

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI



Přírodovědecká
fakulta

Katedra fyzikální chemie

**Využití derivátů grafenu pro elektrochemickou detekci
antibiotik**

Bakalářská práce

Autor: Martin-Alex Nalepa
Studijní program: B1407 Chemie
Studijní obor: Nanomateriálová chemie
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: Mgr. David Panáček

Olomouc 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením Mgr. Davida Panáčka. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne

.....

Martin-Alex Nalepa

Poděkování

Rád bych tímto poděkoval svému vedoucímu práce Mgr. Davidu Panáčkovi za vstřícnost, ochotu a pomoc při sepisování této práce. Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Petru Jakubcovi, Ph.D. za četné rady a za pomoc při zpracovávání a interpretaci naměřených dat. Mé poděkování patří také Mgr. Janu Pauswangovi, Mgr. Veronice Šedajové a všem ostatním pracovníkům Regionálního centra pokročilých technologií a materiálů za pomoc a rady při práci v laboratoři.

V neposlední řadě děkuji také Katedře fyzikální chemie a Přírodovědecké fakultě Univerzity Palackého v Olomouci za vytvoření příjemného prostředí pro studium.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Martin-Alex Nalepa
Název práce:	Využití derivátů grafenu pro elektrochemickou detekci antibiotik
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra fyzikální chemie
Vedoucí práce:	Mgr. David Panáček
Rok obhajoby práce:	2022
Abstrakt:	<p>V rámci této bakalářské práce byly studovány možnosti elektrochemické detekce antibiotika ampicilinu. Za tímto účelem byly testovány dva různé elektrodové systémy: konvenční třielektrodový systém s pracovní elektrodou ze skelného uhlíku (GCE) a tištěné uhlíkové elektrody (SPCE). V obou případech byly pracovní elektrody modifikovány deriváty grafenu. Dále byl prozkoumán vliv těchto 2D materiálů na odezvu elektrod a optimalizováno jejich nanášení na povrch elektrod. Získané výsledky indikují potenciál k návrhu elektrochemického senzoru vhodného jak pro detekci antibiotik, tak rezistentních bakterií, které antibiotika rozkládají.</p>
Klíčová slova:	ampicilin, grafenové deriváty, elektrochemická detekce, tištěné elektrody
Počet stran:	55
Počet příloh:	0
Jazyk:	Čeština

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Martin-Alex Nalepa

Title: Use of graphene derivatives for electrochemical detection of antibiotics

Type of thesis: Bachelor

Department: Department of Physical Chemistry

Supervisor: Mgr. David Panáček

Defence year: 2022

Abstract: The aim of this bachelor thesis was the electrochemical determination of antibiotic ampicillin. For this purpose, two different electrochemical setups were employed: a standard three-electrode system based on glassy carbon working electrode (GCE) and screen-printed carbon electrodes (SPCE). Graphene derivatives were used as modifiers in both setups. Furthermore, the effect of these 2D materials on the electrode response was investigated and their deposition on the electrode surface was optimized. Obtained results of this work indicate the great potential for the development of an electrochemical sensor suitable for the detection of antibiotics or resistant bacteria that degrade antibiotics.

Keywords: ampicillin, graphene derivatives, electrochemical detection, screen-printed electrodes

Number of pages: 55

Number of appendices: 0

Language: Czech

OBSAH

1	ÚVOD.....	8
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1	Grafen.....	9
2.1.1	Příprava grafenu.....	10
2.1.2	Vlastnosti grafenu	12
2.1.3	Aplikace grafenu.....	14
2.2	Funkcionalizace grafenu	15
2.2.1	Deriváty grafenu	17
2.2.2	Dusíkem dopovaný grafen.....	18
2.2.3	Grafen funkcionalizovaný nitrilovými skupinami.....	18
2.2.4	Grafenová kyselina	19
2.2.5	Grafen funkcionalizovaný thiolovými skupinami	20
2.3	Elektrochemické metody.....	20
2.3.1	Cyklická voltametrie.....	22
2.3.2	Square-wave voltametrie	24
2.4	Elektrochemická detekce	25
2.4.1	Modifikace elektrod.....	26
2.5	Ampicilin.....	27
2.5.1	Detekce elektrochemickými metodami	28
2.5.2	Detekce ostatními metodami	29
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	30
3.1	Chemikálie	30
3.2	Deriváty grafenu.....	30
3.2.1	Charakterizace NG.....	30
3.2.2	Charakterizace GA.....	31
3.2.3	Charakterizace GCN	32
3.2.4	Charakterizace GSH	33
3.3	Elektrochemický experiment	35
3.3.1	Měření pomocí tříelektrodeového zapojení.....	35
3.3.2	Měření pomocí tištěných elektrod	36
3.4	Nanesení materiálů na elektrody	37
3.5	Příprava měřených roztoků	38

3.6	Elektrochemické metody	38
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	39
4.1	Elektrochemická charakterizace metodou CV	39
4.2	Testování pulzních metod vhodných pro detekci ampicilinu	40
4.3	Testování materiálů vhodných pro zlepšení odezvy elektrod	42
4.4	Testování vlivu koncentrace NG na odezvu elektrod	45
4.5	Testování odezvy SPCE elektrod pokrytých vrstvou NG	46
5	ZÁVĚR	49
6	SUMMARY	50
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	51

1 ÚVOD

Antibiotika jsou látky, které svým působením inhibují růst mikroorganismů. V průběhu 20. století se velmi rychle etablovala jako léčiva používaná při léčbě bakteriálních onemocnění a výrazně přispěla k rozvoji moderní medicíny. Jedny z nejčastěji používaných antibiotik jsou tzv. beta-laktamová antibiotika, která obsahují ve svých molekulách beta-laktamový kruh.¹ Do této kategorie patří také ampicilin², jehož detekce je dílčím cílem této práce.

V současnosti je možné detekovat antibiotika mnoha různými způsoby, např. pomocí kapalinové a plynové chromatografie, kolorimetrie, s využitím fluorescence nebo imunochemickými metodami (např. ELISA). Tyto metody jsou ovšem časově náročné a vyžadují složitou přípravu vzorků a vyškolený personál.³ Z těchto důvodů je kladen důraz na rozvoj elektrochemických analytických metod, jež představují rychlý, snadný a flexibilní způsob detekce nejrůznějších analytů.⁴ Efektivní způsoby detekce antibiotik jsou nutné pro jejich odstraňování ze životního prostředí a pro detekci rezistentních bakterií, jejichž obranným mechanismem je mimo jiné produkce enzymů, které antibiotika rozkládají.^{3,5}

Jedna ze sledovaných vlastností při konstrukci elektrochemických senzorů je výše odezvy použitých elektrod, která úzce souvisí s výslednou citlivostí detekce. Odezvu elektrod lze modifikovat nanášením vrstvy materiálu na jejich povrch.⁶ V této souvislosti je v posledních letech intenzivně zkoumáno využití uhlíkových nanomateriálů, jako např. uhlíkových nanotrubic nebo grafenu a jeho derivátů. Tyto materiály jsou díky biokompatibilitě a rychlému přenosu elektronů ideální pro výrobu modifikovaných elektrod.⁷

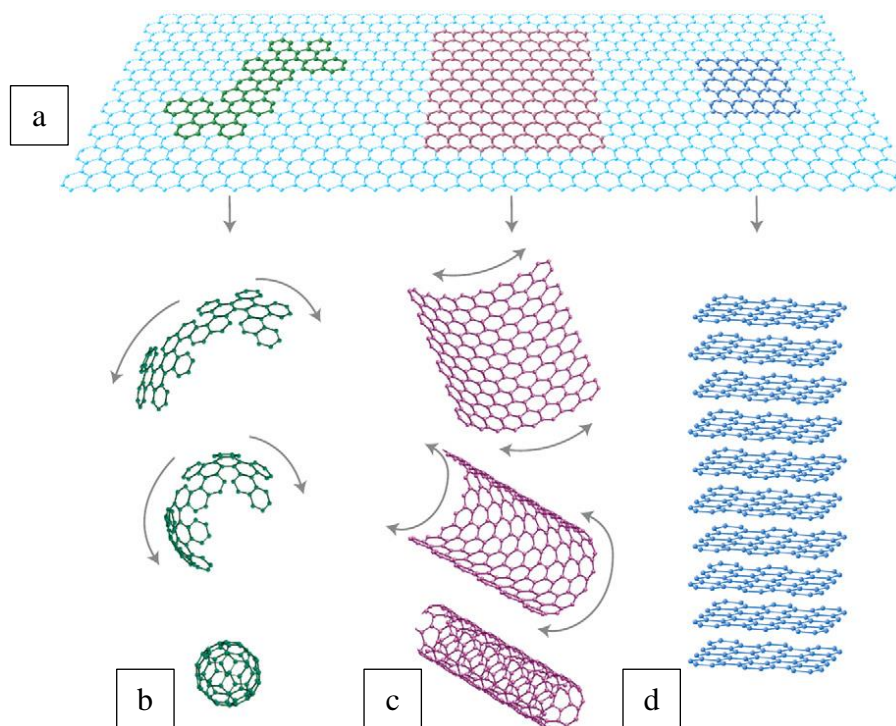
Cílem této práce bylo studium možností elektrochemické detekce antibiotika ampicilinu a využití grafenových derivátů jako materiálů pro modifikaci elektrod. Za tímto účelem byly testovány různé elektrochemické metody a dva systémy uhlíkových elektrod – tříelektrodový systém s pracovní elektrodou ze skelného uhlíku (GCE) a tištěné uhlíkové elektrody (SPCE). Elektrody byly modifikovány metodou tzv. drop-coating, kdy je na povrch elektrody napipetován určitý objem vodné suspenze daného materiálu a po následném vypaření rozpouštědla vznikne film. Dále byl porovnáván vliv jednotlivých materiálů na odezvu elektrod a po výběru vhodného derivátu grafenu také vliv jeho koncentrace.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Grafen

Grafen je dvoudimenzionální materiál skládající se z jedné vrstvy atomů uhlíku, které jsou uspořádány do pravidelné hexagonální struktury. Jedná se o jednu z četných alotropických modifikací uhlíku a ve své podstatě představuje základní stavební kámen uhlíkových alotropů o jiné dimenzionalitě, jak je patrné z Obrázku 1.⁸ Nuladimenzionální fulleren představuje „sbalení“ jednoho listu grafenu do uzavřené kulovité struktury tvořené pěti- a šestiúhelníky, jednodimenzionální uhlíkové nanotrubic jsou vytvořeny „sroláním“ grafenového listu.^{9,10} Grafít, trojdimenzionální v přírodě se vyskytující modifikace uhlíku, vznikne skládáním jednotlivých grafenových vrstev na sebe. Jednotlivé vrstvy jsou od sebe vzdáleny zhruba 335 pm.⁹

Uhlíkové atomy v hexagonální mřížce grafenu se nacházejí v sp^2 hybridizaci. Každý atom uhlíku je vázán se třemi sousedícími atomy kovalentními σ vazbami o délce 142 pm.^{11,12} Nehybridizované p_z orbitály jsou orientovány kolmo k rovinné struktuře grafenu a jsou obsazeny jedním elektronem. Prostřednictvím jejich vzájemných interakcí vzniká π -systém delokalizovaných elektronů, který je základem aromatického charakteru grafenu.^{11,13}



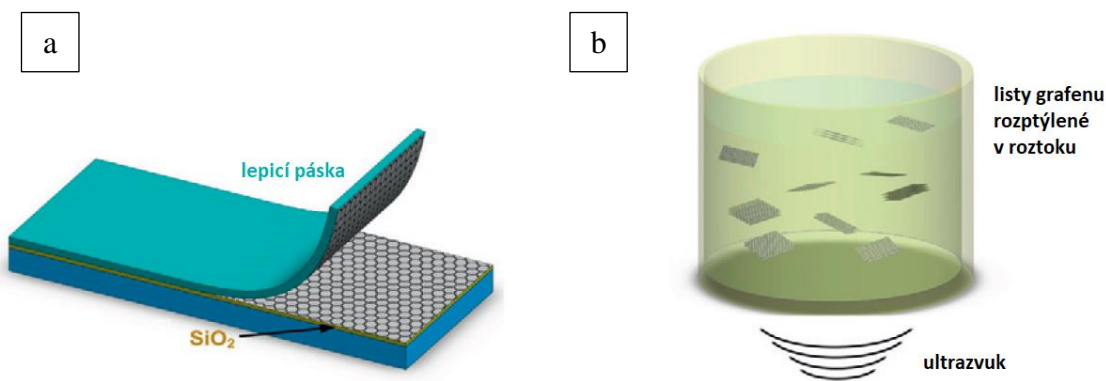
Obrázek 1: Grafen (a) jako základní stavební jednotka uhlíkových alotropů – 0D fullerenu (b), 1D uhlíkových nanotubic (c) a 3D grafítu (d). Převzato z Progress in Materials Science¹⁴.

Ačkoliv byl grafen jakožto základní stavební jednotka grafitu znám již od 2. poloviny 20. století, kdy byly zkoumány vodivostní vlastnosti tenkých grafitových vrstev, úspěšně byl izolován až roku 2004 výzkumnou skupinou A. Geima a K. Novoselova. Po dlouhou dobu totiž panoval názor, že 2D krystaly jsou termodynamicky nestabilní a nemohou existovat volně bez 3D základny.^{10,12} Až na počátku 21. století byla výše zmíněnou dvojicí publikována práce popisující izolaci grafenu metodou mechanické exfoliace z grafitu pomocí lepicí pásky společně s některými elektrickými vlastnostmi tohoto materiálu.¹⁵ Tento objev odstartoval intenzivní výzkum 2D materiálů v nadcházejících letech a svým autorům vynesl Nobelovu cenu za fyziku v roce 2010.

2.1.1 Příprava grafenu

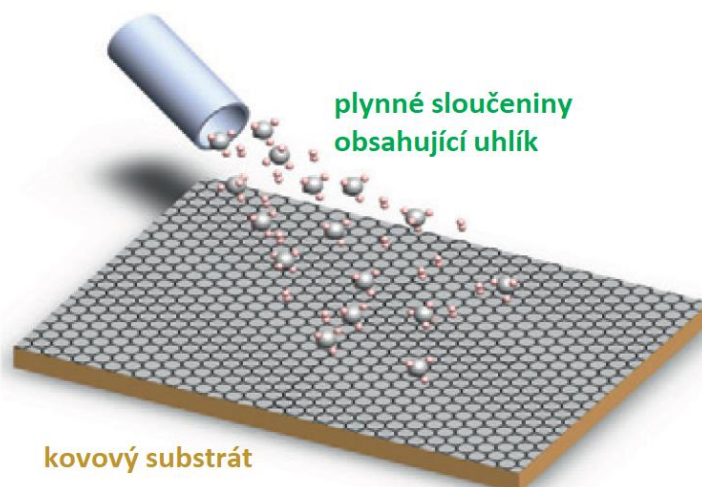
Grafen může být připraven mnoha různými metodami, z nichž nejvýznamnější jsou kromě již zmíněné exfoliace také chemická depozice z plynné fáze (CVD z anglického *chemical vapor deposition*) a redukce grafenových derivátů (nejčastěji grafen oxidu).⁹ Z méně častých metod bylo v literatuře zmíněno také tzv. „rozbalování“ uhlíkových nanotrubic¹⁶, epitaxe z molekulárních svazků (MBE z anglického *molecular beam epitaxy*)¹⁷ a epitaxní růst na karbidu křemíku¹⁸.

Mechanická exfoliace je proces, při kterém jsou dodáním mechanické nebo chemické energie narušovány slabé van der Waalsovy síly mezi jednotlivými listy grafenu, které jsou poté separovány. Tato metoda může být rozdělena na exfoliaci mechanickou (viz Obrázek 2a) a chemickou (viz Obrázek 2b).¹⁶ Mechanická exfoliace je prováděna suchou cestou aplikací mechanické, elektrostatické nebo elektromagnetické síly. Výhodou je v tomto případě nízkonákladový zisk individuálních listů grafenu, nevýhodami naopak nízká reprodukovatelnost a obtížnost produkce většího objemu materiálu. Z těchto důvodů byla tato metoda používána hlavně v prvotním výzkumu.^{9,17} Chemická exfoliace je prováděna mokrou cestou z roztoků grafitu v nevodných organických rozpouštědlech za pomoci ultrazvuku. Proces většinou zahrnuje dispergaci v rozpouštědle (např. N-methylpyrrolidon, pyridin, dimethylformamid), exfoliaci za pomoci ultrazvuku a následnou separaci reziduí grafitu a vícevrstvého grafenu ultracentrifugací.^{11,16,17} Výhodou této metody je možnost produkce většího objemu materiálu za nižších nákladů bez nutnosti významných úprav základního procesu, pokud je vhodně zvoleno složení rozpouštědla a parametry sonikace. Nevýhodou je horší kvalita výsledných listů grafenu, které mohou ve své struktuře obsahovat zvýšené množství defektů.^{9,16}



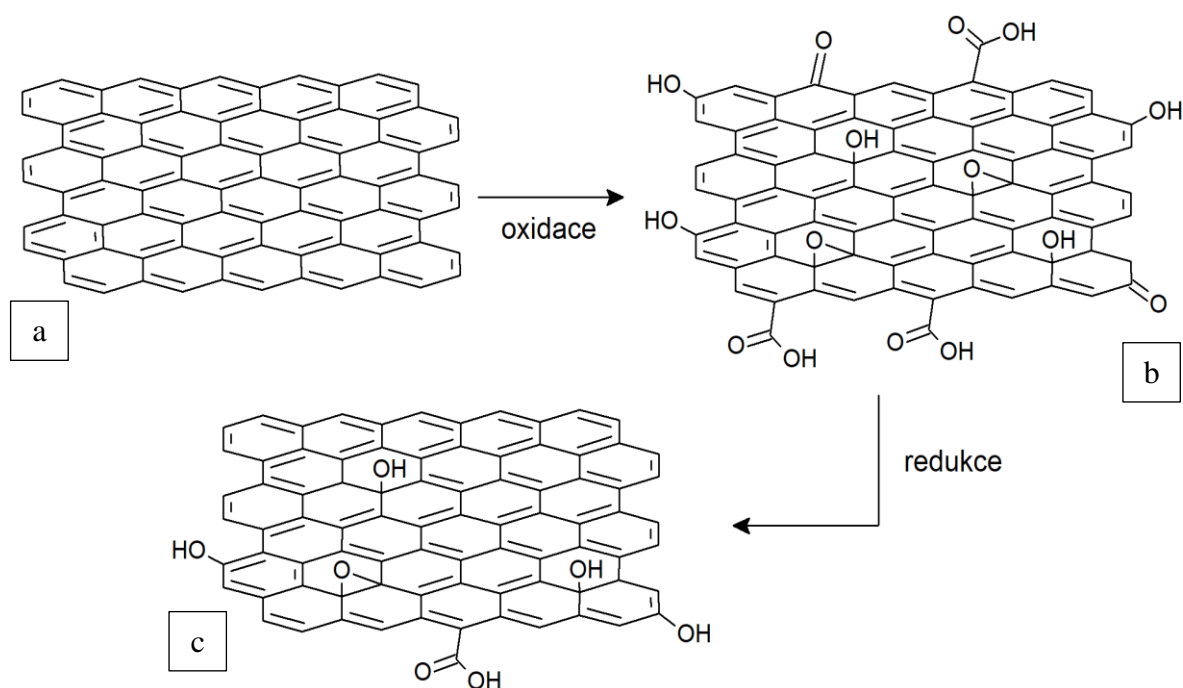
Obrázek 2: Příprava grafenu mechanickou (a) a chemickou (b) exfoliací. Převzato a upraveno z Nanoscale¹⁷.

Metoda chemické depozice z plynné fáze (CVD) spočívá v tepelném rozkladu plynné sloučeniny obsahující uhlík na povrchu kovového katalyzátoru (ilustrováno na Obrázku 3). Jako zdroj uhlíku je nejčastěji používán methan v atmosféře H₂ nebo Ar. Výsledná vrstva grafenu může být poté transportována na jiný substrát, jako například křemík, sklo nebo polydimethylsiloxan.^{9,12,16} Jako katalyzátor se nejčastěji používá měď, případně nikl. Podstatou procesu je použití nejčastěji přechodných kovů, které mají nízkou afinitu k uhlíku, ale zároveň jsou schopny stabilizovat na svém povrchu uhlíkové atomy tvořením slabých vazeb. Tyto vazby jsou důsledkem specifické elektronové konfigurace – v případě mědi, která má zcela zaplněný 3d orbital, mohou být vazby vytvořeny pouze interakcemi mezi π elektrony sp^2 hybridizovaných atomů uhlíku a prázdnými 4s orbitaly mědi.⁹ Výhodami CVD metody jsou možnost kontroly ukládání uhlíkových atomů na konkrétní místa substrátu a produkce většího objemu materiálu. Mezi hlavní překážky patří cena zařízení používaných při výrobě a nelehké oddělení vzniklé vrstvy grafenu od kovu, na kterém vzniká.¹⁸



Obrázek 3: Příprava grafenu metodou CVD. Převzato a upraveno z Nanoscale¹⁷.

Další z metod je redukce grafen oxidu (GO) způsobem, jaký popisuje Obrázek 4. Tento grafenový derivát, obsahující oproti čistému grafenu karboxylové, hydroxylové a epoxidové skupiny, vzniká oxidací grafitu silnými oxidačními činidly, jako jsou KMnO_4 nebo H_2SO_4 . Jednotlivé vrstvy takto připraveného GO jsou následně exfoliovány a redukovány redukčními činidly (např. hydraziny, hydridy nebo hydrochinony), tepelně nebo elektrochemicky. Takto vzniklý produkt je však redukován pouze částečně a jedná se tak o redukovaný grafen oxid (rGO) s méně kvalitní strukturou než má čistý grafen.¹⁰⁻¹² Nejčastěji používaným postupem pro výrobu rGO je Hummersova metoda, která zahrnuje oxidaci směsí KMnO_4 , H_2SO_4 a NaNO_3 , následnou sonikaci a redukci.⁹ Největšími výhodami tohoto způsobu produkce jsou vysoký podíl monovrstev ve finálním produktu, značné výtěžky reakcí a možnost produkce většího množství materiálu. Nevýhodou je na druhou stranu pouze částečná obnova kvality původních grafenových vrstev. Vzniklý rGO obsahuje větší množství strukturních defektů a zbytkových funkčních skupin obsahujících kyslík, které jsou následky redukčních a oxidačních pochodů během procesu výroby.^{9,11}



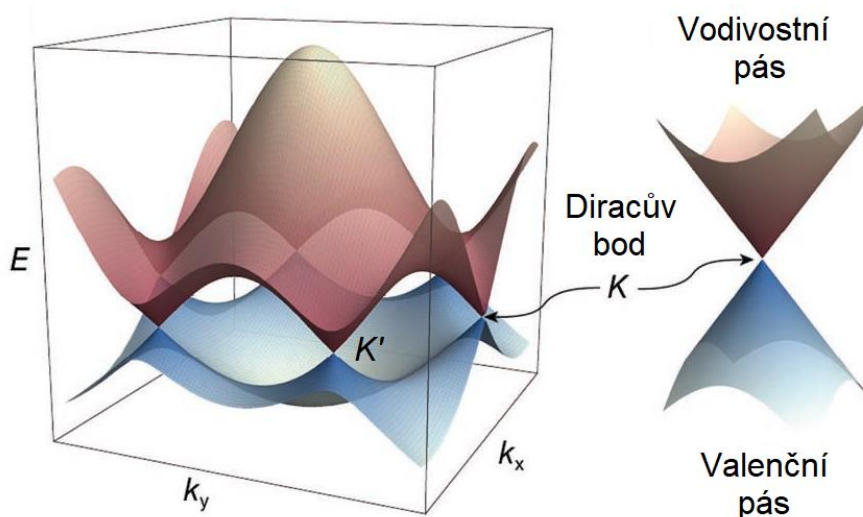
Obrázek 4: Příprava grafenu metodou redukce grafen oxidu. Grafen (a) je oxidován na grafen oxid (b), který je poté redukován na redukovaný grafen oxid (c). Překresleno a upraveno z Progress in Materials Science¹².

2.1.2 Vlastnosti grafenu

Grafen oproti jiným materiálům vyniká svými mechanickými, elektrickými, tepelnými a optickými vlastnostmi. Ty se odvíjí především od způsobu přípravy a kvality vrstvy grafenu.

V důsledku existence vysoce stabilních C=C vazeb mezi sousedními sp^2 hybridizovanými atomy uhlíku je grafen jeden z nejpevnějších materiálů na světě. Nejlepších hodnot je dosaženo v případě izolovaného listu bez strukturních defektů.^{11,19} Za takových podmínek je hodnota Youngova modulu pružnosti 1 TPa, což je nejvyšší naměřená hodnota vůbec. Pevnost v tahu je 130 GPa, což je asi 300krát více než u oceli (0,4 GPa). I přes pevnost vazeb mezi atomy uhlíku se však jedná o velmi pružný a lehký materiál.^{11,19,20} Jednou z klíčových vlastností je také velká specifická plocha povrchu, která může teoreticky dosahovat až hodnoty $2630 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$.²⁰

Z pohledu elektrických vlastností je grafen polovodičem s nulovou velikostí zakázaného pásu vykazující vlastnosti polokovu. Tyto vlastnosti vyplývají z sp^2 hybridizace a delokalizace elektronů. Uhlík obsahuje 4 valenční elektrony, z nichž 3 se účastní kovalentních vazeb s okolními atomy a čtvrtý obsazuje p_z orbital, který se neúčastní hybridizace.^{8,11,21} Tyto elektrony vytváří nad a pod rovinou mřížky valenční a vodivostní pás. Tyto dva pásy se dotýkají v nerovnocenných bodech K a K' (Diracovy body, viz Obrázek 5) v první Brillouinově zóně. Hustota stavů v bodě dotyku je nulová a energie v tomto bodě odpovídá v ideálním případě Fermiho hladině.^{11,21,22} Elektrony se zde chovají jako nehmotné relativistické částice a jsou proto popisovány Diracovými relativistickými rovnicemi. Díky vysoce uspořádané krystalové mřížce se mohou elektrony pohybovat materiálem snadno a velmi rychle, kdy dosahují pohyblivosti až $200\,000 \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.^{11,12}



Obrázek 5: Schéma pásové struktury grafenu v první Brillouinově zóně. Valenční a vodivostní pás se dotýkají v Diracových bodech K a K', v jejichž okolí má disperzní relace tvar dvou dotýkajících se kuželů. Převzato a upraveno z Advanced Materials²¹.

Grafen je rovněž velmi dobrý tepelný vodič díky pevným vazbám a vysoké rychlosti akustických fononů v jeho těsné a lehké krystalové mřížce.^{12,17} Tento materiál dosahuje za pokojové teploty tepelné vodivosti až $5000 \text{ W}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$, což je hodnota zhruba 2,5krát větší než pro diamant, který dosahuje nejvyšší tepelné vodivosti z tradičních materiálů.^{21,22} Co se týče optických vlastností, grafen vykazuje optickou absorpci 2,3 % v případě jednoho listu, což jej činí vysoce transparentním. S přibývajícimi listy se poté absorpce zvyšuje.^{12,22}

2.1.3 Aplikace grafenu

Výše zmíněné vlastnosti předurčují grafen, popřípadě jeho deriváty, k řadě potenciálních aplikací v mnoha oblastech. Díky vynikajícím elektrickým vlastnostem jsou grafenové materiály intenzivně zkoumány v souvislosti s aplikacemi na poli elektroniky, ať už se jedná o senzory²³, uchovávání energie²⁴, roztažnou elektroniku¹⁸ nebo tranzistory¹⁶. Elektrody modifikované materiály na bázi grafenu mohou poskytovat vyšší odezvu, což vede u elektrochemických senzorů k efektivnější detekci. Velká specifická plocha povrchu a biokompatibilita mohou být využity pro navázání dalších součástí senzoru, jako např. specifických protilátek nebo jiných látek se zvýšenou afinitou k detekovanému analytu. Sensory sestavené z derivátů grafenu byly využity pro detekci např. glukózy, iontů těžkých kovů či bakterií.^{23,25} Velká plocha povrchu v kombinaci s vysokou výkonovou hustotou, schopností udržování kapacity a stabilitou při cyklování stojí v posledních letech za intenzivním výzkumem grafenu a jeho derivátů na poli uchovávání energie. Pro tyto účely může být funkcionalizovaný grafen využit jako součást anod v lithium iontových bateriích nebo jako součást superkondenzátorů s elektrickou dvojrstvou.^{24,26} Pružnosti a elektrických vlastností grafenu může být také využito při konstrukci tzv. roztažné elektroniky. Jako příklad lze uvést ohebné nebo průhledné displeje.^{17,18,27} Využití grafenu jako nástupce křemíku pro konstrukci tranzistorů je omezeno nulovou velikostí zakázaného pásu. Ta může být ovšem upravena následnou funkcionalizací.^{16,17}

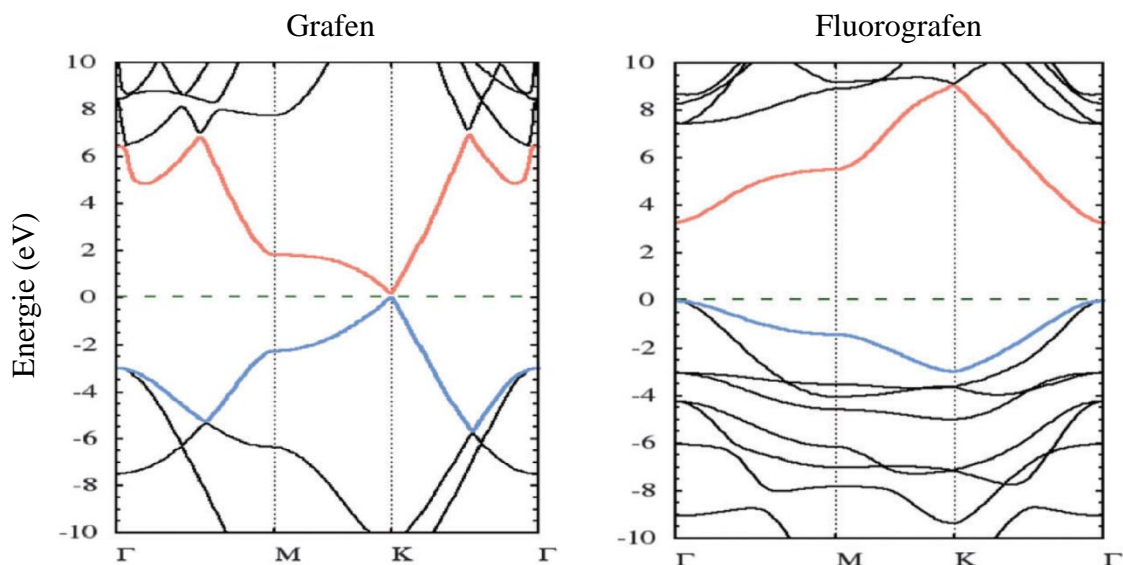
Optické vlastnosti grafenu mohou být využity ve fotodetektorech, tj. zařízeních převádějících energii dopadajících fotonů na elektrický proud. Výhodou grafenových materiálů oproti klasickým polovodičovým materiálům je rychlejší přenos nositelů náboje a možnost detekovat záření v širším rozmezí.^{17,18,21} Díky svým mechanickým a tepelným vlastnostem nachází grafen uplatnění také jako součást nanokompozitních materiálů, kde slouží jako výplň polymerní nebo anorganické matrice. Kompozitní materiály o tomto složení našly potenciální uplatnění v letectví, kosmonautice nebo vojenské výzbroji.^{17,18,27}

Podobně jako jiné materiály, i grafen a jeho deriváty jsou zvažovány pro biomedicínské aplikace. V dostupné literatuře již byly publikovány výzkumy v oblasti nosičů léčiv, antibakteriálních aplikací, tkáňového inženýrství, hypertermie, biosenzorů nebo zobrazování s využitím fluorescence.^{17,18,27} V posledních letech také probíhá výzkum environmentálních aplikací. Jmenovitě se jedná o adsorpci polutantů (kovové ionty, organické sloučeniny, plyny) ve vodném prostředí, fotokatalýzu vedoucí k degradaci těchto polutantů, nepropustné nanoporézní membrány nebo nanokompozity s antibakteriálními vlastnostmi.^{20,27}

2.2 Funkcionalizace grafenu

Přestože vlastnosti nemodifikovaného grafenu lze využít v řadě výše zmíněných aplikací, jiné atributy jsou naopak pro další rozšiřující aplikace překážkou. Nulová šířka zakázaného pásu limituje aplikace především na poli elektroniky. V určitých případech jsou nevýhodami také nízká reaktivita grafenu v důsledku velmi pevných vazeb mezi sp^2 hybridizovanými uhlíky nebo hydrofobní charakter, který omezuje jeho aplikaci v oblasti senzorů či biomedicíny.^{28,29} Tyto skutečnosti lze překonat funkcionalizací, tedy navázáním funkčních skupin kovalentními nebo nekovalentními vazbami na povrch grafenu, případně dopací heteroatomy na pozice uhlíkových atomů v hexagonální struktuře.

Funkcionalizace představuje prostředek, jakým lze rozšířit či upravit základní vlastnosti grafenu. Navázání funkčních skupin nebo molekul kovalentními vazbami vede k narušení aromatického charakteru a možnosti upravovat šířku zakázaného pásu (viz Obrázek 6).³⁰ Funkční skupiny obsahující kyslík (hydroxylové, karbonylové, karboxylové) zvyšují hydrofilní charakter daného derivátu.²⁸ Různými způsoby funkcionalizované grafenové deriváty lze poté využít k dalším aplikacím nad rámec kapitoly 2.1.3. Elektrochemicky stabilnější deriváty grafenu lze využít jako součásti senzorů nebo jako elektrodový materiál superkondenzátorů.¹⁴ Funkcionalizace může také vést k již zmíněnému zvětšování velikosti zakázaného pásu, což vede k posunu charakteru těchto materiálů směrem k polovodičům a izolantům a k potenciálnímu užití v tranzistorech.^{14,28} Zvýšení hydrofilní povahy umožňuje nové aplikace v oblasti ekologie, jako například zachytávání polutantů pomocí ve vodě rozpustných grafenových materiálů prostřednictvím π - π a elektrostatických vazeb. Byl připraven například grafen s navázanými sulfonovými skupinami pro zachytávání naftalenu, grafen funkcionalizovaný polypyrrolem pro zachytávání Hg^{2+} iontů nebo grafen s navázanými magnetitovými nanočásticemi pro zachytávání As^{3+} a As^{5+} iontů.²⁸



Obrázek 6: Schéma pásové struktury grafenu a fluorografenu v první Brillouinově zóně. Je zde patrné vytvoření zakázaného pásu v důsledku funkcionalizace. Převzato a upraveno z Chemical Society Reviews³¹.

Způsoby funkcionalizace lze v zásadě rozdělit na kovalentní a nekovalentní přístup. V případě navázání funkčních skupin či molekul kovalentní vazbou dochází ke změně hybridizace jednoho a více uhlíkových atomů z sp^2 na sp^3 doprovázené současným porušením elektronové konjugace a ztrátou aromatického charakteru.³² Tento typ funkcionalizace může probíhat několika odlišnými mechanismy – substitucí nukleofilní (např. reakcí N-nukleofilů s epoxidovými skupinami grafenu oxidu), substitucí elektrofilní (substitucí atomu vodíku diazoniovou solí), kondenzací (např. mezi kyslík obsahujícími skupinami grafenu oxidu a isokyanáty nebo aminy za vzniku esterových a amidových vazeb) a adicí (Diels–Alderovy cykloadice). Problémem u většiny těchto přístupů je nízký stupeň funkcionalizace vlivem chemické inertnosti grafenu.^{14,30} V případě nekovalentní funkcionalizace je využíváno slabých interakcí jako elektrostatické síly, van der Waalsovy síly nebo π -interakce, které vznikají při adsorpci molekul na povrch grafenu. Výhodou tohoto způsobu modifikace může být zachování konjugovaného π -systému elektronů.^{14,28} V rámci tohoto přístupu lze grafen modifikovat například polymery, porfyriny nebo povrchově aktivními molekulami (cholát sodný, cetyltrimethylamoniumbromid, deriváty pyrenu a další).^{14,32}

Kromě molekul mohou být na povrch grafenu navázány také nanočástice. Grafen se jeví jako ideální substrát pro disperzi nanočástic z důvodu velké aktivní plochy povrchu. Byly připraveny vzorky grafenu modifikované nanočásticemi vzácných kovů (Au, Ag, Pt, Pd,

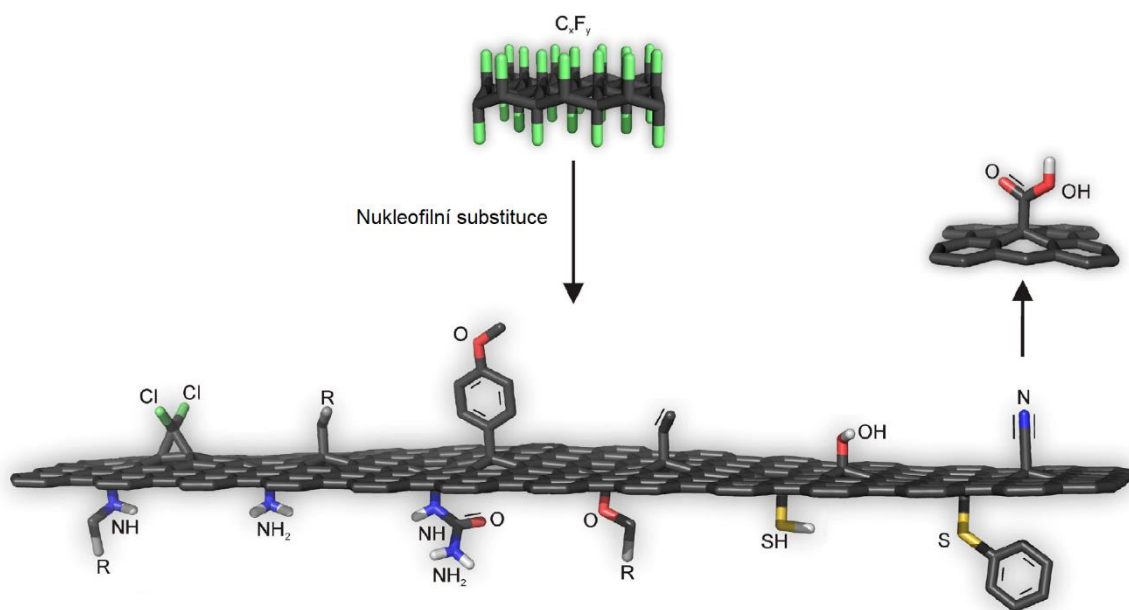
Rh), kterých lze využít v aplikacích jako katalytické systémy, senzory nebo superkondenzátory. Byly využity také nanočástice oxidů kovů (SnO_2 , TiO_2 , Co_3O_4) pro různé aplikace v elektronice, například jako materiály pro anody v lithium iontových bateriích.²⁸ Jiný přístup představuje substituce uhlíkových atomů v hexagonální mřížce heteroatomy. Cílem tohoto procesu je získat kontrolu nad typem a koncentrací nositelů náboje v daném materiálu. Takto dopované grafenové deriváty poté vykazují chování polovodičů typu P nebo N a dochází k vytvoření zakázaného pásu. Pro elektrochemické aplikace je atraktivní především dopace atomy dusíku. Volné páry dusíkových atomů jsou v těchto sloučeninách konjugovány s grafenovým systémem π -elektronů. Materiál poté disponuje chováním podobným polovodičům typu N a potenciálně vyšší vodivostí.^{28,33}

2.2.1 Deriváty grafenu

Jeden z nejlépe prozkoumaných derivátů grafenu je fluorografen. Tato stabilní sloučenina byla připravena fluorinací grafenu (pomocí fluorinačních činidel, např. XeF_2 nebo F_2) nebo exfoliací grafitfluoridu.²⁹ Strukturně se jedná o 2D monovrstvu sp^3 hybridizovaných atomů uhlíku, kdy každý z těchto atomů je kovalentně vázán s atomem fluoru. Tato funkcionalizace ústí ve výše zmíněnou změnu pásové struktury a vytvoření zakázaného pásu – fluorografen je se šířkou zakázaného pásu kolem 3 eV řazen na pomezí mezi polovodiče a izolanty.^{29,31}

Přestože se předpokládalo, že fluorografen bude nereaktivní a nevhodný pro další derivatizaci (jako další sloučeniny uhlíku a fluoru, např. teflon), později se ukázalo, že se může za vhodných podmínek chovat jako elektrofil. Fluorografen tudíž může podléhat nukleofilním substitucím iniciovaným N-, O-, S- a C-nukleofily (Obrázek 7). Jedná se tak o důležitý výchozí materiál pro syntézu kovalentně funkcionalizovaných grafenových derivátů.^{29,34}

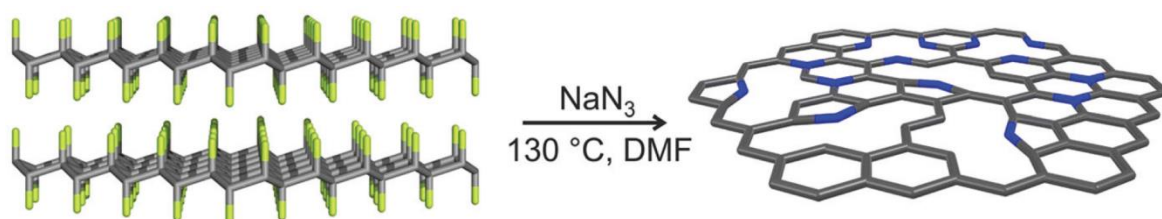
V rámci této práce byl v experimentální části zkoumán vliv čtyř derivátů grafenu na odezvu uhlíkových elektrod. Syntéza všech těchto materiálů – dusíkem dopovaného grafenu (dále v textu označován jako NG), grafenu funkcionalizovaného nitrilovými skupinami (dále v textu označován jako GCN), grafenové kyseliny (dále v textu označována jako GA) a grafenu funkcionalizovaného thiolovými skupinami (dále v textu označován jako GSH) – zahrnovala v některé fázi právě fluorografen.



Obrázek 7: Reaktivita fluorografenu – produkty nukleofilních substitucí. Převzato z Applied Materials Today²⁹.

2.2.2 Dusíkem dopovaný grafen

Tento dusíkem dopovaný grafen byl syntetizován Šedajovou a kol.³⁵ reakcí fluorografenu s azidem sodným v přítomnosti defluorinačního činidla (dimethylformamid). Touto reakcí, jež je znázorněna na Obrázku 8, byly do struktury grafenu zakomponovány dusíkové atomy v pyridinových, pyrrolových a grafitických konfiguracích. NG představuje díky vysoké hustotě materiálu a svým elektrochemickým vlastnostem jeden z derivátů vhodných pro aplikace v oblasti superkondenzátorů a uchovávání energie.³⁵



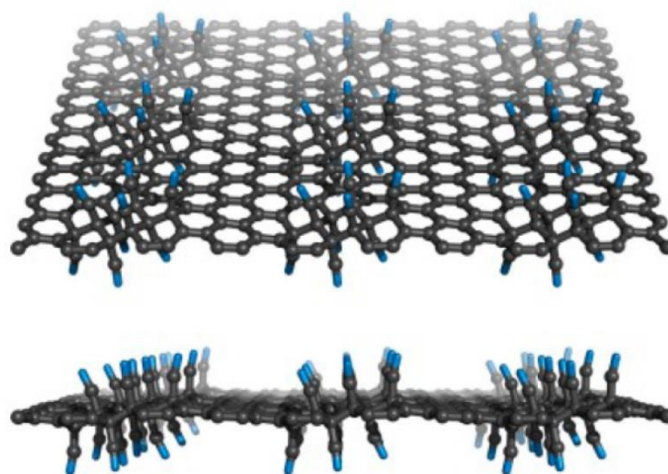
Obrázek 8: Syntéza NG z fluorografenu. Převzato z Energy & Environmental Science³⁵.

2.2.3 Grafen funkcionalizovaný nitrilovými skupinami

Grafen funkcionalizovaný nitrilovými skupinami byl syntetizován reakcí fluorografenu s kyanidem sodným v dimethylformamidu. Touto nukleofilní substitucí atomů fluoru za nitrilové skupiny $-C\equiv N$ byl připraven grafenový derivát o vysokém stupni funkcionalizace

(15 %), v jehož struktuře (viz Obrázek 9) byla obnovena síť sp^2 uhlíků, jelikož došlo k defluorinaci a obnovení vodivosti.³⁴

GCN představuje díky $-C\equiv N$ skupinám na svém povrchu výchozí materiál pro další funkcionalizaci. Jedna z možných aplikací tohoto materiálu leží v oblasti elektrochemické detekce nebo superkondenzátorů.^{34,36}

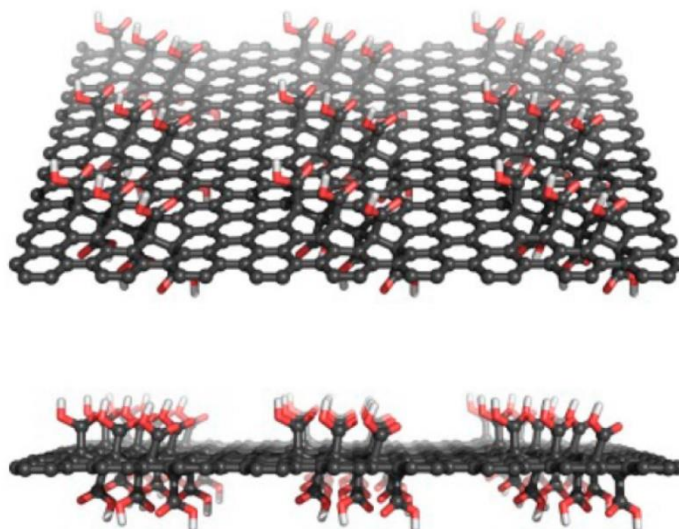


Obrázek 9: Struktura GCN. Převzato z ACS Nano³⁴.

2.2.4 Grafenová kyselina

Grafenová kyselina, jejíž struktura je znázorněna na Obrázku 10, byla syntetizována z GCN kyselou hydrolyzou pomocí 20% HNO_3 . Touto reakcí došlo k oxidaci nitrilových $-C\equiv N$ skupin na karboxylové $-COOH$ skupiny a vzniku derivátu o vysokém stupni funkcionalizace (13 %). Jedná se o dvoudimenzionální kyselinu s pK_a okolo 5,2.³⁴

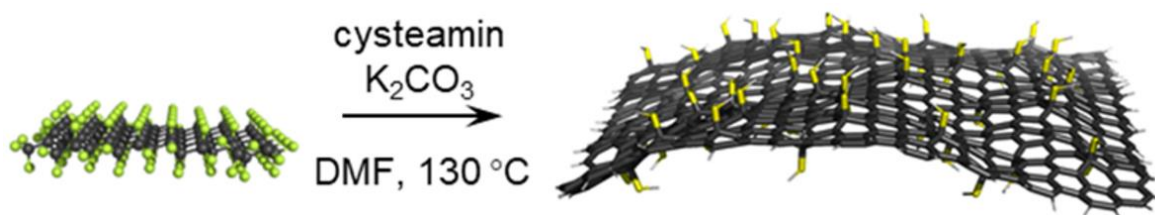
Oproti klasickým grafenovým derivátům se díky přítomnosti karboxylových skupin jedná o hydrofilní materiál. Pro potenciální aplikace je rovněž výhodou nízká toxicita a vysoká biokompatibilita. Kromě toho, že se může jednat o výchozí sloučeninu pro další chemickou úpravu skrze reaktivní karboxylové skupiny, může být využita také v oblastech elektrochemické detekce nebo ukládání energie.^{34,36}



Obrázek 10: Struktura GA. Převzato z ACS Nano³⁴.

2.2.5 Grafen funkcionalizovaný thiolovými skupinami

Grafen funkcionalizovaný thiolovými skupinami byl syntetizován reakcí fluorografenu s cysteaminem v dimethylformamidu. Aminová skupina tohoto biogenního aminu byla deprotonována v přítomnosti K_2CO_3 a následně působila jako N-nukleofil při nukleofilní substituci. Touto reakcí, jež je znázorněna na Obrázku 11, zároveň došlo k defluorinaci a obnovení sítě sp^2 uhlíků. Tento materiál byl navržen pro elektrochemickou detekci Cd^{2+} iontů na základě specifické afinity mezi těmito ionty a thiolovými skupinami.

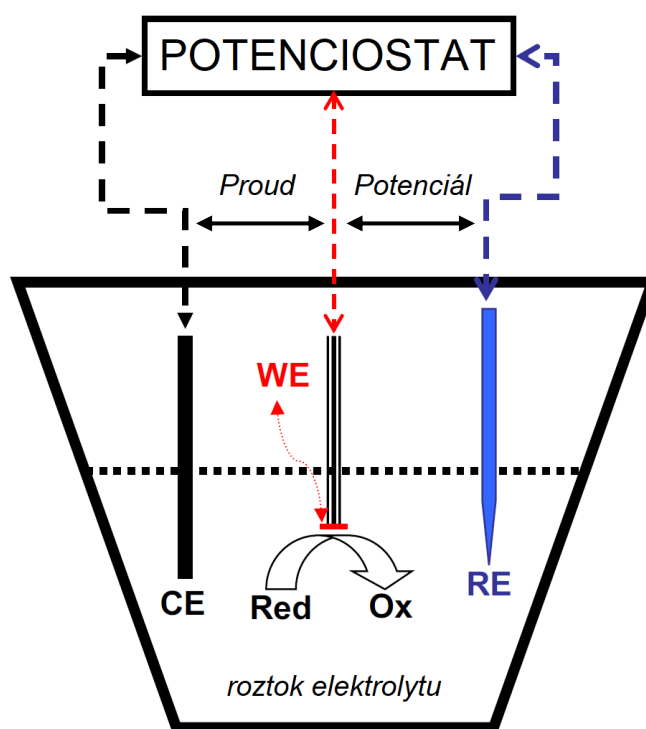


Obrázek 11: Syntéza GSH z fluorografenu

2.3 Elektrochemické metody

Mezi nejčastěji používané techniky v elektrochemii patří voltametrické metody, tj. metody, při kterých je měřen proud jako funkce měnícího se vloženého napětí na pracovní elektrodě. Grafickým výsledkem takového měření je voltamogram, který představuje závislost proudu I na potenciálu E pracovní elektrody, který je relativní vůči konstantnímu potenciálu referentní elektrody.^{37,38}

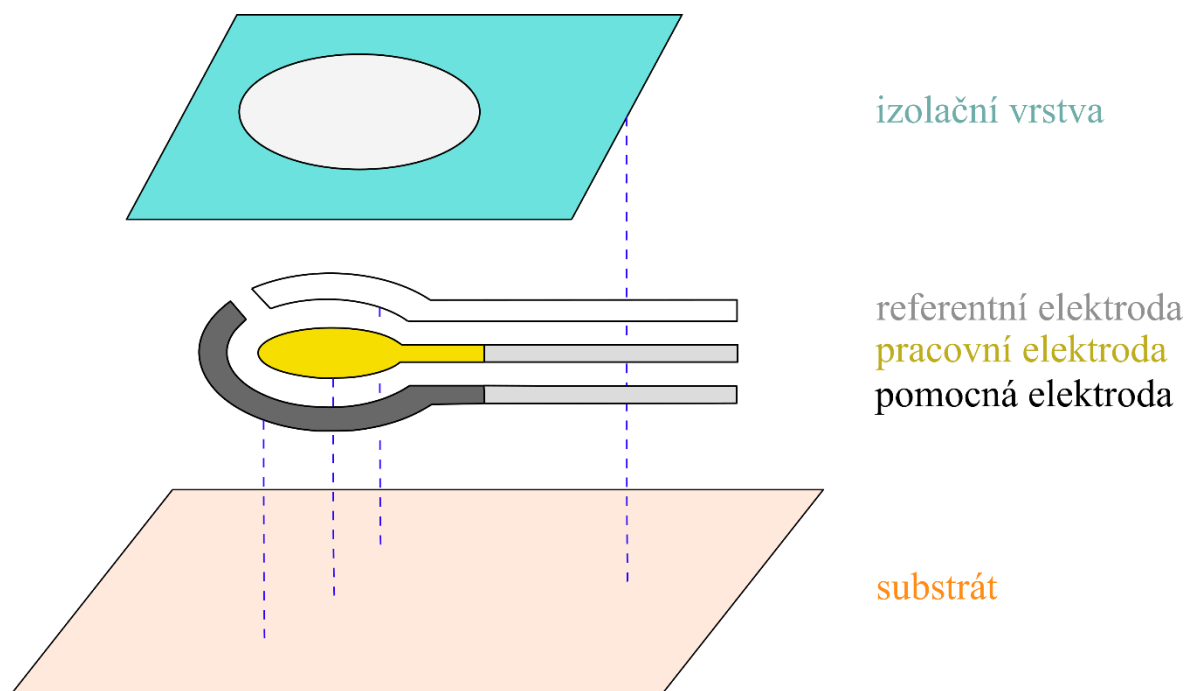
Nejčastěji používaná aparatura pro elektrochemické experimenty se skládá z elektrochemické cely, která je naplněna měřeným roztokem elektrolytu, tří elektrod (pracovní, referentní, pomocná) ponořených do roztoku a potenciostatu, což je zařízení schopné udržovat konstantní potenciál na pracovní elektrodě.³⁹ Schéma takového zapojení je ilustrováno na Obrázku 12. Pracovní elektrody jsou nejčastěji používány diskové o dobře definované ploše, např. grafitové, ze skelného uhlíku nebo zlaté. Na pracovní elektrodě probíhá sledovaná reakce a její potenciál vychází z porovnání s referentní elektrodou, což je elektroda o konstantním chemickém složení s konstantním potenciálem. Nejčastěji používanou je argentschloridová (Ag/AgCl), případně kalomelová (Hg/Hg₂Cl₂) elektroda. Proud neprochází referentní elektrodou, ale pouze mezi pracovní a pomocnou. Ta je tvořena inertním materiálem s velkou plochou povrchu, typicky platinou. Rozdíl potenciálu mezi pracovní elektrodou a roztokem je potom hnací silou výsledné elektrochemické reakce.^{39,40}



Obrázek 12: Schéma tříelektrodevého zapojení. Proud prochází mezi pomocnou (CE) a pracovní (WE) elektrodou. Napětí na pracovní elektrodě je kontrolováno potenciostatem na základě relativního srovnání s referentní (RE) elektrodou. Převzato a upraveno z ChemTexts⁴⁰.

Kromě tohoto tříelektrodevého zapojení existuje také varianta tištěných elektrod, kdy jsou všechny tři elektrody inkorporovány na substrátu (viz Obrázek 13). Tyto elektrody jsou vyráběny vytištěním inkoustu na plastový nebo keramický substrát. Vlastnosti samotného

inkoustu mohou být modifikovány různými aditivami, která zvyšují citlivost či afinitu k analytu výsledných elektrod. Kromě možnosti miniaturizace a připojení k přenosným přístrojům jsou výhodami tištěných elektrod hromadná produkce, nízké náklady a možnost snadné povrchové modifikace materiálu zvyšujícími odezvu nebo biorekogničními složkami (enzymy, protilátky, DNA, aptamery).^{41,42}



Obrázek 13: Schéma tištěné elektrody

V experimentální části této práce byly z elektrochemických metod použity hlavně metody cyklická voltametrie (CV) a square-wave voltametrie (SWV), jejichž teoretické základy a aplikace jsou popsány v následujících kapitolách.

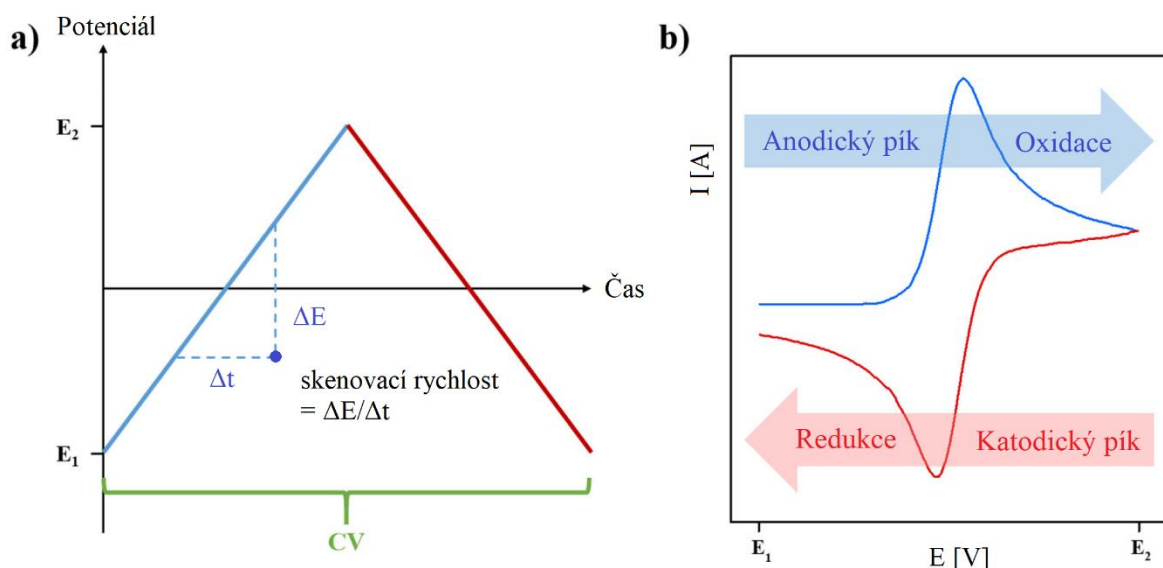
2.3.1 Cyklická voltametrie

Cyklická voltametrie (dále jen CV) je základní elektrochemickou metodou, která poskytuje základní informace o elektrochemické reakci a díky níž je možné rychle obdržet informace o reverzibilitě elektrodového děje, termodynamice redoxních procesů, kinetice přenosu elektronů nebo adsorpčních procesech. Pomocí této metody lze rovněž provést kvantitativní analýzu a určit koncentraci neznámé látky.⁴²⁻⁴⁴ Díky tomu je právě tato metoda použita při prvotním testování daného elektrochemického systému.

Princip CV spočívá v měření proudu v závislosti na vloženém potenciálu, který se v čase mění lineárně. V rámci jednoho cyklu je nejdříve potenciál lineárně zvětšován a je obdržena

první polovina cyklického voltamogramu, která zahrnuje informace o oxidaci. Analyt odevzdává elektrony pracovní elektrodě a je zaznamenán anodický pík (proud). Ve druhé polovině cyklu potenciál lineárně klesá, analyt je redukován elektrony z pracovní elektrody a je registrován katodický pík (proud). Tento cyklus může být opakován a jednotlivé skeny mohou být mezi sebou porovnávány. Z takto obdržených informací lze zjistit, zda je elektrodová reakce reverzibilní či nikoliv.^{42,43}

Grafickým výstupem takového měření je cyklický voltamogram (viz Obrázek 14), jehož základními charakteristikami jsou hodnoty proudu ($I_{p,a}$, $I_{p,c}$) a příslušného potenciálu ($E_{p,a}$, $E_{p,c}$) v anodickém a katodickém píku. Mezi parametry ovlivňující tvar CV křivek patří zejména velikost částic aktivní plochy elektrody, koncentrace elektrolytu, tloušťka elektrody a teplota. Důležitým parametrem měření je skenovací rychlost v [$V \cdot s^{-1}$].^{40,43}



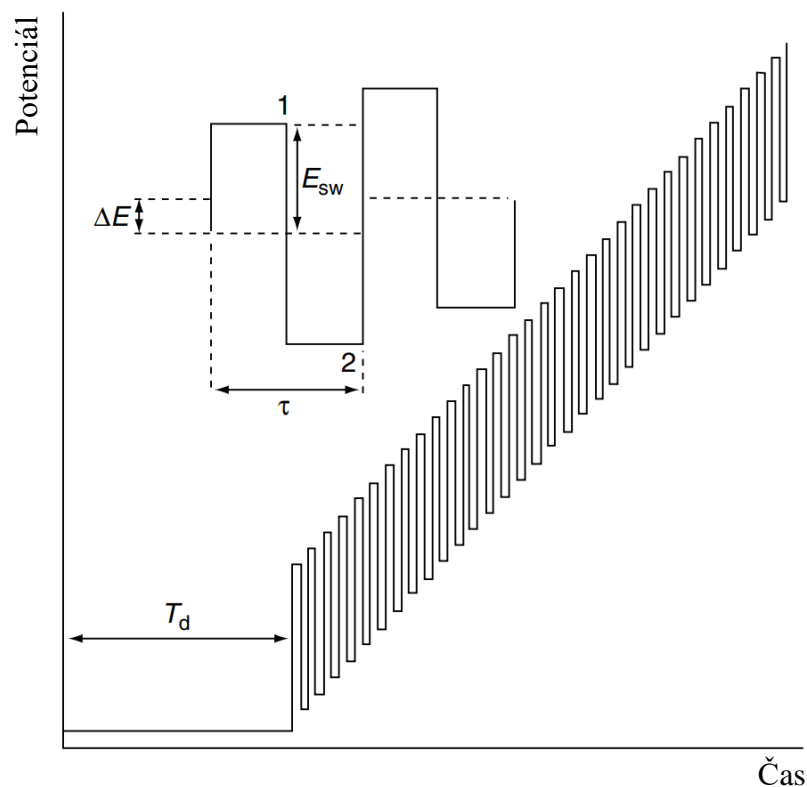
Obrázek 14: (a) Závislost vloženého potenciálu na čase při cyklické voltametrii. (b) Cyklický voltamogram s patrným oxidačním a redukčním píkem. Převzato a upraveno z Journal of Electrochemical Science and Technology⁴³.

Kromě dříve zmíněného použití pro zjištění základních vlastností elektrochemických procesů má CV i další aplikace, jako například kvantitativní stanovení analytů porovnáváním proudů v píku odpovídajícímu danému analytu.⁴⁴ Z jiných aplikací lze uvést charakterizaci polymerů, komplexů kovů, identifikaci reakčních mechanismů (např. proteolýza mléčných proteinů) nebo stanovení různých organických (glukóza) a anorganických látek (ionty kovů).⁴⁵ Tato metoda byla využita také v oblasti uchovávání

energie pro výzkum pseudokapacitního chování materiálů a výpočet difúzních koeficientů elektrodoových materiálů.⁴³

2.3.2 Square-wave voltametrie

Square-wave voltametrie (dále jen SWV) patří mezi pulzní voltametrické techniky. U nich je potenciál na pracovní elektrodu vkládán v potenciálových pulzech, kdy je proud měřen v daných časových intervalech. U SWV je na elektrodu během měření aplikován lineárně rostoucí potenciál s pravoúhlými pulzy. Proud je v průběhu každého pulzu zaznamenáván dvakrát, a to těsně před aplikací pulzu a před koncem vloženého pulzu. Proudový rozdíl je poté vynesena oproti aplikovanému potenciálu.^{44,46} Schéma závislosti potenciálu na čase u SWV s patrnými pulzy je ilustrováno na Obrázku 15.



Obrázek 15: Schéma rostoucího aplikovaného potenciálu u SWV s pulzy o amplitudě E_{sw} , výšce kroku ΔE , délce pulzu τ a prodlevě měření T_d . Převzato z Analytical electrochemistry⁴⁴.

V porovnání s další rozšířenou pulzní technikou, diferenční pulzní voltametrií (DPV), je SWV citlivější a rychlejší. Možnost aplikace vysokých frekvencí vede k vyšším skenovacím rychlostem, což má za následek zkrácení doby měření. SWV měření zároveň poskytují

několikanásobně vyšší odezvu než analogická DPV měření.⁴⁷ Všechny tyto vlastnosti dělají ze SWV jednu z nejpokročilejších elektrochemických metod využitelnou pro řadu aplikací.

SWV je v posledních letech využívána především jako efektivní metoda pro stanovení řady skupin látek, jako např. proteiny, pesticidy, těžké kovy nebo léčiva.⁴⁶ Díky své rychlosti a citlivosti (dokáže simultánně stanovit i látky s blízkými redoxními potenciály, např. paracetamol a penicilin) je výhodnou alternativou k zavedeným metodám jako chromatografie nebo spektrometrie. Byla použita pro stanovení kyseliny askorbové na grafitové elektrodě modifikované uhlíkovými nanotrubicemi, organofosforových pesticidů, těžkých kovů (Bi^{3+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+}) nebo steroidu progesteronu.^{46,48} SWV může být využita také při diagnostice u biosenzorů, např. při detekci bakterií *E. coli* pomocí tištěných elektrod modifikovaných zlatými nanočásticemi a jednovláknovou DNA.⁴⁷ Kromě stanovení může být využita také při kinetické a termodynamické charakterizaci proteinů.⁴⁶

2.4 Elektrochemická detekce

Senzory využívající elektrochemických metod se v posledních letech stávají často vyhledávanými a atraktivními způsoby detekce nejrůznějších analytů. Klasické analytické metody zahrnující nukleární magnetickou rezonanci (NMR), infračervenou spektroskopii (IR), vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC) nebo hmotnostní spektrometrii (MS) jsou náročné na přístrojové vybavení, energii, obsluhu i čas. Elektroanalytické metody jsou oproti tomu snadné, rychlé, citlivé, nízkonákladové a variabilní.⁴ Jeden z nejrozšířenějších elektrochemických senzorů představují jednorázové tištěné elektrody na stanovení glukózy v krvi, které používají diabetici po celém světě.³⁸ Nejčastěji používané metody jsou CV, pulzní techniky a elektrochemická impedanční spektroskopie.⁴

Elektrochemické senzory se skládají ze dvou hlavních částí: přenašeče analytického signálu (elektrody), který převádí signál do elektronického zařízení, a biorekogničního prvku (enzymy, protilátky, DNA, aptamery), který je díky specifické afinitě schopen zachytit a rozpoznat analyt.^{4,42,49} Takto vzniklý senzor je charakterizován svou senzitivitou, selektivitou, reverzibilitou a rychlostí odezvy.⁴

Pomocí elektrochemických senzorů již byla detekována řada sloučenin. V klinické praxi se jedná o nádorové markery (pomocí specifických protilátek), hormony (kortizol a estradiol pomocí protilátek), glukózu a cholesterol (pomocí enzymů) či neurotransmitery

(acetylcholin a adrenalin pomocí enzymů).⁴⁹ Elektrochemické senzory byly také využity pro detekci organismů jako bakterie (*E. coli*, *S. aureus* pomocí specifických protilátek) a viry (způsobující hepatitidu C, ptačí chřipku a horečku dengue pomocí specifických protilátek).^{49,50} Byly navrženy také senzory pro detekci organických a anorganických látek jako těžké kovy (Pb^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+}), dusitany, siřičitany, fenoly nebo pesticidy.⁴

2.4.1 Modifikace elektrod

Nanomateriály našly uplatnění v elektrochemii mimo jiné jako materiály pro modifikaci pracovních elektrod. Takto modifikované elektrody zlepšují citlivost detekce, jelikož svými elektrickými vlastnostmi (rychlý přenos elektronů) zvyšují odezvu a prostřednictvím velké specifické plochy povrchu umožňují navázání většího množství molekul.^{6,49}

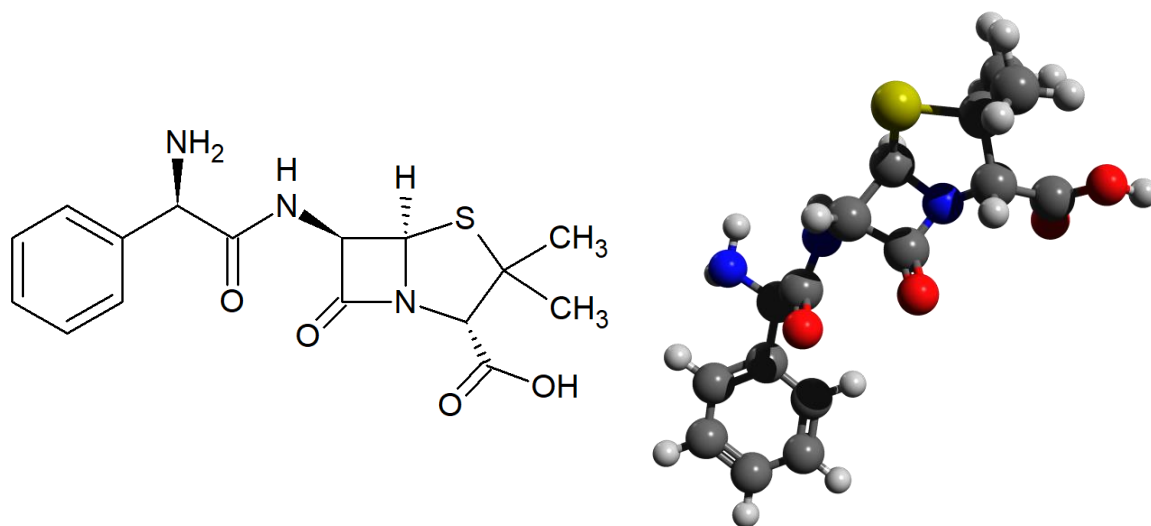
Vrstva materiálu v podobě tenkého filmu může být na povrch pracovní elektrody nanесena několika způsoby. Nejčastěji používané metody jsou tzv. drop-coating (na povrch elektrody je napipetován určitý objem vodné suspenze daného materiálu, po vypaření rozpouštědla vznikne film), který je výhodný díky své jednoduchosti a dostupnosti vybavení, a dále elektrodepozice. V případě tištěných elektrod mohou být nanomateriály přidány přímo do inkoustu.⁴¹

Uhlíkové materiály jsou využívány při modifikacích elektrod především díky elektrokatalytické aktivitě, biokompatibilitě a rychlému přenosu elektronů. Za těmito účely bylo zdokumentováno použití řady uhlíkových materiálů, např. funkcionalizovaných jednotěnných i víceštěnných uhlíkových nanotrubic, fullerenu, grafenu a grafenových derivátů.^{4,6,7}

V experimentální části této práce byly pro experimenty použity modifikované elektrody ze skelného uhlíku (GCE z anglického *glassy carbon electrode*) a tištěné uhlíkové elektrody (SPCE z anglického *screen-printed carbon electrode*). Z konkrétních aplikací těchto elektrod lze uvést GCE elektrody modifikované redukovaným grafen oxidem a nanočásticemi zlata pro detekci lipopolysacharidů bakterií *E. coli*⁵¹ nebo grafenem v kombinaci s uhlíkovými nanotrubicemi pro detekci methotrexátu⁵². V případě SPCE byly navrženy například elektrody modifikované grafenem a nanočásticemi zlata pro detekci C-reaktivního proteinu⁵³ nebo dusíkem dopovaným grafenem pro detekci peroxidu vodíku⁵⁴.

2.5 Ampicilin

Ampicilin je širokospektrální antibiotikum řadící se mezi aminopeniciliny, což je jedna z podtříd penicilinů. Peniciliny spadají společně s cefalosporiny, karbapenemy a monobaktamy pod beta-laktamová antibiotika, která mají jako společný znak přítomnost beta-laktamového kruhu v molekule. K beta-laktamovému kruhu je u penicilinů připojen thiazolidinový kruh a sekundární aminová skupina $-NHR$.^{55,56} Ampicilin je v dnešní době jedno z nejpoužívanějších beta-laktamových antibiotik, které se běžně používá při léčbě infekcí dýchacích či močových cest způsobených bakteriemi. Díky své odolnosti vůči kyselému prostředí může být podáván ústně.² Strukturální vzorec (včetně 3D reprezentace) ampicilinu je znázorněn na Obrázku 16.



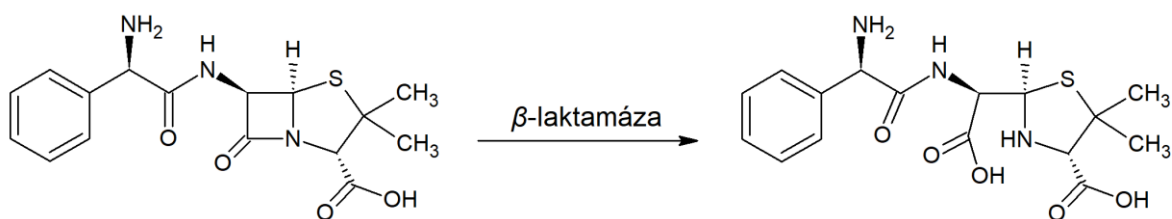
Obrázek 16: Strukturální vzorec a 3D model ampicilinu (molekulární struktura ampicilinu byla vizualizována pomocí softwaru Avogadro 1.2.0⁵⁷)

Antibakteriální mechanismus beta-laktamových antibiotik spočívá v inhibici syntézy buněčné stěny navázáním na enzymy transpeptidázy, někdy též nazývané penicilin-vazebné proteiny. Tyto enzymy katalyzují transpeptidaci peptidoglykanu, což je polymer dodávající buněčné stěně bakterií stabilitu a pevnost. Beta-laktamová antibiotika jsou strukturálně podobná substrátu těchto enzymů – inhibují tak jejich činnost, což vede k lýzi (rozpadu) buňky.^{1,55,58}

V důsledku nadužívání antibiotik a evoluce si bakterie v průběhu času vytvořily různé mechanismy rezistence. Mezi čtyři hlavní mechanismy patří inaktivace antibiotika produkcí enzymů β -laktamáz, modifikace penicilin-vazebných proteinů, regulace permeability

membrány snížením počtu porinových kanálů a buněčný eflux. Většina bakterií využívá více z těchto mechanismů současně.^{5,55,56}

Klíčovou složkou rezistence, zejména u gram-negativních bakterií, je právě produkce β -laktamáz. Jedná se o enzymy, jež hydrolyticky štěpí amidovou vazbu v beta-laktamovém kruhu, což vede k jeho rozpadu a ke ztrátě antibakteriálních vlastností. Enzymů z této skupiny již bylo objeveno několik set.^{5,59} Na základě molekulární struktury se β -laktamázy dělí na skupiny A–D. Skupina B se od ostatních, které mají aktivní místo na serinovém zbytku, liší tím, že musí být katalyzována Zn^{2+} ionty.¹ Na Obrázku 17 je znázorněn rozklad ampicilinu β -laktamázou.



Obrázek 17: Hydrolyza (rozpad beta-laktamového kruhu) ampicilinu β -laktamázou

2.5.1 Detekce elektrochemickými metodami

Za účelem detekce ampicilinu bylo použito mnoho různých metod, ať už se jedná o kapalinovou chromatografii, fluorescenční metody, Ramanovu spektroskopii nebo kolorimetrii. Výraznou pozornost však v posledních letech získaly elektrochemické senzory díky svým výše zmíněným vlastnostem jako rychlost, citlivost a nízké náklady.⁶⁰

Nejčastěji používanými zařízeními jsou tzv. aptasenzory, tj. senzory využívající jako biorekogniční prvek aptamery. Aptamery jsou syntetické jednovláčkové DNA se specifickou vazbou k cílové molekule. Aptasenzor pro detekci ampicilinu navrhl Wang a kol.⁶⁰ Senzor sestával z GCE elektrody, na kterou byly elektrodepozicí uloženy nanočástice zlata. Na ně byla prostřednictvím vazby Au–S připevněna dvouvláčková DNA. Ta může být zpětně uvolněna působením enzymů Dpn II a Exo III, protože jejich substrát je právě dvouvláčková DNA. V přítomnosti ampicilinu je však vytvořen s jedním vláčkem stabilní konjugát aptamer-ampicilin, což se projeví na snížení odezvy elektrody při měření metodou DPV.⁶⁰

Odlišné využití aptameru navrhl Taghdisi a kol.⁶¹ Na povrchu zlaté tištěné elektrody byla z různých úseků jednovláčkových DNA vystavěna konstrukce podobná žebříku, která

fyzicky bránila molekulám elektrolytu v kontaktu s elektrodou. V přítomnosti molekul ampicilinu došlo k jejich navázání na aptamery, které spojovaly jednotlivé úseky této konstrukce. Elektrolyt následně přišel do většího kontaktu s elektrodou a odezva se při měření metodami CV a DPV zvětšila.⁶¹

Hamami a kol.⁶² využil pro zvětšení odezvy aptasenzoru nanokompozit kombinující MoS₂ s polypyrrolovými nanočásticemi uložený na tištěné elektrodě elektrodepozicí. Povrch tohoto materiálu byl následně kovalentně modifikován aptamery a naftochinonem, který sloužil jako redoxní marker. Proudová odezva byla měřena metodou SWV a se zvyšující se koncentrací ampicilinu se zmenšovala.⁶²

2.5.2 Detekce ostatními metodami

Kromě elektrochemických metod lze ampicilin detekovat také jinými metodami. Senzor využívající fluorescenci byl navržen Esmaelpourfarkhanim a kol.⁶³ Na nanočástice zlata byl navázán aptamer a jeho komplementární vlákno. V přítomnosti ampicilinu bylo toto vlákno uvolněno, což vedlo k poklesu fluorescence fluoroforu PTCDI.⁶³

Kolorimetrie využil Shrivasa a kol.⁶⁴ Jako kolorimetrický senzor byly využity nanočástice stříbra stabilizované citrátem. Tato povrchová vrstva reaguje s ampicilinem a dochází k agregaci nanočástic stříbra. V důsledku této interakce dochází k červenému posuvu v UV-VIS spektru a s tím související změně barvy roztoku.⁶⁴

K detekci ampicilinu může být použita také kapalinová chromatografie. Castillo-García a kol.⁶⁵ využil chromatografii v kombinaci s luminiscenčním detektorem. Chelát Ru(bpy)₃²⁺ byl oxidován Ce⁴⁺ ionty na Ru(bpy)₃³⁺, který byl poté analyty (různými peniciliny) zpětně redukován do excitovaného stavu redukované formy. Při její relaxaci do základního stavu poté došlo k emisi záření, které bylo detekováno.⁶⁵

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie

Veškeré chemikálie použité v této práci byly pořízeny od společnosti Sigma-Aldrich. Jedná se o ampicilin, PBS a β -laktamázu (původem z *Bacillus cereus* 569/H9). V rámci všech experimentů byla použita ultračistá voda (vodivost > 18 M Ω).

Tabulka 1: Přehled použitých chemikálií

Chemikálie	Dodavatel	Čistota	M _r
Ampicilin	Sigma-Aldrich	p.a.	349,40
PBS	Sigma-Aldrich	p.a.	-
β -laktamáza	Sigma-Aldrich	-	-

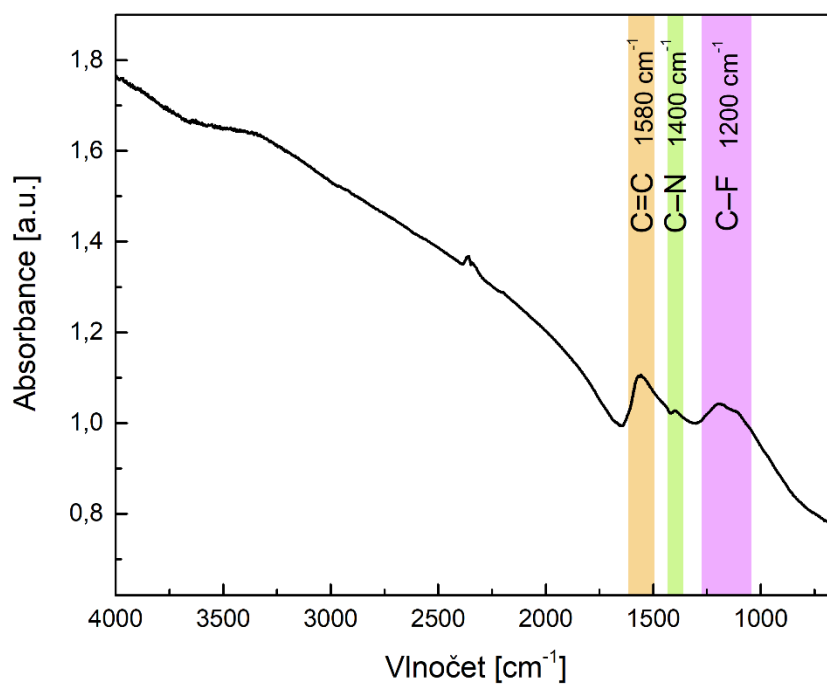
3.2 Deriváty grafenu

Jedním z cílů práce bylo experimentálně určit vliv naneseného filmu různých derivátů grafenu na odezvu elektrody během elektrochemických měření. Jmenovitě se jedná o dusíkem dopovaný grafen (NG), grafenovou kyselinu (GA), grafen funkcionalizovaný nitrilovými skupinami (GCN) a grafen funkcionalizovaný thiolovými skupinami (GSH). Všechny čtyři grafenové deriváty byly připraveny pracovníky Regionálního centra pokročilých technologií a materiálů (RCPTM), které spadá pod Český institut výzkumu a pokročilých technologií (CATRIN) Univerzity Palackého v Olomouci. Materiály byly podrobeny základní analýze metodami FTIR a TEM.

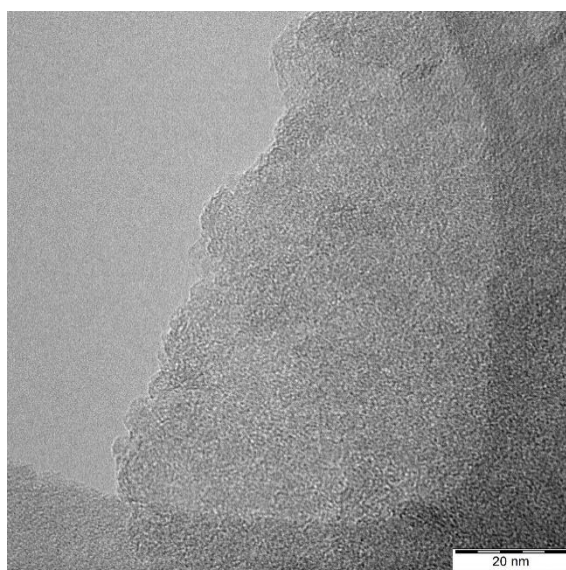
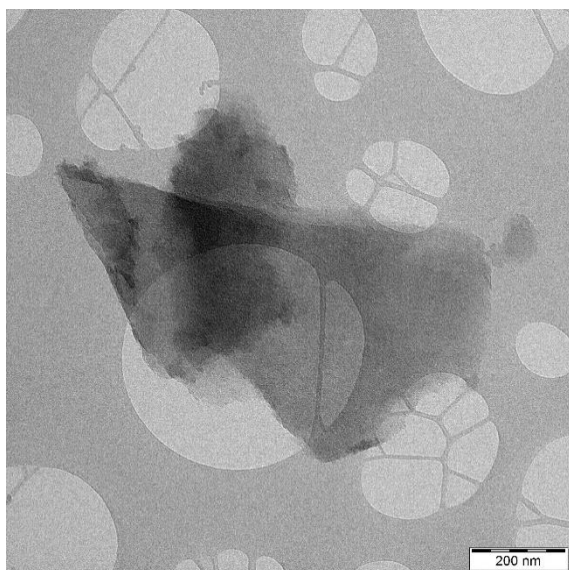
3.2.1 Charakterizace NG

Infračervené spektrum NG (Obrázek 18), dusíkem dopovaného grafenu, zahrnuje vibrace v oblasti okolo 1580 cm⁻¹ (odpovídající valenčním vibracím aromatických kruhů), dále okolo 1400 cm⁻¹ (koresponduje se zvyšujícím se počtem atomů dusíku v grafenové kostře) a 1200 cm⁻¹. Poslední zmíněná vibrace odpovídá vazbě C–F, která je přítomna v prekurzoru NG (fluorografenu).

Ze snímků TEM (Obrázek 19) je patrné, že NG vykazuje laterální velikost zhruba 1 μ m a je tvořen několika vrstvami materiálu.



Obrázek 18: Infračervené spektrum NG

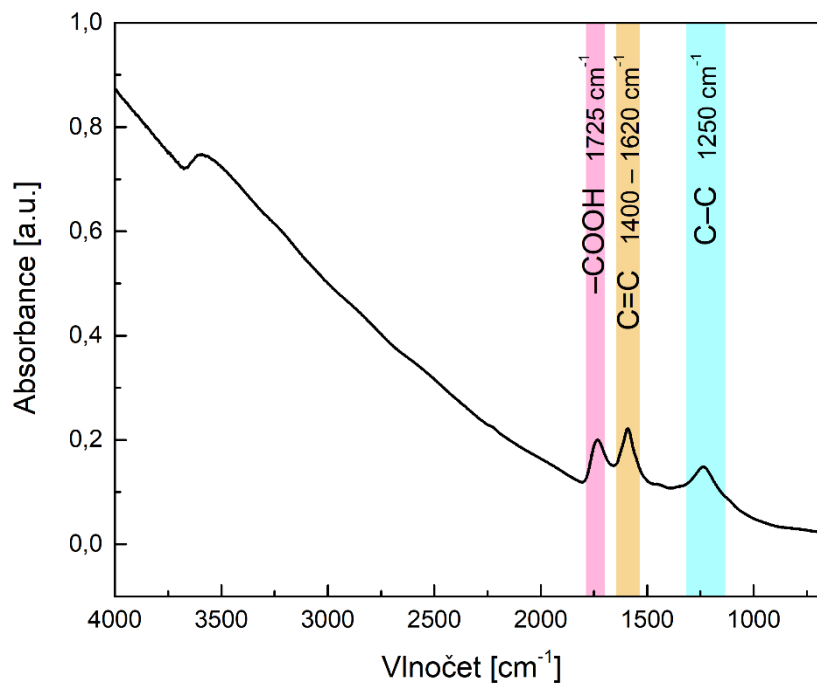


Obrázek 19: TEM snímky NG

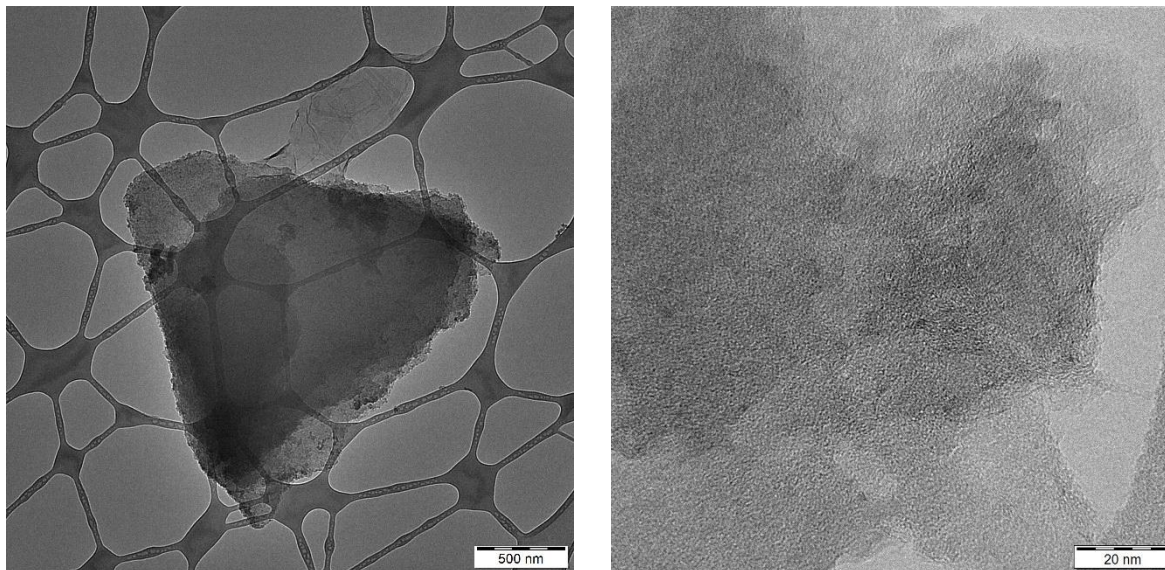
3.2.2 Charakterizace GA

Grafenová kyselina je tvořena grafenem funkcionalizovaným převážně karboxylovými skupinami. Skupinám -COOH odpovídá vibrace o vlnočtu 1725 cm^{-1} . Ve spektru (Obrázek 20) jsou dále patrné vibrace v oblasti $1400\text{--}1620\text{ cm}^{-1}$, které odpovídají síti aromatických kruhů s sp^2 uhlíky, a vibrace kolem 1250 cm^{-1} , která představuje jednoduché C–C vazby.

Na základě TEM snímků (Obrázek 21) bylo zjištěno, že částice GA se skládají z několika vrstev o laterální velikosti cca 1,8 μm .



Obrázek 20: Infračervené spektrum GA



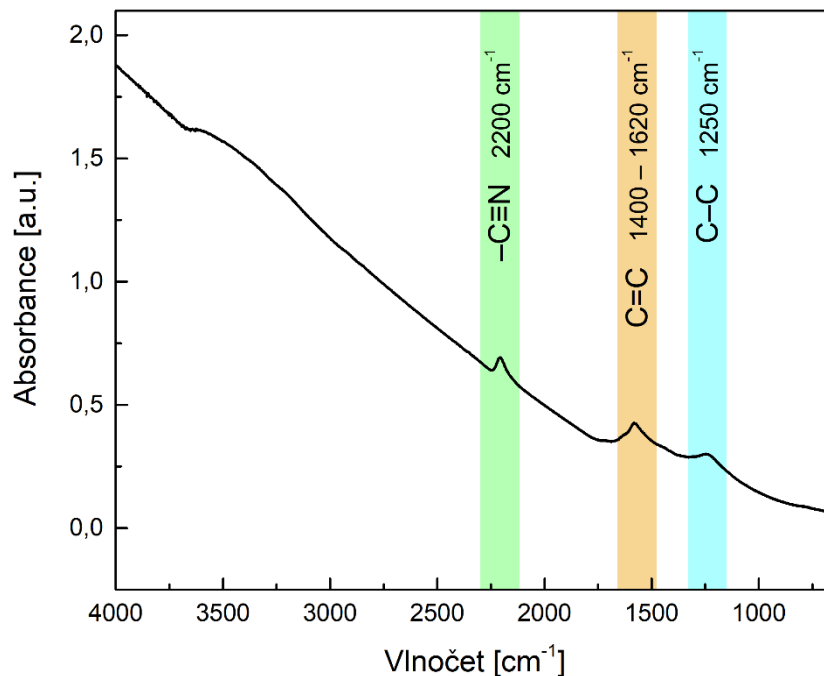
Obrázek 21: TEM snímky GA

3.2.3 Charakterizace GCN

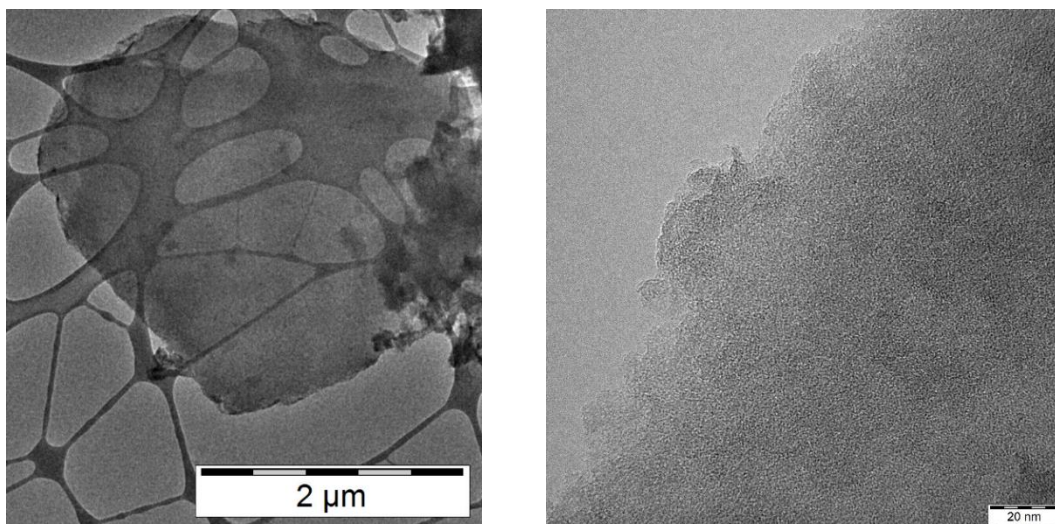
Tento derivát je tvořen grafenem funkcionalizovaným nitrilovými skupinami. Ve spektru (Obrázek 22) jsou patrné vibrace shodné se spektrem GA, a to v oblasti 1400–1620 cm^{-1}

(C=C vazby) a 1250 cm^{-1} (C–C vazby). Záznam navíc obsahuje vibraci 2200 cm^{-1} , která odpovídá $\text{–C}\equiv\text{N}$ skupině.

Na základě TEM snímků (Obrázek 23) bylo zjištěno, že částice GCN se skládají z několika vrstev o laterální velikosti cca $3,3\ \mu\text{m}$.



Obrázek 22: Infračervené spektrum GCN



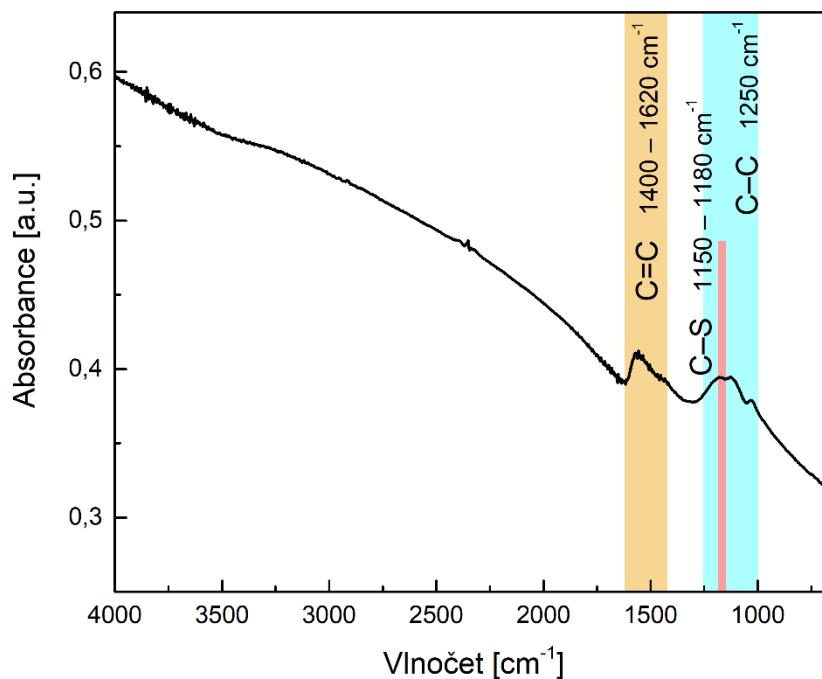
Obrázek 23: TEM snímky GCN

3.2.4 Charakterizace GSH

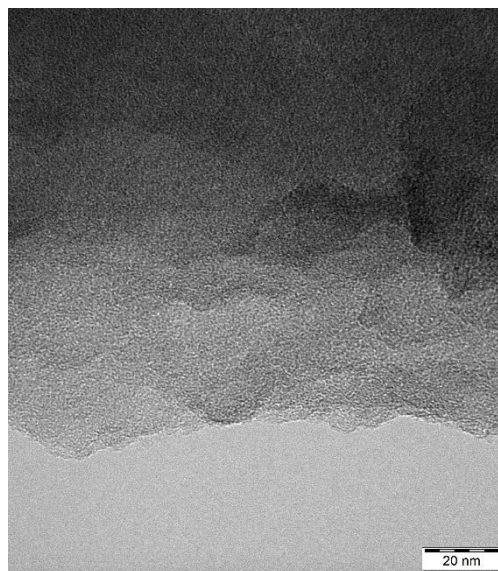
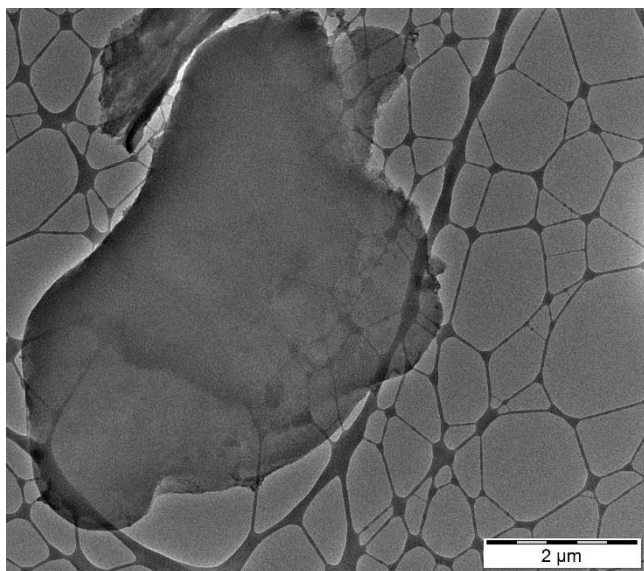
Tento derivát je tvořen grafenem funkcionalizovaným thiolovými skupinami (–SH). V infračerveném spektru (Obrázek 24) je kromě oblasti odpovídající C=C vazbám mezi sp^2

uhlíky ($1400\text{--}1620\text{ cm}^{-1}$) patrný také pás v oblasti okolo 1250 cm^{-1} , který je charakteristický pro řadu grafenových materiálů a zahrnuje především vibrace jednoduchých C–C vazeb. V tomto pásu se rovněž nachází vibrace mezi $1150\text{--}1180\text{ cm}^{-1}$, která je charakteristická právě pro vazbu C–S.

Ze snímků TEM (Obrázek 25) je patrné, že GSH vykazuje laterální velikost zhruba $6\text{ }\mu\text{m}$ a je tvořen několika vrstvami materiálu.



Obrázek 24: Infračervené spektrum GSH



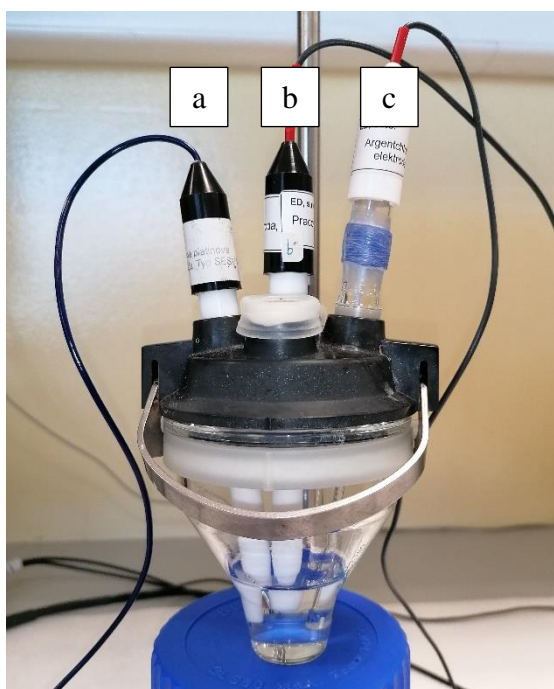
Obrázek 25: TEM snímky GSH

3.3 Elektrochemický experiment

V rámci provedených experimentů byly různými elektrochemickými metodami změřeny odezvy systémů elektrod v roztocích čistého fosfátového pufru (dále PBS z anglického *phosphate-buffered saline*), antibiotika ampicilinu a roztoku antibiotika ampicilinu s přidaným enzymem β -laktamázou. Během měření byly použity dva různé systémy elektrod – tříelektrodevé zapojení s oddělenou pracovní, referentní a pomocnou elektrodou a tištěné uhlíkové elektrody, na kterých jsou všechny tři elektrody inkorporovány na keramickém substrátu.

3.3.1 Měření pomocí tříelektrodevého zapojení

V rámci tohoto zapojení byly použity pracovní elektroda ze skelného uhlíku, referentní argentschloridová elektroda a pomocná platinová elektroda společnosti 2 THETA ASE. Tento systém je zobrazen na Obrázku 26 a dále v textu označován jako GCE (z anglického *glassy carbon electrode*).



Obrázek 26: GCE systém elektrod skládající se z pomocné (a), pracovní (b) a referentní (c) elektrody

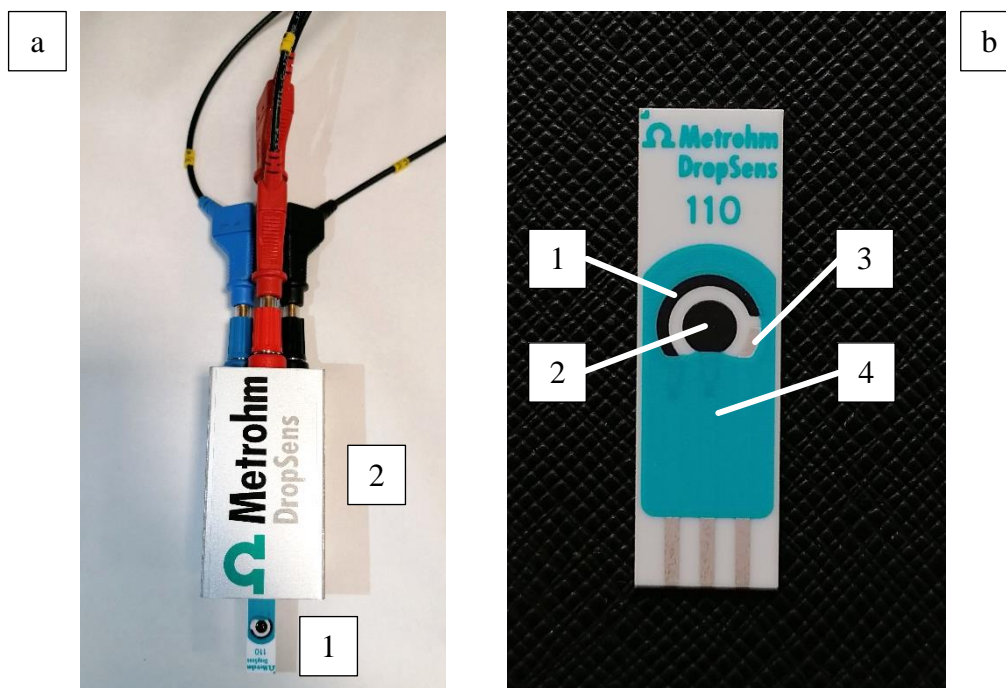
Před samotným měřením byly všechny tři elektrody mechanicky očištěny definovaným způsobem. Pracovní elektroda byla opláchnuta ultračistou vodou, ethanolem, 2-propanolem a opět ultračistou vodou v tomto pořadí. Poté byla vyleštěna na lešticí podložce pomocí aluminy (oxid hlinitý) a opět opláchnuta ultračistou vodou. Referentní elektroda byla

opláchnuta pouze ultračistou vodou a osušena papírovým ubrouskem. Pomocná elektroda byla opláchnuta ultračistou vodou, ethanolem, 2-propanolem a opět ultračistou vodou v tomto pořadí.

Experimenty byly provedeny ve skleněné elektrochemické cele, která byla před měřením opláchnuta ultračistou vodou, ethanolem, 2-propanolem a osušena proudem plynného dusíku. Do této cely bylo odměřeno 15 ml měřeného roztoku a ponořen držák se třemi elektrodami. Měření probíhalo na potenciostatu Autolab (PGSTAT 128N), který byl ovládán pomocí dodaného softwaru NOVA (1.11.2).

3.3.2 Měření pomocí tištěných elektrod

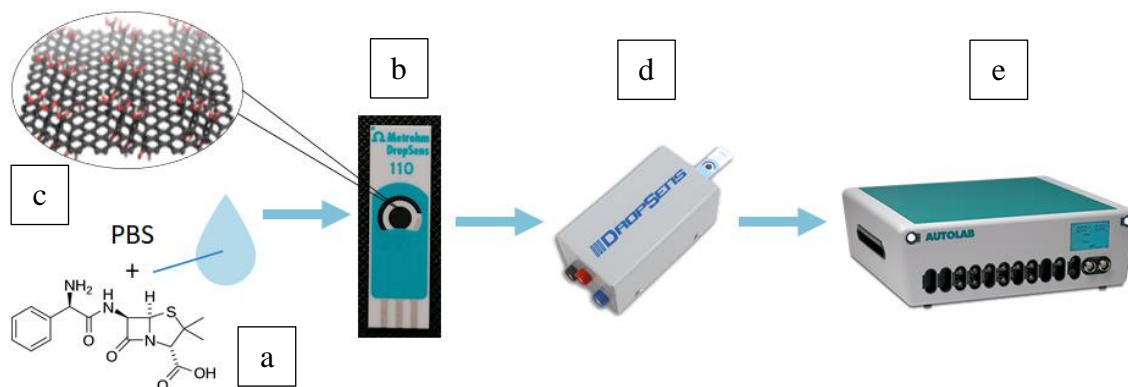
V rámci tohoto zapojení byly použity tištěné uhlíkové elektrody DropSens DRP-110 (dále v textu označovány jako SPCE z anglického *screen-printed carbon electrode*) společnosti Metrohm. Pro připojení těchto elektrod k potenciostatu byl vyžadován konektor rovněž od společnosti Metrohm. Tento systém je zobrazen na Obrázku 27.



Obrázek 27: (a) SPCE systém elektrod skládající se ze samotné tištěné elektrody (1) a konektoru (2). (b) Povrch SPCE elektrody skládající se z pomocné (1), pracovní (2) a referentní (3) elektrody a okolního dielektrika (4).

Před samotným měřením byla elektroda očištěna opláchnutím ultračistou vodou a osušena proudem plynného dusíku. Její povrch byl případně modifikován grafenovým derivátem.

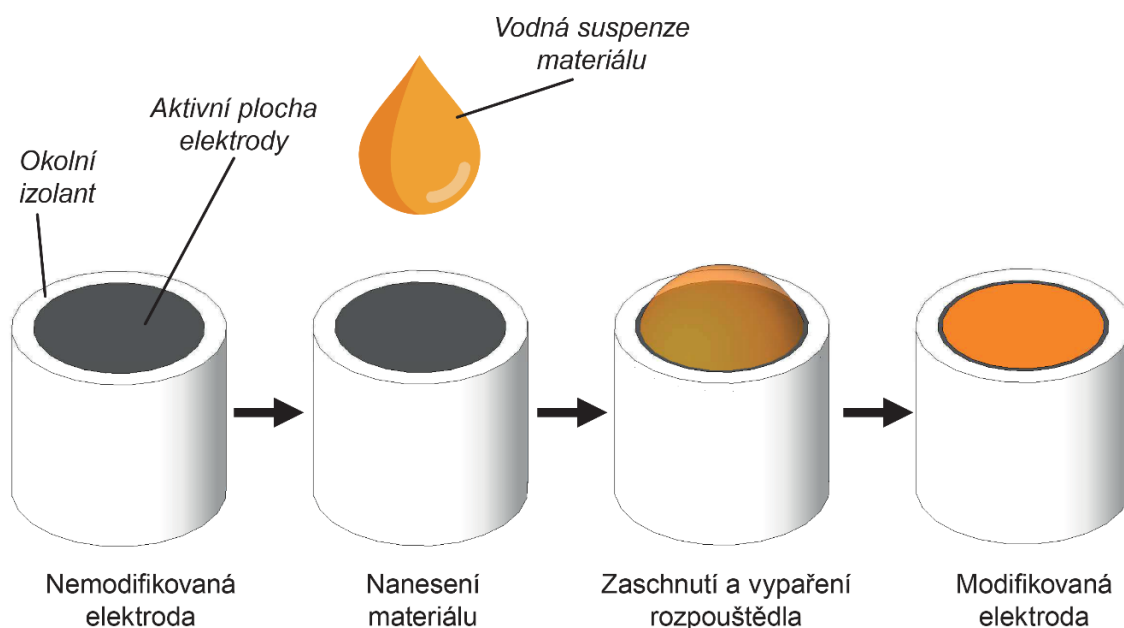
Poté byla zasunuta do konektoru, který byl připojen k potenciostatu. Na elektrodu bylo následně pipetou nanášeno 60 μl měřeného vzorku tak, aby byl povrch elektrody kompletně pokryt vzniklou kapkou. Poté proběhlo měření. Schéma zahrnující tento pracovní postup je zobrazeno na Obrázku 28.



Obrázek 28: Schéma pracovního postupu při měření roztoku ampicilinu (a) na SPCE elektrodě (b) modifikované derivátem grafenu (c), která byla připojena skrz konektor (d) k potenciostatu (e)

3.4 Nanosení materiálů na elektrody

Měření byla prováděna čistými nemodifikovanými GCE, resp. SPCE elektrodami, nebo elektrodami s nanosenou vrstvou materiálu (derivátu grafenu). Materiály byly nanášeny na pracovní elektrody metodou tzv. drop-coating (schéma ilustrováno na Obrázku 29), kdy je na povrch elektrody napipetován určitý objem vodné suspenze daného materiálu. Po vyschnutí a vypaření rozpouštědla je na pracovní elektrodě vytvořen tenký film.



Obrázek 29: Schéma nanášení materiálu na povrch elektrody metodou drop-coating

Vodné suspenze grafenových derivátů byly před nanesením na elektrody umístěny na 15 minut do ultrazvukové lázně, aby došlo k dispergaci případných agregátů. Elektrody byly před nanesením materiálu očištěny výše zmíněnými způsoby. Na jejich povrch bylo poté pipetou nanášeno 10 μl vodné suspenze v případě GCE a 20 μl v případě SPCE (hodnoty byly zvoleny tak, aby byl výsledným filmem pokryt celý povrch pracovní elektrody). Takto vytvořená kapka se poté nechala zaschnout po dobu 1 hodiny za laboratorní teploty.

3.5 Příprava měřených roztoků

Popsanými elektrodovými systémy byly měřeny roztoky čistého PBS, antibiotika ampicilinu a roztoku antibiotika ampicilinu s přidaným enzymem β -laktamáza. Roztok PBS byl připraven z pevných, komerčně dodávaných tablet rozpuštěním 1 tablety ve 200 ml ultračisté vody. V rámci všech experimentů byl použit roztok ampicilinu o koncentraci 1000 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Tento roztok byl vždy před měřením 15 minut ponechán v uzavřené plastové zkumavce za laboratorní teploty a poté převeden do měřicí cely. Při experimentech byl použit dodaný enzym β -laktamáza o aktivitě 0,2 $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$.

Veškeré laboratorní vybavení použité v rámci procesu přípravy těchto roztoků bylo předem očištěno roztokem ethanolu a ultračistou vodou, aby nedocházelo ke kontaminaci vzorků a zkreslení měření.

3.6 Elektrochemické metody

Roztoky byly měřeny na potenciostatu metodami cyklická voltametrie (CV), diferenční pulzní voltametrie (DPV) a square-wave voltametrie (SWV). Příprava měřeného vzorku se pro jednotlivé metody nelišila. Měření daného roztoku bylo provedeno vždy na třech různých elektrodách (ať už čistých, nebo modifikovaných), aby byly eliminovány chyby.

Metoda CV probíhala v potenciálovém okně 0–0,8 V při skenovací rychlosti 50 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$. DPV probíhala v rozsahu 0–0,65 V při skenovací rychlosti 10 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ a SWV rovněž v rozsahu 0–0,65 V při skenovací rychlosti 125 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

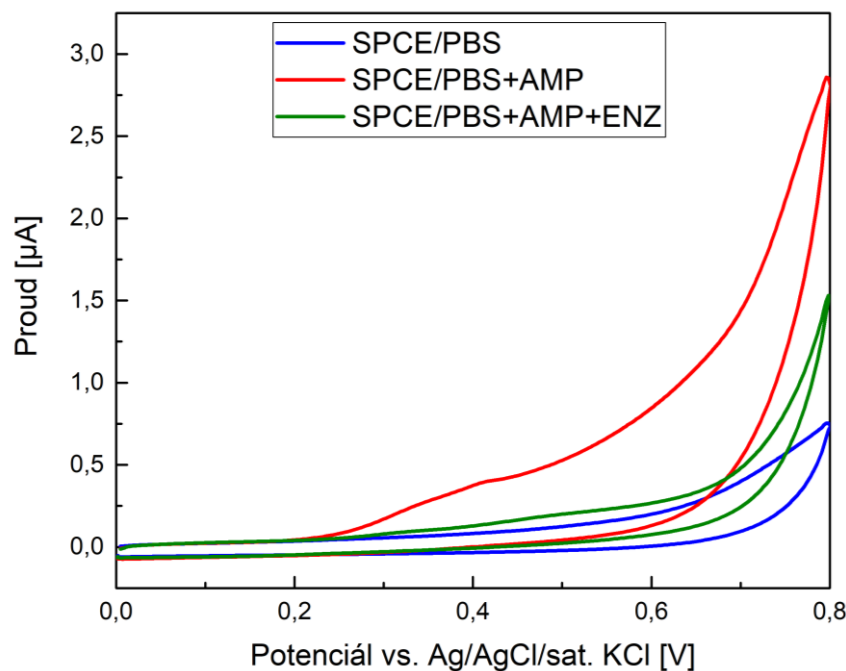
Cílem této práce bylo prozkoumat možnost využití derivátů grafenu při elektrochemické detekci antibiotika ampicilinu. Za tímto účelem byly proměřeny roztoky čistého PBS, antibiotika ampicilinu a roztoku antibiotika ampicilinu s přidaným enzymem β -laktamázou, který jej hydrolyticky štěpí (viz kapitola 2.5), metodou CV, aby byla získána základní charakteristika elektrodového děje. Stejná sada roztoků byla poté proměřena pulzními metodami DPV a SWV, aby byla nalezena metoda vhodná pro detekci ampicilinu v co nejnižších koncentracích. Dále byly změřeny odezvy elektrod s filmy různých materiálů. Z nich byl vybrán vhodný kandidát a následně byly porovnány proudové odezvy při jeho různých koncentracích. Měření byla prováděna na GCE i SPCE.

Naměřená data byla v případě metod DPV a SWV vyhodnocena v programu Nova (verze 1.11.2). U pulzních metod byl na začátku potenciálového okna patrný nežádoucí náběh křivky, který je pro dané techniky charakteristický a svou výškou zkrusluje relativní výšky pík. Tyto body nebyly za účelem zpřehlednění grafů zahrnuty do jejich konečné podoby.

4.1 Elektrochemická charakterizace metodou CV

Měření metodou CV probíhalo na SPCE elektrodách, jelikož dílčím cílem práce bylo ověřit možnost detekce ampicilinu tímto elektrodovým systémem. Obrázek 30 zobrazuje výsledné voltamogramy z měření roztoku PBS (modrá křivka), ampicilinu v PBS (červená křivka) a ampicilinu s β -laktamázou v PBS (zelená křivka).

Z grafu je patrné, že mezi odezvami jednotlivých vzorků je signifikantní rozdíl v proudové odezvě. Roztok ampicilinu v PBS pufru ($c_{AMP} = 1000 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) poskytuje cca 5krát vyšší proudovou odezvu než samotný roztok PBS pufru. Profil křivky je zároveň odlišný, v oblasti zhruba 0,3–0,4 V je zřejmý pík, který odpovídá redoxní reakci ampicilinu. Po přidání β -laktamázy, která toto antibiotikum rozkládá, došlo ke snížení proudové odezvy ampicilinu na úroveň odpovídající koncentraci enzymu. Z výsledků měření je patrné, že SPCE elektrody mohou být využity k primární detekci ampicilinu.

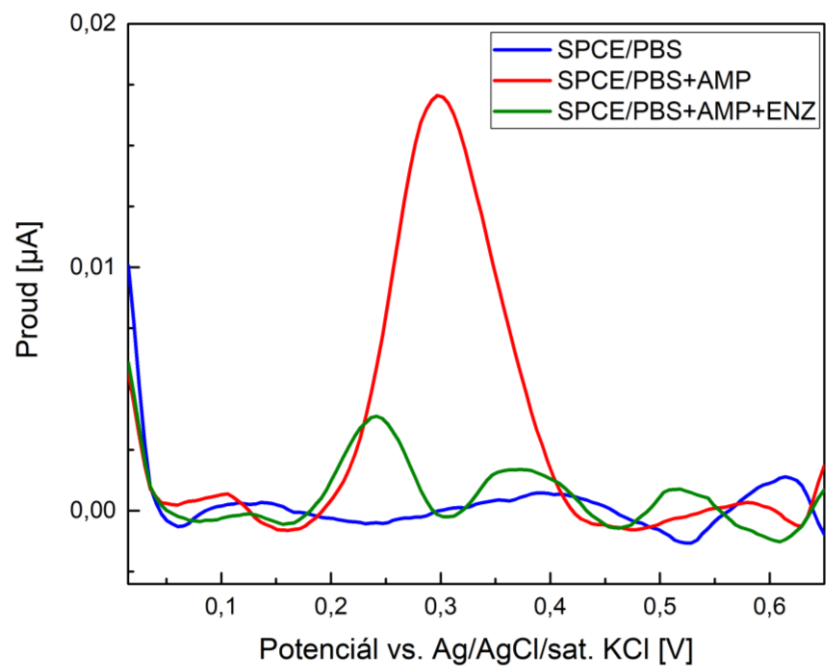


Obrázek 30: Cyklické voltamogramy z měření roztoku PBS (modrá křivka), ampicilinu v PBS (červená křivka) a ampicilinu s β -laktamázou v PBS (zelená křivka) na SPCE elektrodě

4.2 Testování pulzních metod vhodných pro detekci ampicilinu

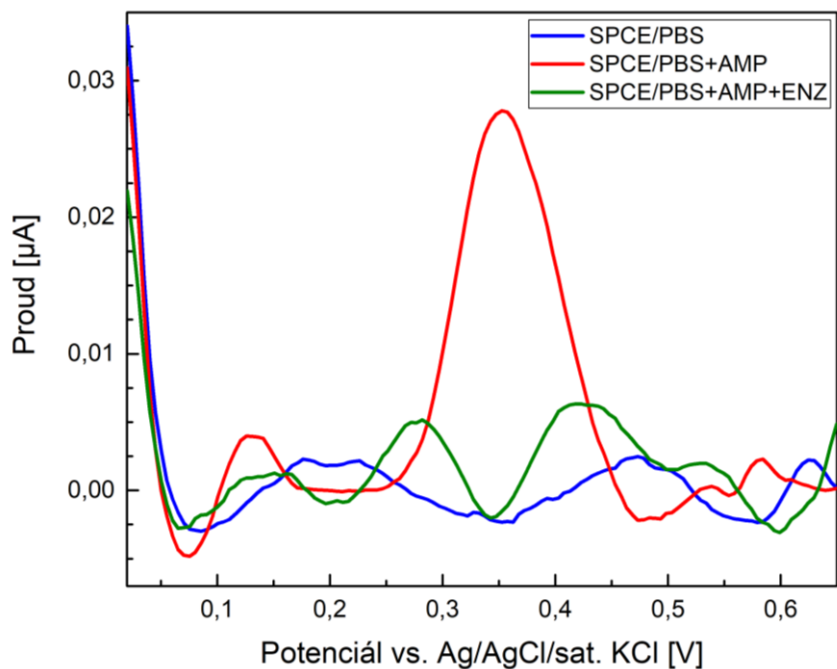
Po základní charakterizaci metodou CV byly na stejné sadě tří roztoků vyzkoušeny také dvě pulzní metody: diferenční pulzní voltametrie a square-wave voltametrie. Měření opět probíhalo na SPCE elektrodách. Obrázek 31 zobrazuje výsledný záznam z měření metodou DPV.

Z grafu je patrné, že podobně jako u metody CV i zde dochází u roztoku ampicilinu ke zvýšení proudové odezvy. Na rozdíl od předchozí metody lze ovšem jednoznačně identifikovat pík přisouzený ampicilinu, a to opět zhruba kolem 0,3 V. Tato metoda je tedy potenciálně vhodná pro detekci tohoto antibiotika, jelikož poskytuje rychlou odezvu s jasně identifikovatelným píkem. Po přidání β -laktamázy opět došlo ke snížení proudové odezvy. Z grafu DPV měření je navíc zřejmé, že po rozkladu ampicilinu tímto enzymem se v záznamu objevují dva reziduální píky, a to okolo 0,25 V a 0,35 V. Tyto píky pravděpodobně přísluší produktu degradace antibiotika (viz kapitola 2.5).



Obrázek 31: Záznam z DPV měření roztoku PBS (modrá křivka), ampicilinu v PBS (červená křivka) a ampicilinu s β -laktamázou v PBS (zelená křivka) na SPCE elektrodě

Následně byl stejný set tří roztoků podroben také měření SWV metodou. Experiment opět probíhal na SPCE elektrodách. Obrázek 32 zobrazuje výsledný záznam z měření metodou SWV.



Obrázek 32: Záznam z SWV měření roztoku PBS (modrá křivka), ampicilinu v PBS (červená křivka) a ampicilinu s β -laktamázou v PBS (zelená křivka) na SPCE elektrodě

Z grafu je patrné, že křivky mají velmi podobný profil jako u DPV měření – v záznamu lze pozorovat nárůst proudové odezvy, pík ampicilinu i dva píky po rozkladu β -laktamázou. Metoda SWV je tudíž rovněž vhodná pro detekci ampicilinu. Rozdíl oproti metodě DPV je v tom, že metoda SWV poskytuje zhruba o polovinu vyšší odezvu, bere-li se v potaz pík antibiotika ($0,0278 \mu\text{A}$ v porovnání s $0,0171 \mu\text{A}$ u DPV), a samotné měření probíhá rychleji. Z tohoto důvodu byla metoda SWV vybrána pro následující experimenty jako nejvhodnější pro detekci ampicilinu.

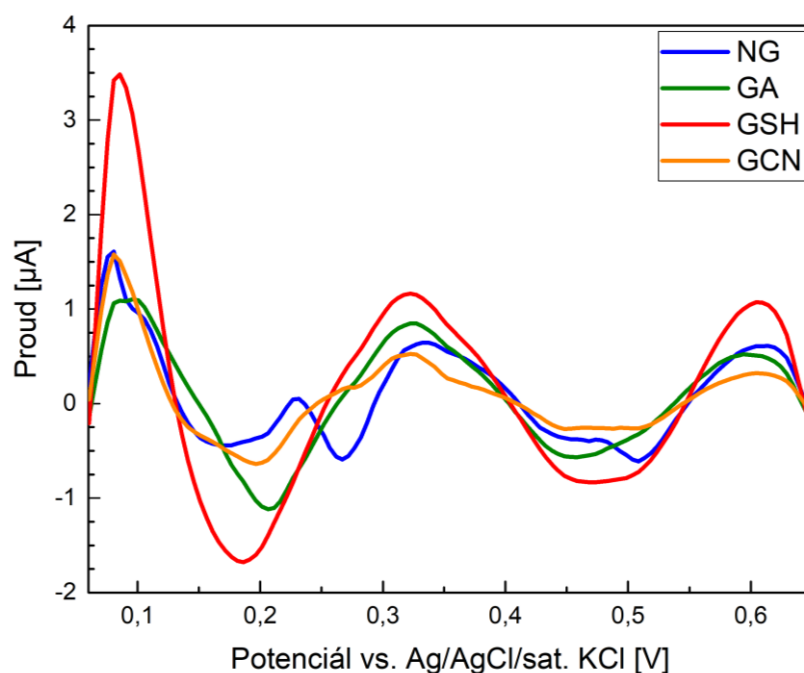
Základní měření elektrochemickými metodami tedy ukázala, že antibiotikum ampicilin lze systémem SPCE elektrod úspěšně detekovat. Proudové odezvy těchto měření jsou ovšem velmi malé (řádově setiny μA). Z tohoto důvodu bylo dále zkoumáno využití derivátů grafenu v podobě filmů nanesených na povrch elektrod za účelem zvýšení jejich odezvy.

Další experimenty, zahrnující porovnání vlivu jednotlivých materiálů na odezvu elektrod, byly prováděny na GCE elektrodách, které poskytují stejnou odezvu jako SPCE elektrody (pracovní elektroda je rovněž z uhlíku). Bylo tak učiněno z důvodu vyšší reprodukovatelnosti výsledků (GCE elektrody představují stálejší systém oproti komerčně vyráběným SPCE elektrodám, které jsou náchylnější na poškození) a cenové dostupnosti (SPCE elektrody jsou jednorázové s cenou okolo 70 Kč za kus).

4.3 Testování materiálů vhodných pro zlepšení odezvy elektrod

Za účelem ověření možného zvýšení proudové odezvy elektrod byly testovány čtyři materiály, a to dusíkem dopovaný grafen (NG), grafenová kyselina (GA), grafen funkcionalizovaný thiolovými skupinami (GSH) a grafen funkcionalizovaný nitrilovými skupinami (GCN).

Materiály byly nanášeny na pracovní elektrody metodou tzv. drop-coating, kdy byl na povrch elektrody napipetován objem vodné suspenze daného materiálu tak, aby kompletně pokryl povrch pracovní elektrody. Po vyschnutí a vypaření rozpouštědla při běžné laboratorní teplotě byl na pracovní elektrodě vytvořen tenký film (viz kapitola 3.4). Pro porovnání odezev výše uvedených materiálů byla zvolena koncentrace vodných suspenzí $1,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Takto modifikované GCE pracovní elektrody byly použity k měření roztoku ampicilinu v PBS pufru ($c_{\text{AMP}} = 1000 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) metodou SWV. Výsledky těchto měření jsou ilustrovány na Obrázku 33.

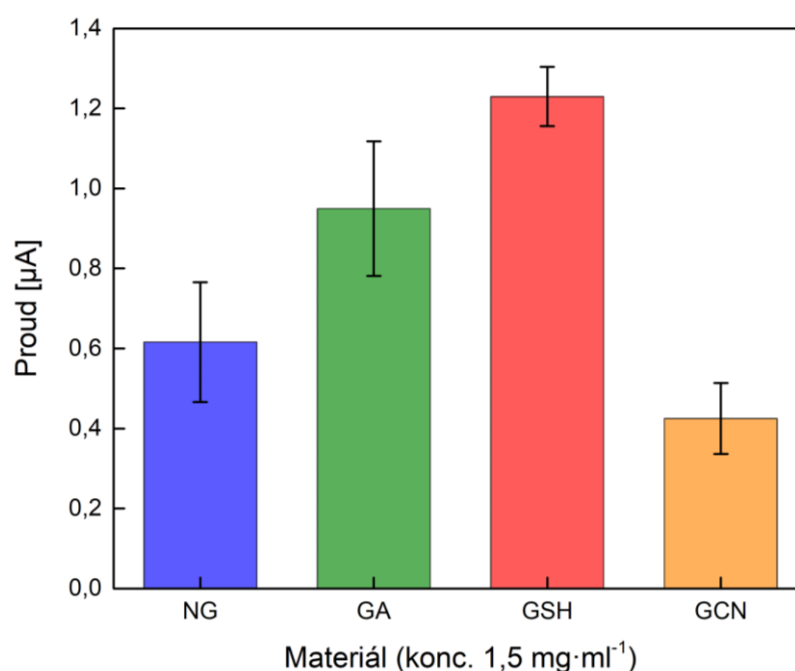


Obrázek 33: Záznam z SWV měření roztoku ampicilinu v PBS na GCE elektrodě modifikované NG (modrá křivka), GA (zelená křivka), GSH (červená křivka) a GCN (oranžová křivka)

Z grafu je patrné, že v oblasti 0,2–0,4 V je v záznamech měření identifikovatelný pík, který ovšem není tak výrazný jako při SWV měření na nemodifikované elektrodě. Srovnáním záznamů měření roztoku ampicilinu v PBS pufru a roztoku pouze PBS pufru bylo zjištěno, že ampicilin neposkytoval výraznější odezvu. Pravděpodobně došlo k degradaci ampicilinu nebo k jeho strukturním změnám, které způsobily zánik signálu. Tato skutečnost však nepředstavuje výraznější komplikace, jelikož primárním cílem bylo srovnat odezvy pro jednotlivé materiály. Tohoto cíle bylo dosaženo, jelikož měřený roztok elektrolytu měl u každého ze čtyř materiálů stejné složení. Filmy všech čtyř testovaných grafenových derivátů zvyšují odezvu GCE elektrod oproti elektrodám s nemodifikovaným povrchem.

Obrázek 34 zahrnuje průměrné hodnoty proudové odezvy z měření roztoku ampicilinu pro jednotlivé materiály včetně směrodatných odchylek. Z naměřených hodnot je patrné, že použití grafenových derivátů vedlo ke zhruba 45násobnému zvýšení odezvy oproti nemodifikované elektrodě v případě materiálu s nejvyšší odezvou (GSH – 1,23 µA vs. GCE 0,0278 µA).

Pro aplikaci v oblasti senzoriky je ovšem žádoucí nejen zvýšená odezva, ale také vhodné mechanické vlastnosti a reprodukovatelnost měření. Z těchto důvodů byl materiál vhodný pro modifikaci elektrody vybrán na základě několika faktorů, a to na výši odezvy, celkové kvalitě filmu deponovaného na elektrodě a směrodatné odchylce. Co se týče mechanických vlastností, filmy GSH a GCN tvořily u všech tří vzorků neuniformní povrch s odlupujícími se částmi. Oproti tomu NG a GA tvořily homogenní vrstvu bez viditelných nerovností na celé ploše elektrod. Tyto dva materiály sice neposkytovaly absolutně nejvyšší proudovou odezvu ze čtyř testovaných, ale průměrná velikost proudové odezvy (NG – 0,62 μA , GA – 0,95 μA) byla přesto několikanásobně vyšší než u nemodifikovaných elektrod.

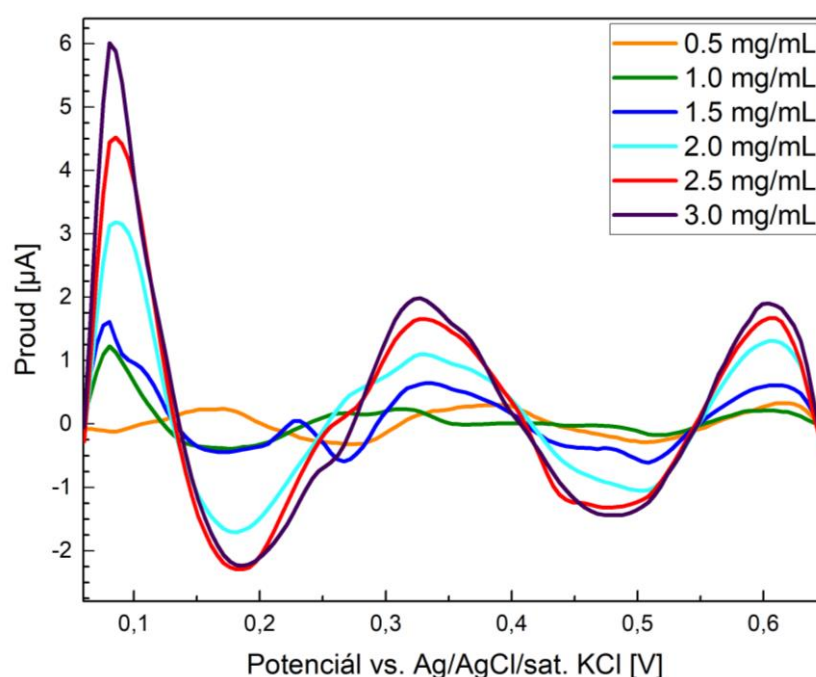


Obrázek 34: Průměrné hodnoty proudové odezvy v rámci tří měření roztoku ampicilinu v PBS na GCE elektrodě modifikované NG (modrý sloupec), GA (zelený sloupec), GSH (červený sloupec) a GCN (oranžový sloupec)

Materiály NG a GA byly srovnatelné jak velikostí proudové odezvy, tak směrodatné odchylky. S NG se ovšem při nanášení na povrch elektrod pracuje lépe, kdy tento materiál tvoří ve výsledku kvalitnější filmy než GA. Důvodem může být jak polární charakter nitrilových skupin, který zvyšuje adhezi k hydrofilnímu povrchu pracovní elektrody, tak rovnoměrná distribuce grafenových plátek o relativně malé velikosti cca 1 μm . S ohledem na všechny zmíněné faktory byl NG vybrán jako vhodný kandidát pro modifikaci elektrod za účelem zvýšení jejich odezvy.

4.4 Testování vlivu koncentrace NG na odezvu elektrod

Dalším krokem v optimalizaci zvýšení odezvy elektrod nanesením vrstvy vhodného materiálu bylo testování vlivu koncentrace takového materiálu, v tomto případě NG. Koncentrace z prvotního testování materiálů $1,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ byla zvolena jako prostřední hodnota souboru, který zahrnoval celkem 6 koncentrací NG: $0,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, $1,0 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, $1,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, $2,0 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, $2,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $3,0 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Materiály byly naneseny na povrch pracovních elektrod způsobem shodným s tím v kapitole 4.3. Měřeným roztokem byl opět roztok ampicilinu v PBS pufru ($c_{\text{AMP}} = 1000 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Výsledky měření jsou ilustrovány na Obrázku 35.



Obrázek 35: Záznam z SWV měření roztoku ampicilinu v PBS na GCE elektrodě modifikované NG o koncentraci $0,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (oranžová křivka), $1,0 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (zelená křivka), $1,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (tmavě modrá křivka), $2,0 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (světle modrá křivka), $2,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (červená křivka), $3,0 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (černá křivka)

Při vyhodnocování výsledků byla opět posuzována oblast grafu v rozmezí 0,2–0,4 V, kde se vyskytuje pík ampicilinu. Z grafu je patrné, že v této oblasti se odezva elektrod zvyšuje se zvyšující se koncentrací NG – nejvyšší proudové hodnoty ($1,98 \text{ μA}$) je dosaženo při koncentraci $3,0 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Toto pozorování velmi dobře reflektuje dobrou vodivost testovaného materiálu (Šedajová a kol.³⁵), kdy se zvyšující se koncentrací materiálu deponovaného na povrchu pracovní elektrody se zvyšuje i proudová odezva při stanovení ampicilinu.

Při volbě nejvhodnější koncentrace NG pro aplikace jsou, stejně jako u volby materiálu, třeba brát v úvahu také vhodné mechanické vlastnosti vytvořené vrstvy. Film tvořený NG o koncentraci $0,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ byl pro jakékoliv aplikace zcela nevyhovující, jelikož pokrýval pouze okrajové části elektrody (důsledek malého množství materiálu, kdy koncentrace suspenze $0,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ odpovídá finální koncentraci $5 \mu\text{g}$ deponovaného materiálu na povrchu pracovní elektrody). Vrstva NG o koncentraci $1,0 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ rovněž nepokrývala celý povrch elektrody. Z grafu je patrné, že tyto dvě koncentrace nezvyšovaly proudovou odezvu elektrod tak výrazně jako zbytek vzorků (v daném rozmezí napětí dosahovalo maximum odezvy cca $0,27 \mu\text{A}$ u koncentrace $0,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $0,24 \mu\text{A}$ u koncentrace $1,0 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$).

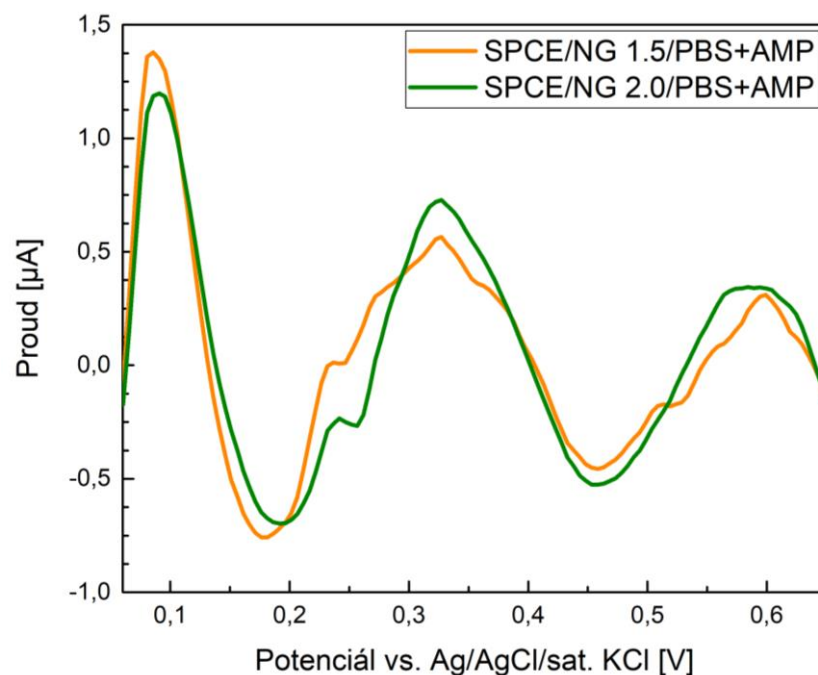
Vrstva NG o koncentraci $1,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ již pokrývala celý povrch pracovní elektrody. Tento film byl tvořen homogenní vrstvou materiálu s povrchem bez výraznějších defektů či nepravidelností. Film tvořený NG o koncentraci $2,0 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ měl velice podobné vlastnosti, tvořil uniformní vrstvu. Tyto dvě koncentrace oproti dvěma nižším již zvyšovaly odezvu znatelněji ($0,62 \mu\text{A}$ u koncentrace $1,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $1,10 \mu\text{A}$ u koncentrace $2,0 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Film tvořený NG o koncentraci $2,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ pokrýval celou plochu pracovní elektrody. Na povrchu se však nacházela vypouklá místa a v některých případech vrstvy materiálu z povrchu elektrod odpadávaly. Film tvořený NG o koncentraci $3,0 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ měl velice podobné vlastnosti. Důvodem horších mechanických vlastností je přebytek materiálu na elektrodě, kdy velikost přitažlivých sil mezi jednotlivými vrstvami není dostatečná a tyto vrstvy se oddělují. Tyto dvě koncentrace oproti zbytku souboru vykazovaly nejvyšší odezvu ($1,66 \mu\text{A}$ u koncentrace $2,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $1,98 \mu\text{A}$ u koncentrace $3,0 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$).

S ohledem na všechny faktory zmíněné v kapitolách 4.3 a 4.4 (výše odezvy, mechanické vlastnosti filmu, směrodatná odchylka) byl jako materiál vhodný pro potenciální aplikace zvolen dusíkem dopovaný grafen NG o koncentraci v rozmezí $1,5\text{--}2,0 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

4.5 Testování odezvy SPCE elektrod pokrytých vrstvou NG

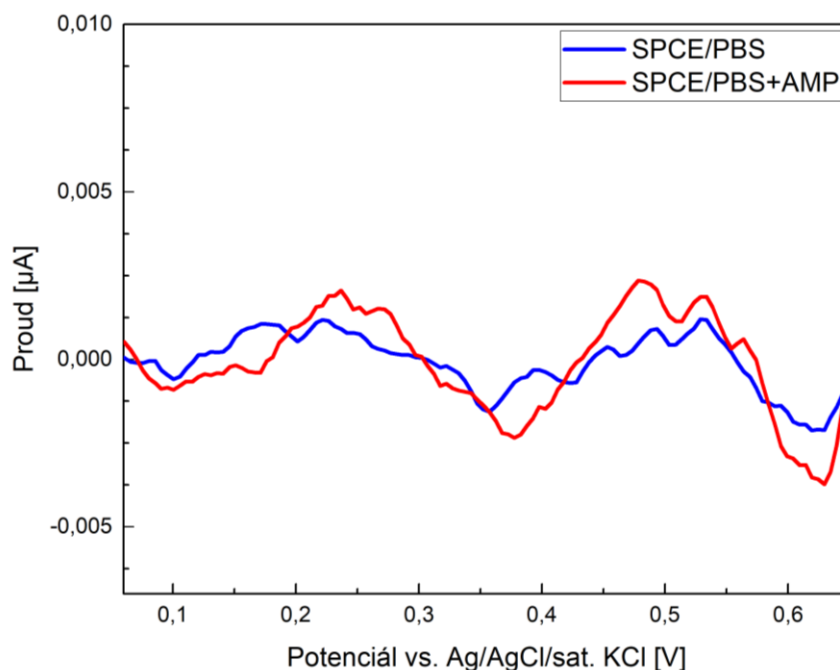
Posledním krokem bylo otestování vlivu vrstvy materiálu NG s optimalizovanými parametry na odezvu SPCE elektrod, které byly použity v prvotních měřeních (kapitoly 4.1 a 4.2). Za tímto účelem byly na pracovní elektrody nanášeny vrstvy NG o koncentracích $1,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $2,0 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ opět metodou tzv. drop-coating. Výsledky těchto měření jsou ilustrovány na Obrázku 36.



Obrázek 36: Záznam z SWV měření roztoku ampicilinu v PBS na SPCE elektrodě modifikované NG o koncentraci $1,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (oranžová křivka) a $2,0 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (zelená křivka)

Z grafu je patrné, že NG zvyšuje odezvu SPCE elektrod obdobným způsobem jako u GCE elektrod. Výše odezvy ve sledované oblasti $0,3\text{--}0,4 \text{ V}$ se zvyšuje se zvyšující se koncentrací materiálu (cca $0,57 \text{ }\mu\text{A}$ u koncentrace $1,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $0,73 \text{ }\mu\text{A}$ u koncentrace $2,0 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), což je v souladu se závěry z kapitoly 4.4. Filmy tvořené NG o těchto dvou koncentracích na SPCE elektrodách měly podobnou kvalitu jako na GCE elektrodách.

Další skutečností patrnou z grafu je však také to, že v záznamu se nevyskytuje výraznější pík ampicilinu, což potvrzuje také srovnání záznamů měření roztoku ampicilinu v PBS pufru a roztoku pouze PBS pufru. Ani s opětovnou změnou systému elektrod na původní SPCE systém tedy nedošlo k úspěšné detekci ampicilinu, jako tomu bylo v kapitole 4.2, kde byl ampicilin detekován metodou SWV na nemodifikovaných SPCE elektrodách. Tyto výsledky podporují teorii, že v průběhu experimentů došlo k degradaci ampicilinu, která způsobila zánik signálu. Ve snaze potvrdit tuto teorii byla ještě jednou provedena měření roztoku ampicilinu v PBS pufru ($c_{\text{AMP}} = 1000 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) a samotného PBS pufru metodou SWV na SPCE elektrodách. Tato měření byla shodná s těmi v kapitole 4.2. Výsledky jsou ilustrovány na Obrázku 37.



Obrázek 37: Záznam z SWV měření roztoku PBS (modrá křivka) a ampicilinu v PBS (červená křivka) na SPCE elektrodě

Z grafu je patrné, že křivky mají velmi podobný profil a v záznamu nelze pozorovat dříve zaznamenaný pík ampicilinu. Červená křivka představuje měření roztoku PBS, ve kterém byl ampicilin rozpuštěn. Srovnáním záznamů měření PBS pufru metodou SWV na SPCE elektrodách z kapitol 4.5 (Obrázek 37) a 4.2 (Obrázek 32) bylo zjištěno, že se jedná o takřka shodné záznamy. Problém tedy v tomto případě nebyl v použitém systému elektrod nebo v nanášení materiálu na jejich povrch, ale v samotném roztoku antibiotika. Tímto měřením bylo potvrzeno, že v průběhu experimentů došlo ke strukturálním změnám ampicilinu, které znemožnily jeho následnou detekci. Tato skutečnost však neměla důsledky na testování vlivu materiálů na odezvu elektrod, jelikož měřený roztok měl ve všech případech stejné složení.

5 ZÁVĚR

Tato práce se zabývala problematikou elektrochemické detekce antibiotika ampicilinu a využití derivátů grafenu v tomto procesu. Jako nejvhodnější z elektrochemických metod byla zvolena square-wave voltametrie, jelikož vykazovala největší proudové odezvy v píku přisouzeném ampicilinu. Prvotní měření zároveň ukázala, že ampicilin lze detekovat jak tištěnými uhlíkovými elektrodami (SPCE), tak tříelektrodovým zapojením s elektrodami ze skelného uhlíku (GCE).

Měřením roztoku ampicilinu elektrodami modifikovanými vrstvou deponovaného materiálu bylo zjištěno, že všechny čtyři testované deriváty grafenu prokazatelně zvyšují odezvu elektrod. S ohledem na kombinaci faktorů, jako jsou mechanické vlastnosti nanosené vrstvy, výše odezvy a reprodukovatelnost měření, byl jako materiál nejvhodnější pro potenciální aplikace vybrán dusíkem dopovaný grafen (NG).

Dále byl testován vliv různých koncentrací tohoto materiálu na odezvu elektrod. Bylo zjištěno, že se zvyšující se koncentrací se zvyšuje také proudová odezva. Jako nejvhodnější byly zvoleny koncentrace 1,5 a 2 mg·ml⁻¹. Suspenze NG o nižších koncentracích neobsahovaly dostatek materiálu na pokrytí celého povrchu elektrod, zatímco suspenze NG o vyšších koncentracích poskytovaly filmy s horšími mechanickými vlastnostmi.

Ačkoliv v průběhu experimentů došlo ke ztrátě signálu ampicilinu, pravděpodobně v důsledku degradace, výsledky tímto ovlivněny nebyly. Měřený roztok měl ve všech případech stejné složení a výsledky tak mohly být mezi sebou srovnávány. Ztráta signálu může být v budoucnu vyřešena dodáním nových vzorků ampicilinu či použitím jiných, citlivějších metod detekce, např. aptasenzorů, které využívají specifickou jednovláčkovou DNA jako prvek pro rozpoznání cílové molekuly. Závěry této práce mohou být využity při konstrukci elektrochemických senzorů pro detekci nejen ampicilinu, ale také dalších polutantů a patogenů včetně rezistentních bakterií, které produkci hydrolyzujících enzymů antibiotika rozkládají.

6 SUMMARY

The aim of this bachelor thesis was the electrochemical determination of the antibiotic ampicillin and the application of various graphene derivatives in this process. Square-wave voltammetry was chosen as the most suitable electrochemical method, since it exhibited the largest current response of ampicillin. Initial measurements also showed that ampicillin could be detected by both screen-printed carbon electrodes (SPCEs) and a three-electrode system equipped with glassy carbon working electrodes (GCEs).

All graphene derivatives tested proved the ability to boost the current response during the voltammetric determination of ampicillin. Considering a combination of factors such as the mechanical properties of the deposited layer, the enhancement of current response and the reproducibility of the measurements, nitrogen-doped graphene (NG) was selected as the material most suitable for potential applications.

Furthermore, the effect of different concentrations of this material on the electrode response was tested. It has been found that higher concentration of NG has a positive impact on the current response. The concentrations of 1.5 and 2 mg·ml⁻¹ were chosen as the most suitable. Lower concentrations of NG did not contain suitable amount of material to cover the entire surface of working electrode, while suspensions of NG with higher concentrations provided films with weak mechanical properties.

As apparent from results, the signal of ampicillin disappeared during the experiments, probably due to the degradation of this antibiotic. However, results were not affected by this phenomenon. The tested solution had the same composition in all cases and thus the results could be compared with each other. The loss of ampicillin signal can be addressed by supplying new ampicillin samples or by using different detection methods including for instance aptasensors that use specific single-stranded DNA as an element able to recognise the target molecule. The findings of this work can be used in the design of electrochemical sensors to detect not only ampicillin but also other pollutants and pathogens, including resistant bacteria that degrade antibiotics by producing hydrolyzing enzymes.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Lima L. M., Silva B. N. M. D., Barbosa G., Barreiro E. J. β -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2020;208:112829.
2. Kaushik D., Mohan M., Borade D. M., Swami O. C. Ampicillin: Rise fall & resurgence. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2014;8(5):ME01-3.
3. Lan L., Yao Y., Ping J., Ying Y. Recent advances in nanomaterial-based biosensors for antibiotics detection. *Biosensors and Bioelectronics*. 2017;91:504-514.
4. Govindhan M., Adhikari B. R., Chen A. Nanomaterials-based electrochemical detection of chemical contaminants. *RSC Advances*. 2014;4(109):63741-63760.
5. Poole K. Resistance to β -lactam antibiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2004;61(17):2200-2223.
6. Sharma S., Singh N., Tomar V., Chandra R. A review on electrochemical detection of serotonin based on surface modified electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*. 2018;107:76-93.
7. Aragay G., Merkoçi A. Nanomaterials application in electrochemical detection of heavy metals. *Electrochimica Acta*. 2012;84:49-61.
8. Chen D., Tang L., Li J. Graphene-based materials in electrochemistry. *Chemical Society Reviews*. 2010;39(8):3157-3180.
9. Brownson D. A. C, Banks C. E. *The Handbook of Graphene Electrochemistry*. Springer; 2014.
10. Allen M. J., Tung V. C., Kaner R. B. Honeycomb carbon: A review of graphene. *Chemical Reviews*. 2010;110(1):132-145.
11. Georgakilas V., Perman J. A., Tucek J., Zboril R. Broad Family of Carbon Nanoallotropes: Classification, Chemistry, and Applications of Fullerenes, Carbon Dots, Nanotubes, Graphene, Nanodiamonds, and Combined Superstructures. *Chemical Reviews*. 2015;115(11):4744-4822.
12. Singh V., Joung D., Zhai L., Das S., Khondaker S. I., Seal S. Graphene based materials: Past, present and future. *Progress in Materials Science*. 2011;56(8):1178-1271.
13. Huang X., Yin Z., Wu S., et al. Graphene-based materials: Synthesis, characterization, properties, and applications. *Small*. 2011;7(14):1876-1902.

14. Kuila T., Bose S., Mishra A. K., Khanra P., Kim N. H., Lee J. H. Chemical functionalization of graphene and its applications. *Progress in Materials Science*. 2012;57(7):1061-1105.
15. Novoselov K. S., Geim A. K., Morozov S. V., et al. Electric field in atomically thin carbon films. *Science*. 2004;306(5696):666-669.
16. Choi W., Lahiri I., Seelaboyina R., Kang Y.S. Synthesis of graphene and its applications: A review. *Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences*. 2010;35(1):52-71.
17. Ferrari A. C., Bonaccorso F., Fal'ko V., et al. Science and technology roadmap for graphene, related two-dimensional crystals, and hybrid systems. *Nanoscale*. 2015;7(11):4598-4810.
18. Novoselov K.S., Fal'Ko V. I., Colombo L., Gellert P. R., Schwab M. G., Kim K. A roadmap for graphene. *Nature*. 2012;490(7419):192-200.
19. Papageorgiou D. G., Kinloch I. A., Young R. J. Mechanical properties of graphene and graphene-based nanocomposites. *Progress in Materials Science*. 2017;90:75-127.
20. Perreault F., Fonseca De Faria A., Elimelech M. Environmental applications of graphene-based nanomaterials. *Chemical Society Reviews*. 2015;44(16):5861-5896.
21. Weiss N.O., Zhou H., Liao L., et al. Graphene: An emerging electronic material. *Advanced Materials*. 2012;24(43):5782-5825.
22. Andrei E. Y., Li G., Du X. Electronic properties of graphene: A perspective from scanning tunneling microscopy and magnetotransport. *Reports on Progress in Physics*. 2012;75(5):056501.
23. Justino C. I. L., Gomes A. R., Freitas A. C., Duarte A. C., Rocha-Santos T. A. P. Graphene based sensors and biosensors. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 2017;91:53-66.
24. Zhu J., Yang D., Yin Z., Yan Q., Zhang H. Graphene and graphene-based materials for energy storage applications. *Small*. 2014;10(17):3480-3498.
25. Song Y., Luo Y., Zhu C., Li H., Du D., Lin Y. Recent advances in electrochemical biosensors based on graphene two-dimensional nanomaterials. *Biosensors and Bioelectronics*. 2016;76:195-212.
26. Sarno M. Nanotechnology in energy storage: The supercapacitors. *Studies in Surface Science and Catalysis*. 2019;179:431-458.

27. Mohan V. B., Lau K. T., Hui D., Bhattacharyya D. Graphene-based materials and their composites: A review on production, applications and product limitations. *Composites Part B: Engineering*. 2018;142:200-220.
28. Georgakilas V., Otyepka M., Bourlinos A. B., et al. Functionalization of graphene: Covalent and non-covalent approaches, derivatives and applications. *Chemical Reviews*. 2012;112(11):6156-6214.
29. Chronopoulos D. D., Bakandritsos A., Pykal M., Zbořil R., Otyepka M. Chemistry, properties, and applications of fluorographene. *Applied Materials Today*. 2017;9:60-70.
30. Bottari G., Ángeles Herranz M., Wibmer L., et al. Chemical functionalization and characterization of graphene-based materials. *Chemical Society Reviews*. 2017;46(15):4464-4500.
31. Miró P., Audiffred M., Heine T. An atlas of two-dimensional materials. *Chemical Society Reviews*. 2014;43(18):6537-6554.
32. Eigler S., Hirsch A. Chemistry with graphene and graphene oxide - Challenges for synthetic chemists. *Angewandte Chemie - International Edition*. 2014;53(30):7720-7738.
33. Tang Q., Zhou Z., Chen Z. Graphene-related nanomaterials: Tuning properties by functionalization. *Nanoscale*. 2013;5(11):4541-4583.
34. Bakandritsos A., Pykal M., Boński P., et al. Cyanographene and Graphene Acid: Emerging Derivatives Enabling High-Yield and Selective Functionalization of Graphene. *ACS Nano*. 2017;11(3):2982-2991.
35. Šedajová V., Bakandritsos A., Błoński P., et al. Nitrogen doped graphene with diamond-like bonds achieves unprecedented energy density at high power in a symmetric sustainable supercapacitor. *Energy and Environmental Science*. 2022;15(2):740-748.
36. Heng Cheong Y., Nasir M. Z. M., Bakandritsos A., et al. Cyanographene and Graphene Acid: The Functional Group of Graphene Derivative Determines the Application in Electrochemical Sensing and Capacitors. *ChemElectroChem*. 2019;6(1):229-234.
37. Scholz F. Voltammetric techniques of analysis: the essentials. *ChemTexts*. 2015;1(4).
38. Monzó J., Insua I., Fernandez-Trillo F., Rodriguez P. Fundamentals, achievements and challenges in the electrochemical sensing of pathogens. *Analyst*. 2015;140(21):7116-7128.
39. Marken F., Neudeck A., Bond A. M. Cyclic voltammetry. In: *Electroanalytical Methods: Guide to Experiments and Applications*. Springer; 2010:57-106.
40. Mirceski V., Skrzypek S., Stojanov L. Square-wave voltammetry. *ChemTexts*. 2018;4(4).

41. Arduini F., Micheli L., Moscone D., et al. Electrochemical biosensors based on nanomodified screen-printed electrodes: Recent applications in clinical analysis. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 2016;79:114-126.
42. Vacek J., Ostatná V. *Bioelektrochemie*. Univerzita Palackého v Olomouci; 2020.
43. Kim T., Choi W., Shin H. C., et al. Applications of voltammetry in lithium ion battery research. *Journal of Electrochemical Science and Technology*. 2020;11(1):14-25.
44. Wang J. *Analytical Electrochemistry*. 3rd ed. Wiley-VCH; 2006.
45. Chooto P. Cyclic Voltammetry and Its Applications. In: *Voltammetry*. IntechOpen; 2019:1-14.
46. Mirceski V., Gulaboski R., Lovric M., Bogeski I., Kappl R., Hoth M. Square-Wave Voltammetry: A Review on the Recent Progress. *Electroanalysis*. 2013;25(11):2411-2422.
47. Chen A., Shah B. Electrochemical sensing and biosensing based on square wave voltammetry. *Analytical Methods*. 2013;5(9):2158-2173.
48. Lovrić M. Square-wave voltammetry. In: *Electroanalytical Methods: Guide to Experiments and Applications*. Springer; 2010:121-145.
49. Justino C. I. L., Duarte A. C., Rocha-Santos T. A. P. Critical overview on the application of sensors and biosensors for clinical analysis. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 2016;85:36-60.
50. Kuss S., Amin H. M. A., Compton R. G. Electrochemical Detection of Pathogenic Bacteria - Recent Strategies, Advances and Challenges. *Chemistry - An Asian Journal*. 2018;13(19):2758-2769.
51. Pourmadadi M., Shayeh J. S., Omidi M., Yazdian F., Alebouyeh M., Tayebi L. A glassy carbon electrode modified with reduced graphene oxide and gold nanoparticles for electrochemical aptasensing of lipopolysaccharides from *Escherichia coli* bacteria. *Microchimica Acta*. 2019;186(12):787.
52. Asadian E., Shahrokhian S., Iraj Zad A., Ghorbani-Bidkorpbeh F. Glassy carbon electrode modified with 3D graphene-carbon nanotube network for sensitive electrochemical determination of methotrexate. *Sensors and Actuators, B: Chemical*. 2017;239:617-627.
53. Boonkaew S., Chaiyo S., Jampasa S., Rengpipat S., Siangproh W., Chailapakul O. An origami paper-based electrochemical immunoassay for the C-reactive protein using a screen-printed carbon electrode modified with graphene and gold nanoparticles. *Microchimica Acta*. 2019;186(3):153.

54. Shi L., Niu X., Liu T., Zhao H., Lan M. Electrocatalytic sensing of hydrogen peroxide using a screen printed carbon electrode modified with nitrogen-doped graphene nanoribbons. *Microchimica Acta*. 2015;182(15-16):2485-2493.
55. Katzung B. G., Vanderah T. W. *Basic & Clinical Pharmacology*. 15th ed. McGraw-Hill; 2021.
56. Finch R. G., Greenwood D., Norrby S. R., Whitley R. J. *Antibiotic and Chemotherapy: Anti-Infective Agents and Their Use in Therapy*. 9th ed. Saunders/Elsevier; 2010.
57. Hanwell M. D., Curtis D. E., Lonie D. C., Vandermeersch T., Zurek E., Hutchison G. R. Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of Cheminformatics*. 2012;4(1):17.
58. Rafailidis P. I., Ioannidou E. N., Falagas M. E. Ampicillin/sulbactam: Current status in severe bacterial infections. *Drugs*. 2007;67(13):1829-1849.
59. El Salabi A., Walsh T. R., Chouchani C. Extended spectrum β -lactamases, carbapenemases and mobile genetic elements responsible for antibiotics resistance in Gram-negative bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*. 2013;39(2):113-122.
60. Wang T., Yin H., Zhang Y., et al. Electrochemical aptasensor for ampicillin detection based on the protective effect of aptamer-antibiotic conjugate towards DpnII and Exo III digestion. *Talanta*. 2019;197:42-48.
61. Taghdisi S. M., Danesh N. M., Nameghi M. A., Ramezani M., Alibolandi M., Abnous K. An electrochemical sensing platform based on ladder-shaped DNA structure and label-free aptamer for ultrasensitive detection of ampicillin. *Biosensors and Bioelectronics*. 2019;133:230-235.
62. Hamami M., Bouaziz M., Raouafi N., Bendounan A., Korri-Youssoufi H. MoS₂/ppy nanocomposite as a transducer for electrochemical aptasensor of ampicillin in river water. *Biosensors*. 2021;11(9):311.
63. Esmaelpourfarkhani M., Abnous K., Taghdisi S. M., Chamsaz M. A novel turn-off fluorescent aptasensor for ampicillin detection based on perylenetetracarboxylic acid diimide and gold nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*. 2020;164:112329.
64. Shrivastava K., Sahu J., Maji P., Sinha D. Label-free selective detection of ampicillin drug in human urine samples using silver nanoparticles as a colorimetric sensing probe. *New Journal of Chemistry*. 2017;41(14):6685-6692.
65. Castillo-García M. L., Aguilar-Caballos M. P., Gómez-Hens A. Determination of veterinary penicillin antibiotics by fast high-resolution liquid chromatography and luminescence detection. *Talanta*. 2017;170:343-349.