

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální chemie



ELEKTRODY MODIFIKOVANÉ NANOČÁSTICEMI MĚDI, OXIDY A SULFIDY MĚDI JAKO SENZORY PRO ELEKTROCHEMICKÉ STANOVENÍ SACHARIDŮ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

| | |
|-------------------|-----------------------------|
| Autor: | Bc. Jana Šťavíková |
| Studijní program: | B 1407 Chemie |
| Studijní obor: | Materiálová chemie |
| Vedoucí práce: | doc. RNDr. Jan Hrbáč, Ph.D. |

Olomouc 2011

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v této práci využila, jsou v seznamu použité literatury.

Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Katedry fyzikální chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu své práce doc. RNDr. Janu Hrbáčovi, Ph.D. a konzultantovi diplomové práce Mgr. Vladimíru Halouzkovi za odborné vedení, cenné rady a trpělivost, které mi poskytli při zpracování této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Aleši Panáčkovi, Ph.D. za pomoc při poskytnutí snímků z transmisního elektronového mikroskopu.

Bibliografická identifikace:

| | |
|--------------------------|---|
| Jméno a příjmení autora: | Jana Šťavíková |
| Název práce: | Elektrody modifikované nanočásticemi mědi, oxidy a sulfidy mědi jako senzory pro elektrochemické stanovení sacharidů |
| Typ práce: | Diplomová |
| Pracoviště: | Katedra fyzikální chemie |
| Vedoucí práce: | doc. RNDr. Jan Hrbáč, Ph.D. |
| Rok obhajoby práce: | 2011 |
| Abstrakt: | <p>Předmětem této práce bylo studium senzorů pro stanovení glukosy. Jako senzory byly používány a testovány elektrody modifikované nanočásticemi mědi, nanočásticemi oxidů a sulfidů mědi a sloučeninami mědi (CuO, Cu₂S). Cílem práce bylo najít vhodný a citlivý elektrodový povrch pro amperometrické stanovení glukosy. Elektrody byly modifikovány různými způsoby. Byly prováděny depozice nanočástic mědi, Cu₂O a nanočástic Cu₂S v matrici polymerní látky. Dále byly provedeny depozice vrstvy CuO pomocí anodizace měděné elektrody v 0,1 M NaOH a depozice vrstvy Cu₂S pomocí anodizace měděné elektrody v 0,1 M NaSH. Dále byla prováděna depozice vrstvy mědi z roztoku CuSO₄ (bez přítomnosti a v přítomnosti PAL) pomocí amperometrie. Nejlepší výsledky vykazovala elektroda modifikovaná nanočásticemi mědi rozptýlenými v Nafionu, elektroda modifikovaná nanočásticemi Cu₂S rozptýlenými v Nafionu a elektroda modifikovaná vrstvou Cu₂S.</p> |

Klíčová slova: Glukosa, nanočátice mědi, nanočástice Cu_2O , nanočástice Cu_2S , CuO , Cu_2S , skelný uhlík, měděná elektroda, amperometrie

Počet stran: 65

Počet příloh: 0

Jazyk: čeština

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Jana Šťavíková

Title: Electrodes modified with copper, copper oxides and copper sulfides as an electrochemical sensors for saccharide determination

Department: Department of Physical Chemistry

Type of thesis: Master

Supervisor: doc. RNDr. Jan Hrbáč, Ph.D.

The year of presentation: 2011

Abstract: The subject of this thesis was the study of sensors suitable for glucose determination. There were used and tested electrodes modified with copper nanoparticles, copper oxide and copper sulfide nanoparticles and copper substances (CuO, Cu₂S) as suitable sensors for glucose determination. The aim of this thesis was to find a suitable and sensitive electrode surface for amperometric glucose determination. The electrodes were modified by different ways. We carried out the deposition of copper nanoparticles, Cu₂O and Cu₂S nanoparticles in polymer matrix, the deposition of CuO layer by anodisation of copper electrode in 0,1 M NaOH and the deposition of Cu₂S layer by anodisation of copper electrode in 0,1 M NaSH. We carried out also the deposition of Cu layer gained from CuSO₄ solution (without and with surfactant) by amperometry. The best results proved the electrode modified with copper nanoparticles dispersed in Nafion, the electrode

modified with Cu_2S nanoparticles dispersed in Nafion and the electrode modified with Cu_2S layer.

Keywords:

Glucose, copper nanoparticles, Cu_2O nanoparticles, Cu_2S nanoparticles, CuO , Cu_2S , glassy carbon, copper electrode, amperometry

Number of pages:

65

Number of appendices:

0

Language:

Czech

OBSAH

| | |
|--|-----------|
| Seznam použitých zkratk | 9 |
| 1. Úvod | 10 |
| 2. Teoretická část | 11 |
| 2.1 Stanovení glukosy | 11 |
| 2.2 Enzymatické glukosové senzory | 12 |
| 2.2.1 Rozdělení enzymatických (na bázi GOx) glukosových senzorů | 13 |
| 2.2.2 Imobilizace GOx na povrch elektrody | 15 |
| 2.2.3 Využití nanomateriálů při konstrukci senzorů využívajících GOx | 17 |
| 2.3 Neenzymatické glukosové senzory | 20 |
| 2.3.1 Platinové elektrody | 20 |
| 2.3.2 Zlaté elektrody | 22 |
| 2.3.3 Niklové elektrody | 23 |
| 2.3.4 Měděné elektrody | 23 |
| 2.3.5 Uhlíkové elektrody | 23 |
| 2.3.6 Elektrody modifikované nanomateriály | 24 |
| 3. Experimentální část | 29 |
| 3.1 Používané chemikálie, roztoky a přístrojové vybavení | 29 |
| 3.2 Výroba měděné elektrody | 30 |
| 3.3 Příprava elektrody ze skelného uhlíku | 31 |
| 3.4 Postup přípravy nanočástic mědi, Cu_2O a Cu_2S | 31 |
| 3.5 Amperometrické stanovení glukosy | 32 |
| 4. Výsledky a diskuze | 33 |
| 4.1 Techniky modifikace elektrod | 33 |
| 4.2 Elektroanalýza glukosy na měděných elektrodách | 35 |
| 4.3 Elektroanalýza glukosy na elektrodách modifikovaných oxidy mědi | 42 |
| 4.4 Elektroanalýza glukosy na elektrodách modifikovaných sulfidy mědi | 45 |
| 4.4.1 Depozice vrstvy Cu_2S při rozdílném počtu scanů | 47 |
| 4.4.2 Depozice při rozdílné rychlosti scanu | 50 |
| 4.4.3 Depozice při rozdílném potenciálovém rozsahu | 51 |
| 4.4.4 pH závislost odezvy senzoru | 53 |
| 5. Závěr | 56 |
| 6. Summary | 58 |
| 7. Použitá literatura | 59 |

Seznam použitých zkratek

| | |
|-------------------|---|
| GO _x | glukosaoxidas |
| ATP | adenosintrifosfát |
| NAD ⁺ | oxidovaná forma nikotinamidadenindinukleotidu |
| NADH | redukována forma nikotinamidadenindinukleotidu |
| FAD | oxidovaná forma flavinadenindinukleotidu |
| FADH ₂ | redukována forma flavinadenindinukleotidu |
| CNTs | uhlíkové nanotrubičky (carbon nanotubes) |
| SWCNTs | jednotěnné uhlíkové nanotrubičky (single-walled carbon nanotubes) |
| MWCNTs | vícetěnné uhlíkové nanotrubičky (multi-walled carbon nanotubes) |
| BDD | diamantové elektrody dopované borem |
| GC | skelný uhlík (glassy carbon) |

1. Úvod

Sacharidy patří k základním stavebním prvkům živých organismů, plní funkci zásobních látek a slouží jako zdroj energie. Stanovení sacharidů je důležité nejen v průmyslových aplikacích – potravinářský průmysl (fermentace), farmacie, biotechnologie, ale především v medicíně. Právě díky medicínským aplikacím dosáhly významného rozmachu glukosové senzory, což je způsobeno nutností nalezení jednoduchého, rychlého, spolehlivého a levného způsobu stanovení obsahu glukosy v krvi. Přesné stanovení obsahu glukosy v krvi je nezbytné obzvláště při diagnostice a léčbě onemocnění diabetes mellitus, kterým v dnešní době trpí více než 200 mil. osob.

V současné době existují dva základní typy senzorů pro stanovení glukosy. Prvním jsou senzory pro stanovení glukosy, jejichž aktivní složkou je enzym glukosaoxidasu. Druhým typem jsou senzory, jež neobsahují enzym glukosaoxidasu, povrch elektrody je citlivý přímo k přídávčkům glukosy, např. měděné elektrody.

Předložená diplomová práce se zabývá senzory pro přímé stanovení glukosy. Cílem práce je najít účinný a citlivý elektrodový povrch pro amperometrické stanovení glukosy. Za tímto účelem jsme testovali elektrodový povrch na bázi mědi, nanočástic mědi a sloučenin mědi (Cu_2S).

2. Teoretická část

2.1 Stanovení glukosy

Rychlé, levné a spolehlivé stanovení obsahu glukosy hraje důležitou roli nejen v potravinářském průmyslu nebo výrobních procesech (např. fermentace), ale především v medicíně, zejména při diagnostice a léčbě diabetes mellitus. V současné době patří diabetes mellitus k jednomu z nejvíce rozšířených onemocnění postihujícím více než 200 milionů lidí na celém světě [1].

Mezi běžně používané metody pro stanovení glukosy patří kapalinová chromatografie [2, 3], plynová chromatografie [4, 5], kalorimetrie [6] či titrace (např. jodometrická) [7, 8].

Další významnou skupinu metod pro stanovení glukosy tvoří široká škála elektrochemických stanovení za využití rozmanitých elektrochemických metod – např. polarografie, voltametrie nebo amperometrie. Výhodou elektrochemických technik oproti jiným metodám stanovení je nízká finanční nákladnost, rychlost a selektivita [9].

V medicíně bývají zpravidla aplikovány dva základní typy monitorování glukosy, a to in-vitro a in-vivo.

In-vitro glukosové senzory jsou založeny na kontrole hladiny glukosy v krvi pomocí glukometrů [10], přístrojů, které obsahují tzv. testovací proužky, tvořené kapilárou a miniaturním elektrodovým systémem. Úkolem kapiláry je nasát vzorek krve dovnitř glukometru, kde se nachází elektrodový systém s pracovní a referentní elektrodou, mezi nimiž prochází elektrický proud. Velikost proudu odpovídá výsledné glykemické hladině v krvi.

U některých pacientů je potřeba měřit hladiny glukosy kontinuálně i s dávkováním inzulínu. In-vivo monitorování glukosy [11] probíhá v kontinuálních glukosových monitorech, jako elektrochemických senzorech. Elektrochemický senzor je vložen do podkožní tkáně paže či žaludku po dobu několika dnů. Během této doby je neustále sledována hladina glukosy v krvi. Amperometrický signál je následně zaznamenáván a data jsou přenesena k přijímači, který vyhodnotí glykemickou hladinu v krvi.

Mezi největší problémy amperometrického stanovení glukosy patří přítomnost elektroaktivních interferentů v krvi a inaktivace elektrody.

K nejčastějším elektroaktivním látkám vyskytujících se v krvi patří kyselina askorbová (vitamin C) a kyselina močová [12]. Tyto dvě kyseliny patří při elektrochemickém stanovení glukosy k nejvíce rušivým elementům. Stejně tak jako glukosa jsou silnými redukčními činidly. Koncentrace kyseliny L-askorbové v krvi se pohybuje v rozmezí od 0,02 až 0,08 mM. Kyselina močová je konečným metabolitem purinů a její koncentrace v krvi se pohybuje v rozmezí od 0,18 do 42 mM.

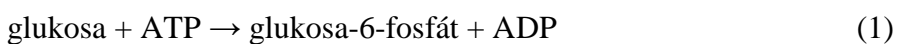
Vlivu interferentů na stanovení glukosy pomocí elektrochemických senzorů lze předejít několika způsoby. Jedním z nich je opatření senzoru vrstvou tvořenou Nafionem. Nafion je sulfonovaný tetrafluoroethylen, mající záporný náboj, čímž zabraňuje průchodu aniontů vrstvou. Vrstva Nafionu tak výrazně omezuje přenos nežádoucích interferentů k povrchu elektrody. Tímto způsobem mohou být odstraněny zřejmě kyselina askorbová a kyselina močová.

Dalšími významnými interferenty stanovení glukosy v krvi mohou být proteiny. Pro zabránění vlivu proteinů se používá polymerizovaná selektivní vrstva tvořená polyfenolem nebo polypyrrolem. Enzym se pokryje tenkou vrstvou polyfenolu nebo polypyrrolu. Díky přítomnosti vrstvy nemohou proteiny inaktivovat povrch elektrody. Výhodou této metody je jednoduchost experimentálního provedení.

2.2 Enzymatické glukosové senzory

Většina enzymatických senzorů funguje s pomocí různých prostředníků nebo katalyzátorů, kterých se využívá k účinnému efektivnímu elektrickému kontaktu enzymatických aktivních center s elektrodami.

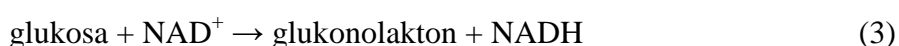
Jedním z postupů monitorování glukosy je metoda využívající enzym hexokinasu (EC 2.7.1.1) [13]. Hexokinasa v přítomnosti ATP fosforyluje glukosu na glukosa-6-fosfát, který je v přítomnosti koenzymu NAD⁺ oxidován enzymem glukosa-6-fosfát dehydrogenasou (EC 1.1.1.49) na glukonát-6-fosfát za současné redukce NAD⁺ na NADH podle níže uvedených reakcí (1, 2).



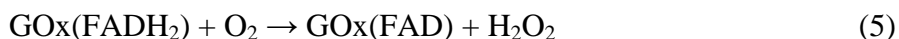
Množství vzniklého NADH odpovídá koncentraci glukosy a nejčastěji bývá stanoveno fotometricky [14] nebo také elektrochemicky [15].

Další dvě metody zahrnují enzymatické elektrochemické glukosové senzory založené buď na použití enzymu glukosaoxidasy (EC 1.1.3.4), nebo glukosadehydrogenasy (EC 1.1.99.10).

Stanovení glukosy pomocí glukosadehydrogenasy je méně časté. Tento enzym oxiduje glukosu na glukonolakton v přítomnosti NAD^+ za vzniku NADH, jak je uvedeno v rovnici (3). Množství vzniklého NADH odpovídá koncentraci glukosy.



Nejčastěji používaným enzymem pro stanovení glukosy je GOx, převážně pro svoji snadnou dostupnost, relativně nízkou cenu a především stabilitu. [12, 16]. GOx (EC 1.1.3.4) patří mezi oxidoreduktasy, obsahuje flavinadenin dinukleotid (FAD) jako koenzym [16]. Během enzymatické reakce mezi GOx a glukosou je FAD glukosou redukován na FADH_2 a glukosa se oxiduje na glukonolakton. FADH_2 je dále reoxidován rozpuštěným kyslíkem a vzniká H_2O_2 a FAD [17].



Podle toho, jestli se elektrochemicky stanovuje úbytek kyslíku, vznik peroxidu vodíku, redukováná forma mediátoru, nebo je aktivní místo enzymu schopné elektrochemické regenerace, lze senzory na bázi GOx rozdělit do následujících (typů) skupin:

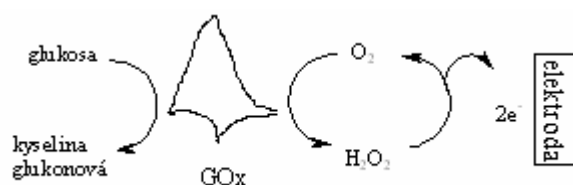
2.2.1 Rozdělení enzymatických (na bázi GOx) glukosových senzorů

Biosenzory I. generace

Biosenzory první generace jsou založené na stanovování úbytku kyslíku. Glukosa je stanovována amperometricky v závislosti na obsahu kyslíku ve vodném roztoku. V roce 1962 Clark a Lyons přišli s návrhem použít enzym glukosaoxidasy pro konstrukci elektrochemického biosenzoru [17]. Jednalo se o biosenzor pro stanovení glukosy v krevní plazmě. Ve své aplikaci popsali elektrodový systém oddělený od měřeného prostředí membránou propustnou pro plyny. Clarkova a Lyonsova metoda je

založena na imobilizaci GOx na membránu kyslíkové elektrody, GOx přeměňuje glukosu podle výše uvedených reakcí (4, 5), při nichž dochází ke spotřebě kyslíku v roztoku. Pokles koncentrace kyslíku je úměrný koncentraci glukosy ve vzorku. Tato metoda představuje spolehlivý měřicí systém, využitelný v mnoha aplikacích.

Jako první uvedla na trh biosenzor tohoto typu firma Yellow Spring Instrument Company (Ohio) v roce 1975. Updike a Hicks tento princip zdokonalili použitím dvou kyslíkových pracovních elektrod, z nichž jedna byla potažená vrstvou enzymu a druhá sloužila pro odečtení pozadí [18].



Obr. 1: Biosenzory I. generace

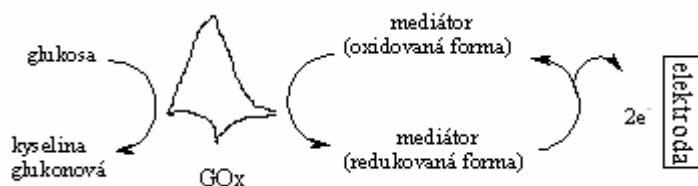
Biosenzory často poskytují odezvu nejen na stanovovaný analyt, tj. glukosu, ale i na elektroaktivní interferenty, které mohou být přítomny ve vzorku [12]. S tímto problémem se potýkají zejména biosenzory první generace, u kterých je třeba průběžně kontrolovat hladinu koncentrace rozpuštěného kyslíku a udržovat ji konstantní. V opačném případě by nebyla odezva biosenzoru na úbytek kyslíku úměrná koncentraci glukosy.

Biosenzory využívající stanovení peroxidu vodíku

Pro analytické stanovení glukosy pomocí enzymatické reakce lze využít také stanovení peroxidu vodíku generovaného enzymatickou reakcí (5). Stanovit běžně H₂O₂ lze pomocí spektroskopických, titračních nebo chemiluminiscenčních metod [18, 19, 20]. Nicméně mezi nejpopulárnější metody v dnešní době patří metody elektrochemické [21], kdy je peroxid vodíku možné stanovit v oblasti katodické či anodické [22]. Pro stanovení peroxidu vodíku se používají elektrody platinové, stříbrné nebo uhlíkové, příkladem mohou být modifikované elektrody ze skelného uhlíku. Většina amperometrických glukosových biosenzorů je založena na elektrochemické oxidaci peroxidu vodíku.

Biosenzory II. generace

Biosenzory druhé generace jsou založené na použití mediátoru, neboli nízkomolekulární redoxní látky používané pro usnadnění výměny elektronů mezi enzymy nebo jinými redoxními biomolekulami a elektrodou. Narozdíl od první skupiny nepoužívají tedy kyslík jako oxidační činidlo, proto se nemusí kontrolovat hladina koncentrace rozpuštěného kyslíku. V případě reakce glukosy s GOx je kyslík v reakci (5) nahrazen oxidovanou formou mediátoru, po reakci s GOx(FADH₂) je redukovaná forma reoxidována na elektrodě. Mediátory urychlují výměnu elektronů mezi aktivním centrem enzymu a elektrodou [12]. Jako mediátory se často používají např. chinony či ferroceny [23]. Oproti senzorům s peroxidem, biosenzory druhé generace pracují při nižších potenciálech, čímž se dá zabránit interferencím způsobených přítomností jiných elektroaktivních látek.



Obr. 2: Biosenzory II. generace

Biosenzory III. generace

Biosenzory třetí generace jsou založené na přímém přenosu elektronů mezi elektrodou a aktivním centrem enzymu [23, 24]. U těchto biosenzorů se používá mediátor pro spojení enzymu s elektrodou. Enzym není možno oxidovat, ani redukovat přímo na běžné (zlaté či uhlíkové) elektrodě, kde dochází k denaturaci proteinové části enzymu, čímž se celý proces zpomalí. Jednou z možností jak tomuto problému předejít, je například modifikace zlaté elektrody 4,4'-bipyridylem [25]. Bipyridyl není sám o sobě elektroaktivní látkou, ale zabraňuje denaturaci.

2.2.2 Imobilizace GOx na povrch elektrody

Pro úspěšné zhotovení biosenzoru je důležitá imobilizace biologického materiálu na povrch elektrody [26, 27]. Jedním z nejvíce používaných způsobů imobilizace je adsorpce. Při tomto procesu se využívají nejrůznější interakce (hydrofobní interakce,

vodíkové můstky nebo iontové síly), které jsou závislé na pH, iontové síle a teplotě. Adsorpce má oproti ostatním imobilizačním metodám řadu výhod. Je méně ekonomicky nákladná, má jednodušší způsob provedení a po inaktivaci imobilizovaného enzymu může být proces adsorpce několikrát opakován. Imobilizací GOx pomocí adsorpce se ve své práci zabývá Bayramoglu a kol. Pro imobilizaci autoři využili polymer, konkrétně polyanilin [26]. Vodivé polymerní vrstvy umožňují snadnější přenos elektronů mezi enzymem a povrchem elektrody. Polyanilin sloužil pro modifikaci povrchu polyakrylonitrylu. GOx o koncentraci 1 mg/ml byla imobilizována na membrány polyanilinu a polyakrylonitrylu při teplotě 22 °C, délka imobilizace byla 4 hodiny. Po této době byly membrány imobilizované GOx z roztoku odstraněny a propláchnuty fosfátovým pufrům o pH 7. Díky přítomnosti vodivých kompozitních membrán vykazovala GOx lepší teplotní stabilitu a aktivitu. Imobilizovaná vrstva GOx, uchovaná při teplotě 4 °C, byla stále aktivní i po dvou měsících.

Další používanou a poměrně jednoduchou technikou je mechanické uchycení enzymu na povrch elektrody pomocí membrány [12]. GOx se kápne na povrch elektrody a překryje se dialyzační membránou, která zadržuje biomakromolekuly. Dialyzační membránou bývá například celuloza nebo acetylceluloza. Zachycené molekuly jsou v prostředí vhodného pufru, do něhož se přidá filtrační papír, který definuje tloušťku biovrstvy. Mechanickým uchycením GOx za využití membrány tvořené celulosou a acetátem celulosy se zabývá Zhao a kol. [28]. Dialyzační membrány byly připraveny z roztoku celulosy a acetátu celulosy. Tyto dvě látky byly smíchány na skleněné desce a následně ponořeny do lázně s destilovanou vodou. Roztok byl nejprve na krátkou dobu ponechán za pokojové teploty stát, po oddělení skleněné desky od směsi byla membrána po dobu 5 minut ponechána ve vodě. Pak se sušila při pokojové teplotě. Takto připravená membrána byla poté ponořena do 0,05 M roztoku jodistanu sodného a ponechána stát po dobu 30 minut při 30 °C. Následně bylo na tuto membránu pomocí skleněné kapiláry nanášeno malé množství GOx o koncentraci 5 mg/ml. GOx s membránou byla ponechána zaschnout při teplotě 4 °C po dobu 24 hodin. Po této době byla směs promyta fosfátovým pufrům o pH 7.

Zesíťování je dalším možným způsobem imobilizace [27]. Jedná se o reakci molekul enzymů s bifunkčním činidlem, např. glutaraldehydem. Zesíťit se může samotný enzym, nebo se enzym může smíchat s inertní bílkovinou, např. albuminem. Enzymy imobilizované zesíťováním mívají velmi dobrou stabilitu. Výhodou této

metody je také její rychlost a jednoduchost. Imobilizaci GOx zesíťováním ve své práci popisuje Jung a kol. [29]. Autoři sledovali imobilizaci GOx v pórech celulární pěny, jako bifunkční činidlo byl použit glutaraldehyd. GOx s glutaraldehydem byly ponořeny do 2 ml 0,1 mM roztoku citrátového pufru. Po protřepání byla připravená směs po dobu několika hodin ponechána stát při teplotě 5 °C. Poté byla pomocí filtrace ze směsi oddělena pevná fáze od kapalné. Získaný pevný materiál tvořený GOx a celulární pěnou byl promyt v citrátovém pufru. Autoři dospěli k závěru, že GOx imobilizovaná zesíťováním vykazuje vysokou aktivitu.

Další technikou je zachycení v gelu nebo polymeru. Jedná se o inkluzi enzymu uvnitř struktury membrány. Tato metoda se používá ve spojení s polyakrylamidem nebo želatinou [12]. Tímto způsobem imobilizace se ve své práci zabývá Zuo a kol. [30]. Místo želatiny autoři použili polyvinylalkohol (PVA). Se 160 μl 5 % PVA bylo smícháno 20 μl oxidu křemičitého. V 10 μl vzniklé směsi bylo rozptýleno 10 μl GOx. Po 1 hodině stání při pokojové teplotě byly 4 μl z připravené směsi nanoseny pipetou na povrch platinové elektrody modifikované Berlínskou modří. Připravený senzor vykazoval rychlou odezvu, dlouhotrvající stabilitu a vysokou citlivost, jejíž hodnota byla 27,06 $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{mM}^{-1}$.

2.2.3 Využití nanomateriálů při konstrukci senzorů využívajících GOx

Při konstrukci glukosových biosenzorů se v poslední době uplatňují nanomateriály. Jejich použití přináší zlepšení vlastností biosenzorů (zlepšení citlivosti, linearity, stability, rychlosti odezvy apod.). V této souvislosti bývají často používány nanočástice přechodných kovů v kombinaci s uhlíkovými nanotrubičkami. Uhlíkové nanotrubičky, tvořené šestiúhelníkovými sítěmi uhlíkových atomů, uspořádaných do podoby trubiček [31], mohou být aplikovány v elektroanalýze [32, 33] a použity jako imobilizační matrice při tvorbě amperometrických biosenzorů. Často se používají v modifikaci planárních elektrod, díky čemuž se zvyšuje drsnost povrchu, pórovitost a kompatibilita k biologickým látkám. Přítomnost CNTs při imobilizaci GOx je užitečná pro zachování její vysoké aktivity. CNTs během těchto elektrochemických reakcí mohou urychlit přenos elektronů. Elektrody modifikované uhlíkovými nanotrubičkami obvykle vykazují rychlou odezvu, vysokou citlivost a stabilitu vůči glukose [33, 34, 35].

Použitím nanočástic mědi v kombinaci s SWCNTs a chitosanem -

biopolymerem, který v tomto případě sloužil pro dispergaci nanočástic mědi a také pro imobilizaci GOx, se ve své práci zabývá Wang a kol. [36]. Na elektrodu ze skelného uhlíku modifikovanou SWCNTs byly nadeponovány nanočástice mědi. Nejprve byly SWCNTs rozpuštěny v destilované vodě a po ponechání 15 minut v ultrazvuku byla vrstva SWCNTs nanášena pipetou na elektrodu ze skelného uhlíku. Na takto modifikovanou elektrodu byly pomocí cyklické voltametrie nadeponovány nanočástice mědi. Rozsah potenciálů při cyklické voltametii se pohyboval v rozmezí od -0,4 do 0,6 V vs. SCE při scanovací rychlosti 50 mV/s. Pro imobilizaci GOx na modifikovanou elektrodu autoři použili metodu zesíťování, kdy byly aminoskupiny chitosanu a enzymu GOx navázány pomocí glutaraldehydu. Zkonstruovaný senzor vykazoval relativně nízký detekční limit, 0,02 mM, vysokou citlivost a poměrně dobrou stabilitu.

Konstrukcí glukosového biosenzoru s využitím nanočástic stříbra se zabývá práce, kterou publikovali Shi a Ma [37]. Roztok GOx o koncentraci 10 mg/ml byl s nanočásticemi stříbra smíchán v kádince. Do roztoku byl přidán chitosan spolu s glutaraldehydem. Po několika minutách byla do směsi ponořena platinová elektroda. Tímto způsobem došlo k depozici vrstvy nanočástic stříbra a zároveň k imobilizaci GOx na platinovou elektrodu. Měření probíhalo při potenciálu 0,6 V vs. Ag/AgCl v neutrálním prostředí. Přítomnost nanočástic stříbra zvýšila schopnost absorpce enzymu a urychlila přenos elektronů mezi molekulami enzymu a povrchem elektrody. Proudová odezva takto modifikované elektrody byla vyšší, než by byla bez přítomnosti nanočástic stříbra. Senzor vykazoval poměrně vysokou citlivost, $67,17 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{mM}^{-1}$, nízký detekční limit, 10^{-6} M a dobrou stabilitu.

Tvorbu amperometrického biosenzoru na bázi nanočástic platiny, thioninu a MWCNTs ve své práci popisuje Yu a kol. [38]. Nanokompozit sestávající z nanočástic platiny, thioninu a MWCNTs, byl připraven redukcí H_2PtCl_6 a NaBH_4 . MWCNTs byly nejprve rozptýleny ve vodném roztoku thioninu. Tato suspenze byla přidána do roztoku H_2PtCl_6 . Po promíchání bylo přidáno NaBH_4 . Nanokompozit byl nanášen pomocí pipety na povrch zlaté elektrody. Elektroda byla poté ponořena do fosfátového pufru o pH 7, který obsahoval GOx o koncentraci 10 mg/ml. Měření probíhalo při potenciálu 0,5 V vs. SCE v neutrálním prostředí. Tento senzor byl vhodný nejen pro stanovení glukosy, ale i pro stanovení peroxidu vodíku. Citlivost senzoru byla poměrně vysoká, $0,14 \text{ A}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{M}^{-1}$, detekční limit dosahoval hodnoty 0,2 μM .

V publikaci Lee a kol. [39] byly nejrůznější nanočástice, včetně nanokrystalů Cu_2S ukotveny na vícestěnné uhlíkové nanotrubičky solvotermální metodou při teplotě $190\text{ }^\circ\text{C}$. 1 mg GOx byl rozpuštěn ve směsi tvořené Cu_2S , MWCNTs, Nafionem a destilovanou vodou. 8 μl takto připraveného roztoku bylo nakápnuto na povrch skelného uhlíku a ponecháno zaschnout. Cílem experimentu bylo dokázat, že elektroda modifikovaná nanokrystaly Cu_2S ukotvenými na MWCNTs může být citlivějším senzorem, než elektroda modifikovaná pouze samotnými nanokrystaly Cu_2S . Průměrná velikost nanokrystalů Cu_2S byla ověřena pomocí snímků z elektronového mikroskopu, její hodnota byla 8 nm. Měření probíhalo při potenciálu 0,55 V vs. Ag/AgCl při pH 7,2. Citlivost senzoru modifikovaného nanokrystaly Cu_2S s MWCNTs na glukosu byla $1,76\ \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{mM}^{-1}$ při pH 7,2. Detekční limit dosahoval hodnoty 10 μM .

Nanočástice platiny pro tvorbu glukosových biosenzorů zmiňuje ve své publikaci Chen a kol. [40]. Do 2 ml chitosanu bylo přidáno 120 mg nanočástic oxidu křemičitého. Připravená směs byla rozptýlena v ultrazvuku. Poté byl na skelný uhlík pomocí pipety nanesen roztok nanočástic oxidu křemičitého s chitosanem. Tím se vytvořila nanokompozitní vrstva. Takto připravená elektroda byla na 10 minut ponořena do 0,05 M HF a následně opláchnuta destilovanou vodou. Na elektrody byly postupně pomocí elektrodepozice nanášeny nanočástice platiny. Na závěr byla elektroda ponořena do roztoku GOx o koncentraci 5 mg/ml. Měření probíhalo při potenciálu 0,6 V vs. SCE v prostředí o pH 6,5. Vytvořený biosenzor vykazoval detekční limit 2 μM .

Jako další materiál využívaný při tvorbě enzymatických glukosových senzorů může být grafen. Grafen je základní stavební jednotka grafitu. Jedná se o dvojrozměrnou strukturu. Tento materiál objevili v roce 2004 profesori Geim a Novoselov [41]. Využití grafenu při tvorbě biosenzoru pro stanovení glukosy ve své práci zmiňuje Wu a kol. [42]. Elektroda ze skelného uhlíku byla modifikována nanočásticemi platiny a grafenem. Nejprve byl 1 mg grafenu rozptýlen v 1 ml 0,2 % roztoku chitosanu. 6 μl vzniklé směsi bylo nanášeno pomocí pipety na skelný uhlík a ponecháno zaschnout. Na takto modifikovanou elektrodu byly pomocí elektrodepozice při potenciálu $-0,25\text{ V vs. Ag/AgCl}$ nanášeny nanočástice platiny. Výchozí látkou pro přípravu nanočástic platiny byla H_2PtCl_4 . Na závěr byla na modifikovanou elektrodu imobilizována GOx. Nejdříve byla GOx o koncentraci 10 mg/ml rozpuštěna v 0,2 % roztoku chitosanu. Poté bylo 6 μl vzniklého roztoku

naneseno pomocí pipety na elektrodu modifikovanou nanočásticemi platiny, grafenu a chitosanu. Měření probíhalo při potenciálu 0,4 V vs. Ag/AgCl v neutrálním prostředí. Výsledný biosenzor vykazoval detekční limit o hodnotě 0,6 μM .

2.3 Neenzymatické glukosové senzory

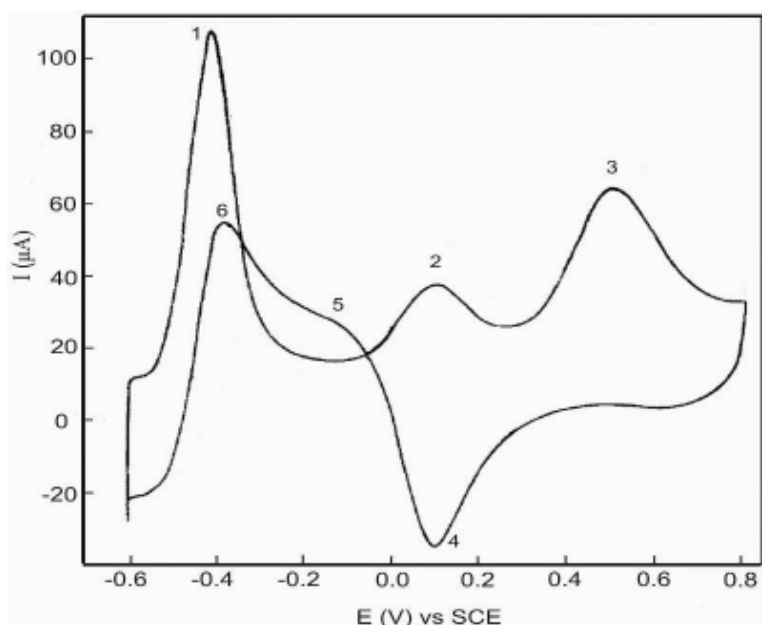
Při enzymatických stanoveních sacharidů se mohou objevit problémy se stabilitou či imobilizací enzymů. Proto jsou zkoumána i neenzymatická stanovení glukosy. Mezi hlavní výhody neenzymatických senzorů patří především vysoká stabilita odezvy v čase a dobrá skladovatelnost. U tohoto typu stanovení se využívá elektrooxidace glukosy na vhodných elektrodách [43].

Z běžných elektrod se pro neenzymatické stanovení glukosy mohou použít elektrody zlaté, platinové, olovené či palladiové [44].

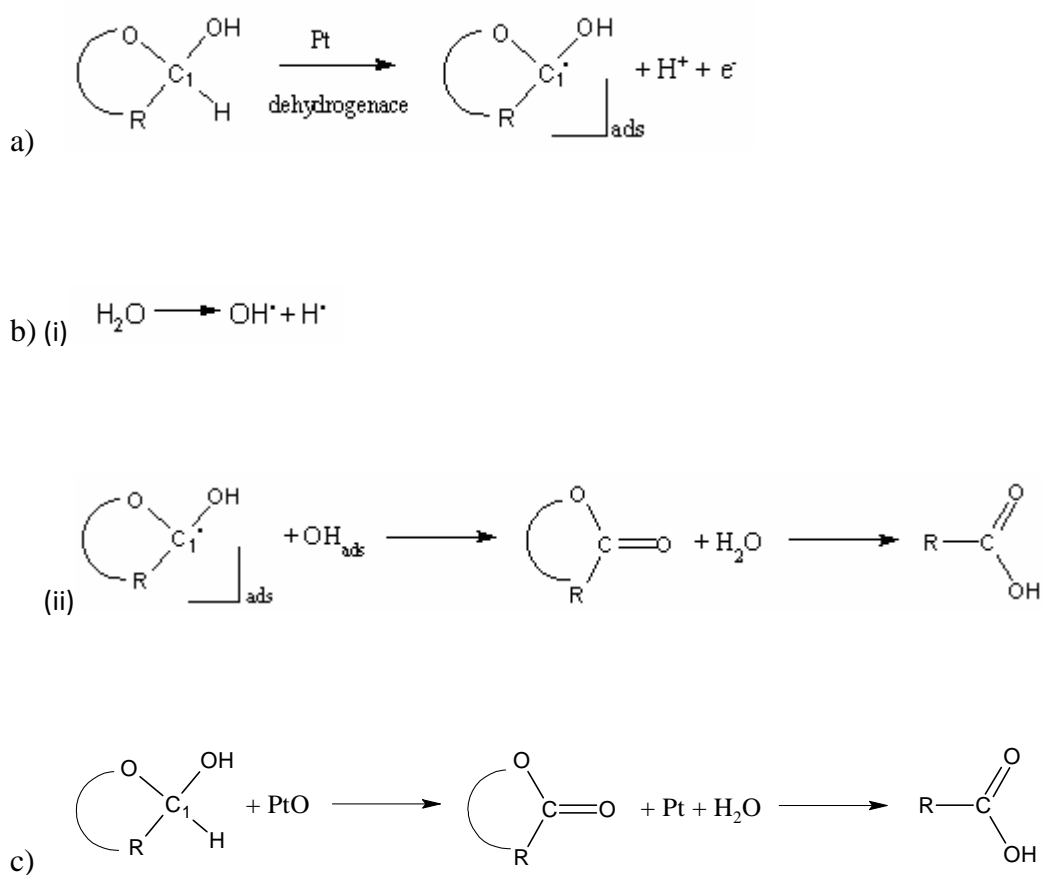
Oxidace glukosy na běžných elektrodách je charakteristická pomalou elektrodovou kinetikou, deaktivací glukosy díky adsorpci zplodin elektrodové reakce a strmou pH závislostí procesu. Přímá oxidace glukosy závisí na používaném elektrodovém materiálu. V dalších kapitolách je popsána oxidace glukosy na elektrodách platinových, zlatých, niklových, měděných a uhlíkových.

2.3.1 Platinové elektrody

Většina prvotních studií zabývajících se elektrooxidací glukosy se prováděla na platinové elektrodě [45]. Hlavním produktem oxidace glukosy je glukonolakton, který se samovolně hydrolyzuje na kyselinu glukonovou bez ohledu na pH roztoku. Obr. 3 vyznačuje cyklický voltamogram oxidace glukosy (0,1 M) na platinové elektrodě v prostředí fosfátového pufru o pH 7 [46]. Cyklický voltamogram poskytuje oxidační píky 1, 2, 3 a katodické píky 4 a 5. První pík představuje adsorpci molekuly glukosy na povrch platinové elektrody. Druhý pík odpovídá pokrytí elektrody adsorbovanými hydroxidovými ionty a jejich elektrooxidaci na hydroxylové radikály, které dále oxidují glukosu adsorbovanou na povrchu elektrody. Třetí pík představuje difúzí řízenou elektrooxidaci glukosy. V potenciálové oblasti, následující po píku 2, je nejprve povrch Pt elektrody pokryt vrstvou adsorbovaného kyslíku (tzv. oxidem platiny), který inhibuje oxidaci glukosy, proto pík 3 nenásleduje ihned za píkem 2. Vyšší oxidy platiny (tzv. oxysloučeniny platiny) však oxidaci glukosy katalyzují.



Obr. 3: Cyklický voltamogram oxidace glukosy (0,1 M) na platinové elektrodě v prostředí fosfátového pufru o pH 7 v rozmezí -0,6 až 0,8 V vs. SCE [47].



Obr. 4: Mechanismus oxidace glukosy na platinové elektrodě [12].

Uvedené schéma (obr. 4) představuje hlavní reakční cestu vedoucí ke glukonové kyselině, nicméně v poměrně velkém rozsahu vznikají i vedlejší produkty, mezi které patří methanol, methanal, kyselina mravenčí či adsorbovaný CO [46]. Struktura vedlejších produktů se obvykle zjišťuje pomocí infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR) [48]. Oxidace glukosy na platině silně závisí na vlastnostech elektrolytu, na povaze a koncentraci iontů přítomných v roztoku. Jednou z hlavních nevýhod platinových elektrod je poměrně silný sklon k inaktivaci elektrodového povrchu adsorpcí výše zmíněných produktů elektrooxidace glukosy („electrode fouling“). Elektrooxidace glukosy je také negativně ovlivněna velkým množstvím látek, které mohou být přítomny v měřeném roztoku a brání elektroaktivitě platiny. Jednou z nejběžnějších látek tohoto typu jsou chloridové anionty, které se snadno adsorbují na platinovou elektrodu, jejíž povrch se tak stane nepřístupný pro glukosu, a to zejména v kyselém prostředí. Deaktivovat povrch platiny mohou i některé organické sloučeniny, jako např. kyselina močová, kyselina askorbová nebo acetaminofen, které velmi snadno přilnou k povrchu elektrody. Povrch platinové elektrody je v podstatě neselektivní k adsorbovaným látkám. I přes nevýhody spojené s použitím platinových elektrod se tyto elektrody používají poměrně často. Některé problémy při použití Pt elektrod lze zmírnit jejich nanostrukturováním. Efekt spočívá ve zvýšení jejich povrchu, a tím i citlivosti. Elektrody z nanoporézního materiálu, tvořeného směsí platina – iridium, poskytují odezvu na glukosu již při potenciálu 0,1 V vs. Ag/AgCl – tj. nižším, než je potenciál potřebný pro oxidaci elektroaktivních interferentů – kyselině askorbové, močové a acetaminofenu. Lze měřit i při vysoké koncentraci chloridových aniontů [49].

2.3.2 Zlaté elektrody

Zlaté elektrody [50, 51, 52] vykazují při oxidaci glukosy větší elektroaktivitu než elektrody platinové. Elektrokatalytické chování zlata je poměrně komplikované, přesto však bylo po četných studiích dokázáno, že mechanismus oxidace glukosy na zlaté elektrodě je stejný jako na elektrodě platinové. Tak jako u platinové elektrody, mechanismus oxidace glukosy závisí na struktuře povrchu zlaté elektrody. I u zlatých elektrod se projevuje negativní vliv chloridových iontů, i když je menší než u elektrod platinových. Zlaté elektrody mají sklon adsorbovat na svůj povrch chloridové ionty převážně v neutrálním prostředí. Bylo prokázáno, že v neutrálním prostředí se rychlost elektrooxidace snižuje úměrně ke koncentraci chloridových iontů, přičemž nejsilnější

efekt byl pozorován u nižších potenciálů. V alkalickém prostředí je vliv chloridových aniontů prakticky eliminován. V kyselém prostředí přítomnost různých aniontů oxidací glukosy na zlaté elektrodě zpomaluje. Náklady na použití zlatých elektrod pro výrobu jednorázových senzorů jsou stejně jako u platinových elektrod poměrně vysoké, proto nejsou zlaté elektrody pro aplikaci glukosových senzorů příliš vhodné.

2.3.3 Niklové elektrody

Stanovení glukosy na niklových elektrodách je citlivější než na elektrodách platinových a zlatých, ovšem jen v alkalickém prostředí [53]. V neutrálním, ani v kyselém prostředí se niklové elektrody nepoužívají. Nevhodnost jejich použití v neutrálním a kyselém prostředí je zapříčiněna faktem, že elektrooxidace glukosy na niklových elektrodách je katalyzována NiOOH [54], jehož existence závisí na přítomnosti OH⁻ iontů. Vrstva NiOOH na elektrodě vzniká dle rovnice 6 v rozmezí potenciálu 0 až 630 mV vs. Ag/AgCl.



2.3.4 Měděné elektrody

Při oxidaci glukosy na měděné elektrodě je aktivní částicí, která oxiduje glukosu, CuO. Měděné elektrody jsou citlivější než elektrody platinové a zlaté. [55]. Produktem elektrooxidace glukosy na měděné elektrodě je totiž kyselina mravenčí, narozdíl od glukonové kyseliny, která vzniká na Pt a Au elektrodách. Na produkci HCOOH je potřeba glukose odebrat 12 elektronů, jedná se o šest dvouelektronových kroků při potenciálu 0,6 V vs. Ag/AgCl v 0,1 M NaOH. CuO je v alkalickém prostředí oxidován na vyšší oxidační stupeň mědi - Cu³⁺, který pak funguje jako katalyzátor oxidace glukosy [56].

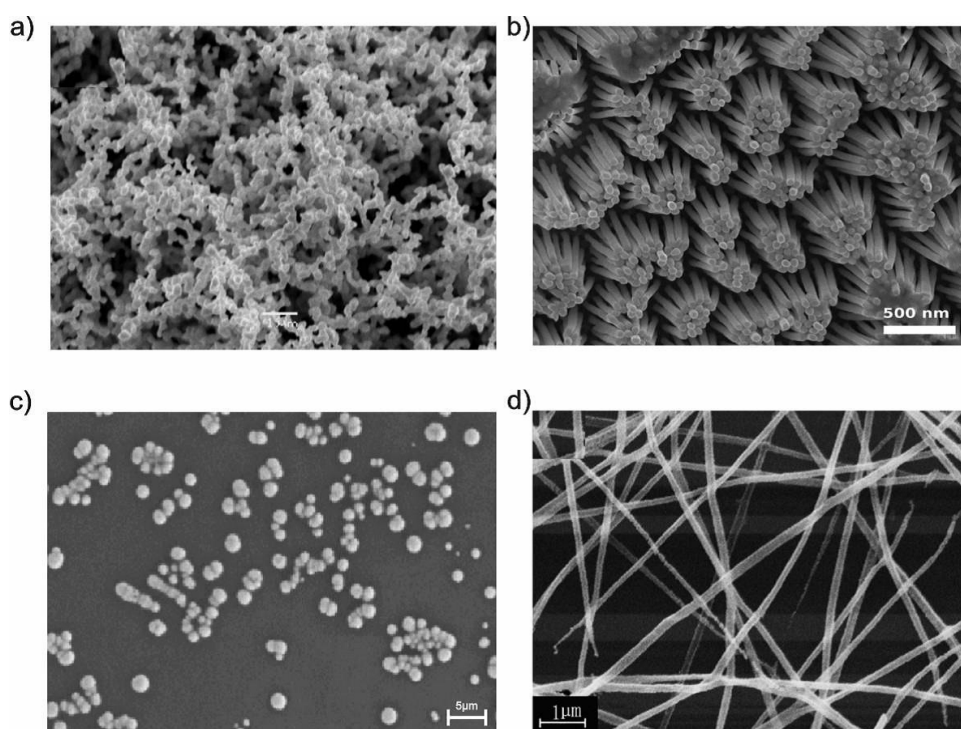
2.3.5 Uhlíkové elektrody

Existují různé typy uhlíkových elektrod, například uhlíkové pastové elektrody, sítotiskové elektrody, diamantové elektrody dopované borem či skelný uhlík. Běžné uhlíkové elektrody nejsou pro stanovení glukosy vhodné. Existují však zmínky o oxidaci glukosy na nemodifikovaných BDD elektrodách. Jednou z prvních publikací zaměřených na tuto problematiku je práce z roku 2005 vydaná Leem a Parkem [57], kdy polykrystalická BDD elektroda byla nejprve žíhána vodíkovým plamenem a následně

byla bez jakékoli modifikace použita pro stanovení glukosy. Elektroda vykazovala lineární odezvu pro koncentraci glukosy v rozmezí od 0,5 mM do 10 mM. Z cyklického voltamogramu, který měřil v rozmezí potenciálů od 0,8 V až -0,1 V vs. Ag/AgCl při scanovací rychlosti 20 mV/s, bylo zřejmé, že oxidace glukosy nastala při potenciálu 0,65 V vs. Ag/AgCl. Výhody takového neenzymatického senzoru spočívají především v jeho selektivitě vůči fyziologickým interferentům. Ve srovnání s jinými elektrodami, například mezoporézními platinovými či modifikovanými zlatými elektrodami, používanými při neenzymatickém stanovení glukosy, je výhodou BDD elektrod především mnohem jednodušší příprava.

2.3.6 Elektrody modifikované nanomateriály

Současné pokroky v syntéze nanomateriálů se dotýkají i vývoje neenzymatických glukosových senzorů [12]. U nanostrukturovaných elektrod se používají aktivní komponenty: nanoporézní PtPb, nanodráty zlata, nanočástice niklu či nanovlákná CuO. Na obr. 5 jsou znázorněny tyto nanostrukturální materiály v neenzymatických glukosových senzorech.



Obr. 5: Ukázka nanostrukturálních elektrodových materiálů. a) nanoporézní PtPb, b) nanodráty zlata, c) nanočástice niklu na BDD elektrodě, d) nanovlákná CuO [12].

Elektrodové materiály citlivé na glukosu, diskutované výše, mohou být uplatněny při tvorbě glukosových senzorů například tak, že jsou do elektrody vkomponovány, tj. smíchány s nosičem a poté jsou naneseny na elektrodu ze skelného uhlíku. Použití nanoporézního PtPb při přípravě glukosového senzoru spočívá v jeho ukotvení na titanovém substrátu [58]. Elektrody modifikované nanoporézní vrstvou PtPb jsou vysoce odolné vlivu chloridových iontů, jsou schopné detekovat glukosu při velmi nízkém potenciálu, -80 mV vs. Ag/AgCl.

V případě použití nanodrátů zlata [59] jsou tyto nanodráty nejprve rozptýleny v rozpouštědle a poté pipetou naneseny na skelný uhlík. Kvůli nízké schopnosti adsorpce nanodrátů zlata na povrch elektrody se jako druhá vrstva nanášená na skelný uhlík používá Nafion.

Nanočástice niklu se na BDD elektrodu nanáší pomocí elektrodepozice z 1 mM $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ (pH 5) [53].

V posledních letech vývoj nanostrukturních materiálů na bázi uhlíku, především uhlíkových nanotrubiček či uhlíkových nanovláken, značně rozšířil možnosti elektrochemického stanovení glukosy. Uhlíková nanovlákná jsou složena z uspořádaných grafitových vrstev, mají velkou aktivní plochu povrchu a jsou velmi vodivá. Narozdíl od uhlíkových nanotrubiček nejsou dutá. Tyto uhlíkové materiály jsou snadno modifikovatelné, vykazují dobrou vodivost, biokompatibilitu a mají velké plochy povrchu [60].

Neenzymatickými glukosovými biosenzory s využitím uhlíkových nanovláken v přítomnosti nanočástic platiny se zabývá práce z roku 2010, kterou publikoval Rathod a kol. [61]. Pro stanovení glukosy byla použita modifikovaná uhlíková nanovlákná spolu s nanočásticemi platiny o velikosti 2,4 - 3,5 nm. Měření probíhalo v neutrálním prostředí při potenciálu 0,55 V vs. Ag/AgCl. Neenzymatický glukosový biosenzor byl připraven tak, že nanočástice platiny spolu s uhlíkovými nanovláknky byly nejprve ponořeny do směsi tvořené deionizovanou vodou a isopropylalkoholem v poměru 3:1. Do takto připravené disperze bylo přidán roztok Nafionu (1 % v/v). 10 μl připraveného roztoku bylo pipetou naneseno na elektrodu ze skelného uhlíku a ponecháno zaschnout. Výsledný senzor vykazoval citlivost na glukosu $0,52 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{M}^{-1}$.

Jako katalytické komponenty se dají využít i oxidy kovů. Příkladem je glukosový senzor na bázi MWNTs pokrytých vrstvou MnO_2 připravenou pomocí elektrodepozice, jehož využitím se ve své práci zabývá Chen a kol. [62]. Takto připravená elektroda vykazovala při stanovení glukosy vysokou elektrokatalytickou aktivitu v alkalickém prostředí. Tento neenzymatický glukosový senzor vykazoval široký lineární rozsah (do 28 mM) a vysokou citlivost na glukosu, $33,19 \mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$ při potenciálu 0,3 V vs. Ag/AgCl. Přítomnost MnO_2 způsobila vysokou odolnost elektrody vůči interferentům, zejména chloridovým iontům, kyselině askorbové, dopaminu a kyselině močové.

Elektrody na bázi mědi a nanočástic Cu, Cu_2O , CuO a Cu_2S

Výhodnými materiály pro modifikaci elektrod při tvorbě neenzymatických glukosových senzorů jsou především z důvodu vysoké citlivosti vzhledem ke glukose nanočástice mědi, oxidu mědi či sulfidu mědi.

Práce publikovaná Li Zhangem a kol. [63] se zabývá přípravou neenzymatického glukosového senzoru za využití porézních částic Cu_2O . Výchozími produkty pro přípravu částic Cu_2O byly: $\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, polyvinylpyrrolidon, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6\cdot\text{H}_2\text{O}$, citrát sodný a NaOH. 10 mg Cu_2O bylo rozptýleno v roztoku Nafionu, poté byla suspenze Cu_2O a Nafionu pipetou nanášena na skelný uhlík a ponechána zaschnout. Měření probíhalo při potenciálu 0,6 V vs. Ag/AgCl v 0,1 M NaOH. Elektroda modifikovaná porézními částicemi Cu_2O vykazovala citlivost na stanovení glukosy, $-997,18 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{mM}^{-1}$, detekční limit $8\cdot 10^{-7}$ M a rychlou proudovou odezvu.

V práci publikované roku 2010 stejným kolektivem autorů [64] byla na skelný uhlík pipetou nanášena vrstva porézního Cu_2O rozptýleného v Nafionu. Autoři sledovali vliv pH na účinnost senzoru, a to experimenty provedenými v sadě Brittonových - Robinsonových pufrů pomocí cyklické voltametrie při scanovací rychlosti $50 \text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ v rozmezí 0,7 až -0,8 V vs. Ag/AgCl. Byly porovnány cyklické voltamogramy glukosy v prostředí 0,05 M NaOH; 0,01 M NaOH a v prostředí pufrů o hodnotách pH 6 a pH 7. V neutrálním a kyselém prostředí byla proudová odezva na přídavky glukosy nepatrná. Proto byla většina dalších experimentů prováděna v 0,1 M NaOH při potenciálu 0,4 V vs. Ag/AgCl. Byl také sledován vliv elektrokatalytické aktivity Cu_2O a Nafionu na oxidaci 2,5 mM glukosy v prostředí 0,1 M NaOH. Byly porovnány cyklické voltamogramy Cu_2O s Nafionem bez přidání glukosy a po přidání glukosy. Bylo

zjištěno, že po přidání glukosy do 0,1 M NaOH byl zřejmý jasný vzrůst oxidačního píku. Nanočástice Cu_2O jsou tedy schopny zlepšit přenos elektronů mezi glukosou a skelným uhlíkem. Takto připravený senzor byl schopný rychle stanovit glukosu ve vodném roztoku s velmi dobrou stabilitou a selektivitou. Citlivost senzoru na glukosu byla vysoká, $154,2 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{mM}^{-1}$, detekční limit dosahoval hodnoty $1,3 \mu\text{M}$. Lineární rozsah byl od $2,0 \mu\text{M}$ do $350 \mu\text{M}$.

V práci z roku 2010 se Cuiling Li a kol. [65] zmiňují o použití glukosového senzoru založeného na bázi nanočástic Cu_2O a CuO . Nanočástice oxidů mědi o různých velikostech byly získány zahříváním měděné fólie při teplotě 250°C . Autoři porovnávali vlastnosti senzorů při stanovování glukosy. Byly porovnávány vlastnosti měděné elektrody modifikované nanočásticemi Cu_2O a CuO , dále elektrody ze skelného uhlíku modifikované Cu_2O a elektrody ze skelného uhlíku modifikované CuO . Všechna měření byla provedena při potenciálu $0,5 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ v prostředí $0,1 \text{ M NaOH}$. Výsledkem této studie bylo zjištění, že měděná elektroda, na které jsou deponovány nanočástice Cu_2O a zároveň nanočástice CuO , vykazuje lepší vlastnosti, nežli elektroda ze skelného uhlíku modifikovaná pouze Cu_2O nebo pouze CuO . Měděná elektroda modifikovaná nanočásticemi Cu_2O a CuO vykazovala lineární odezvu až do přídavku 4 mM glukosy s citlivostí $1,62 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{mM}^{-1}$ na glukosu a nízkým detekčním limitem, jehož hodnota byla $0,049 \text{ mM}$. Elektrody ze skelného uhlíku, na nichž byly nadeponovány pouze nanočástice Cu_2O nebo CuO , vykazovaly lineární rozsah do $1,4 - 1,6 \text{ mM}$ glukosy, což je mnohem užší rozsah.

Huang a kol. [66] v roce 2009 publikovali práci, ve které se zabývali depozicí nanopásů mědi na uhlíkovou SPE elektrodu (SPE = Screen Printed Electrode). Výchozí látky pro přípravu nanopásů mědi byly: CuCl_2 , cetyltrimethylamonium chlorid a HNO_3 . Nanopásky mědi dosahovaly délky 100 mikronů, tloušťky cca 20 nm a šířky cca 50 nm . Připravený roztok nanopásů mědi byl na SPE nanesen pipetou a ponechán zaschnout. Byly sledovány cyklické voltamogramy glukosy v prostředí o $\text{pH } 7,4$ při scanovací rychlosti $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ v rozmezí 0 až $0,8 \text{ V vs. Ag/AgCl}$. Amperometrické měření probíhalo při potenciálu $0,6 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ v prostředí $0,5 \text{ M NaOH}$. Výsledky ukázaly, že elektroda modifikovaná nanopásky mědi vykazuje zvýšenou elektrokatalytickou aktivitu pro oxidaci glukosy. Citlivost takto modifikované elektrody na glukosu byla poměrně vysoká, $1,4 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{mM}^{-1}$, detekční limit dosahoval hodnoty $10 \mu\text{M}$.

Nanokrystaly Cu_2S ukotvenými na dvojstěnné a víceštěnné uhlíkové nanotrubičky se zabývá práce publikovaná roku 2009 Myungem a kol. [67]. Vrstvy, kterými byly modifikovány elektrody byly vytvořeny tak, že 2 – 15 mg nanokrystalů Cu_2S ukotvených na dvojstěnných a víceštěnných uhlíkových nanotrubičkách bylo rozpuštěno v roztoku 0,1 ml Nafionu a 0,9 ml destilované vody. Poté bylo malé množství takto připravené nanostruktury pipetou nanášeno na elektrodu ze skelného uhlíku a ponecháno zaschnout. Tímto způsobem byly připraveny také vrstvy SnO_2 a Pt. Pro usnadnění modifikace elektrody byly nanokrystaly ukotvené na CNTs ponořeny do roztoku Nafionu. Autoři porovnávali vlastnosti senzorů vytvořených pomocí nanokrystalů Cu_2S , nanokrystalů platiny a senzorů využívajících nanokrystaly SnO_2 . Měření byla prováděna při potenciálu 0,5 V vs. Ag/AgCl v prostředí o pH 7,2. Autory vytvořené amperometrické senzory vykazovaly vysokou citlivost a stabilitu. Nanokrystaly platiny ukotvené na dvojstěnných CNTs vykazovaly největší citlivost, $280 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{mM}^{-1}$, detekční limit dosahoval hodnoty $0,2 \mu\text{M}$. Méně citlivé byly nanokrystaly Cu_2S a nejmenší citlivost vykazovaly nanokrystaly SnO_2 . Nanokrystaly platiny ukotvené na víceštěnných CNTs vykazovaly citlivost $110 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{mM}^{-1}$, detekční limit měl hodnotu $0,5 \mu\text{M}$. Citlivost byla nižší než u dvojstěnných CNTs, ale oproti nanokrystalům Cu_2S a SnO_2 ukotvených na víceštěnných CNTs byly nejvíce citlivé. Průměrná velikost nanokrystalů byla ověřena díky snímkům z elektronového mikroskopu: pro Cu_2S byla její hodnota 7 nm, průměrná velikost nanokrystalů Pt byla 3 nm a velikost SnO_2 byla 2 nm.

Z výše uvedených prací je zřejmé, že materiály na bázi mědi a jednoduchých binárních oxidů a sulfidů mědi jsou perspektivní z hlediska přípravy glukosových senzorů. Cílem diplomové práce je neenzymatické stanovení glukosy na měděné elektrodě, měděné elektrodě pokryté vrstvou Cu_2S a CuO a dále na elektrodě ze skelného uhlíku modifikované nanočásticemi mědi, nanočásticemi Cu_2S a nanočásticemi Cu_2O .

3. Experimentální část

3.1 Používané chemikálie, roztoky a přístrojové vybavení

Používané chemikálie

| | |
|--|-------------------|
| NaSH.xH ₂ O | (Sigma – Aldrich) |
| NaOH | (Sigma – Aldrich) |
| CuSO ₄ .5H ₂ O | (Sigma – Aldrich) |
| Na ₂ S ₂ O ₃ .5H ₂ O | (Sigma – Aldrich) |
| NaBH ₄ | (Sigma – Aldrich) |
| Chitosan | (Sigma – Aldrich) |
| Nafion | (Fluka) |
| Pluronic F127 | (Sigma – Aldrich) |
| Triton X 100 | (Sigma – Aldrich) |

Používané chemikálie byly v kvalitě p.a.

Používané roztoky

- 0,1 M Britton-Robinsonův pufr o pH 7 až 12 (univerzální pufr obsahuje směs 0,04 M H₃PO₄; 0,04 M H₃BO₃; 0,04 M CH₃COOH, jehož hodnota pH je upravována pomocí 0,2 M NaOH).

Přístrojové vybavení

- CH Instruments elektrochemická pracovní stanice Model 660-C. Elektrochemická měření probíhala v tříelektrodovém zapojení, obsahující platinový drátek jako pomocnou elektrodu, referentní elektrodu (Ag/AgCl, typ MF-2052, Bioanalytical Systems, USA) a testované pracovní elektrody (Obr. 6).
- Automatický dávkovač (FIA 20, JZD 1. Máj Pouchov se sídlem v Pileticích, upraveno pro řízení pomocí PC).
- Zeta Potential Analyzer Zeta Plus (Brookhaven Instruments Corporation, USA).



Obr. 6: Elektrochemická pracovní stanice CH Instruments Model 660-C. Připojen je automatický dávkovač.

- Transmisní elektronový mikroskop (TEM) FEI CM20 TEM pracující při 200 kV.

3.2 Výroba měděné elektrody

Měděný drát (průměr 1 mm) byl zalit do dentakrylu a následně seříznut. Poté byl řez vyleštěn smirkovým papírem, diamantovou pastou (1 μm , Buehler, USA) a na závěr pomocí aluminy (0,05 μm , Buehler, USA). Takto připravená elektroda sloužila jako elektroda pracovní.



Obr. 7: Měděná elektroda

3.3 Příprava elektrody ze skelného uhlíku

Elektroda ze skelného uhlíku (průměr 3 mm) byla před každým měření vyleštěna pomocí aluminy a poté byl její povrch opláchnut destilovanou vodou.



Obr. 8: Skelný uhlík

3.4 Postup přípravy nanočástic mědi, Cu_2O a Cu_2S

Při přípravě nanočástic mědi jsem vycházela ze své bakalářské práce [68]. Nanočástice mědi byly připraveny redukcí CuSO_4 tetrahydroboritanem sodným. Pro přípravu 250 ml disperze koloidní mědi byly za stálého míchání na elektromagnetické míchačce postupně přidávány chemikálie:

62,5 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

186 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

200 ml destilované vody

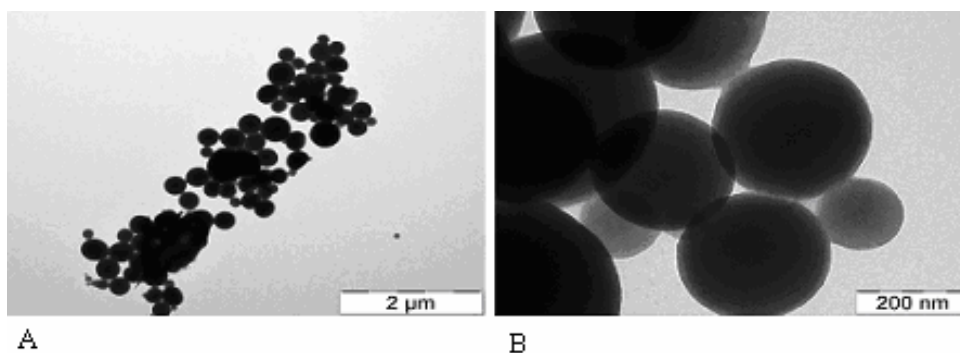
NaBH_4 (rozpuštěno 30 mg v 50 ml destilované vody).

Tímto způsobem byla připravena disperze nanočástic mědi. Koncentrace mědi v roztoku byla 1 mM. Velikost nanočástic mědi byla zjištěna pomocí přístroje Zeta Potential Analyzer Zeta Plus, pracujícím na principu dynamického rozptylu světla (DLS – Dynamic Light Scattering). Velikost nanočástic byla v rozmezí od 260 - 300 nm, jak bylo odhadnuto z TEM snímků (obr. 9A, 9B).

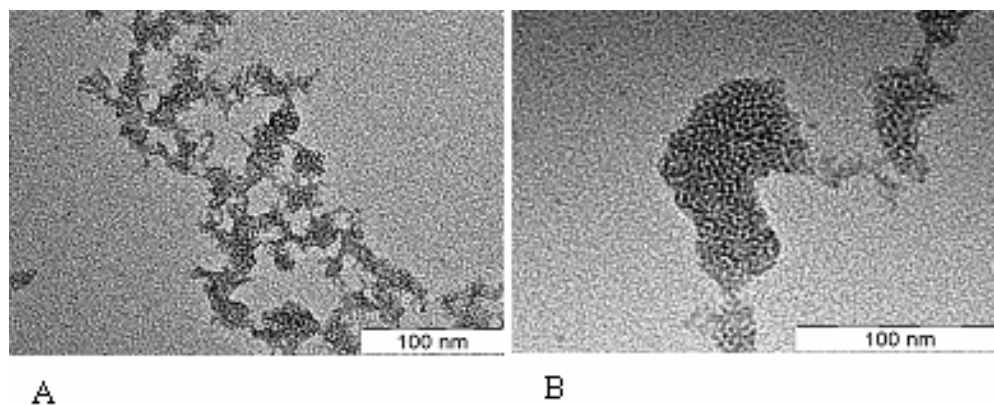
Při přípravě nanočástic Cu_2S byl použit stejný postup jako při přípravě nanočástic mědi s výjimkou, že bylo přidáno 10x větší množství $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, než

u nanočástic mědi, tj. 1860 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Vzniklý roztok (obsahující přebytek $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) měl zelenou barvu, narozdíl od disperze nanočástic mědi, která měla barvu světle hnědou.

Nanočástice Cu_2O byly připraveny samovolným zoxidováním roztoku nanočástic mědi. Disperze nanočástic mědi byla ponechána stát za pokojové teploty ($21\text{ }^\circ\text{C}$) a po cca 4 dnech stání změnila barvu ze světle hnědé na černohnědou. Tato barevná změna odpovídá transformaci nanočástic Cu na nanočástice Cu_2O [69].



Obr. 9: TEM snímky nanočástic mědi. Při zpracování byly vzorky nanočástic mědi nanoseny na měděnou mřížku pokrytou vrstvou uhlíku.



Obr. 10: TEM snímky nanočástic Cu_2S .

3.5 Amperometrické stanovení glukosy

Amperometrické měření probíhalo v míchaném roztoku (nejčastěji NaOH o koncentraci 0,1 M). Rychlost magnetického míchadla byla cca 300 ot/min. Na testované pracovní elektrody byl vkládán potenciál 0,7 V vs. Ag/AgCl . Po ustavení proudové linie byly provedeny nástřiky glukosy pomocí automatického dávkovače –

autosampleru. Všechna měření byla prováděna při pokojové teplotě (21 °C).

Elektrochemická pracovní stanice CH Instruments Model 660-C používá americkou konvenci orientace voltamogramů a amperogramů, tj. anodický proud je záporný.

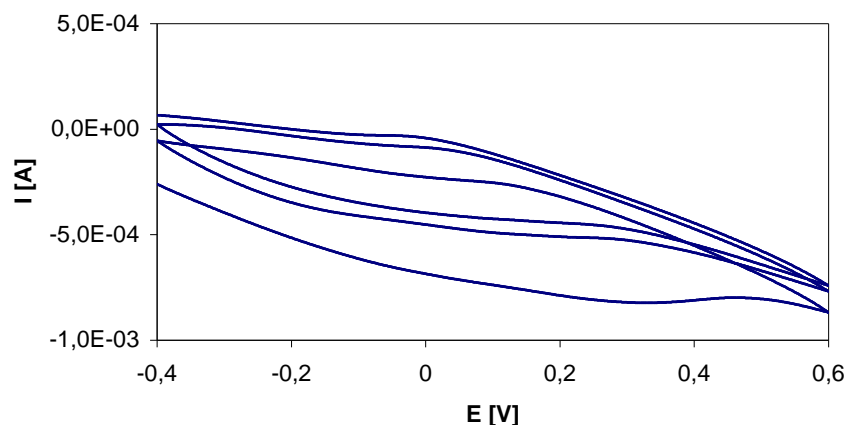
4. Výsledky a diskuze

4.1 Techniky modifikace elektrod

Elektrody byly modifikovány různými způsoby. Testovány byly: depozice nanočástic v matrici polymerní látky, depozice vrstvy Cu_2S pomocí anodizace měděné elektrody v roztoku NaSH, depozice vrstvy CuO pomocí anodizace měděné elektrody v roztoku NaOH a elektrodepozice vrstvy mědi na skelný uhlík.

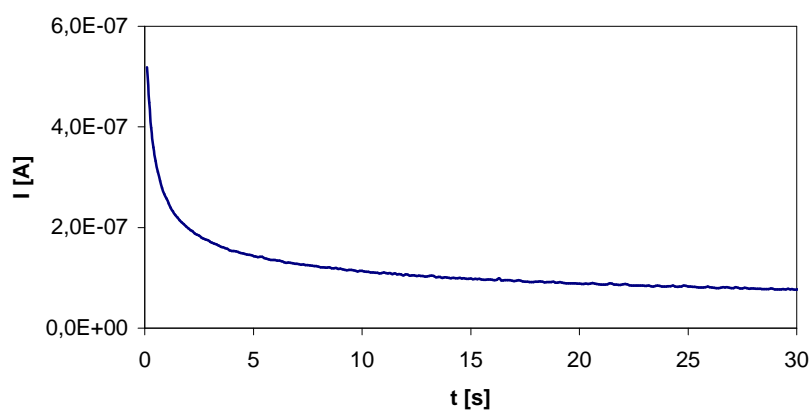
Polymerními látkami používanými jako matrice pro ukotvení nanočástic na povrch elektrody byly Nafion a chitosan. Tento způsob modifikace byl použit pro měření, kde byly zkoumány vlastnosti nanočástic. Jako pracovní elektroda byla použita elektroda ze skelného uhlíku. Modifikace byla provedena tak, že 500 μl roztoku nanočástic ($c_{\text{Cu}} = 1 \text{ mM}$) a 500 μl roztoku polymerní látky (1% w/w) bylo smícháno v mikrozkuhavce a pomocí mikropipety bylo 5 μl takto připravené směsi nanese na povrch skelného uhlíku. Poté byla vrstva ponechána zaschnout po dobu cca 24 hodin. Po této době bylo provedeno amperometrické měření.

Při depozici vrstvy Cu_2S pomocí anodizace měděné elektrody v roztoku NaSH byla Cu elektroda modifikována následujícím způsobem: Cu elektroda byla vložena do 0,1 M roztoku NaSH. Poté byla elektroda podrobena cyklování potenciálu v rozmezí -0,4 až 0,6 V vs. Ag/AgCl při scanovací rychlosti 1 V/s a počtu scanů 3 (obr. 11).



Obr. 11: Voltamogram získaný v průběhu depozice vrstvy Cu_2S z 0,1 M NaSH v rozmezí -0,4 až 0,6 V vs. Ag/AgCl při scanovací rychlosti 1 V/s.

Posledním typem depozice byla elektrodepozice vrstvy mědi na skelný uhlík. Tento způsob depozice byl prováděn amperometrií při konstantním potenciálu. Soustava elektrod byla ponořena do depoziční lázně a na elektrody byl vložen depoziční potenciál. Po nadeponování požadované vrstvy následovalo amperometrické měření. Tímto způsobem byla na skelný uhlík deponována vrstva mědi vyloučená z roztoku CuSO_4 a Pluronicu a vrstva mědi vyloučená z roztoku CuSO_4 a Tritonu X 100.

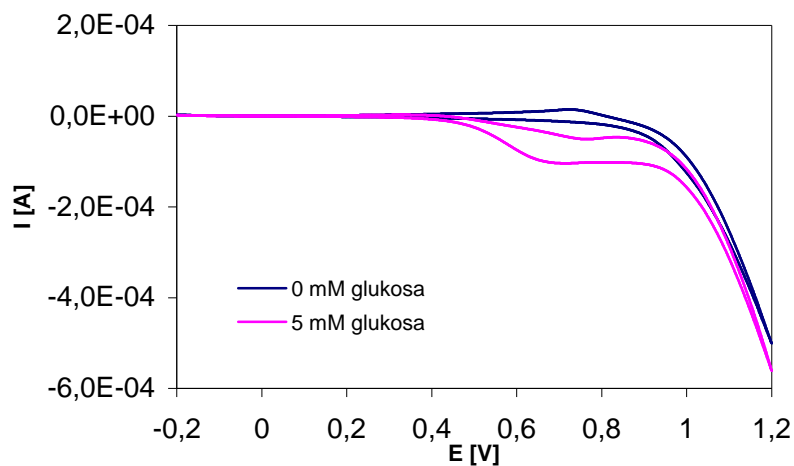


Obr. 12: Průběh proudu v závislosti na čase při depozici mědi vyloučené z roztoku CuSO_4 (0,01 M) a Pluronicu na skelný uhlík, při potenciálu -0,5 V vs. Ag/AgCl po dobu 30 s.

4.2 Elektroanalýza glukosy na měděných elektrodách

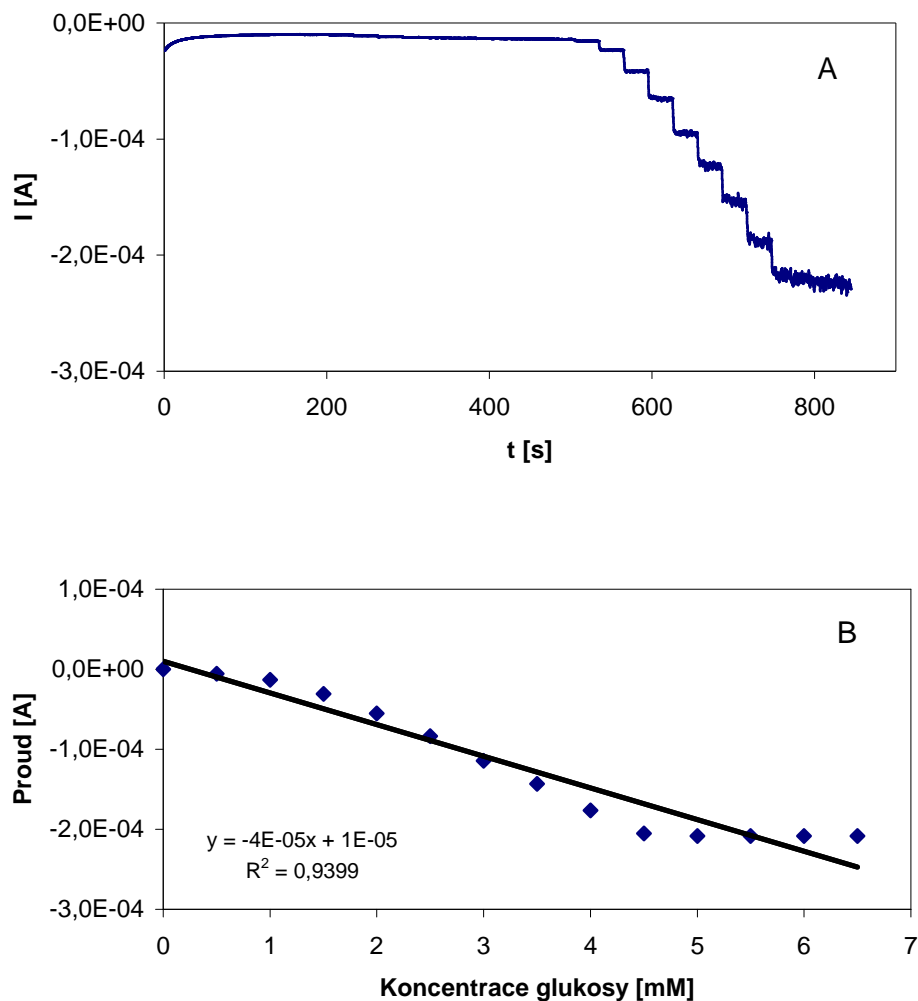
Měděná elektroda

Na obr. 13 je znázorněn voltamogram glukosy na nemodifikované měděné elektrodě.



Obr. 13: Cyklický voltamogram glukosy (5 mM) a základního elektrolytu (0,1 M NaOH) pro nemodifikovanou měděnou elektrodu v rozmezí -0,2 do 1,2 V vs. Ag/AgCl při scanovací rychlosti 100 mV/s.

Z obr. 13 je vidět, že začátek oxidace glukosy nastal při potenciálu cca 0,45 V. E_p odpovídá hodnotě cca 0,65 V. Jako pracovní potenciál pro následná amperometrická měření jsem zvolila hodnotu 0,7 V. Obr. 14A ukazuje amperogram v míchaném roztoku měřený při této hodnotě potenciálu.



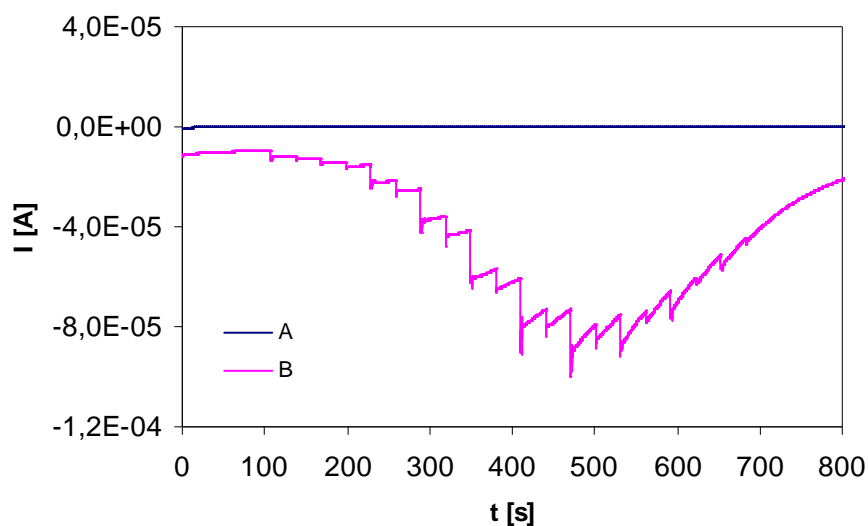
Obr. 14: Amperometrické odezvy (A) pro nemodifikovanou měděnou elektrodu na rostoucí koncentraci glukosy a odpovídající kalibrační křivka (B). Nástřiky 20 μ l 0,5 M glukosy do 20 ml 0,1 M NaOH. (1 přidavek = zvýšení koncentrace glukosy o 0,5 mM). Měřeno při potenciálu 0,7 V vs. Ag/AgCl.

Ze záznamu amperometrické křivky (obr. 14A) je patrné, že nemodifikovaná měděná elektroda je citlivá na přídavky glukosy, nicméně díky nelinearitě odezvy v rozmezí koncentrací glukosy od 1 do 2,5 mM a od 3,5 do 5 mM (obr. 14B) je její využití při analýze glukosy limitováno. Od dosažení koncentrace glukosy 5 mM již elektroda nevykazovala odezvu na glukosu, proto bylo měření přerušeno.

Skelný uhlík s vrstvou mědi

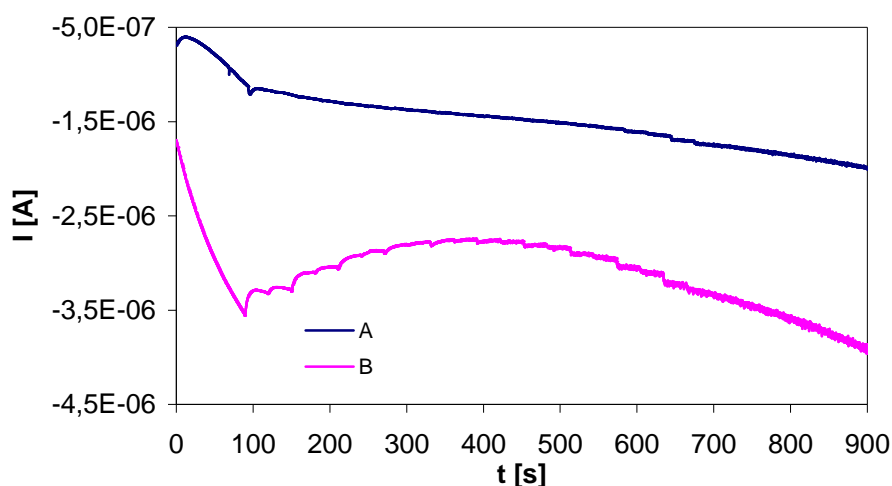
U elektrodových reakcí, které jsou řízeny reakcí přenosu náboje (mezi tyto reakce patří i elektrooxidace glukosy) zlepšuje linearitu odezvy u amperometrických

měření použití elektrod se strukturovaným povrchem. Jednou z možností, jak připravit elektrodu s nanostrukturovaným povrchem, je elektrodepozice kovu z jeho soli v přítomnosti některých makromolekulárních povrchově aktivních látek. Tato technika byla poprvé demonstrována při přípravě nanostrukturované vrstvy platiny, připravené na hladké platinové elektrodě elektoredukci hexachloroplatičité kyseliny v přítomnosti oktaethylenglykolmonohexadecyl etheru [70]. Povrch platiny je pokryt hexagonální kapalně-krystalickou fází povrchově aktivní látky. Elektroredukce probíhá v mezerách mezi hexagonálními útvary PAL. Po odstranění PAL pečlivým opláchnutím povrchu elektrody se na elektrodě nachází hexagonální nanostrukturovaná vrstva platiny. Elektroda poskytuje lineární odezvu na peroxid vodíku (měřeno amperometrií při +700 mV vs. Ag/AgCl) do $c_{\text{H}_2\text{O}_2} = 100 \text{ mM}$ (na hladké elektrodě je rozsah linearit omezen koncentrací 5 mM). Podobná technika byla nedávno použita i pro přípravu vrstvy stříbra pro katodické stanovení H_2O_2 , jako PAL byl použit Pluronic F127 [71]. Z těchto důvodů jsme zkoumali depozici vrstev mědi na elektrodu ze skelného uhlíku z roztoku CuSO_4 (1 mM), v přítomnosti PAL (Pluronic F127 a TX100). Pro srovnání byla otestována i amperometrická odezva nemodifikované GC elektrody a elektrody opatřené vrstvou mědi vyloučené z roztoku CuSO_4 bez přídavku PAL.



Obr. 15: Amperometrické odezvy pro nemodifikovanou GC elektrodu (A) a pro GC elektrodu modifikovanou mědí vyloučenou z 1 mM CuSO_4 (B) na rostoucí koncentraci glukosy. Nástřiky 20 μl 1 M glukosy do 20 ml 0,1 M roztoku NaOH (1 přídavek = zvýšení koncentrace glukosy o 1 mM). Měřeno při potenciálu 0,7 V vs. Ag/AgCl.

Z obr. 15A je vidět, že elektroda ze skelného uhlíku není citlivá k přidávkám glukosy. Po jejím opatření vrstvou mědi (obr. 15B), připravenou elektrodepozicí z 1 mM roztoku CuSO_4 při $-0,5$ V vs. Ag/AgCl po dobu 30 s elektroda poskytovala při amperometrickém experimentu odezvu na glukosu. Tato odezva však zůstala lineární u nízkých koncentrací glukosy a navíc se ukázalo, že vrstva vystavená vyšším koncentracím glukosy byla degradována (při opakování experimentu elektroda neposkytovala odezvu na glukosu – není ukázáno). Zřejmě z tohoto důvodu nebyly odezvy glukosy stanovené na elektrodách s vrstvami mědi připravenými v přítomnosti PAL zaznamenány (obr. 16), přestože byla vrstva mědi na elektrodě patrná.

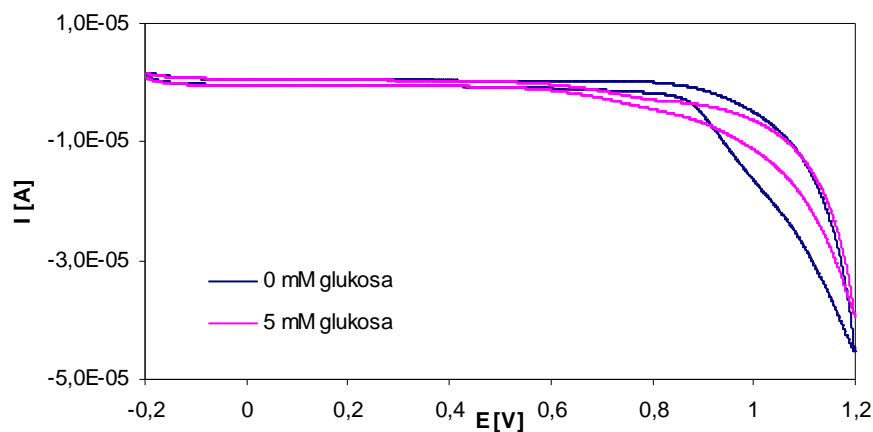


Obr. 16: Amperometrické odezvy pro GC elektrodu modifikovanou mědí vyloučenou z roztoku CuSO_4 (0,01 M) a Pluronicu (A) a pro GC elektrodu modifikovanou mědí vyloučenou z roztoku CuSO_4 (0,01 M) a TX100 na rostoucí koncentraci glukosy. Nástřiky 20 μl 1 M glukosy do 20 ml 0,1 M NaOH. (1 přidavek = zvýšení koncentrace glukosy o 1 mM). Měřeno při potenciálu 0,7 V vs. Ag/AgCl.

Skelný uhlík modifikovaný nanočásticemi mědi rozptýlenými v polymerní matici

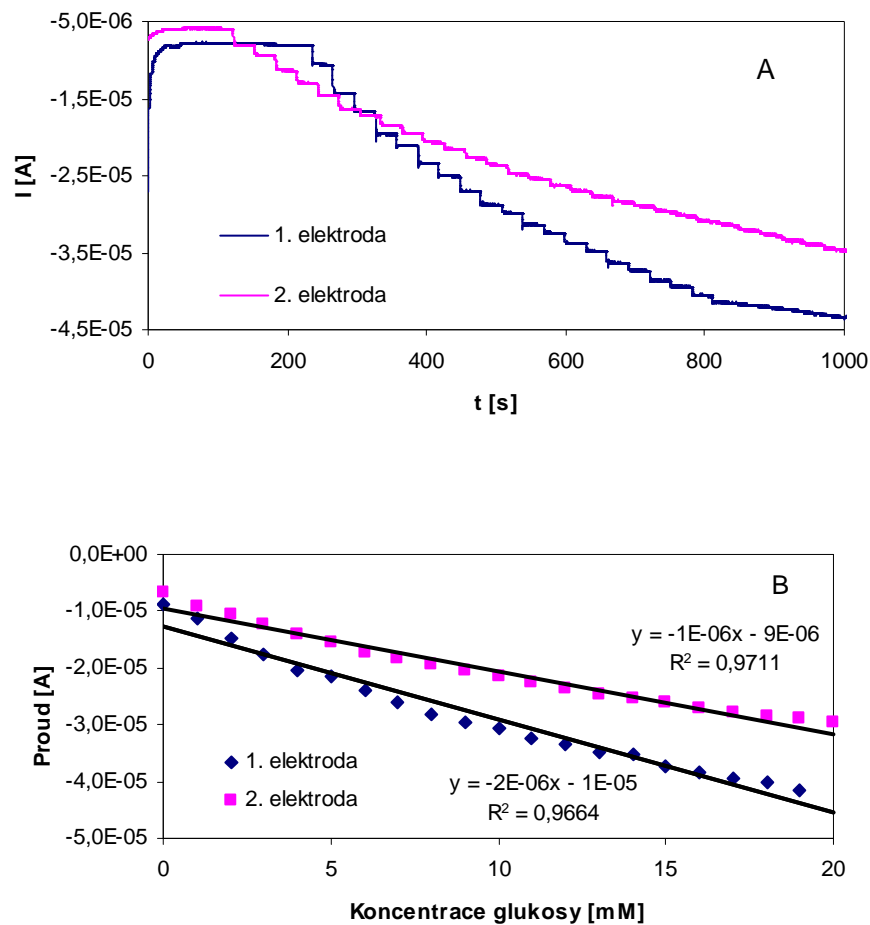
Jak bylo uvedeno v teoretické části práce, nanočástice mědi jsou perspektivním materiálem pro přípravu neenzymatického glukosového senzoru. Nanočástice mědi byly na elektrodu naneseny ve formě směsi s Nafionem. Nejprve byla ověřena odezva

elektrody na glukosu pomocí cyklické voltametrie. Z obr. 17 je vidět, že stejně jako u nemodifikované měděné elektrody (obr. 13), začátek píku odpovídajícího oxidaci glukosy nastal při potenciálu cca 0,45 V. Ep odpovídá hodnotě cca 0,65 V. Proto jsem jako pracovní potenciál pro amperometrická měření vybrala opět 0,7 V.



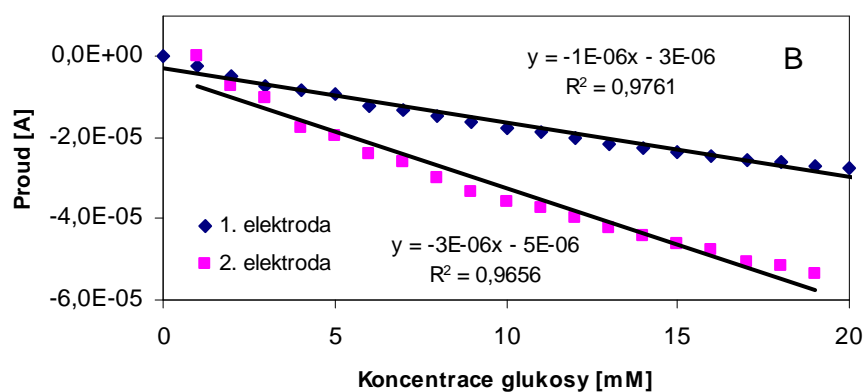
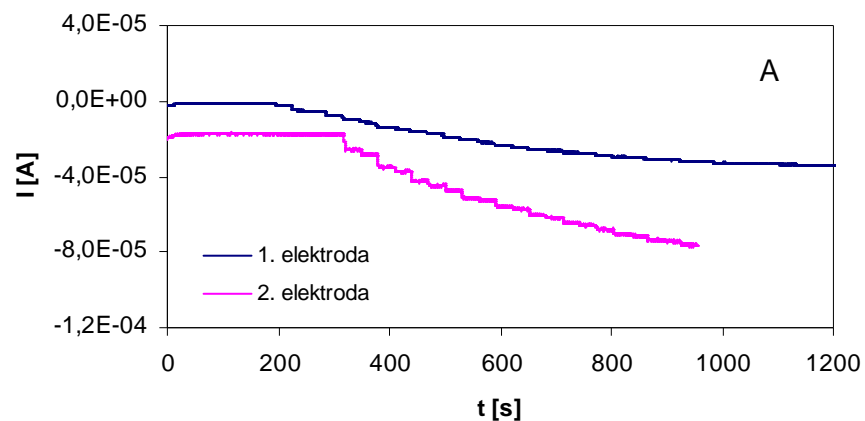
Obr. 17: Cyklický voltamogram glukosy (5 mM) a základního elektrolytu (0,1 M NaOH) pro elektrodu ze skelného uhlíku modifikovanou nanočásticemi mědi a Nafionem v rozmezí -0,2 do 1,2 V vs. Ag/AgCl při scanovací rychlosti 100 mV/s.

Následné amperometrické měření probíhalo v 0,1 M NaOH a ukázalo, že linearita odezvy na glukosu je výrazně lepší u nižších koncentrací než u měděné elektrody, kalibrační křivka vykazuje značnou odchylku od linearity. Ačkoliv se na první pohled zdá, že elektroda modifikovaná nanočásticemi mědi v přítomnosti Nafionu funguje lépe, než objemová měděná elektroda, je extrémně obtížné připravit elektrodu modifikovanou nanočásticemi mědi v přítomnosti Nafionu tak, aby byly výsledky měření reprodukovatelné. Následující obrázky ukazují odezvy GC elektrody modifikované nanočásticemi mědi rozptýlenými v Nafionu. Z obr. 18A je zřejmé, že elektroda poskytovala odezvu na glukosu v širším koncentračním rozmezí, od 0 do 20 mM, ale její odezva nebyla lineární v rozsahu koncentrace glukosy od 0 do 2 mM pro první i druhou elektrodu a od koncentrace glukosy 6 až 12 mM pro první elektrodu. Odezva nemodifikované měděné elektrody (obr. 14A) linearitu sice vykazovala, ale po 9 přidávkách glukosy (tj. po dosažení koncentrace cca 5 mM) přestala elektroda na další přídavky glukosy reagovat.



Obr. 18: Amperometrické křivky (A) a odpovídající kalibrační křivky (B) pro GC elektrodu modifikovanou nanočásticemi mědi rozptýlenými v Nafionu na rostoucí koncentraci glukosy. Nástřiky 20 μ l 1 M glukosy do 20 ml 0,1 M NaOH. (1 přidavek = zvýšení koncentrace glukosy o 1 mM). Měřeno při potenciálu 0,7 V vs. Ag/AgCl.

Podobných výsledků bylo dosaženo při použití elektrody ze skelného uhlíku modifikované nanočásticemi mědi rozptýlených v chitosanu. Z obr. 19A je zřejmé, že elektroda modifikovaná nanočásticemi mědi rozptýlenými v chitosanu vykazuje pro obě elektrody citlivost k přidávkům glukosy, její odezva však není příliš lineární, a to především pro 2. elektrodu v rozsahu koncentrací glukosy od 3 do 5 mM, jak ukazuje obr. 19B.

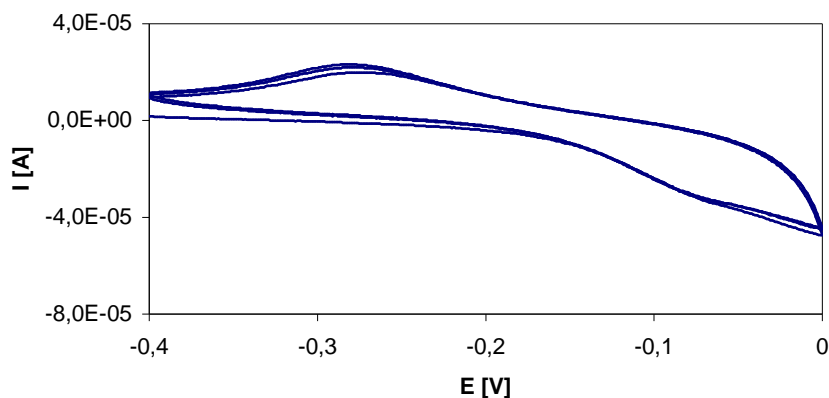


Obr 19: Amperometrické křivky (A) a odpovídající kalibrační křivky (B) pro GC elektrodu modifikovanou nanočásticemi mědi rozptýlenými v chitosanu na rostoucí koncentraci glukosy. Nástřiky $20 \mu\text{l}$ 1 M glukosy do 20 ml 0,1 M NaOH. (1 přidavek = zvýšení koncentrace glukosy o 1 mM). Měřeno při potenciálu 0,7 V vs. Ag/AgCl.

4.3 Elektroanalýza glukosy na elektrodách modifikovaných oxidy mědi

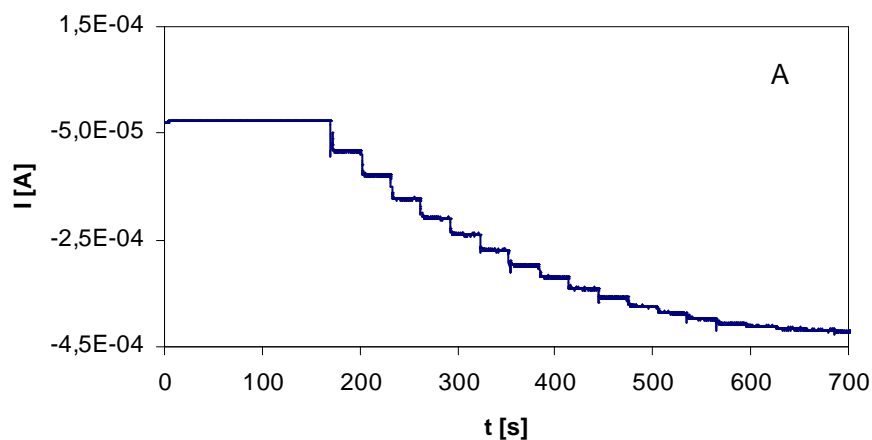
Měděná elektroda modifikovaná CuO

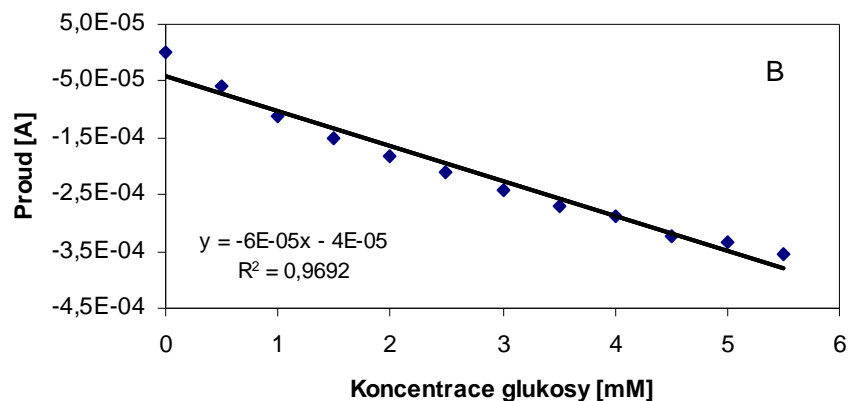
Měděná elektroda byla anodizována v 0,1 M NaOH. Tímto procesem vznikla na povrchu elektrody vrstva oxidů mědi. Anodizace byla prováděna cyklickým scanem.



Obr. 20: Voltamogram získaný v průběhu depozice vrstvy CuO z 0,1 M NaOH v rozmezí -0,4 až 0 V vs. Ag/AgCl při scanovací rychlosti 1 V/s.

Měděná elektroda modifikovaná vrstvou CuO vykazuje vyšší citlivost při amperometrickém stanovení glukosy (obr. 21A) ve srovnání s měděnou elektrodou. Její odezva je však nelineární, a to především v rozsahu koncentrací glukosy od 1 až 3 mM a v rozsahu koncentrací od 5 až 5,5 mM, jak je patrné z obr. 20B.

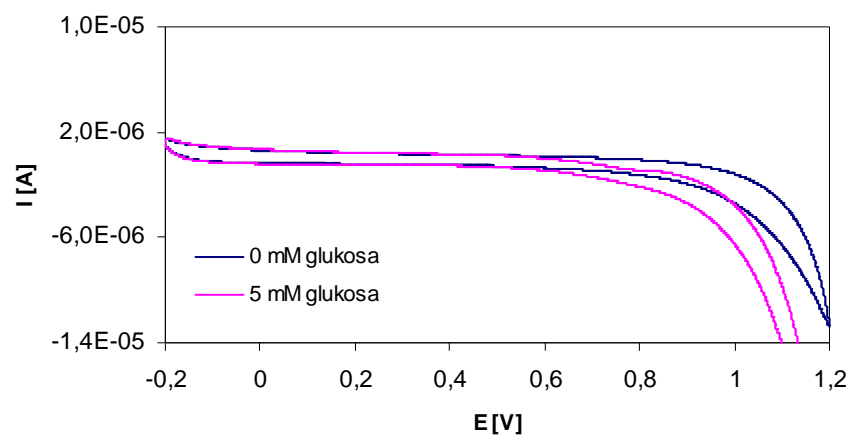




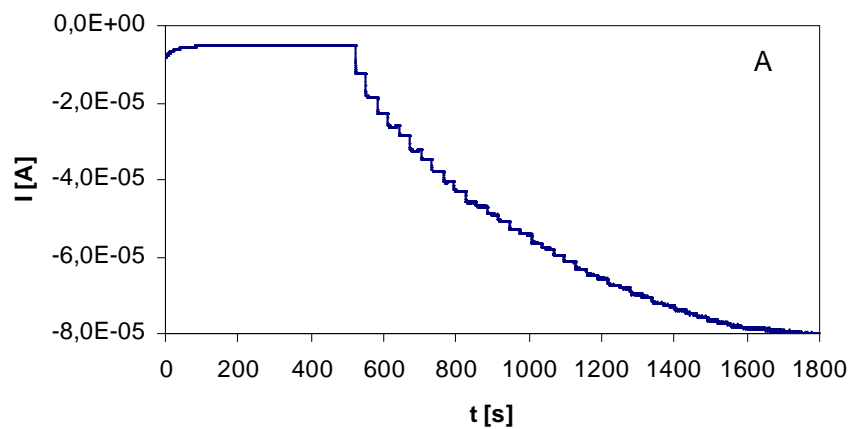
Obr. 21: Amperometrická křivka (A) a odpovídající kalibrační křivka (B) pro měděnou elektrodu modifikovanou vrstvou CuO vyloučenou z 0,1 M NaOH na rostoucí koncentraci glukosy. Nástřiky 20 μ l 0,5 M glukosy do 20 ml 0,1 M NaOH. (1 přidavek = zvýšení koncentrace glukosy o 0,5 mM). Měřeno při potenciálu 0,7 V vs. Ag/AgCl.

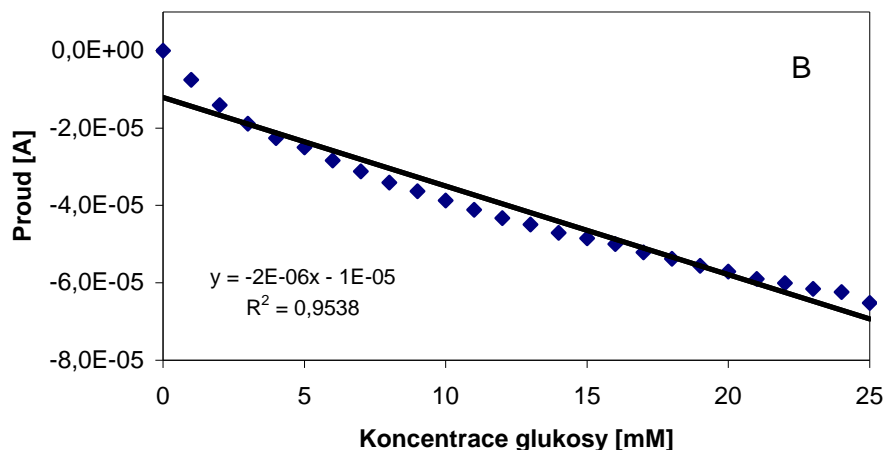
Skelný uhlík modifikovaný nanočásticemi Cu₂O rozptýlenými v Nafionu

GC elektroda modifikovaná nanočásticemi Cu₂O byla připravena stejným způsobem, jako elektroda modifikovaná nanočásticemi mědi. Pomocí cyklické voltametrie byla ověřena odezva elektrody na glukosu. Z obr. 22 je vidět, že stejně jako v předchozích případech, u nemodifikované měděné elektrody (obr. 13) a u elektrody modifikované nanočásticemi mědi rozptýlenými v Nafionu (obr. 17) nastal začátek píku odpovídajícího oxidaci glukosy při potenciálu cca 0,45 V. Ep odpovídá hodnotě cca 0,65 V. Proto jsem jako pracovní potenciál pro amperometrická měření opět vybrala 0,7 V.



Obr. 22: Cyklický voltamogram glukosy (5 mM) a základního elektrolytu (0,1 M NaOH) pro GC elektrodu modifikovanou nanočásticemi Cu_2O rozptýlenými v Nafionu v rozmezí -0,2 do 1,2 V vs. Ag/AgCl při scanovací rychlosti 100 mV/s.





Obr. 23: Amperometrická křivka (A) a odpovídající kalibrační křivka (B) pro GC elektrodu modifikovanou nanočásticemi oxidu měďného a Nafionem na rostoucí koncentraci glukosy. Nástřiky 20 μ l 1 M glukosy do 20 ml 0,1 M NaOH. (1 přidavek = zvýšení koncentrace glukosy o 1 mM). Měřeno při potenciálu 0,7 V vs. Ag/AgCl.

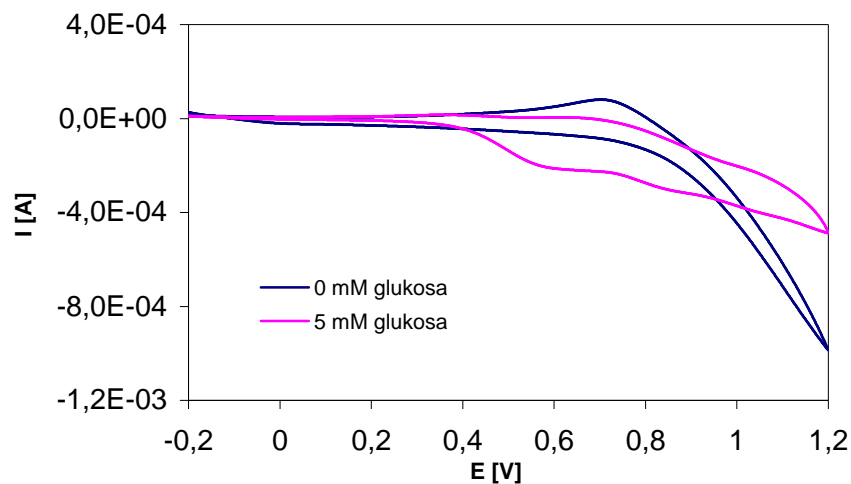
Elektroda modifikovaná nanočásticemi Cu_2O rozptýlenými v Nafionu je přibližně 2x citlivější k přídávům glukosy než obdobná elektroda s nanočásticemi mědi, její odezva je však v celém rozsahu měření značně nelineární, jak dokazuje obr. 23B.

4.4. Elektroanalýza glukosy na elektrodách modifikovaných sulfidy mědi

Měděná elektroda modifikovaná vrstvou Cu_2S

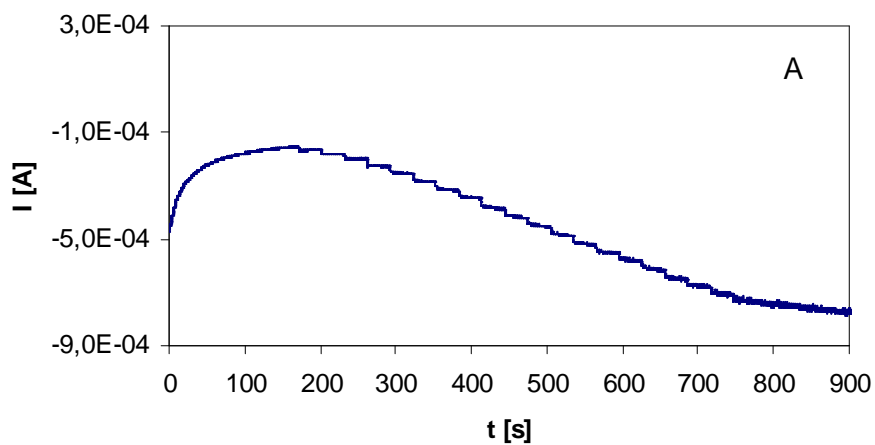
Měděná elektroda byla anodizována v 0,1 M NaSH. Tímto procesem vznikla na povrchu elektrody vrstva Cu_2S . Anodizace byla prováděna cyklickým scanem -0,4 až 0,6 V vs. Ag/AgCl při scanovací rychlosti 1000 mV/s. Ukázka cyklického voltamogramu zaznamenaného během depozice vrstvy Cu_2S z 0,1 M NaSH je uvedena v kapitole 4.1 (obr. 11).

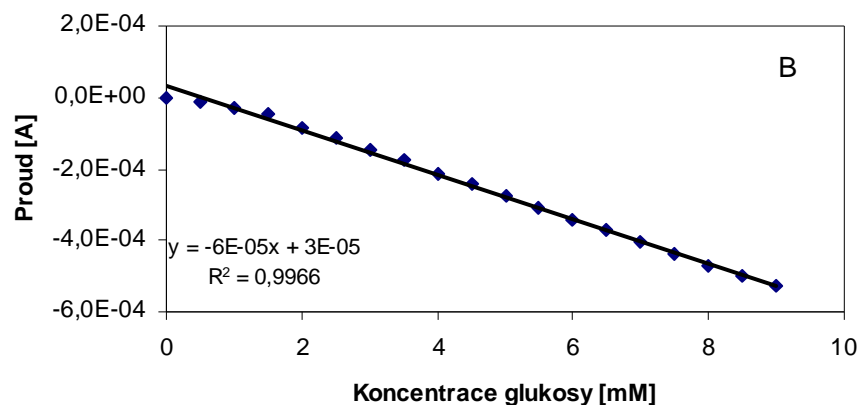
Nejprve byla ověřena odezva elektrody na glukosu pomocí cyklické voltametrie.



Obr. 24: Cyklický voltamogram glukosy (0,5 mM) a základního elektrolytu (0,1 M NaOH) pro měděnou elektrodu modifikovanou vrstvou Cu_2S v rozmezí -0,2 do 1,2 V vs. Ag/AgCl při scanovací rychlosti 100 mV/s.

Z obr. 24 je patrné, že začátek oxidace glukosy nastal při potenciálu cca 0,45 V. E_p odpovídá přibližně 0,65 V. Jako pracovní potenciál byl proto opět zvolen 0,7 V.





Obr. 25: Amperometrická křivka (A) a odpovídající kalibrační křivka (B) pro měděnou elektrodu modifikovanou vrstvou Cu_2S vyloučenou z 0,1 M NaSH na rostoucí koncentraci glukosy. Nástřiky 20 μl 0,5 M glukosy do 20 ml 0,1 M NaOH. (1 přidavek = zvýšení koncentrace glukosy o 0,5 mM). Měřeno při potenciálu 0,7 V vs. Ag/AgCl. Rychlost scanu při depozici cyklickou voltametrií byla 1000 mV/s, počet scanů = 3.

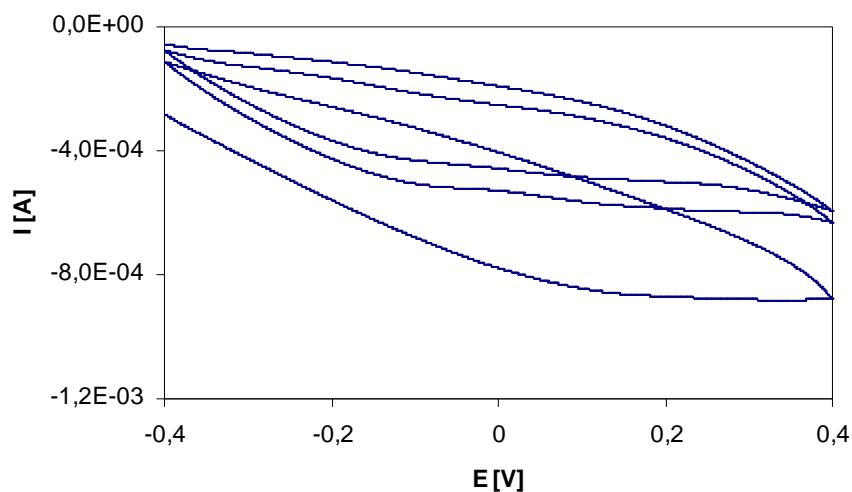
Z amperogramu je zřejmé, že elektroda poskytuje lineární odezvu na glukosu od $c = 2$ mM do 9 mM. Citlivost stanovení glukosy je však nižší než na elektrodách na bázi Cu a CuO.

Protože elektroda pokrytá vrstvou Cu_2S poskytovala zajímavé výsledky při stanovení glukosy (lineární odezva v poměrně širokém rozmezí koncentrací), byl optimalizován způsob depozice vrstvy. Abychom zjistili, jaké parametry nastavené při depozici vrstvy Cu_2S z roztoku NaSH nejlépe vyhovují následnému amperometrickému měření, byla depozice provedena při různém počtu scanů, různé scanovací rychlosti, různém potenciálovém rozsahu. Dále byla provedena sada experimentů, při které byla testována odezva elektrody na glukosu v závislosti na pH roztoku NaSH použitého při depozici. Ukázalo se, že optimální odezvy vykazovaly elektrody opatřené vrstvou deponovanou z roztoku 0,1 M NaSH v 0,1 M NaOH.

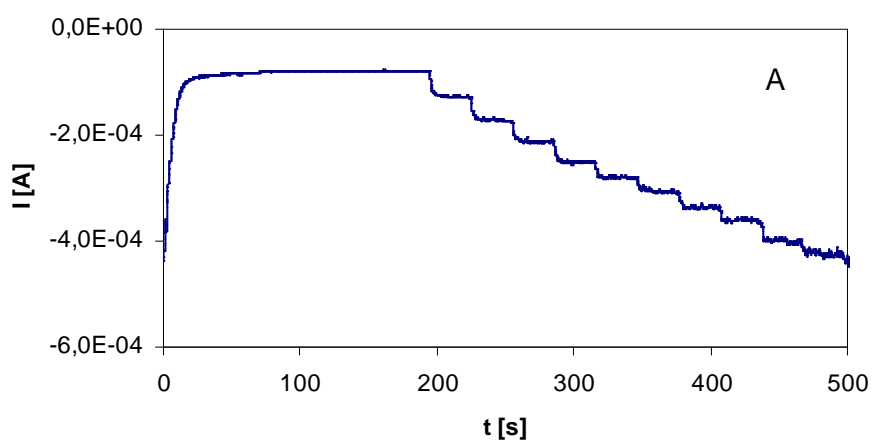
4.4.1 Depozice vrstvy Cu_2S při rozdílném počtu scanů

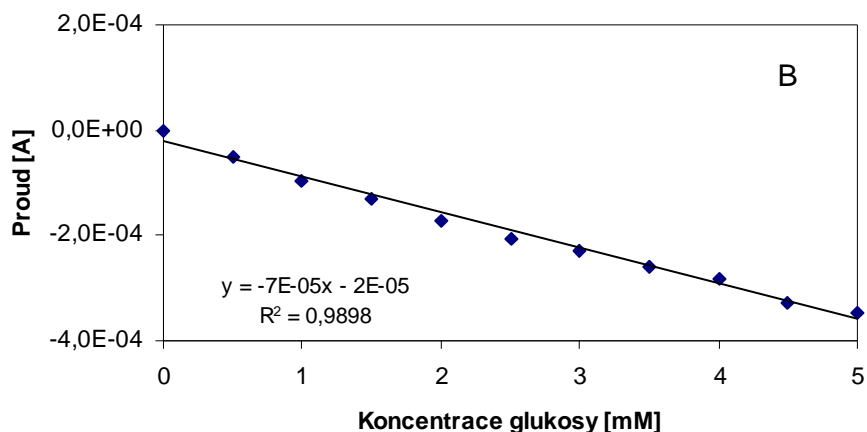
Depozice byla provedena při počtu scanů 1, 2, 3, 5, 10, 20 a 50. Obr. 26 ukazuje cyklický voltamogram depozice vrstvy Cu_2S z 0,1 M NaSH v 0,1 M NaOH v rozmezí -0,4 V až 0,4 V vs. Ag/AgCl při scanovací rychlosti 0,02 V/s a počtu scanů 3.

Záznam amperometrické křivky pro měděnou elektrodu je uveden v obr. 27A. Je patrné, že měděná elektroda modifikovaná vrstvou Cu_2S vyloučenou z 0,1 M NaSH byla citlivá ke glukose, její odezva vykazovala linearitu do koncentrace 4,5 mM. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při depozici s nižším počtem scanů, 1, 2, 3, 5. Naopak při vyšším počtu scanů, 10, 20, 50, elektroda nevykazovala citlivost k přídávům glukosy, jak dokazuje obr. 28.

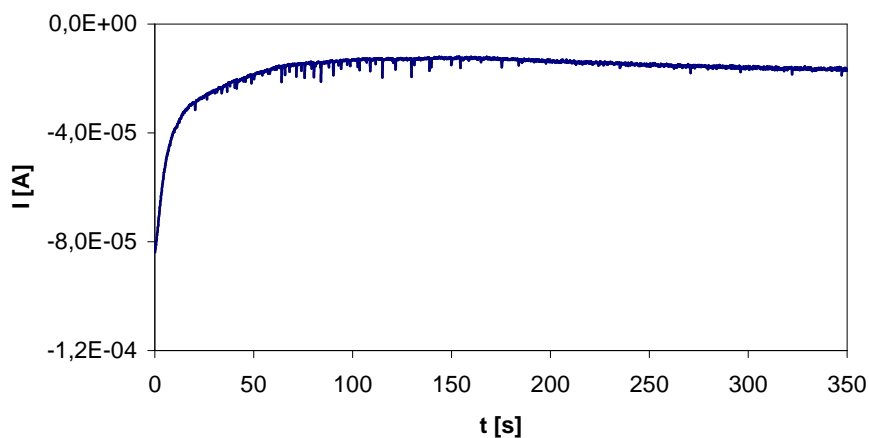


Obr. 26: Cyklický voltamogram depozice vrstvy Cu_2S z 0,1 M NaSH v 0,1 M NaOH v rozmezí -0,4 až 0,4 V vs. Ag/AgCl při scanovací rychlosti 0,02 V/s.





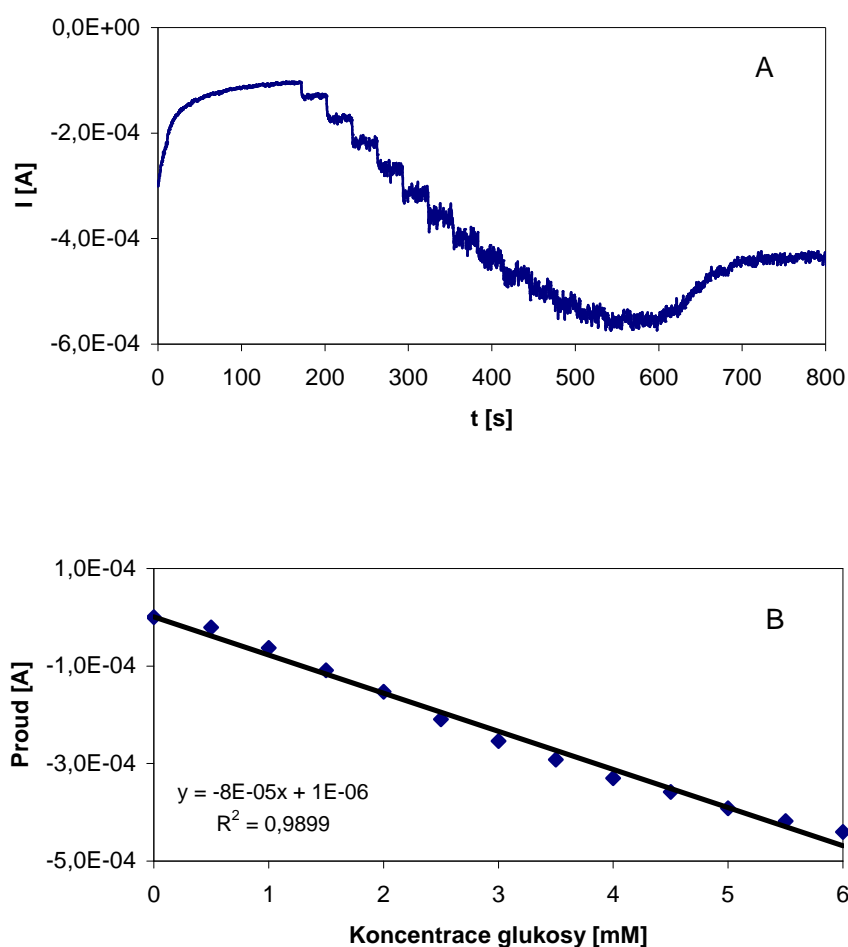
Obr. 27: Amperometrická křivka (A) a odpovídající kalibrační křivka (B) pro měděnou elektrodu modifikovanou vrstvou Cu_2S vyloučenou z 0,1 M NaSH na rostoucí koncentraci glukosy. Nástřiky 20 μl 0,5 M glukosy do 20 ml 0,1 M NaOH. (1 přidavek = zvýšení koncentrace glukosy o 0,5 mM). Měřeno při potenciálu 0,7 V vs. Ag/AgCl.



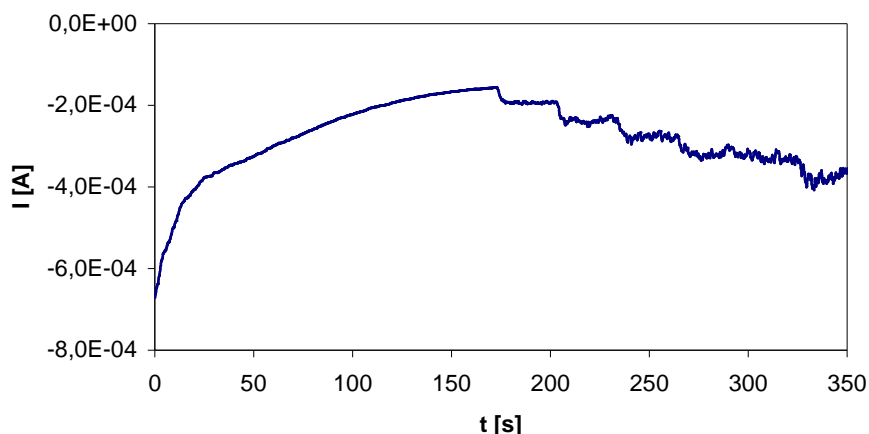
Obr. 28: Amperometrické odezvy pro měděnou elektrodu modifikovanou vrstvou Cu_2S vyloučenou z 0,1 M NaSH na rostoucí koncentraci glukosy. Nástřiky 20 μl 0,5 M glukosy do 20 ml 0,1 M NaOH. (1 přidavek = zvýšení koncentrace glukosy o 0,5 mM). Měřeno při potenciálu 0,7 V vs. Ag/AgCl. Počet scanů při depozici cyklickou voltametrií = 10.

4.4.2 Depozice při rozdílné rychlosti scanu

Depozice byla provedena při scanovacích rychlostech 1, 10, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500 a 5000 mV/s. Počet scanů = 3, potenciálový rozsah se pohyboval v rozmezí -0,4 V až 1 V vs. Ag/AgCl. Odezva elektrody byla optimální při depozici použitím scanovací rychlosti 1000 mV/s, příslušný amperogram již byl prezentován na obr. 25A. Elektrody modifikované při nižších scanovacích rychlostech nebyly citlivé k přidávkám glukosy. Nejhorších výsledků bylo dosaženo při scanovacích rychlostech 50 mV/s a 1 mV/s, jak znázorňuje obr. 30.



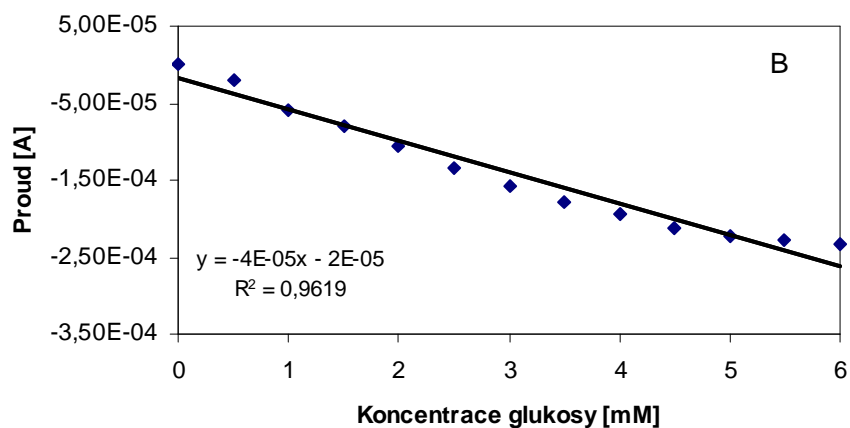
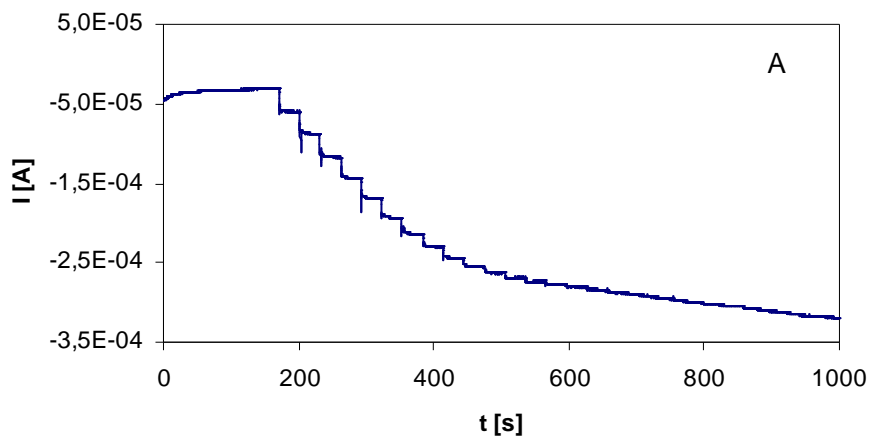
Obr. 29: Amperometrická křivka (A) a odpovídající kalibrační křivka (B) pro měděnou elektrodu modifikovanou vrstvou Cu_2S vyloučenou z 0,1 M NaSH na rostoucí koncentraci glukosy. Nástříky 20 μl 0,5 M glukosy do 20 ml 0,1 M NaOH. (1 přidavek = zvýšení koncentrace glukosy o 0,5 mM). Měřeno při potenciálu 0,7 V vs. Ag/AgCl. Rychlost scanu při depozici cyklickou voltametrií byla 1000 mV/s.



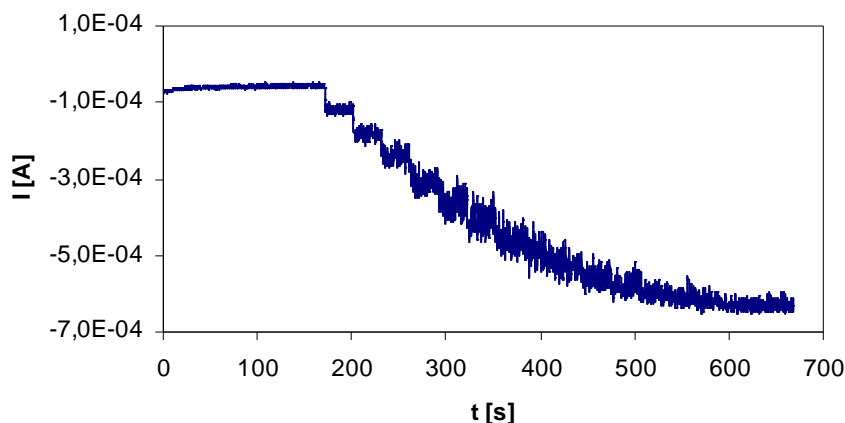
Obr. 30: Amperometrické odezvy pro měděnou elektrodu modifikovanou vrstvou Cu_2S vyloučenou z 0,1 M NaSH na rostoucí koncentraci glukosy. Nástřiky 20 μl 0,5 M glukosy do 20 ml 0,1 M NaOH. (1 přidavek = zvýšení koncentrace glukosy o 0,5 mM). Měřeno při potenciálu 0,7 V vs. Ag/AgCl. Rychlost scanu při depozici cyklickou voltametrií = 50 mV/s.

4.4.3 Depozice při rozdílném potenciálovém rozsahu

Depozice byla provedena v rozmezí potenciálů -0,4 až 1 V; -0,4 až 0,8 V; -0,4 až 0,7 V; -0,4 až 0,6 V; -0,4 až 0,5 V; -0,4 až 0,4 V; -0,4 až 0,2 V; -0,4 až 0,1 V; -0,4 až 0 V; -0,4 až -0,1 V vs. Ag/AgCl. Počet scanů = 3, scanovací rychlost = 1000 mV/s. Obr. 31A znázorňuje odezvy pro modifikovanou měděnou elektrodu na rostoucí koncentraci glukosy. Potenciálový rozsah cyklického voltamogramu při depozici se pohybuje v rozmezí -0,4 až 0 V vs. Ag/AgCl. Je vidět, že elektroda vykazovala citlivost ke glukose, její odezva však byla nelineární v rozmezí koncentrací glukosy od 0 až 0,5 mM; 2,5 až 4,5 mM a 5,5 až 6 mM. Elektrody modifikované při vyšších potenciálech sice vykazovaly citlivost k přídkům glukosy, ale jejich odezvy už nebyly lineární při vyšších koncentracích. Nejhorších výsledků bylo dosaženo při rozsahu potenciálů -0,4 až 0,1 V vs. Ag/AgCl; -0,4 až 0,4 V vs. Ag/AgCl, jak ukazuje obr.32.



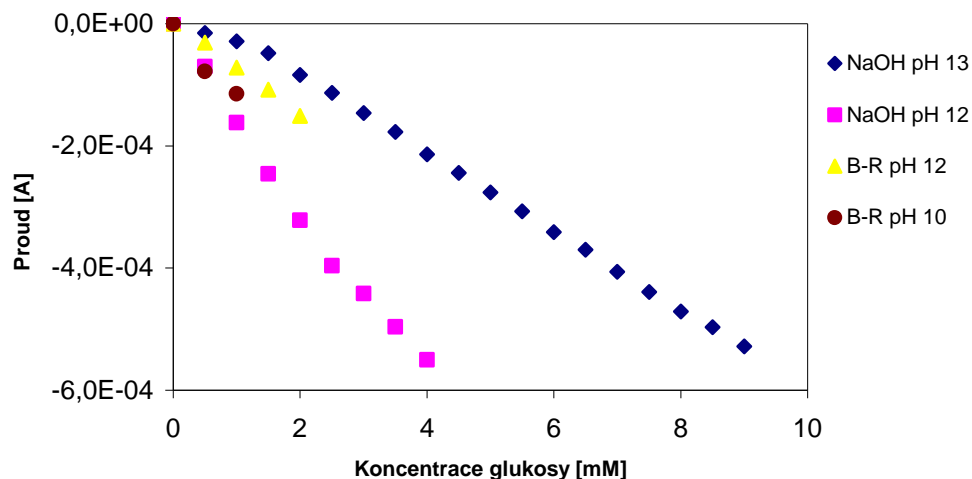
Obr. 31: Amperometrická křivka (A) a odpovídající kalibrační křivka (B) pro měděnou elektrodu modifikovanou vrstvou Cu_2S vyloučenou z 0,1 M NaSH na rostoucí koncentraci glukosy. Nástřiky 20 μl 0,5 M glukosy do 20 ml 0,1 M NaOH. (1 přidavek = zvýšení koncentrace glukosy o 0,5 mM). Měreno při potenciálu 0,7 V vs. Ag/AgCl. Potenciálový rozsah cyklického voltamogramu v rozmezí -0,4 až 0 V vs. Ag/AgCl.



Obr. 32: Amperometrické odezvy pro měděnou elektrodu modifikovanou 0,1 M NaSH na rostoucí koncentraci glukosy. Nástříky 20 μ l 0,5 M glukosy (tj. 1 přidavek = zvýšení koncentrace glukosy o 0,5 mM). Měřeno v míchaném 0,1 M NaOH při potenciálu 0,7 V vs. Ag/AgCl. Potenciálový rozsah cyklického voltamogramu v rozmezí -0,4 až 0,4 V vs. Ag/AgCl.

4.4.4 pH závislost odezvy senzoru

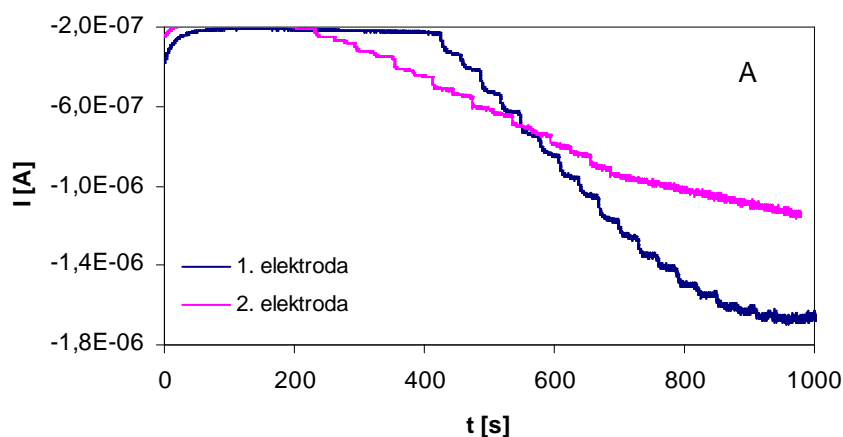
U elektrody opatřené vrstvou Cu_2S optimalizovaným postupem byla zjišťována pH závislost odezvy. Amperometrická měření byla prováděna v míchaném roztoku NaOH o koncentracích 0,1 M a 0,01 M a Britton-Robinsonově pufru o pH 7, 8, 10, 12 s přidavky 0,5 M glukosy. Výsledky jsou ukázány na obr. 33. Odezva elektrody měřené v prostředí o pH 13 byla lineární i při vyšších koncentracích, se snížením pH se oblast linearit odezvy snižuje. Zřejmý je razantní pokles citlivosti elektrody při pH <12. Měření prováděné v B-R pufru poskytuje poloviční odezvy ve srovnání se stejným experimentem provedeným v prostředí NaOH o stejné hodnotě pH. Pod hodnotou pH =10, již elektroda nevykazovala na glukosu žádnou odezvu.

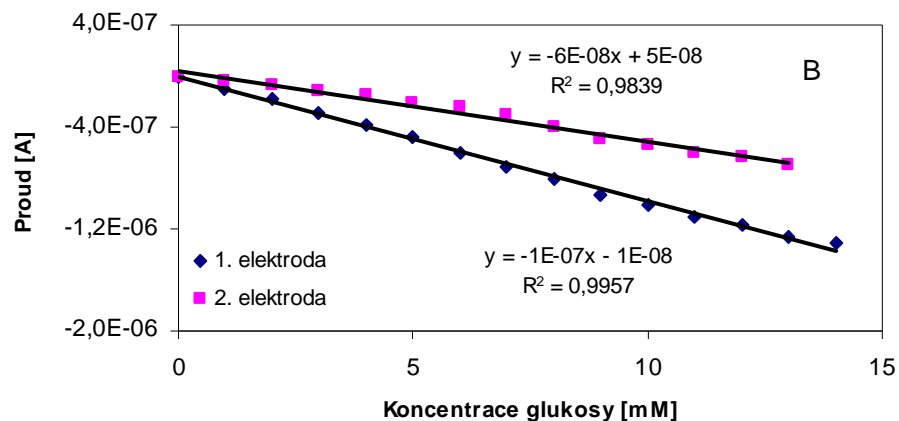


Obr. 33: Kalibrační křivky pro detekci glukosy na měděné elektrodě modifikované vrstvou Cu_2S vyloučenou z 0,1 M NaSH. Měřeno při potenciálu 0,7 V vs. Ag/AgCl.

Skelný uhlík modifikovaný nanočásticemi Cu_2S rozptýlenými v Nafionu

Podobně jako elektrody modifikované vrstvou Cu_2S deponovanou elektrochemicky i elektrody opatřené vrstvou nanočástic Cu_2S rozptýlenými v Nafionu vykazuje odezvu na glukosu při amperometrickém měření (34A) lineární i při vyšších koncentracích, oblast linearity je dokonce mírně posunutá do vyšších koncentrací glukosy (13 - 14 mM) oproti elektrodě s elektrodeponovanou vrstvou Cu_2S (9 mM glukosy).





Obr. 34: Amperometrické křivky (A) a odpovídající kalibrační křivky (B) pro GC elektrodu modifikovanou nanočásticemi Cu_2S rozptýlenými v Nafionu na rostoucí koncentraci glukosy. Nástříky $20 \mu\text{l}$ 1 M glukosy do 20 ml $0,1 \text{ M}$ NaOH . (1 přidavek = zvýšení koncentrace glukosy o 1 mM). Měřeno při potenciálu $0,7 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl .

Podobně jako u elektrod modifikovaných nanočásticemi Cu a Cu_2O , problémem je značná nereprodukovatelnost odezvy (tzv. interelectrode reproducibility), jak je zřejmé z obr. 34B.

5. Závěr

Předložená diplomová práce se zabývá studiem senzorů pro stanovení glukosy. Cílem práce bylo najít účinný a citlivý elektrodový povrch pro amperometrické stanovení glukosy. Za tímto účelem byl testován elektrodový povrch na bázi mědi, nanočástic mědi, nanočástic Cu_2O a Cu_2S a sloučenin mědi (CuO , Cu_2S).

Jako pracovní elektroda byla použita elektroda ze skelného uhlíku a měděná elektroda. Elektrody byly modifikovány různými způsoby. Byly prováděny depozice nanočástic mědi, nanočástic Cu_2O a nanočástic Cu_2S v matrici polymerní látky, depozice vrstvy Cu_2S pomocí anodizace měděné elektrody v roztoku NaSH , depozice vrstvy CuO pomocí anodizace měděné elektrody v roztoku NaOH a elektrodepozice vrstvy mědi vyloučené z roztoku CuSO_4 (bez přítomnosti PAL a v přítomnosti PAL) na skelný uhlík.

Jako polymerní látky pro depozici nanočástic mědi byly použity Nafion a chitosan. Nafion a chitosan jsou látky selektivní vůči některým interferentům, zabraňují průchodu interferentu k senzoru. Při modifikaci elektrody samotnými nanočásticemi bez použití polymerní látky nebyly výsledky reprodukovatelné. Elektroda modifikovaná nanočásticemi mědi rozptýlenými v Nafionu vykazovala shodné výsledky jako elektroda modifikovaná nanočásticemi mědi rozptýlenými v chitosanu, proto byly nanočástice Cu_2O a Cu_2S deponovány pouze v přítomnosti Nafionu.

Dále byla testována elektroda ze skelného uhlíku modifikovaná mědí vyloučenou z roztoku CuSO_4 , elektroda modifikovaná mědí deponovanou z roztoku, který obsahoval CuSO_4 a povrchově aktivní látku. Jako PAL byly použity Pluronic F127 a Triton X 100. Takto modifikovaná elektroda však nevykazovala citlivost ke glukose.

Měděná elektroda byla modifikována vrstvou Cu_2S vyloučenou z roztoku NaSH a vrstvou CuO vyloučenou při anodizaci z NaOH . Měděná elektroda modifikovaná vrstvou CuO vykazovala vysokou citlivost, která byla obdobná jako u elektrody ze skelného uhlíku modifikované nanočásticemi rozptýlenými v Nafionu. Tato elektroda však zároveň vykazovala nelinearitu odezvy na glukosu. Depozice vrstvy Cu_2S z roztoku NaSH byla prováděna cyklickou voltametrií. Abychom zjistili, jaké parametry

nastavené při depozici nejlépe vyhovují následnému amperometrickému měření, byla depozice provedena při různém počtu scanů, různé scanovací rychlosti, různém potenciálovém rozsahu a v různém prostředí pH. Největší citlivost vykazovala elektroda, kdy depozice probíhala při scanovací rychlosti 1000 mV/s, v rozmezí potenciálů -0,4 až 0 V vs. Ag/AgCl a počtu scanů 3. Nejlepších výsledků dosahovala elektroda ze skelného uhlíku modifikovaná nanočásticemi mědi v přítomnosti Nafionu, elektroda ze skelného uhlíku modifikovaná nanočásticemi Cu₂S v přítomnosti Nafionu a měděná elektroda modifikovaná vrstvou Cu₂S vyloučenou z roztoku NaSH. Parametry elektrod připravených v rámci diplomové práce jsou shrnuty v tabulce 1.

Tabulka 1: Výsledné parametry pro testované elektrody

| Elektroda | Citlivost [A.cm⁻².mM⁻¹] | Detekční limit [mM] | Rozsah linearity [mM] |
|--|--|--------------------------------|--------------------------------------|
| Čistá měděná | 1,99.10 ⁻³ | 0,75 | 5 |
| Modifikovaná nanočásticemi Cu a Nafionem | 1,26.10 ⁻⁴ | 0,25 | 19 |
| Modifikovaná nanočásticemi Cu a Nafionem | 1,03.10 ⁻⁴ | 0,25 | 20 |
| Modifikovaná nanočásticemi Cu a chitosanem | 3,73.10 ⁻⁵ | 0,33 | 19 |
| Modifikovaná nanočásticemi Cu a chitosanem | 2,73.10 ⁻⁴ | 0,3 | 8 |
| Modifikovaná CuO vzniklým anodizací v NaOH | 1,22.10 ⁻⁵ | 0,06 | 5,5 |
| Modifikovaná nanočásticemi Cu ₂ O a Nafionem | 8,23.10 ⁻⁵ | 0,125 | 23 |
| Modifikovaná Cu ₂ S vzniklým anodizací v NaSH | 2,14.10 ⁻³ | 2 | 9 |
| Modifikovaná nanočásticemi Cu ₂ S a Nafionem | 3,59.10 ⁻⁶ | 0,375 | 14 |
| Modifikovaná nanočásticemi Cu ₂ S a Nafionem | 3,20.10 ⁻⁶ | 0,5 | 13 |

6. Summary

This thesis deals with study of sensors for amperometric glucose determination. The aim of the research was to find an effective and sensitive electrode surface for glucose amperometric detection. We tested surface-modified electrodes based on copper, copper nanoparticles, Cu_2O and Cu_2S nanoparticles and copper compounds (CuO , Cu_2S).

There were used two types of working electrodes, glassy carbon and copper electrode. The electrodes were modified by different ways. We carried out the deposition of copper nanoparticles, Cu_2O nanoparticles and Cu_2S nanoparticles in polymer matrix, the deposition of Cu_2S layer by an anodisation of copper electrode in NaSH solution, the deposition of CuO layer by an anodisation of copper electrode in NaOH solution and the electrodeposition of copper layer gained from CuSO_4 solution (without and with surfactant) on glassy carbon. As the polymer for the deposition of copper nanoparticles Nafion and chitosan were used. These two substances are selective for some interferences from easily oxidisable species, they protect sensor from getting the interferences onto its surface.

We tested also glassy carbon electrode modified with copper obtained from CuSO_4 solution, the electrode modified with copper obtained from the solution which contained CuSO_4 and a surfactant. As surfactants were used Pluronic F127 and Triton X100. However, this type of electrode did not possess any sensitivity to glucose.

Copper electrode was also modified by Cu_2S layer obtained by anodisation of copper electrode in NaSH solution and modified by CuO layer from anodisation of copper electrode in NaOH solution. Copper electrode modified by CuO layer gave high response for glucose, which was similar to glassy carbon electrode modified with copper nanoparticles dispersed in Nafion. Unfortunately the response of this electrode was not linear.

The best results exhibited glassy carbon electrode modified with copper nanoparticles dispersed in Nafion, glassy carbon electrode modified with Cu_2S nanoparticles dispersed in Nafion and copper electrode modified by Cu_2S layer.

7. Použitá literatura

1. I. Torres, M. Baena, M. Cayon, J. Rojo, M. Diosdado, Use of sensors in the treatment and follow-up of patients with diabetes mellitus, *Sensors* 10 (2010) 7404 – 7420.
2. S. Song, L. Sun, L. Yuan, T. Sun, Y. Zhao, W. Zuo, Y. Cong, X. Li, J. Wang, Method to determine enantiomeric excess of glucose by nonchiral high-performance liquid chromatography using circular dichroism detection, *J. Chromatogr. A* 1179 (2008) 125 – 130.
3. H. Li, F. Song, Z. Zheng, Z. Liu, S. Liu, Characterization of saccharides and phenolic acids in the Chinese herb Tanshen by ESI-FT-ICR-MS and HPLC, *J. Mass. Spectrom.* 43 (2008) 1545 – 1552.
4. H. Davies, Rapid determination of glucose, fructose and sucrose in potato tubers by capillary gas chromatography, *Potato. Res.* 31 (1988) 569 – 572.
5. S. Bruce, I. Breton, J. Decombaz, Ch. Boesch, E. Scheurer, I. Montoliu, S. Rezzi, S. Kochbar, P. Guy, A plasma global metabolic profiling approach applied to an exercise study monitoring the effects of glucose, galactose and fructose drinks during post-exercise recovery, *J. Chromatogr. B* 878 (2010) 3015 – 3023.
6. L. Murphy, M. Baumann, K. Borch, M. Sweeney, P. Westh, An enzymatic signal amplification system for calorimetric studies of cellobiohydrolases, *Anal. Biochem.* 404 (2010) 140 – 148.
7. R. Rieselbach, S. Shankel, E. Slatopolsky, H. Lubowitz, N. Bricker et al., Glucose titration studies in patients with chronic progressive renal disease, *J. Clin. Invest.* 46 (1967).
8. S. Boduroglu, J. Khoury, D. Reddy, P. Rinaldi, J. Hu, A colorimetric titration method for quantification of millimolar glucose in a pH 7.4 aqueous phosphate buffer, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15 (2005) 3974 – 3977.
9. S. Dong, S. Zhang, X. Cheng, P. He, Q. Wang, Y. Fang, Simultaneous determination of sugars and ascorbic acid by capillary zone electrophoresis with amperometric detection at a carbon paste electrode modified with polyethylene glycol and Cu₂O, *J. Chromatogr. A* 1161 (2007) 327 – 333.
10. O. Khalil, Non-invasive glucose measurement technologies: An update from

- 1999 to the dawn of the new millennium, *Diabetes Technol. Ther.* 6 (2004) 660 - 697.
11. J. Pickup, F. Hussain, N. Evans, N. Sachedina, In vivo glucose monitoring: the clinical reality and the promise, *Biosens. Bioelectron.* 20 (2005) 1897 - 1902.
 12. K. Toghill, R. Compton, Electrochemical non-enzymatic glucose sensors: A perspective and an evaluation, *Int. J. Electrochem. Sc.* 5 (2010) 1246 – 1301.
 13. P. Skládal, *Biosenzory*, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita Brno (2002).
 14. Y. Cui, J. Barford, R. Renneberg, Amperometric trienzyme ATP biosensors based on the coimmobilization of salicylate hydroxylase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, and hexokinase, *Sensor Actuator B* 132 (2008) 1 – 4.
 15. S. Tham, J. Pearson, J. Kane, P. Treloar, P. Vadgama, Whole blood assay of glucose-6-phosphate dehydrogenase: potential for simplified immunoassay, *Sensor Actuator B* 50 (1998) 204 – 209.
 16. Ch. Wong, K. Wong, X. Chen, Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78 (2008) 927 - 938.
 17. A. Harper, M. Anderson, Electrochemical glucose sensors - developments using electrostatic assembly and carbon nanotubes for biosensor construction, *Sensors* 10 (2010) 8248 - 8274.
 18. G. Li, Y. Wang, H. Xu, A hydrogen peroxide sensor prepared by electropolymerization of pyrrole based on screen-printed carbon paste electrodes, *Sensors* 7 (2007) 239 – 250.
 19. J. Li, S. Tan, H. Ge, Silica sol-gel immobilized amperometric biosensor for hydrogen peroxide, *Anal. Chim. Acta* 335 (1996) 137 – 145.
 20. P. Xia, H. Liu, Y. Tian, Cathodic detection of H₂O₂ based on nanopyramidal gold surface with enhanced electron transfer of myoglobin, *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 2470 – 2474.
 21. S. Razola, E. Aktas, J. Viré, J. Kauffmann, Reagentless enzyme electrode based on phenothiazine mediation of horseradish peroxidase for subnanomolar hydrogen peroxide determination, *Analyst* 125 (2000) 79 – 85.
 22. R. Garjonyte, A. Malinauskas, Amperometric sensor for hydrogen peroxide based on Cu₂O or CuO modified carbon paste electrodes, *Anal. Chem.* 360 (1998) 122 – 123.

23. A. Safavi, O. Moradlou, M. Saadatifar, Methylated azopyridine as a new electron transfer mediator for the electrocatalytic oxidation of NADH, *Electroanalysis* 22 (2010) 1072 – 1077.
24. W. Zhang, G. Li, Third-generation biosensors based on the direct electron transfer of proteins, *Anal. Sci.* 20 (2004) 603 – 609.
25. T. Sagara, H. Murakami, S. Igarashi, H. Sato, K. Niki, Spectroelectrochemical study of the redox reaction mechanism of cytochrome c at a gold electrode in a neutral solution in the presence of 4,4'-bipyridyl as a surface modifier, *Langmuir* 7 (1991) 3190 – 3196.
26. G. Bayramoglu, A. Metin, B. Altintas, M. Arica, Reversible immobilization of glucose oxidase on polyaniline grafted polyacrylonitrile conductive composite membrane, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 6881 – 6887.
27. U. Roessl, J. Nahálka, B. Nidetzky, Carrier-free immobilized enzymes for biocatalysis, *Biotechnol. Lett.* 32 (2010) 341 – 350.
28. J. Zhao, Z. Yang, Y. Zhang, Immobilization of glucose oxidase on cellulose/cellulose acetate membrane and its detection by scanning electrochemical microscope (SECM), *Chin. Chem. Lett.* 15 (2004) 1361 – 1364.
29. D. Jung, M. Paradiso, M. Hartmann, Formation of cross-linked glucose oxidase aggregates in mesocellular foams, *J. Mater. Sci.* 44 (2009) 6747 – 6753.
30. S. Zuo, H. Zhao, L. Zhang, H. Yuan, M. Lan, G. Lawrance, G. Wei, An amperometric biosensor based on glucose oxidase immobilized in a sol-gel polyvinyl alcohol/silica hybrid composite film on a Prussian blue modified electrode, *Adv. Sci. Lett.* 3 (2010) 476 – 481.
31. N. Sinha, J. Ma, J. Yeow, Carbon nanotube-based sensors, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 6 (2006) 573 - 590.
32. S. Sotiropoulou, N. Chaniotakis, Carbon nanotube array-based biosensor, *Anal. Bional. Chem.* 375 (2003) 103 - 105.
33. S. Wang, Q. Zhang, R. Wang, S. Yoon, A novel multi-walled carbon nanotube-based biosensor for glucose detection, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311 (2003) 572 - 576.
34. S. Wang, Q. Zhang, R. Wang, S. Yoon, J. Ahn, D. Yang, J. Tian, J. Li, Q. Zhou, Multi-walled carbon nanotubes for the immobilization of enzyme in glucose biosensors, *Electrochem. Commun.* 5 (2003) 800 – 803.
35. J. Ye, Y. Wen, W. Zhang, L. Gan, G. Xu, F. Sheu, Nonenzymatic glucose

- detection using multi-walled carbon nanotube electrodes, *Electrochem. Commun.* 6 (2004) 66- 70.
36. Y. Wang, W. Wei, J. Zeng, X. Liu, X. Zeng, Fabrication of a copper nanoparticle/chitosan/carbon nanotube-modified glassy carbon electrode for electrochemical sensing of hydrogen peroxide and glucose, *Microchim. Acta* 160 (2008) 253 – 260.
37. W. Shi, Z. Ma, Amperometric glucose biosensor based on a triangular silver nanoprisms/chitosan composite film as immobilization matrix, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2010) 1098 – 1103.
38. R. Yu, L. Wang, Q. Xie, S. Yao, High-performance amperometric sensors using catalytic platinum nanoparticles-thionine-multiwalled carbon nanotubes nanocomposite, *Electroanalysis* 23 (2010) 2856 – 2861.
39. H. Lee, S. Yoon, E. Kim, J. Park, In-situ growth of copper sulfide nanocrystals on multiwalled carbon nanotubes and their applications as novel solar cell and amperometric glucose sensor materials, *Nano Lett.* 7 (2007) 778 – 784.
40. H. Chen, R. Yuan, Y. Chai, J. Wang, W. Li, Glucose biosensor based on electrodeposited platinum nanoparticles and three-dimensional porous chitosan membranes, *Biotechnol. Lett.* 32 (2010) 1401 – 1404.
41. K. Novoselov, A. Geim, S. Morozov, D. Jiang, Y. Zhang, S. Dubonos, I. Grigorieva, A. Firsov, Electric field effect in atomically thin carbon films, *Science* 306 (2004) 666 - 669.
42. H. Wu, J. Wang, X. Kang, Ch. Wang, D. Wang, J. Liu, I. Aksay, Y. Lin, Glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in platinum nanoparticles/graphene/chitosan nanocomposite film, *Talanta* 80 (2009) 403 - 406.
43. S. Park, H. Boo, T. Chung, Electrochemical non-enzymatic glucose sensors, *Anal. Chim. Acta* 556 (2006) 46 – 57.
44. D. Liu, Q. Luo, F. Zhou, Nonenzymatic glucose sensor based on gold-copper alloy nanoparticles on defect sites of carbon nanotubes by spontaneous reduction, *Synth. Met.* 160 (2010) 1745 – 1748.
45. S. Ernst, J. Heitbaum, The electrooxidation of glucose in phosphate buffer solutions, *J. Electroanal. Chem.* 100 (1979) 173 – 183.
46. H. Lei, B. Wu, Ch. Cha, H. Kita, Electrooxidation of glucose on platinum in alkaline solution and selective oxidation in the presence of additives,

- J. Electroanal. Chem. 382 (1995) 103 – 110.
47. M. Miele, H. Videla, A. Arvía, Potentiodynamic study of glucose electro-oxidation at bright platinum electrodes, *J. Electrochem. Soc.* 129 (1982) 2207 – 2213.
 48. B. Beden, F. Largeaud, K. Kokoh, C. Lamy, Fourier transform infrared reflectance spectroscopic investigation of the electrocatalytic oxidation of D-glucose: Identification of reactive intermediates and reaction products, *Electrochim. Acta* 41 (1996) 701 – 709.
 49. P. Holt-Hindle, S. Nigro, M. Asmussen, A. Chen, Amperometric glucose sensor based on platinum-iridium nanomaterials, *Electrochem. Commun.* 10 (2008) 1438 – 1441.
 50. L. Burke, P. Nugent, The electrochemistry of gold: The electrocatalytic behaviour of the metal in aqueous media, *Gold Bull* 31 (1998) 39 – 50.
 51. A. Luna, M. Mele, A. Arvia, The electrooxidation of glucose on microcolumnar gold electrodes in different neutral solutions. *J. Electroanal. Chem.* 323 (1992) 149 – 162.
 52. M. Pasta, F. Mantia, Y. Cui, Mechanism of glucose electrochemical oxidation on gold surface, *Electrochim. Acta* 55 (2010) 5561 – 5568.
 53. K. Toghill, L. Xiao, M. Phillips, R. Compton, The non-enzymatic determination of glucose using an electrolytically fabricated nickel microparticle modified boron-doped diamond electrode or nickel foil electrode, *Sens. Actuators B* 147 (2010) 642 – 652.
 54. Ch. Zhao, Ch. Shao, M. Li, K. Jiao, Flow-injection analysis of glucose without enzyme based on electrocatalytic oxidation of glucose at a nickel electrode, *Talanta* 71 (2007) 1769 – 1773.
 55. M. Luo, R. Baldwin, Characterization of carbohydrate oxidation at copper electrodes, *J. Electroanal. Chem.* 387 (1995) 87 – 94.
 56. K. Kano, K. Takagi, K. Inoue, T. Ikeda, T. Ueda, Copper electrodes for stable subpicomole detection of carbohydrates in high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 721 (1996) 53 – 57.
 57. J. Lee, S. Park, Direct electrochemical assay of glucose using boron-doped diamond electrodes, *Anal. Chim. Acta* 545 (2005) 27 – 32.
 58. J. Wang, D. Thomas, A. Chen, Nonenzymatic electrochemical glucose sensor based on nanoporous PtPb networks, *Anal. Chem.* 80 (2008) 997 – 1004.

59. S. Cherevko, Ch. Chung, Gold nanowire array electrode for non-enzymatic voltammetric and amperometric glucose detection, *Sens. Actuators B* 142 (2009) 216 – 223.
60. S. Buratti, B. Brunetti, S. Mannino, Amperometric detection of carbohydrates and thiols by using a glassy carbon electrode coated with Co oxide/multi-wall carbon nanotubes catalytic system, *Talanta* 76 (2008) 454 - 457.
61. D. Rathod, C. Dickinson, D. Egan, E. Dempsey, Platinum nanoparticle decoration of carbon materials with applications in non-enzymatic glucose sensing, *Sens. Actuators B* 143 (2010) 547 - 554.
62. J. Chen, W. Zhang, J. Ye, Nonenzymatic electrochemical glucose sensor based on MnO₂/MWNTs nanocomposite, *Electrochem. Commun.* 10 (2008) 1268 - 1271.
63. L. Zhang, H. Li, Y. Ni, J. Li, K. Liao, G. Zhao, Porous cuprous oxide microcubes for non-enzymatic amperometric hydrogen peroxide and glucose sensing, *Electrochem. Commun.* 11 (2009) 812 – 815.
64. L. Zhang, Y. Ni, H. Li, Addition of porous cuprous oxide to a Nafion film strongly improves the performance of a nonenzymatic glucose sensor, *Microchim. Acta* 171 (2010) 103 – 108.
65. C. Li, Y. Su, S. Zhang, Y. Lv, H. Xia, Y. Wang, An improved sensitivity nonenzymatic glucose biosensor based on a Cu_xO modified electrode, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2010) 903 - 907.
66. T. Huang, K. Lin, S. Tung, T. Cheng, I. Chang, Y. Hsieh, Ch. Lee, H. Chiu, Glucose sensing by electrochemically grown copper nanobelt electrode, *J. Electroanal. Chem.* 636 (2009) 123 – 127.
67. Y. Myung, D. Jang, Y. Cho, H. Kim, J. Park, Nonenzymatic amperometric glucose sensing of platinum, copper sulfide and tin oxide nanoparticle-carbon nanotube hybrid nanostructures, *J. Phys. Chem. C* 113 (2009) 1251 – 1259.
68. J. Šťáviková: Stabilita nanočástic mědi; Olomouc, 2009; Bakalářská práce; UP Olomouc.
69. D. Chen, S. Ni, J. Fang, T. Xiao, Preparation of Cu₂O nanoparticles in cupric chloride solutions with a simple mechanochemical approach, *J. Alloy. Compd.* 504S (2010) S345 – S348.
70. S. Evans, J. Elliott, L. Andrews, P. Bartlett, P. Doyle, G. Denuault, Detection of hydrogen peroxide at mesoporous platinum microelectrodes, *Anal. Chem.*

74 (2002) 1322 – 1326.

71. V. Halouzka, P. Jakubec, C. Gregor, D. Jancik, K. Papadopoulos, T. Triantis, J. Hrbac, Silver-Nafion coated cylindrical carbon fiber microelectrode for amperometric monitoring of hydrogen peroxide heterogeneous catalytic decomposition, Chem. Eng. J. 165 (2010) 813 – 818.