

U n i v e r z i t a P a l a c k é h o v O l o m o u c i

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální chemie

Elektrochemické přeměny tyrosinu, tryptofanu a proteinů na  
pevných elektrodách a mikroelektrodách

Bakalářská práce

Autor:  
Školitel:

Šimon Lindovský  
doc. RNDr. Jan Hrbáč, Ph.D.

Studijní program:  
Studijní obor:  
Forma studia:

B 1407 Chemie  
Aplikovaná chemie  
prezenční

Olomouc 2013

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry fyzikální chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne .....

.....  
Vlastnoruční podpis

## Poděkování

Chtěl bych poděkovat svému vedoucímu doc. RNDr. Janu Hrbáčovi Ph.D. za nabídnutí tématu a odborné vedení mé práce, především pak za trpělivost a pomoc při vypracovávání teoretické i experimentální části. Poděkování patří také Mgr. Petru Jakubcovi a Mgr. Vladimíru Halouzkovi za jejich pomoc a cenné rady. Děkuji i kolektivu laboratoře SEM při Centru výzkumu nanomateriálů za pořízení snímku vlákna.

## **Bibliografická identifikace**

Jméno a příjmení autora:	Šimon Lindovský
Název práce:	Elektrochemické přeměny tyrosinu, tryptofanu a proteinů na pevných elektrodách a mikroelektrodách
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra fyzikální chemie
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Jan Hrbáč, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2013
Abstrakt:	Cílem této práce bylo prozkoumat vhodnost použití mikroelektrod z uhlíkových vláken pro elektroanalýzu proteinů na základě oxidace aminokyselin (Cys, Tyr, Trp).
Klíčová slova:	Uhlíkové vlákno, aminokyseliny, BSA, elektroforetická depozice uhlíku, adsorpce, voltametrie
Počet stran:	44
Jazyk:	Český

## **Bibliografic identification**

Author's first name and surname: Šimon Lindovský

Title: Electrochemical transformations of tyrosine, tryptophan and proteins on solid electrodes and microelectrodes

Department: Department of Physical Chemistry

Type of thesis: Bachelor

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

The year of presentation: 2013

Abstract: The aim of this thesis was to make an attempt to electrooxidize protein (oxidation of amino acids) on the carbon fiber microelectrodes.

Keywords: Carbon fiber, amino acids, BSA, electrophoretic deposition of carbon, adsorption, voltammetry

Number of pages: 44

Language: Czech

## Obsah

1.	Úvod.....	7
2.	Teoretická část .....	8
2.1.2.	Oxidace a redukce aminokyselin .....	10
2.1.3.	Adsorpce proteinů.....	12
2.1.4.	BSA – hovězí sérový albumin .....	14
2.2.	Cyklická voltametrie, square-wave voltametrie .....	16
2.3.	Elektrodové materiály využívané při studiu proteinů.....	18
2.4.	Elektroforetická depozice uhlíku .....	20
3.	Experimentální část.....	22
3.1.	Přístrojové vybavení .....	22
3.2.	Chemikálie .....	23
3.3.	Elektroforetická depozice grafenu .....	23
3.4.	Voltametrická měření .....	24
4.	Výsledky a diskuse .....	26
4.1.	Voltametrická měření na elektrodě ze skelného uhlíku.....	26
4.1.1.	Adsorpce BSA na elektrodě ze skelného uhlíku.....	26
4.1.2.	Chování elektroaktivních aminokyselin na skelném uhlíku.....	27
4.1.3.	Voltametrická měření BSA na skelném uhlíku .....	29
4.2.	Uhlíková vlákna.....	33
4.2.1.	Adsorpce BSA na mikroelektrodě z uhlíkového vlákna.....	33
4.2.2.	Chování elektroaktivních aminokyselin na uhlíkovém vlákně.....	34
4.2.3.	Voltametrická měření BSA na uhlíkovém vlákně (mikroelektroda) .....	35
5.	Závěr .....	39
6.	Summary.....	40

## 1. Úvod

Proteiny jsou předmětem zájmu elektrochemiků již od 30. let 20. století. Nejprve byly experimenty s proteiny prováděny na rtuťové elektrodě a postupem času byly vynalézány různé nové postupy zkoumání ve spojení s různými druhy elektrodových materiálů. Od 70. let 20. století jsou studovány oxidace proteinů (oxidaci podléhají aminokyseliny tyrosin, tryptofan a cystein) na elektrodách ze skelného uhlíku. To je druh elektrody, který je svými výbornými mechanickými vlastnostmi a snadným očištěním povrchu velmi vhodný ke zkoumání adsorpce a především redoxního chování elektroaktivních proteinů.

V současnosti mají velký potenciál mikroelektrody, které ve spojení s elektrochemickými stanoveními jsou velmi vhodné k měření *in vivo*. Využívána jsou především uhlíková vlákna, o kterých je však známo, že neposkytují oxidační signály kvůli omezeně probíhající adsorpci proteinů. Cílem této práce bylo nalézt modifikaci povrchu elektrody, která by umožnila odstranit nízkou schopnost povrchu uhlíkového vlákna adsorbovat proteiny. K tomu bylo využito elektroforetické depozice uhlíku, vedoucí k modifikaci povrchu vrstvou grafenu. Modelovým proteinem byla globulární bílkovina hovězí sérový albumin (BSA), obsahující elektroaktivní aminokyseliny tryptofan, tyrosin a cystein. Použitými elektrochemickými metodami byly: cyklická voltametrie, cyklická voltametrie s transferem a square wave voltametrie. Pro srovnání byly prováděny experimenty i s elektrodou ze skelného uhlíku.

## 2. Teoretická část

### 2.1. Elektrochemie proteinů

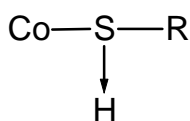
#### 2.1.1. Katalytické procesy

V třicátých letech 20. století bylo v Heyrovského laboratoři objeveno [1], že proteiny na polarografické vlně produkují před vlnou sodných iontů vlnu asi o 0,3 V pozitivnější, tzv. praenatriovou vlnu, a to díky katodickému vylučování vodíku na kapající rtuťové elektrodě (*dropping mercury electrode, DME*). Tato vlna byla nedostatečně rozvinutá a byla velmi blízko šumu pozadí, proto se myslelo, že bude mít malé analytické využití [2], [3]. O padesát let později bylo zjištěno chrono-potenciometrickou rozpouštěcí analýzou (*chronopotentiometric stripping analysis, CPSA*) a visící rtuťovou kapkovou elektrodou (*hanging mercury drop electrode, HMDE*) za využití konstantního proudu, že peptidy a proteiny poskytují charakteristický pík při negativních potenciálech za nanomolárních i subnanomolárních koncentrací [2]. Tento pík, podobně jako pík praenatriový, má základ v katodickém vylučování vodíku a byl označen jako H pík (H podle chemika Jaroslava Heyrovského, vysoké citlivosti (High sensitivity) či vylučování vodíku (Hydrogen evolution). Nedávno bylo objeveno, že H pík je citlivý k celkovým i místním konformačním změnám bílkovin. Při vhodných podmínkách umožňuje rozeznat denaturované, redukované či agregované formy proteinů od jejich nativních stavů, stejně jako rozeznání mutovaných forem od forem původních [2]. Mechanismus tohoto děje může být znázorněn následovně: proton  $H^+$ , odštěpený z BH (kyselé části roztoku), reaguje se záporně nabitým povrchem rtuti ( $B-H \leftrightarrow B^- + H^+$ ;  $H^+ + e^- \leftrightarrow (H)_s$ ). Katalyticky aktivní skupina  $-X^-$  ve své protonizované formě  $-X-H$  je kyslejší než skupina B-H a při mnohem nižších koncentracích je adsorbována na elektrodu nebo ve fyzickém kontaktu s ní ( $(-X-H)_{el}$ ), a také odštěpuje proton ( $(-X-H)_{el} \leftrightarrow (-X)_{el} + H^+$ ;  $H^+ + e^- \leftrightarrow (H)_s$ ). Při určitém negativním potenciálu se vodíkové atomy navázané na povrchu sloučí a oddělí se od elektrody ve formě molekuly vodíku ( $2(H)_s \rightarrow H_2$ ). Deprotonizovaná forma  $(-X)_{el}$  se obnoví pomocí skupin B-H, které jsou v roztoku v nadbytku ( $(-X)_{el} + B-H \leftrightarrow (-X-H)_{el} + B$ ). Výsledkem je, že „kyselá komponenta“ B-H je elektroredukována za vývoje plynného vodíku při napětí, které je méně negativní než při nepřítomnosti katalyzátoru  $-X-H$



na elektrodě. Při praeatriovém proudu je nosičem katalyzátoru protein, obsahující několik skupin  $-X-H$ . V okolí záporně nabitých elektrod je pro katalytický proces účinnou složkou kyseliny BH v roztoku amonný kation ( $NH_4^+$ ) [4].

Reakce katodického vylučování vodíku a její reversní podoba vzbuzují velký zájem mezi elektrochemiky, a to nejen tím, že jsou typickými metodami pro porozumění základním mechanismům elektrochemických reakcí, ale i tím, že mají zásadní význam pro budoucí využití v technologiích palivových článků či rostlinné výrobě vodíku. Zcela přirozeně je bioelektrokatalýza vodíku zaměřena na katalytické vlastnosti enzymů hydrogenas a jejich složek, zda jsou rozpustné v roztoku nebo zablokovány na povrchu elektrod. Přestože jsou hydrogenasy mezi proteiny nejzřejmějšími adepty pro výrobu vodíku, je známo, že mnoho, ale ne všechny bílkoviny, jsou schopny za jistých podmínek katalyzovat při vylučování vodíku. Tomuto však toho času nebyla věnována dostatečná pozornost, oproti související, byť odlišné, „Brdičkově reakci“ proteinů obsahujících cystein. Tyto proteiny poskytují dvojitou vlnu v přítomnosti iontů kobaltu (výška této vlny je přímo úměrná počtu cysteinových částí v molekule, ne žádných jiných skupin) [3], [4]. Vlna dosahuje při napětí 200 mV pozitivnějších hodnot proudu než vlna praeatriová, proto může být přesněji měřena a studována [5]. Jedná se zde o to, že atom síry z  $-SH$  skupiny je navázán na kobalt (je možno též na nikl) v komplexu a jeho vodíkový atom je aktivován jak k zapojení se do elektrodového procesu vyloučení vodíku, tak i k obnovení donoru protonu v roztoku. Katalyticky aktivní částí kobaltitého komplexu bude pravděpodobně struktura (viz Obr. 1) [4].



Obr. 1: Katalyticky aktivní část kobaltitého komplexu

Mezi Brdičkovou reakcí bílkovin a nízkomolekulárních thiolů byly brzy objeveny rozdílnosti. Zatímco proteiny dávají s chloridem hexamminkobaltitým stejný katalytický proud jako s chloridem kobaltnatým, nízkomolekulární thioly dávají buď malou, nebo žádnou odezvu. Tento rozdíl byl vysvětlen vytvořením silnějšího komplexu s kationem kobaltitým oproti kobaltnatému. Silnější komplex se může po své

úplné redukci zbavit všech ligandů a stát se katalyzátorem s –SH skupinou, to však jen tehdy, je-li umístěn na ochranné vrstvě proteinu adsorbovaného na elektrodě [4].

Katalytická elektroredukce vodíkových iontů není jediná možnost, jak proteiny vykazují aktivitu na kapající rtuťové elektrodě: 1) jako vysokomolekulární látky se adsorbují na povrchu rtuti během určitého napětí, které může být udržováno různými způsoby; 2) proteiny obsahující cystin poskytují redukční vlny disulfidických vazeb; 3) bílkoviny obsahující –SH skupinu reagují s ionty rtuti rozpuštěných z elektrody při pozitivních potenciálech a 4) mohou vázat různé ionty kovů z roztoků, ze kterých mohou být tyto kovy vyredukovány na elektrodě; 5) prostetické skupiny některých proteinů mohou být samy o sobě polarograficky aktivní, nicméně jejich pozice v bílkovinné struktuře rozhoduje, zda budou na elektrodě aktivní či neaktivní [4].

### 2.1.2. Oxidace a redukce aminokyselin

V 70. letech 20. století [6] se začala rozvíjet studia zabývající se oxidací elektroaktivních proteinů na jiných typech povrchů elektrod než rtuti (např. uhlík). V současnosti se tento výzkum opět dostává mezi elektrochemiky do popředí, a to především díky požadavku porozumět základním reakcím biomolekul, rozvoji metod k detekci proteinů na povrchu elektrod a za účelem výroby či inovací nových materiálů elektrod [7].

Obecně vzato jsou elektrochemické reakce proteinů založeny na redoxních přeměnách kovového iontu nebo elektroaktivní aminokyseliny obsažených ve struktuře bílkoviny. Bílkoviny studované tímto způsobem se pohybují od malých, ve vodě rozpustných proteinů, po velké enzymy s mnoha redoxními centry [8]. Můžeme říci, že cytochromy, proteiny obsahující měď, a FeS proteiny jsou dobře známy a vyhledávány jak v elektrochemii, tak i biochemii, zatímco výzkumy větších proteinů, neobsahujících ve své struktuře kovový ion (např. albuminu), jsou prováděny velmi málo. Omezený počet publikací není jen kvůli složitosti struktury těchto proteinů, ale také kvůli silné adsorpci proteinů na povrchu elektrod, která může vést ke změně signálu a zároveň tak i k nepředvídatelnosti a nereprodukovatelnosti výsledků, proto je signál těžko využitelný pro detekční metody [7]. Elektrochemické metody ke zkoumání přenosu elektronu (*DET – direct electron transfer*) v kovových nebo jiných neproteinových centrech proteinů by měly splňovat následující kritéria: 1) přenos

elektronu by měl co nejrychlejší a vratný (reversibilní) a 2) nemělo by docházet k denuraci proteinu na povrchu a k narušení jeho charakteristických biologických vlastností (např. enzymatická aktivita, sérologické vlastnosti) [8].

V 80. letech 20. století objevily nezávisle na sobě skupiny českých [9] a francouzských [10] vědců, že aminokyseliny tyrosin (Tyr) a tryptofan (Trp) jsou elektroaktivní (oxidativní) na uhlíkových elektrodách. Bylo zjištěno, že mezi aminokyselinami obvykle se vyskytujícími v bílkovinách, dávají voltametrické oxidační píky jak ve stavu volném tak i navázaném jen aminokyseliny: tryptofan, tyrosin, histidin, methion a cystein. Žádné jiné aminokyseliny, do bílkoviny včleněné, při pH rozsahu od 4 do 10 neposkytují tyto píky. U tryptofanu je náchylný k oxidaci indolový kruh, u tyrosinu elektrooxidaci zahrnuje výměna jednoho elektronu a protonu (podobnost vůči procesům na elektrodě zodpovědným za elektrooxidaci jednoduchých *p*-substituovaných fenolů) [8]. Aminokyselina cystein je oxidována na povrchu elektrody ve třech po sobě následujících reakcích. První zahrnuje oxidaci thiolové skupiny radikálem, kdy se jedná o nukleofilní reakci s vodou, která vede k vytvoření přechodného stavu, který je v druhé reakci oxidován na kyselinu 2-amino-3-sulfopropanovou. Oxidace –SH skupiny vede k vytvoření disulfidické vazby mezi dvěma podobnými zbytky cysteinů, které vytvoří cystin (dimerní aminokyselinu), jehož oxidace vede k získání vyšších potenciálů, což je zapříčiněno pevným kovalentním disulfidickým můstkem. Elektrooxidace methioninu probíhá na elektrodě ve dvou krocích, které odpovídají vytvoření sulfoxidu či sulfonu (zahrnuje adsorpci a protonaci/deprotonaci thiolové skupiny) a následné oxidaci [11]. Aminokyseliny, které jsou elektrochemicky aktivní, dávají pík v anodické oblasti (pozn. aut. pík není úplně přesné označení, neboť se nejedná o typický symetrický tvar píku, ale v elektrochemii se toto označení běžně používá). Při cyklické voltametrii elektroaktivních aminokyselin, prováděné při neutrálním pH (7,0-7,4), se oxidační píky těchto aminokyselin vyskytují při následujících potenciálech: tryptofan při 0,9 V, tyrosin při 0,95 V, cystein 0,7 V [6], methionin 1,35 V [9] (všechny vs. Ag/AgCl) a histidin při 1,2 V (vs. SCE) [12].

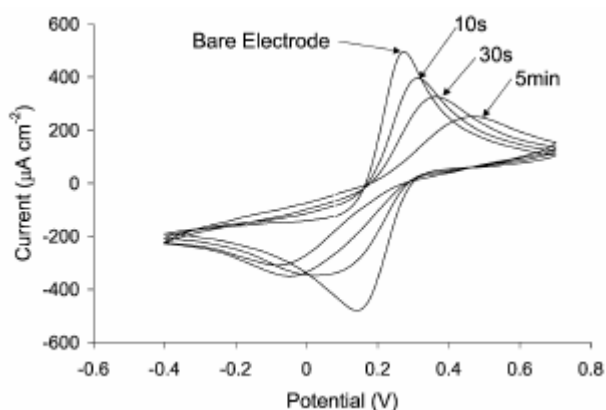
### 2.1.3. Adsorpce proteinů

Adsorpce je nejjednodušší metodou jak připevnit biomakromolekulu k povrchu, kdy nejsou zapotřebí žádná činidla či speciální modifikace. Je to velmi komplexní děj, který zahrnuje elektrostatické, hydrofobní i hydrofilní interakce, vodíkové můstky a dočasné dipólové momenty. Adsorpce proteinů na pevných površích je velmi zajímavá. Má využití např. při vývoji bisenzorů či analytických metod (např. v imunologii nebo při purifikaci proteinů) [14], [15]. Je známo, že adsorpcí proteinů na povrch elektrod je narušována elektrochemická analýza klinických vzorků. To může mít za následek změnu elektrochemického signálu na povrchu elektrody [16].

Rozhraní protein/pevný povrch elektrody byla zkoumána různými metodami jako např. infračervená či fluorescentní spektroskopie, radioaktivní značení nebo quartz crystal microbalance apod. Dnes se upřednostňují metody elektrochemické, a to především cyklická voltametrie a elektrochemická impedanční spektroskopie. Ty odhalují faradaické i nefaradaické procesy vyskytující se v blízkosti povrchu elektrody a mohou být použity k objasnění adsorpčních vlastností bílkovin na pevných elektrodách [14]. Adsorpce bílkovin vzbuzuje zájem díky složitosti celého systému a snaze detailně porozumět tomu, jak koncentrace proteinu, pufr, pH, iontová síla apod. ovlivňují tento děj. V posledních desetiletích byly provedeny mnohé studie s cílem objasnit vliv těchto podmínek a některé obecné rysy byly vysvětleny, byť účinek změn ať jednoho či více výše uvedených parametrů závisí ve značné míře na použité bílkovině [17]. Mimoto chemické a strukturní vlastnosti povrchů mají také velkou důležitost. Vliv stavby adsorpční vrstvy povrchu na adsorpci je studována, však bez valného úspěchu [17].

Biomakromolekuly, jako např. albuminy či DNA, mohou vytvářet filmy na elektrodovém povrchu v uspořádání povrch/makromolekula a může tak být studována termodynamika a kinetika biologických aktivit [18]. K popsání těchto adsorpčních dějů se často využívá změn v proudech u redoxní přeměny hexakynoželeznanat/hexa-kyanoželezitan ( $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ ) a odpovídajícího odporu při přenosu náboje [14], [16]. Nejčastěji se tento pokus provádí na elektrodě ze skelného uhlíku. Elektroda je očištěna na  $\alpha$ -alumině a opláchnuta destilovanou vodou. Poté se nechá naadsorbovat protein (v našem případě albumin) na elektrodu při pokojové teplotě a opláchně se opět destilovanou vodou, kdy se smyje

nenaadsorbovaný protein. Adsorpce se provádí v různých časech. Se zvyšujícím se časem se anodické a katodické píky snižují a zároveň dochází k posunu potenciálů (Obr. 2) [16]. Po adsorpci delší než 10 minut již nebyly píky spojené s oxidací hexakynoželeznanu rozlišitelné od pozadí, to znamená, že se redukční proud ustálil a proces přenosu elektronu je úplně zablokován. Tohoto je dosaženo změnou (snížením) rychlostní konstanty přenosu elektronu přes elektrodový povrch, který je pokryt inertní vrstvou proteinu. Tato vrstva pak vystupuje jako bariéra zamezující přístupu hexakynoželezitanových iontů k povrchu [16]. Proteinový film kontroluje kinetiku přenosu náboje spojenou s pozorovaným proudem. Pro vysvětlení dějů na povrchově upravených elektrodách jsou uváděny dva modely – dírkový a membránový model. Dírkový model předpokládá, že vrstva bílkoviny na elektrodě je nepropustná vyjma malých dírek, kterými mohou difundovat elektroaktivní molekuly, zatímco membránový model prezentuje film jako jednofázovou bariéru s určitou propustností [16].



Obr. 2: Porovnání cyklických voltamogramů na zlaté elektrodě po adsorpci HSA ( $100\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) v roztoku  $1\text{ mM K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  obsahujícím  $0,1\text{ M KNO}_3$  při různých časech adsorpce [16]

Když je elektroda vystavena proteinu v roztoku přímo, tak následně při měření dochází ke snížení reverzibility elektrodového děje [14]. Například v přítomnosti albuminu byl po přibližně 80 minutách potenciál při redukci posunut o  $75\text{ mV}$  níže a jemu odpovídající proud byl snížen o  $30\%$  v porovnání s měřením v roztoku bez albuminu [14]. Tento výsledek lze přičíst pouze přítomnosti vrstvy albuminu

na elektrodě, která brání přenosu elektronu mezi záporně nabitým hexakvanoželeznatanovým iontem a elektrodovým povrchem [16].

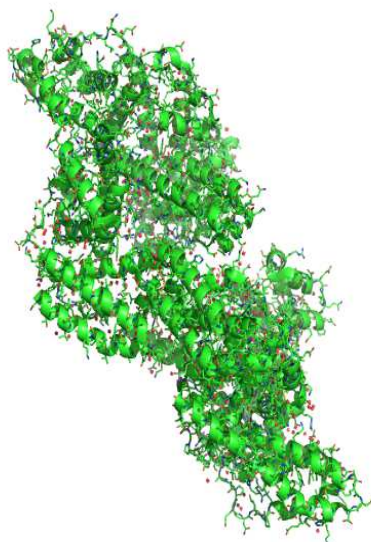
Jsou zkoumány různé modifikace povrchů elektrod, velmi často pokrytím polymerní vrstvou či nanočásticemi. Nespecifické navázání proteinů na elektrodu pokrytou polymerní vrstvou (např. monovrstvou alkanthiolu) velmi závisí na vlastnostech vrstvy včetně její polaritě a hydrofobicity. U bílkovin má adsorpční vlastnost, která je závislá i na stavbě povrchu, praktický význam, a to ve vztahu k biologickým jevům, např. protein – membránové interakce nebo adsorpce proteinů na povrchu buněk [19]. Su a kolektiv ve své práci [20] zkoumali adsorpci proteinu (albumin) na hydrofilním rozhraní oxid křemičitý/voda a zkoušeli koncentrační závislost povrchové vrstvy (nadbytku) albuminu při hodnotě pH blízké jeho isoelektrickému bodu. Povrchový přebytek albuminu existuje i při jeho nízkých objemových koncentracích, což svědčí o vysoké afinitě albuminu pro oxidované povrchy [15]. Patil a kolektiv ve svém bádání [21] zkoumali vliv zeta potenciálu nanočástic oxidu ceru na adsorpci albuminu. Výzkum dále ukázal, že adsorpce proteinu vzrůstá se vzrůstajícím zeta potenciálem. Toto dále potvrzuje to, že elektrostatické síly jsou primárními interakcemi pro adsorpci albuminu. Hlavním úkolem zůstává prozkoumání konformačního chování proteinů v komplexu protein/nanočástice, včetně změny jejich sekundární či terciální struktury, které mohou nastávat v důsledku adsorpce proteinu [15].

#### 2.1.4. BSA – hovězí sérový albumin

BSA (bovine serum albumin, hovězí sérový albumin) je velmi často používaný modelový protein ke zkoumání elektrochemických vlastností bílkovin. Je zástupcem tzv. sferoproteinů, tj. proteinů globulárních - kulovitých či elipsoidních tvarů, rozpustných ve vodě. BSA je tvořen z 585 aminokyselin o celkové hmotnosti 66 kDa ( $1 \text{ Da} = 1,66 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$ ) [23]. Za fyziologických podmínek je složen přibližně z 67 % z  $\alpha$ -helixů (sekundární struktura) [25], obsah  $\beta$ -listů je minimální (okolo 1%) [23]. Terciální struktura BSA má 3 hlavní domény, které mohou měnit své konformace při změně pH [25]. Jeho izoelektrický bod je při pH 4,7; to znamená, že v roztocích o pH 6,6; 7,6 a 8,6 nese negativní náboj. BSA má proto schopnost vázat reversibilně především záporně nabitě molekuly, to je hlavní důvod, proč je tak významným

nosičem [15]. Obsahuje 17 intramolekulárních disulfidických vazeb, které mají zásadní funkci udržení struktury stejně jako volná thiolová skupina Cys34. Jeho součástí jsou také dva tryptofanové zbytky Trp135 (součást první domény, na povrchu molekuly) a Trp214 (druhá doména, umístěna v hydrofóbní kapse, kde se váží ligandy) (Obr. 3). Tato residua jsou využívána jako vnitřní identifikátory celkové rozpustnosti a změny terciální struktury [25], [27].

BSA je typickým zástupcem homologní skupiny sérových albuminů. Úroveň jeho strukturálního uspořádání je takřka identická s uspořádáním lidského sérového albuminu (HSA), liší se pouze v některých residuích aminokyselin. Hlavním rozdílem je, že HSA obsahuje aminokyselinu tryptofan pouze jednou (Trp 214), zatímco BSA obsahuje tuto aminokyselinu dvakrát (viz výše) [23]. Sérový albumin je hlavním proteinem krevní plasmy, kde slouží jako přenašeč. Velice dobře váže vodu, ionty  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  a  $\text{K}^+$ , mastné kyseliny, hormony, bilirubin a léky. Jeho hlavní funkcí je regulace osmotického tlaku v krvi. Je též hlavním přenašečem zinku v plazmě (obvykle váže okolo 80% celkového zinku plazmy) [28]. Podobnost BSA HSA a jeho vlastnost vázání ligandů jsou důvodem, proč má albumin tak široké klinické, farmaceutické a biochemické uplatnění [27].



Obr. 3: Struktura BSA – hovězího sérového albuminu [28]

## 2.2. Cyklická voltametrie, square-wave voltametrie

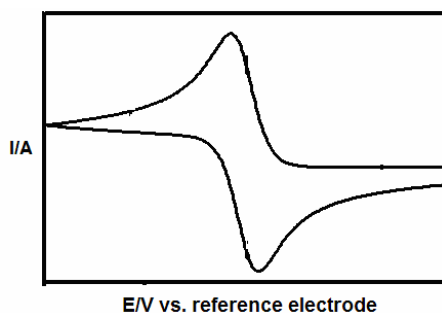
K často využívaným metodám zkoumání redoxního chování aminokyselin se řadí metody voltametrické, především pak cyklická voltametrie a square-wave.

Cyklická voltametrie je metoda, při které je elektroda polarizována potenciálovým programem, který se mění lineárně od počáteční hodnoty k tzv. přepínací hodnotě potenciálu a poté je směr polarizace obrácen [13]. Počáteční směr polarizace elektrody může být jak směrem k záporným, tak i kladným potenciálům (tj. v katodickém, nebo v anodickém směru). Po započetí experimentu je dosažena určitá hodnota potenciálu, při které začne probíhat redox proces (elektronová výměna) a je zaznamenán proud. Proud nejdříve s dalším zvyšováním potenciálu roste, přitom se spotřebovávají molekuly přeměňované látky (depolarizátoru) z okolí elektrody a jejich úbytek se doplňuje difúzí z roztoku. Tak se vytváří difúzní vrstva, která se rozšiřuje dovnitř roztoku. Rychlost určujícím stupněm je transport elektroaktivní látky k elektrodě, přičemž se tato rychlost zpomaluje s rostoucí tloušťkou difúzní vrstvy. V důsledku toho můžeme pozorovat růst proudu jen po určitou maximální hodnotu, která je zaznamenána v okamžiku, kdy koncentrace oxidované formy na povrchu elektrody klesne na nulu. Po dosažení této hodnoty proud klesá. Když potenciál elektrody dosáhne hodnoty tzv. přepínacího potenciálu, kdy se mění směr polarizačního potenciálu, začíná se zaznamenávat tzv. druhá větev voltamogramu. Uvažujeme-li počáteční směr polarizace v katodickém směru, tak pak jde o anodickou větev. Z počátku je zaznamenáván ještě katodický proud, ale jen do okamžiku, kdy potenciál nabude takové hodnoty, že se začne oxidovat redukovaná forma, a tak dochází k postupnému vzrůstu anodického proudu až do maxima, odkud opět klesá [29]. Je značná rozdílnost v orientaci os ve voltamogramech. Je to dáno historickým hlediskem (při polarografii se pracuje při záporných potenciálech, polarogramy byly však kresleny zleva doprava), dnes toto využívají především v amerických elektrochemických časopisech (opačná orientace os). Podle IUPAC však je voltamogram orientován tak, že anodická osa s vynášeným anodickým proudem je orientována vzhůru a potenciál směřuje zleva doprava.

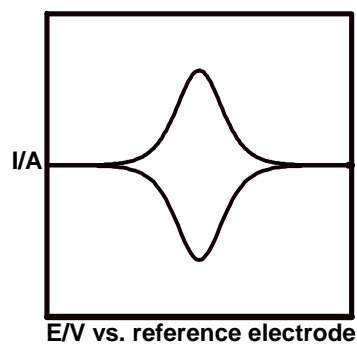
Využíváme především reversibilní cyklické voltametrie, to je případ, kdy probíhá rychlý přenos elektronu mezi elektrodou a analytem. Redoxní reakce na elektrodě jsou v rovnováze a koncentrace reaktantů a produktů jsou dány Nernstovou



rovnici [13]. Jsou zde však dvě možnosti výsledného tvaru voltamogramu. Na Obr. 5 je zaznamenán cyklický voltamogram v případě, kdy elektroaktivní látky jsou stabilní, v roztoku a probíhá zde normálně difúze. Na Obr. 6 je voltamogram, kdy jsou elektroaktivní analyty navázány (např. naadsorbovány) na elektrodě.

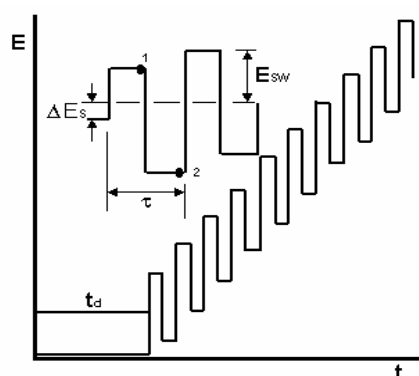


Obr. 5

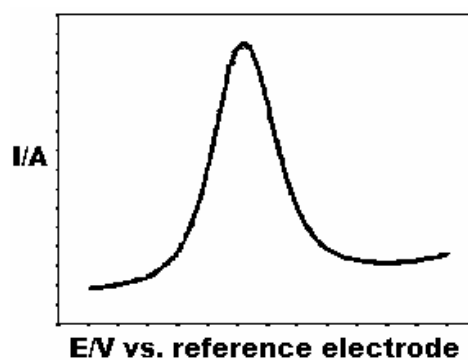


Obr. 6

Při square-wave voltametrii je vložen na elektrodu potenciálový program dle Obr. 7 [13]. Analytický signál je vzorkován v bodech 1 a 2, jednotlivé vzorky jsou od sebe odečteny a výsledné hodnoty jsou vyneseny v závislosti na potenciálu. Výsledkem je square wave voltamogram (Obr. 7a) amplituda střídavé složky faradayického proudu v závislosti na lineárně rostoucím polarizačním napětí (Obr.7b). Mezi výhody této metody patří velká citlivost (i k naadsorbovanému analytu) a následná rychlost záznamu [29].



Obr. 7a [29]



Obr. 7b

### 2.3. Elektrodové materiály využívané při studiu proteinů

Většina výše uvedených dějů (redoxní děje, adsorpce, katalýza vylučování vodíku) probíhá na rozhraní elektroda/roztok. Jsou prováděny na elektrodách velikostí v řádu milimetrů. Nejpoužívanějšími materiály těchto elektrod pro redox děje jsou různé druhy uhlíku (skelný, pyrolytický grafit či uhlíková pasta), pro adsorpci je využíváno stříbro či uhlík a pro katalytické děje je to rtuť.

Rtuť jakožto elektrodový materiál má díky vysokému přepětí vodíku značně široký interval využití v katodickém směru (+0,4 V až -2,5 V dle použitého elektrolytu). Další výhodou je snadno obnovitelný a hladký povrch elektrody. Nevýhodou je toxicita rtuti a omezené využití v anodické oblasti (zde dochází k oxidaci rtuti). Rtuťových elektrod je vícero druhů. K nejpoužívanějším řadíme kapající rtuťovou elektrodu (*DME – dropping mercury electrode*) [32]. Je realizována skleněnou kapilárou o vnitřním průměru 0,05 až 0,08 mm, která je hadičkou spojena s rezervoárem. Oba jsou naplněny rtutí, jež odkapává (vlastní vahou) pravidelně do ústí skleněné kapiláry. Základními charakteristikami jsou průtoková rychlost rtuti (doporučeno méně než 2 mg/s) a doba kapky, které závisí na výšce rtuťového sloupce. Při pulzových metodách se používá kapilára s mechanickým odtrhávačem kapek [13].

Uhlíkové elektrody byly původně využívány ke studiu konjugovaných proteinů [30], ale mají obrovský potenciál v elektrochemii proteinů celkově [8]. Jsou zde využity především dvě hlavní modifikace uhlíku: diamant a grafit. Diamant je krychlové soustavy s hybridizací  $sp^3$ . V elektrochemii je využíván k výrobě elektrod, kdy na nosné materiály (např. uhlík, niob) jsou nanášeny dopované diamanty, které jsou elektricky vodivé. Tyto elektrody jsou chemicky velmi stabilní, a díky tomu mají široké využití (především při analýzách, kdy jinými elektrodami není dosaženo tak vysoké účinnosti) [31]. U grafitu je hybridizační stav  $sp^2$ . Nejdokonalejším grafitovým elektrodovým materiálem je *highly oriented pyrolytic graphite* (vysoce orientovaný pyrolytický grafit). Je zde možné dvojí uspořádání: 1) „*parallel-plane pyrolytic graphite electrode*“, kde jsou jednotlivé vrstvy uspořádány paralelně s povrchem elektrody a pospojovány slabými interakcemi; v těchto vrstvách na sebe atomy uhlíku působí mnohem silněji než na atomy ve vedlejší vrstvě; 2) „*edge-plane pyrolytic carbon*“, kde jsou jednotlivé vrstvy uspořádány kolmo k povrchu elektrody – mají pro většinu analytů mnohem větší elektrochemickou aktivitu.

Při elektrochemických experimentech se velmi často používá elektroda ze skelného uhlíku. Ta obsahuje jak trigonálně, tak tetragonálně vázané atomy uhlíku v uspořádání připomínajícím zamotanou stuhu s různým stupněm zesíťení. Povrch skelného uhlíku má určité charakteristiky stejné jako druh pyrolytického uhlíku (*edge-plane pyrolytic carbon*) [33]. Skelný uhlík je vysoce mechanicky odolný, elektricky vodivý (použitelný v rozsahu napětí od +1,2V do -0,8V) a dostupný v relativně čistém stavu [34]. Je citlivý na průchod velkých proudů a poměrně rychle stárne (rekrystalizace na grafit), čímž narůstá šum a nereprodukovatelný proud. Tato elektroda z uhlíku se připravuje z předmodelovaných polymerních fenolformaldehydových pryskyřic kontrolovaným zahříváním v inertní atmosféře. Kalorizační proces probíhá pomalu za teplot v oblasti 300 až 1200° C, přičemž se z pryskyřice odstraní atomy O, N, H a zůstane tak jen uhlíková kostra. Díky své vysoké hustotě a malých rozměrech pórů skelný uhlík nevyžaduje žádnou impregnaci, stačí jeho povrch pouze vyleštit do „zrcadlového“ lesku jemnou suspenzí oxidu hlinitého (konečný průměr částic až 0,05 mm) [32].

Především v elektroanalytické chemii je v poslední době trend využívat elektrody velmi malých rozměrů (desítky až setiny mikrometru), a to tzv. mikroelektrody. Používány jsou díky svým malým rozměrům a pro své vlastnosti, které záleží obzvláště na specifickém transportu látky k povrchu, který se liší od transportu látky k elektrodě milimetrových rozměrů [13]. Často používaným druhem mikroelektrod jsou uhlíková vlákna. Jedná se o vláknité formy uhlíku, které jsou vyráběny od poloviny minulého století. Původně byla vyráběna z hedvábí. Následně přibýly nové materiály: ropný dehet (v současnosti se od něj ustupuje) a polyakrylonitril. Uhlíková vlákna mají několik jedinečných rysů, díky kterým jsou využívána. Jejich malé rozměry (průměr 5-30  $\mu\text{m}$ ) mají podíl na zvýšení transportu elektroaktivních látek k povrchu elektrody, snižují kapacitu dvojité vrstvy a ohmické ztráty vedoucí k zvýšení poměru signál/šum [35]. Vlákna mají lepší mechanické vlastnosti než elektrody ušlechtilých kovů stejných rozměrů. Navzdory tomu, že uhlíková vlákna mají rozměry vhodné i pro vložení do jedné buňky, jsou spíše vhodná pro manipulaci. Jejich forma a biokompatibilita materiálu je vhodná pro implantaci do tkáně. Další výhodou je cenová nenáročnost vláken [36]. Povrchové úpravy uhlíkových vláken vedou k zlepšení jejich mechanických vlastností a povrchová chemie vláken má tak jednu z nejdůležitějších rolí, co se celkově výzkumu vláken týče.

Tyto úpravy jsou především oxidativní procesy, zahrnují metody „mokrou cestou“ (např. úprava povrchu vláken kyselinou dusičnou či chromovou), metody „suchou cestou“ (katalytická oxidace, či oxidace kyslíkem, vzduchem nebo ozonem, atd.), elektrochemické metody (př. anodická oxidace v různých elektrolytech) a metody vedoucí k pokrytí povrchu vhodnými materiály (např. pokrytí niklem či pyrolytickým grafitem) [35].

## 2.4. Elektroforetická depozice uhlíku

Grafen (uhlíková monovrstva s dvoudimenzionální strukturou) je v současnosti středem vědeckých zájmů a to od jeho syntézy až po využití v elektrochemii.

Elektroforetická depozice je elektrochemická metoda, kdy se nabitě částice v suspenzi pohybují pomocí stejnosměrného elektrického pole k elektrodě opačného náboje, kde se nadeponují na pokrývaný materiál za vytvoření filmu, jehož účelem je vhodná úprava povrchu elektrody. Je to metoda efektivní a universální. Dá se využívat k modifikaci povrchu uhlíkových vláken grafenem, neboť je známo, že uhlíkové materiály (i grafen) mohou výrazně podpořit přenos elektronů na elektrochemickém rozhraní reakce [37], [38]. Touto metodou dochází k zlepšení adsorpčních vlastností vláken a tak i jejich širšímu využití. Postupovat se dá několika způsoby.

Huang a kolektiv si nejprve ve své práci [36] nasyntetizovali chemickou exfoliací grafitu vodný roztok oxidu grafenu o  $\text{pH} = 10$  (Hammersovou metodou) a poté použili uspořádání systému při depozici grafenu skládající se z potenciostatu/galvanostatu, kdy jako pracovní elektroda se používá vlákno či svazek vláken, které bylo pokrýváno a přiváděli na ně kladný náboj (anoda) a jako protielektroda sloužila grafitová tyčinka (záporný náboj, katoda). Během depozice se objevují na obou elektrodách bublinky, které mají původ v elektrolýze vody. Proto, aby se zabránilo vytváření plynových kapes, které mohou bránit depozici, se využívá ultrazvuku, jehož pomocí dochází k odstraňování nově vzniklých bublinek na elektrodách. Při použití stejnosměrného napětí se záporně nabitě pláty oxidu grafenu pohybují směrem k vláknům. Rychlost depozice závisí na několika faktorech jako např. koncentrace oxidu grafenu, velikost aplikovaného stejnosměrného napětí či depoziční čas [36]. Huang [36] dále pozoroval film tvořený oxidem grafenu na povrchu vláken při potenciálech v rozsahu od 2 do 30 V. Tloušťka deponované vrstvy byla stejná, však změnou času

a proudu mohla být změněna v širokém rozmezí od několika stovek nanometrů po desítky mikrometrů [36].

Další možností je depozice přímo z pyrolytického grafitu stejnosměrným elektrickým proudem, bez chemické přípravy roztoku oxidu grafenu. Wang a kolektiv jako první ve své práci [39] připravili grafen elektrolytickou exfoliací z vysoce čistého grafitu ve vodném elektrolytu obsahujícím polystyrensulfonyl sodný (PSS). Následně pak objevili povrchové modifikace vytvořené přichycením pružných grafitových fólií tvořených grafenem, jehož vznik byl podporován vodným elektrolytem. Lee [40] použil stejnou metodu i elektrolyt a z grafitových fólií vyrobil velké množství volných grafenových nanoplátků (*graphene nanosheets*), kterými poté elektroforetickou depozicí pokryl kovové proudové kolektory. Jako anodu použil grafitový plátek, jako protielektrodu skleněnou destičkou pokrytou vrstvou mědi ve vzdálenosti 2 cm od sebe. Elektrody byly umístěny do 1 mM vodného roztoku PSS. Mezi elektrodami byl nastaven užitím stejnosměrného napájení konstantní proud 300 mA po dobu 1h. Během exfoliace byly na povrchu anody pozorovány odlupující se částičky tvořící černou suspenzi s elektrolytem. Ta byla poté promyta vodou a ethanolem a sušena za vakua při 60 °C po dobu 2 hodin. Pro získání čistých grafenových plátů byla suspenze po konečném promytí přefiltrována přes nylonový membránový filtr za vakua a tenký film byl poté z filtru odstraněn. Pro elektroforetickou depozici na nerezové ocelové fólie byly vysušené grafenové pláty rozpuštěny v isopropylalkoholu obsahujícím 0,275 mM dusičnanu nikelnatého. Děj poté probíhal při 100 V/s po dobu 10 minut [40]. Vlastnosti grafenových nanoplátů, vrstvy (1-10) složené z monoatomických plátů grafenu, velký povrch, přítomnost velkého množství defektů, naznačují rozšíření elektrochemických využití v porovnání s grafitovou fólií [40].

### 3. Experimentální část

Cílem práce bylo zjistit, zda elektrochemické přeměny proteinů jsou možné na mikroelektrodách, které jsou v našem případě representovány uhlíkovým vláknem. Tyto procesy jsou zdárně prováděny na elektrodách milimetrových rozměrů (např. skelný uhlík). Co se týče výzkumu na uhlíkových vláknech, tak dle dostupných informací je o něj zájem, výsledky jsou však nereprodukovatelné. Proto jsme se v této práci pokusili o nalezení co nejvhodnějšího postupu a úpravy vláken k tomu, abychom nakonec dospěli k reprodukovatelným výsledkům. Největší pozornost byla věnována elektroforetické depozici "grafenu" na vlákna, kterou dochází k modifikaci povrchu elektrody. Průběh tohoto procesu trval při konstantním potenciálu 15 V 30 minut, během nichž jsme zaznamenávali závislost vzniklého elektrického proudu (mA) na uplynulém čase. Tento pokus však nemá vždy stejně opakovatelný výsledek. Je to způsobeno elektrolýzou vody (vznik bublinek), která probíhá při tomto procesu. Ty zabraňují celistvé depozici grafenu na vlákno. Jakožto modelový protein jsme si vybrali hovězí sérový albumin, který je všeobecně jako dobře adsorbovatelná bílkovina hojně používán.

#### 3.1. Přístrojové vybavení

Všechna elektrochemická měření byla prováděna přístrojem Electrochemical workstation CHI model 660C vyrobený firmou CH Instruments, Inc.

Pretreatment byl proveden pomocí multipotenciostatu vyvinutého v elektrochemické laboratoři na Katedře fyzikální chemie UPOL. Je řízen multifunkční kartou National Instruments PCI-6251E se softwarovým vybavením v programovacím jazyce LabView<sup>TM</sup>.

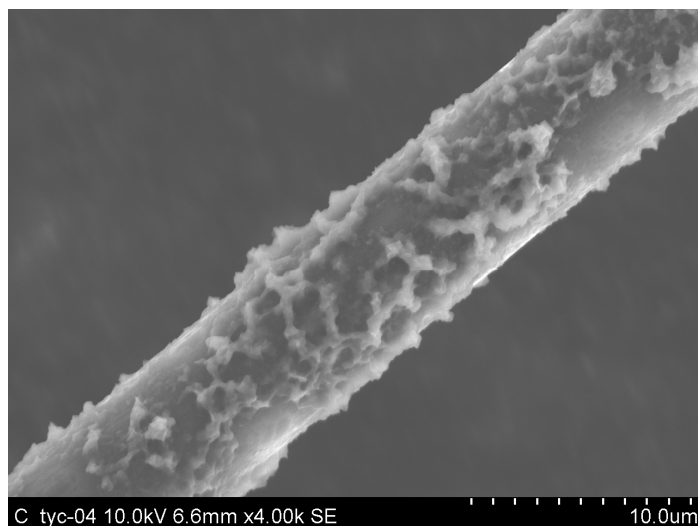
Elektroforetická depozice grafenu byla prováděna ve dvouelektrodovém zapojení pomocí stabilizovaného zdroje Matrix model MPS-30031-3.

### 3.2. Chemikálie

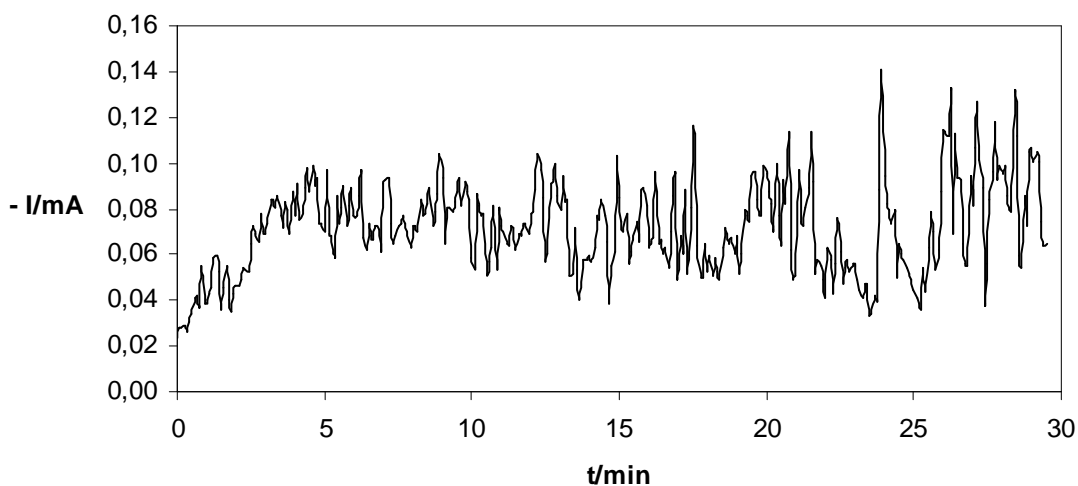
Kyselina octová, p.a., CH <sub>3</sub> COOH (Penta)	M = 60,01 g/mol
Hydroxid sodný, p.a., NaOH (Lach - Ner)	M = 40 g/mol
Kyselina chlorovodíková, p.a., HCl (Lach - Ner)	M = 36,46 g/mol
Chlorid sodný, p.a., NaCl (Lachema)	M = 58,44 g/mol
Hexakynoželezitan draselný, p.a., K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> (Lach - Ner)	M = 329 g/mol
Dusičnan draselný, p.a., KNO <sub>3</sub> (Lach - Ner)	M = 101,1 g/mol
Chlorid draselný, p.a., KCl (Lachema)	M = 74,55 g/mol
Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát, p.a., Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O (Lach - Ner)	M = 358,14 g/mol
Dihydrogenfosforečnan draselný, p.a., KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Lachema)	M = 136,04 g/mol
Tyrosin, p.a.	M = 181,19 g/mol
Tryptofan, p.a.	M = 204,23 g/mol
Cystein, p.a.	M = 121,16 g/mol
Hovězí sérový albumin (BSA), p.a., (Sigma - Aldrich)	M = 66 400 g/mol

### 3.3. Elektroforetická depozice grafenu

Při depozici je jako anoda použit spektrografický grafit a jako katoda pokrývaná elektroda (skelný uhlík nebo uhlíkové vlákno). Elektrody se připojí ke zdroji s nastaveným konstantním potenciálem 15 V. Poté se ponoří do křemenné kádinky s destilovanou vodou, kde je depozice prováděna 30 minut. V průběhu je možno zaznamenávat závislost vzniklého proudu na čase (Obr. 10), kolísání je způsobeno vývojem plynu na elektrodách v důsledku probíhající elektrolýzy vody. SEM snímek pouhlíkováného vlákna je možno vidět na Obr. 9.



Obr. 9: SEM snímek pouhlíkovaného vlákna



Obr. 10: Graf závislosti vzniklého proudu na čase při depozici grafenu při konstantním potenciálu 15 V

### 3.4. Voltametrická měření

V programu CHI 660C se navolí potřebné parametry měření. Napětí v rozsahu 0 - 1,2V, skenovací rychlost v případě milimetrových elektrod 0,1 V/s (procházejí velké proudy) a pro případ uhlíkových vláken 0,01V/s (procházejí proudy v řádu  $\mu\text{A}$  či nA). Při square-wave přibude parametr frekvence 20 Hz a amplituda 0,025 V.

Pracuje se v trojelektrodovém zapojení, pracovní elektroda je skelný uhlík či uhlíkové vlákno, referentní je elektroda Ag/AgCl a pomocná je platinový plátek.



Použili jsme tyto druhy pufrů: acetátový pufr (0,2 mol/l, pH = 5,5) a fosfátový pufr (PBS, pH = 7,4).

Před měřením je potřeba pracovní elektrodu očistit. V případě skelného uhlíku se postupuje následovně: elektroda je opláchnuta destilovanou vodou. Následuje vyleštění pomocí aluminy (suspenze  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , 50 nm, Buehler, U.S.A.), 30 s sonifikace v destilované vodě, poté opláchnutí elektrody destilovanou vodou, zapojení elektrody do systému a následné elektrochemické čištění v používaném čistém pufru, tj. desorpce nečistot redukcí či oxidací povrchu navoleným potenciálem (několikrát je proveden celý cyklus voltametrie) tak, aby se docílilo reprodukovatelného voltamogramu základního elektrolytu (pufru). V případě vláken je nejvhodnější očištění opláchnutím destilovanou vodou a následným „elektrochemickým čištěním“ prováděným tak, že se daný experiment provádí v pufru bez přítomnosti proteinu do dosažení stabilní odezvy.

Po očištění byly použity dvě rozdílné cesty postupu. Buď se nechá elektroda umístěná v připraveném roztoku proteinu a měření se provede přímo v tomto roztoku, nebo lze provést voltametrii s transferem, to znamená, že se elektroda ponechá v roztoku proteinu určitý čas a následné měření je provedeno v čistém pufru.

## 4. Výsledky a diskuse

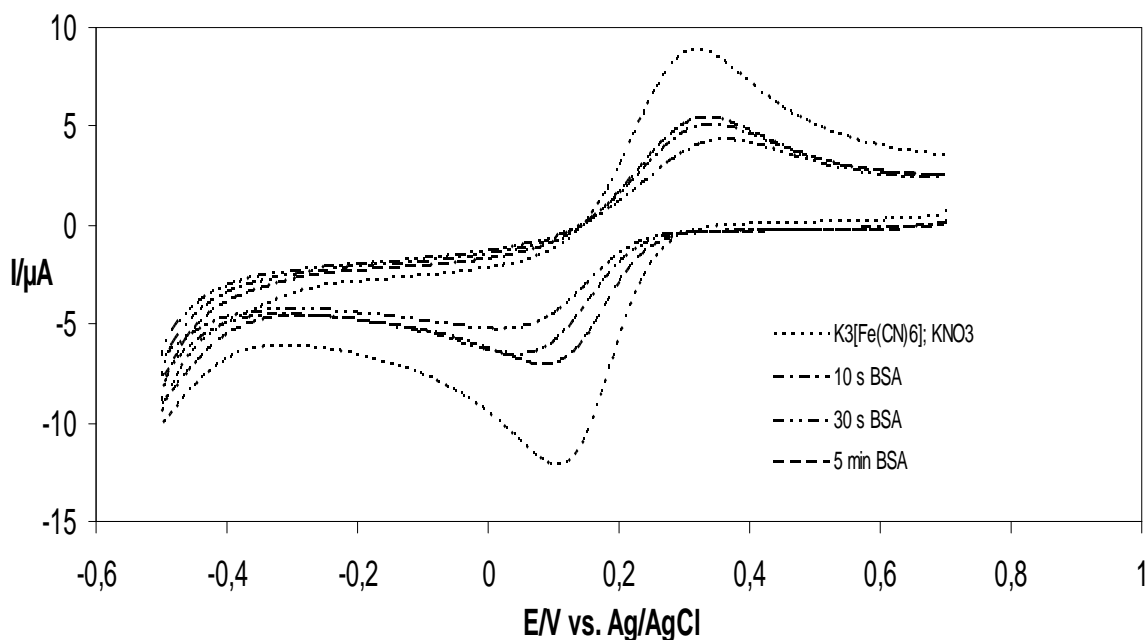
### 4.1. Voltametrická měření na elektrodě ze skelného uhlíku

Pro reprodukovatelnost měření na skelném uhlíku je jedním z nejdůležitějších procesů dokonalé očištění povrchu uhlíku vyleštěním. Prováděno je to pomocí aluminy na sametovém podkladu a následným elektrochemickým čištěním (cyklováním v základním elektrolytu - viz kapitola 3.5.).

#### 4.1.1. Adsorpce BSA na elektrodě ze skelného uhlíku

Schopnost adsorpce albuminu byla vyzkoušena pomocí hexakynoželezitanu draselného. Byla provedena voltametrická měření při různých časech adsorpce BSA. Připravili jsme si vodný roztok hexakynoželezitanu o koncentraci 1 mM  $K_3Fe(CN)_6$  obsahujícím 0,1 M  $KNO_3$ . Před každým měřením jsme očistili elektrodu (viz kapitola 3.5.), a poté následovala adsorpce (10 s, 30 s, 5 min) v roztoku BSA ve fosfátovém pufru (PBS, pH = 7,4), pak měření v roztoku hexakynoželezitanu draselném při rychlosti 0,05 V/s.

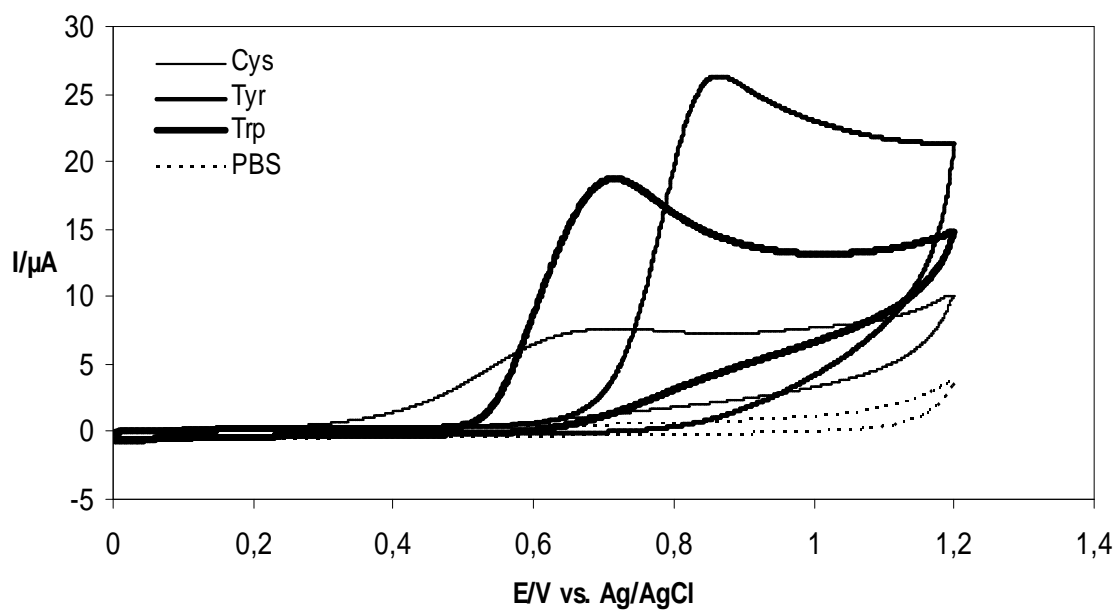
V důsledku zablokování povrchu proteinem se snižuje odezva hexakynoželezitanu. Výsledky neodpovídají práci Moultona a spol. [16], proto jsme měření opakovali ještě třikrát, vždy jsme ale dosáhli stejných výsledků. Tyto výsledky mohou být vysvětleny takto: adsorpcí dochází ke vzniku tenkého filmu, přes který hexakynoželezitan předává elektron a tak patrně probíhá jeho následná redukce. Uvedený děj je doprovázen snížením reversibility voltamogramů. Při delších časech adsorpce nejspíš dochází k zvětšení tloušťky filmu, kdy je povrch patrně zablokován částečně s určitými mezerami, kudy dochází k výměně elektronu.



Obr. 11: Cyklické voltamogramy po adsorpci 15  $\mu\text{M}$  BSA na elektrodu v roztoku 1 mM  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  obsahujícím 0,1 M  $\text{KNO}_3$

#### 4.1.2. Chování elektroaktivních aminokyselin na skelném uhlíku

Cystein, tyrosin a tryptofan - elektroaktivní aminokyseliny jsou obsaženy ve struktuře hovězího sérového albuminu. Proto byly proměřeny cyklické voltamogramy těchto aminokyselin. Před samotným měřením uvedených aminokyselin jsme elektrodu očistili mechanicky a elektrochemicky (2 měření v acetátovém pufru, koncentrace 0,2 mol/l,  $\text{pH} = 5,5$ ). Následovalo ponechání elektrody v roztoku aminokyselin 5 minut a poté měření proběhlo v tomto roztoku s rychlostí 0,05 V/s. Oxidace všech tří elektroaktivních aminokyselin probíhá ireversibilně. Nejsnadněji se oxiduje cystein ( $E_p = 0,65$  V), dále tryptofan ( $E_p = 0,7$  V) a tyrosin ( $E_p = 0,9$  V).



Obr. 12: Cyklické voltamogramy aminokyselin – cystein, tyrosin, tryptofan (koncentrace 1 mmol/l ve fosfátovém pufru (PBS, pH = 7,4))

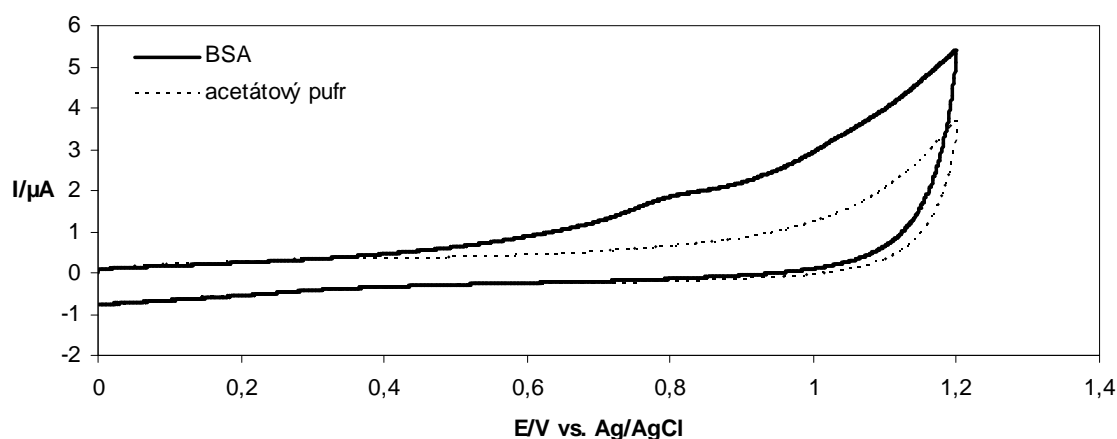
### 4.1.3. Voltametrická měření BSA na skelném uhlíku

#### *Cyklická voltametrie*

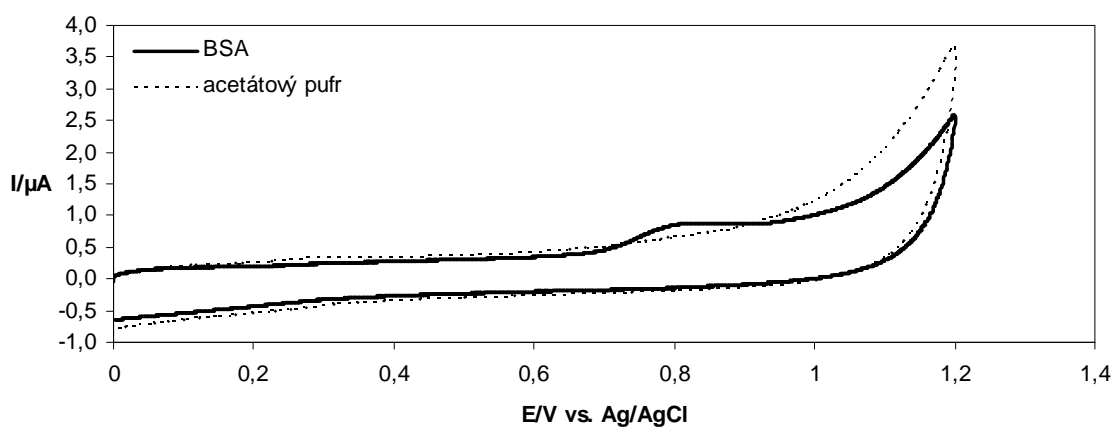
Byla provedena měření cyklickou voltametrií BSA v acetátovém pufru (koncentrace 0,2 mol/l, pH = 5,5) rychlostí 0,1 V/s. Po očištění elektrody (viz kapitola 3.5.) následovalo ponechání elektrody v roztoku BSA po dobu 10 minut, a poté v tomto roztoku proběhlo měření. Je patrný pík ( $E_p = 0,8$  V), který je oxidačním píkem tryptofanu, a letný náznak píku při 0,65 V, který bude mít pravděpodobně podobnost s oxidačním píkem cysteinu (Obr. 16).

Při voltametrii s transferem, tj. po očištění je elektroda ponechána v roztoku proteinu 10 minut a následné měření je provedeno v roztoku čistého pufru, se objevuje jen pík  $E_p = 0,8$  V (Obr. 17).

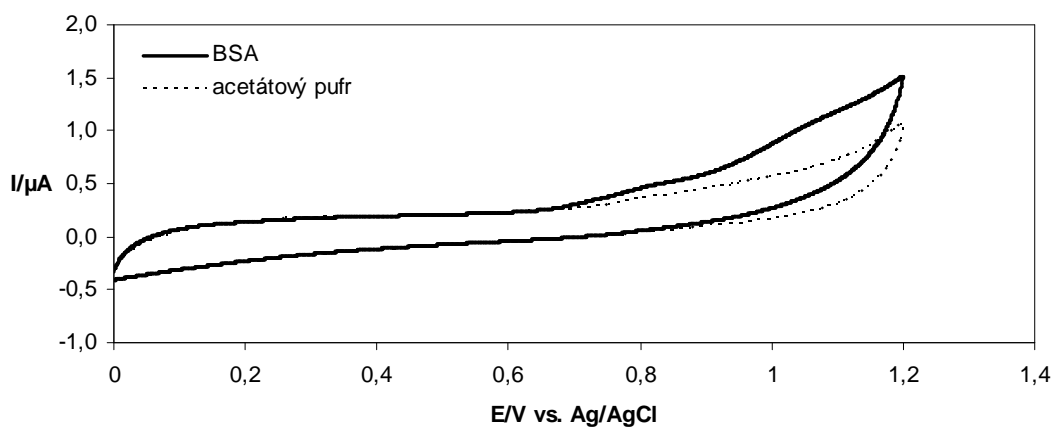
Po pouhřlkování skelného uhlíku elektroforetickou depozicí grafenu (viz kapitola 3.4.) jsme proměřili odezvu BSA pomocí cyklické voltametrie s transferem. Po očištění je elektroda ponechána v roztoku proteinu 10 minut a následné měření proběhlo v čistém pufru (acetátový pufr). Od základní proudové linie se odlišuje od 0,65 V, kdy náznak píku je při 0,8V ( $E_p = 0,8$ ) (nejspíš oxidace cysteinu a tryptofanu). V záznamu je však i náznak píku kol 1 V, což by mohl být oxidační pík tyrosinu (Obr. 18).



Obr. 16: Cyklický voltamogram BSA (koncentrace 15  $\mu\text{mol/l}$ )



Obr. 17: Cyklický voltamogram BSA s transferem (koncentrace 15  $\mu\text{mol/l}$ )



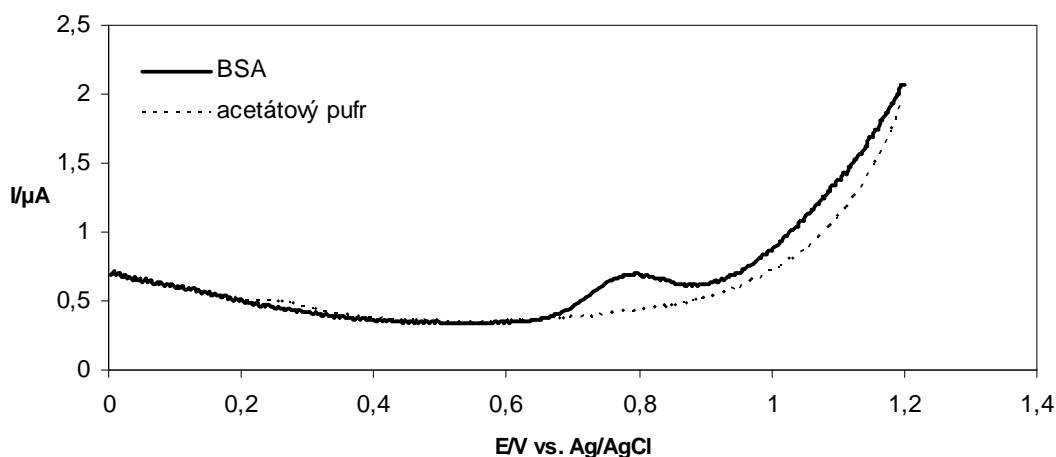
Obr. 18: Cyklický voltamogram BSA (koncentrace 15  $\mu\text{mol/l}$ ) po elektroforetické depozici grafenu na skelný uhlík

### Square-wave voltametrie

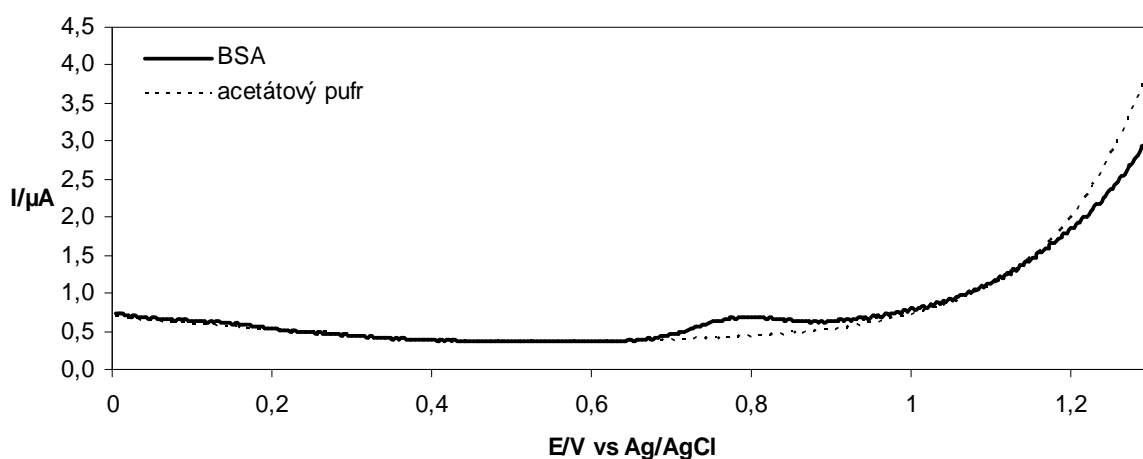
Square-wave je citlivější než cyklická voltametrie, proto byly experimenty provedeny i touto metodou.

Byla provedena square-wave měření roztoku BSA v acetátovém pufru (koncentrace 0,2 mol/l, pH = 5,5) rychlostí 0,1 V/s a amplitudě 0,025 V. Po očištění elektrody (viz kapitola 3.5.) následovalo ponechání elektrody v roztoku BSA po dobu 5 minut a poté měření proběhlo v tomto roztoku. Ze záznamu je patrný oxidační pík  $E_p = 0,8$  V, který je pravděpodobně způsoben oxidací tryprofanu (Obr. 13).

Při voltametrii s transferem, tj. když po očištění je elektroda ponechána v roztoku proteinu 5 minut a následné měření je provedeno v roztoku čistého elektrolytu (acetátový pufr), se pík  $E_p = 0,8$  V objevuje také, ale s nižší výškou než při měření bez transferu (Obr. 14).

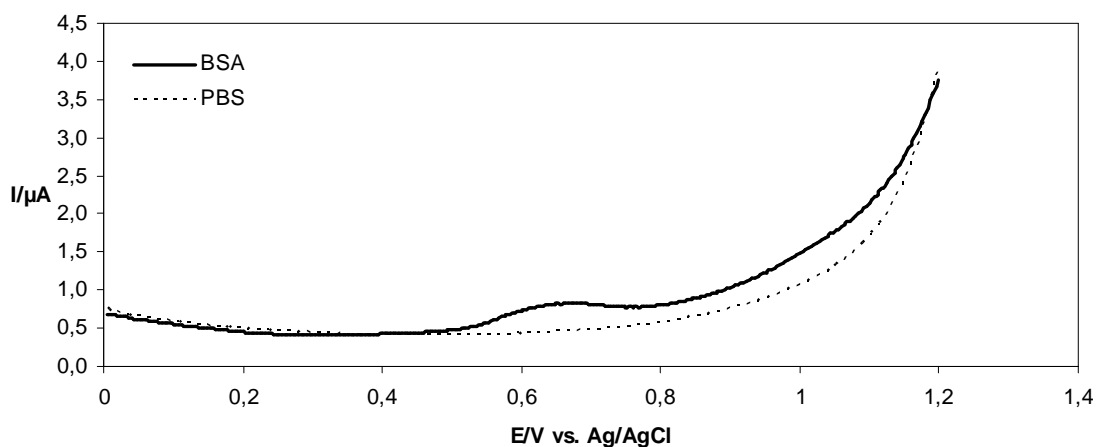


Obr. 13: Square-wave voltamogram roztoku BSA (koncentrace 15 μmol/l)



Obr. 14: Square-wave voltamogram s transferem BSA (15 μmol/l)

Po pouhlikování skelného uhlíku elektroforetickou depozicí grafenu (viz kapitola 3.4.) jsme proměřili square-wave voltametrii s transferem (rychlost 0,1 V/s, amplituda 0,025 V). Po očištění je elektroda ponechána v roztoku proteinu 5 minut a následné měření proběhlo v roztoku čistého elektrolytu (PBS). Naměřen byl oxidační pík ( $E_p = 0,65$ ), jehož vzrůst se objevuje již od 0,5 V. Je to pravděpodobně oxidační pík cysteinu, jehož oxidace byla na čistém skelném uhlíku nezřetelná.



Obr. 15: Square-wave voltamogram s transferem BSA (15 μmol/l) po elektroforetické depozici grafenu na skelný uhlík



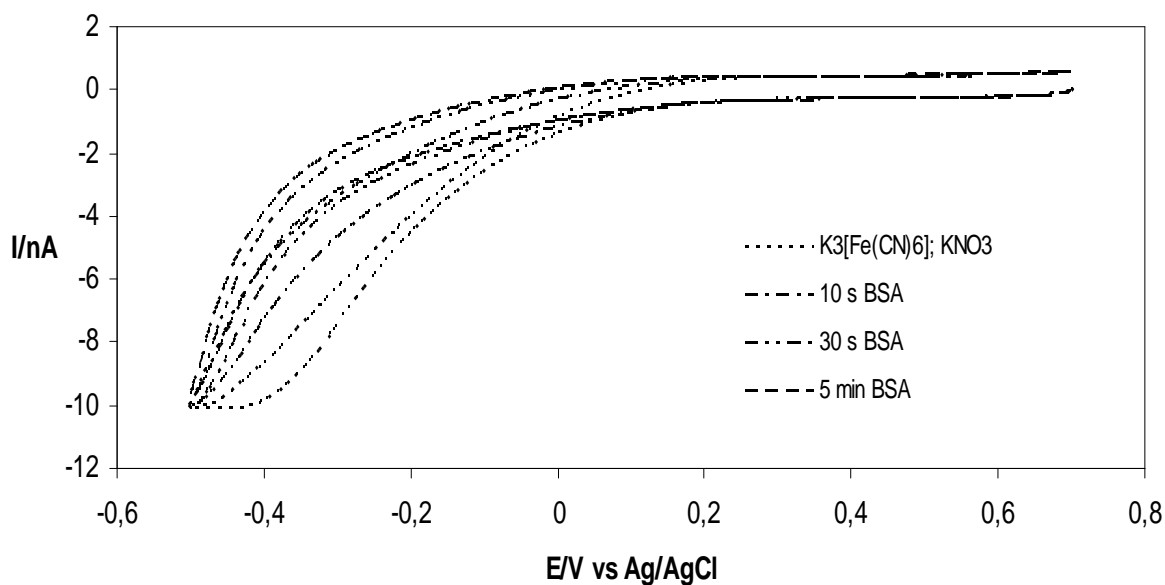
## 4.2. Uhlíková vlákna

Využití mikroelektrod pro elektrochemická stanovení přináší jisté výhody, zejména možnost miniaturizace (nižší spotřeba vzorku). Využívána jsou především uhlíková vlákna, o kterých je však známo, že neposkytují oxidační signály díky omezeně probíhající adsorpci proteinů. K měření byla použita pouze metoda cyklické voltametrie, neboť se ukázalo, že použitý potenciostat CHI660C není schopen zvládnout square-wave měření – signál byl znehodnocen velkým šumem, který se nedařilo odstranit ani po následných matematických úpravách (Fourierova transformace). U elektrochemických dějů řízených difúzí (tj. CV hexakynoželezitanu, cysteinu, tyrosinu a tryptofanu) nemají cyklické voltamogramy tvar píku, ale vlny, díky odlišnému způsobu difúze k uhlíkové mikroelektrodě. Charakter difúze je radiální, na rozdíl od lineární difúze na elektrodách normální velikosti.

### 4.2.1. Adsorpce BSA na mikroelektrodě z uhlíkového vlákna

Schopnost adsorpce albuminu byla vyzkoušena pomocí hexakynoželezitanu draselného i na uhlíkovém vlákně. Byla provedena voltametrická měření při různých časech adsorpce BSA. Připravili jsme si vodný roztok hexakynoželezitanu o koncentraci 1 mM  $K_3Fe(CN)_6$  obsahujícím 0,1 M  $KNO_3$ . Před měřením jsme vlákno očistili 30 s sonifikací a chemickým očištěním. Poté následovala adsorpce (10 s, 30 s, 5 min) v roztoku BSA ve fosfátovém pufru (PBS, pH = 7,4) a následné vlastní měření v roztoku hexakynoželezitanu draselném při rychlosti 0,05 V/s.

Adsorpce albuminu na uhlíkovém vlákně byla potvrzena. Došlo pravděpodobně k vytvoření proteinového filmu, přes který docházelo k přenosu elektronu, a tak k redukci hexakynoželezitanu, jak je zřejmé z viditelně zvýšené irreversibility děje se zvyšujícím se adsorpčním časem.

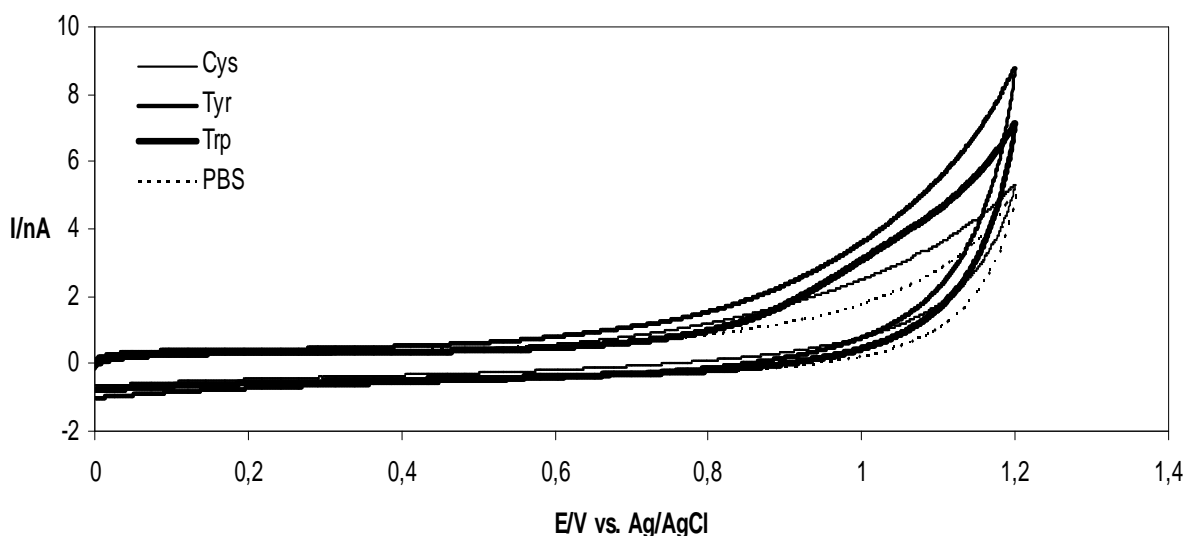


Obr. 19: Cyklické voltamogramy po adsorpci 15  $\mu\text{M}$  BSA na uhlíkové vlákno v roztoku 1mM  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  obsahujícím 0,1 M  $\text{KNO}_3$

#### 4.2.2. Chování elektroaktivních aminokyselin na uhlíkovém vlákne

Byly proměřeny cyklické voltamogramy aminokyselin: cysteinu, tyrosinu a tryptofanu - elektroaktivních aminokyselin obsažených ve struktuře BSA. Před samotným měřením jsme mikroelektrodu očistili 20 s sonifikací a následně elektrochemicky (2 CV scany v PBS,  $\text{pH} = 7,4$ ). Následovalo ponechání elektrody v roztoku aminokyselin 5 minut. Měření proběhlo v tomto roztoku rychlostí 0,05 V/s.

Jelikož je uhlíkové vlákno mikroelektroda, tak se neobjevily přímo rozlišené voltametrické píky. Ze záznamu lze vyčíst, že se nejnadněji oxidoval tyrosin, následoval cystein a tryptofan.



Obr. 20: Cyklické voltamogramy aminokyselin – cystein, tyrosin, tryptofan (koncentrace 1 mmol/l ve fosfátovém pufru (PBS, pH = 7,4))

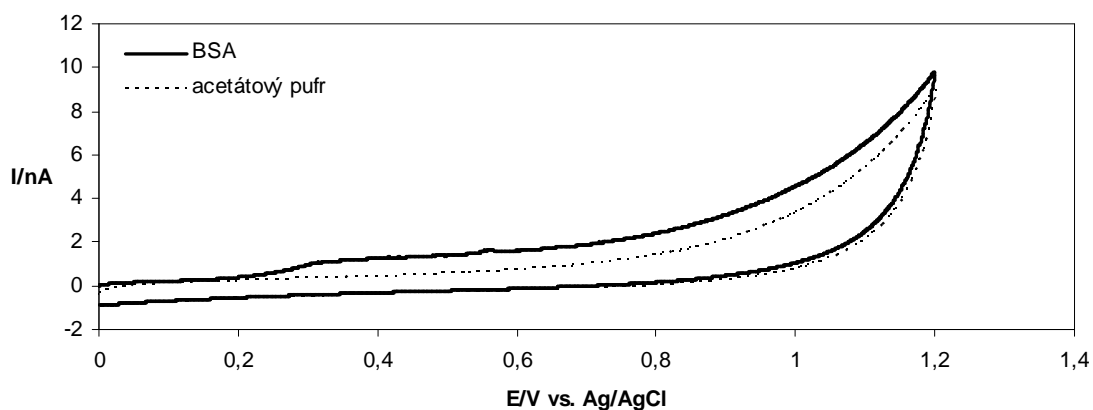
#### 4.2.3. Voltametrická měření BSA na uhlíkovém vlákně (mikroelektroda)

##### *Cyklická voltametrie*

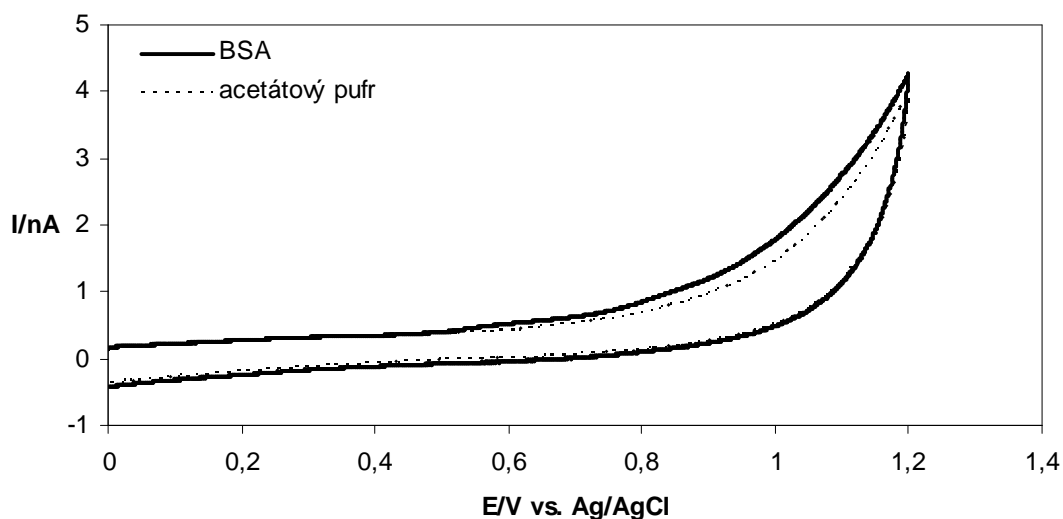
Byla provedena voltametrická měření hovězího sérového albuminu (BSA) na uhlíkovém vlákně. Všechna byla provedena při rychlosti měření 0,01 V/s. Roztok BSA byl připraven v acetátovém pufru (koncentrace 0,2 mol/l, pH = 5,5). Před vlastním měřením byla elektroda očištěna 20 s sonifikací a elektrochemicky (prováděním CV základního elektrolytu – pufru do dosažení stabilní odezvy).

Po očištění byla elektroda nechána 10 minut v roztoku proteinu a následně v něm proběhlo měření. Dle záznamu na Obr. 21 došlo k odlišení od základní proudové linie při 0,3 V, což je přisuzováno oxidaci cysteinu. Další píky aminokyselin nejsou rozlišeny, ale je vidět stále vzrůstající charakter křivky.

Po elektroforetické depozici grafenu na vlákno a následném očištění je vidět z voltamogramu na Obr. 22 náznak píku při 0,6 V i 0,8 V, můžeme se domnívat, že to jsou oxidační píky cysteinu a tryptofanu.



Obr. 21: Cyklický voltamogram BSA (koncentrace 15  $\mu\text{mol/l}$ ) na uhlíkovém vlákne

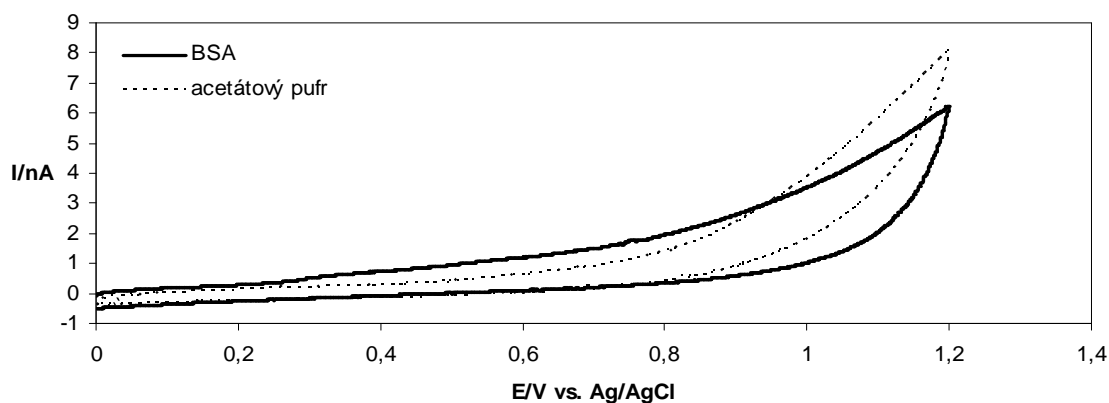


Obr. 22: Cyklický voltamogram BSA (koncentrace 15  $\mu\text{mol/l}$ ) na uhlíkovém vlákne po depozici grafenu

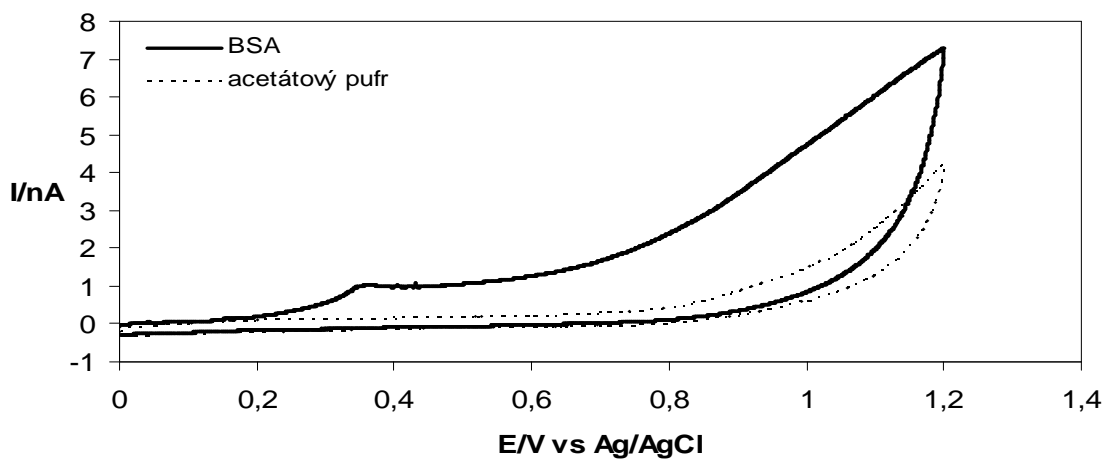
Po elektroforetické depozici grafenu (viz kapitola 3.4.) a elektrochemickém očištění jsme nechali elektrodu v roztoku proteinu a to po čas 5 a následně 10 minut. Po uplynutí požadované doby jsme elektrodu z roztoku vytáhli, opláchli destilovanou vodou a vlastní měření proběhlo v acetátovém pufru.

Ve voltamogramu po čase 5 minut v roztoku je vidět odezva od 0,3 V, kdy předpokládáme oxidaci cysteinu (Obr. 23).

V záznamu po čase 10 minut v roztoku je viditelný pík při  $E_p = 0,35$  V, nejspíš opět zapříčiněný oxidací cysteinu a následná odezva je velká (Obr. 24).



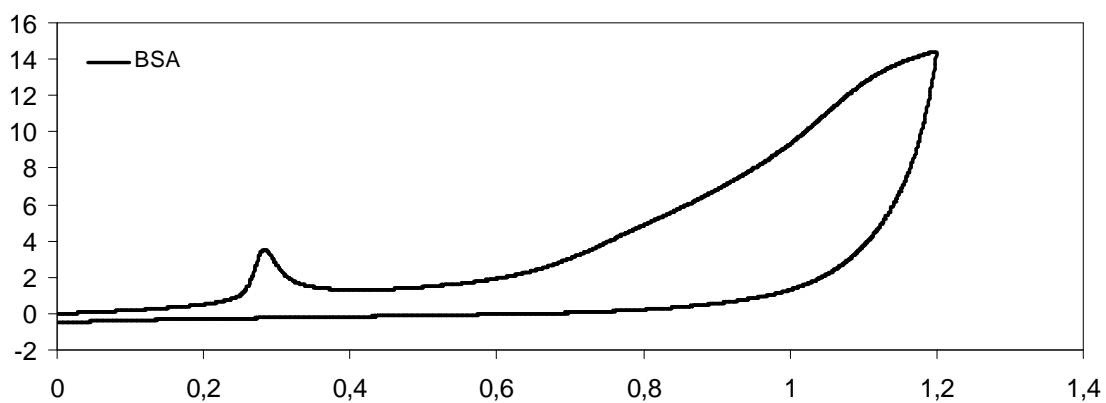
Obr. 23: Cyklický voltamogram s transferem BSA na uhlíkovém vlákne po elektroforetické depozici (5 minut v roztoku albuminu)



Obr. 24: Cyklický voltamogram s transferem BSA na uhlíkovém vlákne, po depozici grafenu (10 minut v roztoku albuminu)

Po elektroforetické depozici grafenu na uhlíkové vlákno (viz kapitola 3.4.) jsme elektrodu pouze opláchli destilovanou vodou a nechali v roztoku albuminu po dobu 5 minut. Vytáhli jsme ji, opláchli a provedli měření.

V záznamu byl patrný pík  $E_p = 0,3 \text{ V}$ , který přisuzujeme oxidaci cysteinu. Dále pak byl náznak při  $0,8 \text{ V}$ , což by měl být náznak oxidačního píku tryptofanu.



Obr. 25: Cyklický voltamogram s transferem BSA na uhlíkovém vlákne bez chemického očištění po elektroforetické depozici grafenu

Bohužel, reprodukovatelnost uvedených výsledků není u experimentů s BSA příliš dobrá. Při opakovaných experimentech s jednotlivými mikroelektrodami kolísala jak velikost, tak i poloha voltametrických píků. U některých mikroelektrod s vrstvou grafenu dokonce nebyla elektrochemická odezva BSA zaznamenána. Experimenty ukazují na citlivost adsorpčního děje BSA na stav povrchu mikroelektrod z uhlíkového vlákna a na horší reprodukovatelnost přípravy grafenové vrstvy na elektrodě.

## 5. Závěr

Byla úspěšně provedena adsorpce proteinu na elektrodě ze skelného uhlíku i mikroelektrodě z uhlíkového vlákna pomocí roztoku hexakynoželezitanu draselného. Na obou těchto elektrodách se adsorbovaný protein chová podobně, kdy při nižších adsorpčních časech se vytváří tzv. „thin layer barrier“, tzn. přenos elektronů probíhá přes tenký film, zatímco u vyšších deposičních časů dochází ke změně vrstvy a vytváří se tzv. „partially blocked electrode“.

Byly proměřeny elektroaktivní aminokyseliny (cystein, tyrosin, tryptofan), které jsou obsaženy v hovězím sérovém albuminu. Na elektrodě ze skelného uhlíku byly oxidovány ireversibilně, oxidační píky se vyskytovaly u cysteinu ( $E_p = 0,65$  V), tryptofanu ( $E_p = 0,7$  V) a tyrosinu ( $E_p = 0,9$  V) (všechna měření proti argentochloridové referentní elektrodě). U uhlíkového vlákna, jelikož se jedná o mikroelektrodu a difúzí řízený děj, se rozlišené voltametrické píky neobjevily.

Dále bylo sledováno chování BSA na elektrodě ze skelného uhlíku a uhlíkovém vlákně. Na skelném uhlíku se oxidační pík vyskytoval při cca 0,8 V vs. Ag/AgCl a přisuzovali jsme jej oxidaci tryptofanu. Na uhlíkovém vlákně byly náznaky píku nejčastěji při 0,6 V (vs. Ag/AgCl) a po modifikaci vlákna elektroforetickou deposicí grafenu se objevoval pík  $E_p = 0,3$  V, ten je pravděpodobně oxidačním píkem cysteinu.

Bohužel reprodukovatelnost výsledků není dobrá. Značně kolísala především u uhlíkového vlákna a to ať velikostí či polohou píku, je proto nutné se této problematice i nadále věnovat, zejména otázce reprodukovatelné přípravy povrchu uhlíkového vlákna.

## 6. Summary

The aim of this thesis was to make an attempt to electrooxidize protein (oxidation of its amino acids) on the carbon fiber microelectrodes. As a model protein we chose BSA (Bovine Serum Albumin). It is a globular water soluble monomeric protein that is widely used as a protein standard. Oxidation processes occur due to oxidation of tyrosine, tryptophan and cysteine residues on adsorbed protein, as demonstrated on glassy carbon electrode. It is known, that it is difficult to observe the above mentioned processes on the carbon fiber electrodes.

Measurements were performed in solutions of acetate buffer (pH 5.5, concentration 0.2 mol/l) and of phosphate buffered saline (PBS, pH = 7,4) in a three-electrode setup (platinum wire as an auxiliary and argentochloride electrode as a reference electrode). BSA was solubilized in this buffer and its concentration was 15  $\mu$ M. We used two electrochemical methods: cyclic voltammetry (CV; the potential was linearly increased from initial (0 V) to vertex potential (1.2 V) and then the potential was decreased to final potential (0 V)) and square-wave voltammetry (SWV, the potential on electrode changed linearly in dependence on time which was superimposed by the alternating current with square-wave form, small amplitude (0.025 V) and frequency (20 Hz)).

The oxidation peaks of aminoacids on glassy carbon electrode were found at potentials 0.6 V (cysteine), 0.7 V (tryptophan) and 0.9 V (tyrosine) vs. Ag/AgCl. The oxidation of BSA on glassy carbon proceeded at potential around 0.8 V (vs. Ag/AgCl). The transfer voltammetry after 10 minutes of adsorption on the surface of electrode was successful.

For glassy carbon it was necessary to polish the electrode by alumina, washed by distilled water or use the electrochemical cleaning. It was a method when high potential caused desorption of impurities from surface of electrode by oxidation or reduction of surface layer.

Carbon fiber was modified by the electrochemical deposition of a graphene. After this procedure we measured electrochemistry of BSA, but unfortunately we did not achieve reproducible results. Sometimes the oxidation peak of BSA was at potential 0,6 V (vs. Ag/AgCl). We speculated that it was caused by not very reproducible deposition of graphene layer on fiber.



## Seznam použité literatury

- [1] HEYROVSKY, J., BABICKA, J., Polarographic studies with the dropping mercury cathode. Part XIII. The effect of albumins, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 2 (1930) 370-379.
- [2] BARTOŠÍK, M., OSTATNÁ, O., PALEČEK, E. Electrochemistry of riboflavin-binding protein and its interaction with riboflavin, *Biochemistry* 76 (2009) 70-75.
- [3] DONEUX, Th., OSTATNÁ, V., PALEČEK E. On the mechanism of hydrogen evolution catalysis by proteins: A case study with bovine serum albumin, *Electrochim. Acta* 56 (2011) 9337-9343.
- [4] HEYROVSKY, M. Early Polarographic Studies on proteins, *Electroanalysis* 16 (2004) 1067-1073.
- [5] EuroChem – Professional Chemistry guide [online]. c2006, [cit. 2013-04-07]. <<http://www.eurochem.cz/polavolt/org/obory/medicina/brdicka.htm>>.
- [6] STANKOVICH, M.T., BARD, A.J. Electrochemistry of proteins and related substances. 1. Cystine and cyteine at mecury electrode. *J. Electroanal. Chem.* 75 (1977) 487-505.
- [7] CHICU, M., IVANDINI, T. A., KAMIYA, A., FUJISHIMA, A., EINAGA, Y. Direct electrochemical oxidation of proteins at conductive diamond electrodes, *J. Electroanal. Chem.* 612 (2008) 201-207.
- [8] PALEČEK, E. – OSTNATÁ, V. Electroactivity of nonconjugated proteins and peptides. Towards electroanalysis of all proteins, *Electroanalysis* 19 (2007) 2383-2403.
- [9] BRABEC, V. Electrochemical oxidation of nucleic-acids and proteins at graphite electrode – qualitative aspect, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 7 (1980) 69-82.
- [10] REYNAUD, J.A., MALFOY, B., BERE, A. The electrochemical oxidation of 3 proteins – RNAase-A, bovine serum albumin and concanavalin-A at solid electrodes, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 7 (1980) 595-606.
- [11] ENACHE, T.A. – OLIVEIRA-BRETT, A.M. Boron doped diamond and glassy carbon electrodes comparative study of the oxidation behaviour of cysteine and methionine, *Biochemistry* 81 (2011) 46-52.
- [12] SARADA, B. V., RAO, T. N., TRYK, D.A., FUJISHIMA, A. Electrochemical Oxidation of Histamine and Serotonin at Highly Boron-Doped Diamond Electrodes, *Anal. Chem.* 72 (2000) 1632-1638.

- [13] BAREK, J., OPEKAR, F., ŠTULÍK, K. *Elektroanalytická chemie*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2005. 188 s. ISBN 80-246-1146-5.
- [14] HELI, H., SATTARAHMADY, N., JABBARI, A., MOOSAVI-MOVAHEDI, A.A., HAKIMELAHI, G.H., FU-YUAN TSAI. Adsorption of human serum albumin onto glassy carbon surface – Applied to albumin-modified electrode: Mode of protein-ligand interactions, *J. Electroanal. Chem.* 610 (2007) 67-74.
- [15] MALEKI, M.S., MORADI, O., TAHMASEBI, S. Comparison between kinetics studies of protein adsorption by single-walled carbon nanotube and gold nanoparticles surfaces, *Fuller. Nanotub. Carbon Nanostruct.* 21 (2013) 733-748.
- [16] MOULTON, S.E., BARISCI, J.N., BATH, A., STELLA, R. WALLACE, G.G. Investigation of protein adsorption and electrochemical behavior at a gold electrode, *J. Colloid Interface Sci.* 261 (2003) 312-319.
- [17] DOLATSHAHI-PIROUZ, A., RECHENDORFF, K., HOVGAARD, M.B., FOSS, M., (CHEVALLIER, J., BESENBACHER, F. Bovine serum albumin adsorption on nano-rough platinum surfaces studied by QCM-D, *Colloids Surf., B.* 66 (2008) 53-59.
- [18] BRABEC, V., SCHINDLEROVA, I., Electrochemical-behavior of proteins at graphite-electrodes. 3. The effect of protein adsorption, *Bioelectrochemistry* 8 (1981) 451-458.
- [19] ANZAI, J., GUO, B., OSA, T. Quartz-crystal microbalance and cyclic voltammetric studies of the adsorption behaviour of serum albumin on self-assembled thiol monolayers possessing different hydrophobicity and polarity, *Bioelectrochemistry* 40 (1996) 35-40.
- [20] SU, T.J., LU, J.R., THOMAS, R.K., CUI, Z.F., PENFOLD, J. The conformational structure of bovine serum albumin layers adsorbed at the silica-water interface, *J. Phys. Chem. B* 102 (1998) 8100-8108.
- [21] PATIL, S., SANDBERG, A., HECKERT, E., SELF, W., SEAL, S. Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential, *Biomaterials* 28 (2007) 4600-4607.
- [22] JADRESKO, D. – LOVRIĆ, M. A theory of square-wave voltammetry of surface-active, electroinactive compounds, *Electrochim. Acta* 53 (2008) 8045-8050.

- [23] GERLACHE, M., KAUFFMANN, J.M., QUARIN, G., BRYANT G.A., TALBOT, J.M. Electrochemical analysis of surfactants: An overview, *Talanta* 43 (1996) 507-519.
- [24] ŠÍPAL, Z., ANZENBACHER, P., PEČ, P., POSPÍŠIL, J., RŮŽIČKA, I. *Biochemie*. 1. vyd Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1992. 480 s. ISBN 80-04-21736-2.
- [25] BABCOCK, J. – BRANCALEON, L. Bovine serum albumin oligomers in the E- and B-forms at low protein concentration and ionic strength, *Int. J. Biol. Macromol.* 53 (2013) 42-53.
- [26] VLASOVA, I. M., ZHURAVLEVA, V. V., VLASOV, A. A., SALETSKY, A. M. Interaction of cationic surfactant cetyltrimethylammonium bromide with bovine serum albumin in dependence on pH: A study of tryptophan fluorescence, *J. Mol. Struct.* 1034 (2013) 89-94.
- [27] SHEN, H., GU, Z., JIAN, K., QI, J. In vitro study on the binding of gemcitabine to bovine serum albumin, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 75 (2013) 86-93.
- [28] Protein data bank (RCSB PDB) [databáze online]. Piscataway: Rutgers, the State University of New Jersey, 2013 [citováno 2013-04-02]. Dostupné z URL <<http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>>.
- [29] EuroChem – Professional Chemistry guide [online]. c2006, [cit. 2013-04-19]. <[http://www.eurochem.cz/polavolt/obecne/zaklady/markusova/elektrochem\\_met/02/02.htm](http://www.eurochem.cz/polavolt/obecne/zaklady/markusova/elektrochem_met/02/02.htm)>.
- [30] JEUKEN, L.J.C., McEVOY, J.P., ARMSTRONG, F.A. Insights into gated electron-transfer kinetics at the electrode-protein interface: A square wave voltammetry study of the blue copper protein azurin, *J. Phys. Chem. B* 106 (2002) 2304-2313.
- [31] PERMELEC ELECTRODE LTD [online]. c2013, [cit. 2013-0-02]. <<http://www.permelec.co.jp/en/products/bdd.html>>.
- [32] EuroChem – Professional Chemistry guide [online]. c2006, [cit. 2013-04-24]. <[http://www.eurochem.cz/polavolt/obecne/zaklady/markusova/elektrochem\\_met/04/index.htm](http://www.eurochem.cz/polavolt/obecne/zaklady/markusova/elektrochem_met/04/index.htm)>.
- [33] ENGSTROM, R.C. Electrochemical pretreatment of glassy carbon electrodes, *Anal. Chem.* 54 (1982) 2310-2014.

- [34] ZITTEL, H.E., MILLER, F.J. A glassy-carbon electrode for voltammetry, *Anal. Chem.* 37 (1965) 200-204.
- [35] SHERWOOD, P.M.A. Surface analysis of carbon and carbon fibers for composites, *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* 81 (1996) 319-342.
- [36] HUANG, S.-Y., WU, G.-P., CHEN, CH.-M., YANG, Y., ZHANG, S.-CH., LU, CH.-X. Electrophoretic deposition and thermal annealing of a graphene oxide thin film on carbon fiber surfaces, *Carbon* 52 (2013) 605-620.
- [37] VEERAPANDIAN, M., LEE, M.-H., KRISHNAMOORTHY, K., YUN, K. Synthesis, characterization and electrochemical properties of functionalized graphene oxide, *Carbon* 50 (2012) 4228 – 4238.
- [38] ZHANG, Y., SUN, X., ZHU, L., SHEN, H., JIA, N. Electrochemical sensing based on graphene oxide/Prussian blue hybrid film modified electrode, *Electrochim. Acta* 56 (2011) 1239-1245.
- [39] WANG, G.-X., WANG, B., PARK, J., WANG, Y., SUN, B. YAO, J. Highly efficient and large-scale synthesis of graphene by electrolytic exfoliation. *Carbon* 47 (2009) 3242-3246.
- [40] LEE, S.H., SEO, S.-D., PARK, K.-S., SHIM, H.-W., KIM, D.-W. Synthesis of graphene nanosheets by the electrolytic exfoliation of graphite and their direct assembly for lithium ion battery anodes, *Mater. Chem. Phys.* 135 (2012) 309-316.