MOŽNOSTI INOVACÍ
V ELEKTROANALYTICKÉ CHEMII

Praha

2006

Tato skripta vznikla pro potřeby kurzu ***Možnosti inovací v elektroanalytické chemii***, pořádaného v rámci projektu ***Pražské analytické centrum inovací***, CZ.04.3.07/4.2.01.1/0002 v grantovém schématu JPD3: Spolupráce výzkumných a vývojových pracovišť s podnikatelskou sférou, podpora inovací. Projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a Státním rozpočtem České republiky.

Odborný garant prof. RNDr. Jiří Barek, CSc., technická redakce RNDr. Eva Juláková, CSc.

OBSAH

1. **Perspektivy elektroanalytických metod** 3
prof. RNDr. Jiří Barek, CSc.

2. **Pevné amalgamové elektrody a jejich využití v analýze biologicky aktivních sloučenin** 15
Bogdan Yosypchuk, Ph.D.

3. **Inkoustové filmové elektrody** 31
Ing. Bogdan Yosypchuk, Ph.D.

4. **Chemické sensory a biosensory** 37
prof. RNDr. František Opekar, CSc.

5. **Elektroanalýza s uhlíkovými pastovými elektrodami** 49
doc. Ing. Ivan Švancara, Dr.

6. **Bismutové elektrody v elektroanalýze** 59
doc. Ing. Ivan Švancara, Dr.

7. **Elektrochemické biosenzory** 69
Adriana Ferancová, Ján Labuda

8. **Elektrochemická detekce poškození a hybridizace dna** 89
Miroslav Fojta

9. **Automatizace elektrochemických měření** 109
Dr. Ing. Tomáš Navrátil, Ing. Bogdan Yosypchuk Ph.D.

10. **Kompozitní elektrody** 113
Dr. Ing. Tomáš Navrátil

11. **Diamantové pracovní elektrody** 119
prof. RNDr. Jiří Barek, CSc.

12. **Eliminační voltametrie s lineárním scanem** 125
Dr. Ing. Tomáš Navrátil

13. **Nové možnosti elektroanalytických metod v analýze farmaceutických, biologických a environmentálních matric** 136
RNDr. Karel Nesměrák, Ph.D.

14. **Konduktometrická měření v průtokových systémech** 143
prof. RNDr. František Opekar, CSc

15. **Ampérometrická měření v průtokových systémech** 149
prof. RNDr. Jiří Barek, CSc. a prof. RNDr. František Opekar, CSc.

16. **Inovace v elektroanalytické instrumentaci** 159
doc. Dr. Ing. Ladislav Novotný, DrSc.

PŘEDMLUVA

Tato skripta vznikla pro potřeby kursu "Možnosti inovací v elektroanalytické chemii", pořádaného v rámci projektu "**P**ražské analytické centrum inovací" cz.04.3.07/4.2.01.1/0002 v grantovém schématu jpd3 "Spolupráce výzkumných a vývojových pracovišť s podnikatelskou sférou, podpora inovací".

Jsou pokusem demo**n**strovat mo**ž**nosti a omezen**í** vybran**ý**ch elektroanalytick**ý**ch metod a perspektiv jejich da**lší**ho rozvoje a představují vhodný doplněk k dalším učebním materiálům vydaným v rámci tohoto kursu, zejména k CD s prezentacemi všech přednášejících v powerpointu. Toto CD je pro případné zájemce k dispozici u garanta tohoto kursu.

Cílem celého projektu je přispět k rozšíření komunikace mezi výzkumnou a vývojovou sférou na straně jedné a sférou podnikatelskou na straně druhé, a tím i k urychlení přenosu nových poznatků vzniklých ve výzkumné sféře, do oblasti praktických aplikací. Autoři jednotlivých kapitol budou proto vděčni za jakékoliv kritické připomínky k jejich koncepci i provedení a zejména za jakékoliv náměty vedoucí k případné realizaci prezentovaných poznatků v praxi.

Jiří Barek

1. PERSPEKTIVY ELEKTROANALYTICKÝCH METOD

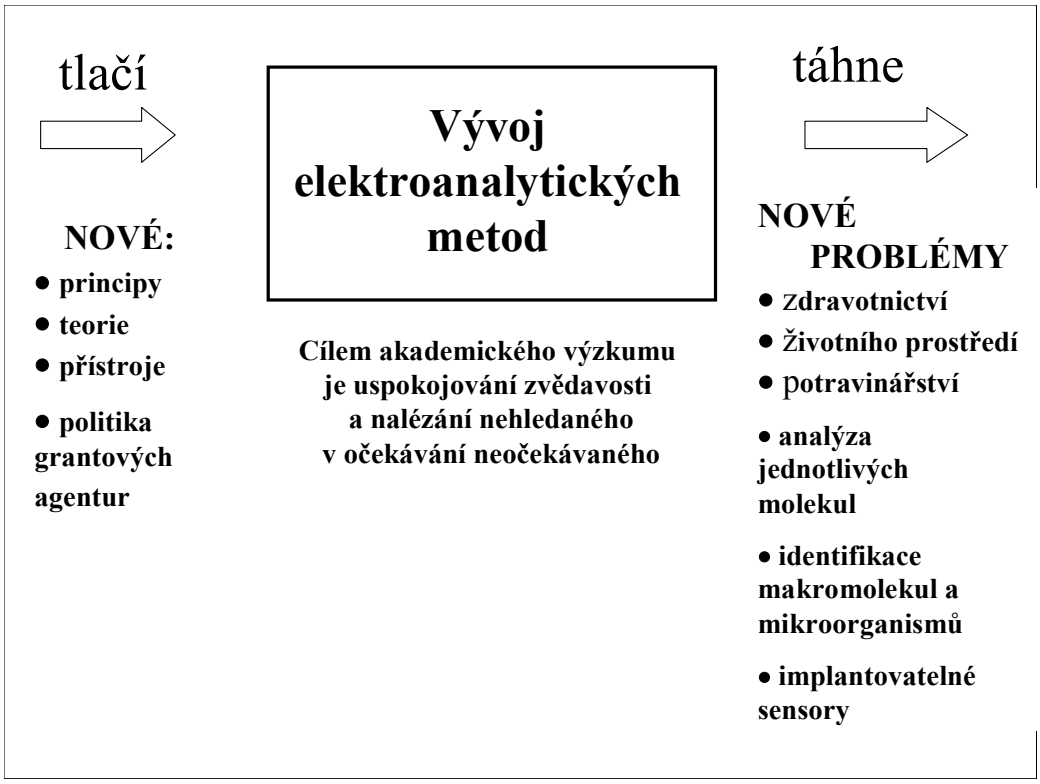
prof. RNDr. Jiří Barek, CSc.
Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, UNESCO laboratoř elektrochemie životního prostředí, Albertov 2030, 128 43 Praha 2
barek@natur.cuni.cz

1.1 Úvod

Rostoucí nároky kladené moderní společností na analytickou chemii nemůže v celé jejich šíři splnit žádná jednotlivá analytická metoda. Vždy je nutné hledat metodu, která je nejvhodnější pro daný účel, tj. pro stanovení konkrétního analytu v konkrétní matrici v přítomnosti daných interferentů a v požadovaném koncentračním rozmezí, při co nejnižší ekonomické a časové náročnosti a minimální pracnosti. A je hlavním úkolem analytického chemika takovouto metodu z celé obrovské plejády existujících analytických metod vybrat.

Tato kapitola je proto jakýmsi stručným zamyšlením nad možnostmi, omezeními a perspektivami moderních elektrochemických metod se zvláštním důrazem na metody voltametrické a amperometrické, jejichž vývoj je středem pozornosti pracoviště autora této kapitoly [1–3]. Je pokusem ukázat, že tyto metody mohou být v některých konkrétních případech životaschopnou a užitečnou alternativou širokého spektra moderních spektrometrických a separačních metod. Je namístě připomenout, že elektroanalytické metody jsou i v dnešní době prakticky denně používány v každé analytické laboratoři. Stačí jen připomenout potenciometrické měření pH či vodivostní kontrolu kvality deionizované vody. Osobní elektrochemické analyzátory pro stanovení glukosy, elektrochemické požární sensory či tzv. lambda sondy pracující na elektrochemickém principu a regulující optimální poměr vzduchu a paliva představují mnohamiliardový a stále rostoucí trh, což platí i o sítotiskových elektrodách na jedno použití. Rovněž v oblasti speciace prvků či sledování jejich biologické dostupnosti v půdě hrají voltmetrické metody nezastupitelnou roli. Přesto zůstává smutnou skutečností, že řada moderních poznatků z elektroanalytické chemie si jen obtížně hledá cestu do praxe a že elektroanalytické metody jsou postupně vytlačovány i z těch oblastí, kde mohou představovat užitečnou alternativu k převládajícím separačním či spektrometrickým metodám, a to alternativu atraktivní zejména z ekonomického hlediska.

Pří vývoji moderních elektroanalytických metod se uplatňují jednak momenty, které lze označit jako tažné, a jednak momenty, které lze nazvat tlačné (viz obr. 1.1).



Obr. 1.1 Vývoj moderních elektroanalytických metod

Na tyto podněty reaguje moderní elektroanalytická chemie vývojem:

- nových typů elektrod a jejich uspořádání
- nových elektrodových materiálů
  - náhodně
  - promyšleně
- nových typů potenciálových programů a zpracování proudové odezvy včetně elektrochemické předúpravy elektrod
- metod kombinujících elektrochemii s jinými principy a technikami (biologickými, magnetickými, spektrometrickými)
- metod kombinujících elektrochemickou detekci s předběžnou separací a prekoncentrací
- nových typů sensorů
- metod založených na průtokových měřeních

Všechny tyto přístupy se pochopitelně doplňují, překrývají a vzájemně prolínají.

Zde je nutné připomenout, že elektroanalytické metody mohou mít šanci na praktické uplatnění jedině při splnění následujících podmínek:

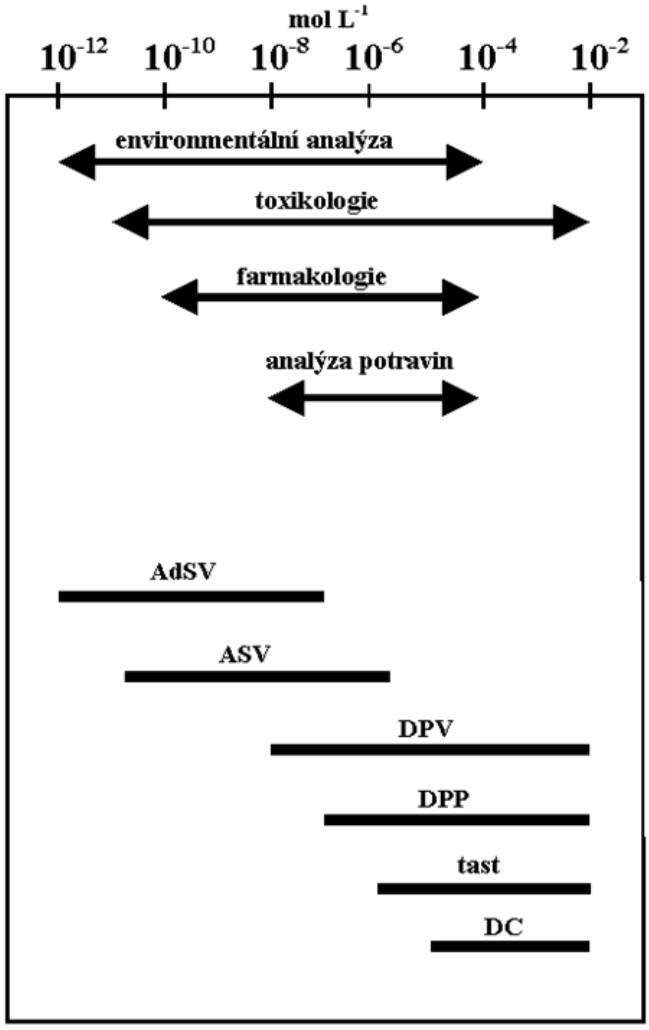
- Je vypracována odpovídající teorie.
- Je komerčně dostupná aparatura.

- Jsou vypracovány a validovány adekvátní analytické postupy.
- Praxe je o metodě dostatečně informována.
- Metoda je konkurenceschopná z hlediska
  - analytických parametrů
  - ekonomických parametrů
  - provozních parametrů
  - přívětivosti k uživateli a k pracovnímu a životnímu prostředí.

Za hlavní výhody polarografických a voltametrických metod lze považovat:

1. Široký koncentrační rozsah se pohybuje od řádově 10^{-3} mol L^{-1} v případě DC-voltametrie až po 10^{-11} mol L^{-1} v případě adsorpční rozpouštěcí voltametrie a splňuje požadavky v celé řadě praktický významných oblastí (viz obr. 1.2)
2. Rozsah analytů je široký (anorganické i organické látky, organokovy, biologické makromolekuly atd.).
3. Pořizovací a provozní náklady jsou nízké.
4. Metody jsou rychlé.
5. Metody jsou snadno automatizovatelné.
6. Molekula analytu je přímo zdrojem signálu, na rozdíl např. od spektrometrických metod, kde je nutné vhodným způsobem nejprve převést elektromagmetické záření na elektrický proud.
7. Představují nezávislou alternativu, což je důležité z právního hlediska, neboť důkaz přítomnosti nějaké látky „nade vší rozumnou pochybnost“ vyžaduje použití několika navzájem nezávislých metod.
8. Mají určitou inherentní selektivitu, neboť všechny sloučeniny nejsou elektrochemicky aktivní, takže lze např. selektivně stanovit elektrochemicky redukovatelné nitrované deriváty polycyklických aromatických uhlovodíků či elektrochemicky oxidovatelné aminoderiváty polycyklických aromatických uhlovodíků v přítomností inaktivních matečných sloučenin.

Za hlavní nevýhodu polarografických a voltametrických metod lze považovat vyšší personální požadavky, neboť úspěšná aplikace těchto technik vyžaduje větší zkušenosti a znalosti nežli aplikace např. jednoduché spektrofotometrie ve viditelné oblasti.



Obr. 1.2 Použitelnost voltametrických technik

Vývoj moderních voltametrických technik probíhal a zřejmě i nadále bude probíhat po několika paralelních liniích:

1. Vývoj elektrod
2. Vývoj měřících technik
3. Vývoj instrumentace
4. Vývoj teorie
5. Vývoj konkrétních analytických metod pro jednotlivé analyty

Ad 1: Vývoj rtuťových elektrod probíhal po linii klasická rtuťová kapková elektroda → tryskající rtuťová elektroda → visící rtuťová kapková elektroda → statická rtuťová kapková elektroda → rtuťová filmová elektroda → rtuťová mikroelektroda → krokově rostoucí elektroda → smršťující se rtuťová elektroda → rtuťová amalgamová elektroda. V současné době je pozornost věnována vývoji mikroelektrod, sítotiskových elektrod, elektrod na jedno použití, elektrod umožňujících sestavit elektrodová pole a různých typů snadno obnovitelných elek-

trod. Pozornost je v této souvislosti věnována i hledání nových elektrodových materiálů. Sem patří např. tuhé amalgamové elektrody, vizmutové filmové elektrody, elektrody na bázi borem dopovaného diamantu, elektrody na bázi nanotrubiček či dalších moderních uhlíkových materiálů. Ve středu pozornosti jsou stále i uhlíkové pastové elektrody a neustále se objevují nové elektrodové materiály vzniklé náhodou či na zakázku.

Ad 2: Při vývoji nových měřících technik je věnována pozornost různým potenciálovým programům, různým typům zpracování proudové odezvy a různým způsobům prekoncentrace. Historicky se vývoj v oblasti měřících technik pohyboval po linii DC polarografie → oscilopolarografie → Kalouskův přepínač → AC polarografie → tast polarografie → pulsní techniky → cyklická voltametrie → konvoluční techniky → eliminační polarografie. V oblasti prekoncentrace analytu na povrchu pracovní elektrody se po anodické a katodické rozpouštěcí voltametrii objevila adsorpční rozpouštěcí voltametrie.

Ad 3: Vývoj instrumentace se pohyboval od původních mechanických přístrojů přes elektronické přístroje a přístroje na bázi operačních zesilovačů až k počítačem řízeným přístrojům, které jsou v současné době koncipovány jako virtuální přístroje, u nichž je do osobního počítače vložena speciální karta umožňující jak řízení elektrochemického experimentu, tak sledování a zpracování jeho výsledků.

Ad 4: Při vývoji teorie se nejprve objevil teoretický popis polarografické křivky včetně teorie limitního difuzního proudu a teorie ostatních typů proudů. Existující teoretický aparát zahrnuje i detailní znalost mechanismů elektrodových reakcí a vztahů mezi strukturou a elektrochemickou aktivitou studovaných látek.

Ad 5: Úspěšný a rozsáhlý vývoj konkrétních analytických metod pro jednotlivé analyty dokumentují desetitisíce pracovních postupů popsaných v rozsáhlé odborné literatuře, desítky monografií, tabulek, kompendií, řada databází mj. i na Internetu. Počet ročně vznikajících nových polarografických stanovení se i dnes, v období zřejmého útlumu polarografie, pohybuje řádově ve stovkách za rok a v případě stanovení voltametrických se jedná řádově o tisíce prací.

V popředí zájmu je i kombinace amperometrie s průtokovými metodami (FIA – průtoková injekční analýza, SIA – sekvenční injekční analýza, HPLC) a s předběžnou separací a prekoncentrací (TLC – tenkovrstvá chromatografie, LLE – extrakce kapaliny kapalinou, SPE – extrakce tuhou fází). K podobnému účelu slouží i elektrody pokryté membránami či filmy (podobně jako je tomu u Clarkova čidla).

Zdá se, že pro další rozvoj voltametrických a amperometrických metod je nejdůležitější hledání nových elektrodových matriálů vykazujících širší potenciálové okno, nižší šum a zbytkový proud, použitelných v různých rozpouštědlech, odolných vůči pasivaci a s vyšší mechanickou stabilitou umožňující jejich kompatibilitu s měřením v průtokových systémech. Významná je i jejich

kompatibilita se zelenou analytickou chemií, požadující minimální toxicitu elektrodových materiálů a minimální odpad při analýzách. (Např. elektrody na jeho použití nejsou z tohoto hlediska příliš ohleduplné k životnímu prostředí).

1.2 Nové elektrodové materiály

Úspěch voltametrického či amperometrického stanovení v rozhodující míře ovlivňuje kvalita použité elektrody, která je v těsném kontaktu s analyzovaným prostředím, což může vést k její pasivaci, která bývá hlavním problémem při praktické aplikaci voltametrických metod. Problémy s pasivací elektrody lze do jisté míry eliminovat mechanickým obnovováním povrchu elektrody (broušení, leštění, otření povrchu uhlíkové pastové elektrody), elektrochemickou předúpravou elektrody (např. vložením vhodných potenciálových pulsů) či použitím elektrodového materiálu na němž se minimálně zachycují produkty elektrodové reakce či interferující látky. Volba elektrodového materiálu je často rozhodující pro úspěch stanovení nejen z hlediska pasivace elektrody, ale i z hlediska dostupného potenciálového okna, šumu, velikosti a reprodukovatelnosti signálu atd. V následujícím textu je věnována pozornost různým netradičním elektrodovým materiálům perspektivním z hlediska moderních voltametrických a amperometrických metod.

1.2.1 Tuhé amalgámové elektrody

Tuhé amalgámové elektrody, které byly vyvinuty na Ústavu fyzikální chemie a elektrochemie Jaroslava Heyrovského [4], mají celou řadu předností:

- Jsou netoxické a tudíž přívětivé k životnímu prostředí.
- Dostupné potenciálové okno je srovnatelné s visící rtuťovou kapkovou elektrodou (HMDE).
- Je u nich jednoduchá elektrochemická předúprava.
- Jsou mechanicky robustní a tudíž kompatibilní s HPLC, FIA a SIA .
- Jsou vhodné k selektivní detekci redukovatelných látek.

Jejich možnosti a omezení jsou detailně popsány v kapitole **2, a** proto jim zde nebude věnována další pozornost.

1.2.2 Bismutové elektrody

Další perspektivní náhradou rtuti, jejíž použití je v poslední době omezováno vzhledem k poněkud neopodstatněným obavám z její toxicity, je bismut [5]. Lze ho použít v kompaktní formě, ve formě filmu na vhodném substrátu i ve formě práškové. Protože detailní přehled této problematiky je předmětem kapitoly **6,** nebude zde tato problematika dále rozváděna.

1.2.3 Uhlíkové pastové elektrody

Uhlíkovou pastu, jako neobyčejně užitečný typ elektrodového materiálu, zavedl Ralph Adams v sedmdesátých letech minulého století. Původně se pokoušel připravit kapající elektrodu na bázi vodivé kapaliny vyniklé rozpýtlením uhlíkového prášku do vhodné organické kapaliny nemísitelné s vodou. Protože tato myšlenka se neosvědčila, Adams zvýšil obsah uhlíkového prášku, takže místo kapaliny dostal pastu, kterou však lze snadno vytlačit pístem z vhodně konstruovaného těla elektrody. Takto připravená uhlíková pastová elektroda tvořená směsí vhodné tzv. pastovací kapaliny a vhodného typu uhlíkového prášku má následující výhody [3]:

1. Její povrch lze snadno obnovit vytlačením uhlíkové pasty z těla elektrody a otřením vytlačené pasty, čímž lze eliminovat řadu problémů souvisejících s pasivací elektrody.
2. Elektrodu lze snadno chemicky modifikovat přídavkem modifikátoru k uhlíkovému prášku, pastovací kapalině či modifikací kompletně připravené uhlíkové pastové elektrody.
3. Ke zvýšení citlivosti lze využít adsorpční akumulace (na povrchu uhlíkové pasty) či extrakční akumulace (do použité pastovací kapaliny).
4. Elektrodu lze snadno pokrýt rtuťovým či bismutovým filmem a tím výrazně rozšířit její katodické potenciálové okno.

Z praktického hlediska je důležité, že při použití mikrokuliček ze skelného uhlíku může být pastová elektroda dlouhodobě používána i v prostředí s vysokým obsahem organického rozpouštědla (methanolu či acetonitrilu), a lze jí tudíž snadno použít i jako pracovní elektrodu při vysokoúčinné kapalinové chromatografii s elektrochemickou detekcí [6], kde elektrody na bázi jiných uhlíkových prášků selhávají vzhledem k vymývání pastovací kapaliny organickým rozpouštědlem.

Podrobně je problematika uhlíkových pastových elektrod zpracována v kapitole **5.**

1.2.4 Sítotiskové uhlíkové elektrody na jedno použití

Další možností eliminace problémů souvisejících s pasivací elektrody je použití tzv. sítotiskových (screen-printed) elektrod na jedno použití. Denně se produkuje několik milionů těchto elektrod, které se použijí na jediné stanovení. Cena těchto elektrod se pohybuje na úrovni jednoho EUR, takže v celkových nákladech na analýzu to není výrazná položka. Elektroda je použita na jediné stanovení, takže se nemůže negativně projevit vliv její historie. Naproti tomu jsou zde problémy s kalibraci a s likvidací použitých elektrod. Z tohoto hlediska nejsou tištěné elektrody na jedno použití zcela slučitelné s koncepcí tzv. „zelené analytické chemie“.

1.2.5 Obnovitelné elektrody pokryté filmem na bázi uhlíkového inkoustu

Vhodnou alternativou k sítotiskovým elektrodám jsou elektrody pokryté obnovitelným filmem připraveným pomocí vodivého inkoustu [7]. Příprava těchto obnovitelných elektrod je velmi pros-

tá: V 5%ním roztoku polystyrenu v dichloromethanu se disperguje třepáním či pomocí ultrazvuku vhodný uhlíkový prášek (osvědčily se výše zmíněné mikrokuličky ze skelného uhlíku). Takto vzniklý vodivý inkoust se nanese na povrch libovolné pevné elekrody mikrodávkovačem či prostě jejím ponořením do připraveného vodivého inkoustu. Po několika minutách se těkavé rozpouštědlo odpaří a elektroda je připravena k měření. Pokud přestane poskytovat spolehlivé výsledky, film se prostě otře kouskem filtračního papíru a během několika minut se připraví film nový. Zůstává tedy zachována výhoda snadného obnovení aktivního povrchu elektrody a je eliminován problém likvidace použitých dispozabilních elektrod. Podrobněji je tato problematika diskutována v kapitole **3.**

1.2.6 Elektrody na bázi borem dopovaného diamantu

Problematika využití diamantových elektrod pro elektroanalytická měření se začala intenzivně zkoumat teprve v poslední době, i když první práce v této oblasti byly publikovány v osmdesátých letech. Diamant se vyznačuje mimořádnou mechanickou i chemickou stabilitou. Je jedním z nejlepších přírodních izolátorů a pro jeho elektroanalytické využití je nutné jej dopovat atomy jiných prvků, nejčastěji boru. Nejčastěji jsou diamantové elektrody používány ve formě tenkých, polykrystalických filmů. Diamantové filmy se připravují tzv. chemickou depozicí par (CVD – „chemical vapor deposition“) při použití žhavených vláken nebo mikrovlnného ohřevu.

Hlavní výhody borem dopovaného diamantu jakožto elektrodového materiálu jsou:

- mimořádně široké potenciálové okno zhruba od –0,7 V do + 2,3 V;
- mimořádně nízký šum až o jeden řád nižší nežli při použití klasických uhlíkových elektrodových materiálů;
- minimální problémy s pasivací elektrody dané parafinickým charakterem povrchu diamantového filmu;
- kompatibilita diamantu s živou tkání, umožňující konstrukci implantovatelných sensorů.

Detailněji je problematika diamantových elektrod diskutována v kapitole **11.**

1.3 Kombinace voltametrie či amperometrie s jinými principy

Stejně jako v ostatních odvětvích analytické chemie lze i v oblasti voltametrie a amperometrie očekávat výrazný pokrok v oblasti aplikace dalších fyzikálních či biologických principů. Tato kombinace umožňuje v řadě případů podstatně zvýšit citlivost či selektivitu příslušných voltametrických či amperometrických stanovení a v neposlední řadě výrazným způsobem pomáhá při objasňování mechanismu elektrodových reakcí, zejména organických látek.

1.3.1 Kombinace s fyzikálními principy

Do této oblasti lze zařadit např.:

1. Využití OTE (opticky transparentních elektrod). Pomocí těchto elektricky vodivých a opticky propustných elektrod lze současně získat elektrochemickou informaci a informaci o spektrech produktů elektrodové reakce v ultrafialové či viditelné oblasti, což výrazně přispívá k objasňování mechanismu elektrodových reakcí.

2. Kombinace elektrochemie a hmotnostní spektrometrie. V tomto případě je u povrchu elektrody umístněna trubička zakončená semipermeabilní membránou na ocelové fritě, bránící průchodu polárních látek (molekul rozpouštědla či základního elektrolytu), ale umožňující průchod nepolárních molekul vznikajících při elektrodové reakci. Ty jsou pak nasáty do hmotnostního spektrometru umožňujícího jejich identifikaci.

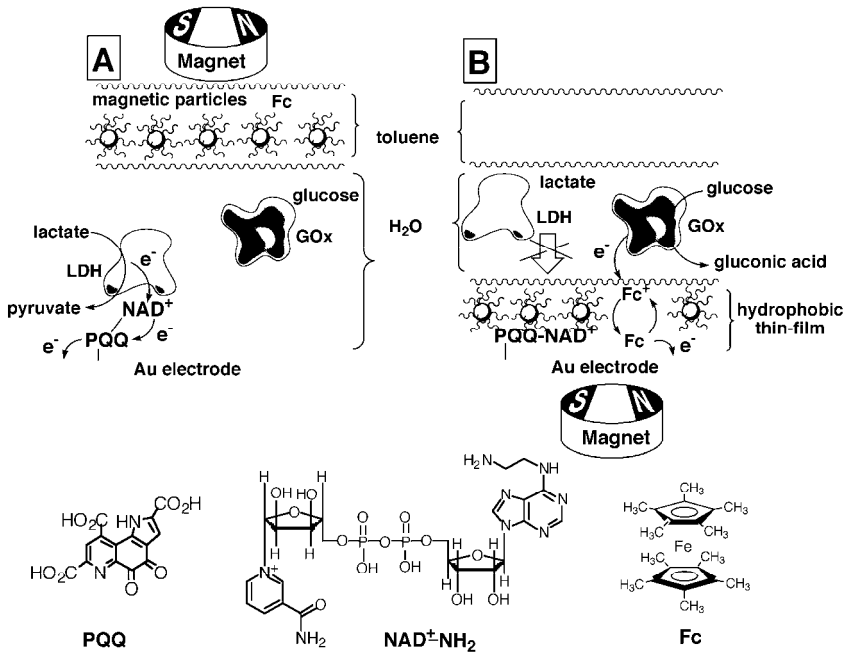
3. Využití magnetických jevů při elektrochemických měřeních. Z této oblasti lze pro ilustraci uvést dva zajímavé případy. Prvním je využití magnetických mikrokuliček, na nichž je navázána sonda pro hybridizaci DNA. Na tuto sondu se na váže pouze komplementární DNA, magnetické kuličky jsou zachyceny na magnetu a nekomplementární DNA se snadno odstraní promytím. Poté se navázaná DNA uvolní a stanoví např. voltametricky. Druhým zajímavým příkladem je využití hydrofobních magnetických mikročástic dispergovaných v toluenu ke zvýšení selektivity současné elektrochemické detekce laktátu pomocí laktátdehydrogenasy s použitím PQQ jako mediátoru a glukosy pomocí glukosaoxidasy za použití ferrocenu jako mediátoru (viz obr. 1.3). Je-li magnet nad roztokem (případ A na obr. 1.3), je hydrofobní toluenová vrstva, která se stěhuje s hydrofobními magnetickými mikrokuličkami, nad vodným roztokem a na elektrodě probíhá pouze oxidace laktátu s hydrofilním mediátorem. Pokud se dá magnet pod elektrodu (případ B na obr. 1.3), přestěhuje se hydrofobní toluenová vrstva s hydrofobními magnetickými mikrokuličkami k povrchu elektrody a s ní i hydrofobní mediátor oxidace glukosy. Tato hydrofobní vrstva na povrchu elektrody zabraňuje přístupu hydrofilního mediátoru oxidace laktátu, která tudíž přestane probíhat. Naopak je usnadněn přístup hydrofobního mediátoru oxidace glukosy k pracovní elektrodě a tato oxidace začne probíhat. Pouhým přesunem magnetu tudíž přepínáme sensor z detekce glukosy na detekci laktátu a naopak.

1.3.2 Kombinace se separačními principy

Příkladem může být pokrytí elektrody vhodnou membránou, která propouští k povrchu elektrody pouze určité částice z analyzovaného roztoku a tím zvyšuje selektivitu elektrochemického stanovení. Selektivitu stanovení může zvýšit i použití vtištěných polymerů, které jsou úspěšně používány v separačních metodách.

1.3.3 Kombinace s biologickými principy

Selektivitu či stanovení lze často výrazně zvýšit – vedle chemické modifikace elektrody – i její biologickou modifikací. Jako příklad lze uvést tzv. enzymové elektrody, kdy se používá modifikace vhodným enzymem (např. polyfenyloxidasou pro stanovení dopaminu na základě jeho oxidace na odpovídající chinon či křenovou peroxidasou) či tzv. tkáňové elektrody, kde se k modifikaci používá přímo levnější biologická tkáň obsahující tento enzym (např. banán v případě polyfenyloxidasy či křen v případě křenové peroxidasy).



Obr. 1.3 Využití hydrofobních magnetických mikrokuliček pro selektivní stanovení laktátu a glukosy

1.4 Využití nanotrubiček v elektroanalytické chemii

Z hlediska elektroanalytické chemie mají přitažlivé vlastnosti tzv. uhlíkové nanotrubičky, což jsou útvary 10 000krát tenčí nežli lidský vlas. Lze je připravit některým z následujících způsobů:

- výbojem v oblouku mezi dvěma uhlíkovými elektrodami,
- laserovou technikou z uhlíku obsahující CO,
- chemickou depozicí par.

V blízké budoucnosti lze očekávat jejich častější aplikace v elektroanalytické chemii jako:

- materiálu pro mikroelektrody,
- materiálu pro pastové elektrody,
- materiálu pro modifikaci elektrod,
- molekulových vodičů připojující objemné enzymy k povrchu elektrody.

Zajímavé jsou i již popsané aplikace využívající nanotrubičky modifikované alkalickou fosfatasou jako značky navázatelné na signální sondu DNA. Navázaný enzym pak katalyzuje uvolnění 1-hydroxynaftalenu, který lze citlivě detegovat pomocí uhlíkové elektrody rovněž modifikované uhlíkovými nanotrubičkami. Tímto způsobem lze detegovat extrémně nízká množství (řádově 1 000 molekul) DNA.

1.5 Kombinace voltametrie a ampérometrie s průtokovými měřeními

Tato kombinace se s úspěchem používá ke:

- zvýšení citlivosti stanovení, neboť v řadě případů je elektrochemická detekce citlivější nežli převládající spektrofotometrická detekce v ultrafialové či viditelné oblasti;
- zvýšení selektivity stanovení, neboť předběžná separace analytů např. pomocí HPLC či CZE zvyšuje selektivitu ve srovnání s přímým voltametrickým stanovením;
- zkrácení doby stanovení, neboť průtoková injekční analýza (FIA) či průtoková sekvenční analýza (SIA) podstatně zkracuje dobu stanovení (řádově na 30–60 sekund) ve srovnání se stanovením vsádkovým (řádově 10 minut).

Této problematice bude věnována pozornost v kapitole 15.

1.6 Závěrečné úvahy

Závěrem lze konstatovat, že obrovská rozmanitost problémů nastolovaných před moderní analytickou chemii vyžaduje stejnou rozmanitost metod používaných pro jejich optimální řešení. Přes obrovský potenciál současných spektrometrických a separačních metod je zřejmé, že moderní elektroanalytické metody mohou v řadě případů představovat konkurenceschopnou alternativu. Není totiž vždy nutné používat tu nejúčinnější – a tím pádem i ekonomicky náročnější – metodu, ale stačí nalézt metodu právě vhodnou pro daný účel („fit for the purpose method“), která splňuje všechny požadavky a přitom není „předimenzovaná“, což se může negativně odrazit v pořizovacích či provozních nákladech. Lze důvodně předpokládat, že moderní voltametrické a amperometrické metody se budou dále rozvíjet a uplatňovat z důvodů:

- ekonomických (mimořádně nízká pořizovací i provozní náklady);
- parametrových (pro řadu případů postačující selektivita, široký lineární dynamický rozsah a mimořádně nízké meze stanovitelnosti a meze detekce);
- legislativních (z právnického hlediska bude ve sporných případech požadována analýza několika nezávislými metodami);
- základního principu (zdrojem elektrického signálu je přímo sledovaná částice a odpadá nutnost konverze např. elektromagnetického záření na elektrický proud);

- možnosti miniaturizace, která bude stále potřebnější zejména v souvislosti s detekcí v průtokových systémech (kapilární elektromigrační metody, kapilární elektroforéza, separace na čipu či dokonce laboratoř na čipu, „lab on chip“).

Moderní pohled na současné elektroanalytické metody lze nalézt např. ve skriptech [8].

A autor této kapitoly nepochybuje o tom, že vynalézavost nadšených elektroanalytických chemiků přijde na celou řadu další možností, jak zvýšit význam moderních elektroanalytických metod v moderní analytické laboratoři a přispět tak k řešení stále složitějších úkolů, které moderní společnost před analytickou chemii klade.

1.8 Literatura

1. Barek J., Zima J.: *Electrochemistry of Environmentally Importatnt Organic Substances*. V knize: *Electrochemistry for Environmental Protection* (Štulík K., Kalvoda R., Eds.). UNESCO Technical Report No. 25. UNESCO Regional Office for Science and Technology for Europe (ROSTE), Venice 1996.
2. Barek J., Fogg A.G., Muck A., Zima J.: *Polarography and Voltammetry at Mercury Electrodes*. Crit. Rev. Anal. Chem. *31*, 291 (2001).
3. Švancara I., Vytřas K., Barek J., Zima J.: Crit. Rev. Anal. Chem. *31*, 311 (2001).
4. Yosypchuk B., Novotny L.: CRC Crit. Rev. Anal. Chem. *32*, 141 (2002).
5. Švancara I., Vytřas K.: Chem. Listy *100*, 90 (2006).
6. Yosypchuk B., Barek J., Fojta M.: Electroanalysis *18*, 1126 (2006).
7. Barek J., Muck A., Wang J., Zima J.: Sensors *4*, 47 (2004).
8. Barek J., Opekar F., Štulík K.: *Elektroanalytická chemie*. Karolinum, Praha 2006.

2. PEVNÉ AMALGAMOVÉ ELEKTRODY A JEJICH VYUŽITÍ V ANALÝZE BIOLOGICKY AKTIVNÍCH SLOUČENIN

Ing. Bogdan Yosypchuk, Ph.D.

Ústav fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského AV ČR, Dolejškova 3, 182 23 Praha 8, josypcuk@jh-inst.cas.cz

2.1 Úvod

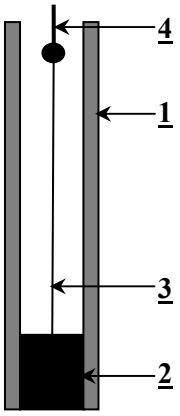
Polarizovátelná elektroda je v polarografii a v od ní metodách odvozených (voltametrii, chronopotenciometrii aj.) zdrojem zpracovatelného elektrochemického signálu. Z hlediska obnovení povrchu elektrody a přilehlé elektrodové dvojvrstvy lze za ideální považovat rtuťovou kapající elektrodu (DME – dropping mercury electrode) zavedenou pro polarografické metody J. Heyrovským [1]. Relativně vysoká mez stanovitelnosti při měření s DME (10^{-5} až 10^{-6} mol l^{-1}) na straně jedné a omezená možnost práce v kladné oblasti potenciálů kvůli rozpouštění rtuti na straně druhé posilovaly potřebu rozvoje stacionárních elektrod. Zavedení visící rtuťové kapkové elektrody (HMDE, hanging mercury drop electrode) a moderních citlivých technik (například, rozpouštěcí voltametrie a chronopotenciometrie) dovolily snížit mez stanovitelnosti do 10^{-10} až 10^{-12} mol l^{-1}. Práce za pozitivních potenciálů je reálně možná jen s nertuťovými elektrodami, nejčastěji z různých druhů uhlíku a z ušlechtilých kovů. Snad největšími problémy pevných nertuťových elektrod jsou nedostačující regenerace jejího povrchu, často prováděná pravidelným leštěním, a nízké přepětí vodíku. Určitým mezičlánkem mezi pevnými a čistě rtuťovými elektrodami jsou elektrody z kompaktních kovů pokrytých vrstvou rtuti, většinou Ag/Hg, Pt/Hg, Au/Hg, Ir/Hg, Cu/Hg . Tento typ elektrod má vysoké přepětí vodíku a umožňuje pohodlnou práci jako s pevnými elektrodami; regenerace jejich povrchu se většinou provádí elektrochemickou cestou. Na druhé straně může být analýza komplikována tvorbou intermetalických sloučenin, nestabilitou rtuťového pokrytí kvůli postupnému rozpouštění kovové podložky ve rtuti doprovázenému vytvořením pevného amalgamu, technickými problémy spojenými s fixací kovů v těle elektrody (kromě platiny se zmíněné kovy do skla nezatavují) apod.

Vývoj nových pevných elektrodových materiálů je určitým kompromisem mezi potřebou docílit požadované vlastnosti a zachovat reprodukovatelnost měření na potřebné úrovni. Moderní trend analytických aplikací (práce v průtokových a/nebo automatizovaných systémech, použití monitorovacích zařízení, elektrochemická detekce v HPLC aj.) vyžaduje zejména zavedení pevných elektrod a prakticky vylučuje možnost mechanického leštění nebo chemickou regeneraci pracovní elektrody (WE – working electrode). Kvalitativně blízkou alternativou rtuťovým kapalným elektrodám by měla být pevná elektroda se širokým rozsahem pracovních potenciálů, srovnatelným

s HMDE, která by se dobře regenerovala elektrochemickou cestou. Použití moderního, počítačem řízeného zařízení by mělo dovolit provádět elektrochemickou regeneraci automaticky před každým měřením. Před několika lety byly jako alternativní materiál pro výrobu elektrod nabídnuty pevné amalgamy [2–4] získávané amalgamací jemného prášku příslušného kovu (MeSAE – metal solid amalgam electrode; kde Me – Ag, Au, Ir, Cu, Bi, Cd aj.). V dalším se budeme věnovat pevným amalgamovým elektrodám, pod kterými budeme rozumět elektrody obsahující kovy nebo jejich slitiny, které se mohou smáčet rtutí a tvořit pevné amalgamy. Tyto amalgamy představují čistší obdobu zubních amalgamů, o nichž je známo, že jsou zcela netoxické. Při jejich případné modifikaci rtutí je množství kovové rtuti na jejich povrchu velmi malé. Náhodně odstranit rtuť je obtížné, přičemž postupem času vytváří podložka elektrody s kapalnou rtutí netoxický pevný amalgám. Některé MeSAE mají, jak bude uvedeno dále, jen o málo menší rozsah pracovních potenciálů, než HMDE, a proto dovolují většinu měření proveditelných jen na rtuťových WE.

2.2 Příprava pracovních elektrod z pevných amalgamů

Do dolní části trubičky **1** (viz obr. 2.1) se napěchuje jemný prášek kovu (Ag, Cu, Au aj.) **2** tak, aby byl vzniklý sloupeček vysoký 0,5 až 1 cm. Do horní části sloupečku se zavede platinový drátek **3** (o průměru 0,1 mm) sloužící jako kontakt. Dolní část trubičky se ponoří do malé lahvičky s 0,5 až 1 ml suché kapalné rtuti a ponechá se v ní, dokud se celý sloupeček práškového kovu nesmočí rtutí. Lahvička se rtutí se vzduchotěsně uzavře a elektroda se ponechá v klidu po 10 až 12 hodin,. až do ztuhnutí amalgamu. K hornímu konci platinového drátku se připevní přívod elektrického kontaktu **4** a horní část trubičky se opatří krytkou. Dolní část trubičky se pomocí jemného smirkového papíru zarovná a pomocí vlhkého práškového oxidu hlinitého (aluminy, 0,3 μm) se vyleští.



Obr. 2.1: ***Schéma MeSAE***

2.3 Popis aplikace pracovních elektrod z pevných amalgamů

Pro úspěšnou aplikaci MeSAE jsou nutné tři základní operace:

1 amalgamace pro m-MeSAE, vytvoření rtuťového filmu pro MF-MeSAE nebo leštění pro p-MeSAE a kompozitní elektrodu;

2. aktivace;

3. regenerace.

Amalgamace m-MeSAE se provádí jednou týdně, nebo častěji, je-li třeba (například při zhoršení citlivosti či reprodukovatelnosti, není-li na povrchu elektrody patrný meniskus kapalného amalgamu apod.). Do lahvičky (objemu 5-10 ml) se dá 0,5-1 ml kovové rtuti a 2-5 ml redestilované vody. Dolní část MeSAE se ponoří do rtuti a intenzivně se lahvičkou se rtutí přibližně 15 s míchá. Poté se lahvička vzduchotěsně uzavře a uloží na bezpečné místo před dalším použitím (uvedené množství rtuti stačí pro mnohaletou opakovanou amalgamaci elektrody). MeSAE se opláchne redestilovanou vodou, zkontroluje se (nejlépe pomocí lupy) přítomnost menisku rtuti na dolní části elektrody. Není-li meniskus patrný, popsaná operace se opakuje.

Vytvoření rtuťového filmu pro MF-MeSAE se provádí elektrochemickou cestou z roztoků obsahujících rtuťnaté ionty (např. 0,01M-$HgCl_2$, 0,1M-HCl.; E_{ac} = –800 mV, t_{ac} = 600 s).

Leštění p-AgSAE se provádí pomocí vlhké aluminy o velikosti částic 0,3 µm po dobu 1-3 min.

Aktivace MeSAE trvá asi 5 min a provádí se vždy na začátku pracovního dne, po přestávce v měřeních větší než 1 h a po amalgamaci, vytvoření filmu nebo leštění. Během aktivace (0,2M-KCl; $E_{aktivace}$ = –2 200 mV; $t_{aktivace}$ = 300 s; vzdušný kyslík se nevybublává) se z povrchu MeSAE odstraňují oxidy a adsorbované látky, čímž se zlepšuje citlivost a reprodukovatelnost následných měření. Povrch m-MeSAE a MF-MeSAE po několikaminutové elektrochemické aktivaci představuje fakticky nasycený kapalný amalgám příslušného kovu. Proto například m-CuSAE vykazuje kromě jiného vlastnosti jak elektrody z kovové mědi, tak i stacionární kapkové elektrody tvořené kapalným amalgamem mědi.

Regenerace MeSAE trvá asi 30 s, provádí se v analyzovaném roztoku před každým měřením automaticky, a to vždy po spuštění měřicího programu; tím se dociluje dobré opakovatelnosti výsledků při obvyklé odchylce do 2-3 %. Parametry regenerace MeSAE mohou být předdefinované v programu analyzátoru a jejich nastavení nebo změna se provádí v příslušném okně programu. Pro obnovení povrchu MeSAE postačí většinou vložit na elektrodu po dobu 20-30 s potenciál o 50-100 mV pozitivnější, než je potenciál vylučování vodíku nebo rozkladu základního elektrolytu. Při tomto potenciálu dochází k redukci oxidů kovů tvořících pevný amalgám (v případě AgSAE jsou to Hg a Ag) i k odstranění adsorbovaných látek. Současně s tím však probíhá akumulace většiny kovů přítomných v analyzovaném roztoku. Aby se zabránilo nekontrolovatelnému procesu této akumulace, provádějí se skokové změny potenciálu z negativních hodnot na pozitivnější, při nichž se naakumulované kovy rozpouštějí. Hodnota pozitivnějšího potenciálu regenerace by však

neměla být taková, aby docházelo k rozpouštění materiálu elektrody nebo k rozkladu základního elektrolytu. Tak např. pro stanovení Cu, Cd, Pb, Zn a Tl proces regenerace m-AgSAE v 0,2M octanovém pufru o hodnotě pH 4,6-5,0 spočívá v aplikaci 50 polarizačních cyklů, při nichž se vždy po dobu 0,3 s vkládá na pracovní elektrodu střídavě 0 a –1 300 mV.

2.4 Pracovní elektrody (WE) z pevných amalgamů

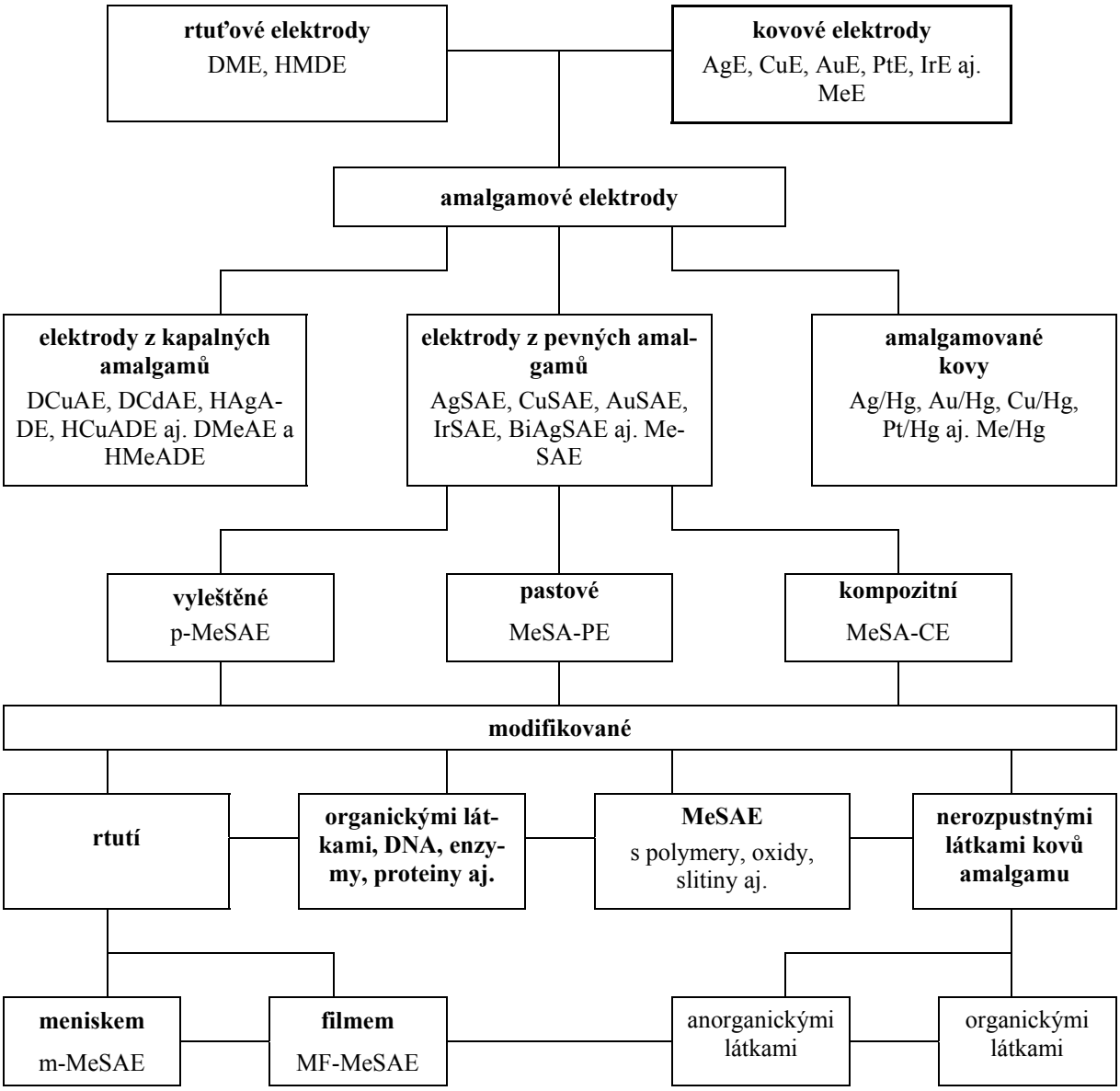
Na obr. 2.2 je uvedeno schéma zobrazující začlenění pevných amalgamových elektrod mezi jinými typy kovových elektrod. Podle stavu povrchu lze MeSAE rozdělit na následující typy:
leštěná – pevná amalgamová elektroda neobsahující kapalnou rtuť (p-MeSAE);
filmová – leštěná MeSAE pokrytá rtuťovým filmem (MF-MeSAE);
menisková – leštěná MeSAE pokrytá rtuťovým meniskem (m-MeSAE);
pastová – WE na bázi jemného prášku pevného amalgamu a kapalného oleje (MeSA-PE);
kompozitní – WE na bázi jemného prášku pevného amalgamu a tuhého polymeru (MeSA-CE).

Uvedené MeSAE i další typy lze podle jejich základních vlastností rozdělit na dvě hlavní skupiny:

1. Amalgám tvoří kov (či kovy, v případě vícesložkových pevných amalgamů), který je elektrochemicky méně aktivní než rtuť (např. AgSAE, AuSAE, IrSAE).
2. Amalgám tvoří kov (nebo aspoň jeden kov u vícesložkových pevných amalgamů), který je elektrochemicky aktivnější než rtuť (např. CuSAE, BiSAE, BiAgSAE, CdSAE, CdAgSAE).

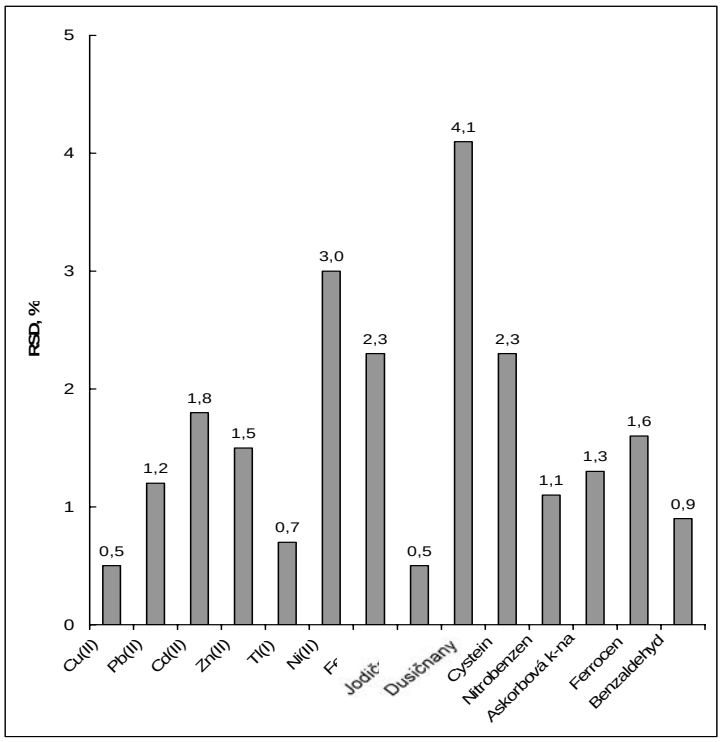
Pracovní elektrody první skupiny se svými vlastnostmi více podobají HMDE. Potvrzují to blízké hodnoty rozsahu pracovních potenciálů (viz tab. 2.1), téměř shodné potenciály píků různých látek na HMDE a m-MeSAE. Hodnoty proudu pozadí na různých MeSAE a HMDE se liší málo, příčinou je spíše rozdíl v geometrické ploše aktivního povrchu WE než rozdíl v jejich vlastnostech. Pracovní elektrody z pevných amalgamů obsahujících kov elektrochemicky aktivnější než rtuť se mohou nejlépe uplatnit pro specifické účely, kdy se využívá interakce analytu právě s tímto kovem (např. interakce adeninu a cysteinu s mědí, která je rozpuštěná v menisku m-CuSAE).

MeSAE připravené postupem popsaným v odst. 2.2 se mohou používat přímo po vyleštění povrchu (p-MeSAE). Rozsah pracovních potenciálů p-AgSAE je pro elektrody neobsahující kapalnou rtuť mimořádně široký, často srovnatelný s HMDE (viz tab. 2.1). Tato skutečnost dovoluje aplikovat p-AgSAE pro stanovení vysoce elektronegativních látek (Zn^{2+}, Mn^{2+}, IO_3^- aj.), pro sledování elektrochemických procesů při velmi negativních potenciálech (katalýza vylučování vodíku, adsorpce-desorpce organických látek aj.), a to i v těch případech, kdy použití elektrod osahujících kapalnou rtuť není vhodné. Pevný povrch p-MeSAE může být různým způsobem modifikovaný (viz obr. 2.2), což podstatně rozšiřuje využitelnost MeSAE. Důležitý je též fakt, že relativně jednoduchým způsobem lze připravit elektrody z pevných amalgamů různých kovů a pak využít specifickou interakci těchto kovů se sledovanou látkou.



Obr. 2.2: ***Různé druhy kovových pracovních elektrod***

Z analytického hlediska se nejlepšími MeSAE ukázaly elektrody modifikované rtutí, a to meniskem (m-MeSAE), nebo filmem (MF-MeSAE). Jejich kapalný povrch je ideálně rovný a stejnorodý, což dovoluje vyloučit snad největší problém pevných elektrod – jejich mechanickou regeneraci a často s tím svázanou nevyhovující opakovatelnost paralelních měření. Elektrochemické obnovení povrchu meniskové nebo filmové elektrody před každým měřením, zvlášť při využití počítačem řízeného analyzátoru (kde se dá tato operace snadno začlenit do měřícího programu), dovoluje dosáhnout RSD při opakovaných měřeních menší než 2-3 % (viz obr. 2.3). Tato skutečnost dovoluje použít MeSAE v průtokovém systému, v automatickém systému s autosamplerem, v amperometrickém detektoru v HPLC apod.



Obr. 2.3: ***Opakovatelnost měření na m-AgSAE***

2.4.1 Elektrody ze stříbrného pevného amalgamu

Stříbro je jedním z nejpoužívanějších materiálů pro výrobu elektrod, zvlášť pokrytých filmem nebo meniskem rtuti. Důležité je, že stříbro rozpuštěné ve rtuti prakticky netvoří intermetalické sloučeniny s jinými kovy, na rozdíl od Pt, Au, Cu. Film Hg na Ag je mnohem stejnorodější než na Pt a Ir, i když je jeho životnost menší. V tab. 2.1 je uveden pracovní rozsah potenciálů AgSAE. Jak je vidět, tento typ elektrod se nejvíce blíží HMDE. Elektroda p-AgSAE vůbec neobsahuje kapalnou rtuť a je jediná nám známá nertuťová kovová elektroda s tak vysokým potenciálem vylučování vodíku. Nutno však podotknout, že opakovatelnost měření s p-AgSAE je horší než s m-AgSAE. Elektrody AgSAE mohou být využitelnou alternativou HMDE pro většinu analytických úkolů a v některých případech, např. měření v terénu, v průtokovém systému, je práce s AgSAE pohodlnější. Lze s nimi dlouhodobě pracovat v prostředí HF, což s HMDE není možné kvůli rychlé korozi skleněné kapiláry. Shoda potenciálů DPV-píků a hodnoty proudu pozadí na m-AgSAE a HMDE dovolují vzájemně přenášet a využít postupy a metodiky dříve vypracované pro rtuťové elektrody. Zvýšení citlivosti analýz lze dosáhnout též prodlužováním doby akumulace t_{ac}. V případě DPASV 10 ppb Pb(II) v 0,2M octanovém pufru o pH 4,8 byla výška píku ve stanoveném rozsahu od 0,5 do 60 min přímo úměrná t_{ac} s vysokou hodnotou korelačního koeficientu (R^2 = 0,999 6). HMDE za stejných podmínek poskytovala lineární závislost i_p–t_{ac} v rozmezí 0,5-15 min. Kratší lineární úsek na HMDE je způsoben difuzí olova do kapiláry elektrody. Práce se rtutí modifikovanými AgSAE je obdobná jako s HMDE, pro každé měření se pouze prodlužuje o přibližně 30 s, během kterých probíhá automaticky regenerace elektrody.

Tab. 2.1: ***Rozsah pracovních potenciálů různých druhů elektrod ve vybraných základních elektrolytech***

Elektroda (průměr disku, mm)	**Rozsah pracovních potenciálů, V**					
	0,1M-$HClO_4$	**0,1M-HCl**	**0,2M acetátový pufr, pH 4,8**	**0,05M-Na_2EDTA, 0,2M acetátový pufr, pH 4,8**	**0,05M-$Na_2B_4O_7$ pH 9,2**	**0,1M-NaOH**
HMDE	–1,19 až +0,44	–1,27 až +0,11	–1,70 až +0,31	–1,55 až +0,09	–1,98 až +0,15	–1,97 až –0,07
PtE (0,40)	–0,32 až +1,37	–0,30 až +1,11	–0,51 až +1,28	–0,51 až +1,05	–0,77 až +1,16	–0,96 až +0,85
AuE (0,40)	–0,54 až +1,69	–0,55 až +0,93	–0,91 až +1,49	–0,84 až +0,75	–1,39 až +1,15	–1,62 až +0,81
AgE (0,40)	–0,64 až +0,39	–0,81 až +0,08	–0,99 až +0,36	–0,99 až +0,35	–1,20 až +0,38	–1,41 až +0,19
CuE (0,60)	–0,95 až +0,017	–0,80 až –0,12	–0,99 až –0,011	–0,97 až –0,039	–1,17 až +0,97	–1,34 až –0,19
p-AgSAE (0,70)	–1,12 až +0,45	–1,12 až +0,11	–1,51 až +0,31	–1,45 až +0,11	–1,88 až +0,16	–1,96 až –0,06
m-AgSAE (0,70)	–1,08 až +0,43	–1,09 až +0,11	–1,44 až +0,21	–1,33 až +0,09	–1,92 až +0,16	–1,95 až –0,07
(0,54)	–1,11 až +0,44	–1,12 až +0,12	–1,39 až +0,30	–1,39 až +0,10	–1,92 až +0,15	–1,99 až –0,06
m-AuSAE (0,40)	–1,12 až +0,45	–1,11 až +0,12	–1,47 až +0,31	–1,45 až +0,11	–1,90 až +0,16	–1,91 až –0,05
m-IrSAE (0,67)	–1,01 až +0,43	–1,01 až +0,12	–1,32 až +0,29	–1,34 až +0,10	–1,63 až +0,15	–1,72 až –0,06
m-CdAgSAE (0,53)	–1,07 až –0,66	–1,06 až –0,69	–1,29 až –0,68	–1,29 až –0,73	–1,93 až –0,69	–1,93 až –0,84
m-CuSAE (0,48)	–1,17 až +0,06	–1,18 až –0,07	–1,44 až –0,03	–1,43 až –0,13	–1,75 až +0,95	–1,86 až –0,24
m-BiAgSAE (0,70)	–0,97 až –0,02	–0,96 až –0,09	–1,25 až –0,18	–1,29 až –0,17	–1,84 až –0,29	–1,82 až –0,48

Experimentální výsledky získané metodou DCV; hodnoty potenciálů odpovídají proudu 1 μA; referentní elektroda SCE; rychlost scanu 20 mV s^{-1}; kyslík byl z roztoku vybublán dusíkem.

Stanovení kationtů. Nejširší uplatnění může AgSAE najít při stanovení kationtů, zvlášť těžkých kovů. Stanovení kovových iontů je nezbytnou součástí monitoringu životného prostředí, sledování výskytu škodlivých látek a biogenních prvků v tělních tekutinách, kontroly technologických procesů atd. Ve voltametrii se pro tyto účely nejčastěji používá visící rtuťová kapková elektroda, elektrody z ušlechtilých kovů, podle potřeby modifikované rtuťovým filmem, rtuťovým meniskem, biologicky aktivními látkami, a dále kompozitní elektrody a elektrody z různých druhů uhlíku, včetně uhlíkových pastových elektrod. Byla otestována možnost analýzy As(III), Cd(II), Co(II), Cr(III), Cu(II), Fe(III), In(III), Mn(II), Ni(II), Pb(II), Sn(II), Tl(I), Zn(II) aj. na různých AgSAE. Stříbrná pevná amalgamová elektroda dovoluje stejně jako HMDE stanovit měď, olovo, kadmium a zinek během jednoho potenciálového scanu [5] (viz odst. 2.5).

Stanovení aniontů. Pro měření na AgSAE v roztocích aniontů lze využít různé elektrochemické procesy, jako redukce (IO_3^-, Nb(V)), katalytické jevy (NO_3^-), chemisorpce v kombinaci s následujícím katodickým scanem (Cl^-, Br^-, I^-, S^{2-}, CNS^- aj.), či adsorpce (Cr(VI)). V odst. 2.5 je popsán postup stanovení jodičnanů v kuchyňské soli.

Stanovení organických látek. V analýze organických látek patří voltametrická měření k jedněm z nejcitlivějších, nevyžadujících složitou a drahou techniku. Tak například citlivost na úrovni 10^{-8} až 10^{-9} mol l^{-1} je běžná pro stanovení adeninu, guaninu, nukleotidů, cysteinu, cystinu aj.

Elektrodové reakce za účasti organických sloučenin probíhají na povrchu pracovní elektrody. Nepředpokládá-li se v analyzovaném roztoku vysoký obsah kovových iontů, není nutné pro regeneraci MeSAE provádět „cyklování“, tj. skokově měnit potenciál regenerace WE z maximálně možné negativní hodnoty na pozitivnější hodnotu (pro rozpuštění kovů nahromaděných v prvním kroku regenerace). Pro odstranění organických komponent měřeného roztoku i produktů elektrodových reakcí adsorbovaných na povrchu WE je většinou dostačující aplikace vysokého negativního potenciálu po dobu 20-30 s. Během této doby se také zredukují oxidy kovů tvořících amalgám. Malá množství kovových iontů, které mohou v roztoku být jako příměsi, se sice během regenerace WE redukují a akumulují na/v WE, ale většinou se rozpouštějí v následujícím kroku měření (např. při akumulaci organické látky v katodické rozpouštěcí voltametrii). Jako radikální a spolehlivá metoda obnovení vlastností MeSAE slouží krátkodobé vyleštění povrchu WE pomocí vlhké aluminy a následující amalgamace.

Různé AgSAE byly vyzkoušeny pro studium a sledování adeninu, guaninu a DNA, deoxyoligonukleotidů, cysteinu, cystinu, SH-látek krevní plazmy, nitrobenzenů, nitrovaných polycyklických aromatických uhlovodíků (1-nitronaftalenu, 2-nitronaftalenu, 2-nitrobifenylu, 3-nitrobifenylu, 4-nitrobifenylu), karcinogenní látky 3-nitrofluoranthenu, pesticidu 2-methyl-4,6-dinitrofenolu, barviv na základě azosloučenin, léčiv aj.

Vzhledem k tomu, že elektrochemickému měření obvykle předchází separace stanovované látky, AgSAE (stejně jako i jiné MeSAE) nachází uplatnění v HPLC jako amperometrický detektor na výstupu z kolony. Pro měření vzácných nebo drahých látek na základě AgSAE byla zhotovena tříelektrodová cela na 5-20 µl analyzovaného roztoku. Toto uspořádaní je vhodné při studiu DNA, kromě toho se dobře osvědčilo pro zvýšení citlivosti v těch případech, kde se sledovaná látka koncentruje odpařením do malého objemu.

2.4.2 Elektrody z měděného pevného amalgamu

Přítomnosti mědi v materiálu pracovní elektrody nebo měďnatých iontů v měřeném roztoku se často používá pro studium a analytické stanovení látek interagujících s Cu(I) nebo Cu(II) a v systémech, kde měď projevuje své katalytické vlastnosti. Práce s m-CuSAE je v podstatě stejná jako s jinými MeSAE. Z tab. 2.1 je vidět, že přepětí vodíku na m-CuSAE se příliš neliší od přepětí na HMDE a v kladné oblasti jsou pracovní potenciály m-CuSAE omezeny rozpouštěním mědi z elektrody. Výjimkou je roztok $Na_2B_4O_7$ a při větších proudech i roztok NaOH, kde se v kladné oblasti potenciálů elektroda pokrývá kompaktní vrstvou oxidů zabraňujících jejímu dalšímu rozpouštění. V závislosti na potenciálu se měď elektrody může oxidovat do jedno-, dvou- nebo trojmocného stavu. Trojmocná měď se tvoři kolem +600 mV a katalyticky oxiduje alkoholy, cukry a jíné látky, které by se na jiných elektrodách oxidovaly buď při mnohem kladnějším potenciálu, nebo by se neoxidovaly vůbec. V našich experimentech při oxidaci ethanolu na m-CuSAE byly získány dobře vyvinuté píky (i když při značném proudu pozadí) a koncentrační závislost byla lineární v rozmezí 0,5-11 obj. % vodného roztoku tohoto alkoholu (R^2 = 0,9967).

Menisková CuSAE je vhodná pro měření s nahromaděním analyzovaných kovů na elektrodě. Bylo otestováno stanovení kadmia a olova v acetátovém pufru. Přesto doporučujeme pro anodickou rozpouštěcí voltametrii kovů používat přednostně m-AgSAE, která nabízí podstatně vyšší citlivost měření a omezenou tvorbu intermetalických sloučenin, jejichž přítomnost většinou ruší (např. měď tvoří ve rtuti intermetalické sloučeniny se zinkem, které se pak na voltamogramu projevují buď píkem v blízkosti píku mědi, nebo samostatným píkem posunutým vůči píku zinku o 150 mV).

Při aplikaci elektrod z mědi nebo z měděného amalgamu se nejčastěji klade důraz na rozdílnou interakci analyzované látky s mědí, ve srovnání se rtutí nebo s jiným kovem. Při katodické rozpouštěcí voltametrii (CSV – cathodic stripping voltammetry) se z měděné elektrody uvolňující ionty Cu^+ nebo Cu^{2+} (v případě HMDE to jsou ionty Hg_2^{2+} nebo Hg^{2+}), tvořící s četnými látkami (adenin, guanin, adenosin, cystein, cystin, fytochelatiny aj.) málo rozpustné nebo komplexní sloučeniny, které se mohou akumulovat na elektrodě. Během následujícího scanu ve směru k negativním potenciálům se pak ionty mědi z adsorbovaného komplexu redukují, což se projevuje vznikem příslušného voltametrického píku. Protože je měď elektrochemicky aktivnější než rtuť, je pík rovněž posunut k negativnějším potenciálům (v porovnání s píkem redukce iontů rtuti z obdobného

komplexu). Katodická rozpouštěcí voltametrie na m-CuSAE našla uplatnění pro stanovení adeninu, guaninu, hydrolyzované DNA, cysteinu, glutathionu a fytochelatinů. Vzhledem k vzácnosti a vysoké ceně vzorků DNA se stává prioritní citlivost měření. Na základě provedených pokusů byly zjištěny podmínky měření hydrolyzované DNA, při nichž se dosáhne nejvyšší (resp. optimální) citlivosti. Reálně změřené koncentraci hydrolyzované DNA $3 \cdot 10^{-9}$ mol l^{-1} odpovídá měřitelná odezva, nacházející se na lineárním úseku kalibrační křivky. Tato hodnota koncentrace je v souladu s hodnotou meze detekce vypočítanou na základě paralelních měření ($4{,}4 \cdot 10^{-9}$ mol l^{-1}). Nízká hodnota relativní směrodatné odchylky (3,7 %) svědčí o možnosti stanovit velmi nízké koncentrace DNA s dostatečně vysokou přesností. Na základě popsaného výzkumu byla m-CuSAE použitá jako součást sensoru hybridizace DNA [7].

Na základě získaných výsledků lze předpokládat, že m-CuSAE může být aplikována tam, kde jsou použitelné elektrody z kompaktní mědi, poamalgámované kompaktní mědi či kapalné měděné amalgámy, a dále pro systémy, v nichž se Cu^{2+} přidává do roztoku pro vytvoření komplexů nebo jiných sloučenin na elektrodě.

2.4.3 Elektrody z pevných amalgamů jiných kovů

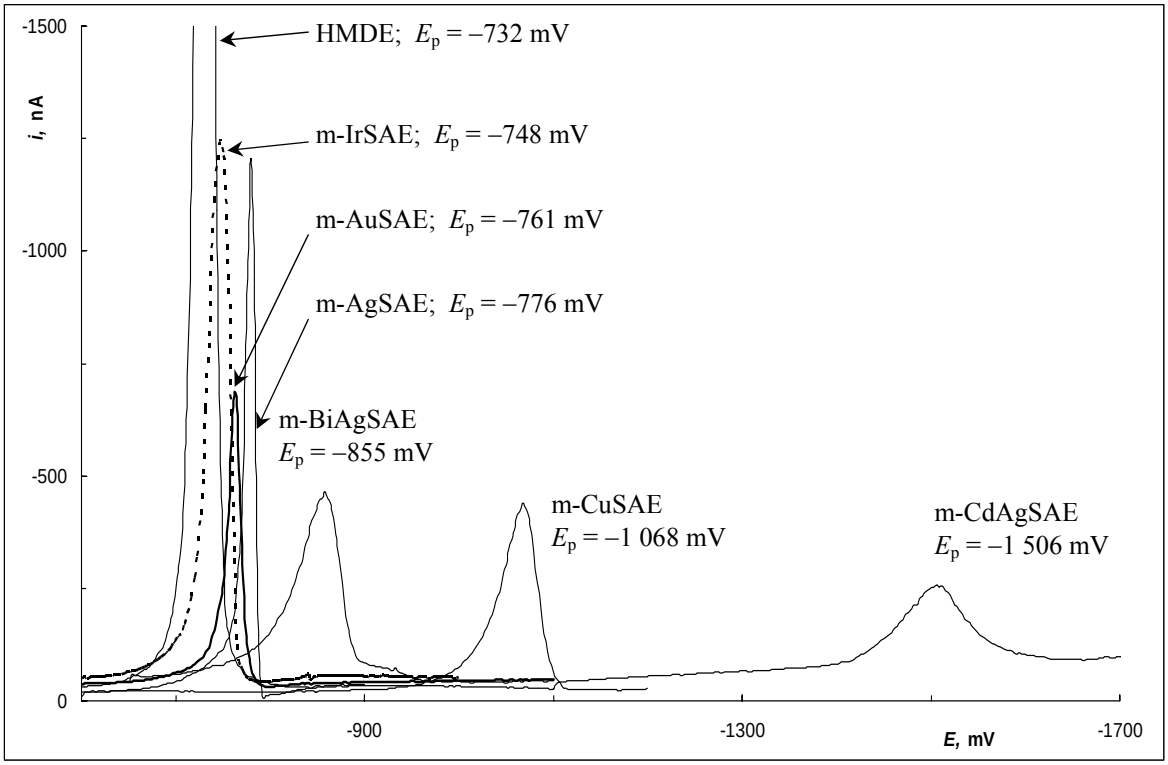
Kromě již popsaných AgSAE a CuSAE byly připraveny pracovní elektrody z pevných amalgamů zlata, iridia, bismutu a kadmia. Jak již bylo zmíněno, pracovní elektrody obsahující kov elektrochemicky méně aktivní než rtuť se svými vlastnostmi více podobají HMDE. Potvrzují to téměř shodné potenciály píků různých kovů na HMDE a m-AgSAE, adeninu a guaninu na HMDE, m-AgSAE, m-AuSAE a m-IrSAE, cysteinu na HMDE a m-AuSAE. Na druhou stranu může kov tvořící amalgám podstatně ovlivnit průběh děje na elektrodě. Bylo např. studováno [8] stanovení osmiem modifikované DNA (DNA-Os,bipy) na elektrodách z pevných amalgamů na základě vysoce citlivé reakce katalytického vylučování vodíku a získané výsledky byly srovnány s měřeními na HMDE, a dále byla zkoumána aplikace tzv. přenosové adsorptivní voltametrie (AdTSV) pro hybridizační pokusy. Na vyleštěné AgSAE, stejně jako na elektrodě z pyrolytického grafitu, nebyl pozorován katalytický pík DNA-Os,bipy (není znázorněno), což rovněž potvrzuje, že pro zmíněné katalytické vylučování vodíku je nutný rtuťový povrch. Elektrody m-AuSAE a m-BiAgSAE mají na rozdíl od p-AgSAE povrch kapalný, ale jejich meniskus obsahuje i ve rtuti rozpuštěné zlato, bismut a stříbro. Na obou uvedených elektrodách byl katalytický signál úplně potlačen, zřejmě inhibičním působením zlata a bismutu. Dobře vyvinuté voltametrické píky s prakticky stejnou polohou (potenciál píku kolem –1 220 mV) byly získané jen na m-AgSAE, m-CuSAE a HMDE.

Interakce mezi analytem a komponentami menisku m-MeSAE může nastat i v případě anodické rozpouštěcí voltametrie kovových iontů. Je známo, že zlato rozpuštěné ve rtuti tvoří s kadmiem, zinkem, indiem a jinými kovy málo rozpustné intermetalické sloučeniny, což vede ke snížení citlivosti stanovení těchto kovů. Srovnání m-AuSAE a m-AgSAE při anodické rozpouštěcí volta-

metrii Zn(II), Cd(II), Pb(II) a Cu(II) (není znázorněno) ukazuje, že zinek a kadmium na elektrodě se zlatým amalgamem prakticky neposkytují rozpouštěcí píky a proudová odezva olova a mědi je podstatně menší. Tento pokus jasně naznačuje, že aplikace m-AuSAE pro stanovení nízkých koncentrací kovů není vhodná. Na druhou stranu by se tato elektroda mohla uplatnit v situaci, kde je nutné eliminovat vliv zinku nebo kadmia.

Iridiové elektrody pokryté rtuťovým filmem byly zavedeny kvůli velmi malé rozpustnosti iridia ve rtuti, což mělo zamezit tvorbě intermetalických sloučenin; takový film by se měl pak chovat jako čistě rtuťový. Při studiu elektrochemického chování m-IrSAE nebyly zatím zjištěny takové její užitečné vlastnosti, které by mohly racionálně zdůvodnit nahrazení m-AgSAE touto elektrodou.

Vliv složení pracovní elektrody na CSV-signál sulfidových iontů je demonstrován na obr. 2.4. V závislosti na elektrochemické aktivitě kovu tvořícího amalgám a také na pevnosti vazby kovu se sírou se může poloha píku pohybovat v širokém rozsahu potenciálů. Potenciály píků na MeSAE tvořenými kovy ušlechtilejšími než rtuť se liší podstatně méně, než v případě přítomnosti elektronegativnějších prvků v elektrodovém materiálu. Různé MeSAE se dají použít pro studium látek obsahujících síru a také jako zásobník kovových iontů, jejichž uvolnění (např. pro tvorbu komplexů) lze velmi přesně řídit nastavením vhodného potenciálu a doby rozpouštění elektrody.



Obr. 2.4: ***Voltametrické záznamy získané při stanovení S^{2-} na různých MeSAE***

Experimentální podmínky: DPV; základní elektrolyt 0,1M-NaOH; t_{ac} = 60 s v míchaném roztoku; regenerace m-MeSAE: E_{reg} = –1 700 mV po dobu 30 s automaticky před každým měřením; v = 20 mV s^{-1}. Koncentrace iontů S^{2-} 0,2 mg l^{-1}

Na základě uvedených příkladů lze říci, že pevné amalgamové elektrody dovolují v mnohá případech nejen nahradit HMDE, ale přinášejí i možnosti buď nové, nebo dokonce neproveditelné na čistě rtuťových elektrodách.

2.5 Příklady použití pevných amalgamových elektrod

Voltametrické stanovení Cu, Pb, Cd, Zn a Tl na m-AgSAE [5]

Mineralizace vzorků. Organické látky obsažené v přírodních a odpadních vodách, ve výluzích z půd, v tělních tekutinách apod. mohou zásadně ovlivnit průběh voltametrického měření a výsledky analýzy. Mineralizace takových vzorků se provádí různými způsoby a s použitím různých oxidačních činidel. Pitná voda by neměla obsahovat tak velké množství organických sloučenin, které by výsledky analýzy mohlo podstatně ovlivnit, proto většinou není nutno vzorky vody mineralizovat. Pevné vzorky (potraviny, rostliny, suroviny, rudy aj.) je třeba rozkládat (mineralizovat) podle metodik vypracovaných pro daný typ vzorku.

Pro mineralizaci vzorků různých druhů vod a výluhů z půd lze doporučit tento postup: K 5-50 ml kapalného vzorku v baňce nebo nádobce se přidá se 1 ml koncentrované kyseliny dusičné a 1 ml 30%ního roztoku peroxidu vodíku. Směs se odpaří do sucha, odparek se ochladí na teplotu okolí, znovu se přidá 1 ml koncentrované kyseliny dusičné a 1 ml 30%ního roztoku peroxidu vodíku a roztok se znovu odpaří do sucha. Je-li suchý odparek bílý nebo žlutavý (sloučeniny železa), je mineralizace ukončena. Je-li odparek hnědý, přidávání a odpaření oxidantů se opakuje. V tomto mineralizovaném suchém stavu je možné vzorky pohodlně uchovávat a transportovat, jestliže nelze provést analýzu ihned na místě. K suchému odparku se přidá 10-25 ml 0,1M-HCl. Roztok se zahřívá a míchá, dokud se neobjeví pára; poté se ochladí, a pokud je to nutné, přefiltruje se. Takto připravený mineralizát vzorku se používá pro voltametrická měření.

Příprava roztoků pro voltametrická měření

Současné stanovení Cu(II), Pb(II), Cd(II) a Zn(II). V závislosti na předpokládané koncentraci iontu daného kovu ve vzorku se do polarografické nádobky přidá 1-6 ml mineralizátu vzorku (doplní se redestilovanou vodou na objem 6 ml) a 4 ml 1M octanového pufru o pH 4,8-5,0.

Stanovení Tl(I). V závislosti na předpokládané koncentraci thallných iontů ve vzorku se do polarografické nádobky přidá 1-5 ml mineralizátu vzorku (doplní se redestilovanou vodou na objem 5 ml), 4 ml 1M octanového pufru o hodnotě pH 4,8-5,0 a 1,0 ml 0,1M-Na_2EDTA.

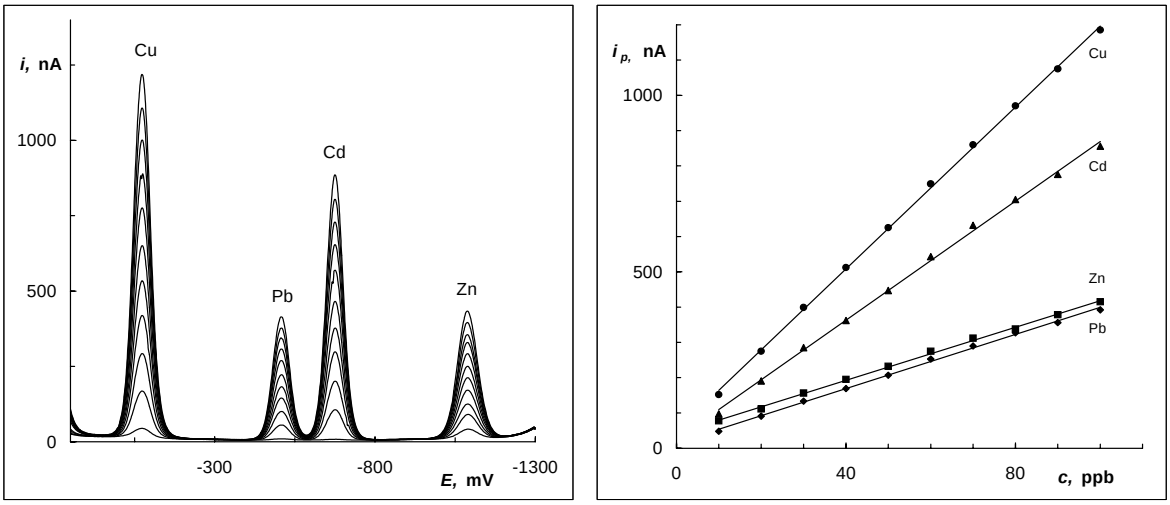
Voltametrická měření

Parametry součastného stanovení Cu(II), Pb(II), Cd(II) a Zn(II): DPV; m-AgSAE; E_{in} = –1 300 mV; E_{fin} = +50 mV; E_{ac} = –1 300 mV; t_{ac} = 30-300 s v míchaném roztoku; regenerace m-AgSAE: 50 polarizačních cyklů, při nichž se vždy po dobu 0,3 s vkládá na pracovní elektrodu střídavě 0 mV

a –1 300 mV (automaticky před každým měřením); rychlost scanu 20 mV s^{-1}; hodnocení výsledků se provádí metodou standardního přídavku.

Parametry stanovení Tl(I): DPV; m-AgSAE; E_{in} = –800 mV; E_{fin} = –300 mV; E_{ac} = –800 mV; t_{a-c} = 30-300 s v míchaném roztoku; regenerace m-AgSAE: 50 polarizačních cyklů, při nichž se vždy po dobu 0,3 s vkládá na pracovní elektrodu střídavě –50 a –1300 mV (automaticky před každým měřením); rychlost scanu 20 mV s^{-1}; hodnocení výsledků se provádí metodou standardního přídavku.

Na obr. 2.5 jsou uvedeny voltametrické záznamy a kalibrační křivky těchto prvků při různých koncentracích. Výsledky statistického zpracování 11 opakovaných měření v modelovém roztoku jsou uvedeny v tab. 2.2. Lineární závislost proudu píku (i_p) na koncentraci sledovaných iontů a výsledky statistického zpracování opakovaných měření svědčí o dobré aplikovatelnosti m-AgSAE pro analytické účely.



Obr. 2.5: ***Kalibrační záznamy a křivky získané při stanovení Cu(II), Pb(II), Cd(II) a Zn(II) na stříbrné pevné amalgamové elektrodě modifikované rtuťovým meniskem***

Experimentální podmínky: DPV; m-AgSAE; základní elektrolyt 0,4M octanový pufr, pH 4,8; E_{ac} = –1 300 mV; t_{ac} = 180 s v míchaném roztoku; regenerace m-AgSAE po dobu 30 s automaticky před každým měřením; koncentrace iontů kovů: 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 a 100 µg l^{-1}.
$i_{p,Cu} = 11{,}47c + 49{,}55$, $R^2 = 0{,}999\ 5$; $i_{p,Pb} = 3{,}83c + 15{,}78$, $R^2 = 0{,}998\ 1$;
$i_{p,Cd} = 8{,}44\ c + 25{,}24$, $R^2 = 0{,}998\ 5$; $i_{p\ Zn} = 3{,}76\ c + 42{,}16$, $R^2 = 0{,}998\ 4$.

Tab. 2.2: ***Statistické zpracování opakovaných měření***

Koncentrace kovových iontů 20 µg l^{-1}; doba akumulace Tl(I) 180 s, pro ostatní ionty 300 s

Parametr	Cu(II)	Pb(II)	Cd(II)	Zn(II)	Tl(I)
průměrná výška píku, nA	216,5	77,3	157,2	127,5	50,8
interval spolehlivosti, nA	0,8	0,6	1,8	1,3	0,2
směrodatná odchylka, nA	1,1	0,9	2,8	1,9	0,3
relativní směrodatná odchylka, %	0,5	1,2	1,8	1,5	0,7
mez detekce (3·SD), µg l^{-1}	0,3	0,7	1,1	0,9	0,4

Je známo, že pro záznam současného voltametrického stanovení několika látek je možné použít analogový zapisovač za předpokladu, že koncentrace těchto látek se vzájemně neliší o více než jeden řád (při měření s analyzátorem řízeným počítačem jsou tyto možnosti podstatně širší). Mnohdy není tato podmínka splněna, a proto bývá nutné provádět analýzu jednotlivých látek postupně; současně to vyžaduje správně nastavit optimální potenciál akumulace (E_{ac}) a potenciál, při kterém se scan ukončí (E_{fin}). Tyto potenciály činí pro Cu(II) –400 mV a +50 mV; Pb(II) –800 mV a –200 mV; Cd(II) –1 000 mV a –500 mV a pro Zn(II) –1 300 mV a –700 mV. Pokud je koncentrace daného iontu v roztoku $c \geq 0{,}5$ mg l^{-1}, lze voltametrický scan registrovat od počátečního potenciálu E_{in} (rovnajícího se uvedené hodnotě E_{fin}) bez uplatněné akumulace ($t_{ac} = 0$ s).

Voltametrické stanovení jodičnanů v kuchyňské soli [6]

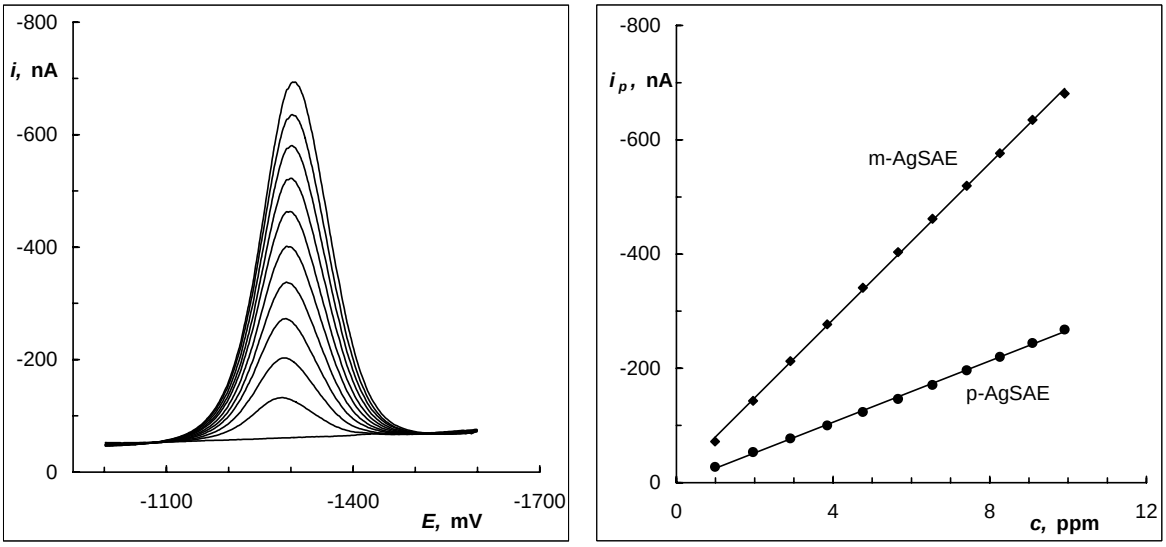
Pro výrobu jodované kuchyňské soli se používá jodičnan draselný, proto jednoduchý a rychlý způsob stanovení jodičnanů může být aktuální pro kontrolu příslušných technologických procesů; ve zdravotnictví by podobná metodika mohla přispět ke studiu bilance jodu v lidském organismu a k prevenci onemocnění štítné žlázy.

Redukce jodičnanů probíhá ve vysoce negativní potenciálové oblasti a dříve byla proveditelná většinou jen na rtuťových elektrodách. Nyní byla prokázána možnost analýzy jodičnanů pomocí p-AgSAE neobsahující kapalnou rtuť (i když citlivost a přesnost analýzy je v případě m-AgSAE lepší), která nabízí rychlou a velmi jednoduchou metodu stanovení jodu ve formě jodičnanů v reálních vzorcích sériově vyráběné jodované kuchyňské soli [6].

Příprava vzorků kuchyňské soli a metodika stanovení jodu. Do vhodné kádinky nebo přímo do polarografické nádobky se přenese 1,00 g analyzované soli, přidá se 9 ml destilované vody, roztokem se míchá do rozpuštění krystalů a pak se přidá 1 ml 1M-NaOH. V takto připraveném roztoku vzorku se po 300 s vybublání rozpouštěného kyslíku stanoví jod. Parametry měření: DPV, $E_{in} = -900$ mV, $E_{fin} = -1\,600$ mV, výška pulsu –50 mV, šířka pulsu 100 ms, rychlost scanu 20 mV s^{-1}, pro výpočet obsahu jodu v kuchyňské soli se používá metoda standardního přídavku. Jednou denně se p-AgSAE leští po 1-2 min pomocí 0,3 μm vlhké aluminy. Před zahájením práce a po přestávce v měřeních delší než 1 h se za míchání roztoku provádí elektrochemická aktivace AgSAE v 0,2M-KCl po dobu 300 s při potenciálu –2 200 mV. Před každým měřením se také automaticky obnovují povrch a vlastnosti AgSAE, a to za následujících parametrů měření: 300 skoků mezi $E_{reg,1} = -300$ mV po $t_{reg,1} = 0{,}05$ s a $E_{reg,2} = -1\,600$ mV po $t_{reg,2} = 0{,}05$ s.

Na obr. 2.6 je uvedena závislost výšky píku redukce jodičnanů na jejich koncentraci při použití m-AgSAE a p-AgSAE. Koncentrační rozsah byl zvolen tak, aby pokrýval možné koncentrace jodičnanů v roztoku vzorku jodované kuchyňské soli připraveném k analýze. Stejný tvar voltametrických křivek s nepatrně odlišným potenciálem píku byl získán na m-AgSAE i na p-AgSAE. Je

zřejmě, že odezva m-AgSAE na stejné přídavky jodičnanů je podstatně vyšší než odezva p-AgSAE. Pro obě elektrody lze konstatovat, že linearita kalibračních křivek je dobrá, a tím je splněná i jedna z nejdůležitějších podmínek pro možnost aplikace postupu v analýze jodičnanů.



Obr. 2.6: ***Kalibrační záznamy získané při stanovení jodičnanů na m-AgSAE a p-AgSAE***

Experimentální podmínky: DPV; základní elektrolyt 0,1M-NaOH; E_{in} = –900 mV; E_{fin} = –1 600 mV; rychlost scanu 20 mV s^{-1}. Koncentrace jodičnanů: 0 až 9,01 ppm. $i_{p,m\text{-}AgSAE} = -68{,}43c - 11{,}37$, $R^2 = 0{,}999\,5$; $i_{p,p\text{-}AgSAE} = -26{,}83c + 1{,}67$, $R^2 = 0{,}999\,1$

Prakticky bylo stanovení jodičnanů ve vodných roztocích uplatněno při analýze jodované kuchyňské soli (Solné mlýny, a. s., Olomouc). V tab. 2.3 jsou shrnuty statisticky zpracované výsledky analýzy reálných vzorků. Je vidět, že navržený postup poskytuje dostatečně přesné a reprodukovatelné výsledky při použití obou typů AgSAE, i když práce s m-AgSAE je pohodlnější. Metodika je velice jednoduchá, fakticky obsahuje jen nezbytné operace (příprava navážky, její rozpouštění ve vodě, přidání roztoku NaOH). Samotné voltametrické stanovení včetně pětiminutového odstranění kyslíku a hodnocení výsledků trvá 8 – 9 minut. Voltametricky nalezený obsah jodičnanů se dobře shoduje s výrobcem deklarovaným obsahem 27 ± 7 mg kg^{-1}.

Tab. 2.3: ***Statistické zpracování stanovení jodu ve formě jodičnanů v kuchyňské soli***

Údaje jsou výsledky ze sedmi analýz

Parametr	m-AgSAE	p-AgSAE
průměrný obsah jodu, mg kg^{-1}	22,2	24,1
interval spolehlivosti, mg kg^{-1}	0,5	1,6
směrodatná odchylka (SD), mg kg^{-1}	0,5	1,7
relativní směrodatná odchylka (RSD), %	2,3	7,1
mez detekce (3·SD), mg kg^{-1}	1,5	5,2

2.6 Závěr

Stříbrná pevná amalgamová elektroda může být využita jako účinná alternativa HMDE ve voltametrii a chronopotenciometrii. Jiné pevné amalgamové elektrody (např. CuSAE, AuSAE) jsou vhodné pro specifické účely, kde se uplatňují vlastnosti kovu tvořícího pevný amalgám. Hlavními uživatelskými a technologickými přednostmi MeSAE jsou:

- široký rozsah pracovních potenciálů;
- elektrochemická regenerace povrchu elektrod modifikovaných rtutí;
- snadná zprovoznitelnost i po několikaměsíční přestávce (během 5-10 min);
- prakticky neomezená životnost elektrod (během 8 let jsme prakticky nezaznamenali změnu jejich vlastností);
- fakt, že elektrody vyrobené z pevných amalgam jsou zcela netoxické;
- aplikovatelnost MeSAE v mobilních laboratořích, zvlášť v těch státech, kde použití kapalné rtuti v terénu je zakázáno;
- snadná zabudovatelnost MeSAE do automatizovaného průtokového systému nebo do výstupu chromatografické kolony;
- využitelnost kovů, které nelze zatavit do skla (Ag, Au, Cu aj.) a kde tak automaticky odpadá nutnost použití speciálních lepidel; při modifikaci MeSAE rtuťovým meniskem nebo filmem se rtuť nedostává dovnitř mezi sloupec pevného amalgamu a tělo elektrody (to obvykle způsobí nepoužitelnost elektrody);
- možnost přípravy elektrody vhodného rozměru a tvaru jednoduchým způsobem;
- maximálně jednoduchá konstrukce MeSAE, bez pohyblivých součástí, zvětšující spolehlivost těchto elektrod.

Navržené elektrody na bázi netoxických pevných amalgamů mohou být aplikovány tam, kde je práce s kapalnou rtutí zakázaná nebo nežádoucí.

2.7 Literatura

1. Heyrovský J., Kůta J., *Principles of Polarography*, Publishing House of the Czech Acad. Sci., Prague 1965.
2. Novotný L., Yosypchuk B., Chem. Listy 2000, 94, 1118.
3. Yosypchuk B., Novotný L., Crit. Rev. Anal. Chem. 2002, 32(2), 141.
4. Yosypchuk B., Novotný L., Electroanalysis 2002, 14, 1138.
5. Yosypchuk B., Novotný L., Chem. Listy 2002, 96, 756.
6. Yosypchuk B., Novotný L., Electroanalysis 2002, 14, 1138.
7. Jelen F., Yosypchuk B., Kouřilová A., Novotný L., Paleček E., Anal. Chem. 2002, 74, 4788.
8. Yosypchuk B., Fojta M., Havran L., Heyrovský M., Paleček E., Electroanalysis 2006, 18, 186.

3. INKOUSTOVÉ FILMOVÉ ELEKTRODY

Ing. Bogdan Yosypchuk, Ph.D.

Ústav fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského AV ČR, Dolejškova 3, 182 23 Praha 8, josypcuk@jh-inst.cas.cz

3.1 Úvod

Obrovskou předností rtuti jako elektrodového materiálu je vysoké přepětí vodíku a dokonale hladký povrch, navíc se vlastnosti elektrody pravidelně regenerují během odkapávání (odklepávání) rtuti. Hlavním omezením rtuťových pracovních elektrod je však anodické rozpouštění rtuti při potenciálech asi +400 mV (vs. SCE - saturated calomel electrode) v roztocích neobsahujících komplexotvorná činidla a látky tvořící sraženiny s ionty rtuti (v přítomnosti těchto látek je potenciál rozpouštění rtuti posunut k negativnějším hodnotám). Rtuťové elektrody se proto nehodí pro řadu oxidačních procesů včetně detekce mnoha anodicky oxidovatelných organických sloučenin [1]. Totéž platí i pro elektrody z pevných amalgamů (MeSAE), které mají elektrochemické vlastnosti podobné rtuťovým elektrodám (viz kap. 2). Elektrody ze zlata (AuE), platiny (PtE) a z jiných ušlechtilých kovů jsou vhodné pro práci v oblasti pozitivních potenciálů, ale kvůli nízkému přepětí vodíku mají omezené možnosti pro realizaci elektrodových redukčních procesů [2]. Z mnoha různých uhlíkových elektrod se zmíníme jen o filmových (screen-printed) elektrodách, např. na základě prášků skelného uhlíku [3] a grafitu [4], které lze hromadně vyrábět pomocí polygrafické techniky, mohou sloužit „na jedno použití“ a výrobní náklady jsou relativně nízké. Reprodukovatelnost měření s těmito elektrodami by měly zajistit identické geometrické a elektrochemické parametry a častá obměna samotných elektrod; to klade zvýšené nároky na kvalitu výroby i na pravidelnost zásobování pracovními elektrodami (WE).

Jednou z cest, jak u stacionárních elektrod obsahujících rtuť docílit dostatečnou reprodukovatelnost a rozšířit rozsah pracovních potenciálů směrem ke kladným hodnotám (resp. u elektrod s nízkým přepětím vodíku směrem k záporným hodnotám) je pokrýt elektrodu filmem z polymeru obsahujícího vodivé částice. Samotný polymer by neměl být vodivý a měl by dokonale izolovat analyzovaný roztok od vodivé části elektrody. Při splnění těchto podmínek se tradiční pevná elektroda stává obyčejným vodičem a elektrodovým materiálem jsou mikročástice vodivého materiálu (grafitu, skelného uhlíku, diamantu dopovaného borem, nanotub aj.) rozptýlené v polymeru a zajišťující kontakt mezi roztokem a vodivou částí elektrody. Výměna takového filmu by měla probíhat rychle a jednoduše. Na tyto elektrody se lze dívat i jako na filmovou obdobu kompozitních elektrod [2, 5] (viz kap. 10), které se v závislosti na poměru polymer : vodivý prášek mohou chovat buď jako soubor mikroelektrod, nebo jako klasické elektrody se stejnorodým povrchem. Hlavním obsahem této kapitoly je uplatnění uvedených úvah při použití elektrod neobsahujících kapalnou rtuť: vyleštěné stříbrné pevné amalgamové elektrody (p-AgSAE), AuE a PtE [6].

3.2 Příprava inkoustových filmů na pevných pracovních elektrodách

Pro přípravu vodivých inkoustů byly použity tyto prášky:

1. grafitový prášek o velikosti částic 1-2 µm (Fluka, SRN);
2. grafitový prášek o průměrné velikosti částic 2 µm (obchodní značení „CR2“, Maziva, ČR);
3. mikrokuličky ze skelného uhlíku o velikosti částic 0,4-12 µm (Alfa Aesar, SRN);
4. polystyren (Sigma-Aldrich s.r.o., ČR).

Příprava vodivého inkoustu

Pro přípravu inkoustu s obsahem uhlíku 90 % se do mikrozkumavky přenese 0,01 g polystyrenu, 0,09 g uhlíkového prášku a přidá se 0,5 ml dichlorethanu. Směs se důkladně protřepe, aby se polystyren rozpustil a suspenze byla homogenní. Pro homogenizaci inkoustu je vhodná ultrazvuková lázeň nebo intenzivní třepání po dobu 3-5 min. Inkoust s jiným obsahem vodivého prášku se připravuje podobně při patřičné změně jeho poměru k polystyrenu.

Vytvoření inkoustového filmu na pevné elektrodě

Inkoust se nanáší na klasickou pevnou elektrodu (p-AgSAE, AuE, PtE aj.) buď mikrodávkovačem (objem 1-2 µl), nebo tak, že se dolní část elektrody jen dotkne povrchu suspenze inkoustu. Po 1-2minutovém odpařování dichlorethanu na vzduchu je elektroda připravena k měření. Při použití elektrochemické regenerace povrchu pracovní elektrody před každým měřením lze s takovým filmem pracovat i několik dnů.

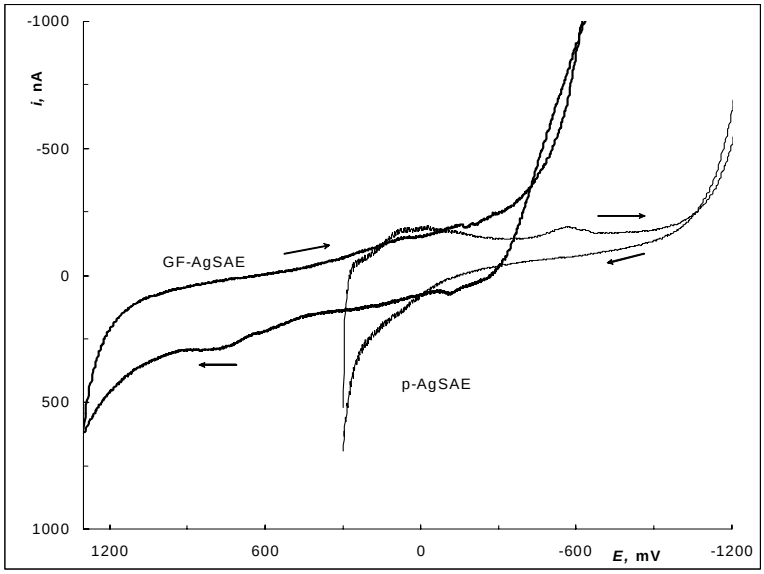
Obnovení inkoustového filmu na pevné elektrodě

Pro výměnu filmu stačí setřít jej filtračním papírem a znovu nanést inkoust na elektrodu.

3.3 Rozšíření rozsahu pracovních potenciálů pevných elektrod

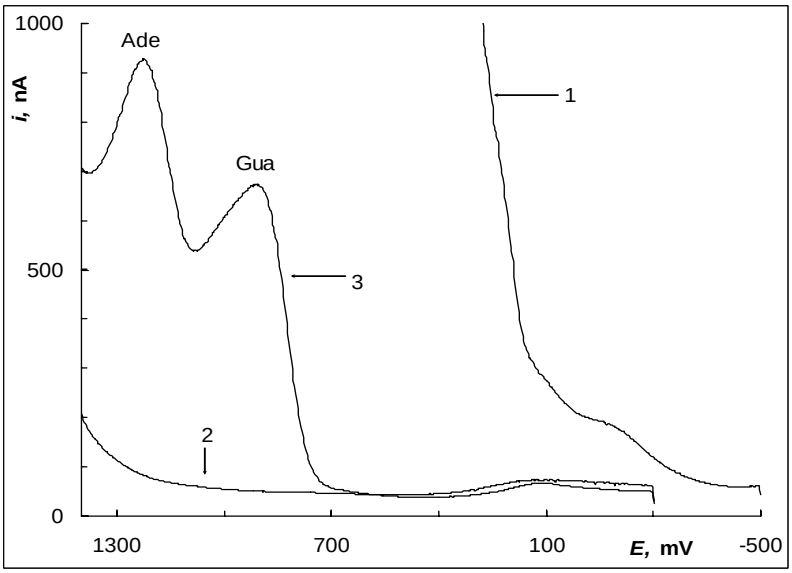
Důležitým úkolem je vytvořit na povrchu pracovní elektrody film, který by ji dokonale izoloval od roztoku. Předběžné pokusy ukázaly, že film polystyrenu na p-AgSAE je dobrým izolantem a pro rozpouštění polystyrenu je vhodné použít dichlorethan; 1-2 µl tohoto roztoku se odpařují z povrchu elektrody 1-2 min. Pří práci s p-AgSAE takto pokrytou filmem polystyrenu nebyly na cyklickém voltamogramu v acetátovém pufru (pH 4,8) v rozpětí potenciálů od –2 000 mV do +2 000 mV pozorovány žádné elektrochemické procesy (není znázorněno), což svědčí o tom, že polystyren dobře izoluje povrch pracovní elektrody. Křivka provedená tenčí čárou na obr. 3.1 odpovídá cyklickému voltamogramu uvedeného základního elektrolytu (ZE) získanému na p-AgSAE; druhá křivka byla zaznamenána na stejné p-AgSAE, ale pokryté filmem obsahujícím 90% grafitu (Fluka) a 10% polystyrenu (GF-AgSAE) - tato křivka demonstruje očekávané rozšíření rozsahu pracovních potenciálů směrem do kladných hodnot. Samozřejmě tato elektroda (fakticky grafitová) má menší přepětí vodíku než samotná p-AgSAE, ale není to podstatné, protože odstranění filmu a přechod na měření s p-AgSAE se uskutečňuje jednoduchým otřením filmové elektrody o filtrační papír.

Praktická využitelnost GF-AgSAE byla vyzkoušena pro stanovení guaninu (Gua) a adeninu (Ade), které se často využívají ke studiu DNA [7]. Na obr. 3.2 je uvedena možnost stanovení Gua a Ade na GF-AgSAE s 90% obsahem grafitu, která je založena na elektrochemické oxidací těchto látek v oblasti tak pozitivních potenciálů, kde se už nedají použít rtuťové ani amalgamové elektrody kvůli jejich elektrolytickému rozpouštění (křivka 1).



Obr. 3.1: ***Cyklické voltamogramy získané na p-AgSAE a GF-AgSAE***

Experimentální podmínky: film obsahuje 90 % grafitu (Fluka); ZE: 0,2M octanový pufr o pH 4,8; $E_{\text{in p-AgSAE}} = -1\ 200$ mV; $E_{\text{in GF-AgSAE}} = -600$ mV; rychlost scanu $v = 20$ mV s^{-1}

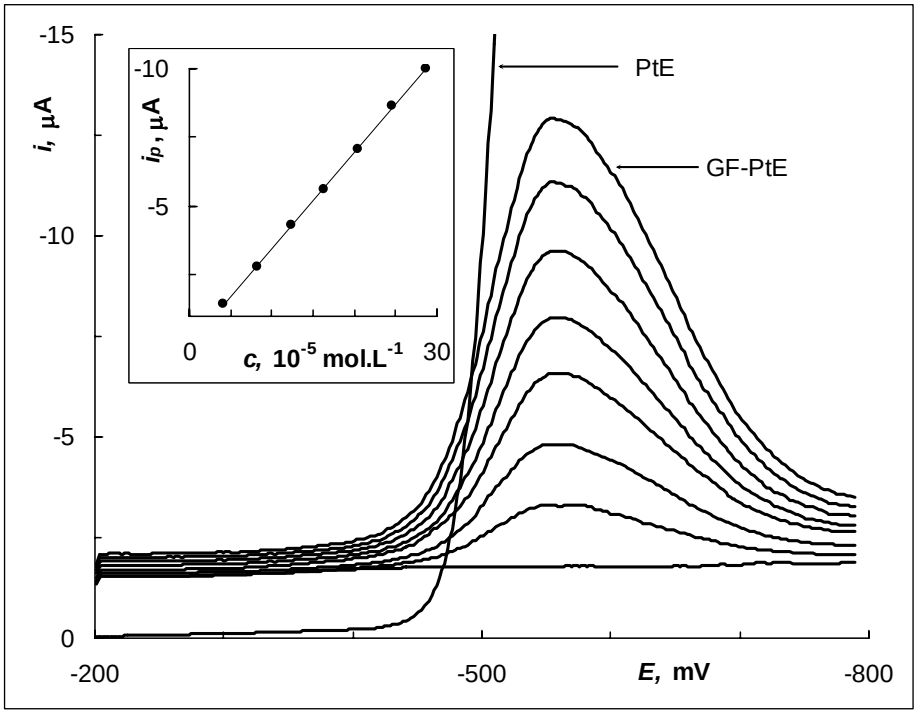


Obr. 3.2: ***DPV voltamogramy získané na p-AgSAE a GF-AgSAE***

Experimentální podmínky: film obsahuje 90 % grafitu (Maziva); ZE: 0,2M octanový pufr o pH 4,8; $E_{\text{in,p-AgSAE}} = -500$ mV; $E_{\text{in,GF-AgSAE}} = -200$ mV; rychlost scanu $v = 20$ mV s^{-1}
(1) ZE na p-AgSAE; (2) ZE na GF-AgSAE; (3) guanin a adenin o koncentraci $5 \cdot 10^{-5}$ mol l^{-1} na GF-AgSAE

Další ukázkou je využití inkoustového filmu s 90 % skelného uhlíku na zlaté diskové elektrodě (GCF-AuE) pro DPV stanovení ferrocenu, který se kvůli reverzibilnímu chování často používá pro testování nových typů elektrod (není znázorněno). Byla změřena koncentrační závislost ferrocenu v dostatečně širokém rozsahu koncentrací. Dobrá vyvinutost píků a linearita odezvy (R^2 = 0,997 8; i_p [nA] = 0,61c [nA µmol l^{-1}] – 6,00 [nA]) potvrzují vhodné parametry použité elektrody.

Rozšíření rozsahu pracovních potenciálů platinové elektrody směrem do negativních hodnot demonstruje obr. 3.3. Nízké přepětí vodíku na PtE zabraňuje stanovit na ní nitrobenzen, protože vylučování vodíku probíhá dříve, než se začne redukovat nitrobenzen (obr. 3.3, křivka PtE). Pokrytí PtE grafitovým inkoustovým filmem dovoluje bezproblémové měření redukčních signálů nitrobenzenu (obr. 3.3, série křivek GF-PtE). Uvedená koncentrační závislost byla změřena na stejném filmu.



Obr. 3.3: ***Kalibrační záznamy získané při stanovení nitrobenzenu na PtE a GF-PtE***

*Experi*mentální podmínky: DPV; film obsahuje 90% grafitu (Maziva); ZE: 0,2M octanový pufr o pH 4,8; E_{in} = –200 mV; v = 20 mVs^{-1}; koncentrace nitrobenzenu 0 až 2,9 · 10^{-4} mol l^{-1}. R^2 = 0,999 6; i_p = -0,35c + 0,03

Reprodukovatelnost všech měření byla zajištěna elektrochemickou regenerací povrchu WE před každým měřením, která spočívala v aplikaci 50 potenciálových skoků mezi –200 mV a +600 mV po dobu 0,3 s každý (celková doba asi 30 s), vše řízeno programem analyzátoru. Statistická zpracování paralelních měření (tab. 3.1) potvrzují, že při vhodné elektrochemické regeneraci povrchu inkoustových elektrod není nutné provádět častou výměnu filmu. Pokusy jsme prokázali, že se stejným filmem lze s dostatečnou přesností a reprodukovatelností měřit i po dobu několika dní, ale kvůli jednoduchosti, rychlosti a zanedbatelné ceně obnovení inkoustového filmu doporučujeme provádět jeho výměnu pro každou sérii měření.

Tab. 3.1: ***Statistické parametry opakovaných měření***

Experimentální podmínky současného měření guaninu a adeninu: DPV; ZE: 0,2M octanový pufr o pH 4,8; E_{in} = +200 mV; E_{fin} = +1 300 mV; v = 20 mV s^{-1}; koncentrace guaninu a adeninu $2 \cdot 10^{-5}$ mol l^{-1}; N = 11

Experimentální podmínky měření ferrocenu: DPV; ZE: 0,1M-$HClO_4$ + 48% ethanol; E_{in} = –200 mV; E_{fin} = +600 mV; v = 20 mV s^{-1}; koncentrace ferrocenu $1 \cdot 10^{-4}$ mol l^{-1}; N = 11

Experimentální podmínky měření nitrobenzenu: DPV; ZE: 0,2M octanový pufr o pH 4,8; E_{in} = –200 mV; E_{fin} = –800 mV; v = 20 mV s^{-1}; koncentrace nitrobenzenu $4{,}1 \cdot 10^{-5}$ mol l^{-1}; N = 11

Parametr	Guanin GF-AgSAE	Adenin GF-AgSAE	Ferrocen GCF-AuE	Nitrobenzen GF-PtE
průměrná výška píku (nA)	315,6	277,6	62,3	–4014
interval spolehlivosti (nA)	1,5	1,4	0,6	120
směrodatná odchylka (nA)	2,2	2,2	0,9	181
relativní směrodatná odchylka (%)	0,7	0,8	1,4	4,5

Bylo vyzkoušeno i rozdílné chování GF-AgSAE se 70%ním a 90%ním obsahem grafitu při měření oxidaci guaninu (není znázorněno). Voltamogramy získané na GF-AgSAE s 90%ním obsahem grafitu mají tvar píků (obr. 3.2), což je typické pro běžně používané WE ve voltametrii. GF-AgSAE se 70%ním obsahem grafitu poskytla voltamogramy ve formě klasických polarografických křivek (esovitých), čímž se potvrzuje, že se tato elektroda chová jako soubor mikroelektrod.

3.4 Závěr

Navržené řešení vytvoření vodivých filmů na konvenčních pevných elektrodách má následující přednosti:

- dovoluje rozšířit pracovní rozsah potenciálů pevných elektrod;
- nezabraňuje tradičnímu použití klasické pevné elektrody;
- uplatňuje se princip „elektrody na jedno použití“ bez nutnosti výměny cele elektrody;
- výměna filmu je rychlá (cca 2-3 min) a velmi jednoduchá (stačí tradiční elektrodu otřít o filtrační papír a znovu ji ponořit do inkoustu nebo mikrodávkovačem nanést na elektrodu 1-2 µl inkoustu);
- výměna filmů různého složení je rychlá;
- reprodukovatelnost měření je pro většinu úkolů dostačující;
- modifikace filmu přidáním potřebné látky do inkoustu je jednoduchá;
- jako vodivé částice lze použít prášky z různých druhů uhlíku a také z jiných materiálů;
- změnou obsahu vodivých částic v inkoustu lze připravit elektrodu, která se chová buď jako soubor mikroelekrod, nebo jako běžná pracovní elektroda;
- cena jednoho filmu je zanedbatelná.

3.5 Literatura

1. Heyrovský J., Kůta J., Principles of Polarography, Publishing House of the Czech Acad. Sci., Prague 1965.
2. Wang J., Analytical electrochemistry, VCH, New York 1994.
3. Seddom B. J., Osborne M. D., Lagger G., Dryfe R. A. W., Loyall U., Schäfer H., Girault H. H., Electrochim. Acta 1997, 42, 1883.
4. Brajnina Kh. Z., Malakhova N. A., Stojko N. Yu., Fresenius J. Anal. Chem. 2000, 368, 307.
5. Navrátil T., Kopanica M., Crit. Rew. Anal. Chem. 2002, 32, 153.
6. Yosypchuk B., Barek J., Fojta M., Electroanalysis 2006, 18, 1126.
7. Paleček E., Fojta M., Jelen F., Bioelectrochemistry 2002, 56, 85.

4. CHEMICKÉ SENSORY A BIOSENSORY

prof. RNDr. František Opekar, CSc.
Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, katedra analytické chemie, Albertov 2030, 128 40 Praha 2
opekar@natur.cuni.cz

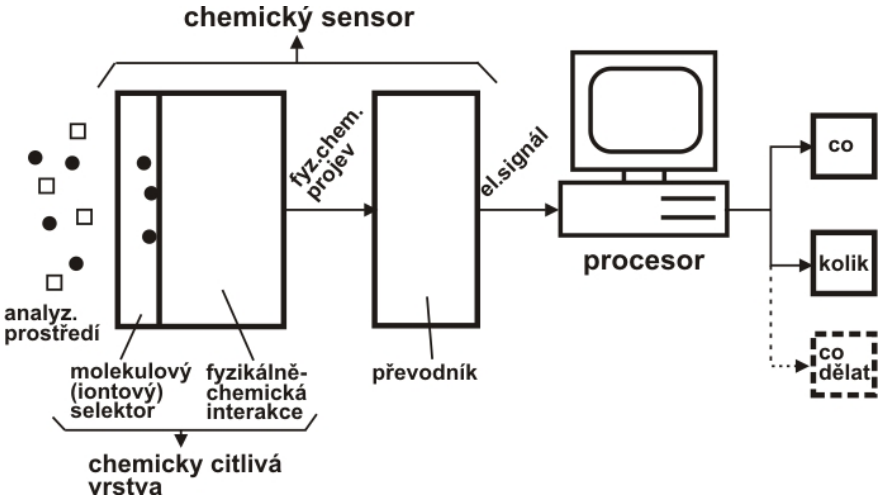
4.1 Definice chemického sensoru

Problematika sensorů všeho druhu – tedy i chemických, je velice živá a aktuální. Svědčí o tom množství vědeckých setkání a konferencí, periodik, monografií a kompendií, např. [1, 2], nehledě na množství internetových adres věnovaných sensorům. Význam sensorů pro praxi je nepochybný, vždyť pro každou činnost je zapotřebí dostatek spolehlivých informací o stavu a vlastnostech prostředí, v němž je tato činnost konána. Potřebné informace jsou získávány prostřednictvím nejrůznějších druhů sensorů, biologických (např. vlastních, jako jsou oči a v případě chemických sensorů i nos či jazyk, nebo sensorů jiných biologických objektů, psů, hmyzu a jiných), ale hlavně sensorů umělých, fyzikálních. **Sensory převádějí stav nebo projev studovaného systému na signály--informace, kterým buď již rozumíme přímo, nebo je lze na srozumitelné snadno převést.** Proto jsou základní komponentou všech měřicích přístrojů, v nichž jsou styčným zařízením mezi sledovaným systémem a měřicím přístrojem, který je k získávání určité informace používán. V řadě případů je signál z chemických sensorů již dostatečně informačně bohatý a tyto **sensory v kombinaci s jednoduchou elektronikou mohou nahradit drahé přístroje a časově náročné analytické postupy**. Jde především o případy rychlého a orientačního monitorování chemického složení sledovaného prostředí, kdy často postačí dvojúrovňová informace – ano/ne, hodně/málo atp. Růst zájmu o fyzikální sensory je vyvolán i tím, že finálním uživatelem informací přestává být člověk, ale stávají se jimi nejrůznější samostatně pracující systémy, automaty, roboty. Tyto systémy potřebují ke své činnosti (podobně jako člověk) dostatek správných informací o pracovním prostředí. Proto musí být na toto prostředí napojeny řadou sensorů, a pokud potřebují informace o chemickém stavu či vlastnostech prostředí, musí být vybaveny potřebnými sensory chemickými. S výhodou jsou zde používány tzv. **integrované sensory**, tj. sensory kombinované s potřebnou elektronikou (zpravidla na jednom čipu integrovaného nebo hybridního obvodu) nebo **inteligentní sensory**, které již na základě vloženého programu a zjištěných informací samostatně spouštějí určitou činnost.

Vysoce efektivní (specifické a citlivé) jsou sensory mnoha organismů, je proto snahou kombinovat biologický sensorický systémem s elektronickou vyhodnocovací částí. Nejčastější je využití některých biologických či lépe biochemických rozpoznávacích mechanismů na úrovni molekul či makromolekul (enzymy, protilátky, nukleové kyseliny), ale konají se již pokusy o spojení elektroniky

s buňkami, tkáněmi či celými orgány. Problematika sensorů obsahující biologickou komponentu, tzv. **biosensorů**, je dnes nejživěji se rozvíjející oblastí chemických sensorů [3].

V literatuře se lze setkat s mnoha různými definicemi chemického sensoru. Jednou z nich je tato [4]: **Chemický sensor je převodník, který poskytuje přímo informaci o chemickém složení svého okolí. Je tvořen fyzikálním převodníkem a chemicky citlivou vrstvou.** Graficky je tato definice znázorněna na obr. 4.1. Fyzikálně-chemický projev interakce molekul či iontů s chemicky citlivou vrstvou je převodníkem převáděn téměř výhradně na elektrický signál. Důvod je zřejmý, elektrické signály lze snadno zpracovávat a informaci, kterou nesou, tak lze snadno zobrazit v požadované formě či využít např. k automatickému spouštění potřebných činností. V chemicky citlivé vrstvě některých sensorů lze najít molekulový či iontový selektor, který zajišťuje potřebnou selektivitu sensoru. Typickými molekulovými a iontovými selektory jsou permeabilní membrány, molekulová síta, ionofory, iontoměniče, specifické katalyzátory, chemické filtry (absorpční činidla), vtištěné polymery a vysoce specifické biochemicky aktivní molekuly.



Obr. 4.1: ***Obecné schéma chemického sensoru převádějící chemický stav či vlastnosti analyzovaného prostředí na elektrický signál, který lze snadno dále zpracovat do informace v požadované formě***

Typ převodníku závisí na charakteru fyzikálně-chemického projevu interakce analytu s chemicky citlivou vrstvou. Je-li projevem této interakce změna teploty, jsou převodníky termistory nebo Pt teploměr, změna optických vlastností je převáděna na elektrický signál např. fotonásobičem nebo polovodičovým detektorem, změna hmotnosti piezoelektrickým krystalem, změna permitivity kondenzátorem atp. Je-li výsledkem interakce analytu s chemicky citlivou vrstvou změna koncentrace, je vhodným **převodníkem elektroda, či lépe elektrochemická cela; mluvíme pak o elektrochemických sensorech.**

4.2 Elektrochemické sensory

Elektrochemické sensory zaujímají v problematice sensorů významné místo. Patří mezi ně desítky variant rtuťových elekrod, stovky variant elektrod z tuhých materiálů používaných ve voltametrických, potenciometrických, coulometrických i vodivostních detekčních metodách. Tyto elektrody tvoří aktivní část elektrochemického článku a jsou v kontaktu s analyzovaným prostředím. Z vlastností tohoto článku či změn jeho vlastností je usuzováno na změnu složení analyzovaného prostředí. Hlavní přednosti těchto sensorů jsou:

- Poskytují z principu přímo elektrický signál jako výsledek interakce elektroda-analyt, tj. chemicky citlivá vrstva a převodník jsou spolu integrovány.
- Jsou snadno miniaturizovatelné, tj. lze na malém prostoru vytvářet rozsáhlé soubory sensorů a lze je integrovat s potřebnou elektronikou.
- Značná tvarová rozmanitost umožňuje přizpůsobit je optimálně detekčnímu prostoru.
- Umožňují speciaci analytu.
- Lze je snadno modifikovat chemickými či biochemickými látkami a výrazně tak ovlivňovat jejich vlastnosti.
- Jsou relativně snadno zhotovitelné a tím i levné, což je předpoklad pro jejich možné jednorázové použití.

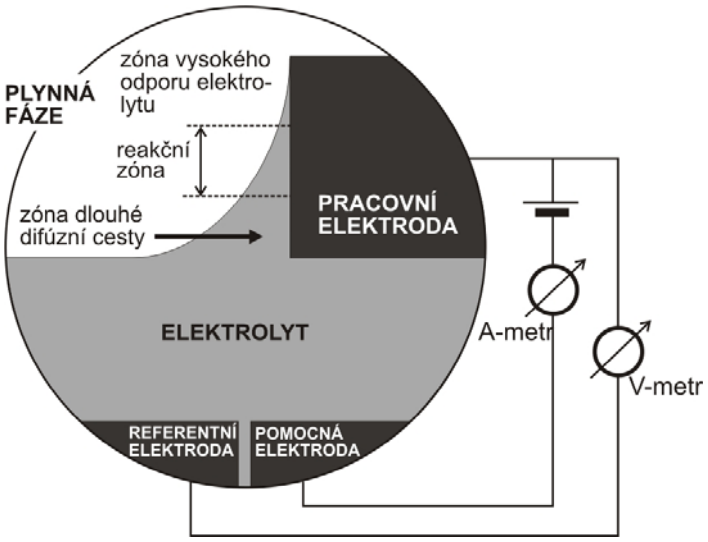
Z nevýhod lze jmenovat především změnu jejich vlastností způsobenou pasivací elektrod. Ve valné většině typů elektrochemických sensorů jsou elektrody v přímém kontaktu s analyzovaným prostředím a látky doprovázející analyt (tzv. matrice) či produkty elektrodových reakcí se mohou adsorbovat na elektrodovém povrchu a měnit jeho elektrochemickou aktivitu, což se projevuje časovou změnou signálu i v prostředí o konstantním složení (tzv. historie elektrod).

V souvislosti s elektrochemickými sensory vyvstává určitý terminologický problém – co je sensorem, indikační elektroda nebo elektrochemický článek? Pouze vlastnosti indikační elektrody se (zpravidla) mění se změnou chemického složení analyzovaného prostředí, ale sama elektroda neumožňuje potřebnou informaci sejmout. Proto se lze setkat s terminologií: elektroda = sensor, elektrochemický článek = detektor. Nicméně tato terminologie není důsledně dodržována. V tomto textu **bude za sensor považován elektrochemický článek**, tj. jednotka, která (v souladu s dříve uvedenou definicí) poskytuje vyhodnotitelný elektrický signál.

4.2.1 Ampérometrické sensory

Problematika elektrochemických sensorů je velice rozsáhlá, takže dále bude pojednáno pouze o ampérometrických sensorech plynných látek. Princip ampérometrických sensorů je všeobecně znám. Hlavními komponentami sensoru plynných látek jsou elektroda, elektrolyt a příslušné analy-

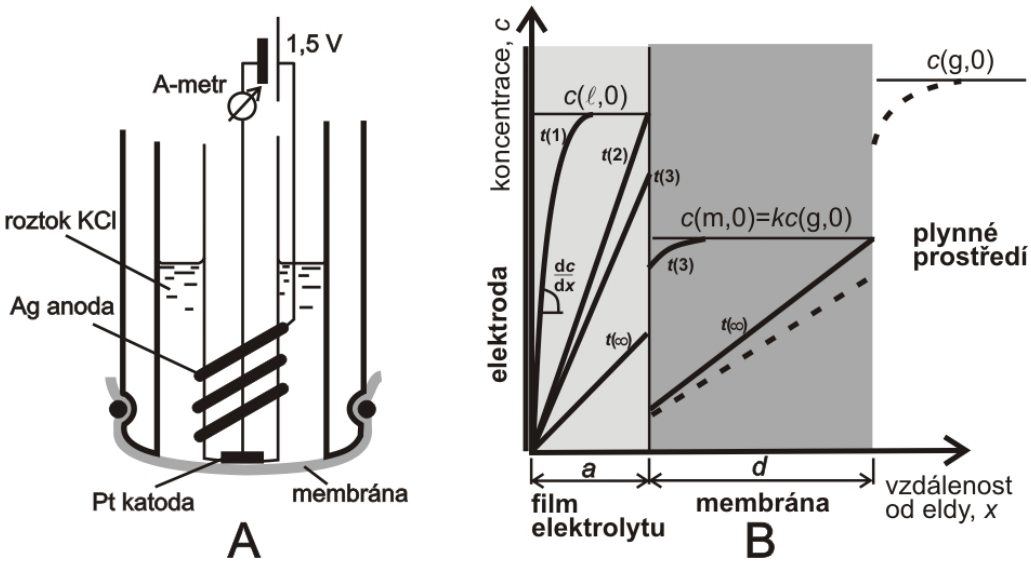
zované plynné prostředí. K tomu, aby sensor měl potřebné analytické parametry, musí být optimalizován elektrodový materiál i elektrolyt. Ne zcela evidentní je ta skutečnost, že vlastnosti sensoru výrazně (v řadě případů dominantně) ovlivňuje charakter kontaktu uvedených tří základních komponent sensoru, tzv. **třífázové rozhraní**, schématicky znázorněné na obr. 4.2. Proto dále bude pojednáno mnohem více o designu sensorů, o používaných konstrukčních materiálech a z toho vyplývajících způsobech realizace zmíněného třífázového rozhraní, než o aplikacích sensorů pro řešení konkrétních analytických úloh. Za typické představitele ampérometrických sensorů plynných látek byly vybrány membránové sensory s kapalným elektrolytem a solid-state sensory s tuhým polymerním elektrolytem.



Obr. 4.2: ***Schématické znázornění třífázového rozhraní v ampérometrickém sensoru plynných látek. Elektrochemické reakce přispívající významně k analytickému signálu (proudu) probíhají pouze v určité oblasti tohoto rozhraní. Mimo ni je jejich příspěvek zanedbatelný: v důsledku úbytku napětí na odporu elektrolytu má část pracovní elektrody nevhodný potenciál a v důsledku malého látkového toku probíhá elektrodová reakce na části elektrody pouze omezeně***

4.2.2 Ampérometrické membránové sensory s kapalným elektrolytem

Ampérometrické sensory tohoto typu jsou dnes již klasické. Elektrodový systém a elektrolyt jsou v nich odděleny od analyzovaného prostředí permeabilní membránou, která umožní, aby se k elektrodě dostaly pouze plynné komponenty. Tento typ sensorů byl navržen lékařem L. C. Clarkem [5] pro stanovení kyslíku v krvi. Dnes jsou **sensory „Clarkova typu“** běžně používány pro stanovování nejen kyslíku (obr. 4.3) v plynných i kapalných prostředích (např. při stanovování biologické spotřeby kyslíku), ale jejich princip je využíván v konstrukcích sensorů pro detekci a stanovení desítek jiných plynů.



Obr. 4.3: ***Schéma ampérometrického membránového sensoru***
A – příklad uspořádání jednotlivých komponent (pro sensor kyslíku); mezi membránou a povrchem indikační elektrody je film elektrolytu o tloušťce jednotek μm, tloušťky membrán (často z polyethylenu či polytetrafluoroethylenu) mívají tloušťku desítek μm

B – časové rozložení koncentrací po připojení elektrody k napětí, při němž elektrodou prochází limitní proud

Na příkladě Clarkova sensoru lze demonstrovat různé možné přístupy k získávání analytického signálu z vícefázové ampérometrické cely, viz schéma B na obr. 4.3:

- V čase $t = 0$ neprobíhá na elektrodě elektrochemická reakce analytu, v systému se vytvoří rovnovážné rozložení koncentrací, v plynné fázi c(g,0), v membráně c(m,0) (k je partiční koeficient analytu mezi plynnou fázi a materiál membrány), ve filmu elektrolytu c(l,0). Po vložení takového napětí na elektrodu, při kterém prochází elektrodou limitní proud, klesne koncentrace na povrchu elektrody k nule a v systému se vytváří koncentrační gradienty;

- V čase $t(1) \ll a^2/D(\mathrm{l})$, kde D(l) je difúzní koeficient analytu v elektrolytu, se gradient tvoří pouze ve filmu eletrolytu, procházející proud ($I = nFAj$) je vysoký a klesá s časem, jak se gradient rozšiřuje do hloubi filmu elektrolytu, látkový tok analytu k elektrodě je řízen difúzí ve filmu elektrolytu ($j = D(\mathrm{l})\, \mathrm{d}c(\mathrm{l})/\mathrm{d}a$).

- V čase $a^2/D(\mathrm{l}) < t(3) < d^2/D(\mathrm{m})$, kde D(m) je difúzní koeficient analytu v materiálu membrány, se gradient rozšíří do membrány a na transportu analytu se podílí jak difúze ve filmu elektrolytu, tak i difúze membránou ($j = f[D(\mathrm{l}), D(\mathrm{m})]$), proud je nižší a s časem klesá.

- V čase $t(\infty) \gg d^2/D(\mathrm{m})$ se v systému vytvoří stacionární stav ($j = D(\mathrm{m})\, [kc(\mathrm{g},0)/d)]$), pokud je konvekcí v analyzovaném plynném prostředí zajištěna konstantní koncentrace analytu u membrány, takže proud nezávisí na čase a je přímoúměrný koncentraci analytu v plynné fázi.

V případě, že dostatečnou konvekci nelze zajistit, rozšíří se koncentrační gradient do analyzovaného prostředí (viz čárkované závislosti v obr. 4.3B), tj, sensor mění jeho složení a výsledek analýzy je zatížen chybou. Problém ovlivnění analyzovaného prostředí spotřebou analytu sensorem je zásadní při měření např. výměny kyslíku v biologických tkáních, zárodcích a embryích. V těchto případech je nutno využívat nestacionárních měření, tj. polarizovat elektrodu napěťovými pulsy tak, aby se gradient analytu projevoval pouze ve filmu elektrolytu nebo pouze v membráně. V prvém případě je kritickým faktorem udržení konstantní tloušťky filmu (používají se různé vložky), udržení konstantní tloušťky membrány bývá schůdnější, pečlivěji však musí být volena délka polarizačních pulsů a jejich frekvence.

Clarkův sensor je významnou komponentou v mnoha biosensorech. Biochemicky aktivní látka, nejčastěji enzymy oxidasy, je imobilizována na vnější straně membrány a je v kontaktu s analyzovaným prostředím. Je-li v něm přítomen analyt – substrát, jehož oxidace kyslíkem je katalyzována příslušným enzymem, dojde k reakci spojené se spotřebou kyslíku. Úbytek kyslíku snímaný membránovým sensorem je korelován s obsahem analytu. Nejčastěji se tento typu biosensoru používá pro stanovení glukosy. K těmto účelům jsou požívány i jednorázové sensory vyráběné metodami sítotisku.

Vážným problémem spojeným s používáním tohoto typu sensorů je vysychání filmu elektrolytu, především při detekci látek v plynné fázi. Rychlost vysychání závisí jednak na rozdílné tenzi vodní páry uvnitř sensoru a v analyzovaném prostředí a jednak na typu použité membrány. Při konstrukci sensoru lze volit v principu mezi dvěma typy membrán – porézní a neporézní. Porézní membránou difunduje plynná molekula plynem (např. vzduchem), který vyplňuje její póry, neporézní membránou permeuje, přičemž permeační koeficient $P(\mathrm{m}) = D(\mathrm{m})k$. Volba membrány tedy závisí na způsobu použití příslušného sensoru a při její volbě je třeba vzít v úvahu řadu parametrů, z nichž ty nejdůležitější jsou v tabulce 4.1.

Omezení problému s vysycháním elektrolytu je řešeno i jinými způsoby. Eliminaci filmu elektrolytu umožňují sensory, v nichž je indikační elektroda vytvořena přímo na té straně membrány, která je smáčena elektrolytem, a strana nepokovená je exponována analyzovanému prostředí; jde o **sensory s pokovenou membránou**. Vysychání elektrolytu je omezováno též zvýšením viskozity kapalného elektrolytu, např. přídavkem ve vodě rozpustných polymerů, imobilizací elektrolytu v tuhé fázi – hydrogelu, známé jsou polymery na bázi esterů methakrylové kyseliny, PMMA (polymethylmethakrylát), polyHEMA (poly-hydroxyethylmethakrylát), dále polyvinylchlorid, agarosa a další. Důležitým konstrukčním prvkem z tohoto hlediska jsou hydrogely připravované technologiemi sol-gel.

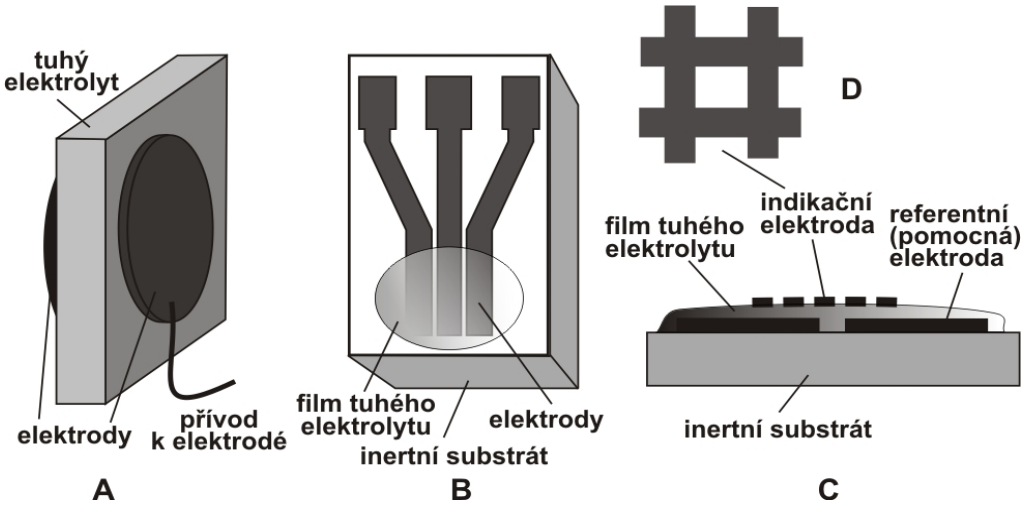
Tabulka 4.1: Porovnání některých vlastností porézní a neporézní membrány

Porézní membrána	**Neporézní membrána**
vysoká odezva ≈ D(g), D(g) ≅ 10^{-1} cm^2 s^{-1} příklad: D(CO_2 ve vzduchu) = 0,13 cm^2 s^{-1}	obecně nižší odezvy ≈ P(m)=D(m)k D(m) ≅ 10^{-6}-10^{-8} cm^2 s^{-1} příklad: D(CO_2 v PE) = 8.10^{-7} cm^2 s^{-1} k(CO_2 PE/vzduch) = 0,48
velká rychlost odezvy	rychlost odezvy závisí na čas. konstantě, τ, difúzního procesu: $t_{99} \approx 5\tau$, $\tau \approx d2/D$(m)
nezavádí selektivitu	může zavést selektivitu pro plyny lišící se partičním koeficientem k
póry mohou být zaplněny kapalnou či tuhou fází	stabilní difúzní geometrie
snadný průchod vodní páry vede k rychlému vysychání filmu elektrolytu	vodní pára permeuje výrazně pomaleji

4.2.3 Solid-state sensory

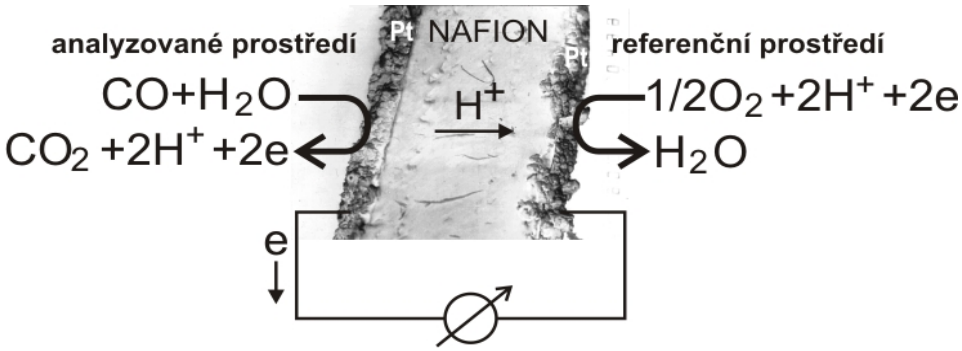
Prakticky úplná eliminace problémů spojená s vysycháním kapalného elektrolytu je jeho **náhrada tuhým elektrolytem**. Tyto materiály jsou využívány v solid-state sensorech, tj. sensorech, v jejichž struktuře není makroskopická kapalná fáze. Existuje řada anorganických i organických tuhých látek s iontovou vodivostí, které lze k tomu využít. Běžným anorganickým tuhým elektrolytem, hojně v praxi používaným, je vhodně dopovaný oxid zirkoničitý. Sensory s tímto elektrolytem jsou používány pro řízení nejrůznějších spalovacích procesů, mj. i v automobilových motorech (lambda sensory); tyto sensory pracují při teplotách až několika set stupňů, kdy má elektrolyt dostatečnou vodivost. Za laboratorní teploty pracují sensory např. s **tuhými polymerní elektrolyty** [6]. Jde o tzv. polymerní soli, kde je iontová komponenta vázána na strukturu polymeru, nikoli jen o polymerní matrice zadržující kapalný elektrolyt, jako jsou výše zmíněné hydrogely. Nejčastěji používaným tuhým elektrolytem je iontoměnič známý pod komerčním jménem Nafion. Pro konstrukce sensorů je k dispozici ve formě membrán nebo v roztoku nižších alkoholů. Zpravidla se používá ve vodíkovém cyklu, tedy jako tzv. protonový vodič.

Základní konstrukční varianty solid-state sensorů jsou na obr. 4.4. Význam třífázového rozhraní u tohoto typu sensorů dramaticky narůstá v důsledku obecně nižší vodivosti tuhých elektrolytů a více brzděného transportu látek tuhým prostředím. Bylo ukázáno, že vhodnými strukturami materiálů pro indikační elektrody ampérometrických solid-state sensorů plynů jsou jemné síťky umístěné ve struktuře sensoru tak, jak je ukázáno na obr. 4.4C. Tyto síťky lze vytvářet vakuovými napařovacími či naprašovacími technikami přímo na povrch tuhého elektrolytu nebo lze použít komerční mikrosíťky známé např. ze spektroelektrochemie. Vakuové techniky umožňují vytvářet velice jemné struktury elektrod, které však nejsou na polymerních elektrolytech příliš stabilní. Při změně vlhkosti analyzovaného prostředí se poněkud mění geometrické rozměry polymeru (iontové komponenty přibírají nebo ztrácejí vodu), takže napařené elektrody se trhají. Výhodnější jsou proto zmíněné mikrosíťky vyráběné elektrochemickým leptáním zlaté fólie, které jsou mechanicky stabilní. Délka třífázového rozhraní je v tomto případě dána prakticky celým obvodem síťky.



Obr. 4.4: ***Základní konstrukční varianty solid-state sensorů. V „hmotnostním“ typu (A) jsou elektrody vytvořeny přímo na tuhém polymerním elektrolytu, v tzv. planárních sensorech jsou elektrody vytvořeny na inertním substrátu (keramika, sklo, polymer) a poté překryty filmem tuhého elektrolytu (B). Z hlediska citlivosti a rychlosti odezvy je výhodná struktura (C), kde je indikační elektroda v přímém kontaktu s analyzovanou plynnou fází. Vhodnou strukturou indikační elektrody je jemná síťka (D)***

V případě Nafionové membrány lze vhodné struktury elektrod vytvářet též chemickým vylučováním kovů. Zpravidla se takto vytvářejí elektrody platinové, méně často zlaté či z jiných kovů. Platina vyloučená na Nafionu chemickou redukcí je porézní, s vysokou hodnotou tzv. faktoru hrubosti (roughness factor, RF), tj. poměrem skutečné plochy ke geometrické ploše elektrody, takže je vysoce elektrochemicky aktivní. Sensory s takto pokovenou Nafionovou membránou jsou zpravidla používány tak, že pokovená strana je v kontaktu a analyzovaným plynným prostředím a strana druhá je smáčena roztokem elektrolytu, v němž jsou ponořeny další elektrody elektrochemického článku. Chemicky vyloučená platina na Nafionové membráně v kontaktu se vzduchem bývá využívána v solid-state sensorech i jako pseudoreferentní elektroda; její potenciál je asi 1 V proti SHE. Nafionové membrány lze však pokovit z obou stran a použít ke konstrukcím solid-state **sensorů pracujících na principu palivového článku (fuel cell sensors**). Schéma takového sensoru je na obr. 4.5. Jedna elektroda je exponována analyzovanému prostředí, druhá je v kontaktu s vhodně zvoleným plynným prostředím referenčním. To musí být vybráno tak, aby produkty elektrochemických reakcí vznikající na jedné elektrodě byly spotřebovávány v reakcích na elektrodě druhé. Tuhý elektrolyt musí zajistit transport iontových produktů mezi elektrodami (v případě Nafionu, který je protonový vodič, mohou být transportovány vodíkové ionty), elektrony procházejí vnějším vodičem a odpovídající elektrický proud je analytickým signálem. Příklady analytů a odpovídajících referenčních prostředí jsou uvedeny v tabulce 4.2. Sensory tohoto typu lze použít i jako potenciometrické.



Obr. 4.5: ***Struktura sensoru s oboustranně pokovenou Nafionovou membránou pracující na principu palivového článku. V uvedeném případě je sensor použit pro detekci a stanovení oxidu uhelnatého***

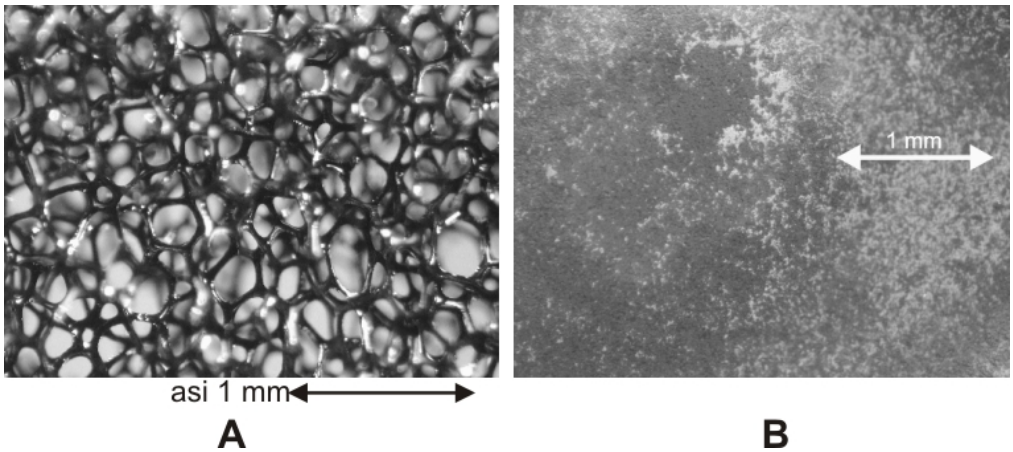
Tabulka 4.2. Příklady analytů (tištěny tučně) a vhodných reakcí na referenční straně sensoru pro detekci a stanovení látek sensory typu palivových článků

Reakce na indikační straně membrány	**Reakce na referentní straně membrány**
$CO + H_2O \leftrightarrows CO_2 + 2\,H^+ + 2\,e^-$	$1/2\,O_2 + 2\,H^+ + 2\,e^- \leftrightarrows H_2O$
$H_2 \leftrightarrows 2\,H^+ + 2\,e^-$	$1/2\,O_2 + 2\,H^+ + 2\,e^- \leftrightarrows H_2O$
$O_2 + 4\,H^+ + 4\,e^- \leftrightarrows 2\,H_2O$	$2H_2 \leftrightarrows 4\,H^+ + 4\,e^-$
$NO_2 + 2\,H^+ + 2\,e^- \leftrightarrows NO + H_2O$	$H_2O \leftrightarrows 2\,H^+ + 2\,e^- + 1/2\,O_2$
$C_2H_5OH \leftrightarrows CH_3CHO + 2\,H^+ + 2\,e^-$	$1/2\,O_2 + 2\,H^+ + 2\,e^- \leftrightarrows H_2O$

Kromě již zmíněných materiálů pro indikační elektrody solid-state sensorů jsou výhodné i další, např. retikulovaný skelný grafit [7] (Reticulated Glassy Carbon, RVC). Jde o tuhý porézní materiál, 40 pórů na cm, s velkým povrchem, 66 $cm^2\ cm^{-3}$, a velkým prázdným objemem, až 97 %, viz obr. 4.6A. Testován byl i materiál připravený dispergováním mikročástic zlata ve změkčeném polyvinylchloridu [8], obr. 4.6B. Vždy jde o materiál, který umožňuje, aby indikační elektroda vytvořila na kontaktu s tuhým elektrolytem a analyzovanou plynnou fází co nejdelší třífázové rozhraní.

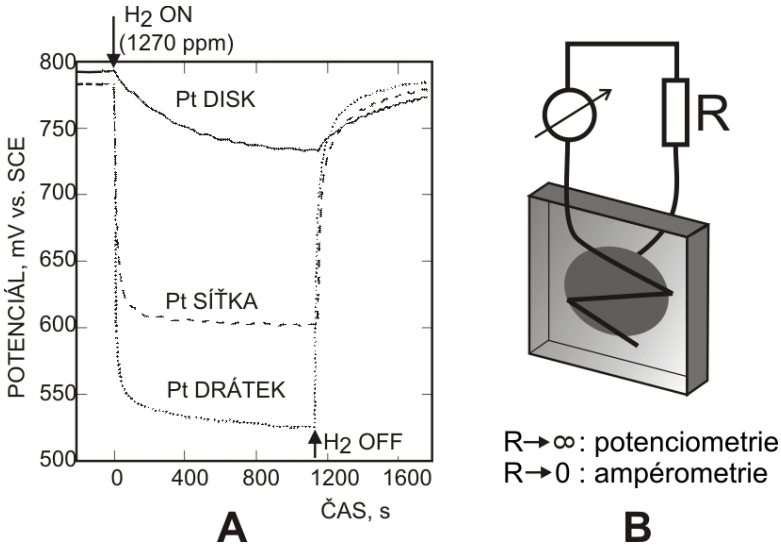
Zásadním praktickým nedostatkem sensorů typu palivového článku je nutnost používat referenční prostředí. V některých speciálních případech však referenční prostředí není nutné. Typickým příkladem je stanovení vodíku ve vzduchu (obecně v prostředí obsahujícím kyslík). V tomto prostředí nabývá platinová elektroda smíšeného potenciálu, který je určován kineticky řízenou redukcí kyslíku ($O_2 \rightarrow H_2O$) a difúzí řízenou oxidací vodíku ($H_2 \rightarrow H^+$). Kineticky řízený proces závisí na skutečné (mikroskopické) ploše elektrody, zatímco difúzí řízený proces závisí na ploše geometrické. Z toho plyne, že na hodnotě smíšeného potenciálu elektrod s vysokou hodnotou RF se bude více podílet rychlost kineticky řízeného procesu, zde redukce kyslíku, kdežto na hodnotě smíšeného potenciálu elektrod s nízkou hodnotou RF se bude relativně více podílet rychlost difúzí řízeného

procesu, zde oxidace vodíku. **Elektrody lišící se hodnotou RF budou tudíž nabývat ve stejném prostředí různého potenciálu**. Nutné je, aby smíšený potenciál byl určován dvěma reakcemi s odlišnou kinetikou, jako ve zmíněném příkladě. Uvedené skutečnosti byly experimentálně potvrzeny [8], výsledky jsou na obr. 4.7A .



Obr. 4.6: ***Příklady vhodných materiálů pro indikační elektrody solid-state sensorů plynných látek, reticulated glassy carbon (A) a dispergované částice zlata ve změkčeném PVC (B)***

S využitím těchto výsledků byl zkonstruován sensor, jehož struktura je na obr. 4.7B. Jednou elektrodou je platinový drátek, potenciál této elektrody je výrazně určován koncentrací vodíku, druhou elektrodou je disk z chemicky vyloučené platiny, jejíž potenciál se mění málo se změnou koncentrace vodíku. Rozdíl potenciálů elektrod lze využít pro potenciometrické i ampérometrické stanovení vodíku ve vzduchu [9].

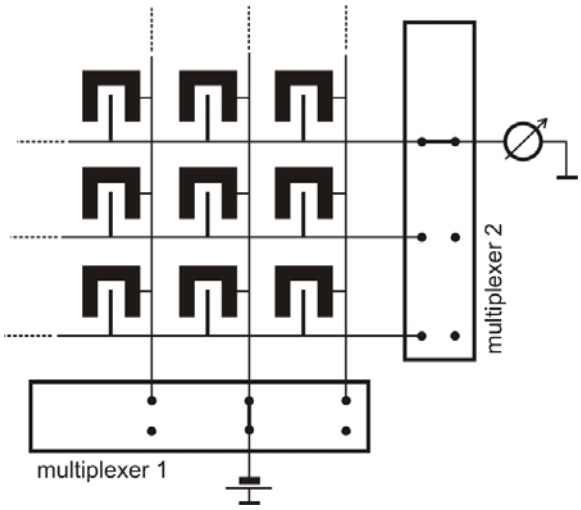


Obr. 4.7: ***Změna potenciálu platinových elektrod o různé hodnotě faktoru hrubosti (RF) při expozici prostředí obsahujícím vodík ve vzduchu (A); hodnoty RF pro disk, síťku a drátek byly 717, 194 a 41(podle [7]). Uspořádání elektrod o různé hodnotě RF v sensoru pro stanovení vodíku ve vzduchu, který nepotřebuje referenční prostředí (B)*** *(podle [8])*

4.2.4 Mikroelektrody jako sensory plynů

Mikroelektrody a jejich soubory jsou specifickým elektroanalytickým (elektrochemickým) nástrojem, charakteristickým nejen svými rozměry, ale především látkovým transportem. Individuální mikroelektrody umožňují detekci látek v malých prostorech, v živých organismech nebo ve specifických prostředích vyznačujících se např. vysokým ohmickým odporem. Pro detekci látek v plynné fázi mají význam především **soubory mikroelektrod,** které jsou používány v tzv. **elektronických nosech** (při detekci v roztocích je používán termín elektronický jazyk) a umožňují sledovat plošné či prostorové rozložení plynů (i jiných látek) např. v blízkosti biologických tkání za různých fyziologických podmínek atp. Na obr. 4.8 je část struktury souboru 1 024 individuálně adresovatelných mikroelektrod obklopených referentní elektrodou. Každý tento element je překryt filmem elektrolytu imobilizovaného v hydrogelu a tvoří tak elektrochemický mikročlánek. Soubor těchto mikročlánků byl testován pro sledování změn koncentrace kyslíku v určitém prostoru (každý mikročlánek je tak sensorem Clarkova typu).

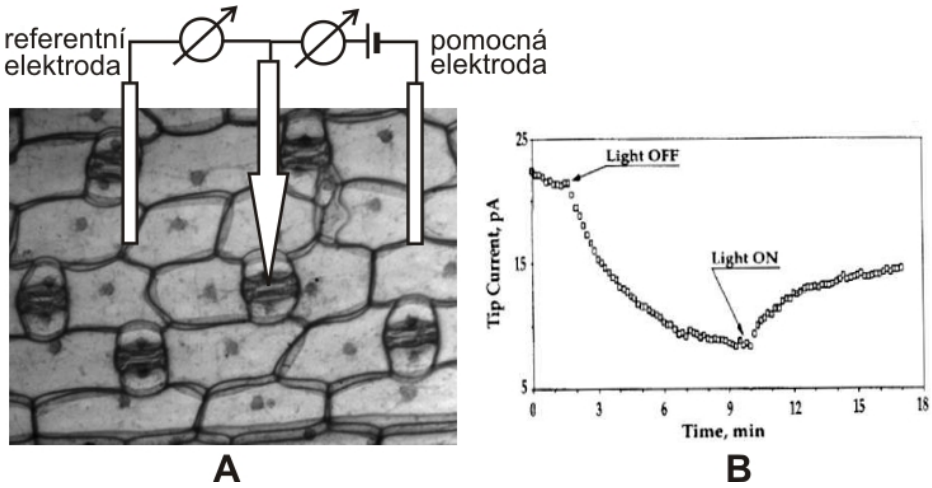
Ne vždy je nutno sledovat plošné či prostorové rozložení plynných látek za použití souboru mikroelektrod, ale postačí k tomu mikroelektroda jediná, je-li indikační elektrodou např. zařízení zvané **skenovací elektrochemický mikroskop** (Scanning Electrochemical Microscope, SECM). Tento mikroskop patří do skupiny přístrojů umožňujících sledovat vlastnosti povrchů látek na atomární či molekulové úrovni, jako jsou AFM (Atomic Force Microscope) či STM (Scanning Tuneling Microscope).



Obr. 4.8: ***Příklad struktury souboru individuálně adresovatelných mikroelektrod, resp. elektrochemických mikrocel. Každá cela je tvořena mikroelektrodu obklopenou referentní elektroda o větších rozměrech. Podle [11]***

V SECM je sensorem mikroelektroda o rozměrech jednotek μm, umístěná v roztoku elektrolytu v mikronové vzdálenosti od studovaného povrchu. SECM může pracovat v několika módech, jeden z nich, tzv. generation/collection mód lze využít v případě, že elektrochemicky aktivní látku,

která je detegována mikroelektrodou, produkuje sledovaný vzorek. Takovými vzorky jsou např. zelené části rostlin, produkující kyslík. Na obr. 9 je ukázáno, jak lze sledovat produkci kyslíku listem voděnky. Mikroelektroda je lokalizována nad průduchem na spodní straně listu a její potenciál je nastaven tak, aby na elektrodě docházelo k redukci kyslíku. Zaznamenáván je elektrolytický proud v závislosti na osvětlení listu [12].



Obr. 4.9: ***Použití SCEM pro studium produkce kyslíku zlenými rostlinami. Na schématu A je epidermis spodní strany listu voděnky (Tradescantia fluminensis) s průduchy. Šipka představuje umístění indikační mikroelektrody. Na obr. B je změřená závislost produkce kyslíku na osvětlení listu [12]***

4. 3 Literatura

[1] *Sensors. A Comprehensive Survey* (W. Göpel, J. Hese, J.N. Zemel, Eds.), Vol. 1-9, VCH Publishers Inc., New York 1991.

[2] *Encyclopedia of Sensors* (C.A. Grimes, E.C. Dickey, M.V. Pishko, Eds.), Vol. 1-10, ASP 2006

[3] *Chemical sensors and biosensors*, B.R. Eggins, John Wiley and Sons, Ltd, Chichester 2002.

[4] J. Janata, A. Bezegh, Anal. Chem. **60** (1988) 62R.

[5] L.C. Clark, R. Wolf, D. Granger, Z. Taylor, J. Appl. Physiol. **6** (1953) 189; L. C. Clark, Trans. Am. Soc., Artif. Int. Organs **2** (1956) 41.

[6] F. Opekar, K. Štulík, Anal. Chim. Acta **385** (1999) 151.

[7] P. Hrnčířoví, F. Opekar, K. Štulík, Sens. Actuators **B69** (2000) 199.

[8] Z. Hoherčáková, F. Opekar, Sens. Actuators **B97** (2004) 379.

[9] F. Opekar, J. Langmaier, Z. Samec, J. Electroanal. Chem. **379** (1994) 301.

[10] Z. Samec, F. Opekar, G. J.E.F. Crijns, Electroanalysis **7** (1995) 1054.

[11] H. Hinkers, T. Hermes, C. Sundermeier, M. Borchardt, C. Dumschat, S. Bühner, M. Bühner, K. Cammann, M. Knoll, Sens. Actuators **B24-25** (1995) 300.

[12] M. Tsionsky, Z.G. Cardon, A.J. Bard, R.B. Jackson, Plant Physiol. **113** (1997) 895.

5. ELEKTROANALÝZA S UHLÍKOVÝMI PASTOVÝMI ELEKTRODAMI

doc. Ing. Ivan Švancara, Dr.

Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Náměstí Čs. legií 565, 532 10 Pardubice.

Ivan.Svancara@upce.cz

5.1 Pohled do historie

Na sklonku padesátých let minulého století se v odborné literatuře objevilo krátké sdělení s lakonickým názvem „*Carbon Paste Electrodes*“ [1]. Ani autor onoho článku tehdy nemohl tušit, jak oblíbeným elektrodovým materiálem se jím objevená uhlíková pasta stane a že se posléze zařadí ke klasickým materiálům pro laboratorní zhotovování sensorů nejrůznějších konstrukcí a typů. Než takovou pozici uhlíkové pasty získaly, prošly směsi uhlíkového prášku s vhodným pojivem zajímavými etapami vývoje, během nichž přispěly i k rozvoji elektrochemie samotné. S odstupem času lze dokonce tvrdit, že málokterý obor dokládá vitalitu a perspektivnost elektrochemických měření názorněji, než právě elektrochemie s uhlíkovými pastovými elektrodami (CPE).

Uplynulá desetiletí existence uhlíkových past v elektrochemických laboratořích je možné ilustrovat na několika klíčových obdobích a momentech, jež charakterizují nejen jednotlivé stěžejní oblasti uplatnění CPE, ale i některé nastupující trendy:

- **1958**: **Uveřejnění zprávy o objevu uhlíkové pasty** [1].

- **1959-1963**: **Zavádění uhlíkových past a jejich první praktické aplikace**. Rané období bylo zcela v režii výzkumného týmu objevitele CPE a jejich zaměření na elektrochemii aromatických sloučenin; práce jiných autorů se zatím objevovaly jen sporadicky [2].

- **1964, 1965**: **První modifikace uhlíkových past**. Ještě ke dvěma důležitým událostem došlo v Adamsově laboratoři: byly zde vyzkoušeny první modifikace uhlíkových past. Tyto průkopnické práce byly výjimečné tím, že vůbec poprvé pojednávaly o ryze účelových úpravách složení CPE, jež vedly k požadovaným změnám jejich vlastností [2,3].

- **1965-1973**: **Rozšíření uhlíkových past v elektrochemických laboratořích**. Postupně se představuje celá řada dalších uživatelů a propagátorů uhlíkových past.

- **1974**: **Příchod uhlíkových past s elektrolytickým pojivem**. První testy se směsmi uhlíkových prášků s roztoky anorganických elektrolytů s přídavkem třetí látky, jejíž vlastnosti jsou zkoumány, lze považovat za prvopočátek hojného využívání CPE v elektrochemii pevné fáze.

● **1981-1990: Éra chemicky modifikovaných uhlíkových past**. Zvláštní povaha uhlíkových past a jejich stále důkladněji popsané elektrochemické vlastnosti [4] zahájily sérii pokusů s chemickými modifikovanými uhlíkovými pastovými elektrodami, CMCPE (cit. [5]). Elektrochemiky zaujalo především to, že uhlíkové pasty lze modifikovat hned několika různými způsoby, přičemž všechny postupy jsou jednoduché, ale přitom účinné a vesměs spolehlivé.

● **1988**: **Uhlíkové pasty s přimíšenými enzymy jako nový typ biosensorů**. Souběžně s rozvojem chemických modifikací [5-7] byly uhlíkové pasty poprvé vyzkoušeny jako substráty k zakotvení biologických katalyzátorů – enzymů, koenzymů a v případě potřeby i příslušných mediátorů (přenašečů elektronů) [8]. Detekční systémy s uhlíkovými pastovými biosensory vyvíjené ke stanovení biologicky důležitých sloučenin (BDS) brzy převzaly otěže dominující oblasti elektrochemie s CPE a v této pozici setrvávají až do dnešních dnů [8-10].

● **1991**: **Soutěž klasických uhlíkových past s tuhými uhlíkovými kompozitními materiály a tištěnými čidly**. Neopominutelnou kapitolou elektroanalýzy s CPE je rovněž počátek snah o cílenou záměnu uhlíkových past za kompaktní, heterogenní uhlíkové materiály (někdy nazývané "tuhé" uhlíkové pasty), či za uhlíkové inkousty, jež jsou podstatou tzv. tištěných elektrod, představujících jeden z typů elektrod poslední generace. V tomto kontextu lze pak uhlíkové pasty považovat za jakýsi testovací substrát při vývoji dané metodiky v laboratoři, zatímco její konkrétní aplikace bude adaptována právě pro tištěné elektrody, vhodnější pro rutinní použití [7,10].

● **1999-2003**: **Uhlíkové pasty v nových technologiích**. Asi poslední významnější okamžik retrospektivního přehledu je důkazem životaschopnosti elektrod z uhlíkových past na přelomu tisíciletí a reflektuje jejich možnosti při vývoji a testování materiálů nové generace, včetně v současnosti velmi populárních nanotechnologií [10]. Možné elektroanalytické aplikace CPE se zatím rýsují a teprve čas ukáže, zda se výrazněji uplatní i v této oblasti.

Můžeme odhadnout, že tématika elektrochemie uhlíkových past ve všech svých podobách byla zúročena v přibližně 1 500 původních sděleních [10], zveřejněných v dostupnějších časopisech. Publikační aktivity a jejich intenzita se nesly v několika vlnách, které věrně odrážely období zvýšeného zájmu či naopak nezájmu o problematiku CPE. Během poslední dekády má rozšiřování literární databáze mírně vzestupný trend, přičemž každoročně lze zaznamenat až stovku nových prací. Převažuje biosensorika s CPE (cca 50-60 %), ale pravidelně bývá zastoupena tématika stanovení anorganických iontů, komplexních částic a molekul (10-15 %), organických sloučenin, farmaceutických preparátů a biologicky důležitých látek (20-30 %); přibývají i příspěvky z oboru elektrochemie pevné fáze (3-4 %) či výše zmíněné průkopnické práce spojené s vývojem nových technologií a materiálů (1-2 %).

5.2 Nejdůležitější pojmy a fakta z elektrochemie a elektroanalýzy s uhlíkovými pastovými elektrodami

Uhlíková pasta v tradičním slova smyslu je **směsí uhlíkového prášku a vhodného pojiva** (pastové kapaliny), jež se vyznačuje chováním odrážejícím jak typ a kvalitu použitého uhlíku, tak i povahu zvolené kapaliny. Mechanické, fyzikálně-chemické a elektrochemické vlastnosti uhlíkových past mohou chování elektrod typu CPE přibližovat příbuzným čidlům z tuhých uhlíkových materiálů, ale přítomné pojivo je činí spíše jedinečnými, s celou řadou zvláštních vlastností. Elektrody typu CPE se dnes řadí mezi **heterogenní uhlíkové elektrody**.

K přípravě dvousložkových (nemodifikovaných) uhlíkových past většinou postačí běžně komerčně dodávané **spektrální grafitové prášky**, které by měly splňovat tato kritéria:

(i) velikost zrna v řádu μm,

(ii) uniformní distribuce velikosti částic,

(iii) snížená absorpční schopnost,

(iv) vysoká chemická čistota.

Binární uhlíkové pasty obsahují jako pojivo organickou kapalinu, jejíž hlavní funkcí je mechanické spojení grafitových částic. Vedle toho však právě kapalná složka rozhoduje o většině charakteristických vlastností past a proto se její volba řídí řadou kritérií. Kapalina, která by beze zbytku splňovala všechny požadavky, je jen stěží dosažitelným ideálem, ale přesto se řada látek v praxi osvědčila. Na prvním místě je nutno jmenovat směsi vyšších kapalných uhlovodíků, tzv. **parafinové**, resp. **minerální oleje**, přičemž nejoblíbenějším zástupcem této skupiny je Nujol®. Poměrně často používané jsou i **silikonové oleje a tuky**; příležitostné uplatnění nacházejí organické estery (např. triarylfosfáty) či halogenované uhlovodíky ($CHBr_3$, 1-bromnaftalen aj.). Typické parametry kapalných pojiv pro přípravu uhlíkových past lze pak shrnout do těchto bodů:

(i) chemická netečnost a elektroinaktivita,

(ii) vysoká viskozita a malá těkavost,

(iii) minimální rozpustnost ve vodě,

(iv) snížená mísitelnost s organickými rozpouštědly.

Zvolený grafit se mísí s pastovou kapalinou v poměru, který do značné míry vychází z předchozích zkušeností a doporučení; **optimální poměr** se obvykle se volí v rozmezí **0,4-0,5 ml pojiva + 1,0 g uhlíkového prášku**. Vyhovující poměr obou komponent lze nejlépe ověřit pomocí vhodně volených testovacích měření se sérií CPE, kdy lze využít celé řady typizovaných experimentů se standardními anorganickými a organickými elektrodovými systémy a výhodné je i porovnání se záznamy na tradičních tuhých elektrodách.

Grafitový prášek lze velmi dobře smísit s kapalným pojivem v obyčejné porcelánové třecí misce (viz obr. 5.1), přičemž homogenizaci pasty je vhodné provést po několika etapách, kdy se

pozvolna vznikající hmota postupně seškrabuje ze stěn misky na její dno, kde lze lépe využít energický tlak a tření tloučku. Pasta je pak hotova v několika minutách a může se uskladnit nebo lépe ihned použít k přípravě elektrody. Výše zmíněná testovací měření a podrobné návody, jak postupovat při přípravě uhlíkových past a CPE, autor tohoto textu před lety zpracoval formou praktického rádce, který lze nalézt v *Chemických listech* [ročník **93** (1999), číslo 8; str. 490-499.].

Obr. 5.1: ***Potřeby a pomůcky nezbytné ke zhotovení uhlíkových pastových elektrod***
(společně s balením grafitového prášku a parafinového oleje)

Aby mohla být měkká, nekompaktní uhlíková pasta používána k měřením, je nezbytné použít vhodné **elektrodové pouzdro**. Taková sestava pak představuje vlastní uhlíkovou pastovou elektrodu (CPE), která může zahrnovat různé konstrukční varianty:

(i) trubičky a pouzdra s dutinami pro náplň uhlíkové pasty,

(ii) elektrodová pouzdra s otočným pístem (s velmi jednoduchou obnovou uhlíkové pasty – viz obr. 5.1),

(iii) uhlíkové pastové mikroelektrody a soubory ultramikroelektrod,

(iv) detektory s náplní uhlíkové pasty pro měření v průtoku,

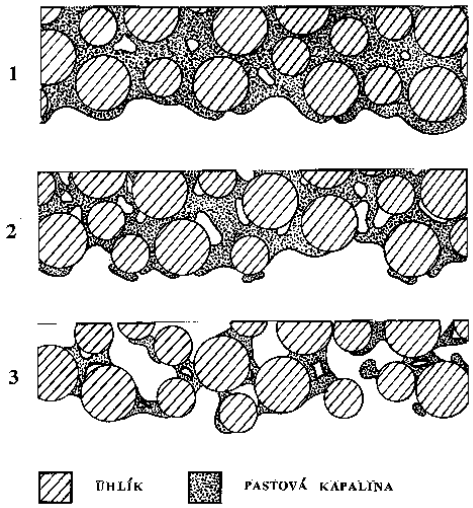
(v) speciální konstrukce uhlíkových pastových elektrod (např. CPE ve tvaru U-trubice či otáčivá kolová elektroda s periodicky obnovovaným povrchem).

Specifické vlastnosti uhlíkových pastových elektrod

V předchozím textu byla pozornost zaměřena na uhlíkové pasty, jakožto elektrodový materiál zvláštní mechanické povahy a specifického fyzikálně-chemického chování. Prolínání jednotlivých vlastností se projevuje u každé CPE trochu jinak, a to nejen v závislosti na typu použité pasty či zvoleném konstrukčním řešení elektrody, ale i na způsobu, jakým je používána při měřeních. Právě tyto aspekty jsou předmětem následujícího stručného pojednání a některých poznámek.

Fyzikálně-chemické a elektrochemické charakteristiky uhlíkových pastových elektrod. Charakteristiky, jimiž se uhlíkové pastové elektrody nejvíce odlišují od ostatních elektrochemických čidel, ať už jde o tuhé elektrody z uhlíku či drahých kovů, varianty rtuťové kapky, či různé sensory s membránami, lze heslovitě popsat takto:

- **Specifická struktura**: Uhlíkové pasty jsou typické heterogenní materiály a v důsledku přítomného kapalného pojiva mívají zcela charakteristickou strukturu. Na základě mikroskopických pozorování pak byly navrženy modely, které se snažily o interpretaci struktury uhlíkových past v závislosti na kvalitě a obsahu obou hlavních složek. Asi nejznámější je Adamsova představa, znázorněná na obr. 5.2, kde schémata 1 až 3 označují struktury s klesajícím podílem pastové kapaliny.



Obr. 5.2: ***Struktura uhlíkové pasty v závislosti na poměru obou hlavních složek*** (podle [4])

- **Velmi nízký ohmický odpor**: Běžné směsi s parafinovými a silikonovými oleji mají odpor jen kolem 10 Ω, což je oceňováno např. při potenciometrických titracích, kde indikační čidla CPE poskytují rychlou odezvu a stabilní signál.

- **Labilita past v organických rozpouštědel**: Vzájemná mísitelnost pojiva s rozpouštědlem podobné povahy vede k rozkladu past. Některé směsi jsou však poměrně rezistentní a mohou být použity alespoň ve směsných roztocích.

- **Stárnutí uhlíkových past**. U většiny CPE lze zaznamenat tři etapy změn jejich chování:
  (i) změny u čerstvě připravených směsí,
  (ii) relativně stabilní období řádu týdnů,
  (iii) nápadné změny u postupně vysychajících past.

- **Hydrofobní povaha uhlíkové pasty**. Z hlediska praktických dopadů je to určitě nejdůležitější fyzikálně-chemická vlastnost, souvisí s přítomností kapalné fáze a značná lipofilita používaných pojiv se v plné míře projevuje i ve výsledném chování CPE popř. CMCPE. Přímým důsledkem je pak tzv. **zpomalená reakční kinetika** [4] na povrchu uhlíkových past ve srovnání s elektrodami z kompaktních kovů či indiferentních materiálů z tuhého grafitu.

Interakce na povrchu a uvnitř uhlíkové pasty. Mezi možné pochody a mechanismy patří faradické i nefaradické procesy:

(**i**) elektrolytické děje spojené s výměnou elektronů, tj. oxidace a redukce,

(**ii**) adsorpce na povrchu uhlíkových past,

(**iii**) extrakce (penetrace) do nitra uhlíkových past,

(**iv**) tvorba iontových párů a jejich selektivní zachycování na uhlíkové pastě,

(**v**) další specifické děje (např. elektrokatalýza) na modifikovaných elektrodách,

které se umně využívají v nejrůznějších elektrochemických a elektroanalytických měřeních, jak dokládají i velmi rozmanité aplikace, shrnuté v následujícím odstavci.

5.3 Aplikace uhlíkových pastových elektrod ve faktech a číslech

V následujících přehledech jsou shromážděny vybrané bilanční údaje o stavu oboru za téměř padesát let jeho existence, tj. od objevu CPE v roce 1958. Není-li uvedeno jinak, byly jednotlivé souhrny sestavovány na základě počtu publikovaných prací, jež nějak souvisely s danou problematikou; u velmi frekventovaných témat jsou uváděny jen přibližné údaje.

- **Zastoupení hlavních typů uhlíkových pastových elektrod:**
  nemodifikované: 200; chemicky modifikované: 500; biologicky a enzymaticky modifikované sensory: 800. (Pozn.: V první kategorii jsou zahrnuty i pasty, použité k modifikacím *in situ*.)

- **Přehled zastoupení nejdůležitějších disciplín elektrochemie s uhlíkovými pastami:**
  analýza anorganických iontů a molekul: 400; analýza organických látek a polutantů: 300; analýza biologicky důležitých sloučenin: 500; farmaceutická analýza léčiv a drog: 150; elektrochemie pevné fáze: 110; voltametrie *in vivo*: 40.

- **Nejdůležitější oblasti elektrochemického výzkumu s uhlíkovými pastami:**
  návrhy a úpravy konstrukcí elektrod a sensorů: 20 %; vývoj, charakterizace a testování uhlíkových past: 40 %; sledování elektrodových jevů a reakční kinetiky: 20 %; studium specifických interakcí a speciační analýza: 10 %; vývoj a užití nových technologií: 3 %; jiné (např. elektrochemie pevné fáze, voltametrie *in vivo*): 7 %.

Tab. 5.1: ***Přehled uplatnění instrumentálních technik v elektrochemii s uhlíkovými pastami***

Metoda	Počet publikací	Metoda	Počet publikací
Voltametrické techniky (přímá měření):		amperometrie (vsádková)	400
cyklická a DC-voltametrie	300	amperometrická a voltametrická detekce v průtokových systémech	150
diferenčně pulsní resp. square-wave voltametrie	400	coulometrie	10
DP-voltametrie 1,5- a 2,5-řádu	5	potenciometrie (přímá měření a potenciometrické titrace)	50
voltametrie s rotovanými elektrodami	5	rozpouštěcí (chrono)potenciometrie v režimu PSA / CCSA	5 / 20
		konduktometrie	3
		kapilární elektroforéza	5
Rozpouštěcí (stripping) voltametrie:		**Ostatní:**	
anodická rozpouštěcí voltametrie	450	mikroskopické studie	20
adsorptivní rozpouštěcí voltametrie	300	impedanční měření	5
		spektrofotoelektrochemie	5
katalytická rozpouštěcí voltametrie	50	chemiluminescenční měření	5

- **Uhlíkové pastové elektrody v elektroanalýze anorganických iontů, částic a molekul**:

  ušlechtilé kovy: Ag^{I} (40), Au^{III} (30), Hg^{II} / Hg^{I} / R-Hg^{II} (35/1/1), Cu^{II} / Cu^{I} (70/10);

  těžké kovy: Zn^{II} (10), Pb^{II} (40), Cd^{II} (20), Tl^{I} / Tl^{III} (5/5), Sn^{II} / Sn^{IV} (2/3), Sb^{III} (5), Bi^{III} (10);

  kovy skupiny železa a V.-VII. skupiny: Fe^{II} / Fe^{III} (2/10), Co^{II} (15), Ni^{II} (15), V^{V} (5), Cr^{III} / Cr^{VI} (3/5), W^{VI} (2), Mo^{IV} / Mo^{VI} (1/5), Mn^{II} / Mn^{IV} / Mn^{VII} (5/1/1), Tc^{VII} (1);

  platinové kovy: $Ru^{III/IV}$ (2), Rh^{III} (1), Pd^{II} (8), Os^{IV} (1), Ir^{III} / Ir^{IV} (3/1), Pt^{IV} (7);

  kovy alkalické a alkalických zemin: Li^{I} (3), Na^{I} (2), Be^{II} (1), Mg^{II} (2), Ca^{II} (3);

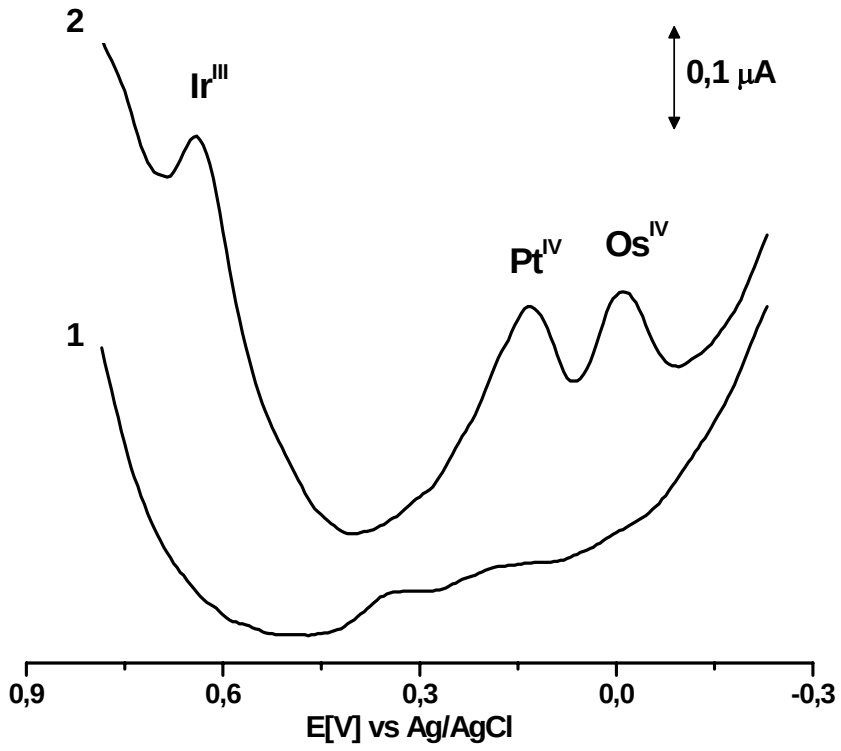
  ostatní kovy: Al^{III} (3), In^{III} (3), Ga^{III} (2), Ti^{IV} (3), Zr^{IV} (4), Sc^{III} (1), U^{VI} (5), $Me^{III/IV}$ (1) (kde Me = kovy vzácných zemin);

  metaloidy a nekovy: As^{III} / As^{V} (2/2), Se^{IV} (2), Si^{IV} (1) (Me = kovy vzácných zemin);

  kationty: NH_4^+ (2), $N_2H_5^+$ (5), NH_3OH^+ (1); H^+ [měření pH] (2);

  anionty: Cl^- (5), Br^- (3), I^- / IO_3^- (15/3), CN^- (5), SCN^- (1), N_3^- (1), NO_2^- (5), NO_3^- (6), SO_3^{2-} (1), SO_4^{2-} (1), S^{2-} (3), HPO_4^{2-} (3), ClO_3^- / BrO_3^- (1), ClO_4^- (2), BF_4^- (1), $S_2O_8^{2-}$ (2), $[B(O_2)(OH)_2]^-$ (1), $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ (1);

  molekuly: H_2O_2 (50), O_2 (5), NO_X (5), SO_2 (1), CO / CO_2 (1/1).



Obr. 5.3: ***Ve spektru metod elektrochemické rozpouštěcí analýzy s CMCPE lze nalézt také unikátní postupy, jakým je např. možnost simultánního stanovení všech tří těžkých platinových kovů***

1 - základní linie: 0,1 M octanový pufr + 0,15 M KCl + $1 \cdot 10^{-5}$ M Septonex (modifikátor *in situ*); 2 - přídavek směsi 0,05 μM Os^{IV} + 0,5 μM Pt^{IV} + 3 μM Ir^{III}
[z experimentálního archívu autora]

- **Elektrody a sensory na bázi uhlíkové pasty v analýze organických látek, environmentálních polutantů, farmaceutických preparátů a drog**:

  dusíkaté sloučeniny: aminy (alifatické/aromatické): 1/25; nitrolátky (alif./arom.): 1/10; nitrosolátky (arom.): 1; hydrazoderiváty (arom.): 3; hydroxylaminy (arom.): 1; azolátky: 3; další sloučeniny (např. indigo, akridin, azepin, alkaloidy): 10;

  kyslíkaté sloučeniny: alkoholy (ethanol/alif./arom.): 10/5/2; fenol/ostatní fenoly: 15/15; aldehydy (alif./arom.) 2/5; chinony: 3; org. kyseliny (mimo BDS): 10; organické peroxidy: 4;

  halogenderiváty (arom.): 5; sirné sloučeniny (mimo BDS): 10;

  environmentální polutanty (např. pesticidy / tenzidy): 25/3;

  farmaceutika a léčiva/drogy: 150/5.

- **Uhlíkové pastové elektrody při studiu a stanovení biologicky důležitých sloučenin**: aminokyseliny: 50; nukleové kyseliny (DNA, RNA / ostatní): 30/5; puriny a pyrimidiny (kys.močová/ostatní): 7/3; proteiny: 10; cukry (glukosa/jiné monosacharidy/disacharidy a ostatní): 60/25/3; vitamíny (kys. askorbová/ostatní): 30/15; enzymy, koenzymy (NADH/ostatní): 20/15; hormony: 5; steroidy: 3; další BDS: dopamin a katecholy: 20; flavanoly a flavonoidy: 5; kys. mléčná a laktáty: 10; jiné: 20.

5.4 Současné trendy a výhledy do budoucna

- **Vývoj nových typů CPE a CMCPE** pro stanovení anorganických a organických látek, k analýze biologicky důležitých sloučenin a farmaceutických preparátů. Příkladem čidel nové generace jsou bismutem modifikované CPE (viz kap. **6**), jež v elektrochemické rozpouštěcí analýze představují slibnou náhražku stále kontroverznějších elektrod na bázi rtuti.
- **Speciační analýza s CMCPE na bázi přírodních zeolitů a syntetických silikátů**. Využití selektivních interakcí těchto substrátů s anorganickými ionty a komplexy pro monitorování jejich výskytu a postupných proměn v přírodním prostředí.
- **Vývoj, testování a aplikace nových amperometrických a potenciometrických biosensorů**. Lze předpokládat, že alespoň v nejbližších letech si tato oblast udrží své dominantní postavení. Rozmanité možnosti opět nabízí především oblast organických polutantů, farmaceutických preparátů a biologicky aktivních sloučenin.
- **Využití uhlíkových past ke konstrukci elektrochemických detektorů pro měření v průtoku**. V této oblasti je třeba věnovat pozornost dokonalejším postupům stabilizace uhlíkových past v prostředích s obsahem organických rozpouštědel, např. mobilních fází v kapalinové chromatografii.
- **Další promítání nejmodernějších technologií do přípravy nových typů uhlíkových past** pro elektrochemická a elektroanalytická měření.

5.5 Literatura

Přehled uvádí desítku klíčových prací, jež byly citovány v předchozím textu a které lze zájemcům doporučit k dalšímu studiu. Většinou to jsou referáty a pro lepší orientaci čtenáře jsou k plným citacím připojeny i stručné charakteristiky jednotlivých příspěvků:

1. Adams R. N.: *Carbon Paste Electrodes*. Anal. Chem. **30** (1958) 1576.

   Průkopnická práce nevelká rozsahem (necelá strana formátu časopisu), ale zásadní důležitosti. Poprvé představuje uhlíkovou pastu, coby směs grafitového prášku a vhodného pojiva, jako použitelný elektrodový materiál. (Zahrnuje 2 odkazy na původní práce)

2. Adams R. N.: *Carbon Paste Electrodes - A Review*. Rev. Polarog. (Kyoto) **11** (1963) 71-78.

   První referát na téma uhlíkové pastové elektrody, ve kterém jsou shrnuty zkušenosti z úvodní pětiletky měření s CPE, vycházející vesměs z výsledků objevitele uhlíkové pasty a jeho vědecko-výzkumné skupiny. (Celkem 13 citací)

3. Adams R. N.: *Electrochemistry at Solid Electrodes*, M. Dekker, New York, 1969.

   Monografie, dnes již klasické dílo a podle mnohých jedno z nejlepších svého druhu vůbec. V textu jsou poměrně časté názorné příklady z měření s uhlíkovými pastami, je jim věnována i samostatný oddíl. Autor v knize také poprvé poodhaluje pozadí objevu CPE (na str. 280) a pro české čtenáře není bez zajímavosti, že měl úzkou souvislost s Heyrovského polarografií a především s kapající rtuťovou elektrodou. (Tematika CPE na str. 26-30, 55, 100, 124-130, 280-283 a 365-367; celkem 25 citací)

4. Rice M.E., Galus Z., Adams R.N.: *Graphite Paste Electrodes: Effects of Paste Composition and Surface States on Electron-Transfer Rates.* J. Electroanal. Chem. **143** (1983) 89-102.

   Jedna z nejcitovanějších původních prací a zároveň poslední zásadní příspěvek Adamsova týmu, v němž je podán vůbec poprvé ucelený výklad elektrodových jevů na povrchu lipofilních uhlíkových past z minerálních a silikonových olejů, včetně jejich specifické reakční kinetiky. (Celkem 45 citací)

5. Kalcher K.: *Chemically Modified Carbon Paste Electrodes in Voltammetric Analysis*. Electroanalysis **2** (1990) 419-433.

   Po Adamsově referátu (**2**) teprve druhá přehledová práce věnovaná tradičním typům uhlíkových pastových elektrod. Jak napovídá název, autor se zaměřil hlavně na chemicky modifikované varianty a jako první vystihl začínající éru tohoto typu elektrod s návrhem přehledné klasifikace způsobů chemické modifikace CPE, jež později převzali i další autoři. Rovněž Kalcherův referát se zařadil mezi klasické práce oboru a je stále hojně citován. (Celkem 173 odkazů)

6. Kalcher K., Kauffmann J.-M., Wang J., Švancara I., Vytřas K., Neuhold C., Yang Z.: *Sensors Based on Carbon Paste in Electrochemical Analysis - A Review with Particular Emphasis on the Period 1990-1993*. Electroanalysis **7** (1995) 5-22.

   Text byl koncipován jako volné pokračování předchozího referátu (**5**), ale v autorském kolektivu se věnoval problematice v obecnějších souvislostech. Systematická část navazovala na kompilaci z roku 1990. Rovněž tento příspěvek patří k nejcitovanějším pracem v oboru. (311 odkazů)

7. Kalcher K., Schachl K., Švancara I., Vytřas K., Alemu H.: *Recent Progress in the Development of Carbon Paste Electrodes*. Sci. Pap. Univ. Pardubice, Ser. A **3** (1997) 57-85.

   Referát je věnován trendům v elektroanalýze s CPE a CMCPE v polovině devadesátých let a svým způsobem doplňuje oba předchozí souhrny (**5**, **6**). Vzhledem k bilančnímu charakteru konferenčního almanachu, v němž byl uveřejněn, si tento přehledový článek více všímá výsledků spolupráce mezi pracovišti katedry analytické chemie na Univerzitě v Pardubicích a ve Štýrském Hradci. V textu lze však nalézt i jedno z prvních hlubších zamyšlení na téma další budoucnosti uhlíkových past v konfrontaci s nastupujícími tištěnými sensory. (Celkem 365 citací)

8. Gorton L.: *Carbon Paste Electrodes Modified with Enzymes, Tissues, and Cells*. Electroanalysis **7** (1995) 23-45.

   Tento příspěvek byl původně zamýšlen jako součást přehledu (**6**), ale vzhledem ke značnému rozsahu tématiky biosensorů na bázi uhlíkové pasty (Bio-CPE) byl nakonec uveřejněn samostatně. Je dodnes jedinou prací svého druhu s velkým citačním ohlasem. (Celkem 220 referencí)

9. Švancara I., Vytřas K., Zima J., Barek J.: *Carbon Paste Electrodes in Modern Electroanalysis. A Review*. CRAC – Crit. Rev. Anal. Chem. **31** (2001) 311-345.

   Zatím poslední přehled v podobě standardního článku premiérově nabízí retrospektivní pohled na významné milníky a etapy historie CPE, CMCPE a Bio-CPE a znovu navazuje na referáty **5** a **6**. Přehled nových metod je opět uveden formou tabulek, v nichž jsou zahrnuty i některé dřívější, dosud opomíjené studie či aplikované práce. (Celkem 247 citací)

10. Kalcher K., Švancara I., Metelka R., Vytřas K., Walcarius A.: *Heterogeneous Carbon Electrochemical Sensors*. In: *Encyclopedia of Sensors*, Vol. 4 (Grimes C.A., Dickey E.C., Pishko M.V., ed.), str. 283-430. American Scientific Publishers, Stevenson Ranch (USA), 2006.

    Letos uveřejněná kapitola je velmi rozsáhlým přehledem, kde dominuje tématika elektroanalýzy s uhlíkovými pastovými elektrodami všech typů. Svým záběrem a délkou kolem 150 stran knižního textu *de facto* supluje dosud chybějící monografii, a této charakterizaci odpovídá i cca 50 stran tabulek s přehledy prakticky všech známých elektroanalytických aplikací CPE, CMCPE a Bio-CPE; s více než 2200 odkazy na původní práce či jiné referáty.

6. BISMUTOVÉ ELEKTRODY V ELEKTROANALÝZE

doc. Ing. Ivan Švancara, Dr.

Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Náměstí Čs. legií 565, 532 10 Pardubice.

Ivan.Svancara@upce.cz

6.1 Úvod do problematiky

Jedním z nejvýraznějších směrů moderní elektroanalýzy je vývoj a testování nových detekčních systémů s pracovními elektrodami nejrůznějších typů a konfigurací. Motivací pro zavádění dalších elektrod a sensorů může být i skutečnost, že osvědčené elektrodové materiály, jež po léta sloužily v elektrochemickém výzkumu i v laboratorní praxi, se postupně dostávají do pozice, kdy z nějakého důvodu přestávají vyhovovat současným potřebám a požadavkům. Učebnicovým příkladem je stávající situace – či spíše hysterie – kolem kovové rtuti, která hrozí přerůst ve všeobecný zákaz jejího používání. Na tento stav museli chtě nechtě zareagovat i elektrochemikové a hledání vhodné alternativy za rtuť se postupně stalo hitem základního výzkumu posledních let.

Jednu z nejslibnějších náhražek oblíbených rtuťových elektrod bezesporu představují elektrody z bismutu, jimž je věnován tento příspěvek. Elektrody na bázi bismutového filmu (BiFE; z angl. *bismuth film electrode*) a později i kompaktního či práškového bismutu (BiBE resp. BiE; *bismuth bulk electrode*) si za poměrně krátkou dobu existence získaly renomé především v elektrochemické rozpouštěcí analýze (ERA), jak o tom svědčí i tato krátká reminiscence:

- **2000: První sdělení o objevu elektrod s povlakem bismutu a jejich možností v ERA** [1].

- **2001-2002: Charakterizace a první aplikace BiFE.** Úvodní práci brzy následovaly další příspěvky, které byly vesměs věnovány podrobnějšímu ověřování BiFE pro měření v nejužívanějších variantách ERA, jmenovitě v anodické rozpouštěcí voltametrii (ASV), adsopční (katodické) rozpouštěcí voltametrii (AdSV) a rozpouštěcí (chrono)potenciometrii v obou základ-ních modifikacích (PSA resp. CCSA). Celá počáteční etapa byla ve znamení objevitelů BiFE, Wangovy skupiny z Nového Mexika, ale k jejich výzkumům se brzy připojilo několik navzájem kooperujících elektroanalytických týmů ze střední Evropy [2].

- **2003-2004: Bouřlivý rozvoj elektroanalýzy s bismutovými elektrodami.** Také třetí rok existence elektrod typu BiFE byl ještě ve znamení aktivit již etablovaných autorských kolektivů, které ve svých nových pracích věnovaly dalším možným aplikacím elektrod na bázi povlaků z bismutu a návrhům konkrétních metod stanovení; objevují se také první pokusy o interpretaci chování bismutových filmů pomocí mikroskopických technik. V roce 2004 však již bylo možno zaznamе-

nat nástup nových propagátorů BiFE a např. paleta stávajících elektrod se výrazně rozšířila. Nastupující týmy pokračovaly v nastoleném trendu spíše aplikačních prací, ale objevily se i zajímavé, teoretičtěji zaměřené studie. Nezaháleli však ani ostatní a databázi elektroanalytických metod obohatili i oni příspěvky, v nichž se objevily i první úspěšné pokusy stanovení organických látek.

- **2005-2006: Bismutové elektrody dobývají svět elektroanalýzy.** Pro někoho možná až nadnesený podtitul lze doložit strohými fakty [3-5]. V těchto letech počet skupin, které se elektrodám z bismutu začaly věnovat soustavněji, narostl několikanásobně a příslušné práce přicházejí prakticky ze všech koutů planety. Počet publikovaných sdělení se pomalu blíží ke stovce a třeba v Evropě, která se stává baštou oboru, neproběhla významnější elektrochemická či elektroanalytická konference, aniž by na ni nebyl prezentován nějaký další příspěvek na téma BiFE a BiE. Je nabíledni, že se tento stav odráží i ve veliké rozmanitosti záběru všech nových prací, proto na tomto místě není možné ve zkratce popsat vše, co se během posledních dvou let událo. Toto období se jistě brzy stane předmětem zájmu nějakého nového pojednání navazujícího na všechny předchozí referáty [2-5].

6.2 Nejdůležitější pojmy a principy měření s bismutovými elektrodami

6.2.1 Konfrontace „bismut *versus* rtuť“

Výše zmíněný důvod zavedení elektrod typu BiFE a BiE do elektroanalýzy, tj. náhrada kontroverzních rtuťových elektrod, se nemůže nepromítnout do výkladu v následujících odstavcích a porovnávání bismutu se rtutí bude prostupovat prakticky celým textem.

- **Fyzikálně-chemické a mechanické vlastnosti:** Bismut a rtuť mají blízkou atomovou hmotnost i relativně nízkou chemickou reaktivitu, ale liší se ve skupenství: rtuť je za normálních podmínek kapalná, zatímco **bismut je pevný kov** (dle některých pramenů s rysy metaloidu) se stříbrným leskem a růžovým nádechem. Jako elektrodový materiál nemůže pevný bismut konkurovat kapkám rtuti ve způsobu obnovování povrchu a jeho vrstva se v případě potřeby **regeneruje jako u jiných filmových elektrod**, popř. tuhých čidel – elektrochemicky nebo mechanickým otřením.

- **Elektrochemické vlastnosti a polarizační charakteristiky:** Bismut je **méně ušlechtilý než rtuť**, $E°(Bi^{3+} \rightarrow Bi) = +0{,}280$ V, $E°$ $(Hg^{2+} \rightarrow Hg) = +0{,}788$ V vs. SHE (cit. [5]), a tak mají Bi-elektrody v porovnání se rtutí omezenější rozsah využitelného potenciálu. V případě konfigurací bismutového povlaku a rtuťového filmu je katodický potenciálový rozsah srovnatelný, ale např. elektrody z tuhého bismutu nemohou konkurovat v přepětí vodíku elektrodám ze rtuťové kapky. Pro oba kovy však platí, že pro **anodická měření** – pokud uvažujeme oxidace látek při kladných potenciálech – jsou jak bismutové, tak rtuťové elektrody ze své podstaty **nepoužitelné**.

- **Hnací síla při elektrolytickém nahromaďování:** V klasické ASV a příbuzných technikách se elektrody z bismutu a rtuti chovají podobně, co se týče mechanismu elektrolytické redukce. **Vznik**

amalgámů na rtuti, $Me(Hg)_X$, jakožto hnací síla při nahromaďování, napodobuje **u bismutových elektrod tvorba slitin**, Me_ABi_B. A stejně jako rtuť, u níž je mírou účinnosti prekoncentrace tendence daného elementu vytvářet amalgám, tak i bismut vykazuje rozdílnou afinitu k různým kovům.

- **Další možné interakce na površích bismutu a rtuti**: Pro **využití principů neelektrolytické akumulace a některých nefaradických jevů** při voltametrické popř. (chrono)potenciometrické detekci mají elektrodové materiály ze rtuti a bismutu **srovnatelné** předpoklady.

- **Teoretické zázemí**: Jen stěží nalezneme čidlo, jehož vlastnosti by byly tak podrobně zmapovány, jako je tomu u rtuťových elektrod. (Je potěšitelné, že velký podíl na tomto stavu má naše elektrochemická škola, pokračující v odkazu objevitele polarografie a laureáta Nobelovy ceny prof. Heyrovského.) V porovnání s tímto je teoretická výbava elektroanalýzy s BiFE a BiE **velmi skromná** a teoretičtěji zaměřené studie, většinou vycházející z analogie se rtuťovou filmovou elektrodou (MFE) nebo visící rtuťovou kapkou (HMDE), se dají spočítat na prstech jedné ruky.

- **Specifika při konstrukci a miniaturizaci elektrod, kombinace s moderní instrumentací**: **Technické aspekty** uplatnění bismutových a rtuťových elektrod lze opět považovat za **srovnatelné**. Co se týče bismutových elektrod, i několik málo let jejich užívání ukazuje, že jednotlivé typy BiFE a BiE jsou kompatibilní s moderní instrumentací, včetně průtokových systémů či příručních analyzátorů, kde se mohou uplatnit miniaturní elektrody a cely, zhotovené technologií sítotisku.

- **Rozsah použití** (**flexibilita**): Prozatím nelze objektivně srovnat oblast využitelnosti bismutových elektrod s jejich protějšky ze rtuti, které se intenzivně používají více jak půl století. Vždyť jen pomocí ERA lze na HMDE či MFE stanovit na 70 elementů napříč periodickou tabulkou a ještě větší pole působnosti nabízí analýza organických sloučenin a biologicky aktivních látek (BAL). Na elektrodách z bismutu byly prozatím **navrženy či alespoň testovány metody ke stanovení asi 20 prvků** a oblast elektroanalýzy organických sloučenin či BAL zůstává dosud téměř netknuta [3-5].

- **Toxikologie bismutu a rtuti**: Vzájemné porovnávání elektrodových materiálů z bismutu a rtuti uzavírá jejich charakterizace z pohledu toxikologie. Zde je nutné uvést na pravou míru mnohdy černobílé vidění zastánců bismutových elektrod, kteří popisují bismut a jeho sloučeniny jako takřka neškodné látky, se zanedbatelným dopadem na životní prostředí a lidské zdraví. Renomované prameny uvádějí, že klinicky prokázány byly i otravy sloučeninami bismutu, jejichž symptomy připomínají intoxikace olovem nebo i rtutí. (Podobně jako u této dvojice jsou za zvlášť toxické považovány organokovové deriváty.) Na druhou stranu se sluší dodat, že **samotný bismut** toxicky **hodnocen není** a že jeho sloučeniny způsobují vážnější otravy až ve vyšších dávkách. Z toho se dá usuzovat, že **toxicita bismutitých solí je nižší** než u dalších těžkých kovů [5].

6.2.2 Příprava a vlastnosti bismutových elektrod

Typy substrátů a jejich konfigurace v podobě bismutových elektrod: Diskové elektrody představují zdaleka nejrozšířenější typ nosiče pro povlaky bismutu. Mezi jednotlivými alternativami prozatím dominují komerčně vyráběné elektrody ze skelného uhlíku (GCE), jejichž výhodou je snadná dostupnost a spolehlivost, je-li jejich pracovní povrch náležitě vyleštěn a ošetřen. Vyzdvihována je i výborná adheze bismutu na GCE, kterou lze dále zlepšit elektrochemickou aktivací – cyklováním před vlastním vylučováním filmu. Levnější alternativou je elektroda z grafitu impregnovaného voskem (WIGE) či grafitová tuha v pouzdře z Teflonu (PLE), které nevyžadují takovou péči při obnově povrchu, ale mají poněkud vyšší pozadí. V druhém případě je však nutno vzít v potaz i skutečnost, že pórovitá tuha s vyloučeným povlakem bismutu může vykazovat značné adsorpční schopnosti. Roli elektrodového substrátu s diskem mohou zastávat i uhlíkové pastové elektrody (CPE), ať již v klasické podobě jako binární směsi grafitového prášku a minerálního či silikonového oleje, nebo speciálně modifikované přídavkem další látky (viz dále). Výčet uhlíkových substrátů uzavírají momentálně módní směsi s uhlíkovými nanotrubičkami či tzv. uhlíkové filmy. Konečně do podoby disku ze upravit i roubík bismutu, čímž se získá celobismutová elektroda (BiBE), jejíž povrch vyžaduje speciální postupy regenerace.

Rotující disková elektroda (GCE–RDE). Zatímco elektrody tohoto druhu nalezly značnou oblibu v elektrochemických studiích za přesně definovaných hydrodynamických podmínek, v praktické elektroanalýze je jejich použití jen příležitostné. V případě BiFE je znám prozatím jediný příklad metody, kde díky GCE–RDE bylo dosaženo kompenzace kinetických vlivů sledované reakce.

Diskové mikroelektrody (μE). Pro nanášení bismutových povlaků byly již úspěšně testovány nosné elektrody z uhlíkových vláken , popř. tenoučkých Pt- a Au-drátků. Jejich masovějšímu rozšíření však budou stát v cestě nepraktické postupy regenerace a malá mechanická odolnost.

Tištěné elektrody (SPE) **a integrované elektrodové cely**. Jejich předností by měla být výroba ve větších sériích s jednorázovou aplikací každého sensoru, principy přímé modifikace uhlíkových matric a planární konfigurace s malými rozměry pro měření v proudících tekutinách.

Další konstrukční typy. Za povšimnutí stojí např. detektor s elektricky vyhřívaným korpusem, vyvinutý speciálně pro měření za zvýšené teploty nebo jakýsi hybrid mezi tištěným sensorem a CPE, tzv. žlábková („korýtková“) elektroda s náplní uhlíkové pasty.

Způsoby vylučování povlaků a úpravy bismutových elektrod pro měření

1. Vylučování „in situ“. Jde o režim, kdy se povlak vylučuje na elektrodovém substrátu, např. na skelném uhlíku (typ BiF-GCE) či uhlíkové pastě (BiF-CPE), elektrolytickou cestou přímo v měřeném roztoku, tj. simultánně s analytem za podmínek prekoncentračního kroku rozpouštěcí analýzy. Redukce bismutité soli (o koncentraci 10krát až 20krát vyšší než stanovovaný ion) se pro-

vádí za potenciálu, který musí natolik negativní, aby umožnil nejen vyloučení samotného filmu, ale i redukci daného iontu. Povlaky vylučované *in situ* obvykle poslouží pouze pro jedno měření a v závěru rozpouštěcího kroku jsou z povrchu elektrody odstraněny elektrochemicky, tj. „rozpuštěním“ bismutu z povrchu elektrody. Při následném měření je během koncentračního kroku povlak vytvořen znovu a jsou-li podmínky konstantní, pak i kvalita a chování nového povlaku jsou srovnatelné s předchozím(i). Tento postup se osvědčil již u substrátů se rtuťovými filmy.

V elektroanalýze s BiFE nalezly velkou oblibu základní elektrolyty na bázi octanového pufru, jež mají zanedbatelné komplexotvorné schopnosti, a tak vytváření bismutových povlaků v režimu *in situ* lze vyjádřit jednoduchou rovnicí:

$$Bi^{3+} + 3\,e^- \longrightarrow Bi^0 \qquad (1a)$$

U roztoků, obsahujících komplexotvorné anionty, se povlak vytváří podle schématu, např.:

$$BiX_n^{(n-3)-} + 3\,e^- \longrightarrow Bi^0 + n\,X^- \quad \text{[kde X = Cl, Br a OH]} \qquad (1b)$$

přičemž se volí poněkud negativnější potenciály pro účinné vyredukování bismutu z komplexu.

V souvislosti s měřeními v režimu *in situ* je nutno ještě upozornit na nebezpečí nevratné hydrolýzy,

$$Bi^{3+} + H_2O \longrightarrow BiO^+ + 2\,H^+ \qquad (2)$$

při měřeních, kde se pracuje s velmi nízkými koncentracemi Bi^{3+}, např. ve stopové analýze.

Bismutové elektrody nabízejí i alternativní možnost přípravy a fungování v režimu *in situ*. První praktickou realizací takového přístupu bylo přimíšení cca 5 hmotn. % pevného oxidu bismutitého, Bi_2O_3(s), do uhlíkové matrice. Na povrchu takto modifikovaných uhlíkových past (typ Bi_2O_3-CPE) a uhlíkových inkoustů (Bi_2O_3-SPE) se pak povlak bismutu vytváří podle schématu:

$$Bi_2O_3 + 6\,H^+ + 6\,e^- \longrightarrow 2\,Bi^0 + 3\,H_2O \qquad (3a)$$

$$Bi_2O_3 + 3\,H_2O + 6\,e^- \longrightarrow 2\,Bi^0 + 6\,OH^- \qquad (3b)$$

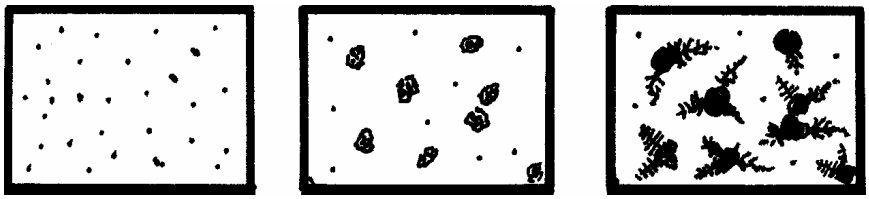
Tímto se příslušné měřící postupy dále zjednoduší, neboť CPE a SPE modifikované Bi_2O_3 nevyžadují v analyzovaných roztocích přítomnost bismutité soli.

2. Depozice z pokovovacích roztoků (vylučování „ex situ“). Nanášení bismutových povlaků ze speciálního roztoku se používá např. při stanovení Ni^{2+} a Co^{2+} pomocí AdSV a adaptované Čugajevovy reakce s dimethylglyoximem. Její průběh vyžaduje zásadité prostředí, proto zde depozice *in situ* nepřichází v úvahu (z důvodů hydrolýzy iontů Bi^{3+}). Povlaky vyredukované externí cestou bývají kompaktnější, tvořené mnohem silnější vrstvou než u depozice *in situ*, a mohou tak být používány pro celou sérii měření. Tento poznatek vychází hlavně z měření s elektrodami typu MFE, zatímco pro BiFE jsou zkušenosti spíše opačné; např. pro potřeby ASV se vylučování bismutu *ex situ* prozatím příliš neosvědčilo.

3. Příprava povrchů elektrod na bázi kovového bismutu. Bismutové elektrody, které nefungují na bázi filmu, se před měřeními musejí obvykle ještě upravovat. U čidel z kompaktního bismutu jde o poměrně zdlouhavé čištění povrchu mechanickou či chemickou cestou; někdy je třeba až 5 min. chemická regenerace téměř po každém záznamu. Ve srovnání s těmito procedurami je příprava povrchu uhlíkových past s přimíšeným práškovým bismutem (typ Bi-CPE) snadná a rychlá; použitou vrstvu pasty stačí lehce setřít a elektroda je ihned připravena k dalším měřením.

Mikrostruktura povlaků bismutu

Výsledky řady mikroskopických studií se shodují v tom, že povlaky bismutu jsou složitá uskupení krystalické povahy, jejichž výsledná struktura a morfologie je značně variabilní. Dokládá to i obr. 6.1, na němž jsou znázorněny postupné proměny povrchu bismutového povlaku v závislosti na intenzitě depozice – ze struktury, připomínající rtuťový film, přes tvorbu shluků, až po vznik charakteristických jehlicovitých krystalků.



I → **II** → **III**

Obr. 6.1: ***Morfologické proměny bismutového povlaku s dobou depozice*** ***(*** $\tau_I < \tau_{II} < \tau_{III}$***)***

Fáze I : tvorba krupiček (analogie Hg-filmu) ⟶ Fáze II: shlukování do agregátů ⟶ Fáze III: růst krystalů bismutu

Ukazuje se, že některé rozdíly v chování BiFE a MFE, popř. HMDE, mohou souviset právě s odlišnou mikrostrukturou členitého povrchu bismutových povlaků ve srovnání s uspořádanějšími strukturami rtuťových filmů nebo takřka ideálně hladkým povrchem rtuťových kapek.

6.2.3 Základní elektrochemické charakteristiky bismutových elektrod

- **Polarizovatelnost a operační schopnosti:** Obecně lze elektrody na bázi bismutu charakterizovat jako čidla se slušným operačním rozsahem v oblasti záporných potenciálů, který je většinou širší než nabízejí běžné pevné elektrody z drahých kovů či uhlíkatých materiálů. Při nejběžnějších aplikacích v režimu ASV či PSA je použitelný rozsah potenciálů určen na jedné straně redukčním vývojem vodíku, na druhé straně oxidačním rozpouštěním bismutu. Odhlédneme-li od atypických konfigurací či měření za extrémních podmínek, lze říci, že bismutové elektrody jsou polarizovatelné v rozmezí cca **–1,2** až **–0,3 V** vs. Ag/AgCl.

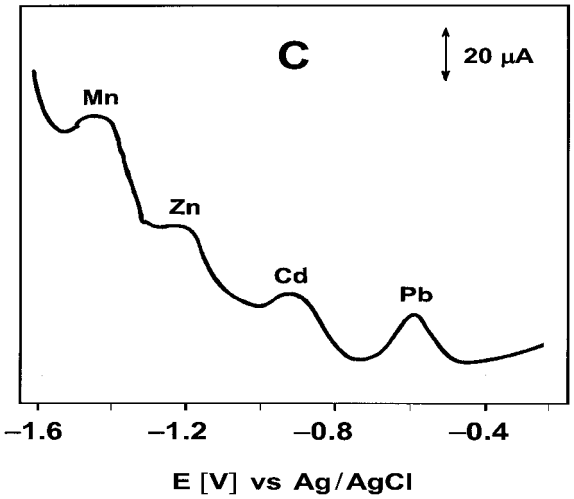
Zvláštností varianty BiFE připravené *in situ* je nepochybně diskontinuita použitelnosti v závislosti na pH, neboť v neutrálních a slabě alkalických roztocích (pH 7-11), dochází k výše

zmíněné hydrolýze (schéma 2), přičemž vzniklé precipitáty solí bismutylu nelze za daných podmínek zredukovat na povlak bismutu. Při vyšších hodnotách pH však BiFE v režimu *in situ* opět funguje, a to díky navázání Bi^{III} do hydroxokomplexů, jež jsou dobře rozpustné a elektroaktivní (1b). Zde je třeba zdůraznit, že možné použití vysoce alkalických roztoků v režimu *in situ* je výsadou pro BiFE a není možné u MFE, jelikož hydroxidy srážejí rtuťnaté soli za vzniku $HgO.\times H_2O$ a filmy se pak nemohou vytvářet.

Zkušenosti a výsledky většiny publikovaných prací ukazují, že jako optimální prostředí pro měření s bismutovými elektrodami jsou nosná média o pH 4-5, tedy zejména **octanové pufry**, jež jsou dostatečně kyselé na to, aby zabránily nežádoucím hydrolytickým pochodům, ale již nemají takovou aciditu, aby se při měřeních výrazněji vylučoval vodík při aplikování negativnějších potenciálů. Mezi vcelku vhodná média spadají i zředěnější roztoky HCl či HNO_3, které se tu a tam uplatnily jako okyselující složka k potlačení matricového efektu u reálných vzorků vod a vybraných nápojů.

Přehled elektrochemických charakteristik iontů a látek analyzovaných s BiFE a BiE

Mn a Zn. Podobně jako jiných elektrod mají oba kovy vylučovací potenciály značně negativní a v režimu anodického rozpouštění jsou jejich píky méně či více deformovány vysokým pozadím vlivem vývoje vodíku (viz obr. 6.2). I proto jsou příslušné meze detekce o poznání vyšší než u jiných kovů a případné analytické aplikace velmi omezené.



Obr. 6.2: ***Prozatím největší pole působnosti pro bismutové elektrody nabízí anodická rozpouštěcí voltametrie a metody stanovení nízkých koncentrací iontů kovů***
[z experimentálního archívu autora]
Experimentální podmínky: SWASV; 0,2 M amonný pufr (pH 9); c(Mn) = 3 mg l^{-1}; c(Zn) = 200 μg l^{-1}, c(Cd,Pb) = 100 μg l^{-1}

Cd a Pb. Tato dvojice těžkých kovů bezesporu představuje „nejvděčnější“ analyty pro bismutové elektrody a dokonce lze říci, že prakticky neexistuje původní práce, kde by použití jednotlivých typů BiFE a BiE nebylo testováno právě v modelových roztocích s ionty Cd^{2+} a Pb^{2+}. Co nelze

pominout ani v tomto stručném přehledu je skutečnost, že hodnoty jejich potenciálů, E_P(Cd) resp. E_P(Pb), a především výsledné rozlišení obou signálů, ΔE_P(Cd,Pb), jsou asi nejrozdílnějším parametrem, srovnáváme-li chování BiFE a MFE. Rozdíl v rozlišení píků na obou elektrodách není nijak dramatický, ale pokud je jeden z iontů Cd^{2+} a Pb^{2+} přítomen ve větším přebytku, i malé nuance v poloze píků mohou zmírnit jejich vzájemné překrývání. Některé výsledky také ukazují, že detekce Cd^{2+} je citlivější na bismutu než na rtuti.

In a Tl. V záznamech ASV a PSA se rozpouštěcí píky těchto méně běžných kovů objevují v bezprostřední blízkosti dvojice Cd a Pb. Zatímco vysoký pík india, odpovídající reoxidaci $In^0 \rightarrow In^{III}$, lze poměrně dobře odlišit již optimální volbou složení elektrolytu, široké a relativně nízké signály přeměny $Tl^0 \rightarrow Tl^I$ zůstávají většinou překryty. Pak je nutné maskování Cd^{2+} a Pb^{2+} buď EDTA, nebo s využitím komplexotvorných schopností NaOH; v obou případech se komplexotvorných reakcí ion Tl^+ neúčastní a jeho signál zůstává prakticky nezměněn.

Sn a Sb. Experimenty s těmito kovy dosud nepřekročily rámec předběžných pokusů a potvrdilo se, že pro vysokou náchylnost sloučenin Sn^{II}, Sn^{IV} a Sb^{III} k hydrolýze a v případě Sn^{II} i k oxidaci, bude jejich případné stanovení na bismutových elektrodách pomocí ASV dosti problematické.

Co a Ni. Tato nerozlučná dvojice kovů je známa tím, že nevytváří ani amalgámy, ani slitiny s bismutem. Proto se měří v režimu AdSV, kdy se Co^{II} a Ni^{II} selektivně nakoncentrují prostřednictvím organického činidla a vzniklého komplexu, jenž se podrobí detekci katodickou redukcí.

Další kovy. V některých pracích je diskutováno i možné stanovení Cu^{II} na BiFE. Jelikož je měď ušlechtilejší než bismut, jedná se spíše o společnou detekci Cu^{2+} a Bi^{3+} na indiferentním substrátu. Zbývající kovy byly předmětem zájmu v kombinaci s metodami AdSV a BiFE získanými *ex situ*. Konkrétně šlo o Fe^{III}, Al^{III}, V^V, Cr^{III}, $Mo^{V/VI}$, U^{IV-VI} a Ti^{IV}, kdy se příslušné redukční píky nacházely v rozmezí $E_P = -0{,}5$ až $-1{,}2$ V; vesměs v pufrovaných roztocích a směsných elektrolytech.

Organické sloučeniny, léčiva a biologicky aktivní látky. Testované substance (např. nitro- a dinitrofenoly, herbicid *Bromfenoxim*, léčivo *Thiamethoxam,* fragmenty DNA) byly na bismutu podrobeny redukci v dosažitelném oboru potenciálů, obvykle mezi –0,5 až –1,0 V *vs.* Ag/AgCl.

6.3 Aplikace bismutových elektrod ve faktech a číslech

U každého nově zaváděného typu elektrody či sensoru zajímají běžného uživatele nejen jeho přednosti a základní elektroanalytické charakteristiky, ale i to, zda je dostupný, jak se používá a k čemu všemu se hodí. V tomto smyslu mají BiFE a BiE velmi slibné vyhlídky. Jejich **příprava je jednoduchá, levná** a lze při ní plně využít stávajícího zázemí, již existujících nosné elektrody a dostupnou instrumentaci nevyjímaje. Vlastní experimenty pak v mnohém **připomínají měření se zavedenými rtuťovými elektrodami**, včetně řady triků z rutinní analýzy, přičemž řadu metod přede-

psaných pro MFE a HMDE lze dobře **adaptovat** i pro měření s BiFE popř. BiE. V této souvislosti jsou však ještě rezervy – zejména dosud neuspokojivé využití bismutových elektrod v analýze organických sloučenin, farmaceutik a biologicky aktivních látek.

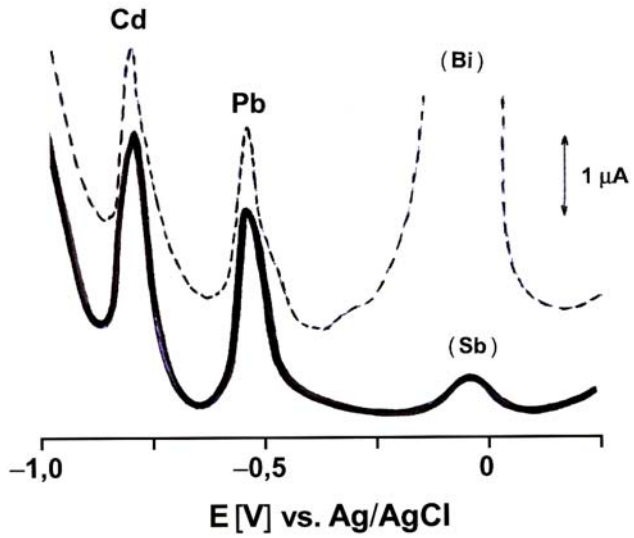
Vzhledem k tomu, že je momentálně k dispozici **aktuální referát** (cit. [5]) o elektroanalýze s bismutovými elektrodami, který přehlednou formou – a navíc v češtině – mapuje všechny práce publikované v období 2000-2005 a konkrétní aplikace představuje v podobě podrobných tabulek, závěrečné řádky přinášejí jen ilustrativní výběr faktů a čísel, která reprezentují počet prací zveřejněných na dané téma, popř. orientační procentické zastoupení.

- **Zastoupení hlavních typů bismutových elektrod:** BiF-GCE (> 50), BiF-CPE (20), BiF-SPE (5) BiF-μE (5), BiBE (5), Bi-CPE (5), Bi_2O_3-CPE/SPE (3).
- **Používané techniky a měřící režimy:** SWASV (40), DPASV (10), SWAdSV (20), DPAdSV (5), DPCtSV (5), CCSA (5), PSA (3), HA (2), FIA / SIA (2).
- **Užívané základní elektrolyty a nosná média**: octanový pufr (> 50); amonný pufr (15); zředěné roztoky minerálních kyselin (10); roztoky solí, vč. mírně okyselených směsí (10), borátové a fosfátové pufry (3), roztoky hydroxidů (3).
- **Analyzované anorganické ionty a sloučeniny**: Cd^{2+} (> 50), Pb^{2+} (> 50), Zn^{2+} (20), Co^{2+} (15), Ni^{2+} (10), Mn^{2+} (5), In^{3+} (3), Tl^{+} (2), Cu^{2+} (2), $Sn^{II / IV}$ (3), Sb^{III} (2), $Mo^{V / VI}$ (2), U^{IV-VI} (2), $Fe^{II / III}$ (2), $Cr^{III / VI}$ (2), Al^{III} (1), Ti^{IV} (1) a V^{V} (1).
- **Analyzované vzorky**: modelové roztoky (> 50), pitná a minerální voda (20), odpadní vody (5), říční voda (5), mořská voda (5), půdní extrakty (4), stolní vína (3), ovocné a zeleninové šťávy (2), rudy a minerály (2), kovy a slitiny (2), rostliny a plody (1), moč a krev (2), lidské vlasy (1), mineralizovaná surová ropa (1).
- **Nejnižší dosažené meze detekce**: 0,07 μg l^{-1} (Co); 0,1 μg l^{-1} (Cd,Pb); 0,2 μg l^{-1} (Ni, Mo,Cr); 0,3 μg l^{-1} (U); 0,5 μg l^{-1} (V); > 1 μg l^{-1} (Zn, Mn, In, Tl, Sn, Sb, Al, Ti).

Význam zkratek (v textu dosud nepoužitých): SPE - z angl. *screen-printed electrode*; SWV - square-wave voltametrie; Ct - katalytický; HA - hydrodynamická amperometrie; CCSA - rozpouštěcí analýza s konstantním proudem; PSA - potenciometrická rozpouštěcí analýza (s chemickou oxidací); FIA/SIA - injekční, popř. sekvenční průtoková analýza.

6.4 Možnosti oboru a výhledy do budoucna

Dosavadní aktivity na poli elektroanalýzy s BiFE a BiE jsou natolik různorodé a inspirativní, že vedle dalšího rozšiřování znalostí o jednotlivých typech elektrod či stávajícího spektra metod praktické analýzy, lze očekávat i nejedno překvapení. Názornou ukázkou takového objevu může být např. obrázek se záznamem úvodního testování tzv. antimonové filmové elektrody (SbFE).



Obr. 6.3: ***Zajímavou konkurencí pro bismutové filmové elektrody mohou být substráty s filmem antimonu, které při měřeních v režimu ASV a v prostředí zředěné HCl fungují možná ještě lépe*** *[převzato z archívu autora]*

SbFE: ——, BiFE: ------- ; SWASV; 0,01M-HCl (pH 2); režim i*n situ* (1 mg l^{-1} Sb^{III}); c(Cd,Pb) = 50 μg l^{-1}.

Odhlédneme-li od tohoto zatím spíše kuriózního příkladu analogie BiFE a SbFE a přičteme-li k úvahám o budoucím směrování [2-5] všechny výsledky a zkušenosti předchozích let plus samotný impuls ke vzniku bismutových elektrod – náhradu rtuti za méně toxický materiál –, lze na závěr konstatovat, že se tu rýsuje zcela nová odnož aplikované elektrochemie: jakási „Elektroanalýza s detekčními systémy šetrnými k životnímu prostředí“.

6.5 Literatura

V předchozím textu bylo citováno pět prací: vedle úvodního sdělení z roku 2000 čtveřice dosud publikovaných referátů, jež shrnují problematiku elektroanalýzy s bismutovými elektrodami a které lze čtenáři doporučit k dalšímu studiu:

1. Wang J., Lu J.-M., Hočevar S. B., Farias P. A. M., Ogorevc B.: *Bismuth-Coated Carbon Electrodes for Anodic Stripping Voltammetry*. Anal. Chem. **72** (2000) 3218-3222.
2. Vytřas K., Švancara I., Metelka R.: *Bismutové elektrody v elektrochemické rozpouštěcí analýze*, In: *Monitorování cizorodých látek v životním prostředí – IV* (Vytřas K., Kellner J., Fischer J., ed.), str. 159-170, Univerzita Pardubice, Pardubice (2002). ISBN 80-7194-496-3.
3. Economou A.: *Bismuth-Film Electrodes. Recent Developments and Potentialities for Electroanalysis.* TRAC– Trends Anal. Chem. **24** (2005) 334-340.
4. Wang J.: *Stripping Analysis at Bismuth Electrodes. A Review*. Electroanalysis **17** (2005) 1341-1346.
5. Švancara I., Vytřas K.: *Elektroanalýza s bismutovými elektrodami*. Chem. Listy **100** (2006) 90-113.

7. ELEKTROCHEMICKÉ BIOSENZORY

Ing. Adriana Ferancová, PhD., prof. Ing. Ján Labuda, DrSc.
Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita v Bratislave, Radlinského 9, 812 37 Bratislava
adriana.ferancova@stuba.sk, jan.labuda@stuba.sk

7.1 Čo sú biosenzory

7.1.1 Základné pojmy a definície

Elektrochemické biosenzory kombinujú analytické výhody elektrochemických metód a špecificitu biologických rozlišujúcich procesov. Podľa definície IUPAC je biosenzor špecifický typ chemického senzora pozostávajúci z biologického rozlišujúceho prvku (biozložky, receptora) a fyzikálno-chemického prevodníka, na ktorom je biozložka pevne ukotvená - imobilizovaná. Biozložka je schopná rozlíšiť prítomnosť, aktivitu alebo koncentráciu špecifického chemického analytu v roztoku. Vznikajúci signál je úmerný koncentrácii analytu v skúšobnom roztoku a prevodník ho konvertuje na merateľný analytický signál.

Biosenzory možno klasifikovať podľa mechanizmu biorozlišujúceho procesu, podľa typu prevodníka, prípadne podľa kombinácie oboch. Môžeme potom hovoriť o enzýmových biosenzoroch, DNA biosenzoroch alebo imunosenzoroch, ďalej o biosenzoroch ampérometrických, potenciometrických či konduktometrických. Príkladom sú enzýmové ampérometrické biosenzory.

7.1.2 Biozložky

Biozložky sú kľúčom ku špecificite biosenzorov. Majú za úlohu vo vzorke rozlíšiť prípadne viazať analyt, ktorý nás zaujíma. Toto rozlíšenie môže byť založené buď na katalytickej (enzýmové, mikrobiálne, tkanivové biosenzory) alebo na nekatalytickej interakcii (imunosenzory, DNA biosenzory). Funkciu biozložky môže plniť pôvodný biologický materiál alebo materiál upravený či biomimetický.

7.1.2.1 Katalytické biozložky

Biosenzory obsahujúce katalytické biozložky sú kinetické zariadenia, ktoré merajú koncentráciu častíc tvoriacich sa alebo spotrebovávaných počas biokatalytickej reakcie. Možno teda zaznamenávať:

i) tvorbu produktu,

ii) úbytok reaktantu,

iii) inhibíciu reakcie.

Bežne sa používajú tri typy katalytických biozložiek:

1. enzýmy;
2. celé bunky (mikroorganizmy, ako baktérie, huby, eukaryotické bunky alebo kvasinky), bunkové organely alebo časti buniek (mitochondrie, bunkové steny);
3. tkanivá (rezy rastlinných alebo živočíšnych tkanív).

Všetky tieto typy biosenzorov sú založené na činnosti enzýmov, ktoré však obklopuje rôzne prostredie, z čoho vyplývajú aj rôzne výhody a nevýhody.

Enzýmy ako biozložky. Enzýmy sa vďaka svojim vlastnostiam veľmi často využívajú ako biozložky. Sú schopné špecifickej väzby a zároveň vykazujú katalytickú aktivitu. S výnimkou malej skupiny molekúl katalytických ribonukleových kyselín sú všetky enzýmy proteínovej povahy. Niektoré enzýmy vyžadujú pre svoju aktivitu len prítomnosť vlastných aminoskupín, kým iné potrebujú ďalšie chemické komponenty - kofaktory, ktorými môžu byť jednoduché anorganické ióny ako Fe^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+} alebo komplexnejšie organické či metaloorganické molekuly - koenzýmy.

Podľa typu chemickej reakcie sa v biosenzoroch využívajú redoxné enzýmy (oxidázy, dehydrogenázy a hydrolytické enzýmy). Základný mechanizmus reakcie katalyzovanej enzýmom je nasledovný:

$$S + E \leftrightarrows SE \rightarrow E + P$$

kde S = substrát, E = enzým, SE = komplex substrát - enzým, P = produkt. Napríklad:

$$\text{glukóza} + O_2 + \text{GOD} \leftrightarrows SE \rightarrow \text{kyselina glukónová} + H_2O_2$$

kde glukóza a O_2 sú substráty, glukózooxidáza (GOD) je enzým, kyselina glukónová a H_2O_2 sú produkty. Pre monitorovania tejto reakcie sa využíva niekoľko stratégií:

- monitorovanie úbytku jedného zo substrátov, napr. kyslíka
- monitorovanie prírastku jedného z produktov, napr. peroxidu vodíka
- sledovanie stavu redoxného centra enzýmu v prítomnosti substrátu pomocou imobilizovaného mediátora
- monitorovanie priameho elektrónového transportu medzi redoxným centrom enzýmu a prevodníkom.

Posledná možnosť prispieva k eliminácii závislosti odozvy na kosubstráte a eliminácii potenciálnych interferujúcich zložiek.

Katalytická aktivita enzýmu závisí od integrity jeho proteínovej časti - ak je denaturovaná, disociovaná alebo rozštiepená na aminokyseliny, katalytická aktivita je minimálna. Katalytickú aktivitu možno tiež meniť pomocou pH, iónovej sily, teploty alebo prítomnosti kofaktorov.

Ako už bolo spomenuté, enzýmy vykazujú vysokú špecificitu voči substrátu. Výhodou katalytickej aktivity je zvýšenie citlivosti a rýchla odozva. Nevýhodou je pomerne vysoká cena.

Často je už zdroj enzýmov drahý a procesy extrakcie, izolácie a čistenia enzýmu zo zdroja cenu ešte zvyšuje. Ďalšou nevýhodou je, že imobilizácia enzýmu na povrch prevodníka časo znižuje jeho aktivitu. Keďže izolované enzýmy nie sú vo svojom prirodzenom prostredí, časom sami strácajú aktivitu a skracujú tak životnosť enzýmového biosenzora.

Mikroorganizmy a tkanivá ako biozložky. Výhodou biosenzorov využívajúcich mikroorganizmy a rastlinné alebo živočíšne tkanivá ako biozložky je, že nie sú potrebné zdĺhavé procesy extrakcie a čistenia enzýmov a že tieto sú v spomenutých materiáloch prítomné v aktívnej forme. Tento fakt zároveň znižuje ich cenu.

Mikroorganizmy hrajú dôležitú úlohu v mnohých biotechnologických procesoch. Mnohé mikrobiálne biosenzory sa vyvinuli práve pre monitorovanie takýchto procesov. Mikroorganizmy dokážu pohlcovať organické zlúčeniny, čo vedie k zmene aktivity dýchania či produkcii elektroaktívnych metabolitov. Výhodou mikrobiálnych ako aj tkanivových biosenzorov je, že sú menej citlivé voči inhibícii zlúčeninami prítomnými vo vzorke, viac tolerujú kolísanie pH, teplotné výkyvy a vo všeobecnosti majú dlhšiu životnosť. Príčinou toho je skutočnosť, že enzýmy sú v nich prítomné vo svojom prirodzenom prostredí. Tieto zariadenia sú založené na kontakte elektródy a imobilizovaných živých buniek, ľahko sa regenerujú. Na druhej strane, na rozdiel od biosenzorov obsahujúcich izolované enzýmy, majú pomalú odozvu a nízku selektivitu, pretože zvyčajne obsahujú zmes rôznych enzýmov. Navyše, nevýhodou tkanivových biosenzorov je, že substrát môže difundovať cez tkanivový materiál, čím sa znižuje efekt enzýmu.

7.1.2.2 Nekatalytické biozložky (biokomplexačné, bioafinitné)

Biosenzory obsahujúce mekatalytické biozložky sú zariadenia, v ktorých receptorová molekula viaže molekuly analytu ireverzibilne, čo spôsobuje fyzikálnochemickú zmenu detegovateľnú prevodníkom. Ako receptorové molekuly môžno použiť:

i) protilátky,
ii) nukleové kyseliny,
iii) hormóny,
iv) biomimetické receptory.

Činnosť biosenzora je založená na interakcii analytu s imobilizovanými receptormi, ktoré ho zo vzorky vychytávajú teoreticky až do dosiahnutia rovnovážneho stavu. Príslušný signál sa monitoruje integrovaným detektorom alebo sa biokomplexačná reakcia monitoruje použitím komplementárnej biokatalytickej reakcie. Využíva sa niekoľko typov interakcií:

1. Interakcia protilátka–antigén: najčastejšie príklady biosenzorov využívajúcich biokomplexačné receptory sú tie, ktoré využívajú imunochemické reakcie, t.j. viazanie antígénu (Ag) na špecifické protilátky (Ab). Tvorba komplexu Ag-Ab sa deteguje za podmienok, pri ktorých sa minimalizujú nešpecifické interakcie.

2. Molekulové rozlíšenie pomocou nukleových kyselín: činnosť nukleových kyselín sa v mnohom podobá činnosti protilátok. V podstate ide o tri typy interakcií: hybridizačné, asociácia hostiteľ – hosť v prípade molekúl s malou molekulovou hmotnosťou a poškodenie DNA.

3. Receptor / antagonista / agonista: najčastejšie sú to iónové kanály, membránové receptory alebo proteíny. Viazanie analytu na imobilizovaný receptor sa monitoruje v podobe zmeny toku iónov cez iónový kanál.

4. Molekulové rozlíšenie pomocou biomimetických zložiek: do tejto skupiny biozložiek patria napr. polyméry s molekulovými odtlačkami (molecular imprinting polymers, MIP), ďalej syntetické oligonukleotidy – aptaméry. Nazývajú sa biomimetické, pretože napodobňujú činnosť biozložiek pochádzajúcich zo živej prírody.

Nevýhodou biosenzorov obsahujúcich nekatalytické biozložky je skutočnosť, že ich činnosť je vo väčšine prípadov založená na dosiahnutí rovnovážneho stavu. Mávajú preto užší lineárny operačný rozsah koncentrácií čo spôsobuje, že niekedy nie sú schopné kontinuálne monitorovať koncentráciu analytu.

Protilátky ako biozložky. Keď je biozložkou protilátka, hovoríme o imunosenzoroch. Protilátky sú proteíny, ktoré vykazujú vysoko špecifické väzbové schopnosti voči určitým štruktúram. Sú to komplexné biomolekuly pozostávajúce zo stoviek individuálnych aminokyselín usporiadaných do vysoko organizovanej sekvencie. Organizmus produkuje protilátky (antibodies, Ab) proti špecifickým látkam – antigénom (Ag), ktoré organizmus ohrozujú. Antigény s protilátkami interagujú prostredníctvom tzv. determinantov, čo sú skupiny atómov na povrchu antigénu, ktoré sa špecificky viažu na receptory protilátok. Činnosť biosenzora obsahujúceho protilátky je založená na vzniku biošpecifickej väzby medzi väzbovými miestami protilátky a determinantnými skupinami antigénu za vzniku protilátkovo-antigénových komplexov – imunokomplexov. Tento proces možno prirovnať k činnosti zámku, ktorý možno otvoriť len jedným typom kľúča a vo všeobecnosti ho možno znázorniť reakciou

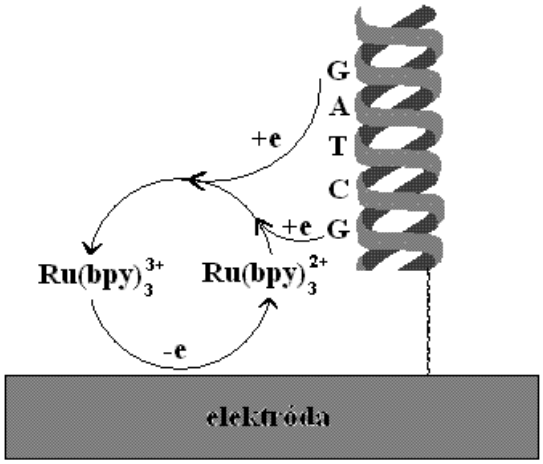
$$Ab + Ag \leftrightarrows Ab{\cdot}Ag$$

Výhodou imunosenzorov je ich vysoká špecifickosť, pričom však každé stanovenie antigénu vyžaduje prípravu špecifickej protilátky, jej izoláciu a obyčajne aj čistenie. Ďalšou výhodou je pevná väzba medzi antigénom a protilátkou. Z toho vyplývajúca nevýhoda je náročná regenerácia imobilizovaného biomateriálu. Citlivosť imunosenzorov možno zvýšiť „dodaním“ katalytickej aktivity, a to pomocou enzýmových značiek.

Nukleové kyseliny ako biozložky. Nukleové kyseliny, vďaka svojej funkcii niesť genetické informácie, sú jedny z najdôležitejších biomolekúl. Vrstva DNA alebo RNA v kombinácii s fyzikálnym (elektrochemickým) prevodníkom predstavuje typ afinitných biosenzorov, z ktorých

hlavne hybridizačné DNA biosenzory sú intenzívne študované a majú široké využitie napr. pri detekcii bakteriálnej kontaminácie potravín, životného prostredia ako aj pri diagnostike ľudských chorôb súvisiacich s genetickými mutáciami alebo patogénnymi organizmami. Činnosť DNA biosenzorov je založená na sledovaní špecifických interakcií, ako sú DNA hybridizácia, asociačné interakcie s látkami s malou molekulovou hmotnosťou (liečivá, rizikové chemické látky) a nakoniec je to štruktúrne poškodenie DNA. Biosenzory s imobilizovanou jednovláknovou DNA sú vhodné pre detekciu špecifickej komplementárnej sekvencie a hybridizačných procesov. Komplementarita párovania báz adenín:tymín (A:T) a guanín:cytozín (G:C) tvorí základ špecificity biorozlíšenia v hybridizačných biosenzoroch, ktoré sa označujú ako genosenzory.

Pre sledovanie zmien štruktúry DNA, jej poškodenia či interakcie s inými molekulami možno využiť niekoľko druhov elektrochemických signálov. Zo zložiek DNA len bázy podliehajú redoxným procesom. Ich oxidáciu možno detegovať na rôznych kovových či uhlíkových elektródach. Tento spôsob sa síce vyznačuje vysokou citlivosťou, vyžaduje však vysoké hodnoty potenciálu. Iný spôsob je oxidovať cieľovú DNA nepriamo pomocou elektrochemického katalyzátora. Najčastejšie sa využívajú komplexy Ru(II) a Os(II) pre elektrochemickú oxidáciu guanínu (obr. 7.1).

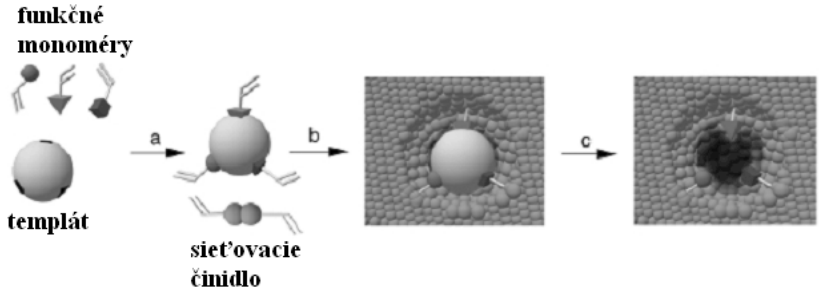


Obr. 7.1: Elektrochemická oxidácia guanínu DNA prostredníctvom komplexu Ru(II)

Široko sa využívajú tiež elektrochemické väzbové indikátory DNA jako komplexy Co(III) s aromatickými ligandami, metylénová modrá a pod. Nepriamym redoxným indikátorom DNA môžu byť ióny vo fáze roztoku, napr. hexakyanoželezitan. Využívajú sa tiež impedimetrické merania.

Polyméry s molekulovými odtlačkami ako biozložky. Polyméry s molekulovými odtlačkami (molecular imprinted polymers, MIP) sú syntetické polyméry s dobre definovanými povrchovými kavitami (imprints) vytvorenými templátovou molekulou (templátom). Technológia prípravy MIP

spočíva v polymerizácii templátovej molekuly, ktorá je rovnaká alebo veľmi podobná analytu, v prítomnosti monomérov s funkčnými skupinami a sieťovacieho činidla (obr. 7.2). Z hotového polyméru sa potom templát vymyje vhodným rozpúšťadlom, čím vznikne kavita. MIP rozlišujú templát v od podobných molekúl v roztoku na základe tvaru molekuly a väzbových skupín na povrchu kavity. Sú to umelé rozlišujúce materiály schopné napodobniť molekulové rozlíšenie prírodných materiálov, napr. protilátka - antigén. Ich väzbové vlastnosti sú porovnateľné s vlastnosťami prírodných receptorov, navyše sú odolné voči agresívnejším podmienkam, ako je vyššia teplota, tlak, extrémne pH alebo prítomnosť organických rozpúšťadiel. Tieto materiály sú tiež lacnejšie, možno riadiť ich špecificitu, stabilitu a ponúkajú možnosť masovej prípravy.



Obr. 7.2: ***Príprava MIP: templát vytvorí komplex s funkčnými monomérmi (a), prebehne polymerizácia v prítomnosti sieťovacieho činidla (b), templát sa z polyméru vymyje vhodným rozpúšťadlom (c)***

7.1.3 Prevodníky

Biosenzory od počiatku ich vývoja na začiatku 60-tych rokov minulého storočia najčastejšie využívajú elektrochemické prevodníky. Používajú sa však aj rôzne iné prevodníky, využívajúce optické javy, meranie zmeny hmotnosti či tepelný efekt reakcie.

7.1.3.1 Elektrochemické prevodníky

Elektrochemické biosenzory sú založené na spotrebe alebo produkcii elektroaktívnych častíc počas interakcie biozložky a substrátu. Pri konštrukcii biosenzorov sa využívajú najčastejšie, pretože sa vyznačujú rýchou odozvou, jednoduchosťou a v porovnaní s optickými, kalorimetrickými či piezoelektrickými prevodníkmi sú lacné. Ich nevýhodou je možnosť znečistenia povrchu elektródy interferujúcimi látkami, čo však vo väčšine prípadov možno obísť napr. použitím membrány, ktorá zabráni prístupu nežiadúcich látok k povrchu biosenzora.

Potenciometrické prevodníky. Potenciometrické merania sledujú zmenu potenciálu indikačnej voči referenčnej elektróde alebo medzi dvoma elektródami oddelenými premselektívnou membránou v momente, keď je prúd medzi nimi zanedbateľný. Najčastejšie sa používajú pH elektródy, iónovo selektívne elektródy citlivé na niektoré ióny (F^-, I^-, CN^-, Na^+, K^+, Ca^+, NH_4^+) alebo plyny (CO_2, NH_3). Zmena potenciálu je úmerná logaritmu aktivity (koncentrácie) stanovovanej látky.

Voltampérometrické a ampérometrické prevodníky. Pri voltampérometrických prevodníkoch sa aplikuje rastúci (klesajúci) potenciál počas oxidácie (redukcie) sledovanej látky a meria sa prúd úmerný koncentrácii stanovovanej látky. Obyčajne sa vyžaduje trojelektródový systém pozostávajúci z pracovnej, referenčnej a inertnej pomocnej elektródy. Ak je známy potenciál oxidácie (redukcie) indikátorovej / stanovovanej látky, môže sa merať hodnota prúdu pri tejto konkrétnej hodnote potenciálu a vtedy hovoríme o **ampérometrických prevodníkoch**. V prípade nízkych prúdov (10^{-9} až 10^{-6} A) možno použiť dvojelektródový systém, kde referenčná elektróda slúži zároveň ako pomocná elektróda. Meraný prúd je úmerný koncentrácii elektroaktívnych častíc v roztoku, ich prírastku alebo úbytku. Ampérometrické prevodníky sa najčastejšie využívajú v prípade enzýmových biosenzorov. Najjednoduchším prípadom ampérometrického prevodníka je Clarkova kyslíková elektróda, ktorej signál závisí od koncentrácie kyslíka v roztoku a ktorá sa použila pri konštrukcii prvého enzýmového biosenzora pre stanovenie glukózy (1962). Pri redoxných enzýmoch reakcii môžeme použiť vhodný redoxný mediátor – prenášač elektrónov. Výhodou tohto systému je, že sa eliminuje potreba merania koncentrácie kyslíka, minimalizuje sa vplyv interferujúcich látok, možno použiť nižší potenciál a zlepší sa linearita a citlivosť stanovenia.

Konduktometrické prevodníky. Konduktometrické prevodníky zaznamenávajú zmeny elektrickej vodivosti, ktoré sú spôsobené biochemickou reakciou biozložky a analytu. Konduktometrické metódy sú neselektívne, založené na biochemickej tvorbe látok iónovej povahy (napr. pri hydrolýze močoviny). Určitú selektivitu možno doiahnuť len použitím vhodnej modifikácie povrchu prevodníka. Výhodou týchto prevodníkov je pomerne nízka cena, pretože nie sú potrebné referenčné elektródy. Stanovenie je rýchle a veľmi jednoduché.

7.1.3.2 Neelektrochemické prevodníky

Optické prevodníky. Optické prevodníky využívajú techniky založené ma meraní absorpcie, bio/chemiluminescencie, fluorescencie, odrazu a rozptylu svetla, indexu lomu a pod. Optické prevodníky sa realizujú imobilizáciou selektívnej biozložky na jednom konci optického vlákna a excitačným a detekčným komponentom na druhom konci. Bežná je tiež imobilizácia biozložky na povrchu optického vlákna. Zmena intenzity absorbovaného alebo emitovaného žiarenia závisí od množstva analytu vo vzorke.

Akustické / piezoelektrické prevodníky. Najnovšie typy prevodníkov predstavujú piezoelektrické kryštály. Vyznačujú sa vysokou citlivosťou a sú vhodné na detekciu malých zmien hmotnosti. Piezoelektrický kryštál osciluje v elektrickom poli špecifickej frekvencie. Rezonančná frekvencia kryštálu závisí od frekvencie aplikovaného elektrického poľa ako aj od hmotnosti kryštálu. Naviazaním molekuly analytu na biozložku imobilizovanú na povrchu piezoelektrického kryštálu sa zmení (stúpne) hmotnosť kryštálu, následne klesne jeho rezonančná frekvencia a túto zmenu možno použiť pre stanovenie množstva analytu viazaného biozložkou.

Termické prevodníky. Pri všetkých chemických a biochemických procesoch dochádza k spotrebe alebo uvoľňovaniu tepla. Teplo uvoľnené pri enzymatickej reakcii sa meria pomocou citlivého termistora. Termické prevodníky s viacerými enzýmovými zónami v miniatúrnom usporiadaní umožňujú sledovať aj viac analytov bez ohľadu na ich redoxné či optické vlastnosti.

7.1.4 Imobilizácia biozložky

Aby sa zabezpečila správna funkcia biosenzora, je potrebné biozložku imobilizovať na povrch prevodníka. K tomuto účelu sa využíva viacero metód imobilizácie (obr. 3).

Adsorpcia. Je to najjednoduchšia metóda imobilizácie a vyžaduje minimálnu prípravu. Mnohé látky, napríklad enzýmy, sú schopné absorbovať sa na povrch prevodníka. Pri tejto metóde nie sú potrebné žiadne ďalšie reagenty ani čistiace kroky. Adsorpcia môže byť buď fyzikálna alebo chemická. Fyzikálna adsorpcia je obyčajne slabšia a vyskytujú sa pri nej van der Waalsove sily, zriedkavo spolu s vodíkovými väzbami či nábojovými interakciami. Chemická adsorpcia je silnejšia a vznikajú pri nej kovalentné väzby. Nevýhodou tejto metódy je krátka životnosť a citlivosť adsorbovaného materiálu na zmeny pH, teploty či iónovej sily.

Mikroenkapsulácia. Pri tejto metóde sa využíva zachytenie biozložky v inertnej membráne na povrchu prevodníka. Ako membrány sa môžu použiť napríklad:

- acetylcelulózu, ktorá zabraňuje prístupu proteínov a spomaľuje transport interferujúcich zložiek;
- polykarbonáty - syntetické materiály, ktoré nie sú permselektívne;
- kolagén - prírodný proteín;
- polytetrafluoroetylén (Teflon) - syntetický polymér, ktorý je permselektávny voči niektorým plynom ako napr. kyslík;
- Nafion a polyuretán.

Mikroenkapsulácia má niekoľko výhod:

- tesné spojenie biozložky a prevodníka;
- možnosť prispôsobenia, spoľahlivosť;
- odolnosť voči zmenám pH, teploty, iónovej sily, potenciálu, koncentrácie substrátu;
- eliminuje možnosť kontaminácie a biodegradácie.

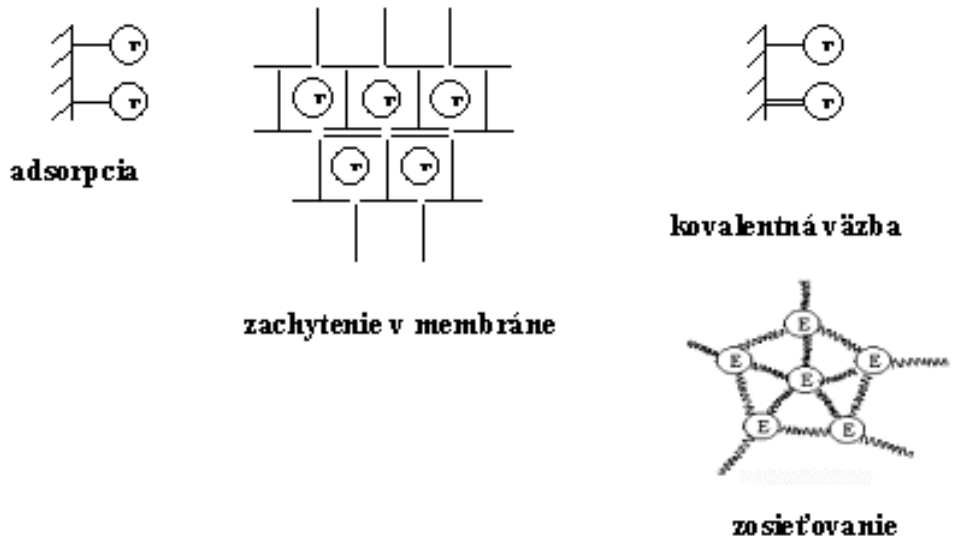
Zachytenie v polymérnych géloch. Biozložka sa zmieša s monomérom, ktorý sa potom polymerizuje za vzniku gélu obsahujúceho biozložku. Iniciácia polymerizácie γ-žiarením súčesne zabezpečuje sterilitu senzora. Iným spôsobom je nanášanie roztoku biozložky a polyméru. Nevýhodou tejto polymerizácie je, že štruktúra polyméru môže brániť difúzii substrátu a spomaľovať tak reakciu. Môže tiež dochádzať k znižovaniu bioaktivity biozložky. Najčastejšie sa používa polyakrylamidový gél, v prípade elektrochemických biosenzorov je to polypyrol.

Zosieťovanie. Biomateriál sa chemicky viaže na pevný nosič alebo iný materiál, napr. gél. Ako sieťovacie činidlo sa často používa glutaraldehyd. Rovnako ako v predchádzajúcom prípade zosieťovaný materiál môže brániť difúzii substrátu a môže tiež dôjsť k poškodeniu biozložky a zníženiu jej bioaktivity.

Kovalentná väzba. Niektoré funkčné skupiny, ktoré nie sú nevyhnutné pre aktivitu biozložky, sa môžu kovalentne viazať na nosič (prevodník alebo membránu). Táto metóda využíva nukleofilné skupiny ako $–NH_2$, $–CO_2H$, –OH, $–C_6H_4OH$, –SH alebo imidazol. Reakcie sa musia uskutočňovať za miernych podmienok: nízka teplota, iónová sila, fyziologické pH. Výhodou je pevná zäzba biozložky.

Vo všeobecnosti je životnosť biosenzora ovplyvnená správnou imobilizáciou. Typické doby životnosti sú nasledovné:

- adsorpcia – 1 deň;
- zachytenie v membráne – 1 týždeň;
- fyzikálne zachytenie – 3 až 4 týždne;
- kovalentné zachytenie – 4 až 14 mesiacov.



Obr. 7.3: Spôsoby imobilizácie biozložky

7.1.5 Ukazovateľe výkonnosti biosenzorov

Pre prípravu a použitie biosenzorov je nutné poznať ich charakteristické operačné parametre. Tieto totiž môžu poukazovať na rôzne obmedzenia, ale aj výhody použitia daného biosenzora. Medzi takéto parametre patria kalibračné charakteristiky, selektivita, rýchlosť odozvy, reprodukovateľnosť, stabilita a životnosť.

Biosenzor sa obyčajne kalibruje pomocou prídavkov štandardného roztoku. Kalibračná závislosť za zhotoví vynesením závislosti signálu odčítaného pre príslušný prídavok štandardného roztoku po dosiahnutí ustáleného stavu oproti koncentrácii príslušného štandardného roztoku. Z tejto

závislosti potom možno zistiť parametre ako citlivosť, lineárny koncentračný rozsah, medzu stanoviteľnosti. Pre elektrochemické biosenzory je dôležitý aj horný limit lineárneho koncentračného rozsahu, ktorý súvisí s biokatalytickými a biokomplexačnými vlastnosťami biozložky.

Selektivita biosenzora závisí od výberu biozložky ako aj od výberu prevodníka. Napríklad, mnohé enzýmy sú špecifické. Sú však aj také, ktoré sú vhodné pre stanovenie skupiny látok ako v prípade tyrozinázy, ktorá je špecifická pre fenoly. Je mnoho metód ako stanoviť selektivitu biosenzora. Najčastejšie sa využívajú dve: Prvá spočíva v meraní odozvy biosenzora na prídavok interferujúcej látky. Pre každú interferujúcu látku sa zmeria kalibračná závislosť a porovná sa s kalibračnou závislosťou pre analyt. Selektivita sa vyjadrí ako pomer výstupného signálu analytu samotného a samotnej interferujúcej látky rovnakej koncentrácie ako analyt. Pri druhej metóde sa interferujúce látky v predpokladanej koncentrácii pridajú k analytu, ktorý má približne polovičnú hodnotu očakávanej koncentrácie. Selektivita sa vyjadrí ako podiel kolísania odozvy biosenzora v percentách.

Mnohé analytické systémy vyžadujú istý čas na dosiahnutie ustáleného stavu. Pre biosenzory sa tento čas – doba odozvy – môže meniť od niekoľkých sekúnd po niekoľko minút.

Stabilitu biosenzora možno vyjadriť ako operačnú stabilitu a dlhodobú skladovaciu stabilitu. Pre zistenie operačnej stability biosenzora je dôležité otestovať vplyv operačných podmienok, napr. koncentráciu analytu, teploty, pH, zloženia tlmivého roztoku, prítomnosť organických rozpúšťadiel, vplyv matrice vzorky. Pre vyjadrenie dlhodobej stability, resp. životnosti, je dôležité poznať podmienky skladovania biosenzora (vlhkosť, zloženie atmosféry, príp. pH, zloženie tlmivého roztoku, prítomnosť aditív). V závislosti od spomenutých podmienok, typu biozložky a účelu biosenzora sa životnosť môže pohybovať od dní alebo týždňov po niekoľko mesiacov až rok.

7.2 Typy elektrochemických biosenzorov

7.2.1 Enzýmové biosenzory

Vo všeobecnosti enzýmové biosenzory možno rozdeliť na tri typy:

- biosenzory prvej generácie – založené na použití kyslíkovej elektródy;
- biosenzory druhej generácie – založené na použití redoxného mediátora;
- biosenzory tretej generácie – sú založené na kombinácii biozložky a redoxného mediátora do jedného tela.

Biosenzory prevej generácie

Pôvodný glukózový biosenzor využíval molekulový kyslík ako oxidačné činidlo:

$$\text{glukóza} \xrightarrow{\text{glukózooxidáza}} \text{kyselina glukónová} + H_2O_2$$

Meria sa úbytok koncentrácie kyslíka použitím Clarkovej kyslíkovej elektródy, pričom prúd je úmerný koncentrácii kyslíka vo vzorke. Glukózooxidáza je imobilizovaná v polyakrylamidovom géli na povrchu membrány permeabilnej pre plyny, ktorá pokrýva elektródu. Samotná elektróda pozostáva z platinovej katódy a striebornej anódy. Podobný princíp možno využiť aj pre mnohé iné enzýmové biosenzory.

Použitie tohto typu biosenzora však naráža na mnohé problémy. Je potrebné kontrolovať hladinu koncentrácie rozpusteného kyslíka a udržiavať ju konštantnú. V opačnom prípade odozva biosenzora na úbytok kyslíka nebude úmerná koncentrácii glukózy. Ďalší problém predstavuje pomerne vysoký potenciál potrebný pre redukciu kyslíka, –0,7 V, pri ktorom môže dochádzať k interferenciám. Jedným zo spôsobov, ako tento problém obísť, je merať oxidáciu H_2O_2:

$$H_2O_2 \longrightarrow 2\,H^+ + 2\,e^- + O_2$$

ku ktorej dochádza pri potenciáli +0,65 V. Pri tejto hodnote potenciálu sú významné vplyvy interferujúcich zložiek schopných oxidácie.

Biosenzory druhej generácie

Tieto biosenzory predstavujú spôsob ako sa vyhnúť použitiu kyslíka ako oxidačného činidla. Redoxné reakcie mediátorov – prenášačov elektrónov – sú reverzibilné, je možné pracovať pri vhodnejších (nižších) potenciáloch a koncentráciu mediátora možno jednoducho kontrolovať. Najčastejšie sa ako mediátory používajú katióny prechodných kovov a ich komplexy. Mnohé z nich obsahujú ióny železa a ich komplexy:

$$Fe(III) + e^- \rightleftharpoons Fe(II)$$

Voľné Fe(III) ióny nie sú vhodnými mediátormi, pretože podliehajú hydrolýze. Z komplexov železa sa najčastejšie využívajú hexakyanoželezitany $[Fe(CN)_6]^{3-}$ a ferocény.

Popis oxidácie glukózy v tomto prípade vyzerá nasledovne:

$$\text{glukóza} + GOD_{ox} \rightleftharpoons \text{glukónolaktón} + GOD_{red} + 2\,H^+$$

$$GOD_{red} + 2\,Fc^+ \rightleftharpoons GOD_{ox} + 2\,Fc$$

$$2\,Fc^+ + 2\,e^- \rightleftharpoons 2\,Fc$$

kde GOD je glukózooxidáza a Fc je ferocén.

Vhodný mediátor musí spĺňať niekoľko kritérií:

- musí rýchlo reagovať s enzýmom;
- jeho redoxný proces má byť reverzibilný;
- má byť nezávislý od pH;

- má byť stabilný v oxidovanej aj redukovanej forme;
- nemá reagovať s kyslíkom;
- nemá byť toxický.

Mediátor býva, rovnako ako biozložka, imobilizovaný na povrchu biosenzora. Najjednoduchšou metódou je príprava biosenzora na báze uhlíkovej pastovej elektródy, kde sa mediátor zmieša s uhlíkovou pastou, a potom sa na povrch adsorbuje alebo inak imobilizuje enzým.

Biosenzory tretej generácie

V tomto prípade sa mediátor využíva pre spojenie enzýmu s elektródou. Enzým nemožno redukovať (oxidovať) priamo na elektróde, pretože by dochádzalo k denaturácii jeho proteínovej časti čím by sa celý proces veľmi spomalil a bol by ireverzibilný. Jedným zo spôsobov je napr. modifikácia povrchu zlatej elektródy 4,4´-bypyridylom. Bipyridyl samotný nie je elektroaktívny, avšak môže slúžiť ako mediátor. Iný spôsob predstavujú organické soli, ako tetratiafulvalén, ktorý sa reverzibilne oxiduje a tetrakyanochinodimetán, ktorý sa podobne reverzibilne redukuje. Pár týchto molekúl vytvorí komplex schopný elektrónového prenosu. Tieto organické soli možno zakomponovať do materiálu elektródy vo forme kryštálov, lisovaných tabliet alebo zmiešaním s uhlíkovým práškom. Novšie imobilizačné techniky umožňujú imobilizovať enzým priamo na elektródu prostredníctvom *in situ* polymerizácie použitím redoxného polyméru.

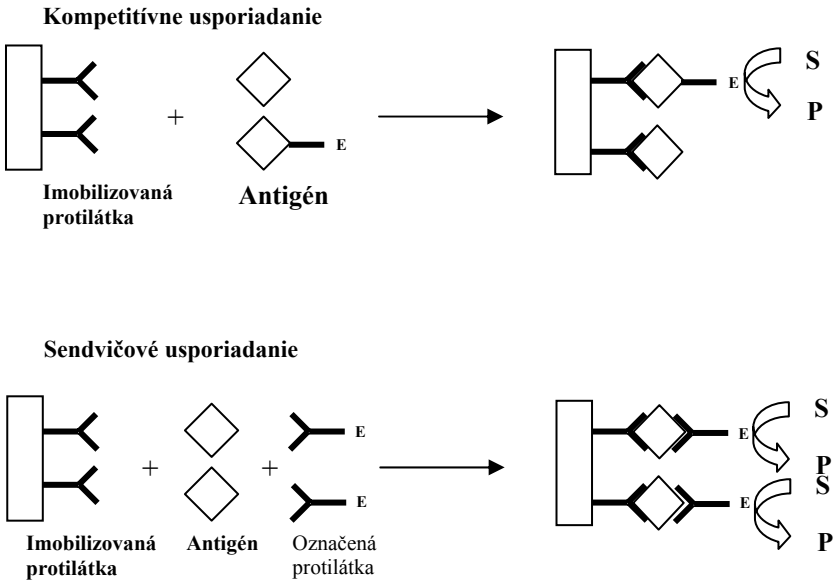
7.2.2 Imunosenzory

Elektrochemické imunosenzory kombinujú špecificitu imunochemickej reakcie s výhodami elektrochemického prevodníka. Sú založené na označení protilátky (alebo antigénu) enzýmom, ktorý generuje elektroaktívny produkt detegovateľný ampérometricky. Enzýmové imunosenzory sa môžu pripraviť v dvoch konfiguráciach: v kompetitívnom usporiadaní a v sendvičovom usporiadaní (obr. 7.4). V kompetitívnom usporiadaní antigén (analyt) vo vzorke „súťaží“ s enzýmom označeným antigénom o väzbové miesto protilátky imobilizovanej na ampérometrickom alebo potenciometrickom prevodníku. Po prebehnutí asociačnej reakcie sa senzor opláchne, aby sa odstránili nezreagované komponenty. Imunosenzor sa potom ponorí do roztoku obsahujúceho substrát pre enzým a deteguje sa produkt alebo reaktant biokatalytickej reakcie. Vďaka kompetitívnej povahe analýzy je meraný signál nepriamo úmerný koncentrácii analytu vo vzorke. Najčastejšie sa na označenie antigénu využívajú alkalická fosfatáza, peroxidáza alebo kataláza.

Sendvičové usporiadanie sa využíva pre väčšie antigény schopné viazať dve rôzne protilátky. Tieto imunosenzory využívajú protilátky viažuce analyt – antigén, ktorý sa potom ďalej viaže na druhú, enzýmom označenú protilátku. Po odstránení nešpecificky adsorbovaných značiek sa

imunosenzor ponorí do roztoku obsahujúceho substrát pre príslušný enzým a elektrochemicky sa monitoruje enzýmová reakcia. Signál je priamo úmerný koncentrácii analytu vo vzorke.

Iné typy imunosenzorov sú založené na imobilizácii antigénu na povrch imunosenzora, na označení antigénu alebo protilátky elektroaktívnou značkou (napr. ťažkým kovom) či na použití bezznačkových kapacitných meraní.



Obr. 7.4: Schéma činnosti imunosenzora v kompetitívnom a sendvičovom usporiadaní

7.2.3 DNA biosenzory

DNA biosenzory predstavujú relatívne nový typ afinitných biosenzorov. Ich činnosť spočíva v špecifických interakciách ako sú hybridizácia DNA, asociácie DNA s látkami s nízkou molekulovou hmotnosťou (liečivá, rizikové látky) a DNA poškodenie.

DNA hybridizačné biosenzory ponúkajú jednoduchý, rýchly a pomerne lacný spôsob ako získať informácie o špecifickej sekvencii DNA. Sú založené princípe párovania báz podľa Watsona a Cricka. Na povrch senzora sa imobilizuje relatívne krátka (20 – 40 báz) sekvencia jednovláknovej DNA (ssDNA), nazýva sa sonda. Táto sonda po hybridizácii na špecifické komplementárne miesto cieľovej DNA spôsobí zvýšenie elektrického signálu. Pre monitorovanie hybridizačného procesu možno použiť tzv. elektroaktívne indikátory. Tieto elektroaktívne látky majú vyššiu afinitu k výslednému duplexu zloženému zo sondy a cieľpvej DNA než k pôvodnej sonde. Ich asociácia s duplexom na povrchu biosenzora vedie k vzniku elektrochemického signálu. Jedným z takýchto indikátorov je komplex $[Co(phen)_3]^{3+}$. Pre dosiahnutie vysokej citlivosti a selektivity sú kľúčové hybridizačné podmienky (napr. iónová sila, teplota, čas).

Asociačné interakcie DNA spočívajú v troch typoch nekovalentných interakcií:

- interkalácia planárnej aromatickej molekuly medzi páry báz DNA;

- väzba do veľkého a malého žliabka dvojvláknovej štruktúry DNA;
- elektrostatické interakcie kladne nabitých hosťujúcich molekúl so záporne nabitými fosfátovými skupinami DNA.

Tieto typy interakcií sa môžu vzájomne kombinovať zmenou reakčných podmienok. Napríklad pri nízkej hodnote iónovej sily je v prípade interakcie dsDNA s kladne nabitými kovovými komplexami obsahujúcimi aromatické ligandy dominantná elektrostatická interakcia, zatiaľ čo pri vysokej hodnote iónovej sily je to interkalácia. Interkalácia je typická pre zlúčeniny s planárnou štruktúrou obsahujúce tri až štyri aromatické kruhy.

Asociačné interakcie DNA s elektroaktívnymi hosťujúcimi molekulami vedú k analyticky významnej zmene signálu, konkrétne k zvýšeniu prúdového signálu vďaka prekoncentrácii analytu. Interakcia s hosťujúcou molekulou môže tiež viesť k zmene elektródového procesu z difúziou riadeného na adsorpciou riadený proces. Pri skúmaní týchto interakcií sa zvyčajne stanovujú väzbové parametre, ako sú väzbové konštanty, veľkosť väzbového miesta a difúzne koeficienty pre voľnú a viazanú hosťujúcu molekulu. Zisťuje sa tiež vratnosť väzbového procesu.

Pri sledovaní malých molekúl viažúcich sa na DNA a hodnotení poškodenia DNA možno využiť elektrochemický signál samotnej DNA - konkrétne jej báz, guanínu a adenínu. Oxidačné signály guanínu a adenínu získané z jednovláknovej DNA sú vyššie než signály z dvojvláknovej DNA. Dôvodom je prístupnejší elektrónový prenos v prípade ssDNA. V dôsledku väzbových interakcií sa signál guanínu znižuje, čo tiež možno využiť pre analytické účely.

Detekčné princípy DNA biosenzorov

Stratégie detekcie asociačných interakcií a poškodenia DNA sú založené na týchto princípoch:

- elektroaktivita zlúčenín s nízkou molekulovou hmotnosťou viažúcich sa na DNA;
- redoxný marker DNA, ktorý „súťaží“ so zlúčeninami s nízkou molekulovou hmotnosťou pri väzbe na DNA;
- elektroaktivita samotnej DNA, konkrétne signály zvyškov báz;
- elektrokatalýza oxidácie guanínu pomocou solí ruténia, ktoré pracujú ako redoxné mediátory;
- redoxné indikátory vo fáze roztoku, napr. hexakyanokomplexy železa, ktoré podávajú informáciu o kvalite pokrytia elektródového povrchu.

Interakcie hostiteľ – hosť

Ako jedna z najdôležitejších biomolekúl je DNA vystavená interakciám s najrôznejšími molekulami. Výskum týchto interakcií nám môže pomôcť pochopiť molekulárne základy života, môže sa využiť v molekulovej diagnostike či pri vývoji liečiv. Na tento účel sa tradične využívajú hlavne fluorimetrické metódy. Tieto techniky sú síce vysoko citlivé, vyžadujú však excitáciu

laserom a spektroskopické zariadenie. Elektrochemické ponúkajú elegantnú, citlivú a pomerne lacnú alternatívu týchto metód.

Činnosť niektorých polutantov a protinádorových liečiv v živých organizmoch je tiež založená na ich interakcii s DNA. Elektrochemické správanie týchto látok v prítomnosti DNA v roztoku alebo na DNA modifikovanej elektróde môže pomôcť objasniť mechanizmus ich interakcie a zistiť, čo spôsobuje ich toxicitu, prípadne pomôcť pri navrhovaní nových liečiv. Navyše interakcie hostiteľ - hosť prebiehajúce na elektrochemických prevodníkoch, lepšie napodobňujú podmienky *in vivo*. Tieto interakcie možno tiež využiť pre bioanalytické účely, konkrétne pre rozlíšenie a monitorovanie dôležitých zlúčenín ako cieľových analytov. Pred samotným stanovením sa látky akumulujú vo vrstve DNA ako elektródového modifikátora.

Redoxné indikátory a katalyzátory DNA

Redoxné indikátory DNA sú elektrochemicky aktívne látky s nízkou molekulovou hmotnosťou, napr. komplexy kovov s aromatickými ligandami, ako komplex Co(III) s tris-(1,10-fenantrolínom) alebo tris-(2,2´-bipyridylom), organické farbivá ako metylénová modrá alebo antracyklínové antibiotiká ako je daunomycín. Používajú sa ako pre stanovenie množstva DNA, tak aj pre zistenie zmien v jej štruktúre. Môžu sa tiež využiť ako kompetitívne činidlá pri stanovení elektrochemicky inaktívnych látok. Na DNA modifikovanej elektróde by mal indikátor poskytovať dobre vyvinutý elektrochemický signál pri nízkych hodnotách potenciálu. Tento signál musí byť signifikantne vyšší než signál indikátora nešpecificky adsorbovaného na povrchu nemodifikovanej elektródy (obr. 7.5). Pre detekciu sa využívajú voltampérometrické metódy alebo chronopotenciometria pri konštantnom prúde.

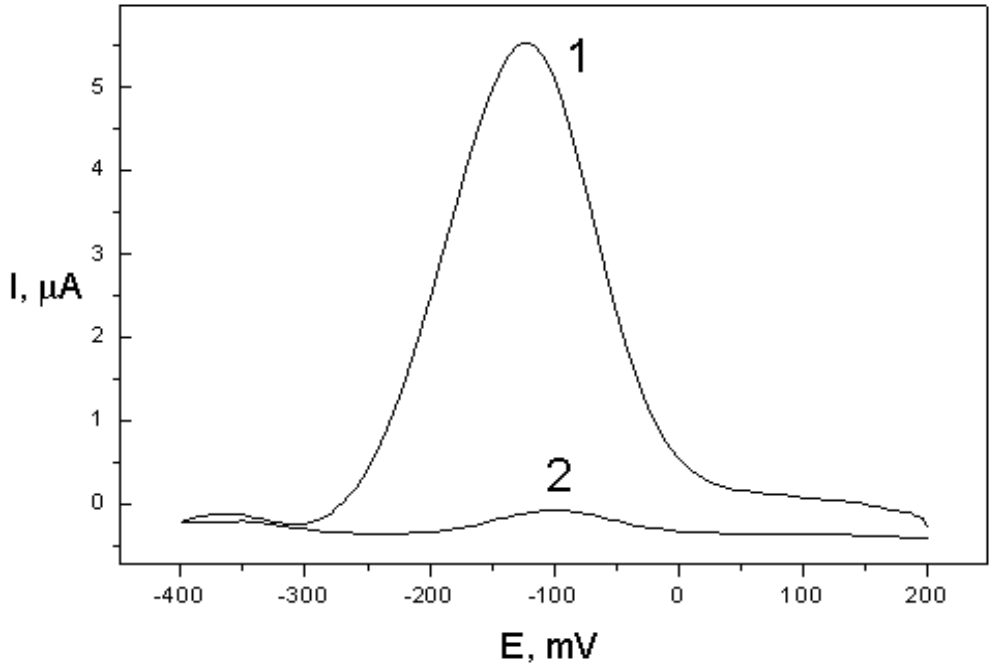
Použitie redoxných katalyzátorov DNA spočíva v ich reakcii s DNA bázami, najčastejšie guanínom. Redoxnými katalyzátormi môžu byť komplexy prechodných kovov, napr. $Ru(bpy)_3^{2+}$ (bpy = 2, 2´- bipyridyl). Komplex $Ru(bpy)_3^{2+}$ sa oxiduje na elektróde na $Ru(bpy)_3^{3+}$:

$$Ru(bpy)_3^{2+} \longrightarrow Ru(bpy)_3^{3+} + e^-$$

a následne reaguje s DNA, pričom vzniká guanínový radikál DNA($guanín_{ox}$):

$$Ru(bpy)_3^{3+} + DNA(guanín) \longrightarrow Ru(bpy)_3^{2+} + DNA(guanín_{ox}) + H^+$$

Elektrochemická recyklácia $Ru(bpy)_3^{2+}$ poskytuje zvýšený voltampérometrický signál oproti signálu samotného $Ru(bpy)_3^{2+}$ alebo samotného guanínu DNA. Prúdový signál je tým väčší, čím väčší je rozsah tejto reakcie.



Obr. 7.5: ***Signál elektrochemického indikátora $[Co(phen)_3]^{3+}$ získaný na DNA modifikovanej „screen-printed“ elektróde (1) a na nemodifikovanej „screen-printed“ elektróde (2)***

Poškodenie DNA

Štruktúrne poškodenie DNA môže viesť ku vzniku mutácií a škodlivých transformácií, ktoré môžu spôsobiť vznik chorôb ako je rakovina či cystická fibróza. Preto je potrebné detegovať poškodenie DNA vyvolané vplyvom mutagénov, karcinogénov, priemyselných polutantov a ich metabolicky aktivovaných produktov. Chemické zlúčeniny (reaktívne zlúčeniny kyslíka, chemické nukleázy, karcinogény, protinádorové liečivá) ako aj ionizujúce žiarenie môžu poškodiť DNA rôznymi spôsobmi (napr. alkylácia, oxidácia, zlomy vlákien), pričom sa mení elektroaktivita DNA a iné detekčné signály. DNA biosenzory možno výhodne použiť pri sledovaní týchto zmien. Z báz DNA sa najľahšie oxiduje guanín, kde hlavným produktom reakcie je 8-oxoguanozín - vysoko mutagénny a dôležitý ukazovateľ oxidačného poškodenia DNA. Pre jeho sledovanie možno využiť napr. komplex $[Os(bpy)_3]^{3+}$, ktorý selektívne oxiduje 8-oxoguanín, ale nie guanín.

Oxidačný stres v ľudskom organizme zahŕňa oxidáciu biomolekúl reaktívnymi zlúčeninami kyslíka (ROS), menovite voľnými radikálmi, napr. hydroxylovými. Odhaduje sa, že jedna ľudská bunka je vystavená asi 10^5 napadnutiam hydroxylovými radikálmi a inými podobnými látkami za deň. Permanentná modifikácia genetického materiálu vynikajúca z oxidačného poškodenia je prvým krokom ku vzniku rakoviny, mutácií a stárnutiu. Vplyv voľných radikálov na DNA možno sledovať aj pomocou DNA biosenzora. Reaktívne prostredie v bunke simuluje tzv. štiepna zmes,

ktorá obsahuje chemikálie produkujúce voľné radikály. Najbežnejšími zložkami štiepnej zmesi sú kyselina askorbová, peroxid vodíka a katión kovu (Fe^{2+}, Cu^{2+}). Príslušné reakcie sú známe ako Fentonova reakcia a voľné hydroxylové radikály vznikajú pri reakcii iónu kovu s peroxidom vodíka:

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + {}^{\bullet}OH + OH^-$$

Pri inkubácii DNA biosenzora v štiepnej zmesi je DNA vystavená vplyvu uvedených voľných radikálov a jej štruktúrne poškodenie (degradáciu) možno detegovať vyššie spomenutými metódami (pomocou redoxného indikátora DNA alebo sledovaním signálu guanínu).

Na druhej strane možno elektrochemické DNA biosenzory využiť aj na hodnotenie antioxidantov. V ich prítomnosti v štiepnej zmesi sú schopné „vychytávať" ROS a v závislosti od ich antioxidačnej aktivity viac či menej chrániť DNA pred poškodením, čo sa prejaví na veľkosti jej elektrochemického signálu. Takto sa hodnotila napr. antioxidačná aktivita čajových extraktov (obr. 7.6), ktoré sú známe vysokým obsahom antioxidantov. Extrakty čajov sa pripravili vo vriacej a 70 ºC vode. DNA biosenzor sa inkuboval 5 min v štiepnej zmesi obsahujúcej $CuSO_4$, kyselinu askorbovú, H_2O_2 a 50 % extrakt čaju vo fosforečnanovom tlmivom roztoku. Poškodenie DNA sa hodnotilo pomocou $[Co(phen)_3]^{3+}$ ako podiel DNA (I/I_0), ktorý sa zachová po inkubácii biosenzora v prítomnosti extraktu čaju.

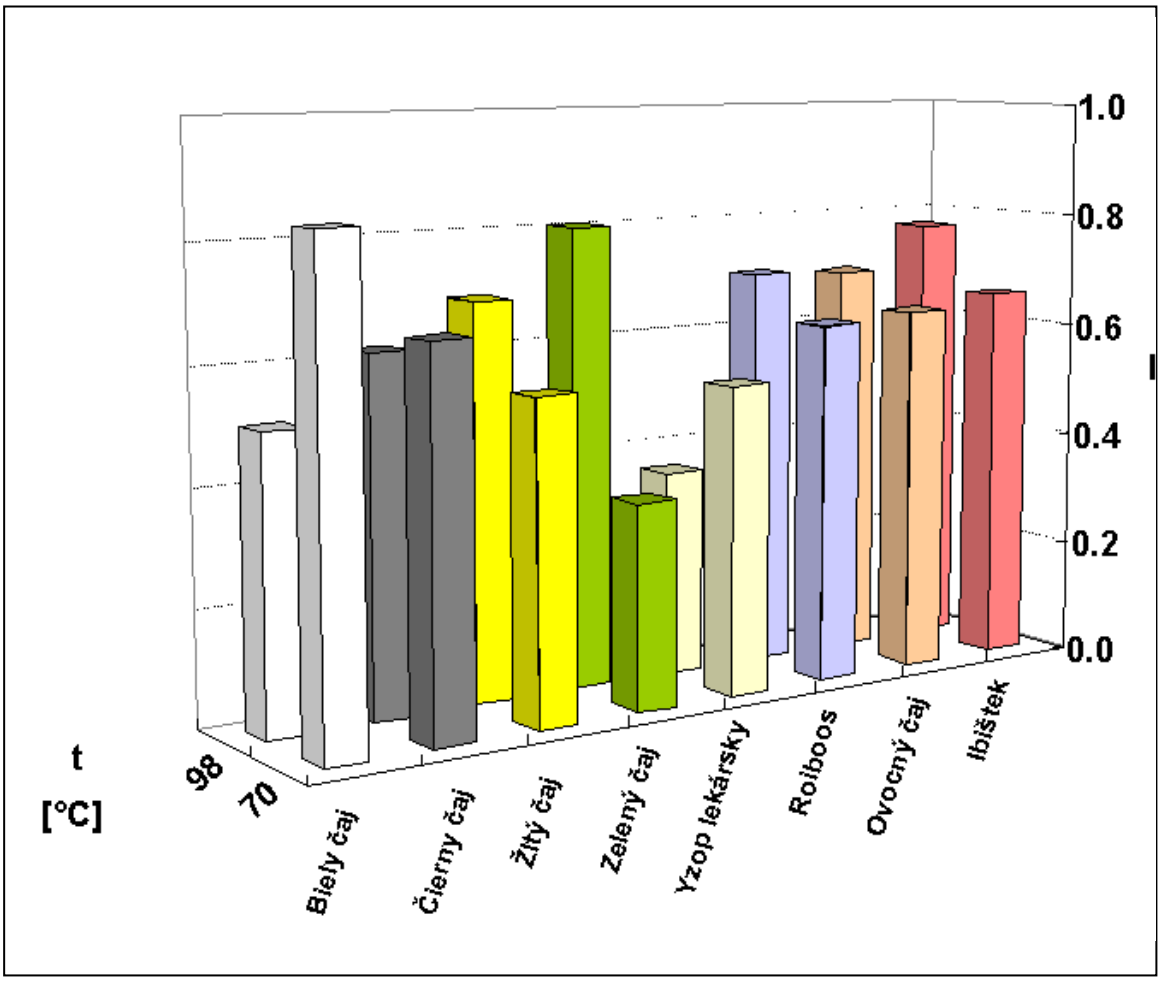
7.2.4 Biosenzory obsahujúce polyméry s molekulovými odtlačkami

MIP sa stále častejšie využívajú v analytickej chémii. Ponúkajú tvorbu receptorov s presne definovanou veľkosťou a tvarom. Sú lacné, na rozdiel od prírodných materiálov majú dobrú chemickú, mechanickú a termálnu odolnosť. Dodnes sa však prevažne využívajú v separačných metódach.

Imobilizácia MIP na povrchu elektrochemického prevodníka

Pri príprave elektród modifikovaných s MIP sa využíva niekoľko spôsobov:

- Polymerizácia *in situ* – je najjednoduchší a najlepší spôsob imobilizácie. Spočíva v elektrosyntéze MIP priamo na povrchu senzora. Výhodou je možnosť integrácie kroku imobilizácie do procesu masovej produkcie.
- Pokrytie povrchu – obyčajne sa používa pre optické prevodníky, ale možno ju využiť aj pri príprave elektrochemických biosenzorov. Umožňuje vytvoriť na povrchu tenký film MIP predtým rozpusteného vo vhodnom rozpúšťadle. Vrstva MIP sa môže na povrch senzora naniesť aj manuálne.



Obr. 7.6: ***Antioxidačná aktivita extraktov čajovpripravených pri rôznej teplote, hodnotená prostredníctvom relatívneho prúdu $[Co(phen)_3]^{3+}$ na DNA modifikovanej „screen-printed“ elektróde***

- Zachytenie MIP – realizuje sa zachytením v géloch alebo membránach. Táto metóda sa často využíva pri modifikácii elektrochemických prevodníkov. Môže sa tiež použiť inertný polymér ako PVC.
- Kompozity MIP – spočíva v zmiešaní MIP s materiálom elektródy, najčastejšie grafitom. Výhodou je, že väzbové miesta a vodivé častice sú v tesnom kontakte. Rýchla a jednoduchá regenerácia mechanickým očistením povrchu elektródy je tiež veľkou výhodou.

Potenciometrické a iónovoselektívne elektródy (ISE) tiež môžu slúžiť ako prevodníky MIP biosenzorov. Tento prístup vyžaduje imobilizáciu MIP v selektívnej membráne ISE. Výhodou je, že v prípade potenciometrických senzorov nie je nutné vymývať templát, čím sa zabráni strate väzbových miest MIP.

Detekčné schémy

Ako pri iných typoch biosenzorov, aj v prípade MIP biosenzorov možno využiť konduktometrikú detekciu signálu. Konduktometrické prevodníky sa využívajú spolu s permselektívnymi membránami. Konduktometrická cela môže pozostávať z dvoch platinových elektród oddelených membránou MIP. Zaznamenáva sa zmena vodivosti membrány bez prítomnosti analytu a s ním.

Interakcia analytu s polymérom vedie ku konformačnej reorganizácii polymérnej štruktúry, čo ovplyvňuje difúziu iónov a protiiónov. Zvýšená koncentrácia analytu potom vedie k zníženiu odporu membrány.

Pomocou voltampérometrických techník môžeme detegovať elektroaktívne ako aj elektroinaktívne analyty v rôznych usporiadaniach:

- „Súťaženie“ medzi elektroaktívnym analytom a elektroinaktívnym kompetítorom monitorované chronoampérometricky. Prvým krokom je meranie signálu základného elektrolytu. V druhom kroku sa pridá elektroaktívny analyt a tento sa akumuluje na povrch MIP biosenzora. V treťom kroku sa pridá elektroinaktívny analyt, ktorý selektívne nahradi analyt akumulovaný v MIP. Metóda sa môže realizovať aj s výmenou roztokov, t. j. v prvom kroku sa elektroaktívny analyt selektívne viaže na biosenzor, potom elektródu opláchneme a prenesieme do čistého tlmivého roztoku. Zmeria sa elektrochemický signál napr. diferenčnou pulzovou voltampérometriou (DPV). V ďalšom kroku sa pridá elektroinaktívny kompetítor. Pozoruje sa nárast prúdového signálu v dôsledku uvoľňovania elektroaktívneho analytu do objemu roztoku a jeho elektrickej premeny.
- Ak je analyt elektroinaktívny, MIP biosenzor sa ponorí do roztoku obsahujúceho elektroaktívny kompetítor a analyt. Po inkubácii sa biosenzor prenesie do čistého elektrolytu a množstvo viazaného elektroaktívneho kompetítora sa zmeria napr. metódou DPV. Pri inej metóde sa najskôr zmeria elektrochemický signál elektroaktívneho kompetítora za neprítomnosti analytu. V druhom kroku sa podobný experiment vykoná s elektroinaktívnym analytom.

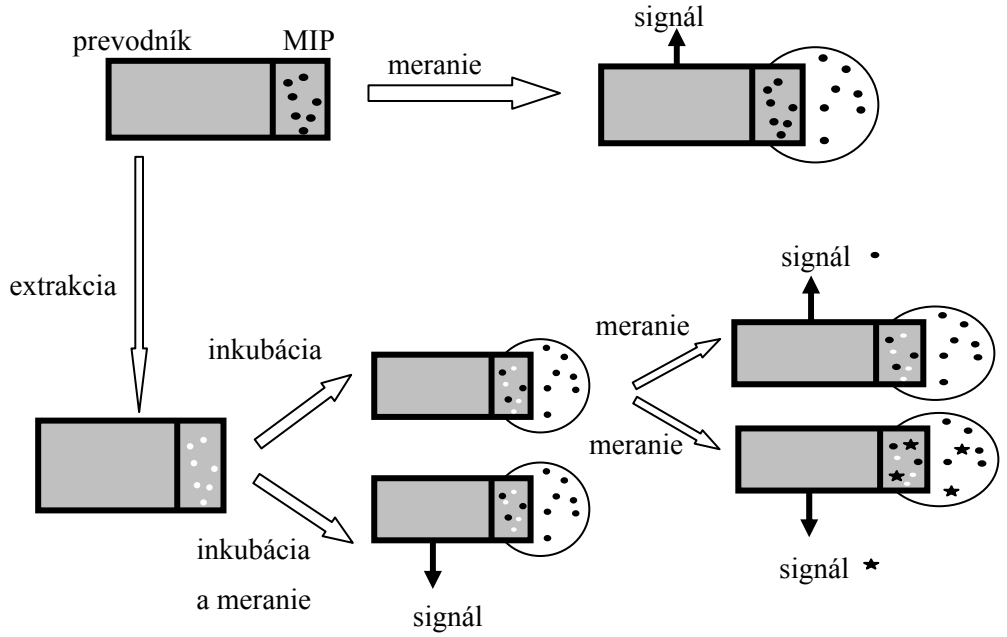
Vo všeobecnosti možno detekčné schémy elektrochemických meraní pomocou MIP senzorov rozdeliť do dvoch skupín: na tie, ktoré vyžadujú extrakciu templátu a tie, ktoré ju nevyžadujú (obr. 7.6). Analytický signál môže pochádzať priamo od analytu (priame meranie), elektrochemickej sondy alebo od kompetitívnej častice (nepriame meranie).

7.3 Záver

Biosenzory sa intenzívne študujú takmer pol storočia, avšak len malý počet z nich je komerčne dostupných. Možnosť prípravy biosenzorov s vyšším výkonom pre spoľahlivé a kontinuálne využitie je stále veľkou výzvou. Inovácie v oblasti biosenzorov sa sústreďujú hlavne na nasledovné oblasti:

- nové imobilizačné schémy a nové citlivé materiály schopné zlepšiť rozlišovacie možnosti biosenzorov hlavne v analýze komplexných environmentálnych a klinických vzoriek. Jedná sa hlavne o aplikáciu nanomateriálov;

Bez extrakcie templátu – potenciometrické, kapacitné merania



S extrakciou templátu – voltampérometrické, ampérometrické, potenciometrické, konduktometrické, kapacitné

Obr. 7.6: Rôzne stratégie meraní pomocou MIP

- použitie nových prevodníkov, príprava nových elektródových materiálov;
- miniaturizácia, mikrofabrikácia a multisenzorová analýza zahŕňa hlavne vývoj biočipov;
- *on-line* merania, merania v reálnom čase a *in vivo* merania vyžadujú prípravu biosenzorov odolných voči extrémnym prostrediam;
- pokroky vo vývoji biomimetických materiálov umožňujúcich „ušiť na mieru“ potrebný biosenzor.

7.4 Literatúra

6. B. R. Eggins, Biosensors. An Introduction, Wiley Teubner, New York (1996).
7. J. Labuda, M. Fojta, F. Jelen, E. Paleček, Electrochemical Sensors with DNA Recognition Layer, In: Encyclopedia of Sensors, Vol. 3, Ed.: C. A. Grimes, E. C. Dickey and M. N. Pishko, Amer. Scientific Publishers, CA, USA, 2006, pp. 201 – 228.
8. M. Mehrvar, M. Abdi, Recent Developments, Characteristics, and Potential Applications of Electrochemical Biosensors, Anal. Sci. 20 (2004) 1113.
9. P. Skládal, Biosensory, Masarykova Univerzita, Přírodovědecká fakulta, skriptum, Brno (2002).
10. D. R. Thévenot, K. Toth, R. A. Durst, G. S. Wilson, Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions ans Classification, Biosensors and Bioelectronics, 16 (2001) 121.
11. J. Wang, Analytical Electrochemistry (Second Ed.), Wiley - VCH, New York (2000).
12. J. Wang, Electrochemical Nuleic Acid Biosensors, Anal. Chim. Acta 469 (2002) 63.

8. ELEKTROCHEMICKÁ DETEKCE POŠKOZENÍ A HYBRIDIZACE DNA

doc. RNDr. Miroslav Fojta, CSc.
Biofyzikální ústav AVČR, Královopolská 135, 612 65 Brno
fojta@ibp.cz

8.1 Úvod

Od roku 1922, kdy Jaroslav Heyrovský vynalezl polarografii, nacházejí elektrochemické metody uplatnění při analýze širokého spektra látek včetně biomakromolekul. Zatímco první polarografická měření bílkovin byla provedena již ve dvacátých letech, počátek elektrochemie nukleových kyselin spadá do druhé poloviny padesátých let minulého století. Emil Paleček na brněnském Biofyzikálním ústavu ČSAV tehdy jako první pozoroval, že DNA poskytuje na rtuťové elektrodě charakteristické polarografické signály [1]. Později se ukázalo, že tyto signály mohou sloužit nejen k identifikaci a stanovení DNA, ale i ke studiu její struktury, interakcí, poškození apod. Zpočátku byl vývoj elektrochemie DNA limitován jednak tehdejší analytickou instrumentací a metodologií, jednak omezenou dostupností dobře definovaného experimentálního materiálu. V osmdesátých letech a zejména na přelomu dvacátého a jednadvacátého století se však tato situace výrazně změnila. Díky pokroku v oblasti chemické syntézy oligonukleotidů a v oblasti genového inženýrství se staly dostupné přesně definované vzorky nukleových kyselin. V současné době není problém získat v dostatečném množství a čistotě úseky DNA vytvářející různé sekundární a terciární struktury i fragmenty genů odpovědných za určité funkce buněk. Moderní elektroanalytická instrumentace a nové typy pracovních elektrod umožňují využití celé škály technik a experimentálních přístupů (o některých z nich pojednávají jiné kapitoly těchto skript). Jedním z hlavních cílů současného výzkumu v oblasti elektrochemie biomakromolekul je vývoj elektrochemických biosensorů, které by umožňovaly rychlou a citlivou detekci poškození genetického materiálu, interakcí DNA s genotoxickými látkami či léčivy, identifikaci specifických nukleotidových sekvencí, mutací v určitých místech genomu apod. Předpokládá se, že takováto zařízení mohou v budoucnu nalézt praktické uplatnění v biomedicíně (např. molekulární diagnostika založená na hybridizaci DNA), v ekotoxikologii (detekce genotoxických látek v životním prostředí), ve vývoji léčiv aj. Tato kapitola je věnována stručnému výkladu základních principů elektrochemie DNA a možnostem jejího využití při analýze poškození a hybridizace DNA.

8.2 DNA – struktura a elektrochemické vlastnosti

Abychom pochopili původ a charakter elektrochemických odezev DNA na různých elektrodách, je užitečné připomenout si základní vlastnosti této makromolekuly zajišťující uchování, přenos a ex-

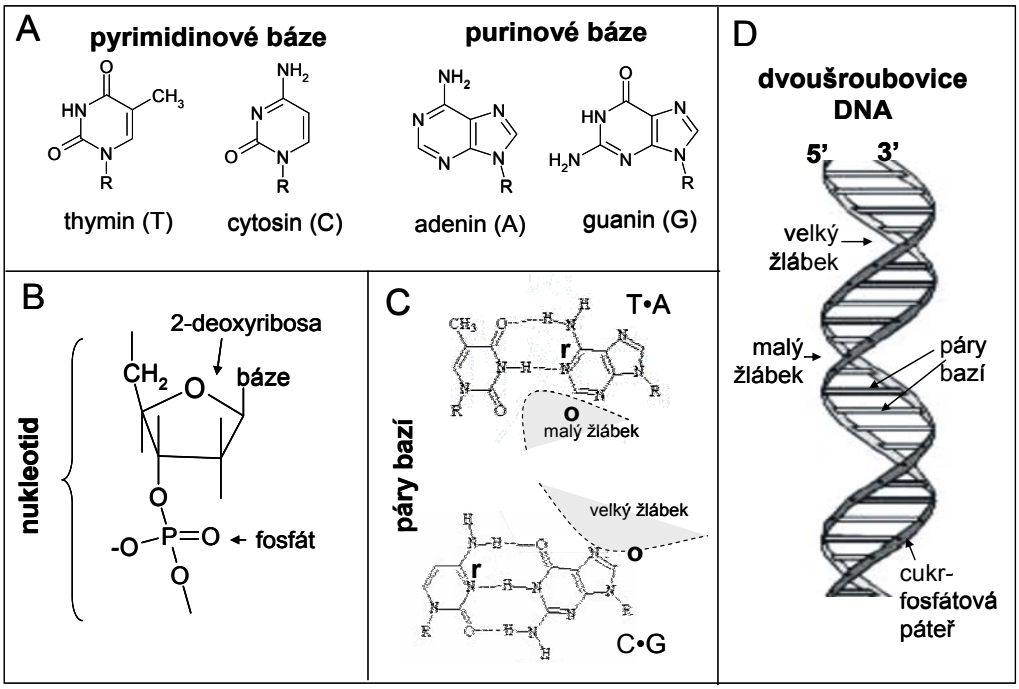
presi genetické informace (obr. 8.1). Základními stavebními kameny DNA jsou dusíkaté báze, cukerná složka (2-deoxyribosa) a kyselina fosforečná. V DNA se vyskytují čtyři základní báze: pyrimidinové deriváty cytosin (C) [1] a thymin (T) a purinové deriváty guanin (G) a adenin (A) (obr. 8.1A). Báze jsou N-glykosidickou vazbou spojeny se zbytkem deoxyribosy a tvoří tak nukleosidy (ty se podle příslušné báze nazývají cytidin, thymidin, guanosin a adenosin [2]). Estery nukleosidů s kyselinou fosforečnou se nazývají nukleotidy. Polykondenzací jednotlivých nukleotidů prostřednictvím fosfodiesterové vazby mezi hydroxylovou skupinou na uhlíku 3' jednoho nukleosidu [3] a hydroxylovou skupinou na uhlíku 5' druhého nukleosidu vznikají polynukleotidové řetězce (na obr. 8.1B je zobrazen jeden nukleotid, resp. nukleosid 3'-fosfát, s naznačením vazeb k dalším nukleotidům). Dva antiparalelně orientované (ve smyslu polarity 5'-3' dané orientací cukerných zbytků) polynukleotidové řetězce mohou vytvořit dvoušroubovicovou strukturu za předpokladu, že pořadí jednotlivých nukleotidů (bází) splňuje podmínku vzájemné komplementarity na principu párování bází – cytosinu vždy s guaninem a thyminu s adeninem (obr. 8.1C).

DNA může zaujímat různé sekundární a terciární struktury v závislosti na konkrétní sekvenci nukleotidů, na topologii polynukleotidových řetězců a na vnějších podmínkách [2]. Za nejběžnější strukturu, typickou pro DNA o průměrné sekvenci při fyziologických podmínkách, je považována tzv. B-forma pravotočivé dvoušroubovice (přibližně ji vystihuje schéma v obr. 8.1D). Byla však popsána řada dalších pravotočivých a levotočivých dvoušroubovic, třířetězcových, čtyřřetězcových (a dokonce i víceřetězcových) forem DNA, vlásenkových a křížových struktur, a také nadšroubovic (šroubovic vyššího řádu). U některých z těchto struktur jsou známy nebo alespoň předpokládány specifické biologické funkce.

Objev základních principů struktury DNA (James Watson a Francis Crick v roce 1953) představoval zcela zásadní průlom v dalším vývoji biologických věd, neboť umožnil pochopit mechanismy, jakými je uchovávána genetická informace, jak je předávána dceřinným buňkám (potomstvu) a jakým způsobem je vyjádřena (exprimována) ve struktuře a funkci bílkovin. Princip komplementarity bází a schopnost tvořit dvoušroubovici umožňuje syntetizovat jeden řetězec DNA podle druhého (replikace), molekuly RNA podle předlohy DNA (transkripce) nebo naopak (reverzní transkripce) a uplatňuje se i při syntéze bílkovin (translace).

---

[1] Zkratky používané v tomto textu: C - cytosin; A - adenin; T - thymin; G - guanin; HMDE - visicí rtuťová kapková elektroda; AgSAE - elektroda z pevného stříbrného amalgámu; DME - kapající rtuťová elektroda, LSV - voltametrie s lineární polarizací; CV - cyklická voltametrie; SWV - „square-wave" voltametrie; DPP (DPV) - diferenční pulsní polarografie (voltametrie); CPSA - chronopotenciometrická rozpouštěcí analýza konstantním proudem; ACP (ACV) - polarografie (voltametrie) se střídavou složkou potenciálu; AdTS - adsorptivní přenosová rozpouštěcí (voltametrie); ss - jednořetězcová (DNA); ds - dvouřetězcová; sc - nadšroubovicová, oc - otevřená kružnicová; ssb - jednořetězcový zlom; Os,L - komplex oxidu osmičelého s dusíkatým ligandem; Os,bipy - complex OsO_4 s 2,2'-bipyridylem.



Obr. 8.1: ***Základní stavební kameny DNA a její struktura***

(A): pyrimidinové a purinové báze (R označuje vodík, pokud jde o volné báze, nebo zbytek deoxyribosy, pokud je báze vázána v nukleotidu, viz B); (B): deoxynukleotid s vyznačenými atomy uhlíku 3' a 5' a s naznačením vazeb k dalším nukleotidům v polynukleotidovém řetězci; (C): Watsonovo a Crickovo párování bází zprostředkované vodíkovými vazbami; písmena r a o označují místa primární elektrochemické redukce, resp. oxidace bází; (D): schéma dvoušroubovice DNA tvořené dvěma komplementárními antiparalelními polynukleotidovými řetězci. Povrch dvoušroubovice tvoří cukrfosfátová páteř, páry bází jsou skryty uvnitř, orientované (u pravotočivé B-formy) přibližně kolmo na její osu.

Elektrochemická aktivita DNA je odvozena od elektrochemických vlastností jejích základních stavebních kamenů [3-5]. Báze adenin, cytosin a guanin jsou redukovatelné na rtuťové elektrodě (a také na elektrodách ze stříbrných amalgámů; s jinými elektrodami nelze redukci těchto bází pozorovat kvůli nedostatečnému přepětí vodíku). Volný adenin a cytosin poskytují dva oddělené redukční signály; naproti tomu redukce těchto bází v DNA je spojena se vznikem jediného píku (v neutrálním prostředí a v přítomnosti amonných iontů při potenciálu okolo –1,5 V [4]). Pokud je tento signál měřen pomocí voltametrických metod nebo CPSA, bývá obvykle označován jako pík CA (**c**ytosin + **a**denin, obr. 8.2); ve spojení s polarografickými technikami je pro signál odpovídající redukci C a A v jednořetězcové DNA používáno označení pík III (viz tab. 8.1). Nedávno se podařilo rozlišit signály C a A v DNA, resp. v syntetických oligonukleotidech, pomocí tzv. eliminační voltametrie [6] (viz kap. 12). Má-li dojít k redukci guaninu, je nutné na rtuťovou (amalgámo-

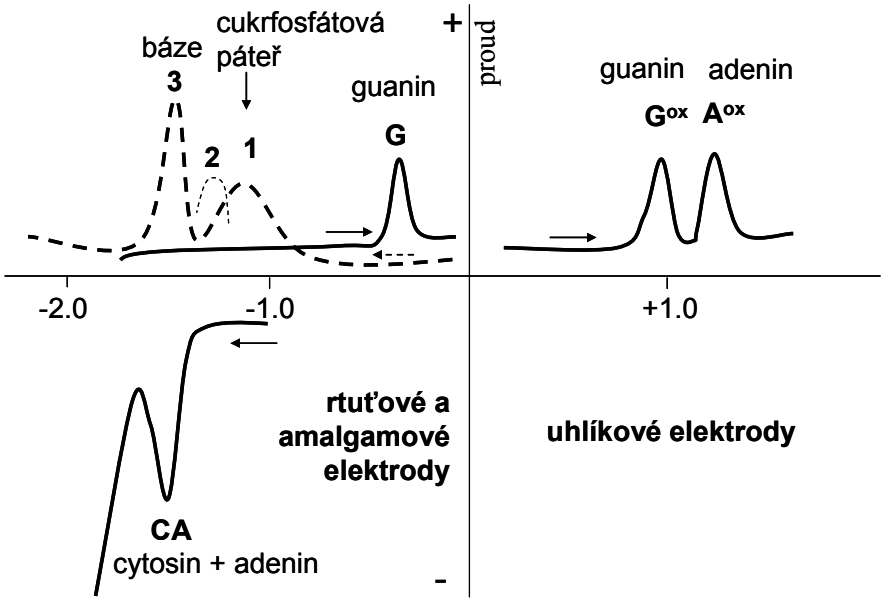
---

[2] Přesněji řečeno jde o deoxynukleosidy, obsahujících na rozdíl od ribonukleosidů jako cukernou složku ribosu; ty představující monomerní jednotky RNA. Předpona deoxy- se používá i ve spojení „deoxycytidin“ apod.

[3] V nukleotidech v nukleových kyselinách jsou atomy ve zbytku báze číslovány 1, 2, 3… a v cukru 1', 2', 3'…

[4] Všechny údaje o potenciálech v tomto textu jsou vztaženy k nasycené kalomelové elektrodě.

vou) elektrodu vložit ještě negativnější potenciál (≤ −1,6 V). Signál spojený s touto reakcí nelze přímo měřit; protože je však redukce guaninu chemicky reverzibilní reakce, je možné produkt této reakce (7,8-dihydroguanin) elektrochemicky oxidovat zpět na guanin [3-5]. Příslušný signál se vyskytuje při potenciálu okolo −0,3 V (pík G, obr. 8.2). K elektrochemické oxidaci purinových bází dochází při poměrně vysokých pozitivních potenciálech (v závislosti na podmínkách okolo +1,0 až +1,1 V pro guanin a +1,2 až +1,3 V pro adenin; viz obr. 8.2 a tab. 8.1) Anodické signály těchto bází lze nejlépe měřit na různých typech uhlíkových elektrod [4, 5].



Obr. 8.2: ***Schematický přehled elektrochemických signálů, které poskytuje DNA na rtuťových a uhlíkových elektrodách***

Plnou čarou jsou znázorněny signály faradické (redukce a oxidace), čárkovanou tensametrické (adsorpce/desorpce). Další detaily jsou uvedeny v textu a v tab. 8.1

DNA je na površích elektrod v širokém rozmezí potenciálů silně adsorbována (toho lze prakticky využít pro její adsorptivní akumulaci a pro jednoduchou přípravu elektrod modifikovaných nukleovými kyselinami, viz dále). Adsorpčně-desorpční děje, jimž DNA podléhá na rtuťových (a některých amalgamových) elektrodách při vkládání negativních potenciálů, dávají vzniknout tzv. tensametrickým (kapacitním) signálům. Ty mohou poskytovat řadu cenných informací o vlastnostech DNA na povrchu elektrody [3-5]. Jelikož jsou molekuly DNA za běžných podmínek záporně nabité, dochází při vložení negativního potenciálu na elektrodu k jejich elektrostatickému odpuzo-

vání, které může mít za určitých podmínek za následek jejich desorpci nebo reorientaci [5]. Přitom se mění diferenciální kapacita elektrodové dvojvrstvy a objevují se zmíněné tensametrické píky. Charakter této odezvy závisí na tom, které složky molekul DNA se adsorpčně-desorpčních dějů účastní. Úseky DNA, které jsou na povrchu elektrody adsorbovány prostřednictvím negativně nabité cukr-fosfátové páteře, podléhají segmentální desorpci okolo potenciálu −1,2 V (poskytují přitom signál označovaný jako pík 1, obr. 8.2, tab. 8.1). Pokud se adsorpce molekul DNA na elektrodovém povrchu účastní hydrofobní zbytky bází (ty mají relativně větší afinitu ke rtuti a menší tendenci přecházet do vodného prostředí), dochází k jejich desorpci při výrazně negativnějších potenciálech (až −1,43 V, kde se objevuje tzv. pík 3, obr. 8.2).

Elektrochemické chování nukleových kyselin je závislé na tom, do jaké míry mohou jejich báze interagovat s povrchem elektrody, ať již formou odevzdávání či přijímání elektronů (redukce, oxidace), nebo formou adsorpčně-desorpčních procesů. Přístupnost zbytků bází v DNA je přitom silně závislá na její struktuře. V„nativní“ (dvouřetězcové, ds) DNA jsou báze skryty uvnitř dvoušroubovice (obr. 8.1) a tudíž nemohou volně komunikovat s prostředím ani s povrchem elektrody. Naproti tomu v „denaturované“, jednořetězcové (ss) DNA jsou báze volně přístupné. V důsledku toho se elektrochemické odezvy nativní a denaturované DNA na rtuťové elektrodě v neutrálním prostředí výrazně liší: zatímco denaturovaná DNA poskytuje výrazný redukční pík CA (polarografický pík III) i kapacitní pík 3, nativní dvoušroubovice se za určitých podmínek může v obou ohledech jevit jako prakticky inaktivní. Jakmile však dojde ke změně struktury DNA, která je spojena se zvýšením přístupnosti zbytků bází, projeví se to na jejích elektrochemických signálech (tab. 8.1). Měření na rtuťových elektrodách umožňují sledovat malé změny ve struktuře dsDNA s vysokou citlivostí. Tyto změny se mohou na elektrochemické odezvě projevit nejen kvantitativně (změnou intenzity jednotlivých píků), ale i kvalitativně (různé formy DNA poskytují píky při různých potenciálech) [3-5, 7]. Např. distortované oblasti dvoušroubovice, ve kterých ale zůstávají báze párovány, dávají v mírně alkalickém prostředí tzv. pík 2 (okolo −1,3 V), na rozdíl od úseků s nespárovanými bázemi (ty poskytují pík 3 při cca −1,4 V, který je specifický pro ssDNA). Podobně při měření redukčních signálů DNA pomocí DPP v prostředí neutrálního mravenčanu amonného lze odlišit změny, při kterých se objevují nespárované báze (poskytující pík III) od změn „předdenaturačních“ či takových deformací dvoušroubovice, při kterých zůstávají báze spárovány (pík II, viz tab. 8.1). Na základě různých potenciálů tenzametrických signálů lze odlišit i nespárované úseky uvnitř kovalentně uzavřených kružnicových molekul DNA (v tzv. negativně nadšroubovicové DNA, scDNA) od jednořetězcových úseků DNA s volnými konci [3].

---

[5] V oblastech dostatečně záporných i kladných potenciálů jsou z povrchu elektrod desorbovány i elektroneutrální molekuly (v důsledku vytěsňování ionty základního elektrolytu, které jsou k opačně nabitému povrchu přitahovány). V případě DNA ovšem hraje její negativní náboj v adsorpčně-desorpčních dějích výraznou úlohu.

Tab. 8.1: ***Polarografické a voltametrické signály nemodifikované (neznačené) DNA***

Označení signálu	Pracovní elektroda	Potenciál (V), cca, *vs.* SCE	Obvyklá elektrochem. technika	Obvykle používané prostředí	Odpovídající děj	Citlivost ke struktuře DNA
pík CA	HMDE, AgSAE	–1,5	LSV, CV	AFP†	redukce cytosinu a adeninu	specifický pro ssDNA#
pík G	HMDE, AgSAE	–0,3	CV, SWV	AFP†	oxidace 7,8-dihydro-guaninu‡	relativně malá
pík G^{ox}	uhlíkové elektrody	+1,0	DPV, SWV, CPSA	0,2M octan sodný, pH 5,0	oxidace guaninu	relativně malá
pík A^{ox}	uhlíkové elektrody	+1,2	DPV, SWV, CPSA	0,2M octan sodný, pH 5,0	oxidace adeninu	relativně malá
pík I	DME	–1,1	DPP	AFP†	adsorpce/desorpce cukrfosfátové páteře	žádná
pík II	DME	–1,4	DPP	AFP†	redukce cytosinu a adeninu	specifický pro dsDNA
pík III	DME	–1,5	DPP	AFP†	redukce cytosinu a adeninu	specifický pro ssDNA
pík 1	DME, HMDE, AgSAE	–1,2	ACP, ACV	0,3M-NaCl + 0,05M-$NaHPO_4$	adsorpce/desorpce cukrfosfátové páteře	žádná
pík 2	DME, HMDE	–1,3	ACP, ACV	0,3M-NaCl + 0,05M-$NaHPO_4$	adsorpce/desorpce distortovaných ds-úseků	specifický pro dsDNA
pík 3*	DME, HMDE	–1,38	ACP, ACV	0,3M-NaCl + 0,05M-$NaHPO_4$	adsorpce/desorpce bází	specifický pro ss-úseky v scDNA
pík 3	DME, HMDE, AgSAE	–1,43	ACP, ACV	0,3M-NaCl + 0,05M-$NaHPO_4$	adsorpce/desorpce bází	specifický pro ssDNA#

† 0,3M mravenčan amonný, 0,05M fosforečnan sodný, pH 6,8-7,0.
‡ 7,8-Dihydroguanin je produkt redukce guaninu na HMDE (AgSAE) při potenciálech ≤ –1,6 V.
# Na HMDE (AgSAE) poskytují za určitých podmínek pík 3 i dsDNA s volnými konci, viz text.

Oxidační signály purinových bází na uhlíkových elektrodách jsou ke struktuře DNA mnohem méně citlivé. Rozdíly v odezvách nativní a denaturované DNA na uhlíkových elektrodách jsou poměrně malé a jemnější změny struktury DNA je obtížné postihnout [4, 5, 7, 8]. Tato nižší citlivost ke struktuře DNA, ve srovnání se signálem souvisejícím s redukcí C a A na rtuťových elektrodách, je způsobena rozdílnou přístupností atomů (skupin) podléhajících elektrochemické oxidaci nebo redukci v dvoušroubovici DNA. Jak je naznačeno v obr. 8.1C, podílejí se primární redukční místa C a A na tvorbě vodíkových vazeb ve Watsonových a Crickových párech a jsou tedy skryta uvnitř dvoušroubovice, zatímco primární oxidační místa obou purinových bází jsou relativně dobře přístupná přes malý (u adeninu) nebo velký (u guaninu) žlábek. Podobně je relativně málo citlivý ke změnám struktury DNA i signál guaninu měřený na HMDE nebo AgSAE (příslušná elektroaktivní skupina, atomy N7 a C8, leží rovněž ve velkém žlábku dvoušroubovice).

Na rtuťové elektrodě za určitých podmínek dochází k jevu, který lze charakterizovat jako „potenciálem indukovanou povrchovou denaturaci“ nebo „odvíjení dvoušroubovice na elektricky nabitém povrchu“. V neutrálním prostředí lze tento jev pozorovat mezi cca −1,0 a −1,3 V (s maximem okolo −1,2 V) – tzv. oblast U (z angl. *unwinding*, odvíjení). Jeho důsledkem je to, že výše zmíněných kvalitativních rozdílů mezi chováním dsDNA a ssDNA (zejména absence píku CA a píku 3 v odezvách dsDNA) lze dosáhnout pouze za určitých podmínek (např. v DPP nebo ACP pracující s DME při malých změnách potenciálu během doby kapky, ve voltametrických technikách s rychlou polarizací nebo při měření ve směru „od negativních do pozitivních potenciálů“). Jestliže se totiž HMDE s dsDNA na povrchu polarizuje od pozitivních do negativních hodnot, „prochází“ elektroda oblastí U před tím (okolo −1,2 V), než je dosaženo potenciálů, při nichž se objevují píky specifické pro ssDNA (−1,4 až −1,5 V). Při pomalé polarizaci (např. v ACV 10 až 20 mV s^{-1}) je DNA vystavena potenciálům oblasti U po dobu dostatečnou k tomu, aby byla podstatná část dvoušroubovice denaturována, a v důsledku toho se objeví zmíněné píky. To může analýzu DNA na jedné straně komplikovat, na straně druhé lze ale tohoto jevu využít při detekci poškození DNA (viz část 8.5.1).

8.3 Elektrody modifikované DNA a elektrochemické DNA biosensory

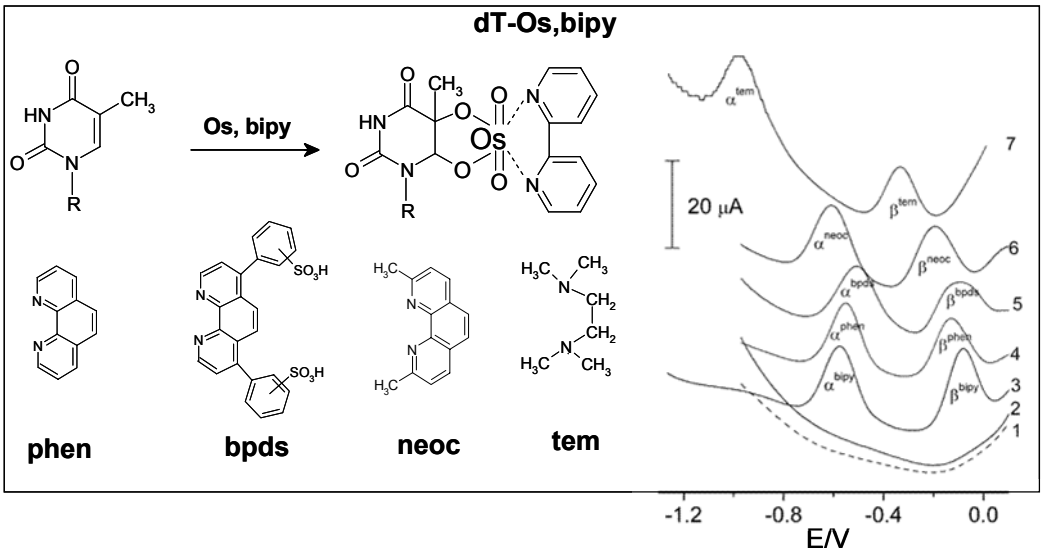
Nukleové kyseliny se na povrch rtuťových a některých amalgámových a uhlíkových elektrod velmi pevně adsorbují (v rozmezí běžných pracovních potenciálů prakticky ireverzibilně). Díky tomu je možno jednoduše připravit elektrody modifikované DNA: postačí pracovní elektrodu na několik minut ponořit do jejího roztoku [4, 5]. Poté je možné elektrodu s adsorbovanou vrstvičkou DNA opláchnout a přenést do elektrochemické nádobky, kde je následně provedeno měření. Tento postup, který byl jako „adsorptivní přenosová rozpouštěcí (AdTS) voltametrie“ poprvé použit v polovině osmdesátých let, znamenal z několika hledisek průlom v možnostech elektrochemie nukleových kyselin. DNA lze totiž na povrch elektrod adsorbovat při otevřeném proudovém obvodu z několika málo mikrolitrů roztoku, což umožňuje práci se vzorky, jejichž příprava je pracná nebo nákladná a jichž bývají k dispozici pouze malá množství. Prostředí, ze kterého je DNA adsorbována na elektrodu, není omezeno požadavky elektrochemického děje, který je při vlastním měření sledován (např. redukce bází v DNA probíhá v kyselém nebo v neutrálním prostředí, zatímco pro měření tensametrických odezev je vhodnější prostředí mírně alkalické). To zcela zásadně rozšiřuje možnosti elektrochemické analýzy DNA, neboť v režimu AdTS lze snadno sledovat vliv složení média, přítomnosti různých specificky interagujících látek, fyzikálních podmínek a dalších faktorů na vlastnosti DNA, aniž by tyto faktory ovlivnily elektrodové děje dávající vznik měřeným signálům.

Elektroda s imobilizovanou vrstvou DNA na povrchu navíc představuje jednoduchý elektrochemický biosensor, v němž pracovní elektroda je převodníkem signálu a DNA biorekogničním prvkem (elektrochemickým bisensorům obecně je věnována kap. 7). Jak již bylo řečeno, závisí

elektrochemické chování DNA na její struktuře. Jestliže tedy vystavíme elektrodu modifikovanou DNA nějakému činidlu, které v imobilizované DNA vyvolá strukturní změny, projeví se to definovaným způsobem na měřené odezvě (tohoto principu využívají např. sensory pro poškození DNA [7, 8], viz. část 8.5). Podobně lze elektrochemické DNA biosensory použít pro detekci molekul, které s DNA specificky interagují, včetně komplementárních vláken nukleových kyselin (sensory pro hybridizaci DNA, viz část 8.6), genotoxických látek, léčiv apod. Vývojem elektrochemických biosensorů s citlivou vrstvou DNA se zabývá řada laboratoří a neustále přibývá publikací (a v poslední době i patentů) věnovaných tomuto tématu. Konkrétní strategie jejich konstrukce, zejména techniky imobilizace DNA na elektrodách, závisí na účelu jejich využití a na materiálu příslušné elektrody. Kromě výše zmíněné fyzikální adsorpce se často využívá chemisorpce oligonukleotidů nesoucích na jednom z konců thiolovou skupinu na zlatých elektrodách a různé metody kovalentního ukotvení DNA na chemicky funkcionalizovaných površích (přehledně [5, 9, 10]).

8.4 Elektroaktivní značky pro DNA

DNA má vlastní elektrochemickou aktivitu a poskytuje řadu analyticky cenných signálů bez jakéhokoli značení (viz výše). V určitých případech je však při detekci DNA výhodnější využít elektroaktivní značky, indikátory či mediátory, pomocí nichž lze zvýšit citlivost nebo specificitu analýzy [4, 5, 10]. Na většině pevných elektrod (uhlíkových, zlatých apod.) je možné dosáhnout spolehlivějšího rozlišení jednořetězcové a dvouřetězcové (případně poškozené) DNA pomocí elektrochemicky aktivních molekul, které jsou schopny se vázat s vysokou selektivitou na dvoušroubovici DNA. Takových látek existuje řada, některé se vmezeřují (interkalují) mezi páry bází dvoušroubovice, jiné se vážou do jejích žlábků. Při detekci hybridizace DNA je obvykle potřeba spolehlivě odlišit cílové vlákno DNA od hybridizační sondy nebo od vznikajícího „hybridu“, dvoušroubovice tvořené sondou a cílovým vláknem (podrobně viz část 8.6), což je na základě vlastních elektrochemických signálů DNA možné pouze v některých případech (např. pokud jedno z vláken DNA neobsahuje elektroaktivní guaninové zbytky). Proto je výhodné na jedno s vláken navázat značku poskytující výraznou elektrochemickou odezvu. Mezi dosud navrženými elektrochemickými značkami zaujímají zvláštní místo organické komplexy přechodných kovů (např. ferrocen, komplexy ruthenia nebo osmia), které poskytují dobře vyvinuté elektrochemické signály [4, 5]. Vynikajícími elektroaktivními značkami jsou komplexy oxidu osmičelého (Os,L, kde L symbolizuje dusíkatý ligand – např. 2,2’-bipyridyl, 1,10-fenanthrolin apod., viz obr. 8.3), které se kovalentně vážou na pyrimidinové báze v DNA. Adukty DNA s Os,L poskytují řadu analyticky využitelných signálů na různých typech elektrod (rtuťových, amalgámových, uhlíkových), a to v oblastech, kde DNA sama žádné signály neposkytuje (obr. 8.3). Redoxní potenciály těchto aduktů je možné ovlivnit výběrem dusíkatého ligandu (obr. 8.3), čehož lze využít pro „vícebarevné“ elektrochemické značení DNA umožňující např. paralelní hybridizační analýzu více nukleotidových sekvencí [11] (analogie k vícebarevnému fluorescenčnímu značení DNA, které se využívá v dnes oblíbených „genových čipech“).



Obr. 8.3: ***Značení DNA komplexy oxidu osmičelého***

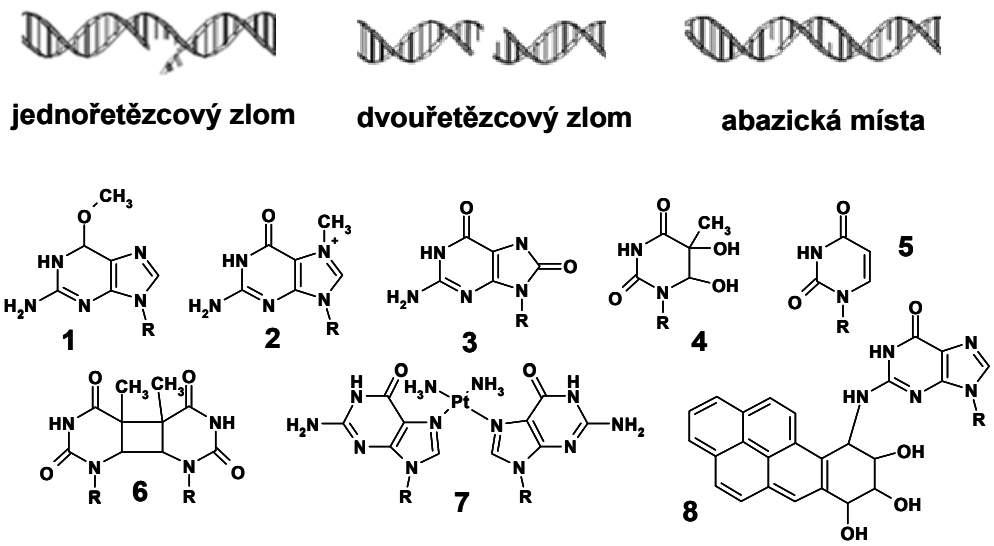
Os,bipy - komplex OsO4 s 2,2'-bipyridylem; dT-Os,bipy - adukt Os,bipy s thyminem; další ligandy, které mohou bipy v aduktu nahradit: phen - 1,10 fenanthrolin; bpds - kyselina bathofenantrolin disulfonová; neoc - 2,9-dimethyl-1,10-fenanthrolin (neocuproin); tem - N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED). Vpravo části „square-wave" voltamogramů poskytovaných na uhlíkové elektrodě nemodifikovanou DNA (1) a DNA modifikovanou Os,bipy (2); Os,phen (3); Os,bpds (4); Os,neoc (5) a Os,tem (6); DNA je v tomto případě představována syntetickým deoxyoligonukleotidem $(GAA)_7T_{20}$

Zvýšení citlivosti elektrochemické detekce DNA lze dosáhnout také na základě využití elektrokatalytických dějů nebo enzymů katalyzujících přeměnu inaktivních substrátů na elektrochemicky aktivní produkty. Elektrokatalytické děje obecně umožňují citlivější měření, protože se jich obvykle účastní větší počet elektronů (což se projevuje větším proudovým signálem) než „běžných" oxidačně-redukčních dějů (při těch jde o jeden až několik málo elektronů na jednu elektroaktivní skupinu). V případě elektrokatalytického děje může jedna aktivní skupina absolvovat velké množství cyklů, při nichž do reakce vstupuje látka, jíž je v prostředí nadbytek. Příkladem je katalytické vylučování vodíku v přítomnosti aduktů DNA s Os,L na HMDE a AgSAE. „Biokatalytická amplifikace" signálu, využívající značení DNA enzymem (nejčastěji peroxidasou nebo fosfatasou), je přístupem analogickým v tom smyslu, že i v tomto případě jedna značka (molekula enzymu) katalyzuje tvorbu velkého množství molekul elektroaktivního indikátoru a tím zvyšuje celkový elektronový výtěžek (podobně jako u známé imunochemické metody ELISA, při které se obvykle využívá kolorimetrická detekce [4, 5, 10]).

8.5 Elektrochemická detekce poškození DNA

DNA je nositelkou dědičné informace, která je zakódována v pořadí bází (nukleotidů) představujících jednotlivá písmena genetické „abecedy". Poškození genetického materiálu (v důsledku jeho vystavení chemickým činidlům nebo fyzikálním faktorům, jako je ultrafialové či ionizující záření)

může mít za následek ztrátu nebo změnu smyslu genetické informace [8]. Pod pojem „poškození DNA“ lze zahrnout jakékoli chemické změny v jejích molekulách, včetně přerušení chemických vazeb mezi jejími základními stavebními kameny (tj. fosfodiesterových a N-glykosidických), substituce atomů nebo funkčních skupin ve zbytcích bází (např. deaminace, alkylace), oxidativní modifikace, adiční reakce (fotochemicky indukovaná tvorba pyrimidinových dimerů) aj. Příklady nejčastějších produktů poškození DNA jsou uvedeny v obr. 8.4. Protože během života organismu dochází k mnoha událostem vedoucím k poškození DNA, disponují buňky několika účinnými reparačními systémy sloužícími k jejím opravám. Ty však mohou v případě masivního nebo opakovaného poškození genetického materiálu selhat. Za takových podmínek může být genetická informace buňky trvale pozměněna (mutována [6]), což může vést ke ztrátě funkce jednotlivých genů a ke vzniku vážných onemocnění (např. rakoviny).



Obr. 8.4: ***Příklady nejčastějších produktů poškození DNA***

Jednořetězcové a dvouřetězcové zlomy vznikají v důsledku hydrolýzy fosfodiesterové vazby nebo poškození cukerného zbytku (např. působením kyslíkových radikálů), abazická místa (tj. místa chybějících bází) v důsledku přerušení N-glykosidické vazby (spontánní nebo enzymem katalyzovaná hydrolýza, často po chemické modifikaci příslušné báze)

Produktů poškození bází je široké spektrum - např. produkty alkylace (1, 2), oxidativního poškození (3, 4), deaminace (5, např. působením hydrogensiřičitanu nebo kyseliny dusité). Působením ultrafialové složky slunečního záření vznikají mj. pyrimidinové dimery (6). Další typy aduktů se tvoří po vystavení DNA některým protinádorovým léčivům (např. cisplatině – 7) nebo karcinogenům (metabolicky aktivované polycyklické aromatické uhlovodíky – 8)

---

[6] Zde je potřeba zdůraznit rozdíl ve smyslu pojmů „poškození DNA“ a „mutace“. Mutace je potřeba chápat jako záměny celých standardních párů bází (nebo jejich inzerce, delece), které jsou při replikaci DNA a dělení buněk přenášeny do dalších generací. DNA obsahující takovéto mutace nese pozměněnou genetickou informaci, ale nelze na ni pohlížet jako na „poškozenou“ DNA, protože v ní jsou všechny báze „správně“ spárovány a její vlákna jsou komplementární. Z hlediska struktury se od „normální“, nemutované DNA nijak neliší a jako s takovou s ní buňky zacházejí. Naproti tomu poškozená DNA má jiné vlastnosti (obsahuje chemicky pozměněné báze, chybí v ní báze, obsahuje zlomy). Mutace ovšem vznikají jako *důsledek* poškození DNA, které není včas nebo správně opraveno.

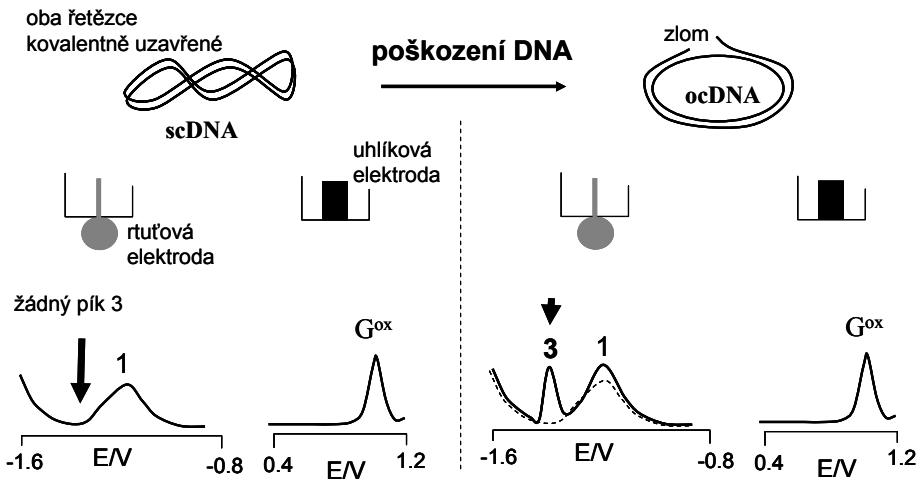
Z hlediska ochrany zdraví populace je důležité mít k dispozici rychlé a citlivé metody detekce poškození DNA, resp. detekce látek, které mohou poškození DNA způsobit. Nejčastěji se pro tento účel využívají metody založené na kompletní hydrolýze DNA a identifikaci jejích chemicky pozměněných (tj. poškozených) složek chromatografickými technikami nebo hmotnostní spektrometrií. Kromě toho je možné studovat poškození DNA i bez hydrolýzy, tj. na úrovni „celých“ molekul, sledovat změny vlastností DNA (např. molekulové hmotnosti nebo topologie) pomocí gelové elektroforézy; do této kategorie technik patří i tzv. „comet assay“, metoda vhodná pro analýzu poškození DNA v jednotlivých buňkách). Proti některým běžnějším produktům poškození bází DNA jsou k dispozici protilátky; ty pak lze pomocí imunohistochemických přístupů detegovat přímo v buněčném jádře, stejně jako zlomy pomocí techniky zvané TUNEL test. Více podrobností o zde zmíněných metodách lze nalézt v nedávno publikovaných přehledech [7, 8] a v nich citované literatuře. Poškození DNA lze detegovat i pomocí elektrochemických metod, jejichž hlavní výhodou oproti výše zmíněným technikám je právě rychlost a relativní jednoduchost.

8.5.1 Elektrochemická detekce zlomů v DNA

Změny ve struktuře DNA vyvolané jejím poškozením je možné zjistit na základě změn v její elektrochemické odezvě. Typickým příkladem jsou jednořetězcové zlomy (ssb; ty často doprovázejí jiné modifikace genetického materiálu), které lze detegovat s vysokou citlivostí pomocí rtuťových a některých amalgamových elektrod [3, 7, 8]. Již v 60. letech minulého století bylo ukázáno, že tvorba ssb v dsDNA se projeví na polarografickém chování DNA, konkrétně nárůstem výšky DPP píku II (viz tab. 8.1). Mnohem větší citlivosti detekce zlomů (a potažmo látek, které tvorbu zlomů indukují) lze však dosáhnout na základě toho, že DNA obsahující zlomy (volné konce vláken) vykazuje na rtuťové elektrodě kvalitativně odlišné chování než DNA, která žádné volné konce neobsahuje. DNA „bez konců“ je snadné připravit v podobě bakteriálních plazmidů, což jsou relativně malé kružnicové molekuly, jejichž obě vlákna jsou kovalentně uzavřena. Tyto molekuly mají často specifickou terciární strukturu označovanou jako „nadšroubovicová“ nebo „superhelikální“ DNA (scDNA, obr. 8.5). Jelikož scDNA neobsahuje žádné konce vláken, nemůže z topologických důvodů podléhat potenciálem indukované povrchové denaturaci (viz poslední odstavec části 8.2) a neposkytuje za žádných podmínek AC voltametrický pík 3. Naproti tomu DNA s volnými konci (např. „otevřená kružnicová“ forma, ocDNA, která ve své molekule obsahuje jeden nebo více ssb, nebo lineární DNA) při pomalé polarizaci elektrody od kladných k záporným potenciálům pík 3 poskytuje (obr. 8.5) a jeho výška závisí na počtu vytvořených zlomů.

Kvalitativní změny v elektrochemické odezvě DNA na HMDE nebo AgSAE po vzniku zlomů lze využít k monitorování výskytu látek, které mohou způsobovat poškození genetického materiálu. Jestliže vystavíme scDNA působení nějakého prostředí (např. odpadní vody) a poté provedeme měření ACV, lze na základě přítomnosti píku 3 usoudit na přítomnost látek způsobujících poškození DNA a na základě jeho intenzity odhadnout rozsah tohoto poškození, resp. koncentraci

poškozujícího činidla. HMDE nebo AgSAE modifikovaná scDNA představuje elektrochemický biosensor pracující na výše uvedeném principu (v tomto případě je působení zkoumaného vzorku vystavena rekogniční vrstva scDNA adsorbovaná na povrchu elektrody). Detekce zlomů pomocí rtuťové elektrody je vysoce citlivá: umožňuje zjistit přítomnost jednoho až dvou procent molekul DNA obsahujících jediný jednořetězcový zlom v nadbytku nepoškozené scDNA (což odpovídá jednomu místu poškození mezi přibližně 200 000 nukleotidy).



Obr. 8.5: ***Detekce tvorby zlomů v DNA pomocí AC voltametrie na rtuťové elektrodě***

Nadšroubovicová plazmidová DNA (scDNA) nemá žádné konce vláken a v důsledku toho neposkytuje pík 3, pro jehož vznik je nutná částečná denaturace DNA na elektricky nabitém povrchu. Pokud jsou v scDNA zlomy vytvořeny (čímž vznikne otevřená kružnicová DNA, ocDNA), pík 3 se objeví, neboť ocDNA se na povrchu elektrody odvinout může. Intenzita tohoto signálu je závislá na počtu vytvořených zlomů. Naproti tomu při měření oxidačního signálu guaninu na uhlíkových elektrodách se tvorba jednotlivých zlomů v molekulách plazmidové DNA nijak neprojeví

Měření oxidačního signálu guaninu na uhlíkových elektrodách (pík G^{ox}), které je mezi elektrochemiky zabývajícími se studiem DNA velmi oblíbené pro svou jednoduchost, dostupnost a zřejmě i díky tomu, že nevyžaduje manipulaci s „obávanými“ rtuťovými elektrodami, je k tvorbě jednotlivých ssb v DNA necitlivé (signál sc a oc, resp. lineární DNA má stejnou intenzitu; je tomu tak proto, že guaninový zbytek je oxidovatelný i v dsDNA a při měření na uhlíkových elektrodách se výrazně neuplatňuje efekt odvíjení dvoušroubovice na elektricky nabitém povrchu). Pro detekci rozsáhlejší degradace DNA byla skupinou J. Labudy (přehledně v [7, 8]) navržena metoda založená na využití elektroaktivního indikátoru, který se selektivně váže na dvoušrobovicovou strukturu nepoškozené DNA (jde o komplex $[Co(phen)_3]^{3+/2+}$, jehož jeden fenanthrolinový ligand se interkaluje mezi páry bází dvoušroubovice). Vrstvou DNA je modifikována uhlíková (např. tištěná) elektroda. Ta je ponořena do roztoku indikátoru, který se na imobilizovanou DNA naváže. Selektivní interakce indikátoru s dsDNA vede ke zvýšení jeho signálu. Pokud je elektroda modifikovaná DNA před interakcí s indikátorem vystavena nějakému činidlu, které DNA poškodí, dojde k pokle-

su signálu, protože poškozená DNA ztrácí dvoušroubovicovou strukturu a váže méně indikátoru. V tomto případě musí jít o poměrně rozsáhlé poškození, nikoli o jednotlivé izolované ssb (ty samy o sobě celkovou strukturu dsDNA příliš nezmění); to však není překážkou pro využití popsaného typu sensoru v oblasti testování potenciální genotoxicity nebo naopak ochranných efektů různých látek, které lze aplikovat v poměrně vysokých koncentracích.

8.5.2 Detekce poškození bází v DNA

Chemické modifikace bází v DNA nemusí vždy vést k tvorbě zlomů, mohou však způsobit změnu jejich elektrochemických vlastností. Jestliže je původní báze elektrochemicky aktivní (viz část 8.2), může v důsledku reakce s genotoxickou látkou svou elektroaktivitu ztratit (pak dojde k vymizení příslušného signálu). V některých případech se mohou objevit signály nové, tj. při jiném potenciálu než měla původní báze. Specifickým případem pak jsou adukty bází s látkami, jejichž elektrochemická aktivita je odvozena od skupiny, která příslušný adukt tvoří (např. komplexy oxidu osmičelého zmíněné v části 8.4; ty přednostně modifikují zbytky thyminu, které samy o sobě nejsou za běžných podmínek elektrochemicky aktivní).

Zřejmě nejčastěji využívané techniky elektrochemické detekce poškození bází jsou založeny na měření oxidačního signálu guaninu. Kromě výše zmíněných důvodů tato skutečnost souvisí s tím, že guaninový zbytek v DNA je nejčastějším cílem širokého spektra genotoxických agens, ať již alkylačních činidel, oxidantů aj. [7, 8]. Primární oxidační místo guaninu leží v imidazolovém kruhu této báze, který je zároveň i nejčastějším místem ataku různými činidly. Modifikace guaninu tedy často vede ke ztrátě jeho elektrochemické aktivity na uhlíkových elektrodách. V důsledku vystavení DNA (v roztoku nebo na povrchu elektrody-elektrochemického biosensoru) činidlům modifikujícím guanin lze tedy očekávat vymizení píku G^{ox}. Protože ale DNA obsahuje velké množství guaninových zbytků, je pro věrohodnou změnu (pokles) intenzity signálu nutné, aby jich byla „poškozena“ určitá minimální frakce; ta přirozeně musí přesáhnout relativní chybu měření. Při práci s uhlíkovými elektrodami, zejména v režimu „*ex-situ*“ a při aplikaci procedur zahrnujících několik kroků (imobilizace DNA, její expozice zkoumanému vzorku, oplachy, opakované výměny média) jsou realistické hodnoty chyby měření obvykle větší než 10 %, z čehož vyplývá, že minimálně 10 % guaninů v DNA musí být modifikováno, aby bylo možno na základě poklesu píku G^{ox} usuzovat na přítomnost genotoxické látky (tím se tento přístup zásadně liší od výše popsané detekce zlomů na HMDE, kde je původní signál nulový a pík se **objeví** v důsledku poškození i velmi malé frakce DNA). Metody založené na tomto principu jsou tedy vhodné spíše pro studium různých látek z hlediska jejich vlivu na genetický materiál (může jít např. o testování bezpečnosti nových produktů chemického průmyslu, ale také o nově vyvíjená léčiva), než pro monitorování stopových množství genotoxických látek v prostředí nebo v klinickém materiálu (nicméně v literatuře lze nalézt i práce věnované využití této metody pro posledně jmenované účely, přehledně v [7,8]).

Příznivější situace nastává v případě, kdy modifikovaná báze poskytuje vlastní elektrochemický signál. To je případ i jednoho z nejběžnějších přirozených produktů oxidativního poškození DNA, 8-oxoguaninu (vzorec 3 v obr. 8.4), který poskytuje na uhlíkových elektrodách anodický pík při výrazně méně pozitivním potenciálu než guanin (obě báze je možno detegovat současně). Protože nepoškozená DNA signál odpovídající modifikovaným bázím nedává, lze s využitím těchto „nových“ signálů dosáhnout vyšších citlivostí. Na základě charakteru elektrochemické odezvy lze také alespoň přibližně odhadnout, k jaké modifikaci došlo (tj. nejen že byl „nějak“ poškozen guanin, jako v případě měření poklesu píku G^{ox}). Navíc měření signálu, jehož intenzita s expozicí DNA nějakému genotoxickému faktoru roste, je vždy věrohodnější, neboť pokles původně intezívního signálu může být kromě specifické modifikace elektroaktivní skupiny způsoben také nějakým zcela nespecifickým efektem (blokování elektrody, desorpce citlivé vrstvy DNA). Citlivé detekce některých typů poškození bází je možno dosáhnout také převedením těchto „lézí“ na zlomy v kombinaci s elektrochemickou analýzou na HMDE nebo AgSAE [8]. Modifikace (nebo odstranění) jedné nebo několika málo bází v každé molekule scDNA se na jejím elektrochemickém chování na těchto elektrodách obvykle neprojeví, pokud zároveň nedojde k přerušení její cukrfosfátové páteře. Existují však komerčně dostupné enzymy, pomocí nichž lze v místech modifikovaných nebo chybějících bází cukrfosfátovou páteř DNA přerušit (v buňkách mají takového enzymy za úkol odstraňovat poškozené nukleotidy z DNA při opravných procesech). Typickým příkladem je enzym endonukleáza V z bakteriofága T4, která rozpoznává a štěpí DNA obsahující pyrimidinové dimery (vzorec 6 v obr. 8.4). Jestliže tedy zkoumaná DNA obsahuje poškozené báze a vystavíme ji působení vhodného enzymu, vzniknou zlomy, které lze elektrochemicky stanovit stejným způsobem, jako zlomy vzniklé přímo působením genotoxického činidla (část 8.5.1).

Problematice elektrochemické detekce poškození DNA bylo v několika minulých letech věnováno několik přehledů [3, 7, 8], ve kterých lze nalézt více podrobnějších informací.

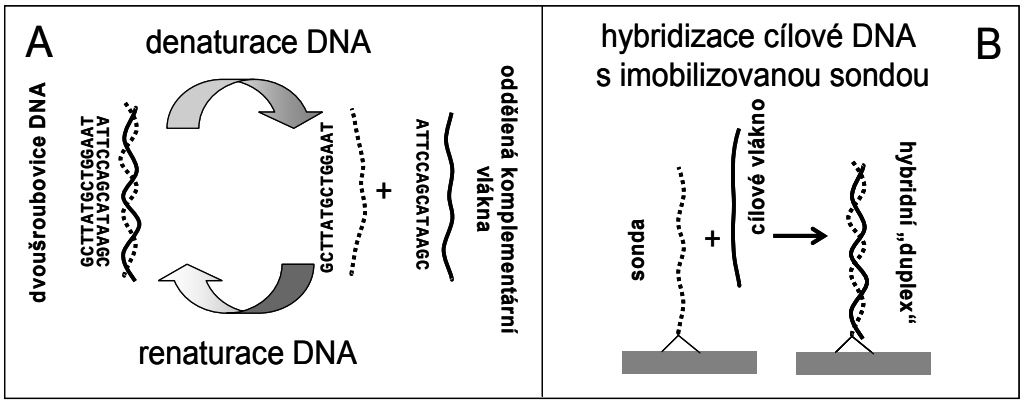
8.6 Elektrochemická detekce hybridizace DNA

Dvě komplementární polynukleotidová vlákna, která tvoří dvoušroubovici DNA (obr. 8.1), lze od sebe oddělit například zahřátím na dostatečně vysokou teplotu; tento proces se označuje jako denaturace DNA. V šedesátých letech minulého století zjistil J. Marmur [12], že za vhodných podmínek může proběhnout i proces opačný: komplementární vlákna dvoušroubovici opět vytvoří. DNA tedy může „renaturovat“ (obr. 8.6A). Tvorba dvoušroubovice (duplexu) ze dvou komplementárních vláken DNA, RNA nebo jejich kombinace patří mezi fundamentální principy, na nichž jsou založeny metody současné molekulární biologie, včetně jejich aplikací v medicíně, agrobiologii a dalších praktických oblastech.

V případě analytického využití tohoto jevu hovoříme o technikách „hybridizace DNA“ nebo obecně „molekulární hybridizace“. Jde v podstatě o metody využívající specifický úsek DNA (hybridizační sondu) o známé sekvenci bází, připravený buďto synteticky, nebo technikami molekulární biologie, k detekci komplementárního vlákna DNA nebo RNA. Vystavíme-li za vhodných podmínek sondu analyzovanému vzorku, dojde v případě přítomnosti komplementárního vlákna k vytvoření dvoušroubovice, tedy k hybridizaci mezi sondou a cílovým vláknem. Z praktických důvodů je výhodné jeden z hybridizujících řetězců (sondu nebo cílovou DNA) imobilizovat na nějakém povrchu (obr. 8.6B). Tím se usnadní oddělení vzniklého hybridu od ostatních složek vzorku, nenavázaných molekul sondy apod., což je obvykle podmínkou pro dosažení dostatečné citlivosti a selektivity (tj. odlišení hledaného úseku DNA od ostatních, kterých může být ve vzorku obrovský nadbytek). Výběr povrchu pro hybridizaci DNA závisí na tom, jakou metodou bude tvorba hybridu detegována. Může to být nitrocelulózová nebo nylonová membrána (na ní se obvykle přenáší, „blotují“, fragmenty DNA separované elektroforézou v agarózovém gelu a pro detekci se používají radioaktivní značky), destička ze speciálně upraveného skla (v moderních čipových analyzátorech, kde se využívá optické detekce), nebo také elektroda (ta pak představuje elektrochemický biosensor pro hybridizaci DNA).

Výzkum a vývoj elektrochemických biosensorů pro hybridizaci DNA se v uplynulém desetiletí těší mimořádné pozornosti v souvislosti s úvahami o tom, že by elektrochemická detekce mohla doplnit a v některých případech i nahradit detekci optickou, která je v současných metodikách využívaných v oblasti genomiky, studia genové exprese na úrovni RNA, molekulární diagnostiky vycházející z těchto principů apod. dominantní. Předpokládá se, že výhodou elektrochemické detekce by vedle vysoké citlivosti mohly být relativně nízké náklady, které by mohly přispět k rozšíření těchto technik mimo specializovaná vědecká pracoviště a velké kliniky i do běžných lékařských ordinací. Existují snahy o vývoj zařízení typu „lab-on-chip“ (laboratoř na čipu), které by po aplikaci například kapky krve pacienta automaticky provedly sérii kroků (izolace DNA, její amplifikace pomocí polymerázové řetězové reakce, hybridizace DNA a její detekce) vedoucí k jednoduše interpretovatelnému signálu asi tak, jak v současnosti fungují glukózové sensory (které ovšem pracují na výrazně jednodušším principu).

Vlastní elektrochemická detekce hybridizace DNA vyžaduje provést několik nutných kroků, včetně vhodné modifikace povrchu elektrody, imobilizace sondy, vlastní hybridizace a měření signálu, kterému může případně (podle konkrétní detekční metody) předcházet značení DNA sondy nebo cílového vlákna. Podrobně se touto problematikou zabývá řada nedávno publikovaných přehledných článků a kapitol v monografiích a encyklopediích, např. [9, 10, 13, 14]. V následujícím textu se zaměříme na několik příkladů detekčních technik, které byly v oblasti elektrochemických biosensorů pro hybridizaci DNA dosud aplikovány.



Obr. 8.6: ***(A) Schéma denaturace a renaturace DNA. (B) Hybridizace cílového vlákna DNA s komplementární sondou zakotvenou na povrchu***

8.6.1 Techniky založené na imobilizaci hybridizačních sond na povrchu pracovní elektrody („jednopovrchové techniky“)

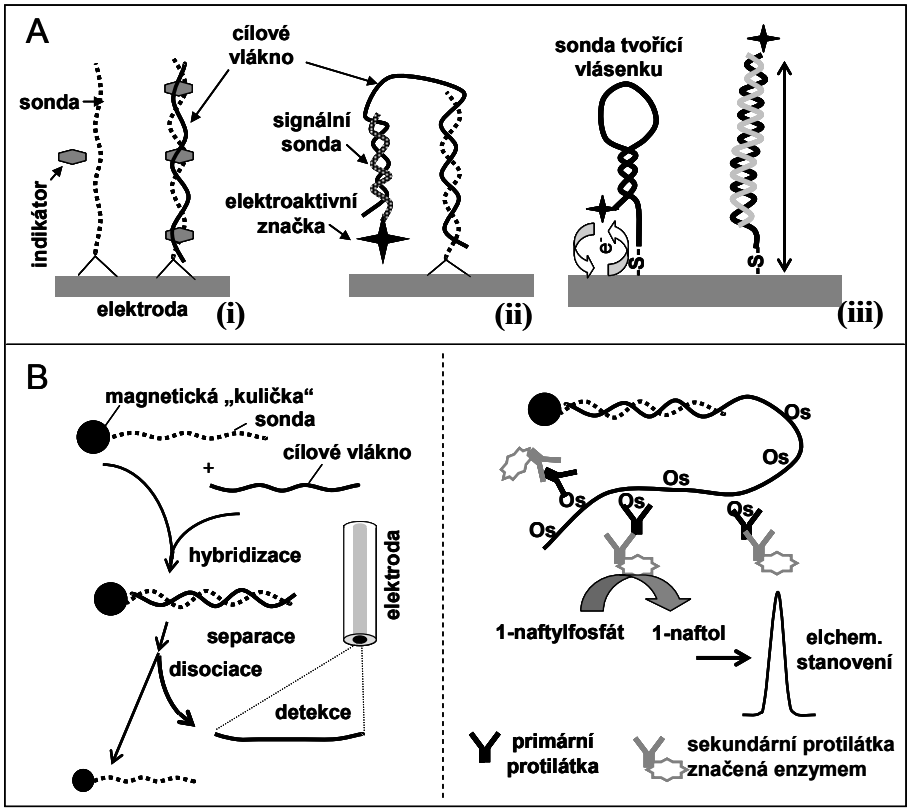
Toto uspořádání odpovídá „skutečným“ elektrochemickým hybridizační biosensorům sestávajícím z převodníku signálu, na němž je imobilizován biorekogniční prvek (sonda nebo cílové vlákno DNA). Hybridizační událost (tvorbu duplexu DNA na povrchu elektrody) je možno detegovat různým způsobem, např.:

- **Využitím vlastní elektrochemické aktivity DNA**. To je možné, pokud sonda a cílové vlákno se výrazně liší v obsahu některé elektroaktivní báze, zejména guaninu, který je možno stanovit na základě jeho elektrochemické oxidace (buď přímé, nebo zprostředkované vhodnými mediátory, nejčastěji komplexy ruthenia [4, 5, 10]). Výrazná asymetrie v obsahu guaninu je však u obvyklých genomových nukleotidových sekvencí, zejména těch, které jsou odvozené z kódujících oblastí genů, vzácná. Tuto obtíž však lze obejít nahrazením všech guaninů v hybridizační sondě hypoxantinem, tj. derivátem purinu, který se podobně jako guanin páruje s cytosinem, ale neposkytuje elektrochemický signál v oblasti potenciálů, kde se vyskytuje oxidační signál guaninu (ani není oxidovatelný rutheniovým mediátorem). Pokud se příslušné elektrochemické signály objeví, znamená to, že došlo k hybridizaci „bezguaninové“ sondy s cílovým vláknem obsahujícím guanin.

- **Využitím signálních sond** (angl. „*reporter probe*“). Při tomto přístupu je cílové vlákno DNA nejprve hybridizováno se sondou zakotvenou na povrchu elektrody („*capture probe*“) a poté s druhou sondou, která je komplementární k jinému úseku cílového vlákna (obr. 8.7A, ii). Signální sonda nese kovalentně navázanou elektrochemicky aktivní skupinu (např. ferrocen), jejíž signál je měřen.

- **Na principu „molekulárního majáku“** (obr. 8.7A, iii). Na povrchu elektrody je za jeden konec zakotvena sonda, která v nepřítomnosti cílového vlákna zaujímá strukturu vlásenky (takovou strukturu vytváří DNA, jejíž nukleotidová sekvence obsahuje v jednom vláknu vzájemně

komplementární úseky, které mohou vytvořit intramolekulární dvoušroubovici). Na druhém konci sondy je navázána elektrochemicky aktivní značka. Pokud je sonda ve formě vlásenky, značka se nachází v blízkosti povrchu elektrody a poskytuje elektrochemický signál. V přítomnosti cílového vlákna se vytvoří lineární duplex, tím se značka od elektrody oddálí a signál zmizí. Označení „molekulární maják“ má původ v analogických technikách založených na měření fluorescence, kdy na jednom konci oligonukleotidu tvořícího vlásenku je navázán fluorofor a na druhém zhášeč (vlásenková forma, ve které jsou oba konce blízko sebe, pak „nesvítí“ a lineární duplex „svítí“).



Obr. 8.7: ***Příklady detekčních principů používaných při elektrochemické detekci hybridizace DNA***

(A) jednopovrchové techniky: (i), detekce založená na elektroaktivních („redoxních“) indikátorech vázajících se selektivně na dsDNA; (ii) využití signální sondy; (iii) elektrochemický molekulární maják; (B) dvoupovrchové techniky: vlevo přístup založený na separaci cílové DNA pomocí magnetického nosiče (DNA může být neznačená, značená elektroaktivní skupinou nebo je také možno využít signální sondy jako v případě A,ii); vpravo elektrochemická imunoanalýza DNA modifikované Os,bipy s využitím alkalické fosfatasy jako enzymové značky. Podrobněji v textu

8.6.2 Dvoupovrchové techniky

Biosensory založené na imobilizaci hybridizační sondy přímo na povrchu elektrody se z hlediska vlastní analytické procedury jeví jako optimální řešení: stačí elektrodu ponořit do zkoumaného vzorku za podmínek příznivých pro tvorbu duplexu DNA, poté opláchnout nespecificky adsorbované složky vzorku a provést měření. Prakticky všechny navržené hybridizační sensory takto sku-

tečně fungují na úrovni krátkých modelových syntetických oligonukleotidů. Při analýze „reálných vzorků“ (tj. obvykle úseků přirozených genomových sekvencí amplifikovaných pomocí polymerasové řetězové reakce PCR [7], které bývají výrazně delší než hybridizační sonda a jsou přirozeně dvouřetězcové), se však ukazuje, že přinejmenším v některých případech lze lepších výsledků dosáhnout oddělením hybridizace DNA od elektrochemické detekce tím, že se tyto dva kroky provedou na dvou různých površích (obr. 8.7B) [5, 10, 14]. Pro hybridizaci DNA je výhodné využít komerčně dostupné magnetické nosiče („kuličky“ z paramagnetického materiálu o řádově mikrometrovém průměru) nesoucí příslušný biorekogniční prvek (hybridizační sondy). Ve srovnání s běžnou pracovní elektrodou mají tyto částice velký souhrnný povrch, který umožňuje zachytit výrazně větší množství cílové DNA. Pomocí magnetu je lze oddělit od roztoku a opakovaným promytím ve vhodném prostředí zbavit všech nežádoucích složek, včetně nespecificky adsorbovaných nukleových kyselin. Poté je možné hybridizované cílové DNA nebo sondy z magnetického nosiče oddělit a stanovit je pomocí vhodné elektrody a elektrochemické techniky, nebo zvolit jinou detekční strategii (viz dále). Ve srovnání s „jednopovrchovými“ přístupy lze tyto „dvoupovrchové“ techniky mnohem snáze optimalizovat, protože magnetické kuličky nemusí mít vlastnosti pracovní elektrody vhodné pro elektrochemická měření, a naopak povrch pracovních elektrod není nutné upravovat tak, aby na něm bylo možné optimálně provádět hybridizaci DNA. V tomto případě samozřejmě nejde o biosensory v pravém slova smyslu; jde spíše o kombinaci jednoduché separační metody (vlastně svého druhu vsádkové afinitní chromatografie) s voltametrickou nebo jinou elektrochemickou detekcí. Na druhou stranu přístupy založené na magnetických mikročásticích mohou být kombinovány s mikrofluidikou a lze si představit využití této technologie ve výše zmíněných zařízeních typu „lab-on-chip“.

Podobně jako v případě „jednopovrchových“ technik, i v případě dvoupovrchových lze využít různé detekční metody:

- **Stanovení purinových bází uvolněných ze separovaného cílového vlákna kyselou hydrolýzou.** Při této metodě je po hybridizaci DNA na magnetických kuličkách cílové vlákno odděleno (jako v levé části obr. 8.6B) a inkubováno s kyselinou chloristou. Tím dojde k jeho depurinaci (uvolnění purinových bází díky hydrolýze N-glykosidických vazeb). Volné purinové báze lze stanovit s velmi vysokou citlivostí v komplexech s ionty rtuti nebo mědi pomocí rozpouštěcích voltametrických technik na HMDE nebo amalgámových elektrodách.

---

[7] PCR je v podstatě replikace DNA *in vitro*, která umožňuje vytvořit velké množství kopií zvoleného úseku DNA z nepatrného počátečního množství „předlohy“ (templátu). K templátu se přidají oligonukleotidové primery komplementární k místům „na okrajích“ úseku, který má být amplifikován (jeden primer se váže k jednomu a druhý k druhému řetězci DNA), směs všech čtyř nukleosid trifosfátů a termostabilní DNA polymeráza. Reakční směs se podrobí teplotnímu cyklování, při kterém se opakují tři kroky: denaturace templátových molekul, „nasednutí“ primerů na příslušná místa a polymerázová reakce (tj. postupné připojování nukleotidů na 3’-konec primerů podle sekvence templátu). Jelikož produkty každého cyklu slouží jako templáty v cyklu následujícím, roste počet kopií zvoleného úseku DNA geometrickou řadou.

- **Značení cílové DNA komplexy oxidu osmičelého**. Tato metoda je vhodná zejména v případech, kdy úsek cílového vlákna tvořící duplex se sondou na povrchu magnetických kuliček neobsahuje pyrimidinové (nebo alespoň thyminové) nukleotidy, zatímco okolní úseky je obsahují. Purinové báze totiž prakticky nereagují s Os,bipy (ani s jinými komplexy OsO_4), takže modifikací DNA tímto komplexem není narušena schopnost homopurinových úseků tvořit hybridní duplex. Naopak modifikace pyrimidinových bází v okolních úsecích cílového vlákna představuje zavedení elektrochemicky aktivních značek (čím je délka cílového vlákna větší, tím více aktivních skupin může být navázáno, což vede ke zvýšení citlivosti analýzy), které lze snadno a citlivě stanovit na HMDE, AgSAE i uhlíkových elektrodách.

- **Signální sondy značené komplexy oxidu osmičelého.** Princip je analogický postupu na obrázku 8.7A, ii, ale hybrid „imobilizovaná sonda-cílové vlákno-signální sonda“ je vytvořen na magnetických kuličkách. Signální sonda je v tomto případě navržena tak, že specifická sekvence tvořící hybridní duplex je zakončena úsekem oligo(T), na který se kovalentně navážou osmiové značky (čím je tento úsek delší, tím více značek sonda nese, čehož lze využít pro zvýšení citlivosti). Po separačních krocích a disociaci navázaných molekul z magnetického nosiče lze osmiové značky stanovit podobně jako v předchozím případě. Ve srovnání s přímým značením cílového vlákna je tato technika flexibilnější a není omezena na homopurin•homopyrimidinové cílové sekvence (značení signálních sond lze snadno provést tak, aby při reakci s Os,L byl specifický úsek sondy chráněn). Lze při ní využít techniky „vícebarevného“ značení s využitím komplexů OsO_4 s různými ligandy (viz obr. 8.3) pro paralelní detekci více cílových DNA [11]. Pomocí signálních sond (ať již značených osmiem, nebo jiným způsobem, např. enzymem) lze stanovit počet kopií opakované sekvence, což je základem diagnostiky některých dědičných chorob [5, 10].

- **Značení DNA pomocí mikro- nebo nanočástic** a podobné přístupy byly v nedávné době úspěšně rozvinuty zejména v laboratořích J. Wanga a I. Willnera (přehledně [14]). Tyto techniky jsou v podstatě také zaměřeny na zvýšení citlivosti detekce prostřednictvím značení každé molekuly sondy nebo cílové DNA větším počtem elektrochemicky aktivních molekul nebo atomů (tvořících příslušnou částici). Na konec jednoho vlákna tvořícího hybrid se vhodným způsobem naváže nanočástice, např. zlatá nebo ze sulfidů zinku, kadmia či olova. Po hybridizaci (na magnetickém nosiči) a separaci mohou být nanočástice rozpuštěny (např. v kyselině) a příslušný kov stanoven pomocí voltametrie nebo CPSA. Vyloučením stříbra na zlatých nanočásticích vázaných na hybridní duplex může být dále zvýšena citlivost. Nanočástice ze ZnS, PbS a CdS byly díky rozdílům v redoxních potenciálech příslušných kovů úspěšně využity jako „vícebarevné“ elektrochemické značky.

- **Využití enzymů při detekci hybridizace DNA** je výhodné díky možnosti amplifikace signálu tím, že jedna molekula enzymu může katalyzovat přeměnu velkého množství molekul vhodného substrátu na elektrochemicky aktivní indikátor, který pak poskytuje měřený elektrochemic-

ký signál. Enzymové značky lze využít ve spojení s dvoupovrchovými technikami. Na rozdíl od výše popsaných přístupů není v tomto případě nutné hybridizovanou DNA z povrchu nosiče uvolňovat, stačí magnetické kuličky i s celým molekulárním „sendvičem“ (včetně enzymu) přenést do roztoku substrátu a nechat proběhnout enzymovou reakci (pravá část obr. 8.7B); např. konjugát alkalické fosfatasy se streptavidinem lze použít k detekci signálních sond koncově značených biotinem, nebo protilátku značenou stejným enzymem k detekci DNA modifikované Os,bipy. Detekce hybridizace DNA využívající enzymů (alkalické fosfatasy, peroxidasy) byla úspěšně využita i v jednopovrchovém, voltametrickém či amperometrickém uspořádání.

8.7 Literatura

[1] E. Paleček, *Nature* **1960**, *188*, 656.

[2] E. Paleček, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1991**, *26*, 151.

[3] M. Fojta, *Collect. Czech. Chem. Commun* **2004**, *69*, 715.

[4] E. Paleček, M. Fojta, F. Jelen, V. Vetterl, in *The Encyclopedia of Electrochemistry, Vol. 9-Bioelectrochemistry* (Eds.: A.J.Bard, M.Stratsmann), Wiley-VCH, Weinheim, **2002**, p.365.

[5] E. Paleček, F. Jelen, in *Electrochemistry of nucleic acids and proteins. Towards electrochemical sensors for genomics and proteomics.* (Eds.: E. Paleček, F. Scheller, J. Wang), Elsevier, Amsterdam, **2005**, p. 74.

[6] L. Trnkova, F. Jelen, I. Postbieglova, *Electroanalysis* **2006**, *18*, 662.

[7] M. Fojta, *Electroanalysis* **2002**, *14*, 1449.

[8] M. Fojta, in *Electrochemistry of nucleic acids and proteins. Towards electrochemical sensors for genomics and proteomics* (Eds.: E. Paleček, F. Scheller, J. Wang), Elsevier, Amsterdam, **2005**, p. 386.

[9] M. J. Tarlov, A. B. Steel, in *Biomolecular Films. Design, Function, and Applications.* (Ed.: J. F. Rusling), Marcel Dekker, New York, **2003**, p. 545.

[10] E. Paleček, M. Fojta, in *Bioelectronics* (Eds.: I. Willner, E. Katz), Wiley-VCH, Weinheim, **2005**, p. 127.

[11] M. Fojta, P. Kostečka, M. Trefulka, L. Havran, E. Paleček, *Anal. Chem.* **2007**, *in press* (vol. 79, iss. 3).

[12] J. Marmur, R. Rownd, C. L. Schildkraut, in *Progress in Nucleic Acid Research, Vol. 1* (Eds.: J. N. Davidson, W. E. Cohn), Academic Press, New York, **1963**, p. 232.

[13] J. Wang, in *Electrochemistry of nucleic acids and proteins. Towards electrochemical sensors for genomics and proteomics* (Eds.: E. Paleček, F. Scheller, J. Wang), Elsevier, Amsterdam, **2005**, p. 175.

[14] J. Wang, in *Electrochemistry of nucleic acids and proteins. Towards electrochemical sensors for genomics and proteomics* (Eds.: E. Paleček, F. Scheller, J. Wang), Elsevier, Amsterdam, **2005**, p. 369.

(Až na několik výjimek je citovaná literatura omezena na nedávno publikované přehledy, ve kterých lze nalézt odkazy na původní práce. Podrobnější informace je možno získat u autora textu, fojta@ibp.cz)

Tato práce byla financována Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy v rámci Centra základního výzkumu LC06035. Autor děkuje za podporu všem kolegům z Laboratoře biofyzikální chemie a molekulární onkologie BFÚ AVČR a zvláště profesoru Emilu Palečkovi, DrSc., jehož zásluhou a pod jehož vedením byla získána velká část poznatků, na nichž je založena tato kapitola.

9. AUTOMATIZACE ELEKTROCHEMICKÝCH MĚŘENÍ

Dr. Ing. Tomáš Navrátil, Ing. Bogdan Yosypchuk Ph.D.
Ústav fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského AV ČR, Dolejškova 3, 182 23 Praha 8
Navratil@jh-inst.cas.cz

9.1 Miniaturizace a automatizace elektrochemických měření

Česká republika patří k zemím, kde má vývoj i praktické užívání elektrochemických metod, především polarografie a voltametrie, bohatou tradici *(Nobelova cena za polarografii - prof. Heyrovský 1959)*. Jejich aplikace v současné době však není tak častá, a to jak v oblastech vědeckých, tak v praktických laboratořích. Elektrochemické (především voltametrické a polarografické) techniky jsou postupně nahrazovány jinými metodami, především spektrálními (AAS, AES). Příčin je hned několik. Jednou z nich je často diskutovaná, avšak naprosto nepodložená obava z toxicity kapalné rtuti (např. [1]), která v některých případech vede naprosto protismyslně k nahrazování kapalné rtuti elektrodami rtuťovými filmovými, pro jejichž přípravu se však používají formy rtuti podstatně toxičtější a představující pro životní prostředí daleko větší zatížení.

Vývoj elektrochemických technik probíhal v minulosti obdobně jako u jiných technik: jednak výzkum teorie, na jejímž principu se měření realizují, jednak vývoj v praxi aplikovatelných měřicích postupů, avšak zcela nezbytný byl i rozvoj přístrojové techniky. Docházelo ke zmenšování až miniaturizaci přístrojů i elektrod, což umožnilo snadnou transportovatelnost, popř. i „polní“ užití. Digitalizace přístrojů umožnila jejich napojení a řízení pomocí běžných stolních či přenosných počítačů. Podobně jako i u jiných technik byl nejvýraznější pokrok dosažen úpravami software, které usnadnily automatizaci měření (přípravu elektrody, její aktivaci, elektrochemickou regeneraci a nakonec samotný záznam měření, složitější průběhy vkládaného napětí i zpracování signálů apod.). Filozoficky se však automatizace omezovala pouze na měření jednoho vzorku.

Pořizovací náklady elektrochemických přístrojů jsou i několikanásobně nižší než u spektrálních či chromatografických zařízení vhodných pro obdobné účely. Tato výhoda je vyvážena nevýhodou potřeby poměrně kvalifikované obsluhy znalé tématiky. Jedním z největších nedostatků bránících většímu rozšíření uvedených metod do praktických laboratoří je však relativně nižší produktivita práce. Zatímco spektrometry jsou vybaveny poměrně často karusely a mohou analyzovat sady vzorků i je vyhodnotit v zásadě automatizovaně, bez většího zásahu obsluhy, srovnatelné elektrochemické přístroje se v současnosti prakticky nevyskytují. První pokus o analýzu pomocí více elektrod byl učiněn již před mnoha desetiletími a zaváděl do přístroje jednu elektrodu měrnou a další tzv. odpočívající [2]. Poměrně značným přínosem bylo zavedení počítačem řízených přístrojů. Zvýšení produktivity mohlo přinést připojení více pracovních stojanů k jednomu počítači, který slouží pouze jako řídicí jednotka více přístrojů stejného typu [3], což sice zkrátí prostoje, ale je

náročnější pro obsluhu a kromě toho, počet stojánku je relativně omezený (cca 4-8) (především fyzicky). Pokud byl napojen na elektrochemický analyzátor karusel, jednalo se spíše o prototypové kusy ve vědeckých laboratořích. Na principu scanovacího elektrochemického mikroskopu je založen přístroj, který přesouvá soustavu elektrod pomocí krokového motoru nad titrační deskou s 96 otvory (obdoba destičky ELISA), v nichž jsou umístěny analyzované roztoky a pomocí dalšího krokovacího motorku se spouští tento svazek elektrod do příslušného otvoru, v němž probíhá analýza [4], avšak jeho užití se omezuje pouze na voltametrické techniky.

Jiným přístupem k automatizaci je sekvenční proměřování sady vzorků. Z této řady je možno jmenovat na trhu dostupný přístroj Palmsens (Palm Instruments, The Netherlands). Tento přístroj je používán pro sensory ve dvojelektrodovém či trojelektrodovém zapojení a umožňuje připojení makroelektrod i mikroelektrod [5]. Z hlediska automatizace je však nejdůležitější možnost připojit multiplexer, který přepíná až 8 sensorů (nepřipojené sensory zůstávají v otevřeném obvodu). Měření proudu probíhá jako funkce času pro každý kanál postupně. Kontinuální scanování kanálů zde probíhá v daných časových intervalech, max. 3 scany za sekundu.

9.2 Multikanálový přístroj pro sekvenční autonomní elektrochemická měření Multielchem

Na sekvenčním principu pracuje i multikanálový přístroj pro sekvenční autonomní elektrochemická měření Multielchem, vyvíjený v Ústavu fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského AV ČR [6]. Jeho podstata spočívá v tom, že dovoluje programově řídit průběh potenciálového či proudového signálu, vkládaného na jednu či více elektrod, a snímat a vyhodnocovat měřené elektrochemické signály (proud, napětí, potenciál, resp. náboj). Přístroj pro sekvenční autonomní elektrochemická měření sestává z následujících částí: Interfaceová karta (např. PCI, PCMCI) je vsunuta do příslušného slotu řídicího počítače (např. stolního PC, notebooku apod.). Kabelem je tato karta propojena s měřicím boxem. K tomu jsou pak připojeny detektory, a to tak, že pro každý z detektorů jsou na vnějším obvodu měřicího boxu umístěny dva, resp. tři kontakty, sloužící k připojení pracovní, referentní, resp. pomocné elektrody. Celé zařízení ovládá řídicí software [6]. Nejdůležitější obvody sloužící pro řízení vkládání a následné snímání a zpracování signálů jsou: AD/DA převodníky, čítač, digitální vstupní a výstupní obvody, multiplexor, řídicí obvody pro multiplexor, potenciostat, galvanostat, převodník proud-napětí a obvody přepínání citlivostí.

Řídicí software určuje, který ze sensorů bude v určenou chvíli aktivní a nastavuje odpovídajícím způsobem multiplexor tak, aby byly vkládány či odečítány příslušné signály ze zvolených elektrod. Měřené analogové signály jsou v měřicím boxu zesíleny, poté digitalizovány a přenášeny z interfaceové karty do řídicího počítače, v němž mohou být v digitální podobě ukládány, přenášeny z něj do dalších zařízení a periferií, či dále zpracovávány či archivovány. Zařízení je schopno pracovat v dvouelektrodovém i ve tříelektrodovém uspořádání.

Pomocí řídicího softwaru lze pro každý sensor určit samostatnou elektrochemickou techniku či jejich kombinaci (stejnosměrnou, cyklickou, diferenčně pulsní, tast, normální pulsní voltametrii či polarografii, potenciometrický stripping, diferenční potenciometrický stripping, chronocoulometrii), zvolit dvouelektrodové či tříelektrodové uspořádání i techniku vyhodnocení (plochy signálového píku nebo jeho výšky). Kvantifikaci koncentrace (či jiného zvoleného parametru) lze provést metodou kalibrační křivky (lineární nebo kvadratické) či standardního přídavku (lineárního či kvadratického) [6]. Počet sensorů je určen možnostmi multiplexoru od 1 do 256, v současné době však probíhá testování na osmikanálovém přístroji.

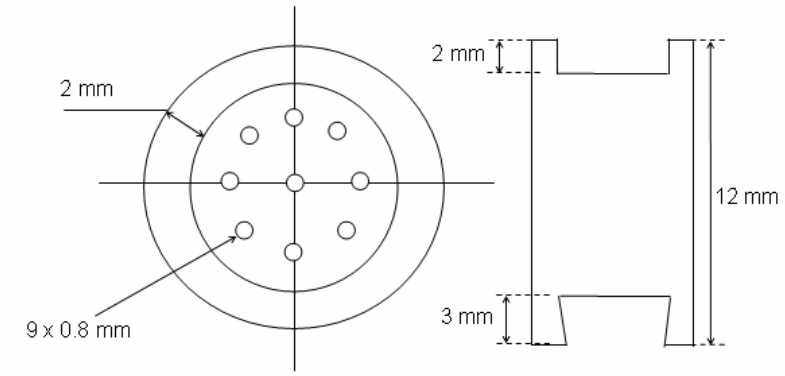
Pro potlačení vnějšího šumu je přístroj vybaven uzemněním, které je možno připojit na vnější uzemňovací zařízení, a zároveň je celé zařízení možno umístit do Faradayovy klece. Přístroj je schopen pracovat s velkou přesností, a to i pro velmi rychlé děje, kdy se rychlosti polarizace pohybují v řádu několika voltů za sekundu; to dovoluje podstatně zvýšit citlivost metody měření, hlavně v DC-technikách. Kvalitní součástky s minimální tolerancí zajišťují dobrou reprodukovatelnost výsledků.

Před zahájením měřicího bloku se nastaví všechny požadované parametry a konstanty v ovládacím programu řídicího počítače a měření se realizují automatizovaně („jediným stiskem tlačítka“), bez dalších zásahů obsluhy, a sekvenčně, tj. pomocí řídicích signálů je vždy v daném okamžiku připojen jen jediný sensor, na nějž a z nějž se přenášejí vkládané či měřené signály. Sensory k provádění elektrochemických měření jsou připojeny k měřicímu boxu paralelně. Sensory jsou situovány buď jednotlivě každý zvlášť, nebo jsou spojeny ve větší blok či bloky sensorů.

K přístroji je možno připojit jakýkoliv sensor: rtuťové kapajicí elektrody či elektrody pastové, kompozitní, screen printed, pevné amalgámové aj. Obecně je možno tato čidla rozdělit na dvě skupiny: obnovitelná a jednorázová. Protože přístroj neobsahuje obvody pro mechanickou renovaci čidla (klepátko, řízení kapky), jeví se jako vhodnější použití elektrody buď jednorázové, nebo s mechanickou či lépe elektrochemickou regenerací povrchu.

9.3 Multikanálový sensor pro sekvenční autonomní elektrochemická měření Multielchem

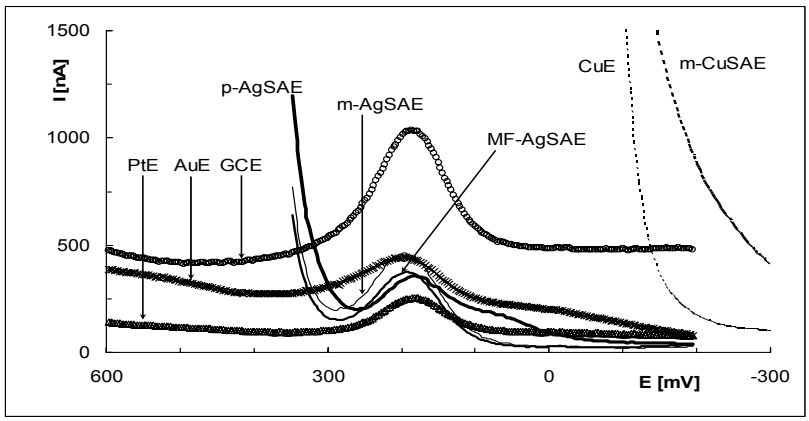
Nadstavbovou součástí, kterou lze k uvedenému zařízení připojit je multisensor pro elektrochemická měření. Testované čidlo má objem vzorku 50 až 500 µL a průměr 8 mm, bylo na něm umístěno osm různých měrných elektrod (Obr. 9.1): stříbrná amalgámová menisková (∅ 0,80 mm), leštěná (∅ 0,80 mm) a filmová (∅ 0,80 mm), leštěná měděná (∅ 0,60 mm), menisková měděná amalgámová (∅ 0,80 mm), zlatá (∅ 0,40 mm), platinová (∅ 0,60 mm), elektroda ze skelného uhlíku (∅ 2,0 mm) a uprostřed 1 pomocná platinové elektroda (∅ 0,80 mm). Jako referentní byla použita kalomelová amalgámová referentní elektroda, která uzavírala měrnou komoru. Díky osmi různým elektrodovým povrchům při napojení na osmikanálový přístroj může být proměřen komplexně vzorek „jedním stiskem tlačítka“. Takto byly proměřeny různé roztoky, obsahující např. olovo, kadmium, měď, kyselinu askorbovou, ferrocen (obr. 9.2), adenin, guanin a řadu jiných látek.



8 pracovních elektrod

Obr. 9.1: Nárys a půdorys sdruženého tříelektrodového sensoru

Kroužky na obvodu znázorňují pracovní elektrody (m-AgSAE, p-AgSAE, MF-AgSAE, CuE, m-CuSAE, AuE, PtE a GCE); kroužek uprostřed představuje pomocnou (platinovou) elektrodu



Obr. 9.2: Anodické DP voltamogramy 10^{-4}M ferrocenu

v 0,1M-$HClO_4$ a v 48% ethanolu na osmikanálovém multisensoru, referentní kalomelová elektroda na bázi stříbrného amalgámu

Jinou variantou použití přístroje je připojení osmi stejných elektrod, kterými je analyzováno osm různých roztoků. Tento přístup byl užit např. při proměřování řady vzorků DNA technikou tzv. dvoupovrchové strategie: Na podložce se upevní úseky DNA komplementární ke sledovaným úsekům DNA, na jejichž koncích jsou zachyceny enzymové značky - obvykle to jsou biotinem značené úseky DNA v kombinaci s konjugáty streptavidinu s enzymy - alkalickou fosfatasou. V reakci vygenerovaný naftol je následně detegován na uhlíkových elektrodách, které se připojují k popisovanému multikanálovému přistroji.

9.4 Literatura

1. Evropský parlament: http://www.europarl.europa.eu/news/expert/infopress_page/064-6115-073-03-11-911-20060309IPR06021-14-03-2006-2006-false/default_cs.htm, 14. 3. 2006.
2. Gerasimenko, P., Ukr. Chim. Zur., 1929, 4, 439.
3. Dřevínek, M., Trojánek, F., Chem. Listy, 2004, 98, 188.
4. Märkle, W., Speiser, B., Tittel, C., Vollmer, M., Electrochimica Acta, 2005, 50, 2753.
5. http://www.palmsens.com/, staženo 10. 9. 2006.
6. Navrátil, T., Yosypchuk, B., Nepublikované výsledky 2006.

10. KOMPOZITNÍ ELEKTRODY

Dr. Ing. Tomáš Navrátil
Ústav fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského AV ČR, Dolejškova 3, 182 23 Praha 8
Navratil@jh-inst.cas.cz

10.1 Kompozitní elektrody, jejich výhody

Jedním z dlouhodobě rozvíjených směrů moderních elektroanalytických čidel je tématika sensorů na bázi pevných materiálů. Ideální pracovní elektroda by měla mít nízký odpor, chemickou a elektrochemickou inertnost v širokém rozsahu pracovních potenciálů, vysoké vodíkové a kyslíkové přepětí, snadné obnovování elektrodového povrchu, nízkou cenu, robustnost a měla by být netoxická. Kromě posledních dvou bodů všechny tyto předpoklady bezesporu splňuje rtuťová elektroda (např. kapková rtuťová elektroda – DME, visící rtuťová kapková elektroda – HMDE nebo rtuťové filmové elektrody – MFE). Avšak vzhledem k faktu, že ekologické a bezpečnostní předpisy zaváděné jak ve světě (např. ve Švédsku), tak i v Evropské unii zakazují nebo podstatným způsobem komplikují používání rtuti [1], objevují se tendence tyto elektrody nahradit jinými, pevnými materiály. Proto byla v posledních letech věnována velká pozornost vývoji pevných nertuťových pracovních elektrod. Do této skupiny patří i kompozitní elektrody, tzn. elektrody vytvořené z materiálu představujícího směs alespoň jednoho izolátoru (ceresinový vosk, teflon, polyethylen, epoxidové či methakrylátové pryskyřice aj.) a jednoho vodiče (uhlík, práškové kovy aj.), případně různých příměsí (grafit aj.) [2-5]. Tyto elektrody mají atraktivní elektrochemické, fyzikální a mechanické vlastnosti. Jsou velmi stabilní, mechanicky odolné, lze je leštit, elektrochemicky obnovovat jejich povrch, mají dlouhou životnost, lze je používat ve velmi pozitivních potenciálových oblastech atd.

Vodivost takového materiálu je srovnatelná s vodivostí klasického kovového vodiče, i když množství vodivých částeček je zde relativně malé. Tento efekt je vysvětlen tzv. perkolační teorií [2, 6-7].

Kompozitní elektrody mohou být klasifikovány v závislosti na typu uspořádání vodivé fáze v polymerní matrici: pravidelně uspořádané (např. litograficky tištěné) a náhodné. V dalších odstavcích bude popisován především druhý typ elektrod. Rozptýlení aktivního materiálu je sice náhodné, avšak při dobrém promísení jej lze považovat za téměř pravidelné. Jednou z hlavních předností pevných nertuťových elektrod bývá možnost práce v rozsáhlé pozitivní potenciálové oblasti. Využití kompozitních elektrod je možno nalézt v oblasti teoretického výzkumu dějů odehrávajících se na povrchu elektrody, stejně tak jako v oblasti analytické chemie. Obě tyto sféry se vzájemně prolínají.

10.2 Efekt „underpotential deposition“ (UPD)

Ke stanovení kovů anodickou rozpouštěcí voltametrií (ASV) v oblasti velmi nízkých koncentrací s použitím kompozitních i kovových elektrod je možné využít jevu, při kterém dochází k vylučování měřeného kovu z povrchu tuhé elektrody při potenciálu pozitivnějším, než je hodnota určená Nernstovou rovnicí pro reverzibilní děje. Tento děj se v literatuře nazývá efekt „underpotential deposition“ (UPD) [8-16]). Jeho aplikace byla již studována na kovových elektrodách, především na stříbrné a zlaté (např. [11-14]) a jeho objasnění bude zřetelné z obr. 10.1. V katodickém směru polarizace na kompozitní, kovové nebo grafitové elektrodě se začne povrch elektrody pokrývat monovrstvou redukované formy analytu (např. kovového olova) (obr. 10.1, pík A) při potenciálu pozitivnějším než odpovídá potenciálu vypočtenému podle Nernstovy rovnice. Po kompletním monovrstevném pokrytí (bez přítomnosti specificky adsorbovaných iontů platí $\theta \approx 0{,}2$, kde θ je poměr skutečně obsazených a obsaditelných míst na povrchu elektrody [8]) se začne vytvářet další vrstva, které odpovídá negativnější, tzv. objemový neboli „bulk“ pík (obr. 10.1, pík B). Rozdíl mezi monovrstvou na povrchu elektrody a objemovými vrstvami je v tom, že při tvorbě monovrstvy jsou vylučované ionty v přímém kontaktu s materiálem elektrody. U objemového píku není již prakticky žádný kontakt mezi materiálem elektrody a nově usazovanými atomy (ty se zachycují na již vytvořenou monovrstvu ze stejných atomů). V anodickém směru polarizace je postup přesně opačný. Při Nernstově potenciálu dochází nejprve k rozpouštění „bulku“ (obr. 10.1, pík B), a teprve při pozitivnějším potenciálu se rozpustí jako poslední monovrstva (obr. 10.1, pík A) [9-10]. Efekt „underpotential deposition“ nemá v češtině zažitý přesný ekvivalent. Jeho název by se dal opisem přeložit jako „nízkopotenciálové vylučování“ nebo „vylučování při nižší potenciálové hodnotě“. K výzkumu tohoto jevu jsou využívány především elektrochemické metody (cyklická voltametrie, potenciostatické nebo galvanostatické pulsní měření aj.), rentgenová fotoelektronová spektroskopie (XPS), optické metody (dielektrimetrie, měření povrchové vodivosti, elektroreflektance apod.) [7, 12].

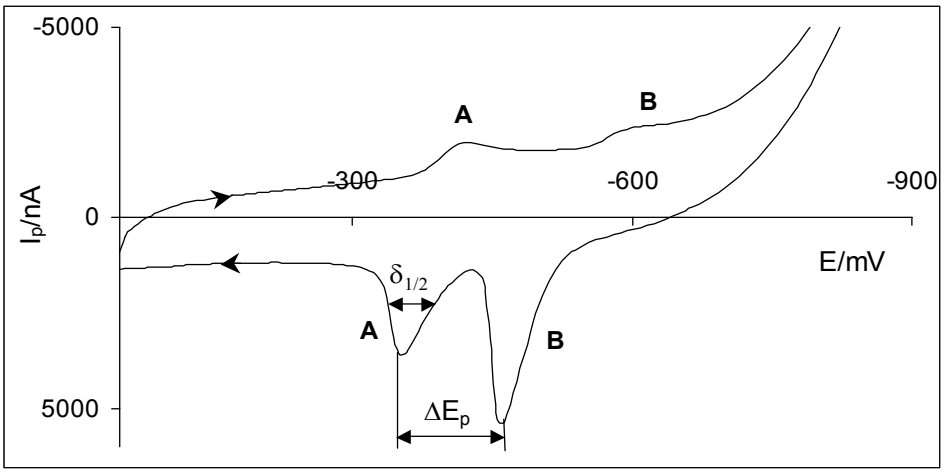
V závislosti na koncentraci iontů v roztoku lze zaznamenat různý počet píků: Při nejnižší koncentraci je registrován pouze monovrstevný pík (obr. 10.2, I), při zvýšení koncentrace se již začíná objevovat nelineárně s koncentrací narůstající bulkový pík (obr. 10.2, II). Při dalším vzrůstu koncentrace již tento pík se zvyšuje lineárně s koncentrací (obr. 10.2, III) a postupně se i rozšiřuje, takže převyšuje a překrývá monovrstevný pík (obr. 10.2, IV).

Poloha monovrstevného píku UPD tedy není obvykle určena potenciálovým rozdílem vůči referentní elektrodě, ale tzv. relativním potenciálovým posunem ΔE_p, což je rozdíl oproti Nernstovu reverzibilnímu potenciálu a platí pro něj rovnice [8]:

$$\Delta E_p = E_r - {}_{ML}E_r(\theta) \qquad (1)$$

kde E_r je potenciál objemového píku a ${}_{ML}E_r(\theta)$ je potenciál monovrstevného píku, a dále je monovrstevný pík charakterizován svou pološířkou ($\delta_{1/2}$) [8-9].

Pokud je objemových píků na voltamogramu více, je vybrán ten nejnegativnější. Posun UPD není závislý na koncentraci kovu v roztoku, protože oba píky (monovrstevný i objemový) jsou koncentračně posouvány stejným způsobem. Poloha píku je prakticky nezávislá i na složení základního elektrolytu (jak vodného, tak nevodného), pokud v něm nejsou obsaženy ionty, které se specificky adsorbují na substrát (např. halogenidové). To by neplatilo, kdyby se jednalo o absolutní polohu na potenciálové ose. Avšak vzhledem k tomu, že monovrstevný i objemový pík jsou založeny na stejném ději, dochází k výměně stejného počtu elektronů a liší se pouze materiálem, na kterém probíhá vylučování, posun obou píků na potenciálové ose je stejný.

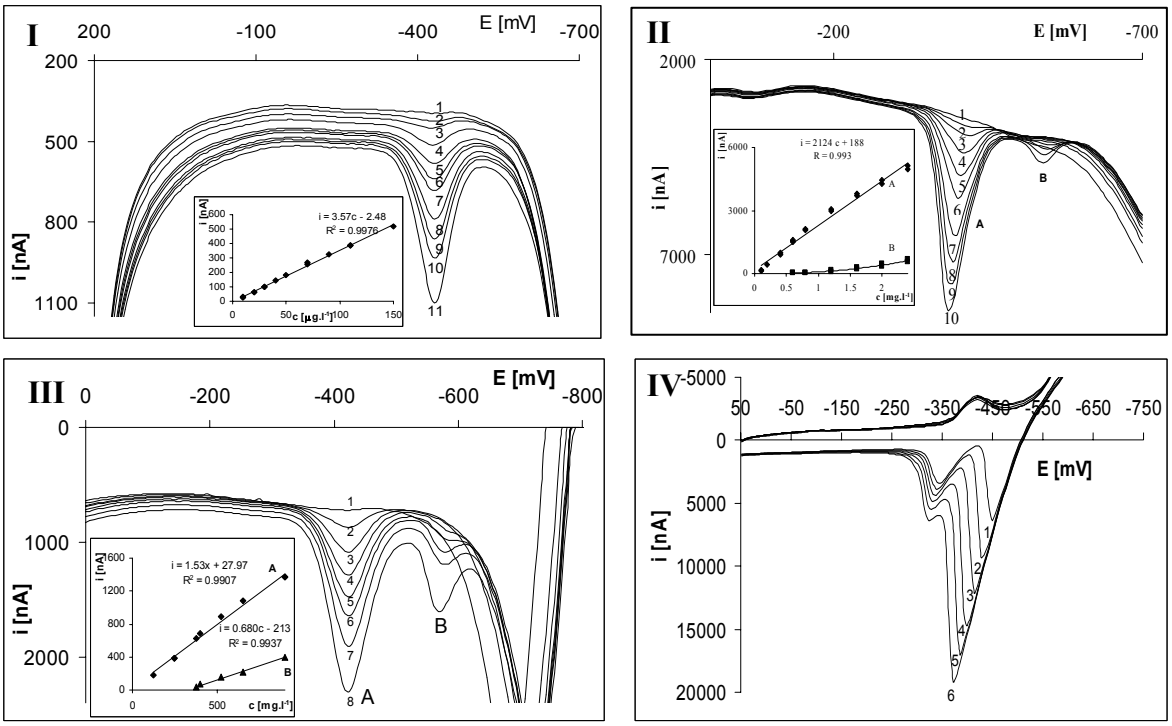


Obr. 10.1: Cyklický voltamogram olovnatých iontů

$c(Pb^{2+})$ = 50 mg l^{-1} v 0,1M-KCl na stříbrné kompozitní elektrodě; A - monovrstevné píky, B - objemové „bulk“ píky, $\delta_{1/2}$ - pološířka, ΔE_p - relativní potenciálový posun

Pro popis závislosti výšky nebo plochy píku na koncentraci nebo na době akumulace lze použít Langmuirovu nebo Frumkinovu izotermu, odkud může být získán nejen adsorpční, ale i interakční koeficient.

Za přítomnosti specificky adsorbovaných aniontů (Cl^-, Br^-) na elektrodě dochází k tomu, že potenciálový rozdíl mezi potenciálem příslušejícím rozpouštění monovrstvy a potenciálem rozpouštění celkového množství depozitu se snižuje. Tento efekt byl studován u halogenidových iontů jako projev konkurenční adsorpce. Měřením adsorpčních izoterem bylo však zjištěno, že povrchová koncentrace chloridových iontů na stříbře a zlatě odpovídá pokrytí více než 50 % monovrstvy při pozitivnějším potenciálu. Protože adsorpční děje vedou běžně k maximálně 10 až 20 % pokrytí, mohl by být učiněn závěr, že chloridové ionty nejsou na povrchu stříbrných a zlatých elektrod adsorbovány, ale tvoří sloučeninu se substrátem (materiálem elektrody) [16]. Vliv specificky adsorbovaných aniontů (např. halogenidů) se projevuje hlavně zmenšením relativního potenciálového posunu ΔE_p a růstem plochy píku (sorpce i desorpce se děje současně se sorpcí a desorpcí specificky adsorbovaného iontu) [17].



Obr. 10.2: Zvyšující se koncentrace Pb (od I do IV)

stříbrná kompozitní elektroda (CAgE20); DPAV v 0,1M-HCl; A - monovrstevný pík; B – bulk pík

10.3 Výroba elektrod

Jako pouzdro pro elektrody se používá dutý váleček z organického skla nebo Teflonu, do něhož se vtlačí elektrodová hmota (průměr aktivní plochy činí obvykle 1,0-2,5 mm). Elektrický kontakt tvoří měděný drátek vsunutý do vrstvy práškového grafitu nasypaného na horní povrch kompozitního materiálu [9-10]. Směs stříbra či zlata s uhlíkem se homogenizuje v misce, poté se přidá polymerizační kapalina (stomatologický materiál Superacryl plus®, epoxidová pryskyřice aj.), čímž dochází k vytvoření plastické kompozitní hmoty. Ta se ponechá volně na vzduchu, dokud kompozitní materiál neztuhne (obvykle cca 5 minut) a pak se vtlačí do elektrodového těla. Polymerační proces probíhá většinou při teplotě 60 až 70 °C po dobu asi 6 hodin. Následně se elektroda brousí na smirkových papírech o různé zrnitosti a nakonec leští na alumimě o zrnitosti 3; 1 a 0,3 µm. Leštění se opakuje po 2 týdnech měření nebo vždy, když se zhorší reprodukovatelnost výsledků nebo je povrch elektrody atakován nečistotami. Přítomnost grafitového prášku v elektrodě v kompozitu přímo neovlivňuje odezvu, ale jeho vyšší vodivost zlepšuje kvalitu ve srovnání s elektrodami bez něj.

V dále popisovaných experimentech byly používány tři typy stříbrných kompozitních elektrod, CAgX, kde X značí hmotnostní procento kovu; kompozitní materiál dále obsahoval 60 % metakrylátové pryskyřice (Superacryl plus®), zbytek byl grafitový prášek. Byly použity CAgE15, CAgE20, CAgE40. V případě grafitové kompozitní elektrody (CCE) se jednalo o CCE30 a CCE40, tj. 30 %, resp. 40 % grafitového prášku (zbytek epoxidová pryskyřice).

10.4 Analytické aplikace kompozitních elektrod

Z analytického hlediska se jeví jako vysoce zajímavé rozsahy pracovních potenciálů, kterých lze dosáhnout pomocí těchto elektrod (tab. 10.1) (např. u CCE30 při pH 9,2 cca 4 V).

Tab. 10.1: Rozsah pracovních potenciálů kompozitních elektrod

DC voltametrie; rychlost polarizace 0,02 V s^{-1}; potenciálové limity (ve V) odpovídaly úrovni 1 μA v případě grafitové kompozitní elektrody (CCE30) a úrovni 20 μA v případě stříbrné (AgE) a stříbrné kompozitní elektrody (CAgE20)

Elektroda (průměr disku 1 mm)	0,1M-$HClO_4$		0,1M-HCl		0,1M acetátový pufr, pH 4,55		0,05 M boraxový pufr, pH 9, 2		0,1M-NaOH	
AgE	-0,85	0,37	-0,70	0,06	-1,03	0,38	-1,42	0,41	-1,62	0,26
CAgE20	-0,85	0,37	-0,80	0,12	-1,15	0,52	-1,65	0,60	-1,74	0,35
CCE30	-1,90	1,70	-1,65	1,40	-1,80	1,60	-2,15	1,90	-2,19	1,60

Na zlaté kompozitní elektrodě CAuE bylo v literatuře popsáno stanovení arsenu s mezí detekce 0,32 μg L^{-1} [18]. Na stříbrných kompozitních elektrodách byl studován jak UPD-efekt, tak byly stanovovány Pb, Cd, Tl (v koncentračním řádu μg L^{-1}), Cl^-, Br^-, I^- (v koncentračním řádu desítek μg L^{-1}) [16], nitrolátky (6-nitrochinolin, 5-nitrobenziimidazol, 2-nitronaftalen, řádově μmol L^{-1}), azosloučeniny (alizarinová chromová čerň PT, řádově 0,5 μmol L^{-1}) [19]. Na uhlíkových kompozitních elektrodách CCE byly prováděny analýzy Pb, Cd, Tl (řádově μg L^{-1}), Mn (řádově 100 μg L^{-11}) [20], nitrolátek (6-nitrochinolin, 5-nitrobenziimidazol, 2-nitronaftalen), aminosloučeniny 2-aminonaftalenu (řádově 0.5 μmol L^{-1}) [21], nukleových kyselin adeninu a guaninu (řádově 10 μg L^{-1}) a azosloučeniny alizarinové chromové černi PT (řádově 0.2 μmol L^{-1}) [21] a metabolitu styrenu - kyseliny fenylglyoxalové (řádově mg L^{-1}) [22].

10.5 Závěr

Lze konstatovat, že kompozitní elektrody se i přes své nedostatky, obdobné jako u ostatních pevných elektrod (horší obnovovatelnost povrchu, kratší životnost, vyšší detekční limity), jeví jako vhodná alternativa k elektrodám obsahujícím rtuť. Výhodná je především jejich široká analytická aplikovatelnost a použitelnost při studiu UPD-efektu. Obnovování povrchu lze provést ve většině případů elektrochemickou cestou a k mechanickým postupům čištění je třeba sahat jen výjimečně. Detekční limity jsou sice v některých případech horší než u rtuťových elektrod, přesto většinou postačují pro účely hygienických norem.

10.6 Literatura

1. Evropský parlament: http://www.europarl.europa.eu/news/expert/infopress_page/064-6115-073-03-11-911-20060309IPR06021-14-03-2006-2006-false/default_cs.htm, 14. 3. 2006.
2. Galoman, D. E., Petersen S. L., Electroanalysis, 1990, 2, 499.
3. Petersen, S. L., Galoman, D. E., Anal. Chem., 1988, 60, 82.
4. Wang, J., Varughese, K., Anal. Chem., 1990, 62, 318.
5. Wang, J., Ozsoz, M., Electroanalysis, 1990, 2, 647.
6. Milliaris, A., Turner, D. T., J. Appl. Phys. 42, 614 (1971).
7. Krista, J., Disertační práce. Karlova Univerzita, Praha 2001.
8. Kolb, M., Advances in Electrochemistry & Electrochemical Engineering (Gerischer H., Tobias C. W., Ed.). Vol. 11, str. 125. John Wiley, New York 1978.
9. Navrátil, T., Kopanica, M., Chem. Listy, 2002, 96, 111.
10. Navrátil, T., Kopanica, M., Crit. Rev. Anal. Chem., 2002, 32, 153.
11. Shen, H., Mark, J.E., Seliskar, C.J., Mark Jr., H.B., Heineman W.R., J. of Solid State Electrochemistry, 1997, 1, 241.
12. Kolb, D. M., Przasnyski, M., Grischer H., J. Electroanal. Chem., 1974, 54, 25.
13. Brand, M., Eshkenazi, I., Kirowa – Eisner, E., Anal. Chem., 1997, 69, 4660.
14. Bonfil, Y., Kirowa-Eisner, E., Anal. Chim. Acta, 2002, 457, 285.
15. Navrátil, T., Šebková, S., Kopanica, M., Anal. Bioanal. Chem., 2003, 375, 164.
16. Šebková, S., Chem. Listy, 2003, 97, 201.
17. Schmidt, E., Wuthrich, G.J., Electroanal. Chem., 1970, 28, 349.
18. Navrátil, T., Kopanica, M., Krista, J., Chem. Anal.(Warsaw), 2003, 48, 265.
19. Šebková, S., Chem. Listy, 2006, 100, 449.
20. Navrátil, T., Kopanica, M., Barek, J., Cent. Eur. J. Chemistry, zasláno k otištění 2006.
21. Šebková, S., Disertační práce, Univerzita Pardubice, 2004.
22. Navrátil, T., Šenholdová, Z., Shanmugam, K., Barek, J., Electroanalysis, 2006, 18, 201.

11. DIAMANTOVÉ PRACOVNÍ ELEKTRODY

prof. RNDr. Jiří Barek, CSc.
Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, UNESCO laboratoř elektrochemie životního prostředí, Albertov 2030, 128 43 Praha 2
barek@natur.cuni.cz

11.1 ÚVOD

Uhlíkové elektrodové materiály (skelný uhlík, uhlíkové vlákna, grafit) jsou běžně používány pro elektroanalytická měření. Tyto materiály mají obdobné vnitřní uspořádání: ve své struktuře obsahují šestičlenné kruhy uspořádané do vrstev, přičemž každý uhlíkový atom je vázán pomocí hybridních orbitalů sp^2 se třemi sousedními atomy. Zbývající orbitaly $2p_z$ vytvářejí systém delokalizovaných π-elektronů, zajišťující elektrickou vodivost. Jednotlivé materiály se od sebe liší zejména velikostí a uspořádáním krystalických domén. Povrch těchto materiálů je nehomogenní a obsahuje množství funkčních skupin, nejčastěji karbonylové a hydroxyskupiny. Elektrochemické vlastnosti těchto materiálů byly ve druhé polovině minulého století intenzivně studovány, a proto je poměrně hodně známo o vztazích mezi strukturou materiálu a jeho reaktivitou [1].

Naproti tomu problematika využití diamantových elektrod pro elektroanalytická měření se začala intenzivně zkoumat teprve v poslední době, i když první práce v této oblasti byly publikovány v již osmdesátých letech [2, 3]. Strukturní uspořádání atomů v krystalické mřížce diamantu je zcela odlišné od uspořádání atomů v materiálech na bázi grafitu. Každý atom uhlíku je vázán prostřednictvím svých sp^3-hybridizovaných orbitalů s dalšími čtyřmi atomy a vytváří se tak pravidelné tetraedry. Diamant se vyznačuje mimořádnou mechanickou i chemickou stabilitou. Je jedním z nejlepších přírodních izolátorů a pro jeho elektroanalytické využití (viz přehledné referáty [4–6]) je nutné jej dopovat atomy jiných prvků. Dopován je nejčastěji atomy boru a podle koncentrace dopantu lze získat diamant s polovodivými nebo polokovovými vlastnostmi. Pokud je koncentrace atomů boru vyšší než celková koncentrace donorů (např. dusíkových atomů), vykazuje diamantový materiál vodivost typu *p*.

Hlavní výhody, které činí borem dopovaný diamant neobyčejně perspektivním elektrodovým materiálem, jsou:

- nízká kapacita elektrické dvojvrstvy, takže zbytkový proud je nízký a šum velmi malý;
- široké potenciálové okno, zhruba od –1,5 V do +1,5 V v 0,1 mol L^{-1} H_2SO_4;
- parafinický charakter povrchu; na tomto elektrodovém materiálu je proto nízká adsorpce látek, což snižuje pravděpodobnost deaktivace zablokováním aktivních center na povrchu

a tudíž minimalizuje problémy související s pasivací elektrody produkty elektrodové reakci či interferenty v analyzovaném roztoku;

- mechanická robustnost a stabilita umožňující využití těchto elektrod v průtokových systémech (HPLC-ED, FIA-ED, SIA-ED);
- biokompatibilita umožňujících snadnou implantaci těchto elektrod do živé tkáně s minimální pravděpodobností negativní biologické odezvy.

11.2 Příprava diamantových filmových elektrod

Nejčastěji jsou diamantové elektrody používány ve formě tenkých polykrystalických filmů. Diamantové filmy se připravují [4, 5] chemickou depozicí par (CVD – „chemical vapor deposition“) při použití žhavených vláken nebo mikrovlnného ohřevu. K depozici diamantového filmu se nejčastěji používá směs methanu a vodíku při objemovém poměru C/H 0,5 až 2,0 % a tlaku 1,3 až 13 kPa. Další parametry systémů jsou: teplota nosiče 800 až 1 000 °C, výkon mikrovlnného zdroje 1 000 až 1 300 W, případně teplota vlákna ~ 2 100 °C. Atomární vodík přítomný v reaktoru zabraňuje depozici nenasycených, sp^2-hybridizovaných uhlíkových struktur. Potlačuje se tak vznik grafitického uhlíku v diamantovém filmu. Dopování borem je dosaženo přidáváním diboranu do směsi plynů, případně je možno použít pevný nitrid boru, který za podmínek panujících v plasmovém hořáku postupně reaguje s atomárním vodíkem na diboran. Koncentrace atomů boru v diamantovém filmu (poměr B/C) mohou dosáhnout až 10 000 ppm, diamantový film pak vykazuje rezistivitu menší než 0,1 Ω cm. Zajímavé je, že při použití pevného nitridu boru je do krystalické mřížky diamantu zabudováno jen velmi málo atomů dusíku. Jako nosič se nejčastěji používá destička z křemíku s nízkým odporem, lze použít i wolfram nebo molybden. Destičku je nutno předem očistit a přeleštit brusnou směsí složenou z diamantového prášku a B_2O_3. Zachycené částice slouží jako krystalizační centra pro růst diamantového filmu. Rychlost tvorby diamantového filmu za popsaných podmínek je zhruba 0,1 až 1,0 μm h^{-1}, depozice filmů o tloušťce několik mikrometrů tak trvá řádově 24 hodin. Tímto způsobem je možno vyrobit diamantové filmy o ploše až několik cm^2. Vzniklé filmy jsou polykrystalické, s ostrými, dobře vyvinutými krystaly o velikosti 0,5 až 3 μm.

Při přípravě DFE se ve směsi methanu a vodíku tvoří radikály a další reaktivní částice, které difundují k povrchu rostoucí diamantové vrstvy. Na povrchu reagují a usazují se ve formě diamantu. Vysoká koncentrace vodíkových atomů zabraňuje tvorbě sp^2-forem uhlíku. Mechanismus nebyl přesně objasněn, ale předpokládá se, že se skládá z následujících kroků:

(a) nabohacení rostoucího povrchu uhlíkem,
(b) depozice amorfního uhlíku na nabohaceném povrchu,
(c) odstranění amorfního uhlíku atomárním vodíkem,
(d) konverze uhlíkem nabohacené vrstvy na diamant,
(e) další nabohacení rostoucího povrchu uhlíkem.

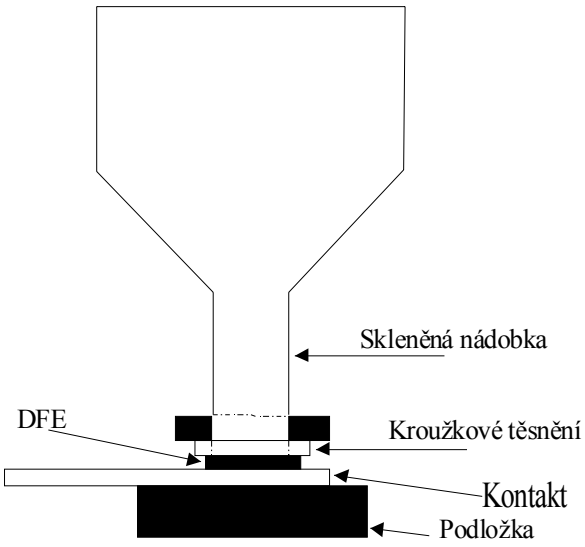
11.3 Vlastnosti diamantových filmových elektrod

Ve srovnání s ostatními uhlíkovými materiály se diamantové filmové elektrody (DFE) vyznačují mimořádnou stabilitou [5]. Nevykazují známky poškození při anodické polarizaci v kyselých, neutrálních ani alkalických roztocích, v přítomnosti chloridových nebo fluoridových aniontů. U diamantových filmů nebyla za zmíněných podmínek pozorována důlková koroze, zdrsnění povrchu ani delaminace filmu. Elektrochemické vlastnosti DFE jsou ovlivněny zejména typem dopantu a jeho koncentrací, morfologickými vlastnostmi (přítomností povrchových defektů a primární krystalografickou orientací), přítomností nečistot uhlíku nemajících strukturu diamantu a druhem povrchové terminace (H, F, O aj.). Povrch diamantového filmu terminovaného vodíkem má obdobnou strukturu jako alkany, a proto má jen velmi nízkou tendenci adsorbovat polární sloučeniny z roztoku. Díky tomu jsou silně zpomaleny elektrodové procesy zahrnující adsorpci intermediátů na povrch elektrody (např. vývoj vodíku, kyslíku nebo halogenů). Vyžadují větší přepětí, aby probíhaly dostatečně rychle. Potenciálové okno, definované jako rozdíl potenciálů, při kterých dosahuje anodický i katodický proud hodnoty 50 μA, je v neutrálních a kyselých roztocích u diamantových elektrod nejčastěji asi 3,5 V. Například v 0,5 mol L^{-1} H_2SO_4 dochází k vývoji vodíku při –1,25 V, kyslík se začíná vyvíjet při +2,3 V (*vs*. SVE) [5]. Potenciálové okno je ale značně závislé na kvalitě diamantového filmu, špičkové diamantové filmy mohou mít potenciálové okno až 4,4 V [7]. Pokud však diamantový film obsahuje velké množství nečistot (tj. uhlíku, který nemá strukturu diamantu), může se velikost potenciálového okna snížit na 2,5 až 2,7 V, což je rozsah pozorovaný u skelného uhlíku nebo u pyrolytického grafitu. Diamantové elektrody díky svému širokému potenciálovému oknu umožňují provádět elektrochemické reakce při potenciálech, kterých není možno dosáhnout jiným způsobem (nebo pouze s velkými obtížemi). Uvnitř potenciálového okna vykazují diamantové filmy velmi nízké hodnoty kapacity elektrické dvojvrstvy, 1 až 5 μF cm^{-2}. Pro skelný uhlík byly zjištěny hodnoty 30 až 40 μF cm^{-2}. Předností diamantových filmových elektrod je i podstatně nižší zbytkový proud a šum ve srovnání např. se skelným uhlíkem [8]. To má za následek podstatné vylepšení poměru signál/šum a tedy i meze detekce.

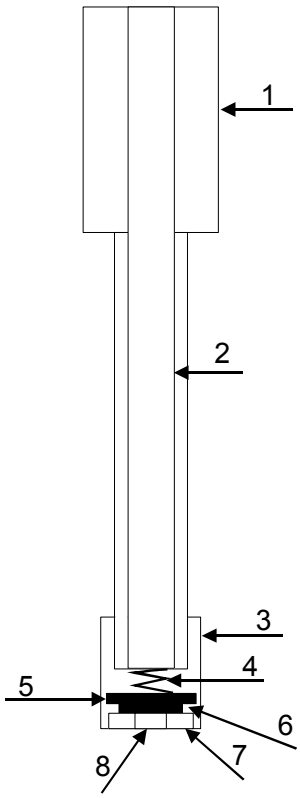
11.4 Konstrukce pracovních elektrod na bázi borem dopovaného diamantu

Při vlastní konstrukci cel pro práci s DFE připadá v úvahu pro vsádkové stanovení buď uspořádání, v němž DFE tvoří dno pracovní nádobky (viz obr.11.1) nebo uspořádaní v němž je DFE vložena to klasického teflonového těla v uspořádání obvyklém pro diskové elektrody (viz obr.11.2).

Pro průtokové uspořádání přichází v úvahu tenkovrstvá cela (viz obr. 11.3). Pro práci s kapilárními technikami (kapilární HPLC, kapilární CZE) je vhodná cela znázorněná na obr. 11.4. Vlastní platinová mikroelektroda je znázorněna na obr. 11.5. Další podrobnosti lze nalézt v disertační práci Quaisarové [9] či v práci Peckové [10].



Obr. 11.1 Nádobka pro práci s diamantovou filmovou elektrodou



1 – teflonové tělo

2 – elektrický kontakt

3 – šroubovací nástavec

4 – kovová pružina

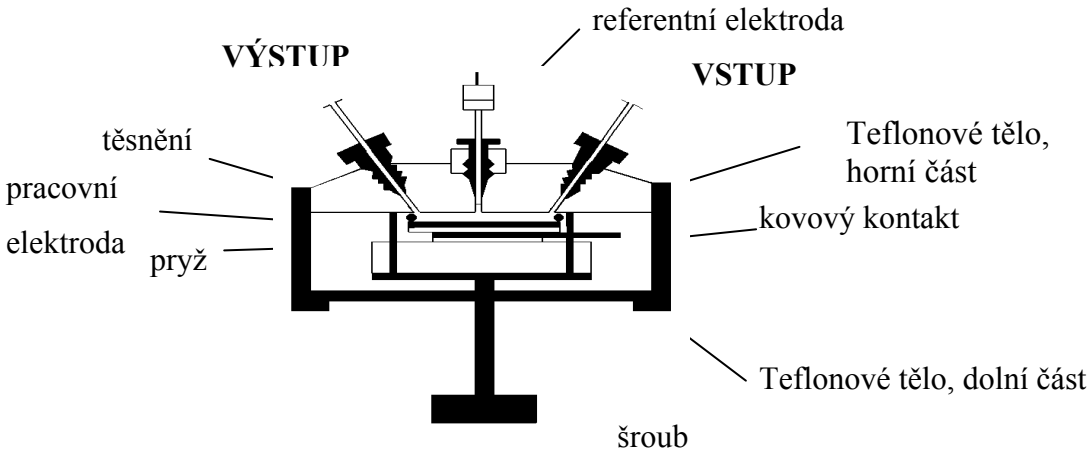
5 – mosazná lamela

6 – DFE na křemíkové podložce

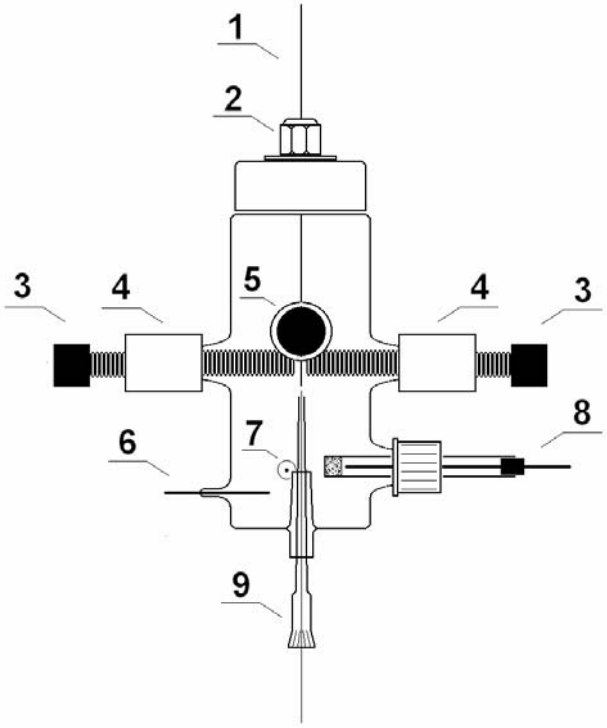
7 – silikonové těsnění

8 – ústí elektrody – kontakt s roztokem

Obr. 11.2: ***Disková elektroda pro práci s diamantovou filmovou elektrodou***

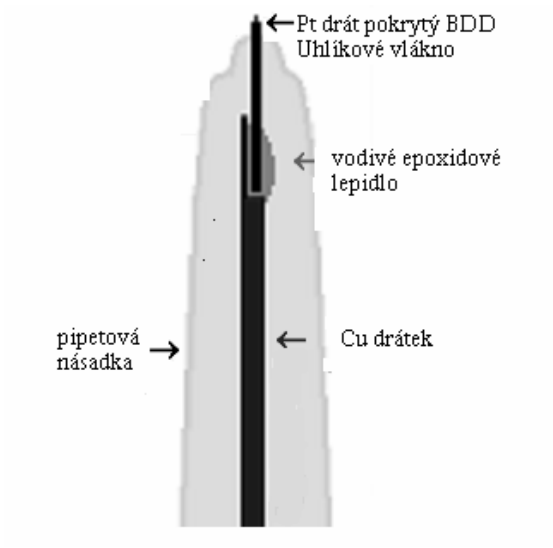


Obr. 11.3 Tenkovrstvá cela pro průtoková měření s diamantovou filmovou elektrodou



Obr. 11.4 Detekční cela pro kapilární elektroforézu

1 – konec separační kapiláry; 2 – chromatografické šroubení; 3 – pár Kel-F šroubů pro nastavení pozice kapiláry v ose *x*; 4 – Teflonová matka; 5 – pár Kel-F šroubů pro nastavení pozice kapiláry v ose *y*; 6 – platinový drát pro připojení vysokého napětí; 7 – platinový drát jako pomocná elektroda; 8 – referentní elektroda Ag/AgCl; 9 – pracovní diamantová mikroelektroda (detail viz obr. 11.5).



Obr. 11.5 Pracovní diamantová mikroelektroda

11.5 Závěr

Z výše uvedených vlastností a výhod diamantových elektrod jednoznačně vyplývá, že to je mimořádně perspektivní elektrodový materiál, jehož využití v elektroanalytické chemii se bude zřejmě i nadále úspěšně rozvíjet. Svědčí o tom i závěry novějších přehledných referátů [12–14] z této oblasti. Do budoucna je tudíž žádoucí věnovat této problematice zvýšenou pozornost.

11.6 Literatura

1. McCreery R.L.: v knize *Electroanalytical Chemistry* (Bard A.J., ed.), sv. 17. Marcel Dekker, New York 1991.
2. Iwaki M., Sato S., Takahashi K., Sakairi H.: Nucl. Instrum.Methods *209*, 1129 (1983).
3. Pleskov Y., Sakharova A., Krotova M.D., Bouilov L., Spitsyn B.V.: J. Electroanal.Chem. *228*, 19 (1987).
4. Xu J., Granger M.C., Chen Q., Strojek J.W., Lister T.E., Swain G.M.: Anal.Chem. *69*, 591A (1997).
5. Swain G.M., Anderson A.B., Angus J.C.: MRS Bulletin *23*, 56 (1998).
6. Granger M.C., Xu J., Strojek J.W., Swain G.M.: Anal.Chim.Acta *397*, 145 (1999).
7. Granger M.C., Witek M., Xu J., Wang J., Hupert M., Hanks A., Koppang M.D., Butler J.E., Lucazeau G., Mermoux M., Strojek J.W., Swain G.M.: Anal.Chem. *72*, 3793 (2000).
8. Cvačka J., Swain G.M., Barek J., Zima J., Barek J.: Chem. Listy 96, 33 (2002).
9. Quaiserová-Mocko V.: *PhD Thesis.* Charles University, Faculty of Science, Prague 2004.
10. Pecková K., Mocko V., Opekar F., Swain G.M., Zima J.: Chem. Listy 100, 124 (2006).
11. Compton R.G., Foord J.S., Marken F.: Electroanalysis 15, 1349 (2003).
12. Pleskov Yu V..: Protection of Metals 42, 115 (2006).
13. Pleskov Yu.V.: Russ. J. Electrochem. 38, 1411 (2002).
14. Chailapakul O., Siangproh W., Tryk D.A.: Senosrs Lett. 4, 99 (2006).

12. ELIMINAČNÍ VOLTAMETRIE S LINEÁRNÍM SCANEM

Dr. Ing. Tomáš Navrátil
Ústav fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského AV ČR, Dolejškova 3, 182 23 Praha 8
Navratil@jh-inst.cas.cz

12.1 Teorie eliminačních metod

Elektrochemické eliminační metody patří do kategorie matematických metod, které rozšiřují možnosti získání kvantitativních a kvalitativních informací z polarografických či voltametrických signálů. Jedná se především o eliminační polarografii (EP) a eliminační voltametrii s lineárním scanem (EVLS). První publikace popisující EVLS se objevila již před deseti lety [1-3], od prvních publikací na téma EP uplynulo ještě o dalších několik let více [4-7]. I když prvotní myšlenka je ještě poněkud starší, reálné uplatnění obou technik a jejich zavedení do praktického užití umožnil až rozvoj a dostatečné rozšíření výpočetní techniky na počátku 90. let 20. století. S omezením užívání polarografie a vzhledem k časové a instrumentální náročnosti byla EP prakticky úplně vytlačena EVLS.

I když teorie uvedených technik je podstatně složitější, lze ji zjednodušeně interpretovat přibližně takto: Základem obou technik jsou dva postuláty. Prvním z nich je aditivita partikulárních proudů, která předpokládá, že registrovaný proud je součtem proudů partikulárních:

$$I = \Sigma I_i \tag{1}$$

$$I_j = I_c + I_d + I_k + I_{ir} + \ldots$$

kde I_j jsou parciální proudy, ze kterých je registrovaný signál I složen – např. difúzně řízený reverzibilní (I_d), kapacitní (I_c), kinetický (I_k) a tzv. difúzně řízený ireverzibilní (I_{ir}) proud.

Druhý postulát předpokládá v případě EVLS vyjádřitelnost jednotlivých proudů ve tvaru:

$$I_j = W_j(v)\ Y_j(E) \tag{2}$$

kde I představuje proud, v rychlost scanu a E potenciál, $W_j(v)$ – člen závisející na rychlosti polarizace a $Y_j(E)$ – člen závisící na potenciálu. Pro EP je tento postulát obdobný, jen místo rychlostního členu je předpokládán člen časový.

Z teorie je známo, že některé druhy proudů je možno vyjádřit zcela explicitně v závislosti na rychlosti polarizace:

$$I_d = v^{1/2}\ Y_d(E) \tag{3}$$

$$I_c = v^{1}\ Y_c(E) \tag{4}$$

$$I_k = v^{0}\ Y_k(E) \tag{5}$$

Proudovou složku tzv. difúzně řízeného ireverzibilního proudu (I_{ir}) takto jednoduše vyjádřit nelze a tato složka se nahrazuje součtem nekonečné řady [1]:

$$I_{ir} = \Sigma v^{-1/2} Y_p(E) = Y_0(E) \quad + \quad v^{-1/2} Y_1(E) \quad + \quad v^{-1} Y_2(E) \quad + \quad v^{-3/2} Y_2(E) \quad + \quad \ldots \qquad (6)$$

Většinou se do výpočtu berou pouze prvé dva členy (prvý z nich je vlastně totožný s proudem kinetickým), avšak výpočty eliminačních rovnic byly provedeny i pro další dva [8]. Sloučením rovnic (1)-(6) se snadno vytvoří proudová funkce

$$I = v^{1/2} Y_d(E) + v^1 Y_c(E) \; + v^0 Y_k(E) \; + v^{-1/2}{}_1 Y_{1ir}(E) \; + v^{-1}{}_2 Y_{ir}(E) \; + v^{-3/2} Y_{2ir}(E) \; + \ldots \qquad (7)$$

Při známých rychlostech polarizace se jedná o lineární rovnici o x (2, 3, 4, …) neznámých. Stačí tedy zkoumaný systém proměřit při daném počtu různých rychlostí polarizace a řešením soustavy lineárních rovnic o daném počtu neznámých [1-3] lze snadno vyjádřit (eliminovat či konzervovat) část, která přísluší zkoumanému proudu. Aby bylo možno výsledky dosažené při různých absolutních rychlostech srovnávat, je lépe přejít na jejich bezrozměrné vyjádření, tj. zvolit si jednu rychlost jako referenční a ostatní pak brát jako její násobky ($v_i = v_{ref}K^n$, kde $K = 2$ a $n = \ldots -2, -1, 0, 1 \ldots$). Násobicí koeficient K bývá obvykle 2 nebo 4 [1]. Při koeficientu $K = 2$ a zvolené referenční rychlosti 80 mV s^{-1} se tedy používají rychlosti 20, 40, 80 a 160 mV s^{-1}. Do rovnice (7) lze pak místo absolutních rychlostí polarizace dosadit jejich relativní hodnoty: ¼, ½, 1 a 2. Tím se získají bezrozměrná vyjadření a zjednoduší se koeficienty u potenciálových členů. Hodnota n nemusí být nutně celočíselná, lze použít i jakýkoliv jiný poměr a podle něj přepočítat eliminační rovnice [8].

Takto lze získat rovnice (8) až (35), pomocí nichž eliminujeme nebo konzervujeme různé druhy proudů.

$f(I_k) = 0; \qquad f(I_d) = I_d; \qquad f(I_c) = ?$

$$f(I) = 3{,}414\,2I - 3{,}414\,2I_{1/2} \qquad (8)$$

$f(I_c) = 0; \qquad f(I_d) = I_d; \qquad f(I_k) = ?$

$$f(I) = 4{,}828\,4I_{1/2} - 2{,}4142I \qquad (9)$$

$f(I_d) = 0; \qquad f(I_k) = I_k; \qquad f(I_c) = ?$

$$f(I) = 3{,}4142I_{1/2} - 2{,}4142I \qquad (10)$$

$f(I_k) = 0; \qquad f(I_c) = 0; \qquad f(I_d) = I_d$

$$f(I) = 17{,}485I - 11{,}657I_{1/2} - 5{,}8284I_2 \qquad (11)$$

$f(I_d) = 0; \qquad f(I_c) = 0; \qquad f(I_k) = I_k$

$$f(I) = 2{,}414\,2I_2 + 6{,}828\,4I_{1/2} - 8{,}242\,6I \qquad (12)$$

$f(I_k) = 0; \quad f(I_d) = 0; \quad f(I_c) = I_c$

$$f(I) = 3{,}414\,2I_2 + 4{,}828\,4I_{1/2} - 8{,}242\,6I \tag{13}$$

$f(I_k) = 0; \quad f({}_1I_{ir}) = 0; \quad f(I_d) = I_d$

$$f(I) = 6{,}828\,5I - 11{,}657I_{1/2} + 4{,}828\,5I_{1/4} \tag{14}$$

$f(I_c) = 0; \quad f(I_k) = 0; \quad f({}_1I_{ir}) = 0; \quad f(I_d) = I_d$

$$f(I) = 43{,}213I - 48{,}041I_{1/2} - 11{,}657I_2 + 16{,}485I_{1/4} \tag{15}$$

$f(I_d) = 0; \quad f(I_c) = I_c; \quad f(I_k) = 0; \quad f({}_1I_{Ir}) = 0$

$$f(I) = 16{,}485I_{1/2} - 16{,}485I + 5{,}282I_2 - 5{,}282I_{1/4} \tag{16}$$

$f(I_d) = 0; \quad f(I_c) = 0; \quad f(I_k) = I_k; \quad f({}_1I_{Ir}) = 0$

$$f(I) = 43{,}213I_{1/2} - 33{,}970I + 8{,}243I_2 - 16{,}485I_{1/4} \tag{17}$$

$f(I_d) = 0; \quad f(I_c) = 0; \quad f(I_k) = 0; \quad f({}_1I_{Ir}) = {}_1I_{Ir}$

$$f(I) = -11{,}657I_{1/2} - 8{,}243I - 1{,}867I_2 + 5{,}282I_{1/4} \tag{18}$$

$f(I_d) = 0; \quad f(I_c) = ?; \quad f(I_k) = I_k; \quad f({}_1I_{Ir}) = 0$

$$f(I) = -8{,}243I + 17{,}485I_{1/2} - 8{,}243I_{1/4} \tag{19}$$

$f(I_d) = ?; \quad f(I_c) = 0; \quad f(I_k) = I_k; \quad f({}_1I_{Ir}) = 0$

$$f(I) = -3{,}414I + 9{,}242I_{1/2} - 4{,}828I_{1/4} \tag{20}$$

$f(I_d) = I_d; \quad f(I_c) = ?; \quad f(I_k) = ?; \quad f({}_1I_{Ir}) = 0$

$$f(I) = -1{,}333I - 0{,}667I_{1/4} \tag{21}$$

Vezměme si za příklad rovnici (15), která konzervuje složku proudu, která odpovídá difúzně řízené reakci (např. redukci), zatímco eliminuje všechny ostatní druhy proudů, takže získaná funkce je prostá všech ostatních složek kromě zmíněné difuzní. Tím je možno odhalit signály odpovídající difúzně řízené reakci, které by byly skryty například v kineticky řízeném rozkladu základního elektrolytu. Rovnice (8) až (21) [1, 9-11] používají poměr rychlostí polarizace (násobicí koeficient) $K = 2$, rovnice (22) až (35) [9] používají neceločíselný koeficient, kde rychlosti scanu jsou v poměru: 0,5 : 1 : 5 : 10 (rychlost „5“ je považována za referenční). Uvedené rovnice jsou jen příkladem a lze je s minimální znalostí matematiky (soustava x lineárních rovnic o y neznámých) modifikovat podle zvolených požadavků [8].

$f(I_k) = 0; \qquad f(I_d) = I_d$

$$f(I) = 0{,}809\,0I_5 - 0.809\,0I_1 \tag{22}$$

$f(I_C) = 0; \qquad f(I_d) = I_d$

$$f(I) = 1{,}809\,0I_1 - 0{,}361\,8I_5 \tag{23}$$

$f(I_d) = 0; \qquad f(I_k) = I_k$

$$f(I) = 1{,}809\,0I_1 - 0{,}809\,0I_5 \tag{24}$$

$f(I_k) = 0; \qquad f(I_c) = 0; \qquad f(I_d) = I_d$

$$f(I) = 3{,}635\,6I_5 - 2{,}019\,8I_1 - 1{,}615\,8I_{10} \tag{25}$$

$f(I_d) = 0; \qquad f(I_c) = 0; \qquad f(I_k) = I_k$

$$f(I) = -2{,}762\,2I_5 + 2{,}645\,6I_1 + 1{,}116\,5I_{10} \tag{26}$$

$f(I_k) = 0; \qquad f(I_d) = 0; \qquad f(I_c) = I_c$

$$f(I) = -0{,}873\,5I_5 + 0{,}374\,2I_1 + 0{,}499\,3I_{10} \tag{27}$$

$f(I_k) = 0; \qquad f({}_1I_{Ir}) = 0; \qquad f(I_d) = I_d$

$$f(I) = -1{,}953\,1I_5 + 0{,}374\,2I_1 + 1{,}579\,0I_{10} \tag{28}$$

$f(I_c) = 0; \qquad f(I_k) = 0; \qquad f({}_1I_{Ir}) = 0; \qquad f(I_d) = I_d$

$$f(I) = 6{,}220\,3I_5 - 7{,}799\,3I_1 - 2{,}536\,0I_{10} + 4{,}115\,0I_{0,5} \tag{29}$$

$f(I_d) = 0; \qquad f(I_c) = I_c; \qquad f(I_k) = 0; \qquad f({}_1I_{Ir}) = 0$

$$f(I) = -0{,}643I_{0,5} + 1{,}277I - 1{,}277I_5 + 0{,}643I_{10} \tag{30}$$

$f(I_d) = 0; \qquad f(I_c) = 0; \qquad f(I_k) = I_k; \qquad f({}_1I_{Ir}) = 0$

$$f(I) = -8{,}019I_{0,5} + 13{,}909I - 7{,}799I_5 + 2{,}909I_{10} \tag{31}$$

$f(I_d) = 0; \qquad f(I_c) = 0; \qquad f(I_k) = 0; \qquad f({}_1I_{Ir}) = {}_1I_{Ir}$

$$f(I) = 4{,}548I_{0,5} - 6{,}387I + 2{,}856I_5 - 1{,}017I_{10} \tag{32}$$

$f(I_d) = 0; f(I_c) = ?; f(I_k) = I_k; f({}_1I_{Ir}) = 0$

$$f(I) = -5{,}110I_{0,5} + 8{,}130I - 2{,}020I_5 \tag{33}$$

$f(I_d) = ?; f(I_c) = 0; f(I_k) = I_k; f({}_1I_{Ir}) = 0$

$$f(I) = -3{,}298I_{0,5} + 4{,}960I - 0{,}662I_5 \tag{34}$$

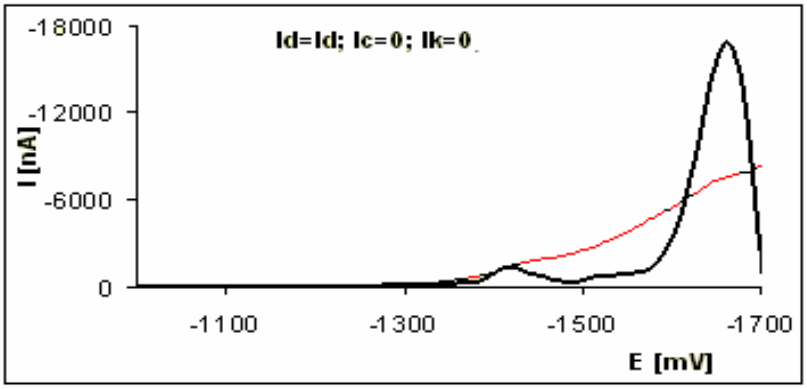
$$f(I_d) = I_d; \qquad f(I_c) = ?; \qquad f(I_k) = ?; \qquad f({}_1I_{Ir}) = 0$$

$$f(I) = 13{,}396I_{0,5} - 3{,}789I_5 \tag{35}$$

Pokud by tedy byl podle rovnice (29) zpracován voltamogram obsahující pouze difúzně řízený děj, pak obdržíme eliminační voltamogram obsahující pouze jeden pík, který je tvarově velice podobný původnímu, jen o něco vyšší (I_c, I_k a I_{ir} by byly vyeliminovány), zatímco eliminační voltamogramy podle rovnic (16) až (18) by obsahovaly samé nuly (difúzní proud by byl vyeliminován).

12.2 Odhalování skrytých dějů a rozšiřování měřicího okna

Představa, že sledovaný děj je složen pouze z adovatelných složek, je většinou velice zidealizovaným předpokladem. Pokud je splněn postulát dle rovnice (1), tj. aditivita proudů, pak je vše v pořádku, pomocí eliminačních rovnic rozčleníme jednotlivé příspěvky. Příkladem může být obr. 12.1, kde je zachycen tenkou křivkou DC voltamogram adeninu a cytosinu, jejichž redukční píky jsou z větší části překryty rozkladem základního elektrolytu (kineticky řízeným), a silná čára ukazuje eliminační voltamogram podle rovnice (11), kde dochází k eliminaci kapacitního a kinetického příspěvku a obdržíme pouze signály odpovídající difúzně řízeným redukcím.



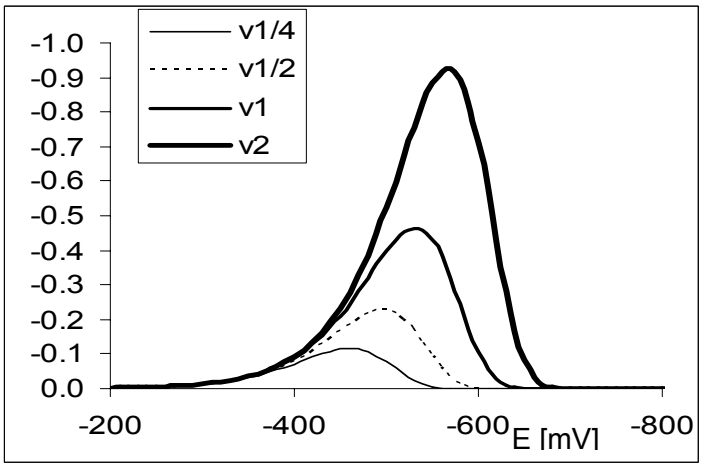
Obr. 12.1: ***Tenká křivka – DC voltamogram adeninu a cytosinu (10^{-4} mol l^{-1}), silná křivka - eliminační voltamogram podle rovnice (11)***

12.3 Odhalování skrytých dějů a rozšiřování měřicího okna

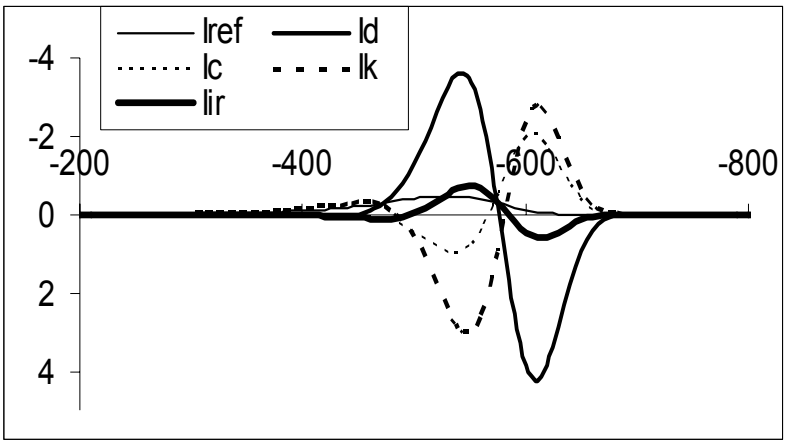
Co se však stane, pokud je aditivita porušena a nelze předpokládat odpovídající separaci příspěvků. Příkladem takovéhoto procesu je redukce odehrávající se v adsorbovaném stavu [12, 13]. Takové voltamogramy jsou popsány rovnicí (36)

$$i = nFAk\Gamma_0 \exp\left(-\frac{RT}{\alpha n_a F}\frac{k}{v}\right) \qquad \text{kde} \quad k = k_i \exp\left(-\frac{\alpha n_a F}{RT}E\right) \tag{36}$$

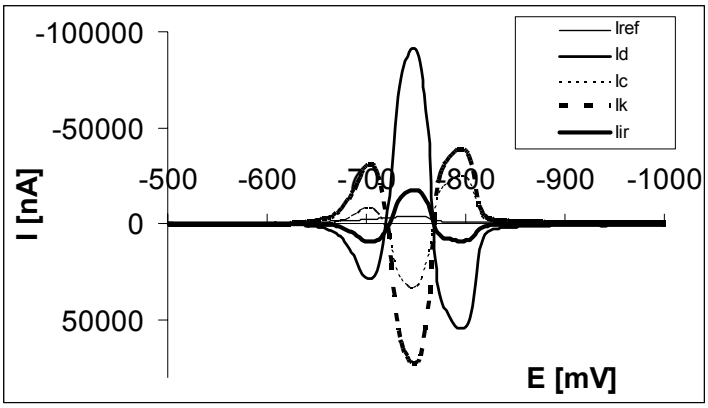
kde je n - celkový počet vyměňovaných elektronů, F - Faradayova konstanta, A - plocha elektrody, k – heterogenní rychlostní konstanta ireverzibilního procesu (k_i- počáteční), Γ_0 – počáteční povrchový přebytek elektroaktivní substance, α - koeficient přenosu náboje, n_a - celkový počet vyměňovaných elektronů v reakci, která určuje rychlost, R – univerzální plynová konstanta, T – teplota, E – potenciál. Na obr. 12.2 je znázorněna matematická simulace difúzně řízeného děje probíhající v adsorbovaném stavu podle rovnice (36) při čtyřech různých rychlostech polarizace a koeficientu $K = 2$. Na obr. 12.3 jsou pak znázorněny výsledky zpracování podle eliminačních rovnic (15) až (18). Tvar signálu podle rovnic (15) a (18) je charakterizován píkem – protipíkem, jejichž výšky jsou ve vypočteném poměru [12]. Eliminační voltamogramy vypočtené podle rovnic (16) a (17) mají tvar opačný, tj. protipík – pík. Obdobné tvary jsou dosaženy pomocí rovnic (11) až (13). Zde se ukazuje, že je nezbytně nutné činit závěry o probíhajícím elektrodovém procesu až po zhodnocení více eliminačních voltamogramů a nepostačuje k tomuto účelu jen jediný.



Obr. 12.2: ***Matematická simulace voltametrické redukce v adsorbovaném stavu podle rovnice (36), při rychlostech 40 ($v_{1/4}$), 80 ($v_{1/2}$), 160 (v_1=v_{ref}) a 320 (v_2) mV s^{-1}***



Obr. 12.3: ***Eliminační voltamogramy vypočtené z křivek dle obr. 12.2 vypočtené podle rovnic (15) až (18). V legendě jsou uvedeny pouze zakonzervované části voltamogramů***

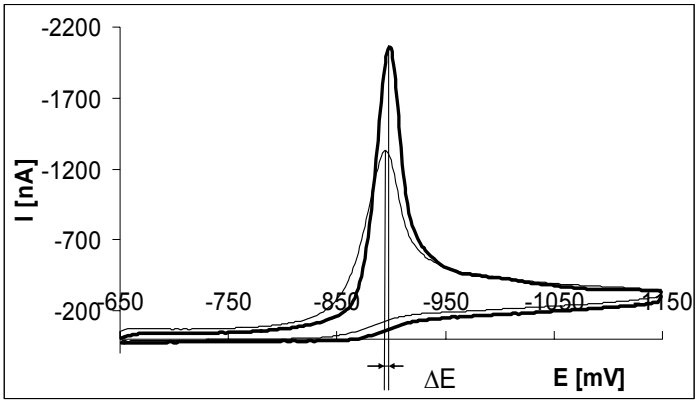


Obr. 12.4: ***Eliminační voltamogramy 10^{-4}M 1-nitronaftalenu v 0,01M-NaOH a methanolu (9:1), výpočty podle rovnic (15)- (18). V legendě jsou uvedeny pouze zakonzervované části voltamogramů***

Komplikovanější situace nastává v tom případě, že difúzně řízené reakci předchází kineticky řízená reakce. Bohužel je tento případ matematicky podstatně komplikovanější a neexistuje jednoduchý matematický model, jako je tomu v případě rovnice (36). Pokud takovéto voltamogramy difúzně řízeného děje s předřazenou kineticky řízenou reakcí zpracujeme pomocí eliminační voltametrie, obdržíme přesně opačné tvary, než u redukce v adsorbovaném stavu, tj. rovnice (15) a (18), resp. (11), poskytnou protipík-pík a rovnice (16) a (17), resp. (12) a (13), pík-protipík [13].

Existují však i kombinované případy, kdy difúzně řízenému ději v adsorbovaném stavu předchází kineticky řízený děj. To je případ 1-nitronaftalenu v NaOH-methanolickém roztoku 9:1 (obr. 12.4). Pokud provedeme výpočet eliminačních rovnic podle (15) až (18), obdržíme jak protipík před, tak za samotným píkem.

Pro posuzování parametrů elektrodového děje se jeví jako vysoce užitečný výpočet koeficientu přenosu náboje a počtu přenesených elektronů pomocí posunu píků [1]. Tento postup je založen na rozdílné pozici vrcholu píku zaznamenaného při referenční rychlosti a eliminačních píků vypočtených podle různých eliminačních rovnic. Na obr. 12.5 je znázorněn způsob odečítání vrcholů píků chinoxalinu. Teoretické posuny vrcholů píků byly prezentovány již v [1] a jsou uvedeny v tab. 12.1. Jelikož koeficient přenosu náboje α se obvykle pohybuje v intervalu 0,3-0,7, lze snadno vypočítat počet přenášených elektronů řídicího děje. Například při redukci komplexu oxidu osmičelého s pyridinem po interakci s thyminovou složkou DNA byl vypočten součin αn = 0,29 a 0,39 (při výpočtech dle rovnic uvedených v tab. 12.1 na HMDE a na pevné stříbrné amalgámové elektrodě modifikované rtuťovým meniskem). Lze tedy usoudit, že řídicími ději registrovaných procesů jsou pravděpodobně jednoelektronové redukce s koeficientem přenosu náboje α cca 0,29, resp 0,39 [10]. Bohužel, rozdíly v polohách vrcholů píků jsou pouze několik mV a běžně zaznamenávané voltamogramy zaznamenávají body v krocích po několika mV (např. po 3 mV). Vzhledem k běžnému zašumění měřených voltamogramů je přesný výpočet relativně komplikovaný.



Obr. 12.5: ***Tenká křivka: DC voltamogram chinoxalinu v amoniakálním pufru pH=6. Tlustá křivka: eliminační voltamogram vypočtený podle rovnice (8)***

Tab. 12.1: ***Výpočet koeficientu přenosu náboje a počtu vyměněných elektronů z posuvu píků***

Rovnice	$\alpha nFE_{max}/RT$	$\Delta E = \Delta E - E_{ref}$ [mV] (αn = 1)
I_{ref}	–0,209	
(8)	–0,621	–10,6
(9)	0,756	+24,8
(11)	–0,001	5,3
(14)	–0,843	–16,3
(15)	–0,201	0,2

Snad nikdo nepochybuje o smysluplnosti fitování (simulací) voltamogramů elektrochemických reakcí, případně včetně předřazených či následných chemických reakcí pomocí jejich matematických modelů. EVLS lze použít v tomto případě jako multidimenzionální rozšíření („brýle s mnoha dioptriemi“). Pokud jeden změřený DC voltamogram poskytne jen jednu křivku, kterou lze fitovat s danou přesností, oproti tomu pouhým proměřením stejného roztoku při více rychlostech polarizace a zpracováním jejich eliminací získáme hned několik pohledů na studovaný systém a jakékoliv odchylky od předpokládaného modelu budou daleko zřetelnější.

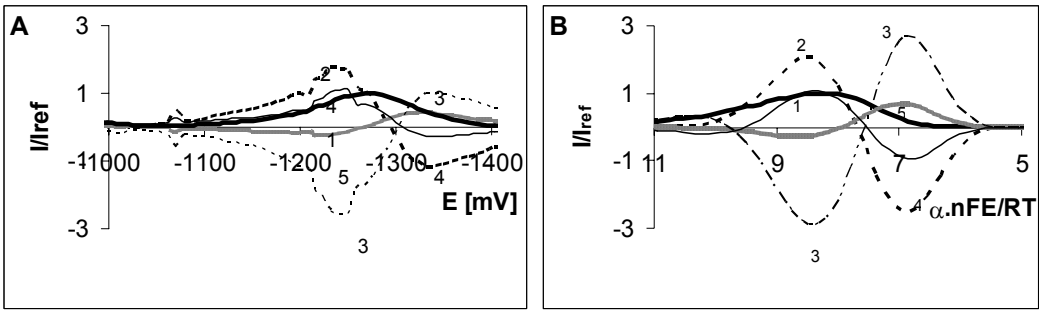
Tato metoda byla testována na systémech Cr(VI) a Cr(VI)+DTPA (při potenciálu +0,05 V *vs.* 3M-Ag/AgCl je Cr(VI) redukován na Cr(III), který tvoří komplex s DTPA) [9] (obr. 12.6), kde byly na základě simulací (fitování) vyčísleny následující parametry:

1. **Mechanismus děje***:* Adsorpce komplexu včetně následné elektrochemická redukce Cr(III) → Cr(II) v adsorbovaném stavu (podle tvarů eliminačních voltamogramů dle rovnic (15) a (18) – pík-protipík, resp. (16) a (17) protipík-pík);
2. **Součin** αn – 0,55, tj. jednoelektronová redukce (Cr(III) → Cr(II)) s koeficientem přenosu náboje cca 0,55*;*

3. **Rychlostní konstanta elektrochemického děje, případně jiných parametrů (adsorpční koeficient apod.)** – provádí se buď iteračním postupem (do teoretických modelů jsou dosazovány příslušné proměnné tak, aby se fitované a reálné voltamogramy co nejvíce shodovaly co do velikosti i tvaru), nebo relativním způsobem (velikosti proudů fitovaných a reálných voltamogramů jsou v jistém konstantním poměru) – rychlostní konstanta $1{,}7 \cdot 10^{-4}$ mol s^{-1}.

Posouzení charakteru elektrodového děje při zvoleném potenciálu je možno provádět v prvním přiblížení pomocí následujícího výpočtu [3,15]: Lze předpokládat, že eliminační funkce je úměrná původně zaznamenanému proudu podle rovnice

$$f(I_j) = b_{\mathrm{EVLS}}\, I_j \tag{37}$$



Obr. 12.6: ***DC-voltamogram zaznamenaný na HMDE, acetátový pufr, pH=6,2 a eliminační voltamogramy podle rovnic (30)-(33)***

A:1 - DC-voltamogram na HMDE , acetátový pufr, pH = 6,2, v = 5 V s^{-1}; křivky 2 až 5 odpovídají eliminacím voltamogramu1

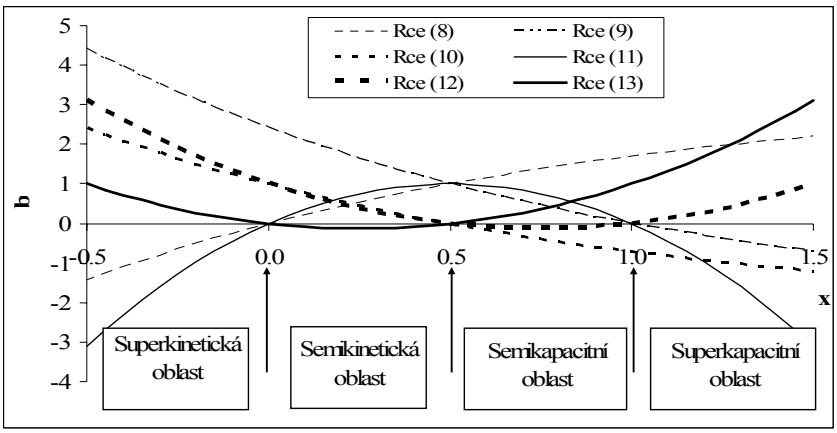
B: 1 - simulovaný voltamogram.; křivky 2 - 5 odpovídají eliminacím simulovaného voltamogramu; 2 - konzervace I_d a eliminace I_c, I_k, $_1I_{ir}$; 3 - konzervace I_c a eliminace I_d, I_k, $_1I_{ir}$; 4 - konzervace I_k a eliminace I_d, I_c, $_1I_{ir}$; 5 - konzervace $_1I_{ir}$ a eliminace I_c, I_k, I_d

Jak je uvedeno výše, lze předpokládat dle rovnic (3) až (7), že koeficient b_{EVLS} je úměrný mocnině rychlosti polarizace ($\sim v^x$). Tak lze odvodit, že

$$f(I_j) / I_j = \mathrm{b}_{\mathrm{EVLS}} \sim v^x \tag{38}$$

Vypočtem x (při zvoleném potenciálu) se zjistí charakter proudu (při tomto potenciálu) (podle rovnic (3) až (7)). Pokud je vypočtené $x = 1$, jedná se o proud kapacitní, rovnice (4), pokud je vypočtené $x = 0{,}5$, jedná se o proud difúzně řízený, rovnice (3), pokud je vypočtené $x = 0$, jde o proud kinetický, rovnice (5). Protože tento výpočet by mohl být komplikovaný, je vhodné jej provádět pomocí předpřipraveného grafu dle obr. 12.7. Pokud tedy vyjde podle rovnice (11) koeficient b roven 0, jsou řešeními $x_1 = 0$ a $x_2 = 1$, tedy v úvahu připadá jak kinetický, tak kapacitní proud. Je proto nutno provést výpočet a rozhodnout podle jiné rovnice, např. (13), pokud i zde vyjde poměr

roven $b = 0$, lze druhé řešení rovnice vyloučit a přijmout řešení $x_1 = 0$, a tedy konstatovat, že jde o děj kineticky řízený. Tento způsob určování charakteru děje je však možno použít pouze pro nejjednodušší procesy.



Obr. 12.7: ***Výpočet mocninného koeficientu x z koeficientu b podle rovnice (38)***

Na základě výše uvedeného by bylo možno dovodit, že jde o poměrně matematicky komplikovanou metodu, která vyžaduje značné množství matematických operací. Avšak veškeré výpočty lze snadno realizovat buď pomocí kalkulačky, stolního PC nebo běžného tabulkového kalkulátoru (např. MS Excel) s příslušným makrem [16], které je k dispozici na vyžádání u autora této kapitoly. Příznivá zpráva je, že už ve dvou profesionálně vytvořených elektrochemických softwarech jsou tyto výpočty přímo zabudovány ve formě modulů. Jedná se o Software Polar 6 k přístroji Eco-Tribo Polarograf (Eco-Trend Plus, spol. s r. o.) a software Multielchem k přístroji Multielchem [17] (Ústav fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského AV ČR) (podrobně popisovaný v kap. 9 této knihy). Způsob výpočtu eliminačních voltamogramů pomocí těchto softwarů je velmi jednoduchý: Do přiloženého ASCII souboru jsou vloženy koeficienty eliminačních rovnic, obsluha software označí pouze, která z naměřených křivek byla změřena příslušným násobkem rychlostí a stiskem jediného tlačítka je proveden výpočet všech eliminačních voltamogramů, se kterými je možno pracovat následně jako s jakýmikoliv jinými voltamogramy. Obdobným způsobem lze velmi jednoduše, stiskem jediného tlačítka, provést v uvedených softwarech i výpočet podílu dvou křivek podle rovnic (37) a (38) a jednoduchým způsobem podle obr. 12.7 určit charakter probíhajícího elektrodového děje.

12.4 Závěr

Eliminační voltametrie s lineárním scanem se jeví jako vhodný nástroj pro získání informací o probíhajících elektrodových dějích na povrchu elektrody. Její teorie je založena na exaktním vědeckém teoretickém základě. Za dobu své existence prokázala, že může být mocným nástrojem v rukou elektrochemika, může být použita jak k eliminaci nežádoucích proudů a konzervaci proudů sledovaných, tak k odhalení skrytých dějů, zvětšení měřicího okna, zvýšení citlivosti měření, ob-

jasnění reakčních mechanismů, výpočtu koeficientu přenosu náboje a počtu vyměňovaných elektronů či k výpočtu rychlostních konstant.

12.5 Literatura

1. Dračka, O., J. Electroanal. Chem., 1996, 402, 19.
2. Trnková, L., Dračka, O., J. Electroanal. Chem., 1996, 413, 123.
3. Trnková, L., Chem. Listy, 2001, 95, 517.
4. Dračka, O., Collect. Czech. Chem. Commun., 1986, 51, 288.
5. Dračka, O., J. Electroanal. Chem., 1990, 296, 405.
6. Trnková, L., Dračka, O., J. Electroanal. Chem., 1993, 348, 265.
7. Kořenek, K., Trnková, L., Dračka O., Chem. Papers 1990, 44, 527.
8. Navrátil, T. Nepublikované výsledky
9. Sander, S., Navrátil, T., Novotný, L., Electroanalysis, 2003, 15, 1513.
10. Fadrná, R., Yosypchuk, B., Fojta, M., Navrátil, T., Novotný, L., Anal. Lett., 2004, 37, 399.
11. Navrátil, T., Šenholdová, Z., Shanmugam K., Barek J., Electroanalysis, 2006, 18, 201.
12. Trnková, L., Kizek, R., Dračka, O., Electroanalysis, 2000, 12, 905.
13. Bard, A.J.; Faulkner, L.R. *Electrochemical Methods*, Wiley: New York, 1980.
14. Trnková, L., Nepublikované výsledky, 2006
15. Trnková, L., J. Electroanal. Chem, 2005, 582, 258.
16. Navrátil, T., Makro pro výpočet EVLS a úpravu křivek v MS Excel. 1996-2006.
17. Navrátil, T., Yosypchuk, B., Electroanalysis, Odesláno, 2006.

13. NOVÉ MOŽNOSTI ELEKTROANALYTICKÝCH METOD V ANALÝZE FARMACEUTICKÝCH, BIOLOGICKÝCH A ENVIRONMENTÁLNÍCH MATRIC

RNDr. Karel Nesměrák, Ph.D.

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie,

Albertov 2030, 128 43 Praha 2

nesmerak@natur.cuni.cz

V současné době bouřlivého rozvoje instrumentálních analytických technik dochází k postupnému posunu významu a využití elektroanalytických metod. Kromě původního poslání elektroanalýzy spočívajícího v možnostech stanovení nízkých koncentrací analytů, které částečně přejaly separační a spektrometrické techniky, se postupně nachází další aplikace elektroanalytické chemie zejména jako nenahraditelného nástroje studia mechanismů chemických a elektrochemických reakcí, jako metody k přípravě produktů redukčních a oxidačních reakcí apod. Významné a nenahraditelné místo tak nacházejí elektroanalytické techniky ve farmacii, medicíně, potravinářství, životním prostředí, tedy v oblastech, které se dotýkají reálného života každého z nás.

13.1 Elektroanalytické metody při analýze farmaceutických matric

Elektroanalytické metody se uplatňují ve všech fázích týkajících se jak výzkumu a vývoje léčiv, jejich výroby a kontroly čistoty, tak při studiích mechanismů účinku a metabolických přeměn léčiv. Zatímco při kontrolách čistoty léčiv či analýze metabolických produktů jsou spíše využívány chromatografické a spektrometrické metody, při vývoji nových léčiv a modelování jejich možného metabolického osudu a mechanismu účinku jsou vzhledem ke své podstatě častější techniky elektroanalytické.

O šťastném vztahu elektroanalýzy a farmacie ostatně svědčí objev protinádorových vlastností *cis*-diammindichloroplatiny, učiněný náhodně při studiu vlivu elektrického proudu na růst bakterie *Escherichia coli.* Za podmínek experimentu prováděném v amoniakálním pufru vznikala jako oxidační produkt na platinové anodě právě *cis*-diammindichloroplatina, která způsobovala inhibici růstu *E. coli* [1].

Jednou z důležitých oblastí farmaceutického výzkumu je studium biotransformace léčiv, které je ovšem *in vivo* značně složité a obtížné. Proto se k němu, alespoň v prvních krocích, využívá jednodušších *in vitro* modelů, z nichž k těm významnějším patří **elektrochemický model I. fáze biotransformace.** Je založen na podobnosti oxidačně-redukčních reakcí na elektrodě s oxidačně-

redukčními enzymatickými reakcemi probíhajícími během I. fáze biotransformace [2]. Vlastní studium probíhá obvykle v nevodném prostředí; kromě důvodů elektrochemických (rozpustnost studovaných látek, anodické potenciálové okno) je hlavním důvodem pro použití takového prostředí i to, že řada metabolických reakcí probíhá v prostředí lipofilní povahy (fosfolipidové membrány). Bylo popsáno, že enzymatické oxidace dobře probíhají i v lipidovém – a tedy bezvodém – prostředí; ukazuje se, že k správné funkci enzymu postačuje monomolekulární vrstva vody na jeho povrchu [3]. Tyto reakce je tedy možné simulovat pomocí elektrooxidačních reakcí prováděných v nevodném prostředí. Z elektroanalytických technik se uplatňují především DC-voltametrie, cyklická voltametrie a coulometrie, jimiž se studují základní elektrochemické parametry studovaných látek (redoxní potenciály, počty vyměňovaných elektronů) a mechanismus reakce. Po tomto základním studiu navazuje příprava oxidačních nebo redukčních produktů metodami preparativní elektrolýzy a jejich následná identifikace pomocí separačních a spektrálních technik (hmotnostní spektrometrie, infračervená spektrometrie, NMR). Výsledky elektrochemického studia oxidací či redukcí farmaceuticky aktivních látek v nevodném prostředí tak mohou poskytnout řadu užitečných informací
o pravděpodobném průběhu biologické oxidace; jako příklady lze uvést studium elektrooxidace benzenu [4], ifosfamidu a cyklofosfamidu [5] nebo derivátů akridinu [6].

Dalším velmi významným a perspektivním uplatněním elektroanalytických metod ve farmacii je možnost **využití elektrochemických dat v QSPR a QSAR** [7, 8], tedy ve studiu vztahů mezi strukturou a fyzikálně-chemickými vlastnostmi látek (QSPR = quantitative structure-property relationships) či vztahů mezi strukturou a biologickými vlastnostmi látek (QSAR = quantitative structure-activity relationships). Předmětem analýzy vztahů mezi strukturou a vlastnostmi látek je hledání funkce vlastnost–struktura porovnáváním kvantitativních experimentálních a teoretických dat pomocí různých matematických modelů a postupů. Výsledky této analýzy umožňují vyvozování obecnějších závěrů z experimentálních dat a předpovědi chování a vlastností dosud nestudovaných látek. Vzhledem ke skutečnosti, že při voltametrických měřeních je získáván signál, který je výsledkem interakce elektronů přímo se studovanou molekulou, je ke korelacím používána „míra“ oxidovatelnosti či redukovatelnosti, tedy oxidační nebo redukční potenciál. Podle používané techniky to může být půlvlnový potenciál $E_{1/2}$ změřený DC-voltametrií, nebo potenciál píku E_p změřený pulsními technikami (diferenční pulsní voltametrií, cyklickou voltametrií); uplatňuje se ale i ionizační potenciál či elektronová afinita [9].

Vztahů mezi strukturou a oxidačně-redukčním potenciálem si povšiml již Heyrovský a roku 1934 definoval **pravidlo konjugace:** „*Polarografická redukce proběhne tím snáze, čím větší je počet konjugovaných vazeb v organické molekule.*“ Druhým empirickým pravidlem je roku 1938 Shikatou a Tachim formulované **pravidlo elektronegativity:** „*Půlvlnový potenciál bude tím klad-*

nější, čím elektronegativnější je substituent." Roku 1935 se podařilo Hammettovi nalézt kvantitativní rovnici popisující vztah mezi strukturou a vlastnostmi

$$\log k = \log k^\circ + \rho\sigma \tag{13.1}$$

kde k je rychlostní/rovnovážná konstanta reakce substituovaného derivátu, k° rychlostní/rovnovážná konstanta reakce nesubstituovaného derivátu, ρ reakční konstanta a σ Hamettova konstanta substituentu. Vzhledem ke vztahu mezi rovnovážnou konstantou oxidačně-redukční reakce a půlvlnovým potenciálem

$$E_{1/2} = \frac{\boldsymbol{R}T}{n\boldsymbol{F}} \ln k \tag{13.2}$$

kde $E_{1/2}$ je půlvlnový potenciál (V), $\boldsymbol{R}$ - molární plynová konstanta (8,314 J $K^{-1}mol^{-1}$), T - termodynamická teplota (K), n - počet vyměňovaných elektronů, $\boldsymbol{F}$ - Faradayova konstanta (96 485 C mol^{-1}) a k rovnovážná konstanta oxidačně-redukční reakce, lze kombinací vztahu (13.1) a (13.2) získat **Hammettovu rovnici pro půlvlnové potenciály**

$$(E_{1/2})_{\mathrm{X}} = (E_{1/2})_{\mathrm{H}} + \rho\sigma \tag{13.3}$$

kde $(E_{1/2})_{\mathrm{X}}$ je půlvlnový potenciál substituovaného derivátu a $(E_{1/2})_{\mathrm{H}}$ půlvlnový potenciál nesubstituovaného derivátu. Kromě Hamettových substituentových konstant se v obdobných korelacích uplatňují i jiné elektronické konstanty (Swain-Luptonovy, Taftovy aj.).

Dosud nejšíře se vlivu substituentů v organické polarografii věnoval Zuman [10]. Bylo dokonce navrženo pojmenování pro hodnocení vlivu substituentů na elektrochemické chování látek jako **QSER = quantitative structure-electrochemistry relationships** [11, 12]. Z novějších prací zabývajících se vztahy mezi strukturou lze např. uvést studium derivátů akridinu [13], benzoxazinu [14] nebo tetrazolu [15].

Vzhledem k tomu, že mezi substituentovými konstantami a elektrochemickými vlastnosti lze v řadě případů nalézt velmi těsné regresní závislosti, jsou rovněž hledány **vztahy mezi elektrochemickými vlastnostmi a biologickými účinky látek**. Elektrochemické parametry nemohou vzhledem ke složitosti biologických systémů poskytnout přímé korelační závislosti s biologickými aktivitami [16]. Do příslušných korelačních rovnic je totiž nutné zahrnout i transportní faktory (průchod látek biologickými membránami) a jiné důležité faktory (stereochemické parametry, difuze, rozpustnost, metabolismus aj.). Důležitým parametrem se ukazuje rozdělovací koeficient oktanol-voda. V nejjednodušších případech lze pak získat závislost

$$BA = f(E_{1/2}, \log P) \tag{13.4}$$

kde *BA* je biologická aktivita, $E_{1/2}$ půlvlnový potenciál a *P* rozdělovací koeficient oktanol-voda. Ze studií – jejichž počet je dosud poměrně malý – publikujících vztahy mezi biologickou aktivitou a půlvlnovým potenciálem lze uvést QSER-vztahy pro anaerobní degradaci chlorcyklohexenů mikrosomálním cytochromem P450 [17], inhibici cytochromu P450 sérií cyklopropyl derivátů [18], toxicitu nitrobenzenů [19] nebo inhibici lipidové peroxidasy katechiny [20].

Kvantitativní analýza vztahů mezi elektrochemickými a fyzikálně-chemickými či biologickými vlastnostmi látek se ukazuje jako velmi perspektivní pole působnosti elektrochemie v době, kdy část jejích úkolů převzaly spektrální a separační metody. Získané rovnice, kvantifikující vztahy mezi strukturou a elektrochemickým chováním látek, se mohou uplatňovat nejen při předpovídání elektrochemického chování dosud nestudovaných či jen teoreticky exitujících látek, ale pro přesnost a poměrnou snadnost jejich získání mohou nalézt uplatnění i ve farmakologii a toxikologii. Za zmínku stojí i to, že elektrochemická měření na rozdíl od měření biologických nejen že šetří biologický materiál, ale umožňují získání odezvy i u vysoce toxických či karcinogenních látek.

13.2 Elektroanalytické metody při analýze biologických matric

Problémem při analýze biologických matric je přirozeně nejen komplikované složení vzorku, ale i značný vliv matrice na výsledek stanovení. Pro takové analýzy se může zdát výhodnější použití selektivnějších technik než jsou techniky elektroanalytické. Pro separační techniky může být ale problémem časté velmi proměnlivé složení vzorku, dále pak široký rozsah molárních hmotností přítomných látek (od solí po makromolekuly proteinů) aj. Proto lze při vhodném experimentálním uspořádání (kombinací s úpravami vzorku) nalézt v použití elektroanalýzy k analýze biologických matric celou řadu výhod.

Příkladem využití elektroanalytických metod při **analýze rostlinného materiálu** může být stanovení růstového hormonu indoyl-3-octové kyseliny. Zatímco stanovení separačními technikami, jako je HPLC nebo GC-MS, je problematizováno zdlouhavou a navíc nepříliš účinnou extrakční úpravou vzorku, bylo pro stanovení indoyl-3-octové kyseliny navrženo jednoduché elektroanalytické stanovení na uhlíkové pastové elektrodě kombinované s poměrně jednoduchou extrakcí rostlinného materiálu ethylacetátem [21].

Poměrně rozsáhlé pole působení nacházejí elektroanalytické metody při **analýze klinického materiálu**, tedy krve, moči, slin aj. Je to jednak využití **iontově selektivních elektrod** (ISE), které jsou součástí celé řady komerčně vyráběných lékařských přístrojů, kde se uplatňují při analýze elektrolytů (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , H^+ , Cl^-). Výhodou ISE je možnost kontinuálního měření v průtokovém uspořádání, což umožňuje sledovat zároveň několik analytů. Další nezanedbatelnou předností ISE je jejich miniaturizace, čímž lze dosáhnout snížení objemu potřebného vzorku řádově na desítky mikrolitrů, nebo konstruovat ISE pro intracelulární měření (ISE s hrotem o průměru men-

ším než 1 μm) [22, 23]. Své místo při analýze klinického materiálu nacházejí i potenciometrické biosensory k detekci plynů (CO_2) či biologicky aktivních látek (močovina, glukosa, aminokyseliny) [24]. Z **voltametrických metod** se při analýze klinického materiálu uplatňují nejvíce diferenční pulsní voltametrie (DPP) a rozpouštěcí voltametrie. Nejčastěji řešeným problémem je stanovení stopových množství kovů v klinickém materiálu. Oproti jiným technikám je výhodou voltametrických technik možnost přímého měření v terénu, nižší cena přístrojů i provozu, snadná přeprava přístrojů. Při vhodném experimentálním uspořádání lze dosáhnout detekčních limitů srovnatelných s atomovou absorpční spektrometrií. Jako příklady lze uvést stanovení olova v krvi na borem dopované diamantové elektrodě s *in situ* vytvářeným bismutovým filmem za ultrasonické depozice s LOD = 0,18 ppb [25], stanovení zinku v krvi po komplexaci s difenylthiokarbazonem technikou sono-adsorptivní rozpouštěcí voltametrie na nafionem modifikované elektrodě ze skelného uhlíku s rtuťovým filmem s LOD = 1,05 ppm [26], či stanovení mědi po komplexaci s N-benzoyl-N-fenyl hydroxylaminem sono-square wave anodickou rozpouštěcí voltametrií na uhlíkové elektrodě s LOD = 0,16 ppm [27]. Důležitou otázkou spojenou se stopovou analýzou je možnost kontaminace vzorku při jeho odběru a úpravách před měřením. Prakticky se této otázce věnuje práce [28], v níž je studována možnost kontaminace vzorku při stanovení mědi v mozkomíšním moku metodou square wave voltametrie na statické rtuťové kapce. Autoři prokázali, že vzorek odebíraný injekčními jehlami z nerezové oceli může být značně kontaminován a navrhli postup na minimalizaci této kontaminace.

Významné místo patří elektroanalytickým metodám i při **analýze potravin.** Rozsáhlý přehled používaných technik podává cit. [29], problematice voltametrické analýzy a speciace arsenu je věnováno review [30]. Z novějších prací lze uvést např. stanovení těžkých kovů ve vínech a destilátech na rtuťové amalgamové elektrodě [31] nebo stanovení kadmia, olova a mědi potenciometrickou rozpouštěcí analýzou ve vínech [32].

13.3 Elektroanalytické metody při analýze environmentálních matric

I v oblasti analýzy environmentálních matric nacházejí elektroanalytické metody své široké uplatnění, např. při analýzách složek pracovního prostředí nebo životního prostředí. I zde se uplatňují přednosti zejména voltametrických technik: možnost přímého měření v terénu, nižší cena přístrojů i provozu, snadná přeprava přístrojů. Řadu informací k celé problematice podává monografie [33] nebo přehledný článek [34].

Iontově selektivní elektrody nenacházejí při analýze environmentálních vzorků tak široké uplatnění jako při analýze klinických vzorků. Kromě skleněné elektrody jsou využívány zejména aniontové ISE pro sledování obsahu nečistot např. v odpadních vodách (kontinuální měření kyanidů, dusičnanů). Vývoj v této oblasti směruje především k ještě selektivnějším sensorům a biosenso-

rům [35]. Z méně běžných uspořádání stojí za zmínku ISE-Array sensor pro *in situ* speciaci prvků na Marsu [36].

Velmi významná část environmentálních analýz je realizována pomocí **voltametrických měření,** jejichž přehled podává rewiev [37]. Jednou z velmi rozšířených analýz je speciace prvků v environmentálních vzorcích podle Barteyho a Florence [38], při níž je kromě jiných metod využívána adsorptivní rozpouštěcí voltametrie. Z novějších prací lze uvést např. stanovení ekotoxických organických barviv [39], studium vlivu reálné matrice (vody z brazilských řek) na stanovení herbicidu picloramu [40], studium vlivu různých matric (voda, půda, obilí) na stanovení insekticidu flumethrinu [41]. Z novějších modifikací instrumentální stránky analýzy lze např. uvést stanovení herbicidu paraquatu ve vodě na elektrodě vyrobené z kompaktního disku [42] nebo konstrukci přenosného zařízení na stanovení mědi přímo pro terénní měření [43].

13.4 Literatura

1. Rajski, S.R., Williams, R.M., Chem. Rev. 1998, 98, 2723.
2. Berry, M.N., Grivell, A.R., Phillips, J.W., Pure Appl. Chem. 1993, 65, 1957.
3. Zaks, A., Klibanov, A.M., J. Biol. Chem. 1988, 263, 8017.
4. Lunte, S.M., Lunte, C.E., J. Pharm. Biomed. Anal. 1990, 8, 131.
5. Paci, A., Martens, T., Royer, J., Bioorg. Med. Chem. Lett. 2001, 11, 1347.
6. Nesměrák, K., Němec, I., Štícha, M., Němcová, I., Horká, V., Anal. Lett. 2002, 35, 1617.
7. Hansch, C., Leo, A., Exploring QSAR. Vol. I – Fundamentals and Application in Chemistry and Biology. Washington, American Chemical Society 1995.
8. Abreu, F.C., Ferraz, P.A.L., Goulart, M.O.F., J. Braz. Chem. Soc. 2002, 13, 19.
9. Chen, E.S.D., Chen, E.C.M., Sane, N., Shulze, S., Bioelectrochem. Bioenerg. 1999, 48, 69.
10. Zuman, P., Vplyvy substituentov v organickej polarografii. Bratislava, Alfa 1970.
11. Driebergen, R.J., Moret, E.E., Janssen, L.H.M., Blauw, J.S., Holthuis, J.J.M., Kelder, S.J.P., Verboom, W., Reinhoudt, D.N., Linden, W. E., Anal. Chim. Acta 1992, 257, 257.
12. Tömpe, P., Clementis, G., Petneházy, I., Jászay, Z.M., Tőke, L., Anal. Chim. Acta 1995, 305, 295.
13. Němcová, I., Nesměrák, K., Jelínek, I., Němec, I., Barbe, J., Anal. Lett. 2001, 34, 1223.
14. Nesměrák, K., Němec, I., Štícha, M., Waisser, K., Palát, K., Electrochim. Acta 2005, 50, 1431.
15. Nesměrák, K., Pospíšek, M., Němec, I., Waisser, K., Gabriel, J., Fol. Microbiol. 2000, 45, 138.
16. Kunz, K.R., Iyengar, B.S., Dorr, R.T., Alberts, D.S., Remers, W.A., J. Med. Chem. 1991, 34, 2281.
17. Kurihara, N., Yamakawa, K., Fujita, T., Nakajima, M., Nippon Noyaku Gakkaishi 1980, 5, 93. CA 93:232035.
18. Guengerich, F.P., Willard, R.J., Shea, J.P., Richards, L.E., Macdonald, T.L., J. Am. Chem. Soc. 1984, 106, 6446.
19. Deneer, J.W., Sinnige, T.L., Seinen, W., Hermens, J.L.M., Aquatic Toxicol. 1987, 10, 115.
20. Yang, B., Kotani, A., Arai, K., Kusu, F., Chem. Pharm. Bull. 2001, 49, 747.
21. Hernández, P., Galán, P., Nieto, O., Hernández L., Electroanalysis 1994, 6, 577.

22. Oesch, U., Ammann, D., Simon, W., Clin. Chem. 1986, 32, 1448.
23. Calabrese, G.S., O'Connell, K.M., *In:* Topics in Current Chemistry, Vol. 143, Steckham, E. (ed.), Springer-Verlag, Berlin 1988, s. 49–78.
24. Lunte, C.E., Heineman, W.R., *In*: Topics in Current Chemistry, Vol. 143, Steckham, E. (ed.), Springer-Verlag, Berlin 1988, s. 1–48.
25. Kruusma, J., Banks, C.E., Compton, R.G., Anal. Bioanal. Chem. 2004, 379, 700.
26. Kruusma, J., Banks, C.E., Nei, L., Compton, R.G., Anal. Chim. Acta 2004, 510, 85.
27. Hardcastle, J.L., Compton, R.G., Electroanalysis 2002, 14, 753.
28. Sánchez Misiego, A.S., Garcia-Moncó Carra, R.M., Ambel Carracedo, M.P., Anal. Chim. Acta 2003, 494, 167.
29. Mannino, S., Wang, J., Electroanalysis 1992, 4, 835.
30. Cavicchioli, A., La-Scalea, M.A., Gutz, I.G.R., Electroanalysis 2004, 16, 697.
31. Mikkelsen, Ø., Schrøder, K.H., Anal. Chim. Acta 2002, 458, 249.
32. Ostapczuk, P., Eschnauer, H.R., Scollary, G.R., Fresenius J. Anal. Chem. 1997, 358, 723.
33. Electroanalytical Methods in Chemical and Environmental Analysis, Kalvoda, R. (ed.), New York, Plenum Press 1987.
34. Ashley, K., Electroanalysis 1994, 6, 805.
35. Rogers, K.R., Williams, L.R., Trends. Anal. Chem. 1995, 14, 289.
36. Kounaves, S., ChemPhysChem. 2003, 4, 162.
37. Esteban, M., Casassas, E., Trends Anal. Chem. 1994, 13, 110.
38. Bartley, G.E., Florence, T.M., Anal. Lett. 1976, 9, 379.
39. Zima, J., Barek, J., Moreira, J.C., Mejstřík, V., Fogg, A.G., Fresenius J. Anal. Chem. 2001, 369, 567.
40. Massaroppi, M.R.C., Machado, S.A.S., Avaca, L.A., J. Braz. Chem. Soc. 2003, 14, 113.
41. Sreedhar, M., Reddy, S.J., Fresenius Environ. Bull. 2002, 11, 371.
42. De Souza, D., Codognoto, L., Machado, S.A.S., Avaca, L.A., Anal. Lett. 2005, 38, 331.
43. Beni, V., Ogurtsov, V.I., Bakunin, N.V., Arrigan, D.W.M., Hill, M., Anal. Chim. Acta 2005, 552, 190.

14. KONDUKTOMETRICKÁ MĚŘENÍ V PRŮTOKOVÝCH SYSTÉMECH

prof. RNDr. František Opekar, CSc

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, katedra analytické chemie, Albertov 2030, 128 40 Praha 2

opekar@natur.cuni.cz

14.1 Zařazení konduktometrie do skupiny elektroanalytických metod

Konduktometrické metody patří do skupiny **elektrometrických** metod, tj. metod, při nichž se sleduje určitá elektrická vlastnost roztoku jako celku. Druhou, podstatně větší skupinu elektroanalytických metod tvoří **elektrochemické** metody, v nichž se využívají reakce přenosu náboje mezi elektrodou a analytem, tj. reakce oxidačně-redukční. Kromě **konduktometrie, při níž se sleduje elektrická vodivost** roztoku, patří do skupiny elektrometrických metod **dk-metrie, při níž se sleduje permitivita** roztoku. Ze své podstaty jde o metody neselektivní, na měřené vlastnosti, jak již bylo řečeno, se podílí roztok jako celek a příspěvek jednotlivých složek roztoku lze rozlišit pouze ve speciálních případech.

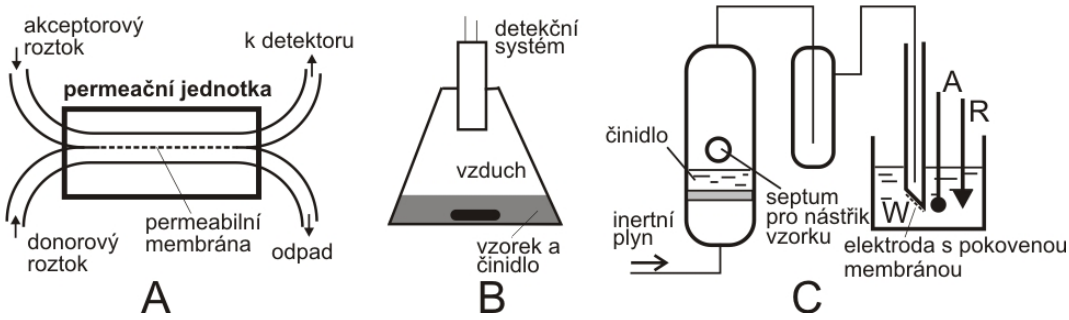
Přes rozdílný princip mají elektrochemické i elektrometrické metody společné to, že detekčním systémem jsou elektrody (dvě či více). Lze se proto i v konduktometrii setkat s obecným elektrochemickým problémem – s časovou změnou aktivity elektrod v důsledku jejich přímého kontaktu s analyzovaným prostředím, roztokem. Změna aktivity se projevuje časovou změnou analytického signálu i v prostředí o konstantním složení; zpravidla dochází k poklesu signálu. Při používání rtuťových kapajících elektrod, tedy elektrod s periodicky obnovovaným povrchem, není nutno uvažovat tento jev, obecně nazývaný **historie elektrody**. Stává se však palčivým problémem, pokud se používají elektrody z tuhých materiálů. Způsoby řešení problémů spojených s historií elektrod lze rozdělit do tří skupin probraných dále.

1. **Odstraňování následků vlivu analyzovaného prostředí na aktivitu elektrody.** Z historického hlediska nejstarší metody využívají otírání elektrodového povrchu břity z různých materiálů [1] či karborundovým práškem přidávaným do analyzovaného roztoku [2], konstrukcí tzv. „odpočívajících“ elektrod [3], kdy se k detekci používá několik stejných indikačních elektrod, přičemž k měřicímu přístroji se v pravidelných intervalech připojuje vždy jen jedna z nich a ostatní, na nichž elektrodová reakce neprobíhá a jsou tudíž nezatížené průchodem proudu, „odpočívají“.

Setkáváme se i různými způsoby tepelné regenerace elektrodového povrchu ať již realizované elektrickým vyhříváním elektrody [4] či laserovým paprskem [5]. V současné době je využíváno

výhradně elektrochemického čištění a předúpravy elektrod aplikací potenciálových pulsů podle určitého programu, viz např. [6].

2. **Omezení vlivu** prostředí na aktivitu elektrody. V případě, že změna aktivity elektrody je způsobována nežádoucím působením, např. adsorpcí, některých látek tvořících matrici vzorku, lze převést analyt do roztoku, který má pro elektrochemická měření příznivější složení. Převod lze ze vzorku provést nejlépe přes plynnou fázi; analyt se reakcí s vhodným činidlem (donorový roztok) převede na ekvivalentní množství plynné látky, která buď permeuje permeabilní membránou do akceptorového roztoku, v němž je elektrochemický detekční systém (využívá se v tzv. GD-FIA, tj. Gas-Diffusion Flow Injection Analysis), nebo difunduje k elektrochemické cele vhodné konstrukce plynnou fází (zpravidla vzduchem, jde o uspořádání nazývané Air-Gap Detector) eventuálně je z plynné fáze vybubláván proudem inertního plynu a veden k elektrodě s pokovenou membránou (metoda je nazvána pneumatoampérometrií). Schematicky jsou uvedené metodiky znázorněny na obr. 14.1.



Obr. 14.1: ***Schematické znázornění permeační (dialyzační) jednotky pro GD-FIA (A), schéma air-gap detekoru (B) a schéma aparatury pro provádění pneumatoampérometrických stanovení (C)***

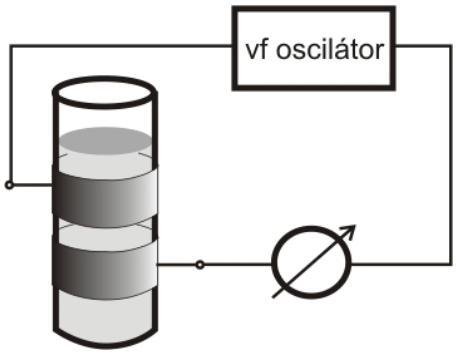
3. **Eliminace kontaktu analyzovaného prostředí s elektrodou.** Ve všech výše uvedených případech jde o parciální řešení problému, neboť elektrody jsou stále k přímém kontaktu s roztokem, byť o daleko příznivějším složení než je roztok vzorku. Jediné elektroanalytické metody, které umožňují totální eliminaci problému, jsou právě konduktometrie a dk-metrie. V těchto metodách mohou být detekční **elektrody zcela galvanicky izolovány od měřeného roztoku**, protože k měření vodivosti a permitivity se používá střídavý elektrický proud, který může procházet izolací (dielektrikem), např. stěnami nádobky se vzorkem.

14.2 Bezkontaktní konduktometrie

Zprvu byl k bezkontaktnímu měření vodivosti používán vysokofrekvenční (vf) proud, řádově desítek MHz. Pravděpodobně jako první použili vysokofrekvenční měření vodivosti již asi v r. 1938 v laboratořích Agricultural and Mechanical College of Texas jako indikační metodu při všech běžných titracích (acidobazických, redoxních, komplexometrických a s výhodou při titracích sráže-

cích). V důsledku poměrně komplikovaných závislostí mezi odezvou vf-konduktometrů a koncentrací byla tato metoda i později používána především jako indikační metoda při **titračních stanoveních** (tzv. vysokofrekvenčních titracích); základní experimentální uspořádání je na obr. 14.2, kde je vzorek v nádobce tzv. kapacitního typu. Bezkontaktně lze vodivost měřit i v nádobkách, které tvoří jádro cívky (induktivní typ nádobky), prakticky se však nepoužívají. Přes problematické koncentrační závislosti se bezkontaktní měření vodivosti s výhodou používá např. pro testování roztoků v uzavřených nádobkách (ampulích), pro měření vodivosti tavenin atp.

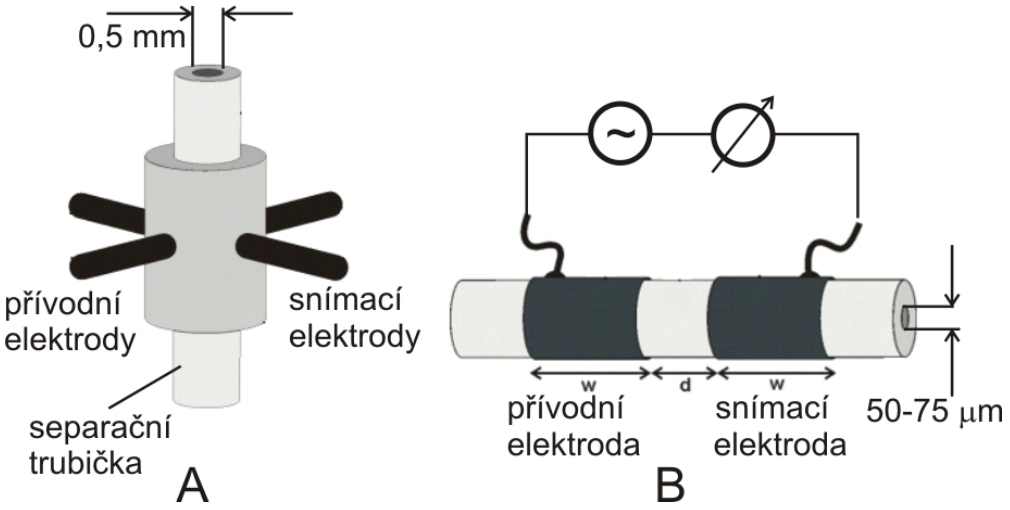
V odborné literatuře byly publikovány práce o použití vf-konduktometrie i pro detekci v separačních metodách, ale metoda se zpočátku nijak výrazně nerozšířila. Oživení nastalo v 80. letech minulého století, kdy se objevily práce využívající tuto metodu pro detekci v proudících kapalinách a v izotachoforéze. Bouřlivý rozvoj bezkontaktní vodivostní detekce lze zaznamenat po r. 1998, kdy byly publikovány dvě zásadní práce [7, 8] o použití této metody v kapilární i čipové elektroforéze. Ty umožnily snadnější přístup k metodě, místo jednotek až desítek MHz byly používány frekvence řádově pouze desítkek až stovek kHz, místo stovek voltů postačily jednotky až desítky a detekční cela byla velice jednoduché konstrukce. Za těchto podmínek je možno bezkontaktní detekci realizovat běžně v laboratoři bez specializovaných elektronických znalostí.



Obr. 14.2: Nádobka kapacitního typu (s elektrodami na vnějších stěnách) používaná pro měření ve vf konduktometrii a při vf titracích.

14.2.1 Bezkontaktní konduktometrická detekce v průtokových systémech

V současnosti se **bezkontaktní konduktometrická detekce využívá především v kapilární zónové elektroforéze (CZE) a elektroforéze na čipu,** podstatně méně ve FIA a kapalinové chromatografii (HPLC). Bezkontaktní vodivostní cela vyvinutá a používaná v izotachoforéze [9] je na obr. 14.3A. Na přívodní elektrody je vkládáno střídavé napětí řádu jednotek až desítek MHz o amplitudě 120 V. Proud prošlý detekční trubičkou a snímaný elektrodami je závislý na vodivosti roztoku protékajícího trubičkou. Uspořádání elektrod v jednom místě separační trubičky je pro izotachoforézu důležité, protože zóny jednotlivých analytů jsou po separaci velmi ostře odděleny.

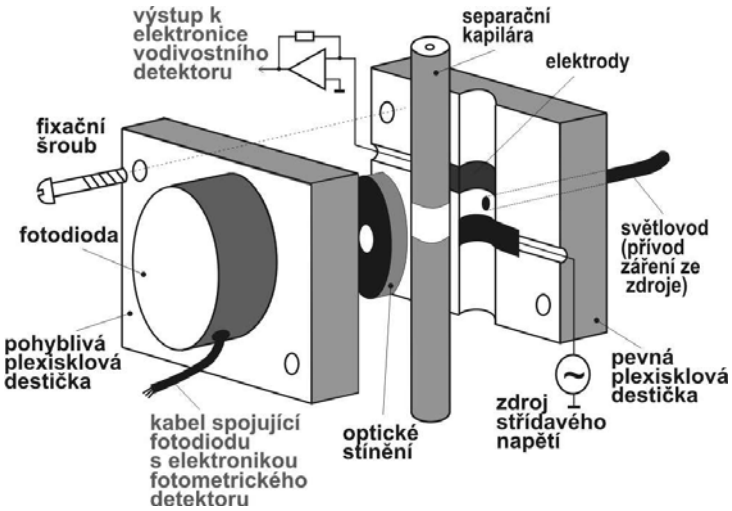


Obr. 14.3: ***Schéma bezkontaktní vodivostní cely pro izotachoforézu, podle [9] (A), bezkontaktní vodivostní cela pro detekci v kapilární elektroforéze, podle [7, 8] (B)***

Pro CZE a čipovou elektroforézu není takové uspořádání nutné, navíc vnitřní průměr separační kapiláry či separačního kanálu jsou podstatně menší, takže vodivostní cela by měla nepříznivou geometrii. Převážná většina konstrukcí detekční cel pro bezkontaktní vodivostní detekci v CZE využívá tubulární elektrody, tak jak byly navrženy v prvních pracích [7, 8], obr. 14.3B. Tubulární elektrody mají délku jednotky až desítky milimetrů a mezera mezi nimi je zpravidla 1 až 2 mm. Princip detekce je stejný jako v izotachoforéze, pouze jsou používány nižší frekvence střídavého signálu a zpravidla i nižší amplitudy, nejčastěji kolem 20 V (viz výše); testovány však byly i amplitudy od jednotek do několika set voltů. Upřednostňují se taková uspořádání, v nichž elektrody nejsou integrální součástí separační kapiláry (tj. nejsou vytvořené např. vodivým lakem nebo vakuovým napařením kovu na povrch kapiláry), ale jsou tvořeny trubičkami, jimiž kapilára volně prochází, aby ji bylo možno podle potřeby vyměnit.

Změna **tubulárního uspořádání elektrod na semitubulární nevede k dramatickým změnám detekčních charakteristik**, ale je výhodná z konstrukčního hlediska [10]. Semitubulárními elektrodami jsou v tomto případě dva proužky kovové (Al) fólie o požadované šířce a v požadované vzdálenosti vlepené do drážky tvaru U o průměru rovném vnějšímu průměru separační kapiláry vytvořené v bloku plexiskla. Kapilára je vložena do drážky a přitisknuta k elektrodám. Toto uspořádání umožňuje snadnou výměnu kapiláry, vzájemná poloha kapiláry a elektrod je přitom fixována a mezi stěnou kapiláry a povrchem elektrody není vrstva vzduchu, jako tomu je v případě standardních tubulárních elektrod, do nichž je kapilára volně vsunutá. Vrstva vzduchu zavádí do detekčního systému seriovou kapacitu, jejíž hodnota se může při pohybu kapiláry v tubulární elektrodě měnit a přispívat tak k nežádoucímu šumu. Semitubulární uspořádání vodivostních elektrod umožňuje nejen snadnou výměnu kapiláry a její dokonalý kontakt s elektrodami, ale do mezery mezi elektrodami lze relativně snadno zaintegrovat optické vlákno spektrálního detektoru, viz. obr.

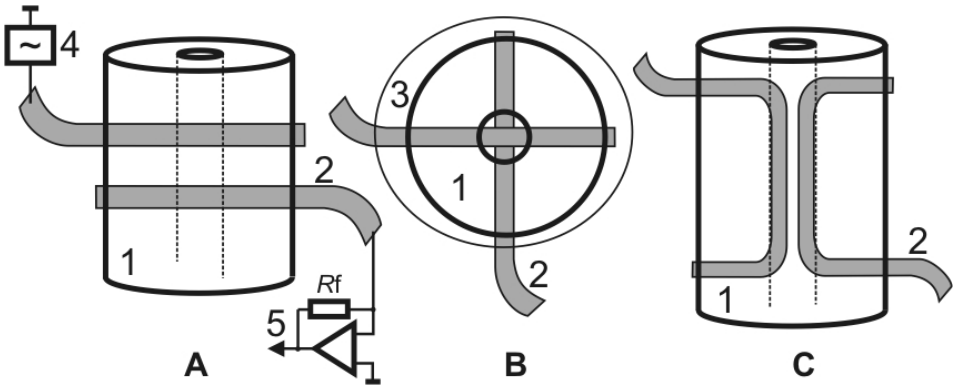
14.4, a realizovat tak kombinovaný bezkontaktní vodivostní a optický detektor detegující látky ve stejném místě kapiláry [10, 11]. **Detektory s vhodným uspořádáním semitubulárních elektrod lze detegovat nejen změny vodivosti, ale i permitivity analyzovaného roztoku**.



Obr. 14.4: ***Schema duálního detektoru pro CZE kombinujícího bezkontaktní vodivostní detekci s detekcí optickou v jednom místě separační kapiláry.*** *Podle [10, 11]*

Bylo rovněž prokázáno [12], že k podstatnému snížení citlivosti nedochází ani v případě, že vodivostní elektrody jsou planární, tj. např. vytvořené na rovinné destičce bez drážky, k nimž je kapilára přitlačena. Toto uspořádání umožňuje nejen velice jednoduchou konstrukci standardní dvouelektrodové detekční cely (doposud využívané v čipové elektroforéze), ale i multielektrodové cely se systémem planárních elektrod v sérii vhodné např. pro studium procesů, k nimž dochází v separační kapiláře. Planární elektrody mohou být též vyleptány přímo na desce s tištěným spojem se zpracovatelskou elektronikou v integrovaných analytických systémech (lab-on-chip).

Zásadně nový přístup k bezkontaktní vodivostní detekci pro průtoková měření byl publikován v práci [13]. Vodivostní **elektrody jsou v tomto případě umístěny uvnitř trubičky a jsou od protékajícího roztoku odděleny tenkým filmem izolantu**; testována byla různá geometrická uspořádání elektrod, viz obr. 14.5. Z analytického hlediska byly nejlepší partametry dosaženy s elektrodami orientovanými v trubičce z PTFE podélně, jak je znázorněno na obr. 14.5C. Detektor s takto orientovanými drátkovými elektrodami byl použit pro vodivostní detekci při stanovení totálního anorganického uhlíku (TIC) metodou GD-FIA [14]: uhličitan ve vzorcích byl převeden okyselením na oxid uhličitý, který v difuzní jednotce permeoval do slabě bázického akceptorového roztoku, jehož vodivost byla monitorována. Bylo dosaženo velmi nízkého limitu detekce CO_3^{2-}, 36 μg l^{-1} (0,6 μmol l^{-1}), což je hodnota minimálně o jeden řád nižší než hodnota uváděná pro různé detekční metody používané pro GD-FIA stanovení TIC.



Obr. 14.5: ***Detekční cely pro bezkontaktní vodivostní detekci s izolovanými drátkovými elektrodami umístěnými uvnitř trubičky s analyzovaným roztokem. Umístění napříč trubičky v rovnoběžném (A) nebo kolmém (B) uspořádání a umístěné podélně (C). Podle [13]***

14.3 Literatura

[1] R.W. Ohse, Z. Elektrochem. 63 (1959) 1063.

[2] F. Štráfelda, P. Kozak, Collect.Czech.Chem.Commun. 26 (1961) 3168.

[3] P. Gerasimenko, Ukr. chim. žur. 4 (1929) 439.

[4] J. Tenygl, Sci.Total Environ. 37 (1984) 113.

[5] M. Poon, R.L. McCreery, Anal. Chem. 58 (1986) 2745.

[6] K. Štulík, Electroanalysis 4 (1992) 829.

[7] A.J. Zemann, E. Schnell, D. Volgger, G. Bonn, Anal. Chem. 70 (1998) 563.

[8] J.A.F. da Silva, C.L. do Lago, Anal. Chem. 70 (1998) 4339.

[9] B. Gaš, J. Vacík, Chem. listy 74 (1980) 652.

[10] P. Tůma, F. Opekar, I. Jelínek, Electroanalysis 13 (2001) 989.

[10] M. Novotný, F. Opekar, I. Jelínek, K. Štulík, Anal. Chim. Acta 525 (2004) 17.

[11] M. Novotný, F. Opekar, I. Jelínek, Chem. Listy 99 (2005) 132.

[12] M. Novotný, F. Opekar, K. Štulík, Electroanalysis 17 (2005) 1181.

[13] Z. Hoherčáková, F. Opekar, K. Štulík, Electroanalysis 17 (2005) 1924.

[14] Z. Hoherčáková, F. Opekar, Anal. Chim. Acta 551 (2005) 132.

15. AMPÉROMETRICKÁ MĚŘENÍ V PRŮTOKOVÝCH SYSTÉMECH

prof. RNDr. Jiří Barek, CSc. a prof. RNDr. František Opekar, CSc.

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie,

UNESCO laboratoř elektrochemie životního prostředí, Albertov 2030, 128 43 Praha 2,

barek@natur.cuni.cz, opekar@natur.cuni.cz

15.1 Úvod

V poslední době je věnována zvýšená pozornost využití elektroanalytických metod v průtokových systémech [1-3] z několika důvodů. Je to:

- potřeba kontinuálních analýz,
- snaha o zrychlení analýz přechodem z vsádkového na průtokový systém,
- snaha o zvýšení selektivity kombinací elektrochemické detekce s předchozí separací pomocí HPLC či CZE.

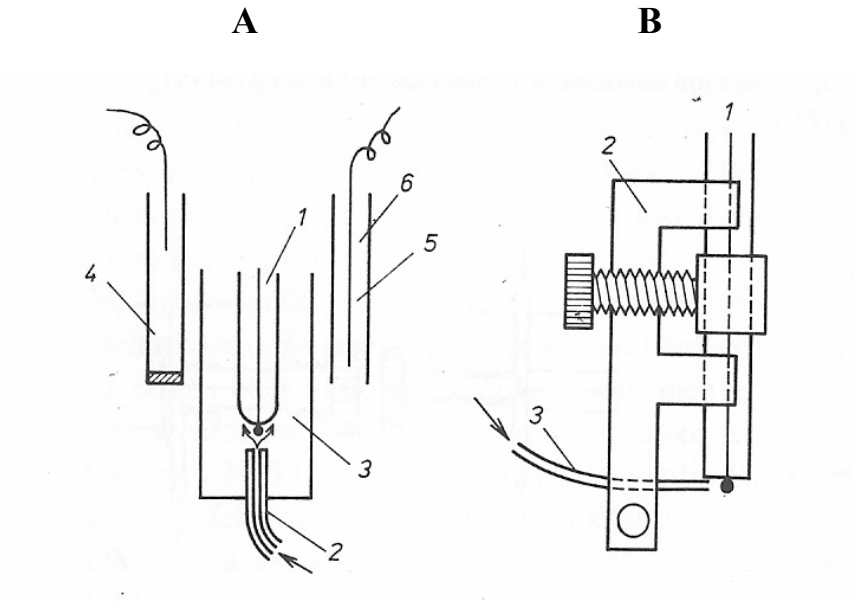
Kromě konduktometrické detekce diskutované v kapitole 14, se při průtokových měřeních často používá i detekce ampérometrická. Jedná se o techniku při níž je analyt stanoven z velikosti proudu procházejícího pracovní elektrodou při konstantním potenciálu, který je zpravidla zvolen tak, aby elektrodou procházel limitní proud stanovované látky. Důležitou roli zde hraje objem a geometrické uspořádání průtokové cely v níž je umístněna pracovní elektroda. V průtokových analytických metodách (FIA, CFA) a především ve vysokoúčinných separačních metodách (kapalinová chromatografie, kapilární zónová elektroforéza) jsou separované látky v úzkých zónách. Detektory je proto nutno konstruovat tak, aby objem detekčního prostoru byl dostatečně malý (teoreticky by neměl převyšovat objem odpovídající teoretickému patru) a detektor tak minimálně přispíval k jejich rozmývání. Základní typy amperometrických detektorů, které budou dále diskutovány jsou:

- tenkovrstvý (thin layer),
- wall-jet,
- tubulární,
- porézní,
- mikrocylindrický.

V dalším textu však budou diskutovány i některé další typy ampérometrických detektorů. Konstrukce detektoru totiž pochopitelně závisí i na charakteru a materiálu použité pracovní elektrody, přičemž zejména rtuťové elektrody vyžadují speciální uspořádání poněkud se vymykající výše uvedené klasifikaci.

15.2 Ampérometrické detektory se rtuťovými pracovními elektrodami

Na obr. 15.1 jsou dvě možná uspořádání HMDE jako pracovní elektrody při HPLC s elektrochemickou detekcí. V obou případech je kapilára vložena do přepadové nádobky naplněné vodivou mobilní fází v níž jsou ponořeny i pomocná a referenční elektroda. Obě uspořádání se liší pouze v tom, že v jednom případě je výtok z kolony HPLC orientován paralelně s osou kapiláry HMDE a ve druhém případě kolmo k ní. Vzhledem k malé mechanické stabilitě HMDE se ani jedno uspořádání v praxi příliš neosvědčilo



Obr. 15.1: HMDE jako pracovní elektroda při HPLC-ED

A: Detektor firmy PAR.1- Kapilára HMDE; 2- výtok ze systému HPLC; 3- základní elektrolyt; 4- referenční elektroda; 5-pomocná elektroda; 6- přívod inertního plynu

B: Detektor firmy Laboratorní přístroje. 1- kapilára HMDE; 2- teflonový držák; 3-výtok ze systému HPLC.

15.3 Ampérometrické detektory s tuhými pracovními elektrodami

Nejběžnějším elektrodovým matriálem jsou v tomto případě různé formy uhlíku, používá si však i platina, zlato, měď (pro detekci aminokyselin a látek tvořících s mědí komplexy) či některé další kovy. Rozšiřuje se i používání uhlíkových pastových elektrod, chemicky modifikovaných elektrod, kompozitních elektrod a filmových elektrod.

15.3.1 Tenkovrstvý detektor

Tento detektor je tvořen dvěma k sobě přitištěnými bloky oddělenými velmi tenkým těsněním (viz obr. 15.2). Roztok ze systému HPLC či FIA nebo SIA prochází detekčním prostorem, jehož objem je určen tloušťkou těsnění a rozměrem kanálku v něm vytvořeném. Pracovní (w) a pomocná (a)

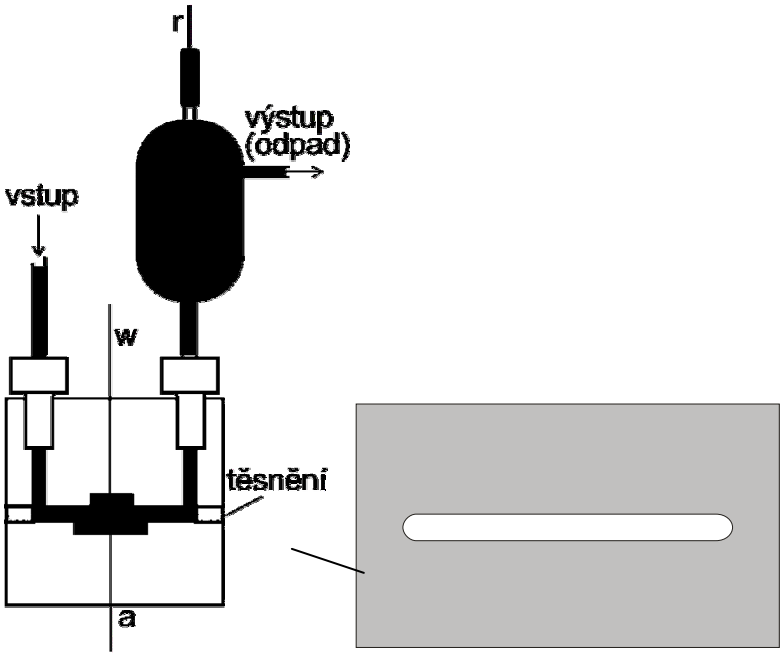
elektroda tvoří část stěny separačního prostoru, referenční (r) elektroda bývá z prostorových důvodů umístěna v rezervoáru na výstupu z detektoru. Nevýhodou tohoto uspořádání je, že potenciál pracovní elektrody není zcela definován pro značnou vzdálenost referenční elektrody (v těsných prostorech detektoru se výrazně projevuje odpor roztoku a úbytky napětí na něm). V běžné praxi nebývá tento problém na závadu.

15.3.2 Detektor typu „wall-jet“

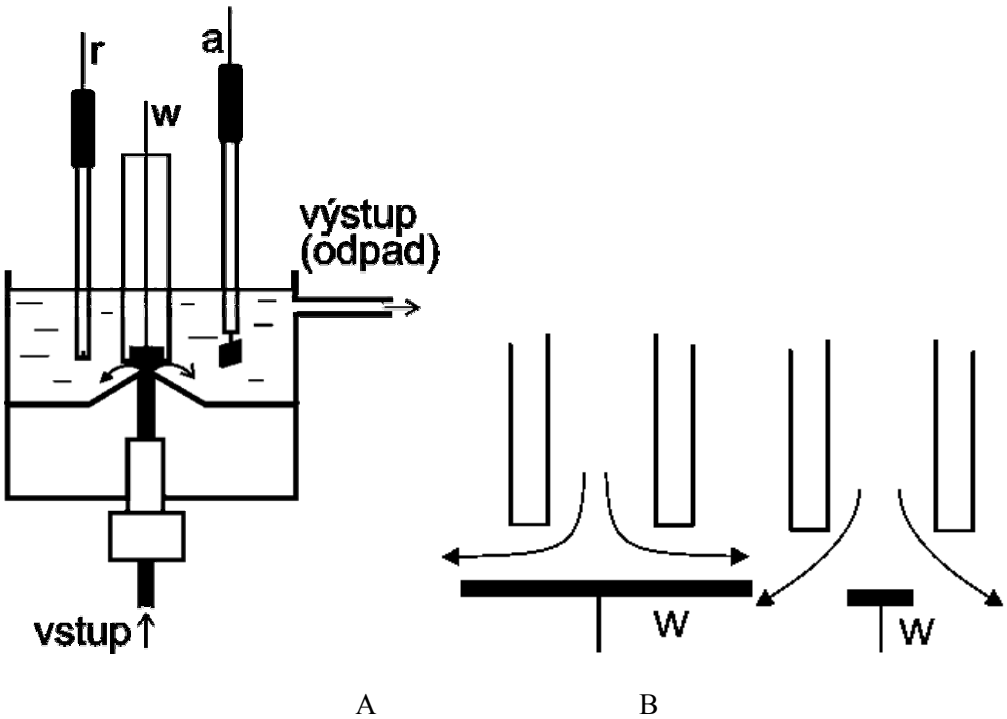
Výstup ze systému HPLC, FIA či SIA je v tomto případě orientován přímo na povrch pracovní elektrody (w), takže detekční prostor je vymezen určitým objemem kapaliny z trubičky vytékající, který „odstíní“ elektrodový povrch od roztoku v přepadové nádobce (viz obr.15.3) V něm jsou snadno umístěny i referenční (r) a pomocná (a) elektroda. V praxi se lze setkat s dvěma variantami tohoto detekčního uspořádání – wall-jet (viz obr. 15.3A) a wall-tube či impinging-jet (viz obr. 15.3B).

15.3.3 Tabulární detektor

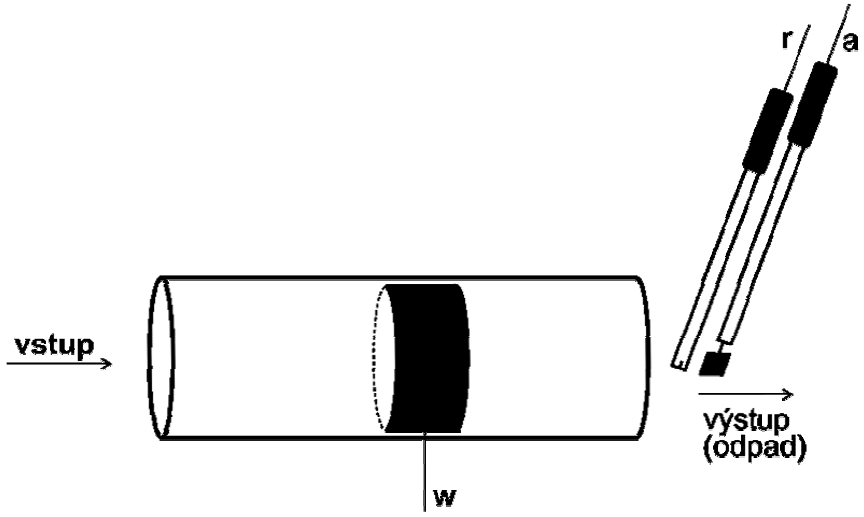
Pracovní elektrodu (w) tvoří určitý úsek vnitřní stěny trubice, jíž kapalina s detegovanou látkou protéká (viz obr.15.4.). Referenční (r) a pomocná (a) elektroda jsou zpravidla umístěny v přepadové nádobce, kam tato trubice ústí. Hlavní výhodou tohoto uspořádání je, že detektor prakticky vůbec nepřispívá k dodatečnému rozmývání zón látek, protože kapalina z trubice jíž protéká nevystupuje. Určitou nevýhodou je ne zcela definovaný potenciál pracovní elektrody, podobně jako je tomu v případě thin-layer detektoru.



Obr. 15.2: ***Tenkovrstvá cela pro měření v průtokových systémech***



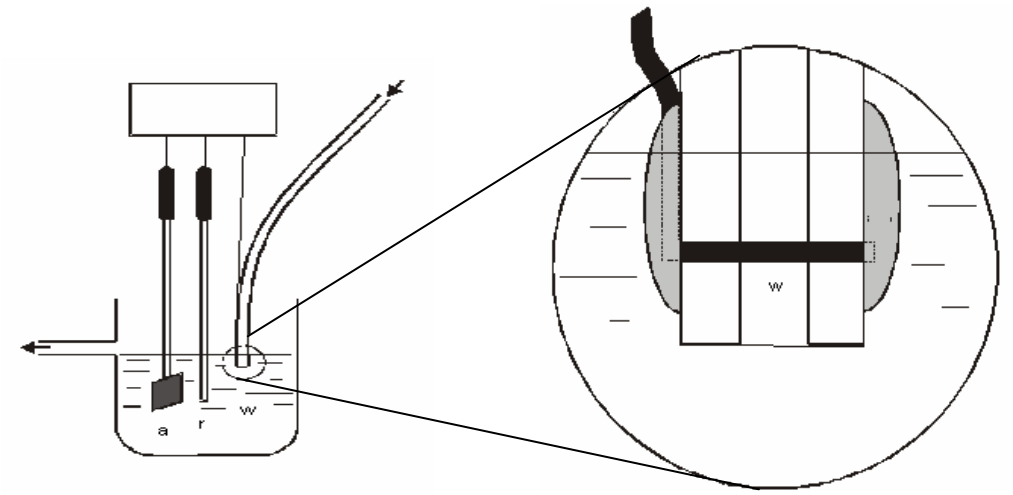
Obr. 15.3: ***Detektor typu „wall-jet“ (A) a „wall-tube“ (B)***



Obr. 15.4: Tubulární detektor

15.3.4 Mikrocylindrický detektor

Teflonová kapilára přímo napojená na výstup z kolony je v blízkosti konce příčně propíchnuta ostrou jehlou a vzniklým otvorem se protáhne tenký drátek z platiny (průměr 0,1 mm) či mědi (průměr 0,2 mm). Drátek je v kapiláře fixován tavným lepidlem, které rovněž izoluje drátek na bocích kapiláry od styku s roztokem. Do kontaktu s analytem tak přichází pouze ta část drátku uvnitř teflonové kapiláry, jehož plocha je dána jeho průměrem a délkou rovnou vnitřnímu průměru použité teflonové kapiláry. Kapilára s pracovní (w) elektrodou je spolu s referenční (r) a pomocnou (w) elektrodou umístěna do přepadové nádobky (Obr. 15.5).



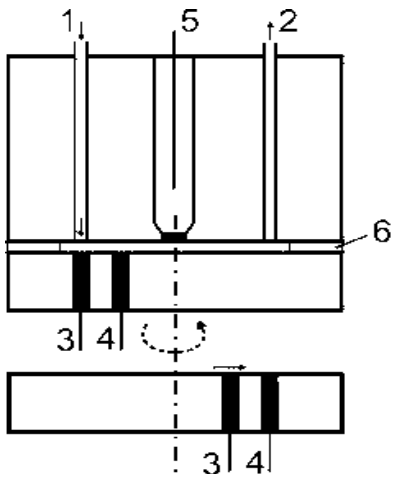
Obr. 15.5: Mikrocylindrický detektor

15.3.5 Detektor umožňující práci v tenkovrstvém systému i v systému „wall-jet“

Vhodnou konstrukcí detektoru (viz obr. 15.6) lze pouhým otočením jedné části detektoru přejít z tenkovrstvého pracovního režimu do režimu „wall-jet“.

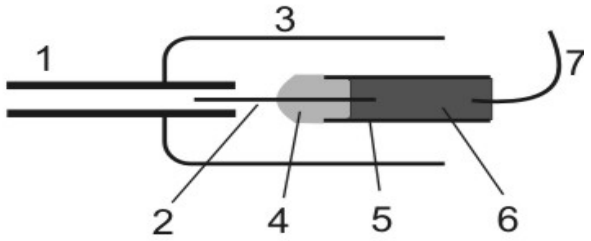
15.3.6 Detektor s uhlíkovou vláknovou elektrodou

Rovněž tento typ detektoru znázorněný na obr. 15.7. je kompatibilní s kapilárními separačními technikami.



Obr. 15.6: Detektor umožňující práci v tenkovrstvém systému i v systému „wall-jet“

1 - vstup, 2 - výstup, 3 - pracovní elektroda, 4 - pomocná elektroda, 5 – referenční elektroda, 6 - distanční fólie



Obr. 15.7: Detektor s uhlíkovou vláknovouelektrodou

1 - kapilární kolona, 2 - uhlíkové vlákno, 3 - skleněná nádobka obsahující roztok KCl pro spojení s referenční a pomocnou elektrodou, 4 - kulička z epoxidové pryskyřice, která fixuje uhlíkové vlákno, 5 - skleněná trubice naplněná rtutí (6), do níž je ponořen platinový kontakt (7)

15.3.7 Detektory s diamantovou filmovou elektrodou

Tyto detektory ať již v uspořádání tenkovrstvé cely či s mikroelektrodou, které jsou kompatibilní s kapilárními technikami, jsou podrobně popsány v kapitole 11 a proto jim zde nebude věnována pozornost.

15.3.8 Detektor s pevnou amalgámovou elektrodou

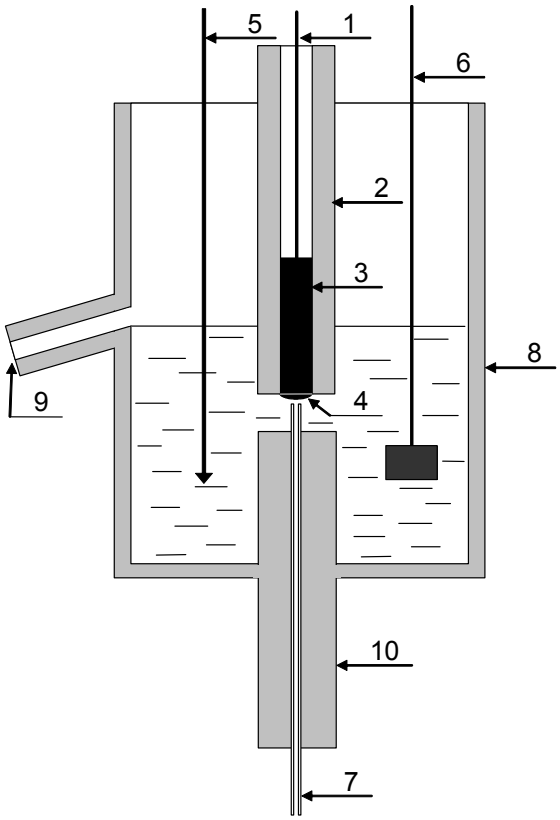
Tento detektor, pracující ve „wall-jet“ režimu (viz obr. 15.8), se osvědčil při selektivní detekci elektrochemicky redukovatelných sloučenin vedle elektrochemicky neaktivních matečných sloučenin (např. snadno redukovatelných nitrovaných polycyklických aromatických uhlovodíků vedle neaktivních nesubstituovaných polycyklických aromatických sloučenin či polarograficky aktivních azosloučenin v přítomnosti neredukovatelných aromatických aminů, ze kterých se připravují).

15.3.9 Detektor s uhlíkovou pastovou elektrodou

Rovněž tento detektor pracuje ve „ wall-jet“ režimu (viz obr. 15.9). Jeho hlavní výhodou je snadná obnovitelnost povrchu pracovní elektrody v případě problémů s její pasivací. Při použití mikrokuliček ze skleného uhlíku je tento typ detektoru použitelný i v prostředích s vysokým obsahem organických rozpouštědel (methanolu či acetonitrilu), v nichž při použití jiných uhlíkových práškových materiálů dochází k vymývání pastovací kapaliny a ke zhoršování kvality pasty.

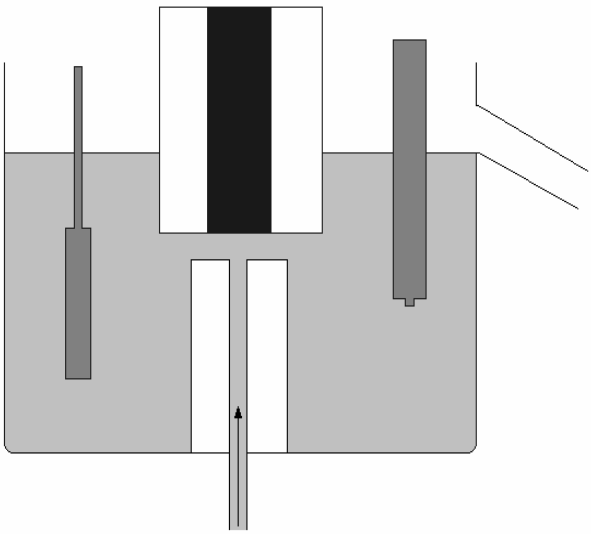
15.3.10 Coulometrický detektor s porézními elektrodami

U tohoto detektoru protéká mobilní faze s analytem prorézním materiálem elektrody, takž stupeň konverze se blíží 100 % a detektor tudíž pracuje v coulometrickém režimu. Případně lze zařadit i několik porézním elektrdod za sebou a provádět současnou detekci při několika různých vložených potenciálech (viz obr. 15.10)



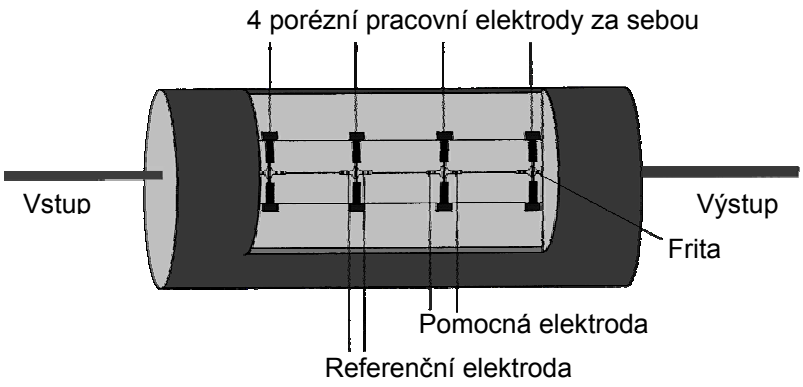
Obr. 15.8: „Wall-jet“ detektor se stříbrnou pevnou amalgámovou elektrodou

m-AgSAE (1 – 4), elektrický kontakt (1), skleněná trubička (2), Ag amalgám (3), Hg meniskus (4), referentní elektroda (5), pomocná Pt elektroda (6), teflonová trubička – výstup ze systému FIA či HPLC (7), skleněná přepadová nádobka (8), přepad (9), skleněná kapilára umožňující fixaci přívodní teflonové kapiláry z průtokového systému (10)



Obr. 15.9: „Wall-jet“ detektor s uhlíkovou pastovou elektrodou

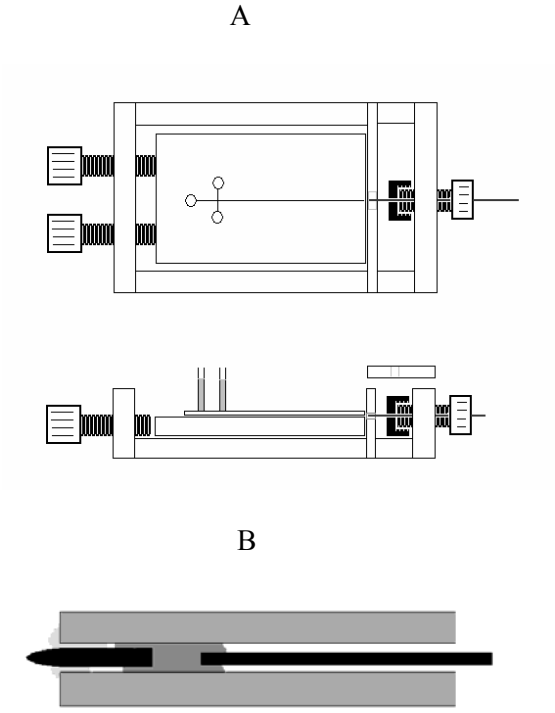
1 – pracovní uhlíková pastová elektroda (uhlíková pasta připravená z 250 mg mikrokuliček skelného uhlíku a 110 µl minerálního oleje); 2 – pomocná platinová elektroda; 3 – referenční kalomelová elektroda; 4 – mobilní fáze; 5 – přívodní kapilára



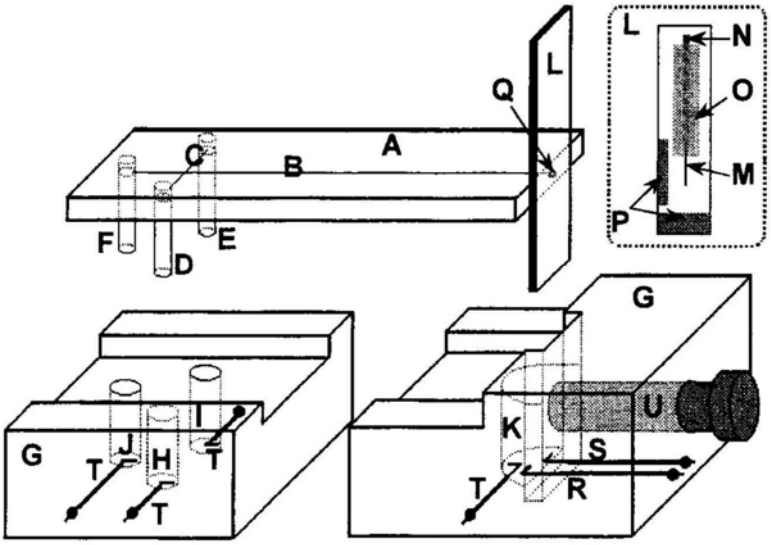
Obr. 15.10: Schéma coulometrického detektoru s více pracovními porézními elektrodami za sebou

15.4 Laboratoř na čipu (lab-on-chip)

V tomto případě dochází k separaci i k detekci na malém čipu, takže se s výhodou uplatňuje možnost miniaturizace elektrochemických detektorů. Schéma čipu s elektrochemickou detekcí na uhlíkové mikroelektrodě je na obr.15.11A, přičemž vlastní pracovní elektroda je znázorněna na obr.15.11B. Schéma čipu s detekcí na sítotiskové elektrodě je na obr. 15.12.



Obr.15.11: A - schéma čipu s elektrochemickou detekcí na uhlíkové mikroelektrodě;
B - vlastní pracovní elektroda



Obr. 15.12: Kapilární elektroforetický systém na čipu s elektrochemickou detekcí na sítotiskové elektrodě

A-skleněný mikročip, B –separační kanálek, C – injekční kanálek, D – špička pipety tvořící nádržku na pufr, F – špička pipety tvořící nádržku se vzorkem, F –špička pipety s třetí nádržkou (v tomto uspořádání není využívána), G – držák z plexiskla, H – rezervoár s pufrem, I - rezervoár se vzorkem, J – nepoužívaný rezervoár, K – detekční rezervoár, L, M – sítotisková pracovní elektroda, N – kontakt tvořený stříbrným inkoustem, O – izolátor, P pásková distanční folie, Q – výstup z kanálku, R – pomocná elektroda, S – referenční elektroda, T – elektrody vysokého zdroje napětí, U – umělohmotný šroub. Pro lepší názornost jsou čip, držák a vlastní proužek se sítotiskovou elektrodou nakresleny zvlášť a nejsou ve stejném měřítku

15.4 Laboratoř na ventilu (lab on valve)

Sekvenční injekční analýza (SIA) je založena na pohybu roztoku pomocí pístové pumpy, jejíž píst se podle pokynů počítače pohybuje oběma směry, čímž zajišťuje obousměrný pohyb roztoku v systému. Počítač řídí i mnohocestný přepínací ventil, který umožňuje proplachování systému, nasátí vzorku, přídavek a mísení s činidly i pohyb vzorku do detektoru a jeho případné zastavení v detektoru umožňující elektrochemickou či adsorpční akumulaci analytu na pracovní elektrodě. Současná technika umožňuje umístění většiny komponent systému přímo na přepínacím ventilu a odtud pochází název „lab on valve“.

15.4 Závěr

Z výše uvedeného přehledu je patrno, že kombinace elektrochemické detekce s průtokovými měřením nabízí celou řadu možností, takže i v nejbližší budoucnosti bude nepochybně této problematice věnována pozornost.

15.7 Literatura

1. Štulík K., Pacáková V.: Elektroanalytická měření v proudících kapalinách. SNTL, Praha 1989; Electroanalytical Measurements in Flowing Liquids. E. Horwood, Chichester 1987.
2. Tóth K., Štulík K., Kutner W., Fehér Z., Lindner E.: Electrochemical Detection in Liquid Flow Analytical Techniques: Characterization and Classification. Pure Appl. Chem. **76**, 1119 (2004).
3. Barek J., Opekar F., Štulík K.: Elektroanalytická chemie. Karolinum, Praha 2006.

16. INOVACE V ELEKTROANALYTICKÉ INSTRUMENTACI

doc. Dr. Ing. Ladislav Novotný, DrSc.
Univerzita Pardubice, FCHT, Ústav ochrany životního prostředí, Doubravice 41,
533 53 Pardubice 19
nvt.l@seznam.cz

16.1 Principy a formy inovace probírané v kurzu

Podobně jako v jiných oborech představují inovace v oblasti elektroanalytické chemie jeden ze základních předpokladů úspěšného rozvoje tohoto oboru. Závisí na nich jeho úroveň, atraktivnost, možnosti uplatnění, uznatelnost i dostupnost produktů, které jsou jejím výsledkem. Z hlediska technického typu, úrovně a rozsahu můžeme je rozdělit na dvě skupiny:

Výzkum a vývoj:

a) v rámci řešení vzájemně propojených oblastí
- teorie
- metodiky
- instrumentace
- aplikací

b) v rámci jednotlivých problémů
- metod, postupů
- částí, jednotek, bloků, komponent, příslušenství
- software
- způsobů aplikace

Inovace odpovídající skupině a) zahrnují většinou systematicky řešené programy, na vysoké technické úrovni a s odpovídajícími nároky na originalitu řešení, personální a jiné zajištění. Skupina b) může zahrnovat většinou jak vymezená originální řešení na zmíněné vysoké technické úrovni, tak celou škálu jednotlivých či parciálních vývojových změn, technických či technologických zlepšení.

Je zřejmé, že uvedené typy inovací jsou průběžně předmětem výzkumu a vývoje, týkajícího se v té či oné míře prakticky všech užívaných elektroanalytických technik. Jejich zevrubnější rozbor by vydal na rozsáhlou stať. V rámci tohoto kurzu bude pro ilustraci typů inovačních procesů v elektroanalýze stručně uvedeno alespoň několik příkladů z nedávné minulosti a přítomnosti.

16.2 Příklady inovací přístrojové techniky, příslušné metodiky a teorie

Následující pasáž obsahuje příklady na bázi převážně systematicky řešených teoreticko-experimentálních programů, jejichž výsledky jsou využitelné jak ve sféře výzkumu, tak v rozsáhlé laboratorní i provozní praxi.

(1) Voltametrické a polarografické systémy

Na rozvoji voltametrické/polarografické (VP) metodiky a instrumentace [1-5] za uplynulé čtvrtstoletí lze názorně ilustrovat inovační principy zásadnějšího významu, doprovázené škálou řešení jednotlivých bloků, jednotek, metod apod. Terminologicky rozumíme pod pojem voltametrie příslušné metody využívající elektrod a čidel, jejichž plocha se během měření s časem nemění; naopak polarografie je spojována s užíváním elektrod s časově proměnlivým (původně obnovovaným) povrchem.

Koncepce VP-systémů

Řešení celkové koncepce VP-systémů a jejich jednotlivých částí spadá do kategorie 16.1.a). Na přelomu 70. a 80. let minulého století zažívala rozmach spíše koncepce laboratorních systémů se zabudovanými řídícími jednotkami (tzv. laboratorních kombajnů), u nichž se po instalaci a seřízení počítalo pouze s obsluhou, nikoliv s možností zasahovat do jejich chodu, programu či uspořádání, přenášet je bez dalšího seřízení z místa na místo apod. Příkladem byl analyzátor 646 VA-Procesor, fy Metrohm (Švýcarsko).

Nicméně v té době již existovaly a začaly být realizovány [6-8] též základy jiné, nové koncepce komponentních (blokových) VP-systémů, řízených (event. i napájených) přes externí řídící jednotku: ovládací jednotku, osobní počítač apod. Příkladem rozdílnosti těchto přístupů bylo současné a vzájemně nezávislé vyřešení dvou základních verzí tehdy nového typu přístroje (součásti VP-systémů): statické rtuťové kapkové elektrody SMDE [6-10] pro opakované vytváření velkého množství vysoce reprodukovatelných kapiček rtuti visících u ústí kapiláry, na principu skokového přerušování toku rtuti upravenou kapilárou pomocí speciálních uzávěrů řízených programem nebo externími pulsy. Konstrukce americké verze SMDE fy P.A.R. [9] reprezentovala typ kompaktního laboratorního celku (využívajícího robustního, osově symetrického mechanismu s velkou přítlačnou silou uzávěru broušené kapiláry). Česká verze [6-8,10], s pružně uloženým, osově asymetrickým mechanismem s relativně malou přítlačnou silou v sedle tvarované kapiláry, měla dvě varianty, stolní a kazetovou, a byla konstrukčně flexibilnější, s možností další miniaturizace. Česká koncepce SMDE tak během následujících 15 až 20 let vyústila v realizaci sortimentu univerzálněji využitelných rtuťových elektrodových systémů, zejména komponentního mobilního (přenosného) systému UMμE [12, 14, 15] s vlastní elektronikou napojitelnou přes příslušnou kartu na řídící PC nebo realizaci různých provedení obnovovatelné stacionární rtuťové elektrody tužkového typu.

Souběžně a s použitím toho bylo vyvinuto a do výroby zavedeno několik typů prvního československého počítačem řízeného Eco-Tribo Polarografu (PC-ETP) [12-16] v linii směřující od laboratorních k mobilním až přenosným verzím a verzím miniaturizovaným. Výzkum a vývoj v těchto směrech stále pokračují. Naopak "laboratorní" konstrukce výše zmíněné americké verze SMDE se za uplynulé čtvrtstoletí prakticky nezměnila. Ačkoliv svůj původní účel stále plní, pro řadu nových aplikací (zejména v oblasti práce s miniaturizovanými elektrodami, s elektrodami s širším rozsahem funkčních parametrů apod.) je např. kvůli svým konstrukčním parametrům uzávěrů, kapiláry, ovládacích mechanismů, robustnosti, velkým přítlačným silám, možným vibracím a rezonancím nevyužitelná nebo využitelná jen v omezené míře.

Uspořádáním systému PC-ETP a jeho částí se v uplynulých cca 15 letech inspirovala ve svých výrobcích řada zahraničních firem, jako Metrohm (Švýcarsko), Eco-Chemie (Holandsko) a další. Jde tu o příklad propojení úspěšné koncepce s originálními technickými řešeními, ovlivňujícími další výzkum a vývoj po desítky let.

(2) Elektrody, elektrodové systémy, sensory a biosensory

Součástí rozvoje elektrod, elektrodových systémů, sensorů a biosensorů je především řešení [3, 6-22, 30] těchto oblastí:

a) nových či inovovaných materiálů elektrod, např. na bázi:
   - uhlíkových past, podle potřeby řízeně upravených (mísených, lisovaných, nanášených, vypalovaných) či obohacených aktivními přísadami s komplexotvornými, katalytickými a jinými selektivními účinky;
   - heterogenních kompozitů a kompozitních past na bázi různých selektivně volených materiálů jako jsou C, Ag, práškový teflon, silikagel, Pt, Au, RuO_2, HgO, Bi_2O_3 a další zvolené materiály;
   - dopovaných materiálů (dopovaných diamantových elektrod), slitin apod.;
   - pevných či nasycených amalgam nebo amalgamových povrchů obsahujících Ag, Cu, Cd, Au, Bi ad.), podle potřeby modifikovaných rtutí, uhlíkovými či jinými pastami, bioaktivními či ekoaktivními látkami apod.;

b) nových či inovovaných funkčních režimů či režimů měření, jako jsou:
   - režimů obvyklých velikostí obnovovaných rtuťových elektrod, mini-, semimikro- až mikroelektrod, v modech kapající, visící či statické kapkové elektrody (DME, HMDE, SMDE, DMmE, HMDmE, SMDmE, DMsμE, HMDsμE, SMDsμE, DMμE, HMDμE, SMDμE), meniskové nebo hemisferické elektrody;
   - režimů kompresně-expanzních rtuťových i nertuťových elektrod, jejichž plocha se řízeným způsobem zvětšuje, je konstantní či se zmenšuje;

- režimů zvolené mechanické, elektrochemické či jiné úpravy elektrod před, během nebo po jejich použití, jejich obnovování apod.;

c) nových funkčních parametrů, jako jsou:
   - velikosti, tvary, rozměry, topologie, geometrická uspořádání, formy, velikosti mezer apod.;
   - časově seřazené posloupnosti jednotlivých kroků vytváření, obnovování, změn a úprav elektrod, jejich algoritmy ap. – v závislosti na konkrétním použití

d) tvarových řešení elektrod, elektrodových sestav, jejich celkového provedení apod.;

e) způsobů snímání, úprav a zpracování elektrodových signálů, zesilování, filtrování, stínění apod.;

f) uspořádání pro dosud nedostupné nebo omezeně dostupné aplikace.

Příklad systému režimů, komponent i aplikací

Ilustrativním příkladem komplexního pojetí je řešení poměrně univerzálně využitelného systému obnovovatelné rtuťové elektrody UMμE s miniaturizovanou elektrodou tužkového typu, zaměnitelnou podle potřeby za tužkové elektrody na bázi pevných, modifikovaných či jiných výše uvedených materiálů. Podle podmínek lze přitom uvažovat o využití režimů mini-, semimikro- a mikroelektrod, meniskových, kapkových, kompresně-expanzních elektrod či režimů s volitelným průběhem plocha elektrody A vs. čas t (se spojitým, krokově rostoucím, stacionárním, monotónním či nemonotónním průběhem).

Příkladem nových možností aplikací jsou:

- využití plastových elektrod a příslušenství [24] pro práci v roztocích kyseliny fluorovodíkové, umožňující např. voltametrickou analýzu obsahu těžkých kovů ve sklech, keramických materiálech, křemičitanových struskách apod.;
- voltametrie s využitím obnovovaných miniaturizovaných stacionárních rtuťových elektrod za působení ultrazvuku [25], umožňující např. i práci v mikroobjemech vzorku a v průtokových systémech za „míchání“ ultrazvukem;
- kompresně-expanzní voltametrická charakteristika DNA-adsorbovaných filmů [23] na rtuťových minielektrodách.

(3) Elektrokapilární analýza

Přes svou historii má i tato oblast podstatné inovační možnosti. Základem je předpoklad, že přítomnost povrchově aktivních látek (PAL) v roztoku způsobuje změny (resp. snižování) průběhu povrchového napětí γ rtuťové elektrody v závislosti na polarizačním potenciálu E [1, 26, 28]. Většina bioaktivních a ekoaktivních organických látek spadá do kategorie silně či středně silně adsorptivních PAL (SAL), tj. látek s adsorpčním koeficientem β dosahujícím za daných podmínek

hodnot vyšších než 10^3 L mol^{-1} [26]. Do osmdesátých let minulého století se soudilo, že se SAL adsorbují až od určité prahové koncentrace, pod kterou se jejich přítomnost neprojevuje. Tento omyl odhalila a příslušným způsobem experimentálně odstranila nově navržená (řádově stokrát citlivější) metoda s využitím dlouhé, reprodukovatelné doby kapky kombinované s konvektivní akumulací SAL během života kapky [26, 27]. Ukázalo se a ukazuje, že správně změřený rovnovážný diagram γ–E–c má dokonce charakter stavového diagramu (analogického známému diagramu p–V–T plynů). Důsledkem byly tyto principiální možnosti:

- potvrdit platnost termodynamické Gibbs-Lippmanovy rovnice [28] i pro SAL a odvodit řadu dalších užitečných a ověřitelných vztahů z oblasti elektrosorpční analýzy, týkajících se např. vyjádření citlivosti a meze stanovitelnosti adsorpční voltametrie/tenzametrie AdSV/AdST, potenciálového posuvu AdST-píku s koncentrací c, porovnání adsorptivity různých látek apod.;
- výrazně zvýšit citlivost přímých elektrosorpčních měření a vyvíjet odpovídající metody nové.

Příkladem využitelných poznatků jsou [29]:

- možnost prokládání různých průběhů adsorpčních izoterem nebo koncentračních závislostí různých elektrosorpčních signálů jako výšky proudového píku (Δi)AdST/AdSV, kapacitních desorpčních píků, změn povrchových napětí $\Delta\gamma$ nebo diferenciálních kapacit ΔC apod., např. pomocí vztahů typu

$$\frac{Y}{1-Y}\exp\left[-\sum_{i=0}^{n} A_i Y^i\right] = X\,; \quad Y = \frac{y-y_0}{y_m-y_0}; \qquad X = \frac{x-x_0}{x_m-x_0}$$

$$\frac{X}{1-X}\exp\left[-\sum_{i=0}^{n} A_i X^i\right] = Y$$

  kde Y značí relativní změny velikosti signálu a X relativní změny koncentrace c;
- možnost vývoje metod pro charakterizaci přítomných PAL či SAL na principu vyhodnocování či vzájemného porovnání koncentračních závislostí měřených signálů.

(4) Tenziometrická měření

Poznatky a zkušenosti z polarografie a elektrokapilárních měření bylo a je možno využít i pro tenziometrická měření ve sledovaných roztocích [12]. S tím souvisí i možnost navržení nové tenziometrické metody pro určování povrchového napětí roztoků γ, využitelné v laboratorních i v provozních, dílenských či terénních podmínkách.

Příklady měření: S odpovídajícím laboratorním uspořádáním tenziometru bylo možno např. změřit povrchové napětí nejen běžných látek a roztoků, ale i látky medovité konzistence, jejichž povrchová vrstva podléhala ve styku se vzduchem a vzdušnou vlhkostí časově závislým změnám. Úspěšné bylo též proměření látky s velmi nízkým povrchovým napětím γ. V obou zmíněných případech bylo určení γ jinými metodami obtížné, ne-li nemožné.

(5) Detekce a monitorování úniku ropných látek (RL) na hladině vod

S využitím poznatků o chování elektrochemické dvojvrstvy při tvorbě adsorbovaných vrstev na elektrodách za voltametrických a elektrosorpčních podmínek byl navržen (a je dále rozvíjen) [31, 32] přenosný systém „Detectoil" pro detekci úniku ropných látek a olejů na hladině vod, např. v odlučovačích ropných látek, v čističkách odpadních vod, ve vrtech pro monitorování eventuelních průsaků či havárií u skladišť RL, u benzínových stanic apod. Detekční souprava sestává především z čidla plovoucího na vodě a spojeného s řídící (polarizační), měrnou a vyhodnocovací jednotkou, s výstupy pro hlášení přítomnosti RL a pro případné spouštění dekontaminačních zařízení. Detectoil je využitelný jak samostatně, tak jako součást technologických celků.

16.3 Shrnutí a závěr

Uvedené příklady ilustrují vysokou úroveň inovační potence rozvoje elektroanalytické metodiky a instrumentace. Ve všech případech jde přitom o aktuální, dále rozvíjené programy.

Vzhledem k potřebám moderní praxe je přitom náležitě věnována pozornost i otázkám spojeným s uznatelností popsaných metod a zařízení, zejména pokud jde o certifikaci příslušných systémů, o příslušné vyhlášky, normy, patenty, znalecké posudky apod. V jednotlivých konkrétních případech lze podle potřeby zajistit i provedení validace metody k tomu oprávněným subjektem.

16.4 Literatura

1. Heyrovský, J., Kůta, J., Základy polarografie, NČSAV, Praha, 1962.
2. Wang, J., Analytical Electrochemistry, VCH Publishers, New York, 1994.
3. Barek, J., Fogg, A.G., Muck, A., Zima, J., Crit. Rev. Anal. Chem., 2001, 31, 291.
4. Scholz, F. (Ed.), Electroanalytical Methods, Springer Verlag, Berlin, 2002.
5. Budnikov, G.K., Kazakov, V.E., Ind. Lab., 1999, 65, 689.
6. Novotný, L., Čs. pat. PV 9200-78, AO 210852, Praha, 1978.
7. Novotný, L., Čs. pat. PV 2367-80, AO 220439, Praha, 1980.
8. Novotný, L., Kandidátská disertační práce, ÚFCHE-J. Heyrovského, ČSAV, Praha, 1981.
9. Peterson, W.M., Internat. Lab., 198, 1/2, 51.
10. Novotný, L., Čs. pat. PV 6100-78, AO 202316, Praha, 1978.
11. Novotný, L., Electroanalysis, 1990, 2, 257.

12. Novotný, L., US pat. č. 5173101, 5294324.
13. Polaro-Sensors, Dokumentace k Eko- Tribo polarografu PC-ETP, Praha, 1993.
14. Novotný, L., Fresen. J. Anal. Chem., 1998, 184, 362.
15. Novotný, L., Chem. Listy, 201, 95, 147.
16. Novotný, L., Heyrovský, M., Croat. Chim. Acta, 1997, 70, 151.
17. Švancara I., Vytřas, K., Bobrowski, A., Kalcher K., Talanta 2002, 58, 45.
18. Vytřas., K., Švancara, I., Metelka, R., Electroanalysis, 2002, 14, 1359.
19. Navrátil, T., Kopanica, M., Crit. Rev. Anal. Chem., 2002, 32, 153.
20. Paleček, E., Bioelectrochem. Bioenerg., 1992, 28, 71.
21. Paleček, E., Electroanalysis, 1996, 8, 7.
22. Novotný, L., Electroanalysis, 1996, 8, 135.
23. Novotný, L., Fojta, M., Heyrovský, M., Electroanalysis, 2000, 12, 1233.
24. Novotný, L., Electroanalysis, 2000, 12, 1240.
25. Novotný, L., Coll. Czech. Chem. Commun., 1996, 61, 1703.
26. Novotný, L., Smoler, I., Kůta, J., Collection Czech. Chem. Commun., 1983, 48, 964.
27. Novotný, L., Smoler, I., J. Electroanal. Chem., 1983, 146, 183.
28. Damaskin, B.B., Petrii, D.A., Batrakov, V.V., Adorption of Organic Compounds on Electrodes, Plenum Press, New York, 1971.
29. Novotný, L., in Review on Electrochemistry for Environmental Protection (Eds. Kalvoda, R., Štulík, K.), UNESCO-ROSTE Publishing House, Venezia, 1995.
30. Yosypchuk, B., Novotný, L., Crit. Rev. Anal. Chem., 2002, 32, 141.
31. Novotný, L., Čs. užit. vzor PUV 9008-99, č. 9163, Praha, 1999.
32. Novotný, L., Herout, M., Kalvoda, R., Electroanalysis, 2000, 12, 1237.