



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

VÝZKUM A VÝVOJ AMALGÁMOVÉ MIKROELEKTRODY NA ČIPU PRO DETEKCI BIOMAKROMOLEKUL

RESEARCH AND DEVELOPMENT OF ONCHIP SOLID AMALGAM MICROELECTRODE FOR THE
DETECTION OF BIOMACROMOLECULES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Tereza Tkáčová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Radim Hrdý, Ph.D.

BRNO 2018



Bakalářská práce

bakalářský studijní obor **Biomedicínská technika a bioinformatika**

Ústav biomedicínského inženýrství

Studentka: Tereza Tkáčová

ID: 155614

Ročník: 3

Akademický rok: 2017/18

NÁZEV TÉMATU:

Výzkum a vývoj amalgámové mikroelektrody na čipu pro detekci biomakromolekul

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Proveďte literární rešerši použití amalgámových elektrod v elektrochemii, zvláště pro diagnostiku biomakromolekul a DNA. 2) Seznamte se s technikami elektrochemické depozice a navrhnete optimální metodiku modifikace pomocí elektrochemických metod vhodných pro zlaté elektrody. 3) Aplikujte vybranou metodu „amalgamace“ na 64-elektrodový systém na čipu. 4) Vyberte několik testovacích látek a navrhnete metodiku umožňující jejich měření na amalgámové mikroelektrodě. Dále navrhnete metodiku hodnocení naměřených dat. 5) Zpracujte vzorky obsahující rozdílné koncentrace a rovněž stanovte limit detekce. 6) Proveďte diskuzi získaných výsledků a zhodnoťte účinnost a využitelnost řešení, případně navrhnete optimalizaci systému.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] BARD A.J. a L.R. FAULKNER. Electrochemical methods: fundamentals and applications. 2nd ed. Wiley 2001, ISBN-13: 978-0471043720.

[2] Yosypchuk, B.; Heyrovský, M.; Paleček, E.; Novotný, L. Use of Solid Amalgam Electrodes in Nucleic Acid Analysis 2002, 14, 1488-1493.

[3] Paleček, E.; Bartošík, M. Electrochemistry of Nucleic Acids, 2012, 112, 3427-3481.

Termín zadání: 5.2.2018

Termín odevzdání: 25.5.2018

Vedoucí práce: Ing. Radim Hrdý, Ph.D.

Konzultant:

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.
předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

Autor bakalářské práce nesmí při vytváření bakalářské 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 práca sa zaoberá použitím amalgámových elektród v elektrochémii, najmä pre diagnostiku biomakromolekul a DNA. V praktickej časti bude navrhnutá vhodná metóda amalgamácie, aplikovaná na 64-elektrodový systém čipu. Na amalgámovej elektróde bude postupne testovaných niekoľko látok, vzorky budú spracované a vyhodnotené.

Kľúčové slová

Elektróda, amalgámová elektróda, biomakromolekuly, mikroelektrody, mikročip

Abstract

The aim of this thesis is utilising of amalgam electrodes in electrochemistry, especially for diagnostics of biomakromolecules and DNA. There will be designed a suitable method of amalgamation, applied on 64-electrodes chip system in the practical part. Several substances will be tested on amalgam electrodes and then the results will be processed and evaluated.

Keywords

Electrode, amalgam electrode, biomakromolecules, microelectrodes, microchip

Bibliografická citácia:

TKÁČOVÁ, T. *Výzkum a vývoj amalgámové mikroelektrody na čipu pro detekci biomakromolekul*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2018. 47 s. Vedoucí semestrální práce Ing. Radim Hrdý, Ph.D..

Výzkum popsany v této bakalářské 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.

Prehlásenie

„Prehlasujem, že som svoju bakalársku prácu na tému „Výzkum a vývoj amalgámové mikroelektrody na čipu pro detekci biomakromolekul“ vypracovala samostatne pod vedením vedúceho bakalárskej práce s použitím odbornej literatúry a ďalších informačných zdrojov, ktoré sú všetky citované v práci a uvedené v zozname literatúry na konci práce.

Ako autor uvedenej bakalárskej práce ďalej prehlasujem, že v súvislosti s vytvorením tejto bakalárskej práce som neporušil autorské práva tretích osôb, najmä som nezasiahol nedovoleným spôsobom do cudzích autorských práv, osobnostných a/alebo majetkových. Som si plne vedomý následkov porušenia ustanovenia § 11 a nasledujúcich ustanovení zákona č. 121/2000 Sb., vrátane možných trestnoprávných dôsledkov vyplývajúcich z ustanovení § 152 trestného zákona č. 140/1961 Sb“

V Brne dňa 25.05.2018

.....

podpis autora

OBSAH

Úvod	10
1 Elektrochemické metódy analýzy	11
1.1 Elektrochemická detekcia	11
1.2 Biomakromolekuly a ich diagnostika	12
1.3 Metódy analýzy.....	12
1.4 Elektródy, použitie, typy	16
2 Amalgámové elektródy.....	19
2.1 Typy amalgámových elektród.....	20
2.2 Aplikácia MeSAE.....	21
2.3 Stanovenie organických látok použitím amalgámových elektród.....	22
2.4 Aplikácia amalgámových elektród	23
3 Praktická časť.....	26
3.1 Elektrochemická depozícia.....	27
3.2 Aplikácia depozície na 64-elektrodový čip.....	31
3.3 Prvková analýza	34
3.4 Analýza biologických látok	36
3.4.1 Analýza ruténia, výsledky a diskusia	37
3.4.2 Analýza BSA, výsledky a diskusia.....	41
3.4.3 Limit detekcie	42
Záver.....	44
LITERATÚRA	45
Zoznam symbolov, veličín a skratiek.....	47

ZOZNAM OBRÁZKOV

Obrázok 1: Ampérometrická krivka.....	13
Obrázok 2: Voltametrické meranie. Závislosť prúdu na rastúcom potenciáli v čase.....	14
Obrázok 3: Voltamogram, výsledok cyklickej voltametrie. Závislosť prúdu na potenciáli	15
Obrázok 4: Diferenčne pulzný voltamogram.....	15
Obrázok 5: Stripovacia potenciometrická analýza.....	16
Obrázok 6: Amalgámová elektróda. Pozostáva z elektrického kontaktu, telo je tvorené sklom a na jej špičke sa nachádza amalgám a amalgámový meniskus	19
Obrázok 7: Typy amalgámových elektród. 1. p-AgSAE, 2. m-AgSAE, 3. MF-MeSAE, 4. kryštály strieborného amalgámu.....	21
Obrázok 8: (a) pík H při použití AdS (in situ) a adsorptive transfer stripping (ex situ); (b) H pík 5nM BSA (modrá) a pozadie elektrolyt 0,2M McIlvaine (čierna); (c) pík H u 300 nM natívneho BSA (čierna) a denaturovaného BSA (červená).....	24
Obrázok 9: voltamogram zmesi adenínu a guanínu v roztoku borátového pufru s použitím amalgámovej elektródy. Použitý akumulčný potenciál -320V, čas 180 s a skenovacia rýchlosť 20 mV/s [13].	25
Obrázok 10: mikročip, snímka z optického mikroskopu, zväčšenie 60 000x.....	26
Obrázok 11: Proces fotolitografie	28
Obrázok 12: Elektrodepozícia s použitím amalgámovej elektródy na zlatej doske	28
Obrázok 13: zlatá vrstva bez amalgámu v rastrovacom elektrónovom mikroskope, zväčšenie 60 000x.....	30
Obrázok 14: Amalgámové zrná v SEM pri prúdovej hustote $1,13 \cdot 10^{-5} \mu\text{A} \cdot \mu\text{m}^{-2}$	30
Obrázok 15: Amalgámové zrná v SEM pri prúdovej hustote $5,65 \cdot 10^{-7} \mu\text{A} \cdot \mu\text{m}^{-2}$	30
Obrázok 16: Amalgámová vrstva na zlatej vrstve čipu pri prúdovej hustote $172 \cdot 10^{-6} \mu\text{A} \cdot \mu\text{m}^{-2}$ a čase depozície 60 s (a). Amalgámová vrstva pri prúdovej hustote $172 \cdot 10^{-5} \mu\text{A} \cdot \mu\text{m}^{-2}$ (b). Použitý bol elektrónový mikroskop a zväčšenie 10 000x.....	31
Obrázok 17: čip po modifikácii vrstvou amalgámu. Vonkajšia elektroda je čisté zlato, vnútorná elektróda je zlato so zrnami amalgámu. Použitý bol optický mikroskop, zväčšenie 50x.....	32
Obrázok 18: softvér Eelektrochemické procesy.....	33
Obrázok 19: závislosť napätia na čase pri prúde 500 nA. Na začiatku je hodnota napätie trochu vyššia, ale po približne 10 s sa ustálila na hodnote okolo 0,7 V.....	33
Obrázok 20: XPS analýza povrchu elektródy, ukazuje celé spektrum a prítomnosť všetkých látok, ktoré sa na čipe nachádzajú.....	35

Obrázok 21: XPS analýza povrchu elektródy, ukazuje prítomnosť ortuti v orbitáli f, spolu s kremíkom, ktorý tvorí podklad čipu.	35
Obrázok 22: XPS analýza povrchu elektródy, ukazuje prítomnosť ortuti v orbitáli d, kde už sa neobjavuje kremík a ortuť je v konvolúcii so zlatom	36
Obrázok 23: cyklické voltamogramy $\text{Ru}[(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ v 0,1 M KCl. Použité koncentrácie 1 mM, 5 mM, 10 mM a 50 mM. Scan rate $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$	37
Obrázok 24: cyklické voltamogramy $\text{Ru}[(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ v 0,1 M KCl. Použité koncentrácie 1 mM, 5 mM, 10 mM a 50 mM. Scan rate $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Čiernou prerušovanou krivkou je vyznačený signál pozadia, teda KCl.....	38
Obrázok 25: cyklické voltamogramy $\text{Ru}[(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ v 0,1 M KCl. Použité koncentrácie 1 mM, 5 mM, 10 mM a 50 mM. Scan rate $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$	39
Obrázok 26: porovnanie cyklických voltametrií 1 mM $\text{Ru}[(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ v 0,1 M KCl pri rôznych hodnotách rýchlosti skenovania, konkrétne scan rate= $10\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$, $50\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ a $100\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$	40
Obrázok 27: Závislosť polohy redukčného píku na skenovacej rýchlosti.....	40
Obrázok 28: detekcia rôznych kocentrácií BSA metódou stripovacej potenciometrie. Použité koncentrácie BSA 100 nM, 1 μM , 5 μM a 20 μM , stripovací prúd $I=-40 \mu\text{A}$, čas akumulácie 60 s pri akumuláčnom potenciáli $E_A=-0,1 \text{ V}$	41
Obrázok 29: kalibračná krivka koncentrácie	42

ÚVOD

V posledných desaťročiach došlo aj v oblasti biomedicíny k významnému pokroku. Vytvárajú sa nové technológie, postupy a metódy detekcie biomakromolekul – proteínov, nukleových kyselín a polysacharidov [1]. V súčasnosti sa k bežne používaným analytickým metódam, chemickým či optickým, začína používať aj metóda elektrochemická, ktorá ponúka lacné a jednoduché analýzy.

Táto práca sa preto zaoberá elektrochemickou metódou na analýzu látok a to využitím zlatých elektród modifikovaných amalgámovou vrstvou na analýzu biologických látok.

Prvá časť práce sa venuje teoretickému rozboru témy, kde prvá kapitola popisuje základné elektrochemické techniky, možnosti detekcie biomakromolekul a úvod do elektród používaných pri elektrochemických analýzach. Druhá kapitola je venovaná čisto amalgámovým elektródam, ich rozdeleniu, použitiu a vývoju. Koniec druhej kapitoly je venovaný praktickému využitiu amalgámových elektród na diagnostiku biomakromolekul v rôznych experimentoch.

Praktická časť popisuje „výrobu“ amalgámovej elektródy metódou elektrochemickej depozície a následnú analýzu vybraných biomakromolekul. Analýza spočíva v detekcii vybraných látok pomocou analytických biochemických metód a následnom porovnaní závislosti koncentrácie látky na ich detekcii.

1 ELEKTROCHEMICKÉ METÓDY ANALÝZY

1.1 Elektrochemická detekcia

Vo vývoji elektrochémie zohral veľkú úlohu český vedec Jaroslav Heyrovský, ktorý získal Nobelovu cenu za objav polarografie, predchodcu moderných elektrochemických metód [2]. K výskumu významne prispel aj profesor Emil Paleček, ktorý ukázal, že polarograficky aktívne sú nie len bielkoviny, ale aj nukleové kyseliny. Trvalo ale ešte niekoľko desiatok rokov, než došlo k výraznému záujmu o elektrochémiu NK [3].

Tým, že veda sa stále rozvíja, vedci sa postupne dozvedeli mnoho z oblasti genomiky a mohli aplikovať nové metódy. Elektrochémiu sa tak zamerala najmä na skúmanie ľudských ochorení, poškodenia DNA, určovanie DNA a RNA sekvencií, v onkológii a génovej terapii no taktiež vo forenzných vedách, u veterinárov či v environmentalistike [3].

Medzi hlavné výhody elektrochemických zariadení patrí nízka cena, jednoduchosť, rýchlosť, nízke požiadavky na funkčnosť a tiež malé rozmery [1]. Je tu možnosť paralelného skúmania viacerých vzorkov vytvorením DNA či proteínových čipov, ktoré vieme minimalizovať. Na druhú stranu, úplné zavedenie tejto metódy čelí niekoľkým technickým problémom, ako napríklad reprodukovateľnosť či regenerácia povrchovej vrstvy [4].

Elektrochemická detekcia je založená, ako jej názov napovedá, na použití elektrických efektov v chemických systémoch. Základom je práca s elektródami a elektrochemickými článkami v roztoku. Analyzovanú látku rozpustíme vo vodnom prostredí a do tohto prostredia ponoríme elektródu. Začne dochádzať k oxidačno-redukčným dejom na povrchu elektródy a dochádza k prenosu elektrónov, čo sa prejaví zmenou sledovaného signálu v podobe prúdového píku. Meraným signálom môže byť prúd, napätie, náboj či vodivosť. Od meraného signálu sa odvíja metóda, ktorú použijeme – napr. konduktometria, potenciometria, voltametria atp [2].

1.2 Biomakromolekuly a ich diagnostika

Nukleové kyseliny (NK) a proteíny sú biomakromolekuly, ktoré sú nevyhnutné pre ľudský organizmus. Proteíny sa zúčastňujú množstva reakcií, sú základným stavebným prvkom bunčných stien, hormónov, prenášačov. Nukleové kyseliny sú nutné pre expresiu genetickej informácie, jej prepis a uchovávanie.

V súčasnosti sa na detekciu biomakromolekúl využívajú najmä metódy založené na optike, ktoré sú overené a zavedené. Sú to metódy využívajúce svetlo (mikroskopia či spektroskopia). V posledných rokoch sa ale čoraz viac začína využívať elektrochemická detekcia, ktorá je založená na prenose elektrónov medzi analyzovanou látkou rozpustenou vo vodnom prostredí a elektródou do tohto prostredia ponorenou. Prenos elektrónov sa následne prejaví zmenou sledovaného signálu, čím dokážeme zistiť prítomnosť danej látky v prostredí [2].

Pre diagnostiku biomakromolekúl boli dôležité tri hlavné objavy v minulom storočí. V prvom rade to bolo pochopenie štruktúry DNA a RNA, o čo sa zaslúžili páni J. Watson, F. Crick a M. Wilkins. Projektom „the Human Genome“ sa podarilo rozlúštiť a pochopiť ľudský genetický kód. Do tretice, pochopenie procesov, ktorými sa realizuje genetická informácia, tzn. transkripcia, translácia, génová expresia [2]. Tým, že NK a proteíny sú nevyhnutné pre život, tieto biomakromolekuly sa neustále skúmajú a hľadajú sa lepšie a výhodnejšie metódy ako na to. Jednou z nich je práve elektrochémia.

1.3 Metódy analýzy

Na analýzu biomakromolekul môžeme využiť rôzne metódy. Každá metóda má svoje výhody aj nevýhody, záleží na situácii, ktorú si vyberieme.

Potenciometria

Potenciometria je založená na zaznamenávaní zmeny potenciálu na fázovom rozhraní. Zmena napätia je závislá na koncentrácii analytu, podľa Nernstovej rovnice:

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln(a), \quad (1)[5]$$

Kde E je potenciál, E_0 je pôvodný potenciál, R je univerzálna plynová konšanta, T je teplota, n je množstvo prenesených elektrónov, F je Faradayova konšanta a a je aktivita

oxidovanej alebo redukovanej formy. Potenciometria sa využíva na meranie pH alebo koncentrácie iónov s použitím iontovo selektívnych elektród, ISE.

Ampérometria

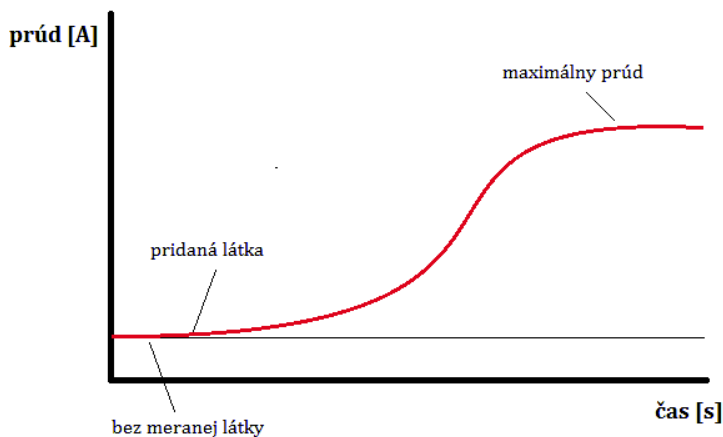
Na pracovnú elektródu sa prikladá konštantné napätie, pričom sa meria difúzny prúd prechádzajúci článkom. Difúzny prúd je potom priamo úmerný koncentrácii skúmanej látky. Ampérometria sa využíva na meranie koncentrácie rozpustených plynov, meranie koncentrácie látok, ktoré reagujú s kyslíkom a na amperometrické titrácie [5].

Veľkosť meraného prúdu sa riadi Cottrellovou rovnicou:

$$I_d = \frac{nAFDsc_0}{L}, \quad (2) [5]$$

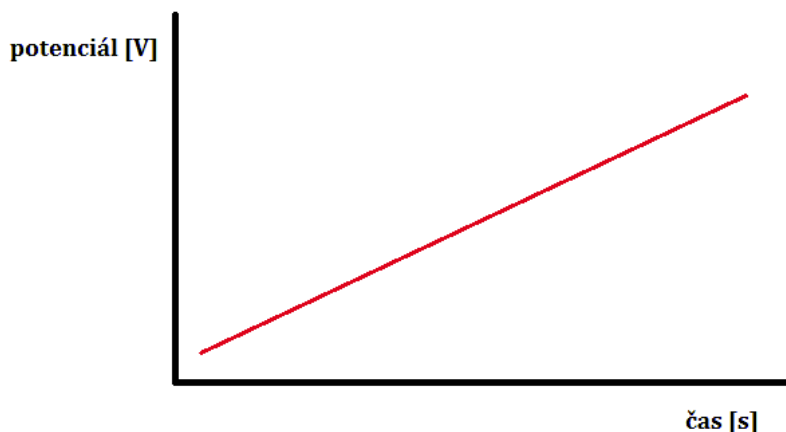
Kde I_d je difúzny prúd, n je počet prenesených nábojov, F je Faradayova konšanta, D je difúzny koeficient a c_0 je primárna hodnota koncentrácie analytu

Ampérometria sa využíva najmä u DNA senzorov. [4] Typická ampérometrická krivka je znázornená na Obrázok 1



Obrázok 1: Ampérometrická krivka

Voltametria je metóda, pri ktorej sa sleduje prúdová odozva – závislosť prúdu na lineárne rastúcom potenciáli, ktorý je vkladáný na pracovnú elektródu. [5] V praxi sa využívajú rôzne druhy voltametrie, napríklad cyklická voltametria, pulzná voltametria, diferenčne pulzná voltametria, lineárna voltametria. [5]



Obrázok 2: Voltametrické meranie. Závislosť prúdu na rastúcom potenciáli v čase

Cyklická voltametria.

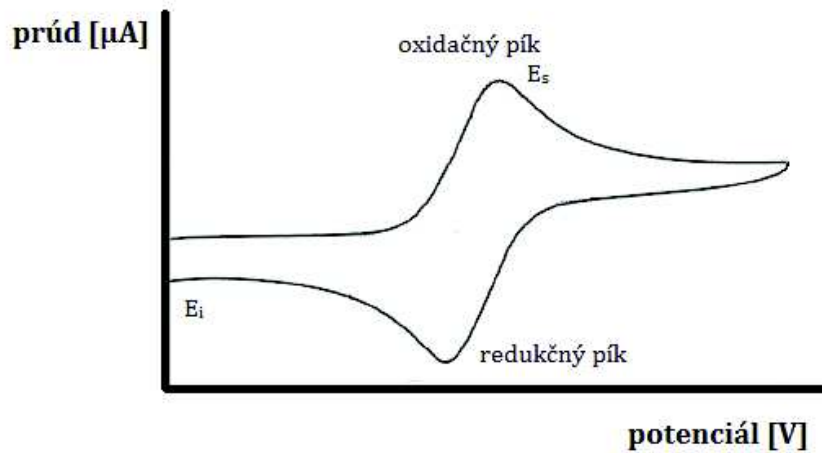
Táto metóda sa využíva najčastejšie a základom je, že potenciál pracovnej elektródy sa mení v čase lineárne a priebeh má tvar trojuholníku – napätie lineárne rastie a klesá v čase. Výslednou krivkou je voltamogram, závislosť prúdu na napätí elektródy. Krivka popisuje oxido-redukčné deje v analyte. Východiskovou hodnotou je E_i , nasleduje „forward scan“, pričom sa látka oxiduje až do zlomového bodu E_s , potom pokračuje „reverse scan“. V prípade, že látka má reverzibilné oxido-redukčné vlastnosti po reverse scan dochádza k reoxidácii redukčných zložiek späť na východiskový stav. Výsledkom je záznam prúdu na napätí [4].

Výška píku je úmerná koncentrácii meraného analytu, závislosť je daná Rendles-Ševčíkovou rovnicou [14]:

$$I_p = 0,4463 n F A C \left(\frac{n F v D}{RT} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (6)$$

Kde I_p je maximálny prúd [A], n je počet elektrónov, ktoré sa zúčastnili reakcie, A je plocha elektródy [cm^2], F je Faradayova konštanta [$\text{C} \cdot \text{mol}^{-1}$], D je difúzny koeficient [$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$], C je koncentrácia [mol / cm^3], v je rýchlosť (scan rate) [$\text{V} \cdot \text{s}^{-1}$], R je univerzálna plynová konštanta [$\text{J} \cdot (\text{K} \cdot \text{mol})^{-1}$] a T je teplota [K].

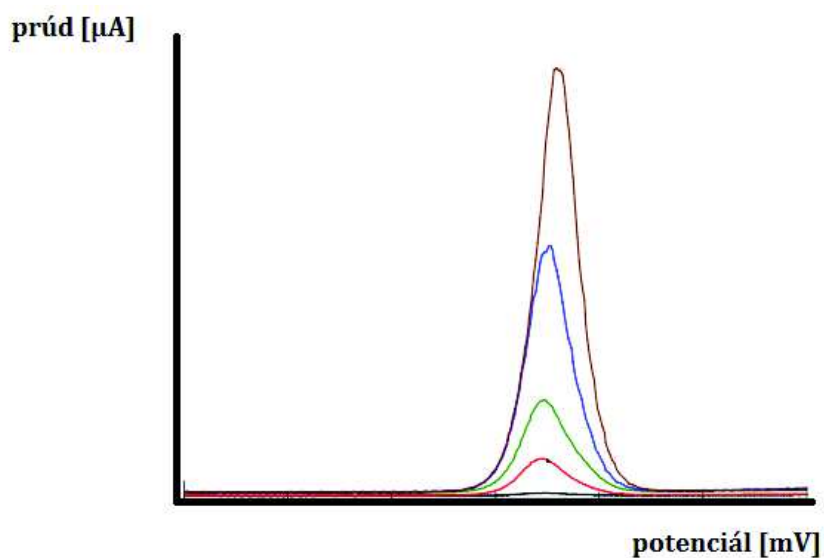
Z rovnice vyplýva aj fakt, že prúd sa zvyšuje so zvyšujúcou sa rýchlosťou skenovania napätia (scan rate).



Obrázok 3: Voltamogram, výsledok cyklickej voltametrie. Závislosť prúdu na potenciáli

Diferenčne pulzná voltametria

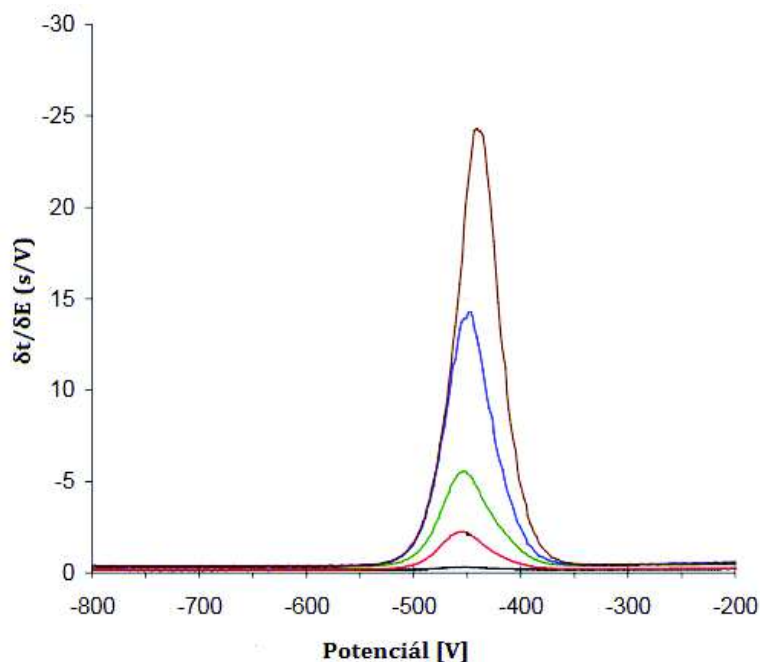
U tejto metódy má vkladáný potenciál tvar pulzov. Vyjadruje závislosť napätia na lineárnej rastúcom čase. Táto metóda je veľmi citlivá a hodnota prúdu sa odčíta buď z výšky píkov alebo na začiatku a na konci pulzov [5]. Práve diferenčne pulzná voltametria sa používa na diagnostiku biomakromolekúl a celkovo na stanovenie koncentrácie rôznych látok. Typický priebeh voltamogramu pri stanovení koncentrácie rôznych látok je znázornený na Obrázok 4



Obrázok 4: Diferenčne pulzný voltamogram

Potenciometrická „stripovacia“ analýza

Metóda, ktorá sa vyvinula z potenciometrických techník, teda s využitím ortuti. Princípom je to, že na elektródu sa privedie určitý prúd, tzv. stripovací prúd a sledovanou odozvou je potenciál pracovnej elektródy ako funkcia času, viz. Obrázok 5. Analyzovaná látka je na elektródu najprv naadsorbovaná a následne prebehne meranie [21].



Obrázok 5: Stripovacia potenciometrická analýza

1.4 Elektródy, použitie, typy

Na elektródach prebiehajú najčastejšie dva procesy: výmena náboja alebo redoxne-oxidačný dej. Z hľadiska materiálu a roztoku, do ktorého sú ponorené môžeme elektródy rozdeliť na tri druhy:

- elektródy I. druhu (vodíková elektróda)
- elektródy II. druhu (referenčné a iónovo selektívne elektródy – kalomelová, merkurosulfátová, argentochloridová)
- elektródy III. druhu (pracovné elektródy)

Pracovné elektródy sú z ušľachtitého kovu (Pt, Hg, Au), sú nerozpustné v roztoku a sú polarizovateľné. Pracovné elektródy sú ponorené do roztoku obsahujúceho oxidovanú aj redukovanú formu danej látky a výmena náboja prebieha prostredníctvom elektrónu [5].

Mikroelektródy

Mikroelektróda je elektróda s miniaturizovanými rozmermi. Môžeme ju charakterizovať ako elektródu, ktorá má rozmery menšie ako je hrúbka difúznej vrstvy počas experimentu. Difúzna vrstva je objem roztoku, v ktorom sa vyskytuje difúzny tok látky.

Mikroelektródy môžu byť vyrobené z rôznych materiálov, či už uhlíku a jeho obmien alebo z rôznych vzácnych kovov (zlato, striebro). Taktiež môžu mať rôzne tvary - z rovinných napríklad disk či pásik, z priestorových napríklad guľa, hemisféra či valec. Všeobecne ich môžeme použiť buď jednotlivo alebo v súbore elektród, čím vznikajú tzv. elektródové polia (microelectrode arrays) [6].

Mohlo by sa zdať, že jednou z najväčších nevýhod mikroelektród sú veľmi malé namerané prúdy, no v praxi je možné dosiahnuť rádovo vyššie prúdové hustoty ako u makroelektród [7].

Výhodou mikroelektród oproti štandardným elektródam je to, že dochádza k menšej spotrebe materiálu, meranie prebieha vo väčšej čistote a celkovo je to ekologickejšie. Veľmi výhodné je aj to, že je možné meranie látok o objeme v jednotkách μL či dokonca menších, teda je možné tieto metódy využívať tam, kde sa pracuje s menšími objemami, napríklad v klinickej praxi na stanovenie metabolitov cytostatik [8]. Oproti štandardným elektródam, u mikroelektród dochádza k rýchlejšiemu ustáleniu prúdu a majú vyšší pomer signálu k šumu.

Správanie samotnej elektródy určuje tzv. hromadný transport (z angl. mass transport) v roztoku v blízkosti elektródy. Prúdový signál je v tomto prípade úmerný toku elektroaktívnej látky k rozhraniu roztok-elektroda. Tento jav je opísaný prvým Fickovým zákonom difúzie, ktorý hovorí, že ióny prúdia z miest o vyššej koncentrácii do miest s nižšou koncentraciou. Prúdenie látky k elektróde môžeme opísať ako súčin difúzneho koeficientu látky D a jeho objemovej koncentrácie, podelený hrúbkou difúznej vrstvy δ . Hrúbku difúznej vrstvy vieme jednoznačne určiť u sférických či diskových elektród,

u ostatných tvarov vieme vrstvu len odhadnúť [23]. Keď δ je hrúbka difúznej vrstvy a r je polomer mikroelektrody, môžu nastať dva prípady:

- $\delta \ll r$ elektroda odpovedá modelu lineárnej difúzie, limitný prúd s časom klesá k nule $I = nFA D c_0 / d$
- $\delta \gg r$ elektroda sa chová ako sférická, prevláda okrajový efekt a tok je nehomogénny. Limitný prúd dosahuje stacionárne, nenulové hodnoty $I \gg nFA D c_0 / r$ [24].

Kde n je počet prenesených nábojov, F je Faradayova konšanta, D je difúzny koeficient a c_0 je primárna hodnota koncentrácie analytu a A je plocha elektrody

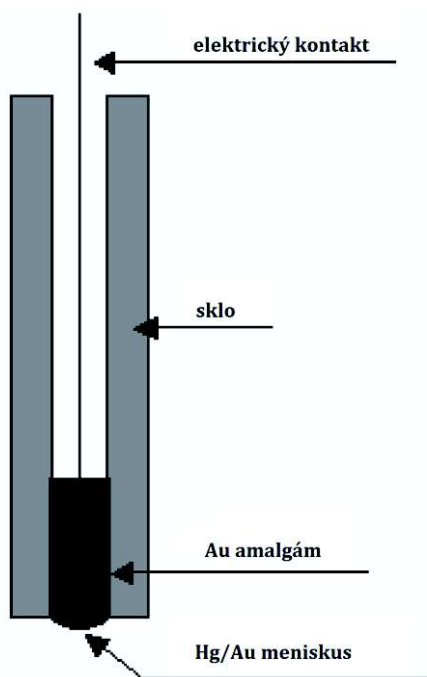
Hrúbka difúznej vrstvy úzko súvisí a trvaním elektrolýzy. Na začiatku elektrolýzy je hrúbka difúznej vrstvy podstatne menšia ako hrúbka mikroelektrody no s pribúdajúcim časom elektrolýzy môže hrúbka difúznej vrstvy značne presiahnuť hrúbku mikroelektrody [23].

2 AMALGÁMOVÉ ELEKTRÓDY

Na elektrochemické analýzy je možné využiť celú radu elektród na báze uhlíku, kovov či oxidov kovov. Napriek tomu sa ako najvhodnejšie stále javí ortuťová kvapková elektróda, ktorá bola pôvodne zavedená pre polarografické metódy [9]. Jej výhody spočívajú vo vysokom prepätí vodíku poskytujúcom široké potenciálové okno, obnoviteľnom hladkom povrchu a vysokej citlivosti detekcie skúmanej látky [8]. Nevýhodou ale je nemožnosť práce v pozitívnom potenciáli z dôvodu rozpustenia ortuti. Z tohto dôvodu sa neustále hľadajú nové možnosti [9].

Najväčšia nevýhoda kovových elektród je nedostatočná regenerácia povrchu a nízke prepätie vodíku. Ako veľmi perspektívne sa javí použitie amalgámu, kovových elektród pokrytých vrstvou ortuti, väčšinou Ag/Hg, Pt/Hg, Au/Hg, Ir/Hg, Cu/Hg.

Výhoda je to, že kovová kvapalná ortuť dokáže zmáčat', či dokonca rozpúšťať niektoré kovy a tým vytvárať amalgámy [9]. Obrázok 6 znázorňuje zloženie amalgámovej elektródy [10].



Obrázok 6: Amalgámová elektróda. Pozostáva z elektrického kontaktu, telo je tvorené sklom a na jej špičke sa nachádza amalgám a amalgámový meniskus

Amalgámové mikroelektrody

V súčasnom trende zmenšovania je z viacerých pohľadov výhodné používať čo najmenšie elektrody, najmä preto, že dokážu analyzovať veľmi malé množstvá analytov. Štandardné elektrody sú vyrobené zo skla či silikónu a môžu mať rôzne využitie. Vhodnou úpravou povrchu ale môžeme elektrody špecializovať na analýzu konkrétnych látok. Zlaté elektrody sa využívajú v DNA a proteínových senzoroach a poliach. Tekuté amalgámové elektrody, ktorých potenciálové okno umožňuje detekciu DNA pri vysokých záporných potenciáloch sú ale na takýchto poliach nevýznamné. Preto sa začali využívať mikroelektrodové polia s použitím pevného amalgámu.

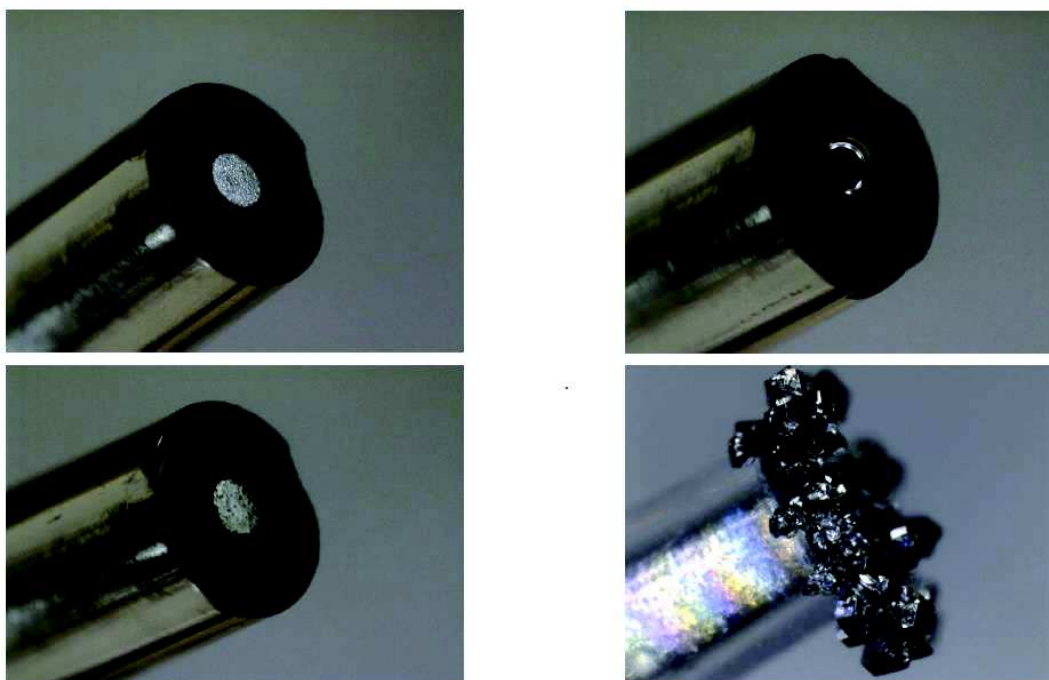
Mikroelektrodové pole sa vyrába procesom fotolitografie a naprášením či naparením kovu na sklenený povrch. Vznikne tak veľmi tenká mikroelektroda s hrúbkou pod 1 μm [11]. Takáto elektroda sa následne modifikuje vrstvou amalgámu, napríklad metódou elektrodepozície.

2.1 Typy amalgámových elektród

V závislosti na pomere kov/ortuť môže mať amalgám rôzne formy – môže byť pevný, pastový alebo kvapalný [7]. Pevné a pastové amalgámové elektrody môžeme podľa ich povrchu rozdeliť na:

- Leštené – pevná elektroda, ktorá neobsahuje tekutú ortuť, povrch mechanicky leštený (p-MeSAE)[8]
- Filmové – leštená elektroda (MeSAE) pokrytá ortuťovým filmom (MF-MeSAE)
- Meniskusové – leštená MeSAE pokrytá ortuťovým meniskusom (m-MeSAE)
- Kompozitné – jemný amalgámový prášok a vhodný tuhý polymér (MeSA-CE)[7]
- Pastové – elektroda na báze jemného prášku pevného amalgámu a kvapalného oleja (MeSA-CE)[9]

Na Obrázok 7 [12] možno vidieť rôzne druhy amalgámových elektród.



Obrázok 7: Typy amalgámových elektród. 1. p-AgSAE, 2. m-AgSAE, 3. MF-MeSAE, 4. kryštály strieborného amalgámu

Výber použitého kovu je veľmi dôležitý z hľadiska výslednej šírky použiteľného potenciálového okna a prípadnej možnosti skúmaných analytov interagovať s kationmi kovu na povrchu elektródy [8]. Jednou z nevýhod amalgámových elektród je teda fakt, že dochádza k vzájomnému ovplyvňovaniu kovu a ortuť. Z tohto pohľadu je preto veľmi vhodné striebro, ktoré má s ortuťou veľmi podobné hodnoty štandardných redoxných potenciálov, tým pádom nie je ovplyvnená anodická časť použiteľného potenciálového okna.

Strieborný amalgám má široké spektrum použitia, či už ako pracovná alebo referenčná elektróda, pre voltamperické, potenciometrické či amperometrické aplikácie [8].

2.2 Aplikácia MeSAE

Na úspešnú aplikáciu pracovných elektród z pevných amalgámov je nutná predúprava, pozostávajúca z troch krokov:

1. Amalgamácia m-MeSAE
2. Aktivácia
3. Regenerácia

Amalgamácia znamená obnovovanie ortuťového meniskusu ponorením do kovovej ortuti. Robiť by sa to malo vždy na začiatku merania, alebo keď na povrchu elektródy nie je patrný meniskus kvapalného amalgámu, pri zhoršenej citlivosti alebo reprodukovateľnosti alebo po dlhšom stáťí elektródy [9]. V prípade leštených strieborných amalgámových elektród stačí povrch elektródy preleštiť na filtračnom papieri zvlhčenom deionizovanou vodou, prípadne zbrúsiť jemným karbónovým papierom [8].

Aktivácia je nutná na začiatku každého dňa, po dlhšej prestávke v meraní, po každom leštení a amalgamácií. Aktivácia znamená vloženie vysokého negatívneho potenciálu (-2,2V) v roztoku KCl (0,2 M) po dobu 300s. Tým sa z povrchu elektródy odstránia všetky oxidy a adsorbované látky a zvýši sa citlivosť a reprodukovateľnosť merania [9].

Regenerácia zaisťuje dostatočnú opakovateľnosť meraní. Robí sa pred každým meraním automaticky a trvá približne 30 s. Regenerácia sa vykonáva striedavým vkladáním krátkych pulzov dvoch hodnôt potenciálov priamo v roztoku medzi každým meraním. Optimálne potenciály regenerácie je nutné pre každý elektrolyt a analyt nájsť experimentálne [8].

2.3 Stanovenie organických látok použitím amalgámových elektród

Na stanovenie biomakromolekúl môžeme použiť rôzne typy voltametrie, v závislosti na ich vlastnostiach. Väčšina zlúčenín vykazuje lineárne závislosti píku H na ich koncentrácii, pričom detekčný limit je približne $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, čiže nanomolárne množstvá. Použitím amalgámových elektród teda môžeme stanoviť rôzne biologicky aktívne zlúčeniny využitím ich priamej redukcie. Selektivita a senzitivita nie je moc vysoká, no môžeme ich zvýšiť napríklad vhodnou predprípravou.

Jednou z najcitlivejších metód na stanovenie organických látok je katodická rozpúšťacia voltametria (CSV). Jej princíp spočíva v tom, že najprv je materiál pracovnej elektródy (zlato alebo ortuť) rozpustený za určitú dobu a za presne definovaného potenciálu. Následne zvyšné katióny vytvoria zlúčeniny s nejakým stanoveným analytom (napríklad dusíkaté bázy), ktoré sú absorbované na elektróde. Redukcia kovových iónov z týchto zlúčením sa prejaví v grafe ako voltamperický pík [8].

Tu sa prejavujú ďalšie výhody amalgámových elektród a to fakt, že elektródu môžeme pripraviť priamo s kovom, ktorý reaguje s vybraným analytom a tým zvýšiť selektivitu celého merania. Detekčný limit je v takomto prípade až 10^{-8} - 10^{-9} mol \cdot l $^{-1}$.

Niektoré látky sa na povrch elektródy absorbujú tak silno, že sa môžu redukovať, oxidovať či resorbovať v takomto absorbovanom stave. V takýchto prípadoch dochádza k zmene registrovaného signálu. V ideálnom prípade je zmena prúdu úmerná množstvu analytu na povrchu elektródy. Pri amalgámových elektródach môže byť absorpcia tak silná, že môžeme hovoriť o elektróde modifikovanej biomakromolekulou [7].

Použitie elektrochemickej detekcie spolu s flow-injection systémom vie výrazne ušetriť čas pri analyzovaní, čím sa zvýši produktivita. Elektródy s použitím amalgámu boli úspešne otestované na metóde vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie (HPLC) pri stanovení stopových prvkov elektrochemicky redukovateľných látok vo vode. Ukázalo sa, že stabilné amalgámové elektródy môžu byť použité na stanovenie elektrochemicky aktívnych pesticídov, liekov, stimulátorov či karcinogénnych látok v prietokových systémoch.

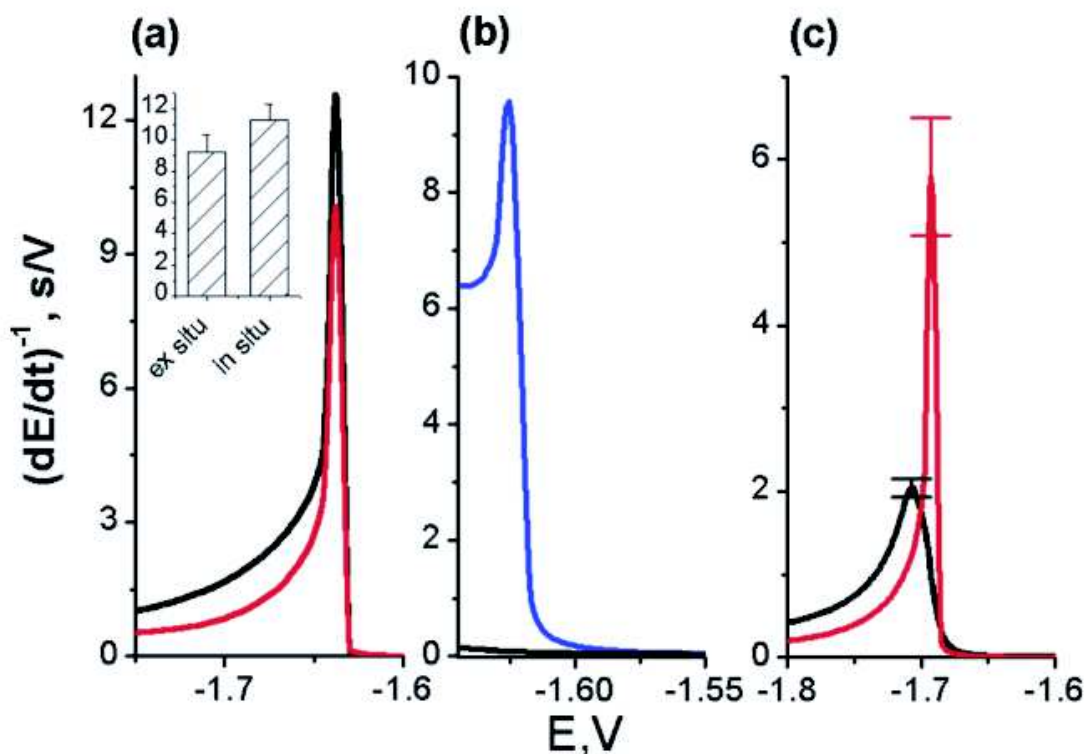
Amalgámové elektródy boli tiež použité na skúmanie DNA, jeho báz či nukleových kyselín. DNA je schopné sa naabsorbovať na elektródu dostatočne silno na prípravu DNA-modifikovanej elektródy. AgSAE elektródy modifikované DNA sú schopné detekovať poškodené DNA. Poškodenie sa prejaví špecifickými voltamperickými píkmi [7].

2.4 Aplikácia amalgámových elektród

Stanovením organických látok s použitím amalgámových elektród sa vo veľkej miere zaoberá pán prof. Emil Paleček, ktorý pôsobí na Akadémii vied Českej republiky. V článku [11] sa zaoberá využitím strieborných a zlatých amalgámových elektród na detekciu proteínov, v porovnaní s metódou elektródy s ortuťovou kvapkou. Konkrétne sa v experimente jednalo o meranie H píku. Ten vzniká pri vylučovaní vodíka u katalýzy proteínov a je ho možné pozorovať len s použitím elektród obsahujúcich amalgám. Experiment poukazuje na možnosť použitia amalgámových elektród ako alternatíva k HMDE. Porovnávaná bola elektroanalytická odozva natívneho a denaturovaného BSA proteínu s použitím HDME a SAE metódy.

Na elektródy bolo naabsorbované 5 μ M BSA proteínu v 0,2 M McIlvaine roztoku pri čase 1 minúta a potenciáli -0,1 V. Výsledky chronopotenciogramu pri prúde -40 μ A ukázali závislosť koncentrácie natívneho BSA na výslednom H piku, pričom závislosť bola lineárna do koncentrácie cca 1 μ M.

Na testovanie BSA boli použité metódy adsorptívnej stripovacej voltametrie (AdS, in situ) a adsorptívnej stripovacej transferovej voltametrie (AdTS, ex situ), pričom obidve ukázali približne podobné výsledky a to maximálny H pík na -1,64 V. Výsledky a štúdie tiež ukázali, že pík H je citlivý na zmeny v proteínovej štruktúre. To bolo overené tak, že denaturovaný BSA produkoval 3 krát väčší pík pri pozitívnych potenciáloch než natívny BSA [11]. Porovnanie ukazuje Obrázok 8 [11].

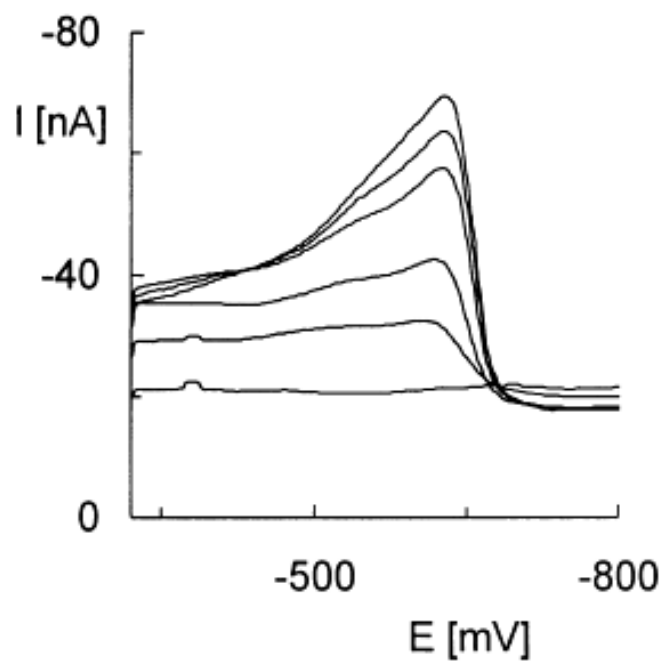


Obrázok 8: (a) pík H při použití AdS (in situ) a adsorptive transfer stripping (ex situ); (b) H pík 5nM BSA (modrá) a pozadie elektrolyt 0,2M McIlvaine (čierna); (c) pík H u 300 nM natívneho BSA (čierna) a denaturovaného BSA (červená)

Fakt, že denaturované bielkoviny sa správajú inak je overený aj v [15], kde bolo porovnávané natívne a denaturované BSA vo fosfátovom pufrí s pH 7 a pH 4,5. Tento experiment dokázal, že BSA vykazovalo oveľa vyšší pík pri zásaditom pufrí. Dôvodom je to, že albumín sa v kyslom prostredí denaturuje. Výsledkom bolo to, že natívny aj denaturovaný proteín sa v pufrí pH 4,5 správal rovnako, tzn. píky sa takmer nelíšili.

V článku [13] sa páni zaoberajú analýzou nukleových kyselín pomocou amalgámových elektród, konkrétne analýzou adenínu a guanínu, s použitím diferenčne pulznej voltametrie (DPV). Výsledkom je to, že prúdové píky sú závislé na použitej koncentrácii kyselín, viz. Obrázok 9. Použité boli rôzne koncentrácie zmesi adenínu a guanínu

v pomere 58:42, v roztoku 0,05 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_6$ s pH 9,5. V tomto experimente bola použitá amalgámová elektróda z medi.



Obrázok 9: voltamogram zmesi adenínu a guanínu v roztoku borátového pufru s použitím amalgámovej elektródy. Použitý akumuláčny potenciál -320V, čas 180 s a skenovací rýchlosť 20 mV/s [13].

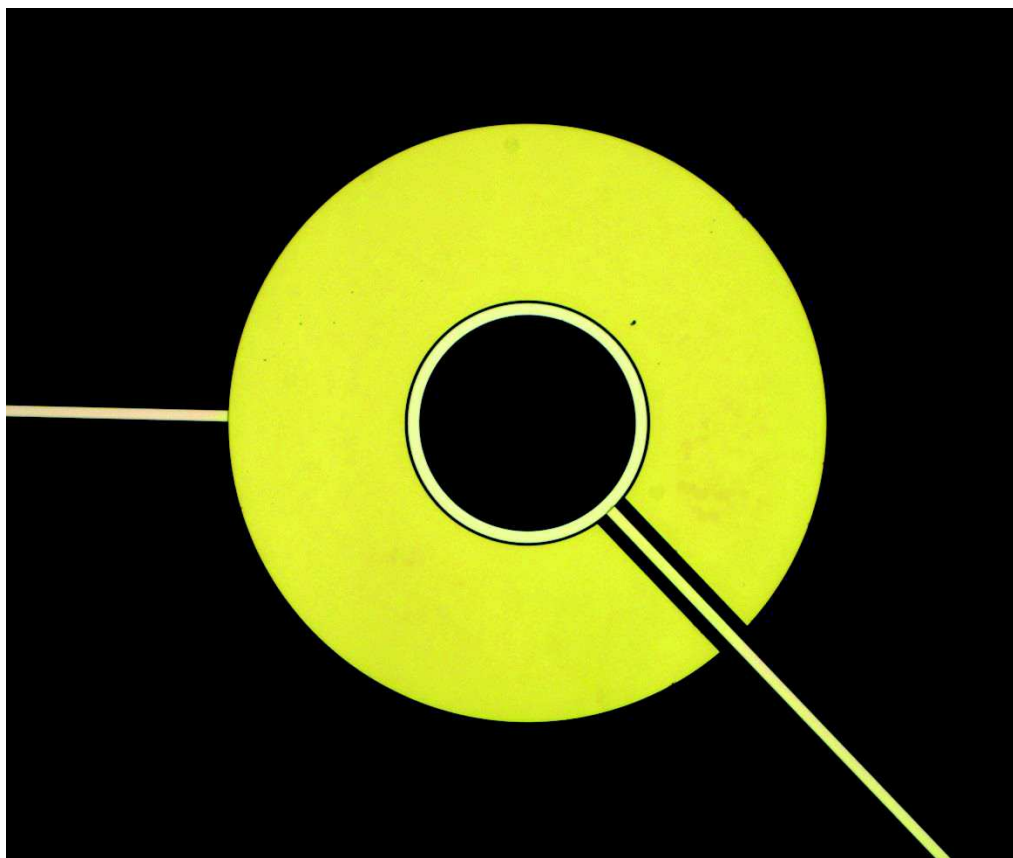
3 PRAKTICKÁ ČASŤ

Praktická časť zahŕňa niekoľko častí. Najprv som pripravila testovací čip na nájdenie optimálnej prúdovej hustoty a hrúbky vrstvy amalgámu. Následne som tieto poznatky použila pri amalgamacii 64-elektrodového čipu. Po modifikácii čipu vrstvou amalgámu bol čip použitý na analýzu biologických látok.

Príprava testovacieho čipu znamenala jeho doleptanie, čím sme odstránili nežiadúci rezist. Leptanie prebiehalo postupom BOE, „Buffered oxid etch“, kedy je použitá zmes kyseliny fluorovodíkovej a fluoridu amónneho v pomere 1:7. Tento roztok leptá u oxidov približne 2 nm za sekundu, pri izbovej teplote.

V tomto prípade prebehlo leptanie po dobu 30 sekúnd pri izbovej teplote. Následne bol čip premytý isopropanolom. Na Obrázok 10 je tento mikročip, odfotený na optickom mikroskope.

Z HClO_3 a ortute bol pripravený 0,1 M roztok acetátu ortuti $\text{Hg}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_2$.



Obrázok 10: mikročip, snímka z optického mikroskopu, zväčšenie 60 000x.

3.1 Elektrochemická depozícia

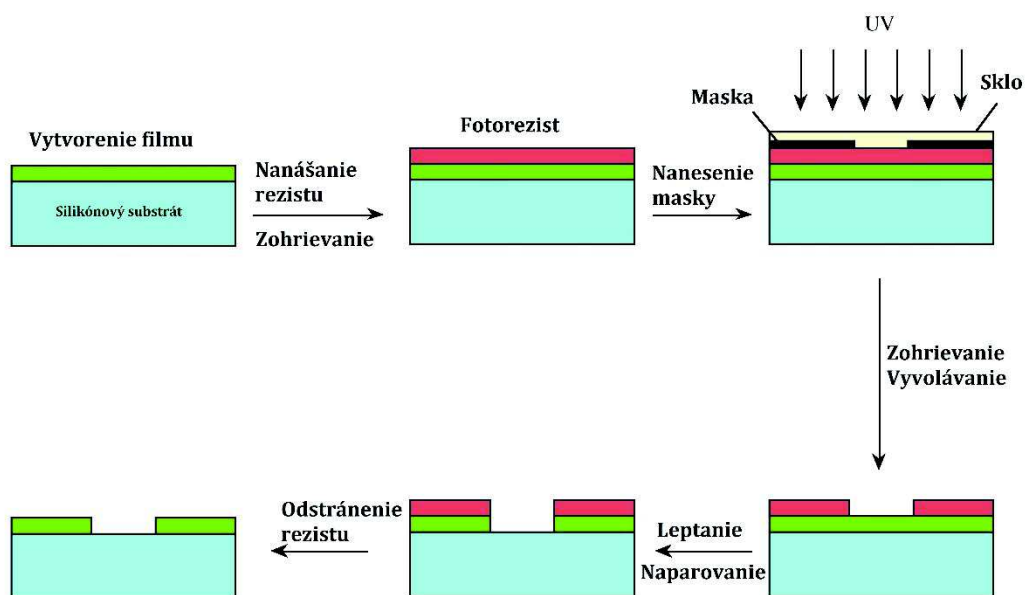
Elektrochemická depozícia je vlastne „nanášanie“ materiálu na vodivý povrch z roztoku, ktorý obsahuje soli. Bežne sa používa zapojenie s dvoma elektródami – pracovnou a referenčnou. Celý systém je zapojený k potenciostatu, ktorý proces kontroluje, a elektródy sú ponorené v roztoku obsahujúcom voľné ióny.

Tá časť systému, na ktorú chceme materiál nanášať, je katóda obvodu. Anóda je vyrobená z materiálu, ktorý budeme nanášať. Všetky časti sú ponorené do roztoku (elektrolytu), ktorý obsahuje rozpustené kovové soli a vodivé ióny. Prúd elektrónov je zaistený pripojením k zdroju. Jednosmerný prúd je usmernený smerom k anóde, čím dôjde k oxidácii kovových iónov a ich rozpusteniu v elektrolyte. Následne sú tieto rozpustené ióny redukované na rozhraní katóda - elektrolyt. Podľa Faradayovho zákona je potom hmotnosť vylúčenej látky priamo úmerná elektrickému náboju prenesenému iónmi a atómovej hmotnosti látky a nepriamo úmerná nábojovému číslu danej látky.

$$m = \frac{Q}{e} \times \frac{M_m}{N_A} \times \frac{1}{z} \quad (4)[17],$$

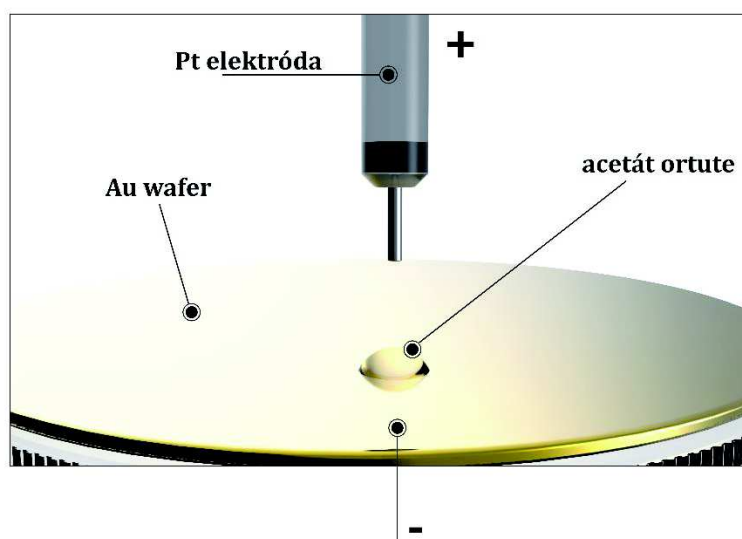
kde m je hmotnosť látky uvoľnenej na elektróde, Q je celkový náboj prenesený elektrónmi, M_m je molekulová hmotnosť látky, N_A je nábojové číslo látky a z je valenčné číslo iónov látky.

V tejto práci bola na začiatku vytvorená zlatá doska ako testovací produkt. Bol vyrobený nanášaním vrstiev silikónu, zlata a rezistu. Následne osvetlením vrstvy rezistu UV svetlom cez masku vznikol výsledný produkt so vzorom malých koliesok, na ktoré sa nanášal amalgám. Kompletný postup fotolitografie je popísaný na Obrázok 11 [12].



Obrázok 11: Proces fotolitografie

Následne bola doska využitá na testovanie amalgamácie. Zapojenie je popísané na Obrázok 12, kde zlato sa chová ako katóda, na ktorú je privedený prúd usmerný smerom ku anóde. Na katódu som kvapla $1 \mu\text{L}$ roztoku ortuti, do ktorej som namočila platinovú anódu. Prechádzaním prúdu dôjde k oxidácii ortute na anóde a následne jej redukcii na katóde. Na katóde teda postupne vzniká vrstva ortute v podobe zfn. Takto bol vytvorená zlatá doska modifikovaná vrstvou amalgámu.



Obrázok 12: Elektrodepozícia s použitím amalgámovej elektródy na zlatej doske

Cieľom elektrochemickej depozície na testovacom produkte bolo nájsť ideálnu prúdovú hustotu na depozíciu amalgámu, teda takú, pri ktorej sa na povrchu zlata vytvorí čo najhustejšia a najkompaktnejšia vrstva ortute. Prebehlo niekoľko experimentov s použitím rôznej prúdovej hustoty v závislosti na čase.

Testovacie kolieska na povrchu zlata majú priemer 1500 μm , tzn. plocha je 1,767 mm^2 .

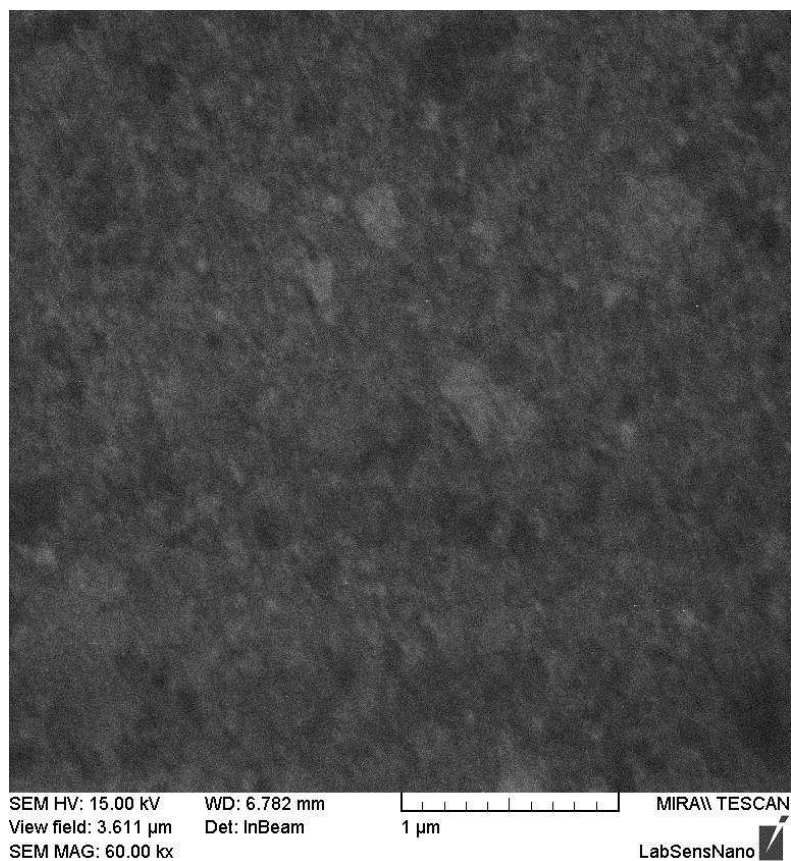
Podielom použitého prúdu a plochy elektródy získame prúdovú hustotu J .

$$J = \frac{I}{S} \left[\frac{\mu\text{A}}{\mu\text{m}^2} \right] \quad (5)[18],$$

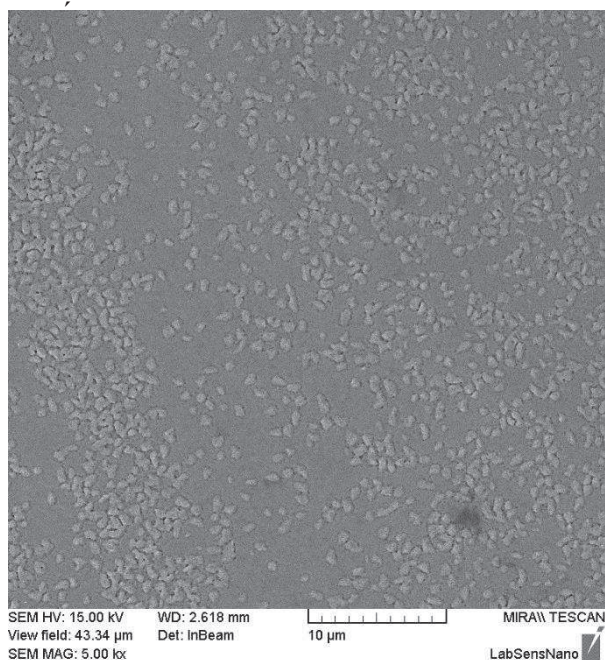
kde I je použitý prúd a S je plocha elektródy.

Použité prúdové hustoty boli od $5,65 \times 10^{-7} \mu\text{A} \cdot \mu\text{m}^{-2}$ do $5,65 \times 10^{-5} \mu\text{A} \cdot \mu\text{m}^{-2}$ pri čase od 10 s do 120 s. Testovacia doska bola potom pozorovaná v rastrovom elektrónovom mikroskope s vytvorením fotografií nadeponovanej vrstvy amalgámu. Obrázok 13 ukazuje zlatú vrstvu bez nadeponovanej vrstvy ortute.

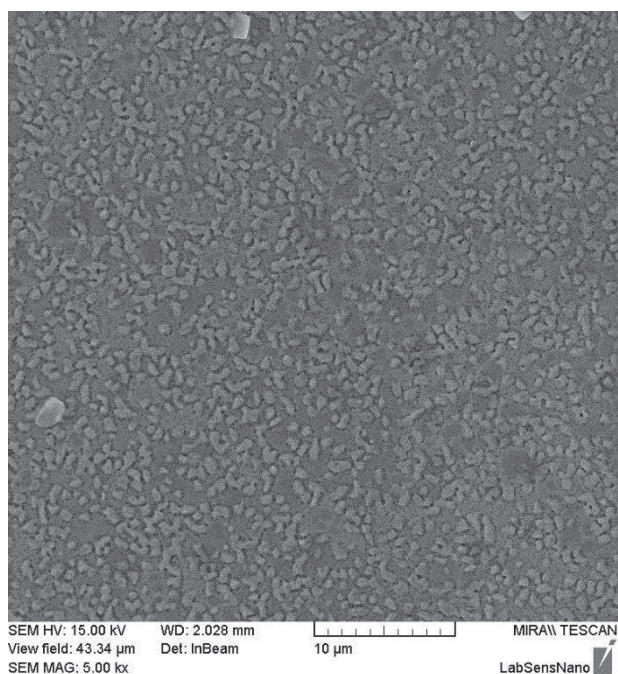
Z vytvorených snímok bol vybraný ten, na ktorom bola viditeľná čo najhomogénnejšia a najhustejšia vrstva ortuti a to konkrétne pri prúdovej hustote $1,13 \times 10^{-5} \mu\text{A} \cdot \mu\text{m}^{-2}$ pri čase 60 s. Na porovnanie bola do tejto práce vybraná prúdová hustota, ktorá bola už príliš vysoká a pri ktorej sa nevytvorila vhodná homogénna vrstva ortuti, a to $5,65 \times 10^{-7} \mu\text{A} \cdot \mu\text{m}^{-2}$ pri čase 30s. Tieto výsledky zobrazujú Obrázok 14 a Obrázok 15.



Obrázok 13: zlatá vrstva bez amalgámu v rastrovacom elektrónovom mikroskope, vzäčšenie 60 000x.



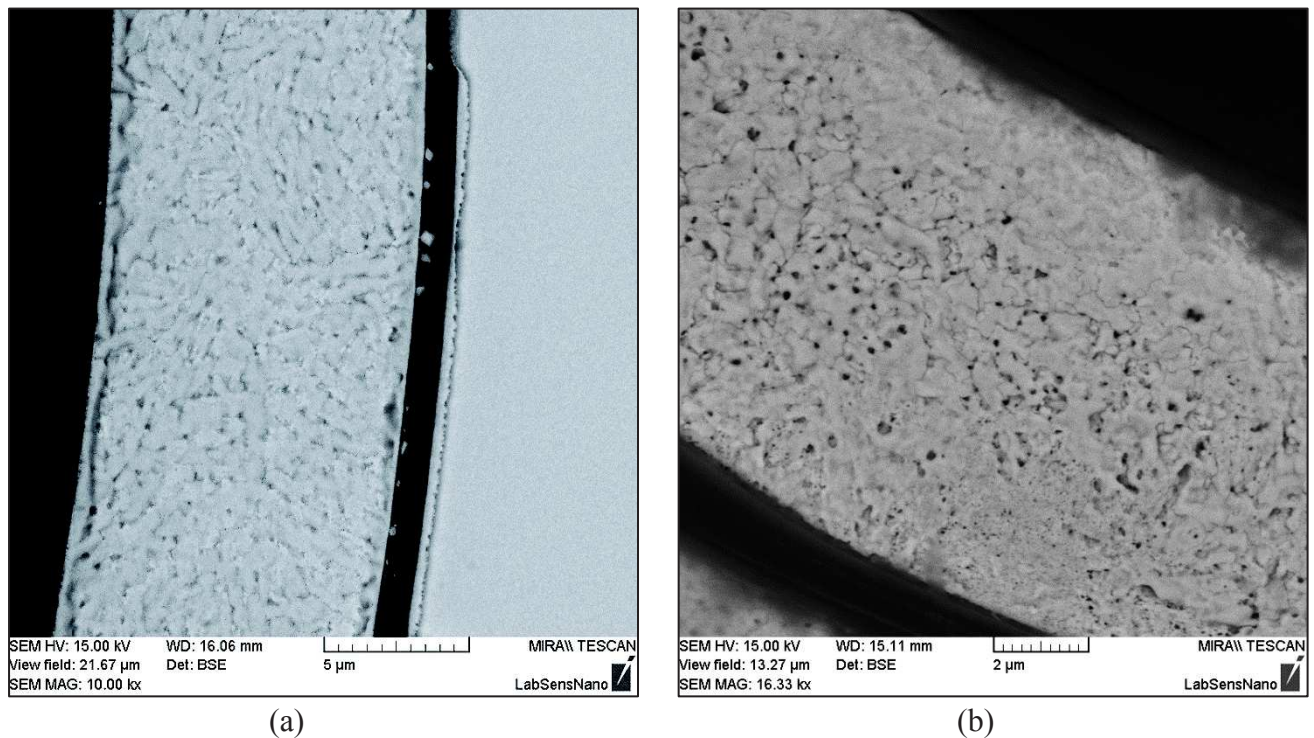
Obrázok 15: Amalgámové zrná v SEM pri prúdovej hustote $5,65 \times 10^{-7} \mu\text{A} \cdot \mu\text{m}^{-2}$



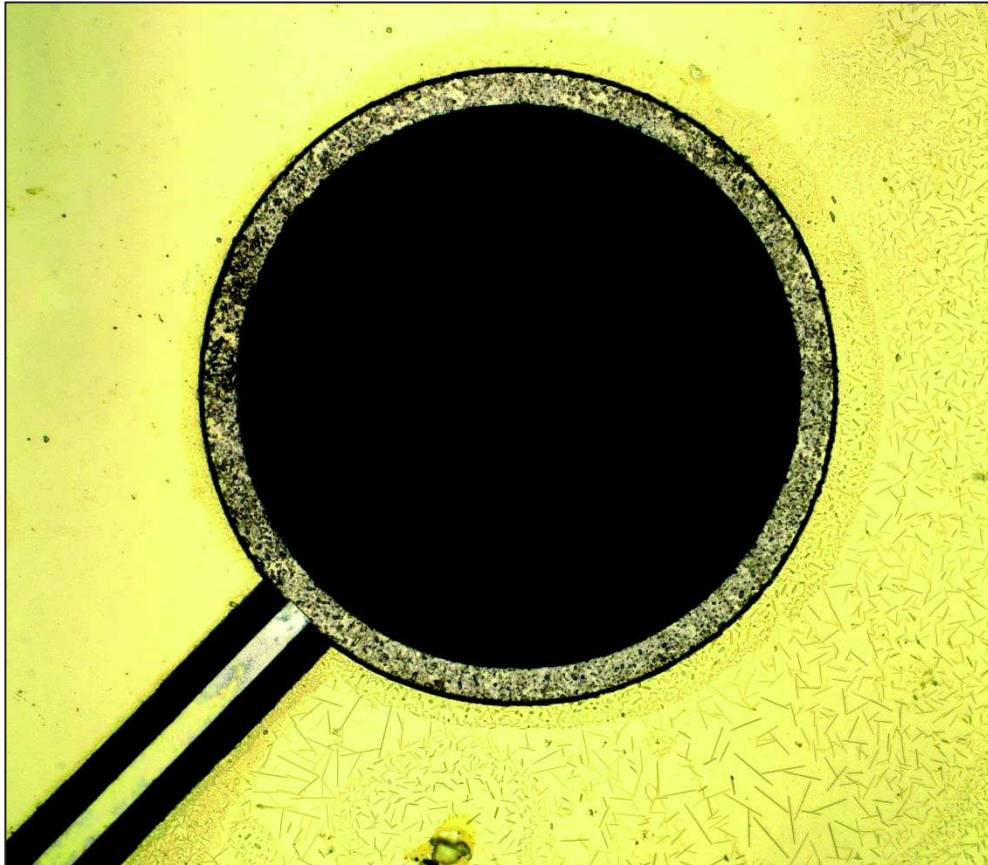
Obrázok 14: Amalgámové zrná v SEM pri prúdovej hustote $1,13 \cdot 10^{-5} \mu\text{A} \cdot \mu\text{m}^{-2}$

3.2 Aplikácia depozície na 64-elektrodový čip

Poznatky získané z amalgamácie testovacieho čipu som využila na modifikáciu 64-elektrodového čipu. Predpoklad bol taký, že najvhodnejšia prúdová hustota bude $1,13 \times 10^{-5} \mu\text{A} \cdot \mu\text{m}^{-2}$ pri čase 60 s. Po viacerých experimentoch s rôznou prúdovou hustotou, tj. od $0,172 \times 10^{-6} \mu\text{A} \cdot \mu\text{m}^{-2}$ po $6,8 \times 10^{-3} \mu\text{A} \cdot \mu\text{m}^{-2}$, bola vytvorená vrstva amalgámu pozorovaná na elektrónovom mikroskope. Najhomogénnejšia vrstva amalgámu sa javila pri najnižšej prúdovej hustote a to $172 \times 10^{-6} \mu\text{A} \cdot \mu\text{m}^{-2}$, pri čase depozície 60 s, čiže prúdová hustota o tri rády vyššia ako sme očakávali. To mohlo byť spôsobené vyšším odporom, ktorý musel prúd prekonať. Výsledná vrstva je zobrazená na Obrázok 16 (a) a je porovnaná s vrstvou, ktorá bola vytvorená príliš vysokou prúdovou hustotou na Obrázok 16 (b). Tu vidno, že vrstva nie je homogénna a môžeme vidieť aj zlatú vrstvu pod amalgámom, čo nie je žiadúce.

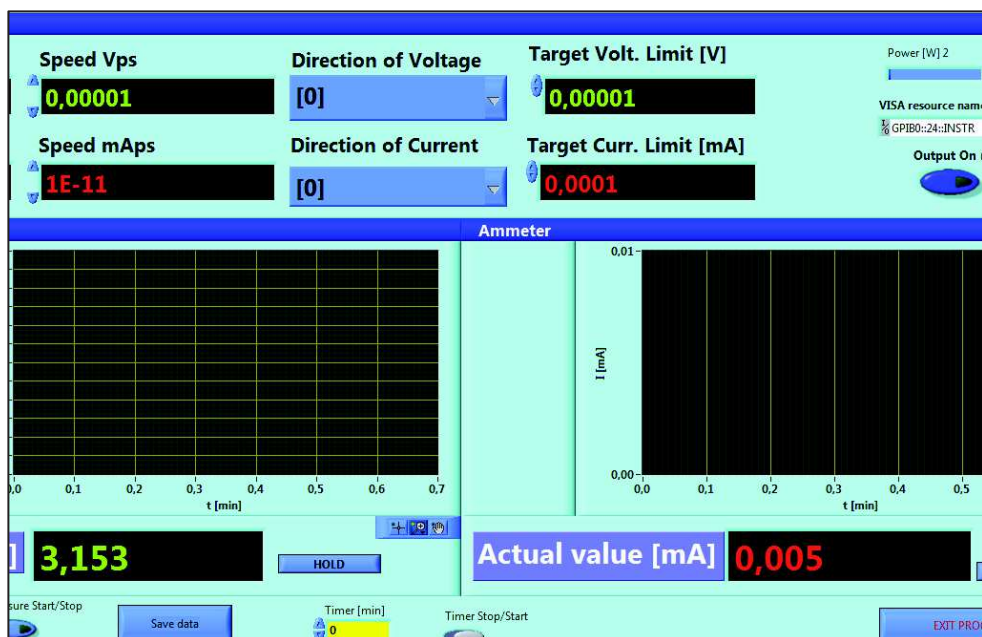


Obrázok 16: Amalgámová vrstva na zlatej vrstve čipu pri prúdovej hustote $172 \times 10^{-6} \mu\text{A} \cdot \mu\text{m}^{-2}$ a čase depozície 60 s (a). Amalgámová vrstva pri prúdovej hustote 172×10^{-5} (b). Použitý bol elektrónový mikroskop a zväčšenie 10 000x.



Obrázok 17: čip po modifikácii vrstvou amalgámu. Vonkajšia elektroda je čisté zlato, vnútorná elektroda je zlato so zrnami amalgámu. Použitý bol optický mikroskop, zväčšenie 50x.

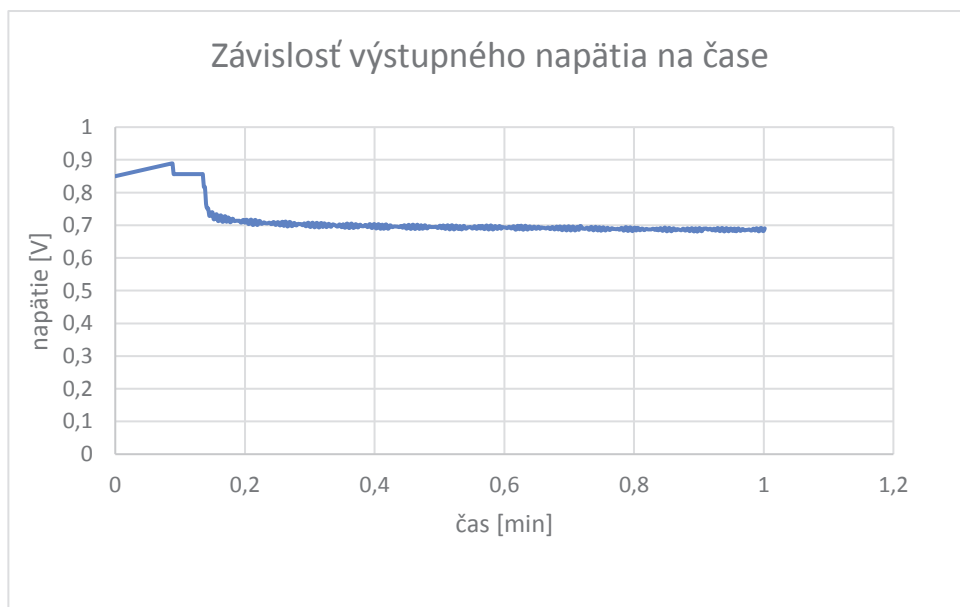
Keďže priemer jedného celého čipu je len 500 μm , celá amalgamácia prebiehala pod mikroskopom, na hrotovej meracej stanici. Cieľom bolo pokryť vrstvou amalgámu menšiu z dvoch elektród na každom čipe. Vonkajšia elektroda bola teda zapojená na kladný výstup a tá vnútorná, menšia na záporný výstup. Hodnoty prúdu, času a maximálneho napätia boli nastavované prostredníctvom softvéru Elektrochemické procesy_v2.0.4, napojeného na prúdový zdroj Keithley, viz. Obrázok 18: softvér



Obrázok 18: softvér Eelektrochemické procesy

Hodnota maximálneho výstupného napätia bola nastavená na 10 V. Priebeh výstupného napätia je ilustrovaný na

Obrázok 19.



Obrázok 19: závislosť napätia na čase pri prúde 500 nA. Na začiatku je hodnota napätie trochu vyššia, ale po približne 10 s sa ustálila na hodnote okolo 0,7 V.

3.3 Prvková analýza

Na čípoch pokrytých vrstvou amalgámu prebehla analýza prvkov technikou EDX a XPS.

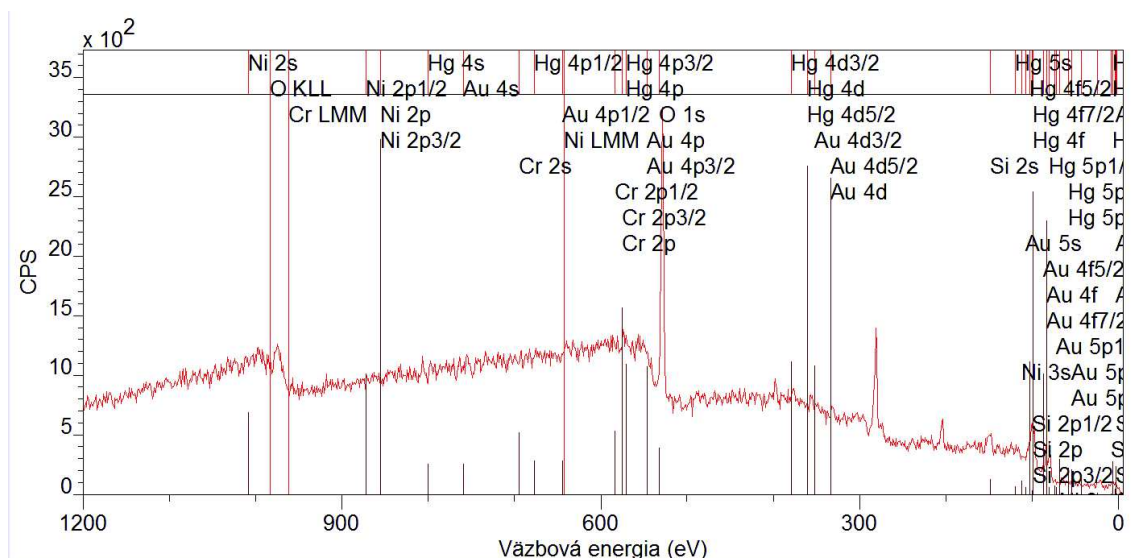
Energiivo disperzná analýza, EDX, je elektroanalytická metóda, ktorá sa používa spolu s rastrovacím elektrónovým mikroskopom, resp. s detektorom BSE. EDX detektor meria množstvo vyžiarených rontgenových lúčov v porovnaní s ich energiou. Keď sa paprsok dostane k detektoru, vytvorí sa impulz, ktorý je úmerný energii tohto žiarenia. Tento impulz je prevedený na napäťový impulz a ďalej spracovávaný v počítači. Výsledkom je zloženie objemu analyzovanej látky [20].

V tomto prípade táto analýza ukázala, že na analyzovanom povrchu sa naozaj nachádza vrstva amalgámu, resp. ukázala prítomnosť ortuti. Problémom v tejto analýze je ale to, že protónové čísla zlata a ortuti sú veľmi blízko a pomocou BSE ich niekedy nie je možné jednoznačne oddeliť.

Preto bola urobená ešte rontgenová elektrónová spektroskopia, XPS s pomocou softvéru CasaXPS. Základom analýzy XPS je fotovoltaiický jav. Technika spočíva v tom, že fotóny sa zrážajú s elektrónmi na povrchu analyzovanej látky a tieto elektróny sú emitované do vákuu. Tam sú potom zachytené a analyzátorom rozdelené podľa ich kinetickej energie a množstva. Keďže poznáme kinetickú energiu elektrónov a aj energiu fotónov budiaceho žiarenia, môžeme sledovať väzbovú energiu každého prvku z analyzovanej látky [19].

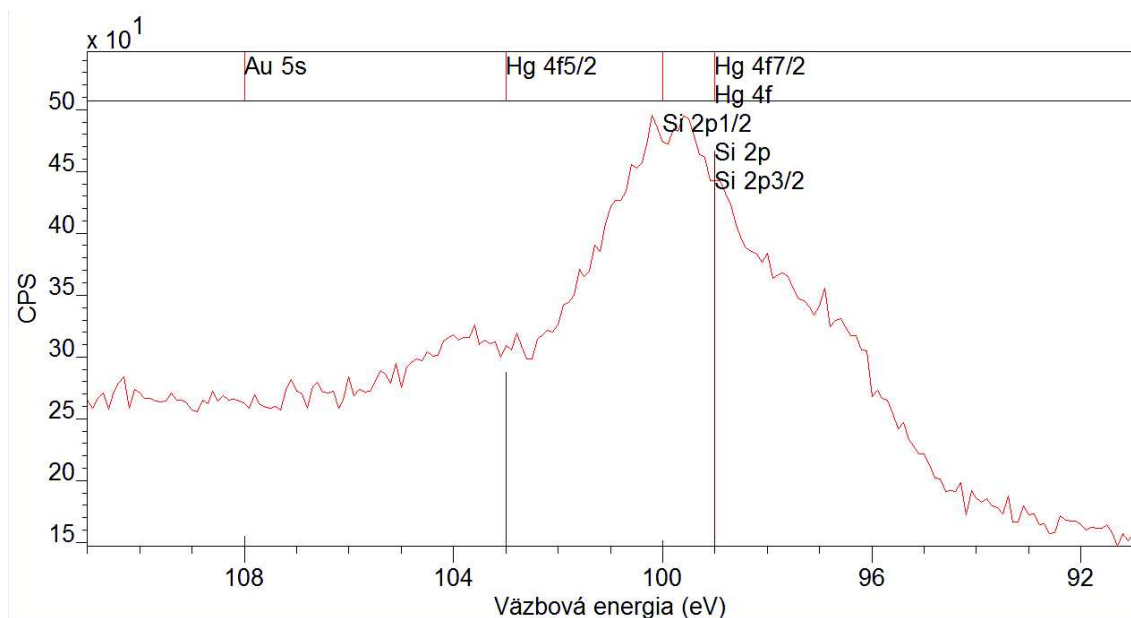
V prípade tohto experimentu mi XPS analýza pomohla uistiť sa v prítomnosti amalgámovej vrstvy na zlatých čípoch a overila nám predpoklad zistený elektrónovým mikroskopom.

Obrázok 20 znázorňuje celé spektrum väzbovej energie všetkých prvkov, ktoré sa nachádzajú v povrchu čipu. Sú to prvky, z ktorých bol vyrobený, teda Si, Cr, Ni, následne Au, z ktorého je vyrobená elektróda a nakoniec Hg, ktorá bola nadeponovaná. Najviac sa samostatná ortuť objavuje v orbitáli d.



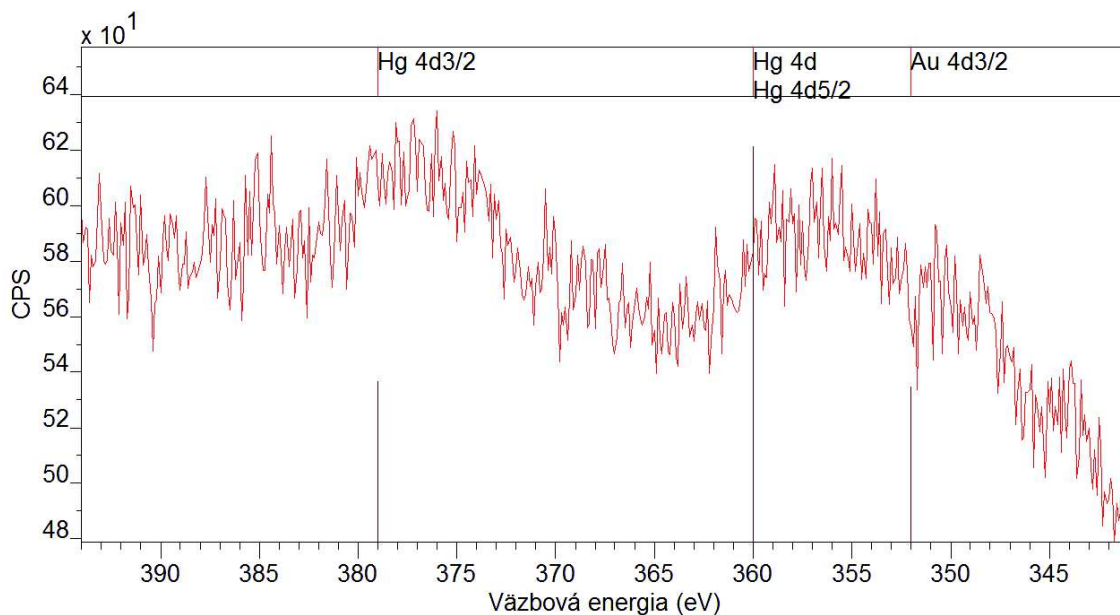
Obrázok 20: XPS analýza povrchu elektródy, ukazuje celé spektrum a prítomnosť všetkých látok, ktoré sa na čípe nachádzajú

Prítomnosť ortuti je dobre vidieť najmä v atómových orbitáloch d a f. Aj pri analýze XPS sa prejavuje problém prekryvania prvkov z dôvodu ich podobného energetického spektra, konkrétne v orbitáli f je kremík, z ktorého je čip vyrobený, priamo pod píkom ortuti, viz. Obrázok 21. Zlato sa nachádza mimo ortuti a tak ju dokážeme dobre rozlíšiť.



Obrázok 21: XPS analýza povrchu elektródy, ukazuje prítomnosť ortuti v orbitáli f, spolu s kremíkom, ktorý tvorí podklad čípu.

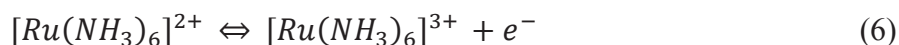
V orbitáli d sa už kremík nenachádza a je možné pozorovať samostatnú ortuť. V blízkosti ortuti sa znovu nachádza aj zlato, viz. Obrázok 22



Obrázok 22: XPS analýza povrchu elektródy, ukazuje prítomnosť ortuti v orbitáli d, kde už sa neobjavuje kremík a ortuť je v konvolúcii so zlatom

3.4 Analýza biologických látok

Funkčnosť čipu bola overená osvedčenou technikou elektrochémie ruténia, s použitím cyklickej voltametrie. Dôvodom je to, že ruténium sa na amalgámových elektródach ľahko oxiduje a redukuje v zápornom potenciáli, tzn. oxidačný a redukčný pík sa nachádza v zápornej časti potenciálu (očakávaný výstup viz. Obrázok 3). Práve to je dôležité pretože, ako je spomenuté vyššie, biomakromolekuly sa redukujú v zápornom potenciáli. Reverzibilný oxidačno-redukčný pár popisuje rovnica [16].



Ďalšou analyzovanou látkou bolo BSA (hovädzí sérový albumín) čo je proteín získaný od kráv. BSA takmer nijak neovplyvňuje chemické reakcie, je ľahko dostupné a lacné, jeho molekuly sú malé a stabilné. Z týchto dôvodov má tento proteín veľmi široké využitie v elektrochémii a je základom mnohých experimentov. Práve preto bolo BSA vybrané aj v tejto práci na analýzu s použitím amalgámových elektród [15][14].

Na všetky analýzy bol použitý AUTOLAB a softvér NOVA 2.0 a experimenty prebehli na hrotovej meracej stanici pod mikroskopom.

3.4.1 Analýza ruténia, výsledky a diskusia

Na prvú analýzu som vybrala ruténium vo forme hexaammineruthenium (III) chloride. Použitý bol 64 elektródový čip, zlaté elektródy modifikované vrstvou amalgámu. Na analýzu bola použitá metóda cyklickej voltametrie.

Roztok ruthenia som namiešala s 0.1M KCl. Boli namiešané štyri rôzne koncentrácie, a to 50 mM, 10 mM, 5 mM a 1 mM.

Hodnoty všetkých analýz cyklickej voltametrie boli nastavené nasledovne:

štartovací potenciál: -0,9 V

koncový potenciál: -0,2 V

dolný vrchol (lower vertex): -0,9 V

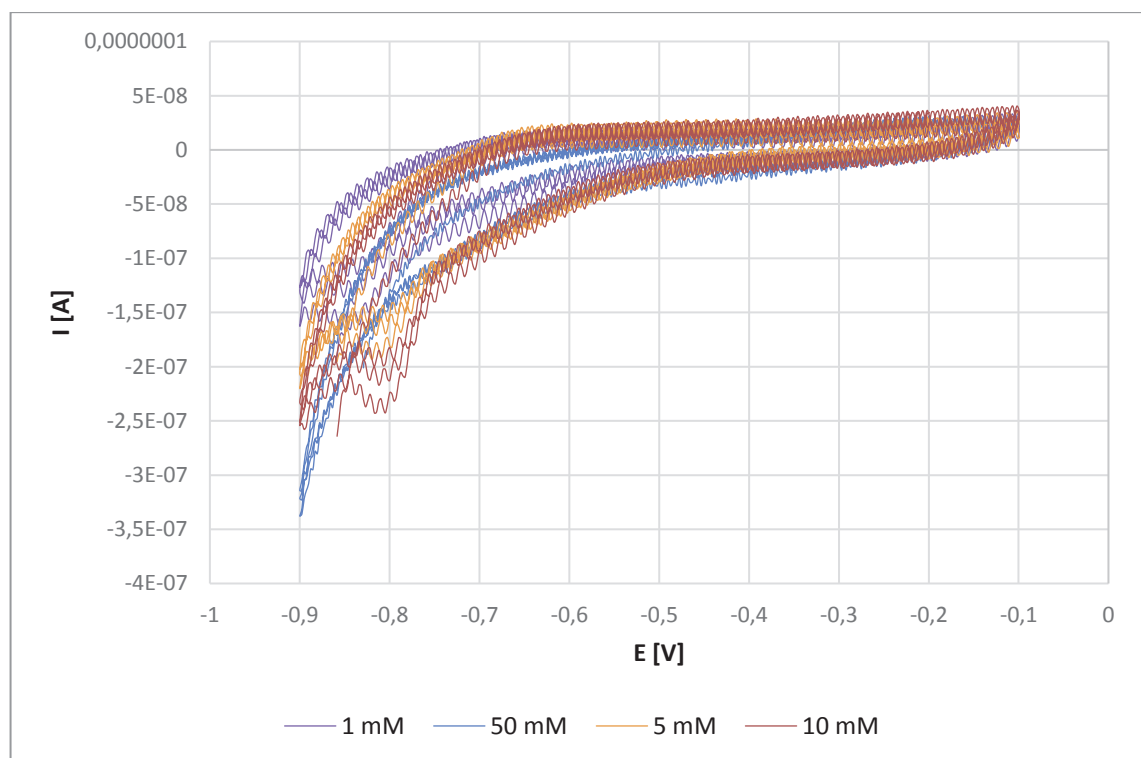
horný vrchol (upper vertex): -0,1 V

rýchlosť skenovania (scan rate): 10mV*s⁻¹, 50 mV*s⁻¹ a 100 mV*s⁻¹

počet cyklov: 3

Najprv bolo namerané pozadie, teda čistý KCl. Následne boli merané všetky koncentrácie ruténia, vždy s troma rôznymi rýchlosťami skenovania. Výsledky sú zobrazené na Obrázok 23.

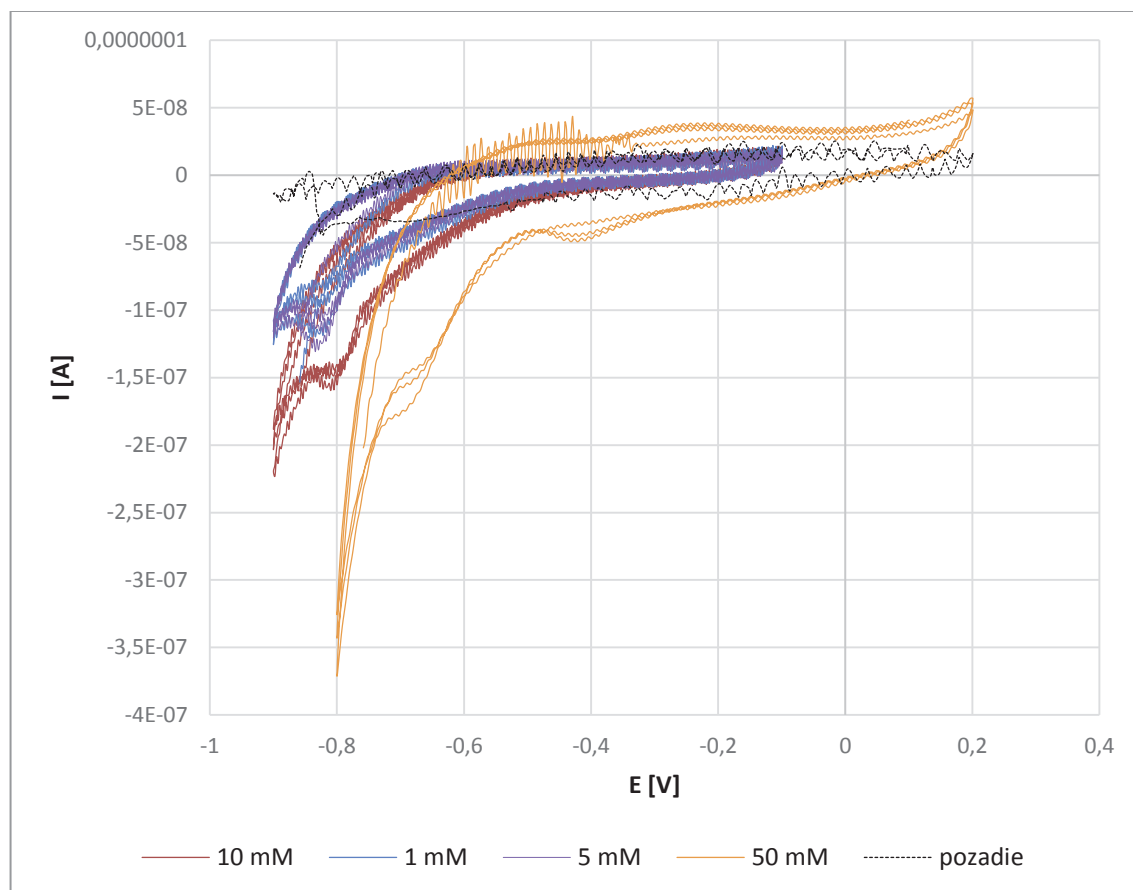
Použité koncentrácie 1 mM, 5 mM, 10 mM a 50 mM. Scan rate 100 mV*s⁻¹.



Obrázok 23: cyklické voltamogramy $\text{Ru}[(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ v 0,1 M KCl. Použité koncentrácie 1 mM, 5 mM, 10 mM a 50 mM. Scan rate 100 mV*s⁻¹.

V grafe sú znateľné redukčné píky v rozmedzí potenciálov -900 až -800 mV. Oxidačné píky pravdepodobne splynuli.

Na krivkách možno vidieť značný vplyv šumu. Bohužiaľ sa pravdepodobne nepodarilo zabezpečiť najvhodnejšie podmienky na túto analýzu. Keďže použité elektródy sú veľmi malých rozmerov a ich nakontaktovanie je zložité, akýkoľvek vonkajší vplyv spôsobí zmenu výsledku. V tomto prípade je možné aj to, že do signálu vstupuje sieťový brum. Na odstránenie šumu po analýze by bolo nutné signály vyhladiť filtrom.

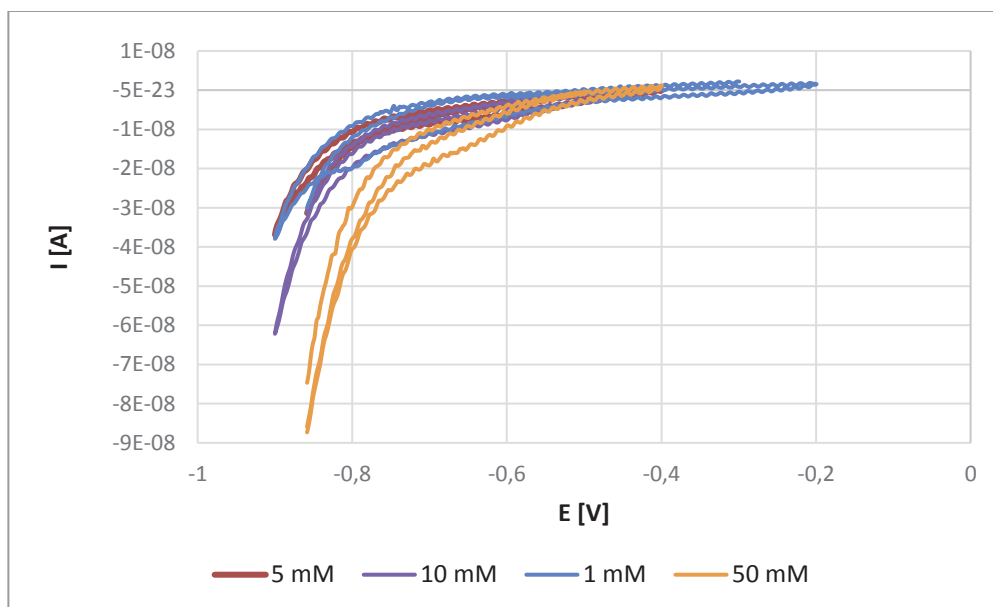


Obrázok 24: cyklické voltamogramy $\text{Ru}[(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ v 0,1 M KCl. Použité koncentrácie 1 mM, 5 mM, 10 mM a 50 mM. Scan rate $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$. Čiernou prerušovanou krivkou je vyznačený signál pozadia, teda KCl

Obrázok 24 znázorňuje obdobnú analýzu $\text{Ru}[(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ v 0,1 M KCl v koncentráciách 1 mM, 5 mM, 10 mM a 50 mM, ale tentokrát je rýchlosť skenovania nastavená na $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, teda grafy sa vykresľovali pomalšie. V tomto grafe je pre ilustráciu zobrazená aj krivka pozadia, KCl, ktorá sa pohybuje okolo nuly.

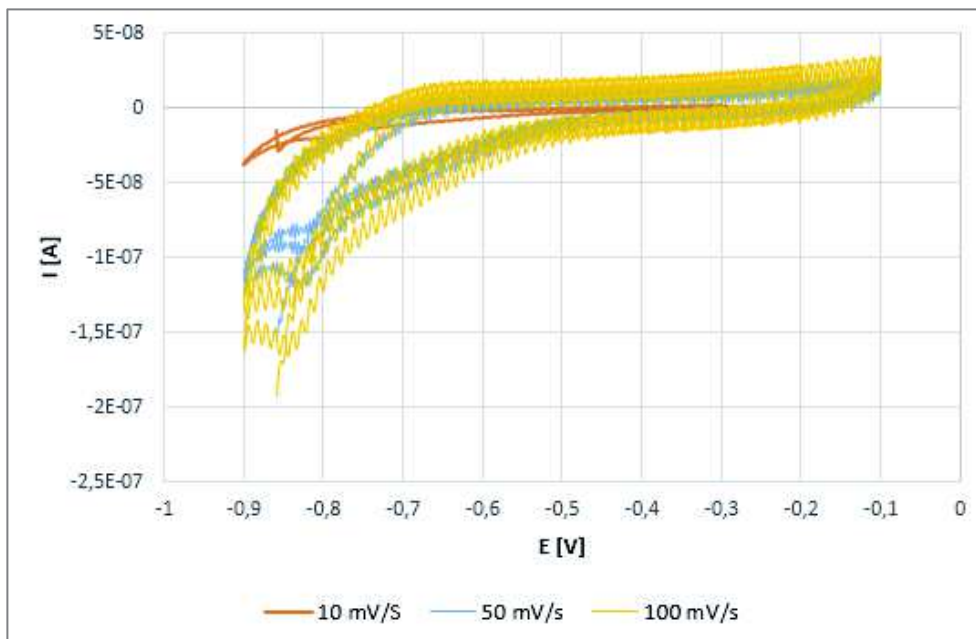
Oproti predošlému grafu je tu znateľné, že redukčné píky sú omnoho výraznejšie. Šum je miernejší, no aj tak je tam znateľný značný vplyv vonkajšieho rušenia.

U tretej analýzy bola použitá najnižšia rýchlosť skenovania a to $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Píky nie sú tak výrazné ako v Obrázok 24, no vplyv okolia je najmenej znateľný a šum sa až tak neprejavuje. Oproti predošlým analýzám je viditeľné celkové zúženie voltamogramov a posun k nižším prúdovým hodnotám. To môže byť spôsobené práve nižšou skenovacou rýchlosťou, čo znamenalo dlhší čas pôsobenia potenciálu na elektródu a prúdová odozva nemusí byť čisto z amalgámovej vrstvy.



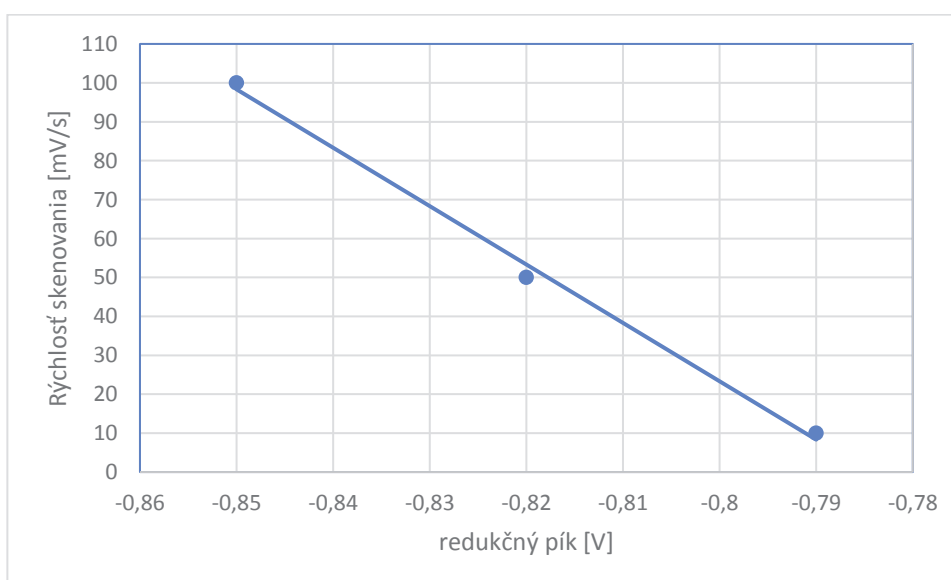
Obrázok 25: cyklické voltamogramy $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ v 0,1 M KCl. Použité koncentrácie 1 mM, 5 mM, 10 mM a 50 mM. Scan rate $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Celkové porovnanie rýchlostí skenovania zhŕňa Obrázok 26, kde je najviac znateľný rozdiel šírky celkového voltamogramu a vplyvu šumu na signál. Vplyv na výsledky mohol mať aj fakt, že prvé dva merania boli uskutočnené v iný deň a teda za iných podmienok ako tretie meranie.



Obrázok 26: porovnanie cyklických voltametrií 1 mM $\text{Ru}[(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ v 0,1 M KCl pri rôznych hodnotách rýchlosti skenovania, konkrétne scan rate= $10\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$, $50\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ a $100\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Obrázok 27 porovnáva hodnotu, resp. polohu redukčného píku na potenciálovej osi pri rôznych hodnotách skenovacej rýchlosti. Nijaká výrazná závislosť preukázaná nebola, aj keď môžeme povedať, že so znižujúcou sa rýchlosťou sa redukčné píky posúvajú veľmi mierne doprava, teda k menej záporným hodnotám. Tento posun sa väčšinou kompenzuje kalibráciou.



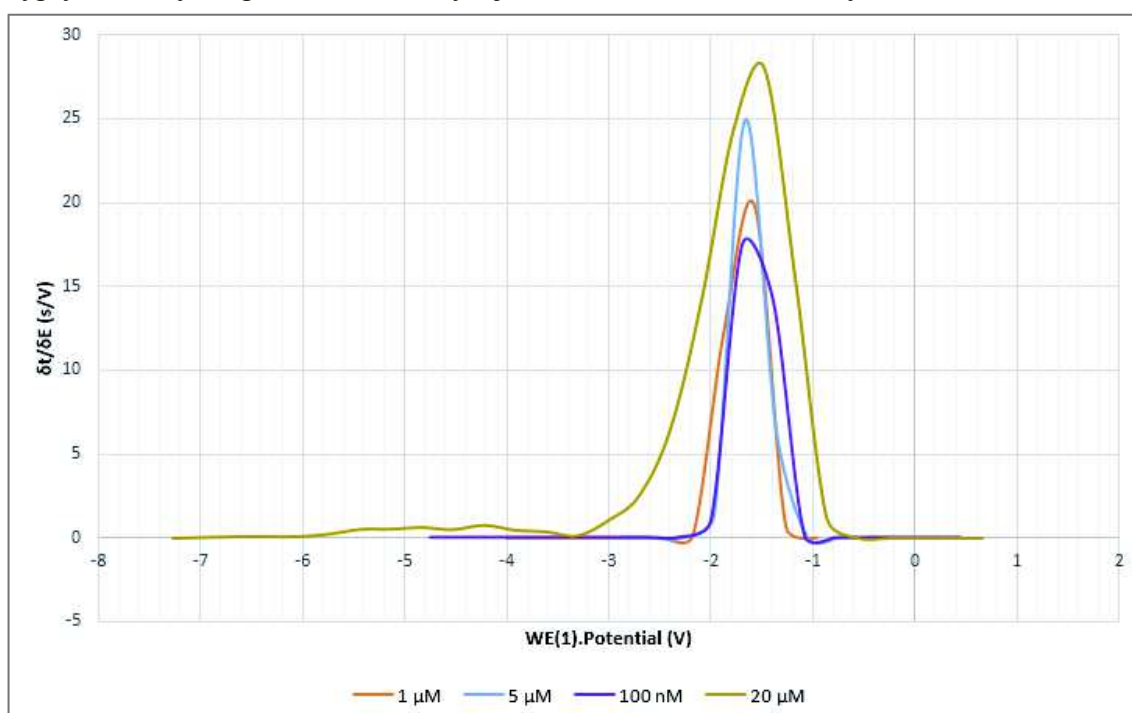
Obrázok 27: Závislosť polohy redukčného píku na skenovacej rýchlosti

3.4.2 Analýza BSA, výsledky a diskusia

Na druhú analýzu bol použitý natívny hovädzí sérový albumín, BSA. Roztoky rôznych koncentrácií som pripravila riedením 20 μM BSA vo fosfátovom pufri, pH 7. Boli pripravené štyri rôzne koncentrácie: 20 μM , 5 μM , 1 μM a 100 nM.

Na analýzu som použila potenciometrickú stripovaciu metódu s konštantným prúdom, ktorý bol nastavený na -40 μA . BSA bolo na pracovnej elektróde akumulované po dobu 60 s pri potenciáli -0,1 V.

Pri analýze boli sledované hodnoty píkovej detekcie BSA na elektróde. Z výsledného grafu vyplýva, že výška píku rastie so zvyšujúcou sa koncentráciou látky, viz. Obrázok 28.



Obrázok 28: detekcia rôznych koncentrácií BSA metódou stripovacej potenciometrie. Použité koncentrácie BSA 100 nM, 1 μM , 5 μM a 20 μM , stripovací prúd $I=-40 \mu\text{A}$, čas akumulácie 60 s pri akumuláčnom potenciáli $E_A=-0,1 \text{ V}$.

V tomto experimente bola použitá metóda stripovacej potenciometrie z dôvodu, aby sme mohli výsledky porovnať s [11], kde pík H u 5 μM BSA bol získaný u potenciálu -1,64V. Táto metóda sa nepoužíva úplne bežne a navrhla by som použiť štandardné voltamperické techniky. Hodnoty získaných píkovej zhrňuje Tabuľka 1

Tabuľka 1: detekcia BSA

Koncentrácia BSA [μM]	0,1	1	5	20
Hodnota píku [V]	-1,695	-1,564	-1,474	-1,668

a môžeme povedať, že mnou nameraná hodnota -1,69 V je veľmi blízka očakávanej hodnote -1,64 V.

Odchýlky v hodnotách mohla spôsobiť napríklad nepresná doba akumulácie látky na elektróde, kontamináciou pipety medzi jednotlivými meraniami či vonkajšími vplyvmi - rýchle vysychanie kvapky roztoku na elektróde v dôsledku vzduchotechniky. Nevýhodou pri experimentoch bolo aj to, že keďže elektródy sú veľmi malé, aj nepatrný pohyb spôsobil stratu ťažko nadobudnutého kontaktu s kontaktnými plôškami. Napriek tomu sú v nameraných hodnotách veľmi malé odchýlky.

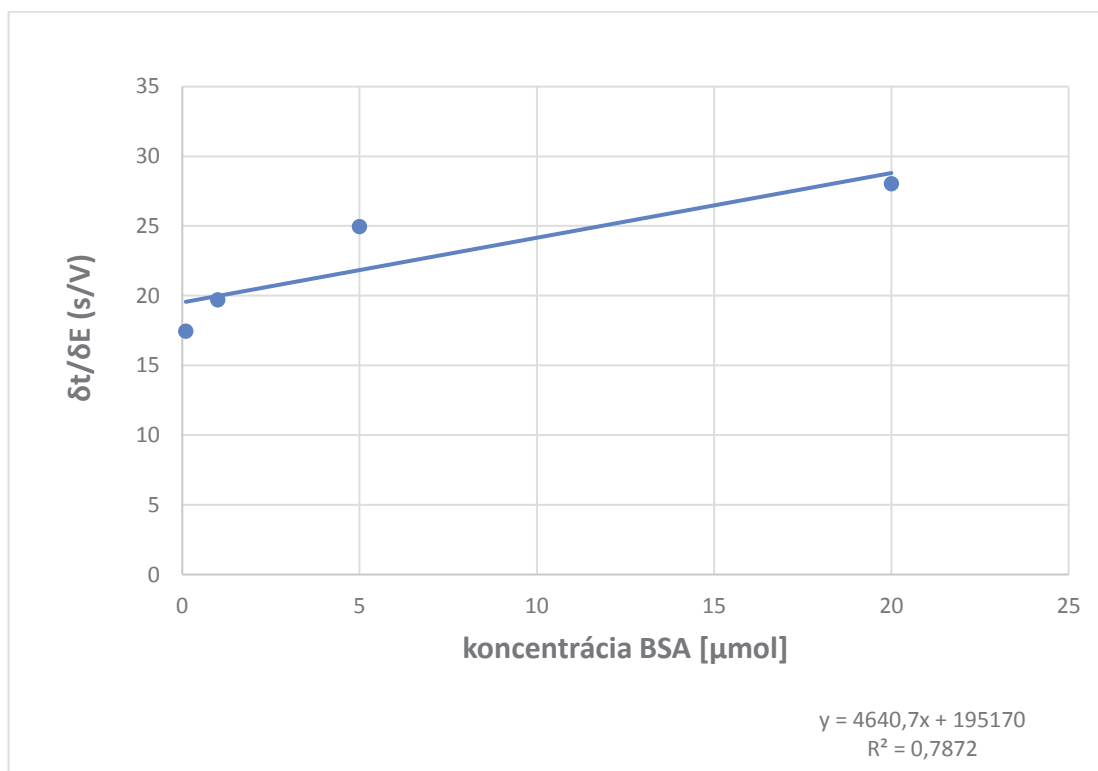
3.4.3 Limit detekcie

Limit detekcie je najmenšie množstvo analytu vo vzorku, ktoré môže byť detekované. Existuje niekoľko postupov, ako zistiť limit detekcie. Ja som si vybrala postup s využitím výsledkov z regresnej krivky, kedy používame vzťah:

$$LOD = \frac{3,3 \times h_n}{m} \quad (7),$$

Kde h_n je smerodajná odchýlka a m je smernica kalibračnej krivky [22].

Ako smerodajná odchýlka môže byť použitá štandardná odchýlka hodnôt y na regresnej krivke.



Obrázok 29: kalibračná krivka koncentrácie

S použitím hodnôt z Tabuľka som vypočítala štandardnú odchýlku $STEYX=27278,85$. Hodnotu sklonu krivky, teda smernicu, vyčítame z rovnice regresie: $m=0,4641$. Po dosadení do vzorca dostávame hodnotu $LOD=11,16$ nM.

ZÁVER

Cieľom tejto bakalárskej práce bolo naštudovať si problematiku amalgámových elektród a ich využitia pri analýze biologických látok a zoznámiť sa s technikami elektrochemickej depozície. Následne získané poznatky aplikovať v praxi na tvorbu 64-elektrodového čipu modifikovaného vrstvou amalgámu. Na vytvorených elektródach som mala analyzovať niekoľko biologických látok rôznych koncentrácií.

V prvej časti praktickej práce som absolvovala experimenty na skúšobnej doske, kde som testovala rôznu prúdovú hustotu a jej vplyv na výslednú vrstvu amalgámu. Po nájdení vhodnej prúdovej hustoty som to aplikovala na 64-elektrodový čip. Bohužiaľ hodnoty, ktoré boli očakávané ako najvhodnejšie, boli príliš vysoké a výsledná vrstva amalgámu nebola vhodná. Preto prebehli ďalšie experimenty, až sa mi podarilo nájsť optimálnu prúdovú hustotu, kedy výsledná vrstva amalgámu na elektróde bola dostatočne homogénna a hustá. Pri ďalšom pokračovaní v práci by som ešte zistila výslednú hrúbku vrstvy.

V druhej časti praktickej úlohy som si vybrala dva testovacie látky a to ruténium a BSA. Ruténium z toho dôvodu, že sa v zápornom potenciáli ľahko redukuje a vieme tým overiť funkčnosť čipu. Bohužiaľ výsledné voltampérické krivky nie sú úplne ideálne. Redukčný pík je detekovateľný v potenciáli, ktorý je o hodne posunutý od očakávania z [16] či [11] a krivky sú roztrásené pravdepodobne vplyvom vonkajších podmienok a elektroniky v laboratóriu. Posun píkov je pravdepodobne spôsobený tým, že v mojej práci bol použitý dvojelektrodový systém s referenčnou elektródou, zatiaľ čo v [11] bol použitý trojelektrodový systém. Druhú testovanú látku, BSA, som vybrala z toho dôvodu, že je ľahko dostupné a je to akýsi základ väčšiny elektrochemických meraní. Na analýzu som použila metódu stripovacej chronopotenciometrie a sledovala som hodnoty píku pri rôznych koncentráciách roztokov. Výsledný graf potvrdzuje závislosť výšky píku od koncentrácie analyzovanej látky.

Vytvorené amalgámové elektródy sú teda vhodné na analýzu biologických látok a v ďalšej práci by som sa zamerala na optimalizáciu vrstvy amalgámu a na skúmanie ďalších biologických látok. Taktiež by som skúsila merania cyklickej voltametrie vo vyšších záporných potenciáloch.

LITERATÚRA

- [1]. Jelen, E.P.a.F., *Electrochemistry of Nucleic Acids and Development of DNA Sensors*. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 2002: p. 261-270.
- [2]. Bartošík M., P.E., Vojtěšek B., *Elektrochemická analýza nukleových kyselin, bílkovin a polysacharidů v biomedicíně*. Klin Onkol, 2014: p. S53-S60.
- [3]. Bartošík, M., *Současné Trendy V Elektrochemii Nukleových Kyselin* Chem. Listy 108, 500–506 (2014) 2014: p. 500-505.
- [4]. Bartošík, M., *Electrochemical analysis of nucleic acids and proteins for biomedicine*. 2012, Masaryk University.
- [5]. Ing. Jana Drbohlavová, P., *Speciální elektrochemické techniky*.
- [6]. Karásek, J., *Voltametrické Stanovení 1-Nitropyrenu S Využitím Stříbrné Tuhé Amalgámové Elektrody V Miniaturizované Detekční Cele* 2010, Univerzita Karlova v Praze.
- [7]. B.Yosypchuk, M.F., J.Barek, *Amalgam electrodes as tool for study of environmental important compounds and for detection of DNA damages*, AVČR, Editor. 2010.
- [8]. A.Daňhel, B.J., J.Barek, M.Fojta, *Možnosti a perspektivy stříbrného amalgámu v elektroanalytické chemii*. Chemické Listy, 2016: p. 215-221.
- [9]. Ing. Bogdan Yosypchuk, P.D., *Pevné amalgámové elektrody a jejich využití v analýze biologicky aktivních sloučenin*.
- [10]. Barek, F., Navrátil, Yosipchuk, Pecková, *Silver solid amalgam electrodes as sensors for chemical carcinogens*. Sensors, 2006.
- [11]. Paleček, J., Ostatná, Foret, *Fabrication and characterization of solid mercury amalgam electrodes for protein analysis*. Analytical Chemistry, 2010: p. 2690-2695.
- [12]. *Chemistry of electronic materials*. p. Steps in optical printing using photolithography.
- [13]. Yosipchuk, H., Paleček, Novotný, *Use of Solid Amalgam Electrodes in Nucleic Acid Analysis*. Electroanalysis, 2002: p. 1488-1493.
- [14]. Krishnan, G. (2011). *Cyclic Voltammetry*. Center for Electrochemical Engineering Research Department of Chemical and Biomolecular Engineering.
- [15]. Emil Paleček, V. O. (2009). *Potential-dependent surface denaturation of BSA in acid media*. *Analyst*: 2076-2080.
- [16]. Rodeo, I. *Ruthenium Hexamine Reversible Cyclic Voltagram*. [online] IO Rodeo Documentation for CheapStat.
- [17]. Bard A.J. a L.R. Faulkner. *Electrochemical methods: fundamentals and applications*. 2nd ed. Wiley 2001, ISBN-13: 978-0471043720
- [18]. Chytil, J. (2006). *Základy elektrotechniky - 3 - Ohmův zákon*. [online] VUT Brno.
- [19]. Kalina, L. (2011). *Analýza a mapování povrchů metodou XPS*. [online] Vysoké učení technické v Brně.

- [20]. Nanakoudis, A. (2017). *How EDX analysis with a scanning electron microscope (SEM) works*. [online], PhenomWorld.
- [21]. J.M.Estela, C. T., A.Cladera, V.Cerda (1995). *Potentiometric Stripping Analysis: A Review*. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*: 91-141
- [22]. Shrivastava A, Gupta VB. *Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods*. *Chron Young Sci* 2011;2:21-5.
- [23]. Karel Štulík, C. A., Karel Holub, Vladimír Mareček, Włodzimierz Kutner (2000). *Microelectrodes. Definitions, characterization, and applications* *Pure and Applied Chemistry(IUPAC)*: 1483-1492.
- [24]. Eurochem Group Portals (2006). *Mikroelektrody* [online]. info@eurochem.eu. Dostupné z <http://archiv.eurochem.cz>

Zoznam symbolov, veličín a skratiek

Skratky

SEM	rastrovací elektrónový mikroskop
DNA	kyselina deoxyribonukleová
RNA	kyselina ribonukleová
NK	nukleové kyseliny
MeSAE	pevná kovová amalgámová elektróda
BOE	buffered oxid etch
HDME	elektroda s ortuťovou kvapkou (hanging mercury drop electrode)
SAE	pevná amalgámová elektróda (solid amalgam electrode)
ISE	iontovo selektívna elektróda
EDX	energiovo-disperzná analýza paprskov X
XPS	rontgenová (foto)elektrónová spektroskopia
BSA	hovádzí sérový albumín

Veličiny

Es	štartovacie napätie
Ek	koncové napätie

Značky

HClO ₃	kyselina chlorečná
Hg(O ₂ CCH ₃) ₂	acetát ortuti
Ru(NH ₃) ₆	chlorid hexaamin rutenitý