



UNIWERSYTET ŁÓDZKI  
WYDZIAŁ CHEMII



# ROZPRAWA DOKTORSKA

*Przewodzące materiały kompozytowe  
na bazie poli(3,4-etylenodioksytiofenu)  
z immobilizowaną oksydazą glukozową.*

**Ewelina Socha**

*Promotor pracy:*

*prof. UŁ dr hab. Sławomira Skrzypek*

*Promotor pomocniczy:*

*dr Paweł Krzyczmonik*

Uniwersytet Łódzki

Wydział Chemii

Katedra Chemii Nieorganicznej i Analitycznej

Łódź, czerwiec 2015

Składam serdeczne podziękowania mojemu promotorowi  
**Pani Profesor Sławomirze Skrzypek**

oraz promotorowi pomocniczemu

**Panu Doktorowi Pawłowi Krzyczmonikowi**

za wszechstronną pomoc, opiekę merytoryczną, cenne uwagi  
i sugestie udzielane mi podczas powstawania tej pracy

Dziękuję również

**Panu Profesorowi Grzegorzowi Andrijewskiemu**

za współpracę, cenne wskazówki oraz opiekę naukową.

Dziękuję wszystkim **Pracownikom**

**Katedry Chemii Nieorganicznej i Analitycznej**

oraz **Wydziału Chemii** za życzliwość i stworzenie wspaniałej  
atmosfery naukowej.

# **SPIS TREŚCI**

Spis treści	3
Wykaz skrótów	4
I. Wstęp	6
II. Część teoretyczna	7
1. Polimery przewodzące	7
2. Poli(3,4 – etylenodioksytyofen)	17
3. Sensory chemiczne i biosensory	21
4. Oksydaza glukozowa	30
5. Glukoza	32
6. Biosensory glukozy	37
7. Metody oznaczania stężenia glukozy	45
8. Zastosowane metody pomiarowe	52
III. Część doświadczalna	60
1. Cel pracy	60
2. Aparatura pomiarowa	61
3. Odczynniki chemiczne	64
4. Przygotowanie roztworów	65
5. Modyfikacja powierzchni elektrody platynowej	70
6. Immobilizacja oksydazy glukozowej	75
7. Postulowany mechanizm działania biosensora	80
8. Czynniki wpływające na działanie otrzymanych biosensorów	83
9. Oznaczania stężenia D – glukozy w roztworze buforu fosforanowego PBS	108
10. Kwas askorbinowy jako interferent w ilościowym oznaczeniu D – glukozy	118
11. Przykrycie enzymu warstwą polimeru	125
12. Ilościowe oznaczanie stężenia D – glukozy w produktach pochodzenia naturalnego	127
13. Przygotowanie elektrody typu plaster miodu	139
IV. Podsumowanie i wnioski końcowe	156
V. Bibliografia	157
VI. Streszczenie	169
VII. Sylwetka autora	177
VIII. Podziękowania	179
IX. Wykaz wzorów statystycznych	180
X. Publikacje	181

# **WYKAZ SKRÓTÓW**

**Wykaz skrótów**

- 2DPN** - dwuwymiarowa nukleacja progresywna  
**3DIN** - trójwymiarowa nukleacja natychmiastowa  
**A** - absorbancja  
**AA** - kwas antranilowy  
**ABS** - kopolimer akrylonitrylu, butadienu i styrenu  
**ADP** - adenozyndwufosforan  
**AFM** - mikroskopia sił atomowych  
**Ask** - kwas askorbinowy  
**ATP** - adenozynotrójfosforan  
**BDDE** - elektroda diamentowa domieszkowana borem  
**Biosensor A** - elektroda zbudowana z (PEDOT+PAA)/PSSLi/GOD  
**Biosensor B** - elektroda zbudowana z PEDOT/(PEDOT+AA)/PSSH/GOD  
**CAT** - kataliza  
**CMC** - krytyczne stężenie micelarne  
**CV** - woltamperometria cykliczna  
**DEAE - Sephadex** - aminoacylaza unieruchomiona na nośniku  
**DPV** - woltamperometria pulsowa różnicowa  
**E** - potencjał  
**EDOT** - (3,4-etylenodioksytiofen)  
**EIS** - spektroskopia impedancyjna  
**FAD/FADH<sub>2</sub>** - dinukleotyd flawinoadeninowy, forma utleniona/zredukowana  
**GOD** - oksydaza glukozowa  
**I** - natężenie prądu  
**IUPAC** - Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej  
**LOD** - poziom wykrywalności  
**LOQ** - poziom oznaczalności  
**NAD<sup>+</sup>/NADH** - dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy, forma utleniona/zredukowana  
**NEK** - nasycona elektroda kalomelowa  
**NGM** - proces zarodkowania i mechanizm wzrostu  
**PAA** - kwas poliakrylowy  
**PANI** - polianilina

- PBS** - roztwór buforu fosforanowego
- PEDOT** - poli(3,4-etylenodioksytiofen)
- POD** - peroksydaza
- PS** - kulki polistyrenowe
- PSSH** - kwas poli(4-styrenosulfonowy)
- PSSLi** - sól litowa kwasu poli(4-styrenosulfonowego)
- Q** - ładunek
- R<sup>2</sup>** - współczynnik korelacji
- RSD** - względne odchylenie standardowe
- SAN** - kopolimer styrenu i akrylonitrylu
- SD** - odchylenie standardowe
- SDS** - dodecylosiarczan sodu
- SE** - błąd standardowy
- SPAN** - polianilina z grupami sulfonowymi
- t** - czas
- TBO** - błękit toluidynowy
- TCNQ** - tetracyjanochinonodimetan
- TTF** - tetratriafulwalen
- UV - VIS** - zakres nadfioletu i światła widzialnego
- v** - szybkość skanowania
- WSC** - chlorowodorek N-(3-dimetyloaminopropylo)-N-etylokarboimidu

**WSTĘP**



### I. Wstęp

Minęło ponad 50 lat od czasu kiedy Clark i Lyons w 1962 roku zaprezentowali koncepcję enzymatycznej elektrody do pomiaru stężenia glukozy. Ich urządzenie zbudowane było z oksydazy glukozowej enkapsulowanej ponad elektrodą tlenową i oddzielonej membraną półprzepuszczalną. Oznaczenie stężenia glukozy odbywało się poprzez monitorowanie ubytku tlenu zużytego w reakcji katalizowanej GOD. Natomiast pierwsze urządzenie komercyjne oparte na tym układzie pojawiło się na rynku w roku 1975.

W okresie niewiele dłuższym niż pół wieku nastąpił gwałtowny rozwój tej gałęzi chemii analitycznej. W czasopiśmie pojawiło się grubo ponad 80 000 prac związanych z różnorodnymi biosensorami, z czego około 10% dotyczyło biosensora glukozy. Biorąc pod uwagę wszystkie te prace, 92% z nich skupiło się na biosensorach amperometrycznych, a tylko 2,5% na potencjometrycznych.

Zainteresowanie biosensorami glukozy idzie w parze z niepokojącymi danymi przedstawianymi przez Światową Organizację Zdrowia (WHO) według danych której ponad 346 miliony światowej populacji cierpi na problemy związane z cukrzycą. Szacuje się, że w roku 2004 prawie 3,5 miliona osób zmarło w wyniku chorób związanych z wysokim poziomem glukozy we krwi, natomiast w roku 2030 liczba ta ulegnie podwojeniu czyniąc cukrzycę siódmą przyczyną zgonów na świecie.

Mając na uwadze wspomniane fakty, postanowiłam dołączyć do grona osób zajmujących się problematyką biosensora glukozy. Celem moich badań było otrzymanie biosensora elektrochemicznego opartego na poli(3,4 – etylenodioksytiofenie) dającego odpowiedź na zmieniające się stężenie glukozy. Przygotowany obiekt powinien spełniać kilka założeń takich jak: długi czas aktywności biosensora, praca zarówno jako sensora I jak i III generacji, trwale unieruchomienie na powierzchni elektrody modyfikowanej, szybkość i prostota wytworzenia, a także niski koszt pojedynczej immobilizacji, nieskomplikowana aparatura. Wyniki moich badań przedstawiłam w niniejszej pracy. Całość poprzedza krótki wstęp teoretyczny, przybliżający omawiane zagadnienia.

**CZEŚĆ**  
**TEORETYCZNA**

## II. Część teoretyczna

### 1. Polimery przewodzące

Polimery to związki wielkocząsteczkowe, posiadające w swej budowie układy wiązań sprzężonych. Początkowo sądzono, że cała grupa związków chemicznych określanych mianem polimerów, to materiały wykazujące wyłącznie wysoką rezystancję elektryczną.



Rys.1. MacDiarmid, Shirakawa i Heeger po odebraniu Nagrody Nobla w 2000 roku.

Zwrot w tej materii nastąpił w latach 70. XX wieku, kiedy to trzech naukowcy Alan J. Heeger, Alan G. MacDiarmid oraz Hideki Shirakawa (rys. 1) wykazali, że niektóre z polimerów wykazują nietypowe, wysokie wartości przewodnictwa zarezerwowane do tej pory tylko dla metali. To zapoczątkowało gwałtowny wzrost zainteresowania tzw. polimerami przewodzącymi na

całym świecie. Rozpoczęto prace mające na celu nie tylko wskazanie nowych polimerów przewodzących, lecz również poprawę właściwości już opisanych związków oraz ich szersze praktyczne zastosowanie. Ukoronowaniem tych wysiłków było przyznanie Nagrody Nobla w roku 2000 trzem prekursorom badań nad polimerami przewodzącymi [1].

Spośród wielu istotnych właściwości polimerów przewodzących należy wymienić między innymi: szeroki zakres przewodnictwa elektrycznego, prostą i stosunkowo tanią polimeryzację czy otrzymanie materiałów o stabilnych parametrach [2]. Na uwagę zasługuje również ich szeroki wachlarz zastosowań, wśród których znajdują się: elektroanaliza i elektrokataliza produkcja baterii i akumulatorów, inhibitory korozji metali, produkcja sensorów i biosensorów, materiały ekranujące, powłoki elektroprzewodzące, diody LED i OLED, membrany i wiele innych[3].

### 1.1. Rodzaje polimerów

Jednym z kryterium podziału polimerów przewodzących jest rodzaj przewodnictwa, w związku z powyższym możemy tu wyróżnić 3 grupy: **polimery przewodzące jonowo**, **polimery przewodzące elektronowo**, **polimery o przewodnictwie mieszanym**.

W **polimerach przewodzących jonowo** [4] przepływ prądu to skutek ruchu jonów w matrycy polimerowej, dlatego też często są one nazywane elektrolitami stałymi. Mogą posiadać zarówno grupy jonowymienne, jak na przykład grupa sulfonowa w Nafionie®, lub grupy elektronodonorowe, np. atomy tlenu posiadające wolne pary elektronowe w glikolu polietylenowym.

**Polimery przewodzące elektronowo** [5] przewodzą prąd tak jak metale, czyli w wyniku ruchu elektronów i dziur, dlatego też nazywa się je „syntetycznymi metalami”. Ich cechą charakterystyczną jest układ sprzężonych wiązań podwójnych w łańcuchu. Do grupy tych polimerów należy między innymi polianilina, poliacetylen, politiofen, polifuran oraz PEDOT.

**Polimery mieszane** [6] posiadają związane kowalencyjnie lub elektrostatycznie z głównym łańcuchem grupy o charakterze donorowo – akceptorowym. Grupy te pojawiają się w wyniku domieszkowania. Przewodnictwo zapewnia przeskok elektronów pomiędzy tymi grupami, czyli tzw. hopping. Przykładem mieszanego polimeru jest poli(N – vinylokarbazol).

### 1.2. Rodzaje przewodnictw, nośniki ładunku i mechanizm przewodnictwa

Każdy z omawianych mechanizmów przewodnictwa, tj. **przewodnictwo jonowe**, **elektronowe** i **hopping**, wykorzystuje ruch nośników ładunków, omówionych w dalszej części pracy..

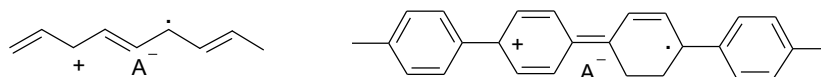
W przypadku **przewodnictwa jonowego** [7] łańcuch polimeru nie posiada właściwości przewodzących, lecz zyskuje je dzięki elektrolitowi w nim rozpuszczonemu. Polimer w tym przypadku pełni funkcję matrycy, niezbędna jest ponadto obecność grup jonowymiennych lub elektrono-donorowych. Za przewodnictwo odpowiada najczęściej kation poruszający się pomiędzy grupami elektrono donorowymi. Aby polimer pozostał elektroobojętny ruchowi kationu odpowiada równoczesny ruch anionu w przeciwnym kierunku.

Mechanizm **przewodnictwa elektronowego** [8] jest identyczny z tym występującym w metalach. Polimery tego typu przewodzą prąd na skutek transportu elektronów i dziur.

Przewodnictwo elektronowe jest charakterystyczna dla polimerów posiadających sprzężony układ wiązań. Zagadnienie przewodnictwa elektronowego wiąże się nierozdzielnie ze zjawiskiem domieszkowania. Domieszkowanie to proces zwiększenia liczby nośników ładunku w polimerze, co w konsekwencji prowadzi do zwiększenia jego przewodnictwa. Warunkiem koniecznym do tego, aby polimer był przewodzący, jest jego częściowe utlenienie, co prowadzi do pojawienia się w łańcuchu dodatkowych ładunków, które z kolei muszą zostać skompensowane, aby sumaryczny ładunek warstwy był obojętny. Dodatek anionów do warstwy jest nazywany domieszkowaniem. Jeśli polimer zostanie całkowicie zredukowany, a aniony domieszkujące usunięte z warstwy, polimer straci zdolność przewodzenia. Popularne domieszki stanowią same elektrolity wykorzystywane do polimeryzacji takie jak: kwas chlorowy (VII), kwas siarkowy (VI).

Ruch nośników ładunku w polimerach przewodzących elektronowo podlega określonym regułom. W przypadku tego typu polimerów mamy do czynienia z trzema strukturami warunkującymi ruch ładunku w warstwie polimeru, są to: **polaron**, **bipolaron** i **soliton** [9, 10].

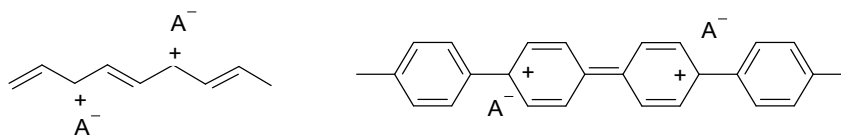
Pierwszy z nośników ładunku to **polaron** [11]. Układ ten tworzy się w czasie utleniania, wtedy to z układu  $\pi$  w głównym łańcuchu zostaje usunięty elektron, w wyniku czego otrzymujemy wolny rodnik i ładunek dodatni. Polaronem może być kationorodnik (rys. 2).



Rys.2. Przykładowe polarony.

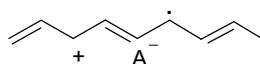
Powstaje nowy stan elektronowy, w którym pojedyncze niesparowane elektrony zajmują niższe stany energetyczne. W tym przypadku przewodnictwo jest realizowane przez przemieszczanie się całego zespołu polaronu (ładunek i niesparowany elektron) wzdłuż łańcucha polimeru.

Jeżeli warunki będą sprzyjające, to w wyniku rekombinacji dwóch polaronów lub utlenienia jednego polaronu otrzymamy **bipolaron** [12]. Jednym z czynników warunkującym powstanie bipolaronów jest używany elektrolit. Część elektrolitów np. kwas chlorowy (VII), sprzyja tworzeniu polaronów, podczas gdy kwas siarkowy (VI) będzie faworyzował powstawanie bipolaronów (rys. 3).



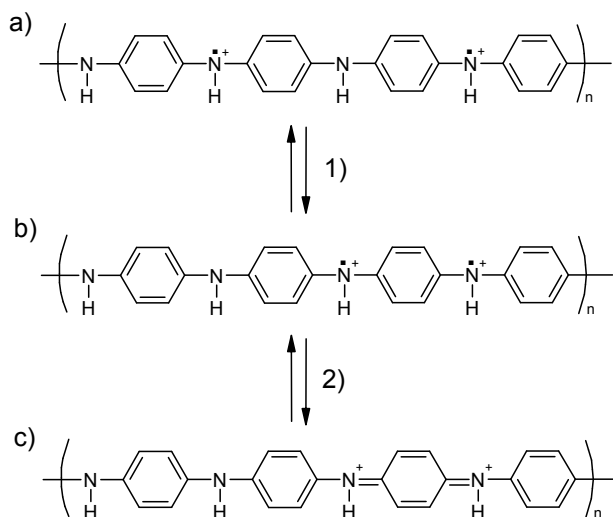
Rys.3. Przykładowe bipolarony.

Trzecim, specyficznym rodzajem nośnika ładunku jest występujący wyłącznie w poliacetylenie **soliton** (rys. 4) [13].



Rys.4. Soliton w poliacetylenie.

Polarony i bipolarony odpowiadają za przenoszenie ładunków wzdłuż łańcucha oraz pomiędzy łańcuchami. Polarony powstające w łańcuchu przemieszczają się, a w sprzyjających warunkach dwa spotykające się polarony mogą utworzyć bipolaron, który następnie przemieszcza się wzdłuż łańcucha. Powstały bipolaron może również ulec rekombinacji dając z powrotem dwa polarony (rys. 5).



Rys. 5. Rekombinacja polaronów na przykładzie polianiliny.  
a) struktura polaronu, b) zbliżenie się polaronów, c) struktura bipolaronu.

W powstawaniu polaronów i bipolaronów istotną rolę odgrywa elektrolit. Elektrolity jednowartościowe (np.  $\text{HClO}_4$ ) faworyzują powstanie polaronów, podczas gdy w środowisku jonów dwuwartościowych (np.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) powstają głównie bipolarony.

**Hopping** [14] to mechanizm opierający się na przeskoku elektronów między sąsiednimi grupami redox, w wyniku czego jedna z nich się utlenia, a druga redukuje. Hopping występuje w wielu materiałach, m. in. domieszkowanych polimerach przewodzących. Jest on związany z obecnością grup donorowo – akceptorowych, połączonych kowalencyjnie

bądź elektrostatycznie z głównym łańcuchem polimeru. Przykładem takiego ugrupowania może być ferrocen. Z powodu obecności tych grup wolne elektrony w łańcuchu praktycznie nie występują.

### 1.3. Metody otrzymywania

Spośród wielu odmian metod otrzymywania polimerów przewodzących możemy wyróżnić trzy podstawowe techniki tj.: syntezę chemiczną, elektrochemiczną i otrzymywanie w plazmie.

Synteza chemiczna polega na utlenieniu monomeru przy użyciu utleniaczy, do których zalicza się między innymi sole żelaza ( $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{Fe}(\text{OTs})_3$ ), dichromian (VII) potasu. W zależności od użytych odczynników i środowiska reakcji otrzymany polimer będzie się charakteryzował różnymi właściwościami. Pierwszą syntezę chemiczną przeprowadzono z roztworu acetonitrylu używając mieszaniny różnych soli żelaza [15]. W wyniku tej polimeryzacji otrzymano niebieski proszek, który był nierozpuszczalny we wszystkich rozpuszczalnikach i wykazywał typową przewodność elektryczną w granicach 5 – 10 S/cm. Metoda ta jest historycznie najstarsza. Kontrola takiej syntezy jest trudna i mało precyzyjna, ponadto trudno otrzymuje się polimer całkowicie utleniony. Dodatkowo postają produkty uboczne, a sam polimer jest zanieczyszczony utleniaczem [16].

Znacznie efektywniejszy jest proces elektropolimeryzacji [17]. Synteza elektrochemiczna umożliwia kontrolę poszczególnych etapów całego procesu polimeryzacji. Odbywać się to może poprzez regulowanie takich parametrów jak stężenie i skład roztworu do polimeryzacji, natężenie i potencjał przy których prowadzi się proces, ilość cykli czy szybkość skanowania. Powstający produkt jest wysokiej czystości, natomiast ilość produktów ubocznych jest śladowa. Elektrochemiczne otrzymywanie polimerów przewodzących możemy podzielić na trzy typy: przy stałym natężeniu prądu (galwanostatyczny), przy stałym potencjale (potencjostatyczny) i potencjodynamiczny np. woltamperometria.

Polimeryzacja w plazmie [18] to metoda, podczas której nie używamy ani utleniacza ani rozpuszczalnika. W metodzie tej pierwszym etapem jest nastrzyknięcie monomeru bądź rozproszonych kropeł monomeru bezpośrednio w strumień plazmy indukowany poprzez stałoprądowy reaktor jarzeniowy. W kolejnym etapie należy dokonać rekonfiguracji reaktora tak, aby dochodziło w nim do osadzania się cząsteczek polimeru przy łagodnych

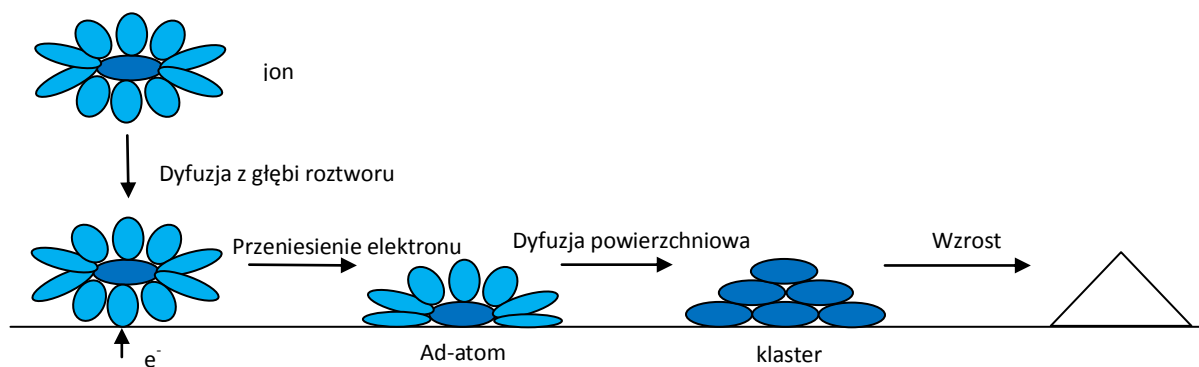
warunkach. W ten sposób można osadzać polimer na dowolnie wybranym podłożu. Wadą tej metody jest konieczność posiadania odpowiedniej aparatury do pracy w plazmie.

#### 1.4. Formowanie i wzrost warstwy

Tworzenie na powierzchni elektrody warstwy polimeru przewodzącego to proces złożony i wieloetapowy. Według podobnych mechanizmów przebiega: katodowe wydzielanie metali, otrzymywanie na drodze elektrolizy tlenków metali i siarczków oraz polimerów przewodzących elektronowo.

Etapy elektrokryształizacji to: dyfuzja jonów z głębi roztworu do powierzchni elektrody, przejście elektronu, częściowe lub całkowite rozpuszczenie otoczki solwatacyjnej, w wyniku czego tworzą się atomy dodatkowe tzw. ad-atomy, łączenie się ad - atomów i tworzenie zarodków, wbudowania ad-atomów w sieć przestrzenną, wzrost osadu (rys. 6). Ogólnie mówi się o procesach zarodkowania i mechanizmach wzrostu warstwy (nucleation and growth mechanism NGM) [19].

Kilka ad-atomów tworzy zarodek krystaliczny. Jeśli przekroczy on rozmiar krytyczny, dochodzi do jego nukleacji, czyli dalszego wzrostu. Gdy jednak rozmiar krytyczny nie zostanie przekroczony następuje rozpad zarodka na poszczególne ad-atomy.



Rys. 6. Schemat elektrokryształizacji.

W zależności od warunków procesu krystalizacji, wzrost krystalitów może się odbywać na trzy sposoby: jednowymiarowy 1-D (otrzymujemy nie prostopadłą do powierzchni elektrody), dwuwymiarowy 2-D (równoległe do powierzchni) oraz trójwymiarowy 3-D (właściwe tworzenie nowej warstwy).

Samą nukleację również możemy podzielić na: natychmiastową i progresywną. Natychmiastowa ma miejsce, kiedy powstaje duża ilość małych zarodków. Podczas



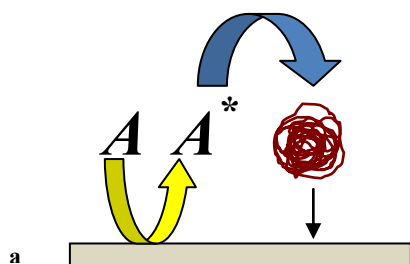
nukleacji progresywnej powstaje mało dużych zarodków, które później nakładają się na siebie.

Kolejne zagadnienie pojawia się wraz z momentem osiągnięcia centrów wzrostu, przedstawianych w formie stożka. Na ich wzrost, zachodzący zarówno prostopadle jak i równoległe do powierzchni, wpływa oddziaływanie pomiędzy osadem a materiałem podłoża. Struktura przestrzenna powstającego polimeru zależy od rodzaju anionów obecnych podczas polimeryzacji. W przypadku gdy elektrolitem podstawowym jest  $\text{HClO}_4$  struktura otrzymywanej polianilina jest zwarta, podczas gdy obecność  $\text{H}_2\text{SO}_4$  faworyzuje strukturę gąbczastą.

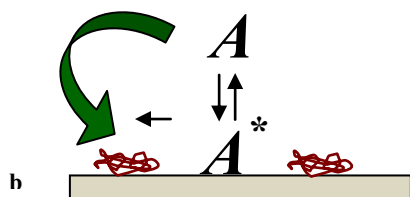
Dwuwymiarowy mechanizm wzrostu zależny od stężenia monomeru został zaproponowany przez Bade [19] i składa się z takich etapów jak elektroutlenianie monomeru, oligomeryzacja, dyfuzja monomeru przy wysokiej gęstości warstwy oligomeru, przesylenie oligomeru i tworzenie ostatecznych klastrów oraz tworzenie warstwy związku.

Wyodrębnił on dwa stadia polimeryzacji charakteryzujące się różną morfologią warstwy polimeru. W stadium pierwszym na powierzchni elektrody tworzy się zwięzła warstwa polimeru o grubości ok. 200 nm. Tempo bocznego wzrostu jest większe niż wzrostu normalnego, co przemawia na korzyść wzrostu 2-D. Powstający polimer silnie wiąże się z powierzchnią podłoża. Na koniec następuje luźne wiązanie otwartych struktur i ciągle rozgałęzianie (rys. 7)

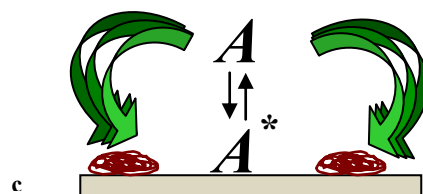
## 1. Stadium



a  
oligomeryzacja, zarodkowanie  
i wytrącanie

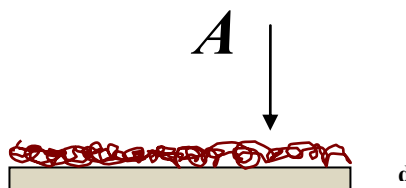


b  
uprzywilejowany wzrost  
w kierunku bocznym



c

## 1. Stadium



d



e

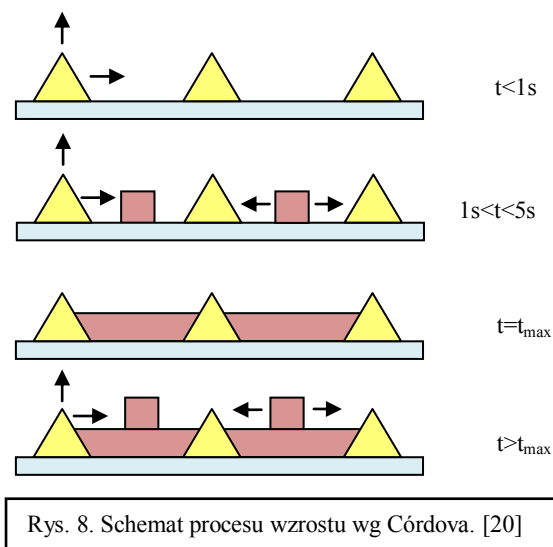
Wzrost i ciągłe rozgałęzianie  
prowadzące do otwartej struktury  
polimeru

Rys. 7. Schemat procesu wzrostu wg Bade [19].

Z kolei Córdova [20] wskazuje, że zarodkowanie i mechanizm wzrostu warstwy zależy od: rodzaju anionów w elektrolicie, mieszanina oraz rozpuszczalności powstających oligomerów. Założył on że NGM jest poprzedzone tworzeniem warstwy oligomerów wysokiej gęstości blisko granicy elektroda/elektrolit. Stwierdzono, że wysokie stężenie monomerów lub anionów gwarantują powstanie dobrze rozpuszczalnych oligomerów i zarodkowanie z trójwymiarowym wzrostem kontrolowanym przez dyfuzję. Niskie stężenie monomeru lub jonów daje warstwy o mniejszej grubości w wyniku zarodkowania natychmiastowego z trójwymiarowym procesem wzrostu lub postępującym dwuwymiarowym wzrostem. W zależności od użytego elektrolitu zaproponowano dwa NGM dla PANI:

- dwuwymiarowa nukleacja progresywna (2DPN) podczas kontroli przeniesienia ładunku – dla  $\text{HClO}_4$ ;

- trójwymiarowa nukleacja natychmiastowa (3DIN) podczas kontroli ładunku – dla  $H_2SO_4$ .



Rys. 8. Schemat procesu wzrostu wg Córdoba. [20]

W czasie  $t < 1s$  przeważa mechanizm 3DIN wzrostu centrów. Dla  $1s < t < 5s$  wzrostowi 3DIN zaczyna towarzyszyć wzrost 2DPN związany z powstawaniem warstwy polimeru pomiędzy centrami. W momencie  $t_{max}$  mamy uformowaną pierwszą warstwę polimeru. Po przekroczeniu  $t_{max}$  dalej mamy dwa modele NGM, jednak zmieniają się tempa wzrostu. Proces 3DIN jest wolny, natomiast następuje wzrost według 2DPN drugiej warstwy polimeru na uprzednio utworzonej (rys. 8.). [20]

### 1.5. Kompozyty, kopolimery i polimery autodomieszkowane.

Pani, polipirol, PEDOT są niezwykle popularnymi i dobrze poznanymi polimerami przewodzącym jednak wraz z rozwojem elektrochemii rosły również oczekiwania stawiane nowym materiałom, stąd też próby uzyskania nowych związków lub modyfikacji już istniejących. Możemy wyróżnić trzy podstawowe grupy polimerów przewodzących: kompozyty, kopolimery i polimery autodomieszkowane.

Kompozyt [21] to materiał, złożony z co najmniej dwóch faz, oddzielonych wyraźnymi granicami międzyfazowymi. Syntezę kompozytów prowadzi się dwu- lub jednoetapowo. Jednym z przykładów dwuetapowej syntezy kompozytów na elektrodzie może być warstwa polipirol – jonomer. W pierwszym etapie elektroda jest mechanicznie pokrywana jonomerem, którym mogą być: sulfonowane węglowodory, sulfonowany polistyren czy polimery akrylowe. W drugim etapie, na elektrodzie pokrytej jonomerem, prowadzi się polimeryzację np. polipirolu. W syntezie jednoetapowej jonomerami mogą być: lateks,

polichlorek winylu, poliuretan. W takim przypadku wykonuje się jednoetapową bezpośrednią syntezę elektrochemiczną np. polipirołu, w obecności jonomeru, pełniącego rolę elektrolitu.

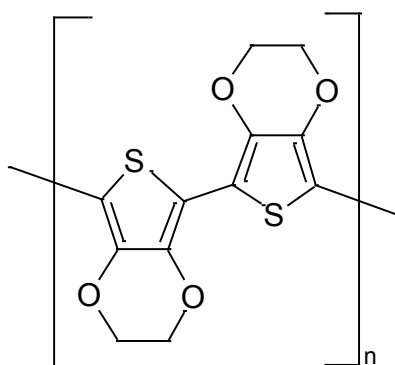
Kopolimery to polimery zbudowane z różnych rodzajów merów. Przykłady kopolimerów to między innymi SAN (kopolimer styrenu i akrylonitrylu), ABS (kopolimer akrylonitrylu, butadienu i styrenu) czy też kopolimer aniliny i o – toluidyny. Właściwości fizykochemiczne kopolimerów zależą od ilościowego udziału poszczególnych monomerów w kopolimerze, ale również od sposobu ich rozmieszczenia w łańcuchu. Jeśli monomery dwóch związków umieszczone w jednym rozpuszczalniku będą polimeryzować, wtedy przeprowadzamy zwykłą polimeryzację. Jeśli monomery ulegają polimeryzacji tylko oddzielnie wtedy należy przeprowadzić dwustopniową elektropolimeryzację [22].

Polimery autodomieszkowane posiadają w swojej strukturze ujemnie naładowane grupy funkcyjne. Największe oczekiwania wiąże się z możliwością ich użycia w ogniwach, które można ładować, innym ważnym zastosowaniem mogą okazać się sensory i biosensory. Przykładem może tu być polianilina z grupami sulfonowymi przyłączonymi do pierścienia (SPAN) otrzymana w wyniku sulfonowania emeraldyny w formie zasady dymiącym kwasem siarkowym przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Następnie produkt reakcji strącono metanolem i acetonem. W polimerze tym osiągnięto 50% stopień sulfonowania. Jego przewodnictwo w stosunku do polianiliny zmalało o 0,1 S/cm, ale zakres pH podniósł się do 7. Dla 75% sulfonowania przewodnictwo wzrosło o 1 S/cm w stosunku do 50% SPAN, a zakres pH zwiększył się do 14 [23]. W polimerach autodomieszkowanych niemożliwe jest całkowite zredukowanie polimeru i wymycie anionów domieszkujących z warstwy. Skutkiem tego polimer nie może utracić zdolności przewodzenia.

## 2. Poli(3,4-etylenodioksytiofen)

### 2.1. Wstęp

Poli(3,4-etylenodioksytiofen) zwany w skrócie PEDOT to pochodna tiofenu będąca jednym z najtrwalszych polimerów przewodzących (rys. 9). Został on opracowany w laboratoriach badawczych firmy Bayer w Niemczech w roku 1988 przez Jonasa, Heywanga i Werner Schmidtberga [24]. Pierwszy zgłoszony patent dotyczył syntezy chemicznej jednak jeszcze w tym samym roku opatentowano również technikę elektropolimeryzacji PEDOT-u [25].



Rys. 9. Struktura PEDOTU.

PEDOT należy do rodziny polimerów przewodzących elektronowo o właściwościach elektrochromowych, tzn. zmieniających barwę pod wpływem przyłożonego potencjału. W postaci utlenionej PEDOT jest jasno niebieski, prawie przezroczysty, w formie zredukowanej jest ciemnoniebieski i praktycznie nieprzezroczysty [26]. Ponadto PEDOT jest nierozpuszczalny w wodzie, lecz rozpuszcza się w rozpuszczalnikach organicznych [27].

Niewątpliwie jedną z największych zalet PEDOT-u jest jego wysokie przewodnictwo dochodzące nawet do wartości 1200 S/cm [28]. Jest to jedno z najwyższych odnotowanych przewodnictw, natomiast polimer o przewodnictwie rzędu 500 S/cm można otrzymać bez większych problemów.

Inną ważną zaletą PEDOT-u, mającą też wpływ na wysokie przewodnictwo, jest regularna struktura, wynikająca z obecności sprzężeń w pozycjach 2 i 5, charakteryzująca się małą ilością defektów [29].

Kolejną zaletą PEDOT-u w porównaniu z innymi polimerami przewodzącymi (np. polianilina, polipiroł) jest doskonała stabilność i odporność na działanie warunków

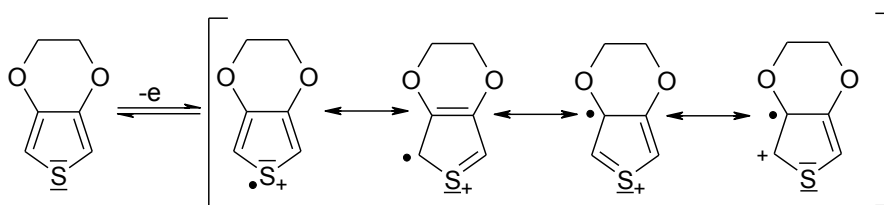
atmosferycznych, ale co ważniejsze odporność na działanie wysokich temperatur rzędu nawet 280°C przy równoczesnym braku spadku przewodnictwa [30].

## 2.2. Mechanizm elektropolimeryzacji

Z punktu widzenia prowadzonych przeze mnie badań najistotniejsza i najefektywniejsza z metod otrzymywania polimeru jest elektrochemiczna polimeryzacja PEDOT-u. Proces ten umożliwia kontrolę otrzymywanego polimeru poprzez wiele parametrów omówionych w rozdziale 1.4.

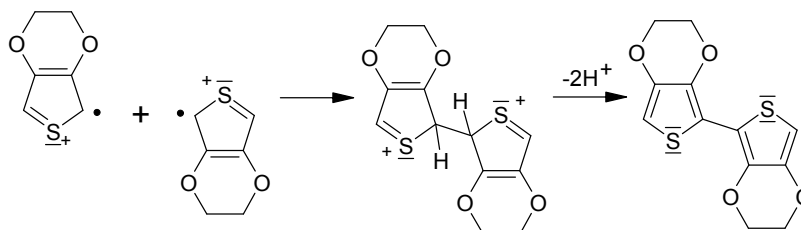
Można wyróżnić tu kilka charakterystycznych etapów.

Etap I: na powierzchni elektrody dochodzi do utlenienia monomeru EDOT-u i powstania kationorodnika (rys. 10). Jest to etap najwolniejszy, limitujący prędkość całego procesu.



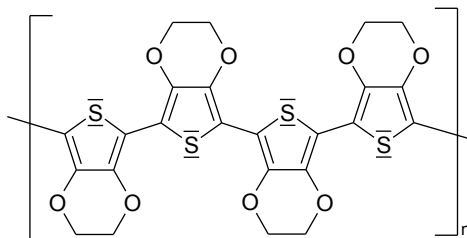
Rys.10. Utlenianie monomeru EDOT-u.

W II etapie w wyniku zbliżenia się do siebie dwóch kationorodników dochodzi do powstania dimeru (rys. 11).



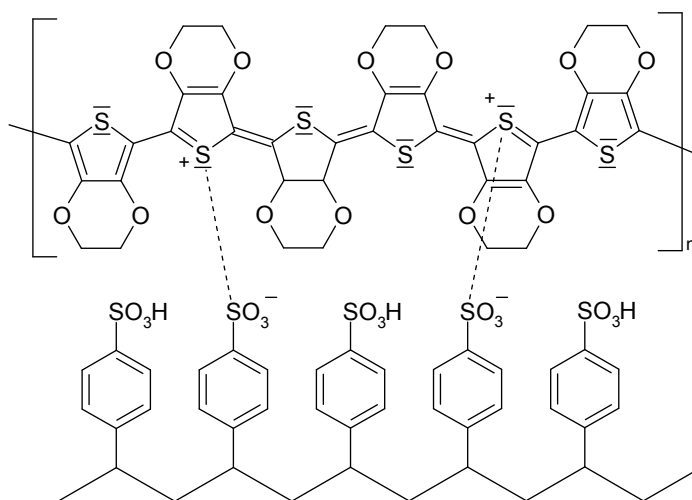
Rys. 11. Powstanie dimeru EDOT-u.

Etap III to elektrotlenianie powstałego dimeru (oligomeru) na powierzchni elektrody. W wyniku powtarzania tej reakcji i łączenia kationorodników dochodzi do propagacji łańcucha polimeru (rys. 12).



Rys.12. Łańcuch PEDOTU.

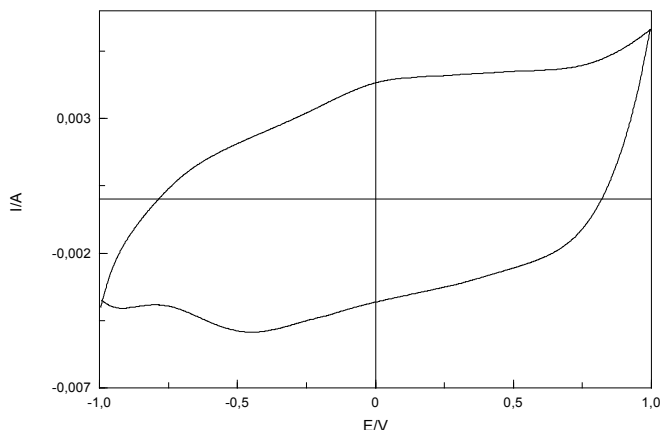
Jeśli zostaną zapewnione odpowiednie warunki do domieszkowania, czyli w środowisku reakcji będzie się znajdował elektrolit zdolny do domieszkowania polimeru, to ostatecznie powstanie łańcuch polimeru częściowo utleniony z wbudowanymi w jego strukturę anionami domieszkującymi. Ma to na celu zapewnienie kompensacji ładunków w powstającym polimerze. Rys. 13 przedstawia strukturę częściowo domieszkowanego PEDOT-u z uwzględnieniem anionów domieszkujących. [31]



Rys. 13. Domieszkowanie łańcucha PEDOTU.

### 2.3. Krzywa CV PEDOT-u

Na cyklicznej krzywej woltamperometrycznej elektrody modyfikowanej PEDOT-em



Rys. 14. Cykliczna krzywa woltamperometryczna PEDOTU w  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  KCl. Polimer otrzymany potencjostaticznie na elektrodzie Pt z roztworu  $0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  EDOT w  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PSSLi w czasie  $t = 360 \text{ s}$  przy potencjale  $E = 1 \text{ V}$ .

(rys. 14) można zaobserwować dwa charakterystyczne piki. Na krzywej anodowej, w okolicach  $0 \text{ mV}$ , znajduje się pik pochodzący od utleniania PEDOT-u, natomiast na katodowej krzywej, przy około  $-500 \text{ mV}$ , wyróżnić możemy pik związany z redukcją polimeru przewodzącego. Wraz ze wzrostem grubości warstwy polimeru piki te stają się coraz bardziej wyraziste [31].

### 2.4. Zastosowanie PEDOT-u

Właściwości, jakimi charakteryzuje się PEDOT, tj. wysokie przewodnictwo oraz stabilność w stanie domieszkowanym, spowodowały że znalazł on szerokie zastosowanie w wielu dziedzinach np.:

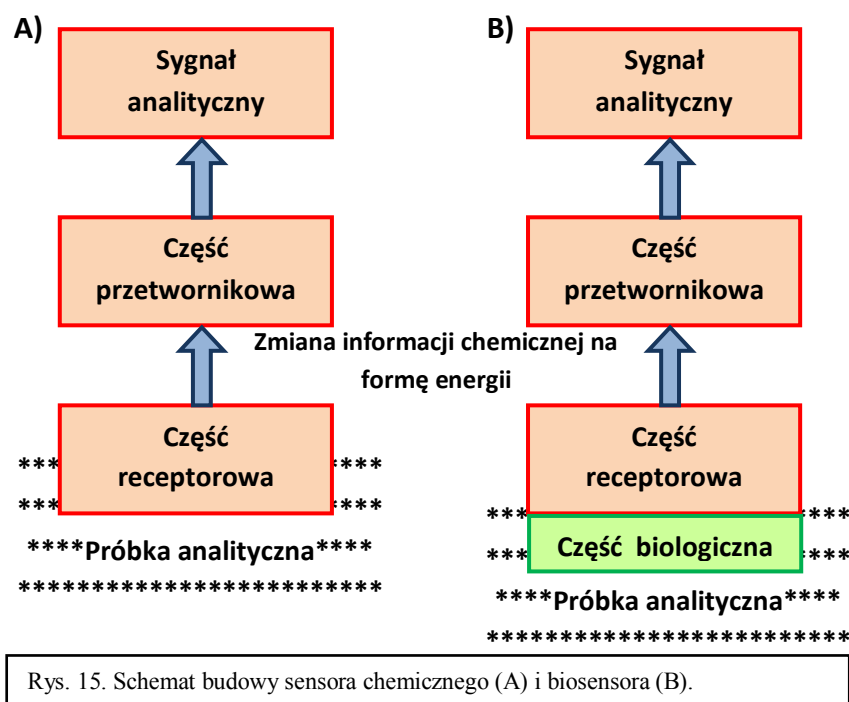
- jako materiał do produkcji powłok antystatycznych oraz elektrostatycznych [32];
- jako materiał w optoelektronice [33];
- w budowie sensorów [34];
- w kolorowych organicznych wyświetlaczach OLED [35];
- do budowy elektronicznych obwodów w samochodach i satelitach [36];
- w urządzeniach elektroluminescencyjnych [37];
- jako warstwa przewodząca w tranzystorach warstwowych [38];
- w ochronie przed korozją metali i stopów [39];
- jako materiał polimerowy w odwracalnych ogniach galwanicznych [40];



### 3. Sensory chemiczne i biosensory

Według definicji IUPAC sensorem chemicznym określamy urządzenie przekształcające informację chemiczną taką jak np. stężenie danej substancji, skład chemiczny itp. w użyteczny analitycznie sygnał [41]. W sensorach chemicznych możemy wyróżnić dwie części, część receptorową i część przetwornikową. W części receptorowej informacja chemiczna jest przekształcana do postaci która następnie w części przetwornikowej jest zamieniana w użyteczną wartość analityczną. Część receptorowa może pracować w oparciu o pomiary fizyczne, takie jak temperatura czy masa, w czasie których nie zachodzi żadna reakcja chemiczna. Źródłem sygnału może być także reakcja chemiczna lub cały proces biochemiczny.

Natomiast biosensor to urządzenie wykorzystujące specyficzną reakcję chemiczną, w identyfikacji której pośredniczy izolowany enzym, immunoukład, tkanki czy inne organelle. Detekcja odbywa się zwykle na drodze sygnałów elektrycznych, termicznych bądź optycznych. Schemat działania sensora i biosensora został przedstawiony na rys. 15. [42]



### 3.1. Podział sensorów

Sensory i biosensory ze względu na metodę detekcji dzielimy na sensory: elektrochemiczne, optyczne, masowe, magnetyczne, termiczne, na bazie elementu biologicznego [43].

- Sensory elektrochemiczne

Sensory elektrochemiczne należą do najstarszej, szerokiej grupy sensorów, które znalazły duże zastosowanie praktyczne. Najstarsze z nich pochodzą z lat 50. XIX wieku. Stosując metodę pomiarową jako kryterium podziału możemy wyróżnić sensory potencjometryczne, amperometryczne, woltamperometryczne oraz pojemnościowe/przewodnościowe. Sensory elektrochemiczne najczęściej mają formę elektrody lub pełnego dwu- lub trójelektrodowego ogniwa. W czasie pracy sensora elektrochemicznego proces elektrochemiczny powoduje zmiany chemiczne w ogniwie, które mogą być detektowane odpowiednią metodą [44, 45].

- Sensory optyczne

Sensory optyczne stanowią dobrze rozwiniętą i poznaną gałąź nauki. Sensor tego typu najczęściej składa się ze źródła światła generującego promień świetlny o odpowiedniej charakterystyce (np. fotodioda), spektrofotometru lub fotodetektora (np. fototranzystor). Do ich budowy używa się głównie światłowodów. W czasie pomiaru wiązka światła zostaje skierowana poza spektrofotometr do optrody, gdzie oddziałuje z badaną próbką. W kolejnych etapach promieniowanie wraca do układu detekcyjnego. Rozwój technologii światłowodów pozwolił na miniaturyzację urządzeń pomiarowych. Najczęściej wykorzystywane metody pomiarowe to metody absorpcyjne i fluorometryczne. [43]

- Sensory masowe

Sensory masowe wykorzystują jako sygnał pomiarowy zmianę masy sensora, co jest wynikiem reakcji z analizowaną próbką. Może to być np. rozpuszczanie metalu, powstawanie polimeru czy wydzielanie się trudno rozpuszczalnej soli. Głównym elementem, na którym opiera się budowa sensora jest kryształ piezoelektryczny charakteryzujący się zmianą częstotliwości drgań w zależności od jego masy. Podstawową zaletą sensorów masowych są ich niewielkie rozmiary, jednak wśród istotnych wad

wskazać należy niską selektywność i wrażliwość na obecność substancji przeszkadzających. [46]

- **Sensory magnetyczne**

Sensory magnetyczne mają za zadanie wykryć pole magnetyczne wraz z jego składowymi. Czujniki pola magnetycznego przetwarzają sygnał proporcjonalny do indukcji lub natężenia pola magnetycznego w powietrzu na sygnał elektryczny (napięcie, zmianę oporu, częstotliwość). Czujniki te wbrew swojej nazwie w niewielkim stopniu są wykorzystywane do bezpośredniego pomiaru pola magnetycznego. Najczęściej wykorzystuje się je do bezstykowych pomiarów przesunięć, prędkości obrotowej, kąta i prądu. [47]

- **Sensory termiczne**

Sensory termiczne wykorzystują ciepło powstające w określonej reakcji chemicznej w celu uzyskania określonej informacji analitycznej. Sensory termiczne nie służą jedynie do bezpośredniego pomiaru temperatury, wykorzystuje się je również do tego, aby poprzez pomiar efektów termicznych poznać inne fizykochemiczne wartości. Ponieważ zmiany termiczne są stosunkowo łatwe do zmierzenia stąd też mnogość systemów i rozwiązań jeśli chodzi o sensory tego typu. Najprostszy podział rozróżnia sensory kontaktowe i bezkontaktowe. Najpopularniejsze sensory termiczne to termostaty, termistory, termopary, rezystancyjne czujniki temperatury. Wadą jest bardzo mała selektywność, wynikająca z tego że ciepło reakcji jest niespecyficzne. [48]

- **Sensory na bazie elementu biologicznego**

Według tego podziału wyróżnić możemy np. biosensory enzymatyczne, mikrobiologiczne oraz na bazie przeciwciał.

Biosensory enzymatyczne cechuje przede wszystkim wysoka selektywność i aktywność względem wybranych substratów, dlatego też są najczęściej stosowane jako materiały biologicznie aktywne. Poważnym ograniczeniem w ich stosowaniu pozostaje dobór odpowiedniego pH, optymalnej temperatury pracy czy siły jonowej oznaczanego roztworu [49]. Sensory mikrobiologiczne wykorzystują mikroorganizmy jako element biologiczny. Podstawą ich działania jest metabolizm wybranego mikroorganizmu. W porównaniu do pozostałych biosensorów są one tańsze i bardziej uniwersalne [50]. Biosensory powstałe na bazie przeciwciał jak wskazuje nazwa jako element wykrywający wykorzystują

przeciwiała unieruchomione na powierzchni. Jako źródło sygnału wykorzystywana jest tu reakcja antygen – przeciwciało, która powoduje niewielkie zmiany w konformacji. Problemem jest tutaj wykrycie owej zachodzącej zmiany [51].

### **3.2. Zastosowanie sensorów i biosensorów**

Sensory i biosensory to intensywnie badane obiekty, które znalazły cały szereg zastosowań we współczesnym świecie. Wynika to z różnorodności sensorów, stosowanych metod pomiarowych, olbrzymich możliwości miniaturyzacji, możliwości stosowania zarówno w pomiarach jednokrotnych, pomiarach ciągłych oraz analizie przepływowej. Cały czas tworzone są i badane coraz to nowe sensory pozwalające na analizę nowych związków lub dokładniejsze bądź szybsze analizy znanych już substancji. Jedną z ważnych cech sensorów jest możliwość ciągłego monitorowania poziomu oznaczanego analitu. Nie dziwi więc fakt, że światowy rynek sensorów i biosensorów w roku 2012 wyniósł 8,5 miliarda dolarów, a w roku 2018 według prognoz osiągnie 16,8 miliarda dolarów.

#### **• Zastosowanie sensorów i biosensorów w analityce klinicznej**

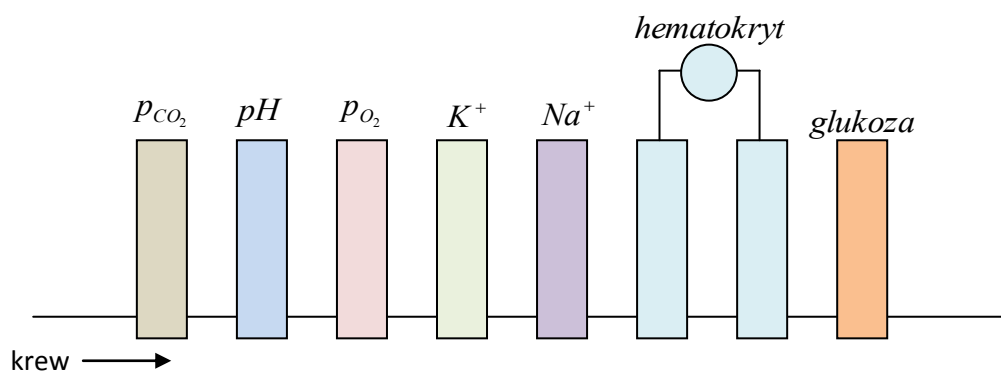
Istnieje duże zapotrzebowanie, aby szereg oznaczeń medycznych przeprowadzać w miejscu obecności pacjenta, otrzymując szybko dokładne wyniki lub by sam pacjent mógł monitorować swój stan zdrowia w domu. Doskonale w tym zakresie sprawdzają się różnego rodzaju sensory i biosensory. Biosensory w pierwszej kolejności, bo już w roku 1962, znalazły zastosowanie przy monitorowaniu poziomu glukozy w ludzkim organizmie. Wyróżnić tu możemy szereg typów biosensorów dzielących się między innymi na inwazyjne, nieinwazyjne, dokonujące pomiaru zarówno we krwi jak i w tkankach, ponadto część z nich może zostać wszczepiona na stałe do organizmu. Wszystko to za sprawą postępującej miniaturyzacji urządzeń oraz obniżenia kosztów ich produkcji. Wraz z rozwojem biosensorów, pojawia się również możliwość aby urządzenia te współpracowały z układami dostarczania insuliny do organizmu i regulowały ich działanie [52].

Początek analityki klinicznej wiąże się z konstrukcją i użyciem trójkanałowego analizatora krwi służącego do oznaczania pH, poziomu CO<sub>2</sub> oraz O<sub>2</sub>.

Inny przykład wart przytoczenia to oznaczanie tlenu azotu w organizmie. NO to cząsteczka endogenna, która została zidentyfikowana jako ważny czynnik w wielu procesach fizjologicznych, jak patogen chorobotwórczy oraz w farmakologii.

Potwierdzono jego sprawczą rolę w przypadku wielu zapaleń, przekazywaniu impulsów nerwowych, odpowiedzi immunologicznej, postępowaniu chorób serca, w chorobie Alzheimera i wielu innych mniej lub lepiej udokumentowanych przypadkach. W zrozumieniu wszystkich tych zagadnień, znaczenia NO w ścieżkach metabolicznych i patogennych kluczową rolę jest określenie jego dokładnego stężenia w danym czasie. Spośród wielu zaprzęgniętych w tym celu technik, najlepsze i najbardziej rzetelne wyniki w czasie rzeczywistym daje użycie amperometrycznego sensora [53].

Spośród elektrod jonoselektywnych na szczególne wyróżnienie i uwagę zasługuje elektroda szklana do oznaczania pH oraz jonów  $\text{Na}^+$ . Kolejnym przykładem jest użycie elektrod jonoselektywnych w celu szybkiego oznaczenia stężeń takich jonów jak  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  we krwi. Ma to niebagatelne znaczenie wzięwszy pod uwagę jak delikatna jest równowaga elektrolitów w organizmie i to jak wieloma procesami fizjologicznymi one



Rys. 16. Schemat wieloelektrodowego analizatora

kierują. Podstawą współczesnej analityki klinicznej są wieloelektrodowe analizatory krwi (rys. 16). Mają one za zadanie dokonać pomiaru w krótkim czasie i szybko przedstawić wynik. Najprostszym sposobem na osiągnięcie tego jest bezpośredni pomiar aktywności jonów w próbce w warunkach ciągłego przepływu. [54]

Następnym polem zainteresowań jest użycie biosensorów do oznaczania makromolekuł (np. cholesterolu), fragmentów DNA czy wszelkiego typu biomarkerów (np. biomarkery raka). Biosensory tego typu zyskują coraz więcej zastosowań praktycznych ze względu na szybkość, korzyści dla pacjenta, mniejsze koszty i mniejsze wymagania technologiczne w porównaniu do obecnie stosowanych analiz [55].

- **Kontrola procesów przemysłowych**

W przemyśle stosuje się biosensory między innymi do monitorowania w czasie rzeczywistym źródeł węgla, rozpuszczonych gazów ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$ ) w procesach fermentacyjnych oraz takich parametrów jak temperatura czy pH. Prowadzi to do optymalizacji procedury, dając zwiększoną wydajność przy jednoczesnym obniżeniu kosztów produkcji. Sensory i biosensory w przemyśle wspierają zautomatyzowanie linii produkcji. Szczególnie cenna jest możliwość zastosowania sensorów w systemach alarmowych do monitorowania stężenia gazów. Przykładem są konduktometryczne sensory półprzewodnikowe typu tlenkowego do detekcji wycieku gazu ziemnego, par substancji organicznych,  $\text{H}_2\text{S}$ , merkaptanów,  $\text{CO}_2$  czy  $\text{H}_2$  w bardzo niskich stężeniach rzędu kilku ppm. [56].

- **Przemysł spożywczy**

Sensory i biosensory pozwalają zabezpieczyć produkty spożywcze zarówno na etapie obróbki jak i gotowe do sprzedaży wytwory. Jednym z takich przykładów jest wykorzystanie biosensorów w celu wykrycia bakterii, a wśród nich *Sallmonelli*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter*, *Escherichia coli*. Spożycie którejkolwiek z powyższych objawia się gorączką, zawrotami głowy, wymiotami, rozstrojem żołądkowym, co w konsekwencji może doprowadzić do odwodnienia czy osłabienia układu immunologicznego. Wspomniane biosensory w celu oznaczenia danej bakterii wykorzystują układ przeciwciał na swojej powierzchni. Jeśli chodzi o produkty spożywcze zagrożenie stanowią nie tylko bakterie, ale również wszelkiego rodzaju zanieczyszczenia będące pozostałością po procesie obróbki lub też pozostałości pestycydów i herbicydów używanych w uprawie i hodowli. Jeszcze inne zastosowanie sensorów i biosensorów to detekcja metali ciężkich pojawiających się w produktach spożywczych. W tym celu wykorzystuje się obecne na powierzchni sensora mikroorganizmy oraz enzymy [57].

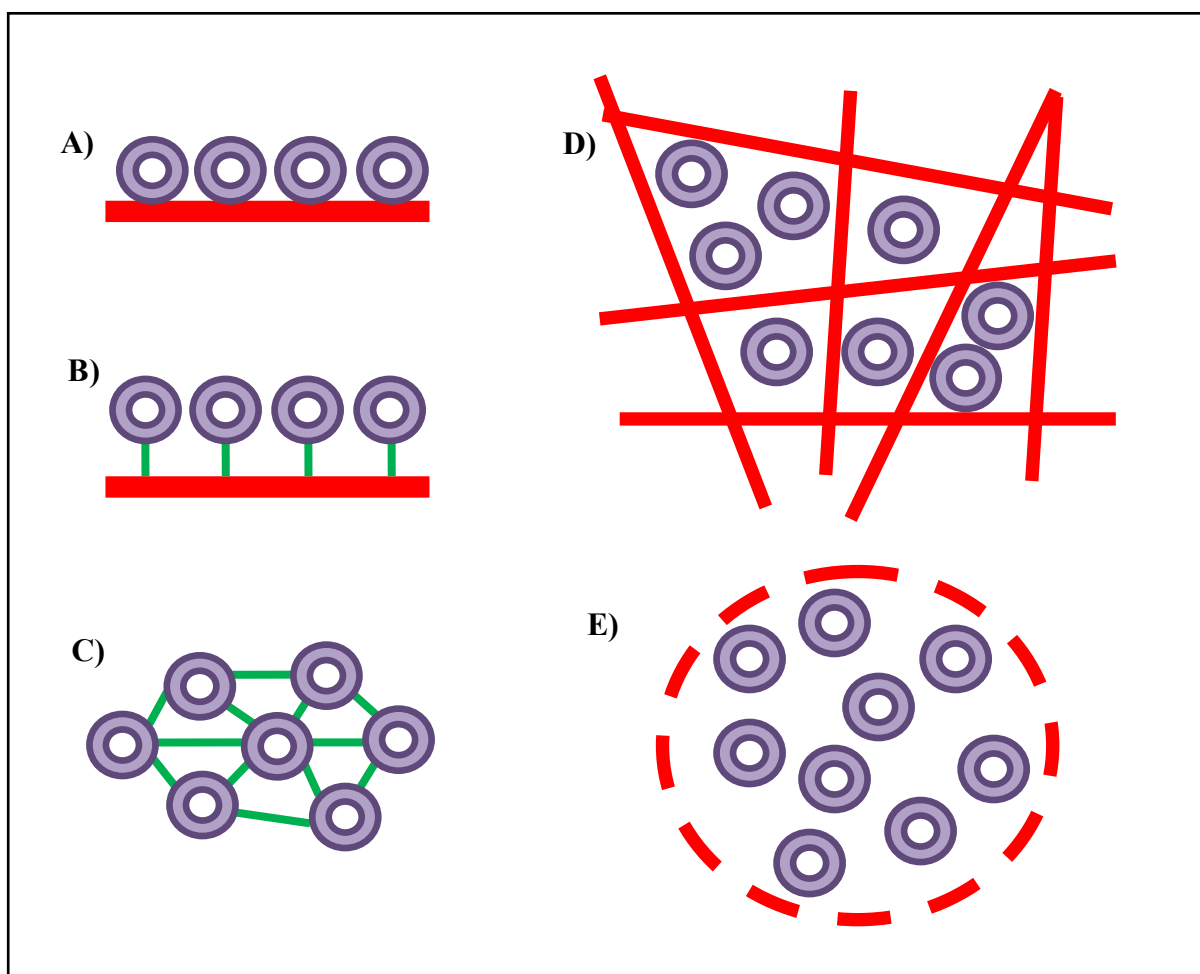
- **Monitoring środowiska**

Stosunkowo nowym, ale intensywnie rozwijającym się zastosowaniem jest wykorzystywanie biosensorów w monitorowaniu zanieczyszczeń środowiska. Możemy w ten sposób kontrolować obecność metali ciężkich w otoczeniu, stanowiących poważne wyzwanie w związku z tym, iż nie podlegają one biodegradacji. Kolejne źródło zanieczyszczeń to

związki azotu. Stosuje się je w dużej ilości jako konserwanty żywności oraz w celu nawożenia gleby. Ponadto biosensory i sensory wykorzystywane są do oznaczania takich związków toksycznych jak polichlorowane bifenyle, związki fenolowe czy związki organofosforowe w tym pestycydy, herbicydy, fungicydy i dioksyny [58].

### 3.3. Metody immobilizacji enzymów w biosensorach.

Podstawowym problemem występującym w konstruowanych biosensorach jest sposób unieruchomienia czynnika biologicznego w warstwie receptorowej. W przypadku



Rys. 17. Schemat przedstawiający metody immobilizacji enzymów. A) adsorpcja, B) wiązanie kowalencyjne, C) sieciowanie, D) pułapkowanie, E) enkapsulacja.

sensorów enzymatycznych dotyczy to sposobu unieruchomienia enzymu na powierzchni sensora. Jest to bardzo ważne zagadnienie ponieważ od niego zależy nie tylko stabilność sygnału sensora, ale również jego trwałość. Podział tych technik przedstawiony poniżej obejmuje metody fizyczne i chemiczne. Wśród pierwszej grupy możemy wyróżnić

adsorpcję, pułapkowanie oraz enkapsulację natomiast drugi typ immobilizacji wykorzystuje wiązanie kowalencyjne i sieciowanie (rys. 17).

- **Adsorpcja**

Adsorpcja umożliwia unieruchomienie enzymu na powierzchni nośnika za pomocą słabych oddziaływań fizykochemicznych, tj. oddziaływań jonowych, wodorowych oraz van der Waalsa. Jest to najprostsza forma immobilizacji, niewątpliwie atrakcyjna ze względu na małe wymagania technologiczne oraz niski koszt, ponadto pozwala zachować nienaruszoną strukturę enzymu. Jednakże jej bardzo poważną wadą pozostaje słabe oddziaływanie pomiędzy enzymem a nośnikiem, co pociąga za sobą problem wymywania enzymu. Przykładem takiej immobilizacji wykorzystywanym na skalę przemysłową jest aminoacylaza unieruchomiona na nośniku DEAE – Sephadex służąca do produkcji aminokwasów [59].

- **Sieciowanie**

Sieciowanie czyli tzw. cross-linking polega na wytworzeniu pomiędzy enzymami lub enzymami a nośnikiem międzycząsteczkowych oddziaływań. Technika ta jest niestety często nieskuteczna, a osiągnięta aktywność enzymu jest na niskim poziomie. Stosuje się ją jako technikę wspomagającą przy metodzie adsorpcyjnej jako dodatkowe zabezpieczenie przed wymywaniem enzymu. Przykładem może tu być tripsyna zaadsorbowana na krzemionce, a następnie utrwalona poprzez międzycząsteczkowe usieciowanie przy użyciu aldehydu glutarowego [60].

- **Pułapkowanie**

Pułapkowanie to inaczej inkluzja enzymu wewnątrz struktur naturalnych bądź syntetycznych. Najczęściej wykonuje się je poprzez polimeryzację nośnika w obecności enzymu przez co dochodzi do zamknięcia enzymu w porach żelu. Niewątpliwą zaletą jest niski koszt pułapkowania oraz możliwość użycia enzymu o niskim stopniu czystości. Niestety nie można użyć tej metody do wielu enzymów, ponieważ pojawia się problem dyfundowania substratów oraz produktów do i ze struktury polimeru oraz degradacja polimerów przez enzymy hydrolityczne [61].



- **Enkapsulacja**

Enkapsulacja to zamknięcie enzymu w sferycznej kapsule z półprzepuszczalnej membrany (np. membrany na bazie azotanu celulozy czy nylonu). Technika ta jest tania i prosta, prowadzona w łagodnych warunkach, jednak w dużej mierze zależy od stabilności wybranego enzymu. Pozwala zachować aktywność enzymu przez długi czas. Enkapsulację z powodzeniem stosuje się w przemyśle kosmetycznym, ponadto trwają badania nad skutecznością jej stosowania w procesach dojrzewania piwa i sera [62].

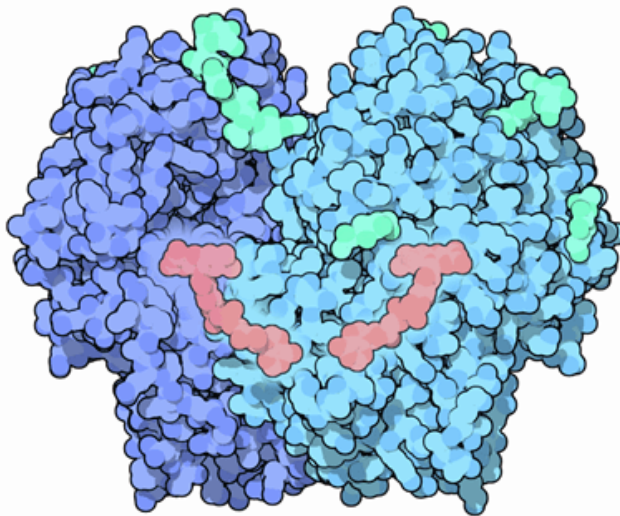
- **Wiązanie kowalencyjne**

Bezpośrednie połączenie enzymu z nośnikiem poprzez wytworzenie wiązania kowalencyjnego to najbardziej skuteczna z metod immobilizacji. Technika ta jest skomplikowana, czasochłonna i kosztowna, ale równocześnie jest ona szeroko stosowana ze względu na stabilność otrzymanego układu oraz niewielki stopień wymywania enzymu. Jednakże próba immobilizacji enzymu poprzez wiązanie kowalencyjne może prowadzić do zmian strukturalnych oraz konformacyjnych centrum aktywnego i spadku jego aktywności lub nawet dezaktywacji. Utworzenie wiązania kowalencyjnego wymaga obecności na powierzchni nośnika odpowiednich grup funkcyjnych (np. hydroksylowych czy karboksylowych) oraz wolnych grup aminowych, karboksylowych lub sulfhydrylowych w enzymach. Wiązania kowalencyjne pomiędzy nośnikiem i immobilizowanym enzymem zazwyczaj nie powstają spontanicznie. Wymagają one zastosowania dwufunkcyjnych związków sieciujących wchodzących w skład wiązania lub związków aktywujących grupy funkcyjne i umożliwiających ich powstawanie, ale niewchodzących w skład wiązania: aldehydu glutarowego, bromocyjanu, diamin, kwasów dikarboksylowych, bezwodników kwasowych, karbodiimidu, epichlorohydryny, czy chlorku tosyłu [63].

#### 4. Oksydaza glukozowa

##### 4.1. Oksydaza glukozowa – modelowy enzym

Odkrycie oksydazy glukozowej przypisuje się Müllerowi [64], który otrzymał ten enzym w 1928 roku z *Aspergillus Niger* i *Penicillium glaucum*. Ponadto zauważył on, iż enzym ten katalizuje utlenianie glukozy do kwasu glukonowego w obecności rozpuszczonego w roztworze tlenu. W tym samym roku również Bernhauer [65] stwierdził, że konwersja glukozy do kwasu glukonowego dokonuje się za sprawą enzymu, który nazwał glukoksydazą. W późniejszy czasie Nord i Engel [66] odkryli podobny enzym w *Fusarium*



Rys. 18. Cząsteczka oksydazy glukozowej z dwoma podjednostkami (kolor jasno- i ciemnoniebieski) oraz centrum flawinoadeninowym (FAD) (kolor różowy). [71]

lini. Następnie Franke [67] wydzielił oksydazę z grzybów z gatunku *Aspergillus Niger* i określił, że jego aktywność jest ściśle związana z centrum flawinowym. Była to pierwsza przesłanka przemawiająca za tym, że oksydaza glukozowa należy do grupy flawoprotein. Z kolei Keilin i Hartree [68] uważani są za pionierów jeśli chodzi o analityczne zastosowanie oksydazy w manometrycznych pomiarach tlenu, w celu oznaczenia glukozy

w próbkach biologicznych. Dopiero Kusai [69] oczyścił, wykrystalizował i częściowo scharakteryzował oksydazę glukozową, zaś Pazur [70] dowiódł, że oprócz bycia flawoproteina jest ona również glikoproteina.

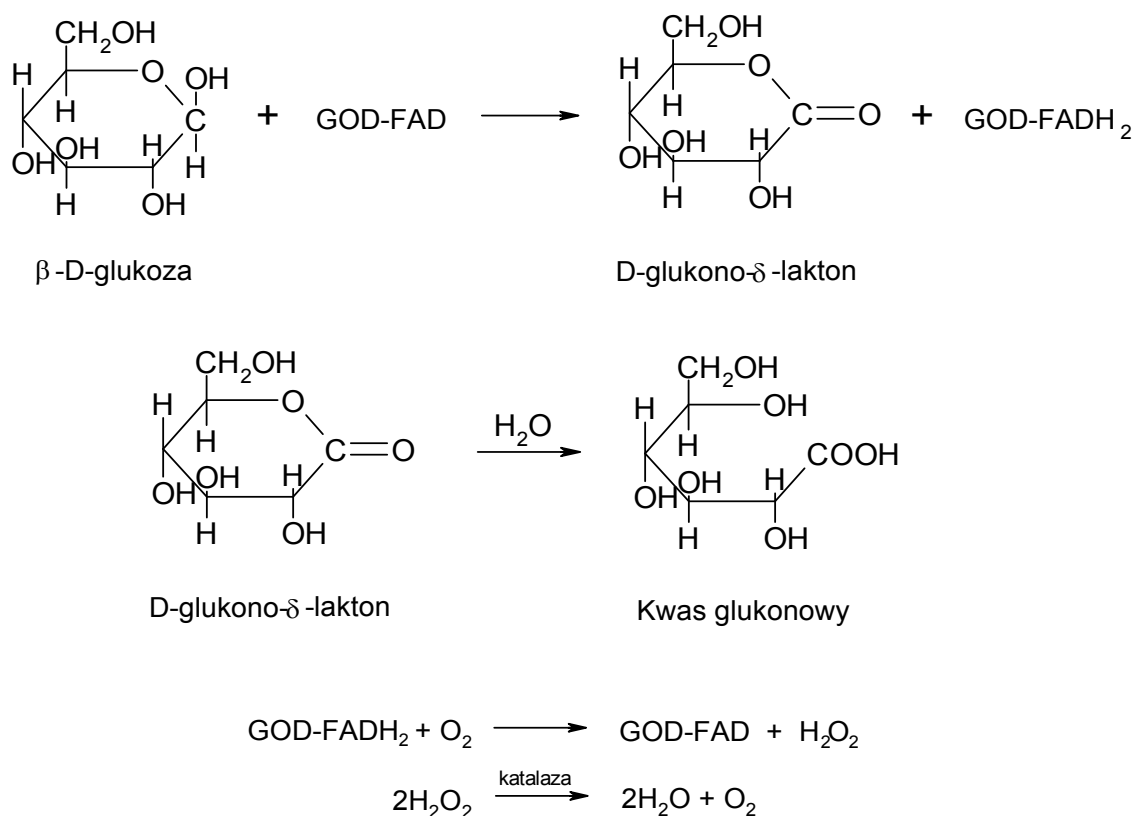
##### 4.2. Budowa i właściwości oksydazy glukozowej

Oksydaza glukozowa (GOD) jest homodimerem składającym się z dwóch identycznych podjednostek oraz dwóch niekowalencyjnie związanych dinukleotydów flawinoadeninowych (FAD). Koenzym FAD pełni rolę nośnika elektronów podczas katalizy ponadto stabilizuje całą strukturę. Cząsteczka GOD ma wydłużony, globularny kształt o średnicy ok. 8 nm (rys. 18). Masa oksydazy glukozowej waha się w granicach 130 - 175 kDa. Poszczególne oksydazy glukozowe mogą się od siebie nieco różnić w zależności od źródła z którego zostały otrzymane. GOD można wyizolować

z czerwonych alg, owoców cytrusowych, insektów, bakterii oraz pleśni. Najpowszechniej otrzymuje się ją jednak z grzybów z rodziny *Aspergillus Niger*.

Pomimo tego, że peptydowa część GOD była wielokrotnie badana, pierwszorzędowa struktura jednostki została poznana dopiero stosunkowo niedawno, tj. w roku 1989 [72].

#### 4.2.1. Mechanizm działania



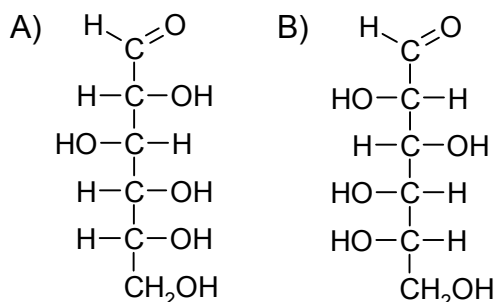
Rys. 19. Mechanizm działania oksydazy glukozowej.

Oksydaza glukozowa to flawoproteina katalizująca utlenianie  $\beta$ -D-glukozy do D-glukono- $\delta$ -laktonu i nadtlenu wodoru przy użyciu tlenu cząsteczkowego jako akceptora elektronów (rys. 19). W procesie tym możemy wyróżnić dwa etapy: redukujący i utleniający. W etapie redukującym to właśnie GOD katalizuje utlenianie  $\beta$ -D-glukozy do D-glukono- $\delta$ -laktonu, który następnie w nieenzymatycznej reakcji hydrolizuje do kwasu glukonowego. W wyniku tej reakcji dinukleotyd flawinoadeninowy (FAD) w GOD zostaje zredukowany do FADH<sub>2</sub>. W etapie utleniającym, zredukowana forma oksydazy glukozowej jest utleniana przy udziale obecnego w roztworze tlenu do postaci poprzedniej, czyli zredukowany FADH<sub>2</sub> zostaje utleniony do FAD. Drugim produktem tej reakcji jest H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Nadtlenek wodoru w reakcji z katalazą (CAT) rozpada się dając tlen i wodę [73].

## 5. Glukoza

### 5.1. Wstęp

Glukoza jest cukrem prostym, monosacharydem z grupy aldoheksoz. Po raz pierwszy została wyizolowana przez niemieckiego farmaceutę Andreeasa Marggrafa w 1747 roku z rodzynek, stąd często nazywana jest cukrem gronowym. W roku 1811 Konstanty Kirchoff przy użyciu wyizolowanej glukozy otrzymał syrop cukrowy. Nazwę glukoza wprowadził dopiero w 1838 roku Jean Baptiste Andre Dumas od greckiego glycos, co oznacza słodki. Na przełomie wieku XIX i XX Emil Fischer przedstawił strukturę glukozy i podał, że występuje ona w dwóch formach (rys. 20). [74]



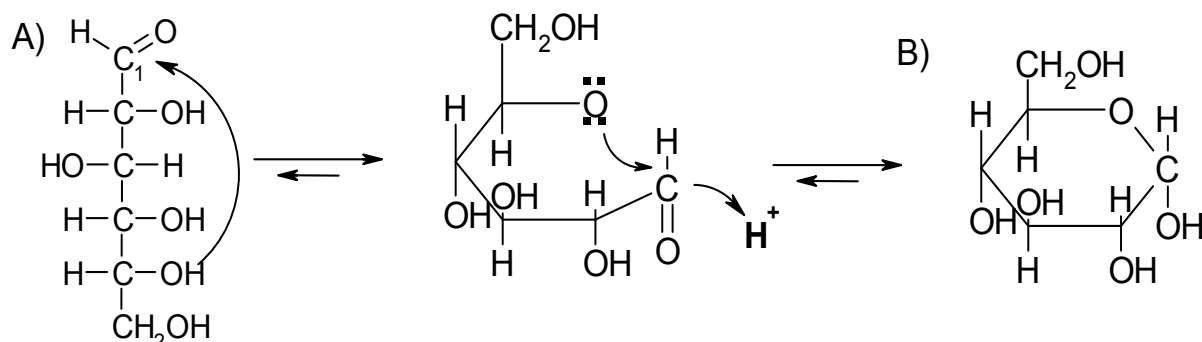
Rys. 20. D – glukoza (A) oraz L – glukoza (B) w projekcji Fischera [74].

### 5.2. Budowa i właściwości

Glukoza w stanie stałym ma postać białego proszku o drobnych kryształkach, dobrze rozpuszczalnego w wodzie. Wzór sumaryczny glukozy to  $C_6H_{12}O_6$ . W formie łańcuchowej wyróżniamy atomy węgla od C1 do C6, przy czym C1 związany jest z grupą aldehydową. Pozostałe węgle posiadają po jednej grupie hydroksylowej, zaś całość uzupełniają atomy wodoru. Dlatego też, w przypadku glukozy możemy się spotkać z określeniami takimi jak heksoza, aldoza czy aldoheksosa. Obecność grupy aldehydowej czyni z glukozy cukier redukujący. Ponadto atomy od C2 do C5 stanowią stereocentra. Naturalna glukoza występuje w przyrodzie w konfiguracji D. Znajduje się ona w stanie wolnym w owocach, miodzie, sokach roślinnych, tkankach roślin zielonych, krwi, płynie mózgowordzeniowym a także w moczu. W stanie związanym występuje natomiast w licznych oligosacharydach oraz w celulozie, skrobi, glikogenie, laminarianie, izolichenie i w hemicelulozach.

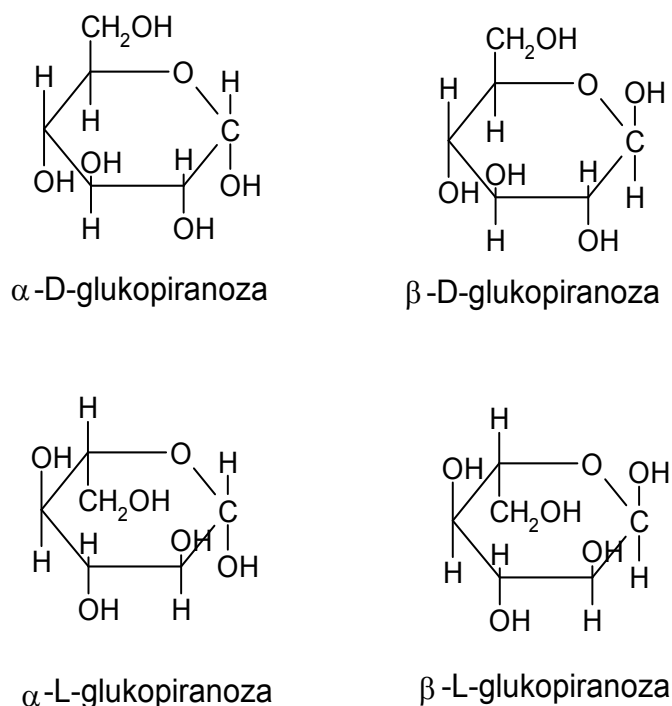
Glukoza w roztworze tylko w niewielkim procencie występuje w formie liniowej, w zdecydowanej większości przypadków (ponad 99% glukozy) nie zawiera ona wolnej grupy aldehydowej tylko występuje w postaci cyklicznej, półacetalowej, powodem tego

jest reakcja wewnątrzcząsteczkowa pomiędzy grupą aldehydową a grupą hydroksylową przy piątym atomie węgla (rys. 21). Glukoza w formie cyklicznej jest nazywana glukopiranozą.



Rys. 21. Cyklizacja cząsteczki glukozy. Przejście z projekcji Fischera (A) do projekcji Hawortha (B). [75]

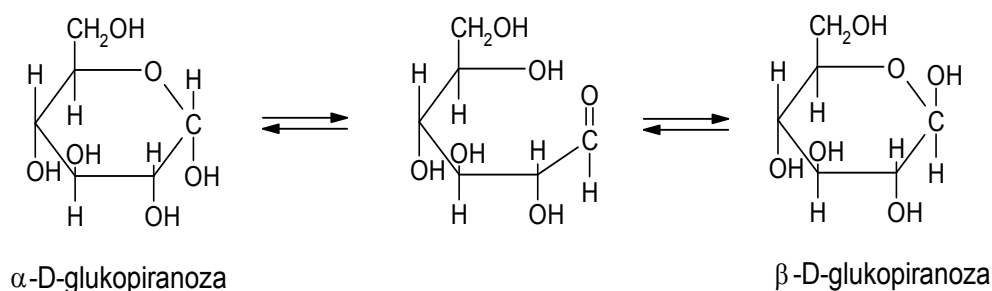
W konsekwencji w wyniku cyklizacji glukozy pierwszy węgiel (C1) staje się asymetryczny w związku z czym powstają dwie stereoizometryczne odmiany  $\alpha$ -D-glukopiranoza i  $\beta$ -D-glukopiranoza (rys. 22).



Rys. 22. Cztery formy glukopiranozy w projekcji Hawortha. [81]

Inną ciekawą właściwością glukozy, jest ustalanie w roztworach wodnych termodynamicznej równowagi pomiędzy anomerem  $\alpha$  i  $\beta$ . Występują one w stosunku 36% do 64%. Zjawisko to nazywane jest mutarotacją (rys. 23). Anomer  $\alpha$  charakteryzuje się

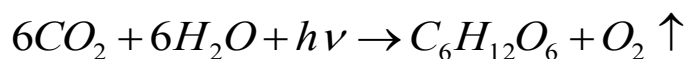
skręcalnością właściwą  $112^{\circ}$  natomiast anomer  $\beta$   $19^{\circ}$ . Natomiast wodny roztwór glukozy po ustaleniu się równowagi w roztworze wykazuje skręcalność  $52,7^{\circ}$ . [75]



Rys. 23. Proces mutarotacji glukozy w roztworze wodnym.

### 5.3. Otrzymywanie

W świecie roślin i niektórych organizmów prokariotycznych glukoza jest produktem procesu fotosyntezy, który jest jedną z najważniejszych przemian biochemicznych na Ziemi. W fotosyntezie możemy wyróżnić dwa etapy, tzw. fazę jasną oraz fazę ciemną. W pierwszym etapie energia zaabsorbowanego światła jest zmieniana na energię wiązań chemicznych czego efektem ubocznym jest tlen. W fazie ciemnej wspomnianą wcześniej energię wykorzystuje się do otrzymania glukozy (rys. 24).



Rys. 24. Uproszczony zapis procesu fotosyntezy.

Grzyby otrzymują glukozę w procesie glikogenolizy z glikogenu. Natomiast w przypadku zwierząt oraz ludzi glukoza jest syntezowana w wątrobie oraz nerkach z niewęglowych produktów pośrednich takich jak pirogronian, mleczan i glicerol w procesie glukoneogenezy. Mechanizm ten odpowiada za regulację poziomu glukozy we krwi. Inny z mechanizmów pozwalający na taką regulację to rozkład glikogenu czyli glikogenoliza.

Na skalę przemysłową glukozę otrzymuje się poprzez enzymatyczną hydrolizę skrobi, którą w zależności od regionu świata pozyskuje się z kukurydzy, ryżu, pszenicy, tapioki, plew kukurydzianych czy palm. [76]

### 5.4. Rola glukozy w organizmie

Glukoza, choć jest cukrem prostym, w ludzkim organizmie pełni niezwykle ważną i skomplikowaną rolę będąc przede wszystkim źródłem energii, ale również bierze udział w tworzeniu tłuszczów i białek, ponadto ma swój udział w procesie starzenia. Źródłem glukozy w organizmie są wszelkiego rodzaju węglowodany, które po spożyciu pod wpływem enzymów zostają rozłożone do cukrów prostych, w tym glukozy. Ta z kolei jest wchłaniana do krwioobiegu dopiero poprzez ścianki jelita cienkiego. Podstawową funkcją glukozy jest wytwarzanie w organizmie energii w wyniku rozkładu na dwutlenek węgla, wodę i właśnie energię. Dwutlenek węgla jest wydalany w procesie oddychania, zaś energia jest zużywana przez komórki w wielu procesach życiowych. Kluczową rolę pełni hormon – insulina, dzięki której glukoza może wnikać do wnętrza komórki. Wyjątek stanowią tu komórki i włókna nerwowe, komórki siatkówki, nerek, nadnerczy, naczyń krwionośnych oraz krwinki czerwone. To właśnie ich zaopatrzenie staje się dla organizmu priorytetem w momencie zaburzenia w produkcji insuliny.

Po każdym posiłku organizm zyskuje zapas glukozy wykorzystywany w czasie 2 – 3 godzin oraz odnawia zapasy glikogenu w wątrobie i mięśniach. Niestety sam mózg nie ma możliwości magazynowania glukozy w żadnej formie i jest zależny od jej ciągłych dostaw.

Ważne jest to, co dzieje się w przypadku gdy zapasy glukozy w organizmie się wyczerpią. Po pierwsze organizm wstrzymuje produkcję insuliny, natomiast trzustka rozpoczyna produkcję hormonu jakim jest glukagon, co jest sygnałem dla organizmu, aby uwolnić zapasy glukozy w postaci glikogenu. Jeżeli stan ten będzie się przedłużał organizm sięgnie po inne źródła glukozy. Pod wpływem wydzielonej adrenaliny rozłożone zostają tłuszcze, dając w ten sposób kwasy tłuszczowe i glicerol, które następnie wątroba przekształci odpowiednio w związki ketonowe i glukozę. W kolejnym etapie podobne reakcje jak wątroba przejmą nerki. W ostateczności organizm pozbawiony źródeł energii zacznie rozkładać również białka, uzyskując w ten sposób energię, Jednak żaden ze wspomnianych procesów nie jest tak wydajny energetycznie jak w przypadku wykorzystania glukozy. Zapasy glikogenu są bardzo ograniczone i u dorosłego człowiek wystarczają na 24 godziny.

Wartości prawidłowego stężenia glukozy w organizmie są zróżnicowane w zależności od płci, wieku, stanu zdrowia i wielu innych czynników. Ogólnie można przyjąć, że zakres

stężenie glukozy u zdrowego człowieka powinien wynosić w granicach 70 – 110 mg/dL (3,8 – 6,1 mmol·L<sup>-1</sup>).

Przedłużający się stan zbyt niskiego stężenia glukozy we krwi (poniżej 3,0 – 3,5 mmol·L<sup>-1</sup>; 55 – 65 mg/dL) nosi nazwę hipoglikemii i jest niebezpieczny dla zdrowia i życia. W celu podwyższenia stężenia glukozy we krwi organizm produkuje takie hormony jak adrenalina, glukagon, kortyzol i hormon wzrostu. Podwyższenie stężenia adrenaliny może wywołać nadmierne pocenie się, drżenie rąk, uczucie niepokoju. Jeśli zaczyna brakować glukozy, aby pokryć zapotrzebowanie mózgu na energię pojawiają się drażliwość, dezorientacja i zaburzenia pamięci. Dłuższe utrzymywanie się hipoglikemii spowoduje pogłębienie się objawów niepożądanych, co może doprowadzić do drgawek, porażenia i utraty przytomności. Niedobór glukozy we krwi może być również skutkiem innej choroby np. niedoczynności tarczycy, nowotworu trzustki, guzem wątroby, niedoczynnością kory nadnerczy.

Podwyższony poziom glukozy we krwi nosi nazwę hiperglikemii ( powyżej 126 mg/dL) i również zagraża zdrowiu. Stan taki nosi nazwę cukrzycy i jest wywoływany niedoborem insuliny. Przy stężeniu powyżej 180 mg/dL organizm rozpoczyna wydalanie nadmiaru glukozy wraz z moczem. Efektem takiego stanu jest wzmożone pragnienie, utrata wagi, osłabienie, senność, skóra i błony śluzowe stają się suche i podatne na infekcje grzybicze, ponieważ białe krwinki stają się mniej wydajne. Hiperglikemia uszkadza tkanki, powoduje zaburzenia lipidowe, powoduje powstanie nieprawidłowych białek, uszkadza enzymy, zwiększa stres oksydacyjny, prowadzi do utraty wzroku, zaburza krzepliwość krwi i zwiększa ryzyko zawału serca. [77]

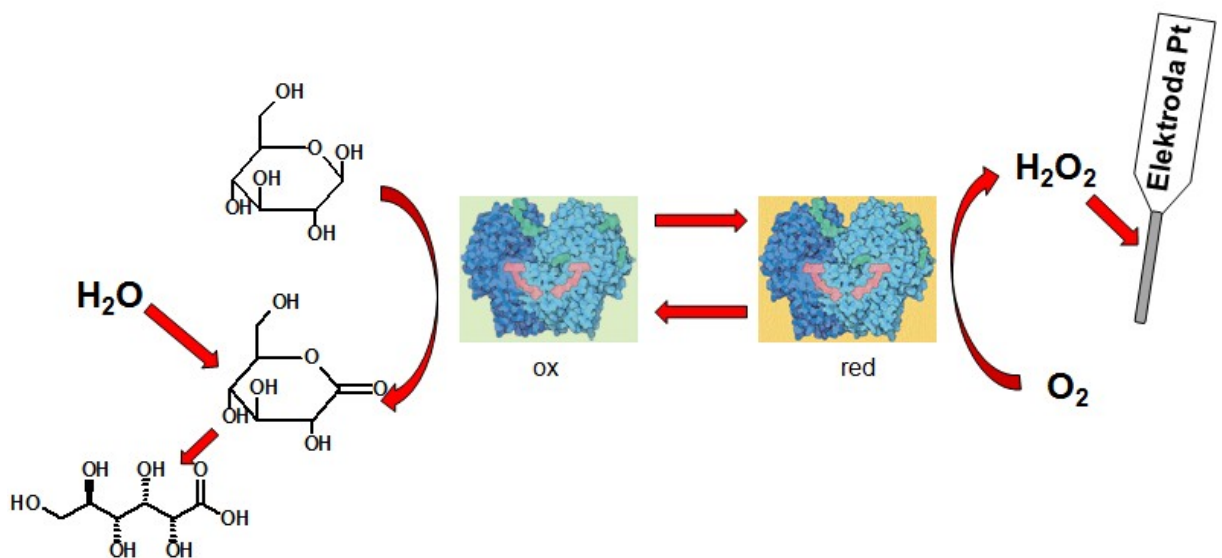


## 6. Biosensory glukozy

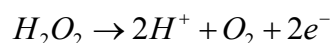
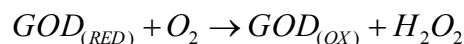
O popularności biosensorów jako zagadnień naukowych może świadczyć fakt, że od początku lat 60 XX wieku opublikowano ponad 80000 prac związanych z różnymi biosensorymi. W puli tej aż 10% stanowią biosensory glukozy z tego 92% to prace poświęcone amperometrycznym biosensynom glukozy, zaś 2,5% to publikacje o biosensynom potencjometrycznych. Bez względu na różnorodność zastosowanych technik, materiałów i rozwiązań, wszystkie biosensory glukozy możemy podzielić na trzy generacje: biosensory pierwszej, drugiej oraz trzeciej generacji.

### • Biosensory pierwszej generacji

Biosensory pierwszej generacji to najstarsza grupa tego typu urządzeń. W swym działaniu wykorzystują one detekcję wytworzonego nadtlenu wodoru jako źródło sygnału (rys. 25 i 26).



Rys. 25. Schemat działania biosensora glukozy pierwszej generacji.



Rys. 26. Równania reakcji zachodzących podczas pracy biosensora pierwszej generacji.

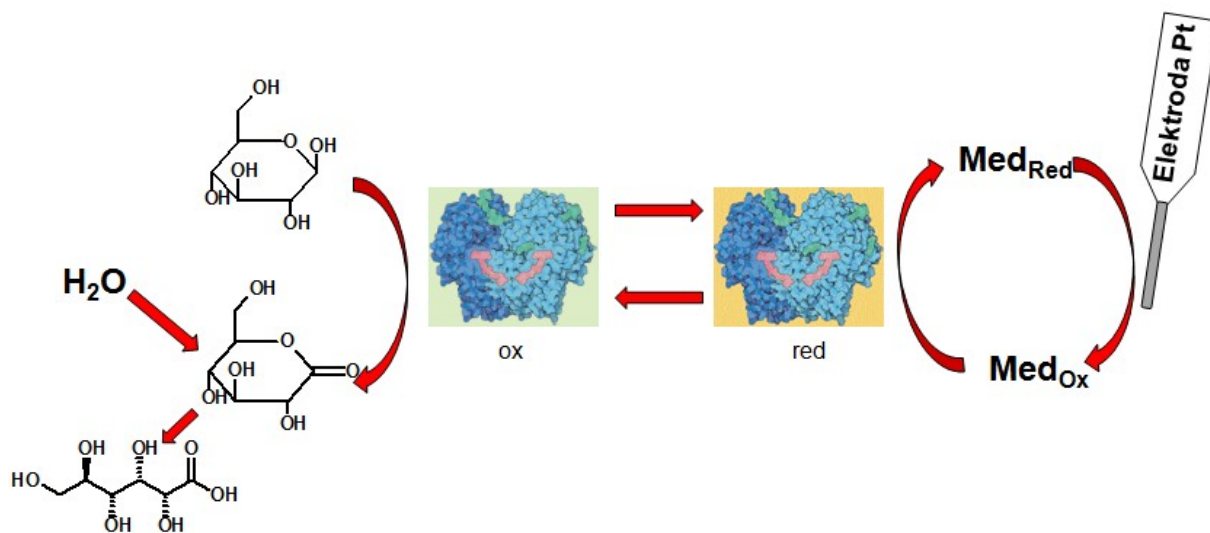
W czasie pracy biosensora pierwszej generacji w wyniku reakcji oksydazy glukozowej w formie utlenionej z cząsteczką glukozy otrzymujemy glukonolakton. W wyniku tego oddziaływania oksydaza glukozowa przekształca się w formę zredukowaną, natomiast

powstały glukonolakton pod wpływem wody hydrolizuje dając kwas glukonowy. Zredukowana postać oksydazy glukozowej pod wpływem tlenu obecnego w roztworze, działającego jako akceptor elektronów, ponownie przeprowadzana jest w formę utlenioną. W procesie utleniania enzymu powstaje nadtlenek wodoru, który następnie jest detektowany na powierzchni elektrody.

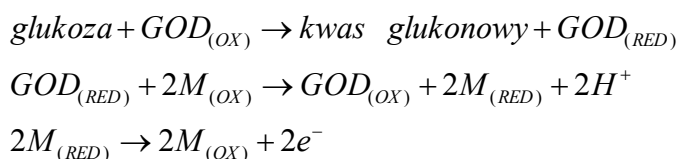
Niewątpliwą zaletą tych biosensorów jest prostota działania. Jednak biosensor pierwszej generacji posiada też istotne wady. Jedną z nich jest problem interferencji innych elektroaktywnych składników np. krwi takich jak kwas askorbinowy czy kwas moczowy przy potencjale operacyjnym (ok. 0,6 V). Ogranicza to selektywność danego biosensora i może skutkować otrzymaniem nieprecyzyjnych wyników. Ponadto, problem może stanowić ciągły dostęp tlenu i fluktuacje jego stężenia w przypadku pomiaru w płynach fizjologicznych. [78]

- **Biosensor drugiej generacji**

Biorąc pod uwagę wady biosensorów pierwszej generacji, rozpoczęto pracę dążące do poprawy ich właściwości. Tak narodziła się druga generacja biosensorów glukozy (rys. 27 i 28), którą otrzymano na drodze poszukiwań alternatywnego dla naturalnego tlenu akceptora elektronów.



Rys. 27. Schemat działania biosensora glukozy drugiej generacji.



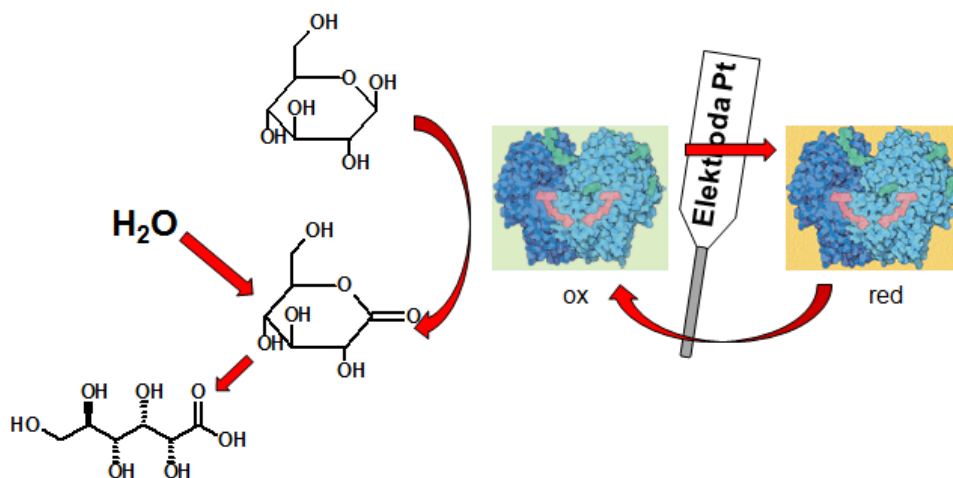
Rys. 28. Równania reakcji zachodzących podczas pracy biosensora drugiej generacji.

W czasie pracy biosensora drugiej generacji w wyniku reakcji oksydazy glukozowej w formie utlenionej z cząsteczką glukozy otrzymujemy glukonolakton. W wyniku tego oddziaływania oksydaza glukozowa przekształca się w formę zredukowaną, natomiast powstały glukonolakton pod wpływem wody hydrolizuje dając kwas glukonowy. Ta część jest identyczna jak w przypadku biosensora pierwszej generacji. Różnica pojawia się przy utlenianiu zredukowanej oksydazy glukozowej. Dzieje się to za sprawą obecnego mediatora, znajdującego się w postaci utlenionej. W wyniku oddziaływania ze zredukowaną oksydazą jest ona ponownie utleniana w wyniku czego sam mediator ulega redukcji. Zredukowany mediator jest następnie utleniany na powierzchni elektrody, co stanowi źródło sygnału analitycznego. Zastosowanie syntetycznych mediatorów pozwoliło wyeliminować problemy pierwszej generacji związane ze stężeniem tlenu i obecnością interferentów. Jedne z najpopularniejszych mediatorów stosowanych w tych biosensorach to ferrocen i Błękit Pruski. Odpowiedni mediator musi się charakteryzować niskim potencjałem redox, niską masą cząsteczkową, małą toksycznością, nie tworzyć kompleksów, być stabilnym w formie utlenionej i zredukowanej. Niestety oprócz zalet pojawiły się również wady tego rozwiązania do których należy zaliczyć wysoką konkurencyjność pomiędzy mediatorem a obecnym tlenem czego wynikiem jest gromadzenie nadtlenu wodoru przy powierzchni elektrody obniżające aktywność enzymu. Inny problem to oddziaływanie pomiędzy mediatorem a interferentem oraz wymywanie mediatora z regionu pomiędzy enzymem a powierzchnią elektrody. W celu eliminacji pojawiających się problemów podjęto prace nad biosensorem trzeciej generacji.

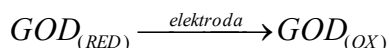
[79]

- **Biosensor trzeciej generacji**

Biosensor trzeciej generacji zakłada wyeliminowanie mediatora oraz bezpośredni transfer elektronów pomiędzy elektrodą a centrum aktywnym enzymu (rys. 29 i 30).



Rys. 29. Schemat działania biosensora glukozy trzeciej generacji.

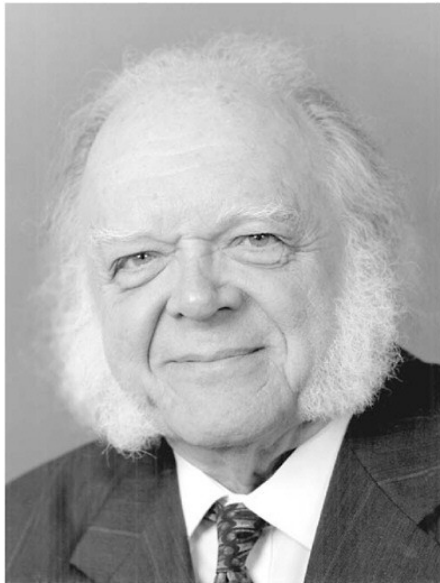


Rys. 30. Równania reakcji zachodzących podczas pracy biosensora trzeciej generacji.

W czasie pracy biosensora trzeciej generacji w wyniku reakcji oksydazy glukozy w formie utlenionej z cząsteczką glukozy otrzymujemy glukonolakton. W wyniku tego oddziaływania oksydaza glukozy przekształca się w formę zredukowaną, natomiast powstały glukonolakton pod wpływem wody hydrolizuje dając kwas glukonowy. Ta część jest identyczna jak w przypadku biosensora pierwszej oraz drugiej generacji. Podstawową różnicą jest usunięcie mediatora. Regeneracja oksydazy glukozy z formy zredukowanej ponownie do formy utlenionej odbywa się na powierzchni elektrody poprzez bezpośredni transfer elektronów pomiędzy elektrodą a centrum aktywnym oksydazy glukozy. Niestety w literaturze odnajdziemy tylko kilka dobrze udokumentowanych przykładów takiego transferu. Problem stanowi w tym przypadku bariera przepływu elektronów jaką jest globularna struktura oksydazy glukozy, której centrum aktywne zawierające FAD jest ukryte we wnętrzu o głębokości około 13 Å. Bezpośredni transfer elektronów jest możliwy dzięki użyciu przewodzących soli organicznych takich jak tetracyjanochinonodimetan (TCNQ), tetratiafulwalen (TTF), polimery przewodzące czy nanorurki węglowe. [80]

### 6.1. Rozwój koncepcji biosensora glukozy

Jako datę kluczową dla koncepcji biosensora przyjmuje się rok 1956, kiedy to profesor Leland C. Clark Jr. (rys. 31) zaprezentował elektrodę tlenową Clarka. Natomiast pierwszą



Rys. 31. Profesor Leland C. Clark Jr.

elektrodę z enzymem, do pomiarów stężenia glukozy we krwi przedstawili w roku 1962 pracownicy Szpitala Dziecięcego w Cincinnati – Clark i Lyons. Był to pierwszy obiekt działający na zasadzie wspomnianego w paragrafie 6.1. biosensora pierwszej generacji [81]. Równoległe do prac nad biosensorem elektrochemicznym, toczyły się prace nad jego kolorymetrycznym odpowiednikiem. Został on wprowadzony na rynek pod nazwą Dextrostix w roku 1966 przez Westa. Miał on formę pasków testowych kolorymetrycznie detekujących nadtlenek wodoru powstały w czasie reakcji glukozy z oksydazą

glukozową [82]. W roku 1967 Updike i Hicks rozwinęli koncepcję biosensora używając dwóch tlenowych elektrod pracujących, z których jedna była pokryta enzymem, mierząc prąd różnicowy i umożliwiając w ten sposób korektę o odchylenia związane z różnicą w poziomie tlenu w próbkach [83]. W roku 1973 Gilbault i Lubrano opracowali elektrodę enzymatyczną do pomiaru stężenia glukozy we krwi poprzez amperometryczny pomiar wytwarzanego nadtlenku wodoru [84]. Pierwsze komercyjne urządzenie do bezpośredniego określenia stężenia glukozy w krwi opracowała firma Yellow Spring Instrument (YSI) w roku 1975, nadając mu nazwę Model 23 YSI. Lata 70 i 80 XX w. to dynamiczny rozwój w dziedzinie biosensorów. Pojawiające się problemy i ograniczenia wiążące się z koncepcją biosensora pierwszej generacji, skłoniły grupy badawcze do poszukiwania nowych rozwiązań. W efekcie czego w roku 1985 Gough zaprezentował dwuwymiarową elektrodę, w której dyfuzja glukozy jest możliwa tylko z jednego kierunku natomiast tlen może dyfundować z dwóch stron [85]. Inną z obranych ścieżek jest wyeliminowanie tlenu i zastąpienie go sztucznym mediatorem umożliwiającym wymianę elektronów pomiędzy elektrodą a centrum aktywnym enzymu. Rozwiązanie takie zaprezentował w 1984 roku Cass [86]. Z kolei Ohara w roku 1994 zaprezentował enzymy unieruchomione w hydrożelach redox, które przewodziły elektrony z centrum aktywnego enzymu na powierzchnię elektrody [87]. W roku 2004 swoją koncepcję biosensora

przedstawił Salimi, w której na elektrodę płaską z pirolitycznego grafitu naniósł metodą sol – gel kompozyt z wielościennymi rurkami nanowęglowymi, w którym za pomocą enkapsulacji unieruchomił oksydazę glukozową. [88]. Natomiast Thibault unieruchomił oksydazę glukozową na nanocząstkach złota [89]. Kolejnym etapem ewolucji biosensora było wyeliminowanie mediatora, co już w roku 1996 zaprezentował Khan [90].

Tabela 1 przedstawia zestawienie wybranych przykładów biosensorów glukozy i ma na celu ukazanie różnorodności w tej dziedzinie chemii. Warto również zwrócić uwagę na duże różnice występujące przede wszystkim w zakresie czasu aktywności jaki utrzymują poszczególne sensory, które wahają się od kilku dni do kilku miesięcy.

Opis	Zakres liniowy	Czas odpowiedzi	Stabilność	Odkrywcą, rok
GOD unieruchomiona kowalencyjnie na elektrodzie grafitowej z zaadsorbowanym jonom N-metylofenazynewym.	0,5 $\mu$ M - 2mM	60s	Enzym - ok.. 9 miesięcy; Mediator - 1 dzień	G. Jönsson, L. Gorton, 1985 [91]
Kilka warstw: octan celulozy, GOD usieciowana aldehydem glutarowym i poliuretan	3 - 28mM	100s	6 dni	W. Kerner, H. Zier, G. Steinbach, J. Brückel, E. F. Pfeiffer, T. Weiss, K. Cammann, H. Planck, 1988 [92]
GOD wbudowana w pastę grafitową modyfikowaną tetracyjanochinodimetanem (TCNQ)	5 - 50mM	15 - 50s	35 dni	P. C. Pandey, A. M. Kayastha, V. Pandey, 1992 [93]
Warstwa GOD przykryta membraną z Nafionu	0,5 - 40mM	30s	6 dni	J. Zhu, C. Tian, W. Wu, J. Wu, H. Zhang, D. Lu, G. Zhang, 1994 [94]
Do unieruchomienia GOD został użyty materiał zol - żel składający się z zolu krzemionkowego i kopolimeru z alkoholu poliwinylowego oraz 4 - winylopirydyny.	8 - 16mM	11s	5 miesięcy (pzechowywanie)	B. Wang, B. Li, Q. Deng, S. Dong, 1998 [95]
GOD unieruchomiona w filmie poli(o-fenylendiaminowym) z dodatkiem błękitu pruskiego.	8 - 14mM	4 - 8s	-	R. Garjonyte, A. Malinauskas, 1999 [96]
Współelektroosadzanie poli(winyloimidazolowego) kompleksu [Os(bpy)2Cl](+/2+) (PVI-Os) oraz GOD	5 - 30mM	5s	64 godziny (50% spadek aktywności)	J. Fei, Y. Wu, X. Ji, J. Wang, S. Hu, Z. Gao, 2003 [97]
GOD unieruchomiona w mikrokapsułkach w zol - żelu na powierzchni elektrody BPPG modyfikowanej wielościennymi nanorurkami węglowymi.	0,2 - 20mM	<5s	3 tygodnie	A. Salimi, R. G. Compton, R. Hallaj, 2004 [94]
GOD zaadsorbowana na nanocząstkach platynowych modyfikowanych nanorurkami węglowymi.	0,1-13,5mM	5s	22 dni (73,5% aktywności)	H. Tang, J. Chen, S. Yao, L. Nie, G. Deng, Y. Kuang, 2004 [98]
GOD enkapsulowana elektrochemicznie w porowatym poli( kwasie akrylonitrylo-co-akrylowym) otrzymanym w wyniku polimeryzacji akrylonitrylu i kwas akrylowego.	5 $\mu$ M - 3mM	<30s	5 tygodni	D. Shan, Y. He, S. Wang, H. Xue, H. Zheng, 2006 [99]

GOD unieruchomiona bezpośrednio na utlenionej elektrodzie diamentowej domieszkowanej borem (BDDE)	0,67 $\mu$ M - 2mM	<5s	1 miesiąc (61%)	J. Wu, Y. Qu, 2006 [100]
Nanobiokompozytowy film składający się z polipirolu, funkcjonalizowanych wielościennych nanorurek węglowych i GOD	0,8 $\mu$ M - 4mM	8s	-	Y. C. Tsai, S. C. Li, S. W. Liao, 2006 [101]
GOD unieruchomiona na elektrodzie z węgla szklatego modyfikowanej platynowymi nanocząstkami umieszczonymi na sulfonowanych wielościennych nanorurkach węglowych.	0,02 - 6,4mM	-	1 godzina (w ciągłym użyciu)	H. J. Wang, C. M. Zhou, H. Peng, H. Yu, 2007 [102]
GOD unieruchomiona w filmie żel - żel naniesionym techniką osadzania z fazy gazowej na elektrodzie modyfikowanej błękitem pruskim.	0,02 - 15mM	<10s	3 miesiące	R. Liang, J. Jiang, J. Qiu, 2008 [103]
Grafitowe nanopłytki z nanocząstkami platynowymi i palladowymi.	0,1 - 20mM	2s	1 tydzień	J. Lu, I. Do, L. T. Drzal, R. M. Worden, I. Lee, 2008 [104]
GOD uwięziona na wewnętrznych ściankach wysoce uporządkowanych nanorurkach polianiliny.	0,01 - 5,5 mM	3s	2 tygodnie (91%)	Z. Wang, S. Liu, P. Wu, C. Cai, 2009 [105]
GOD unieruchomiona na elektrodzie złotej w cienkim filmie chitosanu zawierającym nanokompozyty grafenu i nanocząstki złota.	2 - 14 mM	-	15 dni	C. Shan, H. Yang, D. Han, Q. Zhang, A. Ivaska, L. Niu, 2010 [106]
GOD unieruchomiona w nanohybrydowym materiale składającym się z nanocząstek złota i wielościennych nanorurek węglowych.	20 $\mu$ M - 10mM	3s	1 tydzień	P. Si, P. Kannan, L. Guo, H. Son, D. H. Kim, 2011 [107]
GOD umieszczona w matrycy z filmu kompozytowego zbudowane z chitosanu i nanocząstek platyny	1,2 $\mu$ M - 4mM	<5s	1 miesiąc (61%)	J. Li, R. Yuan, Y. Chai, X. Che, W. Li, 2012 [108]
GOD unieruchomiona w paście węglowej modyfikowanej nanocząstkami tlenku cynku	9,1 $\mu$ M - 14,5mM	-	-	G. Aydoğdu, D. K. Zeybek, Ş. Pekyardımcı, E. Kılıç, 2013 [109]
GOD przyczepiona do samoorganizującej się monowarstwy i przykryta warstwą błękitu pruskiego	0,4 - 25mM	-	4 dni	H. Wang, H. Ohnuki, H. Endo, M. Izumi, 2014 [110]

Tabela 1. Porównanie wybranych parametrów dla opracowanych na przestrzeni lat amperometrycznych biosensorów glukozy .



## 7. Metody oznaczania stężenia glukozy

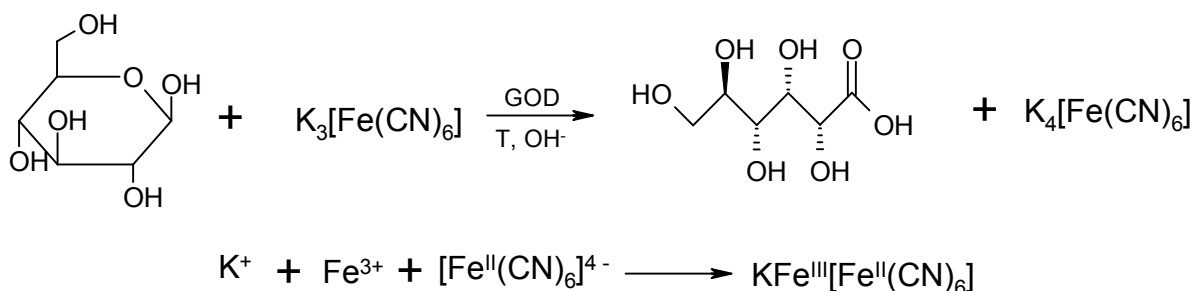
Spśród wielu dostępnych metod oznaczania glukozy w praktyce stosuje się tylko kilka z nich, które możemy skategoryzować jako metody chemiczne oraz metody enzymatyczne.

### 7.1. Metody chemiczne

#### 7.1.1. Reakcje utleniania – redukcji

- Metoda Hoffmana

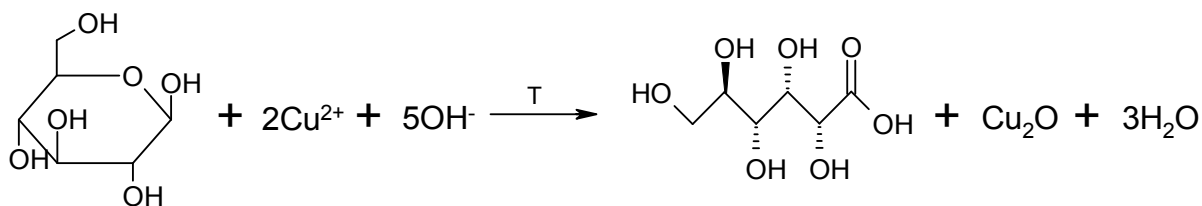
Podstawą tej metody jest reakcja heksacyjanożelazian (III) potasu  $K_3[Fe(CN)_6]$  z glukozą w obecności oksydazy glukozy w alkalicznym środowisku, po podgrzaniu (rys. 32) dochodzi do redukcji  $Fe^{3+}$  do  $Fe^{2+}$  (w postaci heksacyjanożelazianu (II) potasu  $K_4[Fe(CN)_6]$ ) i powstania kwasu glukonowego. W wyniku reakcji następuje zmiana koloru roztworu z żółtego na bezbarwny, co skutkuje zmianą absorbancji i może być zmierzone fotometrycznie. W różnych wariantach tej metody powstały heksacyjanożelazian (II) potasu może następnie reagować z siarczanem (VI) żelaza (III) dając błękit pruski – barwnik, a zatem zmianę barwy można zmierzyć spektrofotometrycznie. [111]



Rys. 32. Schemat reakcji chemicznych w procesie oznaczania glukozy metodą Hoffman'a.

- Metoda Benedicta

Metoda Benedict'a opiera się na wykorzystaniu odczynnika Benedicta, który jest roztworem kompleksu miedzi (II), otrzymywanego poprzez zmieszanie cytrynianu sodu, węglanu sodu oraz siarczanu (VI) miedzi (II). Po dodaniu odczynnika Benedicta do roztworu glukozy i podgrzaniu całości, wypadnięcie czerwonego osadu świadczy o obecności glukozy (rys. 33). Jest to metoda półilościowa, barwa roztworu świadczy o stężeniu glukozy. Odpowiednio kolory niebieski, przez zielony, żółty, pomarańczowy i czerwony odpowiadają stężeniom 0%, 0.5%, 1.0%, 1.5% oraz 2.0%. [112]



Rys. 33. Schemat reakcji chemicznej w procesie oznaczania glukozy metodą Benedict'a.

- **Metoda Fehlinga**

Różnica pomiędzy metodą Fehlinga a metodą Benedicta polega na składzie roztworu, do otrzymania kompleksu miedzi (II). W zasadzie występują tu dwa roztwory: odczynnik Fehlinga A – niebieski wodny roztwór siarczanu (VI) miedzi (II) oraz odczynnik Fehlinga B – bezbarwny wodny roztwór sodowo – potasowego winianu z silnie alkalicznym wodorotlenkiem sodu. Poprzez zmieszanie równych objętości powyższych roztworów otrzymujemy odczynnik Fehlinga o ciemnoniebieskiej barwie będący kompleksem biswinianomiedzianu (II)<sup>4-</sup>. Dalsze postępowanie jest takie jak w przypadku opisanej wcześniej metody Benedicta. [113]

- **Metoda Folin - Wu**

Użycie metody Folin – Wu wymaga otrzymania dwóch odczynników. Pierwszy z nich to alkaliczny roztwór miedzi powstały w wyniku rozpuszczenia węgla sodu, kwasu winowego i siarczanu (VI) miedzi (II). Drugi z odczynników to roztwór kwasu fosfomolibdenowego powstały w wyniku dodania wolframianu sodu, kwasu fosfomolibdenowego, NaOH i kwasu fosforowego (V). Dodatek obu reagentów do próbki zawierającej glukozę daje niebieskie zabarwienie oznaczane spektrofotometrycznie. [114]

- **Metoda Nelsona – Somogyi**

Metoda ta została opracowana najpierw przez Somogyiego, a następnie zmodyfikowana przez Nelsona. Opiera się ona na użyciu molibdenianu arsenu. W pierwszym etapie należy przygotować dwa roztwory. Roztwór A to mieszanina węgla sodu, winianu sodowo – potasowego, dwuwęgla sodu i siarczanu (VI) sodu w wodzie. Roztwór B składa się z uwodnionego siarczanu (VI) miedzi (II) i kwasu siarkowego (VI) w wodzie. Mieszając roztwory A i B w stosunku objętościowym 25:1 otrzymujemy roztwór C. Kolejny krok to przygotowanie odczynnika Nelsona w skład którego wchodzi: molibdenian amonu, kwas siarkowy (VI), arsenian sodu, roztwór finalny to molibdenian arsenu. W wyniku reakcji

odczynnika C, reagenta Nelsona i glukozy otrzymujemy niebieski produkt końcowy, którego absorbancję mierzymy przy 540 nm. [115, 116]

- **Metoda z neokuproiną**

Metoda ta opisana pierwszy raz przez M. E. Browna [117] opiera się na utworzeniu pomarańczowego, nierozpuszczalnego w wodzie, ale dobrze rozpuszczalnego w alkoholu etylowym, kompleksu pomiędzy jonami miedzi (I) i neokuproiną. Reagent Cu(II) – neokuproina, powstaje poprzez zmieszanie wodnego roztworu siarczanu (VI) miedzi (II) z etanolem z roztworem neokuproiny. Zredukowanie Cu (II) w reagentzie przez glukozę do Cu (I) umożliwia powstanie pomarańczowego kompleksu o maksimum absorbancji przy 457 nm, co świadczy o obecności glukozy.

- **Metoda Shaffer – Hartman – Somogyi**

Metodę tą, zaprezentowaną w 1932 roku, można by w skrócie określić jako miareczkowanie jodometryczne. W pierwszym etapie, po zagotowaniu roztworu, dochodzi do redukcji jonów miedzi (II) do miedzi (I) poprzez obecną w alkalicznym roztworze glukozę, która utlenia się do kwasu glukonowego. Roztwór ten jest następnie ochładzany i zakwaszany  $H_2SO_4$  w wyniku czego uwalnia się jod ( $I_2$ ), który ponownie utlenia jon miedzi (I) do miedzi (II). Natomiast nadmiar jodu jest odmiareczkowany roztworem tiosiarczanu sodu. [118, 119]

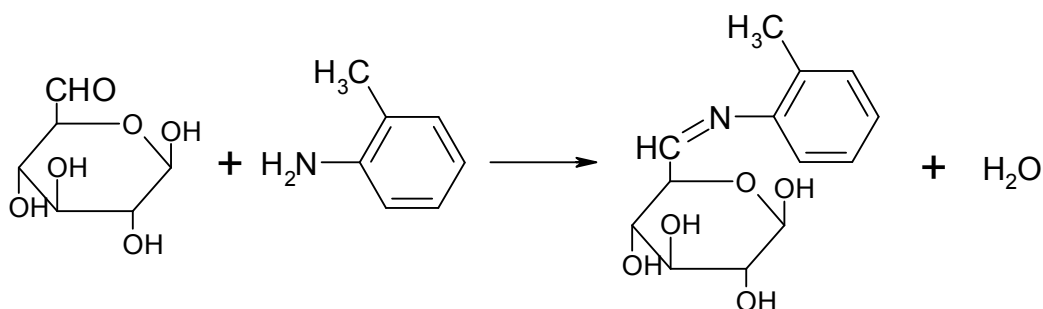
- **Metoda Hagedorna – Jensena**

Opracowana metoda zakłada ogrzewanie roztworu zawierającego glukozę na łaźni wodnej w roztworze węglanu z nadmiarem heksacyjanożelazianu (III). Powstający w reakcji heksacyjanożelazian (II) jest strącany w formie soli potasowo – cynkowej. Natomiast do roztworu zawierającego pozostały nieprzereagowany heksacyjanożelazian (III) dodawany jest jodek potasu. Wydzielony po zakwaszeniu roztworu jod jest następnie miareczkowany tiosiarczanem. [120]

### 7.1.2. Metody kondensacji

- Metoda z orto – toluidyną

Metoda ta wykorzystuje zdolność amin aromatycznych, między innymi orto – toluidyny, do tworzenia w reakcji kondensacji z grupą aldehydową glukozy barwnego produktu, który jest rozpuszczalny w wodzie, reakcja przebiega stechiometrycznie, a produkt wykazuje maksimum absorpcji przy 635 nm.

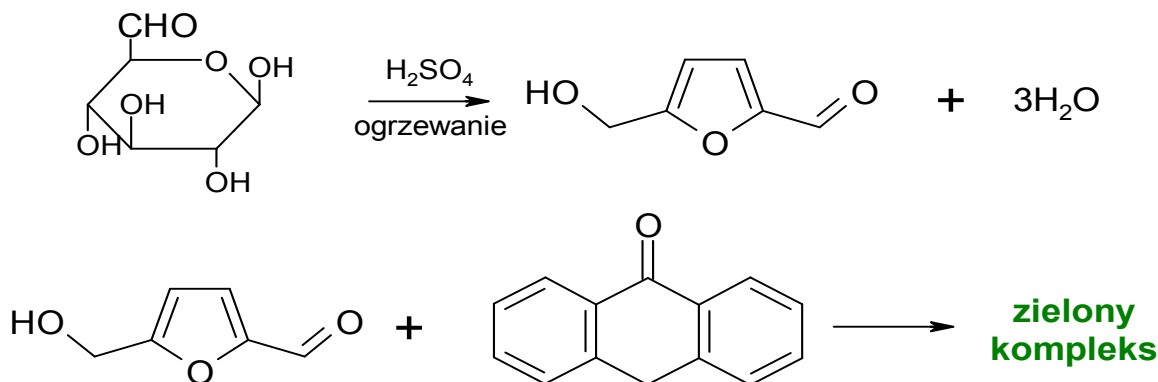


Rys. 34. Schemat reakcji kondensacji pomiędzy glukozą i o-toluidyną.

W omawianej metodzie oznaczania glukozy, pierwszorzędowa amina aromatyczna (o-toluidyna), reaguje z terminalną grupą aldehydową glukozy w roztworze lodowatego kwasu octowego dając niebiesko – zielony produkt (rys. 34). Jego absorpcja mierzona w granicach 600 – 700 nm jest wprost proporcjonalna do stężenia glukozy. Metoda ta jest prosta i tania, ale nieselektywna. [121]

- Metoda z użyciem antronu

Metoda ta jest dwuetapowa. W pierwszym etapie pod wpływem ogrzewania z kwasem siarkowym glukoza zostaje odwodniona tworząc hydroxymetylofurfural. W drugim etapie związek ten z antronem daje zielony kompleks z maksimum absorpcji przy 630 nm (rys. 35). [122]



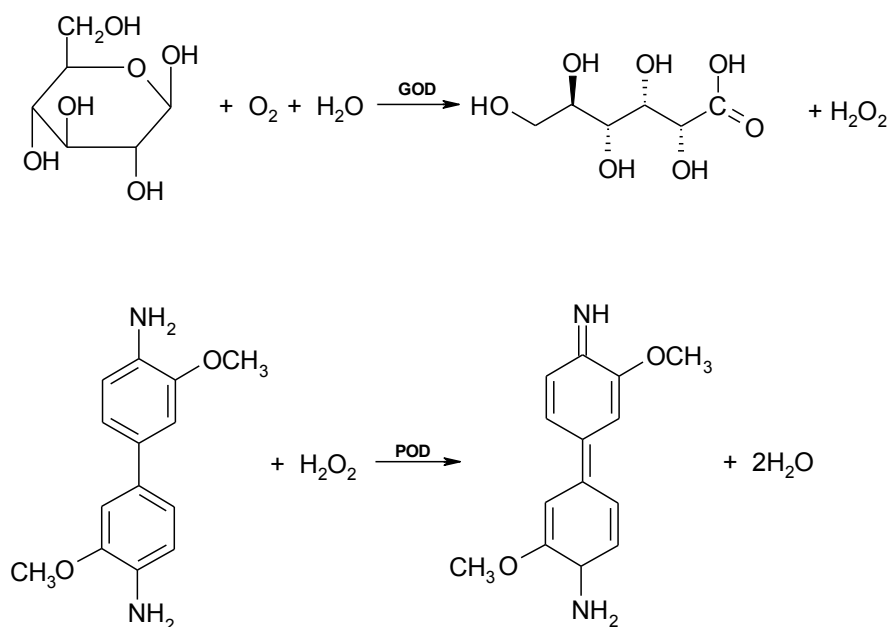
Rys. 35. Schemat reakcji pomiędzy glukozą i antronem.

## 7.2. Metody enzymatyczne

### 7.2.1. Metody z oksydazą glukozową

- Metoda Saifera – Gerstenfelda

Ta enzymatyczna metoda opiera się przede wszystkim na reakcji pomiędzy glukozą i oksydazą glukozową w obecności tlenu. W wyniku tej reakcji otrzymujemy glukonolakton hydrolizujący do kwasu glukonowego oraz nadtlenek wodoru. W drugim etapie  $H_2O_2$  reaguje z o-dianizydyną, która będąc w formie zredukowanej jest bezbarwna. W wyniku powyższej reakcji o-dianizydyna jest utleniana w obecności peroksydazy (POD). Zredukowana postać barwnika jest koloru brązowego (rys. 36). Reakcja jest zatrzymywana poprzez dodanie kwasu siarkowego (VI), w wyniku czego otrzymujemy różowy roztwór, który jest badany spektrofotometrycznie przy 540nm. [123]

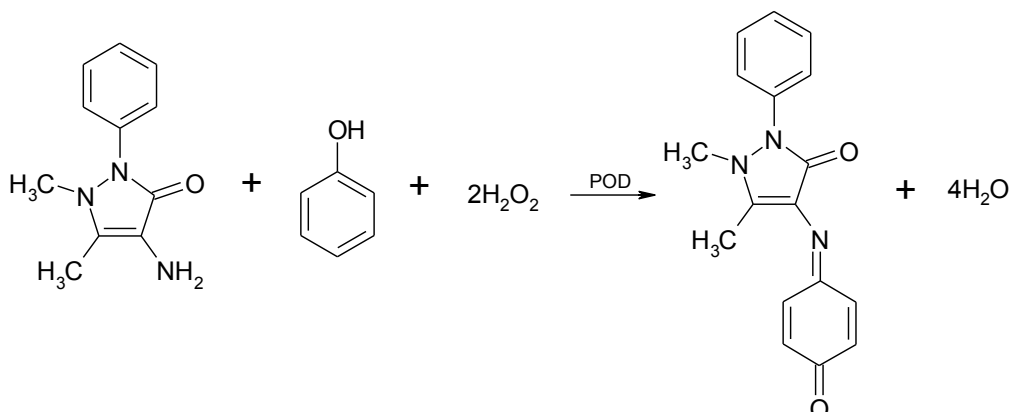


Rys. 36. Schemat reakcji enzymatycznej pomiędzy glukozą i oksydazą glukozową oraz reakcją powstałego w ten sposób  $H_2O_2$  z barwnikiem o-dianizydyną.

- Metoda Trindera

W przypadku tej metody pierwsza z reakcji jest identyczna jak w przypadku opisanej powyżej. Glukoza reaguje z oksydazą glukozową dając glukonolakton, hydrolizujący do kwasu glukonowego, oraz nadtlenek wodoru. Różnica występuje w drugiej reakcji, w której udział bierze powstały wcześniej nadtlenek. Reaguje on z odczynnikiem Trindera, w skład którego wchodzi 4-aminofenazon i fenol, w obecności peroksydazy dając barwnik

chinonoiminowy (rys. 37). Barwnik ten jest w intensywnym czerwono – fioletowym kolorze, którego absorbancja jest mierzona przy 505, 510 bądź 540 nm. [123]



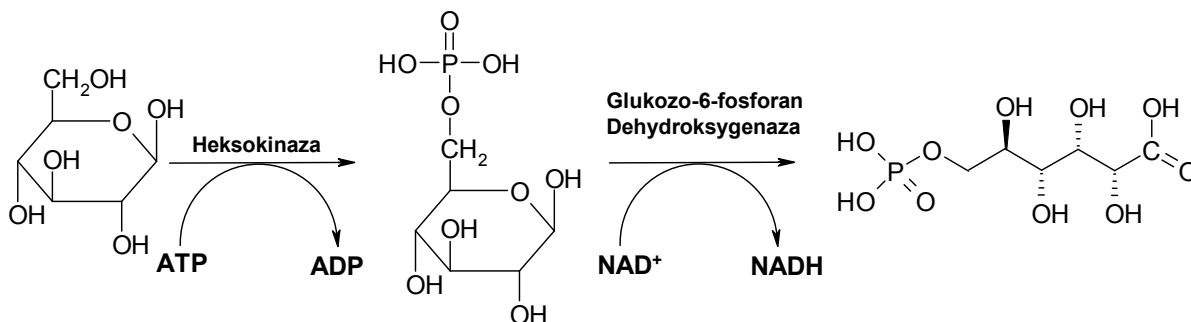
Rys. 37. Schemat drugiego etapu reakcji w metodzie Trindera pomiędzy nadtlenkiem wodoru, fenolem i 4-aminofenazonem.

- **Metoda Kodak Ektachem**

Metoda Kodak Ektachem odnosi się do gamy produktów firmy Kodak wypuszczonych na rynek pod nazwą Ektachem w latach 70. XX wieku. Są to produkty dziedziny tak zwanej suchej chemii. W tym przypadku reakcja pozwalająca na kolorymetryczne oznaczenie wybranej substancji prowadzona jest na cienkich płytkach. Na płytki te naniesione są w postaci cienkiego, porowatego filmu wszystkie niezbędne reagenty. Następnie po nałożeniu na płytkę niewielkiej ilości analitu, jest on równomiernie i szybko transportowany w porach, gdzie zachodzi reakcja chemiczna, której efektem jest powstanie barwnika oznaczanego spektrofotometrycznie. W przypadku oznaczania glukozy na płytkę nanosi się reagenty typowe dla metody Trindera. [125]

### 7.2.2. **Metoda z heksokinazą**

W metodzie tej glukoza pod wpływem heksokinazy (enzym z klasy transferaz) oraz przy

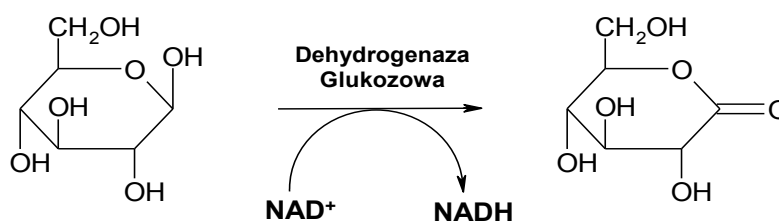


Rys. 38. Schemat reakcji enzymatycznej oznaczania glukozy z użyciem heksokinazy.

udziale ATP (adenozynotrójfosforan) ulega fosforylacji w wyniku czego otrzymuje się glukozo – 6 – fosforan oraz ADP (adenozynodwufosforan) . W kolejnym etapie glukozo – 6 – fosforan jest utleniany do 6 – fosfoglukonianu w obecności dehydrogenazy glukozo – 6 – fosforanu przy jednoczesnej redukcji obecnego  $\text{NAD}^+$  (dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy) do NADH (rys. 38). Wraz z powstawaniem NADH rośnie również absorbancja roztworu przy długości fali  $\lambda=340$  nm. Wzrost ten jest proporcjonalny do stężenia glukozy w badanej próbce [126].

### 7.2.3. Metoda z dehydrogenazą glukozy

W metodzie tej w wyniku reakcji pomiędzy glukozą a dehydrogenazą glukozową przy udziale  $\text{NAD}^+$  otrzymujemy D – glukono – 1, 5 – lakton oraz NADH (rys. 39). Podobnie jak w przypadku poprzedniej metody wraz z powstawaniem NADH rośnie również absorbancja roztworu przy długości fali  $\lambda=340$  nm. Wzrost ten jest proporcjonalny do stężenia glukozy w badanej próbce [127].



Rys. 39. Schemat reakcji enzymatycznej oznaczania glukozy z użyciem dehydrogenazy glukozowej.

## 8. Zastosowane metody pomiarowe

### 8.1. Metody elektrochemiczne

Przedstawione tutaj pokrótce techniki elektrochemiczne stanowią główny aparat pomiarowy w prowadzonych badaniach.

#### 8.1.1. Elektroliza stałopotencjałowa

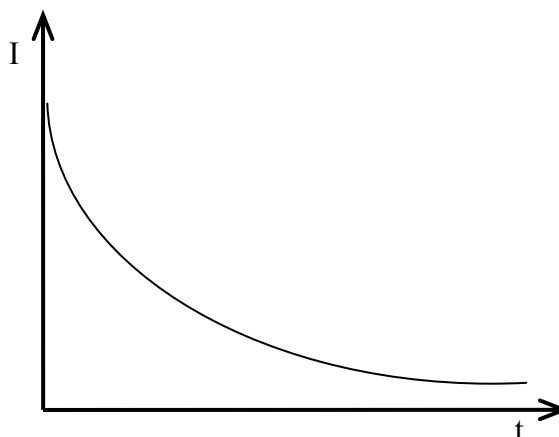
W tej metodzie elektroda pracująca charakteryzuje się stałym potencjałem. Natężenie prądu w czasie pomiaru maleje. Technika ta umożliwia selektywne prowadzenie reakcji elektrodowej w układach wieloskładnikowych. Wartość ładunku  $Q$  od początku elektrolizy do czasu  $t$ , jest określona wzorem:

$$Q = \int_0^t I_t dt$$

gdzie:

$Q$  - wartość ładunku;

$I_t$  - wartość natężenia prądu po czasie  $t$ .



Rys. 40. Krzywa zależności natężenia prądu od czasu.

Natężenie prądu maleje wykładniczo w zależności od czasu (rys. 40) zgodnie z równaniem:

$$I_t = I_0 \cdot 10^{-kt}$$

gdzie:

$I_0$  - początkowe natężenie prądu;

$k$  - stała wartość zależna od powierzchni elektrody, objętości roztworu, szybkości mieszania i temperatury.



W związku z powyższym wartość ładunku  $Q$  można przedstawić w postaci:

$$Q = \int_0^t I_0 \cdot 10^{-kt} dt = \frac{I_0}{2,303k} (1 - 10^{-kt})$$

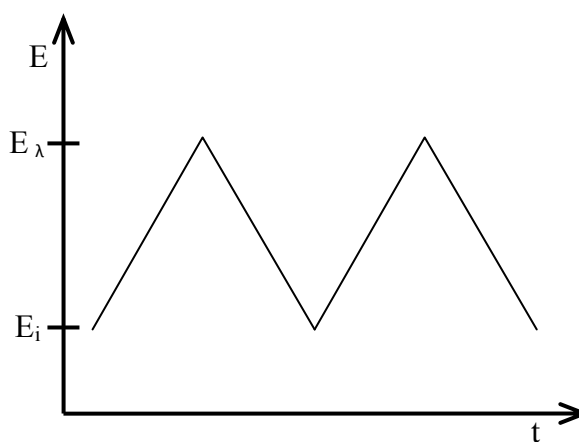
Ze wzrostem  $t$  maleje  $10^{-kt}$  i jeśli wartość  $kt > 3$ , to wyrażenie można uprościć do postaci:

$$Q = \frac{I_0}{2,303k}$$

Elektroliza przy stałym potencjale to wygodna i prosta metoda do otrzymywania warstw modyfikujących z roztworów EDOT-u. [128]

### 8.1.2. Chronowoltamperometria cykliczna

Metody woltamperometryczne to zbiór różnorodnych technik elektroanalitycznych polegających na elektrolizie warstwy dyfuzyjnej. Zajmują się one badaniem zależności natężenia prądu od doprowadzonego napięcia lub potencjału elektrody z użyciem stacjonarnych elektrod wskaźnikowych [129]. Jedną z odmian tej techniki jest chronowoltamperometria cykliczna.



Rys. 41. Krzywa zależności natężenia prądu od czasu.

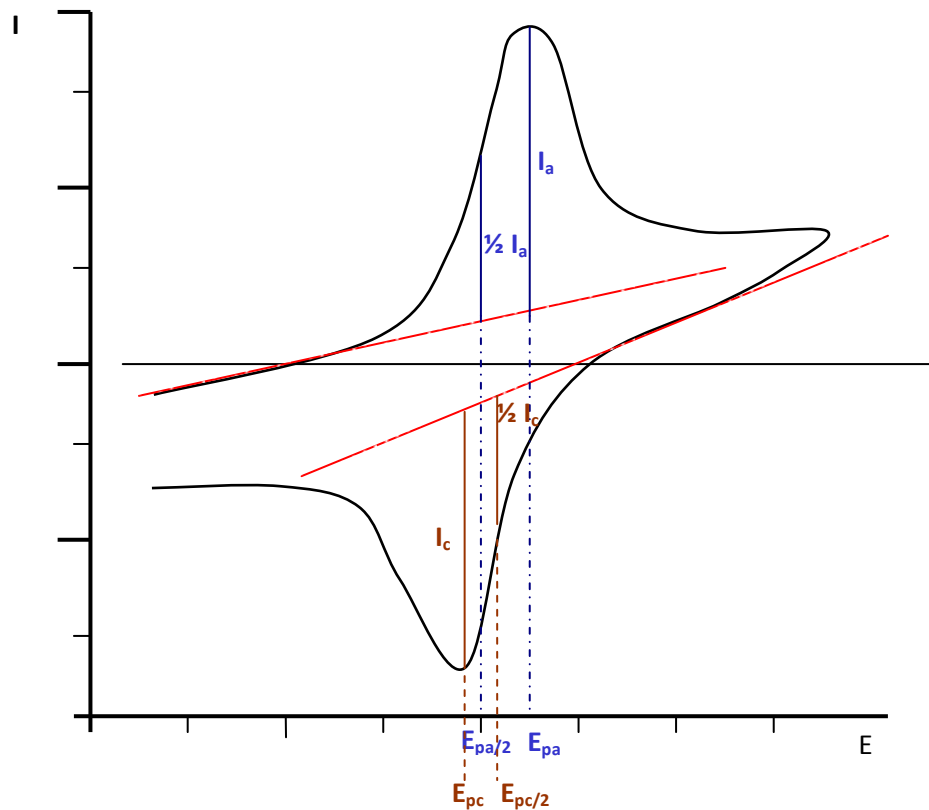
Liniową zmianę potencjału w czasie (rys. 41) przedstawia zależność:

$$E = E_i - v \cdot t$$

gdzie:

- $E$  – potencjał elektrody pracującej względem elektrody odniesienia [V];
- $E_i$  – potencjał początkowy [V];
- $v$  – szybkość zmian potencjału [V/s];
- $t$  – czas [s].

Podstawą tej techniki jest pomiar prądu płynącego przez elektrodę pracującą podczas wymuszenia liniowej zmiany potencjału od  $E_i$  do  $E_\lambda$  i z powrotem. Same pomiary prowadzone są w układzie trójelektrodowym tj. elektrodzie pracującej, elektrodzie odniesienia oraz elektrodzie pomocniczej. Przykład krzywej charakterystycznej dla woltamperometrii cyklicznej przedstawia rysunek 42:



Rys.42. Przykładowa krzywa CV.

Wartości odczytawane z krzywej to:

- $E_{pa}$ ,  $E_{pc}$  – potencjał piku anodowego i katodowego;
- $E_{pa/2}$ ,  $E_{pc/2}$  – potencjał półpiku anodowego i katodowego;
- $I_a$ ,  $I_c$  – prąd piku anodowego i katodowego;
- $I_{a/2}$ ,  $I_{c/2}$  – prąd półpiku anodowego i katodowego.

Wartość natężenia prądu pikowego w chronowoltamperometrii cyklicznej określona jest równaniem Randles'a i Sevcik'a:

$$i_p = 268700n^{3/2}AD^{1/2}\nu^{1/2}c^{1/2}$$

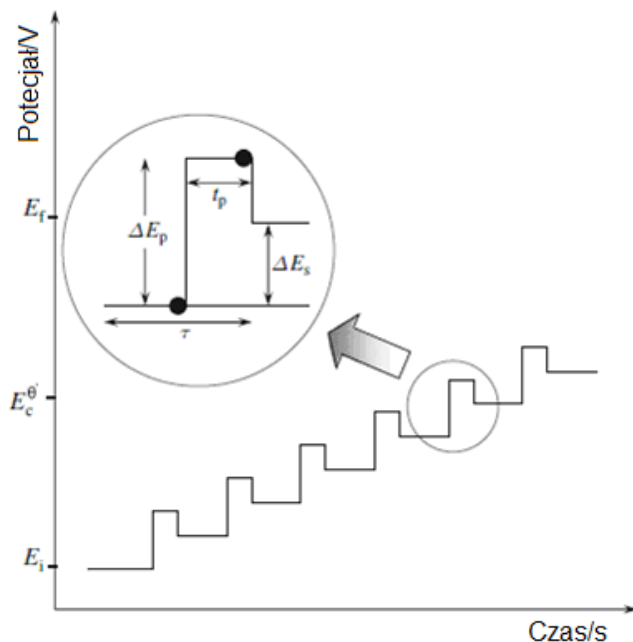
gdzie:

- $i_p$  – prąd pikowy [mA];
- $n$  – liczba elektronów w procesie elementarnym;
- $A$  – pole powierzchni elektrody [ $\text{cm}^2$ ];
- $D$  – współczynnik dyfuzji substancji elektroaktywnej [ $\text{cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$ ];
- $c$  – stężenie substancji elektroaktywnej [ $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ];
- $\nu$  – szybkość zmian potencjału polaryzacji [ $\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$ ];

W woltamperometrii cyklicznej stosuje się elektrody wykonane z metali szlachetnych (Pt, Au, Ag, Pd), z węgla szklanego lub metali i stopów oraz elektrody modyfikowane [130].

### 8.1.3. Woltamperometria pulsowa różnicowa (DPV)

Woltamperometria pulsowa różnicowa (differentia pulse voltammetry – DPV) jest to jedna z technik elektroanalitycznych. W tej metodzie na liniowo narastające napięcie nakładany jest ciąg impulsów o stałej, lecz niewielkiej amplitudzie (rys. 43). Metoda ta jest



Rys. 43. Zależność zmiany potencjału elektrody wskaźnikowej w funkcji czasu w woltamperometrii pulsowej różnicowej wraz z punktami próbkowania prądu [131].

wykorzystywana przede wszystkim do zastosowań analitycznych w związku z możliwością oznaczenia bardzo niskich stężeń rzędu  $10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Jest to możliwe poprzez eliminację prądu pojemnościowego, uzyskiwanego się w wyniku tzw. podwójnego próbkowania, czyli pomiarze wartości natężenia prądu przed nałożeniem impulsu oraz pod koniec jego trwania. W ten sposób mierzy się nie prąd a różnicę prądu, co dodatkowo powoduje, że otrzymuje się woltamperogramy

w postaci pików. Technika ta pozwala zarejestrować piki różniące się wartościami potencjałów o zaledwie 50 mV. Dobór poszczególnych parametrów pomiaru w tym amplitudy impulsu oraz szybkości skanowania potencjału wymaga zwykle znalezienia kompromisu pomiędzy czułością, rozdzielczością oraz szybkością. Najczęściej stosowane amplitudy znajdują się w granicach od 25 do 50 mV. Wśród niewątpliwych zalet DPV należy również wymienić szybkość oraz niski koszt pomiaru. Ponadto przygotowanie próbek do pomiaru nie wymaga długotrwałego i kompleksowego przygotowania próbki poprzez np. separację, ekstrakcję czy filtrację. [131, 132]

### 8.2. Spektrofotometria UV - VIS

Spektrofotometria UV – VIS to technika analityczna opierająca się na absorpcji promieniowania elektromagnetycznego nadfioletu i światła widzialnego (200 – 780 nm).

Stosowanie spektrofotometrii UV – VIS opiera się na prawach absorpcji. Pierwsze z nich zwane jest prawem Lamberta określa, że natężenie światła monochromatycznego po przejściu przez ośrodek optycznie jednorodny jest proporcjonalne do natężenia światła padającego. Można je wyrazić wzorem:

$$T = \frac{I_t}{I_0}$$

gdzie:

- T – transmitancja;
- $I_t$  – natężenie światła wychodzącego;
- $I_0$  – natężenie światła padającego;

Następne prawo absorpcji nazywane jest prawem Bouquera – Lamberta i określa związek między absorpcją a grubością ośrodka absorbującego. Natężenie światła przechodzącego przez warstwę absorbującą zmniejsza się wykładniczo wraz z liniowym zwiększaniem się grubości warstwy:

$$I_t = I_0 \cdot 10^{-kl}$$

gdzie:

- k – współczynnik proporcjonalności;
- l – grubość ośrodka absorbującego;

Kolejne z praw absorpcji to prawo Beera dotyczące zależności absorbancji od stężenia substancji absorbującej w roztworze przy stałej grubości warstwy. Jest ono analogiczne do prawa Bouquera – Lamberta:

$$I_t = I_0 \cdot 10^{-kc}$$

gdzie:

- $c$  – stężenie substancji absorbującej;

Prawo łączące grubość warstwy roztworu absorbującego i jego stężenie nazywane jest prawem Bouquera – Lamberta – Beera – Waltera. Wynika z niego, iż absorbancja jest funkcją liczby cząsteczek absorbujących i wyraża je wzór:

$$I_t = I_0 \cdot 10^{-\epsilon ql}$$

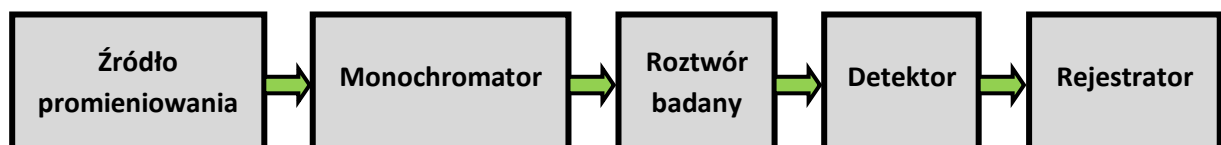
gdzie:

- $\epsilon$  - molowy współczynnik absorpcji;
- $q$  – stężenie masowe;

Ostatnie prawo absorpcji to prawo addytywności. Oznacza ono, że w roztworze wieloskładnikowym, w którym promieniowanie przy wybranej długości fali jest absorbowane przez więcej niż jedną substancję to absorbancja roztworu jest równa sumie absorbancji poszczególnych jego składników:

$$A = \sum_{i=1}^n A_i$$

Do pomiaru absorbancji wykorzystuje się spektrofotometry, których schemat ogólny przedstawia rys. 44.



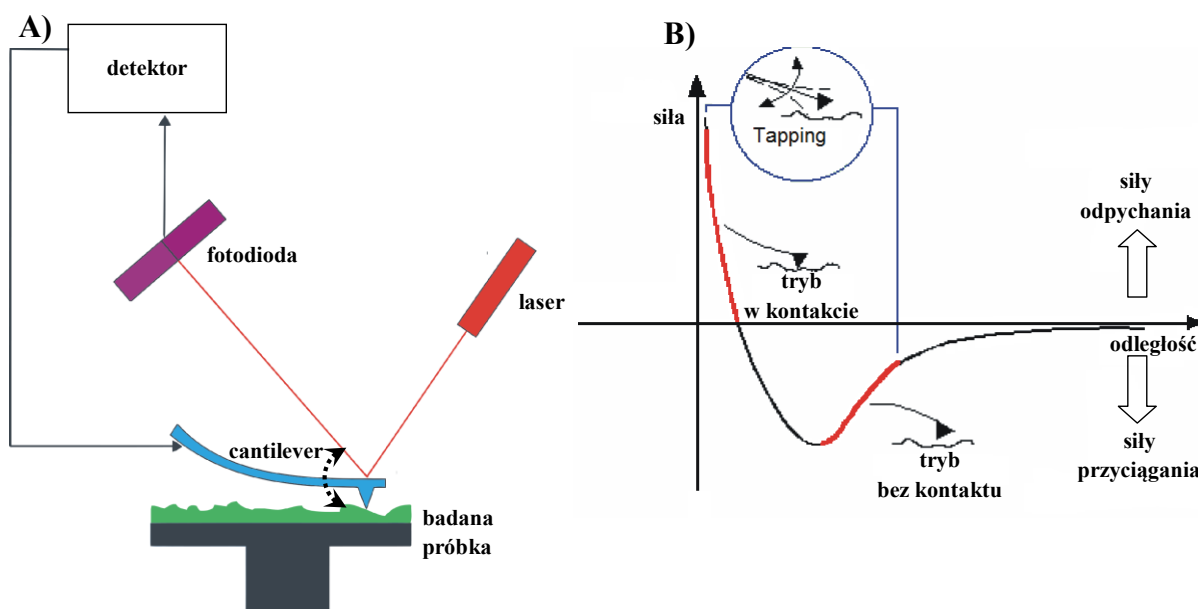
Rys. 44. Schemat blokowy spektrofotometru UV/VIS.

Źródłem promieniowania w spektrofotometrach są lampy deuterowe, wolframowo – halogenowe lub wysokociśnieniowe lampy ksenonowe. We współczesnych urządzeniach monochromatorem jest siatka dyfrakcyjna. W pierwszych aparatach rolę elementu rozszczepiającego pełnił pryzmat. Roztwór badany jest umieszczony w kwarcowej kuwecie o określonej drodze optycznej. Rolę detektora mogą pełnić fotokomórki, fotopowielacze lub fotodiody. Rejestratorem jest komputer.

Przy pomocy spektrofotometrii UV – VIS oznacza się zarówno związki organiczne jak i nieorganiczne charakteryzujące się absorpcją w nadfiolecie lub świetle widzialnym. Wśród nich znajdziemy aldehydy, ketony, kwasy karboksylowe, aminy, pierwiastki ziem rzadkich, ozon, barwniki oraz związki uzyskujące formy absorbujące promieniowanie w wyniku reakcji chemicznej. [133, 134]

### 8.3. Mikroskopia sił atomowych (AFM)

Mikroskopia sił atomowych to technika umożliwiająca obrazowanie powierzchni badanych próbek z dokładnością rzędu kilku nm wykorzystując oddziaływania międzyatomowe (oddziaływania van der Waalsa) pomiędzy próbką a ostrzem mikroskopu (cantilever). Występowanie oddziaływań magnetycznych, elektrostatycznych oraz międzyatomowych pomiędzy atomami ostrza oraz atomami badanej powierzchni pozwala na detekcję ruchów ostrza, a co za tym idzie umożliwia otrzymanie obrazu powierzchni. Ostrze o który mowa jest osadzone na sprężystej mikrobелce, a swym działaniem przypomina igłę gramofonu (rys. 45A). Mapa sił dla danego punktu powierzchni jest przetwarzana komputerowo na obraz. Czubek ostrza wyprodukowanego z krzemu i azotku krzemu to w rzeczywistości kilka do kilkunastu atomów. Pomiary w technice AFM można wykonywać w trzech trybach: kontaktowym, bezkontaktowym i z przerywanym kontaktem (rys. 45B).



Rys. 45. A) Schemat budowy mikroskopu sił atomowych (AFM). B) Wykres zależności siły od odległości dla cantileveru pracującego w trybach: w kontakcie, bez kontaktu, tapping. [135]

W trybie kontaktowym ostrze podczas skanowania jest w ciągłym kontakcie z powierzchnią próbki, pomiar siły jest mierzony poprzez rejestrację wychylenia dźwigni z ostrzem. Nacisk ostrza na powierzchnię wynosi od  $10^{-11}$  N do  $10^{-7}$  N. Zaletą tej metody jest szybkie skanowanie dobre dla twardych powierzchni. Jednak siły działające mogą również zniszczyć lub zdeformować badaną powierzchnię, jeśli jest ona wystarczająco miękka. W trybie bezkontaktowym ostrze porusza się przy powierzchni w obszarze przyciągania sił van der Waalsa tj. od 10 do 100 nm. Dźwignia oscyluje z częstotliwością rezonansową i możemy traktować ją jako oscylator harmoniczny. Zaletą tej techniki są bardzo małe siły działające na próbkę ( $10^{-12}$  N). Wadą jest mniejsza rozdzielczość otrzymywanych obrazów. W trybie z przerywanym kontaktem dźwignia z ostrzem oscyluje w granicach 50 – 500 kHz, występuje duża amplituda oscylacji. Pomiary w tej technice dają wysoką rozdzielczość dla próbek, które łatwo ulegają zniszczeniu, jest odpowiednia dla próbek biologicznych. Wadami są przede wszystkim bardziej wymagająca obsługa aparatu oraz wolniejsze skanowanie. [135]

**CZĘŚĆ**  
**DOŚWIADCZALNA**



### III. Część doświadczalna

#### 1. Cel pracy

Celem prowadzonych pomiarów było **zbadanie możliwości otrzymania biosensora chemicznego na bazie polimeru przewodzącego PEDOT, dającego odpowiedź na zmieniające się stężenie glukozy**. Zdając sobie sprawę z tego, jak wiele zagadnień wiąże się z tym tematem, postanowiłam przystąpić do realizacja założonego celu wyznaczając szereg etapów pośrednich takich jak:

- modyfikacja powierzchni elektrody platynowej kompozytem na bazie poli(3,4 – etylenodioksytiofenu) z wolnymi grupami karboksylowymi.
- unieruchomienie oksydazy glukozowej na otrzymanej wcześniej modyfikowanej powierzchni elektrody platynowej.
- optymalizacja procesu immobilizacji.
- charakterystyka otrzymanego biosensora wraz z pełnym opracowaniem statystycznym.
- opracowanie procedury w celu otrzymania elektrody typu „plaster miodu”, która w przyszłości mogłaby pozwolić na miniaturyzację otrzymanego biosensora.
- sprawdzenie działania otrzymanego biosensora w roztworach pochodzenia naturalnego.

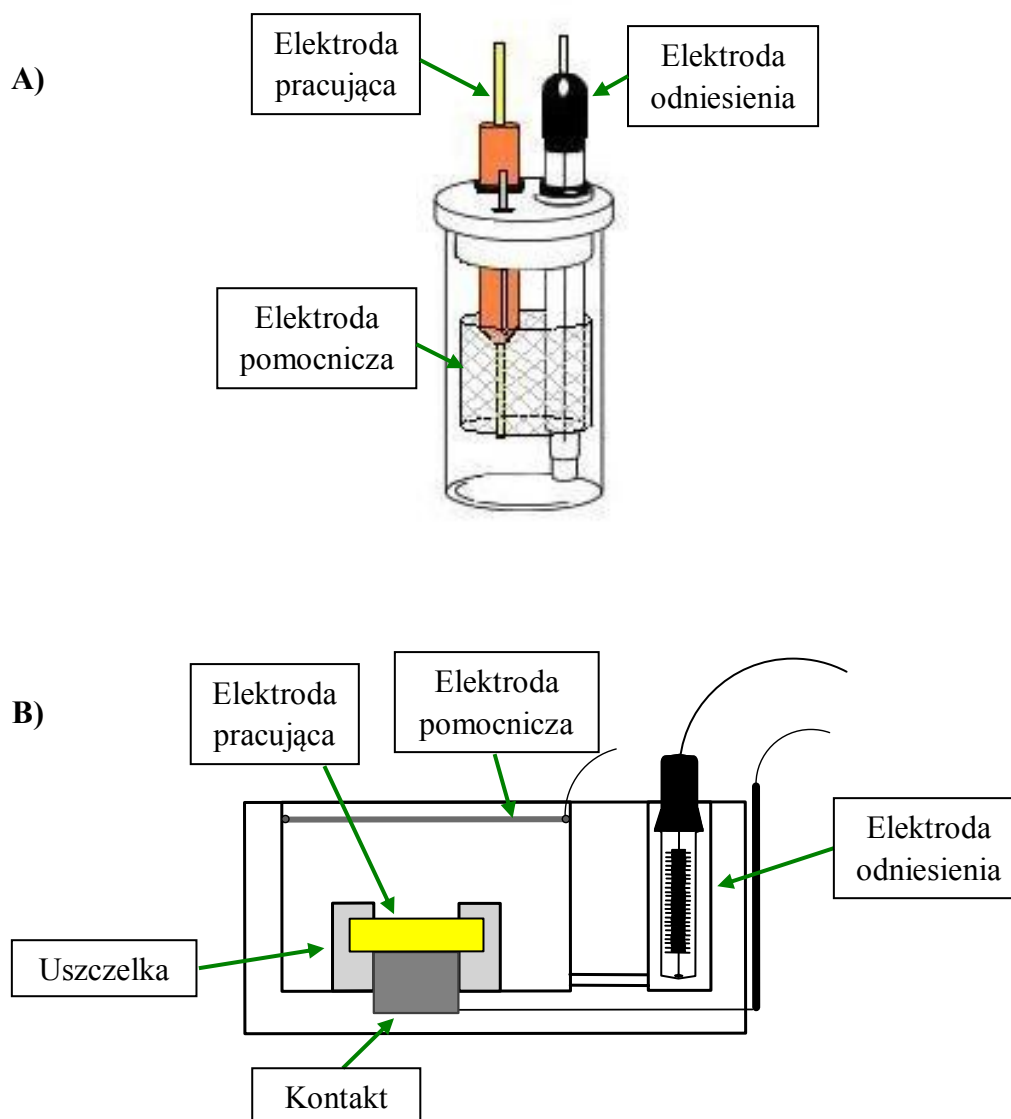
## 2. Aparatura pomiarowa

### 2.1. Pomiary elektrochemiczne

Pomiary elektrochemiczne były prowadzone w układzie składającym się z:

- potencjostatu typu PAR 273A firmy EG&G, Princeton Applied Research,
- komputera PC z oprogramowaniem CorrWare 2.9, CorrView 2.9 (Scribner Associates, Inc.),
- trójelektrodowego naczynka pomiarowego.

Naczynko pomiarowe było podłączone do potencjostatu. Prąd płynął w układzie elektroda pracująca – elektroda pomocnicza, a potencjał elektrody pracującej odczytywany był



Rys. 46. Schemat naczynka pomiarowego wykorzystywanego w pomiarach elektrochemicznych: A) dla elektrod platynowych; B) dla elektrod złotych.

względem elektrody odniesienia. Budowę naczynek pomiarowych dla elektrody platynowej i złotej przedstawiłam na rysunku 46. W obu układach rolę elektrody odniesienia pełniła nasycona elektroda kalomelowa w NaCl (NEK). Dodatkowo trójelektrodowy system uzupełniały w przypadku naczynka A) elektroda pracująca, którą była elektroda platynowa oraz elektroda pomocnicza w formie siatki platynowej. W przypadku naczynka B) były to odpowiednio elektroda złota oraz elektroda platynowa w formie drutu.

Elektroda platynowa miała 1 cm długości oraz 0,15 cm średnicy, co dało powierzchnię 0,49 cm<sup>2</sup>. Natomiast elektroda złota charakteryzowała się powierzchnią 0,20 cm<sup>2</sup>.

### **2.2. Pomiary spektrofotometryczne**

Wszystkie pomiary spektrofotometryczne były wykonane na spektrofotometrze Metertek SP830 z lampą wolframową z kuwetą o grubości 1 cm.

### **2.3. Charakterystyka powierzchni**

Charakterystyka powierzchni została wykonana przy użyciu mikroskopu sił atomowy Solver P47 firmy NT – MTD Company. Pomiary przeprowadzono w trybie tapping mode z użyciem cantileveru NSC35/AIBS ze stałą siłową  $k = 14 \text{ N/m}$  (MikroMasch Company). Ponadto wykonano pomiary skaningowym mikroskopem elektronowym Vega – 3 z podgrzewaną katodą wolframową w próżni z napięciem przyspieszającym 30 kV, dostarczonym przez firmę TESCAN Company.

### **2.4. Termostatowanie roztworów**

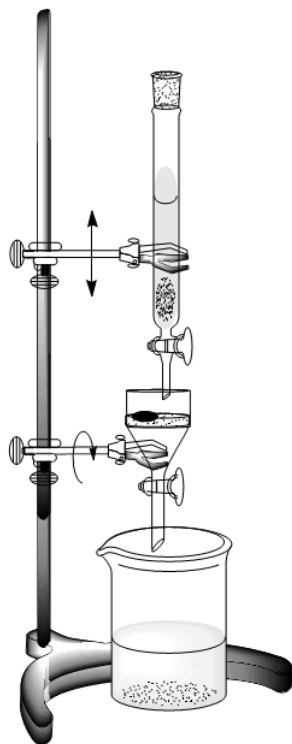
Do utrzymania roztworu w żądanej temperaturze posłużył termostat typu U7C wyprodukowany w Medingen (Niemcy) z dokładnością pomiaru temperatury 0,1°C.

### **2.5. pH roztworów**

W celu sprawdzenia bądź osiągnięcia żądanego pH roztworu, wykorzystywałam pH – metr firmy Teleko z kombinowaną elektrodą szklaną.

**2.6. Nakładanie matrycy polistyrenowej**

Do nakładanie matrycy polistyrenowej posłużył zaprojektowany przeze mnie układ dwóch wkraplaczy umieszczonych na statywie jeden nad drugim, przy czym dolny wkraplacz został wyposażony w polistyrenową podkładkę z wieloma otworami oraz blokadą elektrody, co obrazuje rys. 47. Ponadto wkraplacz górny posiadał regulację położenia w pionie, natomiast wkraplacz dolny pozwalał na regulację kąta nachylenia.



Rys. 47. Schemat zestawu do nakładania matrycy polistyrenowej.

### 3. Odczynniki chemiczne

- 3,4-etylenodioksytiofen (EDOT) (cz.d.a.) - Sigma Aldrich
- argon - Linde
- błękit toluidynowy (TBO) (cz.d.a.) - Sigma Aldrich
- chlorek potasu (KCl) (cz.d.a.) - POCH Gliwice
- chlorek sodu (NaCl) (cz.d.a.) - POCH Gliwice
- chlorek wapnia (CaCl<sub>2</sub>) (cz.d.a.) - POCH Gliwice
- chlorowodorek N-(3-dimetyloaminopropyl)-N-etylokarbodiimidu (WSC) (cz.d.a.) - Sigma Aldrich
- diwodorofosforan potasu (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (cz.d.a.) - POCH Gliwice
- dodecylosiarczan sodu (SDS) (cz.d.a.) - Sigma Aldrich
- kwas antranilowy (AA) (cz.d.a.) - Sigma Aldrich
- kwas askorbinowy (Ask) (cz.d.a.) - Sigma Aldrich
- kwas benzoesowy (cz.d.a.) - Sigma Aldrich
- kwas chlorowodorowy (HCl - 35-38%) - POCH Gliwice
- kwas chlorowy (VII) (HClO<sub>4</sub>) - 70% - Sigma Aldrich
- kwas poli(4-styrenosulfonowy) (PSSH) (18 wt% roztwór wodny) - Sigma Aldrich
- kwas poliakrylowy (PAA) (cz.d.a.) - Sigma Aldrich
- kwas siarkowy (VI) (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - 95%) - POCH Gliwice
- nadtlenek wodoru (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - 30%) - Sigma - Aldrich
- octan sodu (CH<sub>3</sub>COONa) (cz.d.a.) - POCH Gliwice
- o-dianizydyna (cz.d.a.) - Sigma Aldrich
- oksydaza glukozy (GOD)(typ II, Aspergillus Niger, 17 300 jednostek/g) (cz.d.a.) - Sigma Aldrich
- peroksydaza (POD) (typ I, Horseradish, 290 000 jednostek/g) (cz.d.a.) - Sigma Aldrich
- polistyren (PS) (10% wodna zawiesina kulek o średnicy 0,46μm) - Sigma Aldrich
- sól litowa kwasu poli(4-styrenosulfonowego) (PSSLi) (30 wt% roztwór wodny) - Sigma Aldrich
- toluen (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>3</sub> - 99,8%) - Sigma Aldrich
- Woda oczyszczana systemem Millipore (Milli - Q) (18MΩ·cm; 0,056μS·cm<sup>-1</sup>)
- wodorofosforan disodowy dwunastowodny (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O) (cz.d.a.) - POCH Gliwice
- wodorotlenek sodu (NaOH) (cz.d.a.) - POCH Gliwice
- β-D(+)-glukoza (cz.d.a.) - Sigma Aldrich

#### 4. Przygotowanie roztworów

##### 4.1. Roztwór buforu fosforanowego (PBS) o pH = 7,4

Bufor fosforanowy PBS składał się z NaCl ( $137 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), KCl ( $2,7 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) oraz  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $1,67 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

##### 4.2. Roztwór buforu fosforanowego (PBS) z dodatkiem $\text{CaCl}_2$

Roztwór PBS z dodatkiem  $\text{CaCl}_2$  był przygotowywany poprzez zmieszanie dwóch roztworów wyjściowych, co zapobiegało wytrąceniu chlorku wapnia. Roztwór A zawierał  $348 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  i  $70 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Roztwór B zawierał  $70 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  KCl,  $2810 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl oraz  $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$ . Roztwór końcowy powstawał poprzez zmieszanie po 5 mL roztworu A i B oraz 90 mL wody. Po przygotowaniu roztwór nie może być przechowywany w lodówce.

##### 4.3. Roztwory do polimeryzacji

W czasie prowadzenia badań wykorzystywałam kilka roztworów, z których prowadziłam polimeryzację:

- $0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  3,4 – etylenodioksytiofen (EDOT) w  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  soli litowej kwasu poli(4-styrenosulfonowego) (PSSLi)
- $10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  EDOT w  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PSSLi
- $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  EDOT +  $15 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  kwasu poliakrylowego (PAA) w  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PSSLi
- $0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  EDOT +  $0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  kwasu antranilowego (AA) w  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  kwasie poli(4-styrenosulfonowym) (PSSH)
- $0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  EDOT +  $1,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  PAA w  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PSSLi
- $0,005 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  EDOT +  $0,005 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  AA w  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PSSH

##### 4.4. Roztwory do unieruchomienia enzymu

W celu przeprowadzenia immobilizacji oksydazy glukozowej (GOD) na powierzchni modyfikowanej elektrody wykorzystałam serię trzech roztworów:

- $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  chlorowodoru N-(3-dimetyloaminopropyl)-N-etylokarboimidu (WSC) w PBS
- $4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  oksydazy glukozowej (GOD) w PBS +  $\text{CaCl}_2$
- PBS +  $\text{CaCl}_2$

#### 4.5. Roztwory testowe

##### 4.5.1. Test na wolne grupy karboksylowe

W celu wykonania testu potwierdzającego obecność wolnych grup karboksylowych na powierzchni należy przygotować następujące roztwory:

- $0,002 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  błękitu toluidynowego w  $0,015 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl, pH = 11,0
- $0,015 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl, pH = 11,0
- $0,2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl, pH = 2,0

Dobór pH przy pomocy roztworów HCl i NaOH.

##### 4.5.2. Test na aktywność oksydazy glukozowej

W celu wykonania testu potwierdzającego aktywność oksydazy glukozowej należy przygotować następujące roztwory:

- $0,05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  bufor octanu sodu o pH = 5,1
- $0,21 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  o – dianizydyna w  $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  HCl
- 10% roztwór  $\beta$  – glukozy w  $\text{H}_2\text{O}$
- $60 \text{ jednostek}\cdot\text{mL}^{-1}$  peroksydazy w zimnej  $\text{H}_2\text{O}$
- $20 \text{ jednostek}\cdot\text{mL}^{-1}$  GOD w zimnym buforze octanu sodu

#### 4.6. Roztwory D – glukozy

- Podstawowy roztwór glukozy:  
 $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  D – glukozy w roztworze PBS o pH = 7,4
- Seria roztworów D-glukozy do krzywych kalibracyjnych:

W celu wykonania krzywych kalibracyjnych dla otrzymanych biosensorów, przygotowałam serię roztworów według danych zawartych w tabeli 2:

Stężenie końcowe roztworu D-glukozy [mmol·L <sup>-1</sup> ]	Pobrana objętość roztworu podstawowego D-glukozy [mL]	Objętość elektrolitu podstawowego [mL]	Objętość końcowego roztworu D-glukozy [mL]
1	0,2	9,8	10
5	1,0	9,0	
10	2,0	8,0	
15	3,0	7,0	
20	4,0	6,0	
25	5,0	5,0	
30	6,0	4,0	

Tabela 2. Dane do przygotowania roztworów D – glukozy w celu wykonania krzywej kalibracyjnej.

- Roztwory glukozy z dodatkiem kwasu askorbinowego:

W celu przygotowania roztworów glukozy zawierających dodatek kwasu askorbinowego przygotowałam podstawowy roztwór kwasu askorbinowego o stężeniu 10 mmol·L<sup>-1</sup> w PBS o pH = 7,4. Następnie serię roztworów D – glukozy o żądanym stężeniu glukozy i kwasu askorbinowego przygotowałam zgodnie z tabelą 3 i 4.

Stężenie końcowe roztworu D-glukozy [mmol·L <sup>-1</sup> ]	Stężenie końcowe kwasu askorbinowego [mmol·L <sup>-1</sup> ]	Pobrana objętość roztworu podstawowego D-glukozy [mL]	Pobrana objętość roztworu podstawowego kwasu askorbinowego [mL]	Objętość elektrolitu podstawowego [mL]	Objętość końcowa mieszaniny [mL]
1	1	0,2	1	8,8	10
5		1,0		8,0	
10		2,0		7,0	
15		3,0		6,0	
20		4,0		5,0	
25		5,0		4,0	
30		6,0		3,0	

Tabela 3. Dane do przygotowania roztworów D – glukozy z kwasem askorbinowym o stężeniu 1 mmol·L<sup>-1</sup>.



Stężenie końcowe roztworu D-glukozy [mmol·L <sup>-1</sup> ]	Stężenie końcowe kwasu askorbinowego [mmol·L <sup>-1</sup> ]	Pobrana objętość roztworu podstawowego D-glukozy [mL]	Pobrana objętość roztworu podstawowego kwasu askorbinowego [mL]	Objętość elektrolitu podstawowego [mL]	Objętość końcowa mieszaniny [mL]
1	0,1	0,2	0,1	9,7	10
5		1,0		8,9	
10		2,0		7,9	
15		3,0		6,9	
20		4,0		5,9	
25		5,0		4,9	
30		6,0		3,9	

Tabela 4. Dane do przygotowania roztworów D – glukozy z kwasem askorbinowym o stężeniu 0,1 mmol·L<sup>-1</sup>.

- Roztwory z próbek pochodzenia naturalnego:

Wybrane produkty to sok jabłkowy oraz napój winogronowy marki „Fortuna”, napój energetyczny Black Energy Drink marki „Foodcare” oraz miód kwiatowy marki „Sadów”.

Podstawowy roztwór soku jabłkowego przygotowałam poprzez rozcieńczenie roztworem buforu fosforanowego PBS w stosunku objętościowym 0,1 : 24,9.

Podstawowy roztwór napoju winogronowego został przygotowany w analogiczny sposób w stosunku objętościowym napój winogronowy : bufor fosforanowy PBS – 0,1 : 24,9.

Podobnie przygotowałam podstawowy roztwór napoju energetycznego mieszając w stosunku objętościowym napój energetyczny : bufor fosforanowy PBS – 0,8 : 24,2.

Podstawowy roztwór miodu powstał poprzez rozpuszczenie naważki o masie 0,2650 g w buforze fosforanowym PBS o pH = 7,4 w kolbce miarowej o pojemności 25 mL.

Następnie przygotowałam serię odpowiednich roztworów posługując się danymi z tabeli 5.

Objętość podstawowego roztworu wybranego produktu naturalnego [mL]	Stężenie dodanej D-glukozy [mmol·L <sup>-1</sup> ]	Objętość dodanej D-glukozy [mL]	Objętość elektrolitu podstawowego [mL]	Objętość końcowa próbki [mL]
2,5	0	0	7,5	10
	2,5	0,5	7,0	
	5,0	1,0	6,5	
	7,5	1,5	6,0	
	10,0	2,0	5,5	
	15,0	3,0	4,5	
	20,0	4,0	3,5	

Tabela 5. Dane do przygotowania roztworów D – glukozy z próbkami pochodzenia naturalnego do metody dodatku wzorca.

#### 4.7. Roztwory do metody referencyjnej

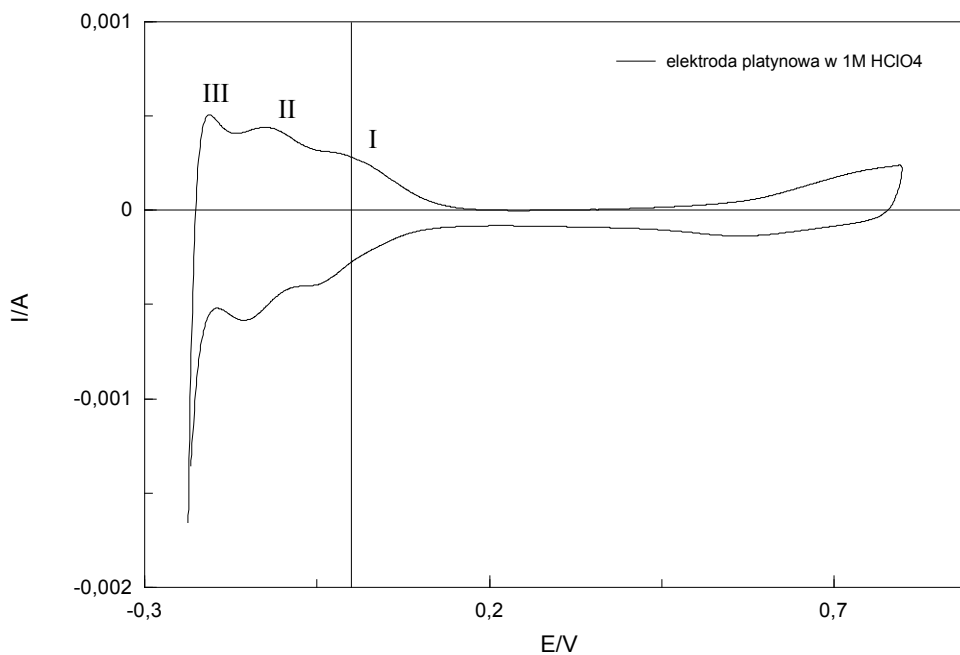
- mieszanina składająca się z 500 jednostek GOD i 100 jednostek peroksydazy (POD) w 39,2 mL buforu fosforanowego PBS
- 5 mg·mL<sup>-1</sup> dichlorowodoru o – dianizydyny w H<sub>2</sub>O
- 1 mg·mL<sup>-1</sup> D – glukozy w 0,1% kwasie benzoowym
- 6 mol·L<sup>-1</sup> kwas siarkowy (VI)

## 5. Modyfikacja powierzchni elektrody platynowej

Do modyfikacji wybrałam elektrodę platynową scharakteryzowaną w części 2.1.

### 5.1. Przygotowanie powierzchni elektrody platynowej

Chemiczne czyszczenie powierzchni elektrody platynowej wykonywałam w roztworze Piranha oraz w mieszaninie chromowej. Następnie wykorzystując technikę woltamperometrii cyklicznej (CV) polaryzowałam elektrodę w zakresie potencjałów  $-0,25 \div 0,8$  V z szybkością zmian potencjału  $v = 200$  mV/s w  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{HClO}_4$ . Zabieg ten nie tylko pomógł oczyścić powierzchnię elektrody, ale również ją aktywował. Kształt krzywej (CV) otrzymanej w tym procesie (rys. 48) pozwalał ponadto potwierdzić pożądany stan elektrody.



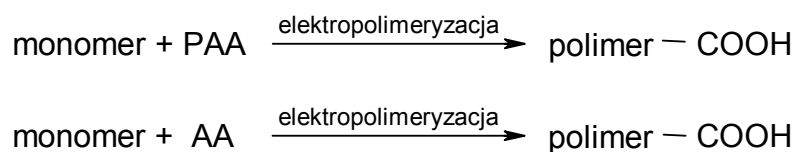
Rys. 48. Krzywa woltamperometryczna (CV) elektrolitu podstawowego ( $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{HClO}_4$ ) zarejestrowana na elektrodzie Pt przygotowanej do modyfikacji,  $v = 200$  mV/s.

Na uwagę zasługuje występowanie charakterystycznych regionów, których identyfikacja daje gwarancję czystości powierzchni elektrody. W zakresie ujemnych potencjałów widzimy 3 układy redox dla wydzielania wodoru na elektrodzie platynowej. Następnie podążając w kierunku dodatnich potencjałów widoczny jest tzw. obszar warstwy podwójnej. Ostatni obszar jest związany z wydzielaniem tlenu. Jest to obszar adsorpcji

i desorpcji tlenu na powierzchni elektrody oraz nieprzedstawiony na Rys. 48 pik związany z wydzielaniem tlenu [136].

## 5.2. Warstwy kompozytowe

Opracowana przeze mnie procedura otrzymywania warstw modyfikujących w celu otrzymania podłoża umożliwiającego unieruchomieniu enzymu na powierzchni elektrody poprzez wiązanie kowalencyjne została wypracowana w oparciu o koncepcję dostępną w literaturze a przedstawioną przez Raitmana i współpracowników [137]. Prowadzili oni prace nad elektrodą modyfikowaną polianiliną z wolnymi grupami karboksylowymi pochodzącymi od kwasu poliakrylowego, które następnie posłużyły do modyfikacji enzymu. Wzorując się na takim podejściu, postanowiłam otrzymać kompozyt na bazie EDOT – u, który na swej powierzchni będzie posiadał dostępne grupy karboksylowe. W tym celu zdecydowałam o użyciu dwóch związków dających takie właściwości, a mianowicie były to kwas poliakrylowy oraz kwas antranilowy. Schemat tego procesu przedstawiłam na rys. 49.



Rys. 49. Schemat reakcji polimeryzacji z utworzeniem kompozytu z wolnymi grupami karboksylowymi.

### 5.2.1. Kompozyt na bazie EDOT – u z kwasem poliakrylowym

Elektroda platynowa została pokryta kompozytem w wyniku elektropolimeryzacji z roztworu zawierającego (rozdział 4.3)  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDOT z dodatkiem  $15 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  kwasu poliakrylowego w  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  roztworze PSSLi. Warstwa była otrzymywana techniką potencjostatyczną przy  $E = 1 \text{ V}$  w czasie  $t = 3 \text{ s}$ . Otrzymana w ten sposób elektroda została schematycznie opisana jako (PEDOT+PAA)/PSSLi.

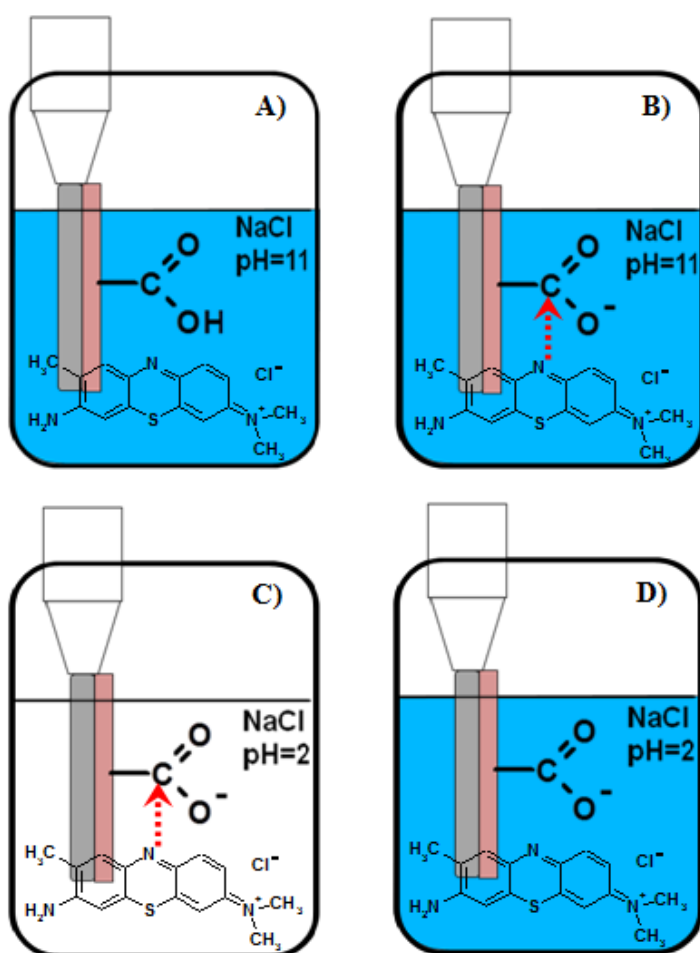
### 5.2.2. Kompozyt na bazie EDOT – u z kwasem antranilowym

W opisywanym przypadku elektroda platynowa została pokryta kompozytem składającym się z dwóch podwarstw mających na celu zapewnienie jej właściwego przewodnictwa. Pierwsza podwarstwa została otrzymana na drodze elektrolizy przy stałym potencjale  $E = 1 \text{ V}$  w czasie  $t = 5 \text{ s}$ , z roztworu zawierającego  $0,01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDOT w  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  PSSLi. Następnie na tak przygotowaną elektrodę nakładałam drugą podwarstwę. Proces

ten był prowadzony techniką voltamperometrii cyklicznej w zakresie potencjałów  $E = -0,4 \div 1,2$  V przy szybkości skanowania  $v = 20$  mV/s w czasie jednego cyklu ( $n = 1$ ). Roztwór polimeryzacyjny zawierał  $0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  EDOT,  $0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  kwas antranilowy oraz  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PSSH. Otrzymana w ten sposób elektroda została schematycznie opisana jako PEDOT/(PEDOT+AA)/PSSH.

### 5.3. Charakterystyka otrzymanych warstw

Najbardziej pożądaną cechą jaką powinny charakteryzować się otrzymane warstwy to obecność wolnych grup karboksylowych na ich powierzchni. W celu potwierdzenia ich obecności przeprowadziłam test chemiczny na obecność wolnych grup karboksylowych [138]. Zgodnie z użytą procedurą, najpierw należało zanurzyć modyfikowaną elektrodę



Rys. 50. Schemat oddziaływań występujących w czasie testu na wolne grupy karboksylowe na powierzchni modyfikowanej elektrody.

w  $0,002 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  roztworze błękitu toluidynowego (TBO) w  $0,015 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl o  $\text{pH} = 11,0$  na około 10 minut (Rys. 50A). W tym czasie następuje odłączenie protonu od grupy karboksylowej z utworzeniem kompleksu pomiędzy anionem  $-\text{COO}^-$  a TBO poprzez oddziaływania jonowe (Rys. 50B). Po tym czasie należało dokładnie przemyć elektrodę  $0,015 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl o  $\text{pH} = 11,0$  i pozostawić ją w wymienionym roztworze na co najmniej godzinę w celu odmycia niezwiązanych cząsteczek barwnika. Następnie elektrodę umieszczamy w  $0,2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl o  $\text{pH} = 2,0$

na 30 minut, całość mieszając (Rys. 50C). W tym pH cząsteczki TBO związane z grupami  $-\text{COO}^-$  na powierzchni elektrody są wymywane do roztworu, zabarwiając go na niebiesko (Rys. 50D). Intensywność zabarwienia roztworu można badać spektrofotometrycznie.

Obie elektrody we wspomnianej procedurze zabarwiły roztwory  $0,2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl o  $\text{pH} = 2,0$  na niebiesko, co dowodzi obecności wolnych grup karboksylowych na powierzchni obu otrzymanych kompozytów.

#### 5.4. Podsumowanie informacji dotyczących warstw kompozytów

Podobieństwa i różnice otrzymanych warstw kompozytów przedstawia tabela 6. Główną cechą łączącą obydwa kompozyty jest podstawowy materiał z jakiego je otrzymałam, czyli polimer przewodzący poli(3,4 – etylenodioksytyofen). Różnią się jednak drugim składnikiem kompozytu, w pierwszym przypadku jest to kwas poliakrylowy, zaś w drugim kwas antranilowy.

	Kompozyt A	Kompozyt B
<b>Polimer bazowy</b>	EDOT	EDOT
<b>Drugi składnik kompozytu</b>	kwas poliakrylowy (PAA)	kwas antranilowy (AA)
<b>Substancja domieszkująca</b>	sól litowa kwasu poli(4-styrenosulfonowego) (PSSLi)	PSSLi, kwasu poli(4-styrenosulfonowy) (PSSH)
<b>Ilość warstw</b>	I warstwa	II warstwy
<b>Metoda otrzymywania</b>	elektroliza przy stałym potencjale	elektroliza przy stałym potencjale, woltamperometria cykliczna
<b>Parametry otrzymywania</b>	$E=1\text{V}$ , $t=3\text{s}$	$E=1\text{V}$ , $t=5\text{s}$ ; $E=-0,4 \div 1,2\text{V}$ , $v=20\text{mV/s}$ , $n=1$
<b>Skład roztworu polimeryzacyjnego</b>	$0,1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDOT + $15\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ PAA + $0,1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PSSLi	$0,01\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDOT+ $0,1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PSSLi, $0,01\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDOT + $0,01\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA + $0,1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PSSH
<b>Przewodnictwo</b>	przewodzi prąd elektryczny	przewodzi prąd elektryczny
<b>Obecność wolnych grup karboksylowych</b>	wolne grupy $-\text{COOH}$	wolne grupy $-\text{COOH}$

Tabela 6. Porównanie dwóch kompozytów modyfikujących elektrodę Pt.

Uwagę zwraca również ilość warstw otrzymywanych w procesie modyfikacji. Kompozyt A zbudowany jest z jednej warstwy, natomiast kompozyt B składa się z dwóch warstw (pierwsza – kolor czerwony, druga – kolor czarny). Dalsze różnice pomiędzy kompozytami wynikają między innymi z liczby warstw modyfikujących. Substancją

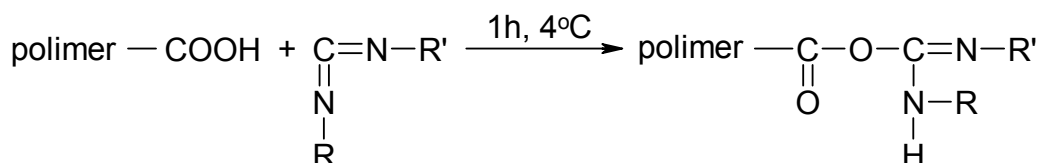
domieszkującą powstający kompozyt jest PSSLi lub PSSLi oraz PSSH. Oba kompozyty zostały otrzymane przy zastosowaniu różnych technik elektrochemicznych, takich jak elektroliza stałopotencjałowa oraz woltamperometria cykliczna, a co się z tym wiąże różne były także parametry w jakich je otrzymano. Naturalnie skład roztworów użytych do polimeryzacji były inny w przypadku kompozytu A oraz kompozytu B. Jednak warto zwrócić uwagę, iż pomimo istotnych różnic bardzo ważne są elementy łączące oba kompozyty. Oba z nich przewodzą prąd elektryczny oraz, co zostało udowodnione w rozdziale 5.3, oba charakteryzuje obecność wolnych grup karboksylowych, niezwykle ważny fakt w kontekście dalszej immobilizacji.

## 6. Immobilizacja oksydazy glukozowej

Zastosowana w moich badaniach metoda unieruchomienia oksydazy glukozowej (GOD) na powierzchni elektrody modyfikowanej opiera się na utworzeniu wiązania kowalencyjnego. Na podstawie publikacji Li [139] oraz Kulik [140] i współpracowników opracowałam własną procedurę immobilizacji enzymu.

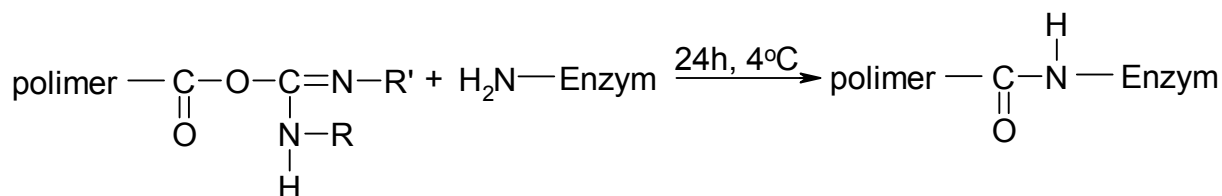
### 6.1. Procedura unieruchomienia oksydazy glukozowej

W pierwszym etapie elektrodę modyfikowaną z wolnymi grupami karboksylowymi umieszczałam w roztworze zawierającym  $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  chlorowodoru N-(3-dimetyloaminopropylo)-N-etylokarboimidu (WSC) w buforze fosforanowym o  $\text{pH}=7,4$ . Przyłączenie WSC do wolnych grup karboksylowych odbywa się w czasie 1 godziny w temperaturze  $4^\circ\text{C}$  (rys. 51):



Rys. 51. Schemat pierwszego etapu w procesie unieruchomienia oksydazy glukozowej, polegający na utworzeniu wiązania kowalencyjnego pomiędzy WSC a wolnymi grupami karboksylowymi na powierzchni elektrody.

Etap drugi obejmował już samą immobilizację. Unieruchomienie oksydazy glukozowej odbywało się na drodze wytworzenia wiązania kowalencyjnego pomiędzy łącznikiem, jakim było WSC, już związanym z wolnymi grupami COOH na powierzchni elektrody modyfikowanej, a enzymem. Etap ten wymagał umieszczenia elektrody w roztworze zawierającym  $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  GOD w buforze fosforanowym z dodatkiem  $0,02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$ . Proces immobilizacji przebiegał w temperaturze  $4^\circ\text{C}$  w czasie 24 godzin (rys. 52):



Rys. 52. Schemat drugiego etapu unieruchomienia oksydazy glukozowej, polegający na utworzeniu wiązania kowalencyjnego pomiędzy związanym z elektrodą WSC a GOD.

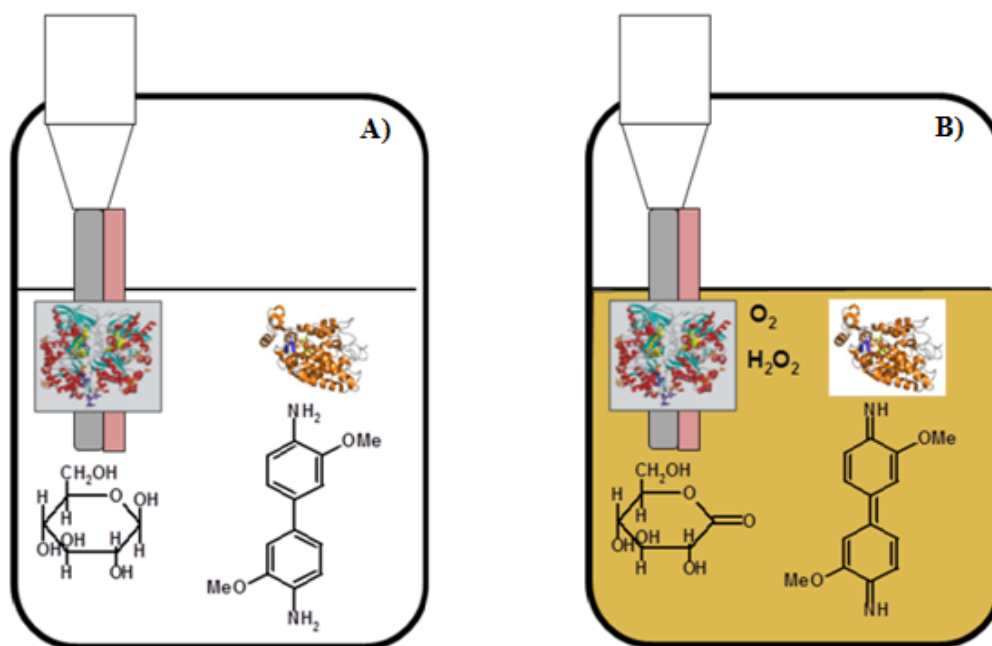


W trzecim i zarazem ostatnim etapie elektroda umieszczona była w roztworze PBS z  $0,02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$  na okres 1 godziny w temperaturze pokojowej. Zabieg ten miał na celu usunięcie niezwiązanej GOD z powierzchni elektrody oraz jej stabilizację. Tak przygotowana elektroda pomiędzy pomiarami była przemywana PBS o  $\text{pH}=7,4$  i przechowywana w tym roztworze w temperaturze  $4^\circ\text{C}$ .

Aby uprościć nazewnictwo obu biosensorów określiłam je jako biosensor A oraz biosensor B, odpowiednio do ich budowy (PEDOT+PAA)/PSSLi/GOD oraz PEDOT/(PEDOT+AA)/PSSH/GOD.

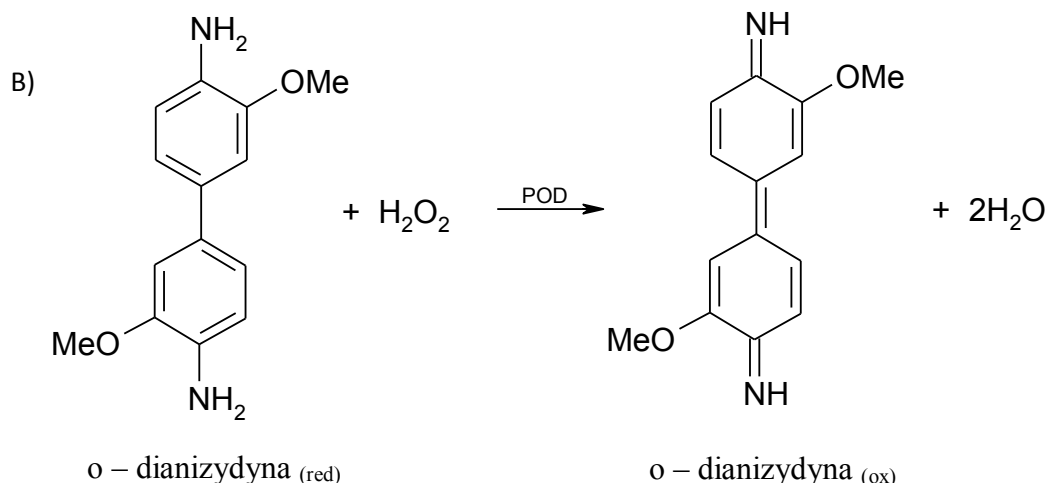
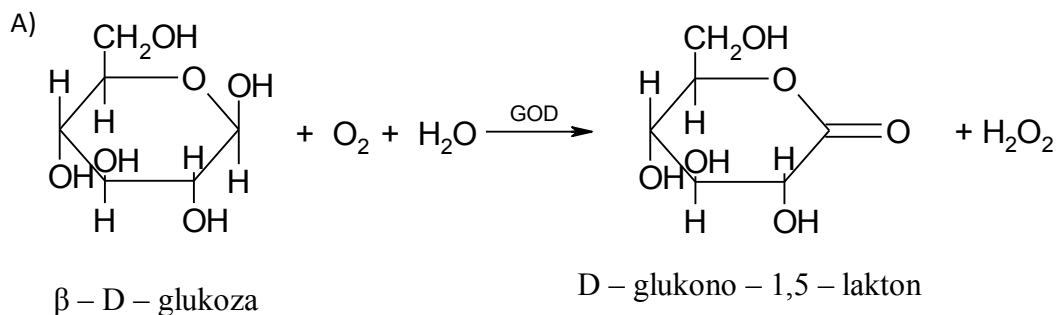
### 6.2. Test aktywności enzymu unieruchomionego na powierzchni elektrody

Po procesie unieruchomienia enzymy na powierzchni elektrody należało przeprowadzić test potwierdzający immobilizację oksydazy glukozy. W tym celu wykorzystując roztwory opisane w rozdziale 4.5.2 wykonałam test aktywności GOD, którego schemat został przedstawiony na rysunku 53.



Rys. 53. Schemat oddziaływań występujących w czasie testu GOD unieruchomionej na powierzchni modyfikowanej elektrody. A) przed rozpoczęciem reakcji, B) w czasie pracy elektrody.

Elektrodę z enzymem należy umieścić w bezbarwnym roztworze składającym się z o-dianizydyny, glukozy oraz peroksydazy. W przypadku obecności GOD w roztworze zachodzą reakcje chemiczne przedstawione na rysunku 54:



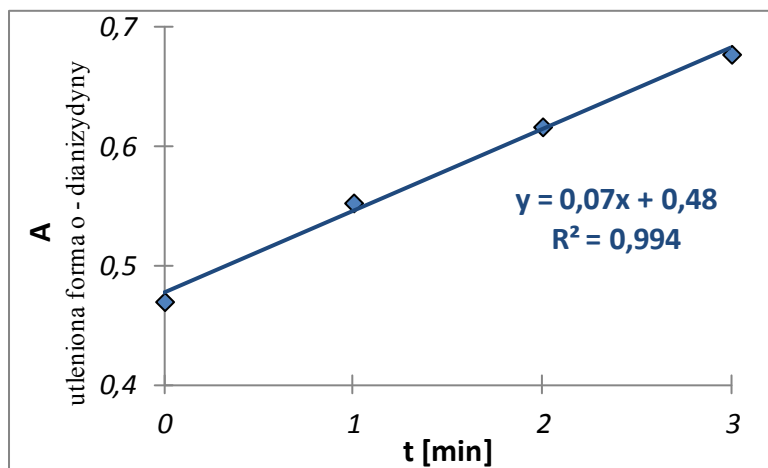
Rys. 54. Równania reakcji chemicznych zachodzących w czasie testu potwierdzającego unieruchomienie oksydazy glukozowej na powierzchni elektrody modyfikowanej.

Glukoza obecna w roztworze reaguje z oksydazą glukozową przy udziale obecnego w roztworze tlenu. W wyniku reakcji przedstawionej na rysunku 54A otrzymujemy glukonolakton oraz nadtlenek wodoru. Pod wpływem  $\text{H}_2\text{O}_2$  zredukowana forma o-dianizydyny (o kolorze bezbarwnym) zostaje utleniona (rys. 54B). Przejście o-dianizydyny z formy zredukowanej do utlenionej wiąże się ze zmianą barwy na kolor brunatny.

Pojawienie się zabarwienia w trakcie wykonywania powyższego testu świadczy o obecności aktywnej oksydazy glukozowej na powierzchni elektrody modyfikowanej. Zmiana barwy może być badana spektrofotometrycznie przy długości fali  $\lambda = 540 \text{ nm}$ . Rysunek 55, tabela 7 przedstawiają zmianę absorbancji (A) w czasie prowadzenia reakcji.

t [min]	A
0	0,47
1	0,553
2	0,617
3	0,678

Tabela 7. Dane obrazujące wzrost absorbancji wraz z wpływem czasu w trakcie prowadzenia testu dowodzącego unieruchomienie GOD na powierzchni elektrody modyfikowanej,  $\lambda = 540$  nm.



Rys. 55. Wykres zależności absorbancji od czasu dla testu potwierdzającego aktywność unieruchomionej oksydazy glukozowej.

### 6.3. Zestawienie informacji dotyczących procesu unieruchomienia enzymu

Proces immobilizacji enzymu można podsumować przedstawiając następujące dane w formie tabeli 8:

Proces immobilizacji					
Etap	t [h]	Reakcja	Związek chemiczny	c [mg·mL <sup>-1</sup> ]	Roztwór
I	1	przyłączenie	WSC	5	PBS
II	24	przyłączenie	GOD	4	PBS + CaCl <sub>2</sub>
III	1	odmycie	-	-	PBS + CaCl <sub>2</sub>

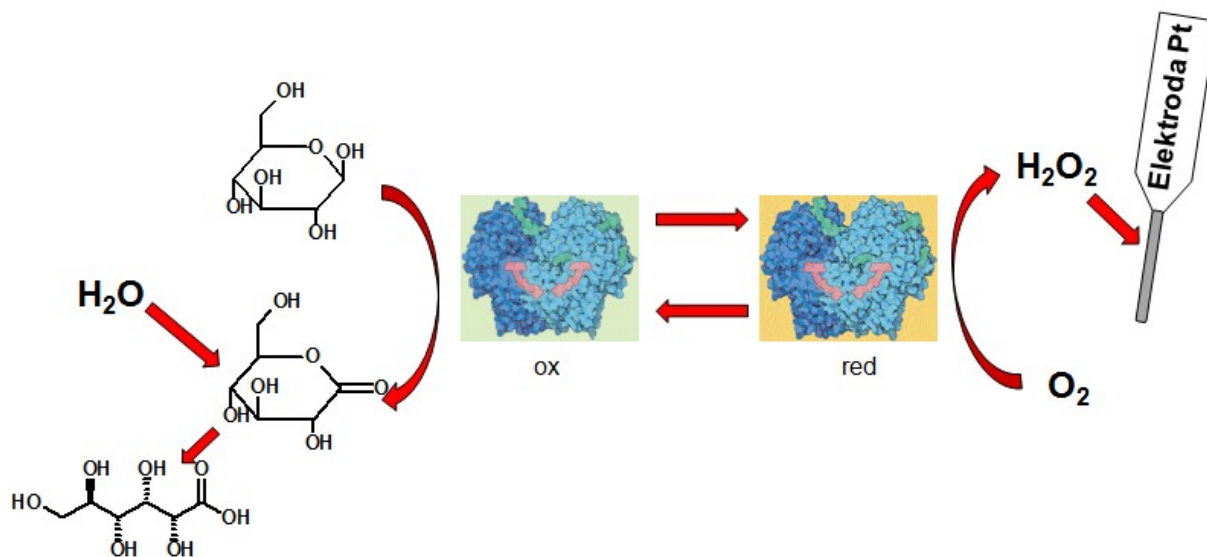
Tabela 8. Podsumowanie parametrów procesu immobilizacji oksydazy glukozowej.

W pierwszym etapie dochodzi do przyłączenia WSC poprzez wiązanie kowalencyjne do wolnych grup karboksylowych. Proces ten zachodzi w czasie 1 godziny w roztworze 5mg·mL<sup>-1</sup> WSC w PBS. W drugim do całego układu poprzez wiązanie kowalencyjne przyłączany jest enzym oksydaza glukozowa. Proces ten zachodzi w czasie 24 godzin w roztworze 4mg·mL<sup>-1</sup> GOD w PBS z dodatkiem CaCl<sub>2</sub>. Trzeci etap trwa 1 godzinę i polega na odmyciu w roztworze PBS + CaCl<sub>2</sub> niezwiązanych cząsteczek z powierzchni elektrody.

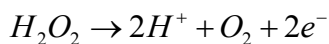
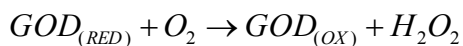
### 7. Postulowany mechanizm działania biosensora

Otrzymane biosensory mogą pracować zarówno jako sensory pierwszej generacji oraz jako sensory trzeciej generacji.

W przypadku prowadzenia pomiaru w warunkach tlenowych techniką amperometryczną przy potencjale  $E = 0,6 \text{ V}$  w czasie  $t = 30 \text{ s}$ , z mieszaniem roztworu w czasie całego etapu, biosensory pracują według mechanizmu pierwszej generacji (omówionego wcześniej w części teoretycznej), co zostało przedstawione na rys. 25 oraz 26:

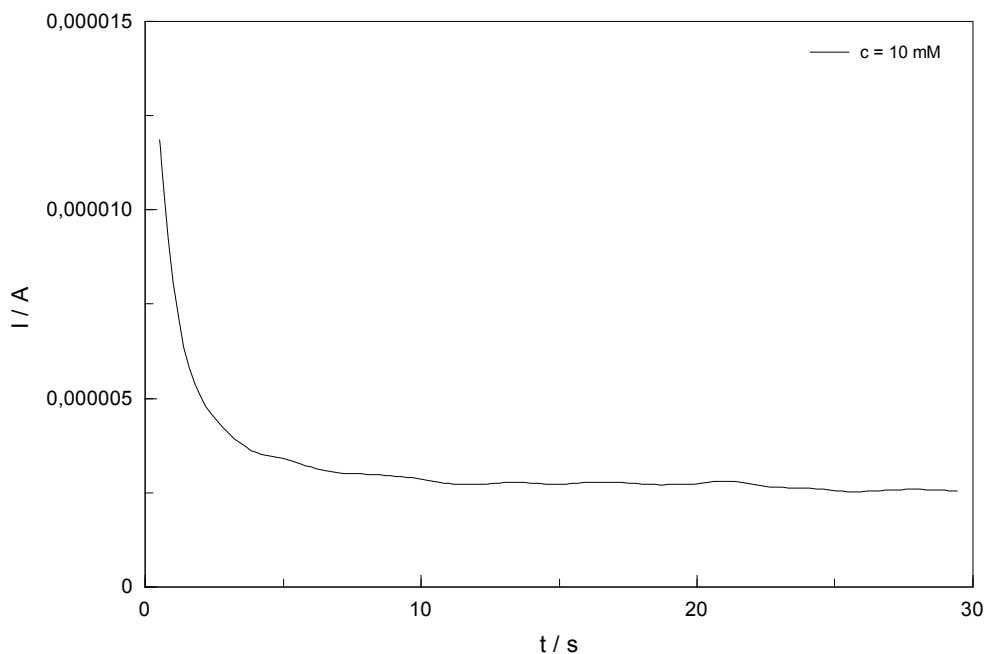


Rys. 25. Schemat działania biosensora glukozy pierwszej generacji.



Rys. 26. Równania reakcji zachodzących podczas pracy biosensora pierwszej generacji.

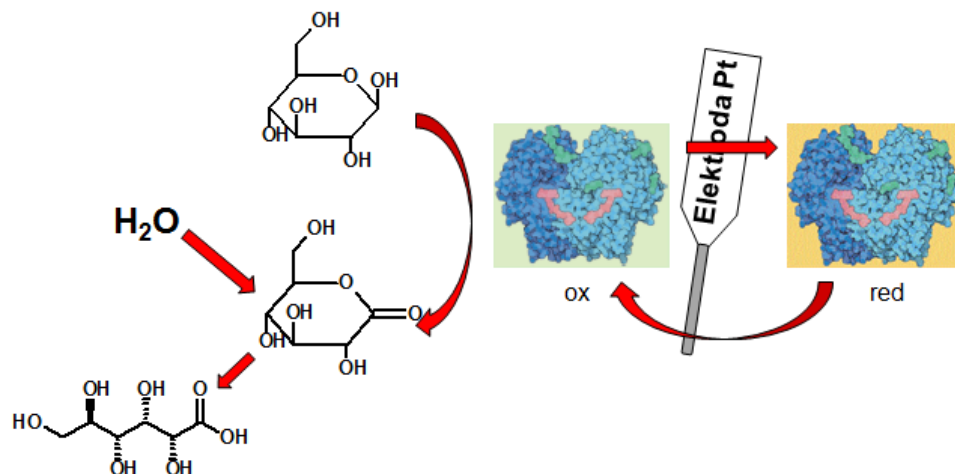
W wyniku takiego pomiaru otrzymujemy amperogram, pozwalający na określenie wartości natężenia prądu proporcjonalnej do stężenia glukozy. Przykład takiego amperogramu przedstawia rys. 56:



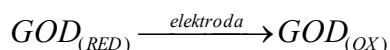
Rys. 56. Przykładowy amperogram zarejestrowany w roztworze D – glukozy o  $c = 0,01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  w PBS o  $\text{pH} = 7,4$  dla biosensora A przy potencjale  $E = 0,6 \text{ V}$  w czasie  $t = 30 \text{ s}$ .

W pierwszym etapie trwającym około 5 sekund następuje gwałtowny spadek wartości rejestrowanego natężenia prądu, następnie mamy jego stabilizacja z niewielkimi wahaniami po około 25 sekundach. Ostateczny wynik stanowi wartość natężenia prądu odczytana po czasie  $t = 28 \div 30$  sekund, kiedy to zmiany natężenia nie wpływają w istotny sposób na końcowy wynik.

Otrzymane biosensory mogą również pracować jako biosensor glukozy trzeciej generacji. Mechanizm takiego działania został zaprezentowany na rysunkach 29 i 30:

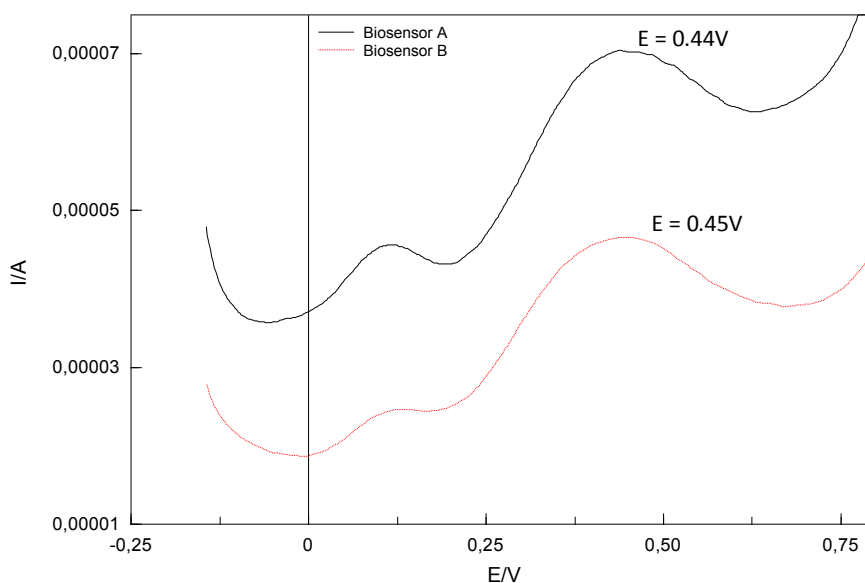


Rys. 29. Schemat działania biosensora glukozy trzeciej generacji.



Rys. 30. Równania reakcji zachodzących podczas pracy biosensora trzeciej generacji.

Pomiar jest prowadzony techniką woltamperometrii pulsowej – różnicowej w roztworach odtlenionych przy zakresie potencjałów  $E = -0,2 \div 0,8 \text{ V}$ , z krokiem potencjału  $E_s = 2 \text{ mV}$ , czasem pulsu  $t_s = 0,4 \text{ s}$ , o amplitudzie  $\Delta E = 50 \text{ mV}$ . W wyniku pomiaru otrzymujemy woltamperogram, pozwalający na określenie wartości natężenia prądu proporcjonalnej do stężenia glukozy. Przykład takiego woltamperogramu przedstawia rys. 57.



Rys. 57. Przykładowe woltamperogramy (DPV) zarejestrowane w roztworze D – glukozy o  $c = 0,05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  w PBS (pH = 7,4) dla biosensora A i B.  $E = -0,2 \div 0,8 \text{ V}$ ,  $E_s = 2 \text{ mV}$ ,  $t_s = 0,4 \text{ s}$ ,  $\Delta E = 50 \text{ mV}$ .

### **8. Czynniki wpływające na działanie otrzymanych biosensorów.**

Otrzymanie biosensora glukozy składa się z wielu etapów takich jak modyfikacja powierzchni elektrody Pt, unieruchomienie na elektrodzie oksydazy glukozowej, optymalizację całego procesu, potwierdzenie procesu optymalizacji odpowiednim opracowaniem statystycznym, spełnianym wymogi współczesnej chemii analitycznej oraz badanie próbek pochodzenia naturalnego. Na każdy z wymienionych etapów, w mniejszym lub większym stopniu wpływa wiele czynników, które muszą być zbadane. Wśród tych czynników uwzględnić należy dobór polimeru przewodzącego, grubość warstwy modyfikującej elektrodę metaliczną, dobór odczynnika modyfikującego oraz jego stężenie, wpływ stężenia WSC oraz GOD.

#### **8.1. Rodzaj kompozytu modyfikującego powierzchnię elektrody.**

Pierwszym krokiem przygotowania biosensora glukozy był wybór polimeru przewodzącego jaki posłuży do modyfikacji powierzchni elektrody platynowej. Wybrałam poli(3,4-etylenodioksytiofen), jako polimer dobrze poznany. Jego zaletą jest szybki i łatwy do kontroli proces polimeryzacji oraz co najistotniejsze przewodzi on prąd elektryczny zarówno w środowisku kwaśnym jak i obojętnym.

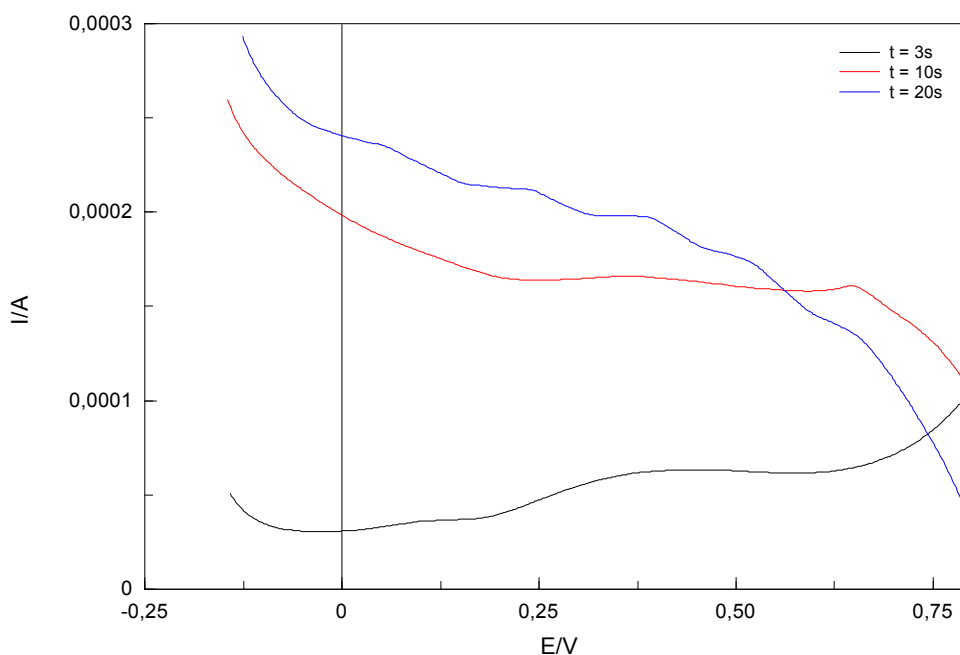
Jeżeli chodzi o wybór drugiego składnika kompozytu to musiał on tworzyć wraz z polimerem kompozyt przewodzący oraz oferować na powierzchni dostępność wolnych grup karboksylowych. Założenia te spełnia zarówno kwas poliakrylowy jak i kwas antranilowy.

#### **8.2. Grubość warstwy kompozytu modyfikującego powierzchnię elektrody**

Kolejnym parametrem, który należało określić aby zoptymalizować proces immobilizacji to grubość warstwy powstającego kompozytu. Z wcześniejszych doświadczeń oraz prowadzonych pomiarów wynikało, że grubość warstwy modyfikującej nie wpływa zasadniczo na wartość natężenia prądu utleniania substancji oznaczanej, jednak powoduje znaczący wzrost prądu utleniania samej warstwy. Parametry jakie pozwalają kontrolować grubość warstwy powstającego kompozytu to stężenia poszczególnych związków wchodzących w skład roztworu do polimeryzacji oraz jej warunki. Warunki polimeryzacji można kontrolować poprzez zmianę potencjału i czasu polimeryzacji, zakresu potencjału, szybkości skanowania i liczby jej cykli. Jeżeli chodzi o dobrane stężenia, to dokonałam tego na podstawie przeglądu literatury dotyczącej elektropolimeryzacji. Stwierdziłam, że

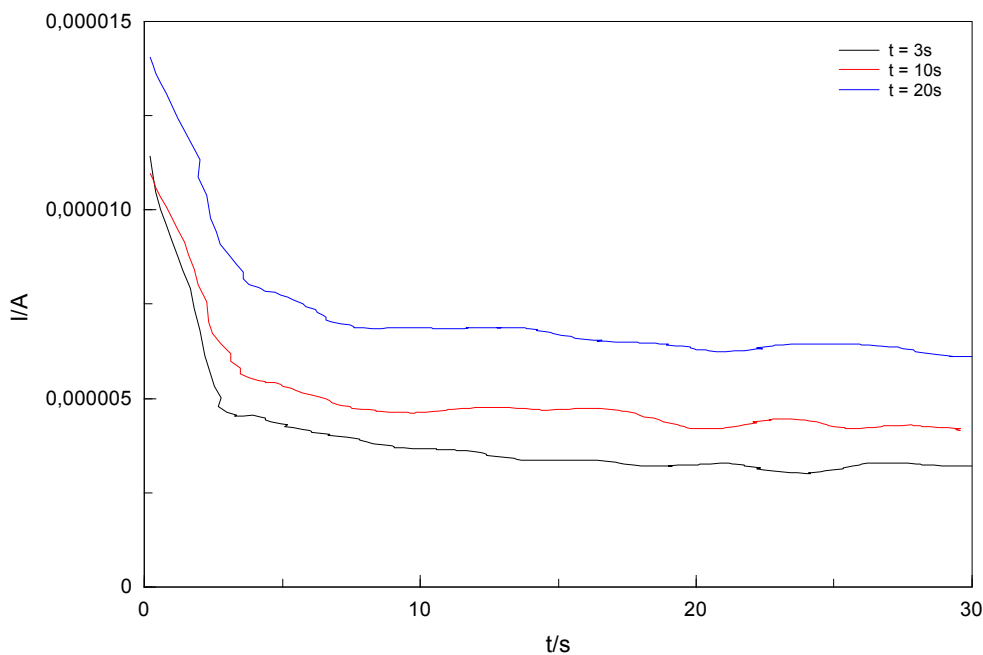


kompozyt zbudowany z (PEDOT+PAA)/PSSLi będzie wygodniej otrzymać metodą elektrolizy stałoprądowej, gdyż jest to powszechnie stosowana technika pracy z tym polimerem przewodzącym. Okazało się, że parametry  $E = 1 \text{ V}$  oraz  $t = 3 \text{ s}$  ( $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  EDOT +  $15 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  PAA w  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PSSLi) warunkują powstanie kompozytu o optymalnej grubości. Znalazło to odzwierciedlenie w pomiarach przedstawionych na rysunku 58.



Rys. 58. Woltamperogramy (DPV) zarejestrowane w roztworze D – glukozy o  $c = 0,05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  w PBS (pH = 7,4) dla biosensora A, otrzymanego przy różnych czasach polimeryzacji warstwy kompozytu modyfikującego ( $t = 3 \text{ s}$ ,  $10 \text{ s}$  oraz  $20 \text{ s}$ ).

Widać tu, że wydłużenie czasu polimeryzacji przy zachowaniu pozostałych parametrów na tym samym poziomie w istocie przyczyniło się wyłącznie do wzrostu wartości natężenia prądu warstwy przy jednoczesnym spadku wartości natężenia prądu związanego z utlenianiem glukozy, doprowadzając nawet do sytuacji, w której przy  $t = 20 \text{ s}$  niemożliwe staje się rzetelne odczytanie jego wartości. W przypadku prowadzenia pomiarów techniką amperometryczną zwiększenie grubości warstwy kompozytu modyfikującego poprzez wydłużenie czasu polimeryzacji podwyższa wartość oznaczanego natężenia prądu (rys. 59).



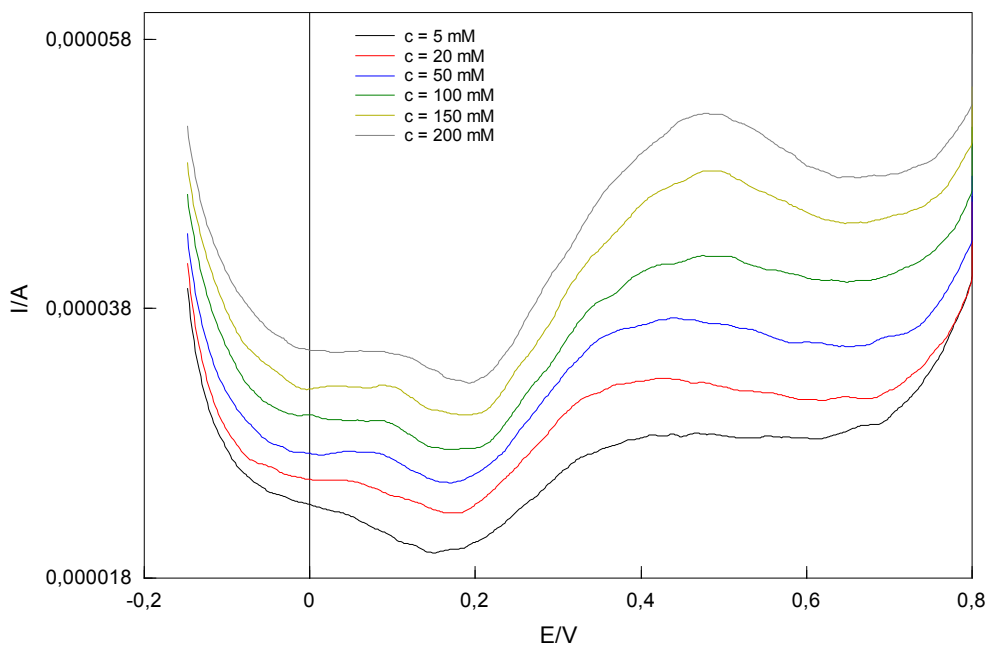
Rys. 59. Amperogramy zarejestrowane w roztworze D – glukozy o  $c = 0,05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  w PBS (pH = 7,4) dla biosensora A, otrzymanego przy różnych czasach polimeryzacji warstwy kompozytu modyfikującego ( $t = 3 \text{ s}$ ,  $10 \text{ s}$  oraz  $20 \text{ s}$ ).

Jednak warto zwrócić tu uwagę, iż wzrosty te nie są znaczącego rzędu, a w przypadku grubszych kompozytów otrzymanych w czasie  $t = 10 \text{ s}$  oraz  $t = 20 \text{ s}$  pojawiały się dodatkowe problemy związane z przyleganiem otrzymanego kompozytu do powierzchni elektrody modyfikowanej. Mając na uwadze otrzymanie biosensora zdolnego zależnie od potrzeb do pracy w warunkach amperometrycznych jak i woltamperometrycznych, najlepszym rozwiązaniem okazało się prowadzenie polimeryzacji w krótszym czasie, tj.  $t = 3 \text{ s}$ .

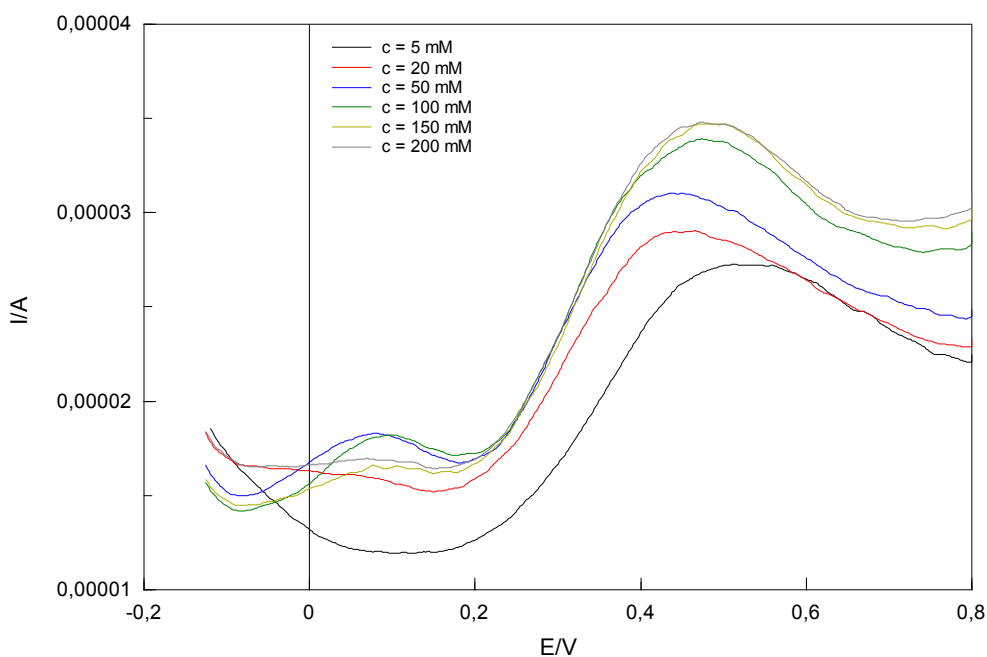
W przypadku drugiego z kompozytów PEDOT/(PEDOT+AA)/PSSH, w związku ze słabym przewodnictwem kwasu antranilowego będącego pochodną polianiliny podjęłam decyzję o użyciu dwóch warstw. Miało to na celu zapewnić dobre przewodnictwo. Pierwsza z nich otrzymana z roztworu  $0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  EDOT w  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PSSLi przy standardowych parametrach tj.  $E = 1 \text{ V}$ ,  $t = 5 \text{ s}$ , ma za zadanie zapewnić wysoki poziom przewodzenia. Druga warstwa jest otrzymywana z roztworu  $0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  EDOT +  $0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  AA w  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PSSH. Z racji użycia pochodnej polianiliny zastosowałam woltamperometrię cykliczną jako metodę pozwalającą na dokładną kontrolę grubości warstwy powstającego kompozytu przy  $E = -0,4 \div 1,2 \text{ V}$ ,  $v = 20 \text{ mV/s}$ ,  $n = 1$  cykl.

### 8.3. Dobór czynnika domieszkującego otrzymywany kompozyt

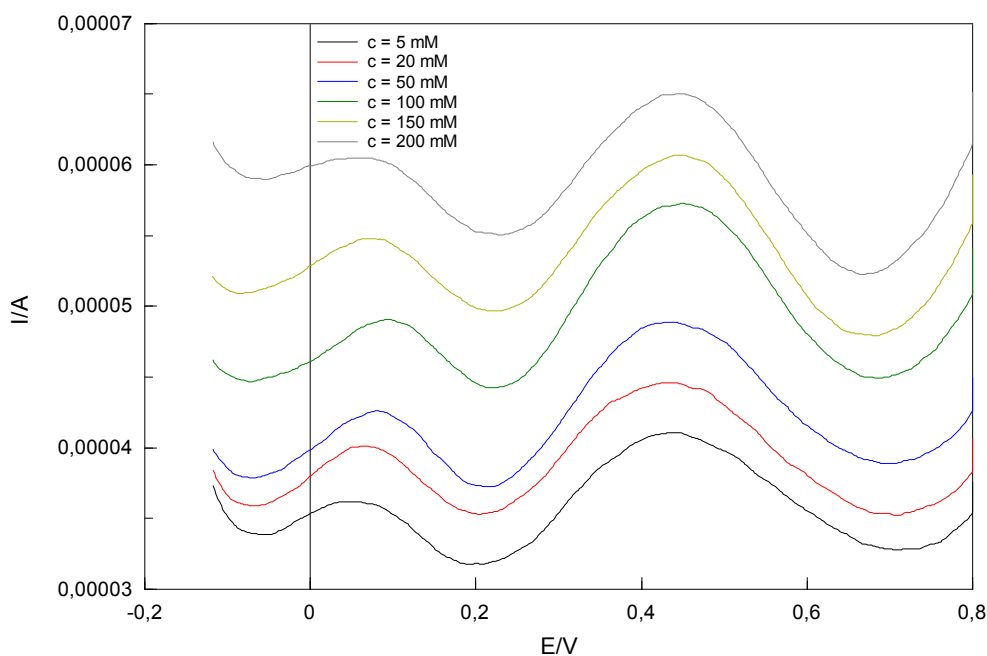
Kolejnym czynnikiem wymagającym optymalizacji był dobór odpowiedniego związku mającego na celu domieszkowanie powstającej warstwy kompozytu, a co za tym idzie zapewnienie jej przewodnictwa na odpowiednio wysokim poziomie. W związku z powyższym jako związki domieszkujące wybrałam  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PSSLi (rys. 60),  $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  LiCl (rys. 61), oraz ich mieszaninę  $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  LiCl +  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PSSLi (rys. 62). Wybór ten dawał możliwość sprawdzenia czy lepszy do planowanych badań będzie klasyczny polimer przewodzący domieszkowany prostym anionem, czy też materiał kompozytowy, w którym domieszkowanie zapewniają grupy anionowe drugiego polimeru. Jeśli polimeryzacja jest prowadzona z roztworu zawierającego EDOT oraz PSSLi to produktem końcowym będzie kompozyt. Jeżeli roztwór do polimeryzacji zawiera EDOT oraz LiCl otrzymamy polimer przewodzący domieszkowany małymi anionami. W przypadku gdy w roztworze do polimeryzacji znajdzie się EDOT, PSSLi oraz LiCl powstanie układ pośredni tj. kompozyt domieszkowany małymi jonami. Według moich przewidywań najlepszym przewodnictwem powinien charakteryzować się kompozyt PEDOT/PSSLi.



Rys. 60. Wpływ stężenia glukozy w PBS na prąd piku (DPV) utleniania (regeneracji) GOD dla biosensora A, otrzymanego przy domieszkowaniu warstwy kompozytu modyfikującego  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PSSLi.



Rys. 61. Wpływ stężenia glukozy w PBS na prąd piku (DPV) utleniania (regeneracji) GOD dla biosensora A, otrzymanego przy domieszkowaniu warstwy kompozytu modyfikującego  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ LiCl}$ .

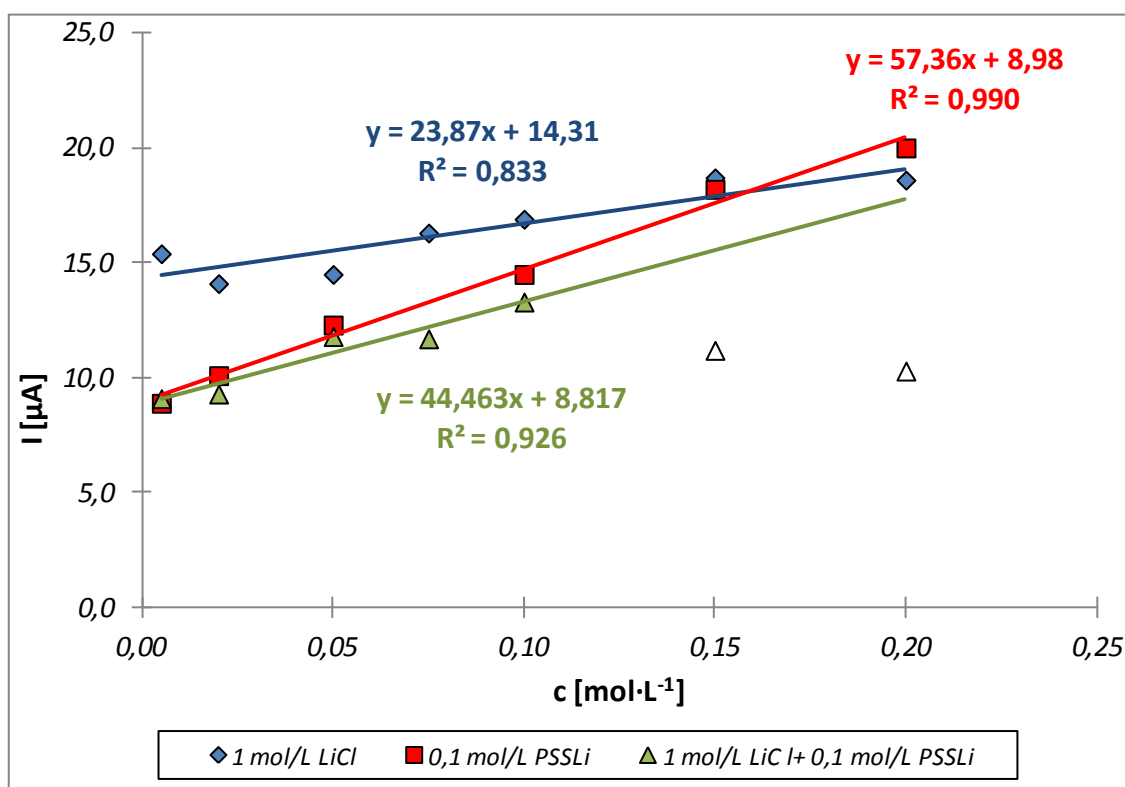


Rys. 62. Wpływ stężenia glukozy w PBS na prąd piku (DPV) utleniania (regeneracji) GOD dla biosensora A, otrzymanego przy domieszkowaniu warstwy kompozytu modyfikującego  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ PSSLi} + 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ LiCl}$ .

Sumaryczne wyniki przedstawiłam w tabeli 9 oraz na rysunku 63.

c glukozy [mol·L <sup>-1</sup> ]	I [μA]		
	1 mol·L <sup>-1</sup> LiCl	1 mol·L <sup>-1</sup> LiCl + 0,1 mol·L <sup>-1</sup> PSSLi	0,1 mol·L <sup>-1</sup> PSSLi
0,005	15,40	9,10	8,90
0,020	14,10	9,30	10,10
0,050	14,50	11,80	12,30
0,075	16,30	11,70	—
0,100	16,90	13,30	14,50
0,150	18,70	11,20	18,20
0,200	18,60	10,30	20,00

Tabela 9. Zależność natężenia prądu piku (DPV) od wzrastającego stężenia D – glukozy dla biosensora A przy domieszkowaniu powstającego kompozytu różnymi związkami chemicznymi.



Rys. 63. Wykres zależności natężenia prądu piku (DPV) od wzrastającego stężenia D – glukozy dla biosensora A przy domieszkowaniu powstającego kompozytu różnymi związkami chemicznymi.

Z wykresów na rys. 66 daje się zauważyć, że najlepsze rezultaty zostały osiągnięte dla domieszkowania warstwy powstającego kompozytu solą litową PSSLi. Świadczą o tym między innymi liniowa zależność potwierdzona wysokim współczynnikiem korelacji  $R^2$ . Ponadto elektroda ta charakteryzowała się wysokimi wartościami natężenia prądu utleniania oksydazy glukozowej oraz dobrą czułością połączoną z trwałością elektrody. Chlorek litu dał najgorsze wyniki jako czynnik domieszkujący, nie zapewniając wysokiej wartości  $R^2$ , a ponadto prezentowana zależność nie miała charakteru wprost proporcjonalnego, tzn. wzrost wartości stężenia glukozy nie zawsze wiązał się ze wzrostem wartości natężenia prądu. Wartość natężenia prądu całej warstwy była porównywalna, a sam biosensor wykazywał krótkotrwałą aktywność unieruchomionego enzymu. Mieszanina wspomnianych związków jako czynnik domieszkujący dawała zadowalające wyniki, jednakże w węższym zakresie. Następował wzrost natężenia prądu utleniania całej warstwy, ale nie miało to znacznego wpływu na wartość natężenia prądu regeneracji oksydazy glukozowej. Efektem jest rozsuniecie równoległe krzywych, oraz niska czułość, przez co uzyskiwane rezultaty uznałam za gorszej jakości od odpowiadających im parametrów dla samego PSSLi. Warto również nadmienić, iż biosensor modyfikowany kompozytem na bazie LiCl jako czynnik domieszkujący charakteryzował się najwyższymi wartościami natężenia prądu jednak różnica ta nie była duża biorąc pod uwagę cały zakres pomiarowy.

Uważam, że jony o mniejszym rozmiarze preferują, zgodnie z teoriami polimeryzacji omówionymi w części teoretycznej, warstwę bardziej zbitą i zwartą, mocniej przylegającą do powierzchni elektrody modyfikowanej. Natomiast jony większego rozmiaru preferują tworzenie kompozytu o formie gąbczastej, mniej zwartej i luźniej związanej z elektrodą. Moim zdaniem z tego właśnie faktu wynika większa użyteczność PSSLi, zapewniającego lepszy kontakt kompozytu z unieruchomionym na jego powierzchni enzymem i to mimo faktu nieco lepszego przewodnictwa kompozytu domieszkowanego LiCl. Ponadto kompozyt eliminuje problem wymywania jonów domieszkujących z powstałej warstwy, a co za tym idzie nie występują spadki wartości natężenia w czasie użytkowania.

Ogólne założenia dotyczące związku domieszkującego powstający kompozyt zarówno dla Biosensora A jak i Biosensora B pozostały takie same. Różnica w doborze czynnika domieszkującego podwarstwę drugą kompozytu B związana jest z używaniem kwasu antranilowego. Kwas antranilowy jest pochodną aniliny, istniała więc obawa

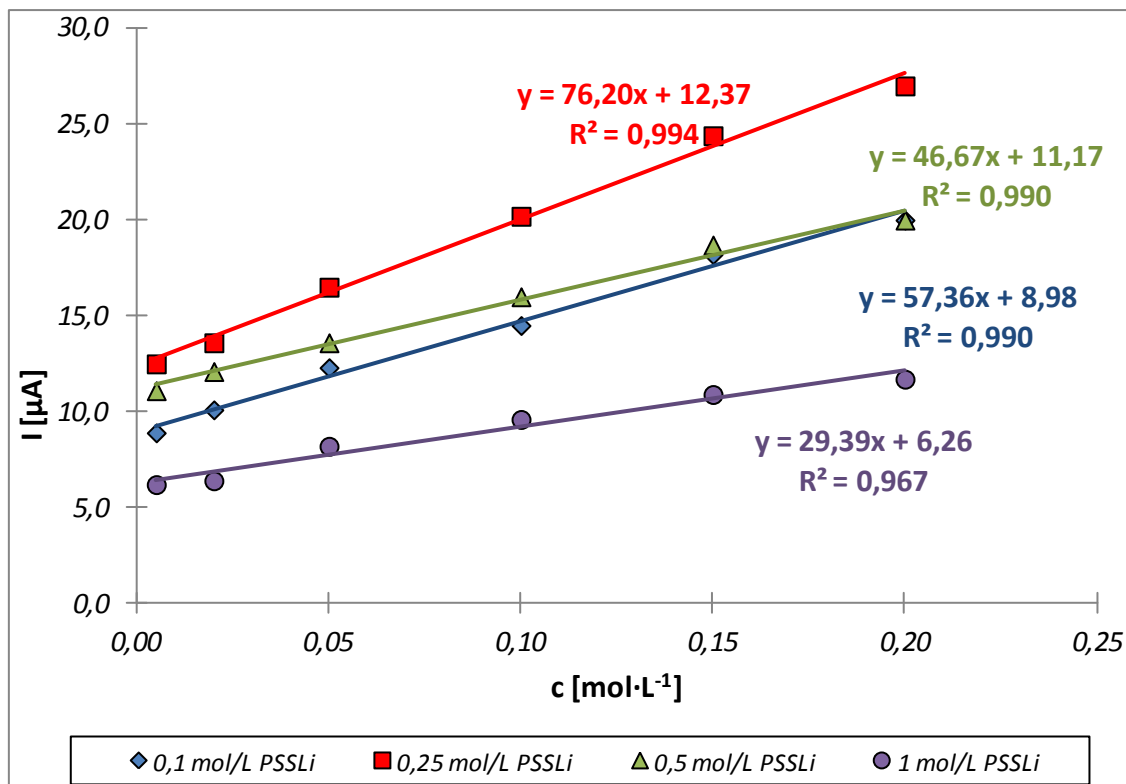
o przewodnictwo warstwy modyfikującej, jako że biosensory pracowały w  $\text{pH} = 7,4$ . W środowisku obojętnym sama polianilina nie przewodzi prądu, tak więc aby podnieść kwasowość samej warstwy kompozytu, a tym samym zapewnić jej dobre przewodnictwo zdecydowałam się zamiast samego PSSLi użyć równomolowej mieszaniny PSSLi oraz PSSH.

#### 8.4. Wpływ stężenia PSSLi na pracę biosensora

Po określeniu, który ze związków domieszkujących powstający kompozyt modyfikujący powierzchnię elektrody najkorzystniej wpływa na właściwości otrzymanego biosensora, należało określić wartość jego stężenia w roztworze do polimeryzacji. W tym celu przygotowałam szereg biosensorów używając w czasie ich otrzymywania roztworów o zmiennym stężeniu PSSLi. Wyniki przedstawione zostały w tabeli 10 i na rysunku 64:

c glukozy [mol·L <sup>-1</sup> ]	I [μA]			
	0,1 mol·L <sup>-1</sup> PSSLi	0,25 mol·L <sup>-1</sup> PSSLi	0,5 mol·L <sup>-1</sup> PSSLi	1 mol·L <sup>-1</sup> PSSLi
0,005	8,90	12,50	11,10	6,20
0,020	10,10	13,60	12,10	6,40
0,050	12,30	16,50	13,60	8,20
0,100	14,50	20,20	16,00	9,60
0,150	18,20	24,40	18,70	10,90
0,200	20,00	27,00	20,00	11,70

Tabela 10. Zależność natężenia prądu piku (DPV) od wzrastającego stężenia D – glukozy dla biosensora A przy domieszkowaniu powstającego kompozytu PSSLi o różnych stężeniach.



Rys. 64. Wykres zależności natężenia prądu piku (DPV) od wzrastającego stężenia D – glukozy dla biosensora A przy domieszkowaniu powstającego kompozytu PSSLi o różnych stężeniach.



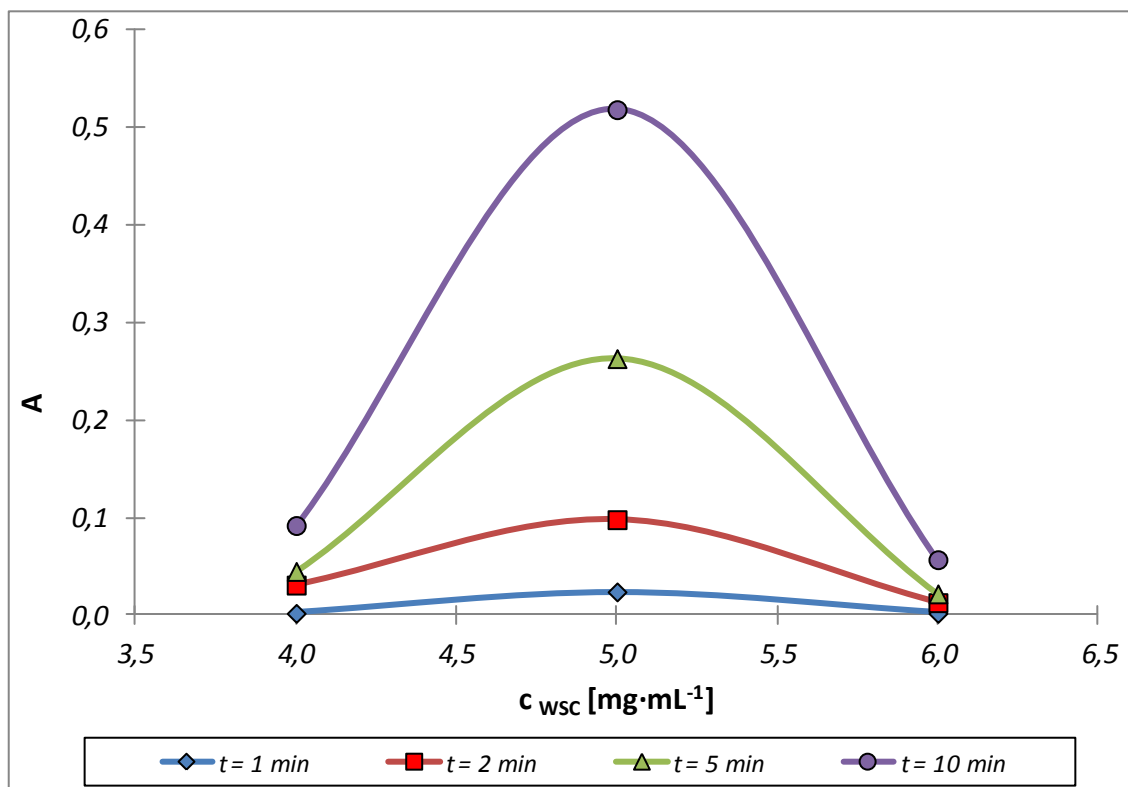
Już przy pierwszej analizie nasuwa się wniosek, iż zastosowanie  $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PSSLi powoduje osiągnięcie najniższych wartości natężenia regeneracji oksydazy glukozowej, podczas gdy pozostałe trzy przypadki charakteryzują się porównywalnymi jego wartościami. Ponadto okazało się, że te biosensory podobnie jak biosensor otrzymany z  $0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PSSLi charakteryzowały się krótkim czasem aktywności otrzymanego enzymu wynoszącym od jednego do trzech dni. Na osiągnięcie najlepszych rezultatów pozwala polimeryzacja warstwy kompozytu przy stężeniu PSSLi równym  $0,1$  oraz  $0,25 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Warstwy te charakteryzują się wysokimi wartościami natężenia prądu regeneracji oksydazy glukozowej oraz długim czasem aktywności unieruchomionego enzymu, o czym szerzej będzie mowa w dalszej części pracy. W związku z powyższym w dalszych pracach zdecydowałam się użyć PSSLi o stężeniu  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

### 8.5. Wpływ stężenia WSC na pracę biosensora

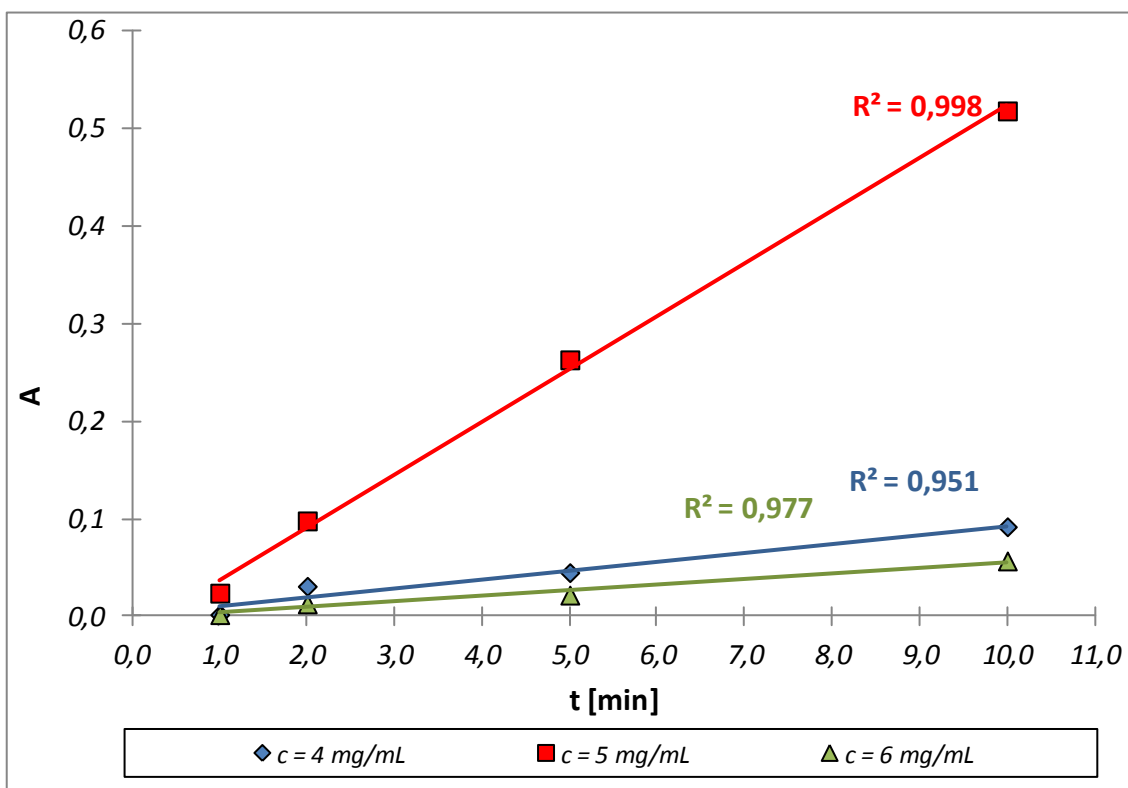
Po określeniu parametrów wpływających na charakter otrzymywanego kompozytu, należało przejść do optymalizacji czynników warunkujących unieruchomienie oksydazy glukozowej na powierzchni elektrody. Pierwszy z nich to stężenie WSC. Bazując na danych literaturowych [144], gdzie za optymalne uznano stężenie  $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , postanowiłam sprawdzić jak będzie zachowywał się unieruchomiony enzym w przypadku użycia stężenia literaturowego oraz wyższego i niższego od niego. Otrzymałam biosensory A, w których w procesie immobilizacji użyłam stałego stężenia GOD równego  $4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  oraz zmiennego stężenia WSC tj.  $4$ ,  $5$  oraz  $6 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Pierwszym testem jakim zostały one poddane, to spektrofotometryczny pomiar aktywności enzymu dla każdej z elektrod przeprowadzony zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 6.2, którego wyniki przedstawia tabela 11 oraz rysunek 65 i 66.

t [min]	A		
	$4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ WSC	$5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ WSC	$6 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ WSC
1	0,002	0,024	0,002
2	0,031	0,098	0,013
5	0,045	0,263	0,022
10	0,092	0,518	0,057

Tabela 11. Zależność absorbancji od czasu prowadzenia reakcji dla biosensora A otrzymanego w wyniku użycia różnych stężeń WSC w procesie immobilizacji enzymu na jego powierzchni.



Rys. 65. Wykres zależności absorpcji od stężenia WSC użytego w procesie immobilizacji dla biosensora A przy wzrastającym czasie prowadzenia reakcji,  $\lambda = 540$  nm.



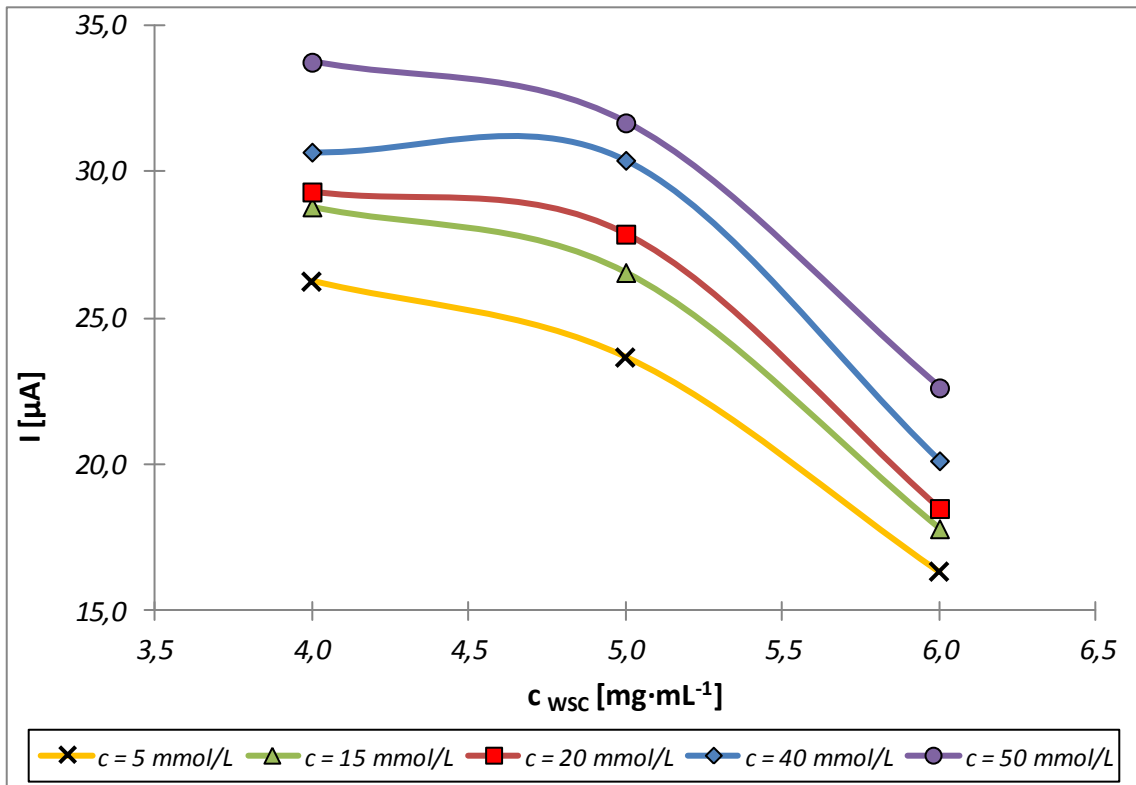
Rys. 66. Wykres zależności absorpcji od czasu prowadzenia reakcji dla biosensora A przy zmiennym stężeniu WSC użytego w procesie immobilizacji enzymu.

Jak obrazuje rysunek 65 wartość absorbancji wzrasta wraz z czasem prowadzenia reakcji, jednak dla każdego z badanych czasów zdecydowanie najlepsze wyniki są osiągnięte dla stężenia WSC równego  $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Zarówno dla niższego jak i wyższego stężenia WSC obserwuje się znaczący spadek wartości absorbancji, co jednocześnie świadczy o mniejszej aktywności unieruchomionego enzymu, a w przyszłości o mniej efektywnym oznaczeniu. Wraz z wydłużeniem czasu od 1 do 10 minut trend ten staje się coraz bardziej wyraźny (rys. 66).

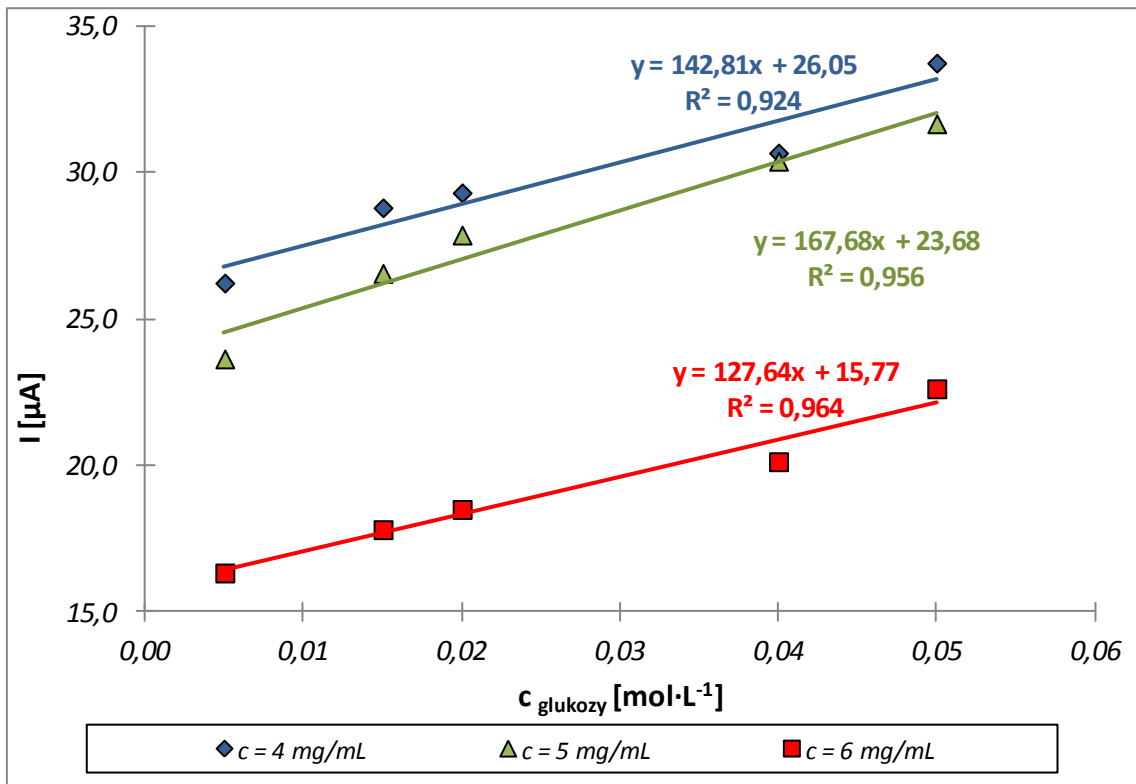
Powyższe wyniki postanowiłam potwierdzić poprzez rejestrację odpowiednich krzywych woltamperometrycznych i amperometrycznych i ich analizą.

		<b>I [<math>\mu\text{A}</math>]</b>				
		<b>c glukozy [<math>\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}</math>]</b>				
<b>c<sub>WSC</sub> [<math>\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}</math>]</b>	<b>0,005</b>	<b>0,015</b>	<b>0,020</b>	<b>0,040</b>	<b>0,050</b>	
4	26,24	28,81	29,32	30,68	33,75	
5	23,65	26,57	27,88	30,40	31,68	
6	16,34	17,82	18,51	20,14	22,63	

Tabela 12. Zależność natężenia prądu utleniania (DPV) oksydazy glukozowej od stężenia WSC użytego w procesie unieruchomienia GOD dla rosnących stężeń D – glukozy (biosensor A).



Rys. 67. Wykres zależności natężenia prądu utleniania (DPV) oksydazy glukozowej od stężenia WSC użytego w procesie unieruchomienia GOD dla rosnących stężeń D – glukozy (biosensor A).



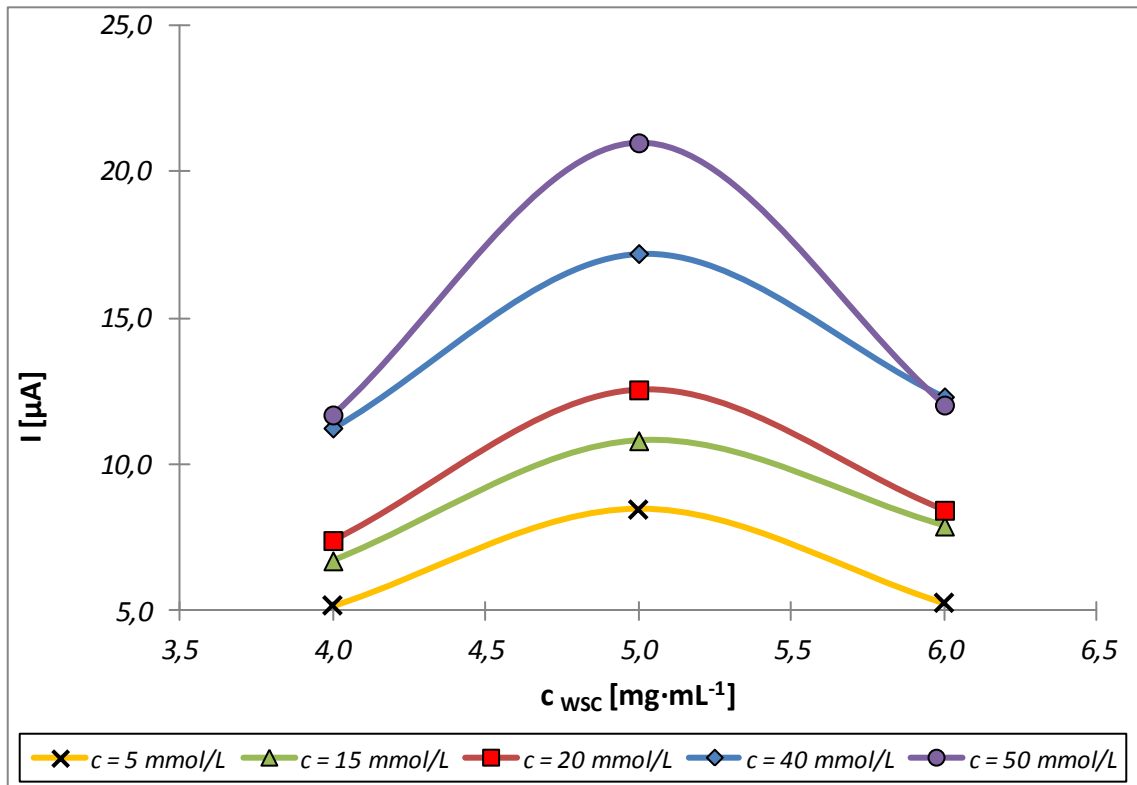
Rys. 68. Wykres zależności natężenia prądu utleniania (DPV) oksydazy glukozowej od stężenia D – glukozy dla różnych stężeń WSC użytych w czasie immobilizacji enzymu (biosensor A).

## Część doświadczalna

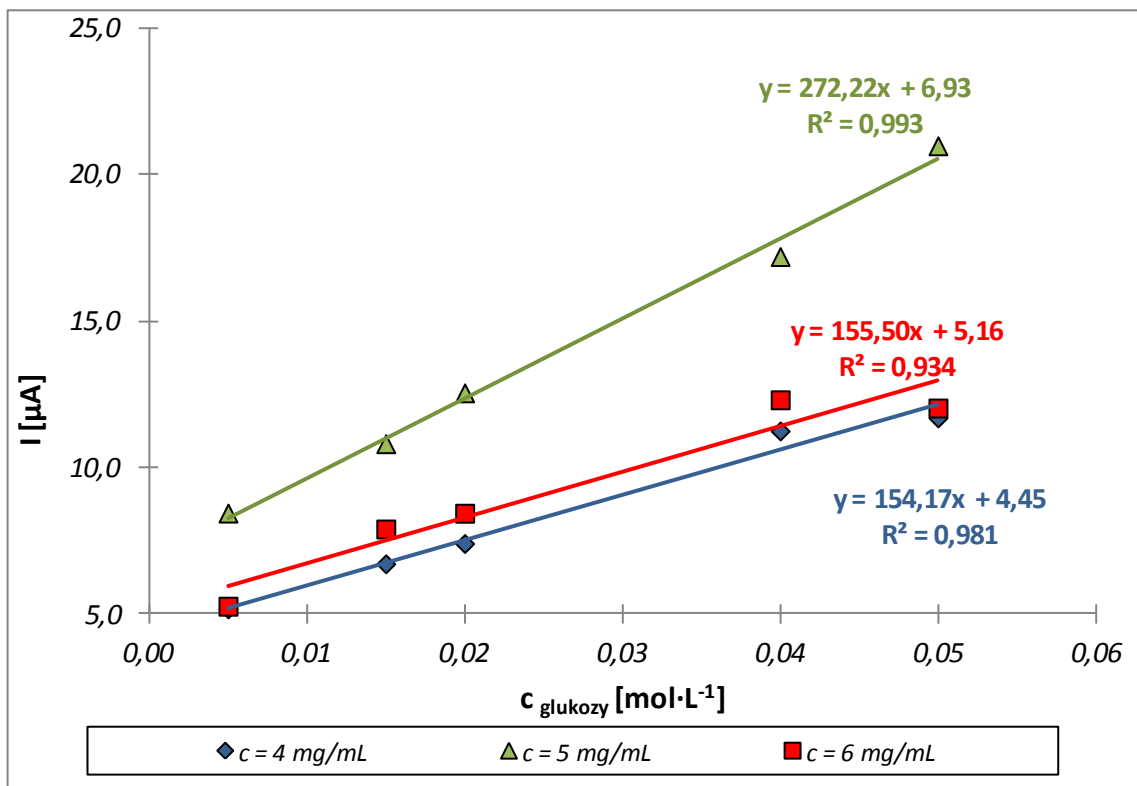
Przeprowadzone pomiary woltamperometryczne wykazały, iż zarówno WSC o stężeniu  $4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  jak i  $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  dają porównywalne wartości natężenia prądu (rys. 67, tabela 12) podczas gdy stężenie rzędu  $6 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  wpływa znacząco na spadek wartości natężenia prądu. Oczywiście wraz ze wzrostem stężenia glukozy we wszystkich badanych przypadkach rosła wartość natężenia prądu, a czułość pomiaru była porównywalna (rys. 68). Wyniki pomiarów woltamperometrycznych zostały porównane z wynikami otrzymanymi techniką amperometryczną.

		<b>I [<math>\mu\text{A}</math>]</b>				
		<b><math>c_{\text{glukozy}} [\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}]</math></b>				
<b><math>c_{\text{WSC}} [\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}]</math></b>		<b>0,005</b>	<b>0,015</b>	<b>0,020</b>	<b>0,040</b>	<b>0,050</b>
4		5,19	6,72	7,42	11,26	11,71
5		8,46	10,83	12,56	17,22	21,00
6		5,28	7,91	8,45	12,33	12,04

Tabela 13. Zależność natężenia prądu (pomiary amperometryczne) utleniania  $\text{H}_2\text{O}_2$  od stężenia WSC użytego w procesie unieruchomienia GOD dla rosnących stężeń D – glukozy (biosensor A).



Rys. 69. Wykres zależności natężenia prądu (pomiaru amperometryczne) utleniania  $H_2O_2$  od stężenia WSC użytego w procesie unieruchomienia GOD dla rosnących stężeń D – glukozy (biosensor A).



Rys. 70. Wykres zależności natężenia prądu (pomiaru amperometryczne) utleniania  $H_2O_2$  od stężenia D – glukozy dla różnych stężeń WSC użytych w czasie immobilizacji enzymu (biosensor A).

Przeprowadzone pomiary amperometryczne wykazały, iż WSC o stężeniu  $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  daje najwyższe wartości natężenia prądu (rys. 69, tabela 13) podczas gdy stężenie rzędu  $4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  oraz  $6 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  powoduje znaczący spadek wartości natężenia prądu. Oczywiście wraz ze wzrostem stężenia glukozy we wszystkich badanych przypadkach rosła wartość natężenia prądu, lecz czułość pomiaru była najwyższa dla  $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (rys. 70).

Wszystkie z przeprowadzonych testów, tzn. pomiary UV – VIS, woltamperometryczne oraz amperometryczne wykazały, że najbardziej optymalne stężenie WSC użyte w procesie unieruchomienia oksydazy glukozowej to  $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

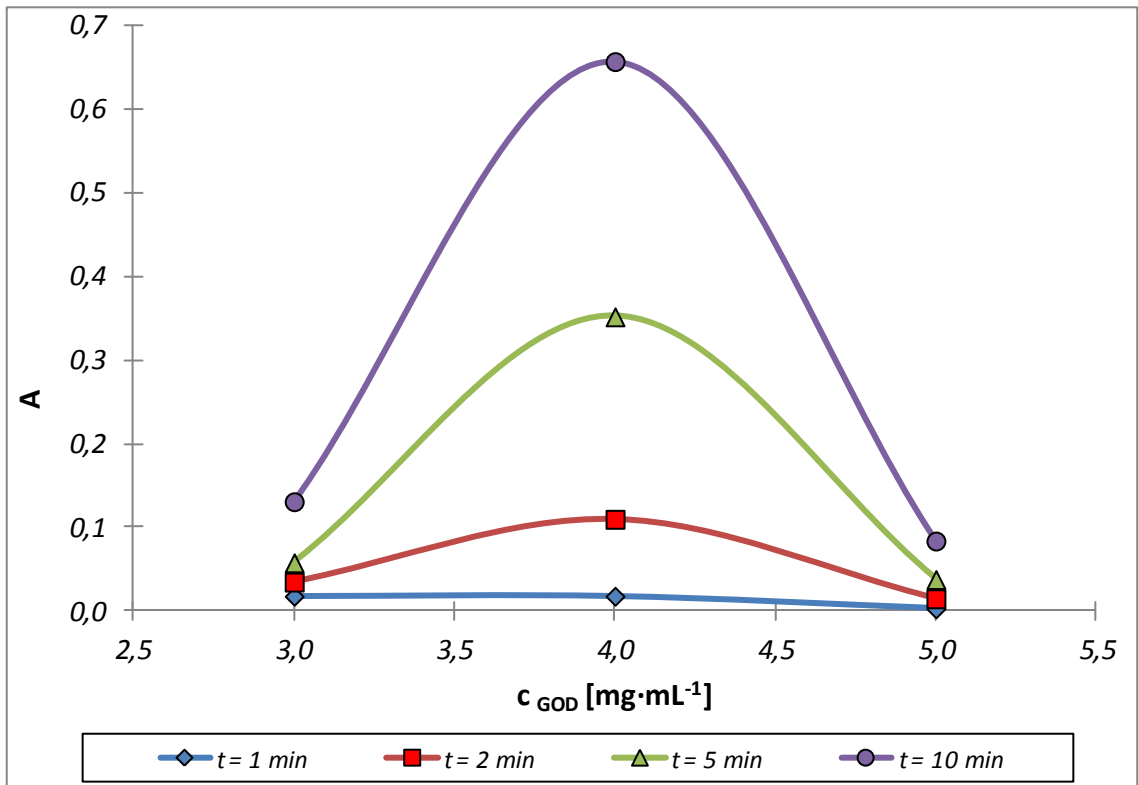
### 8.6. Wpływ stężenia GOD na prace biosensora

Ostatnim z parametrów, który należało zoptymalizować w procesie otrzymywania biosensora było stężenie GOD. Korzystając z informacji literaturowych [144], gdzie za optymalne uznano stężenie  $4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , postanowiłam sprawdzić jak będzie zachowywał się unieruchomiony enzym w przypadku użycia stężenia „literaturowego” oraz wyższego i niższego od niego. Otrzymałam biosensor A, w którym w procesie immobilizacji użyłam stałego stężenia WSC równego  $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  oraz zmiennego stężenia GOD tj. 3, 4 oraz  $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Pierwszym testem jakiemu zostały one poddane był spektrofotometryczny pomiar aktywności enzymu dla każdej z elektrod przeprowadzony zgodnie ze procedurą opisaną w rozdziale 6.2, którego wyniki przedstawia tabela 14 oraz rysunek 71 i 72.

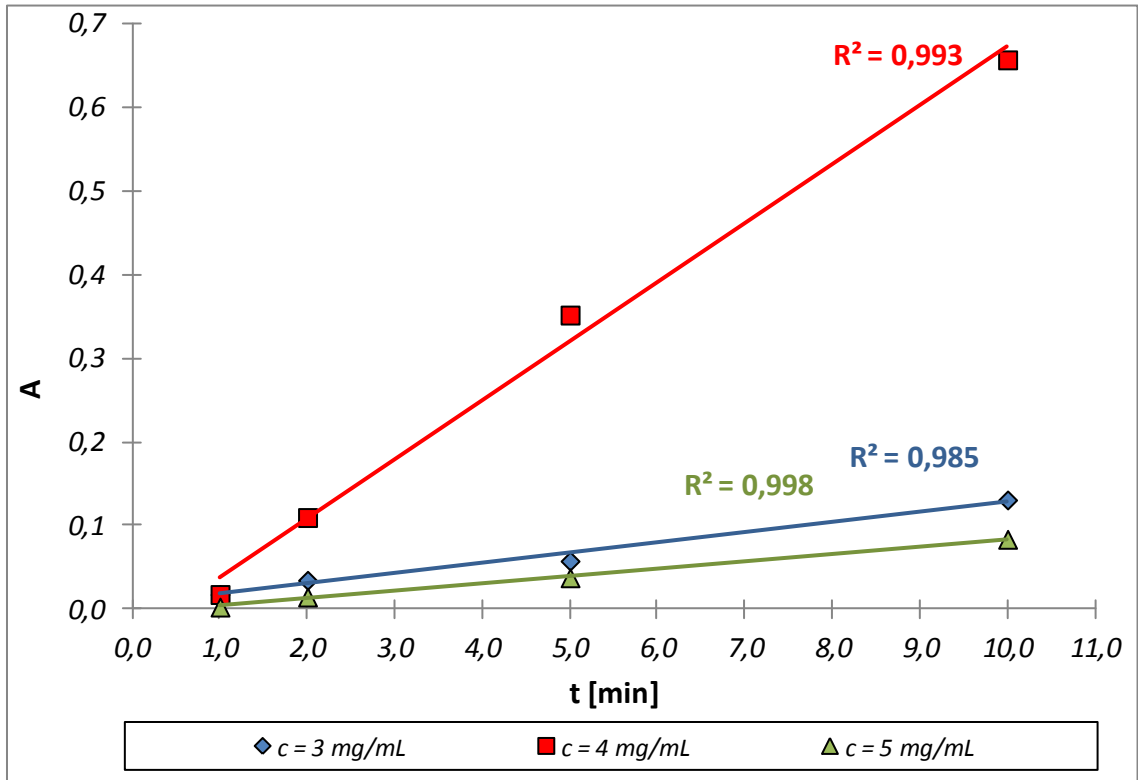
A			
t [min]	$3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ GOD	$4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ GOD	$5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ GOD
1	0,018	0,018	0,003
2	0,035	0,110	0,015
5	0,058	0,352	0,038
10	0,131	0,657	0,084

Tabela 14. Zależność absorbancji od czasu prowadzenia reakcji dla biosensora A otrzymanego w wyniku użycia różnych stężeń GOD w procesie immobilizacji enzymu na jego powierzchni.





Rys. 71. Wykres zależności absorbancji od stężenia GOD użytego w procesie immobilizacji dla biosensora A przy wzrastającym czasie prowadzenia reakcji,  $\lambda = 540 \text{ nm}$ .



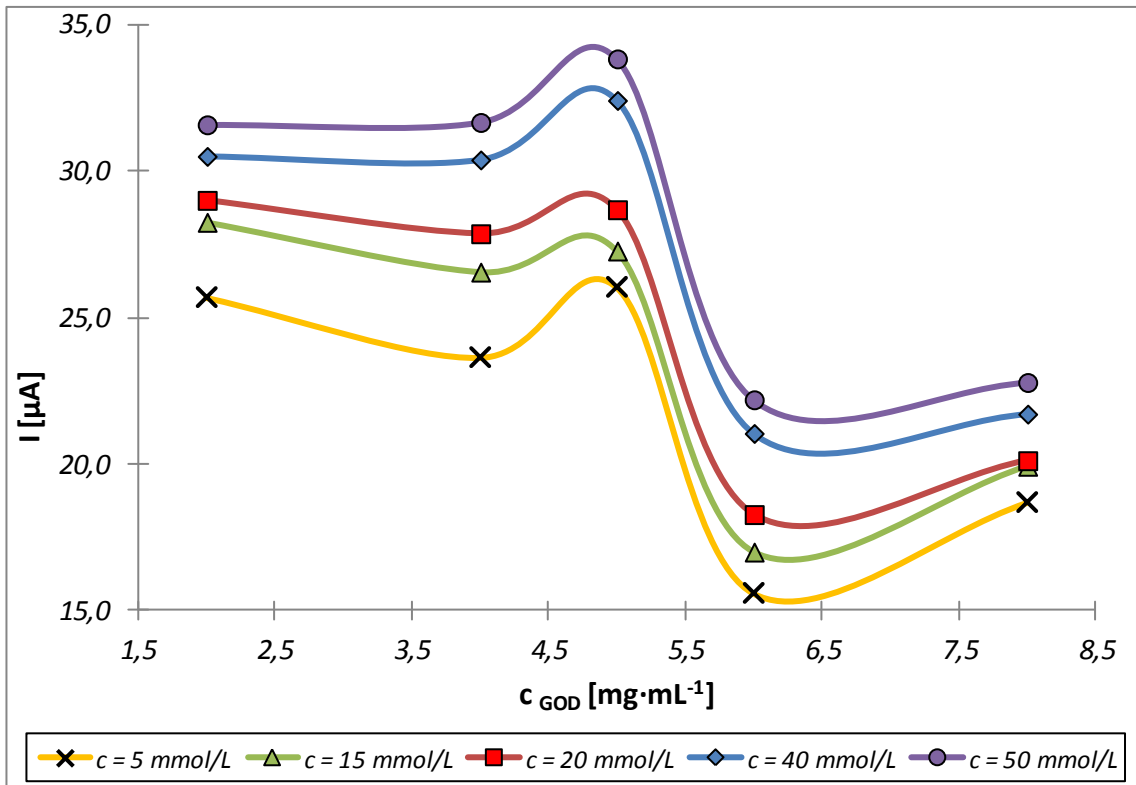
Rys. 72. Wykres zależności absorbancji od czasu prowadzenia reakcji dla biosensora A przy zmiennym stężeniu GOD użytego w procesie immobilizacji enzymu.

Jak obrazuje rysunek 71 wzrostowi czasu prowadzenia reakcji towarzyszy wzrost wartości absorbancji, jednak dla każdego z badanych czasów zdecydowanie najlepsze wyniki są osiągnięte dla stężenia GOD odpowiadającego  $4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Zarówno niższe jak i wyższe stężenie oksydazy glukozowej powoduje znaczący spadek wartości absorbancji, co jednocześnie świadczy o mniejszej aktywności unieruchomionego enzymu, a w przyszłości o mniej efektywnym oznaczeniu. Wraz z wydłużeniem czasu od 1 do 10 minut trend ten staje się coraz bardziej wyraźny (rys. 72).

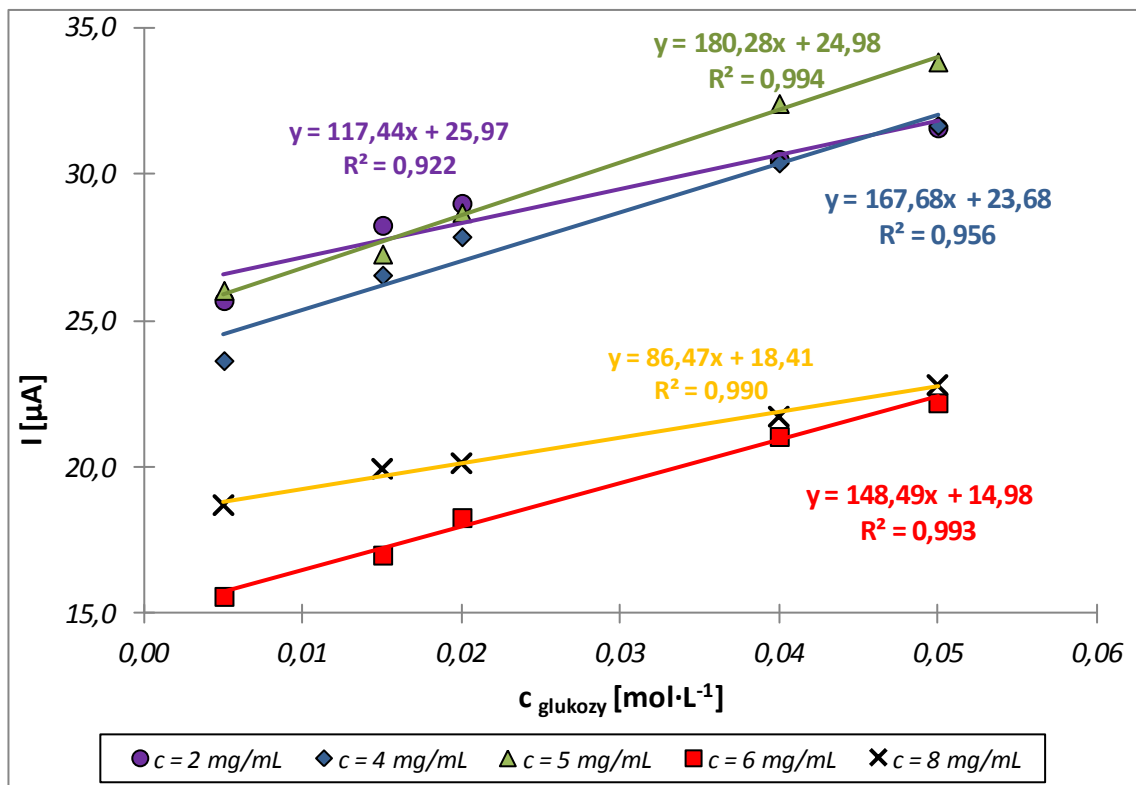
Podobnie jak w przypadku oceny stężenia WSC tak i teraz postanowiłam powyższe wyniki zweryfikować poprzez zarejestrowanie odpowiednich krzywych woltamperometrycznych i amperometrycznych.

		<b>I [<math>\mu\text{A}</math>]</b>				
		<b>c glukozy [<math>\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}</math>]</b>				
<b>c GOD [<math>\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}</math>]</b>		<b>0,005</b>	<b>0,015</b>	<b>0,020</b>	<b>0,040</b>	<b>0,050</b>
2		25,70	28,27	29,02	30,52	31,60
4		23,65	26,57	27,88	30,40	31,68
5		26,05	27,29	28,70	32,43	33,85
6		15,60	17,01	18,29	21,06	22,21
8		18,70	19,94	20,13	21,72	22,80

Tabela 15. Zależność natężenia prądu utleniania (DPV) oksydazy glukozowej od stężenia GOD użytego w procesie unieruchomienia enzymu dla rosnących stężeń D – glukozy (biosensor A).



Rys. 73. Wykres zależności natężenia prądu utleniania (DPV) oksydazy glukozowej od stężenia GOD użytego w procesie unieruchomienia enzymu dla rosnących stężeń D – glukozy (biosensor A).

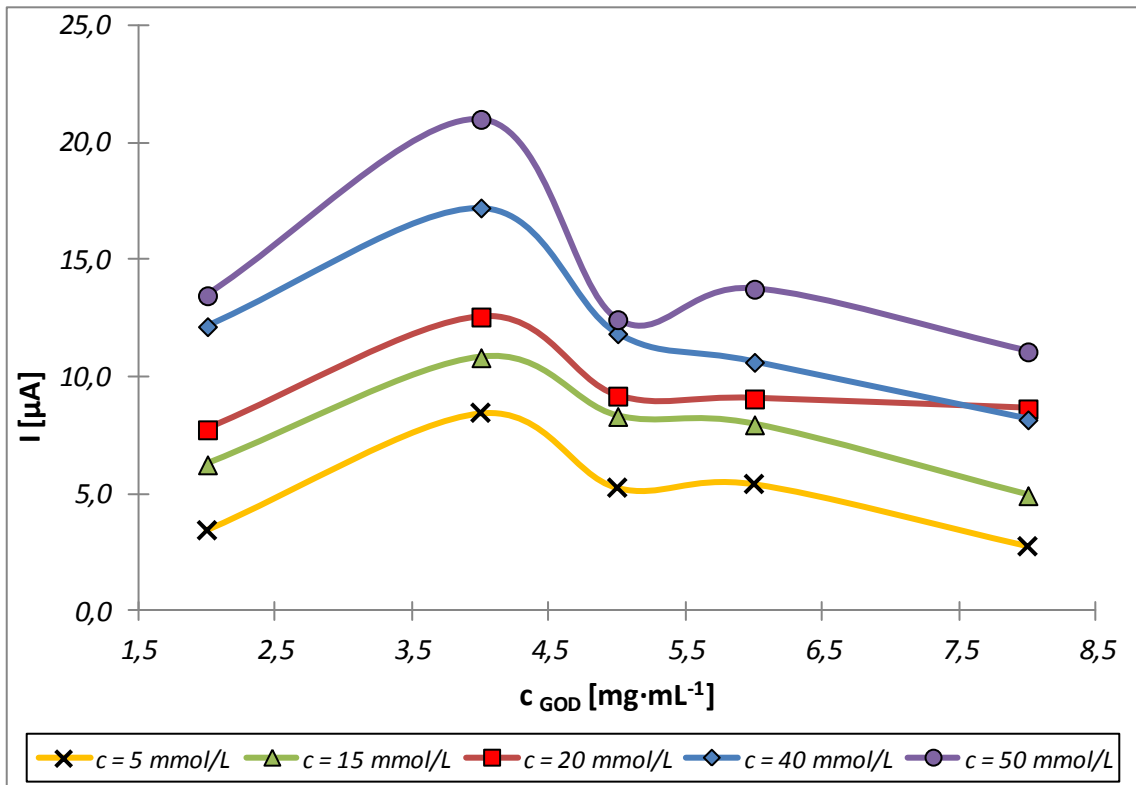


Rys. 74. Wykres zależności natężenia prądu utleniania (DPV) oksydazy glukozowej od stężenia D – glukozy dla różnych stężeń GOD użytych w czasie immobilizacji enzymu (biosensor A).

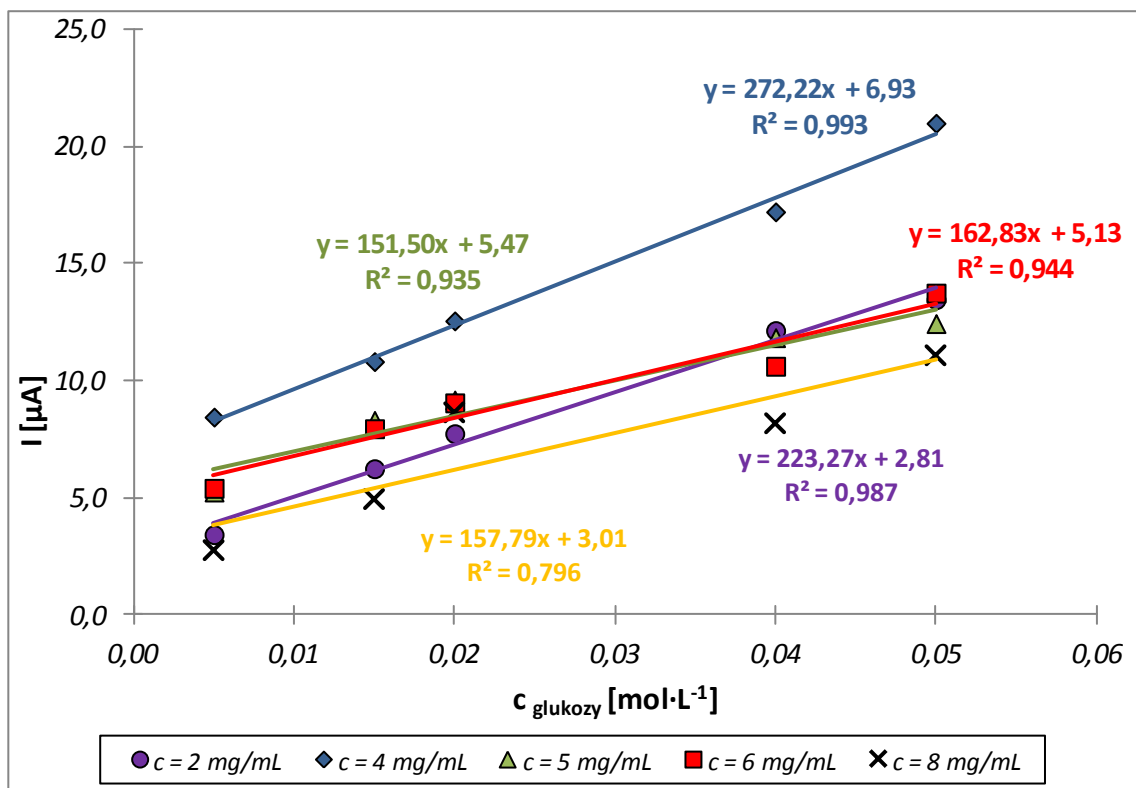
Przeprowadzone pomiary woltamperometryczne wykazały, iż w przypadku GOD zakres stężeń gwarantujący wysokie wartości natężenia prądu mieści się w granicach od  $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  do około  $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (rys. 73, tabela 15). Użycie oksydazy glukozowej o wyższym stężeniu powoduje znaczący spadek wartości natężenia prądu. Największą czułością prowadzenia pomiaru charakteryzują się biosensory otrzymane z użycie GOD na poziomie  $4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  oraz  $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (rys. 74). Wyniki pomiarów woltamperometrycznych należało jeszcze skonfrontować z wynikami otrzymanymi techniką amperometryczną.

		I [ $\mu\text{A}$ ]				
		$c_{\text{glukozy}} [\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}]$				
$c_{\text{GOD}} [\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}]$		0,005	0,015	0,020	0,040	0,050
2		3,44	6,25	7,75	12,15	13,47
4		8,46	10,83	12,56	17,22	21,00
5		5,26	8,32	9,19	11,85	12,45
6		5,42	7,96	9,07	10,63	13,75
8		2,76	4,94	8,64	8,17	11,08

Tabela 16. Zależność natężenia prądu utleniania (pomiary amperometryczne)  $\text{H}_2\text{O}_2$  od stężenia GOD użytego w procesie unieruchomienia enzymu dla rosnących stężeń D – glukozy (biosensor A).



Rys. 75. Wykres zależności natężenia prądu utleniania (pomiaru amperometrycznego) od stężenia GOD użytego w procesie unieruchomienia enzymu dla rosnących stężeń D – glukozy (biosensor A).



Rys. 76. Wykres zależności natężenia prądu utleniania (pomiaru amperometrycznego) od stężenia D – glukozy dla różnych stężeń GOD użytych w czasie immobilizacji enzymu (biosensor A).

Przeprowadzone pomiary amperometryczne jednoznacznie wykazały, iż użycie GOD o stężeniu  $4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  gwarantuje uzyskanie najwyższych wartości natężenia prądu (rys. 75, tabela 16) podczas gdy stężenie zarówno wyższe jak i niższe powodują znaczący spadek wartości natężenia prądu. Oczywiście wraz ze wzrostem stężenia glukozy we wszystkich badanych przypadkach rosła wartość natężenia prądu, lecz czułość pomiaru była najwyższa właśnie dla stężenia GOD równego  $4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (rys. 76).

Wszystkie z przeprowadzonych testów, tzn. pomiary UV – VIS, woltamperometryczne oraz amperometryczne wykazały, że najbardziej optymalne stężenie GOD użyte w procesie unieruchomienia oksydazy glukozowej to  $4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

### 8.7. Stabilność i trwałość uzyskanych biosensorów

Istotną właściwość otrzymanych biosensorów stanowi niewątpliwie ich stabilność i trwałość na przestrzeni około 30 dni o czym świadczą przedstawione w tabeli 17 współczynniki korelacji  $R^2$  oraz wartości natężenia prądu pikowego mierzone techniką woltamperometryczną. Zaprezentowane dane dotyczą trzech sztuk Biosensorów A. W przypadku biosensora 1 i 2 w celu domieszkowania powstającego kompozytu użyto  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  roztwór PSSLi, natomiast dla biosensora 3 był to  $0,25 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  roztwór PSSLi.

t [dni]	Biosensor 1		t [dni]	Biosensor 2		t [dni]	Biosensor 3	
	$R^2$	I [ $\mu\text{A}$ ]		$R^2$	I [ $\mu\text{A}$ ]		$R^2$	I [ $\mu\text{A}$ ]
1	0,995	14,90	1	0,976	18,60	1	0,995	17,70
3	0,992	14,50	3	0,999	17,50	2	0,992	18,10
4	0,986	14,40	4	0,992	18,70	6	0,986	17,40
5	0,981	15,20	5	0,993	18,30	7	0,981	17,30
6	0,984	14,80	6	0,997	18,00	8	0,984	17,60
10	0,981	15,10	10	0,998	18,50	23	0,981	18,00
11	0,985	15,10	11	0,998	17,90	24	0,985	17,70
12	0,978	14,60	12	0,987	18,10	31	0,978	17,20
17	0,986	15,00	17	0,994	17,80	35	0,986	15,30
21	0,993	14,70	21	0,998	17,50			
102	0,972	11,90	102	0,980	13,30			

Tabela 17. Wartości współczynnika korelacji  $R^2$  oraz natężenia prądu pikowego dla trzech wersji biosensora A zmierzone we wskazanych dniach.

Przez ponad 30 dni biosensory pracowały w roztworach glukozy przez 5 dni w tygodniu mierząc około 16 cykli pomiarowych zarówno techniką woltamperometryczną jak i amperometryczną. W tym czasie zachowywały one swą aktywność dając odpowiedź w postaci liniowo zmieniającego się natężenia wraz ze wzrostem stężenia glukozy. Ponadto zależność ta charakteryzowała się wysokimi wartościami współczynnika korelacji. Badając doniesienia literaturowe zebrane w tabeli 1, widać że duża część prezentowanych biosensorów charakteryzuje się stosunkowo krótkim czasem aktywności unieruchomionego enzymu przy którym wspomniane 30 dni to bardzo dobry wynik.

### 8.8. Podsumowanie dotyczące czynników wpływających na prace otrzymanego biosensora

Optymalne parametry pozwalające otrzymać badany biosensor glukozy o najlepszych parametrach i właściwościach zostały zebrane w tabeli 18.

Optymalne parametry otrzymania biosensora	
Polimer bazowy kompozytu	PEDOT
Drugi składnik kompozytu	PAA lub AA
Grubość warstwy	umiarkowana
Substancja domieszkująca	PSSLi lub PSSLi + PSSH
Stężenie substancji domieszkującej [ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ]	0,1
$c_{\text{WSC}}$ [ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ]	5
$c_{\text{GOD}}$ [ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ]	4

Tabela 18. Podsumowanie optymalizacji procesu otrzymywania biosensora glukozy.

Jakiegokolwiek odstępstwo od podanych wartości skutkuje otrzymaniem biosensora o gorszych właściwościach. Objawia się to przede wszystkim w spadku aktywności już unieruchomionego na powierzchni elektrody enzymu i dotyczy to zwłaszcza stężeń WSC oraz GOD. Inny niepożądanym efektem to drastyczny spadek trwałości otrzymanego biosensora z około 30 dni do dni 3 ÷ 4.



### 9. Oznaczanie stężenia D – glukozy w roztworze buforu fosforanowego

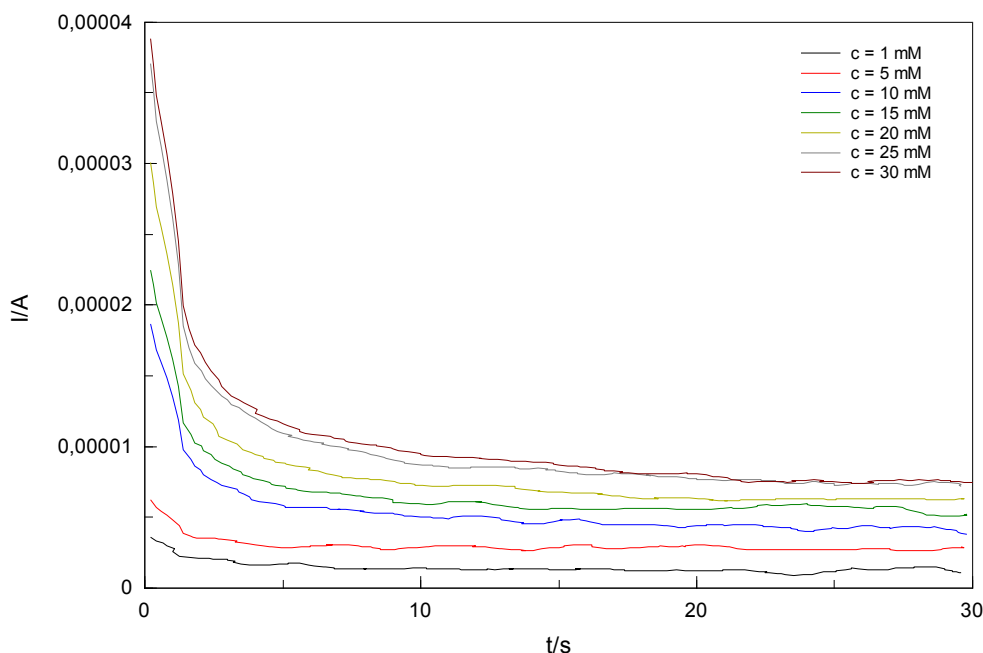
Aby w pełni ocenić i scharakteryzować właściwości otrzymanych biosensorów wykonałam krzywe wzorcowe oznaczania stężenia D – glukozy w roztworze buforu fosforanowego PBS o  $\text{pH} = 7,4$ . Wybór PBS jako środowiska oznaczenia podyktowany jest tym, że bufor ten imituje podstawowy skład płynów ustrojowych, tym również podyktowany był dobór  $\text{pH}$  roztworów, jako że  $\text{pH} =$  krwi człowieka to również 7,4.

#### • Sensory I generacji

W przypadku sensorów I generacji pomiary były wykonywane techniką amperometryczną zgodnie z zasadą działania przedstawioną w rozdziale 7. Badanie przeprowadziłam według procedury przedstawionej w punkcie 4.6. Rejestrowany prąd związany jest z utlenianiem  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Zarejestrowałam amperogramy próbek w zakresie stężeń D – glukozy  $1 - 30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dla biosensorów A i B.

#### • Biosensor A

Rysunek 77 przedstawia przykładowe amperogramy oznaczania D – glukozy za pomocą biosensora A.



Rys. 77. Przykładowe krzywe amperometryczne zarejestrowane w roztworze PBS ( $\text{pH}=7,4$ ) o różnej zawartości D – glukozy ( $1 \div 30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) dla biosensora A.

Jak możemy zaobserwować na powyższym rysunku, wraz ze wzrostem stężenia D – glukozy, rośnie również wartość rejestrowanego natężenia prądu, która po początkowym gwałtownym spadku stabilizuje się i po ok. 25 sekundach osiąga stałą wartość.

Tabela 19 zawiera wyniki kilku serii pomiarowych, w czasie których dokonałam pomiaru wartości natężenia prądu w zależności od stężenia D – glukozy.

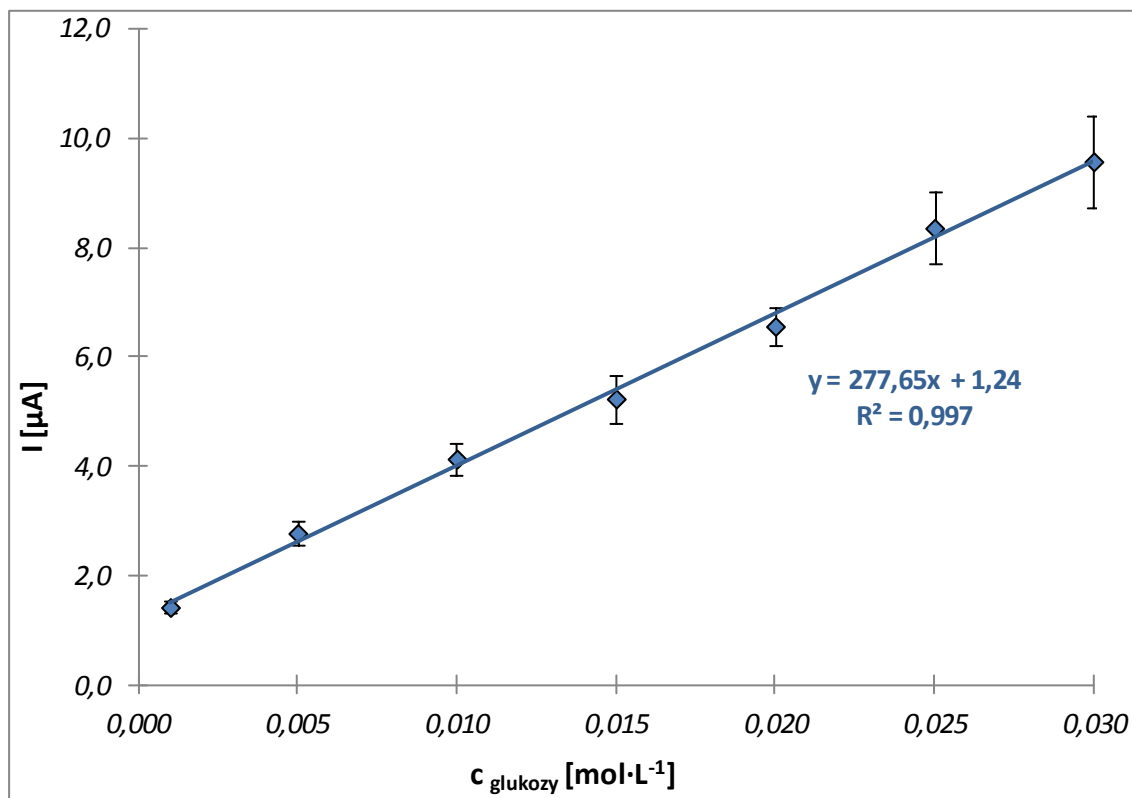
C <sub>glukozy</sub> [mol·L <sup>-1</sup> ]	I [μA]				
	Numer serii				
	I	II	III	IV	V
PBS	0,97	1,02	0,98	1,05	1,00
0,001	1,50	1,43	1,35	1,44	1,42
0,005	2,87	2,78	2,82	2,92	2,99
0,010	4,35	3,95	3,69	4,17	4,07
0,015	4,91	4,98	5,61	5,76	5,10
0,020	6,08	6,45	6,44	6,27	6,69
0,025	9,22	8,42	7,78	7,43	8,26
0,030	9,78	9,62	8,49	10,15	10,50

Tabela 19. Zestawienie zależności natężenia prąd (pomiaru amperometryczne) od stężenia D – glukozy w PBS o pH = 7,4 (biosensor A).

Dane te opracowałam następnie statystycznie, rezultaty przedstawiłam w tabeli 20 oraz rysunku 78.

C <sub>glukozy</sub> [mol·L <sup>-1</sup> ]	I <sub>sr</sub> [μA]	SD	RSD
PBS	1,00 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,03	0,027
0,001	1,42 ± 0,10	0,12	0,085
0,005	2,78 ± 0,21	0,25	0,090
0,010	4,14 ± 0,29	0,35	0,085
0,015	5,24 ± 0,44	0,52	0,099
0,020	6,56 ± 0,36	0,43	0,066
0,025	8,36 ± 0,65	0,78	0,094
0,030	9,58 ± 0,84	0,91	0,095

Tabela 20. Statystyczna ocena wyników. (<sup>a</sup> t(S/n<sup>1/2</sup>), n = 5; p = 95%).



Rys. 78. Wykres zależności natężenia prądu od stężenia D – glukozy dla biosensora A wraz z uwzględnieniem błędów mierzonych wartości.

Należy podkreślić bardzo dobry współczynnik korelacji otrzymanej krzywej oraz niski poziom błędów dla poszczególnych wartości. Następnie korzystając z parametrów krzywej  $y = 277,65x + 1,24$  i wartości natężeń prądów obliczyłam na tej podstawie wartości stężeń D – glukozy (tabela 21), dalej wyniki opracowałam statystycznie obliczając RSD, LOD, LOQ (tabela 22).

c <sub>glukozy</sub> [mmol·L <sup>-1</sup> ]	c <sub>glukozy</sub> wyliczone [mmol·L <sup>-1</sup> ]				
	Numer serii				
	I	II	III	IV	V
1,0	1,0	0,7	0,8	0,7	0,7
5,0	5,9	5,6	5,7	6,0	6,3
10,0	11,2	9,8	8,9	10,6	11,9
15,0	13,2	12,5	12,6	16,3	13,9
20,0	17,4	18,8	18,7	18,1	20,9
25,0	28,7	28,4	28,9	22,3	25,3
30,0	30,8	30,2	26,1	25,0	33,3

Tabela 21. Wartości stężeń D – glukozy wyliczone na podstawie krzywej wzorcowej  $y = 277,65x + 1,24$ .

$c_{\text{glukozy}}$ [mmol·L <sup>-1</sup> ]	$c_{\text{śr glukozy}} \pm \text{SE}$ [mmol·L <sup>-1</sup> ]	SD	RSD	Odzysk [%]
1,0	0,8 ± 0,1	0,11	0,148	123,3
5,0	5,9 ± 0,1	0,30	0,051	118,1
10,0	10,4 ± 0,4	1,06	0,102	104,3
15,0	14,0 ± 0,6	1,49	0,107	106,9
20,0	19,2 ± 0,6	1,56	0,081	104,1
25,0	25,7 ± 1,0	2,82	0,110	102,6
30,0	30,0 ± 1,2	3,27	0,109	100,1

Tabela 22. Statystyczna ocena wyników. (n = 5, p = 95 %)

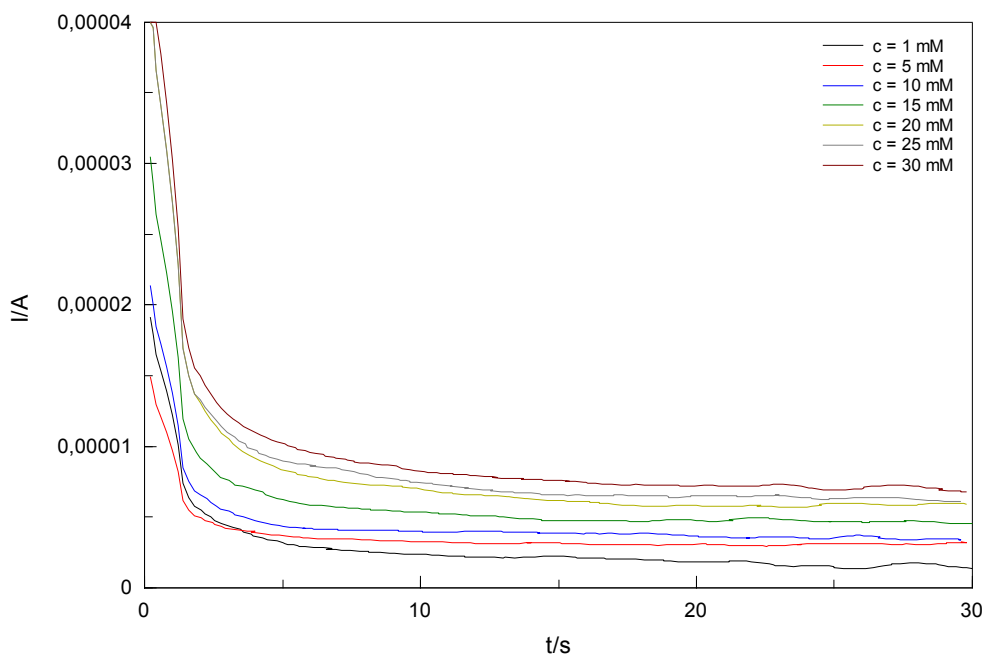
<b>Zakres liniowości</b> [mmol·L <sup>-1</sup> ]	0,98 ÷ 30,00
<b>R<sup>2</sup></b>	0,997
<b>LOD</b> [mmol·L <sup>-1</sup> ]	0,29
<b>LOQ</b> [mmol·L <sup>-1</sup> ]	0,98

Tabela 23. Parametry walidacji biosensora A I generacji.

Na podstawie parametrów walidacji (tabela 23) metody mogę stwierdzić, że przedstawiona procedura oznaczania D – glukozy za pomocą biosensora A może być stosowana do analizy ilościowej roztworów w zakresie stężeń D-glukozy od 0,98 mmol·L<sup>-1</sup> do 30,00 mmol·L<sup>-1</sup>. Podobne pomiary przeprowadziłam dla biosensora B.

- **Biosensor B**

Rysunek 79 przedstawia przykładowe amperogramy oznaczania D – glukozy za pomocą biosensora B. Procedura oznaczenia zawarta jest w paragrafie 4.6.



Rys. 79. Przykładowe krzywe amperometryczne zarejestrowane w roztworze PBS (pH=7,4) o różnej zawartości D – glukozy ( $1 \div 30 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) dla biosensora B.

Jak można zaobserwować na powyższym rysunku, wraz ze wzrostem stężenia D – glukozy, rośnie również wartość rejestrowanego natężenia prądu, która po początkowym gwałtownym spadku stabilizuje i po ok. 25 sekundach osiąga stały poziom, tak jak w przypadku biosensora A.

Tabela 24 zawiera wyniki kilku serii pomiarowych, w czasie których dokonałam pomiaru wartości natężenia prądu w zależności od stężenia D – glukozy.

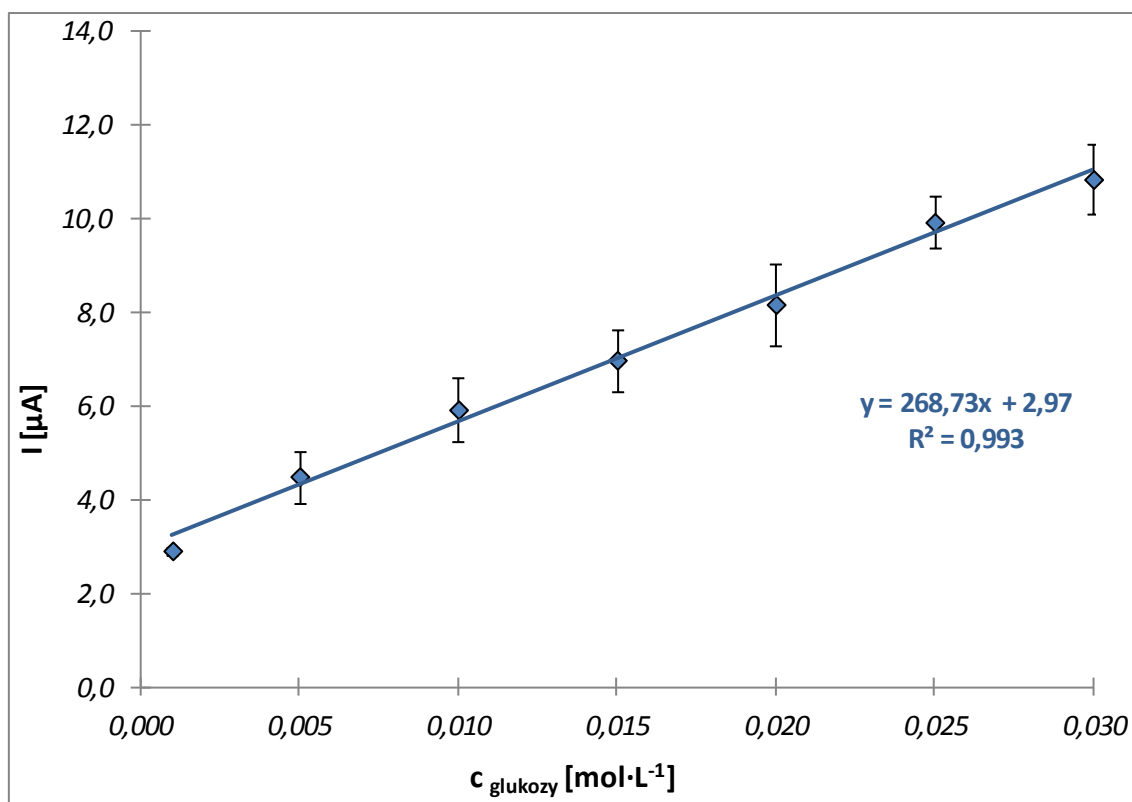
$c_{\text{glukozy}}$ [ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ]	I [ $\mu\text{A}$ ]				
	Numer serii				
	I	II	III	IV	V
PBS	0,74	0,64	0,62	0,61	0,64
0,001	2,92	2,98	2,82	2,92	2,95
0,005	4,93	4,73	4,81	4,03	4,01
0,010	6,65	6,32	5,84	5,51	5,33
0,015	7,21	7,66	6,93	6,92	6,21
0,020	8,27	8,44	7,93	7,16	9,07
0,025	9,66	10,31	10,08	10,31	9,28
0,030	11,33	11,29	11,04	9,85	10,70

Tabela 24. Zestawienie zależności natężenia prądu (pomiaru amperometryczne) od stężenia D – glukozy w PBS o pH = 7,4 (biosensor B).

Dane te opracowałam następnie statystycznie, rezultaty przedstawiłam w tabeli 25 oraz na rysunku 80.

$c_{\text{glukozy}}$ [mol·L <sup>-1</sup> ]	$I_{\text{sr}}$ [μA]	SD	RSD
PBS	0,65 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,05	0,077
0,001	2,92 ± 0,08	0,06	0,021
0,005	4,50 ± 0,55	0,45	0,099
0,010	5,93 ± 0,68	0,55	0,093
0,015	6,99 ± 0,66	0,53	0,076
0,020	8,17 ± 0,87	0,70	0,086
0,025	9,93 ± 0,56	0,45	0,045
0,030	10,84 ± 0,75	0,61	0,056

Tabela 25. Statystyczna ocena wyników. (<sup>a</sup>  $t(S/n^{1/2}), n = 5; p = 95\%$ ).



Rys. 80. Wykres zależności natężenia prądu od stężenia D-glukozy dla biosensora A wraz z uwzględnieniem błędów mierzonych wartości.

Podobnie jak w przypadku biosensora A uzyskałam wysoką wartość współczynnika korelacji otrzymanej krzywej a błędy poszczególnych wartości występują na niskim poziomie. Następnie korzystając z parametrów krzywej  $y = 268,73x + 2,97$  i wartości natężeń prądów obliczyłam na tej podstawie wartości stężeń D – glukozy, a następnie dokonałam statystycznej oceny wyników (tabela 26).

$c_{\text{glukozy}}$ [mmol·L <sup>-1</sup> ]	$c_{\text{śr glukozy}} \pm \text{SE}$ [mmol·L <sup>-1</sup> ]	SD	RSD	Odzysk [%]
1,0	-	-	-	-
5,0	6,9 ± 0,2	0,38	0,055	137,9
10,0	9,6 ± 0,6	0,97	0,101	103,7
15,0	15,7 ± 0,6	1,29	0,083	104,4
20,0	20,3 ± 0,9	1,78	0,087	101,5
25,0	25,9 ± 0,7	1,66	0,064	103,6
30,0	29,3 ± 1,0	2,26	0,077	102,3

Tabela 26. Statystyczna ocena wyników. (n = 5, p = 95 %)

W opracowaniu statystycznym (tabela 26) pominięte zostały wartości dla stężenia D – glukozy  $c = 1,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , wynika to wysokiej wartości RSD wykraczającej poza akceptowalny w chemii analitycznej poziom (< 10%).

<b>Zakres liniowości</b> [mmol·L <sup>-1</sup> ]	1,86 ÷ 30,00
<b>R<sup>2</sup></b>	0,993
<b>LOD</b> [mmol·L <sup>-1</sup> ]	0,56
<b>LOQ</b> [mmol·L <sup>-1</sup> ]	1,86

Tabela 27. Parametry walidacji biosensora B I generacji.

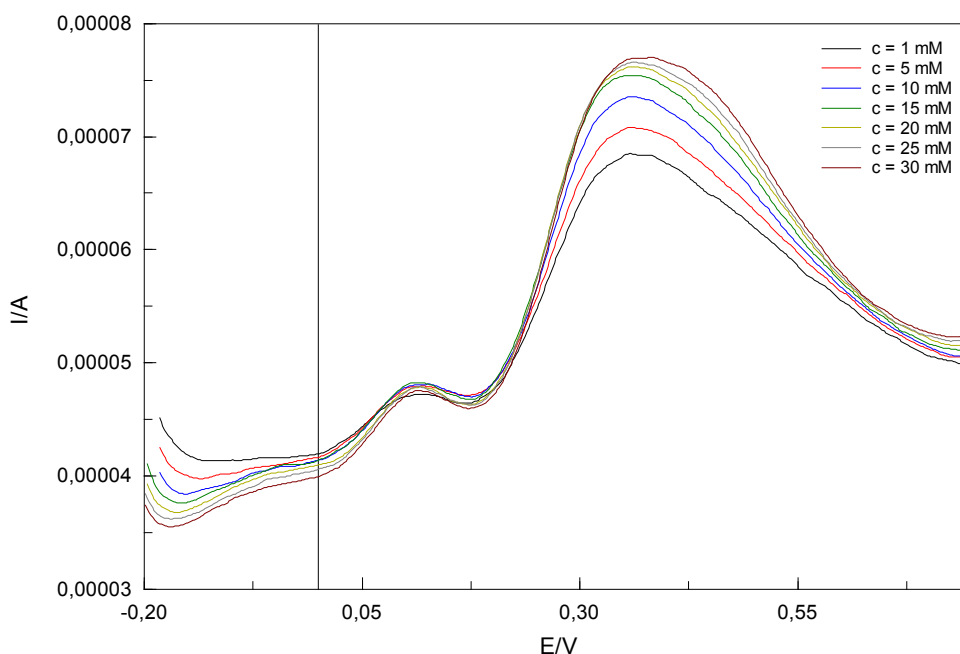
Na podstawie parametrów walidacji wyników, zebranych w tabeli 27, a uzyskanych z pomiarów metodą amperometryczną mogę stwierdzić, że przedstawiona procedura oznaczania D-glukozy za pomocą biosensora B może być stosowana do analizy ilościowej roztworów w zakresie stężeń D-glukozy od 1,86 mmol·L<sup>-1</sup> do 30,00 mmol·L<sup>-1</sup>.

- **Sensory III generacji**

Obie opracowane elektrody mogły również pracować, jako sensory III generacji w myśl zasady przedstawionej w rozdziale 7. Badanie przeprowadziłam według procedury przedstawionej w punkcie 4.6. Pomiary w tym przypadku były prowadzone techniką woltamperometryczną. Rejestrowany prąd pikowy związany jest z utlenianiem oksydazy glukozowej. Zarejestrowałam woltamperogramy (DPV) próbek w zakresie stężeń D – glukozy 1 – 30 mmol·L<sup>-1</sup> dla biosensorów A i B.

- **Biosensor A**

Rysunek 81 przedstawia przykładowe woltamperogramy oznaczania D – glukozy przy użyciu biosensora A.



Rys. 81. Przykładowe krzywe woltamperometryczne (DPV) zarejestrowane w roztworze PBS (pH=7,4) o różnej zawartości D – glukozy (1 ÷ 30 mmol·L<sup>-1</sup>) dla biosensora A.

Na prezentowanych woltamperogramach można wyraźnie zaobserwować pik związany z utlenianiem oksydazy glukozowej przy potencjale  $E = 0,44$  V. Pik poprzedzający sygnał analityczny najprawdopodobniej związany jest z warstwą kompozytu modyfikującego. Uzyskane wyniki przedstawiłam w tabeli 28.



		I [ $\mu\text{A}$ ]						
		Numer serii						
$c_{\text{glukozy}}$ [ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ]		I	II	III	IV	V	VI	VII
PBS		28,64	28,84	26,02	26,19	27,34	28,27	28,77
0,001		23,95	22,41	21,27	22,02	19,25	20,07	22,56
0,005		22,83	22,86	24,78	23,61	21,77	22,91	21,57
0,010		23,99	23,46	25,36	26,52	24,89	24,47	27,37
0,015		25,63	25,93	28,68	26,81	30,94	30,54	25,90
0,020		32,21	32,99	29,83	28,14	31,08	31,15	27,37
0,025		27,46	30,26	27,49	29,12	30,56	32,02	28,29
0,030		28,25	30,97	28,64	29,48	31,56	33,30	30,76

Tabela 28. Zestawienie zależności natężenia prądu (DPV) od stężenia D – glukozy w PBS o pH = 7,4 (biosensor A).

Niestety w tym przypadku, jak pokazują to wyniki zamieszczone w tabeli 28, parametry pracy prezentowanego biosensora III generacji nie pozwalają na uzyskanie wyników, które mogą być podstawą oznaczenia glukozy. Dlatego zrezygnowałam z dalszej oceny statystycznej wyników i wykluczyłam ten biosensor z dalszych badań.

Analogiczne badania przeprowadziłam dla biosensora B. Tutaj również parametry pracy biosensora III generacji nie spełniały warunków walidacji metody, w związku z powyższym zrezygnowałam z ich oceny statystycznej oraz jej dalszego wykorzystywania.

### 9.1. Podsumowanie parametrów walidacji otrzymanych biosensorów

Ten etap badań miał na celu potwierdzenie poprawność działania otrzymanych elektrod pracujących zarówno, jako sensory I generacji oraz sensory III generacji. W tabeli 29 przedstawiłam zestawienie parametrów walidacji dla obu biosensorów.

	Sensory I generacji	
	Biosensor A	Biosensor B
<b>Zakres liniowości</b> [mmol·L <sup>-1</sup> ]	0,98 ÷ 30,00	1,86 ÷ 30,00
<b>R<sup>2</sup></b>	0,997	0,993
<b>LOD</b> [mmol·L <sup>-1</sup> ]	0,29	0,56
<b>LOQ</b> [mmol·L <sup>-1</sup> ]	0,98	1,86

Tabela 29. Zestawienie parametrów walidacji dla obu elektrod

W przypadku biosensorów I generacji przeprowadziłam pełną walidację uzyskanych wyników. Przede wszystkim można zauważyć różnice w zakresach liniowości pomiędzy biosensorem A oraz biosensorem B. Uwagę zwracają też bardzo dobre wartości współczynnika korelacji R<sup>2</sup>. Biosensory glukozy I generacji wydają się być odpowiednie do badań na próbkach pochodzenia naturalnego.

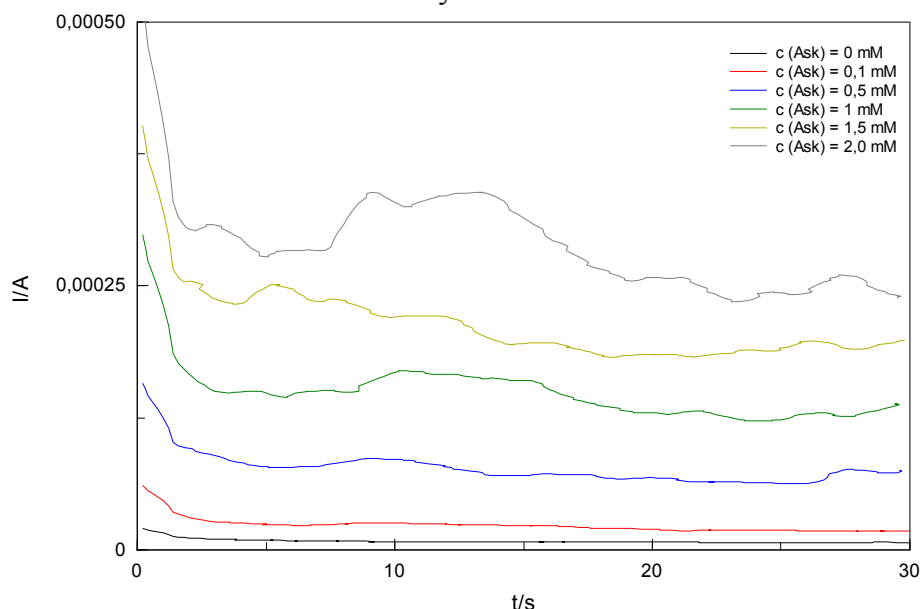
Z kolei biosensory A i B nie mogą pracować jako sensory III generacji. Metoda oznaczania jest wtedy mało czuła a wyniki niepowtarzalne.

### 10. Kwas askorbinowy jako interferent w ilościowym oznaczaniu D – glukozy

Kwas askorbinowy to typowy interferent w przypadku wielu oznaczeń w chemii analitycznej. Poznanie jego wpływu jest niezwykle ważne, gdyż występuje on bardzo często w roztworach naturalnych. Również, jeśli chodzi o pracę biosensorów glukozy należało ocenić jego wpływ, na jakość prowadzonego oznaczenia [141].

Ocenę interferencji kwasu askorbinowego rozpoczęłam od zbadania próbek zawierających stałe stężenie glukozy i zmienne stężenie kwasu askorbinowego.

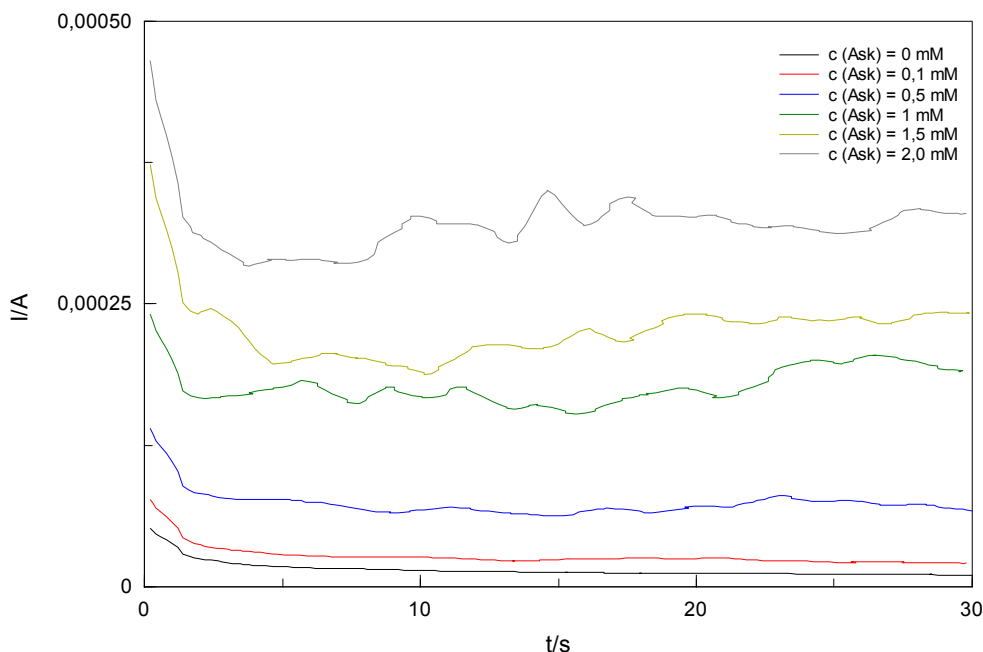
Biorąc pod uwagę możliwość wpływu kwasu askorbinowego na rejestrowany sygnał amperometryczny, badanie rozpoczęłam używając niskiego stężenia kwasu askorbinowego, tj. od 0,1 do 2 mmol·L<sup>-1</sup>. Wyniki zostały przedstawione na rysunku 82 i w tabeli 30 dla biosensora A oraz na rysunku 83 i w tabeli 31 dla biosensora B.



Rys. 82. Krzywe amperometryczne zarejestrowane w roztworze PBS o pH = 7,4 zawierającym glukozę o stałym stężeniu ( $c = 15 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) i zmienne stężenie kwasu askorbinowego (biosensor A).

$c$ glukozy [mmol·L <sup>-1</sup> ]	$c$ Ask [mmol·L <sup>-1</sup> ]	$I$ [μA]
15,0	0,0	10,43
	0,1	20,75
	0,5	71,32
	1,0	189,48
	1,5	241,64
	2,0	329,80

Tabela 30. Zestawienie natężeń prądu mierzonego po 28 s dla roztworów o stałej zawartości D – glukozy ( $c = 15 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) i zmiennym stężeniu kwasu askorbinowego (biosensor A).



Rys. 83. Krzywe amperometryczne zarejestrowane w roztworze PBS o pH = 7,4 zawierającym glukozę o stałym stężeniu ( $c = 15 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) i zmienne stężenie kwasu askorbinowego (biosensor B).

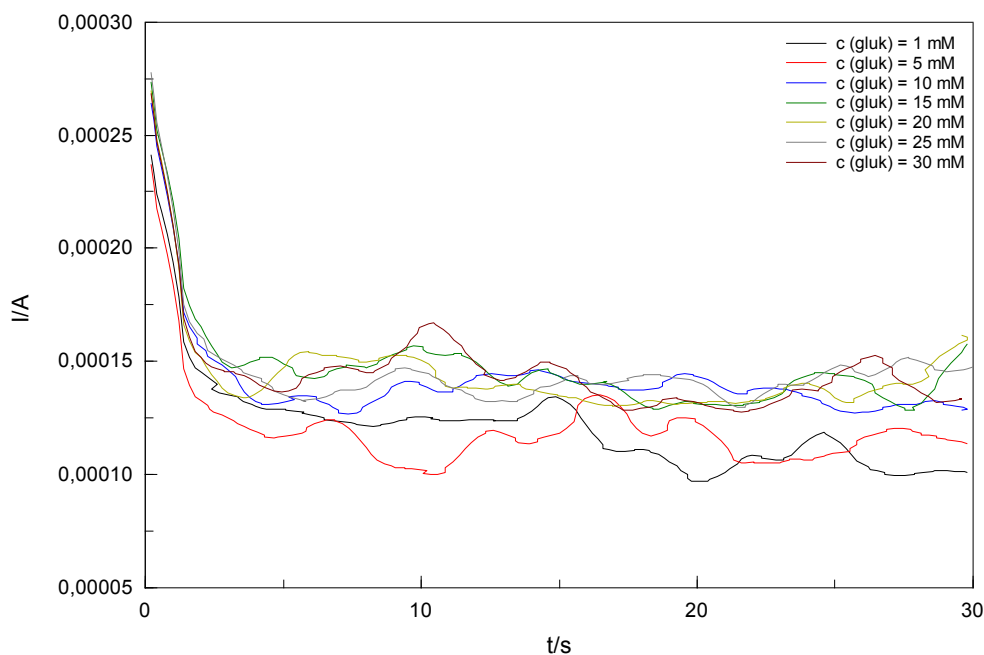
$c_{\text{glukozy}}$ [ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ]	$c_{\text{Ask}}$ [ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ]	$I$ [ $\mu\text{A}$ ]
15,0	0,0	7,08
	0,1	17,78
	0,5	72,55
	1,0	137,02
	1,5	196,65
	2,0	241,53

Tabela 31. Zestawienie natężeń prądu mierzonego po 28 s dla roztworów o stałej zawartości D – glukozy ( $c = 15 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) i zmiennym stężeniu kwasu askorbinowego (biosensor B).

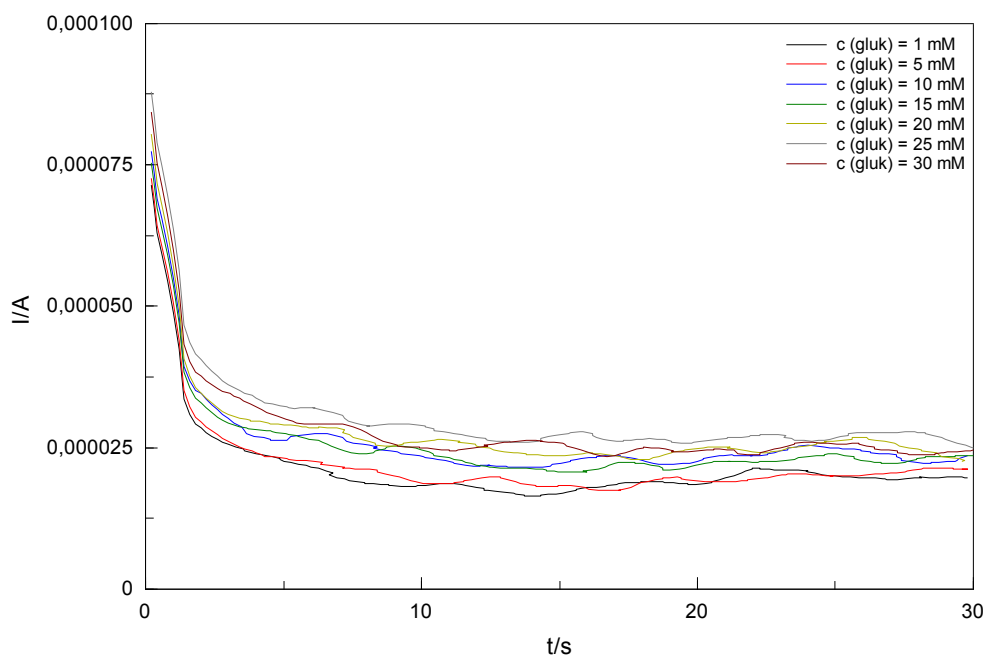
Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że każdy dodatek kwasu askorbinowego podwyższa wartość rejestrowanego natężenia prądu. Przy niskich stężeniach kwasu askorbinowego, zmiany te nie są tak gwałtowne, jednak wraz ze wzrostem stężenia kwasu askorbinowego stają się one coraz bardziej wyraźne. Ponadto przy najwyższej zawartości kwasu askorbinowego, na załączonych amperogramach pojawiają się coraz większe problemy z ustabilizowaniem wartości natężenia prądu. Analizując powyższe dane można

założyć, iż dodatek kwasu askorbinowego będzie wpływał na oznaczanie stężenia D – glukozy. Im wyższe stężenie kwasu askorbinowego tym większy wpływ na wynik oznaczenia. Jedynie bardzo niskie stężenie interferenta rzędu  $c = 0,1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  może dać szansę na wyeliminowanie jego działania interferencyjnego.

Próby takie zostały podjęte, a ich wyniki przedstawiłam na rysunkach 84, 85, 86 oraz w tabeli 32.



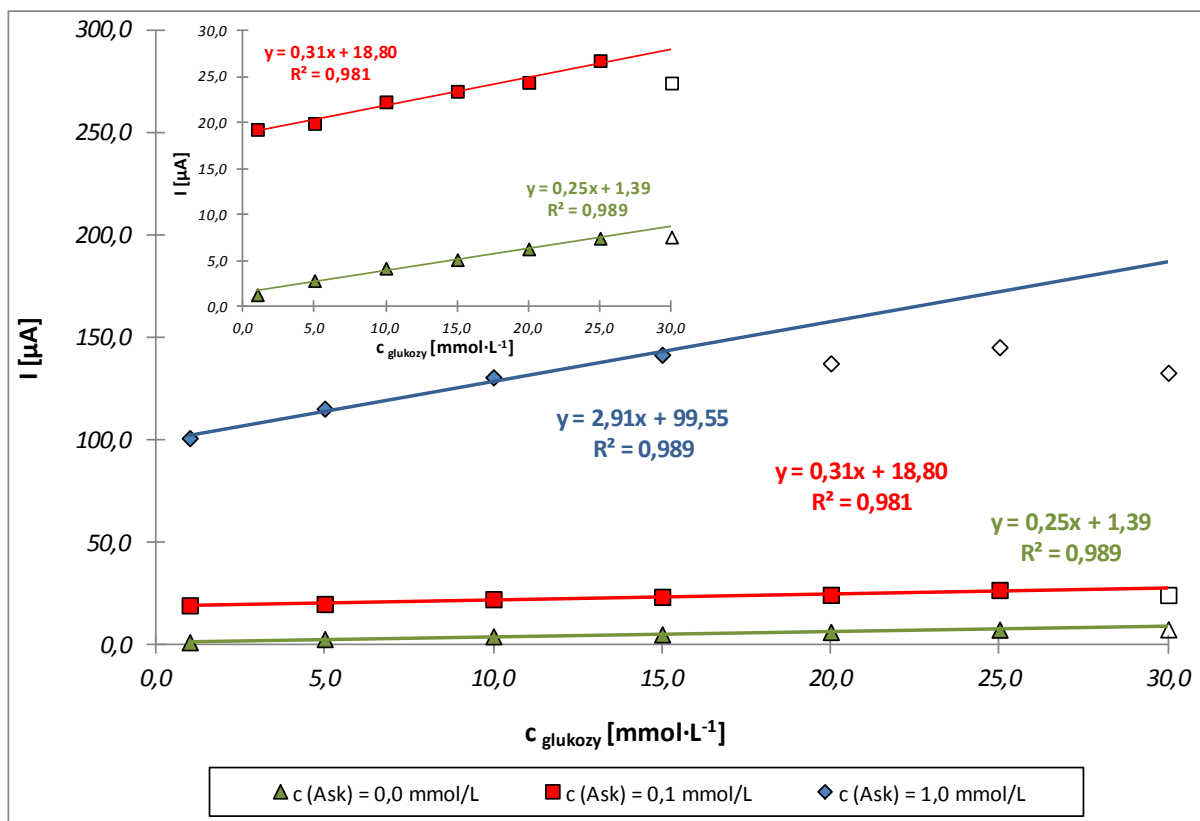
Rys. 84. Krzywe amperometryczne zarejestrowane w roztworze PBS o pH = 7,4 zawierającym kwas askorbinowy o stałym stężeniu ( $c = 1,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) i zmienne stężenie glukozy (biosensor A).



Rys. 85. Krzywe amperometryczne zarejestrowane w roztworze PBS o pH = 7,4 zawierającym kwas askorbinowy o stałym stężeniu ( $c = 0,1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) i zmienne stężenie glukozy (biosensor A).

$c_{\text{glukozy}}$ [mmol·L <sup>-1</sup> ]	I [μA]		
	$c_{\text{Ask}} = 0,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	$c_{\text{Ask}} = 0,1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	$c_{\text{Ask}} = 1,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
1,0	1,28	19,28	100,90
5,0	2,82	19,93	115,30
10,0	4,17	22,28	130,60
15,0	5,10	23,43	141,60
20,0	6,27	24,40	137,40
25,0	7,43	26,77	145,30
30,0	7,56	24,33	132,80

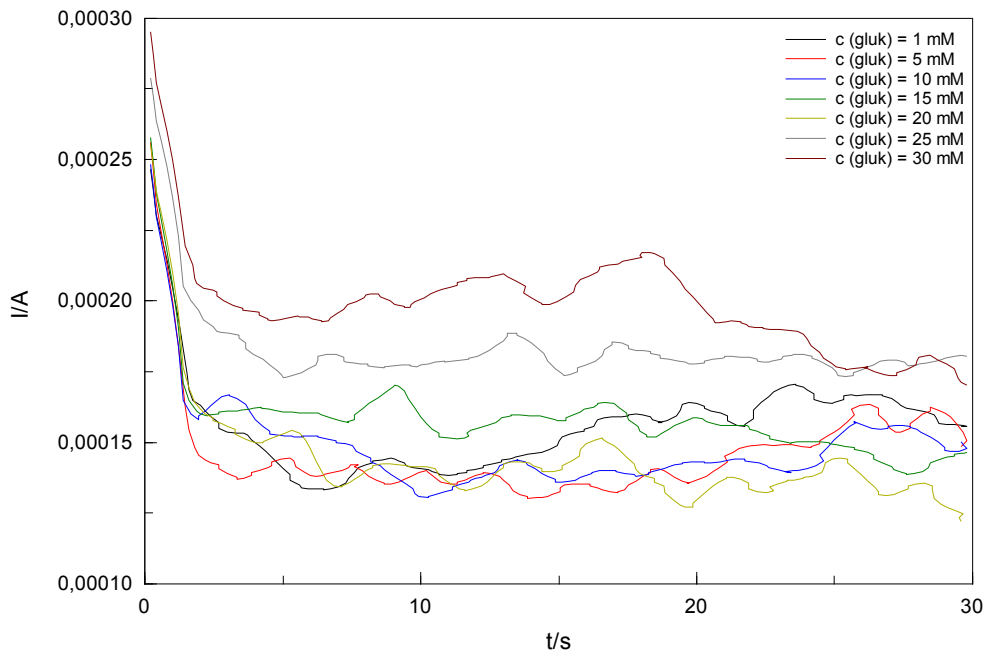
Tabela 32. Zestawienie natężeń prądu mierzonego po 28 s dla roztworów o zmiennym stężeniu D – glukozy i stałym stężeniu kwasu askorbinowego ( $c = 0,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  oraz  $1,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) (biosensor A).



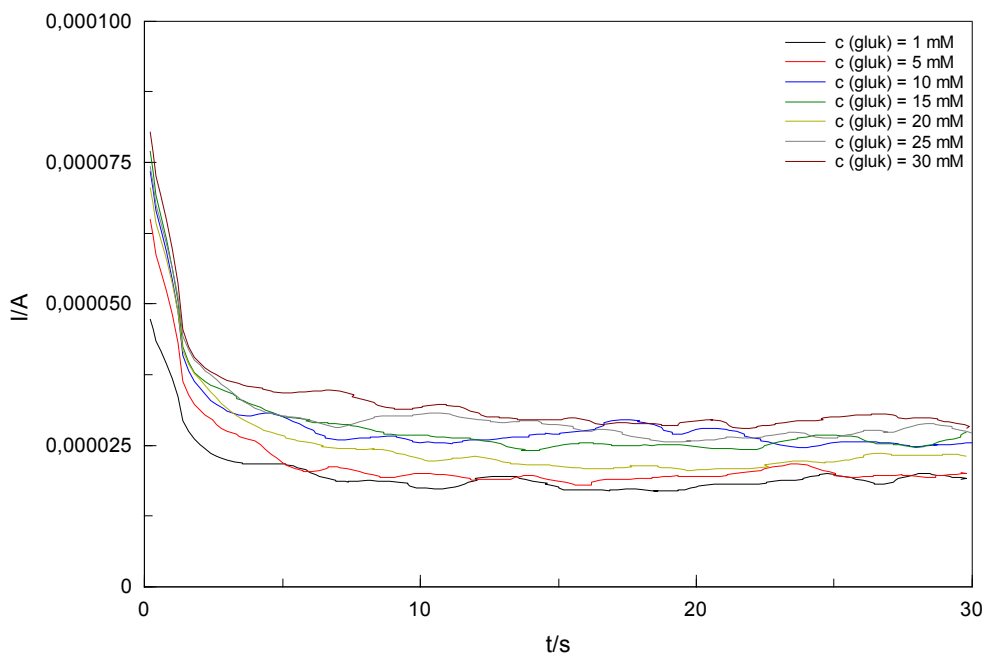
Rys. 86. Wykres zależności natężenia prądu (pomiaru amperometrycznego) od stężenia D – glukozy ( $c = 1 \div 30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) dla roztworów w PBS ( $\text{pH} = 7,4$ ) z dodatkiem kwasu askorbinowego o stężeniu ( $c = 0,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  i  $1,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) (biosensor A).

Jak można zaobserwować na rysunku 89 niewielki dodatek wpływa na podwyższenie wartości prądowych jednak parametry takie jak czułość czy współczynnik korelacji pozostają na porównywalnym poziomie. Dalsze zwiększanie zawartości kwasu askorbinowego w roztworze powoduje nie tylko drastyczny wzrost wartości natężenia, dodatkowo pojawiają się zmiany wszystkich parametrów krzywej oraz zawężony zostaje zakres jej liniowości. W przypadku tego biosensora można prowadzić oznaczenie D – glukozy w obecności kwasu askorbinowego pod warunkiem, że jego stężenie nie przekroczy  $c = 0,1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , będzie na stałym poziomie oraz po wcześniejszej kalibracji biosensora w obecności kwasu askorbinowego.

Podobne wyniki uzyskałam dla biosensora B I generacji, przedstawiłam je na rysunkach 87, 88, 89 oraz w tabeli 33. Przypadek biosensora A i biosensora B jest analogiczny. Tu także można prowadzić oznaczenie D – glukozy w obecności kwasu askorbinowego pod warunkiem, że jego stężenie nie przekroczy  $c = 0,1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  w stosunku do glukozy o stężeniu  $c = 15 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , będzie na stałym poziomie oraz po wcześniejszej kalibracji biosensora w obecności kwasu askorbinowego.



Rys. 87. Krzywe amperometryczne zarejestrowane w roztworze PBS o pH = 7,4 zawierającym kwas askorbinowy o stałym stężeniu ( $c = 1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) i zmienne stężenie glukozy (biosensor B).

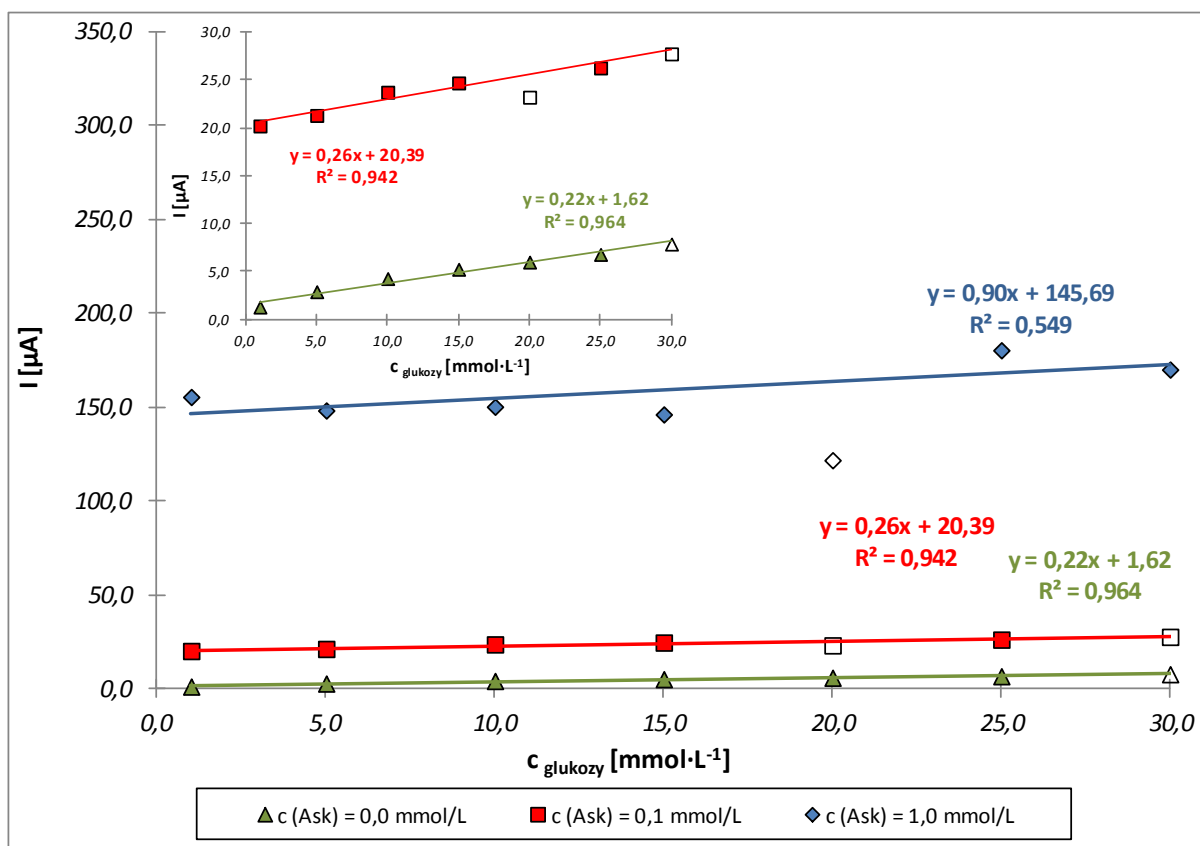


Rys. 88. Krzywe amperometryczne zarejestrowane w roztworze PBS o pH = 7,4 zawierającym kwas askorbinowy o stałym stężeniu ( $c = 0,1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) i zmienne stężenie glukozy (biosensor B).



$c_{\text{glukozy}}$ [mmol·L <sup>-1</sup> ]	I [μA]		
	$c_{\text{Ask}} = 0,0 \text{ mmol·L}^{-1}$	$c_{\text{Ask}} = 0,1 \text{ mmol·L}^{-1}$	$c_{\text{Ask}} = 1,0 \text{ mmol·L}^{-1}$
1,0	1,29	20,23	155,60
5,0	2,90	21,33	148,40
10,0	4,27	23,76	150,40
15,0	5,24	24,73	146,30
20,0	5,99	23,24	121,90
25,0	6,80	26,30	180,50
30,0	7,88	27,77	170,20

Tabela 33. Zestawienie natężeń prądu mierzonego po 28 s dla roztworów o zmiennym stężeniu D – glukozy i stałym stężeniu kwasu askorbinowego ( $c = 0,0 \text{ mmol·L}^{-1}$ ,  $0,1 \text{ mmol·L}^{-1}$  oraz  $1,0 \text{ mmol·L}^{-1}$ ) (biosensor B).



Rys. 89. Wykres zależności natężenia prądu (pomiaru amperometrycznego) od stężenia D - glukozy ( $c = 1 \div 30 \text{ mmol·L}^{-1}$ ) dla roztworów w PBS ( $\text{pH} = 7,4$ ) z dodatkiem kwasu askorbinowego o stężeniu ( $c = 0,0 \text{ mmol·L}^{-1}$ ,  $0,1 \text{ mmol·L}^{-1}$  i  $1,0 \text{ mmol·L}^{-1}$ ) (biosensor B).

### 11. Przykrycie enzymu warstwą polimeru

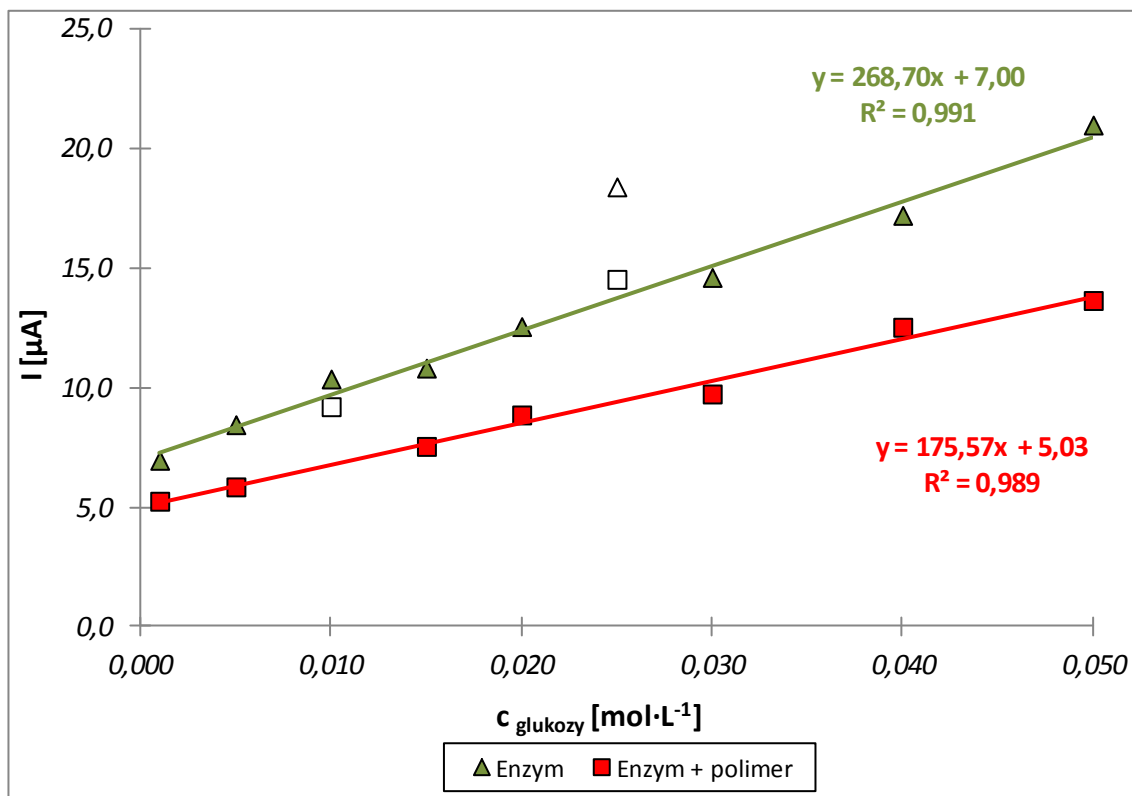
Postanowiłam określić na przykładzie biosensora A I generacji jego odpowiedź na zmieniające się stężenie D – glukozy w przypadku nałożenia na unieruchomioną oksydazę glukozową dodatkowej, cienkiej warstwy polimeru. Warstwa ta w założeniu miałaby chronić enzym przed działaniem czynników zewnętrznych i być może w ten sposób poprawi wyniki oznaczania D – glukozy.

W tym celu przygotowałam dwa identyczne biosensory A, przy czym jeden z nich pozostawiłam bez zmian, natomiast na drugi nałożyłam dodatkową warstwę polimeru. Nakładanie tejże warstwy odbywało się w wyniku elektropolimeryzacji z roztworu zawierającego  $10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  EDOT w  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PSSLi przy potencjale  $E = 1 \text{ V}$  w czasie  $t = 5 \text{ s}$ .

Jeszcze przed przeprowadzeniem pomiarów zakładałam, że może nastąpić spadek wartości natężenia prądu wynikający z ograniczenia kontaktu pomiędzy unieruchomionym enzymem a badanym roztworem. Uzyskane wyniki przedstawiłam w tabeli 34 oraz na rysunku 90.

$C_{\text{glukozy}}$ [ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ]	I [ $\mu\text{A}$ ]	
	Enzym	Enzym + polimer
0,001	6,97	5,26
0,005	8,46	5,86
0,010	10,37	9,21
0,015	10,83	7,55
0,020	12,56	8,87
0,025	18,41	14,54
0,030	14,62	9,74
0,040	17,22	12,54
0,050	21,00	13,66

Tabela 34. Zależność natężenia prądu piku (pomiaru amperometrycznego) od wzrastającego stężenia D – glukozy dla biosensora A I generacji z enzymem „odkrytym,” oraz „przykrytym” warstwą polimeru.



Rys. 90. Wykres zależności natężenia prądu piku (pomiar amperometryczny) od wzrastającego stężenia D – glukozy dla biosensora A I generacji z „odkrytym” enzymem oraz enzymem „przykrytym” dodatkową warstwą polimeru.

Przykrycie oksydazy glukozy dodatkową warstwą polimeru w przypadku biosensora I generacji, powoduje zgodnie z oczekiwaniami spadek rejestrowanych wartości natężenia, co prowadzi do pogorszenia parametrów pracy danego biosensora.

**12. Ilościowe oznaczanie stężenia D – glukozy w produktach pochodzenia naturalnego.**

Kolejnym etapem moich badań było sprawdzenie możliwości zastosowania obu elektrod do oznaczania zawartości D – glukozy w roztworach pochodzenia naturalnego i produktach spożywczych. W tym celu podjęłam próby oznaczenia D – glukozy w następujących próbkach: w soku jabłkowym, napoju winogronowym, napoju energetycznym, miodzie lipowym. Ze względu na fakt, iż pełna walidacja metody została przeprowadzona, gdy elektrody te pracowały jako biosensory I generacji, badania przeprowadziłam techniką amperometryczną dla biosensora A oraz biosensora B.

Wszystkie roztwory użyte do oznaczenia wyżej wymienionych produktów zostały przygotowane zgodnie z danymi zawartymi w rozdziale 4.6. Oznaczenia wykonałam metodą dodatku wzorca.

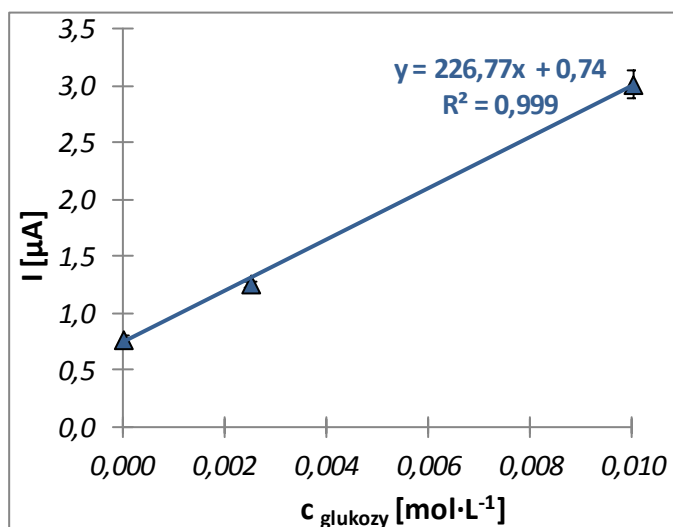
- Próbki soku jabłkowego

- a) Biosensor A

Wyniki pomiarów wykonanych techniką amperometryczną zostały zebrane w tabeli 35 oraz przedstawione na rysunku 91.

$c_{\text{glukozy}}$ [mol·L <sup>-1</sup> ]	I [μA]							$I_{\text{sr}}$ [μA]
	Numer serii							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
Próbka badana	0,82	0,81	0,80	0,76	0,74	0,75	0,73	$0,77 \pm 0,03^a$
0,0025	1,27	1,21	1,27	1,24	1,31	1,26	1,29	$1,26 \pm 0,03$
0,0100	2,97	3,12	2,89	3,11	3,00	2,98	3,07	$3,02 \pm 0,12$

Tabela 35. Zestawienie zależności natężenia prądu (pomiaru amperometrycznego) od stężenia D – glukozy w metodzie dodatku wzorca dla próbek zawierających sok jabłkowy (biosensor A). (<sup>a</sup>t(S/n<sup>1/2</sup>), n = 7; p = 95%).



Rys. 91. Wykres zależności natężenia prądu (pomiaru amperometrycznego) od stężenia D – glukozy w metodzie dodatku wzorca dla próbek zawierających sok jabłkowy (biosensor A). Słupki błędów liczone jako t(S/n<sup>1/2</sup>, n=7, p=95%)

Na podstawie otrzymanych wyników oraz korzystając z wyznaczonego równania funkcji regresji liniowej  $y = 226,77x + 0,74$  wyznaczyłam stężenie oraz przedział ufności D – glukozy w badanej próbce soku jabłkowego, które wyniosło:

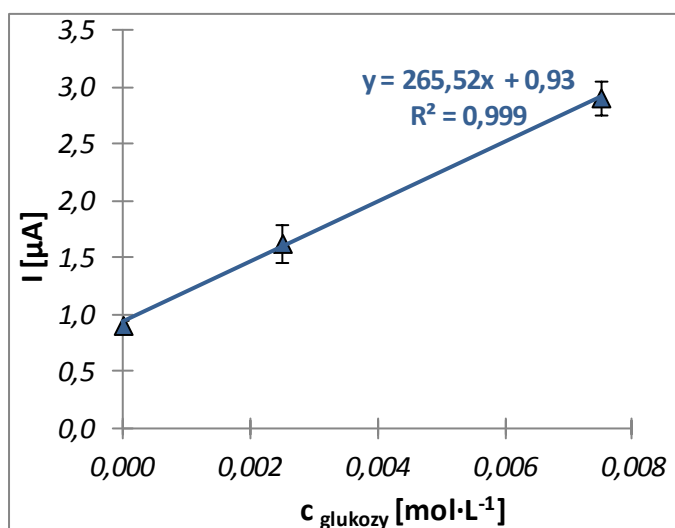
$$c = 0,33 \pm 0,03 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$$

b) **Biosensor B**

Wyniki pomiarów dla biosensora B wykonane techniką amperometryczną zostały zebrane w tabeli 36 oraz przedstawione na rysunku 92.

$c_{\text{glukozy}}$ [mol·L <sup>-1</sup> ]	I [μA]					$I_{\text{sr}}$ [μA]
	Numer serii					
	I	II	III	IV	V	
Próbka badana	0,91	0,93	0,97	0,95	0,91	0,91 ± 0,05 <sup>a</sup>
0,0025	1,64	1,47	1,54	1,78	1,73	1,63 ± 0,16
0,0075	3,00	3,12	2,77	2,93	2,74	2,91 ± 0,15

Tabela 36. Zestawienie zależności natężenia prądu (pomiar amperometryczny) od stężenia D – glukozy w metodzie dodatku wzorca dla próbek zawierających sok jabłkowy (biosensor B). (<sup>a</sup> t(S/n<sup>1/2</sup>), n = 5; p = 95%)



Rys. 92. Wykres zależności natężenia prądu (pomiar amperometryczny) od stężenia D – glukozy w metodzie dodatku wzorca dla próbek zawierających sok jabłkowy (biosensor B). Słupki błędów liczone jako t(S/n<sup>1/2</sup>, n=5, p=95%)

Na podstawie otrzymanych wyników oraz korzystając z wyznaczonego równania funkcji regresji liniowej  $y = 265,52x + 0,93$  wyznaczyłam stężenie oraz przedział ufności D – glukozy w badanej próbce soku jabłkowego, które wyniosło:

$$c = 0,35 \pm 0,02 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$$

- **Próbki napoju winogronowego**

- a) **Biosensor A oraz biosensor B**

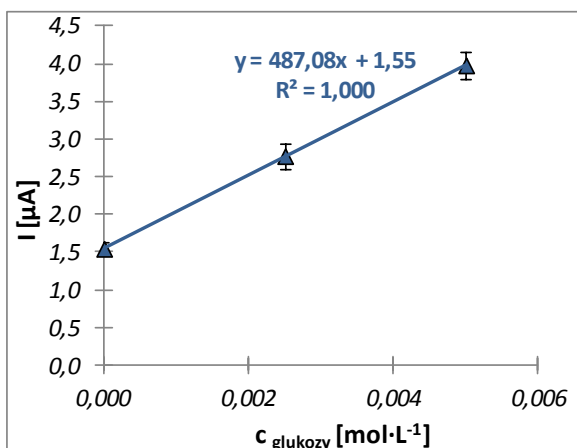
Analogiczne pomiary wykonałam dla napoju winogronowego. Wyniki pomiarów wykonane techniką amperometryczną dla biosensora A oraz biosensora B wykonane techniką amperometryczną zostały zebrane w tabeli 37 i 38 oraz przedstawione na rysunku 93 i 94.

$c_{\text{glukozy}}$ [mol·L <sup>-1</sup> ]	I [μA]					$I_{\text{sr}}$ [μA]
	Numer serii					
	I	II	III	IV	V	
Próbka badana	1,59	1,56	1,47	1,57	1,54	1,55 ± 0,08 <sup>a</sup>
0,0025	2,75	2,80	2,63	2,72	3,00	2,78 ± 0,17
0,0050	4,28	3,74	3,95	3,95	4,06	3,98 ± 0,19

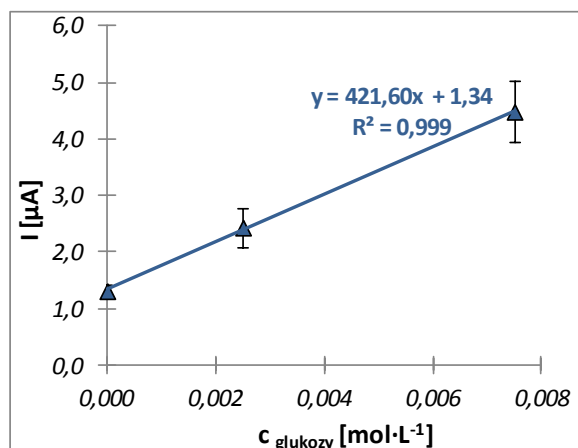
Tabela 37. Zestawienie zależności natężenia prądu (pomiar amperometryczny) od stężenia D – glukozy w metodzie dodatku wzorca dla próbek zawierających napój winogronowy (biosensor A). (<sup>a</sup> t(S/n<sup>1/2</sup>), n = 5; p = 95%).

$c_{\text{glukozy}}$ [mol·L <sup>-1</sup> ]	I [μA]					$I_{\text{sr}}$ [μA]
	Numer serii					
	I	II	III	IV	V	
Próbka badana	1,34	1,41	1,13	1,22	1,45	1,31 ± 0,13 <sup>a</sup>
0,0025	2,74	2,34	2,22	2,45	2,35	2,44 ± 0,35
0,0075	4,68	4,07	4,85	4,36	4,36	4,49 ± 0,55

Tabela 38. Zestawienie zależności natężenia prądu (pomiar amperometryczny) od stężenia D – glukozy w metodzie dodatku wzorca dla próbek zawierających napój winogronowy (biosensor B). (<sup>a</sup> t(S/n<sup>1/2</sup>), n = 5; p = 95%).



Rys. 93. Wykres zależności natężenia prądu (pomiaru amperometryczne) od stężenia D – glukozy w metodzie dodatku wzorca dla próbek zawierających napój winogronowy (biosensor A). Słupki błędów liczone jako  $t(S/n^{1/2}, n=5, p=95\%)$



Rys. 94. Wykres zależności natężenia prądu (pomiaru amperometryczne) od stężenia D – glukozy w metodzie dodatku wzorca dla próbek zawierających napój winogronowy (biosensor B). Słupki błędów liczone jako  $t(S/n^{1/2}, n=5, p=95\%)$

Na podstawie otrzymanych wyników oraz korzystając z wyznaczonego równania funkcji regresji liniowej:

- dla biosensora A  $y = 487,08x + 1,55$  wyznaczyłam stężenie oraz przedział ufności D – glukozy w badanej próbce, które wyniosło:

$$c = 0,318 \pm 0,004 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$$

- dla biosensora B  $y = 421,60x + 1,34$  wyznaczyłam stężenie oraz przedział ufności D – glukozy w badanej próbce, które wyniosło:

$$c = 0,32 \pm 0,02 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$$



- **Próbki napoju energetycznego**

- a) **Biosensor A oraz biosensor B**

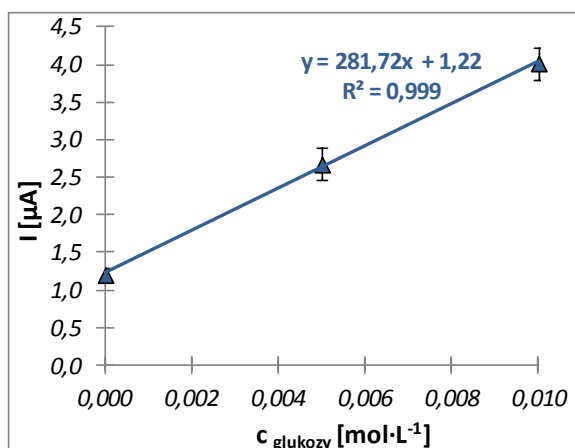
Analogiczne pomiary wykonałam dla napoju energetycznego. Wyniki pomiarów wykonane techniką amperometryczną dla biosensora A oraz biosensora B zostały zebrane w tabeli 39 i 40 oraz przedstawione na rysunku 95 i 96.

C <sub>glukozy</sub> [mol·L <sup>-1</sup> ]	I [μA]						I <sub>sr</sub> [μA]
	Numer serii						
	I	II	III	IV	V	VI	
Próbka badana	1,10	1,31	1,28	1,11	1,25	1,17	1,20 ± 0,09 <sup>a</sup>
0,0050	2,84	2,80	2,73	2,53	2,45	2,65	2,67 ± 0,21
0,0100	4,06	3,71	4,23	4,24	3,86	4,01	4,02 ± 0,22

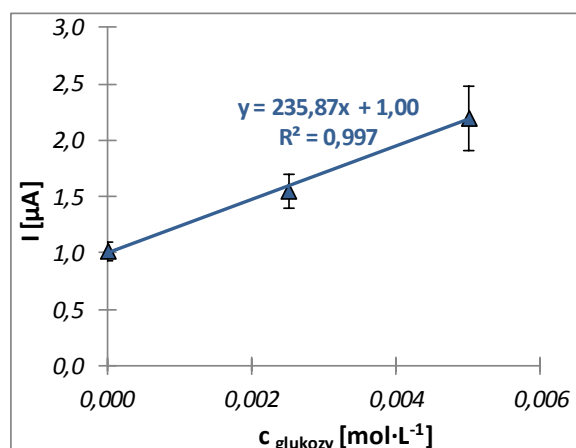
Tabela 39. Zestawienie zależności natężenia prądu (pomiary amperometryczne) od stężenia D – glukozy w metodzie dodatku wzorca dla próbek zawierających napój energetyczny (biosensor A). (<sup>a</sup> t(S/n<sup>1/2</sup>), n = 6; p = 95%).

C <sub>glukozy</sub> [mol·L <sup>-1</sup> ]	I [μA]					I <sub>sr</sub> [μA]
	Numer serii					
	I	II	III	IV	V	
Próbka badana	1,06	1,04	0,89	1,07	1,13	1,02 ± 0,09 <sup>a</sup>
0,0025	1,59	1,41	1,59	1,47	1,72	1,56 ± 0,15
0,0050	2,34	2,24	1,94	2,28	2,19	2,20 ± 0,29

Tabela 40. Zestawienie zależności natężenia prądu (pomiary amperometryczne) od stężenia D – glukozy w metodzie dodatku wzorca dla próbek zawierających napój energetyczny (biosensor B). (<sup>a</sup> t(S/n<sup>1/2</sup>), n = 5; p = 95%).



Rys. 95. Wykres zależności natężenia prądu (pomiaru amperometryczne) od stężenia D – glukozy w metodzie dodatku wzorca dla próbek zawierających napój energetyczny (biosensor A). Słupki błędów liczone jako  $t(S/n^{1/2}, n=6, p=95\%)$



Rys. 96. Wykres zależności natężenia prądu (pomiaru amperometryczne) od stężenia D – glukozy w metodzie dodatku wzorca dla próbek zawierających napój energetyczny (biosensor B). Słupki błędów liczone jako  $t(S/n^{1/2}, n=5, p=95\%)$

Na podstawie otrzymanych wyników oraz korzystając z wyznaczonego równania funkcji regresji liniowej:

- dla biosensora A  $y = 281,72x + 1,22$  wyznaczyłam stężenie oraz przedział ufności D – glukozy w badanej próbce, które wyniosło:

$$c = 0,43 \pm 0,03 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$$

- dla biosensora B  $y = 235,87x + 1,00$  wyznaczyłam stężenie oraz przedział ufności D – glukozy w badanej próbce, które wyniosło:

$$c = 0,42 \pm 0,04 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$$

- Próbki miodu

- a) Biosensor A oraz biosensor B

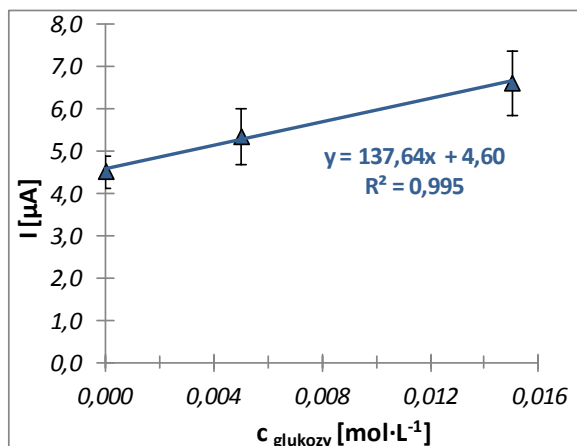
Analogiczne pomiary wykonałam dla miodu. Wyniki pomiarów wykonane techniką amperometryczną dla biosensora A oraz biosensora B zostały zebrane w tabeli 41 i 42 oraz przedstawione na rysunku 97 i 98.

C <sub>glukozy</sub> [mol·L <sup>-1</sup> ]	I [μA]				I <sub>sr</sub> [μA]
	Numer serii				
	I	II	III	IV	
Próbka badana	4,52	4,58	4,56	4,53	4,55 ± 0,38 <sup>a</sup>
0,0050	5,42	5,32	5,38	5,36	5,37 ± 0,66
0,0150	6,58	6,70	6,65	6,68	6,64 ± 0,76

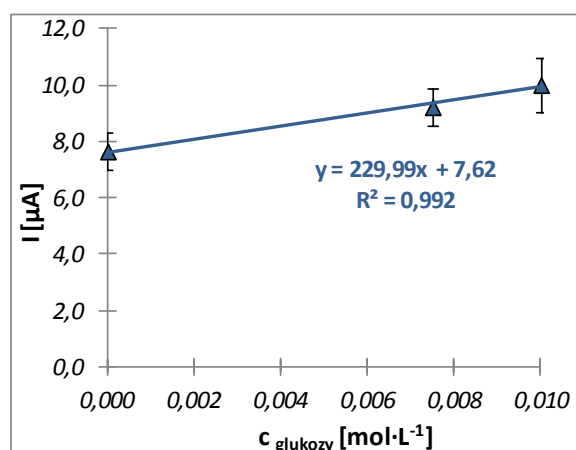
Tabela 41. Zestawienie zależności natężenia prądu (pomiaru amperometryczne) od stężenia D – glukozy w metodzie dodatku wzorca dla próbek zawierających miód (biosensor A). (<sup>a</sup> t(S/n<sup>1/2</sup>), n = 4; p = 95%).

C <sub>glukozy</sub> [mol·L <sup>-1</sup> ]	I [μA]					I <sub>sr</sub> [μA]
	Numer serii					
	I	II	III	IV	V	
Próbka badana	8,51	7,81	7,44	7,10	7,41	7,65 ± 0,67 <sup>a</sup>
0,0075	10,13	9,31	9,04	8,68	8,98	9,23 ± 0,69
0,0100	10,81	10,16	9,45	9,63	9,57	10,01 ± 0,97

Tabela 42. Zestawienie zależności natężenia prądu (pomiaru amperometryczne) od stężenia D – glukozy w metodzie dodatku wzorca dla próbek zawierających miód (biosensor B). (<sup>a</sup> t(S/n<sup>1/2</sup>), n = 5; p = 95%).



Rys. 97. Wykres zależności natężenia prądu (pomiaru amperometryczne) od stężenia D – glukozy w metodzie dodatku wzorca dla próbek zawierających miód (biosensor A). Słupki błędów liczone jako  $t(S/n^{1/2}, n=4, p=95\%)$



Rys. 98. Wykres zależności natężenia prądu (pomiaru amperometryczne) od stężenia D – glukozy w metodzie dodatku wzorca dla próbek zawierających miód (biosensor B). Słupki błędów liczone jako  $t(S/n^{1/2}, n=5, p=95\%)$ .

Na podstawie otrzymanych wyników oraz korzystając z wyznaczonego równania funkcji regresji liniowej:

- dla biosensora A  $y = 137,64x + 4,60$  wyznaczyłam stężenie oraz przedział ufności D – glukozy w badanej próbce, które wyniosło:

$$c = 3,14 \pm 0,15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$$

- dla biosensora B  $y = 229,99x + 7,62$  wyznaczyłam stężenie oraz przedział ufności D – glukozy w badanej próbce, które wyniosło:

$$c = 3,28 \pm 0,35 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$$

Wyniki oznaczania D – glukozy w miodzie za pomocą biosensora A i B świadczą o niskiej czułości obydwóch czujników. Może to być spowodowane wpływem złożonej matrycy.

### 12.1. Referencyjna metoda oznaczania stężenia D – glukozy

W celu potwierdzenia poprawności działania zarówno biosensora A jak i biosensora B I generacji do oznaczania D – glukozy w próbkach pochodzenia naturalnego należało oznaczyć jej stężenie w każdej z próbek metodą referencyjną. Do wykonania takich pomiarów posłużyła mi referencyjna spektrofotometryczna metoda oznaczania stężenia D – glukozy w produktach spożywczych [142]. W metodzie tej przygotowuje się serię roztworów, zgodnie z opisem podanym w rozdziale 4.7.

Roztwór A zawiera GOD oraz POD w PBS. Roztwór B składa się z o – dianizydyny w HCl. Roztwór C to tzw. mieszanina reakcyjna składająca się z roztworów A i B. Roztwór D składa się z glukozy i kwasu benzoowego. Wodny roztwór kwasu siarkowego (VI) to roztwór E. W celu przeprowadzenia pomiaru należy przygotować 3 próbówki. W pierwszej z nich umieszczamy wodę, w drugiej mieszaninę wody i roztworu D natomiast trzecia próbówka zawiera roztwór badany. Reakcję rozpoczyna dodanie do każdej z próbek roztworu C i pozostawienie w łaźni wodnej w temperaturze 37°C. Po tym czasie reakcja jest zatrzymywana w wyniku dodania do każdej próbówki roztworu E. Pomiary absorbancji są prowadzone względem próbówki 1 przy 540 nm, a zawartość glukozy wyliczana jest ze wzoru:

$$\left(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}\right) = \frac{(DA_{540r} \cdot \text{badany}) \cdot (0,05)}{DA_{540r} \cdot \text{glukozy}}$$

gdzie:

- $DA_{540r} \cdot \text{badany}$  – absorbancja roztworu badanego mierzona przy 540 nm;
- $DA_{540r} \cdot \text{glukozy}$  – absorbancja przygotowanego roztworu glukozy mierzona przy 540 nm;

Wyniki pomiaru absorbancji przedstawiłam w tabeli 43, wraz z opracowaniem statystycznym i przeliczeniem na odpowiadające jej stężenia (tabela 44 i 45).

A						
Numer serii						
Próbka	I	II	III	IV	V	VI
Miód	0,957	0,970	0,968	0,971	0,970	0,971
Napój winogronowy	0,887	0,896	0,896	0,893	0,886	0,894
Sok jabłkowy	0,387	0,387	0,388	0,388	0,385	0,348
Napój energetyczny	1,470	1,443	1,447	1,460	1,458	1,459

Tabela 43. Zestawienie wartości absorbancji w seriach dla metody referencyjnej dla próbek pochodzenia naturalnego.

Wyliczone stężenie [mmol·L <sup>-1</sup> ]						
Numer serii						
Próbka	I	II	III	IV	V	VI
Miód	0,336	0,341	0,340	0,341	0,341	0,341
Napój winogronowy	0,312	0,315	0,315	0,314	0,311	0,314
Sok jabłkowy	0,136	0,136	0,136	0,136	0,135	0,122
Napój energetyczny	0,516	0,507	0,508	0,513	0,512	0,512

Tabela 44. Zestawienie wartości stężeń w seriach dla metody referencyjnej dla próbek pochodzenia naturalnego.

Próbka	$c_{sr}$ [mmol·L <sup>-1</sup> ]	SD	RSD
Miód	0,340 ± 0,002 <sup>a</sup>	0,002	0,006
Napój winogronowy	0,313 ± 0,002	0,002	0,005
Sok jabłkowy	0,134 ± 0,006	0,006	0,042
Napój energetyczny	0,511 ± 0,004	0,003	0,007

Tabela 45. Statystyczna ocena wyników (<sup>a</sup> t(S/n<sup>1/2</sup>), n = 6; p = 95%)

## 12.2. Podsumowanie dotyczące oznaczeń w próbkach pochodzenia naturalnego

Próbka	c glukozy [mmol·L <sup>-1</sup> ]		c referencyjne [mmol·L <sup>-1</sup> ]
	Biosensor A	Biosensor B	
Sok jabłkowy	0,33 ± 0,03	0,35 ± 0,02	0,134 ± 0,006
Napój winogronowy	0,318 ± 0,004	0,32 ± 0,02	0,313 ± 0,002
Napój energetyczny	0,43 ± 0,03	0,42 ± 0,04	0,511 ± 0,004
Miód	3,14 ± 0,15	3,28 ± 0,35	3,399 ± 0,020

Tabela 46. Porównanie wartości stężeń D – glukozy dla obu biosensorów i metody referencyjnej dla próbek pochodzenia naturalnego.

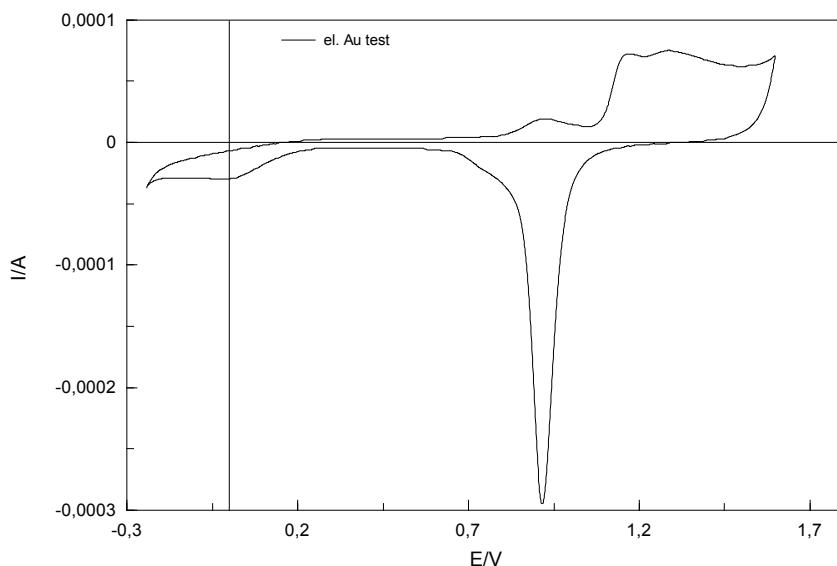
Jak widać na przedstawionym w tabeli 46 wyniki uzyskane metodą referencyjną różnią się od wyników uzyskanych za pomocą biosensorów dla niektórych próbek. Metoda referencyjna oparta jest o enzymatyczny mechanizm spektrofotometrycznego oznaczania D – glukozy wykluczający wpływ kwasu askorbinowego. W zestawieniu, wartości stężeń zmierzone za pomocą obu biosensorów są do siebie zbliżone. Ponadto w przypadku napoju winogronowego i miodu wynik ten jest porównywalny z wartością uzyskaną dla metody referencyjnej. Dla soku jabłkowego stężenie uzyskane metodą referencyjną jest znacznie niższe niż stężenie zmierzone przy pomocy biosensorów. Moim zdaniem różnica ta wynika z większej wrażliwości biosensorów na obecność kwasu askorbinowego, który w soku jabłkowym jest używany, jako przeciwutleniacz. Wyższa wartość stężenia D – glukozy w napoju energetycznym określona metodą referencyjną w porównaniu z biosensorami jest najprawdopodobniej związana z czasem trwania pomiaru. Stwierdziłam w czasie badań, iż produkty tego typu są bardzo wrażliwe na kontakt z atmosferą oraz promieniami słonecznymi, na co narażone są po otwarciu opakowania. W metodzie spektrofotometrycznej ekspozycja ta wynosi aż 30 minut, podczas gdy dla biosensora jest to około 5 minut, co stanowi istotną różnicę.

### 13. Przygotowanie elektrody typu plaster miodu.

Chcąc sprawdzić możliwość oznaczania glukozy na poziomie niższych stężeń postanowiłam przygotować elektrody typu plaster miodu, które następnie mogłyby zostać użyte do unieruchomienia enzymu. W związku z powyższy elektrody te musiały posiadać na swojej powierzchni wolne grupy karboksylowe. Zastosowanie tego typu obiektów ma na celu zwiększenie rzeczywistej powierzchni elektrody przy jednoczesnym zachowaniu powierzchni geometrycznej. Zabieg ten pozwala na zwiększenie czułości danej elektrody. Proces jej przygotowania składał się z kilku etapów.

#### 13.1. Przygotowanie powierzchni elektrody złotej.

Pierwszym etapem w otrzymaniu elektrody typu plaster miodu, było odpowiednie przygotowanie jej powierzchni. W tym celu elektroda była wstępnie szlifowana na



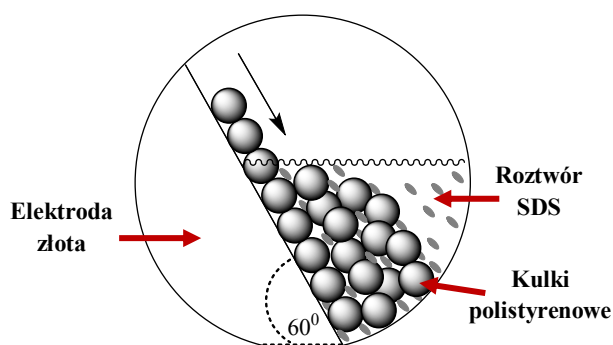
Rys. 99. Krzywa woltamperometryczna (CV) elektrolitu podstawowego ( $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ HClO}_4$ ) zarejestrowana na elektrodzie złotej przygotowanej do modyfikacji,  $v = 200 \text{ mV/s}$ .

W papierze ściernym o wzrastającej gradacji, a następnie polerowana w roztworze tlenku glinu do momentu osiągnięcia lustrzanej powierzchni pozbawionej defektów. W kolejnym etapie elektroda była czyszczona w mieszaninie chromowej oraz acetonie. Przygotowana ten sposób powierzchnia musiała być następnie aktywowana chemicznie. Proces aktywacji przebiegał w roztworze  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ HClO}_4$  i był prowadzony techniką woltamperometrii cyklicznej w zakresie potencjałów od  $E = -0,25 \text{ V}$  do  $E = 1,6 \text{ V}$  i trwał co najmniej 100 cykli. Kształt krzywej woltamperometrycznej (CV) elektrolitu podstawowego zarejestrowany na elektrodzie złotej przygotowanej do modyfikacji przedstawia rysunek 99. Dla dalszego przygotowania elektrody kluczowej było, aby powierzchnia elektrody po aktywacji pozostawała zwilżona.



### 13.2. Nalóżenie matrycy polistyrenowej

Po przygotowaniu powierzchni elektrody, należało nałożyć na nią monowarstwę matrycy. Do tego celu posłużyły kulki polistyrenowe (PS) o średnicy  $0,46\ \mu\text{m}$  przygotowane w formie 4% roztworu w  $0,04\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  SDS (dodecylosiarczan sodu). Aktywowaną elektrodę umieszczałam w przygotowanym zestawie wkraplaczy przedstawionym w rozdziale 2.6. na rysunku 47. Na elektrodę nanosiłam kroplę  $0,04\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  SDS, w którą następnie wprowadzałam kroplę ( $< 50\ \mu\text{L}$ ) roztworu PS i pozostawiałam na 10 minut. Po tym czasie elektrodę zalewałam całkowicie  $0,04\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  SDS i ustawiałam pod kątem około  $60^\circ$ , po czym dekantowałam roztwór z nad elektrody z prędkością  $0,1\ \text{mL}\cdot\text{s}^{-1}$ . Proces ten obrazuje rysunek 100.



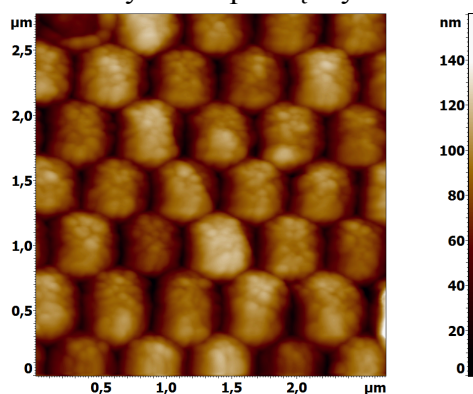
Rys. 100. Schemat nakładania matrycy polistyrenowej.

Po wyschnięciu na powierzchni elektrody pozostaje monowarstwa kulek polistyrenowych. Kluczowymi parametrami podczas nakładania matrycy kulek polistyrenowych był kąt nachylenia elektrody podczas zlewania roztworu, szybkość zlewania oraz stężenie roztworu SDS. Optymalny kąt nachylenia to  $60^\circ$ . Dobór mniejszego kąta powoduje problemy z odmyciem nadmiaru polistyrenu, co skutkuje powstaniem struktury zaburzonej lub wielu warstw matrycy. Zwiększenie kąta zlewania roztworu SDS powoduje zerwanie monowarstwy polistyrenu z powierzchni elektrody. Równie istotna jest szybkość zlewania. Zbyt duża szybkość również spowoduje zerwanie monowarstwy polistyrenu wraz ze spływającym roztworem, jeżeli natomiast będzie ona zbyt mała spowoduje powstanie niewystarczającej siły do odmycia nadmiaru polistyrenu.

Ważna jest również rola dodatku i stężenia SDS. Pomiary dowiodły, iż stężenie surfaktanta musi osiągnąć  $0,04\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Gdy jest ono znacznie poniżej tej wartości na powierzchni elektrody złotej nie pozostają praktycznie żadne kulki PS. Podniesienie stężenia SDS w roztworze, chociaż wciąż poniżej wartości krytycznej, warunkuje powstanie małych domen luźno spakowanych heksagonalnych warstw lub monowarstwy kulek PS w formie

pasków. Dalsze podnoszenie stężenia SDS powoduje coraz gęstsze upakowanie otrzymanej struktury. Przy optymalnym stężeniu surfaktanta, otrzymywałam heksagonalnie, ściśle ułożoną strukturę na całej powierzchni elektrody, nawet pomimo jej defektów. Podwyższenie stężenia powyżej wartości optymalnej powoduje przekroczenie wartości krytycznej czego wynikiem jest otrzymanie multiwarstwy PS. Z prowadzonych badań wynika, iż aby uzyskać optymalną monowarstwę należy przekroczyć znacząco krytyczne stężenie micelarne dla SDS ( $CMC = 0,008 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) [143, 144]. Ponadto obecność SDS zmniejsza napięcie powierzchniowe, co pozwala na uformowanie warstwy polistyrenu na granicy faz roztwór – powietrze podczas wynurzania elektrody [145] oraz zabezpiecza roztwór SDS, będący zawiesiną przed agregacją oraz koagulacją [146].

Przeprowadzone badania pokazały wyraźny związek pomiędzy stężeniem roztworu SDS a formowaniem się heksagonalnej matrycy polistyrenu. Można to wyjaśnić poprzez kilka zjawisk. Przede wszystkim dodatek surfaktanta zwiększa siłę jonową roztworu, co jest siłą napędową migracji kulek polistyrenu z wewnątrz roztworu na granicę faz. Ponadto oddziaływanie pomiędzy surfaktantem a polistyrenem promują powstanie heksagonalnej



Rys. 101. Obraz AFM matrycowej monowarstwy polistyrenu nałożonego z 4% roztworu PS w  $0,04 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  SDS.

warstwy matrycy dzięki stabilizacji termodynamicznej [147]. Również silne hydrofobowe oddziaływanie pomiędzy surfaktantem a powierzchnią złota aktywuje siły osmotyczne, które kierunkują kulki polistyrenu na podłożu ku sobie. Dodatkowo obecność SDS w roztworze spowalnia parowanie elektrolitu na granicy faz podczas wynurzania dzięki czemu warstwa heksagonalna ma więcej czasu na uformowanie się [148]. Dobrze zorganizowane

regiony powstałe na początku procesu działają jako centra nukleacji podczas formowania się monowarstwy. Proces ten przebiega w równowadze pomiędzy siłami termodynamicznymi i kinetycznymi [146]. Ułożona matryca polistyrenowa została przedstawiona na rysunku 101.

### 13.3. Modyfikacja kompozytem przewodzącym

Po nałożeniu matrycy polistyrenowej, kolejnym etapem była polimeryzacja. W jej wyniku otrzymałam trzy elektrody, z czego dwie posiadają wolne grupy karboksylowe. Na szczególną uwagę zasługuje problem grubości powstającej warstwy. Jej optymalna wysokość to wartość promienia użytych kulek PS. Jej przekroczenie może skutkować zniszczeniem struktury po rozpuszczeniu PS i zapadaniem się porów do wewnątrz.

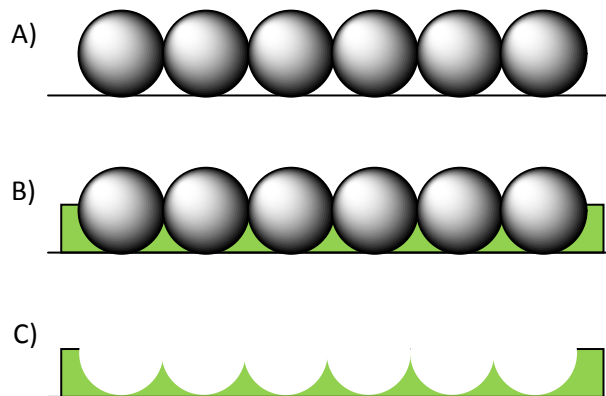
Pierwsza z elektrod (Elektroda 1) została otrzymana w wyniku elektrolizy przy stałym potencjale  $E = 1 \text{ V}$  w czasie  $t = 5 \text{ s}$  z roztworu  $0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  EDOT – u w  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PSSLi. Elektroda ta daje możliwość enkapsulacji wybranych związków wewnątrz powstałych porów.

Druga z elektrod (Elektroda 2) została otrzymana w wyniku elektrochemicznej syntezy PEDOT – u w obecności kwasu poliakrylowego z roztworu zawierającego  $1,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  kwasu poliakrylowego oraz  $0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  EDOT – u w  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PSSLi w warunkach  $E = 1 \text{ V}$  oraz  $t = 5 \text{ s}$ .

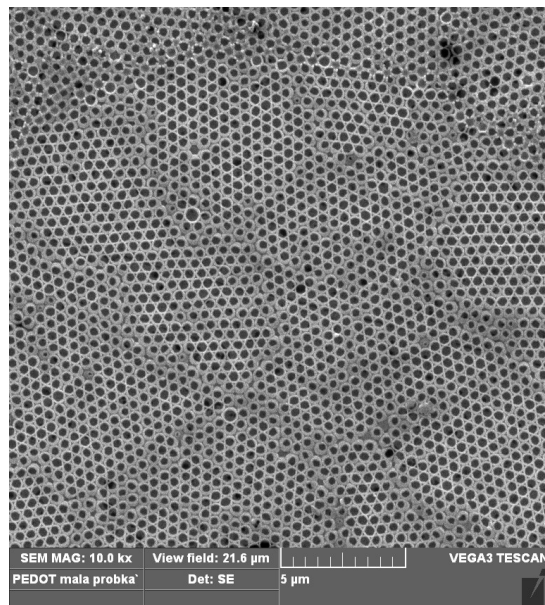
Trzecia elektroda (Elektroda 3) została zmodyfikowana elektrochemicznie syntezowanym PEDOT – em w obecności kwasu antranilowego z roztworu PSSH przy pomocy woltamperometrii cyklicznej. Roztwór do polimeryzacji składał się z  $0,005 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  EDOT – u oraz  $0,005 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  kwasu antranilowego w  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PSSH. Parametry elektropolimeryzacji to zakres potencjałów  $E = -0,4 \div 1,2 \text{ V}$ , szybkość skanowania  $v = 20 \text{ mV/s}$  oraz  $n = 9$  cykli.

W przypadku elektrody 2 i 3 obecność wolnych grup karboksylowych została potwierdzona testem opisanym w rozdziale 5.3.

Po procesie polimeryzacji należało rozpuścić matrycę, co następowało w toluenie w czasie 24 godzin. Schemat procesu otrzymania elektrody typu plaster miodu przedstawia rysunek 102, natomiast obraz elektrody typu plaster miodu po rozpuszczeniu matrycy przedstawia rysunek 103.



Rys. 102. Schemat otrzymywania mikrostrukturalnej elektrody typu plaster miodu: A – nałożona matryca polistyrenu, B – elektropolimeryzacja na matrycy, C – rozpuszczenie matrycy.

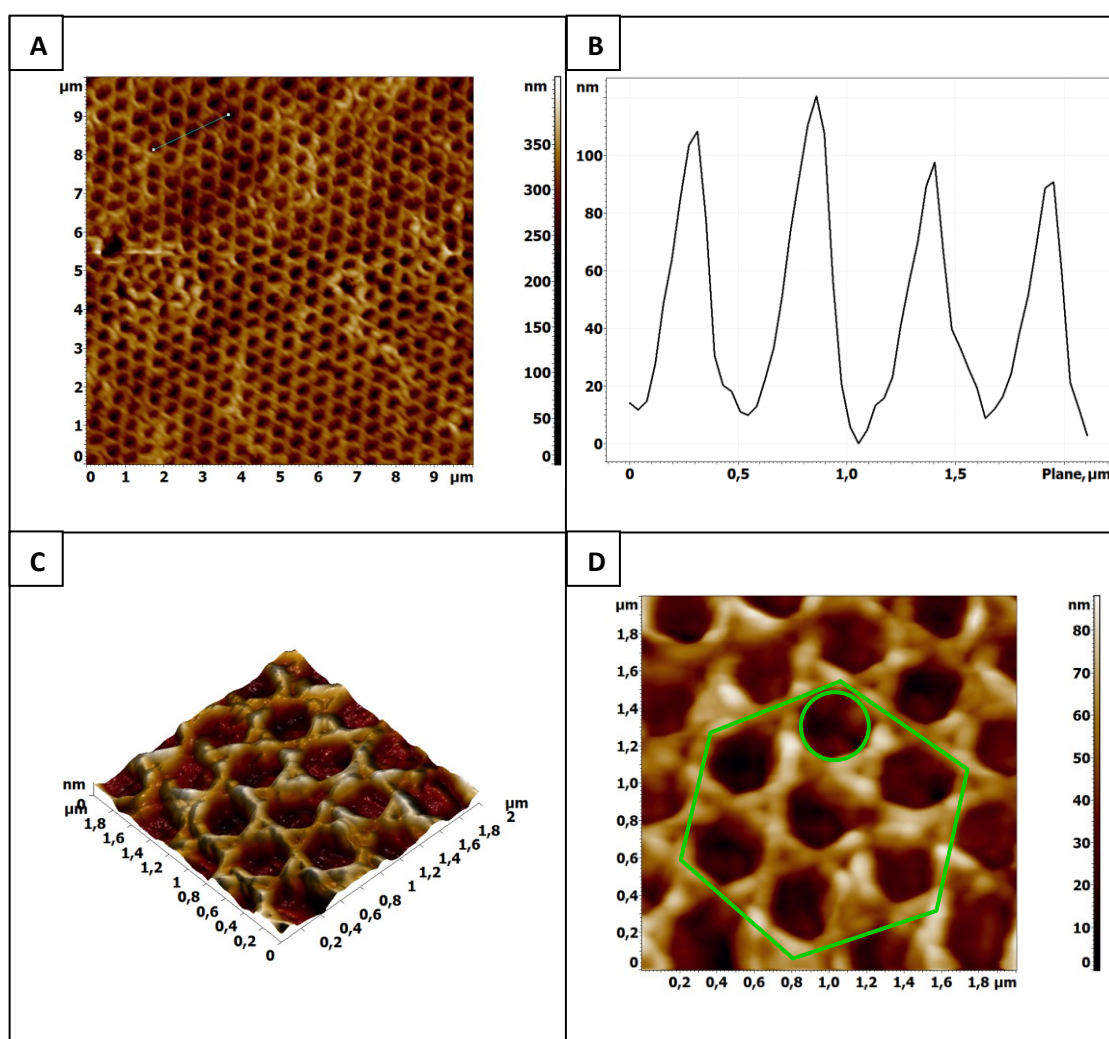


Rys. 103. Obraz SEM heksagonalnie ułożonej mikrostruktury dla elektrody 1.

### 13.4. Charakterystyka parametrów fizycznych otrzymanych warstw mikrostrukturalnych

- Elektroda 1

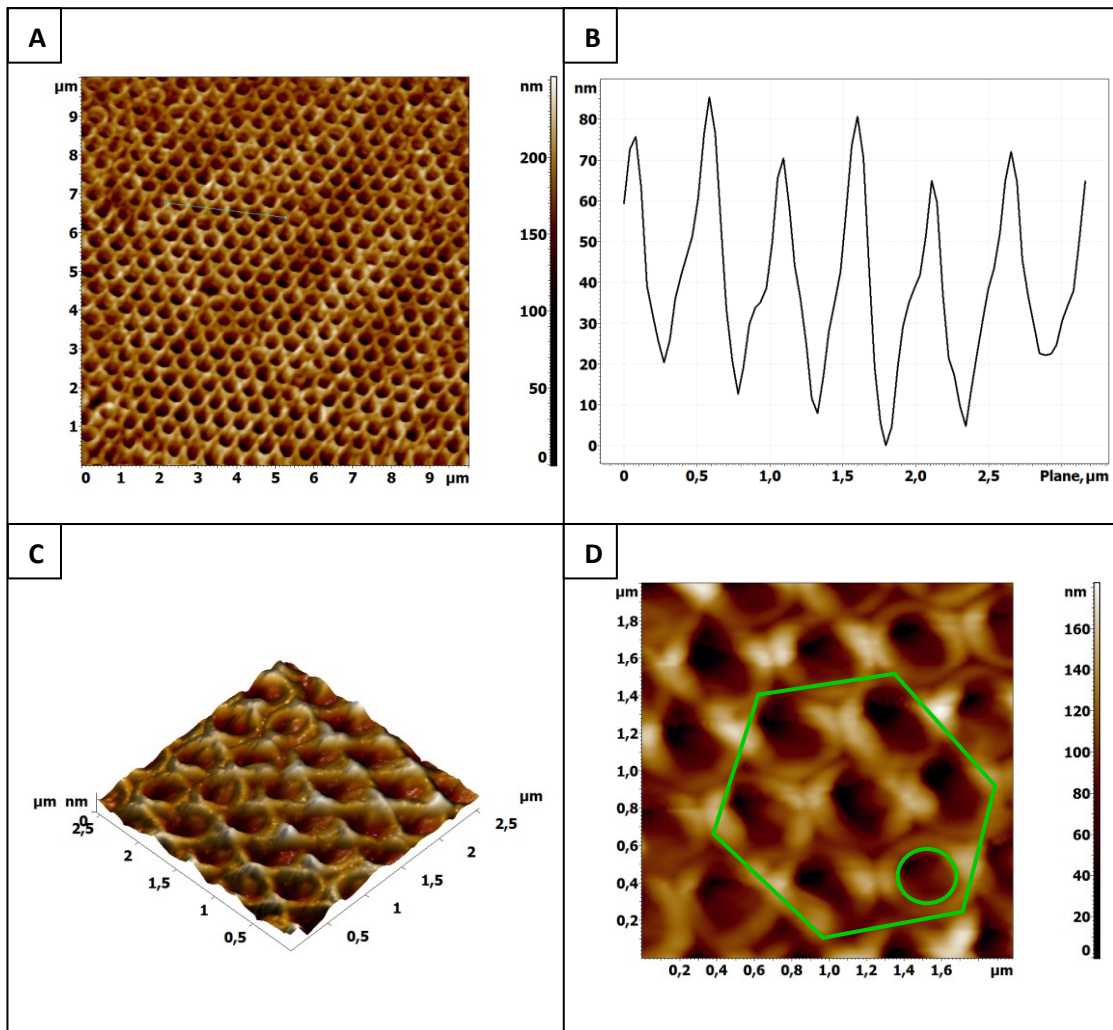
Została zmodyfikowana kompozytem PEDOT/PSSLi o grubości około 100 – 120 nm. Sumaryczna powierzchnia porów wyniosła 40% powierzchni elektrody złotej, co wiązało się z rozwinięciem powierzchni i dało 47,5% większą wartość niż w przypadku elektrody niemodyfikowanej. Powyższe dane odzwierciedla rysunek 104.



Rys. 104. Mikrostrukturalna elektroda 1: A – obraz AFM mikrostruktury, B – przekrój, C – obraz 3D AFM mikrostruktury, D – heksagonalne ułożenie porów w mikrostrukturze.

- **Elektroda 2**

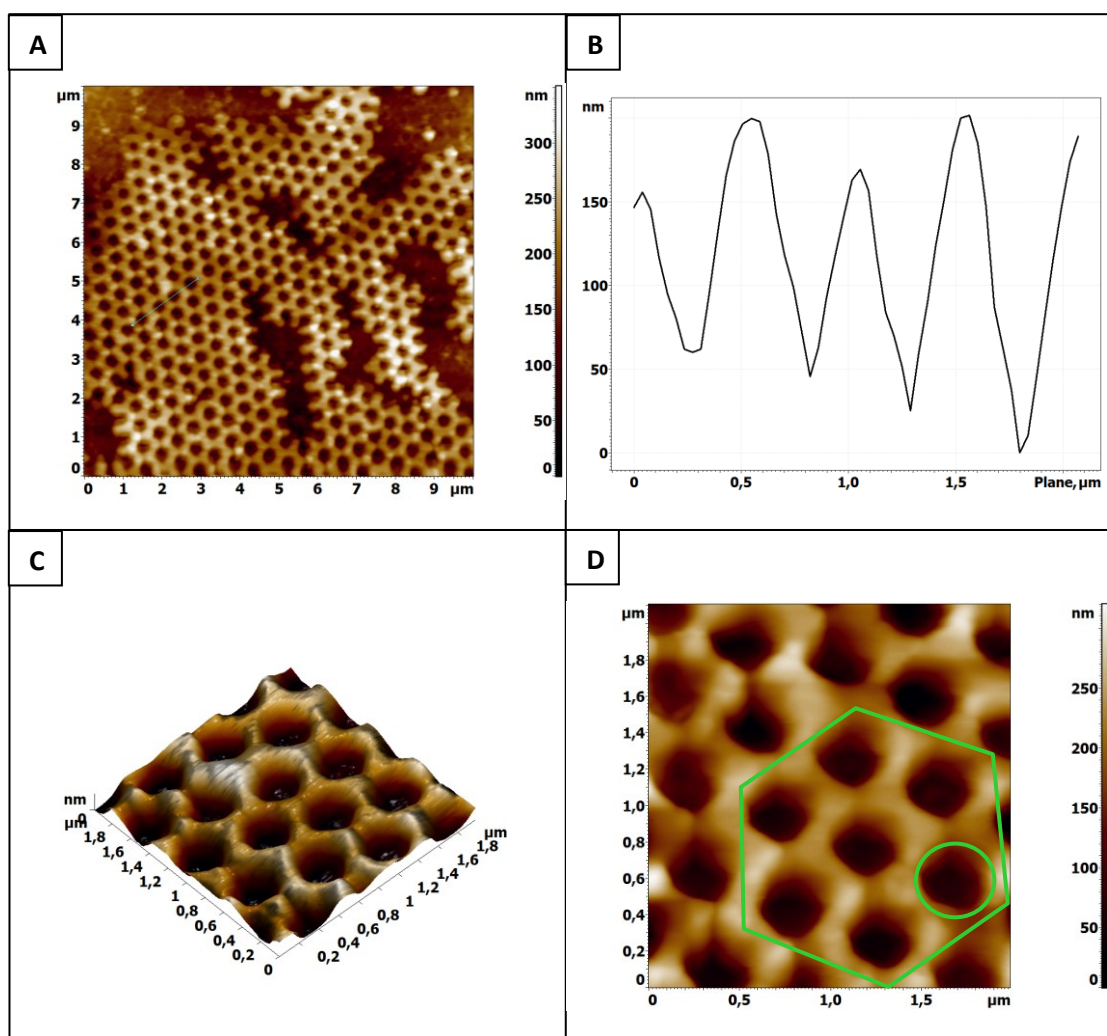
Została zmodyfikowana kompozytem (PEDOT+PAA)/PSSLi o grubości około 90 – 100 nm. Sumaryczna powierzchnia porów wyniosła 35% powierzchni elektrody złotej, co wiązało się z rozwinięciem powierzchni i dało 42% większą wartość niż w przypadku elektrody niemodyfikowanej. Powyższe dane odzwierciedla rysunek 105.



Rys. 105. Mikrostrukturalna elektroda 2: A – obraz AFM mikrostruktury, B – przekrój, C – obraz 3D AFM mikrostruktury, D – heksagonalne ułożenie porów w mikrostrukturze.

- **Elektroda 3**

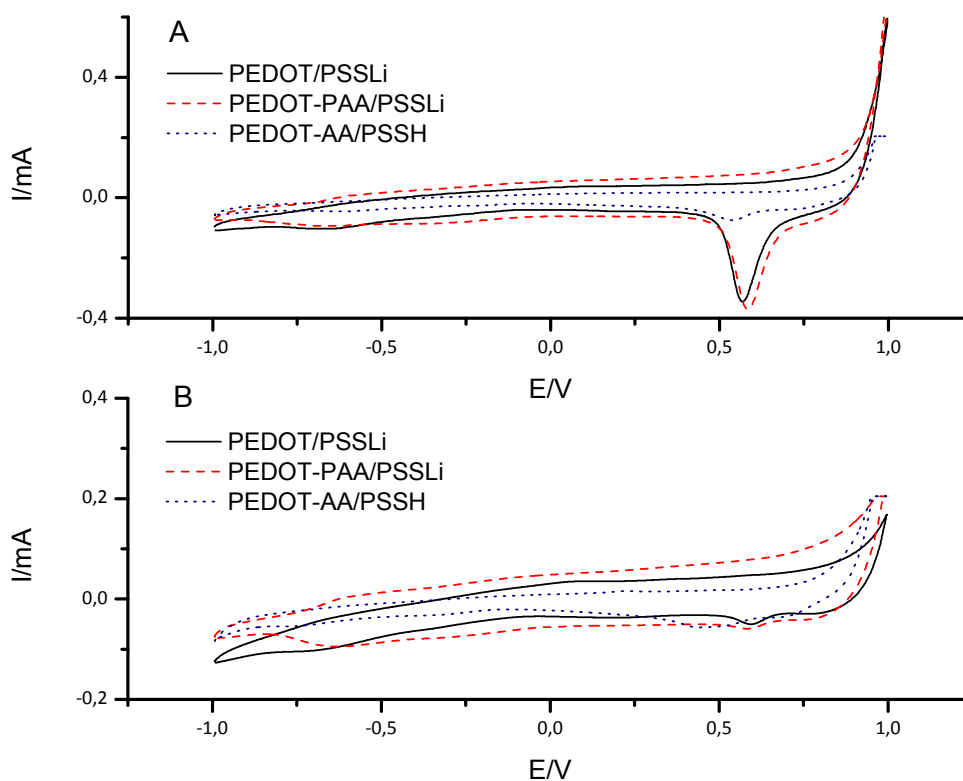
Charakteryzowała się gorszymi parametrami od dwóch pierwszych obiektów. Została ona zmodyfikowana kompozytem (PEDOT+AA)/PSSH o grubości około 30 nm. Sumaryczna powierzchnia porów wyniosła 6% powierzchni elektrody złotej, co wiązało się z nieznacznym rozwinięciem powierzchni i dało 5,6% większą wartość niż w przypadku elektrody niemodyfikowanej. Powyższe dane odzwierciedla rysunek 106.



Rys. 106. Mikrostrukturalna elektroda 3: A – obraz AFM mikrostruktury, B – przekrój, C – obraz 3D AFM mikrostruktury, D – heksagonalne ułożenie porów w mikrostrukturze.

### 13.5. Charakterystyka chemiczna otrzymanych warstw mikrostrukturalnych.

Otrzymane elektrody zostały sprawdzone w pomiarach elektrochemicznych techniką woltamperometrii cyklicznej (CV) w elektrolitach podstawowych ( $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  KCl oraz PBS). Ich wynik został przedstawiony na rysunku 107.

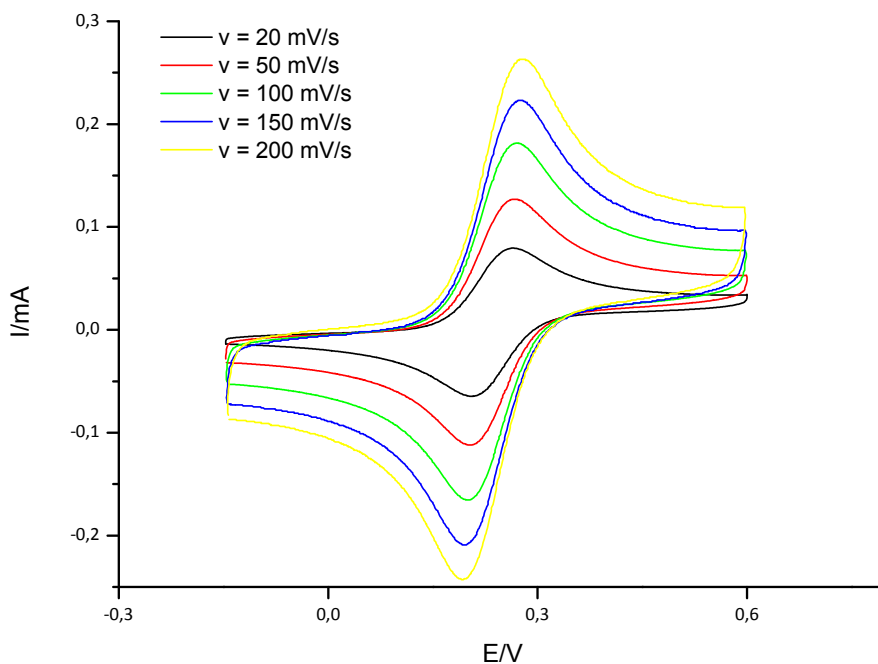


Rys. 107. Cykliczne woltamperogramy zarejestrowane w elektrolitach podstawowych: A –  $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  KCl; B – PBS,  $E = -1 \div 1 \text{ V}$ ,  $v = 200 \text{ mV/s}$  na elektrodzie modyfikowanej strukturami typu „plaster miodu”.

Jak można zauważyć, szeroki zakres potencjałów warstwy podwójnej wynoszący od  $E = -0,65 \text{ V}$  do  $E = 0,9 \text{ V}$  pozwala na badanie procesów elektrodowych. Wynika to z bardzo niskiego potencjału utleniania PEDOT – u.

Oceeniłam również współczynnik chropowatości otrzymanych elektrod na podstawie wartości natężenia prądów utleniania heksacyjanożelazianu (II) potasu –  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  w odniesieniu do niemodyfikowanej elektrody złotej zmierzonych techniką woltamperometrii cyklicznej dla różnych szybkości skanowania ( $v = 20, 50, 100, 150$  oraz  $200 \text{ mV/s}$ ) (rysunek 108).





Rys. 108. Cykliczne woltamperogramy zarejestrowane w  $0,005 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  w  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  KCl na elektrodzie PEDOT – PAA/PSSLi.

Dla procesów odwracalnych wartość natężenia prądu pików opisuje równanie Randles'a – Sevcik'a:

$$I_p = 2,69 \cdot 10^5 \cdot n^{3/2} \cdot A \cdot D_{Ox}^{1/2} \cdot v^{1/2} \cdot C_{Ox}^0$$

gdzie:

- $I_p$  - natężenie prądu pików [A];
- $n$  - ilość elektronów biorących udział w reakcji elektrodowej;
- $A$  - powierzchnia elektrody [ $\text{cm}^2$ ];
- $D_{ox}$  - współczynnik dyfuzji [ $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ];
- $v$  - szybkość zmian potencjału [ $\text{Vs}^{-1}$ ];
- $C_{ox}^0$  - stężenie depolaryzatora [ $\text{mol}(\text{cm}^3)^{-1}$ ];

Jeżeli pomiary zostały przeprowadzone w tym samym roztworze dla dwóch różnie modyfikowanych elektrod, natężenie prądów pików opisują równania:

$$I_{p1} = 2,69 \cdot 10^5 \cdot n^{3/2} \cdot A_1 \cdot D_{Red}^{1/2} \cdot v^{1/2} \cdot C_{Red}^0$$

$$I_{p2} = 2,69 \cdot 10^5 \cdot n^{3/2} \cdot A_2 \cdot D_{Red}^{1/2} \cdot v^{1/2} \cdot C_{Red}^0$$

gdzie:

- $I_{p1}$  - natężenie prądu pików elektrody złotej niemodyfikowanej;
- $I_{p2}$  - natężenie prądu pików elektrody złotej modyfikowanej;

Stosunek tych natężeń prądów będzie równy stosunkowi powierzchni badanych elektrod i będzie opisywał zmianę rzeczywistej powierzchni elektrody:

$$f_r = \frac{I_{p2}}{I_{p1}} = \frac{A_2}{A_1}$$

W związku z tym, że otrzymane elektrody modyfikowane zbudowane są z kompozytu przewodzącego o jednorodnej strukturze, na ich powierzchniach znajdują się rozmieszczone centra red – ox. Współczynnik chropowatości elektrody zależy nie tylko od jej rzeczywistej chropowatości, lecz również od liczby centrów red – ox. Współczynnik chropowatości dla badanych elektrod wynosi odpowiednio: dla elektrody 1 – 1,27; elektrody 2 – 1,40 oraz elektrody 3 – 0,9. Wartość niższa niż 1 oznacza, że pomimo rozwinięcia powierzchni rzeczywistej liczba centrów red – ox na powierzchni elektrody zmniejszyła się. Wynika to z charakteru kompozytu PEDOT – AA i jego gorszych właściwości elektrochemicznych w odniesieniu do samego PEDOT – u.

Ponadto sprawdziłam wpływ struktury otrzymanych elektrod na ich własności elektrochemiczne. Użyłam w tym celu modelu Comptona [149, 150]. Dla elektrod

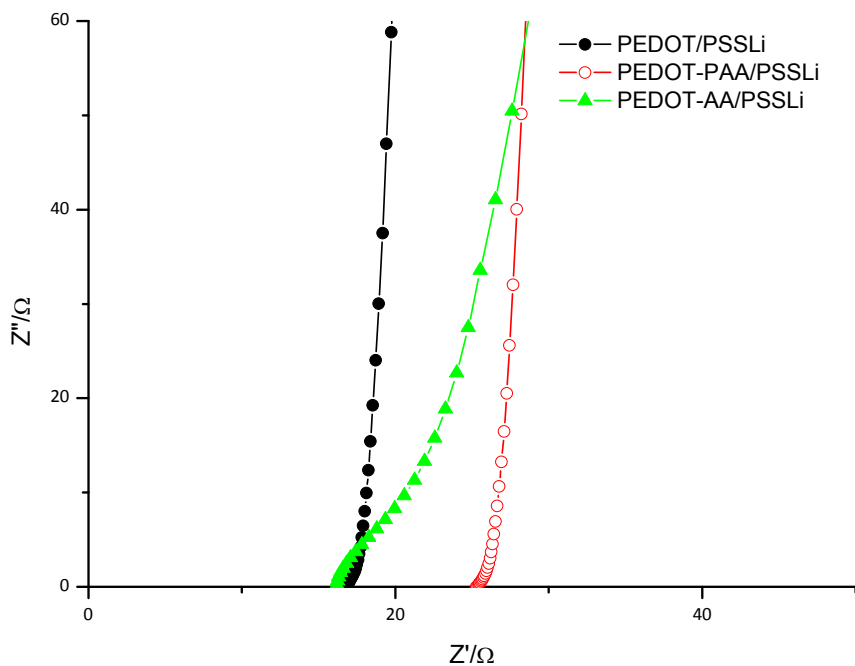
spełniających założenia tego modelu zależność  $\frac{I_p}{\sqrt{v}} = f(v)$  jest rosnąca, a rozdział pików

maleje wraz ze wzrostem głębokości porów. W przypadku badanych elektrod parametr definiujący rozmiar porów wynosi  $L_{cyl} = 1 \div 0,4$ , co oznacza iż znajdują się one na granicy

podziału pomiędzy elektrodami planarnymi i porowatymi. Zależność  $\frac{I_p}{\sqrt{v}} = f(v)$  ma

charakter stały natomiast separacja pików rośnie. Na tej podstawie mogę stwierdzić, że pomimo struktury plastra miodu, badane elektrody zachowują się jak obiekty planarne, co jest związane z geometrią porów, których to głębokość jest równa bądź mniejsza od ich średnicy.

Kolejnym narzędziem do badania otrzymanych elektrod była elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna (EIS). Rysunek 109 przedstawia diagram Nyquista dla badanych elektrod w  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  KCl.



Rys. 109. Diagram Nyquista dla otrzymanych elektrod mikrostrukturalnych.

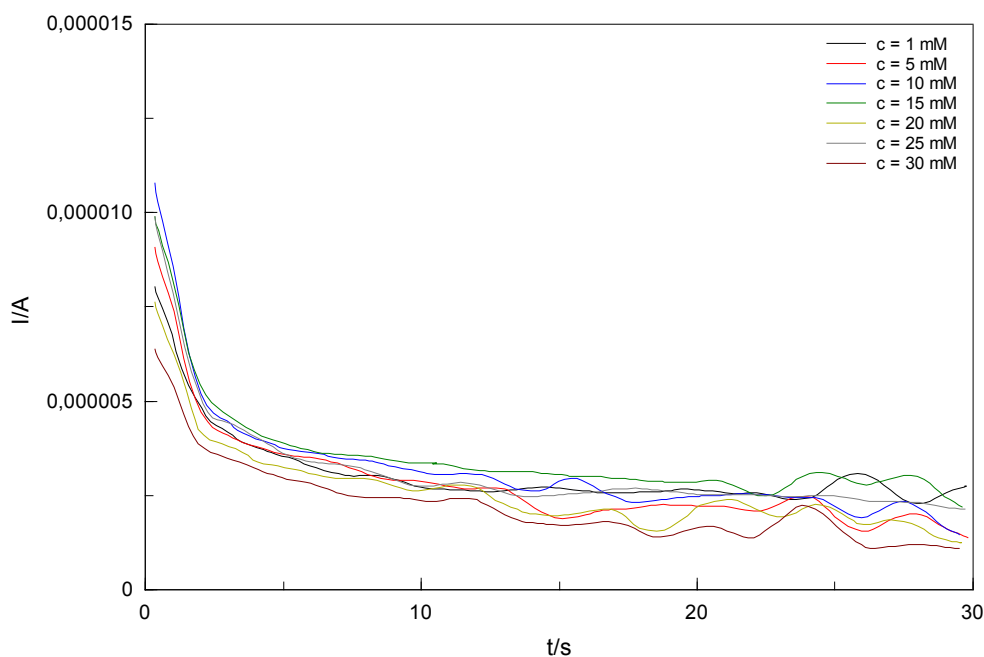
Otrzymane wyniki porównałam z modelami dla elektrod porowatych [151 – 154]. Zgodnie z porównanymi modelami, pory występujące w strukturze plastra miodu o średnicy  $r = 0,23 \mu\text{m}$  i głębokości  $l = 0,1 \div 0,2 \mu\text{m}$  tworzą strukturę chropowatą a nie porowatą. Otrzymane elektrody zachowują się jak obiekty polaryzowalne o bardzo dobrych właściwościach. W obszarze częstotliwości wysokich można zaobserwować zmianę przebiegu krzywych, co jest w zgodzie z mikrostrukturą materiałów kompozytowych. Krzywe dla elektrody 1 i elektrody 2 mają ten sam kształt i charakteryzują się przesunięciem związanym z różną grubością warstwy modyfikującej, z czego wynikają różnice w przewodnictwie tych materiałów. Natomiast podobny kształt w częstotliwościach wysokich świadczy o zbliżonej strukturze obu materiałów. Inny kształt krzywej Nyquista dla elektrody 3 dla wysokich częstotliwości sugeruje, że powstała mikrostruktura ma inny charakter niż struktura samego PEDOT – u. Mniejsze nachylenie krzywych przy niskich częstotliwościach świadczy o pogorszeniu polarności tejże elektrody. Jest to spowodowane dodatkiem kwasu antranilowego.

### 13.6. Pomiar stężenia D – glukozy z użyciem elektrod mikrostrukturalnych typu plaster miodu.

W związku z tym, że elektrody mikrostrukturalne modyfikowane kompozytem (PEDOT+PAA)/PSSLi oraz (PEDOT+AA)/PSSH posiadają na powierzchni wolne grupy karboksylowe, można przeprowadzić na nich immobilizację oksydazy glukozowej. Proces ten przebiega analogicznie jak w przypadku omówionym w rozdziale 6.1.

- Pomiary wykonane techniką amperometryczną dla biosensora I generacji

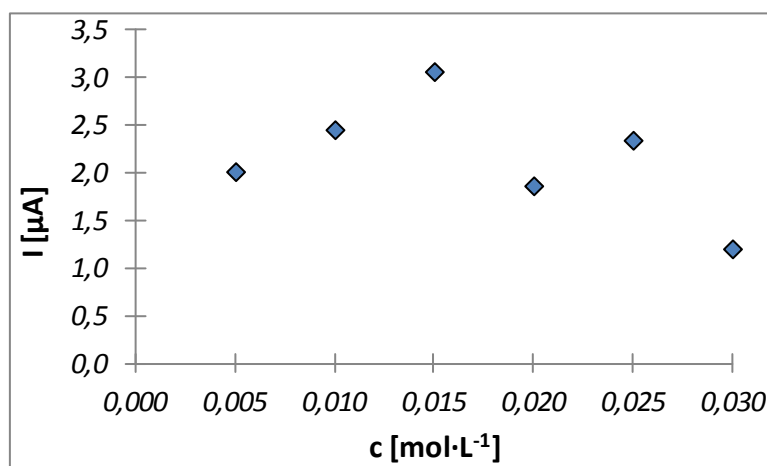
Ostatni etap pracy z wykorzystaniem elektrody typu plaster miodu obejmował sprawdzenie jej działania jako biosensora I generacji. Rysunek 110 przedstawia krzywe amperometryczne dla D – glukozy w roztworze PBS dla elektrody (PEDOT+PAA)/PSSLi. Dane zostały zebrane w tabeli 47 oraz przedstawione na rysunku 111.



Rys. 110. Krzywe amperometryczne zarejestrowane w roztworze PBS (pH=7,4) o różnej zawartości D – glukozy ( $1 \div 30 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) dla biosensora z unieruchomioną oksydazą glukozową na elektrodzie PEDOT – PAA/PSSLi typu plaster miodu.

$c_{\text{glukozy}}$ [mol·L <sup>-1</sup> ]	$I$ [μA]
0,001	-
0,005	2,02
0,010	2,46
0,015	3,07
0,020	1,87
0,025	2,35
0,030	1,21

Tabela 47. Zestawienie natężeń prądów mierzonych amperometrycznie zarejestrowane w roztworze PBS o różnej zawartości D – glukozy dla biosensora z unieruchomioną oksydazą glukozową na elektrodzie PEDOT – PAA/PSSLi typu plaster miodu.

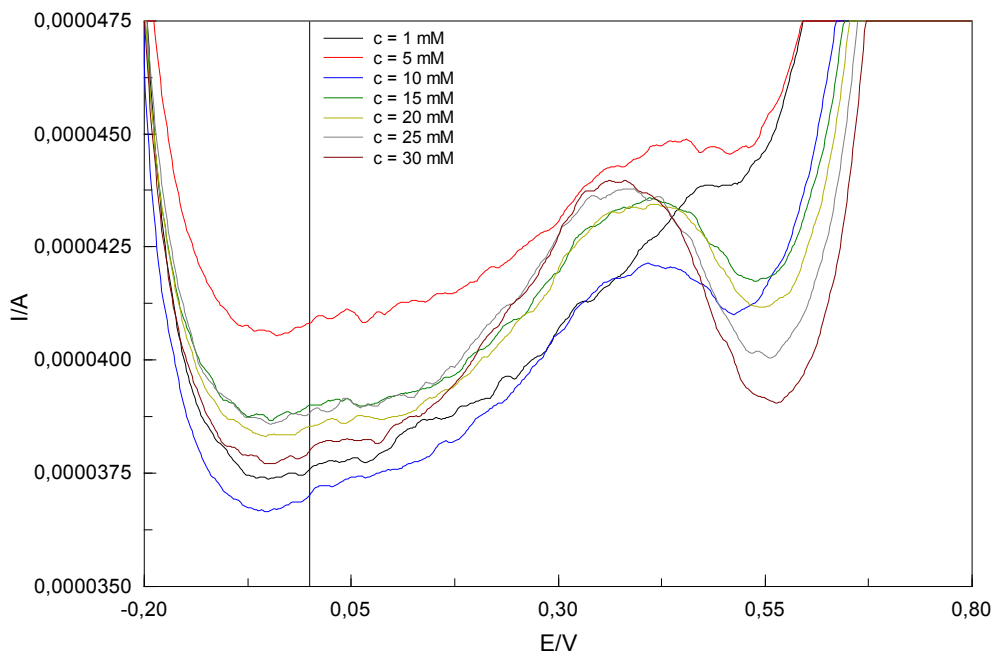


Rys. 111. Wykres zależności natężenia prądu od stężenia D – glukozy dla biosensora z unieruchomioną oksydazą glukozową na elektrodzie PEDOT – PAA/PSSLi typu plaster miodu.

Otrzymane wyniki dla biosensora I generacji charakteryzują się liniowością tylko w wąskim zakresie niskich stężeń D – glukozy (0,005 – 0,015 mol·L<sup>-1</sup>). Wynika to z faktu zamknięcia enzymu w porach przez co powstający H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> powoduje uszkodzenie struktury porowatej i brak liniowości dla wysokich stężeń D – glukozy, a co za tym idzie wysokich stężeń nadtlenku wodoru.

• Pomiary wykonane techniką woltamperometryczną dla biosensora III generacji

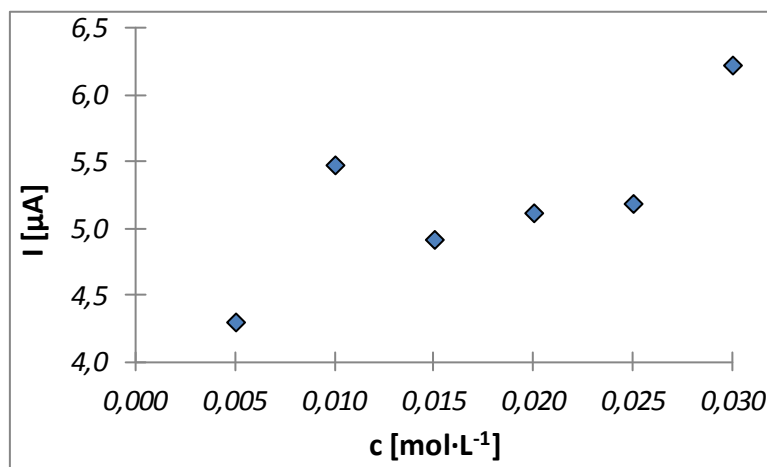
Rysunek 112 przedstawia krzywe woltamperometryczne dla D – glukozy w roztworze PBS dla elektrody (PEDOT+PAA)/PSSLi. Dane zostały zebrane w tabeli 48 oraz przedstawione na rysunku 113.



Rys. 112. Krzywe woltamperometryczne (DPV) zarejestrowane w roztworze PBS (pH=7,4) o różnej zawartości D – glukozy ( $1 \div 30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) dla biosensora z unieruchomioną oksydazą glukozową na elektrodzie PEDOT – PAA/PSSLi typu plaster miodu.

$c$ glukozy [ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ]	E [V]	I [ $\mu\text{A}$ ]
0,001	-	-
0,005	0,44	4,30
0,010	0,41	5,48
0,015	0,41	4,92
0,020	0,42	5,12
0,025	0,38	5,19
0,030	0,38	6,23

Tabela 48. Zestawienie natężeń prądów mierzonych woltamperometrycznie (DPV) zarejestrowane w roztworze PBS o różnej zawartości D – glukozy dla biosensora z unieruchomioną oksydazą glukozową na elektrodzie PEDOT – PAA/PSSLi typu plaster miodu.



Rys. 113. Wykres zależności natężenia prądu od stężenia D – glukozy dla biosensora z unieruchomioną oksydazą glukozową na elektrodzie PEDOT – PAA/PSSLi typu plaster miodu.

Otrzymane wyniki świadczą o aktywności unieruchomionej oksydazy glukozowej oraz o odpowiedzi biosensora na wzrastające stężenie D – glukozy. Brak jest zadowalającej liniowej zależności natężenia prądu od stężenia. Istotny jest również fakt, że otrzymane wartości natężenia prądu są o rząd wielkości niższe niż dla porównywalnego biosensora otrzymywanego na elektrodzie platynowej. Biosensor ten z całą pewnością wymaga dalszej optymalizacji w celu poprawy jego funkcjonowania.

### 13.7. Podsumowanie dotyczące elektrod typu plaster miodu

Parametry dla elektrod mikrostrukturalnych typu plaster miodu zestawiałam w tabeli 49.

	Elektroda 1	Elektroda 2	Elektroda 3
<b>Elektrochemiczna aktywacja</b>	1 mol·L <sup>-1</sup> HClO <sub>4</sub> , E=-0,25 ÷ 1,6V, v=200mV/s, n=100		
<b>Nakładanie matrycy</b>	0,46 μm kulki PS; 4% PS w 0,04 mol·L <sup>-1</sup> SDS (t=10 minut), roztwór zawierający 0,04 mol·L <sup>-1</sup> SDS, kąt nachylenia 60 <sup>o</sup> , szybkość zlewania 0,1 mL·s <sup>-1</sup>		
<b>Polimer bazowy</b>	EDOT		
<b>Drugi składnik kompozytu</b>	-	kwasy poliakrylowy (PAA)	kwasy antranilowy (AA)
<b>Substancja domieszkująca</b>	sól litowa kwasu poli(4-styrenosulfonowego) (PSSLi)		kwasy poli(4-styrenosulfonowy) (PSSH)
<b>Metoda otrzymywania</b>	elektroliza przy stałym potencjale		woltamperometria cykliczna
<b>Parametry otrzymywania</b>	E=1V, t=5s		E=-0,4 ÷ 1,2V, v=20mV/s, n=9
<b>Skład roztworu polimeryzacyjnego</b>	0,01 mol·L <sup>-1</sup> EDOT +0,1 mol·L <sup>-1</sup> PSSLi	0,01 mol·L <sup>-1</sup> EDOT +1,5 mg·mL <sup>-1</sup> PAA +0,1 mol·L <sup>-1</sup> PSSLi	0,005 mol·L <sup>-1</sup> EDOT +0,005 mol·L <sup>-1</sup> AA +0,1 mol·L <sup>-1</sup> PSSH
<b>Usunięcie matrycy</b>	toluen, t=24h, temperatura pokojowa		
<b>Przewodnictwo</b>	+		
<b>Obecność wolnych grup karboksylowych</b>	-	+	
<b>Grubość warstwy [nm]</b>	100 ÷ 120	90 ÷ 100	30
<b>Powierzchnia porów w powierzchni całkowitej [%]</b>	40	35	6
<b>Rozwinięcie powierzchni [%]</b>	47,5	42	5,6
<b>Immobilizacja GOD</b>	-	5 mg·mL <sup>-1</sup> WSC w PBS, t=1h, temperatura= 4 <sup>o</sup> C 4 mg·mL <sup>-1</sup> GOD w PBS+CaCl <sub>2</sub> , t=24h, temperatura=4 <sup>o</sup> C PBS+CaCl <sub>2</sub> , t=1h, temperatura pokojowa	

Tabela 49. Zestawienie parametrów dla elektrod mikrostrukturalnych typu plaster miodu.

Otrzymane elektrody charakteryzują się dobrymi parametrami fizykochemicznymi. Wszystkie zostały w całości zmodyfikowane mikrostrukturalną monowarstwą kompozytu typu plaster miodu. Na elektrodzie numer 2 i 3 przebiega immobilizacja oksydazy glukozowej, co potwierdzają odpowiednie testy. Niestety działanie przygotowanych elektrod zarówno jako biosensor I jak i III generacji jest niesatysfakcjonujące. Główne problemy pojawiające się na tym etapie to niska czułość przygotowanego czujnika oraz niska wartość współczynnika korelacji dla zależności natężenia od rosnącego stężenia D – glukozy.



**PODSUMOWANIE  
I WNIOSKI KOŃCOWE**

#### **IV. Podsumowanie i wnioski końcowe**

W toku prowadzonych badań zrealizowałam cel prowadzonych pomiarów jakim było zbadanie możliwości otrzymanie biosensora chemicznego na bazie PEDOT – u dającego odpowiedź na zmieniające się stężenie D – glukozy. Złożyło się na to kilka, zakończonych sukcesem etapów:

- Opracowałam dwa kompozyty na bazie poli(3,4 – etylenodioksytiofenu) z dodatkiem kwasu poliakrylowego i kwasu antranilowego, z których to kompozyt PEDOT/(PEDOT+AA)/PSSH nie był wcześniej opisany w literaturze. Obie warstwy modyfikujące posiadały na swojej powierzchni wolne grupy karboksylowe, co zostało udowodnione odpowiednim testem chemicznym.
- Na podstawie danych literaturowych opracowałam własną procedurę unieruchomienia oksydazy glukozowej na powierzchni warstwy kompozytu poprzez wytworzenie wiązania kowalencyjnego. Trwałość tego procesu potwierdziłam spektrofotometrycznie.
- Przeprowadziłam optymalizację obu etapów, tzn. modyfikacji elektrody platynowej kompozytem oraz immobilizacji oksydazy glukozowej, określając wartość kluczowych dla tych etapów parametrów.
- Wykonałam pełną charakterystykę dwóch otrzymanych biosensorów pracujących zarówno jako sensory I jak i III generacji wraz z pełnym opracowaniem statystycznym.
- Zbadałam wpływ kwasu askorbinowego jako interferenta na pracę otrzymanych biosensorów.
- Ponadto opracowałam własną procedurę otrzymywania elektrod typu „plaster miodu”, które mogą pozwolić na zwiększenie czułości i miniaturyzację biosensorów.
- Dwie spośród trzech elektrod mikrostrukturalnych wykorzystałam do immobilizacji oksydazy glukozowej i przeprowadziłam wstępne, obiecujące pomiary dotyczące oznaczania stężenia D – glukozy. Biosensory te pozostają do dalszej optymalizacji.
- W ostatnim z zaplanowanych etapów, z użyciem przygotowanych biosensorów przeprowadziłam pomiary stężenia D – glukozy w próbkach pochodzenia naturalnego takich jak sok jabłkowy, napój winogronowy, napój energetyczny oraz miód, które następnie porównałam z wynikami otrzymanymi dla metody referencyjnej.

# **BIBLIOGRAFIA**

**V. Bibliografia**

- [1] MLA style: "The Nobel Prize in Chemistry 2000". *Nobelprize.org*. Nobel Media AB 2013. [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2000/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2000/)
- [2] M. Omastová, I. Chodák, J. Pionteck, Electrical and mechanical properties of conducting polymer composites, *Synthetic Metals*, 1999, 102, 1251 – 1252;
- [3] J. Unsworth, C. Conn, Z. Jin, A. Kaynak, R. Ediriweera, P. Innis, N. Booth, Conducting polymers: Properties and applications, *Journal of Intelligent Material Systems and Structures*, 1994, 5, 595 – 604;
- [4] M. Armand, Polymers with ionic conductivity, *Advanced Materials*, 1990, 2, 278 – 286;
- [5] J. Fink, Electronic structure of conduction polymers, *Advances in Solid State Physics*, 1985, 25, 157 – 165;
- [6] G. Inzelt, M. Pineri, J. W. Schultze, M. A. Vorotyntsev, Electron and proton conduction polymers: recent developments and prospects, *Electrochimica Acta*, 2000, 45, 2403 – 2421;
- [7] C–W. Kuo, C–W. Huang, B–K. Chen, W–B. Li, P–R. Chen, T–H. Ho, C–G. Tseng, T–Y. Wu, Enhanced Ionic Conductivity in PAN – PEGME – LiClO<sub>4</sub> – PC composite polymer electrolytes, *International Journal of Electrochemical Science*, 2013, 8, 3834 – 3850;
- [8] J. Jaguar – Grodzinski, Electronically conductive polymers, *Polymers for Advanced Technologies*, 2002, 13, 615 – 625;
- [9] J.L. Bredas, G.B. Street, Polarons, bipolarons and solitons in conducting polymers, *Acc. Chem. Res.*, 1985, 18, 309 – 315;
- [10] G. Paasch, S. Scheinert, A. Petr, L. Dunsch, Bipolarons or polaron pairs in conducting polymers: equilibrium and kinetics, *Russian Journal of Electrochemistry*, 2006, 42, 1161 – 1168;
- [11] A.J. Heeger, Charge storage and charge transport in conducting polymers: solitons, polarons and bipolarons, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A*, 1985, 314, 17 – 35;
- [12] S. Brazovskii, N. Kirova, Z.G. Yu, A.R. Bishop, A. Saxena, Stability of bipolarons In conjugated polymers, *Optical Materials*, 1998, 9, 502 – 506;

- [13] A.J. Heeger, J.R. Schrieffer, W-P. Su, Solitons in conducting polymers, *Reviews of Modern Physics*, 1988, 60, 781 – 850;
- [14] G.C. Psarras, Hopping conductivity in polymer matrix – metal particles composites, *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 2006, 37, 1545 – 1553;
- [15] A. Yasuda, T. Shimidzu, Chemical and electrochemical analyses of polyaniline prepared with FeCl<sub>3</sub>, *Synthetic Metals*, 1993, 61, 239;
- [16] R. Corradi, S.P. Armes, Chemical synthesis of poly(3,4-ethylenedioxythiophene), *Synthetic Metals*, 1997, 84, 453–454;
- [17] S. Bhadra, N.K. Singha, D. Khastgir, Electrochemical synthesis of polyaniline and its comparison with chemically synthesized polyaniline, *Journal of Applied Polymer Science*, 2007, 104, 1900 – 1904;
- [18] S. Palaniappan, A. John, Polyaniline materials by emulsion polymerization pathway, *Progress in Polymer Science*, 2008, 33, 732–758;
- [19] Bade, V. Tsakova, J. W. Schultze, Nucleation, growth and branching of polyaniline from microelectrode experiments, *Electrochimica Acta*, 1992, 37, 2255 – 2261;
- [20] R. Córdova, M.A. del Valle, A. Arratia, H. Gómez, R. Schrebler, Effect of anions on nucleation and growth mechanism of polyaniline, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1994, 377, 75-83;
- [21] P. Krzyczmonik, E. Socha, Electrodes modified with composite layers of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) and polyaniline (PANI) for applications in bioelectroanalysis, *Chemik*, 2013, 67, 801 – 810;
- [22] B. Somboonsub, M.A. Invernale, S. Thongyai, P. Praserttham, D.A. Scola, G.A. Sotzing, Preparation of the thermally stable conducting polymer PEDOT – Sulfonated poly(imide), *Polymer*, 2010, 51, 1231 – 1236;
- [23] A. Malinauskas, Self – doped polyanilines, *Journal of Power Sources*, 2004, 126, 214–220;
- [24] F. Jonas, G. Heywang and W. Schmidtberg. DE 38 13 589 A1 (Bayer AG), Prior: April 22, 1988;
- [25] G. Heywang, F. Jonas, J. Heinze and M. Dietrich. DE 38 43 412 A1 (Bayer AG), Prior: December 23, 1988;
- [26] Q. Pei, G. Zuccarello, M. Ahlskog, O. Inganäs, Electrochromic and highly stable poly(3,4-ethylenedioxythiophene) switches between opaque blueblack and transparent sky blue, *Polyme*, 1994, 35, 1347 – 1951;

- [27] Praca doktorska, M. Mumtaz, „Synthesis of poly(3,4-ethylenedioxythiophene), polyaniline and their metal-composite nanoobjects by dispersion polymerization”, Uniwersytet Bordeaux –2009;
- [28] P.A. Levermore, L. Chen, X. Wang, R. Das, D.D.C. Bradley, Highly conductive poly(3,4-ethylenedioxythiophene) films by vapor phase polymerization for application in efficient organic light-emitting diodes, *Advanced Materials*, 2007, 19, 2379–2385;
- [29] J. Ouyang, C-W. Chu, F-C. Chen, Q. Xu, Y. Yang, High-conductivity poly(3,4-ethylenedioxythiophene):poly(styrenesulfonate) films and its application in polymer optoelectronic devices. *Advanced Functional Materials*, 2005, 15, 203–208;
- [30] Y. Kudoh, A. Akami, Y. Matsuya, Solid electrolytic capacitor with highly stable conducting polymer as a counter electrode, *Synthetic Metals*, 1999. 102, 973–974;
- [31] A.I. Melato, A. Viana, L. Abrantes, Different steps in the electrosynthesis of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) on platinum, *Electrochimica Acta*, 2008, 54, 590 – 597;
- [32] G.V.A. Aben and L.H.M. Krings. EP 727094 (Philips Electronics N.V.), Prior: August 6, 1994;
- [33] J.C. Yu, J.I. Jang, B.R. Lee, G.W. Lee, J.T. Han, M.H. Song, Highly efficient polymer-based optoelectronic devices using PEDOT:PSS and a GO composite layer as a hole transport layer, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2014, 6, 2067 – 2073;
- [34] Y. Wang, W. Jia, T. Strout, Y. Ding, Y. Lei, Preparation, characterization and sensitive gas sensing of conductive core-sheath TiO<sub>2</sub>-PEDOT nanocables, *Sensors*, 2009, 9, 6752-6763;
- [35] W.H. Kim, G.P. Kushto, H. Kim, Z.H. Kafafi, Effect of annealing on the electrical properties and morphology of a conducting polymer used as an anode in organic light-emitting devices, *Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics*, 2003, 41, 2522–2528;
- [36] A. Teissiera, J-P. Dudonb, P-H. Auberta, F. Vidala, S. Remauryc, J. Crouzetb, C. Chevrot. Feasibility of conducting semi-IPN with variable electro-emissivity: A promising way for spacecraft thermal control, *Solar Energy Materials and Solar Cells*, 2012, 9, 116 – 122;
- [37] M. Hirohatab, K. Tadab, T. Kawaib, M. Onodaa, K. Yoshinob, Electroluminescence in conducting polymers based on poly(phenylene ethynylene), *Synthetic Metals*, 1997, 85, 1273 – 1274;

- [38] J.V. Yakhmi, Vibha Saxena, D.K. Aswal, 2-C polymer sensors, actuators and field-effect transistors, functional materials. preparation, processing and applications, 2012, 61 – 110;
- [39] M. Rohwerder, A. Michalik, Conducting polymers for corrosion protection: What makes the difference between failure and success?, *Electrochimica Acta*, 2007, 53, 1300 – 1313;
- [40] C. Wang, P.G. Whitten, C.O. Too, G.G. Wallace, A galvanic cell driven controlled release system based on conducting polymers, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2008, 129, 605 – 611;
- [41] A. Hulanicki, S. Głąb, F. Ingmar, Chemical sensors definitions and classification, *Pure & Applied Chemistry*, 1991, 63, 1247 – 1250;
- [42] B. Nagel, H. Dellweg, L. M. Gierasch, Glossary for chemists of terms used in biotechnology, *Pure & Applied Chemistry*, 1992, 64, 143 – 168;
- [43] Z. Brzózka, W. Wróblewski, *Sensory chemiczne*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa, 1999;
- [44] C.C. Liu, *The Biomedical Engineering Handbook: Second Edition, Electrochemical Sensors*, CRC Press LLC, Florida, 2000;
- [45] R.N. Adams, *Electrochemistry at Solid Electrodes*, Marcel Dekker, New York, 1969;
- [46] J. Tichý, J. Erhart, E. Kittinger, J. Přívratská, *Fundamentals of Piezoelectric Sensorics: Mechanical, Dielectric, and Thermodynamical Properties of Piezoelectric Materials*, Springer Science & Business Media, Heidelberg, 2010;
- [47] J. Lenz, A. S. Edelstein, Magnetic sensors and their applications, *IEEE Sensors Journal*, 2006, 6, 631 – 649;
- [48] G. Harsanyi, *Sensors in Biomedical Applications: Fundamentals, Technology and Applications*, CRC Press, USA, 2000;
- [49] J.D. Newman, S.J. Setford, Enzymatic biosensors, *Molecular Biotechnology*, 2006, 32, 249 – 268;
- [50] L. Su, W. Jia, C. Hou, Y. Lei, Microbial biosensors: A review, *Biosensors and Bioelectronics*, 2011, 26, 1788 – 1799;
- [51] X. Zeng, Z. Shen, R. Mernaugh, Recombinant antibodies and their use in biosensors, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012, 402, 3027 – 3038;
- [52] E-H. Yoo, S-Y. Lee, Glucose Biosensors: An Overview of Use in Clinical Practice, *Sensors*, 2010, 10, 4558 – 4576;

- [53] B.J. Privett, J.H. Shin, M.H. Schoesfisch, Electrochemical nitric oxide sensors for physiological measurements, *Chemical Society Reviews*, 2010, 39, 1925 – 1935;
- [54] A. Lewenstam, M. Maj – Zurawska, A. Hulanicki, Application of ion-selective electrodes in clinical analysis, *Electroanalysis*, 1991, 3, 727 – 734;
- [55] J. Li, S. Li, C. F. Yang, Electrochemical Biosensors for Cancer Biomarker Detection, *Electroanalysis*, 2012, 24, 2213 – 2229;
- [56] T. Scheper, Biosensors for process monitoring, *Journal of Industrial Microbiology*, 1992, 9, 163 – 172;
- [57] M. Mutlu, *Biosensors in Food Processing, Safety, and Quality Control*, CRC Press, USA, 2010;
- [58] S. Rodriguez – Mozaz, M–P. Marco, M.J. Lopez de Alda, D. Barceló, Biosensors for environmental applications: Future development trends, *Pure Applied Chemistry*, 2004, 76, 723 – 752;
- [59] M.D. Trevan, Enzyme immobilization by adsorption, *Methods in Molecular Biology*, 1988, 3, 481 – 489;
- [60] C.P. Govarthan, Crosslinking of enzymes for improved stability and performance, *Current Opinion in Biotechnology*, 1999, 10, 331 – 335;
- [61] S. Cosnier, C. Mousty, C. Gondran, A. Lepellec, Entrapment of enzyme within organic and inorganic materials for biosensor applications: comparative study, *Materials Science and Engineering: C*, 2006, 26, 442 – 447;
- [62] T.M.S. Chang, Semipermeable Microcapsules, *Science*, 1964, 1, 524 – 525;
- [63] U. Hanefeld, L. Gardossi, E. Magner, Understanding enzyme immobilisation, *Chemical Society Reviews*, 2009, 38, 453 – 468;
- [64] D. Müller, Studien on enzyme glucoseoxydase, *Biochemische Zeitschrift*, 1928, 199, 136 – 170;
- [65] Z. Bernhauer, *Physiological Chemistry*, 1928, 177, 86 – 106;
- [66] F.F. Nord, W. Engel, Enzymatische Umsetzungen durch Fusarien: Beitrag zum Mechanismus der alkoholischen Gährung, *Biochemische Zeitschrift*, 1938, 296, 153 – 170;
- [67] W. Franke, F. Lorenz, Zur Kenntnis der sog. Glucose – oxydase, *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 1937, 523, 1 – 28;
- [68] D. Keilin, E.F. Hartree, Properties of glucose oxidase (notatim), *Biochemical Journal*, 1948, 42, 221 – 229;



- [69] K. Kusai, I. Sekuzu, B. Hagihara, K. Okunuki, S. Yamauchi, M. Nakai, Crystallization of glucose oxidase from *Penicillium amagasakiense*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1960, 40, 555 – 557;
- [70] J.H. Pazur, K. Kleppe, E.M. Ball, The glycoprotein nature of some fungal carbohydrates, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1963, 103, 515 – 516;
- [71] D.S. Goodsell, Glucose oxidase. Molecule of the month: PCSB, 2006, Protein Data Bank;
- [72] R. Wilson, A.P.F. Turner, Glucose oxidase: an ideal enzyme, *Biosensors & Bioelectronics*, 1992, 7, 165 – 185;
- [73] S.B. Bankar, M.V. Bule, R.S. Singhal, L. Ananthanarayan, Glucose oxidase – An overview, *Biotechnology Advances*, 2009, 27, 489 – 501;
- [74] G. Kupryszewski, “Wstęp do chemii organicznej”, Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa, 1983;
- [75] P. Finch, „Carbohydrates: Structures, syntheses and dynamics”, Kluwer Academic Publishers, Wielka Brytania, 1999;
- [76] F.W. Schenck, Glucose and Glucose-Containing Syrups. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH, Niemcy, 2006;
- [77] W.J. Marshall, W.J. Marshall (Ph. D.), S. K. Bangert, *Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects*, Churchill Livingstone, Wielka Brytania, 2008;
- [78] J. Wang, Electrochemical Glucose Biosensors, *Chemical Reviews*, 2008, 108, 814 – 825;
- [79] F.W. Scheller, F. Schubert, B. Neumann, D. Pfeiffer, R. Hintsche, I. Dransfeld, U. Wollenberger, R. Renneberg, A. Warsinke, G. Johansson, Second generation biosensors, *Biosensors and Bioelectronics*, 1991, 6, 245 – 253;
- [80] M. Canoa, J.L. Ávila, M. Mayénb, M.L. Menac, J. Pingarrónc, R. Rodríguez-Amaroa, A new, third generation, PVC/TTF–TCNQ composite amperometric biosensor for glucose determination, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2008, 615, 69 – 74;
- [81] L.C. Clark Jr., C. Lyons, Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1962, 102, 29 – 45;
- [82] K.M. West, J.H. Stein, T.J. Sanders, Dextrostix estimates of blood glucose in mass screening for diabetes, *American Journal of Public Health and Nation's Health*, 1966, 56, 2059 – 2065;

- [83] S.J. Updike, G.P. Hicks, The enzyme electrode, *Nature*, 1967, 214, 986 – 988;
- [84] G.G. Guilbault, J.G. Lubrano, An enzyme electrode for the amperometric determination of glucose, *Analytical Chimica Acta*, 1973, 64, 439 – 455;
- [85] D.A. Gough, J.Y. Lucisano, P.H.S. Tse, Two-dimensional enzyme electrode sensor for glucose, *Analytical Chemistry*, 1985, 57, 2351 – 2357;
- [86] A.E. Cass, G. Davis, G.D. Francis, H.A. Hill, W.J. Aston, I.J. Higgins, E.V. Plotkin, L.D. Scott, A.P. Turner, Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose, *Analytical Chemistry*, 1984, 56, 667 – 671;
- [87] T.J. Ohara, R. Rajagopalan, A. Heller, "Wired" Enzyme Electrodes for Amperometric Determination of Glucose or Lactate in the Presence of Interfering Substances, *Analytical Chemistry*, 1994, 66, 2451 – 2457;
- [88] A. Salimi, R.G. Compton, R. Hallaj, Glucose biosensor prepared by glucose oxidase encapsulated sol-gel and carbon-nanotube-modified basal plane pyrolytic graphite electrode, *Analytical Biochemistry*, 2004, 333, 49 – 56;
- [89] S. Thibault, H. Aubriet, C. Arnoult, D. Ruch, Gold nanoparticles and a glucose oxidase based biosensor: an attempt to follow-up aging by XPS, *Microchimica Acta*, 2008, 163, 211 – 217;
- [90] G.F. Khan, M. Ohwa, W. Wernet, Design of a stable charge transfer complex electrode for a third-generation amperometric glucose sensor, *Analytical Chemistry*, 1996, 68, 2939 – 2945;
- [91] G. Jönsson, L. Gorton, An amperometric glucose sensor made by modification of a graphite electrode surface with immobilized glucose oxidase and adsorbed mediator, *Biosensors*, 1985, 1, 355 – 368;
- [92] W. Kerner, H. Zier, G. Steinbach, J. Brückel, E.F. Pfeiffer, T. Weiss, K. Cammann, H. Planck, A potentially implantable enzyme electrode for amperometric measurement of glucose, *Hormone and Metabolic Research. Supplement*, 1988, 20, 8 – 13;
- [93] P.C. Pandey, A.M. Kayastha, V. Pandey, Amperometric enzyme sensor for glucose based on graphite paste-modified electrodes, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1992, 33, 139 – 144;
- [94] J. Zhu, C. Tian, W. Wu, J. Wu, H. Zhang, D. Lu, G. Zhang, Fabrication and characterization of glucose sensors based on a microarray H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> electrode, *Biosensors and Bioelectronics*, 1994, 9, 295 – 300;

- [95] B. Wang, B. Li, Q. Deng, S. Dong, Amperometric Glucose Biosensor Based on Sol–Gel Organic–Inorganic Hybrid Material, *Analytical Chemistry*, 1998, 70, 3170 – 3174;
- [96] R. Garjonyte, A. Malinauskas, Amperometric glucose biosensor based on glucose oxidase immobilized in poly(o-phenylenediamine) layer, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 1999, 56, 85 – 92;
- [97] J. Fei, Y. Wu, X. Ji, J. Wang, S. Hu, Z. Gao, An Amperometric Biosensor for Glucose Based on Electrodeposited Redox Polymer/Glucose Oxidase Film on a Gold Electrode, *Analytical Sciences*, 2003, 19, 1259 – 1263;
- [98] H. Tang, J. Chen, S. Yao, L. Nie, G. Deng, Y. Kuang, Amperometric glucose biosensor based on adsorption of glucose oxidase at platinum nanoparticle-modified carbon nanotube electrode, *Analytical Biochemistry*, 2004, 331, 89 – 97;
- [99] D. Shan, Y. He, S. Wang, H. Xue, H. Zheng, A porous poly(acrylonitrile-co-acrylic acid) film-based glucose biosensor constructed by electrochemical entrapment, *Analytical Biochemistry*, 2006, 356, 215 – 221;
- [100] J. Wu, Y. Qu, Mediator-free amperometric determination of glucose based on direct electron transfer between glucose oxidase and an oxidized boron-doped diamond electrode, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2006, 385, 1330 – 1335;
- [101] Y.C. Tsai, S.C. Li, S.W. Liao, Electrodeposition of polypyrrole–multiwalled carbon nanotube–glucose oxidase nanobiocomposite film for the detection of glucose, *Biosensors and Bioelectronics*, 2006, 22, 495 – 500;
- [102] H.J. Wang, C.M. Zhou, H. Peng, H. Yu, Glucose biosensor based on platinum nanoparticles supported sulfonated-carbon nanotubes modified glassy carbon electrode, *International Journal of Electrochemical Science*, 2007, 2, 508 – 516;
- [103] R. Liang, J. Jiang, J. Qiu, An amperometric glucose biosensor based on titania sol-gel/prussian blue composite film, *Analytical Sciences*, 2008, 24, 1425 – 1430;
- [104] J. Lu, I. Do, L.T. Drzal, R.M. Worden, I. Lee, Nanometal-decorated exfoliated graphite nanoplatelet based glucose biosensors with high sensitivity and fast response, *ACS Nano*, 2008, 2, 1825 – 1832;
- [105] Z. Wang, S. Liu, P. Wu, C. Cai, Detection of glucose based on direct electron transfer reaction of glucose oxidase immobilized on highly ordered polyaniline nanotubes, *Analytical Chemistry*, 2009, 81, 1638 – 1645;

- [106] C. Shan, H. Yang, D. Han, Q. Zhang, A. Ivaska, L. Niu, Graphene/AuNPs/chitosan nanocomposites film for glucose biosensing, *Biosensors and Bioelectronics*, 2010, 25, 1070 – 1074;
- [107] P. Si, P. Kannan, L. Guo, H. Son, D.H. Kim, Highly stable and sensitive glucose biosensor based on covalently assembled high density Au nanostructures, *Biosensors and Bioelectronics*, 2011, 26, 3845 – 3851;
- [108] J. Li, R. Yuan, Y. Chai, X. Che, W. Li, Construction of an amperometric glucose biosensor based on the immobilization of glucose oxidase onto electrodeposited Pt nanoparticles-chitosan composite film, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2012, 35, 1089 – 1095;
- [109] G. Aydođdu, D.K. Zeybek, ř. Pekyardımcı, E. Kılıç, A novel amperometric biosensor based on ZnO nanoparticles-modified carbon paste electrode for determination of glucose in human serum, *Artificial Cells Nanomedicine and Biotechnology*, 2013, 5, 332 – 338;
- [110] H. Wang, H. Ohnuki, H. Endo, M. Izumi, Impedimetric and amperometric bifunctional glucose biosensor based on hybrid organic-inorganic thin films, *Bioelectrochemistry*, 2014, 101, 1 – 7;
- [111] W.S. Hoffman, A rapid photometric method for the determination of glucose in blood and urine, *Journal of Biological Chemistry*, 1937, 120, 51 – 55;
- [112] S.R. Benedict, A reagent for the detection of reducing sugars, *The Journal of Biological Chemistry*, 1909, 5, 485 – 487;
- [113] H. Fehling, Die quantitative Bestimmung von Zucker und Stärkmehl mittelst Kupfervitriol, *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 1849, 72, 106 – 113;
- [114] F.S. Randles, W.K. Griggs, Estimation of blood sugar by the Folin-Wu method using 0.1 c.c. of blood, *The Journal of the American Medical Association*, 1924, 82, 684 – 686;
- [115] M. Somogyi, A reagent for the copper-iodometric determination of very small amounts of sugar, *The Journal of Biological Chemistry*, 1937, 117, 771 – 776;
- [116] N. Nelson, A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose, *The Journal of Biological Chemistry*, 1944, 153, 375 – 380;
- [117] M.E. Brown, M.S. Boston, Ultra-micro Sugar Determinations Using 2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline Hydrochloride (Neocuproine), *American Diabetes Association*, 1961, 10, 60 – 62;

- [118] P.A. Shaffer, A.F. Hartmann, The Iodometric Determination of Copper and Copper Sulfate and Potassium Iodide, *The Journal of Biological Chemistry*, 1921, 45, 349 – 364;
- [119] M. Somogyi, , Notes on sugar determination, *The Journal of Biological Chemistry*, 1926, 70, 599 – 612;
- [120] H.C. Hagedorn, B.N. Jensen, Zur Mikrobestimmung des Blutzuckers mittels Ferricyanid, *Biochemische Zeitschrift*, 1923, 135, 46 – 58;
- [121] K.M. Dubowski, An o-toluidine method for body fluid glucose determination, *Clinical Chemistry*, 1962, 8, 215 – 235;
- [122] J.H. Roe, The determination of sugar in blood and spinal fluid with anthrone reagent, *The Journal of Biological Chemistry*, 1955, 212 335 – 343;
- [123] A. Saifer, S. Gerstenfeld, The photometric microdetermination of blood glucose with glucose oxidase, *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 1958, 51, 448 – 460;
- [124] P. Trinder, Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen, *Journal of Clinical Pathology*, 1969, 22, 158 – 161;
- [125] E.P. Przybyłowicz, A.G. Millikan, Integral analytical element, US Patent 3, 992, 158, 1976;
- [126] R.J.L. Bondar, D.C. Mead, Evaluation of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *leuconostoc mesenteroides* in the hexokinase method for determining glucose in serum, *Clinical Chemistry*, 1974, 20, 586 – 590;
- [127] H.J. Strecker, S. Korkes, Glucose dehydrogenase, *The Journal of Biological Chemistry*, 1952, 196, 769 – 784;
- [128] W. Szczepaniak, *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2004;
- [129] A. Cygański, *Metody elektroanalityczne*, Wydawnictwa Naukowo – Techniczne, Warszawa, 1995;
- [130] H. Scholl, T. Błaszczuk, P. Krzyczmonik, *Elektrochemia: zarys teorii i praktyki*, Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź, 1998;
- [131] F. Scholz, *Electroanalytical Methods Guide to Experiments and Applications*, Chapter II.2, Z. Stojek, Pulse Voltammetry, Springer, Heidelberg, 2010;
- [132] J. Wang, *Analytical Electrochemistry*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 2006;
- [133] L. Sommer, *Analytical Absorption Spectrophotometry in the Visible and Ultraviolet: The Principles*, Elsevier, Amsterdam, 1989;

- [134] A. Cygański, *Metody spektroskopowe w chemii analitycznej*, Wydawnictwa Naukowo – Techniczne, Warszawa, 1993;
- [135] F.J. Giessibl, *Advances in atomic force microscopy*, *Reviews of Modern Physics*, 2003, 75, 949 – 983;
- [136] B. Ren, J.L. Yao, C.X. She, Q.J. Huang, Z.Q. Tian, *Surface Raman Spectroscopy on Transition Metal Surfaces*, *The Internet Journal of Vibrational Spectroscopy*, 2000, 4, 2, 4;
- [137] O.A. Raitman, E. Katz, A.F. Bückmann, I. Willner, *Integration of polyaniline/poly(acrylic acid) films and redox enzymes on electrode supports: an in situ electrochemical/surface plasmon resonance study of the bioelectrocatalyzed oxidation of glucose or lactate in the integrated bioelectrocatalytic systems.*, *Journal of the American Chemical Society*, 2002, 124, 6487 – 6496;
- [138] A. Tiraferri, M. Elimelech, *Direct quantification of negatively – charged functional groups on membrane surfaces*, *Journal of Membrane Science*, 2012, 499 – 508;
- [139] Z. Li, E. Kang, K. Neoh, K. Tan, *Covalent immobilization of glucose oxidase on the surface of polyaniline films graft copolymerized with acrylic acid*, *Biomaterials*, 1998, 19, 45 – 53;
- [140] E.A. Kulik, K. Kato, M.I. Ivanchenko, Y. Ikada, *Trypsin immobilization on to polymer surface through grafted layer and its reaction with inhibitors*, *Biomaterials*, 1993, 14, 763 – 769;
- [141] F. Palmisano, P.G. Zambonin, *Ascorbic acid interferences in hydrogen peroxide detecting biosensors based on electrochemically immobilized enzymes*, *Analytical Chemistry*, 1993, 65, 2690 – 2692;
- [142] H.U. Bergmeyer, E. Bernt, *Methods of Enzymatic Analysis*, Second Edition, str. 1205 – 1212, 1974, New York: Academic Press Inc..
- [143] A. Domínguez, A. Fernández, N. González, E. Iglesias, L. Montenegro, *Determination of critical micelle concentration of some surfactants by three techniques*, *Journal of Chemical Education*, 1997, 74, 1227 – 1230.
- [144] A.M. Khan, S.S. Shah, *Determination of critical micelle concentration (CMC) of sodium dodecyl sulfate (SDS) and the effect of low concentration of pyrene on its CMC using ORIGIN software*, *Journal of Chemical Society of Pakhistan*, 2008, 30, 186 – 191.

- [145] J. Zhang, S.J. Severtson, C.J. Houtman, Characterizing the distribution of sodium alkyl sulfate surfactant homologues in water-based, acrylic pressure-sensitive adhesive films, *Journal of Physical Chemistry B*, 2011, 115, 8138 – 8144.
- [146] M. Marquez, B.P. Grady, The use of surface tension to predict the formation of 2D arrays of latex spheres formed via the Langmuir-Blodgett-like technique, *Langmuir*, 2004, 20, 10998 – 11004.
- [147] W. Brown, J. Zhao, Interactions between sodium dodecyl sulfate and styrene-butadiene copolymer latex particles with carboxyl groups studied using dynamic light scattering and electrophoretic mobility measurements, *Langmuir*, 1994, 10, 3395 – 3401.
- [148] S. Iakovenko, A. Trifonov, M. Giersig, A. Mamedov, D. Naguesha, V. Hanin, E. Soldatov, N. Kotov, One- and two-dimensional arrays of magnetic nanoparticles by the Langmuir–Blodgett technique, *Advanced Materials*, 1999, 11, 388 – 392.
- [149] D. Menshykau, R.G. Compton, The influence of electrode porosity on diffusional cyclic voltammetry, *Electroanalysis*, 2008, 20, 2387 – 2394.
- [150] Ch. Punckt, M.A. Pope, J. Liu, Y. Lin, I.A. Aksay, Electrochemical performance of graphene as effected by electrode porosity and graphene functionalization, *Electroanalysis*, 2010, 22, 2834 – 2841.
- [151] R. de Levie, Electrochemical responses of porous and rough electrodes, *Advances in Electrochemistry and Electrochemical Engineering*, 1967, 6, 329 – 397.
- [152] J-P. Candy, P. Fouilloux, M. Keddou, H. Takenouti, The characterization of porous electrodes by impedance measurements, *Electrochimica Acta*, 1981, 27, 1029 – 1034.
- [153] H. Keiser, K.D. Beccu, M.A. Gutjahr, Abschätzung der Porenstruktur poröser Elektroden aus Impedanzmessungen, *Electrochimica Acta*, 1976, 21, 539 – 543.
- [154] H-K. Songa, Y-H. Jungb, K-H. Lee, L.H. Dao, Electrochemical impedance spectroscopy of porous electrodes: the effect of pore size distribution, *Electrochimica Acta*, 1999, 44, 3513 – 3519.

# **STRESZCZENIE**



## VI. Streszczenie

Celem prowadzonych badań było sprawdzenie możliwości otrzymania biosensora dającego odpowiedź na zmieniające się stężenie D – glukozy. Zdając sobie sprawę z tego, jak wiele zagadnień wiąże się z tym tematem, postanowiłam przystąpić do realizacja założonego celu wyznaczając szereg etapów pośrednich.

Pierwszy etap polegał na modyfikacji powierzchni elektrody platynowej kompozytem na bazie poli(3,4 – etylenodioksytiofenu). Musiał on spełniać dwa podstawowe warunki, tj. przewodzić prąd elektryczny oraz posiadać dostępne na swojej powierzchni wolne grupy karboksylowe. Aby spełnić podane warunki drugi składnik kompozytu stanowił odpowiednio kwas poliakrylowy lub kwas antranilowy. Finalnym efektem tej części badań były dwie elektrody modyfikowane kompozytami (PEDOT+PAA)/PSSLi oraz PEDOT/(PEDOT+AA)/PSSH. Warto wspomnieć, że o ile pierwszy kompozyt pojawia się w literaturze w podobnej konfiguracji to drugi z prezentowanych kompozytów nie był wcześniej opisany. Dane dotyczące tego etapu przedstawia tabela 6.

	Kompozyt A	Kompozyt B
<b>Polimer bazowy</b>	EDOT	EDOT
<b>Drugi składnik kompozytu</b>	kwas poliakrylowy (PAA)	kwas antranilowy (AA)
<b>Substancja domieszkująca</b>	sól litowa kwasu poli(4-styrenosulfonowego) (PSSLi)	PSSLi, kwasu poli(4-styrenosulfonowy) (PSSH)
<b>Ilość warstw</b>	I warstwa	II warstwy
<b>Metoda otrzymywania</b>	elektroliza przy stałym potencjale	elektroliza przy stałym potencjale, woltamperometria cykliczna
<b>Parametry otrzymywania</b>	$E=1V$ , $t=3s$	$E=1V$ , $t=5s$ ; $E=-0,4 \div 1,2V$ , $v=20mV/s$ , $n=1$
<b>Skład roztworu polimeryzacyjnego</b>	$0,1mol \cdot L^{-1}$ EDOT $+15mg \cdot mL^{-1}$ PAA $+0,1mol \cdot L^{-1}$ PSSLi	$0,01mol \cdot L^{-1}$ EDOT $+0,01mol \cdot L^{-1}$ AA $+0,1mol \cdot L^{-1}$ PSSH
<b>Przewodnictwo</b>	przewodzi prąd elektryczny	przewodzi prąd elektryczny
<b>Obecność wolnych grup karboksylowych</b>	wolne grupy -COOH	wolne grupy -COOH

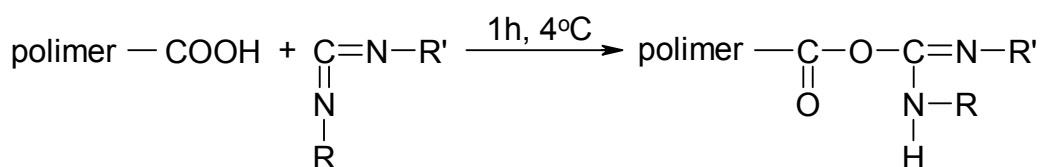
Tabela 6. Porównanie dwóch kompozytów modyfikujących elektrodę Pt.

Główną cechą łączącą oba kompozyty jest podstawowy materiał, z jakiego je otrzymywano, czyli polimer przewodzący poli(3,4 – etylenodioksytiofen). Należy on do grupy polimerów dobrze poznanych, kolejną jego zaletą jest szybki i łatwy do kontroli proces polimeryzacji oraz co najistotniejsze przewodzi on prąd elektryczny zarówno

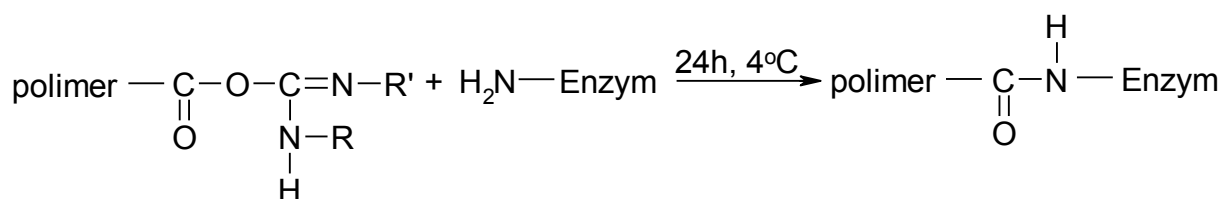
w środowisku kwaśnym jak i obojętnym. Oba obiekty różnią się natomiast drugim składnikiem kompozytu. Musiał on tworzyć wraz z polimerem kompozyt przewodzący oraz oferować na powierzchni dostępność do wolnych grup karboksylowych. Założenia te spełnia zarówno kwas poliakrylowy jak i kwas antranilowy. Uwagę zwraca również ilość warstw otrzymywanych w procesie modyfikacji. Kompozyt A zbudowany jest z jednej warstwy, natomiast kompozyt B składa się z dwóch warstw. Dalsze różnice w dwóch kompozytach wynikają między innymi z liczby warstw modyfikujących. Substancją domieszkującą powstający kompozyt jest PSSLi lub PSSLi oraz PSSH. Oba kompozyty zostały otrzymane przy zastosowaniu różnych technik elektrochemicznych, takich jak elektroliza stałopotencjałowa oraz woltamperometria cykliczna, a co się z tym wiąże różne były także parametry w jakich je otrzymano oraz skład roztworów użytych do polimeryzacji. Zgodnie z oczekiwaniami najlepszym związkiem domieszkującym powstający kompozyt okazał się PSSLi. Zapewnia on wysokie przewodnictwo na stałym poziomie i trwałość otrzymanego kompozytu. Na osiągnięcie najlepszych rezultatów pozwala polimeryzacja warstwy kompozytu przy stężeniu PSSLi równym 0,1 oraz 0,25 mol·L<sup>-1</sup>. Warstwy te charakteryzują się wysokimi wartościami natężenia prądu utleniania oksydazy glukozowej oraz długim czasem aktywności unieruchomionego enzymu.

Warto zwrócić uwagę, iż pomimo istotnych różnic bardzo ważne są elementy łączące oba kompozyty. Oba z nich przewodzą prąd elektryczny, a także oba charakteryzuje obecność wolnych grup karboksylowych, niezwykle ważna z punktu widzenia późniejszej immobilizacji.

Drugim etapem prowadzonych pomiarów było unieruchomienie na powierzchni zmodyfikowanych kompozytami elektrod oksydazy glukozowej (GOD) według procedury opracowanej przeze mnie na bazie informacji literaturowych. Immobilizacja enzymu nastąpiła poprzez wytworzenie wiązania kowalencyjnego pomiędzy GOD a kompozytem. Do tego celu posłużyły obecne na powierzchni wolne grupy karboksylowe. Proces immobilizacji obejmował trzy etapy. Pierwszy z nich polegał na przyłączeniu WSC do wolnych grup karboksylowych, a następnie do całości przyłączana była oksydaza glukozowa. Etap trzeci to odmycie niezwiązanych cząsteczek GOD. Schemat tego procesu znajduje się na rysunkach 51 oraz 52:



Rys. 51. Schemat pierwszego etapu w procesie unieruchomienia oksydazy glukozowej, polegający na utworzeniu wiązania kowalencyjnego pomiędzy WSC a wolnymi grupami karboksylowymi na powierzchni elektrody.



Rys. 52. Schemat drugiego etapu unieruchomienia oksydazy glukozowej, polegający na utworzeniu wiązania kowalencyjnego pomiędzy związanym z elektrodą WSC a GOD.

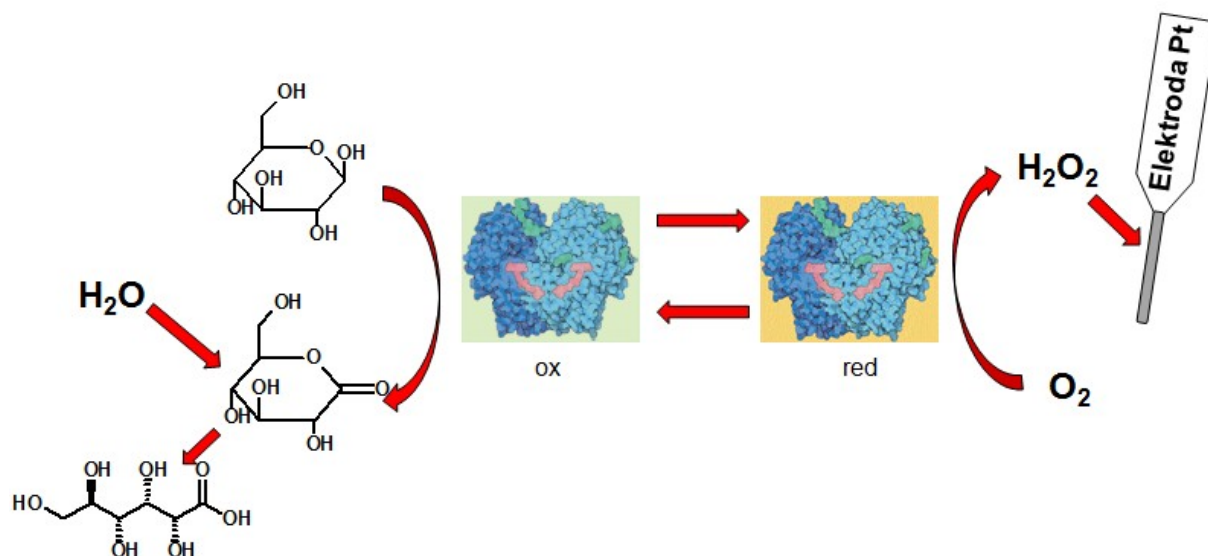
Parametry procesu immobilizacji zostały zestawione w tabeli 8.

Proces immobilizacji					
Etap	t [h]	Reakcja	Związek chemiczny	c [mg·mL <sup>-1</sup> ]	Roztwór
I	1	przyłączenie	WSC	5	PBS
II	24	przyłączenie	GOD	4	PBS + CaCl <sub>2</sub>
III	1	odmycie	-	-	PBS + CaCl <sub>2</sub>

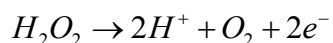
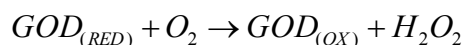
Tabela 8. Podsumowanie parametrów procesu immobilizacji oksydazy glukozowej.

Aktywność unieruchomionej oksydazy glukozowej została potwierdzona spektrofotometrycznie według procedury z wykorzystaniem o – dianizydyny opisanej w rozdziale 5.2.

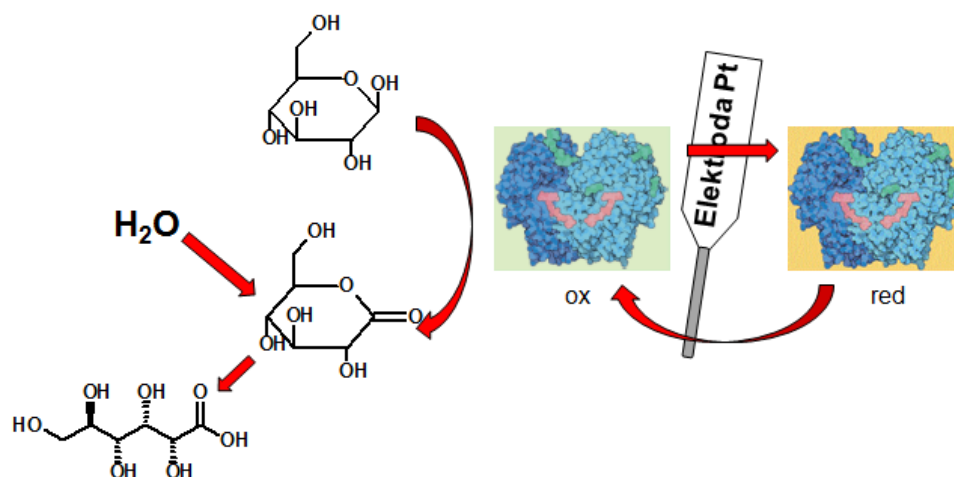
Otrzymane elektrody mogły pracować zarówno jako sensory I generacji (Rys. 25 i 26) jak i III generacji (Rys. 29 i 30).



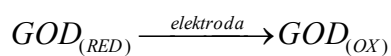
Rys. 25. Schemat działania biosensora glukozy pierwszej generacji.



Rys. 26. Równania reakcji zachodzących podczas pracy biosensora pierwszej generacji.



Rys. 29. Schemat działania biosensora glukozy trzeciej generacji.



Rys. 30. Równania reakcji zachodzących podczas pracy biosensora trzeciej generacji.

W kolejnym etapie zoptymalizowałam proces immobilizacji oksydazy glukozowej, oceniając między innymi wpływ stężenia WSC i GOD oraz wpływ rodzaju i stężenia odczynnika domieszkującego na aktywność jak również stabilność otrzymanego biosensora. Optymalne wartości parametrów przedstawiłam w tabeli 18.

<b>Optymalne parametry otrzymania biosensora</b>	
<b>Polimer bazowy kompozytu</b>	PEDOT
<b>Drugi składnik kompozytu</b>	PAA lub AA
<b>Grubość warstwy</b>	umiarkowana
<b>Substancja domieszkująca</b>	PSSLi lub PSSLi + PSSH
<b>Stężenie substancji domieszkującej [<math>\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}</math>]</b>	0,1
<b><math>c_{\text{WSC}}</math> [<math>\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}</math>]</b>	5
<b><math>c_{\text{GOD}}</math> [<math>\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}</math>]</b>	4

Tabela 18. Podsumowanie optymalizacji procesu otrzymywania biosensora glukozy.

Wszystkie z prowadzonych pomiarów zarówno spektrofotometryczne, woltamperometryczne jak i amperometryczne wykazały, że każde odstępstwo od wartości optymalnych powoduje spadek aktywności enzymu, a co za tym idzie obniżenie mierzonych wartości natężenia prądu. Przygotowane biosensory wykazywały długi czas aktywności unieruchomionego enzymu, co znalazło odzwierciedlenie w porównywalnych wartościach mierzonego natężenia prądu w okresie około 30 dni.

Następnie dokonałam charakterystyki otrzymanych biosensorów glukozy pracujących zarówno jako sensory I jak i III generacji. W tabeli 29 przedstawiłam zestawienie parametrów walidacji.

	Sensory I generacji	
	Biosensor A	Biosensor B
<b>Zakres liniowości</b> [mmol·L <sup>-1</sup> ]	0,98 ÷ 30,00	1,86 ÷ 30,00
<b>R<sup>2</sup></b>	0,997	0,993
<b>LOD</b> [mmol·L <sup>-1</sup> ]	0,29	0,56
<b>LOQ</b> [mmol·L <sup>-1</sup> ]	0,98	1,86

Tabela 29. Zestawienie parametrów walidacji dla obu elektrod

Niestety, parametry pracy prezentowanego biosensora III generacji nie spełniały warunków walidacji metody, zrezygnowałam z ich oceny statystycznej oraz dalszego wykorzystywania tych obiektów.

W przypadku biosensorów I generacji przeprowadziłam pełną walidację otrzymanych elektrod. Przede wszystkim można zauważyć różnice w zakresach liniowości pomiędzy biosensorem A oraz biosensorem B. Uwagę zwracają też bardzo dobre wartości współczynnika korelacji R<sup>2</sup>. Biosensory glukozy I generacji wydają się być odpowiednie do badań próbek pochodzenia naturalnego.

Ponadto określiłam wpływ stężenia kwasu askorbinowego jako interferenta na działanie otrzymanych biosensorów oraz na jakość prowadzonych oznaczeń stężenia D – glukozy. Niestety nawet niewielki dodatek wpływa na podwyższenie wartości prądowych. Dalsze zwiększanie zawartości kwasu askorbinowego w roztworze powoduje nie tylko drastyczny wzrost wartości natężenia, dodatkowo pojawiają się zmiany wszystkich parametrów krzywej oraz zawężony zostaje zakres jej liniowości. W przypadku tych biosensora można prowadzić oznaczenie D – glukozy w obecności kwasu askorbinowego pod warunkiem, że jego stężenie nie przekroczy  $c = 0,1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  w stosunku do glukozy o stężeniu  $c = 15 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , będzie na stałym poziomie oraz po wcześniejszej kalibracji biosensora w obecności kwasu askorbinowego.

Istotnym etapem było zastosowanie obu otrzymanych sensorów I generacji do oznaczenia stężenia D – glukozy w próbkach pochodzenia naturalnego takich jak sok jabłkowy, napój winogronowy, napój energetyczny i miód. Uzyskane wyniki wraz z wynikami zarejestrowanymi metodą referencyjną przedstawiłam w tabeli 46.

Próbka	$c_{\text{glukozy}} [\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}]$		$c_{\text{referencyjne}} [\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}]$
	Biosensor A	Biosensor B	
Sok jabłkowy	$0,33 \pm 0,03$	$0,35 \pm 0,02$	$0,134 \pm 0,006$
Napój winogronowy	$0,318 \pm 0,004$	$0,32 \pm 0,02$	$0,313 \pm 0,002$
Napój energetyczny	$0,43 \pm 0,03$	$0,42 \pm 0,04$	$0,511 \pm 0,004$
Miód	$3,14 \pm 0,15$	$3,28 \pm 0,35$	$3,399 \pm 0,020$

Tabela 46. Porównanie wartości stężeń D – glukozy dla obu biosensorów i metody referencyjnej dla próbek pochodzenia naturalnego.

Jak widać wartości stężeń zmierzone za pomocą obu biosensorów są do siebie zbliżone. Ponadto w przypadku napoju winogronowego i miodu wynik ten jest porównywalny z wartością uzyskaną dla metody referencyjnej. Dla soku jabłkowego stężenie uzyskane metodą referencyjną jest znacznie niższe niż stężenie zmierzone przy pomocy biosensorów. Moim zdaniem różnica ta wynika z większej wrażliwości biosensorów na obecność kwasu askorbinowego, który w soku jabłkowym jest używany, jako przeciwutleniacz. Wyższa wartość stężenia D – glukozy w napoju energetycznym określona metodą referencyjną w porównaniu z biosensorami jest najprawdopodobniej związana z czasem trwania pomiaru. Stwierdziłam w czasie badań, iż produkty tego typu są bardzo wrażliwe na kontakt z atmosferą oraz promieniami słonecznymi, na co narażone są po otwarciu opakowania. W metodzie spektrofotometrycznej ekspozycja ta wynosi aż 30 minut, podczas gdy dla biosensora jest to około 5 minut, co stanowi istotną różnicę. Ostatnim etapem prac było otrzymanie elektrod typu plaster miodu, które stanowią bardzo ciekawy i dobry punkt wyjścia do przyszłych badań mających na celu zwiększenie czułości i miniaturyzację biosensora glukozy. Elektrody te cechują się bardzo dobrymi parametrami fizykochemicznymi. Parametry dla elektrod mikrostrukturalnych typu plaster miodu zestawiałam w tabeli 49.

	Elektroda 1	Elektroda 2	Elektroda 3
<b>Elektrochemiczna aktywacja</b>	1 mol·L <sup>-1</sup> HClO <sub>4</sub> , E=-0,25 ÷ 1,6V, v=200mV/s, n=100		
<b>Nakładanie matrycy</b>	0,46 μm kulki PS; 4% PS w 0,04 mol·L <sup>-1</sup> SDS (t=10 minut), roztwór zalewający 0,04 mol·L <sup>-1</sup> SDS, kąt nachylenia 60 <sup>o</sup> , szybkość zlewania 0,1 mL·s <sup>-1</sup>		
<b>Polimer bazowy</b>	EDOT		
<b>Drugi składnik kompozytu</b>	-	kwasy poliakrylowy (PAA)	kwasy antranilowy (AA)
<b>Substancja domieszkująca</b>	sól litowa kwasu poli(4-styrenosulfonowego) (PSSLi)		kwasy poli(4-styrenosulfonowy) (PSSH)
<b>Metoda otrzymywania</b>	elektroliza przy stałym potencjale		woltamperometria cykliczna
<b>Parametry otrzymywania</b>	E=1V, t=5s		E=-0,4 ÷ 1,2V, v=20mV/s, n=9
<b>Skład roztworu polimeryzacyjnego</b>	0,01 mol·L <sup>-1</sup> EDOT +0,1 mol·L <sup>-1</sup> PSSLi	0,01 mol·L <sup>-1</sup> EDOT +1,5 mg·mL <sup>-1</sup> PAA +0,1 mol·L <sup>-1</sup> PSSLi	0,005 mol·L <sup>-1</sup> EDOT +0,005 mol·L <sup>-1</sup> AA +0,1 mol·L <sup>-1</sup> PSSH
<b>Usunięcie matrycy</b>	toluen, t=24h, temperatura pokojowa		
<b>Przewodnictwo</b>	+		
<b>Obecność wolnych grup karboksylowych</b>	-	+	
<b>Grubość warstwy [nm]</b>	100 ÷ 120	90 ÷ 100	30
<b>Powierzchnia porów w powierzchni całkowitej [%]</b>	40	35	6
<b>Rozwinięcie powierzchni [%]</b>	47,5	42	5,6
<b>Immobilizacja GOD</b>	-	5 mg·mL <sup>-1</sup> WSC w PBS, t=1h, temperatura= 4 <sup>o</sup> C 4 mg·mL <sup>-1</sup> GOD w PBS+CaCl <sub>2</sub> , t=24h, temperatura=4 <sup>o</sup> C PBS+CaCl <sub>2</sub> , t=1h, temperatura pokojowa	

Tabela 49. Zestawienie parametrów dla elektrod mikrostrukturalnych typu plaster miodu.

Wszystkie z elektrod zostały w całości zmodyfikowane mikrostrukturalną monowarstwą kompozytu typu plaster miodu. Na elektrodzie numer 2 i 3 przebiega immobilizacja oksydazy glukozowej, co potwierdzają odpowiednie testy. Niestety działanie przygotowanych elektrod zarówno jako biosensor I jak i III generacji jest niesatysfakcjonujące i wymaga dalszej optymalizacji.



**SYLWETKA**  
**AUTORA**

**VII. Sylwetka autora**• **Publikacje**

1. P. Krzyczmonik, E. Socha, Sł. Skrzypek, Immobilization of glucose oxidase on modified electrodes with composite layers based on poly(3,4-ethylenedioxythiophene), *Bioelectrochemistry*, 2015, 101, 8 – 13;
2. P. Krzyczmonik, E. Socha, Sł. Skrzypek, K. Soliwoda, G. Celichowski, J. Grobelny, Honeycomb-structured porous poly(3,4-ethylenedioxythiophene) composite layers on a gold electrode, *Thin Solid Films*, 2014, 565, 54 – 61;
3. P. Krzyczmonik, E. Socha, Electrodes modified with composite layers of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) and polyaniline (PANI) for applications in bioelectroanalysis. / Elektrody modyfikowane warstwami kompozytowymi na bazie poli(3,4-etylenodiodoksytiofenu) (PEDOT) i polianiliny (Pani) do zastosowań w bioelektroanalizie, *Chemik*, 2013, 67, 801 – 810;
4. P. Krzyczmonik, E. Socha, Structure, properties and applications of nano- and microstructure electrodes. / Budowa, właściwości i zastosowania Elektrod Nano- i mikrostrukturalnych, *Chemik*, 2015, 69, 11 – 18;
5. E. Socha, P. Krzyczmonik and Sł. Skrzypek, Applicability of Electrodes Modified with Composite Layers of Conducting Polymers in Electro- and Bioelectroanalysis, Sensing in Electroanalysis Vol. 8 (K. Kalcher, R. Metelka, I. Švancara, K. Vytřas; Eds.), 2014, 315 – 328;
6. P. Krzyczmonik, E. Socha, Sł. Skrzypek, Electrochemical detection of glucose in beverage samples using poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-modified electrodes with immobilized glucose oxidase, *Food Analytical Methods*, w recenzji;
7. P. Krzyczmonik, E. Socha, B. Olejniczak, G. Andrijewski, Electrochemical study of platinum electrode modified by composite layer of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) and poly(4-lithium styrene sulfonic acid) for measurements of ascorbic acid oxidation, *Analytical Letters*, w recenzji;

- **Wygłoszone komunikaty**

1. P. Krzyczmonik, G. Andrijewski, E. Socha, Electrodes modified with composite layers of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) and polyaniline (PANI) for applications in bioelectroanalysis, Łódź-Giessen Chemistry Workshop, Łódź, 10 – 14 październik 2012, Materiały, OC – 7, str. 34;
2. P. Krzyczmonik, S. Skrzypek, E. Socha, The applications of electrodes modified with composite layers of conducting polymers in electro- and bioelectroanalysis, 9th Seminar/Workshop on Sensing in Electroanalysis, Pardubice, Czechy, 13 – 16.11.2013;

- **Postery**

1. P. Krzyczmonik, G. Andrijewski, E. Socha, „Elektrody modyfikowane warstwami kompozytowymi na bazie poli(3,4-etylenodioksytyofenu) (PEDOT) i polianiliny (PANI) do zastosowań w bioelektroanalizie.”, 55. Zjazd PTChem i SITPChem, Białystok, 16 – 20 września 2012, Materiały Zjazdowe, S08P08 , str. 342; Nagroda za najlepszy poster;
2. E. Socha, P. Krzyczmonik, S. Skrzypek, J. Grobelny, G. Celichowski, K. Soliwoda, „Opracowanie technologii otrzymywania elektrod mikrostrukturalnych typu „plaster miodu” na bazie kompozytów PEDOT/PAA/PSSLi”, I Łódzkie Sympozjum Doktorantów Chemii, Łódź, 18 – 19 kwietnia 2013, Materiały konferencyjne, Poster nr 20, str. 57;
3. P. Krzyczmonik, E. Socha, S. Skrzypek, J. Grobelny, G. Celichowski, K. Soliwoda, „Metoda otrzymywania mikrostrukturalnych elektrod typu „plaster miodu” na bazie kompozytów PEDOTU do immobilizacji enzymów.”, 56. Zjazd PTChem i SITPChem, Siedlce, 16 – 20 września 2013, Materiały Zjazdowe, S10P10 , str. 565;
4. P. Krzyczmonik, Sł. Skrzypek, E. Socha „Zastosowanie biosensorów glukozy do oznaczeń w próbkach pochodzenia naturalnego” 57 Zjazd PTChem i SITPChem, Częstochowa, 14 – 18 września 2014, Materiały Zjazdowe, S08 – P16, str. 327; Nagroda za najlepszy poster;
5. P. Krzyczmonik, K. Sipa, Sł. Skrzypek, E. Socha „Elektroda z węgla szklanego modyfikowana Poli(3,4-etylenodioksytyofenem) (PEDOT) i wielościennymi nanorurkami węglowymi do oznaczania neuroprzebiegów.” 57 Zjazd PTChem i SITPChem, Częstochowa, 14 – 18 września 2014, Materiały Zjazdowe, S08 – P17, str. 327;

# **PODZIĘKOWANIA**

**VIII. Podziękowania**

Pragnę złożyć serdecznie podziękowania dla:

- dr Sylwii Smarzewskiej za wsparcie finansowe w ramach grantu Uniwersytetu Łódzkiego dla Młodych Naukowców nr 545/726, którego była kierownikiem;
- prof. UŁ, dr hab. Jarosława Grobelnego, prof. UŁ, dr hab. Grzegorza Celichowskiego oraz dr Katarzyny Soliwody za wsparcie w zakresie zobrazowania za pomocą AFM oraz SEM elektrod typu „plaster miodu”;

**WYKAZ  
WZORÓW  
STATYSTYCZNYCH**

**IX. Wykaz wzorów statystycznych****1. SD**

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$x_i$  - kolejna wartość mierzona,

$\bar{x}$  - średnia wartość mierzona,

$n$  - liczba pomiarów;

**2. RSD**

$$RSD = \frac{SD}{\bar{x}}$$

**3. Odzysk**

$$[\%] = 100 + \frac{|c_{\text{wyliczone}} - c_{\text{deklarowane}}|}{c_{\text{deklarowane}}} \cdot 100\%$$

**4. LOD**

$$LOD = \frac{3 \cdot SD_0}{a}$$

$SD_0$  - odchylenie standardowe „ślepej” próby

$a$  - współczynnik kierunkowy krzywej kalibracyjnej

**5. LOQ**

$$LOQ = \frac{10 \cdot SD_0}{a}$$

**6. SE**

$$SE = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

**7. Błąd**

$$Error = SD \cdot t(k\alpha)$$

$k$  - liczba stopni swobody

$\alpha$  - poziom istotności