



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

## ÚSTAV MIKROELEKTRONIKY

DEPARTMENT OF MICROELECTRONICS

## ELEKTROCHEMICKÝ BIOSENZOR PRO DETEKCI GLUKÓZY

ELECTROCHEMICAL BIOSENSOR FOR GLUCOSE DETECTION

### DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

### AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Tomáš Matula

### VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Jan Prášek, Ph.D.

BRNO 2016



# Diplomová práce

magisterský navazující studijní obor **Mikroelektronika**  
Ústav mikroelektroniky

**Student:** Bc. Tomáš Matula

**ID:** 146900

**Ročník:** 2

**Akademický rok:** 2015/16

**NÁZEV TÉMATU:**

## Elektrochemický biosenzor pro detekci glukózy

**POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:**

Seznamte se s technologií tlustých vrstev v oblasti elektrochemických senzorů a biosenzorů. Prostudujte možnosti elektrochemické detekce glukózy s využitím biosenzorů. Na základě získaných znalostí připravte vhodnou modifikaci stávajícího tlustovrstvého senzoru biosenzor a proveďte na něm detekci glukózy. Zaměřte se i na možné interferující látky a ověřte jejich vliv na detekci. Získané výsledky vyhodnoťte a porovnejte s výsledky udávanými v literatuře.

**DOPORUČENÁ LITERATURA:**

Podle pokynů vedoucího práce

**Termín zadání:** 8.2.2016

**Termín odevzdání:** 26.5.2016

**Vedoucí práce:** Ing. Jan Prášek, Ph.D.

**Konzultant diplomové práce:**

**doc. Ing. Lukáš Fucík, Ph.D., předseda oborové rady**

**UPOZORNĚNÍ:**

Autor diplomové práce nesmí při vytváření diplomové práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

# Abstrakt

Táto diplomová práca sa zaoberá elektrochemickým biosenzorom pre detekciu glukózy. Teoretická časť sa práce zaoberá technológiou hrubých vrstiev, jej nanášaním a výpalom. Ďalej je popísaná elektrochémia, elektródy používané v elektrochémií a analytické metódy založené na elektrochemickej reakcii. Záver teoretickej časti sa venuje elektrochemickým biosenzorom pre detekciu glukózy pomocou špeciálnych elektród na báze enzýmu glukóza oxidáza. V experimentálnej časti je spracované ampérometrické meranie pre detekciu glukózy pomocou tlačných senzorov S10 a S8 s imobilizovaným enzýmom glukóza oxidáza. Ďalej bol sledovaný vplyv plazmy, rozpusteného chloridu draselného, skladovania, kyseliny askorbovej a reprodukovateľnosť senzorov.

## Kľúčové slová

Tlačný senzor, biosenzor, elektrochémia, elektródy, glukóza

## Abstract

This thesis pays attention to electrochemical sensors for the detection of glucose. The theoretical part deals with the technology of thick film, their application and firing. It is further described electrochemistry, electrodes used in electrochemistry and analytical methods based on electrochemical reaction. End of theoretical part deals with electrochemical biosensors for detection glucose using special electrodes based on enzyme glucose oxidase. In the experimental part is processed amperometric measure for detection glucose using screen-printed sensors S10 and S8 with immobilized enzyme glucose oxidase. Next was studied effect of plasma, dissolved potassium chloride, storage, ascorbic acid and the reproducibility of the sensors.

## Keywords

Screen-printed sensor, biosensor, electrochemistry, electrode, glucose

## Bibliografická citácia

MATULA, T. *Elektrochemický biosenzor pro detekci glukózy*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2016. 54 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Jan Prášek, Ph.D.

## Prehlásenie

Prehlasujem, že svoju diplomovú prácu na téma „**Elektrochemický biosenzor pro detekci glukózy**“ som vypracoval samostatne pod vedením vedúceho diplomovej práce a s použitím odbornej literatúry a ďalších informačných zdrojov, ktoré sú všetky citované v práci a uvedené v zoznamu literatúry na konci práce.

Ako autor uvedenej diplomovej práce ďalej prehlasujem, že v súvislosti s vytvorením tohoto projektu som neporušil autorské práva tretích osôb, najmä som nezasiahol nedovoleným spôsobom do cudzích autorských práv osobnostných a som si plne vedomí následkov porušenia ustanovenia § 11 a nasledujúceho autorského zákona č. 121/2000 Sb., vrátane možných trestnoprávných dôsledkov vyplývajúcich z ustanovenia § 152 trestného zákona č. 140/1961 Sb.

V Brně dne 26. mája 2016

.....  
podpis autora

## Pod'akovanie

Ďakujem vedúcemu diplomovej práce Ing. Janu Práškovi, Ph.D. za účinnú metodickú, pedagogickú a odbornú pomoc a ďalšie cenné rady pri spracovaní projektu.

Modifikácia vzoriek bola uskutočnená v zdieľanom laboratóriu prípravy a charakterizácie CEITEC VUT a hradená z projektu CEITEC – open access LM2011020.

V Brně dne 26. mája 2016

.....  
podpis autora



Výzkum popsáný v této diplomové práci byl realizován v laboratořích podpořených z projektu SIX; registrační číslo CZ.1.05/2.1.00/03.0072, operační program Výzkum a vývoj pro inovace.



EVROPSKÁ UNIE  
EVROPSKÝ FOND PRO REGIONÁLNÍ ROZVOJ  
INVESTICE DO VAŠÍ BUDOUCNOSTI



# Obsah

Úvod.....	8
1 Technológia hrubých vrstiev .....	9
1.1 Pasty .....	9
1.2 Nanášanie hrubých vrstiev .....	12
1.2.1 Sieťotlač .....	12
1.2.2 Šablónová tlač .....	13
1.3 Výpal hrubých vrstiev .....	13
2 Elektrochémia .....	15
2.1 Charakterizácia elektród .....	15
2.1.1 Elektródy prvého druhu .....	15
2.1.2 Elektródy druhého druhu .....	16
2.1.3 Oxidačno – redukčné (redoxné) elektródy .....	16
2.1.4 Iónovo – selektívne elektródy (membránové elektródy) .....	17
2.2 Elektrochemické systémy .....	18
2.2.1 Referenčná elektróda .....	18
2.2.2 Pomocná elektróda .....	18
2.2.3 Pracovná elektróda .....	18
2.3 Metódy založené na elektrochemickej reakcii .....	18
2.3.1 Cyklická voltampérometria .....	19
2.3.2 Chronoampérometria .....	20
3 Elektrochemické senzory .....	21
3.1 Elektrochemické biosenzory .....	21
3.1.1 Elektródy na bázy enzýmov .....	21
3.2 Senzor glukózy na báze glukóza-oxidázy (GoX) .....	23
3.2.1 Biosenzor 1. generácie .....	23
3.2.2 Biosenzor 2. generácie .....	24
3.2.3 Biosenzor 3. generácie .....	25
3.3 Modifikované glukózové biosenzory .....	25
4 Plazma .....	27
5 Experimentálna časť .....	28
5.1 Chemikálie .....	28
5.2 Skúmaný trojelektrodový systém .....	28
5.3 Príprava pracovnej elektródy .....	29

5.4	Stanovenie vhodného potenciálu pre detekciu glukózy .....	29
5.5	Chronoampérometrické stanovenie glukózy .....	30
5.6	Plazmatické čistenie elektród senzora .....	33
5.7	Stanovenie glukózy so senzormi očistenými plazmou.....	35
5.8	Reprodukovateľnosť výsledkov .....	42
5.9	Vplyv KCl .....	44
5.10	Vplyv doby skladovania .....	47
5.11	Vplyv interferujúcej látky .....	48
5.12	Porovnanie výsledkov .....	49
	Záver.....	51
	Použitá literatúra .....	52

# Úvod

Glukóza je jednoduchý cukor, ktorý slúži ako hlavný zdroj energie pre všetky bunky v tele a znalosť jej hladiny v krvi je základným predpokladom pre kvalitný život. Priemerná fyziologická hodnota v krvi mužov a žien od 15 rokov sa pohybuje od 3,9 mmol/l do 5,6 mmol/l ráno pred jedlom. Pokles pod dolnú hranicu koncentrácie glukózy v krvi sa nazýva hypoglykémia. Ľudia trpiaci na cukrovku majú naopak zvýšenú hladinu koncentrácie glukózy v krvi. Existuje mnoho metód ako detegovať glukózu. Medzi najviac používané patria elektrochemické.

V súčasnej dobe priťahujú veľkú pozornosť biosenzory na báze imobilizovaných enzýmov. Tieto zariadenia využívajú výhody elektrochemickej detekcie a biologického činidla, ktorý urýchľuje chemické premeny. Najpoužívanejším enzýmom pre detekciu glukózy patrí glukóza oxidáza (GoX), ktorá je cieľom intenzívneho výskumu. Jedným zo spôsobov transdukcie enzymatickej reakcie medzi glukózou a GoX je z redoxného signálu peroxidu vodíka vytvoreného počas regeneračného cyklu enzýmu. Je všeobecne známe, že pre oxidáciu a redukciu peroxidu vodíka je pri použití uhlíkových elektród potrebný veľký potenciál pri ktorom sa môžu zapojiť do reakcie aj nežiadúce látky ako je kyselina askorbová, kyselina močová atď. Z tohto dôvodu je vhodné pracovné elektródy modifikovať na odstránenie nežiadúcich účinkov týchto látok. Jednou z možností je pridaním ďalšej polymérnej vrstvy, ktorá by pre interferujúce látky slúžila ako bariéra.

Táto diplomová práca sa zaoberá chronoampérometrickou detekciou glukózy za pomoci enzýmu glukózy oxidázy, ktorý bol imobilizovaný na povrch pracovnej elektródy pomocou kvapky v roztoku spolu s albumínom, glycerolom a glutaraldehydom.

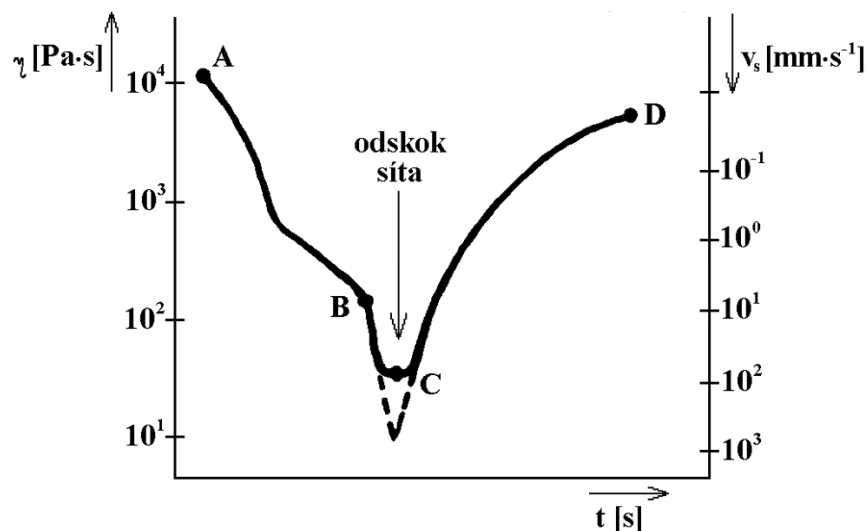


# 1 Technológia hrubých vrstiev

Technológia hrubých vrstiev je v mikroelektronike jednou zo základných metód vytvárania pasívnych prvkov a funkčných blokov nevakuovaným postupom. Základným princípom je nanášanie tixotropných pást na keramický substrát a ich následná sintrácia pri teplote približne 850 °C. Hrúbky vrstiev sa po výpale pohybujú rádovo v desiatkach  $\mu\text{m}$ . Táto technológia si udržuje svoje miesto v mikroelektronike z dôvodu nízkej ceny, vysokej spoľahlivosti, flexibility stabilite parametrov atď. Klasická hrubovrstvá technológia sa používa k tvorbe fotovoltaičných článkov, senzorov, planárnych filtrov, výkonových zosilňovačov, aktívnych RC filtrov a pod. [1,2]

## 1.1 Pasty

Materiály pre vytváranie hrubých vrstiev sú dodávané vo forme pást, u ktorých je dôležitá definovaná viskozita. Tieto pasty predstavujú heterogénny termodynamický systém tzn. systém s viacerými zložkami a s rôznymi chemickými a fyzikálnymi vlastnosťami. Vyznačujú sa dobrými tixotropnými vlastnosťami, čo znamená, že ich viskozita sa mení v závislosti na mechanickom tlaku. Najnižšiu viskozitu dosahujú v okamžiku pretlačenia pasty cez sito na substrát, v dôsledku pôsobenia tlaku stierky bod C (viď Obrázok 1.1). Z obrázku ďalej vyplýva, že viskozita je nepriamo úmerná tlaku stierky. To umožní pretečeniu pasty cez voľné oka v site, ktorý tvorí masku nanášaného obrazca a po odskoku sita vytvorí na keramickom substráte požadovaný motív. [3]



Obrázok 1.1 Závislosť viskozity na tlaku stierky. Prevzaté a upravené z [4].

Pasty sa skladajú z troch zložiek:

- funkčná,
- tavivová,
- laková.

Okrem vyššie uvedených zložiek môžu obsahovať aj modifikátory vlastností, ktoré slúžia na zmenu viskózneho chovania systému. [5]

## **Funkčná zložka**

Práškový materiál o veľkosti častíc rádovo jednotiek  $\mu\text{m}$ , ktorý dodáva paste funkčné vlastnosti. Dôležité je aby boli častice dostatočne malé oproti veľkosti ôk v site. Tým je zaručený definovaný prenos pasty na substrát. Jedná sa o prášky drahých a obecných kovov a ich zlúčenín (u vodivých), dielektrických a sklenených frít (u izolačných), vodivých a polovodivých oxidov (u odporových). [3,5]

## **Tavivová zložka**

Je tvorená sklenenou fritou, ktorá ma za úlohu vytvoriť väzbu na substrát a taktiež nosnú maticu pre funkčnú zložku. Preto sa ako tavivová zložka používajú nízkotaviteľné sklá s teplotou mäknutia už od  $600\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Pri výpalu musí dôjsť k mäknutiu a nie k roztaveniu, inak by nevznikla nosná matica pre funkčnú zložku. [3,5]

## **Laková zložka**

Táto zložka poskytuje stabilnú suspenziu v priebehu nanášania a potrebnú adhéziu k substrátu. Tvoria ju organické látky ako (terpineol, butyldiglykolacetát). Pri výpale sa táto zložka odparuje a nepodieľa sa na konečnej funkčnosti vrstvy. [3,5]

Podľa toho akú funkciu budú hrubovrstvé pasty zastupovať v obvode ich môžeme ďalej rozdeľovať na:

- vodivé,
- odporové,
- dielektrické a izolačné,
- špeciálne[3].

## **Vodivé pasty**

Reprezentujú najväčšie zastúpenie natlačených pást na substráte. Tieto pasty musia mať široký rozsah vypalovacích teplôt, aby mohli byť použité spolu s ostatnými pastami a pritom si musia udržať svoje elektrické vlastnosti a spájkovateľnosť. [6]

Funkčnú zložku vodivých pást predstavujú prášky drahých kovov, ich zmesi alebo zliatiny (AgPd, AgPt, AuPd, AuPt, Au). Lacnejšie pasty sú vyrábané na bázy Cu, Al, Ni, Mo-W. Prenos prúdu vo vrstvách sa deje priechodom cez kontakty kovových častíc a dobrá vodivosť je podmienená obsahom najmenej 60 až 70 % kovu. Teplota výpalu vodivých pást na substrát sa pohybuje v rozmedzí od  $760\text{ }^{\circ}\text{C}$  do  $1000\text{ }^{\circ}\text{C}$ . [7]

Nové vodivé pasty s nanočasticami striebra 5-55 nm udávajú teplotu výpalu okolo  $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Hrúbka dosiahnutej vrstvy je  $2\text{-}3\mu\text{m}$  a je zaručená kompatibilita s aluminou, silikónom, kaptonovou páskou a sklom. Na všetky uvedené substráty vykazujú tieto pasty dobrú zmáčanlivosť, adhéziu, nízky merný odpor, odolnosť proti vysokým výkonom a zvýšeným teplotám. [8]

Konečnú vlastnosť vodivých pást určuje druhý kov obsiahnutý v zliatine. Zliatiny AuPd a AuPt znášajú viacnásobné spájkovanie a rozpustnosť týchto zliatin je malá. Sú však drahšie a oproti AgPd je ich vodivosť menšia. U týchto zliatin nám zlato a striebro zaisťujú dobrú vodivosť, zatiaľ čo platina s paládiom bránia elektromigrácií. [5,7]

V hrubovrstvej technológii sa vodivé pasty používajú prevažne k vytvoreniu prepojovacej vodivej siete, spájkovacích plôšok, plôšok pre lepenie polovodičov, ďalej pre elektródy kondenzátorov a senzorov. [5]

### **Odporové pasty**

Pomocou odporových pást sa realizujú hrubé odporové vrstvy typu cermet, ktorý obsahuje kombináciu práškov vodivého kovu a sklenej boritokremičitej frity. Funkčnú zložku odporových pást tvoria prášky kovov Au, Ag, Pt, Pd a ich niektorých zliatin spolu s polovodivými oxidmi prvkov ako In, Ti, Ru, Ir, W. Rezistivita je možné meniť v širokom rozsahu pomocou pomeru odporovej vrstvy k tavivovej. Pasty na bázy oxidov rútenia, india, rénia sú menej citlivé na zmeny v teplotnom profile a poskytujú väčšiu stabilitu. [5,7]

Kvalita a reprodukovateľnosť vlastností odporových vrstiev závisí predovšetkým na dvoch faktoroch (teploty a doby výpalu). Tieto hodnoty sú udávané v katalógových listoch príslušných pást.[5]

Požiadavky na odporové pasty sú:

- široký rozsah rezistivity,
- stabilita hodnôt odporu a to najmä pri vysokých teplotách,
- nízky teplotný koeficient odporu a jeho dobrá reprodukovateľnosť,
- nízka hodnota napäťového koeficientu odporu,
- nízky šum,
- kompatibilita so systémom vodivých pást. [9]

### **Dielektrické pasty**

Tieto pasty sa v hybridných integrovaných obvodoch používajú predovšetkým na vytvorenie kapacitorov, odizolovanie krížiacich sa vodičov a pre krytie a púzdenie pasívnych sietí, predovšetkým rezistorov. [5]

Dielektrika kondenzátorov obsahujú prášky, používané v klasických keramických kondenzátorov. Sú to predovšetkým stabilit, rutilit a negatit, ktoré sú charakteristické nízkou hodnotou kapacity, nízkym stratovým činiteľom a minimálnou teplotnou závislosťou. [5]

V teplotnom cykle používanom pri spracovaní hrubých vrstiev, nie je možné použiť teplotu nutnú pre sintráciu týchto materiálov. Táto teplota sa pohybuje nad hodnotou 1500 °C a preto sa pasty zmiešavajú so sklenenou zložkou. [5]

Pre izoláciu medzi krížiacimi vodičmi sa používajú materiály na bázy rôznych sklovín s relatívnou permitivitou v rozmedzí 5 až 10 a stratovým činiteľom v rozmedzí 0,01 až 0,005 pri stovkách MHz. [5]

Vrstvy určené k púzdeniu pasívnych sietí sú vytvorené na báze nízkotavných bezalkalických skiel. Žiaduce je pre nich nízka permitivita a dobrá homogenita. [5]

## Špeciálne pasty

Vyrábajú sa pre príslušný typ aplikácie zámerným pridávaním funkčných látok, ktoré sa vyznačujú požadovanými vlastnosťami do základného materiálu.

Druhy špeciálnych pást:

- termorezistívne: NTC oxidy (Mn, Co, Cu, Ni, Fe, Ti, Zn, Mg, Cr, Li), PTC na bázy BaTiO<sub>3</sub>, TiO<sub>2</sub>, VO<sub>2</sub>, V<sub>2</sub>O<sub>3</sub>,
- magnetorezistívne: na bázy Ni, atď.,
- magnetorezistívne: citlivé na vlhkosť: polymérne zlúčeniny, cermetové pasty SnO<sub>2</sub>,
- feromagnetické: obsahujúce zlúčeniny oxidu železitého,
- pyroelektrické: polymérne PVDF (polyvinylidifluorid),
- piezoelektrické: BaTiO<sub>3</sub>, piezoelektrické polyméry,
- piezorezistívne: cermentové piezorezistívne pasty,
- chemicky citlivé: pevné elektródy ZrO<sub>2</sub>, pasty kovových oxidov SnO<sub>2</sub>, polyméry,
- biocitlivé: polymérne lôžka s receptorovými časticami. [10]

## 1.2 Nanášanie hrubých vrstiev

Pasty je možné nanášať na keramický substrát nasledujúcimi metódami:

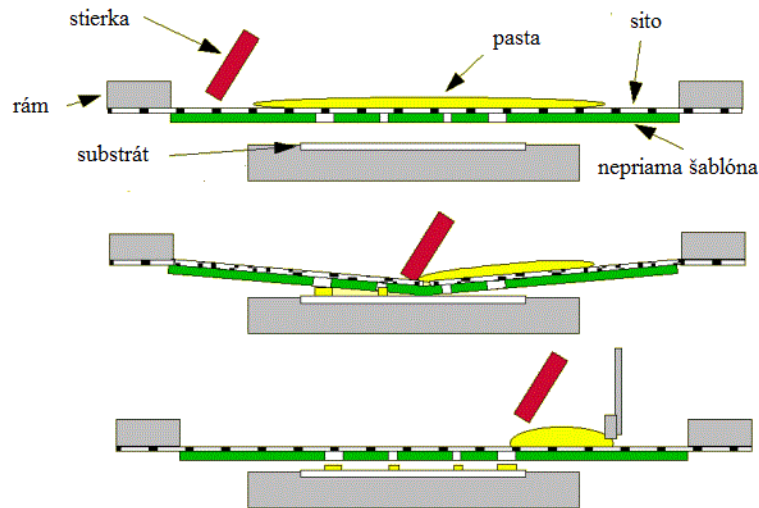
- sieťotlač - nanášanie pást cez sito na keramický substrát,
- šablónová tlač - obdoba sieťotlače, kde sa na požadovaný motív používa šablóna,
- popis – nanášanie pomocou dispenzeru. [3]

### 1.2.1 Sieťotlač

Je najčastejšou metódou, používanou pri nanášaní hrubých vrstiev. Princíp sieťotlače je založený na pretláčaní viskózne pasty skrz sito na keramický substrát. Na site je vytvorená maska nanášaného obrazca (šablóna) a je pevne uchytené na ráme. Rám s napnutým sitom je umiestnený v definovanej vzdialenosti od držiaka pre uchytenie substrátu. Táto vzdialenosť sa nazýva odtrh a jeho hodnota sa pohybuje okolo 0,8 mm. Proces nanášania pasty pomocou metódy sieťotlače je znázornený na Obrázok 1.2. [3,5]

Šablóny používané pri sieťotlači rozdeľujeme na:

- priame: fotocitlivá emulzia nanosená na site,
- nepriame: plastové alebo kovové fólie pevne spojené so sitom.



Obrázok 1.2 Proces sieťotlače. Prevzaté a upravené z [11].

Pri nanášaní každej vrstvy sa na rohu vytvára súťažová značka, pomocou ktorej sa zosúladí poloha rámu so substrátom.

### 1.2.2 Šablónová tlač

Princíp šablónovej tlače je obdoba sieťotlače, kde hlavný rozdiel je v šablóne a jej vzdialenosti od substrátu. Kovová šablóna je uchytená v ráme a prikladá sa priamo na substrát, takže výška nanesej pasty odpovedá hrúbke šablóny a hodnota odtrhu je počas celého procesu nulový. [3]

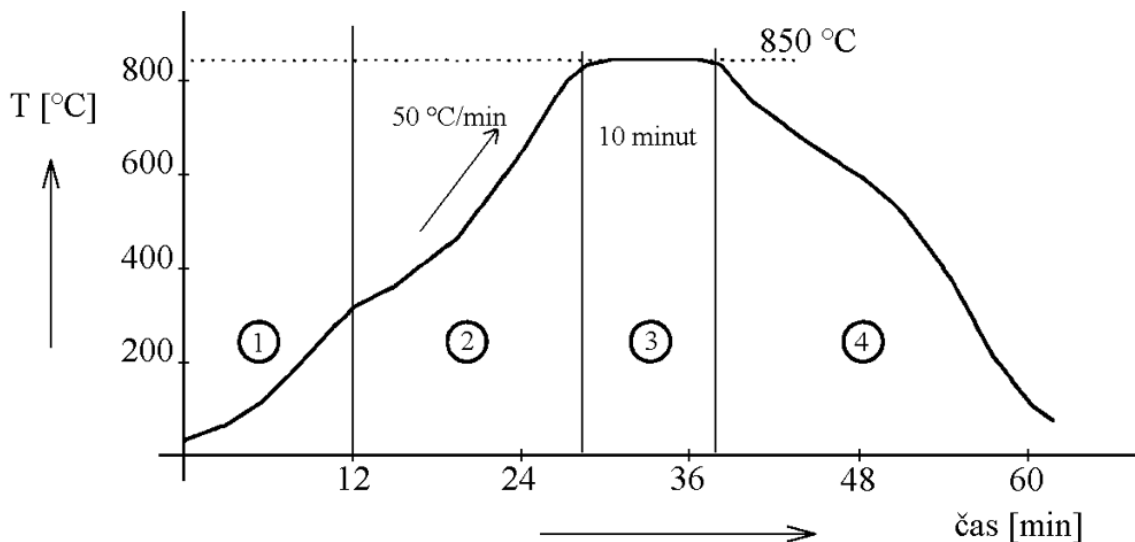
Rýchlosť vlastného odtrhu šablóny od substrátu musí byť dostatočná, aby sa šablóna dobre oddelila od nanesej pasty a zároveň bol zachovaný obrazec. [3]

Pomocou šablónovej tlače je možné vytvoriť veľmi malé spájkovacie plošky s roztečom 0,5 mm a menej. [3]

## 1.3 Výpal hrubých vrstiev

Pri výpalu nanesej vrstiev dochádza k vytvoreniu pevnej väzby so substrátom. Teplota a jej priebeh v čase musia mať presný sled s možnosťou riadiť jednotlivé fázy výpalu. K tomuto účelu sa používajú priebežné alebo tunelové pece s viacerými teplotnými zónami. Bežný čas výpalu sa pohybuje okolo 60 minút. [5]

Základné vlastnosti vypálených vrstiev závisia na parametroch výpalu. Hlavný parameter je teplotný profil pece a jej atmosféra. Tieto informácie poskytuje výrobca pást. Najviac používanou atmosférou je vzduchová ale pre materiály, ktoré viac oxidujú je výhodnejšia dusíková atmosféra. Príklad teplotného profilu je zobrazený na Obrázok 1.3. [5]



Obrázok 1.3 Príklad teplotného profilu pre výpal. [5]

Z teplotného profilu pre výpal je vidieť, že sa rozdeľuje na štyri základné fáze:

- Sušenie – teplota sa pohybuje okolo hodnoty 150 °C a približný čas je 15 minút. V tejto fáze teplotného profilu dochádza k odpareniu organických riedidiel z nanesej pasty.
- Predohrev – teplota okolo 350 °C. Dochádza k úniku posledných stôp po organických rozpúšťadlách, vyhoriava filmotvorný materiál.
- Výpal – teplota 850 °C a čas sa pohybuje v rozmedzí 5 až 10 minút. V tejto fáze začína tvorba zliatin a slinovanie funkčných zložiek pasty a zároveň prebiehajú dôležité chemické reakcie, ktoré ovplyvňujú výsledné vlastnosti pasty.
- Chladenie- dochádza k ochladeniu substrátu na teplotu okolia. Tuhne roztavená sklenená fáza vo vrstve. Nemôže byť prekročený teplotný gradient 5K/s. [5]

## 2 Elektrochémia

Elektrochémia je jednou z odvetví fyzikálnej chémie, patriacej do skupiny analytických metód, umožňujúcej skúmať chemické zloženie látok, na základe meraní vybraných elektrických veličín, kam patrí (napr. potenciál  $E$ , prúd  $I$ , vodivosť  $G$ , náboj  $Q$ , kapacita  $C$ , prípadne iné veličiny). Princípom teda je sledovanie závislosti zmeny veličiny (prúdu, potenciálu, náboja atď.) na zložení (z čoho sa roztoky skladajú) a na množstve (koncentracii) jednotlivých zložiek obsiahnutých v roztokoch, podľa získaných dát. Pozornosť elektrochémie sa zameriava na štúdium procesov a dejov v tzv. elektrochemickom článku, čo je systém alebo sústava skladajúca sa z elektród, ktoré sú v kontakte s analyzovaným roztokom. Jedna sa označuje ako pracovná (merná) a druhá ako referenčná (porovnávací). Toto dvojelektródové usporiadanie potom umožňuje určiť základnú hodnotu (napätie elektrochemického článku). [12,13]

Elektróda je elektrický vodič v kontakte s nekovovou časťou elektrického obvodu (napr. vákuom alebo priestorom naplneným plynom, elektrolytom a pod.). V elektrochémii sa katóda označuje ako elektróda, na ktorej prebieha redukcia a anóda ako elektróda, na ktorej prebieha oxidácia. [14]

### 2.1 Charakterizácia elektród

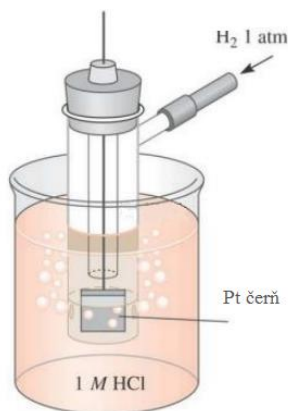
Podľa materiálu elektródy a druhu roztoku, do ktorého je ponorená, rozlišujeme elektródy prvého druhu, druhého druhu, oxidačno-redukčné a iónovo selektívne (membránové). [13]

#### 2.1.1 Elektródy prvého druhu

Prebieha na nich iba jedna chemická reakcia, patria sem kovové alebo plynové elektródy. Tvorí ich prvok ponorený do roztoku svojich iónov. Elektródy prvého druhu sa ďalej rozdeľujú na kationové, amalgámové a aniónové. [14,15]

Príkladom kationovej elektródy je strieborná elektróda. Jedná sa o  $Ag$  pliešok ponorený do roztoku  $Ag^+$  iónov. [15]

Medzi tieto elektródy patrí aj štandardná vodíková elektróda zobrazená na Obrázok 2.1



Obrázok 2.1 Štandardná vodíková elektróda. Prevzaté a upravené z [13].

Je to elektróda vytvorená z platinového pliešku, pokrytá platinovou čerňou, sýtená plynným vodíkom pod atmosférickým tlakom (101 325 Pa) za teploty 2773,15 K, ponorená do roztoku so strednou aktivitou vodíkových iónov. Štandardný elektródový potenciál vodíkovej elektródy je podľa dohody rovný nule. [14,15]

Amalgámové elektródy sa používajú pre kovy, na ich povrchu sa tvorí vrstva oxidu. Kov sa rozpustí v ortuti a vzniknutý amalgám sa použije na výrobu elektródy. [15]

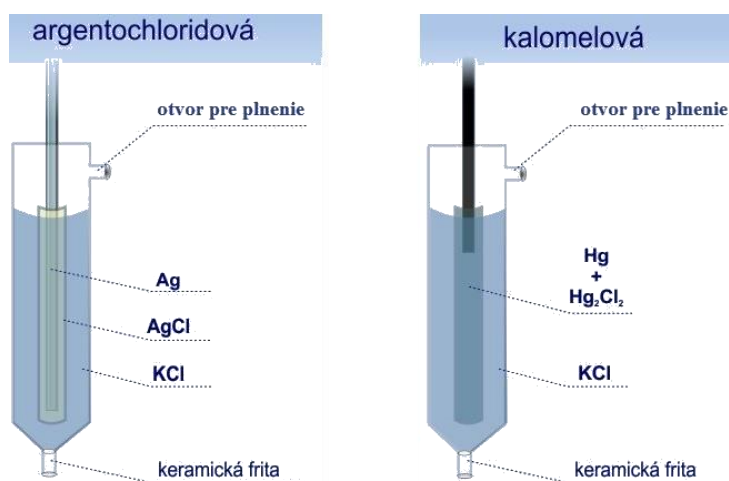
Medzi aniónové elektródy ďalej patria (chlórová, fluórová). [15]

## 2.1.2 Elektródy druhého druhu

Tieto elektródy sú tvorené kovom pokrytým jeho málo rozpustnou soľou, ponoreným do roztoku, ktorý obsahuje rovnaký anión ako táto soľ. Často majú stály a dobre reprodukovateľný potenciál a preto sa používajú ako porovnávacie (referenčné) elektródy (radšej, než vodíková elektróda). [13]

Medzi elektródy druhého druhu patria:

- Argentochloridová elektróda (viď Obrázok 2.2 vľavo) – je to Ag elektróda potiahnutá vrstvičkou AgCl a ponorená do roztoku Cl<sup>-</sup> iónov (najčastejšie KCl).
- Kalomelová elektróda (viď Obrázok 2.2 vpravo) – tvorená kovovou ortuťou, ktorej povrch je pokrytý chloridom ortuťným (Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> – kalomel) a ponorený do roztoku KCl.
- Merkurosulfátová elektróda – tvorená kovovou ortuťou, ktorej povrch je pokrytý vrstvičkou Hg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (síran ortuťný) a ponorený do nasýteného roztoku K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. [13,15]



Obrázok 2.2 Argentochloridová elektróda (vľavo) a kalomelová elektróda (vpravo). Prevzaté a upravené z [15].

## 2.1.3 Oxidačno – redukčné (redoxné) elektródy

Jedná sa o elektródy z ušľachtilého kovu (platina, zlato), ktoré sú ponorené do roztoku obsahujúceho oxidované aj redukované formy iónov (napr. Fe<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>). Elektróda sa reakcie účastní iba ako prostredník pre prenos elektrónov, sama sa nemení. [15]

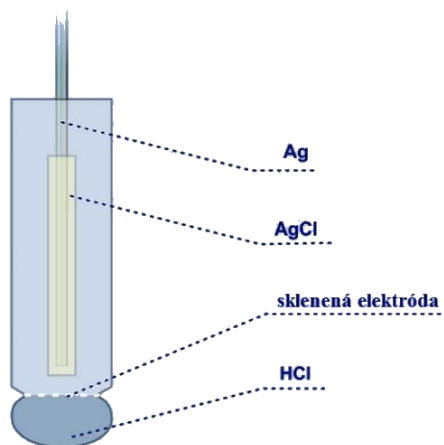


Ďalším príkladom redoxnej elektródy je elektróda chinhydronová. Chindydron je zmes hydrochinonu a p-benzochinonu. P-behnzochinon je oxidovaná forma hydrochinu. Potenciál tejto elektródy je závislý na pH. V alkalickom prostredí je elektróda nestála a pre meranie pH je vhodná len v prostredí do  $\text{pH} < 8$ . V opačnom prípade sa elektródovej reakcie zúčastnia ďalšie častice (najčastejšie ióny  $\text{H}^+$  a  $\text{OH}^-$ ) a musíme ich zahrnúť do podmienky rovnováhy. Ich aktivita ovplyvňuje potenciál elektródy. [15,16]

#### 2.1.4 Iónovo – selektívne elektródy (membránové elektródy)

Základným prvkom iónovo – selektívnych elektród (ISE) je selektívne priepustná membrána, ktorou môžu prenikať len určité ióny (napr.  $\text{H}_3\text{O}^+$ ). Membránový potenciál vzniká pri rovnakej rýchlosti pohybu iónov skrz membránu. Pokiaľ difundujú ióny z jednej strany rýchlo, vzniká elektrochemický potenciál. Ak by cez membránu prenikal len jeden ión ( ideálny stav) závisel by výsledný potenciál len na jeho aktivite. Keďže je druhý ión (prenikajúci z druhej strany membrány) taktiež aktívny, je treba uvažovať o miere selektivity. Čím nižšia priepustnosť rušiaceho iónu, tým je ISE selektívnejšia. [15]

Najbežnejšou ISE je sklenená pH elektróda (viď Obrázok 2.3). Je to tenkostenná banička (membrána) zo špeciálneho skla, naplnená spravidla roztokom HCl, do ktorého zasahuje referenčná argentchloridová elektróda. Medzi takouto elektródou a vonkajším roztokom sa ustáli rovnováha charakterizovaná elektródovým potenciálom. Sklenená elektróda je priepustná pre  $\text{H}_3\text{O}^+$  ióny. V silno zásaditom prostredí vykazuje elektróda odchýlky a taktiež stárne, a preto mení svoj potenciál. Z tohto dôvodu je nutné elektródu štandardizovať, zmeraním rovnovážneho napätia pri ponorení elektródy do tlmeného roztoku (pufru) o známej pH. Štandardizáciu je nutné pravidelne opakovať. [13,15]



Obrázok 2.3 Sklenená elektróda. Prevzaté a upravené z [15].

Ďalšie druhy ISE sú napr. [13]:

- lanthan-fluoridová – selektívna pre  $\text{F}^-$ ,
- elektródy z halogenidov striebra – selektívne pre  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{CN}^-$ ,
- elektródy zo sulfidu strieborného selektívne pre  $\text{S}^{2-}$ ,
- elektródy z  $\text{PbS}$ ,  $\text{CuS}$ ,  $\text{CdS}$  - selektívne pre  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ .

## 2.2 Elektrochemické systémy

Elektrochemické systémy reprezentujú najrozšírenejší typ prevodníkov používaných pre konštrukciu katalytických biosenzorov. Ich hlavnými prednosťami sú jednoduchá konštrukcia, meracieho systému, výborná citlivosť a nízke počiatočné náklady. Pre konštrukciu elektrochemického meracieho systému sú potrebné minimálne dve elektródy, pracovná (meracia) a referenčná. Najčastejšie sa používa trojelektrodové usporiadanie s treťou pomocnou elektródou. [17]

### 2.2.1 Referenčná elektróda

Slúžia ako porovnávací bod pre meranie respektíve nastavenie potenciálu pracovných elektród. Ich vlastný potenciál je presne definovaný a pokiaľ je to možné časovo stály. Základnou referenčnou elektródou je štandardná vodíková elektróda, ktorej potenciál je rovný nule. Medzi ďalšie referenčné elektródy patria elektródy druhého druhu, ktoré sa kvôli nízkemu teplotnému súčiniteľu používajú pre stanovenie potenciálu iných elektród. Referenčné elektródy sa zvyčajne uchovávajú v roztoku KCl a nesmú sa nechať vyschnúť. [17,18]

### 2.2.2 Pomocná elektróda

Pri klasickom dvojelektrodovom systéme môže dôjsť k zmene zloženia referenčnej elektródy vplyvom pretekajúceho prúdu a to vedie k zmene prúdu. Tento nežiaduci efekt je eliminovaný pri použití trojelektrodového systému, kde tretia pomocná elektróda slúži ako spätná väzba, ktorá tento prúd odvádza. Pomocné elektródy sú tvorené z dobrého vodiča s dostatočnou plochou a zároveň musia byť elektrochemicky neaktívne. [17,18]

### 2.2.3 Pracovná elektróda

Ideálna pracovná elektróda má dokonalo čistý povrch s presne definovanými rozmermi a je elektrochemicky stabilná v širokom rozsahu potenciálov. Preto je zvyčajne tvorená ortuťou, zlatom, platinou alebo rôznymi formami uhlíku. Veľkosť a tvar elektródy majú vplyv na ich odozvu. Prúd pretekajúci elektródou je priamo úmerný aktívnej ploche elektródy. [17,18]

Použiteľný rozsah pracovného potenciálu je vždy nutné voliť tak, aby nedochádzalo k elektrochemickému rozkladu materiálu elektródy alebo k interferenčným reakciám. Veľmi dôležitá je často príprava povrchu elektródy pred vlastným meraním (leštenie povrchu brusnými práškami, odstránenie oxidov pomocou kyseliny alebo anodizáciou). [17]

## 2.3 Metódy založené na elektrochemickej reakcii

Najrozšírenejšou skupinou elektroanalytických metód sú postupy založené na elektródových reakciách. Táto skupina má niekoľko podskupín podľa zvolených experimentálnych podmienok. Môže byť merané rovnovážne napätie elektrochemického článku, alebo pracovať s článkom v kinetickom stave (za prechodu elektrolytického prúdu). Môže byť kontrolovaný potenciál pracovnej elektródy a merať prúd (potenciostatické metódy) alebo naopak kontrolovať prúd a merať elektródový potenciál. Je zrejmé, že

elektroanalytických metód je veľký počet a najdôležitejšie z nich sú stručne charakterizované v Tabuľka 1. [19]

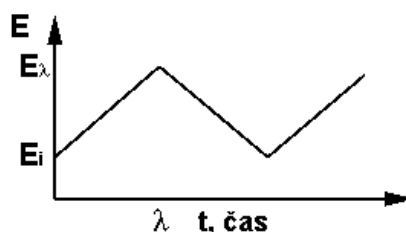
Hlavné smery súčasného vývoja elektroanalytických metód sa týka predovšetkým pracovných elektród. Rýchly vedecký a technologický pokrok umožňuje zavádzať elektródy s takou geometriou, ktorá je výhodnejšia z hľadiska citlivosti merania, selektivity a spoľahlivosti. [19]

Tabuľka 1 Klasifikácia významných elektroanalytických metód založených na elektrochemickej reakcii. Prevzaté a upravené z [19].

Kontrolovaná veličina	Meraná veličina	Názov metódy
Nulový elektrolytický prúd		
	$E = f(a)$	Rovnovážna potenciometria a potenciometrická titrácia
Elektrolytický prúd má konečnú hodnotu		
Potenciál (E)	$I = f(E)$	Voltampérometria (a polarografia) za konštantného potenciálu
Potenciál (E)	$I = f(V)$	Ampérometrická titrácia
Napätie (U)	$I = f(V)$	Biampérometrická titrácia
Prúd (I)	$E = f(V)$	Potenciometrická titrácia za konštantného prúdu
Prúd (I)	$U = f(V)$	Bipotenciometrická titrácia
Potenciál (E)	$Q = \int_0^t I dt$	Coulometria za konštantného potenciálu
Potenciál (E)	$Q = f(c)$	Polarografická coulometria
Prúd (I)	$E = f(t)$	Chronopotenciometria
Potenciál (E)	$I = f(c)$	Chronoampérometria

### 2.3.1 Cyklická voltampérometria

Je to špeciálny druh voltampérometrie, kde je priebeh potenciálu v čase privádzaný na vstup potenciostatu trojuholníkového tvaru a sleduje sa prúd. Vstupný potenciál je znázornený na Obrázok 2.4

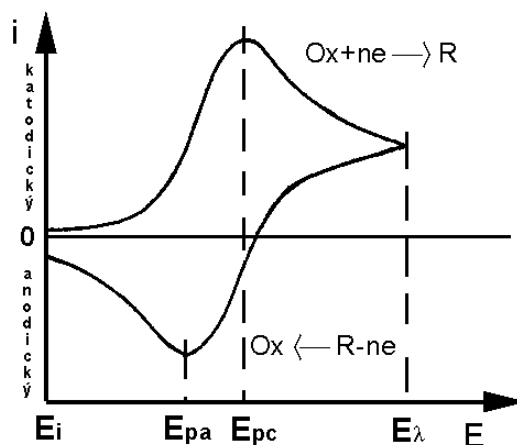


Obrázok 2.4 Vstupný potenciál pri cyklickej voltampérometrii. Prevzaté a upravené z [20].

Napätie sa lineárne mení (rastie a klesá) v čase. V počiatočnej fáze (v čase  $t=0$ ), keď je na elektróde vložený potenciál  $E_i$ , je koncentrácia oxidovanej formy elektroaktívnej látky v ktorejkoľvek vzdialenosti od elektródy rovná objemovej koncentrácii  $c$  tejto formy. Keď časovo premenlivý potenciál dosiahne hodnotu, pri ktorej sa forma Ox začne redukovať, elektródou začne pretekať prúd, pritom sa vyčerpávajú častice oxidovanej formy z najbližšieho okolia elektródy a ich úbytok sa dopĺňa difúziou z roztoku. Difúzna vrstvička sa stále rozširuje do vnútra roztoku. S posúvajúcim sa potenciálom sa síce zvyšuje

rýchlosť elektródovej reakcie, ale rýchlosť transportu elektroaktívnej látky k elektróde sa znižuje s narastajúcou hrúbkou difúznej vrstvičky. Z tohto dôvodu prúd narastá iba po určitú hodnotu. [20]

Keď potenciál elektródy dosiahne hodnotu  $E_{\lambda}$  (prepínací potenciál), pri ktorom sa mení smer polarizačného potenciálu, začína sa registrovať tzv. anodická vetva. Výsledná krivka je závislosť meraného prúdu na kontrolovanom potenciáli a nazýva sa cyklický voltampérogram. [20]



Obrázok 2.5 Cyklický voltampérogram. [20]

### 2.3.2 Chronoampérometria

Chronoampérometria je metóda založená na monitorovaní prúdu prechádzajúcim pracovnou elektródou v závislosti na koncentrácii meranej látky v roztoku pri skokovej zmene potenciálu. Tento potenciál býva najčastejšie stanovený z cyklickej voltampérometrie. Využíva sa buď polvlnný potenciál danej látky alebo potenciál v oblasti limitného difúzneho prúdu. Tento potenciálový skok, vyvolá náhlu zmenu redoxného stavu povrchu elektródy. Preto prebehne veľmi krátko kapacitný prúd a potom nasleduje faradaický proces riadený difúziou k voľnému povrchu. [17,21]

Metóda môže byť využitá aj pri konštantnom napätí a pridávaním meranej látky definovanej koncentrácií pričom sa sleduje hodnota prúdu pri ktorej sa proces ustáli. Táto metóda bola použitá v praktickej časti.

## 3 Elektrochemické senzory

Chemický senzor je malé zariadenie, ktoré môže byť použité pre priame meranie analyzovanej látky. V ideálnom prípade, takéto zariadenie je schopné kontinuálne a reverzibilne reagovať a nebude ovplyvňovať vzorky. Dobrou manipuláciou so vzorkou a vhodnými meracími krokmi, sa znižuje jej potrebné množstvo. Chemický senzor sa skladá z prevodníka, pokrytého vrstvou chemického alebo biologického receptora. Táto vrstva interaguje s cieľovým analytom a chemické zmeny vyplývajúce z tejto interakcie sa konvertujú prevodníkom na elektrický signál. [22]

Vývoj chemických senzorov je od roku 2005 jeden z najaktívnejších z oblastí analytického výskumu. Elektrochemický senzor predstavuje dôležitú podtriedu chemických senzorov, v ktorom je elektróda použitá ako snímací prvok. Takéto zariadenia držia vedúce postavenie medzi senzormi a v súčasnej dobe sú komerčne dostupné. Našli širokú škálu využitia v oblasti medicíny, priemyslu, životného prostredia, poľnohospodárstva. Výskum elektrochemických senzorov prebieha v niekoľkých smeroch. Prvou skupinou je skupina elektrochemických senzorov s iontovo- selektívnou elektródou popísané v kapitole 2.1.4. [22]

### 3.1 Elektrochemické biosenzory

Elektrochemické biosenzory kombinujú výhody analytických elektrochemických techník spolu s biologickými snímacími procesmi. Cieľom je biologicky produkovať elektrický signál, ktorý sa vzťahuje ku koncentrácii analytu. Na tento účel slúži biologické činidlo, ktoré je buď imobilizované alebo uchované vo vhodnej elektróde, ktorá prevádza biologickú reakciu do kvantitatívnej ampérometrickej alebo potenciometrickej odozvy. Táto kombinácia biozložka-elektroda ponúka nové výkonné analytické nástroje, ktoré sú vhodné pre mnoho náročných analýz. Pokroky v elektrochemických biosenzoroch prebiehajú v rôznych smeroch. Dve všeobecné kategórie elektrochemických biosenzorov sú rozličné v závislosti od povahy tohto biologického snímacieho procesu. V prvej kategórii je snímací prvok biokatalytické zariadenie využívajúce imobilizované enzýmy, bunky alebo tkanivá. V druhej kategórii sú na bázy protilátok, membránových receptorov alebo nukleových kyselín. [22]

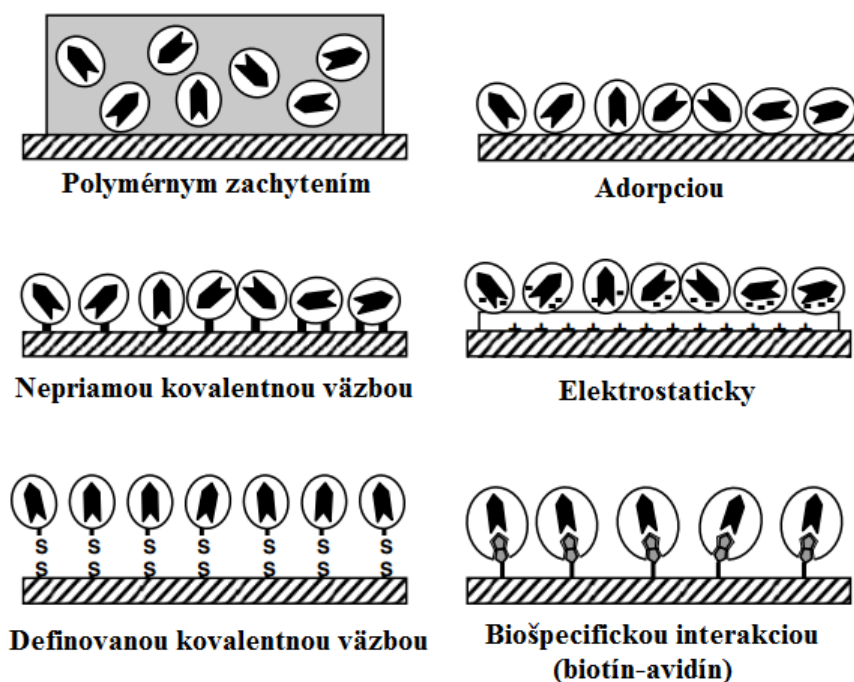
#### 3.1.1 Elektródy na bázy enzýmov

Enzýmy sú proteíny, ktoré katalyzujú chemické reakcie v živých systémoch. Takéto enzýmy sú nielen efektívne ale aj veľmi selektívne. Z tohto dôvodu, kombináciou enzýmov dosiahneme lepšie možnosti snímania v mnohých aplikáciách. [22]

Enzýmové elektródy sú založené na zjednotení vrstvy enzýmov s príslušnou elektródou. Takéto elektródy kombinujú špecifickosť enzýmu s výhodami elektrochemických zariadení. Takéto zjednotenie sa preukázalo mimoriadne výhodné pri sledovaní najrôznejších substrátov analytického významu v klinických vzorkách, za životné prostredie a potravinových vzorkách. [22]

Úspech enzýmových elektród závisí na imobilizovanej vrstve s cieľom poskytnúť blízky kontakt medzi enzýmom a snímacím povrchom pri zachovaní (a dokonca zlepšení) stability. [22]

Na imobilizáciu enzýmu na povrch elektródy sa používa niekoľko fyzikálnych a chemických metód ako ukazuje Obrázok 3.1 (polymérnym zachytením, adsorpciou, nepriamou kovalentnou väzbou, definovanou kovalentnou väzbou, elektrostaticky a biošpecifickou interakciou napr. biotín-avidín). [22]



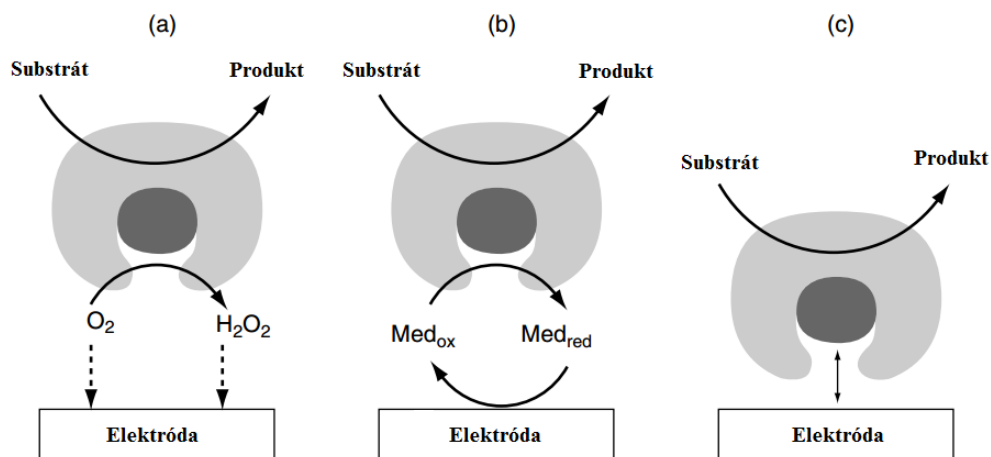
Obrázok 3.1 Metódy imobilizácie enzýmu na povrch elektródy. Prevzaté a upravené z [22]

V chemických metódach je enzým imobilizovaný k povrchu prostredníctvom kovalentnej väzby napríklad pomocou amidu. Ďalšie užitočné systémy imobilizácie zahŕňajú zachytenie vnútri gélovej vrstvy, nízkotepelné zaliatie na solgélkové filmy, adsorpciou na grafitový povrch. Alternatívne polymérne povlaky, môžu byť použité na zachytenie enzýmu prostredníctvom liatia alebo elektropolymerizáciou. [22]

Lepšiu citlivosť a rozsah môže byť dosiahnutý spojením dvoch (alebo viacerých) enzymatických reakcií. Napríklad značne zvýšenie citlivosti enzýmových reakcií môže byť dosiahnuté enzymatickou recykláciou analytu v dvoch enzýmových systémoch. Druhý enzým môže byť navyše použitý pre generovanie detegovaného. [22]

Najdôležitejšou výzvou u ampérometrických enzýmových elektród je vytvorenie uspokojivého elektrického spojenia medzi aktívnym miestom enzýmu a povrchom elektródy. Na ampérometrické biosenzory môžu byť použité rôzne mechanizmy prevodu elektrónov vid' Obrázok 3.2, vrátane prírodných sekundárnych substrátov, umelých redoxných mediátorov alebo priameho prenosu elektrónov. [22]

Pre stanovenie glukózy sa najčastejšie používa enzým glukóza oxidáza (GoX). GoX je dimér s dvoma FAD (flavín-adenín dinukleotid) kovalentne viazanými na podjednotky, ktorý obsahuje asi 16% glykosylovaných zbytkov a je pomerne stálym enzýmom. [23]



Obrázok 3.2 Tri generácie ampérometrických enzýmových elektród na báze využitia prírodného sekundárneho substrátu (a), umelé redoxné mediátory (b), priamym prenosom elektrónu medzi enzýmom a elektródou (c). Prevzaté a upravené z [22].

## 3.2 Senzor glukózy na báze glukóza-oxidázy (GoX)

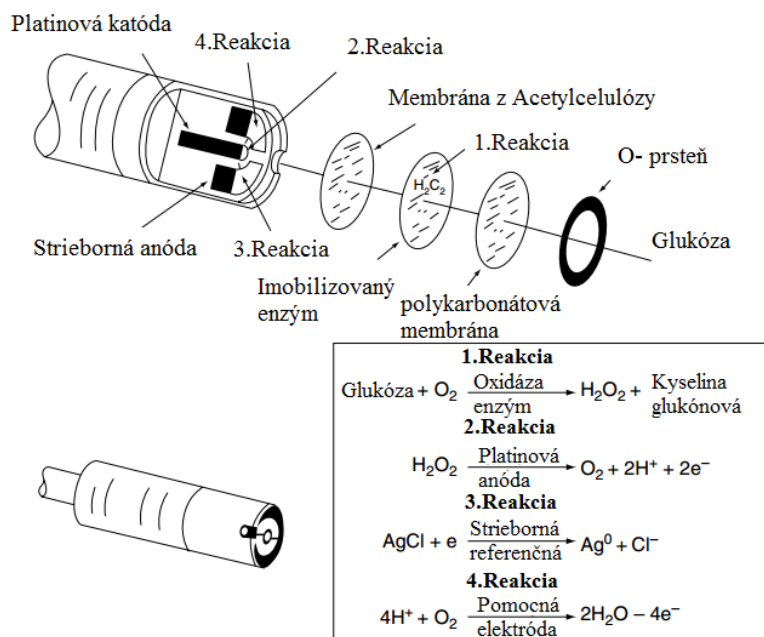
### 3.2.1 Biosenzor 1. generácie

Prvý koncept glukózo-enzýmovej elektródy bol navrhnutý v roku 1962 Clarkom a Lyonsemom. Clark najskôr hľadal elektródu, ktorá by umožnila stanoviť koncentráciu kyslíka. Umiestnil jednoduchú provizórnu membránu na platinovú elektródu a meral koncentráciu kyslíka monitorovaním pretekajúceho prúdu po vložení napätia na elektródu. Potom vyskúšal pridať enzým GoX medzi membránu a elektródu. Tým bol schopný stanoviť koncentráciu glukózy monitorovaním poklesu traku kyslíku, ktorý sa spotrebovával pri enzymatickej oxidácii glukózy na kyselinu glukonovú a peroxid vodíka. [23]

Nevýhodou tohto typu biosenzoru je, že musí byť kontrolovaná hladina koncentrácie rozpusteného kyslíka a udržiavať ju na konštantnej hodnote. V opačnom prípade nebude koncentrácia glukózy úmerná úbytku kyslíka. [23]

V roku 1973 bola Clarkova elektróda konvertovaná na zariadenie schopné merať glukózu monitorovaním uvoľňovaného peroxidu vodíka. [23]

Spoločnosť Yellow spring Instruments (YSI) v roku 1975 využila Clarkovu technológiu a zostrojila prvý účelový analyzátor (viď Obrázok 3.3), ktorý bol určený k priamemu meraniu glukózy v krvi. Na stanovenie presnej koncentrácie bol potrebný objem  $25\mu\text{l}$ . Princíp analyzátoru je založený na zachytení GoX medzi acetylcelulózu a polykarbonátovú membránu na platinovú pracovnú elektródu. Viacvrstvá membrána zlepšuje prechod kyslíka a vylučuje prípadné interferencie. [22,23]



Obrázok 3.3 Schéma "prvej generácie" glukózového biosenzoru (na bázy snímača vyrábaného firmou YSI INC.). Prevzaté a upravené z [22].

Glukózaoxidáza a iné enzýmy (oxidoreduktázy) neprenášajú elektróny priamo bežným elektródam, pretože sú ich redoxné centrá obklopené hrubou proteínovou vrstvou. Takéto izolačné puzdro zavádza priestorové oddelenie elektrónového donor-akceptorového páru, a tým vytvára bariéru pre priami prenos elektrónov. Medzifázový prenos elektrónov závisí na vzdialenosti medzi enzýmovým redoxným centrom a elektródovým povrchom. V prípade väčších a zložitejších molekúl je kontakt redoxnej skupiny s povrchom elektródy možný iba pre molekuly orientované určitým spôsobom. [22]

### 3.2.2 Biosenzor 2. generácie

Ďalšieho zlepšenia bolo dosiahnuté nahradením kyslíka ako oxidačného činidla mediátorom nesúcim elektróny. Tým sa stali merania menej citlivé na kolísanie kyslíka a je možné s nimi pracovať pri nižších potenciáloch, ktoré nevyvolávajú rušivé reakcie. [22]

Mediátor nepôsobí priamo na enzým. Substrát najskôr reaguje s oxidovanou formou enzýmu za vzniku produktu a potom mediátor oxiduje redukovaný enzým a získané elektróny predáva na povrch elektródy Obrázok 3.2 (b).

Prvý biosenzor určený na domáce meranie založený na elektrochemickom princípe s použitím mediátoru vyvinula firma MediSence v roku 1987. Ako mediátor tu slúžil ferrocenový derivát. Tento biosenzor bol vyrábaný ako testovací prúžok z polyvinylchloridu a jednotlivé vrstvy sa nanášali metódou sieťotlače. Prúžok obsahoval trojelektrodovú komôrku, v ktorej sa nachádzala pracovná elektróda potiahnutá vrstvou enzýmu a mediátoru, pomocná elektróda obsahujúca iba mediátor a referenčná argenticchloridová elektróda. Koncentrácia glukózy je meraná odčítaním prúdu vzniknutého na pomocnej elektróde od prúdu na pracovnej elektróde. [23]

Ako mediátor pre elektrokatalytické snímače môže byť použitá vrstva Berlínskej (Pruskej) modrej alebo pokovovaných atómov uhlíka, ktoré prednostne urýchľuje oxidáciu



peroxidom vodíka. Avšak prítomnosť jednoduchých mediátorov, akým je Berlínska modrá môže viesť aj k problému. Tieto mediátory bez problémov reagujú aj s interferujúcimi látkami (kyselina askorbová, močová a iné látky). Pre presné meranie je teda vhodnejšie použiť komplexnejšie zlúčeniny. Takýto mediátor spoločne s enzýmom poskytuje vyššiu selektivitu. [22,23]

Príliš vysoká koncentrácia mediátorov vedie k ďalším problémom spojeným s jeho použitím ako prenášača elektrónov. Pri vysokej koncentrácii oxidovaného mediátoru v reakčnej zmesi môže v extrémnych prípadoch dôjsť k tomu, že molekula mediátoru vstúpi do aktívneho centra oxidovaného koenzýmu (FAD) a ten potom nereaguje s prítomnosťou glukózy. [23]

### 3.2.3 Biosenzor 3. generácie

Tieto biosenzory sú založené na priamom prenose elektrónov. Enzým nie je možné redukovat' (oxidovat') priamo na elektróde, pretože by dochádzalo k denaturácii jeho proteinovej časti a tým by sa celý proces veľmi spomalil a stal by sa ireverzibilným. Jedným zo spôsobov je modifikácia povrchu zlatej elektródy 4,4' - bipyridinom. Samotný bipyridyn nie je elektroaktívny ale môže fungovať ako mediátor. Iný spôsob predstavujú organické soli, ktoré sa reverzibilne oxidujú alebo redukujú. Niekoľko týchto molekúl vytvorí komplex schopný elektrónového prenosu. Tieto organické soli je možné zakomponovať do materiálov elektródy vo forme kryštálov alebo zmiešaním s uhlíkovým práškom. [23]

## 3.3 Modifikované glukóзовé biosenzory

Z dôvodu zlepšenia citlivosti, prúdovej odozvy, detekčného limitu a zároveň odstránenie vplyvu nežiadúcich interferujúcich látok sa vykonávajú rôzne modifikácie.

Miscoria a kolektív v práci [24] modifikovali hrubovrstvové elektródy biosenzoru ródium, ktorý slúžil ako katalyzátor, enzýmom GOx ako biologickým činidlom, a polytyraminom ako bariérou voči interferujúcim látkam. Hrubovrstvové uhlíkové elektródy boli tlačené pomocou poloautomatu (Model TF-100, MPM Inc., Franklin, MA) komerčnou uhlíkovou pastou (Acheson) na alumínu (Coors Ceramic Co., Golden, CO). Povrch elektród bol čistený cyklickou voltampérometriou v rozsahu medzi -0,800 V a 0,800 V s polarizačnou rýchlosťou 50 mV/s v 50mmol/l fosfátovom pufru pH 7,40. Galvanické nanášanie ródia prebiehalo pri napätí -0,800 V počas 20 minút. Adsorpcia GOx bola vykonaná pri napätí 1,200 V vo fosfátovom pufru obsahujúcom 22,5 mg/ml GOx počas 15 minút. Polymerizácia tyraminom prebiehala cyklovaním napätia v rozsahu od -0,100 V do 1,700 V pri polarizačnej rýchlosti 100 mV/s v 0,10mol/l tyraminovom roztoku. Ampérometrické meranie prebiehalo pri napätí 0,700 V a bolo dosiahnuté lineárnej odozvy do koncentrácie 10 mol/l glukózy. Biosenzor rovnako vykazoval vysokú selektivitu, pri pridaní vyššej koncentrácie kyseliny močovej a kyseliny askorbovej nebola spozorovaná odozva.

Pemberton a kolektív vytvorili hrubovrstvový biosenzor uhlíkovou pastou na vodnej báze, ktorá obsahovala kobalt phthalocyanine slúžiaci ako mediátor a GOx ako biologické činidlo. Táto pasta bola zakúpená od firmy Gwent electronic Materials. Pracovná elektróda bola dlhá 3 mm a hrúbka vrstvy dosahovala 20  $\mu$ m. Merania na biosenzore boli uskutočnené pri pokojovej teplote 25 °C. Všetky experimenty prebehli na trojelektrodovom systéme s pracovnou elektródou, plus Ag/AgCl referenčnou elektródou a Pt pomocnou elektródou na

počítačom kontrolovanom potenciostate  $\mu$ Autolab Typ II (Windsor Scientific Ltd., Slough, UK). Voltampérometria 50mmol/l fosfátového pufru pH 8 obsahujúci 150 mmol/l NaCl a 1 mmol/l glukózy preukázal, že prevádzkové napätie 0,400 V je vhodné pre tento biosenzor. V práci bol skúmaný vplyv hladiny pH na odozvu a najlepšiu vykazoval pH 8. Kalibračná štúdia tohto biosenzoru ukázala, že kludový prúd je lineárne závislý na koncentrácií glukózy. Detekčný limit bol od koncentrácie 0,27 mmol/l do 2,0 mmol/l s 6,2 % až 10,7 % reprodukovateľnosťou výsledkov. [25]

Qiang Gao a kolektív vyrobili viacvrstvý glukózový biosenzor pripevnením jednostennými uhlíkovými nanotrubičkami modifikovanými enzýmom GOx (GOx-SWCNT) a redoxným polymérom (PVI-Os) natlačeným na uhlíkovú elektródu (SPCE). Povrch SPCE bol galvanicky pokrytý kationmi polyméru PVI-Os a nasledne striedavo ponorený v aniónovom GOX-SWCNT a kationovom PVI-O. Združená dvojvrstva GOx-SWCNT a PVI-Os bola vytvorená cyklickou voltampérometriou. Výsledný glukózový biosenzor produkuje stabilnú a reprodukovateľnú odozvu. Elektrokatalytický prúd pre oxidáciu glukózy bol zvýšený pomocou navýšenia počtu dvojvrstiev. Ampérometrické meranie prebiehalo pri napätí 0,300 V. Tento biosenzor má široký lineárny rozsah pri detekcii glukózy od koncentrácie 0,5 mmol/l do 8,0 mmol/l a vysokú citlivosť 32 A/mMcm<sup>2</sup> s dobou odozvy menšou ako 5 s, avšak vykazoval vysokú odozvu na kyselinu močovú a kyselinu askorbovú. [26]

## 4 Plazma

Plazma je súbor nabitých aj neutrálnych častíc v rôznych kvantových stavoch, o ktorom platí, že jeho priestorový náboj je približne rovný nule. Túto vlastnosť nazývame kvázineutralita. Časticami sa v tejto definícii rozumie nielen elementárne častice, ako sú napr. elektróny, ale aj ióny, neutrálne atómy, molekuly. Každá z týchto zložiek môže interagovať s ostatnými a taktiež sama so sebou. [27]

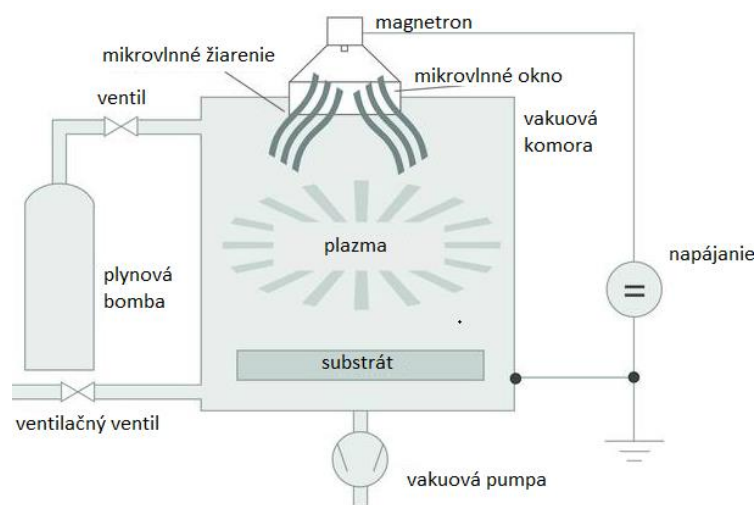
Plazma sa používa na spájanie materiálov dohromady, alebo na zmenu povrchových vlastností materiálov. Pomocou plazmy je možné meniť vlastnosti prakticky akéhokoľvek povrchu. Preto sa ponúka rada aplikácií, napríklad: [28]

- precízne čistenie malých mikro komponent,
- aktivácia plastových dielov pred lepením, maľovaním, atď.,
- leptanie a čiastočne odstránenie rôznych materiálov, ako sú fotorezisty,
- nanášanie tenkých vrstiev, ako sú povlaky znižujúce trenie, hydrofilné a hydrofóbne povlaky, atď. [28]

V nízkotlakovej plazme, je plyn excitovaný dodávanou energiou vo vákuu. Výsledkom sú energeticky bohaté ióny a elektróny, ako aj ostatné reaktívne častice, ktoré tvoria plazma. Tieto častice potom môžu efektívne zmeniť povrch materiálov tromi rôznymi spôsobmi: [28]

- mikropieskovanie – povrch je odstraňovaný bombardovaním iónov,
- chemická reakcia – ionizovaný plyn chemicky reaguje s povrchom,
- UV žiarenie – rozbíja dlhé uhlíkové väzby.

Plazma odstraňuje uvoľňujúce činidla (vrátane silikónu a oleja) z povrchu. Tie sú chemicky kontaminované napr. kyslíkom a prevedené na prchavé zlúčeniny. Uvoľňujúce činidla, alebo ich zvyšky sa čiastočne odparia vplyvom podtlaku a plošného vykurovania. Molekuly týchto činidiel sú rozdelené na menšie fragmenty molekúl vplyvom energetických častíc v plazme a môžu teda byť extrahované. K upravovaniu povrchu materiálov vplyvom plazmy sa používajú rozličné plyny (napr. kyslík, argón, argón-vodík, kyslík-tetrafluórmetan) a chemické látky (napr. acetón, vinyl-acetón, fluórované chemikálie). Diagram nízkotlakovej plazmy s mikrovlnným generátorom je zobrazený na Obrázok 4.1 [28]



Obrázok 4.1 Diagram nízkotlakovej plazmy s mikrovlnným generátorom. Prevzaté a upravené z [28].

# 5 Experimentálna časť

## 5.1 Chemikálie

### Fosfátový pufr

Na prípravu fosfátového pufru bolo potrebné 1,56 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $M_r = 156,01$  g/mol) domiešať do 50 ml vody (pre všetky roztoky bola použitá ultračistá voda Millipore,  $R > 18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ ) a 3,56 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $M_r = 177,99$  g/mol) domiešať do 100 ml vody. Následne zmiešaním 200mmol/l roztoku  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  s 200mmol/l roztokom  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  v pomere uvedeným v tabuľke a doplnením 100 ml vody vzniklo 200 ml 100mmol/l fosfátového pufru.

Tabuľka 2 pH pre fosfátový pufr

hodnota pH	roztok $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [ml]	roztok $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [ml]
7	39	61
7,4	19	81
8	5,3	94,7

### Glukóza

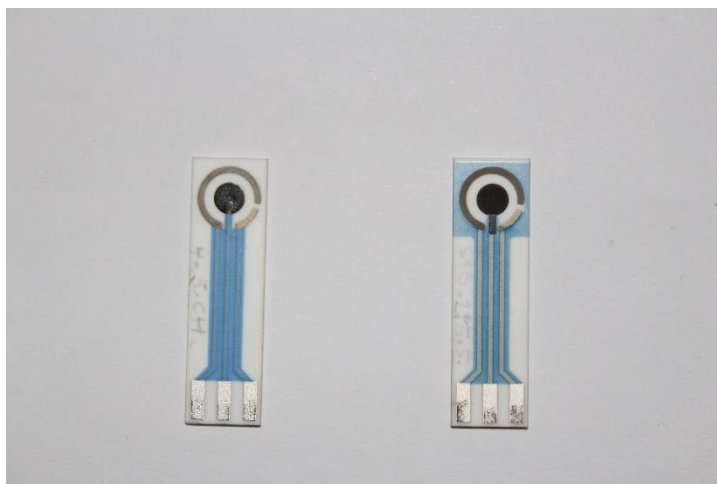
Glukóza s koncentráciou 100 mmol/l bola pripravená, rozpustením 1,9817 g  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$  ( $M_r = 198,17$  g/mol) vo 100 ml vody.

### Kyselina askorbová

Kyselina askorbová s koncentráciou 100 mmol/l bola pripravená, rozpustením 1,7613 g  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$  ( $M_r = 176,13$  g/mol) vo 100 ml vody.

## 5.2 Skúmaný trojelektrodový systém

Pri meraní boli použité dva druhy tlačných trojelektrodových elektrochemických systémov verzia S8 a S10 (vid' Obrázok 5.1). Pri verzii S8 je pod stredom pracovnej elektródy vyvedený strieborný kontakt. Pri verzii S10 je kontakt vedený z okraju pracovnej elektródy pomocou uhlíkovej pasty. Tieto senzory boli vytvorené technológiou hrubých vrstiev a sú významné svojimi malými rozmermi 25,4 mm × 7,2 mm. Pracovná elektróda je vyrobená z uhlíkovej pasty DuPont BQ221 (DuPont, USA) a má priemer 3mm. Pomocná platinová elektróda je realizovaná pastou ESL 5545-G (ESL Electroscience, UK) a referenčná argentschloridová pastou DuPont 5574.[29,30]



Obrázok 5.1 Použité hrubovrstvové trojelektrodové systémy verzia S8 vľavo a verzia S10 vpravo.

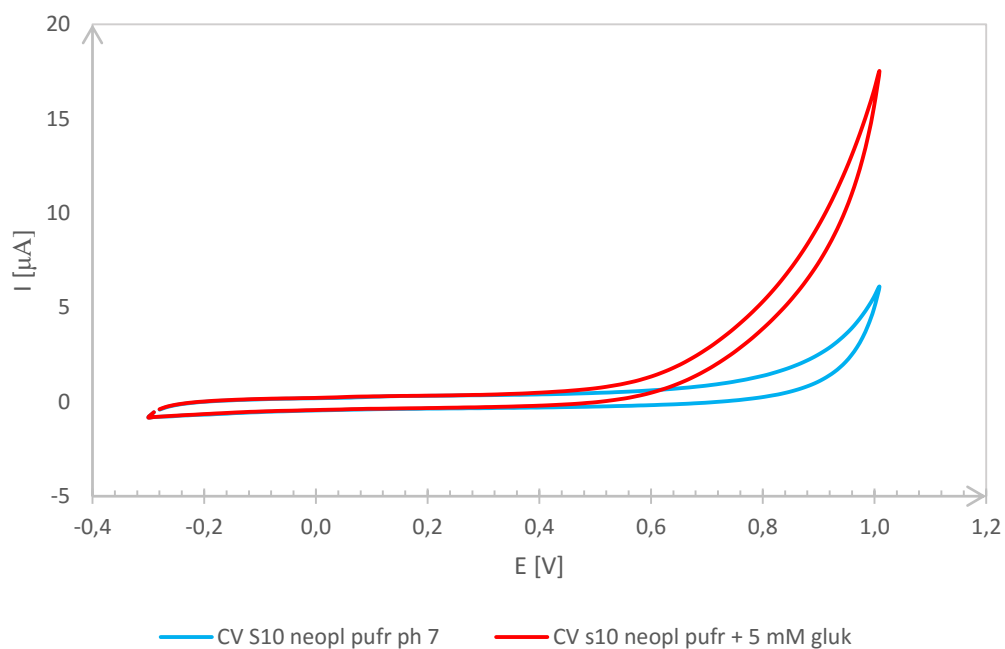
### 5.3 Príprava pracovnej elektródy

Pred každým meraním bola uskutočnená imobilizácia enzýmu GOx na povrch pracovnej elektródy zachytením tohto enzýmu v gélovom roztoku. Na prípravu roztoku bolo potrebné 40  $\mu\text{l}$  albuminu (BSA) 50 mg/ml, ktorý slúži ako stabilizátor enzymovej reakcie, 1  $\mu\text{l}$  glycerolu (5%), zaisťujúceho nevyschnutie pri skladovaní, 20  $\mu\text{l}$  GOx (200 U/mg) kvôli stanoveniu koncentrácií glukózy a 2  $\mu\text{l}$  glutaraldehydu (2%) z dôvodu zosieťovania. Následne bol roztok premiešaný a približne 2  $\mu\text{l}$  boli rovnomerne nanosené na pracovnú elektródu. Roztok sa nechal uschnúť za pokojovej teploty a vytvoril tak sól-gélový film.

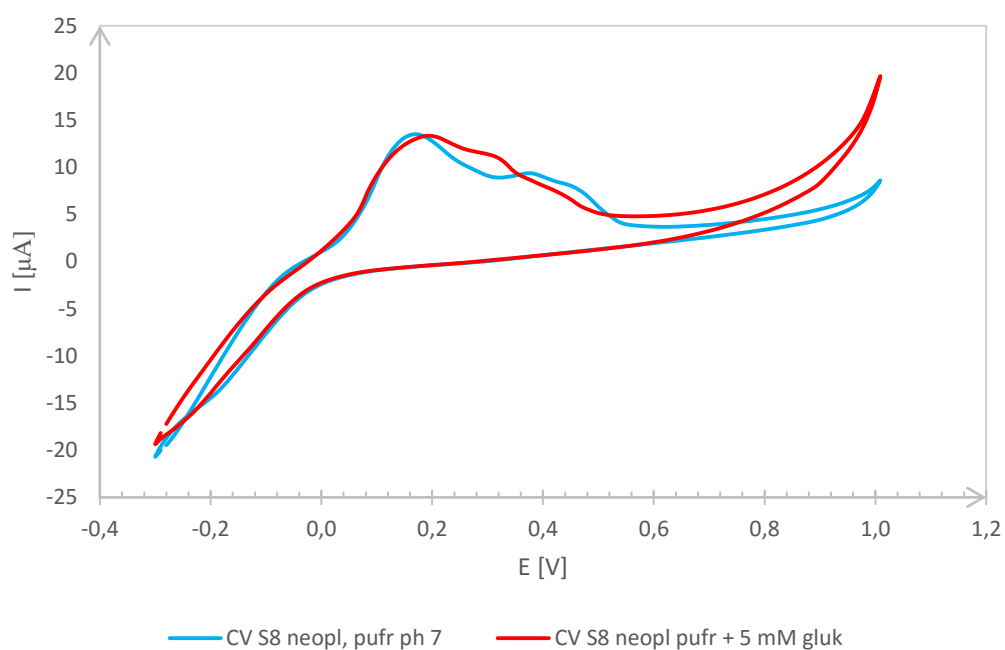
### 5.4 Stanovenie vhodného potenciálu pre detekciu glukózy

Pre stanovenie vhodného pracovného potenciálu pre detekciu glukózy bola uskutočnená cyklická voltampérometria v trojelektrodovom zapojení. Meranie prebiehalo na potenciostate Autolab PGSTAT204/FRA232M (Methrom B.V., Holandsko) s ovládacím softwarom Nova verzia 1.11. Meranie prebiehalo v 10 ml 100mmol/l fosfátového pufru pH 7. Vstupné trojuholníkové napätie bolo rozmiatané - 0,3 až 1 V, s polarizačnou rýchlosťou 0,05  $\text{Vs}^{-1}$  v desiatich cykloch.

Pri druhom meraní bola kvôli nájdeniu vhodného potenciálu pre ampérometrickú detekciu (potenciál, kde dochádza k oxidácii peroxidu vodíka) pridaná do fosfátového pufru glukóza s koncentráciou 100 mmol/l a objemom 526  $\mu\text{l}$ . Výsledná koncentrácia glukózy v roztoku bola 5 mmol/l. Z nameraných hodnôt bolo pre určenie potenciálu vybraný desiaty cyklus, kedy bola ustálená prúdová odozva vidieť Obrázok 5.2 a Obrázok 5.3. V oblasti od - 0,3 V približne do hodnoty 0,6 V voltampérogram s 5 mmol/l glukózy kopíruje krivku pufru. Pri vyšších napätiach má krivka s prídavkom glukózy výrazne vyššiu prúdovú odozvu. Preto bolo pre následné ampérometrické meranie zvolené napätie 0,7 V. Pri senzore S8 je možné vidieť v oblasti od 0 V do 0,5 V nárast prúdu. Tento nárast je spôsobený práve striebornou pastou, ktorá sa zapojuje do elektrochemickej reakcie a prispieva k prevodu elektrónov.



Obrázok 5.2 Cyklická voltampérometria trojelektrodového senzoru S10 .

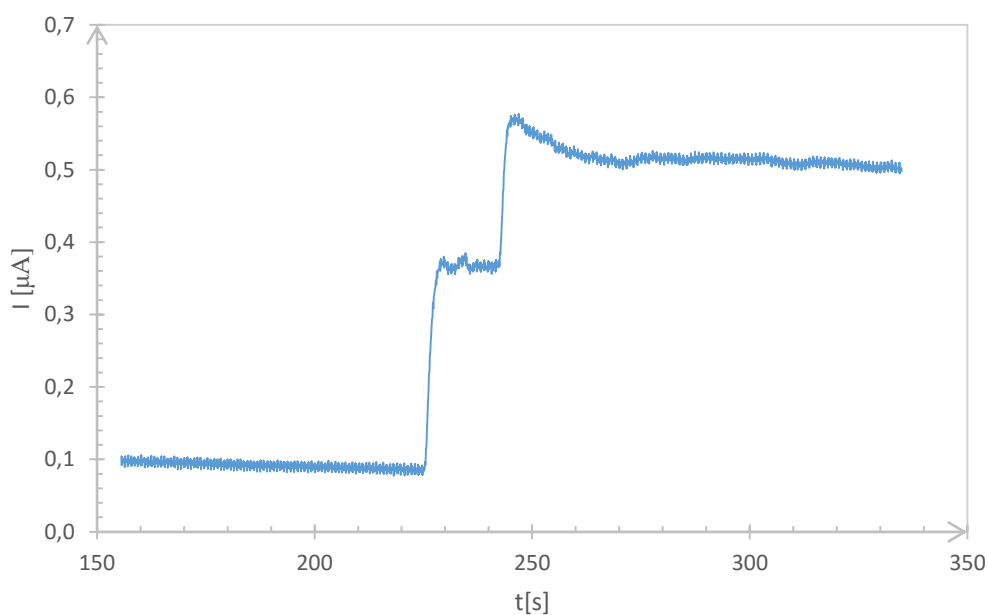


Obrázok 5.3 Cyklická voltampérometria trojelektrodového senzoru S8

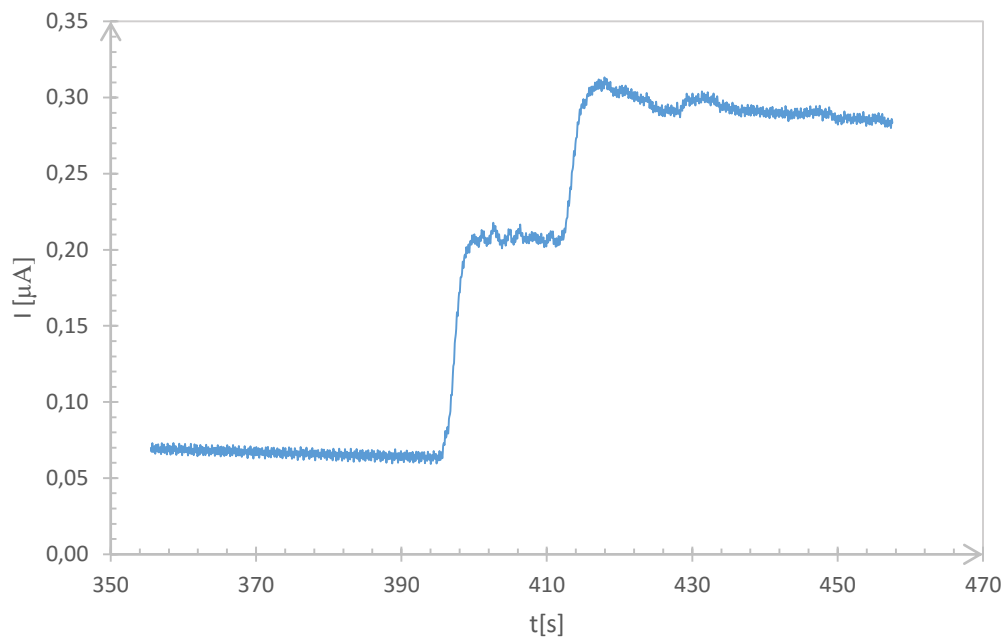
## 5.5 Chronoampérometrické stanovenie glukózy

Meranie opäť prebiehalo na rovnakom potenciostate Autolab. Ako základný roztok bol použitý 10mmol/l fosfátový pufr pH 7 o objemu 10 ml a vstupný potenciál pre meranie bol na základe merania uvedené v podkapitole 5.4 zvolený na 0,7 V. Po ustálení prúdovej odozvy pracovnej elektróde sa do základného roztoku nastriekavali 100  $\mu$ l prídavky

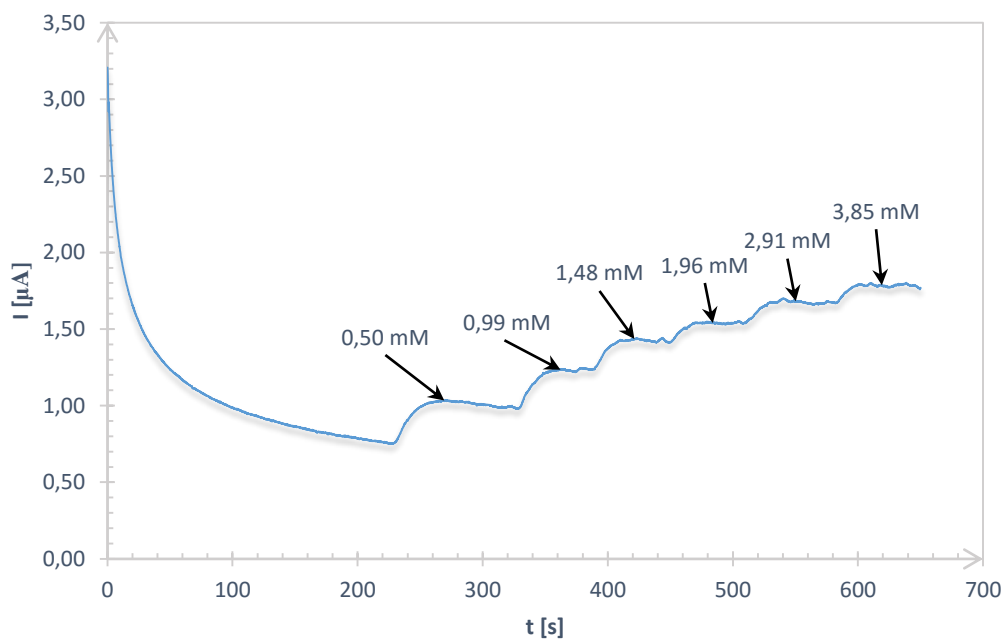
100mmol/l glukózy. Počas meranie bol roztok premiešavaný elektromagnetickou miešačkou MR HEI-MIX-S (Heidolph, Uk) s rýchlosťou otáčania  $2200 \text{ ot} \cdot \text{min}^{-1}$ . V dôsledku toho bolo dosiahnutá rýchlosť odozvy na nástrek glukózy  $t < 5 \text{ s}$ . Skúmaný senzor reagoval len na prvé dva nástreky, čo odpovedá koncentráciám glukózy (0,99 mmol/l, 1,96 mmol/l) vid' Obrázok 5.4 pre senzor S10 a Obrázok 5.5 pre senzor S8. V semestrálnom projekte sa pomocou senzoru S8 podarilo zmerať nástrek glukózy do koncentrácií (0,50 mmol/l, 0,99 mmol/l, 1,48 mmol/l, 1,96 mmol/l, 2,91 mmol/l, 3,85 mmol/l). Lineárna závislosť koncentrácie glukózy na pretekajúcom prúde bola do hodnoty 2 mmol/l a rýchlosť odozvy na nástrek bola 10 s z dôvodu pomalšieho premiešavania roztoku. Rozdiel v prúdovej odozve mohol byť spôsobený horšou imobilizáciou enzýmu (roztok nebol nanesený na celý povrch pracovnej elektródy, bola nanesená príliš veľká prípadne malá vrstva) alebo vplyvom skladovania.



Obrázok 5.4 Chronoampérometrické meranie senzoru S10 s nástrekom  $100 \mu\text{l}$  100 mmol/l glukózy

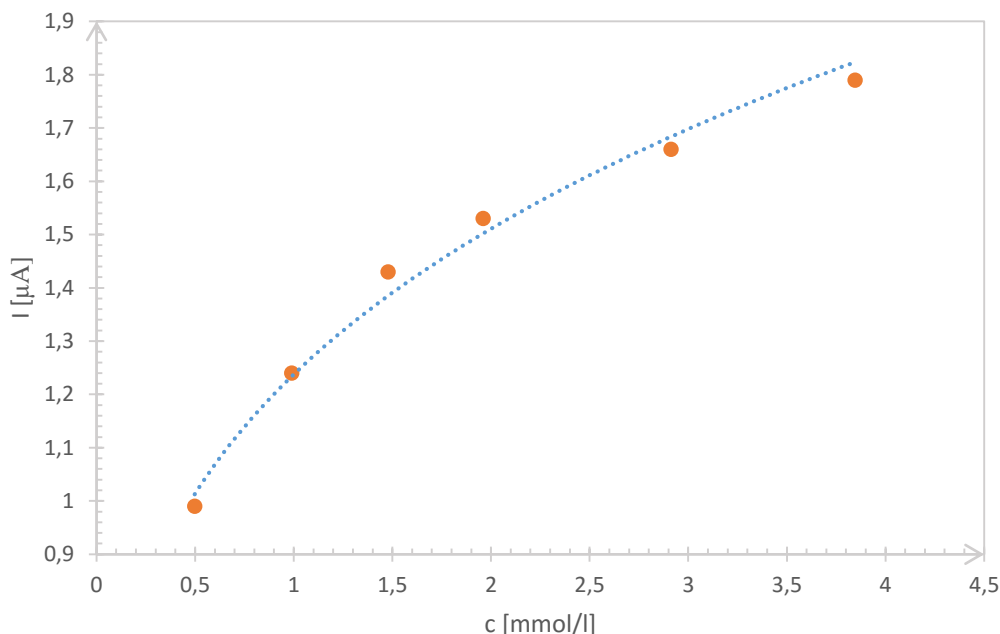


Obrázok 5.5 Chronoampérometrické meranie senzoru S8 s nástrekom 100 µl 100 mmol/l glukózy



Obrázok 5.6 Chronoampérometrické meranie senzoru S8 s koncentraciami glukózy (0,50 mmol/l, 0,99 mmol/l, 1,48 mmol/l, 1,96 mmol/l, 2,91 mmol/l, 3,85 mmol/l)





Obrázok 5.7 Kalibračná krivka trojelektrodového hrubovrstvého systému S8 s koncentraciami glukózy (0,50 mmol/l, 0,99 mmol/l, 1,48 mmol/l, 1,96 mmol/l, 2,91 mmol/l, 3,85 mmol/l)

Kalibračná krivka bola z dôvodu najlepšieho pokrytia všetkých bodov preložená mocninovou závislosťou. To umožňuje lepšiu reprodukovateľnosť výsledkov a určenie neznámej koncentrácie glukózy z pretekajúceho prúdu aj pri vyšších koncentráciách.

## 5.6 Plazmatické čistenie elektród senzora

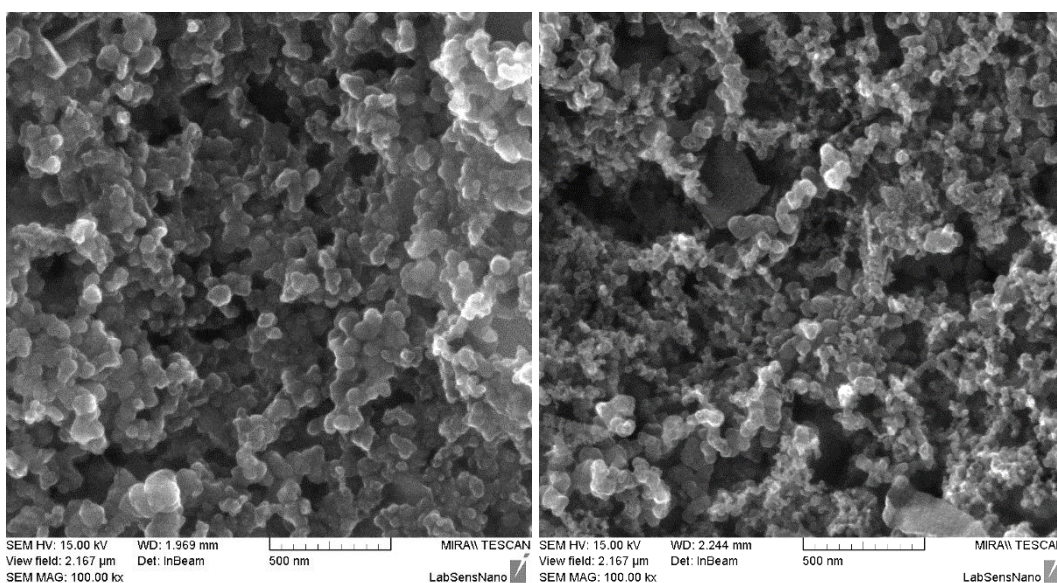
Z dôvodu dosiahnutia lepších výsledkov boli elektródy všetkých trojelektrodových systémov plazmaticky čistené v nízkotlakovej plazme Nano plazma cleaner (Diener plazma surface technology, Nemecko) s mikrovlnným generátorom vid' Obrázok 5.8. Prístroj pracuje na frekvencii 2,36 GHz, jeho maximálny výkon dosahuje 600 W a je ovládaný dotykovým displejom s Microsoft Windows CE.

Pre účel čistenia bol použitý kyslík spolu s argónom v pomere 1:4. Prietok plynu pre kyslík bol 5 sccm a argón 20 sccm. Kvôli zisteniu ideálneho očistenia elektród boli skúšané rôzne parametre plazmy (600 W 5 minút, 300 W 5 minút, 120 W 3 minúty, 120 W 12 minút), z ktorého sa vybrali najlepšie na základe prúdovej odozvy pri chronoampérometrickej detekcie glukózy. Výkon 120 W je najnižší výkon, pri ktorom bola plazma stabilná. Komora sa odčerpala na tlak 0,1 mbar, ktorý po napustení pracovných plynov stúpol na 0,15 mbar. Pred čistením boli prelepené strieborné kontaktovacie plošky všetkých senzorov kaptonovou páskou z dôvodu oxidácie behom procesu.



Obrázok 5.8 Nano plazma cleaner (Diener plazma surface technology, Nemecko)

Na Obrázok 5.9 vľavo je možné vidieť snímok povrchu uhlíkovej pracovnej elektródy zo skenovacieho elektrónového mikroskopu (SEM) pred čistením a napravo po čistení plazmou s výkonom 120 W po dobu 12 min. Snímky boli zhotovené pri zväčšení 100 000krát. Zo snímokach je zrejmé, že povrch pracovnej elektródy nie je pokrytý uhlíkovými časticami homogénne, ale povrch je porézny. Táto morfológia zvyšuje aktívnu plochu. Na obrázku vpravo je navyše vidno, že sú niektoré zrná omnoho menej obalené spojivom, čo zvyšuje reaktívnu plochu a zlepšuje odozvu

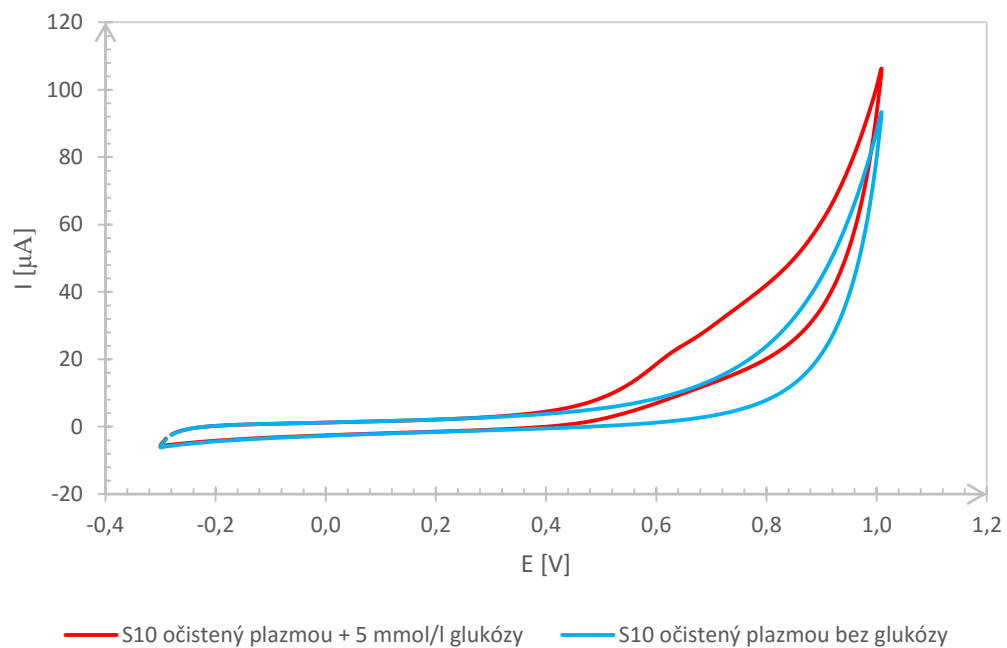


Obrázok 5.9 Sem snímok povrchu pracovnej elektródy pred čistením vľavo a po čistení plazmou s výkonom 120 W po dobu 12 min vpravo.

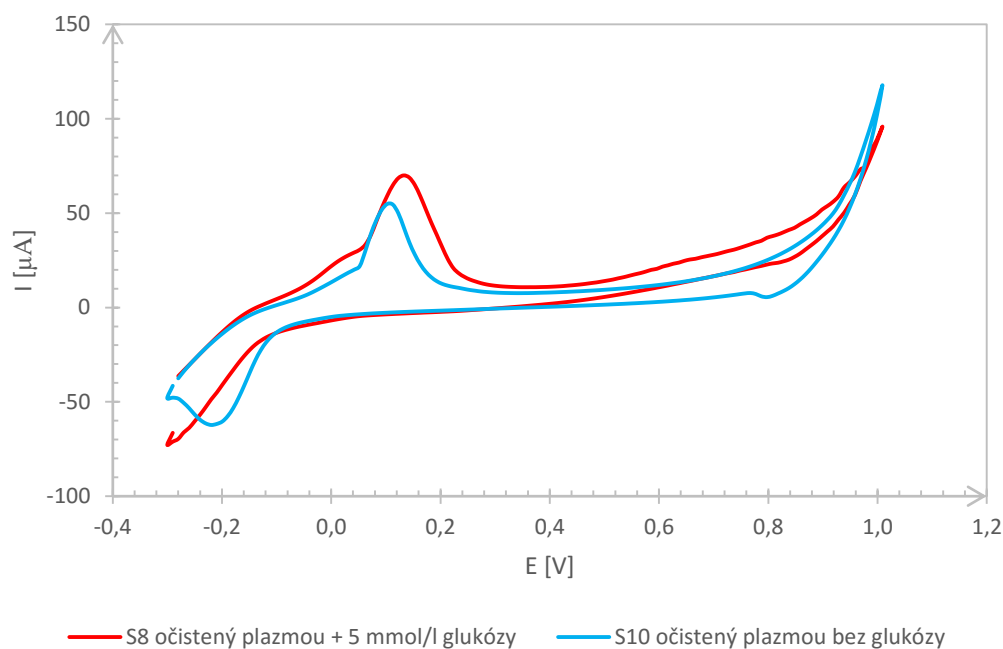
## 5.7 Stanovenie glukózy so senzormi očistenými plazmou

### Stanovenie oxidačného potenciálu glukózy pomocou cyklickej voltampérometrie

Z dôvodu porovnania prebiehalo meranie s parametrami ako v podkapitole 5.4 a vybratý bol 10 cyklus, kedy už bola prúdová odozva ustálená vid' Obrázok 5.10 pre senzor S10 a Obrázok 5.11 pre senzor S8 . Oproti neoplazmovaným senzorom je možné vidieť päť násobný nárast prúdu, pretože na povrchu neočistených senzorov sa nachádzali spojivé zložky, ktoré zabraňovali prenosu náboja. Voltampérogram s prídavkom glukózy pri očistených senzorov kopíroval prúdovú odozvu len do napätia 0,5 V. Pri napätiach od 0,5 V približne do 0,8 V má roztok s 5 mmol/l prídavkom glukózy výrazne vyššiu vodivosť, ktorá ale pri ďalšom zvýšení napätia začína pomaly klesať oproti pufru.



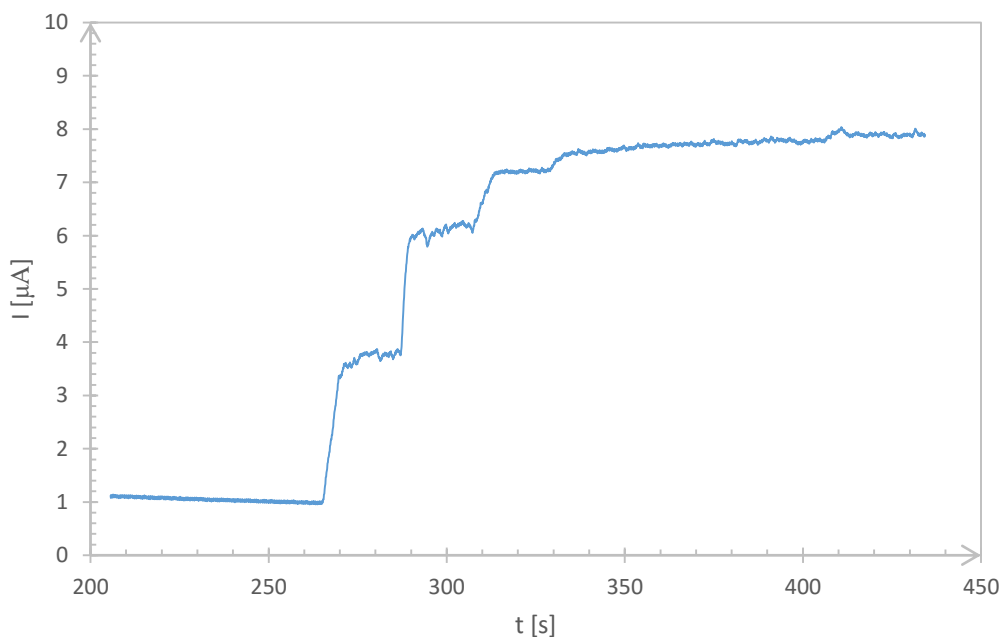
Obrázok 5.10 Cyklická voltampérometria oplazmovaného senzoru S10.



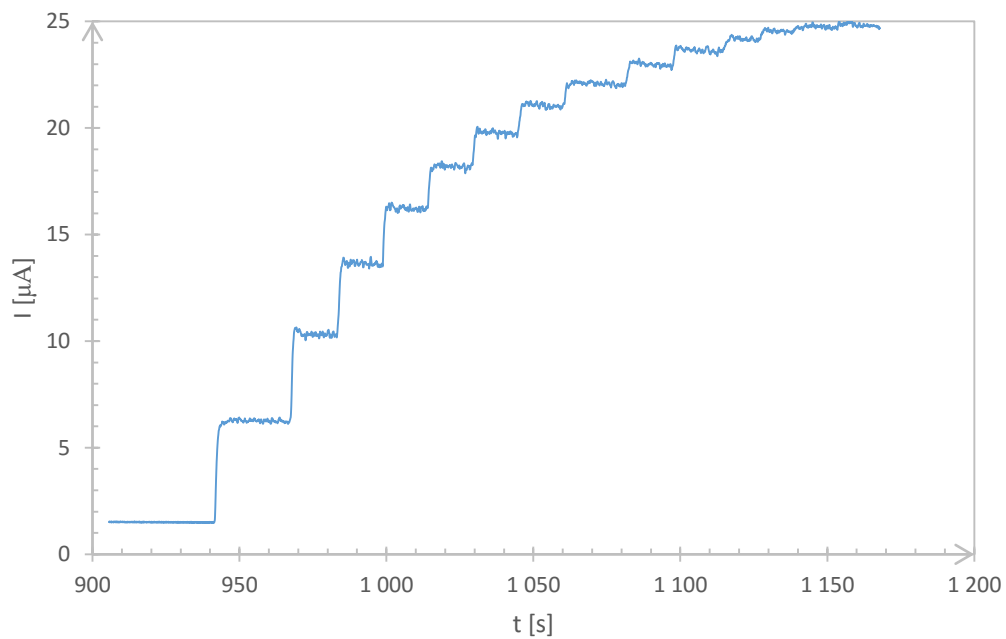
Obrázok 5.11 Cyklická voltampérometria oplazmovaného senzoru S8.

### Chronoampérometrické stanovenie glukózy

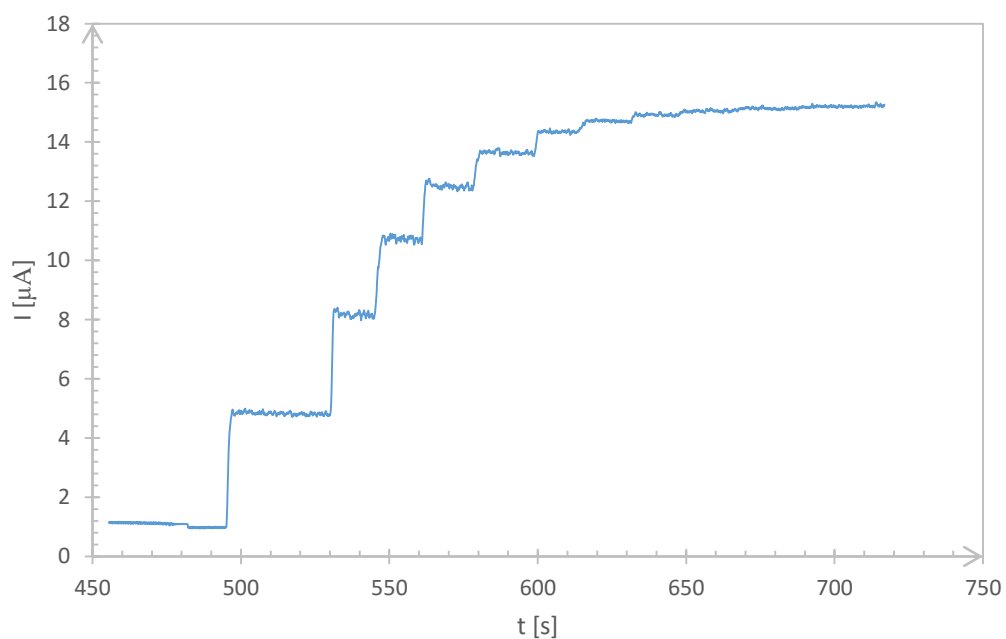
Pri chronoampérometrickom meraní bol zvolený vstupný potenciál 0,7 V z rozsahu 0,5 V až 0,8 V. Pri meraní bol použitý ako základný roztok 100mmol/l fosfátový pufr 10 ml pH 7 do ktorého boli nastrekované 100 $\mu$ l prídavky 100mmol/l glukózy. Výsledné koncentrácie v roztoku boli (0,99 mmol/l, 1,96 mmol/l, 2,91 mmol/l, 3,85 mmol/l, 4,76 mmol/l, 5,66 mmol/l, 6,54 mmol/l, 7,41 mmol/l, 8,26 mmol/l, 9,09 mmol/l, 9,91 mmol/l, 10,71 mmol/l, 11,5 mmol/l, 12,28 mmol/l, 13,04 mmol/l). Pri meraní boli použité senzory očištené plazmou s parametrami (120 W po dobu 3 min. , 120 W po dobu 12 min., 300 W po dobu 5 min. a 600 W po dobu 5 min) pre obe verzie S10 a S8.



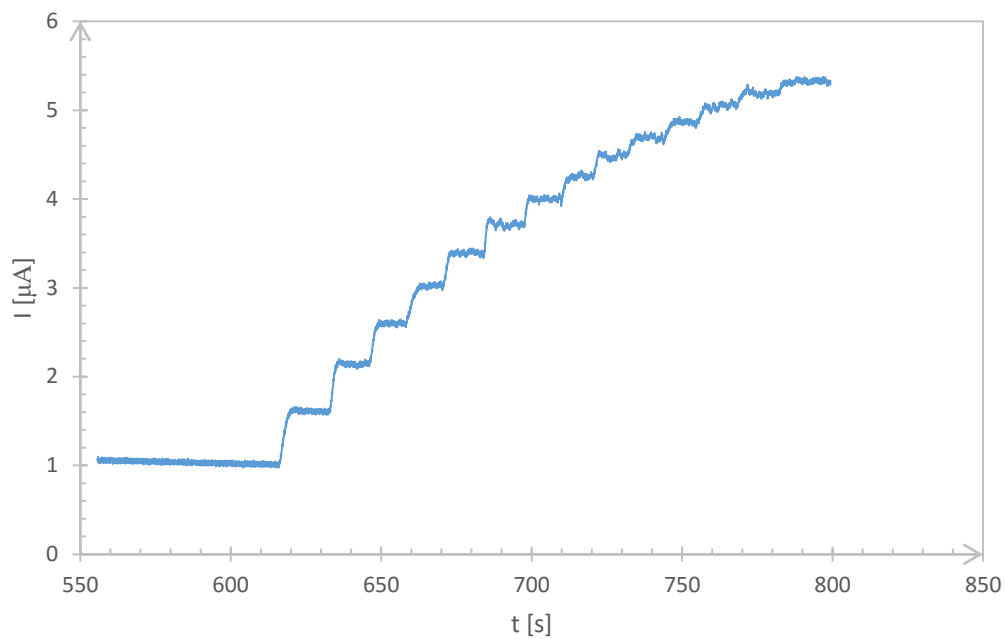
Obrázok 5.12 Senzor S10 oplazmovaný výkonom 120 W po dobu 3 min.



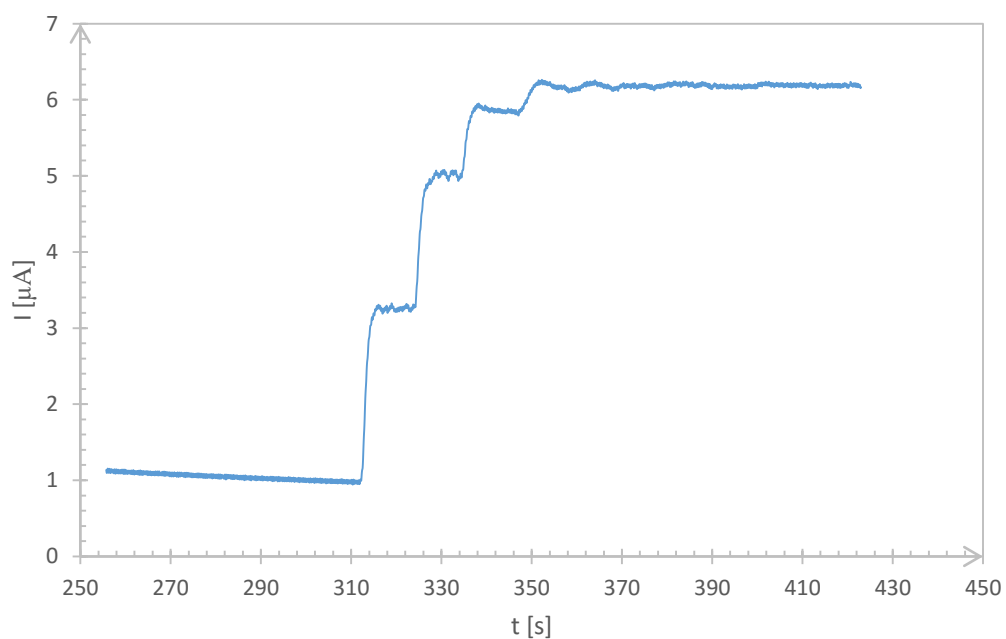
Obrázok 5.13 Senzor S10 oplazmovaný výkonom 120 W po dobu 12 min.



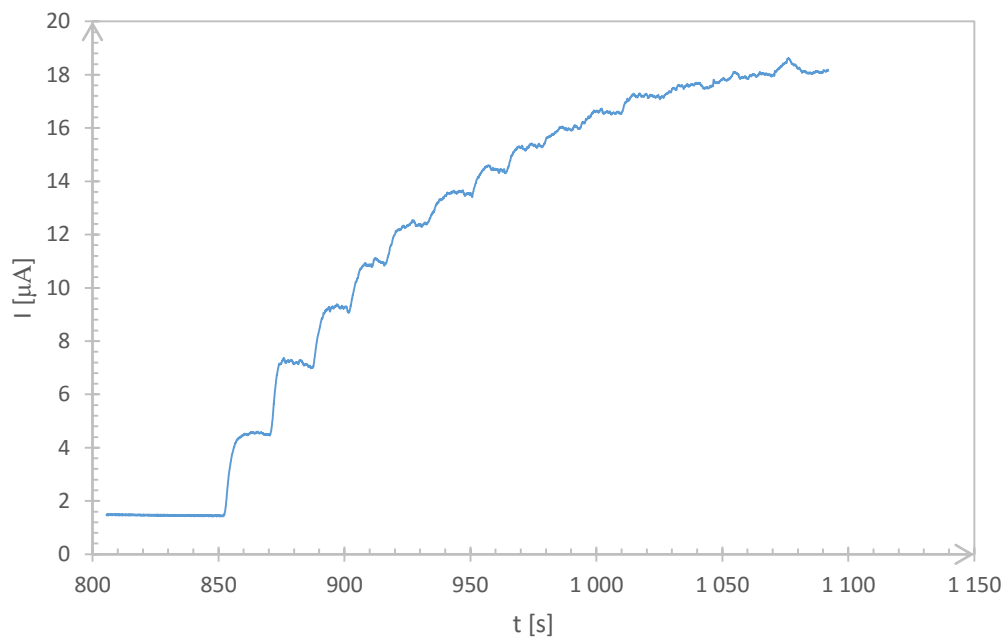
Obrázok 5.14 Senzor S10 oplazmovaný výkonom 300 W po dobu 5 min.



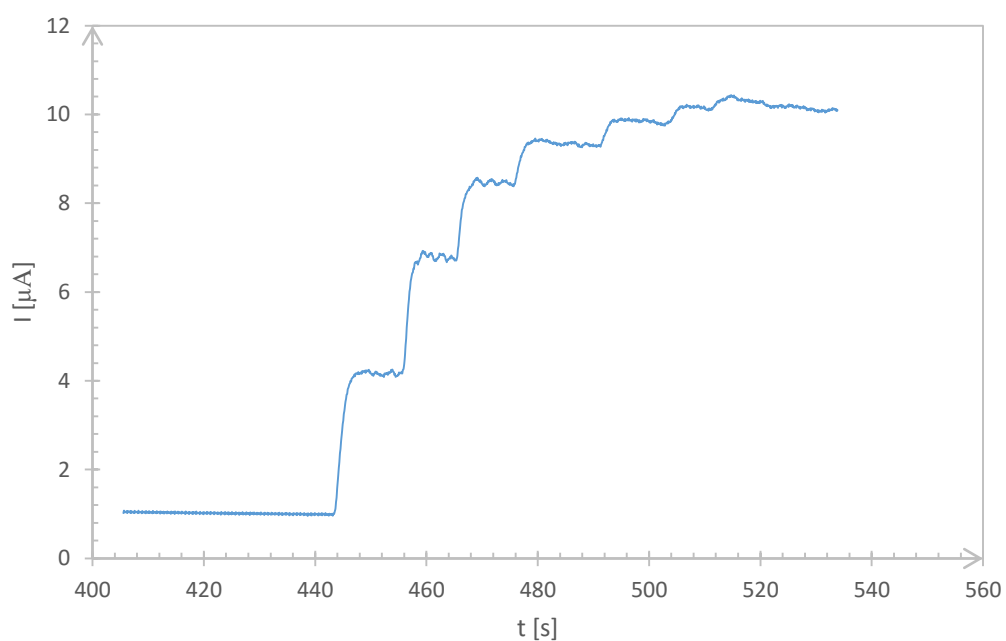
Obrázok 5.15 Senzor S10 oplazmovaný výkonom 600 W po dobu 5 min.



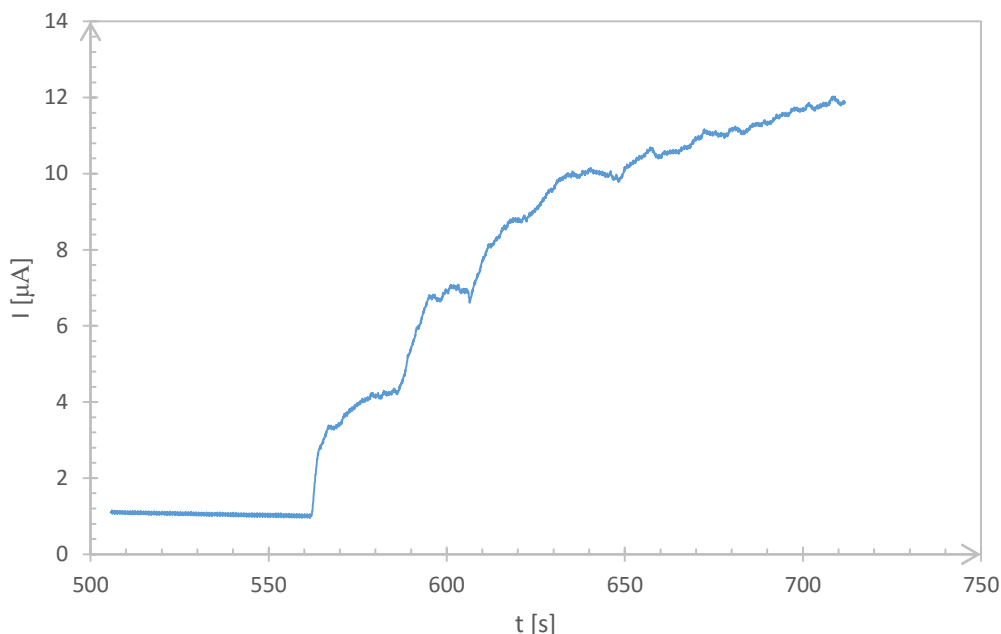
Obrázok 5.16 Senzor S8 oplazmovaný výkonom 120 W po dobu 3 min.



Obrázok 5.17 Senzor S8 oplazmovaný výkonom 120 W po dobu 12 min.



Obrázok 5.18 Senzor S8 oplazmovaný výkonom 300 W po dobu 5 min.



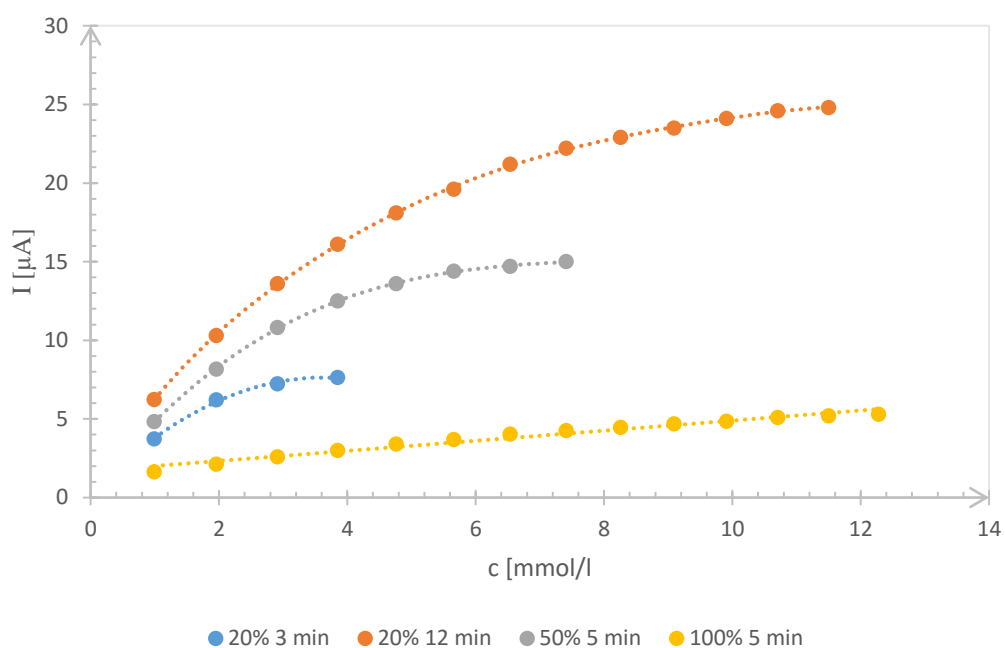
Obrázok 5.19 Senzor S8 oplazmovaný výkonom 600 W po dobu 5 min.

Z grafov Obrázok 5.12 a Obrázok 5.16, kde je použitý výkon plazmi 120 W po dobu 3 minút je zjavné, že povrch elektród bol nedostatočne očistený. Pri výkone 300 W po dobu 5 minút nastal výrazný nárast prúdovej odozvy so skoro okamžitou reakciou na nástrek glukózy. Tieto senzory dosahovali maximálnej detegovanej koncentrácie glukózy 7,41 mmol/l pri senzore S10 a 6,54 mmol/l pri senzore S8. Pri maximálnom výkone plazmy 600 W po dobu 5 minút sa pri senzore S10 zvýšila maximálna detegovaná koncentrácia glukózy na hodnotu 12,28 mmol/l s lineárnym priebehom ale taktiež nastal výrazný pokles prúdu na koncentrácií glukózy. Pri senzore S8 sa zhoršila po druhom prídavku reakčná doba a aj maximálna detegovaná koncentrácia glukózy na 4,76 mmol/l. Zhoršenie mohlo byť spôsobené práve veľkým odberom uhlíkovej pasty až ku striebornej paste, ktorá sa mohla zapojiť do elektrochemickej reakcie. Pri výkone 120 W po dobu 12 minút u oboch druhoch senzorov nastal výrazný nárast pretekajúceho prúdu, reakčná doba bola menšia ako 5 sekúnd a maximálna detegovateľná koncentrácia glukózy bola u senzoru S10 11,50 mmol/l s lineárnou odozvou do koncentrácie 5,66 mmol/l u senzoru S8 12,28 mmol/l s lineárnou odozvou do koncentrácie 6,54 mmol/l. Z dôvodu menšieho vplyvu rušenia elektromagnetickej miešačky a ďalšieho porovnania so senzormi S8 boli pre ďalšie merania vybrané senzory oplazmované výkonom 120 W po dobu 12 minút zvýraznené v Tabuľka 3. Zo všetkých chronoampérogramov boli odčítané hodnoty prúdu na koncentrácií glukózy vid' Tabuľka 3 a vynesené do kalibračných kriviek Obrázok 5.20 pre senzor S10 a Obrázok 5.21 pre senzor S8.

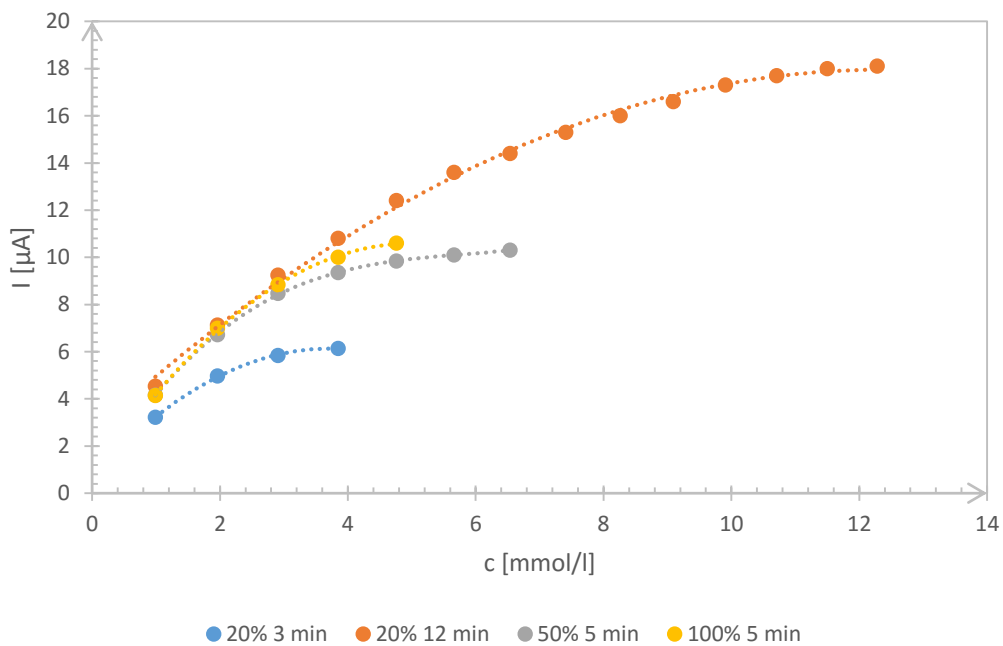


Tabuľka 3 Prúdová odozva senzorov S8 a S10 na nástrek glukózy

c [mmol/l]	S10				S8			
	I [ $\mu$ A]				I [ $\mu$ A]			
	20 % 3 min	20 % 12 min	50 % 5 min	100 % 5 min	20 % 3 min	20 % 12 min	50 % 5 min	100 % 5 min
0	1	1,5	1	1,62	1	1,45	1	1
0,99	3,73	6,23	4,82	2,12	3,22	4,53	4,16	4,14
1,96	6,2	10,3	8,17	2,58	4,97	7,12	6,72	6,99
2,91	7,23	13,6	10,8	2,99	5,83	9,24	8,47	8,83
3,85	7,64	16,1	12,5	3,4	6,14	10,8	9,35	10
4,76	-	18,1	13,6	3,69	-	12,4	9,84	10,6
5,66	-	19,6	14,4	4,02	-	13,6	10,1	-
6,54	-	21,2	14,7	4,26	-	14,4	10,3	-
7,41	-	22,2	15	4,46	-	15,3	-	-
8,26	-	22,9	-	4,69	-	16	-	-
9,09	-	23,5	-	4,84	-	16,6	-	-
9,91	-	24,1	-	5,09	-	17,3	-	-
10,71	-	24,6	-	5,18	-	17,7	-	-
11,50	-	24,8	-	5,30	-	18	-	-
12,28	-	-	-	-	-	18,1	-	-



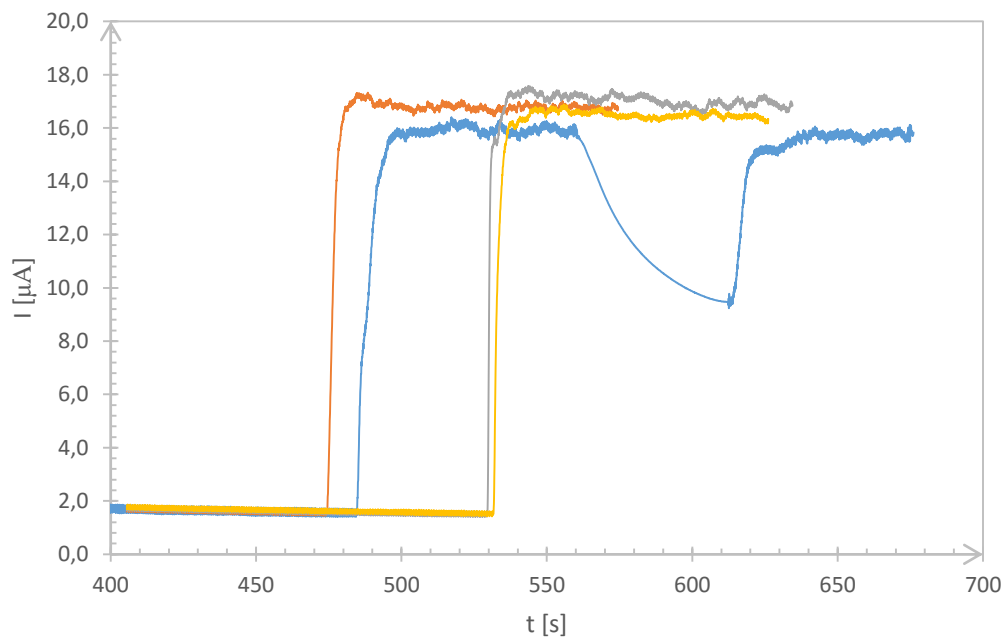
Obrázok 5.20 Kalibračná krivka oplazmovaných senzorov S10.



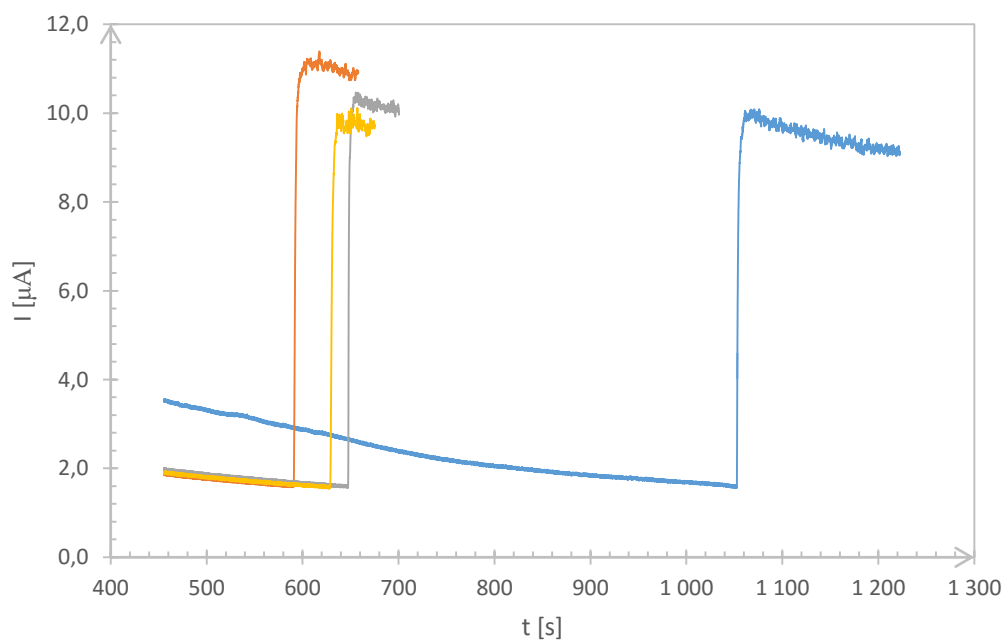
Obrázok 5.21 Kalibračná krivka oplazmovaných senzorov S8.

## 5.8 Reprodukovateľnosť výsledkov

Na reprodukovateľnosť výsledkov boli použité 4 senzory od každej verzie z jedného plátu aby sa vylúčila chyba spôsobená pri tlačení. Všetky senzory boli spolu oplazmované výkonom 120 W po dobu 12 minút v jednom cykle. U senzorech S10 sa ustálil prúd na hodnote 1,5  $\mu\text{A}$  a u S8 na 1,6  $\mu\text{A}$ . Po ustálení prúdu bol uskutočnený nástrek glukózy do výslednej koncentrácie v roztoku 4,5 mmol/l (priemerná hodnota glukózy v krvi človeka ráno pred jedným odobratá z vankúšika prstu).



Obrázok 5.22 Reprodukovateľnosť senzoru S10 očistené plazmou pri výkone 120 W po dobu 12 minút pri nástreku 4,5 mmol/l glukózy.



Obrázok 5.23 Reprodukovateľnosť senzoru S8 očistené plazmou pri výkone 120 W po dobu 12 minút pri nástreku 4,5 mmol/l glukózy.

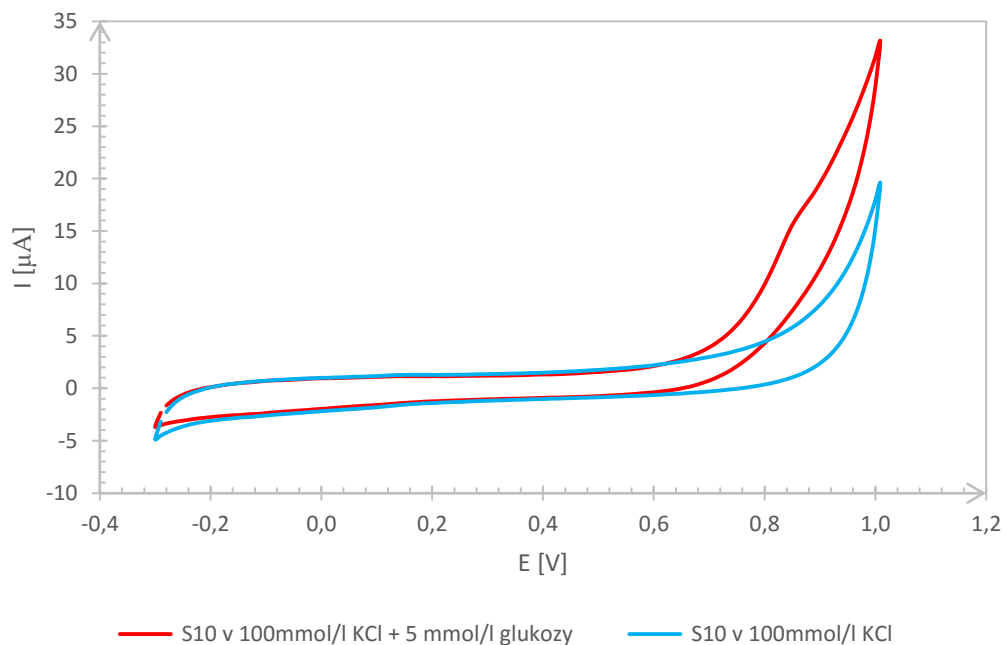
Z chronoampérogramov je možné vidieť, že senzor S10 má vyššiu prúdovú odozvu. Priemerná hodnota prúdu bola 16,55  $\mu\text{A}$ , rozptyl 0,1325  $\mu\text{A}$  a smerodajná odchýlka 0,364  $\mu\text{A}$ . Senzor S8 mal priemernú hodnotu 10,025  $\mu\text{A}$  rozptyl 0,442  $\mu\text{A}$  a smerodajnú odchýlku 0,665  $\mu\text{A}$ .

## 5.9 Vplyv KCl

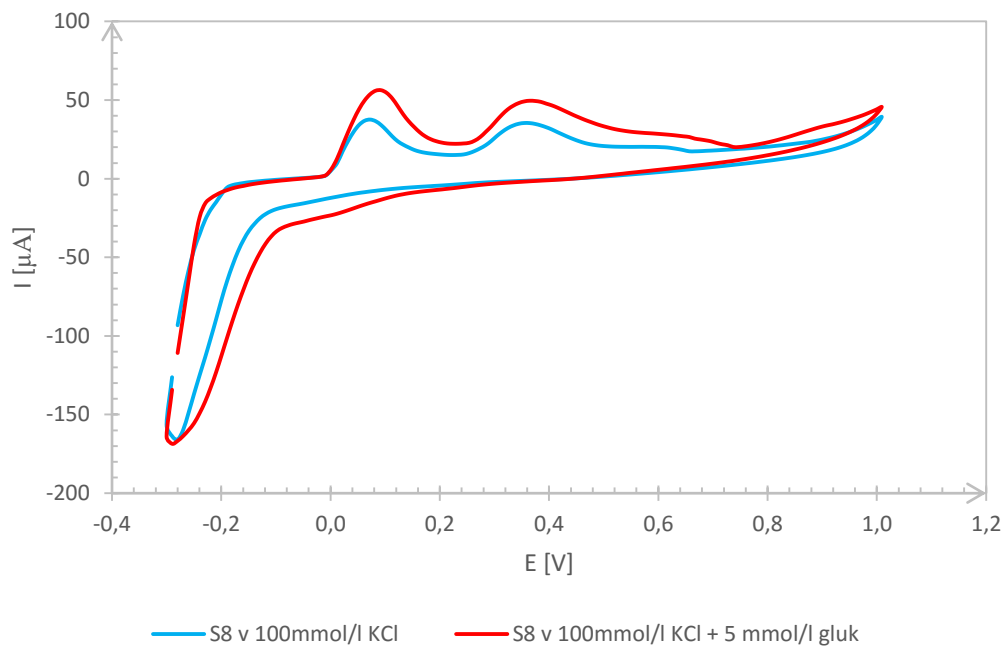
Z dôvodu možného rozpustenia iontov chloridu z referenčnej elektródy do roztoku, sa znížila jeho koncentrácia u povrchu elektródy a tým došlo k posunu oxidačného potenciálu. Na základe toho bol v ďalšom meraní v základnom roztoku rozpustený chlorid draselný do výslednej koncentrácie 100 mmol/l.

### Stanovenie oxidačného potenciálu glukózy pomocou cyklickej voltampérometrie

Pri cyklickej voltampérometrii bol postup merania rovnaký ako v podkapitole 5.4 a sledoval sa rozdiel fosfátového pufru s prídavkom KCl s roztokom obsahujúcim glukózu na požadovanú koncentráciu 5 mmol/l. Roztok s rozpusteným KCl mal pH 6,79.



Obrázok 5.24 Cyklická voltampérometria senzora S10 s rozpusteným KCl do výslednej koncentrácie 100 mmol/l.

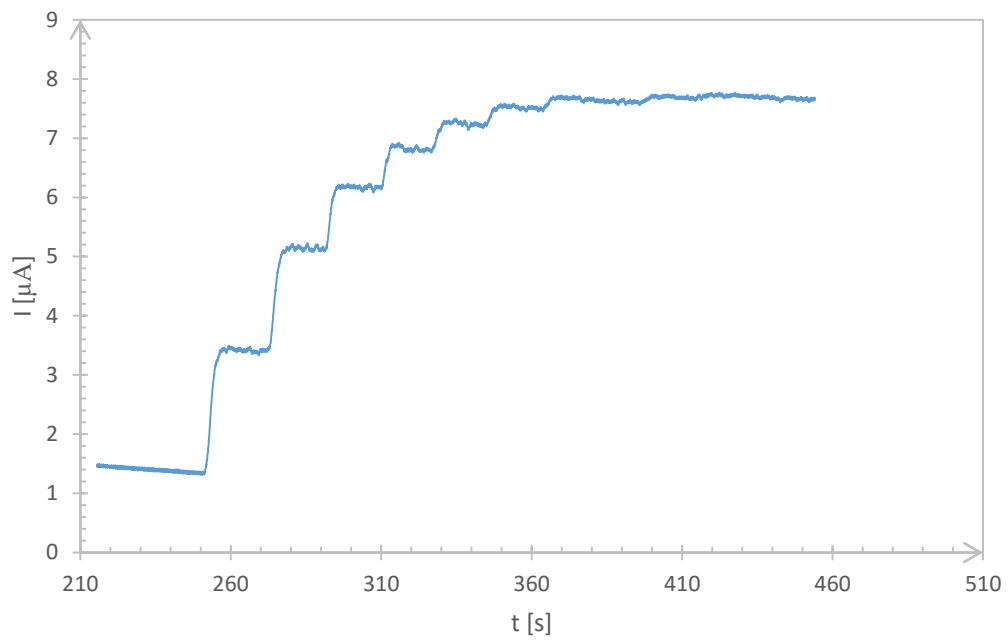


Obrázok 5.25 Cyklická voltampérometria senzora S8 s rozpusteným KCl do výslednej koncentrácie 100 mmol/l.

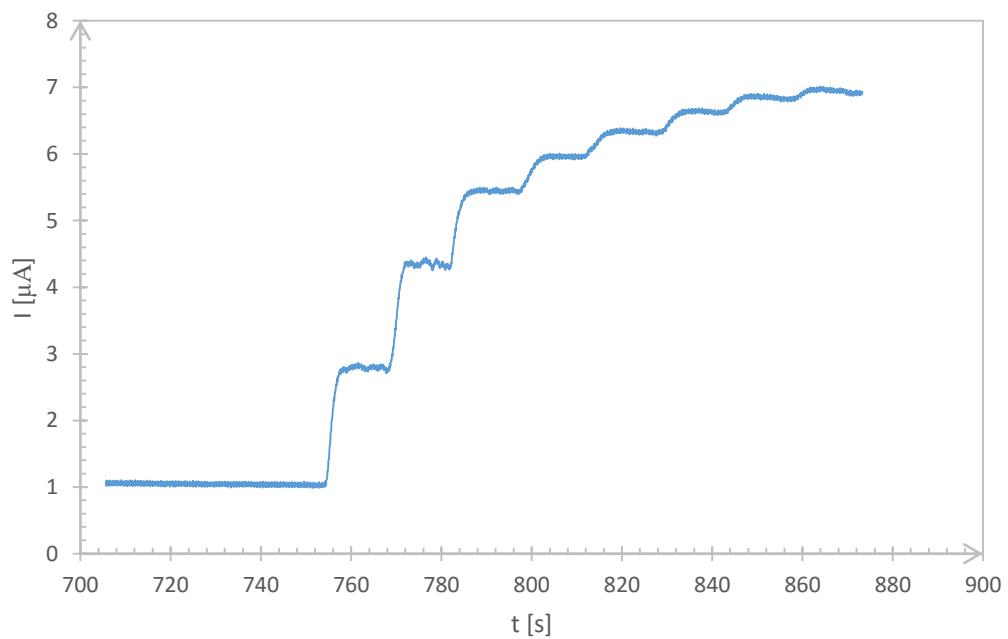
Z nameraných voltampérografov je u oboch senzorov zrejmé, že napätie 0,7 V bude pre následné ampérometrické meranie nedostatočné, pretože prúdová odozva s prídavkom glukózy je rovnaká ako základný roztok. Napätie bolo nutné voliť v rozmedzí od 0,8 V do 1 V.

### Chronoampérometrické stanovenie glukózy

Pri chronoampérometrickom meraní bolo u všetkých senzorov zvolené napätie 0,85 V z predchádzajúceho merania, ako základný roztok bol použitý fosfátový pufr s rozpusteným chloridom draselným a nástrek glukózy bol ako v predchádzajúcich chronoampérometrických meraní po 100  $\mu$ l glukózy do výsledných koncentrácií (0,99 mmol/l, 1,96 mmol/l, 2,91 mmol/l, 3,85 mmol/l, 4,76 mmol/l, 5,66 mmol/l, 6,54 mmol/l, 7,41 mmol/l, 8,26 mmol/l, 9,09 mmol/l, 9,91 mmol/l, 10,71 mmol/l, 11,5 mmol/l, 12,28 mmol/l, 13,04 mmol/l).

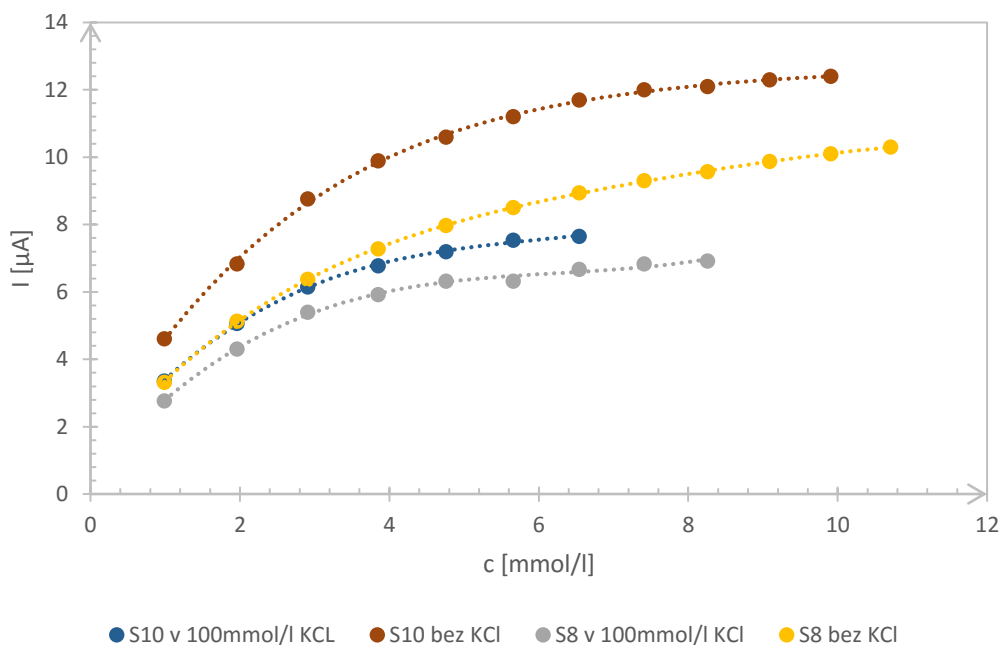


Obrázok 5.26 Chronoampérometrické meranie s rozpusteným chloridom draselným o koncentrácií 100 mmol/l pre senzor S10.



Obrázok 5.27 Chronoampérometrické meranie s rozpusteným chloridom draselným o koncentrácií 100 mmol/l pre senzor S8.

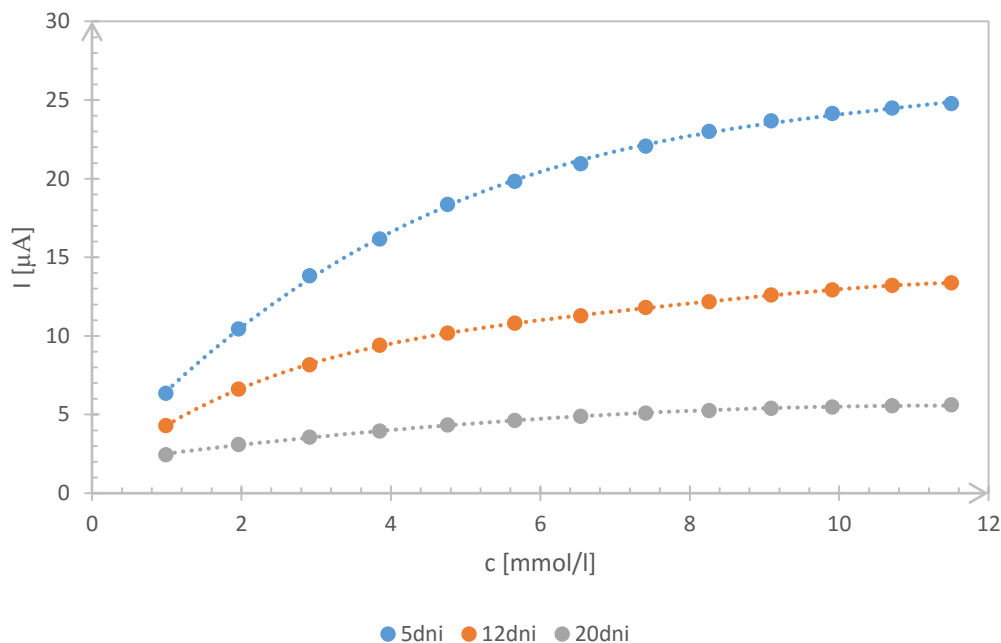
Napriek snahe zlepšiť vlastnosti senzora pomocou pridania chloridu draselného do meraného roztoku aby sa zvýšila jeho koncentrácia na povrchu referenčnej elektródy sa zhoršila jeho prúdová odozva pri detekcii glukózy vid' Obrázok 5.28



Obrázok 5.28 Kalibračná krivka pre senzory S10 a S8 s rozpusteným KCl.

## 5.10 Vplyv doby skladovania

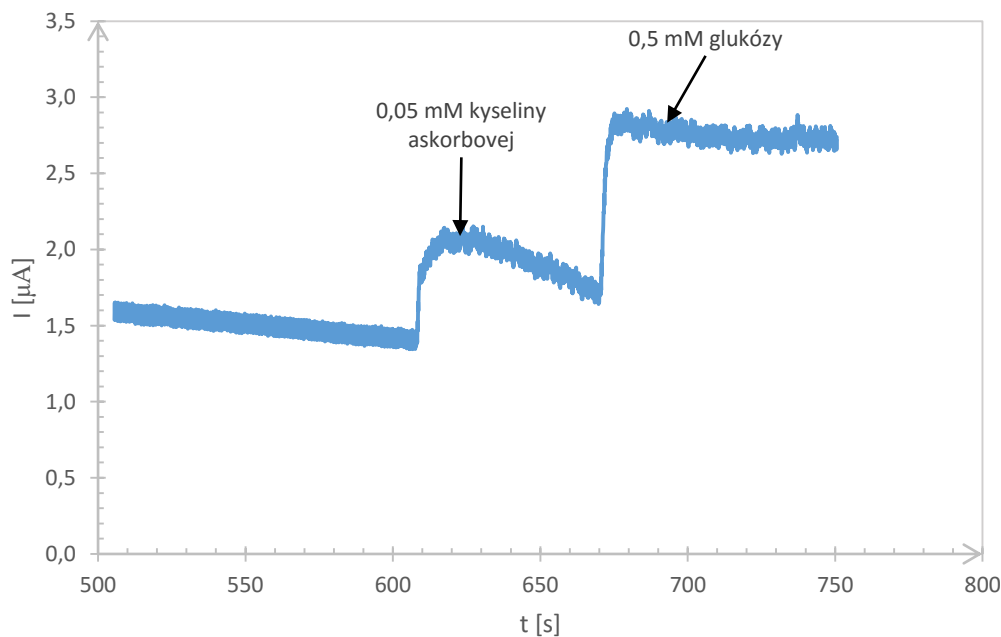
Na vplyv skladovania v dry boxe boli použité senzory S10 očistené plazmou s výkonom 120 W po dobu 12 minút staré (5 dní, 12 dní a 20 dní). Pri meraní bol použitý ako základný roztok 100mmol/l fosfátový pufr pH 7 o objeme 10 ml. Pre porovnanie bolo nutné aby sa všetky senzory ustálili na rovnakom prúde, ktorý bol 1,5 µA. Po ustálení prúdu bol uskutočnený nástrek glukózy po 100 µl do výslednej koncentrácie 11,5 mmol/l. Z dôvodu veľkého rozptylu času kedy sa ustálila prúdová odozva je vplyv skladovania určený z kalibračných kriviek vid' Obrázok 5.29. U senzoru starý 12 dní bol oproti senzoru starý 5 dní priemerný pokles prúdovej odozvy na 56 % hodnoty, pre senzor starý 20 dní bol pokles na hodnotu 25 %.



Obrázok 5.29 Kaličné krivky senzorov S10 staré (5dní, 12 dní, 20 dní).

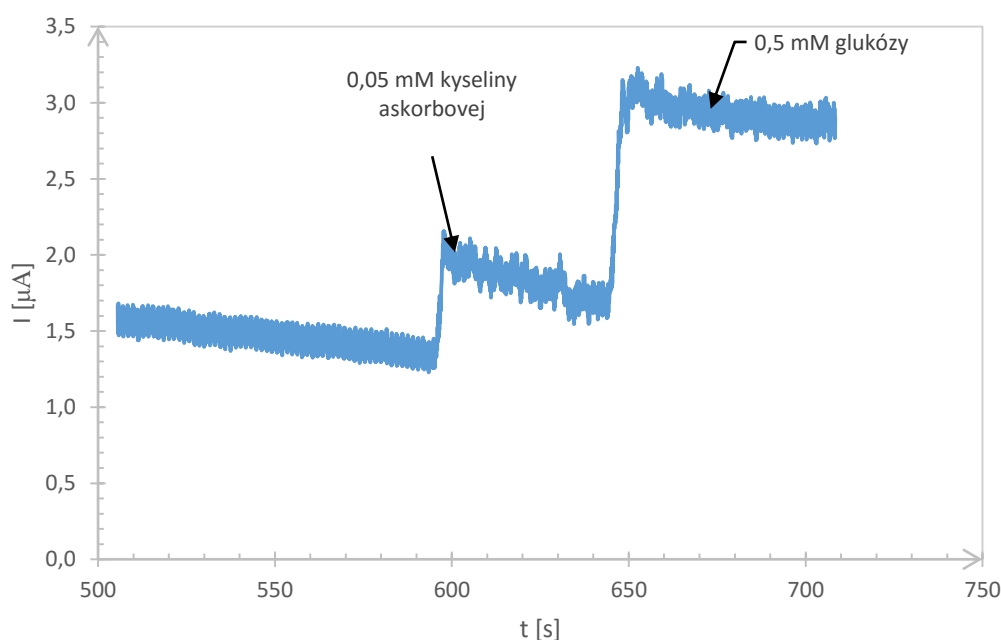
## 5.11 Vplyv interferujúcej látky

Zmeraná bola taktiež reakcia senzorov na prítomnosť interferujúcej látky (kyseliny askorbovej). Pri meraní boli použité 12 dní skladované senzory S10 a S8 oplazmované výkonom 120 W po dobu 12 minút. Po ustálení prúdovej odozvy prebehol najskôr nástrek kyseliny askorbovej do požadovanej koncentrácie 0,05 mmol/l (priemerná hodnota v krvi  $c > 0,02$  mmol/l) a následne glukózy do koncentrácie 0,50 mmol/l vid' Obrázok 5.30 pre senzor S10 a Obrázok 5.31 pre senzor S8.



Obrázok 5.30 vplyv kyseliny askorbovej na prúdovú odozvu senzor S10.





Obrázok 5.31 vplyv kyseliny askorbovej na prúdovú odozvu senzor S8.

Pri senzore S10 spôsobila kyselina askorbová s koncentráciou 0,05 mmol/l chybu pri určení glukózy 0,255 mmol/l a pre senzore S8 bola chyba 0,258 mmol/l.

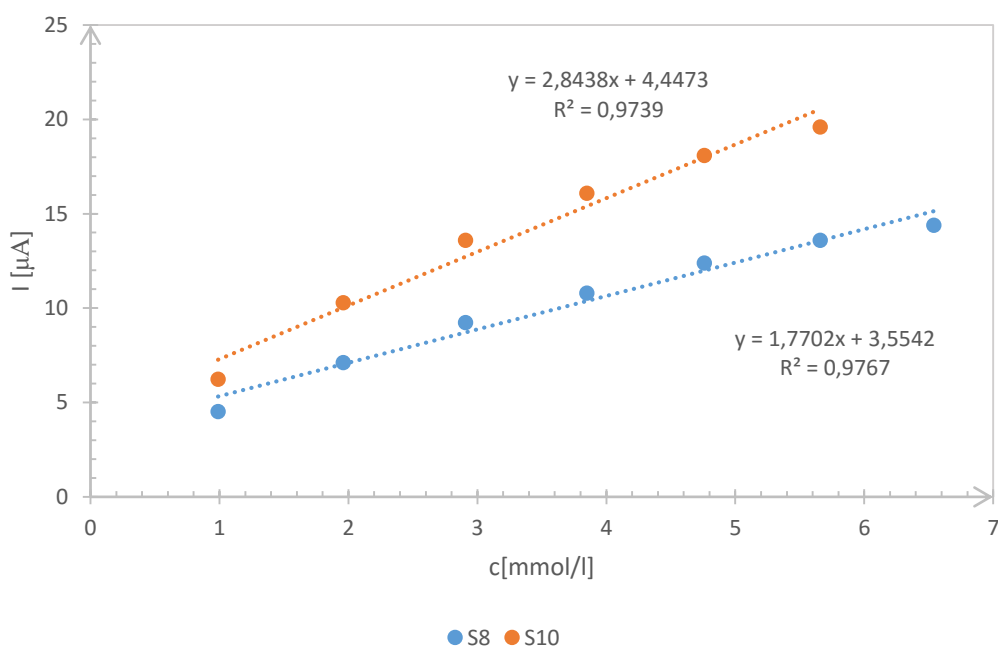
## 5.12 Porovnanie výsledkov

Pre porovnanie výsledkov bolo nutné určiť detekčný limit oboch senzorov, pre ktorý platí podmienka, že výsledný detekčný limit musí byť väčší ako trojnásobok šumu. Pre oba senzory bol stanovený šum 0,08  $\mu\text{A}$  spôsobený predovšetkým magnetickou miešačkou. Limit detekcie bol stanovený na hodnotu 0,2 mmol/l. Glukózu sa podarilo detegovať s lineárnym priebehom do koncentrácie 6,54 mmol/l u senzoru S8 a 5,66 mmol/l u senzoru S10 vid' Obrázok 5.32. Dosiahnuté výsledky spoločne s výsledkami uvedený v literatúrou sú rozpísané v Tabuľka 4, kde najlepších výsledkov dosiahol Shirsat spolu s kolektívom [31]. Tým sa podarilo detegovať glukózu do koncentrácie 50 mmol/l s detekčným limitom 25  $\mu\text{mol/l}$ . Senzor bol vytvorený vrstvou po vrstve uhlíkovými nanotrubičkami, na ktorých bol zachytený enzým GOx a viacvrstvovým filmom polypyrrólom (GOx-SWNT-PPy).

Ďalší zaujímavý výsledok bol dosiahnutý biosenzorom (GOx-SWNT-PVI Os/SPE) vytvoreným jednostennými uhlíkovými nanotrubičkami modifikovanými enzýmom GOx a redoxným polymérom [26]. Tomuto senzoru stačil na detekciu potenciál 0,3 V a spolu s redoxným polymérom bol málo náchylný na interferujúce látky. Lineárna oblasť detekcie glukózy bola do koncentrácie 7,5 mmol/l s detekčným limitom 0,07  $\mu\text{mol/l}$ .

Hrubovrstvový biosenzor modifikovaný vrstvou ródia, enzýmom GOx a polytyraminom dosahoval lineárnej detekcie glukózy do koncentrácie 10 mmol/l s detekčným limitom 25  $\mu\text{mol/l}$  [24].

Najhorších praktických výsledkov bolo dosiahnuté pomocou biosenzoru tlačenej pastou na vodnej báze modifikovaný kobaltom phthalocyaninom a enzýmom GOx [25]. Tento biosenzor bol schopný degekovat' glukózu len do hodnoty 2 mmol/l s detekčným limitom 270 mmol/l.



Obrázok 5.32 Kalibračné krivky pre senzory S10 a S8 oplazmované výkonom 120 W po dobu 12 minút

Tabuľka 4 Porovnanie výsledkov s literatúrou

	U [V]	lineárna oblasť [mmol/l]	detekčný limit [μmol/l]	referencia
senzor s8, plazma 120 W 12 min.	0,7	0,99 – 5,7	200	-
senzor s10, plazma 120 W 12 min.	0,7	0,99 – 6,5	200	-
GOx-SWNT-PPy	0,7	1 - 50	0,3	[31]
SPE-Rh-GOx-Pty	0,7	N - 10	25	[24]
GOx-SWNT-PVI-Os/SPE	0,3	0,2 - 7,5	0,07	[26]
WB-CoPC-GOD	0,4	0,27 - 2	270	[25]

# Záver

V teoretickej časti práce bola popísaná technológia hrubých vrstiev, základný materiál pre ich vytvorenie (pasty), ich nanášanie na substrát a následné vypálenie. Pasty boli podľa funkcie v obvode rozdelené na vodivé, odporové, dielektrické a špeciálne. Ďalej bola popísaná elektrochémia teda analytická metóda, ktorá skúma zloženie látok, na základe elektrických veličín pomocou elektrických vodičov (elektrod). Tieto elektródy sa delili na elektródy prvého druhu, elektródy druhého druhu, oxidačno-redukčné a iónovo-selektívne. Následne boli popísane elektroanalytické metódy použité v experimentálnej časti. Záver teoretickej časti sa venuje elektrochemickým biosenzorom pre detekciu glukózy pomocou špeciálnych elektrod na bázy enzýmu glukóza oxidáza.

V experimentálnej časti bolo spracované chronoampérometrické stanovenie koncentrácie glukózy s použitím hrubovrstvových trojelektrodových systémov S10 a S8, kde bol na povrch pracovnej elektródy imobilizovaný enzým glukóza oxidáza vo forme roztoku, ktorý po uschnutí za pokojovej teploty vytvoril sól-gélový film. Oxidačný potenciál pre toto meranie bol stanovený pomocou cyklickej voltampérometrie na hodnotu 0,700 V. Pri chronoampérometrickom meraní bol dosiahnutý lineárny priebeh koncentrácie na prúde s reakčnou dobou <math>< 5\text{ s}</math> do hodnoty 4,76 mmol/l pre senzor S10 a 5,66 mmol/l pre senzor S8 s použitím 100mmol/l fosfátového pufru pH 7. Detekčný limit oboch senzorov bol 0,2 mmol/l. Senzor S10 skladovaný 5 dní oproti senzoru skladovaný 12 dní vykazoval 44% stratu prúdovej odozvy. Obe verzie senzorov sú náchylne na kyselinu askorbovú preto by bolo vhodné ich ďalej modifikovať pridaním polymérnej vrstvy ako je polytiramine, polyphenol. Táto vrstva by slúžila ako ďalšia selektívna membrána, ktorá by zabraňovala interferujúcim látkam zapojiť sa do elektrochemickej reakcie a zároveň by zlepšila skladovateľnosť, pretože by bol senzor menej náchylný na vlhkosť.

# Použitá literatura

- [1] PULEC, J. a IVAN SZENDIUCH. PLANÁRNÍ FILTR V TLUSTOVRSTVOVÉ TECHNOLOGII. [online]. [cit. 9.12. 2015]. Dostupné z: <<http://www.slaboproudyobzor.cz/files/20130302.pdf>>.
- [2] BUJALOBOKOVÁ, M. a TRNKA, P. Progresivní tlustovrstvé technologie v elektronických aplikacích. [online]. [cit. 4.12. 2015]. Dostupné z: <<http://www.odbornecasopisy.cz/elektro/casopis/tema/progresivni-tlustovrstve-technologie-v-elektronickych-aplikacich--11693>>.
- [3] SZENDIUCH, I. *Základy technologie mikroelektronických obvodů a systémů*. Vyd. 1. Brno: VUTIUM, 2006. s. ISBN 80-214-3292-6.
- [4] SZENDIUCH, I. TLUSTÉ VRSTVY (Thick Films) (2). [online]. Brno: [cit. 7.12. 2015]. Dostupné z: <[http://www.umel.feec.vutbr.cz/~szend/vyuka/bmts/2012-02A-tlust%C3%A9%20vrstvy\(Bc\).pdf](http://www.umel.feec.vutbr.cz/~szend/vyuka/bmts/2012-02A-tlust%C3%A9%20vrstvy(Bc).pdf)>.
- [5] SZENDIUCH, I. LABORATORNÍ CVIČENÍ – REALIZACE HYBRIDNÍHO INTEGROVANÉHO OBVODU. [online]. [cit. 7.12. 2015]. Dostupné z: <[https://moodle.vutbr.cz/pluginfile.php/190407/mod\\_resource/content/1/LC1\\_navod.pdf](https://moodle.vutbr.cz/pluginfile.php/190407/mod_resource/content/1/LC1_navod.pdf)>.
- [6] GAJDOŠ, J. ELEKTRICKÉ VLASTNOSTI TLUSTOVRSTVÝCH ODPOROVÝCH PAST. [online]. [cit. 4.12. 2015]. Dostupné z: <[https://www.vutbr.cz/www\\_base/zav\\_prace\\_soubor\\_verejne.php?file\\_id=67842](https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=67842)>.
- [7] KVÍTEK, E. MATERIÁLY PRO ELEKTROTECHNIKU. [online]. Pardubice: [cit. 7.12. 2015]. Dostupné z: <[http://bastleni.edev.cz/down.php?file=./UEIKMT/2/ls/IMPEE/Skripta\\_materialy.pdf](http://bastleni.edev.cz/down.php?file=./UEIKMT/2/ls/IMPEE/Skripta_materialy.pdf)>.
- [8] JAKUBOWSKA, M. et al. New conductive thick-film paste based on silver nanopowder for high power and high temperature applications. *Microelectronics Reliability*, 2011, sv. 51, č. 7, s. 1235-1240. ISSN 0026-2714.
- [9] TARR, M. Thick film technology. [online]. [cit. 7.12. 2015]. Dostupné z: <<http://www.uni-obuda.hu/users/grollerg/Electronic-technology/Thick%20film%20hybrid%20IC.pdf>>.
- [10] ADÁMEK, M. Tlustovrstvé senzory založené na vlastnostech past. [online]. Brno: [cit. 4.12. 2015]. Dostupné z: <<http://www.umel.feec.vutbr.cz/~adamek/uceb/menufram.htm>>.
- [11] HOBBY, A. PRINTING THICK FILM HYBRIDS. [online]. [cit. 7.12. 2015]. Dostupné z: <[http://www.gwent.org/gem\\_thick\\_film.html](http://www.gwent.org/gem_thick_film.html)>.

- [12] KENŠOVÁ, R. a KONEČNÁ, M. Moderní vizualizační nástroje pro elektrochemickou detekci iontů těžkých kovů [online]. [cit. 13.12. 2015]. Dostupné z: <[http://web2.mendelu.cz/af\\_239\\_nanotech/nanolabsys/kurzy/KU3-1\\_2013\\_p.pdf](http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/nanolabsys/kurzy/KU3-1_2013_p.pdf)>.
- [13] KENŠOVÁ, R. a KONEČNÁ, M. CHARAKTERIZACE NANOELEKTROD. [online]. [cit. 16.12. 2015]. Dostupné z: <[http://web2.mendelu.cz/af\\_239\\_nanotech/nanolabsys/kurzy/KU3-1\\_2013\\_pr2.pdf](http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/nanolabsys/kurzy/KU3-1_2013_pr2.pdf)>.
- [14] KOLSKÁ, Z. Elektrochemie. [online]. [cit. 16.12. 2015]. Dostupné z: <[http://umc.ujep.cz/doc/charakterizace\\_3\\_prednaska\\_studentum.pdf](http://umc.ujep.cz/doc/charakterizace_3_prednaska_studentum.pdf)>.
- [15] GASPARIČ, J. *Vybrané kapitoly z fyzikální chemie ,pro poslucháče farmacie. Díl I.* Praha: 1997. s. ISBN 80-7066-719-2.
- [16] KUBÁČEK, P. Elektrody. [online]. [cit. 6.12. 2015]. Dostupné z: <[http://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js11/fyz\\_chem/web/eлектроchem/elektrody.htm](http://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js11/fyz_chem/web/eлектроchem/elektrody.htm)>.
- [17] SKLÁDAL, P. Biosensory. [online]. Brno: [cit. 12.12. 2015]. Dostupné z: <<http://orion.chemi.muni.cz/pskl/vyuka/Biosensory.pdf>>.
- [18] ŠTEFFAN, P. POTENCIOSTAT PRO ELEKTROCHEMICKÉ ANALÝZY. [online]. Brno: [cit. 13.12. 2015]. Dostupné z: <[http://www.feec.vutbr.cz/EEICT/2003/fsbornik/99-CD/02-Mgr/06-Microelectronics\\_and\\_Technology/14-steffan\\_pavel.pdf](http://www.feec.vutbr.cz/EEICT/2003/fsbornik/99-CD/02-Mgr/06-Microelectronics_and_Technology/14-steffan_pavel.pdf)>.
- [19] BAREK, J. et al. *Elektroanalytická chemie*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2005. s. ISBN 80-246-1146-5.
- [20] MARKUŠOVÁ, K. VOLTAMPÉROMETRIA S LINEÁRNE PREMENNÝM POTENCIÁLOM A CYKLICKÁ VOLTAMPÉROMETRIA (CVA). [online]. [cit. 13.12. 2015]. Dostupné z: <[http://www.eurochem.cz/polavolt/obecne/zaklady/markusova/eлектроchem\\_met/02/02.htm](http://www.eurochem.cz/polavolt/obecne/zaklady/markusova/eлектроchem_met/02/02.htm)>.
- [21] KOVAŘÍK, L. Vliv stáří a skladování na výstupní odezvu amperometrických senzorů bakalářská práce. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2009. 29 s., Vedoucí bakalářské práce Ing. Martin Adámek, Ph.D.
- [22] WANG, J. *Analytical electrochemistry* Hoboken, New Jersey: 2006. 250 s. ISBN 0-471-67879-1
- [23] KULHÁNEK, J. Stanovení glukózy MB 2cast. [online]. [cit. 13.12. 2015]. Dostupné z: <[https://dk.upce.cz/bitstream/handle/10195/34972/Kulh%EdnekJ\\_Stanoven%ED%20gluk%F3zy\\_MB\\_2cast\\_2009.pdf;jsessionid=709926CF9E0CF23B2F126BCB2046538A?sequence=1](https://dk.upce.cz/bitstream/handle/10195/34972/Kulh%EdnekJ_Stanoven%ED%20gluk%F3zy_MB_2cast_2009.pdf;jsessionid=709926CF9E0CF23B2F126BCB2046538A?sequence=1)>.

- [24] MISCORIA, S. A. et al. Glucose biosensors based on the immobilization of glucose oxidase and polytyramine on rodhinized glassy carbon and screen printed electrodes. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2006, sv. 115, č. 1, s. 205-211. ISSN 0925-4005.
- [25] PEMBERTON, R. M. et al. Fabrication of microband glucose biosensors using a screen-printing water-based carbon ink and their application in serum analysis. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, sv. 24, č. 5, s. 1246-1252. ISSN 0956-5663.
- [26] GAO, Q. et al. An amperometric glucose biosensor based on layer-by-layer GOx-SWCNT conjugate/redox polymer multilayer on a screen-printed carbon electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2011, sv. 153, č. 1, s. 219-225. ISSN 0925-4005.
- [27] SCHMIEDT, L. Úvod do fyziky plazmatu. [online]. [cit. 10.5. 2016]. Dostupné z: <<http://physics.mff.cuni.cz/kfpp/s4r/plazma/?p=0>>.
- [28] ELECTRONIC, D. Introduction to Plasma. [online]. [cit. 10.5. 2016]. Dostupné z: <<https://www.plasma.com/en/plasmatechnik/introduction-to-plasma/>>.
- [29] PRÁŠEK, J. a HUBÁLEK, J. Tištěný tříelektrodový systém elektrochemického senzoru. [online]. [cit. 15.12. 2015]. Dostupné z: <<http://www.umel.feec.vutbr.cz/LabSensNano/products.aspx?id=55>>.
- [30] PRÁŠEK, J. a MAJZLÍKOVÁ, P. Tištěný tříelektrodový systém s uhlíkovou pracovní elektrodou pro měření v kapce. [online]. [cit. 15.12. 2015]. Dostupné z: <<http://www.umel.feec.vutbr.cz/LabSensNano/products.aspx?id=96>>.
- [31] SHIRSAT, M. D. et al. Amperometric Glucose Biosensor on Layer by Layer Assembled Carbon Nanotube and Polypyrrole Multilayer Film. *Electroanalysis*, 2008, sv. 20, č. 2, s. 150-156. ISSN 1521-4109.