



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



**FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH
TECHNOLOGIÍ**

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

CHARAKTERIZACE NANOSTRUKTUROVANÝCH ZLATÝCH ELEKTROD MODIFIKOVANÝCH BIOTINOVANÝM OLIGONUKLEOTIDEM

GOLD NANOSTRUCTURED ELECTRODES CHARACTERIZATION MODIFIED BY BIOTINYL
OLIGONUCLEOTIC PARTICLES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

EVA VRBOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. RADIM HRDÝ

BRNO 2013



VYSOKÉ UČENÍ
TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

Ústav biomedicínského inženýrství

Bakalářská práce

bakalářský studijní obor

Biomedicínská technika a bioinformatika

Studentka: Eva Vrbová

ID: 136494

Ročník: 3

Akademický rok: 2012/2013

NÁZEV TÉMATU:

Charakterizace nanostrukturovaných zlatých elektrod modifikovaných biotinovým oligonukleotidem

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Seznamte s problematikou měření biotinylovaného oligonukleotidu pomocí elektrochemické impedanční spektroskopie a dalších voltametrických metod na zlatých elektrodách. 2) Získané poznatky experimentálně aplikujte pro praktické navázání a charakterizaci biomolekul na povrchu nanostrukturované zlaté elektrody. 3) Výsledky měření zpracujte a vyhodnoťte.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] CASTILLO, Gabriela, TRNKOVA Libuse, HRDY Radim a HIANIK Tibor. Impedimetric Aptasensor for Thrombin Recognition Based on CD Support. *Electroanalysis*. 2012, roč. 24, č. 5, s. 1079-1087. ISSN 10400397.

[2] DRBOHLAVOVÁ, Jana, CHOMOUCKÁ, Jana, HRDÝ, Radim, PRÁŠEK, Jan, JANŮ Lenka, RYVOLOVÁ, Markéta, ADAM, Vojtěch, KIZEK, René, HALASOVÁ, Tereza, HUBÁLEK, Jaromír. Effect of Nucleic Acid and Albumin on Luminescence Properties of Deposited TiO₂ Quantum Dots. *International Journal of Electrochemical Science*, 2012, roč. 7, č. 2, s. 1424-1432. ISSN: 1452- 3981.

Termín zadání: 11.2.2013

Termín odevzdání: 31.5.2013

Vedoucí práce: Ing. Radim Hrdý

Konzultanti bakalářské práce: doc. Ing. Jana Kolářová, Ph.D.

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.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci na téma Charakterizace nanostrukturovaných zlatých elektrod modifikovaným biotinylovaným oligonukleotidem jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této práce jsem neporušila autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhla nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědoma následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení § 152 trestního zákona č. 140/1961 Sb.

V Brně dne 31. května 2013

.....

podpis autora

Poděkování

Děkuji vedoucímu bakalářské práce Ing. Radimu Hrdému za účinnou metodickou, pedagogickou, odbornou a praktickou pomoc a za další cenné rady při zpracování mé bakalářské práce, kterých jsem plně využila.

V Brně dne 31. května 2013

.....

podpis autora

Abstrakt

V současnosti se snaží věda vyvíjet stále lepší technologie pro výrobu nanočástic. S tím souvisí i jejich začlenění do elektrochemie a do biosenzorů.

Bakalářská práce se zabývá problematikou měření biotinylovaného oligonukleotidu pomocí elektrochemické impedanční spektroskopie a voltametrických metod na zlatých elektrodách. Praktickou částí je navázání a charakterizace biomolekul na povrch nanostrukturované zlaté elektrody, zpracování výsledků z měření a jejich následné vyhodnocení.

Klíčová slova

nanostruktura, elektroda, biosenzor, impedanční spektroskopie, voltametrie, oligonukleotid

Abstract

Nowdays, science is trying to develop better technology for production of nanotechnology. This is related to integration into the electrochemistry and biosensors.

Bachelor's thesis deals of biotin oligonucleotide measurement using the electrochemical impedance spectroscopy and voltammetric methods on gold electrodes. The aim of practical part is linking and characterization of biomolecules on the surface of the nanostructured gold electrodes, than the discussion of results and measured data.

Key words

nanostructure, electrode, biosensor, impedance spectroscopy, voltammetry, oligonucleotide

Bibliografická citace

VRBOVÁ, E. *Charakterizace nanostrukturovaných zlatých elektrod modifikovaným biotinylovaným oligonukleotidem*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2013. 51 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Radim Hrdý.

Obsah

Seznam obrázků	7
1 Úvod.....	9
2 Elektrochemické metody.....	10
2.1 Elektrochemická impedanční spektroskopie	11
2.1.1 Kapacita dvojvrstvy.....	11
2.1.2 Model impedance elektrody	12
2.1.3 Warburgova impedance.....	13
2.1.4 Constant Phase Element (CPE).....	14
2.2 Voltametrie	16
2.2.1 Typy elektrod	18
2.2.2 Cyklická voltametrie	20
2.2.3 Diferenční pulzní voltametrie.....	20
3 Senzory	22
3.1 Biosenzory	23
3.1.1 Optické biosenzory.....	23
3.1.2 Elektrochemické senzory	24
4 Nanostruktury	25
4.1 Nanotechnologie.....	25
4.2 Zlaté nanočástice	26
4.3 Nanostrukturované elektrody	26
5 Biomolekuly.....	28
5.1 Biotin-modifikované oligonukleotidy	28
6 Praktická část	29
6.1 Elektrody	29
6.1.1 Výroba čistých zlatých elektrod.....	29
6.1.2 Výroba nanostrukturovaných elektrod.....	30
6.2 Materiál.....	31

6.2.1	Roztok biotinu	31
6.2.2	Fosfátový pufr	32
6.2.3	Akumulace	33
6.3	Měření.....	33
6.4	Výsledky a diskuze.....	35
7	Závěr	46
	Literatura	48
	Seznam použitých zkratk a fyzikálních veličin	51

Seznam obrázků

Obrázek 1 Přehled elektroanalytických metod.....	10
Obrázek 2 Rozložení iontů na kovovém rozhraní	12
Obrázek 3 Exponenciální závislost potenciálu na vzdálenosti.....	12
Obrázek 4 Model impedance elektrody.....	13
Obrázek 5 Nyquistův graf	14
Obrázek 6 Nyquistův diagram	15
Obrázek 7 Konstantní fázový prvek.....	16
Obrázek 8 Zapojení elektrického obvodu využívaného při voltametrické analýze	17
Obrázek 9 Příklad realizace voltametrické nádoby	18
Obrázek 10 Argentchloridová elektroda	19
Obrázek 11 Voltamogram z cyklické voltametrie	20
Obrázek 12 Charakter vkládaného potenciálu	21
Obrázek 13 Registrovaná polarizační křivka při DPV	21
Obrázek 14 Schéma optického senzoru	23
Obrázek 15 Tvary nanostruktur	25
Obrázek 16 SEM-snímek zlatých nanotyčinek	26
Obrázek 17 Chemická struktura molekuly biotin-modifikovaného oligonukleotidu	28
Obrázek 18 Použité zlaté naprášené elektrody a nanostrukturované zlaté elektrody.....	29
Obrázek 19 SEM-snímek napařené zlaté elektrody	30
Obrázek 20 SEM-snímek zlaté nanostrukturované elektrody.....	31
Obrázek 21 Chemická struktura biotin-HPDP	31
Obrázek 22 Chemická struktura molekuly glutationu	32
Obrázek 23 Cella s tříelektrodovým zapojením a použité elektrody	34
Obrázek 24 Přístroj MetroOhm Autolab, Faradayova klec a zobrazovací zařízení.....	35
Obrázek 25 Srovnání elektrochemické impedančních spekter.....	35
Obrázek 26 Elektrochemická impedanční spektroskopie	36
Obrázek 27 Voltametrie	36
Obrázek 28 Graf závislosti impedance na koncentraci fosfátového pufru.....	37
Obrázek 29 Elektrochemická impedanční spektroskopie u zlatých elektrod.....	38
Obrázek 30 Elektrochemická impedanční spektroskopie u nanostrukturovaných elektrod.....	39
Obrázek 31 Cyklická voltametrie u zlatých elektrod	39

Obrázek 32 Elektrochemická impedanční spektroskopie s elektrodama bez akumulace	40
Obrázek 33 Závislost impedance na koncentraci fosfátového pufru	41
Obrázek 34 Závislost frekvence na koncentraci fosfátového pufru	41
Obrázek 35 Závislost impedance na době akumulace v glutationu	42
Obrázek 36 Náhradní obvod pro modifikovanou zlatou elektrodu	43
Obrázek 37 Náhradní obvod pro modifikovanou i neakumulovanou nanostrukturu	43
Obrázek 38 Náhradní obvod pro čistou zlatou elektrodu	43
Obrázek 39 Závislost R_{CT} na době akumulace u nanostrukturovaných a zlatých elektrod	45
Obrázek 40 Závislost C_{DL} na době akumulace u nanostrukturovaných a zlatých elektrod	45

1 Úvod

Rozvoj elektrochemických metod není spojován jenom s 20. stoletím, ale i v dřívějších dobách docházelo k jejich velkému rozmachu. Například již roku 1832 Michael Faraday formuloval základní elektrochemické zákony. Důležitým mezníkem, hlavně pro českou elektrochemii, bylo získání Nobelovy ceny Jaroslavem Heyrovským v roce 1959 za polarografii. V současné době je využití těchto metod stále častější a dostupnější, a to hlavně z důvodu selektivity, senzitivity, rychlosti a nižší ceny.

Současný rozmach vědy je spojován i s rozvojem biosenzorů. Hlavní výhodou je hlavně jejich nízká cena a dostupnost oproti jiným výkonnějším metodám. Nejen u nás, ale i ve světě se využívají biosenzory k navazování látek, jak na zlaté povrchy, tak i na nanostrukturované. Jedná se například o streptavidin, který se kovalentně váže na zlatý povrch pomocí aminových vazeb [1]. V jiných postupech se můžou využívat i biotin-modifikované oligonukleotidy, glutation, enzymy a jiné biologické látky.

S tím souvisí i rozvoj nanotechnologií a jejich uplatnění právě v oboru biosenzorů. Nanočástice se vážou na povrch biosenzorů, čímž dochází ke zvětšování jejich povrchu a lepší citlivosti. V dnešní době se s nanotechnologiemi v podstatě setkáváme denně téměř ve všech činnostech. Díky výborným vlastnostem dochází k neustálému vývoji a zlepšování těchto technologií.

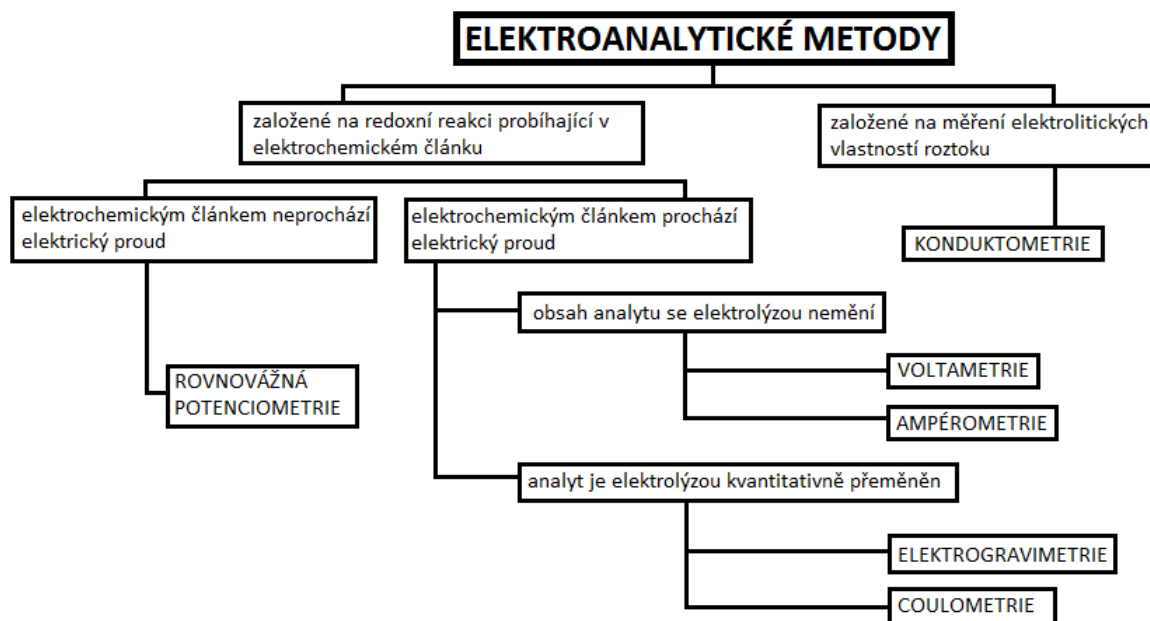
Cílem této bakalářské práce je teoretická rešerše problematiky a měření navázání biotinu a glutationu na zlaté elektrody a na nanostrukturované elektrody. Součástí je i přiblížení výroby těchto elektrod a následná akumulace biologické látky na elektrody. Takto připravená čidla budou charakterizována pomocí elektrochemické impedanční spektroskopie a cyklické voltametrie.

2 Elektrochemické metody

Uvědomíme-li si, že veškeré chemické interakce, které se dějí na úrovni atomů, jsou vlastně elektrické, tak můžeme dospět k tomu, že v některém smyslu můžeme považovat chemii za elektrochemii. Pokud se ale podíváme z obecného hlediska na význam slova elektrochemie, je to vlastně zkoumání jevů, ke kterým dochází na elektrodách a studium roztoků elektrolytů, do nichž jsou elektrody vloženy. Tyto metody můžeme využívat k měření chemických veličin a určování koncentrací látek. Nutnou podmínkou je to, aby měřená látka byla schopná přenášet elektrický náboj.

Každá elektrochemická metoda má jiný postup a jiný druh měření na různých přístrojích a za různých podmínek. Každá metoda je sama o sobě specifická a musíme si vždy rozmyslet, která z nich je lepší či horší k danému měření.

Tato bakalářská práce dále popisuje dvě základní elektrochemické metody, a to elektrochemickou impedanční spektroskopii a voltametrii [2].



Obrázek 1 Přehled elektroanalytických metod

2.1 Elektrochemická impedanční spektroskopie

Mezi velmi důležité a stále více používané elektrochemické metody můžeme bezpochyby na první místo zařadit elektrochemickou impedanční spektroskopii (EIS).

Tato metoda je využívána pro vývoj a výzkum materiálů. Její výsledky určují elektrochemické vlastnosti elektricky vodivých materiálů, rychlost chemických reakcí, popřípadě korozi. Můžeme pomocí ní také předurčit, které chemické senzory je vhodné použít, a které naopak ne [3][4].

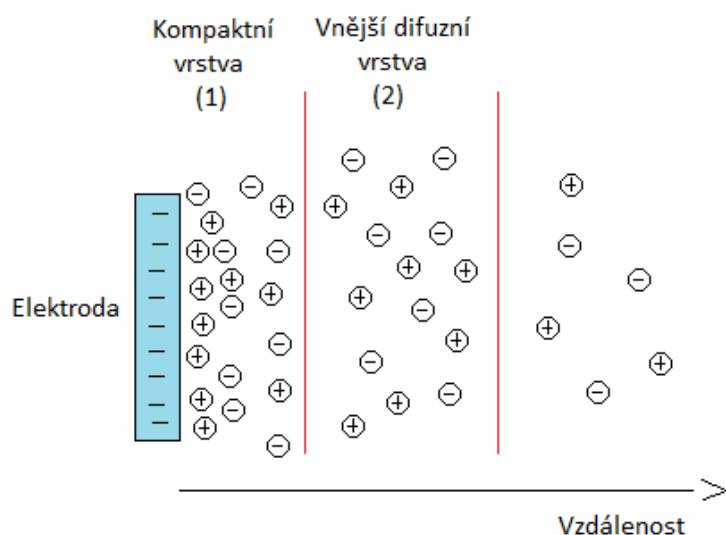
Nejčastějším použitím EIS je zkoumání heterogenních elektrodových povrchů za předpokladu, že vlastnosti povrchů se v čase nemění. Při samotném měření přivádíme na elektrody ponořené do elektrolytu střídavý signál s velmi malou amplitudou.

Výsledkem je elektrická odezva proudu. Nejčastější metodou pro analýzu získaných dat je metoda matematického modelu impedance [5].

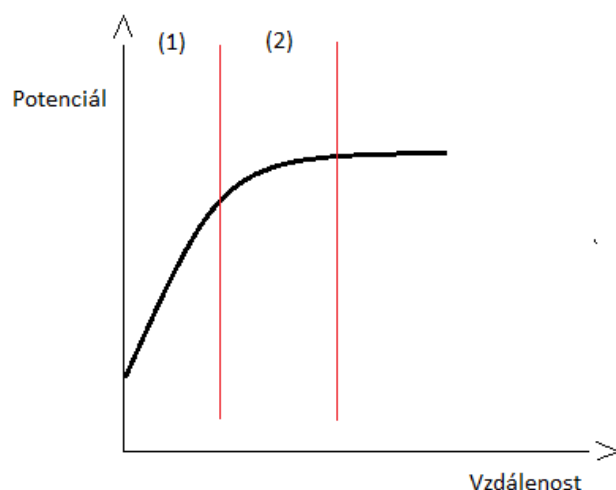
2.1.1 Kapacita dvojvrstvy

Jedním z parametrů při určování vlastností a popisu elektrod je kapacita dvojvrstvy, anglicky Double layer capacity. Je to nehomogenní rozložení iontů na kovovém rozhraní (obr. 2) Tato dvojitá vrstva se skládá ze dvou částí:

1. Kompaktní vrstva (Helmholtzova vrstva) – nachází se nejblíže k povrchu, v němž dochází k rozdělení náboje. Zde se potenciál mění lineárně se vzdáleností od povrchu elektrody
2. Vnější difuzní vrstva (Gouy - Chapmanova vrstva) – dochází zde k exponenciálním potenciálovým změnám [8].



Obrázek 2 Rozložení iontů na kovovém rozhraní



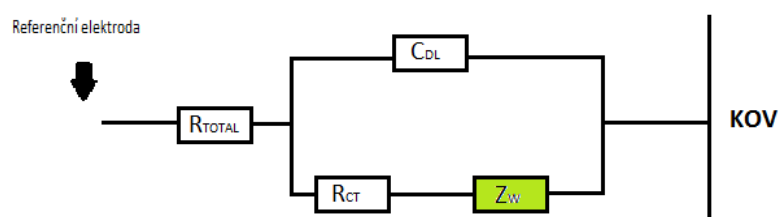
Obrázek 3 Exponenciální závislost potenciálu na vzdálenosti

2.1.2 Model impedance elektrody

Uvedený model podle obr. 4 představuje impedanci jedné elektrody. Reálné měřicí elektrody reprezentují dvě taková zapojení v sérii, při kterém rezistor R_{TOTAL} představuje měřený odpor elektrolytu a C_{DL} představuje kapacitu dvojvrstvy. Vložení elektrody do elektrolytu, dochází k chemickým reakcím a tudíž i k nerovnováze nábojů. Tato nerovnováha je ale hned vyrovnávána přesunem iontů k elektrodě až do té doby, dokud se náboje nevyrovnají. V okolí elektrody začíná vznikat dvojvrstva, která je tvořena ionty. Na jedné straně jsou to kladně nabitě ionty a na straně druhé záporně nabitě ionty. Náboje přes dvojvrstvu přecházejí, ale jejich přechod je zpomalován rychlostí výměny elektronů mezi ionty a elektrodou. Tento

popsaný děj se nazývá odpor přenosu náboje a na výše uvedeném modelu je to R_{CT} . Tento odpor je nelineární a závisí na napětí. Kvůli tomu bylo zavedeno limitní napětí, pro které je jeho chování ještě lineární. Protože R_{CT} klesá s frekvencí, limitní napětí s frekvencí stoupá [6]. Důležitým blokem obvodu je Warburgova impedance Z_W , která je způsobena konečnou rychlostí difúze iontů z elektrolytu k elektrodě. Tato impedance Z_W spolu s R_{CT} tvoří Faradayovu impedanci.

Celkový průběh impedance je nelineární na nízkých kmitočtech a je způsoben povrchem elektrody. Naopak u vyšších kmitočtů, řádově jednotky kHz, je impedance minimální [7].



Obrázek 4 Model impedance elektrody

2.1.3 Warburgova impedance

Tento obvodový prvek se využívá k modelování nekonečné lineární difúze. Může být obtížné jej rozpoznat a to z toho důvodu, že je téměř vždy spjat s R_{CT} (odpor přenosu náboje) a C_{DL} (kapacita dvojvrstvy). Warburgova impedance je běžná v mnoha systémech a dá se považovat za konstantní fázový element (CPE) s konstantní fází 45° a s velikostí nepřímo úměrné odmocnině z frekvence podle

$$Z_W = \frac{A_W}{\sqrt{\omega}} + \frac{A_W}{j\sqrt{\omega}} \quad (1)$$

$$|Z_W| = \sqrt{2} \frac{A_W}{\sqrt{\omega}} \quad (2)$$

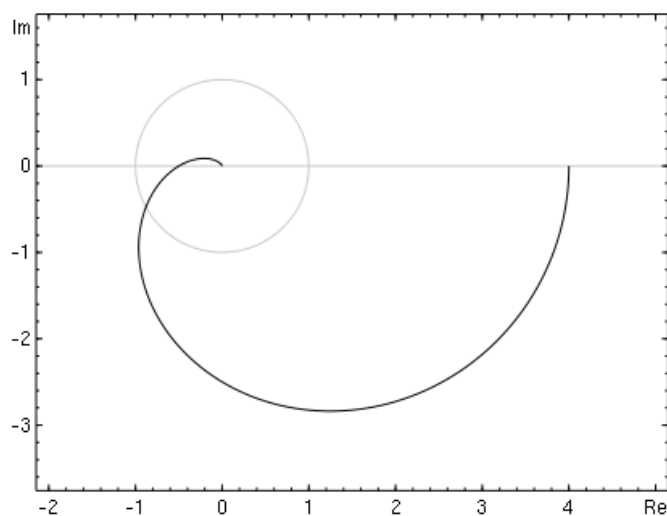
kde A_W je Warburgova konstanta, j je imaginární číslo a ω je úhlová frekvence [7].

2.1.4 Constant Phase Element (CPE)

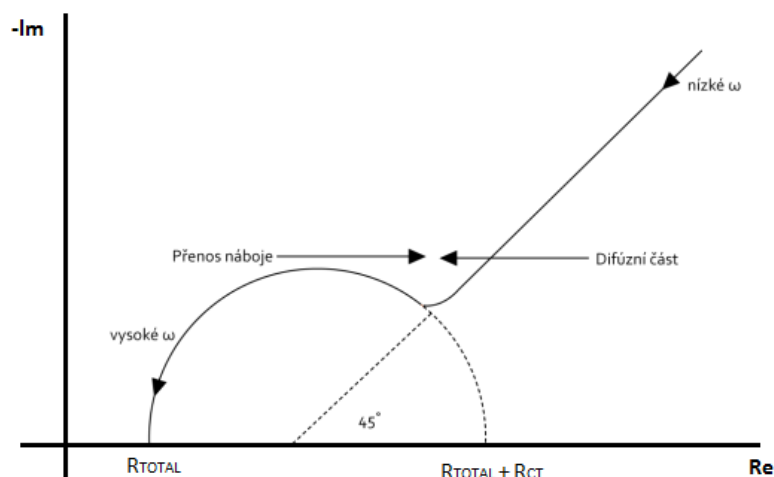
Konstantní fázový prvek, neboli CPE, je obvodový prvek modelující chování dvojvrstvy, která slouží jako nedokonalý kondenzátor. Často se pomocí CPE nahrazují kapacitory, a to z důvodu nelineárního rozmístění v systému. V některých systémech se očekává, že Nyquistův graf bude tvořit půlkruh se středem na ose x . Ve většině případů je grafem opravdu oblouk kruhu, ale střed neleží na ose x , nýbrž v určité vzdálenosti pod ní. Tyto půlkruhy byly vysvětleny řadou jevů, v závislosti na povaze systému, který je stále předmětem zkoumání. Každopádně společným vysvětlením tohoto jevu jsou nehomogenní vlastnosti systému [8].

Nyquistův graf

Nyquistův graf je parametrickým grafem přenosové funkce používané v automatickém řízení a zpracování signálů (obr. 5) Nejběžnější použití tohoto grafu je pro posouzení přenosové funkce stability systému se zpětnou vazbou. V kartézských souřadnicích je reálná část přenosové funkce vynesena na osu x a imaginární část je znázorněna na ose y . Pomocí Nyquistova diagramu můžeme vyjádřit Faradaycké impedanční spektrum [10].



Obrázek 5 Nyquistův graf [26]



Obrázek 6 Nyquistův diagram [25]

Na obr. 6 je znázorněn Nyquistův diagram, který se skládá ze dvou částí. První část má tvar půlkruhu a popisuje přenos náboje přes dvojvrstvu. Tato část je pozorovatelná na vysokých frekvencích. Druhá část má tvar přímky a popisuje kapacitní charakter látky a pozorujeme ji na nižších frekvencích. Pokud je na diagramu z větší části zastoupena přímková část, znamená to, že k přenosu náboje dochází rychleji. Naopak, pokud je z větší části v diagramu zastoupena půlkruhovitá část, k přenosu náboje dochází pomaleji. To může například nastat u málo vodivých roztoků [10].

CPE rovnice

Matematicky popisujeme CPE rovnicí vztahem:

$$\frac{1}{Z} = Y = Q^\circ(j)\omega^n \quad (3)$$

kde Q° má číselnou hodnotu admitance ($1 / |Z|$) na $\omega = 1 \text{ rad / s}$. Jednotky Q° jsou [S.sn].

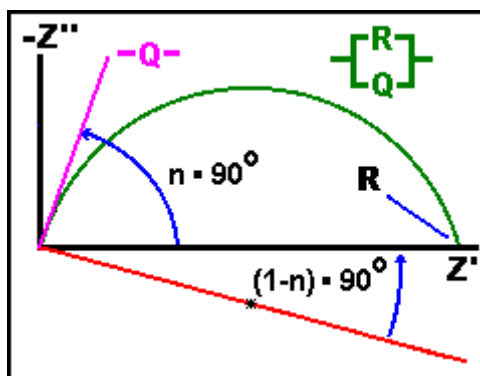
Důsledkem této jednoduché rovnice je to, že fázový úhel impedance CPE je nezávislý na frekvenci a má hodnotu $-(90 \cdot n)^\circ$ [11].

V případě, že $n=1$ dochází ke stejnému případu, jako u rovnice impedance kondenzátoru, kde $Q^\circ=C$.

$$\frac{1}{Z} = Y = jQ^\circ\omega = jC\omega \quad (4)$$

Můžeme tedy říci, že pokud je n v blízkosti 1, tak se CPE podobá kondenzátoru. Fázový úhel však není 90° , ale při všech frekvencích vždy méně než 90° .

CPE je symbolizováno písmenem Q (obr. 7). Je to přímka, která svírá s osou x úhel $(n * 90^\circ)$ [9].



Obrázek 7 Konstantní fázový prvek [9]

2.2 Voltametrie

Voltametrické metody řadíme mezi elektroanalytické metody (obr. 1). Je základní elektrochemickou metodou, která se využívá ke stanovení rozpuštěných látek ve vodných roztocích nebo rozpouštědlech. Setkat se s nimi můžeme zejména ve výzkumu redoxních vlastností molekul (jak už organických, tak anorganických), které jsou využívány jako léky, chemikálie, barviva, katalyzátory a další. S pomocí této metody můžeme stanovovat těžké kovy v roztocích (například zinek, kadmium, měď, olovo nebo titan) anebo elektrochemicky redukovatelné a oxidovatelné organické sloučeniny. U těchto metod se využívá elektrochemických článků [12].

Elektrochemický článek je chemický zdroj elektrického napětí, který se skládá ze dvou materiálů spojených elektrolytem. V praxi můžeme použít dva druhy článků. Je to primární elektrochemický článek (galvanický článek) a sekundární elektrochemický článek (akumulátor). Vzniklé napětí je elektromotorické a vzniká z rozdílu potenciálů na elektrodách. Tyto elektrické potenciály jsou důsledkem chemických reakcí mezi elektrolytem a elektrodami. Reakce mohou být samovolné nebo vyvolané přechodem elektrického proudu. Jakmile zapojíme článek do obvodu, uvnitř článku proběhnou reakce, kterými se postupně snižuje energie a článek se začne vybíjet. Jestliže se napětí na článku po vybití nedá znovu obnovit, mluvíme o takzvané ireverzibilní reakci (primární elektrochemický článek). Pokud se dá článek opět nabít, mluvíme o reakci reverzibilní (akumulátor). Když článkem prochází elektrický proud, projevuje se vnitřní odpor článku a ten má za následek snížení napětí článku.

$$U = U_e - R_i I \quad (5)$$

U_e [V] – elektromotorické napětí

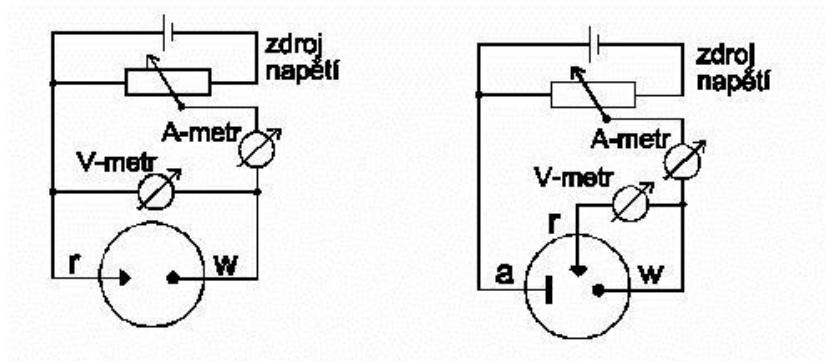
I [A] – elektrický proud

R_i [Ω] – vnitřní odpor

Elektrochemický článek může být zdrojem pouze jednosměrného proudu [2].

U voltametrických metod se měří závislost proudu, který protéká pracovní elektrodou, na potenciálu, který se mění v čase a vkládá se na tuto elektrodu z vnějšího zdroje. Velikost proudu, který protéká elektrodou, je funkcí jeho koncentrace.

$$I = f(cA) \quad (6)$$

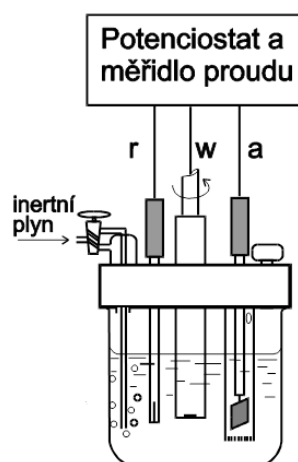


Obrázek 8 Zapojení elektrického obvodu využívaného při voltametrické analýze v dvouelektrodovém a třielektrodovém uspořádání experimentu [2]

Samotné měření probíhá ve voltametrické cele. Nejdůležitějšími částmi jsou elektrody, voltmetr a ampérmetr.

Elektrody jsou pracovní, referenční (srovnávací) nebo mohou být přítomny i elektrody pomocné. Jestliže je přítomna pouze elektroda pracovní a pomocná, nazývá se toto uspořádání dvouelektrodové. Pokud ale je současně přítomna i elektroda referenční, nazývá se toto uspořádání třielektrodové (obr. 8).

Voltmetr je další důležitou částí voltametrické cely a měříme jím napětí, které je vkládáno na pracovní a referenční elektrodu (obr. 9). Přítomný proud, který prochází článkem je naopak měřen ampérmetrem [13].



Obrázek 9 Příklad realizace voltametrické nádoby [27]

U voltametrie se záznam z měření nazývá voltamogram – závislost proudu protékajícího soustavou na vloženém napětí. Změřený signál má poté tvar píku a jsme schopni z něj vyčíst koncentraci zkoumaného vzorku.

2.2.1 Typy elektrod

- Referenční elektrody

Tyto elektrody slouží ke srovnávání měření a lze podle nich nastavovat i potenciál pro pracovní elektrody. Důležité je uchovávat argentchloridovou elektrodu v roztoku KCl, nesmí totiž vyschnout.

-argentochloridová (obr. 10)

-kalomelová

- Pomocné elektrody

Tyto elektrody jsou do určitého potenciálu a proudu elektrochemicky neaktivní a velmi dobře vodivé.

-platina (drátek, plíšek)

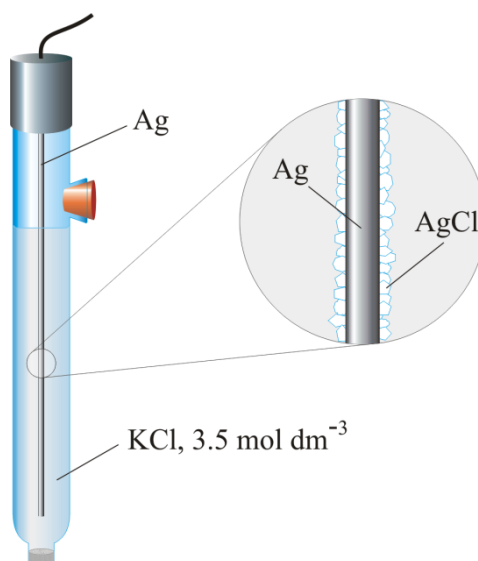
-uhlík

- Pracovní elektrody

Elektrody mohou mít různý tvar, jako je například disk, plíšek, drátek, vlákno nebo kapka. Tyto elektrody se vyrábí z různých materiálů. Platinovou a zlatou elektrodu lze v roztoku HClO_4 polarizovat až k potenciálu +1,5 V.

-rtuťová kapková

- elektrody z tuhých inertních materiálů
- uhlíková (tělo plněné uhlíkovou pastou)
- zlatá, platinová [14].



Obrázek 10 Argentchloridová elektroda [28]

Rtuťová kapková elektroda

Tato elektroda je nejčastěji využívaná v metodě polarografie, můžeme se s ní setkat ale i ve voltametrii. Je používána jako pracovní katoda. Jak z názvu vyplývá, rtuť je důležitou součástí elektrody a je přiváděna kapilárou z rezervoáru do analyzovaného roztoku. Rtuť je kontrolována a kape do roztoku po kapkách v intervalu 2-5 sekund. Elektrodu lze v průběhu měření polarizovat z důvodu značného přepětí vodíku.

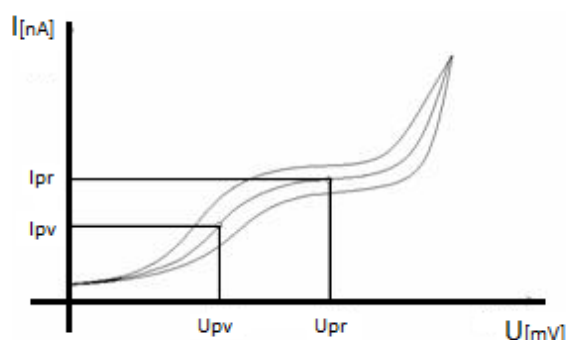
Platinová elektroda

U těchto elektrod dochází k vylučování vodíku při malém negativním potenciálu, přičemž s rostoucím pH se použitelná oblast posunuje k negativnějším potenciálům.

Velmi podobné využití mají i zlaté elektrody [6].

2.2.2 Cyklická voltametrie

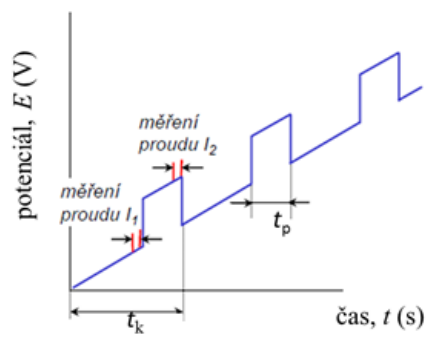
Cyklická voltametrie se řadí mezi důležité dynamické voltametrické metody, u kterých hraje velkou roli čas. Je to z důvodu rychlé a lineární změny potenciálu. Touto změnou je myšlen plynulý nárůst potenciálu pracovní elektrody z jedné mezní hodnoty do druhé a poté klesání potenciálu do výchozího stavu. Tento cyklus se může i několikrát opakovat, proto tato metoda nese název „cyklická voltametrie“. Průměrná rychlost změn potenciálu se pohybuje od 20 mV/s do 1 V/s a závisí hlavně na ploše elektrody [15]. Grafem závislosti proudu na potenciálu je voltamogram (obr. 11).



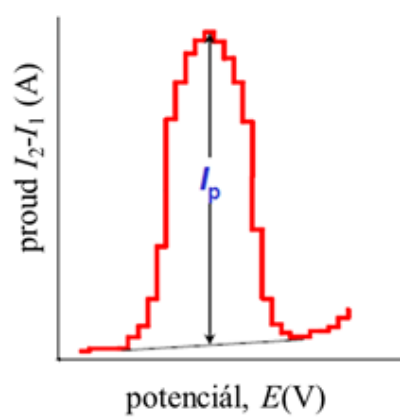
Obrázek 11 Voltamogram z cyklické voltametrie [15]

2.2.3 Diferenční pulzní voltametrie

Při této metodě je potenciál lineárně s časem měněn přikládáním napěťovým pulsem o amplitudě 10 mV až 100 mV a době trvání řádově desítek ms (obr. 12). Napěťový pulz je aplikován ke konci doby života kapky, která je řízena elektronicky klepátkem. Registruje se rozdíl proudů změřených těsně před vložením pulzu a na jeho konci mezi pracovní (Hg) a pomocnou (Pt) elektrodu. Závislost rozdílu proudů na potenciálu prochází maximem, má tvar píku (obr. 13). Poloha píku na potenciálové ose je dána kvalitou analytu, jeho výška závisí na koncentraci [29].



Obrázek 12 Charakter vkládaného potenciálu [29]



Obrázek 13 Registrovaná polarizační křivka při DPV [29]

3 Senzory

Všechny senzory můžeme zjednodušeně popsat jako technické zařízení, které je schopno změřit potřebnou fyzikální, chemickou nebo biologickou veličinu a poté ji automaticky převést na veličinu měřící (signál). Dle transformace signálu můžeme senzory rozdělit na aktivní nebo pasivní. Aktivní sensor se jeví jako zdroj elektrické energie při působení snímané veličiny. Naopak pasivní senzory je nutno napájet.

Senzory musí mít vysoký stupeň citlivosti (hlavně v případě, že měří velmi malé změny) a dynamický rozsah. Název sensor můžeme nahradit pojmem snímač, detektor nebo převodník. Každý sensor má svou citlivou část, která se nazývá čidlo. Senzory jsou každodenně používány například ve formě dotykových tlačítek ve výtahu, v autech, strojích, letadlech, v medicíně nebo v robotice. Celosvětový technologický pokrok stále více umožňuje vyrábět senzory v mikroskopickém měřítku, ve většině případů totiž mikrosenzory mohou dosahovat podstatně vyšší rychlosti a citlivosti ve srovnání s makroskopickými senzory [16].

Rozdělení sensorů

1. Dle měřené veličiny:

- senzory teploty
- senzory tlaku
- senzory polohy
- senzory rychlosti
- senzory elektrické

2. Dle fyzikálního principu:

- senzory indukční
- senzory kapacitní
- senzory odporové
- senzory piezoelektrické

3. Dle výrobních technologií:

- senzory pneumatické
- senzory elektronické
- senzory elektrochemické
- senzory polovodičové
- senzory optoelektronické [16].

3.1 Biosenzory

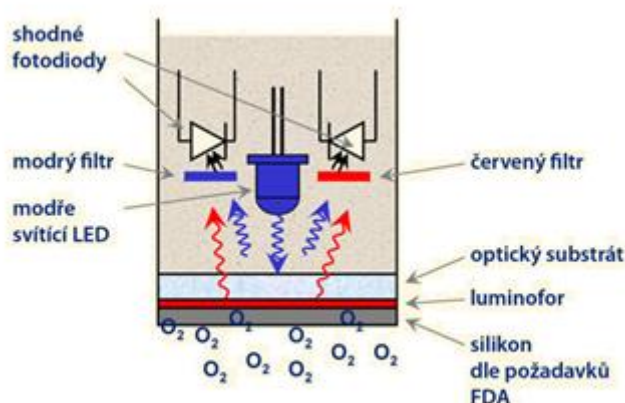
V biotechnologiích a v biomedicině se vyskytují čidla, která jsou schopna detekovat biologické složky, jako jsou například buňky, bílkoviny, nukleové kyseliny nebo polymery. Těmto čidlům se říká biosenzory [17].

U biosenzorů dochází ke spojení určité biochemické látky, například enzymu, s elektrickými obvody. Jsou tedy založeny na biochemických reakcích. Kromě receptoru a převodníku tedy navíc biosenzory obsahují i bioreceptor, který zajišťuje afinitu k analyzované látce a zlepšuje její detekci. V praxi se biosenzory využívají hlavně k izolaci specifického analytu ze vzorku pomocí paramagnetických částic při výrobě penicilinu, v potravinářství, v detekci biologických bojových látek, v lékařské technice, apod. Doba odezvy se pohybuje od 10 sekund až do 10 minut.

Biosenzory, podle použitých převodníků, rozdělujeme na elektrochemické, optické, kalorimetrické a piezoelektrické [18].

3.1.1 Optické biosenzory

Optické biosenzory jsou takové přístroje, které využívají vlastností elektromagnetických vln. Tyto vlny interagují s chemickými látkami a v konečném důsledku měřený vzorek protéká podél tenké zlaté vrstvy, na jejímž povrchu jsou molekuly cíleně zachycovány. Tyto molekuly poté způsobují změnu indexu lomu. Tato změna je měřena pomocí elektromagnetické vlny, která se pohybuje těsně podél povrchu zlaté vrstvy [19]. Struktura optického senzoru je vyobrazena na obr. 14.



Obrázek 14 Schéma optického senzoru [19]

Piezelektrické biosenzory

Tyto biosenzory využívají vibrační piezelektrického krystalu v elektrickém poli. Vibrace se mění v závislosti na tloušťce krystalu. Někdy se můžeme setkat i s názvem hmotnostní biosenzory [20].

3.1.2 Elektrochemické senzory

Obecně můžeme říct, že chemický senzor je element, který snímá určitou chemickou vlastnost a převádí ji na signál, vhodný k měření a interpretaci. Jsou to tedy převodníky, které nás informují o chemickém složení zkoumaného vzorku.

Tyto senzory pracují na principu elektrochemických reakcí, které nastávají na určité elektrodě v daném elektrolytu [17]. Dle měřené techniky je můžeme dále dělit na konduktometrické, potenciometrické a amperometrické.

Potenciometrické biosenzory

Jsou založeny na měření změny potenciálu, která je vyvolaná akumulací náboje na rozhraní elektrody s roztokem, při nulovém proudu [19][20].

Konduktometrické biosenzory

Jejich základem je stanovení změn v konduktanci a v impedanci, a to v důsledku změn, které byly vyvolány náboji v daném prostředí [20].

Amperometrické biosenzory

Tyto biosenzory jsou z elektrochemických biosenzorů nejvíce využívány v elektrochemii. Poskytují jako signál proud, který vzniká elektrochemickou reakcí, přičemž napětí na pracovní elektrodě je konstantní.

Výhodou je rychlá odezva a vysoká citlivost i selektivita [19].

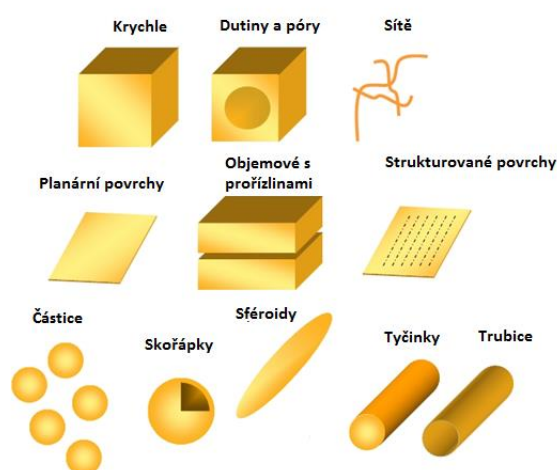
4 Nanostruktury

Název „nanostruktura“ obsahuje předponu „nano“, což je definováno jako 0,000000001 celku (10^{-9}). Pro srovnání jeden nanometr je roven asi jedné miliontině velikosti hlavičky špendlíku. Pod pojmem nanostruktura si tedy můžeme představit materiál, který se skládá ze stavebních jednotek, nazývaných nanočástice, jejichž velikost je v rozmezí desítek až stovek nanometrů. Na povrchu jejich struktur se nachází mnohem méně atomů, než uvnitř struktury, a tím pádem vytváří méně vazeb. Tato skutečnost ovlivňuje jak jejich chemické, tak i fyzikální vlastnosti. Z tohoto důvodu se nanočástice řídí zákony kvantové fyziky. S příchodem nanostruktur přišel i velký vývoj nanotechnologií [21].

4.1 Nanotechnologie

Obecně se jako nanotechnologie označuje technický obor, který se zabývá výrobou materiálů velikostí 10^{-9} metru. Pro srovnání je to asi jedna tisícina tloušťky lidského vlasu. V dnešní době se s nanotechnologiemi můžeme setkat skoro všude. Vyskytují se v pneumatikách automobilů, tenisových raketách, zubních pastách, oblečení, v CD přehrávačích, atd. Nanostrukturované částice se vyskytují v různých tvarech, které jsou znázorněny na obr. 15.

A z jakého důvodu se vůbec využívají? Nanostruktury mají vynikající vlastnosti, jsou menší, lehčí, levnější a odolnější. Jak je ale možné, že malý je současně výkonný? Je to způsobeno tím, že čím menší produkt, tím je vyšší poměr mezi povrchem a jeho mohutností. Na rozhraní povrchů se odehrávají různé chemické reakce. Nanomateriály tedy budou více reaktivní než materiály vyrobené z větších částic. Výsledkem tohoto vývoje by tedy mohly být citlivější a výkonnější senzory [22].



Obrázek 15 Tvary nanostruktur [30]

4.2 Zlaté nanočástice

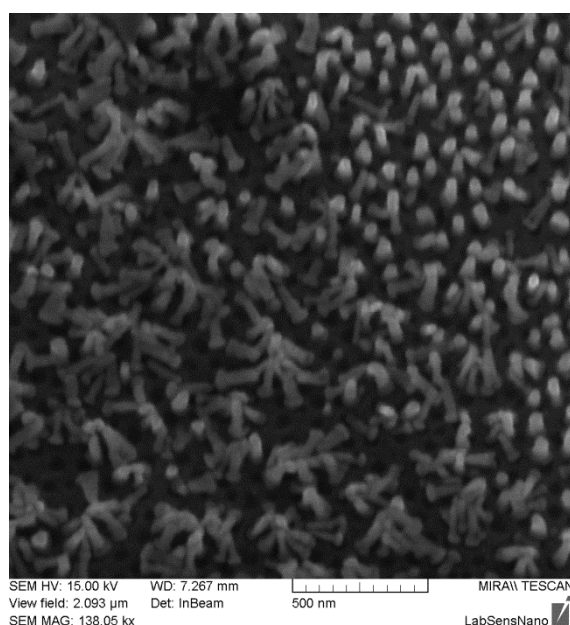
V současné době se v mnoha oblastech nanotechnologií začaly využívat zlaté nanočástice hlavně díky jejich výborným vlastnostem. Na tyto zlaté nanočástice mohou být navázány různé biomolekuly, jako jsou protilátky nebo nukleové kyseliny. S tím souvisí i jejich velikost, která se pohybuje od 1 až do 100 nm. Co se vlastností týče, mají výborné optické a elektrické vlastnosti, dále je to jejich lesk, díky kterému můžou odrážet záření ze svého povrchu.

V biologických aplikacích se nanočástice velmi často spojují se specifickými rozpoznávacími molekulami, v našem případě je to biotin.

4.3 Nanostrukturované elektrody

Pro modifikaci elektrodových povrchů mohou být použity také kovové nanostruktury („nanostrukturované elektrody“). Mezi nanostrukturované elektrody se řadí takové elektrody, jejichž geometrický rozměr dosahuje velmi malých rozměrů.

Výroba spočívá v pokovování porézních membrán, dále následuje elektrodepozice kovu, který prorůstá póry použité membrány. Tato membrána po svém rozpuštění uvolní vytvořené nanostrukturní systémy, jako jsou nanotyčinky, nanotrubičky, atd. (obr. 16). Typ vybrané struktury závisí na rozměrech póru a na elektrodě [22].



Obrázek 16 SEM-snímek zlatých nanotyčinek

Srovnání použití mikroelektrod a jejich vlastnosti

Použití mikroelektrod má řadu výhod. Především jsou schopné detekovat i ve velmi malých prostorech. Toho se využívá u mikroseparačních metod a u *in vivo* měřeních v organismu. Mají také schopnost detekovat i v málo vodivých prostředích, a to díky zanedbatelných úbytků napětí na odporu, z důvodu malých proudů protékajících mikroelektrodami. Při samotném měření dochází k výraznému růstu podílu signál/šum a lze u nich rychle měnit jejich potenciál. V neposlední řadě proud, který teče souborem mikroelektrod, je větší než suma proudů, které tečou souborem izolovaných elektrod [23].

Hlavní důvod použití nanostrukturovaných elektrod je jejich nanostrukturovaný povrch, který je velmi citlivý a ve srovnání s mikroelektrodami podstatně větší, analyt tedy může reagovat na daleko větší ploše. Tyto elektrody jsou využívány v elektroanalytické chemii, a to nejen pro jejich malé rozměry, ale hlavně pro jejich specifické chování [22].

5 Biomolekuly

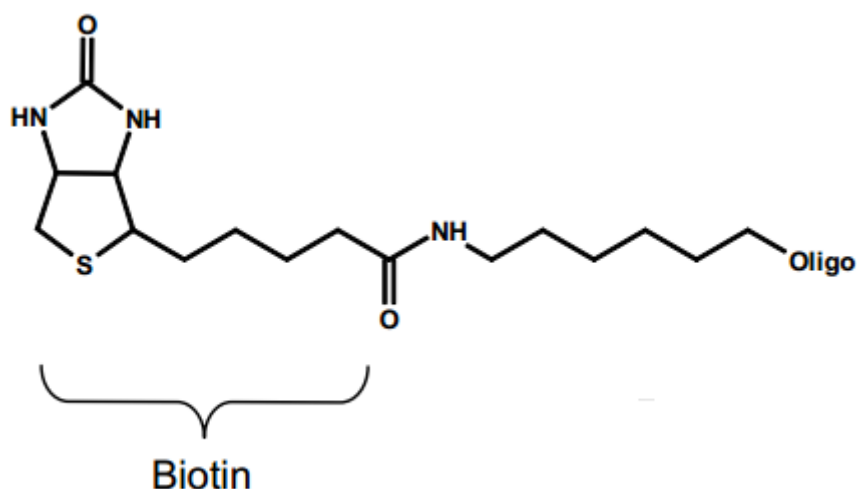
Biomolekuly jsou chemické sloučeniny, které se vyskytují v živých organismech. Jsou to jak velké makromolekuly (proteiny, polysacharidy, lipidy, nukleové kyseliny), tak i malé molekuly (primární a sekundární metabolity, přírodní produkty). Jiný název pro tuto skupinu sloučenin jsou biogenní látky. Skládají se z různých prvků, jako je dusík, kyslík, síra, fosfor a další. Největší zastoupení má však uhlík a vodík [24].

5.1 Biotin-modifikované oligonukleotidy

Biotin neboli vitamin H, či vitamin B7, je malá biologicky aktivní molekula s molekulovou hmotností 244,31 g/mol. Působí jako koenzym v živých buňkách. Vysokou afinitu k biotinu vykazují proteiny avidin a streptavidin (10-15 mol/l). Je ve vodě rozpustný a z chemického hlediska se jedná o kondenzát močoviny a thiofenu.

Sumární vzorec: $C_{10}H_{16}N_2O_3S$ (chemická struktura zobrazena na obr. 17).

Všechny biotin-modifikované oligonukleotidy jsou široce používány k různým chemickým i fyzikálním testům [24].



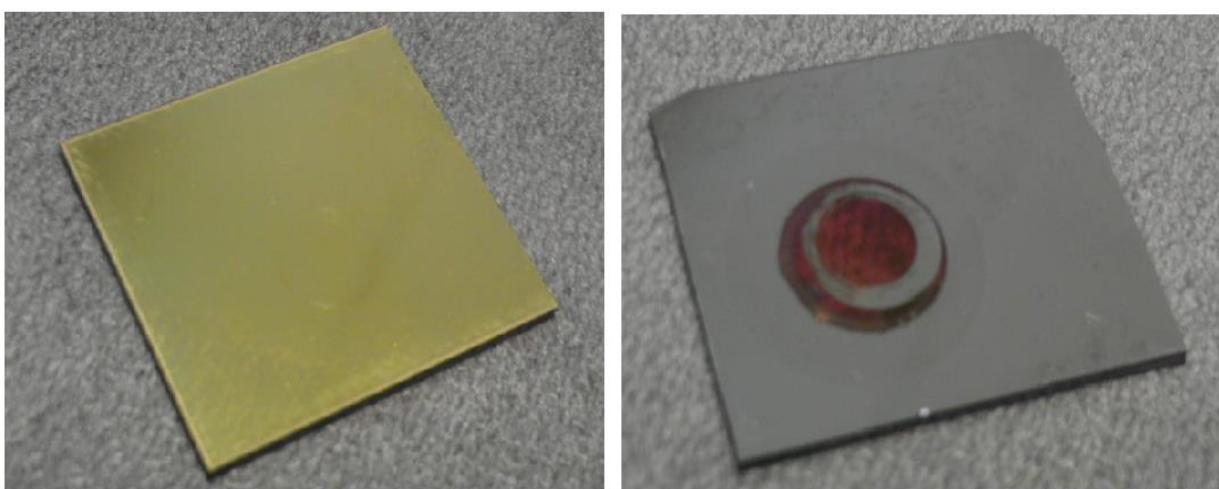
Obrázek 17 Chemická struktura molekuly biotin-modifikovaného oligonukleotidu [31]

6 Praktická část

6.1 Elektrody

Cílem této práce je navázání biotinu na čisté zlaté elektrody a na nanostrukturované elektrody. V průběhu měření však došlo ke změně látky, a to z biotinu na glutation, z důvodu snadnějšího a levnějšího testování akumulací. Postup měření zůstal nezměněn.

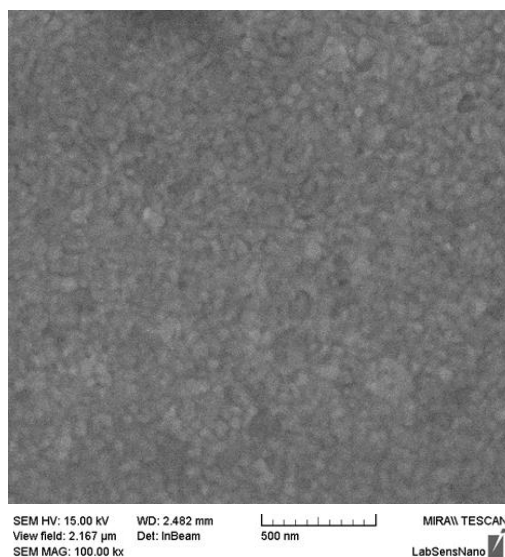
Nejdříve jsou čisté zlaté elektrody a elektrody nanostrukturované vystaveny akumulaci biotinu (glutationu) a poté probíhá jejich měření ve fosfátovém pufru metodou cyklické voltametrie a elektrochemické impedanční spektroskopie.



Obrázek 18 Použité zlaté naprášené elektrody a nanostrukturované zlaté elektrody

6.1.1 Výroba čistých zlatých elektrod

Základem je křemíkový substrát N-typu Na něj je nanесena vrstva nikl-chromu (NiCr) (20 nm) a poslední vrstvou je napařená vrstvička zlata (200 nm). Pohled na strukturu zlaté elektrody v elektronovém mikroskopu Tescan MIRA LMU II. je zobrazen na obr. 19.



Obrázek 19 SEM-snímek napařené zlaté elektrody

6.1.2 Výroba nanostrukturovaných elektrod

Základem pro výrobu nanostrukturovaných elektrod byl wafer, který měl křemíkový základ (500 nm). Na něj byla nanесena adhezni vrstva titanu (20 nm), dále pak vrstva wolframu (200 nm) a nakonec jako substrát pro vytvoření porézní masky hliníková vrstva (200 nm).

Prvním krokem výroby byla anodická oxidace (anodizace) metalické multivrstvy Al/W 0,3 M kyselinou šťavelovou při teplotě 17 °C, konstantním potenciálu 40 V a proměnném proudu. Tím se postupně vytvořila porézní maska Al₂O₃. Pro odleptání vzniklých WO₃ struktur se wafer ponořil na 12 minut do 25 °C fosfátového pufru o pH 7. Pro zjištění správnosti depozice se vzorek vloží do elektronového mikroskopu a zkontroluje se struktura elektrody.

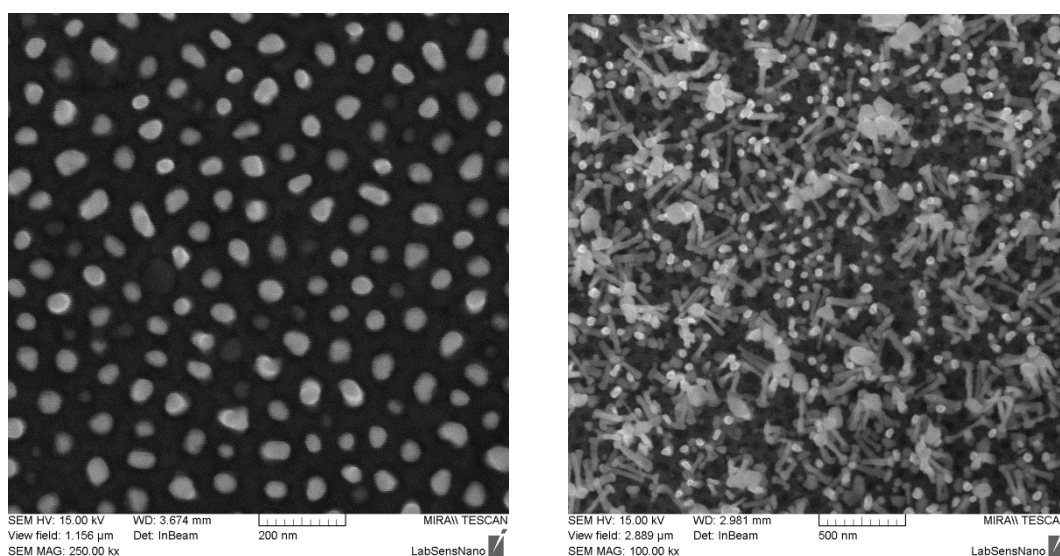
Dále následovala depozice zlata (0,6 g K[Au(CN)₂] + 0,232 g H₃BO₃ + 100 ml demineralizované vody (dále jen demi)).

Posledním krokem bylo odleptání porézní masky v předem připraveném leptadle o teplotě asi 65 °C a opět kontrola struktur v elektronovém mikroskopu (obr. 20).

Příprava leptadla k odleptání porézní masky

K přípravě leptadla, které bylo využito v posledním kroku výroby nanostruktur k odleptání porézní masky, bylo potřeba 3 g oxidu chromového (CrO₃) a 5 ml kyseliny fosforečné (H₃PO₄). Obě látky byly smíchány se 100 ml demi vody.

Na levém obrázku (obr. 20) je zobrazen pohled na zlaté nanotyčinky rovnoměrně uspořádané po celém povrchu elektrody. Pravý snímek zobrazuje zmíněnou velikost a strukturu nanotyčinek po mechanickém působení proudem vody při oplachu.

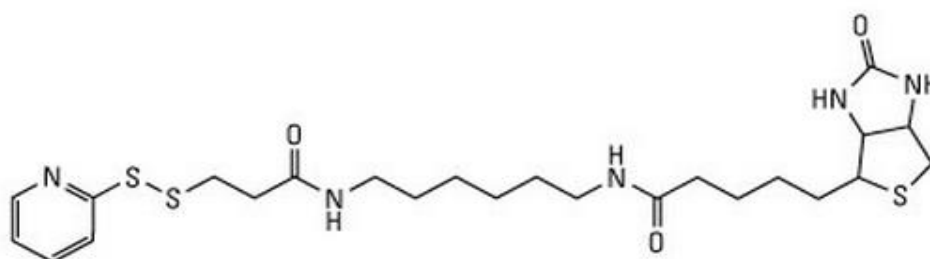


Obrázek 20 SEM-snímek zlaté nanostrukturované elektrody

6.2 Materiál

6.2.1 Roztok biotinu

Biotin-HPDP je bílý prášek vhodný k označování proteinů a dalších molekul, které obsahují sulfhydrylové (-SH) skupiny (obr. 21). Skladovací podmínky jsou při 4°C.



Obrázek 21 Chemická struktura biotin-HPDP [32]

Příprava roztoku biotin-HPDP

1 mg biotin-HPDP (výrobce CLONESTAR, uchovávání při -20 °C) bylo naváženo a poté rozpuštěno v 8 ml dimethylformamidu (DMF). Pro lepší a rychlejší rozpuštění je směs dána

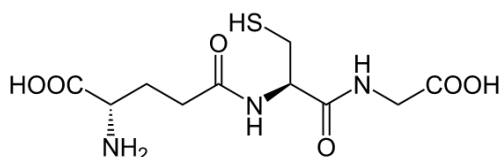
do ultrazvukové lázně na 3 minuty při teplotě 45 °C. Potom je mechanicky promíchána a následně je přidáno 5 μ l butylfosfinu. Reakce butylfosfinu se směsí trvala 30 minut.

Mezi tím byla připravena směs vody a etanolu. Objem této směsi byl 8 ml, smíchán v poměru 1:1 (4 ml vody : 4 ml etanolu) Po uplynutí výše uvedených 30 minut, byl přidán roztok do připravené směsi biotinu.

Roztok glutationu

V následujícím měření byla použita jiná biologická látka, a to především z toho důvodu, že pro tak širokou škálu experimentů a testování Au na thiolové vazby je biotin příliš drahý. Zvolenou náhradní látkou byl glutation, který ve všech praktických měřeních vykazoval lepší chemické vlastnosti než výše zmiňovaný biotin. Následující postup měření, ale i přes změnu navazující látky, zůstal nezměněn.

Glutation je přírodní látka, kterou můžeme nalézt jak v ovoci a mase, tak i v buňkách bakterií, rostlin a živočichů. Stejně jako biotin, i glutation je bílý prášek velmi dobře rozpustný ve vodě (chemická struktura na obr. 22).



Obrázek 22 Chemická struktura molekuly glutationu [33]

Příprava roztoku glutationu

Akumulovací roztok byl připraven z 0,033 g práškového glutationu ($M_r = 307,33$ g/mol, mp 192-195 °C, výrobce SIGMA) a 100 ml demi vody. Dané látky byly smíchány a výsledný roztok měl koncentraci 0,001 M.

6.2.2 Fosfátový pufr

Příprava fosfátového pufru o pH 7,5

K přípravě byl potřeba dihydrogenfosforečnan sodný ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a hydrogenfosforečnan sodný ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

1,5601g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ bylo smícháno se 100 ml demi vody a následně odebráno z výsledné směsi 19 ml. 1,7799g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ bylo také smícháno se 100 ml demi vody

a z výsledné směsi odebráno 81 ml. 81 ml bylo smícháno s 19 ml a poté doplněno do 200 ml demi vodou.

Příprava fosfátového pufru o pH 7

Fosfátový pufr, který má pH 7, byl používán při výrobě nanostruktur k odleptání vzniklých WO₃ struktur.

Pufr byl připraven z 0,1 M Na₂HPO₄ · 2H₂O (Mr = 177,99 g/mol), který se nechal rozpustit ve 100 ml demi vody a z 0,1 M KH₂PO₄ (Mr = 136,09 g/mol), který se také nechal rozpustit ve 100 ml demi vody. Výsledné roztoky byly poté smíchány v poměru 61:39.

6.2.3 Akumulace

Připravené elektrody byly ponořeny do roztoku glutationu a nechány akumulovat. Elektrody byly vytaženy po 24 hodinách a po 48 hodinách.

Následné měření však ukázalo, že výsledky akumulace po 24 hodinách a 48 hodinách byly poměrně stejné, proto se doba akumulace musela rozložit do více časových rozpětí. Elektrody se tedy nechaly akumulovat v glutationu po dobu 4 hodin, 8 hodin, 20 hodin, 24 hodin, 36 hodin a 48 hodin. Po vytažení z akumulovacího roztoku byly opláchnuty v destilované vodě a osušeny proudem vzduchu.

6.3 Měření

Vzorky byly měřeny elektrochemickou impedanční spektroskopií a cyklickou voltametrií pomocí přístroje MetroOhm μ AutoLab III. Samotné měření probíhalo v cele s tříelektrodovým zapojením. Jako elektroda referenční byla použita argentchloridová elektroda, pracovní elektroda byla platinová a pomocnou elektrodou byl měřený vzorek. Před každým měřením probíhal rychlý scan elektrod z důvodu jejich pročištění a minimalizace chyb při následném měření.

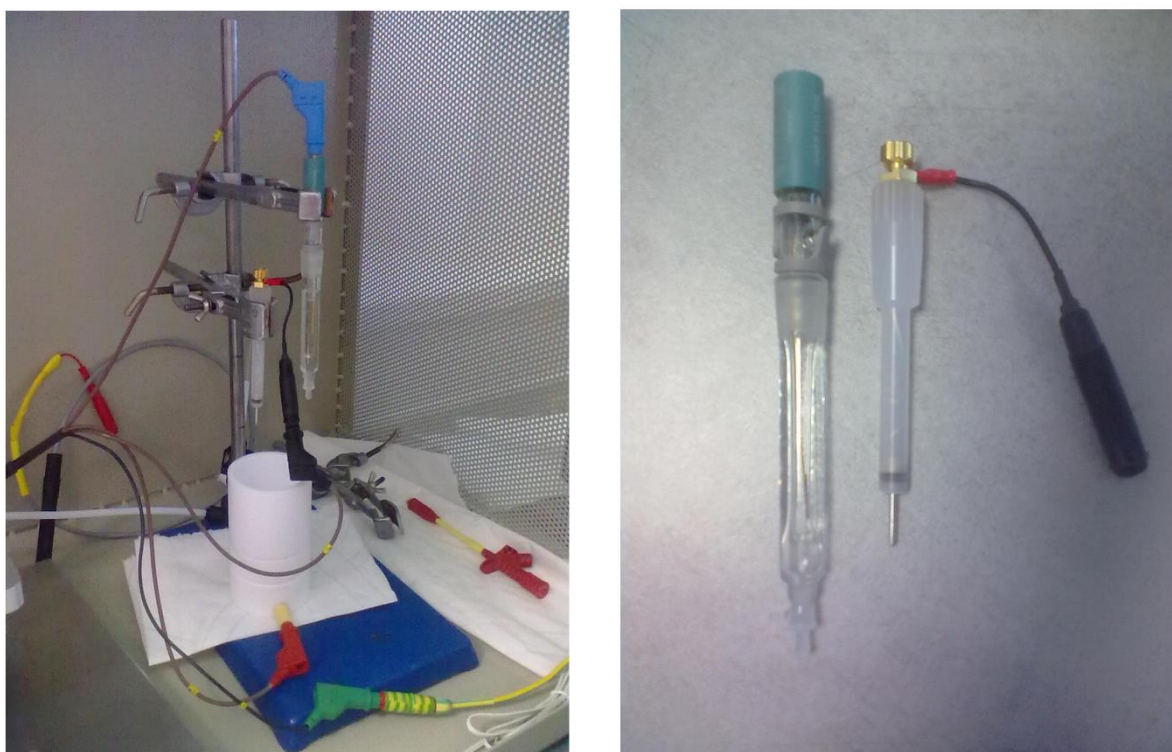
Měření impedanční spektroskopie

Rozsah frekvence byl nastaven od 1 Hz do 250 kHz, amplituda byla nastavena na 0,06 V, počet frekvencí byl 50 a integrační čas 0,125 s. Měření probíhalo na akumulovaných zlatých elektrodách a nanostrukturovaných elektrodách.

Měření cyklické voltametrie

Rozsah napětí byl nastaven od $-0,5\text{ V}$ do $0,5\text{ V}$, step potenciál $0,00244\text{ V}$ a skenovací rychlost $0,1\text{ V/s}$. Postup měření byl podobný jako u měření impedanční spektroskopie (akumulované zlaté elektrody a nanostrukturované elektrody).

Na obr. 23 je zobrazeno tříelektrodové zapojení, při kterém se měřila impedanční spektroskopie i cyklická voltametrie. Velikost elektrod musela být zvolena tak, aby odpovídala velikosti cely, v které bylo měřeno. Na vedlejším obrázku jsou dvě používané elektrody, elektroda argentschloridová (referenční) a elektroda platinová (pomocná).



Obrázek 23 Cella s tříelektrodovým zapojením a použité elektrody (referenční a pracovní)

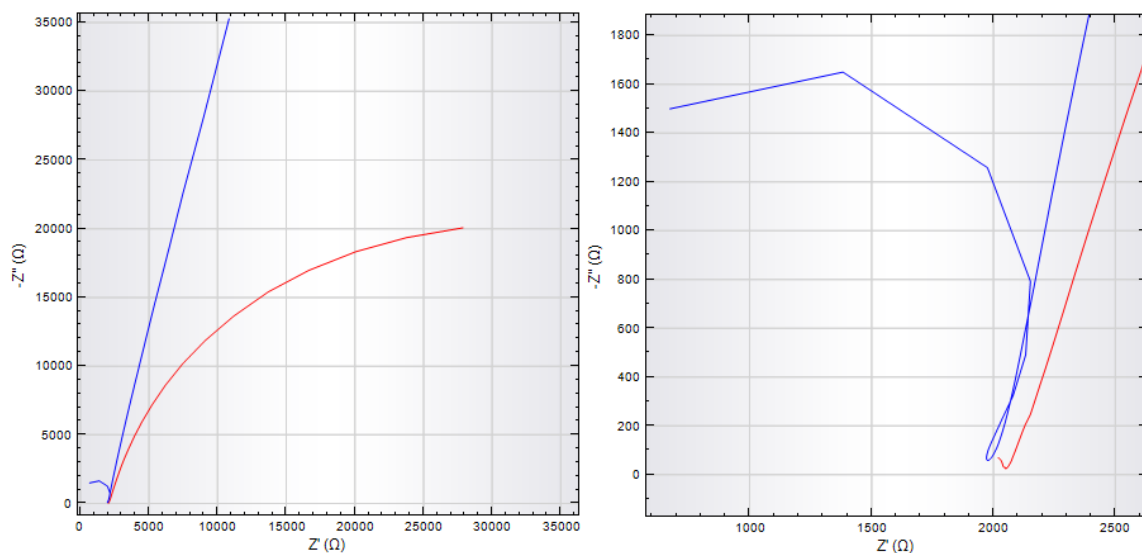
Celé pracoviště je zobrazeno na obr. 24. Součástí je přístroj MetroOhm Autolab, Faradayova klec a zobrazovací zařízení s programem NOVA 1.9. Faradayova klec slouží při měření k tomu, že minimalizuje nebo dokonce ruší působení elektrostatického pole uvnitř klece. Tím nedochází k chybnému měření způsobeného vnějším okolím.



Obrázek 24 Příklad přístroje MetroOhm Autolab, Faradayova klec a zobrazovací zařízení

6.4 Výsledky a diskuze

Prvním krokem v měření bylo srovnání zlaté elektrody a nanostrukturované elektrody bez akumulace. Výsledky nám ukázaly, že čistá zlatá elektroda má standardní průběh vzhledem k použití vysoce vodivého pufru (obr. 25). Naopak u elektrody nanostrukturované je zřetelný fázový posun do difuzní části. Je rovněž zřetelný (viz detail) zanedbatelný vliv dvojvrstvy, avšak je patrný velký vliv sekundární kapacity, kterou vytváří nanostruktura na povrchu elektrody.



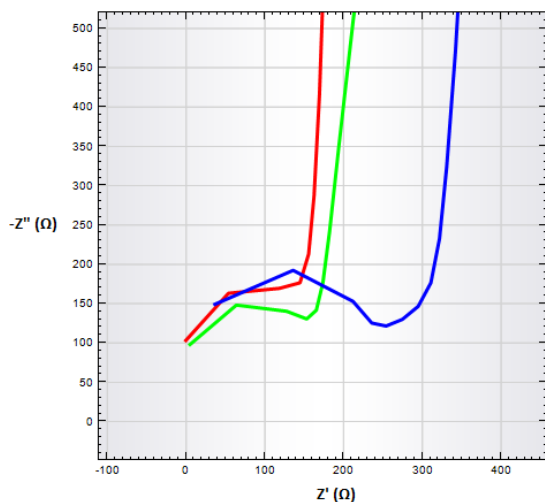
Obrázek 25 Srovnání elektrochemické impedančních spekter u čisté zlaté elektrody (modrá) a u nanostrukturované elektrody (červená)

Na obr. 26 je zobrazen průběh impedance zlaté elektrody (modrá barva), akumulované elektrody po 24 hodinách (zelená barva) a akumulované elektrody po 48 hodinách (červené barva).

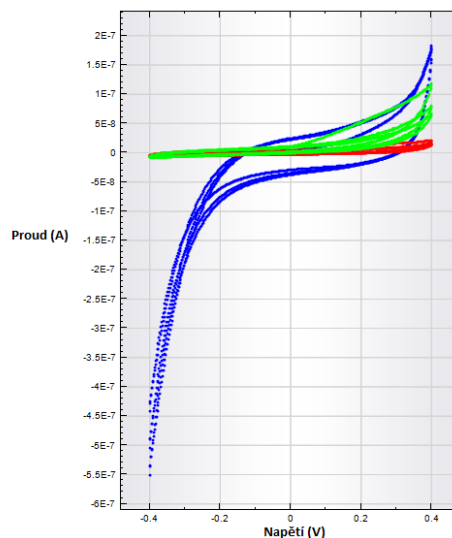
Z obr. 26 je patrné, že po akumulaci biotinu došlo ke snížení impedance. Rozdíl mezi akumulací po 24 hodinách a 48 hodinách není veliký. V dalších měřeních je nutno dobu akumulace snížit na hodiny.

Na obr. 27 jde vidět, že akumulovaný biotin má vliv na procházející proud. Ten postupně klesá a roste odpor. Zde je vidět mnohem patrněji rozdíl mezi jednotlivými elektrodami s různou dobou akumulace. Jejich vliv na proudovou odezvu v daném potenciálovém okně je výrazný a je zde patrný impedančně-kapacitní vliv vrstvy akumulovaného biotinu.

Další měření už probíhalo na nově vyrobených zlatých i nanostrukturovaných elektrodách, které měly rozdílnou dobu akumulace a místo biotinu byl použit glutation.



Obrázek 26 Elektrochemická impedanční spektroskopie

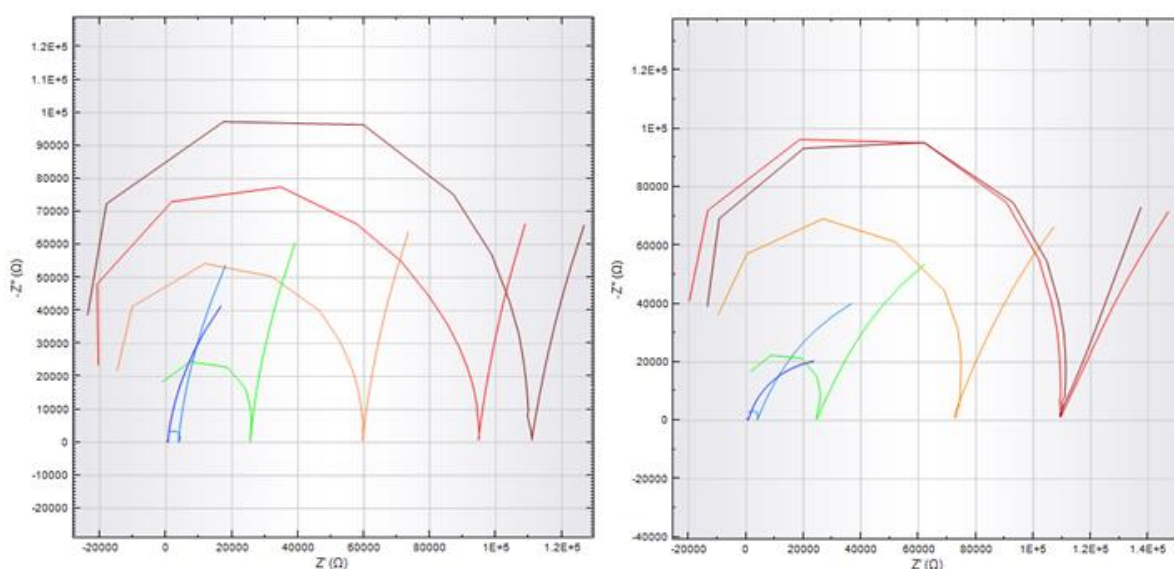


Obrázek 27 Voltametrie

Na obr. 28 je znázorněna EIS zlaté elektrody pro různé koncentrace fosfátového pufru. Měření probíhalo na jednom vzorku a postupovalo se vždy od pufru s nejnižší koncentrací k nejvyšší, z důvodu zabránění možné kontaminace pufru jeho koncentrovanější formou.

Tímto měřením jsme zjistili, že čím více koncentrovaný roztok použijeme, tím výrazněji můžeme pozorovat posun impedančního spektra k difuzní části. To znamená, že k přenosu náboje dochází rychleji. Naopak, u málo koncentrovaných roztoků, je v grafu zastoupena převážně půlkruhovitá část, která zobrazuje dominantní vliv kapacity dvojvrstvy, znázorňující pomalý přenos náboje. Při těchto malých koncentracích může ale docházet ke ztrátě informací, které nejsou při tak malých koncentracích detekovatelné.

Také u nanostrukturovaných elektrod jsme měřili EIS pro různě koncentrované roztoky. Výsledkem bylo, že čím méně koncentrovaný roztok použijeme, tím více se zvětší difuzní vrstva.

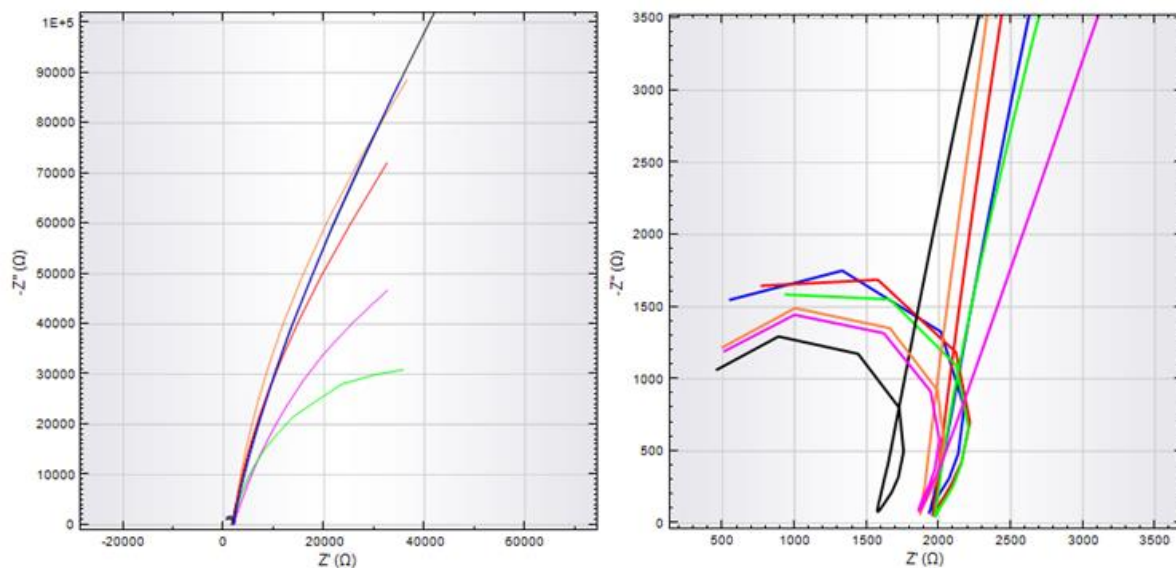


Obrázek 28 Graf závislosti impedance na koncentraci fosfátového pufru u čisté zlaté a nanostrukturované elektrody (0,5 M tmavě modrá; 0,05 M světle modrá; 0,005 M zelená; 0,0005 M oranžová; 0,00005 M červená a 0,000005 M hnědá)

Doby akumulace u zlatých elektrod byly zvoleny tak, aby čas následného vytažení z roztoku byl přijatelný. Následovalo postupné měření a srovnání výsledků.

Výsledné závislosti jsou poté vyneseny do grafu (obr. 29) a je zde patrné, že při delší akumulaci dochází k tomu, že vrstva glutationu na povrchu zlaté elektrody způsobuje rostoucí odpor a tím pádem se elektroda stává méně vodivou. Rozdíl mezi akumulací 4 hodinovou, 8 hodinovou a 20 hodinovou je veliký, avšak delší akumulace už nemá tak veliký vliv na odpor. Z toho vyplývá, že glutation se navazuje na povrch zlaté elektrody jen do určitého

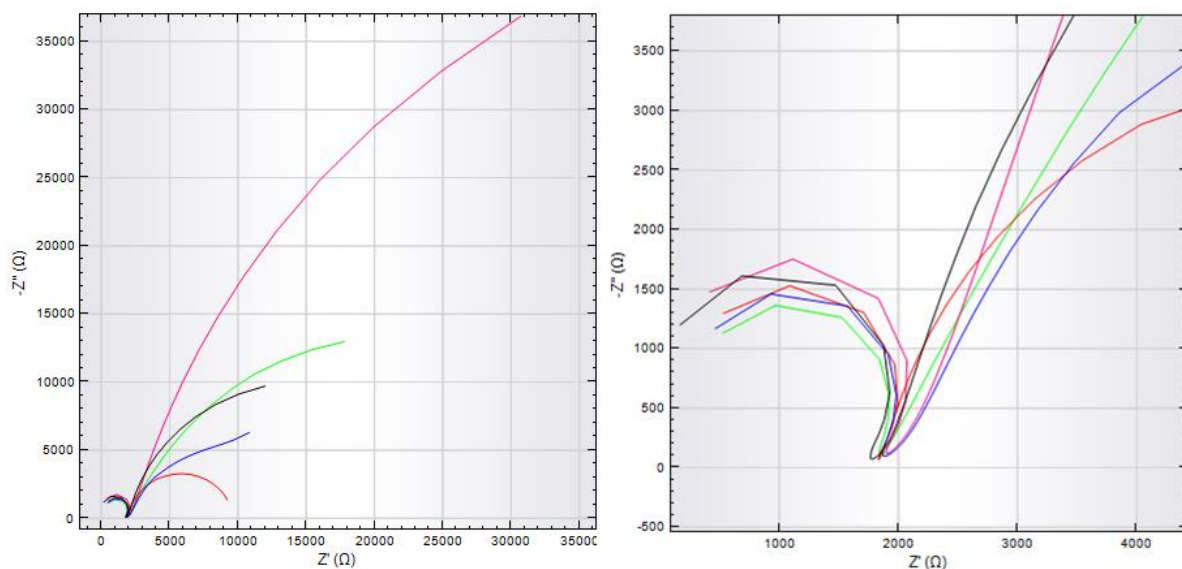
počtu vrstev, potom už k dalšímu navázání nedochází. Můžeme tedy říct, že delší doba akumulace, než je 48 hodin, by neměla už žádný další vliv na růst odporu.



Obrázek 29 Elektrochemická impedanční spektroskopie u zlatých elektrod (4h zelená, 8h fialové, 20h červená, 24h modrá, 36h oranžová, 48h černá)

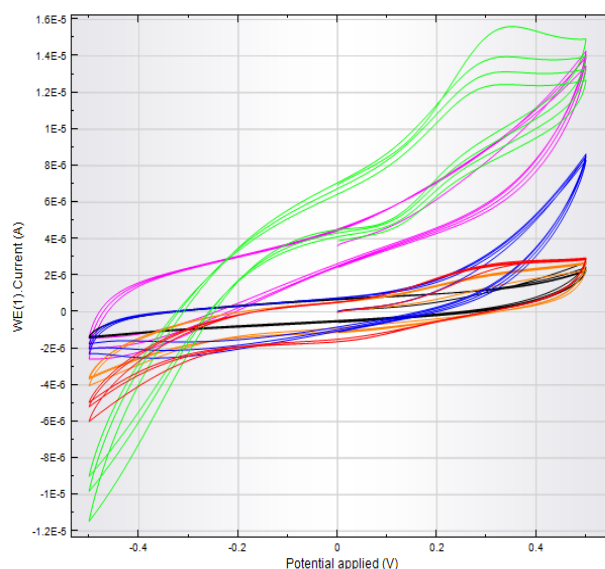
Stejně jako u zlatých elektrod, se postupovalo i u elektrod nanostrukturovaných. Po změření impedance jsou hodnoty opět vyneseny do grafu (obr. 30).

Můžeme vidět, že při kratší době akumulace (4 hodiny) dochází k vytvoření první vrstvy glutationu, která je pouze na špičkách tyčinek. Při delší akumulaci (8 hodin) dochází k vyplnění kanálků a k dalšímu navazování dochází po celém ploše elektrody, tedy i v kanálcích. Vytvoří se nekompaktní vrstva, která je zpočátku dobře vodivá, díky volným elektronům a OH skupinám na glutationu. Avšak při delší akumulaci (>20 hodin) dochází k růstu vrstvy glutationu a tím i k růstu odporu celé elektrody.



Obrázek 30 Elektrochemická impedanční spektroskopie u nanostrukturovaných elektrod (4h zelená, 8h fialové, 20h červená, 24h modrá, 48h černá)

Na obr. 31 je zobrazena cyklická voltametrie zlatých elektrod, které byly ponechány rozdílné době akumulace. Na grafu je vidět výrazný rozdíl v růstu odporu mezi kratší akumulací a delší akumulací. Akumulace glutationu má velký vliv na procházející proud, který klesá s rostoucí dobou akumulace. Tím dochází k růstu odporu a můžeme říct, že elektrody mají impedančně-kapacitní charakter.

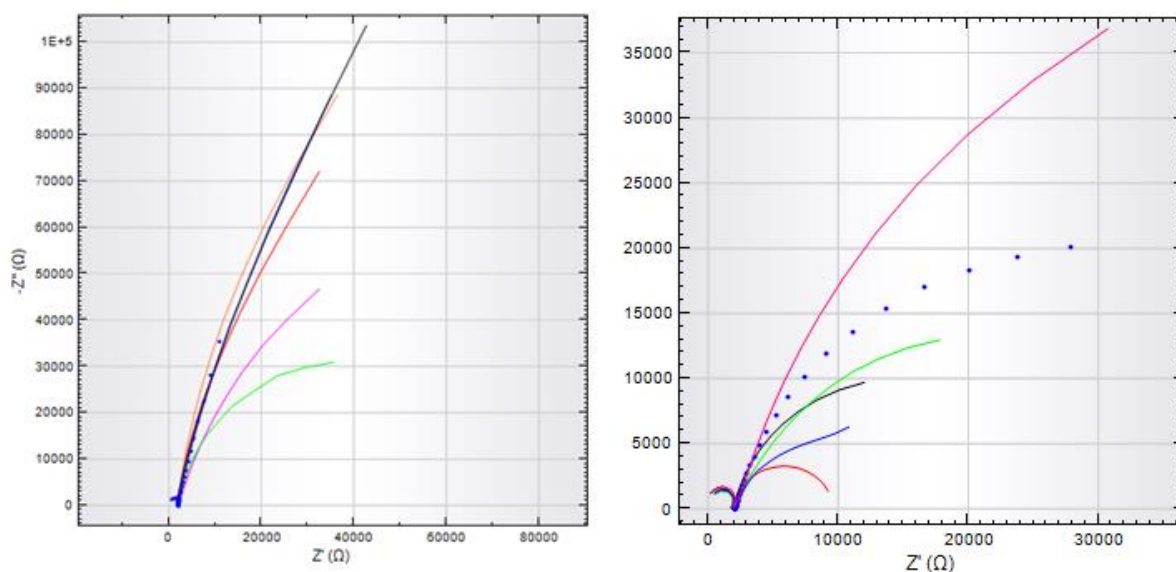


Obrázek 31 Cyklická voltametrie u zlatých elektrod (4h zelená, 8h fialové, 20h červená, 24h modrá, 36h oranžová, 48h černá)

Na obr. 32 je zobrazeno srovnání akumulovaných elektrod s elektrodami bez akumulace.

U zlatých elektrod je patrné, že navázaná vrstva po krátké akumulaci způsobuje vysokou vodivost elektrody. Při další akumulaci, tedy při vytváření dalších vrstev glutationu dochází k postupnému klesání vodivosti. To je způsobeno rostoucím odporem této vrstvy.

U elektrod s nanostrukturami dochází po akumulaci ke zvýšení vodivosti oproti čisté nanostrukturaře a to především u těch elektrod, které jsou ponechány akumulovat po delší časový úsek.

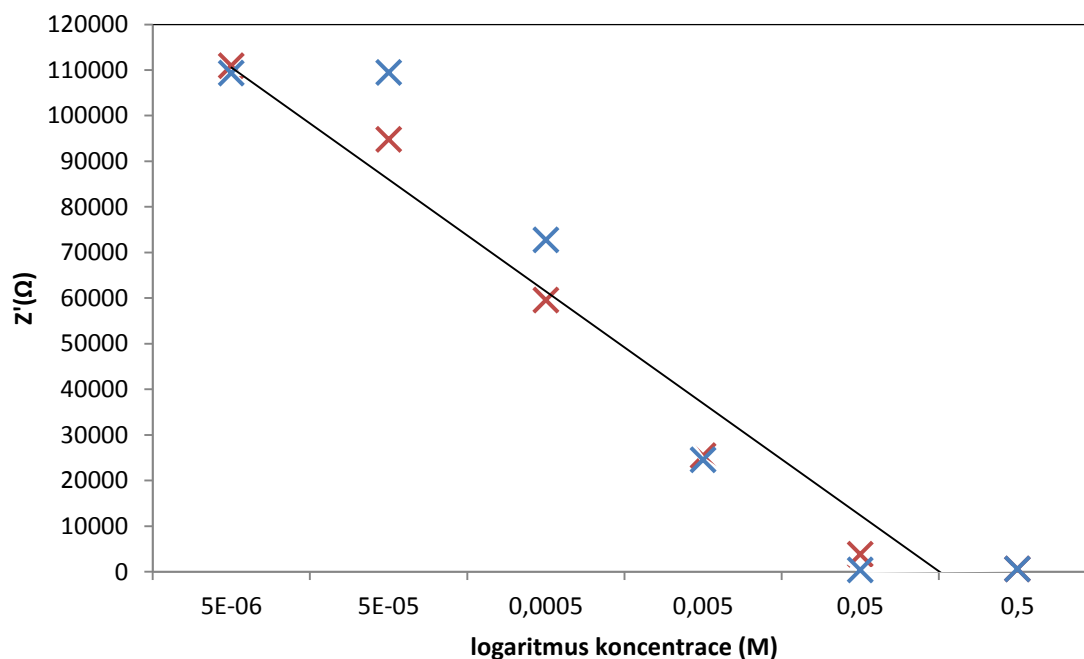


Obrázek 32 Elektrochemická impedanční spektroskopie s elektrodami bez akumulace u zlatých elektrod a nanostrukturovaných elektrod (4h zelená, 8h fialová, 20h červená, 24h modrá, 36h oranžová, 48h černá) se srovnáním elektrod bez akumulace (modrá tečkovaná)

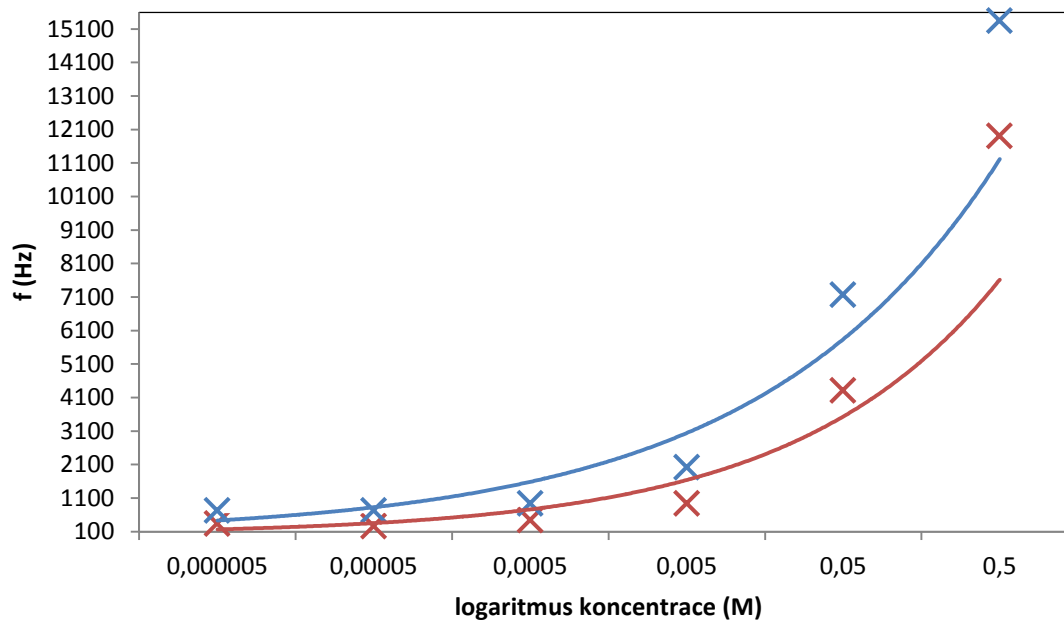
Graf (obr. 33) popisuje závislost impedance na různých koncentracích fosfátového pufru u zlatých elektrod a u nanostrukturovaných elektrod. Impedance u obou elektrod zřetelně klesá s rostoucí koncentrací fosfátového pufru. Klesající závislost je lineární. Bohužel dle očekávání se neprojevil pokles koeficientu RCT přímo úměrné hodnotě reálné složky impedance lokálního minima a při porovnání těchto parametrů se jeví obě struktury jako totožné.

Oproti tomu je na obr. 34 zobrazena závislost frekvence elektrody zlaté i nanostrukturované na různých koncentracích fosfátového pufru, kde je rozdíl mezi jednotlivými typy elektrod zřetelnější. Tato závislost je rostoucí exponenciální a vyjadřuje to, že s rostoucí koncentrací roztoku dochází k nelineárnímu posunu hodnoty frekvence lokálního minima impedančního spektra vyjadřující součet hodnot R_{CT} a R_s . Z grafu je patrné, že nanostrukturovaná elektroda má své lokální minima impedance na vyšších hodnotách

frekvence. Z toho vyplývá, že parametr R_{CT} bude u obou elektrod nabývat podobných hodnot a rozdíl lze najít v hodnotách C_{DL} .

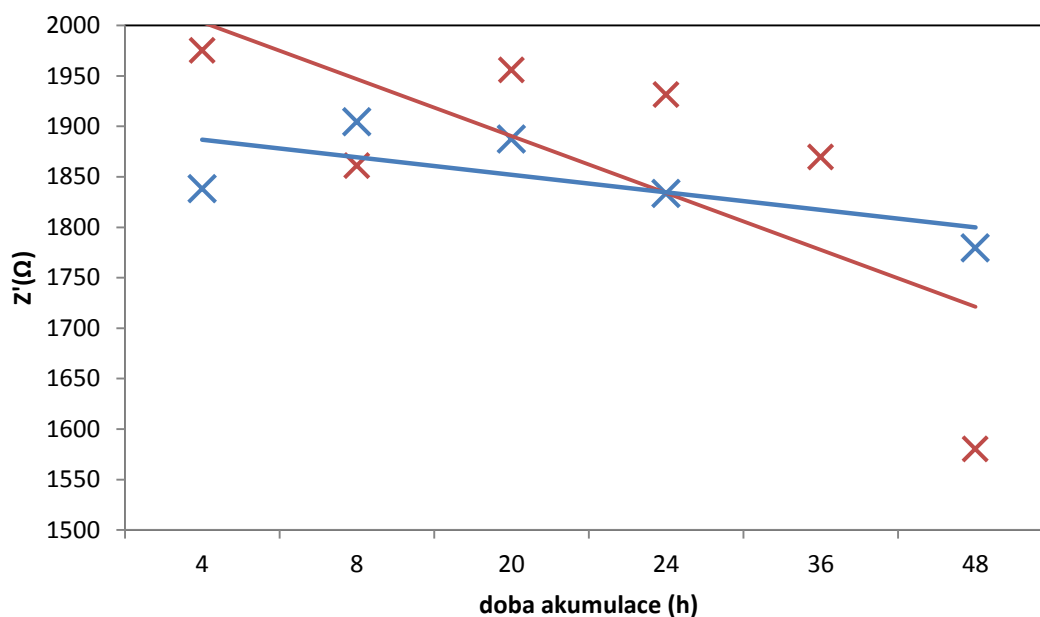


Obrázek 33 Závislost impedance na koncentraci fosfátového pufru u zlaté elektrody (červená) a nanostrukturované elektrody (modrá)



Obrázek 34 Závislost frekvence na koncentraci fosfátového pufru zlaté elektrody (červená) a nanostrukturované elektrody (modrá)

Další závislost, a to závislost zlaté a nanostrukturované elektrody na době akumulace v glutationu, je zobrazena na obr. 35. Tento graf znázorňuje lineárně klesající impedanci s rostoucí dobou akumulace.



Obrázek 35 Závislost impedance na době akumulace v glutationu u zlaté elektrody (červená) a nanostrukturované elektrody (modrá)

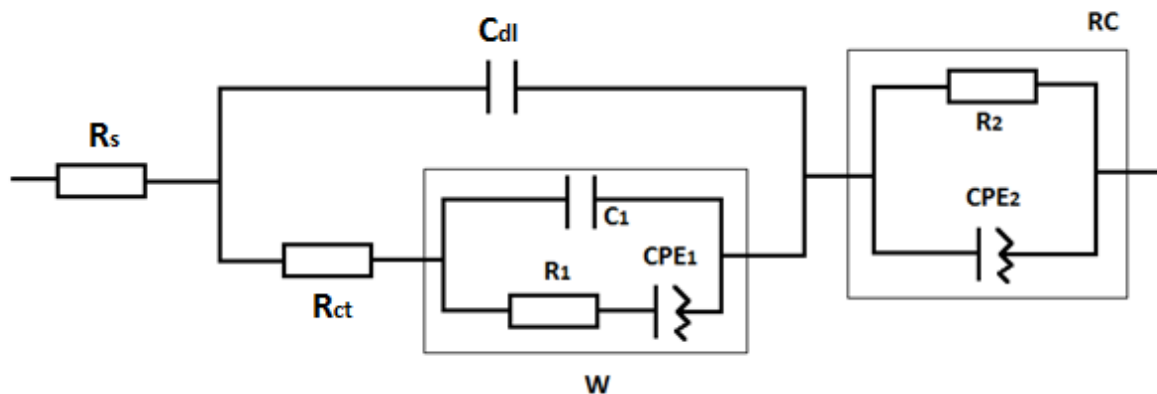
S využitím dostupné literatury, a za pomoci vedoucího práce, byly vytvořeny na základě simulací matematické obvody, které realizují průběhy impedancí elektrod. Pro každou elektrodu byl vytvořen samostatný matematický model, který simuluje naměřené hodnoty s minimální odchylkou.

Na obr. 36 je zobrazen matematický model simulace modifikované zlaté elektrody. Prvek R_s znázorňuje v obvodu měřený odpor elektrolytu, další částí je R_{CT} , reprezentující odpor přenosu náboje. Kapacita dvojvrstvy je interpretována prvkem C_{DL} . Další částí je Warburgova impedance, složená z prvků kapacity, odporu a konstantního fázového elementu. Poslední částí je RC článek, který popisuje chování struktury na povrchu měřené elektrody, jeho prvky jsou odpor a konstantní fázový element.

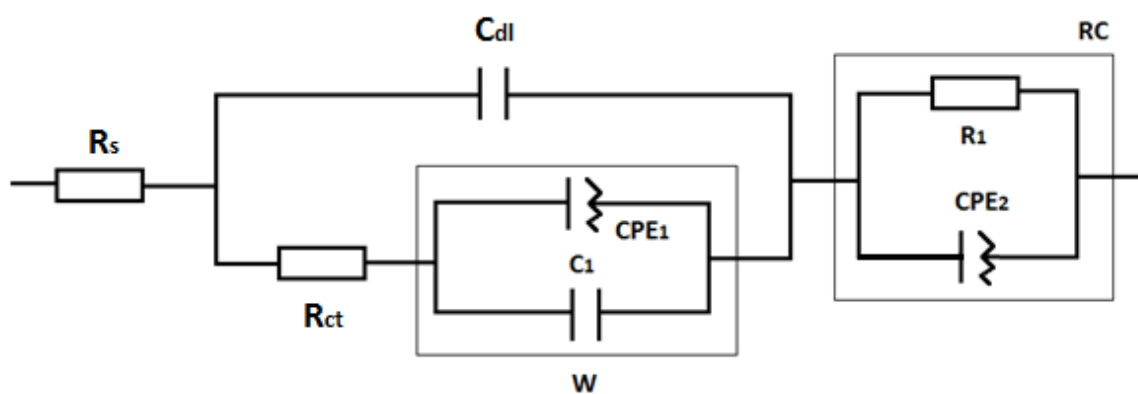
Další matematický model (obr. 37) popisuje simulaci čisté nanostruktury i nanostruktury modifikované. V tomto modelu je vynechán jeden prvek (odpor) ve Warburgově impedanci.

Simulaci pro čisté zlato popisuje matematický model na obr. 38. Tento model se liší od předchozích tím, že Warburgova impedance je nahrazena konstantním fázovým elementem CPE.

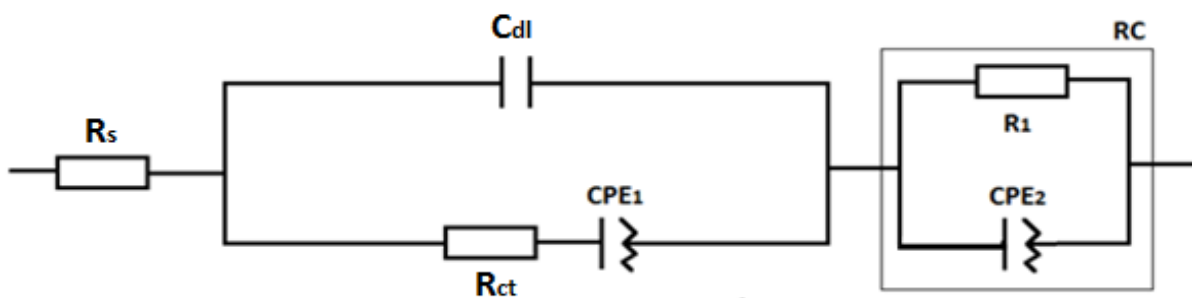
Popis výsledných hodnot je ve fázi zkoumání a nad rámec této bakalářské práce. Taktéž důvody, proč jsou v prvcích Warburgovy impedance u simulace pro modifikované nanostruktury zastoupeny odpory, jsou ve fázi zkoumání.



Obrázek 36 Náhradní obvod pro modifikovanou zlatou elektrodu



Obrázek 37 Náhradní obvod pro modifikovanou i neakumulovanou nanostrukturu



Obrázek 38 Náhradní obvod pro čistou zlatou elektrodu

Simulované hodnoty kapacity dvojvrstvy (C_{dl}), odporu přenosu náboje (R_{ct}) a CPE z matematických modelů (obr. 36, obr. 37, obr. 38) jsou vypsány v tab. 1 a tab. 2 a zobrazeny na obr. 39 a obr. 40.

Na obr. 39 je popsána závislost R_{ct} (odpor přenosu náboje) na době akumulace glutationu. U nanostrukturovaných elektrod dochází po počáteční modifikaci k rychlému poklesu R_{ct} . Poté se odpor ustaluje a dochází k jeho mírnému lineárnímu poklesu. U zlatých elektrod pozorujeme po počáteční modifikaci podobný průběh jako u nanostrukturovaných elektrod, avšak následuje růst R_{ct} až do 20 hodin. Poté rychlý pokles a ustálení u nulových hodnot.

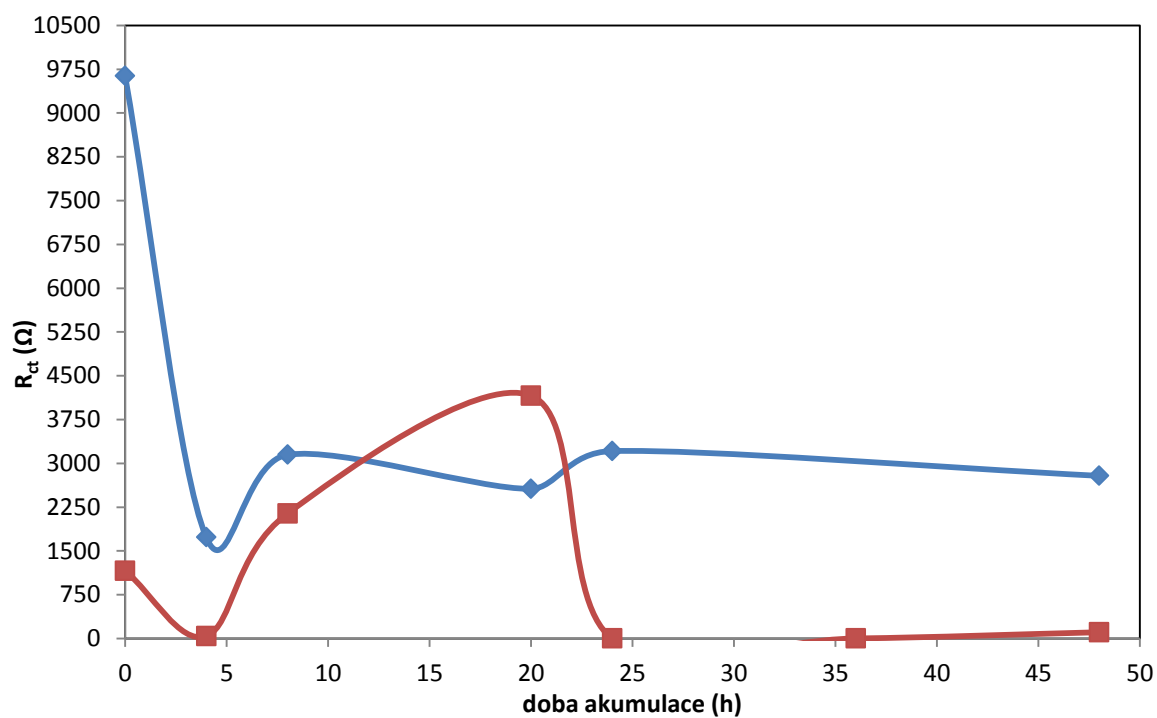
Obr. 40 popisuje závislost C_{dl} (kapacita dvojvrstvy) na době akumulace glutationu. U zlatých i nanostrukturovaných elektrod dochází k poklesu kapacity až k 20 hodinám. Pak u nanostruktur došlo k rychlému nárůstu C_{dl} . Možné vysvětlení nárůstu je vytvoření tenké kompaktní vrstvy glutationu na povrchu elektrody. Následný pokles kapacity po 24 hodinách může být způsobeno vytvořením volných – OH vazeb, která zvyšují vodivost rozhraní elektroda-roztok. U zlatých elektrod, po počátečním poklesu, dochází k pomalému nárůstu kapacity, která se postupně ustaluje.

Tabulka 1 Simulované hodnoty z modelů pro nanostruktury

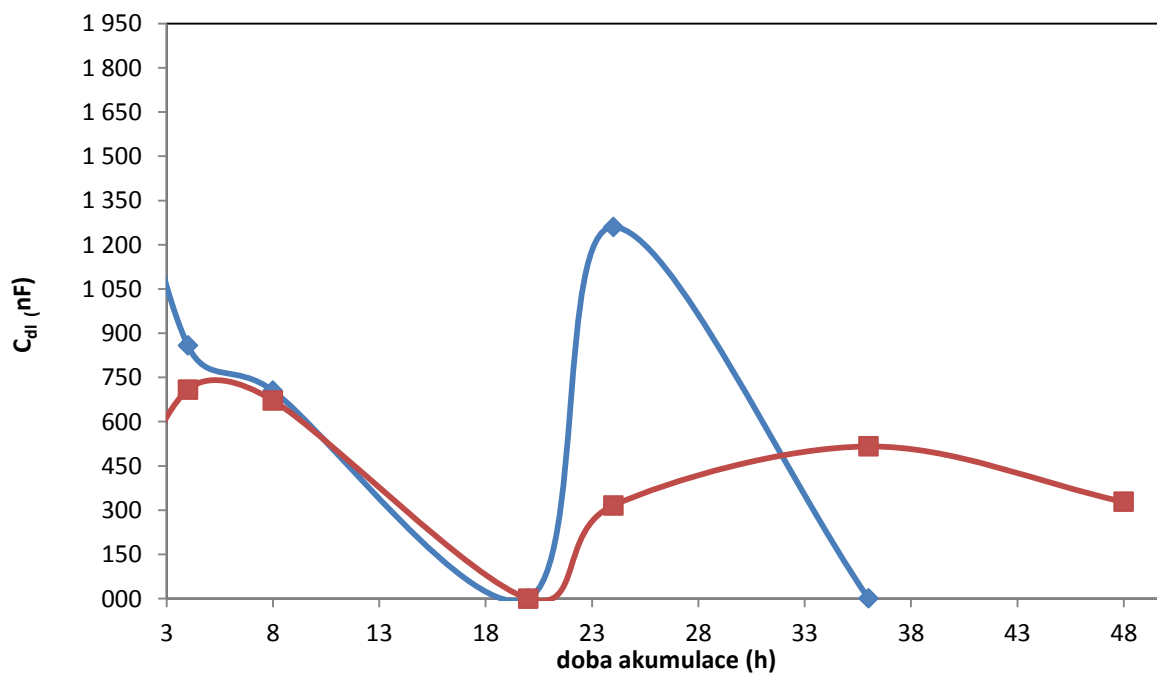
Nanostruktury			
Doba akumulace [h]	C [F]	R [Ω]	$Y_0=Q*(j\omega)^n$
0	1,92E-06	9636	6,33E-05
4	8,58E-07	1733	7,71E-11
8	7,05E-07	3147,3	4,90E-11
20	2,24E-10	2563,8	2,82E-04
24	1,26E-06	3211,1	1,08E-10
48	2,17E-10	2786,4	2,13E-05

Tabulka 2 Simulované hodnoty z modelů pro zlaté elektrody

Zlaté elektrody			
Doba akumulace [h]	C [F]	R [Ω]	$Y_0=Q*(j\omega)^n$
0	1,75E-07	1160	4,99E-11
4	7,09E-07	42,727	4,85E-11
8	6,72E-07	2140	7,36E-11
20	7,27E-11	4161	6,44E-06
24	3,16E-07	0,354	4,33E-11
36	5,16E-07	2,2369	9,83E-11
48	3,28E-07	108,48	7,05E-11



Obrázek 39 Závislost R_{CT} na době akumulace u nanostrukturovaných (modrá) a zlatých elektrod (červená)



Obrázek 40 Závislost C_{DL} na době akumulace u nanostrukturovaných (modrá) a zlatých elektrod (červená)

7 Závěr

Cílem bakalářské práce bylo teoreticky popsat a vysvětlit problematiku měření biotinylovaného oligonukleotidu pomocí elektrochemických metod. V průběhu měření však došlo ke změně analyzované látky, a to z biotinu na glutation, zejména z ekonomických důvodů. Tato změna však neznamenala žádný problém či změnu v postupu měření a charakterizaci vyrobených elektrod.

Je zde popsána metoda elektrochemické impedanční spektroskopie, s podrobným popisem modelu impedance elektrody, voltametrie a popis používaných voltametrických metod. Dále práce popisuje biosenzory, jejich rozvoj ve společnosti a vědě a také jejich výpis s nejčastějším využitím. S biosenzory souvisí i rozvoj nanotechnologií a výroba nanočástic, kterými se tato práce převážně zabývá.

Nejdůležitější částí bakalářské práce je praktická část, která se zabývá jak výrobou elektrod, tak i přípravou potřebných roztoků a samotnou charakterizací.

Veškeré měření probíhalo na přístroji MetroOhm μ AutoLab III v cele umístěné ve Faradayově kleci, z důvodu minimalizace elektrostatických sil z vnějšího okolí. Výsledky vyhodnocoval počítač s programem NOVA 1.9.

V praktické části jsou popsány průběhy EIS spekter u zlatých elektrod a nanostrukturovaných elektrod bez akumulace glutationu. Výsledky ukazují, že u EIS nanostrukturované elektrody dochází ke zvýšení kapacity, kterou nanostrukturovaná vrstva vytváří.

Dalším krokem bylo vytvoření série kalibračních měření pro porovnání vlivu koncentrace pufru na samotné měření. To probíhalo na jednom vzorku a postupovalo se vždy od pufru s nejnižší koncentrací k nejvyšší. Z výsledků vyplývá, že u málo koncentrovaných roztoků je v grafu zastoupena převážně půlkruhovitá část, znázorňující pomalý přenos náboje. Naopak u více koncentrovaných roztoků dochází k přenosu náboje rychleji a lze pozorovat posun impedančního spektra k difuzní části.

Důležitým měřením bylo EIS u akumulovaných zlatých elektrod. Zde můžeme říct, že delší doba akumulace způsobuje, že navázaná vrstva glutationu na povrchu elektrody má za následek zvyšující se odpor, při čemž vodivost klesá. U akumulovaných nanostrukturovaných elektrod dochází k tomu, že navázaný glutation se váže na daleko větší plochu elektrody než u zlaté elektrody, a to z toho důvodu, že se dostává i mezi vytvořené zlaté nanotyčinky.

Následně byla stanovena závislost hodnot frekvence v oblasti lokálního minima impedance zlatých elektrod a nanostrukturovaných elektrod na koncentraci fosfátového pufru, dále pak závislosti impedance na koncentraci fosfátového pufru a závislosti impedance na době akumulace.

Nad rámec této bakalářské práce byly na základě simulací vytvořeny matematické modely, které reprezentují naměřené průběhy elektrochemické impedanční spektroskopie. Pomocí nich byly vyjádřeny parametry popisující jejich elektrochemické vlastnosti a vzniklé rozdíly k jejich typům a dobám akumulací bioložky. Analýza modifikace a následné použití těchto matematických modelů pro charakterizaci bude předmětem dalšího studia.

Literatura

- [1] RENJUN, P; ZHILIANG, Ch; ERKANG, W; XIURONG, Y. *Biosensors & Bioelectronics: Amplification of antigen–antibody interactions based on biotin labeled protein–streptavidin network complex using impedance spectroscopy*, Changchun Jilin, p. 355–361, ISSN 0956-5663, 2001
- [2] HELÁN, V. *Elektroanalytické metody: Sborník přednášek z kurzu*. Vyd. 1. Český Těšín : 2 THETA, p. 316 s, ISBN 80-86380-07-6, 2001
- [3] CONWAY, B.E; WHITE, J.O“M. *Modern aspects of electrochemistry*. Kluwer academic publishers, ISBN 0-306-46919-2.
- [4] BARSOUKOV, E.; MACDONNALD, J.R. *Impedance spectroscopy theory, experiment and applications*. ISBN 0-471-64749-7, 2005.
- [5] ORAZEM, M.E.; TRIBOLLET, B. *Electrochemical Impedance Spectroscopy*, New Jersey, 2008.
- [6] RIGER, P.H. *Electrochemistry*. Prentice-Hall, Inc., A Division of Simon & Schuster, Englewood Cliffs, New Jersey, 1987
- [7] MACDONNALD, D.D.: *Application of Electrochemical Impedance Spectroscopy in Electrochemistry and Corrosion Science*. Toronto, p. 515-580, 1991.
- [8] HUNTER, R.J. *Zeta Potential in Colloid Science*, Academic Press, New York, 1981
- [9] RESEARCH SOLUTIONS & RESOURCES LLC. *The Constant Phase Element*. [online]. 03/06/2011 [cit. 2012-11-28].
Dostupné z: <http://www.consultrsr.com/resources/eis/cpe1.htm>
- [10] SUMI, I.I. *Impedance methods for electrochemical sensors using nanomaterials*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, p. 604-611, 2008.
- [11] KOCHOWSKI, S; NITSCH, K. *Description of the frequency behaviour of metal-SiO₂-GaAs structure characteristics*. Thin Solid Films, p. 133-137, 2012.

- [12] RESEARCH SOLUTIONS & RESOURCES LLC. *The Constant Phase Element* [online]. 03/06/2011 [cit. 2012-11-28].
Dostupné z: <http://www.consultrsr.com/resources/eis/cpe1.htm>
- [13] KREIDEL, M, ŠMÍD, R. *Technická diagnostika - senzory, metody, analýza signálu*, BEN - technická literatura, ISBN 80-7300-158-6, 2006.
- [14] HUBÁLEK, J, DRBOHLAVOVÁ, PRÁŠEK, J, BUŠINOVÁ, P, BENDOVÁ, M. *Mikrosenzory a mikroelektromechanické systémy*. Brno, 2012.
- [15] KYNCLOVÁ, H. *Charakterizace nanostrukturovaných elektrod pro elektrochemické biosenzory*: diplomová práce Brno: FEKT VUT v Brně, 2012
- [16] ŠŤASTNÝ, F. *Zpracování experimentálních dat*. [online]. 1997 [cit. 2012-11-28].
Dostupné z: http://amper.ped.muni.cz/jenik/nejistoty/html_tree/frst_zed.html
- [17] RIPKA, P, ĎAĎO, S, KREIDL, M, NOVÁK, J. *Senzory a převodníky*; ČVUT v Praze, 2005.
- [18] GRIMES, C. A, DICKEY, E. C, PISHKO, M.V. *Encyclopedia of Sensors*, American Scientific Publishers. ISBN 1-58883-056-X, 2006.
- [19] KOTZIAN, P. *Elektrochemické biosenzory* [online]. 2007 [cit. 2012-11-30].
Dostupné z: <http://www.peta.unas.cz/biosenzory/index.htm>
- [20] UHROVÁ, H. *Biosenzory*. [online]. [cit. 2012-11-30]. Dostupné z: <http://fchi.vscht.cz/uploads/pedagogika/nano/predmety/biofyzika/Biosenzory.pdf>
- [21] LEITNER, J. *Struktura nanomateriálů*, Ústav inženýrství pevných látek VŠCHT Praha, 2011.
- [22] Encyklopedia G.W.. EU: Mediasat Poland Sp. ISBN 83-89651-46-7.
- [23] EUROCHEM GROUP PORTALS. *Mikroelektrody*. [online]. 2006 [cit. 2012-11-28].
Dostupné z:
<http://www.eurochem.cz/polavolt/obecne/prislusenstvi/elektrody/opakar/mikroelektrody.htm>

- [24] SAIYED, Z.M. *Application of magnetic techniques in the field of drug discovery and biomedicine biomagnetic*. Research and Technology, p. 1-8, 2003.
- [25] HUBÁLEK, J, KIZEK, R, KLOSOVÁ, K. *Mikrosenzory a mikroelektromechanické systémy*. Brno, 2012.
- [26] *Mathematical diagram Picture Gallery*. [online]. [cit. 2013-05-14]. Dostupné z: <http://www.online-utility.org/image/gallery.jsp?title=Mathematical+diagram>
- [27] *Voltametrie a polarografie*. [online]. [cit. 2013-05-14].
Dostupné z: www.natur.cuni.cz/~opekar/elgeoch/elgeoch3.doc
- [28] *Image rights and permissions*. [online]. [cit. 2013-05-14].
Dostupné z: http://glossary.periodni.com/download_image.php?name=ag-agcl_electrode.png&source=silver%2Fsilver-chloride+electrode
- [29] REICHLOVÁ, T. *Diferenční pulzní voltametrie pro detekci metallothioneinu*: bakalářská práce. Brno: FEKT VUT v Brně, 2011.
- [30] *Nanotechnology*. [online]. [cit. 2013-05-14].
Dostupné z: <http://en.wikibooks.org/wiki/Nanotechnology>
- [31] PRIDCHARD, J. *Which Biotin Modification to Use*. [online]. [cit. 2013-05-15].
Dostupné z: <http://eu.idtdna.com/pages/decoded/decoded-articles/core-concepts/decoded/2012/09/20/which-biotin-modification-to-use-?c=CZ>
- [32] *EZ-Link HPDP-Biotin*. [online]. [cit. 2013-05-14].
Dostupné z: <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=01031002>
- [33] *Glutathione Chemical Structure*. [online]. [cit. 2013-05-14].
Dostupné z: <http://chemistry.about.com/od/factsstructures/ig/Chemical-Structures---G/Glutathione.htm>

Seznam použitých zkratek a fyzikálních veličin

EIS	Elektrochemická impedanční spektroskopie
CPE	Constant phase element
DPV	Diferenčně pulzní voltametrie
DMF	Dimethylformamid
R [Ω]	Odpor
R _S [Ω]	Měřený odpor elektrolytu
R _{CT} [Ω]	Odpor přenosu náboje
C [F]	Kapacita
C _{DL} [F]	Kapacita dvojvrstvy
Z _w [Ω]	Warburgova impedance
A _w	Warburgova konstanta
f [Hz]	Frekvence
ω [Hz]	Úhlová frekvence
U [V]	Napětí
U _e [V]	Elektromotorické napětí
I [A]	Elektrický proud
T[°C]	Teplota
V[l]	Objem
d [m]	Délka
m [g]	Hmotnost
c[mol/l]	Koncentrace
M _r [g/mol]	Molekulární hmotnost