

Politechnika Poznańska
Wydział Technologii Chemicznej
Instytut Chemii i Elektrochemii Technicznej
Dyscyplina: nauki chemiczne

ROZPRAWA DOKTORSKA

**Nanostrukturalne materiały na bazie wielościennej
nanorurek węglowych oraz pochodnych pirenu do
zastosowań w elektroanalizie i biosensorach**



mgr inż. Amanda Leda
Promotor: dr hab. inż. Tomasz Rębiś

Poznań 2025

Podziękowania

*Serdeczne podziękowania kieruję do mojego
Promotora, dr hab. inż. Tomasza Rębisia,
za nieocenione wsparcie, wiedzę i cierpliwość,
które towarzyszyły mi na każdym etapie pracy
nad rozprawą doktorską. Dziękuję za poświęcony
czas, wartościowe uwagi i życzliwość, które uczyniły tę
pracę lepszą, a moją naukową podróż - bogatszym
doświadczeniem. Okazana pasja i zaangażowanie
są dla mnie źródłem inspiracji i wzorem na przyszłość.*

*Chciałabym również podziękować Panu
dr hab. inż. Grzegorzowi Milczarkowi, prof. PP,
za szereg uwag i wskazówek, które z pewnością
wzbogaciły proces realizacji mojej pracy doktorskiej.*

*Serdecznie dziękuję dr inż. Patrycji Płócienniczak-Bywalskiej,
dr inż. Robertowi Frankowskiemu oraz
mgr inż. Julii Płatkiewicz za Wasze wskazówki
i rady, które podniosły wartość zarówno mojego doktoratu,
jak i powstałej pracy. Jednocześnie Wasza serdeczność
i atmosfera, którą tworzyliście, sprawiły, że cały ten proces
był o wiele przyjemniejszy. Bardzo Wam dziękuję za
to, że zawsze mogłam na Was liczyć.*

*Z całego serca pragnę podziękować moim
Rodzicom, Siostrze oraz Babci i Dziadkowi
za Wasze nieocenione wsparcie, bezwarunkową
miłość i wiarę we mnie, które towarzyszyły
mi na każdym etapie mojego życia. Dziękuję za
Waszą cierpliwość, wyrozumiałość oraz za
nieustające motywowanie mnie do sięgania po więcej.*

WYKAZ SKRÓTÓW

1-AP	—	1-aminopiren
1-APox	—	1-aminopiren-4,5,9,10-tetrol
1-HP	—	1-hidroksypiren
3-MCat	—	3-metoksykatechol
35DNBPpy	—	4-(piren-1-ylo)butylu-3,5-dinitrobenzoesu
AAQ	—	1-amino-9,10-antrachinon
ABTS	—	2,2'-azyno-bis(3-etylo-benzotiazolino-6-sulfonian
AFM	—	Mikroskopia sił atomowych
AG	—	Glikozyd antrachinonowy
AgNPs	—	Nanocząstki srebra
AgSNPs	—	Sferyczne nanocząstki srebra
AuNPs	—	Nanocząstki złota
AuNR	—	Nanopręty złota
ADH	—	Dehydrogenaza alkoholowa
ATP	—	Adenozyno-5'-trifosforan
AQ	—	Antrachinon
BCB	—	4,5-bis(4-chloroanilino)-1,2-benzendiol
BMIM-PF ₆	—	Heksafluorofosforan 1-n-butylo-3-metyloimidazolu
BOx	—	Oksydaza bilirubinowa
BP	—	Buckypaper
Cat	—	Katechol
CND	—	Nanodiamenty
CNT	—	Nanorurki węglowe
CPE	—	Elektroda z pasty węglowej
CPT	—	Kamptotecyna
CTS	—	Chitozan
Cyt c	—	Cytochrom c

CV	–	Woltamperometria cykliczna
CVD	–	Metoda osadzania chemicznego z fazy gazowej
DDS	–	System dostarczania leków
DHFR	–	Enzym reduktazy kwasu dihydrofoliowego
DIA	–	Enzym diaforaza
DMF	–	Dimetyloformamid
DPV	–	Woltamperometria pulsowa różnicowa
DTNB	–	5,5'-Ditiobis(kwas 2-nitrobenzoesowy)
DWCNT	–	Dwuścienne nanorurki węglowe
EIS	–	Elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna
EMS	–	Rozszerzona spektrometria masowa
EP	–	Epinefryna
EPI	–	Rozszerzona spektrometria produktów jonowych
ESI	–	Jonizacja elektroprayowa
ESPR	–	Elektrochemiczny plazmonowy rezonans powierzchniowy
ESS	–	System magazynowania energii
EQCM	–	Elektrochemiczna mikrowaga kwarcowa
FAD	–	Dinukleotyd flawinoadeninowy
FIA	–	Analiza przepływowa
Flu	–	Flufenazyna
fMWCNT	–	Funkcjonalizowane wielościenne nanorurki węglowe
FT-IR	–	Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera
FWHM	–	Pełna szerokość w połowie maksimum (wskaźnik XPS)
GA	–	Glutaraldehyd
GAL	–	Kwas galusowy
GC	–	Elektroda z węgla szklanego

GDH	–	Dehydrogenaza glukozowa
Glu	–	Glukoza
GO	–	Tlenek grafenu
GO _x	–	Oksydaza glukozowa
GR	–	Grafen
HRP	–	Peroksydaza chrzanowa
ILC	–	Ciecze jonowe
IUPAC	–	Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej
Lac	–	Lakaza
LOD	–	Granica wykrywalności
LOQ	–	Granica oznaczalności
LS	–	Lignosulfonian
Med _{ox}	–	Utleniona forma mediatora
Med _{Red}	–	Zredukowana forma mediatora
MFP	–	Średnia droga swobodna elektronu (wskaźnik XPS)
MS	–	Spektrometria masowa
MWCNT	–	Wielościenne nanorurki węglowe
NADH	–	β-nikotynoamidoadeninowy dinukleotyd w formie hydratu zredukowanej soli disodowej
NADP	–	Fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego
NAD ⁺	–	Hydrat dinukleotydu β- nikotynoamidoadeninowego
Nf	–	Nafion
NPG	–	Złoto o strukturze nanoporowatej
NPt	–	Nanocząstki platyny
Os(bpy) ₂ PVI	–	[Os(2,2'-bipirydył) ₂ (poliwinyloimidazol) ₁₀ Cl] ^{+ / 2+}
P3ABA	–	Poli(kwas 3-aminobenzoesowy)
PANI	–	Polianilina

PBA	–	Kwas 1-pirenoboronowy
PB	–	Błękit pruski
PBS	–	Bufor fosforanowy
PCA	–	Poli(kwas kawowy)
PCV	–	Fiolet pirokatecholowy
PDA	–	Polidopamina
PdNPs	–	Nanocząstki palladu
PEDOP	–	Poli(3,4-etylenodioksypiol)
PEDOT	–	Poli(3,4-etyleno-1,4-dioksytiofen)
PEDOT CMs	–	Koloidalne mikrocząstki PEDOT
PEI	–	Polietylenoimina
PGE	–	Elektroda grafitowa
PMG	–	Poli(zieleń metylowa)
PNE	–	Polinorepinefryna
PNR	–	Poli(neutralna czerwień)
POA	–	Poli(o-anizydyna)
poly-FA	–	poli(kwas ferulowy)
Poly-Nq-MWCNT	–	Kompozyt poli(1,2-naftochinonu) i MWCNT
poly-XA	–	Poli(kwas ksanturynowy)
PPF	–	Nanocienki film polimeryzowany metodą plazmową
PPy	–	Polipirol
PSS	–	Polistyrenosulfonian
PTH	–	Politionina
PTP	–	Politiofen
PTZ	–	Fenotiazyny
PVDF	–	Poli(fluorek winylidenu)
PVI	–	Poli(1-winyloimidazol)
Pyr	–	Piren

PYRO	–	Pochodna chinonowa pirenu
PzNO ₂	–	2,3,7,8,12,13,17,18-oktakis{2-[2-(4-nitrofenoksy)etoksy]etylotio}porfirazynian magnezu(II)
RA	–	Kwas rozmarynowy
RGD	–	Cykliczny peptyd arginyloglicyloasparaginowy
rGO	–	Elektrochemicznie zredukowany tlenek grafenu
RSD	–	Względne odchylenie standardowe
RSF	–	Współczynnik czułości względnej (wskaźnik XPS)
SEM	–	Skaningowa mikroskopia elektronowa
SPCE	–	Elektrody węglowe sitodrukowane
SWCNT	–	Jednościenne nanorurki węglowe
T	–	Transmisja analizatora (XPS)
TC	–	Tetracen
TEM	–	Transmisyjna mikroskopia elektronowa
TFT	–	Tranzystor cienkowarstwowy
TiC	–	Węglik tytanu
TPU	–	Poliuretan termoplastyczny
UA	–	Kwas moczowy
UO _x	–	Urykaza
WWA	–	Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne
XPS	–	Rentgenowska spektroskopia fotoelektronów
Q	–	Utlenione grupy funkcyjne katalizatora opartego na chinonie
QH ₂	–	Zredukowane grupy funkcyjne katalizatora opartego na chinonie

Spis treści

I. WSTĘP	13
II. CZĘŚĆ LITERATUROWA.....	15
1. Sensory elektrochemiczne	16
1.1. Charakterystyka, budowa i podział sensorów.....	16
1.2. Metody modyfikacji elektrod.....	24
1.3. Zastosowania, wyzwania i perspektywy w zakresie aplikacji sensorów	26
2. NADH w zastosowaniach elektrochemicznych	34
2.1. Informacje ogólne i mechanizm utlenienia.....	34
2.2. Detekcja NADH.....	38
3. Nanorurki węglowe.....	43
3.1. Informacje ogólne, budowa, właściwości i metody syntezy	43
3.2. Potencjał aplikacyjny nanorurek węglowych	49
4. Wielopierscieniowe węglowodory aromatyczne.....	52
4.1. Informacje ogólne	52
4.2. Źródła emisji, wpływ na zdrowie człowieka i usuwanie WWA	56
5. Modyfikacje materiałów węglowych związkami organicznymi	59
5.1. Wykorzystanie elektrod modyfikowanych nanomateriałami węglowymi oraz pirenem i jego pochodnymi	59
5.2. Inne możliwe modyfikacje elektrod za pomocą nanomateriałów węglowych i związków pochodzenia organicznego	64
III. CELE PRACY	68
IV. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	69
1. Metodyka badań	70
1.1. Aparatura pomiarowa	70
1.2. Odczynniki chemiczne.....	71
1.3. Preparatyka materiałów elektrodowych.....	72

2. Dyskusja wyników	75
2.1. Elektrochemiczne wytwarzanie 1-aminopireno-4,5,9,10-tetrolu na powierzchni MWCNT w celu katalitycznego utleniania NADH przy niskim potencjale.....	75
2.1.1. Elektrochemiczna aktywacja elektrody modyfikowanej GC/MWCNT/1-AP	75
2.1.2. Analizy fizykochemiczne materiału MWCNT/1-APox	85
2.1.3. Charakterystyka elektrochemiczna elektrody GC/MWCNT/1-APox	92
2.1.4. Oznaczanie NADH na elektrodzie modyfikowanej GC/MWCNT/1-APox.....	101
2.1.5. Selektowność, stabilność, powtarzalność i odtwarzalność materiału elektrodowego MWCNT/1-APox.....	107
2.1.6. Analizy próbek rzeczywistych.....	109
2.2. Elektrochemiczne osadzanie 3-metoksykatecholu i katecholu na powierzchni wielościennych nanorurek węglowych modyfikowanych 1-aminopirenem, a następnie zastosowanie materiału elektrodowego do detekcji NADH i glukozy.....	112
2.2.1. Elektrochemiczne przyłączanie katecholu i 3-metoksykatecholu do powierzchni elektrody GC/MWCNT/1-AP	112
2.2.2. Analizy fizykochemiczne materiałów elektrodowych.....	115
2.2.3. Charakterystyka elektrochemiczna GC/MWCNT/1-AP/Cat oraz GC/MWCNT/1-AP/3-MCat	122
2.2.4. Detekcja NADH przy użyciu elektrod GC/MWCNT/1-AP modyfikowanych katecholem (Cat) i 3-metoksykatecholem (3-MCat)	128
2.2.5. Oznaczanie glukozy za pomocą elektrod modyfikowanych typu GC/MWCNT/1-AP/Cat/GDH oraz GC/MWCNT/1-AP/3-MCat/GDH.....	134
2.2.6. Wpływ substancji zakłócających oraz badania stabilności, powtarzalności i odtwarzalności elektrody GC/MWCNT/1-AP/3-MCat/GDH.....	141
2.2.7. Testy próbki rzeczywistej	144

2.3.	Elektrochemiczna aktywacja innych pochodnych pirenu osadzonych na powierzchni MWCNT	146
2.3.1.	Elektroaktywacja 1-hidroksypirenu (1-HP).....	146
2.3.2.	Elektrochemiczne utlenienie kwasu 1-pirenoboronowego (PBA).....	151
3.	Wnioski	158
V.	BIBLIOGRAFIA	160
VI.	STRESZCZENIE	194
VII.	ABSTRACT	195
VIII.	SPIS RYSUNKÓW	196
IX.	SPIS TABEL	203
X.	DOROBK NAUKOWY	204

I. WSTĘP

Wyzwania współczesnej nauki, a w szczególności tej z pogranicza chemii materiałowej oraz nanotechnologii, skupiają się obecnie na opracowywaniu rozwiązań zarówno wydajnych, jak i zrównoważonych. Postęp technologiczny związany jest między innymi z wpływem na poprawę jakości życia, obniżeniem kosztów produkcji, ograniczeniem zużycia materiałów i minimalizowaniem zanieczyszczeń. W kontekście możliwości zastosowania i rozwoju nowych materiałów funkcjonalnych, które cechuje wysoka selektywność i trwałość, jak również doskonałe właściwości przewodzące, warto wyróżnić nanomateriały węglowe. Ich unikalna struktura i właściwości elektrochemiczne stwarzają możliwość aplikacji w projektowaniu sensorów nowej generacji. Połączenie nanomateriałów węglowych z pochodnymi wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) daje możliwość tworzenia takich urządzeń o wysokiej czułości, selektywności i stabilności. Główną zaletą tego podejścia jest dodatkowo prostota wykonania układu detekcyjnego. Dzięki elektrochemicznej aktywacji WWA, a w szczególności pochodnych pirenu, na nanomateriałach węglowych, jak wielościenne nanorurki węglowe (MWCNT), możliwa staje się kontrolowana modyfikacja powierzchni oraz dostosowanie właściwości elektrochemicznych modyfikatora. Poprawa właściwości redoks i interakcji z analitami stanowią znaczące udoskonalenie w porównaniu z klasycznymi metodami funkcjonalizacji chemicznej. Podejście to, łączące obszary nanotechnologii z zastosowaniami praktycznymi, zasługuje na szczególne zainteresowanie zarówno ze względu na swój potencjał aplikacyjny, jak i nowatorski charakter.

Elektrooutlenianie WWA jest procesem stosowanym głównie w celu degradacji, funkcjonalizacji czy modyfikacji wspomnianej grupy związków chemicznych. Obecność przynajmniej dwóch skondensowanych pierścieni benzenowych w strukturze WWA sprawia, że związki te są często toksyczne, trwałe w środowisku naturalnym, jak również mają skłonność do bioakumulacji. Znanych jest wiele metod modyfikacji elektrod, mających na celu zwiększenie selektywności, poprawę czułości oraz wydajności w różnych układach elektrochemicznych. Warto wyróżnić procedury związane z pokrywaniem polimerami przewodzącymi, modyfikacje nanocząstkami metali,

osadzanie cienkich warstw czy wykorzystanie nanomateriałów węglowych. Nieliczne doniesienia literaturowe na temat elektroaktywacji WWA, a w szczególności pirenu i jego pochodnych na materiałach węglowych sugerują, że jest to proces wart zainteresowania i rozwinięcia. Rozważania te zostały podjęte w niniejszej rozprawie doktorskiej.

Modyfikacja wielościennych nanorurek węglowych (MWCNT) z wykorzystaniem pirenu i jego pochodnych umożliwia elektroaktywację tych związków prowadzącą do wytworzenia elektroaktywnych form na powierzchni elektrody modyfikowanej. Układy redoks, wykorzystujące jako mediator odwracalne przejście chinon/hydrochinon, znajdują zastosowanie w dziedzinie elektrochemii analitycznej. Wytworzenie utlenionej i zredukowanej formy elektrokatalizatora na powierzchni elektrody umożliwia aplikację takiego układu do detekcji wielu analitów, w tym związków takich jak NADH czy glukoza, które pełnią znaczącą rolę w organizmie ludzkim.

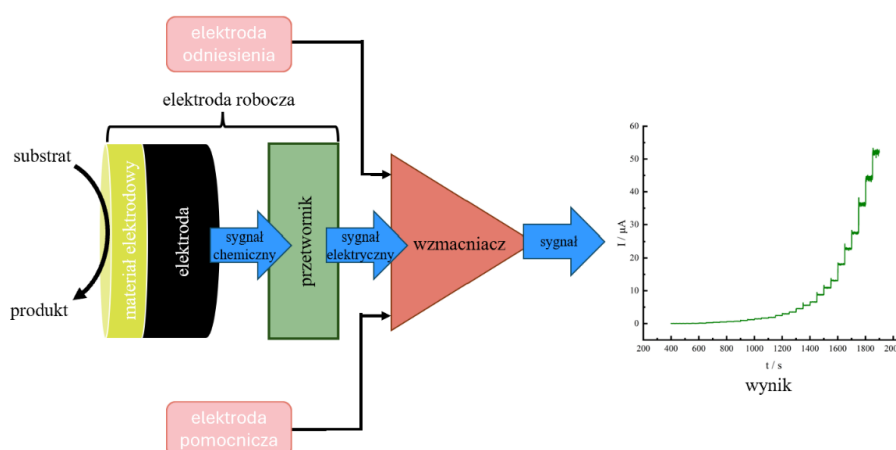
W niniejszej pracy przeprowadzono szereg modyfikacji elektrod GC za pomocą wielościennych nanorurek węglowych, a następnie pochodnych wielopierscieniowych węglowodorów aromatycznych, w tym: pirenu (Pyr), 1-aminopirenu (1-AP), 1-hydroksypirenu (1-HP) oraz kwasu 1-pirenoboronowego (PBA). Następnie przeprowadzono elektroaktywację wymienionych wyżej związków na powierzchni elektrod. Zaproponowane podejście umożliwiło uzyskanie materiałów elektrodowych o ulepszonych właściwościach elektrokatalitycznych, mogących znaleźć zastosowanie w konstrukcji sensorów elektrochemicznych NADH lub glukozy. Dodatkowo w przypadku elektrody modyfikowanej MWCNT i 1-AP na jej powierzchni wytworzono elektroaktywną formę 1-aminopirenu-4,5,9,10-tetrolu. Przeprowadzono szczegółową charakterystykę fizykochemiczną i elektrochemiczną materiału elektrodowego, który finalnie zastosowano do elektrokatalitycznego utlenienia NADH przy relatywnie niskim potencjale (+0,1 V vs. Ag/AgCl). Ponadto na elektrodzie funkcjonalizowanej MWCNT i 1-AP przeprowadzono elektrochemiczne osadzanie 3-metoksykatechołu i katechołu. Dokonano charakterystyki fizykochemicznej, jak również elektrochemicznej materiałów elektrodowych MWCNT/1-AP/Cat oraz MWCNT/1-AP/3-MCat. Końcowym efektem prac była detekcja biologicznie istotnych analitów (NADH i glukozy) na powierzchni elektrod modyfikowanych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej.

II. CZĘŚĆ LITERATUROWA

1. Sensory elektrochemiczne

1.1. Charakterystyka, budowa i podział sensorów

Zastosowanie narzędzi mikroanalitycznych do pomiaru różnych analitów jest niezwykle ważne w kontekście możliwości monitorowania bezpośrednio na miejscu w czasie rzeczywistym. Część dobrze znanych rozwiązań mikroanalitycznych wykorzystuje sensory chemiczne, które są uznane i powszechnie stosowane na rynku [1]. Według IUPAC (ang. *International Union of Pure and Applied Chemistry*) sensor chemiczny definiowany jest jako urządzenie, które przekształca dane chemiczne (od stężenia pojedynczego składnika po kompletną analizę składu), w mierzalny sygnał [2]. Sensory chemiczne składają się z dwóch podstawowych jednostek funkcjonalnych: receptora i przetwornika. Sygnał wyjściowy generowany w trakcie pomiaru powinien być proporcjonalny do stężenia analitu, a urządzenie powinny cechować: selektywność, czułość, powtarzalność i relatywnie krótki czas odpowiedzi [3]. Schematyczne przedstawienie budowy sensora elektrochemicznego przedstawiono na Rys. 1.



Rys. 1. Schematyczne przedstawienie budowy sensora elektrochemicznego, na podstawie [4].

Na Rys. 1 zilustrowano układ trójelektrodowy, w oparciu o który zbudowany jest sensor elektrochemiczny. Reakcja elektrokatalityczna przebiega na elektrodzie roboczej. Rolą elektrody pomocniczej jest zamknięcie obwodu, podczas gdy elektroda odniesienia

odpowiada za utrzymywanie prawidłowego potencjału. Sensory elektrochemiczne cieszą się ogromnym zainteresowaniem zarówno w obszarach naukowych, jak i przemysłowych. Projektowanie materiałów elektrodowych ma bardzo duże znaczenie w kontekście zdolności sensorów do selektywnej detekcji wybranych molekuł. Podczas interakcji analitu z zmodyfikowaną powierzchnią elektrody uzyskana odpowiedź przekształcana jest w mierzalny sygnał odpowiadający stężeniu analitu. W porównaniu z innymi czujnikami, sensory elektrochemiczne posiadają wiele zalet, takich jak możliwość miniaturyzacji, niski koszt produkcji, szybki czas odpowiedzi, jak również potencjał stosowania w układach przenośnych [4,5].

Najczęściej stosowanymi materiałami do budowy sensorów elektrochemicznych są węgiel i złoto, ze względu na stabilność, biokompatybilność i bardzo dobrą kinetykę transferu elektronów [6]. Pośród szerokiej gamy materiałów do modyfikacji powierzchni sensorów dużym uznaniem cieszą się również nanomateriały. Wśród nanomateriałów warto wyróżnić nanostruktury węglowe (jak grafen czy nanorurki), nanocząstki metali (np. złota), polimery przewodzące, kompozyty czy struktury dwuwymiarowe (2D). Stosowanie takich materiałów oferuje wiele korzyści związanych z dużym stosunkiem powierzchni do objętości, zdolnością do immobilizacji związków pochodzenia biologicznego, poprawioną kinetyką transportu elektronów i możliwością projektowania ich właściwości (np. poprzez kontrolowanie liczby warstw nanomateriału) [4,7,8]. Warto wyróżnić również nanokompozyty, które są połączeniem różnych nanomateriałów, zwiększając dodatkowo wydajność sensorów. Związane jest to z dużą reaktywnością, biokompatybilnością i zdolnościami adsorpcyjnymi. Ponadto nanocząstki złota, wytwarzane metodami tzw. „zielonej chemii”, są w tym kontekście atrakcyjne, ze względu na ich właściwości estetyczne, fizyczne i elektrochemiczne, umożliwiając ich zastosowanie w medycynie czy diagnostyce. Urządzenia zbudowane w oparciu o te materiały wykazują zdolność wykrywania różnych analitów (np. leków), w związku z tym ich znaczenie w przemyśle biomedycznym i farmaceutycznym stale rośnie. Wyzwania współczesnej technologii skupiają się więc na poszukiwaniu kombinacji zaawansowanych materiałów, które pozwolą na stworzenie urządzeń o wysokiej czułości, selektywności i powtarzalności [8–11].

Elektrochemiczne sensory mogą być ponadto podzielone ze względu na sposób pomiaru na: potencjometryczne, amperometryczne, impedymetryczne,

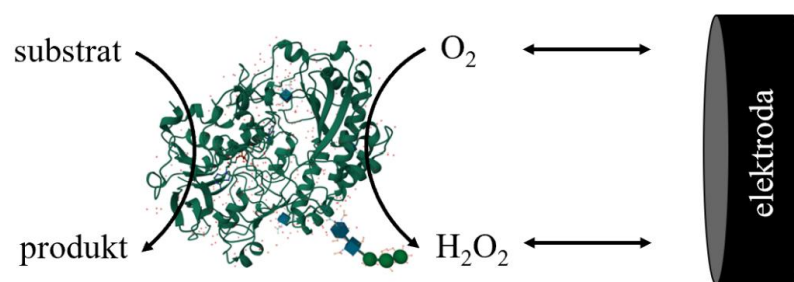
fotoelektrochemiczne, a także wykorzystujące elektrogenerowaną chemiluminescencję. Zadaniem sensorów potencjometrycznych jest mierzenie różnicy potencjałów między elektrodami bez przepływu prądu. Dzięki temu możliwe jest określenie stężenia analitu na podstawie równowagi Nernsta. Ten rodzaj czujników wykorzystuje różne rodzaje membran (np. elektrody szklane, ciekłe czy stałe). Najczęściej stosuje się je do analizy jonów, monitoringu środowiska czy w technologii urządzeń przenośnych. Z kolei sensory amperometryczne mierzą prąd, który jest generowany w wyniku reakcji redoks na powierzchni elektrody w wyniku przyłożonej różnicy potencjałów. Zgodnie z równaniem Cottrella, w warunkach kontrolowanych dyfuzją, prąd jest proporcjonalny do stężenia oznaczanego analitu. Ten rodzaj sensorów znajduje możliwości aplikacyjne w analizach, w których niezbędna jest wysoka czułość i dokładność (np. diagnostyka medyczna). Natomiast sensory impedymetryczne wykorzystują technikę EIS i analizują zmiany impedancji na powierzchni elektrody. Ten rodzaj czujników jest powszechnie wykorzystywany do wykrywania patogenów czy związków pochodzenia biologicznego [8].

Istotne jest, aby sensor elektrochemiczny charakteryzowały określone parametry. To one wpływają na jego wydajność oraz dokładność i skuteczność działania. Wyróżnić należy selektywność, czułość, granicę wykrywalności (LOD), granicę oznaczalności (LOQ), zakres liniowy, stabilność, dokładność, czas reakcji i powtarzalność [12]. Uważa się, że selektywność jest najważniejszą cechą dobrego biosensora. Jest to zdolność receptorowej części biologicznej do wykrywania określonego analitu w próbce, która zawiera dodatkowo inne substancje czy zanieczyszczenia. Czułość określana jest jako zdolność do precyzyjnego wykrycia jak najmniejszej ilości analitu przy jego możliwie najniższym stężeniu, dzięki czemu możliwe jest potwierdzenie obecności śladowych ilości substancji w analizowanej próbce. Granica wykrywalności (LOD) to najmniejsza ilość substancji możliwa do wykrycia, natomiast granica oznaczalności (LOQ) określa najniższe stężenie analitu, przy którym można dokonać dokładnego pomiaru. Zakres liniowy to dokładność, z jaką mierzona odpowiedź (dla różnych stężeń analitu) odpowiada linii prostej. Z kolei stabilność określana jest jako zdolność do utrzymania sygnału wyjściowego bez zmian podczas długotrwałego pomiaru tego samego standardowego sygnału. Dokładność to stopień, w jakim uzyskany wynik pomiarowy odpowiada rzeczywistej wartości mierzonej wielkości. Czas reakcji określany jest jako

czas, który potrzebny jest, aby sensor mógł osiągnąć stabilny, niezmienny odczyt. Powtarzalność określana jest jako zdolność do uzyskania takich samych wyników podczas wykonywania wielokrotnych pomiarów tej samej próbki [12–14].

Biosensor to rodzaj sensora chemicznego, który wykorzystuje procesy rozpoznawania biochemicznego lub biologicznego. Składa się on również z dwóch podstawowych części: selektywnej części receptorowej, a także części przetwornikowej [15]. Składnikami części receptorowej są biologicznie aktywne komponenty jak np. enzymy, białka, kwasy nukleinowe (DNA, RNA), antygeny, przeciwciała czy liposomy. Rolą części przetwornikowej jest przekształcenie sygnału biologicznego na mierzalny sygnał wyjściowy. Sygnał może mieć charakter elektryczny, chemiczny, optyczny, termiczny czy piezoelektryczny. Jego intensywność również jest proporcjonalna do stężenia analizowanej próbki oraz czułości części receptorowej [13]. Biosensory mogą być klasyfikowane ponadto według różnych kryteriów, takich jak metoda przetwarzania sygnału biologicznego, rodzaj wykrywanej substancji, typ zastosowanego przetwornika czy sposób przeniesienia elektronu. Szczególnie istotny jest podział ze względu na mechanizm przenoszenia elektronów między enzymem, a powierzchnią elektrody, na podstawie którego wyróżnia się trzy generacje biosensorów: pierwszą, drugą i trzecią. Podział ten pozwala lepiej zrozumieć różnice technologiczne i zastosowania poszczególnych generacji w różnych dziedzinach, od diagnostyki medycznej po monitoring środowiskowy [16].

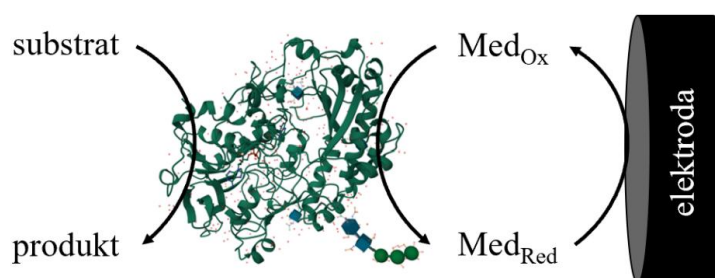
Biosensory pierwszej generacji odpowiadają za pomiar stężenia analitów, bądź produktów reakcji enzymatycznych, które dyfundują do powierzchni przetwornika i generują odpowiedź elektryczną [17]. W pierwszej generacji biosensorów enzym immobilizowany jest na powierzchni przetwornika. Wykorzystywana jest zdolność enzymów do przekształcania substratów w dające możliwość pomiaru elektroaktywne produkty. Wykorzystywane są enzymy z grupy oksydaz i dehydrogenaz, które do katalizowania reakcji wymagają obecności koenzymów (NAD^+ , NADP^+ , NADH , NADPH , ATP FAD , FADH). Oksydazy, które jako kofaktor wykorzystują FAD (dinukleotyd flawinoadeninowy) uczestniczą w reakcjach związanych z produkcją nadtlenu wodoru (H_2O_2) lub konsumpcją tlenu (O_2). FAD nie jest kowalencyjnie związany z enzymem [18]. Na Rys. 2 przedstawiono zasadę działania biosensora pierwszej generacji.



Rys. 2. Zasada działania biosensora pierwszej generacji, na podstawie [19].

Jednym z ograniczeń tej generacji bioczuJNIKÓW zbudowanych w oparciu o enzym z grupy oksydaz jest zależność od dostępu tlenu, co może być przyczyną błędów pomiaru przy zmiennej lub niskiej dostępności tlenu [20]. Do najczęściej stosowanych oksydaz w biosensorach amperometrycznych należą oksydaza glukozowa [21], glutaminianowa [22], alkoholowa [23], mleczanowa [24], askorbinianowa [25], cholesterolowa [26], lakaza [27] czy tyrozynaza [28]. W przypadku biosensorów opartych na dehydrogenazach, ich zadaniem jest monitorowanie stężenia analitu poprzez mierzenie NADH, którego obecność jako składnika matrycy ma kluczowe znaczenie dla generowanego sygnału [29]. Z kolei do najczęściej stosowanych dehydrogenaz w biosensorach amperometrycznych należą dehydrogenaza alkoholowa [30], glukozowa [31], mleczanowa [32] czy glutaminianowa [33]. Główne zalety pierwszej generacji biosensorów to wysoka czułość i krótki czas odpowiedzi. Natomiast używanie ich ma związek z koniecznością przygotowania elektrody czy wyeliminowania wpływu substancji interferujących [16].

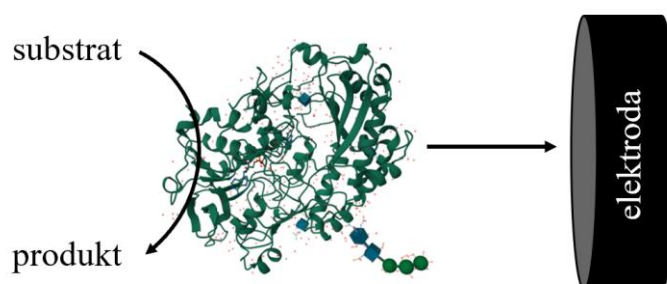
Biosensory drugiej generacji wykorzystują mediatory jako środki utleniające, których zadaniem jest transfer elektronów od centrum aktywnego enzymu do przewodzącej warstwy elektrody (przetwornika). Dzięki temu umożliwiają one pomiary przy relatywnie niskich potencjałach, eliminując przy tym zależność od tlenu i wpływ substancji interferujących [20]. Najczęściej jako mediatory wykorzystywane są następujące związki: heksacyjanożelazian(II) potasu, heksacyjanożelazian(III) potasu [34], ferrocen [35], błękit metylenowy [36], błękit pruski [37], błękit toluidynowy [38], fiolet metylowy [39] czy tionina [40]. Na Rys. 3 przedstawiono zasadę działania biosensora drugiej generacji.



Rys. 3. Schematyczne przedstawienie zasady działania biosensora drugiej generacji, na podstawie [19].

Mediatory odpowiedzialne są za transfer elektronów z centrum aktywnego enzymu do elektrody podczas reakcji, co generuje sygnał prądowy, który jest proporcjonalny do stężenia analitu. Mediator może być unieruchomiony na powierzchni elektrody, bądź dodany bezpośrednio do próbki [41]. Ponadto mediator powinna cechować wysoka stabilność chemiczna, nietoksyczność oraz rozpuszczalność w wodzie. Dodatkowo związki takie muszą posiadać niski potencjał redoks (w celu uniknięcia zakłóceń pochodzących od pozostałych elektroaktywnych form znajdujących się w próbce). Wprowadzenie mediatorów w biosensorach drugiej generacji wyeliminowało zależność od tlenu, jednakże urządzenia tego typu cechuje niższa stabilność, ze względu na możliwość degradacji unieruchomionych mediatorów, jak również wolniejszy transport elektronów, związany z ukryciem centrum aktywnego enzymu [42].

W biosensorach trzeciej generacji transport elektronów odbywa się bezpośrednio pomiędzy centrum aktywnym enzymu, a powierzchnią elektrody bez etapów pośrednich czy użycia zewnętrznego mediatora [42]. Schemat działania biosensora trzeciej generacji został przedstawiony na Rys. 4.



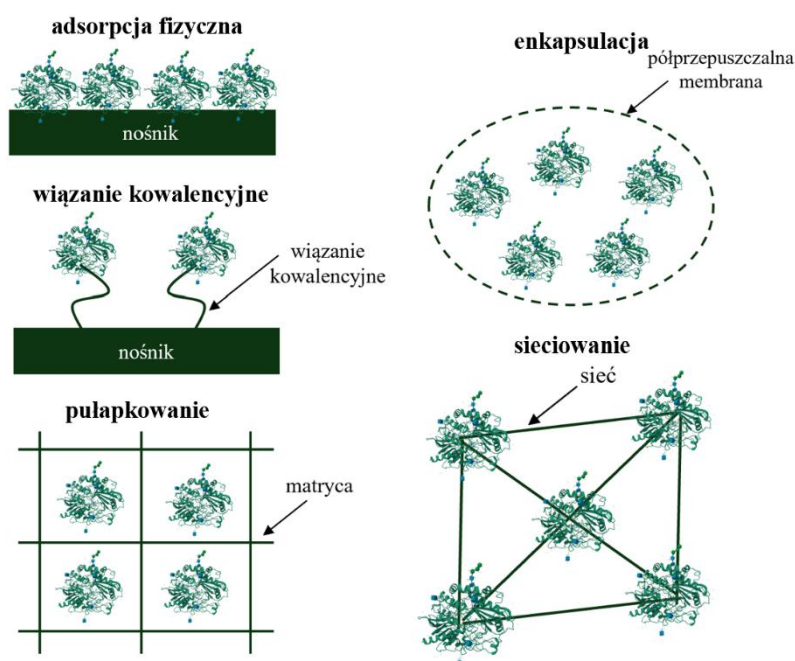
Rys. 4. Zasada działania biosensora trzeciej generacji, na podstawie [19].

Biosensory trzeciej generacji nie są obecnie powszechnie stosowane do analizy, jednak zyskują coraz większą popularność i są nadal rozwijane. Prawdopodobny krótki czas reakcji i niezależność od dostępności tlenu czy kofaktora czyni je obiecującymi urządzeniami w przyszłości [16,17].

Łączenie reakcji biologicznych z generowaniem sygnału elektrochemicznego stwarza możliwości rozwoju nowych, czułych i selektywnych narzędzi do pomiarów analitycznych. Ich prostota obsługi oraz wszechstronność umożliwiają przeprowadzenie analiz zarówno jakościowych, jak również ilościowych. Jednym z bardziej istotnych aspektów konstrukcji biosensora jest unieruchomienie elementu odpowiadającego za detekcję na powierzchni przetwornika. Imobilizacja enzymów to proces, który pozwala zachować ich pierwotne właściwości i aktywność, eliminując dzięki temu ryzyko straty ważnych funkcji podczas kolejnych pomiarów. W związku z tym możliwe jest opracowanie systemów ciągłego pomiaru, co zwiększa zarówno efektywność, jak i powtarzalność procesów. Dodatkowo imobilizacja enzymu odpowiada także za stabilizację jego aktywności biokatalitycznej, a to z kolei ułatwia kontrolowanie przebiegającego procesu [43].

Warto wyróżnić następujące metody imobilizacji: adsorpcja fizyczna, wiązanie kowalencyjne, sieciowanie, enkapsulację i pułapkowanie [44]. Adsorpcja polega na fizycznym unieruchomieniu enzymu na powierzchni nośnika z wykorzystaniem sił elektrostatycznych, wiązań wodorowych, sił Van der Waalsa czy oddziaływań hydrofobowych. Zaletami tej metody jest jej prostota i relatywnie niski koszt, natomiast posiada również pewne ograniczenia związane z stabilnością (desorpcja enzymów pod wpływem zmian pH) [45]. Kolejną z metod jest wiązanie kowalencyjne, które polega na chemicznym przyłączeniu enzymu do nośnika w wyniku reakcji z grupami funkcyjnymi (np. aminowymi, karboksylowymi czy tiolowymi). Metoda ta charakteryzuje się wysoką stabilnością, jednakże stwarza ryzyko utraty aktywności enzymu, spowodowanej modyfikacją grup funkcyjnych [46]. Następną metodą imobilizacji to enkapsulacja, czyli zamknięcie w matrycy. Polega ona na unieruchomieniu enzymu w porowatej strukturze. Dzięki tej metodzie możliwe jest zachowanie struktury enzymu, a także zminimalizowanie ryzyka jego denaturacji. Do wad enkapsulacji należy ograniczona dostępność substratów oraz ryzyko wycieku enzymu przez pory matrycy [44]. Z kolei sieciowanie (ang. *cross-linking*) zakłada tworzenie wiązań między cząsteczkami enzymu

przy użyciu czynników sieciujących (np. glutaraldehydu). Zaletą tej metody jest wysoka trwałość biokatalizatora, a wadą ryzyko obniżenia aktywności podczas nadmiernego procesu sieciowania [47]. Inną metodą immobilizacji biokatalizatorów jest pułapkowanie. Polega ono na zamykaniu enzymów w sieci polimerowej, która umożliwia przenikanie substratów i produktów reakcji, ale ogranicza możliwości ruchu enzymom. Do zalet tej metody należy zwiększenie stabilności enzymów minimalizując ich wyciek. Z kolei jako wadę warto wymienić ograniczenie dostępu substratów do miejsc aktywnych, spowodowane oporami masowymi matrycy [48]. Na Rys. 5 schematycznie przedstawiono opisane metody immobilizacji enzymów.



Rys. 5. *Metody immobilizacji enzymów, na podstawie [49].*

Procesy biokatalityczne prowadzone przy użyciu immobilizowanych enzymów posiadają wiele zalet w porównaniu do enzymów w stanie wolnym. Efektywność procesu może zostać zwiększona, ponieważ w systemach immobilizowanych stosunek enzym-substrat jest relatywnie wysoki (możliwość uniknięcia nadmiernego zużycia substratów). Unieruchomione enzymy charakteryzują się ponadto wyższą odpornością na zmienne warunki pH i temperatury, większą stabilnością oraz stwarzają możliwość łatwiejszego

rozdzielenia produktów od biokatalizatora. Dodatkowo można obniżyć koszty produkcji poprzez wielokrotne wykorzystanie biokatalizatorów. Ponadto w porównaniu do enzymów natywnych, immobilizowane enzymy posiadają takie cechy jak wyższa produktywność, większa tolerancja na warunki operacyjne i lepsza wydajność procesu, co stwarza im większe możliwości aplikacyjne w warunkach przemysłowych [43].

1.2. Metody modyfikacji elektrod

Modyfikacja powierzchni elektrod ma bardzo duże znaczenie w kontekście rozwijających się technologii sensorów i biosensorów elektrochemicznych. Może wpływać na poprawę takich parametrów jak czułość, selektywność i stabilność. W ostatnim czasie obserwuje się zarówno rozwój nowych materiałów, jak również technik służących do modyfikacji elektrod, co bezpośrednio wpływa na postęp w dziedzinie elektroanalizy. Dzięki temu możliwa staje się detekcja związków istotnych z biologicznego i chemicznego punktu widzenia [50]. Wśród technik modyfikacji elektrod warto wyróżnić metody fizyczne, chemiczne i elektrochemiczne.

Metody fizyczne obejmują osadzanie modyfikatorów na powierzchni elektrody za pomocą oddziaływań niekowalencyjnych, w tym wiązań wodorowych, sił elektrostatycznych czy oddziaływań Van der Waalsa [51]. Najczęściej stosowane techniki to enkapsulacja, osadzanie powłok polimerowych czy adsorpcja substancji powierzchniowo czynnych. Jako wady metod fizycznych wymienia się problem z równomiernym pokryciem powierzchni, niską stabilność mechaniczną powłok i trudności związane z odtwarzalnością [52].

Z kolei metody chemiczne skupiają się na tworzeniu silnych wiązań o charakterze kowalencyjnym pomiędzy powierzchnią elektrody, a modyfikatorem. Najczęściej można wyróżnić chemisorpcję czy modyfikacje polimerami zawierającymi katalizatory [52,53]. Wśród metod chemicznych warto wspomnieć o modyfikacjach za pomocą cienkich warstw polimerowych. Jest to podejście powszechnie stosowane, mające na celu funkcjonalizację elektrod o wysokiej aktywności katalitycznej. Dzięki tej metodzie folie polimerowe o właściwościach przewodzących i nieprzewodzących można osadzić na powierzchni elektrody z wykorzystaniem mechanizmu opartego na chemisorpcji

i ograniczonej rozpuszczalności w elektrolicie. W tym procesie wykorzystuje się polimery o charakterze organicznym, metaloorganicznym, bądź nieorganicznym [52,54].

Warto również wspomnieć o metodach elektrochemicznych, które uważane są za bardzo efektywne. Umożliwiają osadzanie zarówno nanocząstek metali, jak również struktur polimerowych. W celu kontroli morfologii nanostruktur czy grubości warstwy procesy mogą być prowadzone w warunkach potencjostatycznych, bądź potencjodynamicznych. Do osadzania relatywnie grubych warstw, powyżej 1 μm , stosuje się często technikę galwanostatyczną [52,55,56]. Zastosowanie elektropolimeryzacji umożliwia otrzymanie cienkich, jednorodnych warstw charakteryzujących się wysoką adhezją do powierzchni elektrody [57,58].

Do najczęściej stosowanych materiałów służących modyfikacji elektrod należą nanocząstki metali, nanomateriały węglowe, tlenki metali przejściowych czy polimery przewodzące [52,59,60]. Nanocząstki złota [61], srebra [62], platyny [63] czy palladu [64] znajdują zastosowanie dzięki doskonałej przewodności elektrycznej, odporności na korozję i wysokiej aktywności elektrokatalitycznej. Nanomateriały węglowe jak np. grafen [65] czy nanorurki węglowe [66] zwiększają powierzchnię elektroaktywną i odpowiadają za poprawę transportu elektronów. Z kolei tlenki metali przejściowych jak TiO_2 [67] czy Co_3O_4 [68] zapewniają relatywnie wysoką stabilność chemiczną i aktywność katalityczną. Polimery przewodzące zwykle stosuje się jako podłoże do immobilizacji enzymów. Jednocześnie wpływają one na poprawę przewodności elektrycznej elektrody i zwiększają wydajność oznaczania analitów. Do najczęściej stosowanych polimerów zalicza się polipirol (PPy) [69], polianilinę (PANI) [70] czy poli(3,4-etyleno-1,4-dioksytyofen) (PEDOT) [71].

Elektrody modyfikowane wykorzystywane są w diagnostyce medycznej, monitoringu środowiska czy kontroli jakości żywności. Dzięki wprowadzeniu wyżej wymienionych materiałów można oznaczać liczne biomarkery jak glukoza, nadtlenek wodoru czy dopamina przy relatywnie dobrych parametrach analitycznych. Wyzwania naukowców skupiają się na konstrukcji elektrod charakteryzujących się wysoką stabilnością i odtwarzalnością, jak również na miniaturyzacji urządzeń służących do detekcji wybranych molekuł. Uwaga badaczy skupiona jest także na zrównoważonych metodach syntezy materiałów, otrzymywaniu odpornych kompozytów i rozwoju technik zgodnych z zasadami „zielonej chemii” [52].

1.3. Zastosowania, wyzwania i perspektywy w zakresie aplikacji sensorów

Zarówno sensory, jak i biosensory znalazły szereg zastosowań w wielu dziedzinach życia, umożliwiając rozwój zaawansowanych rozwiązań technologicznych, dzięki czemu możliwa jest poprawa jakości tych urządzeń. Współpraca specjalistów z różnych dziedzin, jak np. biologia, fizyka, chemia czy inżynieria, zwiększa szanse na interdyscyplinarność prowadzonych działań. W związku z tym rozwój urządzeń wspiera nie tylko sektor nauki i technologii, ale również otwiera możliwości aplikacji w medycynie, ochronie środowiska czy przemyśle żywnościowym [8,13]. W zastosowaniach medycznych sensory odgrywają istotną rolę podczas wczesnego wykrywania chorób (m.in. nowotworów, cukrzycy czy chorób zakaźnych), poprzez identyfikowanie specyficznych biomarkerów w próbkach biologicznych jak krew, ślina, mocz. Dzięki temu możliwa jest szybka diagnoza, bardziej dokładne monitorowanie postępów leczenia i dostosowanie odpowiedniej terapii spersonalizowanej [13,72]. W przemyśle spożywczym i sektorze rolniczym sensory umożliwiają monitorowanie wartości odżywczej produktów oraz odpowiadają za kontrolę jakości, świeżości i bezpieczeństwa. Ma to bezpośredni wpływ na ochronę zdrowia konsumentów, ale również pozwala minimalizować straty żywności. Urządzenia te są również wykorzystywane w celu identyfikacji patogenów i wykrywania pestycydów czy innych szkodliwych substancji [4,13]. Wykorzystanie w ochronie środowiska polega na relatywnie szybkiej i precyzyjnej detekcji zanieczyszczeń w wodzie, powietrzu czy glebie (wykrywanie metali ciężkich, toksyn oraz substancji organicznych). Ich możliwości aplikacyjne skupiają się również wokół monitorowania jakości wód pitnych, identyfikacji źródeł zanieczyszczeń oraz na ocenie, jak działalność przemysłowa wpływa na środowisko naturalne [4,8,13,72]. Przemysł farmaceutyczny i biotechnologia wykorzystują biosensory jako narzędzia wspierające procesy zarówno odkrywania, jak również rozwoju i optymalizacji nowych leków, poprzez badania interakcji molekularnych [73,74]. Jednym z mniej oczywistych obszarów zastosowań sensorów i biosensorów jest przemysł obronny i sektor bezpieczeństwa. Urządzenia są stosowane do detekcji toksycznych substancji chemicznych i biologicznych, dzięki czemu możliwa jest szybka reakcja podczas zagrożenia (np. atakami bioterrorystycznymi) [75–77].

Rozwój nanotechnologii umożliwił również postęp w zakresie miniaturyzacji czujników elektrochemicznych. Analizy mogą być prowadzone na poziomie pojedynczych molekuł, co jest niezwykle istotne w obszarze badań naukowych i medycznych. Rozwijane są również przenośne urządzenia, jak opaski czy zegarki, które pozwalają na ciągłe monitorowanie stanu zdrowia w czasie rzeczywistym. Dzięki temu możliwy jest pomiar poziomu glukozy we krwi, rytmu serca czy parametrów oddechowych. W ostatnim czasie szczególnie ważny staje się rozwój diagnostyki punktowej (ang. *point of care*), która stwarza możliwości wykonania szybkich, tanich i precyzyjnych testów w miejscach, gdzie dostęp do specjalistycznych laboratoriów jest mocno ograniczony [13,78].

Pomimo wielu możliwości aplikacyjnych i szerokich perspektyw zastosowań w przyszłości, rynek sensorów i biosensorów posiada pewne ograniczenia. Powszechne zastosowanie sensorów utrudniają skomplikowane regulacje prawne czy wymagania kliniczne, jak również trudności związane z komercjalizacją. Jednymi z głównych problemów są długoterminowa stabilność, identyfikacja rynku docelowego oraz ograniczenie kosztów produkcji. Należy również zwrócić szczególną uwagę na zagrożenia, jak i kwestie etyczne, związane z wykorzystywaniem i opracowywaniem nowych technologii. Jednakże intensywna współpraca naukowców i firm przemysłowych z pogranicza różnych dyscyplin sprawia, że badania nad sensorami mają charakter interdyscyplinarny. Rynek ten ma wiele perspektyw, a bariery i ograniczenia są w ostatnich latach stopniowo przełamywane, w związku z czym uważa się, że dalszy rozwój czujników jest możliwy do zrealizowania [4,8,13].

Warto również zwrócić uwagę na liczne publikacje naukowe, których celem jest opracowanie wydajnych sensorów i biosensorów elektrochemicznych. Wśród doniesień należy wyróżnić pracę Molinero-Abad i współautorów, w której opracowano sensor do detekcji etanotolu w fazie gazowej w winie. W tym celu wykorzystano węglowe elektrody sitodrukowane (SPCE) modyfikowane nanocząstkami złota (AuNPs). Osadzenie nanocząstek na powierzchni elektrody przeprowadzono przy użyciu dwóch metod: elektroosadzania i wyładowania iskrowego. Metoda elektrochemicznego osadzania AuNPs zapewniła lepszą wydajność analityczną, z kolei metoda elektroiskrowa zwiększyła czułość o około 20%. Ponadto wykorzystanie metody wyładowania iskrowego jest procesem szybkim (około 10 s) i nie wymaga stosowania

dotychczasowych rozpuszczalników, a w związku z tym staje się techniką przyjazną środowisku. W ramach niniejszej pracy Autorzy, aby poprawić selektywność i stworzyć możliwość oznaczania analitu w fazie gazowej, wprowadzili membranę żelową na bazie PVDF (poli(fluorek winylidenu)) i cieczy jonowej BMIM-PF₆ (heksafluorofosforan 1-n-butylo-3-metyloimidazolu). Skonstruowane sensory charakteryzowały się wysoką czułością (granica wykrywalności równa 80 µg L⁻¹), powtarzalnością na dobrym poziomie (RSD 0,3-7,6%) oraz relatywnie wysoką stabilnością wynoszącą około 30 dni. Zaproponowane rozwiązanie stwarza możliwość detekcji etanotolu w fazie gazowej i może służyć do monitorowania poziomu tego związku w winiarniach zapewniając szybkie i selektywne oznaczenie w warunkach *in situ* [79].

Inną ciekawą koncepcję przedstawiają Hajesfandyari i współpracownicy, którzy prezentują amperometryczny sensor do wykrywania glukozy zbudowany na bazie nanocząstek siarczku kobaltu i manganu (CoMn-S) zsyntezowanych w postaci sferycznych mikrostruktur. Elektroda modyfikowana nowym materiałem wykazywała relatywnie dobre właściwości analityczne, w tym wysoką czułość (5148 i 1928 µA mM⁻¹ cm⁻² w szerokich zakresach stężeń 0,001-0,63 mM i 0,63-2,53 mM), niską granicę wykrywalności (LOD równe 0,88 µM) i bardzo szybki czas odpowiedzi (2 s). Z wykorzystaniem technik elektrochemicznych, takich jak EIS i CV potwierdzono, że otrzymany modyfikator elektrody zapewnia dużą powierzchnię aktywną i efektywnie przyspiesza transfer ładunku. Sensor opracowany w ramach niniejszej pracy wykorzystano również do detekcji glukozy w próbkach rzeczywistych (surowica, ślina, soki owocowe, mleko, napoje gazowane), co potwierdza jego praktyczną użyteczność. Ponadto Autorzy wskazują, że zsyntezowana platforma CoMn-S stanowi obiecującą alternatywę w nieenzymatycznych systemach wykrywania glukozy [80].

Kolejną interesującą publikacją to praca Demkiv i grupy badawczej, która dotyczy zastosowania nanozymów o aktywności zbliżonej do lakazy (nAuCu, nPtCu, nCuMnCo, nCoCuCe) do konstrukcji amperometrycznego sensora detekcji dopaminy. Nanozymy cechowały się wysoką aktywnością katalityczną wobec dopaminy. Ponadto elektrody z węgla szklatego zmodyfikowano również nanocząstkami AuPt w celu zwiększenia zarówno czułości, jak i stabilności sensorów. Wykazano, że najlepsze parametry analityczne zostały wyznaczone dla układu nAuCu/nAuPt/GC. Sensor taki

charakteryzował się szerokim zakresem liniowym (od 10 do 170 μM), niską wartością LOD (20 nM) i relatywnie wysoką czułością ($10\,650 \pm 8,3 \text{ A M}^{-1} \text{ m}^{-2}$) przy potencjale +0,2 V względem Ag/AgCl. Autorzy wskazują również, że opracowany sensor wykazywał wysoką selektywność, długoterminową stabilność i odporność na substancje interferujące. Ponadto badania mogą wpłynąć na rozwój przenośnych urządzeń służących do monitorowania poziomu dopaminy [81].

Z kolei w zespole badawczym Jayaraman opracowano przenośny sensor amperometryczny służący do detekcji katecholu zbudowany w oparciu o mezoporowaty węgiel modyfikowany jonami miedzi (Cu-CMC). W ramach prowadzonej w trakcie badań syntezy uzyskano materiał o dużej powierzchni i licznych miejscach aktywnych katalitycznie. Otrzymana struktura wykazuje właściwości podobne do tyrozynazy, co stwarza możliwość selektywnej detekcji katecholu przy potencjale 0 V względem Ag/AgCl. Dodatkowo opracowany w ramach niniejszych badań sensor charakteryzował się szerokim zakresem liniowym (1-1000 μM), relatywnie wysoką czułością ($10,21 \mu\text{A} \mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$) oraz niską granicą wykrywalności (0,099 μM). Zintegrowanie sensora z przenośnym potencjostatem i smartfonem stworzyło możliwość szybkiego i dokładnego oznaczenia analitu w próbkach wody i herbaty. Ponadto Autorzy wskazują, że uzyskany sensor ma duży potencjał w rozwoju przenośnych urządzeń do detekcji katecholu [82].

Następne zwracające uwagę rozważania zostały przedstawione przez Rashed i współautorów. W niniejszej pracy przedstawiono amperometryczny sensor do wykrywania nadtlenu wodoru opracowany w oparciu o nanokompozyt składający się z politiofenu domieszkowanego CuO (PTP-CuO). Materiał ten został zastosowany jako warstwa modyfikująca elektrodę GC, której właściwości elektrochemiczne oceniono takimi technikami jak EIS, CV czy CA. Autorzy wskazują, że elektroda PTP-CuO/GC wykazuje wyższą aktywność elektrokatalityczną w kierunku redukcji H_2O_2 w porównaniu do elektrody niemodyfikowanej, bądź modyfikowanej tylko CuO lub PTP. Oceniono również parametry analityczne opracowanego sensora: czułość ($442,25 \mu\text{A mM}^{-1} \text{ cm}^{-2}$), zakres detekcji (od 20 do 3300 μM) oraz granicę wykrywalności (3,86 μM). Ponadto elektrodę modyfikowaną charakteryzuje również dobra selektywność wobec nadtlenu wodoru w obecności innych biomolekuł, relatywnie wysoka stabilność, a także powtarzalność i odtwarzalność uzyskiwanych wyników. Przeprowadzono również testy

na roztworach rzeczywistych (mleko i woda) uzyskując zadowalające rezultaty odzysku. Autorzy wskazują, że otrzymany nanokompozyt PTP-CuO posiada duży potencjał w rozwoju nowych elektrochemicznych sensorów do detekcji wybranych analitów [83].

Wśród licznych publikacji naukowych zdecydowana ich część poświęcona jest również opracowywaniu wydajnych amperometrycznych biosensorów. W jednej z nich Almeida i współautorzy przedstawiają biosensor do oznaczania związków fenolowych, takich jak kwas galusowy i katechina. W ramach niniejszych badań Autorzy wykorzystali polidopaminę (PDA) i polinorepinefrynę (PNE) jako warstwy adhezyjne do immobilizacji alkalofilowej lakazy. Powłoki zawierające polinorepinefrynę wykazywały relatywnie dobrą elektroaktywność, co związane jest z obecnością grup katecholowych/hydrochinonowych, a to z kolei stworzyło możliwość ich dalszej funkcjonalizacji. Warstwa PNE wykazywała zarówno wyższe przewodnictwo w pH 5,0 i 7,0, jak również silniejszą oraz bardziej czułą odpowiedź amperometryczną w porównaniu do warstwy PDA. Biosensor ze zimmobilizowaną lakazą na powierzchni polinorepinefryny (PNE/Lac) cechowała czułość na poziomie $104 \mu\text{A cm}^{-2} \text{ mM}^{-1}$ w przypadku oznaczania kwasu galusowego oraz $14,4 \text{ cm}^{-2} \text{ mM}^{-1}$ dla katechiny. Autorzy wskazują, że otrzymane wyniki stanowią potencjał w dalszej optymalizacji biosensorów do detekcji związków fenolowych opartych na enzymach pochodzenia bakteryjnego [84].

Kolejna interesująca koncepcja została przedstawiona w pracy L. Tang i współpracowników. Zsyntezowany w ramach niniejszej publikacji hydrożel wykorzystano jako warstwę bioelektrokatalityczną do konstrukcji biosensora glukozy. Na powierzchni otrzymanego w ramach badań materiału unieruchomiono oksydazę glukozową (GOx) i chitozan (CTS). Taki modyfikator posłużył do funkcjonalizacji dwóch typów elektrod: elektrody z węgla szklanego i grafitowej elektrody sitodrukowanej. Biosensor opracowany w oparciu o elektrodę GC wykazywał odpowiedź elektrokatalityczną na utlenianie glukozy w liniowym zakresie stężeń od 0,25 do 15 mM osiągając przy tym czułość równą $27,0 \mu\text{A mM}^{-1} \text{ cm}^{-2}$. Elektroda modyfikowana hydrożelem, GOx i CTS cechowała się relatywnie wysoką stabilnością mechaniczną podczas zginania pod kątami 0° , 30° , 60° i 90° , co klasyfikuje ją jako odporną na deformacje. Dodatkowo charakteryzowała się selektywnością względem glukozy, co umożliwiło detekcję w próbce rzeczywistej (surowicy koziej). Autorzy wskazują, że przedstawiona w pracy hydrożelowa warstwa posiada potencjał aplikacyjny podczas

monitorowania poziomu glukozy w płynie śródtkankowym, a także stwarza możliwości zastosowania w przenośnych urządzeniach do detekcji tego analitu [85].

Inna ciekawa praca została stworzona przez Tuntiwongmetee wraz z grupą badawczą. Autorzy przedstawiają enzymatyczny amperometryczny biosensor do detekcji kwasu moczowego (UA) w oparciu o elektrodę SPCE. Węglowa elektroda sitodrukowana została w niniejszym badaniu zmodyfikowana kompozytem błękitu pruskiego z poli(3,4-etylenodioksytyofenem) i polistyrenosulfonianem (PB-PEDOT:PSS). Następnie elektrodę dodatkowo funkcjonalizowano kriozelem z nanocząstkami złota, tlenkiem grafenu i chitozanem (AuNPs-GO-CTS cry). Tak przygotowana platforma posłużyła do immobilizacji urykazy (UOx) w procesie chemisorpcji. Detekcja kwasu moczowego była możliwa dzięki amperometrycznym pomiarom prądu redukcji błękitu pruskiego, który skorelowano z ilością nadtlenu wodoru produkowanego w reakcji enzymatycznej. Ponadto Autorzy wykorzystali FIA (analiza przepływowa) automatyzując proces, skracając czas oznaczania (2 min) i wykorzystując niewielką ilość próbki do badań. Biosensor charakteryzował się szerokim zakresem liniowej odpowiedzi analitu (od 5 do 300 $\mu\text{M L}^{-1}$), niską granicą oznaczalności (LOD równe 1,88 $\mu\text{M L}^{-1}$), dobrą powtarzalnością (RSD poniżej 2,9%, n=6) oraz selektywnością na relatywnie wysokim poziomie. Autorzy wskazują również, że po 221 cyklach pomiarowych biosensor zachował ponad 90% początkowego sygnału, co stwarza możliwości wielokrotnego użycia, a w związku z tym obniża koszty oznaczania UA. Wyniki wykrywania kwasu moczowego w osoczu krwi były zgodne z rezultatami uzyskiwanymi metodą kolorymetryczną, którą stosuje się w szpitalach, co potwierdza zarówno dokładność, jak i wiarygodność biosensora [86].

Równie nowatorska idea została przedstawiona w publikacji H. Tang i współautorów. W ramach badań opracowali biosensor oparty na enzymie (lakazie) wykorzystując jako mediator grafityzowany węgiel boru pokryty węglem. Częstki modyfikatora cechowała unikalna przewodność (dzięki powłoce grafityzowanego węgla), co wykorzystano do amperometrycznego wykrywania epinefryny (EP). Biosensor charakteryzował się szerokim zakresem liniowej odpowiedzi (od 0,1 μM do 2,6 mM), niską granicą wykrywalności (LOD równe 40 nM), a także relatywnie wysoką czułością (76,05 $\mu\text{A mM}^{-1}$). Ponadto opracowany czujnik enzymatyczny wykazywał odporność na działanie substancji interferujących, co czyni go stabilnym i efektywnym

narzędziem w detekcji EP. Jako jedną z głównych zalet prezentowanej w niniejszej pracy koncepcji Autorzy wskazują, że funkcjonalizowana elektroda osiąga wyjątkową przewodność i stabilność bez potrzeby stosowania skomplikowanych procesów syntezy modyfikatora. Łatwe przygotowanie stanowi niewątpliwą zaletę w porównaniu do skomplikowanych metod otrzymywania innych materiałów nanostrukturalnych. Prezentowany biosensor może posłużyć jako inspiracja do projektowania innych urządzeń zbudowanych w oparciu o lakazę, stwarzając możliwość zastosowania niemetalicznych węglików jako mediatorów do budowy elektrochemicznych biosensorów enzymatycznych [87].

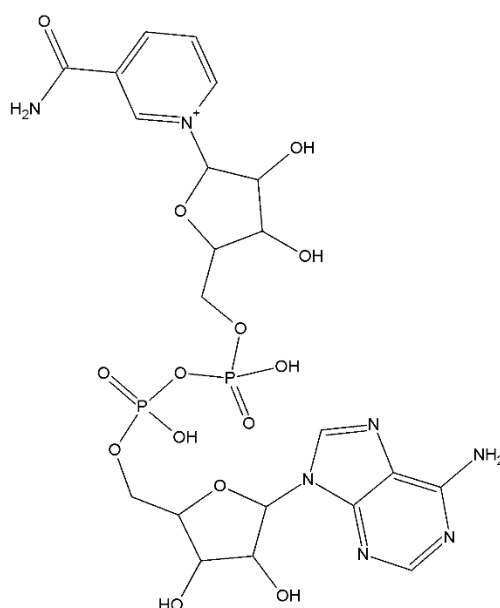
Przedstawione wcześniej artykuły naukowe skupiają się na podkreśleniu postępu w projektowaniu i aplikacji sensorów i biosensorów elektrochemicznych poprzez wykorzystanie różnych metod modyfikacji elektrod oraz innowacyjnych rozwiązań z dziedziny inżynierii materiałowej. W przywołanych pracach zastosowano nanocząstki metali, chalogenki, nanokompozyty węglowe, enzymy, materiały polimerowe czy przewodzące hydrożele w celu opracowania zarówno czułych, jak również selektywnych, a także stabilnych platform mogących służyć detekcji szerokiej grupie analitów (etanotiol, glukoza, dopamina, katechol, nadtlenek wodoru, kwas moczowy, epinefryna czy związki fenolowe). Wśród sensorów opracowanych w ramach prezentowanych publikacji warto zwrócić uwagę na wykorzystanie struktur sferycznych zapewniających dużą powierzchnię, a także porowatych materiałów węglowych czy kompozytów, które nie tylko zwiększają aktywność elektrokatalityczną, ale również poprawiają kinetykę transferu elektronów. Przedstawione koncepcje skupiają się zarówno na układach pozbawionych enzymów oraz takich, które je wykorzystują. Ponadto Autorzy wskazują, że podejście wykorzystujące enzymy i nanozymy stanowi obiecujący kierunek rozwoju czujników elektrochemicznych. Dodatkowo w ramach przedstawionych publikacji badawczych wykazano, że stosowanie powłok z polinorepinefryny czy kompozytów kriożelowych zapewnia wysoką biokompatybilność i ułatwia immobilizację enzymów. Warto również wspomnieć, że w artykułach naukowych stosowane są innowacyjne rozwiązania wykorzystujące integracje układów ze smartfonem czy powłoki hydrożelowe, dzięki czemu możliwy staje się rozwój urządzeń przenośnych i poprawiona zostaje odporność mechaniczna sensorów. Część materiałów elektrodowych charakteryzowała się bardzo dobrymi parametrami analitycznymi, w tym niską granicą

wykrywalności, szerokim zakresem liniowości czy krótkim czasem odpowiedzi. Co więcej, sensory i biosensory wykorzystano do oznaczania analitów w próbkach rzeczywistych, takich jak wino, surowica, ślina, osocze krwi czy napoje (mleko, woda, herbata, soki owocowe). Dzięki tym badaniom możliwy jest więc dalszy rozwój sensorów i biosensorów elektrochemicznych i ich zastosowanie w dziedzinach biomedycznych, monitoringu środowiska i analizie żywności.

2. NADH w zastosowaniach elektrochemicznych

2.1. Informacje ogólne i mechanizm utlenienia

Dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (NAD) to koenzym oksydoreduktaz, który odgrywa istotną rolę w metabolizmie człowieka (występuje we wszystkich żywych komórkach). NAD jest ponadto donorem wodoru w mitochondrialnym procesie fosforylacji oksydacyjnej umożliwiając syntezę ATP (adenozyno-5'-trifosforanu) - głównego nośnika energii w komórkach [88]. Składa się z dwóch nukleotydów (jeden zawiera adeninę, a drugi nikotynoamid) połączonych grupami fosforanowymi. NAD występuje w dwóch formach: utlenionej (NAD^+) i zredukowanej (NADH) [89]. Na Rys. 6 przedstawiono strukturę NADH.



Rys. 6. *Struktura NADH, na podstawie [89].*

Poza pełnieniem kluczowej roli w metabolizmie energetycznym, NADH bierze również udział w wielu procesach zachodzących w komórkach (m.in. jest substratem enzymów takich jak dehydrogenazy). Enzymy te są bardzo ważną częścią łańcucha oddechowego wspierając prawidłowe procesy oddychania komórkowego [90]. Ponad trzysta dehydrogenaz wykorzystuje NAD^+ jako kofaktor i akceptor elektronów. NAD^+

odpowiada za transport dwóch elektronów i jednego protonu podczas reakcji, w której enzym pełni funkcję biokatalizatora [91].

NADH może być utleniany przy bardzo wysokich nadpotencjałach na różnych elektrodach, przy czym sygnał redoks jest bardzo zależny od ich powierzchni [92]. W celu polepszenia kinetyki transferu elektronów opracowywane są sensory oparte na mediatorach do efektywnego utlenienia NADH. Wśród mediatorów redoks wyróżnia się m.in. chinony. Zastosowanie dodatkowo mediatora redoks ma obniżyć nadpotencjał utleniania NADH na elektrodzie [93]. Jako główne zalety elektrochemicznych sensorów NADH wymienia się ich wysoką czułość, niską granicę wykrywalności oraz możliwość miniaturyzacji układu [94].

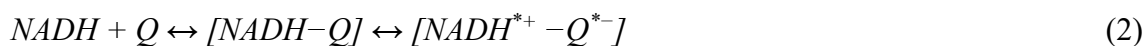
Reakcja utleniania NADH na powierzchni elektrody aktywnej redoks (zawierającej np. mediator) może zostać opisana poniższym mechanizmem [95]:

W wyniku przyłożenia dodatniego potencjału do elektrody, katalizator unieruchomiony na powierzchni elektrody zostaje utleniony do katalitycznie aktywnej formy:



(QH₂ - zredukowane grupy funkcyjne katalizatora opartego na chinonie, Q - utlenione grupy funkcyjne katalizatora opartego na chinonie).

W tym samym czasie NADH dyfunduje do powierzchni elektrody i początkowo między NADH, a utlenioną formą mediatora tworzy się kompleks przeniesienia ładunku. W kolejnym etapie rodnik kationowy [NADH^{*+}-Q^{*-}] tworzy się w wyniku oddania jednego elektronu do mediatora:



Etap ten limituje szybkość procesu.

Następnie dochodzi do przeniesienia protonu kwasowego do mediatora w obrębie kompleksu, co powoduje powstanie rodnika NAD^{*}:



Rodnik NAD^{*} w kompleksie jest bardzo szybko utleniany do NAD⁺:



Ten etap jest bardzo szybki.

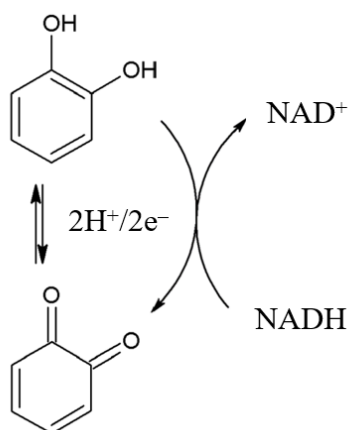
W środowisku kwasowym grupy chinonowe ulegają protonowaniu:



Całkowity proces katalitycznego utleniania NADH na elektrodzie zawierającej grupy chinonowe opisano sumarycznym równaniem:



Taki mechanizm mógłby zostać zaproponowany dla elektrod modyfikowanych materiałami węglowymi i katalizatorem zawierającym grupy chinonowe, co schematycznie przedstawiono dla katecholu (Rys. 7).

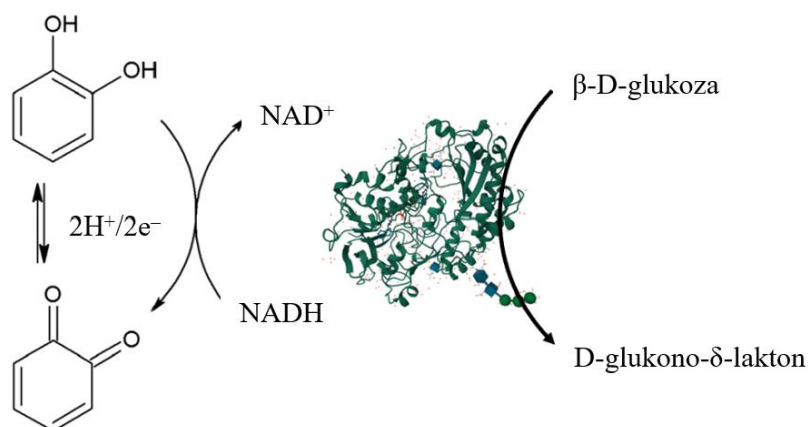


Rys. 7. Katalityczne utlenianie NADH dla katalizatora zawierającego grupy chinonowe, na podstawie [95].

Biosensory oparte na dehydrogenazach zależne od NAD^+ posiadają kilka korzyści w porównaniu z tymi, które oparte są na oksydazach. Tlen nie wpływa na proces enzymatyczny, ponieważ NAD^+ pełni rolę akceptora elektronów i wodoru. NAD^+ działa jako kofaktor w trakcie procesów enzymatycznych, w wyniku czego NADH i produkt powstają jednocześnie [96]. Zarówno utleniona forma (NAD^+), jak i zredukowana (NADH) cechują się wolnymi oraz nieodwracalnymi procesami elektrochemicznymi.

W dziedzinie elektrochemicznych biosensorów modyfikacja powierzchni elektrod również jest kluczowa dla poprawy podstawowych parametrów wydajności, takich jak czułość, stabilność i selektywność [97]. Szczególnym zainteresowaniem cieszą się biosensory glukozy zbudowane w oparciu o dehydrogenazę glukozową (GDH). GDH katalizuje utlenianie β -D-glukozy do D-glukono- δ -laktonu w obecności kofaktora NAD^+ , który jednocześnie ulega redukcji do NADH [98]. Schematyczne przedstawienie

opisanego procesu na powierzchni mediatora zawierającego grupy chinonowe (np. katecholu) pokazano na Rys. 8.



Rys. 8. Katalityczne utlenianie β -D-glukozy do D-glukono- δ -laktonu w obecności kofaktora NAD^+ , na podstawie [89].

Podczas reakcji elektrochemicznej utlenienia glukozy na elektrodach modyfikowanych, glukoza w pierwszej kolejności dyfunduje z elektrolitu do powierzchni elektrody i reaguje z GDH na jej powierzchni. Po skończeniu procesu enzymatycznego β -D-glukoza jest utleniana do D-glukono- δ -laktonu (hydrolizowanego do kwasu glukonowego), a NAD^+ jest redukowany do NADH:



Powstały enzymatycznie NADH reaguje z utlenioną formą mediatora (Med_{Ox}). W wyniku tej reakcji NADH ponownie jest utleniany do NAD^+ , a Med_{Ox} redukuje się do formy zredukowanej mediatora (Med_{Red}).



W ostatnim etapie (9) Med_{Red} ulega utlenieniu, przekazując 2 elektrony/protony [99,100].

2.2. Detekcja NADH

Istotna rola NADH w procesach metabolicznych sprawia, że zainteresowanie tą cząsteczką jest nadal ogromne. Według bazy Science Direct w styczniu 2025 roku ilość prac naukowych dotyczących NADH wynosiła około 155 tysięcy. Uwagę badaczy zwraca przede wszystkim detekcja tej ważnej dla człowieka molekuły. Wykorzystanie elektrod modyfikowanych czy sensorów elektrochemicznych to sposoby na efektywną detekcję dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego.

Jedna z ciekawych koncepcji, w której opracowano amperometryczny sensor do detekcji NADH, to praca Hamidi i współpracowników. Autorzy wykorzystali nanohybrydowy materiał składający się z nanocząstek palladu (PdNPs) i wielościennych nanorurek węglowych (MWCNT). Do badań elektrochemicznych wykorzystano elektrodę z węgla szklanego (GC). Techniki woltamperometryczne wykazały wysoką aktywność elektrokatalityczną modyfikowanej elektrody. Skonstruowany sensor umożliwił detekcję NADH przy obniżonym potencjale (+0,39 V w porównaniu z +0,7 V dla elektrody niemodyfikowanej). Autorzy obserwowali szybką, liniową odpowiedź w zakresie stężeń od 0,1 do 200 μM . Oszacowano czułość elektrody wynoszącą 596 nA $\mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ i niską granicę wykrywalności (32 nM). Elektroda modyfikowana wykorzystana została również w niniejszej pracy do oznaczania H_2O_2 , a także jako matryca do konstrukcji biosensora glukozy (w wyniku immobilizacji GOx). Zadawalające rezultaty potwierdzają wszechstronność zastosowania takiego układu. Bardzo dobre właściwości elektrokatalityczne przypisuje się synergistycznemu efektowi nanocząstek palladu i wielościennych nanorurek węglowych, co sprawia, że taka elektroda modyfikowana może być wykorzystywana do detekcji NADH przy niskich stężeniach [101].

Kolejne interesujące i warte uwagi podejście wykorzystujące jako modyfikator nanocząstki palladu prezentują You i Jeon. Opracowali elektrodę GC modyfikowaną z wykorzystaniem wspomnianych nanocząstek osadzonych na wielościennych nanorurkach węglowych (MWCNT-Pd) oraz polimeru poli(3,4-etylenodioksypirolu) (PEDOP) w celu elektrochemicznego utleniania NADH. Elektroda PEDOP/MWCNTs-Pd/GCE została przygotowana w szybki i prosty sposób, wykazując zwiększoną czułość na NADH. Opracowany sensor NADH charakteryzował się szerokim liniowym zakresem

odpowiedzi wynoszącym od 1 μM do 13 mM przy potencjale +0,42 V. Oszacowana granica wykrywalności wynosiła 0,18 μM . Uzyskane w ramach niniejszych badań wyniki potwierdziły, że zastosowanie nanocząstek palladu i przewodzącego polimeru poprawia właściwości elektrokatalityczne elektrody w procesie detekcji NADH. Jako główne zalety proponowanego sensora Autorzy wyróżniają szybką odpowiedź, długoterminową stabilność oraz relatywnie dobrą selektywność. Ponadto twierdzą, że elektroda modyfikowana PEDOP/MWCNTs-Pd/GCE posiada potencjał do zastosowania w oznaczaniu NADH [102].

Z kolei Manusha wraz z zespołem badawczym opracowali elektrochemiczny sensor do detekcji NADH w oparciu o nanocząstki innego metalu szlachetnego - srebra (AgNPs) oraz fenotiazyny (PTZ). Celem prowadzonych badań było określenie wpływu kształtu nanocząstek srebra na wydajność detekcji analitu. Materiały nanohybrydowe AgNPs/PTZ o różnych kształtach (kulistych, trójkątnych i prętowych) zsyntetyzowano i zastosowano jako modyfikatory elektrody. Spośród trzech kształtów nanocząstek srebra zastosowanych do modyfikacji elektrody i w dalszym etapie oceny ich właściwości elektrokatalitycznych w kierunku utlenienia NADH wykazano, że optymalny kształt posiadają nanocząstki prętowe. Dla tego układu Autorzy wskazują na możliwość detekcji w szerokim zakresie stężeń (1,9-89 μM), z granicą wykrywalności wynoszącą 0,52 μM i czułością równą 0,689 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$. W ramach prowadzonych badań oceniono również inne kluczowe parametry sensora, w tym stabilność, selektywność i powtarzalność, a uzyskane wyniki Autorzy określają jako wysoce zadowalające. Niewątpliwą zaletą jest fakt, że badanie to oferuje perspektywę budowy sensorów chemicznych i biologicznych o ulepszonych właściwościach analitycznych przy użyciu dostosowanych oraz kontrolowanych kształtem nanocząstek [103].

Następna ciekawa praca, dotycząca nieenzymatycznego sensora do detekcji NADH, powstała w zespole Prasanna. Składowe elementy matrycy to nanocząstki złota (AuNPs) osadzone na kompozycie polidopaminy (PDA) i węgliku tytanu (TiC). Modyfikacja elektrody z węgla szklanego materiałem hybrydowym Au@PDA/TiC pozwoliła na możliwość utlenienia NADH przy potencjale równym +0,6 V względem Ag/AgCl w pH równym 7. Dodatkowo wyznaczono liniową odpowiedź w zakresie stężeń analitu od 0,018 do 674 μM . Oszacowana granica wykrywalności w tym układzie wynosiła 0,0062 μM . W niniejszych badaniach Autorzy wskazują, że zsyntezowany przez

nich materiał hybrydowy Au@PDA/TiC jest niedrogi, cechuje się bardzo dobrą aktywnością katalityczną, dużą powierzchnią, relatywnie wysoką przewodnością, a także bardzo dobrą biokompatybilnością, co stwarza możliwość zastosowania przy projektowaniu szybkich i czułych sensorów NADH. Ponadto sensor wykazywał doskonałą selektywność i stabilność, umożliwiając skuteczną detekcję NADH w rzeczywistych próbkach, takich jak żywność, woda czy osocze krwi, co potwierdza jego potencjalne zastosowanie w analizie środowiskowej i diagnostyce [104].

Inne warte uwagi podejście prezentują Marlinda i współpracownicy. W ramach artykułu naukowego Autorzy przedstawiają prostą metodę chemicznej syntezy nanokompozytu, składającego się z nanoprętów złota (AuNR) wbudowanych w zredukowany tlenek grafenu (rGO). Tak otrzymany nanokompozyt, w którym AuNR dekoruje rGO (AuNR@rGO), został bezpośrednio nałożony na elektrodę z węgla szklanego w celu wysoce czułego i selektywnego elektrochemicznego wykrywania NADH. Zbadano elektrokatalityczne właściwości elektrody modyfikowanej AuNR@rGO wobec utleniania NADH, wykazując liniowy wzrost prądu amperometrycznego w zakresie stężeń NADH od 1 do 31 μM . Granica wykrywalności (LOD) została oszacowana na bardzo niski poziom wynoszący 0,22 μM , co potwierdza wysoką czułość elektrody. Dodatkowo Autorzy wskazują, że ich elektroda zachowuje selektywność w obecności innych biomolekuł, takich jak glukoza, kwas moczowy, kwas askorbinowy i dopamina. Ponadto zwracają uwagę na znaczący potencjał zastosowania opracowanej elektrody modyfikowanej w rozwoju zaawansowanych biosensorów opartych na dehydrogenazach [105].

Równie interesujące badania, wykorzystujące jako przewodzący materiał węglowy zredukowany elektrochemicznie tlenek grafenu (rGO), zostały przeprowadzone przez zespół Li. W ramach badań Autorzy skonstruowali amperometryczny biosensor oparty na nanokompozytowej warstwie rGO i politioniny (PTH) do detekcji NADH i etanolu. Materiał rGO-PTH zsyntezowano na powierzchni elektrody z węgla szklanego w procesie wieloetapowym, który obejmował elektrochemiczną redukcję tlenku grafenu oraz elektropolimeryzację tioniny. Wytworzony nanokompozyt cechowała wysoka przewodność oraz obecność grup redoks, co umożliwiło utlenianie NADH przy niskim potencjale (+0,02 V względem Ag/AgCl). Wykrywanie NADH na elektrodzie modyfikowanej umożliwiło określenie relatywnie szerokiego zakresu liniowej detekcji

(0,01-3,9 mM), wysokiej czułości ($143 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$) i niskiej granicy wykrywalności (LOD równe $0,1 \mu\text{M}$). Dodatkowo sensor został zintegrowany z dehydrogenazą alkoholową (ADH), co umożliwiło pośrednią detekcję etanolu. Autorzy uważają, że materiał rGO-PTH z pewnością posłuży do opracowywania innych amperometrycznych biosensorów opartych na dehydrogenazach [106].

Następna warta uwagi publikacja naukowa to praca Chen i jego grupy badawczej, w której opracowano sensor elektrochemiczny oparty na bazie nanostruktur tlenku kobaltu (Co_3O_4) do wykrywania NADH. Modyfikacja powierzchni elektrody umożliwiła znaczące obniżenie potencjału utleniania NADH (z $+0,7$ do $+0,1$ V), eliminując potrzebę stosowania wysokich nadpotencjałów charakterystycznych dla niemodyfikowanych elektrod. Autorzy wskazują, że skonstruowany sensor charakteryzował się wysoką czułością, niską granicą wykrywalności ($4,25 \mu\text{M}$) oraz doskonałą selektywnością wobec NADH przy liniowej odpowiedzi w zakresie stężeń od 10 do $100 \mu\text{M}$ analitu. Niniejsze badania przedstawiają również koncepcję wyeliminowania kwasu askorbinowego jako substancji interferującej (poprzez wprowadzenie oksydazy askorbinianowej). Jak wskazują Autorzy, dzięki stabilności nanostruktur tlenku kobaltu oraz ich efektywności katalitycznej, opracowany sensor oferuje obiecujące możliwości w elektrochemicznej detekcji NADH, zarówno w układach laboratoryjnych, jak i potencjalnych aplikacjach praktycznych [107].

Z kolei w artykule Atta i współautorów przedstawiono nową strategię detekcji NADH z wykorzystaniem platformy kompozytowej składającej się z cieczy jonowych (ILC), nanorurek węglowych oraz nanocząstek magnetytu. Autorzy wykazali, że cząsteczki cieczy jonowej w połączeniu z nanorurkami węglowymi i nanocząstkami magnetytu poprawiły właściwości elektrochemiczne modyfikatora elektrody z węgla szklatego, umożliwiając skuteczne utlenianie NADH. Wyznaczono szereg parametrów charakteryzujących otrzymany sensor NADH, m.in. zakres liniowości $5\text{-}700 \mu\text{M}$, granicę wykrywalności $34,6 \text{ nM}$ oraz granicę oznaczalności $0,115 \mu\text{M}$. Ponadto Autorzy wskazują, że otrzymany w ramach niniejszych badań sensor wykazywał stabilną odpowiedź amperometryczną oraz był odporny na wpływ substancji interferujących, takich jak kwas askorbinowy, tryptofan, ibuprofen czy morfina [108].

Przedstawione w niniejszym rozdziale rozważania w dalszym ciągu nie rozwiązują wszystkich problemów związanych z oznaczaniem NADH. Jednym

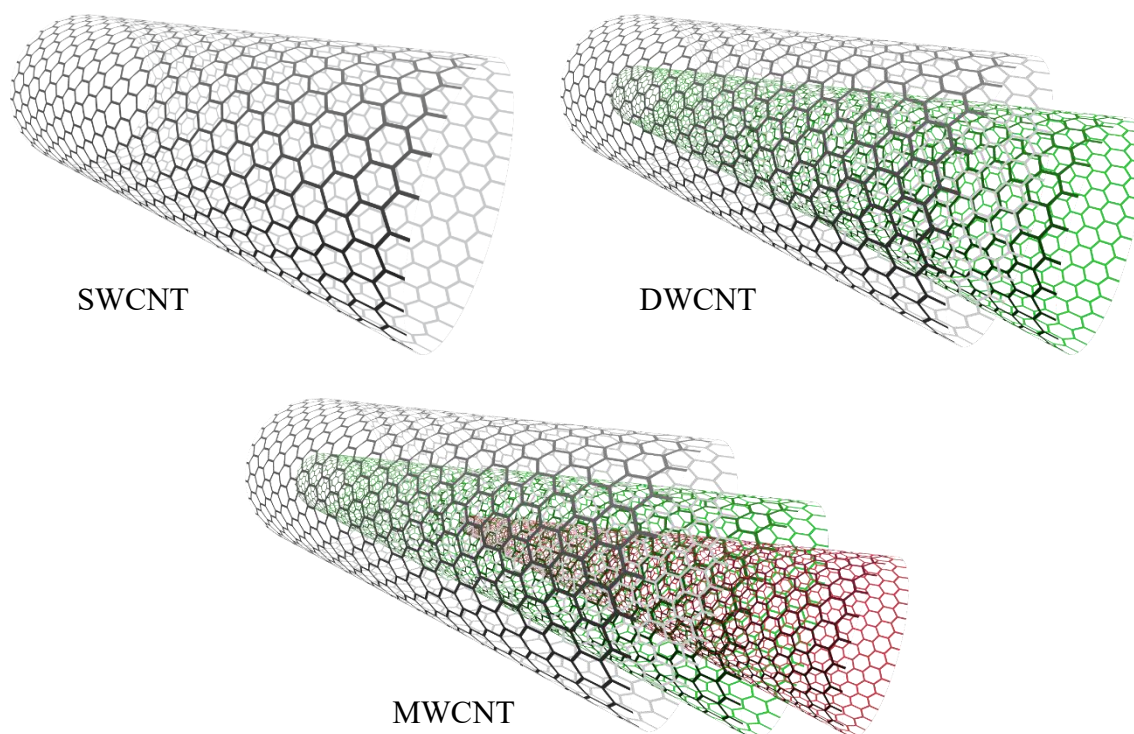
z głównych wyzwań w aspekcie detekcji tego analitu jest wysoki nadpotencjał potrzebny do utlenienia NADH (w wielu przypadkach przekraczający +0,5 V względem Ag/AgCl). To z kolei prowadzi do obniżenia selektywności sensorów, ponieważ wiele związków wchodzących w skład matryc próbek rzeczywistych może utleniać się przy podobnych lub nawet niższych potencjałach, jak również może prowadzić do zanieczyszczania powierzchni elektrody. Ponadto utlenienie NADH może powodować, że na powierzchni elektrody będą adsorbować się produkty uboczne i pośrednie, a to w efekcie będzie prowadziło do stopniowego zmniejszenia aktywności elektrody. Istotny staje się więc sposób modyfikacji powierzchni elektrody. Kluczowe znaczenie ma dobór odpowiednich materiałów, które mają za zadanie zwiększyć aktywność katalityczną wobec utlenienia NADH. Ważnym aspektem staje się również projektowanie elektrody tak, by modyfikacje oparte o mediatory redoks (m.in. chinony) ułatwiały transfer elektronów. Dodatkowo należy skupić się na poszukiwaniu stabilnych mediatorów, wydajnych w pH zbliżonym do obojętnego. W celu zapewnienia selektywności na relatywnie wysokim poziomie, do modyfikacji elektrod często należy wprowadzić specyficzne elementy rozpoznające, np. enzymy. Pomimo rozwijającej się technologii i rozwojowi inżynierii materiałowej, które znacząco wpłynęły na możliwości wykrywania NADH, dalsze wprowadzanie ulepszeń i innowacji, nie tylko w zakresie funkcjonalizacji elektrod modyfikowanych, ale również w doborze wydajnego mediatora, jest nadal wymagane i niezbędne do dalszego rozwoju ogólnodostępnych i konkurencyjnych sensorów NADH. W związku z powyższym, modyfikacje elektrod i ich dalsza ocena aktywności elektrokatalitycznej w kierunku utlenienia NADH jest procesem, któremu wciąż warto poświęcić więcej uwagi. Ponadto uważam, że kontynuowanie tego kierunku rozwoju wniesie dodatkowy wkład w rozwój nauki w dziedzinie sensorów służących oznaczaniu NADH zarówno w roztworach modelowych i rzeczywistych tego związku.

3. Nanorurki węglowe

3.1. Informacje ogólne, budowa, właściwości i metody syntezy

Materiały węglowe stanowią ważny element nowoczesnych technologii za sprawą unikalnych właściwości fizycznych, chemicznych i elektrycznych. Ilość struktur i możliwości modyfikowania pożądanych właściwości materiałów węglowych daje podstawy do dalszych badań i innowacji w zakresie rozwoju nowych technologii. Warto wyróżnić cztery główne klasy tych materiałów: grafen, nanorurki węglowe, fulereny i nanodiamenty [109]. Grafen jest dwuwymiarową strukturą atomów węgla charakteryzującą się wysoką przewodnością elektryczną, cieplną i wytrzymałością mechaniczną [110]. Z uwagi na niski współczynnik absorpcji światła (~2%) jest szeroko stosowany w optoelektronice, a ponadto w systemach magazynowania energii, medycynie i układach elektronicznych [109,111]. Z kolei fulereny (jak C₆₀) są chemicznie stabilnymi nanostrukturami, które również są zdolne do absorpcji światła, magazynowania energii oraz enkapsulacji innych cząsteczek wewnątrz struktury [112–114]. Fulereny są wykorzystywane w systemach dostarczania leków, fotowoltaice czy chemii supermolekularnej [109,114]. Natomiast nanodiamenty (CND) to materiały węglowe o wysokiej wytrzymałości mechanicznej i przewodnictwie cieplnym [115]. Ze względu na swoją biokompatybilność, jak również możliwość funkcjonalizacji są szeroko stosowane w medycynie do obrazowania czy transportu leków, a także w elektronice, materiałach kompozytowych oraz stosuje się je jako dodatki do powłok ochronnych [116,117].

Nanorurki węglowe (CNT) określane są jako arkusze grafitu zwinięte w cylindryczne struktury. Zazwyczaj ich długość wynosi kilka mikrometrów, a średnica około 100 nm [118]. Nanorurki są uważane za pochodne nie tylko włókien węglowych, ale też fulerenów, które zbudowane są z cząsteczek zawierających 60 atomów węgla, uformowanych w zamknięte tuby [119]. Główny podział nanorurek określany jest na podstawie liczby warstw węglowych, tj. na jednościenne (SWCNT), dwuścienne (DWCNT) i wielościenne (MWCNT). Rys. 9 przedstawia schematycznie rodzaje nanorurek węglowych.



Rys. 9. Rodzaje nanorurek węglowych, na podstawie [120].

Jednościenne nanorurki węglowe (SWCNT) składają się z pojedynczej warstwy grafenu, a ich średnica jest równa od 1 do 2 nm. Natomiast długość SWCNT może się różnić, w zależności od zastosowanej metody syntezy. Technologia otrzymywania wymaga użycia katalizatora zapewniającego precyzyjną kontrolę procesu. Mimo to, SWCNT są narażone na różnego rodzaju zanieczyszczenia podczas ich otrzymywania [121]. Dwuścienne nanorurki węglowe składają się z dwóch koncentrycznych warstw, z których zewnętrzna otacza wewnętrzną. Średnica zewnętrznej warstwy jest równa od 2 do 4 nm, a wewnętrznej od 1 do 3 nm [120]. Z kolei wielościenne nanorurki węglowe (MWCNT) zbudowane są z wielu warstw grafenu, które są zwinięte w struktury o średnicach wahających się w granicach 2-50 nm. Średnica wewnętrznej warstwy jest równa około 0,7 nm, a zewnętrznej może wynosić od 2 do nawet 30 nm. Można wyróżnić dwa modele strukturalne MWCNT: model przypominający matryoszkę (warstwy grafenu układają się w koncentryczne cylindry) i model przypominający pergamin (pojedyncza warstwa grafenu jest wielokrotnie zwijana wokół własnej osi, przypominając strukturę zwój papieru) [120,121]. W Tabeli 1 zestawiono najważniejsze cechy i porównano MWCNT i SWCNT.

Tabela 1. Porównanie jedno- i wielościennych nanorurek węglowych, na podstawie [121–123].

	SWCNT	MWCNT
Liczba warstw grafenu	Jedna	Wiele
Obecność katalizatora podczas syntezy	Konieczna	Niekonieczna
Struktura	Brak całkowitego rozproszenia, tworzenie struktur wiązkowych	Równomierne rozproszenie, bez widocznego tworzenia struktur wiązkowych
Rezystywność / $\Omega \cdot m$	Najczęściej w zakresie $10^{-4} - 10^{-3}$	Najczęściej w zakresie $1,8 \cdot 10^{-5} - 6,1 \cdot 10^{-5}$
Czystość	Relatywnie niska	Relatywnie wysoka
Możliwość wystąpienia defektów	Większe prawdopodobieństwo podczas funkcjonalizacji	Mniejsze prawdopodobieństwo podczas funkcjonalizacji
Charakterystyka	Relatywnie łatwa charakterystyka	Skomplikowana struktura
Elastyczność	Można je skręcać, są elastyczne	Nie są elastyczne

Nanorurki węglowe obecnie uważane są za najmocniejsze materiały, jakie występują w przyrodzie. Ich duża wytrzymałość i elastyczność związane są z obecnością silnych wiązań kowalencyjnych pomiędzy atomami węgla, jak również heksagonalnej sieci połączonych atomów tego pierwiastka. W związku z tym charakteryzują się wysokim modułem Younga. Właściwości SWCNT zależą od średnicy i chiralności, natomiast MWCNT od liczby warstw. Wysoka wytrzymałość i lekkość sprawiają, że nanorurki znajdują zastosowanie w przemyśle lotniczym, natomiast właściwości metaliczne i półprzewodnikowe stwarzają możliwości aplikacji w urządzeniach elektronicznych [120,124].

Unikalne właściwości elektroniczne CNT wynikają zarówno z ich struktury molekularnej, jak również symetrii. W zależności od wektora chiralności mogą posiadać charakter metaliczny, bądź półprzewodnikowy. Ich przewodność elektryczna jest zdecydowanie wyższa niż metali takich jak miedź. Zarówno wibracje wewnątrz sieci krystalicznej oraz występowanie defektów mogą wpływać na zmianę niektórych parametrów (np. rezystancji, pojemności czy indukcyjności). W związku z tym nanorurki wykorzystuje się w kompozytach o anizotropowych właściwościach elektrycznych [120,125].

Ponadto nanorurki węglowe posiadają również wyjątkowe właściwości termiczne wynikające z ich specyficznej struktury i silnych wiązań węgiel-węgiel. Takie wiązania sprawiają, że CNT wykazują zjawisko tzw. bezrozproszeniowego przewodzenia ciepła, co daje im ponad 15 razy wyższe przewodnictwo niż w przypadku miedzi (w temperaturze pokojowej). W atmosferze powietrza nanorurki są stabilne termicznie do 750°C, natomiast w próżni aż do 2800°C. Dodatkowo w temperaturach niższych niż -253°C mogą wykazywać nadprzewodnictwo. Co istotne, właściwości cieplne nanorurek zależą od ich struktury (jedno- lub wielościenne). Wzdłuż osi nanorurki są bardzo dobrymi przewodnikami ciepła, z kolei poprzecznie pełnią rolę izolatorów cieplnych [124,126].

CNT mają duże znaczenie również w optyce, co związane jest z ich jednowymiarowością. Podczas teoretycznych badań wykazano, że aktywność optyczna chiralnych nanorurek zanika wraz ze wzrostem średnicy, sugerując, że inne właściwości fizyczne także mogą zależeć od tego parametru. Dzięki właściwościom optycznym wykorzystanie CNT jest szczególnie istotne w technologiach światłowodowych, jak również w układach zaawansowanych urządzeń optoelektronicznych [120,127].

Nanorurki są także bardziej reaktywne niż warstwy grafenu, co wynika bezpośrednio z zakrzywionej powierzchni cylindrycznej. Zróżnicowanie reaktywności pomiędzy ścianami bocznymi, a końcami nanorurek jest związane ze wspomnianą krzywizną i niedopasowaniem orbitali. Im mniejsza średnica, tym większe zakrzywienie struktury i w konsekwencji większa reaktywność. Dodatkowo ściany boczne i końce CNT mogą zostać poddane chemicznej modyfikacji w sposób kowalencyjny, a to z kolei prowadzi do możliwości sterowania rozpuszczalnością nanorurek w różnych rozpuszczalnikach. Możliwość funkcjonalizacji zwiększa potencjał aplikacyjny (należy jednak pamiętać o zanieczyszczeniach mogących utrudnić badanie wpływu poszczególnych modyfikacji) [120–122,124].

Do syntezy nanorurek węglowych wykorzystywane są różne metody, w tym fizyczne, chemiczne i elektrochemiczne [128]. Niejednokrotnie używane są prekursory, m.in. benzen, acetylen, ksilen czy etylen [129]. CNT najczęściej syntezowane są przy użyciu trzech wymienionych metod: wyładowanie łukowe, ablacja laserowa czy chemiczne osadzanie z fazy gazowej [129,130].

Metoda wyładowania łukowego należy do najstarszych, a zarazem najskuteczniejszych technik syntezy nanorurek węglowych [131,132]. W tym procesie wyładowanie łukowe następuje w wysokiej temperaturze (w zakresie od 4000 do 6000 K) pomiędzy dwoma elektrodami grafitowymi w obecności obojętnego gazu (helu lub argonu) pod ciśnieniem $\sim 666,61$ MPa [121,133]. Podczas nagrzewania węgiel z elektrody dodatniej (anody) sublimuje, a generowane pary węgla kondensują się na elektrodzie ujemnej (katodzie) tworząc nanorurki. Przy użyciu metody wyładowania łukowego możliwe jest otrzymanie zarówno jednościennych (SWCNT), jak i wielościennych nanorurek węglowych (MWCNT). Podczas syntezy SWCNT konieczne jest zastosowanie katalizatorów (niklu, kobaltu czy itru). Natomiast w przypadku syntezy MWCNT nie ma konieczności stosowania katalizatorów metalicznych [121]. Na jakość i rozmiary otrzymanych nanorurek wpływ mają takie parametry jak napięcie czy geometria elektrod [133]. Z wykorzystaniem tej techniki możliwe jest otrzymanie nanorurek o średnicy od 2 do 20 nm i długości kilku mikrometrów [132]. Do zalet tej metody należą wysoka jakość i czystość otrzymanych nanorurek. Ponadto można otrzymać CNT o relatywnie niskiej ilości defektów. Jednakże jako wadę podaje się trudność w oczyszczaniu końcowego materiału z produktów ubocznych, w tym węgla amorficznego i resztek katalizatorów [120,121,131].

Kolejną metodą syntezy nanorurek węglowych jest ablacja laserowa. Jest to zaawansowana technika, którą wykorzystuje się zarówno do syntezy SWCNT, jak i MWCNT. W wyniku otrzymywania CNT za pomocą tej metody wiązka lasera skupiona zostaje na grafitowej tarczy reaktora, gdzie następuje ablacja grafitu. Proces ten charakteryzują określone warunki, jak np. temperatura (około 1200°C), obecność gazu szlachetnego (argonu czy helu) oraz obecność katalizatora (kobaltu, bądź niklu). Nanorurki powstają w wyniku formowania odparowanych cząstek węgla, które ulegają kondensacji na powierzchni chłodzonego kolektora [134]. Główną zaletą CNT otrzymanych metodą ablacji laserowej jest możliwość dostosowania średnicy nanorurek w wyniku optymalizacji parametrów syntezy poprzez wybór katalizatora, moc lasera, ciśnienie czy przepływ gazu. Tą metodą możliwe jest otrzymanie CNT o średnicy od 5 do 20 nm i długości kilkuset mikrometrów [132]. Synteza nanorurek z wykorzystaniem opisywanej metody nie jest wydajna z ekonomicznego punktu widzenia poprzez wysokie wymagania energetyczne czy konieczność używania oczyszczonych materiałów.

Dodatkowo powstałe CNT mogą posiadać widoczne defekty. Wydajność techniki jest z reguły niższa niż w przypadku poprzednio opisanej metody wyładowania łukowego. W związku z tym wykorzystywana jest głównie w badaniach naukowych i syntezie wyspecjalizowanych nanomateriałów, gdzie priorytetem jest wysoka jakość otrzymywanego produktu [120,121,135].

Następną często stosowaną techniką używaną do syntezy nanorurek węglowych jest osadzanie chemiczne z fazy gazowej (CVD). Metodę tę charakteryzuje relatywnie niska temperatura prowadzenia procesu (500-1000°C), wysoka wydajność i możliwość precyzyjnej kontroli otrzymywanych struktur CNT [136]. Proces związany jest z dekompozycją gazowych związków węglowych (np. metanu czy acetyleny) w obecności katalizatorów metalicznych (najczęściej niklu, kobaltu, bądź żelaza), które odpowiadają za tworzenie miejsc nukleacji nanorurek. Podczas rozkładu dochodzi do osadzenia węgla na powierzchni katalizatora i tworzenia CNT o różnej średnicy, różnym stopniu uporządkowania czy różnej liczbie ścian [137]. Wyróżnia się kilka wariantów techniki CVD: wysokociśnieniowe, katalityczne CVD przy użyciu alkoholi, wspomagane plazmą czy aerożelowe [123]. Metoda CVD charakteryzuje się niższym kosztem produkcji w porównaniu z poprzednio opisanymi technikami, co stanowi jej dużą zaletę. Ponadto umożliwia kontrolę nad morfologią powstających nanorurek (m.in. możliwość występowania w formie proszków czy cienkowarstwowych filmów). Z kolei problemem tej techniki jest niższa jakość krystalograficzna CNT w porównaniu z metodą ablacji laserowej czy wyładowania łukowego [138].

Po syntezie kluczowym etapem jest oczyszczenie nanorurek, aby mogły znaleźć one zastosowania praktyczne. Podczas otrzymywania CNT mogą powstawać zanieczyszczenia, np. nanocząstkami metali, amorficznym węglem, mniejszymi strukturami fulerenów czy grafitem krystalicznym. Istotne jest więc usunięcie niepożądanych składników, które mogą obniżać właściwości mechaniczne, chemiczne i elektryczne nowo zsyntezowanych nanorurek. Najczęściej stosuje się fizyczne i chemiczne metody oczyszczania. Spośród metod chemicznych wyróżnia się procesy utlenienia za pomocą HNO_3 , $\text{KMnO}_4/\text{H}_2\text{SO}_4$ oraz silne trawienie kwasowe. W przypadku metod fizycznych można wymienić filtrację, chromatografię czy procesy wspomagane ultradźwiękami [120]. Głównym celem tych działań jest nie tylko usunięcie zanieczyszczeń, ale również homogenizacja materiału. W wyniku oddziaływań Van der

Waals nanorurki mają skłonność do agregacji, dlatego bardzo ważnym wyzywaniem jest ich dyspersja. Można wyróżnić metody mechaniczne i chemiczne modyfikacji powierzchni CNT, np. funkcjonalizację kowalencyjną czy niekowalencyjne traktowanie polimerami pozwalające na lepsze rozproszenie w rozpuszczalnikach [139].

3.2. Potencjał aplikacyjny nanorurek węglowych

Obszary nanotechnologii skupiają się wokół zastosowań materiałów, m.in. w medycynie, energetyce, ochronie środowiska czy sensorach. Nanorurki węglowe stanowią podstawę jednych z bardziej rozwijających się nanomateriałów ze względu na ilość możliwych aplikacji. CNT dzięki wysokiej przewodności i zdolnościom adsorpcyjnym są stosowane w kompozytach o wysokiej jakości, urządzeniach służących magazynowaniu energii czy systemach magazynowania wodoru [140].

Nanorurki węglowe powszechnie używane są do konstrukcji sensorów i biosensorów. Modyfikacja nanorurek pozwala zwiększyć zarówno selektywność, jak również czułość tych urządzeń. Interesującą koncepcją jest praca Yang i współpracowników. Autorzy skonstruowali sensor do wykrywania kreatyniny w oparciu o CNT i bimetaliczny szkielet organiczny ZnNiMOF. Użycie w pracy nanorurek węglowych miało istotne znaczenie, ponieważ ich bardzo dobra przewodność elektryczna zwiększyła zarówno aktywność elektrochemiczną, jak również powierzchnię aktywną sensora. W ramach prowadzonych badań zoptymalizowano stosunek metali w strukturze ZnNiMOF oraz proporcje tego bimetalicznego szkieletu do nanorurek w celu osiągnięcia najbardziej wydajnych parametrów działania materiału elektrodowego. Opracowany sensor charakteryzował się doskonałą selektywnością, wysoką czułością (LOD wynosiło 0,009 μM) i szerokim zakresem detekcji równym od 0,03 do 400 μM . Jako kolejne zalety sensora Autorzy wskazują znakomitą stabilność, a także powtarzalność uzyskiwanych pomiarów. Dodatkowo w pracy przeprowadzono analizy w rzeczywistych próbkach zarówno moczu, jak i potu. Koncepcja tego typu stwarza możliwości precyzyjnego wykrywania kreatyniny i może być narzędziem wspomagającym wczesną diagnozę przewlekłej choroby nerek [141].

Inna ciekawa praca to publikacja Batra i zespołu badawczego zakładająca opracowanie enzymatycznego biosensora amperometrycznego służącego do detekcji kwasu foliowego. Biosensor skonstruowano w oparciu o enzym reduktazy kwasu dihydrofoliowego (DHFR). Autorzy wykorzystali nanokompozyt składający się z funkcjonalizowanych wielościennych nanorurek węglowych i nanocząstek tlenku tytanu, którym w kolejnym etapie zmodyfikowali powierzchnię złotej elektrody. Nanorurki wykorzystano jako materiał katalityczny, którego zadaniem było zapewnienie dużej powierzchni aktywnej i dobrej przewodności. Biosensor charakteryzowała odpowiedź w optymalnych warunkach (pH wynoszące 7,5 i temperatura 35°C). Oznaczenie analitu wykonano przy relatywnie niskim potencjale równym +0,125 V względem Ag/AgCl. Wyznaczono również szereg parametrów analitycznych, w tym granicę wykrywalności (LOD równe 11,48 nM), zakres liniowej odpowiedzi biosensora (od 5 do 50 nM) oraz czułość wynoszącą 0,42 $\mu\text{A nM}^{-1} \text{cm}^{-2}$. Dodatkowo wykorzystano otrzymany biosensor do oznaczania poziomu kwasu foliowego w próbkach surowicy pobranej od kobiet w ciąży, co stanowi ogromny potencjał aplikacyjny tego urządzenia [142].

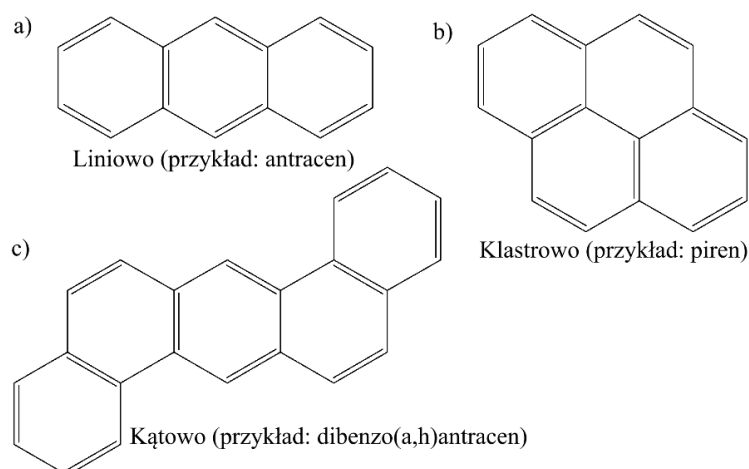
Jednym z innych możliwych zastosowań nanorurek węglowych są wypełniacze, które stosuje się do produkcji kompozytów. Aby poprawić właściwości nowo powstałych materiałów CNT łączy się m.in. z polimerami jak w pracy Wondu i grupy badawczej. Autorzy opracowali kompozyt poliuretanu termoplastycznego (TPU) połączonego z hybrydowym napełniaczem, który zawierał nanorurki węglowe (CNT) i tytanian baru [143]. Kolejne możliwe zastosowanie nanorurek węglowych to aplikacja w układach służących magazynowaniu wodoru. Technologie te są stale rozwijane ze względu zarówno na unikalne właściwości wodoru jako paliwa oraz rosnącą świadomość negatywnych skutków ciągłego zanieczyszczania środowiska. W artykule naukowym autorstwa Dhanya i Ramaprabhu przedstawiono innowacyjne podejście do magazynowania wodoru w wyniku opracowania nowego kompozytu [144]. Bardzo interesujące staje się również wykorzystanie nanorurek węglowych w elektronice, a w szczególności w układach scalonych. Takie rozważania zastosowano w pracy przedstawionej przez J. Tang i współautorów. W ramach niniejszych badań opracowali proces tworzenia wysokowydajnych tranzystorów cienkowarstwowych (TFT) [145]. Opisana grupa materiałów węglowych znajduje również potencjał

aplikacyjny w medycynie, a w szczególności w systemach dostarczania leków (DDS), transportując środki terapeutyczne do obszarów chorobowych w sposób kontrolowany i dodatkowo niwelując przy tym skutki uboczne. Bardzo ciekawe podejście zastosował Koh i jego grupa badawcza, którzy skupili się na opracowaniu ukierunkowanego systemu dostarczania leków przeciwnowotworowych [146].

4. Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne

4.1. Informacje ogólne

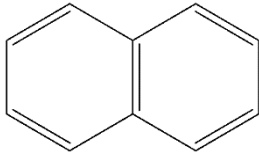
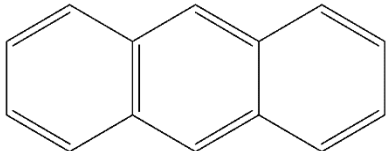
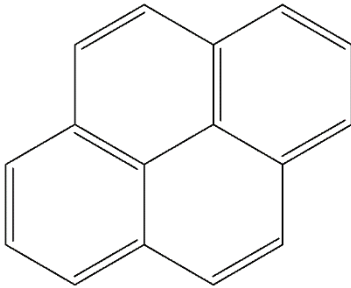
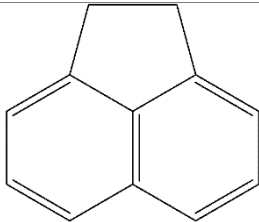
Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) to związki organiczne składające się z dwóch lub więcej pierścieni benzenowych połączonych między sobą liniowo, klastrowo lub kątowo. Budowę molekularną WWA wraz z przykładami przedstawiono na Rys. 10. Zgodnie z nomenklaturą terminem WWA określa się grupę związków chemicznych składających się tylko i wyłącznie z atomów węgla i wodoru [147]. WWA można podzielić na lekkie (zawierające do czterech pierścieni w strukturze) oraz ciężkie (zawierające więcej niż cztery pierścienie w strukturze). Ciężkie WWA są nie tylko bardziej stabilne, ale również zdecydowanie bardziej toksyczne [148,149]. W większości są to bezbarwne, białe bądź jasnożółte ciała stałe. Zazwyczaj przedostające się do środowiska naturalnego WWA występują jako mieszanina dwóch lub większej liczby tych związków, czego przykładem jest sadza. Związki te są najczęściej wykrywane w środowisku: powietrzu, wodzie czy glebie. Powstawanie WWA skupia zarówno procesy biologiczne oraz jako produkty niepełnego spalania (pochodzenia naturalnego, jak pożary lasów i spowodowanych przez człowieka, jak spaliny samochodowe czy dym papierosowy). Udowodniono, że część związków należących do ww. grupy ma działanie rakotwórcze i mutagenne, wpływając na zaburzenia i rozwój m.in. układu odpornościowego czy odporności humoralnej (jeden z mechanizmów odporności swoistej) [147].



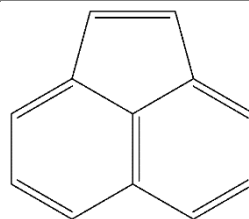
Rys. 10. Budowa molekularna WWA, na podstawie [147].

Główne cechy, którymi charakteryzowane są WWA, to wysokie temperatury topnienia i wrzenia, niska prężność par oraz bardzo mała rozpuszczalność w wodzie. Z kolei ze względu na wysoką lipofilowość, związki te bardzo dobrze rozpuszczają się w rozpuszczalnikach organicznych (m.in. w dimetyloformamidzie, benzenie, toluenie, cykloheksanie czy acetonie) [150]. Każdy węglowodór należący do grupy WWA charakteryzuje się unikalnym widmem absorpcyjnym, co jest szczególnie istotne podczas ich identyfikacji. Dodatkowo część związków jest fluorescencyjna, emitując charakterystyczne długości fal światła w czasie wzbudzenia [151]. W Tabeli 2 przedstawiono struktury najczęściej analizowanych WWA.

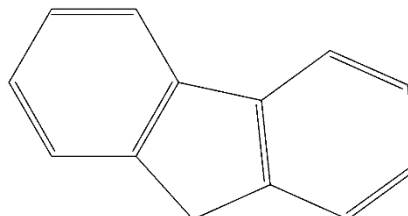
Tabela 2. Nazwy i struktury najczęściej analizowanych WWA, na podstawie [147,150].

Nazwa	Struktura
Naftalen	
Antracen	
Piren	
Acenaften	

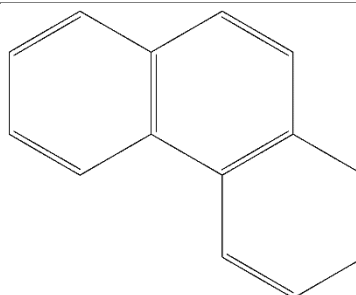
Acenaftylen



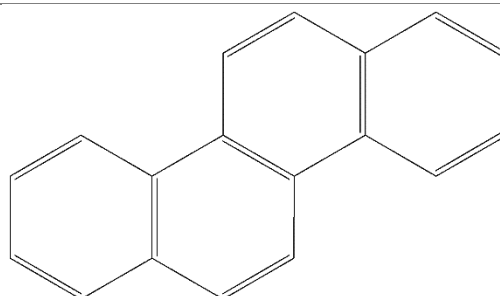
Fluoren



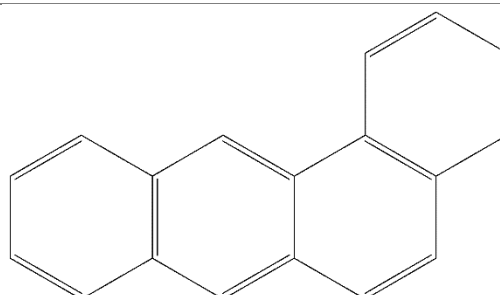
Fenantren



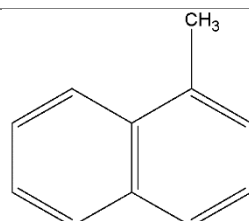
Chryzen



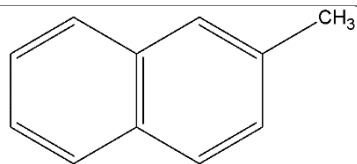
Benzo(a)antracen



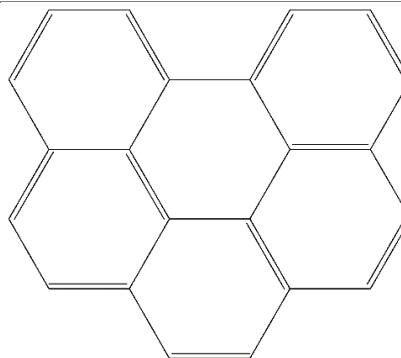
1-metylnaftalen



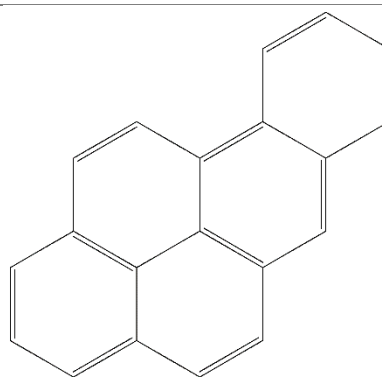
2-metylnaftalen



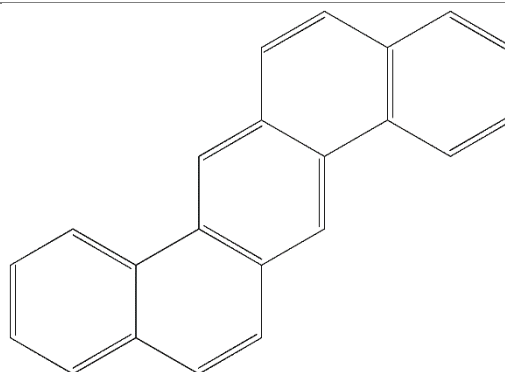
Benzo(g,h,i)perylen



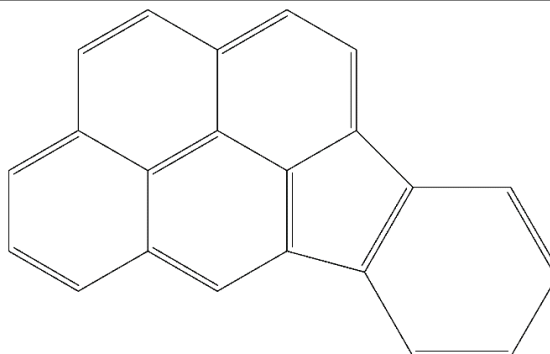
Benzo(a)piren



Dibenzo(a,h)antracen



Indeno(1,2,3-cd)piren



4.2. Źródła emisji, wpływ na zdrowie człowieka i usuwanie WWA

Można wyróżnić dwa główne źródła zanieczyszczeń wielopierścieniowymi węglowodarami aromatycznymi: źródła emisji naturalnych i antropogenicznych. Do naturalnych źródeł emisji można przyporządkować erupcje wulkanów czy pożary lasów. Jednakże to antropogeniczne źródła emisji są tymi, które w znaczący sposób determinują całkowite zanieczyszczenie WWA w środowisku naturalnym. Można je podzielić na cztery podgrupy, tj. przemysłowe, domowe, rolnicze i transportowe [152]. Co istotne, niecałkowite spalanie, zarówno pochodzenia naturalnego, jak i antropogenicznego, jest uznawane za pojedynczy czynnik mający największy wpływ na emisję WWA do środowiska [153]. Przemysłowe zanieczyszczenia WWA obejmują, m.in. spalanie odpadów, produkcję stali i żelaza, aluminium, cementu, barwników, opon gumowych, fungicydów i insektycydów. Dodatkowo zanieczyszczenia pochodzą z rafinerii czy zagazowania węgla. Z kolei zanieczyszczenia pochodzące z transportu są związane z emisją spalin przez pojazdy, takie jak samoloty, statki, pociągi czy samochody (zarówno z silnikami Diesla, jak również benzynowymi). Kolejnym źródłem antropogenicznych zanieczyszczeń jest emisja pochodząca z gospodarstw domowych. Obejmuje ona spalanie śmieci, koksovania węgla, spalanie drewna czy emisje spalin związaną z ogrzewaniem domów mieszkalnych. Głównym źródłem emisji, związanych z rolnictwem, jest spalanie biomasy i odpadów rolniczych [152]. Wyższy poziom zanieczyszczeń WWA na obszarach wiejskich koreluje się z emisją ze źródeł domowych i rolniczych, natomiast na obszarach miejskich z emisją, pochodzącą ze źródeł przemysłowych, transportowych i domowych. Dodatkowo wyższe stężenie WWA obserwuje się w miesiącach zimowych, co przypisuje się niepełnemu spalaniu paliw kopalnych, ogrzewaniu domów, niższemu stopniowi fotodegradacji i słabszej dyfuzji związanej z warunkami atmosferycznymi [154].

Źródła WWA można również sklasyfikować na podstawie sposobu ich powstawania. Wyróżnia się trzy typy: pirogeniczne, petrogeniczne i biologiczne. Pirogeniczne WWA powstają podczas niepełnego, niezamierzonego spalania związków pochodzenia organicznego w bardzo wysokich temperaturach (sięgających ponad 1000°C) przy braku lub bardzo małej ilości tlenu. Innymi źródłami pirogenicznych zanieczyszczeń są rozkład ropy naftowej pod wpływem temperatury czy destylacja węgla

na koks i smołę. W związku z przemysłowym charakterem tych zanieczyszczeń wyższe stężenia WWA pochodzenia pirogenicznego obserwuje się na obszarach miejskich. Węglowodory pochodzenia petrogenicznego występują w ropie naftowej i jej pochodnych. Zarówno przechowywanie, jak również transport oraz wycieki ropy i jej produktów sprawiają, że ten typ WWA jest szeroko rozpowszechniony w środowisku naturalnym [147,155]. Ostatnie z trzech wymienionych wyżej typów powstawania WWA to źródła biologiczne. Są one syntezowane przez organizmy biologiczne, m.in. mikroorganizmy, glony, rośliny, bakterie czy fitoplankton lub mogą być formowane podczas degradacji materii pochodzenia roślinnego [155].

Identyfikacja źródeł wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych skupia się głównie na analizie rzeczywistych próbek środowiskowych. Chemiczne profilowanie (ang. *fingerprinting*), wykorzystujące różne techniki, pozwala rozróżnić grupy źródeł WWA, takie jak te związane z węglem, drewnem czy ropą naftową. Badania skupiają się na określonych wskaźnikach chemicznych obecnych w próbkach. Dzięki tej metodzie możliwa jest identyfikacja i przypisanie rozproszonych źródeł WWA zarówno na obszarach przemysłowych, jak i mieszkalnych [147,156]. Temperatura formowania WWA jest bardzo ważnym wskaźnikiem ich pochodzenia. Wyższe temperatury sprzyjają powstawaniu związków o mniejszej liczbie łańcuchów alkilowych. Na przykład emisje kominowe z elektrowni, powstające w relatywnie wysokich temperaturach, charakteryzują się innym składem WWA niż te, które obserwuje się w miejscach wycieków ropy naftowej, które tworzyły się w niższych temperaturach przez długi czas [157].

Spośród szerokiej grupy wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych, siedemnaście z nich jest sklasyfikowanych jako niepokojące w kontekście możliwego narażenia i niekorzystnego wpływu na zdrowie człowieka. Z uwagi na wiele źródeł zanieczyszczeń WWA w środowisku, monitorowanie poziomu skażenia tymi związkami jest niezwykle istotną kwestią, w szczególności biologiczna kontrola narażenia i ich znaczenie toksykologiczne. Część WWA określana jest jako związki o działaniu rakotwórczym (m.in. benzo(a)piren, naftalen czy chryzen), mutagennym i teratogennym. Jako najpoważniejszy skutek zdrowotny, wynikający z narażenia na obecność WWA w drogach oddechowych człowieka, wymienia się ryzyko zachorowania na raka płuc [158,159]. Źródeł narażenia jest bardzo dużo, jednak jako najbardziej

prawdopodobne określa się wdychanie zanieczyszczonego powietrza, spożywanie jedzenia zawierającego WWA oraz palenie wyrobów tytoniowych [160]. Uogólniając zdecydowana większość populacji jest regularnie wystawiona na bezpośredni kontakt z WWA.

Szkodliwy wpływ WWA zależy jest od kilku głównych czynników: czasu trwania i rodzaju ekspozycji, stężenia związku oraz jego rodzaju, a w konsekwencji różnego poziomu toksyczności. Zarówno możliwość zachorowania, jak również intensywność przebiegu choroby warunkują dodatkowo czynniki indywidualne, takie jak wiek, stan zdrowia czy przebyte choroby. Skutki zdrowotne można podzielić na krótkotrwałe (ostre) i długotrwałe (przewlekłe). Do pierwszej grupy należą objawy związane z podrażnieniem oczu, nudnościami, wymiotami, biegunką i ogólną dezorientacją. Mieszaniny zawierające kilka WWA mogą wywoływać dodatkowo podrażnienia skóry i jej stany zapalne [161]. Przewlekłe i długotrwałe narażenie na WWA może w konsekwencji prowadzić do poważnych problemów zdrowotnych związanych z uszkodzeniem układu odpornościowego, uszkodzeniem narządów wewnętrznych (w tym nerek i wątroby), zaburzeniami układu oddechowego i zaćmą. Długoterminowy kontakt ze skórą może również być przyczyną przewlekłych stanów zapalnych [147].

WWA są trwałe w środowisku, co związane jest z ich relatywnie niską rozpuszczalnością w wodzie, wysoką lipofilowością i stabilnością chemiczną [147–150,162]. W celu zmniejszenia ich toksyczności i negatywnego wpływu na środowisko naturalne, kluczowe są procesy ich degradacji. Może ona zachodzić zgodnie z różnymi mechanizmami, takimi jak procesy fizyczne, chemiczne i biologiczne. Efektywna degradacja wymaga złożonego podejścia, w którym zostają uwzględnione właściwości WWA i warunki środowiskowe. Za najbardziej efektywne uważa się metody biologiczne wspierane technikami chemicznymi i fizycznymi. Kombinacje różnych metod, jak stosowanie bioremediacji, fitoremediacji czy procesów elektrochemicznych, zmniejsza negatywny wpływ WWA na organizmy żywe i ogranicza ich obecność w środowisku [162].

5. Modyfikacje materiałów węglowych związkami organicznymi

5.1. Wykorzystanie elektrod modyfikowanych nanomateriałami węglowymi oraz pirenem i jego pochodnymi

Pochodne pirenu stanowią ważną grupę prekursorów molekularnych, które charakteryzują się wysokim stopniem aromatyczności, co sprzyja silnym interakcjom ze ścianami bocznymi nanorurek węglowych (zarówno MWCNT, jak i SWCNT), a także warstwami grafenu poprzez oddziaływania typu π - π [163]. Ta niekowalencyjna modyfikacja materiałów węglowych umożliwia zachowanie istotnych właściwości nie naruszając ich struktury. Integracja związków organicznych, w szczególności pochodnych pirenu, z różnymi materiałami węglowymi zyskała szerokie zainteresowanie i duży potencjał zastosowania w elektrochemii. W niniejszym rozdziale dokonano przeglądu interesujących doniesień literaturowych na temat zastosowania pirenu i jego pochodnych w połączeniu z nanomateriałami węglowymi przy projektowaniu elektrod modyfikowanych.

Wiele badań naukowych wskazuje na korzyści, które wynikają z łączenia pochodnych pirenu z nanomateriałami węglowymi. Barathi i współpracownicy zaprezentowali podejście, w którym wykorzystano piren (Pyr) i wielościenne nanorurki węglowe (MWCNT) do elektrochemicznej modyfikacji złotych elektrod. Autorzy wskazują, że możliwe jest elektroutlenienie pirenu na powierzchni elektrody modyfikowanej MWCNT w buforze fosforanowym o pH wynoszącym 7 przy potencjale równym +1 V względem elektrody Ag/AgCl. W wyniku tego procesu otrzymano pochodną chinonową pirenu (PYRO), która okazała się nie tylko aktywna elektrochemicznie, ale również posiadała zdolność do kompleksowania jonów metali. Reakcja kompleksowania jonami miedzi potwierdziła zidentyfikowanie atomów tlenu w pozycji orto w nowo powstałej cząsteczce PYRO. W niniejszej pracy Autorzy przedstawiają również dwie elektrody modyfikowane: Au/MWCNT@PYRO-Cu^{2+/1+} do selektywnej detekcji jonów miedzi i Au/MWCNT@PYRO-Cyt c (zawierającą immobilizowany enzym - cytochrom c) do wykrywania H₂O₂. Te inspirujące badania

wykazały użyteczny sposób aktywowania WWA poprzez przekształcenie ich do elektroaktywnych form zawierających grupy chinonowe [164].

Inna ciekawa koncepcja została opisana w pracy Giroud i współautorów. Zaprezentowali oni elektrodę opartą na MWCNT i pochodnej pirenu, którą następnie zastosowali jako element pośredniczący w niekowalencyjnym wiązaniu DTNB (5,5'-ditiobis(kwas 2-nitrobenzoesowy)) w wyniku oddziaływań π - π . Obecność grup karboksylowych i elektroaktywnego układu nitrowego sprawiły, że nanorurki po modyfikacji charakteryzowały się zdolnością katalitycznego utleniania NADH przy relatywnie niskim potencjale ($-0,09$ V względem Ag/AgCl) w obojętnym pH. W dalszym etapie badań przeprowadzono immobilizację dehydrogenazy glukozowej (GDH), co skutkowało utlenieniem glukozy przy niskich stężeniach NAD^+ i osiągnięciu gęstości prądu rzędu $2,03 \text{ mA cm}^{-2}$. Dodatkowo na powierzchni elektrody modyfikowanej przeprowadzono również immobilizację oksydazy bilirubinowej (BOx) i lakazy, co umożliwiło bezpośredni transfer elektronów w procesie redukcji tlenu. Autorzy wskazują, że generowano wysokie prądy elektrokatalityczne ($3,5 \text{ mA cm}^{-2}$), a także niskie nadpotencjały (około $+0,6$ V względem Ag/AgCl) w warunkach nasyconych tlenem. Zintegrowane bioanody oparte na DTNB-GDH i biokatody DTNB-BOx umożliwiły skonstruowanie pozbawionego membrany bioogniwa paliwowego glukoza/tlen. Ogniwo cechowały następujące parametry pracy: potencjał obwodu otwartego ($+0,64$ V), maksymalna gęstość prądu ($2,1 \text{ mA cm}^{-2}$) oraz maksymalna gęstość mocy ($0,5 \text{ mW cm}^{-2}$ przy $+0,36$ V). Niniejsze badania potwierdziły słuszność i znaczenie racjonalnego projektowania bioelektrod funkcjonalizowanych do jednoczesnego wykorzystania ich zarówno w roli katody, jak i anody [165].

W kolejnej publikacji autorstwa Bachman i zespołu badawczego otrzymano elektrodę do zastosowania w urządzeniach służących magazynowaniu energii (ESS). Skonstruowano ją w wyniku polimeryzacji pochodnej pirenu na funkcjonalizowanych nanorurkach węglowych. Wykazano, że pochodne pirenu są odpowiednimi kandydatami do aplikacji w systemach ESS ze względu na generowanie stabilnych par redoks podczas polimeryzacji (przy potencjałach powyżej $+3,5$ V względem Li/Li^+). Elektrody charakteryzowały się wysoką pojemnością właściwą wynoszącą około 175 mAh g^{-1} . Przy niższych mocach wartość energii równa była około 475 Wh kg^{-1} (utrzymywała się na poziomie 350 Wh kg^{-1} przy gęstości mocy około 10 kW kg^{-1}). Jako jedną z zalet

opracowanego rozwiązania Autorzy wskazują wyeliminowanie nieaktywnych spoiw i kolektorów prądowych, co pozwoliło zwiększyć efektywność. Ponadto elektroda zachowywała 85% pojemności początkowej po 10 000 cyklach ładowania/rozładowania. Duża dostępność pirenu (m.in. z destylacji frakcyjnej ropy naftowej i smoły węglowej) sprawia, że opracowana strategia jest rozwiązaniem niskokosztowym i może okazać się wydajną alternatywą dla urządzeń służących magazynowaniu energii na szeroką skalę [166].

W następnej z interesujących prac dotyczących zastosowania pochodnych pirenu w elektrochemii, porównano dwie metody modyfikacji elektrod GC za pomocą MWCNT i 4-(piren-1-yl)butylu-3,5-dinitrobenzoesu (35DNBP). W ramach publikacji zestawiono tradycyjną metodę nanoszenia kropli zawiesiny MWCNT z nowatorską metodą, wykorzystującą cienkie filmy MWCNT zwane w literaturze anglojęzycznej jako *buckypaper* (BP). BP przygotowano w wyniku filtracji zdyspergowanych nanorurek i polistyrenu w 1,3-dioksolanie przez membranę nylonową, następnie wycięto krążki o odpowiednich rozmiarach i ostatecznie nanoszono na powierzchnię elektrody za pomocą procesu stemplowania. Ta niekowalencyjna modyfikacja umożliwiła generowanie par redoks hydroksyloamina/grupa nitrozo, co jest istotne w procesie utlenienia NADH. Modyfikacja elektrod przy użyciu metody BP zapewniła o 17% lepszą powtarzalność prądów pojemnościowych i o około 8% wyższą powtarzalność prądów faradycznych. Dzięki zastosowanemu rozwiązaniu poprawiono stopień homogenizacji nanorurek węglowych, zwiększono stabilność, jak i wydajność projektowanych elektrod, a w konsekwencji proponowana koncepcja stała się atrakcyjną platformą do budowy sensora NADH [167].

Równie odkrywcza praca wykorzystująca pochodną pirenu została stworzona w grupie Reuillard i współpracowników. Autorzy przedstawili prostą, niekowalencyjną funkcjonalizację MWCNT za pomocą pochodnych pirenu, które dodatkowo zawierały grupy funkcyjne pochodzące od kwasu borowego. W ten sposób opracowano elektrody do efektywnego przewodzenia elektronów i wiązania glikozylowanych enzymów redoksowych. Funkcjonalizacja elektrody polegała na inkubacji nanorurek węglowych w roztworze pirenu z kwasem borowym, co umożliwiło formowanie wiązań estrów boronowych z resztami cukrów enzymów (jak peroksydaza chrzanowa (HRP) i oksydaza glukozowa (GOx)). W wyniku zastosowania tej strategii możliwa stała się biokatalityczna

redukcja tlenu do wody w warunkach fizjologicznych, co ma istotne znaczenie w kontekście aplikacji do konstrukcji biokatod do ogniw paliwowych. Testy elektrochemiczne potwierdziły zarówno wydajny, jak i bezpośredni transfer elektronów pomiędzy HRP, a MWCNT oraz efektywną redukcję H_2O_2 przy relatywnie niskich nadpotencjałach. Autorzy podkreślają potencjał wykorzystania funkcjonalizowanych nanorurek węglowych za pomocą pochodnej pirenu z kwasem borowym do konstrukcji bioelektrod i zastosowania w bioogniwach paliwowych [168].

Wśród licznych publikacji naukowych, prezentujących wykorzystanie elektrod modyfikowanych materiałami węglowymi i związkami organicznymi, warto wyróżnić szczególnie prace dotyczące wykorzystania 1-aminopirenu. Pang i współautorzy modyfikowali nanorurki węglowe za pomocą 1-aminopirenu (1-AP) w celu dalszej immobilizacji enzymu - lakazy. Właściwości elektrody modyfikowanej oceniono za pomocą voltamperometrii cyklicznej w buforze Brittona-Robinsona o pH równym 3 w obecności ABTS jako mediatora redoks. Uzyskane w ramach badań wyniki potwierdziły, że elektrodę z nanorurkami modyfikowanymi 1-aminopirenem i immobilizowanym enzymem cechuje wyższa aktywność elektrokatalityczna i lepsza stabilność w porównaniu z elektrodą modyfikowaną lakazą osadzoną na niezmodyfikowanych CNT. Opracowana w ramach niniejszych badań elektroda modyfikowana charakteryzowała się prądem katalitycznym wynoszącym około $21,4 \mu A cm^{-2}$ przy redukcji tlenu w pH 7, co potwierdza trwałą aktywność w warunkach zbliżonych do naturalnych. Autorzy podkreślają, że użycie 1-aminopirenu poprawiło dyspersję nanorurek i ułatwiło unieruchomienie enzymu. Dodatkowo przedstawiono badania wskazujące na dalsze możliwości rozwijania ich w kierunku aplikacji w biosensorach czy bioogniwach paliwowych [169].

Warto również przywołać pracę Zhou i grupy badawczej, w której zaprezentowano konstrukcję platformy enzymatycznego biosensora w oparciu o zredukowany tlenek grafenu (rGO) funkcjonalizowany 1-aminopirenem. Modyfikacja możliwa była w wyniku niekowalencyjnego wiązania 1-AP z rGO poprzez oddziaływania π - π . Efektem tego było równomierne rozmieszczenie grup aminowych na powierzchni materiału węglowego. Lakazę unieruchomiono na zmodyfikowanej elektrodzie za pomocą glutaraldehydu (GA) jako czynnika sieciującego metodą enkapsulacji w chitozanie. Przeprowadzone badania elektrochemiczne potwierdziły bezpośredni

transport elektronów pomiędzy lakazą, a elektrodą GC. Dodatkowo biosensor charakteryzował się aktywnością katalityczną w kierunku redukcji tlenu oraz odpowiedzią na ABTS (LOD równe $0,1 \mu\text{M}$, liniowość w zakresie od $2 \mu\text{M}$ do 1 mM , czułość wynosząca $151,45 \mu\text{A nM}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ i szybki czas odpowiedzi równy 5 s). Jedną z głównych zalet przedstawionych przez Autorów jest stabilność, określona poprzez zachowanie ponad 97% początkowej aktywności po 7 dniach przechowywania w temperaturze 4°C . Uzyskane wyniki stwarzają możliwość potencjalnego zastosowania układu 1-AP-rGO jako efektywnej platformy do immobilizacji enzymów w elektrochemicznych biosensorach, zwiększając dodatkowo biokompatybilność, stabilność, a także efektywność transferu elektronów [170].

Interesujące rozwiązanie zostało również przedstawione w publikacji naukowej Luo i współautorów. Opracowano elektrodę składającą się z materiału hybrydowego typu grafen/1-aminopiren (ApG), która została użyta w impedancyjnym sensorze genetycznym. Grafen i 1-aminopiren połączono poprzez oddziaływania π - π . Aminową sondę oligonukleotydową związano z 1-AP używając glutaraldehydu jako środka sieciującego. Dzięki temu możliwe było wykrywanie hybrydyzacji DNA przy użyciu techniki EIS. Skonstruowany sensor charakteryzował się wysoką czułością, a także granicą wykrywalności wynoszącą $4,5 \cdot 10^{-13} \text{ M}$. Hybrydyzacja DNA umożliwiła wykrywanie docelowych oligonukleotydów w zakresie od $1,0 \cdot 10^{-12}$ do $1,0 \cdot 10^{-8} \text{ M}$. W niniejszej pracy Autorzy wskazują, że zastosowano prostą, niekosztowną funkcjonalizację grafenu zachowując przy tym szereg jego istotnych właściwości, takich jak wysoka powierzchnia właściwa, przewodnictwo czy biokompatybilność. Sensor ApG jest selektywnym narzędziem do detekcji specyficznych sekwencji DNA. Jako główny potencjał aplikacyjny wskazano diagnostykę genetyczną i badania biomedyczne [171].

Przedstawiony przegląd literatury zakłada wykorzystanie pirenu i jego pochodnych jako związków, które umożliwiają funkcjonalizację nanomateriałów węglowych w celu otrzymania wydajnych elektrod modyfikowanych o ulepszonych właściwościach elektrochemicznych. Wykorzystanie wspomnianej grupy związków stwarza możliwość interakcji π - π z powierzchnią materiałów węglowych, co jest niezwykle istotne, ponieważ wyklucza konieczność kowalencyjnej modyfikacji. Zarówno piren, jak i jego pochodne cechuje tzw. wielofunkcyjność, która sprawia, że można je funkcjonalizować poprzez podstawienie różnymi grupami funkcyjnymi, a to

z kolei nadaje możliwość projektowania pod kątem konkretnych aplikacji (jak choćby wspomniane wyżej sensory czy urządzenia służące magazynowaniu energii). Jednakże podczas przeglądu literatury zaobserwowano pewne luki i wyzwania, które dotyczą wykorzystania pirenu i jego pochodnych na szeroką skalę do zastosowań elektrochemicznych. Niejednokrotnie procedury związane z modyfikacją nie są całkowicie zoptymalizowane, brakuje doniesień na temat różnych możliwości osadzenia modyfikatora na powierzchni materiału węglowego czy wpływu lokalizacji grup funkcyjnych na finalne właściwości. Dodatkowo nieczęsto wykorzystuje się elektrody modyfikowane pirenem i jego pochodnymi w bardziej złożonych układach hybrydowych, bądź w warunkach rzeczywistych. Uważam, że kontynuowanie rozwoju w kierunku tworzenia materiałów na bazie pirenu i jego pochodnych do zastosowań w elektrochemii stanowi ogromny potencjał badawczy.

5.2. Inne możliwe modyfikacje elektrod za pomocą nanomateriałów węglowych i związków pochodzenia organicznego

W niniejszym rozdziale omówiono również inne możliwe modyfikacje elektrod za pomocą nanomateriałów węglowych i różnych związków pochodzenia organicznego. Równie innowacyjne rozważania dotyczące elektrootleniania, a w konsekwencji degradacji WWA, przedstawiono w pracy wykonanej przez Barathi i Kumara. Pokazano elektrochemiczną oksydację i rozkład kancerogennego tetracenu (TC) na złotej elektrodzie modyfikowanej za pomocą MWCNT. Proces przeprowadzono przy stałym potencjale równym +0,9 V względem Ag/AgCl w buforze fosforanowym (pH 7). W ramach badań potwierdzono występowanie pochodnych hydrochinonu i antrachinonu na powierzchni elektrody modyfikowanej. W oparciu o opracowany materiał skonstruowano sensor detekcji H_2O_2 (LOD wynosiło 122 nM). Autorzy wskazują również, że elektroda nie reagowała na zakłócenia pochodzące od substancji interferujących takich jak kwas askorbinowy, kwas moczowy, cysteina, azotany i azotyny. Jako główną zaletę prowadzonych badań wskazano nowatorski sposób degradacji toksycznego tetracenu, jak również możliwość rozwoju elektrod modyfikowanych

chinonami do selektywnego oznaczania nadtlenu wodoru. Ponadto dzięki badaniom dostarczono informacji na temat ścieżki utleniania podjednostek grafenowych [172].

Następnym ciekawym doniesieniem naukowym, wykorzystującym inny związek organiczny do modyfikacji elektrody, jest publikacja Zhu i współpracowników. W przedstawionej pracy Autorzy przeprowadzili elektrodpozycję fioletu pirokatecholowego (PCV) z wykorzystaniem techniki ESPR (elektrochemiczny plazmonowy rezonans powierzchniowy), a następnie zastosowali PCV jako mediator redoks do modyfikacji elektrody grafitowej (PGE) pokrytej jednościnnymi nanorurkami węglowymi (SWCNT). Elektroda modyfikowana PGE/SWCNT/PCV cechowała się aktywnością elektrokatalityczną wobec NADH przy relatywnie niskim potencjale (+0,2 V vs. SCE). Dodatkowo wyznaczono szereg parametrów analitycznych, w tym krótki czas odpowiedzi (poniżej 10 s), szeroki zakres liniowości (od 1,3 do 280 μM), wysoką czułość (146,2 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$) i niską granicę wykrywalności (1,3 μM). Jako zaletę zastosowanej modyfikacji PCV na SWCNT Autorzy wskazują zapewnienie struktury porowatej o zwiększonej hydrofilowości, która sprzyja dyfuzji substratu, jak również wpływa na efektywność transferu elektronów pomiędzy mediatorem, a powierzchnią elektrody [173].

Warto również rozważyć koncepcję zaproponowaną przez Gayathri i współautorów, którzy przedstawili elektrochemiczne utlenienie karbazolu na elektrodzie GC modyfikowanej aktywowanymi katodowo wielościennymi nanorurkami węglowymi. W wyniku tego procesu powstała pochodna 1,4-chinonu. Zmodyfikowana w ten sposób elektroda wykazywała dodatkowo aktywność elektrokatalityczną w kierunku utlenienia hydrazyny przy potencjale 230 mV względem Ag/AgCl. Autorzy nie obserwowali wpływu substancji interferujących (m.in. kwasu askorbinowego, kwasu szczawiowego, azotanów czy kwasu moczowego). Przedstawiona metoda jest relatywnie prostą, jednoetapową i selektywną alternatywą dla wieloetapowych procesów otrzymywania pochodnych karbazolu, które są licznie wykorzystywane w farmakologii. Autorzy wskazują również, że koncepcja stwarza nowe możliwości elektrochemicznych metod usuwania zanieczyszczeń pochodzenia organicznego [174].

Z kolei zespół badawczy Kumara w kolejnej pracy naukowej przedstawił elektrodu do utleniania innego związku - indolu, na powierzchni elektrody GC/MWCNT. W wyniku tego procesu ujawniono nową pochodną (indolotetraon). Badania prowadzono

w buforze fosforanowym o pH równym 7 w zakresie potencjałów od $-0,6$ do $+0,4$ V względem Ag/AgCl. Elektroda modyfikowana charakteryzowała się dobrze zdefiniowanymi pikami redoks (przy potencjale $-0,27$ i $+0,27$ V), które Autorzy przypisali reakcjom przeniesienia elektronów w układach indolo-hydrochinonowym i indolo-2,3-dionowym. Dodatkowo w ramach niniejszej pracy zaproponowano mechanizm formowania indolotetraonu. Ponadto materiał hybrydowy zastosowano jako bifunkcyjny elektrokatalizator zarówno utlenienia hydrazyny, jak i redukcji nadtlenku wodoru. Prezentowana koncepcja wnosi wiele informacji w rozwój elektrochemicznego utlenienia związków organicznych na powierzchni wielościennych nanorurek węglowych, jak również stwarza potencjał aplikacyjny w sensorach [175].

Równie interesujące doniesienie naukowe to publikacja Sundaram i zespołu badawczego, w której przeprowadzono badania nad stabilizacją elektrogenerowanej pochodnej o-dianizydyny. Elektroda z węgla szklistego (GC) w pierwszym etapie została zmodyfikowana wielościennymi nanorurkami węglowymi (MWCNT), a następnie przeprowadzono elektrochemiczne osadzanie pochodnej o-dianizydyny. Materiał hybrydowy charakteryzował się występowaniem dwóch dobrze zdefiniowanych i odtwarzalnych par redoks związanych z reakcjami powierzchniowymi zachodzącymi w buforze fosforanowym (PBS) o pH równym 7. Wytworzenie elektroaktywnej formy na powierzchni elektrody umożliwiło selektywną i czułą detekcję kwasu galusowego (GAL) przy relatywnie niskim potencjale ($+0,16$ V względem Ag/AgCl). Z wykorzystaniem techniki chronoamperometrii wyznaczono czułość wynoszącą $0,458 \mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$, zakres pomiarowy (od 100 do 1300 μM) i granicę wykrywalności równą 144 nM. Ponadto Autorzy wykonali testy na roztworach rzeczywistych, takich jak sok z winogron czy woda. Do zalet pracy należą nowatorskie podejście do immobilizacji pochodnych o-dianizydyny, efektywne wykorzystanie wytworzonych grup funkcyjnych i możliwość aplikacji takiego rozwiązania w sensorach opartych na związkach organicznych [176].

Kolejna ciekawa koncepcja to praca Zhu i grupy badawczej, w której zaprezentowano sensor impedancyjny do detekcji lektyn. Skonstruowano go w oparciu o glikozyd antrachinonowy (AG) i nanografen. Fragment antrachinonowy glikozydu umożliwiał oddziaływanie π - π z powierzchnią elektrody modyfikowaną nanomateriałem węglowym. Antrachinon (AQ) pełnił również rolę znacznika generującego sygnał elektrochemiczny. Z wykorzystaniem technik takich jak CV, DPV (voltamperometria

pulsowa różnicowa) i EIS potwierdzono, że elektroda modyfikowana charakteryzuje się powtarzalną odpowiedzią na specyficzną lektynę *Concanavalin A*. Ponadto nie zaobserwowano interferencji sygnałowej w obecności niespecyficznych białek. Niewątpliwą zaletą przygotowanej w niniejszym badaniu elektrody jest wysoka selektywność względem lektyny, co stwarza możliwość zastosowania w taniej i szybkiej analizie badania oddziaływań pomiędzy ligandami, a białkami oraz dalszej standaryzacji i rozwojowi sensorów elektrochemicznych [177].

III. CELE PRACY

Celem niniejszej pracy badawczej było **przeprowadzenie syntezy *in situ*** materiałów hybrydowych typu wielościenne nanorurki węglowe/pochodne pirenu na powierzchni elektrody z węgla szklanego.

Kolejnym etapem badań była **elektrochemiczna aktywacja pirenu i jego pochodnych** (Pyr, 1-AP, 1-HP, PBA) na powierzchni elektrody GC/MWCNT. Zakładanym rezultatem procesu było otrzymanie przewodzących materiałów o właściwościach elektroaktywnych ujawniających odwracalne przejście chinon/hydrochinon.

Następnie przeprowadzono **charakterystykę otrzymanych materiałów hybrydowych** (MWCNT/1-APox, MWCNT/1-AP/Cat oraz MWCNT/1-AP/3-MCat) na powierzchni elektrody GC pod kątem ich właściwości fizykochemicznych i elektrochemicznych w wodnych roztworach elektrolitów o szerokim zakresie pH.

Ostatnim celem pracy było **zastosowanie opracowanych elektrod modyfikowanych jako elektrokatalizatorów czy sensorów/biosensorów elektrochemicznych** służących do detekcji analitów mających istotne znaczenie dla człowieka (NADH i glukoza).

IV. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

1. Metodyka badań

1.1. Aparatura pomiarowa

Pomiary elektrochemiczne przeprowadzono przy użyciu analizatora elektrochemicznego EmStat4S (Holandia), potencjostatu/galwanostatu μ Autolab typ III oraz potencjostatu/galwanostatu Autolab PGSTAT30 (EcoChemie, Holandia). Urządzenia były połączone z komputerami PC za pomocą odpowiednich interfejsów. Wykorzystano następujące programy do obsługi urządzeń: PSTrace 5.9, GPES 2.0 oraz NOVA. Umożliwiły one kontrolowanie parametrów i stosowanych technik elektrochemicznych w czasie rzeczywistym. Eksperymenty prowadzono w układzie trójelektrodowym, w którym jako elektrodę odniesienia wykorzystano elektrodę chlorosrebrową Ag/AgCl (3 M KCl), drut platynowy jako przeciwelektrodę oraz elektrodę z węgla szklanego (GC) o średnicy 3 mm i powierzchni $0,07 \text{ cm}^2$ (BASi, USA) jako elektrodę roboczą. Pomiary elektrochemiczne przeprowadzono w szklanej fiole o pojemności 20 mL, którą wyposażono w teflonowy korek z otworami na elektrody i wąż do wprowadzania gazowego azotu. W przypadku testów techniką elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej (EIS) pomiary wykonano przy potencjale +0,2 V, w czasie 20 s, w zakresie częstotliwości od 0,1 do 100 000,0 Hz, przy amplitudzie potencjału równej +0,1 V. W dodatku wykonano pomiary *in situ* za pomocą woltamperometrii cyklicznej (CV) oraz chronoamperometrii (CA) sprzężonych z elektrochemiczną wagą kwarcową (EQCM). Jako elektrodę wykorzystano w tym celu kryształ złota o powierzchni geometrycznej $0,38 \text{ cm}^2$ i częstotliwości oscylacji 6 MHz, którą połączono z potencjostatem/galwanostatem Autolab PGSTAT30.

Pomiary pH roztworów buforowych przeprowadzono za pomocą pH-metru Elmetron CX-505 110 i kombinowanej elektrody pH ERH-11 (Elmetron, Polska). Ponadto wykorzystano trzy techniki obrazowania mikroskopowego. Mikroskop sił atomowych (AFM) Agilent 5500 (USA) został użyty do badania topografii powierzchni badanych materiałów. Dodatkowo, w celu określenia morfologii powierzchni materiałów elektrodowych, zastosowano technikę transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) przy użyciu aparatu Jeol 1200 EX II (Japonia). Z kolei obrazowanie techniką skaningowej

mikroskopii elektronowej (SEM) zostało przeprowadzone z wykorzystaniem mikroskopu Hitachi typu S-3400N (Japonia). Widma spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IR) uzyskano na spektrometrze Bruker FT-IR IFS 66/s (USA). Ponadto widma rentgenowskiej spektroskopii fotoelektronów (XPS) zarejestrowano przy użyciu spektrometru SPECS (Niemcy) z monochromatycznym źródłem Al-K α , generującym fotony o energii 1486,71 eV (150 W) oraz analizatora hemisferycznego (PHOIBOS 150 MCD NAP) z energiami pasmowymi wynoszącymi odpowiednio 60 eV dla widma przeglądowego i 20 eV dla szczegółowych obszarów. Do określenia struktury związku aktywowanego na powierzchni elektrody zastosowano spektrometr masowy API 4000 QTRAP typu potrójny kwadrupol (AB Sciex, USA) wyposażony w źródło jonizacji elektro sprayowej TurboIonSpray® (ESI). Spektrometr działał w trybie jonów dodatnich do detekcji kationów oraz w trybie jonów ujemnych do detekcji anionów. Zastosowane parametry: ciśnienie gazu osłonowego 20 psi, ciśnienie gazu nebulizującego 40 psi, ciśnienie gazu pomocniczego 40 psi, temperatura źródła 350°C, napięcie ESI 4500 V dla kationów i –4500 V dla anionów, potencjał rozproszenia 50 V dla kationów i –50 V dla anionów, potencjał wejścia 10 V dla kationów i –10 V dla anionów. Wszystkie dane zbierano w trybie EMS (ang. *Enhanced MS*) w zakresie mas od 50 m/z do 800 m/z. Fragmentację przeprowadzono w trybie rozszerzonej spektrometrii produktów jonowych (EPI), a zarejestrowane widmo również obejmowało zakres od 50 m/z do 800 m/z.

1.2. Odczynniki chemiczne

Do przygotowania hybrydowych materiałów elektrodowych wykorzystano wielościenne nanorurki węglowe (MWCNT o średniej średnicy 10 nm i średniej długości 1,5 μ m) firmy Metrohm DropSens (Hiszpania) oraz wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) i ich pochodne. Piren (Pyr), 1-aminopiren (1-AP), 1-hydroksypiren (1-HP) oraz kwas 1-pirenoboronowy (PBA) sprowadzono z firmy Merck (Niemcy). Do przygotowania buforu fosforanowego (PBS, pH 7,4) wykorzystano monosodowe i disodowe fosforany firmy POCH (Polska). Z kolei do przygotowania buforu Brittona-Robinsona użyto kwasu fosforowego, kwasu octowego, kwasu borowego oraz wodorotlenku sodu również dostarczonych przez POCH. Z firmy POCH zakupiono

również kwas nadchlorowy, chlorek sodu, dimetyloformamid (DMF) oraz heksacyjanożelazian(II) i (III) potasu. Zastosowano również NADH (β -nikotynoamidoadeninowy dinukleotyd w formie hydratu zredukowanej soli disodowej), NAD^+ (hydrat dinukleotydu β -nikotynoamidoadeninowego), katechol (Cat), 3-metoksykatechol (3-MCat), chlorek heksaamminorutenu(III) (RuHex), L-glutation (zredukowana forma), L-cysteinę, metanol (MeOH), a także dehydrogenazę glukozową (GDH) z *Pseudomonas sp.* ($\geq 200 \text{ U mg}^{-1}$) dostarczone przez wymienioną wcześniej firmę Merck. Ponadto wykorzystano D (+) – glukozę (Glu) firmy Carl Roth (Niemcy), aceton firmy Chemland (Polska) oraz fruktozę, laktozę, maltozę i sacharozę firmy Warchem (Polska). Firma Fluka (Niemcy) dostarczyła nadtlenek wodoru (30% roztwór), kwas moczowy i kofeinę, a firma Chempur (Polska) siarczan kobaltu(II). Wszystkie stosowane związki chemiczne posiadały czystość odczynnikową, więc nie wymagały dalszego oczyszczania. Do sporządzania roztworów zawsze wykorzystywano wodę destylowaną.

Suplementy diety zawierające NADH zakupiono w lokalnej aptece. Producentem pierwszego suplementu jest firma Forest Vitamin (Polska). Jedna kapsułka zawiera 10 mg substancji czynnej (NADH). Substancjami wypełniającymi (zgodnie ze specyfikacją podaną przez Producenta) są: skrobia pszenna i celuloza mikrokrystaliczna. Z kolei drugi suplement diety jest produkowany przez firmę Kenay (Polska) i zawiera 15 mg NADH w jednej kapsułce. Substancją pomocniczą jest inulina. Rzeczywista próbka glukozy również została zakupiona w lokalnym sklepie. Całkowita zawartość cukru w badanym napoju izotonicznym wynosi 4 g na 100 mL (zgodnie ze specyfikacją Producenta). Producent wymienia również następujące substancje w składzie: woda, glukoza, kwas cytrynowy, cytrynian sodu, sorbinian potasu, benzoesan sodu, cytryniany potasu, aspartam, acesulfam K, guma arabska, estry glicerolu i żywicy roślinnej, aromat, niacyna, witamina B6, biotyna i błękit brylantowy FCF.

1.3. Preparatyka materiałów elektrodowych

Przed każdym pomiarem elektrochemicznym elektrodę GC polerowano przy użyciu wodnej zawiesiny Al_2O_3 o średniej średnicy równej 50 nm (Buehler, USA) na padzie polerskim, a następnie poddawano sonikacji z wykorzystaniem płuczki

ultradźwiękowej przez 10 minut w roztworze woda/aceton (1:1) w celu wyeliminowania pozostałych zanieczyszczeń. W dalszej kolejności 2 μL MWCNT (1 mg mL^{-1} w DMF) naniesiono na czystą powierzchnię elektrody GC metodą naniesienia kropli (ang. *drop-casting*). Tak przygotowaną elektrodę umieszczono w suszarce (w temperaturze wynoszącej 60°C), aby ułatwić odparowanie rozpuszczalnika.

W celu przygotowania hybrydowego materiału MWCNT/1-AP, elektrodę GC/MWCNT zanurzano we wcześniej przygotowanym roztworze 1-AP w DMF ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$). Przed każdym eksperymentem roztwór 1-AP w DMF był świeżo przygotowywany, aby uniknąć wpływu dodatkowych czynników zewnętrznych (takich jak tlen czy światło) na stabilność odczynnika. Adsorpcja 1-AP na powierzchni GC/MWCNT trwała 5 minut. Elektrochemiczną aktywację elektrody GC/MWCNT/1-AP przeprowadzano z wykorzystaniem woltamperometrii cyklicznej w wyniku skanowania w zakresie potencjałów od $-0,1$ do $+0,7 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ w $0,1 \text{ M HClO}_4$ stosując szybkość przesuwu potencjału równą 50 mV s^{-1} . Elektroda zawierająca piren (GC/MWCNT/Pyr) została przygotowana według tej samej procedury (poprzez adsorpcję pirenu na powierzchni GC/MWCNT).

W celu przygotowania elektrody GC/MWCNT/1-AP/Cat z wykorzystaniem CV skanowano elektrodę GC/MWCNT/1-AP (adsorpcja 1-AP według wcześniej opisanej procedury) w $0,1 \text{ mM}$ roztworze katecholu w buforze fosforanowym (PBS, pH 7,4) w zakresie potencjałów od $-0,4$ do $+0,2 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ (5 skanów, szybkość przesuwu potencjału 50 mV s^{-1}). Wybrane warunki zostały również zastosowane podczas opracowywania elektrody modyfikowanej GC/MWCNT/1-AP/3-MCat (skanowanie odbywało się w $0,1 \text{ mM}$ roztworze 3-metoksykatecholu). Dalsza funkcjonalizacja elektrod polegała na unieruchomieniu dehydrogenazy glukozowej (1 mg mL^{-1} w PBS, pH 7,4). Przeprowadzono proces immobilizacji adsorpcyjnej GDH na powierzchni elektrod GC/MWCNT/1-AP/Cat i GC/MWCNT/1-AP/3-MCat trwający 30 minut w warunkach ciągłego mieszania.

Aby przygotować elektrody modyfikowane GC/MWCNT/1-HP oraz GC/MWCNT/PBA, wcześniej przygotowaną elektrodę GC/MWCNT (według opisanej wcześniej procedury) zanurzano w odpowiednio przygotowanych roztworach związków pochodzenia organicznego: 1-hydroksypirenu ($0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ w DMF) i kwasu 1-pirenoboronowego (1 mg mL^{-1} w DMF). Podobnie jak w przypadku elektrod

modyfikowanych 1-aminopirenem, przed przystąpieniem do prac badawczych roztwory zawierające 1-HP oraz PBA przygotowywano na świeżo w celu wyeliminowania wpływu innych czynników pochodzących z zewnątrz mogących wpłynąć na stabilność odczynników. Adsorpcja pochodnych pirenu na powierzchni GC/MWCNT zawsze trwała 5 minut. Elektrochemiczna aktywacja GC/MWCNT/1-HP została przeprowadzona przy użyciu woltamperometrii cyklicznej poprzez skanowanie w zakresie potencjałów od 0,0 do +0,8 V vs. Ag/AgCl w 0,1 M HClO₄ przy szybkości przesuwu potencjału wynoszącej 50 mV s⁻¹. Z kolei w przypadku elektroaktywacji układu GC/MWCNT/PBA również wykorzystano technikę CV w efekcie skanowania w zakresie od -0,5 do +1,0 V vs. Ag/AgCl w PBS (pH 7,4) stosując szybkość przesuwu potencjału równą 50 mV s⁻¹.

Wszystkie eksperymenty elektrochemiczne zostały przeprowadzone w temperaturze laboratoryjnej (ok. 25°C). W razie potrzeby fiolkę zawierającą elektrolit odtleniano poprzez wprowadzenie gazu obojętnego (azotu).

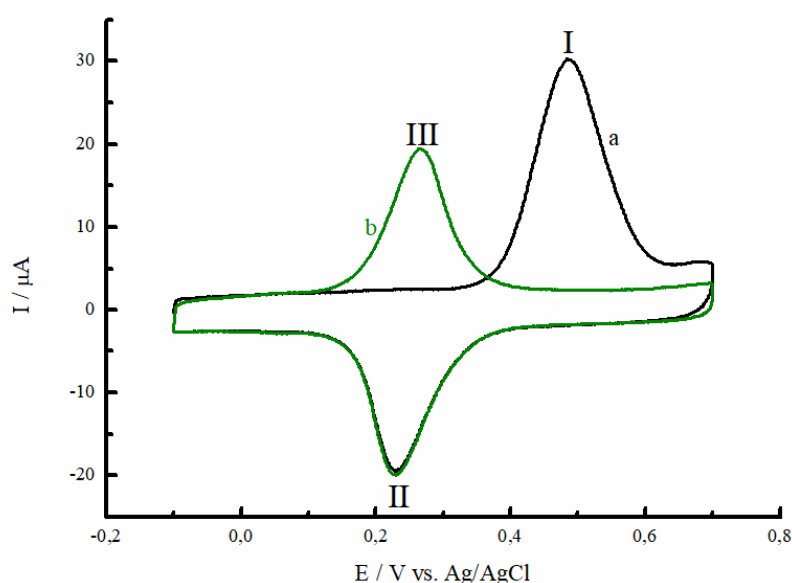
2. Dyskusja wyników

2.1. Elektrochemiczne wytwarzanie 1-aminopireno-4,5,9,10-tetrolu na powierzchni MWCNT w celu katalitycznego utleniania NADH przy niskim potencjale

2.1.1. Elektrochemiczna aktywacja elektrody modyfikowanej GC/MWCNT/1-AP

Woltamperometria cykliczna jest jedną z fundamentalnych technik elektrochemicznych, która jest szeroko stosowana do badań mechanizmu procesów elektrodowych, ich kinetyki, a także obecności reakcji chemicznych sprzężonych z etapami elektrochemicznymi. Ta bardzo wszechstronna technika umożliwia ponadto rozróżnienie procesów, w których etapem limitującym jest dyfuzja, od tych związanych z adsorpcją.

W związku z tym, w pierwszym etapie badań przeprowadzono pomiary techniką woltamperometrii cyklicznej mające na celu scharakteryzowanie elektrody modyfikowanej wielościennymi nanorurkami węglowymi z zaadsorbowanym 1-aminopirenem (GC/MWCNT/1-AP). Na Rys. 11 przedstawiono odpowiedź elektrochemiczną układu GC/MWCNT/1-AP powstałą w wyniku skanowania w elektrolicie kwaśnym (0,1 M HClO₄) w zakresie potencjałów od -0,1 do +0,7 V vs. Ag/AgCl przy szybkości przesuwu potencjału równej 50 mV s⁻¹.



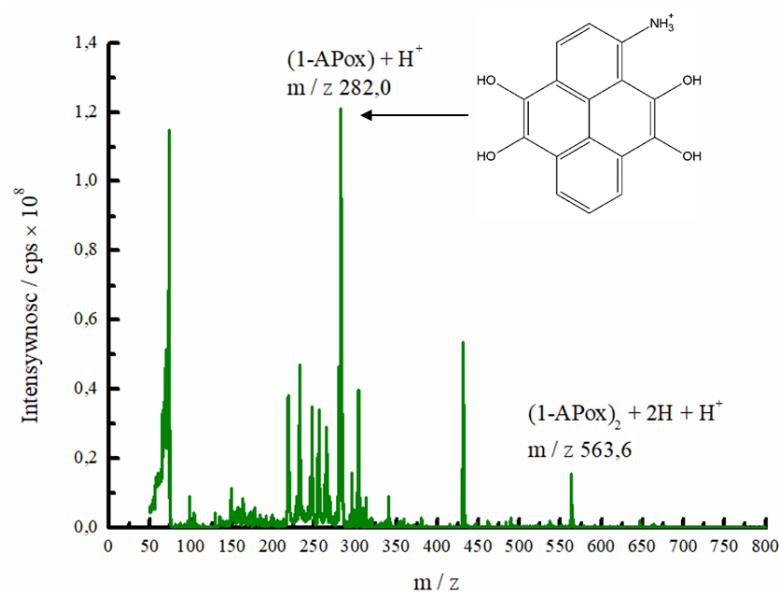
Rys. 11. Elektrochemiczna aktywacja układu GC/MWCNT/1-AP w 0,1 M HClO₄; a - czarna linia (pierwszy skan), b - zielona linia (drugi skan). Szybkość przesuwu potencjału wynosi 50 mV s⁻¹.

Można zauważyć, że w pierwszym skanie w zakresie anodowym pojawia się wyraźnie zdefiniowany, nieodwracalny pik przy potencjale +0,49 V (oznaczony na wykresie jako I). Po odwróceniu kierunku polaryzacji obserwuje się katodowy pik przy niższym potencjale (+0,23 V, oznaczony jako II). Kolejny skan uwidacznia powstanie anodowego piku przy potencjale +0,27 V (oznaczony jako III) oraz zanik piku przy potencjale +0,49 V. Otrzymane wyniki sugerują, że elektrochemiczne utlenienie prowadzi do restrukturyzacji materiału elektrodowego GC/MWCNT/1-AP oraz wytworzenia nowych, elektrochemicznie odwracalnych struktur na powierzchni. Kształt krzywych przedstawionych na powyższym woltamperogramie jest charakterystyczny dla procesów przebiegających według mechanizmu *ECE* (ang. *electrochemical-chemical-electrochemical*) [175,178,179]. Jest to jeden z klasycznych mechanizmów występujących na granicy faz elektroda-elektrolit, charakteryzujący się tym, że proces redoks nie ogranicza się wyłącznie do wymiany elektronów na elektrodzie, lecz obejmuje również etap następnej reakcji chemicznej zachodzącej w roztworze lub na powierzchni elektrody, po którym produkt tej reakcji podlega kolejnemu procesowi redoks. W konsekwencji na woltamperogramie pojawiają się nowe piki, zazwyczaj

zlokalizowane przy niższych potencjałach niż sygnał obserwowany w pierwszym skanie [180].

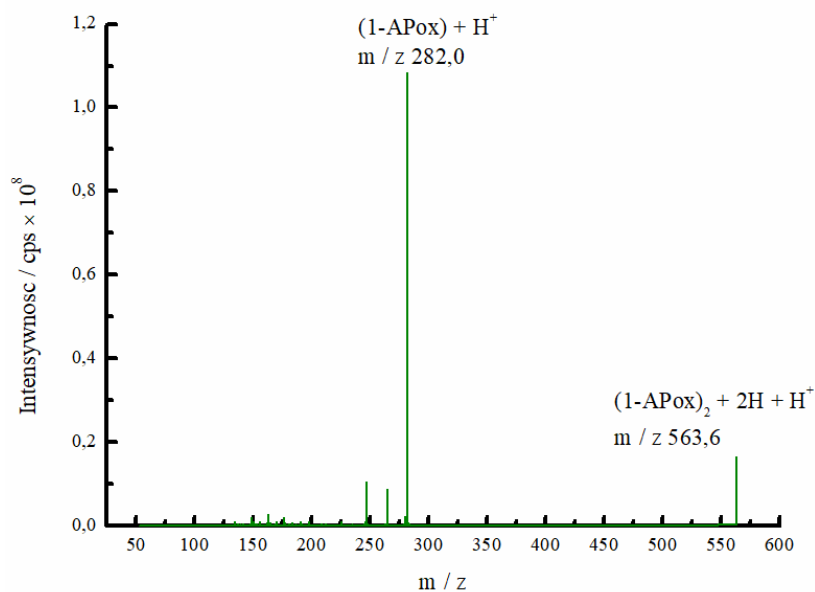
Przebieg krzywych woltamperometrycznych przedstawionych na Rys. 11 wskazuje, że w pierwszym cyklu dochodzi do nieodwracalnego utlenienia zaadsorbowanego 1-AP, któremu towarzyszy reakcja chemiczna - addycja grup hydroksylowych pochodzących z wodnego elektrolitu do pierścieni aromatycznych 1-AP. W rezultacie, powstaje pochodna wykazująca odwracalną aktywność procesów redoks (para pików II/III) przy potencjale formalnym istotnie niższym niż pierwotny sygnał I, co można tłumaczyć efektem dostarczania elektronów do układu aromatycznego przez nowo wprowadzone grupy hydroksylowe. Podobny efekt obserwowany był przez P. Mayuri i współpracowników [175], którzy badali elektrochemiczne utlenienie (aktywację) indolu zaadsorbowanego na powierzchni MWCNT. Powstałe utlenione pochodne zawierały w strukturze nowe grupy hydroksylowe i wykazywały odwracalną aktywność redoks przy niższych potencjałach niż indol. W pracy R. Shanmugam i współautorów [179] wykazano natomiast, że barwnik fenotiazynowy ulega procesowi elektrochemicznego utlenienia na powierzchni MWCNT, w wyniku którego powstaje pochodna fenotiazyny z podstawionymi grupami hydroksylowymi, wykazująca aktywność elektrochemiczną typu chinon/hydrochinon.

W celu potwierdzenia struktury produktu reakcji elektrodowych ekstrakt metanolowy z aktywowanej elektrody poddano analizie spektrometrii mas. Na Rys. 12 przedstawiono widmo masowe, które uzyskano dla wyekstrahowanego związku. Sygnał przy m/z 282,0 można zidentyfikować jako utleniony 1-AP (oznaczony jako 1-APox), który w swojej strukturze aromatycznej posiada cztery grupy hydroksylowe. Co więcej, podczas procesu elektrochemicznego zachodzi także dimeryzacja otrzymanego związku. Z tego powodu dodatkowo na widmie masowym widoczny jest dimer o m/z wynoszącym 563,6 (oznaczony jako (1-APox)₂).



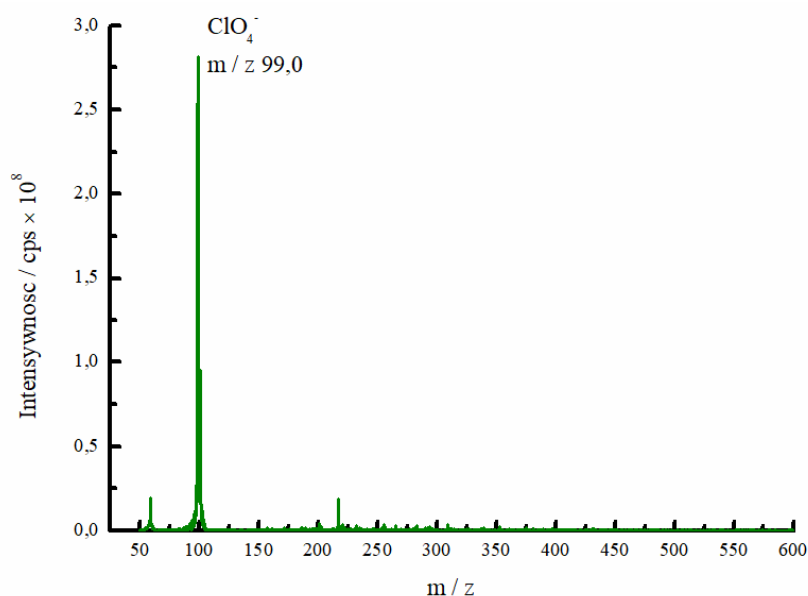
Rys. 12. Widmo masowe ekstraktu metanolowego z elektrody modyfikowanej za pomocą MWCNT/1-APox.

Na Rys. 13 przedstawiono widmo fragmentacyjne tego sygnału. Można więc wnioskować, że widmo fragmentacyjne przedstawione na Rys. 13 jednoznacznie wskazuje na obecność monomeru 1-APox (m/z 282,0) jako głównego produktu reakcji fragmentacji.



Rys. 13. Widmo masowe fragmentacji związku o m/z 563,6 (ekstrakt metanolowy z elektrody MWCNT/1-APox).

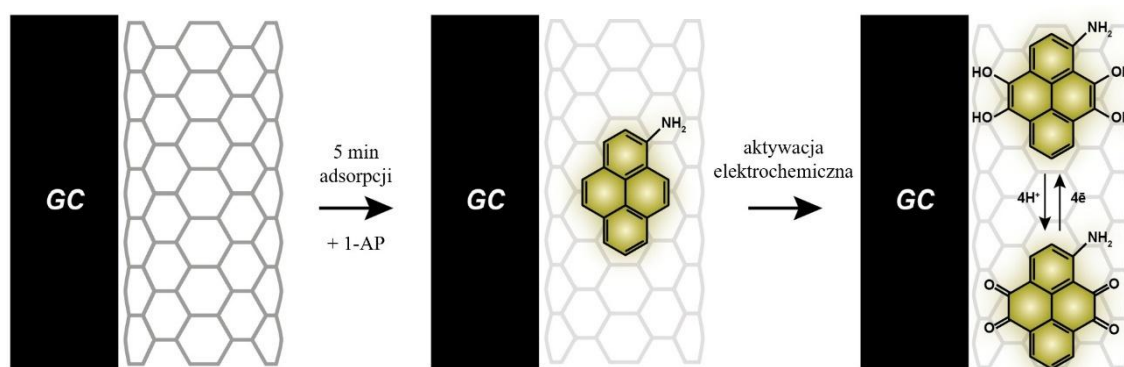
Dodatkowo obecność czwartorzędowej soli amoniowej zawierającej anion nadchloranowy potwierdzono na podstawie obecności sygnału odpowiadającego jonowi ClO_4^- (m/z 99,0), zarejestrowanego w trybie jonów ujemnych i przedstawionego na poniższym widmie masowym (Rys. 14).



Rys. 14. *Widmo masowe ekstraktu metanolowego z elektrody MWCNT/1-APox (zarejestrowane w trybie jonów ujemnych).*

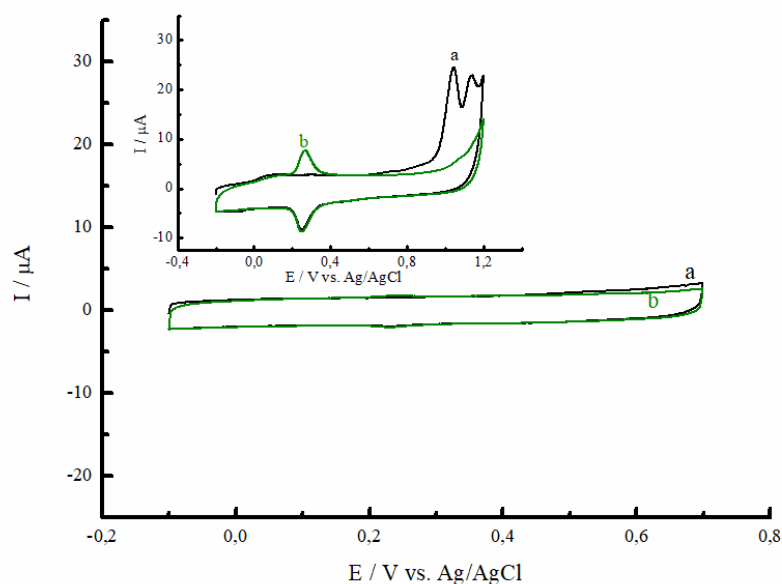
Na podstawie przedstawionych powyżej wyników analiz techniką spektrometrii mas można stwierdzić, że w wyniku elektrochemicznego utleniania 1-AP zaadsorbowanego na MWCNT dochodzi do powstawania 1-aminopireno-4,5,9,10-tetrolu jako głównego produktu (1-APox), a w kolejnym etapie do dimeryzacji powstałej pochodnej.

Schemat przedstawiający etapy modyfikacji elektrody GC za pomocą MWCNT, dalszej adsorpcji 1-AP i elektrochemicznej aktywacji GC/MWCNT/1-AP prowadzącej do powstania elektroaktywnej formy GC/MWCNT/1-APox przedstawiono na Rys. 15.



Rys. 15. Schemat przedstawiający etapy przygotowania elektrody GC/MWCNT/1-APox, w tym proces adsorpcji 1-AP na GC/MWCNT z późniejszą elektroaktywacją. W ostatnim etapie przedstawiono odwracalne przejście redoks 1-APox z udziałem ugrupowań chinonowych/hydrochinonowych.

W celach porównawczych przeprowadzono również próbę kontrolną polegającą na elektrochemicznym utlenieniu pirenu (Pyr) w warunkach identycznych jak w przypadku 1-AP. Wyniki zestawiono na Rys. 16. W przypadku GC/MWCNT/Pyr krzywe prąd-potencjał zarejestrowane w zakresie od $-0,1$ do $+0,7$ V vs. Ag/AgCl mają charakter pojemnościowy związany z ładowaniem podwójnej warstwy elektrycznej na granicy porowatej struktury MWCNT i elektrolitu. W analizowanym zakresie potencjałów nie zaobserwowano jednak pików utlenienia-redukcji, które były obecne w przypadku elektrody GC/MWCNT/1-AP poddanej analogicznym badaniom. Uzyskanie odwracalnej pary redoks w procesie aktywacji GC/MWCNT/Pyr wymagało zwiększenia zakresu potencjału do $+1,2$ V vs. Ag/AgCl. Wskazuje to, że proces elektrochemicznego utlenienia Pyr zachodzi efektywnie dopiero przy wyższych potencjałach, co uwidoczniono we wstawce do Rys. 16, gdzie wyraźnie można zaobserwować parę pików przy potencjale około $+0,3$ V vs. Ag/AgCl. Elektrochemiczne utlenienie zaadsorbowanego Pyr na powierzchni MWCNT opisane zostało wcześniej przez Barathi i Kumara [164]. Procesowi temu towarzyszy przyłączenie czterech grup hydroksylowych do pierścieni aromatycznych Pyr i wytworzenie pireno-4,5,9,10-tetrolu. Autorzy wykazują ponadto, że powstała elektroda modyfikowana jest wysoce elektroaktywna ze względu na powstałe formy chinon/hydrochinon.



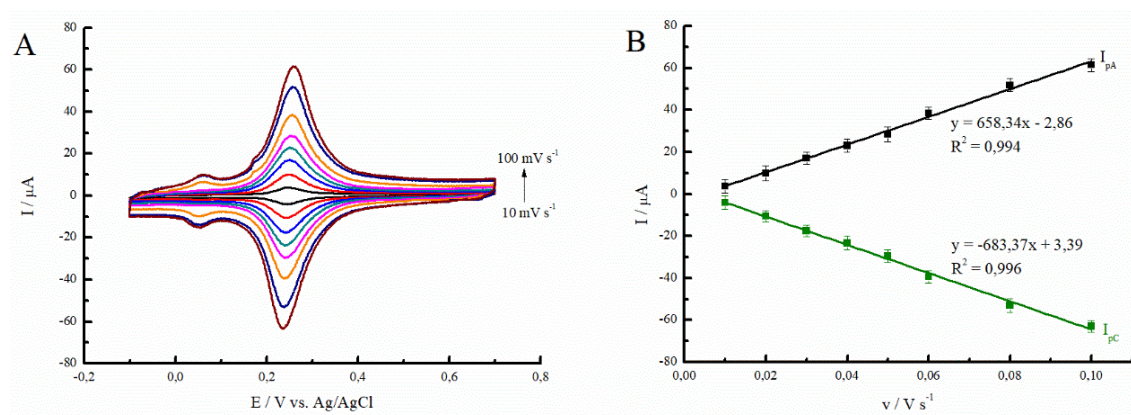
Rys. 16. Elektrochemiczna aktywacja układu GC/MWCNT/Pyr w 0,1 M HClO₄; a - czarna linia (pierwszy skan), b - zielona linia (drugi skan). Wstawka na wykresie przedstawia aktywację pirenu w szerszym zakresie potencjałów (od -0,2 do +1,2 V). Szybkość przesuwu potencjału wynosi 50 mV s⁻¹.

Uzyskane wyniki wykazują, że utlenienie (aktywacja) elektrody GC/MWCNT/1-AP do GC/MWCNT/1-APox przebiega przy zdecydowanie niższym potencjale niż podobny proces na elektrodzie porównawczej (GC/MWCNT/Pyr do GC/MWCNT/Pyrox). Zjawisko to skorelować należy z obecnością grupy aminowej w strukturze 1-AP. Grupa -NH₂ ma charakter elektrodonorowy, a zatem wzbogaca pierścień aromatyczny w dodatkowe elektrony, ułatwiając proces elektROUTLENIA 1-aminopirenu na powierzchni prezentowanej elektrody [175,179].

Modyfikacja elektrody przy użyciu niższych potencjałów jest korzystna przede wszystkim ze względu na zmniejszenie zużycia energii w procesie, co może mieć istotne znaczenie w kontekście opracowywania ekonomicznych, niskoemisyjnych i wydajnych materiałów elektroaktywnych.

Wytworzoną elektrodę GC/MWCNT/1-APox z dobrze wykształconą parą pików II/III poddano następnie badaniom voltamperometrycznym w elektrolicie kwaśnym (0,1 M HClO₄) stosując różne szybkości przesuwu potencjału w zakresie od 10 do 100 mV s⁻¹. Procedura taka umożliwia uzyskanie informacji o kinetyce procesów elektrochemicznych zachodzących na elektrodzie, a także ocenę udziału zjawisk

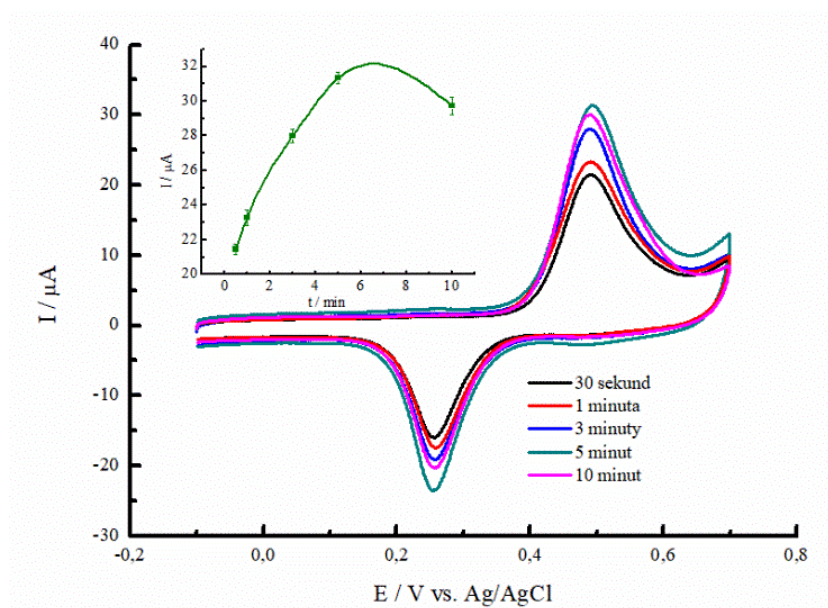
dyfuzyjnych, bądź adsorpcyjnych, towarzyszących reakcjom redoks na granicy faz elektroda-elektrolit. Otrzymane woltamperogramy wraz z wykresem zależności prądu pików w funkcji szybkości przesuwu potencjału przedstawiono na Rys. 17.



Rys. 17. (A) Krzywe woltamperometryczne GC/MWCNT/1-APox przy różnych szybkościach przesuwu potencjału ($10\text{--}100 \text{ mV s}^{-1}$) zarejestrowane w $0,1 \text{ M HClO}_4$. (B) Zależność prądów (anodowego i katodowego) od szybkości przesuwu potencjału.

Obserwuje się liniową korelację prądów pików w funkcji szybkości przesuwu potencjału $I = f(v)$ zarówno dla pików anodowych ($y = 658,34x - 2,86$, $R^2 = 0,994$), jak i katodowych ($y = -683,37x + 3,39$, $R^2 = 0,996$). Uzyskana zależność wskazuje na adsorpcyjny charakter badanego procesu redoks. Oznacza to, że w tym przypadku o wartości prądu decyduje ilość cząsteczek zaadsorbowanych na powierzchni elektrody, a nie transport dyfuzyjny z głębi roztworu elektrolitu. Dodatkowo, przy szybkości przesuwu potencjału 10 mV s^{-1} , otrzymano relatywnie niską wartość separacji pików (5 mV), co jest charakterystyczne dla procesów redoks zachodzących na powierzchni [181].

W kolejnym etapie wykonano badania mające na celu określenie wpływu czasu adsorpcji 1-AP na elektroaktywność uzyskiwanych elektrod modyfikowanych GC/MWCNT/1-AP. W tym celu przeprowadzono adsorpcję 1-AP o stałym stężeniu równym $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ w różnych czasach od 30 s do 10 min , a następnie wytworzone elektrody GC/MWCNT/1-AP przenoszono do $0,1 \text{ M HClO}_4$ i rejestrowano woltamperogramy cykliczne, których pierwsze skany pokazane są na Rys. 18.



Rys. 18. Wykresy woltamperometrii cyklicznej elektrod GC/MWCNT/1-AP zarejestrowane podczas aktywacji w 0,1 M $HClO_4$ (szybkość przesuwu potencjału $50 mV s^{-1}$) dla różnych czasów adsorpcji 1-AP. Wstawka na wykresie przedstawia zależność prądu anodowego od czasu adsorpcji 1-AP.

Na wykresie obserwuje się, że początkowo wraz z wydłużaniem czasu adsorpcji wzrasta sygnał redoks przy potencjale +0,49 V vs. $Ag/AgCl$ pochodzący od nieodwracalnego utleniania GC/MWCNT/1-AP. Po czasie 5 min sygnał osiąga maksymalną wartość, a wydłużenie czasu adsorpcji do 10 min powoduje nieznaczny spadek piku.

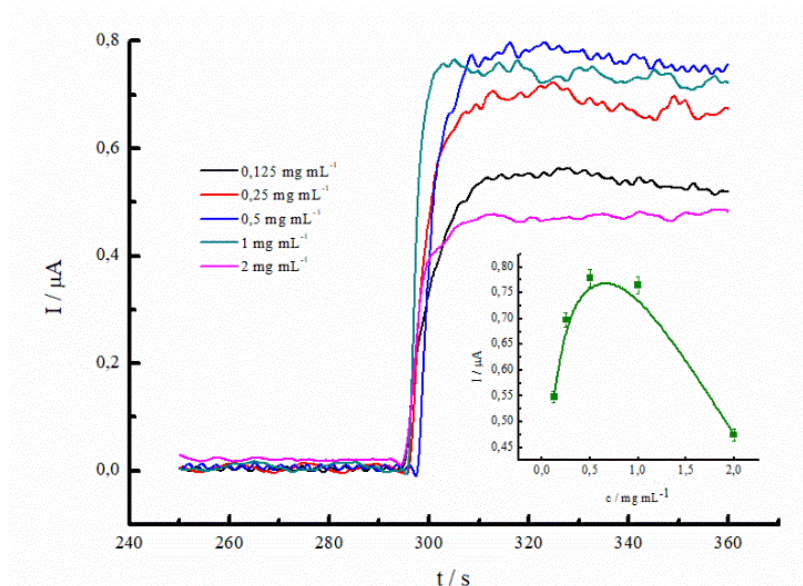
W procesach zachodzących na powierzchni mamy do czynienia z dynamiczną równowagą pomiędzy cząsteczkami przyłączającymi się do powierzchni (adsorpcja), a cząsteczkami ją opuszczającymi (desorpcja). Najczęściej w procesach fizykosorpcji obserwuje się początkowy wzrost ilości substancji zaadsorbowanej, a następnie dochodzi do nasycenia i na krzywej kinetycznej obserwuje się *plateau*.

Wyraźne maksimum obserwowane we wstawce Rys. 18 prawdopodobnie nie jest związane ze zmniejszeniem się ilości 1-AP po dłuższym czasie adsorpcji, a wynikać może ze zmniejszenia się aktywności elektrochemicznej 1-AP, gdy jego ilość na elektrodzie przekracza optymalną wartość. Wspomnieć warto, że pomiar sygnału redoks (ładunku, bądź prądu) nie jest bezpośrednią metodą oszacowania ilości zaadsorbowanego związku,

a na sam sygnał redoks (aktywność elektrochemiczną) wpływać może wiele czynników, włącznie z częściowym utlenieniem związku, dimeryzacją, a w szczególności sposobem ułożenia na powierzchni. Bardzo istotna jest bowiem dobra komunikacja elektronowa pomiędzy aromatycznym szkieletem 1-AP, a dobrze przewodzącą powierzchnią MWCNT.

Do dalszych badań wykorzystywano zatem każdorazowo elektrody GC/MWCNT/1-AP uzyskane w procesie adsorpcji trwającym 5 min.

Dobór odpowiedniego stężenia, które wykorzystywane jest w procesie adsorpcji ma zazwyczaj istotny wpływ na właściwości elektrokatalityczne elektrod modyfikowanych. Następny etap badań dotyczył zatem wytworzenia elektrod GC/MWCNT/1-APox z wykorzystaniem 1-AP o różnych stężeniach w zakresie od 0,125 do 2,0 mg mL⁻¹. Ustalony czas adsorpcji wynosił 5 min. W tym przypadku elektrody zweryfikowano pod kątem sygnału amperometrycznego rejestrowanego po dodaniu do elektrolitu 20 μM NADH. Pomiar przeprowadzono na każdej z elektrod przy stałym potencjale wynoszącym +0,1 V vs. Ag/AgCl, w buforze fosforanowym (PBS, pH 7,4), w warunkach ciągłego mieszania. Uzyskane chronoamperogramy zamieszczone są na Rys. 19.



Rys. 19. Krzywe chronoamperometryczne rejestrujące odpowiedź na dodatek 20 μM NADH w zależności od stężenia 1-AP użytego do przygotowania elektrody GC/MWCNT/1-APox przy stałym potencjale +0,1 V vs. Ag/AgCl w PBS (pH 7,4). Wstawka pokazuje zależność prądu utleniania NADH od stężenia 1-AP (od 0,125 do 2,0 mg mL⁻¹).

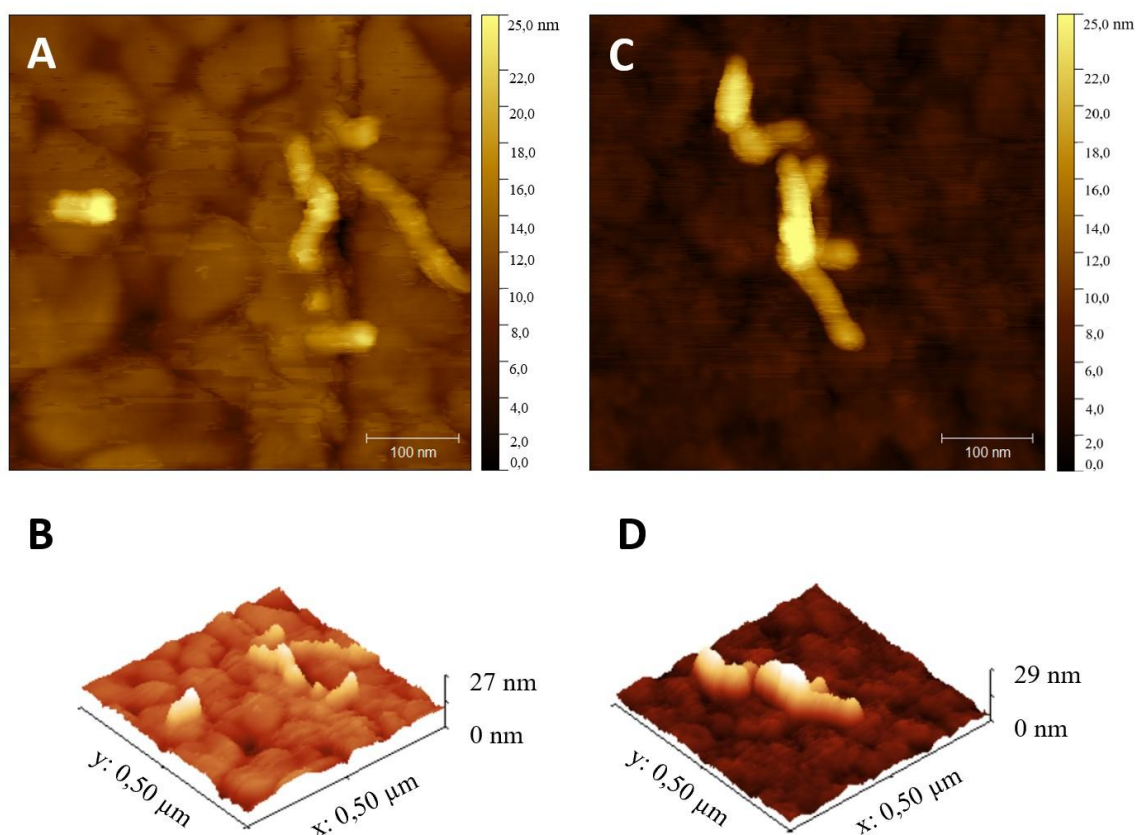
Widać na nich wyraźnie, że istnieje optymalne stężenie 1-AP ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$), dla którego finalna elektroda GC/MWCNT/1-APox wykazuje najwyższą wartość prądu. Powyżej tej wartości zaobserwowano znaczny spadek sygnału. Może to wynikać ze zbyt wysokiego stężenia 1-AP, a w konsekwencji - blokowania powierzchni elektrody przez modyfikator i spadku efektywności katalitycznej. W procesach elektrokatalitycznych kluczowe znaczenie ma właściwa konstrukcja elektrody, która powinna łączyć wysokie przewodnictwo elektryczne z odpowiednią porowatością oraz taką dystrybucją katalizatora, aby umożliwiać efektywną wymianę elektronów pomiędzy analitem, centrami katalitycznymi, a przewodzącym podłożem - w tym przypadku wielościennymi nanorurkami węglowymi (MWCNT).

W związku z wynikami zaprezentowanymi na Rys. 18 i Rys. 19 zdecydowano, że optymalne stężenie 1-AP do modyfikacji powierzchni elektrody GC/MWCNT powinno wynosić $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$, natomiast czas adsorpcji to 5 minut.

2.1.2. Analizy fizykochemiczne materiału MWCNT/1-APox

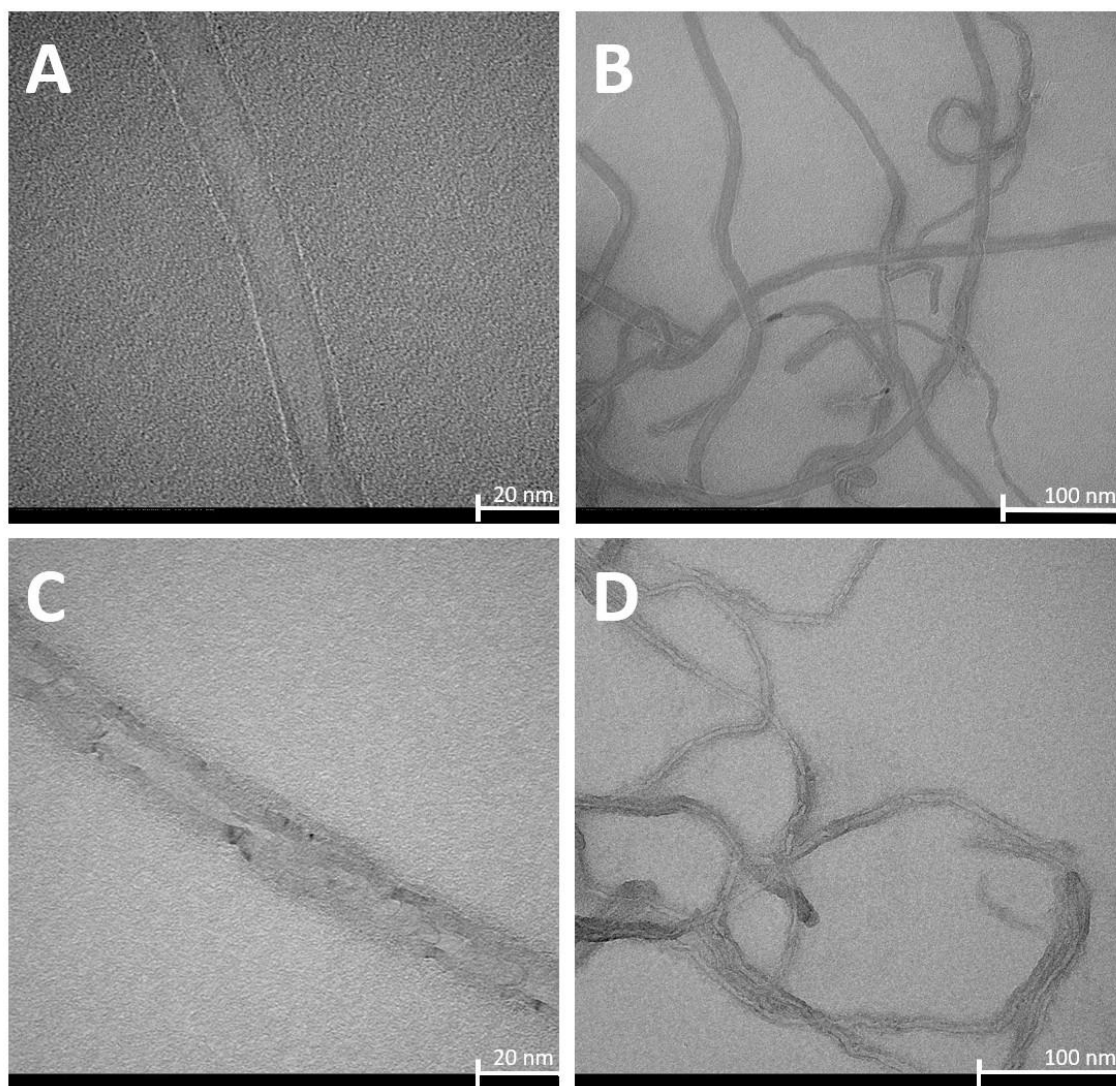
Morfologię MWCNT i MWCNT/1-APox zbadano z wykorzystaniem mikroskopii sił atomowych (AFM) i transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM).

Rys. 20 przedstawia wyniki otrzymane przy użyciu AFM dla pojedynczych struktur MWCNT (A i B) i MWCNT/1-APox (C i D). Oba badane materiały charakteryzują się typową nanometryczną tubularną strukturą. Obserwowane nanorurki mają długość znacznie przekraczającą 100 nm. Porównanie przekrojów MWCNT/1-APox i MWCNT ujawnia, że średnica MWCNT/1-APox ($30,5 \pm 3,7 \text{ nm}$, $n = 10$) jest większa niż w przypadku nefunkcjonalizowanych MWCNT ($22,2 \pm 4,7 \text{ nm}$, $n = 10$). Sugeruje to, że 1-APox pokrywa równomiernie powierzchnię MWCNT, co można przypisać oddziaływaniom typu π - π pomiędzy ich strukturą aromatyczną, a szkieletem 1-APox.



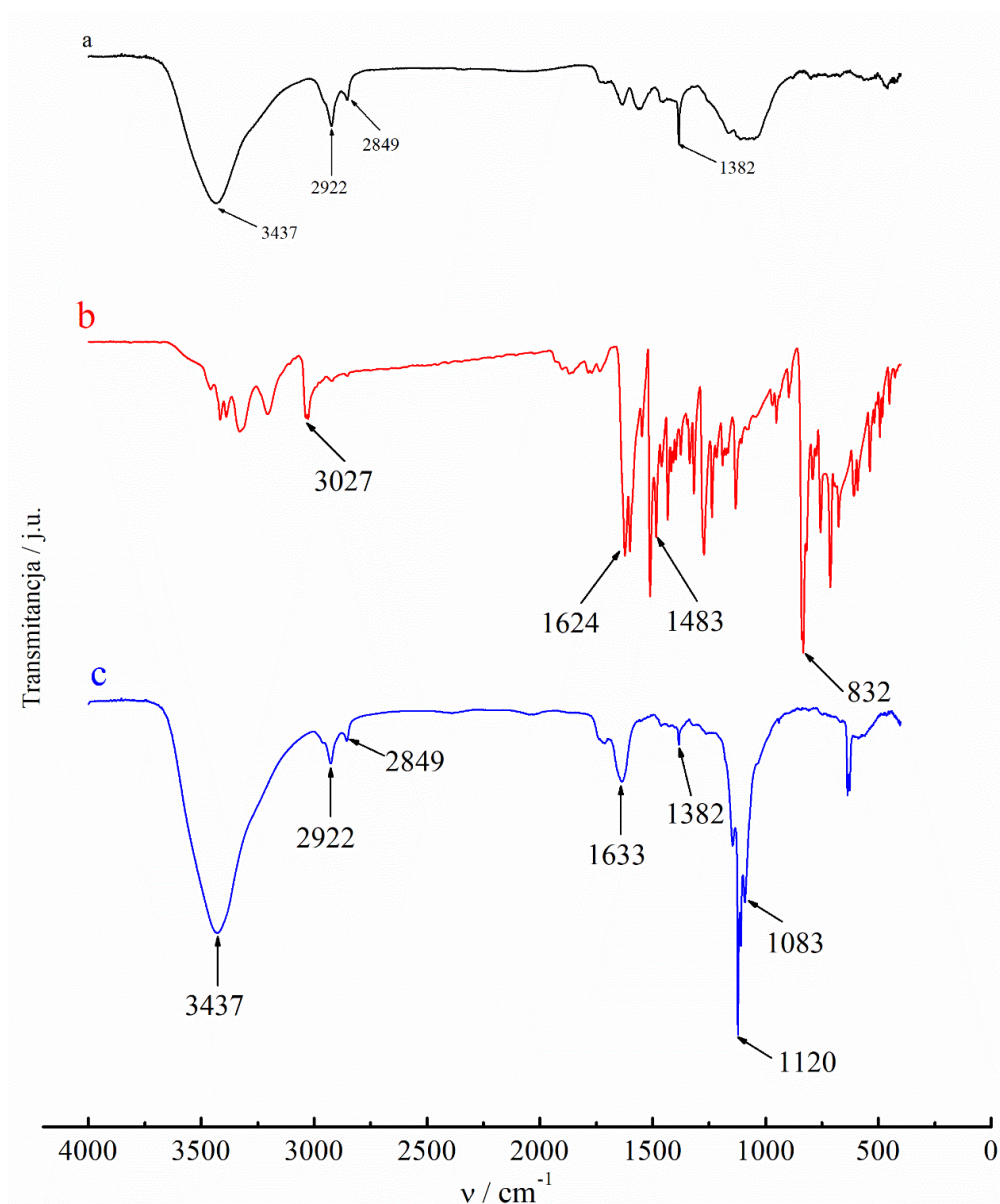
Rys. 20. Obrazy AFM oraz wizualizacje 3D niemodyfikowanych MWCNT (A i B), a także MWCNT/1-APox (C i D).

Rys. 21 przedstawia obrazy TEM dla niemodyfikowanych MWCNT (A i B) i materiału MWCNT/1-APox (C i D). W obu przypadkach również dostrzec można typowy cylindryczny kształt nanorurek. MWCNT charakteryzują się względnie gładką powierzchnią (Rys. 21A i 21B), natomiast materiał po modyfikacji (Rys. 21C i 21D) jest wyraźnie bardziej chropowaty. Wynikać to musi z pokrycia powierzchni MWCNT przez 1-APox. Obrazy TEM ukazujące większy obszar dla niemodyfikowanych MWCNT (Rys. 21B) i MWCNT/1-APox (Rys. 21D) uwiadamiają, że tworzy się sieć wzajemnie nachodzących na siebie włókien. Uformowana w ten sposób i połączona sieć nanorurek węglowych, pokryta dodatkowo warstwą 1-APox, może stanowić jednorodne, przewodzące podłoże, które umożliwi efektywny transport elektronów pomiędzy centrami redoks, a powierzchnią elektrody.



Rys. 21. Obrazy TEM niemodyfikowanych MWCNT (A i B) i MWCNT/1-APox (C i D).

W kolejnym etapie badań wykonano spektroskopię w podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IR), aby przeanalizować skład chemiczny poszczególnych komponentów materiału elektrodowego (MWCNT, 1-AP oraz MWCNT/1-APox). Uzyskane widma FT-IR zestawiono na Rys. 22.

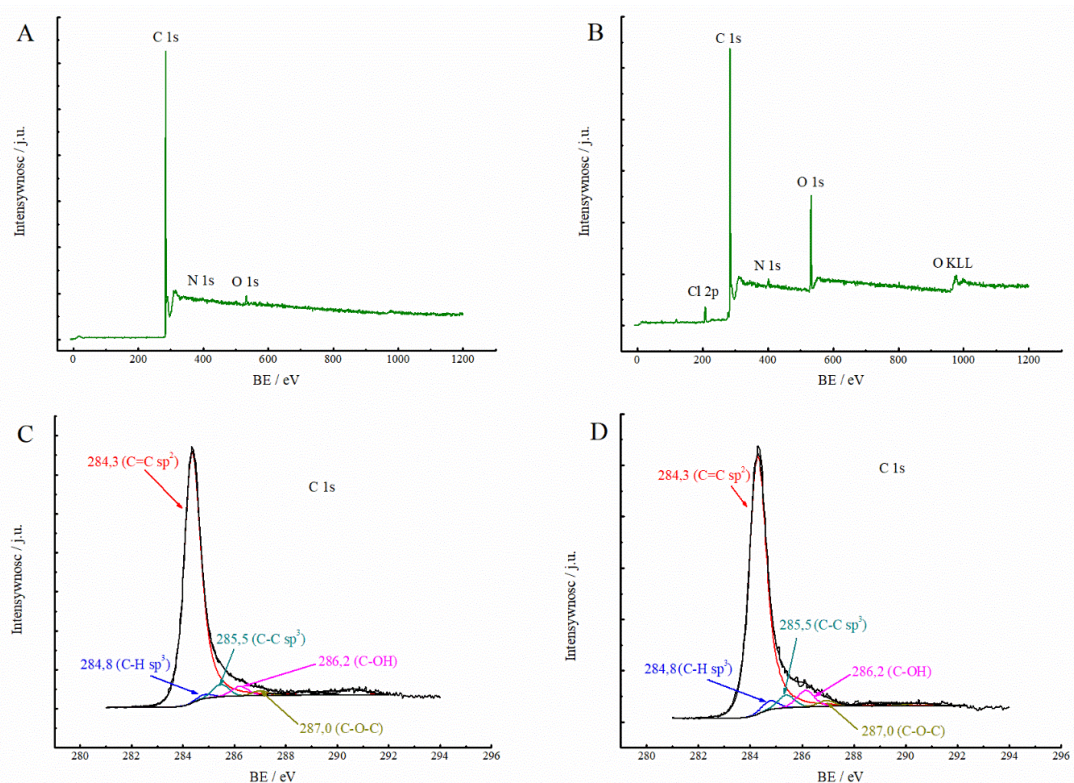


Rys. 22. Widma FT-IR dla (a) niemodyfikowanych MWCNT, (b) 1-AP oraz (c) MWCNT/1-APox.

Widmo FT-IR dla MWCNT (krzywa a, czarna linia) charakteryzuje się pikiem przy 3437 cm^{-1} , który jest związany z charakterystycznymi drganiami rozciągającymi grup fenolowych O–H. Ponadto, piki przy 2922 cm^{-1} , a także 2849 cm^{-1} odpowiadają drganiom rozciągającym C–H. Dodatkowo przy liczbie falowej wynoszącej 1382 cm^{-1} obserwuje się pik związany z drganiami deformacyjnymi C–H [182]. Z kolei widmo w podczerwieni dla 1-aminopirenu (krzywa b, czerwona linia) charakteryzuje się wyraźnym pikiem przy 832 cm^{-1} , który przypisuje się drganiom zginającym N–H. Drgania C=C pochodzące od pierścienia aromatycznego są widoczne przy 1624 cm^{-1}

i 1483 cm^{-1} , podczas gdy drgania rozciągające C–H pierścienia aromatycznego są związane z szerokimi pasmami przy liczbie falowej równej 3027 cm^{-1} [183,184]. Wszystkie wyżej wymienione i opisane piki obserwowane dla widma MWCNT (krzywa a, czarna linia) występują również na widmie FT-IR uzyskanym dla układu MWCNT/1-APox (krzywa c, niebieska linia). Ponadto, dla widma MWCNT/1-APox obserwuje się również dodatkowe piki przy liczbach falowych równych 1633 cm^{-1} oraz 1083 cm^{-1} odpowiadające odpowiednio drganiom deformacyjnym N–H i drganiom rozciągającym C–N. Jednocześnie można wyróżnić drgania rozciągające C–O, charakterystyczne dla alkoholu drugorzędowego (przy liczbie falowej wynoszącej 1120 cm^{-1}), co potwierdza przyłączenie grup hydroksylowych do MWCNT/1-AP. W wyniku tego przyłączenia powstaje elektroaktywny materiał MWCNT/1-APox.

W celu bardziej dogłębnej charakterystyki grup funkcyjnych materiałów MWCNT/1-AP i elektrochemicznie aktywowanego MWCNT/1-APox wykonano rentgenowską spektroskopię fotoelektronów (XPS). Wyniki tej analizy pokazano na Rys. 23.



Rys. 23. Widma XPS dla (A) MWCNT/1-AP i (B) MWCNT/1-APox. Z kolei (C) i (D) to widma C 1s w wysokiej rozdzielczości odpowiednio dla MWCNT/1-AP i MWCNT/1-APox.

Widmo XPS wykonane dla materiału elektrodowego MWCNT/1-AP charakteryzuje się obecnością sygnałów C 1s (285 eV), O 1s (530 V), a także niewielkim sygnałem N 1s (402 eV). Analiza próbki elektroaktywowanego materiału MWCNT/1-APox pozwala wyróżnić dodatkowo sygnał Cl 2p (209 eV), co związane jest z zastosowaniem elektrolitu o kwasowym pH (0,1 M HClO₄) do aktywacji elektrody. Na widmach C 1s dla MWCNT/1-AP (Rys. 23C), a także MWCNT/1-APox (Rys. 23D) można wyróżnić piki przy 284,3; 284,8; 285,5; 286,2 oraz 287,0 eV. Przyporządkowuje się je odpowiednio: wiązaniu C=C węgla sp², wiązaniu C-H sp³, wiązaniu C-C węgla sp³, wiązaniom C-OH oraz wiązaniom C-O-C [164,185].

W przypadku analizy MWCNT/1-APox (w porównaniu z MWCNT/1-AP) obserwuje się wzrost intensywności sygnału przy 286,2 eV (C-OH) z 3,1% do 5,0%, co może być bezpośrednio związane z przyłączeniem grup -OH podczas procesu elektroaktywacji MWCNT/1-AP. W związku z tym w Tabeli 3 porównano wartości sygnałów XPS widm C 1s dla materiału kontrolnego (MWCNT/1-AP) i aktywowanego elektrochemicznie (MWCNT/1-APox).

Tabela 3. Porównanie wartości sygnałów XPS widm C 1s dla MWCNT/1-AP i MWCNT/1-APox.

Material	Sygnał	Wartość sygnału / eV	FWHM	Powierzchnia / (RSF · T · MFP)	Stężenie / %
MWCNT/1-AP	C=C sp ²	284,34	0,73	307,127	88,1
	C-H sp ³	284,84	0,74	4,097	1,2
	C-C sp ³	285,47	0,74	12,981	3,7
	C-OH	286,21	0,79	10,725	3,1
	C-O-C	287,00	0,75	5,099	1,5
	C=O	287,55	0,75	2,258	0,7
	COO-	288,68	0,75	3,867	1,1
	COOR	289,48	0,75	2,592	0,7
MWCNT/1-APox	C=C sp ²	284,27	0,74	243,409	85,8
	C-H sp ³	284,77	0,75	6,917	2,4
	C-C sp ³	285,40	0,75	10,236	3,6
	C-OH	286,13	0,81	14,251	5,0
	C-O-C	286,92	0,76	4,684	1,7
	C=O	287,47	0,76	0,010	0,0
	COO-	288,60	0,76	2,154	0,8
	COOR	289,40	0,76	2,111	0,7

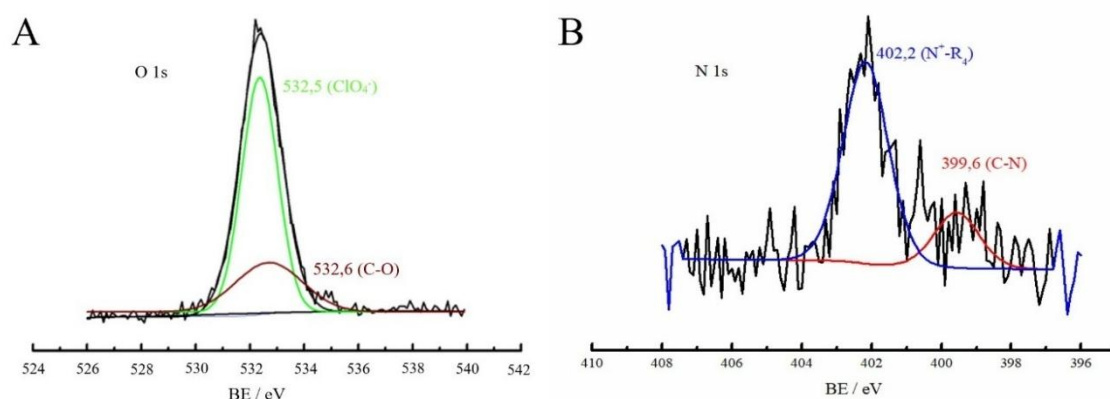
Wyjaśnienie wskaźników XPS: FWHM - Pełna szerokość w połowie maksimum, RSF - Współczynnik czułości względnej, T - Transmisja analizatora, MFP - Średnia droga swobodna elektronu.

Dodatkowo w Tabeli 4 zestawiono również porównanie wartości sygnałów XPS dla materiału kontrolnego i aktywowanego elektrochemicznie. W wyniku procesu elektROUTLENIA zwiększona została zawartość tlenu w próbce (MWCNT/1-APox), czego spodziewano się podczas aktywacji elektrochemicznej elektrody modyfikowanej.

Tabela 4. Porównanie wartości sygnałów XPS widm MWCNT/1-AP i MWCNT/1-APox.

Material	Sygnal	Wartość sygnału / eV	Powierzchnia / (RSF · T · MFP)	Stężenie / %	Odchylenie Standardowe / %
MWCNT/1-AP	C 1s	284,3	13400,500	97,8	0,7
	O 1s	533,3	211,793	1,6	0,4
	N 1s	399,0	83,554	0,6	0,6
MWCNT/1-APox	C 1s	284,3	11464,300	81,5	0,7
	O 1s	532,5	1646,160	11,7	0,4
	N 1s	402,0	315,875	2,2	0,6
	Cl 2p	207,8	413,652	2,9	0,2

Ponadto na Rys. 24 zaprezentowano widma O 1s (A) i N 1s (B) elektrochemicznie aktywowanego materiału MWCNT/1-APox w wysokiej rozdzielczości.



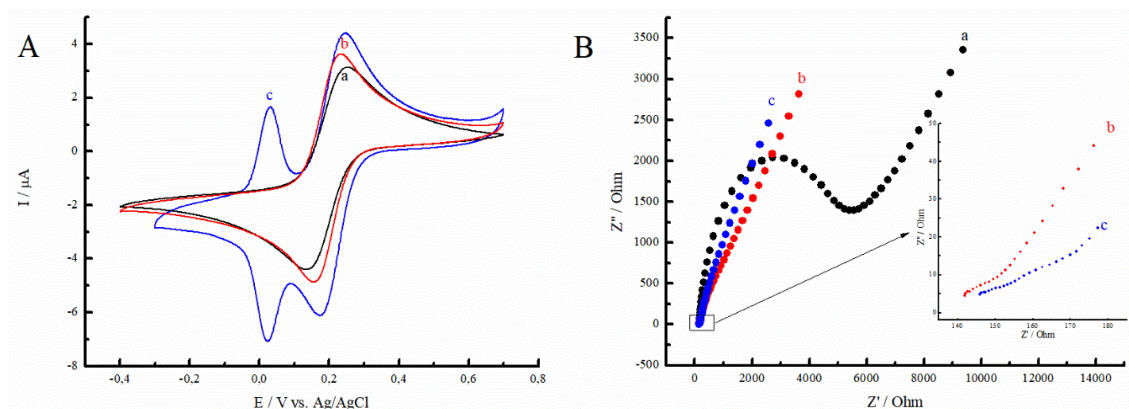
Rys. 24. (A) Widma O 1s aktywowanego materiału MWCNT/1-APox przedstawione w wysokiej rozdzielczości. (B) Widma N 1s również utlenionego materiału MWCNT/1-APox prezentowane w wysokiej rozdzielczości.

Obserwowane sygnały XPS widoczne na widmie O 1s (Rys. 24A) dla MWCNT/1-APox mogą wynikać z obecności grup C–O (532,6 eV) oraz anionu

nadchloranowego (ClO_4^-) przy 532,5 eV [186]. W widmie N 1s próbki MWCNT/1-APox można zaobserwować dwa piki: przy 402,2 eV oraz 399,6 eV, które przypisano odpowiednio kationowi czwartorzędowego amonu (N^+-R_4) oraz wiązaniami C–N (Rys. 24B) [187].

2.1.3. Charakterystyka elektrochemiczna elektrody GC/MWCNT/1-APox

Charakterystykę elektrochemiczną GC/MWCNT/1-APox wykonano następnie w buforze fosforanowym o pH 7,4. Bufor ten jest powszechnie stosowanym elektrolitem w badaniach nad sensorami elektrochemicznymi, ponieważ imituje warunki fizjologiczne panujące w organizmie. Dzięki stabilnemu pH zapewnia on odpowiednie środowisko dla biomolekuł, co jest niezbędne w ocenie właściwości elektroanalitycznych elektrody. W celu dokładnego wyjaśnienia charakterystyki transferu elektronów wykonano analizy woltamperometryczne i chronoamperometryczne dla elektrody modyfikowanej GC/MWCNT/1-APox w buforze fosforanowym zawierającym marker redoks - 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. Para redoks $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ jest powszechnie wykorzystywana w testach elektrochemicznych jako układ modelowy, charakteryzujący się odwracalnym procesem jednoelektronowym. Układ ten jest bardzo pomocny w analizie kinetyki wymiany elektronów, rozróżnianiu mechanizmów ograniczanych przez dyfuzję, bądź adsorpcję, a także jego użycie pozwala ocenić występowanie oddziaływań elektrostatycznych podczas kontaktu elektrody z ujemnie naładowanymi jonami $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. Eksperymenty kontrolne przeprowadzono również na niemodyfikowanej elektrodzie z węgla szklanego (GC) i elektrodzie modyfikowanej wielościennymi nanorurkami węglowymi (GC/MWCNT) dla porównania. Wyniki tych analiz zestawiono na Rys. 25A.



Rys. 25. (A) Krzywe woltamperometryczne dla GC (a, czarna linia), GC/MWCNT (b, czerwona linia) oraz GC/MWCNT/1-APox (c, niebieska linia) w obecności 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. Szybkość przesuwu potencjału wynosiła 10 mV s^{-1} . (B) Wykresy Nyquista odpowiednich elektrod w elektrolicie obojętnym (PBS, pH 7,4) zawierającym 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$.

Na Rys. 25A dla niemodyfikowanej elektrody GC obserwuje się dwa piki przy potencjałach +0,16 i +0,25 V vs. Ag/AgCl (a, czarna linia). Separacja w tym przypadku jest równa 90 mV, co jest wyższą wartością niż oczekiwana, teoretyczna wartość (60 mV) dla procesów kontrolowanych dyfuzją. Zjawisko wyższej niż 60 mV separacji pomiędzy pikami dla niemodyfikowanych elektrod GC jest obserwowane dość często w wynikach wielu badań naukowych [171,188]. Efekt ten jest raczej rzadko komentowany przez Autorów, stąd też interpretacja tego zjawiska jest dość trudna. Przypuszczać można, że powierzchnia węgla szklanego zawierać może śladowe ilości grup funkcyjnych (na przykład tlenowych), które posiadają częściowy ładunek ujemny, co sprawia, że anionowy marker redoks wykazuje zwiększoną separację pików. Z drugiej strony, separacja pików wyższa niż 60 mV świadczy o przebiegu procesu *quasi*-odwracalnego związanego z wolniejszą kinetyką wymiany elektronów na powierzchni. Dla elektrody GC/MWCNT (b, czerwona linia) widoczne są dobrze zdefiniowane piki redoks przy potencjałach +0,16 i +0,23 V vs. Ag/AgCl. Separacja pików wynosi zatem 70 mV, co oznacza, że proces jest również *quasi*-odwracalny. Zmniejszenie się separacji pików z 90 mV dla GC do 70 mV dla GC/MWCNT związane być może z polepszeniem kinetyki transferu elektronów elektrody modyfikowanej nanorurkami w porównaniu do niemodyfikowanej GC. Prądy pików anodowych i katodowych są nieco wyższe niż dla elektrody GC. Z kolei woltamperogramy uzyskane dla elektrody GC/MWCNT/1-APox charakteryzują się pikami redoks $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, dla których separacja niezmiennie

wynosiła 70 mV, a piki dodatkowo nieznacznie wzrosły. Wzrost prądów obserwowany dla elektrod GC/MWCNT i GC/MWCNT/1-APox jest związany ze zwiększeniem powierzchni elektroaktywnej, którą wyznaczono na podstawie pomiarów chronoamperometrycznych w obecności $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. Powierzchnia elektroaktywna została obliczona dla każdej z elektrod przy użyciu równania Cottrella [189], które zostało przedstawione poniżej:

$$I = n \cdot F \cdot A \cdot c_j^0 \cdot D_j^{1/2} \cdot \pi^{-1/2} \cdot t^{-1/2} \quad (10)$$

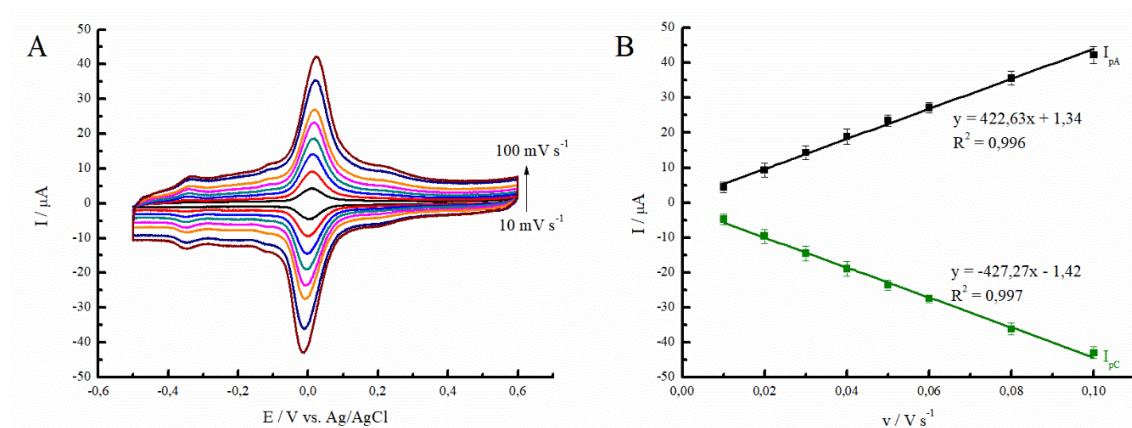
gdzie: I oznacza natężenie prądu (A); n określa liczbę elektronów wymienionych w reakcji ($n = 1$); F to stała Faradaya ($F = 96\,485 \text{ C mol}^{-1}$); A oznacza powierzchnię elektroaktywną (cm^2); c_j^0 to stężenie analitu (mol cm^{-3}); D_j określa współczynnik dyfuzji (dla $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ jest równy $7,3 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$); t to czas (s). Wyznaczone pola powierzchni elektroaktywnej wynoszą odpowiednio $0,079 \text{ cm}^2$, $0,089 \text{ cm}^2$, a także $0,094 \text{ cm}^2$ dla GC, GC/MWCNT i GC/MWCNT/1-APox.

Uzyskane wyniki sugerują, że zastosowane modyfikacje (GC/MWCNT i GC/MWCNT/1-APox) znacząco wpływają na elektrochemiczną odpowiedź markera redoks $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. Obserwowane efekty świadczą o poprawie kinetyki transferu elektronów. Wzrost elektroaktywnej powierzchni elektrody przypisać można porowatej strukturze nanorurek, dzięki której powierzchnia zawiera dużo więcej miejsc, gdzie dochodzi do wymiany elektronów.

Ponadto na Rys. 25B przedstawiono również wyniki pomiarów elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej (EIS), która została wykonana, aby lepiej zrozumieć procesy międzyfazowe elektroda-elektrolit. Przedstawiono wykresy Nyquista dla elektrod GC, GC/MWCNT oraz GC/MWCNT/1-APox zarejestrowane w obecności mieszaniny 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (stosunek molowy formy utlenionej do zredukowanej to 1:1). Prezentowane krzywe potwierdzają wyniki uzyskane wcześniej za pomocą woltamperometrii cyklicznej. Wykres Nyquista dla elektrody GC (Rys. 25B, krzywa a) charakteryzuje się stosunkowo dużym półkołem w obszarze wysokich częstotliwości i prostą linią w obszarze niższych częstotliwości. Obszary wysokich częstotliwości koreluje się z rezystancją transferu elektronów, natomiast liniowa część krzywej w strefie średnich i niższych częstotliwości prawdopodobnie jest związana z pojemnością i rezystancją dyfuzyjną. Z kolei krzywe EIS odpowiadające elektrodom GC/MWCNT

i GC/MWCNT/1-APox posiadają mniejszą średnicę półkola (Rys. 25B, odpowiednio krzywe b i c), co wskazuje na szybszy transfer elektronów na powierzchniach elektrod i dobrze koreluje z wynikami uzyskanymi techniką CV [182,190,191]. Na podstawie wyników uzyskanych technikami CV i EIS można jednoznacznie stwierdzić, że materiał elektrodowy MWCNT/1-APox może zostać wykorzystany do modyfikacji elektrody GC, którą charakteryzować będzie wysoka przewodność oraz szybki transfer elektronów, co może pozytywnie wpływać na elektroaktywność.

Dodatkowo na Rys. 26A zawarte są woltamperogramy cykliczne zarejestrowane przy różnych szybkościach przesuwu potencjału ($10\text{--}100\text{ mV s}^{-1}$) w zakresie potencjałów od $-0,5$ do $+0,6\text{ V vs. Ag/AgCl}$.



Rys. 26. (A) Wykresy woltamperometrii cyklicznej dla elektrody GC/MWCNT/1-APox przy różnych szybkościach przesuwu potencjału ($10\text{--}100\text{ mV s}^{-1}$) zarejestrowane w PBS (pH 7,4). (B) Zależność szybkości przesuwu potencjału od anodowego i katodowego prądu piku.

Dobrze zdefiniowana, odwracalna para pików redoks jest obserwowana przy potencjale około 0 V vs. Ag/AgCl. Piki te są związane są z odwracalnymi przejściami elektrochemicznymi 1-aminopirenu-4,5,9,10-tetrolu do 1-aminopirenu-4,5,9,10-tetronu (chinon/hydrochinon), co pokazano schematycznie wcześniej na Rys. 15 niniejszej rozprawy doktorskiej (str. 80). Wzrost szybkości przesuwu potencjału powoduje wzrost prądu pików, a obserwowane zależności (Rys. 26B) $I_p = f(v)$ zarówno dla pików anodowych (I_{pA} , $y = 422,63x + 1,34$, $R^2 = 0,996$), jak i katodowych (I_{pC} , $y = -427,27x - 1,42$, $R^2 = 0,997$), mają charakter liniowy. Sugeruje to zatem

adsorpcyjny charakter procesów redoks, w których transfer ładunku zachodzi pomiędzy zaadsorbowanymi grupami chinonowymi pochodzącymi od 1-APox, a powierzchnią elektrody. Ponadto zaobserwowano, że potencjały pików nie zmieniają się znacząco wraz ze wzrostem szybkości przesuwu potencjału w wybranym zakresie niższych szybkości przesuwu potencjału (od 10 do 100 mV s⁻¹), co sugeruje dobrą kinetykę transferu elektronów pomiędzy przewodzącą matrycą nanorurek i przyłączonym modyfikatorem (Rys. 26A). Otrzymane wyniki wskazują na silne przyłączenie 1-APox do MWCNT poprzez oddziaływania π - π [169,182,192]. Pokrycie powierzchni (Γ) 1-APox zaadsorbowanego na powierzchni można oszacować na podstawie nachylenia krzywej I_p w funkcji szybkości przesuwu potencjału (Rys. 26B), przy założeniu $n = 4$ i $A = 0,079$ cm² (obliczona wcześniej w pracy), za pomocą równania [193]:

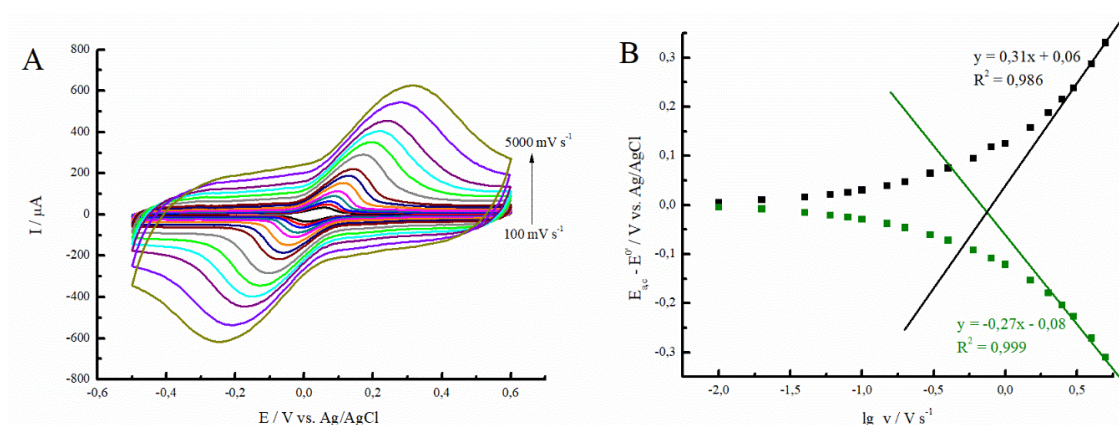
$$I_p = n^2 \cdot F^2 \cdot v \cdot A \cdot \Gamma / 4 \cdot R \cdot T \quad (11)$$

gdzie: I_p określa natężenie prądu pików (A); n to liczba elektronów wymienionych w reakcji; F oznacza stałą Faradaya ($F = 96\,485$ C mol⁻¹); v określa szybkość przesuwu potencjału (V s⁻¹); A oznacza powierzchnię elektroaktywną (cm²); Γ to pokrycie powierzchni (mol cm⁻²); R oznacza stałą gazową ($R = 8,314$ J mol⁻¹ K⁻¹); T określa temperaturę (K).

Pokrycie powierzchni (Γ) oszacowano na $3,71 \pm 0,19 \cdot 10^{-10}$ mol cm⁻². W pracy Golabi i współautorów jako materiał modyfikujący zastosowano kwas chlorogenowy spolimeryzowany na elektrodzie węglowej modyfikowanej MWCNT. Pokrycie powierzchni grupami chinonowymi oszacowano w tym badaniu na $4,5 \cdot 10^{-10}$ mol cm⁻² [194]. Uzyskana wartość jest porównywalna z wynikami niniejszych badań, co wskazuje na wielowarstwowe pokrycie elektroaktywnego 1-APox na powierzchni wielościennych nanorurek węglowych [195].

Dodatkowo na Rys. 27A przedstawiono krzywe woltamperometryczne zarejestrowane dla elektrody GC/MWCNT/1-APox przy wyższych szybkościach przesuwu potencjału (od 100 do 5000 mV s⁻¹) w buforze fosforanowym (PBS, pH 7,4). Wykres zależności $E_{a,c} - E^{0'}$ vs. $\lg(v)$ dla wspomnianej elektrody modyfikowanej przedstawiony jest na Rys. 27B. Teoria Lavirona opisuje zachowanie elektrochemiczne układów unieruchomionych na powierzchni elektrody, które ulegają procesom redoks [196]. Przy dużych szybkościach przesuwu potencjału układ redoks

zmuszany do szybszej odpowiedzi i w takiej sytuacji mogą pojawić się ograniczenia kinetyczne transferu elektronów. Obserwuje się tym samym duże separacje pików świadczące o nieodwracalności procesów. W warunkach eksperymentalnych, w których odpowiedź elektrody staje się ograniczona kinetycznie, możliwe jest wyznaczenie stałej szybkości transferu elektronów (k_s) oraz współczynnika przeniesienia ładunku (α), zgodnie z teorią Lavirona [196–199], zakładając, że cząsteczki redoks są związane z powierzchnią elektrody.



Rys. 27. (A) Woltamperogramy uzyskane dla elektrody modyfikowanej GC/MWCNT/1-APox przy różnych szybkościach przesuwu potencjału ($100\text{--}5000\text{ mV s}^{-1}$) zarejestrowane w PBS (pH 7,4). (B) Wykres Lavirona dla opisanej elektrody modyfikowanej.

Współczynnik przeniesienia ładunku (α) oraz stałą szybkości transferu elektronów (k_s), opisujące kinetykę transportu elektronów pomiędzy 1-APox, a powierzchnią elektrody, można oszacować na podstawie danych z Rys. 27B i zastosowaniu poniższych równań [196]:

$$I / (I - \alpha) = v_a / v_c \quad (12)$$

$$k_s = n \cdot F \cdot \alpha \cdot v_c / R \cdot T = n \cdot F (I - \alpha) v_a / R \cdot T \quad (13)$$

gdzie: α określa współczynnik przeniesienia ładunku; v_a i v_c są prawdopodobnymi szybkościami przesuwu potencjału w punktach przecięcia prostych dopasowanych do danych w zakresach anodowych i katodowych; k_s oznacza stałą szybkości transferu elektronów (s^{-1}); n to liczba elektronów wymienionych w reakcji; F to stała Faradaya

($F = 96\,485\text{ C mol}^{-1}$); R oznacza stałą gazową ($R = 8,314\text{ J mol}^{-1}\text{ K}^{-1}$); T określa temperaturę (K).

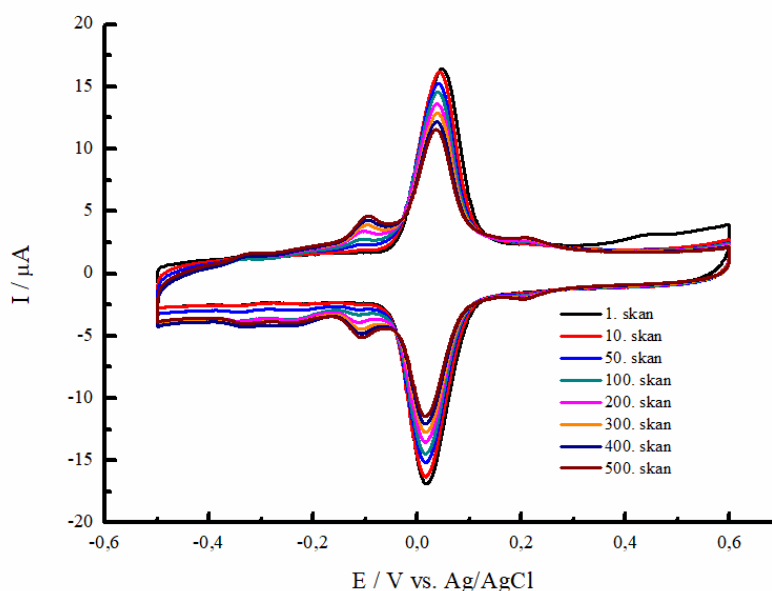
Na podstawie nachylenia i punktu przecięcia krzywej $E_{a,c} - E^{0'} = f(\lg v)$ oszacowano wartość stałej szybkości transferu elektronów (k_s) na $14,8\text{ s}^{-1}$ i współczynnika przeniesienia ładunku (α) na 0,38. Ocena wartości stałej szybkości transferu elektronów (k_s) ma znaczenie w przypadku określania efektywności powierzchniowych mediatorów redoks. Wartość otrzymana w ramach niniejszych badań jest porównywalna z danymi literaturowymi dla pochodnych o-chinonów, fenazyn oraz fenotiazyn, co jednoznacznie wskazuje, że układ GC/MWCNT/1-APox pełni rolę skutecznego mediatora redoks [179,197,200,201].

Warto podkreślić, że pomimo unieruchomienia cząsteczek 1-APox na powierzchni MWCNT, przy wyższych szybkościach przesuwu potencjału ($100\text{--}5000\text{ mV s}^{-1}$) obserwuje się również wyraźne efekty dyfuzyjne. Wynika to z konieczności transportu protonów i anionów z roztworu elektrolitu, które biorą udział w równoważeniu ładunku w procesie redoks Q/QH₂. Znaczące efekty dyfuzyjne są związane z faktem, że modyfikator nie stanowi monowarstwy, a elektroda pokryta jest wielowarstwową strukturą 1-APox, który jest rozmieszczony w porowatej strukturze MWCNT. Ograniczona szybkość dyfuzji powoduje, że przy bardzo szybkich przesuwach potencjału zależność pików prądowych od szybkości przesuwu potencjału odbiega od liniowości i staje się proporcjonalna do pierwiastka kwadratowego z szybkości przesuwu potencjału.

Podsumowując, przy niskich szybkościach przesuwu potencjału obserwuje się typowy charakter adsorpcyjny z niewielką separacją pików. Natomiast w przypadku dużych szybkości przesuwu potencjału uzyskane wyniki wskazują na złożony charakter procesu elektrochemicznego. Z jednej strony, znaczna separacja pików potwierdza kinetyczny charakter przemian zgodnie z teorią Lavirona, z drugiej zaś obecność efektów dyfuzyjnych sugeruje współistnienie dodatkowych etapów związanych z transportem masy w elektrolicie lub wewnątrz porowatej warstwy powierzchniowej. Podobne zależności zostały wcześniej opisane w pracy [194].

Ponadto przeprowadzono również testy mające na celu określenie stabilności elektrody modyfikowanej GC/MWCNT/1-APox. W tym celu wykonano 500 skanów na

jednej elektrodzie w elektrolicie obojętnym (bufor fosforanowy o pH 7,4). Krzywe woltamperometryczne przedstawiono na Rys. 28.

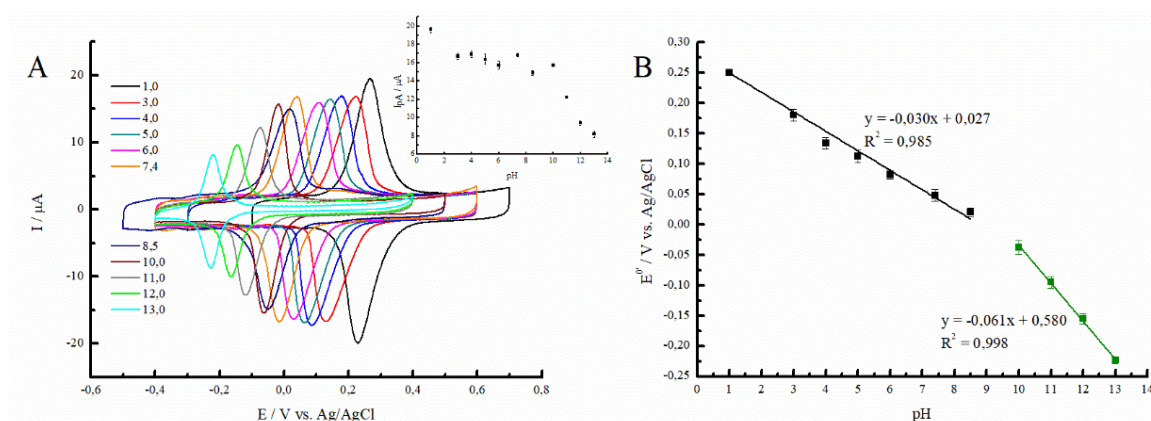


Rys. 28. Wykresy woltamperometrii cyklicznej zarejestrowane dla elektrody modyfikowanej GC/MWCNT/I-APox w PBS (pH 7,4) przedstawiające 500 skanów. Szybkość przesuwu potencjału wynosi 50 mV s^{-1} .

Na podstawie prezentowanego wykresu można zaobserwować, że zarówno anodowe, jak i katodowe piki zmniejszają się wraz z ilością wykonanych skanów. Po 500 skanach widoczny jest spadek sygnału o około 30%. Ponadto przy potencjale $-0,1 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ obserwuje się stopniowe powstawanie nieznacznych pików. Ich pochodzenie nie jest znane, jednakże przypuszczać można, że związane są one z sukcesywnym podstawieniem kolejnych grup hydroksylowych do pierścieni aromatycznych w trakcie starzenia się materiału. Na podstawie przedstawionych rozważań stwierdzono, że elektroda modyfikowana w ramach niniejszych badań charakteryzuje się stabilnością na relatywnie zadowalającym poziomie.

Typowym zachowaniem w przypadku układów chinonowych jest zależność potencjału pików redoks od pH, ponieważ proces utleniania i redukcji związany jest z przeniesieniem nie tylko elektronów, ale również protonów. Aby to potwierdzić wykonano badania techniką woltamperometrii cyklicznej elektrody modyfikowanej

w roztworach o różnym pH. Do tego celu wykorzystano buforę Brittona-Robinsona. Woltamperogramy zarejestrowane w elektrolitach o różnym pH (od 1,0 do 13,0) pokazano na Rys. 29A.



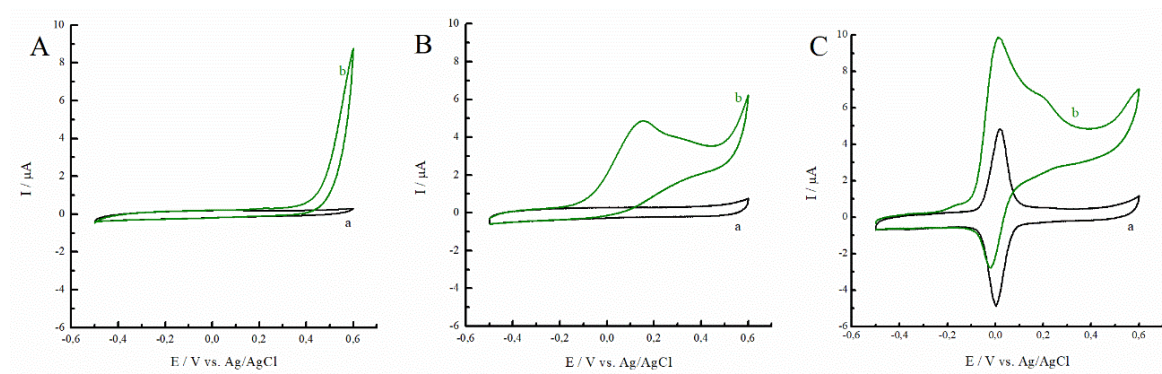
Rys. 29. (A) Woltamperogramy cykliczne dla elektrody modyfikowanej GC/MWCNT/1-APox zarejestrowane w buforach Brittona-Robinsona o różnych pH (od 1,0 do 13,0). Szybkość przesuwu potencjału była równa 50 mV s^{-1} . Wstawka na wykresie przedstawia zależność I_{pA} od pH. (B) Wykres pokazujący zależność $E^{0'}$ od pH.

Zgodnie z odpowiedziami zarejestrowanymi na Rys. 29A wraz ze wzrostem wartości pH, piki redoks przesuwają się w kierunku ujemnych wartości potencjałów. Dodatkowo zaobserwowano również tendencję ukazującą spadek prądów pików wraz ze wzrostem pH, jednak po ponownym zanurzeniu elektrody w elektrolicie kwaśnym, prąd pików wrócił do pierwotnej wartości. Zjawisko to można skorelować ze słabszą kinetyką pary redoks w elektrolitach o wyższym pH. Warto również zwrócić uwagę, że separacja pików zarejestrowanych przy 50 mV s^{-1} wzrasta z 40 mV (w 0,1 M HClO_4) do 53 mV (w buforze o pH 7,4). Zależność pomiędzy $E^{0'}$ i pH (przedstawiono na Rys. 29B) charakteryzuje się liniowością w dwóch zakresach. W pH od 1,0 do 8,5 ($y = -0,030x + 0,027$, $R^2 = 0,985$) oraz od 10,0 do 13,0 ($y = -0,061x + 0,580$, $R^2 = 0,998$) z nachyleniem wynoszącym odpowiednio -30 i -61 mV pH^{-1} . Nachylenie -61 mV pH^{-1} jest zgodne z wartością przewidywaną przez równanie Nernsta (-59 mV pH^{-1}) dla procesów o tej samej liczbie protonów i elektronów, wskazując na przejście $4\text{H}^+/4\text{e}^-$. Z kolei zmiana (-30 mV pH^{-1}) sugeruje, że liczba protonów biorących udział w reakcji elektrochemicznej jest w tym przypadku o połowę mniejsza niż liczba elektronów.

W związku z tym wartość -30 mV pH^{-1} prawdopodobnie jest związana z przejściem $2\text{H}^+/4\text{e}^-$.

2.1.4. Oznaczanie NADH na elektrodzie modyfikowanej GC/MWCNT/1-APox

Elektroaktywne właściwości elektrody modyfikowanej GC/MWCNT/1-APox zostały następnie zbadane w procesie utlenienia NADH. Elektrochemiczne utlenienie NADH do NAD^+ zachodzi zwykle przy stosunkowo wysokich potencjałach dodatnich, co wiąże się z dużą barierą energetyczną i możliwością powstawania produktów ubocznych. Z tego względu w praktyce stosuje się modyfikowane elektrody z mediatorami redoks, które obniżają potencjał utlenienia i umożliwiają selektywną oraz efektywną detekcję NADH [202]. Przeprowadzono więc analizy techniką woltamperometrii cyklicznej w obecności 2 mM roztworu NADH, aby porównać odpowiedź elektrochemiczną elektrod: niemodyfikowanej elektrody GC, GC/MWCNT oraz finalnie GC/MWCNT/1-APox. Wyniki tych testów zestawiono na Rys. 30.



Rys. 30. CV zarejestrowane dla (A) niemodyfikowanej elektrody GC, (B) GC/MWCNT oraz (C) GC/MWCNT/1-APox w buforze fosforanowym o pH 7,4 (a, czarne krzywe) i PBS zawierającym 2 mM NADH (b, zielone krzywe). Szybkość przesuwu potencjału wynosi 10 mV s^{-1} .

Zgodnie z przewidywaniami na Rys. 30A (b, zielona krzywa) obserwuje się wzrost prądu anodowego przy potencjale około $+0,6 \text{ V vs. Ag/AgCl}$. Związane jest to

z utlenianiem NADH na powierzchni elektrody z węgla szklanego, ponieważ proces ten zachodzi przy wysokim nadpotencjale ze względu na ograniczoną kinetykę transportu elektronów [202]. Z kolei na Rys. 30B (b, zielona krzywa) widoczny jest nieodwracalny pik związany z utlenianiem NADH przy potencjale wynoszącym około +0,15 V, co sugeruje poprawę transferu elektronów i zdolność katalityczną nanorurek węglowych do utlenienia analitu [203,204]. Dla elektrody modyfikowanej GC/MWCNT/1-APox (Rys. 30C) w obecności 2 mM NADH (b, zielona krzywa) pik utlenienia NADH jest obserwowany przy potencjale około 0 V. Jest on przesunięty o około 600 i 150 mV w porównaniu do niemodyfikowanej elektrody GC i elektrody GC/MWCNT. Przesunięcie w kierunku ujemnych wartości potencjałów wskazuje na znaczącą poprawę kinetyki transferu elektronów i właściwości elektrokatalitycznych elektrody GC/MWCNT/1-APox [101,103,203,204].

Elektrochemiczne utlenienia NADH na elektrodach węglowych jest procesem, który zachodzi z udziałem dwóch elektronów i jednego protonu [108], zgodnie z poniższymi równaniami:



Gdzie równanie (14) przedstawia nieodwracalny etap elektrochemicznego utlenienia, równanie (15) opisuje proces chemicznego odszczepienia protonu, z kolei równanie (16) ponownie wskazuje na elektrochemiczny etap utleniania [205]. W postaci ogólnej można to przedstawić następująco:



Jednakże elektrokatalityczne utlenianie NADH może zachodzić w obecności akceptorów zdolnych do przyjmowania dwóch elektronów i jednego protonu (np. chinonów, fenazyn czy fenoksazyn), które pełnią rolę mediatorów redoks [95]. Mechanizm elektrodowy zakłada więc, że reakcja między utlenioną formą mediatora i NADH przebiega poprzez pośredni kompleks przeniesienia ładunku zgodnie z równaniami od (1) do (6) przedstawionymi w Części Literaturowej (Rozdział 2, str. 35-36) niniejszej rozprawy doktorskiej.

W związku z tym potencjał utlenienia NADH może zostać obniżony do potencjału formalnego zastosowanego mediatora redoks [95]. W przypadku elektrody GC/MWCNT/1-APox postuluje się właśnie taki mechanizm elektrodowy podczas elektROUTLENIE NADH. Utleniona forma mediatora to 1-aminopiren-4,5,9,10-tetron, a zredukowaną formą mediatora jest 1-aminopiren-4,5,9,10-tetrol.

Kolejnym zagadnieniem wartym poruszenia w ramach niniejszej pracy jest porównanie właściwości elektrokatalitycznych w kierunku utlenienia NADH dla elektrody modyfikowanej GC/MWCNT/1-APox z również elektrochemicznie aktywowaną elektrodą zawierającą piren (GC/MWCNT/Pyrox). W celu wytworzenia odwracalnej pary pików redoks na elektrodzie zawierającej piren, elektroaktywację należało przeprowadzić w szerszym zakresie potencjałów, podobnie jak zostało to przedstawione przez Barathi i współpracowników [164]. W takich samych warunkach przeprowadzono również elektrochemiczną aktywację elektrody GC/MWCNT/Pyr, której wykres przedstawiono wcześniej na Rys. 16 (str. 81). Elektrochemiczne utlenienie elektrod GC/MWCNT zawierających zarówno piren, jak i 1-aminopiren przeprowadzono w elektrolicie obojętnym (PBS, pH 7,4) i kwaśnym (0,1 M HClO₄). Porównanie warunków aktywacji zestawiono w Tabeli 5.

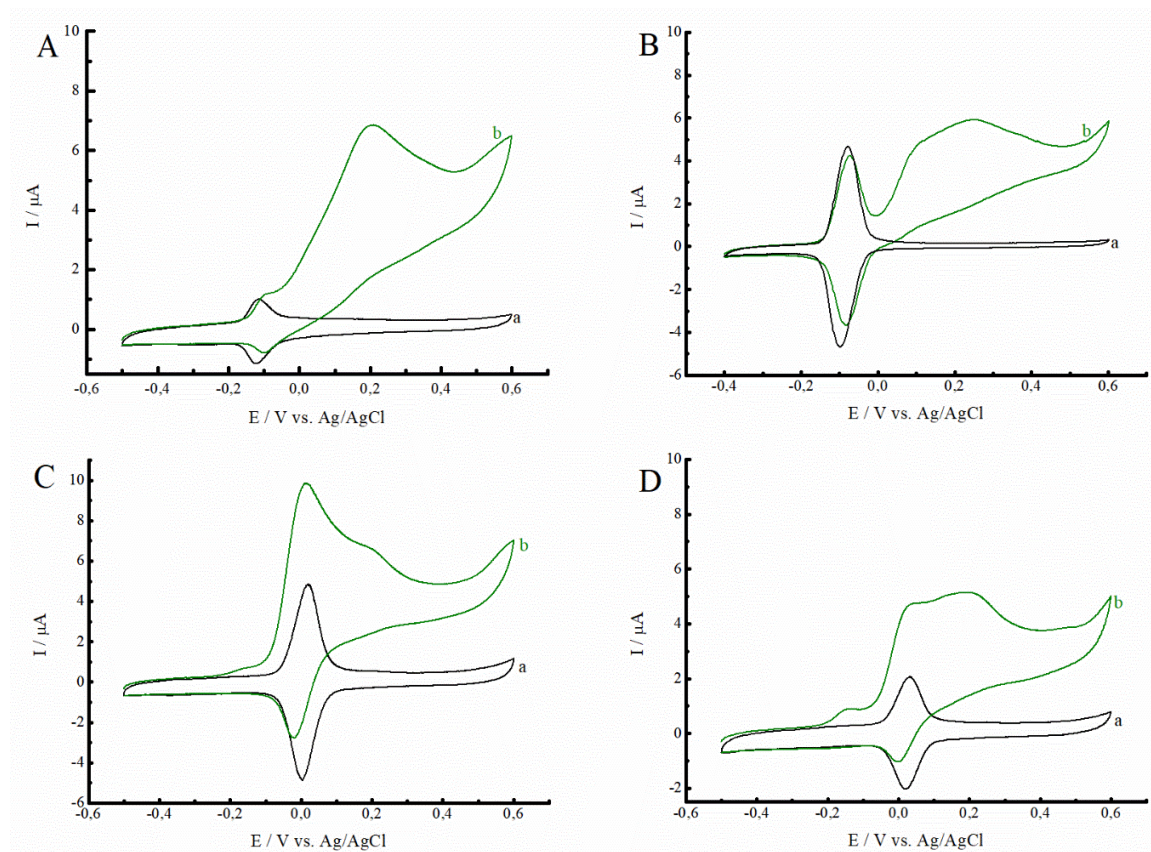
Tabela 5. Porównanie warunków aktywacji elektrod GC/MWCNT zawierających piren i 1-aminopiren.

	Zakres potencjałów / V	Elektrolit oraz pH	Potencjał pik utlenienia NADH ¹ / V
Piren (Pyr)²	od -0,2 do +1,2	0,1 M HClO ₄ ; pH 1,0	+0,20
Piren (Pyr)²	od -0,5 do +1,2	PBS; pH 7,4	+0,25
1-aminopiren (1-AP)³	od -0,1 do +0,7	0,1 M HClO ₄ ; pH 1,0	+0,02
1-aminopiren (1-AP)³	od -0,5 do +0,6	PBS; pH 7,4	+0,12 ⁴

¹ - na podstawie woltamperometrii cyklicznej w obecności 2 mM NADH w PBS, szybkość przesuwu potencjału 10 mV s⁻¹ (Rys. 31); ² - elektroda modyfikowana GC/MWCNT/Pyrox; ³ - elektroda modyfikowana GC/MWCNT/1-APox; ⁴ - nienormatywny pik sugerujący przebieg kilku procesów, w literaturze anglojęzycznej określany jako tzw. *broad peak*

Dodatkowo przedstawiono również woltamperogramy cykliczne zarejestrowane dla elektrod modyfikowanych GC/MWCNT/1-APox i GC/MWCNT/Pyrox w obecności

2 mM NADH. Krzywe woltamperometryczne w buforze fosforanowym i w roztworze zawierającym analit zestawiono na Rys. 31.

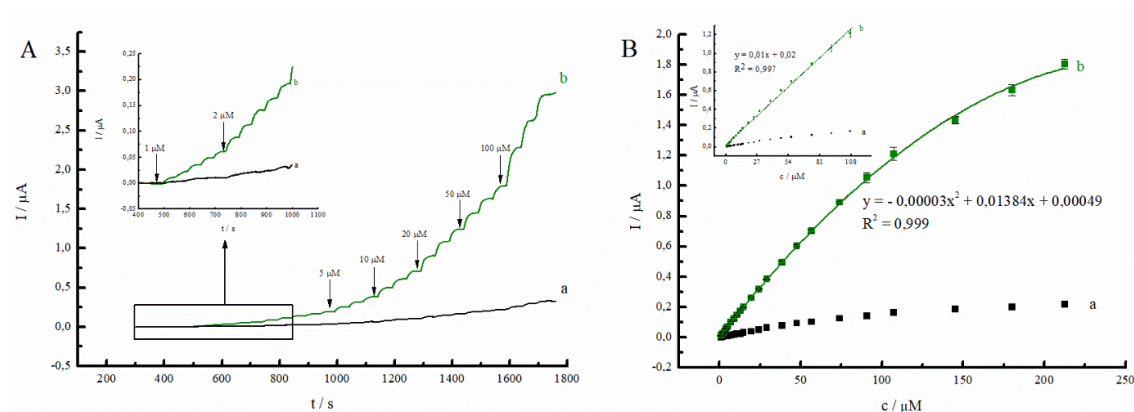


Rys. 31. Porównanie odpowiedzi elektrod modyfikowanych zarejestrowanych w obecności 2 mM NADH w zależności od środowiska aktywacji dla Pyr i 1-AP: (A) Pyr aktywowany w 0,1 M HClO₄, (B) Pyr aktywowany w PBS, (C) 1-AP aktywowany w 0,1 M HClO₄ i (D) 1-AP aktywowany w PBS. Szybkość przesuwu potencjału 10 mV s⁻¹. Czarne krzywe (a) zarejestrowano w PBS (pH 7,4), a zielone (b) w roztworze zawierającym 2 mM NADH.

Na podstawie powyższych woltamperogramów można zauważyć, że elektrolit, w którym przeprowadzano elektroaktywację ma wpływ na właściwości elektrokatalityczne względem utleniania analitu. Lepszą aktywnością katalityczną charakteryzują się zarówno elektrody GC/MWCNT/1-APox, jak i GC/MWCNT/Pyrox aktywowane w elektrolicie kwaśnym (0,1 M HClO₄), co ujawnia się niższym potencjałem piku utlenienia NADH (wartości porównano w Tabeli 5). Ponadto anodowe piki utlenienia analitu zarejestrowane dla elektrod GC/MWCNT/1-APox (Rys. 31C i D)

obserwowane są przy niższych wartościach potencjałów niż dla elektrod GC/MWCNT/Pyrox (Rys. 31A i B). W przypadku elektrod aktywowanych w 0,1 M HClO₄ jest to odpowiednio +0,02 i +0,2 V vs. Ag/AgCl. Warto również zwrócić uwagę, że kształty krzywych woltamperometrycznych w obecności analitu na elektrodzie GC/MWCNT/Pyrox sugerują brak właściwości elektrokatalitycznych Pyrox. Anodowy pik utlenienia NADH jest widoczny przy wyższym potencjale niż odwracalna para pików redoks związana z elektROUTlenieniem pirenu. W związku z tym elektrokatalizatory na bazie 1-APox stanowią bardziej atrakcyjną alternatywę w rozwoju materiałów katalitycznych do reakcji utleniania NADH niż Pyrox.

Postanowiono zatem przeprowadzić analizy techniką chronoamperometrii przy stałym potencjale +0,1 V vs. Ag/AgCl. Oceniono więc odpowiedź amperometryczną na dodatki NADH elektrody GC/MWCNT/1-APox w warunkach mieszania. Na Rys. 32 przedstawiono wyniki tych badań.



Rys. 32. (A) Odpowiedź amperometryczna różnych stężeń NADH zarejestrowana dla elektrody modyfikowanej GC/MWCNT/1-APox w buforze fosforanowym (pH 7,4) w warunkach mieszania przy stałym potencjale +0,1 V oraz (B) Krzywa kalibracyjna dla elektrod: a - GC/MWCNT i b - GC/MWCNT/1-APox.

Powyżej przedstawiono krzywe chronoamperometryczne prąd-czas dla kolejnych dodatków analitu. Dodanie niewielkich ilości NADH do elektrolitu (PBS, pH 7,4) sprawia, że prąd utleniania gwałtownie rośnie, po czym osiąga stałą i stabilną wartość. Zaprezentowane wyniki sugerują, że elektroda GC/MWCNT/1-APox (b, zielona krzywa) charakteryzuje się bardzo dobrymi właściwościami elektrokatalitycznymi i umożliwia wykonywanie pomiarów przy relatywnie niskim potencjale (w porównaniu z elektrodą

GC/MWCNT, czarna krzywa). Dodatkowo wykreślono krzywe kalibracyjne prądu utlenienia NADH w funkcji stężenia analitu (Rys. 32B). Wielomian kwadratowy stężenia NADH w zakresie od 1 do 210 μM charakteryzuje się bardzo dobrym dopasowaniem do prądów anodowych ($y = -0,00003x^2 + 0,01384x + 0,00049$, $R^2 = 0,999$). Odchylenie od liniowości dla utlenienia NADH wynika z kinetyki Michaelisa-Menten, którą często obserwuje się dla różnych mediatorów redoks (fenotiazyn czy pochodnych chinonów) [95,179]. Ponadto na podstawie przedstawionych danych wyznaczono również parametry analityczne, w tym granicę wykrywalności (LOD) równą 0,08 μM , a także granicę oznaczalności (LOQ) wynoszącą 0,23 μM . Zakres liniowej odpowiedzi oznaczania NADH (wstawka do Rys. 32B) dla prezentowanej elektrody GC/MWCNT/1-APox wynosi od 1 do 110 μM analitu ($y = 0,01x + 0,02$, $R^2 = 0,997$). W Tabeli 6 porównano parametry analityczne elektrody modyfikowanej w ramach niniejszej pracy z innymi elektrodami służącymi do detekcji NADH dostępnymi w literaturze.

Tabela 6. Porównanie parametrów analitycznych dla różnych elektrod modyfikowanych stosowanych do elektrochemicznej detekcji NADH.

Elektroda modyfikowana	Granica wykrywalności /μM	Granica oznaczalności /μM	Zakres analityczny /μM	Odniesienie
PCA24h@MWCNT	0,12	0,39	0,5-1270	[182]
GC/MWCNT/AAQ/CAT	0,63	1,90	2,51-55,94	[197]
GC/MWCNT/Flu	5,00	15,00	15-84	[198]
GCE/MWCNT/poly-FA	17,73	59,10	59,1-1560	[200]
SPCE/RA	5,62	18,72	8,72-220	[201]
GC/SWCNT/PzNO ₂	0,16	0,48	0,5-6	[206]
Polyluminol/MWCNT	0,60	5,00	5-150	[207]
POA/GR/GCE	1,30	4,97	0,17-1,77	[208]
GCE/MWCNT/poly-Xa	0,10	0,51	0,5-10	[209]
SPCE/RGO/PNR/AuNP	0,72	2,36	5-3170	[210]
35DNBpy/MWCNT/GCE	0,89	3,15	1-5	[211]
GC/MWCNT/1-APox	0,08	0,23	1-210 1-110*	Niniejsza praca

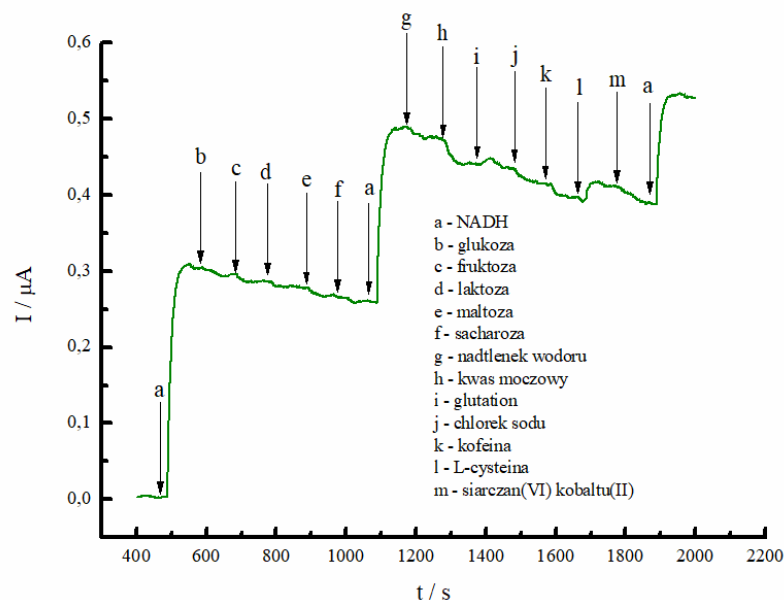
* - zakres liniowy dla elektrody GC/MWCNT/1-APox

Na podstawie powyższej Tabeli można stwierdzić, że zakres analityczny otrzymanego sensora NADH jest porównywalny z innymi wymienionymi w literaturze.

Dodatkowo w porównaniu z innymi sensorami NADH, elektroda modyfikowana GC/MWCNT/1-APox charakteryzuje się relatywnie niskim LOD.

2.1.5. Selektywność, stabilność, powtarzalność i odtwarzalność materiału elektrodowego MWCNT/1-APox

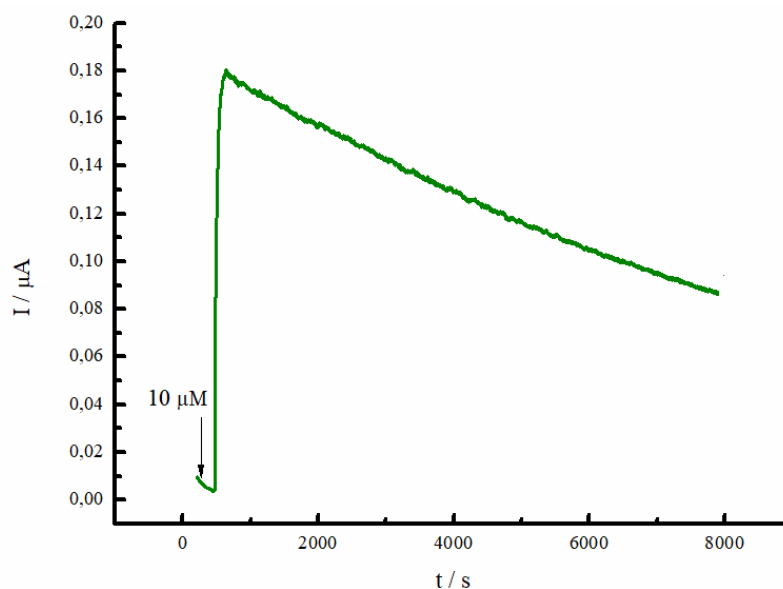
W kolejnym etapie badań postanowiono określić selektywność elektrody GC/MWCNT/1-APox. Jako substancje interferujące wybrano cukry takie jak: glukoza, fruktoza, laktoza, maltoza czy sacharoza. Ponadto postanowiono przeprowadzić testy również na analitach, takich jak nadtlenek wodoru, kwas moczowy, glutation, chlorek sodu, kofeina, L-cysteina i siarczan(VI) kobaltu(II). Na Rys. 33 przedstawiono odpowiedź amperometryczną elektrody modyfikowanej na dodatki 50 μM NADH i tej samej ilości wymienionych wyżej analitów przy stałym potencjale +0,1 V vs. Ag/AgCl.



Rys. 33. Krzywa chronoamperometryczna zarejestrowana dla elektrody GC/MWCNT/1-APox po dodaniu 50 μM NADH oraz tej samej ilości wybranych interferentów. Pomiary wykonano przy stałym potencjale +0,1 V vs. Ag/AgCl w elektrolicie obojętnym (PBS, pH 7,4) w warunkach mieszania.

Na podstawie przedstawionych wyników techniką chronoamperometrii wykazano, że wybrane substancje zakłócające nie miały znaczącego wpływu na amperometryczny sygnał utlenienia NADH. L-cysteina jest jedynym analitem, który spowodował minimalne zakłócenie w tym układzie, jednakże jest to wartość mniejsza niż 5% w stosunku do prądu utlenienia NADH. W związku z tym można stwierdzić, że prezentowany sensor charakteryzuje się akceptowalną selektywnością w obecności interferentów występujących w układach biologicznych, a także tych zawierających metale. Jako jedną z głównych zalet elektrody modyfikowanej GC/MWCNT/1-APox jest możliwość utlenienia NADH przy relatywnie niskim potencjale (+0,1 V vs. Ag/AgCl w pH 7,4), co pozwala wyeliminować wpływ substancji zakłócających, które w większości powodują interferencje przy wyższych potencjałach.

Wykonano również analizy mające na celu określenie stabilności sensora GC/MWCNT/1-APox. W tym celu również przeprowadzono badania chronoamperometryczne przy stałym potencjale (+0,1 V vs. Ag/AgCl) w buforze fosforanowym. Na Rys. 34 pokazano krzywą chronoamperometryczną odpowiedzi sensora na dodanie 10 μM NADH w czasie 2 godzin.



Rys. 34. *Stabilność sensora GC/MWCNT/1-APox rejestrowana w wyniku odpowiedzi na dodatek 10 μM NADH w czasie 2 godzin. Badania prowadzono przy stałym potencjale (+0,1 V vs. Ag/AgCl) w buforze fosforanowym (PBS, pH 7,4), w warunkach ciągłego mieszania.*

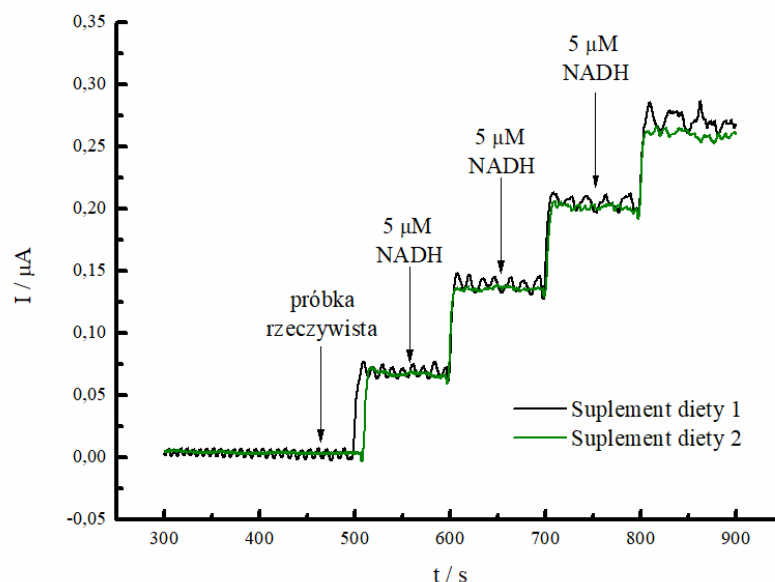
Po dodaniu 10 μM NADH widoczny jest gwałtowny wzrost prądu do 0,16 μA , który spadał wraz z upływem czasu. Na tej podstawie obliczono spadek sygnału po jednej i dwóch godzinach pomiaru. Po 1 godzinie spadek sygnału wynosił około 30%, natomiast po 2 godzinach był równy około 50%. Obserwowany spadek sygnału prądowego sugeruje częściową dezaktywację powierzchni elektrody lub stopniowe gromadzenie się produktu reakcji utlenienia (NAD^+) co jest typowym efektem ubocznym występującym w elektrokatalitycznych sensorach NADH bazujących na chinonach i innych organicznych katalizatorach [212].

Następnie oceniono powtarzalność odpowiedzi sensora, wykonując serię dziesięciu pomiarów NADH (20 μM) na jednej elektrodzie. Uzyskane względne odchylenie standardowe (RSD) wyniosło 6,3%, co potwierdza dobrą precyzję metody. Odtwarzalność oceniono na podstawie odpowiedzi pięciu niezależnie przygotowanych elektrod GC/MWCNT/1-APox w obecności 20 μM NADH. W tym przypadku RSD wyniosło około 7,0%, wskazując na zadowalającą wiarygodność i powtarzalność między-elektrodową.

2.1.6. Analizy próbek rzeczywistych

Finalnym etapem badań prowadzonych w tej części niniejszej rozprawy doktorskiej było przeprowadzenie testów na próbkach rzeczywistych. W związku z tym skonstruowana elektroda GC/MWCNT/1-APox została użyta do oznaczenia NADH w kapsułkach suplementów diety (dwa różne suplementy diety zawierające NADH od różnych producentów). Zgodnie ze specyfikacją producenta kapsułka pierwszego suplementu diety (Forest Vitamin) zawiera 10 mg substancji, a drugiego (Kenay) 15 mg. Początkowo próbki rzeczywiste rozpuszczono w buforze fosforanowym (PBS, pH 7,4), aby uzyskać stężenie równe 1 mM. Stężenie to zostało wybrane ze względu na wyniki uzyskane podczas wcześniej przeprowadzonych testów oznaczania NADH w roztworach modelowych (Rys. 32B). Po dodaniu 50 μL roztworów zawierających próbki rzeczywiste do elektrolitu podstawowego (PBS, pH 7,4, 10 mL) uzyskano wzrost sygnału prądowego

i następnie do takiego układu trzykrotnie dodano po 50 μL roztworu modelowego NADH. Chronoamperogram przedstawiający opisany proces przedstawiono na Rys. 35.



Rys. 35. Odpowiedzi amperometryczne zarejestrowane dla elektrody GC/MWCNT/1-APox na dodatki rzeczywistych i modelowych roztworów zawierających NADH. Pomiar przeprowadzono przy stałym potencjale (+0,1 V vs. Ag/AgCl) w elektrolicie obojętnym (PBS, pH 7,4), w warunkach mieszania.

Wyniki uzyskane w ramach tej analizy zestawiono również w Tabeli 7.

Tabela 7. Oznaczanie NADH w próbkach rzeczywistych (suplementy diety).

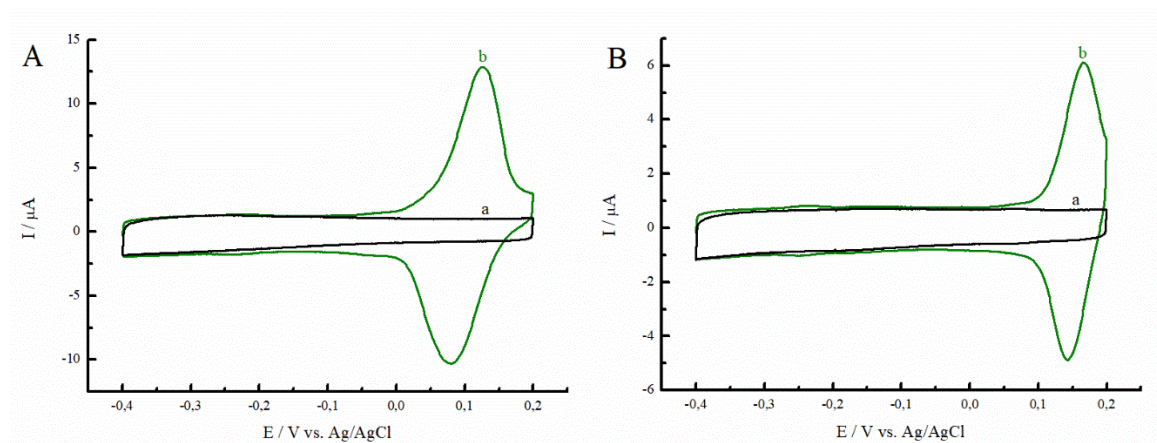
Ilość pomiarów	Oznaczone stężenie NADH / μM	
	Suplement diety 1 (Forest Vitamin)	Suplement diety 2 (Kenay)
1	4,84	5,05
2	4,40	4,39
3	4,53	4,44
Średnia	4,59	4,63
Odchylenie standardowe	0,19	0,30
Specyfikacja producenta	5,00 (10 mg NADH)	5,00 (15 mg NADH)
Oznaczona ilość NADH w jednej kapsułce	9,17 mg NADH	13,88 mg NADH

W pierwszym suplemencie diety (Forest Vitamin) średnia zawartość NADH została określona na $4,59 \pm 0,19 \mu\text{M}$. Obliczono również, że jedna kapsułka tego suplementu zawiera 9,17 mg NADH (wartość deklarowana przez Producenta to 10 mg). Z kolei w drugim suplemencie diety (Kenay) średnia zawartość NADH wynosiła $4,63 \pm 0,30 \mu\text{M}$, a pojedyncza kapsułka zawiera 13,88 mg NADH (specyfikacja Producenta - 15 mg).

2.2. Elektrochemiczne osadzanie 3-metoksykatecholu i katecholu na powierzchni wielościennych nanorurek węglowych modyfikowanych 1-aminopirenem, a następnie zastosowanie materiału elektrodowego do detekcji NADH i glukozy

2.2.1. Elektrochemiczne przyłączanie katecholu i 3-metoksykatecholu do powierzchni elektrody GC/MWCNT/1-AP

Pierwszy etap badań prowadzonych w ramach niniejszej części rozprawy doktorskiej zakładał wykonanie badań woltamperometrycznych w celu scharakteryzowania odpowiedzi katecholu i 3-metoksykatecholu na powierzchni elektrody GC/MWCNT. W związku z tym na Rys. 36 przedstawiono krzywe woltamperometryczne zarejestrowane w zakresie potencjałów od $-0,4$ do $+0,2$ V vs. Ag/AgCl w buforze fosforanowym (PBS, pH 7,4).

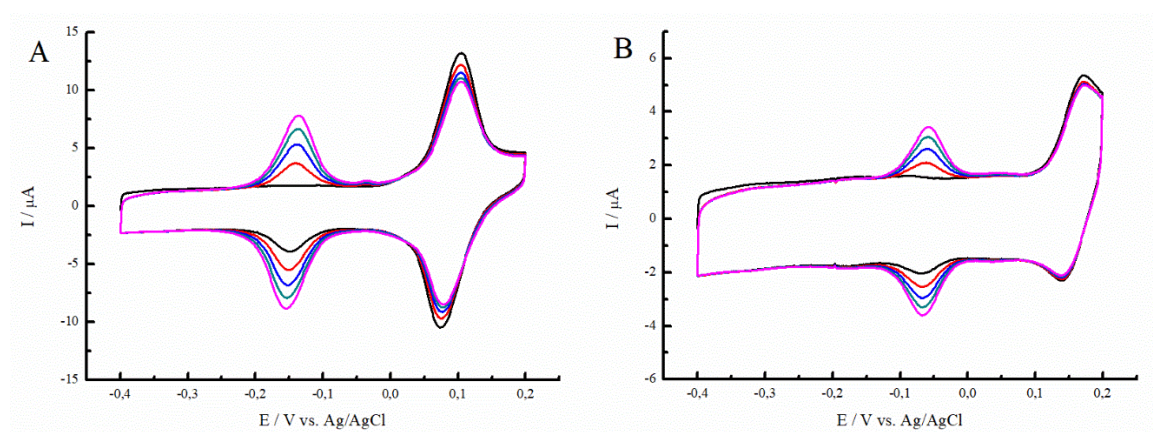


Rys. 36. Porównanie woltamperogramów dla elektrod GC/MWCNT w buforze fosforanowym (a, czarna linia) i pierwszych skanów wykonanych w roztworach odpowiednich modyfikatorów (b, zielona linia): w (A) 0,1 mM 3-metoksykatecholu i (B) 0,1 mM katecholu. Szybkość przesuwu potencjału 50 mV s^{-1} .

Zgodnie z przewidywaniami w przypadku skanowania elektrod GC/MWCNT w elektrolicie obojętnym (a, czarna linia) nie obserwuje się żadnych pików redoks, a krzywe mają charakter jedynie pojemnościowy. Z kolei skanowanie w roztworach

3-metoksykatecholu (3-MCat) i katecholu (Cat) ujawnia odwracalne piki redoks przy potencjałach odpowiednio wynoszących $E^{0'} = +0,1$ V i $E^{0'} = +0,15$ V, które przypisuje się charakterystycznym przejściom chinon/hydrochinon [213,214]. Ponadto warto zwrócić uwagę, że w wyniku skanowania w roztworach Cat i 3-MCat nie pojawiają się żadne dodatkowe piki redoks.

Inną odpowiedź elektrochemiczną zarejestrowano podczas skanowania elektrod GC/MWCNT/1-AP w roztworach odpowiednich katecholi. Wykresy woltamperometrii cyklicznej w takich układach zestawiono na Rys. 37.

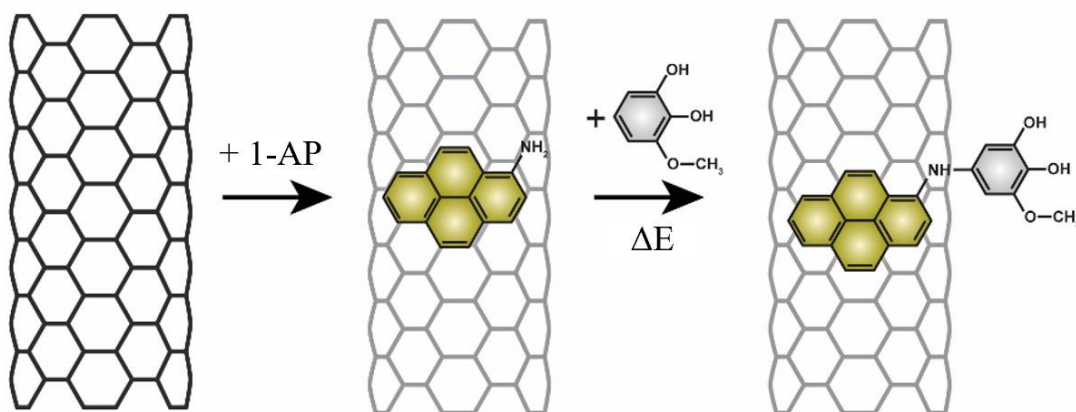


Rys. 37. Elektrochemiczny proces formowania adduktów na powierzchni elektrod modyfikowanych GC/MWCNT/1-AP zarejestrowanych w PBS (pH 7,4) zawierającym odpowiednio (A) 0,1 mM 3-MCat i (B) 0,1 mM Cat. Szybkość przesuwu potencjału 50 mV s^{-1} .

W pierwszym skanie obserwowane są oczekiwane piki, które zarejestrowano również wcześniej (podczas skanowania elektrody GC/MWCNT w roztworach odpowiednich katecholi, Rys. 36). Jednakże po odwróceniu kierunku polaryzacji w zakresie katodowym ujawniają się dodatkowe piki przy niższych potencjałach. Obserwuje się więc ponadto odwracalne pary redoks przy $E^{0'} = -0,05$ V i $E^{0'} = -0,15$ V odpowiednio dla Cat i 3-MCat. Po wykonaniu pięciu skanów uzyskuje się stabilny woltamperogram, na którym uformowane są nowe pary redoks. Wyniki uzyskane na prezentowanym wykresie (Rys. 37) wskazują, że powierzchnia elektrody GC/MWCNT/1-AP uległa restrukturyzacji w wyniku skanowania CV, a w efekcie dochodzi do powstania nowych form aktywnych elektrochemicznie. W tym przypadku

również kształt krzywych sugeruje, że na powierzchni elektrody zachodzi mechanizm *ECE*, gdzie wskutek elektrochemicznego utlenienia dochodzi do powstania adduktu na powierzchni elektrody GC/MWCNT/1-AP. Utlenione grupy chinonowe są wysoce podatne na atak nukleofilowy, co umożliwia tworzenie kowalencyjnych adduktów z szeroką grupą nukleofilów, w tym tioli i amin [215,216]. Podczas utleniania grup katecholowych na elektrodzie zawierającej 1-AP zachodzi reakcja addycji Michaela, prowadząca do powstania adduktu na pierścieniu aromatycznym [217]. Proces ten objawia się pojawieniem nowej pary redoks przy niższych potencjałach. Utworzenie tej nowej pary redoks, obserwowanej przy niższych potencjałach niż ta pochodząca od badanych katecholi, przypisywane jest efektowi donorowemu grupy aminowej w addukcie, który zwiększa gęstość elektronową pierścienia katecholowego [218].

Powstały addukt charakteryzuje się dobrze zdefiniowanymi, odwracalnymi pikami przy niższych potencjałach niż katechol i 3-metoksykatechol [172,179,197]. Na Rys. 38 schematycznie przedstawiono etapy modyfikacji elektrody podczas opisanego procesu (dla 3-metoksykatecholu jako przykładu).



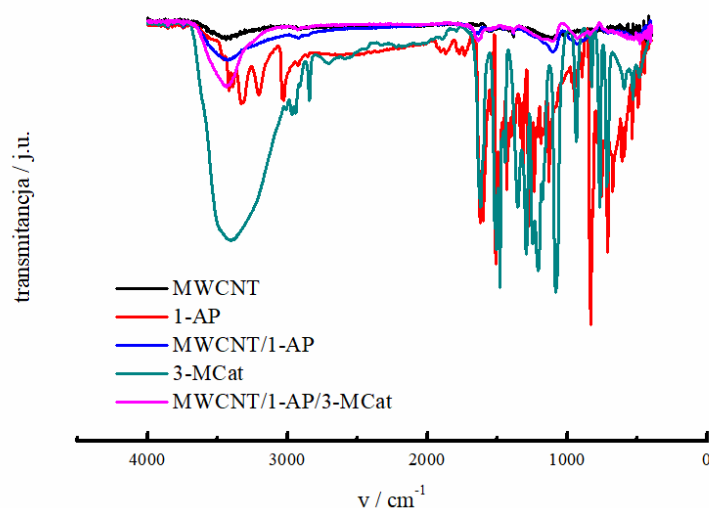
Rys. 38. Schematyczne przedstawienie etapów przygotowania elektrody modyfikowanej GC/MWCNT/1-AP/3-MCat, w tym adsorpcji 1-AP na MWCNT oraz przyłączenia 3-MCat (reakcja addycji Michaela).

Na Rys. 38 schematycznie pokazano, w jaki sposób modyfikowano elektrodę GC/MWCNT/1-AP/3-MCat. Proces związany jest z 5-minutową adsorpcją 1-aminopirenu na powierzchni GC/MWCNT, a następnie z przyłączeniem 3-metoksykatecholu do materiału MWCNT/1-AP w wyniku elektrochemicznego

skanowania w roztworze 3-MCat. Analogicznie wyglądałby proces w przypadku zastosowania katecholu (Cat) jako modyfikatora elektrody GC/MWCNT/1-AP.

2.2.2. Analizy fizykochemiczne materiałów elektrodowych

Następnie przeprowadzono analizy techniką spektroskopii FT-IR mające na celu określenie składu chemicznego zarówno pojedynczych komponentów układu, jak i poszczególnych materiałów elektrodowych: MWCNT, 1-AP, MWCNT/1-AP, 3-MCat i MWCNT/1-AP/3-MCat. Rys. 39 przedstawia uzyskane widma FT-IR.

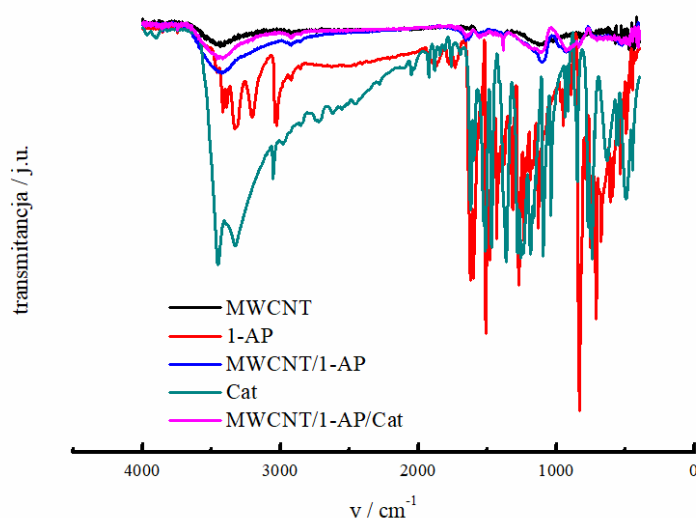


Rys. 39. Widma FT-IR uzyskane dla MWCNT, 1-AP, MWCNT/1-AP, 3-metoksykatecholu (3-MCat) i MWCNT/1-AP/3-MCat.

W przypadku widma FT-IR dla MWCNT (czarna krzywa) można wyróżnić pik przy 3437 cm⁻¹ odpowiadający za charakterystyczne drgania rozciągające grupy fenolowej O–H. Dodatkowo widoczne są piki przy 2920 cm⁻¹ oraz 2840 cm⁻¹, które koreluje się z drganiami rozciągającymi wiązań C–H. Ponadto przy 1390 cm⁻¹ obserwowany jest pik związany z deformacyjnymi drganiami wiązań C–H. Widmo FT-IR otrzymane dla 1-AP (czerwona krzywa) charakteryzuje się wyraźnym pikiem przy 832 cm⁻¹, który odpowiada drganiom zginającym N–H. Dodatkowo wyróżnia się szerokie pasma przy 3027 cm⁻¹, które przypisuje się drganiami rozciągającym C–H pierścienia aromatycznego, natomiast charakterystyczne drgania C=C pierścienia

obserwuje się przy 1610 i 1502 cm^{-1} [184]. Z kolei pik widoczny przy 1275 cm^{-1} odpowiada drganiom rozciągającym C–N, którymi cechują się aminy aromatyczne. Na widmie uzyskanym dla materiału MWCNT/1-AP (niebieska krzywa) można wyróżnić piki przy 1644 cm^{-1} odpowiadające drganiom deformacyjnym N–H oraz przy 1097 cm^{-1} związane z drganiami rozciągającymi C–N. Co więcej, przy długości fali równej 3437 cm^{-1} widoczny jest pik skorelowany z drganiami rozciągającymi O–H, który jest wzmocniony w porównaniu do niemodyfikowanych MWCNT (czarna krzywa). Widmo FT-IR uzyskane dla 3-metoksykatecholu (zielona krzywa) charakteryzuje się pikiem przy 3416 cm^{-1} skorelowanym z drganiami rozciągającymi O–H. Ponadto warto wyróżnić piki przy 1340 cm^{-1} odpowiadające drganiom zginającym grup O–H oraz przy 1080 cm^{-1} związane z drganiami rozciągającymi wiązania C–O. Na widmie otrzymanym dla materiału MWCNT/1-AP/3-MCat obserwuje się piki przy 1644 , a także 1097 cm^{-1} , które przypisuje się odpowiednio drganiom rozciągającym C=N oraz C–N. Intensywność tych pików jest mniejsza niż w przypadku widma uzyskanego dla MWCNT/1-AP, co w pośredni sposób pozwala potwierdzić przyłączenie 3-MCat. Pik przy 3437 cm^{-1} , który wcześniej widoczny był również na widmach MWCNT (czarna krzywa) i MWCNT/1-AP (niebieska krzywa), zwiększa swoją intensywność, co świadczy o większej ilości grup O–H.

Na Rys. 40 przedstawiono również widma FT-IR dla katecholu (Cat) oraz materiału elektrodowego MWCNT/1-AP/Cat.



Rys. 40. Widma FT-IR uzyskane dla MWCNT, 1-AP, MWCNT/1-AP, Cat i MWCNT/1-AP/Cat.

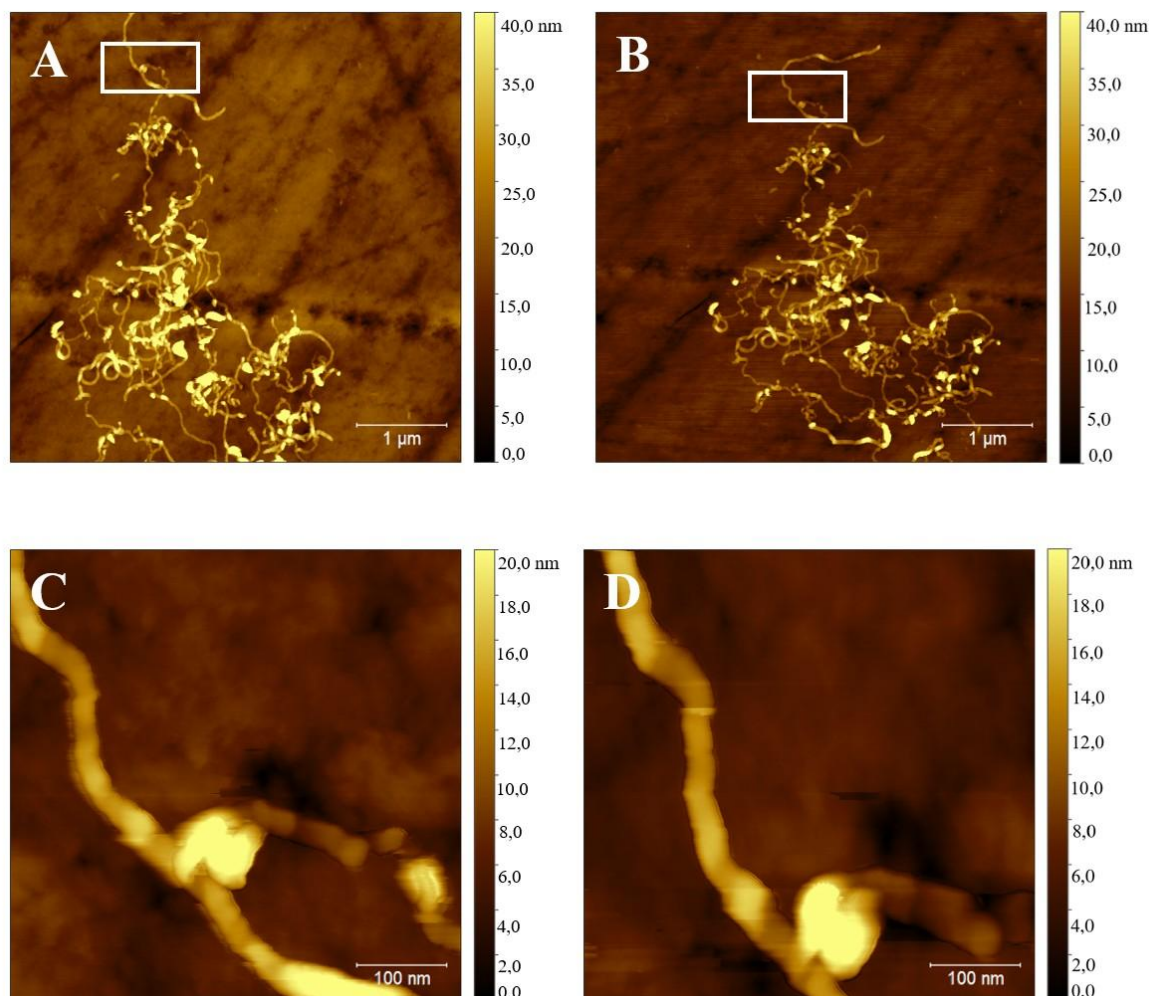
Rys. 40 zawiera dodatkowo widma dla MWCNT, 1-AP i MWCNT/1-AP (opisane wcześniej), w celu ułatwienia interpretacji. W związku z tym warto wyróżnić piki charakterystyczne dla widma FT-IR uzyskanego dla Cat: przy 3459 i 3320 cm^{-1} związane z drganiami rozciągającymi O–H, a także przy 1372 cm^{-1} , które koreluje się z drganiami zginającymi O–H (typowymi dla związków fenolowych). Co więcej, przy 1631 cm^{-1} obserwuje się pik odpowiadający drganiom rozciągającym C=C, które są charakterystyczne dla związków aromatycznych. W porównaniu do widma uzyskanego dla MWCNT (czarna krzywa) i MWCNT/1-AP (niebieska krzywa) pik przy 3437 cm^{-1} zwiększa swoją intensywność, co koreluje się z większą ilością grup –OH w układzie po dodaniu katecholu. Podobne zależności obserwowano w przypadku analizy widm FT-IR dla materiału MWCNT/1-AP/3-MCat (prezentowanymi wcześniej). Analogicznie widoczne jest również zmniejszenie intensywności pików przy 1644 i 1097 cm^{-1} . Dodatkowo, warto zwrócić uwagę, że podobne zależności obserwuje się także w wyniku dodania kolejnego komponentu (Cat) do układu (MWCNT/1-AP), w wyniku czego widmo uzyskane dla MWCNT/1-AP/Cat również charakteryzuje się zwiększoną liczbą grup –OH (po wprowadzeniu katecholu i jego pochodnej) [219,220].

W celu dalszej charakterystyki fizykochemicznej materiałów elektrodowych wykonano badania techniką mikroskopii sił atomowych. Obrazowanie AFM wykonano na specjalnie zaprojektowanej elektrodzie GC ze zdejmowaną końcówką. Dzięki temu możliwe było określenie morfologii materiału przed i po modyfikacji dokładnie w tych samych miejscach na powierzchni elektrody. Na Rys. 41 przedstawiono zdjęcie elektrody GC ze zdejmowaną końcówką.



Rys. 41. Zdjęcie elektrody GC ze zdejmowaną końcówką, której użyto do pomiarów AFM.

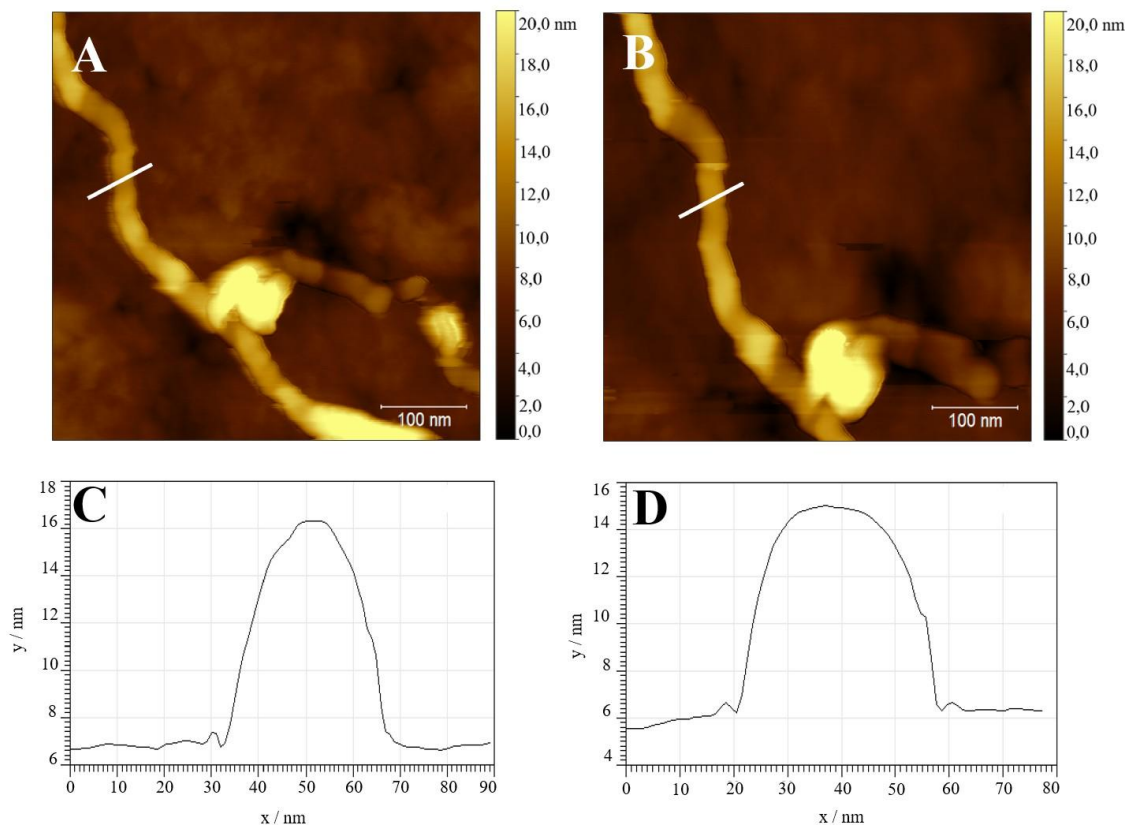
Mikroskopia AFM została więc wykorzystana do analizy topografii niemodyfikowanych MWCNT i materiału MWCNT/1-AP/3-MCat. Wyniki uzyskane przy użyciu tej techniki przedstawiono na Rys. 42.



Rys. 42. Obrazy AFM uzyskane dla: (A i C) niemodyfikowanych MWCNT, a także materiału (B i D) MWCNT/1-AP/3-MCat. Zaznaczone białe pola na zdjęciach A i B wskazują obszary, z których wykonano powiększenia pokazane na C i D.

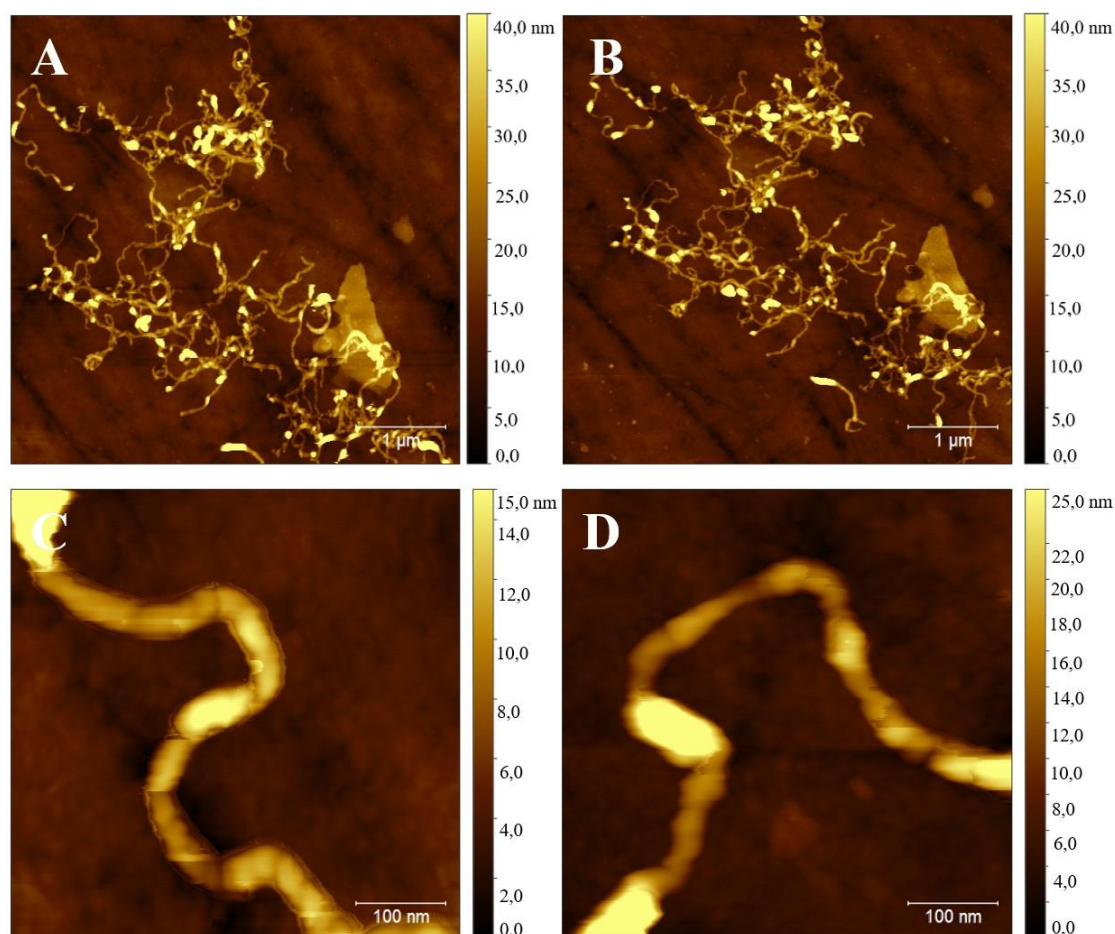
Na obrazach AFM obserwuje się typowy cylindryczny kształt charakterystyczny dla nanorurek węglowych. Porównanie obrazów wykonanych w wysokiej rozdzielczości dla pojedynczej nanorurki węglowej przed (Rys. 42C) i po modyfikacji (Rys. 42D) ujawnia zwiększenie średnicy, co przypisuje się pokryciu warstwą 1-AP/3-MCat. Średnia wartość przekroju niemodyfikowanych MWCNT wynosiła $22,2 \pm 1,4$ nm ($n = 10$), podczas gdy po modyfikacji wzrosła do $27,5 \pm 2,4$ nm ($n = 10$). Dodatkowo na Rys. 43

przedstawiono obrazy AFM uzyskane dla niemodyfikowanych MWCNT i materiału MWCNT/1-AP/3-MCat wraz z zaznaczonymi profilami, co umożliwiło określenie wzrostu opisaną wcześniej średnicy.



Rys. 43. Obrazy AFM dla: (A) niemodyfikowanych MWCNT oraz (B) MWCNT/1-AP/3-MCat wraz z profilami zaznaczonymi białymi liniami dla (C) MWCNT, a także (D) MWCNT/1-AP/3-MCat.

Technika obrazowania za pomocą mikroskopii sił atomowych została również wykorzystana do porównania topografii drugiego układu analizowanego w tej części pracy: niemodyfikowanych MWCNT z modyfikowanym materiałem elektrodowym MWCNT/1-AP/Cat. Obrazy AFM dla tych modyfikacji zestawiono na Rys. 44.

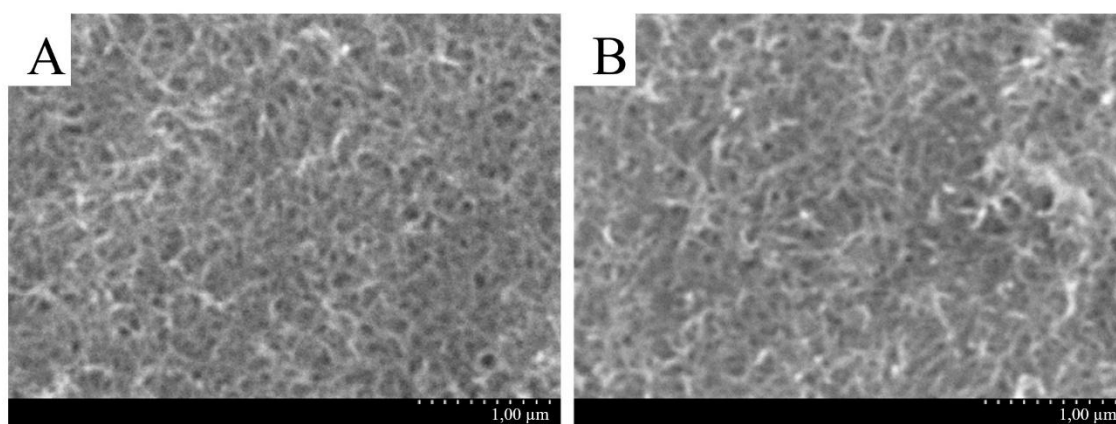


Rys. 44. Obrazy AFM: (A i C) przedstawiające niemodyfikowane MWCNT oraz (B i D) materiał MWCNT/1-AP/Cat.

Można zauważyć, że w przypadku obrazów przedstawionych na Rys. 44 obserwuje się bardzo podobny sposób i rozmieszczenie nanorurek węglowych (jak w przypadku analizy obrazów AFM przedstawionych na Rys. 42). W tym przypadku, również MWCNT przed (Rys. 44C) i po (Rys. 44D) modyfikacji posiadają cylindryczne i dobrze zdefiniowane kształty. Ponadto zmierzono również średnice losowo wybranych nanorurek w skupiskach (na podstawie obrazów zaprezentowanych na Rys. 44A i B). W związku z tym dla niemodyfikowanych MWCNT średnica była równa $28,56 \pm 5,15$ nm ($n = 10$), natomiast po modyfikacji (dla MWCNT/1-AP/Cat) wynosiła $34,46 \pm 5,80$ nm ($n = 10$). Pomiary te przeprowadzono również analogicznie dla MWCNT i MWCNT/1-AP/3-MCat (na podstawie obrazów AFM przedstawionych na Rys. 42A i B). Średnica MWCNT przed modyfikacją była równa $27,77 \pm 2,42$ nm ($n = 10$), a po $31,89 \pm 4,23$ nm ($n = 10$). Na podstawie analizy obrazów AFM można potwierdzić

fizyczną adsorpcję 1-AP i przyłączenie cząsteczek Cat i 3-MCat do materiału elektrodowego.

Aby jeszcze wnikliwiej przeprowadzić analizę materiału elektrodowego MWCNT/1-AP/3-MCat wykonano również charakterystykę fizykochemiczną z wykorzystaniem skaningowej mikroskopii elektronowej. Obrazy SEM dla niemodyfikowanych MWCNT i materiału po modyfikacji (MWCNT/1-AP/3-MCat) zaprezentowano na Rys. 45.

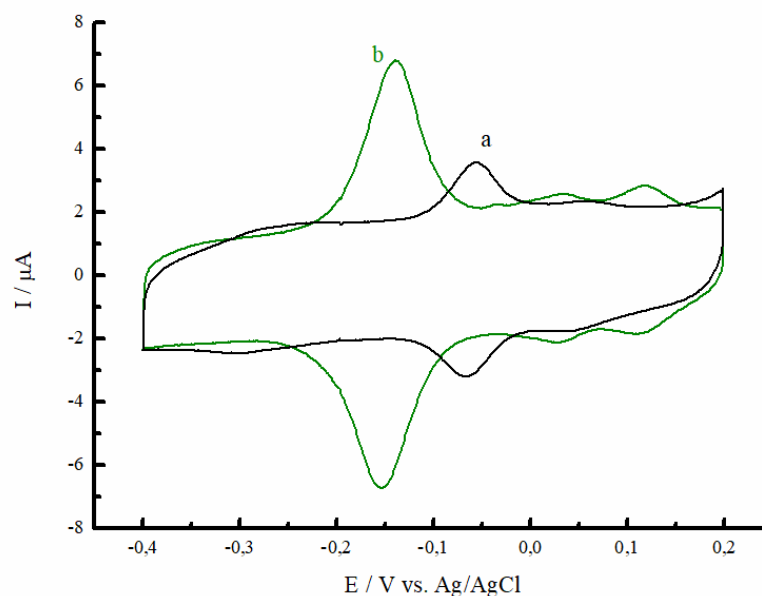


Rys. 45. Obrazy SEM przedstawiające (A) niemodyfikowane MWCNT oraz (B) modyfikowany materiał elektrodowy MWCNT/1-AP/3-MCat. Pomiar wykonano przy powiększeniu 30 000x.

Na podstawie obrazów SEM (przedstawionych na Rys. 45) można zaobserwować, że MWCNT ułożone są w równomierną, porowatą sieć. Dzięki porównaniu obrazów przed i po modyfikacji można stwierdzić, że morfologia nanorurek węglowych nie została zmieniona w znaczący sposób. Zarówno MWCNT, jak i MWCNT/1-AP/3-MCat charakteryzują się cylindrycznym kształtem, a także nie obserwuje się wyraźnych miejsc agregacji nanorurek.

2.2.3. Charakterystyka elektrochemiczna GC/MWCNT/1-AP/Cat oraz GC/MWCNT/1-AP/3-MCat

Po wytworzeniu elektroaktywnych form na powierzchni elektrody GC/MWCNT/1-AP (jak pokazano na Rys. 37) elektrody przepłukano wodą destylowaną i przeniesiono do elektrolitu obojętnego (PBS, pH 7,4). Na Rys. 46 przedstawiono voltamperogramy cykliczne dla elektrod modyfikowanych GC/MWCNT/1-AP/Cat i GC/MWCNT/1-AP/3-MCat zarejestrowane w buforze fosforanowym.

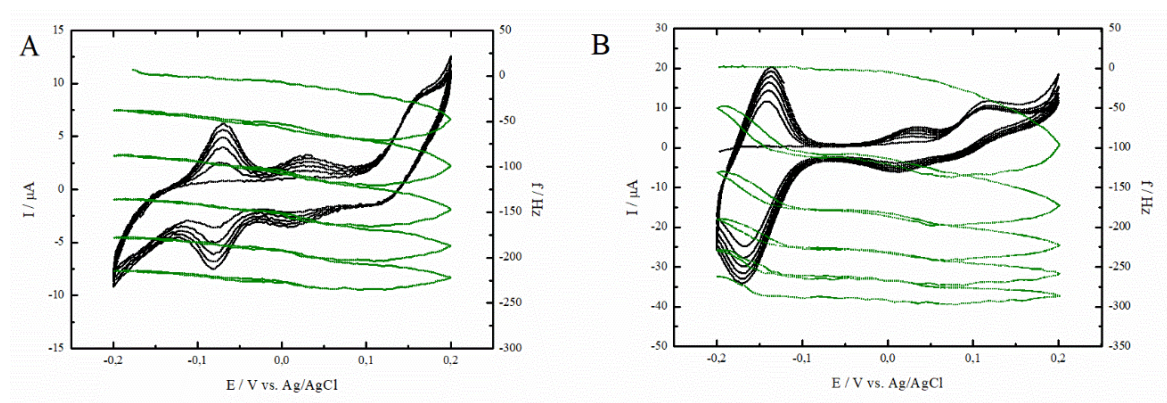


Rys. 46. Porównanie krzywych voltamperometrycznych dla elektrod modyfikowanych GC/MWCNT/1-AP/Cat (a, czarna linia) oraz GC/MWCNT/1-AP/3-MCat (b, zielona linia) zarejestrowanych w PBS (pH 7,4). Szybkość przesuwu potencjału 50 mV s^{-1} .

Zgodnie z przewidywaniami na voltamperogramie obserwuje się dobrze zdefiniowane piki, co sugeruje, że zarówno katechol, jak i 3-metoksykatechol zostały przyłączone do powierzchni elektrod GC/MWCNT/1-AP. Na Rys. 46 można również zauważyć, że pik pochodzący od 3-MCat jest przesunięty o około 10 mV (w kierunku ujemnych wartości potencjałów) w porównaniu z pikiem dla Cat, co prawdopodobnie jest związane z obecnością donorowego podstawnika $-OCH_3$ obniżającego potencjał utlenienia 3-metoksykatecholu [182,213]. Selektywne wprowadzenie modyfikatorów

aktywnych katalitycznie (opartych na chinonach) bezpośrednio na powierzchnię elektrody, jest procesem nieskomplikowanym i nie wymagającym przykładania wysokich potencjałów, co sprawia, że jest to procedura efektywna energetycznie.

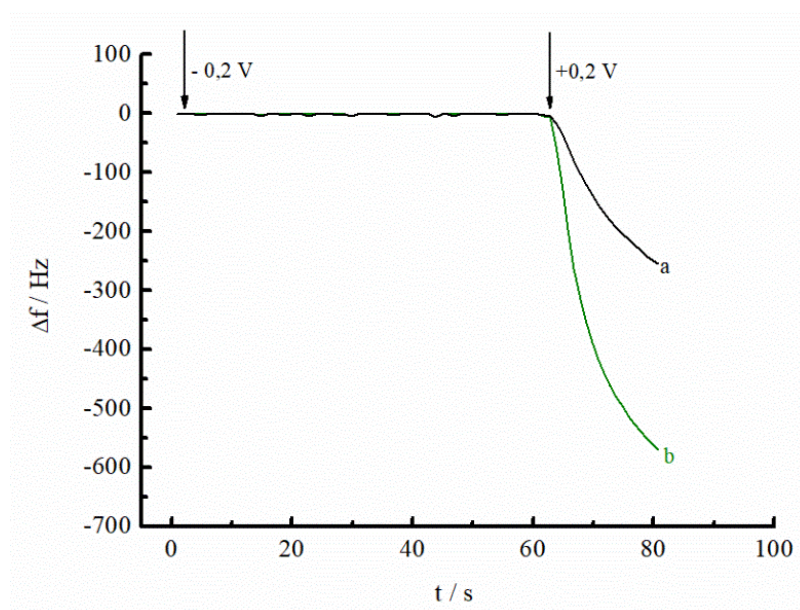
Proces przyłączania cząsteczek do powierzchni elektrody, który w literaturze anglojęzycznej określany jest jako *electrografting* analizowano również za pomocą woltamperometrii cyklicznej (CV) sprzężonej z elektrochemiczną mikrowagą kwarcową (EQCM). Wyniki tej analizy dla Cat i 3-MCat przedstawiono na Rys. 47.



Rys. 47. *Pomiary in situ CV sprzężonej z EQCM dla elektrody modyfikowanej GC/MWCNT/1-AP w roztworach zawierających (A) 0,1 mM katechol i (B) 0,1 mM 3-metoksykatechol. Szybkość przesuwu potencjału 50 mV s^{-1} .*

Podczas skanowania elektrod GC/MWCNT/1-AP w roztworach Cat i 3-MCat w kierunku dodatnich potencjałów obserwowano ciągły spadek częstotliwości sygnału EQCM (rozpoczynający się około +0,1 V), co wskazuje na początek procesu przyłączania adduktu. Jest to wynik zgodny z obserwowanymi pikami anodowymi rejestrowanymi jednocześnie na krzywych woltamperometrycznych. Wraz ze wzrostem wykonanych cykli, zarówno w przypadku skanowania w roztworze Cat, jak i 3-MCat, widoczny jest stopniowy spadek częstotliwości, co z kolei potwierdza, że przyłączenie katecholu i 3-metoksykatecholu zachodzi podczas polaryzowania elektrody do potencjałów anodowych. Dla elektrody modyfikowanej materiałem MWCNT/1-AP/3-MCat obserwuje się większe pole powierzchni piku niż w przypadku elektrody modyfikowanej materiałem MWCNT/1-AP/Cat, co można przypisać większej masie 3-metoksykatecholu wprowadzonej podczas procesu. W celu potwierdzenia obserwacji

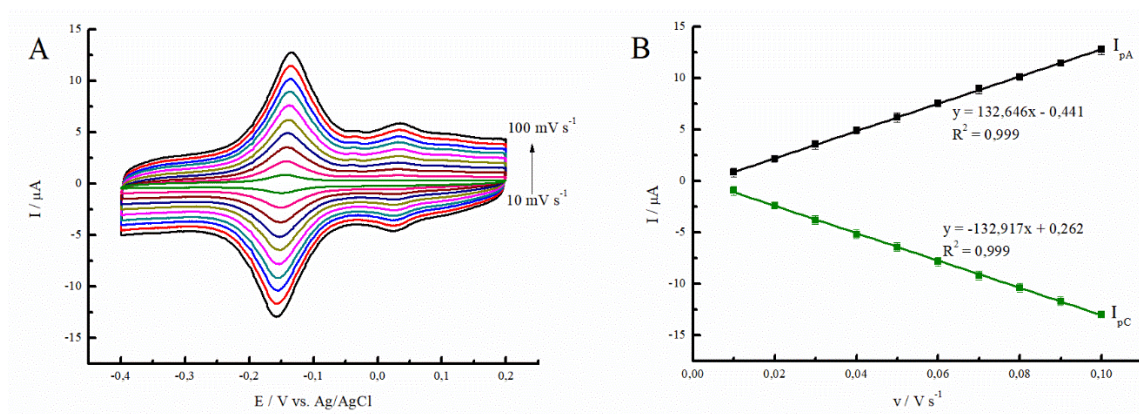
dokonanych podczas przeprowadzania tych pomiarów, wykonano również dodatkowe testy EQCM w warunkach potencjostatycznych, w których polaryzacja elektrody zmieniała się od $-0,2$ V do $+0,2$ V. Uzyskane krzywe techniką chronoamperometrii (CA) sprzężonej z elektrochemiczną mikrowagą kwarcową (EQCM) zilustrowano na Rys. 48.



Rys. 48. *Pomiary in situ CA ($E_1 = -0,2$ V oraz $E_2 = +0,2$ V vs. Ag/AgCl) sprzężonej z EQCM dla elektrody modyfikowanej GC/MWCNT/1-AP w roztworach zawierających (a) 0,1 mM katechol oraz (b) 0,1 mM 3-metoksykatechol.*

Na podstawie przedstawionych powyżej krzywych można stwierdzić, że w obecności 3-MCat (przy stałym potencjale $+0,2$ V vs. Ag/AgCl) obserwuje się wyraźny spadek częstotliwości, co dodatkowo potwierdza większą masę wprowadzaną podczas procesu przyłączania 3-metoksykatecholu i dobrze koreluje z wcześniejszymi wynikami woltamperometrii cyklicznej sprzężonej z elektrochemiczną mikrowagą kwarcową (Rys. 47 niniejszej rozprawy doktorskiej).

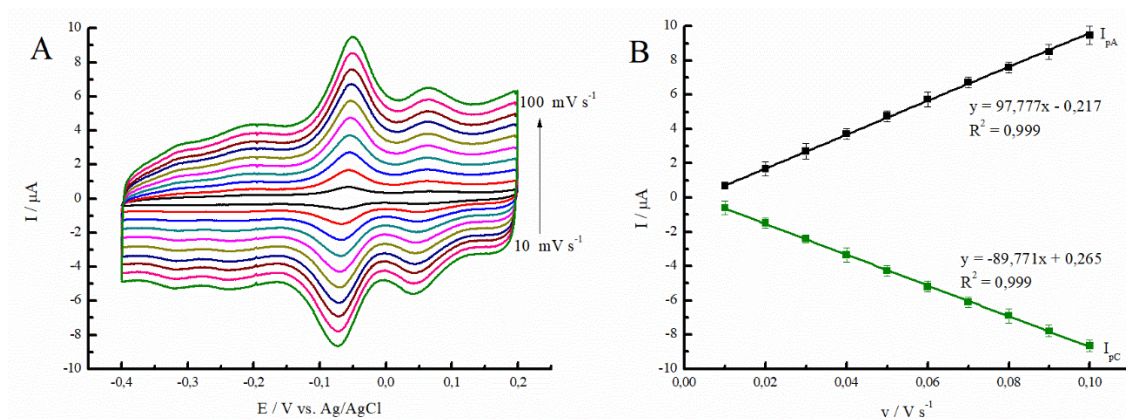
Następnie zarejestrowano krzywe woltamperometryczne przy różnych szybkościach przesuwu potencjału (od 10 do 100 mV s^{-1}) dla elektrody modyfikowanej GC/MWCNT/1-AP/3-MCat w zakresie potencjałów od $-0,4$ do $+0,2$ V vs. Ag/AgCl w buforze fosforanowym (PBS, pH 7,4), co przedstawiono na Rys. 49A.



Rys. 49. (A) Krzywe woltamperometryczne zarejestrowane dla elektrody GC/MWCNT/1-AP/3-MCat przy różnych szybkościach przesuwu potencjału (10-100 mV s^{-1}) w PBS (pH 7,4) oraz (B) Zależność szybkości przesuwu potencjału od prądu pików I_{pA} i I_{pC} .

Można zauważyć, że wraz ze wzrostem szybkości przesuwu potencjału anodowe i katodowe prądy pików zwiększają się na woltamperogramie. Wykreślono zatem liniową zależność między prądami pików (I_{pA} i I_{pC}), a szybkością przesuwu potencjału (v), co przedstawiono na Rys. 49B (dla prądów pików anodowych: $y = 132,646x - 0,441$, $R^2 = 0,999$ oraz dla prądów pików katodowych: $y = -132,917x + 0,262$, $R^2 = 0,999$). W związku z tym przyjmuje się, że transfer ładunku między cząsteczkami, a powierzchnią elektrody jest ograniczony procesami powierzchniowymi. Separacja między pikami zmieniała się nieznacznie wraz ze wzrostem szybkości przesuwu potencjału i wynosiła 5 mV przy $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ oraz 23 mV przy $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$, co sugeruje adsorpcyjny charakter procesu [221,222].

Analogiczny eksperyment przeprowadzono dla elektrody modyfikowanej GC/MWCNT/1-AP/Cat. Na Rys. 50A przedstawiono wykresy woltamperometrii cyklicznej również przy zmieniających się szybkościach przesuwu potencjału (w zakresie od 10 do 100 mV s^{-1}) dla elektrody modyfikowanej katecholem. Analizę także przeprowadzono w zakresie potencjałów od $-0,4$ do $+0,2 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ w buforze fosforanowym (PBS, pH 7,4).



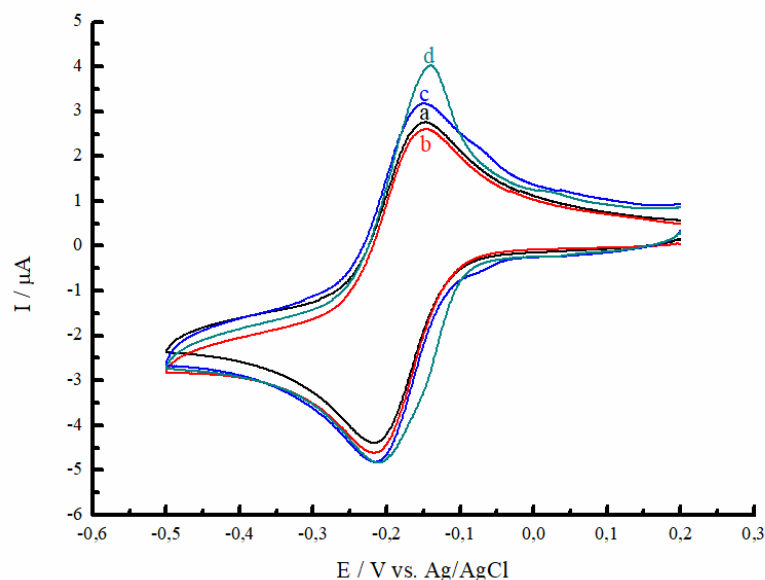
Rys. 50. (A) Wykresy woltamperometrii cyklicznej zarejestrowane dla elektrody GC/MWCNT/1-AP/Cat przy zmieniających się szybkościach przesuwu potencjału (10-100 mV s⁻¹) w PBS (pH 7,4) oraz (B) Zależność szybkości przesuwu potencjału od prądu piku I_{pA} i I_{pC} .

Zgodnie z przewidywaniami wraz ze wzrostem szybkości przesuwu potencjału prądy pików utleniania i redukcji zwiększają się na wykresach woltamperometrii cyklicznej (podobnie jak na Rys. 49A). W związku z tym również wykreślono linową zależność pomiędzy I_{pA} i I_{pC} , a ν , co ukazano na Rys. 50B (dla I_{pA} : $y = 97,777x - 0,217$, $R^2 = 0,999$ oraz dla I_{pC} : $y = -89,771x + 0,265$, $R^2 = 0,999$). Zakłada się zatem także, że transfer ładunku zachodzi głównie na powierzchni elektrody, co wskazuje na jego charakter powierzchniowy. Separacja w tym przypadku również niewiele się zmieniła z 7 mV do 15 mV (odpowiednio dla szybkości przesuwu potencjału 10 mV s⁻¹ i 100 mV s⁻¹).

Otrzymane wyniki na Rys. 49 i Rys. 50 wykazują, że 1-AP połączony ze ścianami bocznymi MWCNT poprzez oddziaływania π - π , jest dobrym prekursorem do dalszej modyfikacji i wprowadzenia dodatkowych grup chinonowych, które są trwale zimmobilizowane na powierzchni, wykazując ponadto odwracalny charakter przemian redoks, co jest pożądane z punktu widzenia późniejszego zastosowania elektrod jako sensorów.

Kolejne pomiary wykonano, aby dokładniej przeanalizować charakterystykę transferu elektronów dla elektrod modyfikowanych GC/MWCNT/1-AP/3-MCat i GC/MWCNT/1-AP/Cat. W tym celu przeprowadzono testy techniką woltamperometrii cyklicznej w wodnym roztworze zawierającym 1 mM marker redoks - chlorek

heksaamminorutenu(III) (RuHex). Dla dokładnego porównania analogiczne eksperymenty wykonano również dla niemodyfikowanej elektrody GC, a także GC/MWCNT. Zebrane krzywe woltamperometryczne prezentuje Rys. 51.



Rys. 51. Woltamperogramy cykliczne zarejestrowane dla: (a) GC, (b) GC/MWCNT, (c) GC/MWCNT/1-AP/Cat i (d) GC/MWCNT/1-AP/3-MCat w obecności 1 mM RuHex. Szybkość przesuwu potencjału 10 mV s^{-1} .

Niemodyfikowana elektroda z węgla szklanego (GC) charakteryzuje się dwoma pikami przy potencjałach $-0,22$ i $-0,15 \text{ V vs. Ag/AgCl}$. Separacja między pikami katodowym i anodowym wynosi zatem 70 mV , co jest wartością nieco większą od teoretycznej dla procesu dyfuzyjnego (60 mV) [188]. Z kolei dla elektrody GC/MWCNT (b, czerwona linia) można wyróżnić dwa dobrze zdefiniowane piki redoks z separacją równą 64 mV . W przypadku elektrod modyfikowanych GC/MWCNT/1-AP/Cat i GC/MWCNT/1-AP/3-MCat separacja jest równa 63 mV , co wskazuje na polepszoną kinetykę transferu elektronów na powierzchniach badanych elektrod.

Wzrost prądów obserwowany dla elektrod GC/MWCNT/1-AP/Cat i GC/MWCNT/1-AP/3-MCat w porównaniu do niemodyfikowanej elektrody GC oraz GC/MWCNT można przypisać zwiększonej powierzchni elektroaktywnej. Obliczono zatem pole powierzchni elektroaktywnej dla każdej elektrody przy użyciu równania Randlesa-Sevcika [223]:

$$I_p = 2,69 \cdot 10^5 \cdot A \cdot D^{1/2} \cdot n^{3/2} \cdot C \cdot v^{1/2} \quad (18)$$

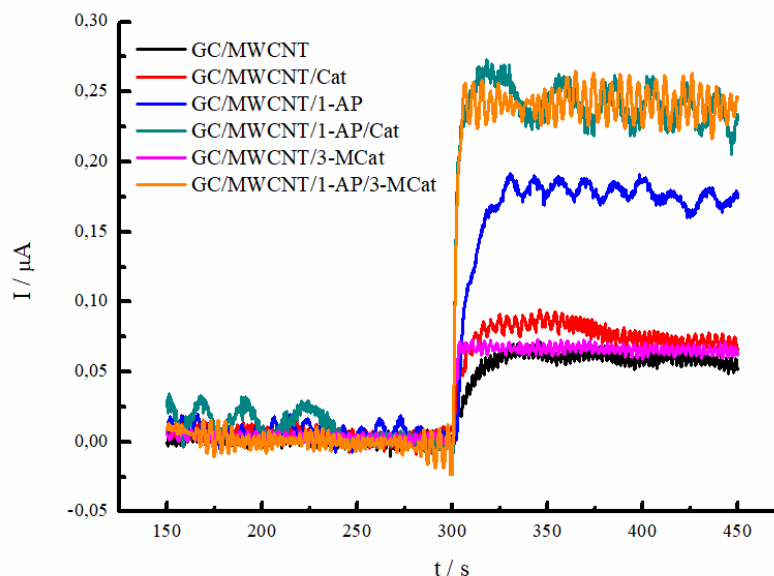
w którym: I_p to natężenie prądu pikowego (A); A oznacza powierzchnię elektroaktywną (cm^2); D określa współczynnik dyfuzji (dla RuHex jest równy $5,48 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ [224]); n to liczba elektronów wymienionych w reakcji ($n = 1$); v oznacza szybkość skanowania (V s^{-1}); oraz C określa stężenie analitu (mol cm^{-3}).

Obliczone na tej podstawie wartości powierzchni elektroaktywnej wynoszą $0,069 \text{ cm}^2$ dla GC, $0,085 \text{ cm}^2$ dla GC/MWCNT, $0,101 \text{ cm}^2$ dla GC/MWCNT/1-AP/Cat oraz $0,116 \text{ cm}^2$ dla GC/MWCNT/1-AP/3-MCat. Na podstawie przedstawionych wyników można założyć, że proponowane modyfikacje zachowują porowatą strukturę MWCNT i zwiększają powierzchnię elektroaktywną. Może to być związane z poprawą zwilżalności hydrofobowych nanorurek węglowych po zastosowaniu warstwy modyfikatora organicznego.

2.2.4. Detekcja NADH przy użyciu elektrod GC/MWCNT/1-AP modyfikowanych katecholem (Cat) i 3-metoksykatecholem (3-MCat)

Z uwagi na polepszoną kinetykę transferu elektronów (co wykazano w poprzednim podrozdziale), elektrody modyfikowane w ramach tej części pracy doktorskiej (GC/MWCNT/1-AP/3-MCat i GC/MWCNT/1-AP/Cat) zostały zaproponowane w kierunku elektrokatalitycznego utlenienia NADH. Jak już wspomniano wcześniej, utlenianie NADH jest katalizowane przez związki charakteryzujące się aktywnością elektrochemiczną (akceptory protonów i elektronów). Z reguły mechanizm elektrodowy obejmuje odwracalną wymianę dwóch protonów i dwóch elektronów ($2\text{H}^+/2\text{e}^-$). Warto przypomnieć, że do grupy najczęściej wykorzystywanych mediatorów redoks należą m.in. chinony, iminochinony, fenotiazyny czy fenazyny [91,95,173,225]. W celu porównania odpowiedzi elektrod modyfikowanych na dodatek $50 \mu\text{M}$ NADH wykorzystano sześć elektrod: GC/MWCNT, GC/MWCNT/1-AP, GC/MWCNT/Cat, GC/MWCNT/3-MCat, GC/MWCNT/1-AP/Cat oraz GC/MWCNT/1-AP/3-MCat (obejmujące różne kombinacje modyfikacji elektrod).

Testy techniką chronoamperometrii w warunkach mieszania przy stałym potencjale +0,1 V vs. Ag/AgCl przedstawiono na Rys. 52.

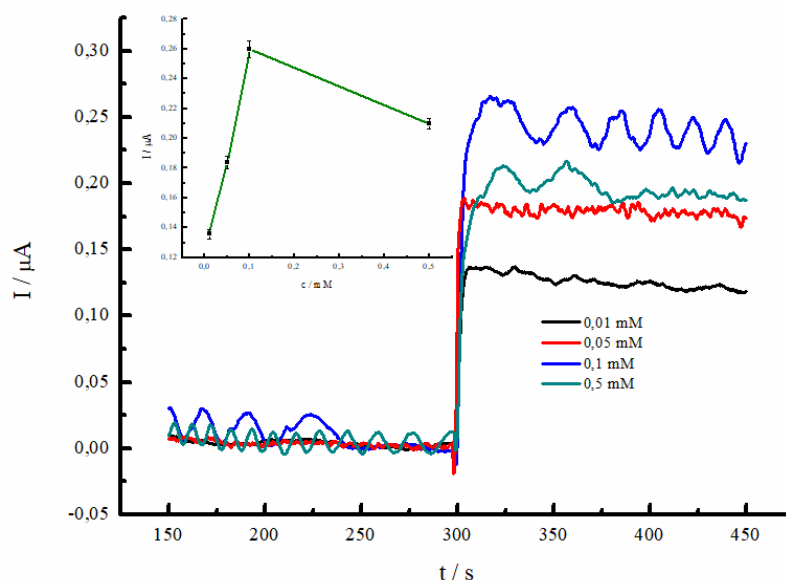


Rys. 52. Odpowiedzi chronoamperometryczne na dodatek 50 μM NADH w zależności od modyfikacji elektrody. Eksperyment prowadzono w warunkach mieszania przy stałym potencjale +0,1 V vs. Ag/AgCl, w buforze fosforanowym (PBS, pH 7,4).

Można zauważyć, że krzywe chronoamperometryczne przedstawione wyżej charakteryzują się wyraźnym zwiększeniem odpowiedzi prądowej na dodatek analitu, a w szczególności efekt ten jest widoczny dla elektrod modyfikowanych GC/MWCNT/1-AP/Cat (zielona krzywa) i GC/MWCNT/1-AP/3-MCat (pomarańczowa krzywa). Zaobserwowany wzrost jest około czterokrotnie wyższy w porównaniu z elektrodami modyfikowanymi GC/MWCNT, GC/MWCNT/Cat oraz GC/MWCNT/3-MCat. W związku z tym modyfikacja elektrody w sposób przedstawiony w ramach tej części pracy staje się zasadna w kontekście zastosowania w amperometrycznych sensorach NADH.

Bardzo istotnym czynnikiem determinującym wydajność katalityczną elektrod modyfikowanych jest nie tylko ilość centrów katalitycznych na powierzchni, ale również ich elektrochemiczna dostępność, rozumiana jako łatwość z jaką mogą one uczestniczyć w procesach wymiany ładunku i brać udział w reakcjach na granicy faz elektroda-elektrolit. Następnie zbadano zatem wpływ użytego stężenia katecholu (0,01; 0,05; 0,1;

0,5 mM) do wytworzenia finalnej elektrody GC/MWCNT/Cat na wielkość sygnału prądowego generowanego poprzez dodatek 50 μ M NADH przy stałym potencjale +0,1 V vs. Ag/AgCl. Analizy techniką chronoamperometrii przedstawiono na Rys. 53.

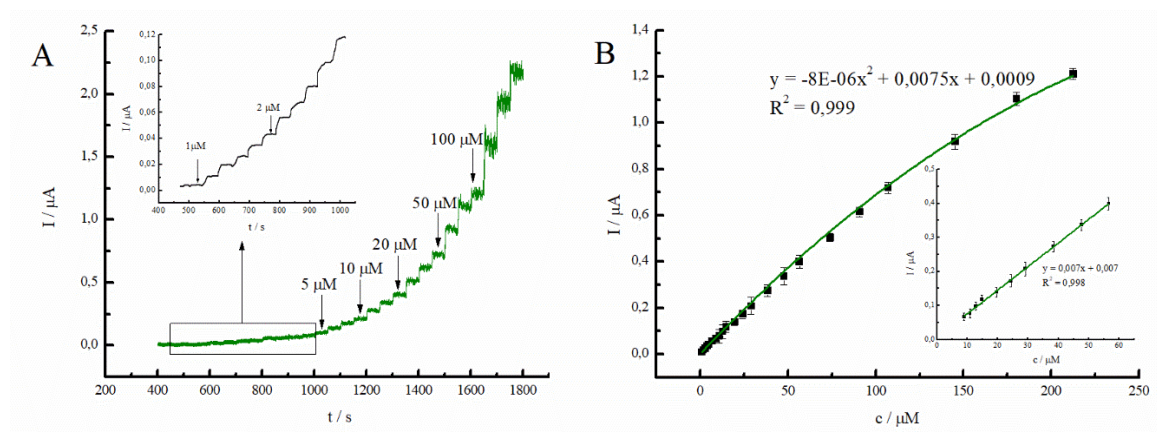


Rys. 53. Odpowiedzi chronoamperometryczne na dodatki 50 μ M NADH w zależności od stężenia katecholu (0,01; 0,05; 0,1; 0,5 mM) użytego do przygotowania elektrody GC/MWCNT/1-AP/Cat. Analizę prowadzono w warunkach mieszania przy stałym potencjale (+0,1 V vs. Ag/AgCl) w elektrolicie obojętnym (PBS, pH 7,4). Wstawka ukazuje zależność prądu od stężenia modyfikatora.

Na podstawie chronoamperogramów przedstawionych na Rys. 53 można zaobserwować, że najwyższy prąd utleniania NADH został zarejestrowany dla elektrody GC/MWCNT/1-AP/Cat, którą zmodyfikowano przy użyciu katecholu o stężeniu 0,1 mM. Przy stężeniu katecholu wynoszącym 0,5 mM (zielona krzywa) odnotowano spadek prądu, w porównaniu do krzywej zarejestrowanej dla stężenia katecholu 0,1 mM (niebieska krzywa). Prawdopodobnie jest to związane z zastosowaniem zbyt dużego stężenia modyfikatora, co w konsekwencji może prowadzić do blokowania powierzchni elektrody. Ten eksperyment pozwolił dobrać odpowiednie stężenie katecholu do badań. Wybrane warunki zostały również zastosowane podczas przygotowywania elektrody modyfikowanej GC/MWCNT/1-AP/3-MCat.

Mechanizm utlenienia NADH na powierzchni elektrod modyfikowanych GC/MWCNT/1-AP/Cat i GC/MWCNT/1-AP/3-MCat przedstawiono w niniejszej pracy, w jej Części Literaturowej (równania (1)-(6), str. 35-36). Dodatkowo na Rys. 7 (Część Literaturowa, strona 36) przedstawiono również schematycznie proces katalitycznego utlenienia NADH dla katalizatora zawierającego grupy chinonowe (obejmujące przejście chinon/hydrochinon). Jako przykład w tym celu zaprezentowano katechol.

W kolejnej części badań prowadzonych nad określeniem efektu elektrokatalitycznego w kierunku utlenienia NADH, na elektrodach modyfikowanych wykonano analizy chronoamperometryczne. Na Rys. 54A zaprezentowano krzywą chronoamperometryczną zarejestrowaną dla dodatków NADH dla elektrody modyfikowanej GC/MWCNT/1-AP/3-MCat. Badania prowadzono w elektrolicie obojętnym (PBS, pH 7,4) przy stałym potencjale +0,1 V vs. Ag/AgCl, w warunkach ciągłego mieszania.

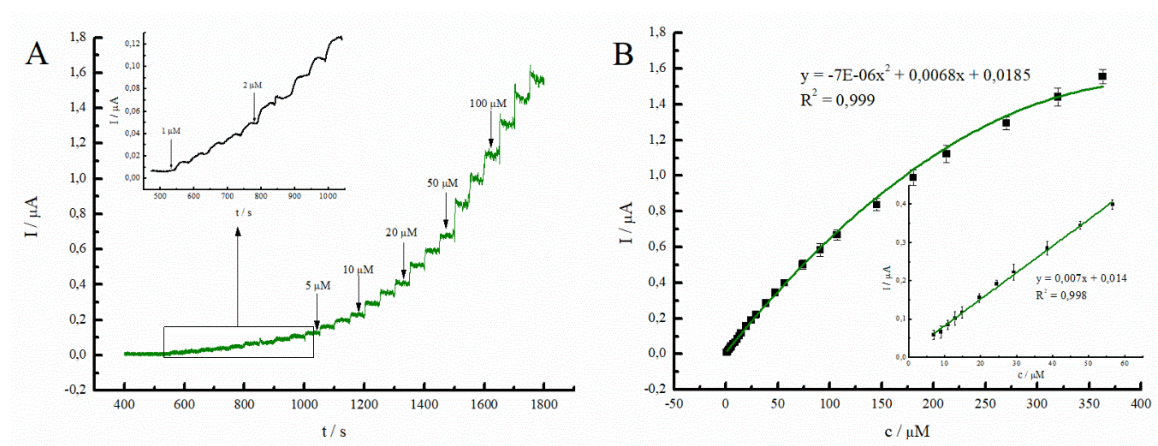


Rys. 54. (A) Krzywa chronoamperometryczna zarejestrowana dla elektrody GC/MWCNT/1-AP/3-MCat po kolejnych dodatkach analitu. Jako elektrolit wykorzystano PBS (pH 7,4), pomiar prowadzono w warunkach mieszania przy stałym potencjale ($E = +0,1$ V vs. Ag/AgCl). (B) Zależność pomiędzy prądem rejestrowanym po dodatku kolejnych porcji NADH, a jego stężeniem.

Na Rys. 54A przedstawiono charakterystyczną krzywą zależności prądu utlenienia NADH od czasu (w zależności od dodatków NADH). Każdy dodatek powodował wzrost prądu utleniania. Następnie obserwowano stabilizację, co potwierdza zdolność elektROUTLENIANIA NADH przy relatywnie niskim potencjale (+0,1 V vs. Ag/AgCl).

Ponadto wykreślono krzywe kalibracyjne zależności prądu utlenienia NADH w funkcji stężenia analitu, co przedstawiono na Rys. 54B. W tym przypadku wielomian kwadratowy, który opisuje zależność stężenia NADH (w zakresie od 1 do 213 μM) charakteryzuje się bardzo dobrym dopasowaniem do prądów anodowych ($y = -0,000008x^2 + 0,0075x + 0,0009$, $R^2 = 0,999$). Obserwowane odchylenie od liniowego przebiegu krzywej wynika z kinetyki Michaelisa-Menten. Jest to zależność, którą bardzo często można zauważyć w przypadku utleniania NADH na powierzchni elektrod wykorzystujących mediatory redoks, o czym wspomniano również wcześniej w ramach tej rozprawy doktorskiej. Dodatkowo wyznaczono również szereg parametrów analitycznych, w tym: granicę wykrywalności (LOD, 2,54 μM), granicę oznaczalności (LOQ, 7,70 μM) czy zakres liniowej odpowiedzi mieszczący się w granicach od 8,92 do 56,6 μM ($y = 0,007x + 0,007$, $R^2 = 0,998$, co przedstawiono jako wstawkę do Rys. 54B). Ponadto oszacowano również czułość elektrody, która była równa $0,046 \mu\text{A} \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-2}$.

W takich samych warunków wykonano oznaczenie NADH wykorzystując w tym celu drugą elektrodę modyfikowaną w ramach prowadzonych badań (GC/MWCNT/1-AP/Cat). Odpowiedź amperometryczną rejestrowano także w warunkach mieszania, przy potencjale +0,1 V vs. Ag/AgCl, w PBS (pH 7,4), a wyniki tej analizy przedstawiono na Rys. 55.



Rys. 55. (A) Odpowiedź amperometryczna różnych stężeń NADH zarejestrowana dla elektrody modyfikowanej GC/MWCNT/1-AP/Cat w buforze fosforanowym (pH 7,4) w warunkach mieszania, przy stałym potencjale +0,1 V oraz (B) Krzywa kalibracyjna dla opisanego układu.

Podobnie jak na Rys. 54A, w tym przypadku również widoczna jest krzywa amperometryczna zależności prądu od czasu podczas kolejnych dodatków NADH. Dla elektrody modyfikowanej GC/MWCNT/1-AP/Cat także wykreślono krzywe kalibracyjne (Rys. 55B). Wielomian kwadratowy stężenia analitu w przedziale od 1 do 363 μM charakteryzuje się bardzo dobrym dopasowaniem do prądów anodowych ($y = -0,000007x^2 + 0,0068x + 0,0185$, $R^2 = 0,999$). Wyznaczono granicę wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ), które wynoszą odpowiednio 1,98 μM i 5,99 μM . Zakres liniowej odpowiedzi NADH dla prezentowanej elektrody GC/MWCNT/1-AP/Cat jest równy od 6,95 do 56,6 μM analitu ($y = 0,007x + 0,014$, $R^2 = 0,998$). Czulość elektrody oszacowano na 0,076 $\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$. Można więc stwierdzić, że zarówno elektroda GC/MWCNT/1-AP/3-MCat, jak i GC/MWCNT/1-AP/Cat charakteryzują się dość podobnymi parametrami. Należy również podkreślić potencjał zastosowania Cat i 3-MCat jako skutecznych mediatorów redoks, które można zastosować do oznaczania NADH przy zadowalających parametrach analitycznych.

W Tabeli 8 porównano parametry uzyskane dla elektrod GC/MWCNT/1-AP/Cat i GC/MWCNT/1-AP/3-MCat z parametrami uzyskanymi przez Naukowców dla innych sensorów NADH dostępnych w literaturze.

Tabela 8. Porównanie parametrów analitycznych dla różnych elektrod modyfikowanych stosowanych do elektrochemicznego oznaczania NADH.

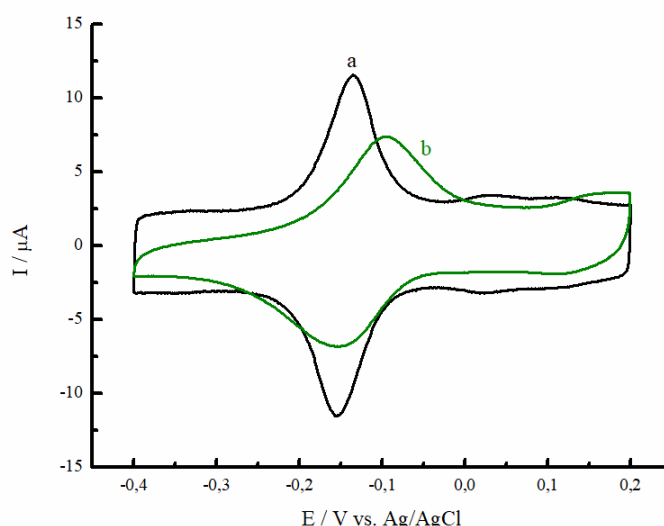
Elektroda modyfikowana	LOD / μM	Czulość / $\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$	Zakres liniowy / μM	Odniesienie
PTZ/AgSNPs/SPE	0,76	0,457	1,9-89	[103]
Au@PDA/TiC	0,0062	7,129	0,018-674	[104]
PGE/SWCNT/PCV	1,3	0,146	1,3-280	[173]
GC/MWCNT/AAQ/3-MCat	0,73	0,154	2,50-55,62	[197]
GC/MWCNT/AAQ/CAT	0,63	0,134	2,51-55,94	[197]
SPCE/RGO/PNR/AuNP	0,72	0,011	5-3170	[210]
SPCE/MWCNT/AuNP/PNR	3,72	0,081	12,4-150	[226]
NPG/Os(bpy) ₂ PVI/DIA	0,8	0,09	5-100	[227]
PEDOT CMs/GCE	5,3	0,219	20-240	[228]
Poly-Nq-MWCNT/GCE	0,1	0,1035	1-140	[229]
ZnO/CNT/BCB/CPE	0,3	1,845	1-650	[230]
GC/MWCNT/1-AP/3-MCat	2,54	0,046	8,92-56,6	Niniejsza praca
GC/MWCNT/1-AP/Cat	1,98	0,076	6,95-56,6	

Można zatem stwierdzić, że elektrody modyfikowane w tej części pracy charakteryzowały się porównywalnymi parametrami analitycznymi do innych elektrod przedstawionych w publikacjach naukowych, w szczególności relatywnie niskim wartościami czułości.

2.2.5. Oznaczanie glukozy za pomocą elektrod modyfikowanych typu GC/MWCNT/1-AP/Cat/GDH oraz GC/MWCNT/1-AP/3-MCat/GDH

W kolejnej części badań przeprowadzono immobilizację enzymu - dehydrogenazy glukozowej z *Pseudomonas sp* (GDH) na powierzchni elektrod modyfikowanych GC/MWCNT/1-AP/Cat i GC/MWCNT/1-AP/3-MCat. Mechanizm i schematyczne przedstawienie utlenienia glukozy na elektrodach modyfikowanych przedstawiono na Rys. 8 i opisano równaniami od (7) do (9) (Rozdział 2 Części Literaturowej niniejszej pracy, str. 37).

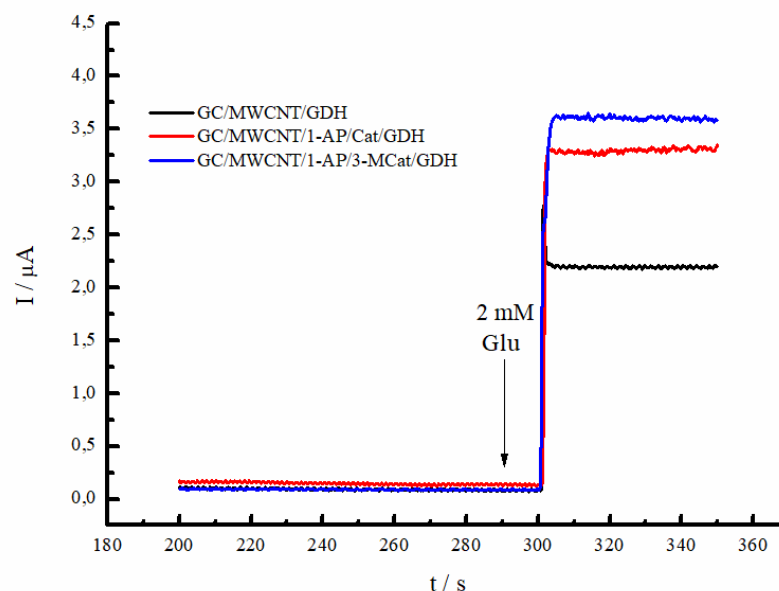
Pierwsza część badań związanych z immobilizacją enzymu skupiała się na porównaniu woltamperogramów cyklicznych elektrody GC/MWCNT/1-AP/3-MCat przed i po procesie immobilizacji GDH. Na Rys. 56 przedstawiono te krzywe.



Rys. 56. Porównanie krzywych woltamperometrycznych zarejestrowanych dla elektrody GC/MWCNT/1-AP/3-MCat przed (a, czarna linia) i po (b, zielona linia) immobilizacji GDH. Eksperyment przeprowadzono w buforze fosforanowym (PBS, pH 7,4) przy szybkości przesuwu potencjału 50 mV s^{-1} .

Można zauważyć, że po procesie immobilizacji dehydrogenazy glukozowej na powierzchni elektrody GC/MWCNT/1-AP/3-MCat obserwuje się zmniejszenie pojemności (b, zielona linia) w porównaniu do układu przed procesem immobilizacji enzymu (a, czarna linia). Dodatkowo obserwuje się zmniejszenie prądów pików zarówno anodowych, jak i katodowych. Widoczny jest również wzrost separacji pomiędzy pikami (odpowiednio z 19 do 56 mV). Obecność nieprzewodzącego materiału białkowego, jakim jest GDH sprawia, że powierzchnia elektrody jest w pewnym stopniu blokowana, co zmniejsza aktywność grup chinonowych. Otrzymane wyniki sugerują, że GDH została unieruchomiona na powierzchni elektrody modyfikowanej.

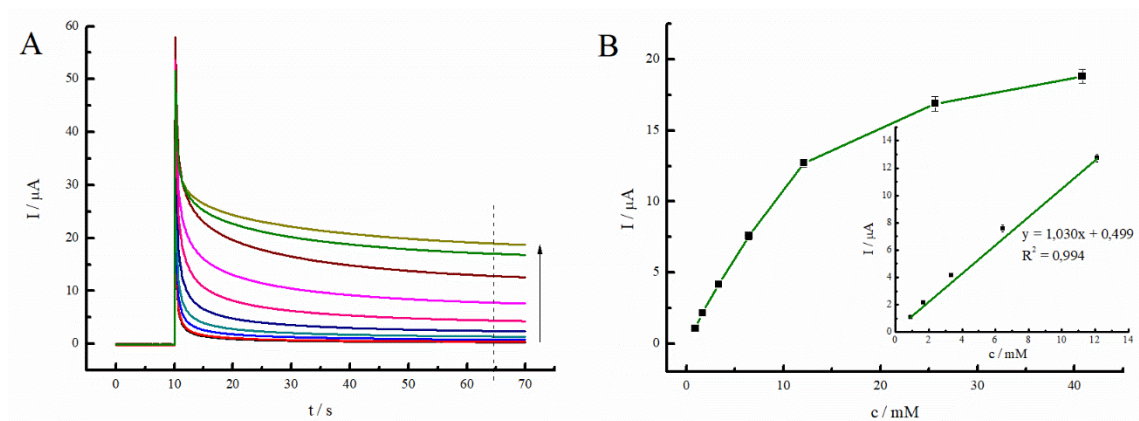
Następnie wykonano testy kontrolne techniką chronoamperometrii w celu weryfikacji czy modyfikacja elektrody przeprowadzona w ramach niniejszych badań była niezbędna do skutecznego utlenienia glukozy. Porównano więc odpowiedź amperometryczną na dodatki 2 mM glukozy zarejestrowaną dla elektrod GC/MWCNT/GDH, GC/MWCNT/1-AP/Cat/GDH oraz GC/MWCNT/1-AP/3-MCat/GDH. Wyniki tej analizy przedstawiono na Rys. 57.



Rys. 57. Odpowiedzi amperometryczne zarejestrowane dla dodatków 2 mM glukozy w zależności od sposobu modyfikacji elektrody przy stałym potencjale +0,6 V vs. Ag/AgCl w warunkach mieszania (w obecności 1 mM NAD^+).

Zauważono, że zdecydowanie wyższe odpowiedzi prądowe są obserwowane dla elektrod modyfikowanych z katalizatorami chinonowymi na powierzchni. W związku z tym elektrody GC/MWCNT/1-AP/Cat/GDH i GC/MWCNT/1-AP/3-MCat/GDH wykorzystano w dalszym etapie do określenia właściwości elektroanalitycznych w kierunku utlenienia glukozy.

Przedstawione wcześniej rozważania pozwalają założyć, że możliwe będzie oznaczanie glukozy technikami chronoamperometrycznymi. Zdecydowano się zatem wykonać eksperymenty przy użyciu metod amperometrycznych w układzie z i bez mieszania. Początkowo do monitorowania poziomu glukozy na elektrodzie modyfikowanej GC/MWCNT/1-AP/3-MCat/GDH wykonano dwuetapowy pomiar amperometryczny bez mieszania. Pomiary prowadzono przy potencjałach $E_1 = -0,2$ V przez 10 sekund i $E_2 = +0,6$ V przez 60 sekund (w obecności 1 mM NAD^+ , vs. Ag/AgCl). Uzyskane wyniki zestawiono na Rys. 58A.

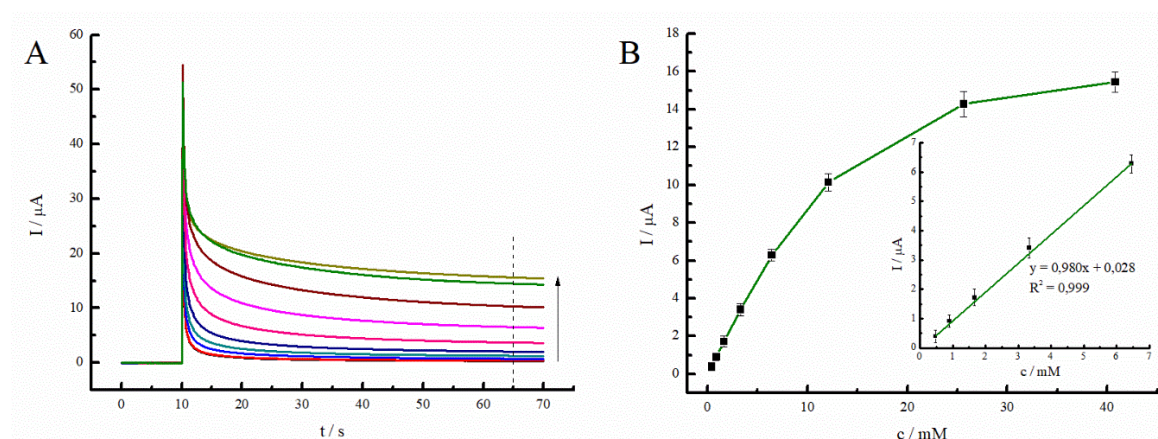


Rys. 58. (A) Odpowiedzi amperometryczne na dodatki różnych stężeń glukozy zarejestrowane dla elektrody GC/MWCNT/1-AP/3-MCat/GDH przy $E_1 = -0,2$ V (10 s) i $E_2 = +0,6$ V (60 s). Eksperyment przeprowadzono w buforze fosforanowym (PBS, pH 7,4) w obecności 1 mM NAD^+ oraz (B) Zależność stężenia glukozy od prądu utleniania.

Zgodnie z założeniem, elektroda GC/MWCNT/1-AP/3-MCat/GDH nie wykazywała odpowiedzi na dodatki glukozy przy potencjale E_1 . Natomiast przy potencjale E_2 obserwowano liniowy wzrost prądu podczas dodatków analitu w zakresie od 0,909 do 12,1 mM ($y = 1,030x + 0,499$, $R^2 = 0,994$), co zestawiono na krzywej kalibracyjnej na Rys. 58B (wstawka). Przeprowadzone testy umożliwiły określenie

kluczowych parametrów analitycznych, w tym: granicę wykrywalności (LOD) równą 0,166 mM, granicę oznaczalności (LOQ) wynoszącą 0,503 mM, a także czułość $6,82 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$. Warto również wspomnieć, że przebieg krzywej kalibracyjnej w całym zakresie stężeń jest zgodny z kinetyką Michaelisa-Menten, którą charakteryzują się układy enzymatyczne [99].

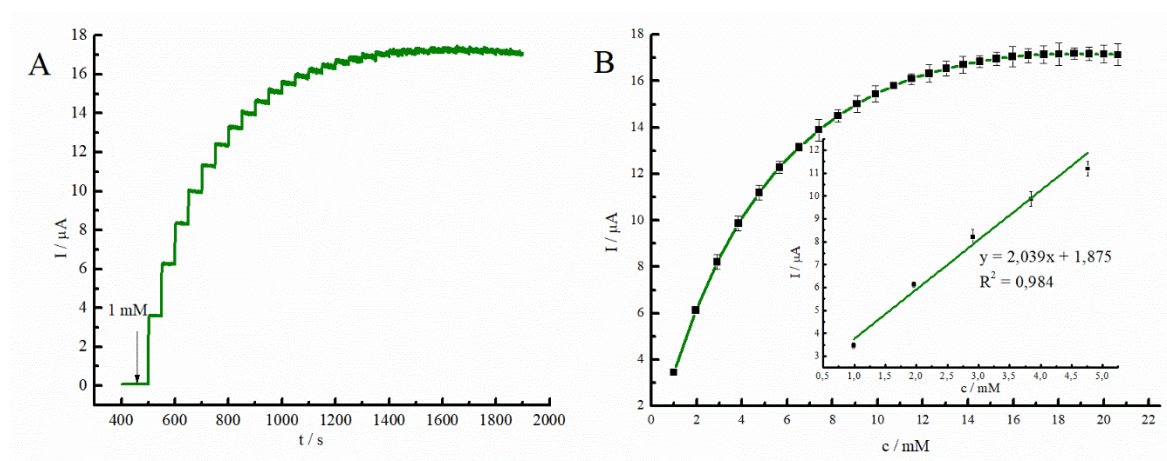
Jak wspomniano wcześniej glukozę oznaczono również z wykorzystaniem tej samej techniki amperometrycznej przy użyciu elektrody modyfikowanej GC/MWCNT/1-AP/Cat/GDH. Zarejestrowano zatem krzywe amperometryczne w analogicznych warunkach i przedstawiono je na Rys. 59A.



Rys. 59. (A) Krzywe amperometryczne zarejestrowane dla elektrody GC/MWCNT/1-AP/Cat/GDH przy $E_1 = -0,2 \text{ V}$ (10 s) i $E_2 = +0,6 \text{ V}$ (60 s) dla różnych stężeń glukozy. Jako elektrolit wykorzystano PBS (pH 7,4) zawierający 1 mM NAD^+ , a także
(B) Krzywa zależności stężenia glukozy w funkcji prądu utlenienia.

Można zatem również zaobserwować liniowy wzrost prądu podczas dodatków analitu w zakresie od 0,476 do 6,45 ($y = 0,980x + 0,028$, $R^2 = 0,999$). Także w tym przypadku określono podstawowe parametry analityczne dla oznaczania glukozy za pomocą elektrody modyfikowanej GC/MWCNT/1-AP/Cat/GDH. Granica wykrywalności (LOD) oszacowana została na 0,107 mM, granica oznaczalności wynosiła 0,325 mM, a czułość była równa $9,66 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$. Przebieg krzywej kalibracyjnej (Rys. 59B) w całym zakresie stężeń także jest charakterystyczny dla układów zawierających enzym na powierzchni elektrody (kinetyka Michaelisa-Menten), o czym wspomniano już wcześniej w ramach tej części pracy.

Glukoza została również oznaczona za pomocą techniki chronoamperometrycznej w warunkach ciągłego mieszania przy stałym potencjale $+0,6\text{ V vs. Ag/AgCl}$. W tym celu zastosowano dwie elektrody modyfikowane w ramach niniejszej części rozprawy doktorskiej: GC/MWCNT/1-AP/3-MCat/GDH oraz GC/MWCNT/1-AP/Cat/GDH. Wyniki analizy dla pierwszej z nich zestawiono na Rys. 60A.

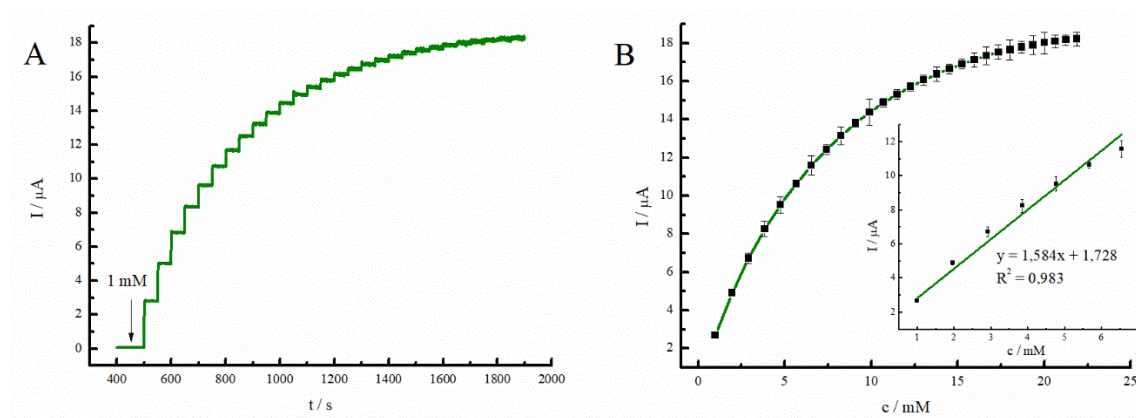


Rys. 60. (A) Odpowiedź amperometryczna elektrody GC/MWCNT/1-AP/3-MCat/GDH dla odpowiednich stężeń glukozy przy stałym potencjale $+0,6\text{ V vs. Ag/AgCl}$ (pomiar prowadzono w obecności 1 mM NAD^+ w PBS, w warunkach mieszania). (B) Zależność stężenia glukozy od prądu utlenienia.

Jak zaobserwowano na Rys. 60A po dodaniu określonej ilości analitu widoczny jest wzrost prądu, a następnie stabilizowanie się krzywej amperometrycznej. Przebieg krzywej kalibracyjnej w całym zakresie stężeń dodawanego analitu charakteryzuje się odchyleniem od liniowości (Rys. 60B), co przypisuje się wspomnianej już wcześniej kinetyce Michaelisa-Menten. Jest to zależność bardzo często obserwowana dla utlenienia glukozy w układach enzymatycznych [100]. Z kolei zakres liniowej odpowiedzi został wyznaczony od $0,990$ do $4,76\text{ mM Glu}$ ($y = 2,039x + 1,875$, $R^2 = 0,984$). Ponadto określono również LOD i LOQ, wynoszące odpowiednio $0,103\text{ mM}$ i $0,313\text{ mM}$. Obliczono także czułość elektrody, która była równa $13,1\text{ }\mu\text{A mM}^{-1}\text{ cm}^{-2}$ (przy użyciu wyznaczonej wcześniej powierzchni elektroaktywnej). Określono również wartość K_m , która wynosiła $5,67\text{ mM}$. Jest to wartość zgodna z innymi danymi dostępnymi w literaturze dla biosensorów glukozy [231,232]. Stosunkowo niska wartość K_m

wskazuje, że opracowana w ramach niniejszych badań elektroda charakteryzuje się relatywnie dobrą aktywnością enzymatyczną.

Przy użyciu tej samej metody i w analogicznych warunkach wykonano również oznaczenie glukozy z wykorzystaniem drugiej elektrody modyfikowanej: GC/MWCNT/1-AP/Cat/GDH. Krzywą chronoamperometryczną i wyznaczoną odpowiednio krzywą kalibracyjną zaprezentowano na Rys. 61.



Rys. 61. (A) Krzywa amperometryczna zarejestrowana dla elektrody GC/MWCNT/1-AP/Cat/GDH dla dodatków Glu. Pomiar prowadzono przy stałym potencjale $+0,6\text{ V}$ vs. Ag/AgCl w buforze fosforanowym (PBS, pH 7,4) w obecności 1 mM NAD^+ (w warunkach mieszania). (B) Krzywa kalibracyjna wykreślona dla opisanego układu.

Można zauważyć, że przebieg krzywej amperometrycznej jest bardzo podobny jak przedstawiono wcześniej dla elektrody GC/MWCNT/1-AP/3-MCat/GDH (Rys. 60A). W tym przypadku również krzywa kalibracyjna w całym zakresie stężeń odbiega od liniowości, co jest związane ze wspomnianymi wcześniej procesami (kinetyka Michaelisa-Menten). Z kolei zakres liniowej odpowiedzi był obserwowany od 0,990 do 6,54 mM glukozy ($y = 1,584x + 1,728$, $R^2 = 0,983$). Wyznaczono również podstawowe parametry analityczne, w tym LOD (0,268 mM), LOQ (0,811 mM) oraz czułość elektrody ($15,4\text{ }\mu\text{A mM}^{-1}\text{ cm}^{-2}$).

W dalszej części niniejszej rozprawy doktorskiej porównano parametry analityczne uzyskane dla elektrod modyfikowanych GC/MWCNT/1-AP/Cat/GDH oraz GC/MWCNT/1-AP/3-MCat/GDH dla oznaczania glukozy dwoma metodami

amperometrycznymi, z innymi biosensorami detekcji tego cukru dostępnymi w literaturze. Zebrane parametry zestawiono w Tabeli 9.

Tabela 9. Porównanie parametrów analitycznych różnych biosensorów używanych do detekcji glukozy.

Elektroda modyfikowana	LOD / mM	Czułość / $\mu\text{A mM}^{-1}$ cm^{-2}	Zakres liniowy / mM	Odniesienie
GDH/NPG/SPCE	0,015	2,04	0,1-3,0	[98]
GDH/AuNPs-DTNB/MWCNT	0,003	-	0,04-4	[99]
PPF/GDH/PTZ/CNT/PPF/Au	0,12	5,1	4,9-19	[231]
MWCNT/PMG/NADP/GDH/Nf/ Porowata elektroda z papieru węglowego	-	50,8	0,05-20	[233]
Nf/GDH-bakteria/MWCNT/GCE	0,004	139,2	0,05-0,8	[234]
GOx/Pt/rGO/P3ABA/SPCE	0,044	22,01	0,25-6,0	[235]
MWCNT/LS/NPt/PEI/GOx	0,016	4,77	0,05-1,4	[236]
Nf-GOx-fMWCNT-PPy/Pt	0,005	54,2	0,05-4,1	[237]
GOx-SWCNT-PVI-Os/SPCE	0,1	14,6	0,2-7,5	[238]
SPCE-CTS-MWCNT/GDH	0,016	-	1-5,5	[239]
GC/MWCNT/1-AP/3-MCat/GDH ¹	0,166	6,82	0,909-12,1	Niniejsza praca
GC/MWCNT/1-AP/Cat/GDH ¹	0,107	9,66	0,476-6,45	
GC/MWCNT/1-AP/3-MCat/GDH ²	0,103	13,1	0,990-4,76	Niniejsza praca
GC/MWCNT/1-AP/Cat/GDH ²	0,268	15,4	0,990-6,54	

¹ pomiar wykonany bez mieszania

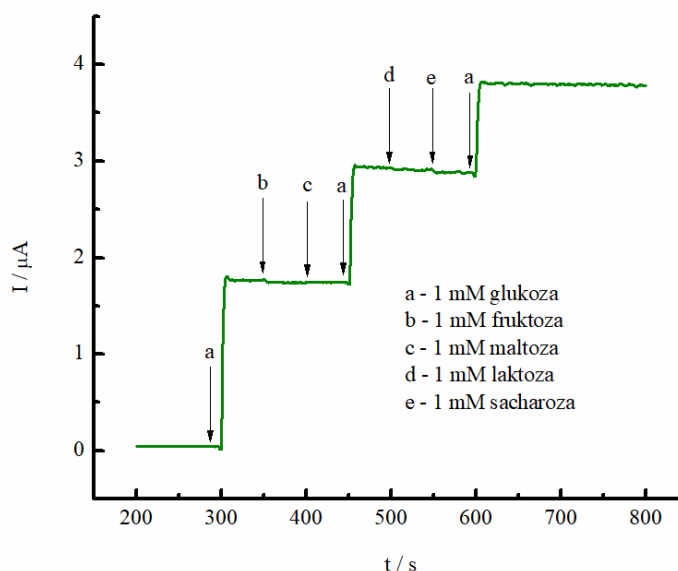
² pomiar wykonany w warunkach mieszania

Można zauważyć, że w porównaniu z innymi biosensorami przedstawionymi w publikacjach naukowych, elektrody modyfikowane w ramach tej części pracy (GC/MWCNT/1-AP/Cat/GDH, a także GC/MWCNT/1-AP/3-MCat/GDH), zarówno w warunkach mieszania, jak również bez mieszania, charakteryzują się zdolnością detekcji Glu przy relatywnie niskich (około 0,1 mM), jak i stosunkowo wysokich (nawet około 12 mM) stężeniach.

Zakres stężeń, w którym działają prezentowane elektrody, jest zgodny z fizjologicznymi poziomami glukozy, szacowanymi na 3,9-5,5 mM w warunkach na czczo oraz do 7,8 mM po posiłku, co stwarza prezentowanym elektrodom rozszerzenie możliwości aplikacyjnych o pomiary w sektorze zdrowotnym [240].

2.2.6. Wpływ substancji zakłócających oraz badania stabilności, powtarzalności i odtwarzalności elektrody GC/MWCNT/1-AP/3-MCat/GDH

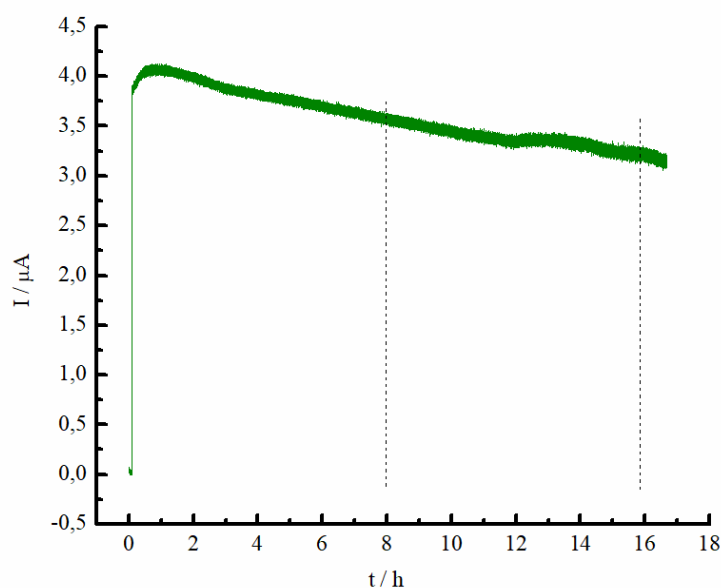
W kolejnej części prowadzonych badań określono również selektywność elektrody (GC/MWCNT/1-AP/3-MCat/GDH) skonstruowanej w ramach pracy. W tym celu wykonano analizę techniką chronoamperometrii polegającą na dodatku 1 mM glukozy i 1 mM odpowiednich cukrów, które są często spotykane w produktach przemysłu spożywczego, w tym fruktozy, laktozy, maltozy i sacharozy. Wyniki tych badań przedstawiono na Rys. 62.



Rys. 62. Krzywa chronoamperometryczna zarejestrowana dla elektrody GC/MWCNT/1-AP/3-MCat/GDH ukazująca dodatek 1 mM glukozy i wybranych substancji interferujących. Eksperyment prowadzono przy stałym potencjale +0,6 V vs. Ag/AgCl w warunkach mieszania (w buforze fosforanowym, w obecności 1 mM NAD^+).

Uzyskane wyniki wskazują, że żaden z wymienionych cukrów nie wpływał na działanie biosensora glukozy. Można zatem stwierdzić, że prezentowana elektroda charakteryzuje się selektywnością na dobrym poziomie, nawet w obecności cukrów (fruktoza, maltoza, laktoza i sacharoza) powszechnie występujących w produktach przemysłu spożywczego.

Postanowiono również określić stabilność biosensora glukozy. W związku z tym wykonano test techniką chronoamperometrii i rejestrowano odpowiedź elektrody GC/MWCNT/1-AP/3-MCat/GDH na dodatek 2 mM Glu w czasie 16 godzin ciągłego pomiaru. Wyniki uzyskane podczas tej analizy przedstawiono na Rys. 63.

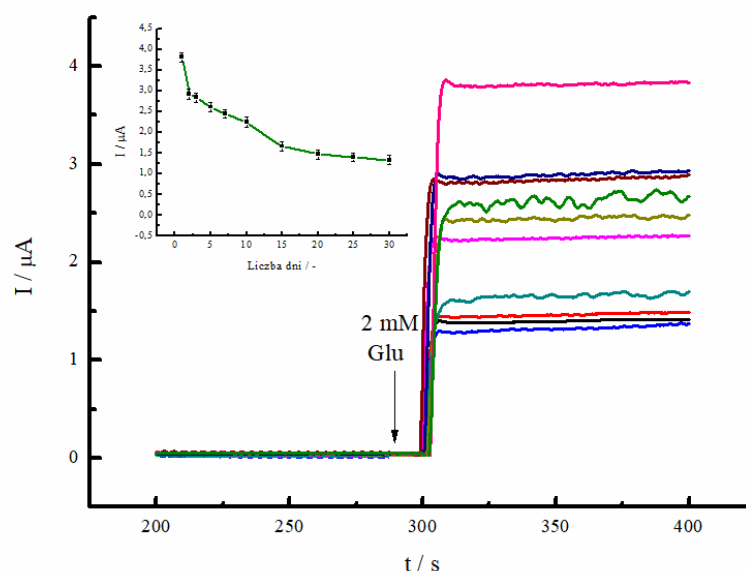


Rys. 63. *Krzywa chronoamperometryczna odpowiedzi biosensora GC/MWCNT/1-AP/3-MCat/GDH zarejestrowana dla dodatku 2 mM glukozy w czasie 16 godzin trwającego pomiaru. Eksperyment prowadzono przy stałym potencjale +0,6 V vs. Ag/AgCl, w warunkach mieszania, w PBS w obecności 1 mM NAD⁺.*

Dodatek 2 mM glukozy do układu spowodował gwałtowny wzrost prądu do około 3,85 μA , który zmniejszał się stopniowo wraz z upływem czasu. Na podstawie danych przedstawionych na powyższym wykresie obliczono procentowy spadek sygnału po 8 i 16 godzinach nieprzerwanego pomiaru. Procentowy spadek po 8 godzinach był równy około 7%, natomiast po 16 - około 17%. Eksperyment ten potwierdził, że elektroda modyfikowana GC/MWCNT/1-AP/3-MCat/GDH charakteryzuje się relatywnie dobrą stabilnością przez stosunkowo długi czas ciągłej pracy.

Ponadto postanowiono również ocenić długoterminową stabilność skonstruowanego biosensora glukozy. W tym celu wykonywano pomiary techniką chronoamperometrii polegające na dodatkach 2 mM Glu. Pomiędzy eksperymentami elektroda była przechowywana w buforze fosforanowym (PBS, pH 7,4) w temperaturze

+4°C. Wszystkie eksperymenty prowadzono w warunkach mieszania przy stałym potencjale +0,6 V vs. Ag/AgCl. Uzyskane wyniki zebrano na Rys. 64.



Rys. 64. Krzywe chronoamperometryczne zarejestrowane dla elektrody GC/MWCNT/1-AP/3-MCat/GDH dla 2 mM dodatków Glu wykonywanych w czasie 30 dni. Eksperyment prowadzono przy stałym potencjale +0,6 V vs. Ag/AgCl, w warunkach mieszania, w PBS w obecności 1 mM NAD^+ . Wstawka ilustruje zależność prądu od liczby dni, w których przechowywano elektrodę.

Na podstawie przedstawionego wcześniej wykresu można stwierdzić, że po trzydziestu dniach przechowywania elektrody sygnał uległ zmniejszeniu o około 50%. Może to być związane ze spadkiem aktywności enzymu (np. z powodu denaturacji, bądź degradacji), starzeniem się materiału elektrodowego, a także wpływem czynników zewnętrznych (wahania pH czy substancje interferujące). Uważa się również, że możliwe jest poprawienie stabilności długoterminowej i trwałości otrzymanego biosensora poprzez odpowiednie modyfikacje lub zastosowanie technik stabilizacji enzymu na powierzchni elektrody.

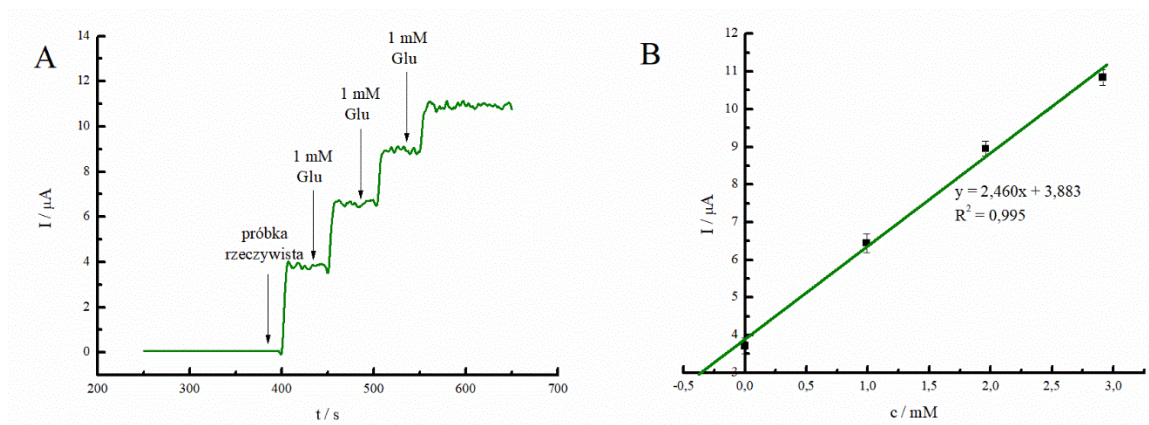
Przeprowadzone badania mające na celu określenie stabilności biosensora glukozy (GC/MWCNT/1-AP/3-MCat/GDH), zarówno w trakcie nieprzerwanego pomiaru, jak i w trakcie miesięcznego przechowywania elektrody, wykazały jego

obiecujący potencjał zastosowania, jednak konieczne są dalsze prace optymalizacyjne i udoskonalenia konstrukcji.

Finalnie oceniono również powtarzalność i odtwarzalność prezentowanej elektrody modyfikowanej. W celu określenia powtarzalności wykonano oznaczenia 1 mM glukozy na pojedynczej elektrodzie ($n = 5$). Względne odchylenie standardowe było równe 7,6%. Wynik ten wskazuje na akceptowalną precyzję metody. Z kolei odtwarzalność elektrody modyfikowanej zbadano przy użyciu trzech świeżo przygotowanych elektrod ($n = 3$) i ponownym oznaczeniu 1 mM Glu. RSD w tym przypadku wyniosło 7,2%, co również świadczy o wiarygodnej odtwarzalności prowadzonych pomiarów.

2.2.7. Testy próbki rzeczywistej

Końcowym etapem badań prowadzonych w drugiej części niniejszej pracy doktorskiej było wykonanie analiz w próbce rzeczywistej glukozy. Jako próbkę rzeczywistą wybrano napój izotoniczny zakupiony w lokalnym sklepie. Specyfikacja Producenta wskazywała, że zawartość glukozy w napoju jest równa 4 g na 100 mL (otrzymane stężenie to 202 mM). Przed przystąpieniem do oznaczania poziomu tego cukru w roztworze próbki rzeczywistej, najpierw rozpuszczono ją w buforze fosforanowym (PBS, pH 7,4) do stężenia 1 mM. Stężenie to wybrano na podstawie wcześniejszych pomiarów oznaczania poziomu glukozy w roztworach modelowych, ponieważ mieści się ono w liniowym zakresie stężeń biosensora GC/MWCNT/1-AP/3-MCat/GDH. Chronoamperogram dla oznaczania glukozy w próbce rzeczywistej przedstawiono na Rys. 65A.



Rys. 65. (A) Krzywa chronoamperometryczna zarejestrowana dla elektrody GC/MWCNT/1-AP/3-MCat/GDH dla dodatków próbki rzeczywistej oraz 1 mM roztworu glukozy. Pomiar prowadzono w warunkach mieszania, przy stałym potencjale $+0,6\text{ V}$ vs. Ag/AgCl, w buforze fosforanowym (PBS, pH 7,4) w obecności 1 mM NAD^+ . (B) Krzywa dodatku wzorca wykreślona na podstawie wyników zebranych na wykresie (A).

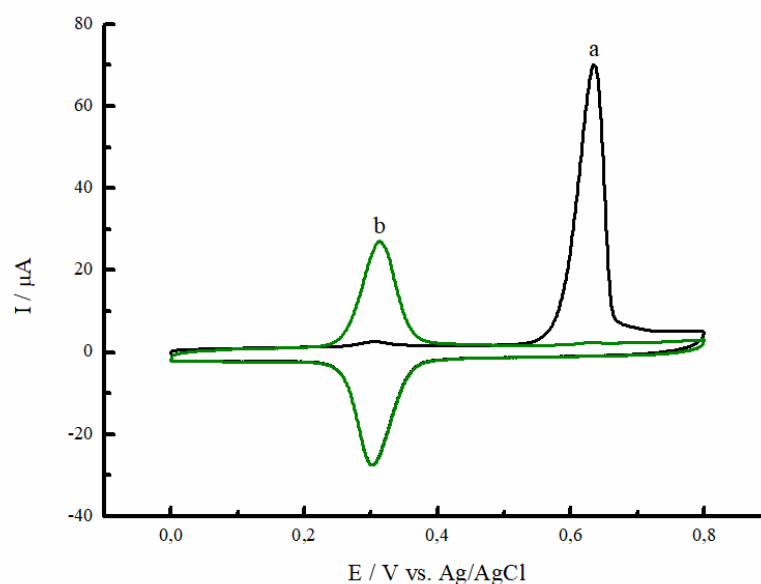
Po dodaniu próbki rzeczywistej o stężeniu 1 mM do elektrolitu zarejestrowano wzrost prądu, a następnie do takiego układu trzykrotnie dodano modelowy roztwór glukozy (również o stężeniu 1 mM). Następnie wykreślono krzywą dodatku wzorca (Rys. 65B) i na podstawie prezentowanych wyżej wyników ustalono, że średnia zawartość tego cukru w napoju izotonicznym jest równa $6,65 \pm 0,26\text{ g}$ na 100 mL (specyfikacja Producenta to 4 g na 100 mL).

2.3. Elektrochemiczna aktywacja innych pochodnych pirenu osadzonych na powierzchni MWCNT

W niniejszym rozdziale prezentowanej rozprawy doktorskiej przedstawiono możliwości elektrochemicznej aktywacji innych pochodnych pirenu na powierzchni wielościennych nanorurek węglowych. Elektrochemiczna aktywacja 1-hidroksypirenu (1-HP) i kwasu 1-pirenoboronowego (PBA) daje możliwość zastosowania wymienionych związków jako modyfikatorów elektrody, a w konsekwencji stwarza szansę na zastosowanie ich jako wydajnych elektrokatalizatorów redoks. Postanowiono zatem wykonać wstępne elektroaktywacje pochodnych pirenu (1-HP i PBA) na powierzchni MWCNT, które mogą zostać dalej rozwinięte i wykorzystane w innych pracach naukowych.

2.3.1. Elektroaktywacja 1-hidroksypirenu (1-HP)

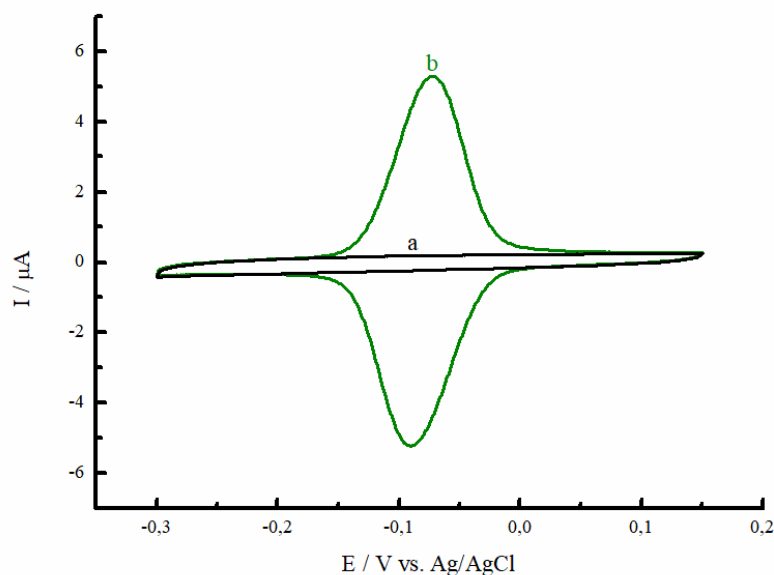
W literaturze nie brakuje doniesień wskazujących na oznaczanie 1-hidroksypirenu (1-HP) przy użyciu elektrod modyfikowanych [241–243]. Jednakże interesującym zagadnieniem jest możliwość aktywacji tej cząsteczki na powierzchni materiału węglowego (MWCNT). W tym celu zaadsorbowano 1-HP na powierzchni MWCNT, a następnie wykonano testy techniką woltamperometrii cyklicznej w elektrolicie kwaśnym (0,1 M HClO₄) w zakresie potencjałów od 0,0 do +0,8 V vs. Ag/AgCl. Wyniki tej analizy przedstawiono na Rys. 66.



Rys. 66. Elektrochemiczna aktywacja elektrody modyfikowanej GC/MWCNT/1-HP w 0,1 M HClO₄; a - czarna linia (pierwszy skan) i b - zielona linia (drugi skan). Szybkość przesuwu potencjału wynosi 50 mV s⁻¹.

Zgodnie z przewidywaniami kształt woltamperogramów jest podobny jak w przypadku CV obserwowanych dla tworzenia elektroaktywnej formy GC/MWCNT/1-APox. W pierwszym skanie można zaobserwować wyraźnie zdefiniowany, nieodwracalny pik w zakresie prądów anodowych przy potencjale około +0,65 V vs. Ag/AgCl. Po odwróceniu kierunku polaryzacji widoczny jest katodowy pik przy niższym potencjale około +0,3 V. W kolejnym skanie pojawia się anodowy pik przy potencjale około +0,31 V, a także zanika wcześniejszy pik utlenienia (przy potencjale +0,65 V). Uzyskane w ramach tego eksperymentu wyniki sugerują, że nastąpiła restrukturyzacja materiału elektrodowego GC/MWCNT/1-HP. W związku z tym uważa się, że podczas skanowania techniką woltamperometrii cyklicznej doszło do powstania nowych, elektroaktywnych form redoks na powierzchni elektrody modyfikowanej. Kształt krzywych świadczy o zajściu charakterystycznego procesu *ECE* (elektrochemiczno-chemiczno-elektrochemiczny), który postulowano już przy wcześniej przedstawionych aktywacjach w pracy doktorskiej. Uważa się zatem, że powstały na powierzchni addukt będzie cechowała odwracalna elektroaktywność [175,179]. Elektrochemicznie aktywowaną elektrodę oznaczono jako GC/MWCNT/1-HPox.

Po wytworzeniu elektroaktywnej formy na powierzchni elektrody modyfikowanej GC/MWCNT/1-HP (co pokazano na Rys. 66), elektrodę przepłukano wodą destylowaną i przeniesiono do elektrolitu obojętnego (PBS, pH 7,4). Rys. 67 przedstawia woltamperogramy zarejestrowane w zakresie od $-0,3$ do $+0,15$ V vs. Ag/AgCl (szybkość przesuwu potencjału 10 mV s^{-1}) dla elektrody GC/MWCNT/1-HPox.

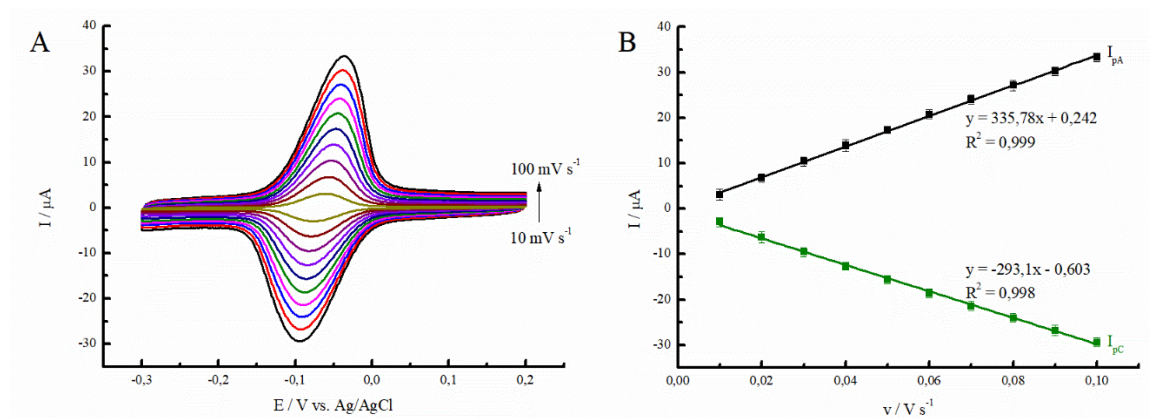


Rys. 67. Porównanie krzywych woltamperometrycznych dla elektrod GC/MWCNT (a, czarna linia) oraz GC/MWCNT/1-HPox (b, zielona linia) zarejestrowanych w PBS (pH 7,4). Szybkość przesuwu potencjału 10 mV s^{-1} .

Na podstawie krzywych woltamperometrycznych zarejestrowanych dla elektrody GC/MWCNT/1-HPox (b, zielona krzywa) można zaobserwować dobrze zdefiniowaną, odwracalną parę pików redoks przy potencjale około $-0,08$ V vs. Ag/AgCl. Uważa się, że piki te są związane z odwracalnym przejściem pomiędzy utlenioną, a zredukowaną formą mediatora redoks na powierzchni elektrody (chinon/hydrochinon). Ponadto warto zwrócić uwagę na szczególnie niską separację pomiędzy prądami pików (poniżej 10 mV), co sugeruje bardzo dobrą kinetykę transferu elektronów i stwarza dalsze możliwości zastosowania takiej modyfikacji w elektrokatalizie.

Postanowiono również przeprowadzić eksperymenty przy różnych szybkościach przesuwu potencjału (10 - 100 mV s^{-1}) w elektrolicie obojętnym (PBS, pH 7,4), zarejestrowane dla utlenionej formy elektrody modyfikowanej GC/MWCNT/1-HPox.

Krzywe woltamperometryczne w zakresie potencjałów od $-0,3$ do $+0,2$ V vs. Ag/AgCl zestawiono na Rys. 68A.

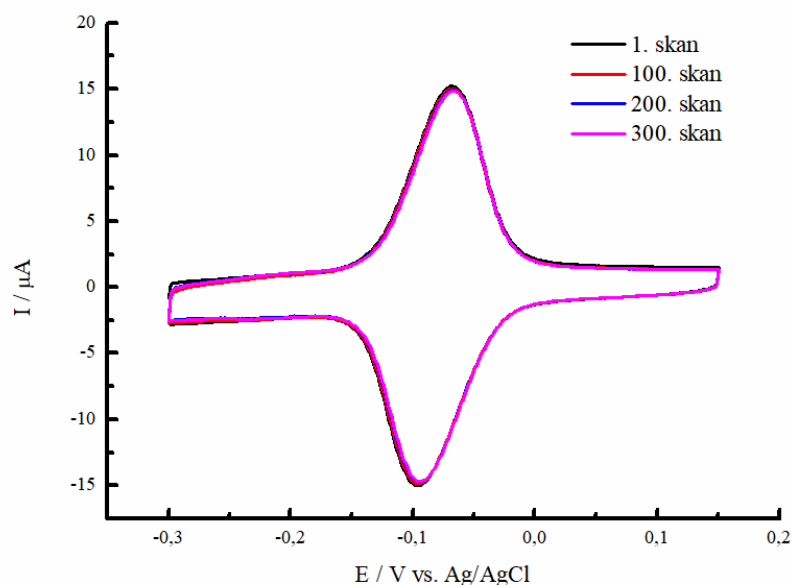


Rys. 68. (A) Wykresy woltamperometrii cyklicznej dla elektrody GC/MWCNT/1-HPox przy różnych szybkościach przesuwu potencjału (od 10 do 100 mV s⁻¹) zarejestrowane w PBS (pH 7,4). (B) Zależność szybkości przesuwu potencjału od anodowego i katodowego prądu pików.

Na podstawie Rys. 68A można zauważyć, że wraz ze wzrostem szybkości przesuwu potencjału prądy pików anodowych i katodowych zwiększają się na woltamperogramie. Na tej podstawie wykreślone zostały liniowe zależności pomiędzy prądami pików (I_{pA} i I_{pC}), a szybkością przesuwu potencjału (ν), co zestawiono na Rys. 68B. Odpowiednio, dla prądów pików anodowych: $y = 335,78x + 0,242$, $R^2 = 0,999$ oraz dla prądów pików katodowych: $y = -293,1x - 0,603$, $R^2 = 0,998$). Zakłada się zatem, że transfer ładunku pomiędzy cząsteczkami, a powierzchnią elektrody modyfikowanej jest kontrolowany przez zjawiska powierzchniowe. Tak jak postulowano również wcześniej, uważa się, że grupa aromatyczna pochodząca od 1-HP łączy się ze ścianami bocznymi nanorurek węglowych w wyniku oddziaływań π - π , co daje duże możliwości wiązania w sposób niekowalencyjny, a w konsekwencji dalsze możliwości modyfikacji powierzchni elektrody [182].

Zauważono również, że pik pochodzący od utlenienia 1-hydroksypirenu charakteryzuje się stabilnością na bardzo wysokim poziomie. Aby to potwierdzić wykonano 300 cykli techniką woltamperometrii cyklicznej dla elektrody

GC/MWCNT/1-HPox w PBS (pH 7,4) i obserwowano spadek sygnału prądów anodowych i katodowych, co pokazano na Rys. 69.



Rys. 69. *Stabilność elektrody GC/MWCNT/1-HPox. Krzywe woltamperometryczne zarejestrowano w buforze fosforanowym (PBS, pH 7,4), w zakresie potencjałów od $-0,3$ do $+0,2$ V vs. Ag/AgCl. Szybkość przesuwu potencjału wynosi 50 mV s^{-1} .*

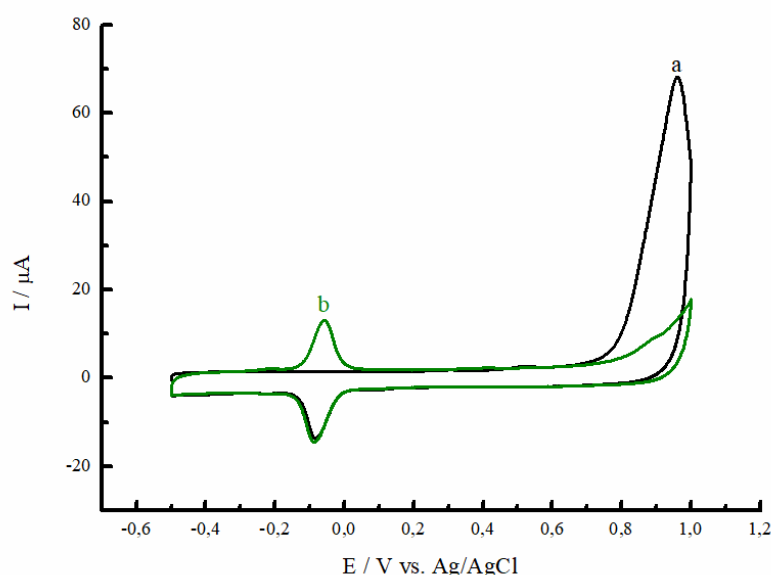
Można zatem zauważyć, że po wykonaniu trzystu cykli woltamperometrycznych prądy pików pochodzących od utlenienia i redukcji 1-HP na powierzchni elektrody modyfikowanej GC/MWCNT/1-HPox niemalże nie zmieniły swoich wartości. Wraz z ilością wykonanych skanów nie zmieniły się również potencjały pików. Otrzymane wyniki świadczą o bardzo wysokiej stabilności elektrody modyfikowanej.

Zarówno możliwość elektrochemicznej aktywacji, obecność dobrze zdefiniowanej pary redoks w elektrolicie obojętnym, a także bardzo dobry transfer elektronów i doskonała stabilność, sprawiają, że elektroda modyfikowana GC/MWCNT/1-HPox stwarza ogromne możliwości zastosowania jej jako wydajnego modyfikatora elektrody i następnie elektrokatalizatora redoks. Ponadto materiał elektrodowy zawierający wielościenne nanorurki węglowe i utlenioną formę 1-hydroksypirenu może być wykorzystany do konstrukcji amperometrycznych sensorów czy biosensorów. Jednocześnie uważam, że kontynuacja badań naukowych w tym

obszarze wydaje się mieć duży potencjał i zdecydowanie zasługuje na rozwinięcie w przyszłości.

2.3.2. Elektrochemiczne utlenienie kwasu 1-pirenoboronowego (PBA)

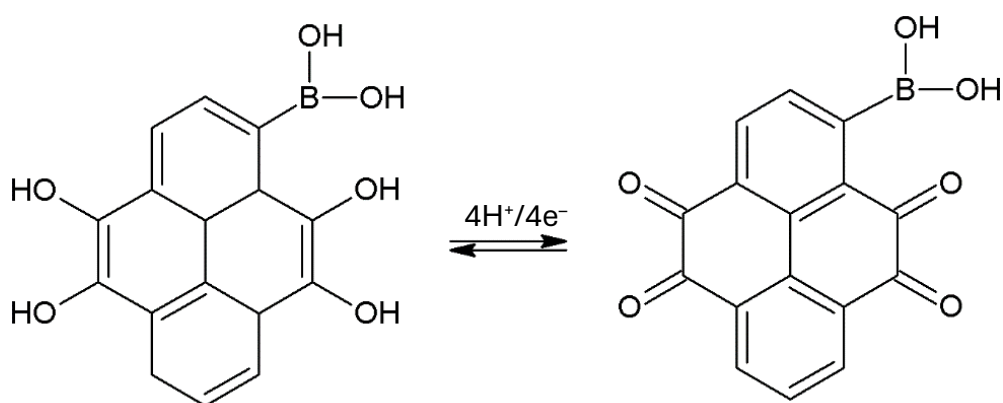
Wśród licznych publikacji naukowych niewiele poświęconych jest modyfikacji materiałów węglowych funkcjonalizowanych kwasem 1-pirenoboronowym (PBA). Wśród materiałów węglowych warto zwrócić uwagę na wykorzystanie grafenu i grafenu o strukturze piankowej (ang. *graphene foam*) [244,245]. Brakuje jednak doniesień o możliwości modyfikacji elektrody za pomocą MWCNT, a następnie PBA i dalszej elektroaktywacji powstałego materiału elektrodowego. W związku z tym postanowiono wykonać również adsorpcję PBA na powierzchni MWCNT. Następnie wykonano elektrochemiczną aktywację elektrody poprzez skanowanie w elektrolicie obojętnym (PBS, pH 7,4), w zakresie potencjałów od $-0,5$ do $+1,0$ V vs. Ag/AgCl, wykorzystując w tym celu technikę woltamperometrii cyklicznej. Wyniki elektrochemicznego utlenienia PBA na powierzchni nanorurek węglowych zaprezentowano na Rys. 70.



Rys. 70. Elektroaktywacja elektrody modyfikowanej GC/MWCNT/PBA, w zakresie potencjałów od $-0,5$ do $+1,0$ V vs. Ag/AgCl, w elektrolicie obojętnym (PBS, pH 7,4);
a - czarna linia (pierwszy skan), b - zielona linia (drugi skan).

Szybkość przesuwu potencjału 50 mV s^{-1} .

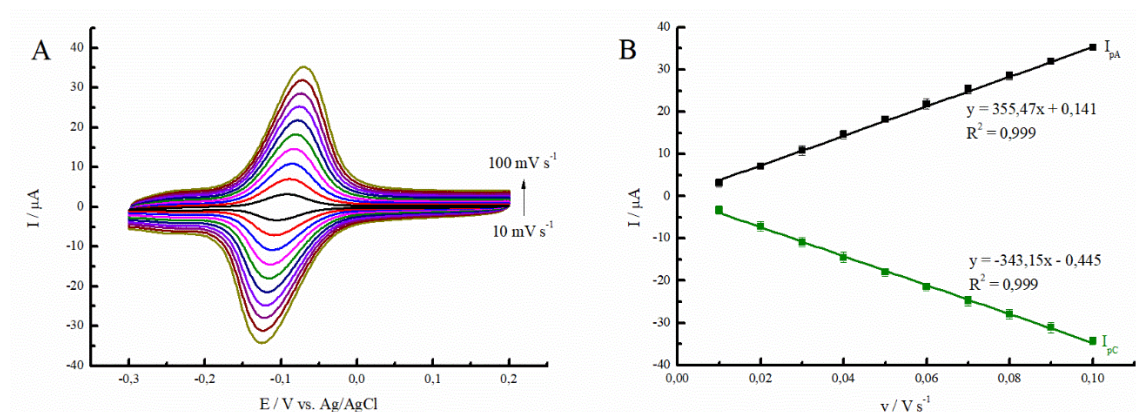
W tym przypadku również widoczny jest charakterystyczny kształt woltamperogramów, który był już obserwowany niejednokrotnie w poprzednich częściach niniejszej rozprawy doktorskiej (podczas elektroaktywacji 1-AP czy 1-HP). Pierwszy skan (krzywa a, czarna linia) uwidacznia powstanie nieodwracalnego, dobrze zdefiniowanego anodowego piku utlenienia przy potencjale około +0,96 V vs. Ag/AgCl. Następnie po odwróceniu kierunku polaryzacji elektrody obserwuje się pik w zakresie prądów katodowych przy potencjale –0,09 V vs. Ag/AgCl. Kolejny skan powoduje wytworzenie piku utlenienia przy potencjale –0,06 V oraz zanik wcześniej powstałego anodowego piku (przy potencjale +0,96 V). Również w przypadku elektroutleniania PBA na elektrodzie GC/MWCNT można sugerować, że nastąpiła restrukturyzacja materiału elektrodowego. Podobnie jak dla elektrod modyfikowanych GC/MWCNT/1-AP i GC/MWCNT/1-HP dochodzi do powstania nowych, elektroaktywnych form na powierzchni. Ponadto kształt krzywych także postuluje zajście procesu ECE [175,179]. W związku z tym powstały addukt powinna cechować odwracalna elektroaktywność, a elektrodę aktywowaną w opisany sposób oznaczono jako GC/MWCNT/PBAox. Na poniższym rysunku (Rys. 71) przedstawiono potencjalną strukturę PBAox.



Rys. 71. Schematyczne przedstawienie struktury kwasu 1-pirenoboronowego po aktywacji w wyżej opisanych warunkach uwzględniające przejście redoks PBAox z udziałem ugrupowań chinonowych/hydrochinonowych.

Następnie wykonano analizę techniką CV przy różnych szybkościach przesuwu potencjału (10-100 mV s⁻¹) w elektrolicie obojętnym (PBS, pH 7,4). Krzywe

woltamperometryczne zarejestrowane dla elektrody GC/MWCNT/PBAox w zakresie potencjałów od $-0,3$ do $+0,2$ V vs. Ag/AgCl zestawiono na Rys. 72A.

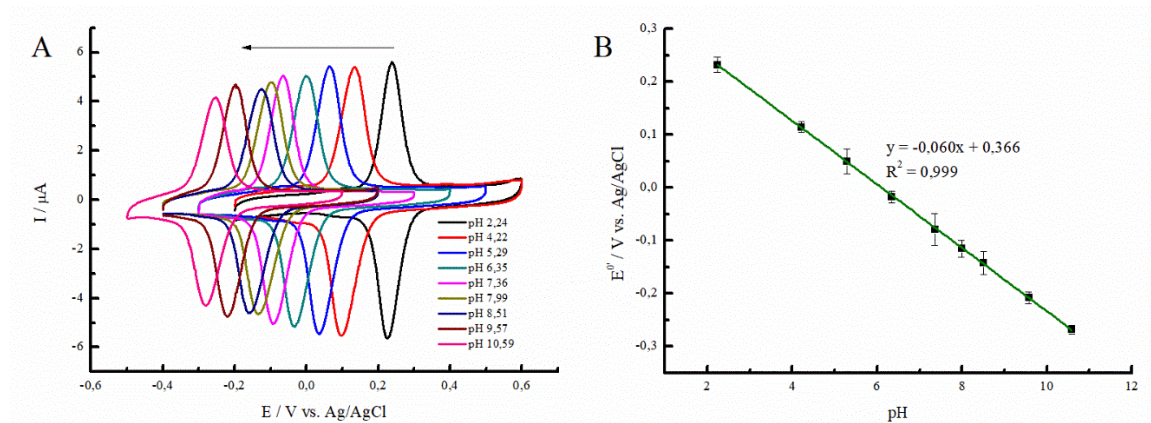


Rys. 72. (A) Krzywe woltamperometryczne dla elektrody GC/MWCNT/PBAox przy różnych szybkościach przesuwu potencjału ($10\text{--}100\text{ mV s}^{-1}$) zarejestrowane w PBS (pH 7,4) oraz (B) Zależność szybkości przesuwu potencjału od prądu pików.

Na podstawie krzywych przedstawionych na Rys. 72A można zauważyć dobrze zdefiniowaną, odwracalną parę pików redoks przy potencjale około $-0,1$ V vs. Ag/AgCl. Dodatkowo warto zwrócić uwagę, że wraz ze wzrostem szybkości przesuwu potencjału prądy pików wspomnianej pary redoks również się zwiększają. Wykreślone zostały zatem liniowe zależności pomiędzy prądami pików anodowych i katodowych (I_{pa} i I_{pc}), a szybkością zastosowanego przesuwu potencjału (v). Krzywe te zaprezentowano na Rys. 72B. W przypadku prądów pików anodowych otrzymano zależność: $y = 355,47x + 0,141$, $R^2 = 0,999$ oraz dla prądów pików katodowych: $y = -343,15x - 0,445$, $R^2 = 0,999$. W związku z powyższym można zatem przypuszczać, że transfer ładunku pomiędzy cząsteczkami, a powierzchnią elektrody modyfikowanej jest determinowany przez zjawiska powierzchniowe. Grupa aromatyczna kwasu 1-pirenoboronowego i ściany boczne MWCNT łączą się w wyniku oddziaływań typu $\pi\text{--}\pi$ (ten mechanizm również postulowano podczas wcześniej opisanych modyfikacji).

Założono także, że położenie pików redoks będzie zależeć od pH. W celu potwierdzenia tego założenia wykonano badania techniką woltamperometrii cyklicznej w roztworach o różnych pH (do przygotowania roztworów o różnym pH wykorzystano bufor Brittona-Robinsona). Krzywe woltamperometryczne zarejestrowane dla elektrody

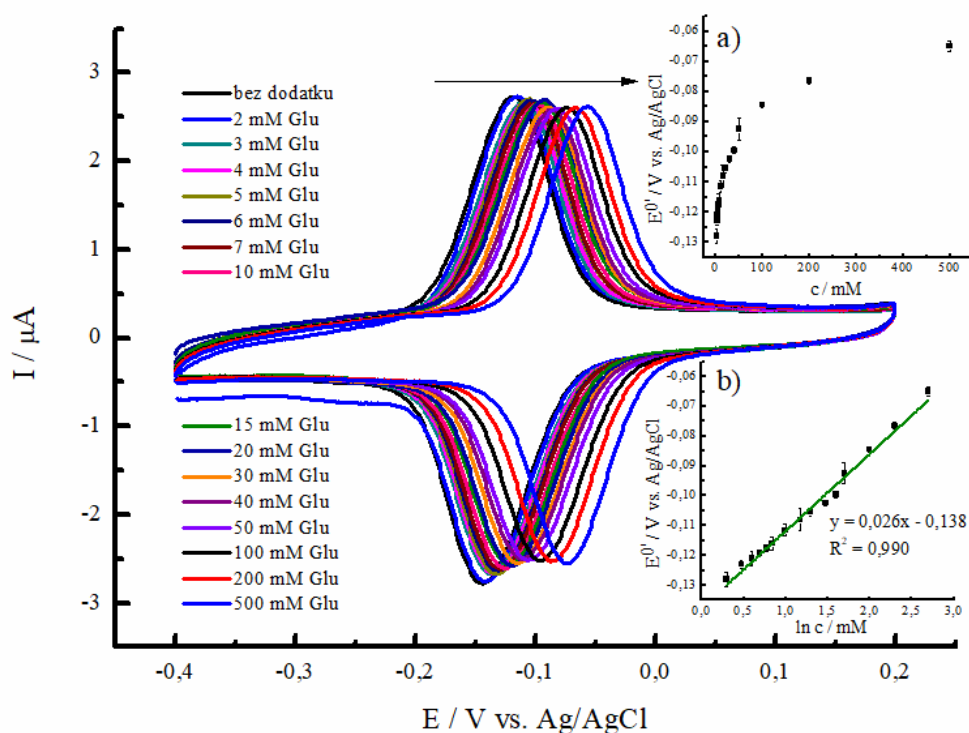
GC/MWCNT/PBAox w elektrolitach o różnym pH (od 2,24 do 10,59) przedstawiono na Rys. 73A.



Rys. 73. (A) Woltamperogramy cykliczne elektrody modyfikowanej GC/MWCNT/PBAox zarejestrowane w buforach Brittona-Robinsona o różnych pH (2,24-10,59). Szybkość przesuwu potencjału 50 mV s^{-1} , także (B) Wykres ilustrujący zależność $E^{0'}$ od pH.

Można zatem zaobserwować, że wraz ze wzrostem pH piki prądów anodowych i katodowych przesuwają się w kierunku ujemnych wartości potencjałów. Zależność pomiędzy $E^{0'}$ i pH charakteryzuje się liniowością w całym zakresie ($y = -0,060x + 0,366$, $R^2 = 0,999$), co przedstawiono na Rys. 73B. Nachylenie krzywej wynoszące -60 mV pH^{-1} jest zgodne z przewidywaną wartością Nernsta dla procesów proton/elektron. Na podstawie przedstawionych danych można więc stwierdzić, że elektroda GC/MWCNT/PBAox charakteryzuje się dobrą kinetyką transferu elektronów, a to z kolei stwarza jej liczne możliwości aplikacyjne w elektroanalizie.

Zaobserwowano również, że położenie pików redoks (w buforze o pH 8,51) zmienia się po dodaniu glukozy. Wykonano zatem analizy techniką woltamperometrii cyklicznej dla elektrody GC/MWCNT/PBAox w buforze B-R o pH 8,51 rejestrując krzywe po kolejnych dodatkach glukozy. Wyniki tych eksperymentów wraz z odpowiadającymi krzywymi zależności stężenia od położenia pików zaprezentowano na Rys. 74.

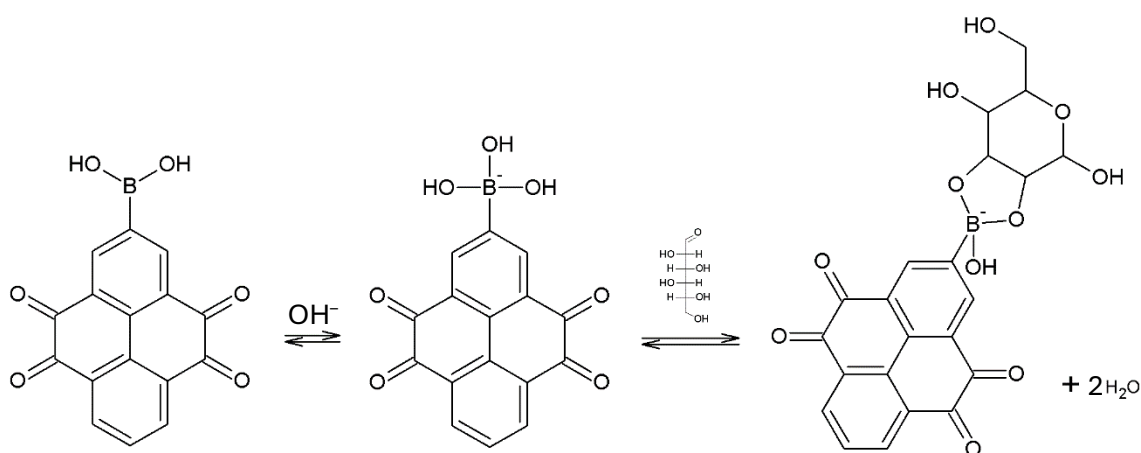


Rys. 74. Krzywe voltamperometryczne dla elektrody modyfikowanej GC/MWCNT/PBAox w buforze Brittona-Robinsona o pH 8,51 rejestrowane po dodaniu kolejnych porcji analitu. Szybkość przesuwu potencjału 50 mV s^{-1} . Wstawka a) pokazuje wykres zależności $E^{0'}$ od stężenia Glu, natomiast b) to liniowa zależność pomiędzy $E^{0'}$, a logarytmem ze stężenia analitu.

Przedstawione voltamperogramy charakteryzują się dobrze zdefiniowanymi, odwracalnymi pikami redoks związanymi z utlenieniem kwasu 1-pirenoboronowego (PBA) na powierzchni elektrody GC zawierającej wielościenne nanorurki węglowe (MWCNT). Po dodaniu kolejnych porcji glukozy obserwuje się przesunięcie pary pików redoks w kierunku dodatnich wartości potencjałów. Obserwowany zakres jest relatywnie szeroki (od 2 do 500 mM dodanej Glu). Wstawka a) na wykresie ukazuje zależność pomiędzy $E^{0'}$ i stężeniem analitu, natomiast wstawka b) ukazuje liniową zależność pomiędzy $E^{0'}$ i logarytmem ze stężenia glukozy ($y = 0,026x - 0,138$, $R^2 = 0,990$). Odpowiedź ta sugeruje, że może to być czujnik potencjometryczny glukozy.

Kwas 1-pirenoboronowy, podobnie jak szereg innych związków aromatycznych zawierających grupę boranową, w środowisku kwaśnym i obojętnym występuje głównie jako cząsteczka obojętna o trygonalnej geometrii (sp^2) z deficytem elektronowym umożliwiającym działanie jako kwas Lewisa. W pH zbliżonym lub wyższym niż jego

pK_a (pK_a najczęściej mieszczą się w zakresie $\sim 8,0 - 9,0$) zachodzi reakcja pomiędzy formą obojętną (akceptorem pary elektronowej) a jonami OH^- (zasada, donor pary elektronowej), czemu towarzyszy zmiana geometrii grupy boranowej z planarnej na tetraedryczną (sp^3). Tetraedryczna forma anionowa, której udział powinien być znaczący w zastosowanym $pH = 8,51$, charakteryzuje się zwiększonym powinowactwem do struktur cis-diolowych glukozy, co prowadzi do powstania stabilnych kompleksów boronianowych w wyniku odwracalnej reakcji estryfikacji (grupa boranowa reaguje z grupami hydroksylowymi glukozy) [246,247]. Schematyczne przedstawienie tego procesu zaprezentowano na Rys. 75.



Rys. 75. Konfiguracje utlenionej formy kwasu 1-pirenoboronowego (PBAox) w środowisku wodnym (w obecności jonów OH^-), a także struktura kompleksu powstała w wyniku reakcji estryfikacji pomiędzy cząsteczką PBAox, a glukozą, na podstawie [248,249].

Proces estryfikacji nie jest związany ze zmianą pH , dlatego też obserwowane przesunięcia pików w stronę dodatnią wynikać mogą najprawdopodobniej ze zmiany struktury elektronowej układu, gdy dochodzi do przyłączenia glukozy. Podczas przekształcenia trygonalnej formy kwasu 1-pirenoboronowego w kompleks boronianowy z udziałem ugrupowań cis-diolowych glukozy można spodziewać się zmian zarówno we właściwościach indukcyjnych, jak i rezonansowych ugrupowań boranowych, co objawia się zmianą potencjału pobliskich grup chinonowych [250].

Opisane zjawisko stanowi kluczowy mechanizm determinujący czułość układów zbudowanych w oparciu o PBA względem glukozy, dzięki czemu możliwe staje się ich

wykorzystanie do konstrukcji sensorów czy zaawansowanych systemów kontrolowanego uwalniania insuliny [251]. Uważam, że kontynuowanie tego tematu przyniesie satysfakcjonujące wyniki w dziedzinie, zarówno elektrod modyfikowanych na bazie pochodnych pirenu, jak również układów pomiarowych do mierzenia glukozy.

3. Wnioski

Elektrochemiczne utlenianie pochodnej pirenu - 1-aminopirenu na elektrodzie GC/MWCNT umożliwiło wytworzenie elektroaktywnego adduktu na powierzchni (1-aminopireno-4,5,9,10-tetrolu). Produkt ten dodatkowo charakteryzował się odwracalnym przejściem redoks pomiędzy chinonem/hydrochinonem. Struktura związku została potwierdzona dzięki analizie fizykochemicznej - MS. Innymi technikami, jak XPS czy FT-IR, potwierdzono przyłączenie grup hydroksylowych do cząsteczki 1-AP. Ponadto technikami obrazowania (TEM i AFM) również potwierdzono adsorpcję pochodnej WWA na powierzchni nanomateriału węglowego. Odwracalne i dobrze zdefiniowane piki redoks pozwoliły na określenie efektu elektrokatalitycznego w kierunku utlenienia NADH. Udowodniono zatem, że analit może być efektywnie utleniany przy relatywnie niskim potencjale (+0,1 V vs. Ag/AgCl) na powierzchni elektrody GC/MWCNT/1-APox. Dodatkowo sensor charakteryzował się parametrami analitycznymi w zakresie umiarkowanym (LOD równe 0,08 μM , LOQ wynoszące 0,23 μM , czy zakres liniowej odpowiedzi oznaczania NADH od 1 do 110 μM). Na podstawie przedstawionych w niniejszej pracy rozważań wnioskuję, że łatwa procedura syntezy i bardzo dobry transfer elektronów na powierzchni prezentowanej elektrody sprawia, że stanowi ona obiecującą perspektywę w dalszym rozwoju sensorów NADH. Przedstawione badania mogą także przyczynić się do postępu w zakresie enzymatycznych biosensorów opartych na utlenionej pochodnej 1-aminopirenu.

Elektrochemiczne osadzenie katecholu (Cat) i jego pochodnej (3-MCat) na powierzchni elektrody modyfikowanej GC/MWCNT/1-AP pozwoliło na otrzymanie elektroaktywnych produktów charakteryzujących się odwracalnym przejściem chinon/hydrochinon. Analiza fizykochemiczna FT-IR pozwoliła potwierdzić obecność grup hydroksylowych, co z kolei wskazuje na przyłączenie modyfikatorów do układu. Wykazano również, że na powierzchni prezentowanych materiałów możliwe jest skuteczne utlenienie NADH przy relatywnie niskim potencjale (+0,1 V vs. Ag/AgCl). Elektrody GC/MWCNT/1-AP/3-MCat i GC/MWCNT/1-AP/Cat wykazywały zatem doskonałą aktywność elektrokatalityczną w kierunku utlenienia NADH. Dodatkowo warto zwrócić uwagę, że niski potencjał oznaczania NADH minimalizuje wpływ substancji interferujących na działanie sensora, co zwiększa jego selektywność. Główną

zaletą skonstruowanych w ramach pracy sensorów jest prosty sposób syntezy, jak również bardzo dobre właściwości związane ze zdolnością przenoszenia elektronów. Udana immobilizacja dehydrogenazy glukozy (GDH) z *Pseudomonas sp* na powierzchni elektrod modyfikowanych, umożliwiła również oznaczenie glukozy w relatywnie szerokim zakresie stężeń przy użyciu dwóch technik amperometrycznych. Dzięki temu otrzymany materiał posiada potencjał zastosowania w biosensorach monitorujących poziom glukozy w produktach przemysłu spożywczego czy diagnostyce klinicznej. Biosensor charakteryzuje się również zwiększoną czułością i stabilnością w trakcie długotrwałych pomiarów w porównaniu z dostępnymi urządzeniami służącymi detekcji Glu. Uważam, że materiały elektrodowe zawierające wielościenne nanorurki węglowe, 1-aminopiren oraz katechol i jego pochodną stanowią obiecującą platformę do konstrukcji zarówno sensorów NADH, jak i biosensorów glukozy.

Elektrochemiczna aktywacja 1-hydroksypirenu (1-HP) i kwasu 1-pirenoboronowego (PBA) pozwala na otrzymanie nowych elektroaktywnych form redoks na powierzchni elektrod modyfikowanych, odpowiednio GC/MWCNT/1-HPox i GC/MWCNT/PBAox. Elektrody te cechuje dobra kinetyka transferu elektronów, a w związku z tym mogą stanowić potencjalne zastosowanie w elektroanalizie. Zaprezentowane wyniki pozwalają wnioskować, że jest to kierunek warty rozwoju i kontynuowania w przyszłości. Otrzymane wstępne rezultaty badań stwarzają możliwość rozwoju elektrod modyfikowanych na bazie pochodnych pirenu i ich elektroaktywacji, jak również dają szansę na postęp w zakresie nieenzymatycznych sensorów, a także układów pomiarowych służących do mierzenia glukozy.

W niniejszej pracy doktorskiej przedstawiono dwa oryginalne sposoby modyfikacji powierzchni elektrod przy użyciu wielościennych nanorurek węglowych (MWCNT) i 1-aminopirenu (1-AP). Pierwsze podejście opierało się na elektrochemicznym utlenianiu pochodnej pirenu, natomiast drugie polegało na podstawieniu pierścienia aromatycznego grupami katecholu i 3-metoksykatecholu. Obie koncepcje umożliwiły utworzenie warstw aktywnych redoks związanych z powierzchnią, z których każda charakteryzowała się odwracalnym przejściem chinon/hydrochinon. Co istotne, modyfikacje te stanowiły inicjujący czynnik do oceny procesów elektrokatalitycznych NADH.

V. BIBLIOGRAFIA

- [1] Liu, D., Wang, J., Wu, L., Huang, Y., Zhang, Y., Zhu, M., Wang, Y., Zhu, Z., & Yang, C. (2020). Trends in miniaturized biosensors for point-of-care testing. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 122, 115701. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115701>
- [2] Hulanicki, A., Glab, S., & Ingman, F. (1991). Chemical sensors: Definitions and classification. *Pure and Applied Chemistry*, 63(9), 1247–1250. <https://doi.org/10.1351/pac199163091247>
- [3] Mollarasouli, F., Zor, E., Ozcelikay, G., & Ozkan, S. A. (2021). Magnetic nanoparticles in developing electrochemical sensors for pharmaceutical and biomedical applications. *Talanta*, 226, 122108. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122108>
- [4] Singh, R., Gupta, R., Bansal, D., Bhateria, R., & Sharma, M. (2024). A review on recent trends and future developments in electrochemical sensing. *ACS Omega*, 9(7), 7336–7356. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c08060>
- [5] Banks, C. E., Killard, T., & Venton, B. J. (2019). Introduction to electrochemistry for health applications. *Analytical Methods*, 11(21), 2736–2737. <https://doi.org/10.1039/c9ay90069a>
- [6] Quesada-González, D., & Merkoçi, A. (2018). Nanomaterial-based devices for point-of-care diagnostic applications. *Chemical Society Reviews*, 47(13), 4697–4709. <https://doi.org/10.1039/c7cs00837f>
- [7] Bakker, E., & Qin, Y. (2006). Electrochemical sensors. *Analytical Chemistry*, 78(12), 3965–3984. <https://doi.org/10.1021/ac060637m>
- [8] Baranwal, J., Barse, B., Gatto, G., Broncova, G., & Kumar, A. (2022). Electrochemical sensors and their applications: A review. *Chemosensors*, 10(9), 363. <https://doi.org/10.3390/chemosensors10090363>
- [9] Jadoun, S., Arif, R., Jangid, N. K., & Meena, R. K. (2020). Green synthesis of nanoparticles using plant extracts: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 19, 355–374. <https://doi.org/10.1007/s10311-020-01074-x>

- [10] Li, L., Liu, X., Su, B., Zhang, H., Li, R., Liu, Z., Chen, Q., Huang, T., & Cao, H. (2022). An innovative electrochemical immunosensor based on nanobody heptamer and AuNPs@ZIF-8 nanocomposites as support for the detection of alpha fetoprotein in serum. *Microchemical Journal*, 179, 107463. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107463>
- [11] Munonde, T. S., & Nomngongo, P. N. (2020). Nanocomposites for electrochemical sensors and their applications on the detection of trace metals in environmental water samples. *Sensors*, 21(1), 131. <https://doi.org/10.3390/s21010131>
- [12] Alves, T., Deroco, P., Wachholz Junior, D., Vidotto, L., & Kubota, L. (2021). Wireless wearable electrochemical sensors: A review. *Brazilian Journal of Analytical Chemistry*, 8(31), 22–50. <https://doi.org/10.30744/brjac.2179-3425.rv-62-2020>
- [13] Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N., & Estrela, P. (2016). Introduction to biosensors. *Essays in Biochemistry*, 60(1), 1–8. <https://doi.org/10.1042/ebc20150001>
- [14] Dincer, C., Bruch, R., Costa-Rama, E., Fernández-Abedul, M. T., Merkoçi, A., Manz, A., Urban, G. A., & Güder, F. (2019). Disposable sensors in diagnostics, food, and environmental monitoring. *Advanced Materials*, 31(10), 1806739. <https://doi.org/10.1002/adma.201806739>
- [15] Kłos-Witkowska, A. (2017). Microbiological biosensors based on luminescence. *Pomiary Automatyka Robotyka*, 21(2), 79–84. https://doi.org/10.14313/par_224/79
- [16] Rocchitta, G., Spanu, A., Babudieri, S., Latte, G., Madeddu, G., Galleri, G., Nuvoli, S., Bagella, P., Demartis, M., Fiore, V., Manetti, R., & Serra, P. (2016). Enzyme biosensors for biomedical applications: Strategies for safeguarding analytical performances in biological fluids. *Sensors*, 16(6), 780. <https://doi.org/10.3390/s16060780>
- [17] Dzyadevych, S. V., Arkhypova, V. N., Soldatkin, A. P., El'skaya, A. V., Martelet, C., & Jaffrezic-Renault, N. (2008). Amperometric enzyme biosensors: Past, present and future. *IRBM*, 29(2-3), 171–180. <https://doi.org/10.1016/j.rbmret.2007.11.007>
- [18] Harper, A., & Anderson, M. R. (2010). Electrochemical glucose sensors—developments using electrostatic assembly and carbon nanotubes for biosensor construction. *Sensors*, 10(9), 8248–8274. <https://doi.org/10.3390/s100908248>

- [19] Fernández, H., Arévalo, F. J., Granero, A. M., Robledo, S. N., Nieto, C. H. D., Riberi, W. I., & Zon, M. A. (2017). Electrochemical biosensors for the determination of toxic substances related to food safety developed in South America: Mycotoxins and herbicides. *Chemosensors*, 5(3), 23. <https://doi.org/10.3390/chemosensors5030023>
- [20] Wang, J. (2008). Electrochemical glucose biosensors. *Chemical Reviews*, 108(2), 814–825. <https://doi.org/10.1021/cr068123a>
- [21] Devasenathipathy, R., Mani, V., Chen, S.-M., Huang, S.-T., Huang, T.-T., Lin, C.-M., Hwa, K.-Y., Chen, T.-Y., & Chen, B.-J. (2015). Glucose biosensor based on glucose oxidase immobilized at gold nanoparticles decorated graphene-carbon nanotubes. *Enzyme and Microbial Technology*, 78, 40–45. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.06.006>
- [22] Soldatkin, O., Nazarova, A., Krisanova, N., Borysov, A., Kucherenko, D., Kucherenko, I., Pozdnyakova, N., Soldatkin, A., & Borisova, T. (2015). Monitoring of the velocity of high-affinity glutamate uptake by isolated brain nerve terminals using amperometric glutamate biosensor. *Talanta*, 135, 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.12.031>
- [23] Chinnadayyala, S. R., Santhosh, M., Singh, N. K., & Goswami, P. (2015). Alcohol oxidase protein mediated in-situ synthesized and stabilized gold nanoparticles for developing amperometric alcohol biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 69, 155–161. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.02.015>
- [24] Giménez-Gómez, P., Gutiérrez-Capitán, M., Capdevila, F., Puig-Pujol, A., Fernández-Sánchez, C., & Jiménez-Jorquera, C. (2016). Monitoring of malolactic fermentation in wine using an electrochemical bienzymatic biosensor for l-lactate with long term stability. *Analytica Chimica Acta*, 905, 126–133. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.11.032>
- [25] Liu, M., Wen, Y., Xu, J., He, H., Li, D., Yue, R., & Liu, G. (2011). An amperometric biosensor based on ascorbate oxidase immobilized in poly(3,4-ethylenedioxythiophene)/multi-walled carbon nanotubes composite films for the determination of l-ascorbic acid. *Analytical Sciences*, 27(5), 477. <https://doi.org/10.2116/analsci.27.477>

- [26] Lata, K., Dhull, V., & Hooda, V. (2016). Fabrication and optimization of ChE/ChO/HRP-AuNPs/c-MWCNTs based silver electrode for determining total cholesterol in serum. *Biochemistry Research International*, 2016, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2016/1545206>
- [27] Gonzalez-Rivera, J. C., & Osma, J. F. (2015). Fabrication of an amperometric flow-injection microfluidic biosensor based on laccase for in situ determination of phenolic compounds. *BioMed Research International*, 2015, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2015/845261>
- [28] Campanhã Vicentini, F., Garcia, L. L. C., Figueiredo-Filho, L. C. S., Janegitz, B. C., & Fatibello-Filho, O. (2016). A biosensor based on gold nanoparticles, dihexadecylphosphate, and tyrosinase for the determination of catechol in natural water. *Enzyme and Microbial Technology*, 84, 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.12.004>
- [29] Lee, C.-A., & Tsai, Y.-C. (2009). Preparation of multiwalled carbon nanotube-chitosan-alcohol dehydrogenase nanobiocomposite for amperometric detection of ethanol. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 138(2), 518–523. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2009.01.001>
- [30] Gómez-Anquela, C., García-Mendiola, T., Abad, J. M., Pita, M., Pariente, F., & Lorenzo, E. (2015). Scaffold electrodes based on thioctic acid-capped gold nanoparticles coordinated Alcohol Dehydrogenase and Azure A films for high performance biosensor. *Bioelectrochemistry*, 106, 335–342. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2015.06.009>
- [31] Kim, D.-M., Kim, M.-y., Reddy, S. S., Cho, J., Cho, C.-h., Jung, S., & Shim, Y.-B. (2013). Electron-Transfer mediator for a NAD-glucose dehydrogenase-based glucose sensor. *Analytical Chemistry*, 85(23), 11643–11649. <https://doi.org/10.1021/ac403217t>
- [32] Azzouzi, S., Rotariu, L., Benito, A. M., Maser, W. K., Ben Ali, M., & Bala, C. (2015). A novel amperometric biosensor based on gold nanoparticles anchored on reduced graphene oxide for sensitive detection of l-lactate tumor biomarker. *Biosensors and Bioelectronics*, 69, 280–286. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.03.012>

- [33] Liang, B., Zhang, S., Lang, Q., Song, J., Han, L., & Liu, A. (2015). Amperometric l-glutamate biosensor based on bacterial cell-surface displayed glutamate dehydrogenase. *Analytica Chimica Acta*, 884, 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.05.012>
- [34] Sun, D., Li, P., Liu, Q., Liu, T., Gu, M., & Wang, G.-L. (2020). Versatile enzymatic assays by switching on the fluorescence of gold nanoclusters. *Analytica Chimica Acta*, 1095, 219–225. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.10.035>
- [35] Jędrzak, A., Rębiś, T., Kłapiszewski, Ł., Zdarta, J., Milczarek, G., & Jesionowski, T. (2018). Carbon paste electrode based on functional GOx/silica-lignin system to prepare an amperometric glucose biosensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 256, 176–185. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.10.079>
- [36] Esokkiya, A., Sudalaimani, S., Sanjeev Kumar, K., Sampathkumar, P., Suresh, C., & Giribabu, K. (2021). Poly(methylene blue)-based electrochemical platform for label-free sensing of acrylamide. *ACS Omega*, 6(14), 9528–9536. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c06315>
- [37] Jiang, Y., Yang, Y., Shen, L., Ma, J., Ma, H., & Zhu, N. (2021). Recent advances of prussian blue-based wearable biosensors for healthcare. *Analytical Chemistry*, 94(1), 297–311. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c04420>
- [38] Thenmozhi, K., & Narayanan, S. S. (2017). Horseradish peroxidase and toluidine blue covalently immobilized leak-free sol-gel composite biosensor for hydrogen peroxide. *Materials Science and Engineering: C*, 70, 223–230. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.08.075>
- [39] Khorasanizadeh, M. H., Hajizadeh-Oghaz, M., Khoobi, A., Ganduh, S. H., Mahdi, M. A., Abdulsahib, W. K., Jasim, L. S., & Salavati-Niasari, M. (2022). Synthesis and characterization of HoVO₄/CuO nanocomposites for photodegradation of methyl violet. *International Journal of Hydrogen Energy*, 47(46), 20112–20128. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.04.136>
- [40] Hajizadeh, K., Tang, H. T., Halsall, H. B., & Heineman, W. R. (1991). Chemical cross-linking of a redox mediator thionin for electrocatalytic oxidation of reduced β -nicotinamide adenine dinucleotide. *Analytical Letters*, 24(8), 1453–1469. <https://doi.org/10.1080/00032719108052984>

- [41] Chaubey, A., & Malhotra, B. D. (2002). Mediated biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 17(6-7), 441–456. [https://doi.org/10.1016/s0956-5663\(01\)00313-x](https://doi.org/10.1016/s0956-5663(01)00313-x)
- [42] Sumitha, M. S., & Xavier, T. S. (2023). Recent advances in electrochemical biosensors – A brief review. *Hybrid Advances*, 2, 100023. <https://doi.org/10.1016/j.hybadv.2023.100023>
- [43] Eş, I., Vieira, J. D. G., & Amaral, A. C. (2015). Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(5), 2065–2082. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6390-y>
- [44] Maghraby, Y. R., El-Shabasy, R. M., Ibrahim, A. H., & Azzazy, H. M. E.-S. (2023). Enzyme immobilization technologies and industrial applications. *ACS Omega*, 8(6), 5184–5196. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c07560>
- [45] Sneha, H. P., Beulah, K. C., & Murthy, P. S. (2019). Enzyme immobilization methods and applications in the food industry. W “Enzymes in food biotechnology” (s. 645–658). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813280-7.00037-2>
- [46] Prabhakar, T., Giaretta, J., Zulli, R., Rath, R. J., Farajikhah, S., Talebian, S., & Dehghani, F. (2024). Covalent immobilization: A review from an enzyme perspective. *Chemical Engineering Journal*, 503, 158054. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2024.158054>
- [47] Gao, S., Wang, Y., Diao, X., Luo, G., & Dai, Y. (2010). Effect of pore diameter and cross-linking method on the immobilization efficiency of *Candida rugosa* lipase in SBA-15. *Bioresource Technology*, 101(11), 3830–3837. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.023>
- [48] Nguyen, H. H., & Kim, M. (2017). An overview of techniques in enzyme immobilization. *Applied Science and Convergence Technology*, 26(6), 157–163. <https://doi.org/10.5757/asct.2017.26.6.157>
- [49] Tan, W. Y., Gopinath, S. C. B., Anbu, P., Yaakub, A. R. W., Subramaniam, S., Chen, Y., & Sasidharan, S. (2023). Bio-Enzyme hybrid with nanomaterials: A potential cargo as sustainable biocatalyst. *Sustainability*, 15(9), 7511. <https://doi.org/10.3390/su15097511>

- [50] Apak, R., Üzer, A., Sağlam, Ş., & Arman, A. (2022). Selective electrochemical detection of explosives with nanomaterial based electrodes. *Electroanalysis*, 35(1), e202200175. <https://doi.org/10.1002/elan.202200175>
- [51] Mallakpour, S., & Behranvand, V. (2017). Recent progress and perspectives on biofunctionalized CNT hybrid polymer nanocomposites. W “Hybrid polymer composite materials” (s. 311–341). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100787-7.00013-5>
- [52] Pimpilova, M. (2024). A brief review on methods and materials for electrode modification: Electroanalytical applications towards biologically relevant compounds. *Discover Electrochemistry*, 1(12). <https://doi.org/10.1007/s44373-024-00012-8>
- [53] Edwards, G. A., Bergren, A. J., & Porter, M. D. (2007). Chemically modified electrodes. W “Handbook of electrochemistry” (s. 295–327). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-044451958-0.50021-5>
- [54] Chen, X., Cheng, X., & Gooding, J. J. (2012). Detection of trace nitroaromatic isomers using indium tin oxide electrodes modified using β -cyclodextrin and silver nanoparticles. *Analytical Chemistry*, 84(20), 8557–8563. <https://doi.org/10.1021/ac3014675>
- [55] Mondal, S. K., Prasad, K. R., & Munichandraiah, N. (2005). Analysis of electrochemical impedance of polyaniline films prepared by galvanostatic, potentiostatic and potentiodynamic methods. *Synthetic Metals*, 148(3), 275–286. <https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2004.10.010>
- [56] Adarakatti, P. S., & Kempahanumakkagari, S. K. (2018). Modified electrodes for sensing. W “Electrochemistry” (s. 58–95). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781788013895-00058>
- [57] Ziyatdinova, G., Guss, E., & Yakupova, E. (2021). Electrochemical sensors based on the electropolymerized natural phenolic antioxidants and their analytical application. *Sensors*, 21(24), 8385. <https://doi.org/10.3390/s21248385>
- [58] L. Brown, K. (2019). Electrochemical preparation and characterization of chemically modified electrodes. W „Voltammetry”. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.81752>

- [59] Jeuken, L. J. C. (2016). Structure and modification of electrode materials for protein electrochemistry. W "Biophotoelectrochemistry: From bioelectrochemistry to biophotovoltaics" (s. 43–73). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/10_2015_5011
- [60] Agrahari, R., Bayar, B., Abubackar, H. N., Giri, B. S., Rene, E. R., & Rani, R. (2022). Advances in the development of electrode materials for improving the reactor kinetics in microbial fuel cells. *Chemosphere*, 290, 133184. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133184>
- [61] Wang, J., Shan, X., Xue, Q., Liu, Y., Liu, Z., He, L., Wang, X., & Zhu, C. (2023). Detection of nitrite in water using Glycine-modified nanocarbon and Au nanoparticles co-modified flexible laser-induced graphene electrode. *Inorganic Chemistry Communications*, 152, 110652. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2023.110652>
- [62] Liu, Y., Wang, L., & Yang, L. (2021). A superior sensor for the electrochemical detection of Tryptophan in food samples using Ag-doped TiO₂ nanoparticles modified glassy carbon electrode. *International Journal of Electrochemical Science*, 16(5), 210534. <https://doi.org/10.20964/2021.05.50>
- [63] Tajik, S., Beitollahi, H., Jang, H. W., & Shokouhimehr, M. (2021). A screen printed electrode modified with Fe₃O₄@polypyrrole-Pt core-shell nanoparticles for electrochemical detection of 6-mercaptopurine and 6-thioguanine. *Talanta*, 232, 122379. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122379>
- [64] Lotfi, S., & Veisi, H. (2019). Pd nanoparticles decorated poly-methyl dopa@GO/Fe₃O₄ nanocomposite modified glassy carbon electrode as a new electrochemical sensor for simultaneous determination of acetaminophen and phenylephrine. *Materials Science and Engineering: C*, 105, 110112. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110112>
- [65] Madadi, M., Moghadam, M. R., Salarizadeh, P., Bazmandegan-Shamili, A., & Shahbakhsh, M. (2025). Sensitive electrochemical detection of dopamine using CuCo₂O₄/graphene quantum dots-modified carbon paste electrode. *Inorganic Chemistry Communications*, 171, 113566. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2024.113566>

- [66] Raoof, J. B., Darvishnejad, F., & Ghani, M. (2025). A sensitive electrochemical sensor based on polyoxometalates@carbon spheres-multi-walled carbon nanotubes- β -cyclodextrin composite modified carbon paste electrode for simultaneous determination of some phenolic compounds in environmental samples. *Microchemical Journal*, 208, 112548. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2024.112548>
- [67] Xu, K., Ma, L., Chen, Y., Li, Y., Abdalbagemohammedabdalsadeg, S., Moosavi-Movahedi, A. A., Yousefi, R., Hong, J., & Xiao, B. (2024). A biosensor based on MWCNTs-BSA and TiO₂-Laccase nanocomposite modified glassy carbon electrode for sensitive detection of luteolin in traditional Chinese Medicine. *Microchemical Journal*, 207, 112103. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2024.112103>
- [68] Wang, Y., Qiu, T., Wang, J., Feng, J., Zhao, S., Chen, H., Gong, L., Wang, Z., Zhang, Y., Yin, S., Zhu, Y., Deng, J., Chen, S., Tao, M., & Li, L. (2025). Hydrothermal synthesis of iron foam-supported Co₃O₄-based sensor electrodes for electrochemical detection of nitrite. *Materials Today Communications*, 43, 111656. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2025.111656>
- [69] Chakravorty, S., Archana, Lakshmi, G., Solanki, P. R., & Kumar, A. (2024). Trimethylamine N-oxide detection by electrochemical sensor based on screen printed electrode modified with molecularly imprinted polypyrrole-molybdenum(III) sulfide nanosheets. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 244, 114164. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2024.114164>
- [70] Esmaeeli, A., Ghaffarinejad, A., Zahedi, A., & Vahidi, O. (2018). Copper oxide-polyaniline nanofiber modified fluorine doped tin oxide (FTO) electrode as non-enzymatic glucose sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 266, 294–301. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.03.132>
- [71] Xue, C., Jamal, R., Abdiryim, T., Liu, X., Liu, F., Xu, F., Cheng, Q., Tang, X., & Fan, N. (2024). An ionic liquid-modified PEDOT/Ti₃C₂TX based molecularly imprinted electrochemical sensor for pico-molar sensitive detection of L-Tryptophan in milk. *Food Chemistry*, 449, 139114. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.139114>
- [72] Kłos-Witkowska, A. (2015). Biosensors. *Pomiary Automatyka Robotyka*, 37–40. https://doi.org/10.14313/par_217/37

- [73] Bhalla, N., Formisano, N., Miodek, A., Jain, A., Di Lorenzo, M., Pula, G., & Estrela, P. (2015). Plasmonic ruler on field-effect devices for kinase drug discovery applications. *Biosensors and Bioelectronics*, 71, 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.04.020>
- [74] Morris, M. C. (2013). Fluorescent biosensors — Probing protein kinase function in cancer and drug discovery. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1834(7), 1387–1395. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.01.025>
- [75] Kirsch, J., Siltanen, C., Zhou, Q., Revzin, A., & Simonian, A. (2013). Biosensor technology: Recent advances in threat agent detection and medicine. *Chemical Society Reviews*, 42(22), 8733. <https://doi.org/10.1039/c3cs60141b>
- [76] Burnworth, M., Rowan, S., & Weder, C. (2007). Fluorescent sensors for the detection of chemical warfare agents. *Chemistry - A European Journal*, 13(28), 7828–7836. <https://doi.org/10.1002/chem.200700720>
- [77] Paddle, B. M. (1996). Biosensors for chemical and biological agents of defence interest. *Biosensors and Bioelectronics*, 11(11), 1079–1113. [https://doi.org/10.1016/0956-5663\(96\)82333-5](https://doi.org/10.1016/0956-5663(96)82333-5)
- [78] Ramya, M., Senthil Kumar, P., Rangasamy, G., Uma shankar, V., Rajesh, G., Nirmala, K., Saravanan, A., & Krishnapandi, A. (2022). A recent advancement on the applications of nanomaterials in electrochemical sensors and biosensors. *Chemosphere*, 308, 136416. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136416>
- [79] Molinero-Abad, B., Trachioti, M., Prodromidis, M. I., Domínguez-Renedo, O., & Alonso-Lomillo, M. A. (2025). Gold nanoparticle-based amperometric sensors integrating a gel polymer membrane electrolyte for the headspace determination of ethanethiol in wines. *Electrochimica Acta*, 515, 145710. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2025.145710>
- [80] Hajesfandyari, Z., Naderi, L., Shahrokhian, S., & Amini, M. K. (2024). Glycerate-assisted CoMn-sulfide with microsphere architecture confined by nanoparticles as an efficient enzyme-free sensor for amperometric measurement of glucose in serum, saliva and beverage samples. *Food Chemistry*, 467, 142175. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.142175>

- [81] Demkiv, O., Nogala, W., Stasyuk, N., Klepach, H., Danysh, T., & Gonchar, M. (2024). Highly sensitive amperometric sensors based on laccase-mimetic nanozymes for the detection of dopamine. *RSC Advances*, 14(8), 5472–5478. <https://doi.org/10.1039/d3ra07587g>
- [82] Jayaraman, S., Rajarathinam, T., Chakravarthi Nagarajan, D., Kandasamy, P., Jeon, S., Kim, C.-S., Won Hong, S., Paik, H.-j., & Chang, S.-C. (2024). A smartphone-based tunable tyrosinase functional mimic modulated portable amperometric sensor for the rapid and Real-Time monitoring of catechol. *Chemical Engineering Journal*, 497, 154811. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2024.154811>
- [83] Rashed, M. A., Ahmed, J., Faisal, M., Alsareii, S. A., Jalalah, M., Tirth, V., & Harraz, F. A. (2022). Surface modification of CuO nanoparticles with conducting polythiophene as a non-enzymatic amperometric sensor for sensitive and selective determination of hydrogen peroxide. *Surfaces and Interfaces*, 31, 101998. <https://doi.org/10.1016/j.surfin.2022.101998>
- [84] Almeida, L. C., Zeferino, J. F., Branco, C., Squillaci, G., Morana, A., Santos, R., Ihalainen, P., Sobhana, L., Correia, J. P., & Viana, A. S. (2025). Polynorepinephrine and polydopamine-bacterial laccase coatings for phenolic amperometric biosensors. *Bioelectrochemistry*, 161, 108826. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2024.108826>
- [85] Tang, L., Huang, Y., Wang, Y., Zhao, J., Lian, H., Dong, Y., Zhang, Z., & Hasebe, Y. (2025). Highly stretchable, adhesive and conductive hydrogel for flexible and stable bioelectrocatalytic sensing layer of enzyme-based amperometric glucose biosensor. *Bioelectrochemistry*, 163, 108882. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2024.108882>
- [86] Tuntiwongmetee, T., Khumngern, S., Nontipichet, N., Romportong, S., Thavarungkul, P., Kanatharana, P., & Numnuam, A. (2024). Flow injection amperometric uric acid biosensor based on AuNPs–GO–CS porous composite cryogel coated on PB–PEDOT:PSS modified screen-printed carbon electrode. *Bioelectrochemistry*, 158, 108725. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2024.108725>
- [87] Tang, H., Cui, M., Zhang, M., & Zhang, Y. (2024). A graphitized carbon@boron carbide-mediated laccase-based amperometric biosensor for epinephrine detection. *Bioelectrochemistry*, 155, 108591. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2023.108591>

- [88] Xie, N., Zhang, L., Gao, W., Huang, C., Huber, P. E., Zhou, X., Li, C., Shen, G., & Zou, B. (2020). NAD⁺ metabolism: Pathophysiologic mechanisms and therapeutic potential. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00311-7>
- [89] Meng, L. (2020) Tailoring Conducting Polymer Interface for Sensing and Biosensing [Praca doktorska, Linköping University]. <https://liu.diva-portal.org/smash/record.jsf?pid=diva2%3A1467768&dswid=-2895> [data dostępu: 27.08.2025]
- [90] Yagi, T., Seo, B. B., Bernardo, S. D., Nakamaru-Ogiso, E., Kao, M.-C., & Matsuno-Yagi, A. (2001). NADH dehydrogenases: from basic science to biomedicine. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 33(3), 233–242. <https://doi.org/10.1023/a:1010787004053>
- [91] Kyere-Yeboah, K., Denteh, J., Liu, K., Ye, P., & Gao, E.-B. (2019). Monitoring Nicotinamide Adenine Dinucleotide and its phosphorylated redox metabolism using genetically encoded fluorescent biosensors. *Sensing and Bio-Sensing Research*, 26, 100307. <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2019.100307>
- [92] Mekawy, M. M., Hassan, R. Y. A., Ramnani, P., Yu, X., & Mulchandani, A. (2018). Electrochemical detection of dihydronicotinamide adenine dinucleotide using Al₂O₃-GO nanocomposite modified electrode. *Arabian Journal of Chemistry*, 11(6), 942–949. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2018.03.017>
- [93] Sun, J.-J., Xu, J.-J., Fang, H.-Q., & Chen, H.-Y. (1997). Electrocatalytical oxidation of NADH with dopamine covalently bound to self-assembled cysteamine monolayers on a gold electrode. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 44(1), 45–50. [https://doi.org/10.1016/s0302-4598\(97\)00042-1](https://doi.org/10.1016/s0302-4598(97)00042-1)
- [94] Wei, W., Li, J., Yao, H., Shi, K., & Liu, H. (2020). A versatile molecular logic system based on Eu(III) coordination polymer film electrodes combined with multiple properties of NADH. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 22(39), 22746–22757. <https://doi.org/10.1039/d0cp03020a>

- [95] Gorton, L. (2002). Electrocatalytic oxidation of NAD(P)H at mediator-modified electrodes. *Reviews in Molecular Biotechnology*, 82(4), 371–392. [https://doi.org/10.1016/s1389-0352\(01\)00053-8](https://doi.org/10.1016/s1389-0352(01)00053-8)
- [96] Zhou, J.-L., Nie, P.-P., Zheng, H.-T., & Zhang, J.-M. (2009). Progress of Electrochemical Biosensors Based on Nicotinamide Adenine Dinucleotide (phosphate)-Dependent Dehydrogenases. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 37(4), 617–623. [https://doi.org/10.1016/s1872-2040\(08\)60098-5](https://doi.org/10.1016/s1872-2040(08)60098-5)
- [97] Nontipichet, N., Khumngern, S., Choosang, J., Thavarungkul, P., Kanatharana, P., & Numnuam, A. (2021). An enzymatic histamine biosensor based on a screen-printed carbon electrode modified with a chitosan–gold nanoparticles composite cryogel on Prussian blue-coated multi-walled carbon nanotubes. *Food Chemistry*, 364, 130396. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130396>
- [98] Chen, S., Shang, K., Gao, X., & Wang, X. (2022). The development of NAD⁺-dependent dehydrogenase screen-printed biosensor based on enzyme and nanoporous gold co-catalytic strategy. *Biosensors and Bioelectronics*, 211, 114376. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114376>
- [99] Lalaoui, N., Gentil, K., Ghandari, I., Cosnier, S., & Giroud, F. (2022). Nitrobenzoic acid-functionalized gold nanoparticles: DET promoter of multicopper oxidases and electrocatalyst for NAD-dependent glucose dehydrogenase. *Electrochimica Acta*, 408, 139894. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2022.139894>
- [100] Wijayanti, S. D., Schachinger, F., Ludwig, R., & Haltrich, D. (2023). Electrochemical and biosensing properties of an FAD-dependent glucose dehydrogenase from *Trichoderma virens*. *Bioelectrochemistry*, 153, 108480. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2023.108480>
- [101] Hamidi, H., & Haghighi, B. (2016). Fabrication of a sensitive amperometric sensor for NADH and H₂O₂ using palladium nanoparticles-multiwalled carbon nanotube nanohybrid. *Materials Science and Engineering: C*, 62, 423–428. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.01.058>

- [102] You, J.-M., & Jeon, S. (2011). Electrocatalytic oxidation of NADH on a glassy carbon electrode modified with MWCNT-Pd nanoparticles and poly 3,4-ethylenedioxypyrrole. *Electrochimica Acta*, 56(27), 10077–10082. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2011.08.104>
- [103] Manusha, P., Yadav, S., Satija, J., & Senthilkumar, S. (2021). Designing electrochemical NADH sensor using silver nanoparticles/phenothiazine nanohybrid and investigation on the shape dependent sensing behavior. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 347, 130649. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.130649>
- [104] Prasanna, S. B., Bahajjaj, A. A. A., Lee, Y.-H., Lin, Y.-C., Dhawan, U., Sakthivel, R., & Chung, R.-J. (2023). Highly responsive and sensitive non-enzymatic electrochemical sensor for the detection of β -NADH in food, environmental and biological samples using AuNP on polydopamine/titanium carbide composite. *Food Chemistry*, 426, 136609. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136609>
- [105] Marlinda, A. R., Sagadevan, S., Yusoff, N., Pandikumar, A., Huang, N. M., Akbarzadeh, O., & Johan, M. R. (2020). Gold nanorods-coated reduced graphene oxide as a modified electrode for the electrochemical sensory detection of NADH. *Journal of Alloys and Compounds*, 847, 156552. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2020.156552>
- [106] Li, Z., Huang, Y., Chen, L., Qin, X., Huang, Z., Zhou, Y., Meng, Y., Li, J., Huang, S., Liu, Y., Wang, W., Xie, Q., & Yao, S. (2013). Amperometric biosensor for NADH and ethanol based on electroreduced graphene oxide–polythionine nanocomposite film. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 181, 280–287. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.01.072>
- [107] Chen, C.-H., Chen, Y.-C., & Lin, M.-S. (2013). Amperometric determination of NADH with Co₃O₄ nanosheet modified electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 42, 379–384. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.10.086>
- [108] Atta, N. F., Abdel Gawad, S. A., El-Ads, E. H., El-Gohary, A. R. M., & Galal, A. (2017). A new strategy for NADH sensing using ionic liquid crystals-carbon nanotubes/nano-magnetite composite platform. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 251, 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.05.026>

- [109] Roy, A., Gupta, A., Haque, B., Qureshi, A. A., Verma, D., Sharma, K., Lee, S. F., Hee, C. W., Roy, A., & Verma, R. (2024). An updated review on carbon nanomaterials: Types, synthesis, functionalization and applications, degradation and toxicity. *Green Processing and Synthesis*, 13(1), 20240150. <https://doi.org/10.1515/gps-2024-0150>
- [110] Ibrahim, A., Klopocinska, A., Horvat, K., & Abdel Hamid, Z. (2021). Graphene-Based nanocomposites: Synthesis, mechanical properties, and characterizations. *Polymers*, 13(17), 2869. <https://doi.org/10.3390/polym13172869>
- [111] Sachdeva, S., Singh, D., & Tripathi, S. K. (2020). Optical and electrical properties of fullerene C70 for solar cell applications. *Optical Materials*, 101, 109717. <https://doi.org/10.1016/j.optmat.2020.109717>
- [112] Xu, T., Shen, W., Huang, W., & Lu, X. (2020). Fullerene micro/nanostructures: Controlled synthesis and energy applications. *Materials Today Nano*, 11, 100081. <https://doi.org/10.1016/j.mtnano.2020.100081>
- [113] Chitranshi, M., Pujari, A., Ng, V., Chen, D., Chauhan, D., Hudepohl, R., Saleminik, M., Kim, S. Y., Kubley, A., Shanov, V., & Schulz, M. (2020). Carbon Nanotube Sheet-Synthesis and Applications. *Nanomaterials*, 10(10), 2023. <https://doi.org/10.3390/nano10102023>
- [114] Pochkaeva, E. I., Podolsky, N. E., Zakusilo, D. N., Petrov, A. V., Charykov, N. A., Vlasov, T. D., Penkova, A. V., Vasina, L. V., Murin, I. V., Sharoyko, V. V., & Semenov, K. N. (2020). Fullerene derivatives with amino acids, peptides and proteins: From synthesis to biomedical application. *Progress in Solid State Chemistry*, 57, 100255. <https://doi.org/10.1016/j.progsolidstchem.2019.100255>
- [115] Wu, H.-C., Chang, X., Liu, L., Zhao, F., & Zhao, Y. (2010). Chemistry of carbon nanotubes in biomedical applications. *Journal of Materials Chemistry*, 20(6), 1036–1052. <https://doi.org/10.1039/b911099m>
- [116] Pan, Y., Liu, X., Zhang, W., Liu, Z., Zeng, G., Shao, B., Liang, Q., He, Q., Yuan, X., Huang, D., & Chen, M. (2020). Advances in photocatalysis based on fullerene C60 and its derivatives: Properties, mechanism, synthesis, and applications. *Applied Catalysis B: Environmental*, 265, 118579. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2019.118579>

- [117] Huang, B.-R., Kathiravan, D., Saravanan, A., & Mai, P.-H. (2021). Crystalline nanodiamond-induced formation of carbon nanotubes for stable hydrogen sensing. *ACS Applied Nano Materials*, 4(3), 2840–2848. <https://doi.org/10.1021/acsanm.0c03454>
- [118] Tasis, D., Tagmatarchis, N., Bianco, A., & Prato, M. (2006). Chemistry of carbon nanotubes. *Chemical Reviews*, 106(3), 1105–1136. <https://doi.org/10.1021/cr050569o>
- [119] Anzar, N., Hasan, R., Tyagi, M., Yadav, N., & Narang, J. (2020). Carbon nanotube - A review on Synthesis, Properties and plethora of applications in the field of biomedical science. *Sensors International*, 1, 100003. <https://doi.org/10.1016/j.sintl.2020.100003>
- [120] Rathinavel, S., Priyadharshini, K., & Panda, D. (2021). A review on carbon nanotube: An overview of synthesis, properties, functionalization, characterization, and the application. *Materials Science and Engineering: B*, 268, 115095. <https://doi.org/10.1016/j.mseb.2021.115095>
- [121] Taib, N.-A. A. B., Rahman, M. R., M.M. Matin, M. M., Uddin, J., Bakri, M. K. B., Khan, A. (2021). A Review on Carbon Nanotubes (CNT): Structure, Synthesis, Purification and Properties for Modern day Applications. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-930166/v1>
- [122] Brito, C. L., Silva, J. V., Gonzaga, R. V., La-Scalea, M. A., Giarolla, J., & Ferreira, E. I. (2024). A review on carbon nanotubes family of nanomaterials and their health field. *ACS Omega*, 9(8), 8687–8708. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c08824>
- [123] Saifuddin, N., Raziah, A. Z., & Junizah, A. R. (2013). Carbon nanotubes: A review on structure and their interaction with proteins. *Journal of Chemistry*, 2013, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2013/676815>
- [124] Omkar, B. T., Shobhraj, B. M., & Sipora, S. G. (2023). A comprehensive review on carbon nanotubes. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, 13(4), 745–753. <https://doi.org/10.5281/zenodo.7809891>
- [125] Peng, H., Alemany, L. B., Margrave, J. L., & Khabashesku, V. N. (2003). Sidewall carboxylic acid functionalization of single-walled carbon nanotubes. *Journal of the American Chemical Society*, 125(49), 15174–15182. <https://doi.org/10.1021/ja037746s>

- [126] Pop, E., Mann, D., Wang, Q., Goodson, K., & Dai, H. (2006). Thermal conductance of an individual single-wall carbon nanotube above room temperature. *Nano Letters*, 6(1), 96–100. <https://doi.org/10.1021/nl052145f>
- [127] Matsuda, K. (2013). Fundamental optical properties of carbon nanotubes and graphene. W “Carbon nanotubes and graphene for photonic applications” (s. 3–25). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9780857098627.1.3>
- [128] Modi, S., Prajapati, R., Inwati, G. K., Deepa, N., Tirth, V., Yadav, V. K., Yadav, K. K., Islam, S., Gupta, P., Kim, D.-H., & Jeon, B.-H. (2021). Recent trends in fascinating applications of nanotechnology in allied health sciences. *Crystals*, 12(1), 39. <https://doi.org/10.3390/cryst12010039>
- [129] Yang, B., Gao, L., Xue, M., Wang, H., Hou, Y., Luo, Y., Xiao, H., Hu, H., Cui, C., Wang, H., Zhang, J., Li, Y.-F., Xie, G., Tong, X., & Xie, Y. (2021). Experimental and simulation research on the preparation of carbon nano-materials by chemical vapor deposition. *Materials*, 14(23), 7356. <https://doi.org/10.3390/ma14237356>
- [130] Szabó, A., Perri, C., Csató, A., Giordano, G., Vuono, D., & Nagy, J. B. (2010). Synthesis methods of carbon nanotubes and related materials. *Materials*, 3(5), 3092–3140. <https://doi.org/10.3390/ma3053092>
- [131] Hughes, K. J., Iyer, K. A., Bird, R. E., Ivanov, J., Banerjee, S., Georges, G., & Zhou, Q. A. (2024). Review of carbon nanotube research and development: Materials and emerging applications. *ACS Applied Nano Materials*, 7(16), 18695–18713. <https://doi.org/10.1021/acsanm.4c02721>
- [132] Shoukat, R., & Khan, M. I. (2021). Carbon nanotubes: A review on properties, synthesis methods and applications in micro and nanotechnology. *Microsystem Technologies*, 27, 4183–4192. <https://doi.org/10.1007/s00542-021-05211-6>
- [133] Yahyazadeh, A., Nanda, S., & Dalai, A. K. (2024). Carbon nanotubes: A review of synthesis methods and applications. *Reactions*, 5(3), 429–451. <https://doi.org/10.3390/reactions5030022>
- [134] Kaur, R. (2018). Carbon nanotubes: A review article. *International Journal for Research in Applied Science and Engineering Technology*, 6(4), 5075–5079. <https://doi.org/10.22214/ijraset.2018.4827>

- [135] Raval, J. P., Joshi, P., & Chejara, D. R. (2018). Carbon nanotube for targeted drug delivery. W “Applications of nanocomposite materials in drug delivery” (s. 203–216). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813741-3.00009-1>
- [136] Hussein, F. H., & Abdulrazzak, F. H. (2018). Synthesis of carbon nanotubes by chemical vapor deposition. W “Nanomaterials: Biomedical, environmental, and engineering applications” (s. 105–132). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781119370383.ch4>
- [137] Pant, M., Singh, R., Negi, P., Tiwari, K., & Singh, Y. (2021). A comprehensive review on carbon nano-tube synthesis using chemical vapor deposition. Materials Today: Proceedings, 46, 11250–11253. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.02.646>
- [138] Wang, X.-D., Vinodgopal, K., & Dai, G.-P. (2019). Synthesis of carbon nanotubes by catalytic chemical vapor deposition. W “Perspective of carbon nanotubes”. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.86995>
- [139] Ma, P.-C., Siddiqui, N. A., Marom, G., & Kim, J.-K. (2010). Dispersion and functionalization of carbon nanotubes for polymer-based nanocomposites: A review. Composites Part A: Applied Science and Manufacturing, 41(10), 1345–1367. <https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2010.07.003>
- [140] Baughman, R. H. (2002). Carbon nanotubes--the route toward applications. Science, 297(5582), 787–792. <https://doi.org/10.1126/science.1060928>
- [141] Yang, S., Gao, H., Tong, Y., Chai, F., & Tian, M. (2025). Development of a ZnNiMOF@CNT-based MIP electrochemical sensor: Toward the selective detection of creatinine in urine and saliva. Electrochimica Acta, 514, 145665. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2025.145665>
- [142] Batra, B., Yadav, S., Kalra, V., Sharma, M., & Rana, J. S. (2023). An electrochemical biosensor for the determination of folic acid in pregnant women based on DHFR/c-MWCNTs/TiO₂NPs modified gold electrode. Sensors International, 4, 100235. <https://doi.org/10.1016/j.sintl.2023.100235>

- [143] Wondu, E., Lule, Z. C., & Kim, J. (2023). Fabrication of thermoplastic polyurethane composites with a high dielectric constant and thermal conductivity using a hybrid filler of CNT@BaTiO₃. *Materials Today Chemistry*, 27, 101287. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2022.101287>
- [144] A R, D., & Ramaprabhu, S. (2025). Nitrogen-doped CNT embedded with Pd/Ni nanoparticles for room-temperature hydrogen storage application. *Fuel*, 380, 133127. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2024.133127>
- [145] Tang, J., Cao, Q., Tulevski, G., Jenkins, K. A., Nela, L., Farmer, D. B., & Han, S.-J. (2018). Flexible CMOS integrated circuits based on carbon nanotubes with sub-10 ns stage delays. *Nature Electronics*, 1(3), 191–196. <https://doi.org/10.1038/s41928-018-0038-8>
- [146] Koh, B., Park, S. B., Yoon, E., Yoo, H. M., Lee, D., Heo, J.-N., & Ahn, S. (2019). AVβ3-Targeted delivery of camptothecin-encapsulated carbon nanotube-cyclic RGD in 2D and 3D cancer cell culture. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 108(11), 3704–3712. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.07.011>
- [147] Abdel-Shafy, H. I., & Mansour, M. S. M. (2016). A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*, 25(1), 107–123. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.03.011>
- [148] Kuppusamy, S., Thavamani, P., Megharaj, M., & Naidu, R. (2016). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by novel bacterial consortia tolerant to diverse physical settings – Assessments in liquid- and slurry-phase systems. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 108, 149–157. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.12.013>
- [149] Li, P.-h., Wang, Y., Li, Y.-h., Wai, K.-m., Li, H.-l., & Tong, L. (2016). Gas-particle partitioning and precipitation scavenging of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the free troposphere in southern China. *Atmospheric Environment*, 128, 165–174. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2015.12.030>

- [150] Kubiak, M.S. (2013). Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) – ich występowanie w środowisku i w żywności. *Problemy Higieny i Epidemiologii*, 94(1), 31–36. <http://www.phie.pl/pdf/phe-2013/phe-2013-1-031.pdf> [data dostępu: 27.08.2025]
- [151] Hou, Y., Li, Y., Liu, Y., Li, G., & Zhang, Z. (2019). Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the UV-induced fluorescence spectra of crude oil films on the sea surface. *Marine Pollution Bulletin*, 146, 977–984. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.07.058>
- [152] Ravindra, K., Sokhi, R., & Vangrieken, R. (2008). Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation. *Atmospheric Environment*, 42(13), 2895–2921. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2007.12.010>
- [153] Zhang, Y., & Tao, S. (2009). Global atmospheric emission inventory of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) for 2004. *Atmospheric Environment*, 43(4), 812–819. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2008.10.050>
- [154] Miura, K., Shimada, K., Sugiyama, T., Sato, K., Takami, A., Chan, C. K., Kim, I. S., Kim, Y. P., Lin, N.-H., & Hatakeyama, S. (2019). Seasonal and annual changes in PAH concentrations in a remote site in the Pacific Ocean. *Scientific Reports*, 9(1), 12591. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47409-9>
- [155] Mojiri, A., Zhou, J. L., Ohashi, A., Ozaki, N., & Kindaichi, T. (2019). Comprehensive review of polycyclic aromatic hydrocarbons in water sources, their effects and treatments. *Science of the Total Environment*, 696, 133971. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133971>
- [156] Wang, Z., Yang, C., Yang, Z., Sun, J., Hollebone, B., Brown, C., & Landriault, M. (2011). Forensic fingerprinting and source identification of the 2009 Sarnia (Ontario) oil spill. *Journal of Environmental Monitoring*, 13(11), 3004. <https://doi.org/10.1039/c1em10620a>
- [157] Parker, D. S. N., Zhang, F., Kim, Y. S., Kaiser, R. I., Landera, A., Kislov, V. V., Mebel, A. M., & Tielens, A. G. G. M. (2011). Low temperature formation of naphthalene and its role in the synthesis of PAHs (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) in the interstellar medium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(1), 53–58. <https://doi.org/10.1073/pnas.1113827108>

- [158] IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. (2010). Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related occupational exposures. IARC Press. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK321712/> [data dostępu: 27.08.2025]
- [159] Kim, K.-H., Jahan, S. A., Kabir, E., & Brown, R. J. C. (2013). A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environment International*, 60, 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.07.019>
- [160] Human health effects of polycyclic aromatic hydrocarbons as ambient air pollutants: report of the Working Group on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons of the Joint Task Force on the Health Aspects of Air Pollution. (2021). <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/350636/9789289056533-eng.pdf?sequence=1> [data dostępu: 27.08.2025]
- [161] Mallah, M. A., Changxing, L., Mallah, M. A., Noreen, S., Liu, Y., Saeed, M., Xi, H., Ahmed, B., Feng, F., Mirjat, A. A., Wang, W., Jabar, A., Naveed, M., Li, J.-H., & Zhang, Q. (2022). Polycyclic aromatic hydrocarbon and its effects on human health: An overreview. *Chemosphere*, 296, 133948. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133948>
- [162] Lawal, A. T. (2017). Polycyclic aromatic hydrocarbons. A review. *Cogent Environmental Science*, 3(1), 1339841. <https://doi.org/10.1080/23311843.2017.1339841>
- [163] Holzinger, M., Cosnier, S., & Buzzetti, P. H. M. (2023). The versatility of pyrene and its derivatives on sp² carbon nanomaterials for bioelectrochemical applications. *Synthetic Metals*, 292, 117219. <https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2022.117219>
- [164] Barathi, P., & Senthil Kumar, A. (2013). Electrochemical conversion of unreactive pyrene to highly redox-active 1,2-quinone derivatives on a carbon nanotube-modified gold electrode surface and its selective hydrogen peroxide sensing. *Langmuir*, 29(34), 10617–10623. <https://doi.org/10.1021/la402092r>

- [165] Giroud, F., Sawada, K., Taya, M., & Cosnier, S. (2017). 5,5-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid) pyrene derivative-carbon nanotube electrodes for NADH electrooxidation and oriented immobilization of multicopper oxidases for the development of glucose/O₂ biofuel cells. *Biosensors and Bioelectronics*, 87, 957–963. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.09.054>
- [166] Bachman, J. C., Kavian, R., Graham, D. J., Kim, D. Y., Noda, S., Nocera, D. G., Shao-Horn, Y., & Lee, S. W. (2015). Electrochemical polymerization of pyrene derivatives on functionalized carbon nanotubes for pseudocapacitive electrodes. *Nature Communications*, 6(1), 7040. <https://doi.org/10.1038/ncomms8040>
- [167] Moscoso, R., Abarca, S., Yáñez, C., & Squella, J. A. (2023). MWCNT buckypaper disc films as alternative to the drop casting method to modify electrode surfaces. *Electrochimica Acta*, 443, 141984. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2023.141984>
- [168] Reuillard, B., Le Goff, A., Holzinger, M., & Cosnier, S. (2014). Non-covalent functionalization of carbon nanotubes with boronic acids for the wiring of glycosylated redox enzymes in oxygen-reducing biocathodes. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(16), 2228–2232. <https://doi.org/10.1039/c3tb21846e>
- [169] Pang, H. L., Liu, J., Hu, D., Zhang, X. H., & Chen, J. H. (2010). Immobilization of laccase onto 1-aminopyrene functionalized carbon nanotubes and their electrocatalytic activity for oxygen reduction. *Electrochimica Acta*, 55(22), 6611–6616. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2010.06.013>
- [170] Zhou, X.-h., Huang, X.-r., Liu, L.-h., Bai, X., & Shi, H.-c. (2013). Direct electron transfer reaction of laccase on a glassy carbon electrode modified with 1-aminopyrene functionalized reduced graphene oxide. *RSC Advances*, 3(39), 18036. <https://doi.org/10.1039/c3ra42312c>
- [171] Luo, L.-q., Zhang, Z., Ding, Y.-p., Deng, D.-m., Zhu, X.-l., & Wang, Z.-x. (2013). Label-free electrochemical impedance genosensor based on 1-aminopyrene/graphene hybrids. *Nanoscale*, 5(13), 5833. <https://doi.org/10.1039/c3nr01237a>

- [172] Barathi, P., & Kumar, A. S. (2014). Electrochemical oxidation of hazardous tetracene to highly redox active anthraquinone and hydroquinone derivatives on a carbon nanotube-modified electrode and its selective hydrogen peroxide sensing. *Electroanalysis*, 26(11), 2342–2349. <https://doi.org/10.1002/elan.201400250>
- [173] Zhu, J., Wu, X.-Y., Shan, D., Yuan, P.-X., & Zhang, X.-J. (2014). Sensitive electrochemical detection of NADH and ethanol at low potential based on pyrocatechol violet electrodeposited on single walled carbon nanotubes-modified pencil graphite electrode. *Talanta*, 130, 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.06.057>
- [174] Gayathri, P., Pillai, K. C., & Senthil Kumar, A. (2019). Regioselective electrochemical oxidation of one of the identical benzene rings of carbazole to 1,4-quinone on the MWCNT surface and its electrocatalytic activity. *The Journal of Physical Chemistry C*, 123(50), 30283–30293. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b07486>
- [175] Mayuri, P., Huang, S.-T., Mani, V., & Kumar, A. S. (2018). A new organic redox species-indole tetraone trapped MWCNT modified electrode prepared by in-situ electrochemical oxidation of indole for a bifunctional electrocatalysis and simultaneous flow injection electroanalysis of hydrazine and hydrogen peroxide. *Electrochimica Acta*, 268, 150–162. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2018.02.107>
- [176] Sundaram, S., Jagannathan, M., Abdul Kadir, M. R., Palanivel, S., Hadibarata, T., & Mohammed Yusoff, A. R. (2015). A new electro-generated o-dianisidine derivative stabilized MWCNT-modified GCE for low potential gallic acid detection. *RSC Advances*, 5(57), 45996–46006. <https://doi.org/10.1039/c5ra06304c>
- [177] Zhu, B.-W., Cai, L., He, X.-P., Chen, G.-R., & Long, Y.-T. (2014). Anthraquinonyl glycoside facilitates the standardization of graphene electrodes for the impedance detection of lectins. *Chemistry Central Journal*, 8(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/s13065-014-0067-y>
- [178] Kachoosangi, R., Wildgoose, G., & Compton, R. (2008). Using capsaicin modified multiwalled carbon nanotube based electrodes and p-chloranil modified carbon paste electrodes for the determination of amines: Application to benzocaine and lidocaine. *Electroanalysis*, 20(23), 2495–2500. <https://doi.org/10.1002/elan.200804385>

- [179] Shanmugam, R., Barathi, P., Zen, J.-M., & Kumar, A. S. (2016). An unusual electrochemical oxidation of phenothiazine dye to phenothiazine-bi-1,4-quinone derivative (a donor-acceptor type molecular hybrid) on MWCNT surface and its cysteine electrocatalytic oxidation function. *Electrochimica Acta*, 187, 34–45. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2015.11.032>
- [180] Compton, R. G., & Banks, C. E. (2010). Understanding voltammetry. Imperial College Press. <https://doi.org/10.1142/p726>
- [181] Eckermann, A. L., Feld, D. J., Shaw, J. A., & Meade, T. J. (2010). Electrochemistry of redox-active self-assembled monolayers. *Coordination Chemistry Reviews*, 254(15-16), 1769–1802. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.023>
- [182] Rębiś, T., Kuznowicz, M., Jędrzak, A., Milczarek, G., & Jesionowski, T. (2021). Design and fabrication of low potential NADH-sensor based on poly(caffeic acid)@multi-walled carbon nanotubes. *Electrochimica Acta*, 386, 138384. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2021.138384>
- [183] Lu, B., Zhen, S., Zhao, L., Zhang, G., Mo, D., & Xu, J. (2014). A novel solution-processable amino-group-substituted oligopyrene: Synthesis, electropolymerization, properties, and application in fluorescent chemosensor. *Synthetic Metals*, 198, 155–160. <https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2014.10.018>
- [184] Kim, K. M., Lee, Y.-G., Park, J. H., & Ko, J. M. (2016). Supercapacitive properties of composite electrode consisting of activated carbon and di(1-aminopyrene)quinone. *ETRI Journal*, 38(2), 252–259. <https://doi.org/10.4218/etrij.16.2515.0018>
- [185] Si, W., Lei, W., Han, Z., Zhang, Y., Hao, Q., & Xia, M. (2014). Electrochemical sensing of acetaminophen based on poly(3,4-ethylenedioxythiophene)/graphene oxide composites. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 193, 823–829. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.12.052>
- [186] Aquino-Binag, C. N., Kumar, N., Lamb, R. N., & Pigram, P. J. (1996). Fabrication and characterization of a hydroquinone-functionalized polypyrrole thin-film pH sensor. *Chemistry of Materials*, 8(11), 2579–2585. <https://doi.org/10.1021/cm9506114>

- [187] Duc Chinh, V., Speranza, G., Migliaresi, C., Van Chuc, N., Minh Tan, V., & Phuong, N.-T. (2019). Synthesis of gold nanoparticles decorated with multiwalled carbon nanotubes (Au-MWCNTs) via cysteaminium chloride functionalization. *Scientific Reports*, 9(1), 5667. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42055-7>
- [188] Mutyala, S., & Mathiyarasu, J. (2016). A highly sensitive NADH biosensor using nitrogen doped graphene modified electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 775, 329–336. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2016.06.011>
- [189] Guzmán-Hernández, D. S., Ramírez-Silva, M. T., Palomar-Pardavé, M., Corona-Avendaño, S., Galano, A., Rojas-Hernández, A., & Romero-Romo, M. (2012). Electrochemical characterization of tenoxicam using a bare carbon paste electrode under stagnant and forced convection conditions. *Electrochimica Acta*, 59, 150–155. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2011.10.046>
- [190] Rębiś, T., Falkowski, M., Kryjewski, M., Popenda, L., Sobotta, L., Jurga, S., Marszał, M. P., Mielcarek, J., Milczarek, G., & Goslinski, T. (2019). Single-walled carbon nanotube/sulfanyl porphyrazine hybrids deposited on glassy carbon electrode for sensitive determination of nitrites. *Dyes and Pigments*, 171, 107660. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2019.107660>
- [191] Zarei, K., & Helli, H. (2015). Electrochemical determination of aminopyrene on glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotube–sodium dodecyl sulfate/Nafion composite film. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 749, 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2015.04.027>
- [192] Zare, H. R., Nasirizadeh, N., Golabi, S.-M., Namazian, M., Mazloun-Ardakani, M., & Nematollahi, D. (2006). Electrochemical evaluation of coumestan modified carbon paste electrode: Study on its application as a NADH biosensor in presence of uric acid. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 114(2), 610–617. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2005.06.013>
- [193] Zheng, L., & Song, J.-f. (2009). Curcumin multi-wall carbon nanotubes modified glassy carbon electrode and its electrocatalytic activity towards oxidation of hydrazine. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 135(2), 650–655. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2008.09.035>

- [194] Zare, H. R., & Golabi, S. M. (1999). Electrocatalytic oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) at a chlorogenic acid modified glassy carbon electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 464(1), 14–23. [https://doi.org/10.1016/s0022-0728\(98\)00459-8](https://doi.org/10.1016/s0022-0728(98)00459-8)
- [195] Salimi, A., Miranzadeh, L., & Hallaj, R. (2007). Amperometric and voltammetric detection of hydrazine using glassy carbon electrodes modified with carbon nanotubes and catechol derivatives. *Talanta*, 75(1), 147–156. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.10.044>
- [196] Laviron, E. (1979). General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 101(1), 19–28. [https://doi.org/10.1016/s0022-0728\(79\)80075-3](https://doi.org/10.1016/s0022-0728(79)80075-3)
- [197] Rębiś, T., Sobczak, A., Wierchowski, M., Frankiewicz, A., Teżyk, A., & Milczarek, G. (2018). An approach for electrochemical functionalization of carbon nanotubes/1-amino-9,10-anthraquinone electrode with catechol derivatives for the development of NADH sensors. *Electrochimica Acta*, 260, 703–715. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2017.12.022>
- [198] Sobczak, A., Rębiś, T., & Milczarek, G. (2015). Electrocatalysis of NADH oxidation using electrochemically activated fluphenazine on carbon nanotube electrode. *Bioelectrochemistry*, 106, 308–315. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2015.07.002>
- [199] Alévêque, O., Blanchard, P.-Y., Breton, T., Dias, M., Gautier, C., Levillain, E., & Seladji, F. (2009). Nitroxyl radical self-assembled monolayers on gold: Experimental data vs. Laviron's interaction model. *Electrochemistry Communications*, 11(9), 1776–1780. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2009.07.015>
- [200] da Silva, L. V., Lopes, C. B., da Silva, W. C., de Paiva, Y. G., Silva, F. d. A. d. S., Lima, P. R., Kubota, L. T., & Goulart, M. O. F. (2017). Electropolymerization of ferulic acid on multi-walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode as a versatile platform for NADH, dopamine and epinephrine separate detection. *Microchemical Journal*, 133, 460–467. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.04.014>

- [201] Bilgi, M., Sahin, E. M., & Ayranci, E. (2018). Sensor and biosensor application of a new redox mediator: Rosmarinic acid modified screen-printed carbon electrode for electrochemical determination of NADH and ethanol. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 813, 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2018.02.012>
- [202] Li, J., Sun, Q., Mao, Y., Bai, Z., Ning, X., & Zheng, J. (2017). Sensitive and low-potential detection of NADH based on boronic acid functionalized multi-walled carbon nanotubes coupling with an electrocatalysis. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 794, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2017.03.042>
- [203] Zhang, F., Wu, X., Gao, J., Chen, Y., Gui, Y., Zhang, L., Gan, W., & Yuan, Q. (2020). Fabrications of metal organic frameworks derived hierarchical porous carbon on carbon nanotubes as efficient bioanode catalysts of NAD⁺-dependent alcohol dehydrogenase. *Electrochimica Acta*, 340, 135958. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2020.135958>
- [204] Liu, A., Watanabe, T., Honma, I., Wang, J., & Zhou, H. (2006). Effect of solution pH and ionic strength on the stability of poly(acrylic acid)-encapsulated multiwalled carbon nanotubes aqueous dispersion and its application for NADH sensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(5), 694–699. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.02.006>
- [205] Rajaram, R., Anandhakumar, S., & Mathiyarasu, J. (2015). Electrocatalytic oxidation of NADH at low overpotential using nanoporous poly(3,4)-ethylenedioxythiophene modified glassy carbon electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 746, 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2015.03.028>
- [206] Rębiś, T., Falkowski, M., Milczarek, G., & Goslinski, T. (2020). Electrocatalytic NADH sensing using electrodes modified with 2-[2-(4-nitrophenoxy)ethoxy]ethylthio-substituted porphyrazine/single-walled carbon nanotube hybrids. *ChemElectroChem*, 7(13), 2838–2850. <https://doi.org/10.1002/celec.202000430>
- [207] Lin, K. C., Yin, C. Y., & Chen, S. M. (2012). Electrocatalytic oxidation of NADH based on poly(luminol and functionalized multi-walled carbon nanotubes. *The Analyst*, 137(6), 1378. <https://doi.org/10.1039/c2an16224e>

- [208] Sangamithirai, D., Narayanan, V., Muthuraaman, B., & Stephen, A. (2015). Investigations on the performance of poly(o-anisidine)/graphene nanocomposites for the electrochemical detection of NADH. *Materials Science and Engineering: C*, 55, 579–591. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.05.066>
- [209] de Assis dos Santos Silva, F., Lopes, C. B., de Oliveira Costa, E., Lima, P. R., Kubota, L. T., & Goulart, M. O. F. (2010). Poly-xanthurenic acid as an efficient mediator for the electrocatalytic oxidation of NADH. *Electrochemistry Communications*, 12(3), 450–454. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2010.01.017>
- [210] Bilgi Kamaç, M., Kıymaz Onat, E., & Yılmaz, M. (2019). A new disposable amperometric NADH sensor based on screen-printed electrode modified with reduced graphene oxide/polynuclear red/gold nanoparticle. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 100(4), 419–431. <https://doi.org/10.1080/03067319.2019.1703965>
- [211] Moscoso, R., Barrientos, C., Moris, S., & Squella, J. A. (2019). Electrocatalytic oxidation of NADH in a new nanostructured interface with an entrapped butylpyrene nitroaromatic derivative. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 837, 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2019.02.013>
- [212] Tu, X., Xie, Q., Huang, Z., Yang, Q., & Yao, S. (2007). Synthesis and characterization of novel quinone-amine polymer/carbon nanotubes composite for sensitive electrocatalytic detection of NADH. *Electroanalysis*, 19(17), 1815–1821. <https://doi.org/10.1002/elan.200703939>
- [213] Leda, A., Rębiś, T., Frankowski, R., Jesionowski, T., & Milczarek, G. (2023). Electrochemical generation of 1-amino-pyrene-4,5,9,10 tetrol on the MWCNT surface for low potential electrocatalytic NADH oxidation. *Electrochimica Acta*, 463, 142822. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2023.142822>
- [214] Xi, W., Kong, Z., Zhang, Z., Chen, Y., Huang, X., Deng, Z., Li, Z., Xu, X., Cui, X., & Zheng, W. (2024). Effect of protein adsorption on hyaluronic acid/curcumin/multi-walled carbon nanotube based electrochemical sensor for detection of dopamine. *Inorganic Chemistry Communications*, 167, 112763. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2024.112763>

- [215] Hugo Seymour, E., Wilkins, S. J., Lawrence, N. S., & Compton, R. G. (2002). Electrochemical detection of glutathione: An electrochemically initiated reaction pathway. *Analytical Letters*, 35(8), 1387–1399. <https://doi.org/10.1081/al-120006674>
- [216] Li, Y., Qi, H., Fan, M., Zhu, Z., Zhan, S., Li, L., Li, B., Zhang, X., Zhao, X., Ma, J., & Wang, L. (2020). Quantifying the efficiency of o-benzoquinones reaction with amino acids and related nucleophiles by cyclic voltammetry. *Food Chemistry*, 317, 126454. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126454>
- [217] Nguyen, N. H., Esnault, C., Gohier, F., Bélanger, D., & Cougnon, C. (2009). Electrochemistry and reactivity of surface-confined catechol groups derived from diazonium reduction. Bias-assisted Michael addition at the solid/liquid interface. *Langmuir*, 25(6), 3504–3508. <https://doi.org/10.1021/la804205d>
- [218] Lee, P. T., & Compton, R. G. (2015). Selective thiol detection in authentic biological samples with the use of screen-printed electrodes. *Analytical Sciences*, 31(7), 685–691. <https://doi.org/10.2116/analsci.31.685>
- [219] Hu, F., Hu, H., Li, Y., Wang, X., & Shi, X. (2023). Signal amplification strategy by chitosan-catechol hydrogel modified paper electrode for electrochemical detection of trace arsenite. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 400, 134836. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2023.134836>
- [220] Suresh, S., Srivastava, V. C., & Mishra, I. M. (2011). Study of catechol and resorcinol adsorption mechanism through granular activated carbon characterization, pH and kinetic study. *Separation Science and Technology*, 46(11), 1750–1766. <https://doi.org/10.1080/01496395.2011.570284>
- [221] Sanko, V., Şenocak, A., Tümay, S. O., Orooji, Y., Demirbas, E., & Khataee, A. (2022). An electrochemical sensor for detection of trace-level endocrine disruptor bisphenol A using Mo₂Ti₂AlC₃ MAX phase/MWCNT composite modified electrode. *Environmental Research*, 212, 113071. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113071>
- [222] Gholivand, M. B., & Solgi, M. (2017). Sensitive warfarin sensor based on cobalt oxide nanoparticles electrodeposited at multi-walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode (Co_xO_y NPs/MWCNTs/GCE). *Electrochimica Acta*, 246, 689–698. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2017.06.105>

- [223] Gira, M. J., Tkacz, K. P., & Hampton, J. R. (2016). Physical and electrochemical area determination of electrodeposited Ni, Co, and NiCo thin films. *Nano Convergence*, 3(6), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s40580-016-0063-0>
- [224] Henry, C., Beck, J. J., Alenicheva, V., Rahn, K., Russo, M. J., & Baldo, T. A. (2023). Evaluating the performance of an inexpensive, commercially available, NFC-powered and smartphone controlled potentiostat for electrochemical sensing. *Electroanalysis*, 35(6), e202200552. <https://doi.org/10.1002/elan.202200552>
- [225] Munteanu, F. D., Mano, N., Kuhn, A., & Gorton, L. (2004). NADH electrooxidation using carbon paste electrodes modified with nitro-fluorenone derivatives immobilized on zirconium phosphate. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 564, 167–178. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2003.10.034>
- [226] Sahin, M., & Ayranci, E. (2015). Electrooxidation of NADH on modified screen-printed electrodes: Effects of conducting polymer and nanomaterials. *Electrochimica Acta*, 166, 261–270. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2015.03.030>
- [227] Otero, F., Mandal, T., Leech, D., & Magner, E. (2022). An electrochemical NADH biosensor based on a nanoporous gold electrode modified with diaphorase and an osmium polymer. *Sensors and Actuators Reports*, 4, 100117. <https://doi.org/10.1016/j.snr.2022.100117>
- [228] Meng, L., Turner, A. P. F., & Mak, W. C. (2018). Positively-charged hierarchical PEDOT interface with enhanced electrode kinetics for NADH-based biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 120, 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.08.017>
- [229] Liu, S., Dai, G., Yuan, L., & Zhao, Y. (2012). A NADH sensor based on 1,2-naphththoquinone electropolymerized on multi-walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 59(11), 1409–1414. <https://doi.org/10.1002/jccs.201200049>
- [230] Raoof, J. B., Teymoori, N., Khalilzadeh, M. A., & Ojani, R. (2015). A high sensitive electrochemical nanosensor for simultaneous determination of glutathione, NADH and folic acid. *Materials Science and Engineering: C*, 47, 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.11.012>

- [231] Hoshino, T., Sekiguchi, S.-i., & Muguruma, H. (2012). Amperometric biosensor based on multilayer containing carbon nanotube, plasma-polymerized film, electron transfer mediator phenothiazine, and glucose dehydrogenase. *Bioelectrochemistry*, 84, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2011.09.001>
- [232] Ramaley, R. F., & Vasantha, N. (1983). Glycerol protection and purification of bacillus subtilis glucose dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, 258(20), 12558–12565. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)44213-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)44213-x)
- [233] Tahar, A. B., Szymczyk, A., Tingry, S., Vadgama, P., Zelsmanne, M., Tsujumura, S., Cinquin, P., Martin, D., & Zebda, A. (2019). One-year stability of glucose dehydrogenase confined in a 3D carbon nanotube electrode with coated poly-methylene green: Application as bioanode for a glucose biofuel cell. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 847, 113069. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2019.04.029>
- [234] Liang, B., Li, L., Tang, X., Lang, Q., Wang, H., Li, F., Shi, J., Shen, W., Palchetti, I., Mascini, M., & Liu, A. (2013). Microbial surface display of glucose dehydrogenase for amperometric glucose biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 45, 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.01.050>
- [235] Phetsang, S., Jakmunee, J., Mungkornasawakul, P., Laocharoensuk, R., & Ounnunkad, K. (2019). Sensitive amperometric biosensors for detection of glucose and cholesterol using a platinum/reduced graphene oxide/poly(3-aminobenzoic acid) film-modified screen-printed carbon electrode. *Bioelectrochemistry*, 127, 125–135. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2019.01.008>
- [236] Płócienniczak, P., Rębiś, T., Leda, A., & Milczarek, G. (2022). Lignosulfonate-assisted synthesis of platinum nanoparticles deposited on multi-walled carbon nanotubes for biosensing of glucose. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 210, 112222. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112222>
- [237] Shrestha, B. K., Ahmad, R., Shrestha, S., Park, C. H., & Kim, C. S. (2017). Globular shaped polypyrrole doped well-dispersed functionalized multiwall carbon nanotubes/naion composite for enzymatic glucose biosensor application. *Scientific Reports*, 7(1), 16191. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16541-9>

- [238] Gao, Q., Guo, Y., Liu, J., Yuan, X., Qi, H., & Zhang, C. (2011). A biosensor prepared by co-entrapment of a glucose oxidase and a carbon nanotube within an electrochemically deposited redox polymer multilayer. *Bioelectrochemistry*, 81(2), 109–113. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2011.04.003>
- [239] Jeon, W.-Y., Kim, H.-S., Jang, H.-W., Lee, Y.-S., Shin, U. S., Kim, H.-H., & Choi, Y.-B. (2022). A stable glucose sensor with direct electron transfer, based on glucose dehydrogenase and chitosan hydro bonded multi-walled carbon nanotubes. *Biochemical Engineering Journal*, 187, 108589. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108589>
- [240] Araszkiewicz, A., Bandurska-Stankiewicz, E., Borys, S., Budzyński, A., Cyganek, K., Cypryk, K., Czech, A., Czupryniak, L., Drzewoski, J., Dzida, G., Dziedzic, T., Franek, E., Gajewska, D., Gawrecki, A., Górską, M., Grzeszczak, W., Gumprecht, J., Idzior-Waluś, B., Jarosz-Chobot, P., Kalarus, Z., Karczewska-Kupczewska, M., Klupa, T., Koblik, T., Kokoszka, A., Korzon-Burakowska, A., Kowalska, I., Krętowski, A., Majkowska, L., Małecki, M., Mamcarz, A., Mirkiewicz-Sieradzka, B., Młynarski, W., Moczulski, D., Myśliwiec, M., Narkiewicz, K., Noczyńska, A., Rymaszewska, J., Sieradzki, J., Skupień, J., Solnica, B., Strączkowski, M., Strojek, K., Szadkowska, A., Szelachowska, M., Szypowska, A., Uruska, A., Wender-Ożegowska, E., Wierusz-Wysocka, B., Witek, P., Wolnik, B., Wyleżoł, M., Wylęgała, E., & Zozulińska-Ziółkiewicz, D. (2022). 2022 Guidelines on the management of patients with diabetes. A position of diabetes Poland. *Current Topics in Diabetes*, 2(1), 1–130. <https://doi.org/10.5114/ctd/146259>
- [241] Pang, Y., Zhang, Y., Sun, X., Ding, H., Ma, T., & Shen, X. (2019). Synergistical accumulation for electrochemical sensing of 1-hydroxypyrene on electroreduced graphene oxide electrode. *Talanta*, 192, 387–394. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.08.042>
- [242] Li, Y., Li, Y., Du, C., Zhang, P., Cen, P., Liu, X., & Li, Y. (2021). Electrochemical sensing of 1-hydroxypyrene on a colloidal gold modified zeolitic imidazolate frameworks-67/carbon nanofiber paste electrode. *Journal of the Electrochemical Society*, 168(5), 057509. <https://doi.org/10.1149/1945-7111/abf216>

- [243] Cui, H., Cui, S., Tian, Q., Zhang, S., Wang, M., Zhang, P., Liu, Y., Zhang, J., & Li, X. (2021). Electrochemical sensor for the detection of 1-hydroxypyrene based on composites of PAMAM-regulated chromium-centered metal–organic framework nanoparticles and graphene oxide. *ACS Omega*, 6(46), 31184–31195. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c04765>
- [244] Teo, E. Y. L., Ali, G. A. M., Algarni, H., Cheewasedtham, W., Rujiralai, T., & Chong, K. F. (2019). One-step production of pyrene-1-boronic acid functionalized graphene for dopamine detection. *Materials Chemistry and Physics*, 231, 286–291. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2019.04.029>
- [245] Wikeley, S. M., Przybylowski, J., Gardiner, J. E., James, T. D., Fletcher, P. J., Isaacs, M. A., Lozano-Sanchez, P., Caffio, M., & Marken, F. (2024). Pyrene-Appended boronic acids on graphene foam electrodes provide quantum capacitance-based molecular sensors for lactate. *ACS Sensors*, 9(3), 1565–1574. <https://doi.org/10.1021/acssensors.4c00027>
- [246] Egawa, Y., Seki, T., Takahashi, S., & Anzai, J.-i. (2011). Electrochemical and optical sugar sensors based on phenylboronic acid and its derivatives. *Materials Science and Engineering: C*, 31(7), 1257–1264. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2011.05.007>
- [247] Morariu, S. (2023). Advances in the design of phenylboronic acid-based glucose-sensitive hydrogels. *Polymers*, 15(3), 582. <https://doi.org/10.3390/polym15030582>
- [248] Liu, Y., Zhang, Y., & Guan, Y. (2009). New polymerized crystalline colloidal array for glucose sensing. *Chemical Communications*, 14, 1867. <https://doi.org/10.1039/b821706h>
- [249] Kim, A., Mujumdar, S., & Siegel, R. (2013). Swelling properties of hydrogels containing phenylboronic acids. *Chemosensors*, 2(1), 1–12. <https://doi.org/10.3390/chemosensors2010001>
- [250] Shoji, E., & Freund, M. S. (2002). Potentiometric Saccharide Detection Based on the pKa Changes of Poly(aniline boronic acid). *Journal of the American Chemical Society*, 124(42), 12486–12493. <https://doi.org/10.1021/ja0267371>

- [251] Jorsch, C., Schmidt, U., Ulkoski, D., Scholz, C., Guenther, M., & Gerlach, G. (2016). Implantable biomedical sensor array with biocompatible hermetic encapsulation. *Journal of Sensors and Sensor Systems*, 5(2), 229–235. <https://doi.org/10.5194/jsss-5-229-2016>

VI. STRESZCZENIE

Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA), w tym piren i jego pochodne, stanowią grupę związków organicznych, która do tej pory nie była powszechnie wykorzystywana w elektrochemii analitycznej, a w szczególności w dziedzinie elektrod modyfikowanych i sensorów/biosensorów amperometrycznych. Możliwe wykorzystanie tej grupy związków umożliwia sterowanie finalnymi właściwościami komponentów materiału elektrodowego.

Połączenie wielościennych nanorurek węglowych (MWCNT), jako materiału węglowego, z pochodnymi pirenu sprawia, że zasadna staje się elektroaktywacja tych związków na powierzchni elektrod modyfikowanych. W jej wyniku powstają nowe formy aktywne redoks, które cechuje bardzo dobra kinetyka transferu elektronów i doskonała odwracalność w elektrolitach obojętnych. Połączenie ścian bocznych nanorurek węglowych z pierścieniem aromatycznym pochodnych pirenu, poprzez oddziaływania typu π - π , umożliwia łatwy, niekowalencyjny sposób syntezy materiałów elektrodowych.

W ramach niniejszej rozprawy doktorskiej skupiono się zatem na adsorpcji pirenu (Pyr) i jego pochodnych, w tym 1-aminopirenu (1-AP), 1-hydroksypirenu (1-HP) i kwasu 1-pirenoboronowego (PBA) na powierzchni elektrody GC modyfikowanej MWCNT. Przeprowadzono procesy elektrochemicznej aktywacji umożliwiające powstanie nowych, elektroaktywnych pochodnych na powierzchni elektrod. Powstanie GC/MWCNT/1-APox umożliwiło dodatkowo elektROUTLENIE NADH przy relatywnie niskim potencjale (+0,1 V vs. Ag/AgCl), a także oznaczenie tego analitu w roztworach modelowych i rzeczywistych (suplementy diety). Ponadto osadzenie katecholu i 3-metoksykatecholu na powierzchni elektrody GC/MWCNT/1-AP pozwoliło na efektywną immobilizację enzymu - dehydrogenazy glukozowej z *Pseudomonas sp.* Dzięki temu oznaczono glukozę dwoma technikami amperometrycznymi przy relatywnie zadowalających parametrach analitycznych. Przeprowadzono również oznaczenie glukozy w roztworze próbki rzeczywistej (napoju izotonicznym).

VII. ABSTRACT

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), such as pyrene and its derivatives, constitute a class of organic compounds that has, so far, seen limited application in analytical electrochemistry - particularly in the design of modified electrodes and amperometric sensors or biosensors. Nevertheless, the potential utilization of these compounds offers a promising strategy for tailoring the final physicochemical properties of electrode materials.

The integration of multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) as carbon-based nanomaterials with pyrene derivatives provides a rational basis for the electrochemical activation of these compounds on the surface of modified electrodes. This process leads to the formation of novel redox-active species exhibiting excellent electron transfer kinetics and high electrochemical reversibility in inert electrolytes. The π - π stacking interactions between the sidewalls of carbon nanotubes and the aromatic rings of pyrene derivatives offer a simple, non-covalent strategy for the construction of functional electrode materials.

This dissertation focused on the adsorption of pyrene (Pyr) and its derivatives - including 1-aminopyrene (1-AP), 1-hydroxypyrene (1-HP), and pyrene-1-boronic acid (PBA) on the surface of glassy carbon (GC) electrodes modified with multi-walled carbon nanotubes (MWCNT). Electrochemical activation processes were employed to generate new electroactive species on the electrode surface. In particular, the formation of the GC/MWCNT/1-APox system enabled the electrooxidation of NADH at relatively low potentials (+0.1 V vs. Ag/AgCl) and facilitated its determination in both model and real samples (diet supplements). Additionally, the deposition of catechol and 3-methoxycatechol on the surface of the GC/MWCNT/1-AP electrode allowed for the efficient immobilisation of glucose dehydrogenase (GDH) from *Pseudomonas sp.* As a result, glucose was successfully determined using two amperometric techniques, yielding satisfactory analytical performance. Glucose quantification was also performed in a real sample matrix (isotonic beverage).

VIII. SPIS RYSUNKÓW

Rys. 1. Schematyczne przedstawienie budowy sensora elektrochemicznego, na podstawie [4].....	16
Rys. 2. Zasada działania biosensora pierwszej generacji, na podstawie [19].....	20
Rys. 3. Schematyczne przedstawienie zasady działania biosensora drugiej generacji, na podstawie [19].....	21
Rys. 4. Zasada działania biosensora trzeciej generacji, na podstawie [19].....	21
Rys. 5. Metody immobilizacji enzymów, na podstawie [49].....	23
Rys. 6. Struktura NADH, na podstawie [89].....	34
Rys. 7. Katalityczne utlenianie NADH dla katalizatora zawierającego grupy chinonowe, na podstawie [95].....	36
Rys. 8. Katalityczne utlenianie β -D-glukozy do D-glukono- δ -laktonu w obecności kofaktora NAD^+ , na podstawie [89].....	37
Rys. 9. Rodzaje nanorurek węglowych, na podstawie [120].....	44
Rys. 10. Budowa molekularna WWA, na podstawie [147].....	52
Rys. 11. Elektrochemiczna aktywacja układu GC/MWCNT/I-AP w 0,1 M $HClO_4$; a - czarna linia (pierwszy skan), b - zielona linia (drugi skan). Szybkość przesuwu potencjału wynosi 50 mV s^{-1}	76
Rys. 12. Widmo masowe ekstraktu metanolowego z elektrody modyfikowanej za pomocą MWCNT/I-APox.....	78
Rys. 13. Widmo masowe fragmentacji związku o m/z 563,6 (ekstrakt metanolowy z elektrody MWCNT/I-APox).....	78
Rys. 14. Widmo masowe ekstraktu metanolowego z elektrody MWCNT/I-APox (rejestrowane w trybie jonów ujemnych).....	79
Rys. 15. Schemat przedstawiający etapy przygotowania elektrody GC/MWCNT/I-APox, w tym proces adsorpcji I-AP na GC/MWCNT z późniejszą elektroaktywacją. W ostatnim etapie przedstawiono odwracalne przejście redoks I-APox z udziałem ugrupowań chinonowych/hydrochinonowych.....	80
Rys. 16. Elektrochemiczna aktywacja układu GC/MWCNT/Pyr w 0,1 M $HClO_4$; a - czarna linia (pierwszy skan), b - zielona linia (drugi skan). Wstawka na wykresie przedstawia aktywację pirenu w szerszym zakresie potencjałów (od $-0,2$ do $+1,2$ V). Szybkość przesuwu potencjału wynosi 50 mV s^{-1}	81

- Rys. 17.** (A) Krzywe woltamperometryczne GC/MWCNT/I-APox przy różnych szybkościach przesuwu potencjału ($10\text{--}100\text{ mV s}^{-1}$) zarejestrowane w $0,1\text{ M HClO}_4$. (B) Zależność prądów (anodowego i katodowego) od szybkości przesuwu potencjału.....82
- Rys. 18.** Wykresy woltamperometrii cyklicznej elektrod GC/MWCNT/I-AP zarejestrowane podczas aktywacji w $0,1\text{ M HClO}_4$ (szybkość przesuwu potencjału 50 mV s^{-1}) dla różnych czasów adsorpcji I-AP. Wstawka na wykresie przedstawia zależność prądu anodowego od czasu adsorpcji I-AP.....83
- Rys. 19.** Krzywe chronoamperometryczne rejestrujące odpowiedź na dodatek $20\text{ }\mu\text{M}$ NADH w zależności od stężenia I-AP użytego do przygotowania elektrody GC/MWCNT/I-APox przy stałym potencjale $+0,1\text{ V vs. Ag/AgCl}$ w PBS ($\text{pH } 7,4$). Wstawka pokazuje zależność prądu utleniania NADH od stężenia I-AP (od $0,125$ do $2,0\text{ mg mL}^{-1}$).....84
- Rys. 20.** Obrazy AFM oraz wizualizacje 3D niemodyfikowanych MWCNT (A i B), a także MWCNT/I-APox (C i D).....86
- Rys. 21.** Obrazy TEM niemodyfikowanych MWCNT (A i B) i MWCNT/I-APox (C i D).....87
- Rys. 22.** Widma FT-IR dla (a) niemodyfikowanych MWCNT, (b) I-AP oraz (c) MWCNT/I-APox.....88
- Rys. 23.** Widma XPS dla (A) MWCNT/I-AP i (B) MWCNT/I-APox. Z kolei (C) i (D) to widma C 1s w wysokiej rozdzielczości odpowiednio dla MWCNT/I-AP i MWCNT/I-APox.....89
- Rys. 24.** (A) Widma O 1s aktywowanego materiału MWCNT/I-APox przedstawione w wysokiej rozdzielczości. (B) Widma N 1s również utlenionego materiału MWCNT/I-APox prezentowane w wysokiej rozdzielczości.....91
- Rys. 25.** (A) Krzywe woltamperometryczne dla GC (a, czarna linia), GC/MWCNT (b, czerwona linia) oraz GC/MWCNT/I-APox (c, niebieska linia) w obecności $1\text{ mM } [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. Szybkość przesuwu potencjału wynosiła 10 mV s^{-1} . (B) Wykresy Nyquista odpowiednich elektrod w elektrolicie obojętnym (PBS, $\text{pH } 7,4$) zawierającym $1\text{ mM } [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$93
- Rys. 26.** (A) Wykresy woltamperometrii cyklicznej dla elektrody GC/MWCNT/I-APox przy różnych szybkościach przesuwu potencjału ($10\text{--}100\text{ mV s}^{-1}$) zarejestrowane w PBS ($\text{pH } 7,4$). (B) Zależność szybkości przesuwu potencjału od anodowego i katodowego prądu pików.....95
- Rys. 27.** (A) Woltamperogramy uzyskane dla elektrody modyfikowanej GC/MWCNT/I-APox przy różnych szybkościach przesuwu potencjału ($100\text{--}5000\text{ mV s}^{-1}$) zarejestrowane w PBS ($\text{pH } 7,4$). (B) Wykres Lavirona dla opisaney elektrody modyfikowanej.....97

- Rys. 28.** Wykresy woltamperometrii cyklicznej zarejestrowane dla elektrody modyfikowanej GC/MWCNT/I-APox w PBS (pH 7,4) przedstawiające 500 skanów. Szybkość przesuwu potencjału wynosi 50 mV s^{-1}99
- Rys. 29.** (A) Woltamperogramy cykliczne dla elektrody modyfikowanej GC/MWCNT/I-APox zarejestrowane w buforach Brittona-Robinsona o różnych pH (od 1,0 do 13,0). Szybkość przesuwu potencjału była równa 50 mV s^{-1} . Wstawka na wykresie przedstawia zależność I_{pA} od pH. (B) Wykres pokazujący zależność E^0 od pH.....100
- Rys. 30.** CV zarejestrowane dla (A) niemodyfikowanej elektrody GC, (B) GC/MWCNT oraz (C) GC/MWCNT/I-APox w buforze fosforanowym o pH 7,4 (a, czarne krzywe) i PBS zawierającym 2 mM NADH (b, zielone krzywe). Szybkość przesuwu potencjału wynosi 10 mV s^{-1}101
- Rys. 31.** Porównanie odpowiedzi elektrod modyfikowanych zarejestrowanych w obecności 2 mM NADH w zależności od środowiska aktywacji dla Pyr i I-AP: (A) Pyr aktywowany w 0,1 M HClO_4 , (B) Pyr aktywowany w PBS, (C) I-AP aktywowany w 0,1 M HClO_4 i (D) I-AP aktywowany w PBS. Szybkość przesuwu potencjału 10 mV s^{-1} . Czarne krzywe (a) zarejestrowano w PBS (pH 7,4), a zielone (b) w roztworze zawierającym 2 mM NADH.....104
- Rys. 32.** (A) Odpowiedź amperometryczna różnych stężeń NADH zarejestrowana dla elektrody modyfikowanej GC/MWCNT/I-APox w buforze fosforanowym (pH 7,4) w warunkach mieszania przy stałym potencjale $+0,1 \text{ V}$ oraz (B) Krzywa kalibracyjna dla elektrod: a - GC/MWCNT i b - GC/MWCNT/I-APox.....105
- Rys. 33.** Krzywa chronoamperometryczna zarejestrowana dla elektrody GC/MWCNT/I-APox po dodaniu $50 \mu\text{M}$ NADH oraz tej samej ilości wybranych interferentów. Pomiar wykonano przy stałym potencjale $+0,1 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl w elektrolicie obojętnym (PBS, pH 7,4) w warunkach mieszania.....107
- Rys. 34.** Stabilność sensora GC/MWCNT/I-APox rejestrowana w wyniku odpowiedzi na dodatek $10 \mu\text{M}$ NADH w czasie 2 godzin. Badania prowadzono przy stałym potencjale $(+0,1 \text{ V vs. Ag/AgCl})$ w buforze fosforanowym (PBS, pH 7,4), w warunkach ciągłego mieszania.....108
- Rys. 35.** Odpowiedzi amperometryczne zarejestrowane dla elektrody GC/MWCNT/I-APox na dodatki rzeczywistych i modelowych roztworów zawierających NADH. Pomiar przeprowadzono przy stałym potencjale $(+0,1 \text{ V vs. Ag/AgCl})$ w elektrolicie obojętnym (PBS, pH 7,4), w warunkach mieszania.....110
- Rys. 36.** Porównanie woltamperogramów dla elektrod GC/MWCNT w buforze fosforanowym (a, czarna linia) i pierwszych skanów wykonanych w roztworach odpowiednich modyfikatorów (b, zielona linia): w (A) 0,1 mM 3-metoksykatecholu i (B) 0,1 mM katecholu. Szybkość przesuwu potencjału 50 mV s^{-1}112

- Rys. 37.** Elektrochemiczny proces formowania adduktów na powierzchni elektrod modyfikowanych GC/MWCNT/1-AP zarejestrowanych w PBS (pH 7,4) zawierającym odpowiednio (A) 0,1 mM 3-MCat i (B) 0,1 mM Cat. Szybkość przesuwu potencjału 50 mV s^{-1}113
- Rys. 38.** Schematyczne przedstawienie etapów przygotowania elektrody modyfikowanej GC/MWCNT/1-AP/3-MCat, w tym adsorpcji 1-AP na MWCNT oraz przyłączenia 3-MCat (reakcja addycji Michaela).....114
- Rys. 39.** Widma FT-IR uzyskane dla MWCNT, 1-AP, MWCNT/1-AP, 3-metoksykatecholu (3-MCat) i MWCNT/1-AP/3-MCat.....115
- Rys. 40.** Widma FT-IR uzyskane dla MWCNT, 1-AP, MWCNT/1-AP, Cat i MWCNT/1-AP/Cat.....116
- Rys. 41.** Zdjęcie elektrody GC ze zdejmowaną końcówką, której użyto do pomiarów AFM.....117
- Rys. 42.** Obrazy AFM uzyskane dla: (A i C) niemodyfikowanych MWCNT, a także materiału (B i D) MWCNT/1-AP/3-MCat. Zaznaczone białe pola na zdjęciach A i B wskazują obszary, z których wykonano powiększenia pokazane na C i D.....118
- Rys. 43.** Obrazy AFM dla: (A) niemodyfikowanych MWCNT oraz (B) MWCNT/1-AP/3-MCat wraz z profilami zaznaczonymi białymi liniami dla (C) MWCNT, a także (D) MWCNT/1-AP/3-MCat.....119
- Rys. 44.** Obrazy AFM: (A i C) przedstawiające niemodyfikowane MWCNT oraz (B i D) materiał MWCNT/1-AP/Cat.....120
- Rys. 45.** Obrazy SEM przedstawiające (A) niemodyfikowane MWCNT oraz (B) modyfikowany materiał elektrodowy MWCNT/1-AP/3-MCat. Pomiar wykonano przy powiększeniu 30 000x.....121
- Rys. 46.** Porównanie krzywych woltamperometrycznych dla elektrod modyfikowanych GC/MWCNT/1-AP/Cat (a, czarna linia) oraz GC/MWCNT/1-AP/3-MCat (b, zielona linia) zarejestrowanych w PBS (pH 7,4). Szybkość przesuwu potencjału 50 mV s^{-1}122
- Rys. 47.** Pomiary *in situ* CV sprzężonej z EQCM dla elektrody modyfikowanej GC/MWCNT/1-AP w roztworach zawierających (A) 0,1 mM katechol i (B) 0,1 mM 3-metoksykatechol. Szybkość przesuwu potencjału 50 mV s^{-1}123
- Rys. 48.** Pomiary *in situ* CA ($E_1 = -0,2 \text{ V}$ oraz $E_2 = +0,2 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl) sprzężonej z EQCM dla elektrody modyfikowanej GC/MWCNT/1-AP w roztworach zawierających (a) 0,1 mM katechol oraz (b) 0,1 mM 3-metoksykatechol.....124
- Rys. 49.** (A) Krzywe woltamperometryczne zarejestrowane dla elektrody GC/MWCNT/1-AP/3-MCat przy różnych szybkościach przesuwu potencjału ($10\text{-}100 \text{ mV s}^{-1}$) w PBS (pH 7,4) oraz (B) Zależność szybkości przesuwu potencjału od prądu piku I_{pA} i I_{pC}125

- Rys. 50.** (A) Wykresy woltamperometrii cyklicznej zarejestrowane dla elektrody GC/MWCNT/I-AP/Cat przy zmieniających się szybkościach przesuwu potencjału ($10\text{--}100\text{ mV s}^{-1}$) w PBS (pH 7,4) oraz (B) Zależność szybkości przesuwu potencjału od prądu piku I_{pA} i I_{pC}126
- Rys. 51.** Woltamperogramy cykliczne zarejestrowane dla: (a) GC, (b) GC/MWCNT, (c) GC/MWCNT/I-AP/Cat i (d) GC/MWCNT/I-AP/3-MCat w obecności 1 mM RuHex. Szybkość przesuwu potencjału 10 mV s^{-1}127
- Rys. 52.** Odpowiedzi chronoamperometryczne na dodatek $50\text{ }\mu\text{M}$ NADH w zależności od modyfikacji elektrody. Eksperyment prowadzono w warunkach mieszania przy stałym potencjale $+0,1\text{ V vs. Ag/AgCl}$, w buforze fosforanowym (PBS, pH 7,4).....129
- Rys. 53.** Odpowiedzi chronoamperometryczne na dodatki $50\text{ }\mu\text{M}$ NADH w zależności od stężenia katecholu ($0,01$; $0,05$; $0,1$; $0,5\text{ mM}$) użytego do przygotowania elektrody GC/MWCNT/I-AP/Cat. Analizę prowadzono w warunkach mieszania przy stałym potencjale ($+0,1\text{ V vs. Ag/AgCl}$) w elektrolicie obojętnym (PBS, pH 7,4). Wstawka ukazuje zależność prądu od stężenia modyfikatora.....130
- Rys. 54.** (A) Krzywa chronoamperometryczna zarejestrowana dla elektrody GC/MWCNT/I-AP/3-MCat po kolejnych dodatkach analitu. Jako elektrolit wykorzystano PBS (pH 7,4), pomiar prowadzono w warunkach mieszania przy stałym potencjale ($E = +0,1\text{ V vs. Ag/AgCl}$). (B) Zależność pomiędzy prądem rejestrowanym po dodatku kolejnych porcji NADH, a jego stężeniem.....131
- Rys. 55.** (A) Odpowiedź amperometryczna różnych stężeń NADH zarejestrowana dla elektrody modyfikowanej GC/MWCNT/I-AP/Cat w buforze fosforanowym (pH 7,4) w warunkach mieszania, przy stałym potencjale $+0,1\text{ V}$ oraz (B) Krzywa kalibracyjna dla opisanego układu.....132
- Rys. 56.** Porównanie krzywych woltamperometrycznych zarejestrowanych dla elektrody GC/MWCNT/I-AP/3-MCat przed (a, czarna linia) i po (b, zielona linia) immobilizacji GDH. Eksperyment przeprowadzono w buforze fosforanowym (PBS, pH 7,4) przy szybkości przesuwu potencjału 50 mV s^{-1}134
- Rys. 57.** Odpowiedzi amperometryczne zarejestrowane dla dodatków 2 mM glukozy w zależności od sposobu modyfikacji elektrody przy stałym potencjale $+0,6\text{ V vs. Ag/AgCl}$ w warunkach mieszania (w obecności 1 mM NAD^+).....135
- Rys. 58.** (A) Odpowiedzi amperometryczne na dodatki różnych stężeń glukozy zarejestrowane dla elektrody GC/MWCNT/I-AP/3-MCat/GDH przy $E_1 = -0,2\text{ V}$ (10 s) i $E_2 = +0,6\text{ V}$ (60 s). Eksperyment przeprowadzono w buforze fosforanowym (PBS, pH 7,4) w obecności 1 mM NAD^+ oraz (B) Zależność stężenia glukozy od prądu utleniania.....136

- Rys. 59.** (A) Krzywe amperometryczne zarejestrowane dla elektrody GC/MWCNT/I-AP/Cat/GDH przy $E_1 = -0,2 \text{ V}$ (10 s) i $E_2 = +0,6 \text{ V}$ (60 s) dla różnych stężeń glukozy. Jako elektrolit wykorzystano PBS (pH 7,4) zawierający 1 mM NAD^+ , a także (B) Krzywa zależności stężenia glukozy w funkcji prądu utlenienia.....137
- Rys. 60.** (A) Odpowiedź amperometryczna elektrody GC/MWCNT/I-AP/3-MCat/GDH dla odpowiednich stężeń glukozy przy stałym potencjale $+0,6 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl (pomiar prowadzono w obecności 1 mM NAD^+ w PBS, w warunkach mieszania). (B) Zależność stężenia glukozy od prądu utlenienia.....138
- Rys. 61.** (A) Krzywa amperometryczna zarejestrowana dla elektrody GC/MWCNT/I-AP/Cat/GDH dla dodatków Glu. Pomiar prowadzono przy stałym potencjale $+0,6 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl w buforze fosforanowym (PBS, pH 7,4) w obecności 1 mM NAD^+ (w warunkach mieszania). (B) Krzywa kalibracyjna wykreślona dla opisanego układu.....139
- Rys. 62.** Krzywa chronoamperometryczna zarejestrowana dla elektrody GC/MWCNT/I-AP/3-MCat/GDH ukazująca dodatek 1 mM glukozy i wybranych substancji interferujących. Eksperyment prowadzono przy stałym potencjale $+0,6 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl w warunkach mieszania (w buforze fosforanowym, w obecności 1 mM NAD^+).....141
- Rys. 63.** Krzywa chronoamperometryczna odpowiedzi biosensora GC/MWCNT/I-AP/3-MCat/GDH zarejestrowana dla dodatku 2 mM glukozy w czasie 16 godzin trwającego pomiaru. Eksperyment prowadzono przy stałym potencjale $+0,6 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl, w warunkach mieszania, w PBS w obecności 1 mM NAD^+142
- Rys. 64.** Krzywe chronoamperometryczne zarejestrowane dla elektrody GC/MWCNT/I-AP/3-MCat/GDH dla 2 mM dodatków Glu wykonywanych w czasie 30 dni. Eksperyment prowadzono przy stałym potencjale $+0,6 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl, w warunkach mieszania, w PBS w obecności 1 mM NAD^+ . Wstawka ilustruje zależność prądu od liczby dni, w których przechowywano elektrodę.....143
- Rys. 65.** (A) Krzywa chronoamperometryczna zarejestrowana dla elektrody GC/MWCNT/I-AP/3-MCat/GDH dla dodatków próbki rzeczywistej oraz 1 mM roztworu glukozy. Pomiar prowadzono w warunkach mieszania, przy stałym potencjale $+0,6 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl, w buforze fosforanowym (PBS, pH 7,4) w obecności 1 mM NAD^+ . (B) Krzywa dodatku wzorca wykreślona na podstawie wyników zebranych na wykresie (A).....145
- Rys. 66.** Elektrochemiczna aktywacja elektrody modyfikowanej GC/MWCNT/I-HP w 0,1 M HClO_4 ; a - czarna linia (pierwszy skan) i b - zielona linia (drugi skan). Szybkość przesuwu potencjału wynosi 50 mV s^{-1}147
- Rys. 67.** Porównanie krzywych woltamperometrycznych dla elektrod GC/MWCNT (a, czarna linia) oraz GC/MWCNT/I-HPox (b, zielona linia) zarejestrowanych w PBS (pH 7,4). Szybkość przesuwu potencjału 10 mV s^{-1}148

- Rys. 68.** (A) Wykresy woltamperometrii cyklicznej dla elektrody GC/MWCNT/I-HPox przy różnych szybkościach przesuwu potencjału (od 10 do 100 mV s^{-1}) zarejestrowane w PBS (pH 7,4). (B) Zależność szybkości przesuwu potencjału od anodowego i katodowego prądu pików.....149
- Rys. 69.** Stabilność elektrody GC/MWCNT/I-HPox. Krzywe woltamperometryczne zarejestrowano w buforze fosforanowym (PBS, pH 7,4), w zakresie potencjałów od $-0,3$ do $+0,2$ V vs. Ag/AgCl. Szybkość przesuwu potencjału wynosi 50 mV s^{-1}150
- Rys. 70.** Elektroaktywacja elektrody modyfikowanej GC/MWCNT/PBA, w zakresie potencjałów od $-0,5$ do $+1,0$ V vs. Ag/AgCl, w elektrolicie obojętnym (PBS, pH 7,4); a - czarna linia (pierwszy skan), b - zielona linia (drugi skan). Szybkość przesuwu potencjału 50 mV s^{-1}151
- Rys. 71.** Schematyczne przedstawienie struktury kwasu 1-pirenoboronowego po aktywacji w wyżej opisanych warunkach uwzględniające przejście redoks PBAox z udziałem ugrupowań chinonowych/hydrochinonowych.....152
- Rys. 72.** (A) Krzywe woltamperometryczne dla elektrody GC/MWCNT/PBAox przy różnych szybkościach przesuwu potencjału (10-100 mV s^{-1}) zarejestrowane w PBS (pH 7,4) oraz (B) Zależność szybkości przesuwu potencjału od prądu pików.....153
- Rys. 73.** (A) Woltamperogramy cykliczne elektrody modyfikowanej GC/MWCNT/PBAox zarejestrowane w buforach Brittona-Robinsona o różnych pH (2,24-10,59). Szybkość przesuwu potencjału 50 mV s^{-1} , także (B) Wykres ilustrujący zależność $E^{0'}$ od pH.....154
- Rys. 74.** Krzywe woltamperometryczne dla elektrody modyfikowanej GC/MWCNT/PBAox w buforze Brittona-Robinsona o pH 8,51 rejestrowane po dodaniu kolejnych porcji analitu. Szybkość przesuwu potencjału 50 mV s^{-1} . Wstawka a) pokazuje wykres zależności $E^{0'}$ od stężenia Glu, natomiast b) to liniowa zależność pomiędzy $E^{0'}$, a logarytmem ze stężenia analitu.....155
- Rys. 75.** Konfiguracje utlenionej formy kwasu 1-pirenoboronowego (PBAox) w środowisku wodnym (w obecności jonów OH^-), a także struktura kompleksu powstała w wyniku reakcji estryfikacji pomiędzy cząsteczką PBAox, a glukozą, na podstawie [248,249].....156

IX. SPIS TABEL

Tabela 1. Porównanie jedno- i wielościennych nanorurek węglowych, na podstawie [121–123].....	45
Tabela 2. Nazwy i struktury najczęściej analizowanych WWA, na podstawie [147,150].....	53-55
Tabela 3. Porównanie wartości sygnałów XPS widm C 1s dla MWCNT/1-AP i MWCNT/1-APox.....	90
Tabela 4. Porównanie wartości sygnałów XPS widm MWCNT/1-AP i MWCNT/1-APox.....	91
Tabela 5. Porównanie warunków aktywacji elektrod GC/MWCNT zawierających piren i 1-aminopiren.....	103
Tabela 6. Porównanie parametrów analitycznych dla różnych elektrod modyfikowanych stosowanych do elektrochemicznej detekcji NADH.....	106
Tabela 7. Oznaczanie NADH w próbkach rzeczywistych (suplementy diety).....	110
Tabela 8. Porównanie parametrów analitycznych dla różnych elektrod modyfikowanych stosowanych do elektrochemicznego oznaczania NADH.....	133
Tabela 9. Porównanie parametrów analitycznych różnych biosensorów używanych do detekcji glukozy.....	140

X. DOROBEK NAUKOWY

Publikacje

1. **Leda A.**, Płócienniczak-Bywalska P., Milczarek G., Rębiś T., *Electrochemical assembly of 3-methoxycatechol and catechol on 1-Aminopyrene-functionalized carbon nanotubes for efficient NADH and glucose biosensing*, *Electrochimica Acta*, 521, 2025, 145906. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2025.145906> (MEiN: 100, IF: 5,6)
2. Falkowski M., **Leda A.**, Hassani M., Wiciński M., Młynarczyk D.T, Duzgunes N., Marszał M.P., Milczarek G., Piskorz J., Rębiś T., *Manganese Sulfanyl Porphyrizine-MWCNT Nanohybrid Electrode Material as a Catalyst for H₂O₂ and Glucose Biosensors*, *Sensors*, 24, 2024, 6257-1-6257-20. <https://doi.org/10.3390/s24196257> (MEiN: 100, IF: 3,5)
3. Płócienniczak-Bywalska P., Rębiś T., **Leda A.**, Milczarek G., *Lignosulfonate-assisted in situ deposition of palladium nanoparticles on carbon nanotubes for the electrocatalytic sensing of hydrazine*, *Molecules*, 28, 2023, 7076-1-7076-21. <https://doi.org/10.3390/molecules28207076> (MEiN: 140, IF: 4,2)
4. **Leda A.**, Rębiś T., Frankowski R., Jesionowski T., Milczarek G., *Electrochemical generation of 1-amino-pyrene-4,5,9,10 tetrol on the MWCNT surface for low potential electrocatalytic NADH oxidation*, *Electrochimica Acta*, 463, 2023, 142822-1-142822-13. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2023.142822> (MEiN: 100, IF: 6,6)
5. Hassani M., **Leda A.**, Porolnik W., Falkowski M., Rębiś T., Piskorz J., Popenda Ł., Wiciński M., Młynarczyk D.T., Duzgunes N., Marszał M.P., *Synthesis, electrochemical and photochemical properties of sulfanyl porphyrizine with ferrocenyl substituents*, *Molecules*, 28, 2023, 5215-1-5215-14. <https://doi.org/10.3390/molecules28135215> (MEiN: 140, IF: 4,2)

6. **Leda A.**, Hassani M., Rębiś T., Falkowski M., Piskorz J., Młynarczyk D.T., McNeice P., Milczarek G., *Improved Electrochemical Hydrogen Peroxide Detection Using a Nickel(II) Phthalimide-Substituted Porphyrazine Combined with Various Carbon Nanomaterials*, *Nanomaterials*, 13, 2023, 862-1-862-14. <https://doi.org/10.3390/nano13050862> (MEiN: 100, IF: 4,4)
7. Falkowski M., **Leda A.**, Rębiś T., Piskorz J., Popenda Ł., Hassani M., Młynarczyk D.T., Marszał M. P., Milczarek G., *A Synergistic Effect of Phthalimide-Substituted Sulfanyl Porphyrazines and Carbon Nanotubes to Improve the Electrocatalytic Detection of Hydrogen Peroxide*, *Molecules*, 27, 2022, 4409-1-4409-15. <https://doi.org/10.3390/molecules27144409> (MEiN: 140, IF: 4,6)
8. Płócienniczak P., Rębiś T., **Leda A.**, Milczarek G., *Lignosulfonate-assisted synthesis of platinum nanoparticles deposited on multi-walled carbon nanotubes for biosensing of glucose*, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 210, 2022, 112222. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112222> (MEiN: 100, IF: 5,6)
9. Kuznowicz M., Jędrzak A., **Leda A.**, Rębiś T., Jesionowski T., *Measurements of working parameters of external mediators for biodetectors based on the polydopamine@magnetite nanoparticles*, *Measurement*, 184, 2021, 109950-1-109950-10. <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2021.109950> (MEiN: 200, IF: 5,131)

Udział w konferencjach naukowych

1. **Leda A.**, Płócienniczak-Bywalska P., Milczarek G., Rębiś T., *Electrochemical deposition of 3-methoxycatechol and catechol onto carbon nanotubes functionalized with 1-aminopyrene for improved electrochemical sensing of NADH*, National Scientific Conference „6th Summer Scientific On-line School”, on-line, 02.08.2025.
2. **Leda A.**, Płócienniczak-Bywalska P., Milczarek G., Rębiś T., *Enzymatic glucose biosensor based on GC/MWCNT/1-AP/3-MCat/GDH*, National Scientific Conference „6th Summer Scientific On-line School”, on-line, 02.08.2025 - poster.

3. **Leda A.**, Milczarek G., Falkowski M., Rębiś T., *Charakterystyka elektrochemiczna materiału elektrodowego typu GC/MWCNT/Pz (Mn)*, II Ogólnopolska Konferencja Naukowa „PUTChemikon”, Poznań, 18.05.2024 - poster.
4. **Leda A.**, Rębiś T., Hassani M., Falkowski M., Milczarek G., *Właściwości elektrochemiczne sulfanyloporfirazyny z podstawnikami ferrocenyłowymi*, Zjazd Zimowy Sekcji Młodych Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Łódź, 09.12.2023 - poster.
5. Płócienniczak P., Rębiś T., **Leda A.**, Milczarek G., *Lignosulfonate-assisted in situ deposition of palladium nanoparticles on carbon nanotubes for the electrocatalytic sensing of hydrazine*, 2nd French-Polish Chemistry Congress, Montpellier, 28-31.08.2023 - poster.
6. **Leda A.**, Rębiś T., Hassani M., Falkowski M., Milczarek G., *Właściwości elektrochemiczne modyfikowanej elektrody GC/MWCNTs/Pz*, XVI Kopernikańskie Seminarium Doktoranckie, Toruń, 29-30.06.2023.
7. **Leda A.**, Rębiś T., Hassani M., Falkowski M., Milczarek G., *Electrochemical properties of an electrode modified with multi-walled carbon nanotubes and an iron-metalated sulfanylporphyrine derivative*, National Scientific Conference „Science and Young Researchers”, 7th Edition, on-line, 03.06.2023 - poster.
8. **Leda A.**, Rębiś T., Falkowski M., Milczarek G., *Wykrywanie nadtlenu wodoru na elektrodach modyfikowanych materiałami węglowymi połączonymi z porfirazynami*, I Ogólnopolska Konferencja Naukowa „PUTChemikon”, Poznań, 06.05.2023 - poster.
9. Hassani M., **Leda A.**, Falkowski M., Porolnik W., Rębiś T., Marszał M.P., Milczarek G., *Synergiczny efekt porfirazyn siarkowych posiadających peryferyjne ugrupowanie ftalimidowe i nanorurek węglowych w celu poprawy elektrokatalitycznego wykrywania nadtlenu wodoru*, IV Ogólnopolskie Sympozjum Chemii Bioorganicznej, Organicznej i Biomateriałów „BioOrg”, Poznań, 03.12.2022 - poster.

10. **Leda A.**, Rębiś T., Falkowski M., Milczarek G., *Metalowana pochodna porfirazyny połączona z nanorurkami węglowymi jako matryca amperometrycznego sensora*, IV Ogólnopolskie Sympozjum Chemii Bioorganicznej, Organicznej i Biomateriałów „BioOrg”, Poznań, 03.12.2022 - poster.
11. **Leda A.**, Rębiś T., Falkowski M., Milczarek G., *Electrocatalytic detection of hydrogen peroxide*, National Scientific Conference „Understand the Science”, 6th Edition, on-line, 17.09.2022 - poster.
12. Płócienniczak P., **Leda A.**, Rębiś T., Milczarek G., *Elektrodowy materiał hybrydowy na bazie nanocząstek palladu do oznaczania hydrazyny*, 64 Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Lublin, Polska, 11-16.09.2022 - poster.
13. Płócienniczak P., **Leda A.**, Rębiś T., Milczarek G., *Materiał elektrodowy typu nanorurka węglowa / lignosulfonian / nanocząstka palladu do oznaczania metanolu*, 64 Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Lublin, Polska, 11-16.09.2022 - poster.
14. **Leda A.**, Płócienniczak P., Rębiś T., Milczarek G., *Charakterystyka elektrochemiczna układu hybrydowego: GC/MWCNT/I-AP*, 64 Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Lublin, Polska, 11-16.09.2022 - poster.
15. **Leda A.**, Płócienniczak P., Rębiś T., Milczarek G., *Materiał hybrydowy typu MWCNT/I-AP jako matryca sensora NADH*, 64 Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Lublin, Polska, 11-16.09.2022 - poster.
16. **Leda A.**, Rębiś T., Płócienniczak P., Milczarek G., *Hybrid system based on platinum nanostructures as an effective electrocatalyst for hydrazine oxidation reaction*, National Scientific Conference „Knowledge - Key to Success”, 6th Edition, on-line, 22.01.2022 - poster.
17. **Leda A.**, Płócienniczak P., Rębiś T., Milczarek G., *Nanocząstki platyny wykorzystane w reakcji elektrokatalitycznego utleniania formaldehydu*, II Ogólnopolska Studencka Konferencja Naukowa „Bliżej Chemii”, on-line, 08-09.01.2022 - poster.
18. **Leda A.**, Rębiś T., Płócienniczak P., Milczarek G., *Optymalizacja układów hybrydowych, na bazie ligniny i nanostruktur platyny oraz palladu, ze względu na stężenie lignosulfonianu*, XVIII Wrocławskie Studenckie Sympozjum Chemiczne, on-line, 04-05.12.2021.

19. **Leda A.**, Rębiś T., Płócienniczak P., Milczarek G., *Hybrid conductive materials based on lignosulfonates and nano-particles of noble metals with increased electrocatalytic properties*, National Scientific Conference „e-Factory of Science”, 6th Edition, on-line, 20.11.2021.
20. **Leda A.**, Płócienniczak P., Rębiś T., Milczarek G., *Material hybrydowy typu MWCNT/LS/NPd zastosowany w kierunku utleniania substancji niebezpiecznych*, IV Edycja Studenckiej Konferencji Nauk Ścisłych im. prof. Antoniego Hoborskiego, on-line, 15.11.2021.
21. **Leda A.**, Kuznowicz M., Rębiś T., Jesionowski T., *Optimization of working conditions of the second generation biosensor due to the selection of an appropriate mediator*, National Scientific Conference “Knowledge - Key to Success”, 5th Edition, on-line, 23.01.2021.
22. Płócienniczak P., Rębiś T., **Leda A.**, Milczarek G., *Synteza hybrydowych materiałów elektrodowych z wykorzystaniem lignosulfonianów i cząstek metali szlachetnych*, XVII KONFERENCJA „Elektroanaliza w teorii i praktyce”, on-line, 19-20.11.2020.
23. Płócienniczak P., Rębiś T., **Leda A.**, Milczarek G., *Właściwości elektrokatalityczne nowego materiału elektrodowego na bazie nanostruktur platyny*, XVII KONFERENCJA „Elektroanaliza w teorii i praktyce”, on-line, 19-20.11.2020 - poster.