

Instytut Chemii Fizycznej
Polskiej Akademii Nauk



Praca doktorska

**Elektrody modyfikowane nanostrukturami
węgla lub złota oraz ich zastosowanie
w czujnikach i ogniwach**

Anna Celebańska

Promotor: prof. dr hab. Marcin Opałło

Praca doktorska wykonana w ramach Międzynarodowych Studiów Doktoranckich w
Zakładzie Procesów Elektrodoowych Instytutu Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk
ul. Kasprzaka 44/52, 01-224 Warszawa

Warszawa, sierpień 2015

Biblioteka Instytutu Chemii Fizycznej PAN

F-B.478/15

A-21-7, A-21-8, K-g-175, K-g-184



<http://rcin.org.pl>



B. 478/15

*Na wstępie pracy doktorskiej pragnę podziękować wszystkim,
którzy przyczynili się do jej powstania, a w szczególności:*

Panu prof. dr hab. Marcinowi Opałło

*za nadanie kierunku moim badaniom, opiekę, cenne wskazówki,
cierpliwość i wyrozumiałość w trakcie powstawania niniejszej pracy doktorskiej*

Justynie Jędraszko

*za przyjaźń i nieocenione wsparcie w każdej dziedzinie życia, a także owocne dyskusje
naukowe i badania SECM*

**Wszystkim Pracownikom, Koleżankom i Kolegom z Zakładu Procesów
Elektrodowych,**

a przede wszystkim:

dr hab. Joannie Niedziółce-Jönsson, dr Ewie Roźnieckiej,

dr Wojciechowi Adamiakowi, dr Wojciechowi Nogali

*za wspaniałą przyjacielską atmosferę, konstruktywne dyskusje oraz wsparcie naukowe,
eksperymentalne i osobiste*

ponadto:

dr Adamowi Leśniewskiemu

za wykonanie zdjęć SEM i AFM

dr hab. Martinowi Jönsson-Niedziółka

za wykonanie zdjęć SEM i AFM oraz nanorurki węglowe

Oldze Krysiak

za pomoc w badaniach nad czujnikami tiocholiny

Magdalenie Bielawskiej

za pomoc w badaniach nad bioogniwami

dr Elenie Jubete

*za wprowadzenie mnie w tematykę czujników pestycydów fosforoorganicznych
i współpracę*

dr Maciejowi Paszewskiemu

za syntezę nanocząstek złota

dr inż. Tomaszowi Płocińskiemu

za wykonanie zdjęć STEM i TEM cząstek polikrzemianowych

Moim Kochanym Rodzicom

za trud i wsparcie włożone w moją edukację i wychowanie

Praca doktorska częściowo finansowana była z projektów:

Elektrody modyfikowane cieczami jonowymi – NN 202 4145 33 i NN202 4145 33



*Kwantowe nanostruktury półprzewodnikowe do zastosowań w biologii i medycynie -
Rozwój i komercjalizacja nowej generacji urządzeń diagnostyki molekularnej opartych
o nowe polskie przyrządy półprzewodnikowe – POIG 01.01.02-00-008/08*



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



*Bioczujnik jednorazowego użytku do oznaczania związków organofosforanowych
w wodzie pitnej – BIOPHOSENS NCBiR/ERA-NET-MATERA+/02/2011*



*Nanotechnology, Biomaterials and aLternative Energy Source for ERA integration
FP7-REGPOT-CT-2011-285949-NOBLESSE*



Celem niniejszej pracy doktorskiej było przygotowanie elektrod w oparciu o nanocząstki węgla, nanocząstki złota, nanorurki węglowe oraz submikrocząstki polikrzemianowe wykorzystując proste metody modyfikacji powierzchni, a także zrozumienie procesów na nich przebiegających oraz ich zastosowanie w bioogniwach lub czujnikach.

W pierwszej, literaturowej części pracy przedstawiono stan dotychczasowej wiedzy na temat stosowanych nanomateriałów, metod modyfikacji elektrod, opisano także enzymy (oksydazę bilirubiny i acetylocholinoesterazę) i sposoby ich immobilizacji. Zaprezentowano konstrukcję, sposób działania i parametry bioogniw paliwowych oraz czujników: dopaminy, tiocholiny i pestycydów fosforoorganicznych.

W części eksperymentalnej najwięcej uwagi poświęcono elektrodom przygotowanym w oparciu o metodę warstwa-po-warstwie wyłącznie z różnoimiennie naładowanych cząstek: złotych, złotych i polikrzemianowych, a przede wszystkim polikrzemianowych i węglowych. Nanostruktury węglowe immobilizowane były także za pomocą metody pułapkowania w matrycy polikrzemianowej, odparowania rozpuszczalnika z kropli zawiesiny oraz metodą osadzania elektroforetycznego.

Powierzchnie otrzymanych elektrod zobrazowano za pomocą technik mikroskopowych. Dla podłoży zawierających nanocząstki złota przedstawiono także efekt SPR w widmie UV-Vis. Przede wszystkim jednak skupiono się na właściwościach elektrochemicznych elektrod. Scharakteryzowano je pod kątem zdolności do akumulacji jonów, rozwinięcia powierzchni, a w szczególności zbadano ich właściwości elektrokatalityczne w stosunku do reakcji redukcji tlenu, utleniania: glukozy, cysteiny, hydrazyny, dopaminy, kwasu askorbinowego, kwasu moczowego, acetaminofenu i tiocholiny,

W oparciu o elektrody polikrzemianowo-węglowe zmodyfikowane oksydazą bilirubiny skonstruowano katodę do dwóch rodzajów ogniw: hybrydowego cynkowo-tlenowego oraz paliwowego askorbinowo-tlenowego. Elektrody te posłużyły również do skonstruowania czujnika dopaminy działającego w obecności substancji przeszkadzających, takich jak: kwas askorbinowy, kwas moczowy czy acetaminofen. Wyznaczona granica wykrywalności umożliwiła pomiar stężenia dopaminy na poziomie występującym u ludzi zdrowych, co jest wystarczające do wstępnej diagnostyki pacjentów.

Elektrody modyfikowane nanocząstkami lub nanorurkami węgla wykazały bardzo dobre właściwości katalityczne w stosunku do utleniania tiocholiny. Stosując różne metody modyfikacji powierzchni opracowano i scharakteryzowano szereg takich podłoży i kilka najlepszych wybrano do skonstruowania inhibitorowego czujnika pestycydów fosforoorganicznych. W tym celu unieruchomiono na nich acetylocholinoesterazę za pomocą pułapkowania w matrycy polikrzemianowej lub w alkoholu poliwinylowym. Najlepsze rezultaty w oznaczeniu kilku wybranych pestycydów otrzymano na elektrodach sitodrukowanych modyfikowanych nanocząstkami węgla. Oprócz tego przedstawiono nową koncepcję budowy czujnika pestycydów obejmującą rozdzielenie części elektroaktywnej od enzymatycznej.

Przedstawione wyniki eksperymentalne mogą przyczynić się do rozwoju prac nad ogniwami i czujnikami.

Abstract

The goal of this thesis was to prepare new nanostructured electrodes based on carbon nanoparticles, gold nanoparticles, carbon nanotubes or silicate submicroparticles by applying simple methods of surface modification. These electrodes were then used to construct biocells and sensors.

The first, literature, part describes the current state of knowledge about applied nanomaterials, methods of electrode modification, enzymes (bilirubin oxidase and acetylcholinesterase) and manners of their immobilization. Electrochemical sensors and cells are presented in this section as well.

In the experimental part most attention was devoted to electrodes made by layer-by-layer methods exclusively from oppositely charged particles: gold; gold and silicate; and, primarily, silicate and carbon. Carbon nanostructures were also immobilized by entrapping them in silicate matrices by solvent evaporation or by electrophoretic deposition methods.

The surfaces of the obtained electrodes were imaged using microscopic techniques. For the electrodes consisting of gold nanoparticles the SPR effect in the UV-Vis spectrum was demonstrated as well. However, the main focus was dedicated to the electrochemical characteristics of the electrodes, like the ion accumulation ability, active surface area and electrocatalytic properties towards the reduction of oxygen or oxidation of glucose, cysteine, hydrazine, dopamine, ascorbic acid, uric acid, acetaminophen or thiocholine.

Based on the silicate-carbon electrode modified with bilirubin oxidase, new cathodes for two biocells, a hybrid zinc-oxygen and an ascorbic acid-oxygen fuel cell, were created. The same electrodes were used to prepare a sensor for dopamine which operate in the presence of interfering substances such as ascorbic acid, uric acid or acetaminophen. The obtained detection limit allows dopamine detection at levels occurring in healthy humans, which is enough for preliminary diagnostics.

The electrodes modified with carbon nanoparticles or nanotubes exhibited very good electrocatalytic properties toward thiocholine oxidation. Series of sensors were prepared and some of them were applied to construct an inhibition-based organophosphate pesticide biosensor. For this purpose the enzyme acetylcholinesterase was immobilized by entrapping it in a silicate matrix or in polyvinyl alcohol. The best results was obtained at screen printed carbon electrodes modified with carbon nanoparticles for detection of several pesticides. What's more, a new idea of pesticide sensor structure which includes separation of the electroactive and enzymatic parts biosensor was developed and tested.

The presented experimental results can contribute to develop the knowledge of biocells and sensors.

2-PAM	2-[(hydroksyimino)metylo]-1-metylopiryd-1-yna, pralidoksyna
AA	Kwas askorbinowy
AA-O₂	Paliwowe bioogniwo kwasowo-askorbinowe
ABTS²⁻	Dianion 2,2'-azynobis(3-etylobenzotioazolino-6sulfonianowy)
AC	Acetaminofen, paracetamol
AChE	Acetylocholinoesteraza – enzym
ACh	Acetylocholina
ACN	Acetonitryl
AFM	Mikroskopia sił atomowych
ATCI	Chlorek acetylotiocholiny
ATI	Jodek acetylotiocholiny
AuNP	Nanocząstki złota
B394	Acetylocholinoesteraza genetycznie modyfikowana
BFC	Bioogniwo paliwowe
BOD	Oksydaza bilirubiny – enzym
CB	Nanocząstki węgla (<i>ang.</i> carbon black)
CFV	Chlorfenwinfos
CNP	Nanocząstki węgla funkcjonalizowane grupami fenylosulfonowymi (Emperor 2000, Cabot Corp.)
CNT	Nanorurki węgla
CoPc	Ftalocyjanina kobaltu
CPE	Węglowa elektroda pastowa
CPO	Okson chloropiryfosu
CTAB	Bromek cetylotrimetyloamonu
Cys	Cysteina
CV	Wolatnperometria cykliczna
DA	Dopamina
DAC	Dopaminochrom
DAQ	Dopaminochinon
DET	Bezpośrednie przeniesienie elektronu
DPV	Woltamperometria różnicowa pulsowa
DTNB	Kwas 5,5-ditiobis-(2-nitrobenzoesowy), odczynnik Ellmana
EBFC	Enzymatyczne bioogniwo paliwowe
EE	Węgorz elektryczny, z którego izolowana jest acetylocholinoesteraza
ELD	Metoda elektrolitycznego osadzania
EU	Unia Europejska
EPD	Metoda elektroforetycznego osadzania
GC	Węgiel szklisty
GOD	Oksydaza glukozy – enzym
HOPG	Wysoko zorientowany grafit pirolityczny
Hyb-Zn-O₂	Hybrydowe ogniwo cynkowo-tlenowe składające się z katody zmodyfikowanej enzymem oraz anody cynkowej
ITO	Szkoło pokryte cienką warstwą tlenku indu (III) domieszkowanego tlenkiem cyny (IV)
IUPAC	Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej
K_M	Stała Michealisa

LbL	Metoda warstwa-po-warstwie służąca do modyfikacji powierzchni
LDAC	Leukodopaminochrom
LOD	Granica wykrywalności
MeOH	Metanol
MWCNT	Wielościenne nanorurki węglowe
NP	Nanocząstki
Mx	Malaokson
OCV	Napięcie obwodu otwartego ogniwa
OP	Pestycydy fosforoorganiczne
PDDA	Poli(chlorek dimetylodialliloamonu)
PVA	Alkohol poliwinylowy
PVA-AWP	Prepolimer zawierający ugrupowania azydkowe (ang. <i>azide-unit pendant water-soluble photopolymer</i>)
RDE	Wirująca elektroda dyskowa
SEM	Skaningowa mikroskopia elektronowa
SPE	Elektroda sitodrukowana
SPR	Plazmonowy rezonans powierzchniowy
SWCNT	Jednościenne nanorurki węglowe
SWNTP	Papier wykonany z SWCNT (ang. <i>single-walled nanotubes paper</i>)
TC	Tiocholina
TCNQ	Tetracyjanochinodimetan
TDA	Submikrocząstki polikrzemianowe otrzymane z prekursorów: TDAp i TMOS
TDAp	Chlorek N-tetradecylo-N,N-dimetylo-N-[3-(trimetoksylilo)propylo]amonu
TEPP	Tetraetylopirofosforan
TMA	Submikrocząstki polikrzemianowe otrzymane z prekursorów: TMAp i TMOS
TMAp	Chlorek N-trimetoksylilopropylo-N,N,N-trimetyloamonu
TMA_{zol}	Film polikrzemionowy otrzymany z prekursorów: TMAp i TMOS
TEOS	Tetraetoksylilan
TMOS	Tetrametoksylilan
TPS	Submikrocząstki polikrzemianowe otrzymane z prekursorów: TPSp i TMOS
TPSp	Siarczan trietoksylilopropylo(polietylenooksy)propylo potasu
OTEOS	n-octyltrietoksylilan
SECM	Skaningowa mikroskopia elektrochemiczna
UA	Kwas moczowy
UPD	Proces przedpotencjałowego osadzania

Spis przygotowanych elektrod

ITO-TDA	ITO pokryte submikrocząstkami polikrzemianowymi TDA
ITO-TMA	ITO pokryte submikrocząstkami polikrzemianowymi TMA
ITO-TPS	ITO pokryte submikrocząstkami polikrzemianowymi TPS
Au-Au(n)	ITO modyfikowane różnoimiennie naładowanymi nanocząstkami złota metodą warstwa-po-warstwie, n – liczba warstw
Au-TPS(n)	ITO modyfikowane różnoimiennie naładowanymi nanocząstkami złota i cząstkami polikrzemianowymi metodą warstwa-po-warstwie, n – liczba warstw
TDA-CNP(n)	ITO modyfikowane różnoimiennie naładowanymi nanocząstkami węgla(CNP) i cząstkami TDA metodą warstwa-po-warstwie, n – liczba warstw
TDA-CNP(n)-BOD	Elektroda TMA-CNP zmodyfikowana oksydazą bilirubiny przez adsorpcję z roztworu
TDA-CNP(n)-ABTS-BOD	Elektroda TMA-CNP z zaadsorbowanym mediatorem ABTS ²⁻ oraz zmodyfikowana oksydazą bilirubiny przez adsorpcję z roztworu
TMA-CNP(n)	ITO modyfikowane różnoimiennie naładowanymi nanocząstkami węgla (CNP) i cząstkami TMA metodą warstwa-po-warstwie, n – liczba warstw
TMA-CNP(n)-NF	Elektroda TMA-CNP pokryta warstwą Nafionu
TMA-CNP(n)-BOD	Elektroda TMA-CNP zmodyfikowana oksydazą bilirubiny przez adsorpcję z roztworu
TMA-CNP(n)-BOD-NF	Elektroda TMA-CNP zmodyfikowana oksydazą bilirubiny przez adsorpcję z roztworu i pokryta warstwą Nafionu
TMA-CNP(n)-AChE	Elektroda TMA-CNP zmodyfikowana acetylocholinoesterazą przez adsorpcję z roztworu
TMA-CNP(n)-TMOS-AChE	Elektroda TMA-CNP zmodyfikowana acetylocholinoesterazą przez pułapkowanie w matrycy polikrzemianowej utworzonej z TMOS-u
TMA-CNP(n)-OTEOS-AChE	Elektroda TMA-CNP zmodyfikowana acetylocholinoesterazą przez pułapkowanie w matrycy polikrzemianowej utworzonej z OTEOS-u
TMA-CNP(n)-TMA-TMOS-AChE	Elektroda TMA-CNP zmodyfikowana acetylocholinoesterazą przez pułapkowanie w matrycy polikrzemianowej utworzonej z TMOS-u i TMAp
TMA-CNP(n)-TPS-TMOS-AChE	Elektroda TMA-CNP zmodyfikowana acetylocholinoesterazą przez pułapkowanie w matrycy polikrzemianowej utworzonej z TMOS-u i TPSp
TMA-CNP(6)-TPS-TMOS-AChE paskowa	Elektroda składająca się z dwóch odrębnych pasków: TMA-CNP(6) i TPS-TMOS-AChE
TMA_{zol}-CNP(n)	ITO modyfikowane nanocząstkami węgla (CNP) i filmem polikrzemianowym utworzonym z TMAp i TMOS, metodą warstwa-po-warstwie, n – liczba warstw
TMA_{zol}-CNP(n)-NF	Elektroda TMA _{zol} -CNP pokryta warstwą Nafionu

TMA_{z01}-CNP(n)-BOD	Elektroda TMA _{z01} -CNP zmodyfikowana oksydazą bilirubiny przez adsorpcję z roztworu
TMA_{z01}-CNP(n)-BOD-NF	Elektroda TMA _{z01} -CNP zmodyfikowana oksydazą bilirubiny przez adsorpcję z roztworu i pokryta warstwą Nafionu
ITO/CNP (EPD)	ITO modyfikowane nanocząstkami węgla (CNP) metodą elektroforetycznego osadzania
TMOS-CNP	ITO modyfikowane nanocząstkami węgla przez pułapkowanie w matrycy polikrzemianowej utworzej z TMOS-u
OTEOS-CNP	ITO modyfikowane nanocząstkami węgla przez pułapkowanie w matrycy polikrzemianowej utworzej z OTEOS-u
TMA-TMOS-CNP	ITO modyfikowane nanocząstkami węgla przez pułapkowanie w matrycy polikrzemianowej utworzej z TMOS-u i TMAp
TMA-TMOS-CNT_{at}	ITO modyfikowane nanorurkami węgla (SWCNT wygotowanymi w kwasie azotowym (V)) przez pułapkowanie w matrycy polikrzemianowej utworzej z TMOS-u i TMAp
DS	Węglowa elektroda sitodrukowana C110 Dropsens
DS-CNP	Elektroda DS modyfikowana nanocząstkami węgla przez odparowanie rozpuszczalnika z kropli zawiesiny
DS-CNP -TMA-TMOS-AChE	Elektroda DS-CNP zmodyfikowana acetycholinoesterazą przez pułapkowanie w matrycy polikrzemianowej utworzonej z TMOS-u i TMAp
DS-CNT_{at}	Elektroda DS modyfikowana nanorurkami węgla (SWCNT wygotowanymi uprzednio w kwasie azotowym (V)) przez odparowanie rozpuszczalnika z kropli zawiesiny
DS-CNT_{ps}	Elektroda DS nanorurkami węgla (SWCNT sfunkcjonalizowanymi sulfonianem piranu) przez odparowanie rozpuszczalnika z kropli zawiesiny
SPEL	Węglowa elektroda sitodrukowana w warunkach laboratoryjnych
SPEL-CNP	Elektroda SPEL modyfikowana nanocząstkami węgla przez osadzenie z kropli zawiesiny
SPEL-CCNP	Elektroda SPEL modyfikowana nanocząstkami węgla przez dodanie do pasty drukarskiej
SPEL-CCNP-TMA-TMOS-AChE	Elektroda SPEL-CCNP zmodyfikowana acetycholinoesterazą przez pułapkowanie w matrycy polikrzemianowej utworzonej z TMOS-u i TMAp
SPEL-CCNP-PVA-AChE	Elektroda SPEL-CCNP zmodyfikowana acetycholinoesterazą przez pułapkowanie w alkoholu poliwinylowym
GC-CNP	Elektroda z węgla szklatego modyfikowana nanocząstkami węgla przez odparowanie rozpuszczalnika z kropli zawiesiny

Nieustanny postęp medycyny wymaga doskonalenia narzędzi diagnostycznych oraz urządzeń zdolnych do ich zasilania. Mowa o czujnikach, które ułatwiają życie milionom ludzi chorych m.in. na cukrzycę, umożliwiając im codzienny pomiar stężenia glukozy we krwi za pomocą domowego, jednorazowego testu. Ze względu na bardzo duże zapotrzebowanie, na rynku dostępnych jest już wiele tego typu sensorów. Nadal poszukiwane są nowe, proste rozwiązania, które umożliwią detekcję takich substancji, których obecne metody oznaczania są drogie i skomplikowane. Przykładem jest dopamina, neuroprzekaźnik, którego niedobór może prowadzić m.in. do choroby Parkinsona. Elektrochemiczna detekcja dopaminy nie należy do prostych metod z uwagi na obecność w płynach fizjologicznych innych substancji elektroaktywnych. Czujniki umożliwiające jej oznaczanie w warunkach domowych bądź w gabinecie lekarskim znacząco poprawiłyby diagnostykę pacjentów. Z tego powodu trwają intensywne badania nad ich udoskonaleniem.

Rozwój rolnictwa przyczynia się do zanieczyszczania środowiska naturalnego toksycznymi pestycydami fosforoorganicznymi, używanymi od początku XX wieku jako insektycydy. Przedostając się do wód gruntowych stanowią niebezpieczeństwo zatrucia ludzi i zwierząt, prowadząc nawet do ich śmierci. Sprawne i szybkie oznaczanie pestycydów w wodzie pitnej jest niezbędne i wymagane prawem Unii Europejskiej. Do tego potrzebne są narzędzia, których można użyć także w warunkach polowych. Wiele prac poświęcono takim czujnikom, w szczególności inhibitorowemu czujnikowi amperometrycznemu, w którym detekcja pestycydów odbywa się w sposób pośredni. Do jego przygotowania niezbędna jest elektroda czuła na generowaną enzymatycznie tiacholinę. Elektroda taka poza wykorzystaniem w czujnikach pestycydów, może mieć zastosowanie do badania aktywności enzymu, acetylocholinoesterazy, który występuje u ludzi i zwierząt. Enzym ten jest inhibowany przez pestycydy, a więc pomiar jego aktywności może mieć niebagatelne znaczenie.

Każdy czujnik potrzebuje źródła zasilania. Od połowy XX wieku trwają prace nad udoskonaleniem enzymatycznego bioogniwa paliwowego, a wciąż uzyskiwane moce i gęstości prądów są niewielkie. Dlatego jako alternatywę zaproponowano ogniwo hybrydowe łączące metaliczną anodę z biokatodą modyfikowaną enzymem. Jednak idealnym rozwiązaniem zdaje się być samonapędzający czujnik, który nie potrzebowałby zasilania zewnętrznego.

Przydatne w rozwoju powyższych urządzeń mogą być nowe materiały elektrodowe otrzymywane prostymi metodami z możliwie tanich komponentów, wykazujące duże powinowactwo do molekuł biologicznych oraz wysoką aktywność elektrokatalityczną.

Celem niniejszej pracy doktorskiej było przygotowanie modyfikowanych elektrod oraz wykorzystanie ich jako elementów bioogniw i czujników amperometrycznych. Wykonano szereg różnych materiałów elektrodowych, w oparciu przede wszystkim o nanocząstki węgla, ale także o nanocząstki złota, nanorurki węglowe oraz cząstki polikrzemianowe. W tym celu wykorzystano kilka sposobów modyfikacji powierzchni: głównie metodą warstwa-po-warstwie, ale także osadzanie elektroforetyczne, osadzanie z kropli zawiesiny, unieruchomienie w matrycy polikrzemianowej czy domieszkowanie pasty węglowej. W celu aplikacji w bioogniwie czy bioczujniku, elektrody zmodyfikowano enzymami przez adsorpcję z roztworu lub pułapkowanie w matrycy polikrzemianowej czy alkoholu poliwinylowym. Otrzymane elektrody poddano intensywnym badaniom mającym

na celu poznanie ich właściwości oraz zrozumieniu zachodzących na nich procesów bioelektrokatalitycznych.

Spis treści

Podziękowania	i
Streszczenie	v
Abstract	vi
Spis wybranych skrótów	vii
Spis przygotowanych elektrod	ix
Wstęp i cel	xi

Część literaturowa

1. Nanomateriały	1
1.1 Węgiel i jego odmiany w zastosowaniu elektrochemicznym	1
1.1.1 Nanocząstki węgla	3
1.1.2 Nanorurki węglowe	7
1.2 Nanocząstki metali	10
1.2.1 Nanocząstki złota	13
1.3 Bibliografia	17
2. Wybrane metody otrzymywania nanostrukturalnych elektrod	20
2.1 Metoda warstwa-po-warstwie	20
2.2 Metoda osadzania elektroforetycznego	25
2.3 Metoda sitodruku	27
2.4 Bibliografia	29
3. Enzymy	31
3.1 Oksydaza bilirubiny	32
3.1.1 Bezpośrednie przeniesienie elektronu	33
3.1.2 Pośrednie przeniesienie elektronu	35
3.2 Acetylocholinoesteraza	36
3.3 Wybrane metody unieruchamiania enzymów	38
3.3.1 Immobilizacja enzymu przez pułapkowanie w matrycy polikrzemianowej	39
3.3.2 Immobilizacja enzymu przez pułapkowanie w alkoholu poliwinylowym	41
3.4 Bibliografia	42
4. Bioogniwa paliwowe	44
4.1 Hybrydowe bioogniwa cynkowo-tlenowe	48
4.2 Kwas askorbinowy jako alternatywne paliwo dla bioogniw	51

4.3 Bibliografia	52
5. Czujniki chemiczne.....	54
5.1 Amperometryczny czujnik dopaminy	55
5.2 Inhibitorowy bioczuJNIK pestycydów fosforoorganicznych.....	61
5.2.1 Czujnik tiocholiny.....	69
5.3 Bibliografia	71

Część eksperymentalna

6. Stosowane techniki pomiarowe i odczynniki	73
6.1 Techniki elektrochemiczne.....	73
6.1.1 Woltamperometria cykliczna	74
6.1.2 Chronoamperometria	76
6.1.3 Różnicowa woltamperometria pulsowa.....	76
6.1.4 Wirująca elektroda dyskowa	77
6.1.5 Skaningowa mikroskopia elektrochemiczna	78
6.2 Techniki spektroskopowe	78
6.2.1 Spektrofotometria UV-Vis.....	79
6.3 Techniki mikroskopowe.....	80
6.3.1 Skaningowa mikroskopia elektronowa.....	80
6.3.3 Mikroskopia sił atomowych.....	80
6.4 Stosowane odczynniki i aparatura.....	81
6.4.1 Odczynniki chemiczne	81
6.4.2 Aparatura.....	82
6.5 Bibliografia	82
7. Submikrocząstki polikrzemianowe syntezowane zmodyfikowaną metodą Stöbera	83
7.1 Bibliografia	89
8. Złote elektrody otrzymane metodą warstwa-po-warstwie	90
8.1 Elektrody złote, Au-Au.....	90
8.2 Elektrody złoto-polikrzemianowe, Au-TPS.....	97
8.3 Bibliografia	104
9. Węglowe elektrody otrzymane metodą warstwa-po-warstwie	105
9.1 Elektrody polikrzemianowo-węglowe, TDA-CNP	105
9.2 Elektrody polikrzemianowo-węglowe, TMA-CNP.....	109
9.3 Elektrody polikrzemianowo-węglowe, TMA _{zol} -CNP.....	111

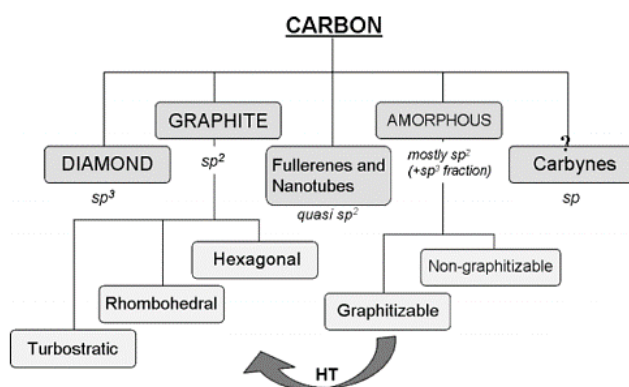
9.4 Bibliografia.....	114
10. Zastosowanie elektrod polikrzemianowo-węglowych w bioogniwach.....	115
10.1 Hybrydowe ogniwo cynkowo-tlenowe.....	118
10.2 Paliwowe bioogniwo askorbinowo-tlenowe.....	120
10.3 Bibliografia.....	124
11. Zastosowanie elektrod polikrzemianowo-węglowych do oznaczania dopaminy	125
11.1 Bibliografia.....	130
12. Czujniki pestycydów fosforoorganicznych	131
12.1 Spektrofotometryczny pomiar stężenia tiacholiny i aktywności enzymu.....	131
12.2 Wybór podłoża elektrodowych wykazujących aktywność elektrokatalityczną w stosunku do utleniania tiacholiny	134
12.2.1 Elektrody polikrzemianowo-węglowe otrzymane metodą warstwa-po-warstwie	134
12.2.2 Elektrody modyfikowane nanocząstkami węgla osadzonymi elektroforetycznie	138
12.2.3 Elektrody modyfikowane nanocząstkami lub nanorurkami węgla przez unieruchomienie w matrycy polikrzemianowej.....	141
12.2.3 Sitodrukowane komercyjne elektrody węglowe	145
12.2.4 Sitodrukowane elektrody węglowe przygotowane w warunkach laboratoryjnych	149
12.3. Wybrane podłoża elektrodowe zaadoptowane do utworzenia czujnika pestycydów fosforoorganicznych.....	153
12.3.1 Elektrody polikrzemianowo-węglowe otrzymane metodą warstwa-po-warstwie, TMA-CNP(6).....	153
12.3.2 Paskowe elektrody polikrzemianowo-węglowe otrzymane metodą warstwa-po-warstwie, TMA-CNP(6).....	161
12.3.3 Sitodrukowane komercyjne elektrody węglowe modyfikowane nanocząstkami węgla	167
12.3.4 Sitodrukowane elektrody węglowe przygotowane w warunkach laboratoryjnych domieszkowane nanocząstkami węgla.....	169
12.4 Bibliografia.....	172
Podsumowanie i wnioski.....	175
Dorobek naukowy.....	181

Część literaturowa

1. Nanomateriały

1.1 Węgiel i jego odmiany w zastosowaniu elektrochemicznym

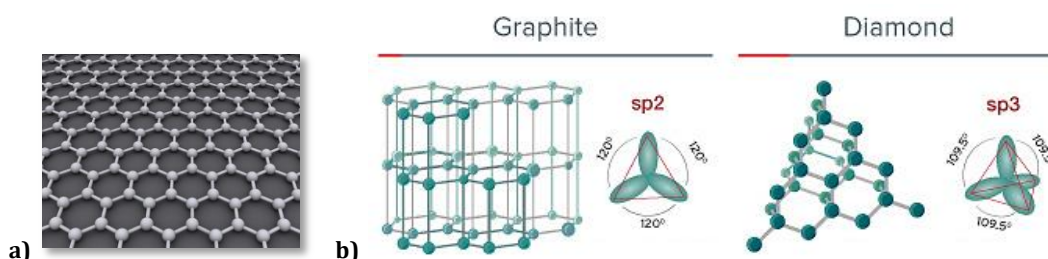
Zainteresowanie węglem, jako materiałem aktywnym elektrochemicznie sięga początku wieku XIX, kiedy to w latach 1807-1808 Sir Humphrey Davy użył grafitowych elektrod do elektrolitycznego otrzymywania metali alkalicznych, potasu i magnezu ¹. Następnie, w roku 1866 Leclanche zastosował nanocząstki węgla tzw. czerń węglową (ang. *carbon black*, CB) jako anodę w ogniwach pierwszego rodzaju, w postaci pręta otoczonego sproszkowanym dwutlenkiem manganu (MnO_2) ². W późniejszych latach CB zastępowano porowatym węglem szklistym, grafitem lub włóknami węglowymi ^{2,3}. Ze względu na wysokie przewodnictwo i dobrą absorpcję tlenu, grafit znalazł również zastosowanie w bateriach alkalicznych ⁴, a CB i inne odmiany węgla w bateriach cynkowo-tlenowych ⁵ i ogniwach paliwowych ^{6,7}. Pozwoliło to na konstruowanie ogniw czy sensorów wolnych od toksycznych metali ciężkich ⁸. Zaletą materiałów węglowych jest duże powinowactwo do molekuł biologicznie aktywnych ⁹. Otwiera to drogę do tworzenia bioogniw ¹⁰ lub biosensorów enzymatycznych ¹¹ czy sensorów czułych na biomolekuły ¹², które łatwo ulegają adsorpcji na rozwiniętych powierzchniach materiałów węglowych ¹³. Użycie węgla do wyżej wymienionych celów ma swoje uzasadnienie w niezwykłych właściwościach elektrycznych i strukturalnych. Jego unikatowość, wiąże się z występowaniem wielu stałych form oraz odmian alotropowych (Rys. 1.1). W zależności od rodzaju hybrydyzacji i struktury atomowej węgiel może formować warstwy półprzewodnikowego grafitu, nieprzewodzącego, bardzo twardego diamentu albo węgla amorficznego o wysoce rozwiniętej powierzchni. Ponadto tworzy wiele innych nanostruktur jak nanorurki, nanocebulki, grafen ¹⁴ czy zaproponowany ostatnio penta-grafen ¹⁵. Kontrowersyjną odmianą alotropową jest karbin, w którym atomy węgla połączone są naprzemiennie potrójnym i pojedynczym wiązaniem. Mimo jego ciekawych potencjalnych właściwości, jak wysoka wytrzymałość mechaniczna, ze względu na małą stabilność i skomplikowaną syntezę, pozostaje w sferze badań naukowych. Tak ogromna różnorodność form węglowych daje wiele możliwości rozwiązań konstruktorskich oraz aplikacji w nowoczesnej technologii i elektrochemii.



Rys. 1.1 Podział węgla ze względu na odmiany alotropowe ¹⁴.

W elektrochemii najczęściej wykorzystywane są struktury oparte na węglu o hybrydyzacji sp^2 , jak grafit, węgiel amorficzny, nanorurki węglowe (ang. *carbon nanotubes*, CNT), fulereny czy grafen. Najmniej uporządkowany węgiel amorficzny zbudowany jest z warstw grafenowych ułożonych jak domki z kart, z wieloma defektami i zniekształceniami. Warstwa grafenowa to płasko ułożone atomy węgla, połączone silnymi wiązaniami

kowalencyjnymi, tworząc strukturę heksagonalną (Rys. 1.2a). W warstwach tych występuje węgiel o hybrydyzacji typu sp^2 , w przeciwieństwie do sp^3 w diamencie, materiale o całkowicie odmiennych właściwościach (Rys. 1.2b). W przypadku węgla bezpostaciowego oprócz hybrydyzacji sp^2 , występują także frakcje węgla o hybrydyzacji sp^3 ¹⁴.



Rys. 1.2 a) Pojedyncza warstwa grafenowa ¹⁶, b) rodzaje hybrydyzacji węgla i odpowiadające im struktury atomowe w graficie i diamencie ¹⁷.

Różne rodzaje węgla bezpostaciowego wykorzystywane są w przemyśle do produkcji grafitu syntetycznego, który z kolei służy do produkcji ogniw. Węgiel ten stosuje się też do wytwarzania elektrod grafitowych, w przemyśle aluminiowym oraz w bateriach litowo-jonowych ¹⁸.

Grafit (Rys. 1.2b) wykazuje właściwości zarówno metali, takie jak wysokie przewodnictwo elektryczne i cieplne, a także niemetalu czyli chemiczną obojętność, oporność termiczną oraz smarowność ¹⁹. Zbudowany jest z polikrystalicznych cząstek, składających się z kilku pojedynczych, uporządkowanych (w naturalnym graficie) kryształów. Strukturę grafitu tworzą równoległe ułożone względem siebie warstwy grafenowe, pomiędzy którymi występują słabe oddziaływania van der Waalsa. W zależności od pochodzenia, obróbki i czystości, grafit może występować w różnych formach, tym samym wykazywać różne właściwości i szerokie zastosowanie. Wyróżnia się cztery podstawowe jego rodzaje: wysoko zorientowany grafit pirolityczny (ang. *highly-oriented pyrolytic graphite*, HOPG), węgiel szklisty (ang. *glassy carbon*, GC), włókna węglowe i CB ²⁰. Stosując różne metody interkalacji grafitu, np. anionami kwasowymi lub metalami alkalicznymi, można zmieniać jego właściwości (np. objętość, przewodnictwo elektryczne), dzięki czemu jest znacznie bardziej użyteczny przy produkcji wielu baterii ^{20,21}.

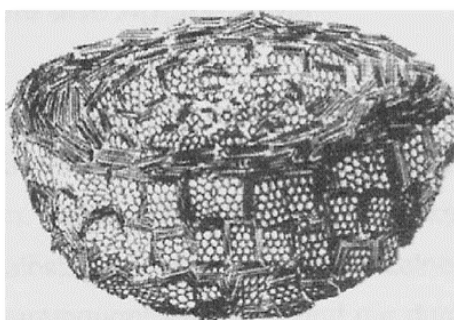
W ostatnim czasie szczególnym zainteresowaniem cieszą się różnorodne nanoformy węglowe, takie grafen, nanocebulki, nanorurki oraz cząsteczki jak fullereny. Fullereny zostały odkryte przez Kroto w 1985 roku ²², a najpopularniejszy, C_{60} , ma kształt piłki futbolowej zbudowanej z fragmentów warstw grafenowych połączonych pięciokątnymi strukturami węgla ²³. Czyste fullereny nie przewodzą prądu elektrycznego, ale domieszkowane metalami alkalicznymi stają się prawie tak dobrymi przewodnikami jak metale ²⁴. Możliwość zamykania molekuł wewnątrz fulerenów ma szczególnie znaczenie w medycynie ²⁵.

Grafen po raz pierwszy wyizolowano w 2004 roku ²⁶. Potencjalne jego zastosowanie jest bardzo szerokie i związane są z nim duże nadzieje, np. w detekcji pojedynczych molekuł gazów, użyciu jako przezroczyste elektrody, w monitorach, ogniwach słonecznych, w tranzystorach, a także ze względu na niezwykle właściwości optyczne, elektryczne, mechaniczne i termalne, w urządzeniach medycznych i biomedycznych ²⁷. Grafen, obecnie jest bardzo popularny w badaniach naukowych. Wydaje się jednak, że ze względu na małą rozwiniętą powierzchnię, nie jest najlepszym materiałem do konstrukcji czujników czy ogniw ²⁸. Obecnie dysponujemy tańszymi i łatwiej dostępnymi odmianami węgla, jak choćby CB o bardzo rozwiniętej powierzchni.

1.1.1 Nanocząstki węgla

Nanocząstki węgla (ogólnie *carbon black*, CB) od dawna powszechnie stosowane są jako substancja barwiąca. W różnych gałęziach przemysłu CB używa się do ochrony przed promieniowaniem UV, a niewielkie ilości dodawane do białych farb redukują ich jasność. Właściwości przewodzące wykorzystywane są zarówno w elektronice, jak i do pokrywania powierzchni, np. samochodów ²⁹. CB powszechnie wykorzystuje się jako dodatek do materiałów polimerowych, np. przy produkcji opon. Efekt stabilizacji, wzmocnienia i wydłużenia czasu życia materiałów gumowych zawierających CB znany jest od wielu lat i tłumaczony oddziaływaniami grup funkcyjnych nanocząstek z polarnymi polimerami. Powierzchnia CB pokryta jest najczęściej grupami chinonowymi, fenolowymi, laktonowymi czy karboksylowymi ³⁰. Komercyjnie dostępne są różne odmiany CB, a w warunkach laboratoryjnych stosuje się modyfikację powierzchni w celu zmiany właściwości nanocząstek i dostosowania ich do własnych potrzeb ³¹. Może to być, np. funkcjonalizowanie solami diazoniowymi przez chemiczne wiązanie ^{32,33} lub z wykorzystaniem reakcji typu „click” z udziałem elektrochemicznego przeniesienia elektronu ³⁴. Znane są także inne modyfikacje, np. nitroaniliną ³⁵ lub ferrocenem ³⁶.

Nanocząstka węgla zbudowana jest z kilku warstw podobnych do grafenowych, na zewnątrz uporządkowanych o równoległej orientacji, która zmniejsza się bliżej środka cząstki (Rys. 1.3). Wielkość cząstek zależy ściśle od parametrów i metody otrzymania. Zazwyczaj waha się od 5 do 100 nm ¹⁸.



Rys. 1.3 Modelowa struktura pojedynczej nanocząstki węgla z koncentrycznymi warstwami grafenowymi ¹⁸.

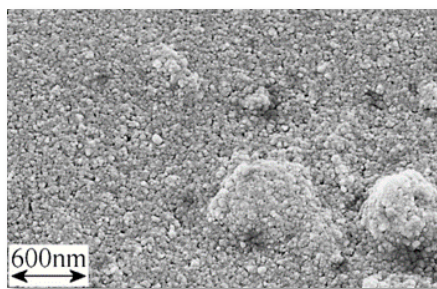
Najpopularniejszą komercyjną odmianą CB jest czerń acetylenowa (ang. *acetylene black*). Otrzymuje się ją przez niecałkowite spalanie gazowych węglowodorów np. etynu ³⁷. Taki rodzaj węgla wykorzystywany jest m.in. w ogniach paliwowych ³⁸, bateriach ³⁹, a także w elektroanalizie do detekcji nitrofenoli ⁴⁰, chryzofanolu ⁴¹ czy insuliny ⁴². Oprócz metody spaleniowej, do produkcji CB stosuje się syntezę hydrotermiczną. Jest to rodzaj reakcji chemicznej zachodzącej w środowisku wodnym w podwyższonej temperaturze (160-200°C) i ciśnieniu, w układzie zamkniętym ⁴³. Metoda cieszy się dużą popularnością ze względu na niski koszt i szeroko dostępne substraty procesu (biomasa, węglowodory, polimery). Synteza hydrotermiczna pozwala na lepszą kontrolę procesu nukleacji, dyspersji i szybkości zachodzących reakcji, a co za tym idzie na kształt i wielkość otrzymanywanych nanocząstek ⁴⁴. Dodatkowo, z powodu zamkniętego układu i środowiska wodnego, jest metodą ekologiczną. W porównaniu do techniki spaleniowej, pozwala na różnorodną funkcjonalizację powierzchni.

Inna forma CB to Pureblack®. Charakteryzuje się wysoką czystością i przewodnictwem dzięki zastosowaniu grafityzacji. Proces ten powoduje równoległe ułożenie warstw grafenowych, podobnie jak to ma miejsce w graficie. Grafityzacja wpływa też

na inne parametry tego materiału, jak zmniejszoną absorpcję rozpuszczalników, co sprzyja jego zastosowaniu m.in. w bateriach litowo-jonowych ⁴⁵.

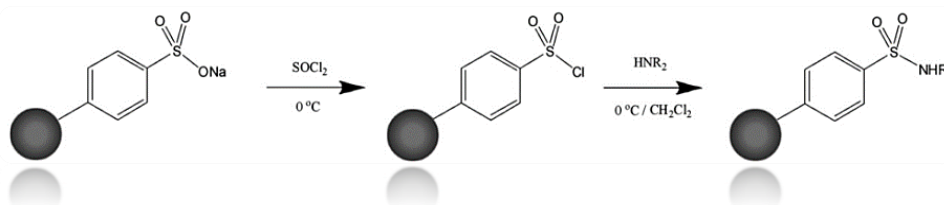
Kolejną odmianą CB jest Vulcan XC-72R (Cabot. Corp) ⁴⁶. Wyróżnia go bardzo rozwinięta powierzchnia, gęsto pokryta grupami chinonowymi, co czyni ją dogodnym podłożem do dalszych chemicznych modyfikacji ⁴⁷. Vulcan dekorowany platyną odegrał ważną rolę w rozwoju ogniów paliwowych opartych na elektrodach węglowo-metalicznych. Przeniesienie elektronu na tego typu materiałach zachodzi prawdopodobnie poprzez atom tlenu zlokalizowany na powierzchni węgla i może być regulowane przez zmianę jej morfologii. Dlatego też oddziaływanie pomiędzy węglem i metalem stało się przedmiotem szczegółowych badań ⁴⁸.

Nanocząstki CB, które w ostatnim czasie cieszą się zainteresowaniem wśród elektrochemików to Emperor 2000 (Cabot Corp.) (CNP) ^{37,49}. Funkcjonalizowane są grupami fenylosulfonowymi ⁵⁰, a ich średnica waha się w przedziale 9-13 nm ⁵¹. Łatwo ulegają dyspersji w wodzie tworząc stabilną zawiesinę i stanowią jeden z najnowocześniejszych czarnych barwników ^{50,52}. Charakteryzują się wysoce rozwiniętą powierzchnią (Rys. 1.4), która zgodnie z izotermą Brunauera, Emmetta i Tellera (BET) wynosi 346 m²g⁻¹, a średni promień cząstki wynosi ok. 3,9 nm (Rys. 1.4) ^{37,49}.



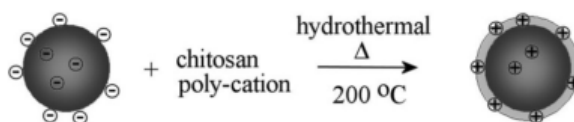
Rys. 1.4 Obraz skaningowej mikroskopii elektronowej (ang. *scanning elektron microscopy*, SEM) nanocząstek węgla Emperor 2000 (CNP) ⁴⁹.

Nanocząstki CNP stanowią dobry materiał wyjściowy do kolejnych modyfikacji przez kowalencyjne wiązanie molekuł, fizysozorcję, czy za pomocą metody hydrotermicznego owijania (ang. *hydrothermal wrapping*) stosowanej w celu otrzymania materiału typu rdzeń-płaszcz (ang. *core-shell*) ⁵³. Przykładową modyfikacją jest przekształcenie grup fenylosulfonowych w grupy sulfonoamidowe, co powoduje zmianę właściwości cząstek oraz ładunku (Rys. 1.5) ⁵⁴.



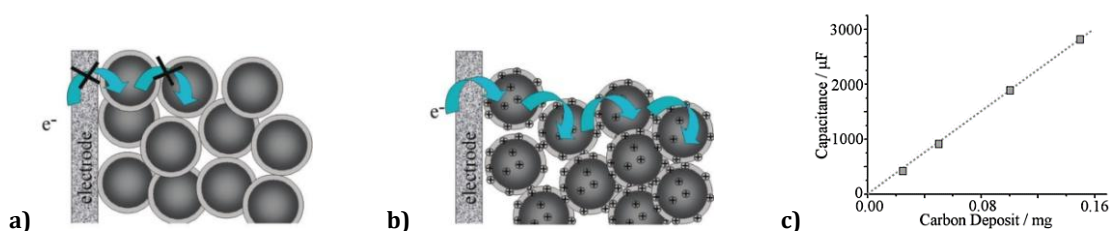
Rys. 1.5 Schemat reakcji modyfikacji cząstek CNP ⁵⁴.

Natomiast metodę hydrotermicznego owijania użyto do zmodyfikowania CNP polimerami o silnym dodatnim ładunku: poli(4-winylopirydyną) ⁵⁵ lub chitosanem ⁵⁶ (Rys. 1.6).



Rys. 1.6 Schemat procesu hydrotermicznego owijania nanocząstki CNP ⁵⁶.

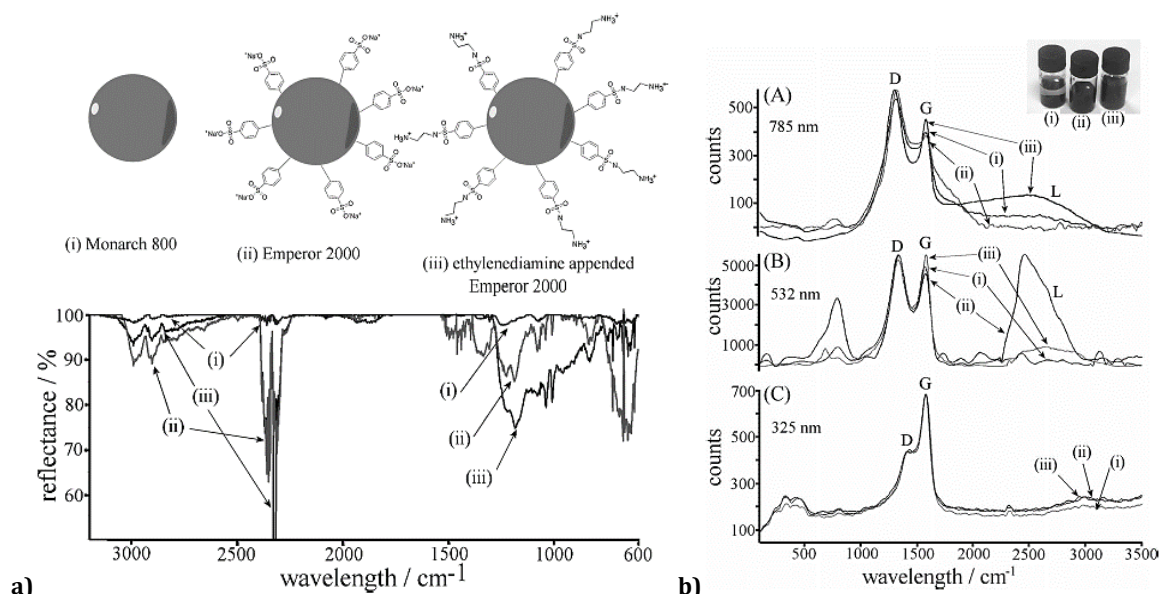
Modyfikacja ta niosła za sobą wiele trudności związanych z blokowaniem przewodnictwa CNP przez otaczający je polimer (Rys. 1.7a) ⁵³. Jednak kontrola grubości i jakości pokrycia nanocząstek zaowocowała powstaniem materiału o wysokim przewodnictwie elektrycznym i pojemności (Rys. 1.7b). Dla elektrody modyfikowanej takimi CNP, otrzymano liniową zależność rejestrowanej pojemności warstwy podwójnej od ilości osadzonego materiału (Rys. 1.7c), specyficzna pojemność wyniosła 18 F g⁻¹ ⁵⁶.



Rys. 1.7 Schemat nanocząstek węgla typu rdzeń-płaszcz gdzie: **a)** płaszcz blokuje przeniesienie elektronu między elektrodą a cząstkami, **b)** płaszcz przewodzi prąd elektryczny; **c)** zależność pomiędzy pojemnością elektryczną a masą osadzonego materiału ⁵⁶.

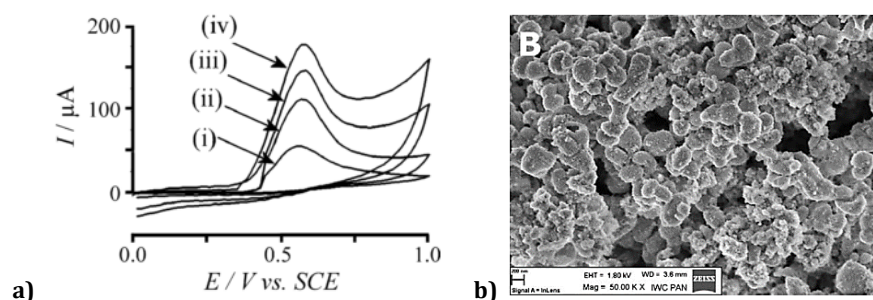
Funkcjonalizacja powierzchni wpływa m.in. na właściwości spektroskopowe nanocząstek. Widać to na widmie odbicia rozproszonego w podczerwieni (DRIFT) (Rys. 1.8a) zarejestrowanym dla trzech odmian CB: hydrofobowego Monarch 800 (Cabot Corp.), hydrofilowego CNP, oraz dodatnio naładowanego CNP funkcjonalizowanego etylenodiaminą ³⁷. Dla wszystkich odmian obserwowano pasmo przy 2300 cm⁻¹, charakterystyczne dla zaadsorbowanego CO₂ na badanej powierzchni, szczególnie intensywne dla CNP modyfikowanych etylenodiaminą, jako rezultat oddziaływania grup aminowych z atmosferycznym CO₂. Pasma w zakresie 2700-3000 cm⁻¹ prawdopodobnie odpowiadają drganiom grup C-H, C-C albo C-O, natomiast przy 1330 i 1150 cm⁻¹ kojarzone są z występowaniem na powierzchni odpowiednio ugrupowań typu S-O i S-N przy 905 cm⁻¹ ³⁷. Jest to dowód na to, że cząstki pokryte są różnymi grupami funkcyjnymi.

Rys. 1.8b przedstawia widma Ramana omawianych CB zarejestrowane przy różnych długościach fali ³⁷. Widoczne charakterystyczne pasma D i G odpowiadają amorficznej (hybrydyzacja sp³) i grafitowej (sp²) strukturze węgla. Przy wzbudzeniu w zakresie światła ultrafioletowego (Rys. 1.8b(C)) nie widać znaczącej różnicy pomiędzy widmami badanych cząstek. Natomiast już w świetle czerwonym (Rys. 1.8b(B)) i zielonym (Rys. 1.8b(A)) takie różnice występują. Widoczne są systematyczne zmiany intensywności pasma G, być może powiązane z ładunkiem powierzchniowym cząstek. Bardzo ciekawy jest słaby sygnał luminescencyjny przy ok. 2500 cm⁻¹ (oznaczony na Rys. 1.8b jako L), sugerujący wpływ modyfikacji powierzchni CNP na jego właściwości fotochemiczne. Podobne efekty obserwowano wcześniej dla Vulcanu XC-72 ⁵⁷. Sposób funkcjonalizacji powierzchni wpływa również na obserwowane widmo spektroskopii fotoelektronów X (XPS), na którym para pików odpowiadająca nieprotonowanej i protonowanej formie aminy występuje wyłącznie dla CNP modyfikowanych etylenodiaminą ⁵⁴.



Rys. 1.8 Schemat nanocząstek węgla i zdjęcia ich zawiesin w wodzie: (i) Monarch 800, (ii) Emperor 2000 (CNP), (iii) Emperor 2000 (CNP) sfunkcjonalizowane etylenodiaminą **a**) widmo DRIFT dla wymienionych nanocząstek, **b**) widmo Ramana rejestrowane przy pomocy lasera o długości fali **(A)** 785, **(B)** 532, **(C)** 325 nm ³⁷.

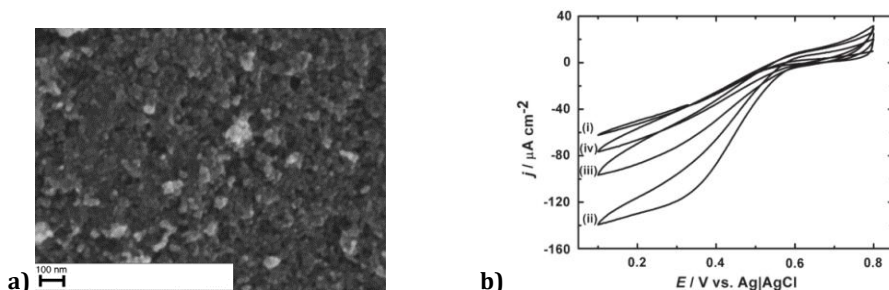
Jedno z pierwszych zastosowań CNP w elektrochemii, polegało na modyfikacji szkła pokrytego cienką warstwą tlenku indu (III) domieszkowanego tlenkiem cyny (IV) (ang. *indium tin oxide*, ITO). W tym celu wykorzystano metodę warstwa-po-warstwie (ang. *layer-by-layer*, LbL) naprzemiennie osadzając cienkie filmy z: CNP i chlorku polidiallilodimetyloamoniowego (PDDA) (CNP-PDDA) ^{58,59} lub CNP i chitosanu ⁶⁰. Elektrody te wykazują właściwości katalityczne w stosunku do utleniania dopaminy i kwasu askorbinowego ⁵⁷ lub triklosanu, środka przeciwwgrzybiczego ⁵⁸. Rejestrowany prąd pikowy, nieodwracalnego utleniania triklosanu, zależy od naniesionej na ITO liczby warstw CNP-PDDA (Rys. 1.9a). Umożliwia to kontrolę właściwości katalitycznych elektrody i ich dobór w taki sposób, aby otrzymać niską granicę wykrywalności ⁵⁸. CNP zastosowano też w innych elektrodach typu LbL, np. w połączeniu z nanocząstkami złota (AuNP) funkcjonalizowanymi grupami o ładunku dodatnim ⁶¹ oraz w połączeniu z submikrocząstkami polikrzemianowymi modyfikowanymi cieczą jonową ⁶². Rys. 1.9b przedstawia powierzchnię opisaną elektrody, na której widać duże cząstki polikrzemianowe pokryte zagregowanymi CNP.



Rys. 1.9 a) Krzywa voltamperometrii cyklicznej (CV) zarejestrowana na elektrodzie CNP-PDDA pokrytej: **(i)** 1, **(ii)** 5, **(iii)** 12, **(iv)** 24 podwójnymi warstwami, 0,05 M Triklosan w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 9,5, szybkość polaryzacji $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$, ⁵⁹, **b**) obraz SEM elektrody ITO pokrytej trzema warstwami CNP i submikrocząstek polikrzemianowych ⁶².

Nanocząstki CNP modyfikowane etylenodiaminą w połączeniu z CNP o ujemnym ładunku, posłużyły do przygotowania węglowej elektrody typu LbL (CNP(+)-CNP(-)). Materiał okazał

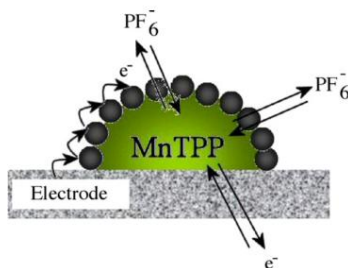
się dogodny do immobilizacji enzymu, np. oksydazy bilirubiny (ang. *bilirubin oxidase*, BOD) ⁶³. Obraz SEM elektrody CNP(+)-CNP(-) (Rys. 1.10a) przedstawia gęste pokrycie podłoża ITO agregatami nanocząstek węgla. Po unieruchomieniu na niej BOD zarejestrowano katalityczną redukcję tlenu, a mierzony prąd proporcjonalny był do ilości naniesionego materiału węglowego (Rys. 1.10b). Elektrody modyfikowane w podobny sposób zostały użyte jako biokatoda w hybrydowym ogniwie tlenowo-cynkowym ⁶⁴.



Rys. 1.10 a) Obraz SEM elektrody LbL pokrytej trzema warstwami CNP(+)-CNP(-), **b)** CV zarejestrowane na elektrodach CNP(+)-CNP(-) pokrytych: (i) jedną, (ii) trzema (iii) pięcioma (iv) dziesięcioma warstwami i zmodyfikowane BOD, 0,1 M nasycony tlenem bufor fosforanowy pH = 4,8, $\nu = 1 \text{ mV s}^{-1}$ ⁶³.

Pojedyncze nanocząstki węgla wykazują tendencję do łączenia się w agregaty o różnej wielkości i strukturze. Wyróżnia się cztery główne typy takich agregatów: sferyczne, eliptyczne, liniowe oraz rozgałęzione ⁶⁵. Odpowiednia dyspersja cząstek i ich właściwości optyczne są ważne z punktu widzenia aplikacji, np. w tuszach drukarskich. Do badania agregacji nanocząstek CNP na granicy faz ciecz-ciecz posłużyła np. metoda optycznego obrazowania absorbancji ⁶⁶.

Dodatek CNP do cieczy organicznej zawierającej porfirynę manganową (MnTPP), ułatwia tworzenie stabilnych mikrokropel na powierzchni elektrody ITO zanurzonej do roztworu wodnego (Rys. 1.11) ⁶⁷. Obecność CNP zwiększa i stabilizuje powierzchnię kontaktu międzyfazowego ciecz-ciecz oraz wspomaga przeniesienie jonów PF_6^- . Dodatkowo, CNP tworzą wewnętrzny kanał wymiany elektronów pomiędzy porfiryną manganową a elektrodą ⁶⁷.

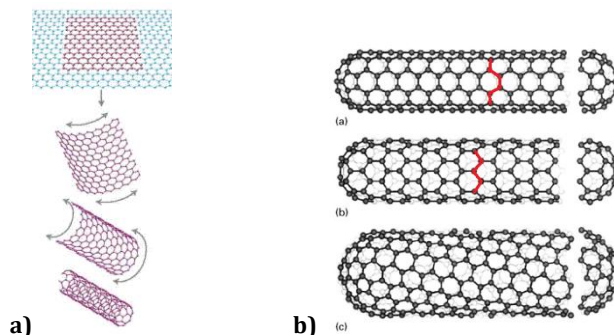


Rys. 1.11 Schemat kropli cieczy organicznej zawierającej porfirynę manganową (MnTPP) unieruchomionej na ITO zanurzonej w roztworze wodnym, jon PF_6^- ulega przeniesieniu pomiędzy fazami ciecz-ciecz ⁶⁷.

1.1.2 Nanorurki węglowe

Nanorurka węglowa to zwinięta w rulon płaszczyzna grafenowa (Rys. 1.12a) ⁶⁸. Jej końce mogą być otwarte lub zamknięte. Właściwości nanorurek węglowych zależą od sposobu zwinięcia, długości, średnicy, morfologii, a także występujących defektów. Wyróżnia się dwa podstawowe rodzaje CNT: jednościenne o średnicy 0,8-2 nm (ang. *single-walled nanotubes*, SWCNT) oraz wielościenne zazwyczaj o średnicy 5-20 nm (ang. *multi-walled nanotubes*, MWCNT). MWCNT zbudowane są z koncentrycznie ułożonych nanorurek

SWCNT ⁶⁸. W zależności od konfiguracji węglowych pierścieni heksagonalnych wyróżnia się trzy typy CNT: krzeselkową (równoległe, wzdłuż osi CNT), zyg-zag (równoległe, wokół osi CNT) i chiralną (skręconą) (Rys. 1.12b) ⁶⁹.



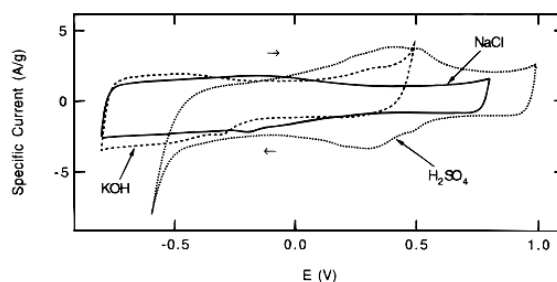
Rys. 1.12 a) Schemat formowania się nanorurki węglowej ¹⁹, **b)** podział CNT ze względu na konfigurację pierścieni węglowych: (a) krzeselkowa, (b) zyg-zag, (c) chiralna ⁶⁹.

Nanorurki węglowe posiadają wiele ciekawych właściwości. To jedne z najwytrzymalszych dostępnych materiałów, są m.in. sto razy wytrzymalsze mechanicznie od komercyjnie dostępnej stali węglowej ⁷⁰. Ich przewodnictwo cieplne przewyższa przewodnictwo diamentu, a moduł sprężystości jest znacznie wyższy od stali. CNT mogą zostać rozciągnięte do prawie pięciokrotnej długości, praktycznie z całkowitą pamięcią kształtu początkowego i niewykrywalnymi defektami struktury. Pojedyncza płaszczyzna grafenowa wykazuje dobre przewodnictwo prądu w dwóch kierunkach, ale po zwinięciu w rulon, przejawia anizotropię przewodnictwa wzdłuż osi nanorurki.

Nanorurki zazwyczaj wymagają wstępnego przygotowania polegającego na usunięciu metalicznych zanieczyszczeń, produktów ubocznych syntezy. Do tego celu wykorzystuje się obróbkę w kwasie azotowym (V), siarkowym (VI) lub chlorowym (VII) w różnych warunkach ⁷¹. Jednak ze względu na niską wydajność procesu oczyszczania, w CNT pozostają duże ilości nanocząstek metali, co wpływa na ich właściwości katalityczne. Jak się okazało, niektóre reakcje w rzeczywistości katalizowane są głównie zanieczyszczeniami, np. nanocząstkami niklu, miedzi, żelaza, nie zaś przez CNT. Istotny problem stanowi ochrona środowiska naturalnego przed metalicznymi zanieczyszczeniami nanorurek węglowych ⁷².

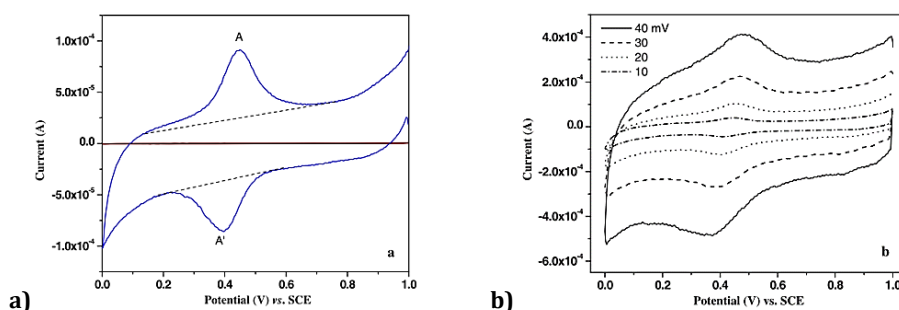
Zastosowanie CNT może być bardzo szerokie, nawet na skalę przemysłową ⁷³. Powszechnie używane są do magazynowania energii elektrycznej, np. w bateriach litowo-jonowych do komputerów i telefonów ⁷⁴. Ważnym, nowym zastosowaniem CNT są elektrochemiczne filtry do oczyszczania wody ⁷⁵.

Aplikację CNT jako materiału elektrodowego, zapoczątkowały badania opublikowane w 1996 roku przez Britto. Mieszaninę MWCNT z bromoformem jako lepiszczem, umieszczono w rurce szklanej i użyto jako elektrodę do amperometrycznej detekcji dopaminy ⁷⁶. Zaobserwowano odwracalne krzywe utleniania-redukcji tego neuroprzekaźnika, trudne do osiągnięcia na materiałach grafitowych, na których proces ten jest znacznie wolniejszy i zachodzi przy wyższym potencjale. Typową krzywą woltamperometryczną dla elektrody modyfikowanej SWCNT, zarejestrowaną w różnych elektrolitach podstawowych przedstawia Rys. 1.13 ⁷⁷. Prócz prądu pojemnościowego występują także piki związane z procesem faradajowskim, a pH elektrolitu znacząco wpływa na ich kształt i położenie. Sugeruje to udział jonów wodorowych w zachodzących procesach. W H₂SO₄ zaobserwowano liniową zależność pomiędzy prądem piku a szybkością polaryzacji elektrody. Zatem widoczna para pików pochodzi od powierzchniowych reakcji redoks zachodzących z udziałem grup funkcyjnych zawierających tlen, jak np. grupy karboksylowe czy chinonowe.



Rys. 1.13 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na elektrodzie zmodyfikowanej SWCNT w 1 M NaCl, 1 M H₂SO₄ oraz 1 M KOH, (E vs. Ag|AgCl), $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ ⁷⁷.

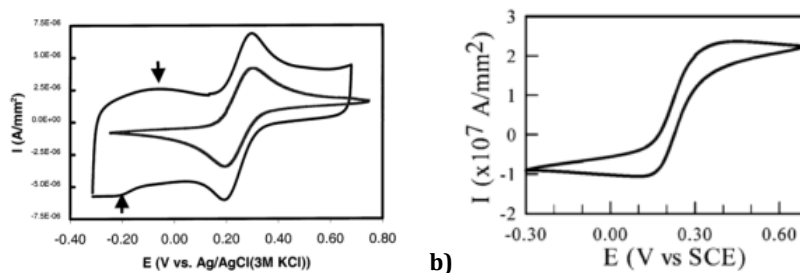
Podobne zachowanie układu rejestrowano na elektrodzie modyfikowanej nanorurkami MWCNT, kształtem przypominającymi bambus (Rys.1.14a)⁷⁸. Widoczna para pików odpowiada reakcji utleniania-redukcji powierzchniowych grup chinonowych. Wraz ze wzrostem szybkości polaryzacji, potencjał pików anodowych przesuwa się w stronę wyższych wartości, a pików katodowych w kierunku niższych potencjałów (Rys.1.14b). Prąd pików także zależy liniowo od szybkości polaryzacji.



Rys. 1.14 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na elektrodach wykonanych z MWCNT typu bambusowego w 1 M H₂SO₄ **a)** $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$, **b)** dla różnych $v = 10\text{-}40 \text{ mV s}^{-1}$ ⁷⁸.

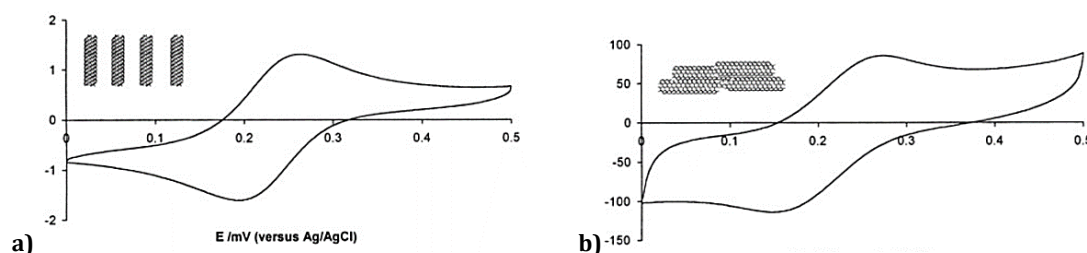
Porównanie sygnału od elektrody z papieru wykonanego z SWCNT (ang. single-walled nanotube paper, SWNTP) i pastowej elektrody węglowej (ang. carbon paste electrode, CPE) w tym samym próbniku redoks (Rys. 1.15a) wskazuje na znaczny wzrost prądu pojemnościowego, czyli świadczy o większym rozwinięciu powierzchni elektrody nanorurkowej. Zaobserwowano tzw. pseudopojemnościowy prąd faradajowski (zaznaczony strzałkami) związany z omawianymi wcześniej reakcjami redoks grup funkcyjnych zaadsorbowanych na powierzchni nanorurek. Różnica potencjałów pików redoks hesacyjanożelazianów (III) dla obydwu omawianych elektrod wynosi ok. 90 mV i jest wyższa od wartości charakteryzującej jednoelektrodowy proces odwracalny (59 mV). Wskazuje to na przebieg reakcji w sposób quasi-odwracalny. Wykazano także, że wewnątrz nanorurek jest penetrowane przez elektrolit, czyli cała powierzchnia aktywne nanorurki ma wkład w obserwowany prąd tła, dzięki czemu materiał ten charakteryzuje się ponad przeciętną wartością powierzchniowej pojemności specyficznej $125 \mu\text{F mm}^{-2}$ ⁷⁹.

Dla elektrody z dużym zagęszczeniem nanorurek, sferyczne warstwy dyfuzyjne poszczególnych CNT nakładają się i w rezultacie dla próbnika redoks otrzymuje się odpowiedź, w postaci dobrze wykształconych pików, charakterystyczną dla dyfuzji liniowej (Rys. 1.15a). Gdy upakowanie CNT na powierzchni jest znacznie mniejsze, wtedy każda nanorurka zachowuje się jak oddzielna nanoelektroda, a obserwowany sygnał ma sigmoidalny kształt fali, charakterystyczny dla stanu stacjonarnego (Rys. 1.15b)⁸⁰. Elektroda taka może służyć jako ultraczuły biosensor elektrochemiczny, np. do oznaczania jonów ołowiu w wodzie metodą rozwijania anodowego (ang. *anodic stripping voltammetry*)⁸¹.



Rys. 1.15 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na elektrodzie: **a)** CPE (wewnętrzna krzywa) oraz na SWNTP o dużej gęstości okrycia (zewnętrzna krzywa), strzałki wskazują na prąd pseudopojemnościowy w 5 mM $K_3Fe(CN)_6$ w 0,1 M KCl, $\nu = 20 \text{ mV s}^{-1}$ ⁷⁹, **b)** MWCNT o małej gęstości pokrycia elektrody w 1 mM $K_4Fe(CN)_6$, 0,1 M KCl, $\nu = 20 \text{ mV s}^{-1}$ ⁸⁰.

O szybkości zachodzącego procesu, decyduje również sposób ułożenia nanorurek w stosunku do powierzchni elektrody (Rys. 1.16) ⁸². Dla CNT unieruchomionych prostopadłe do podłoża w sposób uporządkowany (Rys. 1.16a), różnica pomiędzy potencjałami pików utlenienia-redukcji wynosi 59 mV, co oznacza, że proces zachodzi całkowicie odwracalnie. Natomiast różnica potencjałów na elektrodzie z nieuporządkowanymi, ułożonymi równolegle do podłoża CNT jest większa, 99 mV (Rys. 1.16b). Pionowy i uporządkowany rozkład nanorurek umożliwia większą dostępność reagenta do ich końcówek, które porównywane są z krawędziowymi płaszczyznami grafitu pirolitycznego, natomiast ściany nanorurek do płaszczyzn podstawowych grafitu, ze znacznie wolniejszą kinetyką transportu elektronów ⁸².



Rys. 1.16 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na elektrodzie: **a)** pokrytej SWCNT ułożonymi prostopadłe do podłoża, **b)** pokrytej SWCNT ułożonymi równolegle do podłoża; 1 mM $K_3Fe(CN)_6$ w 0,05 M KH_2PO_4 , 0,05 M KCl, pH = 7, $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$ ⁸².

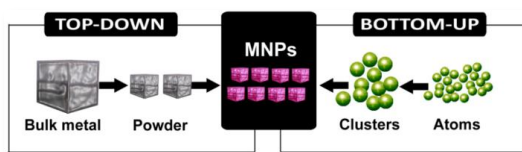
1.2 Nanocząstki metali

W 1959 roku Richard P. Feynman wygłosił niezwykle seminarium „There’s Plenty of Room at the Bottom”, wskazując miniaturyzację i produkcję molekularną jako cele nauki przyszłości ⁸³. Opowiadał o manipulacji pojedynczymi molekułami lub cząstkami, o miniaturyzacji komputerów, zwiększeniu wydajności maszyn liczących, a także użyciu nanorobotów w medycynie. Wydarzenie to zapoczątkowało nową erę w nauce, dziś nazywaną nanotechnologią.

Nanotechnologia obejmuje tworzenie oraz projektowanie materiałów, których wymiar przynajmniej w jednym kierunku mieści się w zakresie 1-100 nm ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$) ⁸⁴. W odniesieniu do tej definicji nanomateriały można podzielić na trzy grupy: 1D – jednowymiarowe (cienkie filmy), 2D – dwuwymiarowe (nanodruty, nanorurki, nanowłókna) oraz 3D – trójwymiarowe (nanocząstki, nanoklastery) ⁸⁵.

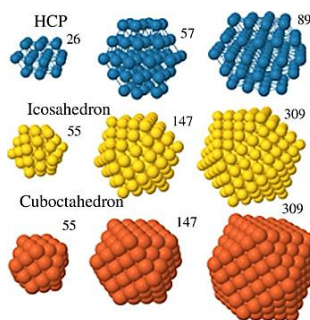
Jedne z ciekawszych i cieszące się dużym zainteresowaniem nie tylko w środowisku akademickim lecz także przemysłowym, to nanobiektory 3D: różnego rodzaju nanocząstki

(ang. *nanoparticles*, NP) przede wszystkim metali. Wyróżnia się dwa główne podejścia do syntezy nanocząstek metali: „top-down” i „bottom-up” (Rys. 1.17) ⁸⁵. Pierwsza obejmuje techniki rozdrabniania, umożliwiające zmniejszenie makroskopowych cząstek aż do wymiarów nanoskali. Jednakże syntezie małych, zunifikowanych obiektów najbardziej sprzyjają techniki typu bottom-up, czyli budowanie atom po atomie ⁸⁵.



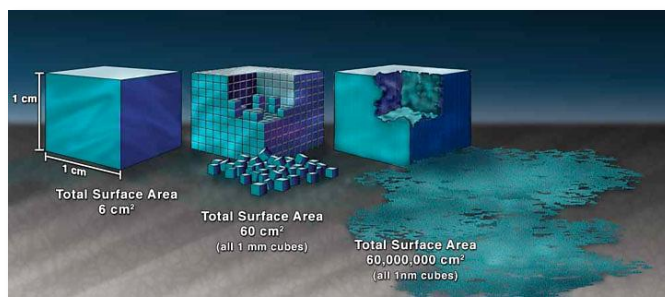
Rys.1.17 Dwa podejścia do syntezy nanomateriałów ⁸⁵.

Inny podział obejmuje metody fizyczne, chemiczne i fizykochemiczne ⁸⁵. Zazwyczaj występują trzy etapy syntezy: zarodkowanie, wzrost i terminacja procesu ⁸⁵. Do syntezy nanocząstek, zarówno monometalicznych jak i stopów, wykorzystuje się substancje stabilizujące, dzięki którym cząstki charakteryzują się uporządkowaną strukturą atomową. Zamknięty zbiór atomów danego metalu nazywany klastrem, charakteryzuje „liczba magiczna” atomów, dla której struktura atomowa jest stabilna energetycznie. Istnieje wiele możliwych struktur, np. kubaoktaedr, ikosaedr (dwudziestościan foremny) czy struktura najgęstszeo heksagonalnego upakowania (ang. *hexagonal close packing*, HCP) ⁸⁶ (Rys. 1.18).



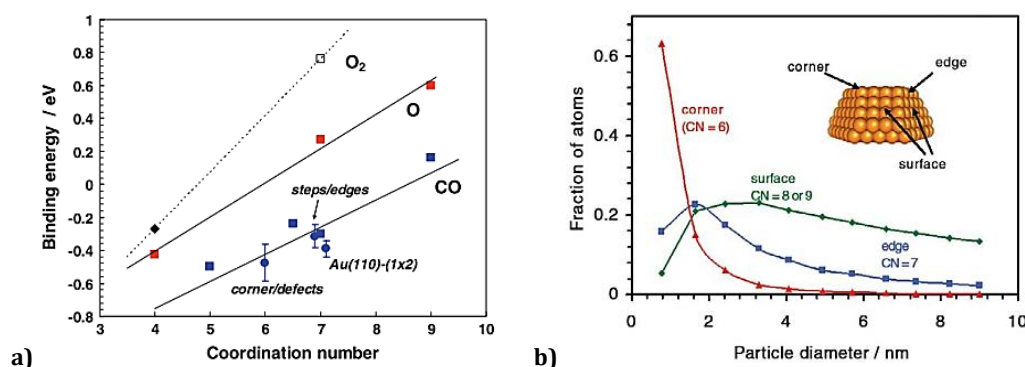
Rys 1.18 Struktura atomowa i liczby magiczne dla kilku reprezentatywnych klastrow ⁸⁶.

W ostatnich latach nanocząstki metali przykuwają uwagę naukowców i inżynierów z powodu ich unikatowych właściwości elektrycznych, optycznych, magnetycznych oraz chemicznych ⁸⁵. Niewielka liczba atomów, powoduje pojawienie się efektów zależnych od rozmiaru. To przede wszystkim: znaczny wzrost stosunku powierzchni do objętości nanocząstki oraz duża liczba atomów powierzchniowych. Powierzchnia właściwa (ang. *specific surface area*, wielkość powierzchni substancji stałej przypadająca na masę tej substancji) oraz stosunek powierzchni NP do jej objętości, są odwrotnie proporcjonalne do średnicy NP i zwiększa się znacząco dla NP o średnicy mniejszej od 10 nm (Rys. 1.19) ⁸⁷.



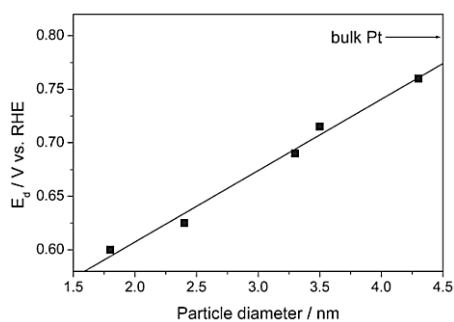
Rys. 1.19 Efekt wzrostu powierzchni spowodowany zmniejszaniem rozmiaru cząstek ⁸⁷.

Na szczególną uwagę zasługują właściwości elektrokatalityczne nanocząstek metali. W katalizie heterogenicznej reagujące cząsteczki ulegają adsorpcji na powierzchni elektrodowej. Stosując NP uzyskuje się bardzo dużą powierzchnię kontaktową, co zapewnia wysoką efektywność procesu ⁸⁸. Jednak nie jest to jedyna przyczyna stosowania NP. Lite złoto zazwyczaj traktowane było jako inertne chemicznie, gdyż jako jedyny metal wykazuje dodatnią wartość energii chemisorpcji tlenu ⁸⁸. Nieoczekiwanie w 1987 roku Haruta pokazał, że nanocząstki złota, o średnicy poniżej 5 nm mogą być niezwykle reaktywne nawet w temperaturze pokojowej ⁸⁹. Do tej pory rozważano różne przyczyny tego zjawiska, jak kwantowe efekty rozmiarowe, oddziaływanie z podłożem (przeniesienie ładunku, siły powierzchniowe) czy lokalne stopnie utlenienia złota w obszarach centrów aktywnych ⁸⁹. Badano wpływ czynnika geometrycznego na właściwości nanocząstek złota. Zaobserwowano wysoką aktywność katalityczną i silną chemisorpcję substratów na atomach złota o niskiej liczbie koordynacyjnej (*CN*), znajdujących się na narożach czy krawędziach cząstek (Rys. 1.20a) i praktycznie jej brak dla wyższych *CN*. Okazało się, że wraz ze zmniejszaniem rozmiaru cząstki, wzrasta znacząco udział niskokoordynowanych atomów w nanocząstce, co potwierdza, że kataliza odbywa się w dużej mierze z ich udziałem i czynnik geometryczny odgrywa znaczącą rolę w tym procesie (Rys. 1.20b) ⁸⁸.



Rys. 1.20 a) Zależność energii adsorpcji CO, O, O₂ od liczby koordynacyjnej złota ⁸⁸, **b)** obliczony udział poszczególnych atomów złota w obsadzeniu: ścian, krawędzi i naroży cząstki Au o kształcie ściętego ośmiościanu dla różnej liczby koordynacyjnej złota (*CN*) ⁸⁸.

Wielkości cząstek wpływa także na nadpotencjał danego procesu. Zjawisko zaobserwowano badając utlenianie monowarstwy tlenku węgla na elektrodzie GC modyfikowanej nanocząstkami platyny. Potencjał tej reakcji jest znacznie niższy od obserwowanego na platynie polikrystalicznej (Rys. 1.21).



Rys. 1.21 Zależność potencjału redukcji powierzchniowych tlenków platyny na elektrodzie GC modyfikowanej nanocząstkami platyny od ich średnicy ⁹⁰.

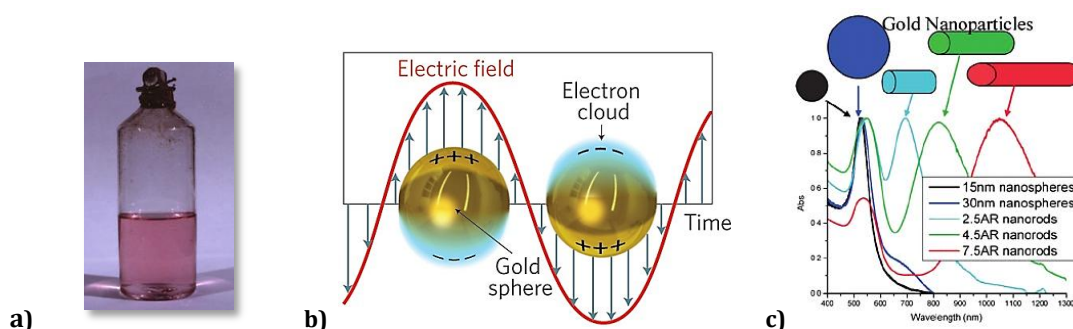
Wpływ rozmiaru cząstek na katalizę tłumaczony jest również przez zmianę energii adsorpcji substratu na powierzchni NP. Zbyt mała jej wartość może być niewystarczająca do związania

substratu, zbyt duża może prowadzić do zanieczyszczenia katalizatora. Odpowiednia wielkość NP może przyczynić się do optymalizacji energii adsorpcji z jednoczesną maksymalizacją częstotliwości cykli katalitycznych (ang. *turnover frequency*, TOF, stosunek liczby molekuł produktu do iloczynu czasu i centrów aktywnych katalizatora) ⁹⁰.

Nanocząstki metali ze względu na wyjątkowe właściwości, mają szczególnie szerokie zastosowanie. Między innymi używane są w spektroskopii, sensorach (nawet testy ciężowe domowego użytku oparte są na nanocząstkach złota), katalizie oraz elektrokatalizie, filtrach optycznych i w biomedycynie ^{91,92}.

1.2.1 Nanocząstki złota

Niesamowitym, rubinowym kolorem koloidalnego złota, jako pierwszy zainteresował się Michael Faraday i co ciekawe miało to miejsce już w połowie XIX wieku (Rys. 1.22a) ⁹³. Koloidalne zawiesiny nanocząstek metali używane były już w starożytnym Egipcie jako barwnik do dekorowania szkła, np. mieszanina srebra i złota nadawała ciekawe kolorowe refleksy w zależności od sposobu padania światła. Późniejsze badania wykazały, że te unikatowe własności optyczne zawiesiny nanocząstek złota, czyli także intrygujący, różowy kolor, są rezultatem rozmiaru i specyficznego kształtu drobin. Nanocząstki metali, takich jak, np. złoto (AuNP), srebro czy miedź, o średnicy w zakresie 1-100 nm, wykazują zupełnie odmienne właściwości chemiczne, fizyczne, elektronowe od ich litego (ang. *bulk*) odpowiednika. Spowodowane jest to kolektywnymi drganiami elektronów pasma przewodnictwa nanocząstki, w następstwie interakcji z polem elektromagnetycznym ⁹⁴. Pole to indukuje dipole elektryczne w nanocząstce, która z kolei kompensując ładunek, zaczynają drgać z częstotliwością rezonansową (ang. *surface plasmon resonance*, SPR) (Rys. 1.22a). Częstotliwość ta mieści się zazwyczaj w zakresie promieniowania widzialnego i zależy od rozmiaru, kształtu nanocząstki, jak i otaczającego nanocząstkę środowiska (stałej dielektrycznej), co znajduje odzwierciedlenie w rejestrowanym widmie UV-Vis (Rys. 1.22b). Zmiana rozmiaru bądź kształtu nanocząstki, powoduje przesunięcie pików absorpcji, a nawet pojawienie się kolejnych sygnałów (Rys. 1.22c).



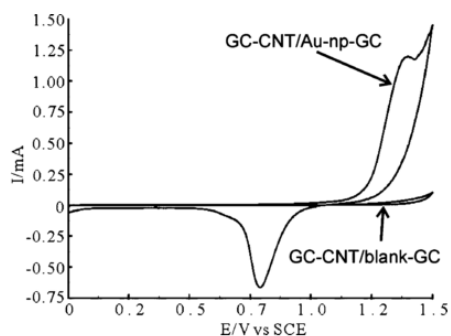
Rys. 1.22 a) Fotografia koloidalnego złota obserwowanego przez M. Farady'ego ⁹³, **b)** schemat oddziaływania pola magnetycznego z nanocząstkami złota ⁹⁵, **c)** widmo UV-Vis przedstawiające wpływ wielkości i kształtu AuNP na rejestrowany sygnał i odpowiadający mu kolor ⁹⁶.

Syntezy nanocząstek złota można dokonać w różnoraki sposób, począwszy od chemicznej redukcji, która wymaga stabilizacji AuNP grupami funkcyjnymi, jak np. tiole ⁹⁷, kończąc na elektrochemicznym generowaniu bezpośrednio na elektrodzie ⁹⁸.

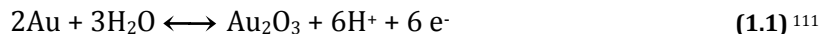
AuNP jak i inne nanocząstki, wykazują także ciekawe cechy powszechnie wykorzystywane w elektrochemii i mogą pełnić różnorakie funkcje. Przede wszystkim mogą

być katalizatorem, zmniejszając nadpotencjał procesu, a zwiększając aktywną powierzchnię elektrodową umożliwiając sprawny i szybki transfer elektronów^{99,100}. Mogą służyć także do immobilizacji biomolekuł¹⁰¹ lub ich znakowania¹⁰² oraz nawet pełnić rolę reagenta¹⁰³. Połączenie nanotechnologii z nowoczesnymi technikami elektrochemicznymi umożliwia tworzenie urządzeń nowej generacji, czujników, bioczuźników, ogniw opartych na zupełnie nowych rozwiązaniach katalizy¹⁰⁴ czy detekcji¹⁰⁵.

Dla jednoznacznego określenia obecności AuNP na powierzchni elektrody wykonuje się elektrochemiczny test (czasem zwany „odciskiem palca”, ang. *fingerprint*) polegający na elektrochemicznym generowaniu monowarstwy tlenków złota na powierzchni elektrody, a następnie jej redukcji¹⁰⁶. W rezultacie powstaje charakterystyczna krzywa (Rys. 1.23), na której widać pik anodowy odpowiedzialny za tworzenie tlenków zgodnie z reakcją (Równ. 1.1) oraz pik katodowy przy potencjale ok. 0,8 V odpowiadający za ich redukcję^{106,107}.



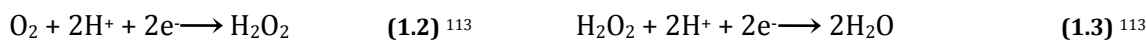
Rys. 1.23 Krzywe woltamperometryczne zarejestrowane na elektrodzie GC modyfikowanej CNT, mikrosferami GC bez dodatku AuNP (blank) i z domieszką AuNP do mikrosfer GC; 0,05 M H₂SO₄, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$ ¹⁰⁷.



Eksperyment ten jest ważny ze względu na możliwość obliczenia powierzchni rzeczywistej złotej elektrody¹⁰⁸. Do tego celu służy także bardzo czuła metoda przedpotencjałowego osadzania miedzi, ołowiu czy srebra (ang. *underpotential deposition*, UPD)¹⁰⁹.

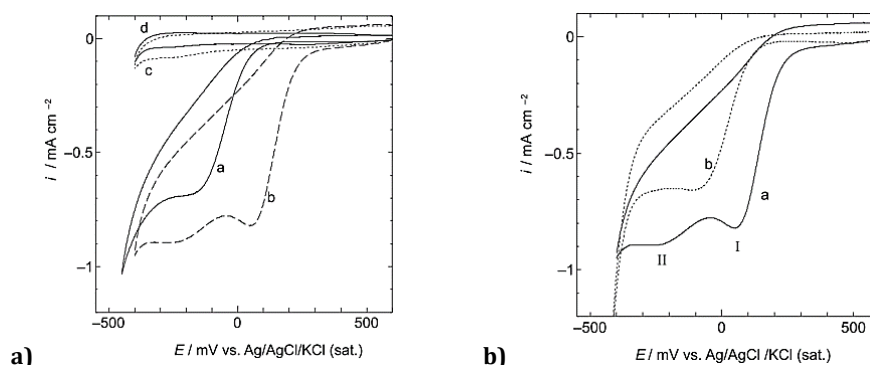
AuNP katalizują różne reakcje elektrochemiczne. Jedne z popularniejszych to redukcja tlenu i utlenianie glukozy, poddane intensywnym badaniom ze względu na zastosowanie w ogniwach paliwowych^{110,111}. Innym, mniej popularnym przykładem jest jednoczesna detekcja hydrazyny (N₂H₄) oraz jonów SO₃²⁻ i NO₂⁻¹¹².

Efekt katalityczny AuNP uwidacznia się dwójako, przez zwiększenie prądu katalizowanej reakcji oraz przesunięciem potencjału redukcji tlenu w kierunku wyższych wartości w tym przypadku o ok. 200 mV¹¹³ (Rys. 1.24). Dodatkowo, dla procesu zachodzącego na AuNP, na rejestrowanej krzywej woltamperometrycznej występują dwa piki redukcji. Pierwszy, przy +50 mV, pochodzi od dwuelektronowej redukcji tlenu, której produktem jest nadtlenek wodoru (Równ. 1.2). Drugi pik, przy -200 mV, świadczący o dalszej redukcji H₂O₂ do wody (Równ. 1.3). W przypadku braku AuNP nie pojawia się drugi pik ponieważ redukcja H₂O₂ zachodzi bardzo wolno i kolejnym dominującym procesem jest wydzielanie wodoru. W obecności AuNP zachodzi pełna czteroelektronowa redukcja tlenu.



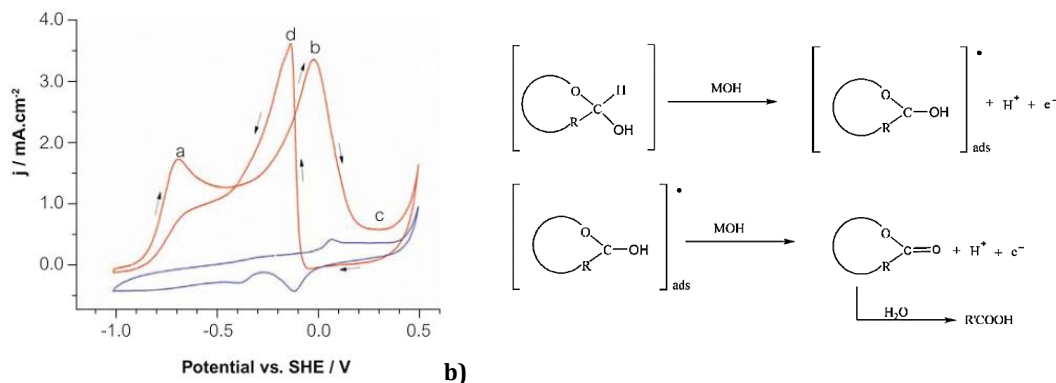
Woltamperogramy na Rys. 1.24b potwierdzają, że rozmiar cząstek jest kluczowym parametrem dla efektu katalitycznego. Rozrost AuNP do mikronowych wielkości (0,5-1,5 μm) powoduje utratę ich katalitycznych właściwości i kształt krzywej odpowiada

woltamperogramowi rejestrowanemu na polikrystalicznej złotej elektrodzie niemodyfikowanej AuNP ¹¹³.



Rys. 1.24 Krzywe woltamperometryczne zarejestrowane na elektrodzie: **a)** niemodyfikowanej Au (a,c) oraz Au modyfikowanej AuNP (b,d) w nasyconym tlenem (a,b) i azotem (N₂) (c,d) roztworze 0,5 M H₂SO₄, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$, **b)** Au pokrytej AuNP o różnych rozmiarach (a) 20-200 nm, (b) 0,5-1,5 μm w roztworze nasyconym tlenem 0,5 M H₂SO₄, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$ ¹¹³.

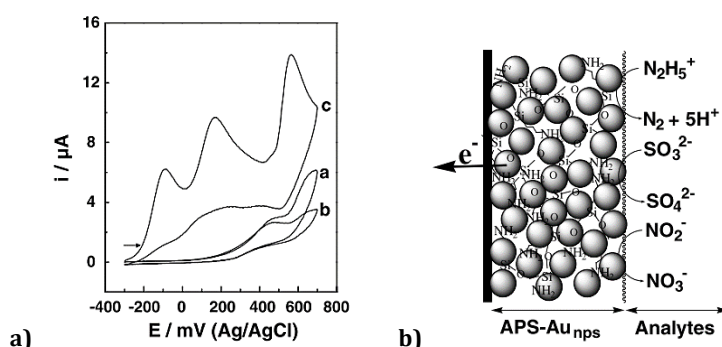
Utlennianie glukozy w środowisku zasadowym na powierzchni złotej elektrody odzwierciedla się w dość skomplikowanym kształcie rejestrowanej krzywej woltamperometrycznej (Rys. 1.25a) ¹¹⁴. Szczególny kształt wynika ze złożonego mechanizmu zachodzących procesów, które badano zarówno na złocie jak i platynie ¹¹⁵. Głównym produktem tej reakcji jest kwas glukonowy, powstającym przez hydrolizę lub elektrochemiczne utlenienie pośredniego glukonolaktonu. Wstępny etap elektROUTLENIANIA glukozy polega na jej dehydratacji i silnej chemisorpcji na centrach aktywnych Au-OH, których liczba limituje szybkość całego procesu (Rys. 1.25b) ^{116,117}. Następnie, w zakresie niskich potencjałów, zachodzi utlenienie produktu pośredniego do glukonolaktonu, co obserwuje się w postaci pik (a) (Rys. 1.25a) ¹¹⁸. W literaturze przedstawione są też krzywe z dwoma pikami odpowiedzialnymi za ten proces, czyli dehydratację do produktu pośredniego, a następnie jego utlenienie do laktonu ^{114,119}. Do utlenienia samego glukonolaktonu wymagany jest znacznie wyższy, dodatni potencjał, dlatego procesowi temu przypisano pik (b) ¹²⁰. W celu potwierdzenia słuszności tego założenia, wykonano eksperymenty na elektrodzie zanurzonej w glukonolaktonie, obserwując pik identyczny z rejestrowanym w roztworze glukozy ¹²¹. Przy jeszcze wyższych potencjałach, prąd dramatycznie spada, powierzchnia złota pokrywa się tlenkami, co powoduje zmniejszenie liczby centrów aktywnych i uniemożliwienie utleniania glukozy, pojawia się pik (c), odpowiadający utlenianiu złota ¹¹⁶.



Rys. 1.25 a) Krzywe woltamperometryczne zarejestrowane na elektrodzie GC modyfikowanej AuNP w 0,1 M KOH (krzywa niebieska) i po dodaniu 10 mM glukozy (krzywa czerwona), 10-te cykle, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$ ¹¹⁴, **b)** schemat mechanizmu utleniania glukozy w zakresie niskich potencjałów (poniżej 0,0 V vs. Ag|AgCl), M=Au, AuOH – miejsca aktywne na powierzchni złota ¹²¹.

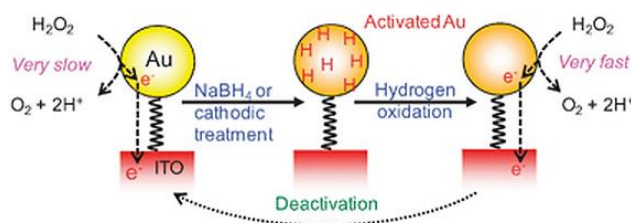
Formowanie się ostrego pików anodowych (d) podczas polaryzacji katodowej próbowano tłumaczyć reakcją tlenków złota z glukozą¹¹⁵ lub jej oddziaływaniem z jonami tlenkowymi powstającymi w czasie redukcji tlenów złota¹²². Jednak nie obserwowano np. wpływu grubości warstwy tlenkowej na wielkość pików. Nowszą teorią mówi o tym, że wraz z redukcją tlenków, na elektrodzie powstają nowe centra aktywne, na których zachodzi bezpośrednie utlenianie glukozy¹²³.

AuNP osadzone w matrycy polikrzemianowej z (3-aminopropyl)trietoksyilanu (APS) otrzymanej w procesie zol-żel, posłużyły do jednoczesnego oznaczania hydrazyny (N_2H_4), jonów siarczanowych (IV) i azotanowych (III) (Rys. 1.26)¹¹². Hydrazyna jest karcynogenną i mutagenną neurotoksyną. Detekcja tych związków jest ważna głównie dla rolnictwa oraz przemysłu chemicznego, spożywczego i farmaceutycznego. Autorzy zaprezentowali elektrodę przygotowaną w prosty sposób, umożliwiającą wyraźne rozseparowanie sygnałów pochodzących od tych trzech związków, z potencjałem pików odpowiednio: -0,07 V dla N_2H_4 , 0,17 V dla SO_3^{2-} oraz 0,52 V dla NO_2^- (Rys.1.26a).



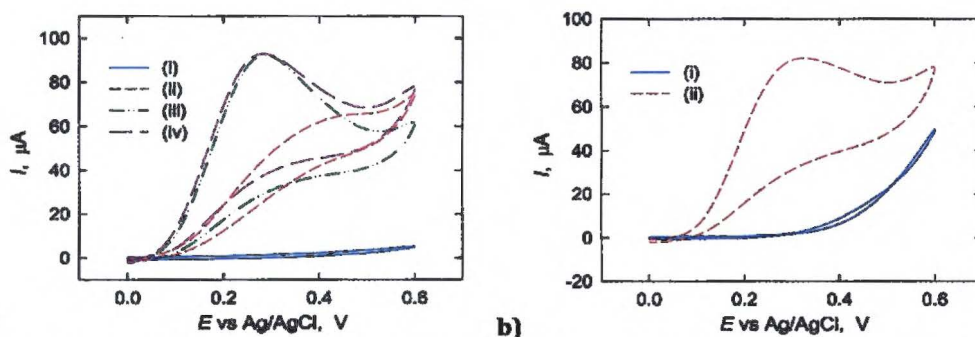
Rys. 1.26 a) Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na elektrodach (a) GC, (b) GC/APS, (c) GC/APS-AuNP w 250 μ M N_2H_4 , SO_3^{2-} , NO_2^- , w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 7,2, $v = 20$ mV s⁻¹, **b)** schemat elektrody GC/APS-AuNP i zachodzących reakcji¹¹².

Warto wspomnieć o możliwości aktywacji powierzchni nanocząstek złota lub ich warstw poprzez odpowiednią wstępną obróbkę powierzchni. Proces taki powoduje zwiększenie właściwości katalitycznych AuNP. Na Rys 1.27 przedstawiono schemat cyklu aktywacji/dezaktywacji nanocząstek pod wpływem chemicznego reduktora $NaBH_4$ ¹²⁴ lub katodowej polaryzacji^{125,126}. Powoduje to adsorpcję/absorpcję atomów wodoru w/na powierzchni AuNP czyli jej aktywację.



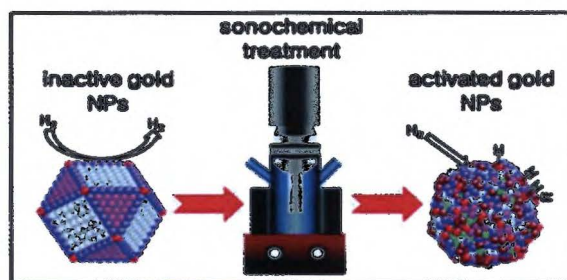
Rys. 1.27 Schemat cyklu zachodzącego podczas aktywacji/dezaktywacji AuNP¹²⁴.

Proces ten ułatwia detekcję takich molekuł, jak H_2O_2 czy kwas mrówkowy^{124,127}. Już jednodominutowe działanie $NaBH_4$ na elektrodę wywołuje znaczącą zmianę jej właściwości katalitycznych w stosunku do utleniania nadtlenu wodoru (Rys. 1.28a), a wydłużenie tego czasu znacznie przyspiesza zachodzącą reakcję¹²⁴. Aktywacja nie jest trwałym procesem i materiał traci z czasem nabyte właściwości (Rys. 1.28b).



Rys. 1.28 Krzywe woltamperometryczne zarejestrowane na elektrodzie ITO modyfikowanej AuNP w 1 mM H₂O₂, 0,1 M buforze węglanowym pH = 10, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$: **a)** (i) przed wystawieniem na działanie NaBH₄; po inkubacji elektrody w NaBH₄ przez (ii) 1 min, (iii) 15 min, (iv) 30 min; **b)** (i) po miesiąc przechowywania elektrody w 10 mM buforze fosforanowym pH = 7,4 (ii) tuż po reaktywacji tej elektrody w NaBH₄, (ii) ¹²⁴.

AuNP można aktywować także przez traktowanie próbki ultradźwiękami (*ang.* sonication), co sprowadza się do efektywnego podgrzewania AuNP bez wpływu na ich rozmiar i dyspersję. Proces ten prowadzi do pojawienia się frakcji koordynacyjnie nienasyconych atomów złota na całej powierzchni nanocząstki, co z kolei powoduje, że wykazują dużą aktywność w stosunku do utleniania wodoru (Rys. 1.29) ¹²⁶.



Rys. 1.29 Schemat aktywacji AuNP przy pomocy podgrzewania ultradźwiękowego ¹²⁶.

1.3 Bibliografia

- (1) McCreery, R. L. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2646–2687.
- (2) Frycz, C. A.; Shui, X.; Chung, D. D. L. *J. Power Sources* **1996**, *58*, 41–45.
- (3) Czerwinski, A. *Akumulatory Baterie Ogniwa*; Wydawnictwo Komunikacji i Łączności WKŁ, 2005.
- (4) Sayilgan, E.; Kukrer, T.; Civelekoglu, G.; Ferella, F.; Akcil, A.; Veglio, F.; Kitis, M. *Hydrometallurgy* **2009**, *97*, 158–166.
- (5) Neburchilov, V.; Wang, H.; Martin, J. J.; Qu, W. *J. Power Sources* **2010**, *195*, 1271–1291.
- (6) Cao, D.; Sun, Y.; Wang, G. *J. Power Sources* **2007**, *167*, 250–257.
- (7) Dicks, A. L. *J. Power Sources* **2006**, *156*, 128–141.
- (8) Li, W.; Dahn, J. R.; Wainwright, D. S. *Science* **1994**, *264*, 1115–1118.
- (9) Gilmartin, M. a; Hart, J. P. *Analyst* **1995**, *120*, 1029–1045.
- (10) Willner, I.; Yan, Y.-M.; Willner, B.; Tel-Vered, R. *Fuel Cells* **2009**, *9*, 7–24.
- (11) Besteman, K.; Lee, J.-O.; Wiertz, F. G. M.; Heering, H. a; Dekker, C. *Nano Lett.* **2003**, *3*, 727–730.
- (12) Jacobs, C. B.; Peairs, M. J.; Venton, B. J. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *662*, 105–127.
- (13) Gasser, M.; Rothen-Rutishauser, B.; Krug, H. F.; Gehr, P.; Nelle, M.; Yan, B.; Wick, P. *J. Nanobiotechnology* **2010**, *8*, 31.
- (14) Falcao, E. H. L.; Wudl, F. **2007**, *531*, 524–531.
- (15) Zhang, S.; Zhou, J.; Wang, Q.; Chen, X.; Kawazoe, Y.; Jena, P. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2015**, *112*, 2372–2377.
- (16) <http://nauka.newsweek.pl/szybki-procesor-dwusiarczek-molibdenu-newsweek-pl,artykuly,282260,1,1,1.html>
- (17) <http://www.pvdadvancedtech.com/dlc/>
- (18) Wissler, M. *J. Power Sources* **2006**, *156*, 142–150.
- (19) Ren, Z.; Lan, Y.; Wang, Y. *Aligned Carbon Nanotubes. Physics, Concepts, Fabrication and Devices*; NanoScience and Technology; Springer Berlin Heidelberg, 2013.
- (20) Noel, M.; Santhanam, R. *J. Power Sources* **1998**, *72*, 53–65.
- (21) Chung, D. D. L. *J. Mater. Sci.* **2002**, *37*, 1475–1489.
- (22) Kroto, H. W.; Heath, J. R.; O'Brien, S. C.; Curl, R. F.; Smalley, R. E. *Nature* **1985**, *318*, 162–163.
- (23) Echegoyen, L.; Echegoyen, L. E. *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 593–601.
- (24) Vul, A. Y. Some Aspects of Fullerene Application. In *Perspectives of Fullerene Nanotechnology*; Osawa, E., Ed.; 2002; pp 23–33.



- (25) Bakry, R.; Vallant, R. M.; Najam-ul-Haq, M.; Rainer, M.; Szabo, Z.; Huck, C. W.; Bonn, G. K. *Int. J. Nanomedicine* **2007**, *2*, 639–649.
- (26) Novoselov, K. S.; Geim, A. K.; Morozov, S. V.; Jiang, D.; Zhang, Y.; Dubonos, S. V.; Grigorieva, I. V.; Firsov, A. A. *Science* **2004**, *306*, 666–669.
- (27) Geim, A. K.; Novoselov, K. S. *Nat. Mater.* **2007**, *6*, 183–191.
- (28) Brownson, D. A. C.; Banks, C. E. *Analyst* **2010**, *135*, 2768–2778.
- (29) <http://www.rynekarb.pl/pigment-carbon-black/>.
- (30) Bandyopadhyay, S.; De, P.; Tripathy, D. K.; De, S. K. *J. Appl. Polym. Sci.* **1995**, *58*, 719–727.
- (31) Boehm, H. M. *Carbon N. Y.* **1994**, *32*, 759–769.
- (32) Downard, A. J. *Electroanalysis* **2000**, No. 12, 1085–1096.
- (33) Barrière, F.; Downard, A. J. *J. Solid State Electrochem.* **2008**, *12*, 1231–1244.
- (34) Leroux, Y. R.; Hui, F.; Noël, J.-M.; Roux, C.; Downard, A. J.; Hapiot, P. *Langmuir* **2011**, *27*, 11222–11228.
- (35) Panchompoo, J.; Aldous, L.; Compton, R. G. *New J. Chem.* **2010**, *34*, 2643.
- (36) Song, Y.; Kang, X.; Zuckerman, N. B.; Phebus, B.; Konopelski, J. P.; Chen, S. *Nanoscale* **2011**, *3*, 1984–1989.
- (37) Lawrence, K.; Baker, C. L.; James, T. D.; Bull, S. D.; Lawrence, R.; Mitchels, J. M.; Opallo, M.; Arotiba, O. A.; Ozoemena, K. I.; Marken, F. *Chem. Asian J.* **2014**, *9*, 1226–1241.
- (38) Chang, J.; Sun, X.; Feng, L.; Xing, W.; Qin, X.; Shao, G. *J. Power Sources* **2013**, *239*, 94–102.
- (39) Wei, Z. D.; H.T., G.; Tang, Z. Y. *J. Power Sources* **1994**, *52*, 123–127.
- (40) Deng, P.; Xu, Z.; Feng, Y.; Li, J. *Sensors Actuators B Chem.* **2012**, *168*, 381–389.
- (41) Zhang, Y.; Wang, Y.; Wu, K.; Zhang, S.; Zhang, Y.; Wan, C. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **2013**, *103*, 94–98.
- (42) Guo, C.; Chen, C.; Luo, Z.; Chen, L. *Anal. Methods* **2012**, *4*, 1377–1382.
- (43) Yoshimura, M.; Byrappa, K. *J. Mater. Sci.* **2007**, *43*, 2085–2103.
- (44) Walton, R. I. *Chem. Soc. Rev.* **2002**, *31*, 230–238.
- (45) Barsukov, I. V.; Gallego, M. a.; Doninger, J. E. *J. Power Sources* **2006**, *153*, 288–299.
- (46) Figueiredo, J. L.; Pereira, M. F. R.; Freitas, M. M. A.; Orfao, J. J. M. **1999**, *37*, 1379–1389.
- (47) Aksoyly, A. E.; Madalena, M.; Freitas, A.; Pereira, M. F. R.; Figueiredo, J. L. *Carbon N. Y.* **2001**, *39*, 175–185.
- (48) Calvillo, L.; Gangeri, M.; Perathoner, S.; Centi, G.; Moliner, R.; Lázaro, M. J. *J. Power Sources* **2009**, *192*, 144–150.
- (49) Vidal, L.; Chisvert, A.; Canals, A.; Psillakis, E.; Lapkin, A.; Acosta, F.; Edler, K. J.; Holdaway, J. a; Marken, F. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *616*, 28–35.
- (50) Belmont, J. A.; Amici, R. M.; Galloway, C. P. Reaction of Carbon Black with Diazonium Salts, Resultant Carbon Black Products and Their Uses. US005851280A, 1998.
- (51) <http://www.cabot-corp.cn/wcm/download/en-us/sb/HC%20CB%20for%20auto-tech%20paper%20090466.pdf>.
- (52) Belmont, J. Carbon Materials Reacted with Diazonium Salts. EP0799282 B1, 1995.
- (53) Xia, F.; Pan, M.; Mu, S.; Jones, M. D.; Wolverson, D.; Marken, F. *Electroanalysis* **2012**, *24*, 1703–1708.
- (54) Watkins, J. D.; Lawrence, R.; Taylor, J. E.; Bull, S. D.; Nelson, G. W.; Foord, J. S.; Wolverson, D.; Rassaei, L.; Evans, N. D. M.; Gascon, S. A.; et al. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 4872–4878.
- (55) Lawrence, K.; Nelson, G. W.; Foord, J. S.; Felipe-Sotelo, M.; Evans, N. D. M.; Mitchels, J. M.; James, T. D.; Xia, F.; Marken, F. *J. Mater. Chem. A* **2013**, *1*, 4559–4564.
- (56) Xia, F.; Pan, M.; Mu, S.; Xiong, Y.; Edler, K. J.; Idini, I.; Jones, M. D.; Tsang, S. C.; Marken, F. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 15860–15865.
- (57) Dong, Y.; Chen, C.; Zheng, X.; Gao, L.; Cui, Z.; Yang, H.; Guo, C.; Chi, Y.; Li, C. M. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 8764.
- (58) Amiri, M.; Shahrokhian, S.; Marken, F. *Electroanalysis* **2007**, *19*, 1032–1038.
- (59) Amiri, M.; Shahrokhian, S.; Psillakis, E.; Marken, F. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *593*, 117–122.
- (60) Rassaei, L.; Sillanpää, M.; Marken, F. *Electrochim. Acta* **2008**, *53*, 5732–5738.
- (61) Lesniewski, A.; Paszewski, M.; Opallo, M. *Electrochem. Commun.* **2010**, *12*, 435–437.
- (62) Lesniewski, A.; Niedziolka-Jonsson, J.; Rizzi, C.; Gaillon, L.; Rogalski, J.; Opallo, M. *Electrochem. Commun.* **2010**, *12*, 83–85.
- (63) Szot, K.; Watkins, J. D.; Bull, S. D.; Marken, F.; Opallo, M. *Electrochem. Commun.* **2010**, *12*, 737–739.
- (64) Szot, K. Electrodes Modified with Carbon Nanoparticles and Enzymes, PhD Thesis, Institute of Physical Chemistry Polish Academy of Sciences, 2012.
- (65) Herd, C. R.; McDonald, G. C.; Hess, W. M. *Rubber Chem. Technol.* **1992**, *65*, 107–129.
- (66) Binks, B. P.; Cui, Z.-G.; Fletcher, P. D. I. *Langmuir* **2006**, *22*, 1664–1670.
- (67) MacDonald, S. M.; Fletcher, P. D. I.; Cui, Z.-G.; Opallo, M.; Chen, J.; Marken, F. *Electrochim. Acta* **2007**, *53*, 1175–1181.
- (68) Ajayan, P. M. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 1787–1800.
- (69) Harris, P. J. F. *Int. Mater. Rev.* **2004**, *49*, 31–43.
- (70) Ruoff, R. S.; Lorents, D. C.; International, S. R. I.; Park, M. **1995**, *33*, 925–930.
- (71) Baughman, R. H.; Zakhidov, A. A.; de Heer, W. A. *Science (80-)* **2002**, *297*, 787–792.
- (72) Pumera, M.; Miyahara, Y. *Nanoscale* **2009**, *1*, 260–265.
- (73) De Volder, M. F. L.; Tawfick, S. H.; Baughman, R. H.; Hart, a J. *Science* **2013**, *339*, 535–539.
- (74) Sotowa, C.; Origi, G.; Takeuchi, M.; Nishimura, Y.; Takeuchi, K.; Jang, I. Y.; Kim, Y. J.; Hayashi, T.; Kim, Y. A.; Endo, M.; et al. *ChemSusChem* **2008**, *1*, 911–915.
- (75) Rahaman, M. S.; Vecitis, C. D.; Elimelech, M. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46*, 1556–1564.
- (76) Britto, P. J.; Santhanam, K. S. V.; Ajayan, P. M. *Bioelectrochemistry Bioenerg.* **1996**, *41*, 121–125.
- (77) Barisci, J. N.; Wallace, G. G.; Baughman, R. H. *J. Electrochem. Soc.* **2000**, *147*, 4580–4583.
- (78) Shanmugam, S.; Gedanken, A. *Electrochem. Commun.* **2006**, *8*, 1099–1105.
- (79) Li, J.; Cassell, A.; Delzeit, L.; Han, J.; Meyyappan, M. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 9299–9305.
- (80) Li, J.; Ng, H. T.; Cassell, A.; Fan, W.; Chen, H.; Ye, Q.; Koehne, J.; Han, J.; Meyyappan, M. *Nano Lett.* **2003**, *3*, 597–602.
- (81) Tu, Y.; Lin, Y.; Yantasee, W.; Ren, Z. *Electroanalysis* **2005**, *17*, 79–84.
- (82) Liu, J.; Chou, A.; Rahmat, W.; Paddon-Row, M. N.; Gooding, J. J. *Electroanalysis* **2005**, *17*, 38–46.
- (83) Toumey, C. *Techné Res. Philos. Technol.* **2008**, *12*, 133–168.
- (84) Kelsall, R. W.; Hamley, I. W.; Geoghegan, M. *Nanotechnology*; Wydawnictwo Naukowe PWN, 2008.
- (85) Domènech, B.; Bastos-Arrieta, J.; Alonso, A.; Macanás, J.; Muñoz, M.; Muraviev, D. N. Bifunctional Polymer-Metal Nanocomposite Ion Exchange Materials. In *Ion Exchange Technologies*; 2012; pp 35–72.
- (86) Frenkel, A. *Zeitschrift für Krist.* **2007**, *222*, 605–611.
- (87) <http://www.nano.gov/nanotech-101/special>.

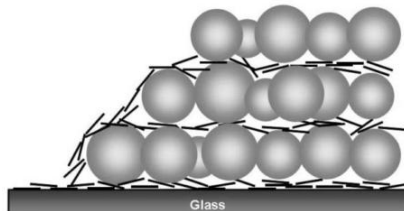
- (88) Hvolbaek, B.; Janssens, T. V. W.; Clausen, B. S.; Falsig, H.; Christensen, C. H.; Norskov, J. K. *Nanotoday* **2007**, *2*, 14–18.
- (89) Janssens, T. V. W.; Clausen, B. S.; Hvolbæk, B.; Falsig, H.; Christensen, C. H.; Bligaard, T.; Nørskov, J. K. *Top. Catal.* **2007**, *44*, 15–26.
- (90) Roduner, E. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 583–592.
- (91) Welch, C. M.; Compton, R. G. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *384*, 601–619.
- (92) Kleijn, S. E. F.; Lai, S. C. S.; Koper, M. T. M.; Unwin, P. R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, 3558–3586.
- (93) Thompson, D. *Gold Bull.* **2007**, *40*, 267–269.
- (94) Liz-Marz, L. M. *Mater. Today* **2004**, 26–31.
- (95) Walters, G.; Parkin, I. P. *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 574.
- (96) http://www.nature.com/nphoton/journal/v5/n6/box/nphoton.2011.56_BX1.html?message-global=remove.
- (97) Zhao, P.; Li, N.; Astruc, D. *Coord. Chem. Rev.* **2013**, *257*, 638–665.
- (98) Huang, C.-J.; Chiu, P.-H.; Wang, Y.-H.; Chen, K.-L.; Linn, J.-J.; Yang, C.-F. *J. Electrochem. Soc.* **2006**, *153*, D193.
- (99) Rassaei, L.; Marken, F.; Sillanpää, M.; Amiri, M.; Cirtiu, C. M.; Sillanpää, M. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2011**, *30*, 1704–1715.
- (100) Fiorito, P. A.; Gonc, V. R.; Ponzio, E. A.; Co, S. I. *Chem. Commun.* **2005**, No. 3, 366–368.
- (101) Zhuo, Y.; Yuan, R.; Chai, Y.; Tang, D.; Zhang, Y.; Wang, N.; Li, X.; Zhu, Q. *Electrochem. Commun.* **2005**, *7*, 355–360.
- (102) Cai, H.; Xu, Y.; Zhu, N.; He, P.; Fang, Y. *Analyst* **2002**, *127*, 803–808.
- (103) Luo, X.-L.; Xu, J.-J.; Zhao, W.; Chen, H.-Y. *Biosens. Bioelectron.* **2004**, *19*, 1295–1300.
- (104) Zhang, H.; Lu, H.; Hu, N. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 2171–2179.
- (105) Ma, Y.; Di, J.; Yan, X.; Zhao, M.; Lu, Z.; Tu, Y. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 1480–1483.
- (106) Burke, L. D.; Nugent, P. F. *Gold Bull.* **1997**, *30*, 43–53.
- (107) Dai, X.; Wildgoose, G. G.; Salter, C.; Crossley, A.; Compton, R. G. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 6102–6108.
- (108) Trasatti, S.; Petrii, O. A. *Pure Appl. Chem.* **1991**, *63*, 711–734.
- (109) Wang, Y.; Laborda, E.; Salter, C.; Crossley, A.; Compton, R. G. *Analyst* **2012**, *137*, 4693–4697.
- (110) Sundmacher, K. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2010**, *49*, 10159–10182.
- (111) Tung, S.-P.; Huang, T.-K.; Lee, C.-Y.; Chiu, H.-T. *RSC Adv.* **2012**, *2*, 1068.
- (112) Maduraiveeran, G.; Ramaraj, R. *Electrochem. Commun.* **2007**, *9*, 2051–2055.
- (113) Deab, M. S. E.-; Ohsaka, T. *Electrochem. Commun.* **2002**, *4*, 288–292.
- (114) Pasta, M.; Ruffo, R.; Falletta, E.; Mari, C. M.; Pina, C. Della. *Gold Bull.* **2010**, *43*, 57–64.
- (115) Vassilyev, Yu. B.; Khazova, O. A.; Nikolaeva, N. N. **1985**, *196*, 105–125.
- (116) Wang, J.; Gong, J.; Xiong, Y.; Yang, J.; Gao, Y.; Liu, Y.; Lu, X.; Tang, Z. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 6894–6896.
- (117) Hsiao, M. W.; Adzic, R. R.; E.B., Y. *Electrochim. Acta* **1992**, *37*, 357–363.
- (118) Mele, M. L. F.; Videla, H. A.; Arvia, A. J. *Bioelectrochemistry Bioenerg.* **1986**, *16*, 213–233.
- (119) Yi, Q.; Yu, W. *Microchim. Acta* **2009**, *165*, 381–386.
- (120) Tominaga, M.; Shimazoe, T.; Nagashima, M.; Kusuda, H.; Kubo, A.; Kuwahara, Y.; Taniguchi, I. *J. Electroanal. Chem.* **2006**, *590*, 37–46.
- (121) Aoun, S. Ben; Dursun, Z.; Koga, T.; Bang, G. S.; Sotomura, T.; Taniguchi, I. *J. Electroanal. Chem.* **2004**, *567*, 175–183.
- (122) Makovos, E. B.; Liu, C. C. *Bioelectrochemistry Bioenerg.* **1986**, *15*, 157–165.
- (123) Pasta, M.; La Mantia, F.; Cui, Y. *Electrochim. Acta* **2010**, *55*, 5561–5568.
- (124) Das, J.; Patra, S.; Yang, H. *Chem. Commun.* **2008**, No. 37, 4451–4453.
- (125) Burke, L. D.; O'Mullane, A. P. *J. Solid State Electrochem.* **2000**, *4*, 285–297.
- (126) Lee, Y.-H.; Kim, G.; Joe, M.; Jang, J.-H.; Kim, J.; Lee, K.-R.; Kwon, Y.-U. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 5656–5658.
- (127) Burke, L. D.; O'Connell, a. M.; O'Mullane, A. P. *J. Appl. Electrochem.* **2003**, *33*, 1125–1135.

2. Wybrane metody otrzymywania nanostrukturalnych elektrod

Na tradycyjnych materiałach elektrodowych wiele procesów elektrochemicznych przebiega z wysokim nadpotencjałem. Jak wspomniano wcześniej, rozwiązaniem tego problemu może być zastosowanie nanomateriałów. Struktury te wymagają odpowiedniego unieruchomienia na powierzchni elektrody, dlatego też opracowano wiele metod tworzenia takich modyfikowanych elektrod. Na uwagę zasługują, poniżej opisane: technika warstwa-po-warstwie, osadzanie elektroforetyczne oraz sitodruk, który szczególnie przyczynił się do komercjalizacji czujników elektrochemicznych. Inną znaną techniką jest pułapkowanie nanoobjektów w matrycach polikrzemianowych, na zasadzie podobnej do pułapkowania enzymów ^{1,2}. Porowata struktura polikrzemianu pozwala uzyskać bardzo rozwiniętą powierzchnię w której przewodzące nanoobjekty tworzą ścieżki perkolacyjne niezbędne dla transportu elektronu.

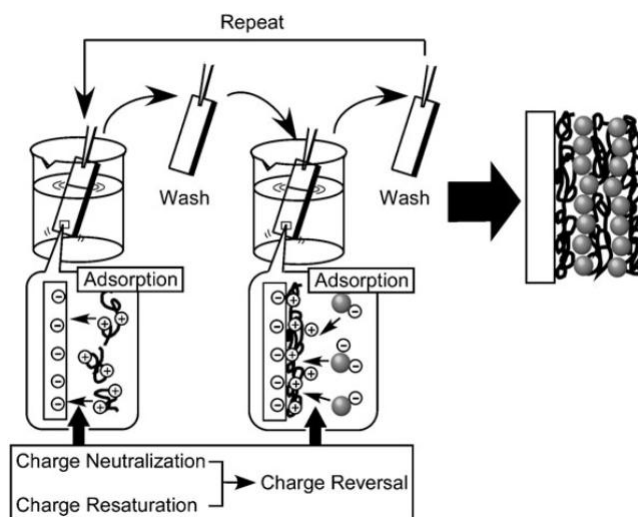
2.1 Metoda warstwa-po-warstwie

W 1966 roku Iler zaproponował nowatorski sposób tworzenia wielowarstwowych materiałów z nieorganicznych cząstek koloidalnych, bez użycia molekuł typu organicznego ³. Zastosował metodę, znaną dziś pod nazwą warstwa-po-warstwie (ang. *layer-by-layer*, LbL) ⁴ lub bardziej odpowiadającą rzeczywistości, krok-po-kroku (ang. *step-by-step*) ⁵. Koloidalne cząstki o przeciwnych ładunkach łączono w warstwy przez ich naprzemienną adsorpcję na podłożu stałym (Rys. 2.1).



Rys. 2.1 Schemat wielowarstwowego filmu składającego się z mikrocząstek krzemianu (kulki) oraz koloidalnego tlenku glinu (druty), osadzonego na powierzchni szkła ^{3,6}.

W 1991 roku metodę tę na nowo odkryli Decher i Hong i zastosowali do wytworzenia ultracienkich warstw ⁷. Początkowo użyto dodatnich i ujemnych bipolarnych amfifili ⁷, następnie amfifili i naładowanych polimerów ⁸, aż w końcu wyłącznie prostych, różnoimiennie naładowanych polimerów zwanych polielektrolitami ⁹. Przez naprzemienne zanurzenie naładowanego podłoża w zawiesinach z dodatnio i następnie z ujemnie naładowanymi obiektami, można utworzyć stabilny film (Rys. 2.2).

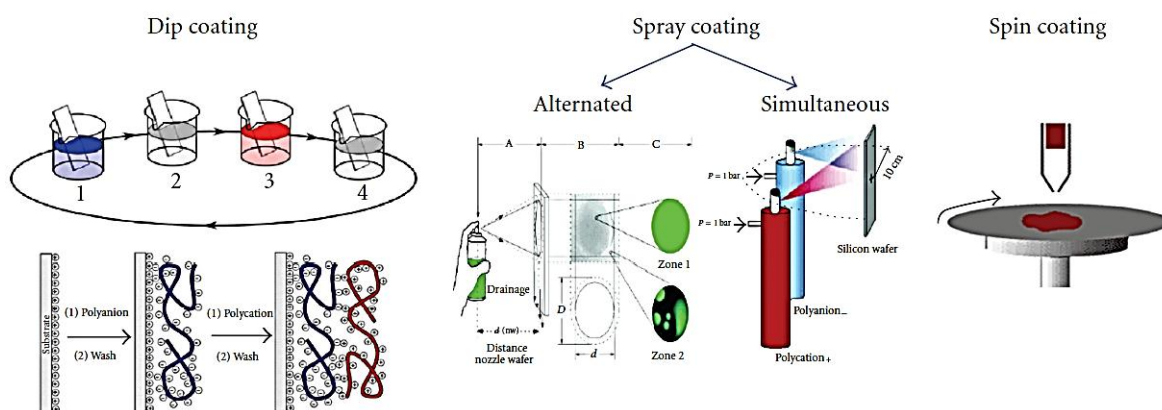


Rys. 2.2 Metoda LbL tworzenia warstw przez oddziaływania elektrostatyczne ¹⁰.

Badania te otworzyły drogę do tworzenia różnorodnych materiałów w oparciu o makromolekuły takie jak białka, DNA, enzymy, wirusy, nanocząstki oraz wielu innych trudnych dziś już do zliczenia ^{11,12}. Co więcej, metoda ta daje możliwość pokrycia powierzchni o najróżniejszych kształcie, wielkości i właściwościach, np. tekstyliów ¹³, papieru ¹⁴, koloidów ¹⁵, nanocząstek ¹⁶, owoców ¹⁷, a nawet komórek biologicznych ¹⁸. LbL stosuje się także do tworzenia produktów komercyjnie dostępnych, takich jak soczewki kontaktowe (CIBA-Vision) ¹¹.

W dalszym ciągu obserwuje się duże zainteresowanie i rozwój LbL, jako wszechstronnej i wydajnej techniki tworzenia cienkich, wielowarstwowych filmów w sposób kontrolowany. Zarówno struktura filmu, jak i jego właściwości mogą podlegać zmianie i regulacji, co jest niewątpliwą zaletą metody LbL.

Na przestrzeni lat pracowano nad skróceniem czasu przygotowywania podłoży metodą zanurzeniową. Każdy jej etap wymaga zazwyczaj kilku minut, ze względu na dyfuzję molekuł, ich adsorpcję na powierzchni oraz czas potrzebny na osiągnięcie równowagowej konformacji ⁵. Opracowano, np. kilkusekundową technikę wtryskową oraz powlekanie obrotowe (Rys. 2.3) ^{5,12}.

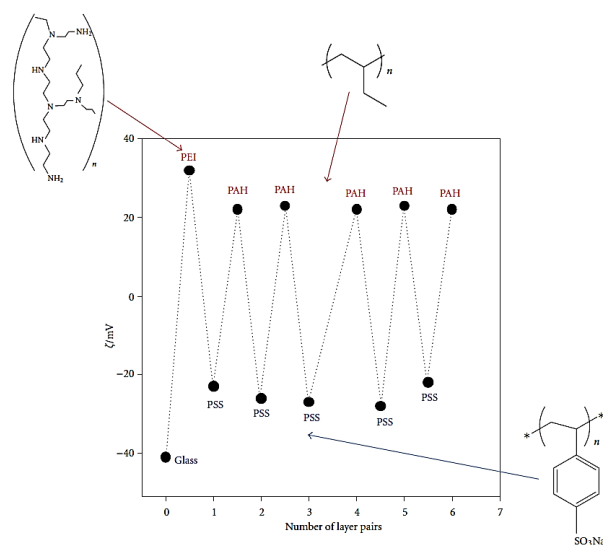


Rys. 2.3 Schemat prezentujący trzy najczęściej stosowane metody osadzania w metodzie warstwa-po-warstwie ⁵.

Właściwości i odtwarzalność uzyskiwanego materiału, zależą od warunków metody LbL. Wielowarstwowy film składa się z sekwencji poszczególnych warstw, a każda z nich ma indywidualną strukturę i właściwości. Ważna jest grubość poszczególnych warstw, porowatość, natura i ilość naładowanych grup funkcyjnych, oraz w niektórych przypadkach,

ich mobilność. Nie bez znaczenia jest zastosowany rozpuszczalnik, stężenie komponentów, temperatura, dodatek soli i jej rodzaj, wilgotność powietrza, płukanie czy szybkość zanurzania/wynurzania ¹¹. Zasady którymi należy się kierować dobierając warunki dla LbL zostały dobrze opracowane dla polielektrolitów, ale mogą mieć zastosowanie także dla innych układów. Pierwsza zasada mówi, że im dłuższy czas adsorpcji, tym bardziej odtwarzalne materiały, gdyż plateau adsorpcji jest funkcją stężenia komponentu (łatwo odtwarzalny parametr) i czasu (trudna odtwarzalność w zakresie kilkusekundowym). W początkowej fazie adsorpcji, niewielkie zmiany czasu mogą znacznie wpływać na ilość adsorbentu. Natomiast, nawet duże różnice czasu w fazie bliskiej plateau adsorpcji powodują niewielkie zmiany masy osadzonego komponentu ¹². Kolejna zasada odnosi się do etapu płukania substratu. Gdy powlekany substrat wyciągany jest z naczynia, cienki film zawieszony ulega adhezji do powlekanej powierzchni, a grubość przywarłej cieczy wynosi około kilku mikronów. Współczynnik rozcieńczenia cieczy do płukania to stosunek jej objętości w naczyniu do objętości przywarłej do substratu. Należy pamiętać, że z każdym zanurzeniem ten współczynnik sukcesywnie wzrasta, a liczba płukań i ilość użytego do tego celu rozpuszczalnika powinna być dobrana tak, aby całkowity współczynnik rozcieńczenia wynosił 1:10⁶. W przeciwnym razie przywarta ciecz zanieczyści kolejne zawiesziny stosowane do osadzania. Jest to czynnik często lekceważony i pomijany, a ma znaczenie, szczególnie dla dużych powierzchni i grubych warstw ¹². Innym istotnym parametrem jest gęstość pokrycia komponentów grupami funkcyjnymi. Optymalne upakowanie prowadzi do liniowego wzrostu grubości warstw. Czasem zdarza się silne zagęszczenie grup lub migracja molekuł, powodująca tzw. superliniowość, która pozwala na tworzenie bardzo grubych filmów. Może także wystąpić zmniejszanie liczby grup funkcyjnych prowadzące do stagnacji filmu i zatrzymania dalszego wzrostu depozytu. Takie zachowanie obserwowane jest dla większych obiektów np. cząstek z niewielką liczbą grup mogących przyjmować różną orientację na powierzchni ¹².

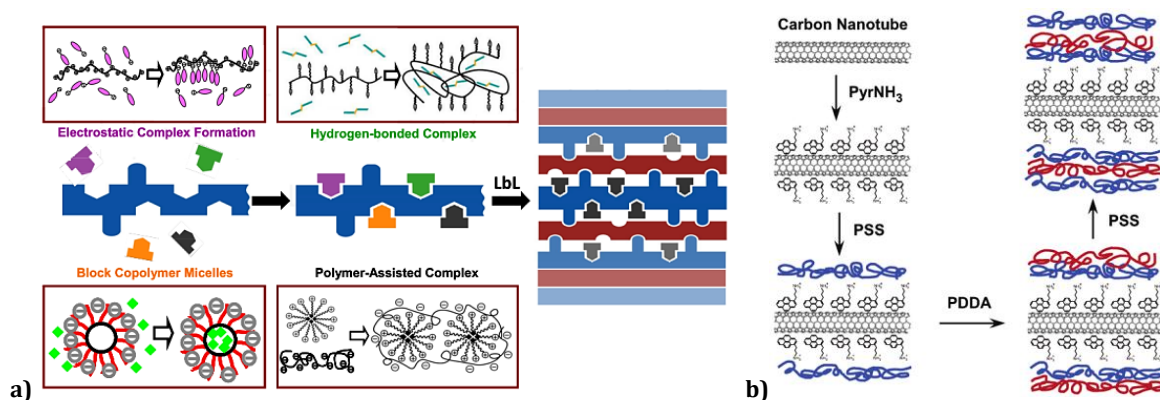
W celu wykazania, że oddziaływania elektrostatyczne odpowiadają za tworzenie układów warstwowych, zmierzono średni potencjał powierzchniowy (potencjał zeta) osadzanych kolejno polielektrolitów i zaobserwowano każdorazową jego zmianę (Rys. 2.4). Świadczy to o znikomym przenikaniu warstw, a każda kolejna warstwa polielektrolitu powoduje neutralizację prawie całego ładunku warstwy poprzedniej. Pozostaje jedynie nieduży jego nadmiar na powierzchni, który jest siłą napędową do dalszej adsorpcji (Rys. 2.4) ⁵.



Rys. 2.4 Zmiana potencjału zeta w zależności od liczby zaadsorbowanych warstw polielektrolitów ⁵.

Nie jest to jednak dostateczny dowód, na to że inne siły nie biorą udziału w tworzeniu filmów, a jedynie potwierdzeniem udziału oddziaływań elektrostatycznych. Należy pamiętać, że uwolnienie przeciwnonu także odgrywa dużą rolę w metodzie LbL. Ponadto, poza oddziaływaniami elektrostatycznymi (Rys. 2.2), wykorzystywane są także inne, takie jak wiązania wodorowe, oddziaływania hydrofobowe, rozpoznanie biomolekularne czy oddziaływania z przeniesieniem ładunku (ang. *ionic charge-transfer*)¹⁹.

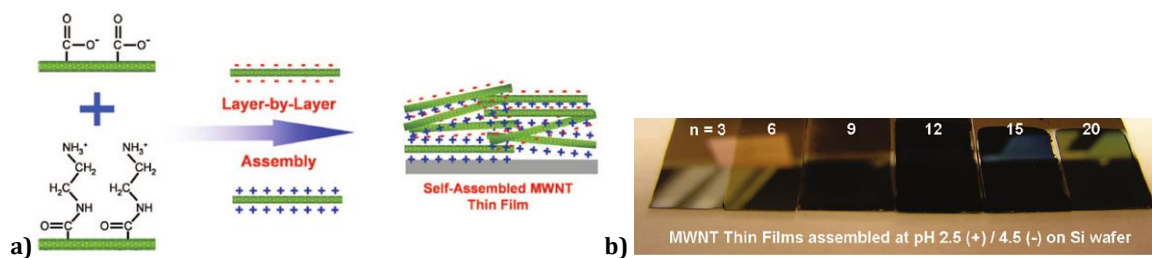
Konwencjonalna metoda LbL opiera się na prostej, naprzemiennej depozycji komponentów i osadzaniu warstw na granicy ciecz-ciało stałe. Jednak nie zawsze jest to możliwe, np. w przypadku pojedynczo naładowanych lub obojętnych elektrycznie molekuł, nierozpuszczalnych w wodzie^{6,11,20}. W tym przypadku z pomocą przychodzi niekonwencjonalna odmiana metody LbL^{6,20}. Zakłada ona wstępną modyfikację komponentu, z którego następnie przeprowadza się naprzemienne osadzanie. W pierwszym etapie niekonwencjonalnego LbL wykorzystuje się różne sposoby łączenia molekuł. Niektóre przedstawione na Rys. 2.5a. Przykładem jest modyfikacja CNT 1-pirenopropylaminą wykorzystująca oddziaływania donor-akceptor i hydrofobowe^{6,21}. W rezultacie CNT zostają obdarzone dodatnim ładunkiem elektrycznym i można poddać je dalszej modyfikacji różnoimiennymi polielektrolitami przez ich naprzemienne nakładanie (Rys. 2.5b).



Rys. 2.5 a) Schemat tworzenia warstw niekonwencjonalną metodą LbL²², **b)** wstępna modyfikacja CNT oraz osadzanie na nich polimerów metodą LbL: sulfonianu polistyrenu (PSS) i poli(chlorkiem dimetylodialiloamonowym) (PDDA)⁶.

Pomimo ogromnej popularności tej techniki, tworzenie warstw wyłącznie z cząstek, bez zastosowania molekuł łączących, stosowano dość rzadko²³. W ten sposób, ze względu na wypełnianie przestrzeni pomiędzy cząstkami otrzymuje się bardzo porowate, nieregularne warstwy. W przeciwieństwie do polielektrolitów, mamy tu do czynienia ze wzajemnym przenikaniem nakładanych na siebie kolejno warstw. Do tej pory opisano układy LbL w oparciu o CNP łączone z polimerem o przeciwnym ładunku²⁴⁻²⁶, z filmem polikrzemianowym^{27,28} oraz w połączeniu z dodatnio naładowanymi CNP^{29,30}, cząstkami polikrzemianowymi modyfikowanymi cieczą jonową³¹ oraz nanocząstkami złota³². W taki sposób wytworzono także materiały w oparciu o cząstki SiO₂/TiO₂²³, TiO₂/CdS³³, AuNP/krzemionka domieszkuje Ru(bpy)₃²⁺³⁴, a także różne połączenia z CNT, np. z nanocząstkami błękitu pruskiego³⁵.

Rys. 2.6 przedstawia pierwszy cienki film utworzony wyłącznie z MWCNT metodą LbL³⁶. Siłami wiążącymi nanorurki są oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy różnoimiennymi grupami funkcyjnymi MWCNT. W rezultacie otrzymano cienki, porowaty film wykazujący wysokie przewodnictwo elektryczne, który można wykorzystać w superkondensatorze.



Rys. 2.6 a) Schemat tworzenia elektrody LbL z MWCNT modyfikowanych grupami karboksylowymi i aminowymi, **b)** zdjęcie różnej liczby biwarstw osadzonych na wafle krzemowym ³⁶.

Mechanizm przeniesienia elektronu pomiędzy warstwami elektrodowymi opisał między innymi Schlenoff ^{37,38}. Badano w tym celu elektrody zbudowane z naprzemiennie ułożonych warstw elektroaktywnych i nieprzewodzących (Rys. 2.7) ^{37,38}. Rejestrowano woltamperogramy dla reakcji redoks zewnętrznej warstwy elektroaktywnej. Wraz ze wzrostem liczby warstw obserwowano wzrost prądu piku, co oznacza, że cały materiał zaangażowany był w zachodzący proces. Biorąc pod uwagę grubość warstw (dziesiąte części nanometra), obserwowany efekt wytłumaczono przeskokiem elektronów (ang. *electron-hopping*) pomiędzy warstwami aktywnymi redoks (Rys. 2.7). Tego rodzaju transport elektronów może być ułatwiony, gdy warstwy się wzajemnie przenikają.

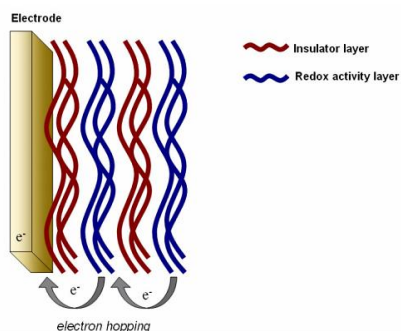


Fig. 2.7 Schemat mechanizmu przeniesienia elektronu pomiędzy warstwami LbL ³⁸.

Metoda LbL wykorzystywana jest do tworzenia innowacyjnych materiałów o zdefiniowanej strukturze, ciekawych właściwościach i coraz częściej stosowana w przemyśle i nanotechnologii ³⁹. Skalowanie LbL jest dość proste i nanoszenie warstw przez rozpylanie stosuje się w procesie walcowania papieru (Rys. 2.8) lub pokrywaniu karoserii samochodów ³⁹.

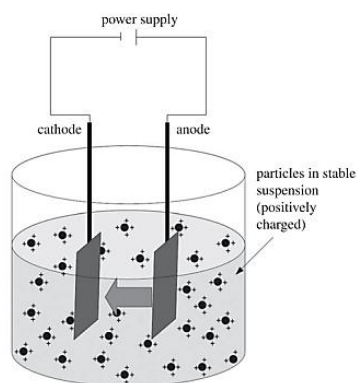


Rys. 2.8 Metoda LbL zastosowana na dużą skalę ³⁹.

2.2 Metoda osadzania elektroforetycznego

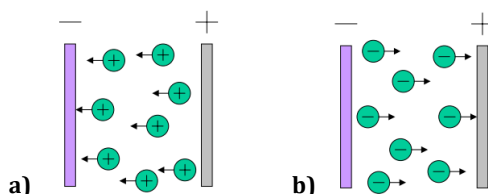
Metoda osadzania elektroforetycznego (ang. *electrophoretic deposition process*, EPD) jest wszechstronną, elektrochemiczną metodą pokrywania powierzchni, która ze względu na prostotę i niską cenę, cieszy się dużym zainteresowaniem w środowisku naukowym oraz w przemyśle⁴⁰. Umożliwia modyfikację powierzchni o różnych rozmiarach i kształtach oraz łatwą kontrolę grubości osadzanych warstw⁴¹. Technika EPD została wynaleziona w 1740 roku przez Bose'a w eksperymencie ciecz-syfon⁴². W 1808 roku Ruess, zaobserwował, że pole elektryczne indukuje ruch cząstek gliny w wodzie⁴¹. Jednak pierwsze praktycznie zastosowanie miało miejsce dopiero w 1927 roku do osadzenia dwutlenku toru i wolframu na platynie⁴².

EPD zazwyczaj przeprowadza się w naczyniu dwuelektrodowym zawierającym stabilną zawiesinę naładowanych cząstek w odpowiednim rozpuszczalniku (Rys. 2.9). Mechanizm osadzania składa się z dwóch etapów. W pierwszym, pomiędzy elektrody przykładane jest napięcie rzędu 10-200 V, pod wpływem którego naładowane cząstki poruszają się w kierunku przeciwnie naładowanej elektrody. W drugim etapie, cząstki gromadzą się na powierzchni elektrody tworząc stabilną, homogeniczną warstwę^{40,41}.



Rys. 2.9 Schemat układu używanego do elektroforetycznego osadzania⁴³.

W odróżnieniu od elektrolitycznego osadzania (ang. *electrolytic deposition process*, ELD), w metodzie EPD zamiast elektrolitów podstawowych stosuje się zawiesiny cząstek w różnych rozpuszczalnikach. EPD nie wymaga użycia wysoko przewodzącego medium, a najczęściej stosuje się rozpuszczalniki organiczne⁴¹. Zależnie od ładunku użytych cząstek, wyróżnia się dwa rodzaje EPD. Gdy na katodzie osadzane są dodatnio naładowane cząstki, wtedy mówimy o katodowym osadzaniu elektroforetycznym (Rys. 2.10a). W przypadku cząstek ujemnych, osadzanych na anodzie, proces nazywany jest anodowym osadzaniem elektroforetycznym (Rys. 2.10b).

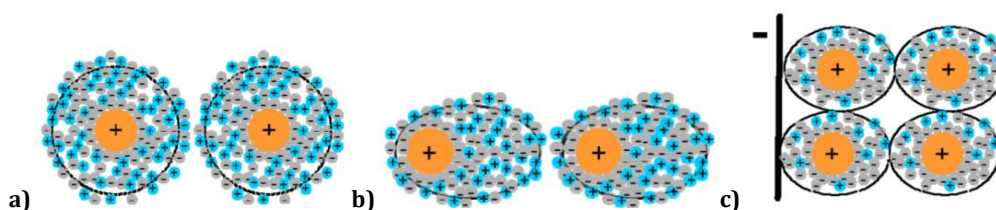


Rys. 2.10 Schemat elektroforetycznego osadzania a) katodowego, b) anodowego⁴¹.

Istotną wadą EPD jest ograniczenie do niewodnych rozpuszczalników. Przyłożenie tak wysokiego napięcia do elektrod zanurzonych w wodzie powoduje jej intensywny rozkład z wydzielaniem gazowego tlenu i wodoru, co niekorzystnie wpływa na jakość otrzymywanego pokrycia lub wręcz uniemożliwia jego wytworzenie⁴¹.

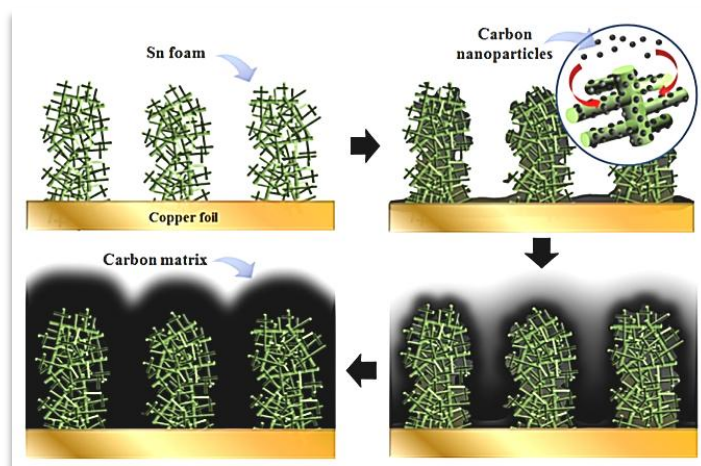
Kluczowymi parametrami dla EPD są takie właściwości zawiesiny cząstek, jak przewodnictwo, potencjał zeta, stężenie cząstek, lepkość. Niezbędnym warunkiem jest stabilność zawiesiny. Ważna jest także wysoka mobilność elektroforetyczna cząstek, przewodnictwo oraz niski ładunek w stosunku do jednostkowej masy ⁴⁴.

Mechanizm EPD, mimo wieloletniego powszechnego stosowania, nie został do końca zrozumiany ⁴⁴. Dotyczy to szczególnie drugiego etapu metody, agregacji i akumulacji cząstek na podłożu. Kilka hipotez jak neutralizacja cząstek lub ich koagulacja przez powstawanie jonów lub polimerów w wyniku reakcji elektrodowej, zostało odrzuconych jako główne powody depozycji. Najbardziej zaawansowana teoria zakłada, że osadzanie zachodzi przez zniekształcenie i zmniejszanie warstwy podwójnej w trakcie procesu, a następnie koagulacji cząstek pod wpływem przyłożonego pola elektrycznego (Rys. 2.11) ⁴⁴.



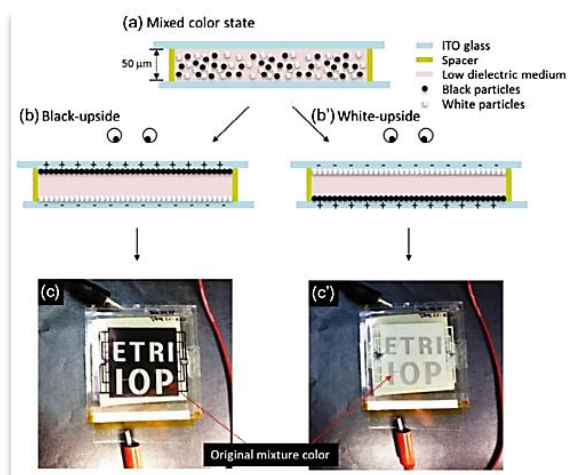
Rys. 2.11 Schemat cząstek i ich warstwy podwójnej **a)** w stabilnej zawieszynie, **b)** zniekształconej warstwy podwójnej przez działanie sił ścinających cieczy podczas ruchów elektroforetycznych cząstek w roztworze, **c)** zmiana stężenia jonów i cząstek po osadzeniu na powierzchni elektrody ⁴⁴.

EPD stosowano głównie do osadzania materiałów ceramicznych ⁴⁰. Jednak ostatnio wykorzystano tę metodę do tworzenia nowoczesnych, zaawansowanych materiałów. EPD jest metodą stosowaną do depozycji biomateriałów ⁴³, metali ⁴⁵, różnych odmian węgla, jak nanorurki ⁴⁶, grafen ⁴⁷, tlenek grafenu ⁴⁸ czy CB ⁴⁹⁻⁵¹. Rys. 2.12 przedstawia, jak bardzo złożone i skomplikowane podłoża mogą być modyfikowane tą metodą. W tym przypadku jest to pianka cynowa, którą stopniowo pokrywano różną ilością (przez regulację czasu osadzania) amorficznych nanocząstek węgla ⁵².



Rys. 2.12 Schemat pokrycia cynowej pianki, nanocząstkami węgla za pomocą metody EPD ⁵².

W ostatnim czasie CB stosuje się także w wyświetlaczach elektroforetycznych, w celu uzyskania głębokiego czarnego koloru. Na rys 2.13 przedstawiony jest schemat działania takiego czarno-białego wyświetlacza, skonstruowanego w oparciu o nanocząstki węgla i nanocząstki dwutlenku tytanu ⁴⁹.

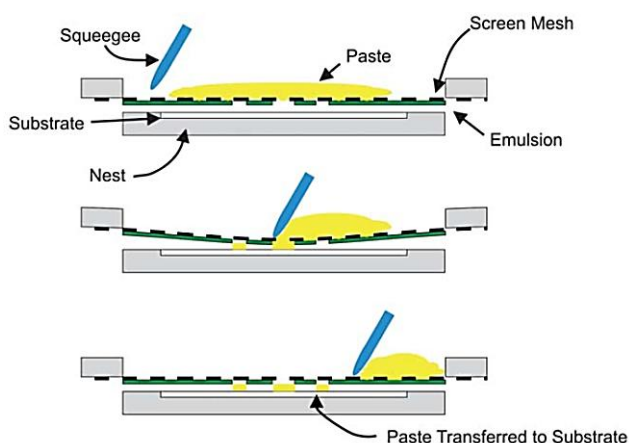


Rys. 2.13 Schemat działania (a,b,b') oraz zdjęcie (c,c') wyświetlacza elektroforetycznego ⁴⁹.

2.3 Metoda sitodruku

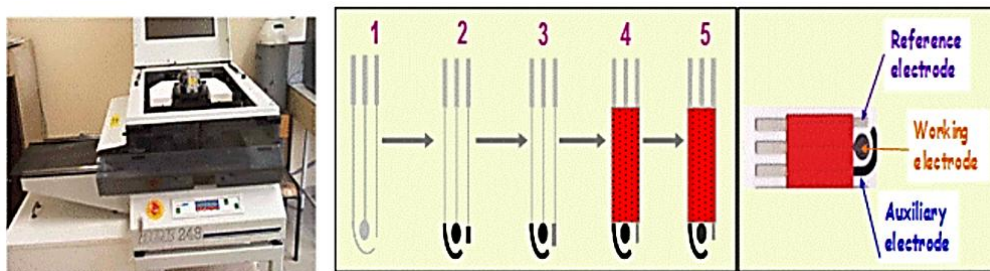
Sitodruk (ang. *screen-printing*, SP) jest starożytną metodą popularną zarówno ponad tysiąc lat temu, jak i dziś w sztuce, tekstyliach i reklamie ⁵³. Przez naukowców wykorzystywana jest do produkcji sensorów i obwodów elektronicznych. W latach osiemdziesiątych zaadoptowano ją do tworzenia sensorów amperometrycznych ⁵⁴. Otrzymywane tą metodą układy elektrochemiczne można łatwo zminiaturyzować co daje możliwość ich stosowania w warunkach polowych czy domowych. Metoda sitodruku pozwala na masową i taną produkcję elektrod, dzięki czemu mogą służyć jako jednorazowego użytku elementy urządzeń elektronicznych ^{55,56}.

Metoda druku sitowego polega na przetłaczaniu przez matrycę z dziurkami za pomocą rolki pasty drukarskiej, na podłoże umieszczone po drugiej stronie matrycy (Rys. 2.14) ⁵⁴.



Rys. 2.14 Schemat druku sitowego ⁵⁷.

W ten sposób, używając różnych matryc, sukcesywnie nakładane są kolejne warstwy wzoru. Pomiędzy drukiem dwóch różnych tuszy, stosuje się utwardzenie termiczne. Na końcu procesu nakładana jest nieprzewodząca warstwa, chroniąca przewodzące odprowadzenia elektrod. W rezultacie otrzymuje się trzy różne elektrody na małym fragmencie podłoża (ang. *screen-printed electrode*, SPE) (Rys. 2.15).



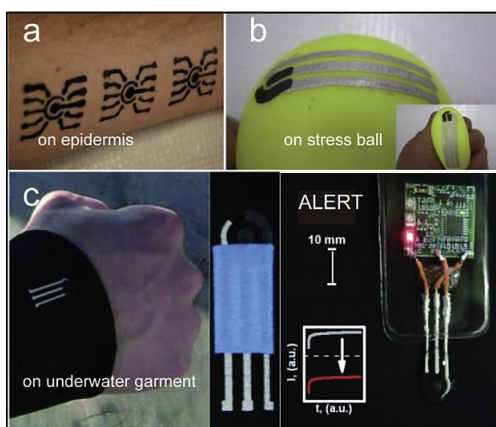
Rys. 2.15 Poszczególne etapy druku SPE oraz schemat takiej elektrody ⁵⁶.

Podłożem elektrod musi być materiał obojętny chemicznie w stosunku do nakładanych past, jak polichlorek winylu, poliwęglan, poliester, ceramika lub włókno szklane ⁵⁴. Matryce natomiast wykonywane są techniką fotolitograficzną z fotosyntetycznego żelu, nylonu, poliestru lub z siatki ze stali nierdzewnej ⁵⁴. Pasty stosowane do elektrod sitodrukowanych ogólnie dzieli się na dwa typy: przewodzące i dielektryki. Głównie stosuje się tusze oparte na węglu i srebro, rzadziej na złocie ⁵³. W celu poprawy adhezji, do past dodaje się mineralne lepiszcza lub nieprzewodzące polimery. Niestety mogą one oblepiać elektrochemicznie aktywne cząstki i blokować w ten sposób powierzchnię elektrody. W celu poprawy kinetyki przeniesienia elektronu stosuje się modyfikacje past różnymi materiałami: metalami szlachetnymi o właściwościach katalitycznych lub tańszymi nanocząstkami tlenku manganu czy tlenku bizmutu. Alternatywą jest wstępna obróbka elektrod mająca na celu usunięcie organicznego lepiszcza i rozwinięcia powierzchni, np. stosując elektrochemiczne anodyzowanie, przemiatając potencjałem, obróbkę plazmą (Ar, O₂, SF₆) lub metodą kompleksową, łączącą obróbkę chemiczną (nasączenie stężonym NaOH) i anodyzowanie ⁵³.

SPE są idealnym podłożem do modyfikacji nanomateriałami, mediatorami czy biocząsteczkami ⁵⁷, np. przez wprowadzenie ich do pasty, np. domieszkowanie mediatorami ⁵⁷ lub wydruk w całości np. grafenowej elektrody ⁵⁸. Domieszkowanie past jest nietrywialnym zadaniem, ponieważ zazwyczaj materiały te są trudno rozpuszczalne w rozpuszczalnikach stanowiących bazę past drukarskich ⁵⁹. Dlatego szczególnie rozwinęły się inne metody modyfikacji powierzchni SPE, jak osadzanie z kropli (ang. *drop-casting*). Przykładem może być osadzanie na SPE nanorurek modyfikowanych ftalocyjaniną kobaltu (CoPc) ⁶⁰. W przypadku nanocząstek metalicznych, a także niektórych mediatorów jak błękit pruski czy polimerów stosuje się osadzanie elektrochemiczne ⁵⁴.

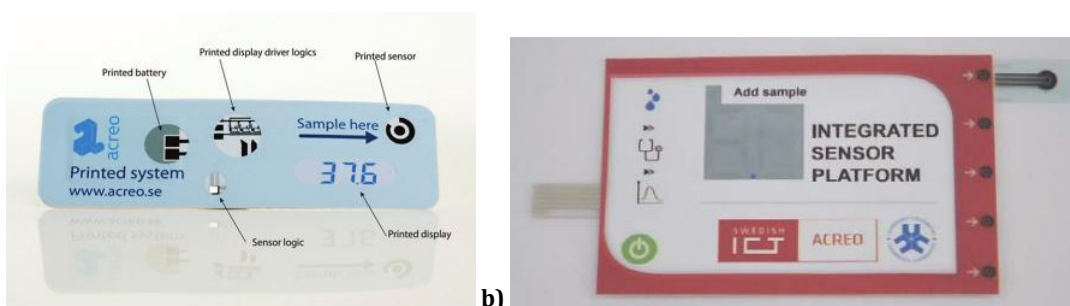
W biocujnikach, komponent biologiczny dodawany jest w różny sposób ^{54,61}. Najprostszą metodą jest ręczne osadzanie z kropli za pomocą pipety na wcześniej wydrukowanych platformach SPE. Nieco bardziej skomplikowane, ale także bardzo popularne jest elektrochemiczne pułapkowanie w matrycach. Kolejny sposób to wprowadzenie materiału biologicznego do pasty drukarskiej, wtedy najczęściej nadrukowuje się go w ostatnim etapie. Jednak ta metoda może wywoływać denaturyzację białek w trakcie procesu suszenia lub w kontakcie ze składnikami pasty.

Elektrody sitodrukowane mogą mieć wiele różnych konfiguracji i kształtów, co pozwala na ich dostosowanie do konkretnych potrzeb. Można je drukować nawet na elastycznych podłożach (Rys. 2.16).



Rys. 2.16 Zdjęcie SPE: **a)** trzy ośmioelektrodowe węglowe stemple na naskórku, **b)** wydrukowane na gumowej piłce, **c)** (po lewej) wydrukowane na neoprenowym skafandrze podwodnym, (po prawej) czujnik i potencjostat z diodą, która zapala się gdy w wodzie morskiej obecne są zanieczyszczenia ⁵³.

SPE stosowane są przede wszystkim do detekcji zanieczyszczeń środowiska, jak pestycydy, herbicydy, metale ciężkie ^{53,56} oraz diagnostyce klinicznej: do oznaczania cholesterolu, sekwencji DNA, narkotyków, etanolu i wielu innych ⁵⁴. Jednak najbardziej rozpowszechnione jest ich użycie do detekcji glukozy. Ma to związek z ekonomią i ogromnym rynkiem zbytu czujników do jej oznaczania, ponieważ diabetycy stanowią 85% całego rynku zapotrzebowania na biosensory ⁵⁵. Niewątpliwie wpływa to na szybki rozwój tych urządzeń. Komercyjne SPE do oznaczania glukozy dostępne są na rynku już od wielu lat. Dzisiaj już nie myśli się o drukowaniu pojedynczych elektrod, ale wyzwaniem stanowią kompleksowe, tanie, w całości drukowane urządzenia. Rys. 2.17a przedstawia wizualizację takiego testu ⁵⁵, natomiast Rys. 2.17b pokazuje zdjęcie pierwszego prototypu tego urządzenia przedstawionego w 2014 roku ⁶². Na jednej małej płytce w całości wydrukowano elementy niezbędne do działania platformy, a więc baterię, wyświetlacz, obwód oraz sensor amperometryczny jako element czuły na glukozę. Pomiar wykonywany jest w ciągu kilku sekund. Urządzenie to zapoczątkowuje nową rodzinę urządzeń analizy medycznej ⁵⁵.



Rys. 2.17 a) Wizualizacja w całości wydrukowanej platformy czujnikowej metodą sitodruku ⁵⁵, **b)** prototyp tak przygotowanego czujnika glukozy ⁶².

2.4 Bibliografia

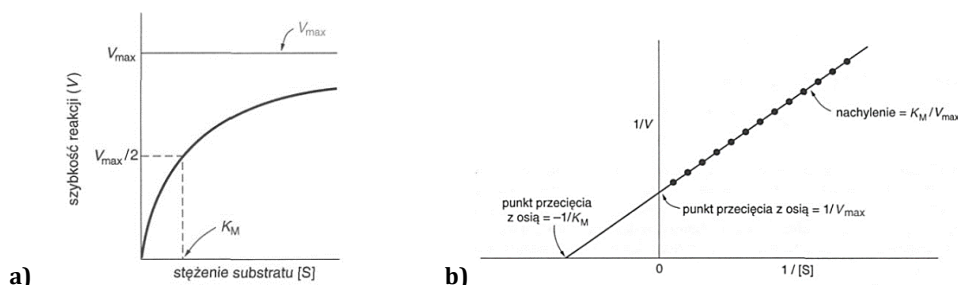
- (1) Macdonald, S. M.; Szot, K.; Niedziolka, J.; Marken, F.; Opallo, M. J. *Solid State Electrochem.* **2008**, *12*, 287–293.
- (2) Rozniecka, E.; Jonsson-Niedziolka, M.; Celebanska, A.; Niedziolka-Jonsson, J.; Opallo, M. *Analyst* **2014**, *139*, 2896–2903.
- (3) Iler, R. K. J. *Colloid Interface Sci.* **1966**, *21*, 569–594.
- (4) Decher, G. *Science (80-)*. **1997**, *277*, 1232–1237.
- (5) Michel, M.; Toniazzi, V.; Ruch, D.; Ball, V. *ISRN Mater. Sci.* **2012**, *2012*, 1–13.
- (6) Zhang, X.; Chen, H.; Zhang, H. *Chem. Commun.* **2007**, 1395–1405.
- (7) Decher, G.; Hong, J.-D. *Makromol. Chem., Macromol. Symp.* **1991**, *46*, 321–327.
- (8) Decher, G.; Hong, J. D. *Ber. Buns. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 1430–1434.
- (9) Decher, G.; Hong, J. D.; Schmitt, J. *Thin Solid Films* **1992**, *210-211*, 831–835.

- (10) Ariga, K.; Hill, J. P.; Ji, Q. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9*, 2319–2340.
- (11) Decher, G.; Schlenhoff, J. B. *Multilayer Thin Films: Sequential Assembly of Nanocomposite Materials, 2nd Edition*; Wiley-VCH, 2012.
- (12) Decher, G. Layer-by-Layer Assembly (Putting Molecules to Work). In *Multilayer Thin Films: Sequential Assembly of Nanocomposite Materials, 2nd Edition*; Decher, G., Schlenhoff, J. B., Eds.; 2012; pp 1–22.
- (13) Dubas, S. T.; Kumlangdudsana, P.; Potiyaraj, P. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2006**, *289*, 105–109.
- (14) Agarwal, M.; Lvov, Y.; Varahramyan, K. *Nanotechnology* **2006**, *17*, 5319–5325.
- (15) Correa-Duarte, M. A.; Kosiorek, A.; Kandulski, W.; Giersig, M.; Liz-Marza, L. M.; December, R. V.; Re, V.; Recci, M.; April, V.; Science, R. E. *Chem. Mater.* **2005**, *17*, 3268–3272.
- (16) Deng, Z. J.; Morton, S. W.; Ben-akiva, E.; Dreaden, E. C.; Shopsowitz, K. E.; Hammond, P. T. *ACS Nano* **2013**, *7*, 9571–9584.
- (17) Arnon, H.; Granit, R.; Porat, R.; Poverenov, E. *Food Chem.* **2015**, *166*, 465–472.
- (18) Fukuda, J.; Khademhosseini, A.; Yeh, J.; Eng, G.; Cheng, J.; Farokhzad, O. C.; Langer, R. *Biomaterials* **2006**, *27*, 1479–1486.
- (19) Srivastava, S.; Kotov, N. A. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1831–1841.
- (20) Xu, H.; Schönhoff, M.; Zhang, X. *Small* **2012**, *8*, 517–523.
- (21) Artyukhin, A. B.; Bakajin, O.; Stroeve, P.; Noy, A. *Langmuir* **2004**, *20*, 1442–1448.
- (22) Wu, G.; Zhang, X. Unconventional Layer-by-Layer Assembly for Functional Organic Thin Films. In *Polymer Thin Films*; Hashim, A. A., Ed.; InTech Published, 2010; pp 143–161.
- (23) Lee, D.; Rubner, M. F.; Cohen, R. E. *Nano Lett.* **2006**, *6*, 2305–2312.
- (24) Amiri, M.; Shahrokhian, S.; Psillakis, E.; Marken, F. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *593*, 117–122.
- (25) Amiri, M.; Shahrokhian, S.; Marken, F. *Electroanalysis* **2007**, *19*, 1032–1038.
- (26) Rassaei, L.; Bonne, M. J.; Sillanpa, M.; Marken, F. *New J. Chem.* **2008**, *32*, 1253–1258.
- (27) Szot, K.; Lesniewski, A.; Niedziolka, J.; Jönsson, M.; Rizzi, C.; Gaillon, L.; Marken, F.; Rogalski, J.; Opallo, M. *J. Electroanal. Chem.* **2008**, *623*, 170–176.
- (28) Szot, K.; Lynch, R. P.; Lesniewski, A.; Majewska, E.; Sirieix-Plenet, J.; Gaillon, L.; Opallo, M. *Electrochim. Acta* **2011**, *56*, 10306–10312.
- (29) Kundys, M.; Szot, K.; Rozniecka, E.; Jönsson-Niedziółka, M.; Lawrence, R.; Bull, S. D.; Marken, F.; Opallo, M. *Anal. Methods* **2014**, *6*, 7532–7639.
- (30) Szot, K.; Watkins, J. D.; Bull, S. D.; Marken, F.; Opallo, M. *Electrochem. Commun.* **2010**, *12*, 737–739.
- (31) Lesniewski, A.; Niedziolka-Jonsson, J.; Rizzi, C.; Gaillon, L.; Rogalski, J.; Opallo, M. *Electrochem. Commun.* **2010**, *12*, 83–85.
- (32) Lesniewski, A.; Paszewski, M.; Opallo, M. *Electrochem. Commun.* **2010**, *12*, 435–437.
- (33) Hao, E.; Yang, Z.; Zhanf, X.; Junqi, S.; Shen, J. *J. Mater. Commun.* **1998**, *8*, 1327–1328.
- (34) Zhang, L.; Wang, F.; Dong, S. *Electrochim. Acta* **2008**, *53*, 6423–6427.
- (35) Wang, L.; Guo, S.; Hu, X.; Dong, S. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2008**, *317*, 394–399.
- (36) Lee, S. W.; Kim, B.-S.; Chen, S.; Shao-Horn, Y.; Hammond, P. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 671–679.
- (37) Laurent, D.; Schlenhoff, J. B. *Langmuir* **1997**, *13*, 1552–1557.
- (38) Crespilho, F. N.; Zucolotto, V.; Osvaldo, N. O. J.; Nart, F. C. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2006**, *1*, 194–214.
- (39) Ariga, K.; Yamauchi, Y.; Rydzek, G.; Ji, Q.; Yonamine, Y.; Wu, K. C.-W.; Hill, J. P. *Chem. Lett.* **2014**, *43*, 36–68.
- (40) Corni, I.; Ryan, M. P.; Boccaccini, A. R. *J. Eur. Ceram. Soc.* **2008**, *28*, 1353–1367.
- (41) Besra, L.; Liu, M. *Prog. Mater. Sci.* **2007**, *52*, 1–61.
- (42) Sarkar, P.; Nicholson, P. S. *J. Am. Ceram. Soc.* **1996**, *79*, 1987–2002.
- (43) Boccaccini, A. R.; Keim, S.; Ma, R.; Li, Y.; Zhitomirsky, I. *J. R. Soc. Interface* **2010**, *7*, S581–S613.
- (44) Ferrari, B.; Moreno, R. *J. Eur. Ceram. Soc.* **2010**, *30*, 1069–1078.
- (45) Hsu, Y.-K.; Yang, J.-L.; Lin, Y.-G.; Chen, S.-Y.; Chen, L.-C.; Chen, K.-H. *Diam. Relat. Mater.* **2009**, *18*, 557–562.
- (46) Boccaccini, A. R.; Cho, J.; Roether, J. A.; Thomas, B. J. C.; Minay, J. E.; Shaffer, M. S. P. *Carbon N. Y.* **2006**, *44*, 3149–3160.
- (47) Li, Y.-T.; Qu, L.-L.; Li, D.-W.; Song, Q.-X.; Fathi, F.; Long, Y.-T. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *43*, 94–100.
- (48) Li, M.; Liu, Q.; Jia, Z.; Xu, X.; Shi, Y.; Cheng, Y.; Zheng, Y.; Xi, T.; Wei, S. *Appl. Surf. Sci.* **2013**, *284*, 804–810.
- (49) Kim, J. Y.; Oh, J.-Y.; Suh, K.-S. *Carbon N. Y.* **2014**, *66*, 361–368.
- (50) Modi, S.; Panwar, A.; Mead, J. L.; Barry, C. M. F. *Langmuir* **2013**, *29*, 9702–9711.
- (51) Modi, S.; Wei, M.; Mead, J. L.; Barry, C. M. F. *Langmuir* **2011**, *27*, 3166–3173.
- (52) Jeun, J.-H.; Kim, W.-S.; Hong, S.-H. *Mater. Lett.* **2013**, *112*, 109–112.
- (53) Li, M.; Li, Y.-T.; Li, D.-W.; Long, Y.-T. *Anal. Chim. Acta* **2012**, *734*, 31–44.
- (54) Jubete, E.; Loaiza, O. A.; Ochoteco, E.; Pomposo, J. A.; Grande, H.; Rodríguez, J. *J. Sensors* **2009**, *2009*, 1–13.
- (55) Turner, A. P. F. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 3184–3196.
- (56) Hayat, A.; Marty, J. L. *Sensors* **2014**, *14*, 10432–10453.
- (57) Metters, J. P.; Kadara, R. O.; Banks, C. E. *Analyst* **2011**, *136*, 1067–1076.
- (58) Ping, J.; Wu, J.; Wang, Y.; Ying, Y. *Biosens. Bioelectron.* **2012**, *34*, 70–76.
- (59) Shen, J.; Dudik, L.; Liu, C.-C. *Sensors Actuators B Chem.* **2007**, *125*, 106–113.
- (60) Jubete, E.; Zelechowska, K.; Loaiza, O. a.; Lamas, P. J.; Ochoteco, E.; Farmer, K. D.; Roberts, K. P.; Biernat, J. F. *Electrochim. Acta* **2011**, *56*, 3988–3995.
- (61) Albareda-Sirvent, M.; Merkoç, A.; Alegret, S. *Sensors Actuators B* **2000**, *69*, 153–163.
- (62) Turner, A. P. F.; Beni, V.; Gifford, R.; Norberg, P.; Arven, P.; Nilsson, D.; Åhlin, J.; Nordlinder, S. Gustafsson, G. Printed Paper- and Plastic-Based Electrochemical Instruments for Biosensors. In *24th Anniversary World Congress on Biosensors – Biosensors 2014, 27-30 May 2014, Melbourne, Australia. Elsevier.*

3. Enzymy

Enzymy są naturalnymi katalizatorami, przyspieszającymi reakcje chemiczne, nawet milionkrotnie. Niemal wszystkie są białkami, selektywnie wiążącymi substrat w odpowiedniej orientacji przestrzennej ¹. Przyspieszają ustalenie stanu równowagi procesu wytwarzając nową, korzystniejszą energetycznie drogę reakcji poprzez tworzenie przejściowego kompleksu enzym-substrat (ES). Wiązanie substratu zachodzi wyłącznie w miejscach specyficznych enzymu, tzw. centrach aktywnych. Zajmują one niewielką część całej cząsteczki i umiejscowione są w zagłębieniach i szczelinach, zazwyczaj niedostępnych dla cząsteczek wody jeżeli nie biorą one udziału w reakcji. Specyficzność enzymu ściśle zależy od ułożenia atomów w centrum aktywnym, gdyż substrat musi wykazać odpowiedni rozmiar i geometrię aby się do niego dopasować. Niekiedy pod wpływem oddziaływań z substratem możliwa jest zmiana konfiguracji centrum aktywnego. Większość enzymów (z wyjątkiem allosterycznych) wykazuje kinetykę reakcji zgodną z modelem Michaelisa-Menten. Szybkość reakcji enzymatycznej (V) zależy liniowo od małych stężeń substratu ($[S]$), natomiast dla dużych wartości $[S]$, obserwuje się wysycenie enzymu czyli obsadzenie wszystkich centrów aktywnych powodujące przebieg reakcji z maksymalną szybkością (V_{max}) (Rys. 3.1a). W takiej sytuacji dalsze zwiększanie stężenia $[S]$ nie ma na nią wpływu. Zależność szybkości reakcji od stężenia substratu opisuje równanie Lineweavera-Burka (Równ. 3.1) i wykres przedstawiony na Rys. 3.1b.

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_M}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} \quad (3.1)^1$$



Rys. 3.1 a) Zależność szybkości reakcji (V) od stężenia substratu ($[S]$), dla enzymu zachowującego się zgodnie kinetyką Michaelisa-Menten, **b)** wykres kinetyki enzymu jako zależność odwrotności szybkości reakcji ($1/V$) od odwrotności stężenia substratu ($1/[S]$), zwany (wykres Lineweavera-Burka) ¹.

Stała Michaelisa (K_M) w Równ. 3.1 określa stężenie substratu potrzebne do obsadzenia połowy miejsc aktywnych enzymu. Może też informować o sile wiązania w kompleksie ES. Duża wartość oznacza słabe wiązanie, natomiast mała – silne. Jej wielkość zazwyczaj mieści się w granicy 10^{-1} - 10^{-6} mol l^{-1} . Stałej K_M używa się także w celu określenia stopnia degeneracji enzymu po unieruchomieniu na elektrodzie. Można ją obliczyć także na podstawie elektrochemicznej wersji równania Lineweavera-Burka (Równ. 3.2). ²

$$\frac{1}{I_{ss}} = \frac{1}{I_{max}} + \frac{K_M}{I_{max}} \times \frac{1}{C} \quad (3.2)^2$$

I_{ss} – prąd stacjonarny rejestrowany po dodaniu substratu w eksperymencie chronamperometrycznym

I_{max} – maksymalny prąd, gdy enzym wysycony jest substratem

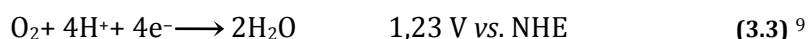
C – stężenie substratu w roztworze

Praca enzymu regulowana jest przez małe cząsteczki lub jony inhibitujące jego aktywność ¹. Podobnie działają też niektóre leki czy substancje toksyczne, jak jony

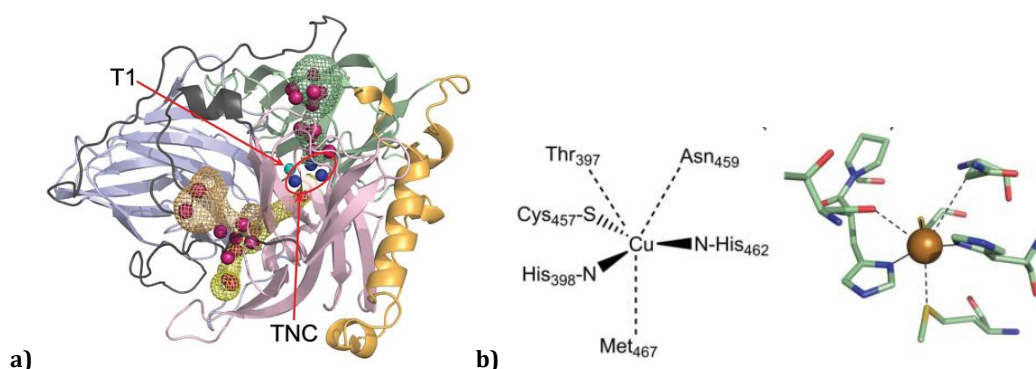
metali ciężkich, pestycydy czy gazy bojowe. Wyróżnia się dwa typy inhibicji, odwracalną i nieodwracalną. Inhibicja nieodwracalna polega na silnym, kowalencyjnym wiązaniu inhibitora, którego dysocjacja z miejsca aktywnego jest bardzo powolna. Natomiast, w inhibicji odwracalnej szybko ustala się równowaga enzym-inhibitor. Wyróżnia się dwie strategie działania takiego inhibitora: poprzez wiązanie w centrum aktywnym i blokowanie dostępu substratu (inhibicja kompetycyjna) albo przez wiązanie w miejscu innym niż centrum aktywne (inhibicja niekompetycyjna) ¹.

3.1 Oksydaza bilirubiny

Oksydaza bilirubiny jest wielomiedziowym enzymem, należącym do grupy oksydoreduktaz. Katalizuje utlenianie bilirubiny do biliwerdyny z jednoczesną redukcją cząsteczki tlenu do wody. Jej cechą charakterystyczną jest wysoka stabilność i aktywność w neutralnym, a nawet alkalicznym pH ^{3,4}. Masa cząsteczkowa BOD wynosi 52-64 kDa, a punkt izoelektryczny 4,2 ^{5,6}. Centrum aktywne zbudowane jest z jonów miedzi, pogrupowanych w klastry: T1, nazywany „niebieskim”, zawierający jon miedzi Cu²⁺; T2 (Cu²⁺) i T3 (Cu²⁺/Cu⁺), zawierające trzy jony miedzi połączone w jeden klaster T2/T3 (ang. *trinuclear centre*, TNC) ^{7,8} (Rys. 3.2). Centrum T1 pełni funkcję akceptora elektronów od substratu (bilirubiny lub elektrody), które następnie są przekazywane do centrum T2/T3, gdzie cząsteczka tlenu ulega czteroelektronowej redukcji do wody (Równ. 3.3).



Centrum aktywne T1, BOD izolowanej z grzybów *Myrothecium verrucaria*, posiada układ koordynacyjny o geometrii bipiramidy pseudotrygonalnej, zbudowanej z dwóch cząsteczek histydyny, jednej cysteiny, metioniny, asparaginy oraz treoniny (Rys. 3.2b) ¹⁰. Potencjał redoks centrum T1 wynosi ok. 670 mV vs. NHE dla BOD izolowanej z *M. verrucaria* oraz 650-750 vs. NHE dla izolowanego z *Trachyderma tsunodae*. Różnice te mogą wynikać z różnego otoczenia chemicznego klastra T1, np. zastąpienia metioniny fenyloalaniną ^{5,11}. Natomiast potencjał redoks centrum T2 wynosi około 390 mV vs. NHE ⁵.



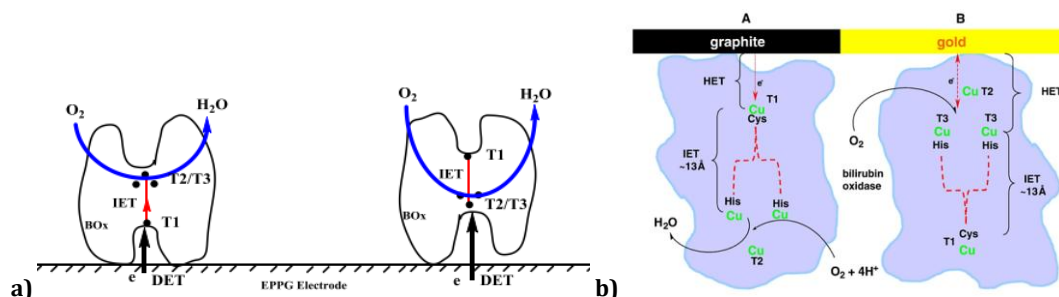
Rys. 3.2 a) Struktura oksydazy bilirubiny: błękitne kulki – centrum T1, niebieskie kulki – centrum T2/T3 (TNC), różowe kulki – cząsteczki wody, **b)** struktura centrum aktywnego T1 BOD, kulka złota-T1, Thr-treonina, Asn-asparagina, His-histydyna, Met-metionina, Cys-cysteina ¹⁰.

BOD wykazuje duże powinowactwo do cząsteczkowego tlenu, na co wskazuje niska wartość stałej Michaelisa dla reakcji redukcji tlenu ¹². Ze względu na zdolność do efektywnej katalizy tego procesu, BOD znajduje zastosowanie w bioogniwach paliwowych (glukozowo-tlenowe ¹³) jako ekologiczna alternatywa dla katalizatorów metalicznych, np. platyny ^{14,15}

oraz dla innego enzymu wielomiedziowego, lakazy ¹⁶. Problemy na jakie napotkano w trakcie konstrukcji wydajnej katody opartej na BOD, to między innymi konieczność stosowania mediatorów przeniesienia elektronu oraz utrata aktywności zaimmobilizowanego enzymu. Enzym jest dużą białkową cząsteczką i wymiana elektronu między ukrytymi głęboko centrami aktywnymi a elektrodą jest utrudniona. W tym przypadku z pomocą przyszły węglowe nanomateriały, których wielkość zbliżona jest do wielkości enzymu. Umożliwiły one eliminację mediatorów i zmniejszenie rozmiarów ogniwa. Nowe materiały elektrodowe oraz immobilizacja enzymu na powierzchni elektrody pozwoliły na rozwój ogniw implantowalnych w żywych organizmach ¹¹.

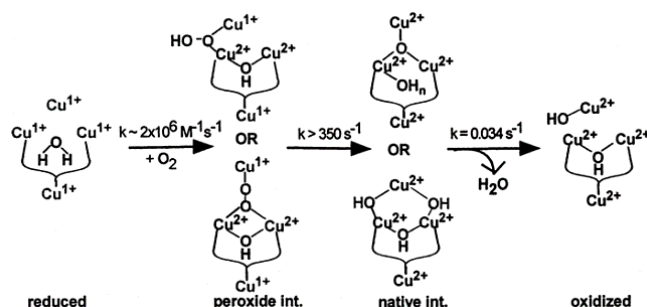
3.1.1 Bezpośrednie przeniesienie elektronu

Aktywność katalityczna enzymu zaadsorbowanego na powierzchni elektrody zależy od jego orientacji przestrzennej. Mogą występować co najmniej dwa przypadki ułożenia BOD (Rys. 3.3). W każdym z nich, wymiana elektronów przebiega w inny sposób, z innym sygnałem elektrochemicznym. Jeżeli centrum aktywne jest wystarczająco blisko elektrody, aby tunelowanie elektronów było możliwe (ok. 1 nm), wtedy mamy do czynienia z bezpośrednim przeniesieniem elektronu pomiędzy elektrodą a enzymem (ang. *direct electron transfer*, DET). Najkorzystniejsze jest takie położenie enzymu, aby T1 było w kontakcie z elektrodą i mogło przekazywać elektrony ścieżką cysteina-histydyna do T2/T3. Czasem jednak centrum T2/T3 przejmuje rolę akceptora elektronów gdy orientacja BOD wymusza takie działanie (Rys. 3.3) ¹⁷.



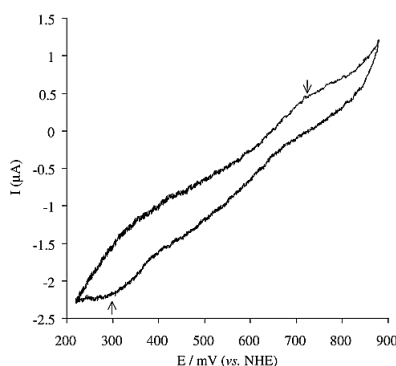
Rys. 3.3 a) Mechanizm bezpośredniego przeniesienia elektronu między elektrodą a centrum aktywnym BOD: T1 lub T2/T3 ¹⁸, **b)** szczegółowy mechanizm DET ¹⁷.

Mechanizm enzymatycznej redukcji tlenu najczęściej opisany jest następująco. Czteroelektronowa reakcja, zachodzi w dwóch, dwuelektronowych etapach (Rys. 3.4) ^{11,19}. Zredukowane jony Cu^+ centrum aktywnego, reagując z tlenem tworzą pośrednią strukturę nadtlenkową, która w drugim etapie redukowana jest do formy wodorotlenkowej. Forma ta ulega rozpadowi, pozostawiając centrum enzymu w formie utlenionej. O całkowitej szybkości procesu decyduje proces redukcji centrum T1 lub też utleniania substratu (przeniesienia elektronu od elektrody) ¹¹. Aby ułatwić ten etap ważny jest optymalny sposób immobilizacji enzymu na powierzchni elektrody.



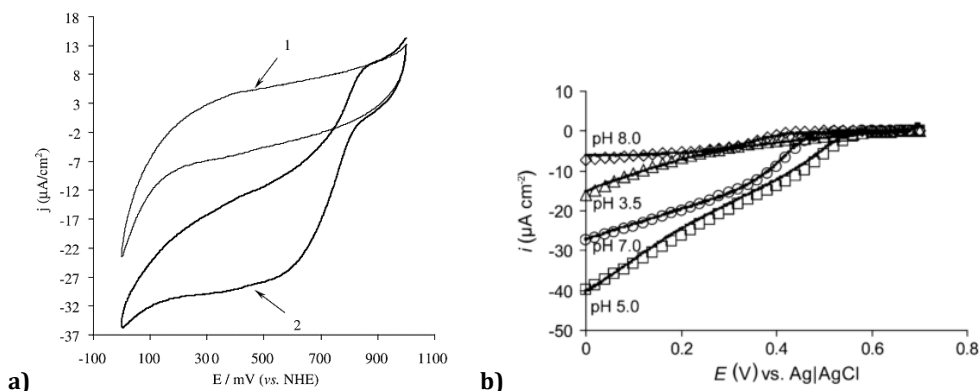
Rys. 3.4 Mechanizm redukcji tlenu w centrum aktywnym wielomiedziowych oksydoreduktaz ¹¹.

Za pomocą woltamperometrii cyklicznej zarejestrowano sygnał związany z przeniesieniem elektronu między elektrodą a zaadsorbowaną BOD, pochodzący od reakcji utleniania-redukcji jonu miedzi Cu^{2+} w centrum T1. Oszacowany na podstawie woltamperogramu, potencjał redoks centrum wynosi 515 mV i jest zbliżony do literaturowej wartości potencjału centrum aktywnego T1 ¹².



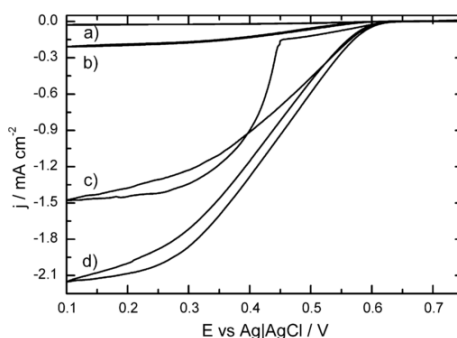
Rys. 3.5 Krzywa woltamperometryczna zarejestrowana na selektywnej elektrodzie membranowej zmodyfikowanej zaadsorbowaną BOD w nasyconym argonie 0,2 M buforze fosforanowym pH = 7,4, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$ ¹².

Modyfikacja elektrody enzymem BOD, np. przez adsorpcję z roztworu, znacząco zmniejsza nadpotencjał redukcji tlenu (Rys. 3.6a). Woltamperogram rejestrowany dla tego procesu ma charakterystyczny kształt fali, z potencjałem początkowym ok. 0,8 V. Na wielkość obserwowanego prądu i potencjału redukcji tlenu, silny wpływ wywiera pH elektrolitu. Dla BOD optymalne pH wynosi ok. 5, ale w środowisku obojętnym nadal widoczny jest silny efekt katalityczny, który praktycznie zanika w pH = 8 (Rys. 3.6b) ³.



Rys. 3.6 a) Krzywe woltamperometryczne zarejestrowane na elektrodzie grafitowej z zaadsorbowaną BOD, napowietrzony (0,26 mM O_2) 0,1 M bufor fosforanowo-cytrynowy pH = 4, $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$ ¹²,
b) krzywa woltamperometrii liniowej zmiany potencjału zarejestrowana na HOPG z zaadsorbowaną BOD w nasyconym tlenem 0,1 M buforze Britton-Robinson pH = 3,5, 5, 7 i 8, $\nu = 20 \text{ mV s}^{-1}$ ³.

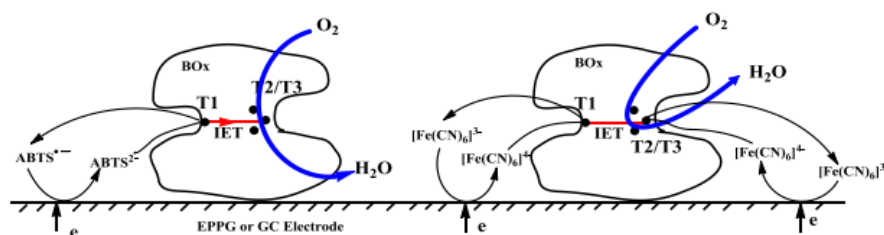
Jedną z największych gęstości prądu redukcji tlenu ²⁰, 2,15 mA cm⁻², uzyskano dla tzw. „oddychającej” elektrody wykonanej z papieru węglowego pokrytego matrycą polikrzemianową z SWCNT i BOD ²¹. Elektroda zapewnia jednoczesny kontakt z atmosferą oraz z elektrolitem. Rejestrowany prąd jest proporcjonalny do stężenia tlenu, a oddychająca elektroda zapewnia stały jego dopływ z atmosfery (Rys. 3.7).



Rys. 3.7 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na elektrodzie z papieru węglowego pokryta matrycą polikrzemianową zawierającą SWCNT i BOD w 0,1 M buforze McIlvaine’a pH = 4,8, od zewnętrznej strony elektrody włączano b) argon, c) powietrze, d) tlen; natomiast w a) argon, ale elektrolit również jest odtlony, $\nu = 1 \text{ mV s}^{-1}$ ²¹.

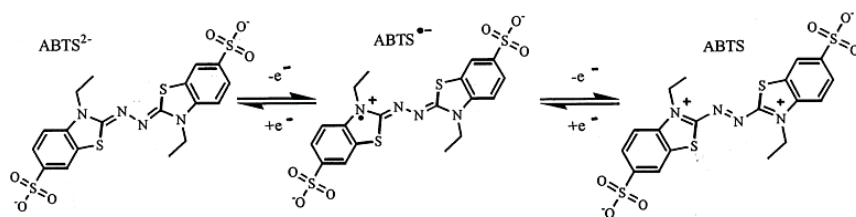
3.1.2 Pośrednie przeniesienie elektronu

Orientacja enzymu na elektrodzie może całkowicie uniemożliwić DET, gdy odległość centrum aktywnego od elektrody jest zbyt duża lub gdy dostęp do niego jest utrudniony (Rys. 3.8). W takim przypadku stosuje się związki redoks nazywane mediatorami zwiększające wydajność przeniesienia elektronu pomiędzy centrum aktywnym a elektrodą ¹¹. Funkcją taką pełni, np. ABTS²⁻ (dianion 2,2'-azynobis(3-etylobenzotioazolino-6-sulfonianowy) ^{17,22} czy syryngaldazyna ²³, a także związki kompleksowe metali, np. jony heksacyjanożelazianowe ¹⁷ (Rys. 3.8). Mediator może być dodany rozpuszczony w elektrolicie lub osadzony na elektrodzie. Potencjał, przy którym pojawia się prąd katalityczny, zależy od potencjału formalnego zastosowanego mediatora. W przypadku BOD, wartość bioelektrokatalitycznego prądu systematycznie maleje ze zmniejszaniem się różnicy pomiędzy potencjałem redoks redukcji tlenu ($E^{0}_{O_2/H_2O} = 0,615 \text{ V}$, pH = 7) a potencjałem formalnym mediatora ¹².



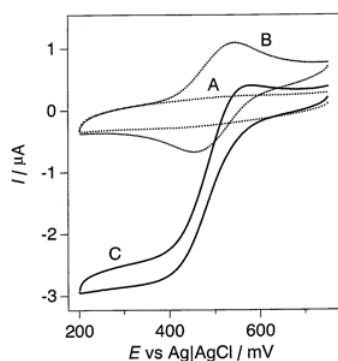
Rys. 3.8 Schemat pośredniego przeniesienia elektronu w trakcie redukcji tlenu katalizowanej przez BOD ¹⁷.

Utlenienie mediatora, ABTS²⁻ do ABTS^{•-}, zachodzi niezależnie od obecności tlenu, z pośrednim etapem tworzenia anionorodnika ABTS^{•-} (Równ. 3.4) ²².



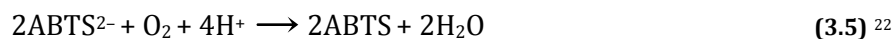
(3.4) ²²

Na woltamperogramie (B) na Rys. 3.8 widać wykształcone piki utleniania-redukcji $ABTS^{2-}/ABTS^{\bullet-}$.



Rys. 3.9 Krzywe woltamperometryczne zarejestrowane na GC (A) w nasyconym tlenem buforze fosforanowym pH = 7, (B) po dodaniu do (A) 0,25 mM $ABTS^{2-}$, (C) po dodaniu do (B) 0,11 μ M BOD, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ ²².

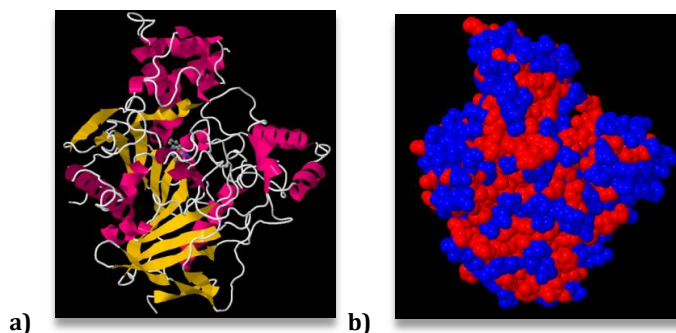
Po dodaniu BOD do elektrolitu, nastąpiła diametralna zmiana kształtu rejestrowanej krzywej (Rys. 3.9(C)). Pojawia się fala odpowiadająca katalitycznej redukcji tlenu wspomaganą mediatorem. Reakcja, podobnie jak w DET, ma czteroelektronowy charakter, po której następuje regeneracja mediatora zgodnie z reakcją ²²:



Dla $ABTS^{2-}$ wymianę elektronu obserwuje się pomiędzy centrum aktywnym T1 a elektrodą. Natomiast dla jonów heksacyjanożelazianowych możliwe jest przeniesienie elektronów zarówno pomiędzy obydwooma centrami T1 jak i T2/T3 (Rys. 3.8) ¹⁷, co powoduje wzrost wydajności reakcji enzymatycznej.

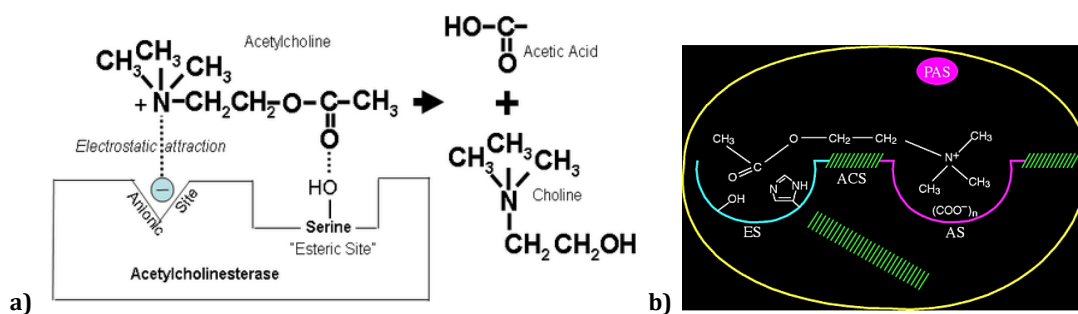
3.2 Acetylocholinoesteraza

Odkrycie nowego neuroprzekaźnika, acetylocholiny (ACh) w organizmach żywych, zaowocowało szybką identyfikacją enzymu katalizującego jego hydrolizę, acetylocholinoesterazy (AChE, Rys. 3.10) ²⁴. Podstawową funkcją AChE jest wygaszanie impulsów przenoszonych w synapsie cholinergiczej poprzez szybką hydrolizę ACh (Rys. 3.11a). Dlatego też, AChE posiada wyjątkową specyficzność substratową oraz bardzo wysoką liczbę obrotów ²⁵. Jest to enzym z grupy serynowych hydrolaz, który przez prowadzenie wszystkich etapów katalizy w zbliżonym tempie, uważany jest za ewolucyjnie perfekcyjny ²⁶. AChE wykazuje elipsoidalny kształt o rozmiarach 4,5 x 6,0 x 6,5 nm (Rys. 3.10) ²⁷. Ma właściwości amfifilowe, część cząsteczki jest hydrofilowa, a część hydrofobowa (Rys. 3.10b) ²⁸.



Rys. 3.10 Struktura AChE: **a)** wewnątrz struktury widoczna jest molekula liganda (inhibitora), **b)** kolory odpowiadają części hydrofilowym (niebieski) i hydrofobowym (czerwony) enzymu ²⁹.

Centrum aktywne AChE osadzone na dnie długiej (ok. 2 nm), wąskiej wnęki, zawiera katalityczną triadę: serynę, histydynę i kwas glutaminowy (Glu 327). W aktywnej katalitycznej wnęce występuje tryptofan oraz anionowe reszty aminokwasowe: kwasu glutaminowego (Glu 327 i Glu 199) oraz asparaginowego. Centrum aktywne AChE zawiera trzy główne domeny (Rys. 3.11a). W pierwszej, esterazowej (ang. *esteratic site*, ES), występuje aktywna seryna i histydyna. Druga domena, anionowa (ang. *anionic site*, AS), posiadająca od sześciu do dziewięciu ujemnych ładunków, oddalona jest od domeny pierwszej o ok. 0,47 nm. W niej wiązana jest czwartorzędowa grupa amoniowa pochodząca od ACh lub ligandów konkurencyjnych ²⁵. Trzecia, domena hydrofobowa, zbudowana z aminokwasów aromatycznych (ang. *aromatic site*, AS) odgrywa ważną rolę w wiązaniu grup arylowych substratu ²⁶. W AChE występuje też czwarta domena, usytuowana w odległości ok. 2 nm od centrum aktywnego, na obrzeżu wnęki, zwana peryferyjnym miejscem anionowym (ang. *peripheral anionic binding site*, PAS). Jest to strefa wiązania różnych ligandów. Funkcją PAS jest regulacja czynności centrum aktywnego, które w nadmiarze ACh hamuje (niekompetytywnie) aktywność katalityczną enzymu ³⁰.



Rys. 3.11 a) Oddziaływanie pomiędzy dodatnio naładowanym atomem azotu z ACh i anionowym miejscem z centrum aktywnego AChE oraz proces hydrolizy w centrum esterazowym, tworzenie choliny i kwasu octowego ³¹, **b)** struktura centrum aktywnego AChE ²⁵.

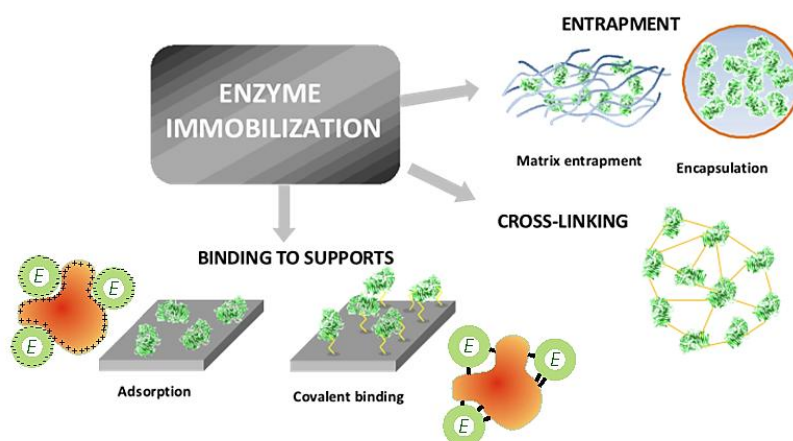
Poza funkcją katalityczną, AChE pełni w organizmie funkcje fizjologiczne: morfogenną i neuromodulacyjną oraz bierze udział w procesie hematopoezy. Badania wskazują, że funkcje te są powiązane z PAS, a zablokowanie centrum aktywnego nie wpływa na funkcje niekatalityczne AChE. Może natomiast prowadzić do nadprodukcji enzymu przez organizm ³⁰.

3.3 Wybrane metody unieruchamiania enzymów

W przemyśle spożywczym oraz kosmetycznym, enzymy stosowane są jako efektywne katalizatory, a ich unieruchomienie na podłożach stałych umożliwia znaczną redukcję kosztów. Okazało się, że taka immobilizacja dobrze wpływa na stabilność enzymów, które są wrażliwe na temperaturę i pH otoczenia. Umożliwia to lepszą kontrolę procesu, łatwe wydzielenie z produktów reakcyjnych oraz wielokrotne użycie katalizatora. Aktywność enzymów, która dość szybko maleje po wyizolowaniu z żywej komórki, może zostać znacznie wydłużona. Proces ten pozwala na pracę enzymów w rozpuszczalnikach organicznych, co rozszerza zakres ich stosowalności³²⁻³⁴.

Właściwości te wykorzystano nie tylko w technikach przemysłowych, ale także projektując czujniki czy ogniwa elektrochemiczne. Poza zmniejszeniem zużycia enzymu, immobilizacja pozwala na implantacje urządzeń w organizmach żywych (oddzielenie katalizatora od elektrolitu, brak wpływu na pacjenta)¹¹ oraz umożliwia powtarzalną, wydajną pracę urządzeń i ich miniaturyzację³⁵. Pomaga także zachować wysoką aktywność enzymu i zmniejsza opór transportu masy³⁶.

Wyróżnia się trzy podstawowe metody unieruchomienia enzymów: wiązanie do podłoża, pułapkowanie (kapsułkowanie) i sieciowanie (ang. *cross-linking*)^{33,37} (Rys. 3.12).



Rys. 3.12 Metody immobilizacji enzymów^{38,39}.

Wiązanie enzymu do podłoża może odbywać się za pomocą oddziaływań fizycznych (adsorpcja, oddziaływania elektrostatyczne, wiązanie jonowe, oddziaływania van der Waalsa i hydrofobowe) lub chemicznych (wiązania kowalencyjne). Adsorpcja fizyczna jest relatywnie prostą i tanią metodą, która nie wymaga chemicznej modyfikacji enzymu, dzięki czemu nie ulega on denaturacji. W tej metodzie substrat zanurzany jest do roztworu enzymu albo osadzany przez odparowanie z kropli enzymu⁴⁰. Jej ograniczeniem jest mała trwałość i wypłukiwanie enzymu z powierzchni, szczególnie w roztworach wodnych, dlatego metoda ta nadaje się przede wszystkim do stosowania w roztworach organicznych lub hydrofobowych⁴¹. Adsorpcję z powodzeniem użyto, np. do unieruchomienia AChE w czujniku na pestycydy⁴² czy do immobilizacji BOD^{17,43,44}.

Unieruchomienie przez tworzenie silnego wiązania kowalencyjnego między enzymem a podłożem jest jedną z częściej stosowanych metod i ma charakter nieodwracalny. Jej zaletą jest ograniczenie tendencji do wypłukiwania enzymu z powierzchni, szczególnie w roztworach wodnych oraz zmniejszenie ryzyka zanieczyszczenia biokatalizatora przez produkt reakcji. Wadą jest natomiast chemiczna modyfikacja enzymu. Do tworzenia wiązań

kowalencyjnych, wykorzystuje się przede wszystkim aminokwasy obecne w strukturze enzymu. Jednak aby katalizator był maksymalnie wydajny w reakcji nie powinny brać udziału ugrupowania kluczowe dla procesu katalitycznego^{37,45}. Metoda ta została użyta między innymi do skonstruowania bioczuJNIKA tlenu opartego na BOD⁴⁶, a także do immobilizacji AChE⁴⁷.

Inną nieodwracalną metodą jest pułapkowanie enzymu przez inkluzję w nieorganicznych lub organicznych polimerach. Znajduje ona zastosowanie ze względu na niski wpływ na strukturę i aktywność enzymu⁴⁸.

3.3.1 Immobilizacja enzymu przez pułapkowanie w matrycy polikrzemianowej

Do pułapkowania enzymu w matrycy polikrzemianowej wykorzystuje się metodę żel-żel. Za początek jej rozwoju uważa się lata dziewięćdziesiąte XX wieku⁴⁹. Umożliwiła ona połączenie ceramiki, szkła i innych nieorganicznych materiałów z bioaktywnymi molekułami, głównie dzięki syntezie odbywającej się w temperaturze pokojowej, korzystnej dla enzymów^{49,50}. Okazało się, że taka immobilizacja nie powoduje denaturacji biocząsteczek. Jest to zaskakujące, biorąc pod uwagę dużą reaktywność chemiczną stosowanych monomerów (alkoksylany metali i półmetali) oraz kurczenie żelu wywołujące nacisk na strukturę białkową, która może się zmienić i wpłynąć na dostępność centrów aktywnych⁴⁹. Unieruchomienie w matrycy polikrzemianowej okazało się wszechstronną, nietoksyczną i taną metodą⁵¹. Do jej zalet można zaliczyć: rozwiniętą i porowatą powierzchnię, termiczną stabilność, odporność na fotodegradację i degradację elektrochemiczną, brak konieczności użycia światła indukującego proces, a ponadto transparentność dla światła UV-Vis, kontrolę przewodnictwa przez dobór monomeru oraz możliwość modyfikacji chemicznej⁴⁹. Należy wspomnieć także o wadach takiej immobilizacji, jakimi są: kruchość, wąskie pory matrycy, wpływające na kinetykę reakcji i dyfuzję dużych molekuł, wymywanie enzymu z matrycy⁴⁹.

Metoda nazywana żelowym kapsułkowaniem lub pułapkowaniem polega na budowaniu porowatej struktury przez chemiczną kondensację, np. polikrzemianów wokół enzymu, który w tym przypadku pełni rolę szablonu (Rys. 3.13)⁵². W konsekwencji otrzymuje się matrycę z enzymem zamkniętym w małych lub większych porach w zależności od tego, czy nastąpiła agregacja. Pory takie muszą być wystarczająco duże aby enzym miał możliwość zmiany konformacji w trakcie cyklu katalitycznego. Matryca musi umożliwiać dyfuzję substratu i produktu do biomolekuły⁵².

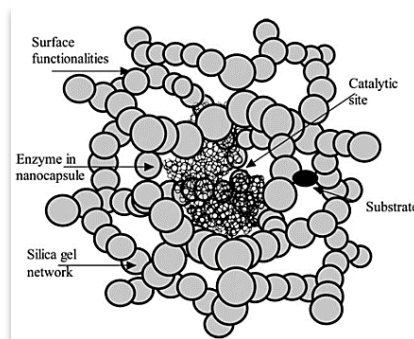


Fig. 3.13 Porowata struktura żelu otaczająca enzym⁵².

Jedną z częściej używanych i szeroko badaną była matryca zbudowana z sieci SiO₂ syntezowana z Na₂SiO₃ (szkło wodne)⁵². Jednak dziś do syntezy matryc najczęściej wykorzystuje się alkoksylany metali, ze względu na łatwość tworzenia dużej, porowatej

struktury, możliwość funkcjonalizacji powierzchni oraz łagodne warunki syntezy. Typowymi prekursorami procesu zol-żel są alkoksylany krzemu, jak tetraalkilokrzemiany $\text{Si}(\text{OR})_4$, czy organoalkilokrzemiany $\text{R}'_{(4-x)}\text{Si}(\text{OR})_x$, gdzie: $x = 1-4$, a R jest grupą funkcyjną (R: CH_3 -, C_2H_5 -, C_6H_5 -, R': CH_3 -, C_2H_5 -, C_6H_5 -, etc.)⁵¹. Proces zol-żel składa się z dwóch etapów: hydrolizy oraz często biegnącej równolegle, kondensacji i polikondensacji w obecności cząsteczek enzymu (Rys. 3.14).

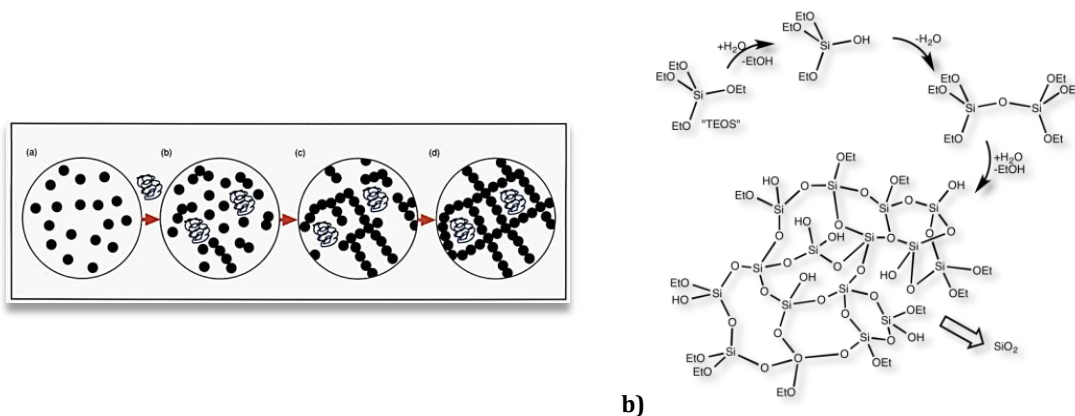
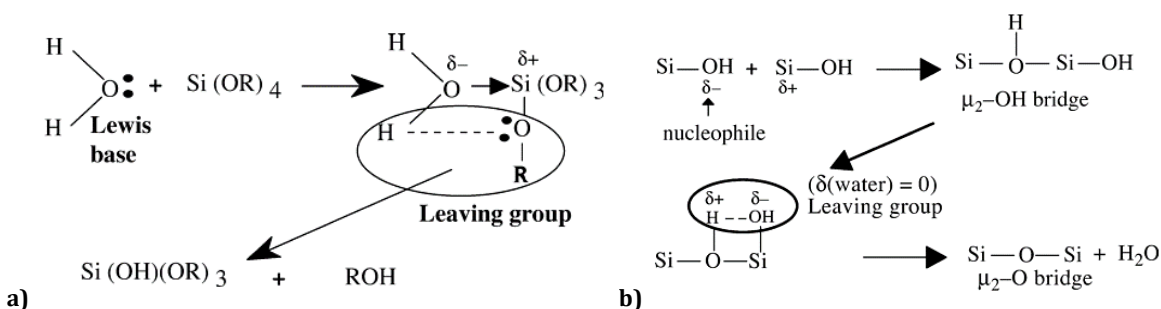


Fig. 3.14 a) (a) Formowanie cząstek zolu podczas wstępnej hydrolizy i kondensacji, (b) dodanie enzymu do zolu, (c) formowanie i wzrost sieci polikrzemianowej, początek pułapkowania protein, (d) enzym w matrycy polikrzemianowej⁵³, **b)** schemat procesu zol-żel z użyciem tetraetoksyilanu, TEOS⁵⁴.

Alkoksylany krzemu charakteryzują się obecnością polarnego wiązania kowalencyjnego, Si-O. Transformacja do formy żelowej zachodzi najczęściej w obecności macierzystego alkoholu, np. metanolu czy etanolu. Użycie odpowiedniego rozpuszczalnika jest dość istotne, ponieważ polarny i protyczny może rywalizować z wodą w reakcji substytucji liganda, która zachodzi w cząsteczce prekursora i odpowiada za proces żelowania⁵². Natura rozpuszczalnika ważna jest także ze względu na enzym, który pod jego wpływem może tracić aktywność. W pierwszym etapie zachodzi hydroliza, która prowadzi do wymiany liganda -OR na grupę -OH (Rys. 3.15a). Po tej reakcji następuje kondensacja, czyli tworzenie trójwymiarowej, żelowej struktury polikrzemianowej SiO_2 z lukami, w których usytuowany jest enzym (Rys. 3.15b).

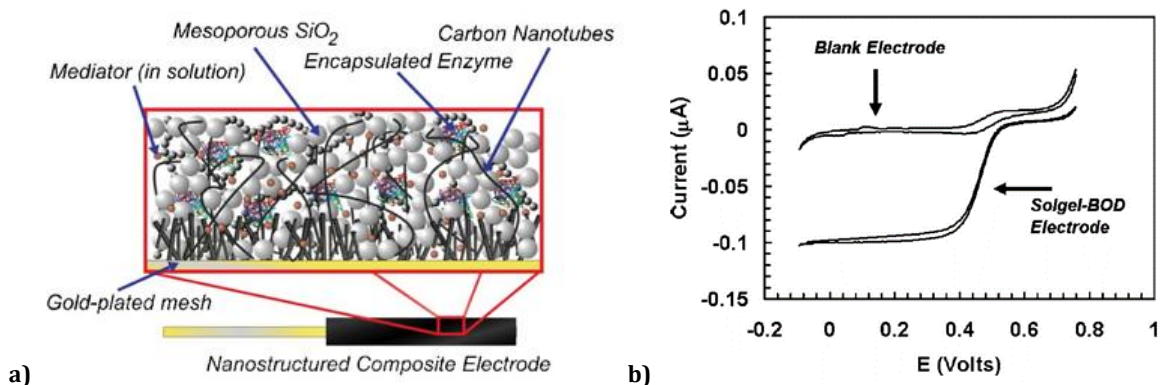


Rys. 3.15 Mechanizm procesu zol-żel: **a)** reakcja hydrolizy, **b)** reakcja kondensacji⁵².

Dla prekursorów zawierających ugrupowanie Si-O, mechanizm hydrolizy uzależniony jest od ataku nukleofilowego na atom krzemu. Atak ten zależy natomiast, od cząstkowego ładunku atomu, który dla krzemu jest niewielki ($\delta^+ = 0,32$ w $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$) w porównaniu do innych metali, np. cyrkonu, $\delta^+ = 0,65$ w $\text{Zr}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ ⁵². Dlatego też, atak nukleofilowy wody z atomem tlenu o cząstkowym ładunku ujemnym, nie jest tak łatwy, jak w przypadku alkoksylanów metali przejściowych. Powoduje to małą szybkość reakcji hydrolizy i kondensacji oraz konieczność stosowania katalizatorów reakcji. Mogą być to kwasy (np. H^+), które przez silny ładunek dodatni zdolne są do ataku na atom tlenu, albo zasady z silnym ładunkiem ujemnym

(np. OH⁻; także silne zasady Lewisa jak F⁻). W tym przypadku obie reakcje, hydrolizy i kondensacji mogą być kontrolowane oddzielnie. W zależności od szybkości tych procesów można uzyskać różne rodzaje żelu. W sytuacji, gdy szybkość hydrolizy jest większa i dodawany jest kwasowy katalizator, otrzymuje się strukturę podobną do polimerowego lub organicznego żelu. W przypadku katalizatorów zasadowych, gdy kondensacja przebiega szybciej, powstaje zwarta struktura polikrzemianowych cząstek i żelu. W przypadku pułapkowania enzymów wrażliwych na kwaśne środowisko, proces ten dzieli się na dwie części, najpierw przeprowadza się hydrolizę i wstępną kondensację prekursora bez obecności enzymu. Następnie dodaje się jego roztwór w buforze o pH optymalnym dla jego wydajnej aktywności (Rys. 3.14). Dla niektórych enzymów, czynnikiem denaturującym może być także alkohol używany na etapie hydrolizy ⁵⁵.

Proces zol-żel znajduje zastosowanie do modyfikacji elektrod zarówno biomolekułami jak i nanomateriałami. Przykładem może być BOD kapsułkowana w matrycy tetrametoksylanu (TMOS), osadzona na elektrodzie z CNT ⁵⁶ (Rys. 3.16a). Na Rys. 3.16b przedstawiono krzywe woltamperometryczne, wydajnej katalitycznej redukcji tlenu przez tak zaimmobilizowaną BOD. Elektroda taka posłużyła do zbudowania bioogniwa tlenowo-glukozowego ⁵⁶.



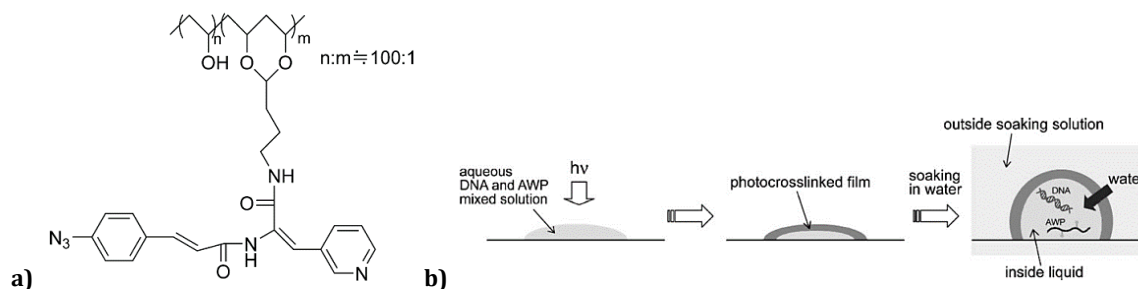
Rys. 3.16 a) Schemat elektrody z BOD unieruchomioną w matrycy polikrzemianowej, **b)** krzywe woltamperometryczne zarejestrowane na elektrodzie złotej pokrytej CNT i BOD unieruchomioną w matrycy polikrzemianowej oraz na elektrodzie bez enzymu, 0,125 mM ABTS²⁻, nasycony tlenem fizjologiczny bufor fosforanowy pH = 7,2, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$ (E vs. Ag|AgCl) ⁵⁶.

3.3.2 Immobilizacja enzymu przez pułapkowanie w alkoholu poliwinylowym

Pułapkowanie enzymów w matrycach utworzonych z polimerów organicznych jest kolejną dogodną metodą immobilizacji ⁵⁷. Trójwymiarowa sieć otaczająca cząsteczki enzymu zazwyczaj tworzona jest przez sieciowanie naturalnych polimerów, jak kappa karagenu czy alginianów. Stosowanie syntetycznych polimerów jak poliakryloamid lub poliuretan, niesie wiele korzyści jak duża wytrzymałość i chemiczna oporność. Jednakże proces polimeryzacji często powoduje utratę aktywności katalitycznej enzymów w wyniku wysokiej aktywności półproduktów lub toksyczność monomerów ⁵⁷. Aby temu zapobiec wprowadzono metodę immobilizacji opartą na prepolimerze. Metoda ta, polega na wstępnej syntezie polimerowej struktury matrycy, prepolimeru, który następnie miesza się z enzymem i na drodze reakcji sieciowania cząsteczek prepolimeru, tworzy się trójwymiarowa struktura zamykająca wewnątrz molekuły enzymu ⁵⁷.

Obiecującym materiałem stosowanym do unieruchamiania enzymów jest alkohol poliwinylowy (ang. *polivinył alkohol*, PVA). To syntetyczny hydrożel, posiadający wyjątkowe

właściwości biokompatybilne, elastyczne oraz higroskopijne. Dzięki temu, że jest stosowany nawet do produkcji soczewek kontaktowych i w operacjach ścięgien⁵⁸. Do unieruchomienia biomolekuł w PVA stosuje się m.in. fotoczuły, rozpuszczalny w wodzie prepolimer, zawierający ugrupowania azydkowe (ang. *azide-unit pendant water-soluble photopolymer*, AWP) (Rys. 3.17)⁵⁹. Polimeryzacja PVA-AWP inicjowana i kontrolowana jest przez światło UV⁵⁸. W trakcie procesu, arylowe grupy azydkowe ulegają fotopolimeryzacji zamykając w matrycy cząsteczki enzymu.



Rys. 3.17 a) Struktura polimeru PVA-AWP, **b)** efekt pęcznienia usieciowanego polimeru pod wpływem wody⁵⁹.

Metoda ta wymaga wstępnej hydratacji substratu, ze względu na to, że PVA-AWP pełni rolę półprzepuszczalnej membrany. Przez ciśnienie osmotyczne wywołane wyższym stężeniem jonowego polimeru w matrycy, woda dyfunduje do jej wnętrza powodując ekspansję żelu (Rys. 3.17b)⁵⁹. Pęcznienie takiej matrycy, daje przestrzeń enzymowi do przyjęcia najlepszej konformacji i zapewnia efektywną katalizę.

Polimer PVA-AWP okazał się dobrym, stabilnym materiałem do immobilizacji enzymu AChE i przygotowania sensora do oznaczania pestycydów takich jak np. chlorfenwinfos⁶⁰ czy okson chlorfenwinfosu^{60,61} oraz metylparaoksonu i dichlorfosu⁶².

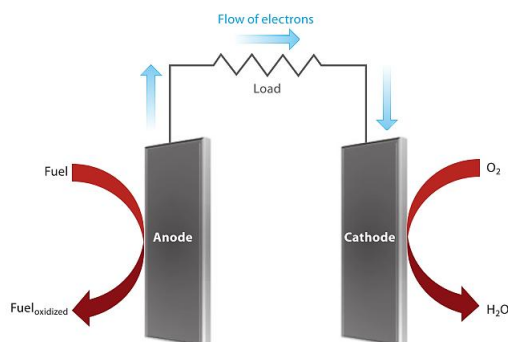
3.4 Bibliografia

- (1) Stryer, L. *Biochemia*; 2003.
- (2) Zhang, X.; Ju, H.; Wang, J. *Electrochemical Sensors, Biosensors and Their Biomedical Applications*; 2008.
- (3) Otsuka, K.; Sugihara, T.; Tsujino, Y.; Osakai, T.; Tamiya, E. *Anal. Biochem.* **2007**, *370*, 98–106.
- (4) Sulistyaningdyah, W. T.; Ogawa, J.; Tanaka, H.; Maeda, C.; Shimizu, S. *FEMS Microbiol. Lett.* **2004**, *230*, 209–214.
- (5) Christenson, A.; Shleev, S.; Mano, N.; Heller, A.; Gorton, L. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1757*, 1634–1641.
- (6) Salaj-Kosla, U.; Pöllner, S.; Beyl, Y.; Scanlon, M. D.; Beloshapkin, S.; Shleev, S.; Schuhmann, W.; Magner, E. *Electrochem. Commun.* **2012**, *16*, 92–95.
- (7) Shleev, S.; Tkac, J.; Christenson, A.; Ruzgas, T.; Yaropolov, A. I.; Whittaker, J. W.; Gorton, L. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *20*, 2517–2554.
- (8) Solomon, E. I.; Penfield, K. W.; Gewirth, A. A.; Lowery, M. D.; Shadle, S. E.; Guckert, J. A.; Lacroix, L. B. *Inorganica Chim. Acta* **1996**, *243*, 67–78.
- (9) Brocato, S.; Lau, C.; Atanassov, P. *Electrochim. Acta* **2012**, *61*, 44–49.
- (10) Cracknell, J. A.; McNamara, T. P.; Lowe, E. D.; Blanford, C. F. *Dalt. Trans.* **2011**, *40*, 6668–6675.
- (11) Barton, S. C.; Gallaway, J.; Atanassov, P. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 4867–4886.
- (12) Shleev, S.; Elkasmi, A.; Ruzgas, T.; Gorton, L. *Electrochem. Commun.* **2004**, *6*, 934–939.
- (13) Mano, N.; Mao, F.; Heller, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12962–12963.
- (14) Cracknell, J. A.; Vincent, K. A.; Armstrong, F. A. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2439–2461.
- (15) Willner, I.; Yan, Y.-M.; Willner, B.; Tel-Vered, R. *Fuel Cells* **2009**, *9*, 7–24.
- (16) Opallo, M.; Bilewicz, R. *Adv. Phys. Chem.* **2011**, *2011*, 1–21.
- (17) Li, D.; Okajima, T.; Mao, L.; Ohsaka, T. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2014**, *9*, 1390–1398.
- (18) Ramírez, P.; Mano, N.; Andreu, R.; Ruzgas, T.; Heller, A.; Gorton, L.; Shleev, S. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1777*, 1364–1369.
- (19) Palmer, A. E.; Lee, S. K.; Solomon, E. I. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6591–6599.
- (20) Navae, A.; Salimi, A.; Jafari, F. *Chem. A Eur. J.* **2015**, *21*, 4949–4953.
- (21) Zloczewska, A.; Jönsson-Niedziolka, M. *J. Power Sources* **2013**, *228*, 104–111.
- (22) Tsujimura, S.; Tatsumi, H.; Ogawa, J.; Shimizu, S.; Kano, K. *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *496*, 69–75.
- (23) Nogala, W.; Rozniecka, E.; Rogalski, J.; Opallo, M. *J. Electroanal. Chem.* **2007**, *608*, 31–36.
- (24) Soreq, H.; Seidman, S. *Nat. Rev. Neurosci.* **2001**, *2*, 294–302.
- (25) Dvir, H.; Silman, I.; Harel, M.; Rosenberry, T. L.; Sussman, J. L. *Chem. Biol. Interact.* **2011**, *187*, 10–22.

- (26) Quinn, D. M. *Chem. Rev.* **1987**, *87*, 955–979.
- (27) Sussman, J. L.; Silman, I. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1992**, *2*, 721–729.
- (28) Bukowska, B.; Pieniazek, D.; Hutniki, K.; Duda, W. *Curr. Top. Biophys.* **2007**, *30*, 11–23.
- (29) http://rcsb.org/pdb/101/motm_discussed_entry.do?id=1acj.
- (30) Gralewicz, S. *Med. Pr.* **2006**, *57*, 291–302.
- (31) <http://www.atsdr.cdc.gov/csem/csem.asp?csem=11&po=23>.
- (32) Cao, L. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 217–226.
- (33) Sheldon, R. A. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1289–1307.
- (34) Mateo, C.; Palomo, J. M.; Fernandez-Lorente, G.; Guisan, J. M.; Fernandez-Lafuente, R. *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40*, 1451–1463.
- (35) Schuhmann, W.; Kranz, C.; Huber, J.; Wohlschläger, H. *Synth. Met.* **1993**, *61*, 31–35.
- (36) Wang, X.; Uchiyama, S. State of the Art in Biosensors - General Aspects. Chapter 3 Polymers for Biosensors Construction. In *State of the Art in Biosensors - General Aspects*; INTECH, 2013.
- (37) Brena, B.; González-Pombo, P.; Batista-Viera, F. *Methods Mol. Biol.* **2013**, *1051*, 15–31.
- (38) <http://www.franciscopouloulab.eu/p/research-lines.html>.
- (39) <http://www1.lsbu.ac.uk/water/enztech/immethhod.html>.
- (40) Datta, S.; Christena, L. R.; Rajaram, Y. R. S. *3 Biotech* **2012**, *3*, 1–9.
- (41) Brady, D.; Jordaan, J. *Biotechnol. Lett.* **2009**, *31*, 1639–1650.
- (42) Bonnet, C.; Andreescu, S.; Marty, J.-L. *Anal. Chim. Acta* **2003**, *481*, 209–211.
- (43) Nogala, W.; Celebanska, A.; Szot, K.; Wittstock, G.; Opallo, M. *Electrochim. Acta* **2010**, *55*, 5719–5724.
- (44) Nogala, W.; Celebanska, A.; Wittstock, G.; Opallo, M. *Fuel Cells* **2010**, *10*, 1157–1163.
- (45) Nisha, S.; S, A. K.; Gobi, N. **2012**, *1*, 148–155.
- (46) Pita, M.; Gutierrez-Sanchez, C.; Toscano, M. D.; Shleev, S.; De Lacey, A. L. *Bioelectrochemistry* **2013**, *94*, 69–74.
- (47) Barshan-Tashnizi, M.; Ahmadian, S.; Niknam, K.; Torabi, S.-F.; Ranaei-Siadat, S.-O. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2009**, *52*, 257–264.
- (48) Hanefeld, U.; Gardossi, L.; Magner, E. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 453–468.
- (49) Avnir, D.; Braun, S.; Lev, O.; Ottolenghit, M. *Chem. Mater.* **1994**, *6*, 1605–1614.
- (50) Braun, S.; Rappoport, S.; Zusman, R.; Avnir, D.; Ottolenghi, M. *Mater. Lett.* **2007**, *61*, 2843–2846.
- (51) Preda, G.; Bizerea, O. S.; Vlad-oros, B. Sol-Gel Technology in Enzymatic Electrochemical Biosensors for Clinical Analysis. In *Biosensors for Health, Environmental and Biosecurity*; Serra, P. P. A., Ed.; InTech, 2011.
- (52) Pierre, A. C. *Biocatal. Biotransformation* **2004**, *22*, 145–170.
- (53) Dave, B. C.; Dunn, B.; Valentine, J. S.; Zink, J. I. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 1120A – 1127A.
- (54) <http://en.wikipedia.org/wiki/Sol-gel>.
- (55) Brinker, C. J. *J. Non-Crystalline Solids* **1988**, *100*, 31–50.
- (56) Lim, J.; Malati, P.; Bonet, F.; Dunn, B. *J. Electrochem. Soc.* **2007**, *154*, A140–A145.
- (57) Uhlich, T.; Ulbricht, M.; Tomaschewski, G. *Enzyme Microb. Technol.* **1996**, *19*, 124–131.
- (58) Schmedlen, R. H.; Masters, K. S.; West, J. L. *Biomaterials* **2002**, *23*, 4325–4332.
- (59) Ishizuka, N.; Hashimoto, Y.; Matsuo, Y.; Ijio, K. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2006**, *284-285*, 440–443.
- (60) Galezowska, A.; Sikora, T.; Istamboulie, G.; Trojanowicz, M.; Polec, I.; Nunes, G. S.; Noguier, T.; Marty, J. *Sensors and Mater.* **2008**, *20*, 299–308.
- (61) Istamboulie, G.; Sikora, T.; Jubete, E.; Ochoteco, E.; Marty, J.-L.; Noguier, T. *Talanta* **2010**, *82*, 957–961.
- (62) Valdés-Ramírez, G.; Cortina, M.; Ramírez-Silva, M. T.; Marty, J.-L. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *392*, 699–707.

4. Bioogniwa paliwowe

Bioogniwa paliwowe (ang. *biofuel cell*, BFC) to urządzenia zdolne do bezpośredniej przemiany energii chemicznej w elektryczną za pośrednictwem procesów elektrochemicznych z udziałem szlaków biochemicznych¹. Podobnie do tradycyjnego ogniwa paliwowego, BFC zbudowane jest z anody, na której zachodzi utlenianie paliwa w sposób ciągły oraz katody, na której zachodzi proces redukcji utleniacza (Rys. 4.1)². Różnica pomiędzy bioogniwem a ogniwem, polega na tym, że metaliczne katalizatory zastąpiono ich biologicznymi odpowiednikami, takimi jak enzymy, drobnoustroje czy organelle komórkowe^{2,3}.



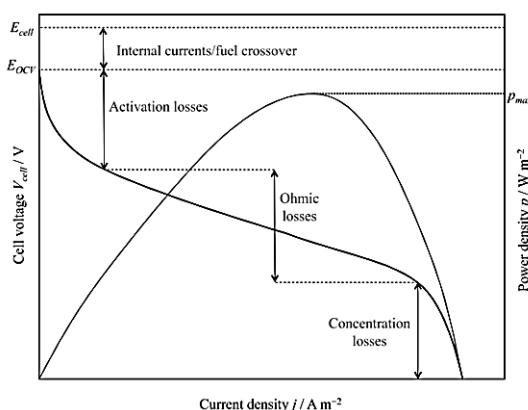
Rys. 4.1 Ogólny schemat ogniwa paliwowego przedstawiający utlenianie paliwa, redukcję tlenu oraz przepływ elektronów przez opornik².

Historia bioogniw paliwowych sięga roku 1870, kiedy to Galvani wykonał pierwszy eksperyment wiążący elektryczność z biologią, dokonując jednocześnie słynnego odkrycia – wpływu prądu elektrycznego (wówczas generowanego z maszyny elektrostatycznej) na skurcz wypreparowanej żabiej nogi¹. Doświadczenie to zrewolucjonizowało wiedzę o systemie nerwowym człowieka. Początek prac nad BFC odnotowano w 1911 roku, gdy Potter najpierw zaprezentował produkcję prądu elektrycznego przez bakterie *Escherichia coli* i *Sacharomyces* na platynowych elektrodach¹, a w 1912 pokazał pierwsze bioogniwo wykorzystujące komórki drożdży do utleniania glukozy³. W latach pięćdziesiątych XX wieku, amerykański program lotów kosmicznych wspomógł rozwój mikrobiologicznych BFC, jako technologii umożliwiającej utylizację odpadów kosmicznych oraz generującej prąd elektryczny¹. Natomiast, w 1964 roku Kimble zaproponował użycie wyizolowanych enzymów i wraz ze współpracownikami skonstruował trzy anody i ogniwa działające w oparciu o oksydazę glukozy, dehydrogenazę alkoholową lub oksydazę aminokwasową⁴. Prace te zapoczątkowały badania nad urządzeniami dziś nazywanymi enzymatycznymi bioogniwami paliwowymi (ang. *enzymatic biofuel cell*, EBFC).

Paliwem klasycznych ogniw paliwowych jest wodór, proste alkohole lub kwas mrówkowy⁵. Jednak stosowanie paliw zawierających atomy węgla może powodować zatrucie i dezaktywację katalizatorów przez tlenek węgla. Naukowcy postanowili zrozumieć, jak u zwierząt powstaje energia, woda i CO₂ w wyniku utleniania cukru. Odpowiedzią okazały się enzymy, naturalne katalizatory, które w przeciwieństwie do metali, nie ulegają zanieczyszczeniom produktami reakcji. Enzymy ze względu na niską cenę i dużą dostępność, od dawna stosowane są w przemyśle np. do produkcji proszków do prania. Jednak użycie ich do generowania prądu elektrycznego jest znacznie bardziej skomplikowane. W organizmach żywych, enzymy wędrują swobodnie w komórkach. Ogniwo ze względu na wydajność i wielkość, wymaga by katalizator był osadzony w jednym miejscu, w odpowiedniej orientacji, czyli unieruchomiony na powierzchni elektrody. Dodatkowo,

enzym powinien pracować kilka miesięcy lub lat. Problem stanowi krótka trwałość enzymów która, np. w organizmie ludzkim wynosi tylko kilka dni oraz niecałkowite spalanie paliwa ^{1,3}. Jednak ogromna dostępność, łatwość pozyskiwania i oczyszczania enzymów, praca w łagodnych warunkach i temperaturze powoduje, że zainteresowanie tymi biologicznymi katalizatorami nie słabnie. Poza tym, enzymy charakteryzują się niezwykle wysoką selektywnością substratową, a produkty uboczne mogą być substratami dla kolejnych enzymów. Proces immobilizacji enzymu ma za zadanie zwiększyć stabilność białka, wydłużyć czas życia, poprawić wydajność oraz zapewnić optymalny transport elektronu pomiędzy powierzchnią elektrody a enzymem. Pomocna jest także inżynieria genetyczna, pozwalająca na otwarcie struktury białkowej i lepszy dostęp do centrów aktywnych (mutanty enzymów), a także nanotechnologia, dając materiały elektrodowe umożliwiające eliminację mediatorów ⁶.

Wydajność ogniw paliwowych określa się przede wszystkim na podstawie charakterystyki prądowo-napięciowej i odpowiadającemu jej profilowi mocy (Rys. 4.2) ^{2,7}. W idealnym przypadku napięcie BFC powinno być niezależne od prądu pobieranego z ogniwa. W rzeczywistości, nawet napięcie obwodu otwartego (ang. *open circuit voltage*, OCV), różni się od wartości równowagowej (E_{cell}). OCV to napięcie ogniwa, przy którym nie płynie prąd, czyli maksymalne napięcie układu elektrochemicznego, równe różnicy potencjałów standardowych poszczególnych reakcji zachodzących na anodzie i katodzie. Skończona szybkość procesów zachodzących w ogniwie wpływa na to, że rzeczywista moc ogniwa zawsze jest mniejsza się od wartości teoretycznej. Różnica pomiędzy rzeczywistym napięciem ogniwa (V_{cell}) a teoretycznym, odwracalnym (równowagowym) napięciem ogniwa (E_{cell}), nosi miano nadpotencjału ogniwa (η) (Równ. 4.1). E_{cell} wyrażone jest równaniem Nernsta dla konkretnego ogniwa i możliwe do obliczenia ze zmiany entalpii swobodnej Gibbs'a dla reakcji katodowej i anodowej, podczas obciążania ogniwa (przy generowanej gęstości prądu) ⁷.



Rys. 4.2 Przykładowa charakterystyka prądowo-napięciowa ogniwa paliwowego z zakresami gęstości prądu w których występują główne straty napięcia ⁷.

Wyróżnia się trzy rodzaje nadpotencjału ogniwa: aktywacyjny, omowy i stężeniowy (masowy) (Rys. 4.2) ⁷. Nadpotencjał aktywacyjny (η_{act}) dominuje przy małych gęstościach prądu. Wynika z bariery energetycznej przeniesienia ładunku z enzymu lub mediatora do elektrody. Straty te przybliża się równaniem Tafela lub Butlera–Volmera ⁷. Można je obniżyć przez odpowiedni dobór katalizatora, zwiększenie powierzchni elektrody i optymalizację parametrów procesu, jak pH czy temperatury. Nadpotencjał omowy (η_{ohm}) wynika z oporów przeniesienia ładunku przez różne komponenty układu. Zawiera w sobie opory odbiornika prądu, elektrolitu, membrany, elektrody, kontaktów elektrycznych i odpowiednich granic

fazowych. Spadek omowy wyrażany jest przy pomocy prawa Ohma. W celu zminimalizowania tych strat, należy stosować membrany o niskiej oporności, zapewnić optymalną odległość elektrod ogniwa oraz dobry kontakt komponentów. Ważne jest wysokie przewodnictwo elektrolitu, ale jego skład i stężenie nie mogą zakłócać pracy biokatalizatora. Przy najwyższych gęstościach prądu dominują straty powodowane oporem transportu masy (nadpotencjał stężeniowy, η_{con}). Opór ten prowadzi do wysokiego gradientu stężenia, szczególnie w pobliżu powierzchni elektrody. Można go zminimalizować wydajnie mieszając roztwór.

$$V_{cell} = E_{cell} - \eta_{act} - \eta_{ohm} - \eta_{con} \quad (4.1) \quad 7$$

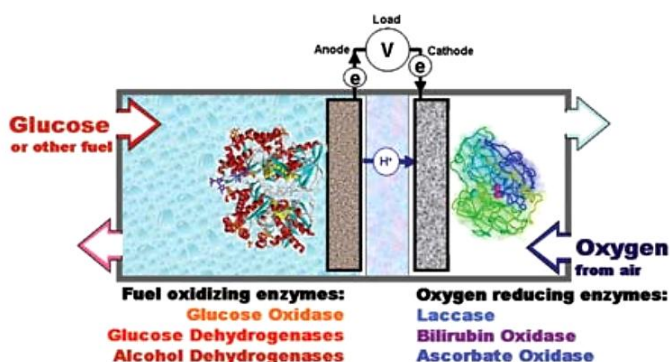
Ważnym parametrem dla BFC jest elektryczna moc ogniwa (p) (Równ. 4.2), definiowana jako iloczyn napięcia ogniwa i generowanego prądu (I). Zazwyczaj przedstawia się profil mocy ogniwa jako znormalizowaną wartość mocy w stosunku do powierzchni elektrody (A) (gęstość mocy, P) w funkcji gęstości generowanego prądu (j) (Równ. 4.2) ⁷.

$$p = I \times V_{cell} \quad (4.2) \quad 7$$

$$P = \frac{p}{A} = j \times V_{cell} \quad (4.3) \quad 7$$

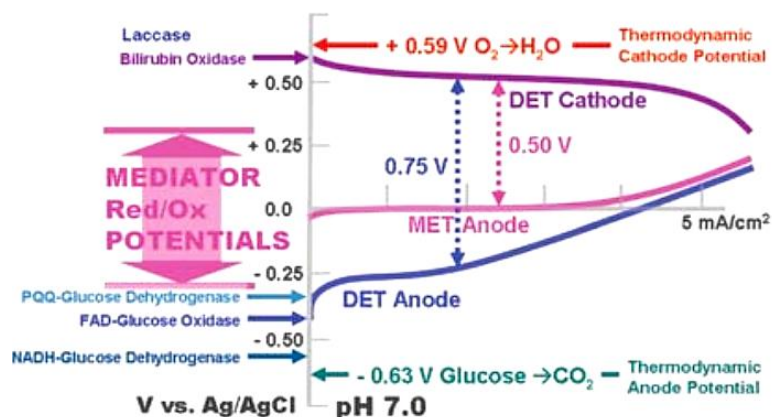
Wartość mocy dla tradycyjnych ogniw paliwowych osiąga kilo- czy nawet megawaty, natomiast EBFC generują jedynie od mikro- do miliwatów, co jest wystarczające tylko dla niewielkich urządzeń ⁸.

Klasycznym przykładem EBFC jest ogniwo glukozowo-tlenowe, w którym na anodzie zachodzi utlenianie glukozy, na katodzie zaś redukcja tlenu (Rys. 4.3) ⁹. Glukoza jest podstawowym źródłem energii w organizmach żywych i może zapewnić do 16 kW g⁻¹, generując dwanaście elektronów na jedną molekułę. Jednym słowem, jest małą cząsteczką, zawierającą dużą ilość energii, czyli idealną do zasilania ogniwa paliwowego ⁹.



Rys. 4.3 Schemat EBFC glukozowo-tlenowego, złożonego z anody i katody modyfikowanej przez różne enzymy ⁵.

Glukoza utleniana jest przez oksydazę glukozy (ang. *glucose oxidase*, GOD) do glukonolaktonu w procesie dwuelektronowym, natomiast tlen redukowany przez BOD w procesie czteroelektronowym ^{2,8,9}. Teoretyczne OCV takiego ogniwa wynosi ok. 1 V (Rys. 4.4) ⁵. Ze względu na to, że orientacja enzymu często uniemożliwia DET, stosuje się mediatory przeniesienia elektronu, które mogą wpływać na OCV ogniwa. Ich potencjał redoks nie może być za bardzo zbliżony do potencjału centrum aktywnego enzymu, ponieważ siła napędzająca wymianę elektronów będzie zbyt niska, natomiast zbyt duża różnica spowoduje ingerencję w OCV ⁵. Prace nad udoskonaleniem ogniwa pozwoliły zwiększyć uzyskiwaną gęstość prądu z μA do $mA\ cm^{-2}$ ⁵.

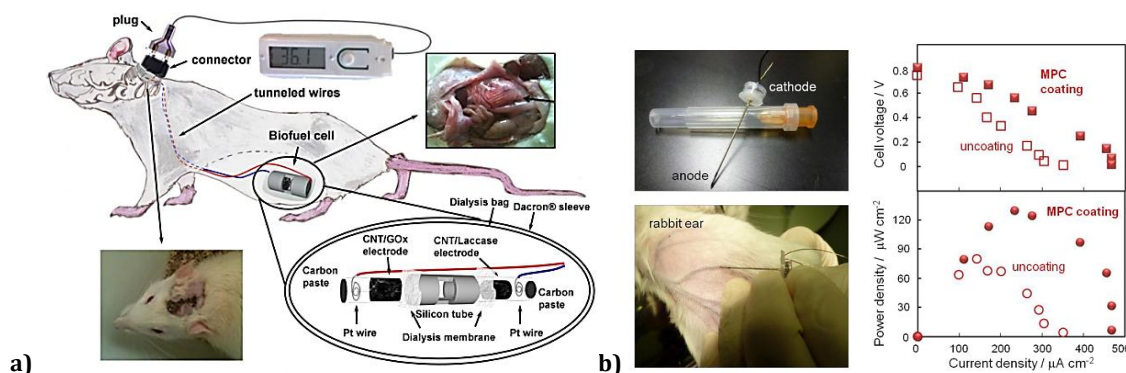


Rys. 4.4 Ogólny schemat potencjałowy dla glukozowo-tlenowego bioogniwa paliwowego ⁵.

Pierwsze chirurgiczne wszczepienie rozrusznika serca w 1960 roku oraz ogromny rozwój implantowalnych urządzeń medycznych, wymusiły poszukiwania odpowiednich źródeł ich zasilania ⁹. Pod koniec lat sześćdziesiątych XX wieku opracowano baterię litową, której trwałość w organizmie ludzkim sięgała nawet kilku lat i była wystarczająca do zasilania rozrusznika serca, który konsumował jedynie 10-40 μW . Jednakże inne implantowane urządzenia, jak sztuczne organy, wymagają większych energii (od mW do W). W obszarze zainteresowania znalazły się BFC, a szczególnie ogniwo glukozowo-tlenowe.

Glukoza i tlen obecne są w płynach fizjologicznych i w sposób ciągły dostarczane na drodze szlaków metabolicznych, więc teoretycznie ogniwo nie wymagałoby wymiany w ciągu życia pacjenta. Ponadto moc takiego ogniwa, przy maksymalnie wydajnym utlenianiu glukozy i redukcji tlenu, może wynosić nawet setki mW ⁹. Jednak płyny fizjologiczne nie są prostym elektrolitem, co powoduje pewne utrudnienie. Przy projektowaniu ogniwa należy wziąć pod uwagę, zmienność stężenia glukozy i tlenu, temperaturę (ok. 37 °C), fizjologiczne pH, obecność innych substancji, które mogą wpływać na pracę ogniwa, a przede wszystkim, co najtrudniejsze, biokompatybilność i hemokompatybilność ⁹.

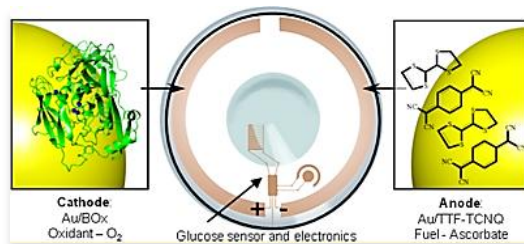
W 1970 roku, po raz pierwszy zaimplantowano ogniwo glukozowo-tlenowe zbudowane z elektrod platynowych u psa ⁹. Przełomowe prace nad implantacją bioogniw paliwowych opublikował Heller w 2003 roku, pokazując mikroelektrody pokryte GOD i lakazą implantowane w owocu winogrona ¹⁰. Natomiast w 2010 Cosnier wszczepił glukozowe EBFC do organizmu szczura ¹¹. Dalsze prace nad ogniwem przyniosły poprawę jego parametrów, między innymi przez zastąpienie grafitu, CNT oraz wyeliminowanie mediatora. W ten sposób w warunkach *in vivo* otrzymano średnie OCV = 0,54 V i gęstość mocy 193,5 $\mu\text{W cm}^{-2}$. Parametry te pozwoliły na zasilenie diody lub czujnika temperaturowego (Rys. 4.5a).



Rys. 4.5 a) Schemat budowy oraz zdjęcie ogniwa zaimplantowanego w ciele szczura z podłączonym do niego termometrem ^{9,12}, **b)** bioogniwo igłowe pokryte polimerem MPC z oddychającą biokatodą, zaimplantowane w żyłę króliczego ucha oraz krzywe prądowo-napięciowe ogniwa ¹³.

Miyake zaproponował ogniwo zaimplantowane w uchu królika (Rys. 4.6b), składające się z igłowej anody pokrytej polimerem zapewniającym biokompatybilność oraz oddychającej biokatody zawierającej BOD ¹³. Jest to tak zwane częściowo zaimplantowane ogniwo, gdyż katoda ma kontakt z otoczeniem i pobiera tlen z powietrza. Taka budowa pozwala wyeliminować ograniczenie wynikające z niskiego stężenia tlenu w płynach ustrojowych, a które limituje moc ogniwa. Podskórna, żylna implantacja, wyklucza konieczność przeprowadzania zabiegów chirurgicznych. OCV w tym przypadku wynosiło 0,81 V, a gęstość mocy 130 $\mu\text{W cm}^{-2}$ przy 0,56 V (Rys. 4.5b).

Bardzo ciekawym przykładem zastosowania EBFC są soczewki kontaktowe, będące jednocześnie czujnikiem glukozy i ogniwem go zasilającym (Rys. 4.6) ¹⁴.



Rys. 4.6 Schemat bioczujnika glukozy połączonego z zasilającym go bioogniwem, zbudowanym z katody złotej pokrytej BOD oraz anody na której zachodzi utlenianie askorbinianu pochodzącego z łez ¹⁴.

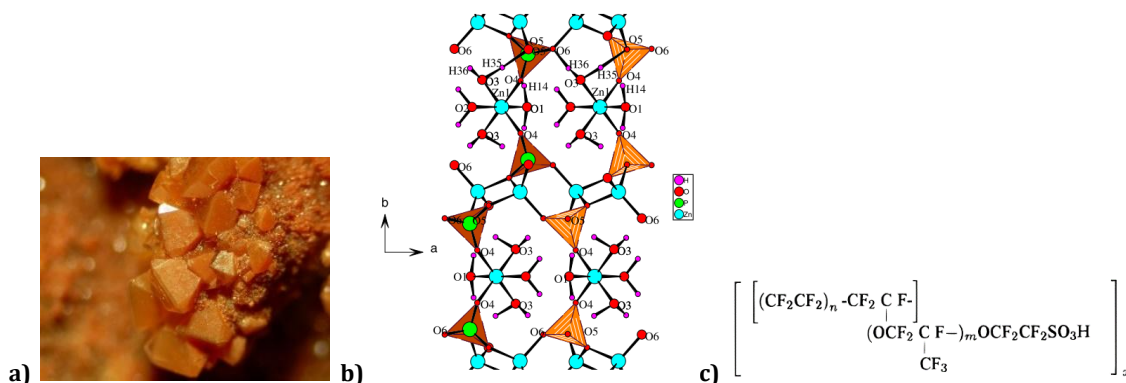
Jak widać, rozwój i badania nad EBFC powodują, że być może w najbliższej przyszłości będą stanowić alternatywę w niszowych zastosowaniach dla baterii litowo-jonowych. Dla BFC rozważane są dwie możliwe drogi aplikacji, *in vivo* jako implantowalne ogniwa do zasilania rozrusznika serca i czujników, ale także *ex vivo* zasilające przenośne urządzenia, jak bezprzewodowe sensory ^{5,15}. Już teraz potrafią zasilić małe urządzenia, jak rozrusznik serca, zaimplantowany biosensor czy sztuczny zwieracz cewki moczowej ⁹.

4.1 Hybrydowe bioogniwa cynkowo-tlenowe

Alternatywę dla bioogniwa glukozowo-tlenowego stanowi hybrydowe ogniwo cynkowo-tlenowe (Hyb-Zn-O₂), łączące anodę cynkową z enzymatyczną biokatodą ¹⁶. W przypadku ogniwa glukozowo-tlenowego często zachodzi reakcja uboczna utleniania glukozy przez tlen rozpuszczony w elektrolicie, co prowadzi do lokalnego spadku stężenia zarówno

glukozy jak i tlenu, co z kolei powoduje spadek mocy urządzenia. Rozwiązaniem problemu jest użycie anody cynkowej, pełniącej jednocześnie rolę paliwa i elektrody¹⁷. Pomimo, że jej wielkość ograniczona jest rozmiarem ogniwa, uzyskiwana moc jest większa od mocy EBFC o podobnych rozmiarach, których czas pracy całkowicie zależy od trwałości enzymów. Teoretyczne OCV ogniw hybrydowych, ze względu na niski standardowy potencjał utleniania cynku ($E^{\circ}_{\text{Zn}/\text{Zn}^{2+}} = -0,76 \text{ V vs. NHE}$), wynosi ok. 1,5 V i jest znacznie wyższe od uzyskiwanego dla ogniwa w pełni enzymatycznego. Jest to ważne ze względu na trudność łączenia tych ogniw szeregowo w warunkach *in vivo*.

Heller w 2006 roku dążąc do miniaturyzacji baterii cynkowo-tlenowych, planując ich implantację, skupił się przede wszystkim na zmianie elektrolitu i eliminacji oprawy ogniwa¹⁶. W celu ograniczenia korozji cynku, w klasycznych ogniwach jako elektrolit stosuje się wodny roztwór KOH, który wymaga użycia szczelnego, stalowego pojemnika, co znacznie ogranicza miniaturyzację. Okazało się jednak, że korozja cynku w płynach fizjologicznych lub buforze fosforanowym jest minimalizowana przez tworzenie na jego powierzchni hopeitu ($\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$). Hopeit jest to naturalnie występujący minerał (Rys. 4.7a,b), nieprzepuszczalny dla cząsteczkowego tlenu (ogranicza tym samym proces korozji), ale też słaby przewodnik jonowy, więc użycie go do ochrony korozyjnej wydawało się niemożliwe¹⁸. Jednak grupa Hellera zaobserwowała, że uwalniane jony Zn^{2+} mogą być wiązane są i strącane przez fosforany obecne w elektrolicie, z utworzeniem na anodzie warstwy hopeitu, przepuszczalnej dla jonów cynku. Wydajność procesu można zwiększyć powlekając elektrodę Nafionem (Rys. 4.7c).



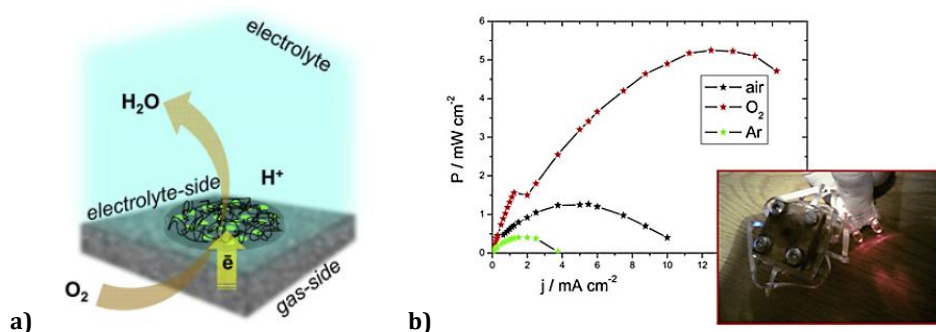
Rys. 4.7 a) Zdjęcie naturalnego hopeitu¹⁹, **b)** struktura hopeitu⁴, **c)** struktura Nafionu, gdzie zazwyczaj $m = 1$ i $5 \leq n \leq 8$ ^{20,21}.

Hopeit jest hydratowanym fosforanem cynku, o otwartej strukturze, z przecinającymi się kanałami, nieco przypominający zeolity. Jego kryształy tworzą warstwy tetraedrycznego ZnO_4 połączone grupami PO_4 (Rys. 4.7b). Pomiedzy dwiema takimi warstwami obecny jest atom cynku (Zn1), w oktaedrycznie skoordynowanej jednostce $\text{ZnO}_2(\text{H}_2\text{O})_4$. Dwa atomy tlenu uwspólnione są z dwoma odseparowanymi tetraedrycznymi PO_4 , a cztery molekuly wody tworzą sieć wiązań wodorowych. Usytuowanie jonów Zn^{2+} bogate jest w wakacje tego jonu, niezbędne do dyfuzji kationu Zn^{2+} ¹⁶.

Heller wraz grupą w 2006 roku przedstawił pierwsze hybrydowe ogniwo cynkowo-tlenowe oparte na anodzie cynkowej pokrytej Nafionem oraz katodzie zmodyfikowanej BOD, pracujące w sztucznej surowicy krwi, w temperaturze 37 °C^{4,16}. W roku 2008 Smolander zaproponowała podobne rozwiązanie stosując sitodrukowane elektrody i lakazę¹⁷. Było to jednak ogniwo dwukomorowe, którego OCV wynosiło ok. 1,5 V, a maksymalna uzyskana gęstość mocy 10 $\mu\text{W cm}^{-2}$ przy prądzie 39 $\mu\text{A cm}^{-2}$ ¹⁷. Prace te zapoczątkowały rozwój tego rodzaju ogniw.

W ogniach Hyb-Zn-O₂ stosowane są dwa enzymy wielomiedziowe: BOD lub lakaza. W literaturze opisano ostatnio wiele tego typu ogni, różniących się głównie materiałem katodowym: lakaza zaadsorbowana na polikrzemianowym filmie z CNP²², „oddychająca” ceramiczna elektroda z CNP i adsorbowanym BOD²³, arylowane SWCNT i BOD w Nafionie²⁴, funkcjonalizowane sulfonianem pirenu SWCNT i BOD unieruchomionym w matrycy polikrzemianowej²⁵, komercyjnie dostępna katoda zbudowana z włókien węglowych i siatki niklowej z lakazą w elektrolicie^{26,27}, sfunkcjonalizowane GCE modyfikowane lakazą²⁸, ceramiczne elektrody węglowe zmodyfikowane BOD^{29,30} lub lakazą³⁰, BOD adsorbowany na nanocząstkach tlenku cyny domieszkowany indem³¹.

W ogniwie Hyb-Zn-O₂ o, jak do tej pory najlepszymi parametrami, jako katodę zastosowano węglowy papier powlekany Teflonem (ang. *Toray paper*) modyfikowany matrycą polikrzemianową ze sfunkcjonalizowanymi SWCNT oraz BOD (Rys. 4.8a)³². W celu zwiększenia wydajności ogniwa papier węglowy miał bezpośredni kontakt z tlenem z powietrza („katoda oddychająca”). Rolę anody pełnił drut cynkowy pokryty Nafionem. Ogniwo charakteryzowało OCV = 1,75 V oraz maksymalna gęstość mocy 5,25 mW cm⁻² przy 0,4 V (Rys. 4.8b). Urządzenie zdolne było do zasilania dwóch diod LED lampki rowerowej (Rys. 4.8b).



Rys. 4.8 a) Schemat ogniwa cynkowo-tlenowego z oddychającą katodą modyfikowaną BOD, **b)** wyjściowa moc ogniwa względem przyłożonego prądu, bufor McIlvaina, pH = 4,8, w środowisku: argonu, powietrza i tlenu; fotografia lampki rowerowej zasilanej przygotowanym ogniwem³².

Ciekawy przykład przepływowego Hyb-Zn-O₂ (Rys. 4.9a), zasilającego czujnik neuroprzeźniacza, katecholu, przedstawiła grupa Bilewicz (Rys. 4.9b)³³. Katodę w ogniwie stanowił papier węglowy, *Toray paper*, pokryty MWCNT (kowalencyjnie zmodyfikowanymi naftalenem) z zaadsorbowaną na powierzchni lakazą. Cynkowy pierścień przykryty warstwą hopeitu pełnił rolę anody. OCV pojedynczego ogniwa wynosiło 1,6 V a jego gęstość mocy ok. 1 mW cm⁻². Układ zasilający złożony z trzech przepływowych ogniw charakteryzował się natomiast OCV = 5,1 V i gęstością mocy 3,1 mW cm⁻² (Rys. 4.9c).

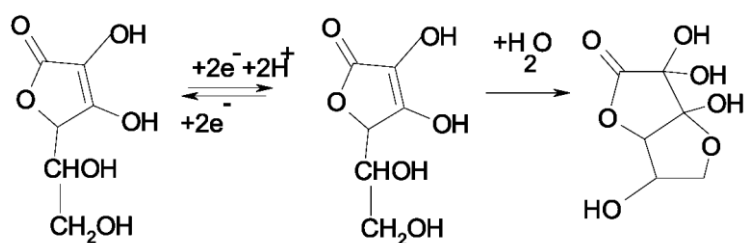


Rys. 4.9 a) Fotografia układu trzech przepływowych ogniw Hy-Zn-O₂, **b)** fotografia systemu zasilającego czujnik podłączonego do mini-potencjostatu wykonanego w warunkach domowych, **c)** charakterystyka prądowo-napięciowa układu trójogniowego, bufor McIlvaina pH = 5,3³³.

Pomimo, że cynk jest nietoksycznym metalem, a jego jony są niezbędnym mikroelementem w organizmach żywych, roztwarzanie cynku w otwartych implantowanych ogniwach może stanowić dla nich pewne niebezpieczeństwo. Można to rozwiązać, np. przez powlekanie cynku hopeitem lub innymi polimerami wyłapującymi jego jony. Ze względu na dużo wyższe OCV i pozyskiwaną moc w porównaniu do wszystkich całkowicie enzymatycznych bioogniw, stosowanie i rozwój ogniw Hyb-Zn-O₂ jest w pełni uzasadniony.

4.2 Kwas askorbinowy jako alternatywne paliwo dla bioogniw

Kwas askorbinowy (AA), popularna witamina C, może być alternatywnym eko- i bioprzyjaznym paliwem zasilającym ogniwa. Łatwo ulega utlenieniu, uwalniając przy tym dwa elektrony, zgodnie z reakcją (Równ. 4.4), dlatego stosowany jest jako reduktor w wielu reakcjach chemicznych ^{34,35}.

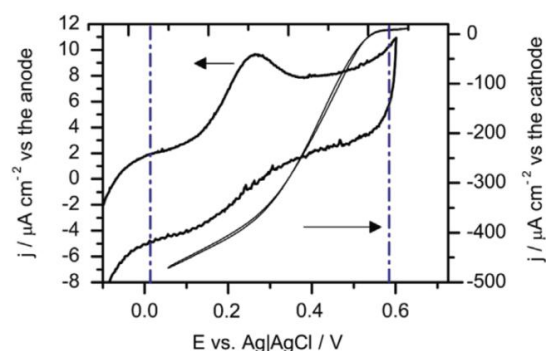


(4.4) ³⁶

Proces elektrootleniania AA badano na różnych podłożach metalicznych, polimerowych, na GC oraz na najbardziej obiecującym, węglu aktywnym czy CB ^{34,37}. Kwas askorbinowy stosowany jest przede wszystkim jako alternatywa dla metanolu w tradycyjnych ogniwach paliwowych (ang. *direct ascorbic acid fuel cell*, DAAFC), ze względu na nietoksyczność oraz możliwość użycia węglowych katalizatorów. Poza tym AA może być pozyskiwany z biomasy w procesie fermentacji lub chemicznej przemiany D-glukozy ³⁷.

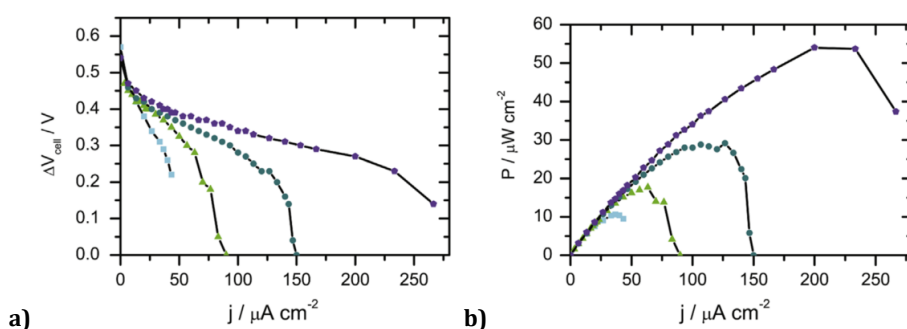
W przypadku ogniwa glukozowo-tlenowego, AA naturalnie występujący w płynach fizjologicznych może dezaktywować enzymy i stanowić duży problem, dlatego zastosowano, np. oksydazę askorbinianową, aby utlenić i całkowicie wyeliminować AA ³⁸. Tym bardziej użycie AA jako paliwa w hybrydowym EBFC może powodować denaturację enzymu zaimobilizowanego na katodzie, dlatego też w celu ochrony Mao zastosował immobilizację lakazy w cieczy jonowej na SWCNT ³⁹, a w innym ogniwie do unieruchomienia enzymu użyto matrycy polikrzemianowej ⁴⁰.

Anodę hybrydowego ogniwa EBFC, na której nieenzymatycznie utleniany jest AA, może stanowić elektroda węglowa przygotowana metodą LbL w oparciu o CNP i cząstki polikrzemianowe albo elektroda pokryta pionowo ustawionymi CNT (ang. *vertically aligned carbon nanotubes*, VACNT) ⁴⁰. Natomiast katodę może stanowić elektroda wykonana z SWCNT zmodyfikowana BOD, na której zachodzi enzymatyczna redukcja tlenu. Rys. 4.10 pokazuje voltamperogramy zarejestrowane odpowiednio na anodzie i katodzie oraz OCV tego ogniwa, które wynosi 0,55 V i jest zbliżone do wartości zmierzonej dla ogniwa (Rys. 4.11). Dla różnych stężeń AA, nie obserwowano znaczących zmian potencjału początkowego redukcji tlenu. Ze względu na to, że prąd redukcji tlenu jest prawie o rząd wielkości większy od prądu utleniania AA, moc ogniwa limitowana jest procesem anodowym i ze wzrostem stężenia AA, generowany przez ogniwo prąd jest wyższy ⁴⁰.



Rys. 4.10 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na katodzie SWCNT-BOD oraz na anodzie VACNT, przerywane linie wskazują potencjał początkowy odpowiednio: utleniania AA i redukcji tlenu, nasycony tlenem roztwór 1 mM AA w buforze McIlvaine'a pH = 4,8, $\nu = 1 \text{ mV s}^{-1}$ ⁴⁰.

Z krzywych polaryzacji oraz zależności prądowo-napięciowych ogniwa, zarejestrowanych dla różnych stężeń AA (Rys. 4.11a,b) wynika, że maksymalna moc ogniwa zależy od użytego stężenia AA.



Rys. 4.11 Krzywe **a)** polaryzacji, **b)** prądowo-napięciowa ogniwa złożonego z katody SWCNT-BOD i anody VACNT dla różnych stężeń AA: 1 (niebieski), 2 (zielony), 4 (granatowy), 6 (fioletowy) mM, bufor McIlvaine'a, pH = 4,8 ⁴⁰.

Zaproponowane ogniwo może pełnić również funkcję samonapędzającego się czujnika AA ⁴⁰.

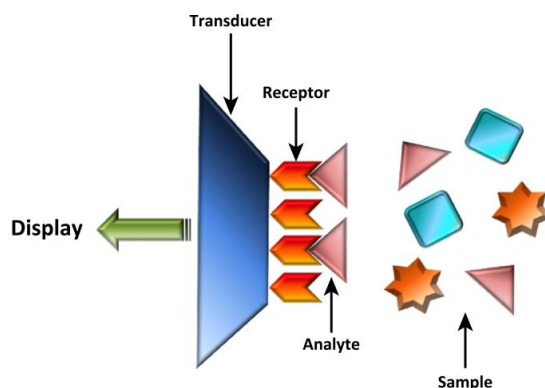
4.3 Bibliografia

- (1) Bullen, R. a; Arnot, T. C.; Lakeman, J. B.; Walsh, F. C. *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *21*, 2015–2045.
- (2) Meredith, M. T.; Minteer, S. D. *Annu. Rev. Anal. Chem. (Palo Alto, Calif.)* **2012**, *5*, 157–179.
- (3) Cooney, M. J.; Svoboda, V.; Lau, C.; Martin, G.; Minteer, S. D. *Energy Environ. Sci.* **2008**, *1*, 320.
- (4) Heller, A. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2004**, *6*, 209–216.
- (5) Atanassov, P.; Apblett, C.; Banta, S.; Brozik, S.; Barton, S. C.; Cooney, M.; Liaw, B. Y.; Mukerjee, S.; Minteer, S. D. *Electrochem. Soc. Interface* **2007**, 28–31.
- (6) Cracknell, J. a; Vincent, K. a; Armstrong, F. A. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2439–2461.
- (7) Osman, M. H.; Shah, a. a.; Walsh, F. C. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *26*, 3087–3102.
- (8) Neto, S. A.; Andrade, A. R. De. *J. Braz. Chem. Soc.* **2013**, *24*, 1891–1912.
- (9) Cosnier, S.; Le Goff, A.; Holzinger, M. *Electrochem. Commun.* **2014**, *38*, 19–23.
- (10) Mano, N.; Mao, F.; Heller, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6588–6594.
- (11) Cinquin, P.; Gondran, C.; Giroud, F.; Mazabrard, S.; Pellissier, A.; Boucher, F.; Alcaraz, J. P.; Gorgy, K.; Lenouvel, F.; Mathé, S.; et al. *PLoS One* **2010**, *5*, 1–7.
- (12) Zebda, A.; Cosnier, S.; Alcaraz, J.-P.; Holzinger, M.; Le Goff, A.; Gondran, C.; Boucher, F.; Giroud, F.; Gorgy, K.; Lamraoui, H.; et al. *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 1–5.
- (13) Miyake, T.; Yoshino, S.; Ofuji, T.; Kaji, H.; Nishizawa, M. *MicroTAS 2012* **2012**, 1432–1434.
- (14) Falk, M.; Andoralov, V.; Silow, M.; Toscano, M. D.; Shleev, S. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 6342–6348.
- (15) Gellett, W.; Kesmez, M.; Schumacher, J.; Akers, N.; Minteer, S. D. *Electroanalysis* **2010**, *22*, 727–731.
- (16) Heller, A. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *385*, 469–473.
- (17) Smolander, M.; Boer, H.; Valkiainen, M.; Roozeman, R.; Bergelin, M.; Eriksson, J.-E.; Zhang, X.-C.; Koivula, A.; Viikari, L. *Enzyme Microb. Technol.* **2008**, *43*, 93–102.
- (18) Shin, W.; Lee, J.; Kim, Y.; Steinfink, H.; Heller, A. *Acta Crystallogr. Sect. E Struct. Reports Online* **2005**, *127*, 14590–14591.
- (19) <http://de.wikipedia.org/wiki/Hopeit>.
- (20) Chen, T. Y.; Leddy, J. *Langmuir* **2000**, *16*, 2866–2871.

- (21) Mauritz, K. a.; Moore, R. B. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 4535–4585.
- (22) Szot, K.; Nogala, W.; Niedziolka-Jönsson, J.; Jönsson-Niedziolka, M.; Marken, F.; Rogalski, J.; Kirchner, C. N.; Wittstock, G.; Opallo, M. *Electrochim. Acta* **2009**, *54*, 4620–4625.
- (23) Nogala, W.; Celebanska, A.; Wittstock, G.; Opallo, M. *Fuel Cells* **2010**, *10*, 1157–1163.
- (24) Stolarczyk, K.; Sepelowska, M.; Lyp, D.; Zelechowska, K.; Biernat, J. F.; Rogalski, J.; Farmer, K. D.; Roberts, K. N.; Bilewicz, R. *Bioelectrochemistry* **2012**, *87*, 154–163.
- (25) Jönsson-Niedziolka, M.; Kaminska, A.; Opallo, M. *Electrochim. Acta* **2010**, *55*, 8744–8750.
- (26) Ahmad, A. A.; Othman, R.; Yusof, F.; Wahab, M. F. A. *Sains Malaysiana* **2014**, *43*, 459–465.
- (27) Ahmad, A. A.; Othman, R.; Yusof, F.; Wahab, M. F. A. *IJUM Eng. J.* **2011**, *12*, 153–160.
- (28) Martinez-Ortiz, J.; Flores, R.; Vazquez-Duhalt, R. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *26*, 2626–2631.
- (29) Celebanska, A. Ceramiczna elektroda węglowa modyfikowana oksydazą bilirubiny jako biokatoda w jednokomorowym ogniwie tlenowo-cynkowym, Praca Magisterska, Uniwersytet Warszawski, 2009.
- (30) Nogala, W. Dioxygen Electroreduction on Enzyme Modified Carbon Ceramic Electrodes, PhD Thesis, Institute of Physical Chemistry Polish Academy of Sciences, 2010.
- (31) Rozniecka, E.; Jonsson-Niedziolka, M.; Sobczak, J. W.; Opallo, M. *Electrochim. Acta* **2011**, *56*, 8739–8745.
- (32) Zloczewska, A.; Jönsson-Niedziolka, M. *J. Power Sources* **2013**, *228*, 104–111.
- (33) Majdecka, D.; Draminska, S.; Stolarczyk, K.; Kizling, M.; Krysiński, P.; Golimowski, J.; Bilewicz, R. *ECS Trans.* **2014**, *61*, 1–7.
- (34) Kim, Y. E.; Kim, M. Y.; Lee, J. K.; Uhm, S.; Seo, G.; Lee, J. *Electrocatalysis* **2011**, *2*, 200–206.
- (35) Uhm, S.; Choi, J.; Chung, S. T.; Lee, J. *Electrochim. Acta* **2007**, *53*, 1731–1736.
- (36) Amiri, M.; Imanzadeh, H.; Banaei, A. *Mater. Sci. Eng. C* **2015**, *47*, 189–195.
- (37) Fujiwara, N.; Yamazaki, S.; Siroma, Z.; Ioroi, T.; Yasuda, K. *J. Power Sources* **2007**, *167*, 32–38.
- (38) Li, X.; Zhang, L.; Su, L.; Ohsaka, T.; Mao, L. *Fuel Cells* **2009**, *9*, 85–91.
- (39) Qian, Q.; Su, L.; Yu, P.; Cheng, H.; Lin, Y.; Jin, X.; Mao, L. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 5185–5191.
- (40) Zloczewska, A.; Celebanska, A.; Szot, K.; Tomaszewska, D.; Opallo, M.; Jönsson-Niedziolka, M. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *54*, 455–461.

5. Czujniki chemiczne

Czujnik chemiczny to urządzenie przetwarzające informację chemiczną, pochodzącą z reakcji chemicznej lub fizykochemicznej właściwości badanego obiektu, na sygnał użyteczny analitycznie^{1,2}. Umożliwia detekcję pojedynczego składnika, a także szczegółową analizę składu całej próbki. Zbudowany jest z dwóch podstawowych elementów: receptora oraz fizyko-chemicznego przetwornika (Rys. 5.1). Zadaniem receptora jest przetworzenie informacji chemicznej w formę energii, która może być zmierzona przez przetwornik. Receptor zapewnia selektywność czujnika i eliminuje fałszywie dodatnie wyniki. Przetwornik natomiast dokonuje konwersji mierzonego parametru na określony sygnał^{1,2}.



Rys. 5.1 Schemat czujnika chemicznego¹.

Zgodnie z definicją IUPAC, w przypadku gdy warstwa receptorowa zawiera biologiczne molekuly, takie jak enzymy, antyciała, DNA, mikroorganizmy itp., urządzenie nazywane jest biosensorem lub bioczujnikiem. W zależności od stosowanego przetwornika, bioczujniki dzieli się na: elektrochemiczne, optyczne, piezoelektryczne, kalorymetryczne i inne¹. Wśród sensorów elektrochemicznych wyróżnia się czujniki potencjometryczne, amperometryczne oraz konduktometryczne. Jak wspomniano, bioczujniki zawierają biologiczną część receptorową, ale często zdarza się, że autorzy prac rozszerzają tę definicję do analitu biologicznego, co odbiega od ścisłej definicji^{1,3}. W przeciwieństwie do biosensorów, w czujnikach chemicznych występuje niebiologiczny receptor, najczęściej odpowiednia modyfikacja powierzchni elektrody, której zadaniem jest zwiększenie selektywności i czułości oznaczenia³.

Historię czujników potencjometrycznych, wykorzystujących zależność potencjału elektrody od stężenia oznaczanej substancji, rozpoczęło przypadkowe odkrycie z początku XX wieku. Jeden z rodzajów szkła wykazał wrażliwość na zmianę pH, co umożliwiło skonstruowanie czujnika do oznaczania jonów wodorowych. Kolejnym przełomem było opracowanie w 1966 roku elektrod jonoselektywnych czułych na różne jony, które dziś są komercyjnie dostępne^{2,4}.

W czujnikach amperometrycznych wykorzystuje się zależność mierzonego prądu od stężenia oznaczanej substancji. Używane są one do detekcji zarówno gazów, jak i cieczy. Ich aktywność silnie zależy od użytego materiału elektrody pracującej⁵. Jedną z popularniejszych elektrod była wynaleziona w 1922 roku przez Heyrovsky'ego, kroplowa, kapiąca elektroda rtęciowa⁵. Cieszyła się zainteresowaniem głównie w analizie inwersyjnej (ang. *stripping*) ze względu na szerokie, katodowe okno potencjału i odnawialną powierzchnię. Inną jej odmianą jest wisząca elektroda rtęciowa, skonstruowana przez Kemulę i Kublika⁶. Jednak toksyczność rtęci i wąski dostępny zakres potencjałów spowodowały jej wyparcie przez elektrody stałe

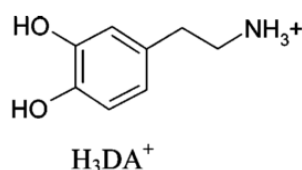
np. węglowe (np. GC), metaliczne (np. złoto, srebro, platyna) oraz elektrody modyfikowane chemicznie ^{5,7}. Przykładem czujników amperometrycznych mogą być sensory oparte na tlenowej elektrodzie Clarka wynalezionej 1956 roku ⁸. W 1962 roku, skonstruowano pierwszy tego rodzaju bioczujnik użyty do oznaczania glukozy. Amperometryczny sygnał pochodził od tlenu konsumowanego w trakcie enzymatycznego utleniania glukozy i był proporcjonalny do jej stężenia ⁵. Zainicjowało to nowy kierunek badań nad sensorami z materiałem biologicznym w warstwie chemoczułej ². W bioczujnikach oznaczany analit może być substratem dla enzymu (np. glukoza dla GOD) albo może pełnić rolę inhibitora, zmniejszając jego aktywność (np. pestycyd dla AChE) ⁴.

Czujnik chemiczny charakteryzuje się różnymi parametrami użytkowymi jak dokładność, powtarzalność oraz szeregiem parametrów analitycznych. Należą do nich granica wykrywalności (ang. *detection limit*, LOD, najmniejsze możliwe do wykrycia stężenie analitu zazwyczaj określane jako trzykrotność wartości szumu urządzenia), czułość (nachylenie krzywej kalibracyjnej), zakres dynamiczny (zakres stężeń dla których czułość jest większa od zera), selektywność (zdolność do oznaczenia sygnału analitu w obecności innych substancji), czas odpowiedzi oraz czas życia sensora. Ocenie poddawana jest również trwałość mechaniczna i odporność chemiczna czujnika ^{2,7}.

5.1 Amperometryczny czujnik dopaminy

Dopamina (DA) (Rys. 5.2) jest hormonem i neuroprzekaźnikiem z grupy katecholamin. Produkowana w reakcji dekarboksylacji aminokwasu, lewodopy, w nadnerczach oraz w kilku obszarach mózgu jest niezwykle istotna dla prawidłowego funkcjonowania organizmu ludzkiego ^{3,9}. Ponadto stanowi prekursor syntezy adrenaliny i noradrenaliny. Jako silny neuromodulator wpływa na procesy myślowe, zdolność uczenia się, przetwarzania sygnałów bólowych, a także na ogólne samopoczucie. Potocznie nazywana jest nawet hormonem szczęścia. Zaburzeniu produkcji dopaminy przypisuje się wiele różnych schorzeń jak schizofrenia, choroba Parkinsona, ADHD, anoreksja, zespół niespokojnych nóg, depresja, uzależnienia czy psychoza. Dopamina jest więc ważnym związkiem chemicznym, a jej wszystkie funkcje i związane z nią choroby nie zostały jeszcze poznane. Co ciekawe, odkryto, że medytacje i joga pomagają stymulować produkcję DA i utrzymywać ją na właściwym poziomie ¹⁰. Obecnie duże grono naukowców pracuje nad poszerzeniem wiedzy o dopaminie oraz o innych neuroprzekaźnikach.

Szerokie spektrum chorób powodowanych przez zaburzenia stężenia DA wiąże się z koniecznością stworzenia łatwej i taniej metody jej detekcji, dostępnej w każdym gabinecie lekarskim. Usprawniłoby to diagnostykę chorych, która dziś pozostawia wiele do życzenia, głównie ze względu na wysokie koszty stosowanych obecnie metod oznaczania, np. pozytonowej tomografii emisyjnej.



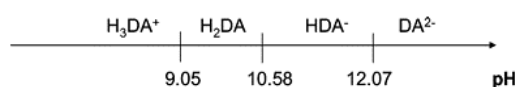
Rys. 5.2 Struktura protonowanej formy dopaminy ¹¹.

Oznaczanie neuroprzekaźników, w tym dopaminy, zazwyczaj wymaga zastosowania kilku różnych technik. Są to: metody separacji i przygotowania próbki, np. mikrodializa,

użycie membran jonowymiennych; metody analityczne, np. testy enzymatyczne, chromatografia cieczowa, spektrometria mas, elektroforeza kapilarna; oraz metody detekcji: optyczne bądź elektrochemiczne ^{3,12}. W celu usprawnienia i zmniejszenia kosztów analizy, poszukiwane są bardziej bezpośrednie rozwiązania umożliwiające detekcję DA na poziomie nanomolowym ^{3,13}. Pomocne okazały się dokładne, proste i szybkie techniki elektrochemiczne. W ostatnim czasie duży nacisk kładzie się na rozwój takich sensorów, ich miniaturyzację, poprawę czułości i selektywności.

Detekcja elektrochemiczna DA, mimo wielu zalet, posiada także pewne ograniczenia. Duży problem stanowi wysoki nadpotencjał bezpośredniego utleniania DA na tradycyjnych elektrodach oraz zdolność do spontanicznego tworzenia polimeru blokującego powierzchnię elektrody ¹⁴. Kolejne wyzwanie stanowi obecność w płynach ustrojowych wielu innych substancji elektroaktywnych w wysokim stężeniu. Są to przede wszystkim: kwas askorbinowy (0,1-0,6 mM) ¹³ i kwas moczowy (UA) (0,24-4,40 mM) ¹⁵. Związki te utrudniają analizę DA, ze względu na jej niskie stężenie (0,01-1 μM) ¹⁶ i zbliżone standardowe potencjały utleniania. Co więcej produkt utleniania DA może reagować z AA prowadząc do regeneracji dopaminy, co także zakłóca pomiar ¹⁷. Poza AA i UA, detekcję DA utrudniają inne substancje występujące w płynach ustrojowych człowieka. Są to, dostępne bez recepty, leki przeciwbólowe, jak np. acetaminofen (AC), często nadużywane przez społeczeństwo,

Rozwiązanie powyższych trudności upatruje się między innymi w modyfikacji powierzchni elektrody, która spowoduje wzrost jej właściwości katalitycznych, czyli w tym przypadku przesunięcie i rozseparowanie potencjałów utleniania-redukcji komponentów mieszaniny. W konsekwencji umożliwi to detekcję każdego z nich. Do tej pory zastosowano różne modyfikacje chemiczne ¹⁸, nanomateriałami węglowymi ^{19,20} lub metalicznymi ²¹. Przeprowadza się także modyfikacje nadające powierzchni czujnika ujemny ładunek, umożliwiające selektywne oznaczenie DA wykorzystując odpychania elektrostatyczne ²². W roztworze o pH fizjologicznym dopamina występuje w formie kationu H₃DA⁺ (Rys. 5.2, 5.3) w przeciwieństwie do substancji współlistniejących, u których dominuje forma ujemna, AA (pK_a = 4,15), UA (pK_a = 3,89). Wyeliminowanie sygnałów pochodzących od AA można także osiągnąć stosując powlekanie czujnika Nafionem lub elektrochemiczną obróbkę wstępną polegającą na dodatniej polaryzacji elektrody (preelektroliza) ^{23,24}.

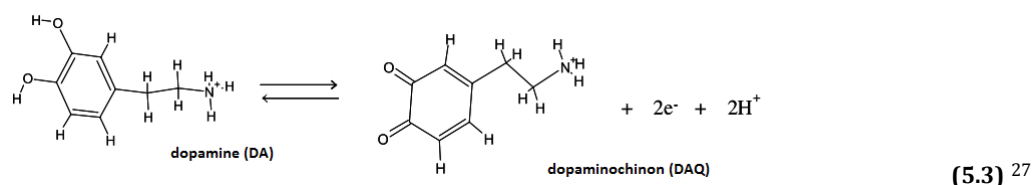
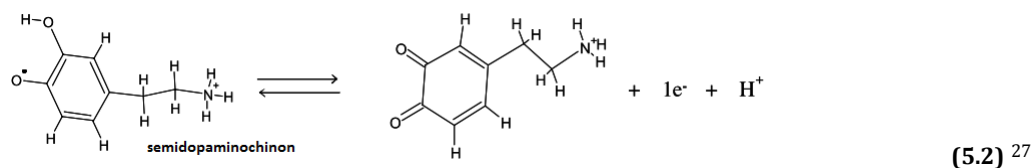
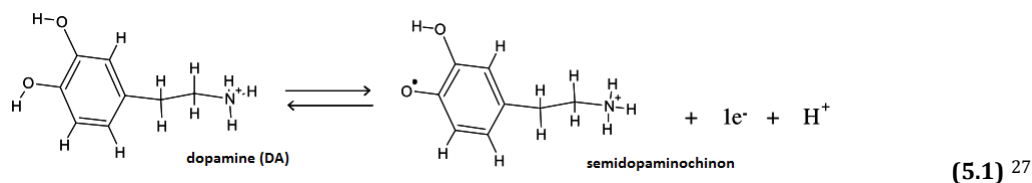


Rys. 5.3 Dominująca forma DA w zależności od pH środowiska ¹¹.

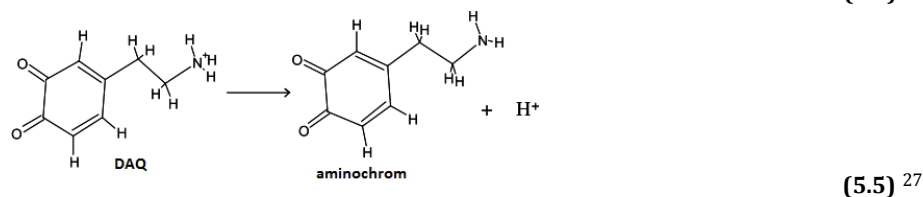
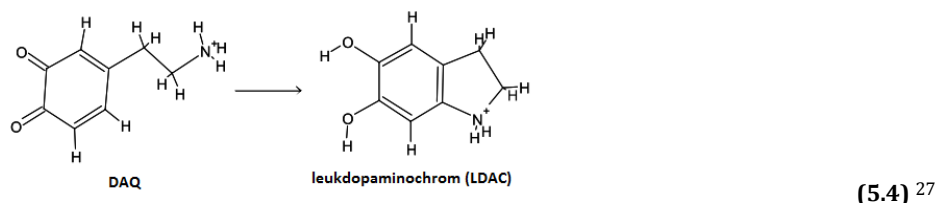
Chcąc wyeliminować niektóre z przeszkód towarzyszących detekcji DA, rozwinięto nowe techniki elektrochemiczne, jak voltamperometria cykliczna szybkiej zmiany potencjału (ang. *fast scan cyclic voltammetry*, FSCV, powyżej 100 V s⁻¹) lub połączenie amperometrii z konduktometrią ¹³. Opracowano także inny sposób detekcji DA, oparty na użyciu enzymu, tyrozynazy, katalizującej utlenianie difenoli do chinonów, które następnie zredukowane są przy ujemnym potencjale. W tego typu biosensorach pojawił się problem trwałości i powtarzalności, który rozwiązuje się zastępując warstwę bioreceptora jego syntetycznym odpowiednikiem, np. materiałem polimerowym, zdolnym do wdrukowania w niego molekuły DA ^{3,25}.

Większość czujników elektrochemicznych DA wykorzystuje zdolność do jej łatwego elektrotlenienia, ale istnieją także czujniki nieutleniające DA, w których detekcja zachodzi w sposób pośredni ¹³, np. gdy utlenieniu ulega produkt reakcji DA z kwasem fenylboronowym ²⁶.

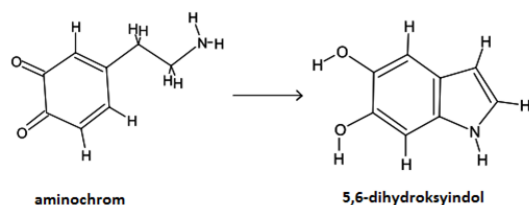
Mechanizm reakcji utleniania dopaminy budzi wiele kontrowersji i wciąż nie ustalono spójnej koncepcji. Wiele prac dotyczących elektrochemicznego utleniania DA przedstawia mechanizm reakcji zgodnie z Równ. 5.3 ²⁷, w którym w wyniku wymiany dwóch elektronów i dwóch protonów powstaje o-dopaminochinon (DAQ) ²⁸. Jednak kilka innych publikacji sugeruje, że proces ten zachodzi w dwóch jednoelektronowych etapach (Równ. 5.1, 5.2) z utworzeniem pośredniego semidopaminochinonu ²⁷.



Inni autorzy sugerują mechanizm typu EC, łączący proces elektrochemiczny (E) (Równ. 5.3) z reakcją chemiczną (C) (Równ. 5.4) ponieważ chinony, jako związki dość reaktywne, mogą ulec atakowi nukleofilowemu ²⁷. DAQ zawiera w pierścieniu zarówno deficyt elektronów jak i zdolną do oddania elektronów grupę aminową. Dlatego też, możliwe jest podstawienie 1,4 Michaela, prowadzące do wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji z utworzeniem leukodopaminochromu (LDAC) (Równ. 5.4) ²⁸. Jeżeli grupa aminowa DAQ jest protonowana, może nastąpić deprotonowanie i powstanie aminochromu (Równ. 5.5) ²⁷.

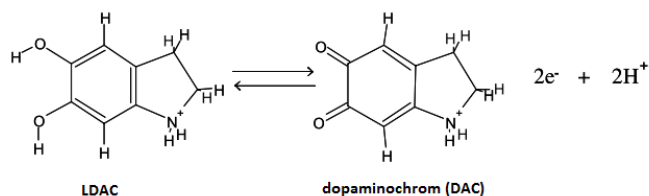


Zhang i Dryhurst zaproponowali mechanizm ECC złożony z trzech reakcji (w pH = 7) (Równ. 5.3), (Równ. 5.5) i (Równ. 5.6) ²⁷. W pierwszym etapie dopamina utleniana jest do DAQ (Równ. 5.3), który następnie ulega deprotonowaniu do aminochromu (Równ. 5.5) i szybkiej cyklizacji do 5,6-dihydroksyindolinu (Równ. 5.6).



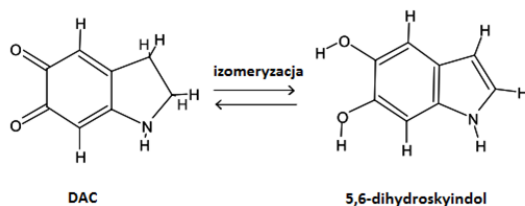
(5.6)²⁷

Kolejny rozpatrywany mechanizm, ECE, składa się z reakcji elektrochemicznej (Równ. 5.3), chemicznej (Równ. 5.4) oraz znów elektrochemicznej (Równ. 5.7), w której z LDAC powstaje dopaminochrom (DAC)^{24,27,28}.

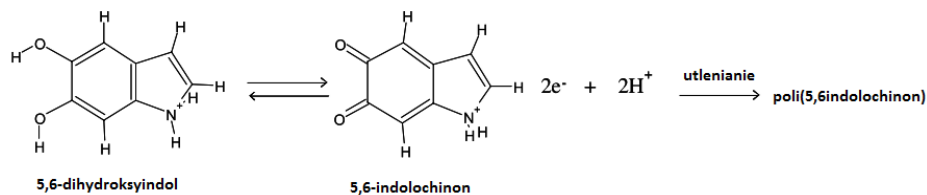


(5.7)²⁷

Lee przedstawił rozwinięcie mechanizmu ECE do ECECEE (dla pH > 3,86), w którym zachodzi dalsza izomeryzacja DAC (Równ. 5.8) i utlenianie prowadzące do tworzenia 5,6-indolochinonu oraz w kolejnej elektrochemicznej reakcji, wzrostu polimeru, poli(5,6-indolochinonu) (Równ. 5.9). W wyniku czego na powierzchni elektrody tworzy się ciemny polimerowy film podobny do melaniny^{27,29}.



(5.8)²⁷

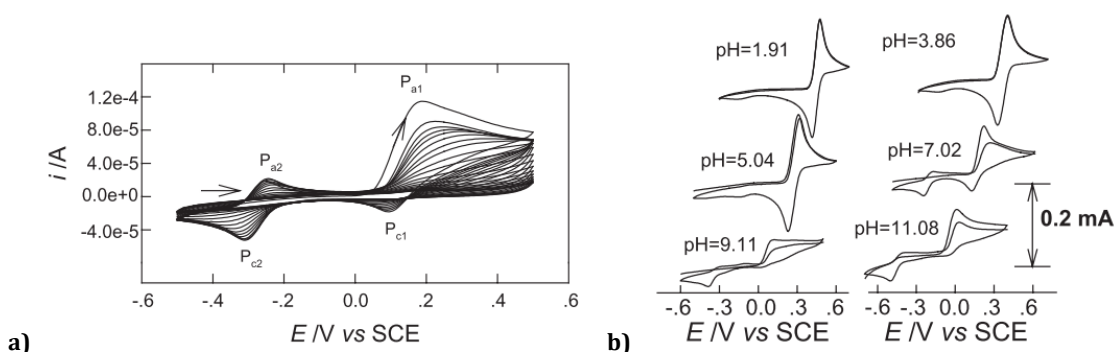


(5.9)²⁷

Głównym czynnikiem decydującym o mechanizmie utleniania DA jest pH środowiska. Na proces mogą wpływać także różne dodatki bądź modyfikacje powierzchni, zmieniające szybkość czy charakter poszczególnych reakcji, np. substancje powierzchniowo czynne, jak dodecylosiarczan sodu²⁷. Adsorpcja i polimeryzacja dopaminy na powierzchni elektrody prowadzi do jej zablokowania i spadku sygnału analitycznego, co jest ogromnym utrudnieniem w detekcji DA. Modyfikacja podłoża inhibitująca polimeryzację oraz dobór parametrów eksperymentu, jak pH czy elektrolit podstawowy o wysokim stężeniu pozwala zredukować to zjawisko^{22,23,29}. Ponadto polimer dopaminy wykazuje selektywność w stosunku do kationów i wykorzystywany jest również do detekcji DA²⁸.

Pierwszy etap tworzenia polimeru dopaminy związany jest z wewnętrzną cyklizacją dopaminochinonu do leukodopaminochromu, więc zahamowanie tego procesu uniemożliwiłoby tworzenie polimeru²⁹. Na voltamperogramie (Rys. 5.4a) zarejestrowanym na elektrodzie złotej zanurzonej w roztworze dopaminy, występuje para pików Pa₁/Pc₂ odpowiadająca reakcji utleniania-redukcji DA/DAQ (Równ. 5.3), oraz sygnał Pa₂/Pc₂

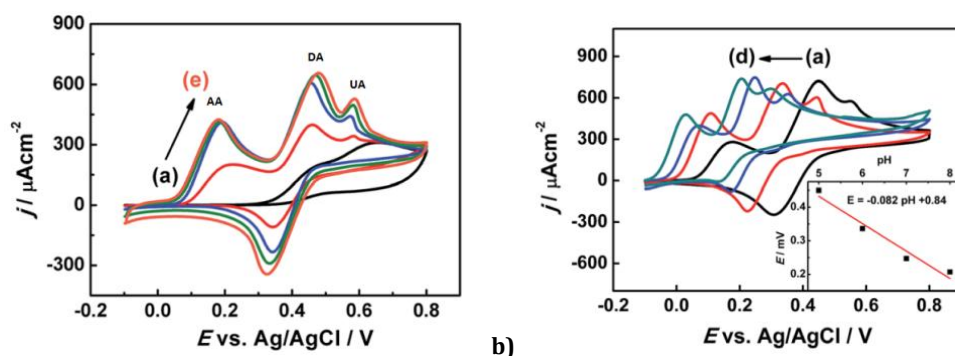
odpowiadający reakcji LDAC/DAC (Równ. 5.7). Z każdym kolejnym cyklem autorzy obserwowali spadek mierzonego prądu, oznaczający utratę katalitycznych właściwości elektrody na skutek tworzenia polimerowego filmu (przez dalsze reakcje LDAC typu CEE, niewidoczne ze względu na nakładanie się sygnałów), stanowiącego barierę dla przeniesienia elektronu. Zmiana pH elektrolitu powoduje wyraźną zmianę kształtu krzywej voltamperometrycznej (Rys. 5.4b). Poniżej pH = 4, przy względnie dużym stężeniu protonów, hamowana jest cyklizacja DAQ i piki P_{a2} / P_{c2} zanikają. Badania prowadzone na mikrowadze kwarcowej, potwierdziły, że w takim środowisku nie tworzy się polimer dopaminy. Podobne zachowanie obserwowano dla niskich stężeń DA, gdzie mała ilość monomeru uniemożliwiła tworzenie filmu. Ponadto ważną rolę odgrywa rodzaj i stężenie elektrolitu podstawowego, który może wpływać na właściwości nukleofilowe atomu azotu DAQ, a konsekwencji na zjawisko cyklizacji tej molekuly²⁹.



Rys. 5.4 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na elektrodzie złotej w 2 mM DA (przedstawiające utlenianie DA wg mechanizmu ECECEE) **a)** w 0,1 M bufor fosforanowy pH = 7,4, kolejne cykle 1-20, **b)** w buforze Britton-Robinson pH = 1,91-11,08, $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$ ²⁹.

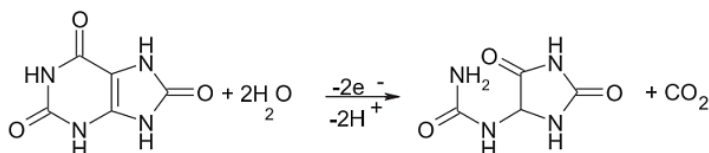
Amperometryczną detekcję dopaminy badano na wielu różnych podłożach³. W 2002 roku po raz pierwszy do tego celu zastosowano elektrodę LbL zawierającą polimerowy łącznik oraz nanomuszlę TiO_2 ³⁰. W kolejnych latach, w oparciu o tę samą koncepcję, użyto: nanocząstki³¹ i nanorurki³² TiO_2 , nanocząstki złota³³⁻³⁵, srebra³⁶, nanorurki węgla³⁷⁻³⁹, grafen^{40,41} i nanocząstki tlenku ceru⁴². Do oznaczania DA posłużyły również elektrody LbL utworzone bez użycia polimerowego łącznika, wyłącznie z różnoimiennie naładowanych obiektów, np. nanocząstek węgla⁴³ albo nanocząstek $\text{Ni}(\text{OH})_2$ ⁴⁴ lub AuNP⁴⁵ z arkuszami zredukowanego tlenku grafenu.

W 2007 roku po raz pierwszy do detekcji DA wykorzystano CNP⁴⁶. Elektrodę typu LbL utworzono na ITO, a jako łącznik posłużył kationowy polimer PDDA. Dopaminę oznaczano w obecności AA (LOD = 0,05 μM). W 2014 roku skonstruowano czujnik LbL w oparciu o różnoimiennie naładowane CNP (CNP(+)-CNP(-))⁴³. Wykorzystując oddziaływania elektrostatyczne możliwe było osadzenie wielu aktywnych warstw, które pozwoliły na czułą detekcję DA (LOD = 0,4 μM) w obecności takich substancji przeszkadzających jak: AA i UA (Rys. 5.6). Modyfikacja nanocząstkami węgla umożliwiła separację sygnałów pochodzących od utleniania każdego z tych związków, która nie była widoczna na niezmodyfikowanym ITO (Rys. 5.5a).



Rys. 5.5 Krzywe woltamperometryczne zarejestrowane na **a)** niemodyfikowanym ITO (a) oraz ITO pokrytym kolejno 1, 3, 5, 10 podwójnymi warstwami CNP(+)-CNP(-) w 2 mM AA, 2 mM DA, 1 mM UA w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 5, **b)** elektroda pokryta trzema warstwami CNP(+)-CNP(-) w 2 mM AA, 2 mM DA, 1 mM UA w 0,1 M buforze fosforanowym pH= (a)5 – 8 (d), $\nu = 20 \text{ mV s}^{-1}$ ⁴³.

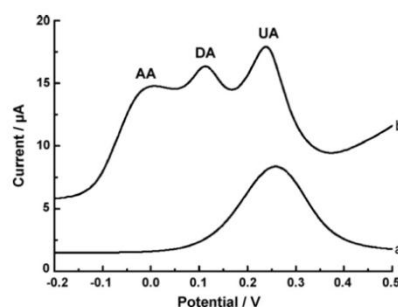
Obie reakcje elektroutleniania AA (Równ. 4.4) i UA (Równ. 5.10) przebiegają w takich warunkach w sposób nieodwracalny (Rys. 5.6). Autorzy pokazali wpływ pH elektrolitu na potencjał poszczególnych reakcji (Rys. 5.5b). Separację sygnałów obserwowano także dla mieszaniny dopaminy, serotoniny i epinefryny ⁴³.



(5.10) ⁴⁷

Podobny efekt dla mieszaniny AA, DA i AC, uzyskano unieruchamiając CNP w matrycy polikrzemianowej w mikrokanale przepływowym, konstruując czujnik zdolny do pomiaru stężenia DA w przepływie ⁴⁸. W innym przypadku, kowalencyjna modyfikacja CNP cysteiną umożliwiła wstępne zateżenie DA i jej oznaczenia na niskim poziomie (LOD = 3,9 nM) ¹⁶. Porównanie LOD dla poszczególnych czujników sprawia trudność, gdyż pomiary wykonywane są w różnych warunkach, a dodatek substancji interferujących znacznie podnosi granicę wykrywalności ⁴⁹.

Do oznaczania DA zastosowano również elektrodę CPE zmodyfikowaną mezoporowatymi cząstkami polikrzemianowymi, uzyskując LOD = 0,1 μM ⁵⁰. Wpływ modyfikacji na właściwości katalityczne elektrody jest dobrze widoczny na zarejestrowanym woltamperogramie (Rys. 5.6) ⁵⁰. Obecność cząstek polikrzemianowych zmienia powierzchnię elektrody i umożliwia rozseparowanie sygnałów pochodzących od mieszaniny związków i oznaczenie DA. Ponadto zastosowanie odpowiedniej techniki elektrochemicznej pozwala na zwiększenie czułości i obniżenie granicy wykrywalności substancji. Są to takie metody jak chronoamperometria, woltamperometria fali prostokątnej (ang. *square wave voltammetry*, SWV) lub jak w opisywanym przypadku, woltamperometria różnicowa pulsowa (ang. *differential pulse voltammetry*, DPV).



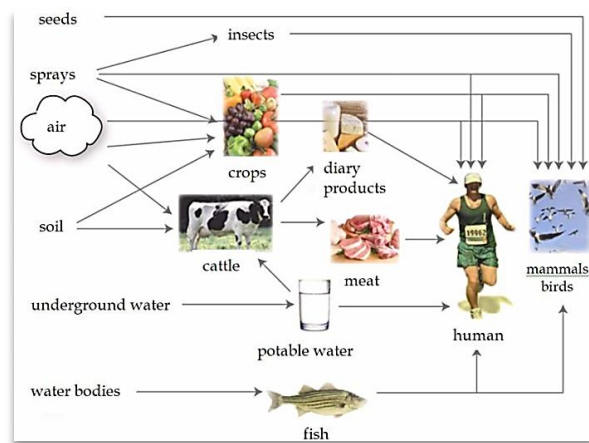
Rys. 5.6 Krzywe różnicowej voltamperometrii pulsowej zarejestrowane na CPE **a)** niemodyfikowanej, **b)** modyfikowanej nanocząstkami polikrzemianowymi, w 0,25 mM AA, 2,5 mM DA and 10 mM UA w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 7, amplituda pulsu: 50 mV, szerokość pulsu: 40 ms, czas akumulacji 2 min, (E vs. SCE), $v = 40 \text{ mV s}^{-1}$ ⁵⁰.

Projektując czujnik dopaminy, należy wziąć pod uwagę szereg niekorzystnych czynników, które mogą wpływać na uzyskiwane wyniki. Na podstawie opisanych przykładów widać, że dzisiejsze nowatorskie rozwiązania i techniki pozwalają rozwiązać niektóre problemy i oznaczać DA nawet na bardzo niskim poziomie. Jest to niezwykle ważne z punktu widzenia taniej diagnostyki dostępnej dla każdego pacjenta oraz dalszego rozwoju wiedzy o neuroprzekaznikach.

5.2 Inhibitorowy bioczuJNIK pestycydów fosforoorganicznych

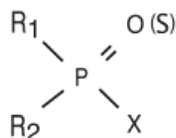
Zgodnie z definicją podaną w 2008 w akcie federalnym o środkach owado-, grzybo- i gryzoniobójczych (ang. *Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act*), pestycydy są substancjami lub mieszaninami substancji, przeznaczonymi do ochrony, odstraszenia, zwalczania różnych szkodników jak zwierzęta, np. insekty, gryznie (insektycydy); niechcianych roślin (herbicydy), grzybów (fungicydy) i mikroorganizmów: bakterii, wirusów, prionów (bakteriocydy) ⁵¹.

Pestycydy fosforoorganiczne (ang. *organophosphate pesticide*, OP), należą do grupy insektycydów. Ze względu na wysoką toksyczność, szybką biodegradację, niską bioakumulację oraz szerokie spektrum działania są powszechnie stosowane w rolnictwie, sadownictwie i w hodowlach zwierząt ⁵¹. Pierwszy OP zsyntezowano w XIX wieku. Jednak do walki ze szkodnikami, zaczęto je wykorzystywać dopiero po 1930 roku gdy odkryto ich toksyczny wpływ na enzym, AChE. Wtedy to niemiecki chemik, Gerhard Schrader opracował pierwszy komercyjny OP, zawierający tetraetylopirofosforan (TEPP) oraz nieco później dobrze dziś znany paration ⁵². TEPP stosowany był m.in. na Jamajce do zwalczania much. Jego toksyczność okazała się jednak tak wysoka, że prócz owadów, zabijał także krowy, które miał chronić ⁵³. Schrader zapoczątkował nową erę w rolnictwie, ale stosowanie OP naraziło ludzi oraz zwierzęta na ich niezwykle toksyczne, pośrednie i bezpośrednie oddziaływanie związane z inhibicją AChE i innych enzymów (Rys. 5.7). Przykładem mogą być także choroby i giniecie pożytecznych pszczoł, co w ostatnim czasie stanowi ogromny problem ⁵⁴. Z tego powodu obecnie sugeruje się zastępowanie OP, mniej niebezpiecznymi, biopestycydami.



Rys. 5.7 Schemat przedstawiający różne drogi narażenia na działanie OP ludzi i zwierząt ⁵⁵.

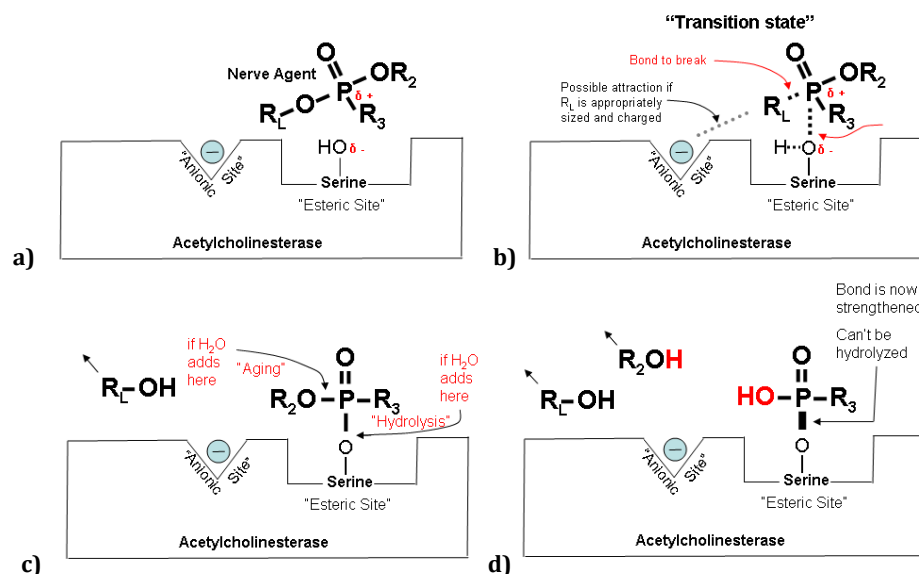
Typowy OP (Rys. 5.8) w centralnej części cząsteczki zawiera ugrupowanie fosforanowe (P=O) albo tiofosforanowe (P=S). Symbolem X oznaczono grupę odchodzącą podczas procesu fosforylacji AChE, która zastępowana jest (przez podstawienie nukleofilowe) atomem tlenu seryny z centrum aktywnego enzymu. Szybkość inhibicji zależy od rodzaju grupy odchodzącej, im większa tendencja do odejścia, tym większy efekt inhibicji AChE ⁵⁵. W najbardziej toksycznych OP, grupą odchodzącą jest fluor, natomiast te mniej chorobotwórcze zawierają grupy aryłowe lub alkilowe.



Rys. 5.8 Struktura OP: R₁, R₂ – alkoksylowe grupy poboczne, X – grupa odchodząca ⁵².

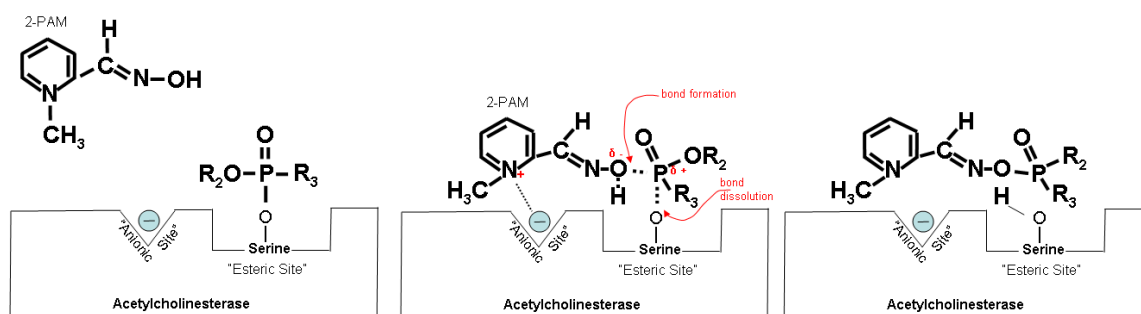
Toksyczność OP wynika z inhibicji AChE, przez tworzenie silnego wiązania kowalencyjnego pomiędzy OP a centrum aktywnym enzymu. Spontaniczna hydroliza tak związanego OP i uwolnienie centrum aktywnego jest procesem niezwykle powolnym lub nawet nieodwracalnym. Powoduje to długotrwały efekt toksyczny, który polega na gromadzeniu w organizmie neuroprzekaźnika, acetylocholinę, zakłócającego pracę mięśni. W konsekwencji prowadząc do problemów z oddychaniem, pracą serca, ostatecznie nawet do śmierci ⁵⁶.

Mechanizm inhibicji AChE wygląda następująco (Rys. 5.9). Cząsteczka OP zbliża się do grupy hydroksylowej seryny w centrum aktywnym enzymu (Rys. 5.9a). Częściowo dodatnio naładowany obszar OP przyciągany jest do częściowo ujemnie naładowanej seryny (Rys. 5.9b). Przyłączenie OP do AChE blokuje połączenie enzymu z ACh. Na tym etapie mogą nastąpić trzy procesy: spontaniczna hydroliza do wyjściowego stanu AChE (niezwykle powolny proces w przypadku OP), regeneracja do stanu początkowego AChE z udziałem oksymów (proces szybki) lub „starzenie” czyli oddysocjowanie grupy alkilowej od fosforanu i umocnieniu wiązania między enzymem i pestycydem (P-O). Po tym ostatnim procesie regeneracja AChE nie jest możliwa (Rys. 5.9c,d) ^{55,57-59}.



Rys. 5.9 Mechanizm inhibicji AChE przez OP: **a)** OP w pobliżu centrum aktywnego AChE, **b)** stan przejściowy, pokazano które wiązania ulegają rozerwaniu, **c)** zablokowana AChE, **d)** proces „starzenia” OP ⁵⁹.

Jak wspomniano wyżej, istnieje możliwość reaktywacji enzymu przez działanie silnym nukleofilem, np. z grupy oksymów. Związki te mają właściwości strukturalne umożliwiające reaktywację AChE, która polega na usunięciu cząsteczki inhibitora z miejsca aktywnego enzymu. Przykładem takiego reaktywatora jest pralidoksyna (2-[(hydroksylimino)metylo]-1-metylopiryd-1-yna, 2-PAM) (Rys. 5.10). Substancja ta jest inhibitorem AChE, ale w odróżnieniu od pestycydów, dezaktywuje enzym odwracalnie. Dodatkowo naładowany atom azotu z cząsteczki 2-PAM przyciągany jest do anionowego miejsca centrum aktywnego AChE. Następnie zachodzi reakcja pomiędzy 2-PAM a pestycydem przyłączonym do ES centrum aktywnego, oddysocjowanie produktu i uwolnienie centrum aktywnego enzymu (Rys. 5.10). Efekt reaktywacji przez 2-PAM tłumaczony jest m.in. efektem alfa, czyli wzrostem nukleofilowości molekuly spowodowany obecnością sąsiedniego atomu z wolną parą elektronową ^{59,60}.



Rys. 5.10 Mechanizm reaktywacji zablokowanego przez PO enzymu AChE z zastosowanie pralidoksyny (2-PAM) ⁵⁹.

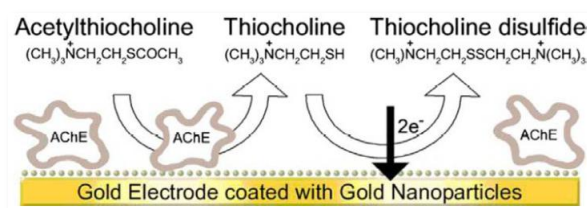
Mając na uwadze przedostawanie OP do gleby, wód gruntowych i powierzchniowych, a przez to wysokie ryzyko zatrucia, chronicznego oddziaływania OP na ludzi i nieodwracalne tego skutki, Unia Europejska wprowadziła zakaz stosowania stężonych pestycydów i niektórych ich rodzajów. Najwyższy dopuszczalny, całkowity poziom OP w żywności wynosi 0,01 mg kg⁻¹ (Rozporządzenie (WE) nr 396/2005), całkowite stężenie OP w wodzie pitnej 0,5 µg l⁻¹, oraz każdego z osobna OP 0,1 µg l⁻¹ (EU Drinking Water Directive 98/83/EC) ^{61,62}. Ustalone limity narzucają konieczność kontroli zawartości PO w produktach spożywczych, co wymaga opracowania odpowiednich do tego narzędzi.

Popularne metody analityczne stosowane do detekcji OP to przede wszystkim: elektroforeza kapilarna, kolorymetria, chromatografia gazowa, cieczowa oraz cienkowarstwowa, sprzężone ze spektrometrią mas ^{56,62}. Mimo, że są bardzo czułe, mają ograniczenia. Są czasochłonne, procedura przygotowania próbek jest skomplikowana. Ponadto wymagają drogich urządzeń oraz zatrudnienia wykwalifikowanego personelu i nie można zaadoptować ich do warunków polowych.

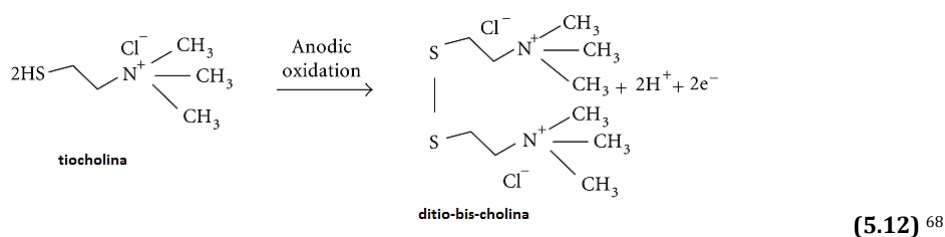
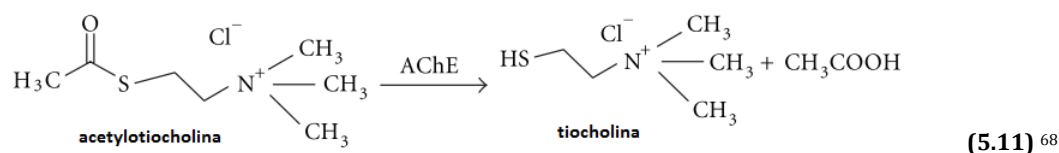
Biosensory enzymatyczne, łącząc wysoką czułość z niewielkimi rozmiarami i przystępną ceną, stanowią alternatywę dla metod tradycyjnych. Ze względu na zastosowany rodzaj przetwornika, dzielimy je na biosensory: optyczne, fluorescencyjne, a wśród elektrochemicznych: potencjometryczne, konduktometryczne oraz najpopularniejsze amperometryczne ⁶³. Biocujniki elektrochemiczne dzieli się na działające bezpośrednio oraz pośrednio przez inhibicję. Czujniki bezpośrednie opierają się na enzymatycznej hydrolizie OP oraz elektrochemicznej detekcji jej produktu ⁶⁴. Jednak najczęściej detekcja OP opiera się na inhibicji aktywności enzymu. Wyróżnia się sensory monoenzymatyczne (AChE lub butylocholinoesteraza), bienzymatyczne (cholinoesteraza-cholinooksydaza) lub trienzymatyczne (cholinoesteraza-cholinooksydaza-peroksydaza) ^{63,65,66}. Detekcja OP możliwa jest także z zastosowaniem sensorów chemicznych (bez użycia enzymu), wykorzystując zdolność elektrotleniania niektórych pestycydów, zawierających grupy nitrofenylowe, np. paration, paraokson ⁶². Spośród czujników elektrochemicznych na uwagę zasługują również sensory immunochemiczne ⁶².

Pierwszy czujnik oparty na inhibicji cholinoesterazy przedstawiony został w 1962 roku przez Guibalt'a ⁶³. Od tego czasu pojawiło się wiele różnych tego typu urządzeń wykrywających pestycydy oraz inne środki oddziałujące na układ nerwowy, np. gazy bojowe czy metale ciężkie.

Najszerzej opisywany biosensor OP to monoenzymatyczny czujnik amperometryczny, w którym zaadoptowano naturalną właściwość OP do inhibicji enzymu, AChE. W czujniku tym nie można zastosować acetylocholiny, neuroprzekaźnika, który jest naturalnym substratem AChE ponieważ produkt jego hydrolizy, cholina, jest nieaktywny elektrochemicznie i jego amperometryczna detekcja nie byłaby możliwa (z powodzeniem używany jest jednak w oznaczeniach potencjometrycznych) ⁶⁷. Z tego powodu, jako substrat, stosuje się syntetyczną pochodną acetylocholiny, acetylotiocholiny (ATCl), której produkt enzymatycznej hydrolizy, tiocholina (TC) (Równ. 5.11), jest aktywna elektrochemicznie. Rejestrowany sygnał pochodzi od utleniania TC (Rys. 5.11) zgodnie z reakcją (Równ. 5.12). Element biorozpoznający (AChE) czujnika poddawany jest działaniu pestycydu, który wiążąc się w centrum aktywnym, zmniejsza ilość generowanej TC. Prowadzi to do spadku mierzonego prądu. Sygnał elektrochemiczny jest proporcjonalny do stężenia TC, natomiast odwrotnie proporcjonalny do stężenia pestycydu. AChE zazwyczaj jest unieruchomiona na powierzchni elektrody, a ATCl rozpuszczona w elektrolicie. Zastosowane podłoże elektroaktywne musi wykazywać właściwości katalityczne w stosunku do utleniania TC ⁶³.



Rys. 5.11 Schemat enzymatycznej reakcji hydrolizy ATCl do TC i dalszego utleniania TC zachodzącego na powierzchni złotej elektrody pokrytej enzymem, AChE ⁶⁴.



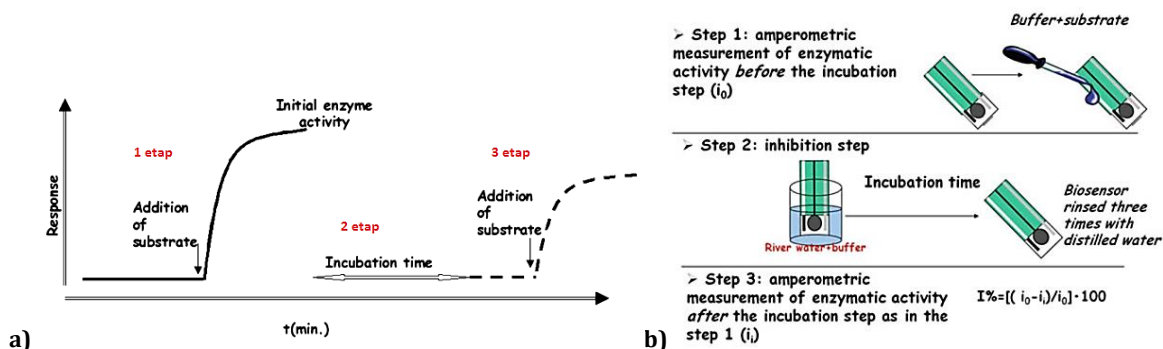
Jedną z wad takich bioczuJNIKÓW jest brak selektywności, dlatego stosuje się systemy wielo-enzymatyczne w jednym urządzeniu lub przeciwciała, które pełnią funkcję rozpoznającą (immunosensory). Alternatywną metodą zapewnienia selektywności i wysokiej czułości jest zastosowanie enzymów modyfikowanych genetycznie^{62,69}. Sotiropoulou i współpracownicy, stosując wysokoczule mutanty AChE *Drosophila melanogaster*: E69Y, Y71D, osiągnęli zdumiewający LOD dla dichlorwosu wynoszący 10⁻¹⁷ M przy 40% inhibicji⁷⁰. Przykład ten pokazuje, że czułość inhibitorowego biosensora zależy w dużej mierze od warstwy biorozpoznającej czyli od enzymu, który powinien charakteryzować się dużym powinowactwem do danego OP, o czym mówi wartość stałej inhibicji (Tab. 5.1).

Tab. 5.1 Porównanie stałej inhibicji dla AChE naturalnego i mutantów, dla trzech różnych OP⁷¹.

AChE origin	Type of AChE	Inhibition constant k_i , mmol/L		
		Chlorpyriphos oxon	Chlorfenvinphos	Malaoxon
<i>Drosophila melanogaster</i>	B1 (wild type)	990	4.8	1.0
	B6 L366F	1200	7.0	2.5
	B24 F368C	34	4.1	0.5
	B53 F368W	68	6.0	1.0
	B394 (patented)	2500	55.4	5.0
Electric eel	Wild type	3.5	0.14	0.1

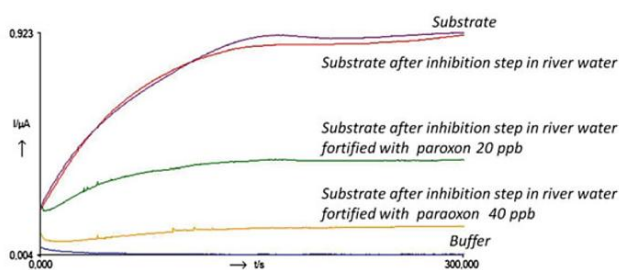
Na czułość i stabilność urządzenia wpływa także sposób unieruchomienia enzymu na elektrodzie⁷². Niebagatelną rolę odgrywa wybrana procedura pomiaru stężenia OP, ilość czy aktywność enzymu, czas inkubacji elektrody w OP oraz stężenie substratu (ATCl)⁷³.

Istnieją co najmniej cztery możliwe sposoby pomiaru amperometrycznego przeprowadzanego bioczuJNIKIEM inhibitorowym⁷³. Dobór procedury ma związek z kinetyką i stopniem odwracalności inhibicji. Najczęściej stosowany jest protokół trójstopniowy, który pozwala osiągnąć niską LOD (Rys. 5.12). W pierwszym kroku wykonuje się pomiar wstępny przy pełnej aktywności unieruchomionego enzymu. Etap drugi polega na zanurzeniu (inkubacji) elektrody w roztworze pestycydu przez ściśle określony czas, a etap trzeci na powtórny pomiarze sygnału elektrochemiczny, który tym razem jest niższy i proporcjonalny do stężenia OP (Rys. 5.12a,b). Istotny jest proces płukania elektrody w wodzie po etapie inkubacji, który zmniejsza ryzyko zakłóceń pochodzących od zanieczyszczenia próbki, np. odwracalnymi inhibitorami, niezwiązanymi kowalencyjnie, detergentami itp.⁷³.



Rys. 5.12 Trój etapowa procedura pomiaru stężenia OP: a) schemat pomiaru amperometrycznego ⁷⁴, b) schemat wykonania procedury z użyciem SPE ⁷³.

Przykładowy amperogram otrzymywany przy oznaczaniu OP metodą trójstopniową przedstawia Rys. 5.13 ⁷³. Dwie krzywe odpowiadające największej wartości prądu rejestrowano przy pełnej aktywności enzymu, kolejne zaś po inkubacji elektrody w roztworze paraoksonu o różnym stężeniu. Poddanie elektrody działaniu OP spowodowało wyraźny spadek aktywność AChE.



Rys. 5.13 Amperometryczny pomiar stężenia OP w wodzie w oparciu o inhibicję enzymu ⁷³.

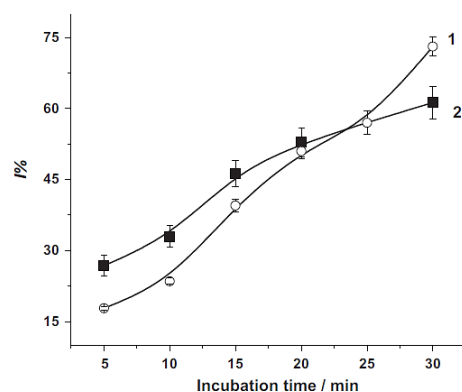
Spadek aktywności enzymu określa procent jego inhibicji ($I\%$), który oblicza się na podstawie zmierzonego prądu przed i po inkubacji w OP (Równ. 5.13). Zazwyczaj LOD stanowi stężenie dla którego obserwuje się inhibicję na poziomie 10% ⁷⁵.

$$I\% = \frac{I_0 - I}{I_0} \times 100\% \quad (5.13) \quad ^{75}$$

I_0 – prąd mierzony przed inkubacją elektrody w OP

I – prąd mierzony po inkubacji elektrody w OP

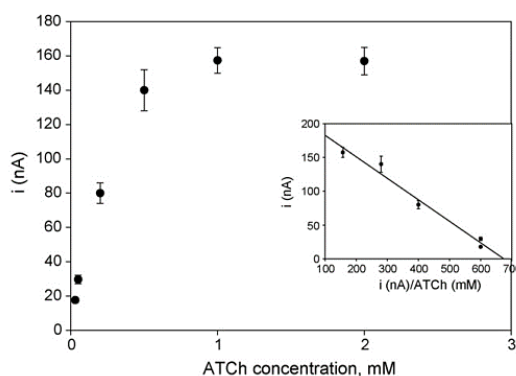
Czas inkubacji jest to czas reakcji enzymu z inhibitorem, w tym przypadku OP. Stopień dezaktywacji enzymu rośnie wraz z wydłużeniem czasu inkubacji, zazwyczaj aż do osiągnięcia plateau ⁷³. Rys. 5.14 pokazuje, że z wydłużeniem czasu inkubacji rośnie procent inhibicji, czyli zwiększa się czułość elektrody. Dobór odpowiedniej wartości opiera się na kompromisie pomiędzy pożądanymi parametrami analitycznymi a rozsądnym czasem eksperymentu, który zazwyczaj wynosi 10-30 min.



Rys. 5.14 Zależność procentu inhibicji enzymu od czasu inkubacji elektrody SPE modyfikowanej SWCNT, ftalocyjaniną kobaltu (CoPc) i AChE: 1-30 ppb paraokson, 2-10 ppb malaokson ⁷⁶.

Znaczący wpływ na czułość biosensora ma aktywność użytego enzymu. Ilość zaimmobilizowanego enzymu powinna być tak dobrana aby otrzymać mierzalny sygnał. Należy przy tym pamiętać, że im mniejsza aktywność AChE tym niższa jest LOD ⁷³. Wymagane jest bardzo czułe podłoże elektrodowe na TC oraz sposób unieruchomienia AChE, który nie wpływa na aktywność enzymu ⁷³. Innym istotnym parametrem jest oczywiście pH, a nawet temperatura elektrolitu.

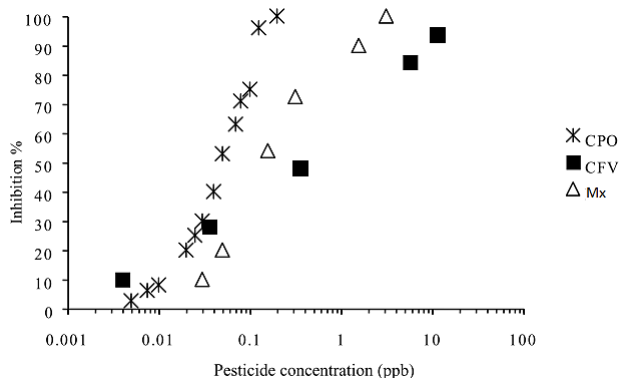
Minimalne możliwe stężenie substratu, dzięki któremu można osiągnąć maksymalną szybkość reakcji, również jest niezbędne dla zapewnienia niskiego poziomu wykrywalności OP ^{73,77}. Stężenie substratu, dobierane jest w taki sposób, aby rejestrować wyraźny sygnał elektrochemiczny. Wybiera się wartość stężenia odpowiadającą plateau krzywej kalibracyjnej ATCl, wskazujące na wysycenie enzymu substratem (Rys. 5.15). Na podstawie tej krzywej można obliczyć stałą Michealisa-Menten, K_M , stosując diagram Eadie-Hofstee (Rys. 5.15 wstawka) i elektrochemiczną wersję równania Michaelisa-Menten (3.1) ²⁶. Stała ta mówi o powinowactwie enzymu do substratu. Dobry biosensor powinien wykazywać wartość K_M zbliżoną do wartości wolnego enzymu w roztworze, wtedy wiemy, że sposób jego unieruchomienia nie wywiera znaczącego wpływu na jego działanie ⁷³. Dla AChE wynosi ona 0,20-0,22 mM ⁷⁷. Autorzy otrzymali wartość równą 0,33 mM, co wskazuje, że unieruchomiony enzym nie utracił powinowactwa do substratu ⁷⁷.



Rys. 5.15 Krzywa kalibracyjna dla ATCl rejestrowana na elektrodzie SPE modyfikowanej Błękitem Pruskim i AChE, $E = 0,2$ V vs. Ag|AgCl, 0,1 M bufor fosforanowy pH = 7,4, 0,05 M KCl. Wstawka: diagram Eadie-Hofstee ⁷⁷.

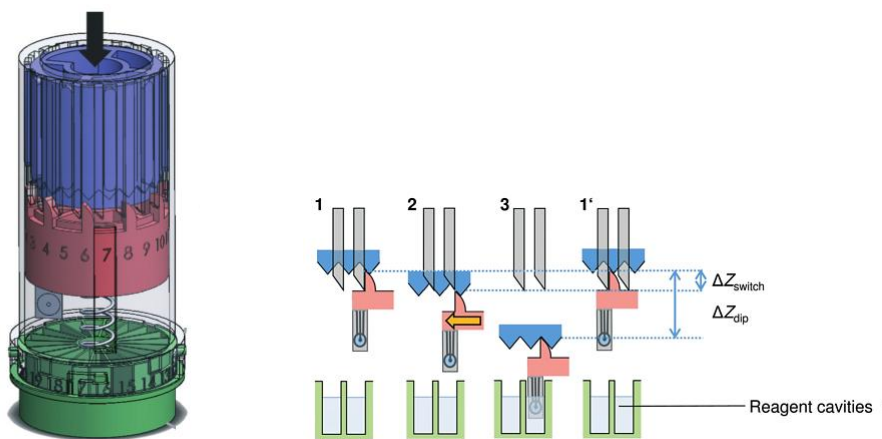
Inne problemy pojawiające się w optymalizacji amperometrycznych czujników OP to, np. spontaniczna hydroliza ATCl, która powoduje przeszacowanie anodowej odpowiedzi amperometrycznej. Aby jej zapobiec stosuje się m.in. dodatek NaCl do roztworu ATCl oraz przechowywanie go w lodzie ⁵¹.

Krzywa kalibracyjna OP przedstawia zależność procentu inhibicji enzymu od stężeniu zaaplikowanego pestycydu (Rys. 5.16). W niniejszym przykładzie prowadzono detekcję trzech pestycydów: oksonu chloropiryfosu (CPO), malaoksonu (Mx) oraz chlorfenwinfosu (CFV) otrzymując odpowiednio LOD ($I = 10\%$) 0,01, 0,02 oraz 0,005 $\mu\text{g l}^{-1}$. Do tego celu zastosowano elektrodę SPE modyfikowaną PVA-AWP z mutantem AChE B394 ⁷¹.



Rys. 5.16 Krzywa kalibracyjna na SPE modyfikowanym AChE B394 w PVA-AVP dla poszczególnych pestycydów ⁷¹.

Paust ze swoją grupą przedstawił bardzo ciekawe rozwiązania automatyzacji pomiarów stężenia OP przy użyciu biosensorów opartych na elektrodach SPE i AChE ⁷⁸. Rys. 5.17 prezentuje urządzenie z zamocowanym czujnikiem SPE, który zanurzany jest automatycznie, po kolei do pojemników z buforem, wodą i pestycydami ⁷⁸. Takie rozwiązanie stanowi alternatywę także dla urządzeń mikroprzepływowych, gdyż ogranicza ilość potrzebnej próbki, ale znacznie ułatwia pomiar próbek rzeczywistych, zawierających liczne zanieczyszczenia. Prócz przyspieszenia i automatyzacji analizy, urządzenie chroni operatora ograniczając kontakt z zainfekowanymi próbkami. Za jego pomocą oznaczono CPO w próbce jabłka z LOD równym 10^{-7} M.



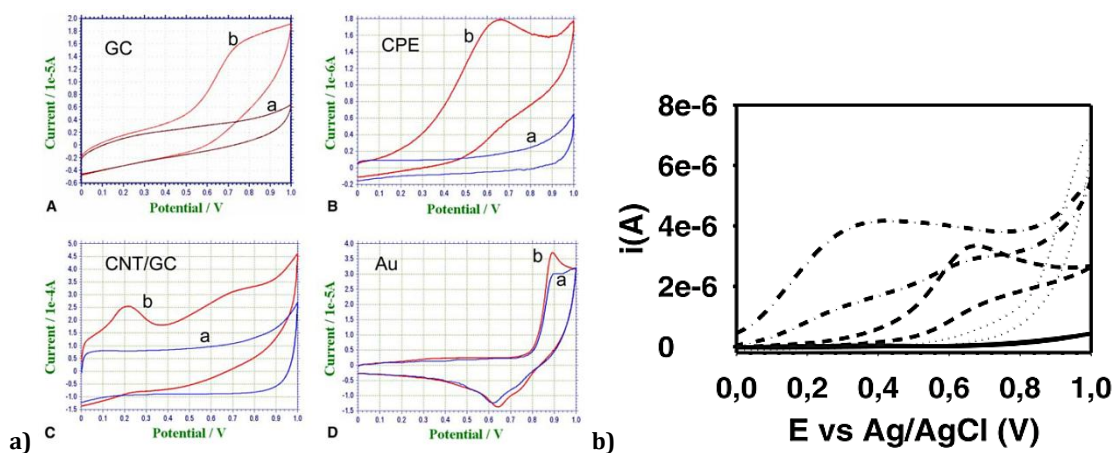
Rys. 5.17 Urządzenie do automatycznego zanurzania i analizy, wyposażone w bioczujniki typu SPE ⁷⁸.

Nowoczesne rozwiązania, postęp nanotechnologii i inżynierii genetycznej dają zupełnie nowe możliwości, które usprawniają oznaczanie OP i innych substancji niebezpiecznych. Elektrody drukowane typu SPE usprawniły i przyspieszyły analizę, a także, ze względu na niskie koszty, przyczyniły się do komercjalizacji biosensorów. Spowodowało to ogromny rozwój bioczujników w ostatnim czasie, a nawet wprowadzenie automatyzacji w oznaczeniach OP ⁷⁸.

5.2.1 Czujnik tiocholino

Reakcja utleniania tiocholino stosowana jest do określenia aktywności enzymu, AChE, a idąc dalej do opracowania o amperometrycznego biocujnika OP, opartego na inhibicji enzymu, AChE ⁷⁹. Do oszacowania stopnia dezaktywacji AChE można wykorzystać metodę adsorpcyjnej woltamperometrii strippingowej oraz potencjałowej chemisorpcji TC i desorpcji w KOH ⁸⁰. Jednak znacznie częściej wykorzystuje się bezpośredni proces utleniania TC. Pierwszy problem jaki napotyka się przy projektowaniu takiego sensora OP, dotyczy doboru elektrody na której ma przebiegać reakcja utleniania TC. Proces ten na litych metalicznych lub węglowych podłożach zachodzi przy wysokim potencjale (ok. 0,8 V vs. Ag|AgCl), bliskim granicy dostępnego zakresu, co skutecznie komplikuje, a nawet uniemożliwia ich stosowanie ⁶². Na zmniejszenie nadpotencjału tej reakcji pozwala użycie mediatorów, ułatwiających proces przeniesienia elektronu. Jeden z popularniejszych to ftalocyjanina kobaltu (CoPc) ⁸¹. Inne wielokrotnie stosowane to tetracyjanochinodimetan (TCNQ) ⁸², heksacyjanożelazian (II) potasu żelaza (III) (Błękit Pruski) ⁸³, heksacyjanożelazian potasu ⁷⁵ oraz kobaltu ⁸⁴. Heksacyjanożelaziany takich metali jak miedzi czy niklu stosowano jako mediatory innych tioli niż TC, np. cysteiny ⁸⁴. Alternatywnym rozwiązaniem jest modyfikacja powierzchni elektrody przez różnego rodzaju nanomateriały ⁸⁵. Przede wszystkim nanorurkami węgla ⁸⁶⁻⁸⁹, kropkami kwantowymi ⁹⁰, AuNP ^{91,92}, AuNP z tlenkiem grafenu ⁶⁶, CdS ⁹³, tlenkiem grafenu ⁶⁶, nanocząstkami (NiO, Pt, SnO₂) z grafenem ⁶⁶, a niedawno również nanocząstkami węgla typu CB ^{94,95}.

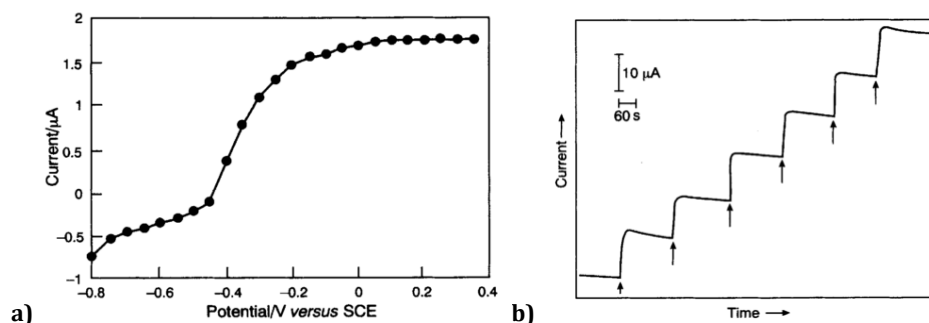
Rys. 5.18 przedstawia krótki przegląd krzywych woltametrycznych utleniania TC na różnych materiałach. Uwagę zwraca wysoki potencjał przy jakim zachodzi ten proces na litych materiałach (Rys. 5.18a(ABD)). Modyfikacja powierzchni nanostrukturami, w tym przypadku CNT (Rys. 5.18a(C)) i CB (Rys. 5.18b) obniża potencjał utleniania TC.



Rys. 5.18 Krzywe woltamperometryczne utleniania TC, zarejestrowane na: **a)** różnych elektrodach, niebieska krzywa – 0,01 M ATCl, czerwona krzywa – 0,01 M TC, 0,05 M bufor fosforanowy pH = 7,4, (E vs. Ag|AgCl), $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ ⁸⁹, **b)** SPE przed (ciągła i kreskowana krzywa), po modyfikacji CB (kropki, kreski-kropki)) (kropla 6 μl zawiesiny CB: 1 mg ml^{-1} w dimetyloformamid: woda (1:1, v:v)) w 0,05 M buforze fosforanowym pH = 7,4 z 0,1 M KCl (linia ciągła, kropki) oraz po dodaniu 1 mM TC (kreski, kreski-kropki) ⁹⁵.

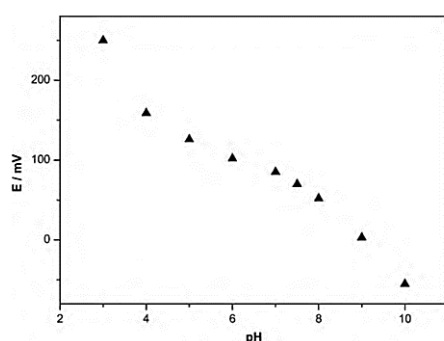
W celu oszacowania optymalnego potencjału służącego do oznaczeń chronoamperometrycznych, często wykorzystuje się metody hydrodynamiczne, w których mieszanie roztworu bądź obracanie elektrodą wymusza transport masy na drodze konwekcji. W konsekwencji pozwala na ustalenie stałej grubości warstwy dyfuzyjnej Nernsta i szybkie osiągnięcie ustalonego, granicznego prądu dyfuzyjnego. Potencjał, przy którym występuje plateau na krzywej hydrodynamicznej, wybierany jest do detekcji analitu, np. 0,1 V

(Rys. 5.19a). Chronoamperometryczna krzywa otrzymana przez sukcesywne dodawanie TC do mieszanego roztworu, pozwala na sporządzenie krzywej kalibracyjnej niezbędnej do przygotowania czujnika (Rys. 5.19b).



Rys. 5.19 a) Voltamperogram hydrodynamic zarejestrowany na elektrodzie SPE modyfikowanej CoPh, 0,25 mM TC, b) krzywa chronoamperometryczna otrzymana przez każdorazowy dodatek 25 µl 0,01 M TC do 20 ml elektrolitu, $E = 0,1$ V vs. SCE, 0,05 M bufor fosforanowy pH = 8⁸¹.

Proces utleniania TC (Rys. 5.20) zależy od pH elektrolitu. W reakcji utleniania TC biorą udział dwa protony i dwa elektrony (Równ. 5.12). Ze schematu tej reakcji wynika, że środowisko zasadowe jest rekomendowane do właściwego jej przebiegu. Biorąc pod uwagę że TC jest słabym kwasem ($pK_a = 7,7$)⁶⁷, pH elektrolitu znacząco wpływa jego dysocjacje. Z zależności przedstawionej na Rys. 5.20 wynika, że potencjał utleniania TC zależy od pH.



Rys. 5.20 Wpływ pH elektrolitu na potencjał piku utleniania TC (vs. Ag|AgCl) na elektrodzie CPE pokrytej MWCNT modyfikowanymi cieczą jonową, 5 mM TC, 0,1 M bufor Britton-Robison, $\nu = 100$ mV s⁻¹⁸⁶.

Możliwe są dwa mechanizmy reakcji utleniania TC. W pierwszym, początkowo zachodzi utlenienie protonowanej formy TC, a następnie deprotonowanie i powstanie rodnika, który ulega sprzężeniu (Równ. 5.14)^{89,96}. Według drugiego mechanizmu, najpierw dochodzi do oderwania protonu, a w następnej kolejności do utlenienia i powstania rodnika TC (Równ. 5.15)^{86,96}. Możliwe, że mechanizm pierwszy dominuje w elektrolicie o niższym pH, natomiast w bardziej alkalicznych roztworach dominuje mechanizm drugi.



Stosując elektrodę typu SPE zmodyfikowaną CB, Palleschi wraz z grupą uzyskał bardzo niską LOD czujnika 0,01 μM ⁹⁴. Inne doniesienia literaturowe prezentują LOD w zakresie od ok. 5-50 μM ^{87,94}.

Czujnik tiocholiny, ze względu na późniejsze zastosowanie w biosensorach pestycydów także tych komercyjnie dostępnych, powinien łączyć w sobie łatwość przygotowania, przystępną cenę, niską granicę wykrywalności, wysoką trwałość i stabilność oraz szeroki zakres liniowy krzywej kalibracyjnej.

5.3 Bibliografia

- (1) Bandothkar, A. J.; Wang, J. *Trends Biotechnol.* **2014**, *32*, 363–371.
- (2) Brzozka, Z.; Wróblewski, W. *Sensory Chemiczne*; Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, 1999.
- (3) Jackowska, K.; Krysinski, P. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405*, 3753–3771.
- (4) Iqbal, M.; Gupta, S.; Hussaini, S. *Adv. Biores.* **2012**, *3*, 158–163.
- (5) Stradiotto, N. R.; Yamanaka, H.; Zannoni, M. V. B. *J. Braz. Chem. Soc.* **2003**, *14*, 159–173.
- (6) Kemula, W.; Kublik, Z. *Anal. Chim. Acta* **1958**, *18*, 104–111.
- (7) Szczepaniak, W. *Metody Instrumentalne W Analizie Chemicznej*; Wydawnictwo Naukowe PWN, 1996.
- (8) Cynk, P.; Gawel, E. *Przegląd Med. Uniw. Rzesz. i Nar. Inst. Leków w Warszawie* **2012**, 373–378.
- (9) Arias-Carrión, Ó.; Pöppel, E. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars.)* **2007**, *67*, 481–488.
- (10) Rubia, K. *Biol. Psychol.* **2009**, *82*, 1–11.
- (11) Corona-Avendaño, S.; Alarcón-Angeles, G.; Rosquete-Pina, G. a.; Rojas-Hernández, A.; Gutierrez, A.; Ramírez-Silva, M. T.; Romero-Romo, M.; Palomar-Pardavé, M. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 1640–1647.
- (12) Perry, M.; Li, Q.; Kennedy, R. T. *Anal. Chim. Acta* **2009**, *653*, 1–22.
- (13) Ali, S. R.; Parajuli, R. R.; Balogun, Y.; Ma, Y.; He, H. *Sensors* **2008**, *8*, 8423–8452.
- (14) Wei, Q.; Zhang, F.; Li, J.; Li, B.; Zhao, C. *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 1430.
- (15) Habibi, B.; Pezhhan, H.; Pournaghi-Azar, M. H. *Microchim. Acta* **2010**, *169*, 313–320.
- (16) Amiri, M.; Eynaki, H.; Mansoori, Y. *Electrochim. Acta* **2014**, *123*, 362–368.
- (17) Ali, S. R.; Parajuli, R. R.; Balogun, Y.; Ma, Y.; He, H. *Sensors* **2007**, *8*, 8423–8452.
- (18) Ciucu, A. A. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *5*, 1–10.
- (19) Alothman, Z. A.; Bukhari, N.; Wabaidur, S. M.; Haider, S. *Sensors Actuators, B Chem.* **2010**, *146*, 314–320.
- (20) Rand, E.; Periyakaruppan, A.; Tanaka, Z.; Zhang, D.; Michael, P.; Andrews, R. J.; Lee, K. H.; Chen, B.; Meyyappan, M. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *42*, 434–438.
- (21) Plowman, B. J.; Mahajan, M.; O'Mullane, A. P.; Bhargava, S. K. *Electrochim. Acta* **2010**, *55*, 8953–8959.
- (22) Gu, X.; Jiang, G.; Jiang, G.; Chen, T.; Zhan, W.; Li, X.; Wu, S.; Tian, S. *Talanta* **2015**, in press.
- (23) Zhou, D.-M.; Ju, H.-X.; Chen, H.-Y. *J. Electroanal. Chem.* **1996**, *408*, 219–223.
- (24) Majewska, U. E.; Chmurski, K.; Biesiada, K.; Olszyna, A. R.; Bilewicz, R. *Electroanalysis* **2006**, *18*, 1463–1470.
- (25) Luo, J.; Jiang, S.; Liu, X. *Sensors Actuators, B Chem.* **2014**, *203*, 782–789.
- (26) Liu, L.; Xia, N.; Xing, Y.; Deng, D. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2013**, *8*, 11161–11174.
- (27) Corona-Avendaño, S.; Alarcón-Angeles, G.; Ramírez-Silva, M. T.; Rosquete-Pina, G.; Romero-Romo, M.; Palomar-Pardavé, M. *J. Electroanal. Chem.* **2007**, *609*, 17–26.
- (28) Luczak, T. *Electrochim. Acta* **2008**, *53*, 5725–5731.
- (29) Li, Y.; Liu, M.; Xiang, C.; Xie, Q.; Yao, S. *Thin Solid Films* **2006**, *497*, 270–278.
- (30) Koktysh, D. S.; Liang, X.; Yun, B. G.; Pastoriza-Santos, I.; Matts, R. L.; Giersig, M.; Serra-Rodríguez, C.; Liz-Marzán, L. M.; Kotov, N. a. *Adv. Funct. Mater.* **2002**, *12*, 255–265.
- (31) Mckenzie, K. J.; Marken, F.; Oyama, M.; Gardner, C. E.; Macpherson, V. **2004**, 89–96.
- (32) Xiao, M.; Wang, L.; Wu, Y.; Huang, X.; Dang, Z. *J. Solid State Electrochem.* **2008**, *12*, 1159–1166.
- (33) Wang, P.; Li, Y.; Huang, X.; Wang, L. *Talanta* **2007**, *73*, 431–437.
- (34) Wei, M.; Xie, Z.; Sun, L.; Gu, Z. *Z. Electroanalysis* **2009**, *21*, 138–143.
- (35) Kurniawan, F.; Tsakova, V.; Mirsky, V. M. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2009**, *9*, 2407–2412.
- (36) Alessio, P.; Rodríguez-Méndez, M. L.; De Saja Saez, J. A.; Constantino, C. J. L. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 3972–3983.
- (37) Manjunatha, R.; Suresh, G. S.; Melo, J. S.; D'Souza, S. F.; Venkatesha, T. V. *Sensors Actuators, B Chem.* **2010**, *145*, 643–650.
- (38) Siqueira, J. R.; Gasparotto, L. H. S.; Oliveira, O. N.; Zucolotto, V. J. *Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 9050–9055.
- (39) Zhang, Y.; Pan, Y.; Su, S.; Zhang, L.; Li, S.; Shao, M. *Electroanalysis* **2007**, *19*, 1695–1701.
- (40) Weng, X.; Cao, Q.; Liang, L.; Chen, J.; You, C.; Ruan, Y.; Lin, H.; Wu, L. *Talanta* **2013**, *117*, 359–365.
- (41) Tan, L.; Wang, G.; Chen, N.; Zhang, J.; Feng, H. *Chinese J. Chem.* **2015**, *33*, 185–191.
- (42) Zhang, X.; Wang, B.; Zhang, X.; He, T. *Sensors Actuators, B Chem.* **2012**, *166-167*, 695–701.
- (43) Kundys, M.; Szot, K.; Rozniecka, E.; Jönsson-Niedziółka, M.; Lawrence, R.; Bull, S. D.; Marken, F.; Opallo, M. *Anal. Methods* **2014**, *6*, 7532–7639.
- (44) Rastgar, S.; Shahrokhian, S. *Talanta* **2014**, *119*, 156–163.
- (45) Liu, S.; Yan, J.; He, G.; Zhong, D.; Chen, J.; Shi, L.; Zhou, X.; Jiang, H. *J. Electroanal. Chem.* **2012**, *672*, 40–44.
- (46) Amiri, M.; Shahrokhian, S.; Marken, F. *Electroanalysis* **2007**, *19*, 1032–1038.
- (47) Amiri, M.; Imanzadeh, H.; Banaei, A. *Mater. Sci. Eng. C* **2015**, *47*, 189–195.
- (48) Rozniecka, E.; Jonsson-Niedziółka, M.; Celebanska, A.; Niedziółka-Jonsson, J.; Opallo, M. *Analyst* **2014**, *139*, 2896–2903.
- (49) Zhao, Y.; Gao, Y.; Zhan, D.; Liu, H.; Zhao, Q.; Kou, Y.; Shao, Y.; Li, M.; Zhuang, Q.; Zhu, Z. *Talanta* **2005**, *66*, 51–57.
- (50) Sun, D.; Xie, X.; Zhang, H. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2010**, *75*, 88–92.

- (51) Stoytcheva, M.; Zlatev, R.; Velkova, Z.; Valdez, B. Organophosphorus Pesticides Determination by Electrochemical Biosensors. In *Pesticides-Strategies for Pesticides Analysis*; Stoytcheva, M., Ed.; INTECH, 2011.
- (52) Costa, L. G. *Clin. Chim. Acta* **2006**, *366*, 1–13.
- (53) Phifer, L.; Smith, D. *Report* **1997**, *16*, 5–6.
- (54) Vanengelsdorp, D.; Meixner, M. D. *J. Invertebr. Pathol.* **2010**, *103 Suppl*, S80–S95.
- (55) Elersek, T.; Filipic, M. *Pesticides - The Impacts of Pesticide Exposure. Chapter 12 Organophosphorus Pesticides - Mechanisms Of Their Toxicity*; InTech, 2011.
- (56) Dhull, V.; Gahlaut, A.; Dilbaghi, N.; Hooda, V. *Biochem. Res. Int.* **2013**, *2013*, 1–18.
- (57) Zhang, L.; Long, L.; Zhang, W.; Du, D.; Lin, Y. *Electroanalysis* **2012**, *24*, 1745–1750.
- (58) Jokanović, M.; Stojiljković, M. P. *Eur. J. Pharmacol.* **2006**, *553*, 10–17.
- (59) <http://www.atsdr.cdc.gov/csem/csem.asp?csem=11&po=23>.
- (60) Delfino, R. T.; Figueroa-Villar, J. D. *J. Phys. Chem.* **2009**, *113*, 8402–8411.
- (61) Dolan, T.; Howsam, P.; Parsons, D. J.; Whelan, M. J. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47*, 4999–5006.
- (62) Stoytcheva, M.; Zlatev, R. Organophosphorus Pesticides Analysis. In *Pesticides in the Modern World - Trends in Pesticides Analysis*; Stoytcheva, Margarita, Eds.; InTech, 2011.
- (63) Hoskocová, M.; Koblíha, Z. Modified Cholinesterase Technology in the Construction of Biosensors for Organophosphorus Nerve Agents and Pesticides Detection. In *Environmental Biosensors*; Somerset, V., Ed.; 2011.
- (64) Mostafa, G. A. E. *Open Electrochem. J.* **2010**, *2*, 22–42.
- (65) Sassolas, A.; Prieto-Simon, B.; Marty, J.-L. *Am. J. Anal. Chem.* **2012**, *03*, 210–232.
- (66) Stoytcheva, M.; Zlatev, R. Recent Trends in the Development of Electrochemical Biosensors for Organophosphorus Pesticides Determination. In *Modern Electrochemical Methods in Nano, Surface and Corrosion Science*; Aliofkhaezrai, M., Ed.; 2014.
- (67) Sgobbi, L. F.; Razzino, C. A.; Rosset, I. G.; Burtoloso, A. C. B.; Machado, S. A. S. *Electrochim. Acta* **2013**, *112*, 500–504.
- (68) Jubete, E.; Loaiza, O. A.; Ochoteco, E.; Pomposo, J. A.; Grande, H.; Rodríguez, J. *J. Sensors* **2009**, *2009*, 1–13.
- (69) Istamboulie, G.; Noguer, T.; Marty, J. **2010**, No. January.
- (70) Sotiropoulou, S.; Fournier, D.; Chaniotakis, N. a. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *20*, 2347–2352.
- (71) Galezowska, A.; Sikora, T.; Istamboulie, G.; Trojanowicz, M.; Polec, I.; Nunes, G. S.; Noguer, T.; Marty, J. *Sensors ans Mater.* **2008**, *20*, 299–308.
- (72) Vargas-Bernal, R.; Rodríguez-miranda, E.; Herrera-pérez, G. Evolution and Expectations of Enzymatic Biosensors for Pesticides. In *Pesticides - Advances in Chemical and Botanical Pesticides*; InTech, 2012.
- (73) Arduini, F.; Amine, A. Biosensors Based on Enzyme Inhibition. In *Biosensors Based on Aptamers and Enzymes*; Gu, M. B., Kim, H.-S., Eds.; Springer Berlin Heidelberg, 2014; Vol. 140.
- (74) Arduini, F.; Amine, A.; Moscone, D.; Palleschi, G. *Microchim. Acta* **2010**, *170*, 193–214.
- (75) Arduini, F.; Guidone, S.; Amine, A.; Palleschi, G.; Moscone, D. *Sensors Actuators B Chem.* **2013**, *179*, 201–208.
- (76) Ivanov, A. N.; Younosov, R. R.; Evtugyn, G. A.; Arduini, F.; Moscone, D.; Palleschi, G. *Talanta* **2011**, *85*, 216–221.
- (77) Arduini, F.; Ricci, F.; Tuta, C. S.; Moscone, D.; Amine, A.; Palleschi, G. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *580*, 155–162.
- (78) Drechsel, L.; Schulz, M.; von Stetten, F.; Moldovan, C.; Zengerle, R.; Paust, N. *Lab Chip* **2015**, *15*, 704–710.
- (79) Amine, A.; Mohammadi, H.; Bourais, I.; Palleschi, G. *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *21*, 1405–1423.
- (80) Du, D.; Ding, J.; Tao, Y.; Chen, X. *Sensors Actuators, B Chem.* **2008**, *134*, 908–912.
- (81) Hart, J. P.; Hartley, I. C. *Analyst* **1994**, *11*, 259–263.
- (82) Montesinos, T.; Pérez-Munguia, S.; Valdez, F.; Marty, J. L. *Anal. Chim. Acta* **2001**, *431*, 231–237.
- (83) Sun, X.; Wang, X. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25*, 2611–2614.
- (84) Arduini, F.; Cassisi, A.; Amine, A.; Ricci, F.; Moscone, D.; Palleschi, G. *J. Electroanal. Chem.* **2009**, *626*, 66–74.
- (85) Periasamy, A. P.; Umasankar, Y.; Chen, S.-M. *Sensors (Basel)* **2009**, *9*, 4034–4055.
- (86) Rotariu, L.; Zamfir, L.-G.; Bala, C. *Sensors Actuators B Chem.* **2010**, *150*, 73–79.
- (87) Jubete, E.; Żelechowska, K.; Loaiza, O. a.; Lamas, P. J.; Ochoteco, E.; Farmer, K. D.; Roberts, K. P.; Biernat, J. F. *Electrochim. Acta* **2011**, *56*, 3988–3995.
- (88) Zhang, S.-P.; Zheng, Y.; Shan, L.-G.; Shi, L.; Leng, K. *Appl. Surf. Sci.* **2008**, *255*, 439–441.
- (89) Liu, G.; Riechers, S. L.; Mellen, M. C.; Lin, Y. *Electrochem. Commun.* **2005**, *7*, 1163–1169.
- (90) Li, X.-H.; Xie, Z.; Min, H.; Li, C.; Liu, M.; Xian, Y.; Jin, L. *Electroanalysis* **2006**, *18*, 2163–2167.
- (91) Du, D.; Chen, S.; Cai, J.; Zhang, A. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *23*, 130–134.
- (92) Buiculescu, R.; Chaniotakis, N. a. *Bioelectrochemistry* **2012**, *86*, 72–77.
- (93) Pardo-Yissar, V.; Katz, E.; Wasserman, J.; Willner, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 622–623.
- (94) Arduini, F.; Majorani, C.; Amine, A.; Moscone, D.; Palleschi, G. *Electrochim. Acta* **2011**, *56*, 4209–4215.
- (95) Arduini, F.; Forchielli, M.; Amine, A.; Neagu, D.; Cacciotti, I.; Nanni, F.; Moscone, D.; Palleschi, G. *Microchim. Acta* **2015**, *182*, 643–651.
- (96) Nekrassova, O.; Allen, G. D.; Lawrence, N. S.; Jiang, L.; Jones, T. G. J.; Compton, R. G. *Electroanalysis* **2002**, *14*, 1464–1469.

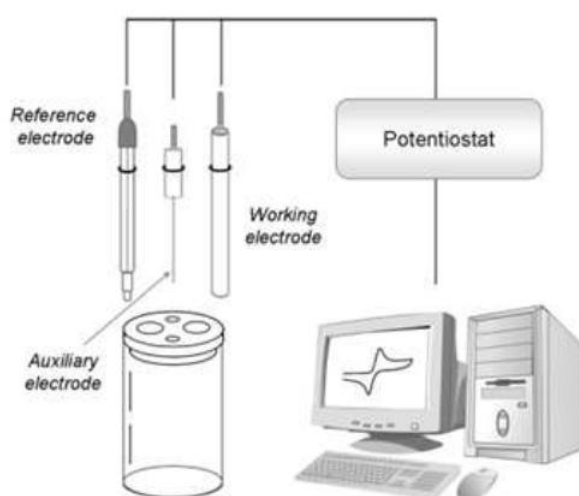
Część eksperymentalna

6. Stosowane techniki pomiarowe i odczynniki

6.1 Techniki elektrochemiczne

Techniki elektrochemiczne należą do metod instrumentalnych, opartych na badaniu reakcji elektrodowych i procesów zachodzących pomiędzy elektrodami ¹.

W kolejnych podrozdziałach opisano wybrane metody, bazujące na pomiarze prądu, płynącego pod wpływem potencjału przyłożonego do elektrody. Rejestrowany prąd związany jest z reakcjami utleniania-redukcji oraz procesami towarzyszącymi. Pomiar najczęściej wykonuje się w naczyniu trójelektrodowym zawierającym: elektrodę pracującą, na której przebiegają badane procesy; elektrodę odniesienia, względem której mierzony jest potencjał oraz przeciwelektrodę będącej odbiornikiem prądu (Rys. 6.1). Do roztworu dodaje się odpowiedni elektrolit podstawowy zapewniający przewodnictwo elektryczne. Potencjałem elektrody pracującej steruje się za pomocą potencjostatu i komputera.



Rys. 6.1 Schemat elektrochemicznego układu pomiarowego ².

W niniejszej pracy stosowano następujące elektrody:

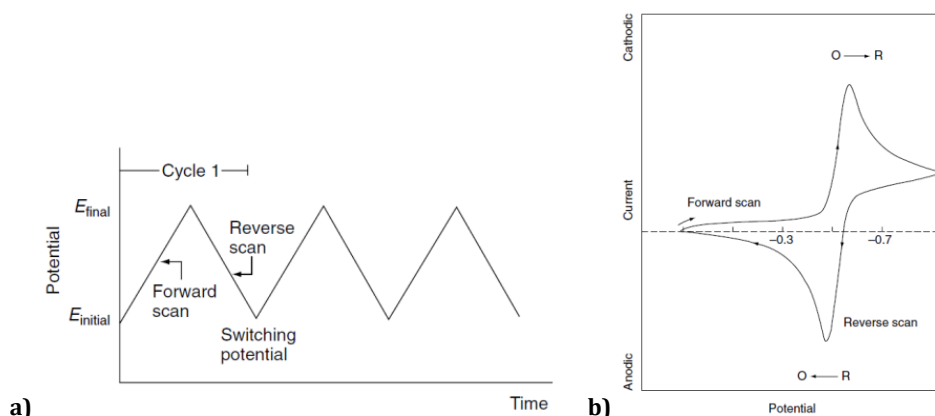
- elektrodę odniesienia (referencyjną): elektrodę chlorosrebrową $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{KCl}_{3\text{M}}$
- elektrodę pomocniczą (przeciwelektrodę): drut platynowy (średnica, $d = 0,5$ mm, Mennica Polska)
- elektrodę pracującą: zmodyfikowane ITO (oporność $8\text{-}12 \Omega \text{ cm}^{-1}$, Delta Technologies, USA), GC (RDE, $d = 3$ mm, ALS Co.), złoto naporowane na szkło (Arrandee), węglowe elektrody sitodrukowane (DS): C110 (Dropsens) oraz elektrody sitodrukowane (SPEL) otrzymane od dr Elena Jubete (IK4-CIDETEC, Centre for Electrochemical Technologies, San Sebastian, Hiszpania), mikroelektrodę złotą, wykonaną przez zatopienie drutu złotego ($d = 25 \mu\text{m}$, Goodfellow) w szkle borokrzemianowym za pomocą wyciągarki do pipet, PC-10, Narishige).

ITO przed modyfikacją myte było w etanolu i w wodzie za pomocą płuczki ultradźwiękowej, a następnie wygrzewane w temp. 500°C przez 30 min. Zmodyfikowaną powierzchnię ITO ograniczano za pomocą taśmy klejącej z otworem o średnicy, $d = 5$ mm, taśma miedziana natomiast zapewniała kontakt elektryczny.

Jako elektrolit podstawowy stosowano wodne roztwory kwasów, zasad i soli oraz bufor fosforanowy.

6.1.1 Woltamperometria cykliczna

Woltamperometria cykliczna (ang. *cyclic voltammetry*, CV) jest najpopularniejszą techniką elektrochemiczną dostarczającą jakościowe i ilościowe dane o procesie elektrodowym. W prosty i szybki sposób informuje o termodynamice i kinetyce reakcji utleniania-redukcji, często sprzężonej z reakcją chemiczną lub adsorpcją³. CV polega na pomiarze natężenia prądu płynącego przez badaną elektrodę, podczas wymuszenia liniowej zmiany potencjału (Rys. 6.2a). W rezultacie otrzymuje się zależność mierzonego prądu od przyłożonego potencjału, zwaną woltamperogramem cyklicznym (Rys. 6.2b). Rys. 6.2b prezentuje woltamperogram odpowiadający reakcji redoks (Równ. 6.1).



Rys. 6.2 Woltamperometria cykliczna: **a)** polaryzacja elektrody w czasie, **b)** typowy woltamperogram dla procesu odwracalnego (Równ. 6.1)³.



Zakładając, że w roztworze występuje jedynie forma utleniona (*O*), eksperyment rozpoczyna się od potencjału przy którym nie zachodzi żaden proces i elektrodę polaryzujemy się w kierunku niższych wartości potencjału. Zbliżając się do potencjału formalnego (E°), charakterystycznego dla danej reakcji redoks, prąd katodowy zaczyna wzrastać, aż do osiągnięcia wartości maksymalnej i uformowania piku. W pobliżu powierzchni elektrody tworzy się zredukowana forma (*R*), która z kolei po zawróceniu potencjału zostaje utleniona z utworzeniem piku anodowego³. Dalsze obniżanie prądu w funkcji potencjału związane jest z wyczerpywaniem się depolaryzatora przy powierzchni elektrody.

Podstawą interpretacji woltamperogramu cyklicznego jest analiza prądu i potencjału pików. Jednym z ważnych parametrów badanego układu jest odwracalność zachodzącego procesu (Rys. 6.3). Dla całkowicie odwracalnego procesu, prąd piku (I_p) jest proporcjonalny do stężenia depolaryzatora i można go wyrazić równaniem Randlesa-Sevčika:

$$I_p = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} A C D^{1/2} \nu^{1/2} \quad (6.2)^3$$

- n – liczba wymienianych elektronów
- A – powierzchnia elektrody [cm^2]
- D – współczynnik dyfuzji [$\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$]
- ν – szybkość polaryzacji elektrody [V s^{-1}]
- C – stężenie depolaryzatora [mol cm^{-3}]

Liniowa zależność prądu piku od pierwiastka z szybkości polaryzacji elektrody, wskazuje na proces elektrodowy kontrolowany transportem masy (seminieskończona dyfuzja liniowa). W procesie odwracalnym, potencjały piku anodowego ($E_{p,a}$) i katodowego ($E_{p,c}$) nie zależą od

szybkości polaryzacji, a stosunek rejestrowanych prądów ($I_{p,a}/I_{p,c}$) równy jest jedności dla prostego układu redoks. Potencjał formalny procesu redoks wyrażony jest równaniem:

$$E^{\circ} = \frac{E_{p,a} + E_{p,c}}{2} \quad (6.3)^3$$

Różnica pomiędzy potencjałami pików mówi o liczbie wymienianych w reakcji elektronów (Równ. 6.4). Dla odwracalnego procesu jednoelektronowego wynosi on 59 mV (w temperaturze 25°C).

$$\Delta E_p = E_{p,a} - E_{p,c} = \frac{2,22 RT}{nF} \quad (6.4)^3$$

R – uniwersalna stała gazowa, 8,314 [JK⁻¹mol⁻¹]

T – temperatura [K]

F – stała Faradaya, 96 487 [C mol⁻¹]

W procesie nieodwracalnym, którego szybkość kontrolowana jest szybkością wymiany elektronów, prądy pików są mniejsze i bardziej rozseparowane, a potencjał pików zależy od szybkości polaryzacji elektrody (Równ. 6.5, jednostki jak w Równ. 6.2).

$$E_p = E^{\circ} - \frac{RT}{\alpha n_a F} \left[0,78 - \ln \frac{k^{\circ}}{D^{1/2}} + \ln \left(\frac{\alpha n_a F v}{RT} \right)^{1/2} \right] \quad (6.5)^3$$

n_a – liczba elektronów biorących udział w procesie przeniesienia ładunku

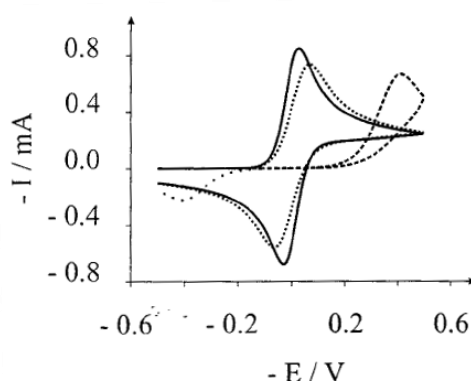
α – współczynnik przeniesienia ładunku

k° – standardowa elektrochemiczna stała szybkości

Prąd pików jest proporcjonalny do stężenia substratu (Równ. 6.6), ale jego wartość jest niższa od obserwowanej w procesie odwracalnym (Rys. 6.3).

$$I_p = (2,99 \times 10^5) n (\alpha n_a)^{1/2} A C D^{1/2} v^{1/2} \quad (6.6)^3$$

Dla procesu quasi-odwracalnego potencjały pików są mocno rozseparowane, a szybkość kontrolowana jest przeniesieniem ładunku i transportem masy. Kształt krzywej jest funkcją $k^{\circ} / \sqrt{\pi a D}$ (gdzie $a = F n v / RT$). Dla dużych wartości ($k^{\circ} / \sqrt{\pi a D}$), proces staje się bardziej odwracalny, dla małych zaś nieodwracalny (np. gdy szybkość polaryzacji elektrody jest duża).



Rys. 6.3 Przykładowa krzywa voltamperometryczna dla procesu odwracalnego (linia ciągła), quasi-odwracalnego (kropki), nieodwracalnego (kreski) ⁴.

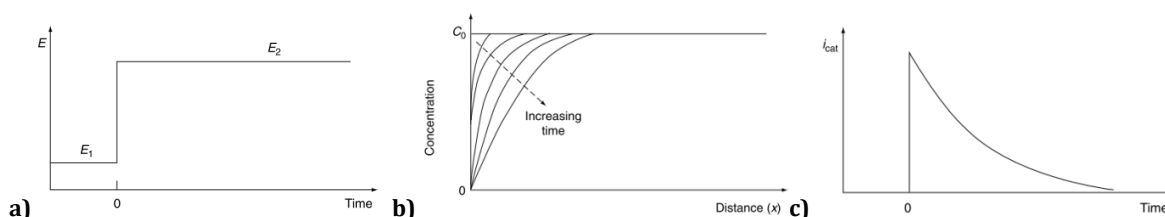
Woltamperometrię cykliczną stosuje się do określenia mechanizmu zachodzącego procesu, w tym udziału reakcji chemicznych, poprzedzających lub następujących po procesie

wymiany elektronów. Współzawodnictwo reakcji powoduje zmiany kształtu krzywej woltamperometrycznej. Przykładem może być mechanizm EC (wspomniany w Rozdz. 5.1), w którym produkt procesu elektrochemicznego ulega dalszej reakcji chemicznej. W takiej sytuacji prąd piku jest znacznie niższy, ponieważ produkt reakcji usuwany jest z przestrzeni przyelektrodowej.

6.1.2 Chronoamperometria

Chronoamperometria polega na polaryzacji elektrody pracującej, początkowo potencjałem przy którym nie występuje proces faradajowski, a następnie do potencjału przy którym ten proces zachodzi (Rys. 6.4a) ³. Rejestrowany chronoamperogram jest zmianą natężenia prądu w czasie (Rys. 6.4c). Niedobór substratu powoduje rozszerzanie warstwy dyfuzyjnej i zwiększanie nachylenia krzywej gradientu stężeń wraz z upływem czasu (Rys. 6.4b). Na amperogramie obserwuje się spadek prądu zgodnie z równaniem Cottrella (Równ. 6.7) ³.

$$I(t) = \frac{nFACD^{1/2}}{\pi^{1/2}t^{1/2}} \quad (6.7)^3$$

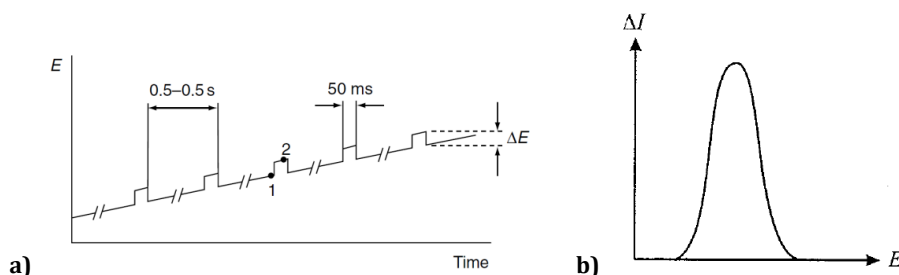


Rys. 6.4 Chronoamperometria: **a)** zmiana potencjału w czasie eksperymentu, **b)** krzywa gradientu stężenia w czasie, **c)** rejestrowany amperogram jako zmiana natężenia prądu w czasie ³.

6.1.3 Różnicowa woltamperometria pulsowa

Różnicowa woltamperometria pulsowa (ang. *differential pulse voltammetry*, DPV) jest przydatną metodą w elektroanalizie szczególnie do oznaczania śladowych ilości substancji ³. W DPV stosuje się impulsy prostokątne o małej amplitudzie (ok. 30 mV), narzucane na liniowo zmieniający się potencjał (Rys. 6.5a) ¹. Rejestrowany prąd (ΔI) jest różnicą prądu mierzonego tuż przed końcem pulsu potencjałowego (I_2) (punkt 2) i prądu tuż przed przyłożeniem pulsu (I_1) (punkt 1) (Równ. 6.8).

$$\Delta I = I_2 - I_1 \quad (6.8)$$



Rys. 6.5 Różnicowa woltamperometria pulsowa: **a)** polaryzacja elektrody w czasie ³, **b)** woltamperogram DPV jako różnica mierzonego prądu (ΔI) w funkcji przyłożonego potencjału ⁴.

W rezultacie otrzymuje się pik prądu, którego wielkość jest proporcjonalna do stężenia analitu (Rys. 6.5b) (Równ. 6.9).

$$I_p = \frac{nFAD^{1/2}C}{\sqrt{\pi t_m}} \frac{(1-\sigma)}{(1+\sigma)} \quad (6.9)^3$$

$$\sigma = e^{[(nF/RT)(\Delta E/2)]}$$

ΔE – amplituda pulsu

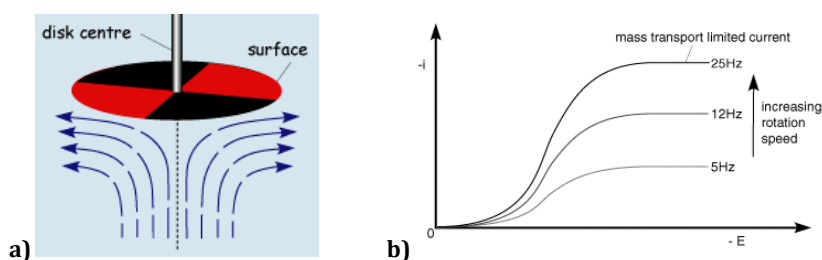
t_m – czas po aplikacji pulsu

Metoda DPV znacząco redukuje udział prądów pochodzących od procesów niefaradajowskich, np. ładowania warstwy podwójnej. Ułatwia także rozdzielenie sygnałów dla mieszaniny związków. Szerokość uzyskiwanego piku (w połowie wysokości piku, $W_{1/2}$) skorelowana jest ze stechiometrią reakcji i w tym przypadku dla jednoelektronowego procesu wynosi 30,1 mV (w temperaturze 25°C) (Równ. 6.10), dzięki czemu zwiększona jest rozdzielczość w stosunku do metody woltamperometrii cyklicznej.

$$W_{1/2} = \frac{3,52 RT}{nF} \quad (6.10)^3$$

6.1.4 Wirująca elektroda dyskowa

Metoda wirującej elektrody dyskowej (ang. *rotating disc electrode*, RDE) zaliczana jest do metod hydrodynamicznych, w których do zwiększenia transportu masy do powierzchni elektrody wykorzystuje się proces konwekcji^{3,5}. Metoda ta umożliwia uzyskanie wielu informacji na temat kinetyki oraz mechanizmu procesów katalitycznych zachodzących na powierzchni elektrody. Ponadto rejestruje się wyższe prądy niż w metodach niehydrodynamicznych, tym samym poprawia się czułość i granice wykrywalności substancji. W metodzie tej zazwyczaj stosuje się elektrody dyskowe obracane ze stałą, ściśle określoną prędkością kątową (ω). Siła odśrodkowa obracającej się elektrody wywołuje ruch cieczy w płaszczyźnie równoległej do elektrody, z dala od jej środka. Natomiast świeży elektrolit stale zasasywany jest głębi roztworu. Obserwuje się laminarny profil przepływu (Rys. 6.6a).



Rys. 6.6 a) Profil przepływu cieczy powstający przy obracającej się elektrodzie, **b)** rejestrowany woltamperogram w zależności od szybkości obrotów elektrody⁶.

RDE pozwala na szybkie ustalenie się stanu stacjonarnego, dlatego rejestrowane woltamperogramy mają kształt fali (Rys. 6.6b). Zwiększając szybkość obrotów elektrody, zmniejsza się grubość warstwy dyfuzyjnej, z której produkt reakcji może zostać usunięty na drodze konwekcji, co powoduje wzrost strumienia reaktanta do powierzchni elektrody. Dla procesów kontrolowanych szybkością transportu reagenta, przebiegających bez zahamowań kinetycznych, rejestrowany prąd graniczny jest liniowo proporcjonalny od pierwiastka z prędkości kątowej elektrody i opisany równaniem Lewicza (dla układów odwracalnych):

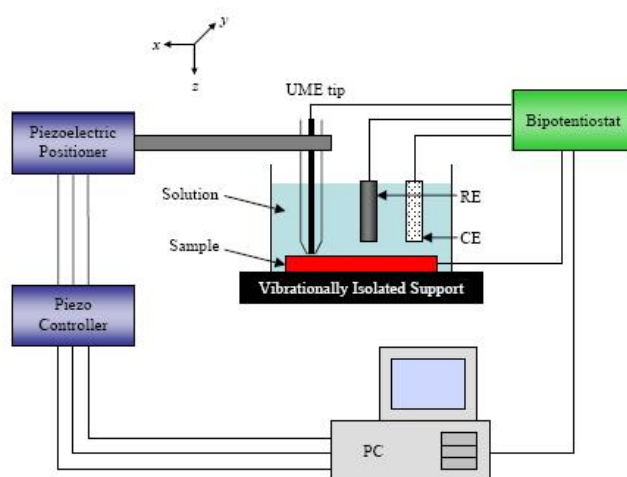
$$I_{Lewicza} = 0,62 nFAD^{2/3}\omega^{1/2}\nu^{-1/6}C \quad (6.11)^3$$

ν – lepkość kinematyczna roztworu [$\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$]

Dla powolnych procesów kinetycznych obserwuje się odchylenia od liniowości lub całkowity brak wpływu szybkości wirowania elektrody na rejestrowany prąd.

6.1.5 Skaningowa mikroskopia elektrochemiczna

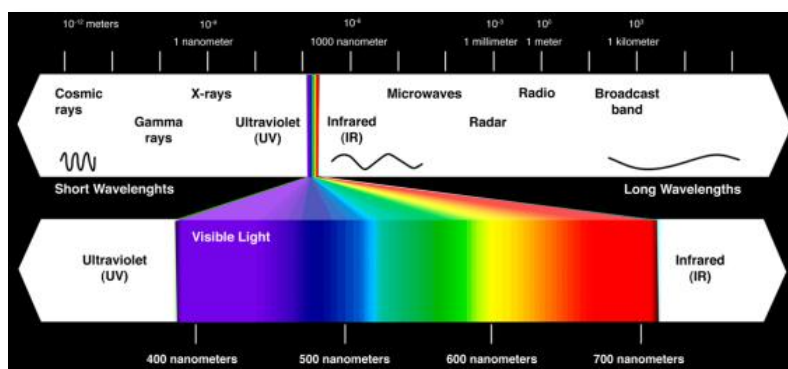
Skaningowy mikroskop elektrochemiczny (ang. *scanning electrochemical microscope*, SECM) umożliwia lokalną obserwację procesów elektrochemicznych³. W SECM mierzony jest prąd faradajowski reakcji redoks na mikroelektrodzie poruszającej tuż nad powierzchnią substratu (Rys. 6.7)³. Prąd ten jest funkcją przewodnictwa, natury chemicznej substratu oraz jego odległości od mikroelektrody. Technika ta ma bardzo szerokie zastosowanie w badaniu aktywności chemicznej, elektrochemicznej, a także topografii elektrod³.



Rys. 6.7 Schemat układu SECM⁷.

6.2 Techniki spektroskopowe

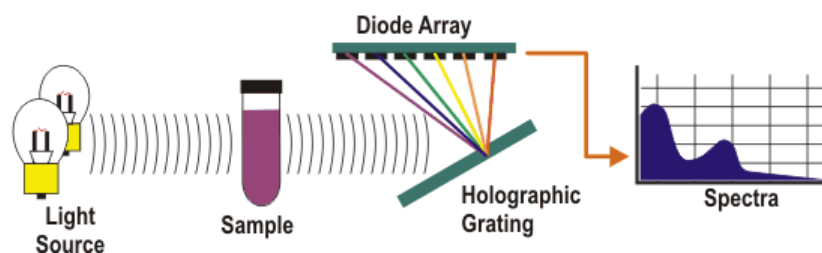
Techniki spektroskopii molekularnej opierają się na oddziaływaniu promieniowania elektromagnetycznego (Rys. 6.8) z cząsteczkami, co skutkuje zmianą ich stanów energetycznych⁸. Absorpcja promieniowania przez molekuly powoduje wzbudzenie elektronów i przejście na wyższe poziomy energetyczne, a rejestrowanym efektem jest odpowiednie widmo czyli obraz promieniowania rozłożony na poszczególne częstotliwości, długości fali lub energie. Stosowanie promieniowania dalekiej podczerwieni i mikrofal daje widmo rotacyjne, widmo oscylacyjne otrzymuje się pod wpływem promieniowania podczerwonego, a efektem oddziaływania promieniowania UV-Vis jest elektronowe widmo absorpcyjne. Techniki te służą do określania struktury, symetrii cząsteczek, rodzaju oddziaływań pomiędzy molekulami, można jest stosować do oznaczeń ilościowych i jakościowych⁸.



Rys. 6.8 Widmo promieniowania elektromagnetycznego ⁹.

6.2.1 Spektrofotometria UV-Vis

Spektrofotometria UV-Vis (ang. *ultra-violet*, UV, ang. *visible*, Vis) należy do najstarszych metod instrumentalnych. Polega na ilościowym pomiarze absorpcji albo transmisji światła widzialnego lub nadfioletowego przez próbkę (Rys. 6.9) ⁸. Pomiar absorpcji promieniowania odbywa się przez porównanie intensywności zabarwienia dwóch roztworów, z których jeden jest roztworem wzorcowym, drugi badanym. W rezultacie otrzymuje się widmo, czyli zależność absorpcji (A) w funkcji długości fali (λ). Absorbancja wyraża zdolność pochłaniania promieniowania przez dany ośrodek.



Rys. 6.9 Schemat działania spektrofotometru UV-Vis ¹⁰.

Oslabienie wiązki promieniowania, po przejściu przez ośrodek absorbujący o danej grubości (b) określa prawo Lamberta (Równ. 6.12) ⁸.

$$\ln \frac{I_0}{I} = kb = A \quad (6.12) \text{ } ^8$$

I_0 – natężenie wiązki promieniowania monochromatycznego padającego na jednorodny ośrodek absorbujący

I – natężenie wiązki promieniowania po przejściu przez ośrodek absorbujący

k – współczynnik absorpcji

Dla roztworu absorbancja proporcjonalna jest zarówno do grubości warstwy absorbującej jak i do jego stężenia (prawo Lamberta-Beera, Równ. 6.13)

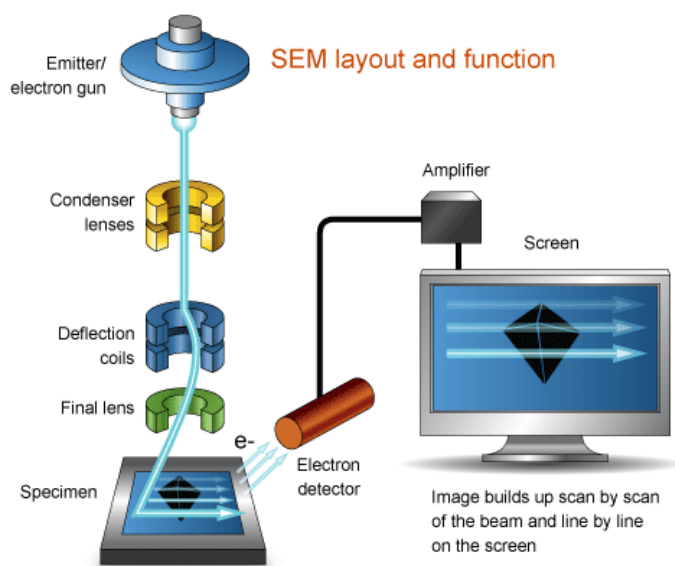
$$\ln \frac{I_0}{I} = kbc = A \quad (6.13) \text{ } ^8$$

Technika ta służy do oznaczeń jakościowych i ilościowych substancji absorbujących promieniowanie w zakresie UV-Vis oraz do badania równowag reakcji chemicznych ⁸.

6.3 Techniki mikroskopowe

6.3.1 Skaningowa mikroskopia elektronowa

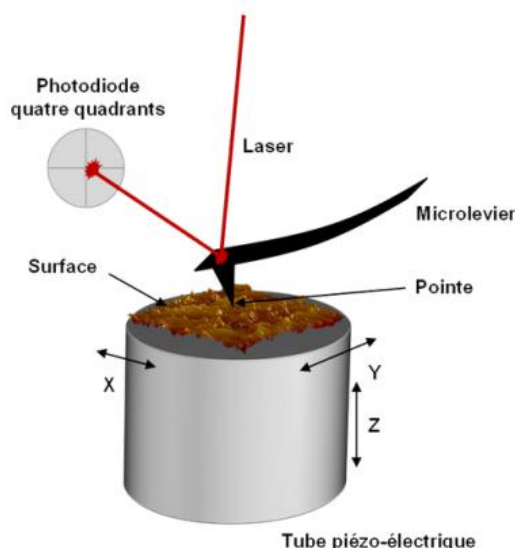
W skaningowym mikroskopie elektronowym (SEM) obraz powstaje na podstawie analizy sygnałów prądowych pochodzących z oddziaływania wiązki elektronów z powierzchnią próbki, której rozmiar i grubość ograniczone są jedynie wielkością komory mikroskopu ¹¹. W dziale elektronowym wytwarzana jest wiązka elektronów, która za pomocą soczewek kondensatorowych i elektromagnesów jest przyspieszana i ogniskowana na badanym obiekcie (Rys. 6.10). Obok próbki znajduje się licznik elektronów odbitych od powierzchni, które wpadając do niego powodują powstanie sygnału prądowego. Część elektronów może zostać pochłonięta przez badany materiał, co także służy do tworzenia obrazu. SEM może także dostarczać informacji o ilości i składzie pierwiastkowym próbki oraz o strukturze krystalograficznej. W celu uniknięcia jonizacji gazów przez wysokoenergetyczne promieniowanie i umożliwienia swobodnego poruszania się elektronów, pomiary wykonuje się w warunkach wysokiej próżni.



Rys. 6.10 Schemat działania skaningowego mikroskopu elektronowego ¹².

6.3.3 Mikroskopia sił atomowych

Mikroskop sił atomowych (ang. *atomic force microscope*, AFM) działa w oparciu o skanującą sondę, której funkcję pełni zaostroma igła umieszczona na końcu elastycznej belki (Rys. 6.11) ⁵. Od belki odbija się światło lasera i pada na detektor, fotodiodę. Siły wywierane przez powierzchnię na igłę, powodują wygięcie belki i odchylenie wiązki lasera. Sygnał z detektora jest więc funkcją stopnia wygięcia belki i może być rejestrowany w funkcji powierzchniowego położenia sondy. AFM umożliwia uzyskanie obrazu z atomową rozdzielczą, a nawet obserwację wiązań chemicznych ¹³.



Rys. 6.11 Schemat działania mikroskopu sił atomowych ¹⁴.

6.4 Stosowane odczynniki i aparatura

6.4.1 Odczynniki chemiczne

H₂SO₄ (98,08%, Chempur), NH₃ (25%, Chempur), HCl (36,46%, Chempur), acetonitryl bezwodny (99,8%, Sigma-Aldrich), etanol (96%, Chempur), 2-propanol (≥99,8%, Merck), methanol (99,8%, Chempur) KOH (Sigma-Aldrich), NaOH (POCH), KCl (Sigma-Aldrich), NaClO₄ (Fluka), Na₂SO₃ (POCH), 98% *tert*-butyloferrocen (*t*-BuFc, 98%, ABCR), kwas mrówkowy (98% Chempur), H₂O₂ (30%, Chempur), kwas 5,5-ditiobis-(2-nitrobenzoesowy) (DTNB, Sigma-Aldrich), bromek cetylotrimetyloamoni (CTAB, Sigma-Aldrich), 2-[(hydroksyimino)metylo]-1-metylopiryd-1-yna (2-PAM, Sigma-Aldrich), K₃Fe(CN)₆ (Sigma-Aldrich), Ru(NH₃)₆Cl₃ (Strem Chemicals Inc.), Na₂HPO₄ (POCH), NaH₂PO₄·H₂O (POCH), sól diamoniowa kwasu 2,2'-azyno-bis-(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowego) (ABTS(NH₄)₂, 98%, Sigma-Aldrich), chlorek acetylotiocholiny (ATCl, 99%, TLC, Sigma-Aldrich), jodek acetylotiocholiny (ATI, Sigma-Aldrich), α-D-glukoza (96%, Sigma-Aldrich), dopamina (Sigma-Aldrich), kwas moczowy (ABCR), L(+)-kwas askorbinowy (Riedel-de Haën), monohydrat kwasu cytrynowego (Chempur), Nafion (5%, Sigma-Aldrich), woda demineralizowana (Elix System, Milipore), argon (N5.0, Multax), tlen (N5.0, Multax), PVA-AWP (Toyo Gosei Kogyo Co (Chiba, Japan), otrzymany od dr Eleny Jubete, I4-CIDETEC, Centre for Electrochemical Technologies, San Sebastian, Hiszpania).

Prekursory procesu zol-żel: tetrametoksysilan (TMOS, 99%, Sigma-Aldrich), n-oktyltrietoksysilan (OTEOS, 95%, ABCR), siarczan trietoksysilopropyl(polietylenooksy)propylu potasu (TPSp, 11 PEG units, ABCR), chlorek N-trimetoksysilopropyl-N,N-trimetyloamoni (TMAp, 50% roztwór w MeOH, ABCR), chlorek N-tetradecyl-N,N-dimetylo-N-[3-(trimetoksysilopropyl)amoni] (TDAP, ABCR).

Pestycydy fosforoorganiczne: paraokson (Px), malaokson (Mx), TEPP, chlorfenwinfos (CFV), paration, fosmet, malation, dichlofos, diazinon, chlorpyrifos, trichlorfon (Sigma-Aldrich).

Enzymy: oksydaza bilirubiny izolowana z *Myrothecium verrucaria* (EC 1.3.3.5, 2,55 U mg⁻¹, Amano Enzyme Ic.), acetylocholinoesteraza: izolowana z *Electric Eel* (EE, Type VIS, Sigma-Aldrich), izolowana z *Drosophila melanogaster* genetycznie modyfikowana B394 (otrzymana od dr Eleny Jubete, I4-CIDETEC, Centre for Electrochemical Technologies, San Sebastian, Hiszpania).

Nanostruktury: nanocząstki węgla funkcjonalizowane grupami fenylosulfonowymi (CNP, Emperor 2000, Cabot Corporation), nanocząstki złota stabilizowane grupami: 1-(11-merkaptoundekano)-3-metylo-imidazoliowymi oraz sulfonianem 11-merkaptu-1-undecanu (syntezowane przez dr Macieja Paszewskiego), nanorurki węgla: gotowane w kwasie (CNT_{at}, SWCNT Elicarb, UK) oraz funkcjonalizowane sulfonianem pirenu (CNT_{ps}) (otrzymane od dr hab. Martina Jonsson-Niedziółki, IChF PAN)

Anoda ogniwa hybrydowego: drut Zn ($d = 250 \mu\text{m}$, 99,95%, Goodfellow)

6.4.2 Aparatura

AFM: Nanoscope V controller (Bruker), MultiMode Scanning Probe Microscope (Veeco),
pomiary wykonywane w trybie kontaktowym

Mikroskop metalograficzny Nikon Eclipse LV 50 z kamerą DS-U1

Myjka ultradźwiękowa EMAG Emmi-12 HC

Potencjostat: Autolab (Methrom AG)

Półautomatyczna drukarka DEK 248 screen-printing system (DEK, UK)

SECM: CHI900B SECM (CH Instruments)

SEM: FEI Nova NanoSEM 450, Zeiss Supra Field Emission microscope

Spektrofotometr UV-Vis Thermo Evolution 300

Wysokorozdzielczy skaningowy transmisyjny mikroskop elektronowy HITACHI HD2700

Zasilacz do elektroforezy: Mini Pro 300V Power Supply, Major Science

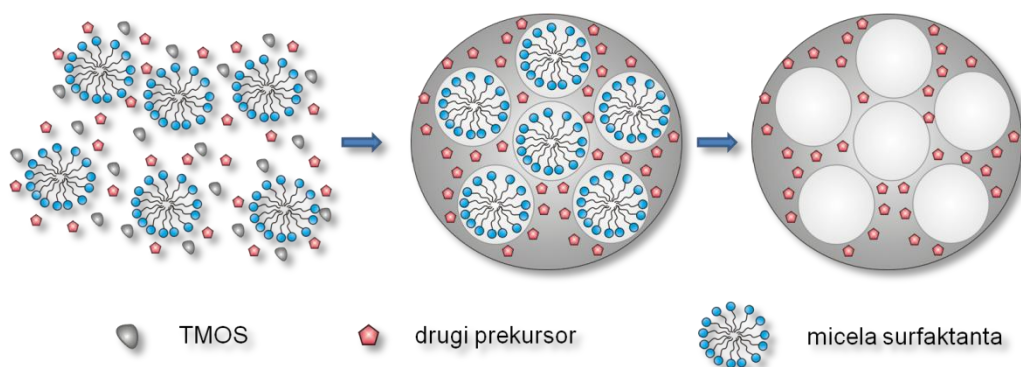
Rozkład i wielkość porów oznaczano w Instytucie Inżynierii Chemicznej Polskiej Akademii Nauk w Gliwicach przez dr Janusza Malinowskiego

6.5 Bibliografia

- (1) Cyganski, A. *Podstawy Metod Elektroanalitycznych*; Wydawnictwo Naukowe i Techniczne, Warszawa, 1999.
- (2) Álvarez-Lueje, A.; Pérez, M.; Zapata, C. *Top. Drug Metab.* **2010**, 221–246.
- (3) Wang, J. *Analytical Electrochemistry*; John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2006.
- (4) Compton, R. G.; Banks, C. E. *Understanding Voltammetry*; World Scientific, 2006.
- (5) Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *Electrochemical Method Fundamentals and Applications*; John Wiley & Sons, Inc., 2001.
- (6) www.ceb.cam.ac.uk/research/groups/rg-eme/teaching-notes/hydrodynamic-voltammetry.
- (7) <http://www2.warwick.ac.uk/fac/sci/chemistry/research/unwin/electrochemistry>.
- (8) Szczepaniak, W. *Metody Instrumentalne W Analizie Chemicznej*; Wydawnictwo Naukowe PWN, 1996.
- (9) <http://www.immunolight.com/technology/>.
- (10) <https://www.etslabs.com/analysis.aspx?id=A52>.
- (11) Donten, M. L.; Donten, M. *Anal. Nauk. i Prakt.* **2001**, 4, 4–8.
- (12) <http://www.ammr.org.au/myscope/sem/practice/principles/layout.php>.
- (13) De Oteyza, D. G.; Gorman, P.; Chem, Y.-C.; Wickenburg, S.; Riss, A.; Mowbray, D. J.; Etkin, G.; Peddrarazi, Z.; Tsai, H.-Z.; Rubio, A.; et al. *Science (80-.)*. **2013**, 340, 1434–1437.
- (14) <http://www.biophyresearch.com/en/technique-analyse/atomic-force-microscopy/#prettyPhoto>.

7. Submikrocząstki polikrzemianowe syntezowane zmodyfikowaną metodą Stöbera

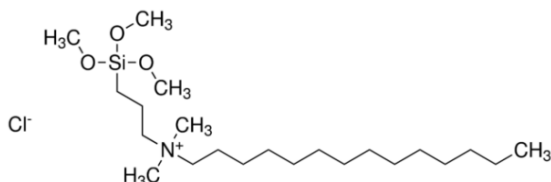
Do wytworzenia porowatej powierzchni elektrod typu LbL zastosowano funkcjonalizowane cząstki polikrzemianowe. Zsyntezowano je metodę Stöbera ¹ znaną od 1968 roku, opartą na procesie zol-żel, zmodyfikowanym przez użycie surfaktanta, umożliwiającego powstanie porowatej struktury ². Bromek cetylotrimetyloamonu (CTAB) pełnił rolę szablonu dla porów. Tworzy on micelowe dendryty wokół których kondensuje polikrzemian. Po usunięciu surfaktanta w strukturze cząstki pozostają puste przestrzenie (Rys. 7.1). W celu funkcjonalizacji powierzchni stosuje się mieszaninę prekursorów polikrzemianowych. Jako podstawowy i niezbędny do kondensacji, TMOS, oraz drugi, który wbudowując się w strukturę polikrzemianową modyfikuje powierzchnię różnymi grupami funkcyjnymi zmieniając jej właściwości (Rys. 7.1).



Rys. 7.1 Schemat tworzenia cząstek polikrzemianowych zmodyfikowaną metodą Stöbera.

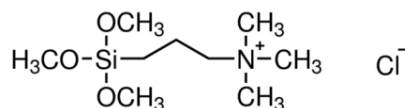
Zmieniając rodzaj drugiego prekursora, przygotowano trzy rodzaje cząstek:

- Chlorek N-tetradecylo-N,N-dimetylo-N-[3-(trimetoksylilo)propylo]amonu (TDAp, Rys. 7.2), uzyskanym cząstkom nadano nazwę TDA



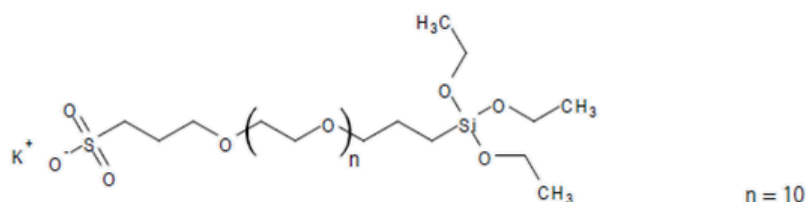
Rys. 7.2 Struktura TDAp ³.

- Chlorek N-trimetoksylilopropylo-N,N,N-trimetyloamonu (TMAp, Rys. 7.3), uzyskanym cząstkom nadano nazwę TMA



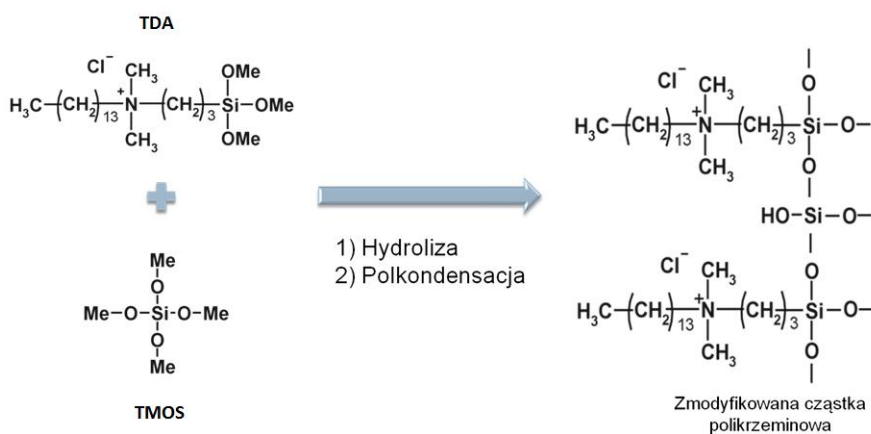
Rys. 7.3 Struktura TMAp ⁴.

- Siarczan trietoksylilopropylo(polietylenooksy)propylo potasu (TPSp, Rys. 7.4), uzyskanym cząstkom nadano nazwę TPS



Rys. 7.4 Struktura TPSP⁵.

W pierwszym etapie syntezy, TMOS i drugi prekursor rozpuszczono w metanolu (MeOH), następnie zmieszano je z roztworem zawierającym wodę, CTAB, MeOH jako rozpuszczalnik oraz amoniak pełniący rolę zasadowego katalizatora reakcji hydrolizy i polikondensacji (Tab. 7.1, Rys. 7.5). Roztwór mieszało przez kolejne 2 godz. za pomocą mieszadła magnetycznego. Obserwowano strącanie białego osadu, który następnie sączono pod zmniejszonym ciśnieniem oraz przemywano etanolem i wodą. W celu oczyszczenia cząstek i usunięcia surfaktanta z porów, osad gotowano w 1 M HCl w etanolu przez kolejne 24 godz. Następnie, cząstki sączono, przemywano wodą i suszono na powietrzu.

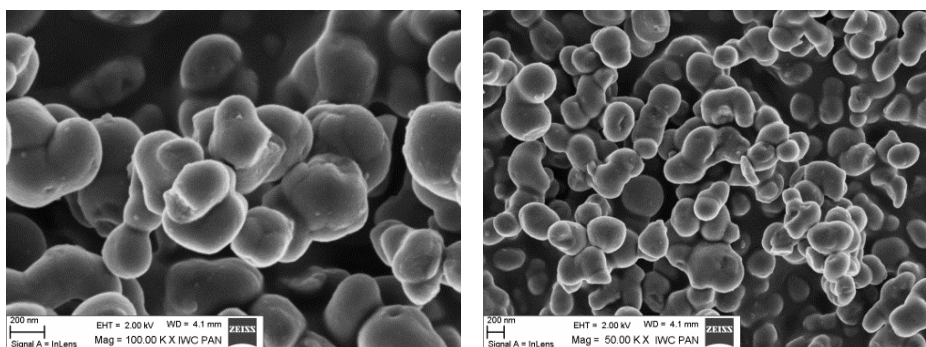


Rys. 7.5 Proces zol-żel syntezy funkcjonalizowanych cząstek polikrzemianowych TDA.

Tab. 7.1 Substraty użyte do syntezy trzech rodzajów cząstek polikrzemianowych.

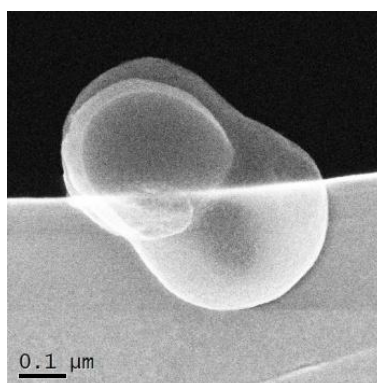
Rodzaj cząstek	TDA		TMA		TPS	
	1	2	1	2	1	2
Odczynnik	1	2	1	2	1	2
TMOS	537 μ l	-	537 μ l	-	537 μ l	-
Drugi prekursor	95,5 μ l	-	105,5 μ l	-	0,32 g	-
CTAB	-	0,5 g	-	0,5 g	-	0,5 g
H ₂ O	-	10 ml	-	10 ml	-	10 ml
NH ₃	-	3 ml	-	3 ml	-	3 ml
MeOH	-	9 ml	-	9 ml	-	9 ml

Średnica otrzymanych cząstek TDA, określona na podstawie obrazów SEM wynosi 200-400 nm. Ze względu na rozmiar można nazywać je submikrocząstkami. Obrazy SEM cząstek TDA przedstawiają ich nieregularny, owalny kształt (Rys. 7.6).



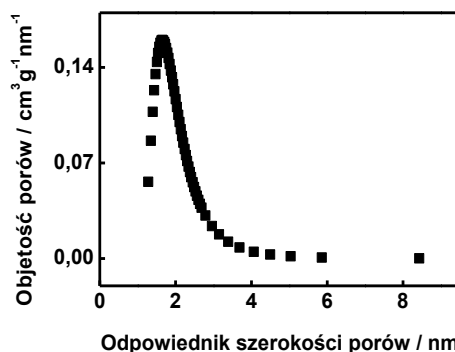
Rys. 7.6 Obrazy SEM submikrocząstek polikrzemianowych TDA.

Natomiast obrazy skaningowej transmisyjnej mikroskopii elektronowej (STEM) ukazujące topografię powierzchni, pokazuje silnie rozwiniętą powierzchnię cząstki (Rys. 7.7). Niestety obrazy transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) nie potwierdziły porowatości wewnętrznej. Być może jest to spowodowane jednakową wielkością porów wewnętrznych i zewnętrznych, co sprawiło, że zobrazowanie porów wewnętrznych przy dużej grubości próbki nie było możliwe.



Rys. 7.7 Obraz STEM cząstki TDA.

Adsorpcja azotu w temperaturze 77 K wykazała porowatość otrzymanych cząstek. Ich powierzchnię właściwą określono na podstawie izotermy BET. Dla cząstek TDA wynosi 330,98 m²g⁻¹ i jest mniejsza od powierzchni cząstek syntezowanych w zbliżony sposób ^{2,6}. Średnia średnica porów wynosi 2,6 nm (Rys. 7.8). Oznacza to, że cząstki te należą do grupy materiałów mezoporowatych ⁷.

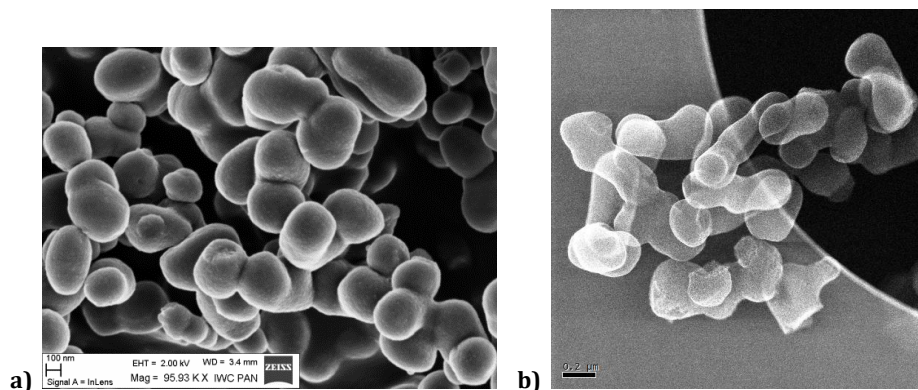


Rys. 7.8 Objętość i rozkład wielkości porów cząstki TDA na podstawie izotermy Dubinin-Astakhov.

Woltamperometria cykliczna posłużyła do zbadania zdolności cząstek TDA do akumulacji jonów. W tym celu na ITO z ograniczoną powierzchnią, naniesiono kroplę 5 μl zawiesiny TDA w metanolu (5 mg ml⁻¹) (ITO-TDA). Po całkowitym odparowaniu

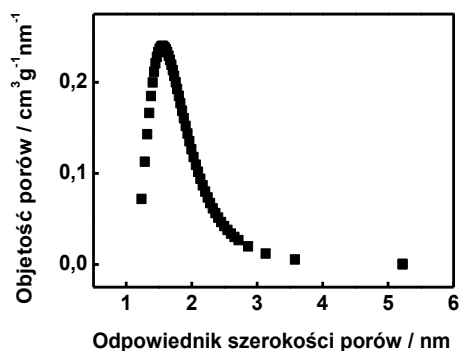
rozpuszczalnika, zanurzono elektrodę w roztworze 10^{-4} M $K_3[Fe(CN)_6]$ lub 10^{-4} M $Ru(NH_3)_6Cl_3$ w 0,1 M $NaClO_4$. W przypadku cząstek TDA, podobnie jak dla niemodyfikowanego ITO, podczas cyklowania nie obserwowano żadnych zmian w rejestrowanych woltamperogramach. Wskazuje to na brak akumulacji zarówno kationów jak i anionów. Brak akumulacji heksacyjanożelazianów (III), może być spowodowany hydrofobowym charakterem grup funkcyjnych TDA.

Kształt cząstek TMA (Rys. 7.9) i topografia powierzchni zbliżona jest do cząstek TDA (Rys. 7.6).



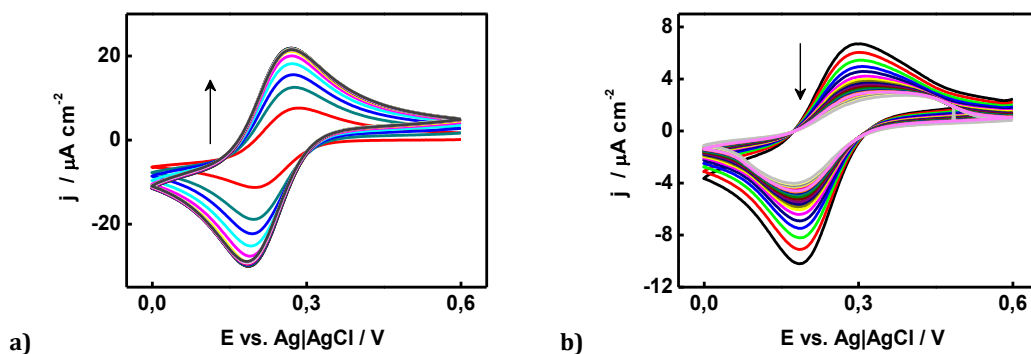
Rys. 7.9 Obraz: a) SEM, b) STEM, submikrocząstek polikrzemianowych TMA.

Powierzchnia właściwa cząstek TMA jest nieco większa od TDA i wynosi $412,39 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$. Średnia średnica porów natomiast $2,7 \text{ nm}$ (Rys. 7.10).



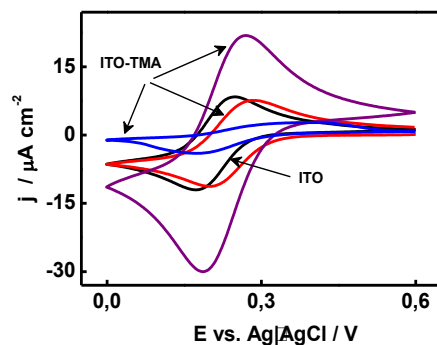
Rys. 7.10 Objętość i rozkład wielkości porów cząstki TMA na podstawie izotermy Dubinin-Astakhov.

Woltamperogramy rejestrowane na ITO pokrytym cząstkami TMA (ITO-TMA) w roztworze 10^{-4} M $K_3[Fe(CN)_6]$, charakteryzują się systematycznym wzrostem prądu pików utleniania-redukcji do osiągnięcia plateau (Rys. 7.11a). Sugeruje to akumulację anionów, odbywającą się na zasadzie wymiany przeciwjonu grup funkcyjnych cząstek. Po umyciu elektrody i zanurzeniu do czystego elektrolitu podstawowego, obserwuje się stopniowy spadek rejestrowanego prądu związany z wypłukiwaniem zakumulowanych na cząstkach anionów (Rys. 7.11b). Eksperyment przeprowadzony w roztworze 10^{-4} M $Ru(NH_3)_6Cl_3$ nie wykazał akumulacji kationu heksaaminorutenu (III) gdyż nie zaobserwowano wzrostu prądu pików na rejestrowanych krzywych woltamperometrycznych.



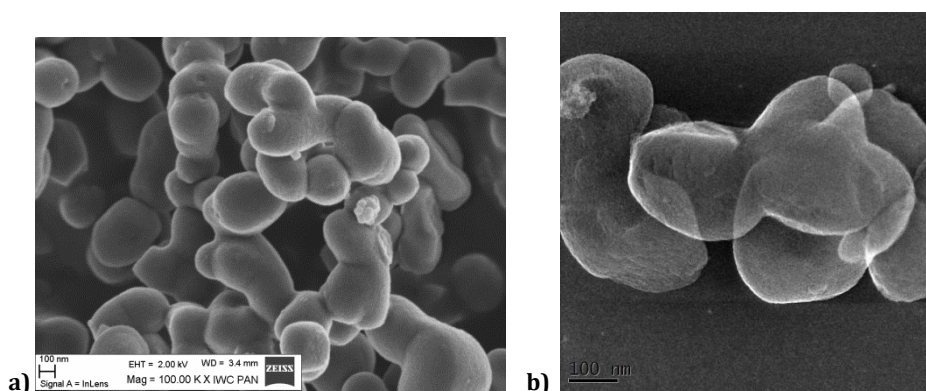
Rys. 7.11 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na ITO pokrytym kroplą 5 μl TMA w metanolu (5 mg ml^{-1}) (ITO-TMA) w: **a)** $10^{-4} \text{ M K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, $0,1 \text{ M NaClO}_4$, akumulacja anionów, kolejne cykle: 1-30, **b)** $0,1 \text{ M NaClO}_4$, wymywanie zakumulowanych anionów, kolejne cykle: 1-30, $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

W porównaniu do niemodyfikowanego ITO, w pierwszym cyklu zarejestrowanym na ITO-TMA, w roztworze jonów heksacyjanożelazianowych (III), obserwuje się przesunięcie potencjału i obniżenie prądów pików (Rys 7.12). Może to świadczyć o częściowym blokowaniu elektroaktywnej powierzchni ITO, nieprzewodzącymi cząstkami TMA.



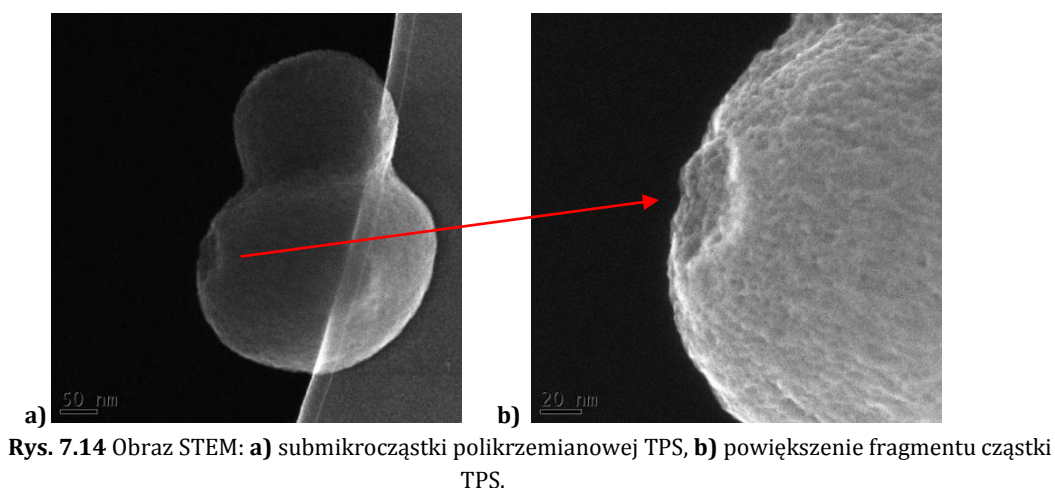
Rys. 7.12 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane w $10^{-4} \text{ M K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, $0,1 \text{ M NaClO}_4$ na niemodyfikowanym ITO (czarna krzywa), na ITO-TMA – pierwszy cykl akumulacji (czerwona krzywa) i po 50 min akumulacji (fioletowa); na ITO-TMA w $0,1 \text{ M NaClO}_4$ – po 50 min wymywania jonów (niebieska krzywa), $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

Cząstki TPS pokryte ujemnie naładowanymi grupami funkcyjnymi charakteryzują się morfologią zbliżoną do cząstek TDA i TMA (Rys. 7.13).

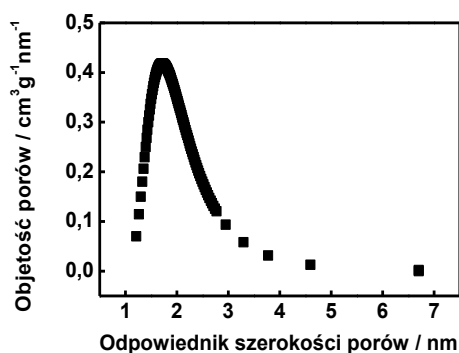


Rys. 7.13 Obraz: **a)** SEM, **b)** STEM, submikrocząstek polikrzemianowych TPS.

Rozwinięcie powierzchni cząstek TPS dobrze widoczne jest na obrazach STEM (Rys. 7.13b, 7.14), a szczególnie na powiększonym fragmencie (Rys. 7.14b).

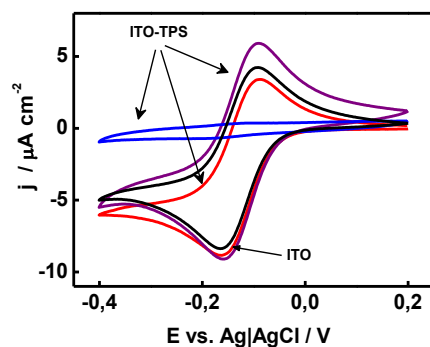


Powierzchnia właściwa cząstek TPS wynosi $1051,63 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ i jest znacznie większa od TDA oraz TMA. Natomiast średnia średnica poru tej cząstki wynosi $2,2 \text{ nm}$, czyli jest najmniejsza (Rys. 7.15).



Rys. 7. 15 Objętość i rozkład wielkości porów cząstek TDA, izoterma Dubinin-Astakhov.

Na elektrodzie ITO pokrytej cząstkami TPS (ITO-TPS) zaobserwowano niewielką akumulację kationu heksaaminorutenu (III), który następnie uległ praktycznie całkowitemu wymyciu (Rys. 7.16).



Rys. 7.16 Krzywa voltamperometryczna zarejestrowana na niemodyfikowanym ITO w $10^{-4} \text{ M Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$, $0,1 \text{ M NaClO}_4$ (czarna krzywa) oraz na ITO-TPS: w $10^{-4} \text{ M Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$, $0,1 \text{ M NaClO}_4$ – pierwszy cykl akumulacji (czerwona krzywa) i cykl po 50 min akumulacji (fioletowa krzywa); w $0,1 \text{ M NaClO}_4$ – po 50 min wymywania jonów, roztwór nasycony argonem, $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

Stosując zmodyfikowaną metodę Stöbera, przygotowano trzy rodzaje mezoporowatych sumikrocząstek polikrzemianowych, pokrytych dodatnimi grupami funkcyjnymi: TDA i TMA oraz ujemnymi grupami: TPS. Otrzymane cząstki scharakteryzowano przy użyciu technik obrazowania SEM i STEM. Zbadano także ich porowatość oraz zdolności akumulacji jonów. Okazało się, że cząstki TMA bardzo dobrze akumulują aniony heksacyjanożelazianowe (III), a cząstki TPS w niewielkim stopniu akumulują kationy heksaaminorutenu (III).

7.1 Bibliografia

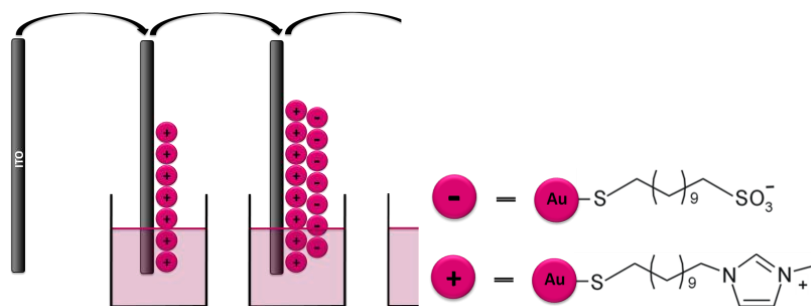
- (1) Stöber, W.; Fink, A.; Bohn, E. *J. Colloid Interface Sci.* **1968**, *26*, 62–69.
- (2) Walcarius, A.; Ganesan, V. *Langmuir* **2006**, *22*, 469–477.
- (3) <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/cds010526?lang=pl®ion=PL>.
- (4) <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/595888?lang=pl®ion=PL>.
- (5) <http://www.abcr.de/shop/en/catalogsearch/advanced/result/?q=AB255012>.
- (6) Lesniewski, A.; Niedziolka-Jonsson, J.; Sirieix-Plenet, J.; Gaillon, L.; Opallo, M. *Electrochem. Commun.* **2009**, *11*, 1305–1307.
- (7) Rouquerol, J.; Avnir, D.; Fairbridge, C. W.; Everett, D. H.; Haynes, J. H.; Pernicone, N.; Ramsay, J. .; Sing, K. S. W.; Unger, K. *Pure Appl. Chem.* **1994**, *66*, 1739–1758.

8. Złote elektrody otrzymane metodą warstwa-po-warstwie

8.1 Elektrody złote, Au-Au

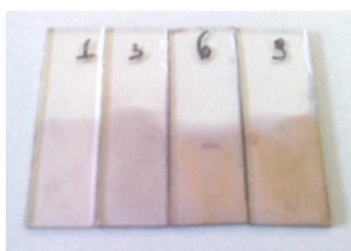
Metodę LbL zastosowano do przygotowania elektrod modyfikowanych różnoimiennie naładowanymi nanocząstkami złota bez użycia polielektrolitów lub innych molekuł spajających cząstki. Warstwy utworzono w oparciu o oddziaływania elektrostatyczne grup funkcyjnych cząstek.

Elektrody modyfikowane AuNP (Au-Au) utworzono przez naprzemienne zanurzenie ITO w zawiesinach różnoimiennie naładowanych nanocząstek złota (Rys. 8.1). AuNP(+) stabilizowane były grupami 1-(11-merkaptoundekano)-3-metylo-imidazoliowymi, syntezowanymi według wcześniej opisaney procedury ¹. Natomiast ujemnie naładowane AuNP(-) pokryte były sulfonianem 11-merkпто-1-undecanu. Średnicę cząstek określono za pomocą dyfraktometrii rentgenowskiej (ang. *small angle X-ray diffraction*) na 6,5 nm (AuNP(+)) oraz 5,9 nm (AuNP(-)). Do osadzenia warstw użyto zawiesiny AuNP(+) w metanolu (MeOH) o stężeniu 1,1 mg g⁻¹ oraz AuNP(-) o stężeniu 1,6 mg g⁻¹ w wodzie. ITO najpierw zanurzano w zawieszynie AuNP(+) na 5 s, pozostawiano do wyschnięcia, następnie płukano w czystym rozpuszczalniku w celu usunięcia słabo zaadsorbowanych cząstek. Po czym procedurę powtarzano z użyciem AuNP(-). W ten sposób tworzą jedną podwójną warstwę zawierającą cząstki AuNP(+) i AuNP(-). Osadzanie rozpoczęto od cząstek dodatnich ze względu na ujemny ładunek powierzchni ITO, którego punkt izoelektryczny mieści się pomiędzy 4 a 6 ². Przygotowano elektrody pokryte n-liczbą warstw (Au-Au(n), n = 1, 3, 6, 9).



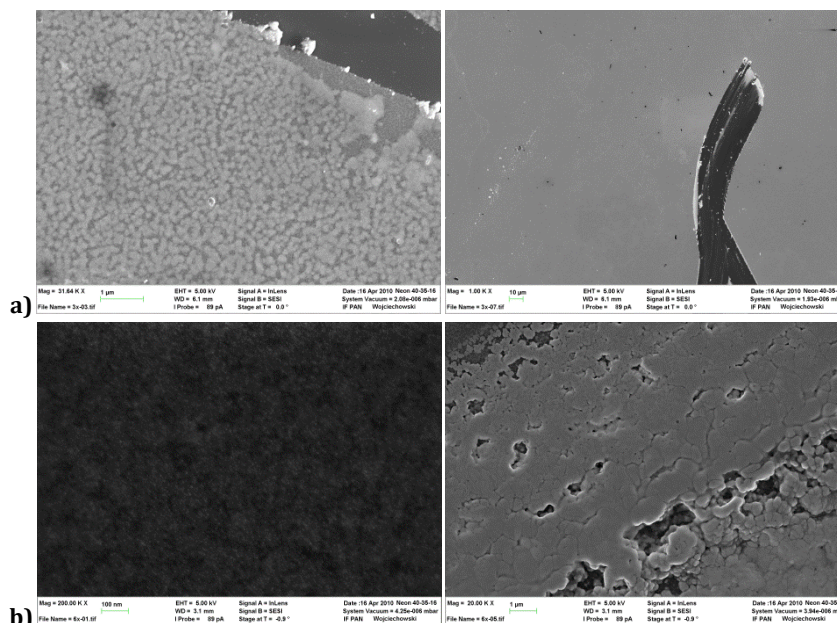
Rys. 8.1 Schemat procedury LbL przygotowania elektrod Au-Au.

Zmiana liczby zanurzeń i wynurzeń ITO w zawiesinach AuNP, umożliwia kontrolę stopnia jego pokrycia, a tym samym właściwości otrzymywanego materiału. Rys. 8.2 przedstawia zdjęcie elektrod ITO częściowo pokrytych AuNP. Gołym okiem widoczna jest już jedna warstwa materiału, a powyżej sześciu pojawia się żółty refleks, charakterystyczny dla litego złota ³.



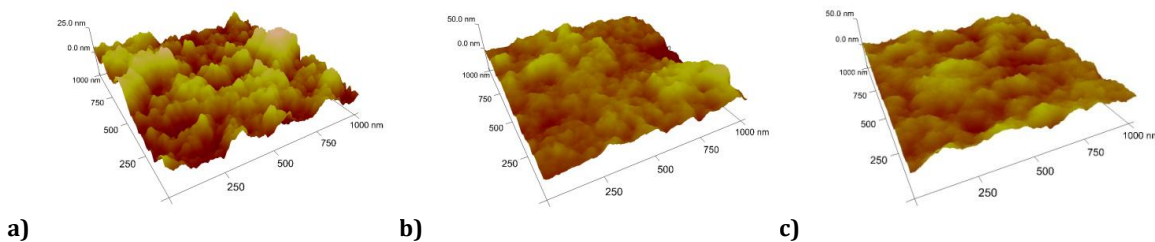
Rys. 8.2 Zdjęcie elektrod Au-Au pokrytych, od lewej: jedną, trzema, sześcioma i dziewięcioma warstwami.

Elektrody Au-Au są stabilne mechanicznie, ich struktura pozostaje nienaruszona nawet po godzinie sonikowania w wodzie, nie można ich też przypadkowo zetrzeć. Obrazy SEM pokazują, że już trzy warstwy nanocząstek złota całkowicie pokrywają powierzchnię ITO lub wafla krzemowego, którego użyto specjalnie do niektórych zdjęć SEM, ze względu na jego niską chropowatość (Rys. 8.3).



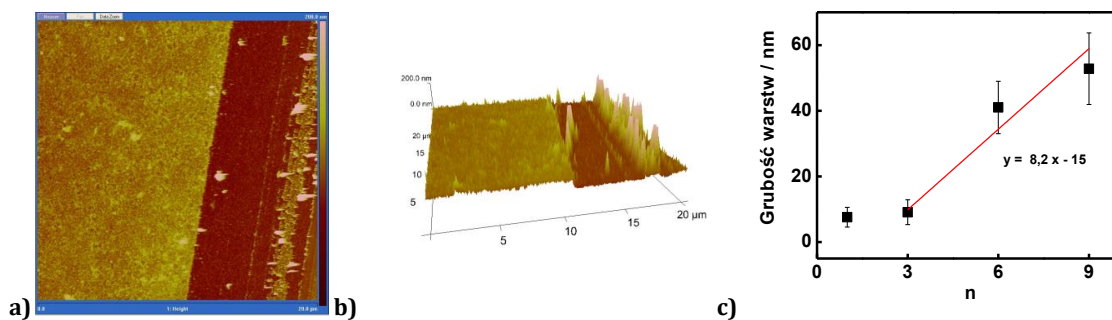
Rys. 8.3 Obrazy SEM elektrody: a) Au-Au(3) osadzone na krzemie, b) Au-Au(6) osadzone na ITO.

Obrazy AFM (Rys. 8.4) sugerują, że zwiększanie ilości warstw powoduje przede wszystkim zapełnianie wolnych przestrzeni pozostałych pomiędzy wcześniej osadzonymi nanocząstkami.



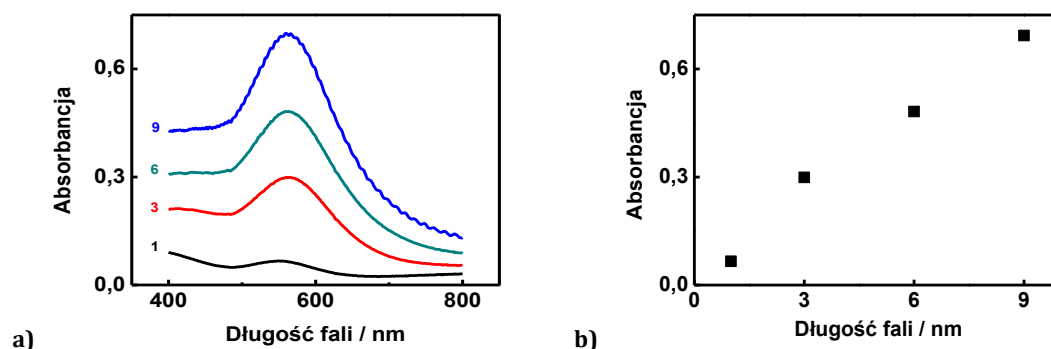
Rys. 8.4 Obrazy AFM ukazujące topografię elektrod: a) Au-Au(3), b) Au-Au(6), c) Au-Au(9).

Pomiar grubości warstw Au-Au wykonano za pomocą AFM. W tym celu, zdrapano skalpelem część osadzonego materiału i zmierzono jego grubość względem ITO (Rys. 8.5). Otrzymane wyniki wskazują na to, że podczas nakładania kilku pierwszych warstw, na powierzchni ITO tworzy się monowarstwa AuNP. Kontynuowanie osadzania, zwiększa jej grubość. Każde zanurzenie powoduje zwiększenie grubości pokrycia o ok. 8 nm. Jest to nieco więcej niż średnica użytych cząstek, co oznacza, że nowo powstała struktura elektrody nie składa się z uporządkowanych warstw.



Rys. 8.5 Obraz AFM ukazujący: **a)**, **b)** zdrapany fragment osadzonego złota na Au-Au(9), ciemniejsza część odpowiada ITO, **c)** grubość poszczególnych warstw elektrod Au-Au określona za pomocą AFM.

Ze zwiększaniem ilości depozytu, fioletowo-różowy kolor elektrod staje się coraz bardziej intensywny (Rys. 8.2), wskazując na to, że nanocząstki na powierzchni elektrody nie ulegają silnej agregacji. Tezę tę potwierdza widmo UV-Vis przedstawiające charakterystyczny, dobrze wykształcony pik absorpcji przy długości fali równej 553 nm (przesunięty do 564 ± 1 nm dla grubszego depozytu), typowy dla SPR (Rys. 8.6a) ⁴. Pik absorpcji przesunięty jest w kierunku czerwonej części widma w porównaniu do pików zarejestrowanych dla AuNP o średnicy poniżej 10 nm (517 nm ⁴). Świadczy to o agregacji AuNP do średnicy kilkudziesięciu nm, co najmniej o rząd wielkości większej od początkowej wielkości AuNP. Rejestrowana absorbanca, jest proporcjonalna do ilości osadzonych warstw AuNP, co potwierdza wnioski uzyskane z pomiarów AFM (Rys. 8.6b).

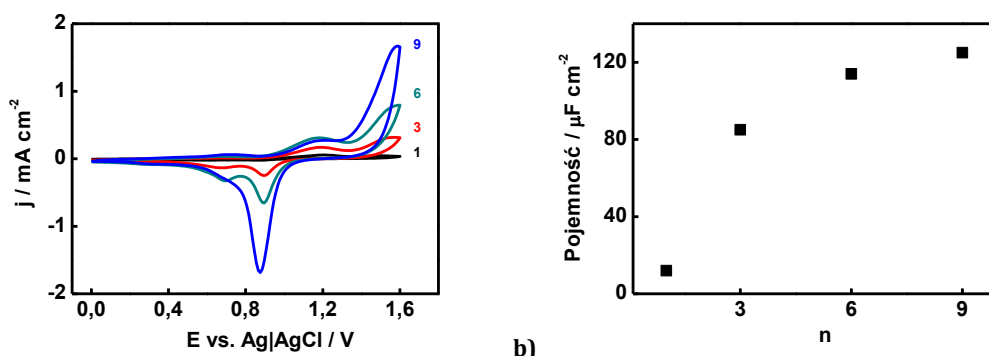


Rys. 8.6 a) Widma UV-Vis rejestrowane na elektrodach Au-Au(1,3,6,9) w powietrzu, względem niemodyfikowanego ITO, **b)** absorbanca pików w funkcji liczby warstw Au-Au(n).

W dalszych eksperymentach skupiono się na ogólnej charakterystyce elektrochemicznej elektrod Au-Au oraz sprawdzeniu ich właściwości elektrokatalitycznych.

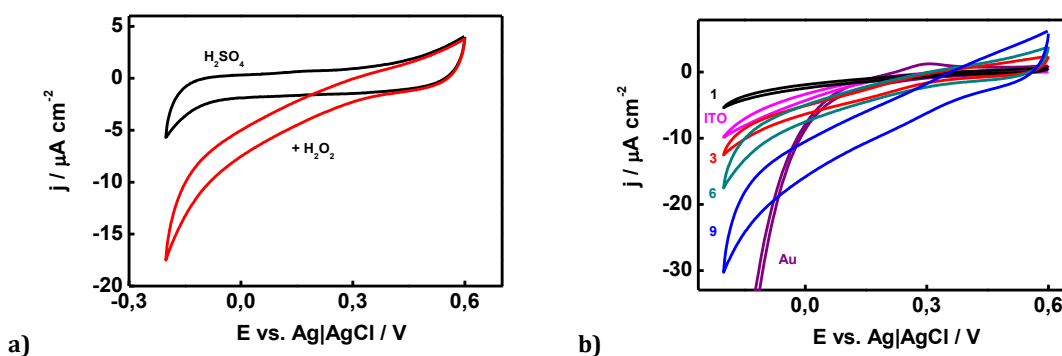
Woltamperogram cykliczny zarejestrowany w środowisku kwaśnym ma charakterystyczny kształt, nazywany „odciskiem palca” złota (Rozdz. 1.2.1, Rys. 8.7a). Piki utleniania-redukcji odpowiadają tworzeniu i rozpuszczaniu się tlenków na powierzchni nanocząstek złota (Równ. 1.1). Prąd pików rośnie wraz z liczbą osadzanych warstw (Rys. 8.7a). Obserwuje się również wzrost pojemności warstwy podwójnej elektrody (Rys. 8.7b). Dla dziewięciu warstw przyrost nie jest już bardzo wyraźny, co może być związane z gęstym upakowaniem AuNP, o czym świadczy także pojawienie się złotego refleksu na elektrodzie. Ładunek jaki przepłynął podczas redukcji monowarstwy tlenków, posłużył do obliczenia rzeczywistej powierzchni elektroaktywnej elektrody złotej. Do tego celu użyto obliczoną wartość ładunku związanego z redukcją tlenków na powierzchni polikrystalicznego złota, $390 \pm 10 \mu\text{C cm}^{-2}$ ⁵. Obliczona na tej podstawie powierzchnia rzeczywista przygotowanych

elektrod wynosi 0,05, 0,33, 0,8 oraz 1,46 cm² odpowiednio dla jednej, trzech, sześciu i dziewięciu warstw. Porównując ją do geometrycznej powierzchni elektrody (0,2 cm²), w przypadku jednej warstwy pokrycie złotem jest minimalne, ale w przypadku dziewięciu warstw, powierzchnia jest już siedmiokrotnie większa.



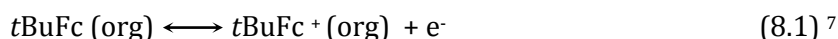
Rys. 8.7 a) Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na elektrodach Au-Au(1,3,6,9) w 0,1 M H₂SO₄, 2-gie cykle, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$, **b)** pojemność warstwy podwójnej (zmierzonej przy $E = 0,2 \text{ V}$ na Rys. 8.7a) w funkcji liczby warstw Au-Au(1,3,6,9).

Podobną zależność gęstości prądu od liczby warstw odnotowano w przypadku nieodwracalnej redukcji nadtlenku wodoru, przy potencjale początkowym ok. 0,35 V (Rys. 8.8). Otrzymana gęstość prądu jest znacznie mniejsza od rejestrowanej na elektrodzie przygotowanej w taki sam sposób z CNP⁶.



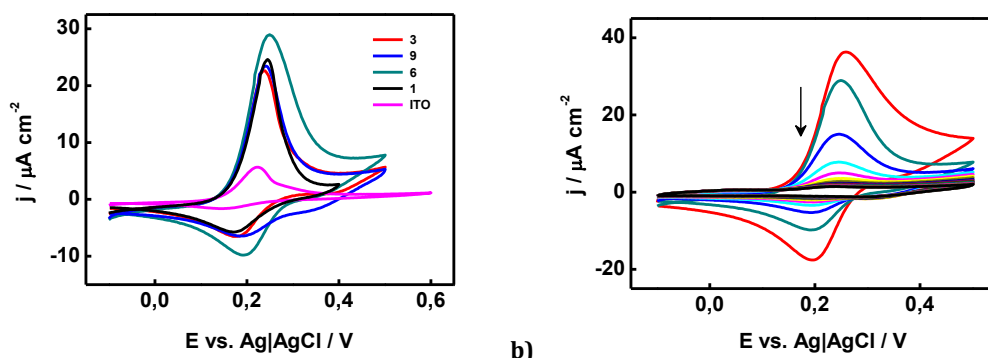
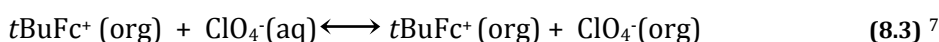
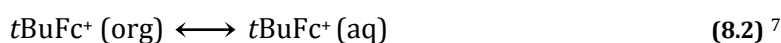
Rys. 8.8 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na: **a)** Au-Au(6) w 0,1 M H₂SO₄ (czarna krzywa) i z dodatkiem 0,05 M H₂O₂ (czerwona krzywa), **b)** Au-Au(1,3,6,9), na niemodyfikowanym ITO oraz na Au (złocie naparowanym na szkło „gold arrandee™”), w nasycyonym argonem 0,05 M H₂O₂ w 0,1 M H₂SO₄, 2-gie cykle, $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

W kolejnym eksperymencie mającym na celu sprawdzenie stopnia rozwinięcia powierzchni elektrod, zastosowano aktywną elektrochemicznie, nierozpuszczalną w wodzie ciecz organiczną, *tert*-butyloferroncen (*t*BuFc)^{7,8}. Na elektrodzie osadzono 5 μl roztworu *t*BuFc w heksanie, w stosunku objętościowym 1:1000. Po odparowaniu rozpuszczalnika na elektrodzie pozostało ok. 25 nmoli *t*BuFc. Proces redoks *t*BuFc zachodzi następująco⁷:



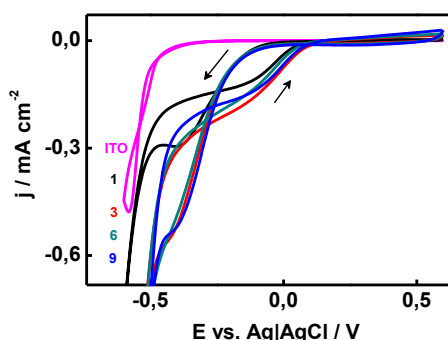
Na niemodyfikowanym ITO, *t*BuFc tworzy kroplę blokującą częściowo elektrodę przez co proces zachodzi mało efektywnie (Rys. 8.9a). Natomiast na rozwiniętej powierzchni elektrody, np. pokrytej nanocząstkami, *t*BuFc ulega rozproszeniu i jego utlenianie może przebiegać z wysoką wydajnością na granicy trzech faz: elektroda|aktywna redoks ciecz organiczna|elektrolit^{7,8}. Maksymalny prąd utleniania obserwuje się na Au-Au(6), co

potwierdza gęste upakowanie AuNP w grubszych depozytach (Rys. 8.9a). Z ładunku pików anodowego drugiego cyklu, korzystając z prawa Faradaya obliczono, że na elektrodzie Au-Au(6) utlenieniu uległo jedynie 0,63 nmola depozytu. Wydajność procesu na każdej z elektrod, obliczono ze stosunku ładunku pików anodowego do ładunku jaki jest potrzebny na utlenianie całego 25 nmol *t*BuFc ($Q_{obl} = 2,41$ mC). Wynosi ona dla ITO niemodyfikowanego 0,4%, oraz 1,6%, 1,56%, 2,54%, 1,68% odpowiednio dla Au-Au(1), Au-Au(3), Au-Au(6) i Au-Au(12). Wraz z kolejnymi cyklami na woltamperogramie obserwuje się stopniowy spadek rejestrowanego prądu pików (Rys. 8.9b). Może to być związane z przejściem generowanego kationu *t*BuFc⁺ do fazy wodnej w celu utrzymania elektroobojętności depozytu organicznego (Równ. 8.2) ⁷. Fakt ten potwierdza także stosunek ładunku anodowego do ładunku katodowego Q_a/Q_k , który dla drugiego cyklu wynosi 2,1 (dla Au-Au(6)) i zmniejsza się w kolejnych cyklach aż do wartości 0,3 dla dwudziestego cyklu. Konkurencyjnym procesem do przejścia *t*BuFc⁺ do fazy wodnej może być przepływ przeciwjonu z fazy wodnej do organicznej (Równ. 8.3) ⁷.



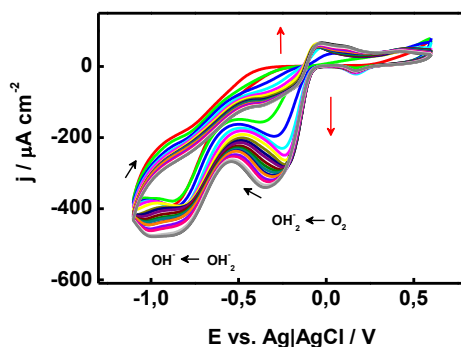
Rys. 8.9 Krzywe woltamperometryczne zarejestrowane po osadzeniu 25 nmol *t*BuFc na: **a)** ITO (różowa krzywa) oraz na Au-Au(1,3,6,9), 2-gie cykle, **b)** Au-Au(6), kolejne cykle 1-20; 0,1 M NaClO₄, $\nu = 10$ mV s⁻¹.

Badanie właściwości elektrokatalitycznych elektrod Au-Au, rozpoczęto od reakcji redukcji tlenu w środowisku kwaśnym (Rys. 8.10). Zaobserwowano przesunięcie potencjału redukcji o ok. 0,5 V w stosunku do ITO. Dla depozytu grubszego od trzech warstw, nie rejestrowano znaczących zmian prądu i potencjału redukcji tlenu. Widoczna na woltamperogramach histereza wynika z aktywacji powierzchni elektrody przez wydzielany przy niższych potencjałach wodór, co potwierdziły późniejsze badania opisane w Rozdz. 8.2.



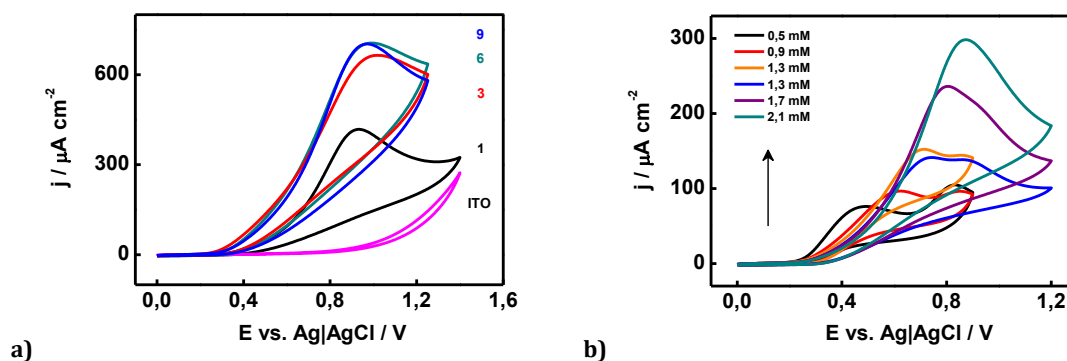
Rys. 8.10 Krzywe woltamperometryczne zarejestrowane na ITO oraz Au-Au(1,3,6,9) w nasycyonym tlenem 0,1 M H₂SO₄, 2-gie cykle, $\nu = 10$ mV s⁻¹.

Rys. 8.11 przedstawia voltamperogramy redukcji tlenu w środowisku alkalicznym (0,1 M KOH) na elektrodzie Au-Au(1). Reakcja ta przebiega według innego mechanizmu niż w środowisku kwaśnym. Pierwszy pik redukcji przy potencjale ok. -0,3 V odpowiada reakcji redukcji O_2 do HO_2^- , drugi natomiast przy -0,85 V redukcji HO_2^- do OH^- . W pierwszym cyklu (Rys. 8.11 czerwona krzywa) występuje wyłącznie pik przy potencjale -0,85 V, pik przy -0,3 V pojawia się w drugim cyklu (zielona krzywa) i podczas cyklowania elektrody sukcesywnie wzrasta wartość jego prądu. W kolejnych cyklach pojawia się także pik utleniania przy ok. 0,1 V, prawdopodobnie związany z reakcją utlenienia OH^- do O_2 ¹⁰. Proces ten dostarcza substratu i wspomaga proces redukcji tlenu, zazwyczaj obserwowany jest w obecności jodków lub bromków w elektrolicie¹⁰.



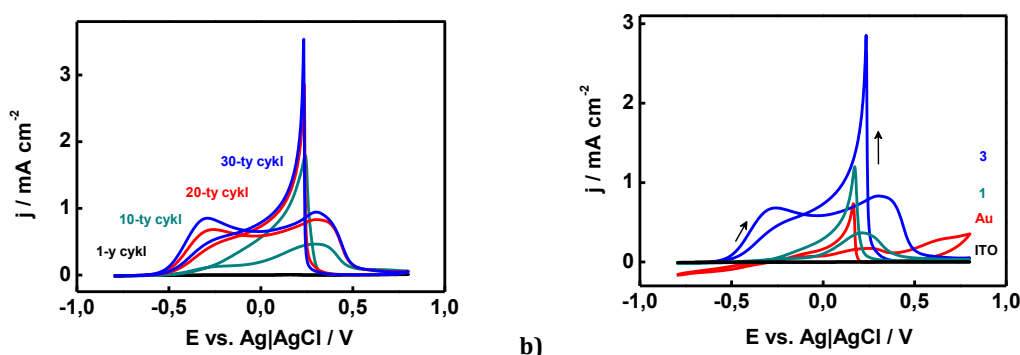
Rys. 8.11 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na Au-Au(1), w nasyconym tlenem 0,1 M KOH, kolejne cykle: 1-20, $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

Następnie zbadano właściwości katalityczne elektrod Au-Au w stosunku do utleniania cysteiny (Cys, Rys. 8.12). Niemodyfikowane ITO nie wykazuje takich właściwości (Rys. 8.12a), ale już jedna warstwa Au-Au powoduje pojawienie się pików utleniania Cys, natomiast zwiększenie ich liczby do trzech nieznacznie poprawia potencjał początkowy utleniania oraz zwiększa prąd piku (Rys. 8.12a). Osadzanie kolejnych warstw nie ma większego wpływu na efekt katalityczny. Reakcja zachodzi prawdopodobnie według mechanizmu Równ. 5.15¹¹. Pojawienie się dwóch pików utleniania Cys może być związane z tworzeniem się większych agregatów Au i zajściem procesu na cząstkach o różnej wielkości lub kształcie. Ze względu na nieodwracalny charakter procesu, zmiana stężenia Cys, powoduje zmianę kształtu i potencjału piku, prawdopodobnie przez adsorpcję Cys na powierzchni złota i nakładanie się pików przy większym stężeniu Cys.



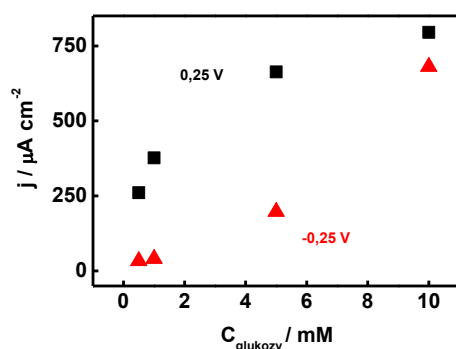
Rys. 8.12 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na: **a)** niemodyfikowanym ITO oraz Au-Au(1,3,6,9), 2-gie cykle, 5 mM Cys, **b)** Au-Au(3) w Cys o stężeniu 0,5-2,1 mM; 0,1 M bufor fosforanowy pH = 5, 2-gie cykle, $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

Utlenianie glukozy w środowisku zasadowym jest kolejnym przykładem zastosowania elektrod Au-Au w elektrokatalizie. Otrzymane krzywe voltamperometryczne charakteryzują się podobnym kształtem do odnotowanego w literaturze (Rozdz. 1.2.1). W pierwszym cyklu polaryzacji nie obserwowano żadnego sygnału, ale dalsze cyklowanie elektrody powoduje aktywację AuNP i umożliwia utlenienie glukozy (Rys. 8.13a). Pierwszy pik anodowy na Au-Au(3) formuje się przy potencjale początkowym -0,55 V i odpowiada utlenianiu glukozy do glukonolaktonu, który ulega kolejnej reakcji utlenienia do laktonu przy potencjale -0,1 V. W trakcie polaryzacji katodowej pojawia się ostry anodowy pik, nazywany odwróconym (ang. *inverted peak*)⁹. Odpowiada on bezpośredniemu utlenieniu glukozy na centrach aktywnych powstałych po redukcji powierzchniowych tlenków złota. Niemodyfikowane ITO nie wykazuje takich właściwości katalitycznych, a na litym złocie potencjał początkowy utleniania glukozy jest wyższy od rejestrowanego na Au-Au i wynosi ok. 0,0 V.



Rys. 8.13 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na: **a)** Au-Au(3), wybrane cykle, **b)** Au-Au(1,3), na ITO oraz na Au (złocie naparowanym na szkło, „gold arrandeeTM”), nasycyony argonem roztwór 10 mM glukozy w 0,05 M KOH, 30-te cykle, $\nu = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

Zarejestrowano voltamperogramy dla kilku wybranych stężeń glukozy i zaobserwowano jego wpływ na wielkość rejestrowanego prądu piku (Rys. 8.14). Do detekcji glukozy korzystniejsze jest użycie wyższego potencjału, na który nie mają wpływu procesy współzachodzące, jak redukcja tlenu, który pomimo nasycenia argonem mógł pozostać w roztworze.



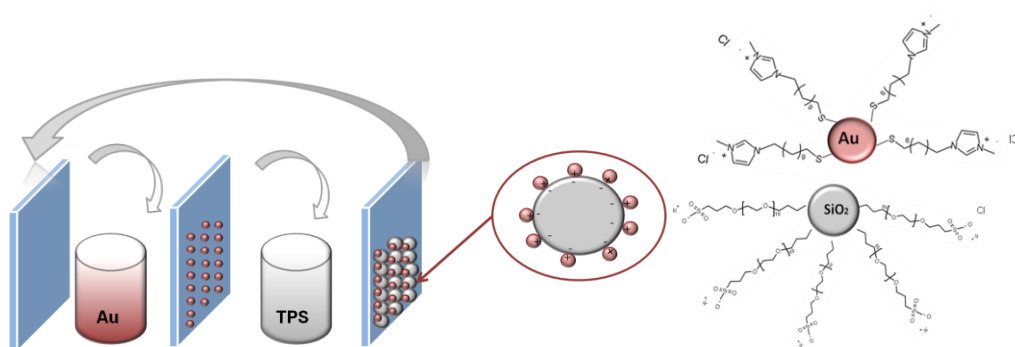
Rys. 8.14 Zależność gęstości prądu od stężenia glukozy przy $E = 0,25 \text{ V}$ i $E = -0,25 \text{ V}$, na podstawie krzywych voltamperometrycznych utleniania glukozy, zarejestrowanych na Au-Au(3) (Rys. 8.13b).

Podsumowując, przygotowano stabilną elektrodę modyfikowaną różniamiennie naładowanymi nanocząstkami złota z użyciem metody LbL. Stopień pokrycia kontrolowano liczbą wynurzeń i zanurzeń, otrzymując w ten sposób różną ilość warstw (1-9) osadzoną na

ITO. Trzy warstwy okazały się wystarczające do całkowitego pokrycia ITO. W porównaniu do innych metod, jak współadsorpcja AuNP¹², LbL pozwala w prosty i szybki sposób tworzyć trójwymiarowe złote filmy. Otrzymane elektrody zbadano za pomocą technik mikroskopowych i elektrochemicznych. Poza podstawową charakterystyką elektrochemiczną, przedstawiono właściwości katalityczne elektrod w stosunku do utleniania cysteiny, glukozy w środowisku alkalicznym oraz redukcji tlenu w środowisku kwaśnym i alkalicznym.

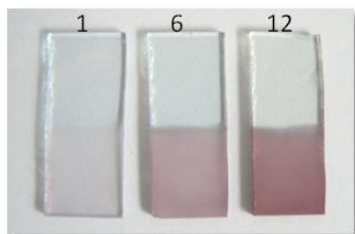
8.2 Elektrody złoto-polikrzemianowe, Au-TPS

Kolejny rodzaj elektrod utworzono w oparciu o wspomniane wyżej, dodatkowo naładowane nanocząstki złota (Au(+)) i ujemnie naładowane cząstki polikrzemianowe (TPS) (Rozdz. 7). Do tego celu użyto zawiesiny AuNP(+) w MeOH o stężeniu 1,1 mg g⁻¹ oraz TPS w MeOH o stężeniu 5 mg ml⁻¹. Stosując metodę LbL, ITO pokryto: jedną, sześcioma i dwunastoma podwójnymi warstwami (Au-TPS(n)) (Rys. 8.15).



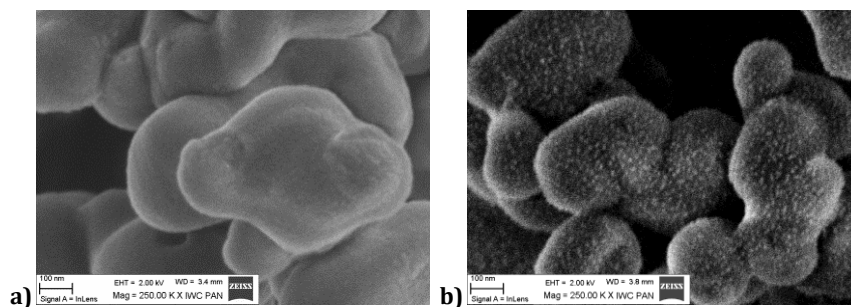
Rys. 8.15 Schemat procedury LbL przygotowania elektrod Au-TPS.

W rezultacie otrzymano elektrody (Rys. 8.16) wyglądem znacząco odbiegające od elektrod Au-Au. Obecność TPS powoduje białe, matowe pokrycie elektrody. Duża średnica tych cząstek (200-400 nm) jest przyczyną powstawania dość grubych warstw, które łatwo można zetrzeć, ale które są trwałe w trakcie pomiarów elektrochemicznych. W przypadku Au-TPS nie obserwowano złotego refleksu, co spowodowane było mniejszą liczbą AuNP i ich osadzeniem na powierzchni dużych cząstek TPS.



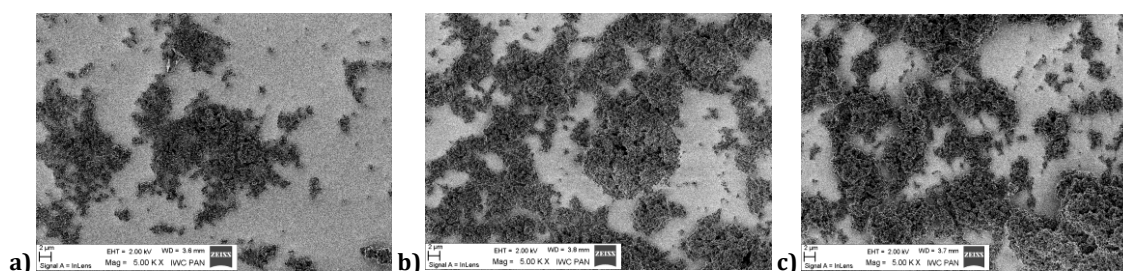
Rys. 8.16 Zdjęcie elektrod Au-TPS pokrytych, od lewej: jedną, sześcioma i dwunastoma warstwami.

Obraz SEM (Rys. 8.17) przed i po osadzeniu AuNP, przedstawia równomierne pokrycie dużych cząstek polikrzemianowych, drobnymi jasnymi punktami odpowiadającymi nanocząstkom złota.



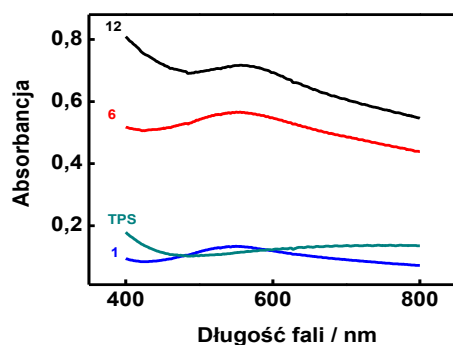
Rys. 8.17 Obrazy SEM: a) cząstek TPS, b) elektrody Au-TPS(6).

Na fotografii elektrod (Rys. 8.16) widoczne jest homogeniczne pokrycie ITO, natomiast skala mikroskopowa (Rys. 8.18) uwidacznia, że nawet 12 warstw materiału nie powoduje pokrycia całej powierzchni ITO. Nakładany materiał tworzy raczej wyspy na powierzchni ITO, które stopniowo ulegają powiększeniu.



Rys. 8.18 Obrazy SEM elektrody a) Au-TPS(1), b) Au-TPS(6), c) Au-TPS(12).

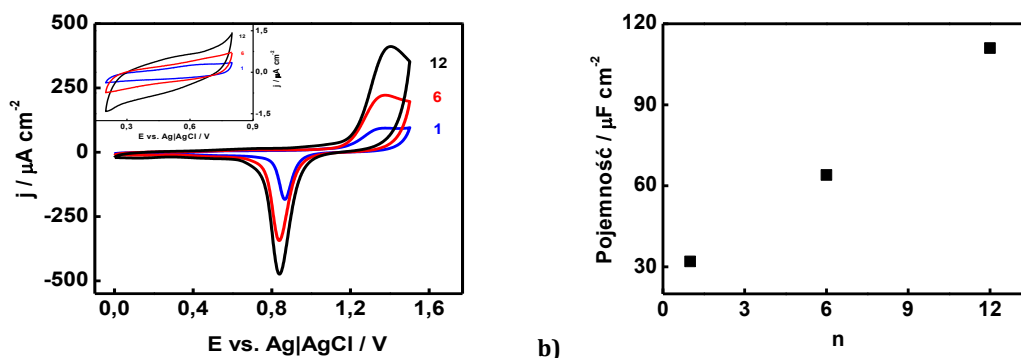
Zmiany w strukturze elektrod Au-TPS widoczne są na widmie UV-Vis (Rys. 8.19). Charakterystyczny dla złota, pik absorpcji wynikający z efektu SPR, pojawia się przy 550 nm dla elektrody Au-TPS(1) i wraz z nakładaniem kolejnych, ulega przesunięciu aż do 570 nm dla Au-TPS(12). Świadczy to o dużej ilości i agregacji nanocząstek złota, czemu odpowiada też delikatny fioletowy kolor elektrod. Nie obserwuje się pików na widmie zarejestrowanym dla ITO pokrytego wyłącznie cząstkami TPS (Rys. 8.19, zielona krzywa).



Rys. 8.19 Widma UV-Vis rejestrowane na elektrodach Au-TPS(1,6,12) oraz ITO-TPS w powietrzu, względem niemodyfikowanego ITO.

Rys. 8.20a przedstawia voltamperogramy zarejestrowane dla elektrod z różną liczbą warstw. Dobrze uformowany pik utleniania występuje przy potencjale ok. 1,3 V i odpowiada tworzeniu monowarstwy tlenków złota, natomiast pik redukcji pojawia się przy potencjale ok. 0,85 V. Gęstość prądu tych pików rośnie ze wzrostem liczby osadzanych warstw. Świadczy to o tym, że nie cała powierzchnia Au(+) pokryta jest grupami 1-(11-merkaptoundekano)-3-metylo-imidazoliowymi.

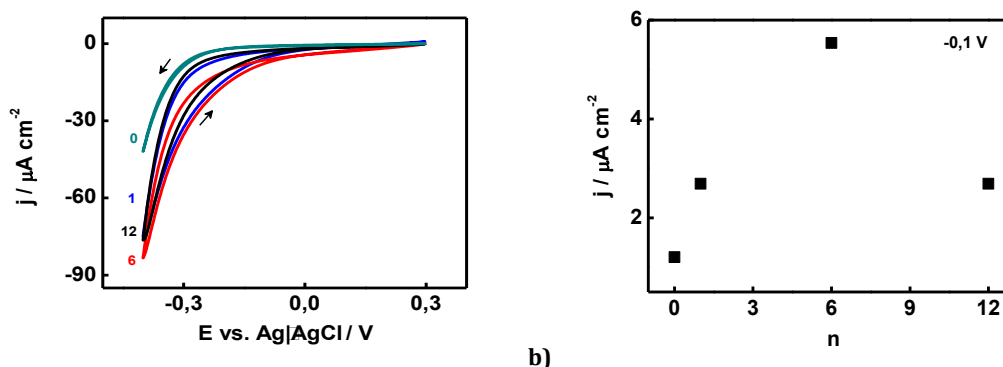
Ładunek pików redukcji monowarstwy tlenków posłużył do obliczenia rzeczywistej powierzchni elektroaktywnej⁵. Powierzchnia ta wynosiła 0,112, 0,226 oraz 0,338 cm² odpowiednio dla jednej, sześciu i dwunastu warstw. Co ciekawe rzeczywista, aktywna powierzchnia dla Au-TPS(1) jest większa od obliczonej dla elektrody Au-Au(1), ale wciąż niższa od powierzchni geometrycznej (0,2 cm²), a związane jest to z niewielką ilością złota na powierzchni ITO, które dodatkowo może być pokryte cząstkami TPS.



Rys. 8.20 a) Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na elektrodach Au-TPS(1,6,12) w 0,1 M H₂SO₄, 2-gie cykle, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$, wstawka - przedstawia zależność prądu pojemnościowego od liczby warstw Au-TPS, 2-gie cykle, $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$, **b)** zależność pojemności warstwy podwójnej ($E = 0,2 \text{ V}$) od liczby osadzonych warstw elektrody Au-TPS.

Zaobserwowano również wzrost prądu pojemnościowego (Rys. 8.20a, wstawka), a tym samym pojemności warstwy podwójnej elektrody (Rys. 8.20b) wraz z liczbą osadzonych warstw Au-TPS.

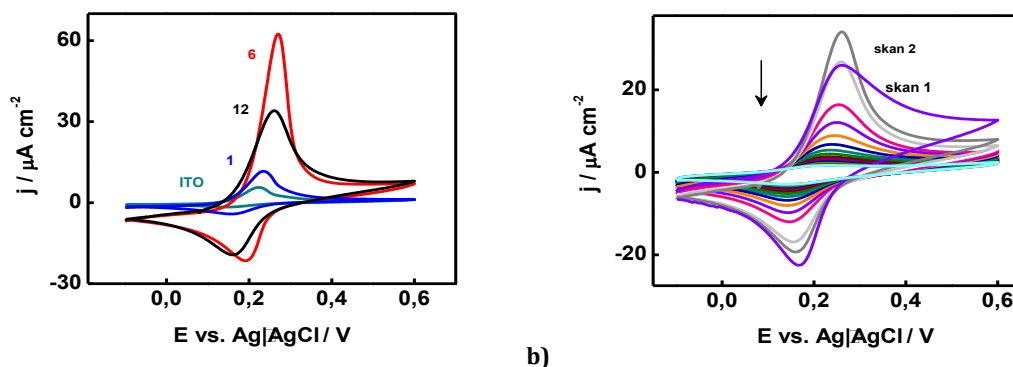
Rozwinięcie powierzchni elektrod Au-TPS, testowano stosując reakcję redukcji nadtlenu wodoru w środowisku kwaśnym (Rys. 8.21). Maksymalną wartość prądu zarejestrowano dla Au-TPS(6), co sugeruje, że dalsze nakładanie warstw powoduje zapełnianie wolnych przestrzeni pomiędzy wcześniej utworzonymi wyspami materiału.



Rys. 8.21 a) Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na niemodyfikowanym ITO (zielona krzywa) oraz na elektrodach Au-TPS(1,6,12) w nasycyonym argonem roztworze 0,05 M H₂O₂, 0,1 M H₂SO₄, 2-gie cykle, $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$, **b)** zależność prądu redukcji H₂O₂ ($E = -0,1 \text{ V}$) od liczby osadzonych warstw Au-TPS.

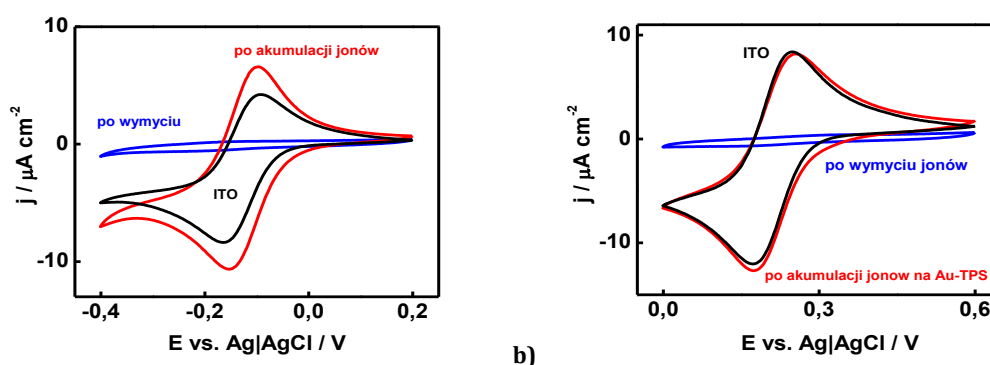
Utlenianie depozytu 25 nmoli *t*BuFc, także wykazało największe rozwinięcie powierzchni dla elektrody pokrytej sześcioma warstwami materiału (Rys. 8.22a). W rezultacie otrzymano krzywe o kształcie zbliżonym do rejestrowanych wcześniej na podłożach złotych¹³ lub złocie modyfikowanym filmem polikrzemianowym¹⁴. Z ładunku pików anodowego drugiego cyklu, obliczono, że na elektrodzie Au-TPS(6) utlenieniu uległo 1,1 nmola depozytu. Wydajność reakcji utleniania wynosi 0,4% oraz 0,9%, 3,8%, 3,6% odpowiednio dla niemodyfikowanego ITO, Au-TPS(1), Au-TPS(6) oraz Au-TPS(12) natomiast

dla ITO pokrytego wyłącznie cząstkami TPS wydajność wyniosła zaledwie 0,04%, co wskazuje na blokowanie powierzchni elektroaktywnej przez te cząstki. Widoczny jest wzrost efektywności reakcji wraz ze zwiększeniem granicy trzech faz. Potencjał formalny reakcji przesunięty jest o ok. 0,1 V w stronę potencjałów bardziej dodatnich, w stosunku do niemodyfikowanego ITO, co oznacza stabilizację obojętnej formy próbnika redoks. Zaobserwowano też spadek prądu utleniania $t\text{BuFc}$ w kolejnych rejestrowanych cyklach (Rys. 8.22b), spowodowany przejściem kationu $t\text{BuFc}^+$ do fazy wodnej (8.2). Potwierdza to także stosunek ładunku anodowego do katodowego Q_a/Q_k , który jest większy od jedności i spada od wartości 1,83 dla drugiego cyklu (Au-TPS(6)) do 0,3 dla dwudziestego cyklu.



Rys. 8.22 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane po osadzeniu 25 nmol $t\text{BuFc}$ na: **a)** ITO (różowa krzywa) oraz na Au-Au(1,3,6,9), 2-gie cykle, **b)** Au-Au(6), kolejne cykle 1-20; 0,1 M NaClO_4 , $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

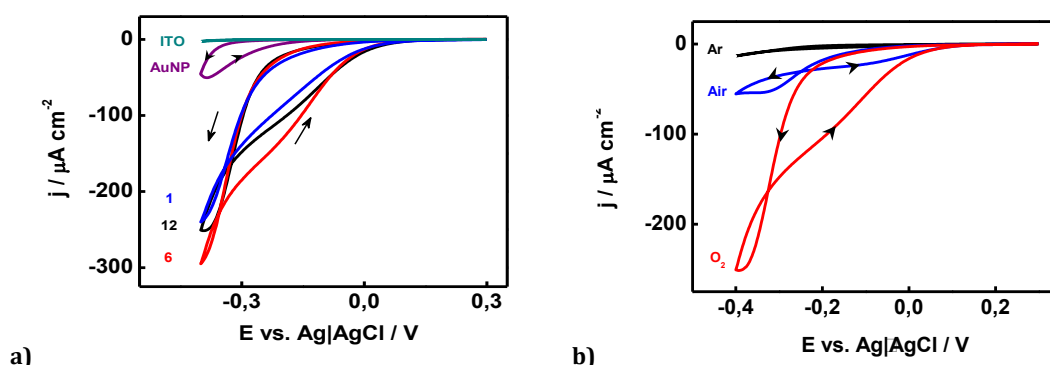
Elektroda Au-TPS(12) wykazała akumulację kationu $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$, obserwowaną wcześniej dla cząstek TPS (Rozdz. 7). Natomiast na Au-TPS(1) nie zarejestrowano akumulacji kationów, ale akumulację anionów $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, która dla dwunastu warstw była już niewidoczna. Akumulacja ta jest odwracalna i po przełożeniu elektrod do elektrolitu bez próbnika redoks, piki w kolejnych cyklach bardzo szybko zanikły. Oznacza to, że zaadsorbowane jony zostały wymyte z powierzchni elektrody. Można wnioskować, że początkowy dodatni ładunek elektrod, wraz z nakładaniem kolejnych warstw ulega zamianie w ujemny, przez dużą ilość cząstek TPS z nieskompensowanym ładunkiem grup funkcyjnych.



Rys. 8.23 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na Au-TPS(12) zanurzonej w: **a)** nasyconym argonem roztworze $10^{-4} \text{ M Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ (czerwona i czarna krzywa); po przełożeniu do czystego 0,1 M NaClO_4 (wymywanie jonów, niebieska krzywa), **b)** $10^{-4} \text{ M K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (czerwona i czarna krzywa); po przełożeniu do czystego 0,1 M NaClO_4 (niebieska krzywa); 0,1 M NaClO_4 , $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

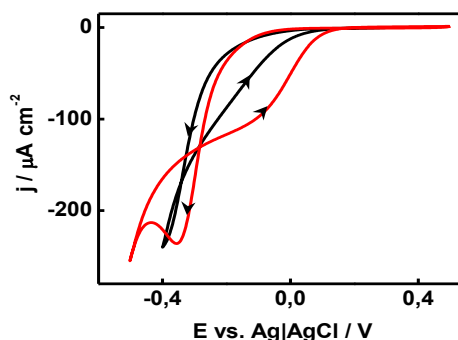
Następnie zbadano właściwości katalityczne przygotowanych elektrod w stosunku do redukcji tlenu w środowisku kwaśnym (środowisko zasadowe nie było brane pod uwagę ze względu na rozpuszczalność polikrzemianu w wysokim pH). Otrzymane voltamperogramy

porównano do niemodyfikowanego ITO oraz ITO pokrytego Au(+) przez jedno zanurzenie w zawieszinie nanocząstek złota (Rys. 8.24a). Potencjał początkowy redukcji tlenu nie zależy od liczby naniesionych warstw, wynosi ok. -0,05 V i jest zbliżony do wartości obserwowanej na elektrodach Au-Au. Widoczny jest wyraźny efekt katalityczny gdyż wartość zarejestrowana na ITO to -0,4 V, a na ITO modyfikowanym Au(+) to -0,3 V. Maksymalną wartość prądu znów obserwowano na elektrodzie sześciowarstwowej Au-TPS(6). Wpływ stężenia tlenu na voltamperogramy przedstawia Rys. 8.24b. W środowisku argonu widoczna jest niewielka redukcja tlenu związana z trudnością jego całkowitego usunięcia z roztworu, a także tlenem który mógł pozostać w porach osadzonego materiału lub jego dyfuzją przez naczynko elektrochemiczne. Po natlenieniu roztworu, prąd redukcji tlenu wzrasta pięciokrotnie, co jest zgodne ze wzrostem jego stężenia w elektrolicie.



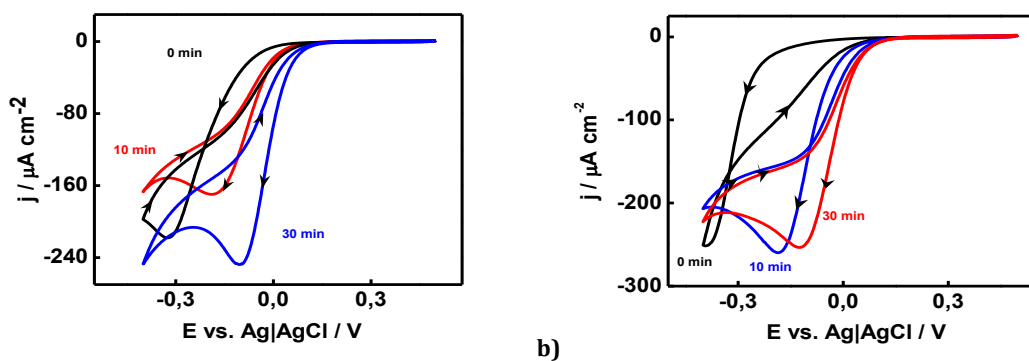
Rys. 8.24 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na: **a)** niemodyfikowanym ITO, ITO pokrytym Au(+) oraz na Au-TPS(1,6,12), w nasyconym tlenem roztworze 0,1 M H_2SO_4 , **b)** Au-TPS(1) w nasyconym argonem (czarna krzywa), napowietrzonym (niebieska krzywa) i nasyconym tlenem (czerwona krzywa) roztworze 0,1 M H_2SO_4 , 2-gie cykle, $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

Interesujący kształt krzywych redukcji tlenu (histereza), sugerujących aktywację elektrody w obszarze niskich potencjałów stał się podstawą do dalszych badań zachodzącego zjawiska. Podczas porzyci elektrody w kierunku anodowym, potencjał redukcji tlenu jest wyższy nawet o 0,1 V od potencjału rejestrowanego w trakcie polaryzacji katodowej. Za zjawisko może odpowiadać katodowa aktywacja elektrody w obrębie niskich potencjałów. Wydzielany na powierzchni złota wodór, wywołuje zmiany w strukturze atomowej AuNP i znacznie zwiększa ich właściwości katalityczne (Rozdz. 1.2.1). W celu zrozumienia zachodzącego procesu, na początku zwiększono zakres potencjałowy rejestrowanego voltamperogramu (Rys. 8.25). Spowodowało to lepsze wykształcenie piku redukcji tlenu, ale także zmianę jego potencjału. Natomiast zwięzienie tego zakresu, tym samym uniemożliwienie aktywacji katodowej, powodowało zanik histerezy.

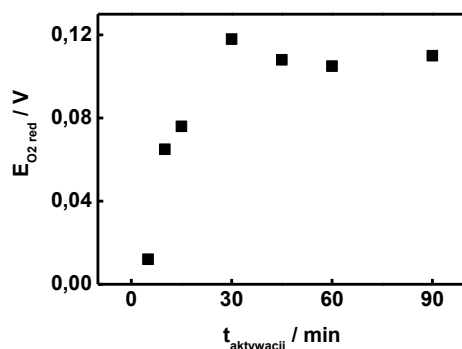


Rys. 8.25 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na Au-TPS(1) w nasyconym tlenem 0,1 M H_2SO_4 , różne zakresy potencjału, 2-gie cykle, $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

Wstępna katodowa polaryzacja (prepolaryzacja) elektrody posłużyła do wyjaśnienia kształtu zarejestrowanych krzywych. W tym celu do elektrod zanurzonych w odtlenionym 0,1 M H₂SO₄ przykładano potencjał początkowy wydzielenia wodoru, -0,5 V przez określony czas. Następnie prowadzono badania redukcji tlenu w świeżym natlenionym roztworze kwasu. Wpływ czasu prepolaryzacji na proces redukcji tlenu przedstawia Rys. 8.26 i 8.27. Po 30 minutach histereza nie występuje, a potencjał redukcji w obu kierunkach polaryzacji ma zbliżoną wartość. Dalsze wydłużanie czasu prepolaryzacji nie wpływa na zmianę potencjału redukcji tlenu (Rys. 8.27).

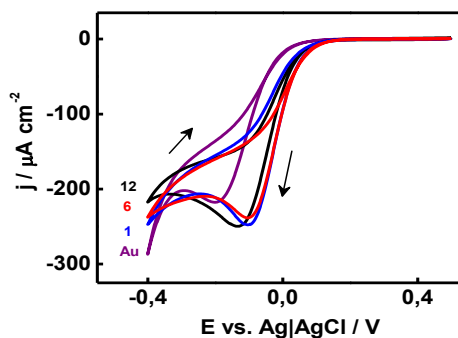


Rys. 8.26 Krzywe woltamperometryczne zarejestrowane na **a)** Au-TPS(1), **b)** Au-TPS(12), po różnym czasie prepolaryzacji przy $E = -0,5$ V; w nasyconym tlenem roztworze 0,1 M H₂SO₄, 2-gie cykle, $\nu = 10$ mV s⁻¹.



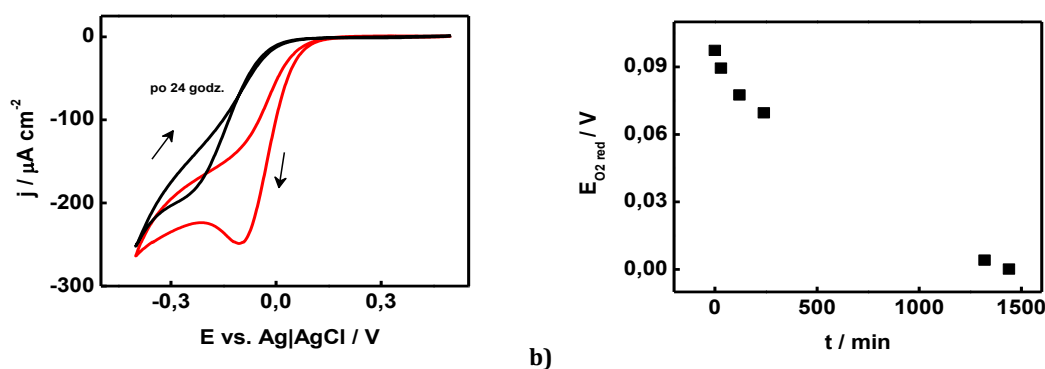
Rys. 8.27 Zależność potencjału redukcji tlenu (przy $j = 5$ $\mu\text{A cm}^{-2}$) od czasu katodowej prepolaryzacji przez przyłożenie $E = -0,5$ V do elektrody Au-TPS(1), na podstawie woltamperogramów cyklicznych wykonanych w nasyconym tlenem 0,1 M H₂SO₄, $\nu = 10$ mV s⁻¹.

Woltamperogramy rejestrowane na elektrodach Au-TPS(1,6,12) po 30 minutach prepolaryzacji, nie różnią się znacząco kształtem i potencjałem redukcji tlenu (Rys. 8.28). Woltamperogram obserwowany dla ITO pokrytego wyłącznie Au(+) (fioletowa krzywa) wykazuje potencjał redukcji niższy o ok. 0,1 V od rejestrowanego na AuTPS. Kształt krzywej woltamperometrycznej dla takiego układu także znacząco odbiega od krzywej rejestrowanej przed aktywacją elektrody (Rys. 8.24a, fioletowa krzywa).



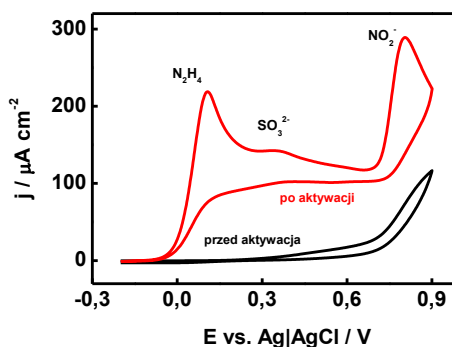
Rys. 8.28 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na Au-TPS(1,6,12) oraz ITO pokrytym Au(+), po 30 min prepolaryzacji przy $E = -0,5$ V, w nasyconym tlenem $0,1$ M H_2SO_4 , 2-gie cykle, $v = 10$ mV s⁻¹.

Okazało się, że aktywacja elektrody przez katodową prepolaryzację nie jest trwała i potencjał redukcji tlenu obniża się wraz z czasem jej przechowywania po procesie aktywacji (Rys. 8.29). Taka nietrwałość została już wcześniej opisana w literaturze (Rozdz. 1.2.1).



Rys. 8.29 a) Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na Au-TPS(1), zaraz po 30 min aktywacji przy $E = -0,5$ V oraz po 24 godz. od aktywacji, w nasyconym tlenem $0,1$ M H_2SO_4 , 2-gie cykle, $v = 10$ mV s⁻¹, **b)** zależność potencjału redukcji tlenu (przy $j = 10$ μA cm⁻²) od czasu, który upłynął od prepolaryzacji elektrody.

Sprawdzono także katalityczne właściwości elektrody Au-TPS(1) w stosunku do utleniania mieszaniny związków: hydrazyny (N_2H_4), jonów siarczanowych (IV) oraz jonów azotanowych (III) (Rys. 8.30). Bez procesu katodowej aktywacji, elektroda zanurzona do takiej mieszaniny nie wykazuje właściwości elektrokatalitycznych. Natomiast po zaktywowaniu powierzchni otrzymano bardzo dobrze rozseparowane sygnały, odpowiednio przy potencjale $0,1$ V dla N_2H_4 , $0,36$ V dla SO_3^{2-} oraz $0,8$ V dla NO_2^- . Są to zbliżone wartości do odnotowanych w literaturze dla elektrody modyfikowanej AuNP w matrycy polikrzemianowej (Rozdz. 1.2.1).



Rys. 8.30 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na Au-TPS(1), przed (czarna krzywa) i po prepolaryzacji przez 30 min przy $E = -0,5$ V, w nasyconym argonem roztworze $0,5$ mM H_2N_4 , $0,5$ mM Na_2SO_3 , $0,5$ mM $NaNO_3$, 2-gie cykle, $v = 10$ mV s⁻¹.

Podsumowując, przygotowano elektrody z nanocząstek złota i submikroczątek polikrzemianowych o przeciwnych ładunkach elektrycznych (Au-TPS) metodą LbL. Następnie scharakteryzowano je stosując SEM, spektrofotometrię UV-Vis oraz techniki woltamperometryczne. Elektrody pokryte większym depozytem Au-TPS wykazały akumulację kationów heksaaminorutenu i brak akumulacji anionów heksacyjanożelaziankowych, co świadczy o powierzchniowym dodatnim ładunku takiej elektrody. Rozwinięcie powierzchni zbadano przez redukcję nadtlenu wodoru i utlenianie organicznego depozytu *t*-BuFc. Elektrody wykazały właściwości katalityczne w stosunku do redukcji tlenu. Katodowa prepolaryzacja umożliwiła znacząco poprawę tych parametrów przez aktywację powierzchni nanocząstek złota. Pozwoliło to na redukcję tlenu przy znacznie wyższym potencjale oraz na separację sygnałów elektrochemicznych pochodzących od utleniania N_2H_4 oraz jonów SO_3^{2-} i NO_2^- .

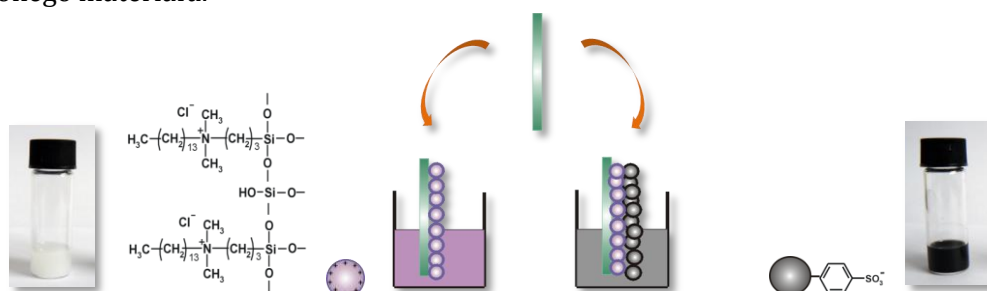
8.3 Bibliografia

- (1) Lesniewski, A.; Paszewski, M.; Opallo, M. *Electrochem. Commun.* **2010**, *12*, 435–437.
- (2) Ngankam, a P.; Van Tassel, P. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 1140–1145.
- (3) Kowalczyk, B.; Byrska, M.; Mahmud, G.; Huda, S.; Kandere-Grzybowska, K.; Grzybowski, B. A. *Langmuir* **2009**, *25*, 1905–1907.
- (4) Daniel, M.-C.; Astruc, D. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 293–346.
- (5) Trasatti, S.; Petrii, O. A. *Pure Appl. Chem.* **1991**, *63*, 711–734.
- (6) Szot, K.; Watkins, J. D.; Bull, S. D.; Marken, F.; Opallo, M. *Electrochem. Commun.* **2010**, *12*, 737–739.
- (7) Macdonald, S. M.; Szot, K.; Niedziolka, J.; Marken, F.; Opallo, M. *J. Solid State Electrochem.* **2008**, *12*, 287–293.
- (8) Niedziolka, J.; Szot, K.; Marken, F.; Opallo, M. *Electroanalysis* **2007**, *19*, 155–160.
- (9) Miah, M. R.; Ohsaka, T. *Electrochim. Acta* **2007**, *52*, 6378–6385.
- (10) Miah, M. R.; Ohsaka, T. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2012**, *7*, 697–710.
- (11) Wang, L. H.; Huang, W. S. *Sensors* **2012**, *12*, 3562–3577.
- (12) Smoukov, S. K.; Bishop, K. J. M.; Kowalczyk, B.; Kalsin, A. M.; Grzybowski, B. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15623–15630.
- (13) Niedziolka, J.; Opallo, M. *Electrochem. Commun.* **2004**, *6*, 475–479.
- (14) Niedziolka, J.; Palys, B.; Nowakowski, R.; Opallo, M. *J. Electroanal. Chem.* **2005**, *578*, 239–245.

9. Węglowe elektrody otrzymane metodą warstwa-po-warstwie

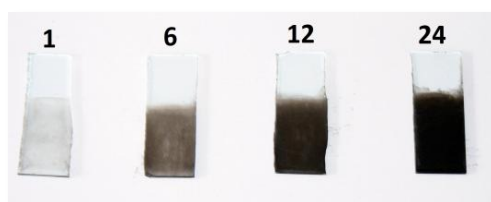
9.1 Elektrody polikrzemianowo-węglowe, TDA-CNP

Wykorzystując oddziaływania elektrostatyczne grup funkcyjnych CNP (Rozdz. 1.1.1) i submikrocząstek polikrzemianowych, TDA, wytworzono elektrody TDA-CNP metodą LbL (Rys. 9.1). W tym celu użyto zawiesiny 5 mg ml⁻¹ TDA w MeOH oraz 5 mg ml⁻¹ CNP w acetonitrylu (ACN), otrzymane przez kilkunastominutowe sonikowanie w płuczce ultradźwiękowej. ITO zanurzano najpierw w zawieszynie cząstek TDA na 5 sekund, pozostawiano do wyschnięcia, następnie płukano w czystym rozpuszczalniku i zanurzano w zawieszynie CNP i kolejno w ACN. W taki sposób powstaje jedna podwójna warstwa osadzonego materiału.



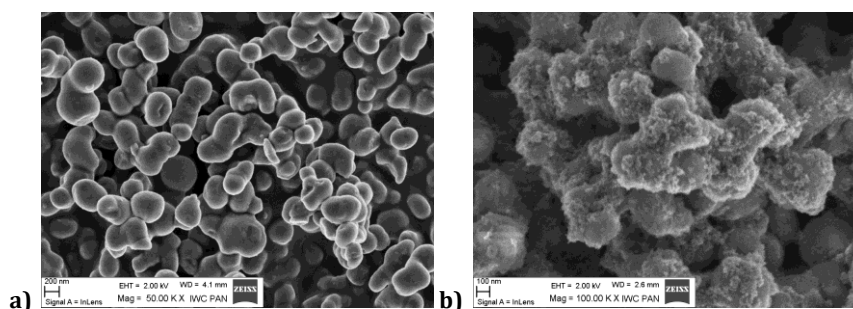
Rys. 9.1 Schemat procedury LbL przygotowania elektrod TDA-CNP, zdjęcia zawieszyn cząstek TDA i CNP.

Przez naprzemienne zanurzenie ITO w zawieszinach różnoimiennie naładowanych cząstek TDA i CNP, utworzono elektrody pokryte jedną, sześcioma, dwunastoma i dwudziestoczwierema podwójnymi warstwami (TDA-CNP(n), n=1, 6, 12, 24). Już jedna warstwa powoduje znaczącą zmianę wyglądu ITO, a pokrycie widoczne jest gołym okiem. Dalsze zwiększanie ilości osadzanego materiału powoduje, że elektrody stają się coraz ciemniejsze (Rys. 9.2). Po osadzeniu około trzydziestu sześciu warstw, elektrody tracą mechaniczną stabilność, depozyt staje się kruchy i odpada z powierzchni ITO.



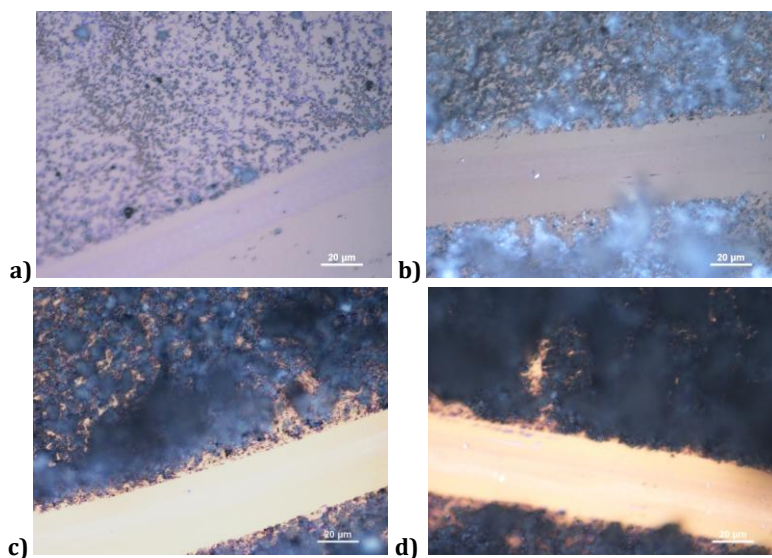
Rys. 9.2 Zdjęcie elektrod pokrytych TDA-CNP jedną, sześcioma, dwunastoma i dwudziestoma czwiera warstwami.

Obrazy SEM pokazują, że gładka powierzchnia cząstek TDA (Rys. 9.3a) zostaje pokryta wieloma nieregularnymi agregatami nanocząstek węgla (Rys. 9.3b).



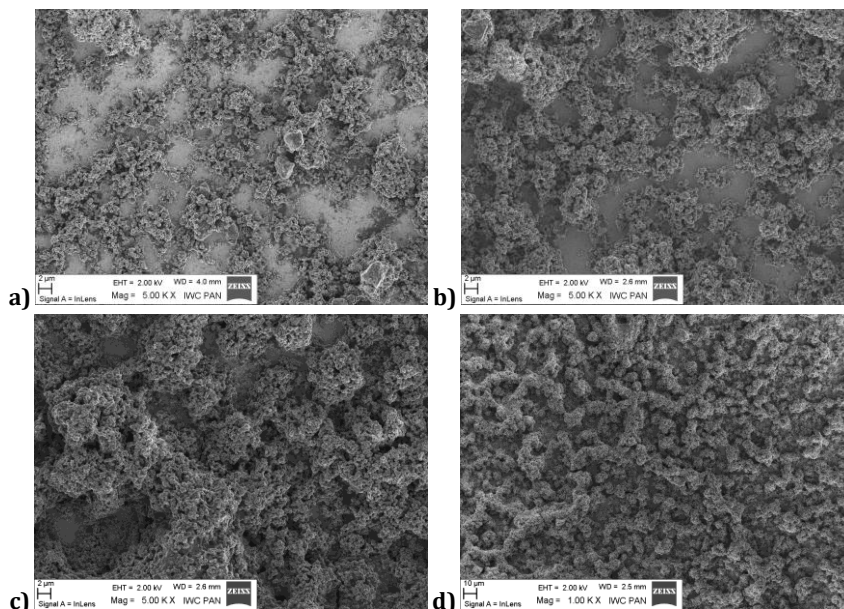
Rys. 9.3 Obrazy SEM: a) cząstek TDA, b) elektrody TDA-CNP(6).

Obrazy mikroskopii optycznej elektrod TDA-CNP(1,6,12,24) ze zdrapanym fragmentem, (Rys. 9.4) prezentują dość równomierny rozkład cząstek na powierzchni ITO. Widoczne są duże, białe agregaty cząstek TDA, a na elektrodzie TDA-CNP(24) duża ilość czarnych CNP.



Rys. 9.4 Zdjęcia mikroskopu optycznego dla: **a)** TDA-CNP(1), **b)** TDA-CNP(6), **c)** TDA-CNP(12), **d)** TDA-CNP(24).

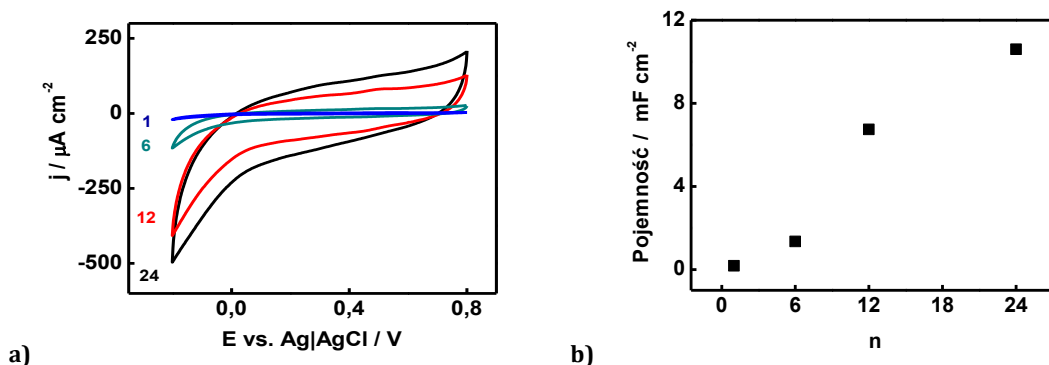
Obrazy SEM wykonano w celu zobrazowania rozmieszczenia cząstek na powierzchni ITO (Rys. 9.5). Podobnie do innych omawianych wcześniej elektrod LbL przygotowanych wyłącznie z różnego rodzaju cząstek, ITO nie jest całkowicie pokryte. Cząstki tworzą wyspy które rosną w miarę nakładania kolejnych warstw. Rys. 9.5d przedstawia bardzo rozwiniętą powierzchnię elektrody TDA-CNP(24) przypominającą rafę koralową.



Rys. 9.5 Obrazy SEM powierzchni elektrod: **a)** TDA-CNP(1), **b)** TDA-CNP(6), **c)** TDA-CNP(12), **d)** TDA-CNP(24).

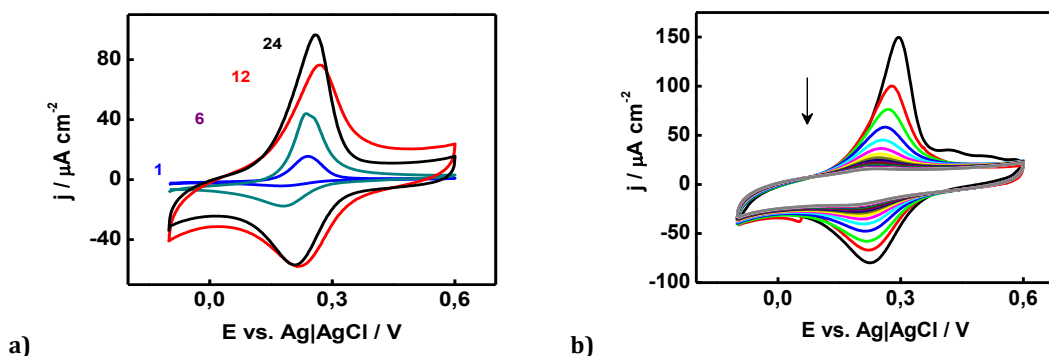
Wykonane obrazy, zarówno mikroskopem optycznym jak i SEM, przedstawiają zróżnicowaną i nieregularną powierzchnię materiału, co może wpływać na ich właściwości elektrokatalityczne. Rozwinięcie powierzchni potwierdza wyniki badań elektrochemicznych. Prąd pojemnościowy oraz pojemność, wzrasta wraz z ilością osadzonych warstw (Rys. 9.6) i jest o ok. dwa rzędy wielkości większa od elektrod Au-Au lub

Au-TPS, ale porównywalna do pojemności elektrod utworzonych z różniamiennie naładowanych CNP¹.



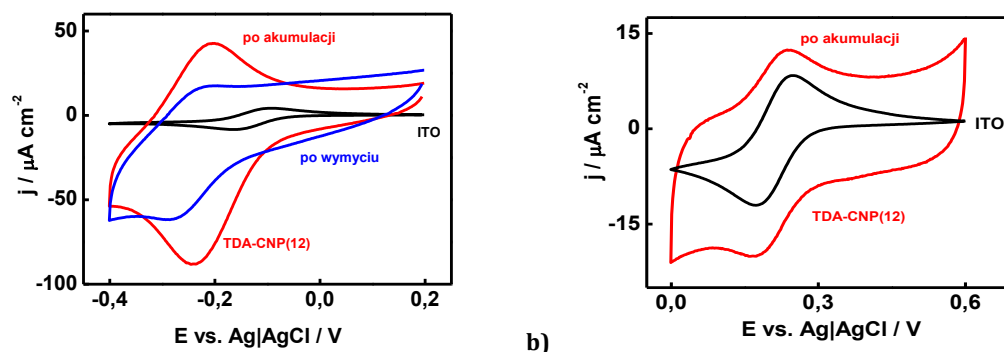
Rys. 9.6 a) Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na TDA-CNP(1,6,12,24) w 0,1 M H₂SO₄, 2-gie cykle, $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$, **b)** pojemność warstwy podwójnej (przy $E = 0,3 \text{ V}$) w funkcji liczby osadzonych warstw.

Największą pojemność warstwy podwójnej zaobserwowano dla elektrody TDA-CNP(24). Rozwinięcie powierzchni potwierdzono utleniając 25 nM depozyt *t*-BuFc (Rys. 9.7a). Tak samo jak w przypadku elektrod z AuNP, rejestrowany prąd na TDA-CNP spada stopniowo w kolejnych cyklach (Rys. 9.7b). Wydajność procesu utleniania *t*-BuFc na granicy trzech faz, wynosi: 2,6%, 6,4%, 12,2% i 11,9% odpowiednio dla jednej, sześciu, dwunastu i dwudziestu czterech warstw TDA-CNP pokrywających ITO. Jest ona niewątpliwie większa od rejestrowanej dla elektrod Au-Au (Rozdz. 8.1) i Au-TPS (Rozdz. 8.2).



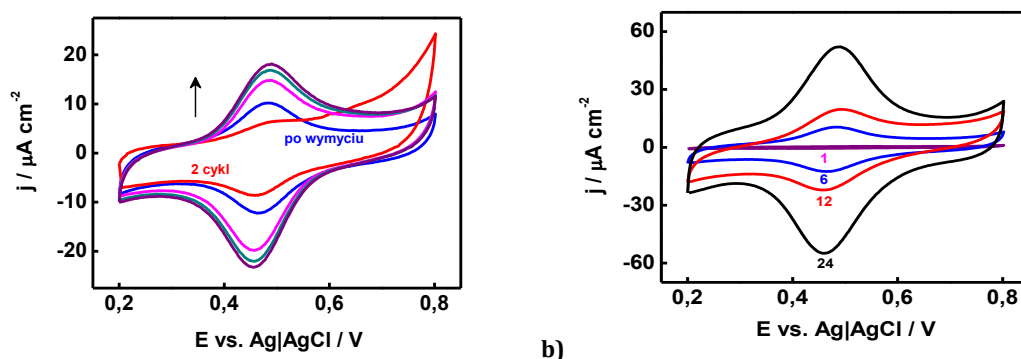
Rys. 9.7 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane po osadzeniu 25 nmol *t*BuFc na: **a)** TDA-CNP(1,6,12,24), 2-gie cykle, **b)** TDA-CNP(12), kolejne cykle 1-20; 0,1 M NaClO₄, $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

Kolejne eksperymenty miały na celu sprawdzenie zdolności przygotowanych podłoży do akumulacji różnych próbników redoks. Elektrody TDA-CNP, szczególnie te z większą liczbą warstw, wykazują akumulację kationu Ru(NH₃)₆³⁺ (Rys. 9.8a). Rejestrowany prąd z każdym kolejnym cyklem stopniowo wzrastał, aż do ustabilizowania w dwudziestym cyklu. Potencjał formalny Ru(NH₃)₆^{3+/2+}, jest niższy o ok. 0,1 V w stosunku do niemodyfikowanego ITO i wynosi 0,22 V. Przesunięcie to świadczy o stabilizacji zredukowanej formy próbnika redoks przez materiał elektrody. Akumulację tę można nazwać odwracalną, gdyż większość jonów ulega wymyciu z powierzchni elektrody, po jej przeniesieniu do czystego elektrolitu podstawowego (Rys. 9.8a). Efektu akumulacji nie zaobserwowano dla jonów Fe(CN)₆³⁻ (Rys.9.8b). Oznacza to, że większość grup funkcyjnych cząstek TDA oddziałuje z grupami nanocząstek CNP, a elektroda posiada nadmiarowy ładunek ujemny. Jest to możliwe ze względu na dużą liczbę CNP znajdujących się na elektrodzie, co pokazują obrazy SEM. Efekt ten można także tłumaczyć dużą hydrofobowością grup funkcyjnych cząstek TDA, dla których nie obserwowano akumulacji tych jonów (Rozdz. 7).



Rys. 9.8 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na: **a)** niemodyfikowanym ITO (czarna krzywa) oraz na TDA-CNP(12) (20-ty cykl, czerwona krzywa) w 10^{-4} M $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$, 0,1 M NaClO_4 i po przełożeniu elektrody do czystego 0,1 M NaClO_4 (20-ty cykl, niebieska krzywa), **b)** niemodyfikowanym ITO (czarna krzywa) oraz na TDA-CNP(12) (20 cykl, czerwona krzywa) w 10^{-4} M $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 0,1 M NaClO_4 ; $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

Zaobserwowano nieodwracalny mechanizm akumulacji organicznego dianionu, zawierającego dwie grupy sulfonowe, ABTS^{2-} (Rozdz. 3.1.2). Największy efekt widoczny jest dla elektrody TDA-CNP(24) (Rys. 9.9b). Rys. 9.9a przedstawia voltamperogramy akumulacji jonów na elektrodzie TDA-CNP(6) przejawiającą się systematycznym wzrostem prądu w kolejnych rejestrowanych cyklach. Na TDA-CNP(24) różnica potencjału pików utleniania i redukcji wynosząca 20 mV oraz charakterystyczny kształt, wskazują na proces kontrolowany szybkością adsorpcji jonów na powierzchni elektrody. Dla elektrody TDA-CNP(6), różnica potencjałów jest większa i wynosi ok. 30 mV. W czystym elektrolicie podstawowym, rejestrowany prąd spada, co świadczy o wymywaniu jonów ABTS^{2-} , ale wciąż widoczne są dobrze wykształcone piki. Świadczy to o nieodwracalności procesu akumulacji tych jonów, który zachodzi nie tylko przez wymianę przeciwjonu, i oddziaływania elektrostatyczne z grupami tetraalkiloamoniowymi TDA, ale także występują tutaj oddziaływania typu π - π aromatycznego anionu z nanocząstkami węgla. Taki efekt obserwowano wcześniej dla elektrod modyfikowanych CNP².

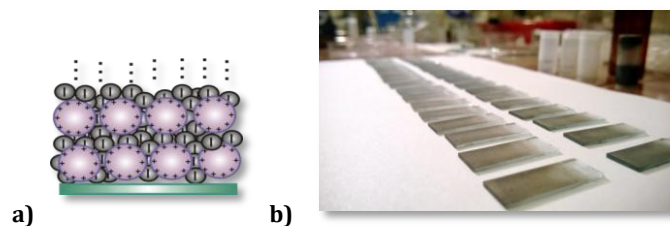


Rys. 9.9 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na: **a)** TDA-CNP(6) (cykle: 2, 10, 15, 20, 30) w 10^{-4} M $(\text{NH}_4)_2\text{ABTS}$, 0,1 M buforze fosforanowym pH = 4,8, oraz po przełożeniu elektrody do czystego 0,1 M buforu fosforanowego pH = 4,8 (30-ty cykl, niebieska krzywa), **b)** TDA-CNP(1,6,12,24) w 10^{-4} M $(\text{NH}_4)_2\text{ABTS}$ w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 4,8, 30-te cykle, $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

Podsumowując, przygotowano elektrody zbudowane z cząstek polikrzemianowych, TDA i nanocząstek węgla CNP. Ilość nanoszonego materiału kontrolowano liczbą zanurzeń i wynurzeń. Elektrody wykazały zdolność do akumulacji kationu heksaaminorutenowego (III) oraz brak akumulacji anionu heksacyjanożelazianowego (III). Natomiast dla dianionu ABTS^{2-} zaobserwowano akumulację nieodwracalną.

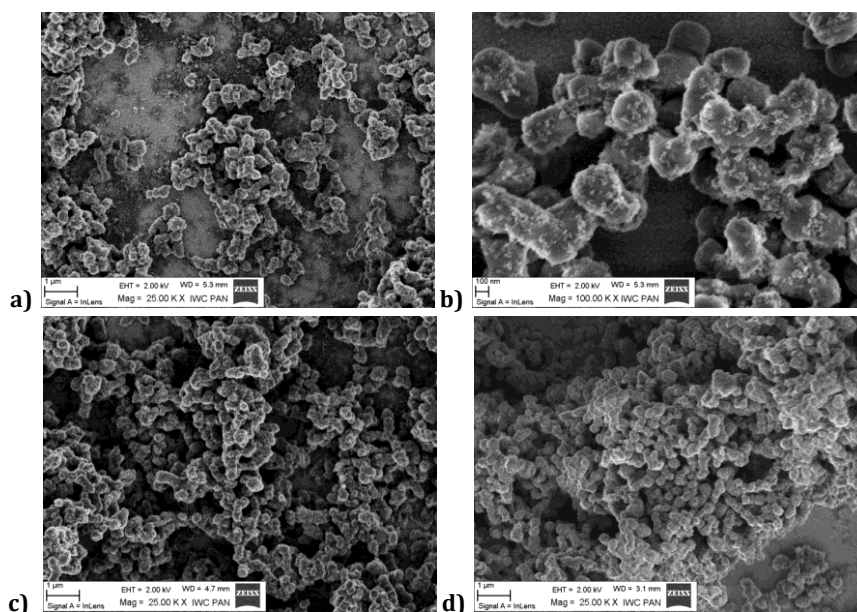
9.2 Elektrody polikrzemianowo-węglowe, TMA-CNP

Kolejny rodzaj elektrod LbL powstały w oparciu o cząstki polikrzemianowe modyfikowane grupami tetraalkiloamoniowymi, TMA (Rozdz. 7) oraz nanocząstki węgla CNP (Rys. 9.10a). Użyto zawiesiny TMA w MeOH o stężeniu 5 mg ml^{-1} , oraz CNP w ACN o stężeniu 5 mg ml^{-1} . Do osadzenia warstw na powierzchni ITO zastosowano tę samą procedurę jak dla elektrod TDA-CNP. W rezultacie otrzymano elektrody przez jedno, sześć, dwanaście i dwadzieścia cztery podwójne zanurzenia w zawiesinach cząstek. Swoim wyglądem elektrody te przypominały TDA-CNP. Rys. 9.10b przedstawiający szereg jednakowo pokrytych elektrod TMA-CNP(6), pokazuje powtarzalność zastosowanej techniki.



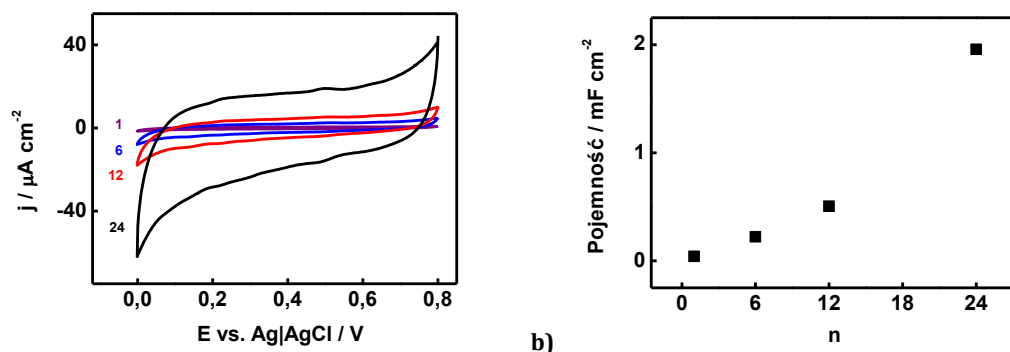
Rys. 9.10 a) Schematyczny przekrój elektrody TMA-CNP, b) zdjęcie elektrod TMA-CNP(6).

Obrazy SEM elektrod TMA-CNP przedstawiają duże cząstki polikrzemianowe pokryte mniejszymi CNP o nieregularnym kształcie (Rys. 9.11). Nawet 24 warstwy TMA-CNP nie pozwalają na całkowite pokrycie ITO i dostrzegalne są fragmenty podłoża (Rys. 9.11d).



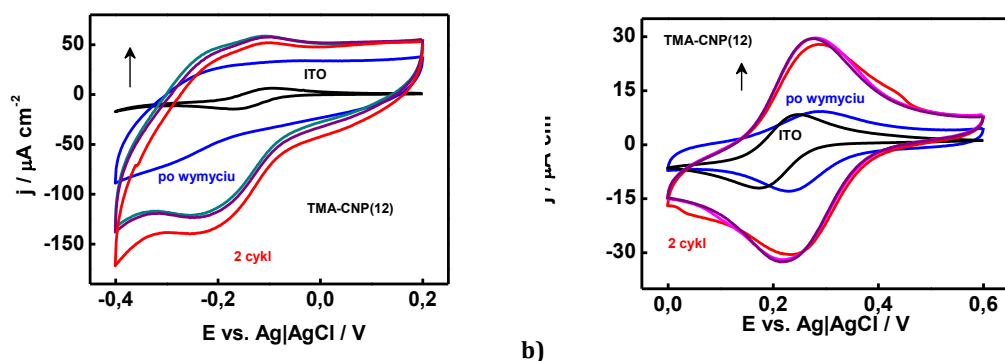
Rys. 9.11 Obrazy SEM powierzchni elektrod: a) TMA-CNP(1), b) TMA-CNP(6), c) TMA-CNP(12), d) TMA-CNP(24).

Prąd pojemnościowy oraz pojemność elektrod wzrasta wraz z ilością osadzonych warstw (Rys. 9.12), jednak co ciekawe, rejestrowane wartości są o ok. rząd wielkości mniejsze od obserwowanych dla elektrod TDA-CNP (Rys. 9.6), różniących się rodzajem użytych cząstek polikrzemianowych.



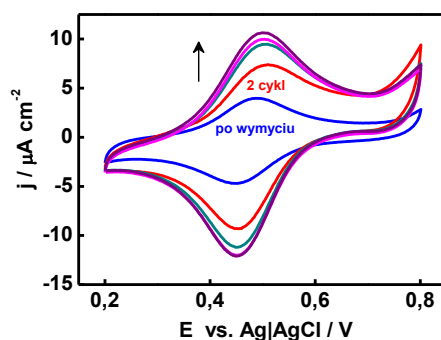
Rys. 9.12 a) Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na TMA-CNP(1,6,12,24) w 0,1 M H_2SO_4 , 2-gie cykle, $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$, **b)** pojemność warstwy podwójnej elektrod (przy $E = 0,3 \text{ V}$) w funkcji liczby osadzonych warstw.

W przeciwieństwie do elektrod TDA-CNP, elektrody TMA-CNP wykazują akumulację anionów heksacyjanożelazianowych (Rys. 9.13b) oraz niewielką zdolność do akumulacji kationów heksaaminorutenu (Rys. 9.13a). Po przełożeniu elektrod do czystego elektrolitu, obserwuje się całkowite wymycie kationów $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$, natomiast piki pochodzące od pary redoks $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ nadal są dobrze wykształcone i widoczne. Wnioskujemy z tego, że elektroda posiada nadmiarowy, powierzchniowy ładunek dodatni, który wynika z tego, że nie wszystkie grupy funkcyjne cząstek TMA oddziałują z grupami funkcyjnymi cząstek CNP. Mogą to potwierdzać obrazy SEM elektrod (Rys. 9.11), na których widoczne jest niecałkowite pokrycie TMA przez nanocząstki węgla. Rejestrowane krzywe wskazują na szybki proces akumulacji jonów $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, gdyż nie obserwowano stopniowego wzrostu prądu, ale wartość prądu piku wzrosła dwukrotnie dla TMA-CNP(12), w stosunku do niemodyfikowanego ITO.



Rys. 9.13 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na: **a)** niemodyfikowanym ITO (czarna krzywa) oraz na TMA-CNP(12) (cykle: 2, 10, 20) w nasyconym argonie $10^{-4} \text{ M Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$, $0,1 \text{ M NaClO}_4$ i po przełożeniu elektrody do czystego $0,1 \text{ M NaClO}_4$ (20-ty cykl, niebieska krzywa), **b)** niemodyfikowanym ITO (czarna krzywa) oraz na TMA-CNP(12) (cykle: 2, 10, 20) w $10^{-4} \text{ M K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, $0,1 \text{ M NaClO}_4$ i po przełożeniu elektrody do czystego $0,1 \text{ M NaClO}_4$ (20-ty cykl, niebieska krzywa); $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

Na powierzchni elektrod TMA-CNP zaobserwowano również nieodwracalną akumulację ABTS^{2-} (Rys. 9.14). Różnica potencjału piku anodowego i katodowego wynosi na TMA-CNP(6) 50 mV, czyli o 20 mV większa od wartości otrzymanej dla elektrody TDA-CNP(6).

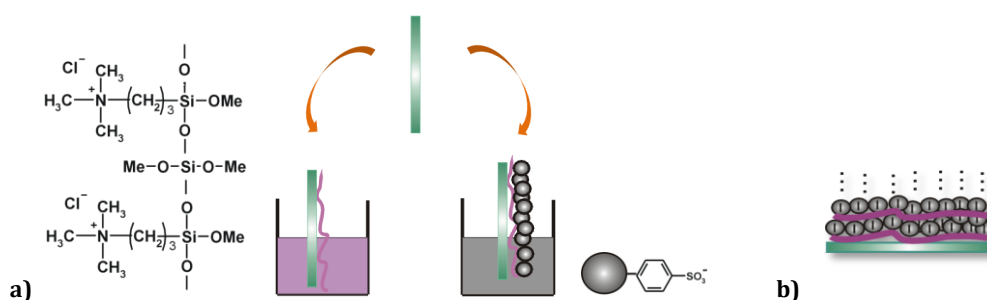


Rys. 9.14 Krzywe woltamperometryczne zarejestrowane na TMA-CNP(6) (cykle: 2, 10, 20, 30) w 10^{-4} M $(\text{NH}_4)_2\text{ABTS}$, 0,1 M buforze fosforanowym pH = 4,8, oraz po przełożeniu elektrody do 0,1 M buforu fosforanowego pH = 4,8 (30-ty cykl, niebieska krzywa), $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

Podsumowując, stosując technikę LbL przygotowano elektrody TMA-CNP z różną ilością naniesionego materiału. Elektrody wykazały niewielkie zdolności do akumulacji kationu heksamianorutenowego (III) oraz nieodwracalną akumulacją anionów heksacyjanżelazianowych (III) oraz ABTS^{2-} .

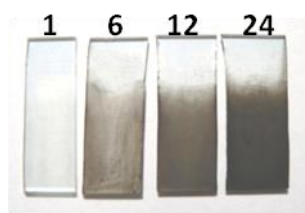
9.3 Elektrody polikrzemianowo-węglowe, $\text{TMA}_{\text{zol}}\text{-CNP}$

Wszystkie opisane poprzednio elektrody składały się wyłącznie z różnoimiennie naładowanych cząstek. W celu sprawdzenia jaki wpływ na właściwości elektrod może mieć zastąpienie cząstek polikrzemianowych, TMA, ich odpowiednikiem w postaci cienkiego filmu z tymi samymi grupami funkcyjnymi, przygotowano elektrody $\text{TMA}_{\text{zol}}\text{-CNP}$. Utworzono je przez jedno, sześć, dwanaście i dwadzieścia cztery zanurzenia kolejno w zolu polikrzemianowym rozcieńczonym w stosunku 1:100 w MeOH i zawieszenie CNP o stężeniu 5 mg ml^{-1} . Zol zawierał: 196 μl TMOS, 169 μl TMAP i 370 μl 96% kwasu mrówkowego. Powstał przez 10 minutowe sonikowanie w płuczce ultradźwiękowej. Schemat struktury polikrzemianu otrzymanego w następstwie hydrolizy i polikondensacji przedstawia Rys. 9.15a.



Rys. 9.15 Schemat: **a)** przygotowania elektrod $\text{TMA}_{\text{zol}}\text{-CNP}$, **b)** przekroju elektrody $\text{TMA}_{\text{zol}}\text{-CNP}$.

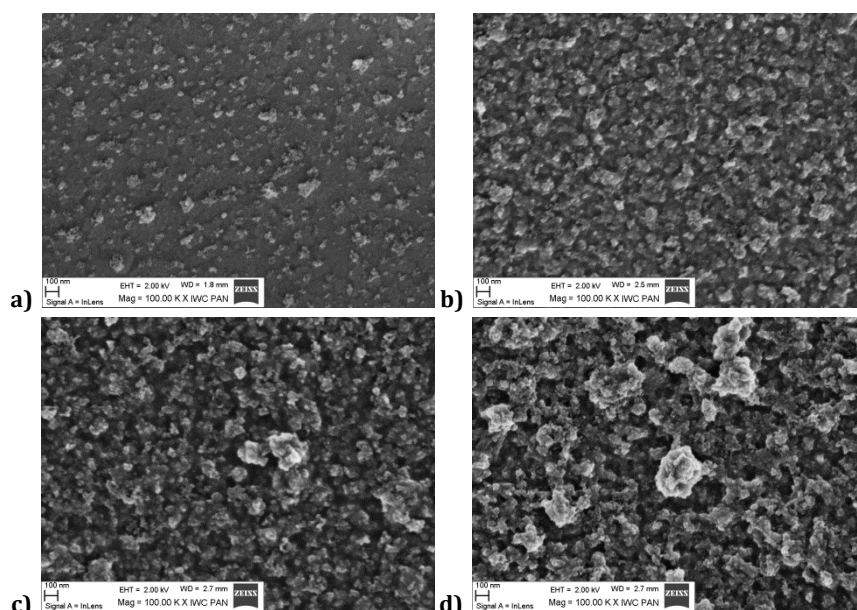
Także i w tym przypadku, w miarę powtarzania procedury modyfikacji, otrzymane elektrody (Rys 9.15b) stają się coraz ciemniejsze (Rys. 9.16) co oznacza coraz większą ilość naniesionego materiału.



Rys. 9.16 Zdjęcie elektrod pokrytych TMA_{zol}-CNP(1,6,12,24).

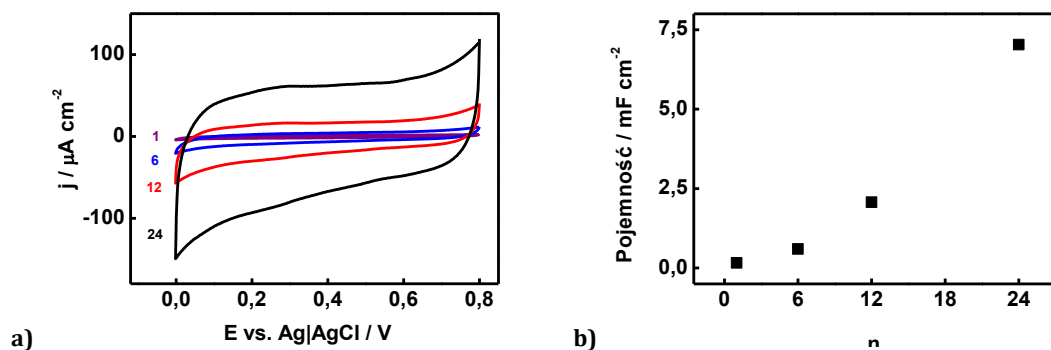
Przygotowane elektrody są niezwykle stabilne mechanicznie. Nałożonych warstw nie można przypadkowo zetrzeć. Pod odpowiednim kątem ich powierzchnia odbija światło, co odróżnia je od ich matowego odpowiednika TMA-CNP.

Obrazy SEM (Rys. 9.17) pokazują całkowite pokrycie powierzchni ITO przez nakładany materiał oraz rozwinięcie powierzchni w miarę powtarzania procedury modyfikacji. Szczególnie na obrazie Rys. 9.17d widoczna jest porowata struktura jaką zazwyczaj tworzy polikrzemianowy film.



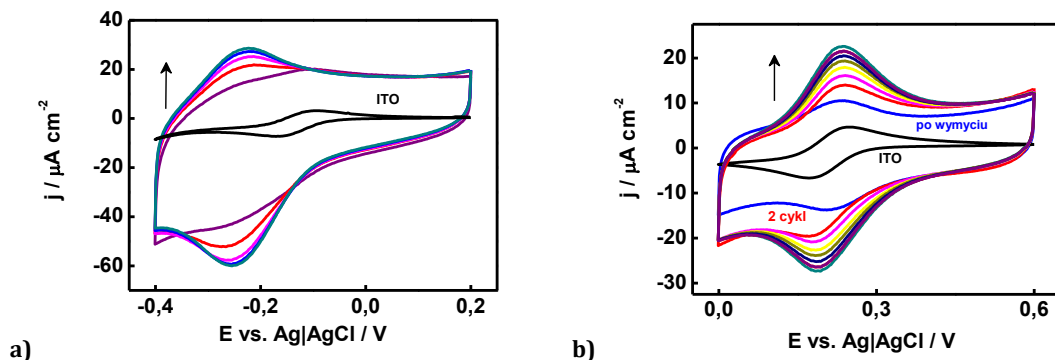
Rys. 9.17 Obrazy SEM powierzchni elektrod: **a)** TMA_{zol}-CNP(1), **b)** TMA_{zol}-CNP(6), **c)** TMA_{zol}-CNP(12), **d)** TMA_{zol}-CNP(24).

Rejestrowany prąd pojemnościowy jest proporcjonalny do liczby naniesionych na ITO warstw TMA_{zol}-CNP (Rys. 9.18a), a obliczona pojemność warstwy podwójnej elektrod (Rys. 9.18b) jest ponad trzykrotnie większa od pojemności elektrod TMA-CNP.



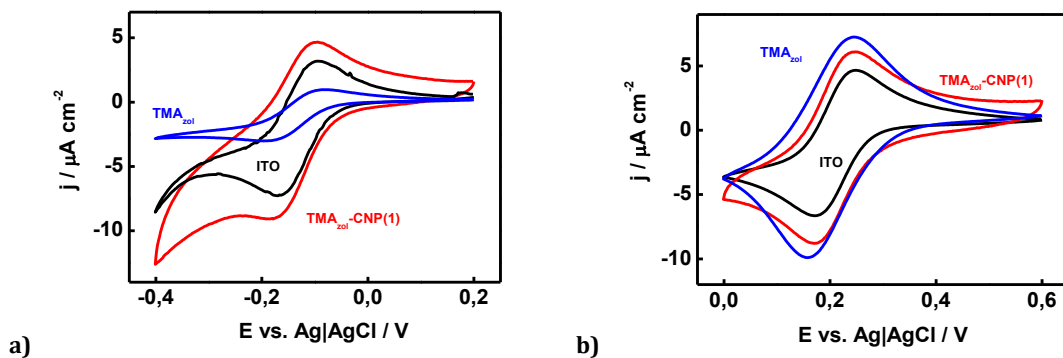
Rys. 9.18 **a)** Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na TMA_{zol}-CNP(1,6,12,24) w 0,1 M H₂SO₄, 2-gie cykle, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, **b)** pojemność warstwy podwójnej elektrod (przy $E = 0,3\text{V}$) w funkcji liczby osadzonych warstw.

Elektrody $\text{TMA}_{\text{zol}}\text{-CNP}$, w porównaniu TMA-CNP , wykazują większą zdolność do akumulacji kationu heksamidorutenowego (III), co sugeruje większą ilość wolnych grup funkcyjnych CNP. Co ciekawe elektrody te wykazują także zdolność do akumulacji anionu heksacyjanożelazianowego (III) (Rys. 9.19), a po przeniesieniu elektrody do czystego elektrolitu, piki utleniania-redukcji wciąż są widoczne.



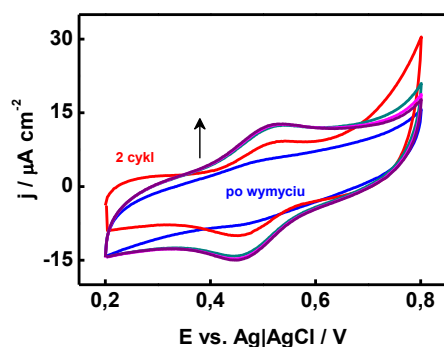
Rys. 9.19 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na: **a)** niemodyfikowanym ITO (czarna krzywa) oraz na $\text{TMA}_{\text{zol}}\text{-CNP}(12)$ (cykle: 2, 10, 15, 20, 30) w 10^{-4} M $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$, 0,1 M NaClO_4 , **b)** niemodyfikowanym ITO (czarna krzywa) oraz na $\text{TMA}_{\text{zol}}\text{-CNP}(12)$ (wybrane cykle: 2-30) w 10^{-4} $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 0,1 M NaClO_4 i po przełożeniu elektrody do czystego 0,1 M NaClO_4 (30-ty cykl, niebieska krzywa), $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

Sprawdzono także zdolność do akumulacji jonów filmu polikrzemianowego modyfikowanego dodatnimi grupami tetraalkiloamoniowymi. Film utworzono przez jednorazowe zanurzenie ITO w zolu. Rys. 9.20 pokazuje, że na takiej elektrodzie jony $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ nie ulegają akumulacji (Rys. 9.20a), natomiast obserwuje się akumulację anionów $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ (Rys. 9.20b), która jest większa od rejestrowanej na elektrodzie $\text{TMA}_{\text{zol}}\text{-CNP}(1)$.



Rys. 9.20 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na niemodyfikowanym ITO (czarne krzywe), $\text{ITO-TMA}_{\text{zol}}$ (niebieskie krzywe) i $\text{TMA}_{\text{zol}}\text{-CNP}$ (czerwone krzywe) na zanurzone w: **a)** 10^{-4} M $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$, **b)** 10^{-4} $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$; 0,1 M NaClO_4 , (30-te cykle), $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

Akumulacja dianionu ABTS^{2-} w tym przypadku okazała się procesem odwracalnym i po etapie wymycia jonów, piki są praktycznie niezauważalne. Różnica potencjałów anodowego i katodowego wynosi 67 mV. Sugeruje to brak adsorpcji ABTS^{2-} na powierzchni węgla, która miała miejsce w TMA-CNP . Być może CNP pokryte jest warstwą polikrzemianu, który uniemożliwia adsorpcję tych jonów. Kształt rejestrowanych krzywych zbliżony jest do opisanego w literaturze dla podobnego układu ³.



Rys. 9.21 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na TMA_{zol}-CNP(6) (cykle: 2, 10, 30) w 10⁻⁴ M (NH₄)₂ABTS, 0,1 M buforze fosforanowym pH = 4,8, oraz dla po przełożeniu elektrody do 0,1 M buforu fosforanowego pH = 4,8 (30-ty cykl, niebieska krzywa), $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

Podsumowując, przygotowano elektrody typu LbL w oparciu o film polikrzemianowy zawierający dodatkowo grupy tetraalkiloamoniumowe, identyczne do użytych w cząstkach TMA, oraz CNP modyfikowane ujemnymi grupami fenylsulfonowymi. Rozwinięcie powierzchni przedstawiono za pomocą obrazów SEM oraz pomiaru pojemności warstwy podwójnej. Dodatni ładunek filmu potwierdzono eksperymentem akumulacji jonów. Elektrody wykazały zdolność do akumulacji zarówno kationów jak anionów aktywnych redoks.

Właściwości elektrokatalityczne przedstawionych elektrod: TDA-CNP, TMA-CNP oraz TMA_{zol}-CNP zostaną omówione w kolejnych rozdziałach.

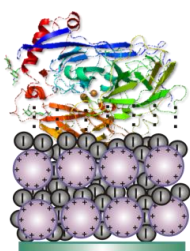
9.4 Bibliografia

- (1) Szot, K.; Jönsson-Niedziolka, M.; Rozniecka, E.; Marken, F.; Opallo, M. *Electrochim. Acta* **2013**, *89*, 132–138.
- (2) Szot, K.; Lesniewski, A.; Niedziolka, J.; Jönsson, M.; Rizzi, C.; Gaillon, L.; Marken, F.; Rogalski, J.; Opallo, M. *J. Electroanal. Chem.* **2008**, *623*, 170–176.
- (3) Szot, K.; Lynch, R. P.; Lesniewski, A.; Majewska, E.; Sirieix-Plenet, J.; Gaillon, L.; Opallo, M. *Electrochim. Acta* **2011**, *56*, 10306–10312.

10. Zastosowanie elektrod polikrzemianowo-węglowych w bioogniwach

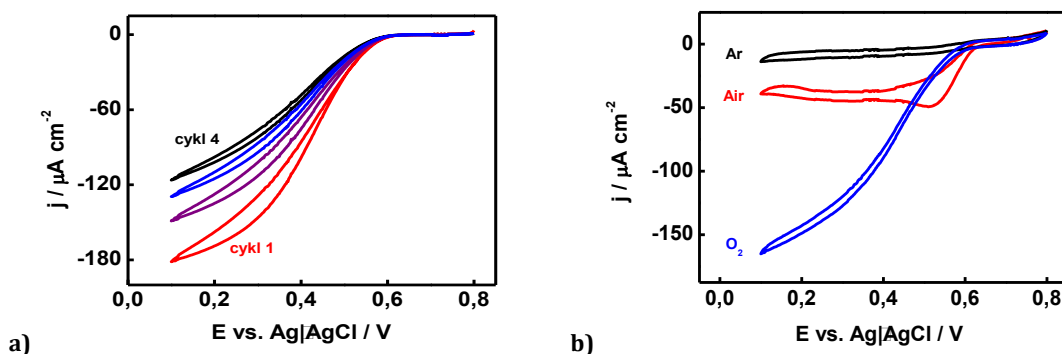
Z uwagi na wysokie powinowactwo nanocząstek węgla do molekuł biologicznych, podjęto próbę immobilizacji enzymu, BOD, na elektrodach zawierających CNP oraz ich aplikacji jako katody w ogniwie paliwowym¹. BOD (Rozdz. 3.1) zmniejsza nadpotencjał redukcji tlenu na elektrodach co umożliwia ich stosowanie w bioogniwach.

Do immobilizacji enzymu wybrano prostą metodę adsorpcji z roztworu. Parametry procesu dobrano na podstawie wcześniejszych doświadczeń¹⁻³. Użyto roztworu BOD o stężeniu $0,7 \text{ mg ml}^{-1}$ w $0,1 \text{ M}$ buforze fosforanowym $\text{pH} = 4,8$. Proces adsorpcji prowadzono przez dwie godziny w temperaturze 4°C przez zanurzenie elektrody w roztworze enzymu². Następnie zmodyfikowaną elektrodę (Rys. 10.1) płukano w buforze fosforanowym i poddawano badaniom elektrochemicznym.



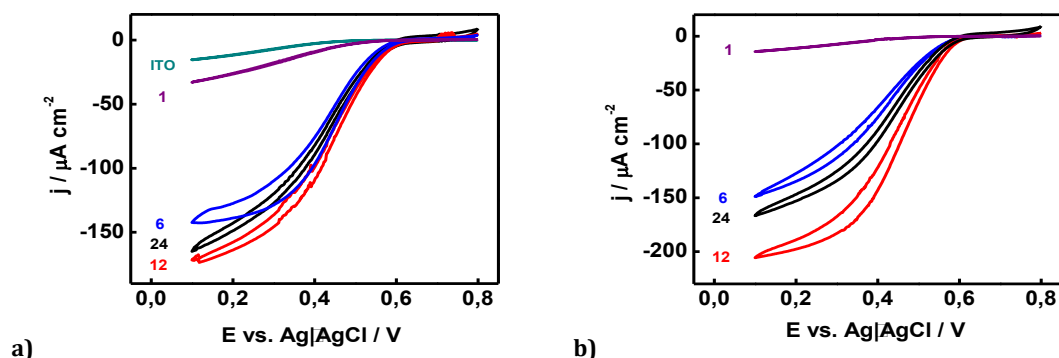
Rys. 10.1 Schemat elektrody LbL zmodyfikowanej enzymem BOD.

Rys. 10.2 przedstawia bezmediatorową, enzymatyczną redukcję tlenu na powierzchni elektrody LbL zmodyfikowanej BOD: TMA-CNP(6)-BOD (Rys. 10.2a) oraz na TDA-CNP(24)-BOD (Rys. 10.2b). Krzywa enzymatycznej redukcji tlenu ma charakterystyczny kształt fali. Potencjał początkowy procesu wynosi ok. $0,63 \text{ V}$ i jest wystarczający do użycia takiej elektrody jako katody w bioogniwie. Wraz z kolejno rejestrowanymi cyklami obserwuje się spadek prądu redukcji, który może być związany ze stopniowym wymywaniem enzymu z powierzchni elektrody (Rys. 10.2a). Wielkość rejestrowanego prądu zależy od stężenia tlenu w elektrolicie (Rys. 10.2b). Na voltamperogramie uzyskanym w roztworze nasyconym argonem widoczny jest wciąż niewielki prąd katodowy, wynikający prawdopodobnie z pułapkowania tlenu wewnątrz materiału elektrodowego. Z tego samego powodu w natlenionym roztworze wartość prądu redukcji jest tylko 4,5 razy większa od rejestrowanej w roztworze napowietrzonym.



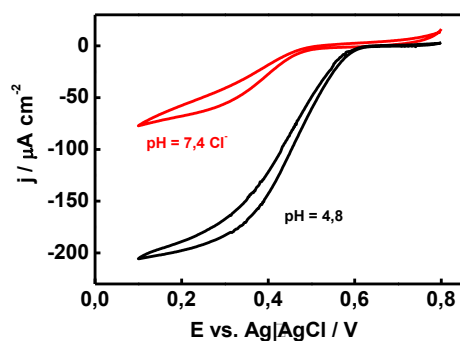
Rys. 10.2 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na: a) TMA-CNP(6)-BOD w natlenionym $0,1 \text{ M}$ buforze fosforanowym $\text{pH} = 4,8$ cykle: 1-4, b) TDA-CNP(24)-BOD w nasyconym argonem (czarna krzywa), napowietrzonym (czerwona krzywa), nasyconym tlenem (niebieska krzywa) $0,1 \text{ M}$ buforze fosforanowym $\text{pH} = 4,8$, 2-gie cykle, $v = 1 \text{ mV s}^{-1}$.

Na gęstość prądu redukcji tlenu wpływa liczba naniesionych na ITO warstw w procesie LbL (Rys. 10.3). Optymalny efekt obserwuje się dla elektrody pokrytej dwunastoma warstwami zarówno na TDA-CNP (Rys. 10.3a), jak i TMA-CNP (Rys. 10.3b) oraz TMA_{z01}-CNP (Rys. 10.5a). Co ciekawe, bioelektrokatalityczna redukcja tlenu przez BOD następuje nawet na niezmodyfikowanym ITO⁴, a wartość rejestrowanego prądu jest mniejsza niż na TDA-CNP(1), ale taka sama jak na TMA-CNP(1) (Rys. 10.3).



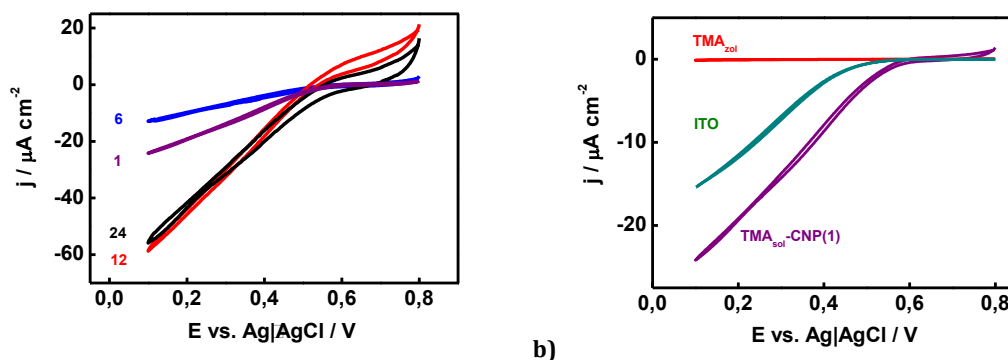
Rys. 10.3 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na: **a)** niemodyfikowanym ITO oraz TDA-CNP(1,6,12,24)-BOD, **b)** TMA-CNP(1,6,12,24)-BOD; w nasyconym tlenem 0,1 M buforze fosforanowym pH = 4,8, 2-gie cykle, $v = 1 \text{ mV s}^{-1}$.

Zmiana elektrolitu, z optymalnego dla działania BOD, na 20 mM bufor fosforanowy pH = 7,4 zawierający jony chlorkowe, skutkuje znacznym spadkiem prądu redukcji tlenu, a także obniżeniem potencjału do 0,5 V (Rys. 10.4). Elektrolit ten ze względu na zbliżone pH i skład, nazywany jest sztuczną surowicą krwi. Eksperyment ten wykonywano pod kątem potencjalnej aplikacji bioogniw do zasilania implantowanych urządzeń, jak mierniki temperatury w miejscach pooperacyjnych.



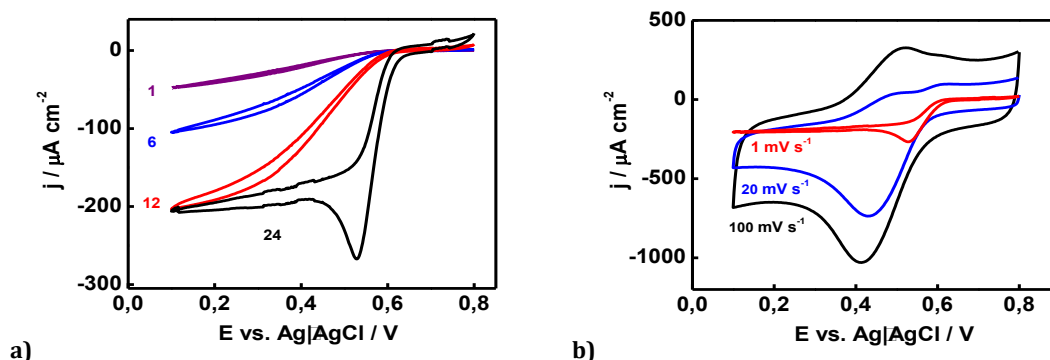
Rys. 10.4 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na TMA-CNP(12)-BOD w nasyconym tlenem: 0,1 M buforze fosforanowym pH = 4,8 (czarna krzywa) i 20 mM buforze fosforanowym pH = 7,4, 0,15 M NaCl (czerwona krzywa), 2-gie cykle, $v = 1 \text{ mV s}^{-1}$.

Na elektrodach TMA_{z01}-CNP potencjał początkowy redukcji tlenu jest niższy niż na TMA-CNP i wynosi 0,57 V (Rys. 10.5a). Kształt rejestrowanych krzywych także jest inny, a małe nachylenie zależności prądu od potencjału może być spowodowane dużym oporem elektrycznym warstw. Na voltamperogramie uzyskanym na elektrodzie modyfikowanej polikrzemianowym filmem (TMA_{z01}) i BOD (Rys. 10.5b), nie zaobserwowano prądu redukcji tlenu co może oznaczać, że enzym nie adsorbuje się na warstwie polikrzemianowej lub blokuje ona kontakt pomiędzy BOD i elektrodą.



Rys. 10.5 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na: **a)** TMA_{zol}-CNP(1,6,12,24)-BOD, **b)** ITO-BOD (zielona krzywa), ITO-TMA_{zol}-BOD (czerwona krzywa), TMA_{zol}-CNP-BOD (fioletowa krzywa); w nasycyonym tlenem 0,1 M buforze fosforanowym pH = 4,8, 2-gie cykle, $\nu = 1 \text{ mV s}^{-1}$.

Mając na celu zwiększenie wydajności katalizy enzymatycznej, zastosowano mediator przeniesienia elektronu, ABTS²⁻. Zakumulowano go na elektrodzie TDA-CNP, a następnie zaadsorbowano BOD. Na tak przygotowanym materiale badano reakcję redukcji tlenu (Rys. 10.6a). Obecność mediatora nieznacznie zwiększyła rejestrowane wartości prądu. Rys. 10.6b przedstawia wpływ szybkości polaryzacji elektrody na kształt otrzymywanego voltamperogramu. Mała szybkość polaryzacji pozwala zaobserwować powolny proces jakim jest enzymatyczna redukcja tlenu, natomiast zwiększanie szybkości powoduje pojawianie się pików utleniania-redukcji mediatora.

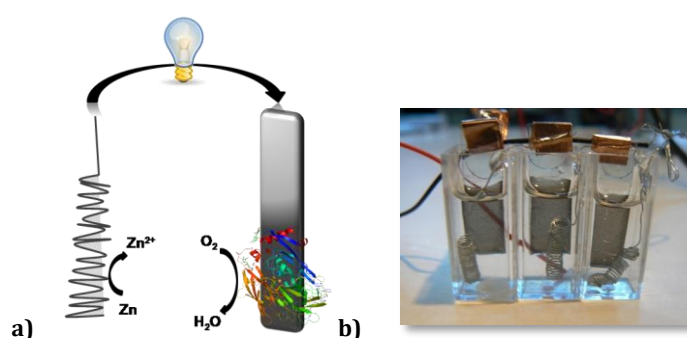


Rys. 10.6 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na: **a)** TDA-CNP(1,6,12,24)-ABTS-BOD, 2-gie cykle, $\nu = 1 \text{ mV s}^{-1}$, **b)** TDA-CNP(24)-ABTS-BOD; w nasycyonym tlenem 0,1 M buforze fosforanowym pH = 4,8, 2-gie cykle, $\nu = 1, 20, 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Podsumowując, przygotowano trzy rodzaje elektrod modyfikowanych enzymem, oksydazą bilirubiny przez adsorpcję z roztworu: TDA-CNP(1,6,12,24)-BOD, TMA-CNP(1,6,12,24)-BOD oraz TMA_{zol}-CNP(1,6,12,24)-BOD. Na elektrodach badano proces bezmediatorowej, enzymatycznej redukcji tlenu. Wszystkie zaproponowane podłoża wykazywały powinowactwo do BOD. Najlepsze parametry odnotowano na elektrodzie TMA-CNP(12)-BOD: potencjał redukcji 0,63 V i gęstość prądu $200 \mu\text{A cm}^{-2}$. W sztucznej surowicy krwi jako elektrolicie, zaobserwowano zmniejszenie prądu i obniżenie potencjału redukcji tlenu. Adsorpcja mediatora na powierzchni elektrody nie wpłynęła znacząco na polepszenie parametrów pracy elektrody.

10.1 Hybrydowe ogniwo cynkowo-tlenowe

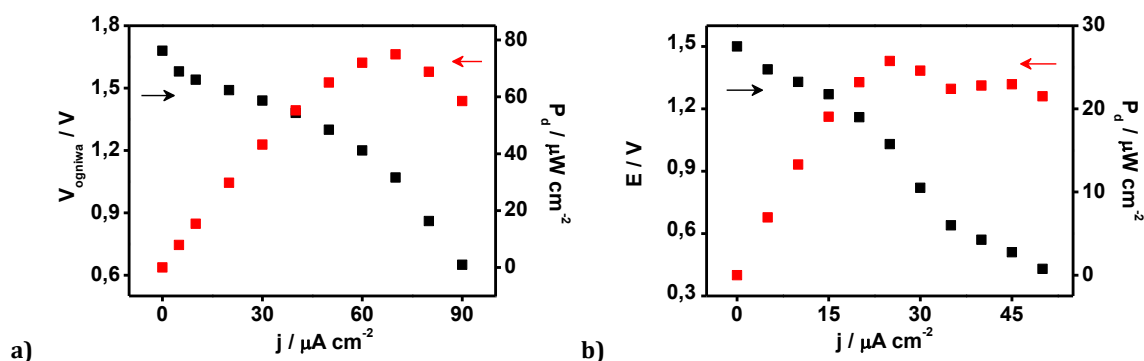
Elektrody polikrzemianowo-węglowe zmodyfikowane enzymem BOD, posłużyły jako biokatody w jednokomorowym, hybrydowym ogniwie cynkowo-tlenowym. W ogniwie tym, w trakcie utleniania cynku uwalniane elektrony przekazywane są zewnętrznym obwodem do katody, na której zachodzi bioelektrokatalityczna redukcja tlenu bezpośrednio do wody (Rys. 10.7). Dzięki wyeliminowaniu mediatora oraz unieruchomieniu enzymu na powierzchni elektrody, skonstruowane ogniwo nie wymagało użycia membrany oddzielającej przestrzenie przyelektrodowe. Jako anodę oraz jednocześnie paliwo ogniwa, zastosowano drut cynkowy pokryty Nafionem, przez zanurzenie w 0,5% roztworze polimeru w alkoholu izopropylowym. Po wysuszeniu, anoda gotowa była do pracy, w czasie której na jej powierzchni może tworzyć się hopeit, a warstwa Nafionu dodatkowo wspomaga ten proces (Rozdz. 4.1). Anoda i katoda miały porównywalną wielkość.



Rys. 10.7 a) Schemat hybrydowego ogniwa cynkowo-tlenowego, **b)** zdjęcie połączonych szeregowo trzech ogniw Hyb-Zn-O₂ z katodą TDA-CNP(6)-BOD (o nieograniczonej powierzchni).

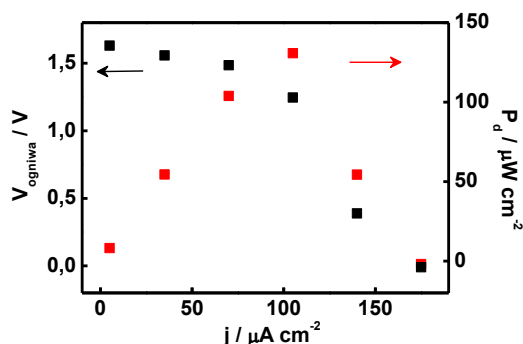
Parametry ogniw sprawdzano prowadząc pomiar różnicy potencjałów pomiędzy elektrodami w trybie galwanostatycznym, po obciążeniu ogniwa stałym w czasie prądem o zadanym natężeniu. Odczyt potencjału prowadzono po 100 s od obciążenia. W rezultacie otrzymano charakterystykę prądowo-napięciową skonstruowanych ogniw.

Napięcie obwodu otwartego ogniwa, w którym katodę stanowi elektroda TDA-CNP(6)-BOD, wynosi 1,68 V w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 4,8 i jest niższe jedynie o 0,07 V od najwyższej wartości opisaney w literaturze ⁵ (Rozdz. 4.1). Natomiast maksymalna gęstość mocy takiego ogniwa wynosi 75 $\mu\text{W cm}^{-2}$ przy 1,07 V (Rys. 10.8a). Zamiana elektrolitu na 20 mM bufor fosforanowy pH = 7,4 z dodatkiem jonów chlorkowych spowodowała pogorszenie parametrów pracy ogniwa. W takich warunkach OCV wynosi 1,5 V, a maksymalna gęstość mocy 25,8 $\mu\text{W cm}^{-2}$ przy 1,03 V (Rys. 10.8b).



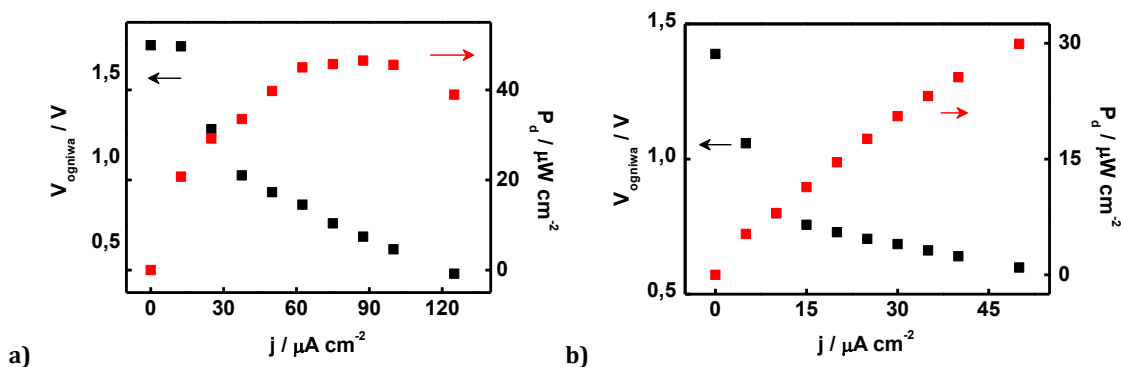
Rys. 10.8 Charakterystyka prądowo-napięciowa ogniwa Hyb-Zn-O₂ z katodą TDA-CNP(6)-BOD w: **a)** nasyconym tlenem 0,1 M buforze fosforanowym pH = 4,8, **b)** nasyconym tlenem 20 mM buforze fosforanowym pH = 7,4 i 0,15 M NaCl.

Użycie katody pokrytej większą liczbą warstw, TMA-CNP(12)-BOD pozwoliło na uzyskanie wyższej gęstości mocy ogniwa 130,8 $\mu\text{W cm}^{-2}$. OCV takiego ogniwa wynosi 1,69 V (Rys. 10.9).



Rys. 10.9 Charakterystyka prądowo-napięciowa ogniwa Hyb-Zn-O₂ z katodą TMA-CNP(12)-BOD w nasyconym tlenem 0,1 M buforze fosforanowym pH = 4,8.

Zamiana cząstek polikrzemianowych na polikrzemianowy film (TMA_{zol}-CNP(12)-BOD) spowodowała znaczne pogorszenie parametrów ogniwa, co może być związane z trzy razy mniejszymi prądami redukcji tlenu w porównaniu do rejestrowanych na TMA-CNP(12)-BOD (Rys. 10.5a). Stosując jako katodę TMA_{zol}-CNP(12)-BOD, OCV ogniwa wynosi 1,67 V, a uzyskana gęstość mocy 46,5 $\mu\text{W cm}^{-2}$ przy 0,53 V (Rys. 10.10a). Zastosowanie sztucznej surowicy krwi jako elektrolit pogarsza parametry ogniwa (Rys. 10.10b). OCV dla takiego układu jest niższe i wynosi 1,4 V.

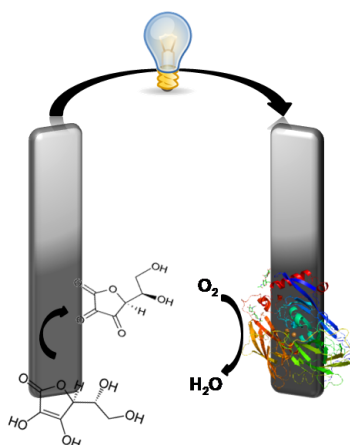


Rys. 10.10 Charakterystyka prądowo-napięciowa ogniwa Hyb-Zn-O₂ z katodą TMA_{zol}-CNP(12)-BOD w: **a)** nasyconym tlenem 0,1 M buforze fosforanowym pH = 4,8, **b)** nasyconym tlenem 20 mM buforze fosforanowym pH 7,4 i 0,1 M NaCl.

Podsumowując, przygotowano trzy typy ogniw, w których anodę stanowił drut cynkowy pokryty Nafionem. Ogniwa różniły się zastosowaną katodą: TDA-CNP(6)-BOD, TMA-CNP(12)-BOD lub TMA_{zol}-CNP(12)-BOD. Najwyższe OCV wynoszące 1,69 V i maksymalną gęstość mocy, 131 $\mu\text{W cm}^{-2}$, otrzymano stosując katodę TMA-CNP(12)-BOD. Zaobserwowano także korelację pomiędzy prądem redukcji tlenu na katodzie a otrzymywaną mocą ogniw. Przygotowane ogniwa z powodzeniem pracowały w sztucznej surowicy krwi.

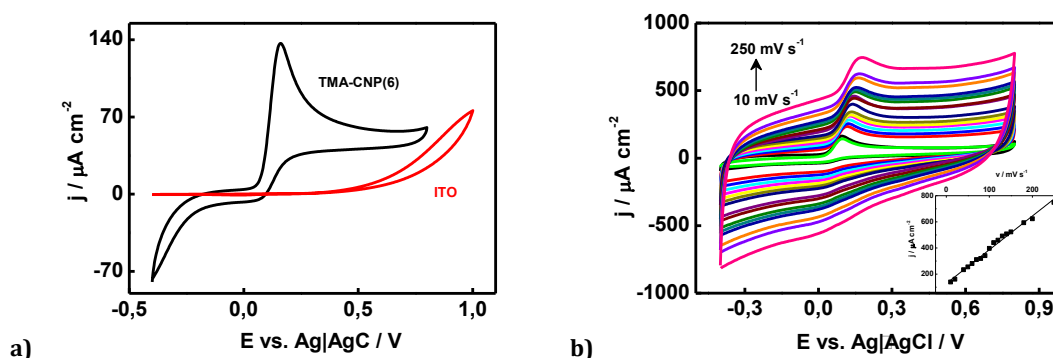
10.2 Paliwowe bioogniwo askorbinowo-tlenowe

Alternatywnym źródłem paliwa dla bioogniw może być kwas askorbinowy (Rozdz. 4.2, Rys. 10.11). Wynika to ze stosunkowo niskiego potencjału przy jakim AA utleniany jest na niektórych podłożach węglowych. Okazało się, że elektrody utworzone z CNP wykazują zdolność do katalizy tej reakcji i w połączeniu z katodą modyfikowaną BOD, możliwe jest skonstruowanie bioogniwa askorbinowo-tlenowego (AA-O₂). W prezentowanym układzie zastosowano anodę modyfikowaną CNP, utleniającą paliwo AA oraz podobną katodę, modyfikowaną BOD, na której zachodzi czteroelektronowa redukcja tlenu (Rys. 10.11). Ponadto, generowana moc zależy od stężenia AA, dlatego też ogniwo tego typu może pełnić funkcję samonapędzającego się czujnika kwasu askorbinowego ⁶.



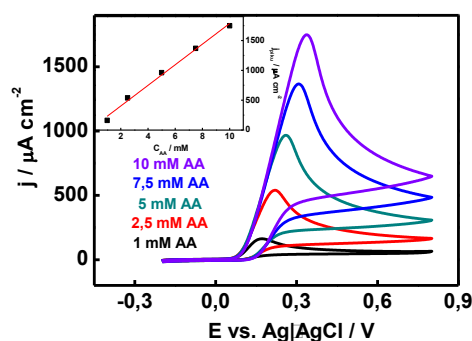
Rys. 10.11 Schemat działania ogniwa AA-O₂.

Na niezmodyfikowanym ITO nie obserwuje się sygnału pochodzącego od reakcji utleniania AA (Rys. 10.12a). Natomiast na elektrodzie TMA-CNP(6) widoczny jest bardzo dobrze wykształcony pik, a potencjał początkowy utleniania AA wynosi 0,025 V i jest porównywalny do prezentowanego w literaturze ⁷ (Rys. 10.12a). Rejestrowana gęstość prądu jest wprost proporcjonalna do zmiany szybkości polaryzacji elektrody, co świadczy o adsorpcji analitu, bądź produktów jego utleniania, na powierzchni elektrody.



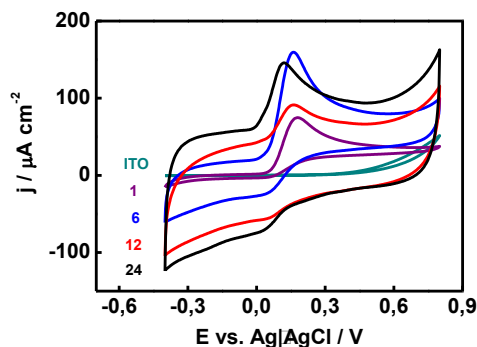
Rys. 10.12 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na: **a)** niezmodyfikowanym ITO (czerwona krzywa) oraz na TMA-CNP(6) w 1 mM AA, **b)** TMA-CNP(6) w 1-10 mM AA; w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 4,8, 2-gie cykle, $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

Zmiana stężenia AA wywołuje sukcesywny, liniowy wzrost mierzonego prądu w zakresie 1-10 mM ($j = 172,7C_{AA} + 57,9$, $R^2 = 0,991$) (Rys. 10.13).



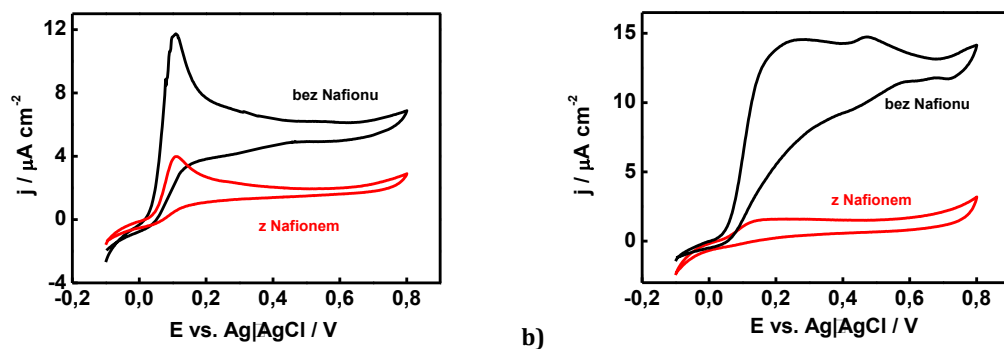
Rys. 10.13 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na TMA-CNP(6) w 1-10 mM AA w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 4,8, 2-gie cykle, $\nu = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

Na elektrodzie TMA_{zol}-CNP(6) potencjał początkowy utleniania AA wynosi 0,05 V. Wraz ze zmianą liczby naniesionych warstw obserwuje się znaczny wzrost prądu pojemnościowego oraz niewielką zmianę potencjału piku i potencjału początkowego (Rys. 10.14).



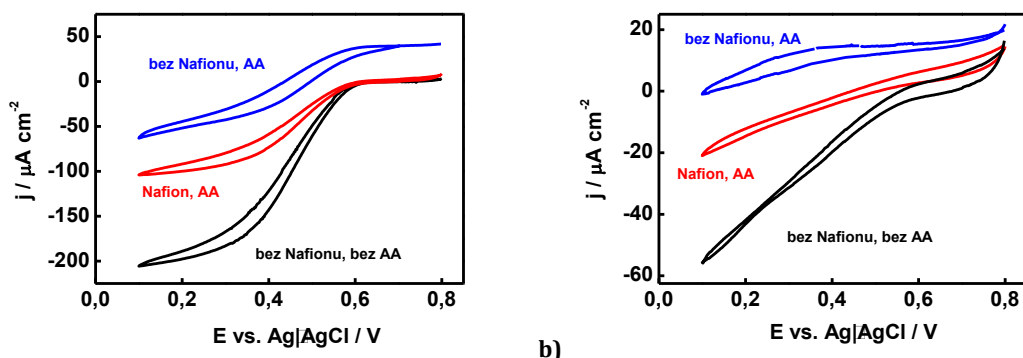
Rys. 10.14 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na niezmodyfikowanym ITO (zielona krzywa) oraz na TMA_{zol}-CNP(1,6,12,24) w 1 mM AA w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 4,8, 2-gie cykle, $\nu = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

Jako optymalne podłoże anodowe wybrano elektrodę zbudowaną z sześciu warstw TMA-CNP(6) lub TMA_{zol}-CNP(6). Natomiast za podłoże katodowe posłużyły elektrody pokryte dwunastoma warstwami i zmodyfikowane enzymem: TMA-CNP(12)-BOD lub TMA_{zol}-CNP(12)-BOD. Ze względu na możliwą dezaktywację enzymu wywołowaną AA oraz niepożądane utlenianie kwasu askorbinowego na katodzie (ang. *crossover process*)⁸, po adsorpcji BOD elektrodę pokryto dodatkowo Nafionem. W tym celu elektrodę zanurzano w roztworze Nafionu rozcieńczonym w stosunku objętościowym 1:500 w buforze fosforanowym pH = 4,8. Taka modyfikacja utrudnia dostęp AA do powierzchni elektrody (Rys. 10.15), dlatego też obserwuje się znaczne mniejsze gęstości prądu dla tego procesu.



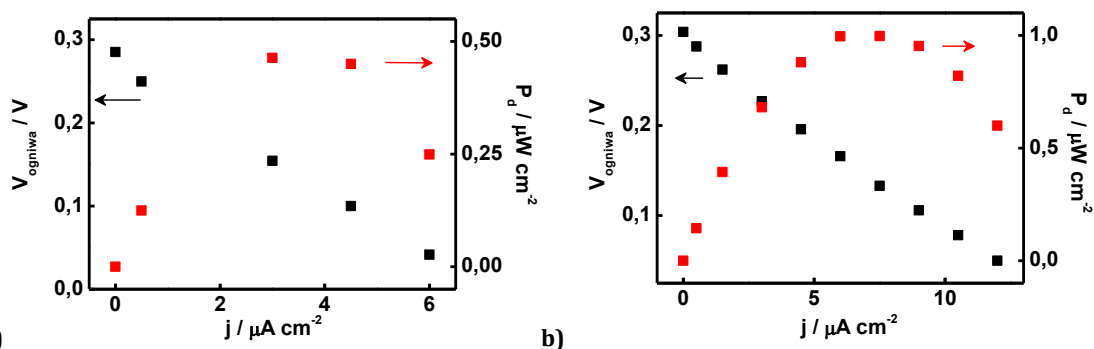
Rys. 10.15 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na: **a)** TMA-CNP(6) (czarna krzywa) i TMA-CNP(6)-NF (czerwona krzywa), **b)** TMA_{zól}-CNP(6) (czarna krzywa) oraz TMA_{zól}-CNP(6)-NF (czerwona krzywa); w nasyconym tlenem 1 mM AA w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 4,8, 2-gie cykle, $\nu = 1 \text{ mV s}^{-1}$.

Rys. 10.16 przedstawia voltamperogramy redukcji tlenu na obydwu katodach w obecności AA w elektrolicie. Widać, że na niezabezpieczonej polimerem elektrodzie, poza redukcją tlenu, zachodzi także proces utleniania AA przejawiający się występowaniem prądów anodowych (niebieskie krzywe). Ochrona Nafionowa skutecznie uniemożliwia dotarcie AA do powierzchni elektrody (czerwone krzywe) i eliminuje procesy anodowe. W pewnym stopniu blokuje także dopływ tlenu, przez co rejestrowany prąd jest niższy od prądów obserwowanych bez warstwy ochronnej na elektrodzie i AA w elektrolicie (czarne krzywe).



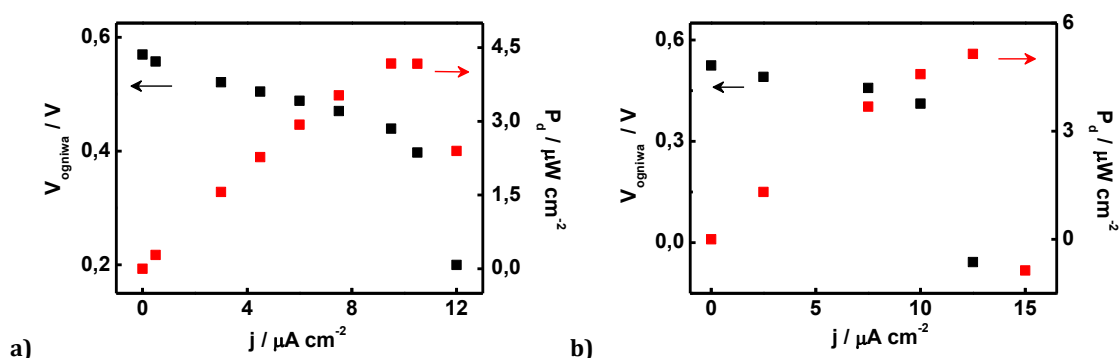
Rys. 10.16 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na: **a)** TMA-CNP(12)-BOD (czarna i niebieska krzywa) oraz na TMA-CNP(12)-BOD-NF (czerwona krzywa), **b)** TMA_{zól}-CNP(12)-BOD (czarna i niebieska krzywa) oraz na TMA_{zól}-CNP(12)-BOD-NF (czerwona krzywa), w nasyconym tlenem 0,1 M buforze fosforanowym pH = 4,8 (czarne krzywe) oraz z dodatkiem 1 mM AA (czerwone i niebieskie krzywe), 2-gie cykle, $\nu = 1 \text{ mV s}^{-1}$.

OCV ogniwa AA-O₂, w którym funkcję anody pełni TMA_{zól}-CNP(6), a katody TMA_{zól}-CNP(12)-BOD wynosi 0,30 V (Rys. 10.17a). Po modyfikacji katody Nafionem, TMA_{zól}-CNP(12)-BOD-NF, OCV jest nieco wyższe i wynosi 0,32 V (Rys. 10.17b). Wartości te odbiegają od teoretycznego OCV wynoszącego ok. 0,50 V. Maksymalna otrzymana gęstość mocy wynosi odpowiednio: dla ogniwa z katodą bez modyfikacji Nafionem 0,46 $\mu\text{W cm}^{-2}$ oraz po modyfikacji Nafionem 1,0 $\mu\text{W cm}^{-2}$. Widoczna jest więc duża poprawa parametrów dzięki zastosowaniu ochrony polimerowej.



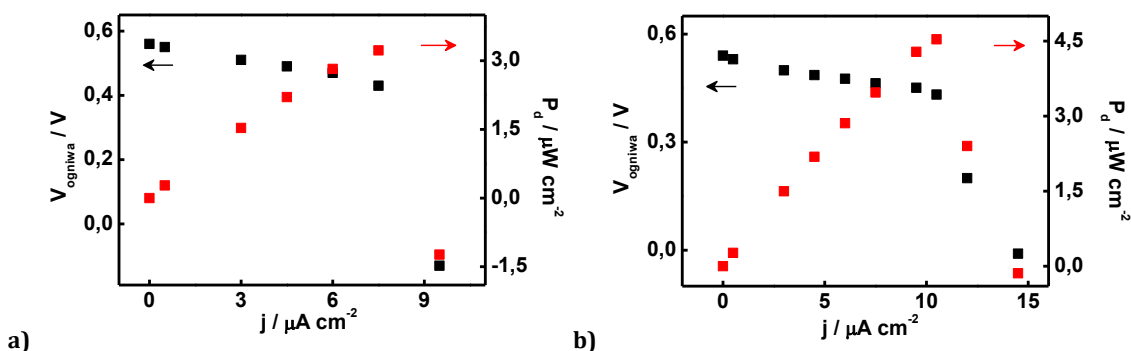
Rys. 10.17 Charakterystyka prądowo-napięciowa ogniw z anodą TMAzol-CNP(6) oraz katodą: **a)** TMAzol-CNP(12)-BOD, **b)** TMAzol-CNP(12)-BOD-NF; w nasycyonym tlenem 1 mM AA w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 4,8.

OCV ogniw AA-O₂, w którym funkcję anody pełni TMA-CNP(6), a katody TMA-CNP(12)-BOD wynosi 0,57 V (Rys. 10.18a). Jest to wartość porównywalna z opisaną w literaturze ⁶. Zastosowanie ochrony Nafionowej TMA-CNP(12)-BOD-NF w tym przypadku nie ma wpływu na wartość OCV. Maksymalna gęstość mocy wynosi odpowiednio dla ogniw z katodą bez modyfikacji Nafionem 4,18 $\mu\text{W cm}^{-2}$ oraz po modyfikacji 5,15 $\mu\text{W cm}^{-2}$ (Rys. 10.18b).



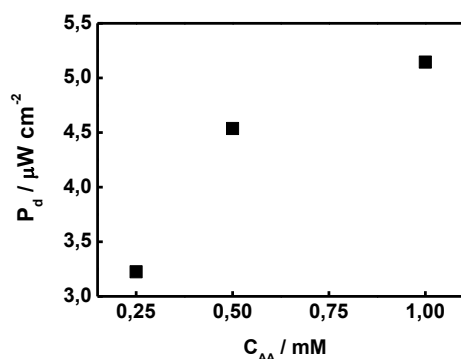
Rys. 10.18 Charakterystyka prądowo-napięciowa ogniw z anodą TMA-CNP(6) oraz katodą: **a)** TMA-CNP(12)-BOD, **b)** TMA-CNP(12)-BOD-NF; w nasycyonym tlenem 1 mM AA w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 4,8.

Zbadano wpływ stężenia AA na parametry ogniw AA-O₂ (Rys. 10.19, 10.20). Im wyższe jest stężenie paliwa, tym wyższa generowana moc przez ogniwo.



Rys. 10.19 Charakterystyka prądowo-napięciowa ogniw z anodą TMA-CNP(6) oraz katodą TMA-CNP(12)-BOD-NF w **a)** 0,25 mM AA, **B)** 0,5 mM AA; w nasycyonym tlenem 0,1 M buforze fosforanowym pH = 4,8.

Ogniwo to może służyć jako samonapędzający się czujnik kwasu askorbinowego, czyli urządzenie, które do działania nie potrzebuje zewnętrznego źródła zasilania.



Rys. 10.20 Maksymalna gęstość mocy generowana przez ogniwo z anodą TMA-CNP(6) oraz katodą TMA-CNP(12)-BOD-NF w funkcji stężenia AA w nasyconym tlenem 0,1 M buforze fosforanowym pH = 4,8.

Podsumowując, proces utleniania kwasu askorbinowego badano na dwóch typach elektrod: TMA-CNP oraz TMA_{zol}-CNP. Obydwa wykazały bardzo dobre właściwości katalityczne w stosunku do tej reakcji i posłużyły do zbudowania ogniw zasilanych AA:

(-)TMA-CNP(6)|AA,bufor fosforanowy pH=4,8|TMA-CNP(12)-BOD-NF(+),

(-)TMA_{zol}-CNP(6)|AA, bufor fosforanowy pH=4,8|TMA_{zol}-CNP(12)-BOD-NF(+).

Modyfikacja katody polimerem kationowymiennym, Nafionem, umożliwiła skuteczną ochronę katody przed niepożądanym utlenianiem paliwa i dezaktywacją enzymu. Maksymalna uzyskana gęstość mocy wynosi 5,15 $\mu\text{W cm}^{-2}$, natomiast OCV 0,57 V. Moc takiego ogniwa zależy od stężenia paliwa, dlatego może ono pełnić rolę samonapędzającego się czujnika kwasu askorbinowego.

10.3 Bibliografia

- (1) Szot, K. *Electrodes Modified With Carbon Nanoparticles And Enzymes*, PhD Thesis, Institute of Physical Chemistry Polish Academy of Sciences, 2012.
- (2) Celebanska, A. *Ceramiczna elektroda węglowa modyfikowana oksydazą bilirubiny jako biokatoda w jednokomorowym ogniwie tlenowo-cynkowym*, Praca Magisterska, Uniwersytet Warszawski, 2009.
- (3) Nogala, W.; Celebanska, A.; Szot, K.; Wittstock, G.; Opallo, M. *Electrochim. Acta* **2010**, *55*, 5719–5724.
- (4) Rozniecka, E.; Jonsson-Niedziolka, M.; Sobczak, J. W.; Opallo, M. *Electrochim. Acta* **2011**, *56*, 8739–8745.
- (5) Zloczewska, A.; Jönsson-Niedziolka, M. *J. Power Sources* **2013**, *228*, 104–111.
- (6) Zloczewska, A.; Celebanska, A.; Szot, K.; Tomaszewska, D.; Opallo, M.; Jönsson-Niedziolka, M. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *54*, 455–461.
- (7) Ngai, K. S.; Tan, W. T.; Zainal, Z.; Zawawi, R. M.; Zidan, M. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2013**, *8*, 10557–10567.
- (8) Fujiwara, N.; Yamazaki, S.; Siroma, Z.; Ioroi, T.; Yasuda, K. *J. Power Sources* **2007**, *167*, 32–38.

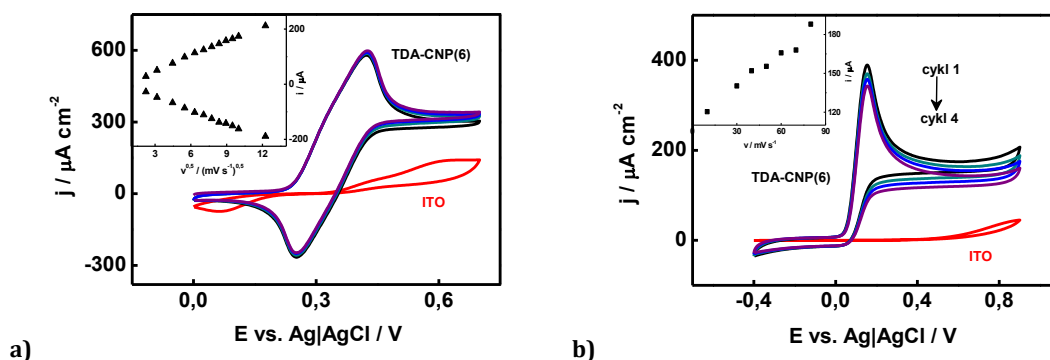
11. Zastosowanie elektrod polikrzemianowo-węglowych do oznaczania dopaminy

Przygotowane elektrody polikrzemianowo-węglowe wykazują katalityczne właściwości w stosunku do utleniania dopaminy oraz innych biologicznych molekuł. Jak opisano w Rozdz. 5.1 oznaczanie DA jest niezwykle ważne ze względu na diagnostykę m.in. choroby Parkinsona. Zastosowanie nanocząstek węgla, CNP oraz cząstek polikrzemianowych umożliwiło jej oznaczenie z dobrą czułością w obecności substancji przeszkadzających, które w płynach fizjologicznych występują w wysokich stężeniach: AA oraz UA lub AC. Użycie tych podłoży umożliwiło separację sygnałów prądowych pochodzących od tych aktywnych elektrochemicznie substancji. W tym rozdziale omówiona zostanie detekcja DA na elektrodzie TDA-CNP. Utlenianie DA na elektrodach TMA-CNP nie odbiegało znacząco od prezentowanych rezultatów ¹. Stosowany układ pomiarowy przedstawiono na Rys. 11.1.



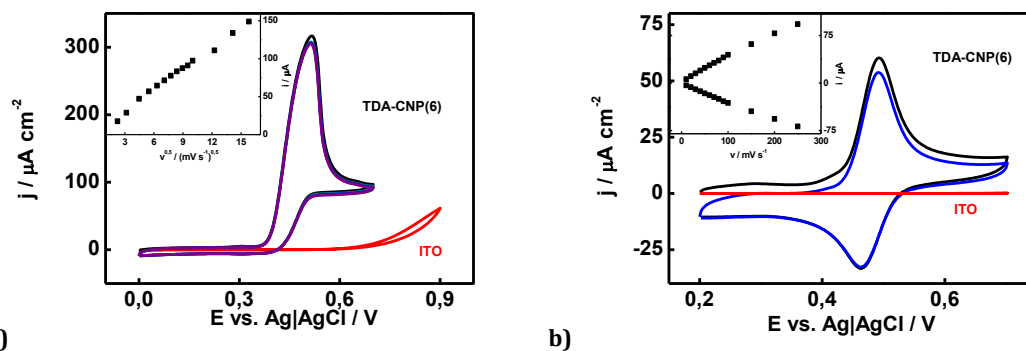
Rys. 11.1 Trójelektrodowy układ pomiarowy służący do detekcji dopaminy.

Rys. 11.2a przedstawia woltamperogram utleniania DA na niezmodyfikowanym ITO oraz na TDA-CNP(6). Widoczny jest duży wpływ podłoża na zachodzący proces, który na niemodyfikowanym ITO jest praktycznie nieodwracalny. Natomiast na TDA-CNP piki utleniania-redukcji są bardzo dobrze wykształcone, potencjał formalny wynosi 0,35 V, a potencjał piku anodowego 0,43 V. Liniowa zależność prądu anodowego i katodowego od pierwiastka z szybkości polaryzacji (Rys. 11.2a, wstawka) świadczy o tym, że proces kontrolowany jest przez szybkość dyfuzji analitu do powierzchni elektrody. Inne zachowanie obserwuje się w przypadku utleniania AA (Rys. 11.2b), które to limitowane jest adsorpcją AA, na co wskazuje liniowa zależność prądu piku od szybkości polaryzacji elektrody (Rys. 11.2b, wstawka). Potencjał piku utleniania AA wynosi 0,152 V, a więc oznaczenie dopaminy w jego obecności jest możliwe ze względu na wystarczające rozdzielanie sygnałów elektrochemicznych.



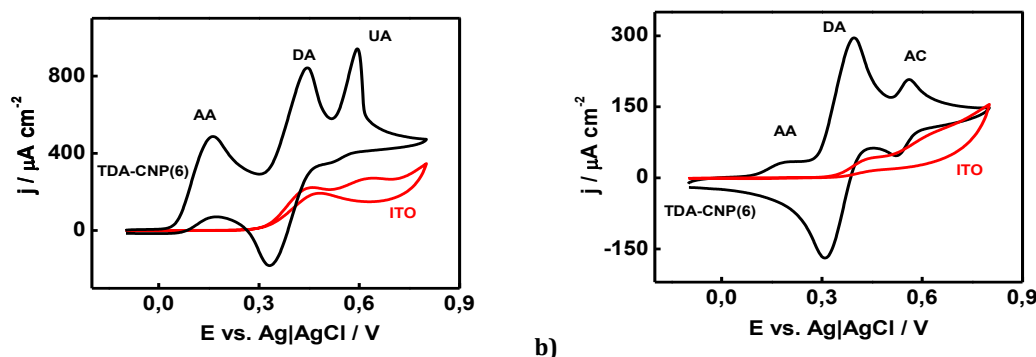
Rys. 11.2 Krzywe woltamperometryczne zarejestrowane na niemodyfikowanym ITO (czerwone krzywe) oraz na elektrodzie TDA-CNP(6) w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 5 zawierającym: **a)** 1 mM DA, **b)** nasycony argonem 2 mM AA; cykle: 1-4, $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$. Wstawki: zależność prądu piku od szybkości polaryzacji elektrody.

Potencjał pikowy utleniania kwasu moczowego na elektrodzie TDA-CNP(6) wynosi 0,53 V (Rys. 11.3a) i jest o 0,1 V wyższy od rejestrowanego dla utleniania DA, a proces kontrolowany jest dyfuzją substratu (Rys. 11.3a wstawka). Na niemodyfikowanym ITO nie obserwuje się sygnału dla tej reakcji. Kolejną testowaną substancją był lek przeciwbólowy, acetaminofen (Rys. 11.3b). Potencjał pikowy utleniania AC wynosi 0,5 V, jest wyższy o 70 mV od potencjału utleniania DA. Proces ten kontrolowany jest przez adsorpcję substratu o czym świadczy liniowa zależność prądu pikowego od szybkości polaryzacji (11.3b, wstawka).



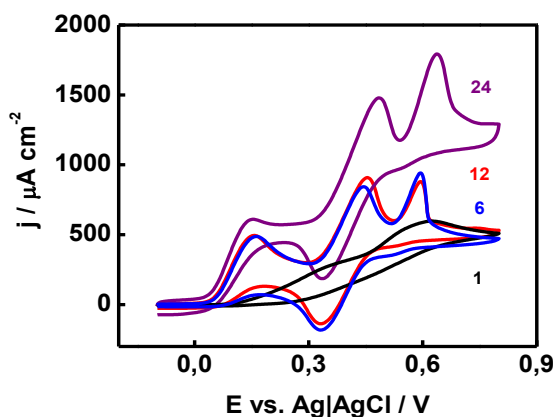
Rys. 11.3 Krzywe woltamperometryczne zarejestrowane na niemodyfikowanym ITO (czerwone krzywe) oraz na elektrodzie TDA-CNP(6) w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 5 zawierającym: **a)** 1 mM UA, cykle: 1-4, **b)** 0,1 mM AC, cykle: 1-2; $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$. Wstawki: zależność mierzonego prądu pikowego od szybkości polaryzacji elektrody.

Woltamperogramy otrzymane na elektrodzie TDA-CNP(6) wykazują dużą stabilność w przypadku omawianych procesów i wraz z kolejnymi cyklami nie obserwuje się znaczących zmian rejestrowanego prądu i potencjału. Oznaczenie DA możliwe jest w obecności AA i UA oraz AA i AC. Rys. 11.6 przedstawia woltamogramy cykliczne dla mieszaniny tych związków zarejestrowane na elektrodzie ITO i TDA-CNP(6): AA, DA, UA (Rys. 11.6a) oraz AA, DA, AC (Rys. 11.6b). Rozseparowanie poszczególnych sygnałów woltamperometrycznych na TDA-CNP(6) w porównaniu do ITO jest wyraźnie widoczne. Modyfikacja powierzchni znacząco obniża nadpotencjał wszystkich omawianych wyżej procesów i zapewnia korzystne warunki do odwracalnego utleniania DA. Może być to spowodowane oddziaływaniami elektrostatycznymi pomiędzy grupami fenylosulfonowymi a protonowaną formą DA. Natomiast protonowana forma AC ($pK_a = 9,5^2$) może tworzyć wiązania wodorowe z wolnymi grupami OH cząstek polikrzemianowych.



Rys. 11.4 Krzywe woltamperometryczne zarejestrowane na niemodyfikowanym ITO (czerwone krzywe) oraz na elektrodzie TDA-CNP(6) w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 5 zawierającym: **a)** 2 mM AA, 2 mM DA, 1 mM UA, **b)** 1 mM AA, 1 mM DA, 0,1 mM AC; 2-gie cykle, $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

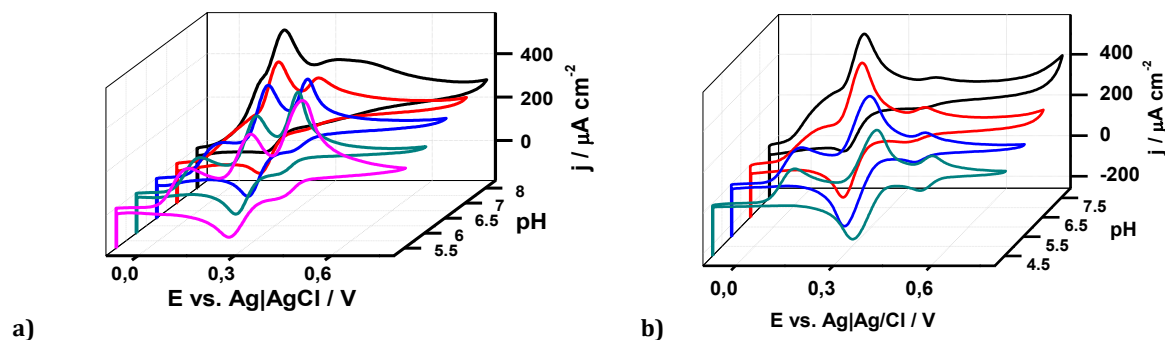
Ilość osadzanego materiału wpływa na kształt rejestrowanych woltamperogramów (Rys. 11.5). Jedna warstwa nie jest wystarczająca do otrzymania dobrze wykształconych i odseparowanych pików dla mieszaniny AA, DA i UA. Rejestrowane gęstości prądu pików są w przybliżeniu proporcjonalne do liczby osadzonych warstw TDA-CNP. Do oznaczania DA wybrano elektrodę pokrytą sześcioma warstwami, łącząc dobre właściwości katalityczne, nieduży prąd pojemnościowy i stosunkowo krótki czas przygotowania (Rys. 9.6a).



Rys. 11.5 Krzywe woltamperometryczne zarejestrowane na niemodyfikowanym TDA-CNP(1,6,12,24) w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 5 zawierającym 2 mM AA, 2 mM DA, 1 mM UA, 2-gie cykle, $\nu = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

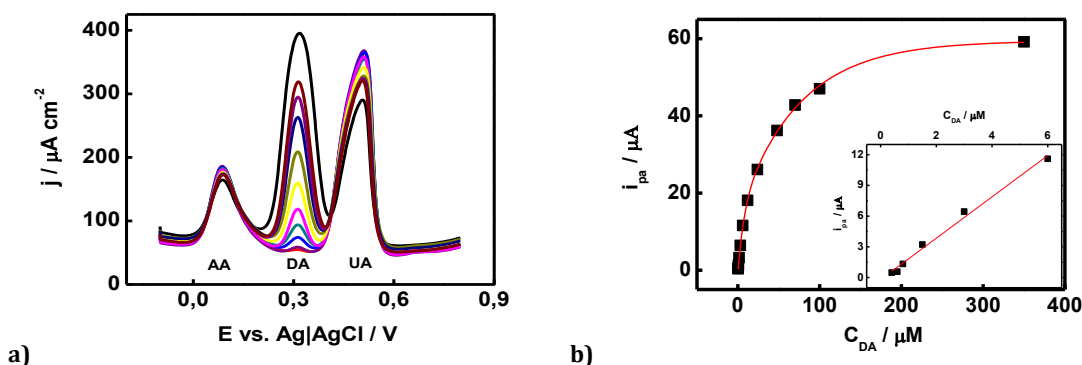
Stosując elektrodę TDA-CNP(6) badano sygnał elektrochemiczny innych substancji które potencjalnie mogą zakłócać oznaczanie DA. Okazało się że 0,1 mM: kwas cytrynowy (pH = 5), NADH (pH = 7,4) i tryptofan (pH = 5, potencjał pików utleniania 0,78 V) nie mają wpływu na detekcję DA.

Woltamperogramy zarejestrowane w buforze fosforanowym o różnym pH pozwalają na bliższe przyjrzenie się mechanizmowi reakcji redoks DA, w której biorą udział protony (Rys.11.6, Rozdz. 5.1). Potencjał formalny tej reakcji ($E_{1/2}$) zależy liniowo od pH. W obecności AA i UA nachylenie prostej wynosi $-0,058 \text{ V pH}^{-1}$ i jest to wartość oczekiwana dla procesu dwuelektronowo dwuprotonowego (Rozdz. 5.1, Równ. 5.3). Tymczasem gdy w elektrolicie występują AA i AC, nachylenie jest mniejsze i wynosi $-0,078 \text{ V pH}^{-1}$. Ma to związek z nakładaniem się sygnałów pochodzących od utleniania AA i AC w pH o wyższych wartościach (Rys. 11.6b). Podobny efekt nakładania pików od AA i DA widać na Rys. 11.6a. Pozwala to na stosowanie elektrolitu o pH poniżej 7.



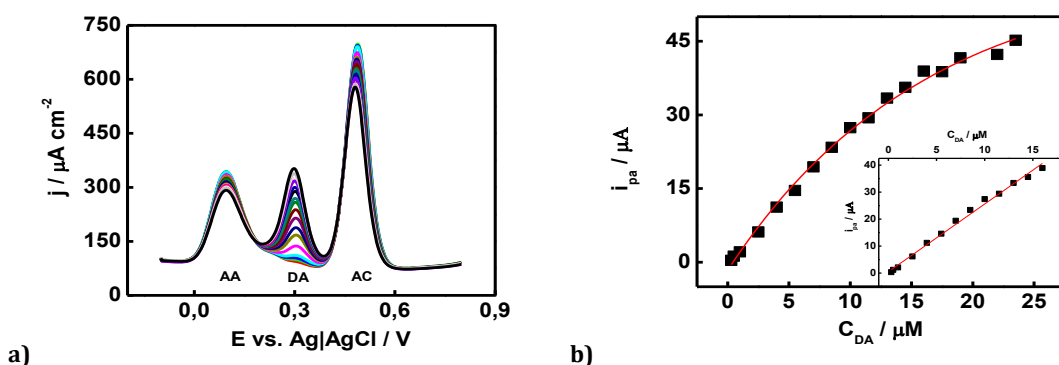
Rys. 11.6 Krzywe woltamperometryczne zarejestrowane na n TDA-CNP(6) w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 4,5-8 zawierającym: **a)** 2 mM AA, 2 mM DA, 1 mM UA, **b)** 1 mM AA, 1 mM DA, 0,1 mM AC; 2-gie cykle, $\nu = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

Ilościowe oznaczenie DA wykonano na elektrodzie TDA-CNP(6) w obecności substancji przeszkadzających. Do elektrolitu zawierającego AA i UA, sukcesywnie dodawano DA o określonym stężeniu i każdorazowo rejestrowano krzywą voltamperometryczną. W celu zwiększenia czułości wybrano technikę DPV. Rys. 11.7a przedstawia wyraźny wzrost mierzonego prądu pikowego utleniania DA wraz ze zwiększaniem stężenia DA. Dla całego mierzonego zakresu stężeń 0,4-350 μM DA, dopasowano krzywą eksponentylną wyrażoną równaniem $I_{pa} = -45,12\exp(-C_{DA}/73,6) - 15,01\exp(-C_{DA}/7,12) + 59,46$, $R^2 = 0,999$ (Rys. 11.7b). Zakres liniowy tej zależności mieści się w przedziale 0,4-6,0 μM ($I_{pa} = 2,51C_{DA} - 0,508$, $R^2 = 0,993$), a granica wykrywalności wynosi 0,135 μM DA (dla $S/N \geq 3$) (Rys. 11.7b, wstawka).



Rys. 11.7 a) Krzywe różnicowej voltamperometrii pulsowej zarejestrowane na TDA-CNP(6) w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 5 zawierającym 2 mM AA, 1 mM UA oraz 0,4 – 350 μM DA, $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$, amplituda pulsu = 60 mV, szerokość pulsu = 50 ms, odstęp pulsu = 100 ms, **b)** krzywa kalibracyjna DA na podstawie pomiaru DPV z Rys. 11.7a; wstawka – liniowy zakres krzywej kalibracyjnej.

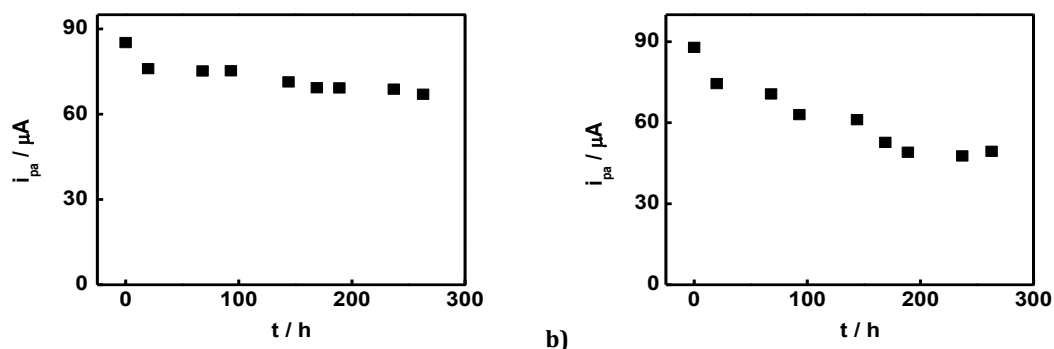
Po zamianie UA na AC, oznaczono dopaminę w zakresie stężenia 0,3-23,5 μM (Rys. 11.8a) z dopasowaną krzywą eksponentylną o równaniu $I_{pa} = -30,74\exp(-C_{DA}/16,13) - 30,74\exp(-C_{DA}/16,13) + 59,84$, $R^2 = 0,995$ (Rys. 11.8b). Zakres liniowy wyznaczono w przedziale 0,3-18 μM ($I_{pa} = 2,03C_{DA} - 0,240$, $R^2 = 0,996$) z granicą wykrywalności 0,103 μM (dla $S/N \geq 3$) (Rys. 11.8a, wstawka). Pomimo mniejszej różnicy potencjałów pików utleniania DA i AC niż w przypadku DA i UA, osiągnięto większą czułość i szerszy zakres liniowy.



Rys. 11.8 a) Krzywe różnicowej voltamperometrii pulsowej zarejestrowane na TDA-CNP(6) w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 5 zawierającym 1 mM AA, 0,1 mM AC oraz 0,3 – 23,5 μM DA, $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$, amplituda pulsu = 60 mV, szerokość pulsu = 50 ms, odstęp pulsu = 100 ms, **b)** krzywa kalibracyjna DA na podstawie pomiaru DPV z Rys. 11.8a; wstawka – liniowy zakres krzywej kalibracyjnej.

Stabilność pracy elektrody badano przez porównanie prądu pikowego utleniania DA po różnym czasie przechowywania elektrody. Przechowując ją w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 5, po 10 dniach zaobserwowano jedynie 10% spadek mierzonego prądu pikowego (Rys. 11.9a). Natomiast przechowywanie elektrody na powietrzu powoduje 50% obniżenie

mierzonego prądu pikowego w tym samym czasie (Rys. 11.9b). Z tego względu rekomendowane jest przechowywanie czujnika w roztworze buforowym.



Rys. 11. Prąd pikowy utleniania dopaminy na TDA-CNP(6) względem czasu przechowywania elektrody: **a)** w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 5, **b)** na powietrzu. Na podstawie voltamperometrii cyklicznej w 2 mM DA, 0,1 M bufor fosforanowy pH = 5, $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

Podsumowując, w oparciu o elektrodę TDA-CNP otrzymaną metodą LbL, przygotowano amperometryczny czujnik dopaminy pozwalający na pomiar jej stężenia w obecności różnych substancji przeszkadzających, a przede wszystkim: AA, UA i AC. Otrzymana granica wykrywalności (0,1 μM) jest porównywalna z innymi czujnikami amperometrycznymi (Tab. 11.1) i umożliwi pomiar stężenia DA na poziomie występującym u ludzi zdrowych. Jest to wystarczające do wstępnej diagnostyki pacjentów. Czujnik ten badano pod kątem stabilności pracy, czasu przechowywania, wpływu pH elektrolitu oraz stopnia pokrycia elektrody.

Tab. 11.1 Porównanie parametrów elektrochemicznych czujników dopaminy opartych na nanomateriałach węglowych.

Materiał elektrodowy	Substancje zakłócające	Zakres liniowy $\times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$	LOD $\times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$	Metoda	Źródło
ITO/CNP-PDDA	AA	0,1-10	0,05	DPV	3
Grafit/PDDA-MWCNT-sulfonian polistyrenu	AA, UA	50-350	0,15	AC	4
ITO/poli(amidoamina-MWCNT-sulfonowana ftalocyjanina niklu	AA	2,5-240	0,54	CV	5
GC/ β -cyklodekstryna-MWCNT-chitosan	-	0,1-25	0,06	DPV	6
GC/SWCNT-bromek cetylopirydyniowy	AA, UA, kwas cytrynowy, glukoza, cysteina, kwas hipurowy	4-120	0,6	DPV	7
ITO/CNP(+)-CNP(-)	AA, UA	0,4-350	0,4	DPV	8
CPE/mezoporowate cząstki polikrzemianowe	AA, UA	0,4-25	0,1	DPV	9
GC/CNP-cysteina	-	0,1-10	0,0036	DPV	10
GC/poli(dibrofluoresceina)	AA, UA	0,2-200	0,03	CV	11
GC/CNT-tlenek grafenu-ciecz jonowa	-	8×10^{-6} -15	3×10^{-6}	SWV	12
TDA-CNP(6)	AA, UA, AC, tryptofan, kwas cytrynowy, NADH	0,3-18	0,1	DPV	niniejsza praca

11.1 Bibliografia

- (1) Tomaszewska, D. *Elektrody modyfikowane nanocząstkami o różnoimiennych ładunkach*, Praca Licencjacka, Uniwersytet Kardynała Stefana Wyszyńskiego, 2010.
- (2) Kachoosangi, R. T.; Wildgoose, G. G.; Compton, R. G. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *618*, 54–60.
- (3) Amiri, M.; Shahrokhian, S.; Marken, F. *Electroanalysis* **2007**, *19*, 1032–1038.
- (4) Manjunatha, R.; Suresh, G. S.; Melo, J. S.; D'Souza, S. F.; Venkatesha, T. V. *Sensors Actuators, B Chem.* **2010**, *145*, 643–650.
- (5) Siqueira, J. R.; Gasparotto, L. H. S.; Oliveira, O. N.; Zucolotto, V. J. *Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 9050–9055.
- (6) Kong, B.; Zeng, J.; Luo, G.; Luo, S.; Wei, W.; Li, J. *Bioelectrochemistry* **2009**, *74*, 289–294.
- (7) Zhang, Y.; Pan, Y.; Su, S.; Zhang, L.; Li, S.; Shao, M. *Electroanalysis* **2007**, *19*, 1695–1701.
- (8) Kundys, M.; Szot, K.; Rozniecka, E.; Jönsson-Niedziółka, M.; Lawrence, R.; Bull, S. D.; Marken, F.; Opallo, M. *Anal. Methods* **2014**, *6*, 7532–7639.
- (9) Sun, D.; Xie, X.; Zhang, H. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2010**, *75*, 88–92.
- (10) Amiri, M.; Eynaki, H.; Mansoori, Y. *Electrochim. Acta* **2014**, *123*, 362–368.
- (11) Wang, Y.; Xiao, Y. *Microchim. Acta* **2012**, *178*, 123–130.
- (12) Wang, M.; Gao, Y.; Zhang, J.; Zhao, J. *Electrochim. Acta* **2015**, *155*, 236–243.

12. Czujniki pestycydów fosforoorganicznych

12.1 Spektrofotometryczny pomiar stężenia tiocholiny i aktywności enzymu

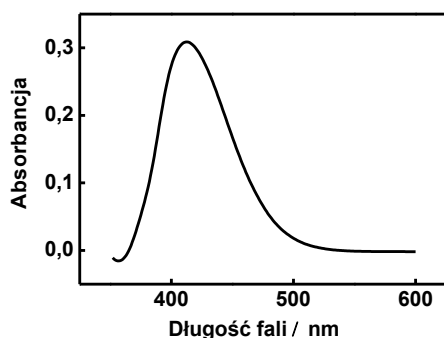
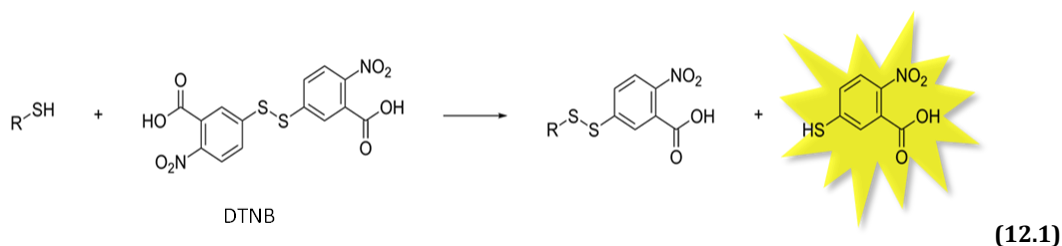
Tiocholina jest nietrwałym związkiem chemicznym, dlatego też jest niedostępna na rynku komercyjnym. Wymaga syntezy laboratoryjnej, polegającej na enzymatycznej hydrolizie chlorku acetylotiocholiny katalizowanej przez acetylocholinoesterazę (Równ. 5.11).

Syntezę TC przeprowadzono przez zmieszanie 5 ml 0,1 M roztworu ATCl w buforze fosforanowym pH = 7 z 500 μ l 0,7 mg ml⁻¹ roztworu AChE w buforze fosforanowym pH = 7. Roztwór mieszano mechanicznie przez kolejne 2 godziny. Następnie po odpowiednim rozcieńczeniu przeprowadzono spektrofotometryczny pomiar stężenia tiocholiny metodą Ellmana wg Tab. 12.1¹. Niewielkie porcje roztworu TC o oznaczonym stężeniu zamrażano w temperaturze -20°C i przechowywano przez kilka miesięcy bez wpływu na jego stabilność.

Tab. 12.1 Skład roztworów stosowanych do spektrofotometrycznego oznaczenia stężenia tiocholiny.

Odczynnik	Kuweta odniesienia [μ l]	Kuweta pomiarowa [μ l]
0,1 M bufor fosforanowy pH = 7	900	895
0,01 M DTNB w buforze fosforanowym pH=7	100	100
5 mM tiocholina	-	5

Metoda Ellmana polega na pomiarze absorbancji roztworu przy długości fali równej 412 nm, przy której występuje pik absorpcji (Rys. 12.1a) charakterystyczny dla produktu reakcji odczynnika Ellmana (kwasu 5,5-ditiobis-(2-nitrobenzoesowego), DTNB) ze związkami posiadającymi grupy tiolowe (Równ. 12.1). Rys. 12.1b przedstawia kuwety pomiarowe przed i po dodaniu TC.



Rys. 12.1 a) Widmo UV-Vis przedstawiające pik przy długości fali 412 nm pochodzący od barwnego, żółtego produktu reakcji tiocholiny z DTNB, b) kuweta pomiarowa przed i po dodaniu TC (żółty roztwór).

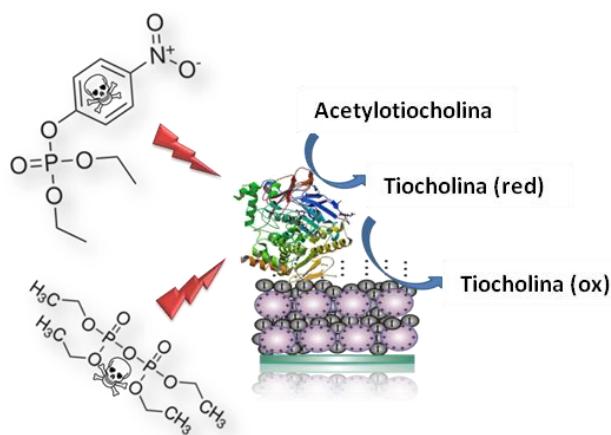
Następnie, korzystając z prawa Lamberta-Beera (Równ. 12.2), obliczano stężenie tiocholiny, C_{TC} .

$$C_{TC} = \frac{A}{\varepsilon} \times D_r \quad (12.2)^1$$

Uwzględniając współczynnik ekstynkcji, $\varepsilon = 13600$ ¹ i czynnik rozcieńczenia D_r , stężenie TC obliczano według równania (Równ. 12.3).

$$C_{TC} = \frac{A}{13600} \times \frac{1000}{5} \times \frac{105}{5} \quad (12.3)^1$$

Przygotowanie bioczuJNIKA do wykrywania pestycydów fosforoorganicznych wymaga immobilizacji enzymu AChE na elektroaktywnej powierzchni katalizującej utlenianie TC. Wynika to z mechanizmu działania takiego sensora, który polega na detekcji sygnału elektrochemicznego utleniania TC wytwarzanej przez AChE. Pestycydy fosforoorganiczne nieodwracalnie inhibują działanie enzymu, co powoduje że generuje on mniej TC. To z kolei wywołuje spadek sygnału amperometrycznego proporcjonalny do stężenia pestycydu (Rys. 12.2).



Rys. 12.2 Schemat działania amperometrycznego bioczuJNIKA na pestycydy, np. paraokson i TEPP.

Każdorazowo przed immobilizacją enzymu, sprawdzana była jego aktywność za pomocą wspomnianej wcześniej spektrofotometrycznej metody Ellmana (Równ. 12.1) ². Zamiast chlorku acetylotiocholiny, używano tańszego jodku acetylotiocholiny (ATI). Wyznaczanie aktywności ATCl polegało na pomiarze absorbancji przy 412 nm w czasie jednej minuty. Do tego celu stosowano roztwory o składzie przedstawionym w Tab.12.2. Na podstawie zmiany absorbancji w określonym czasie i Równ. 12.4 obliczano aktywność enzymu w przeliczeniu na jeden czujnik (objętość unieruchamianego enzymu na jednym czujniku).

Tab. 12.2 Skład roztworów używanych do spektrofotometrycznego oznaczenia aktywności enzymu.

Odczynnik	Kuweta odniesienia [μ l]	Kuweta pomiarowa [μ l]
0,1 M bufor fosforanowy pH = 7	500	490
1 mg ml ⁻¹ DTNB (w buforze fosforanowym pH = 7)	300	300
Woda	100	100
10 mM ATI w 15 mM NaCl	100	100
AChE	-	10

$$\text{Aktywność AChE} = \frac{\frac{\Delta A}{\Delta t} \times 10^5}{13600} [U \text{ ml}^{-1}] \quad (12.4)$$

Pomiary czułości wyglądały następująco. Najpierw wykonywano pomiar tła w czystym 0,1 M buforze fosforanowym pH = 7, a następnie dodawano ATCl i rejestrowano amperometryczną odpowiedź układu przy danym potencjale w określonym czasie. Pomiar taki wykonywano co najmniej trzykrotnie aż do rejestracji stabilnego i powtarzalnego sygnału prądowego. Następnie, inkubowano elektrodę w wodnym roztworze pestycydu o znanym stężeniu, przez ściśle określony czas, po czym powtarzano eksperyment amperometryczny. Za każdym razem elektroda płukana była w czystej dejonizowanej wodzie i osuszana. Wartość procentową inhibicji enzymu obliczano na podstawie Równ. 12.5.

$$\text{Inhibicja \%} = \frac{I_{\text{kontrolne}} - I_{\text{po inhibicji}}}{I_{\text{kontrolne}}} \times 100\% \quad (12.5)$$

$I_{\text{kontrolne}}$ - wartość prądu mierzona przed inhibicją

$I_{\text{po inhibicji}}$ - wartość prądu mierzona po inkubacji elektrody w roztworze pestycydu

Używano dwóch typów enzymu AChE, izolowanego z węgorza elektrycznego (*Electric eel*, EE) oraz genetycznie modyfikowanego izolowanego z muszki owocówki (*Drosophila melanogaster*, B394). Ten ostatni wymagał wstępnego oczyszczania ze stabilizatorów przez dializę (Rys. 12.3). W tym celu umieszczano porcję zawiesiny enzymu w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 7 w kasecie dializacyjnej, wcześniej kondycjonowanej w czystym buforze przez 30 min. Następnie, kasetę została zanurzona w zlewce wypełnionej mieszanym 0,025 M buforem fosforanowym pH = 7 na 24 godz. W tym czasie dwukrotnie wymieniano bufor (Rys. 12.3). Po tej procedurze do enzymu dodano albuminę surowicy bydlęcej (ang. *bovine serum albumin*, BSA) o stężeniu 1 mg ml⁻¹.



Rys. 12.3 Oczyszczanie enzymu B394 w kasecie dializacyjnej.

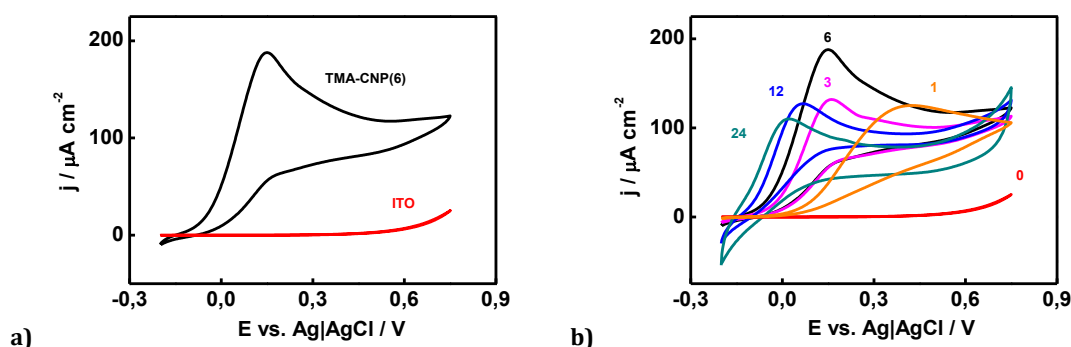
W przypadku niektórych z przygotowanych czujników, możliwa była reaktywacja enzymu z zastosowaniem silnego związku nukleofilowego, który powoduje oddysocjowanie związku fosforoorganicznego z enzymu (Rozdz. 5.1). Zwykle do tego celu stosowane są oksymy, np. pralidoksym (2-PAM). W celu odtrucia czujnika, elektroda była inkubowana w 5 mM roztworze wodnym 2-PAM przez określony czas.

12.2 Wybór podłoża elektrodowych wykazujących aktywność elektrokatalityczną w stosunku do utleniania tiocholiny

W niniejszym rozdziale przedstawiono różne podłoża węglowe, wykazujące elektrokatalityczne właściwości w stosunku do utleniania tiocholiny. Elektrody te zostały, bądź mogą zostać użyte do detekcji TC. Znalezienie odpowiedniego katalizatora tej reakcji jest niezbędne do opracowania czujnika OP i jest traktowane jako etap poprzedzający jego przygotowanie.

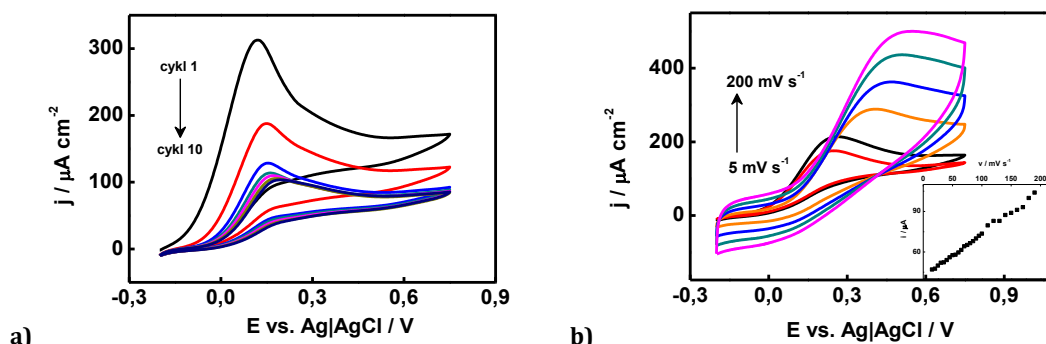
12.2.1 Elektrody polikrzemianowo-węglowe otrzymane metodą warstwa-po-warstwie

Omawiane wcześniej elektrody TMA-CNP zbadano także pod kątem zdolności do utleniania tiocholiny. Porównanie voltamperogramów zarejestrowanych na czystym podłożu ITO i elektrodzie modyfikowanej TMA-CNP(6) przedstawia Rys. 12.4a. Na ITO nie zachodzi żadna reakcja i niewidoczny jest sygnał prądowy. Natomiast modyfikacja CNP i TMA powoduje pojawienie się bardzo dobrze wykształconego piku przy potencjale 0,2 V. Wraz ze wzrostem ilości materiału obserwuje się obniżenie potencjału piku utleniania TC (Rys. 12.4b). Związane jest to ze stopniową zmianą topografii powierzchni elektrody. Przy większych pokryciach, materiał formuje wysokie wyspy co wpływa na szybkość i rodzaj dyfuzji TC do powierzchni elektrody. Do pojawienia się efektu katalitycznego, wystarczające jest naniesienie tylko jednej warstwy polikrzemianowo-węglowej.



Rys. 12.4 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na: **a)** niemodyfikowanym ITO (czerwona krzywa) oraz na TMA-CNP(6) (czarna krzywa), **b)** niemodyfikowanym ITO (czerwona krzywa) oraz na TMA-CNP(1,6,12,24); w 5 mM TC w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 7, 2-gie cykle, $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

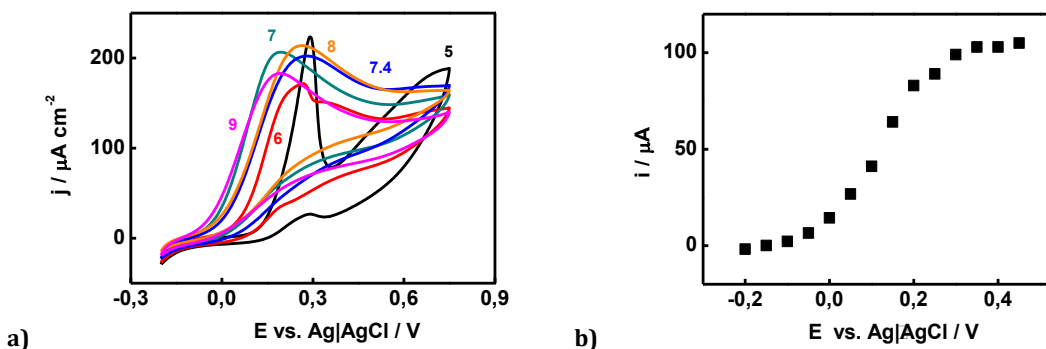
W kolejnych, rejestrowanych cyklach utleniania TC na TMA-CNP(6), obserwuje się początkowy szybki spadek prądu i niewielki wzrost potencjału (Rys. 12.5a). Natomiast począwszy od czwartego cyklu, prąd piku praktycznie się nie zmienia. Wraz ze zmianą szybkości polaryzacji wzrasta prąd pojemnościowy, a potencjał piku utleniania TC przesuwa się w stronę wyższych wartości (Rys. 12.5b). Dlatego jako optymalną wybrano stosunkowo wolną szybkość polaryzacji, 10 mV s^{-1} . Rejestrowany prąd piku zależy liniowo od zmiany szybkości przemiatania (Rys.12.5 wstawka), co wskazuje na proces kontrolowany szybkością adsorpcji TC na powierzchni elektrody.



Rys. 12.5 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na TMA-CNP(6): **a)** kolejne cykle: 1-10, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, **b)** różne szybkości polaryzacji $v = 5\text{-}200 \text{ mV s}^{-1}$, 2-gie cykle; 5 mM TC, 0,1 M bufor fosforanowy pH = 7, wstawka – zależność prądu piku utleniania TC od szybkości polaryzacji elektrody.

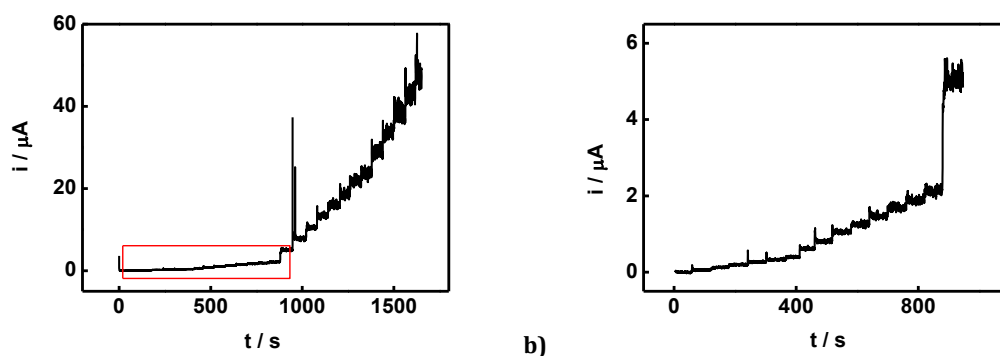
Badano także wpływ pH na utlenianie TC (Rys. 12.6a). Obserwowana zależność kształtu voltamperogramów od pH wiąże się z udziałem jonów wodorowych w tej reakcji (Równ. 5.12). Im wyższe pH tym niższy rejestrowany potencjał piku. Związane jest to z mechanizmem reakcji utleniania TC (Rozdz. 5.2.1). Prawdopodobnie dla niższych wartości pH dominuje mechanizm w którym najpierw utlenieniu ulega sprotonowana forma TC, a następnie zachodzi deprotonowanie, powstanie rodnika i jego dimeryzacja. Natomiast w wyższym pH najpierw zachodzi deprotonowanie TC, a następnie jej utlenianie i dimeryzacja.

Woltamperometria hydrodynamiczna (Rys. 12.6b) posłużyła do wyznaczenia optymalnego potencjału utleniania TC (0,25 V) w warunkach amperometrycznych. W celu przygotowania krzywej przedstawionej na Rys. 12.6b, wykonywano pomiar chronoamperometryczny w mieszanym roztworze 5 mM TC, zmieniając potencjał co 50 mV i odczytując prąd po 50 s. Powyżej optymalnego potencjału, 0,25 V, obserwowano plateau prądowe.



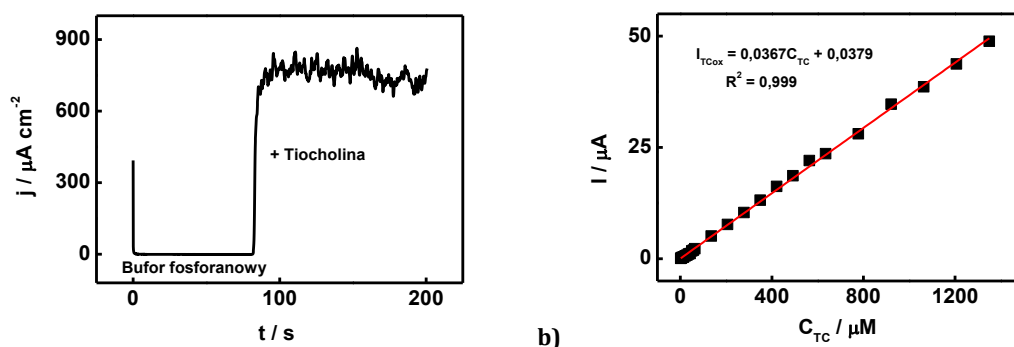
Rys. 12.6 a) Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na TMA-CNP(6) w 5 mM TC w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 5-9, 2-gie cykle, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, **b)** voltamperogram hydrodynamiczny zarejestrowany na TMA-CNP(6) w 5 mM TC w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 7.

Do przygotowania krzywej kalibracyjnej wybrano sześciowarstwową elektrodę, TMA-CNP(6), jako korzystną pod kątem parametrów elektrokatalitycznych oraz czasu przygotowania. Przeprowadzono eksperyment chronoamperometryczny polegający na pomiarze prądu w czasie, po przyłożeniu stałego potencjału 0,25 V, przy którym obserwuje się utlenianie TC. Roztwór TC w buforze fosforanowym o pH = 7 mieszano i sukcesywnie dodawano małymi porcjami stężony roztwór TC, rejestrując wzrost prądu (Rys. 12.7a,b). Wyniki wskazują na szybką i stabilną odpowiedź czujnika na obecność TC (Rys. 12.7a).



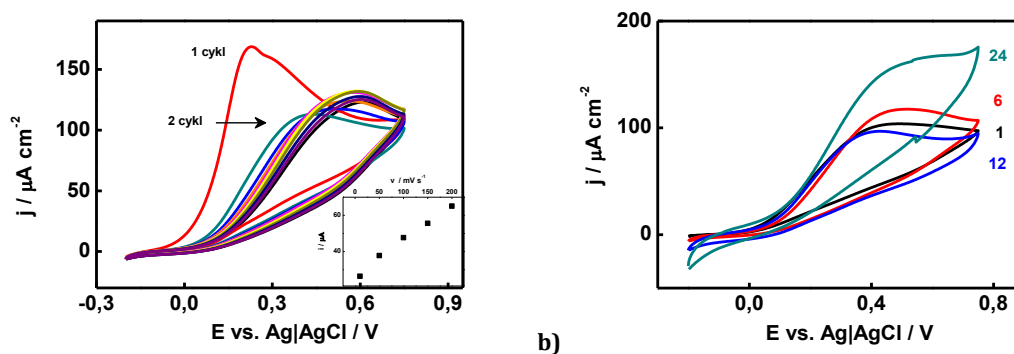
Rys. 12.7 a) Chronoamperogram zarejestrowany na TMA-CNP(6) przez sukcesywne dodawanie stężonego roztworu TC co ok. 50 s. do 0,1 M buforu fosforanowego pH = 7, roztwór mieszany, $E = 0,25$ V, **b)** powiększenie obszaru z chronoamperogramu (Rys.12.7a) rejestrowanego dla niskich wartości stężenia TC.

Na podstawie chronoamperogramu (Rys. 12.7) wykreślono krzywą kalibracyjną do oznaczania tiocholiny na TMA-CNP(6) (Rys. 12.7b). Liniowość obserwowano w szerokim zakresie stężeń od 1,7-1300 μM z wysokim współczynnikiem korelacji liniowej wynoszącym 0,999. LOD wynosi 1,7 μM ($S/N \geq 3$).



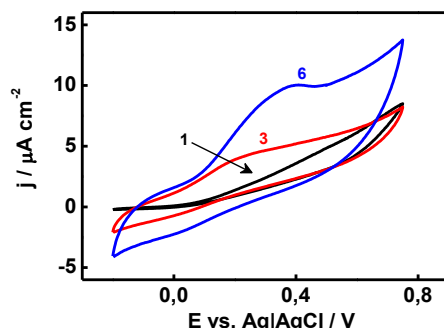
Rys. 12.8 a) Chronoamperogram zarejestrowany na TMA-CNP(6) a) po dodaniu TC do 0,1 M buforu fosforanowego pH = 7 (do uzyskania 5 mM stężenia TC), roztwór mieszany, $E = 0,25$ V, **b)** krzywa kalibracyjna dla TC wyznaczona na podstawie chronoamperogramu z Rys. 12.7a.

W kolejnym etapie zbadano elektrody TMA_{z01}-CNP. W porównaniu do elektrod TMA-CNP, zaobserwowano niekorzystne podwyższenie potencjału piku (Rys. 12.9a). Kolejne, rejestrowane cykle na TMA_{z01}-CNP(6) uwiadcniają początkowy, duży spadek prądu piku, a następnie jego wzrost (od 3 cyklu). Świadczy to prawdopodobnie o adsorpcji TC na powierzchni elektrody. Z kolei położenie piku utleniania TC (0,45 V) nie zależy od liczby osadzonych warstw (Rys. 12.9b). Elektroda ta, w porównaniu do TMA-CNP, wykazuje gorsze właściwości katalityczne w stosunku do utleniania TC.



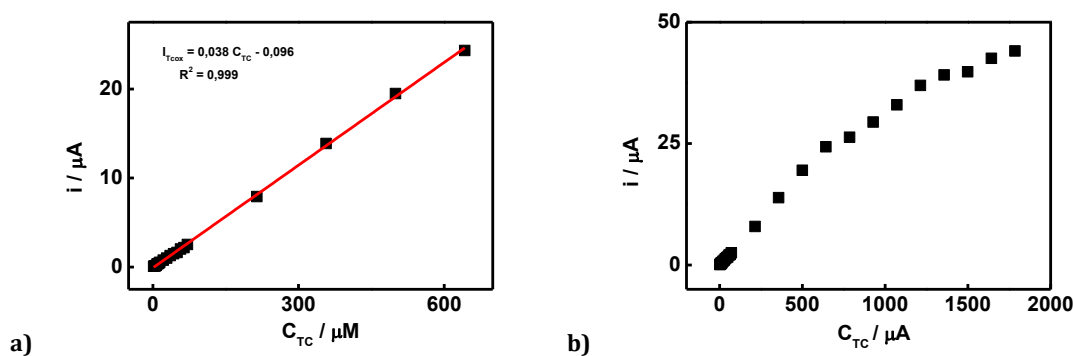
Rys. 12.9 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane w 5 mM TC w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 7 na elektrodzie **a)** TMA_{z01}-CNP(6), cykle 1-10, **b)** TMA_{z01}-CNP(1,6,12,24), 2-gie cykle; $v = 10$ mV s⁻¹.

Na kształt rejestrowanych woltamperogramów utleniania TC wpływa stężenie zolu użytego do nakładania polikrzemianowych warstw (Rys. 12.10). Stwierdzono, że użycie bardziej stężonego zolu (rozcieńczenie 1:10) obniża wartość sygnału utleniania TC, prawdopodobnie ze względu na częściowe zablokowanie elektrody przez polikrzemianowy film. Dlatego też, prace kontynuowano z elektrodami wytworzonymi z zolu rozcieńczonego metanolem w stosunku 1:100 (Rys.12.10).



Rys. 12.10 Krzywe woltamperometryczne zarejestrowane na TMA_{zol} -CNP(1,3,6) przy czym zol do przygotowania elektrod rozcieńczono w metanolu w stosunku 1:10, 5 mM TC w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 7, 2-gie cykle, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

I w tym przypadku do przygotowania krzywej kalibracyjnej wybrano elektrodę modyfikowaną sześcioma warstwami materiału TMA_{zol} -CNP(6), a potencjał oznaczenia wyznaczono na 0,5 V (Rys. 12.12). Zakres liniowy był znacznie węższy i wyniósł 5,4-640 μM z bardzo dobrym współczynnikiem korelacji liniowej 0,999 (Rys. 12.11a). LOD wynosi 5,4 μM ($S/N \geq 3$).



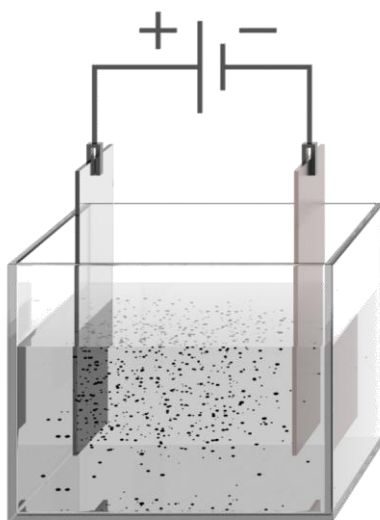
Rys. 12.11 a) Krzywa kalibracyjna (liniowy zakres) dla TC na TMA_{zol} -CNP(6), uzyskana na podstawie pomiaru chronoamperometrycznego, przez sukcesywne dodawanie stężonego roztworu TC do 0,1 M buforu fosforanowego pH = 7, roztwór mieszany, **b)** cały zakres krzywej kalibracyjnej dla TC; $E = 0,5 \text{ V}$.

Podsumowując, zbadano proces utleniania tiocholiny na dwóch rodzajach elektrod przygotowanych metodą LbL: TMA-CNP oraz TMA_{zol} -CNP. Obydwa podłoża wykazują właściwości elektrokatalityczne w stosunku do utleniania TC. Aczkolwiek zastosowanie cząstek polikrzemianowych umożliwia kontrolę potencjału utleniania TC przez zmianę liczby osadzonych warstw. Pozwala także na uzyskanie niższej granicy wykrywalności i szerszego zakresu liniowego krzywej kalibracyjnej. Wnioskując, elektroda TMA-CNP(6) stanowi dogodny podłoże do oznaczania TC, a także budowy czujnika na OP.

12.2.2 Elektrody modyfikowane nanocząstkami węgla osadzonymi elektroforetycznie

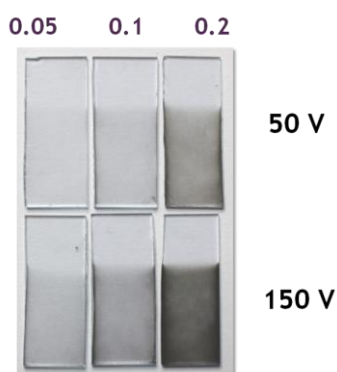
Całkowicie odmiennym od LbL, ale niezmiernie ciekawym sposobem immobilizacji CNP na powierzchni ITO, jest metoda osadzania elektroforetycznego (Rozdz. 2.2). Okazało się, że umożliwia ona przygotowanie stabilnych elektrod w szybki i prosty sposób, używając wyłącznie rozdyspergowanej zawiesiny nanocząstek węgla.

W naczyniu z tworzywa sztucznego, w odległości 1 cm, umieszczono dwie elektrody (Rys. 12.12). Jako substrat dla elektrody modyfikowanej zastosowano ITO ($2,5 \times 1$ cm), a przeciwelektrodę stanowiła blaszka platynowa ($2,5 \times 1,5$ cm).



Rys. 12.12 Schemat układu użytego do elektroforetycznego osadzania nanocząstek węgla.

Do osadzania użyto zawiesiny CNP w acetonitrylu po uprzednim sonikowaniu w płuczce ultradźwiękowej przez 30 min. W celu optymalizacji parametrów elektrody stosowano różne stężenia CNP: 0,05, 0,1, 0,2 mg ml⁻¹. Każdorazowo do osadzania używano 5 ml nowej zawiesiny. Pomiędzy elektrody przykładano różne wartości napięcia: 50 i 150 V w różnym czasie: 0,5, 1, 2 min, otrzymując w ten sposób odmienny stopień pokrycia ITO przez CNP (Rys. 12.13). Zdjęcia elektrod pokazują, że rozkład CNP na powierzchni ITO jest dość równomierny (Rys. 12.13).

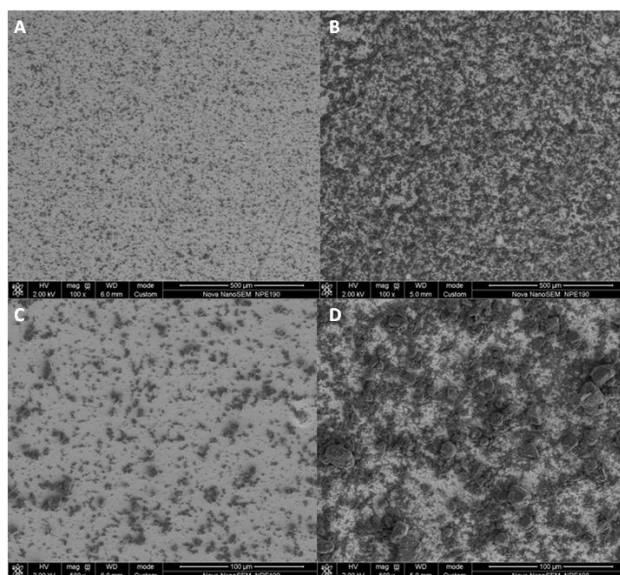


Rys. 12.13 Zdjęcie elektrod przygotowanych w 0,05, 0,1 and 0,2 CNP mg ml⁻¹, czas osadzania: 0,5 min, napięcie 50 lub 150 V.

Elektrodę ITO polaryzowano dodatnio, wymuszając w ten sposób przepływ w jej kierunku ujemnie naładowanych CNP. Przykładając wysokie napięcie w długim czasie, można zaobserwować osadzenie praktycznie całej liczby CNP z rozpuszczalnika – czarna zawiesina

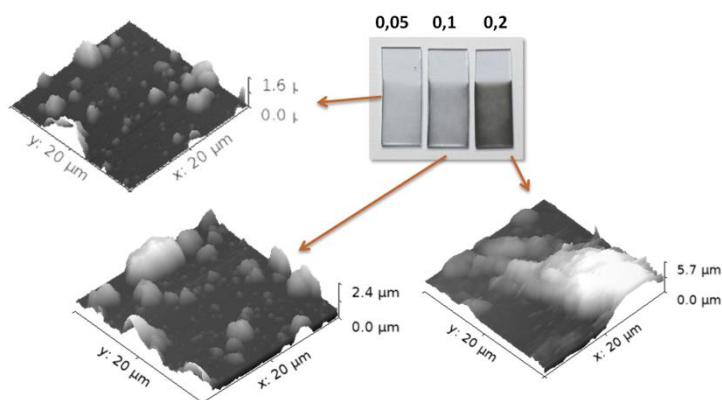
stawała się przejrzysta. Jednak po osadzeniu zbyt dużej liczby CNP, elektroda traciła mechaniczną stabilność. Nie było to także korzystne z analitycznego punktu widzenia (duży prąd pojemnościowy). Po zakończeniu procesu osadzania, elektrodę pozostawiano na powietrzu przez ok. 0,5 min w celu odparowania rozpuszczalnika.

Obrazy SEM wykonane dla różnych elektrod, przedstawiają wyspowy charakter osadzonego depozytu i widoczne fragmenty niezmodyfikowanego substratu (Rys. 12.14). Użycie większego stężenia CNP powoduje, powstawanie dużych agregatów nanocząstek. (Rys. 12.14B,D).



Rys. 12.14 Obrazy SEM elektrod przygotowanych w: 0,1 (A, C) i 0,2 (B, D) CNP mg ml⁻¹, czas osadzania: 0,5 min, napięcie 150 V.

Wzrost osadzonej ilości CNP, a także wyspowy charakter osadzonego materiału, potwierdzono za pomocą AFM (Rys. 12.15). Uzyskane obrazy prezentują wpływ parametrów EPD na strukturę depozytu w nanoskali.

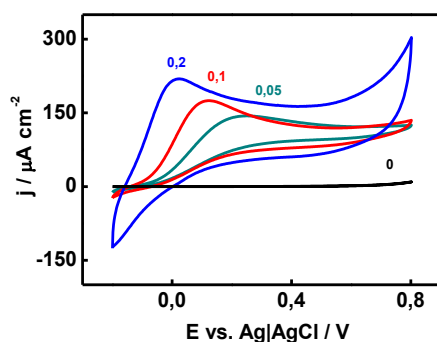


Rys. 12.15 Obrazy AFM dla elektrod przygotowanych w 0,05, 0,1 i 0,2 CNP mg ml⁻¹, przy napięciu 150 V, czas osadzania: 0,5 min.

Po optymalizacji procedury, do dalszych badań wybrano trzy podłoża, otrzymane przez przyłożenie napięcia równego 150 V w czasie 0,5 min, przygotowane z zawiesin CNP w ACN o stężeniu: 0,05, 0,1, 0,2 mg ml⁻¹. Najlepsze rezultaty otrzymano dla stężenia CNP wynoszącego 0,1 mg ml⁻¹. Zastosowanie tych parametrów pozwoliło na połączenie dobrych właściwości katalitycznych podłoża elektrodowych z ich szybkim i efektywnym

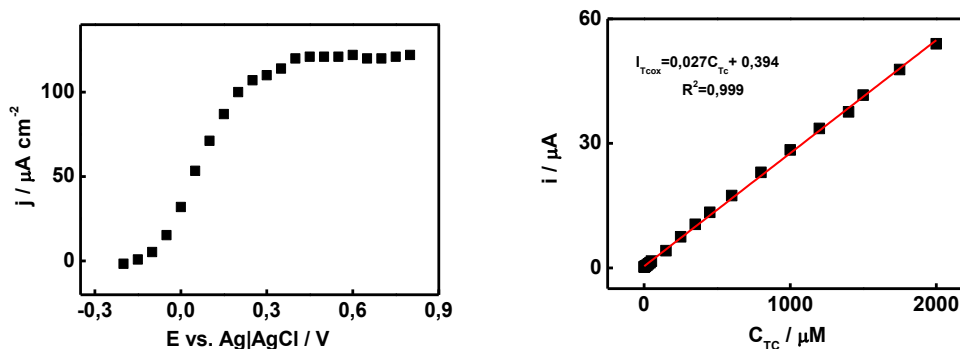
przygotowaniem. Wzrost stężenia zawiesiny CNP, powoduje tworzenie grubszego depozytu CNP na powierzchni ITO, co wpływa na pogorszenie właściwości mechaniczne i elektrochemicznych otrzymanego podłoża, m.in. na wzrost prądu pojemnościowego proporcjonalnie do ilości osadzanego materiału.

Elektrody przygotowane metodą EPD, wykazują bardzo dobre właściwości elektrokatalityczne w stosunku do utleniania TC. Rys. 12.16 przedstawia woltamperogramy utleniania TC na elektrodach otrzymanych z trzech różnych stężeń CNP użytych do EPD. Obserwuje się zależność potencjału pikowego od ilości osadzonego materiału. Grubszy depozyt CNP na powierzchni ITO powoduje zwiększenie szorstkości elektrody, a co za tym idzie, większy udział i wpływ dyfuzji sferycznej na proces faradajowski. W pobliżu szorstkiej powierzchni, konsumpcja substancji elektroaktywnej, w tym przypadku thiocholiny, jest szybsza. Tym samym obszar na krzywej wynikający z kontroli dyfuzyjnej procesu, osiągnąć jest przy niższym potencjale. Dlatego też, dla bardziej rozwiniętych powierzchni, czyli dla ITO pokrytego większą ilością węglowych „wysp” obserwuje się pik przy bardziej ujemnych wartościach aniżeli dla mniej rozbudowanych powierzchni.



Rys. 12.16 Krzywe woltamperometryczne zarejestrowane na niemodyfikowanym ITO (czarna krzywa) oraz na ITO pokrytym CNP metodą EPD z zawiesiny 0,05 (zielona krzywa) i 0,1 (czerwona krzywa), 0,2 (niebieska krzywa) mg ml⁻¹, 150 V, 0,5 min; 5 mM TC w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 7, 2-gie cykle, $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

W celu optymalizacji potencjału utleniania TC, wykonano eksperyment w warunkach hydrodynamicznych. Otrzymano krzywą sigmoidalną (Rys. 12.17a) i do detekcji thiocholiny wybrano potencjał 0,2 V, przy którym zaczyna się prądowe plateau. Jest to niska wartość, otrzymana bez stosowania dodatkowych mediatorów tego procesu. Krzywą kalibracyjną wykonano metodą chronoamperometryczną przez sukcesywne dodawanie stężonego roztworu TC do mieszanego roztworu i rejestrowanie prądu w czasie. Zakres liniowy obserwuje się w szerokim zakresie stężeń 10,7-2000 μM ze współczynnikiem korelacji liniowej $R^2 = 0,999$ (Rys. 12.17b). Granica wykrywalności została wyznaczona na poziomie 10,7 μM ($S/N \geq 3$). Wartość ta jest zbliżona bądź niższa od opisywanych w literaturze (Tab. 12.6). Łatwość przygotowania elektrody i szeroki zakres liniowości pozwalają twierdzić, iż jest to bardzo obiecujący materiał.

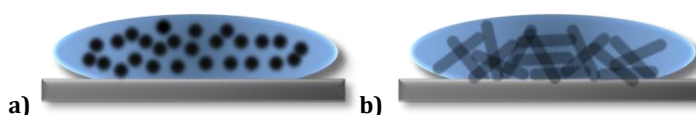


Rys. 12.17 a) Woltamperogram hydrodynamiczny zarejestrowany na elektrodzie przygotowanej metodą EPD z 0,1 mg ml⁻¹ CNP, 0,5 min, 150 V; 5 mM TC w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 7, roztwór mieszany za pomocą mieszadła magnetycznego, **b)** krzywa kalibracyjna zarejestrowana chronoamperometrycznie w mieszanym roztworze 0,1 M buforu fosforanowego pH = 7, do którego sukcesywnie dodawano roztwór stężonej TC, $E = 0,2$ V.

Podsumowując, opracowano nową metodą osadzania nanocząstek CNP na powierzchni ITO. Stosując elektroforetyczne osadzanie z zawiesiny CNP w ACN, przygotowano stabilne elektrody wykazujące bardzo dobre właściwości katalityczne w stosunku to utleniania TC. Jest to innowacyjna i przyszłościowa metoda.

12.2.3 Elektrody modyfikowane nanocząstkami lub nanorurkami węgla przez unieruchomienie w matrycy polikrzemianowej

Elektrody węglowe w oparciu o modyfikację ITO można utworzyć także przez immobilizację CNP lub CNT w matrycy polikrzemianowej. Do tego celu wykorzystuje się metodę zol-żel stosując różne rodzaje prekursorów polikrzemianowych i różne warunki procesu, tak aby otrzymać jak najlepsze elektrody. W pierwszym etapie przygotowujemy zol, który następnie rozcieńcza się odpowiednią zawiesiną CNT lub CNP. Potem kroplę mieszaniny umieszcza się na powierzchni ITO i pozostawia do żelowania (Rys. 12.18). Szukając najlepszego rozwiązania, nanostruktury unieruchomiono w różnych typach matrycy polikrzemianowych.



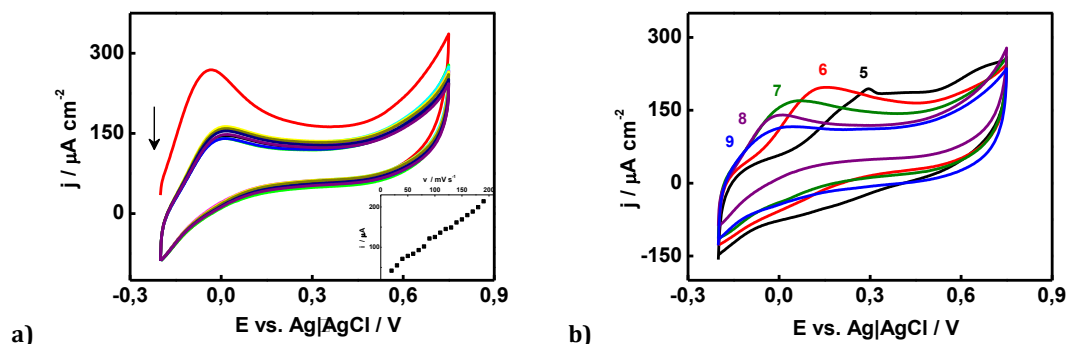
Rys. 12.18 Schemat elektrody zmodyfikowanej: **a)** CNP, **b)** CNT przez unieruchomienie w matrycy polikrzemianowej na powierzchni ITO.

W celu modyfikacji elektrod ITO nanocząstkami węgla, w pierwszej kolejności przygotowano zol z hydrofilowego prekursora TMOS w oparciu o reagenty przedstawione w Tab. 12.3. Następnie rozcieńczono zol w stosunku 1:100 w zawieszynie nanocząstek węgla w 0,05 M KCl o stężeniu 2,5 mg ml⁻¹ i kroplą o objętości 20 μl pokryto powierzchnię ITO (TMOS-CNP).

Tab. 12.3 Skład zolu użytego do przygotowania matrycy TMOS.

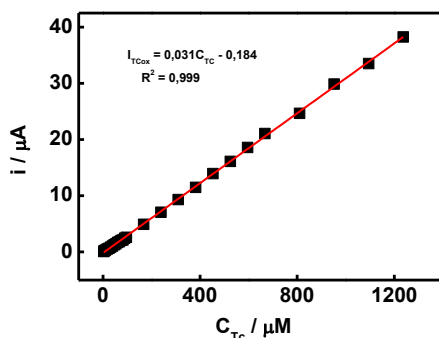
Odczynnik	Objętość [μl]
TMOS (tetrametoksylan)	500
Woda	125
0,04 M HCl	27,5

Woltamperogram utleniania TC (Rys. 12.19a) na elektrodzie TMOS-CNP charakteryzuje się dobrze wykształconym pikiem przy bardzo niskim potencjale ok. 0,0 V oraz dość dużym prądem pojemnościowym. Na kształt woltamperogramu silny wpływ ma pH użytego buforu fosforanowego (Rys. 12.19b).



Rys. 12.19 Krzywe woltamperometryczne zarejestrowane na elektrodzie TMOS-CNP w 5 mM TC w: **a)** 0,1 M buforze fosforanowym o pH = 7, cykle: 1-10, **b)** 0,1 M buforze fosforanowym pH = 5-9, 2-gie cykle, $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

Krzywa kalibracyjna (Rys. 12.20) opracowana na podstawie eksperymentu chronoamperometrycznego, wykazuje liniowość w szerokim zakresie stężenia TC: 5,2-1200 μM ze współczynnikiem korelacji liniowej 0,999. LOD wyniosła 5,2 μM ($S/N \geq 3$).



Rys. 12.20 Krzywa kalibracyjna zarejestrowana techniką chronoamperometryczną na elektrodzie TMOS-CNP przez sukcesywne dodawanie stężonego TC do 0,1 M buforu fosforanowego pH = 7, $E = 0,1 \text{ V}$.

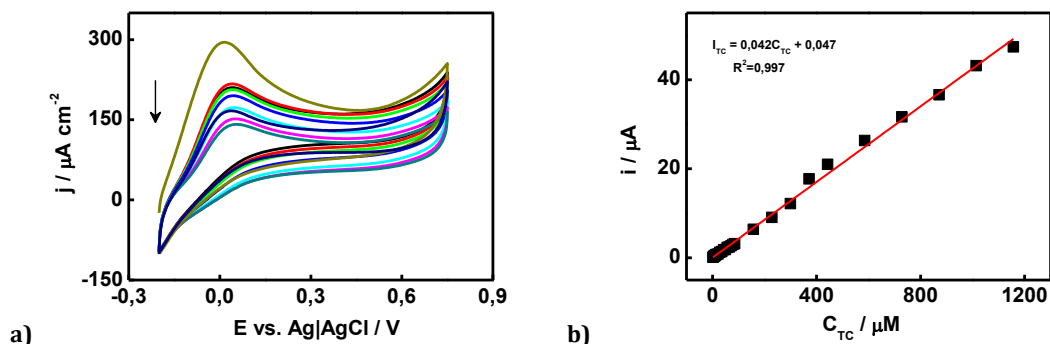
W następnej kolejności postanowiono unieruchomić CNP w hydrofobowej matrycy polikrzemianowej. Przygotowano zol z prekursora, oktylotrietoksylanu (OTEOS) według Tab. 12.4., a następnie rozcieńczono go w stosunku 1:100 w zawieszynie CNP w 0,01 M Na_2SO_3 o stężeniu 1,5 mg ml^{-1} (sól dobrano ze względu na dobrą dyspersję CNP) i kroplą o objętości 20 μl pokryto powierzchnię ITO.

Tab. 12.4 Skład zolu użytego do przygotowania matrycy OTEOS.

Odczynnik	Objętość [μl]
OTEOS (oktylotrietoksylan)	100
Etanol	5
Woda	20
0,04 M HCl	7,5

Woltamperogramy otrzymane na tak przygotowanej elektrodzie w roztworze TC nie są stabilne (Rys. 12.21a). Sugeruje to, że hydrofobowa matryca może nie być korzystnym środowiskiem do immobilizacji CNP. Jednak krzywa kalibracyjna (Rys. 12.21b) dla takiego

układu zarejestrowana przy potencjale 0,1 V ma szeroki zakres liniowości 1,7-1050 μM ze współczynnikiem korelacji liniowej 0.997. Dość niska jest również granica wykrywalności: 1,7 μM .



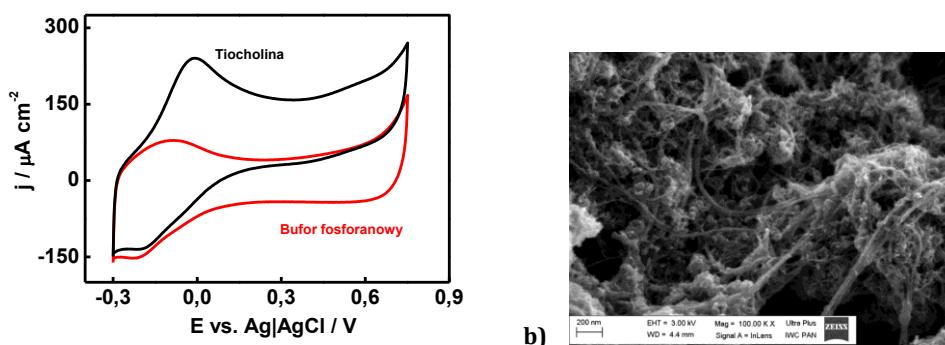
Rys. 12.21 a) Krzywe woltamperometryczne zarejestrowane na elektrodzie OTEOS-CNP w 5 mM TC w 0,1 M buforze fosforanowym o pH = 7, kolejne cykle 1-10, $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$, **b)** krzywa kalibracyjna zarejestrowana techniką chronoamperometryczną na elektrodzie OTEOS-CNP przez sukcesywne dodawanie stężonego TC do 0,1 M buforu fosforanowego pH = 7, $E = 0,1 \text{ V}$.

Następnie, zmodyfikowano opisaną wyżej matrycę TMOS, dodatkowo naładowanymi grupami tetraalkiloamoniowymi przez wprowadzenie prekursora TMAp zgodnie z Tab. 12.5. Zol rozcieńczono w stosunku 1:100 w zawieszinie CNP w 0,01 M Na_2SO_3 o stężeniu 1,5 mg ml^{-1} (TMA-TMOS-CNP) i kroplą mieszaniny o objętości 20 μl pokryto powierzchnię ITO. W podobny sposób unieruchomiono nanorurki, SWCNT, które uprzednio gotowano w 2,6 M HNO_3 przez 2 h w celu usunięcia zanieczyszczeń (CNT_{at}). Zawiesinę CNT_{at} w wodzie o stężeniu 1,5 mg ml^{-1} zmieszano z zolem w stosunku 1:100 i kroplą 20 μl pokryto powierzchnię ITO (TMA-TMOS- CNT_{at}).

Tab. 12.5 Skład zolu użytego do przygotowania matrycy TMA-TMOS.

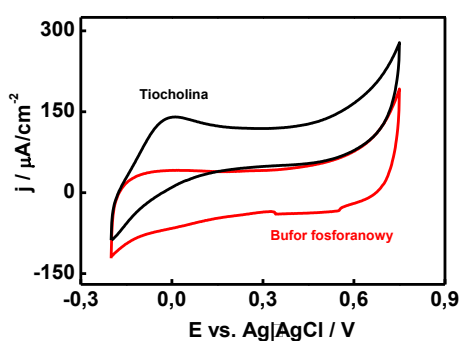
Odczynnik	Objętość [μl]
TMOS	270
TMA-p	30
Metanol	185
Woda	75
HCl_{st}	5

Woltamperogram z dobrze wykształconym pikiem przy potencjale ok. 0,0 V (Rys. 12.22a) pokazuje, że elektroda TMA-TMOS- CNT_{at} wykazuje dobre właściwości elektrokatalityczne dla utleniania TC. Czerwona krzywa wykonana wyłącznie w elektrolicie podstawowym prezentuje piki odpowiadające reakcji redoks grup chinonowych znajdujących się na powierzchni nanorurek, jest to tzw. prąd pseudopojemnościowy (Rozdz. 1.1.2). Obraz SEM (Rys. 12.22b) takiej elektrody, na którym widoczne są nanorurki powleczone warstwą polikrzemianu, wskazuje na dobre pokrycie elektrody i jej rozwiniętą powierzchnię.

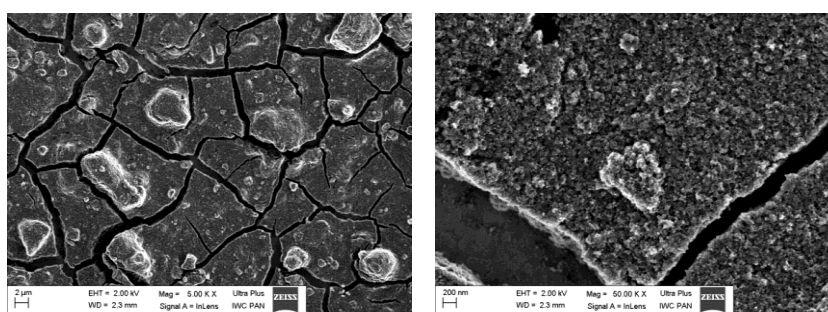


Rys. 12.22 a) Krzywe woltamperometryczne zarejestrowane na elektrodzie TMA-TMOS-CNT_{at} w 5 mM TC (czarna krzywa) w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 7 i bez dodatku TC (czerwona krzywa), 2-gie cykle, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, **b)** obraz SEM elektrody TMA-TMOS-CNT_{at}.

Zamiana CNT_{at} na CNP, poza eliminacją prądu pseudopojemnościowego, nie ma większego wpływu na parametry rejestrowanego woltamperogramu (Rys. 12.23). Obrazy SEM elektrody (Rys. 12.24) pokazują, że powierzchnia ITO nie jest całkowicie pokryta materiałem, widoczne są duże agregaty nanocząstek węgla i spękania, a w nich niezmodyfikowana powierzchnia ITO.



Rys. 12.23 Krzywe woltamperometryczne zarejestrowane na elektrodzie TMA-TMOS-CNP w 5 mM TC (czarna krzywa), w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 7 i bez dodatku TC (czerwona krzywa), 2-gie cykle, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

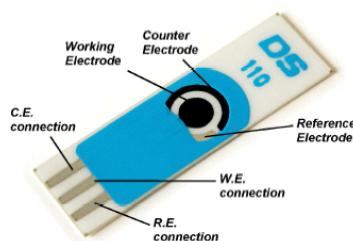


Rys. 12.24 Obrazy SEM powierzchni elektrody TMA-TMOS-CNP.

Podsumowując, w niniejszym podrozdziale przedstawiono elektrody utworzone przez unieruchomienie CNP lub CNT_{at} w matrycy polikrzemianowej na powierzchni ITO. Zastosowano trzy rodzaje matryc opartych o różne prekursorzy polikrzemianowe: TMOS, OTEOS oraz mieszaninę TMOS i TMA. Wszystkie przygotowane podłoża wykazywały dużą stabilność i elektrokatalizę w stosunku do reakcji utleniania TC.

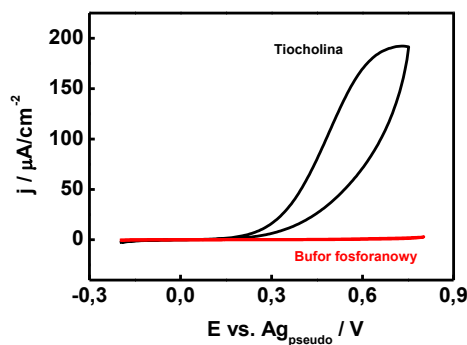
12.2.3 Sitodrukowane komercyjne elektrody węglowe

Część eksperymentów wykonano na komercyjnie dostępnej węglowej elektrodzie SPE, C110 (DS). Na jednej ceramicznej płytce ($3,4 \times 1$ cm) znajdują się wszystkie trzy niezbędne do pomiarów elektrochemicznych elektrody: węglowe – pracująca i przeciwelektroda, srebrna – pseudoreferencyjna (potencjał zbliżony do elektrody chlorosrebrowej) (Rys. 12.25). Taka konstrukcja umożliwia prowadzenie eksperymentu w małej objętości elektrolitu oraz pozwala na przyszłą komercjalizację przygotowanych czujników.



Rys. 12.25 Schemat elektrody sitodrukowanej komercyjnie DS (C110) ³.

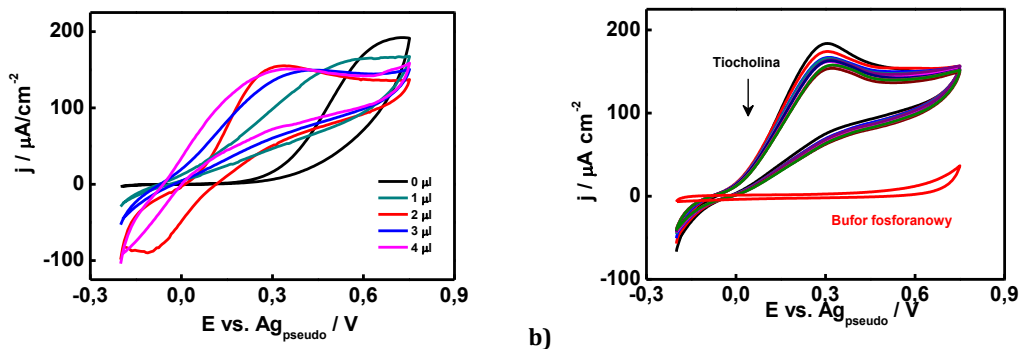
Rys. 12.26 przedstawia woltamperogram utleniania TC na elektrodzie DS. Potencjał piku jest wysoki i wynosi ponad 0,7 V.



Rys. 12.26 Krzywe woltamperometryczne zarejestrowane na elektrodzie DS w 5 mM TC w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 7, 2-gie cykle, $v = 10$ mV s⁻¹.

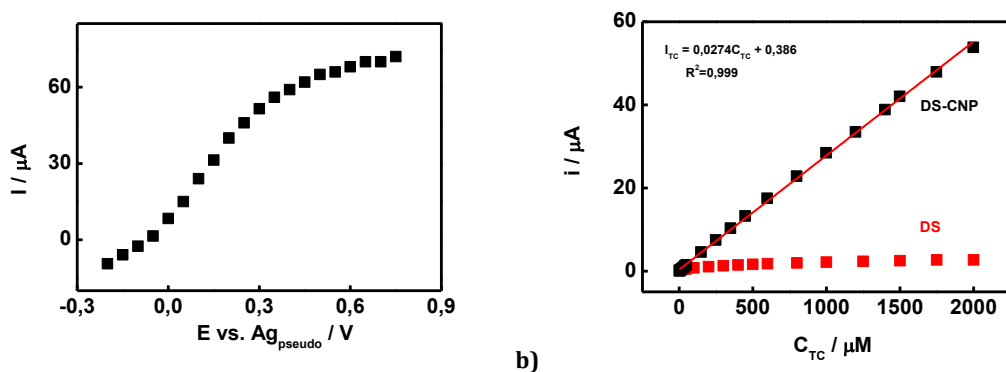
W celu poprawy parametrów katalitycznych omawianej elektrody, postanowiono zmodyfikować jej powierzchnię nanocząstkami lub nanorurkami węgla przez proste osadzenie z kropli.

Do modyfikacji powierzchni DS użyto zawiesinę CNP w acetonitrylu o stężeniu 2,5 mg ml⁻¹. Elektrode pokrywano kroplą o różnej objętości. Po odparowaniu rozpuszczalnika elektrody były gotowe do pomiarów elektrochemicznych, a więc procedura modyfikacji była bardzo prosta i krótka. Elektrody te wykazywały bardzo dobry efekt katalityczny w stosunku do utleniania TC (Rys. 12.27). Zaobserwowano wpływ ilości naniesionego materiału na potencjał rejestrowanego piku (Rys. 12.27a). Do dalszych eksperymentów wybrano elektrodę otrzymaną przez naniesienie kropli o objętości 2 μl (DS-CNP). Rejestrowany woltamperogram po kilku kolejnych cyklach wykazywał dużą stabilność (Rys. 12.27b). Potencjał piku wynosił ok. 0,3 V, a potencjał początkowy poniżej 0 V.



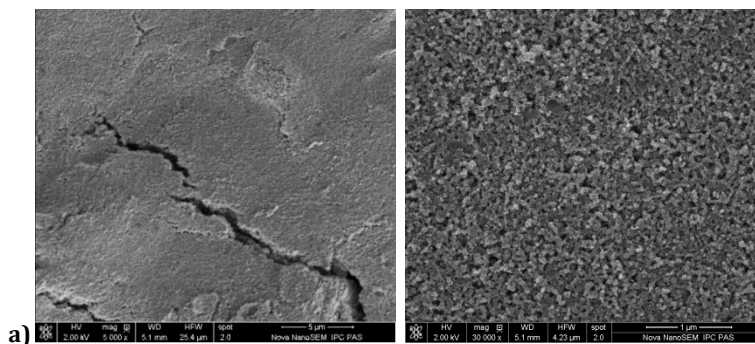
Rys. 12.27 Krzywe woltamperometryczne zarejestrowane na DS pokrytej kroplą zaiwiesiny CNP 2,5 mg ml⁻¹ o objętości: **a)** 0, 1, 2, 3, 4 μl, 2-gie cykle, 5 mM TC w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 7, **b)** 2 μl, kolejne cykle: 1-10, w 5 mM TC w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 7 oraz bez dodatku TC (czerwona krzywa), 2-gi cykl, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

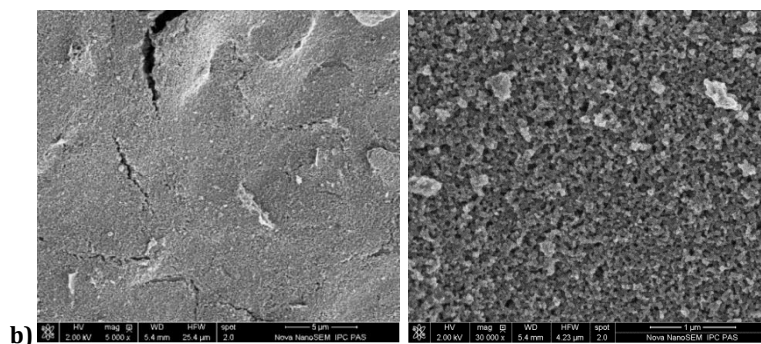
Na podstawie woltamperometrii hydrodynamicznej określono optymalny potencjał utleniania TC jako 0,3 V (Rys. 12.28a). Zakres liniowy krzywej kalibracyjnej, otrzymanej w eksperymencie chronoamperometrycznym przy potencjale 0,3 V, obserwowano w szerokim zakresie stężenia TC 20-2000 μM (w porównaniu do niemodyfikowanej DS), z dobrym współczynnikiem korelacji liniowej 0,999. Granica wykrywalności wyniosła 20 μM ($S/N \geq 3$) (Rys. 12.28b), natomiast czułość elektrody 136 mA M⁻¹ cm⁻².



Rys. 12.28 a) Woltamperogram hydrodynamiczny zarejestrowany na DS-CNP w 5 mM TC w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 7, **b)** krzywa kalibracyjna zarejestrowana chronoamperometrycznie na DS-CNP (czarne kwadraty) i na DS (czerwone kwadraty) przez i sukcesywne dodawanie stężonej TC do 0,1 M buforu fosforanowego pH = 7, roztwór mieszany, $E = 0,3 \text{ V}$.

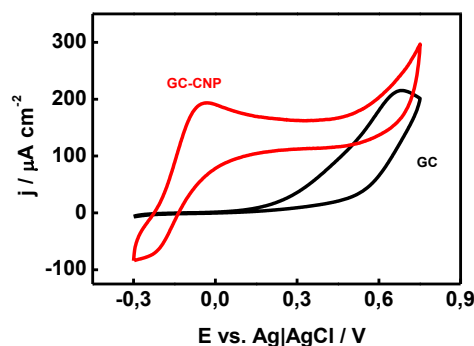
Porównanie obrazów SEM elektrody DS (Rys. 12.29a) i DS-CNP (Rys. 12.29b) uwidacznia agregaty CNP na powierzchni elektrody.





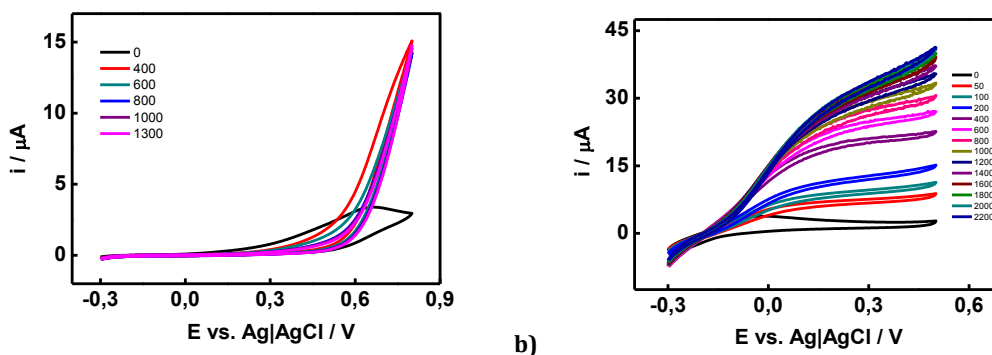
Rys. 12.29 Obrazy SEM elektrod a) DS, b) DS-CNP.

W celu zbadania kinetyki reakcji utleniania TC, zastosowano wirującą elektrodę dyskową (RDE) wykonaną z GC, którą zmodyfikowano kroplą o objętości 2 μl CNP w ACN o stężeniu 2,5 mg ml^{-1} (GC-CNP). Rys. 12.30 przedstawia voltamperogram utleniania TC rejestrowany przed i po modyfikacji elektrody GC. Wpływ CNP na efekt katalityczny jest bardzo wyraźny, przesunięcie potencjału pików wynosi ok. 0,7 V.



Rys. 12.30 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na GC (czarna krzywa) i GC-CNP (czerwona krzywa) w 5 mM TC w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 7, 2-gie cykle, $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

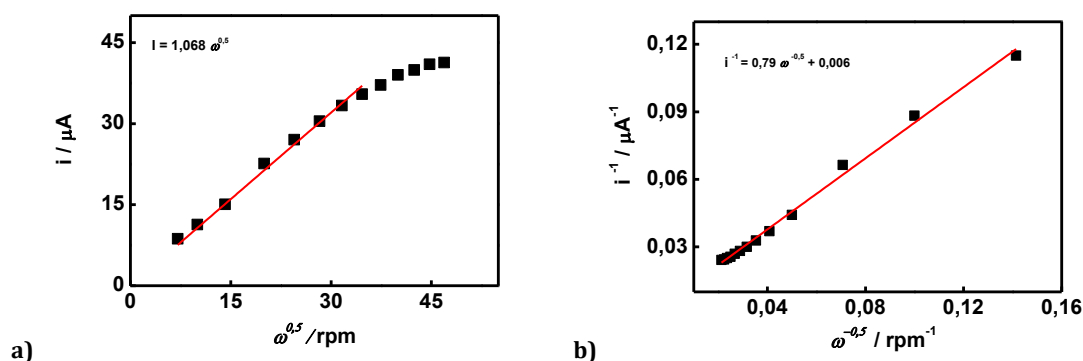
W trakcie pomiaru elektroda wiruje ze stałą szybkością a TC transportowana jest do powierzchni na skutek dyfuzji i konwekcji. Wartość rejestrowanego prądu granicznego w funkcji pierwiastka od szybkości wirowania elektrody jest prostoliniowa dla procesów zachodzących bez zahamowań kinetycznych. Na niemodyfikowanej elektrodzie GC nie obserwuje się zależności prądu od szybkości wirowania elektrody (Rys. 12.31a), co świadczy o wolnej kinetyce procesu.



Rys. 12.31 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane w 1 mM TC w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 7 na RDE: a) niemodyfikowanym GC, b) GC-CNP; przy różnej szybkości obrótów elektrody (rpm).

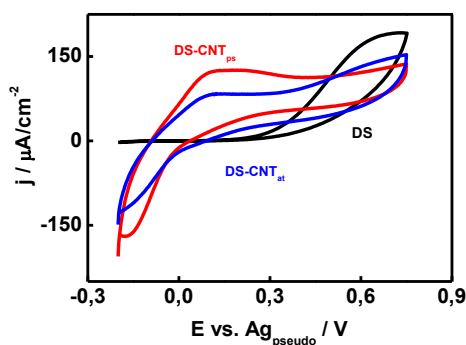
Po zmodyfikowaniu elektrody za pomocą CNP (Rys. 12.31b) prąd utleniania TC zależy liniowo od szybkości obrotów elektrody (Rys. 12.32). Pewne odstępstwa dla dużych

szybkości mogą być spowodowane niestabilnością mechaniczną osadzonych CNP (Rys. 12.32a) i ich odpadaniem, stąd też prosta na Rys. 12.32b nie przechodzi przez punkt zero. Jednak z eksperymentu wynika, że CNP znacząco wpływają na poprawę kinetyki procesu utleniania TC.



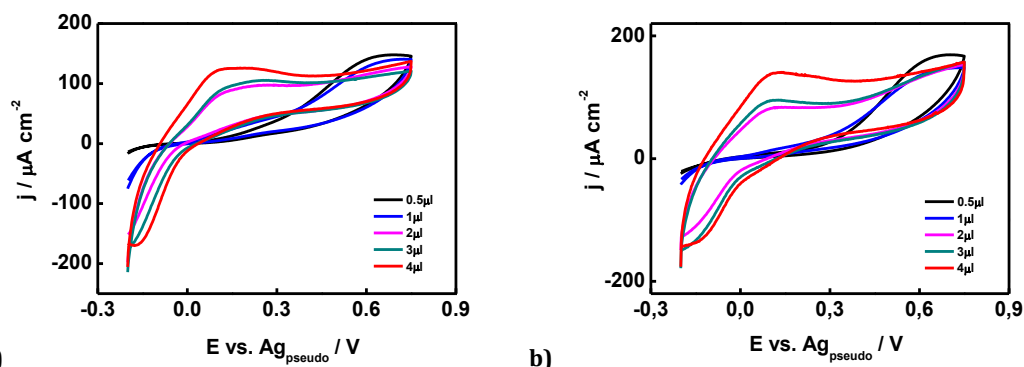
Rys. 12.32 Zależność **a)** rejestrowanego prądu utleniania TC na GC-CNP ($E = 0,4 \text{ V}$) od pierwiastka z szybkości wirowania elektrody, **b)** ich odwrotności, na podstawie Rys. 12.30b.

W kolejnym etapie, do modyfikacji elektrod DS użyto zawiesiny nanorurek SWCNT w ACN. Badano dwa typy nanorurek SWCNT, modyfikowane sulfonianem pirenu (DS-CNT_{ps}) zgodnie z wcześniej opisaną procedurą⁴ oraz wygotowane w kwasie, CNT_{at} (DS-CNT_{at}) o stężeniu 3 mg ml⁻¹. Sprawdzano także wpływ objętości naniesionej zawiesiny CNT. Po osadzeniu kropli i odparowaniu rozpuszczalnika, elektrody były gotowe do pomiarów elektrochemicznych. Modyfikacja ta spowodowała znaczne przesunięcie potencjału pikowego utleniania TC w kierunku niższych wartości (Rys. 12.33). W przypadku CNT_{at} obserwowany pik jest nieco lepiej wykształcony.



Rys. 12.33 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na niemodyfikowanym DS (czarna krzywa), DS-CNT_{ps}(2 μl) (czerwona krzywa), DS-CNT_{at}(2 μl) (niebieska krzywa) w 5 mM TC w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 7, 2-gie cykle, $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

Pokrycie elektrody kroplą o objętości 0,5 czy 1 μl jest niewystarczające do uzyskania znaczącego efektu katalitycznego, natomiast 4 μl generuje znaczny prąd pojemnościowy (Rys. 12.34). Optymalna zdaje się być objętość zawiesiny 2 μl.



Rys. 12.34 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na elektrodach: **a)** DS-CNT_{ps}, **b)** DS-CNT_{at}; pokrytych różną objętością zawiesiny nanorurek: 0,5, 1, 2, 3, 3 μl; w 5 mM TC w 0,1 M buforze fosforanowy pH = 7, 2-gie cykle, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

Podsumowując, komercyjne sitodrukowane elektrody węglowe, DS, zmodyfikowano CNP lub SWNT przez odparowanie rozpuszczalnika z kropli zawiesiny. Zastosowano dwa rodzaje SWCNT. Otrzymano w ten sposób stabilne podłoża katalizujące reakcję utleniania TC. Za pomocą wirującej elektrody dyskowej potwierdzono efekt elektrokatalityczny nanocząstek węgla.

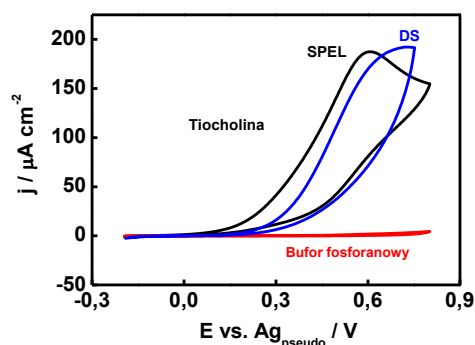
12.2.4 Sitodrukowane elektrody węglowe przygotowane w warunkach laboratoryjnych

W następnej kolejności, po zadowalających testach na podłożach komercyjnych, eksperymenty wykonano na węglowych elektrodach sitodrukowanych w warunkach laboratoryjnych w I4-CIDETEC (SPEL). SPEL drukowane są na grubej folii polimerowej, w odróżnieniu od elektrod DS w których jako podłoże zastosowano ceramikę. Na folii ($3,4 \times 1,2 \text{ cm}$) nadrukowano trzy elektrody: węglowe – pracującą i przeciwelektrodę oraz srebrną – pseudoreferencyjną (o potencjale zbliżonym do elektrody chlorosrebrowej) (Rys. 12.35).



Rys. 12.35 Zdjęcie elektrody SPEL.

Potencjał pikowego utleniania TC na elektrodach SPEL jest o ok. 100 mV niższy niż rejestrowany na komercyjnych elektrodach DS (Rys. 12.36).



Rys. 12.36 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na elektrodzie DS (niebieska krzywa) oraz SPEL (czarna krzywa) w 5 mM TC w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 7 oraz bez dodatku TC (czerwona krzywa), 2-gie cykle, $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

W pomiarach wstępnych, elektrodę zmodyfikowano nanocząstkami przez naniesienie kropli zawiesiny CNP w wodzie o stężeniu 5 mg ml^{-1} (SPEL-CNP). Użycie ACN nie było możliwe ze względu na podłoże elektrodowe nieodporne na ten rozpuszczalnik. Hydrofobową powierzchnię elektrody aktywowano przez naniesienie $2 \mu\text{l}$ czystego etanolu i następnie osadzano kroplę zawiesiny CNP o objętości $3 \mu\text{l}$ lub $6 \mu\text{l}$. Bez aktywacji, kropla "uciekła" z powierzchni elektrody zanim odparował rozpuszczalnik. Tak zmodyfikowane elektrody wykazywały efekt katalityczny w stosunku do utleniania TC (Rys. 12.37). Potencjał pikowy wynosił ok. $0,05 \text{ V}$. Natomiast otrzymane voltamperogramy nie były stabilne.

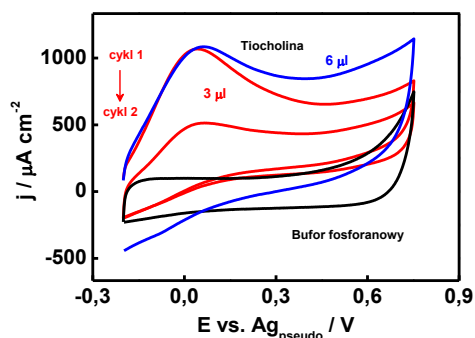
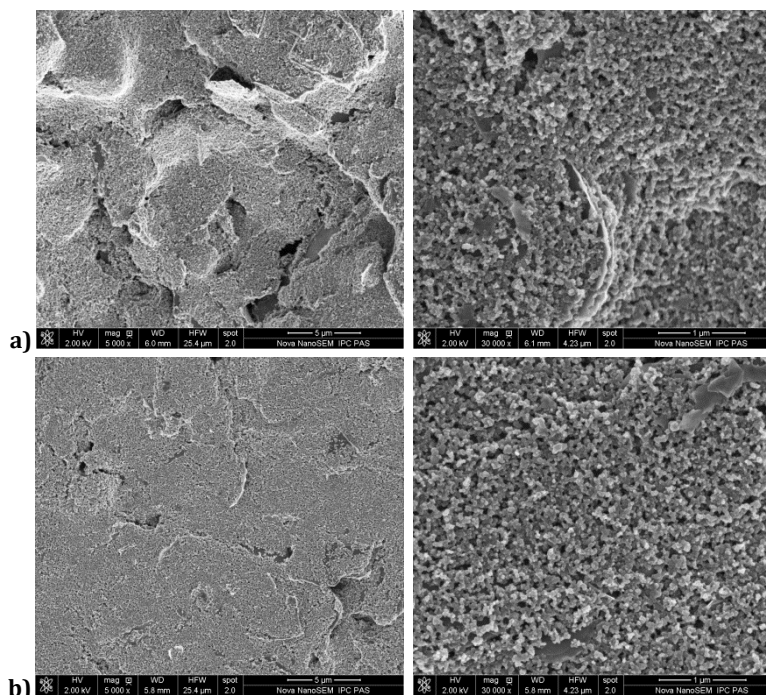


Fig. 12.37 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na elektrodzie SPEL-CNP pokrytej zawiesiną CNP o objętości $3 \mu\text{l}$ (czerwone krzywe, cykle: 1-2) lub $6 \mu\text{l}$ (niebieska krzywa, 1-y cykl) w 10 mM TC w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 7 oraz bez dodatku TC (czarna krzywa, 2-gi cykl), $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

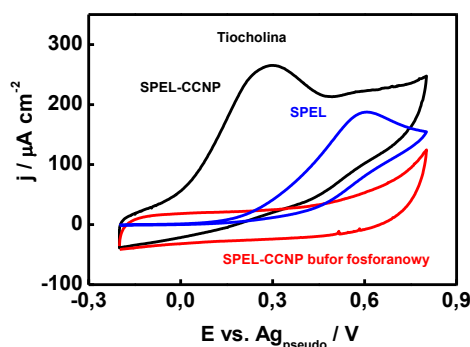
W celu zautomatyzowania modyfikacji elektrod SPE nanocząstkami węgla, do komercyjnie dostępnej pasty węglowej dodano porcję CNP i wydrukowano elektrody (SPEL-CCNP). W celu optymalizacji ich parametrów elektrochemicznych stosowano różne procentowe zawartości nanocząstek. Jednak zwiększenie udziału CNP powyżej 5% w paście grafitowej stosowanej do sitodruku, spowodowało wzrost niekorzystnego prądu pojemnościowego i pogorszenie ich właściwości mechanicznych. Dlatego też 5% zawartość CNP w paście uznano za optymalną.

Na obrazach SEM elektrod wydrukowanych z pasty węglowej (Rys. 12.37a) i z 5% dodatkiem CNP (Rys. 12.37b) dużo trudniej dostrzec różnice, gdyż CNP znajdują się wewnątrz materiału elektrody i na powierzchni są niewidoczne.



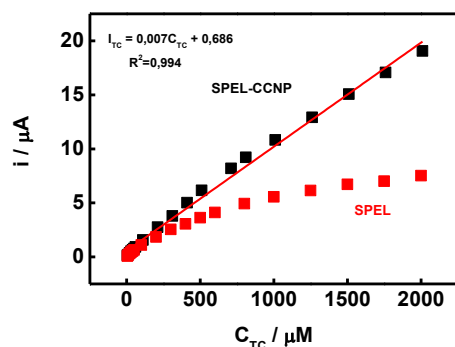
Rys. 12.38 Obrazy SEM elektrod: **a)** SPEL, **b)** SPEL-CCNP (z 5% dodatkiem CNP do pasty grafitowej).

Woltamperogram utleniania TC na elektrodzie SPEL-CCNP przedstawia Rys. 12.39. Potencjał pików w stosunku do elektrody niemodyfikowanej CNP, przesunięty jest o ok. 0,4 V w kierunku niższych wartości. Obserwuje się także duży wzrost prądu pojemnościowego.



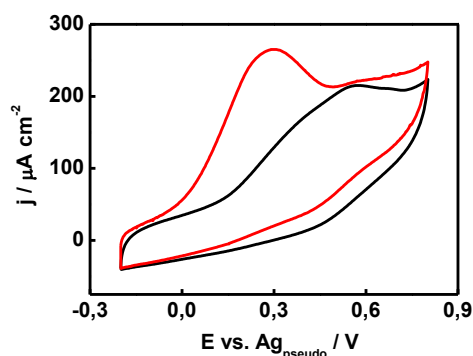
Rys. 12.39 Krzywe woltamperometryczne zarejestrowane na SPEL (niebieska krzywa) oraz na SPEL-CCNP (czarna krzywa) w 5 mM TC w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 7 oraz bez dodatku TC (czerwona krzywa), 2-gie cykle, $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

Do wykonania krzywej kalibracyjnej wybrano potencjał 0,2 V. Rys. 12.40 przedstawia porównanie krzywych kalibracyjnych zarejestrowanych dla elektrody modyfikowanej i niemodyfikowanej przez CNP. Niewątpliwie obecność nanocząstek węgla spowodowała rozszerzenie zakresu liniowego (50-2000 μM) i zwiększenie czułości elektrody, która dla elektrody SPEL-CCNP wynosi 47 $\text{mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$. Granicę wykrywalności określono na 50 μM ($S/N \geq 3$).



Rys. 12.41 Krzywa kalibracyjna zarejestrowana na SPEL (czerwone kwadraty) i na SPEL-CCNP (czarne kwadraty) chronoamperometrycznie przez sukcesywne dodawanie stężonego roztworu TC do 0,1 M buforu fosforanowego $\text{pH} = 7$, $E = 0,2 \text{ V}$.

Zbadano także wpływ pokrycia elektrody matrycą polikrzemianową z dodatnimi grupami funkcyjnymi TMA-TMOS (Tab. 12.5) przygotowaną przez rozcieńczenie zolu w buforze fosforanowym $\text{pH} = 7$ w stosunku 1:100). Eksperyment ma związek z późniejszym pokryciem elektrody matrycą z enzymem. Jak pokazuje Rys. 12.40 matryca powoduje zmianę kształtu krzywej voltametrycznej i podwyższenie potencjału pikowego utleniania TC o ok. 0,3 V.



Rys. 12.40 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na SPEL-CCNP (czerwona krzywa) oraz na SPEL-CCNP-TMA-TMOS (czarna krzywa) w 5 mM TC w 0,1 M buforze fosforanowym $\text{pH} = 7$, 2-gie cykle, $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

Podsumowując, wydrukowano stabilną elektrodę węglową zawierającą CNP, za pomocą której można oznaczać TC na poziomie $50 \mu\text{M}$. Ze względu na wysoką cenę CNT, nie zdecydowano się na wydruk elektrod zawierających nanorurki węglowe.

Przygotowane podłoża elektrodowe wykazują porównywalne lub lepsze od opisanych w literaturze parametry elektrokatalityczne w stosunku do utleniania TC (Tab. 12.6). Większość charakteryzuje się prostym, tanim i szybkim przygotowaniem, co również umożliwia produkcję czujników na dużą skalę.

Tab. 12.6 Porównanie właściwości katalitycznych w stosunku do utleniania TC, przygotowanych podłoży elektrodowych i elektrod wybranych z danych literaturowych.

Modyfikacja elektrody	Potencjał Ag/AgCl (V)	0,04 M Zakres liniowy [mol L ⁻¹]	LOD [mol L ⁻¹]	Źródło
SPE-CB	0,3	$3 \times 10^{-8} - 1 \times 10^{-5}$	1×10^{-8}	5
GC-CNT	0,15	$3 \times 10^{-7} - 1,2 \times 10^{-4}$	3×10^{-7}	6
SPE-heksacyjanożelazian kobaltu	0,5	$5 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-5}$	5×10^{-7}	7
SPE-błękit pruski	0,2	$5 \times 10^{-6} - 5 \times 10^{-4}$	5×10^{-6}	8
SPE-CoPh	0,1	$1 \times 10^{-6} - 7 \times 10^{-5}$	5×10^{-7}	8
Pastowa elektroda węglowa-MWCNT-ciecz jonowa	0,05	-	-	9
TMA-CNP(6)	0,25	$1,7 \times 10^{-6} - 1,3 \times 10^{-3}$	$1,7 \times 10^{-6}$	niniejsza praca
TMA _{zoi} -CNP(6)	0,5	$5,4 \times 10^{-6} - 6,4 \times 10^{-4}$	$5,4 \times 10^{-6}$	
ITO/CNP (EPD)	0,2	$10,7 \times 10^{-6} - 2 \times 10^{-3}$	$10,7 \times 10^{-6}$	
TMOS-CNP	0,1	$5,2 \times 10^{-6} - 1,2 \times 10^{-3}$	$5,2 \times 10^{-6}$	
OTEOS-CNP	0,1	$1,7 \times 10^{-6} - 1,05 \times 10^{-3}$	$1,7 \times 10^{-6}$	
TMA-TMOS-CNP	0,05	-	-	
TMA-TMOS -CNT _{at}	0,05	-	-	
DS-CNP	0,3	$2 \times 10^{-5} - 20 \times 10^{-3}$	2×10^{-5}	
DS-CNT _{at}	0,1	-	-	
DS-CNT _{ps}	0,1	-	-	
SPEL-CNP	0,05	-	-	
SPEL-CCNP	0,2	$5 \times 10^{-5} - 20 \times 10^{-3}$	5×10^{-5}	

12.3. Wybrane podłoża elektrodowe wykorzystane do przygotowania czujnika pestycydów fosforoorganicznych

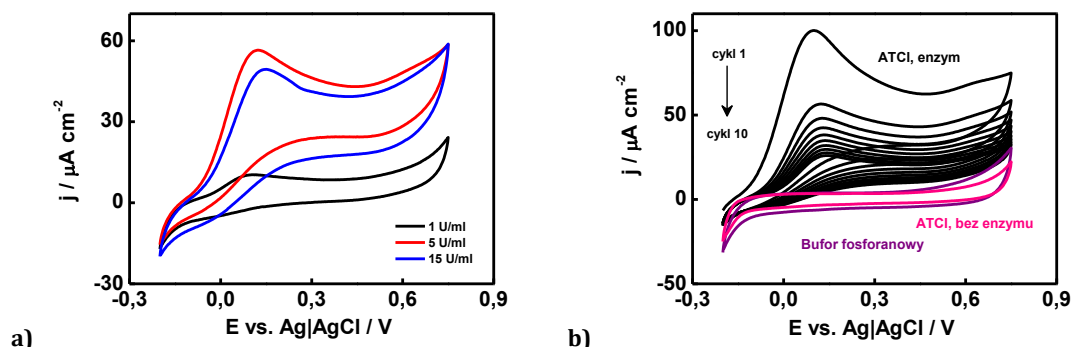
Spośród opracowanych podłoży elektrodowych wykazujących silny efekt katalityczny w stosunku do utleniania TC, wybrano trzy w celu zaadoptowania do czujnika OP. Ze względu na specyfikę pomiarów, nie wykorzystano wszystkich wcześniej opracowanych rozwiązań.

Enzym, AChE (izolowany z EE lub B394) unieruchomiono na powierzchni elektrod przed adsorpcją, osadzenie z kropli lub pułapkowanie w matrycy polikrzemianowej albo w alkoholu poliwinylowym.

12.3.1 Elektrody polikrzemianowo-węglowe otrzymane metodą warstwa-po-warstwie, TMA-CNP(6)

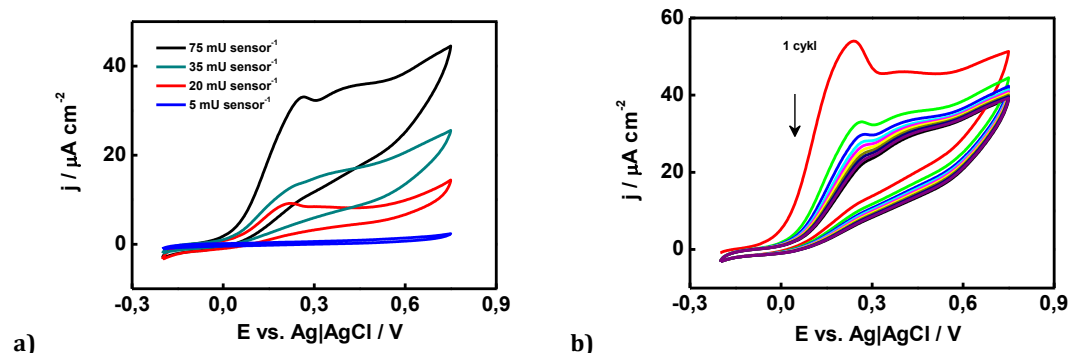
Eksperymenty wstępne do przygotowania czujnika OP, polegały na immobilizacji enzymu przez adsorpcję z roztworu na powierzchni elektrody warstwowej LbL, TMA-CNP(6). Enzym AChE (EE), adsorbowano przez zanurzenie elektrody w 0,1 M buforze fosforanowym o pH = 7 zawierającym enzym o różnej aktywności. Adsorpcja trwała 2 h i prowadzona była w temperaturze 4°C w celu zwiększenia jej efektywności. Po tym procesie elektrodę płukano w czystym buforze i dalsze eksperymenty prowadzono bez jej suszenia (TMA-CNP(6)-AChE). Rys. 12.41 przedstawia voltamperogramy cykliczne utleniania TC generowanej bezpośrednio na elektrodzie z chlorku acetylotiocholiny (Rys. 12.41). Rys. 12.41a wskazuje na zależność sygnału prądowego od aktywności AChE w roztworze użytym do adsorpcji. W nieobecności enzymu na powierzchni elektrody, nie pojawia się żaden sygnał na voltamperogramie (Rys. 12.41b, różowa krzywa). Niestety obserwuje się spadek sygnału

utleniania TC w miarę upływu czasu (Rys. 12.41b) co prawdopodobnie związane jest z wymywaniem z powierzchni słabo związanego enzymu.



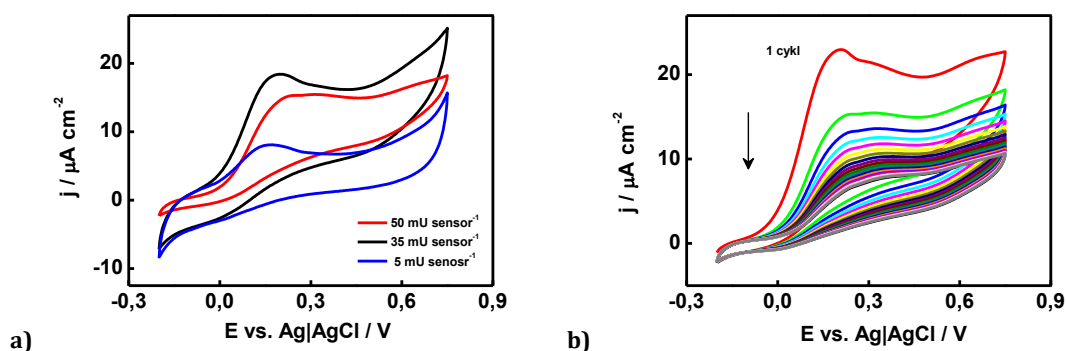
Rys. 12.41 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na TMA-CNP(6)-AChE: **a)** po adsorpcji AChE z roztworu o różnej aktywności, **b)** po adsorpcji AChE z roztworu o aktywności 15 U ml⁻¹, kolejne cykle: 1-10 (czarne krzywe); w 5 mM ATCl w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 7 oraz bez dodatku ATCl (fioletowa krzywa) i na elektrodzie niemodyfikowanej enzymem w obecności ATCl (różowa krzywa); 2-gie cykle, $\nu = 10$ mV s⁻¹.

Z powodu nietrwałości zaadsorbowanego na elektrodzie enzymu, podjęto próbę unieruchomienia AChE w matrycy polikrzemianowej. Do tego celu wybrano matrycę otrzymaną metodą zol-żel z prekursora TMOS (Tab. 12.3). Zol rozcieńczono w stosunku 1:100 w roztworze buforowym enzymu o różnej aktywności. Kroplę o objętości 5 μ l osadzano na powierzchni elektrody TMA-CNP(6) i pozostawiano do wyschnięcia (TMA-CNP(6)-TMOS-AChE). Na tak zmodyfikowanej elektrodzie rejestrowano sygnał utleniania TC przy zastosowaniu różnej aktywności enzymu (Rys. 12.42a). Jak widać niezbędne jest użycie optymalnej aktywności enzymu ze względu na to, że eksperyment prowadzony jest w ok. 5 ml roztworu ATCl, co wiąże się z dość dużą ilością substratu z jakiego enzym generuje TC. Rys. 12.42b przedstawia dość stabilny w czasie voltamperogram utleniania TC.



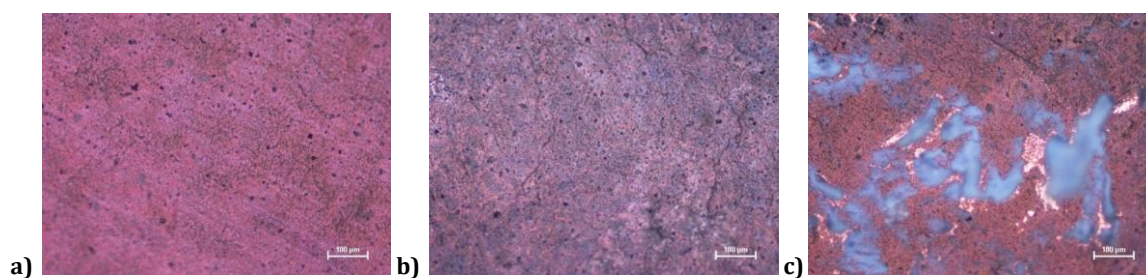
Rys. 12.42 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na TMA-CNP(6)-TMOS-AChE: **a)** z enzymem o różnej aktywności, 2-gie cykle, **b)** z enzymem o aktywności 75 mU sensor⁻¹, kolejne cykle: 1-10; 5 mM ATCl w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 7, $\nu = 10$ mV s⁻¹.

W celach porównawczych, enzym unieruchomiono także we wspomnianej wcześniej hydrofobowej matrycy, otrzymywanej z prekursora OTEOS (TMA-CNP(6)-OTEOS-AChE, Tab. 12.4). Procedura przygotowania i modyfikacji elektrody była taka sama jak w przypadku matrycy TMOS. Rejestrowane voltamperogramy charakteryzują się nieco innym kształtem i mniejszą stabilnością w porównaniu do obserwowanych na TMA-CNP(6)-TMOS-AChE (Rys. 12.43).



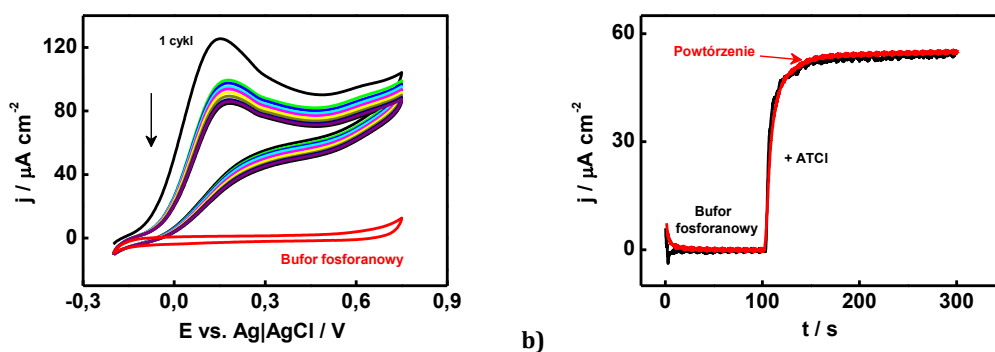
Rys. 12.43 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na TMA-CNP(6)-OTEOS-AChE: **a)** z enzymem o różnej aktywności, 2-gie cykle, **b)** z enzymem o aktywności 50 mU sensor⁻¹, kolejne cykle: 1-10; 5 mM ATCl w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 7, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

Do unieruchomienia AChE użyto także matrycy polikrzemianowej modyfikowanej dodatnio naładowanymi grupami funkcyjnymi (TMA-TMOS). Zol przygotowany wg Tab 12.5 rozcieńczono w roztworze enzymu o optymalnej aktywności 35 mU sensor⁻¹ w stosunku 1:100 i 5 μl takiej mieszaniny osadzono na powierzchni elektrody. Po wyschnięciu/zżelowaniu matrycy wykonano pomiary elektrochemiczne (TMA-CNP(6)-TMA-TMOS-AChE). Obrazy mikroskopii optycznej opracowanych elektrod, uwidaczniają wpływ czasu przechowywania zolu na strukturę otrzymywanego pokrycia (Rys. 12.44). Zol przechowywany przez 12 godz. w lodówce, ulega częściowemu żelowaniu przed zmieszaniem z enzymem i dlatego na powierzchni elektrody widoczne są duże białe plamy polikrzemianu.



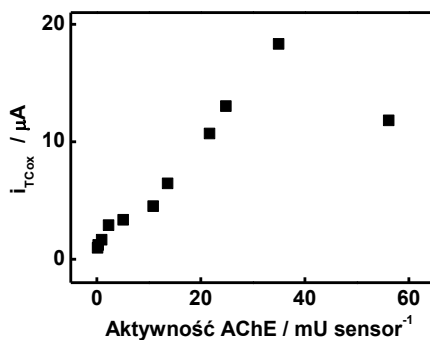
Rys. 12.44 Obrazy wykonane mikroskopem optycznym elektrody TMA-CNP(6): **a)** niemodyfikowanej enzymem, **b)** modyfikowanej warstwą TMA-TMOS-AChE, wykonaną ze świeżego zolu, **c)** modyfikowanej warstwą TMA-TMOS-AChE, wykonaną z zolu przechowywanego 12 godz. w lodówce.

Rys. 12.45a przedstawia voltamperogramy z bardzo dobrze wykształconym pikiem utleniania TC, co świadczy o tym, że przygotowana matryca TMA-TMOS stanowi dobre środowisko do działania enzymu i uzasadnia jej stosowanie. Po początkowym spadku prądu, rejestrowany sygnał staje się stabilny. Chronoamperogram otrzymany przy wcześniej ustalonym potencjale 0,25 V (Rozdz. 12.2.1, Rys. 12.6b), wskazuje na szybką, stabilną i powtarzalną odpowiedź układu na pojawienie się generowanego przez enzym analitu (Rys. 12.45b).



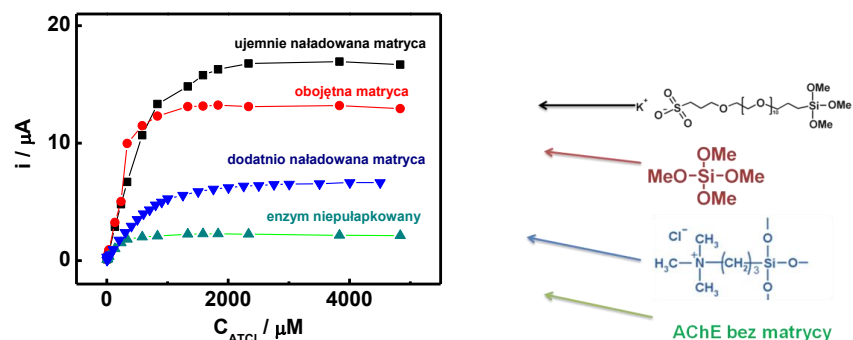
Rys. 12.45 a) Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na TMA-CNP(6)-TMA-TMOS-AChE w 5 mM ATCl w 0,1 M buforze fosforanowym pH=7, kolejne cykle: 1-10, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, **b)** chronoamperogram zarejestrowany na tej samej elektrodzie, przed i po dodaniu ATCl do 0,1 M buforu fosforanowego pH = 7 do uzyskania stężenia 5 mM, $E = 0,25$.

W celu optymalizacji parametrów pracy czujnika unieruchomiono porcje enzymu o różnej aktywności. Maksymalny sygnał zarejestrowano dla enzymu o aktywności $35 \text{ mU sensor}^{-1}$ (Rys. 12.46).



Rys. 12.46 Zależność prądu pikowego utleniania TC od aktywności unieruchomionego enzymu na elektrodzie TMA-CNP(6)-TMA-TMOS-AChE, na podstawie voltamperogramów zarejestrowanych w 5 mM ATCl w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 7, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

Celem określenia optymalnego stężenia ATCl do pomiarów inhibicji enzymu, przygotowano krzywe wysycenia AChE (Rys. 12.47), wynikające z mechanizmu Michaelisa-Menten, opisującego kinetykę reakcji enzymatycznej (Rozdz. 3). Eksperyment przeprowadzono w warunkach chronoamperometrycznych, przykładając potencjał 0,25 V i monitorując prąd w trakcie dodawania stężonego ATCl do mieszanego roztworu. Na podstawie tego eksperymentu wykreślono zależność prądu od stężenia ATCl dla różnych matryc użytych do unieruchomienia enzymu (Rys. 12.47). We wszystkich przypadkach wysycenie obserwuje się przy stężeniu ok. 2,5 mM ATCl. Dlatego też, w dalszych eksperymentach używano tej wartości stężenia. Poza opisanymi matrycami polikrzemianowymi, AChE unieruchomiono także w matrycy zmodyfikowanej ujemnymi grupami funkcyjnymi, przygotowanej w oparciu o prekursor TMOS i TSP, według procedury podanej w Tab. 12.7. Zaobserwowano wpływ matrycy na rejestrowany prąd utleniania TC (Rys. 12.47). Najwyższy prąd otrzymano dla enzymu unieruchomionego w matrycy TMOS-TPS. Może to być związane z oddziaływaniem dodatnio naładowanej TC z ujemnymi grupami matrycy.



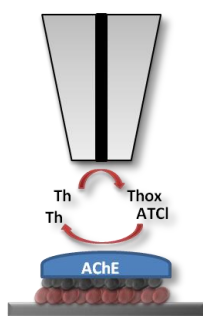
Rys. 12.47 Krzywa kalibracyjna dla ATCl zarejestrowana chronoamperometrycznie przez sukcesywne dodawanie stężonego ATCl do 0,1 M buforu fosforanowego pH = 7, na elektrodzie TMA-CNP(6) z enzymem AChE (EE, 35 mU sensor⁻¹): osadzonym przez odparowanie z kropli (zielona krzywa) oraz pułapkowanym w różnych matrycach polikrzemianowych: TMA-TMOS-AChE (niebieska krzywa), TMOS-AChE (czerwona krzywa), TPS-TMOS-AChE (czarna krzywa), $E = 0,25$.

Tab. 12.7 Skład zolu użytego do przygotowania matrycy TPS-TMOS.

Odczynnik	Objętość [μl]
TMOS	250
TPS-p	5 mg
Metanol	185
Woda	75

Na podstawie Rys. 12.47 i Rów. 3.2 obliczono K_M dla unieruchomionego w różny sposób enzymu, otrzymując odpowiednio wartości: 0,16 mM dla niepułapkowanego enzymu, 0,77 mM dla TMOS, 0,91 mM dla TMA-TMOS oraz 0,42 mM dla TPS-TMOS. Otrzymane wartości wskazują na dobre powinowactwo do ATCl i są zbliżone do wartości prezentowanych w literaturze^{8,10}.

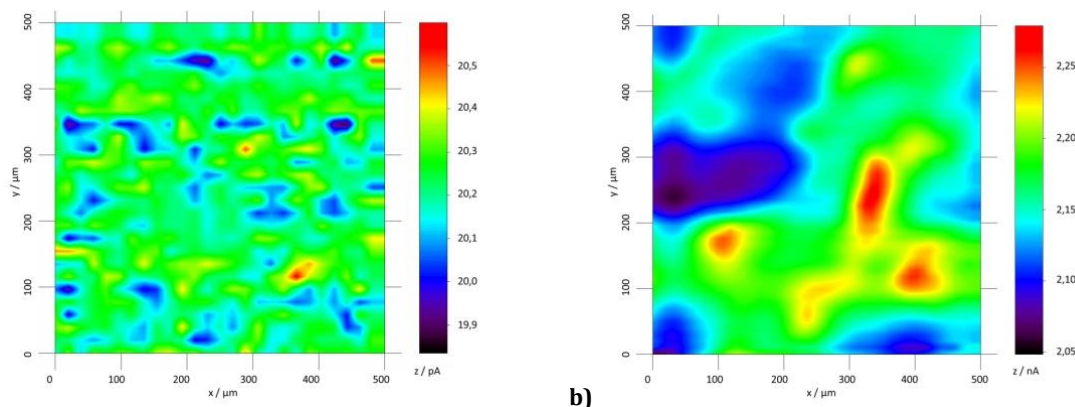
W celu określenia rozkładu aktywności enzymu na powierzchni elektrody, wykonano eksperymenty za pomocą SECM. W tym celu użyto złotej mikroelektrody o średnicy $d = 25 \mu\text{m}$, którą skanowano powierzchnię elektrody pokrytej enzymem, TMA-CNP(6)-TMA-TMOS-AChE (Rys. 12.48). Do elektrody złotej przykładano potencjał 0,9 V przy którym obserwowano utlenianie TC, generowanej lokalnie z rozpuszczonego ATCl.



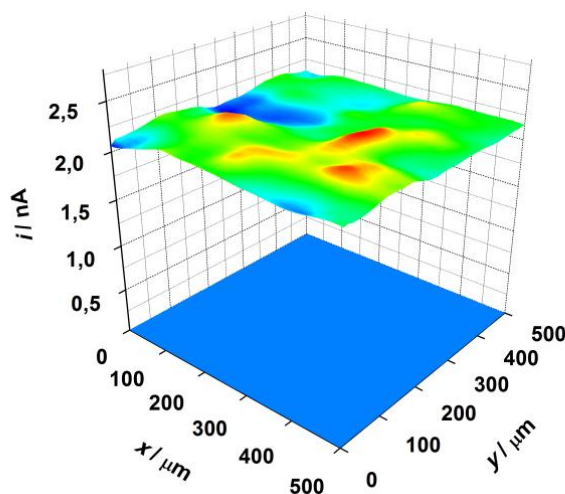
Rys. 12.48 Schemat układu użytego do zobrazowania rozmieszczenia AChE na TMA-CNP(6)-TMA-TMOS-AChE.

W ten sposób wykonano mapowanie powierzchni o rozmiarze $500 \times 500 \mu\text{m}$ (Rys. 12.49), które wykazało dość jednorodny rozkład enzymu w obszarze skanowania. Rys. 12.49 i 12.50 przedstawia porównanie mapy utworzonej w czystym buforze (Rys.12.49a) oraz po dodatku ATCl (Rys.12.49b). Obecność ATCl powoduje generowanie TC, która z kolei utlenia jest na złotej elektrodzie, tuż nad powierzchnią elektrody pokrytej AChE. W nieobecności ATCl nic się nie dzieje. Obserwuje się zatem powstawanie TC punkt po punkcie na powierzchni

elektrody TMA-CNP(6)-TMA-TMOS-AChE. Jednak obszar ten jest za mały aby móc stwierdzić, że rozkład enzymu na całej powierzchni elektrody jest jednorodny.



Rys. 12.49 Mapa aktywności enzymu wykonana techniką SECM elektrody TMA-CNP(6)-TMA-TMOS-AChE zanurzonej w: **a)** 0,1 M buforze fosforanowym pH = 7, **b)** w 2,5 mM ATCl w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 7. Skanująca elektroda złota znajdowała się w stałej odległości 15 μm od skanowanej powierzchni, $E = 0,9 \text{ V}$.



Rys. 12.50 Mapa aktywności enzymu wykonana metodą SECM w 2,5 mM ATCl w buforze fosforanowym pH = 7 (kolorowy wykres) oraz bez dodatku ATCl (niebieski wykres) (połączone mapy przedstawione na Rys. 12.49).

Na podstawie woltamperogramów utleniania TC rejestrowanych w funkcji odległości mikroelektrody od powierzchni elektrody modyfikowanej enzymem (Rys. 12.51a), obliczono lokalne stężenie TC, korzystając z poniższego równania:

$$i = 4nFDC_{TC}r \quad (12.1)^{11}$$

i – rejestrowany prąd przy potencjale $E = 0,9 \text{ V}$

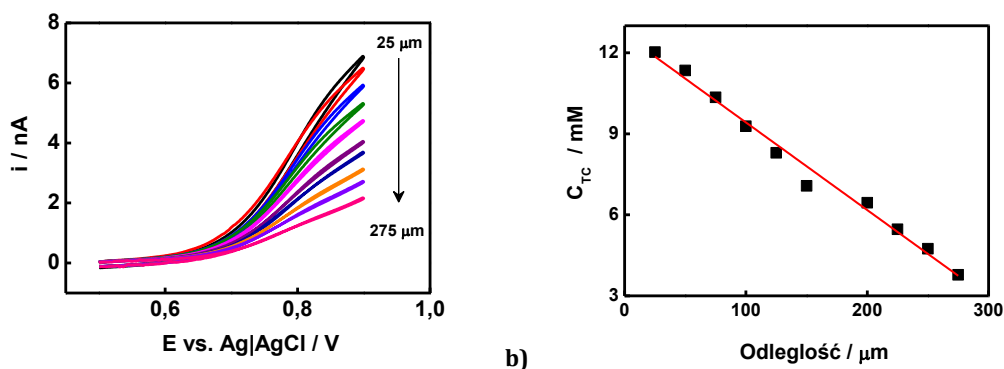
D – współczynnik dyfuzji $D = 6,0 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$

N – liczba elektronów, $n = 2$

F – stała Faradaya

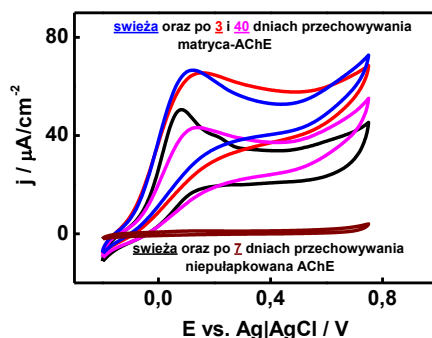
r – promień elektrody złotej, $r = 12,5 \mu\text{m}$

Z iloczynu współczynnika dyfuzji TC i nachylenia prostej przedstawionej na Rys. 12.51b ($3,25 \times 10^{-4} \text{ mol cm}^{-4}$) obliczono strumień TC który wyniósł $1,95 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$.



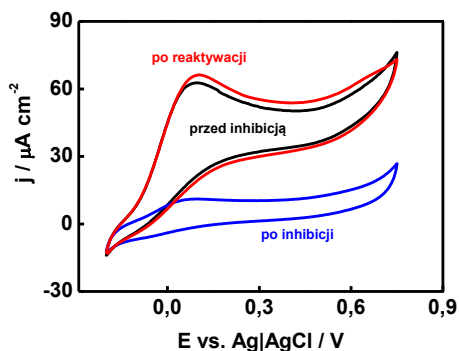
Rys. 12.51 a) Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na złotej mikroelektrodzie w 2,5 mM ATCl, 0,1 M bufor fosforanowy pH = 7, w różnej odległości złotej elektrody od powierzchni TMA-CNP(6)-TMA-TMOS-AChE, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$, **b)** zależność stężenia TC od odległości elektrody złotej od powierzchni elektrody z unieruchomionym enzymem.

Dalsze badania w oparciu o elektrodę TMA-CNP(6)-TMA-TMOS-AChE, wykazały, że 3 dni przechowywania elektrody w temperaturze 4°C nie ma wpływu na generowany sygnał amperometryczny. Po 40 dniach spada on o ponad 50%. Natomiast dla niepaupkowanego AChE, sygnał zanika już po 7 dniach przechowywania.



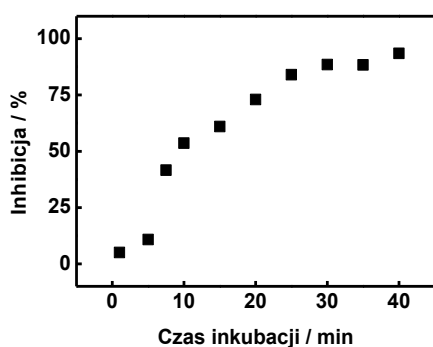
Rys. 12.52 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na TMA-CNP(6)-TMA-TMOS-AChE oraz TMA-CNP(6) pokrytej enzymem osadzoną z kropli bez matrycy, po różnym czasie przechowywania w temperaturze 4°C; 2,5 mM ATCl w 0,1 M buforze fosforanowy pH = 7, 2-gie cykle, $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

Pierwsze pomiary inhibicji i reaktywacji enzymu przeprowadzone zostały z pestycydem fosforoorganicznym – paraoksonem (Px). Na podstawie porównania voltamperogramów zarejestrowanych na elektrodzie TMA-CNP(6)-TMA-TMOS-AChE przed i po inkubacji elektrody przez 30 min w stężonym pestycydzie (10^{-6} M Px), widać że Px powoduje silną inhibicję AChE (Rys. 12.53). Elektrode poddano odtruciu poprzez jej inkubację (30 min) w wodnym roztworze 2-PAM o stężeniu 5 mM. Umożliwiło to reaktywację enzymu przez oddysocjowanie Px z centrum aktywnego AChE (Rozdz. 5.2). Inhibicja i reaktywacja enzymu możliwa jest co najmniej 6-krotnie dla jednej elektrody. Po reaktywacji obserwuje się nieco wyższy sygnał (Rys. 12.53), co może być związane z oczyszczaniem centrów aktywnych enzymu i wzrostem aktywności.

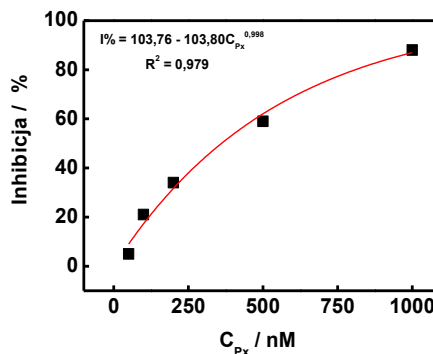


Rys. 12.53 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na TMA-CNP(6)-TMA-TMOS-AChE, przed (czarna krzywa) i po inkubacji w 10^{-6} M paraoksonie 30 min (niebieska krzywa), następnie po inkubacji w 5 mM 2-PAM przez 30 min (czerwona krzywa) w 2,5 mM ATCl w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 7, 2-gie cykle, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

Jednym z czynników wpływającym na czułość sensora, jest czas inkubacji elektrody w roztworze OP. Rys. 12.54a przedstawia porównanie inhibicji przez 10^{-6} M Px po inkubacji elektrody przez różny czas. W tym przypadku jako optymalny wybrano czas inkubacji równy 30 min. Granica wykrywalności, definiowana jako wartość stężenie dla 10% inhibicji ¹², wynosi 50 nM. Rys. 12.54b przedstawia krzywą kalibracyjną w zakresie stężeń 50-1000 nM.



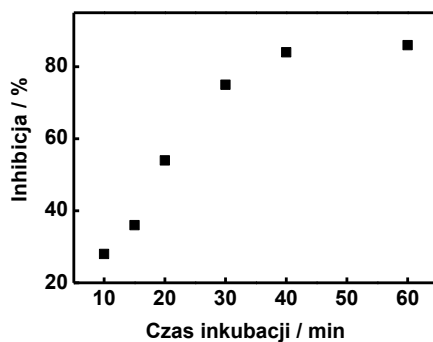
a)



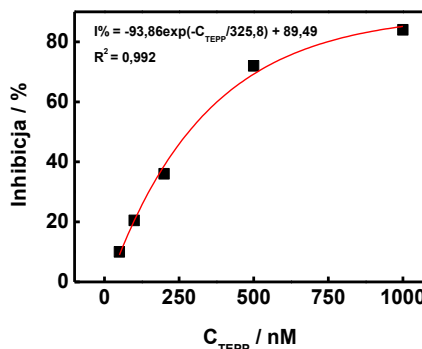
b)

Rys. 12.54 a) Zależność inhibicji od czasu inkubacji elektrody TMA-CNP(6)-TMA-TMOS-AChE w 10^{-6} M Px, **b)** krzywa kalibracyjna dla detekcji Px w wodzie dejonizowanej, na podstawie pomiarów amperometrycznych w 2,5 mM ATCl w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 7, $E = 0,25 \text{ V}$.

Podobne eksperymenty przeprowadzono także dla TEPP-u (Rys. 12.55). Jako optymalny czas inkubacji wybrano 40 min (Rys. 13.55a). W tym przypadku granica wykrywalności ($I = 10\%$) wynosi podobnie jak dla Px, 50 nM. Rys. 12.55b przedstawia krzywą kalibracyjną w zakresie stężeń 50-1000 nM.



a)



b)

Rys. 12.55 a) Zależność inhibicji od czasu inkubacji elektrody TMA-CNP(6)-TMA-TMOS-AChE w 10^{-6} M TEPP, **b)** krzywa kalibracyjna dla detekcji TEPP w wodzie dejonizowanej, na podstawie pomiarów amperometrycznych w 2,5 mM ATCl w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 7, $E = 0,25 \text{ V}$.

Tab. 12.8 przedstawia porównanie inhibicji, przez różne OP, enzymu unieruchomionego w różny sposób. Jak widać AChE izolowany z węgorza elektrycznego jest mało czuły na badane pestycydy. Jedynie TEPP i paraokson wykazują w stosunku do niego toksyczne działanie. Inhibicja niepułapkowanego enzymu poza łatwym dostępem OP do centrów aktywnych enzymu, może wynikać także z jego desorpcji z powierzchni elektrody.

Tab. 12.8 Porównanie inhibicji przez różne pestycydy o stężeniu 10^{-6} M po inkubacji przez 30 min w dejonizowanej wodzie, na elektrodzie TMA-CNP(6) z AChE (EE, 35 mU sensor⁻¹) unieruchomionym w różny sposób.

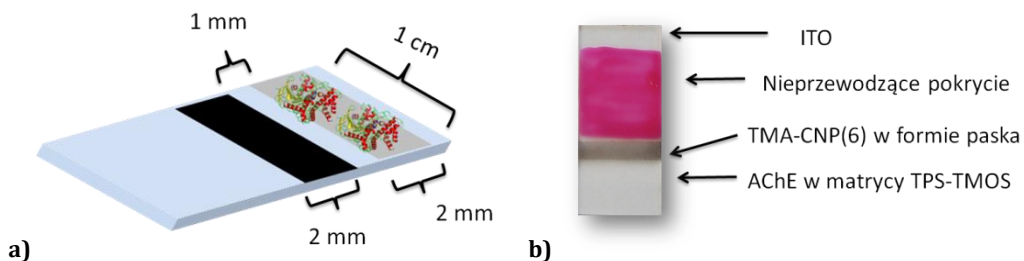
Pestycyd	Wolny AChE	TMA-TMOS	TMOS	TPS-TMOS
Malation	33%	brak	brak	brak
Fosmet	60%	brak	brak	brak
Dichlorfos	80%	brak	brak	brak
Diazinon	37%	brak	brak	brak
Chlorpyrifos	65%	brak	brak	brak
Chlorpyrifos metylowy	77%	brak	brak	brak
Trichlorfon	54%	brak	brak	brak
Paration	65%	brak	brak	brak
Paraokson	97%	62%	58%	49%
TEPP	93%	35%	80%	68%

Podsumowując, warstwową elektrodę polikrzemianowo-węglową TMA-CNP(6), zmodyfikowano enzymem, AChE(EE) przez adsorpcję z roztworu oraz unieruchomienie w matrycach polikrzemianowych: TMOS, OTEOS, TMA-TMOS, TPS-TMOS. Tak przygotowane czujniki optymalizowano pod kątem stabilności i wydajności pracy. Dla TMA-CNP(6)-TMA-TMOS-AChE przedstawiono krzywe kalibracyjne dla dwóch wybranych pestycydów: paraoksonu i TEPP-u.

12.3.2 Paskowe elektrody polikrzemianowo-węglowe otrzymane metodą warstwa-po-warstwie, TMA-CNP(6)

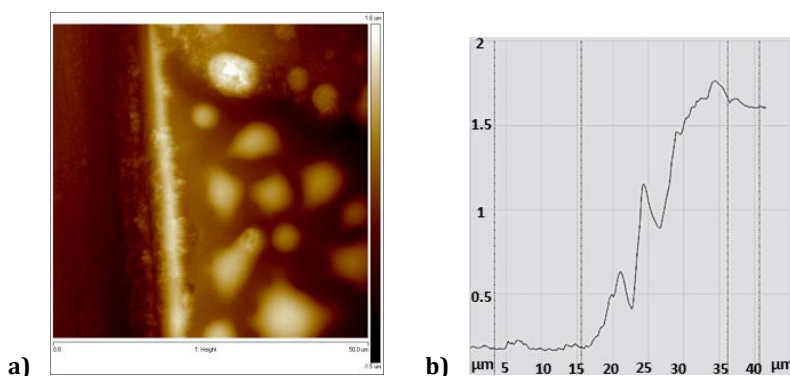
W elektrochemicznych biosensorach OP, enzym zazwyczaj unieruchamiany jest na powierzchni elektrody, co może powodować jej niestabilność mechaniczną. Dlatego też, podjęliśmy próbę opracowania czujnika, w którym enzym nie jest immobilizowany bezpośrednio na powierzchni elektroaktywnej lecz w jej bezpośrednim sąsiedztwie. Jest to możliwe ponieważ enzym nie bierze udziału w wymianie elektronów z elektrodą, a służy jedynie do wytwarzania elektroaktywnej tiocholiny.

Opracowana elektroda składa się z dwóch równoległych pasków (Rys. 12.56). Jeden z nich to omawiana wcześniej elektroda warstwową TMA-CNP(6), tym razem w formie paska o wymiarach 2 mm × 1 cm na podłożu ITO (Rys. 12.56a). Obok niego, osadzono pasek polikrzemianowego filmu TPS-TMOS z enzymem AChE, na części podłoża z którego zdrapano przewodzące ITO, aby nie zakłócało pomiarów elektrochemicznych (Rys. 12.56b). Matrycę przygotowano wg Tab. 12.7, rozcieńczając otrzymany zol w enzymie w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 7 w stosunku 1:100. Pasek otrzymano przez naniesienie kropli o objętości 5 µl. Widoczny na zdjęciu (Rys. 12.56b) różowy kolor to nieprzewodząca warstwa izolacyjna, która ogranicza powierzchnię elektrody.



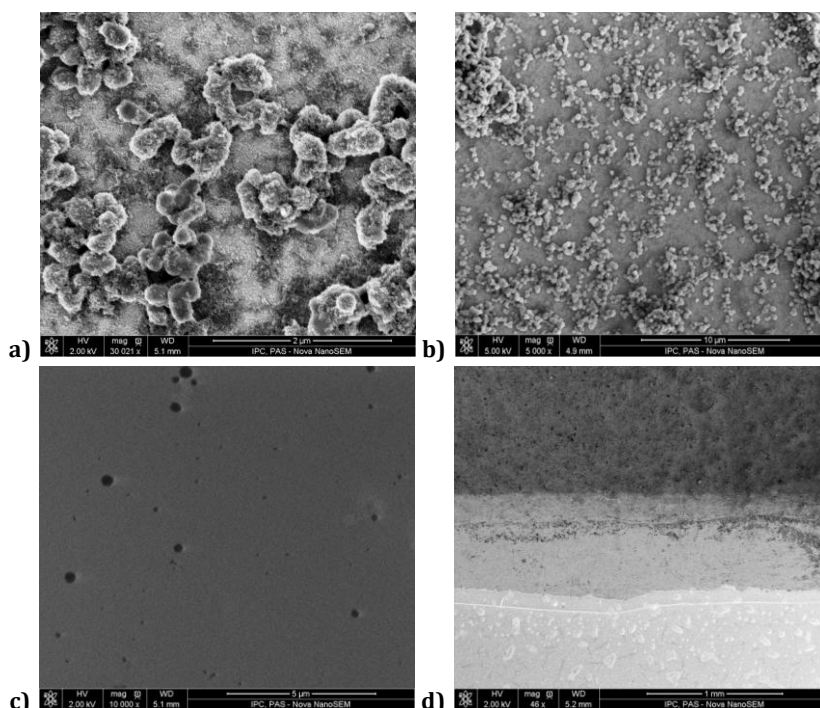
Rys. 12.56 a) Schemat elektrody paskowej TMA-CNP(6) z enzymem w matrycy TPS-TMOS, **b)** zdjęcie wykonanego prototypu.

Grubość polikrzemianowego filmu określono techniką AFM (Rys. 12.57a). Rys. 12.57a przedstawia fragment ITO i matrycy polikrzemianowej, natomiast Rys. 12.57b profil jej grubości ustalonej na 1,5 μm .



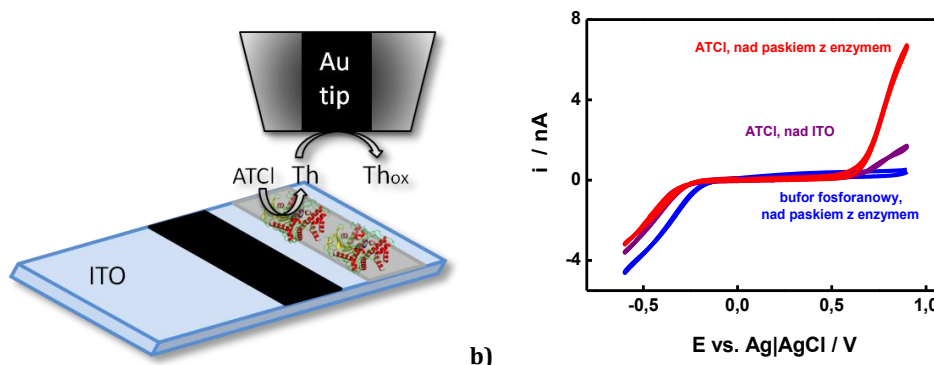
Rys. 12.57 Matryca polikrzemianowa TPS-TMOS-AChE(1mU sensor⁻¹): **a)** obraz AFM, **b)** profil jej grubości.

Na obrazach SEM paska TMA-CNP(6) widoczne są duże submikrocząstki polikrzemianowe pokryte agregatami CNP, ich rozkład na powierzchni ITO jest jednorodny (rys. 12.58a,b). Powierzchnia matrycy z enzymem TPS-TMOS jest w tej skali jednorodna i gładka (Rys. 12.58c). Widać także, że odległość pomiędzy paskami wynosi ok. 0,5 μm (Rys. 12.58d).



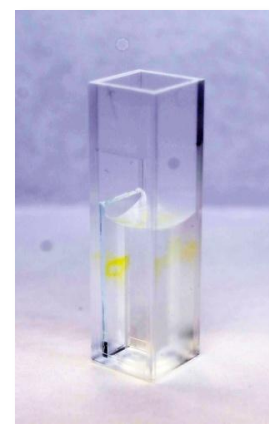
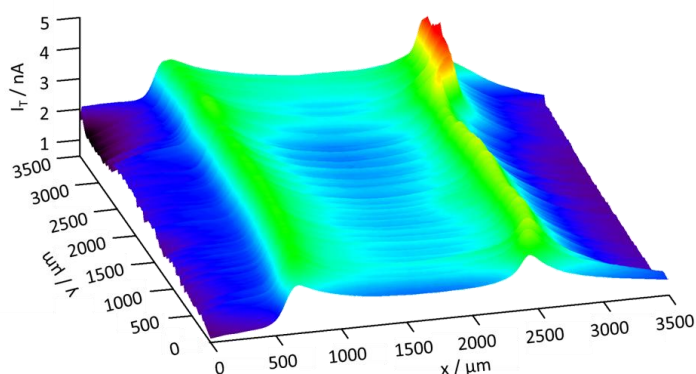
Rys. 12.58 Obrazy SEM: **a)** paska TMA-CNP(6), **b)** paska matrycy TPS-TMOS-AChE, **c)** paska matrycy TPS-TMOS-AChE, **d)** obu pasków jednocześnie.

Rozkład aktywności zaimmobilizowanego enzymu badano za pomocą wspomnianej już techniki SECM, używając złotej mikroelektrody skanującej ($d = 25 \mu\text{m}$). Skanowano znacznie większą powierzchnię niż poprzednio, $3,5 \times 3,5 \text{ mm}$, chcąc przedstawić rozkład enzymu w całym pasku TPS-TMOS (Rys. 12.59a). Do złotej mikroelektrody przykładano potencjał $0,85 \text{ V}$, aby utlenić generowaną enzymatycznie TC. Porównanie voltamperogramów zarejestrowanych na mikroelektrodzie umieszczonej nad paskiem z AChE i nad czystym ITO w elektrolicie zawierającym ATCl, oraz nad paskiem z AChE ale w nieobecności ATCl wskazuje na aktywność zaimmobilizowanego enzymu (Rys. 12.59b).



Rys. 12.59 a) Schemat układu użytego do zobrazowania aktywności enzymu w pasku TPS-TMOS-AChE, **b)** krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na złotej mikroelektrodzie w 5 mM ATCl w $0,1 \text{ M}$ buforze fosforanowym $\text{pH} = 7$, $E = 0,85 \text{ V}$, 1-e cykle, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

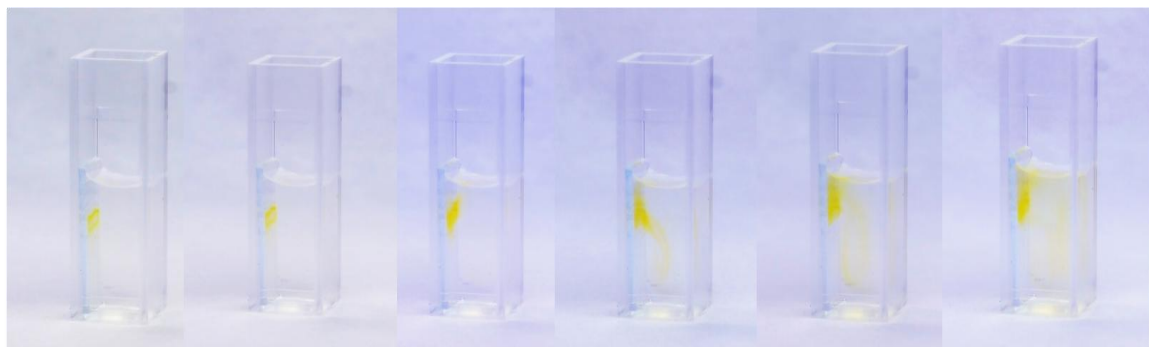
Mapa rozkładu enzymu w pasku przedstawia wzrost prądu utleniania głównie na brzegach paska (Rys. 12.60a). Oznacza to, że większość aktywnego enzymu znajduje się na brzegach paska i tam jest generowana TC, utleniana następnie na powierzchni skanującej mikroelektrody. Jest to tzw. *coffee ring effect*, który wynika ze zmian napięcia powierzchniowego w trakcie odparowywania rozpuszczalnika z kropli zawiesiny cząstek¹³.



Rys. 12.60 a) Mapa aktywności enzymu w wykonana techniką SECM nad paskiem TPS-TMOS-AChE w 5 mM ATCl , $0,1 \text{ M}$ buforze fosforanowym $\text{pH} = 7$, złota mikroelektroda skanująca, $E = 0,85 \text{ V}$, **b)** zdjęcie ITO pokrytego paskiem TPS-TMOS-AChE (5 mU sensor^{-1} , EE) zanurzonego w kuwecie wypełnionej mieszaniną Ellmana (Tab. 12.3).

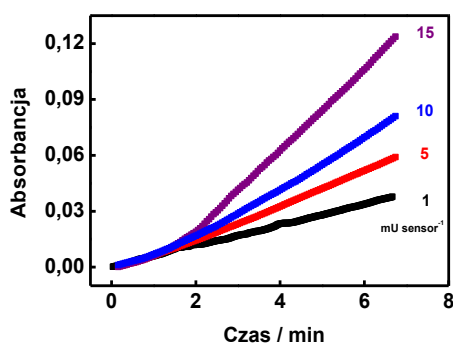
Obserwowany efekt potwierdzono innym doświadczeniem (Rys. 12.60b). W kuwecie spektrofotometrycznej umieszczono ITO z paskiem TPS-TMOS-AChE oraz mieszaninę służącą do określania aktywności enzymu (Tab. 12.3), zawierającą barwnik DTNB, który w obecności TC tworzy produkt o żółtej barwie. Na Rys. 12.60b widać, że żółty kolor pojawia się przede wszystkim na brzegach paska, gdzie enzymu jest najwięcej, a w jego środku pozostaje bezbarwna przestrzeń. Pozostawiając elektrodę na dłuższy czas (30 min) w mieszaninie

Ellmana, można zaobserwować dyfuzję żółtego produktu reakcji barwnika z TC. (Rys. 12.61). Początkowo widoczna jest wędrowka produktu w górę, a dopiero w następnej kolejności w dół i w głąb roztworu. Eksperyment pokazuje niską wydajność enzymu i wskazuje, że dogodnie jest prowadzić eksperyment w kropli w której liczba moli analitu jest mniejsza. Stosując enzym o niskiej aktywności możliwe jest osiągnięcie satysfakcjonujących rezultatów. Prowadzenie eksperymentu w roztworze wymaga użycia enzymu o większej aktywności, co z uwagi na jego cenę nie jest korzystne.



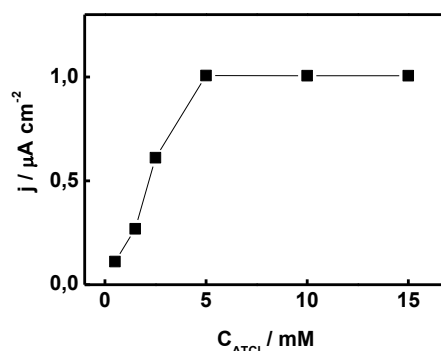
Rys. 12.61 ITO z naniesionym paskiem TPS-TMOS-AChE, zanurzonym w mieszaninie Ellmana (Tab. 12.3), kolejne zdjęcia wykonane w ciągu 30 minut obrazujące dyfuzję TC.

W tym samym układzie przeprowadzono pomiar spektrofotometryczny przy długości fali 412 nm, dla pasków TPS-TMOS-AChE zawierających enzym o różnej aktywności 1, 5, 10, 15 mU sensor⁻¹. W tym przypadku roztwór mieszano za pomocą specjalnie dostosowanego mieszadła magnetycznego. Nachylenie zarejestrowanych krzywych, czyli szybkość zmiany absorbancji zależy od aktywności unieruchomionego enzymu (Rys. 12.62).



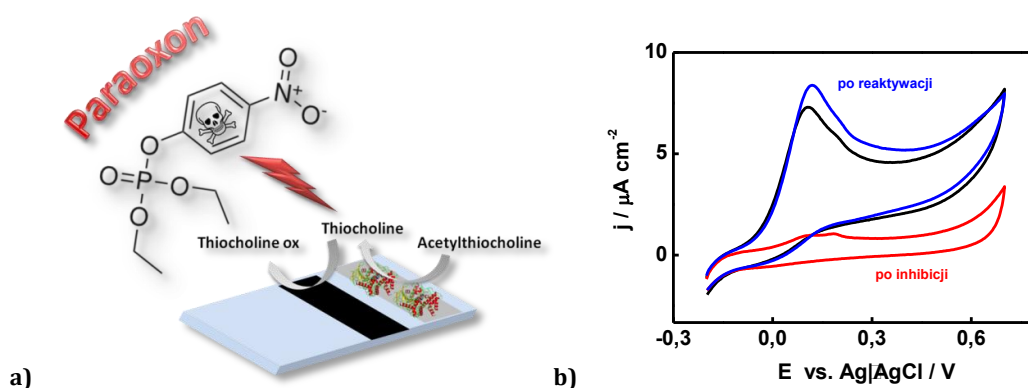
Rys. 2.62 Zmiana absorbancji w czasie, rejestrowana przy długości fali 412 nm, dla ITO z paskiem TPS-TMOS-AChE o różnej aktywności, zanurzonym do mieszaniny Ellmana (Tab. 3), roztwór mieszany mieszadłem magnetycznym.

Na podstawie krzywej kalibracyjnej dla ATCl wykonanej na paskowej elektrodzie TMA-CNP(6)-TPS-TMOS-AChE(1mU sensor⁻¹) oszacowano optymalną wartość stężenia ATCl dla tego typu układu na 5 mM (Rys. 2.63). Eksperymenty prowadzono w układzie trójelektrodowym w kropli o objętości 50 µl.



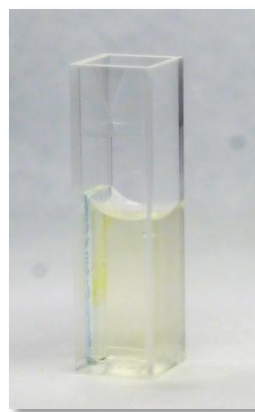
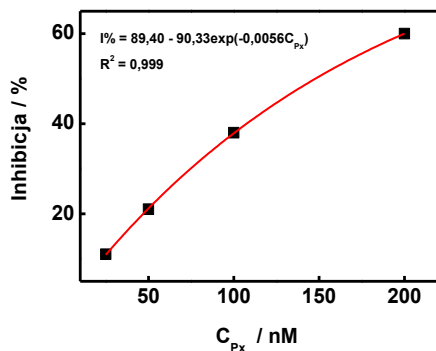
Rys. 12.63 Krzywa kalibracyjna dla ATCl zarejestrowana elektrodzie paskowej TMA-CNP(6)-TPS-TMOS-AChE (1 mU sensor⁻¹, EE) chronoamperometrycznie sukcesywnie dodając stężonej ATCl do 0,1 M buforu fosforanowego pH = 7, eksperyment wykonywany w kropli 50 μl, $E = 0,25$ V.

Tak zaprojektowany paskowy bioczuJNIK OP działa wg schematu zamieszczonego na Rys. 12.64a. Zarejestrowane voltamperogramy cykliczne utleniania TC przedstawiają zarówno inhibicję enzymu przez Px, jak i jego reaktywację przez inkubację w roztworze 2-PAM (Rys. 12.64b).



Rys. 12.64 a) Schemat działania czujnika paskowego TMA-CNP(6)-TPS-TMOS-AChE, **b)** Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane na paskowej elektrodzie TMA-CNP(6)-TPS-TMOS-AChE (5 mU sensor⁻¹, EE) przed inhibicją (czarna krzywa) i po inhibicji w 10⁻⁶ M Px w dejonizowanej wodzie przez 30 min (czerwona krzywa) oraz po reaktywacji w 5 mM 2-PAM (niebieska krzywa) w 5 mM ATCl w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 7, 2-gie cykle, $v = 10$ mV s⁻¹.

Krzywa kalibracyjna dla Px rejestrowana na elektrodach paskowych z enzymem w TPS-TMOS-AChE (1 mU sensor⁻¹, EE), w zakresie stężeń 25-200 nM przedstawiona jest na Rys. 12.65a. Granica wykrywalności Px wynosi 25 nM ($I = 10\%$). Pomiar inhibicji prowadzono rejestrując krzywą chronoamperometryczną w czystym buforze fosforanowym. Następnie pokrywano elektrodę 50 μl kroplą roztworu 5 mM ATCl i czekali 10 min na wygenerowanie TC, po czym znów rejestrowano krzywą chronoamperometryczną. Ważnym etapem jest otrzymanie dokładnie takich samych krzywych przed pomiarem inhibicji, czyli także dokładne wymycie TC i ATCl z powierzchni elektrody. W eksperymencie przeprowadzonym w mieszaninie Ellmana, po inkubacji w roztworze Px, prawie niewidoczny jest obserwowany wcześniej żółty kolor (Rys. 12.65b). Potwierdza to toksyczne działanie Px na enzym i jego dezaktywację.

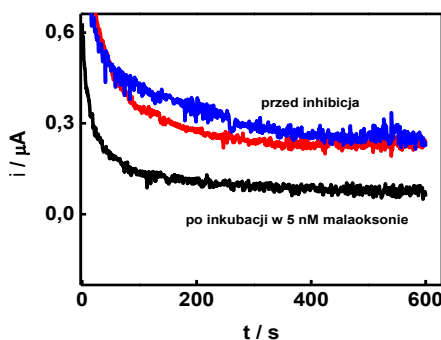
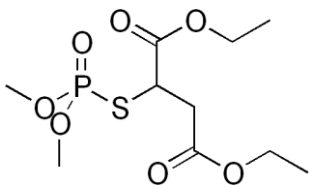


a)

b)

Rys. 12.65 a) Krzywa kalibracyjna dla paraoksonu zarejestrowana na paskowej elektrodzie TMA-CNP(6)-TPS-TMOS-AChE(1 mU sensor⁻¹, EE), chronoamperometrycznie w 5 mM ATCl w 0,1 M buforze fosforanowym pH=7, czas inkubacji wynosił 30 min, $E = 0,25$ V, **b)** zdjęcie ITO z naniesionym paskiem TPS-TMOS-AChE(5mU sensor⁻¹, EE) po inhibicji w 10⁻⁶ M Px zanurzonym w mieszaninie Ellmana (Tab. 12.3).

W pasku TPS-TMOS unieruchomiono także enzym genetycznie modyfikowany B394 (1mU sensor⁻¹) i przeprowadzono inhibicję innym pestycydem, malaoksonem (Mx), na który ten enzym jest bardzo czuły (Rys. 12.66a). Czas inkubacji elektrody skrócono do 10 min. Krzywa chronoamperometryczna wskazuje na silną inhibicję enzymu (Rys. 12.66b).

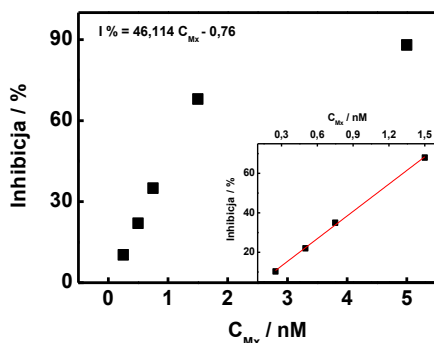


a)

b)

Rys. 12.66 a) Wzór strukturalny malaoksonu ¹⁴, **b)** chronoamperogram zarejestrowany na elektrodzie paskowej TMA-CNP(6)-TPS-TMOS-AChE(1 mU sensor⁻¹, B394) przed (niebieska i czerwona krzywa) i po inhibicji przez 5 nM Mx w dejonizowanej wodzie przez 10 min; 5 mM ATCl w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 7, $E = 0,25$ V.

Sporządzono krzywą kalibracyjną dla Mx w zakresie stężenia 0,25-5,0 nM z liniową zależnością w zakresie 0,25-1,5 nM (Rys. 12.67). Granicę wykrywalności wyznaczono na 0,25 nM ($I = 10\%$) i jest ona niższa od wymaganej przez przepisy Unii Europejskiej.



Rys. 12.67 Krzywa kalibracyjna dla Mx na paskowej elektrodzie TMA-CNP(6)-TPS-TMOS-AChE(1 mU sensor⁻¹, B394), wykonana chronoamperometrycznie w 5 mM ATCl w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 7, czas inkubacji: 10 min, $E = 0,25$ V.

Rys. 12.68 prezentuje zdjęcia stosowanego układu pomiarowego do czujnika paskowego.

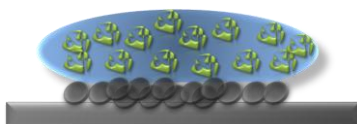


Rys. 12.68 Fotografia układu pomiarowego dla elektrod paskowych TMA-CNP(6)-TPS-TMOS-AChE z elektrodą chlorosrebrową umieszczoną w pipecie szklanej.

Podsumowując, opracowano nowy bioczujnik OP, w którym rozdzielono element generujący TC zawierający enzym, od powierzchni elektroaktywnej umożliwiającej utlenienie TC i rejestrację sygnału amperometrycznego. Do immobilizacji dwóch rodzajów AChE (EE i B394) użyto matrycy TPS-TMOS. Czujnik scharakteryzowano za pomocą AFM, SEM, SECM i technik elektrochemicznych. Zarejestrowano krzywe kalibracyjne dla dwóch wybranych pestycydów: paraoksonu i malaoksonu.

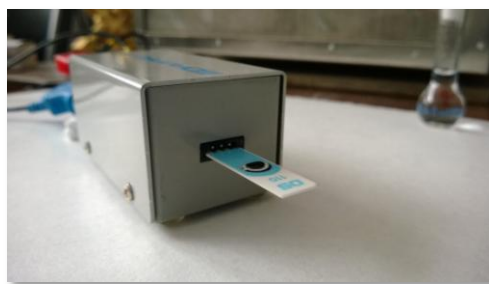
12.3.3 Sitodrukowane komercyjne elektrody węglowe modyfikowane nanocząstkami węgla

W kolejnym etapie, do prac nad czujnikiem OP zaadoptowano elektrodę sitodrukowaną modyfikowaną kroplą zawiesiny CNP w ACN ($2 \mu\text{l}$, $2,5 \text{ mg ml}^{-1}$) zaprezentowaną w podrozdziale 12.2.3. Do unieruchomienia enzymu użyto matrycy polikrzemianowej modyfikowanej dodatnimi grupami funkcyjnymi (TMA-TMOS), ponieważ stabilizuje CNP i normuje pracę elektrody.



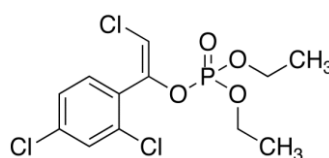
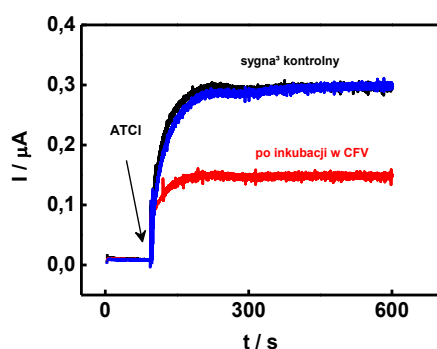
Rys. 12.69 Schemat elektrody DS-CNP-TMA-TMOS-AChE.

W tym przypadku zastosowano bardziej czuły na działanie OP enzym B394, umożliwiający osiągnięcie niższej LOD. W matrycy TMA-TMOS unieruchamiano enzym o aktywności 1 mU sensor^{-1} przez rozcieńczenie zolu (Tab. 12.5) w roztworze enzymu w $0,1 \text{ M}$ buforze fosforanowym $\text{pH} = 7$ w stosunku 1:100. Następnie $5 \mu\text{l}$ mieszaniny osadzono na powierzchni elektrody. Po wyschnięciu czujnik był gotowy do użycia i nie wymagał poprzedniego kondycjonowania. Rys. 12.70 przedstawia zestaw pomiarowy i prototypowy czujnik. Wszystkie pomiary elektrochemiczne przeprowadzane były w kropli o objętości $50 \mu\text{l}$, co ułatwia pracę i zmniejsza koszty czujnika.



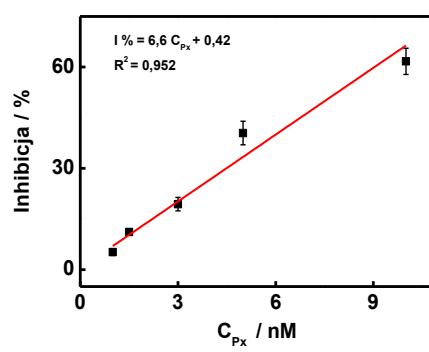
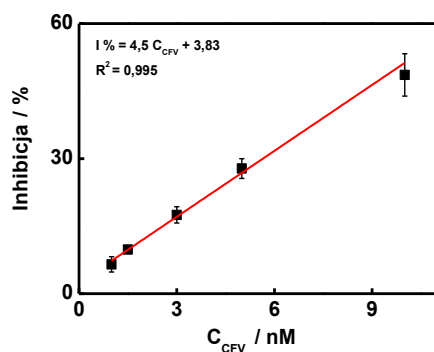
Rys. 12.70 Zdjęcie stosowanego układu pomiarowego dla elektrod DS-CNP-TMA-TMOS-AChE.

Na chronoamperogramie (Rys. 12.71a) zarejestrowanym dla takiego typu czujnika przed i po inkubacją w 10 nM chlorfenwinfosie (CFV, Rys. 12.71b) widoczne jest znaczące obniżenie sygnału prądowego. Wskazuje to na bardzo toksyczne działanie pestycydu na AChE. Elektrode inkubowano przez 10 min w CFV rozpuszczonym w butelkowanej wodzie pitnej „Żywiec-Zdrój”.



a) Chronoamperogram zarejestrowany na elektrodzie DS-CNP-TMA-TMOS-AChE przed (niebieska i czarna krzywa) i po inkubacji w 10 nM CFV w wodzie butelkowanej „Żywiec-Zdrój” (czerwona krzywa); 5 mM ATCl w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 7, czas inkubacji: 10 min, $E = 0,3$ V, b) wzór strukturalny chlorfenwinfosu ¹⁵.

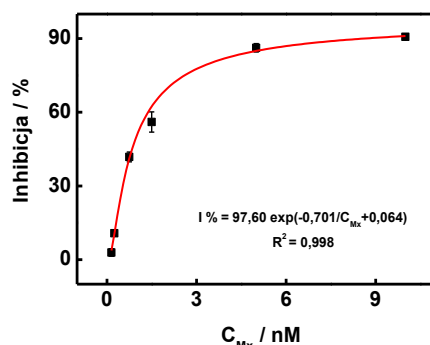
Rys. 12.72a przedstawia krzywą kalibracyjną opracowaną dla CFV w zakresie stężeń 1,0-10 nM. Granica wykrywalności wynosiła 1,5 nM ($I = 10\%$). Sensor DS-CNP-TMA-TMOS-AChE badano też pod kątem czułości na inny OP, paraokson (Rys 12.72b). W tym przypadku zaobserwowano bardzo zbliżone zachowanie układu jak dla CFV. LOD także wyniosło 1,5 nM ($I = 10\%$).



a) Krzywa kalibracyjna otrzymana na elektrodzie DS-CNP-TMA-TMOS-AChE dla: a) chlorfenwinfosu, b) paraoksonu w wodzie butelkowanej; czas inkubacji: 10 min, 5 mM ATCl, 0,1 M bufor fosforanowy pH = 7, $E = 0,3$ V.

Kolejnym OP jaki poddano badaniu na powyższym czujniku był malaokson (Mx). Krzywą kalibracyjną przygotowano w zakresie stężeń 0.15-10 nM Mx (Rys. 12.73a) w wodzie

butelkowanej. LOD ustalono na 0,25 nM ($I = 10\%$). Obecność atomu siarki w strukturze Mx może powodować większą toksyczność i inhibitorowe działanie na AChE. Stąd wynika niższa granica wykrywalności dla tego pestycydu. Pomiary przeprowadzono także w wodzie dejonizowanej i nie odbiegały one od rejestrowanych w wodzie butelkowanej.



Rys. 12.73 Krzywa kalibracyjna otrzymana na elektrodzie DS-CNP-TMA-TMOS-AChE(B394) dla Mx w wodzie butelkowanej, czas inkubacji 10 min, 5 mM ATCl, 0,1 M bufor fosforanowy pH = 7, $E = 0,3$ V.

Badano wpływ czasu przechowywania czujnika na jego pracę, monitorując stopień inhibicji dla uzyskanej wartości LOD danego pestycydu po różnym czasie przechowywania w temperaturze 4°C. Okazało się, że wszystkie czujniki zachowują LOD na poziomie 10% nawet po miesiącu przechowywania w takich warunkach. Co prawda obserwowano spadek rejestrowanego sygnału amperometrycznego, związany ze spadkiem aktywności AChE, ale nie miało to ogólnego wpływu na stopień inhibicji enzymu przez OP.

Podsumowując, w niniejszym podrozdziale przedstawiono czujnik pestycydów przygotowany w oparciu o komercyjne podłoże sitodrukowane modyfikowane CNP przez osadzenie z kropli. Enzym, AChE B394 unieruchomiono w matrycy polikrzemianowej TMA-TMOS. Sensor poddano testom pod kątem detekcji trzech pestycydów: chlorfeninfosu, paraoksonu oraz malaoksonu w butelkowanej wodzie pitnej.

12.3.4 Sitodrukowane elektrody węglowe przygotowane w warunkach laboratoryjnych domieszkowane nanocząstkami węgla

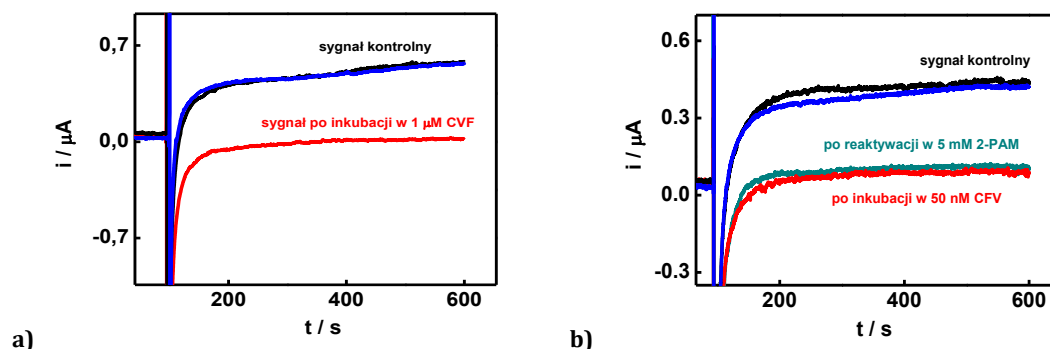
Enzym AChE (B394) unieruchomiono w matrycy TMA-TMOS na sitodrukowanych elektrodach węglowych z domieszką CNP, przygotowanych w warunkach laboratoryjnych, SPEL-CCNP-TMA-TMOS-AChE (Rys. 12.74).



Rys. 12.74 Fotografie układu pomiarowego dla elektrod SPEL-CCNP-TMA-TMOS-AChE.

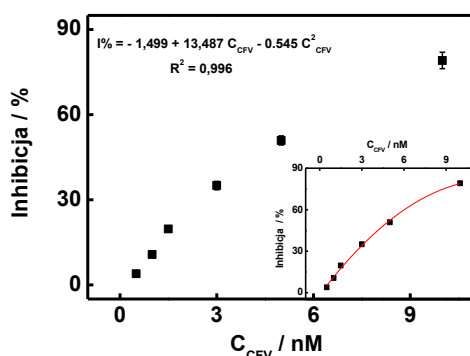
Przygotowany czujnik poddano badaniom pod kątem inhibicji CFV (Rys. 12.75a). Użyto wcześniej ustalony potencjał utleniania TC, 0,2 V (Rozdz. 12.2.4). Rys. 12.75 przedstawia

całkowitą dezaktywację enzymu po 10 min inkubacji elektrody w stężonym CFV. Na Rys. 12.75b widać zaś częściową utratę aktywności AChE po działaniu 50 nM CFV. Reaktywacja zainhibitowanego enzymu B394 nie była możliwa (Rys. 12.75b, czarna krzywa). Oznacza to, że tego rodzaju czujnik można stosować wyłącznie jednorazowo.



Rys. 12.75 Chronoamperogram zarejestrowany na SPEL-CCNP-TMA-TMOS-AChE przed (czarne i niebieskie krzywe) i po inhibicji (czerwone krzywe) za pomocą **a)** 1 μM CFV, **b)** 50 nM CFV w wodzie butelkowanej oraz po reaktywacji w 5 mM 2-PAM (zielona krzywa); 5 mM ATCl w 0,1 M buforze fosforanowym pH=7, czas inkubacji: 10 min, $E = 0,2$ V.

Rys. 12.76 przedstawia krzywą kalibracyjną w zakresie stężeń 0,5-10 nM CFV. LOD ustalono na 1 nM ($I = 10\%$), co jest lepszym wynikiem od rejestrowanego na DS-CNP-TMA-TMOS-AChE (1,5 nM). Może być to powiązane z mniejszą szorstkością elektrody, a tym samym innym rozkładem enzymu na powierzchni i dostępności OP do centrów aktywnych AChE.

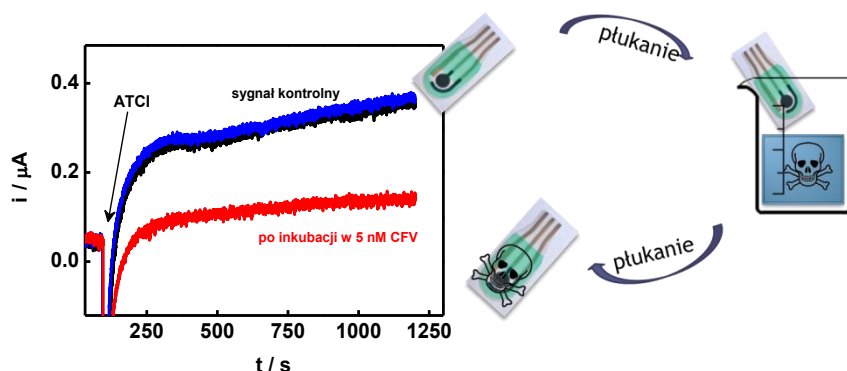


Rys. 12.76 Krzywa kalibracyjna otrzymana na elektrodzie SPEL-CCNP-TMA-TMOS-AChE dla CFV w wodzie butelkowanej, 5 mM ATCl w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 7, czas inkubacji: 10 min, $E = 0,1$ V.

Do unieruchomienia AChE(B394) na elektrodzie sitodrukowanej zastosowano także inną metodę niż pułapkowanie w matrycy polikrzemianowej. Było nią unieruchomienie w usieciowanej warstwie alkoholu poliwinylowego (PVA). Do tego celu użyto prepolimeru PVA z grupami azydkowymi (PVA-AVP) które ulegają całkowitej polimeryzacji pod wpływem światła UV, zamykając w swej strukturze molekuly enzymu (Rozdz. 3.3.2). W celu immobilizacji enzymu przygotowano mieszaninę w stosunku objętościowym 1:1, PVA-AVP z roztworem enzymu rozcieńczonego w dejonizowanej wodzie. Następnie powierzchnię elektrody SPEL-CCNP pokryto kroplą mieszaniny o objętości 3 μl i pozostawiano w temperaturze 4°C na 72 godz. pod ciągłym działaniem światła halogenowego (SPEL-CCNP-PVA-AChE).

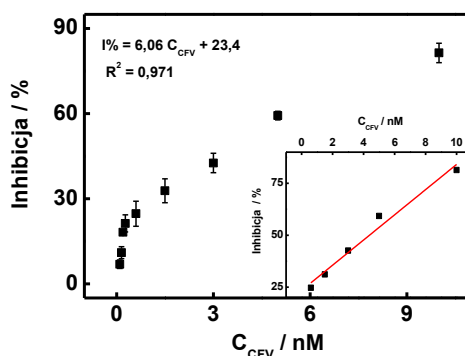
Przed przeprowadzeniem eksperymentów elektrochemicznych elektroda wymagała wstępnego kondycjonowania przez 10 min w 0,1 M buforze fosforanowym pH = 7, w celu ekspansji wiązań polimerowych dla ułatwienia dostępu analitu i OP do centrów aktywnych

AChE. Dłuższy był także czas prowadzenia eksperymentu. Czujnik badano pod kątem wykrywania CFV (Rys. 12.77).



Rys. 12.77 Chronoamperogram zarejestrowany na elektrodzie SPEL-CCNP-PVA-AChE przed (niebieska i czarna krzywa) i po inkubacji w 5 nM CFV w wodzie butelkowanej przez 10 min (czerwona krzywa); 5 mM ATCl w 0,1 M buforze fosforanowym pH=7, $E = 0,2$ V.

W zakresie stężeń 0,6-10 nM zaobserwowano liniową zależność procentu inhibicji od stężenia CFV (Rys. 12.78, wstawka). LOD oznaczono na 0,15 nM ($I = 10\%$) i nie uległ zmianie po 4 tygodniach przechowywania w 4°C. Widać znaczący wpływ sposobu immobilizacji enzymu i PVA wydaje się być jednym z najlepszych, szczególnie do oznaczania CFV.



Rys. 12.78 Krzywa kalibracyjna otrzymana na elektrodzie SPEL-CCNP-TMA-TMOS-AChE dla CFV w wodzie butelkowanej, czas inkubacji elektrody 10 min, 5 mM ATCl, 0,1 M bufor fosforanowy pH = 7, $E = 0,2$ V.

Podsumowując, z powodzeniem zaadaptowano elektrodę sitodrukowaną w warunkach laboratoryjnych (SPEL-CCNP) do skonstruowania bioczuJNIKA chlorfewinfosu. Enzym (B394) unieruchomiono w dwojaki sposób: w matrycy polikrzemianowej oraz w usieciowanym alkoholu poliwinylowym. Ten ostatni umożliwia uzyskanie niższej granicy wykrywalności od wymaganej przez przepisy Unii Europejskiej.

W Tab. 12.9 zaprezentowano porównanie wszystkich opracowanych bioczuJNIKÓW OP z danymi literaturowymi oraz wymogami narzuconymi przez dyrektywy UE. Przedstawione w niniejszym rozdziale czujniki OP charakteryzują się zbliżonymi parametrami do opisanych w literaturze. Czułość takiego sensora zależy przede wszystkim od zastosowanego enzymu oraz od sposobu jego immobilizacji. Wymogi UE zostały spełnione dla czujnika malaoksonu i chlorfenwinfosu. Mogą one zostać z powodzeniem użyte do jednorazowej detekcji tych OP w wodzie pitnej.

Tab. 12.9 Porównanie opracowanych czujników pestycydów z doniesieniami literaturowymi.

Rodzaj pestycydu fosforoorganicznego	Rodzaj elektrody	Sposób unieruchomienia/ rodzaj enzymu	LOD wymagane przez UE [nM]	LOD otrzymane [mol l ⁻¹]	Źródło
Paraokson (Px)	SPE-MWCNT-CoPh	PVA-SBQ-AChE(EE)	3,6 × 10 ⁻¹⁰	1,1 × 10 ⁻⁸	16
	SPE-CB	Aldehyd glutarowy-BChE		2,0 × 10 ⁻⁸	17
	SPE-MWCNT	Osadzanie z kropli-AChE(EE)		5,0 × 10 ⁻¹⁰	18
	SPE-PB	Aldehyd glutarowy-AChE		7,5 × 10 ⁻⁹	8
	TMA-CNP(6)	TMA-TMOS-AChE(EE)		5,0 × 10 ⁻⁸	niniejsza praca
	Pasek TMA-CNP(6)	TPS-TMOS-AChE(EE)		2,5 × 10 ⁻⁸	
	DS-CNP	TMA-TMOS-B394		1,5 × 10 ⁻⁹	
TEPP	TMA-CNP(6)	TMA-TMOS-EE	3,4 × 10 ⁻¹⁰	5,0 × 10 ⁻⁸	niniejsza praca
	Light addressable potentiometric sensor	Celuloza-biotynowany AChE(EE)		1,0 × 10 ⁻⁸	19
Malaokson (Mx)	SPE-SWCNT-CoPh	PVA-SBQ-AChE(EE)	3,2 × 10 ⁻¹⁰	6,4 × 10 ⁻⁹	16
	SPE-CoPh	PVA-AChE(B394)		6,4 × 10 ⁻¹¹	20
	SPE-CoPh	zol-żel-AChE(EE)		3,6 × 10 ⁻⁹	21
	Pasek TMA-CNP(6)	TPS-TMOS-B394		2,5 × 10 ⁻¹⁰	niniejsza praca
	DS-CNP	TMA-TMOS-B394		2,5 × 10 ⁻¹⁰	
Chlorfenwinfos (CFV)	SPE-CoPh	PVA-AChE(B394)	2,7 × 10 ⁻¹⁰	1,5 × 10 ⁻¹⁰	20
	SPE-CoPh-cząstki magnetyczne	Powinowactwo-AChE(B394)		1,3 × 10 ⁻¹¹	22
	SPE-CoPh	PVA-AChE(EE)		1,3 × 10 ⁻⁷	22
		PVA-AChE(B394)		1,4 × 10 ⁻¹⁰	
	DS-CNP	TMA-TMOS-B394		1,5 × 10 ⁻⁹	niniejsza praca
SPEL-CCNP	TMA-TMOS-B394	1,0 × 10 ⁻⁹			
	PVA-B394	1,5 × 10 ⁻¹⁰			

12.4 Bibliografia

- (1) Ellman, G. L. *Arch. Biochem. Biophys.* **1959**, *82*, 70–77.
- (2) Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, V. J.; Featherstone, R. M. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88–95.
- (3) http://www.dropsens.com/en/screen_printed_electrodes_pag.html.
- (4) Jönsson-Niedziolka, M.; Szot, K.; Rogalski, J.; Opallo, M. *Electrochem. Commun.* **2009**, *11*, 1042–1044.
- (5) Arduini, F.; Majorani, C.; Amine, A.; Moscone, D.; Palleschi, G. *Electrochim. Acta* **2011**, *56*, 4209–4215.
- (6) Liu, G.; Riechers, S. L.; Mellen, M. C.; Lin, Y. *Electrochem. Commun.* **2005**, *7*, 1163–1169.
- (7) Arduini, F.; Cassisi, A.; Amine, A.; Ricci, F.; Moscone, D.; Palleschi, G. *J. Electroanal. Chem.* **2009**, *626*, 66–74.
- (8) Arduini, F.; Ricci, F.; Tuta, C. S.; Moscone, D.; Amine, A.; Palleschi, G. *J. Anal. Chim. Acta* **2006**, *580*, 155–162.
- (9) Rotariu, L.; Zamfir, L.-G.; Bala, C. *Sensors Actuators B Chem.* **2010**, *150*, 73–79.
- (10) Li, Y.; Bai, Y.; Han, G.; Li, M. *Sensors Actuators, B Chem.* **2013**, *185*, 706–712.
- (11) Bard, A. J.; Mirkin, M. V. *Scanning Electrochemical Microscopy, Second Edition*; Taylor & Francis, N.Y, 2012.
- (12) Arduini, F.; Guidone, S.; Amine, A.; Palleschi, G.; Moscone, D. *Sensors Actuators B Chem.* **2013**, *179*, 201–208.
- (13) Yunker, P. J.; Still, T.; Lohr, M. A.; Yodh, A. G. *Nature* **2011**, *476*, 308–311.
- (14) [Nohttps://sh.wikipedia.org/wiki/Malaokson](https://sh.wikipedia.org/wiki/Malaokson).
- (15) www.trc-canada.com.
- (16) Ivanov, A. N.; Younosov, R. R.; Evtugyn, G. a; Arduini, F.; Moscone, D.; Palleschi, G. *Talanta* **2011**, *85*, 216–221.
- (17) Arduini, F.; Forchielli, M.; Amine, A.; Neagu, D.; Cacciotti, I.; Nanni, F.; Moscone, D.; Palleschi, G. *Microchim. Acta* **2015**, *182*, 643–651.
- (18) Joshi, K. A.; Tang, J.; Haddon, R.; Wang, J.; Chen, W.; Mulchandani, A. *Electroanalysis* **2005**, *17*, 54–58.

- (19) Fernando, J. C.; Rogers, K. R.; Anis, N. a; Valdes, J. J.; Thompson, R. G.; Eldefrawi, a T.; Eldefrawi, M. E. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 511–516.
- (20) Galezowska, A.; Sikora, T.; Istamboulie, G.; Trojanowicz, M.; Polec, I.; Nunes, G. S.; Noguier, T.; Marty, J. *Sensors ans Mater.* **2008**, *20*, 299–308.
- (21) Ben Ouji, N.; Bakas, I.; Istamboulié, G.; Ait-Ichou, I.; Ait-Addi, E.; Rouillon, R.; Noguier, T. *Food Control* **2013**, *30*, 657–661.
- (22) Istamboulie, G.; Andreescu, S.; Marty, J.-L.; Noguier, T. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *23*, 506–512.

Celem niniejszej pracy doktorskiej było przygotowanie elektrod w oparciu o nanocząstki węgla, nanocząstki złota, nanorurki węglowe oraz submikrocząstki polikrzemianowe wykorzystując proste metody modyfikacji powierzchni, a także zrozumienie procesów na nich przebiegających oraz ich zastosowanie w bioogniwach lub czujnikach amperometrycznych.

Część literaturowa pracy stanowi omówienie dostępnej wiedzy w zakresie prowadzonych badań. Rozpoczęto ją od scharakteryzowania właściwości nanomateriałów węglowych oraz złotych, przede wszystkim pod kątem zastosowania jako materiału elektrodowego. Przedstawiono różne metody modyfikacji elektrod takimi nanostrukturami, jak metoda warstwa-po-warstwie, elektroforetyczne osadzanie oraz sitodruk. Następnie skupiono się na omówieniu biologicznych katalizatorów jakimi są enzymy: oksydaza bilirubiny i acetylocholinoesteraza. Przedstawiono sposoby ich immobilizacji na powierzchni elektrody, a dokładniej scharakteryzowano pułapkowanie w matrycy polikrzemianowej oraz w alkoholu poliwinylowym. Elektroda zmodyfikowana oksydazą bilirubiny może zostać użyta do skonstruowania bioogniwa paliwowego, dlatego stało się ono tematem kolejnego rozdziału niniejszej pracy. Omówiono enzymatyczne ogniwa paliwowe, poświęcając dużo uwagi na hybrydowe ogniwo cynkowo-tlenowe oraz paliwowe bioogniwo askorbinowo-tlenowe. Na koniec zaprezentowano różne rodzaje czujników amperometrycznych: sensor dopaminy, w którym wykorzystuje się właściwości elektrokatalityczne podłoża w stosunku do jej utleniania; czujnik pestycydów fosforoorganicznych, który z kolei opiera się na inhibicji acetylocholinoesterazy oraz amperometryczny czujnik tiocholiny, którego opracowanie jest pierwszym etapem przygotowania bioczujnika pestycydów.

Pierwsze prace eksperymentalne dotyczyły przygotowania, charakterystyki i zastosowania elektrod wykonanych z różnoimiennie naładowanych cząstek w oparciu o metodę warstwa-po-warstwie. W tym celu, w różnych konfiguracjach użyto: nanocząstki złota i węgla oraz zsyntezowane submikrocząstki polikrzemianowe. Materiały elektrodowe otrzymano wykorzystując oddziaływania elektrostatyczne grup funkcyjnych cząstek, nie stosując żadnych molekuł łączących. Poza naszym laboratorium takie podejście wykorzystywano bardzo rzadko. Ta prosta metoda umożliwia kontrolę stopnia pokrycia substratu, w tym przypadku ITO, przez liczbę zanurzeń/wynurzeń w zawiesinach cząstek. Pokrycie elektrody ma znaczący wpływ na właściwości elektrokatalityczne otrzymywanych podłoży. Strukturę osadzonych warstw scharakteryzowano za pomocą technik mikroskopowych jak SEM i AFM, ukazując ich bardzo zróżnicowaną powierzchnię. W przypadku elektrod zawierających nanocząstki złota, widma UV-Vis wykazały charakterystyczny pik SPR korespondujący z liczbą warstw. Przede wszystkim skupiono się na właściwościach elektrochemicznych i elektrokatalitycznych elektrod.

1. Synteza sfunkcjonalizowanych submikrocząstek polikrzemianowych – zmodyfikowaną metodą Stöbera, w oparciu o proces zol-żel. Zsyntezowano trzy rodzaje cząstek: pokryte dodatnio naładowanymi grupami funkcyjnymi: **TDA** i **TMA**, oraz ujemnie: **TPS**. Za pomocą woltamperometrii cyklicznej zbadano ich zdolność do akumulacji jonów: TDA – nie wykazały akumulacji (prawdopodobnie przez hydrofobowy charakter grup funkcyjnych cząstki), TMA – wykazały akumulację anionów heksacyanożelazianowych (III), TPS - wykazały niewielką akumulację kationów heksaaminorutenu (III). Cząstki te użyto do przygotowania elektrod metodą warstwa-po-

warstwie w połączeniu z nanocząstkami złota (Au-TPS) lub nanocząstkami węgla (TDA-CNP, TMA-CNP).

2. Elektrody złote, Au-Au(n) – otrzymane przez naprzemienne osadzanie różnoimiennie naładowanych nanocząstek złota na ITO. Stopień pokrycia ITO nanocząstkami złota zbadano woltamperometrycznie wykorzystując proces tworzenia tlenków złota, a także proces redukcji nadtlenu wodoru i utleniania *t*-BuFc. Zbadano katalizę reakcji redukcji tlenu w środowisku kwaśnym i zasadowym. Elektrody użyto do utleniania cysteiny, a także glukozy w środowisku zasadowym. Przedstawiono zmianę sygnału prądowego dla kilku wybranych stężeń tych związków. Elektrody wykazały bardzo dużą stabilność mechaniczną i złoty refleks dla grubszych depozytów. Oznacza to, że ta prosta metoda osadzania złotych filmów, może stanowić alternatywę dla już istniejących i popularnych technik.

3. Elektrody złoto-polikrzemianowe, Au-TPS(n) – otrzymane przez naprzemienne osadzanie różnoimiennie naładowanych nanocząstek złota i submikrocząstek polikrzemianowych na ITO. Pokrycie podłoża cząstkami zbadano woltamperometrycznie wykorzystując proces tworzenia tlenków złota, a także proces redukcji nadtlenu wodoru i utleniania *t*-BuFc. Elektrody z grubszym depozytem (Au-TPS(12)) wykazały akumulację kationów heksaaminoterutenu (III) i brak akumulacji anionów heksacyjanożelazianowych (III). Natomiast na elektrodzie pokrytej niewielką liczbą cząstek (Au-TPS(1)) obserwowano efekt odwrotny. Sugeruje to, że wraz z osadzaniem kolejnych warstw następuje zmiana początkowego dodatniego ładunku elektrody na ujemny. Elektrody te zastosowano do elektrokatalitycznej redukcji tlenu w środowisku kwaśnym. Zaobserwowano i zbadano efekt aktywacji powierzchni nanocząstek złota przez katodowe wydzielanie wodoru. Wykazano wpływ aktywacji na poprawę właściwości katalitycznych elektrody w stosunku do reakcji redukcji tlenu oraz utlenienia mieszaniny zawierającej hydrazynę, jony siarczanowe (IV) oraz jony azotanowe (III). Opisane cząstki TPS pokryte ujemnymi grupami funkcyjnymi po raz pierwszy użyto do przygotowania materiału elektrodowego.

4. Elektrody polikrzemianowo-węglowe, TDA-CNP(n), TMA-CNP(n) – otrzymane przez naprzemienne osadzanie różnoimiennie naładowanych nanocząstek węgla i submikrocząstek polikrzemianowych na ITO. Przygotowano dwa typy takich elektrod różniących się rodzajem cząstek polikrzemianowych (TDA lub TMA). Dla porównania przygotowano także elektrodę polikrzemianowo-węglową w oparciu o nanocząstki węgla i cienki polikrzemianowy film modyfikowany tymi samymi grupami funkcyjnymi co cząstki TMA (**TMA_{zol}-CNP**).

4.1. Ilość nanoszonego materiału kontrolowano ilością zanurzeń i wynurzeń. Wraz ze zwiększaniem osadzanego depozytu, wzrastał również rejestrowany prąd pojemnościowy ładowania warstwy podwójnej elektrod. Największą pojemność elektryczną wykazały elektrody TDA-CNP, najmniejszą TMA-CNP. TMA_{zol}-CNP, wbrew oczekiwaniom, wykazały ponad dwa razy większą pojemność od TMA-CNP – wiąże się to z dużą porowatością filmów polikrzemianowych.

4.2. Elektrody TDA-CNP wykazały zdolność do akumulacji kationu heksaaminorutenowego (III), brak akumulacji anionu heksacyjanożelazianowego (III) oraz nieodwracalną akumulację dianionu ABTS²⁻. Elektroda TMA-CNP wykazała niewielką akumulację Ru(NH₃)₆³⁺ oraz nieodwracalną akumulację Fe(CN)₆³⁻ i ABTS²⁻.

Natomiast elektroda TMA_{zol}-CNP wykazała zdolność do akumulacji zarówno kationów jak i anionów aktywnych redoks oraz niewielką odwracalną akumulację ABTS²⁻. Zbadano także akumulację jonów wyłącznie na warstwie TMA_{zol}. Okazało się, że blokowany jest proces utleniania-redukcji jonów Ru(NH₃)₆^{3+/2+}, natomiast na powierzchni akumulują się jony Fe(CN)₆³⁻. Potwierdza to występowanie dodatnio naładowanych grup funkcyjnych na filmie polikrzemianowym.

- 4.3. Wszystkie podłoża zawierające nanocząstki węgla wykazały powinowactwo do oksydazy bilirubiny. Na elektrodach z zaadsorbowanym na powierzchni enzymem obserwowano bezmediatorową katalizę reakcji redukcji tlenu bezpośrednio do wody. Najlepsze parametry odnotowano na elektrodzie TMA-CNP(12)-BOD: potencjał redukcji tlenu wynosił 0,6 V vs. Ag|AgCl, a otrzymana gęstość prądu to 200 μA cm⁻². Stosując sztuczną surowicę krwi jako elektrolit ze względu na wyższe pH i obecność jonów chlorkowych, zaobserwowano zmniejszenie prądu redukcji tlenu i obniżenie potencjału. Adsorpcja mediatora na powierzchni elektrody nie wpłynęła znacząco na polepszenie parametrów pracy elektrody.
- 4.4. Elektrody pokryte oksydazą bilirubiny zastosowano jako katodę w hybrydowych ogniwach cynkowo-tlenowych. Przygotowano trzy typy takich ogniw, w których anodę stanowił drut cynkowy pokryty Nafionem. Natomiast ogniwa różniły się rodzajem katody: TDA-CNP(6)-BOD, TMA-CNP(12)-BOD lub TMA_{zol}-CNP(12)-BOD. Zaobserwowano także korelację pomiędzy prądem redukcji tlenu na katodzie a otrzymywaną mocą ogniw. Najwyższe OCV wynoszące 1,69 V z maksymalną gęstością mocy równą 131 μW cm⁻² uzyskano dla ogniwa z katodą TMA-CNP(12)-BOD. Są to wartości wystarczające do zasilania niewielkich implantowanych urządzeń. Przygotowane ogniwa z powodzeniem pracowały także w sztucznej surowicy krwi.
- 4.5. Na elektrodach TMA-CNP(6) oraz TMA_{zol}-CNP(6) badano proces utleniania kwasu askorbinowego. Obydwie elektrody wykazały bardzo dobre właściwości katalityczne w stosunku do tej reakcji i posłużyły do zbudowania ogniw zasilanych AA:
(1) (-)TMA-CNP(6)|AA, bufor fosforanowy pH=4,8|TMA-CNP(12)-BOD-NF(+),
(2) (-)TMA_{zol}-CNP(6)|AA, bufor fosforanowy pH=4,8|TMA_{zol}-CNP(12)-BOD-NF(+)
Modyfikacja katody polimerem kationowymiennym, Nafionem, umożliwiła skuteczną ochronę katody przed niepożądanym utlenianiem paliwa i dezaktywacją enzymu. Maksymalną gęstość mocy 5,15 μW cm⁻² oraz OCV 0,57 V otrzymano dla ogniwa (1). Moc takiego ogniwa zależy od stężenia elektrolitu, dlatego może ono pełnić rolę samonapędzającego się czujnika kwasu askorbinowego.
- 4.6. W oparciu o elektrodę TDA-CNP, przygotowano amperometryczny czujnik dopaminy pozwalający na pomiar jej stężenia w obecności różnych substancji przeszkadzających, a przede wszystkim kwasu askorbinowego, kwasu moczowego i acetaminofenu. Czujnik ten testowano pod kątem stabilności pracy, czasu przechowywania, wpływu pH elektrolitu oraz stopnia pokrycia elektrody. Wyznaczona granica wykrywalności (0,1 μM) jest porównywalna z uzyskanymi na innych czujnikach amperometrycznych i umożliwia pomiar stężenia DA na poziomie występującym u ludzi zdrowych. Jest to wystarczające do wstępnej diagnostyki pacjentów.
- 4.7. Proces utleniania tiocholiny zbadano na dwóch rodzajach elektrod: TMA-CNP oraz TMA_{zol}-CNP. Obydwa podłoża wykazują właściwości elektrokatalityczne w stosunku do utleniania tiocholiny. Zastosowanie cząstek polikrzemianowych umożliwia kontrolę potencjału utleniania tiocholiny przez zmianę liczby osadzanych warstw.

Pozwala także na uzyskanie niskiej granicy wykrywalności (1,7 μM), i detekcję tiocholiny w szerokim zakresie liniowym krzywej kalibracyjnej (1,7-1300 μM). Zbadano także wpływ pH elektrolitu na zachodzący proces.

- 4.8.** Elektrode TMA-CNP(6) zmodyfikowano acetylocholinoestrazą (izolowaną z EE) przez adsorpcję z roztworu lub unieruchomienie w matrycy polikrzemianowej różnego typu: TMOS, OTEOS, TMA-TMOS, TPS-TMOS. Tak przygotowane elektrody posłużyły do inhibitorowej detekcji pestycydów fosforoorganicznych. Zoptymalizowano czas inkubacji elektrody w roztworze pestycydu, zbadano wpływ aktywności enzymu i stężenia substratu na rejestrowany sygnał. Na TMA-CNP(6)-TMA-TMOS-AChE oznaczono stężenia dwóch z nich: paraoksonu (LOD = 50 nM) oraz TEPP-u (LOD = 50 nM). Sfunkcjonalizowana matryca polikrzemianowa modyfikowana dodatkowo naładowanymi grupami funkcyjnymi, TMA-TMOS, zapewniła dogodne warunki do pracy enzymu i elektrody. Ponadto za pomocą SECM zbadano rozkład aktywności enzymu zaimobilizowanego na powierzchni elektrody.
- 4.9.** Opracowano nowy inhibitorowy biocujnik pestycydów, w którym rozdzielono element generujący tiocholinę (unieruchomiony enzym) od elementu utleniającego tiocholinę (powierzchnia elektroaktywna, TMA-CNP(6)). Czujnik stanowiły dwa równoległe osadzone paski na powierzchni ITO. Do immobilizacji dwóch rodzajów AChE (izolowanego z EE lub genetycznie modyfikowanego B394) użyto matrycy modyfikowanej ujemnymi grupami funkcyjnymi: TPS-TMOS. Zarejestrowano krzywe kalibracyjne dla dwóch wybranych pestycydów: paraoksonu (EE, LOD = 25 nM) i malaoksonu (B394, LOD = 0,25 nM, wartość niższa od wymaganej przez UE). Za pomocą SECM zobrazowano rozkład aktywności enzymu w całej szerokości paska. Okazało się, że enzym akumuluje się głównie na jego brzegach. Taka struktura inhibitorowego czujnika pestycydów jest przydatna, gdy elektrody są niestabilne mechanicznie po immobilizacji na nich enzymu.

Poza metodą warstwa-po-warstwie do modyfikacji elektrod nanostrukturami, zastosowano także inne metody, a przygotowane podłoża znalazły zastosowanie jako czujniki tiocholiny oraz niektóre z nich jako czujniki pestycydów fosforoorganicznych.

- 5. Metoda osadzania elektroforetycznego nanocząstek węgla na powierzchni ITO.** W ten sposób przygotowano stabilne elektrody wykazujące bardzo dobre właściwości katalityczne w stosunku do utleniania tiocholiny (LOD = 10,7 μM). Jest to innowacyjna i przyszłościowa metoda pozwalająca utworzyć w krótkim czasie i w powtarzalny sposób, materiały elektrodowe zbudowane wyłącznie z nanocząstek węgla. Metodę zoptymalizowano stosując różne stężenia zawiesiny cząstek w acetonitrylu, przykładane napięcie i czas osadzania. Powierzchnię elektrod scharakteryzowano za pomocą SEM i AFM.
- 6. Unieruchomienie nanocząstek lub nanorurek węglowych w matrycy polikrzemianowej na powierzchni ITO.** W tym celu zastosowano trzy rodzaje matryc opartych o różne prekursory polikrzemianowe: TMOS, OTEOS oraz mieszaninę TMOS i TMA. Wszystkie przygotowane podłoża wykazywały dużą stabilność i elektrokatalizę w stosunku do utleniania tiocholiny przy niskim potencjale. Metoda ta może być pomocna do modyfikacji różnych powierzchni. Wykazano, że inne materiały węglowe, jak nanorurki, mogą być równie dobrymi katalizatorami utleniania tiocholiny co nanocząstki.

7. Unieruchomienie nanocząstek węgla lub nanorurek węglowych przez odparowanie rozpuszczalnika z kropli zawiesiny na węglowej elektrodzie sitodrukowanej. Elektrody sitodrukowane zasługują na szczególną uwagę ze względu na możliwość ich komercjalizacji. Ta prosta metoda modyfikacji pozwoliła otrzymać stabilne mechanicznie podłoża i znacząco poprawić właściwości katalityczne elektrody.

7.1. Elektrody przygotowane tą metodą zastosowano do oznaczania tiocholiny. Zmiana objętości kropli zawiesiny nanostruktur, użytej do modyfikacji elektrod sitodrukowanych, powodowała zmianę właściwości katalitycznych elektrody. Na elektrodzie modyfikowanej nanocząstkami węgla granica wykrywalności tiocholiny wyniosła 20 μM , zakres liniowy krzywej kalibracyjnej obserwowano w szerokim zakresie stężeń. Wpływ nanocząstek na usprawnienie procesu katalizy dowiedziono także metodą wirującej elektrody dyskowej. Powierzchnię elektrod scharakteryzowano za pomocą SEM.

7.2. Na elektrodzie pokrytej nanocząstkami węgla unieruchomiono acetylocholinoesterazę (B394) w matrycy polikrzemianowej TMA-TMOS. Posłużyła ona do oznaczania pestycydów fosforoorganicznych w butelkowanej wodzie pitnej. W ten sposób przygotowano czujnik chlorfenwinfosu (LOD = 1,5 nM), malaoksonu (LOD = 0,25 nM, wartość niższa od wymaganej przez UE) i paraoksonu (LOD = 1,5 nM).

8. Modyfikacja elektrod sitodrukowanych przez dodatek nanocząstek węgla do komercyjnej pasty węglowej, SPEL-CCNP. Jest to szczególnie ważna elektroda ze względu na możliwość potencjalnej komercjalizacji. W tym przypadku nanocząstki węgla dodano do pasty węglowej służącej do wydruku elektrod, otrzymując stabilne mechanicznie podłoża.

8.1. Elektrody te znalazły zastosowanie do oznaczania tiocholiny, której granica wykrywalności wyniosła 50 μM . W porównaniu do elektrod opisanych w pkt. 7.1, obserwowano większy prąd tła, która miał wpływ na czułość elektrody. Powierzchnię elektrod scharakteryzowano za pomocą SEM.

8.2. Na elektrodzie zaimmobilizowano acetylocholinoesterazę (B394) przez pułapkowanie w matrycy polikrzemianowej lub w usieciowanym alkoholu poliwinylowym. Tak przygotowana elektroda posłużyła do detekcji pestycydów fosforoorganicznych w butelkowanej wodzie pitnej: chlorfenwinfosu (1 nM, matryca polikrzemianowa; 0,15 nM, alkohol poliwinylowy, wartość niższa od wymaganej przez UE). Alkohol poliwinylowy jest lepszym środowiskiem dla inhibicji enzymu przez chlorfenwinfos.

Podsumowując, w niniejszej pracy przedstawiono szereg materiałów elektrodowych wykazujących bardzo dobre właściwości elektrokatalityczne i wszechstronne zastosowanie. Utworzono je prostymi i tanimi metodami ułatwiającymi komercjalizację i pozwalającymi na modyfikację powierzchni o różnych kształtach.

Spośród czujników tiocholiny, najniższą granicę wykrywalności uzyskano na elektrodzie OTEOS-CNP i TMA-CNP(6) (porównanie w Tab. 12.6, str. 153). Przygotowanie różnych elektrod czułych na tiocholiny dało możliwość wyboru najlepszej do skonstruowania bioczujnika pestycydów fosforoorganicznych. Wyboru dokonano pod kątem metodologii późniejszych pomiarów, dla których szczególnie odpowiednie okazały się elektrody sitodrukowane.

Wśród opracowanych biocujników pestycydów fosforoorganicznych (porównanie w Tab. 12.9, str. 172) najniższą granicę wykrywalności odnotowano dla chlorfeninfosu na elektrodzie sitodrukowanej (SPEL-CCNP) modyfikowanej enzymem unieruchomionym w alkoholu poliwinylowym. Natomiast zastosowanie matrycy polikrzemianowej do immobilizacji enzymu sprawdziło się w oznaczaniu innego pestycydy – malaoksonu.

Spośród przedstawionych elektrod za najbardziej rozwojową można uznać elektrodę polikrzemianowo-węglową utworzoną metodą warstwa-po-warstwie, ze względu na ciekawe właściwości elektrochemiczne, wszechstronność zastosowania i łatwą, choć niepopularną metodologię wytwarzania.

W przyszłości zarówno przedstawione metody przygotowania, jak i zaprezentowane materiały elektrodowe, mogą zostać użyte do zupełnie nowych celów, a opisane wyniki prac eksperymentalnych przyczynić się do dalszego rozwoju ogniów i czujników.

Zaprezentowane wyniki prac eksperymentalnych stały się tematem:

I. Publikacji naukowych:

1. **Celebańska A.**, Leśniewski A., Niedziółka-Jonsson J., Kominiak M., Nogala W., Wittstock G., Opałło M., *Carbon nanoparticulate film electrode prepared by electrophoretic deposition. Electrochemical oxidation of thiocholine and topography imaging with SECM equipment in dry conditions*, *Electrochimica Acta*, 2014, 144: 136-140.

2. **Celebańska A.**, Leśniewski A., Paszewski M., Jonsson-Niedziółka M., Niedziółka-Jonsson J., Opałło M., *Gold three dimensional film electrode prepared from oppositely charged nanoparticles*. *Electrochemistry Communications*, 2011, 12: 1170-1173.

3. **Celebańska A.**, Leśniewski A., Tomaszewska D., Opałło M., *Film electrode prepared from oppositely charged silicate submicroparticles and carbon nanoparticles for selective dopamine sensing*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011, 26: 4417-4422.

Czujnik dopaminy był tematem programu popularno-naukowego *Era Wynalazków* (sezon 2, odcinek 4) emitowanego na antenie TVP info.

Link do programu: <https://www.youtube.com/watch?v=yNuiCmLdpao>

II. Patentu

1. PL-216936 B1, **Celebańska A.**, Opałło M., Leśniewski A., Tomaszewska D., *Wielowarstwowa elektroda węglowa do oznaczania dopaminy i jej zastosowanie*, Polska, 03.06.2014.

III. Zgłoszeń patentowych

1. P-406915, **Celebańska A.**, Leśniewski A., Niedziółka-Jonsson J., Opałło M., *Sposób przygotowania elektrody węglowej, elektroda otrzymana tym sposobem oraz jej zastosowanie do oznaczania tiocholiny*, Polska, 2014

2. P-405269, **Celebańska A.**, Opałło M., Krysiak O., Roźniecka E., *Matryca polikrzemianowa, jej przygotowanie i zastosowanie*, Polska, 2013.

3. P-393311, **Celebańska A.**, Opałło M., Leśniewski A., Tomaszewska D., *Multilayers electrode and its application*, Polska, Niemcy, 2011.

Pozostały dorobek naukowy:

I. Publikacje

1. **Celebańska A.**, Filipiak M.S., Leśniewski A., Jubete E., Opałło M., *Nanocarbon electrode prepared from oppositely charged nanoparticles and nanotubes for low-potential thiocholine oxidation*. *Electrochimica acta*, 2015, 176: 249-254.

2. Roźniecka E., Jonsson-Niedziółka M., **Celebańska A.**, Niedziółka-Jonsson J., Opałło M., *Selective electrochemical detection of dopamine in a microfluidic channel on carbon nanoparticulate electrodes*. *Analyst*, 2014, 139: 1896-2903.

3. Karczmarczyk A., **Celebańska A.**, Nogala W., Sashuk V., Chernyaeva O., Opałło M., *Electrocatalytic glucose oxidation at gold and gold-carbon nanoparticulate film prepared from oppositely charged nanoparticles*. *Electrochimica Acta*, 2014, 117: 211-2016.

4. Złoczewska A., **Celebańska A.**, Szot K., Tomaszewska D., Opałło M., Jonsson-Niedziolka M., *Self-powered biosensor for ascorbic acid with a Prussian blue electrochromic display*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, 54: 455-465.

5. Nogala W., **Celebańska A.**, Wittstock G., Opałło M., *Bioelectrocatalytic carbon ceramic gas electrode for reduction of dioxygen and its application in a zinc-dioxygen cell*. *Fuel Cells*, 2010, 10: 1157-1163.

6. Nogala W., **Celebańska A.**, Szot K., Wittstock G., Opałło M., *Bioelectrocatalytic mediatorless dioxygen reduction at carbon ceramic electrodes modified with bilirubin oxidase*. *Electrochimica Acta*, 2010, 55: 5719-5724.

II. Zgłoszenie patentowe

1. P-405159, **Celebańska A.**, Opałło M., Filipiak M.Sz., Jędraszko J., Jonsson-Niedziółka M., *Węglowa, wielowarstwowa elektroda, jej przygotowanie i zastosowanie*, Polska, 2013.

B. 478/15



Biblioteka Instytutu Chemii Fizycznej PAN

F-B.478/15



90000000191602