

SENZORY

Praha 2007

Tato skripta vznikla pro potřeby kurzu **SENZORY**, 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.

Odborní garanti: prof. Ing. Karel Štulík, DrSc. a prof. RNDr. Jiří Barek, CSc. Technická redakce RNDr. Eva Juláková, CSc.

ISBN 978-80-86238-20-3

OBSAH

1.	General Aspects of Chemical Sensing 1 Jiří Janata 1.1 General Response Curve 1.2 Origins of Selectivity - Equilibrium Selectivity 1.3 Onigins of Selectivity - Selectivity	
2.	 1.3 ORIGINS OF SELECTIVITY - SELECTIVITY BASED ON KINETICS Senzory na bázi polarizovatelného rozhraní elektrolytů	
	2.4 V I VOJ METODIKI 2.5 ANALYTICKÉ APLIKACE	
3.	 Senzory na bázi porézního křemíku	
4.	 Kompozitní elektrody	
5.	Senzory na bázi amalgámů	
6.	 Senzory na bázi uhlíkové pasty	
7.	 Senzory na bázi borem dopovaného diamantu	
8.	Tlustovrstvé elektrochemické senzory91Jan Krejčí, Radka Stejskalová, Dagmar Krejčová, Zuzana Grosmanová8.1HISTORIECHYBA! ZÁLOŽKA NENÍ DEFINOVÁNA.8.2SENZORY8.3PŘÍSLUŠENSTVÍ K SENZORŮM8.4SPECIÁLNÍ APLIKACE	

9.	Elektrochemické DNA-biosenzory. Analýza nukleotidových sekvencí, mutací a polymorfismů
	 9.3 Dvoupovrchové elektrochemické techniky 9.4 Detekce mutací a polymorfismů v sekvencích DNA
10.	Elektroaktivita nekonjugovaných bílkovin. Možnosti jejího využití v biomedicíně a při konstrukci biosenzorů
11.	Chemické senzory: představují budoucnost analytické chemie?
12.	 Senzory pro detekci v proudících tekutinách
13.	Optical chemical sensors169Ivan Kašík, Vlastimil Matejec, Miroslav Chomát13.113.1INTRODUCTION, BASIC TERMS13.2METHODS – PRINCIPLES OF LIGHT-ANALYTE INTERACTION13.3OPTICAL HARDWARE - INSTRUMENTATION OF OPTICAL METHODS13.4USE OF OPTICAL SENSORS - EXAMPLES13.5OPTICAL SENSING - CONSIDERATION
14.	 Senzory plynných látek
15.	Use of nanomaterials at chemical sensors

15.3 TYPES OF NANOMATERIALS

1. GENERAL ASPECTS OF CHEMICAL SENSING

Jiří Janata, School of Chemistry and Biochemistry, Georgia Institute of Technology, Atlanta, GA 30332-0400, USA, jiri.janata@chemistry.gatech.edu

Chemical sensing is part of information-acquisition process in which an insight is obtained about the chemical composition of the system in real time. In this process an amplified electrical signal results from the interaction of some chemical species and the sensor. Generally, such interaction consists of two distinct steps: **recognition** and **amplification**. An example can be common measurement of pH with a glass electrode (Fig. 1.1). The interaction of the hydronium ion with the electrode is highly specific, but the power density in the primary interaction is very low, on the order of pW cm⁻². If we try to draw current from such electrode the information would be distorted. In other words the source of the signal (electrode) requires a high input impedance amplifier (pH meter) in order to obtain the information in useful, undistorted form. Thus, the recognition (selectivity) is provided by some chemical interaction while the amplification must be provided by some physical transducer. There are some exceptions; for example enzymatic reactions combine high selectivity of the enzyme binding for a given substrate with catalytic properties of the enzyme which represent an amplification step in itself.

TRANSDUCTION MECHANISM



Fig. 1.1: General steps in chemical sensing: Recognition - Amplification

The coupling of chemically selective layer to the physical part of the sensor is very important. As we shall see later it can have a profound effect on the overall performance of the sensor. In some cases the highly selective primary interaction can be destroyed by the use of improper transduction mechanism. The subsequent manipulation of the signal can be done in many different ways and with different degree of sophistication. Thus, it can be displayed in analog form, subtracted from the reference signal and displayed as a difference or it can be digitized or processed statistically etc.. Such processing can be done within the physical boundary of the sensor itself or it can be carried out in a separate processor. In the former case we can talk about "integrated" or "smart sensors". Generally speaking we can distinguish two types of interactions of the chemical species with the sensor: A **surface interaction** in which the species of interest is **adsorbed** at the surface, and a **bulk interaction** in which the species of interest partitions between the sample and the sensor and is **absorbed**. The notion of surface and bulk interaction is relative with respect to the size of the species. It is the case of "chicken and chicken wire". Obviously, "chicken wire fence is

impervious to chicken, but presents no barrier to mosquitos. Similarly, large molecules, such as protein may adsorb at the surface of the sensor layer while smaller ions can penetrate and absorb in the bulk.

Interaction of a chemical species X with sensor S can be described by the equilibrium

$$X + S \xrightarrow{k_{f}} SX$$
(1-1)

$$K_{\rm X} = \frac{a_{\rm SX}}{a_{\rm S}a_{\rm X}} = \frac{k_{\rm f}}{k_{\rm r}} \tag{1-2}$$

The equilibrium constant K is expressed in terms of activities

 $a = fC \tag{1-3}$

where a_{SX} is the activity of the bound species and a_X and a_S are the activities of the species in the sample and of the **binding site** in the sensor, respectively. For the purpose of this discussion the binding site can be thought of as a defined but separate component of the selective layer, such as in **heterogeneous selective layers**, or it can be s specific part of the overall matrix, such as in **homogeneous selective layers**.

The free energy of interaction for the reaction (1-1) is

$$0 = \Delta G = \Delta G^{\circ} + RT \ln \frac{a_{\rm SX}}{a_{\rm S} a_{\rm X}}$$
(1-4)

It follows from Eq. (1-4) that upon the change of sample activity the interaction of the species with the sensor will take place if the change of the standard free energy ΔG° is negative. If the binding equilibrium constant is too high ($K > 10^4$; $\Delta G^{\circ} < 23$ kJ mol⁻¹) the reaction will be nearly irreversible, from the practical point of view, and the device will respond in a non-equilibrium manner, as a dosimeter.

1.1 General Response Curve

The response of a sensor to the primary species X is described by the **response curve** (Fig. 1.2). Besides the analyte X, many other, so called <u>interfering</u> species, i, also interact with and bind to the binding sites in the selective layer. Because such interactions are nonspecific the sites occupied by the interferants are expressed as the sum (Σa_{Si}). Let us assume that only the occupied sites a_0 in or at the selective layer result in the output signal from the sensor. The total available activity of binding sites a_T in the layer is

$$a_{\rm T} = a_{\rm SX} + a_{\rm Si} + a_{\rm S} \tag{1-5}$$

and activity of the occupied sites giving rise to the signal is

$$a_{\rm O} = a_{\rm SX} + \sum_{i} a_{\rm Si} \tag{1-6}$$

The binding equilibrium for a single interferant, i, is analogous to that of the analyte, Eq. (1-2)

$$K_{i,1} = \frac{a_{\rm Si}}{a_{\rm S}a_{\rm i}} \tag{1-7}$$



Fig. 1.2: Propereties of general respose curve (please see text for discussion)

From Eq. (1-2), (1-5), (1-6) and (1-7) we have for the activity of occupied sites

$$a_{\rm O} = a_{\rm ST} \frac{K_{\rm X} a_{\rm X} + \sum\limits_{i} K_{i} a_{i}}{K_{\rm X} a_{\rm X} + \sum\limits_{i} K_{i} a_{i} + 1}$$
(1-8)

Dividing right-hand side of Eq. (1-8) with the value of the binding constant for the analyte, K_X gives

$$a_{O} = a_{\rm ST} \frac{a_{\rm X} + \sum_{i} K_{i} a_{i}}{a_{\rm X} + \sum_{i} K_{i} a_{i} + 1/K_{\rm X}}$$
(1-9)

In this equation K'_i has the meaning of the **selectivity coefficient**. It applies to <u>each interferant</u> <u>individually</u>. The smaller the K'_i , the more selective is the layer to the analyte X than to the interferant species i.

Equation (1-9) defines three operating regions on the general response curve:

At the high activity of the analyte or the high level of the interferants, i.e., at $a_X >> (\sum_i K'_i a_i + 1)$ and/or $\sum_i K'_i a_i >> (a_X + 1)$, all the available binding sites are occupied by one or the other species. This is the **saturation** limit of the sensor for which

$$a_{\rm O} = a_{\rm ST} \tag{1-10}$$

Below the saturation regime lies the **dynamic range**, for which $\sum_{i} K'_{i} a_{i} < a_{X} < 1/K_{X}$. Here a fraction of the sites is occupied by X and their activity is linearly dependent on the activity of X in the sample

$$a_{\rm O} = a_{\rm ST} K_{\rm X} a_{\rm X} \tag{1-11}$$

In the interference region the activity of the analyte and/or its binding constant are low, that is

 $K_{\rm X}a_{\rm X} \ll (\sum_i K_i a_i + 1)$ and the binding sites are occupied only by the interferant and the sensor does not respond to the analyte. From Eq. (1-8) we have

$$a_O = a_{ST} \sum_i K_i a_i \tag{1-12}$$

The intercept of the dynamic range, Eq. (1-11), and of the interference region, Eq. (1-12), defines the **detection limit**.

$$a_{\rm O} = a_{\rm ST} K_i(a_i)_{\rm d.l.} = a_{\rm ST} K_{\rm X}(a_{\rm X})_{\rm d.l.}$$
(1-13)

or

$$\frac{K_i}{K_{\rm X}} = K'_i = \left(\frac{a_{\rm X}}{a_i}\right)_{\rm d.l.}$$
(1-14)

If only <u>one interferant</u> is present Eq. (1-14) yields the value of its **selectivity coefficient** for that interferant. This is the equation from which the selectivity coefficient is experimentally evaluated. The subscript "d.l." denotes activities of the analyte and interferant at the detection limit. However, if the analyte binds strongly <u>and</u> the level of interferants is high the inequality $a_X \ll \sum_i K'_i a_i$ applies and the detection limit for a single interferant is

$$K'_{i} = \left(\frac{a_{\rm X}}{a_{i}}\right)_{\rm d.l.} \frac{1}{1 - K_{\rm X}(a_{\rm X})_{\rm d.l.}}$$
(1-15)

As the value of term $\sum_{i} K_{i} a_{i}$ increases the dynamic range becomes narrower and narrower until for high value of interferants it vanishes completely and the sensor does not respond to the analyte anymore.

$$a_{\rm O} = a_{\rm ST} \frac{\sum_{i} K_{i}^{'} a_{i}}{\sum_{i} K_{i}^{'} a_{i} + 1/K_{\rm X}}$$
(1-16)

At $\sum_{i} K'_{i} a_{i} >> 1/K_{X}$ sensor again reaches the saturation limit ($a_{O} = a_{ST}$), but now most of the sites are occupied by the interferant. The output signal from a sensor depends on the transduction function \Re_{f} . It is related to the occupancy of the binding sites by

$$E_{\rm out} = \Re_f(a_0) \tag{1-17}$$

Thus the **dynamic range** of a sensor is bracketed by the difference of the experimental detection limit, Eq. (1-14) or (1-15), and the saturation limit, Eq. (1-10)

$$\langle \text{dynamic range} \rangle = \Re_f \{ (a_X)_{\text{sat.}} - (a_X)_{\text{d.l.}} \}$$
(1-18)

While the detection limit depends on the activity of interferants in the sample, i.e. on the **application** the saturation limit is the property of the sensor itself. This means that the dynamic range is affected primarily by the saturation limit and depends on the total number of available binding sites. It can be said that the interferants and the selectivity coefficient limit the dynamic range "from the bottom up", while the concentration of binding sites limits it "from the top down". For example a sensor with detectable minimum density of 10⁹ molecules per cm², and maximum

density of 10^{14} sites per cm² (corresponding to 1 nm² per molecule) has theoretical dynamic range of five decades. How is it then possible that some sensors, for example, glass electrode, have a dynamic range extending over <u>thirty</u> decades? There are several reasons: first the number of binding sites is much larger for absorption than for adsorption where the maximum surface density is typically 10^{14} sites per cm². If the effective thickness of the selective layer is 1 µm and a bound molecule occupies a cube (1 nm)³ the maximum number of binding sites increases from 10^{-10} mol cm⁻² for <u>adsorption</u> up to 10^{-7} mol cm³ for <u>absorption</u>.

Second, and more important factor in extending the dynamic range is the availability of different binding sites with multiple binding constants $K_1, K_2, ..., K_n$, for the species X. In that case the response will include contribution from all the binding events. Ignoring for the moment the interferants, according to Eq. (1-11) the activity of the bound species is

$$a_{\rm SX} = a_{\rm X}(K_1 a_{\rm T,1} + K_2 a_{\rm T,2} + \dots + K_n a_{\rm T,n})$$
(1-19)

where $a_{T,1}$, $a_{T,2}$... are the total activities of the individual binding sites. If the partial binding processes are not affecting each other the overall response has the functional relationship \Re which applies to all

$$E_{\text{out}} = \Re_f a_X \left(K_1 a_{T,1} + K_2 a_{T,2} + \dots + K_n a_{T,n} \right)$$
(1-20)

Such situation exists within the <u>hydrated layer</u> of a glass electrode with multiplicity of binding sites for hydrogen ion provided by the statistically large number of lattice defects and high level of doping impurities. Each site yields an individual dynamic range which then overlaps with the next one yielding the overall span much greater than would correspond to any single type binding site with only one equilibrium constant. In glass electrode the overall response function is $\Re_f = \frac{\Re T}{zF} \ln a_{sx}$. In general, a sensing <u>surface</u> has only one type of binding constant and consequently has only limited theoretical dynamic range.

The third possibility that leads to extended dynamic range is the change of the sorption mechanism. There are many types of adsorption isotherms. Which isotherm or isotherms apply in any given situation depends on the composition of the selective layer and on the concentration range. Thus, for example, at low concentration of the analyte the Langmuir isotherm governs the interaction, but at higher concentration, when all available binding sites will have been occupied a BET isotherm may apply. Also, interaction with specific binding site may be replaced by interaction with the matrix and the sorption then follows the simple Henry's law.

The location of the sites is also important from the point of view of the operational characteristics. Sensors whose response depends on <u>bulk interactions</u> are based on the partitioning process which is governed by the Gibbs equation which for a two-phase equilibrium is

$$0 = \Delta G = (\mu_{\rm X} dn_{\rm X})_{\rm sensor} + (\mu_{\rm X} dn_{\rm X})_{\rm sample}$$
(1-21)

where X is the chemical species which partitions between the sample and sensor phase. At equilibrium the number of moles dn_X crossing the interface in each direction must be the same (but of the opposite sign):

$$(\mu_{\rm X} \mathrm{d}n_{\rm X})_{\rm sensor} = -(\mu_{\rm X} \mathrm{d}n_{\rm X})_{\rm sample} \tag{1-22}$$

Thus the chemical potentials of species X in the two phases must be also equal

$$(\mu_{\rm X})_{\rm sensor} = (\mu_{\rm X})_{\rm sample} \tag{1-23}$$

This is the general condition of equilibrium partitioning process. As we will see later it applies to both electrically neutral and electrically charged species. The chemical potential of species X in a phase (gas, solid or solution) is

$$\mu_{\rm X} = \mu^{\circ}_{\rm X} + \Re T \ln a_{\rm X} \tag{1-24}$$

Thus, sensors based on absorption (phase equilibrium) measure <u>activity</u> and if only one type of sorption mechanism is involved their response is <u>logarithmic</u>.

The condition of the general **adsorption equilibrium** which does not assume the existence of high affinity binding sites is again described by the equality of the chemical potential of the species in the sample phase μ_X and at the surface μ_{SX} . The general adsorption equilibrium has the form of the Eq. (1-1) and the equilibrium constant *K* can be expressed in the similar manner as above:

$$X + S_{ads} \longrightarrow SX_{ads}$$
 (1-25)

$$(a_{\rm X}K_{\rm X})_{\rm ads} = (a_{\rm SX})_{\rm ads} \tag{1-26}$$

where SX_{ads} designates the surface **adsorbed species**. The surface activity is related to the bulk activity through some form of adsorption isotherm.

We have been using **activity** in order to emphasize the thermodynamics of the interaction between the analyte and the selective layer. In reality, only a few sensors, notably ion selective electrodes, measure activity. What is it then actually measured in reality: activity or the concentration of the species? We can take a very non-compromising view on this question and accept that all chemical interactions are governed by the activities which can be equated with concentrations only under special circumstances. In gases where the interactions between gas molecules are relatively weak the activities (more appropriately fugacities) can be equated with concentrations (partial pressures). Another "safe" approximation of activity to concentration is commonly made in dilute aqueous solutions in which the ionic strength does not exceed approximately 1 mmol 1^{-1} . For electrically neutral species the concentration of other solutes can be even higher. The immediate consequences of making this assumption without proper justification are the non-specific interferences due to the variation of the activity coefficient, which translates to a loss of the information content in the signal. There are, however, sensors in which the output can be justifiably related to concentration even under conditions where activity and concentration are substantially different. These are the sensors whose output is governed by the **spatial gradient** or the **time-change** of concentration, i.e., in steady-state sensors for which the output signal E_{out} is

$$E_{\rm out} = \Re(\sum_i K_i \frac{\mathrm{d} C_i}{\mathrm{d} x})$$

or

$$E_{\rm out} = \Re\left(\sum_{i} K_i \, \frac{\mathrm{d}C_i}{\mathrm{d}t}\right)$$

If we differentiate the activity equation (1-2), in distance or in time we obtain

(1-27)

$$\frac{\mathrm{d}a}{\mathrm{d}x} = \frac{\mathrm{d}f}{\mathrm{d}x}C + f\frac{\mathrm{d}C}{\mathrm{d}x} \approx f\frac{\mathrm{d}C}{\mathrm{d}x}$$

and

$$\frac{\mathrm{d}a}{\mathrm{d}t} = \frac{\mathrm{d}f}{\mathrm{d}t}C + f\frac{\mathrm{d}C}{\mathrm{d}t} \approx f\frac{\mathrm{d}C}{\mathrm{d}t}$$

The changes of activity coefficients over short distance and/or short time are almost always close to zero and can be neglected. The activity coefficients also cancel out in the mass transport sensors (e.g. amperometric) and can be also expressed in terms of concentrations rather then activities. Generally speaking, only the equilibrium sensors with partitioning or adsorption mechanism depend on activities rather than on concentrations.

(1-28)

A major confusion in the analytical, particularly sensing literature is the misuse of the term "sensitivity" instead of "detection limit". **Sensitivity** of the sensor is the <u>slope of its response in the</u> <u>dynamic range</u> while the detection limit is the minimum detectable response, usually above three times the standard deviation (i.e. > 3*s*). Because it is evaluated experimentally the sensitivity of the sensor has two sources of the error: standard deviation of the response s_R and the standard deviation of the concentration s_C . The sensitivity m of a sensor is the first derivative of its response with respect to the concentration of the analyte at any concentration $C_{X,j}$ at the response curve. Therefore, the sensitivity goes from zero in the interference region through a maximum in the dynamic range, to zero in the saturation region (Fig. 1-2)

$$m = \left(\frac{\mathrm{d}E_{\mathrm{out}}}{\mathrm{d}C_{\mathrm{X}}}\right)_{C_{\mathrm{X},j}} \tag{1-29}$$

It has been proposed [1] to define **analytical sensitivity** γ as

$$\gamma = \frac{m}{\sigma_{\rm R}} \tag{1-30}$$

Because

$$s_{\rm R} = m \, s_{\rm C} \tag{1-31}$$

it is possible to compare the <u>sensitivity of different sensors</u> using relationship from Eq. (1-30) and (1-31) (Fig. 1-2).

$$\gamma = \frac{m}{\sigma_{\rm C}} \tag{1-32}$$

Ideally, sensors should behave <u>reversibly</u> in response to the changes of the analyte. If they do not we talk about **sensor hysteresis**. This phenomenon can be overlooked if the response of the sensor is experimentally evaluated only in the direction of <u>increasing</u> concentrations. This can be a problem for testing of sensors in liquid media. Thus, it is important to evaluate it also for <u>dilutions</u>. A convenient way to do this is to use **flow injection analysis** as the means of preparing progressively dilute samples.

1.2 Origins of Selectivity - Equilibrium Selectivity

Selectivity is the single most important general issue in chemical sensing. It determines the usefulness of the sensor for any given application. It can be defined as the ability of a sensor to respond primarily to only one species (analyte) in the presence of other species. Its role can be best explained by examining the response curve (Fig. 1.2). In this graph several responses of the sensor to increasing concentration of the analyte are plotted, for increasing concentration of **interfering species**. As their concentration increases the detection limit shifts to the higher concentration of the primary species, and the dynamic range becomes narrower and narrower. In the most extreme case it vanishes and the sensor becomes entirely non-responding.

Obviously, one of the most important objectives is to design the selective layer in such a way, that it has wide dynamic range and as low the detection limit as possible. It means that in the ideal case the layer should completely reject any interfering species and would respond exclusively to the analyte. In a real analytical situation the nature of interferences it is rarely known *a priory*. For practical reasons it is desirable to design the selective layer to be as specific as possible. Various strategies for doing that are outlined in the following sections. It is also important to mention here that the selectivity of the sensor response is also affected by the correct combination of the recognition mechanism provided by the selective layer and of the amplification, transduction principle. That aspect will be also discussed in individual types of sensors. There are two general classes of selectivity: equilibrium based and kinetically based. Both types depend on specific interactions of the analyte molecule with the selective layer. Besides that, there is also **physical selectivity** based on highly specific interaction of the molecule with electrostatic and electromagnetic field. It applies specifically to electrochemical and optical sensors.

1.2.1 Equilibrium Based Selectivity

Outline of the thermodynamics governing the equilibrium binding was given, in Section 1.1. The selective layer can be homogeneous or can contain specific binding sites imbedded in a matrix. When ideal selective layer is exposed to a mixture of molecules it interacts with those for which the layer is selective and rejects the other, interfering molecules. The above discussion has been formulated in terms of the change of free energy, but so far did not consider the <u>types</u> of the chemical interactions, which may be involved in such interaction. The interactions that are relevant are all **weak interactions**. They are summarized in Table 1.1 and arranged in the order of decreasing strength. The covalent bond is shown only for comparison; otherwise it has no function in the selectivity scheme.

There are two aspects that we need to pay attention to besides the interactions energies. First is the effect of the dielectric constant. Since the nature of all these interactions is electrostatic increasing dielectric constant D makes most of the interactions weaker. Second is the distance dependence on r. The higher the power of r faster the interaction energy decays with distance between the molecule and its binding site. This is why weak interactions are also called **short range interactions**. There is no distance dependence for donor-acceptor complexes, hydrogen and hydrophobic bonds in which the bond length is fixed and typically on the order of tenths of nm. The significance of the short range distance dependence is in the **shape recognition**, which is the most important reason for the high selectivity inherent in the so called "lock-and-key" biological interactions. There the geometry of the interaction plays a dominant role.

Type of Interaction	Distance Relationship (nm)	Order of Magnitude (kJ mol ⁻¹)
covalent bond	0.08-0.2	50-200
hydrogen bond	0.1-0.3	20-150
donor-acceptor	0.1-0.3	50-150
Hydrophobic bond CH ₃ –CH ₃	< 0.1	(1.2)*
$\Phi - \Phi$	< 0.1	(5)*
ion-ion	$E \approx \frac{z_1 z_2}{Dr}$	90
ion-dipole	$E \approx \frac{z_1 \mu_2 \cos \Theta}{Dr^2}$	15
dipole–dipole (stationary)	$E \approx \frac{\mu_1 \mu_2}{Dr^3}$	±2
dipole-induced dipole	$E \approx \frac{z_1 \alpha_2}{Dr^4}$	2
dispersion	$E \approx \frac{\alpha_1 \alpha_2}{r^6} \frac{I_1 I_2}{I_1 + I_2}$	2-4

Table 1.1: Approximate Interaction Energies

D is dielectric constant; α – polarizability; μ – dipole moment; *r* – distance; *z* – charge; Θ – angle and *I* ionization energy; (*) means per mole unit coupling

Living organisms are the ultimate sensing machines. In order to survive a living organism must accomplish three missions: to metabolize, to reproduce and to process information. The latter means both information acquisition and processing. There are millions of chemical species in the environment and the <u>selectivity</u> is of primary importance because the acquisition of "false signals" and/or their wrong interpretation could be anything from humorous to disastrous. The biological strategy is to involve <u>shape recognition</u>, in other words, stereospecificity. The energies in Table 1.1 are listed as <u>enthalpies</u> *H* but the driving force in the chemical species/sensor interactions are really the changes of free energy, ΔG , that includes the change of **entropy** ΔS . At constant temperature the two are related by

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \tag{1-33}$$

The higher the entropy change, the more negative the free energy change and the more stable the system. Entropy is a measure of the randomness of the system.

So, let us look at the geometry of the binding site and of the analyte in Fig. 1.3. We are interested in examining their geometrical fit, meaning: "shape-recognition". Within the system marked by the asterisk they are clearly in a more random configuration if <u>they are not associated</u> because they have more degrees of freedom and therefore higher entropy. In other words, on the <u>entropy</u> consideration alone they would be more stable if they were disassociated. The only way they would be used in an active sensor is if the enthalpy decrease due to their association was high enough to compensate for the value of the term $T\Delta S$. In this case the "shape recognition" strategy will work only if there are negative enthalpy producing binding sites (exothermic) present inside the "cleft" of the binding site S. The Nature has, indeed used this strategy in using hydrogen bond, ionic bonds, charge transfer complexes etc., inside the binding sites of hormone receptors, antibodies etc. However, as can be seen from Table 1.1, most of the interactions fall of rapidly with the distance between the interacting entities, with the exception of the coulombic ion-ion bond, and with the increase of dielectric constant. The enthalpic interactions are common to many classes of compounds and as such would not be an optimum strategy for achieving high selectivity. So, is there a way out? Let us consider the most regular object, a sphere. It has only one parameter, which affects its potential to be selectively recognized - its size. There is only one "arrangement" which corresponds to a selective fit of the sphere to the binding site. If we now take a two spheres connected with a solid rod (like a dumbell) the number of possible "fits" increases to three (two for the sizes of the balls and one for their distance). We take one more step in this progression (Fig. 1.3) and interconnect three balls of different size with two links of different length. For this "molecule" the number of requirements for a perfect fit increases to twelve: three for the diameters of the balls, two for the lengths of the links, one for the angle and than double that for the configuration 1-2-3 or 1-3-2. It is important to realize that only one configuration will fit the binding site. Generally, as the geometrical complexity increases the number of possible misfits decreases and therefore the selectivity increases. Moreover, the "size of the ball" can be also interpreted as the "type of interaction". Therefore, a molecule approaching the binding site can be either attracted ($\Delta G < 0$) or repulsed ($\Delta G > 0$). Thus, even if the molecule fits the binding site geometrically it must also match the type of the enthalpic interaction belonging to that part of the binding site. For example, if the region 2 on the molecule is hydrophobic then it must be again matched by the hydrophobic region in the binding site. Any other interaction will result in $\Delta G > 0$, which means repulsion. Thus a "mismatch" may actually have a negative contribution to the binding and thus further enhance the overall recognition.



Fig. 1.3: Principle of geometrical "fit" of the analyte and the binding site

As we see from Eq. (1-33) the increase of entropy favors binding. This is the essence of the probably most important bond in biological systems, the **hydrophobic bond**. Figure 1.4A depicts the situation as it exists in vacuum, which is obviously not a "typical biological situation". The biological sensory systems work in aqueous environment. This means that water must be included in the thermodynamic considerations (Fig. 1.4B). Water molecule interacts (hydrate) both S and X

because its hydrogen bond, ion-dipole and dipole-dipole interactions have enough energy to cause such association. When S and X are separated (Fig. 1.4B) there are arbitrarily selected two free (random) molecules of water present in the system. For a unique description of the system we have to specify the coordinates of all the components. If we place the origin of the coordinate system in the binding site then the position of the remaining particles is uniquely described by 3n = 9 coordinates. Those are their degrees of freedom. On the other hand when complex SX is formed (Fig. 1.4C) thirteen more water molecules will have been liberated from the cleft thus increasing the number of the particles to 15 and the number of degrees of freedom to 45 (the numbers correspond, of course, to the Fig. 1.4, but are otherwise arbitrary). This results in the increase of the entropy (lowering the free energy) of the whole system. Thus, the binding free energy is driven by the entropy of hydration. Its equivalent enthalpy value/interaction is included in Table 1.1 for comparison.



Fig. 1.4: Principle of hydrophobic bonding. (A) binding in vacuum, (B) and (C) binding in aqueous environment when S and X are hydrated

For the purpose of this discussion it is most important to realize that the hydrophobic bond will contribute to the free energy of interaction only if the two molecules geometrically fit and eliminate some hydration water from the binding cleft and its vicinity. It is this condition which primarily accounts for the high selectivity found in the immunochemical reactions, biological receptor binding, enzyme/substrate recognition etc. It is also combined with enthalpy driven binding which can again act only at a relatively short range.

Equilibrium constants of some biological recognition reactions have stronger dependence on temperature than others implying that the relative contribution to free energy change from, e.g., the hydrogen bond (enthalpy) and the hydrophobic bond varies [2]. The important corollary for the design of so called biosensors is that it would be difficult to employ a water-based biological selective system (e.g. most enzymes or antibodies) for water-free applications.

1.2.2 Bioselectivity

Specific binding sites of biological origin define the special class of chemical sensors – **biosensors**. Due to their exceptionally high selectivity these bioligands have been subject of intense interest among sensor scientists and engineers. They are classified in Table 1.2. Unfortunately, high specificity implies strong binding energies, often in the excess of 100 kJ mol⁻¹. It then becomes the case of "too much of a good thing". Once again we must invoke the difference between the sensor and sensing system (or assay). The later requires some intervention in order to disassociate the strong complex formed between the biological ligand and the substrate. Such step places them outside the definition of the chemical sensors. However, they will be briefly discussed here for several reasons. It may help to clarify the misuse of the term "biosensor". Perhaps more importantly, there is a real hope that these bioligands could be used in genuine biosensors if their high binding constant could be lowered to the level where they could be used in equilibrium binding regime. Such de-tuning of selectivity is possible, in principle, if the binding region in the biomolecule is covalently modified. Another possibility is to operate them under the conditions when the binding interaction becomes weaker to the point that the equilibrium is established. This can be done by modifying the reaction medium, i.e., increasing ionic strength and lowering the pH (immunochemical interactions), addition of "hydrogen bond breakers" (DNA, RNA binding), elevating the temperature (DNA, RNA binding), use of mixed organic/aqueous solvents (immunochemical and receptor binding). Such change of operating conditions may, however, impose unacceptable constraints on the operation of such biosensors. Finally, their very successful use in various bioassays is another reason for having them briefly discussed. This assessment applies to all bioligands except enzymes.

BIOLIGAND	USE	
Antibodies/antigens	Immunoassays	
Oligonucleotides	DNA (RNA) bioassays	
Aptamers	Bioassays	
Enzymes	Enzyme sensors	
Receptors	Bioassays	
Cells & Tissues	Bioassays	

Table 1.2: Biologands Used in Biosensors & Bioassays

Immunochemical Selectivity

If one were to define an ideal reagent for construction of a selective layer, antibodies would have to be considered very seriously. Their selectivity is based on stereospecificity of the binding site for the antigenic determinand (antigen, hapten, epitope). Their production is relatively inexpensive and universal, which means that antibody for any antigen, regardless of its shape or chemical nature, can be produced by the same general procedure. In this respect the only limitation seems to be that of the size: Antigens of the molecular mass less than 2 000 normally do not induce an immunochemical response in B-lymphocytes which produce them. In order to obtain antibodies for low molecular weight antigens (haptents) it is necessary to link the latter to a high molecular weight polymeric carrier (e.g. bovine serum albumin, polyethylene glycol etc.).

Antibodies belong to the group of serum proteins called immunoglobulins [2]. Their molecular mass ranges from 140 000 to 970 000. The number of antigens which can be bound to one antibody determines their valency which is typically 2 but can be as high as 10 for immunoglubulin M (IgM). Their primary function is to disable foreign (high molecular weight) immunogens, be it proteins, nucleic acids, viruses etc., which may invade and endanger the organism. In that respect they can be looked at as highly specific complexing agents, which are one of the key factors in the defense mechanism. The most common antibody is immunoglobulin G (IgG) which has the molecular mass 146 000 and valency 2. The diameter of the molecule is estimated to be \sim 7 nm and the characteristic dimension of the binding site varies between 25 and 40 nm (Fig. 1.5).



Fig. 1.5: Immunoglobilin IgG

Although the active site on the antibody is fundamentally highly specific to the given antigen any preparation of antibodies either polyclonal or monoclonal is heterogeneous. This heterogeneity is far greater in polyclonal antibodies than in their monoclonal counterparts. The average ability to complex antigen is called avidity of the preparation while the binding equilibrium between antibody (Ab) and an antigen (Ag) is referred to as affinity

$$Ab + Ag \xleftarrow{k_{f}}{k_{r}} [Ab^{*}Ag]$$
(1-34)

The binding constant *K* is again defined as the ratio of the forward and reverse rate constants, Eq. (1-34). It ranges from $K < 10^4 \,\mathrm{l}\,\mathrm{mol}^{-1}$ for weak binding of antigens of $M_{\rm r} < 2,500$ to $K > 10^9 \,\mathrm{l}\,\mathrm{mol}^{-1}$ for antigens of $M_{\rm r} > 6$ to 8×10^6 , which are very strongly bound [3].

Under the physiological conditions the equilibrium constant in the range of $K = 10^5$ to $10^9 \,\mathrm{l}\,\mathrm{mol}^{-1}$ correspond to $\Delta G^\circ = -25$ to $-50 \,\mathrm{kJ} \,\mathrm{mol}^{-1}$. The forward rate of the immunochemical reaction is invariably very high (diffusion limited). This is consistent with the strategy of the biological defense mechanism: "shoot first, ask questions later", where the inactivation of a "potentially harmful" antigen must be done with the maximum speed, but the recognition of the truly harmful (or innocuous) constituent can be done much more slowly. This means that the dissociation rate constants vary over 7 decades from $10^{-4} \,\mathrm{s}^{-1}$ to 10^3 s and determine the overall high affinity of the hapten or antigen to the antibody.

The nature of the Ab-Ag bond is of critical importance for analytical purposes. The most prevalent bonds are considered to be coulombic, and Van der Waals interactions. The role of water in the overall binding is also critically important. First of all it is the prerequisite in the formation of the hydrophobic bond. However, expulsion of water from the binding site, which takes place during binding, decreases the local dielectric constant and increases the strength of the coulombic and Van der Waals bonds (Table 1.1) in that region. Thus the binding is cooperative. The close stereospecific fit is, of course, necessary. There is no covalent bonding involved in any immunochemical reactions.

In order to assess the utility of the immunochemical reaction for chemical sensing we need to examine the effects of the experimental conditions on the primary association reaction. The effect of temperature is not particularly distinct for most reactions and cannot be generalized. This is due to the fact that the relative contribution of the hydrophobic (entropic) bond and other (enthalpic) bonds is different. The equilibrium is largely insensitive to pH (between 6.5 - 8.5) and normal ionic strength. However, by lowering the pH below 2 and increasing the ionic strength above 1M weakens the Ab*Ag complex to the point that it can be dissociated. The presence of organic solvents begins to play role only when the hydrophobic bonds become affected. Obviously, the presence of water in the binding process is mandatory.

DNA and RNA Based Selectivity

The selectivity of DNA (and RNA) interaction is probably the highest among all biological recognition sites. It is unique in that it relies exclusively on highly stereospecific hydrogen bonding between base pairs: adenine–thymine, and cytosine–guanine (Fig. 1.6). The enthalpic value of one base pair formation is $\Delta H = 20.1$ kJ mol⁻¹ for the A–T and $\Delta H = 57.5$ kJ mol⁻¹ for the G–C. Because the interaction enthalpies are additive the overall DNA fragment increases with the number of base pairs reaching the "reversible" threshold even for a dimer. The sensing dilemma is obvious - the interaction is again too strong. The sensing reversibility can be achieved, in principle, by operating the sensor near the "melting temperature" of the duplex, but the melting point depends on the number and type of base pairs and is not generally known *a priory*.

It is necessary to invoke the meaning of selectivity at this point. If the DNA fragment contains a "mismatch" it must be considered to be an interferant, or "impurity" in the sensing context. However, one such mismatch may lower the interaction energy by such a small amount that for all purposes the "binding" and sensing still takes place. If the transduction mechanism cannot distinguish such an event then the selectivity is lost. Thus, paradoxically, the high selectivity of the elementary sensing interaction becomes self-defeating. Moreover, the position of the "mismatch" in the DNA duplex plays also a role. The hybridization process is sequential, in nature. This means that the association process starts at one end of the single strand (ssDNA) and progresses down the chain. This is known as the "kiss-and-zip" mechanism. A single "mismatch" is always skipped and does not play a major role in the overall result, except for a slightly lover overall binding energy.



Fig. 1.6: General structure of DNA

Aptamers

These are "artificial/natural" oligonucleotides (DNA or RNA) in which the principle of the biological "lock-and-key" recognition is preserved (Fig. 1.7). They are capable of binding small molecules in the range of 100 – 10,000 Daltons. They have been designed for assays of drugs, small proteins and other small molecules [4]. Their affinity is comparable or higher than corresponding monoclonal antibodies. It is due to the unique folding ability of RNA and of single-stranded DNA. They are prepared by entirely in vitro procedure called SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) process [5]. It is obvious that they suffer from the same problem as other bioligands with the high binding constant, i.e. a virtual irreversibility. Again, they found number of applications in bioassays where they show better performance (namely long term stability) than antibodies. What makes them potentially interesting for the reversible sensing applications is the possibility to manipulate, specifically to <u>decrease</u> the binding constant to the point that they would operate in equilibrium regime.



Fig. 1.7: Aptamer and chematic of its production

1.2.3 Molecularly Imprinted Polymers

Another way to realize the shape recognition ability is through the process known as **molecular imprinting** [6,7]. In this process a template molecule creates a "footprint" in polymerizing matrix. After its removal from the polymerized material this footprint becomes a shape-recognizing specific binding site for the same molecule. The idea of molecular imprinting is quite old, dating to mid fifties when Linus Pauling reported selective sorbents from silica gels. Imprinted polymers came later and have been successful as stationary phases in chromatographic separations, particularly of chiral isomers. In applications as direct sensing materials their success has been quite limited.

There are two processes by which the <u>bulk</u> imprinted polymers are formed: **covalent imprinting** and **non-covalent imprinting**. In the former the template molecule is first covalently functionalized with the <u>monomer</u> and then co-polymerized with the pure monomer. After that the covalent bond is broken and the template molecule is removed by extraction. In order to facilitate the extraction step so called "porogenic solvent" is used. It effectively swells the polymer matrix.

In the non-covalent approach the monomer is "self-assembled" around the templating molecule and then again co-polymerized with the additional monomer. The template is then removed by using the porogenic solvent. The two schemes are shown in Fig. 1.8.



Fig. 1.8: Principle of molecular imprinting

It is also possible to prepare molecularly imprinted surfaces [8]. The process is depicted in Fig. 1-9. First the template (in this case protein) is deposited on a mica surface, which is atomically smooth. Next the surface and the adsorbed protein are coated with water-soluble disaccharide (sugar). After that a fluoropolymer is deposited by plasma polymerization of C3F6. A mechanical support is then added by attaching a glass cover slip with epoxy. Finally, the mica support is peeled off, the sugar coating and protein molecules are washed away exposing the "footprint pit" where the protein was. The thus prepared surface shows up to ten fold preferential enhancement of adsorption of the template protein molecule as compared to other, non-imprinted proteins.

There are several reasons why imprinted polymers do not match the affinities of natural stereospecific binding sites. First of all, the shape alone (i.e. entropic contribution) is not sufficient. The specific short range interactions that exist in the natural binding sites generally do not exist in the imprints. Second, it is implicit in solution polymerization that the templating molecules and the monomers are solvated and that the solvation shell contributes to the overall shape and size of the template in a significant way. When the imprinted material is used in a solid-gas interaction the fit of the molecule without the solvent is poor. Another reason is that a "tight fit" implies that the template is locked in the bulk of the polymer matrix and cannot get be extracted even with the aid of the "porogenic" solvent. The fact that it is leached out and that the template molecule can exchange between the imprint and the sample is because the fit is not as good as it has been expected. Therefore the binding reversibility and the stereoscopic specificity are two conflicting requirements. This problem does not exist in the imprinted surface where the "binding pit" is freely accessible. Only the properly designed "baseline experiments" can truly assess the viability of the imprinting approach.



Fig. 1.9: Molecular imprinted surface

1.2.4 Selectivity Based on Solubility. Organic Materials

The main difference between the materials described in this section and the previous ones is that they are homogeneous. In other words, there are no discrete binding sites and the interaction between the analyte and the selective layer is governed by the Gibbs equation, Eq. (1-23). The solid phase is treated as a "solid solvent" to which the analyte partitions from the sample. The solid phase can be amorphous or polycrystalline or even a gel and the sample can be liquid or gas. An immediate analogy with a gas chromatographic (GC) experiment comes to mind. There the sample partitions between mobile gas or liquid phase and the stationary, solid or semi-liquid phase. Indeed such analogy leads to one of the most successful empirical relationships, Linear Solvation Energy Relationship (LSER) that has been used in design of selective layers, particularly for gas sensing. The partitioning process is described by Eq. (1-35)

$$\Delta G_{\rm S}^{\rm o} = RT \ln K_{\rm S} = c + rR_2 + s\pi_2 + a\sum \alpha_2^{\rm H} + b\sum \beta_2^{\rm H} + l \log L^{16}$$
(1-35)

The lower case coefficients are related to the sorbent material while the capital and the Greek letters describe the gas. Hundreds of these values have been compiled from the GC data and tabulated [9].

The terms on the right-hand side of Eq. (1-35) have the meaning of individual contributions to the Gibbs free energy change according to specific interactions, more-or less matching those given in Table 1.1. The second term, rR_2 , is the **polarizability**, describing the interactions involving induced dipoles. The term $s\pi_2$ is the **polarity**, matching ion-dipole and dipole-dipole interactions. The terms $a\sum \alpha_2^{\text{H}}$ and $b\sum \beta_2^{\text{H}}$ relate to hydrogen bonding to acidic (a) and basic (b) sites, respectively. Finally, the last term, $l \log L^{16}$, is related to dispersion of van der Waals interactions. The superscript 16 indicates the carbon-16 alkyl chain against which the dispersion has been referenced.

The usefulness of the LSER approach hinges on the similarity of the partitioning coefficients obtained from the sensing experiments (KS) and the gas chromatographic experiments (KGC). In other words it is assumed that the relationship $K_{\rm S} \approx K_{\rm GC}$ holds. This is how LSER is used for evaluation of a new sensing material. First the coefficient KGC is obtained from the tabulated database, or experimentally. Second, using multiple linear regression technique the best fit is obtained for the sensor test data and the individual coefficients in Eq. (1-35) are evaluated. This approach has been used successfully in evaluation of multiple materials for gas sensors [10,11].

The coefficient *c* in Eq. (1-35) is a "fitting parameter" that does not have an assigned physical meaning, but may account for the difference between the static (K_S) and dynamic (K_{GC}) nature of the two experiments. It has been found that the GC partitioning coefficients are consistently lower by a factor ~ 4, than those obtained from the mass sensor measurements with QCM and SAW sensors [12]. This discrepancy may have its origin in the different nature of the two measurements. In the chromatographic experiment the gas molecules at the front of the advancing zone encounter "pristine" sorbent material. This is particularly important when a mixture of analytes is evaluated. Second, the GC measurement is dynamic and not done under the conditions of fully developed equilibrium. Nevertheless, in spite of this discrepancy the predictive properties of LSER in design of new sensing materials has been exceptionally successful. The main domain of its application has been in design of selective layers for various types of mass sensors.

One typo of interaction that is not covered in the LSER equation is formation of charge transfer complex which can also increase the solubility of the gas on the selective matrix. Partial transfer of charge in electron donor-acceptor interactions is a common notion in organic chemistry [13]. The bond that is formed is a dipole whose dipole moment depends on the fraction of transferred charge and on the separation distance. When this interaction takes place between two molecules the positive end of the dipole is located at the donor molecule and the negative at the acceptor molecule. The amount of transferred charge depends on the **electron affinities** of the participating molecules. The notion of electron affinity applies also to electronically conducting solid phases where it is related to the position of the **Fermi level** and the value of **work function**. If the material has high value of work function, i.e., it will act as electron acceptor and *vice versa*. Therefore, molecules of gas that has low electron affinity, i.e., low **ionization potential** will <u>partially</u> transfer electrons to the **conduction energy band** (of the material and become associated with the matrix. From the material's point of view this guest-host interaction represents a form of doping which changes the electronic properties of the material, namely its conductivity and work function. From the guest molecule viewpoint it increases its solubility in the matrix.

of this association is highly specific to the material. It is important to realize the crucial difference between this **charge transfer doping** and **ionization doping**. In charge transfer doping it is <u>electrically neutral molecule</u> that interacts with the solid matrix. Such interaction is typical for <u>gases</u> and can be exploited in gas sensors. On the other hand in ionization doping process electron is <u>completely exchanged</u> between the quest molecule and the matrix, leaving usually immobile donor cation (in n-doping) or immobile acceptor anion (in p-doping). In chemists' language the charge transfer doping process constitutes Lewis acid-base chemistry while the ionization doping is characteristic of the ionization or oxidation-reduction (redox) process. This distinction is critically important for chemical sensing. The ionization doping is the key mechanism of ion selective electrodes where the ion selectively partitions into the organic phase, called ion selective membrane. On the other hand charge transfer doping is key mechanism in work function sensors [14]. The transduction principle that applies to these two interactions are substantially different. The two mechanisms can be represented as

• charge transfer doping:

$$OS_{solid} + G_{sample} \longleftrightarrow \left[OS^{+\delta} * G^{-\delta} \right]_{solid}$$
(1-36a)

• ionization doping:

$$OS_{solid} + I_{liquid}^{\pm} \longleftrightarrow [OS \cdot I]_{solid}^{\pm}$$
(1-36b)

The asterisk in Eq. (1-36a) indicates that the guest <u>molecule</u> G is associated with the organic semiconductor (OS) in some intimate, dipolar geometrical arrangement dictated by the partially exchanged charge. Because the guest molecule is electrically neutral the sample from which this molecule can be partitioned can be <u>either gas or liquid</u>. On the other hand partitioning of ions functions between OS and a liquid sample. The organic materials that fall into this category of selective materials are all organic semiconductors, namely conducting polymers, redox polymers and van der Waals organic solids. Because there are many more electrically neutral gases general applicability of charge-transfer recognition far exceeds that of e.g. ion selective electrodes.

It was stated at the beginning of this section that the distinguishing feature of materials based on solubility-based selectivity is that they are homogeneous. This rule can be broken and enhancement of selectivity can be achieved by incorporating specific binding binding sites into these matrices. The choice of correct transduction mechanism then becomes important. Generally speaking, detection of <u>mass change</u> will work in all modes of solubility-based selective materials, as long as the **mechanical properties** of such layers are not affected [15].

1.2.5 Selectivity Based on Solubility. Inorganic Materials

Although the general principle of partitioning equilibrium remains the same, there are additional mechanism and underlying physical principles governing inorganic materials are different. An important, albeit somewhat unique example is the solubility of hydrogen in palladium metal in which the charge transfer mechanism again applies. Molecular hydrogen first dissociates into atomic hydrogen [16], which then diffuses into Pd bulk forming bulk palladium hydride PdHx (Fig.1-10). Thus, at the surface

$$H_{2,ads} \longrightarrow 2 H_{ads}$$
 (1-37)

followed by

$$Pd_{surf} + x H_{surf} \longrightarrow PdH_{bulk}$$
 (1-38)



Fig. 1.10: Selective sorption of hydrogen by palladium

In the absence of oxygen the reaction (1-37) is reversible. However, when oxygen is present a competing oxidation takes place at the Pd surface making the overall reaction **irreversible**.

$$4 \operatorname{H}_{\operatorname{surf}} + \operatorname{O}_2 \Longrightarrow 2 \operatorname{H}_2 \operatorname{O} \widehat{}$$
 (1-39)

Hydrogen is very important species and various hydrogen sensors based on reactions (1-37) through (1-39) have been commercialized. They will be discussed in more detail later.

An entirely different selectivity principle, **phase equilibrium**, comes into play in high temperature ionic conductors. The existence of many important gases dissolve in ionic solids at elevated temperatures. However, the solubility is rather sharply defined for the gas and the solid by the lattice parameters and the size of gas molecule. The best example is the solubility of oxygen in zirconium dioxide. When ZrO_2 is doped with yttrium ions it exhibits high mobility for O-anion. The solubility and anion mobility then become the cornerstone of several electrochemical gas sensors based on "yttria stabilized zirconia" (YSZ). There are several factors that make solid state ionic conductors attractive for chemical sensing purposes. One is the aforementioned selectivity stemming from the narrowly defined solubility. Second is the fact that these materials are intensively investigated as building blocks of fuel cells and the knowledge database useful also for sensors is rapidly expanding. Third is their operating temperature which is typically well above the critical point for water which eliminates this ubiquitous interference found in room temperature sensors. The reverse side of this coin is that the high temperature requirement somewhat limits their applications. Finally, the diffusion is faster at higher temperatures resulting in faster response time.

1.3 Origins of Selectivity - Selectivity Based on Kinetics

This form of selectivity applies to sensors that operate in steady state regime. The prime examples are **thermal** and **amperometric** sensors. It is somewhat limited for **potentiometric** sensors and it is least suitable for mass sensors.

Consider mixture of species, X_1 , X_2 ... X_n which are undergoing common chemical transformation to products P, but with <u>different</u> reaction rates

$$X_{1} \xrightarrow{k_{1}} P_{1}$$

$$X_{2} \xrightarrow{k_{2}} P_{2}$$

$$X_{n} \xrightarrow{k_{n}} P_{n}$$

$$(1-40)$$

Let us assume that a **catalyst** can <u>selectively</u> increase the rate of conversion of the analyte X_X

$$X_{X} \xrightarrow{k_{X}} P_{X}$$
(1-41)

Therefore,

 $k_X >> k_1, k_2..k_n$

Such situation may arise for example, in the combustion sensor in which the species of interest is methane and the other "combustibles" are different higher hydrocarbons. The catalyst in this case can be Pt and the preferentially catalyzed reaction is

$$2 \operatorname{CH}_{4} + 3 \operatorname{O}_{2} \xrightarrow{\Delta H} 2 \operatorname{CO}_{2} + \operatorname{H}_{2} \operatorname{O}$$
(1-42)

This is the reaction taking place at the surface of thermal sensor, **pellistor** discussed in Part 1.2. An example of a **biocatalyst** is enzyme **glucose oxidase** (G.O.D.) which highly selectively promotes oxidation of D-glucose to gluconic acid

$$C_6H_{12}O_6 \xrightarrow{G.O.D} C_6H_{12}O_7^- + H^+$$
(1-43)

This reaction will be used throughout this book because it is the most common biocatalyst in the biosensor literature and will be discussed in greater detail below.

1.3.1 Enzyme Kinetics

In terms of sensing applications enzymes vastly outnumber any other type of catalysts. They are natural products in biological systems where their primary function is to control the rates of important reactions, mainly, but not exclusively, in metabolism. There are a few lipophilic enzymes, but for most part they function in aqueous environment. Enzymes are the key component in the largest group of biosensors. In the following section we will outline the fundamentals of enzyme kinetics. The specific differences which arise from the different transduction mechanisms of different sensors will be discussed separately. Here we shall focus only on the key aspects of enzymatic reactions.

Enzymes are a special kind of catalysts, proteins of M_r 6,000 - 400,000 which are found in living matter. They have two remarkable properties: 1) they are extremely selective to the given substrate and 2) they are extraordinarily effective in increasing the rates of reactions. Thus, they <u>combine the</u> recognition and amplification steps. A general enzymatically catalyzed reaction can be described

by the Michaelis-Menten mechanism in which E is the enzyme, S is the substrate and P is the product, formed from the **intermediate** complex ES

$$S + E \xrightarrow{k_1} ES \xrightarrow{k_2} P$$
 (1-44)

The reaction velocity v can be expressed as the rate of increase of the concentration of the product P

$$v = \frac{\mathrm{d}C_{\mathrm{P}}}{\mathrm{d}t} = k_2 C_{\mathrm{ES}} \tag{1-45}$$

For high value of substrate concentration the reaction velocity reaches its maximum (saturation). Under those conditions all the available enzyme E_T is bound in the complex with the substrate. Thus

$$v_{\max} = k_2 C_{\rm ET} \tag{1-46}$$

This means that the maximum velocity is proportional to the concentration of the enzyme. The enzyme is present in this reaction in either free form or complexed with the substrate

$$C_{\rm ET} = C_{\rm E} + C_{\rm ES} \tag{1-47}$$

At steady state the concentration of the enzyme the concentration of the ES complex is constant

$$\frac{dC_{\rm ES}}{dt} = k_1 C_{\rm S} C_{\rm E} - (k_{-1} + k_2) C_{\rm ES} = 0$$
(1-48)

The Michaelis–Menten constant K_m is defined as

$$K_{\rm m} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = \frac{C_{\rm S}C_{\rm E}}{C_{\rm ES}}$$
(1-49)

Substitution for C_E in Eq. (1-49) from Eq. (1-47) yields

$$K_{\rm m} = \frac{C_{\rm S}(C_{\rm ET} - C_{\rm ES})}{C_{\rm ES}}$$
(1-50)

which when combined with Eq. (1-45) and (1-46) gives

$$K_{\rm m} = \frac{C_{\rm S}(v_{\rm max} - v)}{v}$$
(1-51)

After rearrangement we obtain the Michaelis-Menten equation

$$v = \frac{v_{\text{max}}C_{\text{S}}}{C_{\text{S}} + K_{\text{m}}} \tag{1-52}$$

It can be shown that K_m equals the concentration of the substrate at which the reaction velocity is one-half of its maximum. Michaelis–Menten constant is important figure of merit for the enzyme. It is the measure of its activity. Although it describes <u>kinetic process</u>, it has physical meaning of <u>dissociation constant</u>, i.e. reciprocal binding constant. It means that smaller the K_m , more strongly the substrate binds to the enzyme. The extraordinary specificity of enzymatic catalysis is due to the shape recognition. Enzymes are proteins having a stereospecific binding site. At this site the two reactants (in the above example D-glucose and oxygen) are brought together in a precise and favorable orientation, for the reaction to take place.

Like any other proteins, enzymes are subject to acid-base equilibria which affect their catalytic properties, i.e., their K_m . Each enzyme has its own characteristic pH dependence. Thus the general Michaelis–Menten equation which takes into account this pH dependence of K_m can be written as

$$v = \Re_{\rm pH} \frac{v_{\rm max} C_{\rm S}}{C_{\rm S} + K_{\rm m}} \tag{1-53}$$

Besides hydrogen ions other species can also affect the enzymatic catalytic activity. This phenomenon is called *inhibition* which may be specific, non-specific, reversible or irreversible. The inhibition reactions can be also used for sensing of inhibitors. The best know example is the sensor for detection of "nerve gases". These componds inhibit the hydrolysis of the acetylcholine ester which is catalyzed by the enzyme **acetylcholine esterase**. Acetylcholine ester is a key component in neurotransmission mechanism.

Enzymatic reactions combine substrate specificity with the high amplification factor. From that viewpoint they are ideal selective layers for chemical sensors. However, they are not specifically part of the information acquisition/processing scheme in Nature. Their exclusive role is to lower, highly selectively, the activation energy barrier of certain reactions, thus acting as a regulator.

A general diagram of an enzymatically coupled chemical sensor is shown in Fig. 1-11. The geometry shown here corresponds to a semi-infinite planar diffusion. Other, e.g., radial geometries typical for microsensors can be used. The enzyme containing layer is typically a hydrogel, whose optimum thickness depends on the enzymatic reaction, on the operating pH and on the activity of the enzyme (i.e., on the K_{m} .). Enzymes can be used with any transduction principle, i.e. as thermal, electrochemical or an optical sensor. Mass sensors are generally not suitable for several reasons. The most fundamental one is the fact that the net mass change in a catalyzed reactions is usually small. Moreover, the mass sensors do not perform well in a gel, due to the mechanical damping.

The basic operating principle of use of enzymes in sensors is simple: an enzyme is immobilized inside a permeable layer into which the substrate(s) diffuse and the product(s) can effuse. Any other species which participate in the reaction, such as buffers must also diffuse in and out of the layer (Fig. 1-11). Because of the combined mass transport and chemical reaction this scheme is often referred to as *diffusion-reaction mechanism*. Mathematically this case is described by the set of second-order partial differential equations, which are usually solved numerically.



Fig. 1.11: Scematic of enzyme sensor with "zero-flux boundary"

The general uni-directional (in x coordinate) diffusion-reaction equation for species is

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} = D_i \frac{\partial^2 C_i}{\partial x^2} \pm \Re_{\text{pH}}(C_i)$$
(1-54)

in which the first term represents the mass transport and the second is the "reaction term". This equation has to be written for every participating species with the appropriate sign in front of the reaction term.

When the pH-dependent Michaelis–Menten equation Eq. (1-53) is substituted for the reaction term \Re (*C_i*) we obtain for the substrate S at any point inside the enzymatic gel layer

$$\frac{\partial C_{\rm S}}{\partial t} = D_{\rm S} \frac{\partial^2 C_{\rm S}}{\partial x^2} - \frac{\Re_{\rm pH} v_{\rm max} C_{\rm S}}{(C_{\rm S} + K_{\rm m})}$$
(1-55)

The first term on the right-hand side of Eq. 1-55 is the **diffusion term** and the second one is called **kinetic (reaction) term**.

It is necessary to normalize the variables as follows:

$$t = \frac{t^* L^2}{D}$$
 $C_{\rm S} = C_{\rm S}^* K_{\rm m}$ $x = x^* L$ (1-56)

where the symbols with the asterisk are dimensionless variables. Substitution to Eq. (1-55) yield dimensionless diffusion-reaction mechanism equation

$$\left(\frac{\partial C_{\rm S}}{\partial t}\right)^* = D_{\rm S} \left(\frac{\partial C_{\rm S}}{\partial x^2}\right)^* - \phi^2 \left(\frac{C_{\rm S}}{1+C_{\rm S}}\right)^* \tag{1-57}$$

The parameter ϕ is called **Thiele modulus**:

$$\phi = \frac{Lv_{\text{max}}^{1/2}}{\left(K_{\text{m}}D_{\text{S}}\Re_{\text{pH}}\right)^{1/2}}$$
(1-58)

It contains all important design parameters, as well as the pH dependency of the enzyme activity. It defines two operating regimes: For $\phi > 10$ the mechanism is **diffusion controlled** while for the

Thiele modulus $\phi < 5$ it is **reaction controlled**. In other words it defines which of the terms on the right hand side of Eq. 1-57 controls the rate of the conversion of the substrate. Because they are operating <u>in parallel</u> it is always the <u>smaller</u> of the two. For chemical sensing the diffusion control is always preferable. In order to have the high value of Thiele modulus we want to increase the thickness of the layer, L, decrease the effective diffusion constant of the substrate D_S and increase the enzyme loading (i.e., v_{max}). The value of K_m is a given for the enzyme. However, if we have a choice, the enzyme <u>preparation</u> with lower K_m is preferable.

Because there are several species diffusing in and out of the gel the normalization transformation must be done for all of them, leading to the system of second order partial differential equations. Each species has its own Thiele modulus and again it is the <u>smallest one</u> that determines the overall outcome. The complicating factor are the reactions involving the buffer which are <u>algebraic</u>. In mathematical terms it means that the resulting partial differential equations are "stiff", requiring numerical solution. As always with the differential equations, the final solution depends on the initial and on the boundary conditions. The crucial ones define the conditions at the transducer/gel interface. If <u>none</u> of the reacting species can cross this interface this boundary is called **zero flux boundary**. It is found in thermal, potentiometric and optical sensors. However, in <u>amperometric sensors</u> at least one of the species is consumed at this interface (typically oxygen) and a *gradient* of that species is established at that interface which is then called **non-zero flux boundary**. This difference in operating mechanism has profound influence on the performance of such sensor.

The boundary and initial conditions are always defined by the assumption that have been made in formulation of the model. These, in turn, depend on the approximations and compromises. Let us now review briefly the approximations which have been made, more or less historically, by various workers for the enzyme sensors, and rank them in the approximate order of severity.

- (1) there is a linear diffusion gradient inside the enzyme layer
- (2) there is no pH dependence of $K_{\rm m}$
- (3) there is no effect of <u>mobile</u> buffer capacity
- (4) there is no effect of <u>fixed</u> (i.e. the gel itself) buffer capacity
- (5) there is no partitioning of reactants and products between the gel and the sample
- (6) there is no Donnan potential at the gel/sample boundary
- (7) there is no depletion layer at the gel/sample boundary

Approximations (1) and (2) have been made in the earliest models of development of enzymatic sensors in order to simplify the mathematics. They are both bad; the concentration profiles are non-linear [17] and pH dependence of enzyme kinetics is an established fact. Approximations (3) and (4) would be the most serious for enzymatic sensors in which the sensor output is related to the change of pH, because for such sensors the <u>buffer capacity</u> would have to be low and constant. However, for sensors which use some other reactants/products but hydrogen ion a large excess of buffer would mitigate the effects of these assumptions. To some extent they can be also mitigated by the experimental design, as we will see later. The partitioning of electrically neutral species (assumption 5) and electrically charged species (assumption 6), between the gel and the sample affects the <u>algebraic</u> part of the model. To some extent it can be mitigated by the choice of the gel matrix. It is a serious problem for both electrically neutral species (e.g. oxygen) and charged (ions) species. Assumption 7 pertains exclusively to the enzymatic sensors with "non-zero flux boundary" at the gel/transducer interface (i.e. amperometric sensors). It can be eliminated by decreasing the size of the sensor. In summary, assumptions (1) and (2) are unnecessary and have been avoided in more advanced models. Assumptions (3) and (4) are unavoidable and illustrate the fundamental weakness of most enzymatic sensors, particularly those depending on detection of pH changes. Assumptions (5) and (6) can be avoided to some extent by experimental design, but should be always accounted for in the model. Assumption (6) is easily avoidable. There is another assumption that has not been mentioned, but that cannot be assumed to be always justified and that is the equality of concentration and activity.

Because the Thiele modulus is the controlling parameter in the diffusion-reaction equation it is obvious from Eq. (1-57) that the optimum thickness L will depend on the other constants and functions included in the Thiele modulus. For this reason the optimum thickness will vary from one enzyme and one kinetic scheme to another.

Another important observation is related to the detection limit, dynamic range and sensitivity. For the expected values of the diffusion coefficient (in the gel) of approximately 10^{-6} cm² s⁻¹ and substrate molecular mass about 300 the detection limit is approximately 10^{-4} mol 1^{-1} . This is due to the fact that the product of the enzymatic reaction is being removed from the membrane by diffusion with approximately the same rate as it is being supplied. The dynamic range of the sensor depends on the value of the $K_{\rm m}$ and on $v_{\rm max}$ (which depends on the enzyme loading). Generally speaking, higher loading should extend the dynamic range at the top concentration range. In is sometimes stated incorrectly that "the enzyme sensor has close to theoretical dependence" or a "nernstian response" which means that a one-decade change of the bulk concentration of the substrate is expected to yields a one-decade change at the surface (x = 0) concentration. In the case of potentiometric enzyme sensors it would yield the slope of approximately 60 mV/decade at 25 °C. It is not intuitively obvious, but clearly evident from the comparison of the experimental and calculated response curves that there is no general theoretical slope, each enzymatic sensor having its own "theoretical curve", depending on the mechanism and on the conditions under which it operates. We must remember, that the decade/decade slope would occur only if a constant fraction of the product would reach the x = 0 interface. The upper limit of the dynamic range depends on the value of the Thiele modulus. It can be increased by the enzyme loading but, obviously, only up to a point. Normally the dynamic range is approximately between 10^{-4} and 10^{-1} mol 1^{-1} .

We now return to the pH dependent reaction term \Re_{pH} in Eq. (1-59). Enzymes are proteins that are subject to multiple protonation equilibria. In that respect they are polyelectrolytes. Scheme shown in Fig. 1-12 depicts the <u>simplest</u> situation with only one product forming pathway in which the product P is formed from the protonated enzyme/substrate complex H⁺ES. Fractions of protonated and deprotonated enzyme are given by the dissociation equilibria with appropriate dissociation constants. The substrate S shown in this scheme does not have acido-basic properties in the give pH range. Solving the equations outlined in Scheme 1 yields for this reaction term relationship

$$\Re_{\rm pH} = \left(1 + \frac{C_{\rm H}}{K_{\rm ES_1}} + \frac{K_{\rm ES_2}}{C_{\rm H}}\right) \tag{1-65}$$

This is the term which has to be inserted into Eq. (1-59) and normalized equations for all the other species involved in the reaction.

Scheme I



Fig. 1.12: Scheme of pH dependent enzymatic reaction

Zero Flux Boundary Glucose Sensors

Probably without exception all "enzyme sensor developers" have used D-glucose/glucose oxidase as the first step in their studies. Glucose is an easily accessible, non-toxic substrate, D-glucose oxidase (G.O.D.) is inexpensive and available enzyme. The reaction itself is amenable to thermal, electrochemical and optical sensing. The blood glucose sensing is important diagnostic problem (related to diabetes) that makes a good selling point in the perennial hunt for funding. Finally, some glucose oxidase-based sensors have been commercially exceptionally successful for <u>specific diagnostic applications</u>. Not surprisingly, there are thousands of "glucose sensor" papers in the literature.

Glucose oxidase belongs to a large and important family of enzymes that catalyze selective oxidation of various substrates. In nature the obvious electron acceptor (oxidant) is oxygen which then becomes the <u>second substrate</u> in the kinetic scheme. In this form the glucose oxidase has been used in many types of glucose sensors. Hydrogen peroxide is an intermediate in any reaction in which the oxygen is the ultimate electron acceptor. Because H_2O_2 is cytotoxic another enzyme, **catalase**, always accompanies the natural oxidases. Its role is to remove the H_2O_2 as fast as it is formed. Nevertheless, certain amount of hydrogen peroxide always escapes and causes damage to the parent oxidase, thus limiting its lifetime. This two-enzyme scheme is an example of **enzymatic cascade** arrangement in which the product of one enzymatic reaction (intermediate) becomes the substrate for the next reaction. Quite often it is possible to base the sensing scheme on the interception of such intermediate.

In spite of its importance and popularity, the fine details of the β -D-glucose oxidase mechanism are not completely known. The proposed model (Fig. 1-13) includes both the catalase cascade and the protonation equilibria [18]. The pH dependent reaction term corresponding to this model is quite complex:

$$\Re_{\rm pH} = \left[\frac{1 + \frac{C_{\rm H}}{K_5} + \frac{K_5^{\odot}}{C_{\rm H}}}{k_{\rm cat}C_{E_{\rm total}}} + \frac{\frac{C_{\rm H}}{K_3} + 1}{k_3C_{\rm S}C_{E_{\rm total}}} + \frac{\frac{K_4}{C_{\rm H}} + 1}{k_4C_{\rm O_2}C_{E_{\rm total}}} \right]^{-1}$$
(1-66)

The verification of the model is agin performed by fitting the experimental calibration (Fig. 1-14) and time response (Fig. 1-15) curves. It is possible to plot the profiles of the most important species in the gel layer (Fig. 1-16) and from this fit to estimate the optimum thickness of the gel layer. For glucose sensor the optimum thickness appears to be 150 μ m under the given loading conditions. The most important result of this procedure is to estimate the effect of buffer capacity and of oxygen concentration on the pH at the hydrogel/transducer boundary. This result clearly indicates that both the buffer capacity and oxygen are serious interferences and practically negate the high selectivity of the enzyme itself. This is the most serious reason why zero flux boundary sensors (i.e. potentiometric or optical) have failed in all but most rigorous laboratory conditions.



Fig. 1.13: Enzymatic oxidation of glucose



Fig. 1.14: Theoretical and experimental concentration response of potentiometric glucose sensor. The "curve-fitting" verifies the model



Fig. 1.15: Theoretical and experimental time-response for glucose sensor

1.3.2 Selectivity Based on Mass Transport

This form of selectivity is based on the concept of selectively blocking the access of all (interfering) species, except the analyte to the active region of the transducer. It is a form of "filtration" which is depicted in Fig. 1-17. The "blockage" can be achieved by size or charge discrimination. Thus, if a dialysis membrane is placed in front of the transducer proteins and other species above certain size cut-off can be rejected. This may work well if this process involves <u>only electrically neutral</u> species. However, when ions are discriminated on the basis of size the partitioning process is affected by the Donnan potential (Chapter 4) which develops at the membrane/electrolyte interface.

Another possibility is to discriminate on the basis of charge. Again a porous barrier membrane containing fixed electrically charged moieties is placed in front of the transducer. It then "rejects" the like charged species by electrostatic repulsion. In other words, it is a form of "ion exchange" membrane.



Fig. 1.16: Concentration profiles for pH, glucose and oxygen



Fig. 1.17: Schematic of charge-selective mass transport. Anions are rejected by the immobilized negative groups in the barrier

LITERATURE:

- [1] N. Barsan, J. Stetter, W. Gopel, Anal. Chem. 71 (1999), 2512.
- [2] D. R. Absolom and C. J. van Oss, CRC Crit. Rev. Immunol. 6 (1986).
- [3] K. E. van Holde, Physical Biochemistry, Prentice Hall, 1971, New York.
- [4] S. Tombelli, M. Minnumi and M. Mascini, Biosens. Bioelectron. 20 (2005) 2424-2434.
- [5] C. Tuerk and L. Gold, Science, 249 (1990) 505-510.
- [6] M. E. Diaz-Garcia and R. Badia, "Molecularly Imprinted Polymers for Optical Sensing Devices", in Optical Sensors, O. S. Wolfbeis, Ed., Springer Verlag, 2004.
- [7] K. Haupt, "Molecularly Imprinted Polymers as Recognition Elements in Sensors", in Ultrathin Electrochemical Chemo-and Biosensors", Springer Verlag, 2004.
- [8] Huaiqiu Shi, Wei-Bor Tsai, M. D. Garrison, S. Ferrari and B. D. Ratner, Nature 398 (1999) 593-597.
- [9] M. H. Abraham, Chem. Soc. Rev. 22 (1993) 73.
- [10] M. H. Abraham, J. Andonian-Haftvan, Chau My Du, V. Diart, G. S. Whiting, J. W. Grate and R. A. McGill, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2(1995)369.
- [11] J. W. Grate, S. J. Patrash, M. H. Abraham and Chau My Du, Anal. Chem. 68 (1996) 913.
- [12] A. Hierlemann, E. T. Zellers and A. J. Ricco, Anal. Chem. 73 (2001) 3458.
- [13] C. Reichardt, Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry, 2nd Ed., 1988, VCH, Weinheim.
- [14] J. Janata and M. Josowicz, Accounts of Chemical Research, 31 (1998) 241-248.
- [15] A. Hierlemann, E. T. Zellers and A. J. Ricco, Anal. Chem. 73 (2001) 3458.
- [16] L-S. Gunnar Ekedahl, M. Eriksson and I. Lundstrom, Acc. Chem. Res. 31 (1998) 249.
- [17] S. D. Caras, J. Janata, D. Saupe and K. Schmidt, Anal. Chem. 57 (1985) 1917; Edowes, M. J. Sens. Actuators, 7 (1985) 97.
- [18] S. D. Caras, J. Janata, D. Saupe and K. Schmidt, Anal. Chem. 57 (1985) 1917 pH-Based Enzyme Field Effect Transistors. Part I Theory.
2. SENZORY NA BÁZI POLARIZOVATELNÉHO ROZHRANÍ ELEKTROLYTŮ

prof. Ing. Vladimír Mareček, DrSc.,

Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR, v.v.i., Dolejškova 3, 182 23 Praha 8 marecek@jh-inst.cas.cz

S dvoufázovými kapalnými systémy, ve kterých probíhá transport a separace nabitých částic se setkáváme v chemické praxi zejména u separačních postupů, analytické chemii a chemické syntéze. Polarizovatelné rozhraní nemísitelných roztoků elektrolytů [1] lze s výhodou využít jak pro studium procesů probíhajících na rozhraní analytických senzorů využívajících kapalné membrány [2] tak pro návrh a vývoj nových typů analytických čidel.

2.1 Typy systémů

Lze rozlišit tři základní typy systémů s rozhraním dvou nemísitelných roztoků elektrolytů [3]. Nejjednodušší systém je složen ze dvou nemísitelných rozpouštědel, *w* a *o*, a jednoho binárního elektrolytu AX, který může v obou rozpouštědlech disociovat na kation A^+ a anion X^- . Výsledkem rozdělovací rovnováhy

$$AX(w)|AX(o) \tag{2.1}$$

je ustavení rovnovážného potenciálového rozdílu, $\Delta_o^w \varphi$, mezi fázemi *w* a *o*, tzv. distribučního potenciálu. Pro distribuční potenciál platí

$$\Delta_{o}^{w}\varphi = \varphi^{w} - \varphi^{o} = \frac{\Delta_{o}^{w}\varphi_{+}^{o} + \Delta_{o}^{w}\varphi_{-}^{o}}{2} + \frac{RT}{2F}\ln\frac{\gamma_{+}^{w} + \gamma_{-}^{o}}{\gamma_{+}^{o} + \gamma_{-}^{w}}$$
(2.2)

kde $\Delta_o^w \varphi_i^o$ je standardní potenciálový rozdíl a γ_i je aktivitní koeficient iontu *i*. Distribuční potenciál nezávisí přímo ani na koncentraci elektrolytu AX, ani na stupni jeho disociace ve fázích *w* a *o* a je určen především hodnotami standardních chemických potenciálů (standardní Gibbsovou energií přenosu) $\Delta G^{ow \to o} = \mu_i^{o,w} - \mu_i^{o,o}$ těchto iontů ve fázích *w* a *o*,

$$\Delta_o^w \varphi_i^o = \frac{\mu_i^{o,w} - \mu_i^{o,o}}{z_i F} = \frac{\Delta G^{\circ w \to o}}{z_i F}$$
(2.3)

Protože hodnotu distribučního potenciálu nelze změnit dodáním náboje z vnějšku, je rozhraní v systému (2.1) nepolarizovatelné. Tento typ rozhraní se uplatňuje v řadě systémů praktického významu, ve kterých se rovnovážným rozdělením vhodné soli mezi fázemi dosahuje potenciálového rozdílu zvolené polarity a velikosti až několika desetin voltu. Potenciálový rozdíl je pak hnací silou využitelných reakcí přenosu hmoty, jichž se účastní nabité částice.

Druhý typ systému zahrnuje rozhraní s jedním společným kationtem nebo aniontem, tj. schematicky

$$AX(w)|AY(o) \tag{2.4a}$$

Rovnovážný potenciálový rozdíl mezi fázemi *w* a *o* je v těchto systémech výsledkem rozdělovacích rovnováh tří iontů. Za předpokladu, že standardní potenciálové rozdíly splňují nerovnosti

(2.4b)

 $\Delta^w_o \varphi^{\rm O}_{\rm X} \, << \, \Delta^w_o \varphi^{\rm O}_{\rm A} \, << \, \Delta^w_o \varphi^{\rm O}_{\rm Y} \quad {\rm resp.} \quad \Delta^w_o \varphi^{\rm O}_{\rm B} \, << \, \Delta^w_o \varphi^{\rm O}_{\rm X} \, << \, \Delta^w_o \varphi^{\rm O}_{\rm Y}$

je rovnovážný potenciálový rozdíl $\Delta_o^w \varphi$ určen Nernstovou rovnicí

$$\Delta_o^w \varphi = \Delta_o^w \varphi_i^o \frac{RT}{z_i F} \ln \frac{a_i^o}{a_i^w}$$
(2.5)

kde $a_i^{w(o)}$ jsou aktivity kationtu A⁺ resp. aniontu X⁻ ve fázích *w* nebo *o*. Tehdy může být rozhraní základem funkce iontově-selektivní elektrody reverzibilní ke kationu A⁺ nebo anionu X⁻. Má i významné použití jako součást referenční elektrody pro organickou fázi ve čtyřelektrodovém nebo tříelektrodovém systému pro polarizaci rozhraní dvou nemísitelných elektrolytů.

Ve třetím typu systému obsahuje každá z fází jiný elektrolyt

$$AX(w)|BY(o) \tag{2.6}$$

Jestliže jsou hodnoty standardní Gibbsovy energie přenosu z fáze w do fáze o pro ionty A⁺ a X⁻ velké a kladné, tj. $\Delta G^{\circ w \to o}_{tr,A}, \Delta G^{\circ w \to o} \to \infty$, a pro ionty B⁺ a Y⁻ velké a záporné, tj. $\Delta G^{\circ w \to o}_{tr,B}, \Delta G^{\circ w \to o}_{tr,Y} \to -\infty$, chová se rozhraní mezi fázemi w a o jako ideálně polarizovatelná elektroda a z elektrického hlediska jako kondenzátor. Takový systém je pro elektrochemické studium nejvýznamnější, neboť umožňuje sledovat průběh vybrané reakce přenosu náboje jako funkci nezávislé elektrické proměnné (proudu nebo potenciálu) při současném potlačení nežádoucích ohmických složek potenciálového rozdílu nebo transportu nabitých částic. Například v systému

$$AX(w), MX(w)|BY(o)$$
(2.7)

lze sledovat reakci přenosu iontu M^+ z fáze *w* do fáze *o*, aniž by docházelo k interferenci s přenosy iontů A^+ , B^+ , X^- a Y^- za podmínek, že standardní potenciálové rozdíly splňují nerovnosti

$$\max\left(\Delta_{o}^{w}\varphi_{\mathrm{B}}^{\mathrm{o}},\Delta_{o}^{w}\varphi_{\mathrm{X}}^{\mathrm{o}}\right) \ll \Delta_{o}^{w}\varphi_{\mathrm{M}}^{\mathrm{o}} \ll \min\left(\Delta_{o}^{w}\varphi_{\mathrm{A}}^{\mathrm{o}},\Delta_{o}^{w}\varphi_{\mathrm{Y}}^{\mathrm{o}}\right)$$

2.2 Typy reakcí

Jednoduchá reakce přenosu iontu M^z z fáze w do fáze o

$$M^{z}(w) \leftrightarrows M^{z}(o) \tag{2.8}$$

je základním typem reakce přenosu náboje na rozhraní dvou nemísitelných roztoků elektrolytů.

Druhým základním typem je jednoduchá reakce přenosu elektronu mezi redoxním systémem O1/R1 ve fázi *w* a redoxním systémem O2/R2 ve fázi *o*

$$O1(w) + R2(o) \leftrightarrows R1(w) + O2(o) \tag{2.9}$$

Spřažením těchto jednoduchých reakcí s chemickými reakcemi ve fázích *w* a *o* vznikají složitější mechanismy typu CE, EC, ECE atd.

Z elektroanalytického hlediska je významný přenos iontu M^z , usnadněný tvorbou asociátu nebo komplexu s protiiontem nebo ligandem L^x na rozhraní

$$r\mathbf{M}^{z}(w) + s\mathbf{L}^{x}(o) \leftrightarrows \mathbf{M}_{r}\mathbf{L}_{s}^{(rz-sx)}(o)$$

$$(2.10)$$

kde *r* a *s* jsou stechiometrické koeficienty. Významné jsou i reakce, kdy nedojde k přenosu náboje z jedné fáze do druhé, ale produkt reakce je adsorbován na rozhraní. To nastává zvláště v případě, když alespoň jedna z výchozích látek je povrchově aktivní. V prvním kroku dochází k adsorpci povrchově aktivní látky na rozhraní, v dalším pak k tvorbě asociálu nebo komplexu

$$sL^{x}(o) \leftrightarrows sL^{x}(ads) + rM^{z}(w) \leftrightarrows M_{r}L_{s}^{(rz-sx)}(ads)$$
(2.11)

2.3 Vlastnosti rozhraní

Rozhraní dvou nemísitelných roztoků elektrolytů tvoří pravděpodobně jedna až dvě vrstvy orientovaných molekul obou rozpouštědel (tzv. vnitřní vrstva), která odděluje dvě oblasti prostorového náboje (tzv. difuzní dvojvrstva) s přebytkem pozitivního prostorového náboje na jedné straně rozhraní a negativního prostorového náboje na straně druhé. Měření kapacity rozhraní ukázala, že podstatná část potenciálového rozdílu $\Delta_a^w \varphi$ je soustředěna v difuzní části dvojvrstvy.

Transportní, termodynamické, případně kinetické parametry byly určeny u velké řady reakcí jednoduchého přenosu jednomocných i dvojmocných iontů, usnadněného přenosu iontu a dalších spřažených reakcí převážně přes rozhraní voda/nitrobenzen a voda/1,2-dichlorethan.

2.4 Vývoj metodiky

Metodiky používané pro studium procesů na polarizovatelném kapalném rozhraní vycházejí z principů klasických potenciostatických a galvanostatických metod, používaných pro studium dějů na pevných elektrodách. Z potenciostatických metod je to hlavně metoda cyklické voltametrie, ac-voltametrie a faradické impedance při rovnovážném potenciálu. Z galvanostatických metod je to metoda chronoamperometrie a metoda krátkého proudového skoku.

Pro přesná měření parametrů faradických i nefaradaických procesů je nejvhodnější rovinné rozhraní, na kterém lze dosáhnout homogenní polarizace a tím kontrolovat požadovaným způsobem potenciálový rozdíl na celém rozhraní. V důsledku ohmického spádu v elektrolytu byly první polarizační křivky na stacionárním rozhraní dvou elektrolytů značně deformovány. Při použití galvanostatické techniky zůstává sice ohmický potenciálový rozdíl konstantní, je však třeba ho při analýze chronopotenciogramů vyhodnotit a odečíst. Pionýrská práce na elektrolytové kapkové elektrodě [4] stimulovala další metodický rozvoj. Byla zavedena technika voltametrie se čtyřelektrodovým potenciostatem a automatickou kompenzací ohmického potenciálového rozdílu. Tato technika je v současnosti nejrozšířenější. Na obr. 2.1 je schematicky znázorněna čtyřelektrodová skleněná nádobka [5] se dvěma referentními elektrodami (RE1,2) a dvěma pomocnými elektrodami (CE1,2). Typický reverzibilní voltamogram přenosu tetramethylamoniového kationtu z vody do organické fáze je ukázán na obr. 2.2.



Obr. 2.1: Elektrolytická nádobka s rovinným rozhraním

RE, CE – referentní a pomocná elektroda pro vodnou (1) a organickou (2) fázi, B – skleněná přepážka, C – elektrolytové rozhraní

Obr. 2.2: Cyklický voltamogram

1 – základní elektrolyty 0,01M-LiCl ve vodě a 0,01M-tetrabutylamonium tetrafenylborát (TBATPB) v nitrobenzenu; 2 – přídavek 0,8mM-tetrametylamonium bromidu do vodné fáze

2.5 Analytické aplikace

2.5.1 Detektor pro průtokový systém

Využití jednoduché reakce přenosu náboje (2.8) přes rozhraní dvou nemísitelných roztoků elektrolytů pro detekci iontů byla testována v průtokovém systému na stanovení iontu acetylcholinu (ACH⁺). Stanovení jednotlivých iontů v jejich směsích jednoduchou přenosovou reakcí je vázáno podmínkou uvedenou u systému (2.7). Pokud je standardní potenciálový rozdíl jednotlivých iontů přítomných v roztoku podobný, je jejich rozlišení nemožné. Na druhé straně lze této malé selektivity využít v konstrukci analytického detektoru v systému, kdy k separaci iontů dojde jiným způsobem, např. v chromatografické koloně. V průtokovém detektoru [6] byly vodná a nitrobenzenová fáze stabilizovány přídavkem gelotvorné látky, agarem nebo PVC.

Stanovení bylo provedeno v elektrochemickém článku

kde čísla ve schématu odpovídají číslům v popisu detektoru na obr. 2.3. Konstantní průtok mobilní fáze 0,01M-LiCl detektorem byl udržován peristaltickou pumpou Buchler (USA). DP-voltamogram naměřený za konstantního průtoku vodné fáze (0,3 cm³ s⁻¹) je ukázán na obr. 2.4. Křivka 1 je proud základních elektrolytů, křivka 2 odpovídá koncentraci $5 \cdot 10^{-5}$ M-ACH⁺. Pro detekci iontu ACH⁺ v průtokovém systému byly pulsy DPV generovány při konstantním potenciálu *E* = 0,36 V. Odezva systému pro různé koncentrace ACH⁺ v nástřiku o objemu 100 µl při průtoku 1,6 cm³ s⁻¹ je ukázána na obr. 2.5. Závislost proudu píku na koncentraci ACH⁺ je lineární, viz. obr. 2.6.



Obr. 2.3: Schéma průtokového detektoru

1, 2 – vstup a výstup mobilní fáze; 3, 5 – vstup a výstup agarové fáze; 4 – gel PVC v nitrobenzenu; 6, 7 – elektrody Ag/AgCl; 8 – pomocná elektroda Cu; 9 – distanční podložka PE, tlouštka 0,07 mm; 10, 11 – Teflex; pracovní objem detektoru je ca. 0,3 μl

Obr. 2.4: DP-voltamogram v průtokovém systému

Mobilní fáze: 0,01M-LiCl bez chloridu acetylcholinu (1) a s přídavkem $5 \cdot 10^{-5}$ M-chloridu acetylcholinu (2). Velikost pulsů 25 mV, délka pulsu 0,5 s, polarizační rychlost 5 mV s⁻¹, průtok 0,3 cm³ min⁻¹



Obr. 2.5: Proudový signál detektoru pro různé koncentrace ACH⁺ v nástřiku o objemu 100 μl
Obr. 2.6: Závislost proudu píku na koncentraci ACH⁺

2.5.2 Určení konstanty stability komplexu a jeho stechiometrie z voltmetrických měření usnadněného přenosu iontu

Přítomnost ligandu tvořícího komplex s přenášeným iontem se projeví posunem voltamogramu usnadněného přenosu k menším hodnotám potenciálových rozdílů (tj. na obr. 2.2 doleva) proti voltamogramu bez přítomnosti ligandu. Z analytického hlediska jsou zajímavé dva limitní případy usnadněného přenosu iontu, (2.10). V prvém, je-li koncentrace iontu ve vodné fázi podstatně větší než koncentrace ligandu v organické fázi, $c^{0,w}{}_{M} >> c^{0,o}{}_{L}$, je reakce řízena difuzí ligandu k rozhraní, tj. měřený proud je úměrný jeho koncentraci. V druhém případě, pro $c^{0,w}{}_{M} << c^{0,o}{}_{L}$, je situace opačná.

Tvar voltametrických křivek pro případ $c^{0,w}_{M} \gg c^{0,o}_{L}$, s různým stechiometrickým poměrem kation : ligand byly spočítány [7] pro reversibilní průběh reakce (2.10). Závislost bezrozměrné proudové funkce $\chi(\tau)$ na potenciálu pro jednotlivé stechiometrie komplexu M_rL_s (r:s 1:1, 1:2 a 1:3) je ukázána na obr. 2.7. Závislost změny půlvlnového potenciálu $\Delta E_{1/2}$ na změně koncentrace ligandu $\Delta c^{0,o}_{L}$ je na obr. 2.8. Z výsledků je patrné, že tvar voltmetrické křivky pro komplex o stechiometrii 1:1 je totožný s tvarem pro reakci jednoduchého přenosu iontu (obr. 2.2). Usnadněný přenos se projeví pouze v potenciálovém posunu voltmetrické křivky směrem k menším hodnotám potenciálových rozdílů, z kterého lze vypočítat konstantu stability komplexu v organické fázi K_{ML}

$$E^{0}_{ML} = E^{0}_{M} - (RT/rzF) \ln K_{ML} (c_{M})^{r}$$
(2.13)

kde E°_{ML} a E°_{M} jsou formální potenciály reakce (2.10) a (2.8). Rozdíl potenciálů proudových píků ΔE_{p} (obr. 2.7) je závislý na složení komplexu a lze ho tedy použít pro určení jeho stechiometrie.



Obr. 2.7: Závislost bezrozměrné funkce $\chi(\tau)$ na potenciálu $z(E - E_{1/2})$ pro reakci usnadněného přenosu náboje a různou stechiometrii komplexu

Poměr kation:ligand: 1:1 (1), 1:2 (2) a 1:3 (3)

Obr. 2.8: Závislost změny půlvlnového potenciálu $\Delta E_{1/2}$ na změně koncentrace ligandu $\Delta c^{0,o}_{L}$ pro reakci usnadněného přenosu náboje a různou stechiometrii komplexu Poměr kation:ligand: 1:1 (1), 1:2 (2) a 1:3 (3)

2.5.2 Stanovení monensinu na agarové elektrodě

Příkladem využití usnadněného přenosu náboje přes rozhraní dvou nemísitelných roztoků elektrolytů pro stanovení koncentrace ligandu je vypracovaná metoda na stanovení kokcidiostatika monensinu ve fermentačních půdách [8]. Monensin (obr. 9) je acyklická monokarboxylová kyselina, tvořící komplexy s kovovými ionty umístěnými uvnitř kruhu, který je uzavřen vodíkovým můstkem. Stanovení monensinu je založeno na reakci usnadněného přenosu sodíkového iontu přes kapalné rozhraní. Je-li koncentrace přenášeného iontu podstatně větší než koncentrace monensinu v organické fázi, odpovídá měřený proud difuzi monensinu k rozhraní a lze ho tedy použít k určení jeho koncentrace. Protože monensin je přítomen ve fermentační půdě ve formě sodné soli NaMon, která další komplex s iontem Na⁺ netvoří, musí se nejprve převést na kyselou formu HMon. Rovnováha této reakce spojená s následujícím usnadněným přenosem iontů přes rozhraní voda/nitrobenzen byla studována v práci [9].



Obr. 2.9: Struktura monensinu A $R_1 = CH_2(Me)CO_2H, R_2 = Et; B: R_1 = CH_2(Me)CO_2H, R_2 = Me; C: R_1 = (CH_2)_3CO_2H, R_2 = Me$

Celý proces lze popsat schématem



Stanovení monensinu bylo provedeno v elektrochemickém článku

AgAgCl
$$0,01M$$
-NaCl $0,01M$ -TBATPB $0,01M$ -TBAClAgClAg(2.16) $0,1M$ -C₆H₆O₇Na2
 3% Agar
(w) $0,01M$ -TBATPB $0,01M$ -TBACl
 3% AgarAgClAg(2.16)

kde roztok citronanu sodného ve vodné fázi *w* udržuje pH na hodnotě 4,9. Půlvlnový potenciál usnadněného přenosu sodíkových iontů je dán vztahem

$$E_{1/2}^{\text{rev}} = \Delta_o^w \varphi_{\text{Na}}^{\varnothing} - \Delta_o^{w'} \varphi_{\text{TBA}}^{\varnothing} - \frac{RT}{F} \ln K_{\text{Mon}} c_{\text{Na}}^w$$
(2.17)

kde K_{Mon} je konstanta stability komplexu Na[HMon]⁺ v nitrobenzenové fázi. Vzhledem k tomu, že konstanta stability K_{Mon} je pro monensin A i B prakticky stejná, log K_{Mon} = 5,9 a 6,05, nelze touto metodou stanovit jejich podíl ve směsi, ale pouze jejich celkovou koncentraci.

Elektrolytická nádobka pro stanovení monensinu využívá vodné elektrody mechanicky zpevněné agarovým gelem. Její nákres je na obr. 2.10. Agarové elektrody lze z nádobky vyjmout, opláchnout a použít pro další měření. Příklad voltamogramu usnadněného přenosu sodíkového

iontu monensinem A+B při polarizační rychlosti 0,05 V s⁻¹ je ukázán na obr. 2.11. Kladný proud přísluší přenosu Na⁺ z vodné fáze do nitrobenzenové, kde tvoří komplex s HMon podle schématu (2.15), který se pak při zpětném pochodu rozpadá a uvolněný sodíkový kation přechází zpět do vodné fáze. Větší hodnota rozdílu potenciálů prodových maxim, $\Delta E_p = 0,08$ V, je způsobena částečně polarizací elektrody Ag/AgCl při průchodu proudu a nedekompenzovaným ohmickým odporem elektrolytu. Koncentraci monensinu lze určit metodou standardního přídavku nebo přímo z kalibrační křivky. Výška proudového maxima je přímo úměrná koncentraci monensinu *c*_{Mon} = 1,38*I*_p (mmol dm⁻³, µA), pro koncentrace monensinu *c*_{Mon} = 0,1 až 1,2 mmol dm⁻³. Monensin byl extrahován z fermentační půdy dvoustupňovým vytřepáním do čistého nitrobenzenu.



Obr. 2.10: Tříelektrodová nádobka s rozhraním kapalina/polymerový gel

RE2, CE2 – referentní a pomocná elektroda pro organickou fázi, RE1, CE1 – pracovní elektroda (WE, schéma (2.16)) pro vodnou fázi

Obr. 2.11: Voltamogram usnadněného přenosu iontu Na⁺ monensinem na rozhraní agarový gel/nitrobenzen

(1) standardní roztok $5 \cdot 10^{-4}$ M-monensinu, (2) přídavek 50 µl extraktu z fermentační půdy do 2 cm³ organické fáze, --- proud základního elektrolytu. Polarizační rychlost 0,05 V s⁻¹

Literatura

- 1. A.G. Volkov (Ed.): *Liquid Interfaces in Chemical, Biological, and Pharmaceutical Applications*. Marcel Dekker, New York, 2001.
- 2. J. Koryta a K. Štulík: *Ion-selektive Electrodes*. Cambridge University Press, Cambridge 1983.
- 3. V. Mareček, Z. Samec a J. Koryta: Adv. Coll. Interface Sci., 29 (1988) 1.
- 4. J. Koryta, P. Vanýsek a M. Březina: J. Electroanal. Chem., 67 (1976) 263.
- 5. V. Mareček a Z. Samec: J. Electroanal. Chem., 185 (1985) 263.
- 6. V. Mareček, H. Jänchenová, M.P. Colombini a P. Papoff: J. Electroanal. Chem., 217 (1987) 213.
- 7. D. Homolka, K. Holub a V. Mareček: J. Electroanal. Chem., 138 (1982) 29.
- 8. V. Mareček, H. Jänchenová, M. Březina, M. Betti: Anal. Chim. Acta, 244 (1991) 15.
- 9. J. Koryta, Guo Du, W. Ruth a P. Vanýsek: Faraday Discuss. Chem. Soc., 77 (1984) 209.

3. SENZORY NA BÁZI PORÉZNÍHO KŘEMÍKU

doc. RNDr. Ivan Jelínek¹, doc. RNDr. Juraj Dian, CSc.²

¹Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Hlavova 2030, 128 40 Praha 2, ijelinek@natur.cuni.cz

²Katedra chemické fyziky a optiky, Matematicko-fyzikální fakulta Univerzity Karlovy, Ke Karlovu 3, 121 16 Praha 2, dian@karlov.mff.cuni.cz

Pevnolátkové materiály vykazují chování značně rozdílné ve srovnání s molekulárními útvary. Hlavním důvodem je jejich pásová elektronová struktura, která může vykazovat specifické rysy v závislosti na typu uspořádaní (krystalické, mikrokrystalické a nanokrystalické, amorfní). Viditelná fotoluminiscence porézního křemíku má původ v nanostrukturních útvarech, které vznikají v průběhu elektrochemického leptání krystalického křemíku. V důsledku kvantového rozměrového jevu dochází jednak k rozšíření zakázaného pásu, jednak k postupné změně jeho struktury z nepřímé na přímou. Výsledný materiál pak vykazuje velice intenzivní fotoluminiscenci v červené oblasti viditelného spektra. U nanostrukturních útvarů mají, vzhledem k svému vysokému relativnímu zastoupení, velmi významnou roli atomy v blízkosti povrchu. Fyzikální a chemické vlastnosti porézního křemíku tak závisejí na přítomnosti různých látek v blízkosti povrchu. Této závislosti se využívá pro konstrukci chemických senzorů nejrůznějších typů.

Předmětem našeho studia bylo měření závislosti fotoluminiscenčních vlastností porézního křemíku – intenzitě fotoluminiscence a doby dohasínání fotoluminiscence – na přítomnosti chemických látek. Cílem byla jednak optimalizace přípravy tohoto materiálu pro zvýšení citlivosti senzorové odezvy, jednak zvýšení selektivity senzorové odezvy funkcionalizací povrchu křemíkových nanostruktur vhodnými chemickými látkami.

3.1 Fyzikální vlastnosti krystalického křemíku

3.1.1 Pásová struktura krystalického křemíku.

Korektní popis souboru elektronů v pevných látkách vyžaduje využití přístupů kvantové fyziky, které jsou nutné pro vysvětlení jevů probíhajících v oblastech prostoru, jejichž rozměry jsou srovnatelné s tzv. de Broglieho vlnovou délkou λ studované částice:

$$\lambda = \frac{2\pi\hbar}{m\nu} \tag{3.1}$$

kde $\hbar = 1,054 \cdot 10^{34}$ J s je Planckova konstanta, *m* je hmotnost uvažované částice a *v* je její rychlost. Částicím, které se chovají uvedeným způsobem, nelze jednoznačně připsat částicové nebo vlnové vlastnosti. Důsledkem tohoto vlnově-korpuskulárního dualismu je vzájemný vztah mezi energií *E* a hybnosti \vec{p} , což jsou typicky částicové fyzikální veličiny, a úhlovou frekvencí ω a vlnovým vektorem \vec{k} , což jsou typicky vlnové veličiny:

$$E = \hbar \omega \qquad \vec{p} = \hbar \vec{k} \tag{3.2}$$

kde \hbar je Planckova konstanta.

Při vzniku molekul má podstatný význam snížení celkové energie systému v důsledku přerozdělení elektronové hustoty při určité geometrické konfiguraci jader. Vnitřní elektrony, které se neúčastní chemické vazby, zůstávají součástí původních atomů. Valenční elektrony, které obsazují vazebné MO, se stávají součástí molekuly jako celku a oproti původním atomům se v závislosti na symetrii MO můžou pohybovat v oblasti prostoru vymezené rozměrem dané molekuly. V důsledku omezení elektronu v malé oblasti prostoru (srovnatelné s jejich de Broglieho vlnovou délkou) je celková elektronová energie závislá na mezijaderné vzdálenosti.

Při vzniku chemické vazby v krystalických látkách dochází k rozštěpení elektronových hladin původních atomů za vzniku odpovídajícího počtu vazebných a protivazebných orbitalů. Překryv makroskopického počtu hladin vede ke vzniku kvazispojité struktury s rozdílem elektronových energetických hladin menším, než je energie tepelného pohybu. Typická velikost energie elektronového pásu je cca 20 eV [1]. Při pokojové teplotě ($kT \approx 25$ meV) se vytváří pásová struktura již pro útvary o velikosti kolem jednoho tisíce atomů.

Elektronové pásy, které odpovídají nejvýše obsazeným orbitalovým hladinám původních atomů, vytvářejí **valenční pásy**, pásy odpovídající v základním stavu nejníže neobsazeným hladinám vytvářejí **vodivostní pásy**. U kovů dochází buď k tomu, že valenční pás není zcela zaplněn (případ částečně zaplněných slupek původních atomů - alkalické kovy a většina přechodných kovů) popř. valenční a vodivostní pás se překrývají (případ zcela zaplněných slupek atomů – kovy alkalických zemin). U polovodičů a izolantů jsou valenční a vodivostní pás odděleny pásem zakázaných energií. Jako polovodiče označujeme v současné době materiály, jejichž šířka zakázaného pásu je menší než 3,5 eV, materiály s vyšší hodnotou zakázaného pásu jsou izolanty¹.



Obr. 3.1: Vznik pásové struktury křemíku

¹ Hranice mezi polovodičem a izolantem se postupně posouvá k vyšším hodnotám. Je to dáno zejména schopností současné optoelektroniky využít materiály s vyšší hodnotou zakázaného pásu v polovodičových aplikacích. Současné modré LED diody pracují na bázi GaN, který má šířku zakázaného pásu 3,45 eV.

3.2.1 Chování elektronu v energetických pásech, pojem k-prostoru

Elektrony ve vodivostním pásu polovodiče se ve velmi dobrém přiblížení chovají jako volné elektrony. Díky tomu bylo možné mnohé vlastnosti kovů – např. elektrickou a tepelnou vodivost – vysvětlit brzy po objevu elektronu na počátku 20. století v rámci klasické fyziky. Energie volného elektronu je určena jeho kinetickou energií:

$$E = \frac{p^2}{2m} \tag{3.3}$$

Uvážením vztahu (3.2) dostaneme závislost energie volného elektronu na vlnovém vektoru \vec{k} :

$$E = \frac{\hbar^2 k^2}{2m} \tag{3.4}$$

Závislost celkové energie elektronu ve vodivostním pásu na vlnovém vektoru \vec{k} lze popsat parabolickou závislostí pouze v okolí minima (viz. obr. 3.2a).



Obr. 3.2: Závislost energie (a) elektronu ve vodivostním pásu, (b) díry ve valenčním pásu na vlnovém vektoru \vec{k}

Excitací elektronu z valenčního do vodivostního pásu vznikne ve valenčním pásu prázdné místo. Tento chybějící elektron je výhodné popsat jako kladně nabitou částici, kterou nazýváme díra. Závislost energie díry na vlnovém vektoru je analogická jako pro elektron s tím, že energie díry roste opačným směrem (analogie bublinek ve vodě, kdy potenciální energie bublinky roste s hloubkou) – viz obr. 3.2b.

Úplný popis pásové struktury krystalického polovodiče vyžaduje znalost závislosti energie na libovolné hodnotě vlnového vektoru. Tento popis se provádí pomocí pojmu reciprokého prostoru (prostoru vlnových vektorů), který je sdružený s danou krystalovou mřížkou [2]. Pásová struktura se určuje pro vhodně vybranou elementární buňku – Brillouinovu zónu – pomocí semiempirických výpočtů [3].

3.1.3 Polovodiče s přímým a nepřímým zakázaným pásem

Úplnou pásovou strukturu lze získat kombinací vhodných semiempirických metod teorie pevných látek. Tvar elektronových pásů v okolí maxima valenčního pásu a minima vodivostního pásu lze v prvním přiblížení aproximovat paraboloidem. Polovodiče rozdělujeme podle typu pásové struktury na polovodiče s přímým zakázaným pásem a polovodiče s nepřímým zakázaným pásem. U polovodičů s přímým zakázaným pásem leží maximum valenčního pásu při stejné hodnotě vektoru

 \vec{k} jako minimum vodivostního pásu, u polovodičů s nepřímým zakázaným pásem při jiné hodnotě vektoru \vec{k} (viz. obr. 3.3) Uvedené rozdělení polovodičů má zásadní význam pro pravděpodobnost elektronových přechodů v těchto materiálech. Při elektronových přechodech je u polovodičů s přímým zakázaným pásem nutné splnit pouze zákon zachování energie. Pro polovodiče s nepřímým zakázaným pásem je při excitaci elektronů do vodivostního pásu v blízkosti absorpční hrany a při zpětném přechodu excitovaných elektronů z vodivostního pásu zpět do valenčního pásu nutné kromě zákona zachování energie splnit i zákon zachování hybnosti (dochází ke změně vlnového vektoru elektronu). Potřebnou hybnost dodává zpravidla mřížková vibrace – fonon. Důsledkem této dodatečné podmínky je podstatně nižší pravděpodobnost nepřímých elektronových přechodů (kvantový výtěžek je při pokojové teplotě zpravidla nižší než 10⁻⁴).



Obr. 3.3: Mechanismus fotoluminiscence polovodiče s přímým (a) a nepřímým (b) zakázaným pásem

3.1.4 Fotoluminiscence v pevných látkách

Fotoluminiscence je zářivá rekombinace excitovaných nosičů náboje a v principu jde o děj opačný k absorpci fotonu. Jde o nerovnovážný proces a energie je v případě fotoluminiscence dodávána právě absorpcí fotonu o vhodné energii.

Fotoluminiscence spektroskopie slouží již od svého vzniku k charakterizaci polovodičových materiálů, zejména pak k osvětlení fyzikálních procesů doprovázejících zářivou rekombinaci excitovaných nosičů náboje. Významným způsobem tak doplňuje další základní metody charakterizace polovodičů jako jsou optická absorpce, rentgenová difrakce, transmisní elektronová mikroskopie, rastrovací elektronová mikroskopie a měření Hallova jevu. Všechny uvedené charakterizační metody jsou užitečné pro stanovení dílčích vlastností studovaných materiálů a pro úplnou charakterizační metod. Z tohoto hlediska přísluší klasické "steady-state" fotoluminiscenční spektroskopii důležité postavení při určování těchto materiálových charakteristik: (1) kvantový výtěžek luminiscence, (2) chemické složení materiálu, (3) kvantitativní obsah příměsí a (4) tloušťka tenkých vrstev. Časově rozlišená fotoluminiscence poskytuje informace o (5) dynamice volných nosičů náboje, (6) mechanismu rekombinačních procesů a v případě současného laterálního rozlišení, (7) informace o transportu nosičů náboje [4].

3.2 Křemík a význam viditelné fotoluminiscence nanostrukturních materiálů na bázi křemíku

Křemík představuje v současném světe základní materiál mikroelektroniky, která nás dnes doprovází na každém kroku. Tuto významnou roli získal křemík díky svým jedinečným fyzikálním a chemickým vlastnostem (velmi důležité jsou vlastnosti oxidu křemičitého), díky kterým dosáhla mikroelektronika současné hustoty integrace polovodičových prvků na křemíkovém čipu. Samotný krystalický křemík je polovodič s nepřímým zakázaným pásem o velikosti 1,12 eV (optické přechody v oblasti kolem 1 200 nm) a jeho kvantový výtěžek luminiscence je při pokojové teplotě téměř zanedbatelný. Optoelektronické prvky na bázi křemíku by měly jedinečnou výhodu snadné integrace do současných mikroelektronických obvodů a z toho plynoucí obrovské možnosti pro nejrůznější aplikace. Jednou cest jak získat viditelnou fotoluminiscenci z materiálů na bázi křemíku je využití nanostrukturních forem křemíku.

Polovodičové nanokrystalické materiály obsahují krystalické částice (nanokrystaly) s rozměry zpravidla menšími než 10 nm (kdy se již začíná projevovat kvantový rozměrový jev) a zpravidla většími než 1-2 nm (kdy lze ještě mluvit o pásové struktuře). Uvnitř nanokrystalů je zachováno uspořádání na dlouhou vzdálenost, což umožňuje popis energetických pásů pomocí disperzních relací $E-\vec{k}$. Nanokrystaly tak představují jistý přechod mezi krystalickým a amorfním stavem.

Kvantový rozměrový jev je projevem vlnového chování částic v prostoru, jehož rozměry jsou srovnatelné s de Broglieho vlnovou délkou těchto částic. Pokud se zmenšuje vnější rozměr krystalu, od určité kritické velikosti (jednotky až desítky nm) jsou pozorovány výrazné změny fyzikálních vlastností, které závisejí na velikosti krystalu. Při makroskopických velikostech krystalu fyzikální vlastnosti na vlastních rozměrech nezávisejí. Z řešení Schrödingerovy rovnice pro elektron v nekonečně hluboké potenciálové jámě plyne pro povolené hodnoty jeho energie vztah [5]:

$$E_n = \frac{\hbar^2 \pi^2}{2m L^2} n^2$$
(3.5)

tj. povolené hodnoty elektronové energie (jakož i energie přechodů) rostou s převrácenou hodnotou čtverce šířky potenciálové jámy L (\hbar je Planckova konstanta, m hmotnost elektronu, n kvantové číslo). Pro reálné systémy byla pozorována závislost L^{-1x} .

Kvantový rozměrový jev má v polovodiči s nepřímým zakázaným pásem dva důsledky:

- Dochází k posuvu energetických hladin (jakož i energií přechodů) k vyšším hodnotám, tj. v případě křemíku se fotoluminiscence z blízké infračervené oblasti posune směrem do viditelné oblasti. (obr. 3.4).
- 2. Lokalizace nosičů náboje v nanokrystalech způsobuje v důsledku Heisenbergova principu neurčitosti – relaxaci výběrových pravidel pro vektor \vec{k} . Lokalizace v reálném prostoru vede k delokalizací vlnové funkce elektronu v \vec{k} -prostoru a u polovodičů s nepřímým zakázaným pásem dochází k "napřimování" zakázaného pásu. Důsledkem je významný nárůst pravděpodobnosti přímých přechodů (obr. 3.4).



Obr. 3.4: Kvantový rozměrový jev pro polovodič s nepřímým zakázaným pásem

Zmenšováním rozměrů (makro)krystalického polovodiče (A) pod určitou hranici dochází k posuvu energetických hladin (B) a zvětšení zakázaného pásu. Pro velmi malé nanokrystaly (C) dochází kromě dalšího zvětšení zakázaného pásu k výraznému nárůstu pravděpodobnosti přímých přechodů v důsledku delokalizace vlnové funkce v \vec{k} -prostoru.

Později byl rozpoznán význam povrchových stavů pro vysvětlení některých fyzikálních vlastností nanostrukturních materiálů [6,7]. Model povrchových stavů vychází z faktu, že u nanokrystalických látek je významná část atomů na jejich povrchu. Tyto atomy jsou vystaveny jinému působení než atomy uvnitř nanokrystalu, což je doprovázeno výrazným nárůstem entropie. Nepravidelnosti na povrchu jsou spojeny s přítomností různých defektů. Přítomnost těchto defektů způsobuje vznik nových hladin v zakázaném pásu, které se rovněž účastní rekombinace excitovaných elektronů a děr (viz obr. 3.5).



Obr. 3.5: Vliv povrchových stavů na elektronovou strukturu nanokrystalu

3.3 Porézní křemík

Porézní křemík patří od objevu své intenzivní fotoluminiscence v roce 1990 [8] mezi nejintenzivněji studované materiály (cca 7 000 publikací). Původem viditelné fotoluminiscence v porézním křemíku jsou nanostrukturní útvary na stěnách pórů, které vznikají v průběhu elektrochemického leptání krystalického křemíku. V závislosti na velikosti pórů rozlišujeme křemík makroporézní, mesoporézní a mikroporézní.



Obr. 3.6: Morfologie povrchu porézního křemíku určena rastrovacím elektronovým mikroskopem

(a) pohled shora, (b) pohled z řezu

Úplný mechanismus elektrochemického leptání křemíku v prostředí fluoridových iontů není dosud plně objasněn. Byla navržena řada modelů, které vycházejí ze skutečnosti, že k procesu leptání je nezbytná přítomnost fluoridových iontů a děr (h^+) a že se během leptání spojeném s tvorbou porézního křemíku vyvíjí vodík. Množství vytvořeného vodíku při zvyšování vkládaného napětí klesá a jeho tvorba se zastavuje v oblasti napětí, kde dochází k odtrhávání vrstvy (electropolishing) [9]. V oblasti proudů odpovídajících tvorbě porézního křemíku (tzv. dvouvalentní režim) lze celkový průběh popsat chemickou rovnicí

$$Si + 4 HF_2^- + h^+ \rightarrow SiF_6^{2-} + H_2 + 2 HF + e^-$$
 (3.6)

v oblasti vyšších proudů dochází k electropolishingu (čtyřvalentní režim), kdy nejdříve dochází k tvorbě SiO₂. Proces lze popsat poloreakcí:

$$SiO_2 + 4HF_2^- + 2 HF \rightarrow SiF_6^{2-} + 2 H_2O$$
 (3.7)

Souhrnné reakce neposkytují informace o mechanismu vzniku porézní struktury. Nejběžnější model mechanismu tvorby porézního křemíku pocházející od Lehmanna je znázorněn na obr. 3.7 [10].



Obr. 3.7: Model rozpouštěcího mechanismu křemíku fluoridovými ionty

3.4 Experimentální část

Vzorky porézního křemíku byly připraveny anodických leptáním krystalického křemíku (p-typ, měrný odpor cca 10 Ω cm, orientace <100>) ve směsi HF:EtOH = 1:2.5 při proudové hustotě 10 mA cm⁻² po dobu 30 min. Povrch porézního křemíku byl modifikován hydrosilylací methyl-10-undeceonátem. Vysušený vzorek porézního křemíku byl ponořen do reakční směsi obsahující methyl-10-undecenoát a hexan (v poměru 1:5). Fotochemicky indukovaná hydrosilylační reakce probíhala při ozařování UV-zářením ze rtuťové výbojky po průchodu interferenčním filtrem 365 nm. Oxidovaný vzorek porézního křemíku byl připraven ponořením do 30%ního roztoku H₂O₂ po dobu 60 minut. Vzorky byly vysušeny v evakuovaném exsikátoru.

Měření parametrů fotoluminiscenční odezvy – intenzity a doby dohasínání – byla prováděna na aparatuře uvedené na obr. 3.8. Zdrojem budícího záření byla pulsně buzená UV LED dioda o vlnové délce 375 nm. Fotoluminiscence byla analyzována monochromátorem Jobin Yvon HT20 a detegována fotonásobičem Hammamatsu R3896. Pulsní buzení (f \approx 500 Hz), proudový předzesilovač (SR570) a využití synchronní detekce (LockIn SR830) umožňovaly současné měření intenzity a časového průběhu fotoluminiscence (osciloskop Tektronix 3052B) v průběhu doby jednoho pulzu (\approx 2 ms). Vzorek byl umístěn v optodě, která byla spojena se systémem dávkování definovaných koncentrací studovaných analytů (viz obr. 3.8).

3.5 Výsledky a diskuse

V přítomnosti analytů dochází ke změnám intenzity fotoluminiscence a doby dohasínání fotoluminiscence. Změny intenzity fotoluminiscence porézního křemíku pro různé koncentrace methanolu v systému jsou uvedeny na obr. 3.9a, na obr. 3.9b je znázorněn průběh dohasínaní fotoluminiscence před nástřikem methanolu o koncentraci $c = 29,7 \ \mu g \ ml^{-1}$ a po něm. Ze závislosti intenzity fotoluminiscence standardního porézního křemíku na koncentracích analytu plyne, že s rostoucí koncentrací roste zhášení luminiscence. Při vysokých koncentracích analytů dochází díky omezené sorpční kapacitě vzorku k saturaci signálu. Míra zhášení fotoluminiscence v plynné fázi závisí na fyzikálních vlastnostech sledovaných analytů – dielektrické konstantě a tlaku nasycené páry [11].



Obr. 3.8: Senzorová aparatura pro současné měření intenzity a doby života fotoluminiscence

Pro srovnání míry zhášení různých analytů jsou na obr. 3.10a vyneseny závislosti relativního zhášení fotoluminiscence v závislosti na koncentraci vybraných analytů, na obr. 3.10b jsou odpovídající závislosti doby dohasínání fotoluminiscence na koncentraci.

Ze závislosti zhášení fotoluminiscence na koncentraci pro vybrané analyty plyne, že nejvíce zháší fotoluminiscenci vyšší alkoholy, značně zháší toluen a velmi málo zháší nepolární látky. Doba dohasínání fotoluminiscence, τ , značně závisí na stupni oxidace porézního křemíku. Z obr. 3.9b plyne, že doba dohasínání vzorku standardního porézního křemíku závisí na stupni oxidace: s rostoucí oxidací povrchu se postupně prodlužuje. Pro studované analyty se doba dohasínání s koncentrací nejvíce zkracovala pro vyšší alkoholy, střední sílu zkracování doby života vykazovaly nižší alkoholy a aromatické uhlovodíky (toluen, xylen) a nejmenší zkracování doby života s koncentrací bylo opět pozorováno pro málo polární organické látky. Pro určení časové konstanty dohasínání fotoluminiscence porézního křemíku byl použit model disperzní kinetiky, kterému odpovídá natažená exponenciála ("stretched exponential")¹²:

$$I(t) = I_0 e^{-\left(\frac{t}{\tau}\right)^{\beta}}$$
(3.8)

kde *t* je čas, I_0 intenzita fotoluminiscence v čase t = 0 (v okamžiku přerušení excitace vzorku) a I(t) intenzita fotoluminiscence v čase *t* po přerušení excitace vzorku.



Obr. 3.9: a – Časový průběh intenzity fotoluminiscenční senzorové odezvy standardního porézního křemíku na různé koncentrace methanolu v plynné fázi

b – Časový průběh dohasínání fotoluminiscence standardního porézního křemíku bez přítomnosti analytu a pro koncentraci methanolu $c = 29,7 \ \mu g \ m^{-1}$





b – Koncentrační závislost doby dohasínání fotoluminiscence standardního porézního křemíku

Parametr β (disperzní parametr) se pohybuje v rozmezí 0 až 1, pro daný vzorek standardního porézního křemíku byla stanovena hodnota $\beta = 0.79$, pro oxidovaný vzorek $\beta = 0.83$ a pro vzorek derivatizovaný methyl 10-undecenoátem $\beta = 0.81$. Pro vyšší koncentrace detegovaných analytů byla v důsledku nízké intenzity fotoluminiscence doba dohasínání určena se značnou chybou, tyto hodnoty nebyly zahrnuty do dalšího vyhodnocení.

Chemická derivatizace vzorků se projevila interakcí detegovaných analytů s povrchem porézního křemíku. Senzorová odezva byla nižší ve srovnání se standardním porézním křemíkem a v důsledku interakce analytů s povrchem byly pozorovány značné odchylky v závislosti na polaritě sledovaných analytů ¹³.



Obr. 3.11: Koncentrační závislost zhášení intenzity fotoluminiscence oxidovaného porézního křemíku (a) a porézního křemíku derivatizovaného methyl 10-undecenoátem (b) pro vybranou skupinu analytů

Kvantitativní srovnání odezvy jednotlivých analytů lze nejjednodušeji provést pomocí citlivosti senzorové odezvy – absolutní hodnoty směrnice koncentrační závislosti. Na obr. 3.12 jsou uvedeny korelační závislosti citlivosti senzorové odezvy poklesu intenzity fotoluminiscence S_I a zkracování doby dohasínání S_{τ} pro měřené analyty. Z obrázku je patrné, že jednotlivé analyty vykazují různou odezvu při měření intenzity a doby dohasínání fotoluminiscence. Pro sledované lineární alkoholy byla pozorována přibližně lineární korelace mezi zhášením fotoluminiscence a zkracováním doby života fotoluminiscence (obr. 3.12a). Při srovnání různých skupin organických látek byly pozorovány nízké hodnoty citlivosti senzorové odezvy S_I a S_{τ} na málo polární alifatické látky (alkany, halogenalkany), vyšší hodnoty poměru citlivostí S_{τ}/S_1 pro aromatické uhlovodíky a vyšší hodnoty citlivostí S_I a S_{τ} senzorové odezvy na silně polární látky (alkoholy).



Obr. 3.12: a – Korelace citlivostí senzorové odezvy pro lineární alkoholy b – Korelace citlivostí senzorové odezvy pro vybrané skupiny organických látek

Chemická derivatizace povrchu porézního křemíku a duální detekce fotoluminiscenčních parametrů umožňují zvýšení selektivity senzorové odezvy na vybrané skupiny detegovaných látek. Vzhledem ke kompatibilitě s křemíkovou mikroelektronikou má porézní křemík velký potenciál pro aplikace v elektronických nosech pro detekci širokého spektra organických látek.

Literatura

- ¹ Ch. Kittel, *Úvod do fyziky pevných látek*, SNTL Praha 1978.
- ² M.T. Dove, *Structure and Dynamics*, Oxford University Press 2003.
- ³ J.R. Chelikowsky, M.L. Cohen, *Phys. Rev. B* **14** (1976) 556.
- ⁴ G.D. Gilliland, *Mat. Sci. Eng.* **R18** (1997) 99-400.
- ⁵ M.T. Dove, *Structure and Dynamics*, Oxford University Press 2003.
- ⁶ M.G. Bawendi, P.J. Carroll, W.L. Wilson, L.E. Brus, J. Chem. Phys. **96** (1992) 946.
- ⁷ F. Koch, V. Petrova-Koch, T. Muschik, *J. Luminesc.* **57** (1993) 271.
- ⁸ L.T. Canham, *Appl. Phys. Lett.* **57** (1990) 1046.
- ⁹ M.J. Eddowes, J. Electroanal. Chem. **280** (1990) 297.
- ¹⁰ V. Lehman, U. Gösele, *Appl. Phys. Lett.* **58** (1991) 856.
- ¹¹ J. Dian, T. Chvojka, V. Vrkoslav, I. Jelínek, *phys. stat. sol. (c)* **2** (2005) 3481.
- ¹² J. Kudrna, P. Bartošek, F. Trojánek, I. Pelant, P. Malý, J. Lumin. **72-74** (1997) 347.
- ¹³ I. Jelínek, T. Chvojka, V. Vrkoslav, J. Jindřich, M. Lorenc, D. Nižňanský, I. Němec, V. Král, J. Dian, *Chimia* **59** (2005) 222.

4. KOMPOZITNÍ ELEKTRODY

Dr. Ing. Tomáš Navrátil

Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR, v.v.i., Dolejškova 3, 182 23 Praha 8 e-mail: Navratil@jh-inst.cas.cz

4.1 Senzory na bázi kompozitních materiálů, jejich složení a výhody

Ačkoliv rtuťová elektroda (např. kapková rtuťová elektroda – DME, visicí rtuťová kapková elektroda – HMDE nebo rtuťové filmové elektrody – MFE) se jeví v mnoha směrech jako ideální (široký pracovní rozsah, velmi snadná obnovitelnost, cena aj.), její použití pro konstrukci jednoduše použitelných, lehce přenosných a případně jednorázových senzorů provázejí některé problémy. Jedním z nich jsou ekologické a bezpečnostní předpisy zaváděné ve světě i v Evropské unii, které zakazují nebo podstatným způsobem komplikují používání rtuti [1], stejně jako neopodstatněné obavy z její toxicity (paradoxně je dokonce netoxická rtuť nahrazována filmovými elektrodami, při jejichž přípravě se používají vysoce toxické rozpustné sloučeniny rtuti). Kapalná rtuť se jeví jako nevhodná i v případech, kdy je nutno se senzorem manipulovat, přenášet jej z místa na místo nebo dokonce přikládat senzor ke vzorku, přičemž měření probíhá v jiném místě.

Pro takovéto účely se jeví daleko vhodnější senzory založené na bázi pevných materiálů. (Poznámka: V práci [2] je diskutován terminologický problém senzor vs. elektroda. Ačkoliv se lze přiklonit k názoru, že senzor = elektrochemický článek, v této práci bude pozornost věnována pouze pracovním elektrodám, jakožto stěžejní části senzoru. Je třeba si tedy uvědomit, že popisovaný senzor na bázi kompozitu je potřeba doplnit ještě o referentní a popř. pomocnou elektrodu.) Do této skupiny patří i elektrochemická čidla označovaná jako pevné kompozitní elektrody. Jsou velmi stabilní, mechanicky odolné, lze je leštit, elektrochemicky obnovovat jejich povrch, mají dlouhou životnost, lze je používat ve velmi pozitivních potenciálových oblastech, mají nízkou pořizovací cenu, vykazují stabilitu v organických rozpouštědlech, lze je modifikovat atd. Kompozitní elektroda poskytuje za jinak stejných podmínek větší proud na jednotku aktivní plochy než odpovídající čistý vodič (grafitová či kovová elektroda). Absolutní velikosti šumu a proudu pozadí bývají stejné, avšak kompozitní elektroda má poměr signál/šum lepší. Je to proto, že vázané elektrody mají dobrou vodivost i při malém množství částeček vodivého materiálu v kompozitu [3, 4]. Jako všechny pevné senzory vykazují i kompozitní materiály (ve srovnání se rtuťovou elektrodou) hůře reprodukovatelný a obnovovatelný povrch. K nevýhodám pevných elektrod patří i problémy způsobené časovými změnami kvality jejich povrchu. Každá analýza je zatížena "historií" elektrody, a to z hlediska časového, z hlediska kvality a kvantity probíhajících reakcí. Běžně je povrch čidla atakován různými látkami, "stárne" a pasivuje se [3]. Při polarizaci kovů v oblasti pozitivních potenciálů dochází především k tvorbě povrchových oxidů a k adsorpci kyslíku. U negativních potenciálů se může adsorbovat vodík. Vedle toho dochází často k adsorpci některých složek roztoku na povrch elektrody.

Využití senzorů na bázi kompozitních materiálů je možno nalézt v oblasti teoretického výzkumu dějů odehrávajících se na povrchu, stejně tak jako v oblasti analytické chemie. Obě tyto sféry se vzájemně prolínají. Pevné kompozitní elektrody, popisované v následujících odstavcích, patří do skupiny kompozitních elektrod s náhodně distribuovanými nejméně dvěma látkami, které mají po smísení tuhou konzistenci. Podle definice je jednou z uvedených promísených látek vodič a druhou izolátor [5-9]. Dle schématu publikovaného v práci [6] patří do skupiny kompozitů – náhodně uspořádaných – dispergovaných – pevných. Izolátorová fáze je obvykle představována polymerickým materiálem (polyakrylátem [7, 8, 10, 11], epoxidem [10, 12], polyvinylchloridem (PVC) [13], teflonem [10, 14], vinylacetátem [10], polyesterem [10], polyethylenem [10] aj.) nebo monomerním materiálem. Vodič může být tvořen kovem (stříbrem [7, 8], zlatem [15] apod.), jiným nekovovým vodivým materiálem (např. grafitem [16]) nebo jejich směsí [16]. Do směsi lze přidat další složky tak, aby bylo dosaženo specifických vlastností materiálu pro stanovení či detekci zvolených analytů, např. kobaltftalocyanin [17, 18], Cu₂O [13], Ni/Cu [19], Mn [20, 21], hexakyanoferát [20-23], methylenová modř [24], Ru[(tpy)(bpy)Cl]PF₆ [25, 26], nebo jejich směsi [20, 21]. Povrch senzorů může být též modifikován, např. Nafionem [27], vhodným katalyzátorem (např. enzymem: tyrosinasou [28], glukosooxidasou [29, 30], Au-Pd [10], RuO₂, silikagelem [10, 31, 32]).

Vodivost kompozitního materiálu je srovnatelná s vodivostí samotného kovového vodiče, i když množství vodivých částeček je relativně malé (10 až 60 %). Tento efekt je vysvětlen tzv. perkolační teorií [5, 6, 33-35], např. odpor grafitové elektrody poklesává z 70 k Ω na 30 Ω při zvýšení obsahu grafitu z 15 na 35 % (což je srovnatelný odpor s čistým grafitem [35]) nebo obsah stříbra v Kel/F pouhých 15 % je dostatečný pro dosažení 98 % vodivosti čistého stříbra [6]. Z analytického hlediska jsou vysoce zajímavé rozsahy pracovních potenciálů, kterých lze dosáhnout pomocí těchto elektrod (Tabulka 4.1) (např. u kompozitní elektrody typu CCE30 při pH 9,2 cca 4 V) [3, 36]. V ideálním případě může kompozitní materiál představovat pole mikroelektrod, tj. měření nejsou rušena přítomností kyslíku ve vzorku, tvar signálu se blíží vlně, míchání roztoku není nutné atd. Jejich struktura a povrch mohou být studovány mimo cyklické voltametrie, dc-voltametrie a dalších voltametrických metod také za použití optické mikroskopie [5], skenovací elektronové mikroskopie [3, 16, 33, 37, 38], elektrochemické impedanční spektroskopie [33, 37, 38], rentgenové difrakce (XRD) [38], mikroskopie atomových sil (AFM) [38, 39] či X-ray fotoelektronové spektroskopie (XPS) [40].

Tab. 4.1: Příklady rozsahů pracovních potenciálů kompozitních elektrod

dc-voltametrie; rychlost polarizace 0,02 V s⁻¹; potenciálové limity (ve V) odpovídaly úrovni 1 μ A v případě grafitové kompozitní elektrody (CCE30) a úrovni 20 μ A v případě stříbrné (AgE) a stříbrné kompozitní elektrody (CAgE20)

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

4.2 Efekt "underpotential deposition" (UPD)

U pevných elektrod, ať již monokrystalických, polykrystalických, kompozitních či jiných, lze pozorovat efekt "underpotential deposition" (UPD) [7, 8, 41-49]. Při něm dochází k monovrstevnému vylučování měřeného kovu na povrchu tuhé elektrody při potenciálu pozitivnějším, než je hodnota určená Nernstovou rovnicí pro reverzibilní děje [7, 8, 16, 41, 45]. Tento jev lze využít pro vysoce citlivé stanovení kovů anodickou rozpouštěcí voltametrií (ASV) na pevných kompozitních elektrodách v oblasti velmi nízkých koncentrací (např.[7, 8, 16]).

4.3 Výroba elektrod

Jako pouzdro pro elektrody se používá váleček z Teflonu nebo z organického skla, uvnitř dutý, do něhož se vtlačí elektrodová hmota (průměr aktivní plochy činí obvykle 1,0 až 2,5 mm) [11, 48]; elektrodový matriál se také může nanést na vhodnou podložku. Materiál pouzdra i senzorové podložky je třeba volit s ohledem na použité prostředí analýzy (např. methanol ve vyšších koncentracích [50]). Elektrický kontakt může tvořit drátek vsunutý do vrstvy práškového grafitu nasypaného na horní povrch kompozitního materiálu [15, 16], nebo zasunutý do elektrodového materiálu před jeho ztuhnutím. Směs vodiče (stříbra, zlata apod.) s objemovým modifikátorem (např. uhlíkem) se homogenizuje v misce, poté se přidá polymerizační kapalina (stomatologický materiál Superacryl plus[®], epoxidová pryskyřice aj.), čímž se vytvoří plastická kompozitní hmota. Ta se ponechá volně na vzduchu, dokud kompozitní materiál částečně neztuhne (obvykle cca 5 minut), a pak se vtlačí do těla senzoru nebo na podložku. Pro optimální realizaci polymerizačního procesu je třeba dodržet teplotní a časový profil (např. 60 - 70 °C po dobu asi 6 hodin, následně 100 - 120 °C po následující 2 hodiny atd.) [7, 8]. Vzniklý povrch se brousí na smirkových papírech o různé zrnitosti a nakonec se leští na alumině. Leštění se opakuje cca po 2 týdnech měření, nebo vždy, když se zhorší reprodukovatelnost výsledků nebo je povrch senzoru atakován nečistotami. Takto připravený povrch je možno pokrýt vhodnými modifikátory (Nafionem [27], enzymy, např. tyrosinasou [28] nebo glukosooxidasou [29, 30]).

Elektrochemická oxidace senzoru, která se vykonává po leštění nebo po delší době neaktivity (např. každý den před zahájením měření), se provádí cyklickou polarizací (desítky až stovky cyklů rychlostí v řádu stovek mV s⁻¹, při použití stejného elektrolytu, v němž se následně realizuje měření) [48, 49, 51]. Regenerace se provádí i v závislosti na typu aplikace. V průtočných systémech (HPLC, FIA atd.) jsou nežádoucí látky a reakční produkty většinou odnášeny z povrchu průchodem mobilní fáze. Při dávkové analýze je v krajním případě nutno povrch přeleštit, přetřít filtračním papírem (např. stanovení naftalenu na grafitové kompozitní elektrodě [49]) nebo provést elektrochemickou regeneraci povrchu (např. [8, 11, 12]). Elektrochemická aktivace či regenerace, prováděná před každým měřením či před sérií měření, může zabrat určitý čas (řádově několik minut), tyto procedury mohou být však plně zautomatizovány vhodným řídicím software (např. Polar 5.1, Polaro-Sensors, Praha, ČR) [12, 16, 36].

4.4 Analytické aplikace kompozitních materiálů

Pevné kompozitní elektrody mohou být používány jako ampérometrické senzory v anorganické [7, 8, 52-54] i organické analýze [23, 25, 36, 55]. Mohou být používány pro voltametrii [8, 12, 54], chronopotenciometrii (potenciometrickou stripping analýzu, PSA) [32, 56, 57], v HPLC [19, 58, 59], FIA [13, 17, 26, 60, 61], v luminiscenčních technikách [29, 62, 63], v kapilární elektroforéze [58, 64, 65] a pro jiné vědecké účely (např. výzkum efektu UPD [48, 54]), vhodné jsou ale i rutinních laboratořích [66]. Měření mohou být prováděna ve vodných i v nevodných prostředích [67].

Senzor na bázi zlaté kompozitní elektrody (CAuE) je možné využít pro stanovení arsenu s mezí detekce (LOD) cca 0,32 μ g L⁻¹ [11]. Na stříbrných kompozitních elektrodách (CAgE) založených na akrylátové pryskyřici byl studován jak UPD-efekt, tak byly stanovovány Pb, Cd, Tl (v koncentračním řádu μ g L⁻¹), Cl⁻, Br⁻, I⁻ (v koncentračním řádu desítek μ g L⁻¹) [7, 8, 50, 51]. CAgE byly využity i při stanovení nitrátů v 0,01M-KCl (LOD 1 · 10⁻⁴ mol L⁻¹) [7], organických nitrosloučenin, např. 6-nitrochinolinu, 5-nitrobenziimidazolu, 2-nitronaftalenu v Brittonově–Robin-

sonově (BR) pufru, pH 9-10 (LOD $\approx 10^{-6}$ mol L⁻¹ [3, 55]), azosloučeniny alizarinové chromové černi PT ve stejném pufru (LOD $\approx 0.5 \ \mu \text{mol } \text{L}^{-1}$) [36].

Podobné výsledky byly dosaženy při analýzách Pb, Cd, Tl i na uhlíkových epoxidových elektrodách (CCE) (LOD $\approx \mu g L^{-1}$) [48], Mn (LOD $\approx 100 \mu g L^{-1}$) [16, 54]. BR-pufr se jeví jako vhodné medium i pro stanovení většiny organických látek pomocí CCE, např. nitrolátek, jako je 6-nitrochinolin, 5-nitrobenziimidazol, 2-nitronaftalen (LOD $\approx \mu mol L^{-1}$) [3, 49], aminosloučeniny 2-aminonaftalenu (LOD $\approx 0.5 \mu mol L^{-1}$) [16], nukleových kyselin, adeninu a guaninu (LOD $\approx 10 \mu g L^{-1}$) [16], azosloučeniny alizarinové chromové černi PT (LOD $\approx 0.2 \mu mol L^{-1}$) [21] a metabolitu styrenu - kyseliny fenylglyoxylové (LOD $\approx m g L^{-1}$) [12]. Senzory na bázi grafitu a epoxidu nalezly své uplatnění i v analýze složek kosmetických krémů, opalovací krémů a podobných produktů, např. askorbové kyseliny, magnesiumaskorbylfosfátu, askorbylpalimitátu s LOD $\approx 0.1 \mu mol L^{-1}$ [68] a oktylsalicylátu v nevodném prostředí (LOD $\approx 10^{-5} mol L^{-1}$) [67]. Senzory na bázi grafitu s metakrylátem (CME) jsou též vhodné pro aplikace v potravinářském průmyslu, např. pro stanovení kyseliny askorbové v džusech a vitaminových tabletách [17, 18] či tryptofanu v krmivech [69].

Velmi důležitou oblastí aplikací kompozitních senzorových materiálů je analýza léčiv, biochemie, medicína, např. při stanovení antirevmatika Diclofenacu na CCE [70] nebo na grafitovýchpolytetrafluoroethylenových elektrodách (PTFE-G) [70], cysteinu, tryptofanu nebo tyrosinu na CME v hladinách 10^{-5} to 10^{-6} mol L⁻¹ [71], dopaminu na CAgE modifikované Nafionem (LQD $\approx 10^{-6}$ mol L⁻¹) [27], na grafitových-PVC elektrodách (GPVCE) bez či po modifikaci Nafionem (LQD $\approx 10^{-7}$ mol L⁻¹) [72, 73], na materiálu založeném na skelném uhlíku smíšeném s nano-Cu₂O a methylenovou modří (LQD $\approx 5 \cdot 10^{-8}$ mol L⁻¹) [24], quercetinu a kempferolu ve fytofarmaceutikách (v Ginko Bilobě) na GPVCE (LOD $\approx 10^{-6}$ mol L⁻¹) [59], kyseliny močové na GPVCE (LQD $\approx 10^{-7}$ mol L⁻¹) [72, 73] nebo glukosy na podobných elektrodách modifikovaných práškem Cu₂O ve FIA [13]. Kompozitní materiály založené na methyltrimethoxysilanu a grafitovém prášku lze využít pro square-wave voltametrické stanovení kyseliny močové, vitaminu C či neurotransmiterů (katecholaminu) [74].

Především v oblasti organické analýzy biologicky aktivních sloučenin v životním prostředí jsou využívány nejrůznější další kombinace vodičů, izolátorů a modifikátorů. Jejich příprava je někdy velmi komplikovaná. Vhodné by bylo zmínit též grafitové kompozitní elektrody na bázi sol-gel, které jsou používány např. na stanovení dopaminu a epinefrinu (fosfátový pufr, pH 6,5 $(LOD \approx 10^{-8} \text{ mol } \text{L}^{-1})$ [64]. Zajímavé se jeví i biochemické aplikace při voltametrické stejně jako chronopotenciometrické (PSA) analýze metalothioneinů a fytochelatinů na materiálu složeném z grafitu s parafinovým olejem a silikagelu v borátovém pufru (LOD $\approx 10^{-8} \text{ mol } \text{L}^{-1}$) [31, 32]. Kompozit grafit/PVC-COOH/ferrocen s kovalentně imobilizovaným enzymem lze použít pro stanovení glukosy v koncentračním rozmezí 0,1 až 20 mmol L^{-1} [30]. Kompozitní materiály jsou též vhodné pro použití ve voltametrické analýze hydrochinonu ve fotografické vývojce (grafit-ricinový olej–polyuretan) (LOD $\approx 9 \cdot 10^{-7}$ mol L⁻¹) [75]. Další aplikace kompozitních materiálů lze nalézt při stanovení butylovaného hydroxyanisolu, který je používán od roku 1947 jako antioxidant v řadě potravin, včetně jedlých tuků a olejů, masa, potravin z obilovin, brambor, pekařských výrobků, oříšků, žvýkaček a nápojů i v kosmetice (rtěnky, oční stíny) atd. Pro jeho stanovení DPV jsou vhodné kompozitní materiály na bázi grafit–vosk–hexakyanoferát stříbrný (LOD $\approx 4 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹) [22], kobalt hexakyanoferát–grafit–parafin (LOD $\approx 2 \cdot 10^{-7} \text{ mol } \text{L}^{-1}$) [23] nebo grafit–vosk–Mn(II)-hexa-

kyanoferát (LOD $\approx 5 \cdot 10^{-8}$ mol L⁻¹) [21]. Podobné senzorové materiály (grafit–vosk–Mn(II)-hexakyanoferát) lze aplikovat i pro stanovení kyseliny askorbové (LOD $\approx 2 \cdot 10^{-5} \text{ mol } \text{L}^{-1}$) [20]. Pracovní elektroda připravená z PVC s příměsí Cu nebo Cu a Ni (popř. s modifikací Ru) je využitelná pro stanovení ethanolu [19]. Keramické uhlíkové elektrody s příměsí Ru[(tpy)(bpy)Cl]PF₆ byly testovány pro FIA stanovení cysteinu (LOD $\approx 10^{-14}$ mol L⁻¹) [26] a glutathionu v 0,1M fosfátovém pufru, pH 2 (LOD $\approx 10^{-14}$ mol L⁻¹) [26] nebo insulinu v 0,1M fosfátovém pufru, pH 7 $(LOD \approx 10^{-14} \text{ mol } \text{L}^{-1})$ [25]. FIA s ampérometrickou detekcí insulinu byla realizována i na sol-gel keramické uhlíkové elektrodě modifikované niklovým práškem a oktakyanomolybdenátem(IV), pH 7,4 (LOD $\approx 10^{-6}$ mol L⁻¹) [76]. Kompozitní materiál grafit – polyuretan je používán i pro square wave voltametrické stanovení dopaminu (LOD $\approx 6 \cdot 10^{-8} \text{ mol } \text{L}^{-1}$) [77] a tricyklického antidepresiva imipraminu (LOD $\approx 5 \cdot 10^{-9}$ mol L⁻¹) [78]. PTFE-G v kombinaci s tyrosinasou může být použita pro velmi citlivé FIA stanovení alkalické fosfatasy v mléce (LOD $\approx 7 \cdot 10^{-14}$ mol L⁻¹) [28]. Zajímavá aplikace kompozitních materiálů byla publikována v práci [29], kde je popisováno elektrochemiluminiscenční stanovení glukosy za užití sol-gel keramické-uhlíkové elektrody, impregnované glukosooxidasou v silikátové síti, která byla použita ve formě optického vláknového biosenzoru (LOD $\approx 8 \cdot 10^{-6} \text{ mol } \text{L}^{-1}$).

4.5 Závěr

Lze konstatovat, že kompozitní materiály se jeví i přes své nedostatky, obdobné jako u ostatních pevných elektrod (horší obnovovatelnost povrchu, kratší životnost, vyšší detekční limity), jako vhodná alternativa k elektrodám obsahujícím rtuť (HMDE či amalgámovým). Díky možnosti připravit vhodný elektrodový materiál přímo podle sledovaného analytu lze dosáhnout jejich pomocí vysokou specifičnost a dostatečnou citlivost. Výhodná je především jejich široká analytická aplikovatelnost stejně jako použitelnost při studiu UPD-efektu. Obnovování povrchu lze provést ve většině případů elektrochemickou cestou a k mechanickým postupům čištění je třeba přistoupit jen výjimečně. Detekční limity jsou sice v některých případech horší než u rtuťových elektrod, přesto většinou postačují pro účely hygienických norem. V této stati uvedené metody přípravy a praktického použití kompozitních elektrod jsou pouze příklady z široké řady jejich možných aplikací v anorganické či organické analýze.

Literatura

- [1] European_parliament, http://www.europarl.europa.eu/news/expert/infopress_page/064-6115-073-03-11-911-20060309IPR06021-14-03-2006-2006-false/default_en.htm, 14. 3. 2006.
- [2] Opekar, F., Chemické sensory a biosensory, v Možnosti inovací v elektroanalytické chemii (ed.: Barek, J.), Str. 37. Pražské analytické centrum inovací, VŠCHT, Praha 2006.
- [3] Sebkova, S., Ph.D. Thesis.University Pardubice, Pardubice 2004.
- [4] Barek, J., Fischer, J., Navratil, T., Peckova, K., Yosypchuk, B., Zima, J., Electroanalysis, 2007, accepted.
- [5] Petersen, S. L., Tallman, D. E., Anal. Chem., 1988, 60, 82.
- [6] Tallman, D. E., Petersen, S. L., Electroanalysis, 1990, 2, 499.
- [7] Navratil, T., Kopanica, M., Crit. Rev. Anal. Chem., 2002, 32, 153.
- [8] Navratil, T., Kopanica, M., Chem. Listy, 2002, 96, 111.

- [9] Navratil, T., Kompozitní elektrody, v Možnosti inovací v elektroanalytické chemii (ed.: Barek, J.), str. 113. Pražské analytické centrum inovací, VŠCHT, Prague 2006.
- [10] Cespedes, F., Alegret, S., Food Technol Biotech, 1996, 34, 143.
- [11] Navratil, T., Kopanica, M., Krista, J., Chemia Analityczna (Warszaw) 2003, 48, 265.
- [12] Navratil, T., Senholdova, Z., Shanmugam, K., Barek, J., Electroanalysis, 2006, 18, 201.
- [13] Palenzuela, B., Simonet, B. M., Garcia, R. M., Rios, A., Valcarcel, M., Anal. Chim. Acta, 2004, 524, 167.
- [14] Blanco-Lopez, M. C., Gutierrez-Fernandez, S., Lobo-Castanon, M. J., Miranda-Ordieres, A. J., Tunon-Blanco, P., Anal. Bioanal. Chem., 2004, 378, 1922.
- [15] Navratil, T., Kopanica, M., Chemia Analityczna (Warszaw), 2003, 48, 127.
- [16] Sebkova, S., Navratil, T., Kopanica, M., Anal. Lett., 2005, 38, 1747.
- [17] Khorasani, J. H., Amini, M. K., Ghanei, H., Tangestaninejad, S., Iranian Journal of Chemistry & Chemical Engineering-International English Edition, 2001, 20, 66.
- [18] Wring, S. A., Hart, J. P., Birch, B. J., Anal. Chim. Acta, 1990, 229, 63.
- [19] Pereira, M. G., Jimenez, M. D., Elizalde, M. P., Manzo-Robledo, A., Alonso-Vante, N., Electrochim. Acta, 2004, 49, 3917.
- [20] Jayasri, D., Narayanan, S. S., Bull. Electrochem., 2005, 21, 537.
- [21] Jayasri, D., Narayanan, S. S., Food Chem., 2007, 101, 607.
- [22] Jayasri, D., Narayanan, S. S., Sensors and Actuators B-Chemical, 2006, 119, 135.
- [23] Prabakar, S. J. R., Narayanan, S. S., Anal. Bioanal. Chem., 2006, 386, 2107.
- [24] Liu, C. Y., Hu, J. F., Hu, J. M., Tanga, H., Electroanalysis, 2006, 18, 478.
- [25] Salimi, A., Pourbeyram, S., Haddadzadeh, H., J. Electroanal. Chem., 2003, 542, 39.
- [26] Salimi, A., Pourbeyram, S., Talanta, 2003, 60, 205.
- [27] Shankaran, D. R., Uehara, N., Kato, T., Anal. Chim. Acta, 2003, 478, 321.
- [28] Serra, B., Morales, M. D., Reviejo, A. J., Hall, E. H., Pingarron, J. M., Anal. Biochem., 2005, 336, 289.
- [29] Zhu, L. D., Li, Y. X., Tian, F. M., Xu, B., Zhu, G. Y., Sensors and Actuators B-Chemical, 2002, 84, 265.
- [30] Li, C. X., Zeng, Y. L., Tang, C. R., Chinese Chemical Letters, 2005, 16, 1357.
- [31] Sestakova, I., Mader, P., Cellular and Molecular Biology, 2000, 46, 257.
- [32] Sestakova, I., Navratil, T., Bioinorg. Chem. Appl., 2005, 3, 43.
- [33] Albertus, F., Llerena, A., Alpizar, J., Cerda, V., Luque, M., Rios, A., Valcarcel, M., Anal. Chim. Acta, 1997, 355, 23.
- [34] Navarro-Laboulais, J., Trijueque, J., Garcia-Jareno, J. J., Benito, D., Vicente, F., J. Electroanal. Chem., 1998, 444, 173.
- [35] Navarrolaboulais, J., Trijueque, J., Vicente, F., Scholl, H., J. Electroanal. Chem., 1994, 379, 159.
- [36] Sebkova, S., Chem. Listy, 2006, 100, 449.

- [37] Beaunier, L., Keddam, M., Garcia-Jareno, J. J., Vicente, F., Navarro-Laboulais, J., J. Electroanal. Chem., 2004, 566, 159.
- [38] Salazar-Banda, G. R., Suffredini, H. B., Calegaro, M. L., Tanimoto, S. T., Avaca, L. A., J. Power Sources, 2006, 162, 9.
- [39] Pauliukaite, R., Paquim, A. M. C., Brett, A. M. O., Brett, C. M. A., Electrochim. Acta, 2006, 52, 1.
- [40] Chen, W. C., Wen, T. C., J. Power Sources, 2003, 117, 273.
- [41] Kolb, D. M., Physical and Electrochemical Properties of Metal Monolayers on Metallic Substrates, (eds.: Gerischer, H., C. W. Tobias), 125, Wiley, New York 1977.
- [42] Shen, H., Mark, J. E., Seliskar, C. J., Mark, H. B., Heineman, W. R., J. Solid State Electrochem., 1997, 1, 241.
- [43] Kolb, D. M., Przasnys.M, Gerische.H, J. Electroanal. Chem., 1974, 54, 25.
- [44] Brand, M., Eshkenazi, I., KirovaEisner, E., Anal. Chem., 1997, 69, 4660.
- [45] Kirowa-Eisner, E., Bonfil, Y., Tzur, D., Gileadi, E., J. Electroanal. Chem., 2003, 552, 171.
- [46] Bonfil, Y., Brand, M., Kirowa-Eisner, E., Anal. Chim. Acta, 2002, 464, 99.
- [47] Bonfil, Y., Kirowa-Eisner, E., Anal. Chim. Acta, 2002, 457, 285.
- [48] Navratil, T., Sebkova, S., Kopanica, M., Anal. Bioanal. Chem., 2004, 379, 294.
- [49] Sebkova, S., Navratil, T., Kopanica, M., Anal. Lett., 2003, 36, 2767.
- [50] Sebkova, S., Navratil, T., Kopanica, M., Anal. Lett., 2004, 37, 603.
- [51] Sebkova, S., Chem. Listy, 2003, 97, 201.
- [52] Kirgoz, U. A., Marin, S., Pumera, M., Merkoci, A., Alegret, S., Electroanalysis, 2005, 17, 881.
- [53] Carregalo, S., Merkoci, A., Alegret, S., Microchim. Acta, 2004, 147, 245.
- [54] Navratil, T., Barek, J., Kopanica, M., Central European Journal of Chemistry, 2007, Sent,
- [55] Peckova, K., Ph. D. Thesis (Charles University, Prague) 2001.
- [56] Khoroshilov, A. A., Bulgakova, K. N., Volodin, Y. Y., Russ. J. Appl. Chem., 2000, 73, 1922.
- [57] Serradell, M., Izquierdo, S., Moreno, L., Merkoci, A., Alegret, S., Electroanalysis, 2002, 14, 1281.
- [58] Trojanowicz, M., Szewczynska, M., Wcislo, M., Electroanalysis, 2003, 15, 347.
- [59] Aguilar-Sanchez, R., Ahuatl-Garcia, F., Davila-Jimenez, M. M., Elizalde-Gonzalez, M. P., Guevara-Villa, M. R. G., J. Pharm. Biomed. Anal., 2005, 38, 239.
- [60] Cohen, J. L., Widera, J., Cox, J. A., Electroanalysis, 2002, 14, 231.
- [61] Mendes, R. K., Claro-Neto, S., Cavalheiro, E. T. G., Talanta, 2002, 57, 909.
- [62] Hiroi, T., Inui, A., Jin, J. Y., Takeuchi, T., Microchim. Acta, 2006, 154, 269.
- [63] Zheng, X. W., Qu, Y. J., Zhang, Z. J., Zhang, C. M., Electroanalysis, 2005, 17, 1008.
- [64] Sun, X. H., Yang, X. R., Wang, E. K., Journal of Chromatography A, 2003, 991, 109.
- [65] Tan, S. N., Hua, L., Anal. Chim. Acta, 2001, 450, 263.
- [66] Luque, M., Rios, A., Valcarcel, M., Accreditation and Quality Assurance, 2001, 6, 514.
- [67] Chang, M. L., Chang, C. M., Journal of Food and Drug Analysis, 2001, 9, 199.
- [68] Chang, M. L., Chang, C. M., Journal of Food and Drug Analysis, 2005, 13, 205.

- [69] Saurina, J., Hernandez-Cassou, S., Fabregas, E., Alegret, S., Analyst, 1999, 124, 733.
- [70] Blanco-Lopez, M. C., Fernandez-Llano, L., Lobo-Castanon, M. J., Miranda-Ordieres, A. J., Tunon-Blanco, P., Analytical Letters, 2004, 37, 915.
- [71] Saurina, J., Hernandez-Cassou, S., Fabregas, E., Alegret, S., Anal. Chim. Acta, 2000, 405, 153.
- [72] Aguilar, R., Davila, M. M., Elizalde, M. P., Mattusch, J., Wennrich, R., Electrochim. Acta, 2004, 49, 851.
- [73] Davila, M. M., Elizalde, M. P., Mattusch, J., Wennrich, R., Electrochimica Acta, 2001, 46, 3189.
- [74] Salimi, A., MamKhezri, H., Hallaj, R., Talanta, 2006, 70, 823.
- [75] Mendes, R. K., Cervini, P., Cavalheiro, E. T. G., Talanta, 2006, 68, 708.
- [76] Salimi, A., Roushani, M., Haghighi, B., Soltanian, S., Biosensors & Bioelectronics, 2006, 22, 220.
- [77] de Toledo, R. A., Santos, M. C., Cavalheiro, E. T. G., Mazo, L. H., Anal. Bioanal. Chem., 2005, 381, 1161.
- [78] de Toledo, R. A., Santos, M. C., Honorio, K. M., da Silva, A. B. F., Cavalheiro, E. T. G., Mazo, L. H., Anal. Lett., 2006, 39, 507.

5. SENZORY NA BÁZI AMALGÁMŮ

Ing. Bogdan Yosypchuk, Ph.D.

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

5.1 Úvod

Mezi elektrochemické senzory patří různé varianty kapalných rtuťových elektrod, elektrod z tuhých a pastových materiálů, používaných ve voltametrických, potenciometrických, coulometrických i vodivostních detekčních metodách. I když samotná pracovní elektroda (WE, working electrode) neumožňuje získat potřebnou informaci (potřebujeme ještě aspoň referentní elektrodu), právě její vlastnosti se mění se změnou chemického složení analyzovaného roztoku. Protože referentní elektroda (popřípadě i pomocná elektroda) by neměly zásadně ovlivňovat signál WE, bude v tomto textu za senzor považována pracovní elektroda.

Před několika lety byly jako alternativní materiál pro výrobu elektrod nabídnuty pevné amalgámy [1–3] získávané amalgamací jemného prášku příslušného kovu (MeSAE – metal solid amalgam electrode; kde Me je Ag, Au, Ir, Cu, Bi, Cd aj.). Tyto amálgamy představují čistší obdobu zubních amalgámů, 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 jen o málo menší rozsah pracovních potenciálů než klasická visící rtuťová kapková elektroda (HMDE, hanging mercury drop electrode), a proto umožňují většinu měření proveditelných jen na rtuťových WE. Příprava WE z pevných amalgámů, popis jejich aplikací, elektrochemické vlastnosti a možné praktické využití těchto elektrod jsou detailně popsány v skriptech PACI [4]. Podle stavu povrchu lze MeSAE rozdělit na následující typy:

- leštěná: pevná amalgámová 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 amalgámu a kapalného oleje (MeSA-PE);
- **kompozitní**: WE na bázi jemného prášku pevného amalgámu a tuhého polymeru (MeSA-CE).

V závislosti na poměru rtuť : kov může být amalgám kapalný, nebo pevný. Kapalný amalgám se používá pro zaplnění kapající elektrody nebo elektrody se stacionární kapkou a z pevného amalgámu se dají připravit zmíněné pevné elektrody. Existuje také poměrně úzký rozsah obsahu kovu ve rtuti, při kterém tato směs má dlouhodobě konzistenci pasty. V této kapitole bude větší důraz kladen na výsledky testování senzorů ze stříbrného pastového amalgámu (AgA-PE, silver amalgam paste electrode). Takový senzor (elektroda) by mohl spojit přednosti kovových a pastových elektrod a nebyl popsán v předchozích skriptech [4].

5.2 Příprava pracovních elektrod z pastového amalgámu

Směs obsahující rtuť a 10 až 15 % jemného stříbrného prášku byla důkladně mixována v zařízení pro přípravu dentálních amalgámů Dentomat compact (Degussa, Brazil). Takto získaným pastovým amalgámem byla naplněna elektroda, která se používá jako klasická pastová elektroda s uhlíkovou pastou (Universita Pardubice, ČR, [5]). Před použitím se z elektrody vytlačí zhruba 1 mm

pasty, odstraní se, znovu se vytlačí trochu pasty a povrch se zarovná na skleněné destičce. Povrch AgA-PE by měl být rovný, lesklý a měl by se podobat rtuťové filmové elektrodě. Na obr. 5.1 je elektroda ze stříbrného pastového amalgámu (A) a také zvětšený obraz její pracovní časti (B).



Obr. 5.1: Pracovní elektroda z pastového amalgámu (A) a zvětšený obraz aktivní plochy elektrody (B; průměr disku pastového amalgámu je 2,0 mm)

5.3 Senzory z pastových amalgámů

Pastové stříbrné amalgámy s obsahem Ag 15 – 18 % tuhnou relativně rychle (1 – 2 dny) a jsou pro pastové elektrody prakticky nepoužitelné. Je-li naopak obsah stříbra menší než 10 %, amalgám je spíše kapalný než pastový (netvaruje se, tvoří se meniskus). Podle výsledků našich experimentů je optimální podíl Ag v pastě 10 – 12 %. Pro reprodukovatelnost povrchu elektrody a výsledků měření je důležité, aby povrch WE byl lesklý jako u rtuťové filmové elektrody. Při obsahu stříbra od 13 do 15 % je obtížné získat lesklý povrch WE již za 7 – 10 dnů po přípravě pasty a reprodukovatelnost měření se skokově zhoršuje. Se správně připravenou elektrodou lze ale pracovat i několik dnů bez výměny jejího aktivního povrchu (regenerace WE se tradičně provádí elektrochemickou cestou před každým měřením).

Tabulka 5.1 obsahuje rozsahy pracovních potenciálů AgA-PE v některých základních elektrolytech. Celkově se tato elektroda podobá meniskové a filmové variantě AgSAE, ale absolutní hodnoty proudů na ní registrované jsou podstatně vyšší, což je důsledkem mnohém větší plochy. Přepětí vodíku na této pastové elektrodě zůstává velké, a proto je možné použít AgA-PE pro měření látek, které se redukují v oblasti vysokých negativních potenciálů.

Studium vlastností AgA-PE se provádělo na látkách, které se často používají pro testování nových typů elektrod (KIO₃, *p*-nitrofenol, askorbová kyselina aj.). Na obr. 5.2A je uvedená koncentrační závislost KIO₃ v 0,1M-NaOH. Každá koncentrační hladina je představena dvěma křivkami, které jsou téměř totožné. O dobré reprodukovatelnosti měření jodičnanů svědčí i statistické údaje tab. 5.2. Srovnání polohy píků *p*-nitrofenolu na různých WE (viz obr. 5.2B) potvrzuje, že elektroda z pastového amalgámu se více podobá meniskové AgSAE (téměř stejné potenciály píků). I když absolutní hodnoty proudů jsou na AgA-PE řádově větší než na MeSAE o průměru 0,4 – 0,7 mm, jsou meze detekce na m-AgSAE nižší díky příznivějšímu poměru signál : šum.

Tab. 5.1: Rozsah pracovních potenciálů elektrody z pastového stříbrného amalgámu (ve V)
 Experimentální výsledky získané metodou DCV a DPV; hodnoty potenciálů odpovídají proudům 5 a 20 μA v různých základních elektrolytech; referentní elektroda SCE; rychlost scanu 20 mV s⁻¹; kyslík byl z roztoku odstraněn probubláním dusíkem

AgA-PE (průměr disku 2,0 mm; Hg:Ag = 88:12 %)						
Základní elektrolyt	Proud	DCV	DPV			
0,1M-HClO ₄	5 μΑ	+0,292 až -1,128	+0,268 až -1,109			
	20 µA	+0,475 až -1,242	+0,388 až -1,208			
0,1M-HCl	5 μΑ	+0,125 až -1,131	+0,049 až -1,107			
	20 µA	+0,146 až -1,239	+0,085 až -1,200			
0,2M acetátový pufr, pH 4,8	5 μΑ	+0,310 až -1,314	-0,030 až -1,577			
	20 µA	+0,356 až -1,473	+0,276 až -1,685			
0,05M-Na ₂ EDTA;	5 μΑ	+0,114 až -1,311	-0,093 až -1,465			
0,2M acetátový pufr; pH 4,8	20 µA	+0,150 až -1,464	+0,105 až -1,546			
0,1M-NaClO ₄	5 μΑ	+0,299 až -1,517	+0,316 až -1,822			
	20 µA	+0,494 až -1,890	+0,424 až -1,879			
0,05M-Na ₂ B ₄ O ₇ , pH 9,3	5 μΑ	+0,167 až -1,590	+0,101 až -1,818			
	20 µA	+0,209 až -1,898	+0,122 až -1,872			
0,1M-NaOH	5 μΑ	-0,025 až -1,484	-0,090 až -1,804			
	20 µA	+0,008 až -1,829	–0,069 až –1,855			



Obr. 5.2: Voltametrické záznamy získané na různých amalgámových elektrodách

A: redukce IO_3^- na AgA-PE v 0,1M-NaOH; DPV, koncentrační závislost v rozmezí 0,1 až 9,91 mg I^{-1} , $i_p = -730,58 c + 73,61$, R = 0,999 9; rychlost scanu $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$; B: redukce *p*-nitrofenolu na AgA-PE v 0,1M octanovém pufru o pH 4,8; DPV, koncentrační závislost v rozmezí 5,0 · 10⁻⁶ – 1,1 · 10⁻⁴ mol I^{-1} , $i_p = -91,30 c + 22,56$, R = 0,999 9; srovnání odezvy 1,1 · 10⁻⁴ mo $I^{-1} p$ -nitrofenolu na různých elektrodách: 1 – AgA-PE o průměru disku 2,0 mm; 2 – m-AgSAE, \emptyset 0,54 mm; 3 – p-AgSAE, \emptyset 0,52 mm; 4 – m-AuSAE, \emptyset 0,40 mm; 5 – m-BiAgSAE, \emptyset 0,70 mm; 6 – HMDE, plocha kapky 1,01 mm²; $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$ Testovaná pastová elektroda se ukázala vhodná i pro měření oxidačních procesů. Koncentrační závislost askorbové kyseliny byla změřena v rozsahu $1 \cdot 10^{-5} - 9.9 \cdot 10^{-4}$ mol l⁻¹ a byla lineární (R = 0.999 9; $i_p = 576.65 c - 5.90$ [nA]). V tab. 5.2 jsou uvedeny některé parametry, vypočítané z paralelních měření kyseliny askorbové na různých pracovních elektrodách. Jak je vidět z tab. 5.2, opakovatelnost paralelních měření je na AgA-PE vždy horší, než na m-AgSAE, ale lepší (s výjimkou měření jodičnanů), než na p-AgSAE. Podle naší zkušenosti, hlavní příčinou horší reprodukovatelnosti p-AgSAE je její pevný povrch, který se elektrochemický obnovuje hůře, než kapalný povrch m-AgSAE a prakticky kapalný povrch AgA-PE.

Tab. 5.2: Statistické zpracování opakovaných měření různých analytů na různých WE

DPV bez akumulace; N = 11. Koncentrace analytů: 1,00 mg l⁻¹ KIO₃ (pro p-AgSAE 2,00 mg l⁻¹); 1,39 mg·l⁻¹ p-nitrofenolu, 8,80 mg l⁻¹ askorbové kyseliny (pro p-AgSAE 17,6 mg l⁻¹). Všechna měření pro každou látku byla provedena na stejném povrchu; WE se před každým měřením přibližně 30 s elektrochemicky regenerovaly.

			Průměrná	Interval	Relativní	Mez detekce
Analyt	Základní	Pracovní	výška píku,	spolehlivosti,	směrodatná	(3 SD),
	elektrolyt	elektroda	nA	nA	odchylka,	$mg l^{-1}$
				$\alpha = (0,05)$	%	
IO ₃ ⁻	0,1M-NaOH	AgA-PE	-682,0	5,04	1,11	0,033
		m-AgSAE	-46,14	0,18	0,58	0,017
		p-AgSAE	-27,45	0,17	0,93	0,558
<i>p</i> -nitrofenol	0,1M octa-	AgA-PE	-81,88	0,39	0,72	0,030
	nový pufr,	m-AgSAE	-8,45	0,02	0,42	0,017
	pH 4,8	p-AgSAE	-5,47	0,10	2,76	0,229
askorbová	0,1M octa-	AgA-PE	235,0	3,57	2,29	0,60
kyselina	nový pufr,	m-AgSAE	26,16	0,18	1,03	0,26
	pH 4,8	p-AgSAE	19,66	0,37	2,86	0,76

Neočekávaně složitější situace nastává na elektrodě z pastového amalgámu při použití anodické rozpouštěcí voltametrie (ASV, anodic stripping voltammetry) v analýze kovových kationtů. Při scanu ve směru do negativnějších potenciálů se pozoruje redukce kovových kationtů, ale po provedení akumulace se během zpětného scanu ne vždy registrují oxidační procesy. Celkem bezproblémové současné ASV stanovení Cu(II), Pb(II), Cd(II) a Zn(II) na m-AgSAE je na AgSA-PE doprovázeno posuvem potenciálů píků rozpouštění a také vznikem píků nových. Příčinou může být tvoření intermetalických sloučenin, které ovlivňují oxidaci nahromaděných kovů. Citlivost a reprodukovatelnost těchto měření je podstatně horší než na m-AgSAE a zatím nebyly zjištěny dostatečně relevantní důvody, proč by pro ASV kationtů měla elektroda z pastového amalgámu nahradit HMDE nebo m-AgSAE.

Testování elektrod na základě pastových amalgámů pokračuje a je teď především zaměřeno na zajištění dostačující reprodukovatelnosti odezvy AgA-PE při obnovení jejího povrchu a na možnosti použití AgA-PE v různých variantách rozpouštěcí voltametrie.

5.4 Závěr

Amalgámy, pevné i pastové, se ukázaly velice vhodným materiálem pro přípravu nejrůznějších typů elektrochemických senzorů (elektrod). Vysoké přepětí vodíku na amalgámech dovoluje provádět měření většinou možná jen na rtuťových elektrodách. Různé modifikace povrchu (leštěné,

filmové, meniskové, kompozitní, pastové) a složení (amalgámy stříbrné, zlaté, měděné, bismutové aj.) rozšiřují použitelnost elektrochemických metod a často přinášejí i možností buď nové, nebo dokonce neproveditelné na jiných elektrodách. Senzory na bázi netoxických amalgámů mohou být aplikovány tam, kde je práce s kapalnou rtuti zakázaná nebo nežádoucí.

Literatura

Přehled literatury uvádí všechny nám známé publikace v odborných časopisech, týkající se senzorů (elektrod) na základě pevných amalgamů. Pro lepší orientaci čtenáře jsou v citacích uvedeny i plné názvy článků.

- 1. Novotný L., Yosypchuk B.: Pevné stříbrné amalgamové elektrody. Chem. Listy 2000, 94, 1118.
- Yosypchuk B., Novotný L.: Nontoxic Electrodes of Solid Amalgams. Crit. Rev. Anal. Chem. 2002, 32(2), 141.
- 3. Yosypchuk B., Novotný L.: Electrodes of non-toxic solid amalgams for electrochemical measurements. Electroanalysis 2002, 14, 1733.
- 4. Yosypchuk B., Pevné amalgámové elektrody a jejich využití v analýze biologicky aktivních sloučenin. Skripta ke kursu: Možnosti inovací v elektroanalytické chemii.Pražské analytické centrum inovací (Prague Centre for Innovations in Analytical Chemistry), (Barek J., Ed.), , str. 15 – 30. VŠCT, Praha 2006
- 5. Švancara I., Elektroanalýza s uhlíkovými pastovými elektrodami. Skripúta ke kursu: Možnosti inovací v elektroanalytické chemi. Pražské analytické centrum inovací (Prague Centre for Innovations in Analytical Chemistry), (Barek J., Ed,). str. 49 58.), VŠCHT, Praha 2006
- 6. Yosypchuk B., Novotný L.: Cathodic stripping voltammetry of cysteine using silver and copper solid amalgam electrodes. Talanta 2002, 56, 971.
- 7. Yosypchuk B., Novotný L.: Determination of Iodates Using Silver Solid Amalgam Electrodes. Electroanalysis 2002, 14, 1138.
- 8. Jelen F., Yosypchuk B., Kouřilová A., Novotný L. and Paleček E.: *Label-free determination of picogram quantities of DNA by stripping voltammetry with solid copper amalgam or mercury electrodes in the presence of copper*. Anal. Chem. 2002, 74, 4788.
- 9. Yosypchuk B., Novotný L.: Voltametrické stanovení Cu, Pb, Cd, Zn a Tl pomocí stříbrné pevné amalgámové elektrody. Chem. Listy 2002, 96, 756.
- 10. Yosypchuk B., Heyrovský M., Palecek E., Novotný L.: Use of solid amalgam electrodes in nucleic acid analysis. Electroanalysis 2002, 14, 1488.
- 11. Yosypchuk B., Novotný L.: Uspořádání kombinovaného voltametricko-potenciometrického senzoru s můstkem ze stříbrné pevné amalgámy. Chem. Listy 2002, 96, 886.
- 12. Yosypchuk B., Novotný L.: Combined voltammetric-potentiometric sensor with silver solid amalgam link for electroanalytical measurements. Electroanalysis 2002, 14, 1739.
- 13. Kizek R., Havran L., Kubičarová T., Yosypchuk B., Heyrovský M.: Voltammetry of two single-stranded isomeric end-labeled –SH deoxyoligonucleotides on mercury electrodes. Talanta 2002, 56, 915.
- 14. Yosypchuk B., Novotný L.: Copper solid amalgam electrodes. Electroanalysis 2003, 15, 121.
- 15. Yosypchuk B., Šestáková I., Novotný L.: Voltammetric determination of phytochelatins using copper solid amalgam electrode. Talanta 2003, 59, 1253.
- Yosypchuk B., Novotný L.: Merkurosulfátová referentní elektroda na základě stříbrné pevné amalgamy. Chem. Listy 2003, 97, 1083.
- Barek J., Dodova E., Navrátil T., Yosypchuk B., Novotný L., Zima J.: Voltammetric Determination of N,N-Dimethyl-4-Amino-2'-Carboxyazobenzene at a Silver Solid Amalgam Electrode. Electroanalysis 2003, 15, 1778.
- Yosypchuk B., Novotný L.: *Reference electrodes based on solid amalgams*. Electroanalysis, 2004, 16, 238.

- Fadrná R., Yosypchuk B., Fojta M., Navrátil T., Novotný L.: Voltammetric determination of adenine, guanine, and DNA using liquid mercury free polished silver solid amalgam electrode. Anal. Let., 2004, 37, 383.
- 20. Kuchaříková K., Novotný L., Yosypchuk B., Fojta M.: *Detecting DNA Damage with a Silver Solid Amalgam Electrode*. Electroanalysis, 2004, 16, 410.
- 21. Hasoň S., Simonaho S.-P., Silvennoinen R., Vetterl V.: Detection of phase transients in two-dimensional adlayers of adenosine at the solid amalgam electrode surfaces. J. Electroanal. Chem. 2004, 568, 65.
- 22. Fadrná R., Cahová-Kuchaříková K., Havran L., Yosypchuk B., Fojta M.: Use of Polished and Mercury Film-Modified Silver Solid Amalgam Electrodes in Electrochemical Analysis of DNA. Electroanalysis, 2005, 17, 452.
- 23. Ostatná V., Jelen F., Hianik T., Palecek E.: *Electrochemical Responses of Thiolated Oligodeoxynucleotides in Cobalt-Containing Solutions*. Electroanalysis 2005, 17, 1413.
- 24. Fadrná R.: Polished Silver Solid Amalgam Electrode: Further Characterization and Applications in Voltammetric Measurements. Anal. Let. 2005, 37, 3251.
- 25. De Souza D., de Toledo R.A., Mazo L.H., Machado S.A.S.: Utilization of a Copper Solid Amalgam Electrode for the Analytical Determination of Atrazine. Electroanalysis 2005, 17, 2090.
- 26. De Souza D., de Toledo R.A., Suffredini H.B., Mazo L.H., Machado S.A.S.: *Characterization and Use of Copper Solid Amalgam Electrode for Electroanalytical Determination of Triazines-Based Herbicides*. Electroanalysis 2006, 18, 605.
- 27. Fischer J., Barek J., Yosypchuk B., Navrátil T.: Voltammetric Determination of Trace Amounts of 2-Methyl-4,6-dinitrophenol at a Silver Solid Amalgam Electrode. Electroanalysis, 2006, 18, 127.
- Yosypchuk B., Fojta M., Havran L., Heyrovský M., Paleček E.: Voltammetric Behavior of Osmiumlabeled DNA at Mercury Meniscus-modified Solid Amalgam Electrodes. Detecting DNA Hybridization. Electroanalysis, 2006, 18, 186.
- 29. Barek J. Fischer J., Navratil T., Peckova K., Yosypchuk B.: Silver Solid Amalgam Electrodes as Sensors for Chemical Carcinogens. Sensors, 2006, 6, 445.
- 30. Yosypchuk B., Barek J., Fojta M.: Carbon Powder Based Films on Traditional Solid Electrodes as an Alternative to Disposable Electrodes. Electroanalysis, 2006, 18, 1126.
- Vaňková L., Maixnerová L., Čížek K., Fischer J., Barek J., Navrátil T., Yosypchuk B.: Voltametrické stanovení submikromolárních koncentrací 3-nitrofluoranthenu a pendimethalinu na stříbrné pevné amalgamové elektrodě. Chem. Listy, 2006, 100, 1105.
- 32. Hasoň S., Vetterl V.: Detection of synthetic oligonucleotides by alternating current voltammetry at solid amalgam surfaces. Electrochim. Acta 2006, 51, 5199.
- 33. Čížková P., Navrátil T., Šestáková I., Yosypchuk B.: Verification of Applicability of Solid Amalgam Electrode for Determination of Heavy Metals in Plant Matrices. Electroanalysis, 2007, 19, 161.
- Daňhel A., Pecková K., Čížek K., Barek J., Zíma J., Yosypchuk B., Navrátil T.: Voltametrické stanovení genotoxických dinitronaftalenů pomocí rtuťovým meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrody. Chem. Listy, 2007, 101, 144.
- 35. De Souza D., de Toledo R.A., Galli A., Salazar-Banda G.R., Silva M.R.C., at al.: *Determination of triazine herbicides: development of an electroanalytical method utilizing a solid amalgam electrode that minimizes toxic waste residues, and a comparative study between voltammetric and chromatographic techniques.* Anal. Bioanal. Chem. 2007, 387, 2245.
- 36. Šelešovská-Fadrná R., Fojta M., Navrátil T., Chýlková J.: Brdička-type processes of cysteine and cysteine-containing peptides on silver amalgam electrodes. Anal. Chim. Acta 2007, 582, 344.
- Fischer J., Vanourkova L., Danhel A., Vyskocil V., Cizek K., Barek J., Pecková K., Yosypchuk B., Navrátil T.: *Voltammetric Determination of Nitrophenols at a Silver Solid Amalgam Electrode*. Int. J. Electrochem. Sci., 2007, 2, 226.

6. SENZORY NA BÁZI UHLÍKOVÉ PASTY

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

Příští rok tomu bude přesně padesát let, kdy světlo světa spatřila **uhlíková pasta**¹, směs jemně práškovitého uhlíku s vhodným kapalným pojivem, která se s odstupem času zařadila mezi nejoblíbenější, laboratorně zhotovované uhlíkaté materiály používané pro přípravu elektrod a senzorů. Pro českého čtenáře není bez zajímavosti, že objev uhlíkové pasty má úzkou souvislost s kapající rtuťovou elektrodou a Heyrovského polarografií. Původně byla totiž směs grafitového prášku s chemicky inertní a ve vodě nerozpustnou kapalinou testována v podobě tekuté disperze, která by jako **kapající uhlíková elektroda**² (viz obr. 1) mohla sloužit k sledování anodických oxidací organických látek, pro něž jsou rtuťové elektrody ze své podstaty nepoužitelné. Přes vytrvalé úsilí a řadu pokusů se uhlíkové disperze pro tento účel neosvědčily, ale tužší směsi o konzistenci tvárné pasty je nakonec plně zastoupily.

Uplynulá desetiletí existence uhlíkových past v elektrochemických laboratořích charakterizuje řada přelomových událostí, které vedly ke směrování oboru do několika klíčových oblastí, věrně ilustrujících rozvoj elektrochemických měření jako takových. S jistou nadsázkou lze dokonce říci, že málokterý obor dokládá vitalitu elektrochemie tak, jako právě experimentování s uhlíkovými pastovými elektrodami ³.

Dokládají to i dosud publikované přehledové práce, které bilancují jednotlivá období či nejdůležitější oblasti oboru⁴⁻⁹. To platí i o nedávno uveřejněném souhrnu v desetidílné encyklopedii¹⁰, jehož cca 200 stran textu, 50 stran tabulek a více než 1500 citací na téma uhlíkové pasty představuje zatím nejrozsáhlejší práci svého druhu a může být i předzvěstí zrodu samostatné monografie, na niž problematika elektro-chemie s uhlíkovými pastami stále čeká a kterou by si za půlstoletí existence bezesporu zasloužila...



Obr. 6.1: Neúspěšný koncept tzv. kapající uhlíkové elektrody stál u zrodu uhlíkové pasty

6.2 Nejdůležitější pojmy a fakta o elektrodách a senzorech na bázi uhlíkové pasty či příbuzných materiálů

Uhlíkové pasty, jakožto směsi uhlíkového prášku a vhodného pojiva (pastové kapaliny), se vyznačují chováním, které odráží jak typ a kvalitu použitého uhlíku, tak i povahu zvolené kapaliny. Mechanickými, fyzikálně-chemickými a elektrochemickými vlastnostmi uhlíkové pasty vesměs připomínají příbuzné **tuhé elektrodové materiály** z uhlíku a podobných substrátů, ale kvůli přítomnému pojivu mívají elektrody a senzory na bázi uhlíkové pasty jisté specifické rysy či dokonce některé zcela unikátní vlastnosti.

■ Předtím, než budou stručně představeny běžných typy uhlíkových past, jejich složení, příprava a fyzikálně chemické resp. elektrochemické vlastnosti, je nutno ještě uvést na pravou míru vztah "elektroda vs. senzor". Ačkoli tyto termíny neznamenají totéž (senzor je obecnějším výrazem – viz např. cit.¹⁰), v elektrochemii a elektroanalýze s uhlíkovými pastami oba pojmy často splývají, a to jak z pohledu pojmenování jednotlivými autory, tak i vzhledem k samotnému fungování čidel, kdy řada měření využívá i ryze neelektrochemické principy. V tomto duchu tak budou detekční jednotky a systémy z uhlíkových past klasifikovány v dalším textu, přičemž termínu "senzor" bude dávána přednost u všech atypických konstrukcí a uspořádání.

Pro přípravu **dvousložkových** (tzv. **nemodifikovaných**) uhlíkových past se běžně používají komerčně vyráběné **spektrální grafitové prášky**, které vyhovují z pohledu:

- (i) velikosti zrna v řádu µm,
- (ii) uniformní distribuce velikosti částic,
- (iii) vysoké chemické čistoty,
- (iv) snížené absorpční schopnosti.

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 typických vlastností past a tak se její volba řídí řadou kritérií. Postupně se v praxi osvědčila řada látek, především tzv. **parafinové** resp. **minerální oleje** (nejoblíbenějším zástupcem této skupiny je Nujol[®]). Často doporučované jsou i **silikonové oleje a tuky** a uplatnění nacházejí tu a tam i organické estery (např. triarylfosfáty) či halogenované uhlovodíky (1-brom-naftalen). Typické parametry kapalných pojiv pro přípravu uhlíkových past pak jsou:

- (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 obvykle vychází z předchozích zkušeností ¹¹; **optimální poměr** bývá v rozmezí **0,4-0,5 ml pojiva + 0,8-1,0 g uhlíkového prášku**. Grafitový prášek lze velmi dobře smísit s kapalným pojivem v obyčejné porcelánové třecí misce, přičemž homogenizace pasty se provádí v několika etapách, kdy se pozvolna vznikající hmota postupně seškrabuje ze stěn misky na dno, kde lze lépe využít energického tlaku tloučku. Pasta je pak hotova v několika minutách a lze ji hned použít k přípravě daného čidla.
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**) resp. **senzor** a může zahrnovat různé konstrukční varianty:

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

(ii) elektrodová pouzdra s otočným pístem (viz obr. 6.2),

(iii) uhlíkové pastové mikroelektrody či soubory ultramikroelektrod,

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

(v) speciální konstrukce uhlíkových pastových senzorů, jako jsou např. čidla s planární konfigurací, které mohou konkurovat dnes velmi rozšířeným tištěným elektrodám či integrovaným elektrodovým celám.



Obr. 6.2: Pouzdra pro uhlíkovou pastu pístového typu: sestava a příslušenství

Vlevo: plnící nástroje; uprostřed: rozložené a sestavené pouzdro; vpravo: vyměnitelné koncovky o různém průměru pracovního otvoru)

[z archívu autora]

V předchozím výkladu byla pozornost zaměřena na uhlíkové pasty, jako na zvláštní elektrodový materiál s vícesložkovým charakterem a tomu odpovídajícími mechanickými vlastnostmi. Nehomogenní povaha se promítá i do dalších vlastností, které se u každého čidla z uhlíkové pasty projevují trochu jinak, a to nejen v závislosti na typu použité pasty a zvoleném konstrukčním řešení pouzdra, ale i na způsobu, jakým jsou prováděna vlastní měření. Všechny tyto aspekty jsou pak předmětem heslovitého výkladu v následujícím odstavci.

Fyzikálně-chemické a elektrochemické charakteristiky uhlíkových pastových elektrod

Vlastnosti, jimiž se uhlíkové pastové elektrody nejvíce odlišují od jiných elektrochemických čidel, ať už jde o tuhé elektrody z uhlíku či drahých kovů, varianty rtuťové kapky či různé další senzory, byly již diskutovány v učebním textu *PACI* (cit.¹²) nebo do detailů popsány ve výše zmíněných referátech ⁴⁻¹⁰. Pro potřeby tohoto textu postačí alespoň jejich vyjmenování:

- specifická struktura povahy "tuhé" disperze grafitových částicích v použitém pojivu,
- velmi nízký ohmický odpor (běžné směsi s kapalinami typu olejů mívají odpor cca 10 Ω),
- labilita past v organických rozpouštědlech vlivem mísitelnosti pojiva s rozpouštědlem,
- stárnutí uhlíkových past jako důsledek pozvolného vysychání pojiva,

• **hydrofobní povaha uhlíkové pasty** související s přítomností pojiva lipofilní povahy a projevující se jako tzv. zpomalená reakční kinetika na povrchu uhlíkových past.

Interakce na povrchu a uvnitř uhlíkové pasty

Mezi možné pochody a mechanismy, kterých lze využít při měřeních s uhlíkovými pastami, patří **faradické i nefaradické procesy**:

- elektrolytické děje spojené s výměnou elektronů, tj. oxidace a redukce,
- adsorpce na povrchu uhlíkových past,
- extrakce (penetrace) do nitra uhlíkových past,
- tvorba iontových párů a jejich selektivní zachycování na uhlíkové pastě,
- **další specifické děje** (např. elektrokatalýza) na modifikovaných elektrodách.

6.3 Elektrochemické a elektroanalytické aplikace čidel z uhlíkové pasty

Předchozí výčet specifických vlastností, různorodost využívaných pochodů a jejich možné kombinace dávají tušit, že praktické aplikace čidel z uhlíkových past mohou být velmi rozmanité, což stávající databáze metod jasně dokládá ¹⁰. Dosavadní výstupy oboru lze představit formou souhrnných přehledů a tabulek ¹², ale základní orientaci v možnostech aplikované elektrochemie s uhlíkovými pastami dovolí i výběr konkrétních příkladů, ilustrujících měření a postupy založené na různých principech. Právě takový přístup byl zvolen zde, přičemž jednotlivé ukázky vycházejí z experimentální práce autora a jeho nejbližších spolupracovníků.

Příklad 1: Vývoj a testování uhlíkových past pro elektrochemická měření v roztocích s organickými rozpouštědly

Nespornou nevýhodou běžných druhů uhlíkových past je jejich **malá stabilita v organických rozpouštědlech**. Zejména to platí pro nejrozšířenější směsi na bázi parafinových olejů, jako je Nujol, kdy lze dokonce říci, že příslušné elektrody a senzory jsou v prostředí organických rozpouštědel nepoužitelné ¹⁰. Týká se to rovněž směsných roztoků typu voda/methanol, které bývají voleny jako média, v nichž se do roztoku převádějí ve vodě nerozpustné organické látky. A uhlíkové pasty na bázi Nujolu jsou atakovány methanolem a podobnými rozpouštědly také v případech, kdy směsná média obsahují i velmi nízký podíl nevodné složky, např. 5-10 % (v/v). Tato skutečnost prakticky vylučuje použití parafinových uhlíkových past jako elektrodového materiálu v detektorech pro průtoková měření či ve spojení s HPLC, kde jsou uvedená média běžně používána jako mobilní fáze.

Této slabiny tradičních nujolových past si byla dobře vědoma i autorova skupina, a proto již v období prvních důkladnějších charakterizací uhlíkových past byla věnována značná pozornost alternativním směsím na bázi vysoce viskózních silikonových olejů ¹³. Ty se nakonec ukázaly mnohem odolnější vůči běžně používaným rozpouštědlům, jako MeOH, ACN, DMFA či DMSO, kdy bylo možno provádět elektrochemická měření v roztocích s obsahem až 50 % uvedených polárních rozpouštědel. (Kontakt s nepolárními a inertními rozpouštědly typu CCl₄, hexanu nebo acetonu vede k rychlému rozkladu jakékoli pasty, což je pochopitelné vzhledem k jejich blízké povaze, a tím i mísitelnosti s pojivy ze skupiny parafinových a silikonových olejů.) **Odolnost uhlíkové pasty** ze silikonového oleje vůči methanolu dokládá i voltamogram na Obr. 6.3, znázorňující velmi zajímavou oxidaci *m*-nitrofenothiazinu, C_6H_4 –NH(S)– C_6H_3 –NO₂, získaného šetrnou nitrací ve směsi 5 % KNO₂ + CH₃COOH, přičemž studovaná látka byla přítomna – a plně rozpuštěna – v roztoku 2M-H₂SO₄ + 30 % MeOH. Oxidace je pětistupňová (píky I až V), v intervalu pouhých 500 mV. Tento experiment byl součástí rozsáhlejšího studia elektrodového chování fenothiazinových derivátů, používaných jako chemoterapeutika při léčení těžkých psychóz ¹³.



<u>Obr. 6.3</u>: Anodická oxidace nitrovaného fenothiazinu v prostředí 30 % methanolu na uhlíkové pastě na bázi vysoce viskózního silikonového oleje z řady Lukoil[®]

Záznam v režimu DPV; ----- základní linie elektrolytu; ---- $c(n-fen) = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol } 1^{-1}$ [z archívu autora]

Zvýšení rezistence uhlíkových past v médiích s vyšším obsahem methanolu se v posledním období soustavně věnují i kolegové z pražské UNESCO laboratoře elektrochemie životního prostředí ¹⁴. Odlišným přístupem, kdy se rozkladu pastové směsi účinně brání volbou speciálního uhlíku na bázi skelného grafitu, dosáhli pozoruhodných výsledků a pasty tohoto typu již úspěšně odzkoušeli v roztocích s obsahem až 90 % MeOH.

Ačkoli mechanismus stabilizace skelným grafitem s kulovitými částicemi a specificky upraveným povrchem není dosud zcela objasněn¹⁰, je nepochybné, že podobné experimenty mohou rozšířit využití uhlíkových past v organické elektrochemii, kde je většina látek málo rozpustných či zcela nerozpustných ve vodných roztocích, které jinak v elektrochemii stále převažují.

<u>Příklad 2</u>: Využití neelektrolytického nakoncetrování pro vysoce selektivní stanovení jodidu ve vzorcích se složitější matricí

Jak již bylo několikrát zdůrazněno, uhlíkové pasty bývají připravovány z pojiv, které jsou za běžných podmínek chemicky a elektrochemicky indiferentní. To však neplatí o zvláštní skupině pastových směsí, kde jako kapaliny vystupují organické estery. U těchto past, které poprvé prostudovala a navrhla naše elektroanalytická skupina ¹⁵ se v roli atypického pojiva nejlépe osvědčil **trikresylfosfát**, $(C_7H_7-O_3P=O, známý i jako plastifikátor membrán či reagens užívané pro modifikace$ kapilárních chromatografických kolon k separacím na principu iontové výměny. Právě tohoto mechanismu využívají i měření s trikresylfosfátovými pastami, které již ve slabě kyselých roztocích vytvářejí aktivní povrchovou vrstvu s protonovanými molekulami pojiva, jež jsou pak schopny párování s některými objemnějšími protiionty, např. **jodidy**. Je-li takový anion elektroaktivní, což platí i o částici **I**⁻ resp. **I**₃⁻, lze celého postupu využít k analytickým účelům ¹⁶:

$(\mathbf{C}_{7}\mathbf{H}_{7}\mathbf{-}\mathbf{O}\mathbf{-})_{3}\mathbf{P}=\mathbf{O}+\mathbf{H}^{+}\longrightarrow [(\mathbf{C}_{7}\mathbf{H}_{7}\mathbf{-}\mathbf{O}\mathbf{-})_{3}\mathbf{P}=\mathbf{O}\mathbf{H}]^{+}$	protonizace trikresylfosfátu	(I)
$[(C_7H_7-O_{-})_3P=OH]^+ + I^- \longrightarrow \{[(C_7H_7-O_{-})_3P=OH]^+, I^-\}$	tvorba iontového páru	(IIa)
$2 \{ [(C_7H_7-O_{-})_3P=OH]^+, I^- \} \longrightarrow 2 [(C_7H_7-O_{-})_3P=OH]^+ + I_2 + 2 e^-$	oxidace aniontu na elektrodě	(IIb)
$I_2 + 2 e^- \longrightarrow 2 I^-$	elektrochemická detekce prostřed tvím opětovné redukce jodu zach ho v elektrodovém materiálu	nic- ycené- (IIc)

Ke schématu (**IIa-c**) je nutno dodat, že **tvorba iontových párů** probíhá i bez aplikace potenciálu na pracovní elektrodě, a tím splňuje podmínku neelektrolytické povahy nakoncentrování. V tomto případě je však akumulace prováděna při pozitivních potenciálech, aby bylo možno zoxidovat jodid na jod (dle **IIb**). Celý mechanismus je dále charakteristický tím, že hlavní pochod – tj. iontové párování – doprovází i **extrakce (penetrace)** do nitra uhlíkové pasty, přičemž tohoto děje se mohou účastnit jak neutrální iontové páry, tak na elektrodě vznikající elementární jod.

V každém případě prolínání obou procesů vede k dalšímu zvýšení selektivity nahromadění, jež je u metod na principu iontového párování už tak značně selektivní. A protože elektrochemická detekce vzniklého jodidu (**IIc**) patří k poměrně citlivým, je výsledkem fakt, že se příslušná metoda pyšní nevšedními elektroanalytickými parametry. Mimořádná je především její selektivita k ostatním halogenidům a pseudohalogenidům a např. pro stanovení jodidů vedle chloridů ji lze vyjádřit poměrem **I**⁻ : **CI**⁻ = **1** : **2 000 000** (cit. ¹⁶), což je hodnota, které zdaleka nedosahují ani komerčně vyráběné jodidové iontově-selektivní elektrody.

Selektivitu navržené metody, která se již osvědčila ke stanovení jodu v kuchyňských solích, buďto přímo jodidovaných ¹⁷, nebo s přídavkem jodičnanu ¹⁶, KIO₃, který je však nutno předem chemicky zredukovat, lze ještě umocnit kombinací se specifickou detekcí v režimu rozpouštěcí analýzy s konstantním proudem (CCSA) ^{17,18}.



Obr. 6.4: Detekce jodu v lidské moči rozpouštěcí potenciometrií s uhlíkovou pastou na bázi trikresyl fosfátu

Záznamy v režimu CCSA; dole vzorek moči zředěný nosným elektrolytem; uprostřed $c(\Gamma) = 0.5$ ppm; nahoře $c(\Gamma) = 5$ ppm [z archívu autora] Potom je možné celý postup aplikovat na stanovení jodu i ve vzorcích s extrémně složitou matricí, jako je lidská moč, aniž by bylo nutno vzorek předem upravovat. To dokládají i záznamy na Obr. 6.4, které byly pořízeny během modelové analýzy vzorku moči obohaceného jodidem. Vlastní provedení je velmi jednoduché, rychlé a vzhledem k použité elektrochemické instrumentaci i ekonomicky nenáročné, což nelze říci o stanoveních technikami neutronové aktivační analýzy (NAA) či iontové chromatografie (IC), které jsou pro analýzy podobně složitých vzorků obvykle doporučovány.

Z pohledu nyní protěžované tzv. **zelené analytické chemie**¹⁹ jsou však postupy s trikresylfosfátovou uhlíkovou pastou jen stěží akceptovatelné, a to z důvodu nesporné zdravotní závadnosti používaného esteru. V některých případech je možné toxický trikresylfosfát zaměnit za běžnou pastovou kapalinou a jeho afinitu k aniontům nahradit **modifikací** *in situ* roztokem kationaktivního tenzidu ze skupiny **kvarterních amoniových solí**, R'R₃N⁺X⁻. Selektivita takto upravených past je sice o poznání nižší, ale postačí např. ke stanovení jodidu ve vzorcích přírodních a minerálních vod ²⁰. Na druhé straně jsou postupy s modifikátory typu R'R₃N⁺ velmi flexibilní a poměrně snadno adaptovatelné ke stanovení dalších anorganických aniontů, jak bylo nedávno ukázáno na stanovení **chromu** ve formě **HCrO**₄⁻ resp. **Cr**₂**O**₇²⁻ (cit. ²¹) nebo trojice těžkých platinových kovů, **osmia, iridia a platiny**, v podobě jejich hexachlorokomplexů **OsCl**₆²⁻, **IrCl**₆³⁻ **a PtCl**₆²⁻ (cit. ²²).

<u>Příklad 3</u>: Soutěž uhlíkových past a tištěných uhlíkových inkoustů při konstruování senzorů pro detekci v průtokových systémech

Odpůrci elektrod a senzorů z uhlíkové pasty často namítají, že chování tohoto elektrodového materiálu je málo čitelné a že prakticky neexistuje dvojice čidel, jejichž vlastnosti by byly zcela totožné. S tím se dá souhlasit, neboť u laboratorně zhotovovaných uhlíkových past je to nedosažitelný požadavek ^{3,11}, i když po získání určité dovednosti lze připravovat pastové směsi velmi podobných vlastností. Nicméně se tento argument postupem času stává hnacím motorem při vývoji a testování **uhlíkových inkoustů**, které svojí povahou a složením jsou mnohdy velmi blízké právě uhlíkovým pastám ^{8,10}, ale lze je ve velkém a ze přesně definovaných podmínek tisknout na keramické či plastové podložky na speciálních strojích, a tak vyrábět za kontrolovaných podmínek senzory, popř. i celé soubory senzorů, s takřka identickými parametry. Oproti pastám je tu ale přeci jen jeden zásadní rozdíl: uhlíkové inkousty se obvykle vytvrzují a použité pojivo přejde do tuhého stavu, čímž se zcela ztrácí cenná funkce původní kapaliny – její extrakční schopnosti. Nespornými přednostmi tištěných elektrod jsou však planární konfigurace a malé rozměry, tzn. parametry žádané při konstrukcích detektorů pro měření v průtoku.

Pokusem vytvořit jakési **hybridní čidlo**, které by mělo geometrii a proporce tištěných senzorů, ale v roli elektrodového materiálu by vystupovala běžná pastová směs s kapalným pojivem, je nedávno navržený **plastový korpus s podélným otvorem** (žlábkem)^{23,24}, který lze snadno naplnit uhlíkovou pastou. Konkrétní podobu celé sestavy znázorňuje Obr. 6.5, k němuž se sluší dodat, že elektrický kontakt pasty s obvodem je tu řešen krokodýlkem, připnutým k mosazné vložce (**2**), která je mechanicky odolnější než měkká pasta. A jelikož vložka těsně přiléhá k náplni, je i u tohoto provizorního řešení výsledný odpor celého kompletu minimální.

Během počátečního testování byl žlábkový senzor používán ve vsádkové konfiguraci, tj. vertikálně vnořen do měřeného, elektromagneticky míchaného roztoku, kdy jeho hladina byla zhruba v polovině délky druhé plastové vložky (**4b**). Z těchto úvodních experimentů pak pochází i Obr. 6.6, na němž jsou srovnávány záznamy z detekce glukosy na dvou různých uhlíkových substrátech s přimíšeným mediátorem a s enzymem, imobilizovaným v membráně z Nafionu[®].



<u>Obr. 6.5</u>: Nový typ senzoru na bázi plastového rovinného těla s náplní uhlíkové pasty: schéma kompletní sestavy

1 – hranolek z PTFE, 40×10×2 mm, s podélným žlábkem 40×3×1 mm, 2 – mosazný kontakt, 3 – uhlíková pasta (náplň), 4a,b – dvojice plastových vložek, kterými se vymezuje aktivní plocha čidla

[z archívu autora]

Příslušné amperogramy dokládají, že žlábkový senzor vyšel ze zkoušky na výtečnou a vykazoval prokazatelně lepší odezvu než obdobné čidlo s téměř stejnou geometrií, ale na bázi vytvrzeného uhlíkového inkoustu. Rovněž stabilita náplně uhlíkové pasty byla shledána vynikající, uvážíme-li, že celý experiment probíhal v intenzivně míchaném roztoku po dobu dvou hodin.



<u>Obr. 6.6</u>: Testování dvou různých biosenzorů na glukózu v režimu hydrodynamické amperometrické detekce

 $\mathsf{A}-\mathsf{substrát}$ na bázi korpusu s náplní uhlíkové pasty; $\mathsf{B}-\mathsf{substrát}$ na bázi tištěného uhlíkového inkoustu

Experimentální podmínky: oba substráty modifikovány 5 % MnO₂; glukosooxidasa v membráně; 0.1M fosfátový pufr (pH 7,5); osm přídavků 3 mM glukosy; doba ustálení 120 min; operační potenciál +0,45 V vs. Ag/AgCl, otáčky při míchání cca 300 rpm

[z archívu autora]

Stabilita a těsnost náplně uhlíkové pasty byly nakonec ověřeny i za podmínek měření v průtoku, kdy byl naplněný korpus zasunut do laboratorně zhotovené detekční cely. Protože ani za extrémních průtoků (> 2 ml s⁻¹) nebyly zjištěny problémy s utěsněním náplně či jejím eventuálním vymýváním tekoucím nosným elektrolytem, lze konstatovat, že jednoduchá konstrukce žlábku s uhlíkovou pastou je jakousi "hozenou rukavicí" tištěným senzorům srovnatelné konfigurace, někdy až nekriticky protěžovaných na úkor starších, ale spolehlivých typů elektrod.

V samotném závěru kapitoly je snad možné prozradit, že se znovu zvažuje konstrukce s odporově vyhřívanou náplní uhlíkové pasty, se kterou by bylo možno ryze fyzikální cestou docílit dalšího zvýšení citlivosti detekce. Je tomu již několik let, co proběhly první předběžné pokusy o výrobu elektricky ohřívaného korpusu, přičemž výsledky byly vcelku slibné ²³.

<u>Příklad 4</u>: Bismutem modifikované uhlíkové pasty jako environmentálně šetrné materiály pro elektrody a senzory nertuťové povahy

V elektrochemických a elektroanalytických měřeních měly rtuťové elektrody dlouhá léta takřka neotřesitelnou pozici ²⁵ a zhruba totéž lze říci i o prakticky zaměřených metodách elektrochemické rozpouštěcí analýzy (ERA) ²⁶. Avšak tento stav se poslední dobou radikálně mění v souvislosti s rostoucí averzí laické veřejnosti vůči rtuti, údajně vysoce toxické. Celá kampaň již nabývá rozměrů jakési **merkurofobie** a nezvratně vede k tomu, že se i elektroanalytici postupně vzdávají oblíbených rtuťových elektrod, senzorů či detektorů a hledají alternativní měřící systémy. Tyto trendy jsou plně v souladu s koncepcí, ze které vychází i již zmíněná **zelená analytická chemie** ¹⁹, akcentující materiály a postupy šetrné k životnímu prostředí. Aniž by chtěl autor tohoto textu nějak komentovat celou situaci, faktem zůstává, že i on, spolu se svými spolupracovníky, se již před lety do takto orientovaného výzkumu aktivně zapojil.

Bylo to v období počátečního testování elektrodových substrátů s povlaky z bismutu ²⁷, kdy se brzy ukázalo, že pro potřeby ERA půjde o jeden z nejúspěšnějších typů nertuťových materiálů. Pojem "**nertuťový** resp. **nertuťová**" není dosud v elektrochemickém názvosloví zcela běžný, ale postupně se začíná prosazovat, jak sílí snahy o náhradu rtuťových kapek a rtuťových filmů alternativními čidly ¹⁹. Českého čtenáře může zaujmout, že tento termín (v angličtině psaný jako "*nonmercury*" popř. "*mercury-free*") byl možná vůbec poprvé použit u nás na začátku osmdesátých let ²⁸, ačkoli zřejmě ve zcela jiném kontextu. Právě spojitost s výše popsaným úsilím naznačuje, že adjektivum "nertuťový" neznamená jakoukoli elektrodu či senzor, které nejsou ze rtuti, ale představuje čidla, jež nahrazují rtuť a rtuťové filmy v některých elektrochemických a elektroanalytických meřeních. Právě **elektrody a senzory na bázi bismutu** ²⁹ jsou momentálně asi nejnázornějším příkladem nertuťových čidel a zároveň i konkrétním důkazem nahraditelnosti rtuti, zejména ve spojení s moderními technikami ERA při stanoveních iontů těžkých kovů.

Také **uhlíkové pasty** představují vhodné substráty pro přípravu bismutových elektrod ^{27,29}, a to nejen pro velmi snadnou obnovu povrchu, ale i proto, že jejich heterogenní podstata a laboratorní způsoby přípravy umožňují získat tři různé varianty bismutem modifikovaných čidel:

- uhlíkové pasty s bismutovým filmem, vyloučeným *in situ*, popř. externě, tzn. předem a ze speciálního pokovovacího média typ <u>BiF-CPE</u> (se dvěma různými způsoby přípravy);
- uhlíkové pasty s přimíšeným pevným oxidem bismutitým, Bi₂O₃ (1-5 %; m/m), který slouží pro vytváření filmu bismutu *in nascenti* typ <u>Bi₂O₃-CPE</u>
- uhlíkové pasty s dispergovaným práškovitým kovovým bismutem (15-20 %); typ <u>Bi-CPE</u>.

Existence hned trojice různých elektrod a senzorů na bázi bismutu jen dokládá mnohostranné využití uhlíkových past a v elektroanalýze s bismutovými elektrodami nemá podobná variabilita obdoby ^{29,30}. Každé z uvedených čidel má své přednosti i nedostatky. Je tu například možnost obměny uhlíkové pasty za kvalitativně odlišný druh či její další modifikace u čidel typu BiF-CPE, zjednodušení analýzy vzorků bez použití pokovovacích roztoků či přídavku iontů Bi³⁺ do roztoku při měřeních s Bi₂O₃-CPE anebo atypické využití Bi-CPE v zásaditých médiích, kde jsou oba typy

s vylučovanými povlaky nepoužitelné v důsledku hydrolýzy bismutitých solí. Z případných nedostatků lze u varianty BiF-CPE uvést sníženou adhezi externě vylučovaných povlaků k hydrofobnímu povrchu uhlíkových past, poněkud zhoršené pozadí při měřeních s Bi₂O₃-CPE a riziko pasivace částeček kovového bismutu u typu Bi-CPE. Vesměs se však jedná o jevy, které lze vhodně zvolenými experimentálními podmínkami potlačit, popř. i zcela odstranit.

Jednotlivé varianty bismutem modifikovaných elektrod a senzorů z uhlíkové pasty již byly úspěšně vyzkoušeny v anodické rozpouštěcí voltametrii a příbuzných technikách ke stanovení iontů kovů, které lze elektrolyticky nahromadit a posléze, během rozpouštěcího kroku, podrobit detekci. Jmenovitě šlo o studie s ionty Mn²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺, In³⁺, Tl⁺, Sn²⁺, Sb³⁺ a dokonce i Cu^{2+} , tedy kovu, který je ušlechtilejší než bismut a jehož analytický signál leží již mimo operační rozsah bismutových elektrod. Při testování bismutem modifikovaných uhlíkových past bylo ve většině případů u příslušných metod dosaženo parametrů, které jsou plně srovnatelné s výsledky měření na dosud nejrozšířenějších čidlech na bázi skelného uhlíku s povlakem bismutu^{27,29}. Platí to i o možném stanovení india za přítomnosti kadmia a olova, které je v podobě modelového voltamogramu znázorněno na Obr. 6.7. Zatímco velmi citlivá detekce iontů Cd²⁺ a Pb²⁺ na bismutových elektrodách je již všeobecně známa a dnes běžně využívána v praktické analýze (viz přehledy v cit. ²⁹), selektivní stanovení In^{3+} za srovnatelných podmínek a koncentračních poměrů bylo kvůli méně účinné depozici a rozpouštění kovového india dlouho nevyřešeným problémem. Nakonec se ukázalo, že vedle vhodného substrátu je klíčovým faktorem volba nosného média s obsahem bromidu, který nejenže má příznivý vliv na vylučování bismutu v režimu in situ, ale jeho komplexotvorné schopnosti vedou i k lepšímu rozdělení všech tří píků.



Obr. 6.7: Simultánní stanovení iontů Cd2+, In3+ a Pb2+ na uhlíkové pastě s povlakem bismutu vyloučeným 'in situ'

----- základní linie, 0,2M octanový pufr + 0,2M-KBr (pH 4,2);

— přídavek c(Cd,Pb) = 20 ppb + c(In) = 100 ppb;

měření v režimu SWASV; uhlíková pasta "C/SO"; c(Bi) = 1 ppm

6.4 Shrnutí a výhledy do budoucna

Již na několika málo konkrétních příkladech ze základního výzkumu bylo možno představit elektrody a senzory z uhlíkové pasty jako čidla, jejichž využívání lze flexibilně přizpůsobovat nejmodernějším trendům a inovacím v elektrochemii a elektroanalýze. Platí to jak o jejich možnostech při studiu organických látek a farmakologických preparátů (**Příklad 1**), tak i o jedno-duchých a přitom velmi přizpůsobivých metodách na principu tvorby iontových párů a extrakce do nitra pasty (**Příklad 2**) nebo o uplatnění uhlíkových past při zhotovování stále velmi populárních bisenzorů, popř. pro konstrukce detektorů k měřením v průtokových systémech (**Příklad 3**).

Zcela aktuálním tématem jsou pak možnosti elektrod a senzorů na bázi uhlíkové pasty v oblasti v současnosti velmi protěžované – při zavádění environmentálně šetrných čidel a detekčních systémů do elektroanalytické praxe. Dokládá to mimořádná adaptibilita uhlíkových past pro měření s bismutovými elektrodami (**Příklad 4**) a skutečnost, že tato problematika byla již předmětem zájmu v kursu *Možností inovací v elektroanalytické chemii* ³⁰.

Tento příspěvek vznikl za podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (projekty MSM0021627502 a LC 06035) a Grantové agentury České republiky (reg. č. 203/05/2106).

Literatura

- 1. Adams R. N.: "Carbon Paste Electrodes". Anal. Chem. 30 (1958) 1576.
- 2. Adams R. N.: Electrochemistry at Solid Electrodes, M. Dekker, New York (1969).
- 3. Švancara I.: *Elektroanalýza s uhlíkovými pastovými elektrodami*. Habilitační práce, Univerzita Pardubice, Pardubice (2002).
- 4. Adams R. N.: Carbon Paste Electrodes A Review. Rev. Polarog. (Japan) 11 (1963) 71-78.
- Kalcher K.: Chemically Modified Carbon Paste Electrodes in Voltammetric Analysis. *Electroanalysis* 2 (1990) 419-433.
- 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.
- Gorton L.: "Carbon Paste Electrodes Modified with Enzymes, Tissues, and Cells". *Electroanalysis* 7 (1995) 23-45.
- 8. Kalcher K., Schachl K., Švancara I., Vytřas K., Alemu H.: Recent Progress in Development of Carbon Paste Electrodes. *Sci. Pap. Univ. Pardubice, Ser. A* **3** (1997) 57-85.
- 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.
- Kalcher K., Švancara I., Metelka R., Vytřas K., Walcarius A.: Heterogeneous Carbon Electrochemical Sensors, v: *Encyclopedia of Sensors*, Vol. 4 (Grimes C.A., Dickey E., Pishko M.V., ed.), str. 283-430. American Scientific Publishers, Stevenson Ranch, Florida, USA (2006).
- Švancara I., Schachl K.: Testing of Unmodified Carbon Paste Electrodes. Chem. Listy 93 (1999) 490-499.
- 12. Švancara I.: Elektroanalýza s uhlíkovými pastovými elektrodami. In: Barek J. a kol.: *Možnosti inovací v elektroanalytické chemii*, str. 49-58. Pražské analytické centrum inovací, Praha (2006).
- 13. Švancara I., Vytřas K., Renger F., Smyth M. R.: Application of Carbon Paste Electrodes in Highly Methanolic Solutions. *Electrochim. Acta* 37 (1992) 1355-1361.
- 14. Zima J., Barek J., Muck A.: Monitoring of Environmentally and Biologically Important Organic Substances at Carbon Paste Electrodes. *Rev. Chimie (Bucharest)* 55 (2004) 657-661.

- 15. Švancara I., Vytřas K.: Voltammetry with Carbon Paste Electrodes Containing Membrane Plasticizers Used for the PVC-Based Ion-Selective Electrodes". *Anal. Chim. Acta* 273 (1993) 195-204.
- Švancara I., Konvalina J., Schachl K., Kalcher K., Vytřas K.: Stripping Voltammetric Determination of Iodide with Synergistic Accumulation at a Carbon Paste Electrode. *Electroanalysis* 10 (1998) 435-441.
- Švancara I., Ogorevc M., Novič M., Vytřas K.: Simple and Rapid Determination of Iodide in Table Salt via Stripping Potentiometry with a Carbon Paste Electrode". *Anal. Bioanal. Chem.* 372 (2002) 795-800.
- Švancara I., Ogorevc B., Hočevar S. B., Vytřas K.: Perspectives of Carbon Paste Electrodes in Stripping Potentiometry. Anal. Sci. (Japan) 18 (2002) 301-305.
- 19. Wang J.: Real-Time Electrochemical Monitoring: Toward Green Analytical Chemistry. Ass. Chem. Res. 35 (2002) 811-816.
- Švancara I., Čermáková I., Vytřas K., Gössler W., Kalcher K.: "Cationic Surfactants as Modifiers for Carbon Paste Electrodes. Application to the Determination of Iodide". *Sci. Pap. Univ. Pardubice, Ser.* A 5 (1999) 95-108.
- 21. Švancara I., Foret P., Vytřas K.: A Study on the Determination of Chromium as Chromate at a Carbon Paste Electrode Modified with Surfactants. *Talanta* 64 (2004) 844-852.
- 22. Švancara I., Galík M., Vytřas K.: Stripping Voltammetric Determination of Platinum Metals at a Carbon Paste Electrode Modified with Cationic Surfactants. *Talanta* 72 (2007) 512-518.
- Švancara I., Kotzian P., Metelka R., Bartoš M., Foret P., Vytřas K.: Plastikové proužky s uhlíkovou pastou: Nový typ pracovní elektrody v elektroanalýze, v: *Monitorování cizorodých látek v životním prostředí IV* (K. Vytřas, J. Kellner, J. Fischer, ed.), str. 145-158. Univerzita Pardubice, Pardubice (2002).
- 24. Švancara I., Kotzian P., Bartoš M., Vytřas K.: Groove Electrodes: A New Alternative of Using Carbon Paste in Electroanalysis. *Electrochem. Commun.* 7 (2005) 657-662.
- 25. Zuman P.: Electrolysis with a Dropping Mercury Electrode: J. Heyrovský's Contribution to Electrochemistry. *CRAC – Crit. Rev. Anal. Chem.* **31** (2001) 281-289.
- 26. Barek J., Fogg A., Muck A., Zima J.: Polarography and Voltammetry at Mercury Electrodes. *CRAC Crit. Rev. Anal. Chem.* 31 (2001) 291-309.
- Królicka A., Pauliukaitė R., Švancara I., Metelka R., Norkus E., Bobrowski A., Kalcher K., Vytřas K.: Bismuth Film-Plated Carbon Paste Electrodes (Short Communication). *Electrochem. Commun.* 4 (2002) 193-196.
- Volke J.: Structure of Molecules and Their Reactivity on Non-Mercury Electrodes. Surf. Technol. 15 (1982) 94-98.
- 29. Švancara I., Vytřas K.: Elektroanalýza s bismutovými elektrodami (referát). *Chem. Listy* **100** (2006) 90-113.
- 30. Švancara I.: Bismutové elektrody v elektroanalýze. In: Barek J. a kol.: *Možnosti inovací v elektroanalytické chemii*, str. 59-68. Pražské analytické centrum inovací, Praha (2006).

7. SENZORY NA BÁZI BOREM DOPOVANÉHO DIAMANTU

prof. RNDr. Jiří Barek, CSc.

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, katedra analytické chemie, Albertov 2030, 128 43 Praha 2 barek@natur.cuni.cz

7.1 Úvod

Podle definice IUPAC [1] je senzor zařízení, které měří určitou vlastnost (tj. přijímá podnět) reálného systému a informuje (tj. produkuje odezvu) svůj systém o výsledku tohoto měření. Je to tedy subsystém umožňující získávat kvantitativní informace o reálném světě. Chemický senzor se skládá ze dvou částí, z části citlivé na chemické složení okolního prostředí (tzv. transduceru) a z části převádějící získaný chemický podnět na elektrický signál (tzv. transmiteru). Zdrojem elektrického signálu může být oxidace či redukce rozpouštědla či částic v něm rozpuštěných, adsorpce či desorpce částic na povrchu elektrody, nabíjení či vybíjení elektrodové dvojvrstvy či oxidace nebo redukce materiálu elektrody. Ve všech případech jde o procesy silně závislé na materiálu elektrody. Kvalita jakéhokoliv elektrochemického senzoru tudíž do značné míry závisí na materiálu, z něhož je vytvořena jeho elektroaktivní část. Ta je v bezprostředním kontaktu s analyzovaným prostředím, což může vést k její pasivaci ať již produkty elektrodové reakce, nebo složkami matrice. To je příčinou neustálého hledání nových materiálů, které vykazují z hlediska využití v elektrochemických senzorech lepší vlastnosti než materiály dosud používané (zejména jde o dostupný potenciálový rozsah, šum, chemickou, elektrochemickou a mechanickou stabilitu a v neposlední řadě o resistenci vůči pasivaci). Velmi slibným a perspektivním materiálem se z tohoto hlediska jeví borem dopovaný diamant, jehož možnosti a výhody v oblasti elektroanalytické chemie byly podrobně diskutovány v kursu PACI "Možnosti inovací v elektroanalytické chemii" [2]. Na adsorpci polárních látek jsou citlivé téměř všechny sp²-uhlíkové elektrody, hlavně kvůli přítomnosti polárních skupin na povrchu [3]. Naproti tomu borem dopovaný diamant je díky svému sp³-charakteru značně rezistentní vůči pasivaci látkami naadsorbovanými na jeho povrchu. Zatímco řada aplikací borem dopovaného diamantu k úplné elektrochemické oxidaci organických polutantů při jejich odstraňování z životního prostředí využívá mikrokrystalické filmy borem dopovaného diamantu nanesené na mechanicky pevných kovech (Nb, Ta, W či podstatně levnější Ti), téměř všechny publikované elektroanalytické aplikace byly provedeny na borem dopovaných diamantových filmech nanesených na křemíku [4-6]. Příprava a vlastnosti borem dopovaného diamantu spolu s konstrukcí pracovních elektrod z tohoto matriálu byly podrobně diskutovány v předchozím kursu PACI [2] a proto jim zde již nebude věnována pozornost. Ta bude po úvodních obecnějších úvahách týkajících se charakteru diamantových filmů soustředěna na využití senzorů na bázi tohoto netradičního elektrodového materiálu pro detekci látek v plynné fázi, voltametrickou detekci anorganických a organických látek ve vsádkovém upořádání a amperometrickou detekci zejména biologicky aktivních organických látek v průtokovém uspořádání (vysokoúčinná kapalinová chromatografie, průtokové injekční analýza, kapilární zonová elektroforéza).

7.2 Typy diamantových filmů

Stejně jako existuje řada nejrůznějších typů klasických uhlíkových materiálů, i diamant byl syntetizován v řadě různých forem lišících se svými elektrochemickými vlastnostmi. Tyto formy se mohou lišit velikostí krystalů, obsahem dopantu, způsobem povrchové terminace, obsahem přítomných sp²-forem i substrátem, na kterém jsou naneseny [7]. Vzhledem k omezeným výhodám na sp²-bohatých diamantových filmů, jejichž vlastnosti se blíží ostatním grafitickým materiálům, většina elektroanalytických aplikací využívá vysoce kvalitních borem dopovaných mikrokrystalických či nanokrystalických filmů na křemíkovém substrátu. Významnou výhodou borem dopovaných diamantových filmových elektrod (BDDFE) je jejich chemická stabilita i při značně pozitivních potenciálech kombinovaná s nízkým zbytkovým proudem a vysokým přepětím pro vylučování kyslíku, což nabízí nové možnosti v oblasti stanovení anodicky oxidovatelných látek. Dostatečně široké je však i jejich potenciálové okno v katodické oblasti.

Obvyklým způsobem se BDDFE připravují technikou chemické depozice par (CVD) – tyto elektrody jsou označované jako "as gown CVD films" a mají na svém povrchu monovrstvu vodíku, což souvisí s jejich růstem v atmosféře bohaté na vodík. Povrch diamantu s volnými vazbami ukončenými vodíkem je tudíž hydrofobní a poměrně málo aktivní. Naproti tomu oxidovaný povrch diamantu obsahuje kyslíkaté funkční skupiny, a je tudíž hydrofilní. Předpokládá se přítomnost etherových či karbonylových funkčních skupin, přičemž posledně uvedené mohou být využity k chemické modifikaci povrchu BDDFE, umožňující další ladění jejich elektrochemických vlastností. Tyto dva typy povrchů mohou být realizovány elektrochemickou předúpravou BDDFE jejich katodickou či anodickou polarizací ve vhodném vodném základním elektrolytu. S výhodou zde lze využít skutečnosti, že BDDFE jsou mimořádně odolné vůči korozi i při extrémních potenciálech v silně agresivních prostředích. Například dlouhodobé cyklování potenciálu BDDFE ve směsi 1M-HNO3 a 0,1M-HF v rozmezí potenciálů od katodického vývoje vodíku do anodického vývoje kyslíku nemá pozorovatelný vliv ani na morfologii povrchu, ani na poměr diamantoidní a nediamantoidní fáze na povrchu této elektrody. (Za stejných podmínek jsou elektrody ze skleného uhlíku či pyrolytického grafitu výrazně poškozeny). Vzhledem ke značné odolnosti vůči korozi jsou BDDFE vhodné pro anodickou rozpouštěcí voltametrii. Jejich výhodou je, že obecně nevyžadují pravidelnou regeneraci. Nevýhodou může být jejich nízká elektrokatalytická aktivita, kterou však lze eliminovat různými způsoby modifikace povrchu diamantového filmu. Nejčastěji se používá oxidace a elektrochemická depozice mikromnožství různých kovů. Modifikace povrchu anodickou oxidací vede k výraznému zvýšení selektivity k některým analytům, např. dopaminu či močové kyselině, které pak lze stanovit i v přítomnosti velkého nadbytku askorbové kyseliny. Vzhledem k biologické kompatibilitě diamantu se tak nabízí k jeho využití pro in vivo senzory řady biologicky významných látek. Průhlednost diamantu a pozorovaný fotoelektrický jev umožňují využití fotoelektrochemických měření pro nedestruktivní charakterizaci tohoto elektrodového materiálu a nabízí možnost konstrukce různých optrod a senzorů kombinujících optické a elektrochemické principy.

Elektrochemické vlastnosti BDDFE závisejí i na obsahu dopantu. Obecně lze říci, že elektrochemické reakce probíhající mechanismem vnější sféry (outter-sphere) jsou na BDDFE reversibilnější než reakce probíhající mechanismem vnitřní sféry (inner-sphere), při nichž dochází ke vzniku či zániku vazeb mezi atomy. Dále platí, že systémy s relativně pozitivnějším rovnovážným potenciálem jsou reverzibilnější než systémy s potenciálem negativnějším a že na silně dopovaných BDDFE s kovovějším charakterem povrchu probíhají reakce reverzibilněji než na površích s menším obsahem dopantu, a tudíž spíše polovodičovým charakterem. Další vlastností BDDFE ovlivňující jejich elektrochemické chování je jejich mikroskopická či nanoskopická hrubost, čili velikost narostlých mikrokrystalků či nanokrystalků borem dopovaného diamantu. V prvém přiblížení lze říci, že tato hrubost kopíruje hrubost substrátu, na němž je diamantový film připravován. V řadě případů však bylo pozorováno snížení hrubosti diamantového filmu ve srovnání se substrátem, což zřejmě souvisí s možným překrytím mikroporů substrátu diamantovými krystaly. S rostoucí hrubostí povrchu se zužuje dostupné potenciálové okno a zvyšuje se diferenciální kapacita a elektrochemická aktivita. Hrubost povrchu ovlivňuje kinetiku sledovaných elektrodových reakcí, přičemž s rostoucí hrubostí se zpravidla zvyšuje i reversibilita elektrodových reakcí. Rostoucí hrubost povrchu usnadňuje přenos náboje a umožňuje přechod z oblasti kinetické kontroly do oblasti kontroly difuzní, což může být výhodné z hlediska elektroanalytických aplikací.

Dalším možným způsobem ovlivnění povrchové morfologie diamantového filmu je vytvoření pravidelného uspořádání porů typu včelího plástu (tzv. honeycomb – viz obr. 7.1). Lze tak učinit reaktivním leptáním polykrystalického diamantového filmu v kyslíkové plasmě přes vhodně připravenou masku z SiO₂ či Al₂O₃ s pravidelným systémem otvorů. Materiály s tímto povrchem mají sice srovnatelné dostupné potenciálové okno, ale výrazně vyšší zbytkový proud, což omezuje jejich využití v oblasti senzorů.



Obr. 7.1: BDDFE s pravidelným systémem vertikálních porů

Mechanická i elektrochemická stabilita BDDFE umožňuje použít k výraznému zvýšení měřených proudů ultrazvuk. Působení ultrazvuku výrazně zvýší transport elektroaktivních látek k povrchu elektrody, avšak drastické mechanické účinky tlakových vln a kavitací indukovaného toku kapaliny způsobují značnou erozi elektrod z klasických materiálů na rozdíl od BDDFE, pro které se tak otvírá nová zajímavá oblast použití.

Je popsána i příprava a elektrochemické využití dopovaných diamantových monokrystalů připravených za vysoké teploty a tlaku, jejichž elektrochemické vlastnosti pochopitelně závisí na krystalové orientaci elektroaktivní plochy, což souvisí s různou koncentrací atomů boru v různých plochách danou různou schopnosti těchto ploch inkorporovat atomy dopantu (viz obr.7.2).



Obr. 7.2: Schématické znázornění diamantového monokrystalu narostlého při vysoké teplotě a tlaku

V závislosti na charakteru, kvalitě a případné předúpravě BDDFE můžeme tudíž pozorovat reverzibilní, kvazireverzibilní či ireverzibilní chování řady testovacích systémů (viz obr. 7.3). Tvar těchto voltamogramů neodpovídá učebnicovým charakteristikám příslušných systémů, což zřejmě souvisí s různou rychlostí přenosu elektronů na různých krystalových rovinách. Stejně jako u jiných elektrodových matriálů i v případě BDDFE je sytém $Ru(NH_3)_6^{3+}/Ru(NH_3)_6^{2+}$ relativně nejméně citlivý na aktuální stav elektrodového povrchu, takže poskytuje prakticky stejné cyklické voltamogramy pro mechanicky, katodicky i anodicky předupravenou BDDFE.



Obr. 7.3: Schematické znázornění cyklických voltamogramů systémů použitelných k charakterizaci BDDFE [7]

A - BDDFE mechanicky vyleštěná aluminou; B – BDDFE po anodické předúpravě cyklováním potenciálu v 1M-HNO₃ mezi 0 a +5 V proti nasycené kalomelové elektrodě; C – BDDFE po katodické předúpravě cyklováním potenciálu v 1M-HNO₃ mezi 0 a –2 V proti nasycené kalomelové elektrodě Přestože diamant je nejtvrdším známým materiálem a parafinický charakter jeho povrchu potlačuje nežádoucí adsorpci reakčních produktů či interferujících látek na jeho povrchu, byla popsána řada postupů k obnovení povrchu diamantových filmů v případě jejich pasivace [7]. Patří sem například leštění emulsí oxidů kovů či diamantových částiček, působení vodíkové, fluorové či kyslíkové plasmy, působení extrémních katodických či anodických potenciálů, desorpce působením paprsku elektronů či intenzívním UV-zářením. Tato případná předúprava pochopitelně rovněž ovlivňuje elektrochemické vlastnosti BDDFE. V případě laserové aktivace jde převážně o termální proces vysoce lokalizovaný na povrchu elektrody. Krátká doba pulsu (řádově 10 ns) umožňuje aktivaci bez nadměrného zahřátí celé elektrody. To umožňuje pracovat se systémy tradičně pasivující elektrody. Na rozdíl od konvenčních elektrod se tepelná energie v diamantu rychleji rozptyluje a v důsledku optické transparentnosti diamantu se nekoncentruje na jeho povrchu. Negativním důsledkem je ovšem omezená možnost odstraňovat laserovou aktivací opticky transparentní filmy, jaké vznikají například při anodické oxidaci fenolů, či velmi malé ostrůvky deponovaných kovů.

Byla popsána i řada způsobů chemické modifikace BDDFE po jejich plasmatické či elektrochemické předúpravě, elektrochemická funkcionalizace dusíkatými funkčními skupinami v kapalném amoniaku, fotochemická kovalentní modifikace nejrůznějšími organickými funkčními skupinami, která umožňuje kovalentní imobilizaci enzymů či proteinů na jejich povrchu. Takto připravené senzory bývají velmi citlivé k oxidovatelným analytům např. fenolického typu s minimální interferencí kyslíku díky jeho mimořádně vysokému přepětí. Tak např. prostá adsorpce vhodného hemu a křenové peroxidasy poskytuje stabilní senzor s enzymatickým pokrytím použitelný pro konstrukci biosenzorů založených na detekci peroxidu vodíku.

Modifikace kovy či dalšími elektrochemicky aktivními materiály může být provedena mechanicky poněkud neobvyklou abrasivní technikou, kterou se na povrch BDDFE přenesou stopy případně elektrokatalyticky aktivních částic.

Zajímavou možností je i konstrukce pole BDDF mikroelektrod koplanárních s izolujícím diamantem. Tato koplanarita umožňuje i mechanické leštění takového elektrodového pole. Navíc je možno tyto BDDF mikroelektrody elektrochemicky modifikovat pokrytím vhodným kovem, např. zlatem, mědí či paladiem.

7.3 Detekce látek v plynné fázi

Byly vyvinuty chemické senzory na bázi diamantu založené na architektuře katalyticky účinný kov (M = metal)-nevodivý diamant (I = insulative)-polovodičový diamant (S = semiconductor) - tato architektura se tedy označuje zkratkou MIS (viz obr. 7.4). Funkce tohoto typu senzoru např. při detekci vodíku lze popsat následovně:

- A. molekula vodíku se adsorbuje na povrchu palladia,
- B. vodík disociuje a difunduje paladiem k rozhraní paladium-nevodivý diamant,
- C. vodíkové atomy se adsorbují na vnitřní rozhraní mezi palladiem a nevodivým diamantem za vzniku vrstvy dipolů, která mění charakter pracovní křivky mezi palladiem a vnitřním diamantem,
- D. mění se závislost proudu na napětí této MIS-diody,
- E. změny závislosti jsou korelovány s parciálním tlakem vodíku v monitorovaném prostředí.



Obr. 7.4: Chemický senzor na bázi diamantu



Obr. 7.5: I-E charakteristika diamantového senzoru při 200 °C a různém parciálním tlaku benzenu

1 – 1 064 Pa; 2 – 133 Pa; 3 – 0 Pa

Charakteristika této diody se analogicky mění i při adsorpci benzenu, toluenu či dalších uhlovodíků, což lze využít při detekci těchto látek v plynné formě. Z obr. 7.5 je patrno, že proud při konstantním napětí, např. 1 V, závisí na parciálním tlaku benzenu, čehož se využívá k jeho detekci. V tomto případě je za nejpravděpodobnější výklad funkce senzoru přijímána možnost štěpení studovaných látek na menší částice, které difundují palladiem a na základě své adsorpce na rozhraní s diamantem ovlivňují pracovní charakteristiku senzoru. Jiný navrhovaný mechanismus, založený na kompletní disociaci uhlovodíku a detekci vodíku po jeho průchodu vrstvou palladia na základě jeho vlivu na pracovní křivku senzoru, je méně pravděpodobný, protože vodík měřený proud snižuje, zatímco benzen i toluen ho zvyšují. Jinou možností je, že vrstva palladia je dostatečně pórovitá, takže umožňuje průchod nedisociovaných molekul benzenu či toluenu až k rozhraní palladia a diamantu. Tento mechanismus se s největší pravděpodobností uplatňuje u senzorů na oxid uhelnatý či ethanol.

7.4 Voltametrická detekce ve vsádkovém upořádání

Různé konstrukce BDDFE pro práci při vsádkovém uspořádání jsou podrobně diskutovány ve skriptech k předchozímu kursu PACI [2]. Vzhledem k mimořádně širokému anodickému potenciálovému oknu, lze tyto elektrody úspěšně využít k detekci fenolů a jejich derivátů, jejichž oxidace bývá na jiných typech elektrod zpravidla překryta značným zbytkovým proudem a doprovázena tvorbou polyfenoxy filmů blokujících povrch elektrody. Jako příklad lze uvést oxidaci 4-chlor-fenolu, 2,4-dichlorfenolu a 4-chlor-methylfenolu. Vzhledem k mimořádné mechanické odolnosti BDDFE lze citlivost stanovení lze zvýšit i použitím ultrazvuku. Dále byly tyto elektrody použity např. k detekci sulfanu, řady látek obsahujících funkční skupiny–SH, sulfonamidů i nukleových kyselin a jejich bází. BDDFE byly úspěšně použity i při stanovení stopových množství kovů pomocí anodické či katodické rozpouštěcí voltametrie. Řadu odkazů na původní práce lze nalézt v přehledech citovaných na konci této kapitoly. Jako příklad anodické rozpouštěcí voltametrie lze uvést stanovení Pb či Au po katodické předúpravě BDDFE, která značně zvyšuje rychlost depozice i rozpouštění. Katodickou rozpouštěcí voltametrií lze stanovit kovy, které při pozitivních potenciálech vytvářejí na pracovní elektrodě deposity oxidů (Pb, Mn, Ag, V, atd.). Vybrané příklady analytických aplikací BDDFE ve vsádkovém uspořádání lze nalézt v Tab. 7.1.

Aplikace	Technika	Poznámka
stanovení stop kovů	abrasivní rozpouštěcí volt- ametrie	sleduje se elektrochemické roz- pouštění mikročástic přenesených abrasí z analyzovaného materiálu na BDDFE
selektivní detekce dopaminu v přítomnosti askorbové kyseliny	BDD mikrovláknové elek- trody	stabilní senzory vyžadující elek- trodovou aktivaci
stanovení fenolických látek	detekce v průtokové cele	sonoelektrochemie či laserová aktivace
stanovení estrogenů s fenolickou skupinou	amperometrický biosenzor s kovalentně vázanou tyro- sinázou	
detekce cukrů a aminokyselin	HPLC-ED	BDDFE s implantovaným Ni a Cu
oxidace cytochromu c	voltametrie	přímá elektrochemická oxidace na BDDFE
aromatické aminy a polyaminy,	HPLC-ED	
histamin a serotonin	HPLC-ED	
katecholaminy	CZE-ED	
dopamin, indol, aminochrom	cyklická voltametrie	
antidepresiva (impramin, desipramin, clo- mipramin, amitriptylin, nortriptylin, doxe- pin)	HPLC-ED	
organické kyseliny (citronová, maleinová, močová, alanin, cystein)	voltametrie	anodizovaná BDDFE
xanthin, theophyllin, kofein	voltametrie	
N-methylkarbamátové pesticidy (carbaryl, carbo-furan, bendiocarb, methyl-2-benzimi- dazolkarbamát)	HPLC-ED	
homocystein, glutathion, cephalexin, mer- kaptoethansulfonová kyselins	HPLC-ED	

 Tab. 7.1:
 Vybrané analytické aplikace borem dopovaných diamantových filmových elektrod

cystein	voltametrie	přímá detekce či nepřímá detekce v přítomnosti ferrokyanidu
sulfan	voltametrie	nepřímá detekce s ferrokyanidem
NADH, histamin, sulfadiazinová antibioti- ka, tetrachlormethan	FIA-ED	makro- a mikro-BDDFE
dusitany a oxidy dusíku	FIA-ED	anodická odezva
sulfonamidy a sulfadiazinová léčiva (sulfa- diazin, sulfamerazin, sulfamethazin)	HPLC-ED	
t-RNA, jedno- a dvoupramenná DNA	voltametrie	
Au	anodická rozpouštěcí volt- ametrie	sonovoltametrie
Pb, Ag	rozpouštěcí voltametrie	katodická a anodická depozice
Нg	anodická rozpouštěcí volt- ametrie	
Mn	katodická rozpouštěcí voltametrie	stanovení v čaji
hydrazin a další genotoxické látky, 4-nitro- fenol, dusitany	voltametrie	pole BDDF mikroelektrod

7.5 Amperometrická detekce v průtokovém uspořádání

Tento typ detekce se hojně používá ve spojení s miniaturizovanými separačními systémy z následujících důvodů:

- A. technologie výroby miniaturizovaných elektrod a detekčních obvodů je dostatečně zvládnutá,
- B. změna elektrodových ploch z milimetrových na mikrometrové rozměry zpravidla nesnižuje detekční limity,
- C. elektrické obvody kontrolující detekční systém je možno integrovat s řídícími obvody separačních systémů a zachovat tak kompatibilitu celého zařízení,
- D. náklady na vývoj, výrobu a provoz zařízení představují zlomek ceny srovnatelně výkonných detekčních systémů jiného typu,
- E. elektrochemické detektory poskytují informaci o koncentraci detegovaných látek přímo ve formě snadno zpracovatelných elektrických signálů. Odpadá tak konverze jiných forem signálu (světelný tok, hmotnost, teplota atd.) na elektrický signál.

O progresivním vývoji v oblasti řídících jednotek svědčí fakt, že v současnosti již existují přenosná zařízení napájená bateriemi s integrovaným potenciostatem a kapesním počítačem pro voltametrické a amperometrické analýzy. Právě amperometrie se nejvíce uplatňuje ve spojení s kapalinovými separačními metodami díky své citlivosti, zpravidla širokému dynamickému lineárnímu rozsahu a relativní selektivitě. Konstrukce amperometrických detektorů pro kapalinovou chromatografii v mikro i makro měřítku je vedena snahou vyhovět chromatografickým a elektrochemickým požadavkům na geometrii detekčních cel. Na jedné straně je to snaha o miniaturizaci vlastního detekčního prostoru, aby zbytečně nedocházelo k rozmytí zóny analytu, na straně druhé je to elektrochemický požadavek na takové uspořádání elektrod, které zaručí homogenní elektrické pole mezi pracovní a pomocnou elektrodou a zároveň co nejbližší umístění referentní elektrody, což je podmínkou pro udržení definovaného potenciálu na pracovní elektrodě při amperometrické detekci. Toto požadované blízké postavení všech tří elektrod zpravidla vyžaduje větší detekční prostor, což je z chromatografického hlediska nežádoucí. Dalším problémem je volba vhodného elektrodového materiálu tak, aby byla zaručena kompatibilita s mobilní fází, dostatečně široké potenciálové okno, dlouhodobá stabilita odezvy a odolnost proti pasivování. Z tohoto hlediska se jako zvláště vhodný elektrodový materiál jeví borem dopovaný diamant.

Amperometrická detekce na BDDFE v průtokovém uspořádání (kombinace vysokoúčinné kapalinové chromatografie, průtokové injekční analýzy či kapilární zonové elektroforézy s elektrochemickou detekcí) byla použita zejména ke stanovení řady biologicky aktivních a environmentálně významných organických sloučenin. Navíc např. anodická detekce řady aminů a polyamidů odhalila i zajímavé detaily oxidace těchto látek na BDDFE. Zajímavé je, že lepších výsledků bylo v tomto případě dosaženo při použití méně kvalitních diamantových filmů (s více defekty a vyšší proporcí rozhraní mezi jednotlivými zrny). Možným vysvětlením je adsorpce molekul analytu na povrchových atomech boru. Vybrané příklady analytických aplikací BDDFE ve vsádkovém uspořádání lze nalézt v Tab. 7.1.

Problémem pro využití BDD elektrod v kapilární elektroforeze zůstává miniaturizace, jelikož BDDFE se zpravidla připravují metodou chemické depozice par na vhodný nosič. Běžně používané planární křemíkové destičky nejsou pro miniaturizaci příliš vhodné s výjimkou jejich použití při konstrukci tenkovrstvých detekčních cel [2]. Vhodnějším substrátem se ukázaly být platinové drátky o průměru 10 až 100 μ m, které je možné vyleptat do špičky tak, že se umístí do roztoku 1M-KOH mezi čtyři uhlíkové elektrody a vloží se na něbstřídavé napětí. Takto upravený platinový drátek se pak pokryje vrstvou krystalického borem dopovaného diamantu. Nakonec je plocha elektrody vymezena v rozmezí $1,5 \cdot 10^{-2}$ až $4,5 \cdot 10^{-2}$ mm², a to tak, špička elektrody zahřeje, navleče se na ni polypropylenová násadka a manuálně se stlačí. Detail pracovní mikroelektrody BDDF je na obr. 7.6b, její umístění v cele pro detekci za kolonou je zřejmé z obr. 7.6a. Mikroelektroda BDDDF se proti konci kapiláry nastavuje manuálně s pomocí mikroskopu do vzdálenosti cca 20 μ m.



Obr. 7.6: Elektrochemická detekční cela pro detekci na konci kolony v CZE (a) a detail pracovní elektrody (b)

1 – pipetová násadka se zatavenou pracovní elekrodou, 2 – referentní elektroda Ag/AgCl,
 4M-KCl, nasycený AgCl), 3 – pomocná Pt elektroda, 4 – separační kapilára, 5 – šrouby v navzájem kolmé pozici sloužící k přesnému nastavení konce separační kapiláry proti pracovní elektrodě

V kombinaci s kapilární zonovou elektroforézou byly i použity diamantové mikročárové elektrody o rozměrech 300 x 50 µm (viz obr. 7.7) pro detekci submikromolárních koncentrací řady katecholaminů. V kombinaci s kapilární elektroforézou na čipu se osvědčily válcové mikroelektrody BDDF připravené výše popsaným postupem chemické depozice par na platinových drátkových mikroelektrodách (viz obr. 7.8)



Obr. 7.7: Schéma detektoru s diamantovou mikročárovou elektrodou



Obr 7.8: Borem dopovaná diamantová filmová elektroda připravené depozicí na platinové drátkové mikroelektrodě a její připojení k systému kapilární zonové elektroforézy na čipu

Vlastní postup přípravy těchto BDDF mikroelektrod znázorňuje obr. 7.9.





Obr 7.9: Platinové drátky s leptáním připraveným hrotem o průměru (a) 76 μm, (b) 25 μm, (c) 10 μm a pokryté BDD filmem. Zvětšeno 300×

Nejprve se provede elektrochemické leptání platinových drátkových mikroelektrod v 17% $CaCl_2$ ve směsi aceton:voda (1:1) po dobu 45 s při vloženém napětí 12 V (76 µm) či 3,5 V (10 a 25 µm). Následuje čištění a zavedení krystalizačních center sonikací v acetonu 5 min., pak v suspenzi diamantového prášku (5 nm částice) po dobu 30 min. Závěrečnou fází je chemická depozice par z argonové plazmy obsahující přídavek CH_4 a H_2 a B_2H_6 pro dopování borem.

7.6 Závěr

Senzory na bázi borem dopovaného diamantu mají před sebou slibné perspektivy dalšího vývoje. Přestože nemohou zcela nahradit senzory na bázi rtuti, řada jejich vlastností je z hlediska elektrochemických senzorů mimořádně užitečná. Na jedné straně jsou totiž slučitelné s prací za extrémních podmínek (vysoké tlaky, vysoké teploty, značné mechanické namáhání, práce v přítomnosti ultrazvuku či po laserové aktivaci) a na druhé straně jsou kompatibilní s biologickými systémy, neboť nevyvolávají žádnou negativní biologickou odezvu organismu. Přítomnost kyslíkatých funkčních skupin na jejich povrchu po anodické předúpravě umožňuje jejich chemickou modifikaci. Lze předpokládat, že další vývoj v této oblasti půjde jednak směrem extenzivním (rozšiřování palety studovaných látek, technických uspořádaní diamantových elektrod v různých typech senzorů) a jednak směrem intenzivním (hlubší studium vztahů mezi strukturou a charakterem diamantových filmů a jejich elektrochemickými případně fotoelektrochemickými vlastnostmi).

Poděkování

Tento výzkum byl finančně podporován MŠMT ČR (projekty LC 06035 a MSM 0021620857).

Literatura

- 1. IUAC: Compendium of Analytical Nomeclature, str. 7-32. Blackwel Science, Oxford 1997.
- 2. Barek J.: Diamantové pracovní elektrody. Ve skriptech Možnosti inovací v elektroanalytické
- 3. chemii. PACI, VŠCHT, Praha 2006.
- 4. McCreery R. L., v knize: Interfacial Electrochemistry (Wieckowski A., ed.). Dekker, New York 1999.
- 5. Fujishima A., Einaga Y., Rao T. N, Trik D. A.: Diamond Electrochemistry. Elsevier, Amsterdam 2005.
- 6. Pleskov Y. V., Russ. J. Electrochem. 38, 1275 (2002).
- 7. Pleskov V.Yu.: Protection of Metals 42,115 (2006).
- 8. Compton R.G., Foord J.S., Marken F.: Electroanalysis 15, 1349 (2003).
- 9. Chailapakul O., Siangproh W., Tryk D.A.: Senzors Lett. 4, 99 (2006).

8. TLUSTOVRSTVÉ ELEKTROCHEMICKÉ SENZORY

RNDr. Jan Krejčí, Ph.D., Ing. Radka Stejskalová, MUDr. Dagmar Krejčová, Ing. Zuzana Grosmanová

BVT Technologies, Hudcova 78c, 612 00 Brno <u>info@bvt.cz</u>

8.1 Historie

Pravděpodobně málokdo ví, že jedny z prvních elektrochemických senzorů připravovaných speciálními technologiemi byly vytvořené v České republice. Mezi lety 1985 a 1986 byl zahájen výzkum senzoru glukosy pro řízení umělého pankreatu ve Výzkumném ústavu zdravotnické techniky v Brně. V tehdejší době byly k dispozici pouze klasické elektrody a z biosenzorů byla známa pouze enzymová elektroda vzniklá spojením enzymové membrány a kyslíkového čidla. I když v této době již byly prováděny první práce se speciálními elektrodami s použitím mediátorů a uhlíkových past, vznikala první použití sítotisku pro nanášení aktivních vrstev na senzory v zahraničí. Roku 1983 vznikl patent¹, který je dnes využíván pro výrobu diabetických proužků. Snahou o vytvoření senzorů ve Výzkumném ústavu zdravotnické techniky bylo nahrazení klasických elektrod novými technologiemi z oblasti mikroelektroniky zejména s cílem významného snížení ceny tak, aby bylo možné zefektivnit léčbu diabetu a případně vytvořit implantovatelný senzor glukosy. Po analýze technického stavu byla zvolena technologie laminované keramiky a obecně tlustovrstvá technologie. První senzory byly připraveny ve Výzkumnému ústavu elektrochemické keramiky v Hradci Králové a jejich další technologické zpracování bylo provedeno v podniku Mesit v Uherském Hradišti.



Obr. 8.1: Aktivní plocha elektrody vyrobená HTCC technologií (high temperature cofired ceramic). Aktivní plocha obsahuje dvě platinové pracovní elektrody a teploměr Pt 100

Na obr. 8.1 je elektroda vyrobená technologií high temperature multilayer cofired ceramic (HTCC), na jejímž čele jsou umístěny dvě platinové elektrody a platinový teploměr Pt 100. V dutině byla sintrovaná stříbrná elektroda ze stříbrných zrn a sintrování bylo prováděno ve vodíkové atmosféře (viz Obr. 8.2*b*). Pro výrobu byly použity speciální technologie, které byly v celém východním bloku dostupné pouze v České republice. Bylo na ně uvaleno embargo a dodnes jsou tyto senzory na technologicky velmi vysoké úrovni a v některých případech se ani současné výrobky nemohou rovnat jejich tehdejší kvalitě.



Obr. 8.2: a) Srovnání velikosti elektrody se zápalkou. Elektroda obsahovala sintrovanou AgAgCl referentní elektrodu, dvě platinové pracovní elektrody, zásobník elektrolytu a teploměr Pt 100. Na druhém konci bylo kontaktní pole

b) Sintrovaná vrstva Ag v dutině zásobníku elektrolytu (před nanesením Pt vrstev)

Na druhé straně však byla jejich výroba příliš drahá a technologicky nesmírně náročná. Musela být zvládnuta příprava speciálních past, jejichž vlastnosti jsou kompatibilní s mnohovrstvou spékanou keramikou, dále několik technologických postupů spékání, které umožňovaly vytvářet rotační tvary a konečně technologie vytváření platinových elektrod na čele, včetně teplotní kompenzace platinovým teploměrem Pt 100. Bylo zřejmé, že jak vývoj, tak samotné elektrody jsou velmi drahé a v podstatě jejich výrazné zlevnění je možné pouze při dosažení velmi vysokých výrobních sérií. To v tehdejší době nebylo možné. Na druhé straně v sériích cca 100-500 kusů byla cena těchto elektrod srovnatelná nebo levnější než klasické elektrody vyráběné ručně nebo semitechnologicky ručním způsobem.





Nejdůležitější však byl poznatek, že nové mikroelektronické technologie přináší do oblasti zcela nové možnosti, které byly v některých případech u klasických elektrod nepředstavitelné. Příkladem může být např. miniaturizace (viz obr. 8.3) – mikroelektroda připravená technologií HTCC. V tomto období významně přispěli k rozvoji technologie Ing. B. Kurtev CSc. z Výzkumného ústavu elektroniky keramiky v Hradci Králové, RNDr. K. Šuranský CSc. a Ing. Karel Řezníček z Mesitu Uherské Hradiště.



Obr. 8.4: Příklad elektrochemického detektoru na Si čipu

Postupným rozvojem těchto elektrod bylo nakonec zjištěno, že elektrochemické senzory i biosenzory vytvářené sítotiskem na korundových podložkách výrazným způsobem snižují cenu ve srovnání s technologií HTCC. Zde je nutno vzpomenout přispění firmy Excellent (Ing. J. Burša), která zajistila špičkové materiály firmy Du Pont a významným způsobem přispěla k optimalizaci topologie senzoru. Všechny další výhody zůstaly zachovány – možnost miniaturizace, velká variabilita materiálů a možnost vytváření pole elektrod. Paralelně s rozvojem tlustovrstvé technologie byly prováděny experimenty s elektrochemickými detektory připravovanými na Si-čipech (ve spolupráci s firmou Laboratorní přístroje Praha, Dr. S. Vozka CSc., Dr. J. Litomiský CSc.; 1987 – 89). Ukázka čipu je na obr. 1.4. Dalším cílem bylo elektrody zlepšit a zjednodušit, zejména v poměru výkonu a ceny. Toho bylo dosaženo použitím keramických destiček, na které byly pracovní elektrody tištěny. Na obr. 8.5 je znázorněna první elektroda tohoto typu.



Obr. 8.5: První vzorky senzorů tištěných na keramice (1992)

Hlavní výhody a nové technologické možnosti, které tlustovrstvá technologie v oblasti senzorů a biosenzorů umožňuje jsou tyto:

- Čistota; v některých případech lze dosáhnout reprodukovatelnější přípravy, vyšší čistoty a chemické odolnosti materiálu než v případě klasických elektrod.
- Rozšířený výběr materiálů pro přípravu pracovní elektrody; v klasické elektrochemii je velmi závažným problémem vytvoření aktivní plochy elektrody, která je kompaktně spojena s tělem elektrody tak, že na rozhraní mezi elektroaktivním materiálem a materiálem elektro-

dy nemohou vznikat mikrotrhliny, spáry o velikosti desítek nanometrů, ve kterých se akumuluje elektroaktivní látka a může potenciálně způsobovat nestandardní chování elektrody. Příkladem může být tzv. tailing, tzn. že odezva po klasické formě přechází do nestandardní formy, kdy je zpomalená a těžko reprodukovatelná. Mikroelektronické technologie umožňují velmi kompaktní spojení platiny s keramikou či korundovou keramikou a její překrytí velmi chemicky odolnými polymery, keramickými materiály nebo sklem. Vznikají tak kompaktní senzory, které jsou zbaveny problému klasických elektrod, tj. nehomogenity materiálu. Je tak možno vytvářet elektrody obsahující nejčastěji platinu, zlato a stříbro, méně obvykle měď, nikl nebo iridium. V dalším se zmíníme o nových speciálních technologiích vyvinutých naší firmou, které umožňují vytvářet elektrody na bázi skelného uhlíku, zlatých a platinových kompaktních vrstev a téměř veškerých materiálů včetně materiálů velmi exotických.

- Množství použitého kovu; drahé aktivní materiály jsou použity ve velmi malém množství. Vlastnosti elektrody se mohou blížit vlastnostem klasické platinové nebo zlaté elektrody, avšak množství užitého kovu je výrazně nižší, což se odráží i na ceně senzoru. Znamená to, že elektroda může být používána stejně jako klasická elektroda, ovšem vzhledem k její ceně dosahující jednotek EUR lze tuto elektrodu v případě kontaminace vyměnit za novou. V případě jedné šarže lze dosáhnout dobré reprodukovatelnosti, což znamená, že sada experimentů bude poskytovat kvalitní výsledky i při záměně elektrod.
- Možnost integrace pole elektrod; tím je umožněno paralelní měření řady elektrolytů nebo elektrochemických reakcí. V klasickém uspořádání je to také možné, ale spojením 20 klasic-kých elektrochemických klasických nádobek a 20 polarografů, ať klasické velikosti, nebo moderních přístrojů třeba firmy Palmsens (<u>http://www.palmsens.com/</u>), vzniká složitý a fakticky nepoužitelný systém. Jakmile je pole elektrod integrováno do senzoru velikosti několika milimetrů či centimetrů, situace se dramaticky mění a vzniká nový systém umožňující provádět zcela nové fyzikálně-chemické postupy a elektrochemická měření.
- Spojení s novými technologiemi; možnost integrace kanálů, předfiltrace, modifikace povrchů elektrod (nanostrukturované elektrody).
- Různorodost povrchových struktur; elektrochemické senzory a biosenzory vyrobené pomocí tlustovrstvé technologie umožňují používat nejen čisté elektrodové materiály, ale i slitiny a navíc umožňují vytvářet struktury povrchů.

Technologie má však i jednu nevýhodu, která pravděpodobně způsobovala pomalé uplatnění na trhu. Vývoj používá drahé materiály a i přesto, že se na aktivní ploše použije řádově miligramové množství aktivního elektrodového materiálu, při vývoji jsou nutná gramová i větší množství. Na vývoj jednotkových počtů kusů senzorů jsou tedy náklady výrazně vyšší než na vývoj klasické elektrody. Hlavní výhody nových technologických postupů se tedy projeví až v případě minimální sériové výroby.

8.2 Senzory

8.2.1 Senzor AC1

Prvním výrobkem, který naše firma zavedla na trh v oblasti tlustovrstvých elektrochemických senzorů byl senzor AC1.W*.R*. "Elektrochemická myšlenka", která se skrývá v návrhu senzoru AC1 je schématicky znázorněna (viz obr. 8.6)



Obr. 8.6: Princip elektrochemických senzorů – integrace elektrochemické cely do malého kompaktního senzoru

Snahou bylo integrovat klasické elektrody do jednotného, robustního a levného senzoru. Jeho prodej byl zahájen v roce 1993 a i po 12 letech neustále roste a nyní již dosahuje řádově desetitisíce kusů za rok. Topologie senzoru byla patentována a jejím cílem bylo vytvořit co nejhomogennější pole v oblasti pracovní elektrody. Senzor AC1 byl použit v řadě aplikací, jednou z nejzajímavějších byly senzory DNA, které byly použity například ve Velké Británii pro testování vlivu prostředí v atomových elektrárnách na zaměstnance. Tento výzkum provedl v roce 1995 prof. David Lax z univerzity v Hullu a nebyl dosud publikován.

V těsné spolupráci s Masarykovou univerzitou v Brně byla nalezena řada aplikací v oblasti biosenzorů pro stanovení toxických látek nebo imunosenzorů pro stanovení pesticidů. Jako čistě elektrochemickou aplikaci lze jmenovat použití tohoto senzoru pro stanovení arsenu v pitných vodách. Podrobnosti je možné nalézt v literatuře.

Zavedli jsme jednotnou strukturu označení senzorů, umožňující jejich specifikaci, snadnou orientaci v jejich typech i v možnostech, které nabízejí. Formule se skládá z obvykle dvoupísmenného kódu následovaného číslicí, za nimi je po tečce opět písmenný kód s číslicí, po další tečce písmenný kód s číslicí a takto specifikace pokračuje. Pro senzor AC1 má formule tvar:

AC1. W *. R *

První písmeno charakterizuje základní elektrochemickou metodu, která je pro senzor vhodná (A – amperometrie či C – konduktometrie), druhé písmeno charakterizuje nosný substrát, na kterém je senzor natištěn (C – keramika či P – plast) a číslice charakterizuje pořadí topologie senzoru. Další písmeno, W, specifikuje pracovní elektrodu a za ní následující znak charakterizuje materiál pracovní elektrody. (S – vrstva zlata a platiny, 1 – čisté zlato, 2 – čistá platina, 3 – čisté stříbro, 4, 5 – různé typy grafitu). Tento kód je oddělený tečkou a následuje specifikace referentní elektrody, označené písmenem R a číslem, které opět specifikuje použitý materiál (S – stříbro, 1 – směs stříbra a chloridu stříbrného, 2 – pochloridované stříbro).

Pro každý typ elektrody je vybrán základní standardní materiál, který je označen S. Například elektroda AC1.W1.RS (viz obr. 8.7) je určena pro amperometrická měření, je vytvořena na keramické podložce (99 % Al₂O₃), topologie má číslo 1, jako referentní elektroda slouží vrstva Ag. Senzory typu AC1 jsou vhodné pro širokou škálu aplikací, např. pro měření koncentrace H_2O_2 , glukosy, ferrikyanidu, enzymové aktivity a konstanty Michaelise–Mentenové. Bylo publikováno jejich využití jako imunosenzorů, senzorů DNA a herbicidů ^{2, 3}. O úspěšnosti návrhu topologie svědčí i skutečnost, že ji používají i další firmy ve světě (Německo, Thaiwan).



Obr. 8.7: AC1.W1.RS

Obr. 8.8: Základní rozměr a struktura senzoru AC1

8.2.2 Senzor AC2

Jedním z prvních zákaznických požadavků byla možnost kompenzace elektrochemických jevů na pozadí při elektrochemických reakcích. To vedlo k vytvoření senzoru AC2. V těsné blízkosti jsou na něm umístěny dvě pracovní elektrody, které jsou obklopeny společnou referentní elektrodou. Pracovní elektrody mohou být z různých materiálů, nebo ze stejného materiálu, nebo jedna z nich je modifikována a druhá ne. V tom případě na jedné elektrodě lze detegovat signál a elektrochemické jevy na pozadí, na druhé elektrodě je možno detegovat pouze jevy pozadí. To znamená, že rozdíl signálů (v nejjednodušším případě) umožňuje kompenzaci vzhledem k elektrochemickým jevům probíhajícím na pozadí. V mnoha případech je však situace složitější a pouhé odečtení signálu není postačující.





8.2.3 Senzor AC3

Tento senzor byl vytvořen na zakázku ve spolupráci s firmou Sycopel (Velká Británie) a jeho cílem je náhrada a miniaturizace drahých klasických elektrod. V podstatě se jedná o miniaturní elektrodu o šířce 2,5 mm a délce 50 mm, na jejímž konci je pracovní elektroda o průměru 1 mm, která je opět vyrobená z platiny, zlata, případně jiných materiálů.



Obr. 8.10: Senzor AC3

Obr. 8.11: Senzor AC4

8.2.4 Senzor AC4

Jako pomocné elektrody se používají platinové dráty či plíšky, vždy je však množství použité Pt relativně velké. U senzoru AC4 je na korundové podložce nanesena vrstva 5-7 µm Pt. Plocha je srovnatelná s běžnými pomocnými elektrodami, avšak cena je výrazně nižší. Elektrodu lze také použít jako velkoplošnou platinovou elektrodu při mnoha elektrochemických experimentech nebo při experimentech s korozí.

8.2.5 Senzor AC5

Senzor AC5 byl vyvinut pro Masarykovu univerzitu v Brně. Jednotlivé elektrody byly modifikovány protilátkami a senzor byl používán pro imunochemické stanovení např. herbicidů. Podrobnosti lze nalézt v literatuře ^{4, 5, 6}.



Obr. 8.11: Senzor AC5



Obr. 8.12: Senzor AC6

8.2.6 Senzor AC6

Senzor se dvěma pomocnými elektrodami byl vytvořen na zakázku pro univerzitu v Hullu na detekci dusičnanů. Měření bylo prováděno využitím elektrochemické generace činidla. Naše firma nemá podrobné informace o metodě měření. Zákazník zadal pouze topologii, kterou naše firma vyrobila.

8.2.7 Senzor AC7

Senzor byl vyvinut pro Vojenský technický ústav ochrany a použit v přístroji pro detekci bojových otravných látek – BioNA. Senzor byl spojen s miniaturní difuzní komůrkou, kde dochází k přenosu látek ze vzduchu do roztoku. Analýzou roztoku je možno zjistit složení plynu⁸.

8.2.8 Senzor AC8

Senzor byl vyvinut pro Masarykovu univerzitu v Brně a umožňoval současné měření čtyř analytů. Referentní a pomocná elektroda byly externí.





Obr. 8.13: Senzor AC7

Obr. 8.14: Senzor AC8

8.2.9 Senzor AC9

Senzor byl vyvinut v EU projektu Intellisens ve spolupráci s universitou v Lundu. Jeho užití bylo v oblasti detekce znečišťujících látek v odpadních vodách. Elektrody byly po dvou modifikovány enzymy (vyšší spolehlivost). Senzor umožňoval stanovení látek inhibujících acetylcholinesterasu, fenolytické látky a redoxní potenciál.

8.2.10 Senzor AC10

Senzor je příkladem relativně velmi komplikovaného systému 20 elektrod umístěných v okolí jedné referentní elektrody. Systém byl vyvinut s cílem realizovat novou elektrochemickou metodu, kterou jsme pracovně nazvali "přímá voltametrie". Pro tuto metodu byl vyvinut speciální potenciostat, který umožňuje každou elektrodu polarizovat na svůj vlastní potenciál, čímž je možno měřit vývoj elektrochemické reakce v čase na jednotlivých elektrodách polarizovaných na různé potenciály. Je to fakticky velmi podobný výsledek, jaký dává cyklická voltametrie – ta však udává řez v ploše závislosti napětí, času a odezvy senzoru. Výsledek přímé voltametrie s užitím senzoru AC10 je na obr. 8.17.





Obr. 8.15: Senzor AC9

Obr. 8.16: Senzor AC10



8.2.11 Senzor AC11

Senzor umožňuje praktické měření malých objemů vzorku (cca 50 µl) v mikropipetě firmy Ependorf. Konická část na jeho konci je totožná s konickou částí vialek firmy Ependorf o objemu 1,5 ml.

8.2.12 Senzor AC12

Senzor je ukázkou zákaznického senzoru, byl vyvinutý pro Masarykovu univerzitu pro průtokové měření na poli elektrod.







Obr. 8.19: Senzor AC12

8.2.13 Senzory CC1 a CC2

Všechny dosud popsané senzory byly určeny pro amperometrická měření. Naše firma avšak vyvinula i senzory pro konduktometrická měření a i pro některé složitější aplikace. Senzor CC1 je příkladem jednoduchého vodivostního čidla, jehož aktivní část je tvořena hřebínkovými elektrodami (onr. 8.20). Složitější topologie obsahuje dvě měřící místa s dvěma systémy hřebínkových elektrod. Systém byl navržen pro diferenciální konduktometrické měření (obr. 8.21).



Obr. 8.20: Senzor CC1



8.3 Příslušenství k senzorům

Z reakcí zákazníků využívajících senzor AC1 jsme pochopili, že naše firma nemůže zůstat pouze u výroby senzorů – pro použití u je nutno senzor připojit, vložit jej do průtokové komůrky, která zajistí definovanou hydrodynamiku v okolí pracovní elektrody, je nutno vytvářet software, který vyhodnotí odezvy. Všechny tyto podněty od zákazníků byly integrovány do příslušenství, které je k senzorům dodáváno a o kterém bude pojednáno dále.

8.3.1 Průtokové cely (Flow cells - FC)

Bylo publikováno mnoho článků, které řeší vztah odezvy elektrochemického senzoru vzhledem k průtoku, domníváme se ale, že tato problematika je stále nedoceněna. Odezva senzoru závisí zásadním způsobem na přenosu hmoty mezi kapalinou a povrchem elektrody a je nutno připustit, že toto je zásadní nevýhodou vzhledem k optickým metodám. Elektrochemické senzory měří z povrchu, kdežto optické senzory integrují signál z celého objemu vzorku. Znamená to, že optické senzory mohou být fakticky robustnější než elektrochemické.

Přestože je tento problém velmi složitý a pravděpodobně v některých případech nelze dosáhnout optimálního řešení, pokusili jsme se alespoň v rámci možností dosáhnout co nejlepšího řešení. Experimentálně byla vytvořena sada průtokových cel typu wall-jet, přičemž tyto cely se lišily průměrem kapiláry, kterou kapalina proudí na pracovní elektrodu a různými průměry vstupních a výstupních kapilár. Průměry vstupních a výstupních kapilár ovlivňují gradienty tlaku uvnitř průtokové cely, a tím také její hydrodynamické vlastnosti. Podobně u systému "thin layer" byla optimalizována geometrie tenké vrstvy analyzovaného roztoku u pracovní elektrody.

Pro všechny tyto cely bylo provedeno měření jejich elektrochemických vlastností v závislosti na průtoku a jejich vyhodnocením byly nalezeny optimální geometrické rozměry vzhledem k minimální závislosti signálu na průtoku a technologickým možnostem výroby. Na tomto místě je nutno zmínit, že závislost odezvy senzoru na průtoku nelze odstranit, lze ji pouze minimalizovat. V okamžiku, kdy byly tyto optimální rozměry nalezeny, byly vytvořeny formy, takže v současné době jsou cely vyráběny z jediného typu formy a geometrické rozměry jsou u všech výrobků totožné. To znamená, že přesto, že nejsme schopni naprosto přesně specifikovat funkční závislosti a souvislost mezi průtokem a odezvou, zkalibruje-li si experimentátor svoje měření pro jednu průtokovou celu, je zaručeno, že s vysokou přesností při záměně cel a senzorů budou zachovány tytéž hydrodynamické podmínky, to znamená podobná, nebo téměř stejná odezva. Základní uspořádání průtokové cely wall-jet je na obrázku 3.2.



Obr. 8.22: Průtoková cela FC2



Obr. 8.23: Základní uspořádání průtokové cely wall-jet

Velmi zajímavou aplikací je stimulace elektrochemického měření optickou cestou. Technicky je toto zařízení realizováno v průtokové cele FC 3, která integruje "thin film" průtokové uspořádání s tím, že těsně pod průtokovým kanálem je integrována vysoce svítivá LED-dioda. Tento systém byl vyvinut pro detekci herbcidů ve spolupráci s Mikrobiologickým ústavem v Třeboni. Systém umožňuje detekci herbcidů v koncentracích až 10^{-8} mol L⁻¹. Elektrochemická cela FC9 je navržena jako součást detektoru pro elektrochemicky aktivní látky (tzn. látky, které se dají oxidovat nebo redukovat v závislosti na potenciálu vloženém na pracovní elektrodu). Detektor se skládá z pole pracovních elektrod obklopených referentní elektrodou (tj. senzor AC9). Každá elektroda se polarizuje na jiný potenciál. Tímto způsobem lze najednou měřit osm signálů. Vzájemné ovlivňování elektrod je potlačeno radiálním tokem analyzované kapaliny. Cela je uspořádána tak, že nad senzorem je umístěn disk, jehož středem vstupuje kapalina. Rotaci disku se kapalina rozvádí od středu senzoru k okrajům.



8.3.2 MFS

Optimalizované průtokové cely jsou využity v přístroji MFS ⁹. Klíčovou myšlenkou je dvoukruhové čerpadlo, které míchá 2-10 ml pracovního roztoku, přičemž 90-95 % roztoku probíhá míchacím okruhem a 5-10 % pracovního roztoku prochází detekční celou. Míchací okruh zabezpečuje, že po přídavku vzorku je do 100 ms roztok homogenně promíchán. Druhý okruh kontinuálně odebírá vzorky a monitoruje probíhající reakce s vzorkováním 0,1 s až 10 min. Přístroj je používán pro vsádkovou ("batch") analýzu a měření aktivit enzymů.

Přístroj MFS se stal základem pro další vývoj, ve spolupráci s VUT Brno byl vyvinut biosenzorový analyzátor toxicity (BTA) sloužící k měření účinků velmi nízkých koncentrací organofosforových sloučenin, pesticidů, bojových ochranných látek a toxických karbamátů. Aparát byl vyvinut v rámci projektu ANTOPE, financovaného MPO FD-K2/53 a je patentován českým patentem ⁹. Žádný podobný přenosný přístroj, který by umožňoval měření velmi nízkých koncentrací toxických látek, ve světě neexistuje. Přístroj využívá acetylcholinesterasu (AChE) imobilizovanou na pracovní elektrodě AC1. V případě přítomnosti toxických organofosforových insekticidů nebo karbamátových látek je možno sledovat pokles aktivity AChE, který je úměrný toxicitě vzorku. Přístroj je přenosný a je možno jej používat v polních podmínkách např. pro kontrolu, zda při ošetření zemědělských plodin insekticidy nedošlo ke kontaminaci vod.

8.3.3 PP a LP

Měření s využitím cel FC2 nebo FC3 vyžaduje velmi malé průtoky. Proto byla vyvinuta miniaturní peristaltická a lineární čerpadla (série PP a série LP). Vyznačují se napájecím napětím 3 V (dva monočlánky) a proudem cca 100-150 mA a poskytují průtoky 10 nl až 200 µl za minutu. Byla vyvinuta pro kapesní přístroje a jsou velmi užitečná jako autonomní systémy, které mohou např. odebírat vzorky či dávkovat malá množství aditiv v průběhu chemických technologických procesů. Jejich velmi malý příkon umožňuje, aby byla použita pro odběr vzorku v polních podmínkách (např. v oblasti ekologie, monitorování životního prostředí, analýzy průtoků, atp.).



Obr. 8.25: Peristaltická pumpa PP10

8.4 Speciální aplikace

Aplikace dosud uvedené v tomto textu jsou dnes více či méně klasické. Firma se však snaží o intenzivní výzkum zejména v oblastech směřujících k aplikacím typu lab on chip. Výsledkem jsou dvě mezinárodní patentové přihlášky. První ¹⁰ chrání technologii umožňující přípravu složitých struktur kanálů, druhá ¹¹ chrání technologii přípravy nanostrukturovaných povrchů elektrod.

8.4.1 Nanostrukturované elektrody

Jednou z velmi význačných oblastí, které potenciálně mohou zabezpečit zásadní zlepšení vlastností elektrochemických senzorů, je vytváření speciálních struktur na jejich povrchu. V projektu Mikroprotein byly vytvořeny první vzorky nanostrukturovaných elektrod. Myšlenka je velmi jednoduchá: Je známo, že odezva planárního elektrochemického detektoru se řídí Cotrellovou rovnicí, to znamená, že signál s časem klesá. Tento pokles působí problémy při filtraci signálu, systém je časově nestabilní, dochází k saturacím a zejména k nestabilitě v případě změn či vyčerpání analytu v blízkosti elektrody. Na druhé straně je známo, že mikroelektrody velmi malých rozměrů díky sférické symetrii difuze zabezpečují ustálení signálu v čase. Nabízí se myšlenka, že pole mikroelektrod může významným způsobem zvýšit časovou stabilitu odezvy elektrochemického čidla. Vzniká tedy idea vytvořit pole mikroelektrod, které by mělo dostatečně velký signál, a na druhé straně by zajišťovalo vlastnosti mikroelektrod. Tento systém byl vytvořen, byl experimentálně ověřen a bylo zjištěno, že skutečně je možné takové elektrody připravovat a že existuje časové okno, kde jejich odezva nezávisí na čase¹². Existence časového okna vyplývá z podstaty dějů na poli mikroelektrod. V případě dostatečně dlouhého času se totiž Nernstovy vrstvy, ve kterých je analyt vyčerpán, začnou překrývat a přestože se jedná o pole mikroelektrod, jejich chování bude totožné jako u planární elektrody. Výsledky těchto měření jsou v publikacích ¹³.

Nanostrukturované elektrody mají velký význam i z hlediska jiných aspektů, zejména z hlediska biosenzorů. Ukazuje se totiž, že v některých případech může být imobilizace bioaktivních látek na povrchu senzoru natolik hustá, že tato imobilizovaná vrstva sama o sobě vytváří velmi významnou bariéru pro přenos hmoty mezi aktivními částicemi biovrstvy a elektrochemicky aktivním povrchem. Toto je zejména velmi důležité u tzv self-assembled (samo se organizujících) vrstev a imunosenzorů. Skutečně imobilizací biolátek na nanostrukturované elektrody se podařilo výrazným způsobem zlepšit a zvýšit odezvu senzoru¹⁴.

Práce spojené s přípravou nanostrukturovaných elektrod vyústily do nové technologie, která umožňuje přípravu pracovních elektrod z materiálů uvedených v následujícím výčtu. V mnoha případech je možno zajistit i definovanou čistotu použitého materiálu (např. Au 99,9%). Na speciální požádání jsme schopni vyrobit elektrodu z Al, Sb, Be, Bi*, Cd, Glassy carbon*, Ce, Cr, Co, Cu, Dv, Er, Gd, Au, Hf, Ho, In, Fe, La, Pb, Li*, Lu, Mg*, Mn, Mo, Nd, Ni*, Nb, Pd, Pt, Pr, Re, Sm, Sc, Ag, Ta, Er, Th, Tm, Sn, Ti, W, U, V, Yb, Y, Zn, Zr, Ir + slitiny, které neuvádíme¹.

U výše zmíněných kovů je velmi drahé minimální objednací množství základního materiálu. Dále u každého kovu je nutný základní rozbor technologie např. vzhledem k jeho oxidaci. Proto nelze stanovit cenu všeobecně a pro každý případ je nutno stanovit speciální cenu dle konkrétní poptávky zákazníka.

Novou technologii vkládání chemicky čistých látek má naše firma patentovanou a na rozdíl od klasického sítotisku se nejedná o levnou technologii. Pouze základní kovový materiál elektrody v množství na 1 000 elektrod stojí 10 až 20 tisíc Kč s tím, že materiál na tisíc kusů elektrod je minimální množství, které je možné objednat od dodavatele. Na druhé straně nová technologie nemá klasickou analogii a otevírá nové možnosti ve vývoji elektrochemických senzorů.

V předchozím případě byla nanostrukturace vytvářena litograficky a v podstatě se jednalo o náročnou technologii, zejména z toho důvodu, že nanostruktura byla reálně vytvořena v jistých dimenzích. Existuje i jiný přístup ve vytváření nanostruktur na povrchu elektrod, kdy cílem je vy-tvořit porézní nebo relativně hladkou strukturu. V případě porézní struktury se dosáhne vysoký aktivní povrch pracovní elektrody a navíc v případě biosenzoru lze dosáhnout, že bioaktivní látka pronikne do struktury elektrody. Vytvoří se tím jednak dobrá a stabilní vazba mezi mikroelektrodou a bioaktivní látkou, jednak reakce probíhá na velkém povrchu.

Při jiných biosenzorových aplikacích zejména v oblasti imunosenzorů by však bylo na závadu, kdyby protilátky, které specificky reagují na povrchu elektrody, byly uvnitř složité struktury, protože tím by fakticky byly znemožněny jejich reakce. V tomto případě je důležité, aby povrch byl co nejhladší. Tyto možnosti lze dosáhnout různou technologií výpalu a různým stupněm sintrování zrn aktivních materiálů na povrchu elektrody. Fakticky se jedná o nanomateriály, neboť charakteristická velikost zrn, které používáme pro výrobu našich senzorů, se pohybuje mezi 100 nm a jedním mikrometrem. Na obr. 8.26 jsou mikrofotografie platinové elektrody s porézní strukturou a vliv vlastností vysokého povrchu platinové elektrody s porézní strukturou ukazuje obr. 8.27 na kalibrační křivce, ze které je vidět reprodukovatelnost měření. Pro kalibraci byl použit peroxid vodíku, který je elektrochemicky aktivní a je produktem řady enzymových reakcí.

¹ Pro materiály označené hvězdičkou: *Bi – velmi snadno oxiduje a je velmi měkký, elektrody nelze snadno a levně přepravovat; *Glassy carbon – skelný uhlík, významný materiál z hlediska elektrochemie pro využití v tištěných elektrodách, je však nutno použít modifikovanou technologii; *Li - vysoce reaktivní, speciální podmínky dodání senzoru; *Mg - vysoce reaktivní, speciální podmínky dodání senzoru; *Ni - nanokrystalic-ká struktura


Obr. 8.26: Fotografie povrchu platinové elektrody pořízená elektronovým mikroskopem



Kalibraèní køivky pro peroxid vodíku

Obr. 8.27: Kalibrační křivka pro peroxid vodíku

Je nesmírně zajímavé, že faktický lineární rozsah měření je 6 řádů a jestliže elektronické zařízení má spolehlivě pracovat v tomto rozsahu, je nutno, aby převodníky pracovaly o 1 řád lépe, než je dolní rozsah, a o 1 řád lépe, než je horní rozsah. Fakticky to znamená dynamiku 8 řádů. Pro takové aplikace již je zásadním problémem zajištění elektronických součástek od nejjednodušších odporů, kapacitorů až po převodníky. Podařilo se vyřešit tyto otázky v bioanalyzátoru, jehož efektivní citlivost převodníku je 30 bitů bez přepínání. Fakt, že tato přesnost je dosažena bez přepínání, je nesmírně důležitý, neboť při přepínání rozsahů dochází k depolarizaci senzoru, což vede k nestabilitě signálu a zejména měření velmi malých koncentrací a s následujícím měřením vysokých koncentrací dochází k problémům s vyhodnocením signálu.

Tento rozsah kalibrační křivky je výsledkem spojení optimalizované průtokové cely, speciálních převodníků a softwaru, který byl zmíněn o několik řádků výše. Fakticky tyto dva vlivy zvýšily citlivost elektrochemických senzorů o 2-3 řády.

Kombinací výše zmíněných poznatků (speciální převodníky s vysokým rozlišením, optimalizace přenosu hmoty mezi povrchem senzoru, vzorkem a vhodnou strukturou elektrody) a sofistikovanými algoritmy filtrace signálu se daří dosáhnout zlepšení. Tyto skutečnosti se nám podařilo prokázat, jak ve srovnávacích měřeních, tak i ve srovnání s jinými komerčními přístroji, kde naše senzory ve spojení s optimalizovanými průtokovými celami a specializovaným softwarem jsou standardně schopny měřit o 2-3 řády nižší koncentrace.

V předchozím textu bylo zmíněno, že elektrochemické senzory jsou v mnoha případech méně robustní než optické metody. Tato skutečnost vychází z fyzikálních principů a pravděpodobně ji nelze vyřešit. Abychom alespoň částečně zvýšili robustnost elektrochemických metod, vyvinuli jsme dva pomocné přístroje, Dummy cell a testovací senzor. Dummy cell je jednoduchý přístroj, který obsahuje řadu typických elektrochemických odezev, které jsou však realizovány čistě elektronickou cestou. Odezvy jsou přesně definovány a jsou časově neměnné. Uživatel si může ověřit, zda jeho přístroj správně vyhodnocuje polarografickou vlnu či zda jsou správně nastaveny převodníky přístrojů, nebo že nejsou poškozeny některé hladiny převodníků. Testovací senzor je geometricky zcela totožný se senzorem AC1, jeho odezva je však vytvořena elektronickou cestou. Je-li vložen do systému místo elektrochemicky aktivního senzoru AC1, je možno zkontrolovat vlivy rušení, svody, zvlhnutí kontaktů, svody způsobené povrchovými proudy a řadu dalších vlivů, které mohou ovlivnit naměřený signál při jeho přenosu od místa měření k místu vyhodnocení. Nestandardní odezva způsobená výše zmíněnými vlivy se často velmi obtížně odhaluje.

Poděkování

V závěru zbývá poděkovat řadě spolupracujících firem, organizací a vysokých škol:

Ve spolupráci s VUT Brno byl řešen přístroj BTA pro stanovení pesticidů v rámci projektu MPO – Antope.

V dlouholeté spolupráci s VTUO byly vyvíjeny senzory pro detekci nervově paralytických látek.

Ve spolupráci se slovenskou AV v Bratislavě byly připraveny speciální senzory mikroeletronickými technologiemi na Si. Tato spolupráce pokračuje s cílem technologicky zlepšit metody kombinující elektrochemické senzory s optickými metodami.

Ve spolupráci s firmou eDAQ jsou rozpracovány nové elektrochemické metody.

Ve spolupráci v rámci projektu Mikroprotein s výzkumným centrem Demokritos v Aténách byly vyřešeny metody fotolitografického nanášení bioaktivních látek ^{9, 11}.

Ve spolupráci s univerzitou v Pardubicích byly připraveny senzory obsahující bismut a speciální grafitové elektrody ^{16, 17, 18, 19}.

Ve spolupráci s Mikrobiologickým ústavem v Praze byly vytvořeny senzory s optickou stimulací pro detekci herbicidů ^{20, 21}.

Více než 15 let spolupracujeme s Masarykovou univerzitou v Brně s profesorem Macholánem a doc. Skládalem. V této spolupráci byla vytvořena řada nových elektrochemických senzorů^{22, 15.}

Ve spolupráci s firmou BST se podílíme na vývoji senzorů pro detekci mikroorganismů v potravinářském průmyslu. Výsledky naší práce byly podpořeny řadou projektů národních i mezinárodních. Zejména je to projekt TECHNOS (TC-5-119), IBIS (FT-TA/089), ANTOPE (FD-K2/53), z mezinárodních projektů BIOMEDNANO (NMP4-CT-2006-017350), MIKROPROTEIN (G5RD-CT-2002-00744), INTELLISENS (QLK3-CT-2000-01481).

Literatura

- [1] Anthony P. F. Turner, Stuart P. Hendry, Marco F. Cardosi (Cranfield Institute of Technology): US Patent 4882013.
- [2] Skládal P.: Detection of organophosphate and carbamate pesticides using disposable biosenzors based on chemically modified electrodes and immobilized cholinesterase, Analytica Chimica Acta 269, 281 (1992).
- [3] Skládal P.: Determination of organophosphate and carbamate pesticides using a cobalt phthalocyanine-modified carbon paste electrode and a cholinesterase enzyme membráně, Analytica Chimica Acta 252, 11 (1991).
- [4] Kaláb T., Skládal P.: A multichannel immunochemical senzor for determination of 2,4dichlorophenoxyacetic acid, Analytica Chimica Acta 316, 73 (1995).
- [5] Kaláb T., Skládal P.: A disposable amperometric immunosenzor for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, Analytica Chimica Acta, Elsevier 304, 361 (1995).
- [6] Skládal P.: Advances in Electrochemical Immunosenzors, Electroanalysis 10, 737 (1997).
- [7] Krejčí J., Grosmanová Z., Krejčová D., Skládal P., Šafář B.: NATO workshop "Commercial and Precommercial Cell Detection Technologies for Defence against Bioterror - Technology, Market and Society", Brno 3-6 September 2006
- [8] Dock E., Christenson A., Sapelnikova S., Krejci J., Emnéus J., Ruzgas T.: A steady-state and flowthrough cell for screen-printed eight-electrode arrays, Analytica Chimica Acta 531, 165 (2005)
- [9] Zařízení pro provádění elektrochemických a biosenzorových měření Krejčí J. (Ing. Ilja Krejčíengineering): PV 1996-3779.
- [10] Součástky s trojrozměrnou strukturou připravené tlustovrstvou technologií a způsob jejich výroby. Krejčí J. (Ing. Ilja Krejčí-engineering): PV 2002-1926
- [11] Nanostrukturovaná pracovní elektroda elektrochemického senzoru, způsob její výroby a senzor obsahující tuto pracovní elektrodu. Krejčí J., Malý J., Stejskalová R. (BVT Technologies): PV 2005-294
- [12] Tallman D. E., Petersen S. L.: Composite Electrodes for Electroanalysis: Principles and Applications, Electroanalysis 2, 499 (1990)
- [13] Krejčí J., Malý J., Stofik M., Argitis P., Chatzichristidi M., Misiakos K., Stejskalová R.: The development of generic nanostructured ceramic based electrodes for enhancement of mass transport and increased sensitivity of biosenzor, Bioelectrochemistry, 2005, Coimbra, Portugal – poster
- [14] Malý J., Krejčí J., Ilie M., Jakubka L., Masojídek J., Pilloton R., Sameh K., Steffan P., Stryhal Z., Sugiura M.: Monolayers of photosystem II on gold electrodes with enhanced senzor response-effect of porosity and protein layer arrangement, Anal. Bioanal. Chemistry 381, 1558 (2005)
- [15] Boháčková J., Krejčí J., Macholán L.: A new design of enzyme membrane biosenzor for the determination of glucose in a wide concentration range, Scripta Fac. Sci. Nat. Univ. Masaryk. Brun. 23, 3 (1993).
- [16] Metelka R., Krejčí J., Vytřas K.: Screen-printed bismuth electrodes. In ESEAC 2006 11th International Conference on Electroanalysis, Book of Abstract: June 11-15, 2006, Bordeaux. Bordeaux : European Society for Electroanalytical Chemistry, 2006, s. P2-101.
- [17] Metelka R., Krejčí J., Vytřas K.: Bismutové tištěné elektrody. In Barek, J.; Navrátil, T. (Eds.). Moderní elektrochemické metody XXVI: 9. - 12. 5. 2006, Jetřichovice. Praha : Česká společnost chemická, 2006, s. 49-50.
- [18] Metelka R., Stočes M., Krejčí J., Vytřas K.: Screen printed carbon electrodes modified with bismuth powder. In Aggarwal S. K., Chander K.; Gopinath, N. (Eds.). ELAC-2007, International Conference

on ElectroAnalytical Chemistry and Allied Topics: March 10-15, 2007, Shilonbagh. Mumbai : Indian Society for ElectroAnalytical Chemistry, 2007, s. 107-111. ISBN 978-81-901950-0-3.

- [19] Metelka R., Stočes M., Krejčí J., Bartoš M., Švancara I., Kotzian P., Vytřas K.: The development and characterisation of new types of screen-printed bismuth based senzors. In Vytřas K., Kalcher K. (Eds.). Sensing in Electroanalysis, Vol. II. University of Pardubice, Pardubice 2007.
- [20] Souček P., Krejčí J., Máchová J., Frolík J., Malý J., Krejčová D., Kopecký J., Masojídek J.: The biosenzor toxicity analyser for detection of photosynthetic herbicides, The Eight World Congress on Biosenzors, 2004, Granada, Spain - poster
- [21] Souček P., Krejčí J., Frolík J., Malý J., Masojídek J.: A biosenzor toxicity analyser for detection of photosynthetic herbicides. 7th Workshop on Biosenzors and Bioanalytical μ-Techniques in Environmental and Clinical Analysis, Kuşadası, Turecko, September 10-14, 2006.
- [22] Skládal P., Macholán L.: Biosenzory-současný stav a perspektivy, Chemické listy 91, 105 (1997).

9. ELEKTROCHEMICKÉ DNA-BIOSENZORY. ANALÝZA NUKLEOTIDOVÝCH SEKVENCÍ, MUTACÍ A POLYMORFISMŮ

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

9.1 Úvod

Hybridizací DNA (obecně nukleových kyselin, NK) se rozumí tvorba dvoušroubovice DNA (RNA, hybridu RNA•DNA či kterékoliv z přirozených NK s jejich syntetickými, chemicky modifikovanými analogy) ze dvou komplementárních vláken. Jedná se v podstatě o jev, který poprvé popsal v šedesátých letech minulého století J. Marmur [1] jako "renaturaci" DNA. Komplementární polynukleotidová vlákna, která tvoří dvoušroubovici "nativní" DNA, lze od sebe oddělit například zahřátím; tento proces se označuje jako denaturace DNA. Za vhodných podmínek může proběhnout i proces opačný: komplementární vlákna dvoušroubovici opět vytvoří – dojde k "renaturaci" (obr. 9.1A). O "hybridizaci" nebo "molekulární hybridizaci" obvykle hovoříme v případě analytického využití tohoto jevu, který patří mezi fundamentální principy, na nichž jsou založeny metody současné molekulární biologie, včetně jejich aplikací v medicíně, agrobiologii a dalších praktických oblastech.



Obr. 9.1: (A) Schéma denaturace a renaturace DNA. (B) Hybridizace cílového vlákna DNA s komplementární sondou zakotvenou na povrchu

Techniky molekulární hybridizace využívají specifický úsek NK (hybridizační sondu) o známé sekvenci bazí k detekci komplementárního vlákna DNA nebo RNA. Hybridizační sonda může být připravena buďto synteticky (chemickou cestou), nebo technikami molekulární biologie (klonováním určitého úseku DNA do bakteriálních plasmidů, amplifikací fragmentů DNA pomocí polymerasové řetězové reakce – PCR, *in vitro* transkripcí pro přípravu sond RNA apod.). Vystavíme-li za vhodných podmínek sondu analyzovanému vzorku, ve kterém je přítomno komplementární cílové vlákno NK, dojde 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. 9.1B). 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, jichž může být ve vzorku obrovský nadbytek). Výběr povrchu pro hybridizaci DNA závisí na tom, jakou me-

todou bude tvorba hybridu detegována. Může to být nitrocelulosová nebo nylonová membrána (na ní se obvykle přenášejí, "blotují" [2], fragmenty DNA separované elektroforézou v agarosovém gelu a pro detekci se většinou používají radioaktivní značky), skleněná destička (v čipových analyzátorech, kde se využívá optické detekce), magnetické mikročástice (ty se osvědčily jako výborný nástroj pro prekoncentraci a separaci nejen specifických DNA a RNA, ale také proteinů a dalších biomolekul), nebo elektroda (která se po zakotvení hybridizační sondy stává elektrochemickým biosenzorem pro hybridizaci DNA).

Výzkum a vývoj elektrochemických biosenzorů pro analýzu nukleotidových sekvencí, včetně detekce mutací a sekvenčních polymorfismů v určitých místech genomu, se v uplynulém desetiletí těšila mimořádné pozornosti (přehledně [3-12]). Předpokládá se, že by zařízení pracující na elektrochemické platformě mohla v blízké době doplnit a v některých případech i nahradit zařízení optická (obvykle využívající fluorescence), která jsou dominantní v současných metodikách využívaných v oblasti genomiky, studia genové exprese na úrovni RNA a molekulární diagnostiky vycházející z těchto principů. Výhodou elektrochemické detekce by vedle vysoké citlivosti měly být relativně nízké náklady, což by mohlo přispět k rozšíření těchto technik mimo specializovaná vědecká pracoviště a velké kliniky např. 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 PCR, hybridizace DNA a její detekce) vedoucí k jednoduše interpretovatelnému signálu asi tak, jak v současnosti fungují glukosové senzory (které ovšem pracují na jednodušším principu).

9.2 Elektrody modifikované hybridizační sondou jako elektrochemické biosenzory

Biosenzorem se obecně rozumí zařízení sestávající z biorekogničního prvku (rozpoznávací nebo "citlivé" vrstvy), který specificky interaguje s molekulami příslušného analytu, a z převodníku signálu, který proběhnuvší interakci převádí na měřitelný signál (podrobnější definici biosenzorů lze nalézt v jiných kapitolách těchto skript). V případě elektrochemického biosenzoru pro hybridizaci DNA je biorekogničním prvkem hybridizační sonda, analytem komplementární cílové vlákno a převodníkem signálu pracovní elektroda, na jejímž povrchu je sonda imobilizována. Konstrukce funkčního elektrochemického biosenzoru pro hybridizaci DNA zahrnuje několik nezbytných kroků: (a) výběr pracovní elektrody, (b) imobilizaci sondy (včetně vhodné modifikace této sondy a úpravy povrchu elektrody), (c) blokování neobsazeného povrchu elektrody proti nespecifické adsorpci nespecifické DNA a dalších látek Způsob imobilizace sondy a procedury s tím související jsou ovlivněny jednak typem (materiálem) pracovní elektrody, jednak zvolenou detekční strategií (viz dále). Podrobněji se touto problematikou zabývá řada nedávno publikovaných přehledných člán-ků a knižních kapitol (např. [4, 6, 11, 12]), zde se zaměříme pouze na několik typických příkladů.

9.2.1 Imobilizace hybridizačních sond na elektrodách

Patrně nejrozšířenějšími typy elektrod v oblasti elektrochemické detekce hybridizace DNA jsou elektrody zlaté a uhlíkové. Zakotvení hybridizačních sond na zlatých elektrodách je založeno na interakci thiolových skupin kovalentně navázaných na jednom z konců syntetických oligonukleotidů (ON) s povrchem zlaté elektrody (chemisorpce síry na zlatě). Výhodou této techniky je orientované zakotvení sondy – ta je navázána na elektrodě jedním koncem, za vhodných podmínek je orientována víceméně kolmo na povrch a její zbytky bazí tak mohou snadnou interagovat se svými protějšky v cílovém vlákně. Podrobné studie vrstev ON na zlatých elektrodách ukázaly, že pro dosažení optimálního citlivosti detekce hybridizace DNA je nutno správně "nastavit" hustotu molekul sondy na povrchu (je-li molekul sondy příliš málo, citlivost je nízká pro malý počet zachycených cílových vláken; je-li hustota sondy naopak příliš vysoká, je výtěžek hybridizace ze sterických důvodů nízký) [6, 11]. Optimálního pokrytí elektrody sondou lze dosáhnout pomocí derivátů thioalkanů (např. 6-merkapto-1-hexanolu), které "mezi" zakotvenými ON vytvoří samoorganizovanou vrstvu a kromě žádoucího "naředění" sondy zajistí i blokování povrchu elektrody proti nespecifické adsorpci.

Na uhlíkových elektrodách lze imobilizovat DNA jednoduše pomocí fyzikální adsorpce (způsob osvědčený pro elektrody z pyrolytického grafitu, pastové elektrody a elektrody tištěné technikou "tlusté vrstvy") . Přestože tento způsob nezajišťuje specifickou orientaci zakotveného vlákna (adsorbované molekuly DNA na povrchu obvykle "leží"), hybridizační senzory připravené tímto způsobem jsou funkční. Jejich nevýhodou je relativní nestabilita (může dojít k desorpci adsorbovaného vlákna, resp. k jeho výměně za molekulu NA z roztoku, aniž dojde k hybridizaci) a tudíž je jejich využití prakticky omezeno na experimenty využívající krátké časy hybridizace při nízké teplotě. Na druhou stranu se jedná o velmi jednoduchý a levný způsob imobilizace DNA na elektrodě, vhodný zejména pro "obrácené" uspořádání, kdy je na povrch elektrody adsorbována přímo cílová DNA a ta je (po zablokování "volného" povrchu elektrody např. mléčnými proteiny nebo hovězím serumalbuminem) hybridizována se značenou sondou [13]. Adsorbovat DNA na povrch uhlíkové elektrody lze i z denaturujícího prostředí (např. 0,2M-NaOH), čehož lze využít pro účinnou separaci řetězců přirozených cílových DNA (např. amplifikovaných pomocí PCR).

Kovalentního zakotvení sondy na uhlíkových elektrodách lze dosáhnout např. využitím derivátů karbodiimidu, který zprostředkuje vazbu mezi aminoskupinami DNA a funkčními skupinami na povrchu elektrod (např. elektrochemicky generované karboxylové skupiny). Za vhodných podmínek lze takto imobilizovat jakékoli NK (i nemodifikované), protože příslušné funkční skupiny se nacházení v jejich bazích. Náhodné zakotvení sondy přes aminoskupinu na zbytku baze uvnitř nukleotidové sekvence, která má rozpoznat sekvenci cílového vlákna, je však z hlediska funkčnosti senzoru problematické. Vhodnější je připravit ON koncově modifikované primární aminoskupinou, které se na aktivovaný povrch elektrody navážou orientovaně a mohou účinně hybridizovat s cílovou DNA. Analogickým způsobem lze zakotvit hybridizační sondy na uhlíkových elektrodách modifikovaných deriváty silanu nesoucími vhodné reaktivní skupiny, vodivými polymery (elektropolymerizovaný pyrrol) apod. Stejným způsobem byly pro účely vývoje hybridizačních senzorů využity i jiné elektrodové materiály, např. cínem dopovaný oxid inditý (ITO) [10].

Rtuťové a amalgamové elektrody dosud nebyly jako převodníky signálu v elektrochemických biosenzorech pro hybridizaci DNA využívány (našly však uplatnění v tzv. "dvoupovrchových technikách", viz část 9.3.1.1). Dřívější studie ukázaly, že chování DNA na rtuťovém povrchu je silně ovlivněno její strukturou a že pomocí voltametrie na rtuťových a amalgamových elektrodách lze nejen odlišit jednořetězcovou a dvouřetězcovou DNA, ale rozpoznat i malé změny v konformaci dvouřetězcové DNA [8, 14, 15]. Vysoká citlivost ke struktuře DNA souvisí se silnou adsorpcí hydrofobních zbytků bazí na rtuť. Na druhou stranu velká afinita bazí ke rtuti znemožňuje tvorbu duplexu (hybridizaci) DNA přímo na rtuťové elektrodě. Nedávné výsledky však ukazují, že ON modifikované thiolovou skupinou lze na rtuťových elektrodách orientovaně imobilizovat podobně jako na zlatě (viz výše); oproti zlatým elektrodám je tento proces dokonce rychlejší [16]. Tím se otevírají nové možnosti využití rtuťových, a pravděpodobně zejména pevných amalgamových elektrod při analýze hybridizace DNA, interakcí DNA s proteiny a podobně.

9.2.2 Detekční principy využívané v elektrochemických biosenzorech pro hybridizaci DNA

Po vystavení elektrody s imobilizovanou sondou (nebo s cílovou DNA) zkoumanému vzorku cílové DNA (nebo hybridizační sondě v roztoku) dojde na povrchu elektrody k vytvoření duplexu za předpokladu, že jsou nukleotidové sekvence obou vláken vzájemně komplementární. V tomto okamžiku zbývá jediné – zjistit, zda k hybridizaci došlo, případně kvantifikovat množství vzniklého duplexu. K tomu je zapotřebí zvolit vhodnou detekční metodu (v našem případě elektrochemickou). V literatuře (přehledně [3-8, 10-12]) lze nalézt řadu detekčních principů a experimentálních uspořádání, z nichž nejrozšířenější jsou zmíněny v následujících odstavcích.

9.2.2.1 Využití vlastní elektrochemické aktivity DNA.

Je známo, že DNA je elektrochemicky aktivní látka díky přítomnosti redukovatelných nebo oxidovatelných zbytků bazí [7, 8]. Využít vlastní elektrochemické signály DNA při detekci hybridizace je možné, pokud se sonda a cílové vlákno výrazně liší v obsahu některé z nich. Nejčastěji (a v případě hybridizace DNA dosud téměř výhradně) využívaným elektrochemickým signálem DNA je signál odpovídající elektrochemické oxidaci guaninu (buď přímé, nebo zprostředkované vhodnými mediátory, nejčastěji komplexy ruthenia [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 lze obejít nahrazením zbytků guaninu v hybridizační sondě hypoxanthinem (obr. 9.2a), tj. derivátem purinu, který se podobně jako guanin páruje s cytosinem, ale neposkytuje příslušný elektrochemický signál (ani není oxidovatelný rutheniovým mediátorem). Pokud se signál odpovídající guaninu objeví, znamená to, že došlo k hybridizaci "bezguaninové" sondy s cílovým vláknem obsahujícím guanin.

9.2.2.2 Impedanční měření

Tato technika využívá změn vlastností elektrodové dvojvrstvy v důsledku tvorby duplexu DNA. Elektroda modifikovaná jednořetězcovou DNA je charakterizována jinou diferenciální kapacitou, než elektroda nesoucí na svém povrchu hybridní duplex. Pro monitorování změn hustoty negativního náboje na povrchu elektrody, který tvorbu duplexu DNA nutně doprovází, lze též využít měření redoxních signálů anionických depolarizátorů (hexakyanoželeznatan/ hexakyanoželezitan).

9.2.2.3 Elektroaktivní ("redoxní") indikátory

Tento přístup využívá elektrochemicky aktivních látek, které se vážou na duplex DNA s výrazně vyšší afinitou než na jednořetězcovou DNA. Takových látek existuje řada a zahrnují tzv. interkalátory (planární aromatické molekuly, které se vmezeřují mezi páry bazí v DNA, obr. 9.2b) a látky vázající se do malého nebo velkého žlábku dvoušroubovice. Pokud je na povrchu elektrody přítomna dvouřetězcová DNA, projeví se to zvýšením signálu interkalátoru v důsledku jeho akumulace ve vrstvě duplexu [17]. Lepších výsledků než s jednoduchými interkalátory bylo dosaženo s tzv. bisinterkalátory, které obsahují dvě interkalující se skupiny kovalentně spojené prostřednictvím linkeru o vhodné délce. Takovéto látky se vážou na duplex DNA s větší afinitou a umožňují lepší rozlišení hybridu od jednořetězcové sondy.



Obr. 9.2: Některé principy využívané při vývoji elektrochemických senzorů pro hybridizaci DNA

(a) sonda zakotvená na povrchu elektrody obsahuje místo zbytků guaninu zbytky hypoxanthinu (I = inosin, tj. nukleosid hypoxanthinu); tvorbu hybridu s cílovou DNA obsahující guanin je možno sledovat na základě měření specifického signálu této baze;
(b) vznik duplexu na povrchu elektrody je detekován pomocí signálů látek, které selektivně interagují s ds DNA (např. interkalátory); (c) cílové vlákno je kovalentně modifikováno elektrochemicky aktivní skupinou; (d) na povrchu elektrody je vytvořen molekulární "sendvič" z imobilizované sondy, cílového vlákna a druhé, signální sondy; (e) elektrochemický "molekulární maják"

9.2.2.4 Využití elektroaktivních nebo enzymových značek

Kovalentní navázání vhodné značky na jeden z hybridizujících řetězců (na cílovou DNA nebo, v případě "obráceného" uspořádání, kdy je na povrchu elektrody imobilizována cílová DNA, na signální sondu) (obr. 9.2c) umožňuje tyto řetězce od sebe spolehlivě odlišit bez ohledu na jejich nukleotidové složení (viz 9.2.2.1) a tím i rozhodnout, zda došlo na povrchu elektrody k hybridizaci DNA. Značit DNA a její složky lze elektrochemicky aktivními skupinami (např. ferrocenem, komplexy oxidu osmičelého [18], komplexy dvojmocného osmia nebo ruthenia [19] apod.) nebo enzymy katalyzujícími konverzi inaktivního substrátu na elektrochemicky aktivní produkt (nejčastěji peroxidasou nebo alkalickou fosfatasou [13, 20]).

9.2.2.5 "Sendvičová" (dvoukroková) analýza využívající značených signálních sond

Při tomto přístupu je cílové vlákno DNA nejprve hybridizováno se sondou zakotvenou na povrchu elektrody (ta bývá označována v anglické literatuře jako *capture probe*) a poté s druhou, signální sondou (*reporter probe*), která je komplementární k jinému úseku cílového vlákna (obr. 9.2d). Signální sonda může opět být značena elektrochemicky aktivní skupinou nebo enzymem [20].

9.2.2.6 Elektrochemický molekulární maják

Na povrchu elektrody je za jeden konec zakotvena sonda, která v nepřítomnosti cílového vlákna zaujímá strukturu vlásenky [4, 6, 21]. Na druhém konci molekuly sondy je navázána elektroche-

micky aktivní značka (např. ferrocen). 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").

9.2.3 "Signal on" a "signal off" odpověď na hybridizační událost

Elektrochemický molekulární maják v té podobě, v jaké je zmíněný v předchozím odstavci, se od předchozích technik liší tím, že odpovědí na hybridizační událost zde není vznik (či zesílení), ale vymizení měřeného signálu. To je určitá nevýhoda této jinak bezesporu elegantní techniky. Experimentální uspořádání, při kterém negativní odpověď odpovídá nulovému signálu a měřitelný signál se objeví po proběhnuvším sledovaném ději (dojde k "zapnutí" signálu, "signal on"), je obecně výhodnější než uspořádání, při kterém v důsledku sledovaného děje signál mizí ("vypnutí" signálu, "signal off"). "Signal on" umožňuje sledovat nízké výtěžky dané reakce (hybridizace DNA, tj. vytvoření duplexu DNA jen z malé frakce molekul sondy) díky tomu, že srovnáváme nenulový (třebaže v absolutní hodnotě malý) signál s nulovým (obr. 9.3). Naproti tomu v případě "signal off" odpovědi nelze spolehlivě rozlišit částečný pokles původně intenzivního signálu, pokud nepřesáhne relativní chybu měření. V literatuře lze nalézt řadu návrhů elektrochemických hybridizačních technik, které jsou založeny na měření poklesu signálu (např. techniky využívající methylenové modři jako redoxního indikátoru, který se dle některých autorů váže selektivně nikoli na dvouřetězcovou, ale na jednořetězcovou DNA); jejich praktická využitelnost v reálné situaci je někdy ovšem problematická. Technika elektrochemického molekulárního majáku se v literatuře objevila i v jiných verzích než je nejjednodušší varianta v obr. 9.2e, z nichž některé poskytují odpověď typu "signal on" na hybridizaci DNA nebo na interakci zakotvené nukleové kyseliny (aptameru) s proteinem [22].



Obr. 9.3: "Signal on" a "signal off" odpověd' na hybridizaci DNA.

9.3 Dvoupovrchové elektrochemické techniky

Biosenzory sestávající z hybridizační sondy zakotvené na povrchu elektrody se z praktického hlediska jeví jako optimální, protože pro uživatele jednoduché řešení. Jakmile je senzor vyroben, stačí jej ponořit do zkoumaného vzorku za podmínek příznivých pro hybridizaci DNA, poté "odmýt" nespecificky adsorbované složky vzorku a provést elektrochemické měření. Na úrovni krátkých modelových syntetických oligonukleotidů všechny techniky zmíněné v části 9.2 skutečně takto ideálně fungují. Reálné vzorky DNA (obvykle jde o úseky genomových DNA amplifikované pomocí PCR) však bývají výrazně delší než hybridizační sonda a jsou přirozeně dvouřetězcové. Tím se situace komplikuje: vzorek obsahuje nadbytek nekomplementárních DNA (vždy přinejmenším úseky cílového vlákna lemující sekvenci rozpoznávanou sondou a komplementární vlákno, které je potřeba před hybridizací od cílového vlákna oddělit tepelnou denaturací) a dalších nečistot (složky reakční směsi, nezreagované deoxynukleosidtrifosfáty a primery, DNA polymerasy a další proteiny), které se mohou nespecificky adsorbovat na povrch elektrody a znesnadňovat hybridizaci. To často vede ke snížení citlivosti i selektivity analýzy. Ukázalo se, 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 (viz obr. 9.4) [6, 12, 23]. Pro hybridizaci DNA je výhodné využít magnetické nosiče (mikročástice z paramagnetického materiálu) nesoucí příslušný biorekogniční prvek (v našem případě hybridizační sondu, ale mohou být modifikovány i jinými biomolekulami, např. streptavidinem, protilátkami nebo proteiny, na které se protilátky specificky vážou, apod.). Ty jsou komerčně dostupné a v oblasti bioanalýzy často využívané. Magnetické částice mají ve srovnání s běžnou pracovní elektrodou 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 libovolné elektrody a elektrochemické techniky, nebo zvolit jinou detekční strategii, jejíž výběr lze do značné míry podřídit vlastnostem cílové DNA a typu informace, kterou o ní chceme získat. Ve srovnání s "jednopovrchovými" senzory diskutovanými v části 9.2 lze tyto "dvoupovrchové" techniky snáze optimalizovat, protože magnetické kuličky nemusí mít vlastnosti pracovní elektrody vhodné pro elektrochemická měření, a naopak povrch pracovních elektrod není nutné speciálně upravovat pro hybridizaci DNA. V tomto případě nejde o biosenzory ve smyslu "biorekogniční prvek spojený s převodníkem"; jedná se v podstatě o kombinaci jednoduché separační metody (svého druhu vsádkové afinitní chromatografie) s "off-line" elektrochemickou detekcí. Na druhou stranu přístupy založené na magnetických mikročásticích mohou být kombinovány s mikrofluidikou a lze si představit využití této technologie v zařízeních typu "lab-on-chip".

9.3.1 Detekční principy využívané ve spojení s dvoupovrchovými technikami

Ve srovnání s "jednopovrchovými" elektrochemickými biosenzory pro hybridizaci DNA je výběr detekčních technik aplikovatelných ve spojení s magnetickou separací širší. Při vlastním měření není nutno zachovat podmínky zajišťující stabilitu duplexu (jak je ukázáno dále, dokonce je možno zachycenou a separovanou cílovou DNA rozložit – hydrolyzovat – a stanovit její monomerní slož-ky), což usnadňuje hledání optimálních podmínek detekce a dosažení vysoké citlivosti. V následu-jících odstavcích jsou uvedeny některé typické příklady elektrochemických detekčních technik využívaných v dvoupovrchové strategii.

9.3.1.1 Stanovení purinových bazí uvolněných ze separovaného cílového vlákna

Při této metodě je po hybridizaci a separaci DNA na magnetickém nosiči cílové vlákno DNA odděleno (obr. 9.4B) a inkubováno s kyselinou chloristou. Tím dojde k jeho depurinaci (uvolnění purinových bazí díky hydrolýze N-glykosidických vazeb). Volné purinové baze lze detegovat s velmi vysokou citlivostí pomocí rozpouštěcích voltametrických technik. Přitom lze využít buď tvorby nerozpustných komplexů s ionty rtuti (vzniklých anodickou oxidací rtuti z materiálu rtuťových nebo stříbrných amalgamových elektrod), které lze stanovit pomocí katodické rozpouštěcí voltametrie [7, 14], nebo komplexů s měďnými ionty. Ty je možno generovat elektrochemicky redukcí měďnatých iontů z roztoku, nebo oxidací mědi z měděné amalgamové elektrody [24]. Komplexy purinů s měďnými ionty lze stanovit jak na elektrodách rtuťových či amalgamových (obvykle se měří signál odpovídající redukci Cu⁺ na Cu⁰), tak na elektrodách uhlíkových (v tomto případě byla využita oxidace Cu⁺ na Cu²⁺). V důsledku tvorby komplexů s ionty mědi navíc dochází k výraznému zesílení oxidačních signálů guaninu a adeninu [25]. Techniky založené na stanovení purinů jsou přirozeně vhodné zejména pro analýzu DNA bohaté na purinové zbytky, a zvláště pro detekci dlouhých fragmentů DNA (čím je molekula delší, tím více purinových bazí je "zachyceno" při každé jednotlivé hybridizační události).



Obr. 9.4: Příklady elektrochemických "dvoupovrchových" technik detekce hybridizace DNA

(A), cílové vlákno DNA je zachyceno na magnetickém nosiči s imobilizovanou sondou. Tímto způsobem je možno cílovou DNA účinně separovat od všech nespecifických složek původního vzorku (nekomplementární DNA a RNA, proteiny) a předkoncentrovat pro následnou elektrochemickou analýzu. Tuto proceduru lze kombinovat s různými detekčními technikami, např.: (B) stanovení zachycené cílové DNA založené na její částečné kyselé hydrolýze a detekci purinových bazí rozpouštěcími voltametrickými metodami; (C), využití signální sondy značené elektrochemicky aktivní skupinou (např. Os,L). (D) využití signální sondy značené enzymem přeměňujícím inaktivní substrát na elektrochemicky aktivní produkt

9.3.1.2 Značení cílové DNA komplexy oxidu osmičelého (Os,L).

Tato metoda je vhodná zejména v případech, kdy úsek cílového vlákna tvořící duplex se sondou na povrchu magnetického nosiče neobsahuje pyrimidinové (nebo alespoň thyminové) nukleotidy, zatímco okolní úseky je obsahují [20]. Purinové baze totiž s Os,L (např. komplex OsO_4 s 2,2'-bipy-

ridinem) prakticky nereagují, takže modifikací DNA těmito komplexy není narušena schopnost homopurinových úseků tvořit duplex. Naopak modifikací pyrimidinových bazí v okolních úsecích cílového vlákna dochází k zavedení elektrochemicky aktivních značek (opět: čím je délka těchto "lemujících" sekvencí v cílovém vlákně větší, tím více skupin poskytujících elektrochemický signál může být navázáno, což vede ke zvýšení citlivosti analýzy), které lze snadno a citlivě stanovit na HMDE, amalgamových i uhlíkových elektrodách.

9.3.1.3 Signální sondy kovalentně značené elektroaktivními skupinami

Tuto techniku (obr. 9.4C) lze využít v "sendvičovém" uspořádání podobně, jak bylo ukázáno výše u "jednopovrchových" biosenzorů (s tím rozdílem, že hybrid "imobilizovaná sonda-cílové vláknosignální sonda" je vytvořen na magnetickém nosiči). Jako elektrochemickou značku lze opět s výhodou využít Os,L [18]. 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, což vede ke 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 [18]). Další výhodou značení hybridizačních sond Os,L je snadná proveditelnost této metodiky v běžné biochemické laboratoři, protože reakce DNA s Os,L probíhá ve vodných roztocích za fyziologických podmínek. K přípravě značené sondy tedy stačí zakoupit relativně levné ON složené z běžných, nemodifikovaných bazí, a ty dle potřeby modifikovat. Není nutno pořizovat řádově nákladnější značené ON (např. ferocenem), pro jejichž přípravu je nutno disponovat vybavením a zkušenostmi z oblasti organické syntézy. Os,L lze využít i pro "vícebarevné" značení sond (viz 3.1.6). Pomocí signálních sond je možno stanovit počet kopií opakované sekvence (viz část 9.4.2).

9.3.1.4 Signálních sondy značené enzymy

Značení biomolekul enzymy je výhodné díky tomu, že zajišťuje amplifikace signálu (jedna molekula enzymu může katalyzovat přeměnu velkého množství molekul vhodného substrátu na elektrochemicky aktivní indikátor, který je pak elektrochemicky stanoven). Enzymovou značku lze navázat na signální sondu pomocí biotin-(strept)avidinové technologie [13, 20] (použije se signální sonda koncově značená biotinem a konjugát příslušného enzymu s avidinem nebo streptavidinem; pro enzymy běžně využívané v bioanalýze, jako jsou peroxidázy nebo fosfatázy, jsou takovéto konjugáty komerčně dostupné). 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 navázaného enzymu) přenést do roztoku substrátu, nechat proběhnout enzymovou reakci a vzniklý elektrochemický produkt pak stanovit (obr. 4D).

3.1.5 Značení DNA pomocí mikročástic nebo nanočástic

Jde o moderní přístup, který byl v posledních letech úspěšně rozvinut (mimo jiné) rovněž v kombinaci s magnetickou separací (přehledně [4, 6, 23]). Aplikace mikročástic a nanočástic zajišťuje vysokou citlivosti detekce v důsledku značení každé molekuly sondy nebo cílové DNA větším počtem elektrochemicky aktivních molekul nebo atomů (tvořících příslušnou částici). Na konec jednoho vlákna tvořícího hybrid (cílová DNA nebo signální sonda) se vhodným způsobem naváže nanočástice, např. zlatá nebo ze sulfidů zinku, kadmia či olova. Po hybridizaci a separaci mohou být nanočástice rozpuštěny (např. v kyselině) a příslušný kov stanoven pomocí voltametrie nebo chronopotenciometrie. Velmi vysoké citlivosti detekce DNA hybridizované na magnetickém nosiči bylo dosaženo, byly-li jako značky aplikovány polystyrénové kuličky obsahující ferrocen (stanovený elektrochemicky po rozpuštění kuliček v acetonitrilu) nebo uhlíkové nanotrubičky modifikované alkalickou fosfatázou (každá nanotrubička nesla více molekul enzymu a každá molekula enzymu katalyzuje tvorbu velkého množství molekul elektroaktivního indikátoru, což vede k velmi silné amplifikaci signálu).

9.3.1.6 "Vícebarevné" elektrochemické značení DNA

Vícebarevné optické (fluorescenční) značení využívané v technologii "genových čipů" umožňuje paralelní detekci několika nukleotidových sekvencí (pro každou z nich se použije značka fluoreskující v jiné vlnové délce, což umožňuje jejich odlišení). Při elektrochemické detekci je možné dosáhnout téhož v případě, že se použijí značky nebo indikátory poskytující elektrochemické signály při dostatečně odlišných potenciálech. "Vícebarevné" (multipotenciálové) elektrochemické kódování nukleotidových sekvencí bylo dosud úspěšně aplikováno opět především v kombinaci s magnetickou separací. Jako značky byly využity nanočástice ze sulfidů zinku, kadmia a olova (příslušné kovy se liší potenciálem svého katodického vylučování, resp. anodické oxidace) nebo enzymy katalyzující tvorbu elektrochemicky rozlišitelných produktů (alkalická fosfatáza katalyzující produkci 1-naftolu a β-galaktosidasa uvolňující z neaktivního substrátu fenol) [4, 23]. Při modifikaci signálních sond komplexy oxidu osmičelého lze redox potenciály vzniklých aduktů výrazně ovlivnit volbou ligandu a připravit tak sondy, které po hybridizaci s příslušnými cílovými sekvencemi poskytují dobře rozpoznatelné a paralelně měřitelné signály [18].

9.4 Detekce mutací a polymorfismů v sekvencích DNA

Předchozí text byl věnován problematice detekce hybridizační události buďto na povrchu elektrody, nebo na jiném povrchu, tedy hledání odpovědi na otázku: vznikl hybridní duplex, nebo nevznikl?. Jestliže zjistíme, že k hybridizaci došlo, znamená to, že v analyzovaném vzorku byl přítomen úsek NK schopný tvořit duplex s imobilizovanou (nebo signální) sondou (tj. musel být se sondou komplementární nebo alespoň téměř komplementární, viz dále). Protože známe sekvenci sondy, získáváme takto informaci o sekvenci vlákna, které s ní hybridizovalo, a na základě této informace můžeme usoudit na přítomnost určitého organismu ve zkoumaném biologickém materiálu (např. bakterie, viru), genu kódujícího nějakou specifickou vlastnost daného organismu (třeba virulenci bakteriálního kmenu, produkci aflatoxinů u plísní apod.) nebo cizorodého genu (transgenu v geneticky modifikovaném organismu). Pomocí hybridizace DNA je rovněž možno sledovat genovou expresi. Přitom se obvykle využívá reverzní transkripce informační RNA (mRNA, do které je při genové expresi přepsána kódující sekvence exprimovaného genu) do tzv. komplementární DNA (cDNA), jež je poté amplifikována pomocí PCR a může být (kromě jiných technik) analyzována technologií "genových čipů", pracujících na principu hybridizace DNA. V tomto případě znamená pozitivní signál, že gen je aktivní (je exprimován), negativní signál znamená, že gen "mlčí" (není exprimován).

Poté, co bylo dokončeno sekvenování kompletní DNA řady organismů, a zejména člověka, nabývá na významu analýza individuálních odchylek v určitých místech nebo oblastech genomu. Pořadí nukleotidů v lidském genomu tak, jak bylo stanoveno, totiž odpovídá "průměrnému" člověku, zatímco u skutečných jedinců se vyskytují specifické, po generace děděné odchylky i různé mutace vzniknuvší náhodně či jako důsledek vystavení mutagenním vlivům (ty jsou rovněž po zárodečné linii dědičné). Většina těchto sekvenčních polymorfismů zdraví a život člověka nijak neohrožuje, ale pokud je genetická informace pozměněna v určitých místech, může to mít fatální následky. V některých případech je pro ztrátu funkce klíčového genu postačující záměna jedné jediné baze. Detekce těchto tzv. bodových mutací je tedy velmi důležitá z hlediska včasné diagnostiky určitých onemocnění, prevence jejich šíření v populaci i pro stanovení optimální (individualizované) terapie.

9.4.1 Detekce bodových mutací a jednonukleotidových polymorfismů

Bodové mutace (záměny, inzerce nebo delece jednotlivých nukleotidů v daném úseku DNA) lze odhalit na základě rozdílné stability duplexu vytvořeného jedním nemutovaným (*"wild type"*, wt) a jedním mutovaným vláknem. V tomto tzv. heteroduplexu jsou všechny baze spárovány až na místo, kde se v cílovém vlákně vyskytuje mutace. V něm může být buď chybný pár bazí (např. G•A, G•T apod.), nebo baze "navíc" (v případě její inzerce nebo delece v komplementárním vlákně). Takovéto chyby (*"mismatches"*) se projeví tím, že se příslušná dvoušroubovice snáze denaturuje, než dvoušroubovice tvořená dvěma přesně komplementárními vlákny. Čím je v heteroduplexu více "chyb", tím výrazněji je oproti přesně komplementárnímu homoduplexu destabilizován. Pokud se provede hybridizace a "odmývání" nenavázané sondy při zvýšené teplotě a/nebo nižší iontové síle (tj. za vysoce "stringentních" podmínek), je výtěžek heteroduplexu nižší než výtěžek analogického homoduplexu, což se projeví snížením měřeného signálu (v krajním případě žádný heteroduplex nevznikne nebo se rozpadne během odmývání a výsledek hybridizačního experimentu je negativní).

Kromě technik založených na destabilizaci heteroduplexů při hybridizaci za vysoce "stringentních" podmínek lze mutace detekovat také na základě specifických vlastností heteroduplexů. V tom případě jsou podmínky voleny tak, aby duplex tvořený wt sondou a mutovaným cílovým vláknem byl stabilní, a sleduje se přítomnost chybného páru bazí.

9.4.1.1 Využití přenosu elektronů zprostředkovaného dvoušroubovicí DNA.

Podle autorů z okruhu Jacqueline Bartonové z pasadenského Caltechu je DNA schopna přenášet elektrony prostřednictvím π-elektronů aromatických zbytků bazí zapojených do systému stohových ("stacking") interakcí uvnitř dvoušroubovice [26]. Ačkoli někteří jiní autoři tento model nepřijímají a o vodivých, polovodivých či dielektrických vlastnostech DNA se vedou spory, byla publikována řada elegantních prací dokumentujících přenos elektronů (elektrického náboje) dvoušroubovicí DNA mezi dvěma redox centry interkalovanými ve vzdálenosti několika až několika desítek párů bazí. Podobný efekt byl zaznamenán u duplexů DNA zakotvených za jeden konec na elektrodě [27]. V tom případě molekula DNA zprostředkovává přenos elektronů mezi elektrodou a redox aktivním interkalátorem vázaným na druhém konci duplexu (obr. 9.5A). Z hlediska využití tohoto principu pro detekci mutací v DNA je důležité, že přenos elektronů přes DNA je možný jen tehdy, jsou-li všechny baze v úseku mezi donorem a akceptorem správně spárovány (přesněji řečeno nejsou-li narušeny stacking interakce). Chybný pár bazí, inzerce nebo delece nukleotidu v tomto úseku přenosu elektronu brání, což se projeví ztrátou signálu.

9.4.1.2 Rozpoznání chybných párů bazí proteinem MutS a jeho elektrochemické stanovení.

Buňky disponují systémy umožňujícími opravit poškozenou nebo chybně replikovanou DNA, jejichž součástí jsou bílkoviny rozpoznávající "chyby" v dvoušroubovici DNA. Jednou z takových bílkovin je protein MutS, který se váže chybně párované nebo nespárované baze a tím umožňuje zahájení opravy těchto míst [9, 28]. Tuto jeho vlastnost je možné analyticky využít pro detekci bodových mutací. Byla navržena řada technik umožňujících detekci vazby MutS-DNA využívajících fluorescenčního značení proteinu MutS, enzymové a další relativně složité přístupy. Při využití principu dvoupovrchové strategie lze protein MutS vázaný na heteroduplexy DNA zachycené na magnetickém nosiči snadno stanovit elektrochemicky na rtuťových [9] nebo uhlíkových [28] elektrodách, a to s vysokou citlivostí (pikogramová množství odpovídající několika málo desítkám attomolů proteinu) bez nutnosti jakéhokoli značení. Elektrochemická detekce proteinu MutS a jeho vazby na DNA nevyžaduje žádné značení ani jinou úpravu proteinu a navíc je ve srovnání s výše zmíněnými metodami citlivější.



Obr. 9.5: Příklady metod umožňujících detekci mutací (polymorfismů) v sekvencích DNA

(A) Využití "elektrické vodivosti" DNA. Homoduplex DNA, tj. dvojšroubovice tvořená dvěma přesně komplementárními vlákny, je schopna zprostředkovat přenos elektronů mezi elektrodou, na jejímž povrchu je zakotvena, a redox-aktivní skupinou vázanou na druhém konci duplexu. V uspořádání na obrázku dochází k elektrochemické redukci interkalátoru elektrony přenesenými duplexem DNA a jeho reoxidaci ferikyanidem v roztoku, tím se uzavírá elektrokatalytický cyklus a prochází proud, jenž je měřen amperometricky. Naproti tomu heteroduplex DNA obsahující "chybný" pár bazí (např. G •A) není schopen elektrony efektivně přenášet a proud neprochází. (B) Chybně spárované nebo nespárované baze v heteroduplexu DNA jsou rozpoznávány specifickými proteiny, např. proteinem MutS. Pomocí dvoupovrchové elektrochemické techniky je možno navázaný protein citlivě stanovit. (C) Pomocí techniky "primer extesion" lze určit, jaký nukleotid se nachází v templátovém vlákně (tvořícím duplex s primerem) v první pozici jednořetězcového přesahu (zde adenin). Jsou-li správně zvoleny podmínky reakce, k inkorporaci značeného nukleotidu v reakci katalyzované DNA polymerázou dojde pouze v případě, že příslušný dNTP přidaný do reakční směsi obsahuje bazi komplementární k tomuto nukleotidu (zde uracil). Značka navázaná na příslušný nukleotid může být elektrochemicky aktivní, enzymová, fluoreskující či jiná

9.4.1.3 Techniky založené na "minisekvenování" DNA s využitím DNA polymeráz.

Jakoukoli změnu v pořadí nukleotidů v DNA můžeme přirozeně zjistit pomocí některé ze zavedených sekvenačních metod [2]. Pokud již máme vytipováno konkrétní "podezřelé" místo v určitém úseku DNA, není nutno sekvenovat celý úsek, ale stačí se zaměřit právě příslušný nukleotid. K tomu je zapotřebí navrhnout ON sondu hybridizující s cílovým vláknem DNA tak, že "podezřelá" baze se nachází v první pozici jednořetězcového přesahu v sousedství 3'-konce této sondy (obr. 9.5C). Po přidání DNA polymerasy a deoxynukleosidfosfátu (dNTP) obsahujícího bazi komplementární k bazi ve zkoumané pozici dojde k inkorporaci příslušného nukleotidu na konec sondy (ta slouží jako primer pro polymeraci DNA na cílovém templátu – takovéto metody se obecně označují jako *primer extension*). Pokud není baze v dNTP komplementární a jsou-li dobře nastaveny podmínky reakce, k inkorporaci nedojde. Příslušný dNTP může být značený elektroaktivní skupinou (ferocenem), fluoroforem, enzymem (resp. biotinem, viz část 9.3.1.4) nebo jinou značkou. V principu lze využít všechny čtyři dNTP značené různými markery a přímo tak zjistit, která baze se ve zkoumaném místě nachází. Přístupy založené na primer extension byly úspěšně aplikovány přímo na povrchu elektrody [29] i v kombinaci s dvoupovrchovými technikami [30].

9.4.2 Expanze trinukleotidových opakování a stanovení délky repetivní sekvence

Jiným typem mutací, které se spontánně objevují v genomu člověka, jsou tzv. expanze trinukleotidových opakování [31]. Trinukleotidové repetice se v genomech vyskytují poměrně často, a to i v sousedství nebo uvnitř některých genů. U zdravých jedinců se v těchto místech vyskytuje několik (nebo nanejvýš několik málo desítek) tripletů. Tyto sekvence však mají schopnost se při replikaci DNA samovolně prodlužovat (expandovat). Pokud jejich délka dosáhne desítek až stovek trinukleotidů, může dojít k zamezení správné exprese příslušných genů nebo ke vzniku defektních proteinů, což má za následek vznik závažných nerodegenerativních chorob jako jsou syndrom fragilního chromozómu X (expanze tripletu CCG), myotonická dystrofie (CAG) nebo Friedrichova ataxie (GAA). Molekulární diagnostika těchto onemocnění je založena na měření délky příslušných opakovaných sekvencí (počtu repetitivních motivů). To lze (kromě jiných přístupů) provést pomocí krátkých signálních sond, které hybridizují s jedním nebo (v případě trinukleotidových opakování) s několika málo opakujícími se motivy v cílovém vlákně (obr. 9.6). Podle počtu opakování (délky repetitivní sekvence) dochází k vícenásobné hybridizaci signální sondy s cílovým vláknem [20]. V ideálním případě je počet navázaných molekul sondy úměrný počtu opakování cílového motivu. Pokud je sonda vhodným způsobem označena, dochází s rostoucí délkou repetitivní sekvence ke zvyšování počtu molekul zachycené značky a tím ke zvyšování intenzity příslušného (v našem případě elektrochemického) signálu; při vhodné kalibraci (viz obr. 9.6) lze z intenzity signálu odvodit délku repetitivní sekvence. Tato technika byla úspěšně aplikována v kombinaci se značením signálních sond a cílových vláken DNA enzymy a komplexy oxidu osmičelého při analýze jak modelových, tak reálných (pacient s Friedrichovou ataxií) vzorků DNA, a to v dvoupovrchovém [20] i jednopovrchovém [13] uspořádání.



Obr. 9.6: Stanovení délky repetitivní sekvence DNA (počtu opakování repetitivní jednotky) pomocí signální sondy

Principem této metody je vícenásobné hybridizace značené signální sondy, délkou odpovídající jednomu nebo několika opakováním repetitivního motivu, s cílovým vláknem. Čím vícekrát se tento motiv v cílovém vlákně opakuje, tím více molekul sondy se na něj naváže. Díky tomu dochází k akumulaci značky (b) a ke zvýšení intenzity měřeného signálu. Pro spolehlivý odhad délky repetitivní sekvence je zapotřebí paralelně stanovit počet molekul cílové DNA. Toho lze dosáhnout např. jeho koncovou modifikací jinou značkou (a) poskytující odlišný signál než značka (b); počet opakování repetitivní jednotky je pak dán poměrem signálů (b:a).

Tato práce byla podporována 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, v.v.i.

Literatura

- J. Marmur, R. Rownd, and C. L. Schildkraut, Denaturation and renaturation of deoxyribonucleic acid, in Progress in Nucleic Acid Research, in Davidson, J. N., and Cohn, W. E., (Eds.), Academic Press, New York, 1963, pp. 232-300.
- [2] J. Sambrook, and D. W. Russell, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3 ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2001.
- [3] J. J. Gooding, Electrochemical DNA hybridization biosenzors, Electroanalysis 14 (2002) 1149-1156.
- [4] J. Labuda, M. Fojta, F. Jelen, and E. Palecek, Electrochemical Senzors with DNA Recognition Layer, in Encyclopedia of Senzors, in Grimes, C. A., Dickey, E. C., and Pishko, M. V., (Eds.), American Scientific Publishers, Stevenson Ranch, CA, USA, 2006, pp. 201-228.
- [5] E. Palecek, and M. Fojta, Detecting DNA Hybridization and Damage, Anal. Chem. 73 (2001) 74A-83A.
- [6] E. Palecek, and M. Fojta, Electrochemical DNA Senzors, in Bioelectronics, in Wilner, I., and Katz, E., (Eds.), Wiley VCH, Weinheim, 2005, pp. 127-192.
- [7] E. Palecek, M. Fojta, F. Jelen, and V. Vetterl, Electrochemical analysis of nucleic acids, in The Encyclopedia of Electrochemistry, in Bard, A. J., and Stratsmann, M., (Eds.), Wiley-VCH, Weinheim, 2002, pp. 365-429.
- [8] E. Palecek, and F. Jelen, Electrochemistry of nucleic acids., in Electrochemistry of nucleic acids and proteins. Towards electrochemical senzors for genomics and proteomics., in Paleček, E., Scheller, F., and Wang, J., (Eds.), Elsevier, Amsterdam, 2005, pp. 74-174.

- [9] E. Palecek, M. Masarik, R. Kizek, D. Kuhlmeier, J. Hassmann, and J. Schulein, Sensitive electrochemical determination of unlabeled MutS protein and detection of point mutations in DNA, Anal. Chem. 76 (2004) 5930-5936.
- [10] N. Popovich, and H. Thorp, New strategies for electrochemical nucleic acid detection., Interface 11 (2002) 30-34.
- [11] M. J. Tarlov, and A. B. Steel, DNA-Based Senzors, in Biomolecular Films. Design, Function, and Applications., in Rusling, J. F., (Ed.), Marcel Dekker, New York, 2003, pp. 545-608.
- [12] J. Wang, Electrochemical Nucleic Acid Biosenzors, in Electrochemistry of nucleic acids and proteins. Towards electrochemical senzors for genomics and proteomics, in Palecek, E., Scheller, F., and Wang, J., (Eds.), Elsevier, Amsterdam, 2005, pp. 175-194.
- [13] M. Fojta, P. Brazdilova, K. Cahova, and P. Pecinka, A single-surface electrochemical biosenzor for the detection of DNA triplet repeat expansion, Electroanalysis 18 (2006) 141-151.
- [14] M. Fojta, Mercury Electrodes in Nucleic Acid Electrochemistry: Sensitive Analytical Tools and Probes of DNA Structure, Collect. Czech. Chem. Commun 69 (2004) 715-747.
- [15] M. Fojta, Detecting DNA damage with electrodes, in Electrochemistry of nucleic acids and proteins. Towards electrochemical senzors for genomics and proteomics, in Palecek, E., Scheller, F., and Wang, J., (Eds.), Elsevier, Amsterdam, 2005, pp. 386-430.
- [16] V. Ostatna, and E. Palecek, Self-assembled monolayers of thiol-end-labeled DNA at mercury electrodes, Langmuir 22 (2006) 6481-6484.
- [17] H. Karadeniz, B. Gulmez, A. Erdem, F. Jelen, M. Ozsoz, and E. Palecek, Echinomycin and cobaltphenanthroline as redox indicators of DNA hybridization at gold electrodes, Frontiers in Bioscience 11 (2006) 1870-1877.
- [18] M. Fojta, P. Kostecka, M. Trefulka, L. Havran, and E. Palecek, "Multicolor" Electrochemical Labeling of DNA Hybridization Probes with Osmium Tetroxide Complexes, Anal. Chem. 79 (2007) 1022-1029.
- [19] M. Vrábel, M. Hocek, L. Havran, M. Fojta, I. Votruba, B. Klepetářová, R. Pohl, L. Rulíšek, L. Zendlová, P. Hobza, I. Shih, E. Mabery, and R. Mackman, Purines Bearing Phenanthroline or Bipyridine Ligands and Their Ru^{II} Complexes in Position 8 as Model Compounds for Electrochemical DNA

Labelin – Synthesis, Crystal Structure, Electrochemistry, Quantum Chemical Calculations, Cytostatic and Antiviral Activity, Eur. J. Inorg. Chem. 2007 (2007) 1752–1769.

- [20] M. Fojta, L. Havran, M. Vojtíšková, and E. Palecek, Electrochemical Detection of DNA Triplet Repeat Expansion, J.Am. Chem. Soc. 126 (2004) 6532-6533.
- [21] E. Palecek, Surface-attached molecular beacons light the way for DNA sequencing, Trends Biotechnol. 22 (2004) 55-58.
- [22] A. E. Radi, J. L. A. Sanchez, E. Baldrich, and C. K. O'Sullivan, Reagentless, reusable, ultrasensitive electrochemical molecular beacon aptasenzor, J Am Chem Soc 128 (2006) 117-124.
- [23] J. Wang, Nanoparticle-Based Electrochemical DNA Detection, in Electrochemistry of nucleic acids and proteins. Towards electrochemical senzors for genomics and proteomics, in Palecek, E., Scheller, F., and Wang, J., (Eds.), Elsevier, Amsterdam, 2005, pp. 369-384.
- [24] F. Jelen, B. Yosypchuk, A. Kourilova, L. Novotny, and E. Palecek, Label-free determination of picogram quantities of DNA by stripping voltammetry with solid copper amalgam or mercury electrodes in presence of copper, Anal. Chem. 74 (2002) 4788-4793.
- [25] S. Hason, and V. Vetterl, Amplified oligonucleotide sensing in microliter volumes containing copper ions by solution streaming, Analytical Chemistry 78 (2006) 5179-5183.
- [26] E. M. Boon, and J. K. Barton, Charge transport in DNA, Curr. Opin. Struct. Biol. 12 (2002) 320-329.
- [27] S. O. Kelley, E. M. Boon, J. K. Barton, N. M. Jackson, and M. G. Hill, Single-base mismatch detection based on charge transduction through DNA, Nucleic Acids Res. 27 (1999) 4830-4837.
- [28] M. Masarik, K. Cahova, R. Kizek, E. Palecek, and M. Fojta, Label-free voltammetric detection of single-nucleotidemismatches recognized by the protein MutS, Anal. Bioanal. Chem. 388 (2007) 259-270.

- [29] F. Patolsky, A. Lichtenstein, and I. Willner, Detection of single-base DNA mutations by enzymeamplified electronic transduction, Nat Biotechnol 19 (2001) 253-257.
- [30] F. Patolsky, Y. Weizmann, E. Katz, and I. Willner, Magnetically amplified DNA assays (MADA): Sensing of viral DNA and single-base mismatches by using nucleic acid modified magnetic particles, Angew Chem Int Edit 42 (2003) 2372-2376.
- [31] H. L. Paulson, and K. H. Fischbeck, Trinucleotide repeats in neurogenetic disorders, Annu. Rev. Neurosci. 19 (1996) 79-107.

10. ELEKTROAKTIVITA NEKONJUGOVANÝCH BÍLKOVIN. MOŽNOSTI JEJÍHO VYUŽITÍ V BIOMEDICÍNĚ A PŘI KONSTRUKCI BIOSENZORŮ

prof. RNDr. Emil Paleček, DrSc.

Biofyzikální ústav AVČR, Královopolská 135, 612 65 Brno palecek@ibp.cz

Bílkoviny byly v polovině 20. století studovány po několik desítek let pomocí polarografických metod. V 70. letech se zájem elektrochemiků obrátil k poměrně malé skupině konjugovaných bílkovin obsahujících redoxní centra nebílkovinné povahy, poskytující rychlé reversibilní elektrodové děje, většinou na zlatých elektrodách. V současné době proteomika vyžaduje metody analýzy všech bílkovin. Rovněž biomedicína nevystačí s analýzou malé skupiny konjugovaných bílkovin. Elektrochemické senzory hybridizace DNA jsou v současné době velmi aktuálním tématem výzkumu. Větší rozšíření elektrochemických senzorů bílkovin vyžaduje nové přístupy k elektrochemii bílkovin. V této přednášce bude ukázáno, že

- (i) bílkoviny obsahující zbytky tyrosinu nebo tryptofanu jsou oxidovatelné na uhlíkových elektrodách,
- (ii) na rtuťových elektrodách bílkoviny poskytují signály vyžadující přítomnost zbytků cysteinu,
- (iii) všechny bílkoviny poskytují elektrokatalytický pík H (pomocí chronopotenciometrie konstantním proudem) umožňující analýzu peptidů a bílkovin v nanomolárních a subnanomolárních koncentracích; analýzu lze provádět v objemu několika μL a pík H je velmi citlivý ke změnám v konformaci bílkovin v důsledku denaturace, agregace změn redoxního stavu apod.

Bude rovněž ukázáno, že elektroaktivitu DNA a bílkovin lze využít při výzkumu interakcí DNA s proteiny.

10.1 Úvod

Bílkoviny se velmi liší od nukleových kyselin svými funkcemi, strukturou a fyzikálně chemickými vlastnostmi. Nukleové kyseliny v buňkách uchovávají, replikují a předávají genetickou informaci. Role bílkovin je výrazně mnohotvárnější. Některé tvoří podstatnou část strukturní kostry tkání a buněk, jiné vykonávají transport a úschovu malých molekul. Jedna z nejdůležitějších tříd bílkovin jsou enzymy, katalyzátory schopné vykonávat obrovské množství reakcí, které určují nezbytné metabolické dráhy. Patří k nim protilátky a další spousta jiných důležitých biologických faktorů. V každé buňce se udržuje několik tisíc druhů bílkovin. Ve srovnání s DNA jsou bílkoviny extrémně komplexní molekuly v souladu s rozmanitostí jejich funkcí. Od padesátých let minulého století jsme zaznamenali ohromný pokrok v chemii a biologii bílkovin. Mezi metodami, které přispěly k tomuto pokroku, jmenujme rtg-difrakční analýzu, nukleární magnetickou rezonanci, elektronovou a rastrovací silovou mikroskopii (scanning force microscopy), elektroforézu a izoelektrickou fokusaci, chromatografii aj. Nicméně při prohlídce učebnic a kompendií o biochemii a bílkovinách stěží mezi těmito metodami najdeme elektrochemii. Proč tomu tak je? Proč se elektrochemie tak málo využívá v soudobém výzkumu bílkovin? Je snad elektrochemie k těmto účelům nepoužitelná? Já se domnívám, že tomu tak není; zdůvodnění najde čtenář v dalším textu.

Značná pozornost byla v poslední době věnována přímému přenosu elektronů u bílkovin v mezifází.

Dnes máme k dispozici metody proteinového inženýrství, takže můžeme ve výzkumu používat jak standardní (wild-type), tak mutantní proteiny nebo jejich domény. Zvláště zajímavé se jeví mutantní proteiny se záměnou jediné aminokyseliny. Takové rekombinantní proteiny byly nedávno aplikovány při studiích přímého přenosu elektronů v bílkovinách jako je azurin nebo peroxidáza. Na druhé straně, prakticky neexistují studie individuálních proteinových domén nebo mutantních proteinů, které neobsahují žádné centrum pro rychlou reversibilní redoxní reakci. Zvláštní pozornost bude věnována přístupům, které mohou poskytnout nové nástroje pro biomedicínu nebo biotechnologie.

Elektrochemická analýza bílkovin byla úspěšně aplikována v biochemii, farmacii a medicíně a zejména v klinické onkologii po několik desetiletí uprostřed dvacátého století. Později se pozornost elektrochemiků soustředila na přímou elektrochemii omezeného množství bílkovin, obsahujících redox aktivní centra, poskytující reversibilní elektrodové děje. Možnosti elektrochemické analýzy jako nástroje pro analysu většiny bílkovin důležitých v molekulární biologii a biomedicíně byla zanedbávána.

10.1.1 Adsorpce a imobilizace bílkovin

Bílkoviny se adsorbují na všemožných površích včetně pevných a kapalných (rtuťových) elektrod, dojde-li ke kontaktu vodného roztoku bílkoviny s povrchem. Zvýšenému zájmu se těší kontrola adsorpčního procesu za účelem získání dobře definovaného a náležitě orientovaného adsorbátu. Imobilizace bílkovin na površích a zejména na elektrodách je klíčová pro konstrukcí proteinových senzorů, včetně vývoje senzorů pro DNA-proteinové a protein-proteinové interakce a obecně v elektrochemii bílkovin.

10.1.1.2 Modifikované povrchy elektrod

Samoorganizující monovrstvy (self-assembled monolayers, SAM). Od doby pionýrských prací Hillových a Kuwanových v roce 1977, byly jako elektrody pro elektrochemii bílkovin stále častěji používány ušlechtilé kovy, jako zlato nebo stříbro, modifikované různými adsorbáty. Obdobně posloužily materiály jako uhlík nebo kovové oxidy s přirozenými funkčnostmi. Monovrstvy thiolovaných DNA a bílkovin byly připraveny na zlatých elektrodách. V nedávné době se stále více aplikují alkanthioly s hydrofobními, polárními nebo elektricky nabitými hlavičkami (koncovými skupinami) pro tvorbu samoorganizujících monovrstev na zlatých elektrodách, aby tak vytvořily specifické adsorbáty pro imobilizaci dané bílkoviny v příslušné orientaci směrem k povrchu elektrody. V roce 1991 Tarlov a Bowden jako první použily SAM z alkanthiolu s negativně nabitou koncovou skupinou, aby imobilizovali cytochrom c na zlaté elektrodě. Přímá elektronická komunikace mezi adsorbovanou bílkovinou a elektrodou byla detekována cyklickou voltametrií. Připojení bílkoviny se uskutečnilo s největší pravděpodobností prostřednictvím elektrostatické interakce positivně nabitých lysinových zbytků a negativně nabitých karboxylových skupin alkanthiolové vrstvy. Tento zajímavý systém byl pak charakterizován velkým počtem metod zahrnujících resonanční Ramanovu spektroskopii a elektroreflektanční spektroskopii.

Uhlíkové nanotrubičky. V posledních letech byl vyřešen problém, jak syntetizovat uhlíkové nanotrubičky (*carbon nanotubes*, CNT) ve velkých množstvích a tento materiál je také komerčně dostupný. CNT s průměrem v rozmezí 5 – 50 nm a délkách až několik mikrometrů představují atraktivní materiál se zajímavými mechanickými, chemickými, strukturními a elektronickými vlastnostmi. CNT mohou být připraveny různými metodami včetně metod s uhlíkovým obloukem a ukládání chemických par. Můžeme si je rozdělit na monostěnné a mnohostěnné uhlíkové natnotrubičky. Bylo ukázáno, že CNT mohou být použity jako elektrodový materiál a že bílkoviny mohou být imobilizovány na povrch nebo do vnitřku otevřených nanotrubiček beze ztráty jejich aktivity.

10.1.1.2 Nemodifikované (holé) elektrody

Rtuťové elektrody. Kdysi byly velmi populární, ale v posledních třech desetiletích byly v elektrochemii bílkovin rtuťové elektrody používány velmi málo. Se svým extrémně vysokým vodíkovým přepětím a velmi vysokou afinitou pro síru tyto elektrody nabízejí určité možnosti nedosažitelné na jiných než rtuťových pevných elektrodách. Nedávno jsme ukázali, že s využitím chronopotenciometrické stripovací analýzy konstantním proudem (*constant current chronopotentiometric stripping analysis*, CPSA) může být získán dobře vyvinutý pík při velmi nízkých koncentracích peptidů nebo bílkovin na visící rtuťové kapce (*hanging mercury drop electrode*, HMDE). Tento pík se objevuje při vysoce negativních potenciálech, ale v CP modu je dobře oddělen od vylučování vodíku ze základního elektrolytu; byl pojmenován jako pík H. S použitím tohoto píku byly stanoveny peptidy a bílkoviny ve femtomolárních koncentracích bez korekce pozadí (*base line*). Využili jsme vysoké citlivosti elektrochemického stanovení a použili jsme pík H k analýze několika biologicky velmi důležitých bílkovin, jako jsou metalothionein, α -synuklein (důležitý při Parkinsonově chorobě), nádorový supresor protein p53, MutS protein, který se účastní opravy DNA, a dalších bílkovin a peptidů.

Pevné elektrody. Oxidace peptidů a nekonjugovaných bílkovin (neobsahujících redoxní centra poskytující rychlé reversibilní elektrodové děje) byla pozorována na uhlíkových elektrodách. Použití ostatních pevných elektrod, např. zlaté či platinové, bylo omezeno na studium adsorpce těchto bílkovin nebo ke sledování enzymových reakcí. Dále chceme ukázat příklady použití elektrooxidability oligopeptidů a bílkovin na uhlíkových elektrodách a též jejich elektroaktivity na kapalných a pevných amalgamových rtuťových elektrodách ve vztahu k důležitým biologickým problémům.

10.2 Elektroaktivita peptidů a bílkovin na rtuťových a uhlíkových elektrodách

10.2.1 Elektrooxidace na uhlíkových elektrodách

Asi před 10 lety byla elektrochemická analýza peptidů a nekonjugovaných bílkovin limitována na ty, které obsahují cystin/cysteinové zbytky v kombinaci se rtuťovými elektrodami, a dále na elektrooxidaci Tyr a Trp zbytků na uhlíkových elektrodách. Nejlepší výsledky při analýze bílkovin na uhlíkových elektrodách byly získány s diferenční pulsní voltametrií. Nicméně tato metoda nebyla schopná stanovit bílkoviny v submikromolárních koncentracíchm ani poskytovat dobře oddělené píky Tyr a Trp. Ukázali jsme, že CPSA na uhlíkových elektrodách poskytla dobře vyvinuté píky při velmi nízkých koncentracích DNA a RNA za podmínek, kdy voltametrické metody neprodukovaly žádný signál nebo jevily jen špatně vyvinuté inflexy. Na základě této zkušenosti jsme použili CPSA ke studiu tří biologicky důležitých peptidů obsahujících zbytky Tyr a/nebo Trp; byly to bombesin, uvolňující hormon pro luteinizující hormon (*luteinizing-hormone-releasing-hormone*, LH-RH) a neurotensin. Uvedené peptidy byla adsorbovány a akumulovány na uhlíkové pastové

elektrodě (*carbon paste electrode*, CPE) a stanoveny při nízkých koncentracích v roztoku pomocí CPSA. Byly získány dobře oddělené oxidační píky zbytků tyrosinu (pík Y při cca 0,55 V) a/nebo tryptofanu (pík W při asi 0,7 V proti Ag/AgCl/3 M KCl). Neurotensin nebo bombesin, obsahující jenom Tyr resp. jenom Trp produkovaly po jednom píku při odpovídajících potenciálech, zatímco LH-RH, který obsahuje zbytky Tyr i Trp, vytvářel dva dobře oddělené píky. S využitím CPSA byly tyto peptidy stanoveny při až nanomolárních koncentracích i při krátkých akumulačních časech. Za stejných podmínek nebyly pozorovány žádné voltametrické signály.



Obr. 10.1: Chronopotenciometrie konstantním proudem (constant current stripping analysis, CPSA) a diferenční pulsní voltametrie (DPV)

Signály 3,5µM peptidů (a) neurotensinu a (b) LH-RH na upravené uhlíkové pastové elektrodě. Akumulační čas (2 min při 0,1 V), v 0,2M fosfátovém pufru (pH 7,0); přístroj TRACERLAB; CPSA: rozpouštěcí proud 5 µA; DPV: výška pulsu 25 mV, doba kapky 0,5 s; rychlost posunu potenciálu 5 mV s⁻¹; Y = tyrosin, W = tryptofan

10.2.2 Elektroaktivita peptidů na rtuťových elektrodách

V 0,2M fosforečnanu sodném, pH 7,0, 1 μ M [Lys⁸]–vasopressin poskytl pík S při -0,56 V, související s přítomností cystinu v tomto peptidu. Za stejných podmínek nebyl pozorován pík S s angiotensinem II, který neobsahuje žádný cystin/cysteinový zbytek. Vasopressin, ne však angiotensin, produkuje katalytický redukční signál v prostředí s kobaltnatými ionty, ale i v prostředí bez iontů přechodových kovů.

Elektroaktivita peptidové nukleové kyseliny (PNA) je podobně jako u DNA podmíněna redukcí bazí nukleových kyselin na rtuťových elektrodách a oxidací basí na elektrodách uhlíkových. Doposud nebyly publikovány žádné zprávy, že by PNA byla schopná katalyzovat vylučování vodíku. Naše předběžné výsledky naznačují, že PNA neposkytuje Brdičkův signál v roztocích obsahujících kobalt. Na druhé straně, PNA koncově značená cysteinem poskytuje zřetelný pík H stejně jako Brdičkovu dvojvlnu.

Pík H [Lys⁸]–vasopressinu a angiotensinu II. Angiotensin II a [Lys⁸]–vasopressin byly studovány pomocí CPSA na HMDE v 0,22M fosforečnanu amonném pH 7,8 (bez iontů kobaltu). [Lys⁸]-vasopressin (1 μ M) poskytl symetrický pík kolem -1,7 V, dobře oddělený od základního elektrolytu. Vasopressin (1nM) poskytoval po pětiminutové akumulaci ještě dobře vyvinutý pík i bez korekce pozadí. Tento pík, který produkují také jiné peptidy a bílkoviny, byl pojmenován pík H, a to pro svou vysokou (*high*, **H**) citlivost, katalytické vylučování vodíku (**H**ydrogen) a na počest Jaroslava Heyrovského. Skutečně, byli to Heyrovský a Babička, kteří v roce 1930 odstartovali historii elektrochemické analýzy bílkovin, když publikovali polarografickou práci o tzv. prenatriové vlně. CPS pík H pravděpodobně zahrnuje podobný elektrodový proces jako prenatriová vlna, ale tento pík je lépe vyvinut, což dovoluje stanovní peptidů a bílkovin v nanomolárních a subnanomolárních koncentracích. K lepší citlivosti CPS píku H ve srovnání s polarografií v kobalt obsahujících roztocích (Brdičkovy bílkovinné vlny) a v nepřítomnosti kobaltu (prenatriová vlna) přispívá několik faktorů:

(i) Při CPSA lze dospět k negativnějším potenciálům než při voltametrii a polarografii. Dosažení vysoce negativního potenciálu je nezbytné, má-li se získat dobře vyvinutý pík H; ten je při voltametrických a polarografických měřeních příliš blízko vylučování základního elektrolytu.

(ii) Silně adsorbované peptidy a proteiny mohou být akumulovány na HMDE (nebo jiné stacionární nebo pevné rtuť obsahující elektrodě, jako jsou amalgamové elektrody). Použití adsorptivního stripingu velmi zvyšuje citlivost stanovení ve srovnání s polarografickými metodami.

(iii) Účinná korekce základní linie vestavěná do chronopotenciometrických přístrojů může vylepšit tvar píku při velmi nízkých koncentracích bílkovin. Toto obvykle není potřeba, poněvadž citlivost CPS píku H je velmi dobrá i bez korekce pozadí.



Obr. 10.2 CPSA signály [Lys⁸]-vasopressinu měřené na HMDE

(a) pík S redukce HgS/disulfidické vazby, (b) pík kobaltu (Co) a katalytické píky A a B peptidu za přítomnosti iontů kobaltu (Brdičkova soluce), (c) katalytický pík H měřený v roztoku bez kobaltu

Chronopotenciogramy 1µM vasopressinu byly měřeny za podmínek: (a) 0,2M fosfátový pufr pH 7,0 ($t_A = 300$ s, $E_A = 0$ V, I = -0,2 µA); (b) 0,1M-NH₄Cl, 0,1M-NaOH, 1mM-[Co(NH₃)₆]Cl₃ ($t_A = 60$ s, $E_A = -0,6$ V, I = -10 µA); (c) 0,2M amonium fosfátový pufr pH 7,8 ($t_A = 60$ s, $E_A = 0$ V, I = -20 µA)

10.2.3 Elektroaktivita bílkovin

Avidin a streptavidin jsou elektroaktivní proteiny poskytující elektrochemické signály jak na uhlíkových, tak rtuťových elektrodách. Byly studovány jako příklad bílkovin obsahujících (avidin) a neobsahujících (streptavidin) zbytky cystinu ¹. Vazba biotinu se projeví změnami v elektrochemických signálech avidinu. Experimenty ukázaly snížení Trp-píku W, zvýšení píku S a snížení katalytických signálů při negativních potenciálech. Kapsa avidinu nebo streptavidinu, která váže biotin, obsahuje zbytky Trp a vytváří "hydrofobní schránku". Vazba biotinu na avidin nebo streptavidin snižuje dostupnost Trp-zbytků pro rozpouštědlo a v důsledku toho také elektrooxidaci na PGE a lze tudíž očekávat snížení oxidačního píku W. Na druhé straně, zvýšení píku S a snížení katalytických signálů při negativnějších potenciálech může být stěží pochopeno bez toho, že by se uvažovala orientace bílkoviny na povrchu a popřípadě určité změny konformace bílkoviny v mezifází. Snížení píku H po vazbě biotinu bylo v souladu s naznačeným schématem. Shora uvedená data mohou být důležitá v biotechnologiích. Například avidinem značená DNA v biosenzorech může být detegována bez použití dalších značek, jako jsou enzym-avidinové konjugáty.



Obr. 10.3 AC-voltametrické chování avidin-biotinového komplexu.

Koncentrace složek: avidin 15 μ M, biotin 60 μ M. HMDE, AdTS-AC-V v 0,1M-NH₄Cl, 0,1M-NH₄OH, pH 9,5. Nastavení přístroje: $t_A = 1 \text{ min}, f = 230 \text{ Hz}$, amplituda 50 mV, fázový úhel 0°.

Vložený graf: Závislost výšky píku S na koncentraci biotinu v avidin-biotinovém komplexu (hodnota proudu 15 μ M avidinu se 60 μ M biotinu (1:4) byla vzata jako 100 %). Data převzata z práce Havran et al., 2004

Zvláště zajímavé se jeví nízké detekční limity, které obdržíme u píku H. Potíže se rtuťovými elektrodami v senzorech mohou být překonány využitím pevných amalgamových elektrod. Pík H byl pozorován u všech až dosud studovaných bílkovin a peptidů. Naproti tomu pík S a BCR mohou poskytovat jen bílkoviny obsahující zbytky cysteinu.

10.2.3.1 Nativní, mutované a denaturované bílkoviny

Je dobře známo, že konformace bílkovin je úzce spjata s funkcí bílkovin. Záměna jediné aminokyseliny může vyvolat velké změny jak konformace bílkoviny, tak její biologické aktivity. Na příklad specifická bodová mutace může přeměnit funkci nádorového supresoru proteinu p53 na funkci rakovinu podporující. Proto se hledají rychlé a citlivé metody pro detekci mutací a konformačních změn bílkovin. Pomocí integrovaných optických technik bylo prokázáno, že neutralizující mutace (glutamin místo kyseliny glutamové) ve kterékoliv ze dvou různých pozic (15 nebo 48) v rozpustném fragmentu cytochromu *b* měla za následek obrovský rozdíl adsorpčních vlastností mutovaných bílkovin. Adsorpce bílkoviny byla ovlivněna vlastnostmi povrchu. Adsorpce na silně negativně nabitý povrch byla plně reversibilní, ale adsorpce na neutrální fosfolipidovou dvojvrstvu byla velmi pomalá a prakticky irreversibilní; vysoce pozitivně nabitý povrch fungoval jako výlevka, totiž adsorpce byla limitována pouze rychlostí transportu. Dá se očekávat, že elektrochemické metody, které jsou schopny poskytovat data o transportu elektronů a adsorpci bílkovin na površích nabitých na různé potenciály, mohou odrážet změny v interfaciálních vlastnostech bílkovin vzniklých v důsledku jejich mutací a jejich konformačních změn v roztoku. Tyto metody se ukazují jako potenciálně užitečné nástroje analýzy bílkovin. Nicméně doposud byly málo použity pro studium mutovaných bílkovin.

Proteiny mohou být **denaturovány** změnou svého chemického nebo fyzikálního prostředí. Zahřívání, přídavek chemického denaturačního činidla, jako jsou guanidinium chlorid nebo močovina, změna pH nebo použití vysokého tlaku jsou nejpoužívanější metody. Malé bílkoviny mohou být denaturovány reversibilně a když se vrátí do podmínek příznivých pro sbalení opět nabudou svou nativní strukturu. Mnohé velké bílkoviny však denaturují irreversibilně. Po odstranění denaturačních podmínek často agregují a srážejí se. Stav denaturované bílkoviny není jediný fixovaný stav. Je to sbírka stavů o velmi podobné energii, které jsou ve vzájemné rychlé rovnováze. Optické metody indikují zbytkovou sekundární strukturu. Označení "D" je často používáno pro denaturovaný stav, na rozdíl od rozvinutého stavu za přítomnosti denaturačních podmínek (pojmenované jako "U"). Silně rozbalený stav v koncentrovaném denaturantu, jako je močovina, připomíná nejvíce statistické klubko (*random coil*).

Rozdílné odpovědi nativních a denaturovaných bílkovin byly pozorovány polarografickými metodami již před několika desetiletími. Později mnozí autoři ukázali, že minimálně u některých bílkovin může dojít k částečnému nebo úplnému rozvinutí bílkoviny na povrchu elektrody. Tato "povrchová denaturace" může být ovlivněna různými faktory, jako jsou iontové podmínky a zejména specifická adsorpce aniontů na negativně nabitém povrchu rtuti, hydrofobicitou a elektrickým nábojem povrchu apod. Výsledky početné skupiny autorů naznačují, že rozsáhlá povrchová denaturace je u mnoha bílkovin nepravděpodobná: (i) polarografie a voltametrie byla úspěšně aplikována při studiích denaturace a renaturace některých bílkovin, (ii) enzymatická aktivita bílkovin na rtuťové elektrodě byla reversibilně zapínána a vypínána v závislosti na potenciálu elektrody a (iii) α-helix a β-struktura polylysinu byly rozpoznány polarografií střídavým proudem (AC) a přechod helix-klubko bylo možné sledovat AC-polarografií.

Otázku povrchové denaturace bílkovin diskutoval Honeychurch (1997). Aby překonal obtíže s daty, která si protiřečila, navrhl, že pouze malé bílkovinné molekuly, studované Schellerem a spol. (např. insulin, rubinukleasa A a lysozym) podléhají rozsáhlé povrchové denaturaci, zatímco větší bílkoviny se adsorbují pouze malou částí své molekuly a zbytek proteinu je zachován. Nicméně bylo ukázáno, že i relativně malá bílkovina viru tabákové mosaiky (TMV) ($M_r = 17500$) vytvářela velmi rozdílné elektrochemické signály pro nativní a denaturovanou formu na rtuťových i na uhlíkových elektrodách. Rozdíl mezi nativní a denaturovanou bílkovinou byl zvláště výrazný na rtuťové kapkové elektrodě. Nativní TMV-vulgare protein poskytoval Brdičkovu reakci (BCR) asi při –1,55 V, zatímco denaturovaná bílkovina produkovala mnohem větší signál při potenciálech asi o 100 mV negativnějších. Takto výrazná diference ukazuje, že konformace nativní a denaturované bílkoviny se liší nejen v roztoku, ale i na povrchu elektrody. Brabec měřil BCR cytochromu c s využitím derivační (DPP) a normální pulsní polarografie (NPP) a také fázově citlivé AC-polarografie. Zjistil, že u charakteristické dvojvlny negativnější vlna B byla citlivá k denaturací indukovanému rozvinutí bílkoviny. DPP a DC-polarografická vlna B rostly se zvyšující se koncentrací močoviny nebo chloristanu sodného souběžně se změnou absorbance roztoku bílkovin, což naznačuje, že obě polarografické metody odrážely konformační změny cytochromu c, vyvolané v roztoku denaturačním činidlem. Na druhé straně NPP (to jest technika pracující s velkými změnami napětí během života kapky) vykázala za týchž podmínek významnou závislost BCR na počátečním potenciálu (E_i). Při E_i méně negativním než -1,0 V (proti referentní elektrodě Ag/AgCl nasyc. KCl) byla pozorována vysoká vlna B (charakteristická pro rozvinutý cytochrom c). Závěr zněl, že cytochrom c podléhá povrchové denaturaci v širokém rozmezí potenciálů kolem potenciálu nulového náboje, avšak nikoliv při potenciálech negativnějších než polarografická BCR. Tyto výsledky dobře korespondují s výsledky, které pozoroval Paleček při DPP a NPP zkoumání dsDNA, které ukázaly závislost NPP signálů DNA na E_i , což naznačuje povrchovou denaturaci DNA kolem -1,2 V. Na druhé straně DPP (pracující s malými exkursemi napětí během života kapky) odrážejí změny ve struktuře DNA v roztoku, takže na povrchu elektrody se neprojevují žádné sekundární změny ve struktuře DNA.

Kterákoliv biomakromolekula o uspořádané struktuře v principu musí podstoupit nejméně malou strukturní změnu v segmentu přiléhajícímu k povrchu, když je adsorbována. Problém rozvinutí bílkoviny na povrchu (povrchové denaturace) může být srovnáván s povrchovou denaturací DNA. DNA může být kompletně rozvinuta na povrchu elektrody anebo její denaturace může být zanedbatelná, což závisí na iontových podmínkách, materiálu a potenciálu elektrody a způsobu a rychlosti skenování potenciálu. Ovšem jen stěží mohou být nalezeny stejné podmínky platné pro všechny bílkoviny. Na druhé straně by nemělo být obtížné najít pro určitý individuální protein ta-kové podmínky, za kterých je povrchové rozvinutí buďto minimalizováno nebo maximalizováno.



Obr. 10.4: Nativní a denaturovaný hovězí serum albumin. Chronopotenciometrický pík H se liší od dříve popsaných polarografických a voltametrických elektrokatalytických signálů bílkovin (i) svojí schopností detegovat bílkoviny v nanomolárních a subnanomolárních koncentracích, (ii) svoji mimořádnou citlivostí k lokálním a globálním změnám ve struktuře bílkovin. Zatím však byl analyzován jen poměrně malý počet bílkovin

V nedávné době bylo ukázáno, že denaturované formy řady globulárních bílkovin poskytují mnohonásobně vyšší pík H než jejich nativní formy². Bylo rovněž zjištěno, guanidinium chlorid v nedenaturačních koncentracích silně zvyšuje pík H nativních i denaturovaných bílkovin³.

10.2.3.2 Redoxní stavy peptidů a bílkovin

Dva cysteinové (Cys) zbytky v různých částech polypeptidového řetězce mohou být oxidovány za tvorby disulfidového můstku, je-li zaručeno, že tyto zbytky jsou v sousedství trojrozměrné struktury bílkoviny. Disulfidové můstky se zpravidla nenacházejí v intracelulárních proteinech. Redukovaný stav těchto bílkovin je často spojen s jejich biologickou aktivitou, jako např. je jejich sekvenčně specifická vazba na DNA. Proto se hledají metody schopné rozeznat redukované a oxidované stavy bílkovin.

Elektroredukce disulfidických vazeb

Elektrochemické metody jsou potenciálně užitečné pro tento účel. Bylo publikováno několik přehledů o adsorpci a redukci bílkovin stejně jako jejich schopnosti katalyzovat vývin vodíku na rtuťových elektrodách. Stankovich a Bard (1977) studovali podrobně insulin a navrhli mechanismus jeho elektrochemického chování na HMDE. Prokázali, že dvě přístupné disulfidické vazby byly přerušeny, zatímco třetí, která byla uložena v hydrofobní kapse, růstala nedotčena. Reoxidace redukované vazby na původní se vyskytla jen po krátkých časech, po delších časech byla možná reoxidace pouze jedné disulfidické skupiny. Znovuvytvoření redukované disulfidické skupiny po krátkém čase bylo možné pravděpodobně proto, že konformace bílkoviny byla částečně udržena na povrchu HgS interakcemi a intramolekulárními vodíkovými vazbami. Aby byla dosažena reoxidace, sulfhydrylové skupiny (vytvořené původně elektroredukcí) musejí zůstat v těsné blízkosti (alespoň po krátkou dobu), aby bylo umožněno znovuvytvoření disulfidické skupiny. Toto chování insulinu bylo konsistentní s chováním ureasy, jejíž enzymatická aktivita byla zrušena a obnovena oxidací a redukcí enzymu. Cecil a Weitzman (1964) pozorovali další DC-polarografickou vlnu přibližně při –1,2 V, kterou vysvětlili redukcí bílkoviny ve druhé adsorpční vrstvě. Pozdější studie cyklickou voltametrií naznačily zapojení substance v roztoku spíše než adsorbované. Studie hovězího serumalbuminu (BSA) ukázaly elektrochemické chování v principu podobné chování insulinu. BSA o 69 kDa se svými 17 disulfickými vazbami a jednou sulfhydrylovou skupinou je mnohem komplikovanější bílkovina než insulin s M_r 5 700 a třemi disulfidickými vazbami. Model interakce BSA se rtuťovou elektrodou zahrnuje adsorpci BSA se silnou interakcí několika exponovaných disulfidických vazeb s povrchem elektrody, zatímco struktura BSA je udržována interními disulfidovými vazbami a intramolekulárními vodíkovými vazbami. Po elektroredukci exponovaných disulfidů nejméně některé sulfhydrylové skupiny zůstávají v těsné blízkosti, aby se mohly znovu vytvořit při elektrooxidaci.

10.2.3.3 Agregace bílkovin

Značný počet lidských chorob je spojen s poruchami sbalení bílkovinných molekul, které vyústí do vadné funkce buněčné mašinerie. Nedávno byla velká pozornost soustředěna na skupinu chorob, při kterých se bílkoviny přeměňují ze svých normálně rozpustných forem do nerozpustných fibril. Konečná forma takových agregátů má často dobře definovanou vláknitou strukturu, známou jako amyloid. (Tento termín byl původně použit pro diskusi o bílkovinných agregátech, poněvadž některé jejich vlastnosti připomínaly škrob/amylosu). Skupina asi 20 chorob zahrnuje choroby Alzheimerovu, Parkinsonovu, Creuzfeldt-Jakobsovu chorobu a další. Každá z chorob je spojena s určitou bílkovinou a uvažuje se, že agregáty této bílkoviny jsou přímou či nepřímou příčinou patologických stavů. Zdá se, že první fáze tvorby amyloidu zahrnuje tvorbu rozpustných oligomerů, s následnými relativně nespecifickými interakcemi.

10.3 Parkinsovoa choroba (PD)

Přestože klinické symptomy PD byly poprvé popsány přibližně před 200 lety, zprávy o možném parkinsonském syndromu se datují z údobí před tisíciletími. PD je druhá nejčastější neurodegenerativní choroba; je charakterizována ztrátou dopaminergních neuronů v *substantia nigra*. Některé přežívající nigrální dopaminergní neurony obsahují cytosolické vláknité inkluse, známé jako Lewyho tělíska (LB) a Lewyho neurity (LN); ty se také účastní v patogenesi Alzheimerovy choroby a mnohočetné systémové atrofie. Bylo zjištěno, že převážnou část fibrilárního materiálu v LB a LN představuje α -synuklein. Nedávné studie signalizují, že α -synuklein je klíčový účastník v patogeneze několika neurodegenerativních poruch.

10.3.1 α-Synuklein (ASyn)

ASyn byl poprvé popsán v roce 1988 jako neuron-specifický protein lokalizovaný v jádře. Aminokyselinové sekvence tohoto proteinu vykazuje vysoký stupeň konzervace. Primární sekvence lidského ASyn (M_r 14 000) zahrnuje 140 aminokyselin (aa). Může být rozdělena do tří segmentů:

- (1) Zbytky 1-60 tvoří N-terminální segment. Obsahuje čtyři 11-aa nedokonalá opakování s hexamerovým motivem (KTKEGV).
- (2) Centrální segment zahrnuje vysoce amyloidogenní NAC sekvenci (zbytky 61-95) obsahující dvě další KTKEGV sekvence.
- (3) C-terminální segment, který představují zbytky 96-140, je obohacen o kyselé aa zbytky a proliny, což nasvědčuje neuspořádané konformaci. V tomto segmentu jsou situovány tři konservované Tyr zbytky.

ASyn je silně exprimován v různých částech mozku. Jako nativní je rozvinutý, ale podléhá agregaci, která vede k fibrilárním strukturám. *In vitro* lze indukovat agregaci ASyn různými způsoby a je podporována řadou podmínek, které generují oxidativní stres, a mutacemi v ASyn genu. Agregovaný ASyn vykazuje celou řadu různých morfologií v závislosti na inkubační době agregace a podmínek v roztoku, při čemž zralé amyloidní fibrily utvářejí hlavní morfologii v plně agregovaných roztocích fysiologických pufrů.

Elektrochemická analýza α-synukleinu ASyn neobsahuje žádná redox aktivní centra pro reversibilní elektrochemii. Navíc neobsahuje ani žádné cystinové nebo cysteinové zbytky, které poskytují signály na rtuťových elektrodách, a ani tryptofan, oxidovatelný na uhlíkových elektrodách. Mezi 140 aa zbytky ASyn jsou pouze 3 tyrosiny. Možnosti elektrochemické analýzy této bílkoviny jsou tedy dosti omezené. Přesto však jsme se pokusili zkoumat schopnost ASyn katalyzovat vývoj vodíku na rtuťových elektrodách a oxidovatelnost tyrosinu na uhlíkových elektrodách. Nejdříve jsme testovali HMDE ve spojením s různými postupy elektrochemické stripovací analýzy, konkrétně linear sweep voltametry (LSV), square wave voltametry (SWV) a chronopotenciometrií konstantním proudem (CP). Při testu s HMDE při 60 s akumulační doby (t_A) při koncentraci 2nM-ASyn v 50mM fosfátovém pufru (pH 7,0) byly nejlepší výsledky dosaženy s CPSA: byl získán dobře vyvinutý pík H bez korekce pozadí. Při podstatně vyšších koncentracích ASyn byl pozorován oxidační pík Tyr (Y) zbytků na uhlíkových pastových elektrodách (CPE) při +0,8 V jak pomocí CPSA, tak SWV rozpouštěcí analysy. Korekce základní linie byla nezbytná, aby se získaly dobře vyvinuté píky.

Pík H nativního \alpha–synukleinu. Koncentrační závislost píku H nativního ASyn mezi 10 a 1 000nM při t_A 60 s poskytla křivku typickou pro adsorpční procesy s lineární kalibrací až ke 175nM-ASyn. Při vyšších koncentracích se neměnila plocha píku, což indikovalo plné pokrytí plochy elektrody.

Potenciál píku se při zvyšující se koncentraci posouval k pozitivnějším hodnotám. ASyn (400pM) adsorbovaný z 5 μ L kapky poskytl dobře vyvinutý pík H při t_A 10 min, což ukázalo schopnost AdT CPSA detegovat ASyn až ke 2 fmolům, to je 30 pg.

Oxidace nativního α-synukleinu na uhlíkových elektrodách. ASyn (250nM) v 0,2M acetátovém pufru (pH 5,0) při t_A 60 s produkoval CPSA a SWV odezvy, které se změnily v dobře vyvinutý pík Y po korekci základní linie.

Agregace α-synukleinu. In vitro agregace 100µM-ASyn byla indukována mícháním při 37 °C. Elektrochemické odezvy nativního ASyn byly pozorovány v časových intervalech, ve kterých jak cirkulární dichroismus, tak fluorescence Thioflavinu T vykazovaly signifikantní změny v odezvách ASyn. Pík Y 3,5µM agregovaného ASyn byl o 9 % menší než obdobný pík nativního proteinu a potenciál píku agregovaného proteinu byl lehce posunut k méně positivním hodnotám. Za těchto podmínek byla uhlíková elektroda blízká plnému pokrytí, což naznačovalo, že rozdíl ve výšce píků nativního a agregovaného ASyn nebyly jednoduše způsobeny pomalejším transportem agregovaných molekul k povrchu elektrody. Pozorovaný pokles výšky píku Y a E_p byl sice malý, ale signifikantní a ukázal se jako potenciálně užitečný pro studie přechodu mezi nativními a plně agregovanými stavy ASyn. Nicméně tato metoda nenabízela žádnou zvláštní výhodu proti běžně užívaným metodám studia agregace ASyn.

Pík H. Výrazně větší rozdíly mezi nativním a agregovaným ASyn byly pozorovány na HMDE. Agregovaný ASyn nedával žádný pík H až k asi 100nM koncentraci, což kontrastovalo s dobře vyvinutým píkem nativního ASyn při 2nM. "Pík H 150nM agregovaného ASyn byl asi o 77 % menší a jeho E_p bylo lehce méně negativní (kolem 4 mV) než píku H nativního ASyn. Tyto výsledky ukázaly, že pík H reflektoval agregaci ASyn se zásadně větší citlivostí než pík Y.

Počáteční stadia agregace α-synukleinu. První stadium v procesu tvorby amoyloidu je zvláště důležité z těchto důvodů: (i) Tento krok na dráze agregace určuje rychlost nuklease a takto délku lagprodlevy, což se považuje za klíčový faktor pro věk nástupu příslušné choroby. (ii) Nedávné studie signalizovaly, že malé rozpustné oligomery amyloidogenních proteinů a peptidů mohou vykazovat vyšší toxicitu než zralé fibrily. Metody běžně používané pro sledování tvorby amyloidu se vyznačují vysokou citlivostí pro fibrilární agregáty, ale ne pro pre-fibrilární oligomery.

Zajímalo nás, jestli naše elektrochemické metody budou schopny detegovat jakékoliv změny v mezifázových vlastnostech ASyn v časových intervalech, ve kterých fluorescenční a CD měření nevykazují žádné změny. V našich prvních pokusech jsme pozorovali malý pokles píku Y (jen málo převyšující experimentální chybu) 24 h po iniciaci agregace. Na druhé straně, za týchž podmínek pík H poklesl přibližně na 41 % se současným posunem E_p více než 30 mV k méně negativním hodnotám. Naše další práce ukázala významné změny ve výšce a E_p píku H v průběhu prvních hodin inkubace ASyn. Tyto výsledky napovídají tomu, že pík H indikuje proces, který probíhá v počáteční lag fázi (nukleaci), jako je akumulace pre-fibrilárních oligomerů. Tento předpoklad je podpořen našimi předběžnými výsledky, které ukazují různý časový průběh v pre-agregačních změnách píku H, indukovaných nízkomolekulárnímu látkami, o nichž je známo, že ovlivňují časový průběh agregace ASyn.

Pokud je nám známo, naše práce reprezentuje první případ, kdy agregace amyloidogenního proteinu je detegována metodami elektrochemické analysy. Při částečném pokrytí elektrody tyto metody mohou odrážet velké změny v molekulární hmotnosti analyzované bílkoviny způsobené agregací, protože elektrochemický signál je ovlivněn rychlostí transportu molekul k povrchu elek-

trody. Na konci procesu agregace, kdy jsou vytvořeny velmi velké agregáty, elektrochemický signál může značně poklesnout až zcela vymizet. Na druhé straně signifikantní změny v E_p píku H v počátečních stadiích agregace jsou neočekávané. Mohou být způsobeny změnami v tom, že oligomery jsou schopny lépe katalyzovat vývoj vodíku. Podrobné vysvětlení mezifázového chování oligomerů nebude možné bez lepšího pochopení katalytického procesu, odpovědného za pík H.

Vývin vodíku katalyzovaný α-synukleinem na rtuťových elektrodách. Při použití píku H pro ASyn jsme dosáhli citlivosti o několik řádů vyšší ve srovnání s píkem Y na uhlíkových elektrodách. Nebylo zapotřebí korigovat základní linii a metoda nebyla optimalizována pro získání nejvyšší citlivosti pro stanovení ASyn. Vysoká citlivost píku H je dána katalytickou povahou elektrodových procesů na rtuťových elektrodách. Je dobře známo, že redukce protonů probíhá na rtuťových elektrodách s největším přepětím mezi všemi kovovými elektrodami. Bílkoviny adsorbované na povrchu rtuti jsou schopny snižovat toto přepětí a tím dávají vznik elektrochemickým signálům, které jsou mnohem větší, než kterékoliv signály vyvolané obvyklými procesy kontrolovanými difusí. Bílkovina váže protony, které vstupují do elektrodového procesu. Detailní schéma vývoje vodíku katalyzované bílkovinami a dalšími sloučeninami bylo navrženo několika autory. V principu postulují, že převzetí elektronu protonovaným katalyzátoru reakcí s kyselou složkou pufru. Předpokládá se, že do katalytické reakce bílkovin jsou zapojeny protonované aminoskupiny.

Ukázali jsme, že 400pM-ASyn se dá stanovit v objemu 5 μ L při rozumných akumulačních časech (např. $t_A = 600$ s), což odpovídá 30 pg bílkoviny. Nicméně toto není nejvyšší citlivost dosažitelná touto metodou. Naše předběžné výsledky napovídají, že optimalizací podmínek, zejména snížením pH základního elektrolytu, dovolí detekci ještě nižších koncentrací ASyn a menších množství ASyn. Agregace může být také monitorována pomocí A_{280} rozpustného materiálu po ultracentrifugaci vzorku ASyn. S použitím píku H mohou být analyzována velmi malá množství ASyn v sedimentech stejně jako změny koncentrace ASyn v supernatantu, čímž se doplní data získaná spektrofotometrií. V jiných případech, kdy tak vysoká citlivost stanovení není zapotřebí, mohly by se použít pro studium agregace ASyn další elektrochemické metody vedle CPSA, ovšem tato měření budou vyžadovat vyšší koncentraci ASyn.

10.4 Interakce DNA-proteiny

V organismech má velké množství bílkovin schopnost vázat DNA. Bylo odhadnuto, že typicky 6 až 7 % eukaryotického genomu a 2 až 3 % prokaryotického genomu kóduje bílkoviny vázající DNA. Tyto bílkoviny hrají centrální roli v mnoha aspektech genetické aktivity organismu, jako je transkripce, replikace, sbalení NDA atd. Je proto extrémně důležité zkoumat procesy vazby DNA na bílkoviny a povahu komplexů vytvořených mezi DNA a proteiny. V porovnání s DNA a RNA jsou bílkoviny mnohem méně pravidelné, a tudíž porozumění jim je obtížnější. V posledních dvou desetiletích jsme svědky obrovské expanze v získávání vysoce kvalitních struktur DNA vázajících bílkovin. Tyto struktury a zvláště jejich komplexy s DNA zajistily cenné náhledy do principů vazby, včetně toho, jek je specifická sekvence DNA rozpoznávána proteinem a jak je struktura DNA zpravidla modifikována při vazbě na bílkovinu. Na základě strukturní analýzy 240 DNA-protein komplexů obsažených v Proteinové databance (PDB), bílkoviny vázající DNA byly klasifikovány do osmi různých strukturně-funkčních skupin, dále rozdělených do 54 strukturních rodin. Vedle vysokorozlišující rtg-krystalové analýzy byla použita celá řada metod ke studium interakcí DNA-proteiny. Na druhé straně až do nedávné doby naprosto chybělo využití metod elektroche-

mické analýzy ke studiu interakcí DNA-proteiny. Uvážíme-li, že DNA i bílkoviny jsou elektroaktivní a mohou být analyzovány s vysokou citlivostí, aplikace elektrochemické analýzy pro DNA-proteinové interakce se jeví jako přirozená a velmi slibná. Naše nedávné výsledky nasvědčují tomu, že samoorganizující monovrstvy (self-assembled monolayers, SAMs) thiolovaných ODN (HS-ODN) mohou najít uplatnění při studiu interakcí proteinů s nukleovými kyselinami.

10.4.1 Thioalkany a thiolované ODN na zlatých a rtuťových elektrodách

SAM thiolovaných ODN (HS-ODN) byly pozorovány na zlatých elektrodách a detailně studovány atomovou silovou mikroskopií, elektrochemickými i jinými metodami. Byly často použity v DNA senzorech v kombinaci s redox indikátory díky tomu, že na zlatých elektrodách není DNA elektrochemicky aktivní. SAMy vytvořené různými thioalkany byly studovány na rtuťových elektrodách, které nabízejí atomárně hladký povrch rtuti bez defektů, což je pro tvorbu SAM ideální. Pokud je nám známo, nebyla publikována žádná zpráva o vytvoření SAM z HS-ODN na rtuťových elektrodách. Nedávno jsme pozorovali tvorbu HS-ODN SAM na rtuťových elektrodách a zjistili jsme, že tyto ODN jsou elektroaktivní, neboť vykazují rozdílné signály v různých médiích. Kromě toho jsme našli, že tyto ODN poskytují několik specifických voltametrických signálů v roztocích obsahujících kobalt, ne však v roztocích bez kobaltu.

10.4.1.2 HS-ODN v roztocích obsahujících kobalt

Studovali jsme voltametrické chování thiolovaných ODN v Brdičkových roztocích obsahujících kobalt, které jsou vhodné pro elektrochemickou analýzu peptidů obsahujících cystein a analýzu bílkovin. Když jsme použili DPV-adsorptivní transfer striping (ex situ), mohli jsme změřit celou řadu thiolovaných a nemodifikovaných ODN. Většina měření se uskutečnila s 21-merem ODN. HS-(CTT)₇, který byl připojen na HDME a DNA-modifikovaná elektroda byla ponořena do prázdného základního elektrolytu obsahujícího kobalt. Tento ODN poskytl při DPV několik signálů; dva z nich, totiž pík 3 a méně negativní pík 2 se zvyšovaly se zvyšující se koncentrací pufru, což naznačuje, že tyto píky jsou způsobeny katalytickým vylučováním vodíku. Tyto píky tedy mají podobný charakter jako polarografické a voltametrické signály peptidů obsahujících cystein a bílkovin v témže prostředí. Byl použit standardní základní elektrolyt obsahující 1mM-[Co(NH₃)₆]³⁺, 0,1M-NH₄Cl, 0,1M-NH₄OH, pH 9,5, ale podobné výsledky byly získány i v 1mM- $[Co(NH_3)_6]^{3+}$, 0,1M borátovém pufru pH 9,2; v tomto médium byly signály HS-ODN o hodně menší. Pík 3 submikromolárního HS-(CTT)7 byl mnohem vyšší než BCR peptidu obsahujícího cystein asi 10krát koncentrovanějšího. Pík 3 se objevoval u méně negativních potenciálů než píky peptidů, což dovolovalo měřit odděleně signály HS-ODN a peptidů. HS-(CTT)7 byl změřen také na pevných amalgamových elektrodách, na nichž poskytoval signály podobné jako na HMDE. Tato nová možnost měřit signály thiolované DNA v médiích vhodných pro analýzu proteinů se jeví jako slibná pro vývoj elektrochemických senzorů DNA-proteinových interakcí, které se mohou uplatnit v genomice a proteomice. Nedávno bylo zjištěno, že HS-ODN vytvářejí na rtuťových elektrodách hustě uspořádané SAM⁴, podobné vrstvám thioalkanů na týchž elektrodách, které se chovají jako izolátory bránící přenosu elektronů.

10.4.2 Elektrochemická analýza interakcí DNA-proteiny

Nedostatek elektrochemických prací o interakcích DNA-proteiny byl způsoben několika faktory, jako jsou:

- nedostatek citlivých stanovení bílkovin, které neobsahují skupiny umožňující rychlý přenos elektronů na zlatých elektrodách;
- (ii) těžkosti s detekcí proteinů tzv. jednopovrchovými technikami, ponejvíce používanými v elektrochemických censorech pro hybridizaci DNA;
- (iii) nedostatek komerčně dostupných bílkovin, které se specificky váží na DNA a/nebo problémy se sloučeninami zpravidla přítomnými v roztocích, ve kterých jsou bílkoviny uskladněny apod.

Podobně jako senzory pro hybridizaci DNA, censory pro interakce DNA-proteiny mohou být založeny buďto na jednopovrchové metodě, ve které se provádí na stejném povrchu DNA-proteinová interakce a její detekce, totiž na elektrodě, anebo na technice dvojího povrchu. U této techniky se interakce DNA-protein uskuteční na jednom povrchu, zatímco detekce proběhne odděleně na detekční elektrodě. Nedávno se objevily první práce založené na obou těchto přístupech. Budou stručně probrány v následujících odstavcích.



Obr. 10.5: DNA koncově značená skupinou –SH vytváří na rtuťových elektrodách samouspořádané vrstvy. Thiolovaná DNA (HS-DNA) poskytuje na rtuťových elektrodách signály podmíněné redukcí bazí (pík C) a redukcí vazby Hg-S. Pík C podává informaci o kontaktu bazí s povrchem elektrody a indikuje změnu orientace molekul HS-ODN; při nízké povrchové koncentraci HS-ODN leží molekuly na povrchu Hg elektrody na plocho, při vysokých koncentracích mohou být orientovány téměř kolmo k povrchu a vytvářet velmi husté vrstvy nepropouštějící přenos elektronů

Jednopovrchové metody. V principu interakce DNA s proteiny vyvolá změny v DNA, jako jsou zlomy řetězců způsobené nukleázami, což lze elektrochemickými metodami snadno sledovat. Na příklad štěpení nadšroubovicové DNA deoxyribonukleasou I v roztoku a na rtuťovém povrchu bylo prozkoumáváno AC-voltametrií. Zavedení jednořetězových zlomů do molekuly DNA se projevilo specifickým signálem. Tento signál byl použit ke studiu kinetiky štěpení DNA. Ve srovnání se štěpením v roztoku kinetika štěpení DNA adsorbované na povrchu naznačila omezenou přístupnost DNA adsorbované na povrchu. Štěpení imobilizované DNA bylo ovlivněno nábojem elektrody. Na positivně nabité elektrodě enzymatická reakce byla ve své počáteční fázi inhibována, zatímco mírně negativně nabitá elektroda stimulovala enzymatické štěpení DNA. Nedávno Kerman a spol. (2005) použil jednostěnné uhlíkové nanotrubičky (single-walled carbon nanotubes, SWCNT), kterými modifikoval tištěné uhlíkové elektrody na jedno použití (screen-printed carbon electrodes, SPCE). V tomto systému monitoroval interakci proteinu vážícího se na jednořetězovou DNA (sing*le-strand binding*, SSB). SSB je homotetramerní protein ($M_r 4 \times 18800$), který hraje důležitou roli při rekombinaci, replikaci a opravě DNA. Každý monomer SSB obsahuje 4 tyrosinové a 3 tryptofanové zbytky, oxidovatelné na uhlíkových elektrodách. DNA byla navázána na SWCNT-SPCE prostřednictvím svého amino konce a DNA modifikovaná elektroda byla ponořena do roztoku SSB $(10-50 \text{ µg mL}^{-1})$. Po vazbě SSB na jednořetězovou DNA se objevil oxidační signál bílkoviny a poklesl guaninový signál DNA. Žádný proteinový signál se neprojevil při interakci dvoušroubovicové DNA s roztokem SSB.

Změny v přenosu náboje v DNA na zlatých elektrodách vyvolané proteiny. Zajímavý přístup ve studiu interakcí DNA–proteiny vyvinula Bartonová a spol. (2002). Spočívá v transportu náboje zprostředkovaném dsDNA. Bylo prokázáno, že vazba base-flipping enzymu MHhaI na dsDNA velmi snižuje signál daunomycinu vázaného na DNA, což svědčí o tom, že vazba tohoto proteinu narušila integritu stohování (stacking) basí způsobenou vybočením basí (flipping) z duplexu. DNA reparující enzym (MutY), který se váže na nesprávná spojení 8-oxo-G:A a G:A, byl využit pro detekci vadného párování jedné base. Tato metoda se však neosvědčila, neboť vybočení (flipping) basí nebylo zjištěno. Na druhé straně, tatáž skupina později prokázala, že [4Fe4S] klastr, obsažený v MutY, může být použit pro detekci MutY-DNA interakcí. Přestože MutY není detegovatelný v nepřítomnosti DNA, MutY vázaný na DNA vykazuje reversibilní dvojici při CV na zlatých elektrodách. Tato metoda vyžaduje enzym s prostetickou skupinou schopnou podstoupit redoxní proces za určitých podmínek a poměrně vysokou koncentraci MutY.

Změny v katalytických signálech thiolovaných DNA na rtuťových elektrodách. Schopnost peptidů a bílkovin poskytovat signály díky katalytickému vylučování vodíku, jako jsou pík H a BCR v roztocích obsahujících kobalt, podobně jako stripovací proudy vztahující se k reduck vazby HgS nabízejí velké možnosti rtuťových elektrod při zkoumání interakcí DNA–proteiny. Vysoká citlivost píku H byla využita při analýze interakcí DNA-proteiny pomocí DST.

Naše předběžné výsledky naznačují, že použijí-li se rtuťové elektrody s imobilizovanými thiolovanými ODN, snad bude možné sledovat nejen cystein obsahující bílkoviny (které dávají BCR), ale i interakce DNA s bílkovinami neobsahujícími cystein/cystinové zbytky, jako jsou histony a protaminy. To znamená, že by mohlo být možné sledovat jak sekvenčně specifické, tak nespecifické elektrostatické vazby DNA-protein. Histony zprostředkovávají skládání DNA ve většině eukaryotických buněk. Histony mohou být odděleny od DNA pomocí vysoké koncentrace solí, což nasvědčuje tomu, že povaha hlavních interakcí mezi histony a DNA je elektrostatická. Smíchali jsme 1µM HS-(CTT)₇ s ekvimolárním množstvím histonu H2A jednak při nízké, jednak při vysoké koncentraci NaCl a po krátké inkubaci byla HMDE ponořena do směsi na 60s a promyta. Modifikovaná elektroda byla pak přenesena do prázdného kobalt obsahujícího základního elektrolytu a provedeno DPV měření. Experimentální uspořádání bylo podobné jako v práci Ostatná a spol. (2005), ale pH elektrolytu bylo 7,5. Katalytický signál thiolovaného ODN byl méně intensivní, ale podobný jako při pH 9,5. Inkubace DNA s histonem při nízké koncentraci NaCl (50mM) měla za následek silný pokles píku 2 HS-ODN. Žádný pokles tohoto píku nebyl pozorován, když byla inkubace provedena v l M-NaCl, což jsou podmínky nepříznivé pro vazbu DNA-histon. Tato metoda se jeví jako citlivější než shora diskutované postupy.

Dvoupovrchová technika (Double-surface technique, DST). Vazba prakticky jakéhokoliv proteinu na DNA (nebo RNA) může být detegována elektrochemickou DST. Například DNA může být snadno navázána na magnetické kuličky, provedena interakce s bílkovinou s následným promytím, navázaný protein oddisociován a elektrochemicky detegován na rtuťových elektrodách (např. s využitím píku H) nebo na uhlíkových elektrodách (obsahuje-li bílkovina oxidovatelné tyrosinové nebo tryptofanové zbytky). Vysoká citlivost píku H činí rtuťové elektrody zvláště přitažlivé pro detekci bílkovin, ale použití uhlíkových elektrod, v kombinace s účinnou korekcí základní linie, může být výhodnější pro censory, u kterých se nevyžaduje vysoká citlivost pro stanovení bílkovin. Oba typy elektrod byly použity při studiích interakcí proteinu MutS s DNA, s úmyslem detegovat v DNA bodové mutace. *Vazba proteinu MutS na DNA obsahující jedinou špatně párovanou dvojici basí.* Protein MutS hraje důležitou roli v systémech opravy DNA jak v prokaryontních, tak eukaryontních buňkách; rozpoznává nepárované a špatně párované base ve dvoušroubovicové DNA a dá se použít pro detekci bodových mutací *in vitro*. Nedávno jsme prokázali, že malá množství tohoto proteinu mohou být detekována elektrochemicky jak na rtuťových, tak uhlíkových elektrodách, bez jakéhokoliv značení. Pomocí píku H byly detekovány desítky attomolů této bílkoviny.



Obr. 10.6. Interakce DNA-protein s využitím dvojpovrchové techniky bez značení proteinu. Biotinylovaná dvoušroubovicová DNA byla imobilizována na magnetických kuličkách pokrytých streptavidinem a smíchána s bílkovinou. Po magnetické separaci byla bílkovina uvolněna z vazby s DNA a bílkovina byla stanovena na rtuťové nebo uhlíkové elektrodě. S využitím proteinu MutS byla takto prokazovány bodové mutace v DNA (Paleček et al., 2004)

Citlivost stanovení na uhlíkových elektrodách byla o více než tři řády nižší. Kombinace vysoké citlivosti píku H s DST vyústila v metodu pro stanovení bodových mutací v DNA. Připravili jsme biotinylované duplexní DNA navázané na magnetické kuličky a nechali interagovat imobilizovanou DNA s MutS proteinem. Množství navázaného proteinu bylo deteGováno na HMDE s pomocí píku H. Touto cestou bylo zjištěno chybné párování jediné base a inserce nebo delece basí. Pomocí CPSA byla stanovena pikogramová množství MutS po jeho uvolnění z kuliček. Tato velmi citlivá detekce MutS bez značení otevřela cestu pro vývoj DNA čipů pro vysoce výkonné elektrochemické stanovení bodových mutací v genomové DNA a podpořila současné tendence, směřující k doplnění optické detekce v senzorech pro hybridizaci DNA jednoduššími a levnějšími elektrochemickými metodami. Navíc, tyto metody representují nový přístup k analýze NAproteinových interakcí, aplikovatelný na velké množství NA vážících proteinů.

Seznam zkratek

AC (alternating current) střídavý proud; ACV (AC-voltammetry) voltametrie střídavým proudem; AdS (adsorptive stripping) adsorptivní rozpouštěcí; AdTS (adsorptive transfer stripping) adsorptivní přenosová rozpouštěcí; ASyn (α-synuclein) α-synuklein; BCR (Brdicka's catalytic response) Brdičkova katalytická reakce; CNT (carbon nanotubes) uhlíkové nanotrubičky; CP (constant current chronopotentiometry) chronopúotenciometrie střídavým proudem; CPE (carbon paste electrode) uhlíková pastová elektroda; CPSA (constant current chronopotentiometric stripping analysis) chronopotenciometrická rozpouštěcí analýza konstantním proudem; CV (cyclic voltammetry) cyklická voltametrie; DC (direct current) stejnosměrný proud; DME (dropping mercury electrode) rtuťová kapková elektroda; DPP (differential pulse polarography) diferenční pulsní polarografie; DPV (differential pulse voltammetry) diferenční pulsní voltametrie; DST (double surface technique) dvojpovrchová technika; ds (double-stranded) dvojšroubovicová; HMDE (hanging mercury dropping electrode) visící rtuťová kapka; LSV (linear sweep voltammetry) voltametrie s lineární
časovou základnou; NPP (normal pulse polarography) normuální pulsní polarografie; ODN (oligodeoxyribonucleotides) oligodesoxyribonukleotidy; PNA (peptide nuclic acid) peptidová nukleová kyselina; SAM (self-assembled monolayer) samoorganizující monovrstva; ss (single-stranded) jednořetězová; SST (single-surface technique) jednopovrchová metoda; SWV (sqare wave voltammetry) pravoúhlá voltametrie; t_A (accumulation time) akumulační čas; Trp (tryptophan) tryptofan; Tyr (tyrosine) tyrosin

Literatura

- 1. Havran L., Billová S., Paleček E. (2004): Electroactivity of avidin and streptavidin. Avidin signals at mercury and carbon electrodes respond to biotin binding. *Electroanalysis* **16**, 1139-1148..
- Ostatná V., Dogan B., Uslu B., Ozkan S. and Paleček E.:Native and denatured bovine serum albumin. D.c. polarography, stripping voltammetry and constant current chronopotentiometry. *J. Electroanal. Chem.* 593, 172.
- 3. V. Ostatná, E Paleček, připravováno k publikaci.
- Ostatná V. and Paleček E. (2006): Self-assembled monolayers of thiol-end-labeled DNA at mercury electrodes. <u>Langmuir</u> 22, 6481-6484.

LITERATURA K DALŠÍMU STUDIU

Antony, T., W. Hoyer, D. Cherny, G. Heim, T. M. Jovin and V. Subramaniam, 2003, Cellular polyamines promote the aggregation of alpha-synuclein, J. Biol. Chem. 278, 3235.

Armstrong, F.A., 2002, Voltammetry of proteins. Bioelectrochemistry. Vol. 9: Encyclopedia of Electrochemistry, Ed. G.S. Wilson, Wiley-VCH, Weinheim, 11.

Banica, F. G. and A. Ion, 2000, Electrocatalysis-based kinetic determinations. Encyclopedia of Analytical Chemistry. Ed. R.A. Meyers, John Wiley and Sons, Chichester, 11115

Fersht, A., 1999, Structure and mechanism in protein science. W.H. Freeman and company, New York.

Finklea, H. O., 2000, Self-assembled Monolayers on Electrodes. Encyclopedia of Analytical Chemistry. Vol. 11, Ed. R. A. Meyers, Wiley, New York, 10090.

Havran, L., S. Billova and E. Palecek, 2004, Electroactivity of avidin and streptavidin. Avidin signals at mercury and carbon electrodes respond to biotin binding, Electroanalysis 16, 1139.

Heyrovsky, J. and J. Babicka, 1930, Polarographic stiudies with the dropping mercury cathode. Part XIII. Effect of albumins, Coll. Czech. Chem. Commun. 2, 370.

Kerman, K., Y. Morita, Y. Takamura and E. Tamiya, 2005, Escherichia coli single-strand binding protein-DNA interactions on carbon nanotube-modified electrodes from a label-free electrochemical hybridization senzor, Anal. Bioanal. Chem. 381, 1114.

Kizek, R., L. Trnkova and E. Palecek, 2001, Determination of metallothionein at the femtomole level by constant current stripping chronopotentiometry, Anal. Chem. 73, 4801.

Masarik, M., A. Stobiecka, R. Kizek, F. Jelen, Z. Pechan, W. Hoyer, T. M. Jovin, V. Subramaniam and E. Palecek, 2004, Sensitive electrochemical detection of native and aggregated alpha-synuclein protein involved in Parkinson's disease, Electroanalysis 16, 1172.

Ostatna, V., F. Jelen, T. Hianik and E. Palecek, 2005, Electrochemical responses of thiolated oligodeoxynucleotides in cobalt-containing solutions, Electroanalysis 17, 1413-1420.

Palecek, E., 1983, Modern polarographic (voltammetric) methods in biochemistry and molecular biology. Part II. Analysis of macromolecules. Topics in Bioelectrochemistry and Bioenergetics. Vol. 5, Ed. G. Milazzo, J. Wiley, London, 65.^{*}

Palecek, E. and M. Fojta, 2001, Detecting DNA hybridization and damage, Anal. Chem. 73, 74A

Palecek, E., M. Fojta and F. Jelen, 2002, New approaches in the development of DNA senzors: hybridization and electrochemical detection of DNA and RNA at two different surfaces, Bioelectrochemistry 56, 85.

Palecek, E., M. Masarik, R. Kizek, D. Kuhlmeier, J. Hassman and J. Schulein, 2004, Sensitive electrochemical determination of unlabeled MutS protein and detection of point mutation in DNA, Anal. Chem. 76, 5930.

Palecek E., Scheller F. and Wang J. (eds.) (2005): Electrochemistry of nucleic acids and proteins. Towards electrochemical senzors for genomics and proteomics. Elsevier, Amsterdam. 789 pp.

Ramsden, J. J., D. J. Roush, D. S. Gill, R. Kurrat and R. C. Willson, 1995, Protein adsorption kinetics drastically altered by repositioning a single charge, J. Am. Chem. Soc. 117, 8511

Roscoe, S. G., 1996, Electrochemical investigations of the interfacial behaviour of proteins. Modern aspects of electrochemistry. Vol. 29, Eds. J. O'M. Bockris, B. E. Conway and R. E. White, Plenum Press, New York, 319.

Roscoe, S. G. and K. L. Fuller, 1992, Interfacial behavior of globular-proteins at a platinum-electrode, J. Coll. Interfac. Sci. 152, 429.

Ruttkay-Nedecky, G. and B. Bezuch, 1971, Polarographic changes accompanying denaturation and renaturation of tobacco mosaic virus protein, J. Mol. Biol. 55, 101.

Scheller, F. and H. Jehring, 1972, Untersuchen des helix-knauel-uberganges von poly-lysin mit der wechselstrompolarographie, Studia biophys. 33, 211.

Tomschik, M., L. Havran, M. Fojta and E. Palecek, 1998, Constant current chronopotentiometric stripping analysis of bioactive peptides at mercury and carbon electrodes, Electroanalysis 10, 403.

Tomschik, M., L. Havran, E. Palecek and M. Heyrovsky, 2000, The presodium catalysis of electroreduction of hydrogen ions on mercury electrodes by metallohionein. An investigation by constant current derivative stripping chronopotentiometry, Electroanalysis 12, 274.

Vacek J., M. Masařík, E. Paleček a M. Fojta, 2006, Elektrochemické metody v analýze nukleových kyselin a bílkovin. <u>Čs. Čas. Fyz.</u> 56, 293-304.

Yeh, P. and P. Kuwana, 1977, Reversible electrode reaction of cytochrome c, Chem. Lett., 10, 1145.

^{*} V této monografii jsou elektrochemii bílkovin věnovány následující kapitoly: konstrukce senzorů (A. Warsinke et al. s. 451), rozsáhlý přehled přímé elektrochemie bílkovin a enzymů (E.E. Ferapontova ze skupiny Lo Gortona, s. 517) a specializovaná stať věnovaná katalytickému vývoji vodíku (M. Heyrovský, s. 657). Podrobnější přehled elektrochemické aktivity bílkovin od autora (E.P.) začíná na str. 694, historii polarografie bílkovin přiblížili P. Zuman spolu s E.P. (s. 755). kapitola o elektrochemii nukleových kyselin (E.P. a F. Jelen) je na s. 74).

11. CHEMICKÉ SENZORY: PŘEDSTAVUJÍ BUDOUCNOST ANALYTICKÉ CHEMIE?

V. Král, M. Kronďák, M. Šťastný, R. Volf, G. Broncová, T. Shishkanová, K. Hlávka a Z. Kejík

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Ústav analytické chemie, Laboratoř molekulárního rozpoznávání Vladimir.Kral@vscht.cz

11.1 Úvod

Analytická chemie, a především bioanalytická chemie, stojí v současnosti před řadou výzev. Jsou jimi především obrovské množství analyzovaných vzorků (biologické materiály v klinické analytické chemii, analýza kombinatoriálních knihoven), dále vysoké požadavky na rychlost analýz a v neposlední řadě jejich cena. Tento text odpovídá na otázku, jaké výhody může v této souvislosti nabídnout senzorová analýza.

Zatímco klasická analytická chemie je založena na definované reakci analytického činidla se s stanovovanou látkou, senzorová analýza naopak využívá tvorbu specifického komplexu receptorové vrstvy pro detekci analytu. Z toho vyplývá celá řada výhod, které budou dále představeny, především pro rychlost analýzy a použití v modu vysokokapacitní metody.

Analýza chemického složení materiálů je oborem, který zasahuje do téměř všech oblastí lidské činnosti. Výsledky chemických analýz určují prodejní cenu mnohých materiálů nebo rozhodují například o způsobu léčby pacienta. Chybný nebo nedostatečně přesný výsledek mohou vést v prvém případě k velikým finančním ztrátám a v druhém případě k fatálnímu selhání léčby. Dalším důležitým kritériem je rychlost analýzy. Lékaři na operačním sále nemohou čekat na výsledek jednotlivých rozborů příliš dlouho, při některých operacích dokonce požadují kontinuální monitorování koncentrací životně důležitých složek organismu. Nezanedbatelné jsou i finanční náklady na analýzu, které velmi závisejí na racionálním přístupu a získávání pouze nezbytně nutné informace. V současné době, především ve farmaceutickém průmyslu, představují náklady na analýzu léčiv velmi výraznou část rozpočtu celého projektu. Skloubit tyto požadavky vede k vývoji stále nových analytických *on-line*-technik založených především na integrovaných snímačích chemické veličiny – chemických senzorech.

11.2 Definice chemického senzoru

Vlastní senzor je kompozitní zařízení, které sestává z několika funkčních částí (obr. 11.1). Aktivní vrstvou (též nazývanou senzorový element) může být vrstvička uměle vytvořená při prefabrikaci senzoru, ale také např. elektrodová dvojvrstva vytvořená automaticky na povrchu kovové elektrody při styku s elektrolytem. U modulačních metod, kdy se sledují změny charakteristických vlastností frekvenčního signálu (např. amplituda či fáze), bývá aktivní vrstvou pouhý analyzovaný vzorek či část sledovaného systému, kterým prochází "čistý" signál (signál s nulovou informací). Přítomnost analytu (detegované látky) generuje chemickou či fyzikální změnu v aktivní vrstvě senzoru (u modulačních detektorů pouze přechodně s relaxací během jedné periody střídavého signálu); nakonec však musí dojít k trvalé či přechodné změně určité měřitelné fyzikální veličiny (při změně chemického složení vrstvy typicky ke změně jejího zabarvení, náboje nebo vodivosti). Pokud došlo in-

terakcí s analytem ke změně chemického složení aktivní vrstvy doprovázené fyzikální změnou, pak tuto změnu zpracuje fyzikální převodník signálu, jehož výstupem je informace v elektrické formě (napětí, proud či elektrický odpor). Elektrický proud, odpor či "měkký" napěťový signál, se převedou aktivně (s použitím zesilovačů) na analogové napětí a analogově-číslicovým převodníkem na číslicová data.



Obr. 11.1: Schéma chemického senzoru

11.3 Rozdělení a základní vlastnosti chemických senzorů

V praxi se používá několik různých typů fyzikálních převodníků, které lze rozčlenit mnoha způsoby. Prvé rozdělení je na základě nosiče informace a rozlišují se tak senzory elektrické, které poskytují elektrický výstupní signál, a senzory neelektrické, např. mechanické. Elektrické senzory z mnoha praktických důvodů dominují a lze je dále z praktické hlediska rozdělit na elektronické, polovodičové a mikroelektronické. Jiný způsob klasifikace fyzikálních převodníků je podle druhu snímané veličiny na snímače mechanické (poloha, otáčky,...), tepelné (teplota, tepelný tok,...), elektrické (proud, napětí, výkon,...), magnetické (magnetická indukce, intenzita pole,...), radiační (intenzita záření ve viditelné oblasti, UV, infračervené, α , β , γ , RTG,...) a konečně chemické. Třetí možností klasifikace je dělení na snímače aktivní, které jsou zdrojem energie, a snímače pasivní, které samy o sobě zdrojem energie nejsou. Čtvrtým způsobem je rozdělení podle způsobu interakce s měřeným prostředím na snímače dotykové a bezdotykové.



Tab. 11.1: Přehled chemických senzorů

11.4 Parametry senzorů

Jako u každého zařízení vyvstává potřeba popsat parametry jednotlivých senzorů. Prvním kritériem hodnocení chemických senzorů je jejich selektivita. **Koeficient selektivity** udává, kolikrát poskytne senzor nižší signál při měření interferentu než při měření sledovaného analytu, mají-li interferent a analyt stejné koncentrace. Pro stanovení tzv. koeficientů selektivity u iontově selektivních elektrod lze v odborné literatuře nalézt mnoho různých metod, které jsou mnohdy ovlivňovány vnějšími podmínkami. Proto je vždy vhodné selektivitu experimentálně ověřit při těchto konkrétních podmínkách. Pro praktická měření by koeficient selektivity měl být alespoň 0,001, mnohdy se však musíme spokojit se selektivitou podstatně nižší.

Dalším parametrem posuzovaným u senzoru je **mez detekce**. Tato veličina udává nejmenší možnou koncentraci analytu, která je ve vzorku detegovatelná. Doporučení IUPAC definuje detekční limit jako trojnásobek směrodatné odchylky signálu, který je získán měřením slepého vzorku (vzorku o nulové koncentraci analytu). Tento způsob vyjádření má však i některé nevýhody a v praxi je mnohem častěji využívána metoda, kdy se lineární částí (pro koncentrace, kde je signál přímo úměrný koncentraci) a konstantní částí (pro malé koncentrace, při kterých signál nezávisí na koncentraci) proloží dvě přímky a detekční limit je udán jejich průsečíkem (někdy se též nazývá **praktický detekční limit**). V odborné literatuře se vedou velice bouřlivé polemiky o relevantnosti obou přístupů a doporučuje se proto vždy uvádět způsob, jakým byl daný detekční limit získán. Analogicky lze získat tzv. "horní" detekční limit, který však nemá takovou důležitost jako detekční limit "spodní", neboť je-li vzorek příliš koncentrovaný, je snadné ho naředit.

Třetím parametrem je koncentrační **rozsah senzoru**. Koncentrační rozsah je rozmezí koncentrací, mezi kterými lze stanovit koncentraci analytu. Je-li koncentrace mezi dolní mezí koncentračního rozsahu a dolním detekčním limitem, lze určit, zda je analyt přítomen či nikoli, ale nelze určit jeho koncentraci. Totéž analogicky platí pro horní mez koncentračního rozsahu a horní detekční limit. Koncentrační rozsah se někdy též nazývá rozsah linearity, nicméně v praxi nemusí být odezva striktně lineární, stačí je-li monotónní a dostatečně strmá.

Čtvrtou základní charakteristikou senzoru je **citlivost**, která bývá udávána jako změna výstupního signálu na jednotkovou změnu koncentrace. Předpokladem pro toto vyjádření je lineární odezva senzoru. Obecně platí, že čím strmější je jeho kalibrační křivka, tím lépe.

Dynamické vlastnosti senzorů charakterizuje **časová konstanta senzoru** v jejím běžném významu v měřící technice. Dlouhodobá časová stálost je popisována poklesem citlivosti a udává se v procentech za jednotku času. Pro praktické použití hromadně vyráběných senzorů je důležitá i doba mezi rekalibrací senzoru, tento časový interval zpravidla určuje výrobce.

11.5 Hmotnostní senzory

Hmotnostní senzory tvoří asi 6 % používaných chemických senzorů a jsou navíc i velice perspektivní. Přírůstek hmotnosti na aktivní ploše senzoru generuje změnu elektrického signálu. První typem jsou QCM senzory (z anglického Quartz Crystal Microbalances). Na povrchu piezokrystalu zapojeného v oscilátoru je nanesena aktivní vrsta s receptorem, který je schopen selektivně komplexovat analyt. Na této vrstvičce se vratně sorbuje analyt z plynného vzorku a to tím více, čím vyšší je jeho koncentrace ve stanovovaném médiu. Změna kmitočtu oscilátoru souvisí se změnou hmotnosti citlivé vrstvičky deponované na povrchu piezokrystalu podle vztahu:

$$\Delta f = f^2 \frac{\Delta m}{N\rho F}$$

kde Δf je změna frekvence, f je základní frekvence oscilátoru, Δm je změna hmotnosti na povrchu krystalu, N je frekvenční konstanta, ρ je hustota sorbentu a F jeho plocha. Touto sorpcí dochází ke změně hmotnosti vrstvičkym, a tím i změně vlastní frekvence oscilátoru. Schematicky je systém znázorněn na obr. 11.2. Základní frekvence oscilátoru se pohybuje v řádu 1 až 10 MHz a systém musí být dobře temperován na konstantní teplotu a navíc je teplotně kompenzován použitím diferenčního uspořádání zařízení. To je rovněž citlivé na průtok média a proto musí být průtok udržován konstantní.

Určitou nevýhodou je nelinearita odezvy. Dosahované detekční limity jsou typicky 1 až 10 ppm pro plyny. V praxi se QCB používají pouze pro plyny. Mezi používané sorbenty patří například trietanolamin (na SO₂), sorbová kyselina s AgNO₃ (NH₃), carbowax550 (toluen), Pd (H₂, detekční limit 10 ppb!) a LiCl v želatině (stanovení vlhkosti).



Obr. 11.2: Schéma hmotnostního senzoru QCM

Jiným obdobným druhem hmotnostních snímačů jsou tzv. snímače SAW, kde SAW je zkratkou z anglického Sourface Acoustic Wave, tedy povrchová akustická vlna. Principem techniky je vygenerování Rayleighovy akustické vlny, která se šíří po povrchu podložky modifikovaném selektivně reagujícím sorbentem, přičemž změna hmotnosti tohoto povrchu způsobí změnu rezonanční frekvence (Δf) senzoru vlivem absorbovaného analytu. Změna rezonanční frekvence je přímo úměrná čtverci rezonanční frekvence a plošné hmotnosti citlivé vrstvy. Pracovní frekvence senzoru se volí v rozsahu od 10 MHz do řádově jednotek GHz a dosahované detekční limity jsou velmi nízké, typicky 10⁻⁹ až 10⁻¹⁵ g, což odpovídá např. koncentraci 100 ppb SO₂ ve vzduchu.

11.6 Teplotní senzory

Teplotní senzory jsou nejčastěji založeny na vzniku tepelného efektu na fázovém rozhraní kapalina-tuhá fáze nebo plyn-tuhá fáze, přičemž plyn nebo kapalina jsou analyzovaným vzorkem a tuhá fáze je teplotním senzorem, jehož povrch je vhodným způsobem upraven látkou (katalyzátorem) umožňující reakci analyzované složky vzorku a reagencie, která se ke vzorku v dostatečném množství přidává. Možné je také uspořádání, kdy látka nanesená na povrch teplotního senzoru přímo reaguje s analytem v plynné nebo kapalné fázi za vzniku tepelného efektu.

Příkladem prvního typu senzoru jsou diferenční teplotní biochemické senzory, přičemž na povrchu jednoho z nich je zakotven enzym (biokatalyzátor) a druhý senzor je srovnávací. Vysoce selektivní biokatalyzátory, např. typu oxidas, jsou schopny za přítomnosti kyslíku selektivně konvertovat (oxidovat) některé organické látky, například jednoduché cukry, za uvolnění značně velkého množství reakčního tepla (řádově $10^4 - 10^5$ kJ mol). Detekční limity pro stanovení glukosy, fruktosy a dalších cukrů pro výše uvedené senzory jsou na úrovni 10^{-6} až 10^{-7} mol l^{-1} .

Jako teplotní činidla se v minulosti používaly dnes již zastaralé a necitlivé termočlánkové baterie, dnes pak především platinové odporové teploměry, termistory a teploměry pracující na pyroelektrickém principu.

Nevýhodou všech teplotních chemických senzorů je to, že je nutno stabilizovat teplotu okolí jejich umístěním v termostatu a využít diferenční zapojení s jedním aktivním a jedním srovnávacím čidlem, jak již bylo výše naznačeno.

11.7 Vodivostní chemické senzory

Pro vodivostní senzory, jak již název sám napovídá, je charakteristická změna vodivosti citlivé vrstvičky v závislosti na koncentraci analytu. Citlivou vrstvou může být vodič prvního druhu – napařený kov. Jako příklad je možno uvést destičku z izolantu (např. ze slinutého oxidu hlinitého, aluminy) s napařenou vrstvou zlata o tloušťce 100 až 200 nm. Tento senzor lze použít pro detekci vysoce reaktivních sodíkových par ve vakuu. Odpor zlaté vrstvičky prudce naroste za vzniku slitiny AuNa_(x), a to dokonce o několik řádů.

Příkladem vodivostního senzoru založeného na vodiči druhého druhu, tedy elektrolytu, je destička opatřená platinovými elektrodami s naneseným polymerem (směsí polyvinylacetátu a polyvinylalkoholu) obsahujícím hydroskopický chlorid lithný. Pomocí takovýchto senzorů je pak možno měřit relativní vlhkost plynů v mezích od 10 do 99 % při teplotách od –40 do +60 °C.

Třetí kategorií materiálů pro citlivou vrstvu je polovodič, např. na bázi oxidu cíničitého. Konkrétní vlastnosti senzorů tohoto typu se značně liší jednak podle provedení, tj. zda jde o sintrovaný, tlustovrstvý či tenkovrstvý senzor, a v nemenší míře podle přítomnosti některých dopujících látek, které selektivitu ovlivňují velice dramaticky.

Selektivita jednotlivých typů senzorů je ovlivněna způsobem interakce analyzovaného plynu s aktivní vrstvou a event. přítomností některých dalších složek. Vodivost oxidu cíničitého, který je polovodičem typu N, vzrůstá za přítomnosti donorů elektronů (F⁻, O₂, Sb, apod.). Přítomnost plynů, jako je vodík, metan či isobutan, ve směsi se vzduchem, které vytěsňují kyslík, resp. reagují s ním (nebo přesněji s kyslíkovými radikály na povrchu polovodivého SnO₂) za zvýšené teploty, způsobí, že vodivost aktivní vrstvy senzoru klesá. Naopak za přítomnosti kyslíku, oxidu uhličitého či par ethanolu, tj. látek obsahujících kyslík, se bude vodivost aktivní vrstvy zvyšovat. Z toho také plyne, že při měření je nutno zachovávat konstantní koncentraci okolního kyslíku a samozřejmě i teplotu.

Jako konstrukční materiály vodivostních senzorů se ve výrobě i ve výzkumu používají i jiné polovodivé oxidy (oxid inditý, oxid železitý, směsné oxidy hlinité a vanadičné, oxid nikelnatý a další), které samozřejmě mají odlišnou selektivitu. Některé jejich typy jsou vyráběny v obrov-ských sériích. Používají se téměř výhradně pro analýzu plynných směsí.

11.8 Potenciometrické senzory

11.8.1 Iontově selektivní elektrody

Iontově-selektivní elektrody (ISE) patří co do počtu prováděných analýz k nejdůležitějším a nejfrekventovanějším analytickým technikám vůbec a přitom jsou cenově dostupné jak elektrody, tak měřící přístroje (zpravidla digitální voltmetry s vysokým vstupním odporem). Jejich princip je založen na měření potenciálu mezi dvěma elektrodami, jedné pomocné, referentní, jejíž potenciál nezávisí na koncentraci analyzovaných iontů, a měrné, jejíž potenciál závisí, v ideálním případě, na koncentraci podle Nernstovy rovnice:

$$E = E^{\rm f} + \frac{0,059\ 2}{z}\log c$$

kde *E* je potenciál měrné elektrody, E^{f} je tzv. formální potenciál elektrody, který je zpravidla konstantní, *z* je nábojové číslo analyzovaného iontu a *c* jeho koncentrace v roztoku. Z této rovnice plyne, že je-li elektroda citlivá na kationty, pak s rostoucí koncentrací roste i její potenciál a naopak, je-li citlivá na anionty, pak s rostoucí koncentrací její potenciál klesá. Potenciometricky nelze přímo stanovovat nenabité neutrální molekuly.

Typickým reprezentantem iontově selektivních elektrod je skleněná elektroda citlivá na vodíkové ionty, respektive kyselost, jejíž základem je speciální lithné sklo. Skleněná elektroda poskytuje lineární, nernstovskou odezvu v širokém rozsahu pH od 2 do 12, tedy v rozmezí koncentrací vodíkových iontů od 0,01 mol l^{-1} do 10^{-12} mol l^{-1} . U skleněných elektrod je možno se setkat s tzv. kyselou a alkalickou chybou. Kyselá chyba je odchylka od nernstovské odezvy při nízkých hodnotách pH a alkalická chyba při vysokých hodnotách pH je vysvětlitelná interferencí velké koncentrace alkalických kovů (resp. prakticky velmi častou přítomností Na⁺ a K⁺) a matematicky popsaná zobecněním Nernstovy rovnice, rovnicí Nicholsky-Eisenmanovou.

Kromě skleněné elektrody citlivé na vodíkové ionty existují též elektrody založené na jiných druzích skel, která jsou citlivá na Li^+ , Na^+ , K^+ , Ag^+ a některé další kationty. Skleněné elektrody náležejí do skupiny elektrod s tuhou membránou. Kromě nich do této kategorie patří ještě elektrody krystalové a elektrody s kapalnou membránou.

Krystalové iontově-selektivní elektrody lze dále rozdělit na monokrystalické, kam patří především fluoridová iontově selektivní elektroda, jejíž membrána je tvořena monokrystalem fluoridu lanthanitého (LaF₃) dopovaného fluoridem europia pro zvýšení vodivosti. Elektroda poskytuje nernstovskou směrnici 59 mV na koncentrační dekádu v koncentračním rozsahu 1 mol l^{-1} až 10^{-6} mol l^{-1} . Nejvýznamnějším interferentem jsou hydroxidové ionty.

Kromě monokrystalových elektrod jsou v analytické chemii užívány i elektrody polykrystalické, selektivní na ionty sulfidové, chloridové, bromidové, stříbrné či rtuťnaté, a elektrody směsné citlivé např. na chloridy, bromidy, iodidy, kyanidy, ionty kademnaté, olovnaté, měďnaté či stříbrné.

Zvláštním typem iontově selektivních elektrod jsou elektrody s kapalnou membránou. Ta je nejčastěji tvořena základním polymerem, např. polyvinychloridem (PVC), nepolární přísadou, např. *o*-nitrofenyloktyletherem (*o*-NPOE), popřípadě změkčovadlem, které zlepšuje mechanické vlastnosti membrány. Obě látky po rozpuštění v organickém rozpouštědle (s výhodou v tetrahydro-furanu) a po jeho odpaření vytvoří tenkou membránu (obr. 11.3), ve které je kapalný *o*-NPOE fixo-

ván v polymerní sítí PVC. Zatímco PVC ovlivňuje především mechanické vlastnosti membrány, pak nepolární látka typu *o*-NPOE má zásadní vliv na mechanismus její funkce. Kationty a anionty jsou totiž hydrofilní částice, které nemají zájem samovolně přecházet do nepolární organické fáze, avšak přidá-li se do membrány malé množství receptoru, pak do membrány selektivně přechází pouze ion, na který je receptor citlivý. Vhodnou volbou receptoru lze vytvořit ISE selektivní na různé analyty. Kromě receptoru se do membrány zpravidla ještě přidává tzv. lipofilní přídavek, což je látka, která výrazně zlepšuje odezvu elektrody. ISE s kapalnou membránou lze rozčlenit podle použitého receptoru na membrány s receptorovým iontoměničem, má-li receptor povahu organic-kého kationtu či aniontu, a na membrány s neutrálním nosičem, jedná-li se o neutrální molekulu.



Obr. 11.3: Membrány pro iontově-selektivní elektrody s "kapalnou membránou"

Zvláštní kategorií iontově-selektivních elektrod jsou tzv. elektrody "coated wire", které jsou tvořeny, jak název napovídá, drátkem z inertního kovu (Pt, Au) pokrytého polymerem obsahujícím vazebná místa pro analyt. Tento polymerní povlak se velice dobře vytváří například elektrolyticky. Je známo, že při vhodném potenciálu se na elektrodu v roztoku některých organických látek (anilin, pyrrol, thiofen,...) na podkladové kovové elektrodě (Pt, Au atd.) vytváří kompaktní elektricky vodivý polymerní film (obr. 11.4). Pro jeho lepší homogenitu se polymerace někdy provádí cyklováním potenciálu, resp. cyklickou voltametrií. Nechá-li se polymerovat látka, která má v molekule jednak polymerizovatelnou skupinu a jednak citlivou receptorovou skupinu, pak je vzniklý povlak citlivý na ionty, na které je citlivá receptorová skupina (obr. 11.4). Aby takto připravená elektroda fungovala, musí být umožněn přenos náboje mezi receptorovými skupinami a elektricky vodivou skupinou (spojka mezi těmito skupinami nesmí mít velký ohmický odpor).



Obr. 11.4: Příklad přípravy a použití "coated wire" iontově-selektivních elektrod

Moderní a přitom sériově vyráběné jsou v současnosti miniaturní potenciometrické senzory vycházející z tranzistorů řízených polem, označované ISFET (Ion-Selective FET), CHEMFET (citlivé na sloučeniny nebo ionty), ENFET (využívající biokatalyzátorů, enzymů) a řady dalších. Jsou to polem řízené tranzistory, které mají na řídící elektrodě umístěnu vrstvičku látky selektivně reagující s analytem. Jako selektivně reagující látky se využívají v podstatě stejné vrstvy jako v iontově selektivních elektrodách s kapalnou membránou a i jejich vlastnosti jsou podobné. Výhodou senzorů ISFET, CHEMFET, ENFET aj. je to, že neobsahují vnitřní elektrolyt, a proto mohou pracovat i v nakloněné poloze. Ke zpracování jejich signálu se používá jednoduché zapojení s operačním zesilovačem (obr. 11.5). V posledním desetiletí se objevují na trhu, především pro potřeby klinické biochemie, integrované senzory umožňující stanovení několika složek vzorků souběžně.



Obr11.5: Kombinovaný senzor IS-FET – REFET

11.9 Amperometrické senzory

Senzory pracující na amperometrickém principu využívají zpravidla dvou elektrod, z nichž jedna, měřící, je rozměrově malá (polarizovatelná), druhá pak je velkoplochá, nepolarizovatelná (referentní, zpravidla argentchloridová). Na měřící a referenční elektrodu se vkládá tak velké napětí, že je zaručeno, že sledovaná látka na pracovní elektrodě podlehne elektrochemické přeměně (oxidaci nebo redukci). Elektrolytický proud procházející mezi oběma elektrodami je přímo úměrný množství sledované látky, které podlehne elektrochemické reakci na měřící (polarizované) elektrodě. Řídícím dějem, který rozhoduje o velikosti proudu, bývá zpravidla difúzní transport elektroaktivní látky k elektrodě.

Jako příklady amperometrických senzorů je možno uvést typického zástupce amperometrického membránového senzoru, kterým je tzv. Clarkovo kyslíkové čidlo a z něho odvozené vysoce selektivní enzymové amperometrické senzory organických látek. Clarkovo čidlo, ve velkých sériích vyráběné různými firmami po celém světě, je určeno pro sledování obsahu kyslíku ve vodě nebo vodných roztocích. Vychází z planárního elektrodového systému, který je tvořen měřící elektrodou, zhotovenou z Au, Pt, Ag, a velkoplochou referentní elektrodou (Ag/AgCl). Elektrodový systém je překryt membránou o permeabilitě *P*_m, která je definována jako takové množství látky, které projde membránou o jednotkové ploše při její jednotkové tloušťce a při jednotkovém rozdílu parciálního tlaku na obou stranách membrány za časovou jednotku. Mezi membránou a elektrodami je pomocí separátoru vymezena tenká vrstva elektrolytu (např. roztok KCl a NaHCO₃). Na elektrody je vkládáno konstantní napětí například 0,65 V, přičemž pracovní elektroda je připojena na (–) pól zdroje (polarizována katodicky). Na této elektrodě probíhá reakce:

$$O_2 + 2 H_2O + 4 e^- = 4 OH^-$$

Pro proud tekoucí Clarkovým čidlem platí vztah

$$i = \text{konst} \cdot nFAP_m c(O_2)/b$$

ve kterém *n* je počet elektronů vyměňovaný při elektrodové reakci, *b* je tloušťka membrány, *A* plocha měřící katody, *F* je Faradayova konstanta (náboj) a c (O₂) koncentrace kyslíku.

Pokud k plynopropustné membráně vhodným způsobem zafixujeme ze strany měřeného roztoku polyamidovou síťku, na které je vhodným imobilizačním postupem zakotven enzym, obdržíme tzv. enzymová čidla, která se uplatňují v současných biochemických laboratořích k vysoce selektivním stanovením četných organických látek. Například pro stanovení glukosy je využívána reakce katalyzovaná enzymem glukosooxidasou, která probíhá podle reakce:

glukosa +
$$O_2$$
 + $H_2O \xrightarrow{glukosoxidasa}$ glukonová kyselina + H_2O_2

Při reakci spotřebovaný kyslík je indikován Clarkovým kyslíkovým čidlem, které je součástí enzymového senzoru.

Pro potřeby klinické biochemie byly vyvinuty senzory využívající obecně oxidas, které umožňují stanovení řady dalších látek, např. cholesterolu, močové kyseliny aj.

Aplikace amperometrických membránových čidel nejsou omezeny pouze na stanovení, u kterých je signál zprostředkován měřením koncentrace kyslíku. Z dalších plynů je možno uvést jako příklad měřící celu pro SO₂, kdy se používá rovněž Clarkovo čidlo nebo jeho anodická oxidace (na grafitové elektrodě), přičemž katoda je zhotovena z mědi. Obě elektrody jsou v galvanickém kontaktu s roztokem obsahujícím CuSO₄ a H_2 SO₄. Pracovní oblast je 10 až 10 000 ppm (obj.).

11.10 Multikomponentní analýza

Zatímco pro jednosložkovou analýzu je vysoce selektivní (specifický) receptor klíčový pro úspěch stanovení, u multikomponentní kvantitativní a kvalitativní analýzy lze použít poněkud jinou koncepci. Při ní se aplikuje řada senzorů s částečnou, ale odlišnou selektivitou k různým analytům multikomponentního analyzovaného systému (vzorku). Podobně mohou být použity i analytické metodiky s dvojrozměrným a vícerozměrným signálem odezvy na chemické složení vzorku. Tento signál musí mít různou selektivitu pro různé analyty pro měření při odlišných vstupních parametrech (na různých "kanálech"), např. při různých vlnových délkách elektromagnetického záření (spektrofotometrické metody), různých potenciálech elektrod (voltametrické metody), různých

retenčních dobách (chromatografické metody) apod. Z naměřených dat se požadovaná analytická informace extrahuje pomocí matematických metod rozpoznání vzoru (*pattern recognition*); v případech lineární odezvy senzorů obvykle s pomocí analýzy principiálních komponent (PCA), při nelineárních odezvách aplikací vhodného algoritmu neuronové sítě. Pole senzorů různé selektivity (*senzor arrays*) jsou podstatou tzv. **elektronických nosů a jazyků**, o kterých bude pojednáno v dalším textu.

Metoda rozpoznání vzoru v souboru chemickoanalytických dat je ovšem použitelná jen v případě, že se nevyžadují podrobné údaje o kvantitativním obsahu všech složek v roztoku, ale postačí informace o identitě vzorku (jeho přiřazení určitému vzorovému vzorku), časových změnách v jeho kvalitě (např. kažení mléka), případně nanejvýše jeho hrubé semikvantitativní ohodnocení. Výhodou je nepoměrně rychlejší a lacinější získání požadované informace než v případě klasické analýzy, která vyžaduje u biologických, ale i jiných materiálů, kvalitativní i kvantitativní stanovení desítek různých analytů.

To platí již dnes, kdy je tento obor teprve na počátku vývoje. Perspektivně lze očekávat, že se stoupajícím množstvím dostupných senzorů vysoké selektivity bude ekonomická a rychlá senzorová analýza multikomponentních vzorků postupně nahrazovat nákladné laboratorní analýzy ve stále větším množství případů.

11.10.1 Elektronické jazyky a nosy

Elektronický jazyk je vícekanálový chemický analyzátor, jehož kanály poskytují omezeně selektivní odezvu na několik podstatných složek měřeného kapalného vzorku. Signál je zpracováván algoritmy rozpoznání vzoru a výsledkem je identifikace vzorku s určitou známou substancí (např. konkrétní druh vína) a stanovení jeho vlastností (stáří, stupeň kvality určitého produktu či suroviny apod.), případně včetně kvantitativního ohodnocení některých komponent. Analyzátorem může být laboratorní přístroj poskytující dvojrozměrný či vícerozměrný signál (např. spektrální, voltametrický či chromatografický systém), ale především pole chemických senzorů s rozdílnou selektivitou.

Elektronický nos má stejné vlastnosti jako jazyk, rozdíl je pouze v tom, že reaguje na plynné prostředí. Elektronické nosy i jazyky jsou někdy kombinovány do jediného systému, který je pak vhodný pro analýzu těkavých kapalných vzorků. Data odezev obou částí kombinovaného analyzátoru se obvykle zpracovávají po určité normalizaci společně v jediné signálové matici.

11.10.2 Příklady aplikací elektronických nosů a jazyků

Elektronické jazyky

První systém pro analýzu kapalin s iontově selektivními elektrodami, který lze nazvat elektronickým jazykem, pochází z roku 1985. Počátkem devadesátých let se začínají objevovat práce, které pro vyhodnocení používaly neuronové sítě. V druhé polovině devadesátých let se pak výzkum soustřeďuje na vývoj chemických senzorů a začínají se uplatňovat voltametrické techniky a impedanční měření, vhodná i pro látky, které nenesou elektrický náboj. V této době se také objevují práce popisující praktické aplikace. Následují stručné příklady z posledních let.

Pro ohodnocení různých nápojů bylo použito pole 16 **potenciometrických senzorů** na bázi PVC a polypyrrolových mebrán dotovaných různě selektivními ionofory. Senzorové pole bylo umístěno na obrazci z uhlíkové pasty vyrobeném technikou tištěných spojů na polymerním podkla-

du. Naměřená potenciometrická data byla zpracována analýzou a regresí principiálních komponent, metodou částečných nejmenších čtverců (PLS) a neuronovou sítí FF se zpětným šířením. Stejní autoři dokázali rozlišit italská vína podle druhu i podle vinic včetně stanovení celkové i přechodné kyselosti, obsahu alkoholu, vinné kyseliny, oxidu siřičitého, polyfenolů, glycerolu atd. Použili pole 23 potenciometrických senzorů, kde kromě membránových elektrod na bázi plastů byly aplikovány tuhé krystalické, skleněné (klasické a chalkogenitové) a kovové elektrody.

U potenciometrických senzorů lze dosáhnout značné miniaturizace umístěním selektivních membrán přímo na řídící elektrodu tranzistoru řízeného polem (ISFET, CHEMFET). Tato technologie však zatím nedosahuje vlastností tradičních uspořádání, především ve stabilitě systému.

Voltametrický princip detekce ve spojení s injekční průtokovou analýzou (FIA, *Flow Injection Analysis*) byl vyvinut pro rozlišení různých druhů ovocných džusů. Předností techniky FIA je vysoký stupeň automatizace a reprodukovatelnosti: vzorky jsou připraveny ve vzorkovnicích podavače, který je postupně dopravuje k injekčnímu dávkovacímu zařízení a celý proces zpracování vzorku i standardů je přesně časován. Injektor dávkuje pouze malý objem vzorku do proudu nosné kapaliny a pole voltametrických elektrod poskytuje odezvy s obalovými křivkami ve tvaru píků (odpovídající koncentračnímu profilu naředěného vzorku procházejícího přes senzory). I když senzorové elementy jsou zde pouze tři (zlatý, platinový a rhodiový drátek), získaných dat je podstatně více, neboť se na každé elektrodě měří odezva na pulsní sekvence polarizačních potenciálů (dva druhy sekvencí, zpracování pomocí PCA).

Automatizace FIA byla také využita ve spojení s detekcí QCM (mikrováhy na bázi křemenného oscilátoru) a aplikována byla také horizontální akustická vlna.

Vzory pro všech pět druhů chuti byly rozlišeny elektronickým jazykem na bázi absorbce evanescentní vlny s vláknovou optikou.

Dalším elektrochemickým principem vhodným pro konstrukci elektronického jazyku je impedanční měření na dopovaných slabě vodivých polymerních elektrodách. Riul a spolupracovníci testovali pole tvořené šesti senzory, jejichž spárované elektrody měly tvar dvou vzájemně se prolínajících (*interdigitated*) hřebínků. Měřila se kapacitance při 400 Hz a data byla zpracována pomocí PCA.

Jazyky se nepoužívají jen pro identifikaci různých vzorků, ale také např. ke sledování výrobních procesů. Turner a spolupracovníci použili pole 21 potenciometrických senzorů (dopované PVC-membrány) pro monitorování fermentace v reaktoru s *Escherichia coli*, čímž zkrátili dobu testu z 24 hodin na 3 minuty.

Elektronické nosy

První práce týkající se elektronických nosů vznikly již v 70. letech. V roce 1961 byla poprvé popsána instrumentace pro detekci vůní, první mechanický nos byl popsán v roce 1964 (pracoval na principu potenciometrického sledování redoxní reakce vůní na elektrodě), avšak koncept elektronického nosu jako inteligentního chemického pole senzorů (první multikomponentní elektronický nos) vznikl až v roce 1982, kdy byly použity tři metaloxidové senzory pro 20 čistých par a výparů esenciálních olejů.

Elektronické nosy našly využití v mnoha odvětvích, zejména v potravinářském průmyslu, kde je prvotní důraz kladen na kontrolu kvality a čerstvosti potravin (maso, ryby, rajčata), dále pak rozpoznání druhů potravin (sýry, oleje, houby) či nápojů (káva, víno, pivo, ovocné šťávy, mléko).

Další neméně důležitou oblastí je životní prostředí (stanovení plynů v ovzduší, kontrola vody) a medicína (diagnostika na základě pachu, rozboru tělních tekutin) či kosmetický průmysl (parfémy). Mimo to se elektronické nosy začaly uplatňovat i v automobilovém průmyslu (zápach plastů), papírenském průmyslu (kvalita papíru) a tabákovém průmyslu (kvalita). Zajímavé je použití elektronického nosu jako detektoru výbušnin a drog.

Jako příklady lze uvést použití elektronického nosu v medicínské diagnostice, kde na základě dechu pacientů je možno rozpoznat choroby způsobující selhání ledvin (urémie) [10]. Bylo použito šesti křemenných krystalů pokrytých aktivní vrstvou obsahující peptidy. Takto byly detegovány deriváty aminu (mono-, di- a trimethylamin) a amoniak. Analýzy výsledků klinických testů byly provedeny na základě diskriminační analýzy pomocí programu Statgraphics plus. Elektronické nosy byly použity i při diagnostice cukrovky a plicní rakoviny.

Stejné typy senzorů, avšak potažené dnes populárními metalloporfyriny, byly implementovány v elektronických nosech jako univerzální nástroj pro testování potravin, např. ryb, masa, zeleniny a červeného vína. Byl použit přístroj vyrobený na univerzitě Tor Vergata v Římě, obsahující osm senzorů derivátu porfyrinu s centrálními kovy Ru, Rh, Co, Sn a Mn. Byly sledovány látky typu organických kyselin, alkoholů, aminů, sulfidů a látky obsahující karbonylovou skupinu. Například u telecího masa a tresky byla sledována doba skladování, která má vliv na jejich kvalitu. Při analýzách rajčatového protlaku byla pozorována citlivost senzorů k octové kyselině a u červeného vína byly zaznamenány změny aroma při kontaktu se vzduchem.

Metalloporfyriny byly rovněž použity jako receptory při konstrukci elektronických nosů na optickém principu pro detekci alkanů, aldehydů, alkoholů, ketonů a aminů.

Akustické senzory (SAW) patří mezi velice perspektivní čidla elektronických nosů. Zvláště účinná je kombinace plynové chromatografie se SAW-detektorem (GC/SAW), který není potažen žádným selektivním receptorem, a přesto je dosaženo ekvivalence stovek senzorů. Na rozdíl od klasické chromatografie zde trvá analýza systému o desítkách složek jen několik sekund. GC/SAW je prvním elektronickým nosem, který byl validován, tj. ověřen a schválen, organizací EPA *(Environmental Protection Agency, USA)* pro monitorování těkavých látek ve vodě a PCB (polychlorovaných bifenylů) v půdě. Další validaci získal od *White House Office of National Drug Control Policy* pro detekci výparů drog jako kokainu, heroinu či metamfetaminů.

Komerční oblast

V současnosti je dostupných jen málo průmyslově vyráběných elektronických jazyků, avšak podstatně lepší situace je v oblasti komerčních elektronických nosů. Nalézt tyto systémy na Internetu není nijak obtížné a proto je zde nebudeme uvádět (klíčová slova jsou: *chemical sensor arrays, electronic tongue, tast, electronic nose, odour, artificial olfaction, artificial olfactory analyzer*). Do této kategorie lze navíc zařadit i ekonomicky nákladné univerzální laboratorní analyzátory (především spektrální a hmotnostně spektrální), které se od standardních laboratorních přístrojů liší pouze tím, že je k nim nabízeno i programové vybavení pro multivariantní analýzu.

11.11 Optické senzory

Objev optických vláken v roce 1966 umožnil vznik zcela nových aplikací. Přenos světla na dlouhé vzdálenosti umožnil rychlé přenosy dat s malým zkreslením a optická vlákna se téměř stala synonymem pro moderní telekomunikace. Nicméně i v oblasti senzorů se pilně využívá výhod, které vláknová optika nabízí. Světlovody umožňují měření na dlouhé vzdálenosti, jejich ohebnost a možnost miniaturizace usnadňuje jejich použití v místech s obtížným přístupem či v nebezpečných prostředích. Oddělení vlastní citlivé vrstvy od jeho elektrické části světlovodem významně zvyšuje bezpečnost při měření v explozivních prostředích a snižuje vliv elektromagnetického rušení.

V chemických senzorech slouží světlo pouze jako nosič informace. Je vedeno optickým vláknem ze zdroje do citlivé vrstvy, která je v kontaktu se vzorkem. Zde je absorbováno, odraženo nebo vyvolává emisi fluorescenčního záření. Takto změněné světlo je vedeno zpět do optického systému buď stejným vláknem, nebo jiným vláknem. Nakonec je zaostřeno, filtrováno a převedeno na elektrický signál. Na rozdíl od makroměření není u absorbčního a fluorescenčního měření třeba, aby světelný paprsek procházel citlivou vrstvou – využívá se tzv. evanescentní vlna na rozhraní povrchu světlovodu a aktivní vrstvy (ATR, *Attenuated Total Reflection*, zesílený povrchový rozptyl).

Ze srovnání s elektrochemickými senzory, které jsou hlavním konkurentem optod, vyplynou kromě výše uvedených výhod i nevýhody, jako je interference okolního světla (lze odstranit modulací zdroje), nelinearita odezvy daná Lambertovým–Beerovým zákonem a mnohem menší dynamický rozsah (pouze jeden až dva koncentrační řády). Proti elektrochemickým technikám je též mnohem komplikovanější instrumentace.

Klasickým zástupcem této skupiny senzorů je optoda citlivá na pH, založená na fenolové červeni imobilizované na polyamidových částicích, které byly naplněny do špičky dutého vlákna překryté membránou propustnou pro plyn (obr. 11.6). Fenolová červeň je klasický pH indikátor používaný v titrační analýze, který má barevný přechod v uvedené oblasti. Jeho kyselá forma je žlutá a bazická forma má červenou barvu. Obdobná je rovněž konstrukce, kde je polyakrylamid nahrazen roztokem bromthymolové modři, která má barevný přechod ze žluté do modré v rozsahu pH od 6,0 do 7,6. Výhodnější je však analogická konstrukce s fluorescenčními indikátory umbelliferonem či hydroxypyrensulfonovou kyselinou, kdy je možné při stejné citlivosti detektoru použít tenčí citlivou vrstvu a tím snížit dobu odezvy, časovou konstantu senzoru.



Obr. 11.6: Acidobazický optický senzor citlivý na pH v rozmezí pH 7,0 až 7,4. Systém s bifurgovanými vlákny

Podobně jako optody pro pH pracují i optody pro stanovení jiných kationtů a aniontů v roztocích. Konkrétním příkladem jsou senzory s aktivní vrstvou obsahující kalcein či akridin, kdy fluorescence prvého klesá s rostoucí koncentrací kobaltnatých, nikelnatých a měďnatých iontů a druhého s rostoucí koncentrací jodidů, bromidů a chloridů. Obdobným způsobem jako iontová čidla jsou řešeny senzory pro plynovou analýzu. Jako příklad je možno uvést čidla pro stanovení plynných sloučenin, jakými jsou oxid uhličitý, amoniak, kyslík či vzdušná vlhkost.

11.12 Výhled do budoucnosti

Senzorová analýza jistě představuje velký potenciál v paletě metod současné analytické chemie. Z uvedeného je zřejmé, že tento multidisciplinární obor vyžaduje spolupráci specialistů z celé řady oblastí, vedle analytické také organické chemie, biochemie a informatiky. Její budoucí rozvoj je spojen s návrhem, přípravou a testováním nových receptorových materiálů s vyšší selektivitou, sensitivitou a stabilitou pro průmyslově a biologický významné analyty.

Literatura

- [1] M. Šťastný, M.Kronďák, R. Volf, V. Král: Chemické senzory I, Automatizace 46 (2003), s. 405
- [2] M. Šťastný, M. Kronďák, R. Volf, V. Král: Chemické senzory II, Automatizace 46 (2003), s. 464
- [3] M. Šťastný, M. Kronďák, R. Volf, V. Král, K. Hlávka: Chemické senzory III, Automatizace 46 (2003), s. 533
- [4] M. Šťastný, M. Kronďák, R. Volf, V. Král, K. Hlávka: Chemické senzory IV, Automatizace 46 (2003), s. 624
- [5] M. Šťastný, M. Hub, M. Kronďák, R. Volf, V. Král, K. Hlávka: Chemické senzory V, Automatizace 46 (2003), s. 690
- [6] M. Šťastný, M. Kronďák, R. Volf, V. Král, K. Hlávka: Chemické senzory VI, Automatizace 46 (2003), s. 758
- [7] M. Šťastný, M. Kronďák, R. Volf, V. Král, K. Hlávka: Chemické senzory VII, Automatizace 46 (2003), s. 826
- [8] M. Šťastný, G. Broncová, M. Kronďák, K. Ženíšek, P. Mudra, V. Pešek, B. Šárka, R. Volf, V. Král: Elektronické nosy a jazyky, Automatizace 47 (2004), s. 318

12. SENZORY PRO DETEKCI V PROUDÍCÍCH TEKUTINÁCH

prof. Ing. Karel Štulík, DrSc.

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, katedra analytické chemie, Albertov 2030, 128 43 Praha 2 stulik@natur.cuni.cz

12.1 Úvod

Pojem senzoru, čidla, tedy instrumentální jednotky, která reaguje na přítomnost určité látky či skupiny látek v jejím bezprostředním okolí změnou výstupního elektrického signálu, jehož velikost obvykle závisí na množství přítomné látky či látek, je neobyčejně široký. Zahrnuje několik základních typů z hlediska účelu použití:

- (a) Patrně nejjednodušší jsou indikátory, jejichž úkolem je pouze zaregistrovat dostatečně rychle a s dostatečnou citlivostí přítomnost jisté látky a vydat varovný signál – typickým příkladem jsou požární čidla či indikátory radioaktivního záření.
- (b) Podstatně složitější jsou senzory pro sledování **nejen přítomnosti, ale i koncentrační úrovně** látek jde např. o monitorování různých látek v ovzduší, či ve vodních tocích a nádržích.
- (c) Nejnáročnější je použití senzorů pro sledování průběhu nejrůznějších procesů, které mohou být i velmi rychlé sem např. patří monitorování úrovně látek při průmyslových výrobních operacích, při provozu strojů, při kontrole složitých reakcí živých organismů v biologii a lékařství a v neposlední řadě v analytické chemii, kde je zapotřebí detegovat látky při průtokových měřeních a při vysokoúčinných separacích.

Řada kapitol tohoto textu rozebírá vlastnosti širokého spektra senzorů z hlediska jejich detekčních mechanismů, analytických parametrů a možností použití. Tato kapitola se věnuje požadavkům, které na senzory kladou průtokové měřicí systémy, kde tedy senzory jsou součástí průtokových detektorů. Problematika proto spadá do bodu (c) předchozího odstavce. Nebudeme se zde zabývat konkrétními senzory, budeme hovořit obecně o podmínkách, které je třeba splnit, aby měření bylo representativní a spolehlivé.

Především musíme rozlišovat dvě základní skupiny senzorů. První skupina sleduje **celkové vlastnosti systému (bulk properties)**. Sem patří především většina optických měření, hmotnostní spektrometrie, dále pak měření elektrické impedance a termometrická měření. Druhá skupina zahrnuje **specifické vlastnosti systému (specific properties)** a senzory jsou založeny na heterogenních interakcích mezi senzorem a sledovanou látkou. Nejdůležitějším reprezentantem jsou elektrochemické metody. Rozdíl mezi těmito dvěma skupinami je zcela zásadní: zatímco první skupina sleduje změny v celém objemu monitorovaného prostředí, druhá skupina závisí na přísunu monitorované látky k povrchu senzoru.

Při sledování změn koncentrace látek v průtokovém systému obecně záleží na těchto parametrech: jde-li o kontinuální monitorování, pak je důležitá **rychlost změn koncentrace** sledované látky či látek; pokud se sledují zóny vzorků vnesené do proudu, pak záleží i na **změnách šířky a tvaru zón v čase**. Pro posouzení těchto podmínek je zapotřebí definovat profil lokálních rychlostí v proudu sledovaného prostředí a rychlost transportu sledované látky v proudícím prostředí. Popis rychlostí v proudu poskytuje **hydrodynamika**, transport sledované látky je popsán zákonitostmi **difuze, konvekce a migrace** (v případě nabitých částic).

V následujících odstavcích budeme nejprve charakterizovat typické průtokové systémy a jejich vlastnosti, pak uvedeme podmínky pro popis rychlosti odezvy senzoru a dále se budeme věnovat diskusi vlastností proudících prostředí a jejich vlivu na odezvu senzoru. Je třeba zdůraznit ještě jednu důležitou skutečnost: pojem **tekutina** se vztahuje ke všemu, co teče, tedy k plynům, nadkritickým tekutinám, kapalinám i jemně dispergovaným tuhým látkám. Všemi těmito systémy se zabývá hydrodynamika. V této kapitole budeme klást hlavní důraz na kapaliny, protože veškeré děje v plynech jsou velmi rychlé, a tudíž většinou nijak podstatně neovlivňují rychlost a charakter odezvy senzoru; vlastnosti nadkritických tekutinách jsou pomalejší než děje v plynech, avšak rychlejší než děje v kapalinách; tuhé látky nás v této souvislosti nezajímají.

12.2 Základní způsoby průtokových měření

12.2.1 Kontinuální monitorování

Je zapotřebí sledovat koncentraci určité složky (určitých složek), např. v automatizovaných kontinuálních průmyslových procesech, kdy řídící počítač nemůže udržovat optimální pracovní podmínky, aniž by měl nepřetržitě informace o úrovních látek vstupujících do procesu a látek z procesu vystupujících. Obdobně je zapotřebí kontinuálně sledovat polutanty v přírodním prostředí, např. v říční vodě. Medicínské aplikace jsou rovněž velmi významné, např. sledování koncentrace významných iontů v krevním řečišti pacienta v průběhu dialýzy na umělé ledvině. Takovýchto příkladů může být velmi mnoho. Jednoduché schéma kontinuálního analyzátoru je uvedeno na obr. 12.1.



Obr. 12.1: Blokové schéma kontinuálního analyzátoru

1 - proud analyzované kapaliny (potrubí, vodní tok apod.), 2 - sonda pro odběr vzorku, 3 - filtr (pro odstranění mechanických nečistot), 4 - zařízení pro udržování konstantního průtoku (nebo pro jeho programování), 5 - blok na úpravu vzorku (přidávání činidel, regulace teploty, pre-koncentrace, izolace, separace atd.), 6 - detektor, 7 - čerpadlo, 8 - odpad, 9 - měřicí přístroj, 10 - zařízení pro zpracování, záznam a zobrazování signálu detektoru, ukládání a přenos dat, 11-kontrolní jednotka

12.2.2 Analýzy individuálních vzorků v proudu kapaliny

Provozní laboratoře, např. klinické nebo průmyslové, jsou nuceny analyzovat rychle a spolehlivě velké počty obdobných vzorků. Pracovní postup se musí automatizovat, aby se zrychlila práce, omezily se požadavky na lidskou práci a snížily se náklady. Jsou dva přístupy k automatizaci: Jednak to je **použití laboratorních robotů**, které kopírují práci člověka, jsou výkonné a spolehlivé, avšak jsou investičně a provozně nákladné a je obtížné adaptovat je na jiný typ analýzy, než ten, pro který byly vytvořeny. Můžeme však také vzorek **vnést do proudu nosné kapaliny**, která jej vede analytickým systémem od jedné operace k druhé, až po detektor. Tím se analytický systém zjednoduší, zlevní a jeho flexibilita se zvětší. Existují dva základní systémy, starší **kontinuální průtoková analýza (***continuous flow analysis*, **CFA)** a novější **průtoková vstřikovací analýza (***flow injection analysis*, **FIA**). Jednoduchá schémata těchto dvou přístupů jsou uvedena na obr. 12.2.



Obr. 12.2: Principy technik kontinuální průtokové analýzy: CFA (A, B) a průtoková injekční analýza, FIA (C, D)

1 - zařízení pro nástřik vzorku, 2 - peristaltické čerpadlo, 3 - mísicí spirála, 4 - detektor; šířka zón analytů se mění v širokých rozmezích a rozdíl mezi CFA a FIA v tomto směru často bývá malý; u CFA jsou jednotlivé zóny vzorku odděleny vzduchem, ve FIA nosným roztokem

12.2.3 Detekce ve vysokoúčinných separačních metodách

Složitější analýzy většinou vyžadují zařazení vysokoúčinného separačního kroku před vlastní měření, aby se sledované látky oddělily od matrice vzorku a analyty se rozdělily mezi sebou. Separace plynovou chromatografií většinou nepřinášejí zásadni problémy z hlediska detekce. V kondenzovaných fázích je situace složitější. Jednoduchá schémata systémů pro chromatografii obecně a pro kapilární elektroforézu jsou na obr. 12.3 a 12.4.

Je evidentní, že detekční zařízení, jehož jádrem je senzor, musí splnit požadavky na kvalitu vlastního měření a nesmí zhoršit funkci celého zařízení, z hlediska veškerých analytických parametrů. Jak je již výše uvedeno, musí být odezva senzoru dostatečně rychlá a v průtokových systémech musí být hydrodynamické charakteristiky a látkový transport dostatečně dobře definovány, aby byly získány spolehlivé analytické hodnoty. Těmito otázkami se zabývají následující odstavce.



Obr. 12.3: Blokové schéma chromatografu

1 – zdroj mobilní fáze, 2 – zařízení pro nástřik vzorku, 3 – kolona, 4 – detektor, 5 – zařízení pro zpracování signálu detektoru



Obr. 12.4: Princip kapilární elektroforézy, CE

1 - zdroj vysokého napětí (řádově 10⁴ V), 2 - separační kapilára, 3 - detektor, 4 - elektroforetické elektrody, 5 - vstupní a 6 - koncová nádobka s nosným elektrolytem (nahrazením vstupní nádobky nádobkou se vzorkem se do kapiláry dávkuje vzorek)

12.3 Operační parametry detektorů v průtokových systémech

Většina parametrů, které charakterizují činnost průtokových měřicích zařízení, se neliší od měření v klidném roztoku. Pojmy citlivost, šum, mez detekce a mez stanovitelnosti, dynamický rozsah, lineární dynamický rozsah a robustnost měření jsou definovány stejně pro průtoková i neprůtoková měření. Někdy dochází k určitým rozdílům v pojmu meze detekce, která se často v průtokových měřeních ztotožňuje s pojmem meze stanovitelnosti. Zásadní význam v průtokových měřeních má však dynamické chování měřicího systému, jak již bylo zdůrazněno výše.

Popis dynamického chování průtokového měřicího systému (detektoru), neboli nalezení vztahu mezi vstupem, kterým je koncentrace analytu jako funkce času, c(t), a výstupem, což je signál detektoru jako funkce času, R(t), vyplývá z řešení soustavy diferenciálních rovnic a vede k parametru nazvanému **přechodová charakteristika (funkce)** (*transient characteristic, transient function*), jež vyjadřuje časový průběh signálu po **skokové změně koncentrace analytu o jednot-ku**. Explicitní řešení tohoto problému je často velmi obtížné, a proto je výhodné popsat měřicí systém jednoduchým elektrickým náhradním schématem. Detektory jsou statické systémy, a tudíž se po skokové změně koncentrace jejich signál za určitou dobu spontánně stabilizuje na nové hodnotě. Potom lze jako náhradní schéma použít určitý počet elektrických odporů a kapacit zapojených

v sérii, jejichž dynamické chování popisuje lineární diferenciální rovnice s konstantními koeficienty *a*; řád této rovnice *n* se rovná počtu kapacit v sérii:

$$a_n R(t)^n + a_{n-1} R(t)^{n-1} + \dots + a_1 R(t)' + a_0 R(t) = c(t)$$
(12-1)

Ideální detektor (nebo reálný detektor při konstantní koncentraci analytu) vykazuje nekonečně rychlou změnu odezvy a odpovídá náhradnímu schématu bez kapacity

$$a_0 R(t) = c(t) \tag{12-2}$$

Je zřejmé, že převrácená hodnota a_0 je za uvedených podmínek statická citlivost S

$$\frac{1}{a_0} = S \tag{12-3}$$

Pro jednu kapacitu v systému a zmíněnou jednotkovou změnu koncentrace analytu má rovnice

$$a_1 R(t)' + a_0 R(t) = c(t) \tag{12-4}$$

řešení

$$R(t) = S\left[1 - e^{-t/T_{k}}\right]$$
(12-5)

kde T_k je **časová konstanta** (*time constant*), která se u detektorů (hlavně chromatografických a elektroforetických) používá k vyjádření rychlosti odezvy. Rovná se poměru koeficientů a_1/a_0 a je tedy dána průsečíkem tečny ke křivce signálu v počátku s horizontální tečnou ke stabilizovanému signálu (viz obr. 12.5A).

Abychom se více přiblížili skutečnosti, musíme zvolit model s více kapacitami; přechodové charakteristiky pak vykazují inflexní body (obr. 12.5B). Zpracování pak můžeme zjednodušit přiložením křivky prvního řádu podle obr. 12.5C a zavedením hodnoty **kapacitního zpoždění** (*capacity lag*) $T_{\rm m}$. Přechodová charakteristika je pak dána vztahem

$$R(t) = S\left[1 - e^{-(t - T_{\rm m})/T_{\rm k}}\right]$$
(12-6)

jehož vyhodnocení plyne z obr. 12.5D. Časová konstanta tedy odpovídá času, který uplyne od skokové změny koncentrace analytu do okamžiku, kdy signál detektoru dosáhne 63,2 % maximální hodnoty. U kontinuálních analyzátorů se rovněž používají hodnoty T_{50} a T_{90} , jejichž význam je zřejmý z obr. 12.5D, a pro něž přibližně platí:

$$T_{50} \approx 0.69 \ T_{\rm k};$$
 $T_{90} \approx 2.3 \ T_{\rm k}$ (12-7)

Hodnota T_s na obr. 12.5D je tzv. **stabilizační čas** (*stabilization time*), který je teoreticky nekonečně dlouhý a prakticky se rovná zhruba čtyřnásobku časové konstanty. Konečně **zpoždění odezvy detektoru** (*lag in the detector output*) T_a (obr. 12.5D) je zhruba rovno sumě hodnot T_m a T_s . Z uvedeného je zřejmé, že při popisování dynamických vlastností detektorů je nezbytné jednoznačně specifikovat způsob vyjádření hodnot. Experimentální stanovení dynamických charakteristik je jednoduché: po rychlém nástřiku dostatečně dlouhé zóny analytu o dostatečné koncentraci (avšak v oblasti lineárního dynamického rozsahu) přímo do detektoru se vyhodnotí časový záznam odezvy podle obr. 12.5D. Je nutno poznamenat, že charakterizovat rychlost odezvy hodnotou časové konstanty má smysl pouze u exponenciálních odezev, tj. odezev řídících se rov. (12-5) či (12-6). Kritérium, zda jde o exponenciální průběh vyplývá z rov. (12-7): pro exponenciální průběh platí, že $T_{90}/T_{50} \approx 3,3$ (hodnoty T_{90} a T_{50} se odečtou ze záznamu odezvy). Pokud se tento poměr od uvedené hodnoty liší, odezva není exponenciální a k popisu dynamických vlastností se použijí pouze odečtené hodnoty T_{90} a T_{50} .



Obr. 12.5: *Přechodové funkce detektoru* $(\Delta c(t) = 1)$

Přechodová funkce prvního řádu (A), přechodová funkce prvního, druhého, třetího a čtvrtého řádu (B), aproximace přechodové křivky vyššího řádu pomocí přechodové křivky prvního řádu (C), vyhodnocení přechodové křivky (D)

12.4 Vlastnosti proudících tekutin a jejich vliv na odezvu senzoru

Jak již bylo zdůrazněno výše, distribuce lokálních rychlostí v proudící tekutině a transport jednotlivých látek v proudu ovlivňují především funkci senzorů, jejichž odezva závisí na interakcích sledovaných látek v mezifází povrchu senzoru a proudu tekutiny. U senzorů sledujících celkovou vlastnost systému pak hydrodynamické a transportní parametry ovlivňují pouze měření zón sledovaných látek, tedy v případě analytických metod CFA, FIA, CE a chromatografie obecně. Budeme se tedy věnovat změnám, kterým podlehne pravoúhlá zóna sledovaného vzorku vnesená do proudu na své cestě k senzoru a které ovlivní výstup senzoru. Abychom naše úvahy zjednodušili, budeme předpokládat, že proudící tekutina je nestlačitelná (lze připustit u monitorování v plynech a při plynové chromatografii, protože pracovní tlaky jsou nízké, jakož i při HPLC, kde vyšší tlaky neovlivňují podstatně objem kondenzované fáze). Dále předpokládáme, že tekutina je normální (newtonská), je tedy izotropní a síly tření v ní se řídí Newtonovým zákonem (koeficient dynamické viskosity je konstantní za dané teploty a tlaku). Veškeré tyto předpoklady jsou splněny v dostatečné míře při většině běžných analytických měření.

12.4.1 Charakteristiky proudění

Představme si nyní, že jsme do kapaliny proudící konstantní celkovou lineární rychlostí v_0 (s rozměrem např. cm s⁻¹) vnesli pravoúhlou zónu vzorku o určité délce. Zóna je unášena proudem a působí na ni dva základní vlivy:

(a) Vzhledem k tomu, že uvnitř zóny jsou částice, které nejsou přítomny vně zóny, musí nutně nastat difúzní pohyb těchto částic, který tento rozdíl kompenzuje, tedy pohyb ven ze zóny – zóna se postupně rozšiřuje.

(b) Protože v kapalině existuje vnitřní tření a ještě větší tření nastává mezi povrchem kapaliny a stěnou dráhy proudu (např. trubice), lokální rychlosti v průřezu proudu nejsou stejné – **původně pravoúhlé hranice zóny se zakřivují**. Zatímco rychlost difúzního pohybu je dána Fickovými zákony, rozdělení lokálních rychlostí pohybu kapaliny musíme určit z hydrodynamických základem popisu rozdělení lokálních rychlostí \vec{v} v proudu tekutiny jsou dvě rovnice:

(a) rovnice kontinuity,

div
$$\vec{v} = \frac{\partial v_x}{\partial x} + \frac{\partial v_y}{\partial y} + \frac{\partial v_z}{\partial z} = 0$$
 (12-8)

kde hodnoty v_x , v_y a v_z jsou složky rychlosti \vec{v} ve směru os kartézského souřadnicového systému vztaženého na nemísitelnou (většinou tuhou) fázi, např. elektrodu v proudu tekutiny nebo stěnu trubice, kterou tekutina proudí. Tato rovnice vyjadřuje zákon zachování hmotnosti.

(b) Navierova-Stokesova rovnice,

$$\rho \frac{\mathrm{d}\vec{v}}{\mathrm{d}t} = -\mathrm{grad} \, p + \eta \Delta \vec{v} + \vec{F}_1 \tag{12-9}$$

kde ρ je hustota tekutiny, p je tlak působící na tekutinu a vyvíjený např. čerpadlem, η je koeficient dynamické viskozity tekutiny, Δ je Laplaceův operátor a \vec{F}_1 je jakákoli jiná vnější síla působící na tekutinu (v analytických experimentech je to zpravidla gravitační síla). Tato rovnice popisuje pohyb objemového elementu tekutiny a vyjadřuje první Newtonův zákon, tj.

$$F = m\vec{a} \tag{12-10}$$

kde \vec{F} je vektor síly a \vec{a} je vektor odpovídajícího zrychlení. Levá strana rov. (12-9) tedy odpovídá součinu $m\vec{a}$ pro daný objemový element tekutiny a pravá strana je sumou sil, které na tento element působí.

Nebudeme se zabývat řešením této soustavy rovnic, neboť je obtížné a lze jej analyticky získat pouze pro určité soubory počátečních a okrajových podmínek (jednoduché, dobře definované geometrie průtokového systému). Povšimneme si pouze některých důležitých praktických důsledků. Při naprosté většině měření v analytické chemii lze v rovnici (12-9) zanedbat působení síly \overline{F} a předpokládat, že proudění je stacionární, čili platí podmínka:

$$\frac{\partial \vec{v}}{\partial t} = 0 \tag{12-11}$$

Tím se rovnice (12-9) podstatně zjednoduší. Takto zjednodušenou rovnici převedeme do bezrozměrné koordinátové formy: předpokládáme, že proudění tekutiny nastává ve směru osy x, fázové rozhraní je rovnoběžné s osou z a osa y je k fázovému rozhraní kolmá. Zavedeme bezrozměrné veličiny vydělením původních veličin hodnotami o stejném rozměru – délku X = x/l, kde l je tzv. charakteristický rozměr tělesa umístěného v proudu tekutiny (např. pro destičku je charakteristickým rozměrem její délka ve směru proudění, pro trubici je to poloměr jejího průřezu, pro kouli a disk jsou to jejich poloměry), rychlost $V = v /v_0$ a tlak $P = p/(\rho v_0^2)$. Po všech těchto úpravách nabude rov. (12-9) tvar

$$V_Z \frac{\partial V_X}{\partial Z} = -\frac{\partial P}{\partial X} + \frac{\eta}{\rho v_0 l} \frac{\partial^2 V_X}{\partial Z^2}$$
(12-12)

V rov. (12-12) je velmi důležitý bezrozměrný parametr, který předchází druhému členu na pravé straně a který je převrácenou hodnotou **Reynoldsova čísla (kritéria)** *Re*

$$\boldsymbol{R}\boldsymbol{e} = \frac{\rho v_0 l}{\eta} = \frac{v_0 l}{v} \tag{12-13}$$

kde ν je koeficient kinematické viskozity ($\nu = \eta/\rho$). (*Pozn.* Hydrodynamika a nauka o převodu tepla obsahují řadu bezrozměrných kritérií, pojmenovaných po jejich autorech, která v obou oborech často mají stejnou definici, ale jména autorů jsou jiná).

Reynoldsovo číslo, které pro daný systém velmi snadno vypočteme, má zásadní význam v tom, že charakterizuje proudění. Pohlédneme-li na hladinu poklidné řeky (např. nad jezem) vidíme, že je hladká a nezčeřená – proudění je **laminární** a objem vody si můžeme představit jako soubor tenkých vrstev, které po sobě klouzají a vzájemně se nemísí. Pod jezem, kde je hloubka menší, z vody vyčnívají balvany a lineární průtoková rychlost vody se zvětší, se poklidný tok změní a stane se z něho bystřina, kde se voda všemožně převaluje a víří – tok je nyní **turbulentní**. Je evidentní, že laminární tok je mnohem reprodukovatelnější, snáze exaktně popsatelný. Turbulentní tok je typický stochastický proces a při většině analytických měření je nežádoucí, protože podstatně zhoršuje spolehlivost měření, avšak v určitých případech je prospěšný (např. v průtokových reaktorech, kde intenzivní promíchávání urychluje celkovou rychlost reakce).

Tab. 12.1: Kritické hodnoty Reynoldsova čísla pro některé systémy

Re krit	Systém
10^5 až 10^6	destička v proudu, rotující disk
2 500	přímá trubice
1 500	tenký film na povrchu tuhé fáze
1 až 100	náplňový reaktor nebo náplňová chromatografická kolona

Zvyšuje-li se průtoková rychlost za daných podmínek, pak roste i hodnota Reynoldsova čísla a po dosažení **kritické hodnoty** Re_{krit} se změní původně laminární proudění na proudění turbulent-

ní. Typické hodnoty Re_{krit} jsou uvedeny v tab. 12.1. Je třeba poznamenat, že v náplňovém reaktoru či koloně je v rov. (12-13) nahrazen charakteristický rozměr hodnotou průměru částic náplně d_p

$$\boldsymbol{R}\boldsymbol{e} = \frac{v_0 d_p}{v} \tag{12-14}$$

a že se v těchto systémech turbulence vyvíjí postupně se zvětšující se hodnotou *Re*. Snadno vypočteme, že pro vodné roztoky odpovídají kritické hodnoty *Re* průtokům řádu desítek mililitrů za minutu, a proto naprostá většina analytických průtokových měření probíhá v laminárním režimu. Tyto závěry ovšem platí pro přímé dráhy tekutiny a pro dokonale hladké povrchy, jinak jsou kritické hodnoty *Re* podstatně nižší – toho se využívá např. pro vyvolání lokální turbulence v kapilárních reaktorech tím, že se stočí do spirály.

Za předpokladu, že pracujeme v laminárním režimu, se postupně vytvoří stacionární rozdělení lokálních rychlostí v proudu tekutiny. Těsně u povrchu tuhé fáze vznikne velmi tenká **stagnantní vrtsva**, která se nepohybuje, a se zvyšující se vzdáleností od fázového rozhraní průtoková rychlost vzrůstá, až dosáhne hodnoty v_0 . Oblast, ve které průtoková rychlost vzrůstá, se nazývá **hydrodynamická hraniční vrstva (Prandtlova vrstva)** (*hydrodynamic boundary layer, Prandtl layer*) δ_0 a její tloušťka je definována podle obr. 12.6. Povšimněme si, že tloušťka Prandtlovy vrstvy se vzrůstající délkou dráhy toku roste a asymptoticky se blíží konstantní hodnotě. Z Navierovy-Stokesovy rovnice lze vypočítat, že pro rovinný povrch tuhé fáze přibližně platí

$$\delta_0 \approx \frac{l}{\sqrt{Re}} \tag{12-15}$$

a pro vzrůst tloušťky hraniční vrstvy s rostoucí vzdáleností x je

$$\delta_0 \approx 5, 2\sqrt{\frac{\nu x}{\nu_0}} \tag{12-16}$$





 v_0 - rychlost tekutiny daleko od povrchu,
 δ_0 - tloušťka hraniční vrstvy, x - vzdálenost pod
él tuhého tělesa

Při průtoku tekutiny kapilárou se tedy tloušťky hraničních vrstev u protilehlých stěn k sobě blíží, až se vytvoří stacionární rozdělení lokálních rychlostí. Vznikne **parabolický rychlostní profil** (viz obr. 12.7), který se rovněž nazývá **Poiseuillův profil** a je popsán vztahem

$$v(r) = v_{\max}\left(1 - \frac{r^2}{R^2}\right) \tag{12-17}$$

kde r je vzdálenost od osy trubice a R je poloměr trubice. Je zřejmé, že parabolické rozdělení lokálních rychlostí v tekoucím prostředí podstatně rozšíří a zdeformuje zónu analytického vzorku a že při měření je zapotřebí, aby se rychlostní profil ustálil (stabilizovala se tloušťka hraniční vrstvy) – nesmíme proto měřicí systém umístit těsně ke vstupu do systému. Délku oblasti nestabilizovaného proudění h lze zhruba odhadnout ze vztahu

 $h \approx 0,04 \, Re \tag{12-18}$

Turbulentní proudění vykazuje podstatně plošší rychlostní profil (logaritmická závislost na vzdálenosti od povrchu tuhé fáze), viz. obr. 12.8. Obdobně plochý rychlostní profil má i elektroosmotický tok při kapilární elektroforéze, ten však vzniká jiným mechanismem.



Obr. 12.7: Proudění trubicí (R - průměr trubice, h - vstupní oblast)



Obr. 12.8: Profily rychlostí v trubici

A - laminární proudění, parabolický profil rychlostí; B - turbulentní proudění, logaritmický profil průměrné rychlosti

12.4.2 Látkový transport v proudu tekutiny

Základní způsoby látkového transportu (difúze, konvekce a migrace) byly již zmíněny v odst. 12.1. Budeme-li předpokládat, že migrace nabitých částic v elektrickém poli je potlačena přítomností základního elektrolytu, pak zbývá transport konvekcí a difúzí. V případě, že je v systému ustaven stacionární stav, platí pro konvektivně-difúzní transport obecná rovnice

$$D\Delta c = \vec{v} \operatorname{grad} c$$
 (12-19)

kde ⊿ je Laplaceův operátor. Převedeme-li tuto rovnici na bezrozměrnou, koordinátovou formu stejným způsobem, jako jsme to učinili v předchozím odstavci s Navierovou-Stokesovou rovnicí, dostaneme

$$V_X \frac{\partial C}{\partial X} + V_Y \frac{\partial C}{\partial Y} + V_Z \frac{\partial C}{\partial Z} = \frac{D}{v_0 l} \left(\frac{\partial^2 C}{\partial X^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial Y^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial Z^2} \right)$$
(12-20)

kde $C = c/c_0$ je bezrozměrná koncentrace (c_0 je koncentrace v hloubi roztoku). Okamžitě si povšimneme bezrozměrného parametru na pravé straně rovnice, jehož převrácená hodnota je analogická Reynoldsovu číslu v rov. (12-12),

$$\boldsymbol{P}\boldsymbol{e} = \frac{v_0 l}{D} \tag{12-21}$$

Hodnota Pe je Pécletovo číslo, které má obdobný význam pro konvektivní difúzi, jako má Reynoldsovo číslo pro charakter proudění. Při malých hodnotách Pe, čili při malých průtokových rychlostech a malých rozměrech systému, převládá difúze nad konvekcí, zatímco při vysokých hodnotách Pe je konvekce dominujícím způsobem látkového transportu. Poměr Pe/Re se nazývá Schmidtovo číslo Sc,

$$Sc = \frac{Pe}{Re} = \frac{(v_0 l)/D}{(v_0 l)/\nu} = \frac{\nu}{D}$$
(12-22)

Dosadíme-li do rov. (12-22) hodnoty typické pro analytická měření v kapalinách (zředěných vodných roztocích, $D \approx 10^{-6}$ až 10^{-5} cm² s⁻¹ a v $\approx 10^{-2}$ cm² s⁻¹), pak dostaneme poměrně vysoké hodnoty *Sc* (zhruba 10^3 až 10^4), takže je zřejmé, že v naprosté většině průtokových analytických měření převládá konvektivní látkový transport nad transportem difúzním.

Podobně jako je definována Nernstova difúzní vrstvu o tloušťce δ pro roztok v klidu, můžeme i zde definovat **difúzní hraniční vrstvu o tloušťce** δ , která se od Nernstovy vrstvy liší jen v tom, že její tloušťka vzrůstá s rostoucí vzdáleností podél povrchu tuhé fáze, obr. 12.9. Poměr tlouštěk Prandtlovy vrstvy, rov. (12-16), a difúzní vrstvy je zhruba 10² až 10³ (Prandtlova vrstva má za běžných podmínek analytického měření tloušťku okolo 1 mm, zatímco difúzní vrstva má hodnotu řádu jednotek až desítek mikrometrů).

Vezmeme-li v úvahu všechny výše uvedené skutečnosti, které se týkají jak proudění, tak látkového transportu v proudu, můžeme znázornit osud pravoúhlé zóny analytu vnesené do proudu nosné kapaliny, obr. 12.10. Zóna se tedy kontinuálně rozšiřuje a zaobluje, protože relativní vliv difúze postupně narůstá ve srovnání s konvekcí, která poměrně brzy dospěje do stacionárního stavu. Koncentrační profil analytu postupně přechází od pravoúhlého rozdělení přes binomické a Poissonovo rozdělení až k normálnímu, gaussovskému rozdělení.

12.5 Závěr

Ze všech uvedených závislostí vyplývá, že praktické použití jakéhokoli senzoru závisí nejen na vhodném výběru senzoru a posouzení jeho analytických parametrů z hlediska množství a charakteru sledovaných analytů a matric vzorků, ale i na posouzení okolností, za kterých bude pracovat. Zcela zásadními parametry jsou rychlost a reprodukovatelnost odezvy, které hrají roli nejen při indikaci náhlého zvýšení koncentrace určité látky, ale hlavně při sledování průběhu procesů, ať jiř v průmyslu, biologii, či medicině, nebo při sledování analytických postupů v průtokových systémech, ať již s vysokoúčinnou separací, nebo bez ní. Výsledný analytický výsledek ovšem závisí nejen na kvalitě fungování vlastního senzoru, ale i na funkci celého analytického systému.



Obr. 12.9: Hydrodynamická a difúzní hraniční vrstva u rovinného povrchu

 v_0 - rychlost tekutiny daleko od povrchu, $\delta_0 a \delta$ - tloušťka hydrodynamické a difúzní hraniční vrstvy



Obr. 12.10: Rozšiřování a deformace zóny analytu podél dráhy proudění

Poděkování

Tento výzkum byl finančně podporován MŠMT ČR (projekt MSM 0021620857).

Literatura

- V. G. Levich: Physicochemical Hydrodynamics. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J., 1962.
- L. Prandtl: Essentials of Fluid Dynamics. Blackie, Glasgow, 1952.
- P. Faure, M. Depeyrot: *Elements of System Theory*. North Holland Publ.Comp., Amsterdam, New York, Oxford, 1977.
- J. Váňa: Analyzátory plynů a kapalin. SNTL, Praha, 1984; Gas and Liquid Analyzers. Elsevier, Amsterdam, 1982.
- W. B. Furman: Continuous Flow Analysis. Theory and Practice. M. Dekker, New York, 1976.
- J. Růžička, E. H. Hansen: Flow Injection Analysis. 2nd ed., J.Wiley, New York, 1988.
- M. Valcárcel, M. D. Luque de Castro: *Flow-Injection Analysis. Principles and Practice*. E. Horwood, Chichester, 1987.
- K. Štulík, V. Pacáková: *Elektroanalytická měření v proudících kapalinách*. SNTL, Praha, 1989; *Electroanalytical Measurements in Flowing Liquids*. E. Horwood, Chichester, 1987.

13. OPTICAL CHEMICAL SENSORS

Dr. Ing. Ivan Kašík, Ing. Vlastimil Matejec, CSc., Ing. Miroslav Chomát, CSc. Ústav fotoniky a elektroniky AV ČR, Chaberská 57, Praha 8, 182 51 kasik@ufe.cz

13.1 Introduction, basic terms

One of key issues of analytical chemistry is to achieve portability and continuous on-site monitoring of a wide range of analytes. This issue is especially important for environmental monitoring, medical analyses, food control, etc. Basically, the portability can be achieved either by miniaturizing established analytical apparatus or by the development of chemical sensors. The first strategy can be represented, e.g., by the miniaturization of separation techniques and spectrometry [A1], as is, for example, done in "lab on a chip"-approaches [A2]. The second strategy relies on the employment of miniaturized measuring devices optimized to interact with a specified analyte. In principle, this yields good-value apparatus, making the technology of much interest for both scientific and technological application.

Generally, a **sensor** can be defined as a miniaturized device than can detect physical or chemical phenomena in their sources and give us specific information on these phenomena in real time. Particularly, a sensor consists of a **part sensitive** to a detected phenomenon, **a detection site**, one of the physical properties of which changes during effects of the detected phenomenon, and a physical transducer which transforms this change into an electrically processable signal [A3]. In contrast to discontinual analytical measurements, sensors can operate **continuously**. Usually, sensors exhibit **reversible operation**, although, irreversible "one shot" sensors have also been developed [A3].

This review deals with **optical chemical sensors** (see principal arrangements in Figure 13.1), i.e. sensors employing physical changes of light waves (intensity, phase, polarisation etc.) for qualitative and quantitative detection of chemical species [A3]-[A7]. Namely fiber-optic chemical sensors are in focus. Each optical sensor consists of an **optical source**, **optical detection element** (bulk optics, planar waveguide, optical fiber) **and a photo detector**.

High detection sensitivity in a wide dynamic range, immunity to electromagnetic interference, possibility of internal reference belongs undoubtedly to **advantages** of optical sensors. On the other hand, certain **limitations** of optical sensors as e.g., photodegradation of samples, limited performance in harsh (e.g. dusty) environments resulting e.g., from unwanted effects of parasitic signals occurring due to light scattering in the medium, unwanted background fluorescence etc. should also be considered.

Optical sensors with based on optical fibers are capable of fully distributed or multipoint sensing (Figure 13.2) along the whole fiber length. Such layouts may serve as a basis of advanced sensor networks or "smart structures" employed e.g., for monitoring of leakages from pipelines, health or ageing monitoring of buildings, bridges, constructions etc. Suitable dimensions and material properties of optical fibres (fire-safe insulators) make them indispensable tools for sensing in medicine, for the detection of explosives or easily flammable substances (hydrogen, petrol etc.) and for operating in high-voltage facilities.



Fig. 13.1: Principal arrangement of optical sensors (transmission, reflection)



Fig. 13.2: Principal scheme of point, multipoint and distributed detection

The presence and concentration of analytes in the detection site of sensors can be determined in many different ways. The easiest one is visualization (imaging) of an analyte where optical parts serve only as a passive tool for transmission of light to and from the detection site (**extrinsic** sensors – see *Figure 3*). However, in **intrinsic** sensors the detection site can be anchored in a properly designed optical detection element, e.g., optical fiber (Figure 13.3).



Fig. 13.3: Scheme of extrinsic and intrinsic optical sensor

In case when optical responses to changes induced by variations of analyte concentrations or by chemical reactions in the detection sites are weak or not selective enough, **opto-chemical transducers** can be applied into the detection site to enhance the sensor response (Fig. 13.4). There are two main effects of these opto-chemical transducers in which they can enhance the sensor response. The first effect relies on distribution properties of transducer materials which can control concentrations of the detected chemicals (analytes) in the site. This ability can be described by high values of the partition coefficients for the detected chemicals and small ones for the others. In this case, the transducers work as so called **selective membranes**.

The second effect of opto-chemical transducers is based on enhancing optical properties (optical absorption, fluorescence) in the detection site caused by the interaction of a suitable transducer molecule provided with chromogenic parts with the detected chemicals. In this case optical changes in the site result from a chemical reaction of the opto-chemical transducer in which the detected analyte takes place and this transducer acts as an **optical indicator**. If no optical indicator sensitive directly to the detected analyte is available, an indirect detection can be employed. Such a principle has already been used for the detection of glucose by means of enzymatic reaction of glucose with oxygen and by the detection of oxygen.



Fig. 13.4: Different approaches to obtain optical information of chemical composition (changes)

Optical detection elements (planar waveguides, fiber-optic) are dielectric structures composed of an optical **core surrounded by an optical cladding with a refractive index lower than that of the core**. Light is guided through the waveguides as a result of total reflections on the core/cladding boundary (Figure 13.5).



Fig. 13.5: Principle of optical waveguides

The **numerical aperture** (Figure 13.6) represents the maximum angle of the incident rays which can be coupled (collected) into the fiber core and guided in it, and which can potentially be employed for the detection:

$$NA = n_0 \sin \gamma_c = \sqrt{n_1^2 - n_2^2}$$
(13-1)



Fig. 13.6: Numerical aperture

The interaction of light with analytes can be understood either on the basis of ray optics (Figure 13.5) or waveguide optics (Figure 13.7). In terms of waveguide optics, light is transmitted through a optical detection element with a limited dimension of the core in a set of light waves - so called optical modes. Each optical mode is composed from a **guided wave** transmitted in the core and an **evanescent wave** transmitted in the optical cladding. The guided wave of a fundamental mode has a Gaussian distribution of light intensity (optical power) with a maximum intensity in the core centre (Figure 13.7). The light intensity of an evanescent wave exponentially decreases with the distance from the core/cladding boundary and fall down to a 1/e of its maximum value on a micrometer range (a penetration depth ~hundreds nm).

Provided that the optical cladding of an optical fiber contains light-absorbing species characterized by the bulk absorption coefficient α , the light absorption coefficient of i-th optical ray (mode) γ_i that is guided in the core determined from the optical power transmitted P_i by this ray as

$$P_i = P_{i0} \exp(-\gamma_i L) \tag{13.2}$$

where *L* is the fiber length and P_{i0} is the input optical power. The light absorption coefficient γ_i can be expressed as:

$$\gamma_{i} \approx \alpha \frac{\lambda}{\pi d \sqrt{n_{co}^{2} - n_{cl.}^{2}}} \frac{\left(\frac{\theta_{i}}{\theta_{ic}}\right)^{2}}{\sqrt{1 - \left(\frac{\theta_{i}}{\theta_{ic}}\right)^{2}}}$$
(13.3)

In Eq. (13.3) n_{co} and n_{cl} are the refractive indexes of the core and the cladding, respectively, λ is the wavelength, *d* denotes the core radius and θ_i is the complementary angle to the angle at which *i*-th ray strikes the core/cladding boundary [A8].

By assuming that P_{i0} has a same value for each optical ray (a homogenous excitation) an overall absorption coefficient γ can be calculated as:

$$\gamma \approx \alpha \frac{4\sqrt{2}}{3} \frac{\lambda}{\pi d \sqrt{n_{co}^2 - n_{cl}^2}}$$
(13.4)

On the basis of (13.4) one can estimate that less than 1 % of an overall optical power is transmitted in evanescent waves - in an evanescent field in conventional telecommunication fibers.

Provided that in optical detection element an analyte interacts with guided waves optical responses directly measured as well as the sensitivity are high, and consequently detection limits are low. If an analyte interacts only with evanescent waves, optical responses to the analyte can also be detected due to the coupling between guided and evanescent waves. However, in this case, the response and sensitivity depend on fraction of the power in the evanescent field which can be low in standard optical fibers – see Eqs (13.3) and (13.4). Nevertheless, if efficient and specific absorption or fluorescent optical indicators are immobilized in the evanescent field sensitivity can be increased substantially.



Fig. 13.7: Principle of detection by evanescent wave and/or guided wave

13.2 Methods – principles of light-analyte interaction

Information about the presence and concentrations of an analyte in the detection site of a an optical sensor can be obtained from **intensity** changes, **phase** changes, changes of the state of **polarisation** and changes in the **time** domain of light transmitted through the site and induced by the analyte.

Intensity (amplitude) changes can be determined as changes of the output optical power resulting from **absorption, luminescence or refractive index changes** in the detection site.

13.2.1 Absorption-based methods

Intrinsic light **absorption** of an analyte or light absorption of a suitable optical indicator can be employed for the detection based on the principle of absorption spectroscopy (Figure 13.8). Molecules of the analyte (or indicator) absorb incident light in a characteristic way causing presence of absorption bands in the spectrum of light transmitted through the detection site. Absorption changes (absorbance *A*) are proportional to the concentration of absorbing species (*c*), the optical pathlength (thickness of a sample or cell, active length of a fiber *L*), and specific wavelength-dependent absorption coefficient $\alpha(\lambda)$ according to a modified Lambert-Beer's law :

$$A(\lambda) = \eta L c \ \alpha(\lambda) \tag{13.5}$$

In the previous equation $\eta = \gamma \alpha$ denotes the fraction of power transmitted through the detection site. This fraction depends on the refractive-index profile of the optical detection element as one can see from Eqs (13.3) and (13.4).

Changes of output optical power $P(P_0 \text{ is a reference})$ can be measured by a detector at individual wavelength or by spectrometer making possible evaluation of spectral changes.

$$A = -\log\left(P / P_0\right) \tag{13.6}$$

The most intensive and specific absorption responses can be obtained in a Mid-IR region between cca 2-6 µm due to intensive vibration absorption bands of molecules themselves (molecular fingerprint). Most absorption-based optical chemical sensors operate in VIS or UV region. As only few analytes have chromogenic groups absorbing in VIS spectral region usually suitable optical indicators (such as, e.g., pH indicators) are immobilized in the detection sites of these sensors [A7], [A9]. Sensors operating in UV spectral region employ electronic transitions in analyte molecules. Such transition can be used for the detection of molecules with conjugated systems, e.g. aromatic hydrocarbons [A10].

Using wavelengths specific for the analyte or for an optical indicator a good sensitivity and selectivity of such absorption-based sensors can be obtained. The development of suitable optochemical transducers (optical indicators) and their immobilization in detection sites of optical sensors represent key issues of this kind of sensing task.



Fig. 13.8: Principle of absorption-based methods and spectral response (differential absorption spectra) of methylene blue to the presence of chlorine

13.2.2 Luminescence-based methods

Intrinsic **luminescence** of an analyte or luminescence of a suitable optical indicator can be employed for the detection based on the principle of luminescence spectroscopy. These effects usually take place in VIS spectral region [A7], [A9]. Molecules of the analyte (or indicator) emit characteristic light after absorbing excitation light. The emission is called fluorescence or phosphorescence (depending on lifetime of the emission) in the case that the analyte is excited by the interaction with light; it is called chemoluminescence in the case that the analyte is excited by chemical reactions etc.

In the case of **fluorescence** (Figure 13.9) molecules of the analyte absorb incident light (Io) in a characteristic way (α – absorption coefficient at excitation wavelength) and convert it (with a quantum yield Φ) into characteristic emission of light (I) exhibiting maximum intensity shifted to longer wavelength – fluorescence. Intensity of fluorescence (I) is proportional to the sample concentration (c) :

$$I = I_0 \alpha \, \boldsymbol{\Phi} \, \boldsymbol{c} \, \boldsymbol{K} \, \boldsymbol{L} \tag{13.7}$$

where *K* is an instrumental parameter and *L* is optical pathlength. Since parameter *K* depends on experimental arrangement, the results obtained are related particularly to the arrangement employed for the detection. Since the absolute output optical power can be influenced, e.g., by background emission, temperature etc., I/I_0 ratio is usually employed to minimize such unwanted effects.



Fig. 13.9: Spectral response (excitation and fluorescence spectra) of and 2',7'-Bis(2carbonylethyl)-5(6)-carboxyfluorescein to the pH and principle of fluorescence-based methods

Choice of a selective optical indicator with the quantum yield as high as possible absorbing at wavelengths coinciding with available optical sources represents a key issue of solution of such a sensing task.

13.2.3 Methods based on refractive-index changes determination

Since the **refractive index** is a characteristic property of any matter, its dependence on the concentration of the analyte can also be utilized for optical detection [A8]. The detection of refractive-index changes of an analyte can be explained on the basis of waveguide optics (Figure 13.5). Any change of refractive indices of the core or of the cladding (analyte surrounding the bare core or penetrating into the optical cladding) lead to changes of a number of optical modes transmitted through the optical detection element. These changes are related to changes of the numerical aperture and output optical power (Figure 13.6). The sensitivity and selectivity of refractometric evanescent-wave sensors can be improved by the deposition of layers of selective membranes onto optical detection elements. These membranes can enable penetrating some chemicals into the detection site as well as discriminate the access of some chemicals into the sites and thus they make these sensors selective.

13.2.4 Methods based on phase changes

Apart from the detection methods based on the determination of light-amplitude changes, detection approaches based on **phase changes** of light can be also applied. In such a case, the phase shift (delay) dependent on properties of analyte is determined from the comparison of the light guided through the measurement and reference channels. As the phase shift is determined by interferometers, this approach is usually called interferometry (Figure 13.10).



Fig. 13.10: Principle of methods based on determination of phase changes

13.2.5 Methods based on determination of changes in time domain

Fluorescence of samples or optical indicators can be characterized not only by the intensity (intensity ratio) of the response, but also in **time domain**. The principle (Figure 13.11) is based on determination of characteristic **lifetime** (τ) of decay after the illumination of the sample by a short excitation pulse (I_0). The lifetime represents the reciprocal of the rate constant of the (first order) emission decay (I_t) and is strongly dependent on properties of the analytes.
$$I_t = I_0 \exp\left(-t/\tau\right) \tag{13.8}$$

Since the excitation pulses are actually short (\sim ns), this approach does not suffer from drawbacks of intensity-based fluorescence methods related, e.g., to the instability of the excitation source, interference from ambient light or to photodegradation of samples.



Fig. 13.11: Principle of methods based on determination of lifetime of fluorescence

13.3 Optical hardware - instrumentation of optical methods

As it is shown in Figure 13.1, each optical sensor consists of an optical source, optical detection element (bulk optics, planar waveguide, optical fiber) and a photo detector. List of optical sources and detectors for UV - VIS - IR spectral regions can be found in Tab. 13.1.

Spectral region	Sources	Detectors
UV	Xenon arc, deuterium lamps	
	Excimer lasers	Photomultiplier tubes (Cs-Te, Sb-Cs)
VIS+NIR	Halogen lamps (FWHM~ 2 µm)	Avalanche photodiodes
	LEDs (light emitting diode, w~40 nm)	Photodiodes (GaN, AlGaN)
	LDs (laser diode)	CCD arrays
	Lasers (He-Ne, Ti-saphire, Nd:YAG,	Detectors :Si [200; 1100 nm], Ge [600;
	semiconductor, FWHM<1nm)	2000 nm], InGaAs
IR	Hot plates (SiC, Pt, W)	IR – thermal
	Lasers CO, CO2	IR – quantum
	Quantum cascade lasers (QCL)	

Tab. 13.1: Overview of sources and detectors available for optical sensing in UV-VIS-IR

Optical detection elements for optical sensors can be based on bulk optical elements, planar/channel waveguides or on optical fibers. Optical detection elements are **required** to be durable to the analytes (glasses > polymers > crystals), transparent (i.e., of minimum optical losses) in a wide spectral range (VIS-NIR > UV & IR), and of common availability (conventional > special; VIS-NIR > UV & IR). **Bulk-optic** detection elements can be represented by disks or foils containing immobilized optical indicators and prepared usually on the basis of polymers or inorganic-organic composites [A7], [A9].

Planar optical waveguides (OWG) are 2D planar (channel) dielectric structures with core layer of higher refractive index deposited on/in a substrate of lower refractive index; the covering material (superstrate) is usually air (*Figure 12*). An interesting feature of such waveguides is that the electric field associated with a wave propagating in the waveguide layer is very strong at the surface of the OWG; hence, highly sensitive optical monitoring can be performed for chemical species located at the OWG surface on the basis of absorption and scattering of the guided waves.

Thin-film OWG sensors for detection of gaseous analytes based on porous glass materials prepared by the sol-gel process have been described. Ion-sensitive and selective thin-film (polymer) waveguide sensors have been reported and a polymer waveguide sensor with symmetric multilayer configuration was fabricated and its application in sensing low humidity concentrations has been demonstrated [A11], [A12].



Fig. 13.12: Planar (channel) waveguides

Planar channel waveguides makes possible to simply develop interferometric sensing structures such as a Michelson interferometer. Preparation of planar waveguides on the basis of hybrid inorganic-organic materials make possible to develop novel sensing structures based on tapered waveguides, gratings or photonic crystals [A13].

Optical fibers are dielectric, in most cases cylindrical structures, with diameters much smaller than their lengths, composed of an optical core surrounded by an optical cladding with a refractive index lower than that of the core (*Figure 5*). The function of specialty optical fibers for sensing is to produce a sensitive response to changes in the fiber surroundings. The sensitivity to changes of fiber surroundings is the main feature distinguishing the specialty fibers for sensing from the conventional telecommunication ones. Thus, a great effort has been expended for the development of fiber-optic detection elements with tailored performances for chemical sensing.

Fiber-optic sensor configurations can be divided into three main groups including **end-of-fiber**, **side-of-fiber and porous or interrupted fiber configurations** [A3]. For end-of-fiber sensors, the optical fiber acts as a conduit to carry light to and from the sample. The modulation of intensity for a given range of wavelengths is dependent on the absorbance or fluorescence of the

analyte, optical indicator, or analyte-indicator complex. The optical indicator can be trapped behind a membrane, in a polymer, or covalently immobilized to the end of the fiber. For absorbance measurements, the signal may be enhanced by placing the optical indicator between a reflector and the end of the fiber.

Another recently introduced variation of the end-of-fiber chemical sensor involves the use of an optical imaging **fiber bundle**. This 350 μ m-diameter fiber bundle contains 6000 optical fibers, which allow pattern resolution using enzyme or pH-indicator incorporated into a polymer layer at the distal end of the fiber. These fibers can be used in an "optical nose" [A14].

Side-of-fiber configurations typically rely on the use of the evanescent wave. The evanescence field can be used to detect the presence of optical indicators or changes in refractive index at the surface of the declad fiber. When fluorescent indicators are applied, the method is highly sensitive primarily because only the chromophores bound to the fiber are detected. For refractive-index based sensors, the optical effect is generic, and selectivity has to be imposed by the use of selective membranes.

For porous or interrupted fiber configurations, optical indicators are typically incorporated directly into the structure of the fiber. For several reasons, this configuration has the potential to be extremely versatile. For example, because of the large surface area provided by the porous fiber core, this method is particularly well suited for absorbance measurements. Further, because the porous regions are intrinsically coupled with the fiber (i.e., they are part of the fiber), measurements can be made at multiple locations along a single fiber. Sol-gel-glass methods can also be used to introduce a range of porosities and chemistries into a fiber or at the fiber surface to facilitate analyte detection using absorbance, fluorescence, or refractive index measurements.

Optical fibers can operate in UV spectral region (based on silica-Suprasil, CaF_2), VIS-NIR spectral region (based on silica-Herasil, optical glasses – e.g. BK7, polymers – e.g. PMMA), and IR spectral region (based on silicon, germanium, sapphire, chalcogenide and chalco-halide glasses). Transparency of several kinds of these materials can be seen from Figure 13.13.

The simplest **fiber structure** is the **step-index** one, characterized by constant refractive indexes in the core as well as in the optical cladding. These structures have usually large diameters of the core <200; 1000> μ m, they support the transmission of thousands optical modes and so they are called **multimode (MM)** structures. A typical MM step-index structure is the **PCS** fiber (polymer-clad-silica – Figure 13.14) composed of pure silica core and polymeric optical cladding of lower refractive index.

When the fiber core diameter is within a range of several micrometres (~ 2-15 μ m), only one or several modes can be guided in the fiber core, and so these structures are denoted as **singlemode (SM) or few-mode (FM)**. They can be characterized by lower numerical apertures in the comparison with the MM structures (0.1-0.25). Usually laser sources with suitable output optics are used for the exitation os SM or FM sensing fibers and LEDs or halogen lamps are used for exciting multimode structures. As there is no direct access of an analyte to the core of circularly symmetric SM and FM structures, special **D-shaped fibers**, sectorial "**S-fibers**" (Figure 13.15) and/or "**capillary sectorial fibers**" were designed (removing of part of the glass cladding is necessary) [A8]. These fibers make possible to combine high sensitivity to chemicals resulting from small core diameters with a sufficient mechanical durability of these fibers. MM optical fibers with **inverted-graded index profiles** have been developed for the same reason [A8].



Fig. 13.13: Spectral transmission of several kinds of materials suitable for planar waveguide and/or optical fiber fabrication

Annual core fibers, hollow fibers - fiber capillaries (Figure 13.16) could also be mentioned as special cases of optical fiber structures. In these structures, an analyte is pumped through the hollow part(s) and depending on its optical properties the optical output is recorded as a result of changes of guided waves or evanescent waves. Recently, microstructure fibers or their special kind photonic crystal fibers which can represent multicapillary fibres have been developed (see Figure 13.17). In these fibers their capillaries can be filled with the detected chemicals and used as the detection sites of fiber-optic sensors [A15].

The sensitivity of optical fibers to chemicals in their vicinity can also be enhanced by the inscription of fiber gratings which rely on periodic longitudinal modulations of the refractive index in the fiber core [A5], [A16]. There are several types of fiber gratings [A5]. The first one is a fiber Bragg grating (FBG) that couples the forward propagating core mode to the backward propagating core mode. A long-period fiber grating (LPG) can couple the forward propagating core mode to one or a few of the forward propagating cladding modes. A chirped fiber grating has a wider reflection spectrum and each wavelength component is reflected at different positions, which results in a delay time difference for different reflected wavelengths. A tilted fiber grating can couple the forward propagating core mode to the backward propagating core mode and a backward propagating cladding mode. A sampled fiber grating can reflect several wavelength components with equal wavelength spacing. All these types of gratings have been utilized in various types of fiber grating sensors and wavelength change interrogators.

FBG sensors can be used for chemical sensing based on the fact that the central wavelength of an FBG varies with refractive index changes, i.e. chemical concentration changes, via the evanescent "field interaction between the FBG and the surrounding chemical. For this purpose an approach based on an FBG written onto an etched D-fibre has been demonstrated and very recently a modified version based on a sidepolished fibre configuration has been reported as a refractive index sensor, allowing fast on-line measurements of chemicals, such as carbon hydrides in petrol industry [A16].



Fig. 13.14: Microphoto of optical fiber Polymer-Clad-Silica (PCS 400 µm)



Fig. 13.16: Microphoto of fiber capillary 390/260 μm



Fig. 13.15: Microphoto of S-fiber (125 µm)



Fig. 13.17: Microphoto of microstructure fiber

LPGs have been discovered to be more sensitive to the refractive index change of the material around the grating cladding when compared with FBGs. As LPGs couple light from the forward-propagating mode into several forward-propagating cladding modes, any variation on the refractive index of the material around the cladding modifies the transmission spectrum properties to generate loss peaks. A sensitivity of up to 10^{-7} is possible with further improvement of the interrogation resolution. As LPGs are also sensitive to temperature changes, temperature compensation is required. The concentration of a number of chemicals, including ethanol, hexanol, methylcyclohexane, hexadecane, and CaCl₂, NaCl, have been tested with LPGs [A16]. In principle, any chemical with its loss peak lying in the refractive index range from 1.3 to 1.45 can be detected using such a LPG technique.

Optical detection elements have to be properly processed before using for optical sensing. Optical fibers are usually declad (stripped), cut or joint by splicing or connectoring. A beveled fiber tip obtained by grinding (Figure 13.18) can be useful for point sensing arrangements. For the monitoring of small volumes of analytes, fiber **taper** (Figure 13.19) can be employed; fiber tips (tapers) can be prepared even in micron dimensions.

The sensitivity of detection fibers to optical changes of an analyte depends also on ways for launching light into their detection sites. They include the axial excitation, excitation by an inclined collimated beam [A8], inhomogenous excitation by using gratings [A9], side excitation, mode filters etc.



Fig. 13.18: Bevelled fiber tip

Fig. 13.19: Tapered fiber tip

Coatings of optical fibers represent an integral part of "optical hardware" as they make it possible to **tailor the access of the analyte** to the detection site, **to immobilize optical indicators** in the detection site, and serve as a mechanical protection of the glass core. Conventional coatings (polysiloxanes, UV-curable acrylates, polyimides, polytereftalates, teflon) on fibers are coated during the process of fiber fabrication (thickness ~ 4-100 µm), and serve primarily for mechanical protection. Special coatings are usually coated additionally (by dip coating) with thickness ~ 10^2 nm [A11],[A12]. They should be **porous and thick to a certain controllable degree** to make possible penetration of analytes to the fiber core, **adhesive** with the fiber, **stable** and **hydrophobic**. Nanoporous fiber-optic sensing coatings enable to use to enhance the selectivity of sensors to different chemicals [A12].

Important kind of special fiber coatings can be represented by bioreceptors which are applied in the detection sites of the biosensors [A6]. In fact, biosensors can be divided in catalytic and affinity biosensors. The catalytic ones which are also known as metabolism sensors and are kinetic devices based on the achievement of a steady-state concentration of a transducer-detectable species. The progress of the biocatalyzed reaction is related to the concentration of the analyte, which can be measured by monitoring the rate of formation of a product, the disappearance of a reactant, or the inhibition of the reaction. The biocatalyst can be an isolated enzyme, a microorganism, a subcellular organelle, or a tissue slice.

In the affinity biosensors the receptor molecules binds the analyte "irreversibly" and noncatalytically. The binding event between the target molecule and the bioreceptor, for instance an antibody, a nucleic acid, or a hormone receptor, is the origin of a physicochemical change that will be measured by the transducer.

There other coatings of optical fibers indispensable for modern chemical sensors includes very thin silver or gold layers supporting the transmission of surface plasmons or layers of silver or gold nanoparticles supporting the generation of localised surface plasmons [A17].

13.4 Use of optical sensors - examples

Despite relatively short period of development of the field of optical sensing, number of optical sensors is nowadays available for the detection of different phenomena (Tab. 13.2), not only as prototypes but as commercially available products. The scope has expanded on many chemical and biochemical analytes (Tab. 13.3) from the original fundamental research of optical detection of pH and oxygen at the beginning of 80's of the last century. Some sensors are offered commercially (Tab. 13.4).

Phenomenon	% of the OFS-15 papers
strain	23
temperature	17.2
pressure/accoustic	15.2
current/voltage	12.2
chemical/gas	11.3
rotation	6.2
vibration/acceleration	5.5
bending/torsion	3.7
displacement	3.3
bio	2.4

Tab. 13.2: Distribution of OFS-15 papers according to measured phenomena

Chemical analytes	Organic (biochemical) analytes
oxygen	alcohols
pH	glucose
carbon dioxide	lactate
ammonia	creatinine
hydrogen	esters
sulfur dioxide	urea
nitrogen dioxide	glutamate
hydrocarbons	oxalate
chlorinated hydrocarbons	phenols
chlorine	cholesterol
sulfites	ascorbate
cations – K^+ , heavy metal ions	bilirubin
anions – chlorides, nitrates	xantin

Tab. 13.4: Commercially available fiber-optic sensors

Sensor	Producer	WWW
рН	GeoCenters	
hydrocarbons	FiberChem	decisionlinkinc.com
pH, oxygen	Presens	presens.de
carbon dioxide	Yellow Springs	ysi.com
oil	Soundek	otech.fi
pH, oxygen	OceanOptics	oceanoptics.com
oxygen	SMSI	s4ms.com
oxygen	Photosense	photosense.com

13.5 Optical sensing - consideration

For a particular sensing task, a suitable method, adequate optical detection element and/or optochemical transducers should be proposed and achievable selectivity, sensitivity, dynamics, stability and reproducibility of such a solution should be estimated. Then, feasibility of the technical solution and economical aspects has to be considered and optimized with respect to the requirements. Although planar and bulk optics are increasingly used in many areas of sensing, there are still some special application fields in which optical fibers can be advantageously used. Their dimensions and material properties make them indispensable for sensing particularly in medicine, for the detection of explosives or flammable substances, and for operating in high-voltage facilities. Optical fibers are suitable for distributed sensing and their price is relatively low in comparison with other optical detection elements.

The sources, detectors and optical elements for the VIS-NIR spectral region are better available than those for UV and IR spectral regions. Optical losses of optical elements operated in the VIS and NIR are also lower than those of components for UV or IR spectral region. However, valuable results can be obtained by sensing in the UV and IR.

Multimode fiber-optic structures (75% of sensing applications) are advantageous because they allow employment of cheap LED sources and accessories, they are robust enough for easy handling and compatible with conventional fiber optics, but their sensitivity is usually much lower in comparison with that of single-mode structures. Generally, conventional structures are more available than the specialty ones. On the other hand, use of special structures can lead to advanced and unconventional valuable solutions.

References

- [A1] A. Rios, A. Escarpa, M.C. Gonzalez, A.G. Crevillen, Challenges of analytical microsystems, Trac-Trends Anal. Chem. 25(5) 467–479 (2006)
- [A2] P.S. Dittrich, K. Tachikawa, A. Manz, Micro total analysis systems. Latest advancements and trends Anal Chem 78 (12):3887–3907 (2006).
- [A3] K. R. Rogers, E. J. Poziomek, Fiber optic sensors for environmental monitoring, Chemosphere 33 (6) 1151-1174 (1998)
- [A4] P.A. Lieberzeit, F. L. Dickert, Sensor technology and its application n environmental analysis, Anal Bioanal Chem 387, 237–24 (2007)
- [A5] B. Lee, Review of the present status of optical fiber sensors, Optical Fiber Technology 9, 57–79 (2003)
- [A6] M D. Marazuela, M.C. Moreno-Bondi, Fiber-optic biosensors an overview, Anal. Bioanal. Chem. 372: 664–682 (2002)
- [A7] G.J. Mohr, New chromogenic and fluorogenic reagents and sensors for neutral and ionic analytes based on covalent bond formation-a review of recent developments, Anal Bioanal Chem 386 1201– 1214 (2006).
- [A8] V. Matejec, M. Chomat, M. Hayer, I. Kasik, D. Berkova, F. Abdelmalek, N. Jaffrezic-Renault, Development of special optical fibers for evanescent-wave chemical sensing, Czechosloval Journal of Physics 49 (5) 883-888 (1999).
- [A9] B.H. Weigl, O.S. Wolfbeis, Capillary optical sensors, Anal. Chem. 66, 3323-3327 (1994).
- [A10] G. Schwotzer, I. Latka, H. Lehman, R. Wilsch, Optical sensing of hydrocarbons in air or in water using UV absorption in the evanescent field of fibers, Sens. Act. B38(1-3) 150-153 (1997).
- [A11] A. Yimit, A.G. Rossberg, T. Amemiya, K. Itoha, Thin film composite optical waveguides for sensor applications: a review, Talanta 65 1102–1109 (2005).

- [A12] J.F. Fernandez-Sanchez, R. Cannas, S. Spichiger, R.Steiger, U.E. Spichiger-Keller, Novel nanostructured materials to develop oxygen-sensitive films for optical sensors, Analytica Chimica Acta 566 271–282 (2006).
- [A13] N. Skivesen, A. Têtu, M. Kristensen, Photonic-crystal waveguide biosensor, Optics Express 15(6) 3169-3176 (2007).
- [A14] D. James, S.M. Scott, Z. Ali, W.T. O'Hare, Chemical Sensors for Electronic Nose Systems, Microchim. Acta 149 1–17 (2005).
- [A15] J.M. Fini, Microstructure fibres for optical sensing in gases and liquids, Meas. Sci. Technol. 15 1120-1128 (2004).
- [A16] Z.J. Rao, Recent progress in applications of in- fibre Bragg grating sensors, Optics and Lasers in Engineering 31 297-324 (1999).
- [A17] Surface Plasmon Resonance Based Sensors, Springer Series on Chenical Sensors and Biosensors Vol.
 04, Series Editor O.S. Wolfbeis, Volume Editor J. Homola, Springer 2006.

Recommended literature:

Optical Fiber Sensors, Editor J.Dakin, B.Culshaw, MA, Artech House 1997 (1989)

- Chemical and Biochemical Sensing With Optical Fibers and Waveguide, Editor G. Boisdé, A. Harmer, Artech House 1996
- Optical Fiber Sensor Technology, Vol.4, Editor K.T.V.Grattan, B.T.Meggitt, Kluwer 1999

Optical sensors, Editor O.S.Wolfbeis, 2004

Optical chemical sensors, Editor F.Baldini, A.N.Chester, J.Homola, S.Martelluci, Springer 2006

14. SENZORY PLYNNÝCH LÁTEK

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 Úvod

Chemické senzory plynů jsou založeny na mnoha principech. Elektrochemických principů je využíváno v membránových senzorech s kapalným elektrolytem či v tzv. elektrochemických solidstate senzorech, v nichž je kapalný elektrolyt nahrazen tuhou látkou s iontovou vodivostí (tuhým elektrolytem). Velká skupina senzorů je založena na měření změn elektronové vodivosti určitých materiálů v přítomnosti některých plynných látek. Jde o tzv. metaloxidové senzory a chemirezistory. Změn teploty při chemických reakcích, především při katalytické oxidaci plynných látek, je využíváno v senzorech založených na měření teploty, jako jsou pelistory či pyroelektrické senzory. Změna hmotnosti piezoelektrik způsobená absorpcí či adsorpcí stanovovaných plynů vede ke změně jejich rezonanční frekvence. Na tomto principu jsou založeny senzory hmotnostní, tzv. křemenné mikrováhy, nebo senzory s povrchovou akustickou vlnou. Plynné látky mohou měnit optické vlastnosti určitého prostředí (změna absorbance, fluorescence), které lze sledovat optickými senzory, často založenými na vedení záření optickými vlákny.

Uvedený přehled obsahuje pouze základní principy a typy senzorů využívané pro detekci a stanovování plynných látek. O nich bude stručně pojednáno v dalším textu. V praxi, ale především ve výzkumných a vývojových laboratořích jsou používány a testovány senzory plynů a par založené na mnoha dalších fyzikálně-chemických či bio-chemických interakcích. Intenzivní vývoj v oblasti chemických senzorů (a nejen plynných látek) se neomezuje jen na vlastní senzor, ale hledány a vyvíjeny jsou i metody zpracování signálů ze senzorů, především z jejich souborů. Posledně zmíněná problematika je akcelerována rozvojem a dostupností technologií pro výrobu mikro a nanostruktur (soubory senzorů) a výpočetní techniky (zpracování signálů). Nejnovější informace o této problematice je nutno hledat především v původních pracech ve specializovaných časopisech (Sensors, Sensors and Actuators, IEEE Sensors Journal, Biosensors a další). Další podrobné informace o chemických senzorech obecně, tedy i o senzorech plynů lze nalézt v řadě monografií a encyklopedických publikacích, viz seznam literatury.

14.2 Elektrochemické membránové senzory s kapalným elektrolytem

Žádné pojednání o chemických senzorech plynů nemůže opominout potenciometrické a ampérometrické membránové senzory. Konstrukční uspořádání obou typů je obdobné (obr. 14.1A, B): indikační elektroda, iontově selektivní (ISE) v potenciometrickém a např. platinová v ampérometrickém senzoru jsou přitištěny k semipermeabilní membráně tak, aby se mezi membránou a aktivním povrchem elektrody vytvořil film vnitřního elektrolytu (obr. 14.1C). Indikační elektroda je tak exponována analyzovanému prostředí přes membránu, která zajistí, aby se k elektrodě dostaly pouze plynné komponenty. Ty permeují membránou a poté se rozpouštějí ve filmu elektrolytu.



Obr. 14.1: Schema potenciometrického (A) a ampérometrického (B) membránového senzoru plynných látek a struktura těchto senzorů v blízkosti indikační elektrody (C)

14.2.1 Potenciometrické membránové senzory

V případě potenciometrického senzoru je elektrolyt volen tak, aby v něm došlo ke změnám, na něž reaguje indikační iontově selektivní elektroda změnou potenciálu. Často je využíváno protolytických reakcí spojených se změnou pH roztoku; indikační elektrodou je pak např. skleněná elektroda. Senzory tohoto typu, tzv. gas sensing ion selective electrodes, jsou používány pro stanovení řady plynů, viz tabulka 1. Selektivity je dosahováno volbou roztoku vnitřního elektrolytu a typem detekční elektrody.

-			
Stanovovaný plyn	Reakce ve filmu elektrolytu	Složení vnitřního elektrolytu	Detekční elektroda
CO ₂	$\rm CO_2 + H_2O \leftrightarrows \rm HCO_3^- + \rm H^+$	roztok NaHCO ₃	pH selektivní*
SO_2	$SO_2 + H_2O \leftrightarrows HSO_3^- + H^+$	roztok NaHSO ₃	pH selektivní*
NO_2	$2 \operatorname{NO}_2 + \operatorname{H}_2 \operatorname{O} \leftrightarrows 2 \operatorname{H}^+ + \operatorname{NO}_3^- + \operatorname{NO}_2^-$	roztok NaNO ₃	pH selektivní*
NH ₃	$NH_3 + H_2O \leftrightarrows NH_4^+ + OH^-$	rotok NH₄Cl	pH-selektivní, NH4 ⁺ -ISE
H_2S	$H_2S \leftrightarrows 2 H^+ + S^{2-}$	pufr (pH 5)	sulfidová ISE
HF	$HF \leftrightarrows H^+ + F^-$	kyselý roztok	fluoridová ISE
Cl_2	$Cl_2 + H_2O \leftrightarrows Cl^- + 2 H^+ + ClO^-$	HSO ₃ ⁻ pufr	chloridová ISE

Tab. 14.1:Přehled stanovovaných plynů potenciometrickými membránovými senzory a
příslušné experimentální podmínky.

*) skleněná ISE, Sb-elektroda

Vztah mezi hledaným obsahem stanovovaného plynu a měřenou změnou pH lze ukázat na příkladě stanovení CO₂. Příslušné reakce lze popsat dvěma kroky:

a) rozpouštění ve vodě CO₂ + H₂O \leftrightarrows H₂CO₃ $K_s = \frac{[H_2CO_3]}{p_{CO_2}}$

kde K_s je rovnovážná konstanta reakce a pCO₂ je parciální tlak oxidu uhličitého;

b) disociace kyseliny
$$H_2CO_3 \leftrightarrows HCO_3^- + H^+$$
 $K_A = \frac{[HCO_3^-][H^+]}{[H_2CO_3]}$

kde K_A je disociační konstanta. Kombinací těchto rovnic lze dospět ke vztahu:

$$p_{\rm CO_2} = \frac{[\rm HCO_3^{-}]}{K_s K_{\rm A}} [\rm H^+]$$

Koncentrace hydrogenuhličitanu v roztoku vnitřního elektrolytu se volí podle obsahu CO_2 v analyzovaném plynu tak, aby se v důsledku příslušných protolytických reakcí měnila zanedbatelně, pak je mezi parciálním tlakem plynu a koncentrací H^+ iontů přímá úměra. Právě pro stanovení CO_2 v krvi byl membránový potenciometrický senzor vyvinut lékařem Severinghausem.

14.2.2 Ampérometrické membránové senzory

U ampérometrických senzorů difunduje analyt k indikační elektrodě, kde je při vhodně zvoleném potenciálu oxidován nebo redukován. Typickou aplikací ampérometrických membránových senzorů je stanovení kyslíku ve vodě (biologická spotřeba kyslíku) a v jiných kapalinách (např. v krvi; není bez zajímavosti, že právě pro stanovení kyslíku v krvi byl senzor vyvinut opět lékařem – fyziologem Clarkem). V klasických "clarkových" senzorech je indikační elektrodou platinová katoda a referenní elektrodou stříbro, senzor tak pracuje v dvouelektrodovém uspořádání, elektrolytem je roztok KCl. Proud úměrný koncentraci kyslíku určují reakce:

reakce na Pt katodě: $O_2 + 4 H^+ + 4e \leftrightarrows 2 H_2O$ reakce na Ag anodě: $Ag + KCl + H_2O \leftrightarrows AgCl + KOH + H^+ + e$ článková reakce: $O_2 + 4 Ag + 4 KCl + 2 H_2O \leftrightarrows 4 AgCl + 4 KOH$

Obecným problémem všech ampérometrických senzorů je spotřeba analytu senzorem. Tím dochází ke změně složení analyzovaného prostředí v blízkosti senzoru v případech, kdy nelze zajistit dostatečný transport analytu např. konvekcí. K tomu dochází např. při měření výměny kyslíku v rostlinných a živočišných tkáních. V těchto případech je nutno využívat nestacionárních měření, tj. vkládat na elektrodu dostatečně krátké potenciálové pulsy tak, aby se vyčerpání analytu projevovalo pouze ve filmu elektrolytu nebo pouze v membráně. V těchto případech je nutné zajistit konstantnostní tloušťku filmu elektrolytu či konstantní tloušťku membrány.

Kyslík lze stanovovat i galvanickými články, tj. články bez vloženého napětí z externího zdroje (tzv. články Mancyho typu). Důležitý je zde výběr materiálu elektrod a složení elektrolytu. Klasickým příkladem je článek s platinovou katodou a olověnou anodou v alkalickém roztoku elektrolytu: reakce na Pt katodě: $O_2 + 4 H^+ + 4e \leftrightarrows 2 H_2O$

reakce na Pb anodě: $Pb + H_2O \leftrightarrows PbO + 2 H^+ + 2 e$ článková reakce: $2 Pb + O_2 \leftrightarrows 2 PbO$

Problémem spojeným s používáním membránových senzorů s kapalným elektrolytem je vysychání filmu elektrolytu, především při detekci látek v plynné fázi. Rychlost vysychání závisí jednak na rozdílné tenzi vodní páry uvnitř senzoru a v analyzovaném prostředí a jednak na typu použité membrány. Při konstrukci senzoru lze volit v principu mezi dvěma typy membrán porézní a neporézní. Porézní membránou difunduje plynná molekula, a tudíž i vodní pára, plynem (např. vzduchem), který vyplňuje její póry, neporézní membránou molekula permeuje, přičemž permeační koeficient P = Dk, kde D je difúzní koeficient plynu (vodní páry) v materálu membrány a k je partiční koeficient. Problém s vysycháním filmu elektrolytu je eliminován při použití senzorů, u nichž je indikační elektroda vytvořena přímo na membráně např. napařením příslušného kovu (zpravidla platiny či zlata). Takto jsou konstruovány tzv. senzory s pokovenou membránou; pokovená strana membrány je v kontaktu s roztokem elektrolytu, nepokovená strana je exponována analyzovanému prostředí. Plynná molekula prochází membránou a na kontaktu kov/plyn/roztok (tzv. třífázové rozhraní) podléhá elektrochemické reakci. Pro správnou činnost takového senzoru je nutné, aby třífázové rozhraní bylo dostatečně dlouhé, což je zajištěno v případě, že kovová elektroda je porézní. Pro tento typ senzorů jsou vhodné porézní membrány, obr. 14.2, kde je délka třífázového rozhraní určována strukturou membrány.

Ampérometrické membránové senzory jsou používány pro stanovení mnoha plynných látek. Rozmanitost stanovitelných plynů plyne z uvedených příkladů: AsH₃, Cl₂, CO, H₂, H₂S, NO, NO₂, PH₃, SO₂, SiH₄ a další. Selektivity je dosahováno volbou pracovního potenciálu, složením vnitřního elektrolytu a materiálem indikační elektrody.



Obr. 14.2: Příklad porézní PTFE pokovené membrány používané v senzorech plynů

14.2.3 Senzory využívající principu palivových článků

V senzorech typu galvanického článku dochází při detekci plynů ke spotřebě některých komponent senzoru (materiál elektrody, elektrolyt), což je faktor limitující jejich životnost. V senzorech typu palivového článku jsou spotřebovávány pouze plynné komponenty z vnějšího prostředí. Palivové články jsou relativně běžně používány jako zdroje energie, pro účely detekce plynných látek jsou konstruovány jako miniaturní cely s velice malou spotřebou stanovovaných plynů. Transport plynu k indikační elektrodě je zpravidla řízen difúzí permeabilní membránou. Odpovídající elektrický proud je proto lineární funkcí koncentrace stanovovaného plynu. Obvykle jsou těmito senzory stanovovány plyny schopné oxidace, např.

 $CO + H_2O \leftrightarrows CO_2 + 2 H^+ + 2 e$ $H_2S + 4 H_2O \leftrightarrows H_2SO_2 + 8 H^+ + 8 e$

Na katodě v tomto případě probíhá reakce

 $O_2 + 2 H^+ + 2 e \leftrightarrows 2 H_2O$

při níž jsou spotřebovávány na indikační elektrodě vznikající elektrony a protony. Stanovovat však lze plyny i redukcí, např.

 $NO_2 + 2 H^+ + 2 e \leftrightarrows NO + H_2O$

 $Cl_2 + 2 H^+ + 2 e \leftrightarrows 2 HCl$

v tomto případě je zdrojem potřebných elektronů a protonů oxidace vody na anodě

 $2 H_2O = O_2 + 2 H^+ + 2e$

Jelikož tyto senzory nespotřebovávají žádné vnitřní komponenty, jejich doba životnosti je teoreticky nekonečná, prakticky jsou využitelné 3 až 4 roky.

14.3 Elektrochemické solid-state senzory

Prakticky úplně lze eliminovat problém spojený s vysycháním kapalného elektrolytu jeho nahrazením tuhým elektrolytem. Existuje řada anorganických i organických tuhých látek s iontovou vodivostí, které lze k tomu využít, viz. tab. 14.2. Obecně řečeno, tuhý elektrolyt použitelný v senzoru pro stanovení určitého plynu musí mít vodivost způsobovanou ionty tohoto plynu nebo ionty, které se účastní jeho elektrochemických reakcích v senzoru probíhajících.

Elektrolyt	Ion způsobující vodivost	Pracovní teplota, K
anorganické elektrolyty		
Ag ₂ S	Ag^+	lab. teplota
$Zr(HPO_4)_2.nH_2O$	H^{+}	lab. teplota
HUO ₂ PO ₄ .4H ₂ O (HUP)	H^{+}	lab. teplota
PbCl ₂	Cl	350
ZrO ₂ (dop. CaO, Y ₂ O ₃)	O ^{2–}	1 000
Nasicon (Na ₃ Zr ₂ Si ₂ PO ₁₂)	O ^{2–}	600
perovskity (SrTiO ₃ , SrSnO ₃)	O ^{2–}	
β -Al ₂ O ₃ (Ag ⁺)	Ag^{+}	400 - 1 000
β -Al ₂ O ₃ (Na ⁺)	Na^+	500
organické elektrolyty		
gely, hydrogely	*	lab. teplota
(polyethylenoxid) ₄ -LiClO ₄	ClO_4^-	lab. teplota
Nafion (iontoměnič)	H^{+}	lab. teplota

Tab. 14.2:Příklady tuhých elektrolytů využívaných v solid-state elektrochemických senzorech
plynných látek

*) dle soli imobilizované ve struktuře gelu

14.3.1 Potenciometrické senzory s tuhým elektrolytem

Významnými senzory tohoto typu jsou senzory kyslíku s elektrolytem tvořeným vhodně dopovaným oxidem zirkoničitým. Jsou v praxi používány v systémech pro řízení nejrůznějších spalovacích procesů (elektrárny, teplárny, spalovací motory). Princip ZrO₂ senzorů je zřejmý z obr. 14.3A. Platinové porézní elektrody jsou vytvořeny na ZrO₂ elektrolytu. Jedna z elektrod (např. elektroda 2 na obr. 14.3A), je v kontaktu s referentním prostředím (čistý vzduch), druhá je exponována analyzovanému prostředí. Rozdílný parciální tlak kyslíku na elektrodách, p(2) > p(1), je hnací silou snažící se o jejich vyrovnání. Proto na elektrodě 2 dochází k redukci plynného kyslíku na kyslíkový anion, který putuje elektrolytem k elektrodě 1, na níž je oxidován zpět na plynný kyslík: $p(2rO_2) + 4 e = O^2 (ZrO_2) + 4 e$

Senzor se tak chová jako koncentrační galvanický článek. Pokud nejsou elektrody spojeny vnějším vodičem, který by převáděl elektrony z elektrody 1 na elektrodu 2, vytvoří se v elektrolytu elektrické pole bránící dalšímu transportu iontů O^{2–} a reakce se makroskopicky zastaví. Mezi elektrodami lze změřit elektrické (rovnovážné) napětí článku, které je funkcí rozdílu parciálních tlaků kyslíku:

$$\Delta E = \frac{RT}{4F} \ln \frac{p(1)}{p(2)} = K \ln p(1)$$

kde konstanta K zahrnuje parciální tlak kyslíku v referentním prostředí.



*Obr. 14.3: Princip potenciometrického senzoru s ZrO*₂ *elektrolytem pro stanovení kyslíku (A) a ampérometrický senzor na principu tzv. kyslíkové pumpy (B)*

Jak již bylo zmíněno, potenciometrické senzory tohoto typu se používají k řízení procesů ve spalovacích motorech, např. v automobilech. Zde jsou nazývány lambda-senzory, protože monitorují tzv. lambda-poměr,

$$\lambda = \frac{\text{aktuální poměr (vzduch / palivo)}}{\text{stechiometrický poměr (vzduch / palivo)}}$$

Je-li $\lambda = 1$, vstupuje do motoru stechiometrická směs, je-li $\lambda > 1$ je vstupující směs chudá, při $\lambda < 1$ bohatá. Lambda-senzor je umístěn ve výfukovém potrubí a vymizení kyslíku či objevení se nadbytečného kyslíku se projeví potenciálovým skokem (obdobným skoku na potenciometrické titrační křivce) s inflexním bodem při $\lambda = 1$. Odchylka od potenciálu odpovídajícího hodnotě $\lambda = 1$ je snímána počítačem, který příslušně upraví dávkování paliva a vzduchu do válců tak, aby byla vždy spalována stechiometrická směs vzduch/palivo.

Bylo zjištěno, že v automobilových exhalacích je nižších koncentrací nežádoucích zplodin dosaženo, vstupuje-li do motoru nikoli stechiometrická, ale poněkud chudší směs. Potenciometrický senzor však v důsledku logaritmické závislosti potenciálu na parciálním tlaku kyslíku není schopen dostatečně citlivě obsah kyslíku ve výfukovém potrubí monitorovat. Proto byl vyvinut ampérometrický senzor využívající principu kyslíkové pumpy (obr. 14.3B). Pokud se v galvanickém článku na obr. 14.3A spojí elektrody vnějším vodičem majícím odpor R (např. ampérmetrem), prochází jím proud, který je roven

$$I = \frac{\Delta E}{R + R(\text{ZrO}_2)}$$

kde $R(\text{ZrO}_2)$ je odpor elektrolytu. Proud prochází, dokud se nevyrovnají parciální tlaky kyslíku na obou elektrodách. Pakliže se do serie s vnějším odporem R zařadí zdroj napětí U, pak prochází článkem proud

$$I = \frac{\Delta E + U}{R + R(\text{ZrO}_2)}$$

Podle polarity a velikosti napětí U prochází proud jedním či druhým směrem, takže lze např. transportovat kyslík i z prostředí o jeho nižším parciálním tlaku do místa o vyšším parciálním tlaku (kyslíková pumpa). Pokud se jedna z elektrod senzoru, např. elektroda 2 (obr. 14.3B), opatří difúzní bariérou (porézní keramika, kapilární otvor) a napětí U se nastaví tak, aby kyslík byl na této elektrodě redukován, může dojít k situaci, že veškerý kyslík transportovaný difúzní bariérou k elektrodě je zredukován, tj. jeho parciální tlak na povrchu elektrody klesne k nule. V tom případě prochází senzorem limitní difúzní proud, který je přímo úměrný parciálnímu tlaku kyslíku, $I = K \cdot p_{02}$. Tímto způsobem lze podstatně citlivěji měřit obsah kyslíku ve výfukových plynech a regulovat tak vstup chudší směsi do motoru.

14.3.2 Senzory s pomocnou fází

Jak bylo řečeno výše, tuhý elektrolyt, který je použitelný v solid-state senzoru pro detekci určitého plynu, musí mít vodivost způsobovanou ionty tohoto plynu nebo ionty, které se účastní jeho elektrochemické reakce. Ne vždy lze nalézt požadovaný tuhý elektrolyt. V tom případě lze využít tzv. pomocné fáze.

Princip nejlépe vysvitne z následujícího příkladu. Pro stanovení chloru je sestaven elektrochemický článek, jehož schéma je na obr. 14.4. Tuhým elektrolytem je v něm ionty Ag^+ dopovaný β -Al₂O₃ (β -alumina, viz tab. 14.2). Katodou je platina, na níž dochází k redukci 1/2Cl₂ + e \leftrightarrows Cl⁻, anodou kovové stříbro. Pokud by platinová katoda byla v přímém kontaktu s elektrolytem, nemohl by článkem procházet proud, protože elektrolyt není vodičem iontů Cl⁻. Vloží-li se mezi tuhý elektrolyt a katodu pomocná vrstva, AgCl, může být obvod iontově uzavřen v důsledku reakcí uvedených na obr. 14.4: chloridové ionty vznikající na katodě reagují se stříbrnými ionty v pomocné fázi, jejich úbytek je kompenzován rozpouštěním stříbrné anody, odkud mohou být dopravovány do pomocné fáze β -aluminou. Elektrony pak procházejí vnějším obvodem a odpovídající proud je analytickým signálem.



Obr. 14.4: Schema solid-state senzoru s pomocnou fází (AgCl) pro stanovení chloru

14.4 Senzory založené na změně elektronové vodivosti

Typickými senzory plynů založenými na měření elektronové vodivosti jsou tzv. metaloxidové senzory. Některé oxidy kovů se chovají jako polovodiče a mají schopnost adsorbovat a redukovat na svém povrchu kyslík. K reakci dochází za zvýšené teploty. O elektrony spotřebované k redukci kyslíku je ochuzena povrchová vrstva a odpor mezi zrny polovodiče je velký. V přítomnosti některých plynů, zpravidla snadno oxidovatelných, např. uhlovodíků, schematicky popsaných jako $R-H_2$, dochází k tomu, že plyn se na povrchu polovodiče adsorbuje, disociuje a adsorbovaný vodík reaguje s adsorbovanými ionty O^{2-} na vodu. Touto reakcí uvolněné elektrony jsou injektovány do vrstvy polovodiče a jeho odpor klesne. Popsaný princip detekce je znázorněn na obr. 14.5A.

Z konstrukčního hlediska jsou senzory tohoto typu realizovány jako trubičkové typy, tj. aktivní materiál je ve formě trubičky, uvnitř s vyhřívacím kovovým vláknem. Tyto senzory jsou distribuovány pod názvem TGS (Tagushi Gas Sensors), obr. 14.5B. Příklady polovodivých oxidů používaných jako aktivní materiál v metaloxidových senzorech jsou v tab. 14.3. Tyto oxidy bývají dopovány různými příměsemi ke zvýšení počtu nosičů náboje a k ovlivnění citlivosti a selektivity. Kromě dopujících příměsí se citlivost detekce zvyšuje snižováním velikosti zrn polovodiče, v současné době až do nanometrové oblasti, příznivě se zde uplatňuje zlepšený poměr povrch/objem.

Další konstrukční variantou senzorů založených na měření elektronové vodivosti jsou chemirezistory, obr. 14.5C, kde je aktivní materiál nanesen ve formě tenkého filmu na dvojici vodivostních elektrod zpravidla tzv. interdigitálního typu. Aktivními vrstvami chemirezistorů mohou být rovněž filmy polovodivých oxidů (tab. 14.3), ale používají se i jiné aktivní materiály, např. metaloftalocyaniny či vodivé a polovodivé polymery. Selektivita chemirezistorů při použití metaloftalocyaninů závisí výrazně na typu koordinovaného kovu.



Obr. 14.5: Schéma metaloxidových senzorů. Princip detekce plynných látek (A), trubičkový typ senzoru (B), struktura chemirezistorů (C)

Oxid	Detegovatelné plyny
SnO ₂	H ₂ , CO, NO ₂ , H ₂ S, CH ₄
TiO ₂	H ₂ , C ₂ H ₅ OH, O ₂
Fe ₂ O ₃	СО
$Cr_{1.8}Ti_{0.2}O_3$	NH ₃
WO ₃	NO ₂ , NH ₃
In_2O_3	O ₃ , NO ₂ ,
LaFeO ₃	NO ₂ , NO _x

Tab. 14.3: Příklady polovodivých oxidů kovů používaných v senzorech pro detekci uvedenýchplynů ve vzduchu

Vzhledem k velikosti a přímé kompatibilitě s mikroelektronickými prvky jsou chemirezistory častými prvky souborů senzorů, obr. 14.6, využívaných v problematice tzv. elektronických nosů. Tyto analytické systémy jsou používány především k charakterizaci analyzovaného plynného prostředí jako celku, tj. nikoli k detekci a stanovení jednotlivých komponent, chemických individuí, které jsou v tomto prostředí obsaženy. Před použitím v praxi je nutno elektronický nos nejprve naučit rozpoznávat různá prostředí, podobně jako je tomu v případě biologického nosu. Za tím účelem je soubor senzorů postupně exponován různým prostředím (takovým, která mají být poté elektronickým nosem identifikována a charakterizována). Soubor obsahuje senzory, z nichž téměř každý mění stav na výstupu po expozici analyzovanému prostředí, ale každý jinak; kromě senzorů chemických látek jsou součástí souboru zpravidla i teplotní čidlo, senzor relativní vlhkosti atp. Soubor odezev sejmutých ze všech senzorů v každém prostředí je vhodnými chemometrickými metodami vyhodnocen a je mu přiřazen určitý význam. Při praktickém použití je elektronický nos schopen rozlišit a identifikovat ta prostředí, která se naučil rozpoznávat. Elektronické nosy nacházejí uplatnění v mnoha oblastech lidské činnosti (kvalita potravin a nápojů, kosmetika, lékařská diagnostika, kriminalistika atd.). V současnosti se k vyhodnocování souboru odezev používají především metodiky umělých neuronových sítí.



Obr. 14.6: Příklad souboru senzorů s chemirezistory s různými chemicky citlivými vrstvami a soubor metaloxidových senzorů ve víčku testovací cely elektronického nosu

14.5 Senzory založené na měření změn teploty

Chemické reakce jsou často doprovázeny změnou teploty. Je tedy možno tohoto efektu využít k detekci a stanovení plynných látek, při jejichž reakci s určitou komponentou senzoru k tomu dochází. Zcela obecně lze strukturu těchto senzorů popsat jako kombinaci chemicky citlivé vrstvy a neselektivního teploměru.

14.5.1 Pelistory

Pelistory jsou senzory používané pro detekci a stanovení hořlavých plynů. Některé materiály (kovy, oxidy kovů) mají katalytické účinky, takže plyny jsou na jejich povrchu oxidovány (hoří) při podstatně nižší teplotě, než je jejich normální teplota vzplanutí. Jde tedy o tzv. katalytické spalování (někdy bývají tyto senzory nazývány katalytickými senzory). Hoření plynu je doprovázeno změnou teploty, která je snímána teplotním čidlem.

Nejjednodušší formou senzoru využívajícího katalytické spalování je platinový drátek. Platina má výrazné katalytické vlastnosti a její odpor se mění prakticky lineárně se změnou teploty v oboru 500 až 1 000 °C, což je pracovní teplota platinového senzoru. Platinový drátek má dvojí funkci, je využit jednak jako vyhřívací tělísko a zároveň jako měřidlo změny teploty. Problémem je, že při uvedených pracovních teplotách se platina již znatelně vypařuje, dochází ke změně průměru drátku a tudíž i ke změnám jeho odporových vlastností. Výsledkem je drift signálu ze senzoru a nakonec i přerušení platinového drátku.

Řešením tohoto problému je překrytí platinového drátku keramickým materiálem na bázi oxidů kovů (Al₂O₃, SiO₂ a další), na jehož povrchu je nanesen potřebný katalyzátor. Ochranná keramika má tvar kuličky či válečku o průměru kolem 1 mm. Uvnitř keramiky skrytý platinový drátek si zachovává funkci vyhřívací a měřicí; toto je typické uspořádání pelistoru, obr. 14.7A. Takto chráněný platinový drátek může být velice tenký, což má příznivý vliv na velikost pelistoru, umožňuje citlivější detekci látek a snižuje nároky na výkon napájecího zdroje.



Obr. 14.7: Schematické uspořádání pelistoru (A): Pt drátek je měřidlem teploty a zastává funkci vyhřívací, katalyzátor je nanesen na povrchu ochranné keramické kuličky či válečku. Schema pyroelektrického senzoru (B)

Při měření je signál z pelistoru zpravidla provnáván se signálem z referenčního pelistoru stejné konstrukce a složení, ale bez katalyzátoru; pelistory bývají zapojeny ve větvích Wheatstoneova můstku. Jejich význam je především pro stanovování hořlavých plynů a par o koncentracích blízkých tzv. dolní mezi výbušnosti (DMV), obecně nad asi 100 ppm. Typická závislost signálu z pelistoru na koncentraci, demonstrovaná na příkladě směsi methanu a vzduchu, je na obr. 14.8. V koncentrační oblasti 0-5 %, tj. pod DMV, je odezva témeř lineárně závislá na koncentraci. Při koncentraci blízké stechometrické (asi 9 % pro uvedený případ) odezva prudce vzroste. Pro koncentrace nad asi 20 % odezva klesá a v čistém methanu je rovna nule.

Problémem při praktickém používání pelistorů je deaktivace katalytické aktivity některými látkami, což se projevuje snížením nebo totální ztrátou odezvy. Inhibitory (např. halogenované uhlovodíky, freony) způsobují dočasnou ztrátu aktivity, kalyzátorové jedy (např. silikony, alkylované sloučeniny těžkých kovů, sloučeniny síry) způsobují ztrátu aktivity trvalou. Odolnější typy pelistorů jsou před těmito látkami chráněny vrstvou molekulového síta (zeolity) nebo je k ochraně platinového drátku použita porézní keramika a katalyzátor je dispergován uvnitř jejích pórů.



Obr. 14.8: Typická závislost výstupního signálu pelistoru na koncentraci plynu demonstrovaná na příkladě methanu ve vzduchu

14.5.2 Pyroelektrické senzory

Pyroelektrika, např. monokrystal LiTaO₃, mají tu vlastnost, že při změně toku tepla těmito materiály dochází ke generaci pyroelektrického napětí. V senzorech plynů se využívá uspořádání, při němž je plátek pyroelektrika na jedné straně elektricky vyhříván a na straně druhé opatřen filmem chemicky citlivé vrstvy, obr. 14.7B. Pokud v analyzovaném prostředí není přítomna látka, která při reakci s chemicky citlivou vrstvou mění její teplotu, je tepelný tok pyroelektrikem konstantní, čemuž odpovídá i konstantní hodnota pyroelektrického napětí. Je-li chemicky citlivé vrstvy a tím i ke změně toku tepla, což se projeví změnou pyroelektrického napětí. Například pro stanovení CO je chemicky citlivou vrstvou platinová čerň katalyzující oxidaci analytu, pro stanovení H₂ je vhodnou chemicky citlivou vrstvou kovové palladium.

Pyroelektrika jsou využívána též v detektorech infračerveného záření. V této funkci nachází uplatnění v tzv. nedisperzních infračervených detektorech (NDIR), které jsou často používány pro monitorování např. oxidů uhlíku.

14.6 Senzory hmotnostní

Hmotnostní senzory využívají piezoelektrických materiálů, na jejichž povrchu je film chemicky citlivé vrstvy. Změna hmotnosti chemicky citlivé vrstvy v přítomnosti analytu se projevuje změnou rezonanční frekvence těchto materiálů. V praxi se lze setkat s dvojím typem těchto senzorů, s tzv. Bulk Acoustic Wave (BAW) senzory, které jsou též známy jako křemenné mikrováhy, Quartz Crystal Microbalance (QCM) a senzory s povrchovou akustickou vlnou, Surface Acoustic Wave (SAW). Oba typy hmotnostních senzorů jsou často používány jako komponenty souboru senzorů pro elektronické nosy. Obzvláště druhý typ, SAW, je pro tyto účely vhodný, protože může být jak materiálově, tak rozměrově kompatibilní s mikroelektronickými obvody. Typickým používaným piezoelektrikem je křemen, používány jsou i jiné materiály, např. LiNbO₃, LiTaO₃.

14.6.1 Křemenné mikrováhy

V těchto senzorech je z křemenného krystalu vyříznuta destička (tzv. AT-cut), viz obr. 14.9, která je na dvou protilehlých stranách opatřena elektrodami (např. napařením kovu). Destička s elektrodami je součástí elektronického oscilátoru a přivádí se na ni střídavé elektrické napětí o frekvenci blízké rezonanční frekvenci křemenné destičky. Pod jeho vlivem se destička rozkmitá. Na povrchu destičky je nanesena vhodná chemicky citlivá vrstva, jíž bývá zpravidla látka, v níž se analyt absorbuje. Tím se zvětší její hmotnost a frekvence oscilací poklesne. Pro změnu frekvence, Δf , platí vztah

$$\Delta f = -2.3 \cdot 10^6 \cdot \frac{f_0^2 \Delta m}{A}$$

kde f_0 je základní rezonanční frekvence destičky, Δm je změna hmotnosti a A je plocha chemicky citlivé vrstvy. Je vidět, že čím vyšší je základní rezonanční frekvence, tím menší změna hmotnosti se projeví změnou frekvence. Proto bývají používány takové řezy, jejichž základní frekvence je řádu jednotek až desítek MHz. Tak např. při frekvenci 10 MHz způsobí měřitelnou změnu frekvence, 0,1 Hz, změna hmotnosti 10^{-10} g cm⁻². Aby bylo možno změnu frekvence přesně zjistit, měří se zpravidla rozdíl frekvencí dvou stejných oscilátorů, z nichž jeden je exponován analyzovanému prostředí a druhý je v prostředí referentním. Při měření je nutno dodržovat konstantní teplotu a pokud měření probíhá v toku nosného plynu, musí být konstantní i jeho průtoková rychlost. Koncentrační závislosti bývají nelineární.



Obr. 14.9: Schéma křemenných mikrovah (A) a způsob výřezu křemenné destičky z krystalu, tzv. AT výřez (B)

14.6.2 Senzory s povrchovou akustickou vlnou

Druhým typem hmotnostních senzorů jsou tzv. SAW-senzory. Přivedením střídavého napětí vysoké frekvence na dvojici elektrod interdigitálního typu vytvořených na povrchu piezoelektrického materiálu se rezonančním rozkmitáním povrchových vrstev piezoelektrika generuje tzv. Rayleighova povrchová vlna (obr. 14.10A). Ta postupuje po povrchu piezoelektrika a může být převáděna další dvojicí elektrod, vytvořených na téže straně piezoelektrika jako elektrody generační, zpět na střídavé elektrické napětí. Pokud se na povrchu piezoelektrika může analyt adsorbovat, nebo je povrch opatřen vhodnou chemicky citlivou vrstvou, v níž se analyt selektivně absorbuje, dochází ke změně hmotnosti povrchu a mění se rychlost šíření povrchové vlny projevující se změnou rezonanční frekvence (podobně jako tomu je v případě BAW-senzorů) a její amplituda. Princip je zřejmý z obr. 14.10B.

Podobně jako u BAW-senzorů je změna frekvence se změnou hmotnosti závislá na čtverci základní rezonanční frekvence. Jelikož povrchovou vlnu lze budit v tenkých filmech piezoelektrika (na rozdíl od podstatně hmotnějších destiček v BAW-senzorech), může být tato frekvence řádu až GHz. Proto jsou SAW-senzory citlivější, lze detegovat změny hmotnosti až 10⁻¹⁵ g cm⁻². Příklady typických aplikací SAW-senzorů jsou v tab. 14.4. Uvedené materiály chemicky citlivých vrstev jsou použitelné i v BAW-senzorech.



Obr. 14.10: Schematické znázornění Rayleighovy povrchové vlny (A) a princip SAW senzorů (B) (a – vznik povrchové vlny v místě vysílacích elektrod, b – ovlivnění povrchové vlny chemicky citlivou vrstvou v přítomnosti analytu, c – generace výstupní frekvence na místě přijímacích elektrod)

Tab. 14.4:	Příklady	plynů a par	• stanovitelných	SAW-senzory
------------	----------	-------------	------------------	-------------

Plyn či pára	Chemicky citlivá vrstva	Limit detekce
H ₂	Pd	50 ppm
NH ₃	Pt	< 0,5 %
NO ₂	Pb-ftalocyanin	0,5 ppm
H_2S	WO ₃	< 10 ppm
SO ₂	triethanolamin	10 ppb
H ₂ O	polyimid	1,1 kHz / % RH*
organofosforečnany	fluoropolyol	0,03 ppm

*) RH = relativní vlhkost

14.7 Optické senzory

Pro stanovení plynných látek optickými senzory je využíváno stejných principů jako při standardních optických metodách, tj. absorpce a emise záření. Často je zde k vedení záření využíváno optických vláken, světlovodů.

Optická vlákna mohou být využita dvojím způsobem. V tzv. extrinsických senzorech slouží vlákno jako pasivní vodič záření od zdroje k místu detekce a odtud k detektoru, tj. chemicky citlivá vrstva, v níž dochází ke změně optických vlastností v důsledku interakce s analytem, leží mimo optické vlákno. Typickým příkladem takového senzorů je optická varianta potenciometrických plynových senzorů Severinghausova typu (viz část 14.2.1); schéma je na obr. 14.11A. Chemicky citlivá vrstva, oddělená od analyzovaného prostředí např. permeabilní membránou, obsahuje vodný roztok pH-indikátoru. V přítomnosti analytu podléhajícího ve vodě protolytickým reakcím (viz tab. 14.1) se mění pH roztoku, na což reaguje indikátor změnou barvy. Ta je detegována opticky. Použitím zrcadla se prodlužuje optická dráha, čímž je umožněna citlivější detekce analytu.

Při druhém způsobu využití optických vláken je část ochranného obalu vlákna odstraněna a přímo na obnažené vlákno je nanesena chemicky citlivá vrstva. Jde o tzv. intrinsické senzory, k detekci analytu dochází na optickém vlákně. Vedení záření optickým vláknem je založeno na totálním odrazu záření na rozhraní dvou látek o různém indexu lomu (rozhraní jádro vlákna/optický izolátor). Při tom se však neodrazí záření zcela, část ho vystupuje z vlákna do určité vzdálenosti jako tzv. evanescentní vlna. Toto záření může interagovat s chemickým prostředím na povrchu optického vlákna. Příkladem využití tohoto typu senzorů je fluorescenční senzor kyslíku, obr. 14.11B. Záření budící fluorescenci je od zdroje (světelné diody, LED) vedeno vláknem k místu detekce, v němž je na povrchu vlákna film komplexu tris(4,7-difenyl-1,10-fenathrolin)ruthenatého imobilizovaného v hydrogelu. Stejným vláknem je vedeno emitované fluorescenční záření k detektoru. V přítomnosti kyslíku dochází ke zhášení fluorescence. Využití jednoho vlákna pro přívod i odvod záření je umožněno tím, že obě záření se liší vlnovými délkami. Pokud by budící záření interferovalo se zářením emitovaným, lze využít varianty uspořádání vláken jako na obr. 14.11C.



Obr. 14.11: Základní principy optických senzorů. Senzor pro stanovení plynů podléhajících protolytickým reakcím ve vodném roztoku (typ extrinsického senzoru) – A, senzor pro stanovení kyslíku pracující na principu zhášení fluorescence (typ intrinsického senzoru) – B, jiná varianta uspořádání optických vláken v senzorech založených na fluorescenci – C, princip optoakustického senzoru – D

Některé konstrukční varianty senzorů s optickými vlákny jsou nazývány optrody – obdoba názvu elektroda, tj. senzoru, který je použit tak, že je jednoduše ponořen do analyzovaného prostředí. Někdy se lze setkat s názvem optoda.

14.7.1 Optoakustické senzory

Mnohé molekuly v plynné fázi mají v infračervené oblasti při vlnových délkách mezi 1 až 15 µm ostré a výrazné absorpční pásy (oblast skeletárních vibrací, tzv. molekulární fingerprint), které jsou využitelné pro selektivní kvalitativní i kvantitativní analýzu optoakustickými (fotoakustických) senzory. Princip je následující: do kyvety s analyzovaným plynem je vysíláno pulsní nebo amlitudově modulované záření (frekvence 10 až 10⁸ Hz) o vlnové délce, kterou stanovovaný plyn absorbuje, obr. 14.11D. Zpravidla se využívá různých typů laserů a z rozměrových důvodů i laserových diod. Absorpcí záření dochází k zahřátí plynu úměrnému absorbované energii a tím ke vzrůstu tlaku v kyvetě. Tlakové změny jsou snímány akustickými detektory, např. elektretovými mikrofony. Moderní mikrofony a vhodná zpracovatelská elektronika dokáží detegovat tlakové změny vyvolané změnou teploty řádově 10⁻⁶ až 10⁻⁷ °C, vysoce citlivými optickými mikrofony až 10⁻⁹ °C. Amplituda akustického signálu je korelována s koncentrací plynu. Vysoké citlivosti je dosahováno použitím fázově citlivé detekce akustických vln (minimalizace signálu pozadí, šumu) a detekčními celami typu akustických rezonátorů. Na rozdíl od standardní absorpční spektroskopie se měří absorbovaná energie, nikoli energie prošlá vzorkem. Lze tedy této metody použít např. i pro detekci plynů v opaleskujících prostředích. Detekční limity při stanovení plynů a par organických látek jsou řádu desetin až jednotek objemových ppb. Citlivé optoakustické detekce je využíváno nejen v tradičních environmentálních aplikacích, ale např. i v medicíně (analýza látek v dechu) či skladování potravin (kontrola stopových koncentrací uvolňovaných plynů).

14.7.2 Detekce plynných látek v otevřeném prostoru – LIDAR

Ve valné většině aplikací uvedených senzorů dochází k detekci v prostoru o malém objemu či dokonce v prostoru zcela uzavřeném. Velice efektivní a do budoucna nepochybně perspektivní metodou sledování plynných látek v prakticky neohraničeném prostoru je tzv. LIDAR (LIght Detection And Ranging). Domnívám se, že zmínka o této detekční metodě je vhodným závěrem textu o chemických senzorech, byť charakter zařízení neodpovídá zcela obecné definici chemického senzoru. Příncip LIDARU je jednoduchý, technické nároky na zařízení, především na rychlost zpracování signálů, jsou však značné. LIDAR vysílá nad sledovanou oblast pulsní laserový paprsek o vlnové délce, kterou absorbuje analyt a měří intenzitu tohoto záření odraženou z atmosféry (od molekul plynů, prachových či aerosolových částic) zpět k přístroji. Intenzita přijatého záření závisí jednak na vzdálenosti, z které bylo záření odraženo a jednak na obsahu absorbujících molekul analytu. Korekce na zeslabení intenzity záření vzdáleností je provedena tak, že souběžně s měřicím zářením je vysíláno záření o vlnové délce, kterou analyt neabsorbuje. Vyhodnocuje se rozdíl intenzit těchto dvou záření v závislosti na vzdálenosti od LIDARU (obr. 14.12). Současná elektronika je schopna zpracovat odražený signál již ze vzdálenosti řádově stovek metrů. Směr vysílaného záření lze měnit v horizontálním i vertikálním směru a získat tak prostorový obraz obsahu analytu nad sledovanou oblastí. Příklady aplikací LIDARU při sledování zamoření atmosféry běžnými polutanty jsou v tab. 14.5.



Obr. 14.12: Schéma použití LIDARU k detekci látek v prostoru (λ_{on} – vlnová délka absorbovaná analytem, λ_{off} – vlnová délka referenčního záření neabsorbovaná analytem).

Zařízení je mobilní, takže je lze umístit na vhodné místo a sledovanou oblast monitorovat dálkově. LIDAR nemusí být umístěn pouze v pozemních zařízeních, stále častěji bývá umístěn např. v letadlech. V kombinaci ze satelitní navigací je tímto způsobem možno získávat přesné obrazy rozložení látek nad rozsáhlými územími.

Polutant	Limit detekce, µg m ⁻³	Rozsah, km
oxid siřičitý	10	3
oxid dusičitý	20	3
oxid dusnatý	3	0,5
ozon	5	3
páry rtuti	0,0002	1
chlor	85	3
toluen	10	2
benzen	10	2

Tab. 14.5: Detekce běžných polutantů metodou LIDAR

Poděkování

Práce vznikla za podpory MŠMT ČR, výzkumný záměr MSM 0021620857.

Literatura

 Sensors. A Comprehensive Survey (W. Göpel, J. Hese, J.N. Zemel Eds.), Vol. 1-3, VCH Publishers Inc., New York 1991.

- [2] Ecyclopedia of Sensors (C.A. Grimes, E.C. Dickey, M.V. Pishko Eds.), Vol. 1-10, American Scientific Publishers, 2006.
- [3] Gas Sensing Probes, F. Opekar, K. Štulík, in Encyclopedia of Analytical Science, Vol. 4, p. 515, 2nd edition, Elsevier 2005.
- [4] Principles of Chemical Sensors, J. Janata, Plenum Press, New York 1989.
- [5] M. Šťastný, M. Kronďák, R. Volf, V. Král, K. Hlávka, M. Hub, Chemické senzory I VII, Automatizace 46 (2003) 405, 464, 533, 624, 690, 758, 826.
- [6] Hazardous Gas Monitors-A Practical Guide to Selection, Operation and Applications, J. Chou, McGraw-Hill, New York, 1999.
- [7] Physics, Chemistry and Technology of Solid State Gas Sensor Devices, A. Mandelis, C. Constantinos, Wiley, 1993.
- [8] Electronic Noses. Principles and Applications, J. W. Gardner, P. N. Bartlett, Oxford University Press, 1999.
- [9] Electrochemical Sensor Analysis (S. Alegret, A. Merkoci, Eds.), Elsevier 2007.

15. USE OF NANOMATERIALS AT CHEMICAL SENSORS

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

15.1 Introduction

Nanotechnology and nanomaterials become more and more popular at construction of devices such as chemical sensors, biosensors, electromechanical and analytical systems, diagnostic instruments, etc. It concerns the use of so-called nanomaterials and enables manipulations on the supramolecular level. Chemical sensors are devices which incorporate a sensing element connected to the transducer. The sensing element is able to recognize an analyte in the sample and chemically or electrochemicaly intereact with analyte. If the sensing element is of biological origin we can speak about the biosensors. The transducer converts the signal of the recognition process into the measurable signal. According to type of the trasducer or measurable signal, the chemical sensors can be classified into electrical/electrochemical, optical, acoustic and thermal.

15.2 What are nanomaterials?

Nanomaterials are characterized by at least one dimension smaller than 100 nm (Fig. 1). Typically they have unique physical and chemical properties because of quantum size, mini size, surface and macro-tunnel effects. Use of nanomaterials in construction of chemical sensors and biosensors allows new signal transduction technologies, improvement of biological component immobilization, simple and rapid analyses with high sensitivity and selectivity as well as analyses *in vivo*. These structures involve, for example, carbon or metal nanotubes, nanoshells, nanofibers, other carbon nanostructures such as fullerenes and diamonds, nanorods and nanowires, nanoscale assemblies, nanoclusters and nanoparticles, as well as nanocomposites.



Fig. 15.1: Comparison of nanomaterial's size

15.3 Types of nanomaterials

15.3.1 Carbon nanotubes

Carbon nanotubes (CNT) were discovered in 1991. Since that time they became very popular in preparation of electrochemical sensors and biosensors because of their unique chemical, physical and electrical properties. CNT are formed from rolled-up graphite sheet consist of carbon hexagons (Fig. 15.2). They can be divided into two groups: single-walled carbon nanotubes (SWNT) consist of one single carbon nanotube (Fig. 15.2a) and multi-walled carbon nanotubes (MWNT) which are formed by several concentric CNT (Fig. 15.2b).



Fig. 15.2: Single-walled and multi-walled carbon nanotubes

According to the angle at which carbon sheet is rolled-up, CNT can have different chirality leading to the differences in conductivity. We can recognize chiral and zig-zag CNT with the semiconducting properties and armchair CNT showing metallic properties (Fig. 15.3). These properties can be affected by doping or functionalization of CNT.



Fig. 15.3: Chirality of carbon nanotubes

CNT are almost insoluble in all solvents. This fact can lead the problem in sensor applications. Strong attractions between carbon atoms are a reason for the aggregation of CNT and the hydrophobic interactions cause that CNT cannot be dispersed in polar solvents such as water or ethanol. Several methods of CNT dispersion were reported:

- a) oxidative acid treatments (refluxing in diluted HNO₃);
- b) non-covalent stabilization in non-polar organic solvents (dimethylformamide (DMF)) using surfactants (sodium dodecyl sulfate (SDS), Nafion) and γ-cyclodextrin;
- c) covalent stabilization (by glucose, DNA, enzymes).

Very often CNT are pretreated with the mineral acids, such as HNO_3 and H_2SO_4 , under reflux or with aid of ultrasonication. During this process CNT become shorter and open and carboxylic groups are introduced into the tips of CNT. Such nanotubes can be successfully dispersed in solvents, such as water, ethanol and acetone. Carboxylic acid groups can be further modified (Fig. 15.4). Side-walls of CNT can be functionalized with different substances.

Because of the biocompatability of CNT, they can be advantageously used at electrochemical biosensors. They can enhance the reactivity of biomolecules, mediate the biorecognition reaction and work as catalysts or signal trasducers. They effectively increase the electrode surface and adsorb the biomolecules such as enzymes or nucleic acids.



Fig. 15.4: Functionalization of carbon nanotubes (DCC – dicyclohexylcarbodiimide)

Electrochemical sensors

The first application of CNT at electrochemical sensors was reported in 1996. Since that time CNT became promising and often used at the preparation of electrochemical sensors and biosensors due to their large ratioof length to diameter leading to a high surface-to-volume ratio. Enhanced electron transfer ability was also observed. CNT have good biocompatability and form an environment suitable for the immobilization of biomolecules. To prepare the CNT modified electrodes, the usual methods of the chemical modification can be used: in the case of bulk modification it is mixing of CNT with the binder liquid, epoxy resin or sol-gel material to prepare the CNT composite while in the case of surface modification usually adsorption, electropolymerization with monomer, cross-linking or covalent binding can be used.

The paste and composite electrodes are very popular for many years because of their simple preparation and use. CNT paste can be prepared by mixing of CNT with the binder liquid such as vaseline, mineral oil, nujol or bromoform. This approach combines the advantages of CNT material

with the attractivity of the carbon paste such as feasibility to incorporate different substances and the low background currents. CNT paste electrodes were reported as stable and robust and they are generaly easily renewable. They showed an excellent electrochemical catalytic properties towards biologically active substances. In contrast to simple carbon paste electrode, the properties of CNT enable to use up to 50 % of mineral oil without any leaking of paste into the solution.

The CNT paste electrodes (CNTPE) exhibit also excellent electrocatalytic properties to biologically active substances such as DNA and others. DNA can be immobilized on the surface of CNTPE by an electrically stimulated adsorption from its solution in acetate buffer. It was shown that CNTPE is a suitable tool for adsorptive stripping measurements of trace levels of nucleic acids and it provides an enhanced signal of guanine oxidation. Moreover, free guanine can be adsorbed at CNTPE under certain conditions at which no adsorption at conventional CPE is observed. The interaction between nucleic acids and CNTPE has mainly hydrophobic character. Another way for immobilizing biomolecules is to mix them directly with the CNT and binder.

Teflon is material suitable for the preparation of CNT composite electrodes. Granular Teflon can be mixed with CNT to give the composite which is put into the electrode tube. It was shown that this combination did not decrease the electrocatalytic properties of CNT. Sol-gel is the method for the preparation of ceramic materials. Sol-gel technology is based on the fabrication of inorganic materials by formation of the colloidal suspension (sol) and gelation of the sol to the form of wet gel, which is then dried to form dry gel. The step of condensation and polycondensation yealds to a polymeric oxo-bridged siloxane network. The resulting electrodes could be simply renewed by polishing the electrode surface.

During the fabrication step the electrochemical mediators and recognition elements can be also incorporated into the composite. In this case, CNT ceramic composite electrode can be prepared by dispersing CNT in the trimethyltrimethoxysilane derived sol-gel solution. CNT are physically entrapped into the network structure therefore their chemical and electrochemical properties are not changed. Such electrode showed a high stability, mechanical rigidity and high electrochemical reactivity and it was used for amperometric determination of nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) and H_2O_2 . Sol-gel material can be also prepared directly on the surface of glassy carbon electrode (GCE) as the composite film. In the preparation of biosensors, two methods of the electrode modification can be used. The surface of the electrode can be modified by simple adsorption of CNT, then enzyme mixed with the sol solution can be added as further layer. Another way is to mix CNT and enzyme with the sol solution and put it onto the surface of electrode.

Very often, pre-treated CNT (using mineral acids or ultrasonication) in the form of dispersion in DMF, dihexadecyl-hydrogen-phosphate (DHP) or other dispersion agents are simply casted onto the surface of GCE, CPE or metal electrode to form CNT film. Solvent is then evaporated. Such sensors show a stable electrochemical behaviour and could be used to catalyze the electrochemical reaction of biomolecules (dopamine, epinephrine, ascorbic acid, cytochrome c), fast response, excellent reproducibility, long stability and low detection limits also for trace metals (mercury, lead, cadmium) and toxic compounds (H₂S, NO, nitrophenols). They are very popular because of simple preparation. CNT can also serve as the nanoreactors and they can be filled with metalic, inorganic or organic materials. The presence of any molecule filled will affect the properties and the further applications of the modified CNT. For example, MWNT filled with toluene were dispersed in ethanol. Suspension was then silmply casted onto the surface of Au electrode and dried on air. It was found that the toluene-filled carbon nanotubes can catalyze the electrochemical response of some biomolecules such as dopamine and epinephrine while empty nanotubes do not.

One of the most frequently used methods of CNT immobilization on the electrode surface is self-assembling. This method enables to functionalise electrode surface easily by forming a highly organized and well-defined monolayer film. In general, the self-assembled monolayers (SAM) are organic assemblies formed by the adsorption of molecular constituents from solution or the gas phase onto the surface of metal electrodes; the adsorbates organize spontaneously into the crystalline structures. The molecules or ligands that form the SAM have a chemical functionality or "headgroup" with a specific affinity for a substrate; in many cases, the headgroup also has a high affinity for the surface and displaces adsorbed adventitious organic materials from the surface. The flexibility to design different head groups of monolayers by large numbers of electroactive or electroinactive functional groups makes this method useful also for the preparation of biosensors. In case of CNT one end of nanotube is first termined with thiol groups (disulphides, amines, silanes are also suitable). Then modified CNT are self-assembled onto Au surface via Au-S bonds. Second end of CNT can be then modified with biomolecule to produce biosensor. The big advantage of this method is in the obtaining of well-ordered CNT surface (Fig. 15.5).



Fig. 15.5: Highly ordered self-assembled carbon nanotubes

Very often a self-assembling method serves for the preparation of DNA modified CNT biosensors. Two ways of preparation can be used: CNT are first self-assembled, then DNA is covalently attached into unbonded end of CNT or DNA is covalently attached onto CNT, this product is then self-assembled via CNT onto the electrode surface. Self-assembling of CNT can be also mediated with DNA as a linker. In this case, the ends of CNT are functionalized with single-stranded DNA (ssDNA). Electrode surface is modified with complementary ssDNA. Then hybridization event is allowed to self-assembling CNT via DNA.

Polymer matrix was also reported as good way to disperse CNT, therefore it was used to prepare CNT composite or polymeric film. The unique properties of CNT can be then coupled with the properties of polymeric matrix. The mostly used polymers are polypyrrole, polyaniline and

 β -cyclodextrin. Polypyrrole and polyaniline are conducting polymers and they can be prepared by electropolymerization. CNT can be incorporated in the polymer film during the electropolymerization step. Resulted polymeric material shows enhanced electrocatalytic activity, conductivity as well as charge density. The advantage of electropolymerized films is in their uniformity and possibility to control the thickness and morphology of the film by applied current or potential. An electropolymerization of the polymer in solution contained catalyst (ferrocyanide, ruthenium complexes, copper complexes) enables an incorporating catalyst into the polymeric film.

The polyppyrole (ppy) film can be deposited from neutral pH and one of its attractive features is good conductivity and the contribution to a sufficient stability of the biosensors. Ppy film doped with CNT can be prepared by several cyclic voltammetric scans in the range from 0 V to 0.7 or 0.9 V or by holding constant potential around 0.7 V for given time directly in the solution contained certain amount of pyrrole monomer and CNT. There are also many applications of ppy at CNT biosensors. Two approaches were used: the surface of the electrode was modified with a suspension of CNT functionalized with carboxylic groups, then the ppy film doped with biomolecule was formed using electropolymerization from the solution containing pyrrole and biomolecule. In the second case, the ppy film doped with CNT was prepared on the surface of the electrode by the electropolymerization from the solution contained pyrrole and CNT. The film was covered with the biomolecules to form the biosensor.

Similarly to ppy, polyaniline (pani) is also favourable polymer because of its electrochemical properties and formation of environment suitable for immobilization of biomolecules. pani can also act as a mediator for enzyme electrodes, where pani undergoes redox cycling and can couple electrons directly from the enzyme active site to the electrode surface.

Cyclodextrins (CD) can effectively enhance the dispersion of CNTs and immobilize them by an entrapment within the polymer. The ability of CD to form supramolecular complexes is well known. They can serve as efficient molecular receptors. The composit which containes CD and CNT offers the advantages of both mentioned materials. The complexes between CD and CNT were studied using NMR and Raman spectroscopy. The evidence of an intermolecular interaction between γ -CD and SWNT was found and it was shown that SWNTs can be solubilized by threading with large-ring CD (η -CD).

Many applications of the CD/CNT film coated electrodes for the determination of biological and other organic molecules such as dopamine and epinephrine, thymine, dopamine, rutine and DNA were reported. It was also shown that β -CD at the electrode surface can act as a filter mambrane. CD can serve in two positions: the dispersion of CNT and the preconcentration of determined molecules by a forming the supramolecular complexes. Sensors are prepared usually by casting CNT suspension in CD onto the surface of electrode and evaporated to dry.

Chitosan is the cationic polymer which has been extensively studied for many purposes because of its biocompatability, biodegradability, multiple functional groups and solubility in aqueous medium. When mixed with CNT, chitosan can seve as effective dispersion agent while CNT enhance the mechanical and electrochemical properties of chitosan. It also forms a suitable environment for further simple modification and efficient immobilisation of biomolecules. For example, DNA is effectively immobilized on the polycationic polymer film of chitosan by means of electrostatic attractions and a non-specific DNA adsorption can be avoided using high ionic strength. Chitosan – MWNT solution was spread uniformly on the surface of the graphite electrode and evaporated to dry. Then, DNA was immobilized on the surface of modified electrode by simple adsorption from its solution. As a cationic polymer, chitosan can adsorb anionic chemicals such as CNTs containing carboxylic groups. Therefore, CNTs could be dispersed uniformly in aqueous solution of chitosan and the stability of the CNT solution is enhanced.

The formation of DNA/chitosan-CNT film was indicated using the $[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$ redox couple. In case of enzyme biosensor when the CNT-chitosan film was casted onto the glassy carbon electrode surface, the oxidation potential of NADH decreased greatly. Furthermore, the enzyme glucose dehydrogenease was immobilized onto the electrode surface with amino groups of chitosan through cross-linking with glutaric dialdehyde. The resulting biosensor showed high sensitivity and good operational stability.

A powder microelectrode can easily be prepared by etching the tip of a conventional Pt microdisk electrode in aqua regia so that a microcavity is formed at the tip. Then the microcavity is packed with powder by grinding the etched tip on the surface of a flat plate (such as glass) and lightly spraying it with the powder of interest. The powder can be removed easily after the experiments and the cavity cleaned by sonication. The advantage is that no binder is needed for the preparation of the electrode, which is therefore simple and can prevent impurities. CNT powder electrode can be prepared by filling the cavity with the powder of CNT. Such electrodes can be used for the detection of inorganic compounds (nitrite, hydrazine) or for the study of electrochemical properties of organic molecules (cysteine, horseradish peroxidase).

To modify the properties of CNTs, they can be doped with various materials, for example metal nanoparticles, redox mediators, and polymers. Such conjugates offer the combination of the properties of both materials used resulting in a synergic effect. For example, DNA was imobilized on the electrode modified with a MWNT/nanoporous ZrO₂/chitosan composite film to form the DNA biosensor. It was shown that nanoporous ZrO₂ and MWNTs have a synergic effect on the redox behavior of daunomycine. Because of effectively enlarged surface area and good charge-transport characteristics, an increased ssDNA loading quantity and enhanced detection sensitivity for the DNA hybridization were observed.

CNTs can be also used as a carrier of the nanoparticle tracer such as CdS quantum dots and Pt nanoparticles at the detection of DNA hybridization. MWNT suspension was mixed with the Pt solution and the resulted mixture was casted onto the surface of glassy carbon electrode. After drying, the electrode was incubated in DNA solution to immobilize the DNA probe. Electrochemical properties of the modified electrode were studied using cyclic voltammetry. The results indicated larger effective surface of MWNT/Pt modified electrode than that of Pt or MWNT modified electrodes. High selectivity of the MWNT/Pt based hybridization assay was also observed.

Optical sensors

Although the CNT are mostly used in electrochemical sensors, several application at optical sensors can be also found. They have unique fluorescent properties and show good photostability. SWNT-based optical biosensors can be more sensitive owing to their increased scattering from adsorbates. It is neccessary to functionalize SWNT with ligand specificity before using them in biosensors. For this purposes, non-covalent binding is required because side-wall covalent functionalization diminishes the optical properties of SWNT.

SWNT have to be also suspended as individuals to maintain the fluorescence. For example, SWNT are suspended with glucose oxidase and side-walls are irreversibly functionalized by adsor-

bed ferricyanide. Glucose react with glucose oxidase around SWNT. Generated H_2O_2 reduces ferricyanide. The reduction transfers the electrons back to the nanotube leading to increased fluorescence. These experiments suggest that fluorescent biosensors based on SWNT can be miniaturized and applied *in vivo* soon.

The SWNT fluorescence sensor is a promissed tool which serves as multi-analyte sensor. It is necessary to separate the SWNT according to their chirality or type and then functionalize them selectively by an appropriate enzyme. It was found that the emision from SWNT red shifts when surrounded by enzymes. Therefore, if various enzymes result in distinguishable shifts in fluorescence, it could be possible to monitor each analyte by monitoring the intensity of the shifted fluorescence spectra. Results show that CNT are good alternative for optical sensors in cases where traditional dyes suffer from bleaching, degradation and toxicity problems. Monitoring of changes in the CNT fluorescence can be also used for the detection of DNA conformation polymorphism, DNA hybridization and blood glucose *in vivo*.

15.3.2 Nanoparticles and quantum dots

Nanoparticles (NP) are clusters of a few houndred to a few thousand atoms that are only a few nanometers long. Because of their nano-size they can behave electronically as zero-dimensional quantum dots with discrete energy levels that can be tuned in a controlled way by synthesizing NP of different diameters. NP can be used for many bioanalytical purposes. They can improve the specific activity of a label as well as affinity to the tracer molecules such as nucleic acids. Nanosized particles can behave similarly to small molecules and can be used as specific electrochemical or optical labels. NP can be synthetized from various materials. Metallic gold and silver are the most used materials for the preparation of nanoparticles. Gold nanoparticles (GNP) can be prepared electrochemically or non-electrochemically via chemical reduction (usually reduction of Au(III) from HAuCl₄.3H₂O to Au(0) using NaBH₄) which often produces colloidal gold. Colloidal gold consists of octahedral units of gold homogeneously dispersed in the liquid phase. GNP can be modified with the biomolecules such as oligonucleotides or proteins. The attachment of oligonucleotides to the surface of the GNP can be performed by simple adsorption or via biotin-avidin linkage, where avidin is previously adsorbed onto GNP surface. Another method is attachment via thiol-gold bonds. Thiol-functionalized oligonucleotides stick strongly to the gold surface. This bonds are much more stronger and efficient than simple adsorption.

Quantum dots (QD) are also nanostructured materials known as zero-dimensional material. A quantum dot is a location that can contain a single electrical charge, single electron. The presence or absence of electron changes the properties of QD and they can be then used for several purposes, such as information storage or transducers in sensors. They are semiconductor nanocrystals roughly spherical in shape with the diameter of 1-12 nm. Because of such reduced sizes QD behave differently from bulk solids due to quantum-confinement effects which are responsible for their remarkable attractive properties. Due to the availability of precursors and the simplicity of crystalization, CdS and CdSe are usually used for the preparation of QD. QD can be prepared several methods based on pattern formation (colloidal self-assembled pattern formation by surfactant micellation), organometallic thermolysis or electrochemical deposition. QD can be modified with DNA or proteins by simple adsorption, linkage via thiol groups, electrostatic interaction and covalent linkage via streptavidin-biotin bonds.

Electrochemical sensors

In electrochemical devices, NP can be used for various purposes. Because of their ultrahigh surface area they can enhance the amount of the immobilized biomolecule and lead to lowering of detection limits. They can catalyze biochemical reactions and improve the electron transfer. In many cases they are used as electrochemical labels. By the modification of gold with DNA, a significant stabilization of the gold colloid was observed, which represents a prerequisite for further biochemical and/or molecular-biological manipulations.

Electrochemical DNA hybridization biosensor based on bind event between Escherichia coli ssDNA binding protein (SSB) and ssDNA conjugated to GNP was prepared. The recognition ability of SSB and electrochemical properties of GNP, streptavidin-coated beads and biotin-modified CPE were studied and a specific discrimination of streptavidin-coated beads towards mismatched and non-complementary DNA sequences was observed. GNP enabled lowering of the detection limits down to 2.17×10^{-12} mol L⁻¹.

The interaction between the DNA and $[Co(phen)_3]^{3+}$ is affected by GNP. To invesitgate this effect GNP of different size were assembled onto the surface of gold disk electrodes through dithiols molecule and the DNA biosensor was prepared by casting the DNA solution onto GNP modified surface. It was found that the concentration of DNA adsorbed on the electrode surface depends on the GNP size. The DNA biosensor was tested in aqueous solution as well as non-aqueous environment containing acetonitrile and well developed redox peaks of $[Co(phen)_3]^{3+}$ were obtained in both media. With increasing the GNP size a decrease in the concentration of DNA adsorbed on GNP modified surface as well as in the redox currents of $[Co(phen)_3]^{3+}$ were observed.

DNA hybridization biosensor was prepared by the immobilization of target DNA onto colloid GNP self-assembled on the cysteamine monolayer modified gold electrode. GNP significantly enlarged the electrode surface as well as the amount of the immobilized ssDNA. Oligonucleotide probe was modified with silver nanoparticles which were released after the hybridization process. The electrochemical signal of solubilized Ag(I) in the case of one complementary oligonucleotide sequences was much more higher than that at oligonucleotide sequences contained the single-base mismatch. An anodic stripping voltammetric determination offered the detection of target nucleotide down to 5×10^{-12} mol L⁻¹.

The target ssDNA was immobilized on the surface of GCE by the formation of stable electrostatic complex with chitosan. Hybridization reaction was performed by immersing the prepared biosensor into the medium of GNP modified DNA probe. After the hybridization, the electrochemical signal of GNP was enhanced by their modification with the silver particles. The biosensor was successfully applied to the recognition of an oligonucleotide sequence from the target with single nucleotide mismathes. Electrodeposited DNA membrane doped with GNP was prepared on the surface of GCE. Catalytic activity of this biosensor towards the oxidation of norepinephrine (NE) was found and the biosensor was used for the determination of NE in presence of ascorbic acid.

GCE modified with poly-2,6-pyridinecarboxylic acid film was further modified with GNP by a combination of the electrodeposition and adsorption of nanogold. Then, the ssDNA probe was immobilized onto the modified electrode by adsorption from its solution and the hybridization process was detected using electrochemical impedance spectroscopy. The difference in the surface electron transfer resistance in $[Fe(CN)_6]^{3/4-}$ solution measured on the DNA probe biosensor and

that on the hybridized electrode was used for the evaluation. It was found that the hybridization of DNA probe with the complementary DNA rapidly increased the surface electron transfer resistance and the prepared biosensor was used to determine sequence-specific phosphinothricin acetyltransferase gene with the detection limit of 2.4×10^{-11} mol L⁻¹.

An electrical DNA hybridization device based on gold nanoparticles attached to oligonucleotide probes and closely-spaced interdigitated electrodes was reported. The oligonucleotide probe was attached in the gap between two microelectrodes, and the hybridization of target DNA and the second nanoparticle-coupled probe brought the gold nanoparticles into the gap. Follow-up silver deposition resulted in a conductivity signal only when the DNA hybridization took place.



Fig. 15.6: Multiplexed electrochemical analysis using QD

QD can act, similarly to GNP, as labels for the detection of DNA hybridization. For example QD of PbS and ZnS enable electrochemical stripping detection of DNA with detection limits in subpicomolar level. For example, by attaching PbS, CdS and ZnS to various detection probe sequences and subsequently stripping the labels at various potentials, the defferent target sequences can be detected and quantified (Fig. 15.6). Similarly multiplexed immunoassay of proteins with measurements of different antigens can be performed.

QD labels can be advantageously used in electrochemical impedance spectroscopic detection. It is baced on the detection of change in the electron transfer resistance between the electrode and the redox marker in the solution. The resistance increases upon the hybridization. Whe CdS particles were used to label the target DNA, resistance increase was aplified up to 100 times. As the labels for DNA detection SWNT carrying the large number of CdS QD can be also used.
Optical sensors

GNP can be used for DNA detection also in optical devices. For this purposes GNP are modified with oligonucleotide detection probes and introduced into the solution of the single-stranded target oligonucleotide. A polymeric network of GNP is formed and a color change is detected with the detection limits down to 10 nM. The sensitivity of colorimetric detection can be improved by catalytic deposition of Ag on GNP labels. In this case detection limit is lowered to fmol L^{-1} (100 times more sensitive than the fluorophore-based system). GNP can be used as universal fluorescence quenchers to develop an optical biosensor for recognizing and detecting the specific DNA sequences. Attached to GNP were oligonucleotide molecules labeled with a thiol group at one end and a fluorophore at the other end. It was found that such hybrid spontaneously assembled into a constrained arch-like conformation on the nanoparticle surface. Binding of the target molecules resulted in the conformation change and this restored the florescence of the quenched fluorophore. Such biosensor was able to detect a single-base mutation in a homogenous format. Changes in absorbance spectrum of colloidal gold monolayer when bound to biomoleculer allow the real-time measurement of the binding events using label-free optical sensor.

QD show attractive luminescent and fluorescent properties. The luminescence of QD is very sensitive to the surface states of the QD. It can be used for optical sensing of small molecules and ions. For example, the addition of Cd ions into the basic aqueous solution containing unpassivated CdS QD resulted in enhancment of the luminescence quantum yeald of nanoparticles without detectable changes in particle sizes. A similar photoluminescent-activation effect was also induced after adding Zn and Mn ions into CdS or ZnS QD. This behaviour provided the basis for optical sensing of metallic cations with QD. Besides the activation effect, QD-based optical sensing quanchis strategies can be also used. The luminescent deactivation of water-soluble CdS QD with respect to several cations (Zn, Cu) was affected by three different ligands (cysteine, thioglycerol, polyphosphate). The photoluminescence quenching of the CdSe-ZnS QD modified with bovine serum albumin was also invesitgated for the determination of copper. QD have been also used as inorganic, non-specific, DNA-binding proteins that act as luminescent labels for different applications. Fluorescence quenching of water-soluble CdSe QD, surface modified with mercaptoacetic acid, has also been used to develop a fluorescence probe for rapid, sensitive determination of DNA in a neutral medium.

QD have been also used for measurements by surface plasmon resonance (SPR). Redox transformations occuring on the chemically modified surfaces may significantly alter the refractive index of the interface and thus induce changes in the plasmon angle of the SPR spectra. This approach was used in the design of SPR sensor for acetylcholine esterase inhibitors.

15.3.3 Fullerenes, diamonds and nanofibers

Fullerene and its derivatives represent the class of carbon materials starting to be interesting in many fields of science. The biological properties and activity of fullerenes and their derivatives, such as DNA cleavage, anti-viral activity, electron-transfer, are well known and highlighted. Till now, the analytical applications of fullerenes are not so common. Their unique structure and properties, similarly to CNTs, make them attractive for using as sorbents or chromatographic stacionary phase. To develop chemically modified sensors and biosensors, the deposition of fullerenes on various substrates could be also of interest regarding a decrease of the resistivity of

the electrode material. Fullerenes are closed-cage carbon molecules with pentagonal or hexagonal rings (Fig. 15.7).



Fig. 15.7: Fullerene, C₆₀

They have attractive electrocatalytic properties. It is known that the presence of fullerenes improves the electrochemical properties of the film or membrane by reducing the resistivity. Fullerene modified electrodes are also promising way in the fullerene application. They can be used as electron transfer mediators in the biosensors. C_{60} : γ -CD was found to mediate the electron transfer to DNA showing two-way activity toward DNA. In this case, the glassy carbon electrode was modified with complex C_{60} : γ -CD by simple adsorption. As the mentioned complex was soluble in water, the modified surface was covered with Nafion to prevent leaching the C_{60} : γ -CD layer. Such an electrode had good stability and reproducibility. It was shown that in the absence of C_{60} no redox wave corresponding to DNA was found.

The interaction between C_{60} derivatives and DNA was investigated by using DNA modified gold electrode. As the C_{60} derivative is non-electroactive, the $[Co(phen)_3]^{3+/2+}$ redox pair was used as an electroactive indicator for a study of this interaction. Kinetics of binding and dissociation were studied by using cyclic voltammetry.

ITO electrode was used to study C_{60} -derivative/porphyrin/DNA complex deposited on the electrode surface by polymerization of 3,4-ethylenedioxythiophene. A porphyrine derivative was shown to bind to DNA as in intercalator. It was shown that both fullerene and porphyrine derivatives were entrapped by the DNA scaffold. The DNA modified electrode was used for the electrochemical detection of 16S rDNA extracted from *Escherichia coli*. The DNA probe was immobilized onto fullerene impregnated screen-printed electrode which was first activated by exposure to air plasma. Good enhancement of the signal of $[Co(phen)_3]^{3+}$ due to the incorporation of fullerene was observed. The DNA biosensor was able to detect target oligonucleotide also in the presence of mismatching oligonucleotides.

Optical properties of the fullerene have been applied to the development of the sensitive oxygen-sensing system based on the quenching of the photoexcited triplet state of the fullerene molecules. Fullerene can be used as an indicator because its thermaly stable films with polymers (polystyrene) and possesses useful photochemical properties such as a fairly long lifetime for the photoexcited triplet state (cca 100 μ s). The lifetime is effectively quenched by the oxygen and decreased with the oxygen concentration. In recent years different piezoelectric quartz crystal membrane sensors based on fullerene were developed to detect organic as well as inorganic compounds or biological species.

Diamond (Fig. 15.8) is known as a superhard material. However, similarly to carbon materials mentioned above, it has also unique electrochemical, physicochemical and optical properties interesting for the preparation of chemical sensors.



Fig. 15.8: Structure of diamond

The basic electrochemical properties of diamond films at the electrodes were studied by electrochemical and impedance spectroscopy measurements. To enhance its properties, diamond is usually doped with an acceptor, such as boron. Boron-doped diamond electrode (BDDE) provides greater reversibility of the electrochemical reaction than glassy carbon electrode (GCE) and pyrrolitic graphite electrode (PGE) and can be used for the electrochemical oxidation of 4-nitrophenol. An investigation of ferrocyanide redox behavior has shown that the charge-transfer resistance and capacitive currents of BDDE are lower than those of GCE and PGE. With the BDDE electrode, the best detection limit, repeatability and reproducibility were also obtained.

As the diamond has a good biocompatability, its surface can be modified with biomolecules. The covalent immobilization of DNA on diamond was investigated using diffuse reflectance infrared spectroscopy. Several studies utilized X-ray photoelectron spectroscopy and impedance spectroscopy to investigate DNA modified diamond thin films. High stability and sensitivity of the DNA modified diamond as well as properties usefull for the detection of DNA hybridization event were observed. Chemical vapor deposition (CVD) diamond chips were covered with DNA using a solidification technique which enables DNA bound vertically to the substrate. It was shown that the amount of oligonucleotide on the CVD diamond chip was higher than that on the silicon chip. The results obtained are usefull for developing a microarray type of DNA chip for the DNA diagnostic.

DNA hybridization biosensor based on the BDD film was prepared on a Si substrate and covered by electropolymerization with a thin layer of polyaniline/poly(acrylic acid) composite. The DNA probe was immobilized by incubation of the sensor in DNA solution. It was found that carboxylic groups in the polymeric film can act as active sites for covalent binding of the DNA probe. Non-specific adsorption of DNA onto polymeric film was not observed. The DNA biosensor showed an appropriate stability and selectivity to DNA sensing. The BDD film electrode with low

background current was used to study the electrochemical behavior of native and thermally denatured fish DNA. Two well-defined peaks corresponding to oxidation of guanine and adenine residues were observed on the cycling voltammogram of thermaly denatured DNA. It was found that in the presence of cytosine, the guanine peak decreases indicating an interaction of cytosine with denatured DNA via hydrogen bonds. It was also shown that cationic porphyrins can stabilize the denatured DNA by intercalation and ionic interactions.

Aminophenyl-modified BDD electrode was covered with cross linker and thiol-modified DNA oligonucleotide probe. The presence of DNA probe was confirmed by the DNA hybridization using fluorescein-labeled complementary/non-complementary target DNA oligonucleotides. Electrochemical AFM measurements were used to characterize DNA functionalized and hybridized surfaces and to show that closed and dense DNA films were obtained. The BDD electrode was also used as HPLC detector for the detection of purine and pyrimidine. Well-defined oxidation peaks of cytosine and thymine were observed due to a wide potential window of the BDD electrode. Low detection limits and high sensitivity and stability were also reported. The electrode was successfully applied to the determination of 5-methylcytosine in the DNA sample after HPLC analysis. Sufficient recoveries around 95 % and good reproducibility were obtained. Diamond can be also advantageously employed in surface acoustic wave devices, piezoelectric and optical sensors.

Carbon nanofibers are another form of intensively studied carbon materials. They are cylindric nanostructures formed of graphene layers arranged as stacked cones, cups or plates (Fig. 15.9). The length of carbon nanofibers ranges in order of μ m and their diameter varies between tens of nm up to 200 nm. They are attractive materials for the catalysis. Unusual electrochemical properties make them interesting as a novel electrode material for electrochemical applications. Vertically aligned carbon nanofibers are shown to be also useful for applications in chemical sensors and biosensors. Several utilizations in enzyme and DNA biosensors can be also found. Nanofibers surface was modified with amino groups to bind thiol-modified DNA probe. The biosensor was used to recognize the fluorescently labeled targed DNA complementary to immobilized probe.



Fig. 15.9: Carbon nanofiber

Vertically aligned carbon nanofibers were covalently modified with DNA using photochemical and chemical method. An excellent specificity and reversibility were observed in recognizing complementary and non-complementary sequences. It was found that carbon nanofibers possess an enhanced surface area. They also shown approximately eight times higher amount of hybridized DNA in comparison with glassy carbon electrode. Vertically aligned carbon nanofibers were also modified with DNA through carboxylic groups on nanofibers and used for a direct physical introduction and expression of exogenous genes in mammalian cells. Transcriptional accessibility of DNA was investigated using polymerase chain reaction and *in-vitro* transcription.

15.4 Conclusions

Development of sensors is the subject of permanent interest. Employing of the nanotechnology and nanomaterials in the construction of chemical sensors possesses new possibilities of controlling the properties of transducers, matrices for immobilization of biomolecules, redox mediators, markers, indicators, etc. and leads to lowering the detection limits. Nanomaterials are also of interest for miniaturization of the sensors and preparation of nanoelectrode arrays and offer new environmental, biomedical and *in vivo* applications.

References

What are nanomaterials?

- C. Jianrong, M. Yuqing, H. Nongyue et al., Nanotechnology and biosensors, Biotechnology Adv. 22 (2004) 505.
- J. Riu, A. Maroto, F. X. Rius, Nanosensors in environmental analysis, Talanta 69 (2006) 288.
- A. Vaseashta, D. Dimova-Malinovska, Nanostructured and nanoscale devices, sensors and detectors, Sci. Technol. Adv. Mater. 6 (2005) 312.
- L. He, C. S. Toh, Recent advances in analytical chemistry A material approach, Anal. Chim. Acta 556 (2006) 1.
- E. Thostenson, C. Li, T. W. Chou, Nanocomposites in context, Compos. Sci. Technol. 65 (2005) 491.

Carbon nanotubes

S. Iijima, Helical microtubules of graphitic carbon, Nature 354 (1991) 56.

- M. Trojanowicz, Analytical applications of carbon nanotubes: a review, Trends Anal. Chem. 25 (2006) 480.
- M. Valcarcel, B. M. Simonet, S. Cardenas et al., Present and future applications of carbon nanotubes to analytical chemistry, Anal. Bioanal. Chem. 382 (1005) 1783.
- S. K. Smart, A. I. Cassady, G. Q. Lu, D. J. Martin, The biocompatability of carbon nanotubes, Carbon 44 (2006) 1034.
- S. Daniel, T. P. Rao, K. S. Rao et al., A review of DNA functionalized/grafted carbon nanotubes and their characterization, Sens. Actuat.122 (2007) 672.
- P. He, Y. Xu, Y. Fang, Applications of carbon nanotubes in electrochemical DNA biosensors, Microchim. Acta 152 (2006) 175.
- L. Vaisman, H. D. Wagner, G. Marom, The role of surfactants in dispersion of carbon nanotubes, Adv. Colloid Interface Sci. 128-130 (2006) 37.
- M. Paradise, T. Goswami, Carbon nanotubes Production and industrial applications, Mater. Design 28 (2007) 1477.
- P. Liu, Modifications of carbon nanotubes with polymers, Eur. Polym. J. 41 (2005) 2693.
- J. J. Gooding, Nanostructuring electrodes with carbon nanotubes: A review on electrochemistry and applications for sensing, Electrochim. Acta 50 (2005) 3049.
- J. Wang, Carbon-nanotube based electrochemical biosensors: A review, Electroanalysis 17 (2005) 7.
- Q. Zhao, Z. Gan, Q. Zhuang, Electrochemical sensors based on carbon nanotubes, Electroanalysis 14 (2002) 1609.

- E. T. Thostenson, Z. Ren, T. W. Chou, Advances in the science and technology of carbon nanotubes and their composites: a review, Compos. Sci. Technol. 61 (2001) 1899.
- K. J. Ziegler, Developing implantable optical biosensors, Trends Biotechnol. 23 (2005) 440.
- J. Zhao, X. Chen, J. R. H. Xie, Optical properties and photonic devices of doped carbon nanotubes, Anal. Chim. Acta 568 (2006) 161.

Nanoparticles and quantum dots

- I. M. Hsing, Y. Xu, W. Zhao, Micro- and nano- magnetic particles for applications in biosensing, Electroanalysis, in press.
- I. Willner, B. Willner, Functional nanoparticle architectures for sensoric, optoelectronic, and bioelectronic applications, Pure Appl. Chem. 74 (2002) 1773.
- S. G. Penn, L. He, M. J. Natan, Nanoparticles for bioanalysis, Curr. Opin. Chem. Biol. 7 (2003) 609.
- N. C. Tansil, Z. Gao, Nanoparticles in biomolecular detection, Nanotoday 1 (2006) 28.
- I. Willner, R. Baron, B. Willner, Integrated nanoparticle-biomolecule systems for biosensing and bioelectronics, Biosens. Bioelectronics 22 (2007) 1841.
- J. Wang, Nanoparticle-based electrochemical DNA detection, Anal. Chim. Acta 500 (2003) 247.
- A. Merkoci, M. Aldavert, S. Marin, S. Alegret, New materials for electrochemical sensing V: Nanoparticles for DNA labeling, Trends Anal. Chem. 24 (2005) 341.
- M. Seydack, Nanoparticle labels in immunosensing using optical detection methods, Biosens. Bioelectronics 20 (2005) 2454.
- J. Shi, Y. Zhu, X. Zhang et al., Recent developments in nanomaterial optical sensors, Trends Anal. Chem. 23 (2004) 351.
- J. M. Costa-Fernandez, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, The use of luminescent quantum dots for optical sensing, Trends Anal. Chem. 25 (2006) 207.

Fullerenes, diamonds and nanofibers

- J. R. Baena, M. Gallego, M. Valcarcel, Fullerenes in the analytical sciences, Trends Anal. Chem. 21 (2002) 187.
- B. S. Sherigara, W. Kutner, F. D'Souza, Electrocatalytic properties and sensor applications of fullerenes and carbon nanotubes, Electrocanalysis 15 (2003) 753.
- K. Winkler, A. L. Balch, W. Kutner, Electrochemically formed fullerene-based polymeric films, J. Solid State Electrochem. 10 (2006) 761.
- A. W. Jensen, S. R. Wilson, D. I. Schuster, Biological applications of fullerenes, Bioorg. Med. Chem. 4 (1996) 767.
- S. Bosi, T. Da Ros, G. Spalluto et al., Fullerene derivatives: an attractive tool for biological applications, Eur. J. Med. Chem. 38 (2003) 913.
- Y. V. Pleskov, Electrochemistry of diamond: A review, Russ. J. Electrochem. 38 (2002) 1275.
- V. A. Pedrosa, H. B. Suffredini, L. Codognoto et al., Carbon surfaces for electroanalytical applications: A comparative study, Anal. Letters 38 (2005) 1115.