

## OZNACZANIE TLENU – OD METODY WINKLERA DO CZUJNIKÓW ENZYMATYCZNYCH

### DETERMINATION OF OXYGEN – FROM WINKLER METHOD TO ENZYMATIC SENSOR

**Sylwia Dramińska<sup>1</sup>, Jan F. Biernat<sup>2</sup>, Renata Bilewicz<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> *Uniwersytet Warszawski, Wydział Chemii, Pracownia Teorii i Zastosowań Elektrod,  
ul. Pasteura 1, 02-093 Warszawa*

<sup>2</sup> *Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny,  
Katedra Chemii i Technologii Materiałów Funkcjonalnych,  
ul. Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk*

*\*e-mail: bilewicz@chem.uw.edu.pl*

---

*Praca została opublikowana w specjalnym numerze  
„Wiadomości Chemicznych”, poświęconym pamięci Profesora Stanisława Głęba,  
w 70-tą rocznicę Jego urodzin*

---

Abstract

Wprowadzenie

1. Metody oznaczania tlenu rozpuszczonego w wodzie
2. Elektrochemiczne metody oznaczania tlenu
  - 2.1. Membranowa elektroda tlenowa Clarka
  - 2.2. Konstrukcje elektrody Clarka
  - 2.3. Katalizatory redukcji tlenu
  - 2.4. Biocujniki tlenu

Piśmiennictwo cytowane

---

**prof. dr hab. Renata Bilewicz** jest absolwentką Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Tamże uzyskała stopień doktora, doktora habilitowanego, profesora. Obecnie kontynuuje pracę na Wydziale Chemii UW na stanowisku profesora zwyczajnego. Jest autorką ponad 200 prac w dziedzinie elektrochemii i jej wykorzystania w chemii bionieorganicznej oraz supramolekularnej. Obszar Jej zainteresowań obejmuje mechanizmy transportu ładunku i procesy rozpoznania molekularnego w monowarstwach samorzutnie organizujących się na stałych podłożach oraz otrzymywanych metodą Langmuira-Blodgett. Badania w Jej Zespole dotyczą także wykorzystania kompleksów makrocyclicznych i enzymów redoks w elektrokatalizie i czujnikach elektrochemicznych.

**prof. dr hab. inż. Jan Biernat** jest absolwentem specjalności Lekka Synteza Organiczna na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej. Tamże uzyskał stopień doktora n.t., doktora habilitowanego a następnie profesora i stanowisko profesora zwyczajnego. Dwukrotnie pełnił funkcje prodziekana i dwukrotnie dziekana Wydziału Chemicznego. Pracował w Katedrze Chemii Organicznej, potem kierował pracą Katedry Chemii Ogólnej, która po połączeniu z innymi jednostkami dydaktycznymi utworzyła Katedrę Technologii Chemicznej. Obecnie jako profesor emeritus działa w obrębie Katedry Chemii i Technologii Materiałów Funkcjonalnych Politechniki głównie współpracując z Wydziałem Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Autor ponad dwustu publikacji i wielu opracowań dla przemysłu.

**mgr Sylwia Dramińska** ukończyła studia magisterskie na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Pracę magisterską wykonała w Pracowni Teorii i Zastosowań Elektrod pod kierunkiem prof. dr hab. Renaty Bilewicz, gdzie obecnie prowadzi badania naukowe w ramach studiów doktoranckich. Zainteresowania naukowe Autorki dotyczą opracowania enzymatycznych czujników elektrochemicznych z wykorzystaniem nanostruktur węglowych.

## ABSTRACT

Monitoring of dioxygen levels is of utmost importance from the view-point of life processes, medical diagnostics, nutrition and chemical industries. In all these measurements both low and high levels of this element are important. The common methods for the determination of dioxygen are the Winkler method, Clark electrode and pulseoxymeters. A new, already strong field of research can be now recognized – the development of miniaturized biosensors of dioxygen, characterized by short response time, selectivity and utility in continuous monitoring of dioxygen. This trend can be seen in all fields where analytical methods are applied. The aim is to construct simple and, therefore, low cost devices and a good example of such device is the enzymatic biocathode sensitive towards dioxygen. The main issue in the construction of such electrodes is how to immobilize a redox enzyme on the conductive support in a way allowing to retain its full activity and to provide efficient transfer of charge between the electrode and the active centres of the enzymes. The difficulty in achieving suitable electrical contact can be solved by applying suitable carbon nanomaterials, increasing the working surface of the electrode and providing access to the active centres of the enzyme molecules.

Keywords: determination of oxygen, dioxygen reduction, bioelectrocatalysis, oxygen biosensor, laccase, carbon nanotubes

Słowa kluczowe: oznaczanie tlenu, redukcja tlenu, bioelektrokataliza, bioczujnik tlenowy, lakaza, nanorurki węglowe

---

---

## WPROWADZENIE

W stanie podstawowym budowa cząsteczki tlenu jest trypletowa o nietypowej konfiguracji elektronowej z dwoma niesparowanymi elektronami na dwóch antywiążących orbitalach. Jest ona energetycznie trwalsza od bardziej reaktywnego stanu singletowego będącego najniższym stanem wzbudzonym ditlenu. Całkowita czteroelektronowa redukcja tlenu prowadzi do powstania wody, natomiast produkty niecałkowitej redukcji są określone jako reaktywne formy tlenu (ROS) [1].

Do reaktywnych form tlenu zaliczamy: anionorodnik ponadtlenkowy ( $O_2^{\bullet-}$ ), rodnik wodoronadtlenkowy ( $HO_2^{\bullet}$ ), nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ ), rodnik hydroksylowy ( $OH^{\bullet}$ ), ozon ( $O_3$ ) oraz wszystkie produkty powstające w wyniku reakcji wymienionych form ze związkami organicznymi [2]. Wiadomo również, że cząsteczka ditlenu pod ciśnieniem  $> 20$  GPa przechodzi w odmianę czteroatomową ( $O_4$  – „czerwony” tlen) o wysokiej energii wewnętrznej.

Tlen jest pierwiastkiem biogennym, niezbędnym organizmom aerobowym – w tym człowiekowi, do przeprowadzenia oksydacyjnej fosforylacji, będącej w procesie oddychania najważniejszym etapem pozyskiwania wysoce bogatego w energię kwasu adenosynotryfosforowego (ATP); z drugiej strony tlen i jego związki mogą uszkadzać składniki komórek. Stwierdzono, że podwyższone stężenie tlenu wywołuje odczuwalne zaburzenia dróg oddechowych oraz podnosi ciśnienie krwi i wywołuje kwasicę (a nawet prowadzi do śmierci organizmów, np. ryb). Ponadto reaktywne formy tlenu zaburzają funkcje komórek. Prowadzą między innymi do pęknięć i uszkodzeń nici DNA, degradacji rybozy, rozpadu erytrocytów, uszkodzeń chromosomów, powstawania mutacji, stając się przyczyną stanów chorobowych, przede wszystkim w warunkach osłabionej ochrony antyoksydacyjnej, a także procesów starzenia [3–5]. Stężenie tlenu rozpuszczonego w wodzie decyduje głównie o warunkach życia organizmów wodnych, procesach rozkładu w oczyszczaniu ścieków, uzdatnianiu wody. Detekcja i oznaczanie tlenu jest więc bardzo ważne z punktu widzenia ochrony środowiska, medycyny, przemysłu spożywczego i chemicznego. Oznaczanie tlenu od stu lat wykonywano stosując metodę Winklera [6], natomiast dziś, w wielu normach, uznawane są metody wykorzystujące pomiar elektrochemiczny.

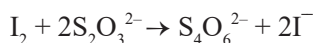
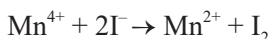
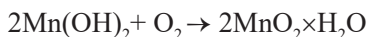
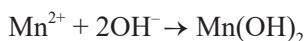
### 1. METODY OZNACZANIA TLENU ROZPUSZCZONEGO W WODZIE

Tlen rozpuszczony w wodzie umożliwia życie wodnych organizmów. Zawartość tlenu w wodzie jest najważniejszym wskaźnikiem jej jakości, dlatego jego pomiar jest istotnym elementem w uzdatnianiu wody, w hodowli ryb i oczyszczaniu ścieków [5].

Ilość tlenu rozpuszczonego w wodzie zależy od wielu czynników. Pierwszym z nich jest temperatura wody, gdyż rozpuszczalność gazów maleje wraz z jej wzrostem, co opisuje równanie Clausiusa-Clapeyrona. Obok temperatury na rozpusz-

czalność tlenu w wodzie wpływa ciśnienie zewnętrzne – wraz z jego spadkiem rozpuszczalność gazów maleje. Warto też zaznaczyć wpływ zasolenia; wraz z jego wzrostem rozpuszczalność tlenu zmniejsza się. Z drugiej strony proces fotosyntezy zachodzącej w wodzie stanowi źródło tlenu, co zwiększa nasycenie gazem zbiornika wodnego.

Do oznaczania zawartości rozpuszczonego tlenu w wodzie stosuje się znaną od ponad stu lat metodę Winklera [6]. Do badanej próbki wody dodaje się nadmiar  $\text{MnSO}_4$ , a następnie alkalizuje, czego wynikiem jest powstanie białego osadu  $\text{Mn(OH)}_2$ . Obecny w próbce tlen utlenia  $\text{Mn(II)}$  do  $\text{Mn(IV)}$ . Następnie zakwasza się roztwór i dodaje jodku potasu  $\text{KI}$ , który pod wpływem jonów  $\text{Mn(IV)}$  wydziela jod w ilości równoważnej zawartości tlenu rozpuszczonego w wodzie. Kolejnym krokiem jest oznaczanie tlenu przez miareczkowanie wolnego jodu tiosiarczanem sodu wobec skrobi jako wskaźnika. Omówione reakcje mają postać:



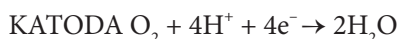
Metoda Winklera obarczona jest szeregiem wad. W oznaczaniu tlenu przeszkadzają substancje o właściwościach utleniających i redukujących zawarte w badanej próbce wody. Ponadto metoda nie umożliwia oznaczeń bardzo małych ilości tlenu; stosuje się ją w przypadku stężeń wyższych niż 0,5 mg/l. Kolejna komplikacja wynika ze sposobu pobierania i przechowywania próbki, gdyż nie może ona stykać się z powietrzem.

Nowsze, komercyjne sposoby detekcji tlenu polegają na zastosowaniu metod kolorymetrycznych. Do oznaczania tlenu w zakresie stężeń od 0,2–15 ppm używa się wskaźnika indygokarminy. W formie zredukowanej wskaźnik jest żółty, natomiast w formie utlenionej przybiera barwę niebieską, której intensywność zależy proporcjonalnie od stężenia rozpuszczonego tlenu. Metoda oznaczania bardzo niskich stężeń tlenu w zakresie ppb wymaga zastosowania jako wskaźnika rodazyny D. W wyniku reakcji z tlenem wytwarza się barwny produkt o zabarwieniu jasnoróżowym do intensywnie fioletowego w zależności od ilości tlenu rozpuszczonego w wodzie. Obie metody są niepodatne na zmiany temperatury, obecność soli, hydrazyny i siarczków [7].

## 2. ELEKTROCHEMICZNE METODY OZNACZANIA TLENU W ROZTWORZE

### 2.1. MEMBRANOWA ELEKTRODA TLENOWA CLARKA

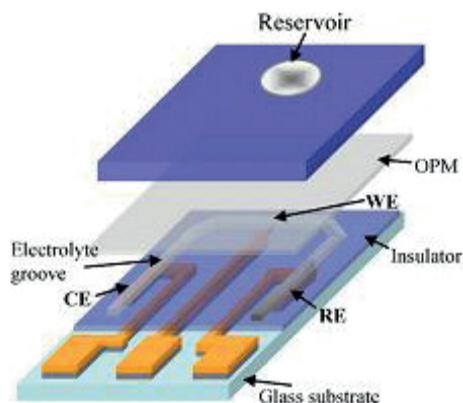
Elektroda tlenowa Clarka jest amperometrycznym czujnikiem do pomiaru stężenia tlenu w roztworze. W klasycznym zestawieniu jest układem dwuelektrodowym. Anodę stanowi elektroda chlorosrebrowa zanurzona w roztworze elektrolitu KCl. Katodą, na której zachodzi redukcja tlenu jest z reguły platyna lub złoto. Zasadniczym elementem konstrukcyjnym elektrody Clarka jest półprzepuszczalna membrana, która zabezpiecza układ przed przenikaniem zanieczyszczeń do naczynka pomiarowego. Najczęściej wykorzystywanym materiałem do budowy membran jest teflon lub polietylen, przez które tlen swobodnie przenika, w przeciwieństwie do innych gazów [8]. Na anodzie zachodzi utlenianie srebra, które wchodzi w reakcję z jonami chlorkowymi elektrolitu, natomiast na katodzie tlen ulega procesowi redukcji:



Odpowiedź chronoamperometrycznego czujnika tlenowego odczytywana jest poprzez pomiar wzrostu prądu, związanego ze wzrostem stężenia lub ciśnienia parcjalnego tlenu. W ostatnich latach można zaobserwować wyraźny trend zmierzający do opracowania nowoczesnych, miniaturowych układów stosowanych do detekcji tlenu. Mikroczujnik może służyć do oznaczeń w nieruchomym roztworze wodnym, w osadach lub nawet wewnątrz tkanek roślinnych. Istotną rolę odgrywa tu grubość i wielkość stosowanej membrany; im jest ona cieńsza tym ilość zużytego tlenu jest mniejsza, a pomiar staje się niezależny od mieszania [9]. Modyfikacja standardowej konstrukcji elektrody Clarka może być przeznaczona do detekcji również innych gazów np. CO, Cl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S.

### 2.2. KONSTRUKCJE ELEKTRODY CLARKA

Wu i współpracownicy [10] skonstruowali elektrodę Clarka, służącą do pomiaru ilości zużytego tlenu przez komórki HeLa. Pobierają one tlen w celu pozyskiwania wysoce bogatego w energię ATP, dzięki czemu można oszacować ich aktywność. Przedstawiony układ składa się ze zbiornika zbudowanego z dimetylopolisiloksanu (PDMS), membrany przez którą dyfunduje tlen (OPM) oraz szklanego podłoża z systemem trzech elektrod. Hydrofobowa powierzchnia membrany została dodatkowo zmodyfikowana grupami aminowymi w celu poprawy adhezji HeLa. Schemat opisanego układu przedstawia Rysunek 1.

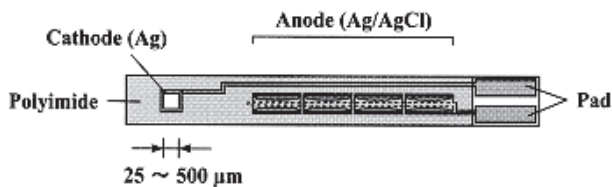


Rysunek 1. Konstrukcja elektrody Clarka do pomiaru aktywności oddychania komórek HeLa; WE – elektroda pracująca, RE – elektroda referencyjna, CE – elektroda pomocnicza [10]

Figure 1. The construction of Clark electrode for measuring the respiratory activity of HeLa cells, WE – working electrode, RE – reference electrode, CE – auxiliary electrode [10]

W zbiorniku umieszczano roztwory różniące się stężeniem rozpuszczonego tlenu. Zależność natężenia prądu od stężenia tlenu jest prostoliniowa ze współczynnikiem korelacji  $r^2 = 0,993$ . Sprawdzano również zużycie tlenu przez komórki HeLa w różnym czasie. Otrzymane rezultaty wskazują, że ilość pobranego tlenu wzrasta wraz z czasem adhezji HeLa na powierzchni PDMS OPM.

Suzuki i współpracownicy [11] skonstruowali zminiaturyzowaną elektrodę Clarka do pomiaru ciśnienia parcjalnego w analizowanych próbkach krwi. Układ zbudowany jest z katody (srebro) i anody (elektroda chlorosrebrowa), które tworzą cienki film na szklanym podłożu. Do badań wykorzystano katody różniące się rozmiarami. Ponadto warstwa silikonu utrzymuje mikropojemnik z elektrolitem na powierzchni szkła oraz spełnia funkcje ochronne. Zasadniczym elementem strukturalnym elektrody Clarka jest membrana przepuszczalna dla tlenu. Opisaną konstrukcję przedstawia rysunek poniżej (Rys. 2):



Rysunek 2. Katoda i anoda na szklanym podłożu [11]

Figure 2. The cathode and anode on a glass substrate [11]

Wyniki uzyskane za pomocą elektrody Clarka porównano z wartościami zmierzonymi analizatorem krwi. Wykorzystując do pomiarów układ z mniejszą katodą otrzymane wartości były porównywalne do tych uzyskanych przez analizator.

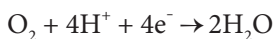
W oparciu o budowę elektrody Clarka konstruuje się czujniki do oznaczania również innych związków. Używając dehydrogenazy alkoholowej i oksydazy alkoholowej, które zostały unieruchomione na nylonowej membranie można oznaczać etanol w napojach alkoholowych [12]. Do detekcji związków fenolowych wykorzystuje się membrany z octanu celulozy z immobilizowaną tyrozinazą, enzymem zawierającym w centrum aktywnym atomy miedzi. Układ ten posłużył do oznaczania katecholu przy granicy wykrywalności równej 1  $\mu\text{M}$  [13].

Elektroda Clarka wymaga zewnętrznego zasilania elektrycznego, dość częstej kalibracji i wymian membrany. Rozwiązaniem tych niedogodności jest stosowanie dobrze zaprojektowanego tlenomierza Mackeretha z krótkim czasem odpowiedzi. Katodę stanowią metale szlachetne, natomiast anoda wykonana jest z Zn, Cd, Pb [14, 15].

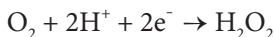
### 2.3. KATALIZATORY REDUKCJI TLENU

Proces elektroredukcji tlenu jest wieloelektronowy i składa się z kilku etapów zależnych od pH badanego roztworu [16, 17]:

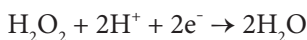
bezpośrednia czteroelektronowa redukcja tlenu do wody w środowisku kwaśnym lub do jonów hydroksylowych w środowisku zasadowym



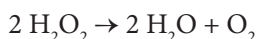
dwuelektronowa redukcja tlenu do nadtlenu wodoru



powstały nadtlenek wodoru jest dalej redukowany do wody



lub jest rozkładany katalitycznie na powierzchni elektrody:



Proces redukcji tlenu zależy również od rodzaju zastosowanej elektrody. Na elektrodzie platynowej zachodzi redukcja ditlenu do wody, której mechanizm składa się z dwóch etapów. Pierwszy etap to adsorpcja cząsteczki tlenu na platynie, prowadzący w konsekwencji do wytworzenia nadtlenu wodoru. Z kolei w drugim etapie nadtlenek wodoru ulega redukcji do wody [18]. Ze względu na wysoką cenę oraz wrażliwość platyny na zanieczyszczenia zaczęto stosować inne rozwiązania. Interesującym materiałem katalitycznym do redukcji tlenu są makrocykliczne związki metali przejściowych MN4. Są to np. połączenia porfiryn i ftalocyjanin z jonami metali (Cr, Mn, Co). Charakteryzują się one dość wysoką aktywnością katalityczną;



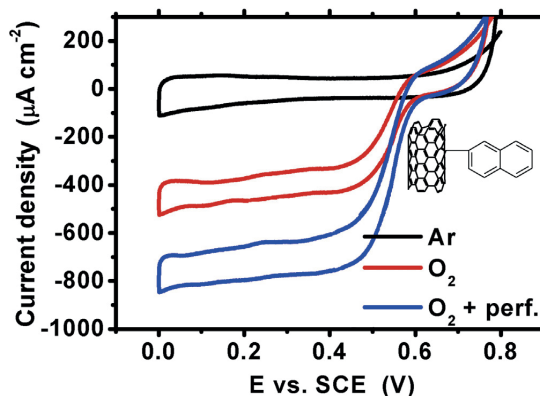
z drugiej strony są mało trwałe i zwykle produktem redukcji nie jest woda, a nadtlenek wodoru. Dowiedziono, że obróbka termiczna materiału poprawia jego stabilność i właściwości katalityczne [19, 20].

Główną trudnością w praktycznym zastosowaniu procesu redukcji tlenu na materiałach węglowych, zastępujących katalizatory zawierające metale, jest przede wszystkim zbyt duży nadpotencjał oraz stosunkowo niskie wartości gęstości prądu. Elektrochemiczna redukcja tlenu na niemodyfikowanej elektrodzie z węgla szklitego zachodzi przy potencjale  $-0,6$  V względem elektrody chlorosrebrowej. Ponadto proces ten jest dwuelektronowy i przebiega z wytworzeniem nadtlenu wodoru jako produktu finalnego. Modyfikacja powierzchni elektrody za pomocą nanorurek węglowych prowadzi do przesunięcia potencjału redukcji tlenu w stronę bardziej dodatnich wartości. W przypadku elektrody pokrytej nanorurkami węglowymi redukcja tlenu zachodzi przy potencjale ok.  $-0,1$  V względem elektrody chlorosrebrowej. Zastosowanie nanomateriałów węglowych powoduje także wzrost prądu ze względu na fakt zwiększenia fizycznej powierzchni elektrody oraz poprawy jej przewodnictwa. Właściwości nanorurek węglowych pozwalają na ich modyfikację, która ma na celu przyłączenie różnych grup funkcyjnych do ich powierzchni. Dzięki temu uzyskujemy materiał o pożądanych właściwościach fizykochemicznych. Do funkcjonalizacji wykorzystuje się obecność grup karboksylowych, wynikających z defektów struktury [21]. Modyfikacja może odbywać się na końcach nanorurek lub na powierzchni ścian bocznych. Należy jednak zaznaczyć, że osiągnięty potencjał jest daleki od wartości potencjału formalnego procesu redukcji tlenu. W celu skonstruowania optymalnej biokatody zaczęto poszukiwać rozwiązań zaproponowanych przez naturę czyli enzymów. Redukcja tlenu katalizowana enzymem następuje niemal bez nad napięcia. Najistotniejszą zaletą stosowania nanomateriałów węglowych jest możliwość zaobserwowania bezpośredniego przeniesienia elektronu pomiędzy centrum aktywnym enzymu a powierzchnią elektrody [22–27]. Najczęściej wykorzystywanymi biokatalizatorami są oksydoreduktazy miedziowe, zawierające w swojej strukturze co najmniej cztery atomy miedzi. Szczególna uwaga poświęcona jest lakazie i oksydazie bilirubiny [28–33].

W ostatnich pracach naszej grupy scharakteryzowany został proces redukcji tlenu na elektrodach modyfikowanych nanorurkami węglowymi z resztami aromatycznymi o zróżnicowanej strukturze i z zaadsorbowaną lakazą [34–38]. Wykazaliśmy, że nanorurki modyfikowane grupami fenylowymi, naftylowymi, bifenylowymi, antrylowymi oraz terfenylowymi skutecznie zwiększają ilość zaadsorbowanego enzymu oraz umożliwiają trwałe jego unieruchomienie, eliminując przy tym możliwość denaturacji. Obecność pierścieni aromatycznych, posiadających układ sprzężonych wiązań podwójnych, które z łatwością wnikają do hydrofobowej kieszeni enzymu, ułatwia bezpośrednią wymianę elektronów między powierzchnią elektrody a centrum aktywnym enzymu [33].

Karaśkiewicz i współpracownicy [39] zbadali wpływ jednościennych nanorurek z przyłączonymi perfluorowanymi grupami aromatycznymi i zaadsorbowaną lakazą

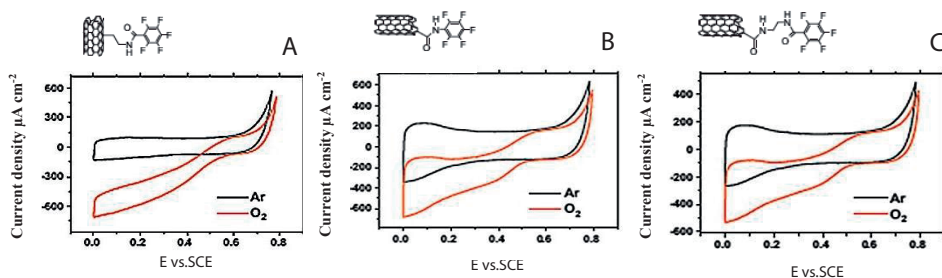
na proces redukcji tlenu. W przypadku zastosowania nanorurek z perfluorowanym podstawnikiem otrzymano cztery razy wyższy prąd katalityczny w porównaniu z jednościanowymi nanorurkami naftyłowymi (Rys. 3). Otrzymane wartości gęstości prądu, świadczą o dużej zdolności akumulowania tlenu przez związki fluoru. Fala katalityczna redukcji tlenu w każdym ze stosowanych wariantów nanorurek rozpoczyna się przy potencjale 0,6 V względem elektrody chlorosrebrowej, natomiast potencjał półfali jest bardzo bliski potencjałowi formalnemu lakazy, a także formalnemu potencjałowi procesu 4e redukcji tlenu do wody.



Rysunek 3. Porównanie woltamogramów cyklicznych dla elektrody z węgla szklonego GCE modyfikowanej nanorurkami naftyłowymi i lakazą (krzywa czerwona) oraz GCE modyfikowanej nanorurkami perfluorowanymi ze związaną lakazą (krzywa niebieska), pomiar w buforze natlenionym i odtlenionym McIlvaine'a pH 5,3,  $\nu = 1$  mV/s [39]

Figure 3. Comparison of cyclic voltammograms recorded GCE modified with naphthylated carbon nanotubes and adsorbed laccase (red curve) and GCE modified with perfluorophenylated carbon nanotubes with laccase (blue curve), the measurements were done in the oxygenated and deoxygenated (black curve) McIlvaine buffer solution, pH 5,3,  $\nu = 1$  mV/s [39]

Kolejnym etapem było zbadanie wpływu miejsca modyfikacji nanorurek i długości łańcucha podstawnika na wartość gęstości prądu. Elektrody modyfikowano nanorurkami perfluoro-aryłowymi o różnej długości podstawnika przyłączonego do ścian bocznych lub do końców nanorurek (Rys. 4).



Rysunek 4. Woltamogramy cykliczne zarejestrowane dla elektrody pokrytej nanorurkami perfluorowanymi (A, B, C) i lakazą w buforze McIlvaine'a pH 5,3 natlenionym (krzywa czerwona) i odtlenionym (krzywa czarna);  $v = 1 \text{ mV} [39]$

Figure 4. Cyclic voltammograms recorded for the electrode covered with perfluorophenylated carbon nanotubes (A, B, C) and adsorbed laccase in oxygenated (red curve) and deoxygenated (black curve) McIlvaine buffer solution, pH 5,3;  $v = 1 \text{ mV/s} [39]$

Najwyższą gęstość prądu uzyskano na elektrodzie pokrytej nanorurkami modyfikowanymi na ścianach (Rys. 4A). Z przeprowadzonych badań wynika, że zwiększenie długości łącznika wpływa negatywnie na wartość prądu katalitycznego ze względu na utrudniony transport elektronu pomiędzy enzymem i elektrodą (Rys. 4B,C). Przedstawione powyżej różne modyfikacje biokatod wskazują na możliwość opracowania wydajnej bioelektrody do katalitycznej redukcji tlenu i wykorzystania jej w konstrukcji bioczujników lub bioogniw paliwowych.

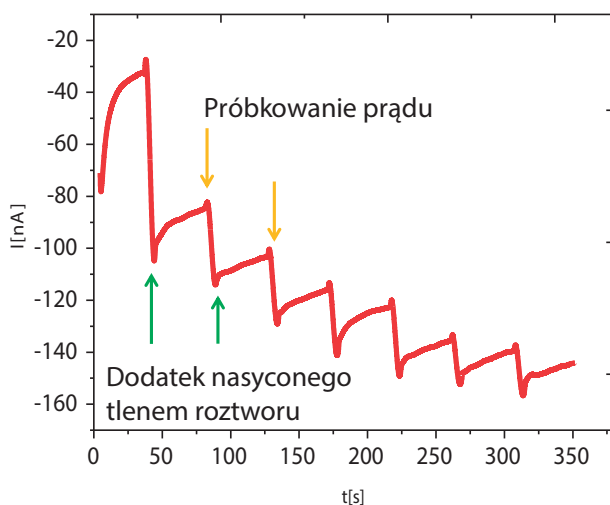
#### 2.4. BIO CZUJNIKI TLENU

Dynamiczny rozwój technologii, diagnostyki medycznej oraz zaostojące się wymogi ochrony środowiska stwarzają potrzebę rozwoju metod analitycznych i systemów kontroli jakości. Typowe metody analizy chemicznej pomimo wielu zalet stają się mało przydatne tam gdzie pożądane jest szybkie, w pełni zautomatyzowane oznaczenie, a nawet monitorowanie. Ponadto w większości wymagają one stosowania drogiego i skomplikowanego sprzętu laboratoryjnego. Wymienione wyżej warunki spełniają bioczujniki ze względu na szeroki wachlarz możliwości konstrukcyjnych. W ostatnim czasie można zaobserwować silny trend związany z udoskonalaniem i modyfikowaniem dotychczas już znanych układów poprzez poprawę właściwości, parametrów pracy i miniaturyzację. Do podstawowych elementów biosensora można zaliczyć warstwę receptorową zbudowaną z materiału biologicznego, odpowiedzialną za rozpoznanie analitu oraz element przetwornikowy. Atrakcyjność bioczujników wynika z dużej selektywności, która jest ściśle określona przez zastosowanie właściwych biokatalizatorów [40]. Z medycznego punktu widzenia dużym atutem jest możliwość stworzenia nieinwazyjnego urządzenia, charakteryzującego się łatwością obsługi, prostotą budowy, a co za tym idzie niskim kosztem produkcji. W tym celu należy stosować tanie materiały, które są rozpowszechnione i łatwe do wytworzenia [41].

Biocujniki tlenowe znajdują zastosowanie w analizie próbek środowiskowych, przemysłowych oraz w diagnostyce medycznej, zapewniając wczesne wykrywanie problemów i punktów kryzysowych.

Pita i współpracownicy [42] opracowali biosensor wrażliwy na tlen w roztworze i płynach fizjologicznych. W tym celu wykorzystali złotą elektrodę dyskową, pokrytą nanocząstkami złota AuNPs ze związaną kowalencyjnie oksydazą bilirubiny wyizolowaną z *Myrothecium verrucaria*. Centrum aktywne enzymu, podobnie jak lakazy zawiera cztery atomy miedzi. Enzym charakteryzuje się niezwykłą odpornością na działanie jonów halogenkowych, w szczególności  $\text{Cl}^-$ . Przewagą oksydazy bilirubiny nad równie powszechnie stosowaną lakazą jest maksymalna aktywność enzymu w środowisku obojętnym. Otrzymano liniową odpowiedź tak skonstruowanego biosensora w szerokim zakresie stężeń od 6–300  $\mu\text{M}$  z granicą oznaczalności równą  $6 \pm 1 \mu\text{M}$ .

Gutierrez-Sanchez i współpracownicy [43] skonstruowali biosensor do monitorowania tlenu w roztworze. W tym celu użyli elektrody grafitowej z kowalencyjnie unieruchomioną lakazą *Trametes hirsuta*. Złożony proces unieruchamiania enzymu na powierzchni elektrody doprowadził do stworzenia biosensora o dużej odtwarzalności i selektywności z granicą wykrywalności poniżej 1  $\mu\text{M}$ .

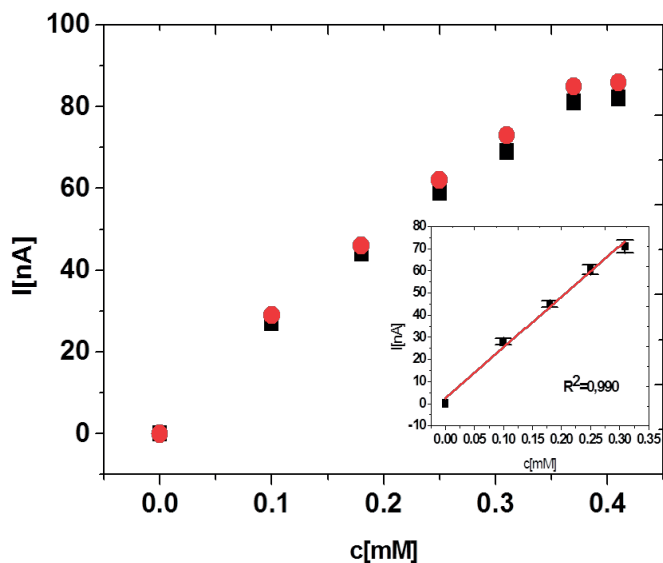


Rysunek 5. Chronoamperometryczna zależność gęstości prądu od czasu zarejestrowana w układzie z katodą pokrytą naftylovanymi nanorurkami węglowymi i lakazą, dla różnych stężeń tlenu w roztworze buforu McIlvaine'a o pH 5,3. Potencjał: 0,3 V [44]

Figure 5. Chronoamperometric current density vs time plots recorded using the cathode covered with naphthylated carbon nanotubes and adsorbed laccase in McIlvaine buffer solution, pH 5.3 containing different oxygen concentrations. Potential: 0.3 V [44]

Kizling i współpracownicy [44] skonstruowali biosensor do monitorowania stężenia tlenu w roztworze. W tym celu zmodyfikowano elektrodę GCE ( $0,008 \text{ cm}^2$ ) wielościennymi nanorurkami węglowymi, posiadającymi na końcach grupy naf-

tyłowe, które skutecznie wiązały lakazę na elektrodzie oraz zapewniały kontakt elektryczny przewodzącego podłoża z centrami aktywnymi enzymu. W celu scharakteryzowania układu wykorzystano metodę woltamperometrii cyklicznej i chronoamperometrii. Wielkość prądu katalitycznego była rejestrowana w funkcji czasu dla różnych stężeń tlenu przy stałym potencjale 0,3 V (Rys. 5.). Zależność prądu od stężenia była liniowa w zakresie 1  $\mu\text{M}$ –0,35 mM (Rys. 6.).



Rysunek 6. Krzywa kalibrowania: zależność prądu katalitycznego od stężenia tlenu [44]

Figure 6. Calibration plot showing the dependence of catalytic current on oxygen concentration [44]

Jako źródła mocy dla minipotencjostatu połączonego z biosensorem tlenowym użyto bioogniwa. Jako biokatodę zastosowano papier węglowy (CP) pokryty również wielościennymi naftylowanymi nanorurkami węglowymi z zaadsorbowaną lakazą *Trametes versicolor*. Anodę stanowił również papier węglowy pokryty kompozytem celulozy i polipirolu z dehydrogenazą fruktozy (FDH). W naszym zespole trwają testy układu oraz próby miniaturyzacji czujnika tlenowego do oznaczania stopnia nasycenia krwi tlenem. Kontrola nasycenia tlenem jest jednym z głównych badań wykonywanych u inkubowanych noworodków oraz pacjentów w śpiączce farmakologicznej. Wykorzystuje się w tym celu zjawisko dyfuzji tlenu przez skórę, dzięki czemu nie jest konieczne pobieranie krwi do badań. Opracowana koncepcja biosensora ma duże szanse komercyjnego sukcesu na rynku.

Falk i współpracownicy [45] opracowali bioczujnik z własnym źródłem zasilania i bezprzewodową transmisją sygnału. Urządzenie działa jako bioczujnik węglowodanów i tlenu. Składa się ono z bezprzewodowego urządzenia elektronicznego, nadajnika radiowego i oddzielnych czujnikowych bioelektrod. Powyższe elementy są zasilane energią elektryczną z enzymatycznego ogniwa paliwowego, dostarczającego wystarczającą energię, i napięcie wymagane do działania części elektronicznej.

W Zespole Profesora Stanisława Głęba skonstruowano szereg biocujników potencjometrycznych, amperometrycznych oraz optycznych z wykorzystaniem zmian barwy pod wpływem reakcji redoks. Modyfikowana oksydazą glukozy warstwa błękitu pruskiego posłużyła do konstrukcji optycznego czujnika glukozy [46]. Amperometryczny czujnik z warstwą kompozytową błękitu pruskiego, pochodnej polipirolu oraz oksydazy glukozy wykorzystano do oznaczania glukozy na podstawie redukcji enzymatycznie wytworzonego nadtlenu wodoru [47]. Unieruchomienie enzymu na sfunkcjonalizowanym polimerze prowadzi do znacznie efektywniejszej dynamiki transportu ładunku i poprawy stabilności enzymu. Wcześniejsze prace w tym zespole obejmowały konstrukcję biosensorów potencjometrycznych do oznaczania analitów na bazie elektrod z membranami jonoselektywnymi [48–52]. W czujniku na mocznik, membranę z polichlorku winylu modyfikowano grupami aminowymi, które służyły do kowalencyjnego wiązania enzymu – ureazy [48]. Elektrody jonoselektywne na jon amonowy zastosowano w układach przepływowych do monitorowania procesu hemodializy [50, 51]. W zależności od badanego analitu stosowano również keratynazy i arginazy. Otrzymane biosensory charakteryzowały się wysoką czułością, stosunkowo krótkim czasem odpowiedzi, trwałością i długim czasem życia (ponad 1 miesiąc). Połączenie biocujników elektrochemicznych, których przykłady podano powyżej, z bioogniwami wykorzystującymi do zasilania powietrze i glukozę, dostępne w ludzkim organizmie, jest obecnie jednym z wyzwań współczesnej elektroanalizy dla potrzeb medycyny. Postęp w dziedzinie nanotechnologii, biochemii i elektroniki otwiera wiele możliwości konstrukcji takich samozasilających się układów biosensorowych jako kontynuacji biosensorowych prac Profesora Stanisława Głęba.

#### PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] L. Li, G. Ishdorj, S.B. Gibson, *Free Radical Biology and Medicine*, 2012, **53**, 1399.
- [2] E.G. Hrycay, S.M. Bandiera, *Advances in Pharmacology*, 2015, doi:10.1016/bs.apha.2015.03.003, in press.
- [3] D. Zhou, L. Shao, D.R. Spitz, *Advances in Canser Research*, 2014, **122**, 1.
- [4] C.Y. Liu, C.F. Lee, Y.H. Wei, *Journal of the Formosan Medical Association*, 2009, **108**, 599.
- [5] V.R. Mattson, J.R. Hockett, T.L. Highland, G.T. Ankley, D.R. Mount, *Chemosphere*, 2008, **70**, 1840.
- [6] J. Dojlido, J. Zerbe, *Arkady*, 1997, 196.
- [7] M.L. Hitchman, John & Sons, 1978, **49**, 195.
- [8] E.G. Banica, Wiley & Sons, 2012, 306.
- [9] G. Jobst, G. Urban, A. Jachimowicz, F. Kohl, O. Tilado, I. Lettenbichler, G. Nauer, *Biosensors and Bioelectronics*, 1933, **8**, 123.
- [10] C.C. Wu, H.N. Luk, Y.T. Tsai Lin, C.Y. Yuan, *Talanta*, 2010, **81**, 228.
- [11] H. Suzuki, T. Hirakawa, I. Watanabe, Y. Kikuchi, *Analytica Chimica Acta*, 2001, **431**, 249.
- [12] A.M. Pisoschi, A. Pop, A.I. Serban, G.P. Negulescu, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2012, **671**, 85.
- [13] M. Stoytcheva, R. Zlatev, M. T. Beleno, G. Montero, *Current Analytical Chemistry*, 2015, **11**, 50.
- [14] J. Fligier, praca doktorska, 1974.

- [15] L. Nei, M. Lillenberg, *ECS Transactions*, 2009, **19**, 55.
- [16] R. Adzic, J. Lipkowski, P.N Ross, Wiley-VCH, 1998, 197, Chapter 5.
- [17] V.S. Bagotsky, A John Wiley & Sons, 2006, 272.
- [18] A.B. Anderson, T.V. Albu, *Journal of The Electrochemical Society*, 2000, **147**, 4229.
- [19] J.H. Zagal, S. Griveau, K.I. Ozoemena, T. Nyokong, F. Bedioui, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2009, **9**, 2201.
- [20] J.H. Zagal, F.J. Recio, C. A. Gutierrez, Z. Zuniga, M. A. Paez, C. A. Caro, *Electrochemistry Communications*, 2014, **41**, 24.
- [21] A. Hirsch, *Angewandte Chemie International Edition*, 2002, **41**, 1854.
- [22] S. Shleev, J. Tkac, A. Christenson, T. Ruzgas, A. I. Yaropolov, J. W. Whittaker, L. Gorton, *Biosensors and Bioelectronics*, 2005, **20**, 2517.
- [23] S. Shleev, Y. Wang, M. Gorbacheva, A. Christenson, D. Haltrich, R. Ludwig, T. Ruzgas, L. Gorton, *Electroanalysis*, 2008, **20**, 963.
- [24] S. Brocato, C. Lau, P. Atanassov, *Electrochimica Acta*, 2012, **61**, 44.
- [25] E. Rozniecka, M. Jonsson-Niedziolka, J. W.Sobczak, M. Opallo, *Electrochimica Acta*, 2011, **56**, 8739.
- [26] N. Lalaoui, A. Le Goff, M. Holzinger, M. Mermoux, S. Cosnier, *Chemistry- A European Journal*, 2015, **21**, 3198.
- [27] D. V. Pankratov, Y. S. Zeifman, O. V. Morozova, G. P. Shumakovich, I. S. Vasil'eva, S. Shleev, V. O. Popov, A. I. Yaropolov, *Electroanalysis*, 2013, **25**, 1143.
- [28] C. F. Blanford, S. R. Heath, F. A. Armstrong, *Chemical Communications*, 2007, **17**, 1710.
- [29] L. dos Santos, V. Climent, C. F. Blanford, F. A. Armstrong, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2010, **12**, 13962.
- [30] E. I. Solomon, U. M. Sundaram, T. E. Machonkin, *Chemical Reviews*, 1996, **96**, 2563.
- [31] J. A. Cracknell, K. A. Vincent, F. A. Armstrong, *Chemical Reviews*, 2008, **108**, 2439.
- [32] N. Mano, L. Edembe, *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, **50**, 478.
- [33] R. Bilewicz, M. Opallo, A. Wieckowski, J. K. Norskov, John Wiley & Sons, 2010, 169.
- [34] K. Sadowska, K. Stolarczyk, J. F. Bierant, K. P. Roberts, J. Rogalski, R. Bilewicz, *Bioelectrochemistry*, 2010, **80**, 73.
- [35] E. Nazaruk, K. Sadowska, J. F. Bierant, J. Rogalski, G. Ginalska, R. Bilewicz, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, **398**, 1651.
- [36] K. Stolarczyk, M. Sepelowska, D. Lyp, K. Zelechowska, J. F. Bierant, J. Rogalski, K. D. Farmer, K.P. Roberts, R. Bilewicz, *Bioelectrochemistry*, 2012, **87**, 154.
- [37] M. Karaškiewicz, E. Nazaruk, K. Zelechowska, J. F. Bierant, J. Rogalski, R. Bilewicz, *Electrochemistry Communications*, 2012, **20**, 124.
- [38] K. Stolarczyk, D. Lyp, K. Zelechowska, J. F. Bierant, J. Rogalski, R. Bilewicz, *Electrochimica Acta*, 2012, **79**, 74.
- [39] M. Karaškiewicz, J. F. Biernat, J. Rogalski, K. P. Roberts, R. Bilewicz, *Electrochimica Acta*, 2013, **112**, 403.
- [40] A. E. Gardiol, R. J. Hernandez, B. Reinhammar, B. R. Harte, *Enzyme and Microbial Technology*, 1996, **18**, 347.
- [41] N. Yang, X. Chen, T. Ren, P. Zhang, D. Yang, *Sensors and Actuators B*, 2015, **207**, 690.
- [42] M. Pita, C. Gutierrez-Sanchez, M.D. Toscano, S. Shleev, A. L. De. Lacey, *Bioelectrochemistry*, 2013, **94**, 69.
- [43] C. Gutierrez-Sanchez, S. Shleev, A. L. De. Lacey, M. Pita, *Chemical Papers*, 2014, short communication.
- [44] M. Kizling, S. Draminska, K. Stolarczyk, P. Tammela, Z. Wang, L. Nyholm, R. Bilewicz, *Bioelectrochemistry*, 2015, **106**, 34.

- [45] M. Falk, M. Alcalde, P.N. Bartlett, A. L. De Lacey, L. Gorton, C. Gutierrez-Sanchez, R. Haddad, J. Kilburn, D. Leech, R. Ludwig, E. Magner, D. M. Mate, P. Ó. Conghaile, R. Ortiz, M. Pita, S. Poller, T. Ruzgas, U. Salaj-Kosla, W. Schuhmann, F. Sebelius, M. Shao, L. Stoica, C. Sygmund, J. Tilly, M.D. Toscano, J. Vivekananthan, E. Wright, S. Shleev, PLoS ONE, 2014, **10**, 9.
- [46] T. Lenarczuk, D. Wencel, S. Głąb, R. Koncki, *Analytica Chimica Acta*, 2001, **447**, 23.
- [47] K. Derwinska, K. Miecznikowski, R. Koncki, P. J. Kulesza, S. Głąb, M. A. Malik, *Electroanalysis*, 2003, **15**, 1843.
- [48] I. Wałcerz, R. Koncki, E. Leszczyńska, S. Głąb, *Analytica Chimica Acta*, 1995, **315**, 289.
- [49] R. Koncki, I. Wałcerz, F. Ruckruh, S. Głąb, *Analytica Chimica Acta*, 1996, **333**, 215.
- [50] R. Koncki, A. Radońska, S. Głąb, *Talanta*, 2000, **52**, 13.
- [51] A. Radońska, R. Koncki, K. Pyrzyńska, S. Głąb, *Analytica Chimica Acta*, 2004, **523**, 193.
- [52] R. Koncki, E. Leszczyńska, A. Cybulska, S. Głąb, *Analytica Chimica Acta*, 1996, **321**, 27.

Praca wpłynęła do Redakcji 15 lipca 2015