



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

ELEKTRO-OPTICKÝ SENZOR PRO DETEKCI EXTRACELULÁRNÍCH IONTŮ

ELECTRO-OPTICAL SENSOR FOR THE DETECTION OF EXTRACELLULAR IONS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Boris Bellan

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Mgr. Martin Vala, Ph.D.

BRNO 2021

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1622/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student: **Boris Bellan**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. Mgr. Martin Vala, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Elektro–optický senzor pro detekci extracelulárních iontů

Zadání bakalářské práce:

Práce je zaměřena na vývoj senzoru na bázi vodivého polymeru a fluorescenční sondy pro monitorování akčního potenciálu vzrušivých buněk. Polarizace/depolarizace buněčné membrány je doprovázena transportem iontů skrze iontové kanály, přičemž zásadní roli hraje výměna iontů sodíku a draslíku. Tato práce se zaměřuje na vývoj senzoru založeného na kombinaci elektrické a optické detekce změny koncentrace těchto iontů. Senzor bude možné využít při studiu akčních potenciálů kardiomyocytů, neuronů, svalových a endokrinních buněk ale i vzrušivých buněk rostlin a hub.

Termín odevzdání bakalářské práce: 30.7.2021:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Boris Bellan
student(ka)

doc. Mgr. Martin Vala, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Cílem práce bylo připravit platformu organického elektrochemického tranzistoru, která by umožňovala elektrickou i optickou detekci výměny iontů mezi elektrolytem a vrstvou organického polovodiče, kterým byl poly(3,4-ethylenedioxythiopen):poly(styrensulfonyl). Cílem bylo ověřit, zda navržená platforma vyhovuje požadavkům obou metod charakterizace, a zda při daném uspořádání je citlivost dostačující v požadovaném rozsahu koncentrací analytu. Práce se také zabývala studiem stability platformy ve vybraných rozpouštědlech a kultivačních médiích, současně byla studována metoda optimalizace přípravy distančního rámečku a kompletace měřicí cely OECT. Bylo hledáno vhodné rozpouštědlo polymethylmethakrylátu tak, aby toto rozpouštědlo neovlivňovalo okolní části platformy. Na základě získaných výsledků bylo zjištěno, že zvolený fotorezist pro přípravu distančního rámečku není vhodný. Nicméně, bylo zjištěno, že navržená platforma vyhovuje oběma metodám charakterizace. Při studiu detekce výměny iontů bude tedy nutné současný fotorezist nahradit novým, více chemicky stabilním.

KLÍČOVÁ SLOVA

Bioelektronika, biosenzory, organický elektrochemický tranzistor, polovodivé polymery, poly(3,4-ethylenedioxythiopen):poly(styrensulfonyl)

ABSTRACT

The aim of this work was to prepare a platform based on electrochemical transistor that would allow both electrical and optical detection of ion exchange between the electrolyte and the layer of organic semiconductor. Semiconductor that have been used in this work was poly(3,4-ethylenedioxythiophene):poly(styrenesulfonate). The main goal was to verify whether the proposed platform meets the requirements of both characterization methods, and whether the sensitivity in the given arrangement is sufficient for the required range of analyte concentrations. The work also dealt with the study of the stability of the prepared platform in selected solvents and culture media, at the same time the method of optimizing the preparation of the photoresist foil and the completion of the OECT measuring cell was studied. A suitable solvent for polymethyl methacrylate was sought so that it did not affect the surrounding parts of the platform. Based on the obtained results, it was found that the selected photoresist for the preparation of the spacer frame is not suitable. However, it was found that the proposed platform satisfies both characterization methods. Therefore, it will be necessary to replace the current photoresist with a new, more chemically stable one.

KEY WORDS

Bioelectronics, biosensors, organic electrochemical transistor, conducting polymers, poly(3,4-ethylenedioxythiophene):poly(styrene sulfonate)

BELLAN, Boris. Elektro-optický senzor pro detekci extracelulárních iontů. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131436>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Martin Vala.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Tato bakalářská práce pro mě byla náročnou, bez pomoci některých lidí by její dokončení bylo pro mě velice problematické. Proto bych rád poděkoval mému vedoucímu práce, doc. Mgr. Martinu Valovi, Ph.D., za jeho čas, odborné rady a trpělivé vedení v průběhu celé práce. Dále bych rád poděkoval všem členům mé rodiny, přátelům a nejbližším za podporu a zázemí, které mi při mém studiu vytvořili.

Boris Bellan

OBSAH

1	Úvod	6
2	Teoretická část.....	7
2.1	Organický elektrochemický tranzistor (OECT)	7
2.2	Polovodivý polymer PEDOT:PSS.....	8
2.3	Transport sodných (Na^+) a draselných (K^+) iontů	10
2.4	Fluorescenční sondy pro selektivní detekci iontů	11
3	Experimentální část	13
3.1	Použité materiály a přístroje	13
3.2	Příprava modifikovaných platform OECT	14
3.3	Elektrická charakterizace OECT	15
3.4	Optická (fluorescenční) charakterizace	16
3.5	Způsob přípravy a optimalizace PMMA	17
3.6	Metoda přípravy distančního rámečku	18
4	Výsledky a diskuze.....	19
4.1	Limit detekce K^+ iontů v malém objemu elektrolytu pomocí OECT.....	19
4.2	Schopnost detekce fluorescence QSH	20
4.3	Optimalizace přípravy lepidla PMMA	24
4.3.1	Rozpustnost PMMA.....	24
4.3.2	Doba tuhnutí PMMA	26
4.3.3	Test kvality lepení	27
4.4	Metoda přípravy distančního rámečku	28
4.4.1	Příprava fotorezistu	29
4.4.2	Stabilita fotorezistu	30
5	Závěr	35
6	Seznam použité literatury	37
7	Seznam zkratk a symbolů	39

1 ÚVOD

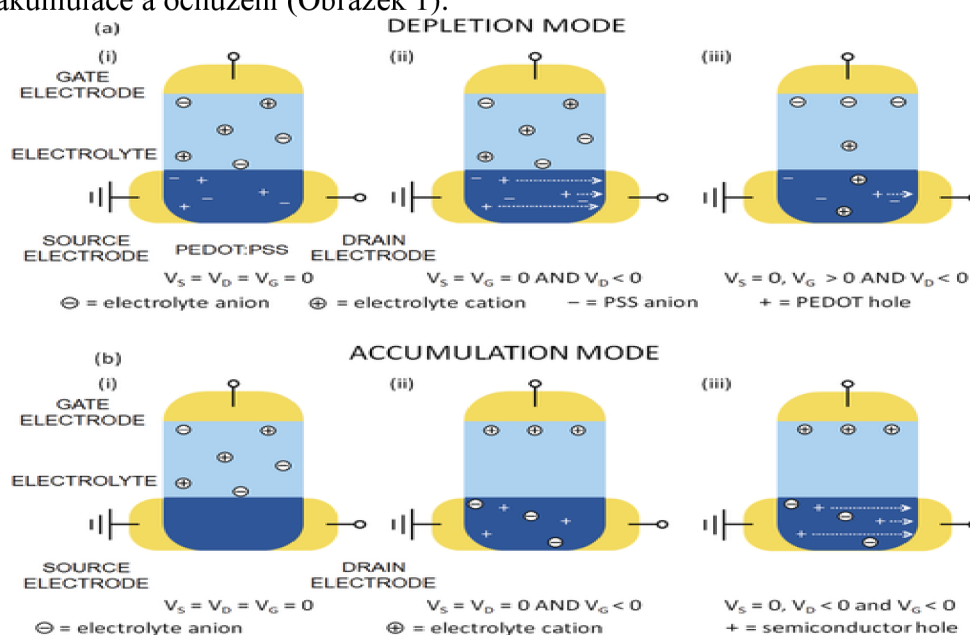
Organická elektronika byla intenzivně studována po několika desetiletí od objevu konjugovaných polymerů a vyvinula se do velice lákavé oblasti výzkumu a technologie. Jedním z hlavních důvodů je, že organická elektronika s implementací organických polovodičů dokáže dosáhnout vysokých hodnot vodivosti [2, 10]. Od konce sedmdesátých let dvacátého století, byl pro organickou elektroniku učiněn velký pokrok v optimalizaci chemických, elektrických a mechanických vlastností organických, vodivých materiálech [5]. Organické polovodičové materiály, včetně konjugovaných polymerů a malých molekul, vykazují vynikající výkon v mnoha elektronických zařízeních, včetně organických světelných diod (OLED), organických solárních článků a organických elektrochemických tranzistorů (OECT) [5]. Integrací organických polovodičových biopolymerů do sensorů, pracujících na bázi tranzistorů, dokážeme dosáhnout mnoha výhod, jako jsou například vysoká citlivost a kontrolovatelná propustnost elektronů, nebo iontů během měření [2, 5]. Vysoce citlivé biosenzory jsou velmi žádané v mnoha vědeckých oblastech medicíny a biologie, jako je například kvantitativní zkoumání výměny iontů buňky s okolím při polarizaci/depolarizaci membrány, nebo monitorování akčního potenciálu vzrušivých buněk rostlin i hub [4]. Využívání elektrických signálů s biologickými systémy pomohlo získat mnoha poznatků pro různé, základní principy živých organismů.

V naší práci jsme se zabývali vývojem sensoru na bázi vodivého polymeru s implementací fluorescenční sondy, který by dokázal monitorovat akční potenciál vzrušivých buněk. Sensor byl modifikován, aby byl schopen elektrické i optické detekce změny koncentrace extracelulárních draselných iontů (K^+) při změně elektrochemického potenciálu v okolí eukaryotické buňky. V naší práci byl modifikován sensor na bázi organického, elektrochemického tranzistoru (OECT). Jednou z charakteristických vlastností OECT je fakt, že mezi elektrolytem a kanálem OECT se nenachází izolátor, a to umožňuje dopování iontů z elektrolytu přímo do objemu tenké vrstvy polovodivého polymeru. OECT mají široké uplatnění jako biosenzory pro řadu biologických aplikací, a to z důvodu, že dokážou pracovat při nízkých pracovních napětích, které bývá standardně nižší než +1 V, čímž dokážou zabránit hydrolýze v analyzovaném systému. Mezi další výhodou OECT patří jejich vysoká chemická stabilita ve vodném prostředí a jeho biokompatibilita, kterou při určitém uspořádání dokážou nabýt [1, 4]. Jako polovodivý polymer byl pro naši modifikovanou platformu OECT použit osvědčený organický polovodič p-typu poly(3,4-ethylendioxythiophen):poly(styrensuflonát) (PEDOT:PSS). Pro splnění účelu ověření schopnosti detekce byly měření s modifikovanou platformou provedeny s připravenými roztoky o velmi nízkých koncentracích, pohybujících se v oblasti extracelulární koncentrace draselných iontů.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Organický elektrochemický tranzistor (OECT)

Organický elektrochemický tranzistor (OECT) je tříelektrodové, tranzistorové zařízení, které pozůstává z hradlové („Gate“), zdrojové („Source“) a odtokové („Drain“) elektrody [1, 8]. Prostor mezi zdrojovou a odtokovou elektrodou je vyplněn tenkou vrstvou polovodivého polymeru, který tvoří kanál OECT, skrz který je za určitých podmínek umožněn tok elektrického proudu. Mezi kanálem OECT a hradlovou elektrodou se nachází elektrolyt, bohatý na ionty [1, 8]. Ionty v polovodivém polymeru dokážou být za určitých podmínek zpětně dedopovanány do elektrolytu [1, 8]. Změnu procházejícího proudu lze modulovat změnou napětí na hradlové elektrodě [2]. Dopování iontů do vrstvy polovodivého polymeru má za následek významné zvýšení citlivosti tranzistorového zařízení OECT. Další výhodou je, že dopování probíhá v celém objemu polovodivého polymeru. Dopování iontů je umožněné pomocí aplikovaného elektrického pole a v zařízení OECT o daném uspořádání nedochází k žádné elektrochemické reakci [2]. OECT mají široké uplatnění jako biosenzory pro řadu biologických aplikací, a to z důvodu, že dokážou pracovat při relativně nízkém napětí, čímž se zabrání hydrolyze a jsou chemicky stabilní ve vodném prostředí [4, 7]. OECT lze rozdělit do čtyř kategorií, na základě transportu náboje skrz polovodivý polymer a podle režimu fungování OECT [2,4,5]. Transport náboje může být uskutečněn pomocí použití dvou typů polovodičů a to p-typ a n-typ. P-typ polovodič vede proud pomocí kladného náboje, tzv. děr a n-typ polovodič vede proud pomocí elektronů [3]. OECT pracuje ve dvou režimech, a to v režimu akumulace a ochuzení (Obrázek 1).



Obrázek 1: OECT v režimu ochuzení a v režimu akumulacním [2]

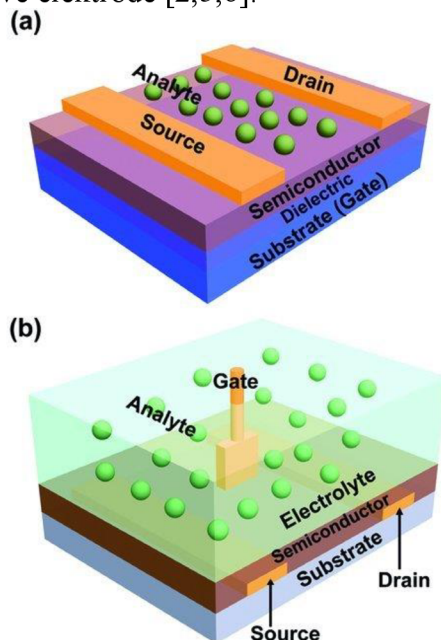
Pro náš experiment jsme se zabývali režimem ochuzení z toho důvodu, že se při aplikovaném kladném napětí na hradlové elektrodě se snižuje vodivost polovodivého polymeru mezi zdrojovou a odtokovou elektrodou. Pro režim ochuzení byl jako modelový polymer použit poly(3,4-ethylendioxythiophen) dopován látkou poly(styrenulfonát) (PEDOT:PSS) [1]. Navzdory širokému zájmu o OECT díky jeho možnosti využití v mnoha biologických

aplikacích, nebyl doposud komplexněji vysvětlena jeho volt-ampérová charakteristika [1]. Je to pravděpodobně z toho důvodu, že pro správný popis OEET je zapotřebí spojit poznatky elektrochemie a fyziky pevných látek. K popisu fungování OEET v ustáleném stavu a v režimu ochuzení, byl popsán mechanismus OEET pomocí snížení pohyblivosti a počtu děr v organickém polymeru poly(3,4-ethylendioxythiophen) (Obrázek 2) [1, 10]. Snížení pohyblivosti děr je způsobeno dopovanými ionty z elektrolytu do tenké vrstvy polovodivého polymeru PEDOT:PSS za podmínky přiložení kladného napětí na hradlové elektrodě, která je v přímém kontaktu s elektrolytem [1]. Transport děr v polymeru mezi zdrojovou a odtokovou elektrodou je dán Ohmovým zákonem [7]. zesílení OEET je popsáno pomocí veličiny transkonduktance (g_m), definované v rovnici (1) a (2). Z rovnice (2) vyplývá, že transkonduktanci OEET lze modulovat úpravou rozměrů kanálu OEET (w , d , l), nebo použitím jiného polovodivého polymeru (μ , C) [2,6,7]. Také bylo prokázáno, že transkonduktance OEET je silně závislá od aplikovaného napětí na hradlové elektrodě. [2,5,6].

$$g_m = \frac{\partial I_{SD}}{\partial V_G} \quad (1)$$

$$g_m = \frac{w \cdot d}{l} \cdot \mu \cdot C \cdot (U_{Th} - U_G) \quad (2)$$

Člen ∂I_{SD} v rovnici (1) znázorňuje změnu procházejícího proudu skrz tenkou vrstvu polovodivého polymeru mezi zdrojovou a odtokovou elektrodou, člen ∂V_G označuje změnu aplikovaného napětí mezi hradlovou a zdrojovou elektrodou. Veličina w označuje v rovnici (2) šířku kanálu, d označuje tloušťku kanálu, l popisuje délku kanálu, μ popisuje mobilitu náboje, C kapacitu polovodivého polymeru, veličina U_{Th} znázorňuje prahové napětí a veličina U_G reprezentuje napětí na hradlové elektrodě [2,5,6].

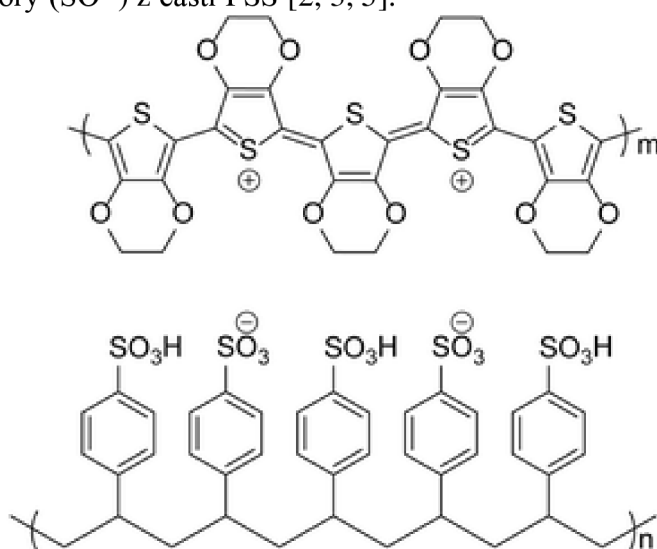


Obrázek 2: (a) organický tranzistor řízený fyzikálním polem (OFET)
(b) organický elektrochemický tranzistor (OEET) [5]

2.2 Polovodivý polymer PEDOT:PSS

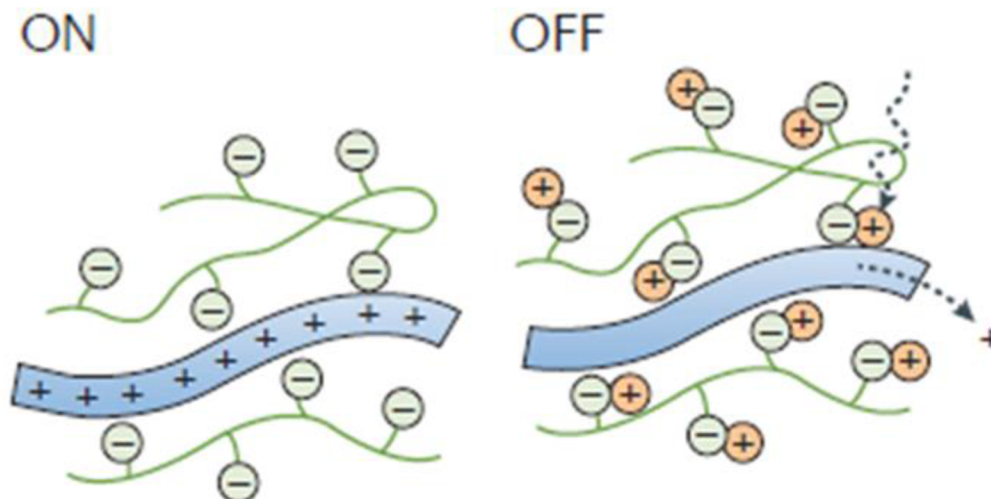
Poly(3,4-ethylendioxythiophen):poly(styrenulfonát) (PEDOT:PSS) (Obrázek 3) se prokázal jako nejúspěšnější materiál pro aplikace OEET [1,5]. PEDOT:PSS si našel uplatnění v širokém

spektru oblastí, včetně displejů OLED, organických termoelektrických materiálů a hlavně v organických elektrochemických tranzistorech (OECT) [1,5,11]. PEDOT:PSS byl poprvé představen jako materiál pro OECT v roce 2002, z důvodů jeho rozšířené komerční dostupnosti a výrazně vysoké elektrické vodivosti, která může za určitých podmínek dosáhnout vodivosti 3000 S/cm^2 [2, 5]. Právě díky kombinaci vysoké volumetrické kapacity a rozšířené komerční dostupnosti je PEDOT:PSS ideálním materiálem pro výzkum OECT [5, 10]. PEDOT:PSS je degenerovaně dopovaný polovodič p-typu, v kterém jsou díry na řetězci PEDOT kompenzovány akceptory (SO_3^-) z části PSS [2, 3, 5].



Obrázek 3: Struktura polovodivého polymeru PEDOT: PSS [11]

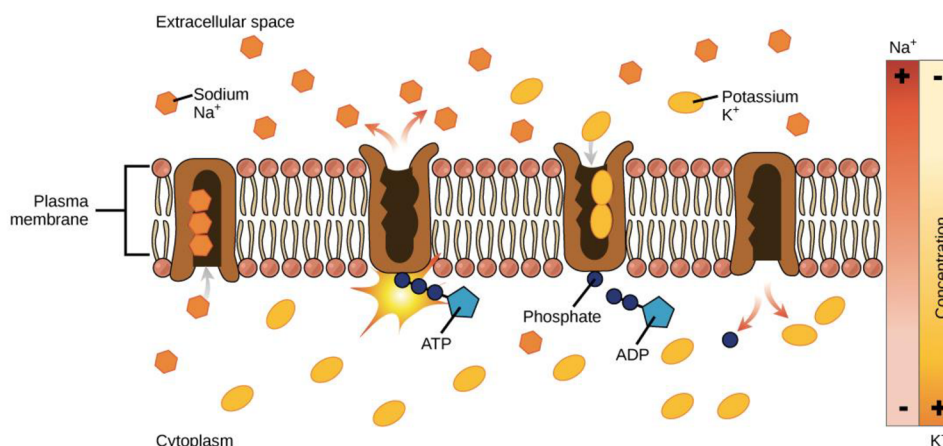
Princip fungování OECT v ochuzeném režimu s použitým polymerem PEDOT:PSS je založen na vlastnostech 3,4-dioxyalkylového můstku na thiopenových částech, poskytující elektrony pro řetězec poly(3,4-ethylendioxythiophen). PEDOT:PSS se v ochuzeném režimu chová jako p-typ polovodič, tedy elektrický proud je veden s pomocí děr podél řetězce PEDOT. Vzhledem k tomu, že řetězec PEDOT je částečně oxidován a sulfonátové skupiny v PSS tak poskytují rovnováhu náboje, pracuje OECT v ochuzeném režimu. Zvyšováním aplikovaného napětí na hradlové elektrodě způsobí, že anionty v elektrolytu migrují směrem k hradlové elektrodě a následně vytvoří elektrickou dvojvrstvu. Současně jsou z elektrolytu do materiálu kanálu OECT, který je tvořen tenkou vrstvou PEDOT:PSS, dopovány kationty interagující s částí PSS. V polovodivém polymeru tak dochází ke snaze dosáhnout elektrickou rovnováhu a to má za následek dedopování na řetězci PEDOT, čímž se postupně snižuje procházející elektrický proud skrz kanál OECT (Obrázek 4) [2]. Zlepšení výkonnosti polymeru PEDOT:PSS lze dosáhnout přidáním látky, jako je například ethylenglykol. Funkce ethylenglykolu je jemně upravit strukturu kanálu vzhledem k jeho iontové pohyblivosti. Po zvýšení obsahu ethylenglykolu, se zvýší transkonduktance OECT [2]. Organický, elektrochemický tranzistor s nejvyšší transkonduktancí byl dosud připraven při obsahu 5% ethylenglykolu. Navzdory různým atraktivním vlastnostem má PEDOT:PSS i několik nevýhod jako je jeho například kyselá povaha polystyren sulfonátu (PSS) a korozi materiálů obklopujících aktivní vrstvu OECT [2].



Obrázek 4: Polovodivý polymer PEDOT:PSS v režimu ochuzení („ON“) a akumulčním („OFF“) [14]

2.3 Transport sodných (Na^+) a draselných (K^+) iontů

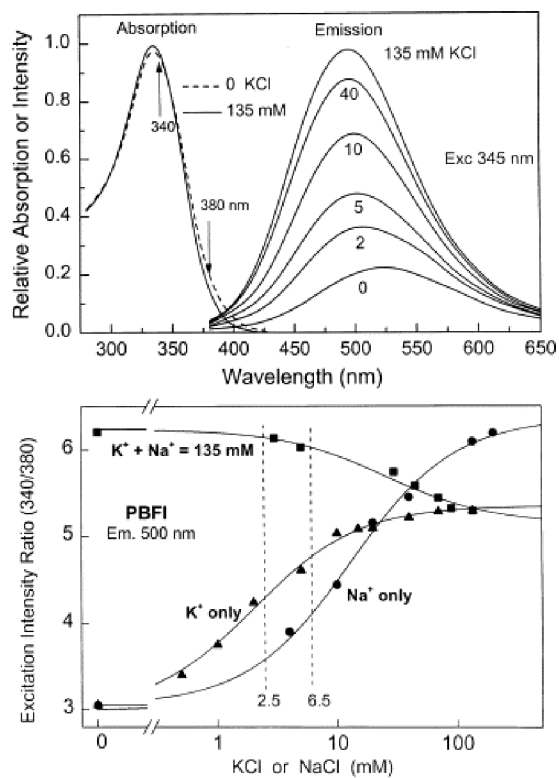
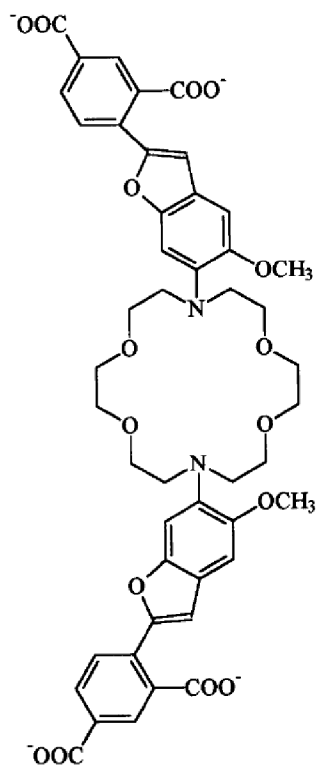
Enzym Na^+/K^+ -Adenozíntrifosfatáza (ATPáza), také nazývaná sodno-draselná pumpa (Obrázek 5), je pro život živočišné buňky jedním z nejdůležitějších enzymů ze skupin hydroláz. Funkce sodno-draselné pumpy spočívá v transportu sodných (Na^+) a draselných (K^+) iontů přes plazmatickou membránu. Tento transportní protein hydrolyzuje ATP na ADP, aby zajistil transport sodných iontů ven z buňky. Při hydrolyze ATP na ADP dochází k spotřebě energie. Současně se transport sodných iontů ven z buňky spojuje s transportem draselných iontů směrem do buňky. Sodno-draselná pumpa představuje pro živočišnou buňku důležitou funkci při energetické bilanci buňky a obvykle spotřebuje až 30 % veškerého ATP, který se v buňce nachází. Cyklus sodno-draselné pumpy začíná navázáním tří iontů Na^+ skrz plazmatickou membránu a následuje fosforylace cytosolové strany pumpy ATP. Fosforylace sodno-draselné pumpy donutí určitý transportní protein ke změně jeho strukturní konformace tak, aby dokázal přenést sodné ionty (Na^+) skrz plazmatickou membránu a uvolnit je ven do prostředí. Cyklus pokračuje navázáním dvou draselných iontů (K^+) na vnější povrch transportního proteinu, jehož konformace byla změněna při fosforylaci cytosolové strany pumpy ATP. Po navázání draselných iontů na vnější povrch transportního proteinu nastává defosforylace, díky které se transportní protein vrátí zpět do původní, strukturní konformace. Transportní protein pomocí defosforylace přenesse draselné ionty přes cytoplazmatickou membránu a uvolní je do cytosolu [9]. Intracelulární koncentrace sodných iontů se pohybuje v rozmezí 120 mM až 160 mM. Pro draselné ionty se intracelulární koncentrace pohybuje v rozhraní 2,5 mM a 6,5 mM [9, 16]. Pro klinické měření je maximální přijatelná odchylka pro intracelulární koncentrace ± 3 mM pro sodné ionty a pro intracelulární koncentraci draselných iontů je maximální přijatelná odchylka $\pm 0,2$ mM [9, 16].



Obrázek 5: Cyklus sodno-draselné pumpy [16]

2.4 Fluorescenční sondy pro selektivní detekci iontů

Fluorescence je fyzikální jev, ke kterému dochází, když se molekula v excitovaném stavu z nejvyšší energetické hladiny vrátí na základní, energetickou hladinu tím, že emituje fotony (energii). Koncentraci selektivně vybraných iontů dokážeme pomocí fluorescence pozorovat jen díky jejich navázání na správně navrženou sondu, která je pro analyzovaný iont selektivní. Díky vysoké citlivosti, kterou dokážeme při fluorescenci dosáhnout, dokážeme pozorovat a zaznamenávat změny intenzity fluorescence. Změna intenzity fluorescence nastane, když se draselný iont (K^+) naváže na fluorescenční sondu, která je pro něj selektivní. Draselné ionty je možné studovat například pomocí komerčně dostupné sondy PBFI [12, 13] (Obrázek 6). Mezi další komerčně dostupné sondy pro draselné ionty patří látky jako například CD18 a C18, a MCC [12, 13]. PBFI je selektivní, iontový indikátor pro stanovení extracelulárních koncentrací draselných iontů. Sonda PBFI se skládá ze dvou stejných fluoroforů benzofuran izoftalátu, navázaných na atomy dusíku, které jsou součástí "diazacrown" etheru. Draselné ionty se na sondu PBFI vážou stechiometrií 1:1 [13], pomocí přesně navrženého poloměru „diazacrown“ etheru, který má odpovídající poloměr jako draselný iont. Stanovení intracelulární i extracelulární koncentrace K^+ iontů se provádí pomocí měření poměru intenzity fluorescence při excitaci při vlnových délkách 340/380 nm (při emisi o vlnové délce 500 nm) [12, 13] (Obrázek č. 6). Princip stanovení intracelulárních i extracelulárních draselných iontů poměrem naměřených intenzit při vlnových délkách 340 nm a 380 nm byl dán výrobcem fluorescenční sondy PBFI [13].



Obrázek 6: Fluorescenční sonda PBF1 selektivní pro draselné (K^+) ionty, její křivka závislosti intenzity při absorpčním a emisním spektru na vlnové délce (emisní spektrum měřeno při excitaci 345 nm), křivka závislosti poměrů intenzity fluorescence při excitaci na koncentraci roztoku chloridu draselného (KCl), poměr naměřené intenzity při vlnových délkách 340/380 nm (měřeno při emisi o vlnové délce 500 nm) [12, 13]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem této práce je optimalizovat organický elektrochemický tranzistor tak, aby umožňoval jak elektrickou, tak i optickou (fluorescenční) detekci vyměňovaných iontů mezi vrstvou aktivního kanálu OECT (PEDOT:PSS) a elektrolytem. Možnost současné elektrické a optické detekce výměny iontů by pak mohla pomoci blíže objasnit proces výměny iontů a stanovit množství vyměňovaných iontů, a tedy napomoci např. k objasnění přesného mechanismu stimulace elektrogenních buněk (buňky kardiomyocytu) s pomocí OECT. Aby těchto cílů mohlo být dosaženo, je nutné vyvinout dostatečně citlivou OECT platformu, která bude vyhovovat požadavkům nejen elektrické charakterizace, ale i optické charakterizace, tj. detekci iontů pomocí iontově specifické fluorescenční sondy. Z toho důvodu se experimentální část zabývá zejména vývojem měřicí platformy a ověřením její funkčnosti jak z hlediska elektrických, tak optických vlastností.

V následující kapitole bude popsána příprava vzorků a postup prováděných experimentů, které budou diskutovány v kapitole 4. V kapitole 3.1 budou uvedeny všechny použité materiály a přístroje, následovně bude popsána příprava platformy OECT (kapitola 3.2). V kapitole 3.3 bude popsán postup experimentu, který byl zaměřen na změnu Voltampérových charakteristik OECT s klesající koncentrací K^+ iontů. V kapitole 3.4 bude popsán postup experimentu ověřujícího schopnost detekce fluorescence draselné sondy PBF1 při velmi nízkých koncentracích v tenké vrstvě. Dále bude popsán způsob přípravy polymethylmethakrylátu (PMMA) a způsob jeho optimalizace. Na závěr bude popsán postup přípravy fotorezistní fólie a její modifikace.

3.1 Použité materiály a přístroje

PEDOT:PSS (HERAEUS, eraues CleviosTM P JET HC V2) byl v OECT platformách použit jako náš polovodivý polymer. Vrstva PEDOT:PSS byla nanášena pomocí statické metody rotačního lití, odpor zlatých elektrod u OECT platformy byl měřen multimetrem (METEX M 4660A). Na vymezení optické dráhy a objemu v OECT platformě byla použita negativní, fotorezistní fólie (FORTEX, DF500 DRY FILM). K čištění substrátů byla používána ultrazvuková čistička (POWERSONIC PS02000A). K vytvrzení fotorezistních fólií byla použita UV lampa s emisním maximem 360–380 nm, k vyvíjení negativních fotorezistních fólií byl použit uhličitán draselný (K_2CO_3 , FORTEX, AQUADEV 450) a na zapečení („soft bake“) fotorezistních fólií byla použita topná deska („hot plate“, PRÄZITHERM PZ28 2, 7250512). Tloušťka vrstev byla měřena profilometrem (BRUKER, DektakXT) s programem VISION 64. Pro ověření schopnosti detekce fluorescence byl použit fluorescenční standard chinin sulfát hydrát (QSH, GLENTHAM, 6119-70-6) rozpuštěný v kyselině sírové o koncentraci $0,05 \text{ mol/dm}^3$ (H_2SO_4 , PENTA, 7664-93-9). Měření fluorescence probíhalo pomocí spektrofotometru (HORIBA Yobin Yvon, Fluorolog 3). K lepení křemenného skla k platformě OECT byl použit polymethylmethakrylát a jeho rozpustnost a další vlastnosti byly testovány v rozpouštědlech: 1) chloroform (SIGMA ALDRICH, 602-006-00-4), 2) toluen (PENTA, 108-88-3), 3) dichlormethan (DCM, PENTA, 75-09-2), 4.) 1,2-dichlorbenzen (1,2-DCB, SIGMA ALDRICH, 95-50-1). Čas odpaření jednotlivých rozpouštědel pro polymethylmethakrylát (PMMA) byl měřen na přístroji pro měření kontaktního úhlu (Contact Angle System). K měření elektrických vlastností byl použit voltmetr (analog input \pm

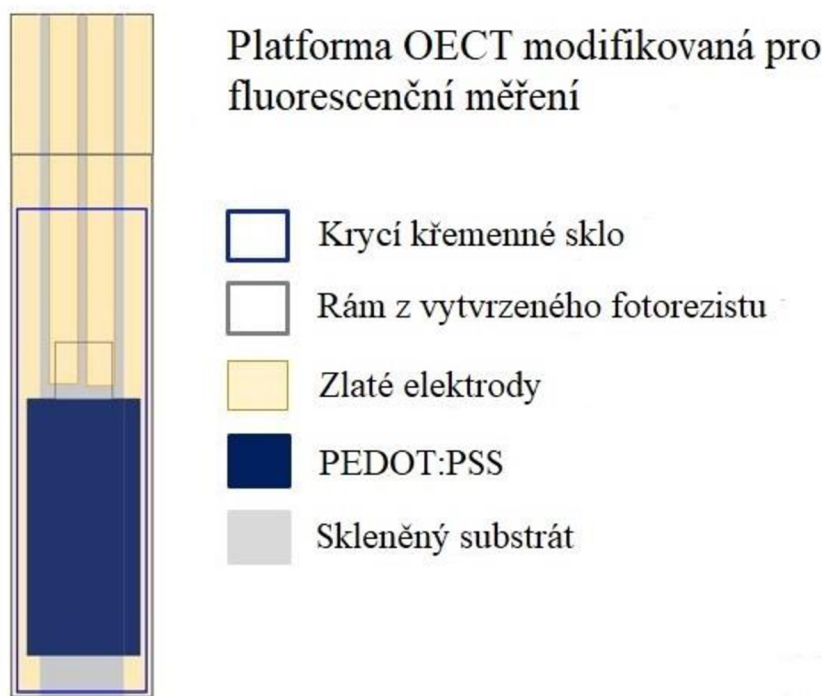
10 V, National instruments 9201), ampérmetr (analog input ± 20 mA, National instruments 9203) a zdroj napětí (analog output ± 10 V, National instruments 9263). Voltamperické měření probíhalo s roztokem chloridem draselným (KCl, PENTA, 7447-40-7), rozpuštěným v miliQ vodě. Stabilita negativní, fotorezistní fólie byla zjišťována pomocí UV-Vis spektrofotometru (VARIAN CARY 50 PROBE).

3.2 Příprava modifikovaných platforem OECT

Jako platformy byly použité skleněné substráty o rozměrech 10 mm \times 48 mm s napařenými, zlatými elektrodami. Před napařením a nanášením tenké vrstvy polovodivého polymeru PEDOT:PSS pomocí rotačního nanášení bylo potřeba skleněné platformy důkladně očistit. Nejprve byly substráty čištěny v ultrazvukové čističce v připraveném 5% roztoku hydroxidu sodného (NaOH) po dobu 10 minut, pak byly opláchnuty destilovanou vodou a ponořeny do destilované vody a opětovně vloženy do ultrazvukové čističky po dobu 10 minut. Následně byly substráty ponořeny do roztoku isopropanolu a čištěny pomocí ultrazvuku po dobu 10 minut. Nakonec byli vysušeny suchým a čistým vzduchem.

Po očištění byly substráty připraveny k vakuovému napařování zlatých elektrod o tloušťce 100 nm. Po vakuovém napaření byla na substráty nalepena folie negativního fotorezistu v 5 vrstvách. Jedna vrstva folie má tloušťku udanou výrobcem 40 μ m, a tedy průměrná tloušťka nalepených vrstev fotorezistu je přibližně 200 μ m. Po uplynutí 10 minut („hold time“) byla potřeba laminace fólie při teplotě 120 °C. Laminace probíhala přerušovaně, substrát byl laminován při teplotě 120 °C po dobu 5 sekund a následně chlazen po dobu 10 sekund. Tento proces byl opakován do uplynutí 1 minuty, tedy celkově 4x. Po ukončení laminace byla na fotorezist umístěna osvitová maska pro negativní fotorezist. Tato maska byla připravena tak, aby vytvrzená část fotorezistu vymežila optickou dráhu (distanční rámeček) a zároveň i přesně definovaný prostor pro elektrolyt. Po uplynutí 20 minut („hold time“) byly substráty s fotorezistem a nalepenou maskou vytvrzeny pomocí expozice UV lampy s emisním maximem 360–380 nm. Doba expozice byla 5 minut. Po uplynutí 15 minut („hold time“) byli substráty ponořené do výrobcem dodaného vyvíječe fotorezistu (K_2CO_3) po dobu 20 minut a po uplynutí této doby byly substráty s vytvrzeným fotorezistem omývány destilovanou vodou po dobu 13 minut, z důvodu zbavení se nevytvrzené fólie. V průběhu promývání byla topná deska předehřata na 100 °C. Hned po ukončení promývání byly substráty položeny na předehřátou topnou desku po dobu 60 minut. Po vychladnutí byla na definovaný úsek pro analyt nanášena vrstva PEDOT:PSS o tloušťce 50 nm pomocí statické metody rotačního nanášení.

Z důvodu zamýšlené fluorescenční detekce bylo k uzavření systému použito křemenné krycí sklo, které bylo umístěno na fotorezist a po obou delších stranách bylo přilepeno k platformě OECT pomocí připraveného roztoku polymethylmethakrylátu (PMMA). Takto přilepené krycí sklo brání kontaminaci analytu a spolu s distančním rámečkem vymezuje přesně definovaný objem elektrolytu, a především délku optické dráhy při fluorescenčním měření (Obrázek 7). Po zatuhnutí PMMA je OECT platforma připravena k měření. Před měřením je skrz středové kanály v distančním rámečku (fotorezistu) pomocí kapilárních sil nasát analyt (elektrolyt). Následně jsou otvory kanálu uzavřeny opět pomocí PMMA tak, aby nedocházelo k odpařování a vytékání analytu z platformy.

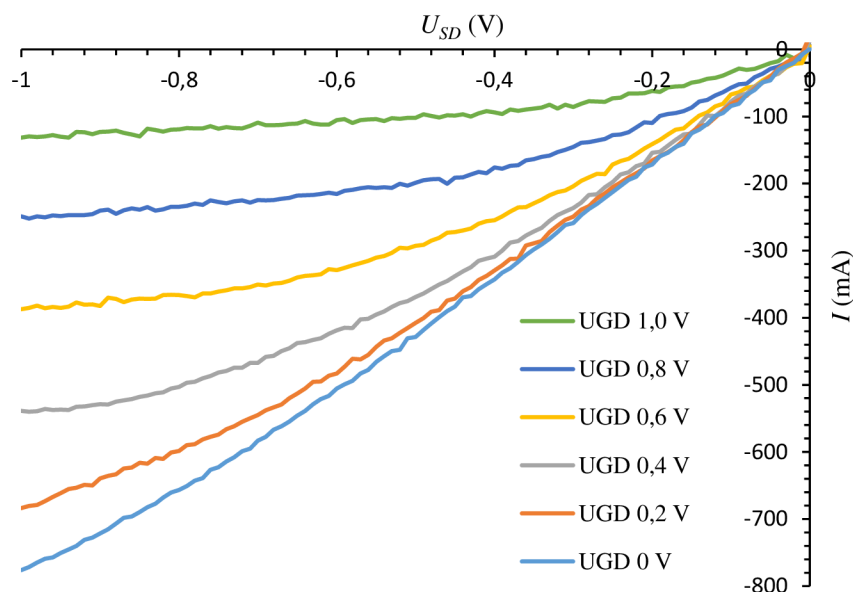


Obrázek 7: Schéma modifikované platformy OECT pro fluorescenční měření

3.3 Elektrická charakterizace OECT

Elektrická charakterizace spočívala především v měření výstupních voltampérových (VA) charakteristik OECT. Pro měření byla připravena platforma OECT podle popsaného postupu v kapitole 3.2, s rozdílem, že nebylo potřebné lepení krycího, křemenného, skla, a to z důvodu horizontálního měření. Jako elektrolyt (analyt) byl použit roztok chloridu draselného (KCl) o různé koncentraci (vodivosti). V literatuře byly dohledány teoretické vodivosti pro různé koncentrované roztoky KCl (miliQ voda až 1 mol/dm^3) [15] a na základě těchto údajů pak byly roztoky o daných koncentracích připraveny (Tab. 1.). Roztoky KCl byly připraveny s použitím miliQ vody.

Před měření VA charakteristik byl pomocí multimetru změřen elektrický odpor mezi S a D elektrodou OECT platformy. Následně byla tato platforma zapojena do připravené aparatury pro měření voltampérových charakteristik a pro takto zapojenou platformu bez roztoku byla změřena výstupní VA charakteristika, tedy elektrická vodivost kanálu OECT. Poté byla pomocí Pasteurovi pipety kápnuta kapka miliQ vody o nedefinovaném objemu na aktivní plochu OECT (PEDOT:PSS vrstva) a roztažena po celé ploše tak, aby byla pokryta celá vrstva PEDOT:PSS včetně HRADLOVÉ (G) elektrody. Aktivní plocha s miliQ vodou byla přikryta krycím sklem, a opět byla změřena výstupní VA charakteristika v rozsahu U_{SD} (-1 V až 0 V) pro různá U_{GD} (0 V až 1 V) (Obrázek 8). Následně bylo krycí sklo odstraněno a miliQ voda důkladně odsáta, opět byla změřena VA charakteristika bez roztoku. Stejným způsobem bylo postupováno i pro roztoky s KCl. Roztoky KCl byly měřeny od nejnižší vodivosti až po nejvyšší vodivost. Mezi jednotlivými koncentracemi roztoků KCl byla vždy proměřena voltampérová charakteristika pro platformu bez roztoku.



Obrázek 8: Voltampérová charakteristika platformy OECT změřena pro roztok KCl o koncentraci $0,1 \text{ mol/dm}^3$ rozpuštěný v miliQ vodě při změně aplikovaného hradlového napětí od 0 V po 1 V

Tab. 1: Přibližná teoretická koncentrace roztoků chloridu draselného (KCl) [15] a jejich příslušná teoretická vodivost, reálná koncentrace KCl a naměřená vodivost

Teoretická koncentrace (mol/dm^3)	Teoretická vodivost (mS/cm)	Skutečná koncentrace (mol/dm^3)	Změřená vodivost (mS/cm)
1,0000	102,10	1,1900	121,000
0,1000	11,67	0,1200	14,100
0,0100	1,28	0,0130	1,670
0,0010	0,13	0,0012	0,158
0,0001	0,02	0,0001	0,020
miliQ voda	<0,000055	-	0,002

3.4 Optická (fluorescenční) charakterizace

Pro optická měření byla připravena koncentrační řada roztoků chinin sulfát hydrátu (QSH) rozpuštěného v $0,05 \text{ mol/dm}^3 \text{ H}_2\text{SO}_4$. Bylo připraveno pět roztoků QSH o koncentracích 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} a 10^{-7} mol/dm^3 . Připravené roztoky QSH byly následně změřeny pomocí spektrofluorometru Fluorolog 3 spolu s čistým rozpouštědlem H_2SO_4 . Nejprve byl v úzké křemenné kyvetě změřen roztok QSH o nejvyšší koncentraci 10^{-3} mol/dm^3 , a podle něho byly nastaveny štěrbin tak, aby detektor nebyl přesycen dopadajícím paprskem z příliš koncentrovaného vzorku. Pak byla kyveta důkladně vymyta od nejkonzentrovanějšího roztoku QSH a podle nastavených štěrbin z měření pro nejkonzentrovanější roztok QSH bylo pak následně změřeno čisté rozpouštědlo H_2SO_4 . Dále se v měření pokračovalo se stále stejným nastavením štěrbin od nejméně koncentrovaného roztoku QSH až po roztok QSH o koncentraci 10^{-4} mol/dm^3 . Stejným způsobem bylo postupováno i při měření emisních spekter pro roztoky QSH uzavřené do modifikované platformy OECT s tím rozdílem, že pro každou koncentraci roztoku QSH byla použita nová platforma. Platforma OECT v tomto případě byla modifikována a značně zjednodušena v přípravě, tj. platforma byla tvořena pouze substrátem (podložní sklo o rozměrech $10 \times 48 \text{ mm}$), vymezuujícím rámečkem z fotorezistu a křemenným krycím sklem,

celý systém byl na delších stranách slepen pomocí PMMA rozpuštěného v acetonu. Roztoky byly do platforem nasáty pomocí kapilárních sil a transportní kanály byly následně uzavřeny pomocí PMMA rozpuštěného v acetonu.

3.5 Způsob přípravy a optimalizace PMMA

Pro první část experimentu byly připraveny roztoky PMMA v chloroformu, 1,2-dichlorbenzenu, dichlormethanu, a toluenu (Tab. 2). Pro každé rozpouštědlo byly připraveny 3 roztoky s různou koncentrací PMMA, a to 8,6; 15,4 a 32,5 mg/ml. V případě dichlormethanu pak byly připraveny ještě koncentrace 108,9; 121,2 a 134,8 mg/ml. Objem každého roztoku byl 2 ml. Celkem bylo připraveno 15 roztoků PMMA o různých koncentracích v různých rozpouštědlech. Připravené roztoky byly míchány při 300 rpm až do úplného rozpuštění PMMA. Při míchání byly roztoky sledovány v časových intervalech: 0, 1, 2, 5, 10, 30, 60, 120 min, 24 hod., 48 hod. a 7 dní.

V následující části experimentu byl u připravených roztoků PMMA z první části změřen čas odpaření rozpouštědla z kapky pomocí přístroje pro měření kontaktního úhlu. Nejprve bylo umístěno podložní sklo do zorného pole kamery, a poté pomocí automatické pipety byly vždy na podložní sklo kápnuty 3,0 μ l daného roztoku PMMA. Současně s odkápnutím kapky z pipety byl spuštěn časový záznam a vytvořena fotografie vytvořené kapky. Po odpaření rozpouštědla byl časový záznam zastaven a čas zaznamenán, současně byla opět vytvořena fotografie. Pro koncentrace 108,9; 121,2 a 134,8 mg/ml byl zvolen objem kapky 15,0 μ l.

Tab. 2: Připravené roztoky PMMA o daných hmotnostních koncentracích a jejich příslušné rozpouštědlo

Hmotnostní koncentrace PMMA (mg/ml)	Rozpouštědlo
8,6	Chloroform
	Toluen
	Dichlormethan
	1,2-Dichlorbenzen
15,4	Chloroform
	Toluen
	Dichlormethan
	1,2-Dichlorbenzen
32,5	Chloroform
	Toluen
	Dichlormethan
	1,2-Dichlorbenzen
109	Dichlormethan
121	Dichlormethan
135	Dichlormethan

3.6 Metoda přípravy distančního rámečku

Pro první část experimentu byly jako platformy pro experiment s modifikací fotorezistní fólie použité skleněné substráty o rozměrech $1,0 \times 2,5$ cm, které byly zbaveny nečistot stejným způsobem jako v kapitole 3.2. Celkem bylo vyčištěno 18 skleněných substrátů. Na všechny očištěné platformy bylo nalepeno 5 vrstev fotorezistní fólie a postup přípravy fotorezistní fólie byl dodržen jako v kapitole 3.2, s jistými modifikacemi. Fotorezistní fólie byla na skleněný substrát nalepena po celé délce delší strany a z kratší strany byla nalepena pouze do poloviny strany. Platformy byly rozděleny do čtyř skupin po 6 platformách. První skupina platform byla vystavena expozici UV světlu o emisním maximu 360–380 nm po dobu 3,5 min. a platformy byly zapečeny na topné desce při 100 °C po dobu 30 min. Druhá skupina byla vystavena expozici UV světlu po stejnou dobu jako první skupina a doba vytvrzení byla 5 min. Třetí a čtvrtá skupina platform byla vystavena expozici stejné UV lampy po dobu 5 min. Platformy z třetí skupiny byly vytvrzeny na topné desce při 100 °C po dobu 30 min. Čtvrtá skupina byla zapečena na topné desce po dobu 60 min. Po zapečení na topné desce byla pro všech 18 platform ze tří skupin změřena tloušťka nalepené a vytvrzené fólie pomocí profilometru (BRUKER, DektakXT).

Po změření tloušťky nalepené a vytvrzené fólie následovala druhá část experimentu, a to měření stability připravených platform. Měření stability bylo provedeno v rozpouštědlech dichlormethan, Tris-HCl a PBS. Z každé skupiny byly vybrány tři připravené platformy, které byly jednotlivě ponořeny do vybraných rozpouštědel tak, aby byla ponořena jenom polovina platformy a druhá polovina byla vystavena parám rozpouštědla. Stabilita fotorezistní fólie byla pozorována pomocí změny absorbance jednotlivých rozpouštědel s ponořenými platformami v čase. Absorbance jednotlivých rozpouštědel byla měřena na UV-Vis spektrofotometru (VARIAN CARY 50 PROBE) v časových intervalech: 0; 1; 2; 5; 10; 30; 60; 120 min.; 24 hod. a 48 hod.

Na závěr byla testována stabilita fotorezistní fólie nad čistými parami rozpouštědla dichlormethanu na vybraných platformách z druhé a třetí skupiny. Stabilita byla vizuálně pozorována a zaznamenávána pomocí fotoaparátu v časových intervalech: 0; 1; 2; 5; 10; 20 a 30 min.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

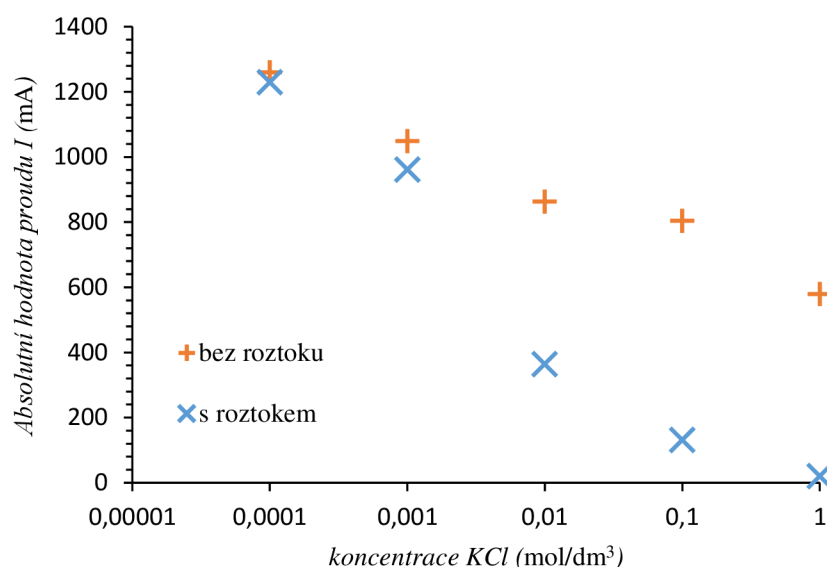
Cílem práce bylo vyvinout modifikovanou platformu OECT, která by byla vhodná jak pro elektrické, tak i pro optické měření tenkých vrstev analyzovaných roztoků o velmi nízkých koncentracích. Aby mohlo být tohoto cíle dosaženo, budou v následujících podkapitolách postupně řešeny jednotlivé kroky vývoje takové platformy. V první fázi bylo nutné ověřit, zda pomocí námi navržené platformy OECT jsme schopni zaznamenat dostatečně velkou změnu ve výstupním proudu i pro velmi nízké koncentrace elektrolytu. Tedy, zda je námi navržená OECT platforma dostatečně citlivá i pro ionty s koncentrací 0,0001-1 M (kapitola 3.1). Následně bylo potřeba ověřit, zda navržená platforma OECT vyhovuje požadavkům na optickou charakterizaci (fluorescence), a zda jsme při daném uspořádání (velmi krátká optická dráha) schopni detekovat fluorescenci (emisní a excitační spektrum) pro roztoky o velmi nízkých koncentracích (0,01-10 mM) s dostatečně velkou změnou v intenzitě měřeného signálu. Pro ověření správnosti zvoleného postupu bylo měření provedeno nejprve v úzké kyvetě a následně pro námi modifikovanou platformu OECT (kapitola 3.2). Jednou z kritických oblastí dané platformy se ukázal být způsob přípravy (kapitola 3.4) a komplectace měřicí cely (kapitola 3.3). Z tohoto důvodu byla nejprve hledána vhodná formulace polymethylmethakrylátu (PMMA) (kapitola 3.3), především vhodné rozpouštědlo tak, aby pomocí PMMA došlo k co nejlepšímu utěsnění měřicí cely. V poslední části (kapitola 3.4) byla zkoumána stabilita distančního rámečku v prostředí různých organických rozpouštědel a ve dvou kultivačních mediích. Cílem bylo ověřit, zda nemůže nedocházet k rozpuštění některé části platformy a interferenci s měřením fluorescence.

4.1 Limit detekce K^+ iontů v malém objemu elektrolytu pomocí OECT

Náplní první experimentální části práce bylo ověřit, zda jsme pomocí námi navržené platformy OECT o daném uspořádání (pouze tenká vrstva elektrolytu, cca 200 μm , (Obrázek 9) schopni zaznamenat dostatečně velkou změnu ve výstupním proudu i pro velmi nízké koncentrace elektrolytu (0,0001–1 M). Jako elektrolyt byla zvolena koncentrační řada roztoku chloridu draselného, který byl rozpuštěn v miliQ vodě. Měření bylo prováděno s modifikovanou platformou OECT po kápnutí roztoku chloridu draselného (KCl) o příslušné vodivosti (s roztokem) a následně po důkladném odstranění roztoku (bez roztoku), podle postupu popsaného v kapitole 2.3. Pro každý roztok byla změřena výstupní charakteristika v rozsahu $U_{SD} -1-0$ V a bylo sledováno k jak velkému uzavření PEDOT:PSS kanálu dojde u jednotlivých roztoků při $U_{GD} +1$ V a $U_{SD} -1$ V. Aby bylo možné odhadnout zkreslení výstupního proudu pro daný roztok vlivem předchozího měření (stejná platforma pro všechny roztoky), vždy po odměření VA v režimu OECT s roztokem, byla změřena vodivost kanálu PEDOT:PSS bez roztoku. Jak lze vidět z obrázku 9, i při měření bez roztoku dochází k poklesu výstupního proudu, a to vlivem pozůstatku iontů K^+ v PEDOT:PSS vrstvě po předchozím měření. Obr. 11 tedy vyjadřuje skutečnou velikost změny výstupního proudu VA pro danou koncentraci roztoku KCl.

Z teorie OECT vyplývá, že se zvyšující se koncentrací KCl, tedy se zvyšující se koncentrací K^+ iontů, bude při stejném U_{GD} i U_{SD} aktivní kanál (PEDOT:PSS) mnohem více uzavřen, a tedy výstupní proud se bude se zvyšující se koncentrací snižovat. To lze také pozorovat u námi naměřených výsledků, viz. Obrázek 9. Na obrázku 9 lze také vidět, že jsme

schopni pozorovat změnu procházejícího elektrického proudu (pro lepší názornost je proud v grafu uveden v absolutní hodnotě) i pro velmi nízké koncentrace draselných iontů v roztoku. Se zvyšující se koncentrací KCl vzrůstá i rozdíl mezi měřeními bez roztoku a s roztokem, to znamená, že se z vyšší se koncentrací se také zvyšuje citlivost zařízení. Rozdíl ve výstupním proudu pro platformu bez roztoku a s roztokem o koncentraci KCl 0,1 mM je minimální (~30 mA), což je na pomezí odchylky měření, a tedy tuto koncentraci lze považovat za dolní hranici citlivosti našeho OECT zařízení. Výsledkem první experimentální části práce je tedy zjištění, že naše modifikovaná platforma OECT je schopná detekovat změnu procházejícího výstupního proudu vedeného pomocí PEDOT:PSS mezi zdrojovou a odtokovou elektrodou i pro velmi nízké koncentrace pohybující se v oblasti koncentrací extracelulárních draselných (K^+) iontů (řádově 0,1 mM a vyšší).



Obrázek 9: Závislost absolutní hodnoty procházejícího elektrického proudu vedeného pomocí PEDOT:PSS skrz kanál mezi elektrodami S a D pro kladné hradlové napětí +1 V, měřené pro modifikovanou platformu OECT s roztokem chloridu draselného (KCl) a bez roztoku

4.2 Schopnost detekce fluorescence QSH

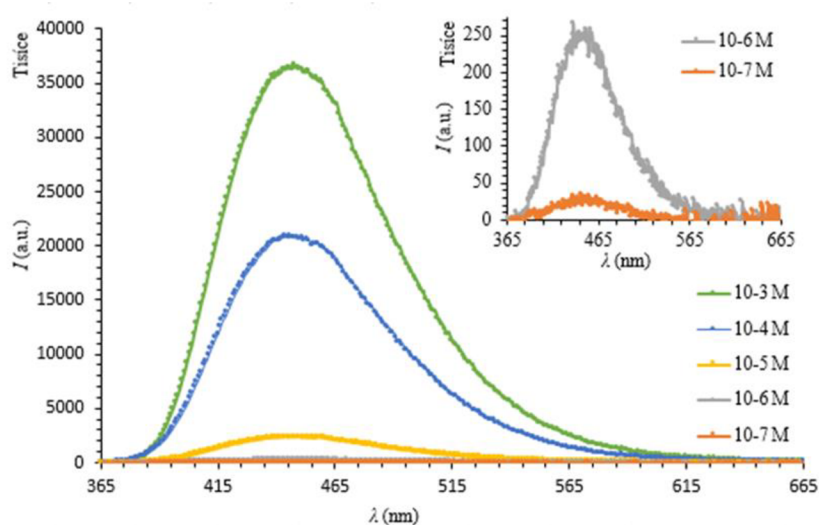
Cílem druhé experimentální činnosti bylo ověřit, zda jsme schopni u naší modifikované platformy OECT v daném uspořádání (tenká vrstva analyzovaného roztoku – 200 μm) detekovat fluorescenci pro nízké koncentrace analytu v roztoku a na základě velikosti změny intenzity fluorescenčního signálu určit množství analytu. Cílem bakalářské práce je vyvinout OECT platformu, která bude pomocí dvojí detekce (fluorescenční a elektrické) schopna určit množství vyměřovaných kationtů, především draselných, mezi elektrolytem (kultivační médium) a aktivní vrstvou OECT (PEDOT:PSS). Abychom však byly schopni změnu v koncentraci K^+ iontů pomocí fluorescence zaznamenat, je nutné použít vhodnou fluorescenční sondu, jako fluorofor, který bude dostatečně selektivní pro K^+ ionty i v komplexním prostředí. Takovou to sondou je například sonda PBFI, která váže K^+ ionty v poměru 1:1. Tedy jedna molekula PBFI je schopná zachytit jeden draselný kationt. Vzhledem k tomu, že taková to sonda je pro prvotní experimenty poměrně drahá a klade poměrně vysoké nároky na přípravu, byla sonda PBFI v tomto experimentu nahrazena fluorescenčním standardem, kterým byl chinin sulfát hydrát (QSH) rozpuštěný v 0,05 M kyselině sírové

(H₂SO₄). QSH byl zvolen z důvodu velmi dobře v literatuře definovaného kvantového výtěžku (55 %) [17] a obdobných parametrů jako má fluorescenční sonda PBFI. Emisní i excitační spektrum fluorescenčního standardu QSH je obdobné jako u fluorescenční sondy PBFI.

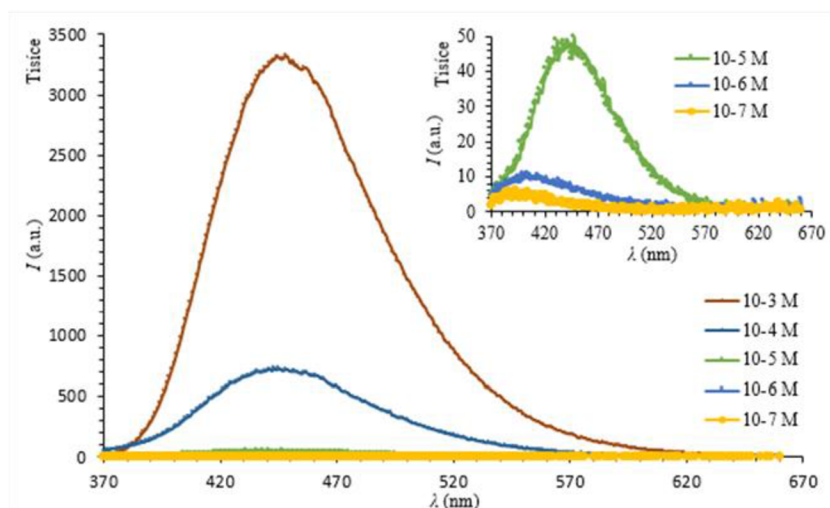
Pro účely spektrofotometrického měření byla připravena koncentrační řada roztoků QSH v rozmezí koncentrací 10⁻³ mol/l až 10⁻⁷ mol/dm³. Roztoky QSH byly rozpuštěny v kyselině sírové (H₂SO₄) o koncentraci 0,05 mol/dm³. Rozsah koncentrační řady roztoků QSH byl navržen tak, abychom získali co nejlepší představu o míře změny intenzity s koncentrací, a také abychom měli představu, jak se daný systém chová v oblasti koncentrace 10⁻⁶ mol/dm³, při použití sondy PBFI je očekávána pracovní koncentrace 50·10⁻⁶ mol/dm³. Nejprve byla změřena fluorescence pro připravené roztoky QSH v úzké kyvetě, abychom si ověřili, zda byly roztoky připraveny správně, a zda zvolený postup odpovídá předpokladům, tj. intenzita fluorescence vzrůstá se vzrůstající koncentrací QSH v roztoku, za standardizovaných podmínek. Poté bylo měření zopakováno pro dané roztoky v naší modifikované OECT platformě.

Z obrázku 10 lze vidět, že v případě měření roztoků v úzké kyvetě intenzita fluorescence klesá s klesající koncentrací fluoroforu (QSH) jak bylo očekáváno, a že jsme schopni měřit fluorescenci i u roztoku s koncentrací 10⁻⁷ mol/dm³. Z emisních spekter na obrázku 10 byly odečteny hodnoty intenzity maxima a vyneseny v závislosti na koncentraci roztoku QSH (Obrázek 12). Jak vidět, závislost je lineární v oblasti koncentrací 10⁻⁷ mol/dm³ do 10⁻⁴ mol/dm³. Koncentrace roztoku 10⁻³ mol/dm³ je příliš vysoká a způsobuje vedlejší optické jevy ovlivňující měření. Linearita závislosti intenzity fluorescence na koncentraci roztoků potvrzuje správnost přípravy roztoků.

V návaznosti na měření emisních spekter roztoků QSH v úzké kyvetě byla tato spektra změřena pro stejné roztoky v naší upravené platformě pro OECT. Pro každý roztok byla připravena nová OECT platforma a roztoky byly nasáty do měřicí cely OECT pomocí kapilárních sil, měřicí cely byla následně uzavřena pomocí polymethylmethakrylátu (PMMA) rozpuštěného v acetonu. Pro takto připravené roztoky byly opět změřeny emisní spektra (Obrázek 11).

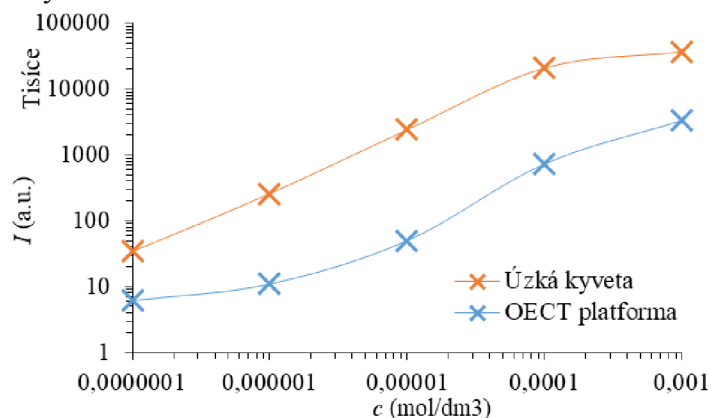


Obrázek 10: Emisní fluorescenční spektrum roztoků QSH rozpuštěných v roztoku H₂SO₄ o koncentraci 0,05 mol/dm³ v úzké kyvetě



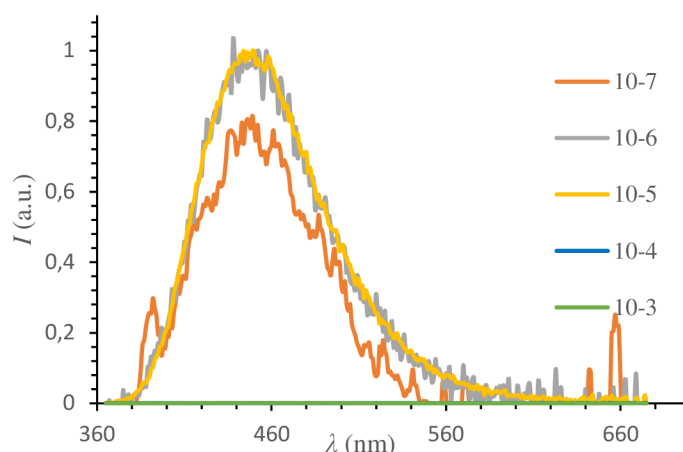
Obrázek 11: Emisní fluorescenční spektrum roztoků QSH rozpuštěných v roztoku H_2SO_4 o koncentraci $0,05 \text{ mol/dm}^3$, umístěných v uzavřené platformě OECT pomocí připraveného lepidla PMMA, rozpuštěného v acetonu

Opět lze pozorovat pokles intenzity fluorescenčního signálu s klesající koncentrací, ovšem závislost již není lineární, jak lze vidět v obrázku 12, ale má tvar „S-křivky“. Současně si lze povšimnout, že u nejméně koncentrovaných roztoků došlo k posunu emisního maxima do oblasti nižších vlnových délek.

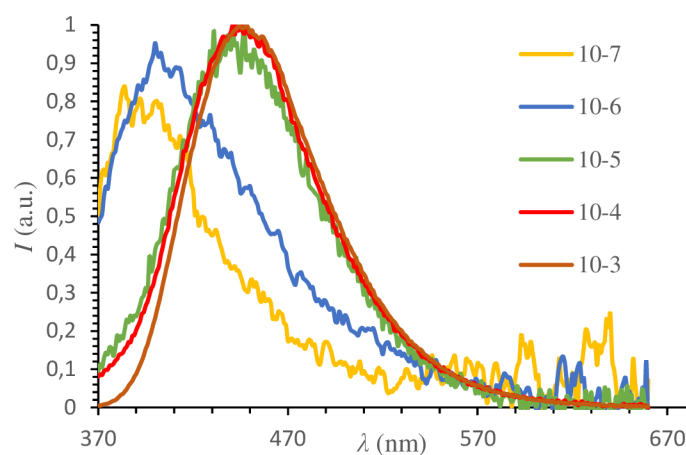


Obrázek 12: Závislost maximální, naměřené intenzity při emisi roztoků QSH rozpuštěných v H_2SO_4 o koncentraci $0,05 \text{ mol/dm}^3$, umístěných v úzké kyvetě na koncentraci QSH a v uzavřené platformě OECT pomocí připraveného lepidla PMMA rozpuštěného v acetonu na koncentraci QSH

Tento efekt je pak mnohem více pozorovatelný po znormalizování spekter (viz. Obrázek 13 a Obrázek 14), kdy v případě QSH v úzké kyvetě se spektra překrývají, ale v případě QSH v OECT platformě je poloha maxima různá.



Obrázek 13: Emisní fluorescenční spektrum (po normalizaci) roztoků QSH rozpuštěných v roztoku H_2SO_4 o koncentraci $0,05 \text{ mol/dm}^3$ v úzké kyvetě



Obrázek 14: Emisní fluorescenční spektrum (po normalizaci) roztoků QSH rozpuštěných v roztoku H_2SO_4 o koncentraci $0,05 \text{ mol/dm}^3$, umístěných v uzavřené platformě OECT pomocí připraveného lepidla PMMA, rozpuštěného v acetonu

K tomuto posunu maxima emisního spektra, a tedy ke změně celého emisního spektra, dochází pravděpodobně vlivem kontaminace roztoku QSH rozpuštěným fotorezistem, z něhož je vyroben distanční rámeček. Rozpouštění fotorezistu bylo vizuálně pozorovatelné po zalepení platformy pomocí PMMA rozpuštěného v acetonu (Obrázek 15). Aby se zabránilo kontaminaci, která ovlivňuje emisní spektrum QSH, bude pravděpodobně potřeba najít vhodnější rozpouštědlo pro PMMA. Řešením daného problému se zabýváme v následující experimentální činnosti (kapitola 3.3).



Obrázek 15: Znárodná kontaminace roztoku chinin sulfát hydrátu v modifikované platformě OECT rozpuštěním částí vytvrzené fotorezistní fólie, která formuje měřicí prostor na platformě, kontaminace nastala při procesu lepení

4.3 Optimalizace přípravy lepidla PMMA

Z předchozí kapitoly vyplynulo, že pravděpodobně vlivem použitého rozpouštědla PMMA dochází k částečnému rozpouštění distančního rámečku (fotorezistu). Z tohoto důvodu je potřeba najít pro PMMA vhodnější rozpouštědlo, v kterém se PMMA dobře rozpouští, ideálně za co nejkratší dobu. Tohle téma bylo rozebráno v kapitole 3.3.1. Vybrané rozpouštědlo dále musí mít co nejkratší dobu odpaření při procesu lepení krycího křemenného skla k platformě OECT tak, aby působení rozpouštědla a par na fotorezist bylo co nejkratší, ale současně se za tuto dobu stihla utvořit celistvá vrstva PMMA. Tím jsme se zabývali v kapitole 3.3.2. A na závěr musí PMMA dokázat po úplném odpaření rozpouštědla vytvořit dostatečně tlustou a souvislou vrstvu tak, aby bylo dosaženo maximální kvality lepení, což bylo studováno v kapitole 3.3.3. Cílem následujících podkapitol bylo najít vhodné rozpouštědlo pro lepidlo PMMA, které splňuje všechny požadavky tak, aby se zabránilo kontaminaci analytu při fluorescenčním měření v naší modifikované platformě OECT.

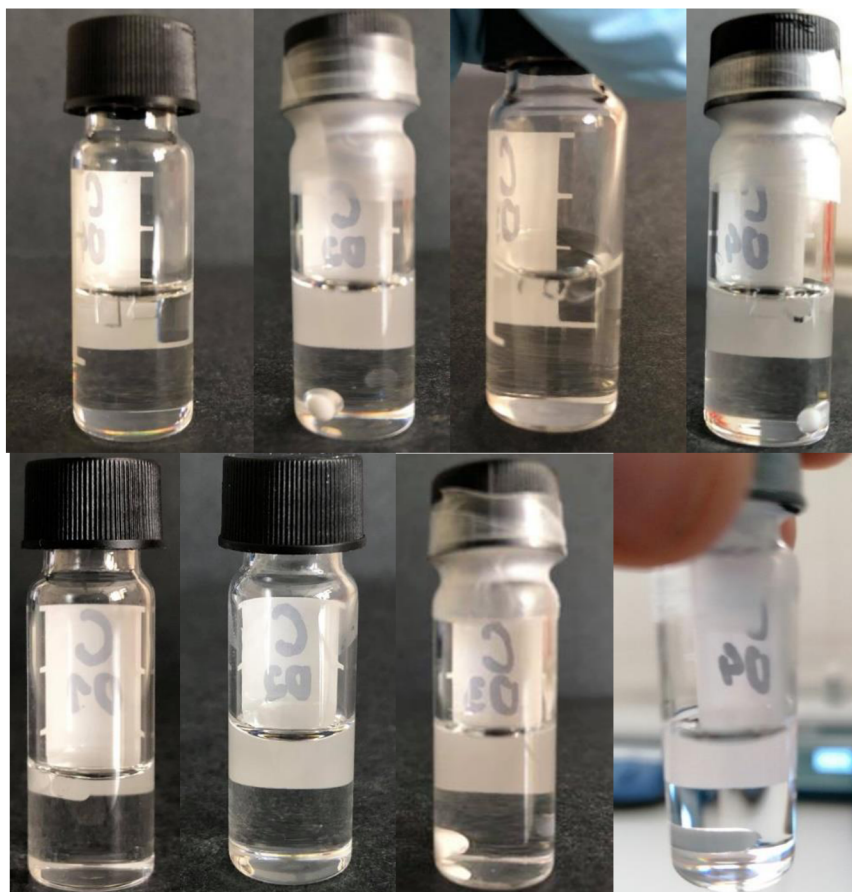
4.3.1 Rozpustnost PMMA

Z důvodu nalezení vhodného rozpouštědla s dobrou rozpustností PMMA bylo připraveno patnáct roztoků polymethylmethakrylát (PMMA) o různých hmotnostních koncentracích, rozpuštěných v různých rozpouštědlech. Pro experiment byly vybrány rozpouštědla: 1. chloroform, 2. toluen, 3. dichlormethan (DCM) a 4. 1,2-dichlorbenzen (1,2-DCB). Všech patnáct roztoků bylo připraveno o celkovém objemu 2 ml. Připravené roztoky PMMA č. 1, č. 2, č. 3. a č. 4 byly míchány při 300 otáčkách za minutu (r/min). Podle tabulky číslo 3 (Tab. 3) lze vidět, že téměř ve všech vybraných rozpouštědlech se PMMA rozpustí do 30 min., kromě rozpouštědla č. 4, tedy 1,2-dichlorbenzen. Pro rozpouštědlo č. 4 bylo potřeba po 24 hodinách, kdy byl PMMA stále nerozpuštěn, zvýšit otáčky z 300 r/min. na 400 r/min. Po uplynutí 7 dnů byl PMMA rozpuštěn i v rozpouštědle č. 4, tedy v 1,2-dichlorbenzen. Nejrychlejší doby rozpuštění PMMA dosáhlo rozpouštědlo dichlormethan, doba rozpuštění byla do 10 min.

pro nižší hmotnostní koncentrace PMMA a pro vyšší hmotnostní koncentrace byla doba rozpuštění PMMA do 30 min. Nejdelší dobu rozpuštění PMMA dosáhlo rozpouštědlo 1,2-dichlorbenzen, a to za dobu 7 dnů. Výsledkem experimentu bylo, že PMMA se rozpouští ve všech vybraných rozpouštědlech, avšak v případě použití 1,2-dichlorbenzenu je nutné počítat s delší dobou rozpuštění v časovém harmonogramu uvažovaného experimentu (Obrázek 16).

Tab. 3: Označení připravených roztoků PMMA a doba rozpuštění v příslušných rozpouštědlech o daných hmotnostních koncentracích PMMA

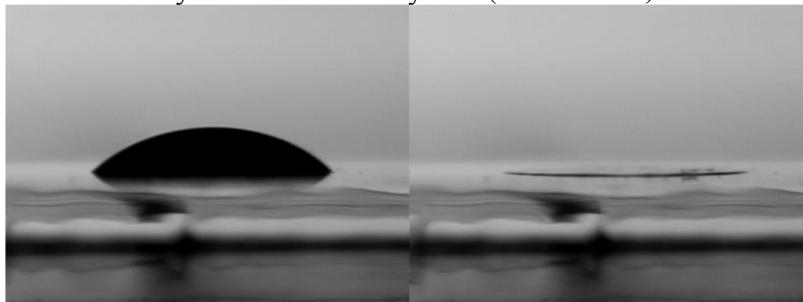
Pojmenování roztoků PMMA	Hmotnostní koncentrace PMMA (mg/ml)	Rozpouštědlo	Doba rozpuštění PMMA
9CHCl ₃	8,5	Chloroform	10 min.
9Tol		Toluen	30 min.
9DCM		DCM	10 min.
9 1,2-DCB		1,2-DCB	7 dnů
15CHCl ₃	15,4	Chloroform	10 min.
15Tol		Toluen	30 min.
15DCM		DCM	10 min.
15 1,2-DCB		1,2-DCB	7 dnů
33CHCl ₃	32,5	Chloroform	10 min.
33Tol		Toluen	30 min.
33DCM		DCM	10 min.
33 1,2-DCB		1,2-DCB	7 dnů
109DCM	108,9	DCM	30 min.
121DCM	121,2	DCM	30 min.
135DCM	134,8	DCM	30 min.



Obrázek 16: Rozpustnost roztoků PMMA o různých hmotnostních koncentracích připravených podle tab. 2, celkový objem ve roztoků byl 2 ml, roztoky byly míchány při 300 r/min

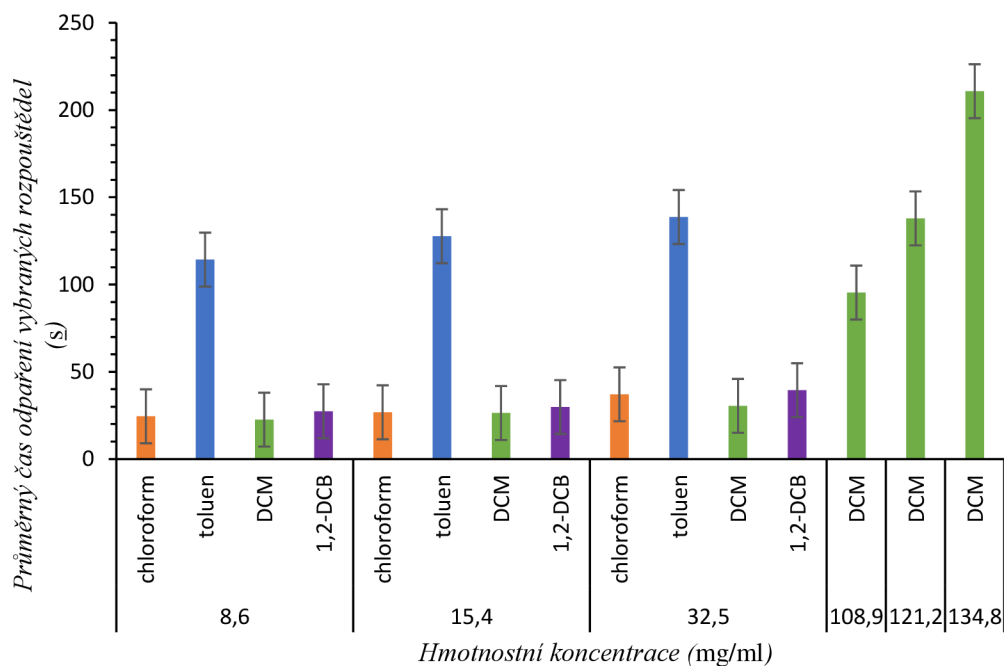
4.3.2 Doba tuhnutí PMMA

Pro připravené roztoky PMMA v různých rozpouštědlech o různých hmotnostních koncentracích (Tab. 3) byla dále testována jejich manipulovatelnost, konkrétněji doba odpaření vybraných rozpouštědel. Doba odpaření musí být co nejkratší, aby se minimalizovala doba působení rozpouštědla a jeho par na fotorezist (distanční rámeček) a nedocházelo tak ke kontaminaci analytu vlivem rozpuštěného fotorezistu. Platformu OECT je nutné uzavřít především z důvodu vertikálního umístění při fluorescenčním měření. Připravené roztoky PMMA byly pomocí automatické pipety kápnuty na podložní sklo (3 μ l) a pomocí kamery a programu přístroje pro měření kontaktního úhlu byla sledována doba odpaření rozpouštědla pro všechny připravené roztoky PMMA z tabulky č. 3 (Obrázek 17).



Obrázek 17: Kapka PMMA o objemu 3 μ l a hmotnostní koncentraci PMMA 32,5 mg/ml v rozpouštědle DCM na začátku kápnutí a při úplném odpaření rozpouštědla

Doba odpaření rozpouštědla z kapky byla pro každý roztok měřena desetkrát a následně zprůměrována. Z obrázku 18 lze vidět, že nejkratší průměrnou dobu odpaření dosáhlo rozpouštědlo č. 3, tedy dichlormethan (22,6 s pro koncentraci 8,6 mg/ml). Průměrná doba odpaření zbývajících rozpouštědel, kromě toluenu, byla téměř obdobná jako pro dichlormethan (Obr. č. 18). Průměrná doba odpaření toluenu byla ze všech rozpouštědel nejdelší (114,3 s pro koncentraci 8,6 mg/ml). Vzhledem k tomu, že i pro nejnižší koncentraci trvalo odpaření toluenu téměř 2 minuty, dané rozpouštědlo nevyhovuje podmínkám procesu lepení krycího křemenného skla k platformě OECT. Jako nejvhodnější se tedy pro proces lepení jeví dichlormethan. Jelikož byly připravené roztoky o daných koncentracích poměrně málo viskózní, a mohlo by tak dojít k jejich zatečení mezi dvě slepované části, byly připraveny další tři roztoky PMMA v dichlormethanu o vyšších hmotnostních koncentracích (D03, E03 a F03). Pro tyto roztoky (D03, E03 a F03) byla také studována doba odpaření rozpouštědla (Tab. 3). Z důvodu vyšší viskozity byly studovány kapky o objemu 15,0 μ l. Průměrnou dobu odpaření rozpouštědla včetně výběrové směrodatné odchylky (chybové úsečky) pro všechny připravené roztoky PMMA uvádí obrázek 18.



Obrázek 18: Naměřené hodnoty času odpaření vybraných rozpouštědel pro jednotlivě připravené roztoky PMMA o různých hmotnostních koncentracích

4.3.3 Test kvality lepení

Připravovaný roztok PMMA je zamýšlen jako lepidlo pro přípravu měřicí cely platformy OECT. Musíme být tedy schopni pomocí tohoto lepidla k sobě slepit dvě skla po hranách tak, aby nedocházelo k vytékání a odpařování analyzovaného roztoku, a zároveň, aby nedocházelo k zatékání lepidla do prostoru mezi tato dvě skla. Připravené lepidlo musí tedy splňovat podmínku rychlého tuhnutí (krátká doba odpaření rozpouštědla) a mít dostatečnou viskozitu, aby dokázalo vytvořit dostatečně tlustou, pevnou a souvislou vrstvu. Z předchozího experimentu (kapitola 3.3.2) vyplynulo, že nejkratší dobu odpaření rozpouštědla (dobu tuhnutí)

mají roztoky PMMA v dichlormethanu, pro toto rozpouštědlo byly také připraveny roztoky o vyšších koncentracích PMMA (viz. kapitola 3.3.2).

Abychom našli nejvíce vyhovující lepidlo PMMA, byl proveden pro roztoky PMMA v dichlormethanu, především pro ty s vyšší koncentrací, test kvality lepení. Tento test se shoduje s postupem slepování skel při kompletaci reálné platformy OECT, kde se k podložnímu sklu (OECT platformě) přitiskne krycí (křemenné) sklo a nejprve se PMMA lepidlo nanese po delších hranách, po zaschnutí se v případě reálné platformy nasaje analyzovaný roztok, a následně se PMMA lepidlo nanese i po kratších hranách. V případě testu kvality lepení byly použity platformy OECT bez distančního rámečku a jako krycí skla byla použita čistá podložní skla. PMMA lepidlo bylo nanášeno pomocí plastové tyčinky.

Vhodnost daného PMMA lepidla byla posuzována především vizuálně, kdy bylo hodnoceno zatékání lepidla mezi sklo, celistvost a pevnost nanesené vrstvy, celková manipulovatelnost (zda nedochází k tvrdnutí lepidla dříve, než je nanese a rozetřeno po dané ploše). Na základě těchto pozorování a výsledných vrstev PMMA bylo vybráno jako nejvíce vyhovující lepidlo PMMA s hmotnostní koncentrací 121,2 mg/ml v dichlormethanu (DCM). Fotografie vrstvy PMMA je zobrazena na obrázku 19.



Obrázek 19: Test kvality připraveného lepidla PMMA o hmotnostní koncentraci 121,2 mg/ml, rozpuštěného v DCM

4.4 Metoda přípravy distančního rámečku

V kapitole 3.2 bylo pozorováno rozpouštění distančního rámečku (fotorezistu) následně po nanesení lepidla z PMMA rozpuštěného v acetonu. V předchozí kapitole jsme hledali alternativní metodu přípravy PMMA v jiných rozpouštědlech a studovali jejich vhodnost pro lepení měřicí cely platformy OECT tak, abychom minimalizovali dobu působení rozpouštědla na okolní části platformy. Nyní je však nutné ověřit stabilitu vrstvy fotorezistu v námi vybraném rozpouštědle PMMA (dichlormethan), a zda k rozpouštění fotorezistu nedochází i vlivem působení kultivačního media (fosfátový pufr PBS, Tris-HCl) v němž je rozpuštěn analyt (K^+ ionty), a zda lze pomocí modifikace postupu přípravy distančního rámečku (fotorezistu) fotorezist chemicky stabilizovat, aby nedocházelo k jeho rozpouštění. Cílem této

části je tedy nalézt nejvhodnější modifikaci vrstvy fotorezistu a stanovit její stabilitu ve vybraných rozpouštědlech (DCM, PBS, Tris-HCl).

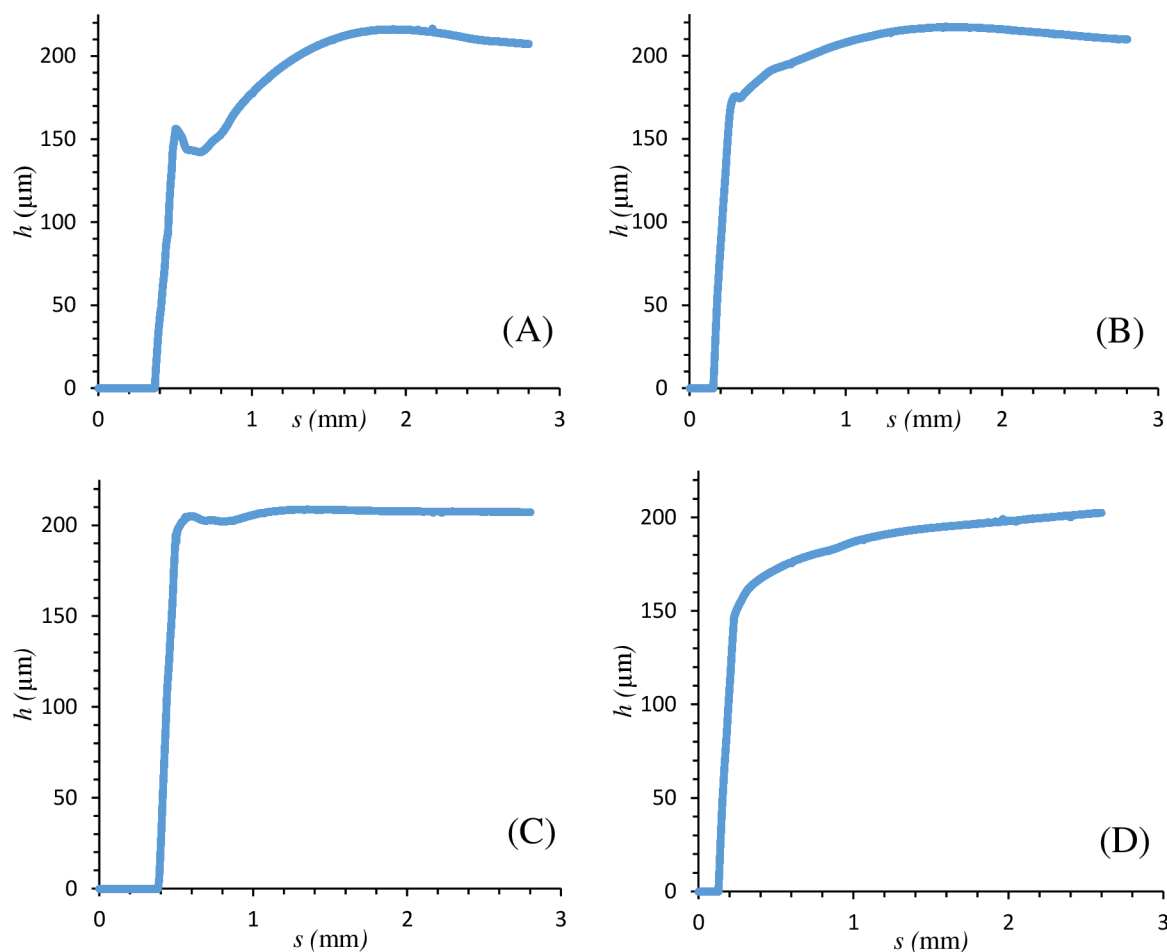
Nejprve byl hledán vhodný způsob přípravy fotorezistu především pomocí změnou doby vyvolání a vytvrzení fotorezistu (kapitola 3.4.1). Následně byla u takto připravených vrstev fotorezistu studována stabilita v prostředí DCM a dvou kultivačních mediích (PBS a Tris-HCl) pomocí UV-Vis spektrofotometrie (kapitola 3.4.2). Na závěr byl také sledován vliv par DCM na vrstvu fotorezistu (kapitola 3.4.2).

4.4.1 Příprava fotorezistu

Abychom mohli nalézt nejvhodnější způsob přípravy vrstvy fotorezistu, a nalézt tak postup přípravy distančního rámečku z fotorezistu kdy je nejstabilnější, bylo potřeba připravit nové platformy za různých procesních podmínek. Jako platformy pro následující experimenty posloužili opět podložní skla o rozměrech 1,0 × 2,5 cm. Tato skla byla očištěna podle postupu popsaného v kapitole 2.2. Na očištěné substráty bylo nalepeno 5 vrstev fólie fotorezistu a pokračovalo se podle postupu přípravy fotorezistu, který byl popsán v kapitole 2.2. Tento postup byl však za účelem experimentu pozměněn jistými modifikacemi, které budou následně popsány. Platformy byly rozděleny do čtyř skupin podle různých dob expozice UV světlem (3,5 nebo 5 minut) a různé doby (30 nebo 60 minut) vytvrzení fólie na topné desce při 100,0 °C (Tab. 4). Pro každou variantu bylo připraveno 6 platforem. Po ukončení procesu vytvrzení byla pro všech 24 připravených platforem, pomocí profilometru, změřena tloušťka vytvrzené vrstvy fotorezistu. Z obrázku 20 lze vidět, že fólie fotorezistu, která byla při procesu přípravy vystavena UV světlu o emisním maximu 360–380 nm po dobu 3,5 min. a doba vytvrzení fólie na topné desce byla 30 min., má nejméně rovnoměrnou vrstvu (Platforma A). Z obrázku 20 je také možné vidět, že nejkvalitnější a nejvíc rovnoměrný povrch dosáhla fólie, která byla vystavena UV světlu po dobu 5 min. a doba vytvrzení fólie byla 30 min (Platforma C). Platformy ze skupin č. 2 a č. 4 (Tab. 4) měli podobnou strukturu povrchu vytvrzené fólie, lze zde však pozorovat značnou nerovnost povrchu. Pro vybrané platformy ze skupin č. 2, č. 3 a č. 4 byla následně zkoumána v následující kapitole 3.4.2. chemická stabilita při ponoření do vybraných rozpouštědel a v prostředí jejich par. Skupina č. 1 byla z experimentu vyřazena z důvodu nerovnoměrného povrchu vytvrzené fólie, která by mohla způsobit špatné doléhání krycího skla, případně by vrstva fotorezistu mohla snáze podléhat vlivům okolního prostředí, což by mohlo mít za následek kontaminaci analytu.

Tab. 4: Rozdělení připravených platforem do skupin podle modifikací způsobu přípravy fotorezistní fólie

Rozdělení platforem do skupin	Doba expozice UV světla (min.)	Doba vytvrzení (min.)
Skupina č. 1	3,5	30
Skupina č. 2	3,5	60
Skupina č. 3	5,0	30
Skupina č. 4	5,0	60



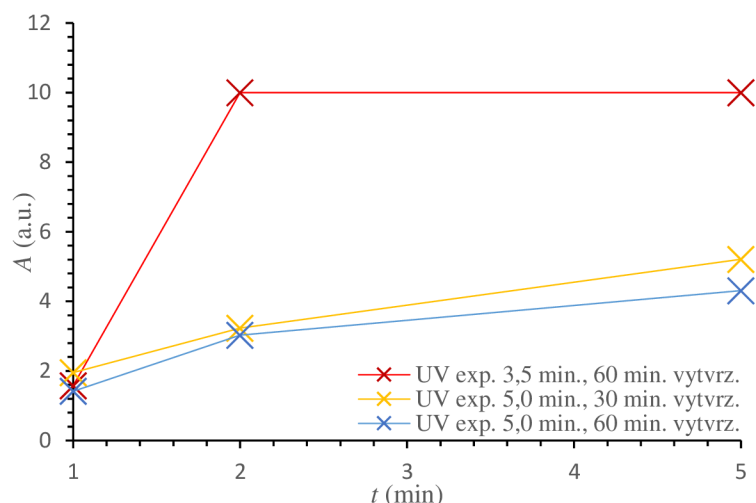
Obrázek 20: Závislost naměřené tloušťky nalepené, vytvrzené fotorezistní fólie na měřeném úseku pro platformy: (A) Platforma 3,5 min. expozice UV, 30 min. vytvrzení na topní desce
 (B) Platforma 3,5 min. expozice UV, 60 min. vytvrzení na topní desce
 (C) Platforma 5 min. expozice UV, 30 min. vytvrzení na topní desce
 (D) Platforma 5 min. expozice UV, 60 min. vytvrzení na topní desce

4.4.2 Stabilita fotorezistu

V předchozí kapitole (kapitola 3.4.1) byly připraveny vrstvy fotorezistu za různých podmínek vyvolání a vytvrzení. Následně na základě měření profilu vrstvy byly vybrány pro další experimenty vrstvy ze skupiny 2, 3 a 4. Nyní budou tyto vrstvy testovány na stabilitu v prostředí DCM rozpouštědla a dvou kultivačních medií (PBS a Tris-HCl). Stabilita vybraných platform bude také studována v prostředí par DCM. Stabilita v prostředí DCM a v prostředí jeho par je studována z důvodu použití tohoto rozpouštědla pro přípravu PMMA lepidla, které bude použito při přípravě měřicí cely platformy OECT. Stabilita fotorezistu v prostředí Tris-HCl je studována z důvodu zamýšlené aplikace připravovaného OECT pro studium výměny K^+ iontů, kdy je nutné použít takové rozpouštědlo KCl, které neobsahuje ionty K^+ a nemůže tak docházet k ovlivnění koncentrace těchto iontů v daném roztoku. PBS je pak zamýšleno jako náhrada Tris-HCl při studiu výměny iontů v mnohem komplexnějším prostředí, případně při užití OECT jako stimulační platformy elektrogenních buněk.

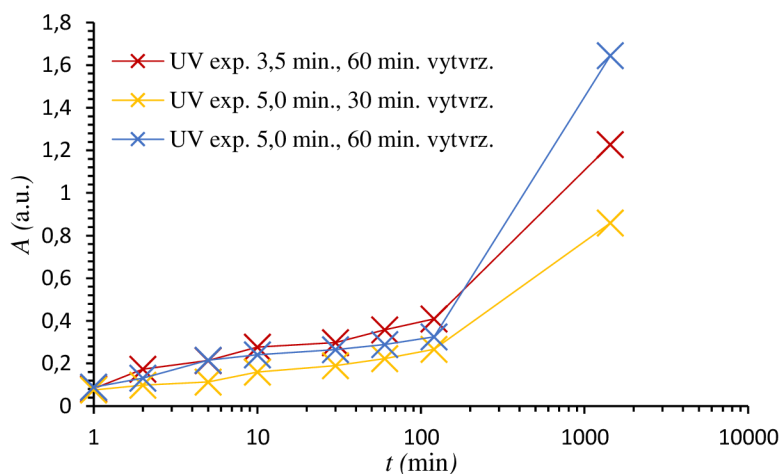
Vždy jedna platforma z dané skupiny byla ponořena do jednoho rozpouštědla na předem stanovenou dobu, po této době byla vytažena, vyfocena a u vzniklého roztoku byla změřena

závislost absorpce na vlnové délce. Z naměřených závislostí v různých časech byly odečteny hodnoty absorpce v maximu píku (stejná vlnová délka polohy maxima u daného rozpouštědla) a vyneseny jako závislost absorpce na čase. Z těchto závislostí lze vidět, že k určitému rozpouštění vrstvy fotorezistu (distančního rámečku) dochází v případě působení všech tří zvolených rozpouštědel (DCM, PBS, Tris-HCl). K nejvýznamnějšímu rozpouštění fotorezistu dochází, podle očekávání, v DCM, jelikož již po první minutě se absorpce blíží 2 a.u., a v následujících minutách se ještě více zvyšuje až do úplného rozpuštění v 5. minutě (platforma s expozicí 3,5 minuty a dobou vytvrzení 60 minut) (Obrázek 21).



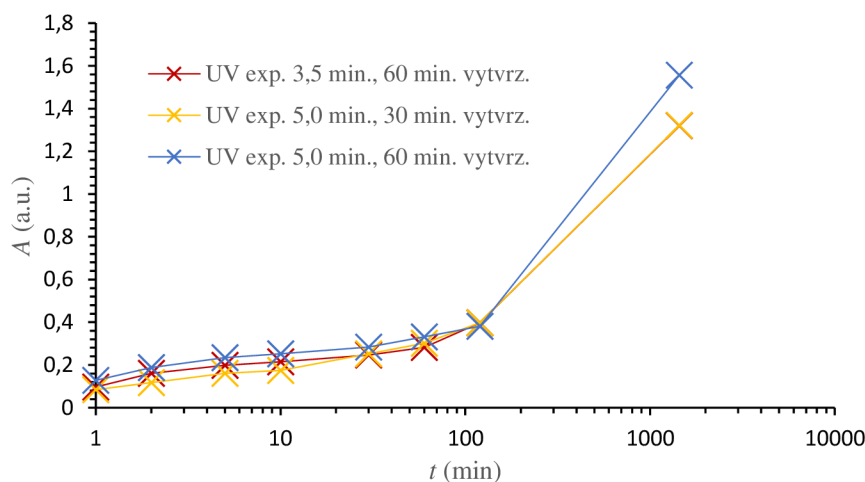
Obrázek 21: Závislost maximální hodnoty naměřené absorpce rozpouštědla DCM s ponořenými platformami z vybraných skupin č. 2, č. 3 a č. 4 (Tab. 4) na čase při vlnové délce s absorpčním maximem 285 nm, pro časové intervaly (min.): 0 min.; 1 min.; 2 min. a 5 min.

U platformem s expozicí 5 minut a dobou vytvrzení 30 a 60 minut dochází sice k pomalejšímu rozpouštění než u předchozí platformy, ale i přesto je rozpouštění v DCM na tolik významné, že jej pro danou aplikaci nelze použít. Rozpouštění fotorezistu v obou kultivačních médiích je téměř srovnatelné, v obou případech je po první minutě absorpce roztoku 0,2 (Obrázek 22 a Obrázek 23).



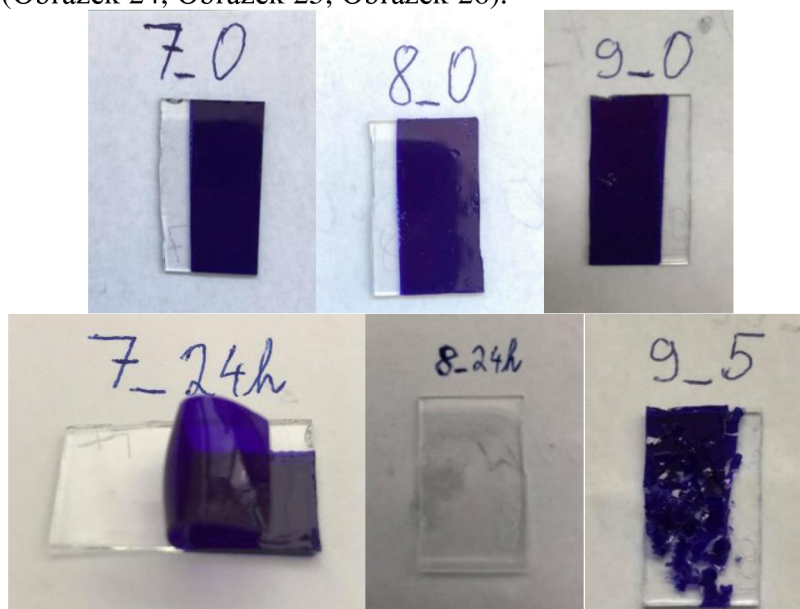
Obrázek 22: Závislost maximální hodnoty naměřené absorpce rozpouštědla PBS s ponořenými platformami z vybraných skupin č. 2, č. 3 a č. 4 (Tab. 4) na čase při vlnové délce s absorpčním maximem 262 nm, pro časové intervaly (min.): 0 min.; 1 min.; 2 min.; 5 min.; 100 min.; 30 min.; 60 min.; 120 min. a 24 hod.

Tato hodnota se v případě Tris-HCl u všech variant mění během prvních 120 minut jen minimálně, to stejné v případě platformy s expozicí 5 minut a dobou vytvrzení 30 minut v prostředí PBS, u zbývajících dvou platform se absorbance přibližně za tuto dobu zdvojnásobila.

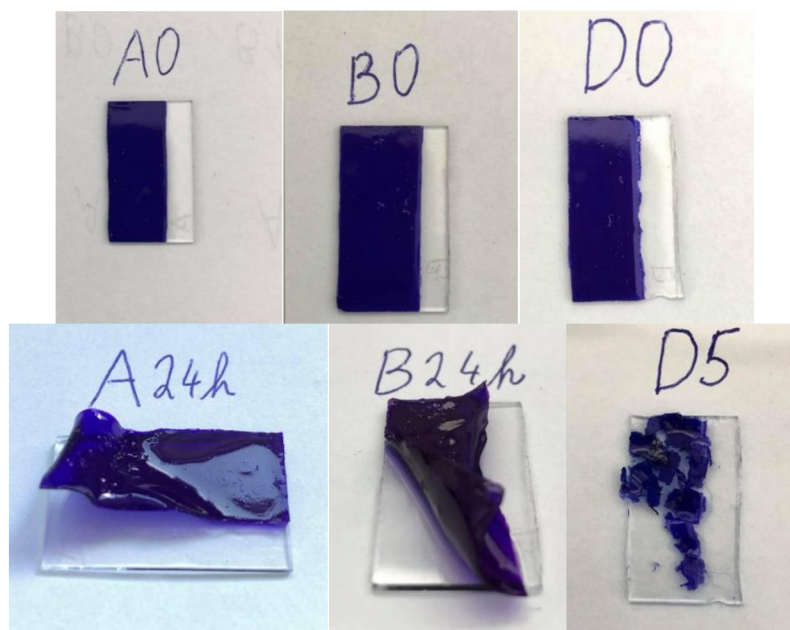


Obrázek 23: Závislost maximální hodnoty naměřené absorbance rozpouštědla Tris-HCl s ponořenými platformami z vybraných skupin č. 2, č. 3 a č. 4 (Tab. 4) na čase při vlnové délce s absorpčním maximem 262 nm, pro časové intervaly (min.): 0,0 min., 1,0 min., 2,0 min., 5,0 min., 10,0 min., 30 min.; 60 min.; 120 min. a 24 hod.

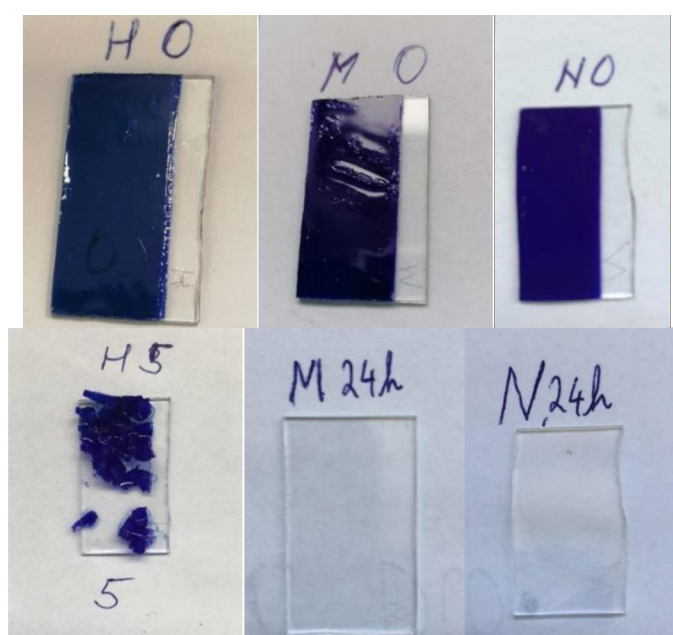
Bohužel však u všech platform došlo po 24 hodinách buď k úplnému rozpuštění fotorezistu, nebo k částečnému rozpuštění a k částečnému/úplnému oddělení fotorezistu od substrátu viz. fotografie níže (Obrázek 24, Obrázek 25, Obrázek 26).



Obrázek 24: Vybrané platformy s vytvrzenou fotorezistní fólií ze skupiny č. 1, ponořené v rozpouštědlech zleva: Tris-HCl, PBS, DCM, vyfocené před vložením do rozpouštědla (horní obrázky platform) a po rozpuštění fotorezistní fólie (dolní obrázky), po uplynutí doby 24 hod. pro rozpouštědla Tris-HCl i PBS, a doba úplného rozpuštění pro rozpouštědlo DCM byla 5 min.

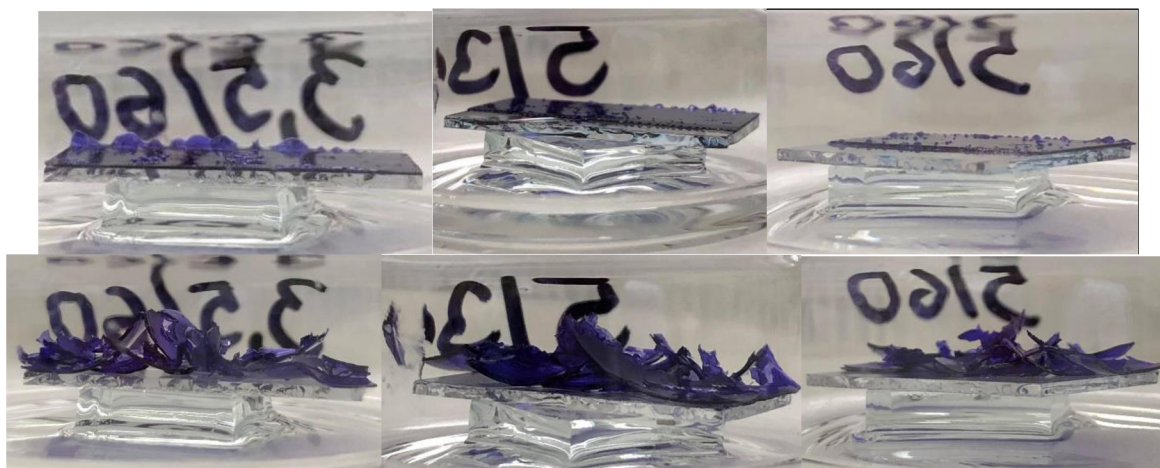


Obrázek 25: Vybrané platformy s vytvrzenou fotorezistní fólií ze skupiny č. 2, ponořené v rozpouštědlech zleva: Tris-HCl, PBS, DCM, vyfocené před vložením do rozpouštědla (horní obrázky platform) a po rozpuštění fotorezistní fólie (dolní obrázky), po uplynutí doby 24 hod. pro rozpouštědla Tris-HCl i PBS, a doba úplného rozpuštění pro rozpouštědlo DCM byla 5 min.



Obrázek 26: Vybrané platformy s vytvrzenou fotorezistní fólií ze skupiny č. 3, ponořené v rozpouštědlech zleva: DCM, PBS, Tris-HCl, vyfocené před vložením do rozpouštědla (horní obrázky platform) a po rozpuštění fotorezistní fólie (dolní obrázky), po uplynutí doby 24 hod. pro rozpouštědla Tris-HCl i PBS, a doba úplného rozpuštění pro rozpouštědlo DCM byla 5 min.

Jelikož DCM je použito pouze jako rozpouštědlo PMMA a je nanášeno z vnější části platformy, dá se očekávat, že na fotorezist budou působit především jeho páry. Z tohoto důvodu jsme na vybrané platformy nechali působit páry DCM a sledovali změnu povrchu fotorezistu v čase. Z obrázku 27 lze vidět, že vrstvy fotorezistu byly i v parách čistého rozpouštědla DCM rozpuštěny v průběhu prvních 30 minut.



Obrázek 27: Vybrané platformy s vytvrzenou fotorezistní fólií ze skupin zleva: č. 2, č. 3, č. 4, uložené nad parami rozpouštědla DCM, vyfocené v čase 0,0 min. a 30,0 min.

Z experimentální činnosti vyplývá, že se vrstva fotorezistu rozpouští ve všech důležitých rozpouštědlech, které jsou pro navazující měření s naší modifikovanou platformou OECT nezbytné. Z tohoto důvodu je potřeba nahradit používaný fotorezist za takový, který je pro vybrané rozpouštědla chemicky stabilní. Po průzkumu trhu byl nalezen fotorezist s názvem „SY-300“, který by měl být chemicky stabilní. Náplní navazující práce by tedy bylo ověření, zda je tento fotorezist s názvem „SY-300“ vhodný pro naši modifikovanou platformu OECT. Nejdůležitějším faktorem bude jeho chemická stabilita. Fotorezistní fólie se nesmí rozpustit v žádném rozpouštědle, které je pro naplánované měření s platformou OECT nevyhnutné, ani při procesu lepení krycího křemenného skla k platformě OECT. Jakékoliv rozpuštění fólie, způsobí, že se rozpuštěná část fólie dostane do analyzovaného roztoku s danou koncentrací draselných kationtů, umístěného v části měřicí cely naší modifikované platformy OECT. To by mělo za následek významné ovlivnění jak fluorescenční, tak i elektrické detekce.

5 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo vyvinout modifikovanou platformu OECT, která by umožnila jak elektrickou, tak i optickou (fluorescenční) detekci vyměňovaných iontů mezi vrstvou aktivního kanálu OECT (PEDOT:PSS) a elektrolytem. Takováto platforma by měla mít vysokou citlivost i pro velmi nízké koncentrace a současně vyhovovat požadavkům na optickou charakterizaci. Tato práce se tedy zabývala přípravou takovéto platformy a ověřením její funkčnosti z hlediska elektrických i optických vlastností.

Nejprve bylo u nás navržené platformy ověřeno, jak velkou změnu ve výstupním proudu jsme schopni zaznamenat pro různě koncentrované roztoky (0,0001–1 M), a zda je tato změna dostatečná. Na základě tohoto experimentu bylo zjištěno, že dolní hranice citlivosti platformy je pro koncentraci KCl 0,1 mM. Vzhledem k tomu, že je zamýšlena aplikace platformy v oblasti stimulace elektrogenních buněk, tedy ve fyziologickém prostředí, očekává se, že se budeme pohybovat kolem 3,5–5,5 mM KCl. To znamená, že zjištěná citlivost platformy je pro danou aplikaci vyhovující.

Následně jsme se snažili ověřit, zda navržená platforma vyhovuje požadavkům optické charakterizace, a zda při daném uspořádání jsme schopni měřit fluorescenci i pro roztoky o velmi nízkých koncentracích (0,01–10 mM) s dostatečně velkou změnou v intenzitě měřeného signálu. Správný postup jsme si nejprve ověřili měřením připravených roztoků v úzké kyvetě, a následně jsme tyto roztoky změřili stejným postupem i v navržené platformě. Na základě těchto měření lze usoudit, že dané uspořádání platformy zcela vyhovuje požadavkům na optickou charakterizaci, jelikož emisní spektrum studovaného roztoku QSH v kyselině sírové bylo rozlišené s dostatečnou intenzitou měřeného signálu v celém svém rozsahu u všech měřených koncentrací. Nicméně, při měření nižších koncentrací QSH v platformě byl pozorován posun emisního maxima do kratších vlnových délek a současně bylo vizuálně pozorováno rozpouštění distančního rámečku, který byl připraven z fotorezistu, po nanesení vrstvy lepidla PMMA rozpuštěného v acetonu. Bylo tedy nutné optimalizovat postup přípravy měřicí cely a kompletace platformy, což bylo řešeno v následujících kapitolách.

Nejdříve jsme hledali vhodnou formuli polymethylmethakrylátu (PMMA), a to především vhodné rozpouštědlo a koncentraci. Studovány byly čtyři rozpouštědla (chloroform, toluen, dichlormethan a 1,2-dichlorbenzen) a různé hmotnostní koncentrace. U připravených roztoků byla studován čas rozpuštění PMMA, doba odpaření rozpouštědla, a následně manipulovatelnost, tedy jak kvalitně vybraný roztok PMMA dokáže slepit dvě skla k sobě. Na základě tohoto experimentu jako nejvhodnější lepidlo k lepení OECT platformy jevílo PMMA rozpuštěné v dichlormethanu o koncentraci 121,2 mg/ml.

V poslední části pak byla zkoumána stabilita distančního rámečku (fotorezistu) v prostředí dichlormethanu a ve dvou kultivačních médiích (PBS a Tris-HCl). Byly připraveny vrstvy fotorezistu, které se lišily dobou vyvolání (3,5 a 5 minut) a dobou vytvrzení (30 a 60 minut). U takto připravených vrstev pak byla studována hrubost povrchu (profilometrie), následně stabilita (rozpuštěnost vrstev) ve vybraných rozpouštědlech (UV-Vis spektrometrie) a následně stabilita v parách DCM. Výsledkem těchto experimentů bylo zjištění, že daný fotorezist pro použití v dané platformě není vhodný, jelikož se rozpouští alespoň částečně již po 1 minutě ve všech námi zvolených rozpouštědlech, a je tedy nutné zvolit pro přípravu platformy některý

z více chemicky odolných fotorezistů. Jedním z vhodných se zdá být fotorezist SY300. Ověření jeho vhodnosti bude naplní další práce.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- 1) BERNARDS, Daniel. A. a George G. MALLIARS, 2007. Steady-State and Transient Behavior of Organic Electrochemical Transistors. *Advanced functional materials* [online]. 17(17), 3538-3544 [cit. 2021-07-19]. Dostupné z doi:10.1002/adfm.200601239
- 2) MOSER, Maximilian, James F. PONDER JR., Andrew WADSWORTH, Alexander GIOVANNITTI a Iain MCCULLOCH, 2019. Materials in Organic Electrochemical Transistors for Bioelectronic Applications: Past, Present, and Future. Special Issue: Advanced Materials and Architectures for Organic, Printable, and Bio-Inspired Photonics [online]. 13.12.2018, 29(21), 1-15 [cit. 2021-07-19]. DOI: 10.1002/adfm.201807033. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/adfm.201807033>
- 3) SUN, Hengda, Mikhail VAGIN, Suhao WANG, Xavier CRISPIN, Robert FORCHHEIMER, Magnus BERGGREN a Simone FABIANO, 2018. Complementary Logic Circuits Based on High-Performance n-Type Organic Electrochemical Transistors. *Advanced materials* [online]. 30(9), 1-7 [cit. 2021-07-19]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1002/adma.201704916>
- 4) BERGGREN, M. a A. RICHTER-DAHLFORS, 2007. Organic Bioelectronics. *Advanced materials* [online]. 19(20), 3201-3213 [cit. 2021-07-19]. Dostupné z: doi:10.1002/adma.200700419
- 5) LIN, Peng a Feng YAN, 2012. Organic Thin-Film Transistors for Chemical and Biological Sensing. *Advanced Materials* [online]. 21.11.2011, 24(1), 34-51 [cit. 2021-02-25]. DOI: 10.1002/adma.201103334. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/adma.201103334>
- 6) SUN, Hengda, Jennifer GERASIMOV, Magnus BERGGREN a Simone FABIANO, 2018. N-Type organic electrochemical transistors: materials and challenges. *Journal of Materials Chemistry C* [online]. 31.8.2018, 6(44), 11778-11784 [cit. 2021-02-25]. DOI: 10.1039/C8TC03185A. Dostupné z: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2018/tc/c8tc03185a>
- 7) BAIL, Liming, Cristina García ELÓSEGUI, Weiqi LI, Ping YU, Junjie FEI a Lanqun MAO, 2019. Biological Applications of Organic Electrochemical Transistors: Electrochemical Biosensors and Electrophysiology Recording. *Frontiers in chemistry* [online]. 7(313), 1-16 [cit. 2021-02-25]. DOI: 10.3389/fchem.2019.00313. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00313>
- 8) Mabeck, J.T., Malliaras, G.G. Chemical and biological sensors based on organic thin-film transistors. *Anal Bioanal Chem* 384, 343–353 (2006). Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00216-005-3390-2>
- 9) HRSTKA, Miroslav, 2007. *Obecná Biologie*. 2. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. ISBN 978-80-214-3464-6.
- 10) HOPKINS, Jonathan, Kristina FIDANOVSKI, Antonio LAUTO a Damia MAWAD, 2019. All-Organic Semiconductors for Electrochemical Biosensors: An Overview of Recent Progress in Material Design. *Frontiers in bioengineering and*

- biotechnology [online]. 7(237), 1-8 [cit. 2021-02-25]. DOI: 10.3389/fbioe.2019.00237. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00237>
- 11) CAMERON, Joseph a Peter J. SKABARA, 2020. The damaging effects of the acidity in PEDOT:PSS on semiconductor device performance and solutions based on non-acidic alternatives. *Materials Horizons* [online]. 2020(7), 1759-1772 [cit. 2021-02-25]. DOI: 10.1039/C9MH01978B. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/C9MH01978B>
 - 12) LAKOWICZ, Joseph R., 1999. Potassium and sodium measurements at clinical concentrations using phase-modulation fluorometry. *Sensors and Actuators B: Chemical* [online]. 60(1), 8-18 [cit. 2021-02-25]. DOI: 10.1016/S0925-4005(99)00235-X. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0925-4005\(99\)00235-X](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(99)00235-X)
 - 13) MEUWIS, Katrien, Noël BOENS, Frans C. DE SCHRYVER, Jacques GALLAY a Michel VINCENT, 1995. Photophysics of the Fluorescent K⁺ Indicator PBFI. *Biophysical Journal* [online]. 68(4), 2469-2473 [cit. 2021-02-25]. DOI: 10.1016/S0006-3495(95)80428-5. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(95\)80428-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(95)80428-5)
 - 14) RIVNAY, Jonathan, Sahika INAL, Alberto SALLES, Róisín M. OWENS, Magnus BERGGREN a George G. MALLIARAS. Organic electrochemical transistors. *Nature Reviews Materials*. 2018, 3 (2), 17086-. [cit. 2021-02-25] DOI: 10.1038/natrevmats.2017.86. ISSN 2058-8437. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/natrevmats201786>
 - 15) Standard vodivosti, KCl, (25 °C). Avantor [online]. Česká republika: VWR [cit. 2021-7-19]. Dostupné z: <https://cz.vwr.com/store/product/11794231/standard-vodivosti-kcl-25-c>
 - 16) Active transport. In: Khan Academy [online]. [cit. 2021-07-19]. Dostupné z: <https://www.khanacademy.org/science/biology/membranes-and-transport/active-transport/a/active-transport>
 - 17) KUBIN, R.F. a A.N. FLETCHER, 1982. Fluorescence quantum yields of some rhodamine dyes. *Journal of Luminescence* [online]. 27(4), 455-462 [cit. 2021-7-19]. Dostupné z: [doi:https://doi.org/10.1016/0022-2313\(82\)90045-X](https://doi.org/10.1016/0022-2313(82)90045-X)

7 SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

OECT	Organický elektrochemický tranzistor
PEDOT:PSS	Poly(3,4-ethylenedioxythiopen):poly(styrenulfonát)
PBFI	Selektivní fluorescenční sonda pro draselné ionty (Potassium Binding Benzofuran Isophtalate)
PMMA	Polymethylmethakrylát
K ⁺	Draselný iont
Na ⁺	Sodný iont
K ₂ CO ₃	Uhličitan draselný
QSH	Chinin sulfát hydrát
H ₂ SO ₄	Kyselina sírová
NaOH	Hydroxid sodný
KCl	Chlorid draselný
CHCl ₃	Chloroform
DCM	Dichlormethan
1,2-DCB	1,2-dichlorbenzen
PBS	Fosfátový pufr (Phosphate Buffered Saline)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
HCl	Kyselina chlorovodíková