

# کارایی نانوکامپوزیت گرافن - سیستئین جهت تثبیت آنزیم گلوکز اکسیداز در سطح الکتروود کربنی

هدیه ناصری مقدم<sup>۱</sup> و هدایت اله قورچیان<sup>۱\*</sup>

<sup>۱</sup> تهران - دانشگاه تهران - مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک (IBB)

<sup>۲</sup> تهران - دانشگاه خوارزمی - دانشکده‌ی علوم زیستی - گروه علوم سلولی و مولکولی

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۰/۲۶

تاریخ تصحیح: ۹۵/۰۱/۱۲

تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۱/۱۴

## چکیده

در سال‌های اخیر تلاش فراوانی جهت فراهم نمودن بسترهای بیولوژیکی برای تثبیت آنزیم‌ها و استفاده از آنها در بیو تکنولوژی و توسعه زیست حسگرها صورت گرفته است. یکی از این روش‌ها استفاده از اسیدآمینه سیستئین می‌باشد. تثبیت مقدار بیشتر سیستئین بر سطح الکتروود، موجب قرارگیری مقدار بیشتری از پروتئین بر سطح الکتروود می‌شود که باعث بهبود زیست حسگر می‌شود. در پژوهش حاضر سیستئین به روش الکتروشیمیایی بر سطح الکتروود کربن شیشه‌ای برهنه، الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با گرافن و الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با گرافن اکساید تثبیت شد. بررسی نتایج حاصل از ولتامتری چرخه‌ای نشان داد که سیستئین بر سطح الکتروود اصلاح شده با گرافن بهتر تثبیت می‌شود. به علاوه استفاده از نانوکامپوزیت سیستئین-گرافن در سطح الکتروود کربن شیشه‌ای نه تنها موجب قرارگیری مقدار بیشتری از آنزیم گلوکز اکسیداز بر سطح الکتروود اصلاح شده گردید، بلکه گرافن بستری را فراهم نمود که انتقال الکترون از سطح الکتروود به مرکز ردوکس آنزیم تسهیل شود.

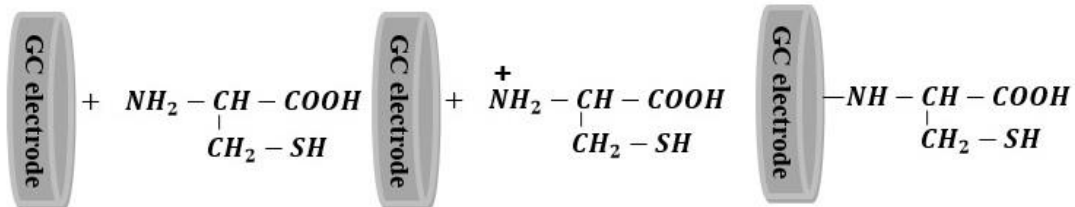
واژگان کلیدی: سیستئین، گرافن، گرافن اکساید، الکتروود کربن شیشه‌ای، الکتروشیمی

## ۱- مقدمه

ال-سیستئین (HS-CH<sub>2</sub>-CH (NH<sub>2</sub>)-COOH)، اسیدآمینه‌ای است که به طور گسترده در پروتئین‌ها وجود دارد و در بیولوژی مولکولی، پزشکی، بیوشیمی و بخصوص در تعامل بیومولکول‌ها با مواد غیرآلی نقش حیاتی ایفا می‌کند. برای مثال به منظور اتصال پروتئین‌ها و آنتی‌بادی‌ها به سطح فلزات استفاده می‌شود [۱]. ال-سیستئین فعالیت الکتروشیمیایی مناسبی از خود نشان داده و تجمع خود به خودی آن سبب ایجاد یک تک لایه بر سطح الکتروود طلا می‌گردد [۲]. از سیستئین به عنوان عنصر شناساگر به منظور شناسایی یون‌ها استفاده شده است. به عنوان مثال از الکتروود طلای اصلاح شده با ال-سیستئین به منظور شناسایی یون مس استفاده شده است [۳]. تا کنون از روش‌های مختلفی برای کاهش پتانسیل اضافی (آور پتانسیل) برای پایین آوردن پتانسیل ردوکس گونه‌های مختلف استفاده شده است [۴-۵]. در مطالعه‌ای از الکتروود خمیر کربنی اصلاح شده با

(9, 10-dihydro-9, 10-ethanoanthracene-11, 12-dicarbox- imido)-4-ethylbenzene-1, 2-diol (DEDE) و نانوکامپوزیت NiO/CNT برای شناسایی سیستمین استفاده شد. نتایج الکتروشیمیایی نشان داد که الکترواد اصلاح شده فعالیت الکتروکاتالیتیکی موثری در کاهش پتانسیل اضافی آندی اکسیداسیون سیستمین دارد [۴]. همچنین در پژوهشی دیگر الکترواد خمیر کربن با N-(4-hydroxyphenyl)-3,5-dinitrobenzamide و FePt/CNT اصلاح شد و برای شناسایی گلوکاتینون استفاده شد. الکترواد اصلاح شده سبب کاهش ۲۲۰ میلی ولتی در پتانسیل اکسیداسیون گلوکاتینون گردید [۵].

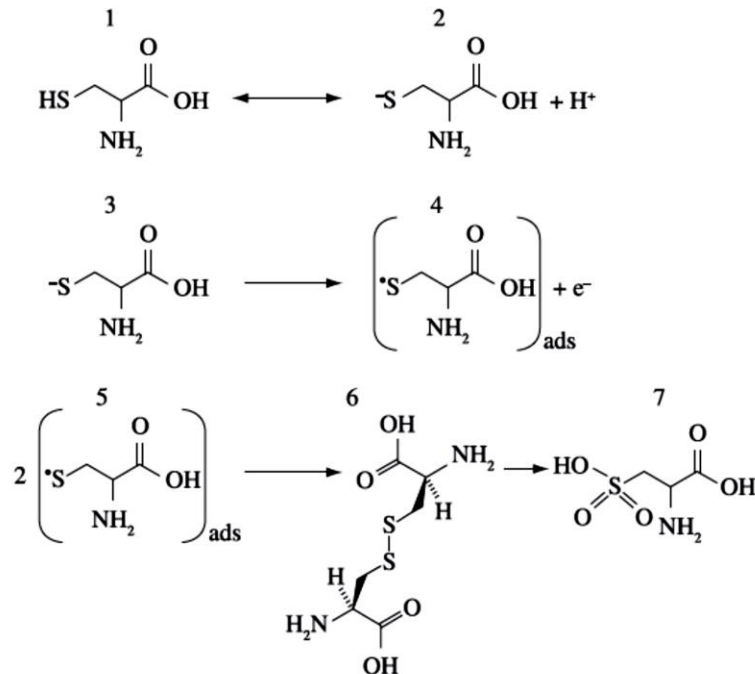
در سال ۲۰۰۶ یک الکترواد کربن شیشه‌ای اصلاح شده با ال-سیستئین به طریقه‌ی اکسیداسیون الکتروشیمیایی ساخته شد و به طور موفقیت‌آمیزی برای سنجش الکتروشیمیایی استامینوفن بکار رفت. در این الکترواد ال-سیستئین باعث بهبود انتقال الکترون شد و باعث کاهش پتانسیل اکسیداسیون استامینوفن و افزایش قابل توجهی در پیک جریان اکسیداسیون شد. همچنین ال-سیستئین یک اثر الکتروکاتالیتیکی بالایی بر اکسیداسیون استامینوفن داشت. یک حد تشخیص پایین، پایداری مناسب و حساسیت بالا به وسیله این الکترواد اصلاح شده به دست آمد. [۶]. در مطالعه‌ی دیگری از الکترواد کربن شیشه‌ای اصلاح شده با ال-سیستئین برای شناسایی دوپامین استفاده شد، که یک روش سریع، قابل اطمینان، کم هزینه و آسان برای شناسایی دوپامین می باشد. تعامل مطلوب بین ال-سیستئین و دوپامین سبب افزایش جریان در مقایسه با الکترواد کربن شیشه‌ای اصلاح شده با نافیون و الکترواد کربن شیشه‌ای برهنه شد [۷]. عموماً سیستمین به عنوان اتصال‌دهنده برای تثبیت پروتئین‌ها استفاده می‌شود. در پژوهشی از ال-سیستئین برای تثبیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در سطح الکترواد طلا استفاده شد. یک انتقال الکترون مستقیم بین آنزیم و سطح الکترواد از طریق ال-سیستئین ایجاد گردید [۸]. برای تثبیت ال-سیستئین در سطح الکترواد کربن شیشه‌ای به روش الکتروشیمیایی دو نظریه وجود دارد: در نظریه اول معتقدند که تثبیت سیستمین از طریق اکسیداسیون تک الکترونی گروه آمین و تبدیل آن به رادیکال کاتیونی متناظر و سپس تشکیل پیوند نیتروژن-کربن در سطح الکترواد انجام می‌شود (شکل ۱). پیک اکسیداسیون در پتانسیل ۱/۳+ ولت و پیک احیا در پتانسیل ۰/۳۲- ولت مشاهده شده است [۹].



شکل ۱- مکانیسم اکسیداسیون ال-سیستئین در سطح الکترواد کربن شیشه‌ای بر اساس نظریه اول [۷].

در نظریه دوم گروه SH ال-سیستئین در سطح الکترواد اکسید شده و دو مولکول به یکدیگر متصل می‌گردد. پیک اکسیداسیون به صورت برگشت‌ناپذیر در ولتاژ ۰/۷+ ظاهر می‌شود. در این فرایند ال-سیستئین (ترکیب ۱، شکل ۲) به ال-سیستین (ترکیب ۶، شکل ۲) اکسید می‌شود. از سوی دیگر پیک اکسیداسیون برگشت‌ناپذیر دیگری در پتانسیل ۱/۶+ ولت مشاهده شده که مربوط به

اکسید شدن ال-سیستین به سیستیک اسید (ترکیب ۷، شکل ۲) است [۱۴-۱۰ و ۷]. گروه عاملی  $\text{SO}_3\text{H}$  از سیستیک اسید می‌تواند به شدت جذب سطح الکترود کربن شیشه‌ای شود [۱۰].



شکل ۲- مکانیسم اکسیداسیون ال-سیستین در سطح الکترود کربن شیشه‌ای بر اساس نظریه دوم [۷].

همانطور که گفته شد از سیستین تثبیت شده بر سطح الکترود به دو منظور استفاده می‌شود، یا به عنوان یک واسطه برای اتصال پروتئین به سطح الکترود و یا به عنوان بخش شناساگر برای واکنش با آنالیت خاص در محلول. در هر دو حالت یافتن راهی برای تثبیت مقدار بیشتری از این اسیدآمین به سطح الکترود می‌تواند منجر به بهبود عملکرد الکترود گردد. تثبیت مقدار بیشتر سیستین موجب قرارگیری مقدار بیشتری از پروتئین بر سطح الکترود می‌شود. برای رسیدن به این هدف الکترود کربن شیشه‌ای با گرافن و گرافن اکساید اصلاح شد و تثبیت سیستین بر سطح الکترودها با هم مقایسه شد.

گرافن به دلیل داشتن ویژگی‌های عالی مکانیکی، الکتریکی، دمایی، اپتیکی، مساحت بسیار بالا و امکان کنترل تمام این ویژگی‌ها از طریق عامل‌دار کردن شیمیایی، مورد توجه دانشمندان قرار گرفته است [۱۵]. به دلیل این خواص شگفت‌انگیز، گرافن به طور گسترده در سنتز نانوکامپوزیت‌ها استفاده شده‌است. تحقیقات اخیر نشان داده که گرافن فعالیت الکتروشیمیایی مطلوب نسبت به بسیاری از آنالیت‌ها دارد و باعث بهبود انتقال الکترون می‌شود [۱۶].

گرافن اکساید، مشتق مهمی از گرافیت است که تعداد زیادی از گروه‌های عملکردی اکسیژن دار (هیدروکسیل، کربوکسیل، اپوکسی) در آن وجود دارد، که به آن امکان برهمکنش با نانومواد و یا مولکول‌های زیستی را می‌دهد [۱۷].

در پژوهش حاضر به منظور یافتن بستری مناسب برای تثبیت آنزیم گلوکز اکسیداز، ال-سیستئین به طریق الکتروشیمیایی بر سطح الکتروود کربن شیشه‌ای برهنه (GCE)، الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با گرافن اکساید (GO/GCE) و الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با گرافن (Gr/GCE)، تثبیت شد و نتایج مقایسه گردید.

## ۲- مواد و روش ها

### ۲-۱- مواد شیمیایی و دستگاه‌ها

مواد مورد استفاده در این پژوهش عبارتند از: ال-سیستئین (سیگما/آمریکا)، پتاسیم دی هیدروژن فسفات، پتاسیم هیدروژن فسفات، پتاسیم کلراید و پتاسیم هگزا فری سیانید (مرک/آلمان)، گرافن و گرافن اکساید (اهدایی از لیلا شهریاری، دانشکده شیمی، دانشگاه پونه، هند). از الکتروود مرجع نقره-کلرید نقره، الکتروود کمکی پلاتین و الکتروود کار کربن شیشه‌ای (GCE) استفاده شد. آزمایش‌های ولتامتری چرخه‌ای با استفاده از دستگاه پتانسیواستات-گالوانواستات EG&G مدل 263A ساخت کشور آمریکا، انجام شد.

### ۲-۲- تثبیت ال-سیستئین بر سطح الکتروود کربن شیشه‌ای

سطح GCE به کمک دوغاب آلومینیوم اکسید (۰/۰۵ میکرومتر) صیقل داده می‌شود و سپس به ترتیب با آب، اتانول و آب دوبار تقطیر شستشو داده می‌شود. محلول سیستئین با غلظت ۵ میلی‌مولار در بافر فسفات با pH ۷ تهیه شد. سپس الکتروود را در محلول سیستئین قرار داده و در محدوده پتانسیل ۰/۷- تا ۱/۷ با سرعت روبش ۱۰۰ میلی‌ولت بر ثانیه ۲۰ چرخه تکرار شد.

### ۲-۳- تثبیت ال-سیستئین بر سطح الکتروود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با گرافن یا گرافن اکساید

۴ میکرولیتر از سوسپانسیون گرافن یا گرافن اکساید در اتانل (۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) را بر سطح الکتروود تمیز شده به روش مذکور در بخش قبل چکانده شد و اجازه داده شد که خشک شود، سپس ال-سیستئین به روش مذکور در بخش قبل روی الکتروودها تثبیت می‌شود. در نهایت از فروسیانید به عنوان یک کاوشگر برای بررسی تغییرات رفتار الکتروود، بعد از هر مرحله از اصلاح، استفاده شد. برای این منظور ابتدا دو میلی‌لیتر محلول پتاسیم کلراید ۰/۰۵ مولار حاوی نمک  $[Fe(CN)_6]^{3-}$  (۵ میلی‌مولار) تهیه شد و داخل سل ریخته شد و ولتاموگرام‌های آن در سطح الکتروودهای اصلاح شده ثبت شد.

## ۳- نتایج و بحث

ولتاموگرام‌های ال-سیستئین در سطح GCE، GO/GCE و Gr/GCE به ترتیب در شکل ۳ A، B و C، نشان داده شده است. همانطور که ملاحظه می‌شود در ولتاژ ۰/۷+ ولت یک پیک اکسیداسیون وجود دارد که مربوط به اکسایش ال-سیستئین به ال-

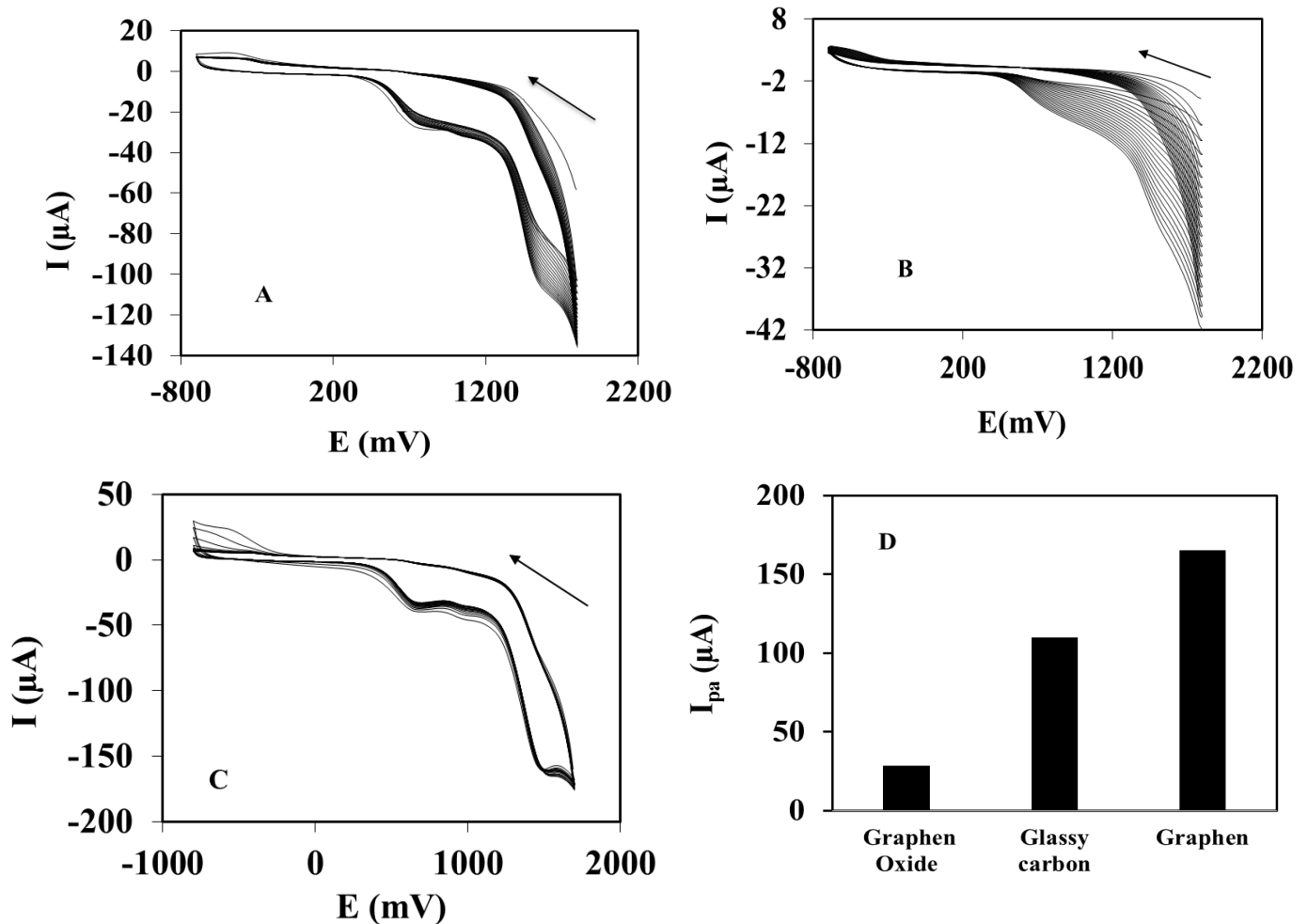
سیستین است. از سوی دیگر پیک اکسیداسیون ظاهر شده در ولتاژ  $1/6+$  ولت مربوط به اکسید شدن ال-سیستین به سیستیک-اسید است [۷]. در شکل ۳ D، جریان پیک آندی در پتانسیل  $1/6+$  ولت مربوط به اکسید شدن ال-سیستین به سیستیک-اسید در سطح الکترودهای GC، GO/GC و Gr/GC با هم مقایسه شده است. همانطور که مشاهده می‌شود، بیشترین جریان متعلق به Gr/GCE می‌باشد که بیانگر اکسایش بیشتر ال-سیستین است.

با توجه به این که بر اساس نظریه دوم (مذکور در مقدمه) پیک های اکسایش دو فرایند تبدیل ال-سیستین به ال-سیستین، و ال-سیستین به سیستیک اسید، به ترتیب در ولتاژهای  $0/7+$  و  $1/6+$  ولت ظاهر می‌شود و این امر با نتایج شکل ۳ مطابقت دارد می‌توان نتیجه گرفت که تثبیت سیستین از طریق اتصال گروه تیول به کربن انجام شده است.

زمانی که pH بین  $1/71$  و  $8/33$  قرار بگیرد اکثر گونه های سیستین بار کلی صفر را نشان می دهند. pH ایزوالکتریک سیستین  $5/07$  است. در این pH گروه آمین به صورت  $NH_3^+$  و گروه کربوکسیل به صورت  $COO^-$  می باشد. حضور این زوویترون در اطراف الکتروده سبب تشکیل یک لایه سیستین بر سطح الکتروده می شود. چون جذب سیستین تحت تاثیر بار سطح الکتروده ( سطح اکسیژنه) قرار نمی گیرد.

در زیر pH ایزوالکتریک گروه کربوکسیل پروتونه شده و به صورت  $COOH$  می باشد و بار سیستین مثبت است، این بار مثبت سبب ایجاد یک دافعه بین این گونه ها می شود و از تجمع آنها جلوگیری می کند. یک لایه سیستین در نهایت در سطح الکتروده ایجاد می شود ولی به صورت آهسته و تدریجی صورت می گیرد [۷].

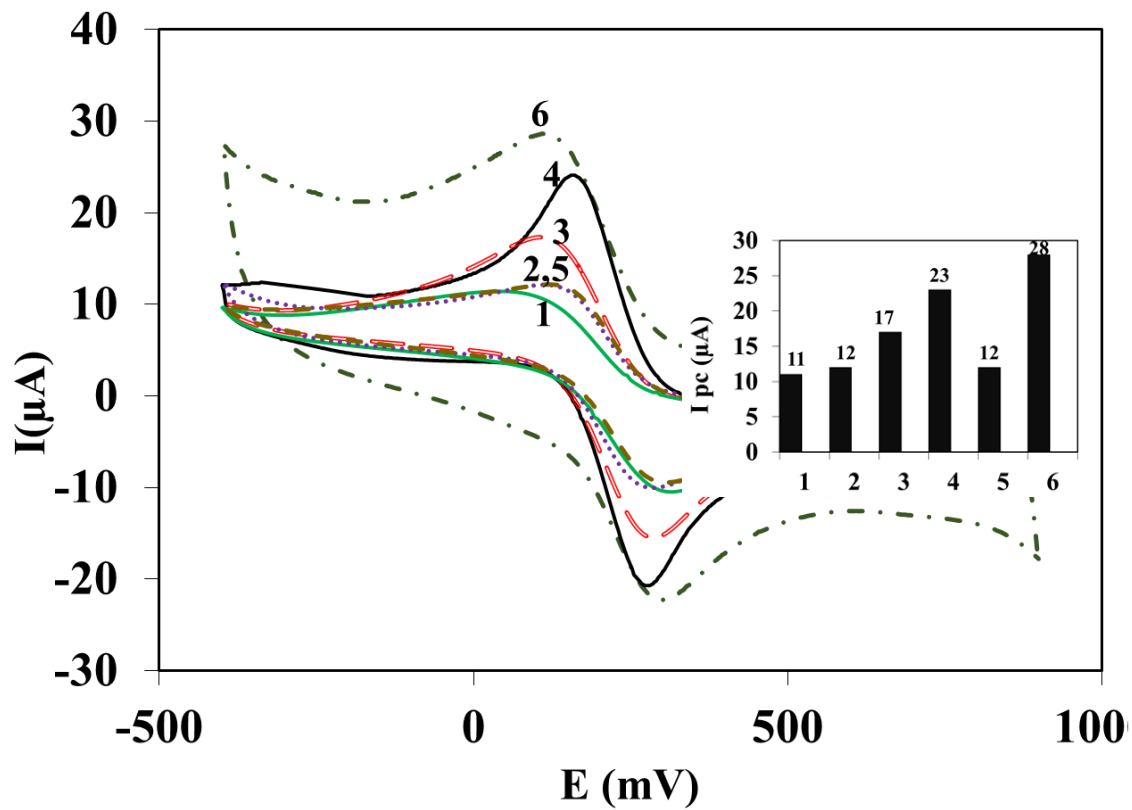
در مطالعه ای که انجام گرفت بعد از تثبیت سیستین بر سطح الکتروده، آنزیم گلوکز اکسیداز بر سطح الکتروده اصلاح شده تثبیت گردید. از آنجایی که آنزیم در ساختار خود دارای گروه های آمین با بار مثبت می باشد برای اتصال لازم است که سطح الکتروده دارای بار منفی باشد. برای این منظور pH مربوط به تثبیت سیستین را بالاتر از pH ایزوالکتریک سیستین ( $5/07$ ) یعنی ۷ انتخاب گردید. در این pH سطح الکتروده اصلاح شده دارای گروه های کربوکسیلیک با بار منفی می باشد.



شکل ۳- ولتاموگرام‌های چرخه‌ای تثبیت الکتروشیمیایی سیستئین (A) بر سطح GCE، (B) GO/GCE، (C) Gr/GCE. سیستئین با غلظت ۵ میلی-مولار در بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH ۷ و ۲۰ چرخه در محدوده پتانسیل ۰/۷- تا ۱/۷ ولت با سرعت ۱۰۰ میلی‌ولت بر ثانیه تثبیت شد. (D) نمودار پیک جریان آندی مربوط به اکسید شدن ال-سیستئین به سیستیک‌اسید (بر اساس داده‌های حاصل از شکل ۳-A، B و C)

### ۳-۱- ارزیابی عملکرد الکترودهای اصلاح شده با سیستئین

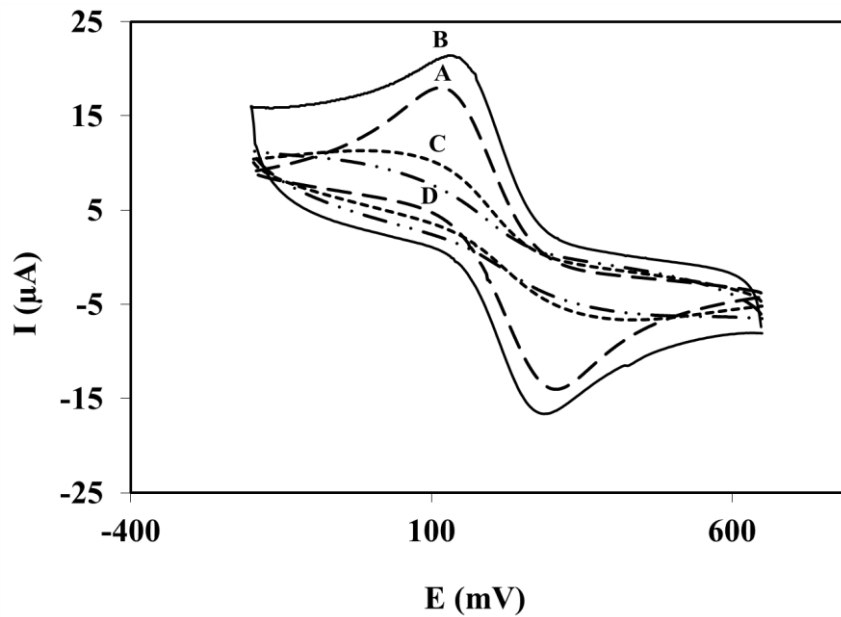
ولتامتری چرخه‌ای فروسیانید، ابزار ارزشمند و مناسبی برای ارزیابی تغییرات سطح الکترودهای می‌باشد. به منظور ارزیابی عملکرد الکترودهای GC، GO/GC و Gr/GC اصلاح شده با سیستئین، از محلول کاوشگر فروسیانید استفاده شد. ولتاموگرام‌های چرخه‌ای سه الکترودهای GC، GO/GC و Gr/GC (شکل ۴) بعد از تثبیت ال-سیستئین نشان می‌دهد که بیشترین تغییر جریان مربوط به الکترودهای Gr/GC می‌باشد. از آنجایی که ال-سیستئین یک اسید آمینه بوده و به عنوان یک عایق عمل می‌کند، هر قدر میزان ال-سیستئین متصل شده بیشتر باشد کاهش جریان نیز بیشتر خواهد بود. همانطور که در ولتاموگرام چرخه‌ای شکل ۴ مشاهده می‌گردد، Gr/GCE دارای بالاترین مقدار جریان است که البته بیشترین کاهش جریان بعد از تثبیت ال-سیستئین نیز مربوط به Gr/GCE می‌باشد. این نتایج موید این مطلب است که ال-سیستئین در سطح Gr/GCE بهتر تثبیت می‌شود. نمودار داخل شکل ۴ مقدار جریان پیک کاتدی هر یک از الکترودها قبل و بعد از تثبیت ال-سیستئین را نشان می‌دهد. سس



شکل ۴-ولتامتری چرخه‌ای  $K_3Fe(CN)_6$  ۵ میلی‌مولار در سطح (۱) Cys/GO/GCE، (۲) GO/GCE، (۳) Cys/GCE، (۴) GCE، (۵)

Cys/Gr/GCE و (۶) Gr/GCE با سرعت روبش ۵۰ میلی‌ولت بر ثانیه بود. نمودار الحاق شده، جریان پیک کاتدی الکترودهای اصلاح شده ۱ تا ۶ را نشان می‌دهد.

شکل ۵، ولتاموگرام‌های چرخه‌ای  $K_3Fe(CN)_6$  را در سطح الکترودهای GC (A)، Gr/GC (B)، Cys/Gr/GC (C) و GOx/Cys/Gr/GC (D) نشان می‌دهد. با مقایسه ولتاموگرام‌های A و B، ملاحظه می‌گردد که افزودن گرافن بر سطح الکترودهای موجب افزایش رسانایی و در نتیجه فزونی جریان می‌شود لیکن با افزایش سیستین بر سطح Gr/GCE جریان کاهش می‌یابد (ولتاموگرام C) چون ال-سیستین مولکولی عایق می‌باشد و سرعت انتقال الکترون را کند می‌سازد. با تثبیت آنزیم بر سطح الکترودها به دلیل عایق بودن ساختار پروتئین جریان باز هم کاهش می‌یابد (ولتاموگرام D).

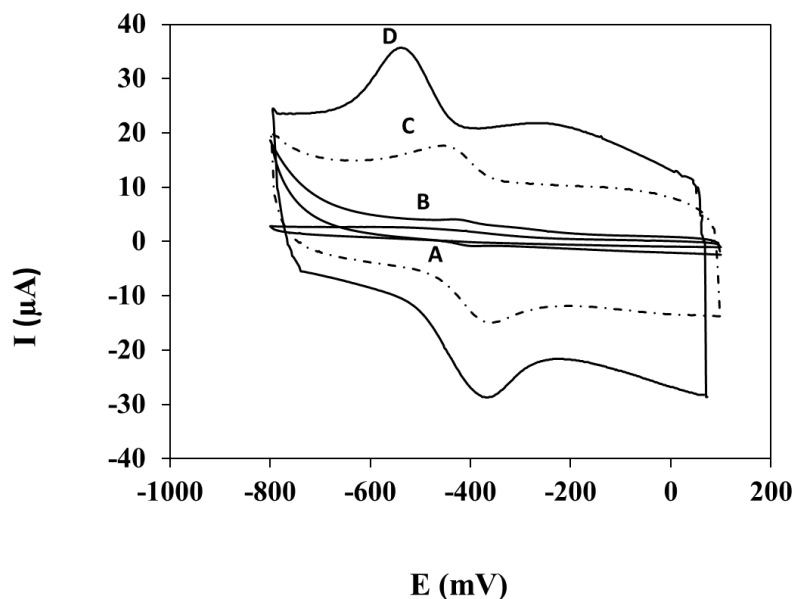


شکل ۵-ولتامتری چرخه‌ای  $K_3Fe(CN)_6$  ۵ میلی‌مولار، (A) GCE، (B) Gr/GCE، (C) Cys/Gr/GCE، الکترود اصلاح شده با نانوکامپوزیت گرافن-سیستئین و آنزیم گلوکز اکسیداز (D) با سرعت روبش ۵۰ میلی‌ولت بر ثانیه

### ۳-۲- الکتروشیمی مستقیم آنزیم گلوکز اکسیداز تثبیت شده در سطح الکترودهای اصلاح شده

شکل (۶) ولتاموگرام چرخه‌ای GOx تثبیت شده در سطح الکترودهای (A) Cys/GC، (B) GO/GC، (C) Gr/GC و Cys/Gr/GC (D) را در محلول بافر فسفات نشان می‌دهد. زوج پیک مشاهده شده معطوف به گروه ردوکس  $FAD/FADH_2$  مدفون در مرکز آنزیم می‌باشد. همانطور که در شکل نشان داده شده است شدت جریان‌های آندی و کاتدی آنزیم در سطح الکترودهای اصلاح شده با نانوکامپوزیت Cys/Gr نسبت به سه الکترودهای دیگر (Cys/GC، GO/GC و Gr/GC) بسیار بیشتر است. بیشتر بودن شدت جریان در این الکترودهای گویای این مطلب می‌باشد که از یک سو سیستم به عنوان یک اتصال دهنده مناسب موجب قرارگیری مقدار بیشتری از آنزیم بر سطح الکترودها شده است و از سوی دیگر گرافن بستری را فراهم نموده که انتقال الکترون از سطح الکترودها به مرکز ردوکس آنزیم را تسهیل نموده و بهبود بخشیده است.





شکل ۶-ولتاموگرام چرخه‌ای GOx در سطح الکترودهای (A) Cys/GC، (B) GO/GC، (C) Gr/GC و (D) Cys/Gr/GC. آزمایش در محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH ۷ در سرعت روبش ۵۰ میلی‌ولت بر ثانیه انجام شد.

#### ۴- نتیجه گیری

در پژوهش حاضر سیستمین به روش الکتروشیمیایی در سطح الکترودهای GC، GO/GC و Gr/GC تثبیت شد. نتایج حاصل با مکانیزم اتصال سیستمین از طریق گروه تیول مطابقت دارد. همچنین مطالعات ولتامتری چرخه‌ای فروسیانید نشان داد که اتصال سیستمین در سطح Gr/GCE بهتر صورت می‌گیرد. از آنجایی که در مطالعات بسیاری، از سیستمین به عنوان یک اتصال دهنده برای تثبیت پروتئین به سطح الکترود استفاده شده، نتایج حاصل از این پژوهش می‌تواند در راستای انتخاب بستر مناسب جهت تثبیت الکتروشیمیایی سیستمین و در نتیجه افزایش میزان تثبیت پروتئین کمک شایانی نماید. به عبارت دیگر، نانوکامپوزیت Cys/Gr در سطح الکترود کربن شیشه‌ای یک نقش دوگانه ایفا می‌کند. بدین معنی که از یک سو سیستمین به عنوان یک اتصال دهنده موجب قرارگیری مقدار بیشتری از آنزیم گلوکز اکسیداز بر سطح الکترود اصلاح شده گردید. از سوی دیگر گرافن بستری را فراهم نمود که انتقال الکترون از سطح الکترود به مرکز ردوکس آنزیم را تسهیل نموده و بهبود بخشید.

#### ۵- مراجع

- [1] Z. Zhang, H. Jia, F. Ma, P. Han, X. Liu, B. Xu, *J Mol Model.* **17** (2011) 649–655.
- [2] Y. Song, Y.Z. Song, A.F. Zhu, H. Zhong, *Indian Journal of Chemistry.* **50** (2011) 1006-1009.
- [3] W. Yang, J. J. Gooding, D. B. Hibbert, *Journal of Electroanalytical Chemistry.* **516** (2001) 10–16.
- [4] H. Karimi-Maleh, P. Biparva, M. Hatami, *Biosensors and Bioelectronics.* **48** (2013) 270–275.

- [5] H. Karimi-Maleh, F. Tahernejad-Javazmi, A. A. Ensafi, R. Moradi, S. Mallakpour, H. Beitollahi, *Biosensors and Bioelectronics*, **60** (2014) 1–7.
- [6] C. Wang, C. Li, F. Wang, C. Wang, *Microchim Acta*, **155** (2006) 365–371.
- [7] C.A. Martínez-Huitle, M. Cerro-Lopez, M.A. Quiroz, *Materials Research*, **12** (2009) 375-384.
- [8] H.A. Rafiee-Pour, H. Ghourchian, K. Eskandari, *Anal. Bioanal. Electrochem*, **3** (2011) 215-226.
- [9] B. Barbier, J. Pinson, G. Desarmot, M. Sanchez, *Journal of the Electrochemical Society*, **137** (1990) 1757-1764.
- [10] N. Spataru, B.V. Sarada, E. Popa, D.A. Tryk, A. Fujishima, *Analytical Chemistry*, **73** (2001) 514-519.
- [11] J. Zagal, C. Fierro, R. Rozas, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **119** (1981) 403-408.
- [12] S.D. Fei, J.H. Cheng, S.Z. Yao, G.H. Deng, D.L. He, Y.F. Kuang, *Analytical Biochemistry*, **339** (2005) 29-35.
- [13] T.R. Ralph, M.L. Hitchman, J.P. Millington, F.C. Walsh, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **375** (1994) 1-15.
- [14] L. Zhang, *Microchimica Acta*, **161** (2008) 191–200.
- [15] S. Park, R. S. Ruoff, *Nature nanotechnology*, **4** (2009) 217-224.
- [16] G. Wang, H. Huang, G. Zhang, X. Zhang, B. Fang, L. Wang, *Analytical Methods*, **2** (2010) 1692-1697.
- [17] B. Yuan, C. Xu, D. Deng, Y. Xing, L. Liu, H. Pang, D. Zhang, *Electrochimica Acta*, **88** (2013) 708-712.