

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

DIZERTAČNÍ PRÁCE

Brno, 2021

Ing. Hana Kynclová



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

ÚSTAV MIKROELEKTRONIKY

DEPARTMENT OF MICROELECTRONICS

NANOSTRUKTUROVANÉ MATERIÁLY NA BÁZI ALUMINY PRO ELEKTROCHEMICKÉ SENZORY A BIOSENZORY

NANOPATTERNED ALUMINA-BASED MATERIALS FOR ELECTROCHEMICAL SENSORS AND
BIOSENSORS

DIZERTAČNÍ PRÁCE

DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. Hana Kynclová

ŠKOLITEL

SUPERVISOR

Ing. Jan Prášek, Ph.D.

BRNO 2021

Abstrakt

Dizertační práce je zaměřena na základní výzkum a vývoj nanostrukturovaných povrchů připravených pomocí nanoporézní aluminy. Metodou anodické oxidace byly připraveny různé druhy nanostrukturovaných povrchů se zlatými nanostrukturami a nanoporézní aluminové membrány pro využití v elektrochemických senzorech a biosenzorech. Nanostrukturované povrchy byly připravovány metodou elektrochemické anodizace hliníkového materiálu za vzniku hexagonálně uspořádaných nanopórů. Do nanoporézních masek pak bylo elektrochemicky redukcí z roztoku dikyanozlatnanu draselného deponováno zlato metodou pulzní depozice. Připravené zlaté nanostrukturované povrchy byly elektrochemicky charakterizovány elektrochemickou impedanční spektroskopií a voltametrií, byla zkoumána jejich teplotní stabilita a vliv žíhání při atmosférickém tlaku i ve vakuu na jejich elektrochemické chování. V další části práce byly připraveny zlaté nanostruktury o různých rozměrech a byl sledován vliv tvaru a rozměrů nanostruktur na elektrochemické chování. Nanostrukturované povrchy byly také modifikovány 11–merkaptoundekanovou kyselinou a byl sledován vliv modifikace na elektrochemické výsledky. Poslední část práce se věnuje přípravě nanoporézních aluminových membrán a studiu jejich molekulové propustnosti.

Klíčová slova

Alumina, oxid hlinitý, nanostrukturované materiály, nanosloupky, elektrochemické senzory, biosenzory, elektrochemická impedanční spektroskopie, cyklická voltametrie, Randles–Ševčíkova rovnice, anodická oxidace, elektrochemická depozice.

Abstract

The doctoral thesis is focused on basic research and development of nanostructured surfaces prepared using anodic alumina material. Various types of gold nanostructured surfaces and nanoporous aluminum membranes for electrochemical sensors and biosensors were prepared using the anodic oxidation method. Nanostructured surfaces were prepared by electrochemical anodization of aluminum material to form hexagonally arranged nanopores. Gold was then deposited into the nanoporous masks by electrochemical reduction from potassium dicyanoaurate solution using a pulse deposition method. The prepared nanostructured gold surfaces were electrochemically characterized by electrochemical impedance spectroscopy and voltammetry. Temperature stability and the effect of annealing on their electrochemical behavior at atmospheric pressure as well as in the vacuum were investigated. Then, gold nanostructures of various dimensions were prepared and the influence of their shape and dimensions on the electrochemical behavior was studied. Nanostructured surfaces were also modified with 11-mercaptoundecanoic acid, and the effect of this modification on the electrochemical results was studied. In the last part of the work, nanoporous aluminum membranes were prepared, and their permeability was studied.

Keywords

Alumina, alumina oxide, nanostructured materials, nanopillars, electrochemical sensors, biosensors, electrochemical impedance spectroscopy, cyclic voltammetry, Randles–Sevcik equation, anodic oxidation, electrochemical deposition.

Bibliografická citace

KYNCLOVÁ, Hana. *Nanostrukturované materiály na bázi aluminy pro elektrochemické senzory a biosenzory*. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/135162>. Dizertační práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Ústav mikroelektroniky. Vedoucí práce Jan Prášek.

Prohlášení

„Prohlašuji, že svou dizertační práci na téma Nanostrukturované materiály na bázi aluminy pro elektrochemické senzory a biosenzory jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího dizertační 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 autorka uvedené dizertační práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této dizertační 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 části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

V Brně dne: 18. 4. 2021

.....
Podpis autora

Poděkování

Ráda bych poděkovala všem, kteří mě jakýmkoliv způsobem podporovali při tvorbě této práce. Největší dík patří mému školiteli a to nejen za cenné rady, podněty a metodické vedení během realizace práce, ale také za vstřícný a přátelský přístup. Dále bych ráda poděkovala kolegovi Ing. Jiřímu Smilkovi, Ph.D. za pomoc s charakterizací AAO membrán, která byla provedena v rámci společného studentského projektu. Můj velký dík patří i všem kolegům z VUT za příjemnou spolupráci a přátelskou atmosféru, která provázela celé mé doktorské studium.

Na závěr bych velmi ráda poděkovala svým rodičům za trpělivost a podporu nejen při psaní této dizertační práce, ale i po celou dobu mého dlouhého studia. Bez nich bych nikdy nebyla tím, kým jsem.

Tato práce vznikla za podpory grantů a v návaznosti na ně:

- Vývoj senzorů na bázi nanoporézních membrán s řízenou iontovou propustností, zahájení: 01.01.2015, ukončení: 31.12.2015.
- Nové typy elektronických obvodů a senzorů pro specifické aplikace, zahájení: 01.01.2014, ukončení: 31.12.2016.

Obsah

1	ÚVOD	10
2	SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY	12
2.1	SENZORY	12
2.1.1	<i>Chemické senzory</i>	12
2.1.2	<i>Biosenzory</i>	12
2.1.3	<i>Nanomateriály v sensorice</i>	14
2.1.4	<i>Nanostrukturované materiály pro sensoriku</i>	15
2.2	ELEKTROCHEMICKÁ MĚŘENÍ A ELEKTRODY PRO ELEKTROCHEMICKÉ SENZORY ..	19
2.3	ELEKTROCHEMICKÉ METODY	20
2.3.1	<i>Elektrochemická impedanční spektroskopie (EIS)</i>	20
2.3.2	<i>Voltametrie</i>	27
2.4	ANODICKÁ OXIDACE.....	30
2.4.1	<i>Anodická oxidace hliníku</i>	31
2.5	NANOPORÉZNÍ MEMBRÁNA Z OXIDU HLINITÉHO.....	32
2.5.1	<i>Senzory a na bázi oxidu hlinitého</i>	36
2.6	PŘÍPRAVA ZLATÝCH NANOSTRUKTUROVANÝCH POVRCHŮ PRO BIOSENZORY.....	40
2.6.1	<i>Příprava povrchů modifikovaných nanosloupky s využitím masek</i>	41
2.7	NANOSTRUKTUROVANÉ POVRCHY VYTVOŘENÉ POMOCÍ ALUMINOVÉ MASKY	45
2.7.1	<i>Postup výroby povrchů modifikovaných zlatými nanosloupky</i>	45
2.7.2	<i>Elektrochemická impedanční charakterizace elektrod modifikovaných nanosloupky</i>	47
2.7.3	<i>Difuze elektrolytu mezi nanosloupky při voltametričtém měření</i>	48
3	CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE	52
4	POUŽITÉ MATERIÁLY A METODY	54
4.1	VÝROBA NANOSTRUKTUROVANÝCH ELEKTROD SE ZLATÝMI NANOSLOUPKY	54
4.1.1	<i>Příprava tenkých vrstev</i>	54
4.1.2	<i>Chemikálie pro výrobu nanostruktur</i>	55
4.1.3	<i>Aparatura pro výrobu nanostruktur</i>	55
4.2	ELEKTROCHEMICKÁ CHARAKTERIZACE	56
4.2.1	<i>Elektrochemická impedanční spektroskopie</i>	57
4.2.2	<i>Cyklická voltametrie</i>	58
4.2.3	<i>Diferenčně pulzní voltametrie</i>	58
4.3	BIOMODIFIKACE KYSELINOU MERKAPTOUNDEKANOVOU (MUA)	58

4.4	VÝROBA ALUMINOVÝCH MEMBRÁN	58
4.4.1	<i>Aparatura pro výrobu membrán</i>	58
4.4.2	<i>Materiál</i>	59
4.4.3	<i>Leštění hliníkové fólie</i>	59
4.4.4	<i>Anodizace</i>	60
4.4.5	<i>Leptání</i>	60
4.4.6	<i>Zalévání membrán</i>	60
4.4.7	<i>Měření tloušťky a drsnosti membrán</i>	61
4.4.8	<i>Studium propustnosti membrán</i>	61
4.5	CHARAKTERIZACE RASTROVACÍM ELEKTRONOVÝM MIKROSKOPEM	61
5	PRAKTICKÁ ČÁST	63
5.1	ELEKTRODY SE ZLATÝMI NANOSLOUPKY NA RŮZNÝCH TYPECH SUBSTRÁTU	63
5.1.1	<i>Příprava nanostrukturovaných elektrod se zlatými nanosloupy</i>	64
5.1.2	<i>Elektrochemická impedanční spektroskopie</i>	68
5.2	TEPLOTNÍ STABILITA NANOSTRUKTUROVANÝCH ELEKTROD	72
5.2.1	<i>Výroba nanostrukturovaného povrchu – „nanoskleniček“</i>	73
5.2.1	<i>Žihání při atmosférickém tlaku</i>	76
5.2.2	<i>Žihání ve vakuu</i>	78
5.3	VLIV TVARU NANOSTRUKTUR NA VELIKOST ELEKTROAKTIVNÍ PLOCHY	83
5.3.1	<i>Příprava tenkých vrstev</i>	84
5.3.2	<i>Příprava nanostrukturovaných elektrod</i>	84
5.3.3	<i>Elektrochemická charakterizace</i>	85
5.3.4	<i>Biomodifikace nanostruktur</i>	86
5.3.5	<i>Výsledky</i>	86
5.4	PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE NANOPORÉZNÍCH MEMBRÁN Z ALUMINY	101
5.4.1	<i>Výroba nanoporéznic AAO membrán</i>	101
5.4.2	<i>Studium propustnosti membrán</i>	105
5.4.3	<i>Shrnutí</i>	109
6	ZÁVĚR	110
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	115
	PUBLIKAČNÍ AKTIVITY	123
	PRODUKTY	126
	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	127
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ	129
	SEZNAM OBRÁZKŮ	131

CURRICULUM VITAE	135
PŘÍLOHA A	138
PŘÍLOHA B	139
PŘÍLOHA C	140
PŘÍLOHA D	141

1 Úvod

Nanotechnologický průmysl je jedno z velmi dynamicky se rozvíjejících odvětví a pojem „nano“ již zasahuje do nepřeberné řady odvětví lidské činnosti. Běžné látky v nanoměřítku vykazují velmi odlišné vlastnosti v porovnání s látkami v měřítcích makrosvětla, což nabízí velkou škálu nových možností v oblasti jejich využití nejen pro vědecké účely v laboratorních podmínkách, ale i ke komerčním aplikacím.

Využití nanostrukturovaných materiálů navíc v kombinaci s elektrochemickými metodami nachází velké uplatnění v mnoha oblastech výzkumu a vývoje, z velké části pak v oblasti elektrochemických sensorů a biosenzorů. Elektrochemické metody představují nejen poměrně levný, rychlý a přesný způsob výroby, ale nabízí i možnost charakterizace nanostrukturovaných elektrod a následné provedení detekce látek v roztocích s jejich využitím. [1]

Jedním z hojně využívaných materiálů v sensorice je nanoporézní keramika (oxid hlinitý - Al_2O_3), označovaná také jako alumina nebo AAO (z angl. Anodic Alumina Oxide). Alumina může být využívána nejen jako nanoporézní membrána, ale také jako maska pro výrobu nanostrukturovaných povrchů [2]. Jedná se o jedinečný nanostrukturovaný materiál, který vykazuje samouspořádanou nanoporézní strukturu s velkým potenciálem využití a velkou reprodukovatelností výroby. [3-5]. Možnost řídit průměr a délku pórů změnou experimentálních podmínek přináší široké možnosti využití aluminy k přípravě velké škály nanoporézních membrán a nanostrukturovaných elektrod. [6]

Nanoporézní alumina je připravována pomocí anodické oxidace (anodizace) hliníkové fólie nebo nadeponované tenké vrstvy hliníku na pevný substrát, kdy za vhodných podmínek vznikají hexagonálně uspořádaná pole nanopórů. Jedná se o typ metody „top-down“, kdy jsou objekty postupně převáděny z makroskopických rozměrů do nanometrových dimenzí. [7]

Tato dizertační práce se zabývá studiem a optimalizací elektrod modifikovaných zlatými nanostrukturami (připravenými s využitím aluminy), jejichž využití je směřováno do biosenzorických aplikací, kde modifikace elektrodových povrchů vodivými nanostrukturami často přináší zvýšení skutečné elektroaktivní plochy elektrod při zachování jejich geometrických rozměrů. To obvykle vede ke zvýšení odezvy sensorů, v důsledku čehož často dochází i ke zlepšení limitu detekce látek. Pro charakterizaci nanostrukturovaných elektrod byly v práci využívány metody elektrochemické impedanční spektroskopie (EIS) a voltametrické metody.

Práce se dále zabývá přípravou AAO membrán a studiem jejich propustnosti. Tenké nanostrukturované membrány jsou v posledních letech hojně studovány díky jejich širokému spektru aplikací, mezi něž patří optická, elektronická a elektrochemická odvětví. Konkrétně nachází uplatnění v optoelektronických zařízeních, senzorech plynů, biosenzorech, katalýze, paměťových a supravodivých zařízeních, při selektivní separaci molekul, filtraci, purifikaci, detekcích látek a podobně. [3, 8]

2 Současný stav problematiky

Tato část práce se zabývá úvodem do problematiky senzorů včetně využití nanostrukturovaných materiálů v senzorce, teorie elektrochemických metod a techniky přípravy nanostrukturovaných povrchů a nanoporézních membrán včetně jejich aplikací.

2.1 Senzory

Za několik posledních desetiletí se staly senzory neodmyslitelnou součástí našich životů a nalezneme je prakticky všude kolem nás. Neustále je věnována velká pozornost zlepšování jejich vlastností. Mezi klíčové vlastnosti senzorů lze zařadit například citlivost, limit detekce, míru šumu, linearitu, reprodukovatelnost měřených výsledků, rozlišitelnost (nejmenší měřitelná změna snímané veličiny), selektivitu, rychlost odezvy, životnost, biokompatibilitu a dynamický rozsah měřitelných veličin (od prahu citlivosti senzoru až po maximální hodnotu měřené veličiny). Obecně se senzory skládají ze snímací části / převodníku, který převede signál detekované veličiny na měřitelnou veličinu a elektronické části, která obvykle zajistí zpracování signálu a jeho případné předání k dalšímu zpracování či zobrazení. [9]

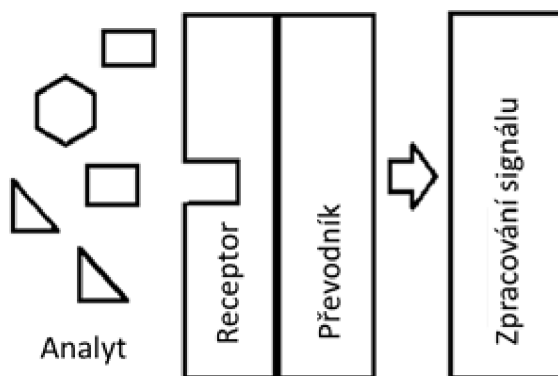
2.1.1 Chemické senzory

Chemické senzory jsou zařízení vybavená speciální citlivou vrstvou, která je schopna rozpoznat analyt na základě chemické interakce s analytem a převést ho chemicko-fyzikálním převodem na veličinu fyzikální. Podle typu převodníku nebo typu měřitelného signálu můžeme chemické senzory dělit na elektrochemické, gravimetrické, optické, akustické a kalorimetrické. [10]

2.1.2 Biosenzory

Biosenzory jsou dnes definovány jako analytická zařízení, která kombinují biologicky citlivý element s fyzikálním převodníkem tak, aby selektivně a kvantitativně detekovala přítomnost daných látek v analytu. Biologicky citlivý element se skládá z biologického receptoru tvořeného látkami molekulárního charakteru pro navázání cílových analytů a vhodně zvoleného biochemicko-fyzikálního převodníku (elektrochemický, optický, piezoelektrický, magnetický, akustický nebo kalorimetrický) pro převod biologického signálu na elektrický nebo optický signál [11]. Bioreceptory dělíme na biokatalické (přeměňují analyt v průběhu reakce) mezi které patří například enzymy, organely, buňky, tkáně nebo organismy a bioafinitní (váží analyt), mezi které řadíme protilátky, nukleové kyseliny a další. Z materiálového hlediska se dnešní biosenzory skládají z organické (biorekogniční) a anorganické (převodník) části. Očekává se ovšem, že v budoucnu se

struktura biosenzorů výrazně změní. Není vyloučeno, že budoucí senzory budou kompletně z organických materiálů se schopností bezdrátově komunikovat (elektricky nebo opticky) s externími analytickými a monitorovacími zařízeními. [9, 12] Základní schéma uspořádání biosenzoru je zobrazeno na obr. 1.



Obr. 1: Schéma uspořádání biosenzoru.

Současné biosenzory můžeme rozdělit do dvou hlavních kategorií: in vivo a ex vivo dle jejich možnosti umístění. In vivo biosenzory jsou zařízení pracující uvnitř těla po krátkou nebo delší dobu a monitorující cílové látky, zatímco ex vivo biosenzory analyzují biologický vzorek mimo tělo.

Pro biologické detekce se nejčastěji využívají pracovní módy: amperometrický, voltametrický, potenciometrický, konduktometrický a impedimetrický. Amperometrické biosenzory měří elektrický proud generovaný při výměně náboje mezi elektrodami a ionizovanými částicemi, který je reakcí na polarizaci elektrody při skokově se měnícím napětí v delších časových intervalech. Voltametrické biosenzory měří závislost proudu na napětí (tzv. voltamogram) vyvolanou redoxním procesem. Impedimetrické biosenzory měří změny elektrochemického procesu v komplexní impedanci při cyklickém buzení pracovní elektrody v předurčeném rozsahu frekvencí. Měřenými výsledky (Bode plot – závislost celkové impedance na frekvenci, Nyquist plot – závislost reálné a imaginární složky impedance) poskytují informaci o odporu přenosu náboje, který souvisí s vlastnostmi rozhraní elektrody a elektrolytu a s koncentrací analytu [12].

Při konstrukci biosenzorů je klíčovým krokem tzv. imobilizace (zde připojení) biomolekul na povrch elektrody a zároveň zachování jejich biologické aktivity. Pro imobilizaci molekul na povrch elektrody se využívá několik metod: absorpce, zapouzdření, zachycení, kovalentní navázání a zesíťování [13].

2.1.2.1 Požadavky na biosenzor

Biosenzory stejně jako všechny ostatní senzory kladou v první řadě důraz na citlivost a spolehlivost po dlouhou dobu. Za spolehlivost považujeme i to, že senzor bude fungovat bez falešně negativních nebo falešně pozitivních výsledků. Bohužel, jak konvenční senzory, tak i biosenzory jsou často vystavovány prostředí, v němž se mimo běžnou změnu teploty a vlhkosti vyskytuje i množství látek biologické povahy, které mají podobnou strukturu a podobné mechanismy navázání se na biosenzor, jako požadovaný cílový analyt. Dalším základním požadavkem tedy je, aby senzor byl dostatečně specifický. Jinak řečeno, aby specificky reagoval pouze na cílové látky vzorku. Pouze takováto specifická zajistí dostatečnou spolehlivost biosenzoru. Obecně je životnost biosenzoru omezena nejslabším prvkem systému a tím je bioreceptor. Nejčastější příčinou snížení spolehlivosti a použitelnosti senzoru je ztráta aktivity biorekogničního elementu, ke které dochází v důsledku vystavení senzoru komplexnímu biologickému prostředí. Ztráta aktivity biorekogničního elementu je ve většině případů způsobena degradací molekul na povrchu senzoru nebo navázání nežádoucích prvků (mikroorganismů nebo vysokomolekulárních proteinů) na rekogniční molekuly (v angličtině často nazývané „fouling“). Proto je pro využití v biosenzorice důležité zapojení molekulárních sond s dlouhotrvající aktivitou a s chováním zabráňujícím znečištění. Díky rozdílnému pracovnímu prostředí *in vivo* a *ex vivo* biosenzorů často čelíme rozdílným požadavkům na jejich výrobu. *In vivo* biosenzory jsou konstruovány za využití materiálů kompatibilních s organismem kvůli jejich implantabilní povaze. Implantované zařízení by například nemělo zarůstat tkáněmi v těle a zařízení umístěná v krevním řečišti by neměla způsobovat srážení krve [12].

2.1.3 Nanomateriály v senzorce

Využití nanostrukturovaných materiálů v senzorce rozšířilo možnosti detekce stopových množství látek v krátkém čase a v malém množství analytu. K tomuto výrazně přispěly nanomateriály na bázi uhlíku (uhlíkové nanotrubičky, fullereny, grafen) [14], nanočástice na bázi kovů (především zlata [15], stříbra, magnetické nanočástice) a nanostrukturované filmy a membrány [16].

Nanomateriál je charakterizován dle IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) jako materiál, který je alespoň v jednom směru menší než 100 nanometrů ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$) [17]. Dle toho dělíme nanomateriály:

- 0 – dimenzionální (splňují podmínku ve všech třech prostorových rozměrech - nanočástice, nanokrystal, nanoklastr),

- 1 – dimenzionální (dva rozměry jsou v požadovaném nanoměřítku - nanodráty, nanotrubičky, nanovlákna),
- 2 – dimenzionální (pouze jedna dimenze splňuje podmínku - nanovrstvy) [18].

Nanomateriály jsou hojně využívány především pro své unikátní vlastnosti, které přímo souvisí s redukcí velikosti materiálů do nanoměřítku. Tyto vlastnosti se výrazně liší od vlastností materiálů běžných makroskopických velikostí stejného prvkového složení. Jedná se především o vlastnosti chemické, magnetické, elektrické, optické apod. Nanomateriály se také vyznačují tím, že množství atomů na povrchu nanostruktury je výrazně větší než množství atomů uvnitř. Tento fakt má za následek to, že atomy na povrchu struktury tvoří menší množství vazeb s dalšími atomy nanostruktury a to následně ovlivňuje jejich vazebnou energii. Zvýšení povrchové energie pak vyvolá jedinečný kvantový efekt (nanomateriály se řídí zákony kvantové fyziky), který ovlivňuje chování nanostrukturovaných materiálů. [17]

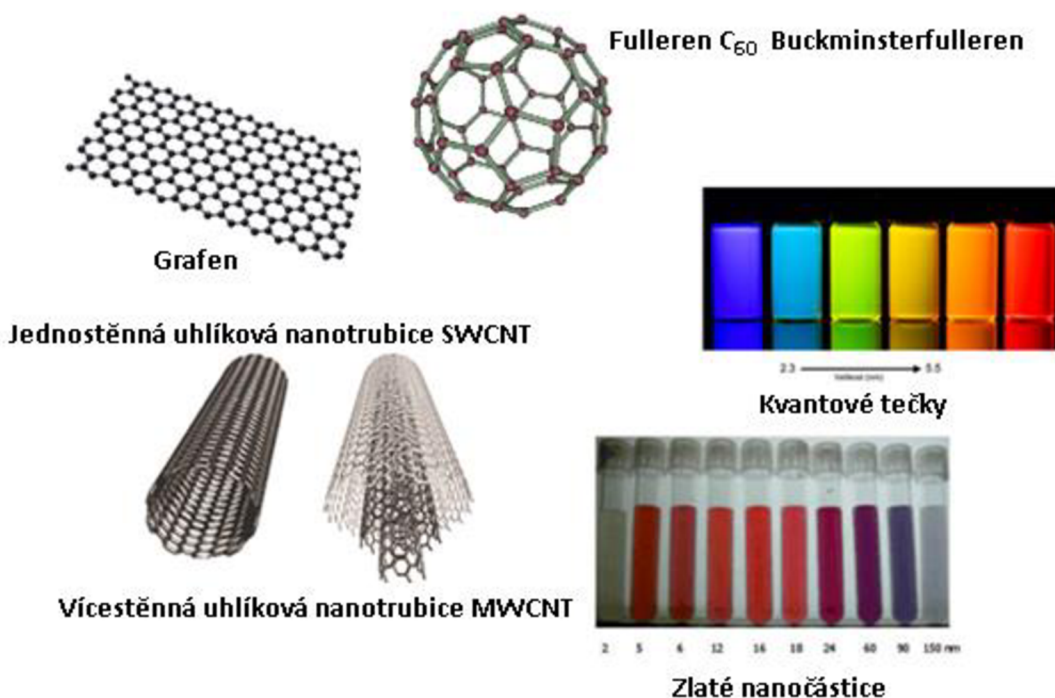
V posledních letech hojně využívaný pojem „nano“ neznamena pouze zmenšování velikosti hmoty do nanorozměrů, ale i manipulaci s hmotou na molekulární a atomární úrovni. Schopnost měnit uspořádání atomů a molekul může poskytnout další nové fyzikální a chemické vlastnosti materiálů. V případě biosenzoriky se očekává, že takováto radikální transformace povede k snímání signálů na úrovni jediné molekuly s vícenásobnou detekcí v živých buňkách. Na úrovni systému, posun do nanooblasti sníží velikost aktivního snímacího elementu do měřítek cílových částic což má za následek zvýšení citlivosti a snížení detekčního limitu. Postupně dochází i k redukci nutného objemu analytu a minimalizaci detekčního času. Redukce velikosti biosenzorů také vede k miniaturizaci zařízení, které díky své velikosti, může být umístěné na libovolném místě v těle. [12]

Nanostrukturované senzory jsou nejčastěji dále funkcionalizovány pomocí enzymů, protilátek, nukleotidů, buněk a proteinů. Nejčastěji využívanými elektrochemickými biosenzory v dnešní době jsou senzory glukózy, laktózy, močoviny, kyseliny mléčné a DNA hybridizace. [12]

2.1.4 Nanostrukturované materiály pro sensoriku

Příklady nejznámějších nanostruktur využívaných v sensorice jsou zobrazeny na obr. 2. Nejhojněji využívané jsou nanostrukturované materiály tvořené atomy uhlíku. Mezi ně se řadí především fullerény, které byly objevené v roce 1985, v čele s nejstabilnějším fullerenem Buckminsterfullerenem C_{60} s kulovým tvarem. Fullerény jsou uzavřené struktury tvořené 5-ti a 6-ti čtými cykly z atomů uhlíku. Dvacet atomů uhlíku je minimální počet pro vytvoření fullerenu, dvacet čtyři uhlíkových atomů pak

stačí pro vytvoření uzavřené struktury. Mezi jejich základní vlastnosti patří obtížná rozpustnost (rozpustné pouze ve vybraných rozpouštědlech), nesmáčivost, měkkost, pružnost, hnědé zbarvení a to, že se chovají jako izolanty. [19] Pokud ovšem do fullerenu uzavřeme molekulu, je s fullerenem spjata, přestože s ním netvoří žádnou chemickou vazbu – vznikají tak tzv. endohedrické molekuly (např. La@C₆₀ nebo He@C₆₀ - pomocí značky @ se označuje, že atom je uvnitř fullerenu a netvoří s ním chemickou vazbu), které v kombinaci s molekulami alkalických kovů mohou vykazovat supravodivost (např. K₃C₆₀, Rb₃C₆₀, Cs₃C₆₀) [20].



Obr. 2: Příklady nanostruktur pro sensoriku: Grafen [21], Fulleren C₆₀ [22], jednotěnné a vícestěnné uhlíkové nanotrubičice [23], kvantové tečky [24] a zlaté nanočástice [25].

Dalšími uhlíkovými nanostrukturami jsou jednotěnné (SWCT – Single-Walled Carbon Nanotube) a vícestěnné uhlíkové nanotrubičice (MWCT - Multi-Walled Carbon Nanotube). Uhlíkové nanotrubičice jsou 1 – dimenzionální nanostruktury vzniklé stočením grafenového listu (rovinná struktura vzájemně navázaných šestiúhelníků z uhlíkových atomů) do tvaru trubice. [26] Struktura grafenu i obou typů trubic je zobrazena na obr. 2. Jednotěnné trubice mají poloměr přibližně 1 nm, vícestěnné pak 5-100 nm dle počtu stočených grafenových listů. Délka nanotrubic pak může dosahovat až několika mikrometrů. Uhlíkové nanotrubičice se vyznačují velkou vazebnou silou mezi jednotlivými atomy, velkou pružností a tepelnou stabilitou. Elektrické vlastnosti jsou závislé na prostorovém a topologickém uspořádání nanotrubic – mohou se tak chovat jako vodiče i polovodiče. [27] Uhlíkové nanotrubičice jsou nejčastěji využívány ke konstrukci

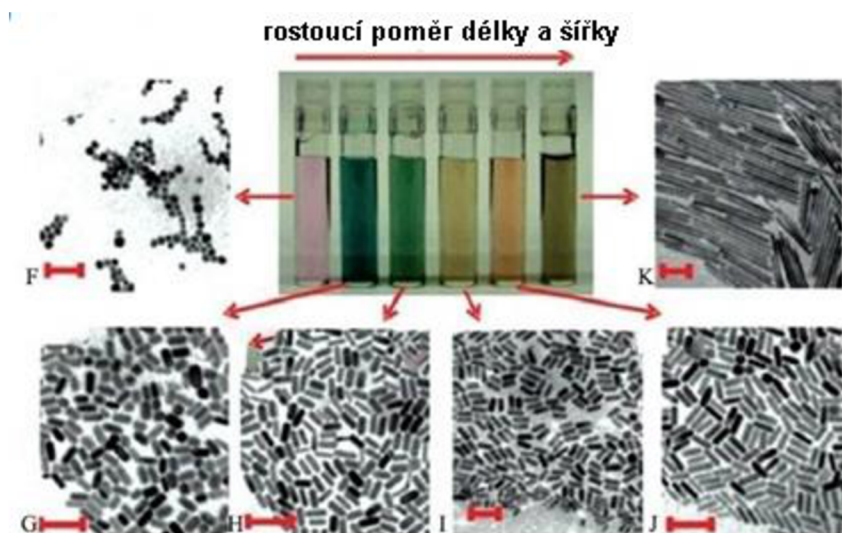
imunosenzorů (senzor využívající interakce mezi antigenem a protilátkou) a DNA senzorů. Velkou předností nanotrubic pro využití v biosenzorech jsou jejich dobré elektrochemické vlastnosti a schopnost vázat na sebe biomolekuly. [28]

Dalším příkladem nanočástic využívaných v sensorice jsou 0 – dimenzionální struktury nazývané kvantové tečky (quantum dots). Jedná se o polovodičové krystaly o velikosti v rozmezí od 1 do 10 nm s diskrétním rozdělením energetických hladin, díky čemuž jsou tečky často označovány jako umělé atomy (artificial atoms). Většinou jsou sférického tvaru, mohou ale být například i krychlové nebo tyčinkové a podobně. Energetické hladiny jsou řízeny změnami tvarů a velikostí teček stejně tak, jako jejich schopnost se zabarvovat. Menší tečky se zabarvují do modré části spektra díky vyšší excitační energii, větší tečky se pak zabarvují do červena (Obr. 2). Kvantové tečky se často vyskytují v tzv. „Core / Shell“ uspořádání, kdy je tečka složena ze dvou polovodičů, přičemž jeden tvoří jádro tečky a druhý její obal. [29] Nejčastější sloučeniny, ze kterých se tečky skládají, jsou: CdSe a CdTe, CdS, ZnSe, InAs, InP. Takové sloučeniny vykazují polovodičové vlastnosti. Mezi hlavní vlastnosti kvantových teček patří vysoká fluorescence v závislosti na velikosti teček a kvantová stabilita. Tečky jsou často využívány při bioanalýzách jako optické značení, zobrazování in vivo [30] a konstrukci nanosenzorů. Kvantové tečky je také možné modifikovat pro případné navázání biomolekul, což umožní přímý přenos elektronů z navázané biomolekuly na povrch elektrody přes polovodičové tečky. Pro připojení biomolekul na povrch kvantových teček může být využito fyzikální adsorpce nebo kovalentní vazby. [31, 32]

Další nanostruktury, které stojí za zmínku, jsou zlaté nanočástice o velikosti 1 – 100 nm, které vykazují optické a elektronické vlastnosti lišící se od vlastností zlata v makroskopickém měřítku. Zlaté nanočástice vykazují výbornou elektrickou i tepelnou vodivost, což je důsledkem toho, že elektrony materiálu nejsou pevně vázány a tvoří tzv. elektronový mrak a přenos náboje pak probíhá jednodušeji. Další vlastností je lesk nanostruktur, což způsobuje jejich zabarvení po ozáření v závislosti na velikosti nanočástic. Část dopadajícího světla je při vzniku povrchového plazmonu absorbována a část odražena, přičemž odražená část spektra způsobí změnu zabarvení. Nanočástice menších velikostí absorbují záření v modrozelené části spektra (400 - 500 nm) a světlo z červené části spektra (700 nm) je odraženo, čímž dává částicím tmavě červenou barvu. Se vzrůstající velikostí částic se vlnová délka rezonance tzv. povrchového plazmonu posouvá k delším (červenějším) vlnovým délkám. To znamená, že červená složka záření je absorbována a modřejší je odražena, to způsobí bledě modrou nebo fialovou barvu částic. S dalším růstem velikosti nanočástic se vlnová délka rezonance povrchového plazmonu zvyšuje až k infračervené oblasti spektra a odrazí se stále více viditelného světla, což přinese částicím průhlednou barvu (Obr. 2). [33] Většina aplikací pro využití

zlatých nanostruktur je založena na jejich optických vlastnostech, a tak jsou využívány pro fluorescenční značení, biodetekce patogenů nebo jako kontrastní činidla pro rastrovací elektronové mikroskopy a další [34-36]. V biosenzorice jsou využívány pro efektivní zvýšení povrchu biosenzoru, a to hlavně z důvodu biokompatibility zlata a velké afinity biomolekul ke zlatu. Zlatý materiál tak vytváří stabilní povrch pro imobilizaci biomolekul za zachování jejich biologické aktivity. [37, 38]

Dalšími zajímavé nanostruktury jsou zlaté nanotyčinky (Obr. 3). Zlaté nanotyčinky (gold nanorods) mají velký potenciál ve sledování analytů, především v oblastech medicíny a biologie. Právě v biomedicinském odvětví jsou velkým přínosem pro svou schopnost absorbovat elektromagnetické záření o vlnových délkách blízkého infračerveného záření (NIR – Near – Infrared Radiation – vlnový rozsah 700 – 1000 nm). Tento fakt přináší dvě velké výhody: nízkou auto-luminiscenci a nízký rozptyl záření, což má za následek vysokou senzitivitu a hluboké pronikání NIR záření, což umožňuje zkoumání i detailních strukturních informací o biologickém vzorku.



Obr. 3: Zlaté nanotyčinky s různým poměrem délky k průměru. TEM (Transmisní Elektronový Mikroskop) snímky a jejich zabarvení ve viditelné oblasti spektra, velikost měřítka 100 nm [41].

Klasické zlaté nanomateriály jsou fotoaktivní ve viditelné oblasti spektra. Je známo, že délka absorbovaného světla je závislá na jejich velikosti, z čehož vyplývá, že zlaté nanotyčinky absorbují záření delších vlnových délek. Absorbovaná vlnová délka záření je u nanotyčinek také závislá na změně poměru jejich délky a průměru (angl. aspect ratio). Těchto faktů se využívá především ke značení biologických vzorků. Zlaté nanotyčinky jsou dále přínosem pro zlepšení detekčních signálů založených na rezonanci povrchových plazmonů. Pro tyto účely je potřeba nanotyčinky pro specifikaci na konkrétní cíle, jako jsou buňky a proteiny modifikovat. Zlaté nanotyčinky se vyrábí elektrochemicky,

fotochemicky, nebo metodou „seed-mediated“ (semínkem – zprostředkovaná metoda). Nejčastěji využívanou metodou je třetí jmenovaná „seed-mediated“ metoda a to pro její jednoduchost a snadné získání nanotyčinek s požadovanými rozměry. Fotochemická metoda výroby je jednoduchá, ale méně používaná. Metodou elektrochemické syntézy lze získat nanotyčinky jednotných rozměrů a tvarů, vyžaduje však potřebné vybavení. [39, 40]

Další zajímavé a hojně využívané nanostruktury jsou také aluminové membrány nebo povrchy modifikované zlatými nanosloupky. O těch bude uvedeno více v podkapitolách 2.5 a 2.7.

2.2 Elektrochemická měření a elektrody pro elektrochemické senzory

Elektrochemická měření jsou metody, pro jejichž provedení je třeba minimálně dvou elektrod ponořených do elektrolytu, na nichž probíhají elektrodové děje a lze mezi nimi odečítat hodnoty například napětí nebo proudu. Většina elektrochemických dějů souvisí s procesy, které probíhají na rozhraní elektroda / elektrolyt. Průběh elektrodové reakce je ovlivněn dílčími kroky, jako je transport iontů k elektrodě, adsorpce na povrch elektrody, reakce na elektrodě, desorpce produktu z elektrody a transport od elektrody.

Elektrochemická měření přinášejí spoustu výhod: vysokou citlivost, specifitu, nízkou cenu, jednoduchost provedení a také možnost využití například v mikro nebo nano elektronických a fluidních zařízeních.

Obecně v elektrochemickém měření hraje zásadní roli velikost elektrod. Elektrody s menšími rozměry umožňují vzniku 3D paprskovité nelineární difuze a poskytují rovnovážnou (angl. steady – state) odezvu. Nabitě elektrody ponořené do roztoku jsou zpravidla na rozhraní mezi kovem a elektrolytem obklopeny tzv. elektrodovou dvouvrstvou (angl. electrical double layer) tvořenou solvatovanými ionty. Jakmile se elektrodová velikost začíná blížit velikosti elektrodové dvouvrstvy (v řádech nanometrů), elektrické pole vytvořené v blízkosti elektrody ovlivní přenos elektronů a transport iontů, čímž změní elektrodové reakce a výslednou proudovou odezvu. Proto je při měření s elektrodami v nanoměřítku důležité vědět, jak může elektrodová dvouvrstva ovlivnit elektrodovou reakci a tím i výslednou proudovou odezvu. Vliv na odezvu nanostrukturovaných elektrod pro elektrochemii mají, mimo tvar a rozměry nanostruktur, i typy jejich funkcionalizace, použité molekuly a kinetika přenosu hmoty [12].

Podle geometrických rozměrů elektrod používaných v elektrochemických metodách, kde se měří protékající proud v závislosti na přiloženém napětí, lze rozlišit:

- makroelektrody (plocha v řádech cm^2),

- minielektrody (např. kapající rtuťová elektroda – *DME* – z angl. Dropping Mercury Electrode),
- semimikroelektrody (visící rtuťová kapková elektroda – *HMDE* – z angl. Hanging Mercury Drop Electrode),
- mikroelektrody (např. některé tištěné nebo tenkovrstvé elektrody),
- ultramikroelektrody – do této skupiny patří elektrody, jejichž průměr je menší než 20 μm .

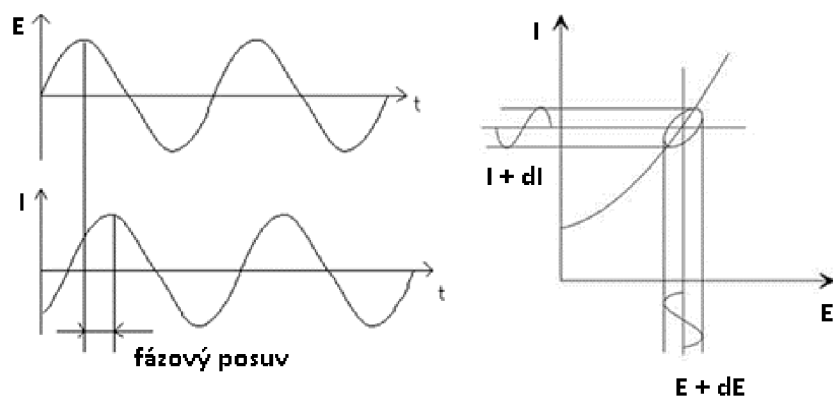
Miniaturizace elektrod s sebou přináší požadavek na zvýšení citlivosti elektrod nebo jejich odezvy zvýšením jejich elektroaktivní plochy při zachování malých geometrických rozměrů, a to například umístěním nanostruktur na jejich povrch. Pro zlepšení výsledků elektrochemických měření se často využívají elektrody modifikované nanostrukturami, jako jsou: nanotyčinky, nanosloupky, nanotrubičky, nanodráty [42]. Díky využití nanostrukturami modifikovaných povrchů lze dosáhnout zvýšení citlivosti měření a to díky tomu, že rozměry nanostruktur jsou často menší, než je délka difuzní vrstvy v běžném voltametrickém měření. Nanostruktury na površích elektrod zvyšují elektroaktivní plochu, na které dochází k elektrochemickým dějům a tím je zvyšována citlivost elektrod při zachování stejných geometrických rozměrů, které potom mohou být redukovány. Využití nanostruktur v biosenzorice přineslo posun v detekcích některých látek, například v detekci DNA nebo glukózy. [12]

2.3 Elektrochemické metody

Elektrochemické metody řadíme k analytickým metodám založeným na sledování fyzikálně-chemických veličin roztoků. Elektrochemické chování roztoků je závislé na jejich složení a koncentraci. Podmínkou pro využití elektrochemických metod k detekci látek je to, že stanovované látky musí mít schopnost přenášet náboj. Dle toho, jakou elektrickou veličinu sledujeme, rozlišujeme elektrochemické metody: potenciometrie (napětí), polarografie a voltametrie (proud), coulometrie (náboj), konduktometrie (vodivost) a elektrochemická impedanční spektroskopie (impedance).

2.3.1 Elektrochemická impedanční spektroskopie (EIS)

Impedance obecně je měřítkem schopnosti obvodu odolávat toku elektrického proudu. Popisuje odpor obvodu a fázový posun napětí oproti proudu při průchodu harmonického střídavého proudu (Obr. 4 vlevo). Fázový posun napětí a proudu je možné zobrazit pomocí Lissajova grafu (Obr. 4 vpravo). Jedná se o závislost sinusového napětí na proudové odezvě systému (osa y).



Obr. 4: Fázový posuv napětí oproti proudu (vlevo) a Lissajův graf (vpravo) [43].

Impedance je odezvou systému na přiložený budící signál, je definována jako frekvenčně závislá a je určena jako komplexní veličina s reálnou a imaginární složkou. Jednotkou impedance je ohm (Ω). V kartézském tvaru se zapisuje jako:

$$Z = Re + i Im, \quad \text{Rovnice 1}$$

$$Re = |Z| \cdot \cos\phi, \quad \text{Rovnice 2}$$

$$Im = |Z| \cdot \sin\phi, \quad \text{Rovnice 3}$$

$$|Z| = \sqrt{Re^2 + Im^2}, \quad \text{Rovnice 4}$$

$$Z = Z \cdot e^{j\phi}, \quad \text{Rovnice 5}$$

kde Z je označení komplexní impedance [Ω], Re je reálná složka impedance [Ω], Im je imaginární složka impedance [Ω] a ϕ je úhel [rad], který svírá komplexní impedance Z s reálnou osou Re . [44]

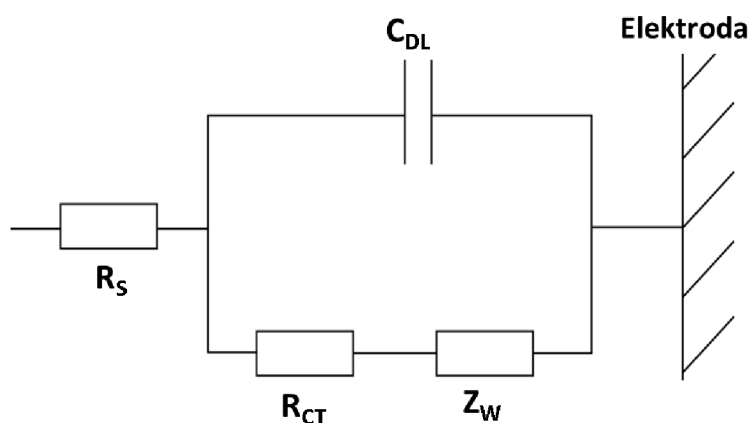
2.3.1.1 Impedance v elektrochemickém systému

V elektrochemickém systému je elektrochemická impedanční spektroskopie důležitou metodou pro studium povrchově upravených elektrod. Měříme odezvu elektrochemického systému na přiložený harmonický sinusový signál. Výsledná impedance $Z(j\omega)$ je pak vypočtena jako podíl napětí $U(j\omega)$ [V] a proudu $I(j\omega)$ [A] nebo jako součet reálné složky impedance $Z_{Re}(\omega)$ a imaginární složky impedance $Z_{Im}(\omega)$ dle rovnice:

$$Z(j\omega) = \frac{U(j\omega)}{I(j\omega)} = Z_{Re}(\omega) + jZ_{Im}(\omega), \quad \omega = 2 \cdot \pi \cdot f, \quad \text{Rovnice 6}$$

kde $j = \sqrt{-1}$, f je frekvence [Hz] a ω je úhlová frekvence [$\text{rad} \times \text{s}^{-1}$].

Elektrochemické děje na rozhraní elektrody a elektrolytu mohou být vyjádřeny náhradním elektrickým obvodem (Obr. 5) skládajícím se z odporu roztoku R_S [Ω], který se řídí Ohmovým zákonem, Warburgovy impedance Z_W [Ω], která popisuje difuzi iontů elektrolytu k elektrodovému rozhraní a je koncentračně závislá, kapacity elektrodové dvouvrstvy C_{DL} [F] a odporu přenosu náboje R_{CT} [Ω]. Náhradní elektrické schéma je také nazýváno Randlesův nebo Ershlerův obvod. [45, 46]



Obr. 5: Náhradní elektrický obvod impedance, upraveno dle [46].

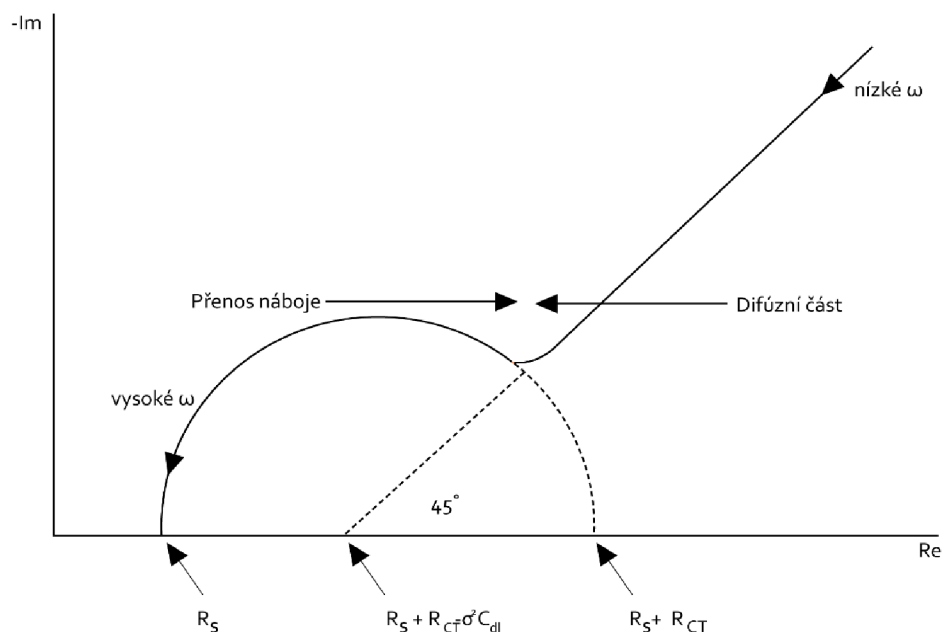
V jedné větvi Randlesova obvodu se nachází kapacita dvouvrstvy C_{DL} a v druhé větvi Warburgova impedance Z_W a odpor přenosu náboje R_{CT} . Celkový proud je dán součtem všech příspěvků z Faradayových dějů I_F [A] a nabíjení dvouvrstvy I_C [A]. Celkový proud prochází přes odpor roztoku R_S , který je připojen sériově. Kapacita dvouvrstvy C_{DL} a odpor přenosu náboje R_{CT} se podílí na dielektrických a izolačních vlastnostech na rozhraní elektroda – elektrolyt a jsou vzájemně v paralelním zapojení. Kapacita dvouvrstvy je závislá na dielektrické permitivitě dvou nábojové vrstvy molekul vytvořené na rozhraní elektrody a elektrolytu. Pro méně polární molekuly je kapacita menší. Odpor přenosu náboje popisuje redoxní děj probíhající při přenosu elektronu na rozhraní elektrody. Odpor elektrolytu R_S a Warburgova impedance Z_W jsou prvky charakterizující vlastnosti elektrolytického roztoku a jeho difuzní vlastnosti.

Faradayova impedance se skládá z odporu přenosu náboje R_{CT} a Warburgovy impedance ($Z_W = \sigma\omega^{-1/2} - j\sigma\omega^{-1/2}$) zapojené v sérii. Faradayova impedance je

zapojena paralelně s kapacitou dvouvrstvy a sériově s odporem roztoku. Celková impedance je pak dána vztahem [47]:

$$Z = R_S + \frac{1}{(R_{CT} + Z_W)^{-1} + j\omega \cdot C_{DL}} \quad \text{Rovnice 7}$$

Grafickým vyjádřením frekvenčně závislého průběhu impedance je tzv. Nyquistův diagram (Obr. 6).



Obr. 6: Nyquistův diagram, upraveno dle [46].

Nyquistův diagram se na vysokých frekvencích se skládá z půlkruhové části a na nízkých frekvencích z difuzní lineární části. Ve vysoce koncentrovaných roztocích dochází k přenosu náboje rychle a impedanční spektrum obsahuje především difuzní přímkovou část a minimum polokruhové části. Naopak je tomu v případě málo koncentrovaných roztoků, kde dochází k přenosu malého náboje přes rozhraní. Spektrum obsahuje především polokruhovitou část a méně difuzní přímkový úsek. Z diagramu můžeme určovat přenosové a difuzní charakteristiky. Průměr půlkruhu je roven přenosu náboje R_{CT} . Průsečík půlkruhu ve vysokých frekvencích s reálnou osou je roven odporu roztoku R_S . Dokreslením kruhu do nízkých frekvencí a jeho průniku s reálnou osou dostaneme hodnotu, která udává součet $R_S + R_{CT}$. [46, 47]

2.3.1.2 Odpor roztoku R_S

Odpor roztoku je v elektrochemickém systému významným parametrem. Moderní potenciostaty pro elektrochemickou impedanční spektroskopii s tříelektodovým

zapojením odpor roztoku mezi pomocnou a referentní elektrodou kompenzují. Odpor roztoku je závislý na koncentraci elektrolytu, typu iontů, teplotě a geometrii systému. V ohraničené oblasti s plochou A o délce l může být odpor R_S vyjádřen rovnicí:

$$R_S = \rho \cdot \frac{l}{A}, \quad \text{Rovnice 8}$$

kde A je plocha oblasti [cm^2], l je délka oblasti [cm] a ρ rezistivita roztoku [$\Omega \times \text{cm}$]. Místo rezistivity je více známou veličinou její reciproká veličina a to konduktivita (γ) [$\Omega^{-1} \times \text{cm}^{-1} = \text{S} \times \text{cm}^{-1}$], neboli měrná elektrická vodivost. Odpor roztoku pak může být vyjádřen:

$$R_S = \frac{1}{\gamma} \cdot \frac{l}{A} \rightarrow \gamma = \frac{l}{R_S \cdot A}. \quad \text{Rovnice 9}$$

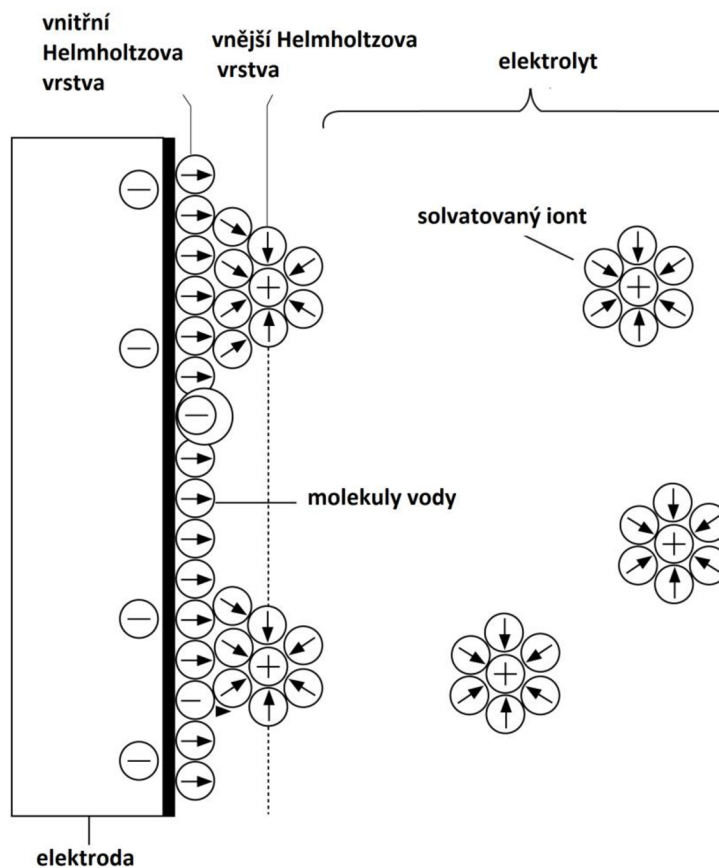
Konduktivita γ je standardní tabulková hodnota pro daný roztok.

Většina elektrochemických systémů v praxi nemá rovnoměrné rozložení proudu v definované oblasti. Při výpočtu je pak hlavním problémem stanovení dráhy toku proudu a geometrie elektrolytu, kterým proud protéká. Naštěstí většinou není odpor roztoku určován výpočtem z iontových vodivostí, ale je určen experimentálně modelováním EIS průběhů. [43]

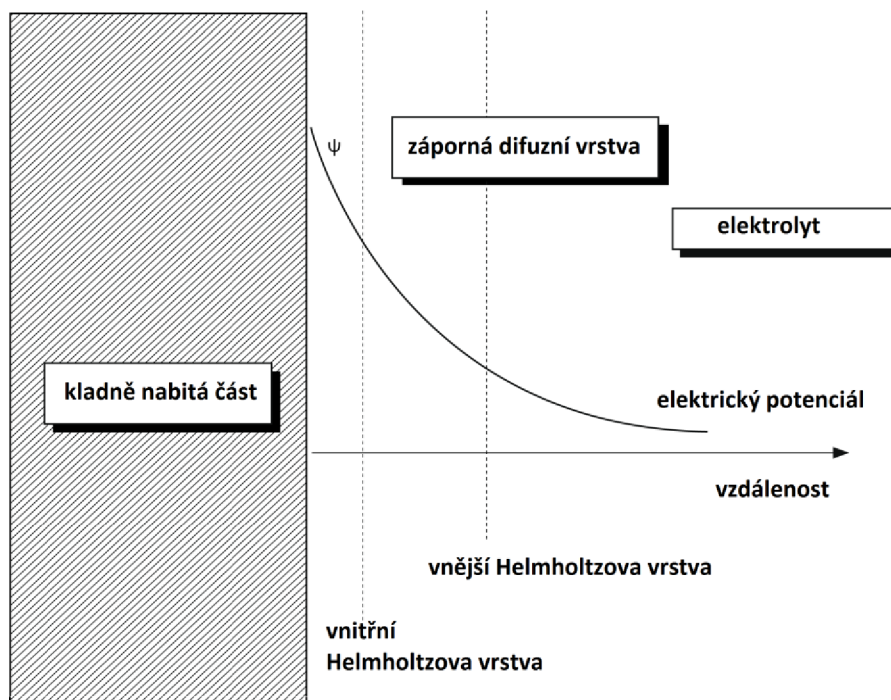
2.3.1.3 Kapacita dvouvrstvy C_{DL}

Na rozhraní pevné elektrody a elektrolytického roztoku se vytváří elektrická dvouvrstva iontů roztoku adsorbovaných na povrch elektrody (Obr. 7). Nabitá elektroda je pak oddělena od nabitých iontů elektrolytu izolačním prostorem (v řádech desetin nanometrů). Náboje oddělené izolátorem tvoří kondenzátor. Řádově pak na 1 cm^2 plochy se bude kapacita kondenzátoru pohybovat v řádech od 20 do 60 μF . Jedná se ale o hodnotu závislou na spoustě faktorů, jako jsou například: potenciál elektrody, teplota, iontová koncentrace, typ iontů, vrstvy oxidů, drsnost elektrod, adsorpce nečistot a podobně. Elektrická kapacita dvouvrstvy je hodnota vypovídající o povrchových vlastnostech elektrody a o rozložení náboje na rozhraní elektrody a elektrolytu. [48]

Elektrický model kapacity dvouvrstvy se skládá z několika vrstev. První vrstvou je pevná elektroda, druhou vrstvou je inertní vrstva mezi elektrodou (vnitřní Helmholtzova vrstva, tvořena dipóly vody) a vnější Helmholtzovou vrstvou, třetí vrstvou je elektrolyt, kterým difundují nabití ionty k elektrodě. Vnější Helmholtzova vrstva je tvořena solvatovanými ionty, které elektrostaticky interagují s nabitou elektrodou. Model dvouvrstvy můžeme pozorovat na obr. 8.



Obr. 7: Elektrodová dvouvrstva, upraveno dle [49].



Obr. 8: Elektrický model elektrodové dvouvrstvy – průběh potenciálu na elektrodě.

2.3.1.4 Odpor přenosu náboje R_{CT}

Odpor přenosu náboje R_{CT} (z angl. Charge Transfer Resistance) je jedním z parametrů pro popis elektrodové dvouvrstvy společně s kapacitou dvouvrstvy C_{DL} se kterou je v paralelním zapojení v Randlesově obvodu. Odpor přenosu náboje popisuje redoxní děj probíhající při přenosu elektronu na rozhraní elektrody. Na izoláčně upravené elektrodě se očekává snížený přenos náboje přes rozhraní a odpor přenosu náboje poroste.

2.3.1.5 Warburgova impedance Z_w

Warburgova impedance je tvořena difuzí iontů z roztoku k nabitě elektrodě. Impedance závisí na frekvenci. Při vysokých frekvencích je Warburgova impedance malá, protože difuzní ionty se nemusí pohybovat příliš daleko. Při nízkých frekvencích musí reaktanty difundovat dále a zvyšují tak Warburgovu impedanci. Nekonečná Warburgova impedance (fáze 0,5; sklon křivky 45°) je pak vyjádřena:

$$Z_w = \sigma(\omega)^{-1/2} \cdot (1 - j), \quad \text{Rovnice 10}$$

kde ω je úhlová frekvence [$\text{rad} \times \text{s}^{-1}$], j odpovídá $-I^{1/2}$ a σ je konstanta známá jako Warburgův koeficient, který je vyjádřen jako:

$$\sigma = \frac{R \cdot T}{n^2 \cdot F^2 \cdot A \cdot \sqrt{2}} \cdot \left(\frac{1}{C_{Ox}^0 \cdot \sqrt{D_{Ox}}} + \frac{1}{C_{Red}^0 \cdot \sqrt{D_{Red}}} \right), \quad \text{Rovnice 11}$$

kde D_{Ox} a D_{Red} jsou difuzní koeficienty oxidované resp. redukované formy [$\text{cm}^2 \times \text{s}^{-1}$], A je plocha elektrody [cm^2], R je plynová konstanta [$\text{J} \times \text{K}^{-1} \times \text{mol}^{-1}$], F je Faradayova konstanta [$\text{C} \times \text{mol}^{-1}$], T je absolutní teplota [K] a n je počet přenesených elektronů. [43]

2.3.1.6 Prvek s konstantní fází (CPE)

Kondenzátory v experimentech EIS se často nechovají ideálně. Místo toho byl pro náhradu kondenzátorů zaveden prvek s konstantní fází (z angl. Constant Phase Element – CPE), který vyjadřuje reálné chování elektrod. Je definován jako:

$$Z_{CPE} = \frac{1}{(j\omega)^\alpha \cdot Y_0}, \quad \text{Rovnice 12}$$

kde Y_0 je rovna kapacitě, α je exponent, který je roven 1 pro případ ideálního kondenzátoru, v případě, že je roven 0, budeme, CPE prvek považovat za rezistor. Pro prvek s konstantní fází je exponent α nenulový a menší než jedna. „Dvouvrstvý kondenzátor“ se ve skutečných elektrochemických systémech často chová, jako CPE, ne

jako ideální kondenzátor, i když bylo navrženo několik teorií (drsnot povrchu, „unikající“ kondenzátor, nerovnoměrné rozložení proudu atd.), které zohledňují neideální chování elektrodové dvouvrstvy. [45, 47, 50]

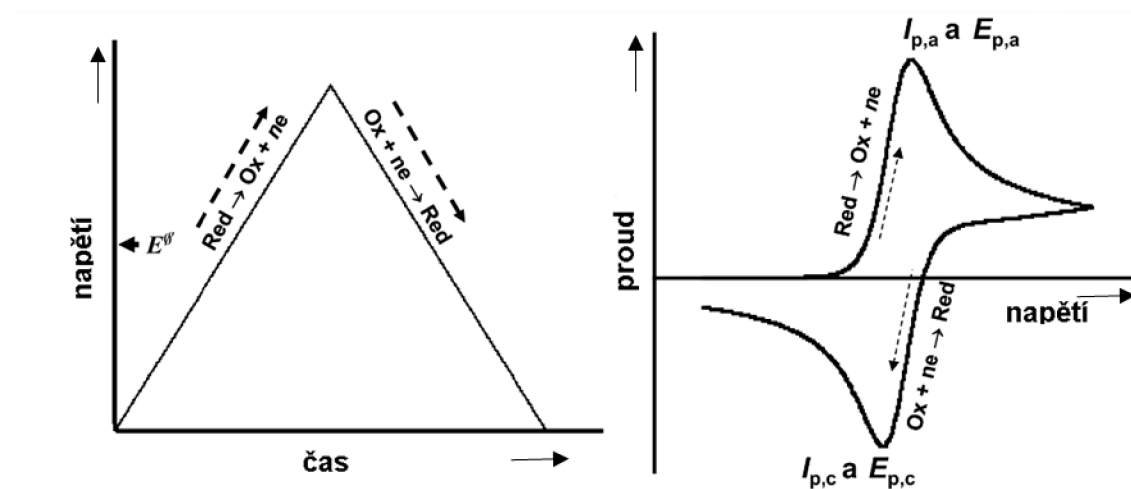
2.3.2 Voltametrie

Voltametrie je potenciometrická analytická metoda, původně odvozená z polarografie. V polarografii je křivka závislosti proudu a napětí zaznamenávána pomocí kapající rtuťové elektrody (DME) nebo statické rtuťové kapkové elektrody (SMDE – z angl. Static Mercury Drop Electrode). Voltametrie zahrnuje všechny metody, ve kterých se provádí měření proudu v závislosti na potenciálu přiloženého na stacionární a tuhé pracovní elektrody bez ohledu na jejich materiálové složení. Mezi tyto elektrody patří například visící rtuťové kapková elektroda (HMDE), tenká rtuťová filmové elektroda (TMFE – z angl. Thin Mercury Film Electrode), skelná uhlíková elektroda (GCE – z angl. Glassy Carbon Electrode), uhlíkové pastové elektrody a popřípadě další pracovní elektrody z ušlechtilých kovů (zlato, stříbro, platina). Voltametrie a polarografie pak zahrnují velké množství metod lišících se především typem excitačního elektrického napětí. Obecně je tato metoda založena na měření křivky proudu protékajícího přes elektrodu ponořenou do elektroaktivního roztoku v závislosti na přiloženém napětí. Měření mohou být provedena s využitím minimálně dvou elektrod, ale v dnešní době je již běžné provádět měření s využitím tříelektrodového zapojení. První elektrodě říkáme pracovní elektroda (zlatá, platinová, sklo-uhlíková, rtuťová visící). Druhou elektrodou je elektroda referentní s konstantní hodnotou potenciálu. Nejčastěji využívanými, komerčně dostupnými referentními elektrodami jsou elektrody kalomelové (rtuť pokrytá vrstvou Hg_2Cl_2 v roztoku KCl) nebo elektrody argentchloridové (stříbrný drátek pokrytý vrstvou Ag/AgCl v roztoku KCl). Třetí elektrodu nazýváme pomocnou a nejčastěji se jedná o komerčně dostupnou elektrodu z platiny. Měřicí potenciostat zajišťuje, aby mezi pracovní a pomocnou elektrodou protékal takový proud, který mezi pracovní a referentní elektrodou udrží požadovaný napěťový průběh. [51]

2.3.2.1 Cyklická voltametrie

Cyklická voltametrie (CV) je jednou ze základních voltametrických metod. V této metodě se vyskytují čtyři základní proměnné, mezi které řadíme napětí, proud, koncentraci roztoku a čas. Metoda je založena na tom, že na pracovní elektrodu je přikládáno napětí ve tvaru trojúhelníkového pulsu: nejprve napětí v čase narůstá dle nastaveného potenciálového rozsahu (forward scan) a po dosažení zlomového bodu začne klesat k počáteční hodnotě (backward / reverse scan). V čase je pak měřen výsledný proud procházející obvodem. Výsledkem měření je pak závislost měřeného proudu na napětí – tzv. cyklický voltamogram. Na obr. 9 lze pozorovat tvar přiloženého napětí v čase

(Obr. 9, vlevo) a cyklický voltamogram (Obr. 9, vpravo). Na voltamogramu pozorujeme katodický (redukční) pík se zápornou hodnotou (při němž dochází k redukci) a anodický (oxidační) pík s kladnou hodnotou, při němž dochází k oxidaci. [52] V ideálním případě můžeme systém považovat za reverzibilní, tedy pokud rozdíl potenciálů naměřených ve vrcholku katodického a anodického píku je menší než 0,59 V.



Obr. 9: Cyklická voltametrie: průběh přikládání napětí (vlevo), cyklický voltamogram (vpravo), upraveno dle [53].

Reverzibilní proces lze matematicky vyjádřit Randles–Ševčíkovou rovnicí:

$$i_{pa} = i_{pc} = 0,4463 \cdot \frac{n^{3/2} \cdot F^{3/2}}{R^{1/2} \cdot T^{1/2}} \cdot A \cdot D^{1/2} \cdot v^{1/2} \cdot c, \quad \text{Rovnice 13}$$

kde i_{pa} a i_{pc} je výška anodického / katodického píku [A], n je počet vyměněných elektronů, F je Faradayova konstanta [9,648455 C×mol⁻¹], R je plynová konstanta [8,31441 J×mol⁻¹×K⁻¹], T je teplota [K], A je plocha elektrody [cm²], D je difuzní koeficient oxidované / redukované formy [cm²×s⁻¹], c je koncentrace oxidované / redukované formy [mol×cm⁻³] a v je rychlost posunu potenciálu [V×s⁻¹]. [54]

2.3.2.2 Elektroaktivní plocha elektrod

Velikost elektroaktivní plochy elektrod A je velmi důležitým faktorem pro určení elektrochemické odezvy senzoru. Elektroaktivní plocha se v realitě liší od geometrické plochy senzoru a je mnoho způsobů, jak elektroaktivní plochu senzoru určit. Jedním z nich je výpočet elektroaktivní plochy z nabíjecího proudu, kdy nabíjecí proud je úměrný velikosti elektroaktivní plochy. Dalším způsobem je využití tzv. Randles–Ševčíkovy rovnice uvedené výše (Rovnice 13). Rovnici pro výpočet elektroaktivní plochy lze získat odvozením z Randles–Ševčíkovy rovnice a dosazením konstant:

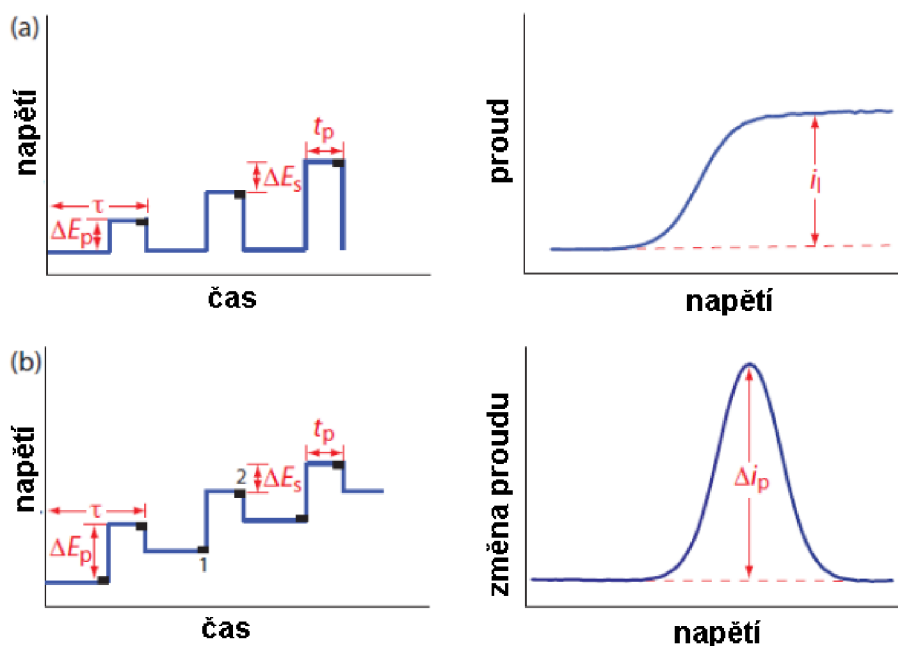
$$i_{pa} = i_{pc} = 2,687 \cdot 10^5 \cdot n^{3/2} \cdot A \cdot D^{1/2} \cdot v^{1/2} \cdot c, \quad \text{Rovnice 14}$$

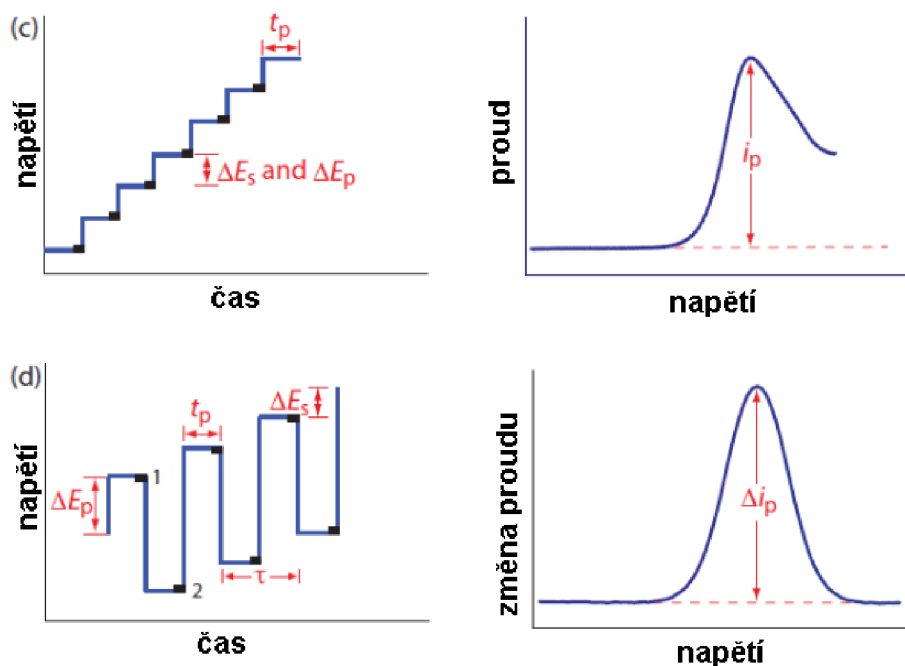
$$A = \frac{i_p}{2,687 \cdot 10^5 \cdot n^{1/2} \cdot D^{1/2} \cdot v^{1/2} \cdot c}. \quad \text{Rovnice 15}$$

Elektroaktivní plocha pak může být určena empiricky ze stanovení výšek píků cyklického voltamogramu. Hlavní podmínkou pro využití rovnice je reverzibilita zkoumaného systému (v ideálním systému vzdálenost píků cyklického voltamogramu menší než 0,59 V) a předpoklad měření při pokojové teplotě 25 °C.

2.3.2.3 Pulzní voltametrické metody

Pulzní voltametrické metody jsou metody, mezi které řadíme: diferenčně pulzní voltametrii (DPV – Differential Pulse Voltammetry), voltametrii čtvercových vln (SWV – Square wave voltammetry), normální pulzní voltametrii (NPV – Normal Pulse Voltammetry) a nebo staircase pulzní voltametrie (SCV – StairCase Voltammetry). Společným rysem pulzních metod je to, že elektrodové procesy jsou excitovány periodicky se měnícími signály čtvercových vln při konstantní nebo rostoucí amplitudě těchto vln. [55] Výhodou těchto technik je především vyšší odezva a tím nižší limit detekce, než je tomu například u základní cyklické voltametrie. Příklady excitačních signálů a příslušných voltamogramů pro jednotlivé metody jsou uvedeny na obr. 10.

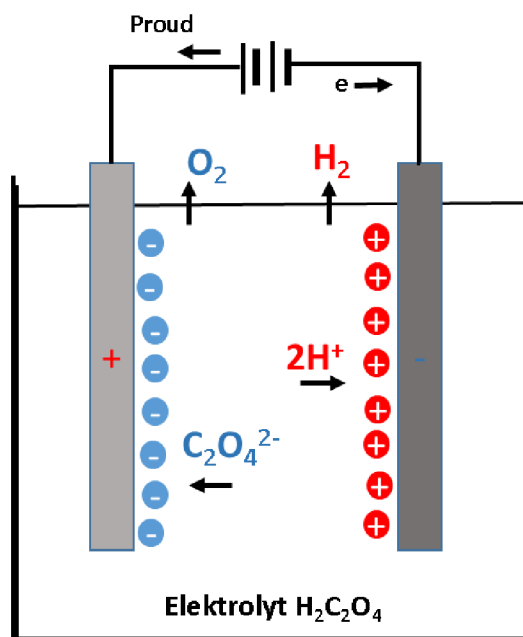




Obr. 10: Pulzní voltametrie – excitační signály a voltamogramy: a) normální pulzní voltametrie b) diferenčně pulzní voltametrie, c) staircase voltametrie d) voltametrie čtvercových vln, i_p je proud [A], Δi_p je změna proudu [A], i_l je limitující (omezující proud) [A], τ je délka cyklu [s], ΔE_p je napětí (výška) pulzu [V], ΔE_s je změna potenciálu mezi cykly [V] a t_p je doba trvání pulzu [s], upraveno dle [56].

2.4 Anodická oxidace

Anodická oxidace je elektrochemická metoda pro vytvoření oxidové vrstvy na kovovém povrchu. Z kovového materiálu (anody), ponořeného do vhodného elektrolytického roztoku, je odebírán elektron a protielektroda (katoda) se oxiduje. Jedná se tak o zrychlený oxidační proces, který je zesílen přirozenou oxidační vrstvou kovu. Mezi kovový materiál a protielektrodu, oboje ponořené v kyselém roztoku, je přiložen stejnosměrný elektrický potenciál, přičemž elektrický proud procházející elektrolytem je relativně nízký. Znárodnění procesu na obr. 11 je uvedeno na případu anodické oxidace v roztoku kyseliny šťavelové. Vrstvy získané anodickou oxidací jsou obecně velmi husté, stabilní a s různými mikrostrukturálními vlastnostmi. Vlastnosti výsledných vrstev jsou pak navíc závislé na typu použitého elektrolytu, délce oxidace, teplotě elektrolytu a vlastnostech výchozího materiálu. [57]



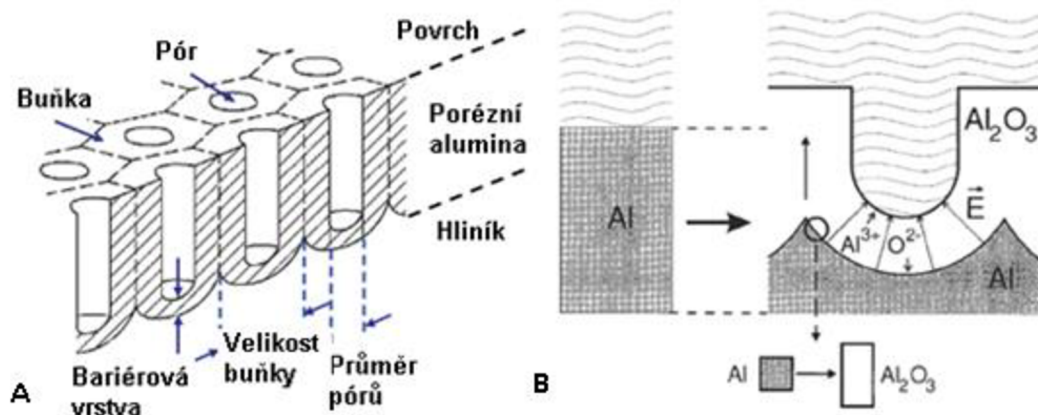
Obr. 11: Anodická oxidace v kyselině šťavelové.

2.4.1 Anodická oxidace hliníku

Pro využití v sensorice je anodická oxidace nejčastěji využívána především pro přípravu nanoporézní aluminu (AAO, oxidu hlinitého). Anodizací hliníkové vrstvy / fólie dostáváme vrstvu oxidu hlinitého obsahujícího pravidelně hexagonálně uspořádané nanopóry. Nanoporézní alumina je hojně využívaným a dobře známým materiálem s ověřeným výrobním procesem. Vytvoření vrstvy oxidu hlinitého předcházela příprava čistého hliníku před přibližně 150–ti lety [58]. První vrstvy oxidu hlinitého byly připravovány za účelem pasivace povrchů tenkou oxidovou vrstvou metodou anodické oxidace kovu v elektrolytu s neutrálním pH. V roce 1953 byl neutrální elektrolyt nahrazen kyselým (konkrétně kyselinou fosforečnou) a tím byla získána nanoporézní aluminová struktura obsahující samospořádané a rovnoběžné nanopóry s definovaným průměrem. V roce 1989 byla publikována výroba prvních membrán na bázi aluminu s plně kontrolovatelnou velikostí pórů [59]. Vlastnosti získaných nanoporézních membrán (průměr pórů, vzdálenost mezi póry atd.) jsou silně závislé na anodizačním napětí a typu zvoleného kyselého elektrolytu. Délka pórů je pak dána tloušťkou anodizované hliníkové fólie / vrstvy s tím, že vlivem oxidace dojde k nárůstu tloušťky vrstvy přibližně 1,4 krát [4]. Schéma hexagonálního uspořádání nanoporézní aluminu a zvýšení objemu hliníkové vrstvy na uvedeno na obr. 12.

Nanoporézní alumina je v praxi nejběžněji vyvíjena dvěma způsoby: pro přípravu volných nanoporézních membrán z hliníkových fólií vysoké čistoty nebo vytvořením nanoporézní AAO masky z tenké hliníkové vrstvy deponované na pevný substrát, která

slouží k depozicím materiálů do připravených pórů. Obojí je blíže popsáno v podkapitolách 2.5 a 2.6.1.



Obr. 12: Schéma hexagonálního uspořádání nanoporézní aluminu (A) a schéma zvýšení objemu hliníkové vrstvy během anodizace (B), upraveno dle [60].

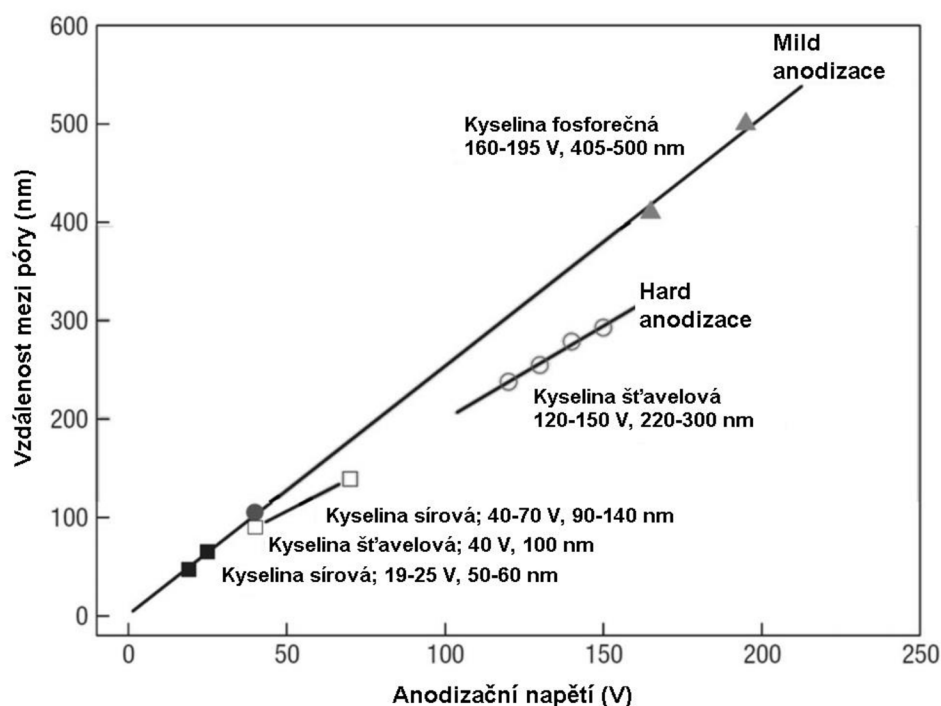
2.5 Nanoporézní membrána z oxidu hlinitého

Nanoporézní membrány jsou již nějaký čas hojně studovány a neustále jsou nacházeny široké možnosti jejich uplatnění [8, 61, 62]. Výchozím materiálem pro přípravu AAO membrán jsou hliníkové fólie vysoké čistoty (99,999 %), nejčastěji o tloušťkách v rozmezí od cca 10 μm do 500 μm . Proces výroby nanoporézních membrán se skládá ze tří částí. První částí je tzv. předzpracování (z angl. pretreatment), které představuje čištění a leštění hliníkové fólie (žihání, „electropolishing“) pro odstranění vnějších poškození povrchu a krystalických defektů materiálu. Strukturu surové hliníkové fólie s ukázkou běžných defektů lze pozorovat na SEM snímku (Obr. 67). Další částí výroby je samotná anodizace hliníkové fólie probíhající při snížené teplotě (0–17 $^{\circ}\text{C}$). Jedná se o proces, při kterém dochází k elektrochemické oxidaci hliníku přiložením kladného napětí na hliníkovou fólii ponořenou v kyselém elektrolytu. Formování aluminové vrstvy je vysoce termodynamická reakce, která mimo teploty závisí i na koncentraci a pH elektrolytu. Během anodizace s časem roste pravidelnost získané struktury a náhodně vznikající póry se postupně formují do struktury uspořádaných šestiúhelníků – tzv. medové plástve. Uprostřed každé hexagonální buňky se nachází jeden pór o kruhovém průřezu (Obr. 12, A).

Spontánní oxidace hliníku je dána změnou Gibsovy volné energie, kdy výsledkem reakcí jsou: oxid hlinitý (Al_2O_3), hydroxid hlinitý ($\text{Al}(\text{OH})_3$), hlinité ionty (Al^{3+}) a aluminové anionty (AlO^{2-}). Lze rozlišit tři typy anodizace: pulzní anodizace, anodizace

za konstantního proudu a anodizace za konstantního napětí, která patří mezi nejčastěji využívané.

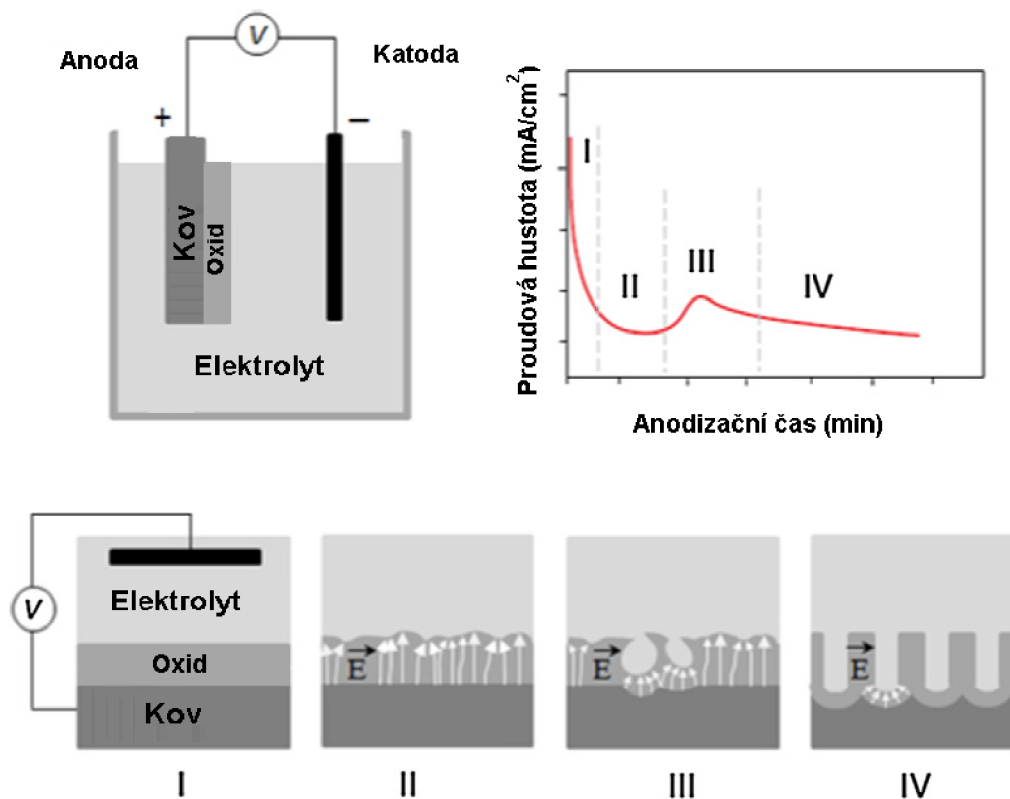
Anodickou oxidací za konstantního napětí lze provádět dvěma způsoby: buď jako „mild“ nebo „hard“ anodizaci. Typy anodizačního procesu lze rozdělit dle velikosti anodizačního napětí v závislosti na zvoleném elektrolytu (Obr. 13).



Obr. 13: Zobrazení anodizačních napětí a výsledných vzdáleností nanopórů při „mild“ a „hard“ anodizaci v různých typech elektrolytů, upraveno dle [60].

První typ anodizace (mild) vede k dosažení uspořádané porézní aluminu při nižších hodnotách napětí, převážně v kyselině sírové, šťavelové nebo fosforečné. Průměry nanopórů jsou lineárně závislé na anodizačním napětí s konstantou $1,25 \text{ nm} \times \text{V}^{-1}$. Druhý typ anodizace (hard nebo také high field) využívá značně vyšší proudovou hustotu (vyšší napětí) než „mild“ anodizace. Výsledkem je rychlý růst aluminové vrstvy. Tento typ anodizace umožňuje připravit tlustší vrstvy s nižší pórovitostí a menší uspořádaností porů. Vedlejším efektem reakce je velká produkce tepla, které může způsobit odtržení nebo poškození vzniklé struktury. Pro každý elektrolyt je dán v závislosti na druhu, koncentraci a aktivitě elektrolytu rozsah vhodných napětí tak, aby nedošlo k poškození anodizované vrstvy (kyselina fosforečná – 200 V, kyselina šťavelová – 120 V, kyselina sírová – 30 V). [63]

Podrobnější schéma vzniku nanopórů se skládá ze čtyř základních fází a je zobrazeno společně s průběhem hustoty proudu na pracovní elektrodě v závislosti na době trvání anodizace na obr. 14.

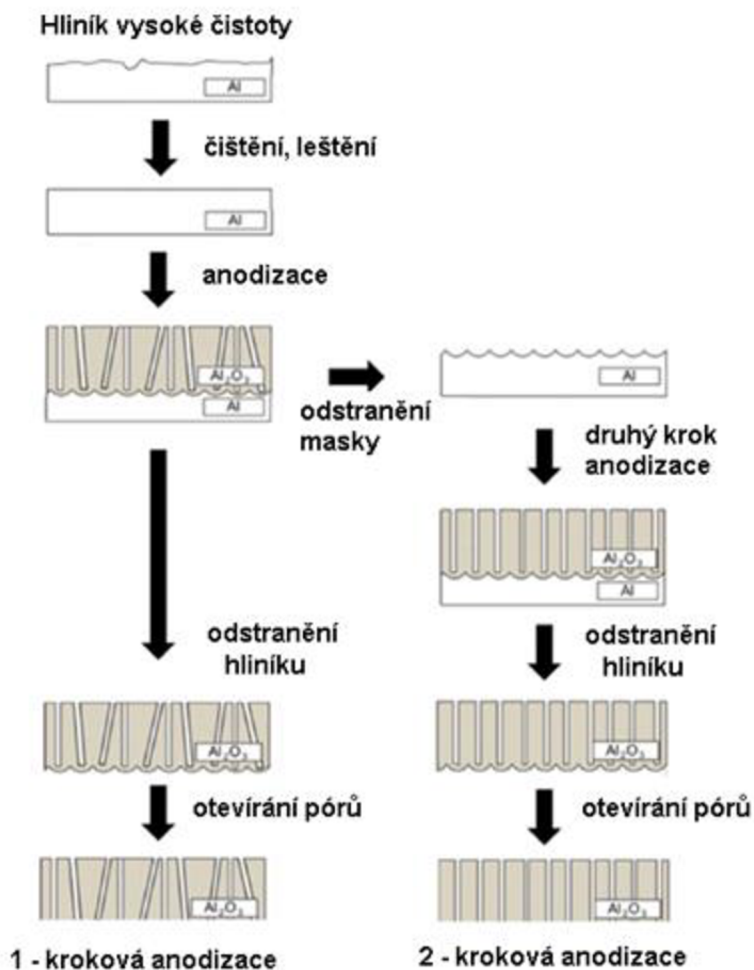


Obr. 14: Schéma znázorňující jednotlivé fáze vzniku samouspořádaných nanopórů při elektrochemické anodizaci: tvorba oxidové vrstvy (fáze I); tvorba jamek v důsledku lokálních nehomogenit elektrického pole (fáze II); počáteční tvorba pórů (fáze III); růst pórů za ustálených podmínek (fáze IV). Uspořádání anodizační aparatury (vlevo nahoře), závislost hustoty proudu na délce anodizace v jednotlivých fázích (vpravo nahoře), schéma tvorby nanopórů v jednotlivých fázích (dole) [6].

Na začátku procesu, při konstantním napětí, je na kovovém povrchu vytvořena kompaktní a rovnoměrná vrstva oxidu a dochází k výraznému poklesu aktuální proudové hustoty (fáze I). Distribuce elektrického pole je silně závislá na nehomogenitách a drsnosti povrchu vzniklé oxidové vrstvy. V místech s většími nehomogenitami dochází na rozhraní elektrody a elektrolytu k lokálním poklesům a zesílením elektrického pole (fáze II), v důsledku čehož dochází k rozpuštění oxidové vrstvy a vzniku prvotních nanopórů (fáze III). Následkem vzniku prvotních pórů dochází ke zvyšování proudové hustoty až do doby, kdy póry pokrývají celý povrch. Poté dochází k růstu jednotlivých pórů, přičemž intenzita elektrického pole je koncentrována ve vrcholcích nanopórů a klesá směrem k jejich stěnám. V této fázi zatím póry nejsou uniformní, ale s délkou

anodizace stále narůstá jejich uspořádanost. V poslední fázi (fáze IV) proces růstu pórů dosáhne ustáleného stavu a vytvoří se rovnoměrně rozložené nanopóry. [6]

Anodizaci můžeme také provádět jednokrokově nebo dvoukrokově (Obr. 15).



Obr. 15: Výroba nanoporézní aluminové membrány: jednokroková a dvoukroková anodizace – upraveno dle [63].

Během počáteční fáze anodizace dochází, před navozením rovnovážného stavu s rovnoměrným růstem oxidu, k větvení a propojování jednotlivých pórů. Proto je výsledkem jednokrokové anodizace nepravidelně uspořádaná struktura na povrchu vzorku a vysoce uspořádaná struktura na dolní části vzorku. Pro odstranění těchto nepravidelností je vhodné provádět anodizaci dvoukrokově. Dvoukroková anodizace je v dnešní době velmi používanou metodou a umožňuje získat vysoce uspořádanou nanoporézní strukturu oxidu hlinitého. Prvním krokem této metody je předzpracování krátkou anodizací vrchní vrstvy hliníkové fólie. Vzniklý aluminový film je následně odleptán ve směsi kyseliny fosforečné a chromové při teplotě 55–80 °C, čímž získáme

hliníkovou vrstvu s nanodůlky, které slouží jako preferenční místa pro vznik nových nanopórů v druhém kroku anodizace. Druhý krok anodizace je proveden se stejnými nebo podobnými podmínkami jako anodizace v kroku prvním, čímž je dosaženo vyššího uspořádání vrstvy. Bylo zjištěno, že vícezkroková anodizace nemá na výsledek lepší vliv, než dvoukroková anodizace. [63, 64]

Poslední částí výroby aluminové nanoporézní membrány je tzv. post-treatment. V rámci tohoto kroku jsou odstraněny zbytky neanodizovaného hliníku a dochází k otevírání pórů odstraněním spodní bariérové vrstvy aluminy. Pro odstranění zbytků hliníku je využíváno několika roztoků, jako je například 20% kyselina chlorovodíková s přiloženým napětím 1–5 V. Mezi více využívané metody však patří chemické leptání. Jedním z využitelných roztoků je směs chloridu měďnatého a kyseliny chlorovodíkové, dále nasycený chlorid rtuťnatý, brom v etanolu nebo nasycený síran měďnatý. Aby se při odstraňování bariérové vrstvy předešlo nechtěnému rozšiřování pórů, je leptadlu (kyselině fosforečné, chromové, sírové) vystavena pouze spodní část vrstvy.

2.5.1 Senzory a na bázi oxidu hlinitého

Nanoporézní alumina je hojně využívána v nejrůznějších aplikacích. Její výhodou je především mechanická pevnost, chemická odolnost, nerozpustnost a kontrolovatelné rozměry (délka a průměr) pórů. Využití nanoporézních struktur na bázi aluminy lze rozdělit do několika oblastí [6]:

- Masky pro následnou přípravu nanostrukturovaných materiálů různých tvarů (nanovlákna, nanodrátky, nanosloupky, nanotyčinky, nanotrubice, nanokanátky, nanokužely, nanokroužky, nanopásky a nanočástice) s využitím různých metod: chemické a elektrochemické depozice (viz. podkapitola 2.6.1), sol-gel techniky, odlévání, chemická polymerizace, termální napařování (PVD – Physical Vapor Deposition), chemická depozice z plynné fáze (CVD – Chemical Vapor Deposition) a dalších. Těmito materiály mohou být například:
 - o kovové nanočástice (zlato, stříbro, nikl měď, platina, zinek apod.),
 - o oxidy kovů (MnO_2 , SnO_2 , SiO_2),
 - o polovodivé částice (WO_3 , TiO_2),
 - o slitiny,
 - o polymery atd.
- Katalýza (využití velkého povrchu materiálu vzhledem k celkovému objemu a chemické inertnosti).
- Biomedicínské aplikace (biokompatibilita, růst buněk, tkáňové inženýrství).

- Cílená doprava léčiv („drug delivery“ – biokapsule pro imunoizolaci, léčiva vymývající stenty).
- Senzorické aplikace (optické chemosenzory a biosenzory, elektrochemické senzory a biosenzory) – viz podkapitola 2.5.1.3.
- Aluminové membrány pro molekulární separaci a detekci (separace iontů a molekul, separace aminokyselin a proteinů, organických sloučenin, separace DNA) – viz podkapitola 2.5.1.2.
- Další aplikace (palivové a solární články, fotonické krystaly). [6]

2.5.1.1 Pokrývání aluminových membrán vrstvou kovu

Nanoporézní membrány mohou být pro své další využití v senzorce pokrývány tenkou vrstvou kovu (zlato, platina) nebo kovových nanočástic. [65] Takto nanosené vrstvy mohou být pouze na jedné straně membrány nebo oboustranně a slouží buď jako elektrody nebo jako materiál pro další navazování látek. Pro pokrývání membrán kovem lze využít například vakuového termálního napařování nebo iontového naprašování, kdy dojde k nanosení vrstvy na povrch membrány. Další technikou jsou depozice tenkých vrstev na atomární úrovni, kterými lze pokrýt i vnitřky nanopórů (ALD – Atomic Layer Deposition) [66]. Vodivost nanosených vrstev závisí přímo úměrně na tloušťce nanosených kovových vrstev. Při nanášení tlustších vrstev dochází ke snížení vnějšího průměru pórů [67]. V referenci [61] byla využita pokovená nanoporézní alumina k sestavení impedimetrického senzoru DNA pro detekci oligonukleotidové sekvence viru horečky dengue. Na obě strany nanoporézní aluminu bylo nanoseno 50–100 nm platiny tvořící elektrody. Uvnitř nanopórů byla kovalentně navázána DNA sonda a v přítomnosti komplementární oligonukleotidové sekvence Dengue viru došlo k jeho navázání a tím k ucpání pórů membrány. To způsobilo zvýšení impedance naměřené mezi platinovými elektrodami nanosenými na membráně. Obdobně bylo ucpávání pórů pozorováno na snížení píku diferenčně pulzního voltamogramu v PBS (z angl. Phosphate Buffered Saline) pufru. Podobným způsobem byl dengue virus detekován v referenci [68], kdy byly na membránu oboustranně naprašeny 100 nm tlusté vrstvy platiny, které byly využity jako pracovní a pomocná elektroda. Do vnitřku pórů byly navázány protilátky a BSA (z angl. Bovine Serum Albumin / hovězí sérový albumin). Po navázání viru na protilátky uvnitř pórů došlo ke zvýšení impedance. V referenci [69] byla naprašena platinová vrstva na povrch membrány o průměru pórů 100 nm a tloušťce 60 μm , která slouží k separaci proteinů (BSA, lysozym a myoglobin). Tloušťka platinové vrstvy byla 1 μm a transport proteinů skrz membránu byl podpořen různě velkými hodnotami přiloženého napětí na elektrody umístěné na membráně. Bylo zjištěno, že metoda je

nejselektivnější pro kationty lysozymu, poté pro anionty BSA a nakonec pro neutrální molekuly myoglobinu v závislosti na pH pufru a polaritě přiloženého napětí.

2.5.1.2 *Filtrace s využitím aluminových membrán*

Schopnost řídit velikost průměru pórů a tloušťky membrány vede k hojnému využívání nanoporézní aluminu pro separaci a filtraci látek. Separaci lze chápat jako proces, kdy převádíme danou směs látek na dvě a více oddělených složek pro konečné využití [70]. Lze tak oddělovat například proteiny, těžké kovy nebo je využívat v procesech filtrace a purifikace [8, 71, 72]. Membrány umístěné na vodivé elektrodě mohou také sloužit jako filtry pro částice, které nechceme na elektrodě detekovat. Na základě toho lze konstruovat senzory pro detekci vybraných látek ze směsí biologického původu, jako jsou například krev nebo moč [73]. V publikaci [74] byly propojeny dva přístupy, kdy aluminová membrána slouží jako filtr částic a zároveň je vnitřek nanopórů modifikován biomolekulami, které na sebe specificky váží další biolátky. Jedná se o zařízení navržené pro detekci trombinu, nezbytného pro srážení krve, a to přímo z nijak neupravené krve. Membrána zde slouží jako filtr krevních derivátů, jako jsou krvinky a krevní destičky. Uvnitř pórů je pak adsorbován aptamer, který na sebe váže trombin. Dále jsou na takovou strukturu specificky navázány protilátky trombinu adsorbované na zlatých nanočásticích obalených stříbrem. Tato struktura způsobí zablokování nanopórů membrány a zabráni tak průchodu $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ iontům, čímž dojde k poklesu voltametričeského signálu detekovaného na druhé straně membrány.

Na základě membrán z oxidu hlinitého jsou konstruována více či méně složitá zařízení pro různá biosenzorická využití. V referencích [71, 75] jsou využity membrány v konstrukci mikrofluidních čipů s oboustranně průchodnou membránou pro separaci biomolekul na základě isoelektrického bodu molekul (BSA, hemoglobin) a detekci prošlého protirakovinného léčiva. Dále byl zkonstruován mikrofluidní senzor pro refraktometrickou detekci glukózy, kdy jsou molekuly tříděny na základě jejich velikosti. Některé molekuly membránou prochází a jiné jsou zachyceny [8]. Také bylo vyvinuto zařízení pro sledování účinnosti antibiotik založené na nanoporézní membráně sloužící jako filtr ve spojení s optickým detekčním systémem. Zmíněné zařízení umožňuje rychlé ověření účinnosti daných antibiotik na bakteriální buňky z pacientova sputa při diagnóze pooperačního zápalu plic. Pomocí digitální kamery je pak opticky detekováno množství přeživších bakterií v závislosti na čase [76].

2.5.1.3 *Modifikace aluminových membrán pro využití v biosenzorice*

Využívání funkcionalizovaných aluminových membrán s velkým povrchem (v důsledku nanostrukturování) nachází uplatnění také v extrakci biomakromolekul

z komplexních směsí kapalin, jako jsou například buněčné lyzáty, vzorky krve nebo séra. Porézní struktura membrán obsahuje nanopóry o velikosti menší než 100 nm v průměru. Je tak vhodná k blokaci mnoha velkých biologických látek a buněk, které obvykle interferují s rovinným povrchem, takže vnitřní aktivní povrchy nanopórů zůstávají vystaveny pouze látkám, které jsou dostatečně malé pro vstup do pórů – proteiny, protilátky, RNA, kratší řetězce DNA a další menší molekuly. [77]

V biosenzorice jsou aluminové membrány využívány především díky jejich chemické inertnosti a velké ploše povrchu. Jejich mírná průhlednost v ultrafialové (UV) a infračervené (IR) oblasti dovoluje přímou detekci absorbance v transmisním módu. Bylo vyvinuto několik typů optických sensorů na bázi nanoporézní aluminy k detekci proteinů (hemoglobin, myoglobin, cytochrom), enzymů (cholesterol, oxidáza, peroxidáza), protilátek, DNA a celých buněk [6].

V současné době dochází k velkému rozvoji v oblasti elektrochemických biosenzorů založených na nanoporézních membránách. Enzymy jsou navázány na povrch aluminy nebo do pórů kovalentně nebo nekovalentně. V publikaci [75] je membrána z oxidu hlinitého modifikována nejdříve OH skupinou, následně silanem, a nakonec je na membráně vytvořena monovrstva TPM (3-(trimethoxysilyl)propyl metakrylát) a PEG (poly(ethylenglykol)). Na takto připravené membráně je testována účinnost protirakovinného léčiva cisplatinu na rakovinné buňky. V referenci [78] je do vnitřku pórů membrány imobilizována jednořetězcová DNA (ssDNA – single stranded DNA) za účelem detekce konkrétní sekvence komplementární DNA (cDNA). Po hybridizaci cDNA s ssDNA dochází k postupné blokaci kanálů a tím se snižuje průchod zlatých nanočástic skrz póry, čímž dojde ke změně impedance. Pro detekci bakterií v mléce byl sestaven impedimetrický imunosenzor, kdy na povrch membrány modifikované kyselinou hyaluronovou jsou navázány protilátky, na které jsou zachytávány patogenní bakterie z mléka. Obdobné využití AAO je v referenci [79], kde je popsán biosenzor, založený na nanoporézní membráně z oxidu křemičitého umístěné na zlaté pracovní elektrodě, který slouží k elektrochemické detekci kardiovaskulárních proteinových biomarkerů z lidského séra. Tím pomáhá předvídat pacientovu náchylnost ke zmíněnému onemocnění. Na pracovní elektrodu je přes disulfidický můstek (SS vazba) navázán streptavidin a na něj biotinylované protilátky, na které se pak specificky váží proteinové biomarkery C-reaktivní protein (CRP) a myeloperoxidáza (MPO). Další druhy elektrochemického imunosenzoru pro detekci glukózy oxidázy a viru dengue byly publikovány v referencích [80-82]. V tomto případě je nanoporézní alumina umístěna na platinové vrstvě. Na celý povrch oxidu jsou adsorbovány protilátky a dále je zbylý povrch pokryt BSA proto, aby docházelo pouze ke specifické vazbě antigenu na protilátky. Obdobným způsobem byl konstruován i biosenzor pro detekci DNA sekvence patogenní

bakterie *Legionella pneumophilla* [83], kde do nanoporézní aluminy na platinovém podkladu je kovalentně navázána specifická jednořetězcová DNA, na kterou se pak navazuje komplementární bakteriální sekvence. Po navázání dojde k zablokování průchodnosti pórů pro částice $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ a útlumu signálu diferenčně pulzního voltamogramu.

2.6 Příprava zlatých nanostrukturovaných povrchů pro biosenzory

Pro přípravu povrchů modifikovaných zlatými nanostrukturami již existuje několik metod. Nejběžnější metodou přípravy zlatých nanostruktur je elektrochemická depozice zlata do připravených nanoporézních AAO masek s vertikálně uspořádanými nanopóry. Tato metoda je hojně využívána pro svou jednoduchost, dobrou reprodukovatelnost, nízkou cenu, univerzálními rozměry výsledných nanostruktur – např. variabilitou poměru průměr / výška. Často jsou nanostruktury také připravovány metodou obrábění fokusovaným iontovým svazkem (FIB – z angl. Focused Ion Beam) nebo nanootiskovou litografií (NIL – z angl. NanoImprint Lithography). V těchto případech se jedná o výrazně dražší metody z hlediska potřeby nanoobráběcích zařízení. Naopak, získané nanostruktury vykazují velmi přesnou geometrii a vysokou reprodukovatelnost výroby. FIB metodou lze vytvářet nanostruktury ve větším rozsahu průměrů a délek než u ostatních běžných metod.

Tabulka 1: Rozptyl velikosti zlatých nanosloupků v závislosti na výrobní metodě [84].

Metoda výroby	Průměr [nm]	Délka [nm]	Vlastnosti
AAO maska, elektrochemická depozice	15 - 200	100 – 8 000	jednoduché, levné, dobrá opakovatelnost, velký rozptyl velikostí.
FIB obrábění	50 – 8 000	30 – 11 000	přímá výroba nanosloupků, velký rozptyl velikostí, dobrá opakovatelnost, vysoká cena.
Nanootisková litografie	100 – 1 100	50 – 4 000	pokryvání polymerních odlitků je běžné, vysoká cena.
Litografie elektronovým svazkem	50 - 200	50 - 285	v kombinaci s elektrochemickou depozicí, dobrá opakovatelnost, vysoká cena.

Další metodou je litografie s využitím elektronového svazku, kdy je využito předstrukturovaného fotorezistu, který slouží jako maska pro následnou depozici zlata. Tato metoda přináší dobrou opakovatelnost, používá se však zřídka z důvodu vysoké ceny. Další velmi zřídka využívaná metoda je uspořádání zlatých nanočástic do nanosloupků s využitím polymerové masky. Rozměry nanosloupků, které lze připravit jednotlivými metodami jsou shrnuty v tabulce (Tabulka 1). [84]

2.6.1 Příprava povrchů modifikovaných nanosloupků s využitím masek

Nejčastěji využívané masky jsou masky s válcovitými nanopóry a jednotnou velikostí nanopórů – masky z oxidu hlinitého vzniklého anodickou oxidací hliníku, jejichž výhody již byly popsány v podkapitole 2.6. nebo leptané polymerní membrány. Dalšími materiály, které mohou sloužit jako masky, jsou například: sklo, silikagely, membrány z oxidu titaničitého, porézní zeolity. Tvar, velikost a rozmístění nanopórů v membránách jsou klíčové parametry pro výslednou geometrii připravených nanosloupků. Některé zmíněné typy membrán jsou již komerčně dostupné (např. AnoporeTM, CycloporeTM – obojí od Whatman, UK), ovšem v omezeném množství typů, tloušťek a rozměrů nanopórů. V praxi je obvykle maska nanosená na planární substrát, který následně slouží jako pevná podložka pro připravené nanostruktury.

Hlavní výhodou aluminových masek (obdobně jako u AAO membrán) je jejich levná technika výroby, která poskytuje samsopřádané a rovnoběžné nanopóry, které jsou kolmé k povrchu a obsahují uniformní průměr nanopórů a délku dosahující až 100 μm . Rozměry nanopórů mohou být přesně řízeny parametry výroby, jako je typ použitého elektrolytu (kyselina šťavelová, fosforečná, sírová), pH kyseliny, anodizační napětí, teplota elektrolytu a čas. Připravené nanopóry AAO masky mohou nabývat průměrů od 4 nm až do několika stovek nanometrů s hustotou nanopórů až 10^{11} pórů na cm^2 . [77, 84]

Pro depozici kovu do připravených nanoporézniích masek je možno využít několika depozičních technik. Nejrozšířenější technikou je elektrochemická depozice, která bude více popsána v podkapitole 2.6.1.1.

Další možností depozice kovu je pak bezproudé pokovování, pro které není třeba, na rozdíl od elektrochemické depozice, vytvářet vodivou vrstvu na jedné straně masky. Je ale třeba využití katalyzátoru, který slouží jako molekulární kotva na stěnách nanopórů. Depozice tak začíná na stěnách nanopórů a rovnoměrně pokračuje po celé jejich délce (až do 50 μm). Pokud je depoziční čas krátký, dojde k vytvoření dutých nanotrubic a až delší depozice (cca 48 hodin) umožní vytvoření plných nanosloupků. Nanosloupky získané touto metodou mohou mít průměry v rozsahu od 10 nm až do 460 nm.

Další metodou vytváření zlatých nanosloupek je metoda termálního napařování (PVD). Touto metodou lze však získat spíše duté nanotrubic, u kterých je vhodné následné zesílení například elektrochemickou metodou. Samotné nanosloupky nanosené PVD metodou nejsou dostatečně mechanicky stabilní pro využití v senzorech. Navíc je u této metody poměrně problematické rovnoměrné nanášení do velmi úzkých a dlouhých / hlubokých nanopórů, kde během depozice dochází i k pokrývání samotné masky.

2.6.1.1 Elektrochemická depozice s využitím AAO masek

Elektrochemická depozice je technika pro materiálovou syntézu, kdy dochází k vyredukování materiálu z elektrolytu. Jako první použil galvanické pokovování zlatem Luigi Brugnatelli v roce 1805. Od té doby se možnosti depozice rozšířily o další kovy a slitiny včetně kovových solí. V poslední době vznikla možnost také galvanicky nanášet oxidy kovů, sulfidy kovů, polovodiče a vodivé polymery. Základem depozičního procesu je závislost na difuzi nabitých částic v roztoku směrem k pracovní elektrodě. Tento proces je řízen Nernstovou rovnicí:

$$E = E_0 + \frac{R \cdot T}{n \cdot F} \cdot \ln(a), \quad \text{Rovnice 16}$$

kde E je rovnovážný elektrodový potenciál [V], E_0 je standardní elektrodový potenciál [V], R je plynová konstanta [$8,31 \text{ J} \times \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$], T je teplota [K], n je počet vyměněných elektronů, F je Faradayova konstanta [$9,65 \text{ C} \times \text{mol}^{-1}$], a je aktivita částic v roztoku. [85, 86]

Pokud je přiložený potenciál větší než rovnovážné napětí, dojde k oxidaci iontů a je-li tomu naopak, pak je oxidace nahrazena redukcí.

V posledních letech se zvyšuje zájem o vytváření nanomateriálů s řízenými rozměry a dobře definovanou distribucí nanostruktur. Výroba nanostruktur s využitím masek je závislá především na tvaru masky, která umožňuje v kombinaci s galvanickou depozicí vytvářet velmi zajímavé nanostruktury. Úpravou experimentálních podmínek galvanické depozice můžeme optimalizovat rozměry, materiály a morfologii nanostruktur. [1]

Elektrochemická depozice může být také provedena pulzně. Elektrodepozice je provedena přikládáním proudu o definované amplitudě, dané délce pulsu a časem mezi pulzy [87]. Délka vyrobených nanostruktur je pak závislá i na počtu depozičních pulzů.

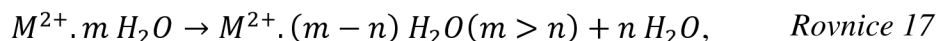
Elektrochemická depozice je nejrozšířenější metodou pro přípravu nanoteček, nanosloupek či nanotrubic s využitím AAO masky vytvořené na elektrodové oblasti senzoru. Pro depozici kovu touto metodou je nutné, aby byla jedna strana nanoporézní

masky pokryta elektricky vodivou vrstvou kovu vytvořenou například termálním napařováním nebo naprašováním. Obvykle se jedná o kovovou vrstvu tvořící elektrodu senzoru vytvořenou na pevném substrátu, která je převrstvena nanoporézní aluminou. Tato kovová vrstva během depozice nanostruktur slouží jako katoda. Po dokončení depozice je nanoporézní maska je v posledním kroku výroby rozpuštěna ve vhodném rozpouštědle (například hydroxid draselný nebo oxid chromový ve směsi s kyselinou fosforečnou). Výsledné rozměry nanostruktur vzniklých elektrochemickou depozicí s využitím AAO masek jsou dány průměrem a délkou nanopórů masky, ale také řízením množství deponovaného zlata – např. počtem pulzů nebo délkou depozice (delší depozice umožní nadeponování většího množství materiálu, a tím umožní vznik delších nanostruktur). [84, 86, 88, 89]

2.6.1.2 Mechanismus plnění nanopórů kovem

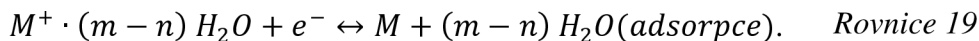
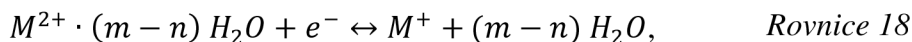
Porozumění mechanismu růstu nanostruktur v porézních maskách hraje důležitou roli v cíleném řízení tvaru nanostruktur připravených elektrochemickou depozicí do masek. Redukční proces, při kterém dochází k vyredukování kovových iontů z roztoku a jejich následné adsorpci na povrch katody se skládá ze tří kroků:

1. V prvním kroku depozičního (redukčního) procesu klesá počet hydratovaných kovových iontů a kovové ionty se přeskupují směrem k povrchu katody:



kde M označuje kov, který je z roztoku redukován.

2. V dalším kroku kovové ionty obklopené molekulami vody se krok po kroku vyredukují a přeskupí k bezprostřední blízkosti katody:



3. V posledním kroku se adsorbované atomy kovů zbaví přebytečné hydratační vrstvy a vstoupí do krystalové mřížky:



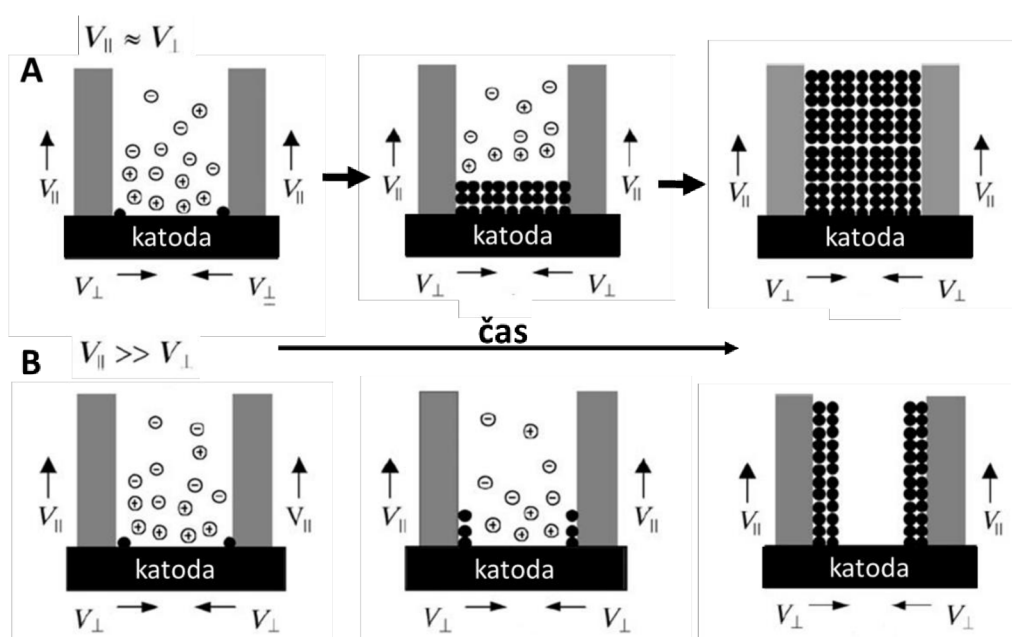
Rychlost pohybu kovových iontů v elektrickém poli (E) je dána rovnicemi:

$$\gamma_+ = U_+ \cdot \frac{dE}{dl}, \quad \text{Rovnice 21}$$

$$\gamma_- = U_- \cdot \frac{dE}{dl}, \quad \text{Rovnice 22}$$

kde γ_+ je rychlost pohybu kovových kladných iontů [$\text{m} \times \text{s}^{-1}$], U_+ je mobilita kladných iontů kovů [$\text{m}^2 \times \text{s}^{-1} \times \text{V}^{-1}$], γ_- a U_- jsou pak rychlost pohybu a mobilita negativních iontů, dE/dl je potenciálový gradient [$\text{V} \times \text{m}^{-1}$]. [90]

Základní mechanismus plnění nanoporézních masek kovem je zobrazen na obr. 16.



Obr. 16: Mechanismus plnění nanopórů kovem upraveno dle [90]. Růst nanosloupků (A) znamená, že rychlost růstu ve směru rovnoběžném ke směru proudu v_{\parallel} je přibližně stejná k rychlosti růstu ve směru kolmém ke směru proudu v_{\perp} ($v_{\parallel} \approx v_{\perp}$). Růst nanotrubic (B) znamená, že růst ve směru rovnoběžném ke směru proudu je výrazně větší, než ve směru kolmém ke směru proudu ($v_{\parallel} \gg v_{\perp}$).

V momentě, kdy ionty dorazí ke katodě, redukují se a vstupují do krystalové mřížky. Dle hypotézy si nejprve ionty jako preferenční místo zvolí rozhraní mezi kovovou katodou a na ní kolmou stěnou nanopóru. Další směr růstu kovových nanostruktur závisí na rychlosti růstu ve směru kolmém ke směru proudu v_{\perp} a rychlosti růstu ve směru rovnoběžném ve směru proudu v_{\parallel} . To, že dochází k růstu nanosloupků (nanostruktury vyplněné kovem v celém objemu, obr. 16, A) znamená, že rychlost růstu ve směru rovnoběžném ke směru proudu v_{\parallel} je přibližně stejná rychlosti růstu ve směru kolmém ke směru proudu v_{\perp} ($v_{\parallel} \approx v_{\perp}$). V případě, že by rychlost růstu ve směru rovnoběžném ke

směru proudu byla výrazně větší, než ve směru kolmém ke směru proudu ($v_{\parallel} \gg v_{\perp}$), docházelo by k růstu nanotrubic (dutých nanostruktur, obr. 16, B). Výsledná morfologie nanostruktur je tedy závislá na konkurenčních rychlostech v_{\parallel} a v_{\perp} . V praxi to znamená, že je-li přiloženo pole o nízké proudové hustotě, má tak malý vliv na v_{\parallel} a v_{\perp} , což znamená, že obě hodnoty jsou přibližně stejné ($v_{\parallel} \approx v_{\perp}$) a dochází k růstu nanosloupků. Přiložení pole o vysoké proudové hustotě vede k velkým hodnotám dE/dl , což způsobí zvýšení rychlosti růstu v rovnoběžném směru ke směru proudu ($v_{\parallel} \gg v_{\perp}$) a kovové ionty vytváří trubicové struktury. [90, 91]

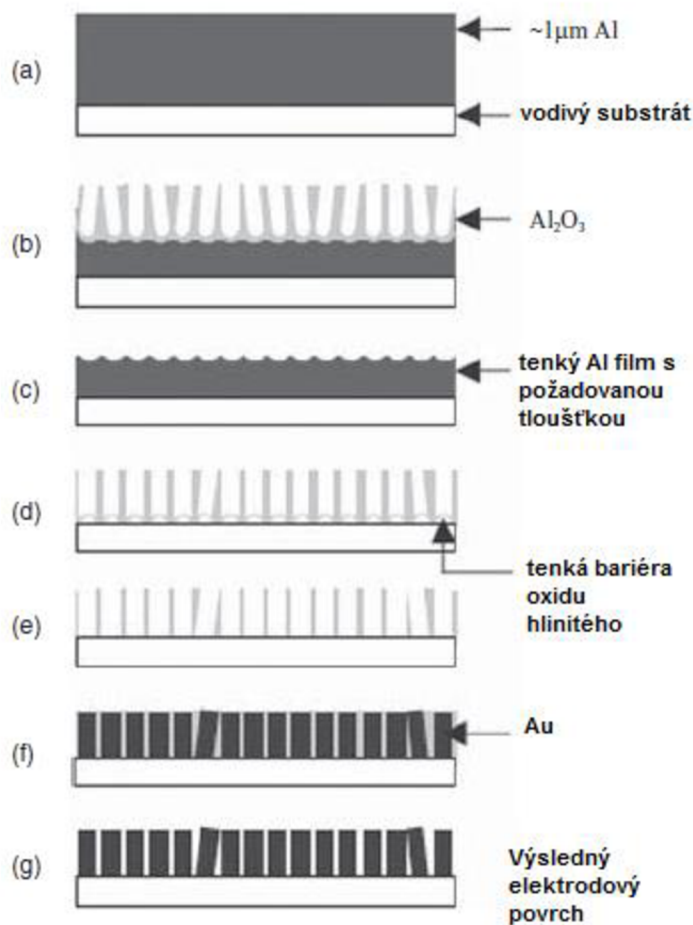
2.7 Nanostrukturované povrchy vytvořené pomocí aluminové masky

V posledních letech je příprava nanostrukturovaných povrchů z nejrůznějších materiálů sledována a dále zkoumána. Velmi aktuálním tématem jsou uspořádaná pole nanosloupků, jelikož poskytují velké množství aplikací v mnoha různých oblastech. Velmi často jsou využívány například při fotokatalýze, v elektrochemii, výzkumu baterií a především v biosenzorických aplikacích. Nanostrukturované povrchy vykazují výborné elektronické vlastnosti a umožňují přípravu nízkoimpedančních elektrod. Ostré vrcholky nanostruktur mohou také sloužit k lepšímu zachycení buněk na povrch nanostrukturovaných elektrod. V biosenzorice nanostrukturované povrchy zvyšují senzitivitu senzorů díky jejich velkému poměru stran (angl. aspect ratio) [77]. Vyrobené struktury mohou být z různých materiálů: kovy (zlato [40,92,93], stříbro [94-96], nikl [97]), vodivé polymery, polovodiče [98] a další.

2.7.1 Postup výroby povrchů modifikovaných zlatými nanosloupky

Pro elektrochemické aplikace je velkou nevýhodou některých nanostrukturovaných povrchů to, že po kontaktu s kapalným prostředím a přiložením elektrického napětí může docházet k deformacím v uspořádání nanostruktur [12]. Zde se jeví jako výhodné využití pevných povrchů modifikovaných zlatými nanosloupky.

Celý proces výroby zlatého nanostrukturovaného povrchu s dvoukrokovou anodizací lze pozorovat na obr. 17. V prvním výrobním kroku je na vodivý substrát nanesena vrstva hliníku (Obr. 17, a). V dalším kroku se hliníková vrstva, podobně jako při výrobě AAO membrán (viz. kapitola 2.5) anodicky oxiduje a vzniká nanoporézní alumina (Al_2O_3) s prozatím méně uspořádanými póry (Obr. 17, b). Proces provedený dvoukrokově (jak bylo uvedeno v kapitole 2.5) má za cíl vytvoření struktury s vysoce uspořádanými póry. Proto je alumina vzniklá v prvním kroku anodizace odleptána a získáváme hliníkový povrch s „nanodůlky“, které budou sloužit jako preferenční místa pro vznik nových a pravidelnějších nanopórů (Obr. 17, c).



Obr. 17: Výroba zlatých nanosloupků využitím nanoporézní aluminové masky: a) depozice hliníkové vrstvy na povrch elektrody, b) první krok anodizace, c) odstranění masky vzniklé v prvním anodizačním kroku, d) druhý krok anodizace, e) proražení bariérové vrstvy, f) elektrochemická depozice zlata do aluminové masky, g) odstranění masky, upraveno dle [99].

Následuje druhý krok anodizace provedený za stejných podmínek jako krok první (Obr. 17, d), na jehož konci dojde k proražení bariérové vrstvy (Obr. 17, e) a získáme nanoporézní masku pro následnou depozici zlata do pórů. Před depozicí je možné provést rozšíření pórů leptáním v zahřáté 5% kyselině fosforečné, není však podmínkou. Následuje elektrochemická depozice zlata (Obr. 17, f), po níž se maska selektivně odstraní a získáme povrch pokrytý zlatými nanosloupky (Obr. 17, g). [99] Obdobným způsobem je možné vytvořit nanosloupky i z jiných kovů (stříbro).

2.7.1.1 Funkcionalizace a modifikace elektrod pokrytých zlatými nanostrukturami

Zlaté nanostrukturované povrchy v porovnání s povrchy z dalších kovových materiálů přináší spoustu výhod: jsou chemicky inertní, biokompatibilní a nabízí možnost funkcionizace cestou thiolových skupin, které umožňují navázání řady dalších látek

biologické povahy. Možnost funkcionalizace usnadňuje využití zlatých povrchů v biosenzorických aplikacích a je pro ně využívána celá řada metod.

První významnou metodou je tvorba samouspořádaných monovrstev (SAM z angl. Self-Assembled Monolayer). Tato metoda umožňuje reprodukovatelně imobilizovat orientované a organizované molekuly na různé typy kovových povrchů přes různé typy funkčních skupin. Modifikace povrchů metodou SAM s využitím thiolových skupin přináší velmi silnou kovalentní vazbu mezi –SH skupinou a zlatým materiálem. Kvůli této silné vazbě však není možné SAM vrstvy z povrchu odstranit a znovu je použít [100]. Při využití SAM v biosenzorech, zabráňují monovrstvy přiblížení rozpouštědel k povrchu elektrody, což má za následek snížení nefaradaických proudů [101]. SAM metody bylo prvně využito pro výrobu enzymových elektrod pro amperometrickou detekci glukózy a peroxidu vodíku, kde zlaté nanostrukturované povrchy byly funkcionalizovány uspořádanými vrstvami 2–merkaptóethylaminu a 3–merkaptopropionové kyseliny [101,102]. Lee a kol. na elektrodách modifikovaných nanosloupky detekovali změny impedance pro různé stupně vazby páru biotin - avidin. Na elektrody s nanosloupky nejprve imobilizovali 11–merkaptoundekanovou kyselinu (MUA) pomocí SAM metody a poté aktivovali –COOH skupinu na MUA. U modifikovaných elektrod pak byla měřena změna impedance při vzrůstající koncentraci biotinu (od 1 ng/ml do 50 ng/ml) [103]. Další aplikací SAM metody jsou buněčné kultury. Haq a kol. modifikovali povrch se zlatými nanosloupky monovrstvami cysteinu, které byly dále pokryty proteinem poly–L–lysinem, který podporoval adhezi neuronálních buněk. [104]. V další studii byly dva typy monovrstev připraveny pro růst primárních kortikálních krysích neuronů [105].

Dalším typem modifikace zlatých nanostruktur je polymerní funkcionalizace. Vodivé polymery (např. poly (3,4–ethylendioxythiofen)) mohou být využity jako alternativa SAM monovrstev například pro funkcionalizaci glukózaoxidázou a následnou detekci glukózy [106].

Zlaté nanostrukturované povrchy mohou být dále funkcionalizovány proteiny (např. fibronektin, cysteamin), jejichž výhody oproti SAM jsou především v možnosti jejich selektivního odstranění z povrchů pomocí enzymů (např. trypsin), což umožňuje opakované použití připravených nanostrukturovaných povrchů. [105]. Další modifikace mohou zahrnovat modifikace oxidy kovů [107].

2.7.2 Elektrochemická impedanční charakterizace elektrod modifikovaných nanosloupky

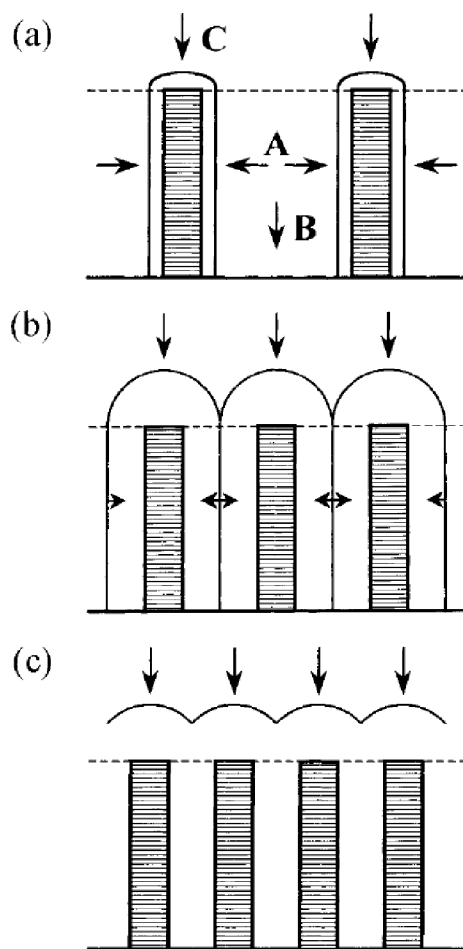
V elektrochemickém systému můžeme změnu impedance elektrody využít k charakterizaci změn na rozhraní elektrody a elektrolytu. Tato vlastnost nachází využití

například v afinních elektrochemických biosenzorech, kde jsou měřeny změny impedance elektrod způsobené navázáním molekul. [12, 108, 109]. Nanostrukturované povrchy se v biosenzorice obecně využívají pro zvýšení elektroaktivního povrchu elektrod. Při navázání biomolekul (enzymy, protilátky, hormony a další proteiny) na nanostrukturované povrchy ovšem mohou sloužit také jako přenašeče náboje mezi biomolekulami a povrchem elektrody. Při měření v koncentrovanějších roztocích mají ionty větší tendenci pronikat hlouběji mezi nanosloupky než při měření v nízké koncentrovaných roztocích, kdy máme k dispozici menší počet iontů. Elektroaktivní plocha je tak přímo úměrná rostoucí koncentraci elektrolytu až do mezní hodnoty, od které je pak velikost elektroaktivní plochy konstantní.

2.7.3 Difuze elektrolytu mezi nanosloupky při voltametrickém měření

V případě hodnocení voltametrických měření na poli nanosloupků je nutno uvažovat difuzi řízené faradické reakce. Tyto reakce jsou založené na nelineárních difuzních profilech jednotlivých nanosloupků vzájemně se překrývajících v daném čase. Schematicky jsou jednotlivé případy zobrazeny na obr. 18. Prvním případem difuzních podmínek jednotlivých nanosloupků zobrazeným na obr. 18 (a) je případ, kdy difuzní tok každého nanosloupku je řízen přibližně cylindrickou difuzí po stranách každého nanosloupku. V druhém případě uvedeném na obr. 18 (b) je difuzní tok řízen vodivou podkladovou vrstvou mezi nanosloupky a v posledním případě na obr. 18 (c) je difuzní tok řízen difuzí na horním povrchu každého nanosloupku, což může být v počátečním krátkém čase považováno za přibližně lineární difuzi a vyvíjí se do přibližně hemisférické difuze. V případě individuální nelineární difuze je celkový tok pole nanosloupků dán součtem všech vzájemně nezávislých toků každého nanosloupku (Obr. 18 (a)). Nicméně, tento případ difuze bude trvat pouze do doby, než se rozšiřující boční cylindrické difuzní vrstvy začnou překrývat - například v krátkém čase po nástupu difuzního toku v polích s dodatečně vzdálenými nanosloupky. S rostoucím časem se difuzní vrstvy kolem každého nanosloupku rozšiřují až do kompletního překryvu (Obr. 18, (b)). Posledním případem je „limitní lineární případ difuzního toku“, kde difuzní tok v objemovém elementu mezi nanosloupky je úplně vyčerpán a difuzní transport probíhá mezi vrchními částmi nanosloupků a přilehlým množstvím elektrolytu v přibližně lineárním difuzním vzoru.

Zatímco voltametrická odezva je řízena vysoce nelineárním difuzním modelem (případ (a) a (b)). Případ (c) je ekvivalentní k lineární difuzi na elektrodě, jejíž elektrochemicky aktivní povrch je redukován a je dán pouze součtem horních povrchů všech nanosloupků. [89]



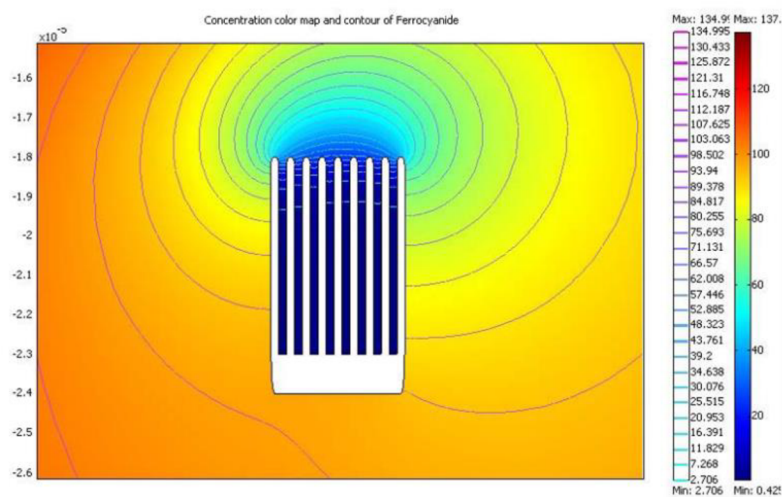
Obr. 18 Schéma difuze převládajících na povrchu pokrytém nanosloupky: individuální nelineární případ (a), případ úplného překryvu (b), limitní lineární difuzní případ (c) [89].

V elektrochemických senzorech a biosenzorech má velký vliv na proudovou odezvu také kinetika přenosu hmoty v blízkosti rozhraní elektrody a elektrolytu [42]. Anandan a kol. testovali uspořádaná pole zlatých nanosloupků s různou délkou (1 μm , 2,5 μm a 6 μm) v různých koncentracích redoxního $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Zjistili, že nanostrukturované povrchy s různou délkou struktur vykazují téměř stejnou citlivost, ačkoliv citlivost nanostrukturovaných povrchů je o dost větší než citlivost naměřená pro hladkou zlatou elektrodu (Tabulka 2).

Autoři tvrdili, že tento jev mohl být způsoben obtížným pronikáním částic redoxní látky do malých prostorů mezi nanosloupky v důsledku nízké difuzivity a konstanty přenosu náboje. Částice mají problém pronikat hluboko do míst mezi nanosloupky pokud je difuzivita moc nízká nebo rychlostní konstanta přenosu náboje moc vysoká. Za těchto okolností se předpokládá, že s roztokem reagují pouze horní části nanosloupků a pouze tam dochází k oxidaci $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

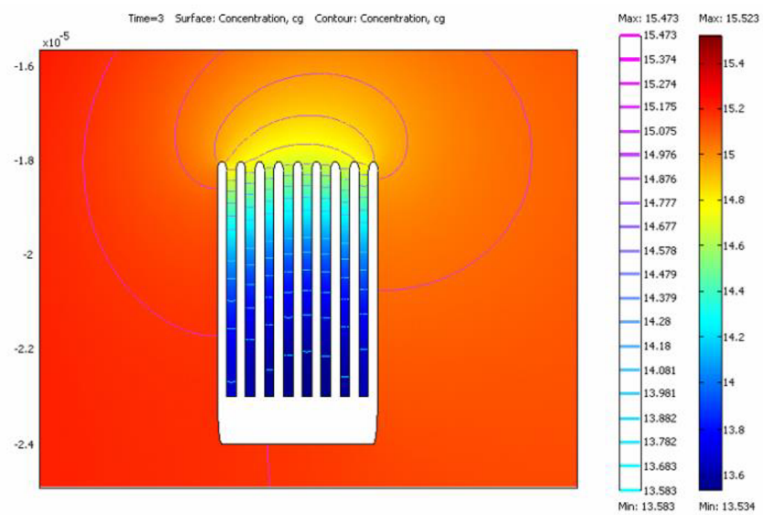
Tabulka 2: Citlivost elektrod s různými délkami nanosloupků a ploché elektrody, upraveno dle [42].

vzorek	Faktor drsnosti / délka nanostruktur	Citlivost elektrody k $K_4[Fe(CN)_6]$ [$\mu A \times mM^{-1} \times cm^{-2}$]	Citlivost elektrody ke glukóze [$\mu A \times mM^{-1} \times cm^{-2}$]
Plochá elektroda	1 / -	19,3	0,27
Nano A	28 / 1 μm	41,4	0,91
Nano B	38,8 / 2,5 μm	41,05	1,8
Nano C	63,4 / 6 μm	41,7	3,13



Obr. 19: Graf koncentrace $K_4Fe(CN)_6$ v blízkosti elektrody, převzato z [42].

Situace se ovšem výrazně změnila poté, co byly nanosloupky funkcionalizovány glukóza oxidázou (SAM). Citlivost nanostrukturovaných elektrod stoupala s délkou nanosloupků (s rostoucím poměrem stran), což bylo přičítáno změně v elektrochemických reakcích a kinetice transportu. Simulovaný graf koncentrace $K_4[Fe(CN)_6]$ a glukózy je zobrazen na konturových grafech (Obr. 19, Obr. 20). [42]



Obr. 20: Graf koncentrace glukózy v blízkosti elektrody, převzato z [42].

3 Cíle dizertační práce

Tato práce se zabývá studiem nanoporézní aluminy jako vhodného nástroje pro realizaci přesně definovaných nanostrukturovaných elektrod a membrán elektrochemických senzorů a biosenzorů. Jak vyplývá ze současného stavu problematiky uvedeného v kapitole 2, existuje již řada prací, kde byla nanoporézní alumina pro senzorické aplikace využita – buď jako maska pro přípravu elektrod modifikovaných uspořádanými poli nanostruktur nebo jako membrána vhodná například pro zachycení látek ze směsi, filtraci nebo pro další modifikace. Problémem je, že dosud nebyla přesně a komplexně popsána problematika charakterizace nanostrukturovaných povrchů připravených pomocí aluminové masky. Tato práce se postupně zabývá přípravou a postupnou optimalizací povrchů s dostatečně stabilními a uspořádanými poli zlatých nanostruktur. Je hledán optimální typ nanostrukturovaného povrchu pro zlepšení vlastností elektrod vhodných pro konstrukci elektrochemických senzorů. Dále jsou studovány metody pro elektrochemickou charakterizaci nanostrukturovaných elektrod, které jsou v průběhu studia také neustále optimalizovány. Povrchy jsou charakterizovány i opticky s využitím rastrovací elektronové mikroskopie a je testován vliv modifikace nanostrukturovaných povrchů na elektrochemická měření.

Dále se práce zabývá studiem nanoporézních membrán z aluminy. Je studována jejich příprava, charakterizace a propustnost pro vybrané molekuly. Tato práce je navázána i na projekt FCH/FEKT-J-15-2663 získaný ve spolupráci s Fakultou chemickou v roce 2015.

Cílem dizertační práce je nalezení optimálních parametrů nanostrukturovaných povrchů tak, aby byly co možná nejvíce vhodné pro využití v elektrochemické detekci, případně separaci / filtraci látek. Vhodné parametry nanoporézních struktur by tak měly přispět ke zlepšení parametrů současných senzorů v oblasti jejich miniaturizace a snížení detekčních limitů. Tímto má práce navázat na mé předchozí zkušenosti získané během řešení bakalářské a diplomové práce [110, 111], kde se ukázalo, že nanostrukturované povrchy mohou mít významný vliv na detekční limit a citlivost elektrod. Optimalizované nanostrukturované povrchy by se do budoucna mohly stát i standardem u komerčních senzorů.

Hlavní cíle práce lze rozdělit na několik dílčích cílů, mezi které patří zejména:

1. Studium přípravy nanoporézní aluminy a jejího využití pro přípravu nanostrukturovaných povrchů a to jako masky pro výrobu nanostruktur nebo nanoporézní membrány pro další využití a modifikace. Studium přípravy nanostrukturovaných povrchů s využitím optimalizovaných masek z nanoporézní aluminy.

2. Studium elektrochemických dějů na rozhraní nanostrukturované elektrody a elektrolytu s využitím elektrochemické impedanční spektroskopie a voltametrických metod.
3. Příprava a charakterizace zlatých nanostrukturovaných povrchů s různými parametry (velikost a rozložení nanostruktur, využití různých materiálů kovových vrstev substrátu) pro elektrody elektrochemických senzorů. Optická charakterizace rastrovacím elektronovým mikroskopem a elektrochemická charakterizace EIS a voltametrickými metodami.
4. Porovnání nanostrukturovaných povrchů modifikovaných nanostrukturami o různých velikostech (průměr a délka nanostruktur) pro využití v sensorice. Biomodifikace připravených povrchů a studium vlivu biomodifikace na elektrochemická měření (EIS a voltametrická měření).
5. Příprava různých typů nanoporézních membrán na bázi aluminy a studium samovolné difuze látek o různých parametrech skrz membrány na základě koncentračního gradientu.

Je předpokladem, že splnění výše uvedených dílčích cílů povede k přípravě nanostrukturovaného povrchu s co nejoptimálnějšími parametry tak, aby byl vhodný pro využití v sensorice. Zvýšení elektroaktivní plochy pracovní elektrody modifikací povrchu nanostrukturami při zachování malé geometrické plochy by mimo předpokládaného zlepšení odezvy a limitu detekce pro vybrané analyty umožnilo například i snížení množství vzorku potřebného pro provedení analýzy. Zvládnutí procesu přípravy nanoporézní aluminy nadále povede k efektivnější modifikaci elektrod elektrochemických senzorů pomocí nanostruktur z vhodných kovů.

4 Použité materiály a metody

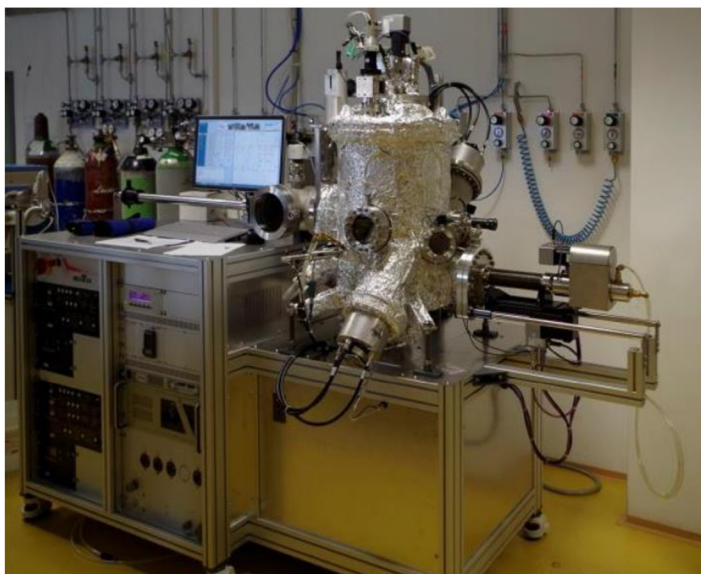
V této kapitole jsou shrnuty všechny základní materiály, chemikálie, výrobní aparatury, použité přístroje a analytické metody, které byly využity při realizaci práce.

4.1 Výroba nanostrukturovaných elektrod se zlatými nanosloupky

Výrobu nanostruktur můžeme rozdělit do dvou základních kroků. Prvním krokem je příprava tenkých vrstev. Druhým krokem je příprava nanoporézních masek a následná depozice zlata do připravené nanoporézní masky.

4.1.1 Příprava tenkých vrstev

Tenké vrstvy byly deponovány na n-dopovaný křemíkový substrát s 500 nm tlustou vrstvou termálního oxidu (SiO_2) metodou vakuového napařování s využitím Kaufmanova iontového zdroje (IBAD – z angl. Ion Beam Assisted Deposition, viz obr. 21, BESTEC, Německo) nebo termálním napařováním (Balzers, Lichtenšnějsko).



Obr. 21: IBAD Napařovačka se dvěma Kaufmanovými iontovými zdroji.

Kvalita nanosených vrstev pomocí IBAD napařování i termálního napařování je mimo jiné závislá na čistotě použitých kovů. Pro jejich přípravu bylo využito kovů:

- titan (99,99%, Goodfellow, UK / Porex, CZ),
- wolfram (99,999%, Goodfellow, UK / Porex, CZ),
- hliník (99,999%, Goodfellow, UK),

- chromnikl (80% Cr, / 20% Ni, 99,99%, Goodfellow, UK),
- zlato (99,999%, Safina, CZ).

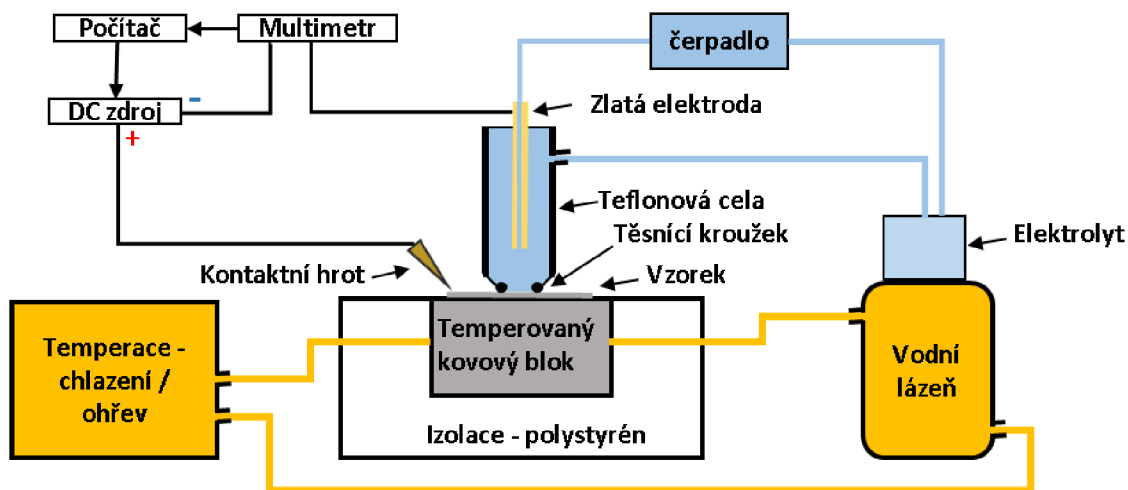
4.1.2 Chemikálie pro výrobu nanostruktur

Pro přípravu aluminových masek a depozici zlata do masek bylo využito následujících chemikálií:

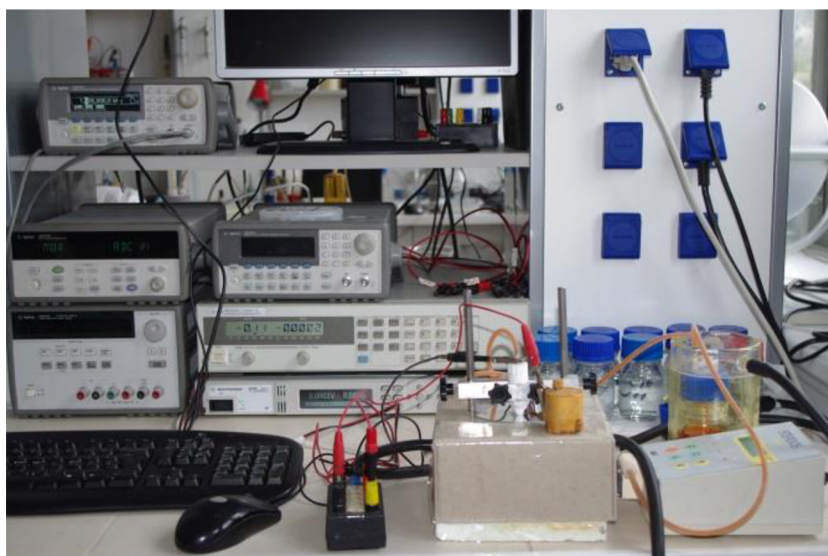
- kyselina sírová (H_2SO_4 , 96%, p. a., Penta, CZ),
- kyselina šťavelová ($(\text{COOH})_2$, p. a. Penta, CZ),
- dikyanozlatnan draselný ($\text{K}[\text{Au}(\text{CN})_2]$, 68,3% Au, 99,9%, Safina, CZ),
- kyselina boritá (H_3BO_3 , p., Penta, CZ),
- oxid chromový (CrO_3 , p. Penta, CZ),
- kyselina fosforečná (H_3PO_4 , 98%, p. a., Penta, CZ),
- dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 99%, Penta, CZ),
- hydrogenufosforečnan sodný dihydrát ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 98%, Fluka, CZ).

4.1.3 Aparatura pro výrobu nanostruktur

Na obrázcích níže je znázorněno schéma (Obr. 22) a fotografie (Obr. 23) aparatury, která byla využita pro výrobu nanostrukturovaných povrchů. Aparatura se skládá z termoregulačního zařízení, které zahrnuje temperovaný blok pro regulaci teploty vzorku (izolovaný polystyrénem) a temperovanou nádobu pro zajištění požadované teploty roztoků. Další částí je průtoková teflonová cela, která se přitlačí na připravený křemíkový substrát s nadeponovanými vrstvami a zajistí se šrouby ve vhodné poloze. K dispozici je několik typů cel lišících se průměrem – je tak možné provádět experimenty na plochách o různých průměrech. V teflonové cele probíhají veškeré elektrochemické děje (anodizace, depozice), ale mohou v ní probíhat i procesy leptání (odstraňování aluminové masky, rozšiřování nanopórů, odleptávání nechtěných struktur apod.). Průtoková cela je hadičkami propojená s lahvičkou se zásobním roztokem (elektrolytem, leptadlem), která je umístěna v temperované nádobě. Pohyb roztoku mezi zásobní lahvičkou a průtokovou celou je zajištěn peristaltickým čerpadlem s plynulou regulací průtoku. V průtokové cele je integrovaná dutá zlatá protielektroda, kterou je přiváděn roztok ke vzorku. Vzorek je kontaktován kovovým hrotem. Další částí aparatury je multimetr, stejnosměrný zdroj a počítač s řídicím softwarem naprogramovaným v prostředí LabVIEW (National Instruments, USA).



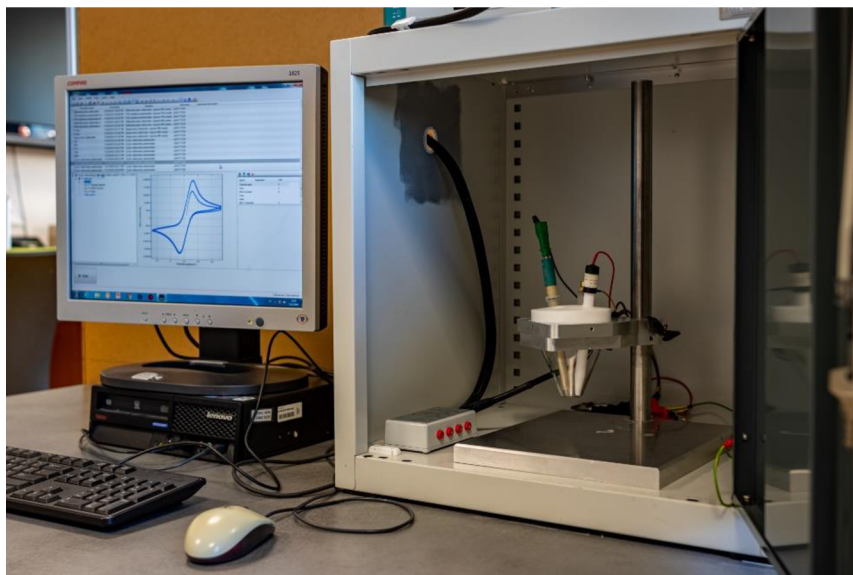
Obr. 22: Schéma aparatury pro výrobu nanostrukturovaných povrchů – upraveno dle [57, 112].



Obr. 23: Fotografie aparatury pro výrobu nanostrukturovaných povrchů.

4.2 Elektrochemická charakterizace

Veškerá elektrochemická měření byla provedena na přístroji μ AUTOLAB III/FRA2 (Obr. 24, nahoře) se softwarem NOVA 1.9, později 1.10.3 (Metrohm Autolab, Nizozemsko). Pro měření bylo využito tříelektrodevého zapojení s využitím platinové pomocné elektrody, Ag/AgCl/3M KCl referentní elektrody (obě Metrohm AG, obr. 25) a bylo provedeno ve Faradayově kleci (Obr. 24, dole). Před měřením byly elektrody čištěny cyklováním v roztoku 0,1M kyseliny sírové (H_2SO_4 , 96%, Penta, CZ).



Obr. 24: μ AutolabIII/FRA 2 (nahore) a základni měřicí uspořádání ve Faradayově kleci (dole).



Obr. 25: Pomocná platinová elektroda (vlevo), referenční Ag/AgCl elektroda (vpravo).

4.2.1 Elektrochemická impedanční spektroskopie

Elektrochemická impedanční spektroskopie byla měřena při nulovém potenciálu ve frekvenčním rozsahu od 500 kHz do 0,1 Hz a s amplitudou 20 mV. Elektrochemické impedanční charakterizace byly provedeny v několika typech roztoků:

- síran draselný (K_2SO_4 , p. a., Lachema Neratovice, CZ) o koncentracích od 0,01 μ M do 10 mM,

- standardní vodivostní roztoky o vodivostech: $1,3 \mu\text{S}\times\text{cm}^{-1}\pm 1 \%$, $5 \mu\text{S}\times\text{cm}^{-1}\pm 1 \%$, $15 \mu\text{S}\times\text{cm}^{-1}\pm 1 \%$, $100 \mu\text{S}\times\text{cm}^{-1}\pm 1 \%$, $706 \mu\text{S}\times\text{cm}^{-1}\pm 1 \%$, $1413 \mu\text{S}\times\text{cm}^{-1}\pm 1 \%$, Hamilton, Švýcarsko).

4.2.2 Cyklická voltametrie

Cyklická voltametrie byla měřena v roztoku chloridu draselného a ferro–ferrikyanidu draselného:

- chlorid draselný (KCl, 99,95%, Penta, CZ),
- hexakynoželezitan draselný ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 99%, Sigma Aldrich, USA),
- hexakynoželeznatan draselný ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 99%, Sigma Aldrich, USA).

4.2.3 Diferenčně pulzní voltametrie

Kalibrační křivka pro detekci doxorubicinu byla měřena metodou diferenčně pulzní voltametrie v 0,1M fosfátovém pufru (pH 7), při potenciálovém kroku 5 mV, amplitudou 25 mV, rychlostí skenování $10 \text{ mV}\times\text{s}^{-1}$ a rozsahem napětí od -0,75 V do -0,4 V. Bylo využito následujících chemikálií:

- doxorubicin hydrochlorid ($\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{NO}_{11}$, Sigma Aldrich, USA),
- dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 99%, Penta, CZ),
- hydrogenfosforečnan sodný dihydrát ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 98%, Fluka, CZ).

4.3 Biomodifikace kyselinou merkaptoundekanovou (MUA)

Pro biomodifikaci bylo využito:

- 11–merkaptoundekanová kyselina ($\text{HS}(\text{CH}_2)_{10}\text{CO}_2\text{H}$, 95%, Sigma Aldrich, USA),
- absolutní etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, p. a., Penta, CZ).

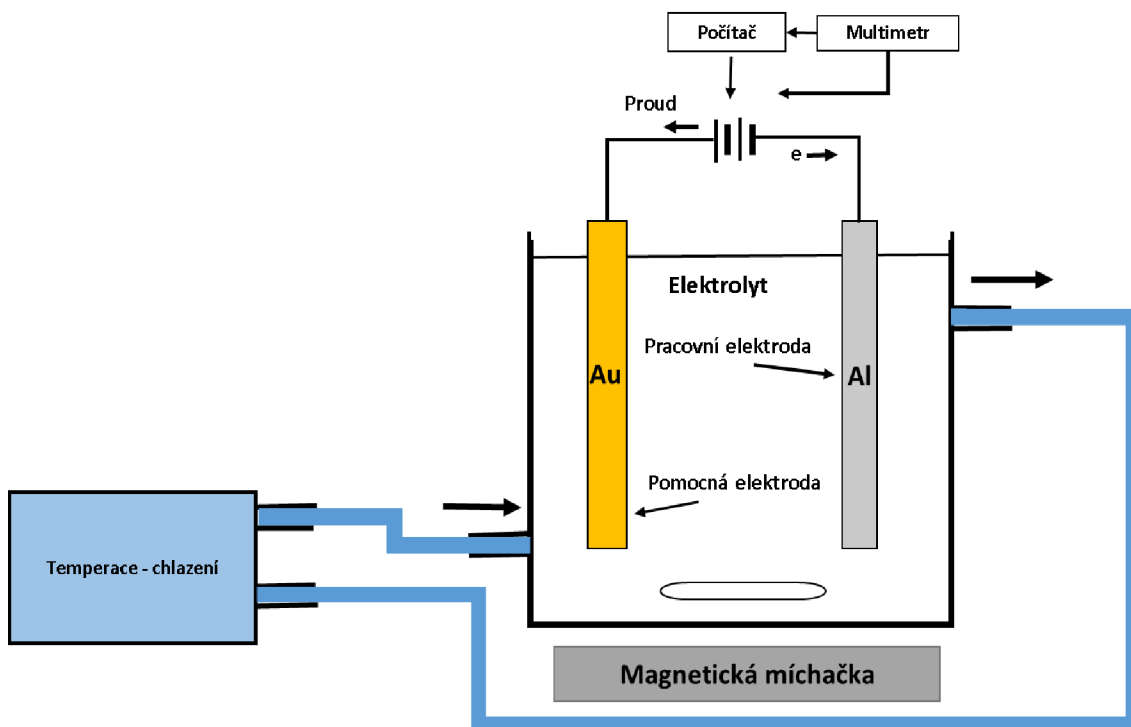
4.4 Výroba aluminových membrán

V této kapitole je shrnut veškerý materiál a technické vybavení potřebné pro přípravu nanoporézních aluminových membrán.

4.4.1 Aparatura pro výrobu membrán

Schéma aparatury pro přípravu nanoporézních membrán je zobrazeno na obr. 26. Základem celé aparatury je chlazená nádoba (anodizace je silně exotermní proces) s elektrolytem, do kterého jsou ponořeny elektrody: jednou elektrodou je zlatá pomocná elektroda a druhou je anodizovaná hliníková fólie. Aparatura se dále skládá z magnetické

míchačky, která zajišťuje cirkulaci chlazeného roztoku a zamezuje lokálnímu přehřívání elektrolytu a zničení vzorku. Součástí aparatury je také zdroj stejnosměrného proudu, řídicí počítač a multimetr.



Obr. 26: Aparatura pro přípravu nanoporézních membrán.

4.4.2 Materiál

Jako výchozí materiál pro přípravu nanostrukturovaných membrán z aluminy byly využity hliníkové fólie (99,999%, Goodfellow, UK) o tloušťkách v rozmezí od 10 μm až do 500 μm . Hliníkové fólie jsou standardně dodávány v rozměrech 10 \times 10 cm. V rámci práce byly nejčastěji využívány fólie o tloušťce 250 μm . Pro pokrývání jedné strany hliníkového plechu (pro zajištění anodizace pouze z jedné strany vzorku) bylo využito polymeru PDMS - Poly(dimethylsiloxan) - (Sigma Aldrich, USA), který byl na plech nanesen ručně.

4.4.3 Leštění hliníkové fólie

Před samotnou anodizací byly hliníkové fólie leštěny v roztoku obsahujícím:

- kyselina chloristá (HClO_4 , 70%, p. a., Penta, CZ),
- absolutní etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, p. a., Penta, CZ).

4.4.4 Anodizace

K anodizaci bylo využito kyselin:

- kyselina sírová (H_2SO_4 , 96%, p. a., Penta, CZ),
- kyselina šťavelová ($(\text{COOH})_2$, p. a. Penta, CZ).

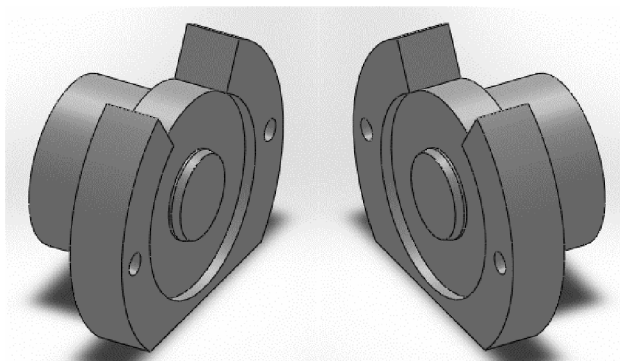
4.4.5 Leptání

K leptání bylo využito chemikálií:

- kyselina fosforečná (H_3PO_4 , 84%, p. a., Penta CZ),
- oxid chromový (CrO_3 , p., Penta, CZ),
- kyselina chlorovodíková (HCl , 35%, p. a., Penta CZ),
- chlorid měďnatý dihydrát ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, p. a. Penta CZ).

4.4.6 Zalévání membrán

Membrány byly pro další charakterizaci zalévány do polymerní hmoty Sylgard® 184 (Sigma Aldrich, USA), k čemuž byla připravena dvoudílná teflonová forma (viz obr. 27), do jejíhož středu byly umístěny aluminové membrány. Oba díly byly následně sešroubovány dohromady a zality polymerní hmotou. Připravené vzorky jsou zobrazeny na obr. 28.



Obr. 27: Dvoudílná forma pro zalévání membrán do polymerní hmoty.



Obr. 28: Připravené vzorky aluminových membrán.

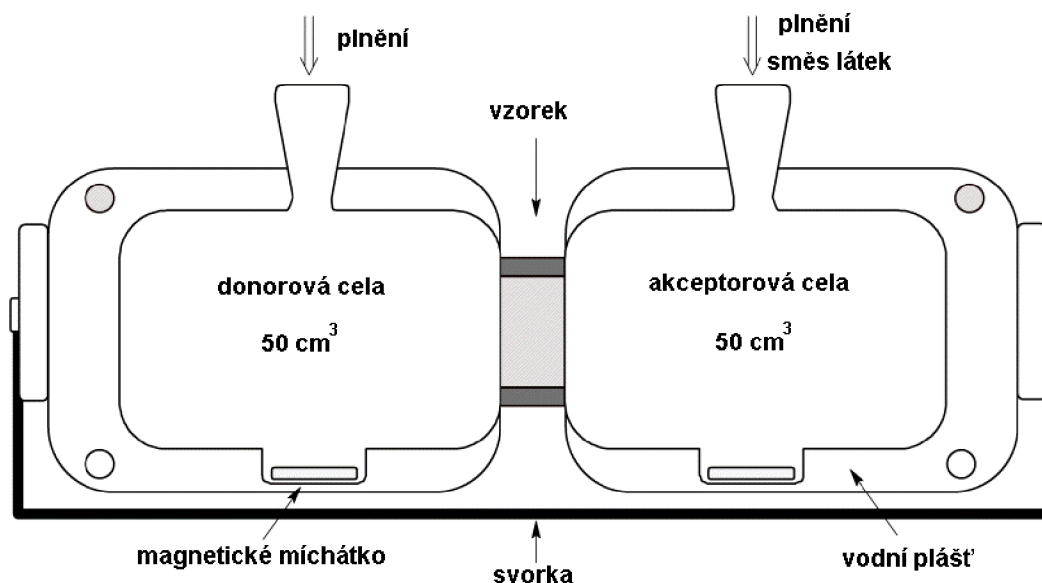
4.4.7 Měření tloušťky a drsnosti membrán

Pro měření tloušťky membrán byla využita metoda hrotové profilometrie (DektaXT, Bruker, USA) a pro určení drsnosti povrchů byla využita elipsometrie (Uvisel, Horina JobinYvon, Japonsko).

4.4.8 Studium propustnosti membrán

Pro studium propustnosti membrán byla využita horizontální difuzní cela (Obr. 29, PermeGear, Inc.). Cela se skládá z dvou nádob o objemu 50 cm^3 , které jsou odděleny studovaným vzorkem. Experimenty probíhaly při pokojové teplotě $25\text{ }^\circ\text{C}$, což je zajištěno cirkulací vodní lázně okolo obou nádob cely. V obou nádobách (donorové i akceptorové) je umístěno magnetické míchadlo (350 otáček / minutu). Využito bylo chemikálie:

- Chlorid draselný (KCl, 99%, Sigma Aldrich).



Obr. 29: Schéma horizontální difuzní cely, upraveno dle [113].

Deionizovaná voda ($18,2\text{ M}\Omega$) pro přípravu veškerých roztoků byla připravena přístrojem Millipore RG system MiliQ (Millipore Corp., USA).

4.5 Charakterizace rastrovacím elektronovým mikroskopem

Pro optické charakterizace nanostrukturovaných vzorků byl použit rastrovací elektronový mikroskop (SEM – Scanning Electron Microscope) MIRA II/LMU (TESCAN s.r.o., Česká republika) s instalovaným detektorem EDX X-Max 50 a WDX (Oxford Instruments). Obojí je zobrazeno na obr. 30.



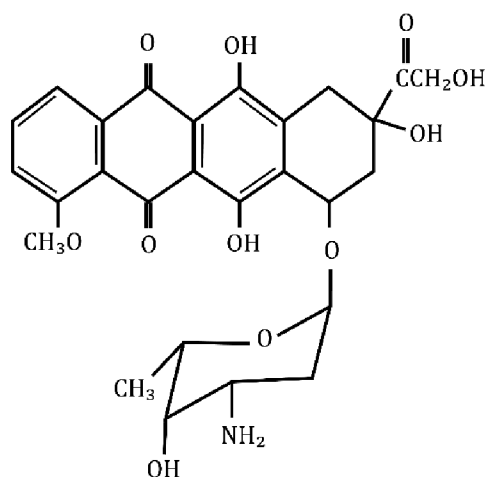
Obr. 30: Rastrovací elektronový mikroskop MIRA II/LMU s instalovaným detektorem EDX a WDX.

5 Praktická část

Praktická část práce se postupně zabývá řešením dílčích cílů vytyčených v kapitole 3. Jsou zde popsány postupy přípravy nanostrukturovaných povrchů o různých parametrech vyrobených s využitím různých materiálů a postupů přípravy tak, jak postupně docházelo k optimalizaci výroby. Také jsou zde uvedeny a diskutovány výsledky elektrochemických měření, která měla za cíl připravené povrchy charakterizovat.

5.1 Elektrody se zlatými nanosloupky na různých typech substrátu

V první části práce [92] byly studovány a porovnávány zlaté nanostrukturované povrchy připravené na substrátech z různých materiálů: tedy různých materiálech podkladové tenké vrstvy, na které se pak anodickou oxidací hliníku a následnou depozicí zlata do pórů AAO masky vytváří pole zlatých nanosloupků. Celkem byly pro studii připraveny tři typy elektrod: elektrody se zlatými nanosloupky na titanovém substrátu, elektrody se zlatými nanosloupky na wolframovém substrátu a pro porovnání ploché zlaté elektrody bez nanosloupků. Všechny připravené elektrody měly stejnou geometrickou plochu (3 mm v průměru). Wolframový i titanový materiál byl vybrán pro svou schopnost se anodicky oxidovat. Výhody této vlastnosti budou dále popsány v podkapitole 5.1.1. Všechny připravené elektrody byly charakterizovány metodou elektrochemické impedanční spektroskopie v širokém rozsahu frekvencí (500 kHz – 0,1 Hz) a následně použity k detekci protirakovinného léčiva doxorubicinu (Obr. 31), jako reálného analytu.



Obr. 31: Doxorubicin, upraveno dle [114].

5.1.1 Příprava nanostrukturovaných elektrod se zlatými nanosloupky

Nanostrukturované povrchy byly připraveny elektrochemickými metodami: konkrétně metodou anodické oxidace hliníku, při které byla vrstva hliníku přeměněna na vrstvu Al_2O_3 s pravidelně uspořádanými nanopóry [115], která následně sloužila jako maska pro galvanickou depozici zlata do nanopórů této masky. Zlatý materiál nanosloupeků byl vybrán pro jeho biokompatibilní vlastnosti, jak bylo uvedeno v kapitole 2.7.1.1. Nanostrukturované elektrody modifikované zlatými nanosloupky byly připraveny na dvou typech substrátů: titanovém a wolframovém. Titanové a wolframové substráty byly vybrány pro svou materiálovou schopnost elektrochemické oxidace za vzniku oxidu titaničitého (TiO_2) a oxidu wolframového (WO_3). Po dokončení anodizace hliníku tak anodizace pokračuje na substrátové vrstvě. Vzniklé TiO_2 (pro Ti substrát) nebo WO_3 (pro W substrát) nanostruktury pak mají být odleptány a zlato je deponováno do vzniklých nanodůlků, které slouží jako základny pro zlaté nanosloupky a zajišťují tak větší stabilitu budoucích nanostruktur. Postup přípravy obou typů elektrod je zobrazen na obr. 32.

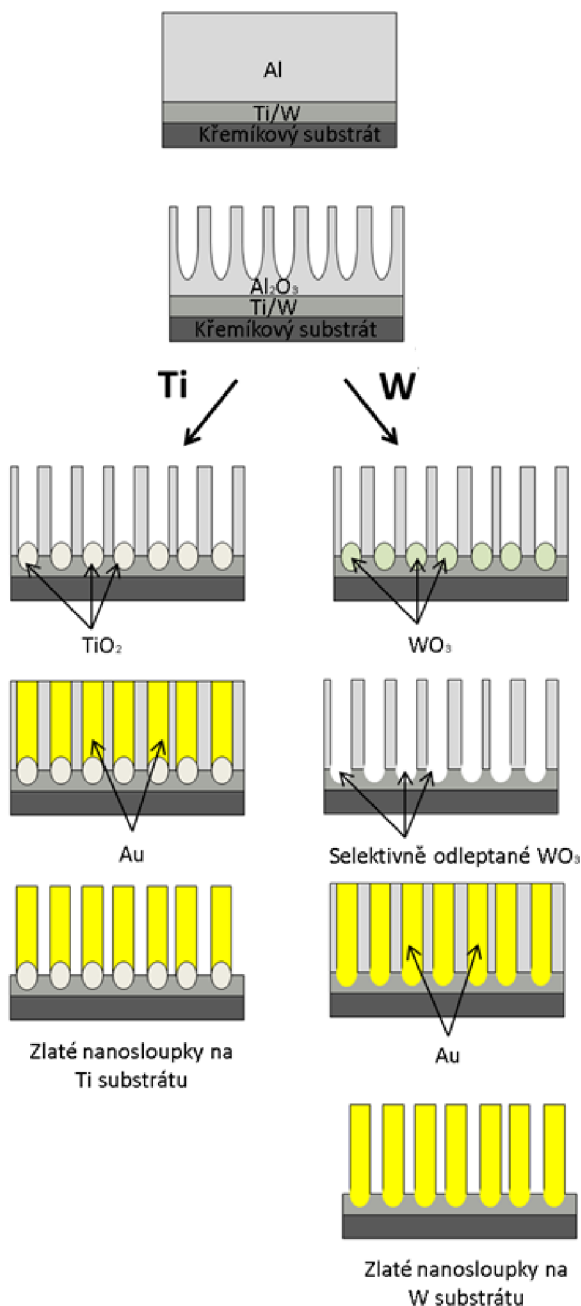
Dříve byla jako podkladová vrstva používána vrstva zlata nebo platiny [40, 111]. Po dokončení anodizace hliníkové vrstvy ale často docházelo k odtržení masky od povrchu a výsledná nanostrukturovaná pole byla značně nestabilní. Proto bylo od zlaté a platinové podkladové vrstvy upuštěno.

5.1.1.1 Příprava nanostrukturovaných elektrod na titanovém substrátu

Prvním krokem výroby nanostrukturovaných elektrod na titanovém substrátu bylo nanesení vrstvy titanu na 525 μm tlustý křemíkový substrát pokrytý 500 nm vrstvou termálního oxidu křemičitého. Tloušťka titanové vrstvy byla 120 nm a na ní byla nanesena vrstva hliníku o tloušťce 160 nm. Obě vrstvy byly připraveny metodou termálního napařování, jak je popsáno v kapitole 4.1.1.

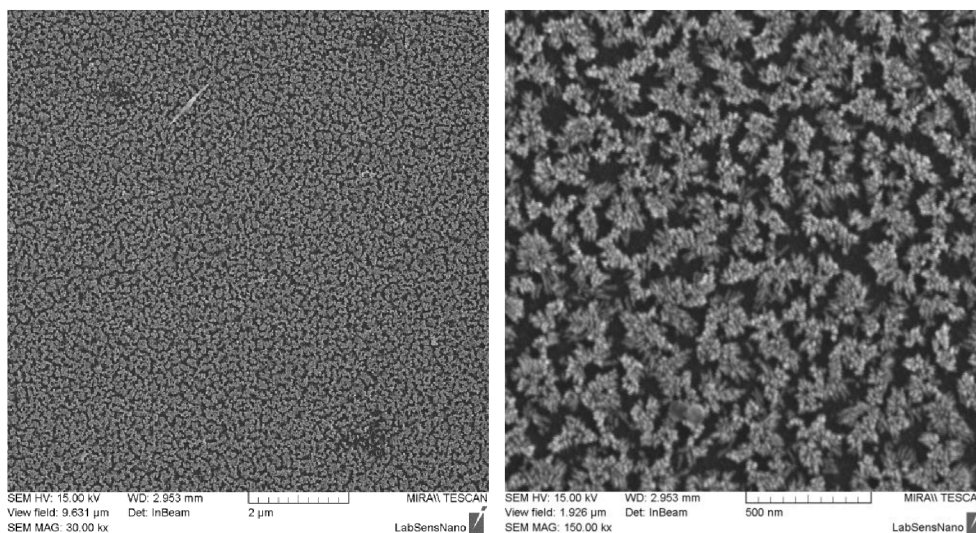
Dalším krokem byla elektrochemická příprava nanostrukturovaných povrchů, která byla provedena s využitím aparatury uvedené v kapitole 4.1.3. Nejprve byla hliníková vrstva přeměněna anodickou oxidací na vrstvu aluminy (Al_2O_3) za vzniku hexagonálně uspořádaných nanopórů. Anodická oxidace hliníkové vrstvy probíhala při konstantním napětí 5 V v 3M roztoku kyseliny sírové zchlazené na teplotu 10 °C. Po dokončení anodizace hliníkové vrstvy došlo k otevření spodní části nanopórů rostoucích ve vrstvě aluminy (proražení bariérové vrstvy [89]) a začalo docházet k anodizaci spodní titanové vrstvy a k nežádoucímu růstu nanostruktur z oxidu titaničitého skrz masku z oxidu hlinitého. Cílem bylo ukončit anodizaci bezprostředně po proražení nanopórů aluminy, aby docházelo k anodizaci titanové vrstvy co možná nejméně. Přítomnost oxidu titaničitého není žádoucí pro dobrou vodivost výsledných nanostruktur, proto byla snaha

oxid selektivně odstranit v SCS (z angl. Standard Clean Solution), který obsahuje peroxid vodíku a hydroxid amonný, což se bohužel nikdy úplně nepodařilo. V dalším kroku bylo do nanopórů připravené aluminové masky nadeponováno zlato elektrochemickou redukcí zlatých iontů z roztoku dikyanozlatnanu draselného. Depozice byla provedena při konstantním proudu 20 mA s časem 4 s. V posledním kroku výroby byla aluminová maska rozpuštěna ve směsi, která obsahovala 3 g oxidu chromového a 5 ml kyseliny fosforečné na 100 ml roztoku.



Obr. 32: Postup výroby nanostrukturovaných elektrod na Ti / W substrátu.

Výsledné zlaté nanosloupky na nanotečkách z oxidu titaničitého byly charakterizovány rastrovacím elektronovým mikroskopem: zlaté nanosloupky byly přibližně 70 nm vysoké s průměrem 10 nm. Na obrázcích níže jsou SEM výsledky nanostrukturovaných elektrod připravených na titanové vrstvě (Obr. 33).

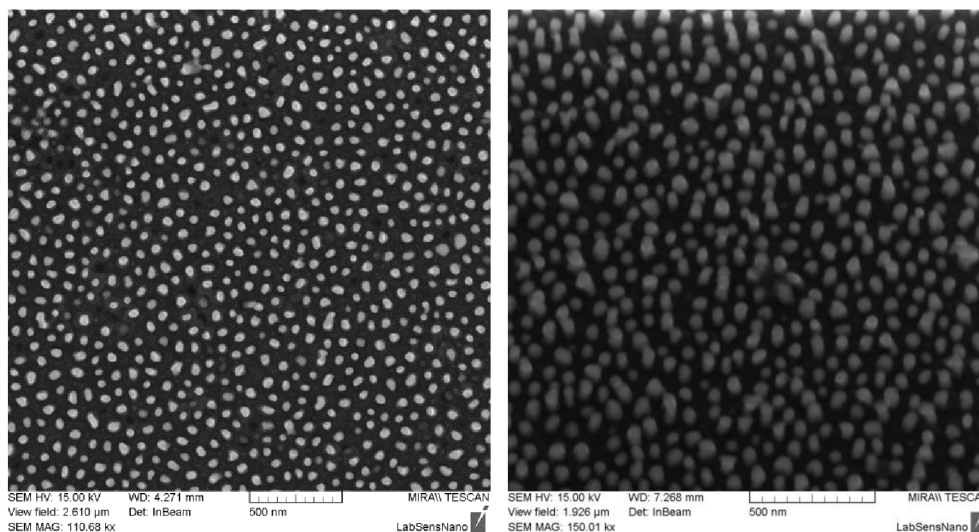


Obr. 33: SEM snímky připravených zlatých elektrod na titanovém substrátu.

5.1.1.2 Příprava nanostrukturovaných elektrod na wolframovém substrátu

Druhý typ elektrod byl vyroben obdobně. Rozdíl spočíval pouze v tom, že místo vrstvy titanu byla na křemíkový substrát s SiO_2 nadeponována vrstva wolframu s 20nm adhezí vrstvou titanu. Depozice titanové adhezí vrstvy a wolframové vrstvy o tloušťce 200 nm byla provedena metodou iontového naprašování. Na vrstvu wolframu byla metodou termálního naprašování nanesena vrstva hliníku o tloušťce 150 nm. Hliníková vrstva byla poté anodizována při napětí 40 V v roztoku 0,3M kyseliny šťavelové ochlazené na 17 °C. Po dokončení anodizace hliníkové vrstvy byla po proražení bariérové vrstvy ve vzniklých nanopórech aluminové masky anodizována vrstva wolframu za vzniku nanostruktur z oxidu wolframového (WO_3). Oxid wolframový byl ze spodní části nanopórů selektivně odleptán v roztoku fosfátového pufru s pH 7. Fosfátový pufr byl temperován na 25 °C a leptání probíhalo po dobu 20 minut. Selektivním odleptáním WO_3 nanostruktur došlo k vytvoření tzv. nanodůlků ve vrstvě wolframu na spodní části aluminové masky, které sloužily jako základny pro nově deponované zlaté nanostruktury. Zlatý materiál byl do aluminové masky s nanodůlky deponován metodou pulzní depozice s 23 pulzy, proudem (amplitudou pulzu) 1 mA a délkou pulsů 400 ms. Výsledné zlaté nanosloupky byly přibližně 100 nm vysoké a s průměrem 50 nm (Obr. 34). Postup přípravy nanostrukturovaných elektrod na wolframové vrstvě je zobrazen na obr. 32. Na obrázcích

níže jsou SEM výsledky nanostrukturovaných elektrod připravených na wolframové vrstvě (Obr. 34).

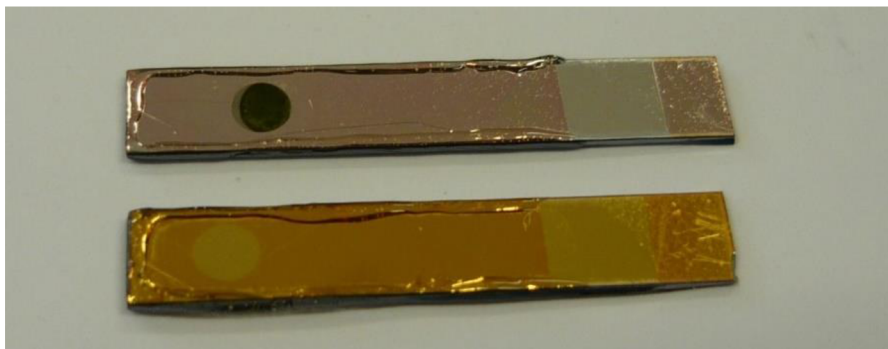


Obr. 34: SEM snímky připravených zlatých elektrod na wolframovém substrátu.

Z uvedených snímků na obr. 33 a obr. 34 je zřejmé, že nanosloupky připravené na wolframové vrstvě jsou velmi stabilní oproti nanosloupkům připraveným na titanové vrstvě. Ty tvoří shluky (klastry). Stabilita nanostruktur na wolframovém podkladu je způsobena nanodůlky ve struktuře wolframové vrstvy a také tím, že se jedná o nanosloupky s výrazně větším průměrem. Navzdory tomu, je ale celková homogenita obou typů povrchů modifikovaných zlatými sloupky výborná.

Pro porovnání chování připravených nanostrukturovaných elektrod při detekci doxorubicinu byly vyrobeny hladké zlaté elektrody připravené nadeponováním 180 nm vrstvy titanu a 150 nm vrstvy zlata na křemíkový substrát. Vrstvy byly nanášeny metodou termálního napařování a litograficky vyrobeny tak, aby měly stejnou geometrickou plochu jako nanostrukturované elektrody (3 mm v průměru).

Připravené elektrody jsou zobrazeny na obr. 35. Elektroaktivní plocha elektrod byla vymezena litograficky ještě před výrobou nanostrukturovaných povrchů. Po výrobě povrchů byl křemíkový substrát nařezán na jednotlivé elektrody a jejich kraje byly pokryté rezistem tak, aby se vodivé řezy elektrod nemohly účastnit elektrochemických dějů. Elektrody byly pro měření kontaktovány krokodýlky a vkládány do elektrochemické cely s komerčně dostupnou platinovou pomocnou elektrodou a argentchloridovou referenční elektrodou (viz podkapitola 4.2). Zlaté elektrody byly připraveny obdobným způsobem.



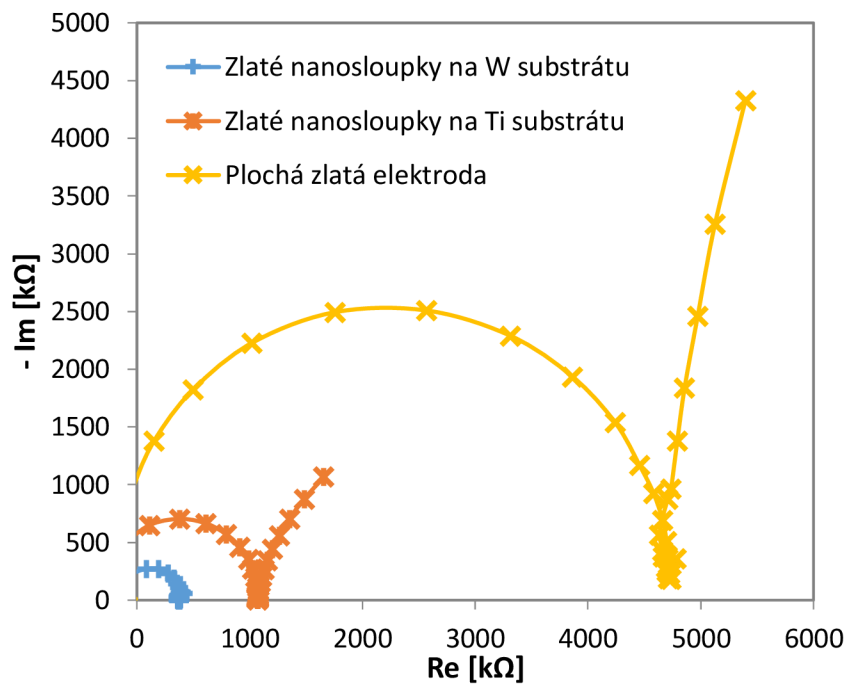
Obr 35: Připravené elektrody: elektroda se zlatými nanosloupky (nahore) a hladká zlatá elektroda (dole).

Všechny připravené elektrody byly opticky charakterizovány rastrovacím elektronovým mikroskopem (viz podkapitola 4.5) a poté elektrochemicky metodou elektrochemické impedanční spektroskopie (viz podkapitola 4.2.1).

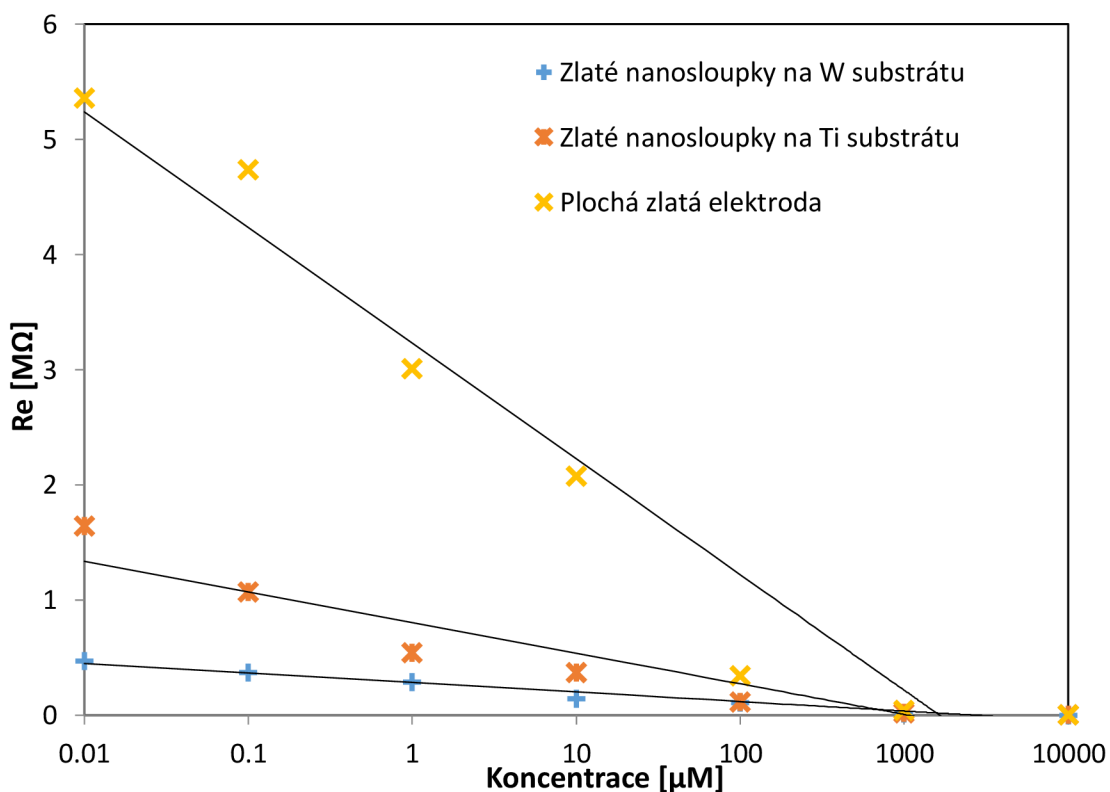
5.1.2 Elektrochemická impedanční spektroskopie

Elektrochemická impedanční spektroskopie byla použita pro charakterizaci připravených nanostrukturovaných elektrod jako účinný nástroj pro pochopení dějů, které se odehrávají na rozhraní elektroda / elektrolyt a byla využita pro porovnání velikostí elektroaktivních ploch elektrod. Elektrochemická impedanční spektroskopie byla měřena na všech typech připravených elektrod v roztoku síranu draselného (K_2SO_4) o koncentracích od $0,01 \mu M$ do 10 mM . EIS byla měřena při nulovém potenciálu ve frekvenčním rozsahu od 500 kHz do $0,1 \text{ Hz}$ a amplitudě 20 mV . Na obr. 36 jsou vyobrazena impedanční spektra měřená pro všechny typy elektrod v $0,1 M$ roztoku K_2SO_4 . Na dalším obr. 37 jsou závislosti reálné složky impedance v bodě lokálního maxima impedančního spektra ($Re = R_S + R_{CT}$) v závislosti na koncentraci roztoku K_2SO_4 pro všechny typy připravených elektrod.

Z výsledků impedanční analýzy lze pozorovat rozdíly v elektrochemickém chování jednotlivých typů měřených elektrod. Z kalibračních křivek je zřejmé, že nanostrukturované elektrody oproti hladké elektrodě vykazují nižší hodnotu reálné složky impedance v bodě lokálního maxima funkce, což značí jejich větší elektroaktivní plochu při dané velikosti geometrické plochy. Velikost elektroaktivní plochy elektrod je významným faktem při posuzované citlivosti elektrod. Elektrody s vyšší elektroaktivní plochu tak vykazují vyšší citlivost elektrod (senzitivitu) a tím i nižší limit detekce (LOD – z angl. Limit Of Detection). Nanostrukturované elektrody na wolframovém substrátu vykazují výrazně vyšší elektroaktivní plochu ve srovnání s plochou zlatou elektrodou. Nanostrukturované elektrody na wolframovém substrátu pak vykazují elektroaktivní plochu nejvyšší ze všech typů elektrod.

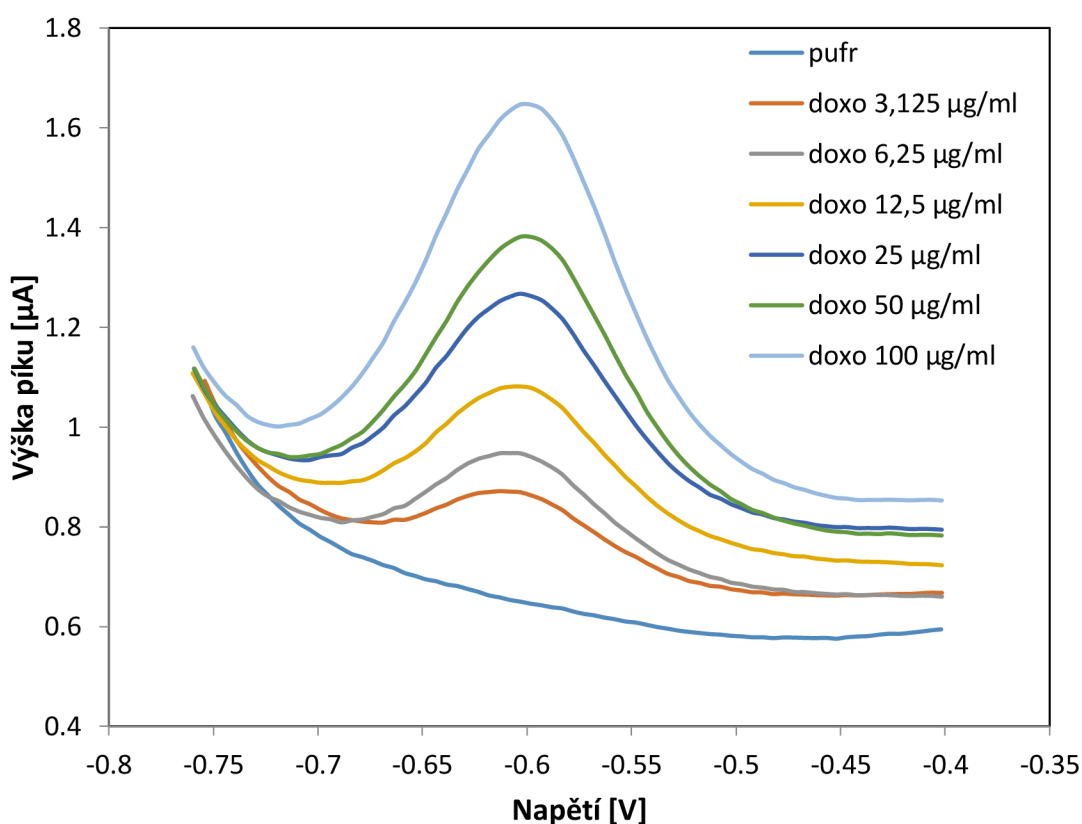


Obr. 36: Impedanční spektra pro tři typy připravených elektrod získaná v 0,1M roztoku K_2SO_4 .



Obr. 37: Závislosti reálné složky impedance Re v bodě lokálního maxima v závislosti na koncentraci elektrolytu K_2SO_4 .

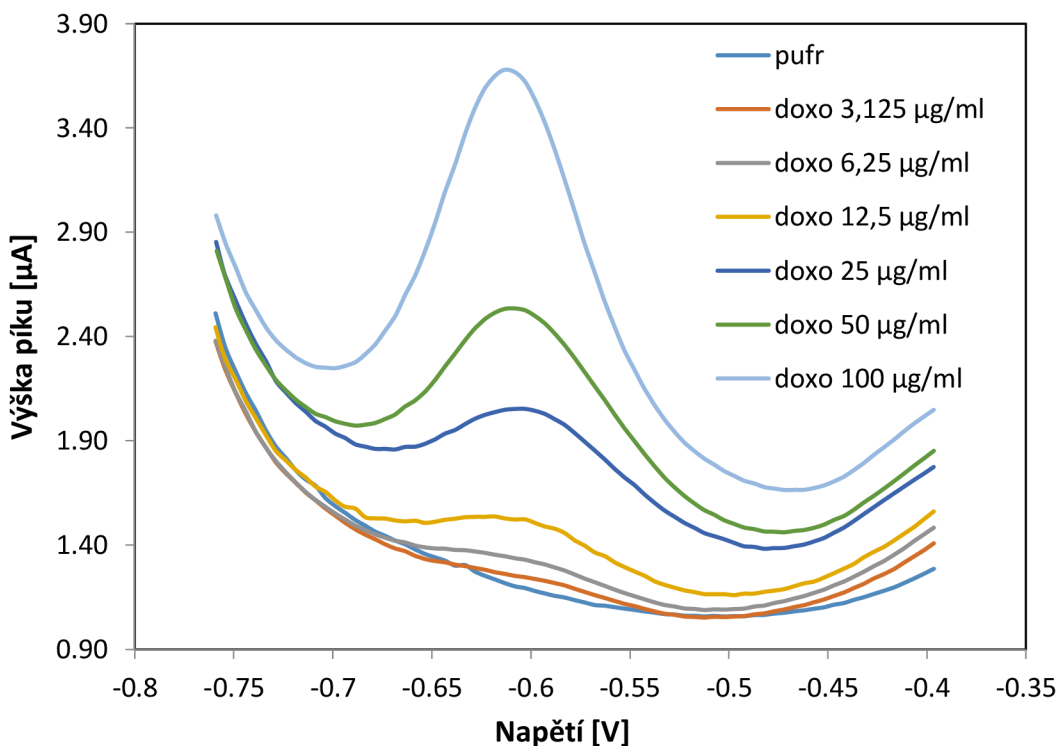
Všechny připravené typy elektrod byly dále charakterizované při stanovení cytostatického léčiva doxorubicinu. Pro stanovení byla využita metoda diferenčně pulzní voltametrie měřená v 0,1M fosfátovém pufru (pH 7), s potenciálovým krokem 5 mV, amplitudou 25 mV, rychlostí skenování $10 \text{ mV} \times \text{s}^{-1}$ a rozsahem napětí od -0,75 V do -0,4 V. Detekce probíhala v rozsahu koncentrací od $390 \text{ nM} \times \text{ml}^{-1}$ do $100 \text{ } \mu\text{M} \times \text{ml}^{-1}$ po desetiminutové akumulaci léčiva. Anodický pík doxorubicinu byl pozorován na potenciálu 0,6 V. Na obr. 38 a obr. 39 jsou zobrazeny získané voltamogramy naměřené na ploché zlaté elektrodě a elektrodě se zlatými nanosloupky na wolframovém substrátu. Detekční limit pro oba typy elektrod byl stanoven na $790 \text{ nM} \times \text{ml}^{-1}$.



Obr. 38: Diferenčně pulzní voltamogram měřený na ploché zlaté elektrodě bez nanosloupků pro různé koncentrace doxorubicinu.

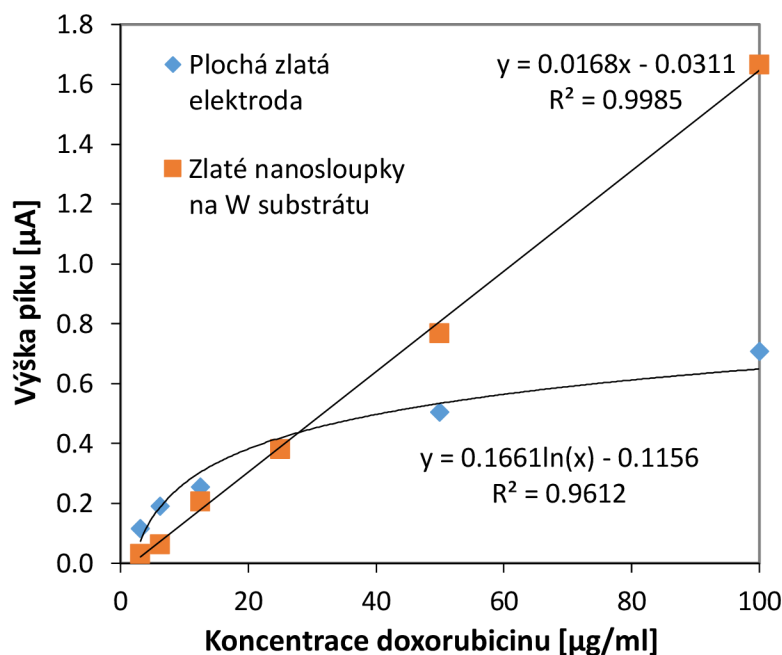
Na dalším obr. 40 jsou závislosti výšek píku vztažené ke koncentraci doxorubicinu. Pro hladkou zlatou elektrodu je tato závislost logaritmická, což u ní výrazně přispívá k lepšímu stanovení detekčního limitu, pro elektrodu s nanosloupky na wolframovém substrátu je závislost lineární v celém rozsahu, což je naopak výhodné pro vyšší koncentrace. Tento jev je pravděpodobně způsoben tím, že plocha elektrody bez nanosloupků nemá dostatečně velký povrch a je tak dříve nasycena molekulami

detekované látky a proto nedochází k nárůstu výšky píku při vyšších koncentracích doxorubicinu.



Obr. 39: Diferenčně pulzní voltamogram měřený na elektrodě se zlatými nanosloupky na wolframovém substrátu pro různé koncentrace doxorubicinu.

Na elektrodách se zlatými nanosloupky na titanovém substrátu se doxorubicin detekovat nepodařilo. Největším problémem v přípravě elektrod na tomto substrátu bylo, že se nikdy nepodařilo efektivně selektivně odleptat oxid titaničitý vzniklý pokračující anodizací po dokončení anodizace hliníkové vrstvy a proražení bariérové vrstvy. Oxid titaničitý uvnitř nanopórů byla snaha odleptat v čerstvě připraveném roztoku standard clean solution (SCS), který se skládá ze směsi hydroxidu amonného (NH_4OH), peroxidu vodíku 34% (H_2O_2) a vody v objemovém poměru 1:1:5. Tento roztok ovšem vždy porušil i aluminovou masku. Nanostruktury z oxidu titaničitého ve spodní části nanopórů, na které se deponovalo zlato, způsobují nestabilitu výsledných nanosloupků, což je zřejmé ze SEM snímků (Obr. 33), a tudíž i jejich snadné poškození během měření a dále výrazně zhoršují vodivost zlatých nanosloupků a vytvářejí tzv. přechodový odpor, který v tomto případě blokuje signál vzniklý na rozhraní elektrody a elektrolytu. Z těchto důvodů bylo od výroby elektrod na titanovém substrátu upuštěno a dále byly optimalizovány nanostruktury připravené na wolframovém substrátu. [92, 93]



Obr. 40: Kalibrační křivky - velikost anodického píku v závislosti na koncentraci doxorubicinu - měřené na ploché zlaté elektrodě a elektrodě se zlatými nanosloupky na wolframovém substrátu po desetiminutové akumulaci doxorubicinu.

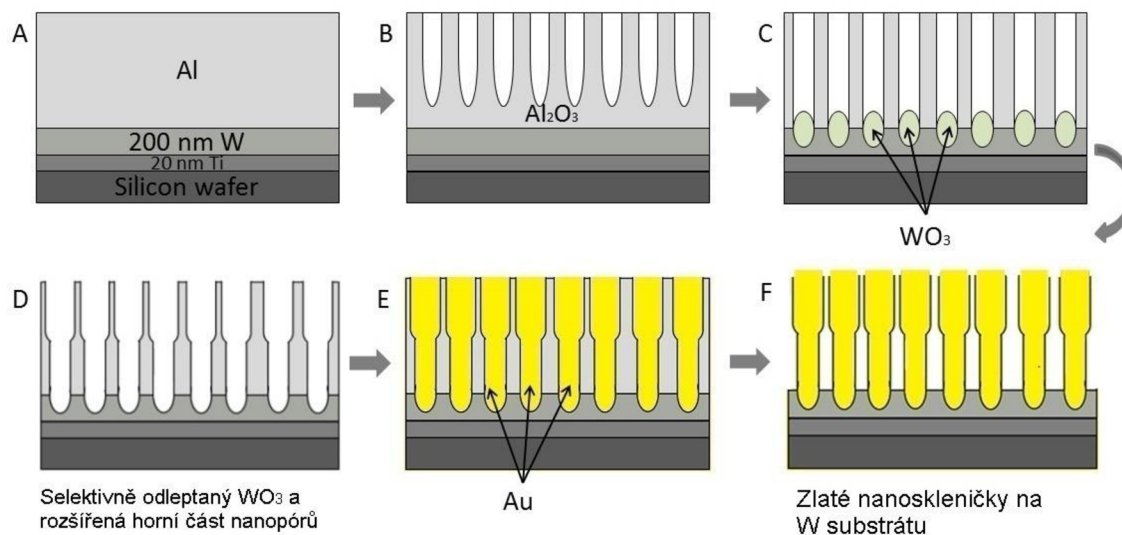
5.2 Teplotní stabilita nanostrukturovaných elektrod

Tato část práce se zabývá vlivem dvou typů žihání (vakuové žihání a žihání při atmosférickém tlaku) na změnu elektrochemických vlastností připravených elektrod modifikovaných zlatými nanostrukturami, případně i změnu jejich tvaru. Elektrody pro tuto studii byly připraveny obdobně jako v předchozí kapitole 5.1 metodou elektrochemické anodizace hlinkové vrstvy a následné galvanické depozice zlata do nanopórů aluminové masky. V tomto případě byla navíc před galvanickou depozicí horní část nanopórů aluminové masky rozšířena leptáním v kyselině fosforečné s cílem zpřístupnit více nanopóry zlatým iontům a tak ulehčit a zefektivnit depozici zlata do pórů. Přidáním tohoto kroku do výrobního postupu se podařilo dosáhnout neobvyklých a jedinečných tvarů výsledných nanostruktur, které jsou na spodní části užší a v horní části rozšířené a tím se svým tvarem podobají tzv. „nanoskleničkám“. Rozšíření nanopórů v předchozí studii provedeno nebylo. Dalším rozdílem oproti předchozí studii (viz kapitola 5.1) je to, že elektrochemická depozice byla provedena pulzně (viz. podkapitola 2.6.1.1). Právě kombinace těchto dvou přístupů (rozšíření nanopórů a pulzní depozice) přinesla efektivnější depozici zlata do nanopórů a získání dosud nikde nepublikovaných nanostruktur s jedinečným tvarem.

Hlavní myšlenkou teplotního experimentu bylo, že dodatečné žíhání nanostrukturovaných povrchů při atmosférickém tlaku ve vzduchové atmosféře způsobí zoxidování spodní wolframové vrstvy elektrod. Výsledkem by pak byla elektroda modifikovaná zlatými nanostrukturami a v mezerách mezi nimi by byla vrstva oxidu wolframového (WO_3). Předpokladem bylo, že se tak spodní wolframová vrstva nebude účastnit elektrochemických dějů na rozhraní elektrody a elektrolytu. Naopak, těchto přenosových dějů mezi elektrodou a elektrolytickým roztokem by se pak měly účastnit pouze zlaté nanostruktury (čistě zlaté elektrody nachází uplatnění v biosenzorice). Přínos vakuového žíhání naopak předpokládal lepší propojení materiálu zlatých nanostruktur a spodní wolframové vrstvy a tím zlepšení přenosu signálu v systému a v důsledku toho snížení impedance elektrod a zlepšení limitu detekce. Vliv těchto dvou typů žíhání na elektrochemické chování elektrod byl studován elektrochemickou impedanční spektroskopií v sadě komerčně dostupných vodivostních elektrolytů s přesně definovanou vodivostí (viz podkapitola 4.2.1). Dále byla sledována stabilita připravených nanostruktur v souvislosti s výškou teploty a typem žíhání. Strukturální změny v morfologii povrchů byly hodnoceny opticky rastrovacím elektronovým mikroskopem.

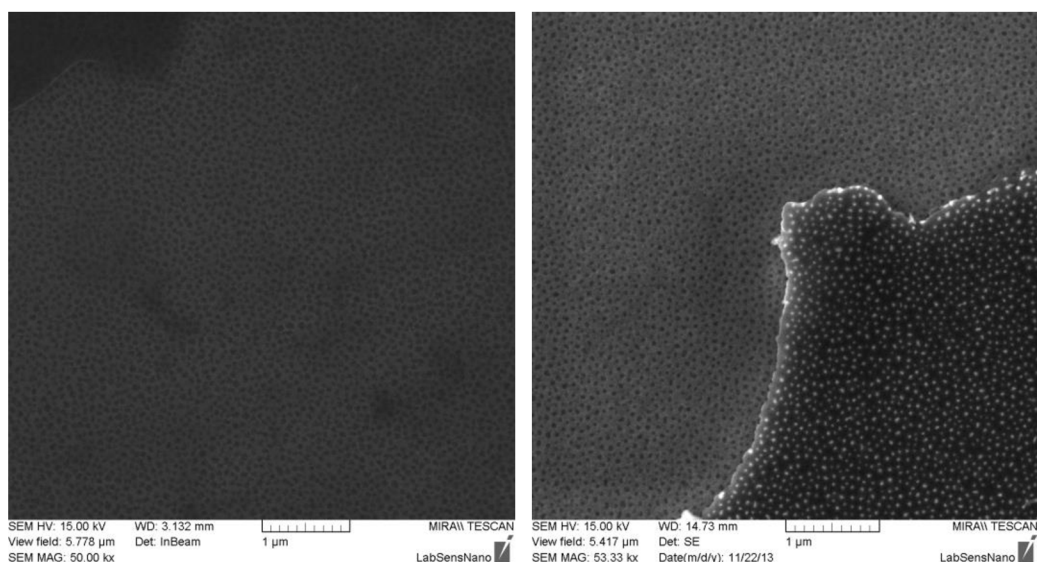
5.2.1 Výroba nanostrukturovaného povrchu – „nanoskleniček“

Elektrody s povrchem tvořeným „nanoskleničkami“ byly vyrobeny obdobným způsobem jako v předchozí studii. Postup výroby je zobrazen na obr. 41.



Obr. 41: Postup výroby zlatých „nanoskleniček“: A) příprava vrstev na substrát; B) anodizace hliníkové vrstvy; C) anodizace spodní wolframové vrstvy za vzniku WO_3 ; D) selektivní odstranění WO_3 a rozšíření vrchní části nanopórů; E) depozice zlata a F) selektivní odstranění aluminové masky.

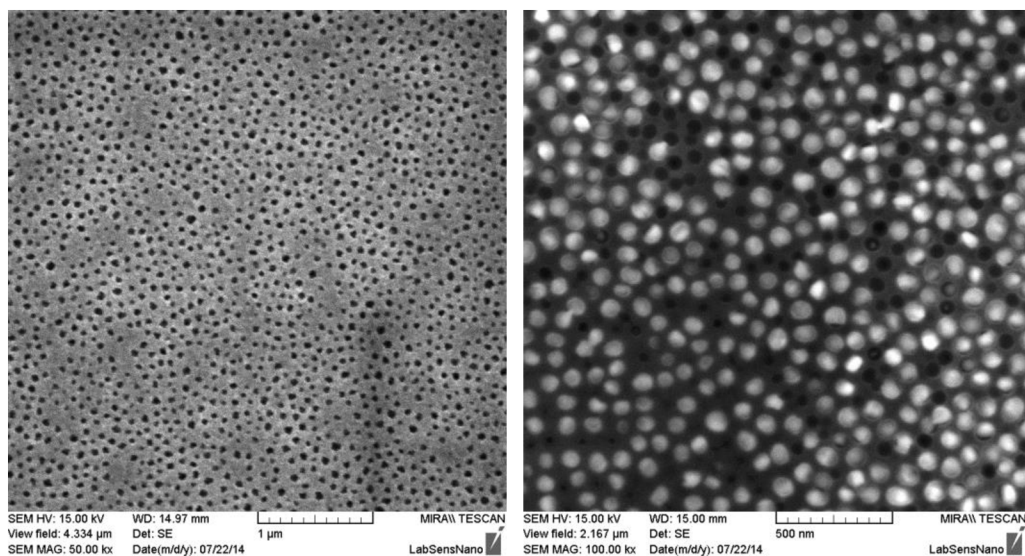
Na křemíkový substrát bylo iontovým naprašováním deponováno 20 nm adhezivní vrstvy titanu, na titanovou vrstvu byla nadeponována 200 nm tlustá vrstva wolframu a 100 nm vrstva hliníku (viz obr. 41 A). V dalším kroku byla vrchní hliníková vrstva anodizována v 0,3M kyselině šťavelové o teplotě 10 °C při konstantním napětí 50 V (viz. obr. 41 B). Po dokončení anodizace hliníkové vrstvy došlo k proražení nanopórů ve vrstvě Al₂O₃ a začala se anodizovat spodní wolframová vrstva za vzniku nanostruktur z oxidu wolframového (WO₃) (viz. obr. 41 C). V dalším kroku byly WO₃ struktury odleptány ve fosfátovém pufru s pH 7 při teplotě 25 °C. Tím byla získána nanoporézní maska z aluminu s nanodůlky ve struktuře wolframu. Na SEM snímku na obr. 42 vlevo lze pozorovat wolframovou vrstvu s nanodůlky a na obr. 42 vpravo lze pozorovat WO₃ nanostruktury v substrátové vrstvě po odtržení masky.



Obr. 42: Wolframový povrch s nanodůlky po odleptání WO₃ struktur a aluminové masky (vlevo), rozhraní aluminové masky a místa s odtrženou maskou, kde lze pozorovat WO₃ nanostruktury (vpravo).

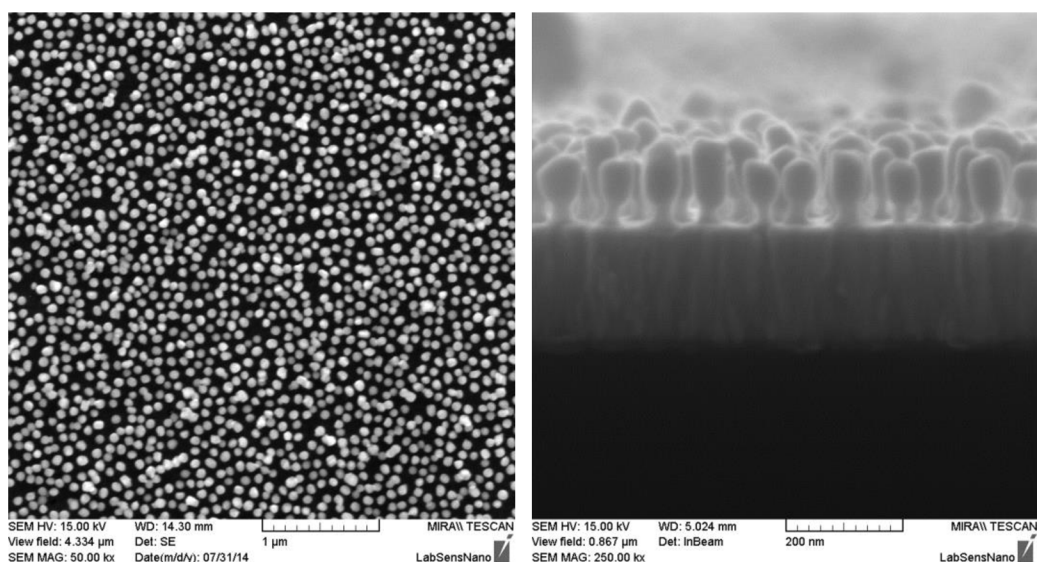
Nanodůlky slouží jako základny pro vytvoření stabilnějších zlatých nanostruktur. Vzorek byl dále leptán v 5% roztoku kyseliny fosforečné (H₃PO₄) temperovaném na 50 °C po dobu 3 minut, což způsobilo rozšíření horních částí nanopórů a nanopóry tak získaly specifický tvar „nanoskleniček“ (viz. obr. 41 D). Dále bylo do vzniklých nanopórů z roztoku dikyanozlatnanu draselného zahřátého na 50 °C deponováno zlato metodou pulzní depozice (2 pulzy, délka pulzu 400 ms, perioda 2 s, konstantní proud 1 mA, amplituda 5 V) (viz. obr. 41 E). Nakonec byla aluminová vrstva selektivně odstraněna v roztoku, který obsahoval 3 g oxidu chromového a 5 ml kyseliny fosforečné na 100 ml roztoku, čímž byla získána wolframová elektroda modifikovaná zlatými „nanoskleničkami“ (viz. obr. 41 F).

Vyrobené nanostruktury jsou přibližně 140 nm vysoké s průměrem 50-60 nm. Připravené elektrody byly opticky charakterizovány rastrovacím elektronovým mikroskopem. Na SEM snímcích je zobrazena nanoporézní aluminová maska (viz. obr. 43, vlevo) a deponované nanostruktury v masce (viz. obr. 43, vpravo).

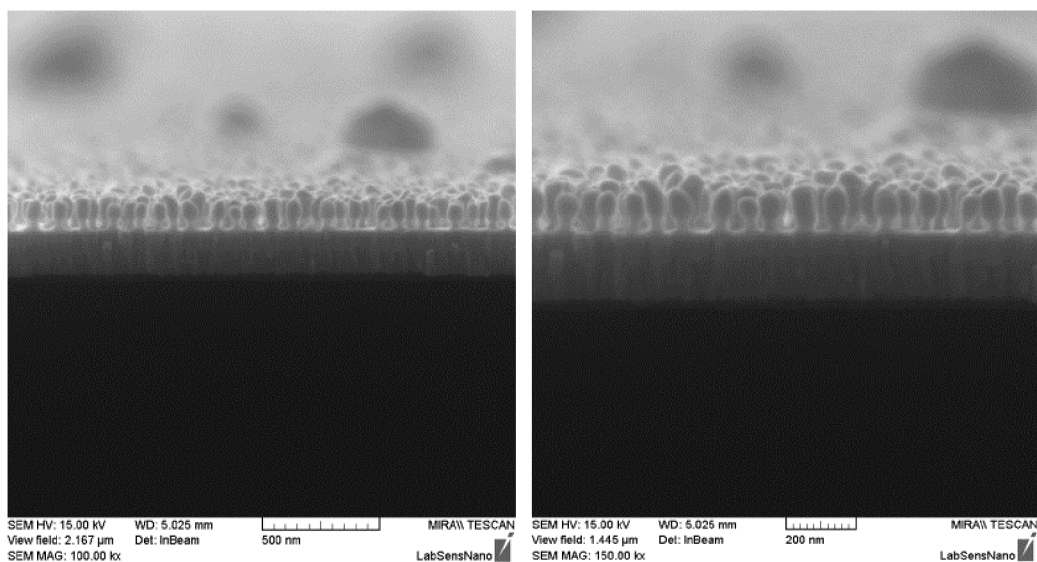


Obr. 43: Aluminová maska (vlevo), zlato deponované v nanoporézní masce (vpravo).

Dále lze pozorovat připravené nanostruktury v pohledu shora (viz. obr. 44, vlevo) a řez nanostrukturovanou elektrodou, na které lze pozorovat „nanoskleničky“ (viz. obr. 44, vpravo a obr. 45).



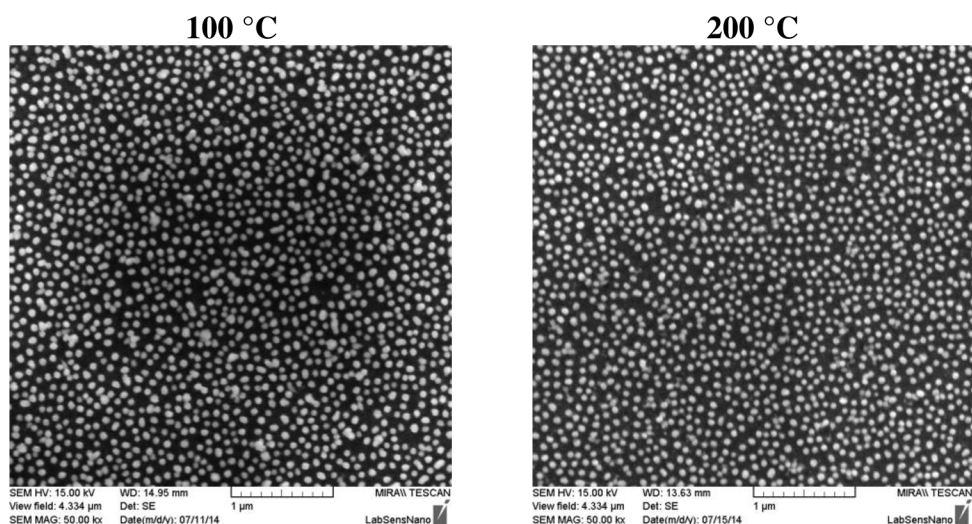
Obr. 44: Povrch elektrody tvořený zlatými „nanoskleničkami“: pohled shora (vlevo), řez elektrodou (vpravo).

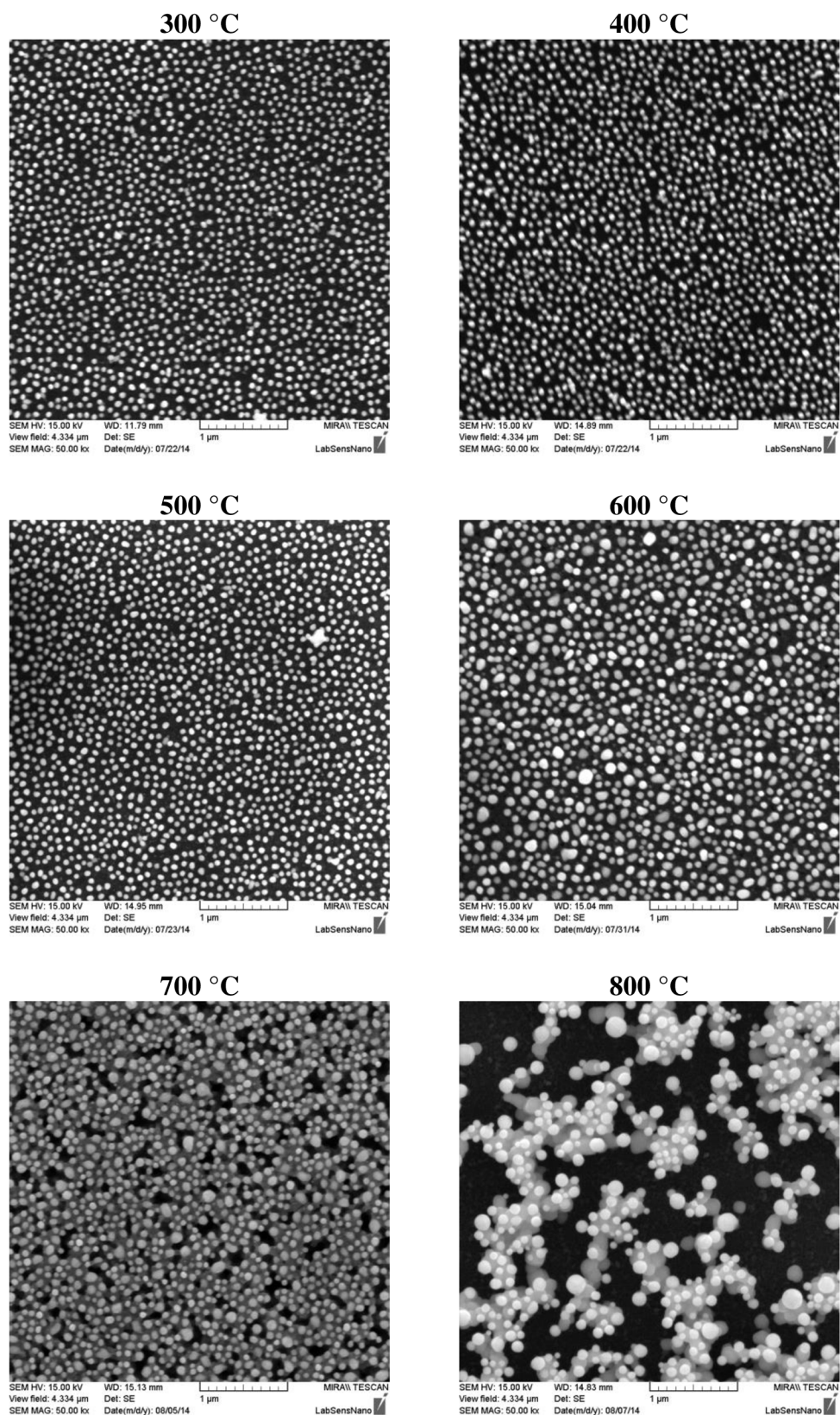


Obr. 45: Řezy nanostrukturovanou elektrodou s „nanoskleničkami“.

5.2.1 Žihání při atmosférickém tlaku

Připravené elektrody byly žihány při atmosférickém tlaku v muflové peci (Obr. 47 vlevo) v rozsahu teplot od 100 °C do 800 °C s krokem 100 °C vždy po dobu 1 hodiny. Po každém žihání byl pomocí SEM kontrolován vliv procesu žihání na strukturální změny nanostrukturovaného povrchu. Na SEM snímcích (Obr. 46) lze pozorovat vliv žihání za atmosférického tlaku na strukturu zlatých nanostruktur při všech testovaných teplotách. Nejvyšší teplota pro žihání při atmosférickém tlaku, při které byly nanostruktury stabilní, byla 400 °C po dobu 1 hodiny. Při vyšších teplotách se nanostruktury začaly vyhlazovat a zkracovat. Od teploty 600 °C a výše už byly pozorovány významné změny ve struktuře „nanoskleniček“.





Obr. 46: SEM snímky nanostrukturovaných povrchů po žíhání za atmosférického tlaku při teplotách od 100 °C do 800 °C po dobu 1 hodiny.

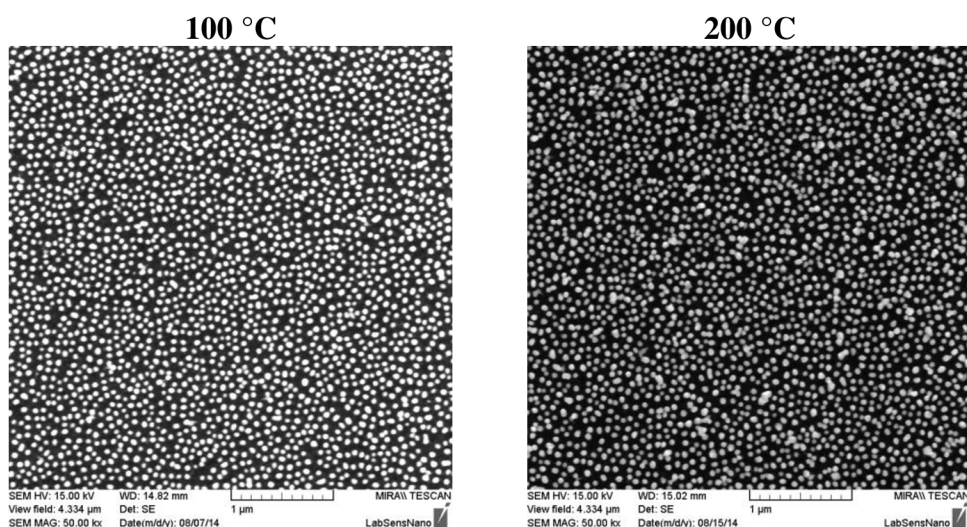
5.2.2 Žihání ve vakuu

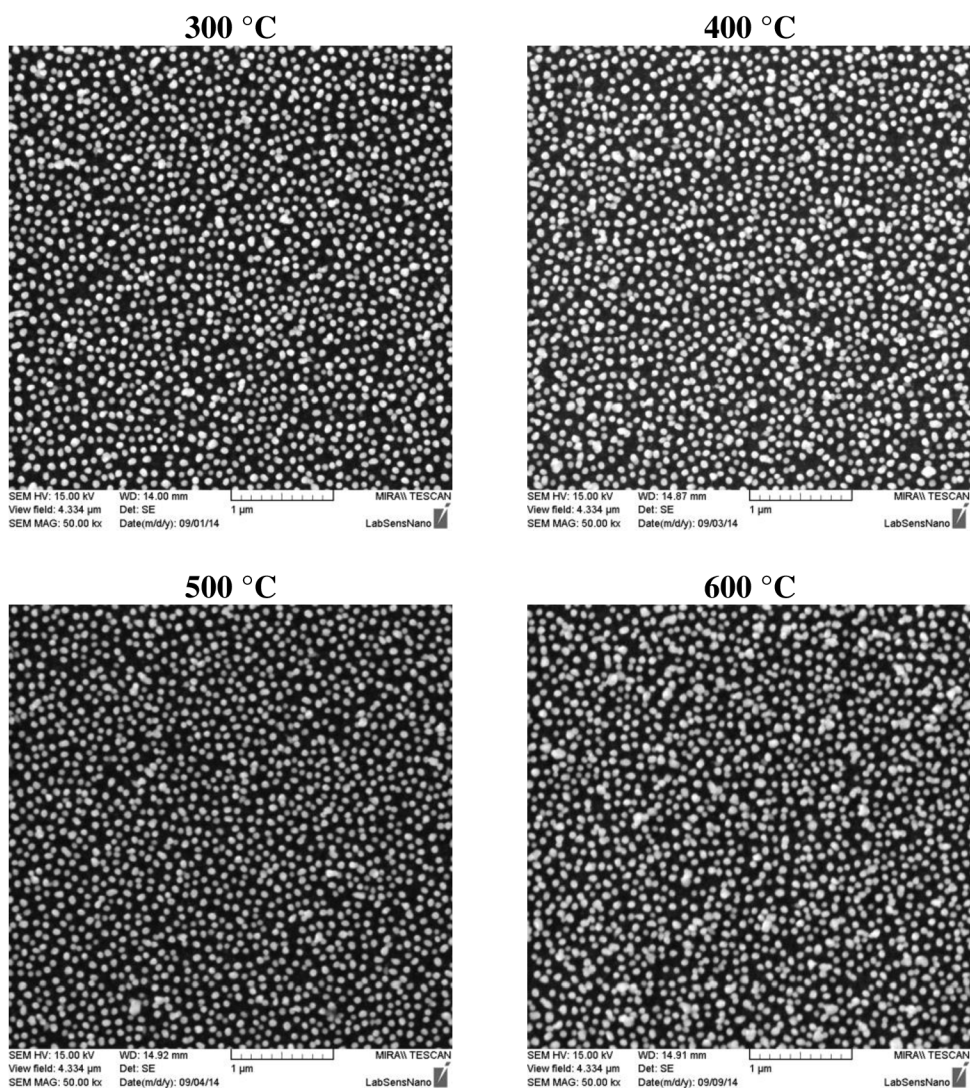
Vakuové žihání bylo provedeno v teplotním rozsahu od 100 °C do 600 °C ve vakuové peci (Vakuum Praha, obr. 47 vpravo) opět s krokem 100 °C po dobu 1 hodiny a tlaku 4×10^{-4} Pa.



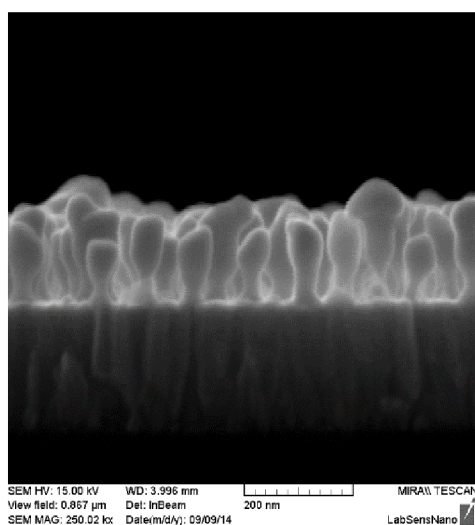
Obr. 47: Muflová pec pro žihání při atmosférickém tlaku (vlevo) a pec pro žihání ve vakuu (vpravo).

Na SEM snímcích na obr. 48 lze pozorovat vliv žihání ve vakuu na změnu struktury povrchu se zlatými nanostrukturami při všech testovaných teplotách. Pro vakuové žihání se jeví nanostruktury jako stabilní v celém testovaném rozsahu teplot. Na SEM snímcích níže (Obr. 49) lze pozorovat řez nanostrukturovanou elektrodou po žihání ve vakuu při 600 °C po dobu 1 hodiny, na které jsou již viditelné mírně natavené nanostruktury – viditelné zkrácení dolní části nanostruktur.





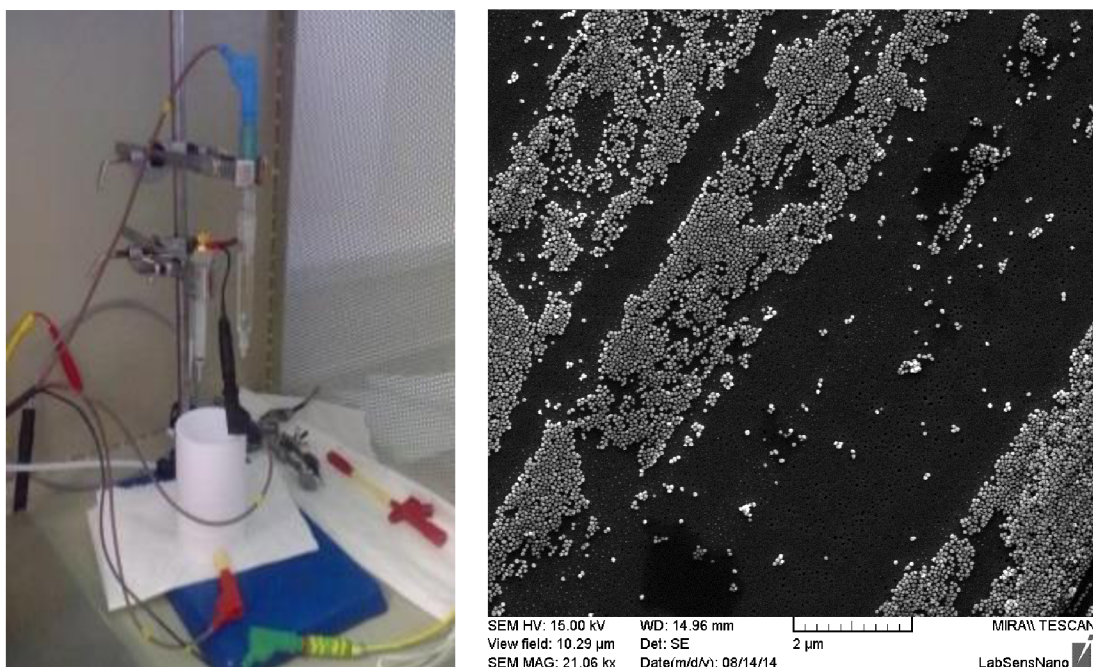
Obr. 48: SEM snímky nanostrukturovaných povrchů po žíhání ve vakuu (4×10^{-4} Pa) při teplotách od 100 °C do 600 °C po dobu 1 hodiny.



Obr. 49: Řez nanostrukturovanou elektrodou po žíhání ve vakuu při 600 °C po dobu 1 hodiny.

5.2.2.1 Elektrochemická charakterizace žíhaných elektrod

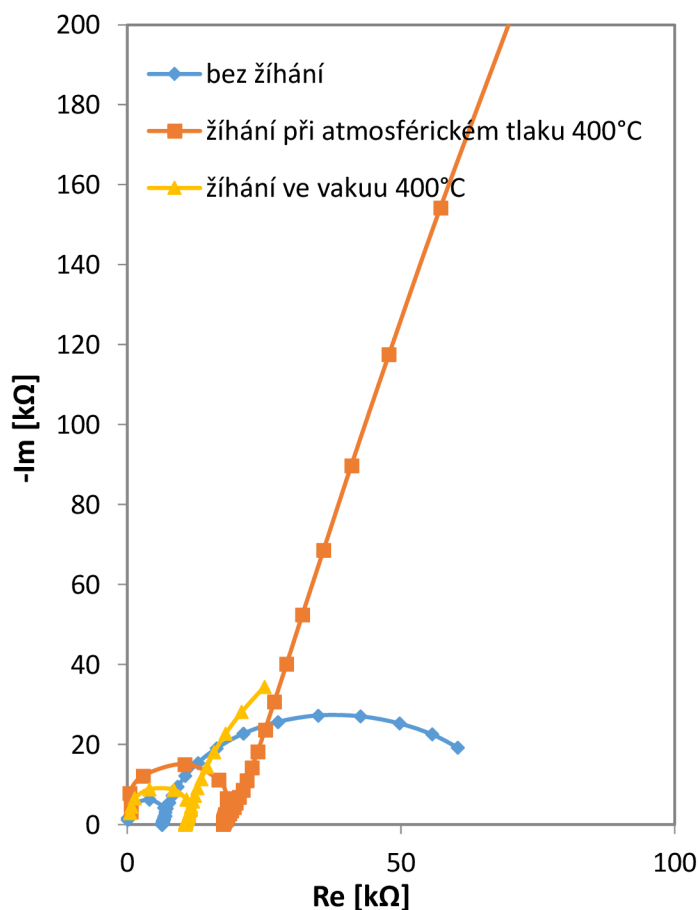
Pro elektrochemickou charakterizaci byly vybrány elektrody žíhané při atmosférickém tlaku i ve vakuu při teplotě 400 °C po 1 hodinu, protože se jednalo o nejvyšší teplotu, při které oba vzorky nevykazovaly strukturální změny. Pro porovnání byl měřen i vzorek nežíhaný. Měření probíhalo v tříelektrodovém zapojení. Pro tyto účely byla připravena teflonová cela, do které se testovaná pracovní elektroda zašroubuje (Obr. 50 vlevo). Kontakt elektrody je řešen přilepením drátku elektricky vodivou pastou na vodivou vrstvu vzorku a ten je pak kontaktován s celou s výstupem pro připojení k potenciostatu. Pomocná a referentní elektroda jsou pak vkládány do nádoby cely. Byl tak odstraněn jeden litografický krok, čímž byl proces výroby zjednodušen. Zpřesnila se i vymezená plocha pracovní elektrody (3 mm v průměru). Nanostruktury jsou totiž vyráběné na větší ploše pomocí cely pro výrobu nanostrukturovaných povrchů s větším průměrem – pro anodizaci je využita cela s průměrem 1 cm a pro depozici zlata cela s průměrem 5 mm (viz. podkapitola 4.1.3). Pro elektrochemická měření je plocha vymezena měřicí celou. Také byly eliminovány problémy s pokrýváním elektricky vodivých hran substrátu pomocí rezistu. Nespornou nevýhodou použitého řešení je fakt, že je cela v přímém kontaktu s nanostrukturovaným povrchem, což v místech kontaktu způsobí jeho poškození (Obr. 50, vpravo). Není tak zcela možné vzorky z cely vyjmout a následně opakovaně použít pro měření.



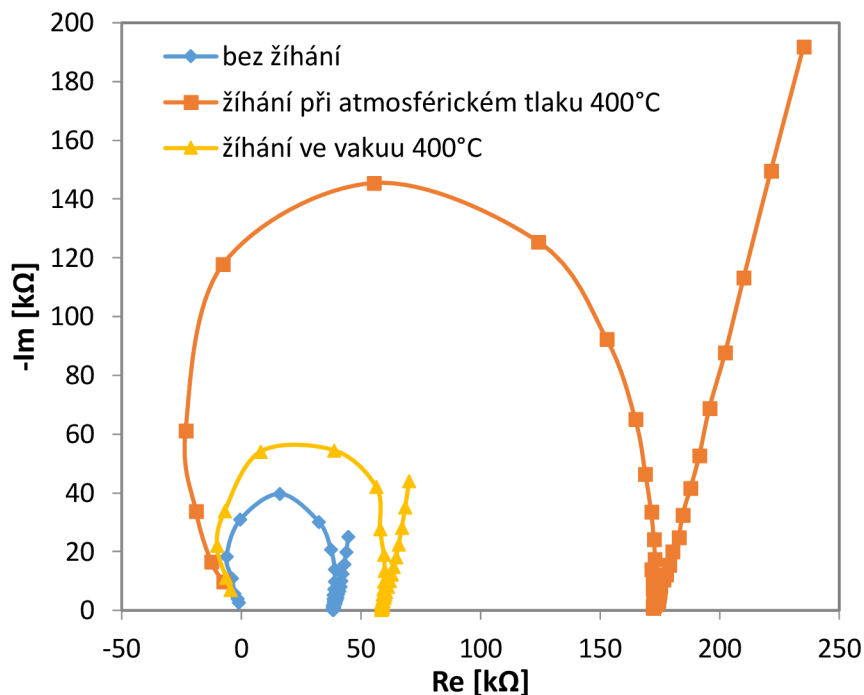
Obr. 50: Měřicí cela ve Faradayově kleci (vlevo), SEM snímek zlatého nanostrukturovaného povrchu v místě po kontaktu s celou (vpravo).

Měření probíhalo s využitím přístroje μ Autolab III/FRA2 a měřicí cela byla umístěna ve Faradayově kleci (viz podkapitola 4.2). Charakterizace elektrochemickou impedanční spektroskopií byla provedena v standardních vodivostních roztocích s různými vodivostmi ($1,3 \mu\text{S}\times\text{cm}^{-1} \pm 1 \%$, $5 \mu\text{S}\times\text{cm}^{-1} \pm 1 \%$, $15 \mu\text{S}\times\text{cm}^{-1} \pm 1 \%$, $100 \mu\text{S}\times\text{cm}^{-1} \pm 1 \%$, $706 \mu\text{S}\times\text{cm}^{-1} \pm 1 \%$, $1413 \mu\text{S}\times\text{cm}^{-1} \pm 1 \%$). EIS byla měřena v rozsahu frekvencí od 500 kHz do 0,1 Hz a amplitudou 20 mV. Na obr. 51 a obr. 52 jsou zobrazena impedanční spektra pro nanostrukturované povrchy žíhané při atmosférickém tlaku při 400 °C, žíhané ve vakuu při 400 °C a nežíhané, měřené při koncentracích vodivostních roztoků $706 \mu\text{S}\times\text{cm}^{-1}$ a $100 \mu\text{S}\times\text{cm}^{-1}$.

Pro názornost chování jednotlivých elektrod byly vyneseny i závislosti reálné části impedance v bodě lokálního maxima impedančního spektra na vodivosti měřených standardů (Obr. 53).

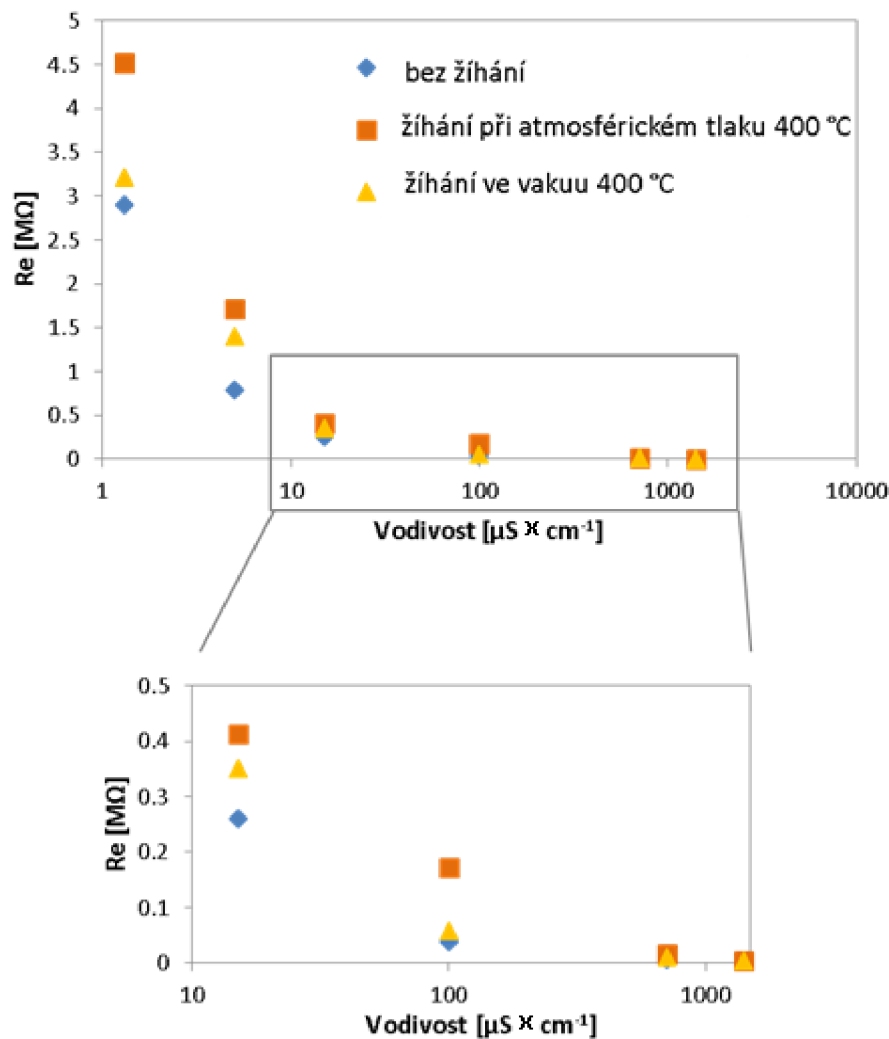


Obr. 51: Impedanční spektrum pro nanostrukturované povrchy nežíhané, žíhané při atmosférickém tlaku a žíhané na vzduchu – měřeno ve vodivostním roztoku $706 \mu\text{S}\times\text{cm}^{-1}$.



Obr. 52: Impedanční spektrum pro „nanoskleničkami“ nanostrukturované povrchy nežíhané, žíhané při atmosférickém tlaku a žíhané na vzduchu – měřeno ve vodivostním roztoku $100 \mu\text{S}\times\text{cm}^{-1}$.

Klíčovým požadavkem na sensor je jeho vysoká elektroaktivní plocha a dobrá elektrická vodivost. Docílení těchto dvou požadavků má za výsledek nízkou hodnotu impedance senzoru a lepší detekční limity. Podle výsledků impedančních měření (viz. obr. 51, obr. 52, obr. 53) lze soudit, že elektroaktivní plocha vzorku žíhaného při atmosférickém tlaku klesla, což mělo za následek zvýšení impedance. Tento fakt by mohl vypovídat o dvou možných případech chování elektrod. Prvním případem je to, že během žíhání při atmosférickém tlaku došlo k oxidaci spodní wolframové vrstvy mezi nanostrukturami. To by rovněž dokazovalo, že spodní wolframová vrstva se běžně účastní elektrochemických interakcí – elektrolyt proniká hluboko mezi nanostruktury a účastní se elektrodových procesů. Druhým případem by byla možnost, kdy došlo k oxidaci nejen wolframové vrstvy mezi nanostrukturami, ale i části wolframové vrstvy pod nanostrukturami, čímž došlo ke zhoršení přenosu náboje mezi zlatými nanostrukturami a spodní wolframovou vrstvou. To by ovšem znamenalo, že se spodní vrstva běžně nemusí účastnit elektrochemických dějů, protože elektrolyt běžně neproniká tak hluboko mezi nanostruktury. Zvýšení impedance by v tomto případě bylo pouze v důsledku zhoršení vodivého kontaktu mezi „nanoskleničkami“ a substrátovou vrstvou.



Obr. 53: Závislosti reálné části impedance v bodě lokálního maxima na vodivosti všech měřených standardních roztoků pro všechny typy nanostrukturovaných povrchů: nežíhaných, žíhaných při atmosférickém tlaku při 400 °C a žíhaných ve vakuu při 400 °C.

Výsledky pro nežíhané vzorky a vzorky žíhané ve vakuu jsou velmi podobné. Nežíhané vzorky dokonce vykazují mírně nižší hodnoty impedance, což znamená, že žíhání u těchto vzorků vodivostní propojení zlatých nanostruktur a wolframového substrátu nezměnilo. Z uvedeného vyplývá, že přímo vyrobené nanostrukturované elektrody mají dobré vlastnosti, které není třeba upravovat žíháním. [116]

5.3 Vliv tvaru nanostruktur na velikost elektroaktivní plochy

V další části studie [54] byly porovnávány pracovní elektrody připravené na wolframovém substrátu a modifikované různými typy zlatých nanostruktur. Elektrody byly připravené obdobně a to depozicí zlata do hexagonálně uspořádané aluminové masky. Byl sledován vliv tvaru a velikosti nanostruktur na elektrochemické vlastnosti

nanostrukturovaných povrchů - velikosti elektroaktivní plochy a tím i jejich senzitivity. Nejprve byla detailně zkoumána topologie vyrobených povrchů využitím rastrovacího elektronového mikroskopu. Poté byly sledovány elektrochemické vlastnosti elektrod pomocí elektrochemické impedanční spektroskopie a cyklické voltametrie. V další části studie byl povrch elektrod modifikován molekulami 11-merkaptoundekanové kyseliny, která poskytuje základ pro budoucí navazování analytů v biosenzorických aplikacích přes thiolové skupiny. Pro interpretaci výsledů EIS byl modelován modifikovaný náhradní Randlesův obvod. Pro zkoumání jevů na rozhraní elektroda – elektrolyt byla využita metoda cyklické voltametrie v přítomnosti redoxního páru $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$.

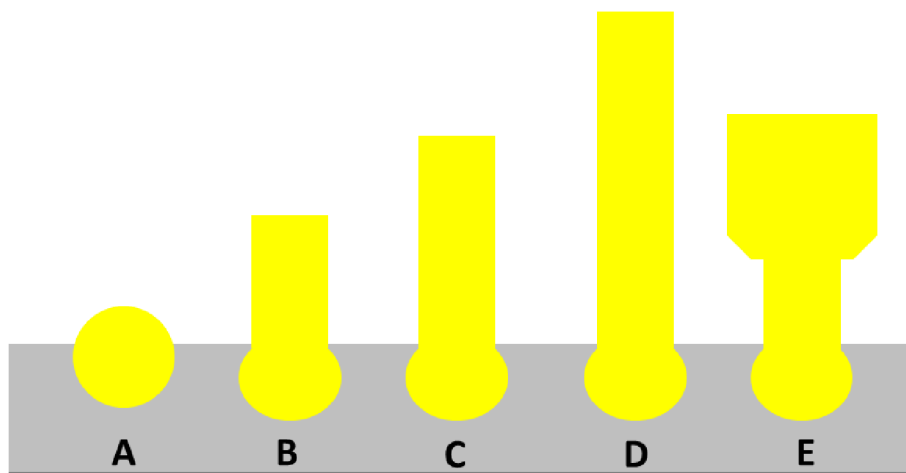
5.3.1 Příprava tenkých vrstev

Základním substrátem pro výrobu elektrod byl křemíkový substrát s 500 nm vrstvou oxidu křemičitého (SiO_2), která slouží jako izolant mezi n-dopovanou křemíkovou vrstvou a vodivými tenkými vrstvami. Jako první byla nanášena adhezivní vrstva titanu o tloušťce 20 nm a na ní vrstva wolframu o tloušťce 200 nm. Obě vrstvy byly připraveny metodou iontového napařování (viz kapitola 4.1.1). Na takto připravené substráty byly metodou termálního napařování (viz kapitola 4.1.1) nanášeny vrstvy hliníku o tloušťkách 100 nm a 500 nm. Pro možnost srovnání povrchů s hladkou elektrodou byla iontovým napařováním na křemíkovém substrátu s 200 nm tlustým termálním SiO_2 připravena hladká zlatá vrstva o tloušťce 250 nm.

5.3.2 Příprava nanostrukturovaných elektrod

Nanostrukturované elektrody byly vyrobeny na wolframové vrstvě obdobným způsobem jako v předchozích částech práce (Obr. 32). Nejprve byla anodicky oxidována horní hliníková vrstva v 0,3M kyselině šťavelové při teplotě 10 °C a konstantním napětí 50 V nebo 53 V. Tímto procesem byla získána nanoporézní maska s hexagonálním uspořádáním nanopórů. Jakmile byla anodizace hliníkové vrstvy dokončena, začalo docházet k anodizaci spodní wolframové vrstvy za vzniku WO_3 nanostruktur, které byly následně odleptány ve fosfátovém pufru pH 7 při teplotě 25 °C. Byla tak získána nanoporézní aluminová maska s nanodůlky ve wolframové vrstvě, které slouží jako základny pro budoucí nanostruktury a zvyšují tak jejich stabilitu. Zlatý materiál byl do nanopórů elektrochemicky deponován pulzní depozicí z roztoku dikyanozlatičitanu draselného. Depozice probíhala při teplotě roztoku 50 °C, délkou pulzu 400 ms, proudem 1 mA, časem mezi pulzy 2 s a amplitudou 5 V. Rozmanitost tvaru získaných nanostruktur byla ovlivňována tloušťkou použité hliníkové vrstvy (a tím i vzniklé aluminové masky), anodizačním napětím, počtem pulzů při depozici a leptáním aluminové masky v kyselině fosforečné pro rozšíření vrchní části nanopórů a vzniku tzv. „nanoskleníček“, které byly

pro tuto studii převzaty z předchozí práce (viz podkapitola 5.2.1). Pro následující měření tak bylo připraveno pět typů nanostruktur (Obr. 54).



Obr. 54: Schéma vyrobených nanostruktur v závislosti na počtu depozičních pulsů a parametrech aluminových masek (tloušťka, rozměry pórů): (A) Au „nanokopečky“, 2 pulzy, maska ze 100 nm vrstvy hliníku, (B) nanosloupky, 5 pulzů, maska ze 100 nm vrstvy hliníku, (C) nanosloupky, 10 pulzů, maska ze 100 nm vrstvy hliníku, (D) nanosloupky, 10 pulzů, maska z 500 nm vrstvy hliníku a (E) „nanoskleničky“, 2 pulzy, maska ze 100 nm vrstvy hliníku po rozšíření pórů.

5.3.3 Elektrochemická charakterizace

Všechna elektrochemická měření nanostrukturovaných elektrod i zlaté elektrody bez nanočástic probíhala na přístroji μ AUTOLAB III/FRA2 a software NOVA 1.10.3 (Metrohm Autolab, Nizozemsko). Měření probíhalo v teflonové cele připravené na míru (obr. 50) při tříelektrodevém zapojení: platinová pomocná elektroda a Ag/AgCl/3M KCl referentní elektroda (viz. podkapitola 4.2). Teflonová cela definuje přesnou velikost pracovní elektrody na 3 mm v průměru (cca 7 mm²). Před každým měřením byly elektrody elektrochemicky čištěny cyklickou voltametří v 0,1M kyselině sírové. Při čištění docházelo k desorpci nečistot z povrchu elektrod. Bylo zjištěno, že je to klíčový krok pro dosažení reprodukovatelných měření. Na druhou stranu je třeba dávat pozor, aby při cyklování nedošlo k poničení nanostrukturovaných povrchů.

Elektrochemická impedanční spektroskopie byla provedena při nulovém potenciálu v rozsahu frekvencí od 500 kHz do 0,1 Hz s amplitudou 20 mV. EIS byla provedena v komerčně dostupných roztocích o vodivostech 100, 706 a 1413 $\mu\text{S}\times\text{cm}^{-1}$. Výsledky EIS byly poté simulovány náhradním elektrickým obvodem s využitím software NOVA 1.10.3.

Cyklická voltametrie byla měřena v rozsahu potenciálů od -0,6 V do 0,7 V v roztoku chloridu draselného s hexakynoželezitanem a hexakynoželezitanem draselným o koncentracích 2,5 mM, 5 mM a 7,5 mM.

5.3.4 Biomodifikace nanostruktur

Všechny studované elektrody byly charakterizované elektrochemickou impedanční spektroskopii a cyklickou voltametrií v rozsahu potenciálů od -0,2 V do 0,7 V v 5mM fosfátovém pufru s pH 7. Povrchy elektrod byly modifikovány 11-merkaptoundekanovou kyselinou proto, aby se jejich povrch modifikoval thilovými skupinami, což nachází uplatnění v mnoha biosenzorických aplikacích. Elektrody byly ponořeny do 5mM roztoku 11-merkaptoundekanové kyseliny rozpuštěné v absolutním etanolu po dobu 24 hodin. Poté byly vzorky opláchnuty v absolutním etanolu, aby byly odplaveny nenavázané zbytky kyseliny, osušeny v proudu vzduchu a proměřeny.

5.3.5 Výsledky

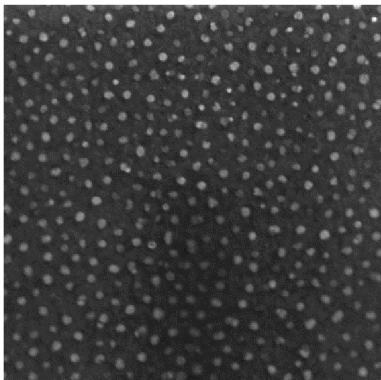
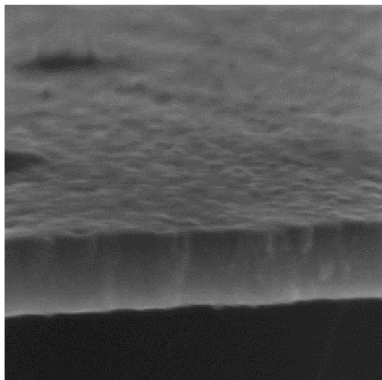
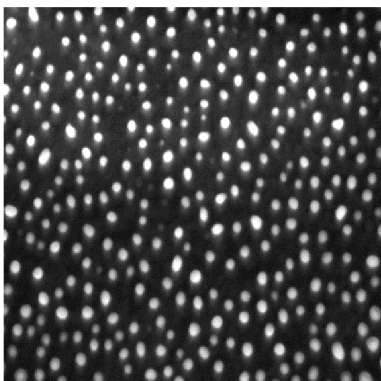
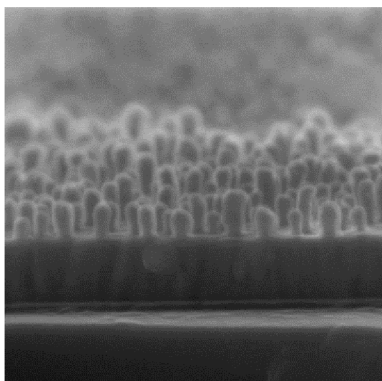
5.3.5.1 SEM charakterizace zlatých nanostruktur

Podrobnou SEM charakterizací uvedenou v tabulce (Tabulka 3) bylo shledáno, že reprodukovatelnost výrobního procesu nanostruktur je vysoká a získáváme tak homogenní pokrytí elektrodového povrchu nanostrukturami o různých tvarech a velikostech v závislosti na výrobních podmínkách. Aby bylo docíleno homogenního rozložení nanostruktur na elektrodovém povrchu, musely být výrobní parametry postupně optimalizovány. Velmi důležitým parametrem byla shledána adheze kovových vrstev na termální oxid křemičitý, který pokrývá křemíkový substrát. Dalším důležitým prvkem je uniformita tloušťky nanosených tenkých vrstev, která umožňuje přípravu nanostruktur stejné délky po celé ploše výchozího substrátu. Přítomnost nečistot byla eliminována použitím materiálů vysoké čistoty – konkrétně kovových terčů pro iontové naprašování, kovů pro termální naprašování a chemikálií pro anodickou oxidaci hliníku a wolframu, chemikálií pro depozici zlata a dalších (viz podkapitola 4.1.2).

Výsledné variability tvarů nanostruktur bylo dosaženo změnou výrobních parametrů. Těmito parametry byla například velikost anodizačního napětí, která výrazně ovlivňuje průměr nanopórů v aluminové masce a následně i průměr a výsledný tvar deponovaných zlatých nanostruktur. Obecně, vyšší anodizační napětí má za následek větší průměr nanopórů aluminové masky a následně i nanostruktur. Výška nanostruktur je dána tloušťkou aluminové vrstvy (výškou masky) a také počtem depozičních pulsů. Větší počet depozičních pulsů znamená vyšší výsledné nanostruktury, a tak například po 2-pulzové depozici získáváme nanostruktury připomínající „nanokopečky“, zatímco 5-ti a více

pulzové depozici získáváme nanosloupy. Se vzrůstající tloušťkou aluminové masky lze docílit i vyšších nanostruktur při zachování počtu depozičních pulzů. Pro tuto studii byly také vyrobeny netradiční nanostrukturované povrchy tzv. „nanoskleničky“, které byly připraveny obdobně, jak je popsáno v kapitole 5.2.1. Struktury pro tuto studii byly připraveny leptáním vrchní části nanopórů kyselinou fosforečnou o teplotě 50 °C po dobu 3 minut. Vzhledem k rozšíření vrchní části nanopórů bylo do masky snadnější deponovat zlatý materiál, a tak postačily 2 pulzy ke kompletnímu naplnění aluminové masky. Celkem bylo připraveno 5 typů nanostruktur (Obr. 54), které jsou i s výrobními parametry shrnuty v tabulce (Tabulka 3).

Tabulka 3: SEM charakterizace zlatých nanostrukturovaných povrchů s pěti různými typy zlatých nanostruktur (A – E) zobrazující vliv výrobních parametrů na výsledný tvar a velikost nanostruktur.

Parametry	SEM pohled shora	SEM pohled v řezu
A Al vrstva: 100 nm Anodizační napětí: 53 V 2 pulzy „Nanokopečky“ o výšce: 20–30 nm Průměr nanokopeček: 50–60 nm	 <p>SEM HV: 15.00 kV VID: 5.099 mm View field: 2.167 μm Det: InBeam SEM MAG: 100.00 kx MIRAX TESCAN LabSensNano</p>	 <p>SEM HV: 15.00 kV VID: 6.166 mm View field: 1.083 μm Det: InBeam SEM MAG: 200.00 kx MIRAX TESCAN LabSensNano</p>
B Al vrstva: 100 nm Anodizační napětí: 53 V 5 pulzů Výška nanosloupků: 80–90 nm Průměr nanosloupků: 55–65 nm	 <p>SEM HV: 15.00 kV VID: 14.95 mm View field: 2.167 μm Det: SE SEM MAG: 133.33 kx Date(m/d/y): 11/14/14 MIRAX TESCAN LabSensNano</p>	 <p>SEM HV: 15.00 kV VID: 4.076 mm View field: 1.083 μm Det: InBeam SEM MAG: 200.00 kx MIRAX TESCAN LabSensNano</p>

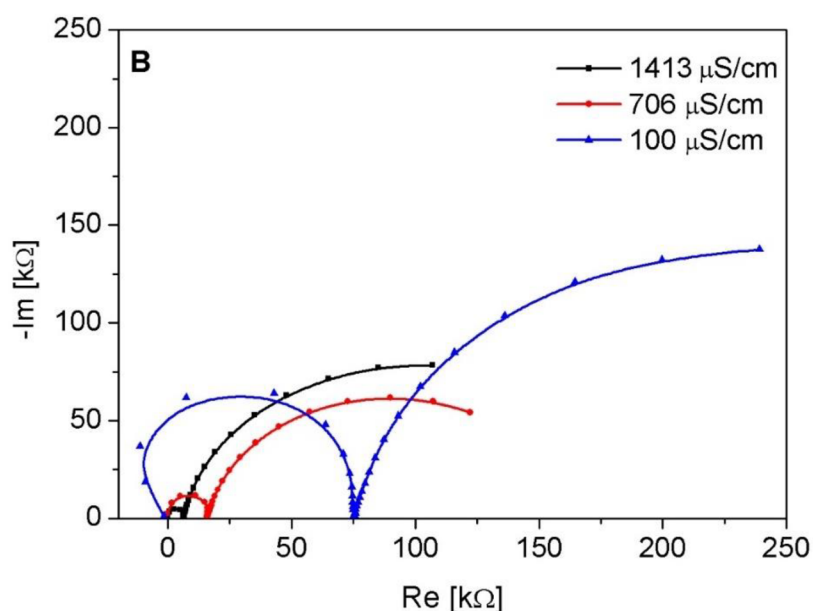
<p>C</p> <p>Al vrstva: 100 nm</p> <p>Anodizační napětí: 53 V</p> <p>10 pulzů</p> <p>Výška nanosloupků</p> <p>130–140 nm</p> <p>Průměr nanosloupků</p> <p>55–65 nm</p>	
<p>D</p> <p>Al vrstva: 500 nm</p> <p>Anodizační napětí: 53 V</p> <p>10 pulzů</p> <p>Výška nanosloupků: 190–210 nm</p> <p>Průměr nanosloupků:</p> <p>60–70 nm</p>	
<p>E</p> <p>Al vrstva: 100 nm</p> <p>Anodizační napětí: 50 V</p> <p>2 pulzy</p> <p>Výška „nanoskleniček“:</p> <p>130–150 nm</p> <p>Průměr „nanoskleniček“:</p> <p>50–60 nm</p>	

První typ nanostrukturovaného povrchu (A) byly tzv. „nanokopečky“. Jedná se o nanostruktury vzniklé 2-pulzovou depozicí zlata do masky ze 100 nm hliníku. Struktury jsou velmi krátké (20–30 nm), mají tedy menší délku, než je jejich průměr (50–60 nm). Další nanostruktury byly připraveny 5-ti pulzovou depozicí (B) a 10-pulzovou depozicí

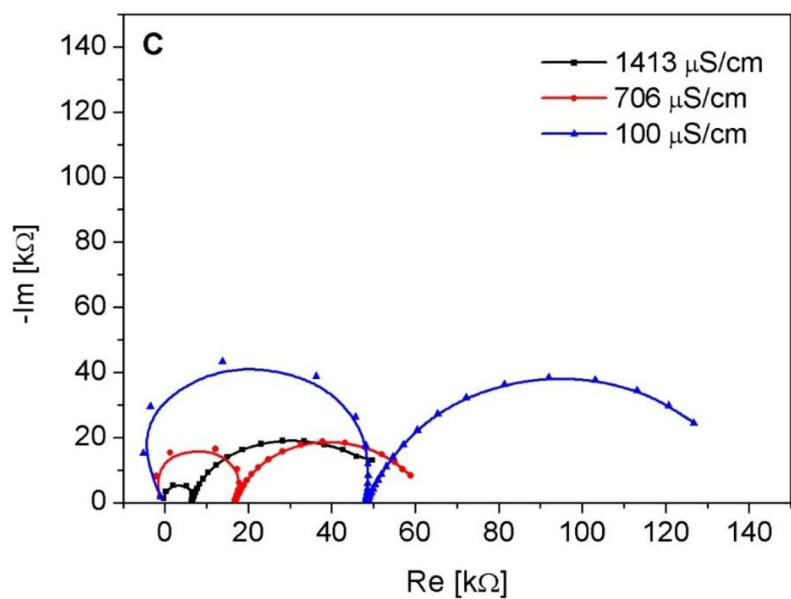
(C) do masky připravené ze 100 nm hliníku. Nanosloupky připravené 10-ti pulzovou depozicí (C) mají homogennější délku jednotlivých nanosloupků, protože dochází k vyplnění masky téměř v celé délce nanopórů, jelikož jejich délka je přibližně 130–140 nm (maska ze 100 nm Al je přibližně 140 nm tlustá – viz. 2.4.1). Nanostrukturovaný povrch připravený 5-ti pulzovou depozicí (B) má jednotlivé délky nanosloupků více rozdílné s výškami dosahujícími přibližně 80-90 nm. Poslední typ nanosloupků byl připraven 10-ti pulzovou depozicí do masky z 500 nm tlustého hliníku (D). Na SEM snímcích lze pozorovat, že délky nanosloupků se také výrazněji liší. Jedná se o nanostruktury s největším průměrem v důsledku dlouhé anodizace (60–70 nm) a největší délkou (190–210 nm). Posledním typem nanostruktur v této studii jsou tzv. „nanoskleničky“ připravené 2-pulzovou depozicí do masky ze 100 nm hliníku (E), u které byl rozšířen horní průměr nanopórů. Výsledné „nanoskleničky“ jsou 130–150 nm dlouhé s horním průměrem 50–60 nm a stopkou o průměru přibližně 30–40 nm.

5.3.5.2 Elektrochemická charakterizace EIS

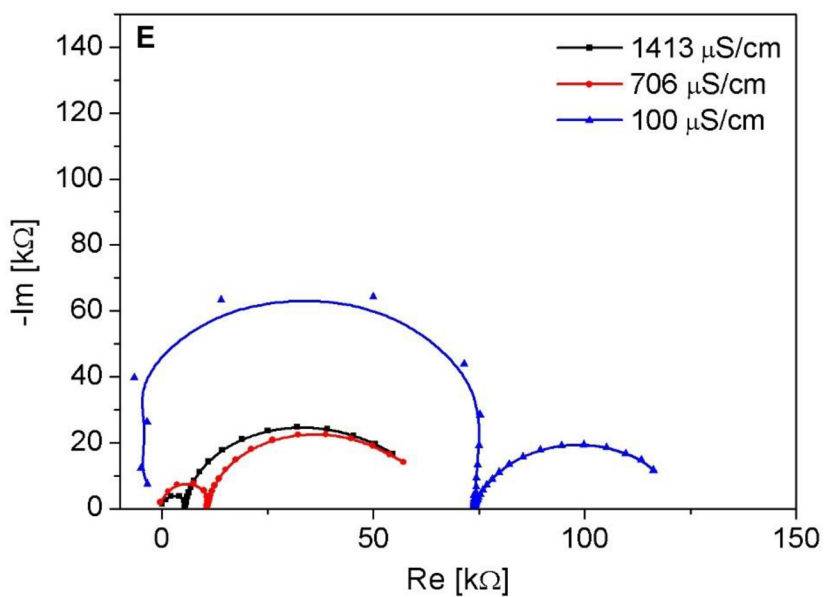
Pomocí elektrochemické impedanční spektroskopie byly mezi sebou porovnány elektroaktivní plochy připravených nanostrukturovaných pracovních elektrod společně i s hladkou zlatou elektrodou. Měření EIS odhalila závislost velikosti elektroaktivní plochy na tvaru a velikosti nanostruktur a pokrytí povrchu nanostrukturami. Na obr. 55, obr. 56 obr. 57 a Obr. 58 jsou ukázány typické frekvenční závislosti pro vybrané typy elektrod. Výsledky všech impedančních výsledků z této části studie jsou shrnuty v příloze A.



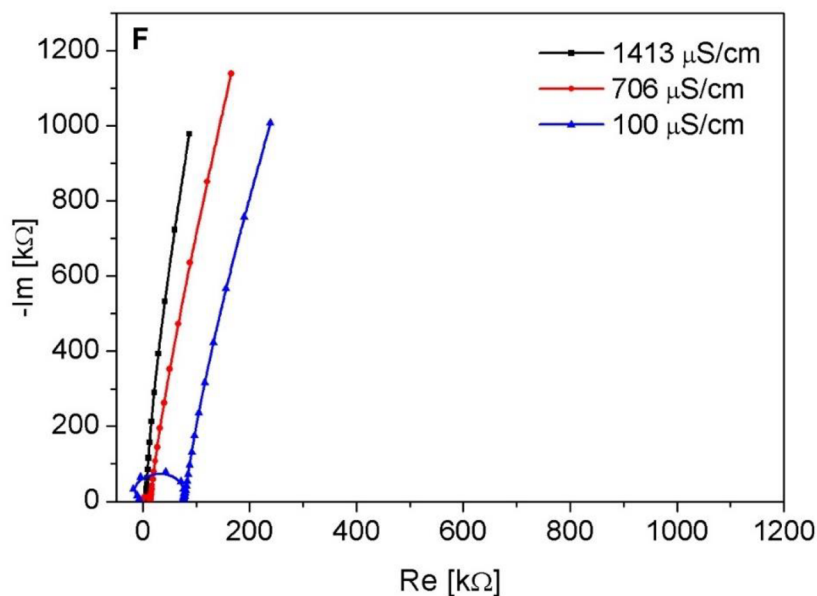
Obr. 55: Nyquistův diagram pro nanostrukturovanou zlatou elektrodu o geometrické ploše cca 7 mm² připravenou 5 pulzovou depozicí do masky ze 100 nm hliníku (Tabulka 3-B).



Obr. 56: Nyquistův diagram pro nanostrukturovanou zlatou elektrodu o geometrické ploše cca 7 mm² připravenou 10 pulzovou depozicí do masky ze 100 nm hliníku (Tabulka 3-C).



Obr. 57: Nyquistův diagram pro nanostrukturovanou zlatou elektrodu o geometrické ploše cca 7 mm² připravenou 2 pulzovou depozicí do masky ze 100 nm hliníku po rozšíření pórů – tzv. „nanoskleničky“ (Tabulka 3-E).



Obr. 58: Nyquistův diagram pro hladkou zlatou elektrodu o geometrické ploše cca 7 mm² bez nanočástic.

Jak vyplývá z grafů impedančních závislostí, na vysokých frekvencích (1000 Hz a vyšší) Nyquistova diagramu lze pozorovat půlkruhovitou část (faradaickou), která odpovídá odporu přenosu náboje přes rozhraní elektroda / elektrolyt a jehož velikost je závislá na koncentraci (vodivosti) elektrolytu, ve kterém měření probíhá. Další rozdíl v naměřených výsledcích též související s vodivostí, je pozorován mezi difuzní a faradaickou částí. Posun rozhraní difuzní a faradaické části směrem k nižším hodnotám reálné části impedance znamená vyšší vodivost elektrody při dané vodivosti / koncentraci elektrolytu, což souvisí s elektroaktivní plochou elektrody. Lze vyzpozorovat, že účinek zvětšení elektroaktivní plochy elektrody (snížení impedance elektrody) je největší pro elektrodu s nanostrukturami připravenými 10-pulzní depozicí do aluminové masky připravené ze 100 nm tlustého Al (Obr. 56, Tabulka 3-C). V tomto případě lze z EIS měření konstatovat, že došlo ke značnému zvětšení elektroaktivní plochy. Bylo také pozorováno, že všechny nanostrukturované elektrody vykazovaly nižší hodnotu reálné části impedance v bodě lokálního maxima v porovnání s hladkou zlatou elektrodou bez nanočástic (Obr. 58). Tento fakt potvrzuje, že modifikace elektrod nanostrukturami je přínosná. Při nižších frekvencích vykazuje difuzní část impedance nelineární průběh a tím kapacitní chování všech typů nanostrukturovaných elektrod, které je z tohoto zakřivení difuzní části zřejmé a odráží přítomnost nanostruktur na povrchu elektrody EIS průběh naměřený pro hladkou zlatou elektrodu bez nanočástic vykazoval vyšší hodnoty impedance v difuzní části průběhu v porovnání s ostatními měřenými elektrodami, což je způsobeno nižší vodivostí elektrody. Difuzní část impedance je téměř lineární a nevykazuje žádné deformace – jedná se o typický průběh Warburgovy impedance.

Pro zjištění vlastností elektrod z EIS výsledků se dá každé měření popsat pomocí náhradního obvodu s parametry, podle kterých lze pak jednotlivé elektrody snáze porovnat (viz. kapitola 2.3.1). V okamžiku, kdy elektrodu ponoříme do vodivého roztoku, na rozhraní elektrody a elektrolytu se vytvoří difuzní dvouvrstva, která může být popsána kapacitou dvouvrstvy C_{DL} (double layer capacitance) a odporem přenosu náboje R_{CT} (charge transfer resistance) přes elektrodovou dvouvrstvu. Jinak řečeno, povrchový potenciál elektrody čerpá ionty z roztoku, čímž zapříčiní vznik dvouvrstvy a způsobí tak odpor přenosu náboje R_{CT} přes tuto vrstvu. Odpor přenosu náboje je parametr, který charakterizuje elektrochemické chování studované pracovní elektrody. Lokální maximum Nyquistova diagramu je dáno součtem R_S a R_{CT} s minimálním příspěvkem imaginární části a je závislé na koncentraci elektrolytu. Hodnoty lokálních maxim odečtených z Nyquistova diagramu připravených elektrod jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 4). Parametry charakterizace EIS byly následně simulovány pomocí ekvivalentních obvodů, které budou popsány v následující kapitole 5.3.5.5.

Tabulka 4: Parametry lokálního maxima Nyquistova diagramu pro a všechny typy nanostrukturovaných elektrod (A-E) a hladkou zlatou elektrodu (F).

Typ elektrody	Vodivost roztoku [$\mu\text{S}\times\text{cm}^{-1}$]	Frekvence [Hz]	Reálná část impedance [k Ω]	Absolutní hodnota imaginární části impedance [Ω]	Impedance [Ω]
A: 100 nm Al, 2 pulzy, 53 V Výška nanokopečků: 20–30 nm Průměr nanokopečků: 50–60 nm	100	359	47,12	252	47,12
	706	1263	10,67	74	10,67
	1413	2371	3,51	35	3,51
B: 100 nm Al, 5 pulzů, 53 V Výška nanosloupků: 80–90 nm Průměr nanosloupků: 55–65 nm	100	491	74,96	297	74,96
	706	1263	15,79	108	15,79
	1413	2371	6,11	63	6,11
C: 100 nm Al, 10 pulzů, 53 V Výška nanosloupků: 130–140 nm Průměr nanosloupků: 55–65 nm	100	491	48,40	300	48,40
	706	1263	16,82	114	16,82
	1413	2371	6,37	59	6,37
D: 500 nm Al, 10 pulzů, 53 V Výška nanosloupků: 190–210 nm Průměr nanosloupků: 60–70 nm	100	359	48,22	247	48,22
	706	1263	9,71	71	9,71
	1413	2371	3,54	35	3,54
E: 100 nm Al, 2 pulzy, 50 V Výška „nanoskleníček“: 130–150 nm Průměr „nanoskleníček“: 50–60 nm	100	262	73,93	255	73,94
	706	1263	10,58	60	10,58
	1413	1730	5,33	42	5,34
F: Plochá zlatá vrstva	100	673	75,70	512	75,70
	706	2371	13,53	174	13,53
	1413	3248	5,86	89	5,86

5.3.5.3 Elektrochemická charakterizace cyklickou voltametrií

Elektroaktivní plocha, která představuje skutečnou oblast podílející se na procesech probíhajících mezi elektrodou ponořenou do elektrolytu a objemem roztoku, je jedním z nejdůležitějších pojmů v elektrochemii. Elektroaktivní plocha elektrod je ovlivňována elektrodovým materiálem, drsností a smáčivostí povrchu. V posledních letech se ke zvýšení elektroaktivní plochy hojně využívá nanostruktur umístěných na povrch elektrod. Výsledná elektroaktivní plocha se tak může výrazně lišit od geometricky změřené plochy elektrody, jak již bylo uvedeno dříve.

Pro vyhodnocování velikosti elektroaktivních ploch pracovních elektrod je mimo jiné běžně využívaná cyklická voltametrie provedená v redoxním elektrochemickém systému (viz. podkapitola 2.3.2.2). V této studii byla CV analýza provedena v 0,1M chloridu draselném se třemi různými koncentracemi redoxního páru ferro–ferrikyanidu draselného (2,5 mM, 5 mM, 7,5 mM). Vyhodnocení výsledků cyklické voltametrie může odhalit skutečnou penetraci elektrolytického roztoku mezi zlaté nanostruktury, kdy vyšší pík cyklického voltamogramu (závislý též na koncentraci) značí vyšší elektroaktivní odezvu. Výsledky jsou nejpřesnější, když systém splňuje podmínku reverzibility, tj. když reverzibilní systém zahrnuje katodické a anodické píky se vzdáleností potenciálů menší než 0,59 V. V praxi je však vzdálenost mezi píky, zejména pak u nanostrukturovaných elektrod vyšší.

Elektroaktivní plocha byla určena pomocí Randles–Ševčíkovy rovnice:

$$i_{pa} = i_{pc} = 2,687 \cdot 10^5 \cdot n^{3/2} \cdot A \cdot D^{1/2} \cdot \nu^{1/2} \cdot c, \quad \text{Rovnice 23}$$

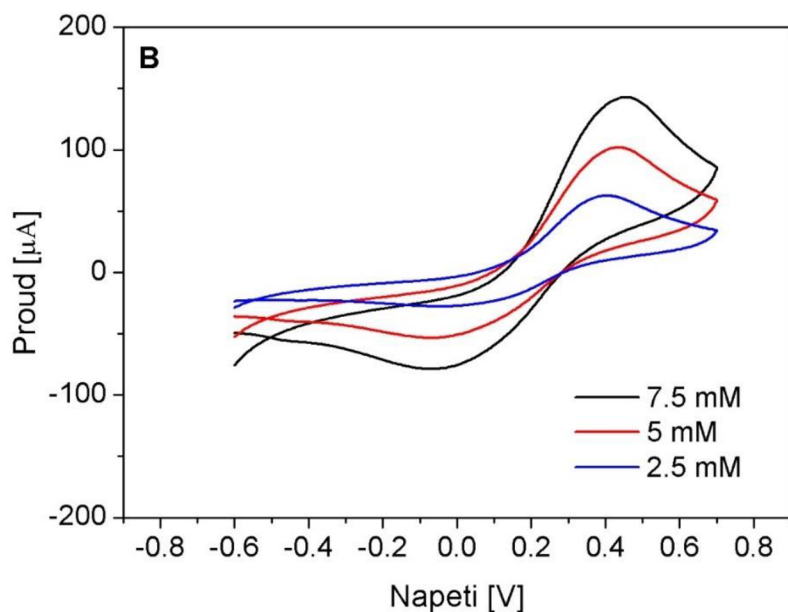
kde i_{pa} a i_{pc} jsou výšky CV píků, n je počet přenášených iontů (v tomto případě rovno 1), A je elektroaktivní plocha [cm^2], D je difuzní koeficient [$\text{cm}^2 \times \text{s}^{-1}$], ν je rychlost skenování [$\text{V} \times \text{s}^{-1}$] a c je koncentrace elektrolytického roztoku [$\text{M} \times \text{dm}^{-3}$]. Vypočítané průměrné elektroaktivní plochy jsou vypsány v tabulce (Tabulka 5). Je důležité zmínit, že geometrická plocha všech připravených elektrod je cca 0,07 cm^2 .

Podle výsledků cyklické voltametrie (Obr. 59, obr. 60 a Tabulka 5) roste vypočtená elektroaktivní plocha s délkou nanosloupků a tím tedy i s počtem depozičních pulzů. Překvapivě, velkou elektroaktivní plochu vykazovaly nanostrukturované elektrody pokryté tzv. „nanoskleničkami“. Jejich elektroaktivní plocha se blížila strukturám s největším počtem pulsů (nejvyšším nanostrukturám). A to při pouhých dvou depozičních pulzech. Důvodem tohoto jevu je rozdílný tvar nanopórů, které byly před depozičí rozšířeny leptáním v kyselině fosforečné. Rozšířené konce nanopórů zapříčiní to, že při nižším počtu pulzů je možné nadeponovat do nanopórů větší množství zlatého

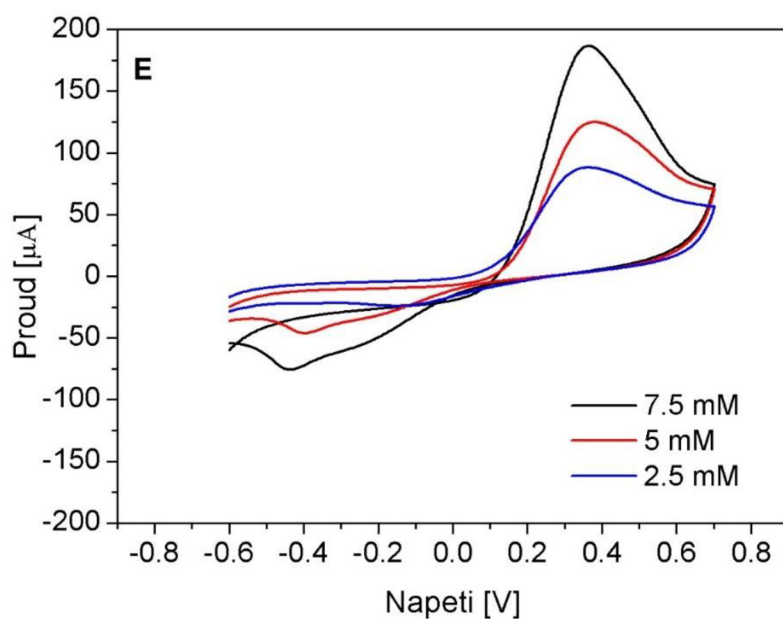
materiálu. Největší elektroaktivní plocha byla ovšem změřena pro hladkou elektrodu bez nanočástic, což může být vysvětleno tím, že elektroda je tvořena pouze vrstvou zlata. Měřený signál je zde veden pouze přes zlato, a tak cestou nedochází ke ztrátám signálu z procesů na elektrodovém povrchu v porovnání s nanostrukturovanými elektrodami, kde signál vzniká na zlaté nanostrukturuře, je veden zlatou nanostrukturou až do substrátové wolframové vrstvy, z ní přechází do neanodizované vrstvy hliníku a tam je kontaktován s měřicí celou, která je připojena k potenciostatu. Lze předpokládat, že v místě rozhraní zlaté nanostruktury a wolframu mohla při výrobním procesu narůst tenká vrstva oxidu, která vytváří další přechod (kov – izolant – kov), který způsobuje odpor a snižuje tak detekovaný signál. Z měřených výsledků je také možno předpokládat, že nanostruktury s větší délkou cca nad 210 nm (více než 10 depozičních pulzů) by mohly mít lepší elektrochemické výsledky a vyšší vypočítanou elektroaktivní plochu. Výsledky voltametrických měření pro všechny typy elektrod jsou uvedené v příloze B.

Tabulka 5: Porovnání průměrných elektroaktivních ploch dopočtených dle Randles–Ševčíkovy rovnice různých typů nanostrukturovaných elektrod a zlaté elektrody bez nanočástic.

Typ elektrody	Elektroaktivní plocha [cm ²]
A: 100 nm Al, 2 pulzy, 53 V Výška nanokopečků: 20–30 nm Průměr nanokopečků: 50–60 nm	1,32
B: 100 nm Al, 5 pulzů, 53 V Výška nanosloupků: 80–90 nm Průměr nanosloupků: 55–65 nm	1,34
C: 100 nm Al, 10 pulzů, 53 V Výška nanosloupků: 130–140 nm Průměr nanosloupků: 55–65 nm	1,45
D: 500 nm Al, 10 pulzů, 53 V Výška nanosloupků: 190–210 nm Průměr nanosloupků: 60–70 nm	1,80
E: 100 nm Al, 2 pulzy, 50 V Výška „nanoskleniček“: 130–150 nm Průměr „nanoskleniček“: 50–60 nm	1,69
F: Hladká zlatá elektroda	1,85



Obr. 59: Cyklický voltamogram zlatých nanostrukturovaných elektrod připravených depozicí s 5 pulzy do aluminové masky ze 100 nm Al (Tabulka 3-B).



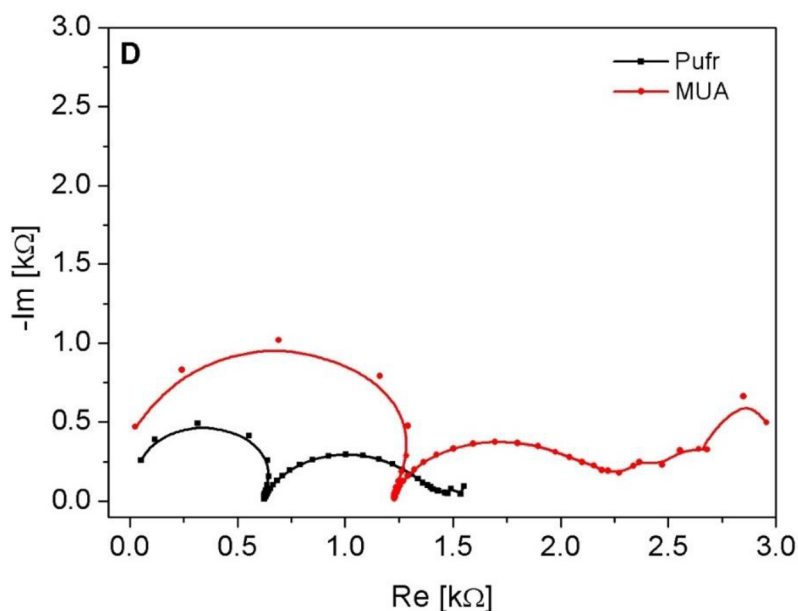
Obr. 60: Cyklický voltamogram pro zlaté nanostrukturované elektrody tzv. „nanoskleníčky“ připravené depozicí s 2 pulzy do aluminové masky ze 100 nm hliníku po proleptání pórů (Tabulka 3-E).

Dalším důležitým parametrem v elektrochemickém voltametričném měření je stabilita elektrodového systému, což znamená reverzibilitu měřenou v přítomnosti redoxní sondy. Hladká zlatá elektroda projevovala očekávané chování standardního reverzibilního systému. Nanostrukturované elektrody vytvořené za použití anodické aluminové masky

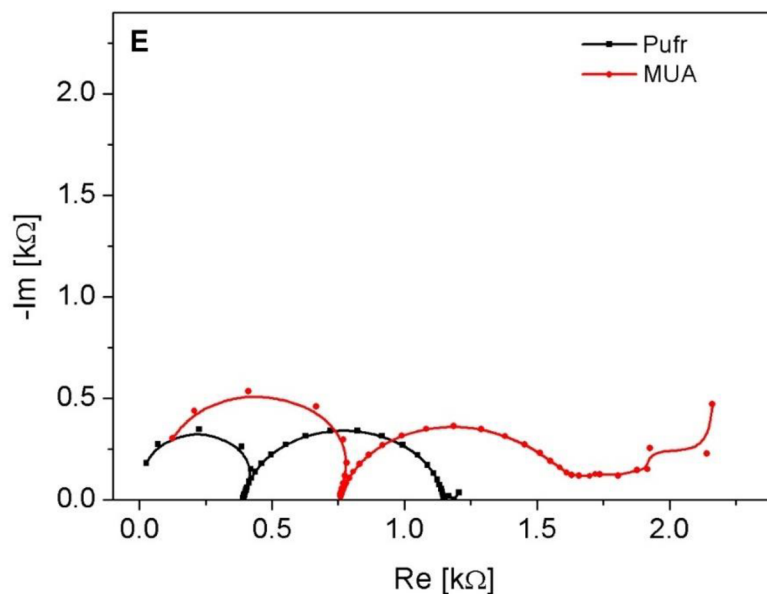
ze 100 nm tlusté hliníkové vrstvy se chovají reverzibilně, ale vzdálenost maxim píků je větší ve srovnání s plochou zlatou elektrodou. Křivky pro nanostrukturované elektrody s tzv. skleničkami a elektrody připravené depozicí s 10 pulzy nevykazují reverzibilní chování. Výsledkem těchto měření je výrazně menší a odlišně tvarovaný anodický pík v porovnání s katodickým píkem.

5.3.5.4 Elektrochemická charakterizace po biomodifikaci MUA

Kyselina 11–merkaptoundekanová (MUA) byla použita jako biomodifikační činidlo pro modifikaci nanostrukturovaných elektrod a hladké zlaté elektrody karboxylovými funkčními skupinami, které by v budoucnu měly sloužit jako místa pro potenciální navázání dalších biomolekul. Modifikace byla provedena ponořením připravených povrchů na 24 h do 5mM 11–merkaptoundekanové kyseliny rozpuštěné v absolutním etanolu. Poté byly elektrody opláchnuty etanolem a osušeny. Po této modifikaci bylo pozorováno zvýšení hodnot reálné části impedance a delší difuzní části impedance. Vybrané průběhy jsou zobrazeny na obr. 61 a obr. 62, průběhy pro všechny měřené povrchy lze pozorovat v příloze C. Nejvýraznější zvýšení impedance bylo pozorováno u nanostrukturované elektrody připravené depozicí s 10-ti pulzy. Naopak v případě hladké zlaté elektrody byla změna půlkruhovitě části Nyquistova diagramu po modifikaci merkaptoundekanovou kyselinou zanedbatelná. Bylo však pozorováno prodloužení difuzní části průběhu.

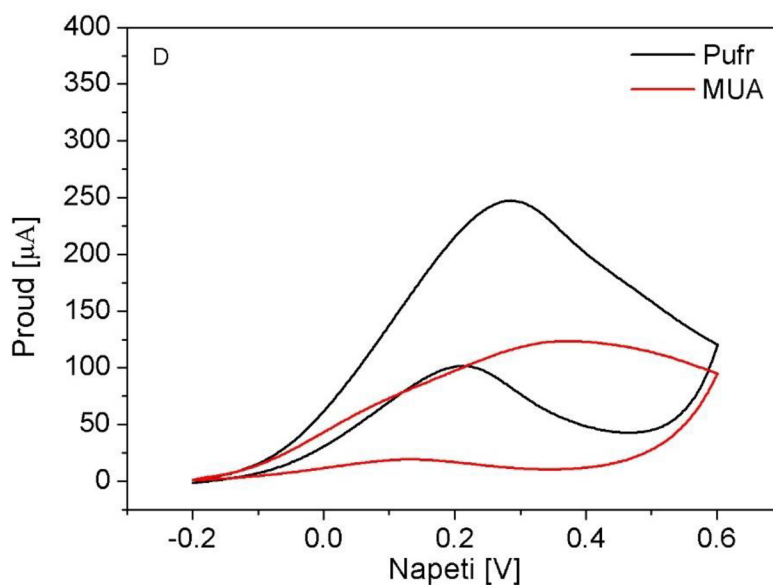


Obr. 61: Nyquistův diagram nanostrukturované zlaté elektrody připravené 10-ti pulzy do aluminové masky z 500 nm vrstvy hliníku (viz. Tabulka 3-D) po modifikaci 11–merkaptoundekanovou kyselinou.

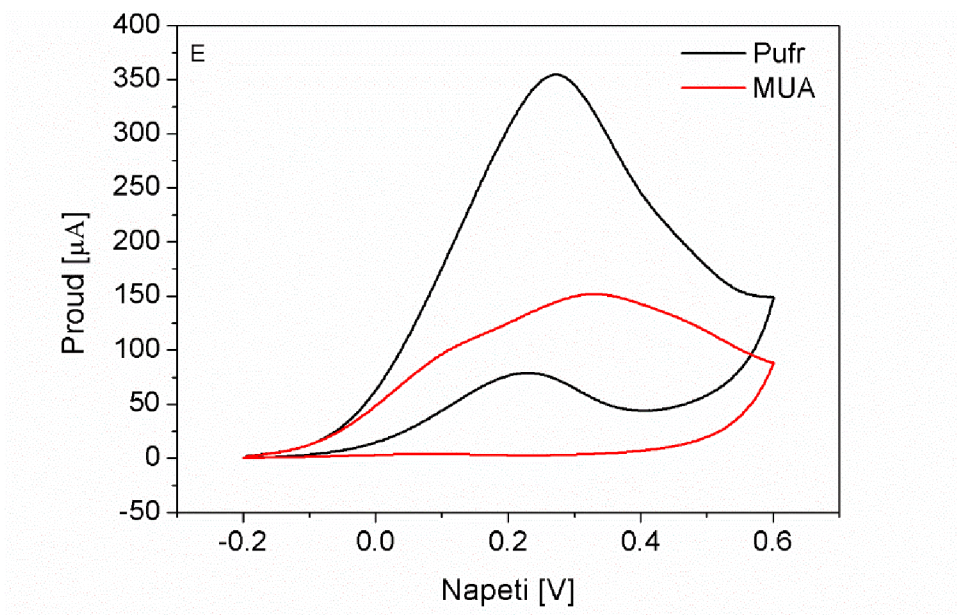


Obr. 62: Nyquistův diagram nanostrukturované zlaté elektrody připravené 2 pulzy do aluminové masky ze 100 nm vrstvy hliníku s rozšířenými póry – tzv. „nanoskleničky“ (viz. Tabulka 3-E) po modifikaci 11-merkaptoundekanovou kyselinou.

Po modifikaci elektrod MUA byla provedena analýza pomocí cyklické voltametrie obdobně jako před modifikací. Proudová odezva voltamogramů poklesla oproti odezvě měřené před modifikací u všech nanostrukturovaných elektrod. Vybrané voltamogramy jsou zobrazeny na obr. 63 a obr. 64. Tento fakt potvrzuje zachycení MUA na povrchu.



Obr. 63: Cyklický voltamogram nanostrukturované zlaté elektrody připravené 10-ti pulzy do aluminové masky z 500 nm vrstvy hliníku (Tabulka 3-D) po modifikaci 11-merkaptoundekanovou kyselinou.

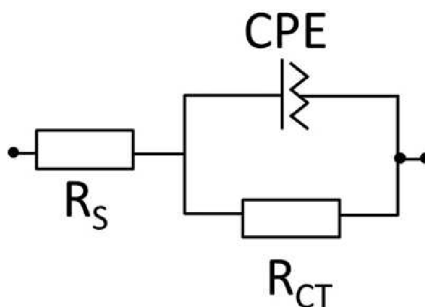


Obr. 64: Cyklický voltamogram nanostrukturované zlaté elektrody připravené 2 pulzy do aluminové masky ze 100 nm vrstvy hliníku s rozšířenými póry – tzv. „nanoskleničky“ (Tabulka 3-E) po modifikaci 11–merkaptoundekanovou kyselinou.

Průběhy pro všechny měřené povrchy lze pak pozorovat v příloze D.

5.3.5.5 Simulace náhradního obvodu

Polokruhovitě části naměřených impedančních průběhů byly prokládány jednoduchým impedančním nástrojem implementovaným v programu Nova. Tato analytická metoda používá zjednodušený Randlesův obvod (Obr. 65) s následujícími parametry: R_S jako aktivní odpor elektrolytu mezi pracovní elektrodou a pomocnou platinovou elektrodou, prvek s konstantní fází (CPE – z angl. Constant Phase Element) a R_{CT} jako odpor přenosu náboje. Prvek s konstantní fází (CPE) v obvodu nahrazuje parametr přenosu náboje a prvek kapacity dvouvrstvy.



Obr. 65: Náhradní elektrický obvod.

Důvodem použití prvku s konstantní fází je nehomogenita povrchu elektrod způsobená přítomností nanostruktur. Z tohoto důvodu je velmi obtížné najít náhradní obvod pro

všechny typy nanostrukturovaných elektrod s vysokou přesností. Interpretace pomocí běžného Randlesova modelu pro ideální elektrochemický systém v tomto případě není vhodná [117]. Povrchová modifikace ve formě nanostruktur způsobuje deformaci difuzní části Nyquistova diagramu v podobě například sférických nebo lineárních difuzí. Nicméně v této studii nebyla difuzní část modelována.

Vzorec pro výpočet nedokonalého prvku konstantní fáze (zde označeno jako Q) je následující:

$$Q = \frac{1}{Q_0} \cdot (j\omega)^{-n}, \quad \text{Rovnice 24}$$

kde Q je kapacitance, j je imaginární jednotka, ω je úhlová frekvence a n je číslo mezi 0 a 1 [118]. Pokud je $n=1$, Q je ideálním kapacitorem, pokud je $n=0$; Q je rezistorem. Pokud je $n=0,5$, Q odpovídá Warburgově impedanci (difuzní část je lineární se sklonem 45°). Obecně je chování prvku s konstantní fází spojeno s rozložením reaktivity na povrchu elektrody, nehomogenitou a drsností povrchu, fraktální geometrií a porézností elektrod, distribucí proudu a potenciálu spojenou s geometrií elektrod [50]. Pro vyhodnocení chování jednotlivých typů elektrod byly porovnávány hodnoty R_{CT} ze simulovaných náhradních obvodů a vypočítané hodnoty C_{DL} (nejnižší hodnota imaginární části impedance v půlkruhu a tomuto bodu odpovídající frekvence) pomocí vzorce. Hodnoty odečtené z náhradních obvodů a určené využitím rovnice pro výpočet Q jsou vypsány v tabulce (Tabulka 6).

5.3.5.6 Závěr

Bylo porovnáno pět typů zlatých nanostrukturovaných povrchů elektrod s různými tvary a velikostmi nanostruktur připravených pulzní depozicí zlata do masky z oxidu hlinitého vyrobené anodickou oxidací hliníku. Tři typy připravených elektrod byly modifikovány zlatými nanosloupky různých výšek, čtvrtý typ nanostrukturovaných elektrod byly tzv. „nanokopečky“ a poslední typ elektrod byl pokryt nanostrukturami ve tvaru tzv. „nanoskleniček“, což bylo způsobeno proleptáním horní části nanopórů aluminové masky. Pro porovnání výsledků s nanostrukturovanými elektrodami byla připravena hladká zlatá elektroda bez nanostruktur. Všechny připravené elektrody byly elektrochemicky studovány pomocí cyklické voltametrie za přítomnosti redoxního páru ferro–ferrikyanidu draselného a elektrochemickou impedanční spektroskopií měřenou ve standardních vodivostních roztocích. Výsledky EIS pro nanostrukturované elektrody ukázaly, že modifikace nanostrukturami způsobí zakřivení difuzní části Nyquistova diagramu, zatímco u výsledků pro hladkou zlatou elektrodu bez nanočástic je difuzní část impedančního spektra lineární. Dle výsledků měření EIS na vysokých frekvencích (část

přenosu náboje) vykazují nanostrukturované elektrody nižší hodnoty reálné části impedance, což značí vyšší vodivost. Z výsledků CV byly odečteny hodnoty proudových odezvy a hodnocena reverzibilita elektrochemického systému. Nejlepší výsledky byly pozorovány na zlaté elektrodě bez nanočástic a elektrodě modifikované nanosloupky o největší délce (10 pulzů, maska z 500 nm Al).

Tabulka 6: Parametry získané ze simulace náhradního obvodu pro zlaté nanostrukturované elektrody a hladkou zlatou elektrodu.

Typ elektrody	Vodivost roztoku [$\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$]	Odpor roztoku R_s [k Ω]	Odpor přenosu náboje R_{CT} [k Ω]	Kapacita C_{dl} [pF]
A: 100 nm Al, 2 pulzy, 53 V Výška nanokopečků: 20–30 nm Průměr nanokopečků: 50–60 nm	100	2,75	48,00	3,11
	706	0,77	9,55	10,24
	1413	0,40	2,98	21,94
B: 100 nm Al, 5 pulzů, 53 V Výška nanosloupků: 80–90 nm Průměr nanosloupků: 55–65 nm	100	3,66	72,60	1,75
	706	1,18	14,60	7,02
	1413	0,70	5,25	12,66
C: 100 nm Al, 10 pulzů, 53 V Výška nanosloupků: 130–140 nm Průměr nanosloupků: 55–65 nm	100	1,10	45,80	1,89
	706	0,04	15,70	4,98
	1413	0,55	5,69	11,17
D: 500 nm Al, 10 pulzů, 53 V Výška nanosloupků: 190–210 nm Průměr nanosloupků: 60–70 nm	100	1,41	47,20	2,20
	706	0,79	8,60	10,85
	1413	0,54	3,02	22,51
E: 100 nm Al, 2 pulzy, 50 V Výška „nanoskleníček“: 130–150 nm Průměr „nanoskleníček“: 50–60 nm	100	1,59	68,70	2,39
	706	0,34	10,20	10,80
	1413	0,77	4,48	15,93
F: Hladká zlatá elektroda	100	5,25	75,80	1,41
	706	0,30	13,50	6,89
	1413	0,72	4,96	12,92

V dalším kroku byly nanostrukturované elektrody a zlatá elektroda bez nanočástic ošetřeny adsorpcí kyseliny merkaptoundekanové pro studium elektrochemického chování před a po modifikaci thiolovými skupinami, což je užitečné pro případné konstrukce biosenzorů. Bylo zjištěno, že modifikace elektrod merkaptoundekanovou kyselinou způsobí nižší proudovou odezvu v cyklické voltametii a zvýšení reálných hodnot lokálních maxim ve většině impedančních křivek. Toto elektrochemické chování bylo očekáváno. Bylo shledáno, že dalším důvodem nedokonalosti nanostrukturovaných elektrod může být vícevrstvá struktura elektrod (zlaté nanostruktury na wolframové

vrstvě), kdy přechody mezi jednotlivými materiály mohou mít za následek ztrátu / utlumení detekovaného signálu. Z této studie vyplývá, že nejvýhodnějším typem nanostrukturovaného povrchu se jeví elektrody modifikované tzv. „nanoskleničkami“ a elektrody s nanosloupky vytvořenými 10 ti pulzy. Zmíněné elektrody se zdají být vhodné pro zvyšování elektroaktivní plochy, a tedy vhodné i pro využití v biosenzorické oblasti. [54]

5.4 Příprava a charakterizace nanoporézních membrán z aluminy

Tato část práce se zabývá přípravou a studiem propustnosti nanoporézních membrán na bázi aluminy připravených anodickou oxidací hliníkové fólie, při které vznikají hexagonálně uspořádané rovnoběžné nanopóry.

Problematická detekce některých látek pomocí miniaturizovaných senzorů často souvisí se špatnou selektivitou těchto senzorů. V analytu se tak často nachází látky, které potlačují nebo přímo zastíňují látky detekované. Ukazuje se, že právě membrány z nanoporézního oxidu hlinitého představují slibný nástroj pro třídění (bio)molekul nebo filtraci a čištění látek před jejich vlastní detekcí. AAO je jedinečný materiál, který se vyznačuje pravidelnou samouspořádanou strukturou s poměrně nízkými náklady na přípravu. Velkou výhodou je, že se jedná o materiál hydrofilní, chemicky stabilní, nevodivý, bioinertní a biokompatibilní. [119-121]

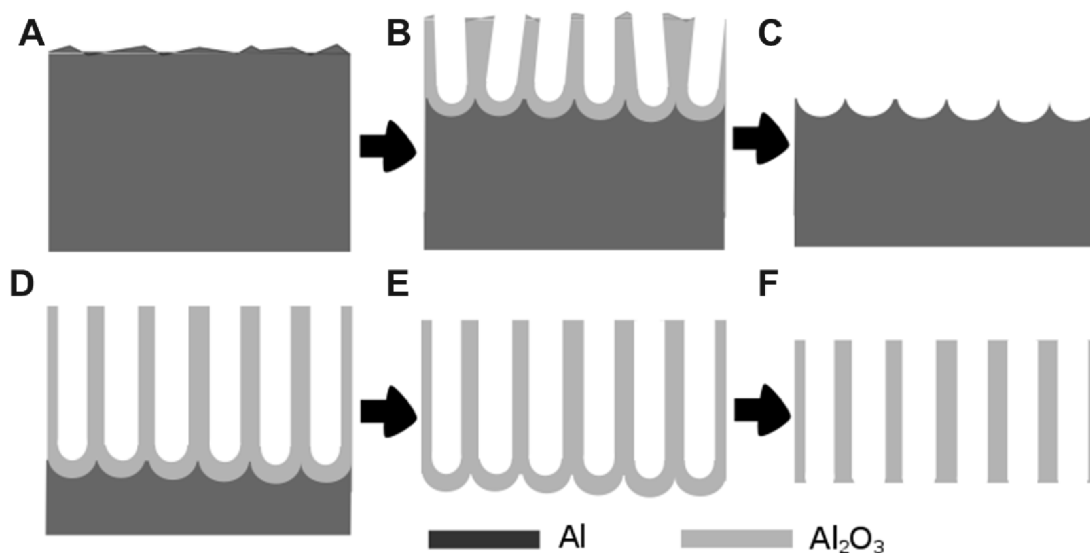
Jak již bylo popsáno v kapitole 2.5, anodickou oxidací můžeme připravit membrány s průměrem pórů od 4 nm do 250 nm a tloušťkou od 1 μm do několika desítek mikrometrů. Jejich rozměry lze snadno řídit změnou experimentálních podmínek (anodizační napětí, hustota proudu, délka anodizace, typ elektrolytu). Nanopóry jsou rovnoměrně rozložené, rovnoběžné a kolmé k povrchu. [122]

5.4.1 Výroba nanoporézních AAO membrán

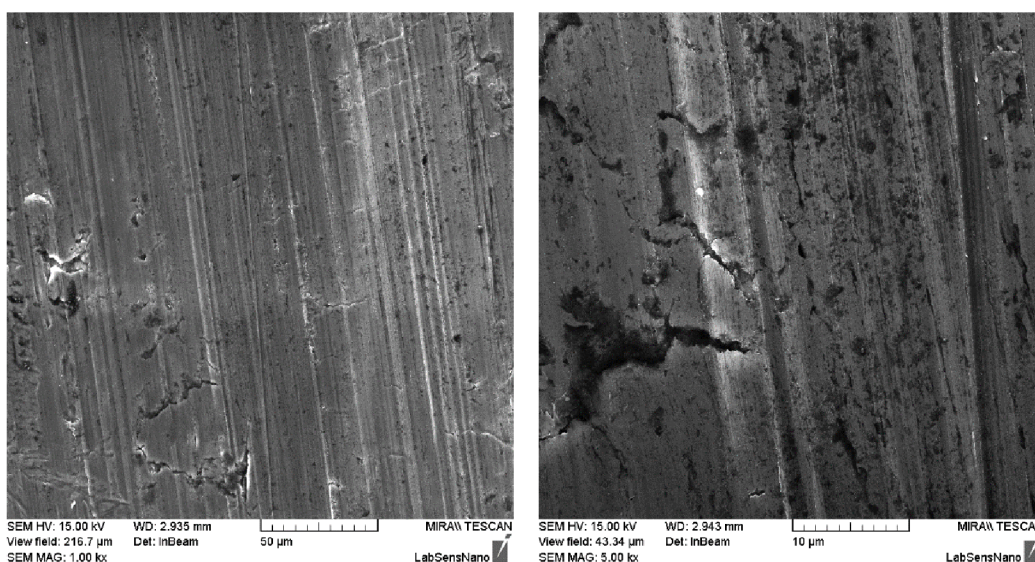
Postup přípravy nanoporézních membrán na bázi aluminy je znázorněn na obr. 66. Schéma a popis aparatury, která byla využita pro anodizaci membrán je a popsána v podkapitole 4.4.1. Výsledné parametry připravených membrán, jako je například homogenita rozložení pórů v membránách, velikost pórů a tloušťka membrán, jsou závislé na kvalitě výchozího hliníkového materiálu a postupu přípravy (délka anodizace, typ anodizačního elektrolytu, teplota a další), jak již bylo uvedeno v podkapitole 2.5.

V prvním kroku výroby byl surový hliníkový plech o vhodných tloušťkách (99,999 % Al, Goodfellow, UK) nařezán na požadovanou velikost a elektrochemicky leštěn (Obr. 66, A). Leštění je důležitým a nezbytným krokem před samotnou anodizací.

Jak lze pozorovat na obr. 67, neleštěný hliníkový plech obsahuje velmi nehomogenní povrch plný rýh, trhlin a dalších vad. V dalším kroku předpřípravy (tzv. pretreatment) byl surový hliníkový plech požadovaného rozměru opláchnut acetonem, aby došlo k jeho odmaštění a poté byl omyt v demineralizované vodě.



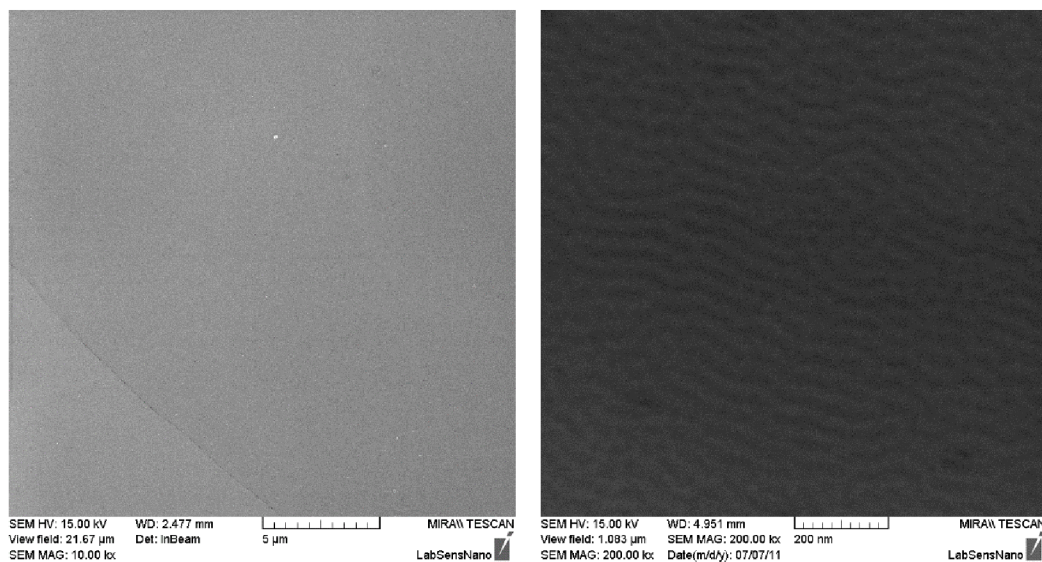
Obr. 66: Postup přípravy nanoporézních membrán: předpříprava surového materiálu (A), první krok anodizace (B), odstranění aluminy vzniklé při první anodizaci (C), druhý krok anodizace (D), odstranění neanodizované Al vrstvy (E), odleptání bariérové vrstvy a otevření nanopórů (F).



Obr. 67: SEM snímek struktury surového hliníkového plechu.

Následovalo elektrochemické leštění ve směsi etanolu a kyseliny chloristé zchlazené na 4 °C při napětí 20 V po dobu 90-ti sekund. Na snímcích z rastrovacího elektronového

mikroskopu lze pozorovat strukturu hliníkového plechu po elektrochemickém leštění (Obr. 68). Po provedení elektrochemického leštění byla jedna strana pokryta vrstvou PDMS (Polydimethylsiloxan) proto, aby anodizace probíhala pouze z jedné strany hliníkového plechu.

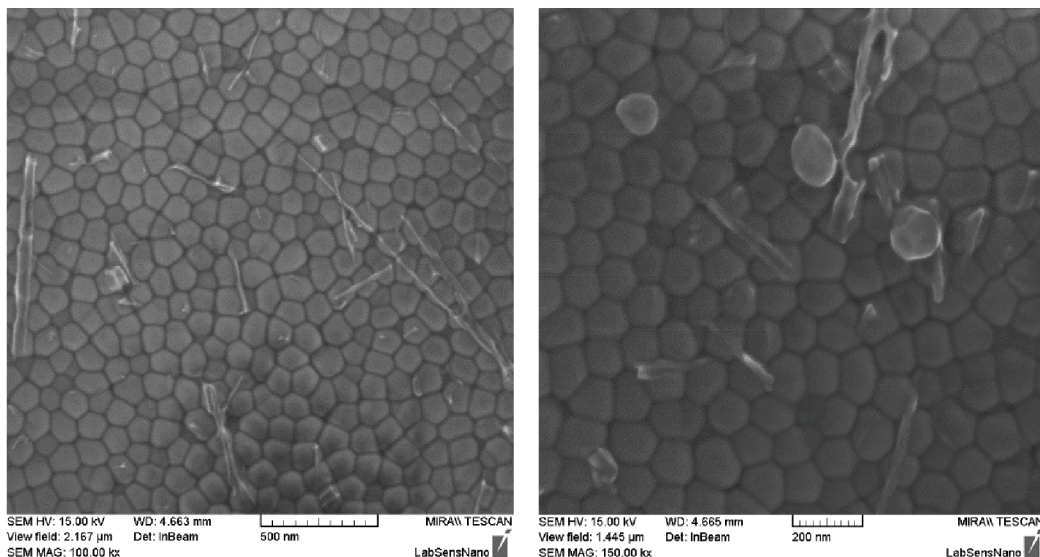


Obr. 68: SEM snímek hliníkového plechu po elektrochemickém leštění.

Poté následovalo provedení prvního kroku anodizace (Obr. 66, B). První anodizace slouží pouze k další úpravě povrchu proto, aby následně vzniklé póry mohly vznikat homogenně a narůstat kolmo k povrchu (směru anodizace) a být uniformní. První anodizace trvá kratší dobu (cca 30 minut až 2 hodiny), je provedena ve stejném elektrolytu a za stejných experimentálních podmínek, jako následná druhá anodizace. V této práci byla jako elektrolyt používaná 1M kyselina sírová zchlazená na 5 °C (anodizační napětí 10 V, 20 V) a 0,3M kyselina šťavelová zchlazená na 7 °C (anodizační napětí 30 V, 40 V, 50 V, 60 V). Po ukončení první anodizace je vzniklý méně uspořádaný oxid hlinitý odleptán ve směsi 4,2% kyseliny fosforečné a 3% oxidu chromovém. V tomto kroku byl získán prestrukturovaný homogenní povrch s malými nanodůlkami po odleptaném oxidu, které slouží jako matrice pro druhý krok anodizace (Obr. 66, C). Dalším krokem přípravy membrán z oxidu hlinitého byla druhá fáze anodizace, která byla prováděna za stejných experimentálních podmínek jako první anodizace. Délka anodizace se lišila v závislosti na tom, jaký byl požadavek na výslednou tloušťku membrány a průměr nanopórů. Dle požadovaných parametrů byl zvolen typ elektrolytu a velikost anodizačního napětí.

Posledním krokem přípravy membrán byl takzvaný posttreatment (Obr. 66, D, E). Tento krok se skládal z odstranění PDMS vrstvy na spodní straně vzorku jejím rozpuštěním v acetonu, nanesení PDMS vrstvy na druhou stranu vzorku (strana

s otevřenými póry, kde PDMS vrstva chrání povrch před dalším proleptáním) a odleptání neanodizovaného hliníku v 17% kyselině chlorovodíkové s přídavkem dihydrátu chloridu měďnatého (Obr. 66, E). Odleptání neanodizované vrstvy hliníku odhalilo spodní uzavřené části nanopórů – tzv. bariérovou vrstvu (Obr. 69), kterou je třeba proleptat a póry tím otevřít.

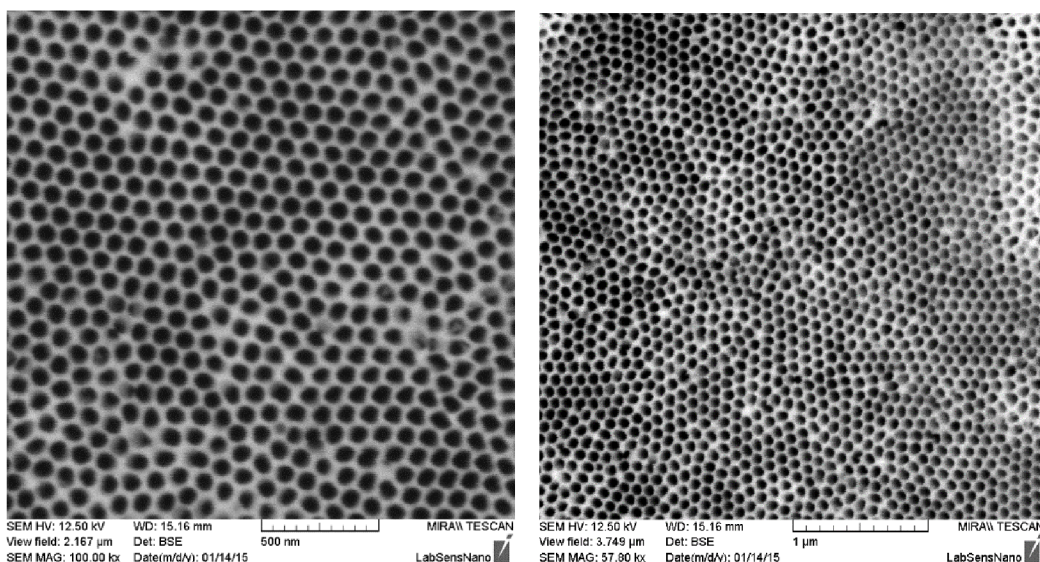


Obr. 69: SEM snímek spodní (bariérové) vrstvy membrán před jejím odleptáním.

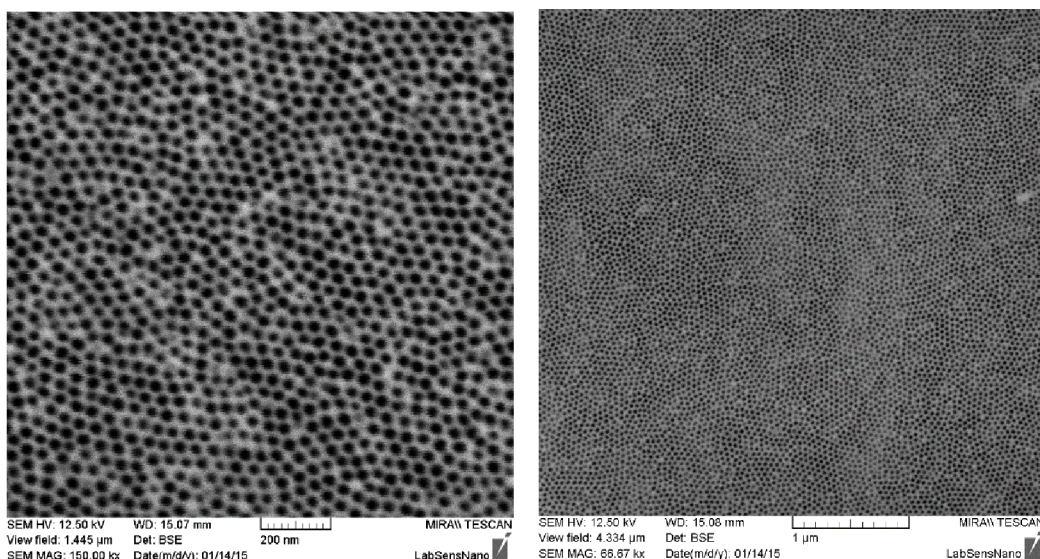
Odstranění bariérové vrstvy je provedeno leptáním ve směsi oxidu chromového a kyseliny fosforečné. Nakonec byla v acetonu rozpuštěna vrstva PDMS z druhé strany membrány a tím byly získány membrány s oboustranně otevřenými nanopóry (Obr. 66, F). Vybrané připravené membrány je možno pozorovat na obr. 70, obr. 71.

Pro další studium vlastností membrán byly membrány zalévány do polymerní hmoty s využitím teflonové zalévací formy (viz. obr. 27), jak bylo uvedeno v podkapitole 4.4.6. Je třeba zmínit, že tento krok byl pro přípravu vzorků značně rizikový, protože bylo třeba aluminové membrány do teflonové cely pevně utáhnout, aby se zalévací hmota nedostala na vymezenou plochu vzorku, která byla dále studována. To u řady vzorků způsobilo prasknutí membrány, jelikož všechny membrány nebyly dokonale rovné, protože v průběhu přípravy docházelo k jejich prohýbání.

U připravených vzorků membrán byly dále studovány jejich difuzní vlastnosti. Fotografie připravených zalitých vzorků membrán lze vidět na obr. 28.



Obr. 70: SEM snímek připravených membrán: Vzorek 1 – průměr nanopórů 100 nm, tloušťka membrány 160 μm , anodizace v 0,3 M $(\text{COOH})_2$, 40 V, 20 h.



Obr. 71: SEM snímek připravených membrán: Vzorek 3 - průměr nanopórů 50 nm, tloušťka membrány 103 μm , anodizace v 0,1 M H_2SO_4 , 20 V, 20 h.

5.4.2 Studium propustnosti membrán

Tenké dvourozměrné nanostrukturované filmy se hojně používají pro vývoj celé řady senzorů, zejména biosenzorů. Rostoucí zájem o využití nanoporézních materiálů při senzorické analýze je dán hlavně jejich specifickou propustností, která je primárně určena velikostí a tvarem pórů. Tyto důležité parametry lze ovlivnit úpravou procesu přípravy, jak bylo zmíněno výše. Nezbytným předpokladem pro praktické využití nanoporézních membrán je jejich charakterizace, zejména s ohledem na jejich transportní vlastnosti –

stanovení kritické velikosti částic, které jsou schopny nerušeně procházet membránou. Slibnou metodikou pro studium pronikání vybrané difuzní sondy přes nanoporézní membrány je technika využívající difuzních cel. Z difuze vhodné sondy (v tomto případě chloridu draselného) skrz připravené nanoporézní membrány byly ze změny koncentrace vybrané difuzní sondy v akceptorové části difuzní cely vypočítány základní transportní parametry (efektivní difuzní koeficient). Změna koncentrace byla stanovena změnou vodivosti.

Obdobné experimenty byly provedeny již dříve. Například Kipke a Schmid studovali difuzní procesy realizované přes aluminové membrány s velikostí pórů v rozmezí 20 až 200 nm s využitím organického barviva krystalické fialové (C.I. 42555) zapouzdřené v micelách dodecylsulfátu sodného (SDS). K realizaci transportních experimentů použili horizontální difuzní celu (Franzovu difuzní celu). Ve svých experimentech ale nezaznamenali žádný vliv šířky pórů na rychlost přenosu látek přes membránu. [62]

Romero et al. studovali penetraci chloridu sodného přes nanoporézní AAO membrány. Studovali především interakce mezi difuzními sondami (nízkomolekulárními iontovými sloučeninami) s membránami z oxidu hlinitého. [123]

V této práci bylo studium propustnosti provedeno ve spolupráci s kolegy z Fakulty chemické v rámci projektu Interní grantové agentury VUT v Brně FCH/FEKT-J-15-2663 „Vývoj senzorů na bázi nanoporézních membrán s řízenou iontovou propustností“, kteří mají s obdobnými měřeními bohaté zkušenosti. Ti již dříve studovali mobilitu methylenové modři ve vzorcích hydrogelů s přidavkem huminových kyselin. Toto kationtové barvivo je schopné interagovat s aniontovými supramolekulárními huminovými kyselinami a lze vypočítat základní difuzní parametry, jako je efektivní difuzní koeficient, doba průniku (doba prodlevy) a sorpční kapacita agarózového hydrogelu s nebo bez přidání huminových kyselin. [124, 125]

V této studii byla stanovena permeabilita různých aluminových membrán v celách s horizontální difuzí, které byly popsány v podkapitole 4.4.8 a to sledováním změny koncentrace vybrané difuzní sondy přes membrány. Jako vhodná difuzní sonda byl zvolen chlorid draselný (KCl), jakožto zástupce nízkomolekulárních iontových sloučenin. Změna koncentrace byla stanovena vodivostním měřením.

Pro studium difuzních vlastností membrán byly vybrány vzorky, jejichž parametry výroby, tloušťky membrán (stanovené profilometrií a rastrovacím elektronovým mikroskopem) a drsnosti povrchů (stanovené elipsometricky) jsou uvedené v tabulce (Tabulka 7).

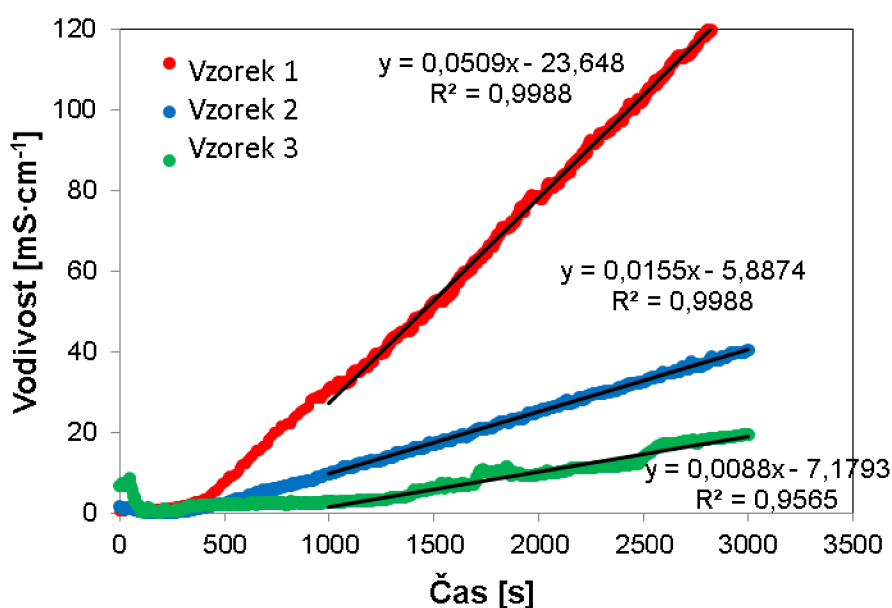
Tabulka 7: Výrobní parametry vzorků pro studium difuzních vlastností.

AAO membrány	Anodizační napětí	Anodizační elektrolyt	čas anodizace	Tloušťka membrán	Průměr pórů	Drsnost povrchu
Vzorek 1	40 V	0,3 M (COOH) ₂	20 hodin	160 ± 5 μm	100 nm	3,4 μm
Vzorek 2	40 V	0,3 M (COOH) ₂	6 hodin	43 ± 2 μm	70 nm	4,4 μm
Vzorek 3	20 V	1 M H ₂ SO ₄	20 hodin	103 ± 2 μm	50 nm	0,5 μm

Z dat uvedených v tabulce (Tabulka 7) lze vyvodit, že drsnost aluminových membrán byla ovlivněna zejména změnou anodizačního elektrolytu, který má výrazný vliv na velikost nanopórů. Vzorek 3 byl připraven anodizačním procesem v kyselině sírové namísto dalších vzorků, které byly připraveny anodizací v kyselině šťavelové a vykazuje výrazně nižší drsnost ve srovnání se všemi ostatními vzorky. Znalost drsnosti je jedním z nejdůležitějších parametrů pro přesný popis difuzních procesů. Vzorky 1 a 2 mají větší nanopóry v porovnání se vzorkem 3 (viz tabulka 7), což můžeme pozorovat na obr. 70 a obr. 71.

5.4.2.1 Zkoušky iontové propustnosti

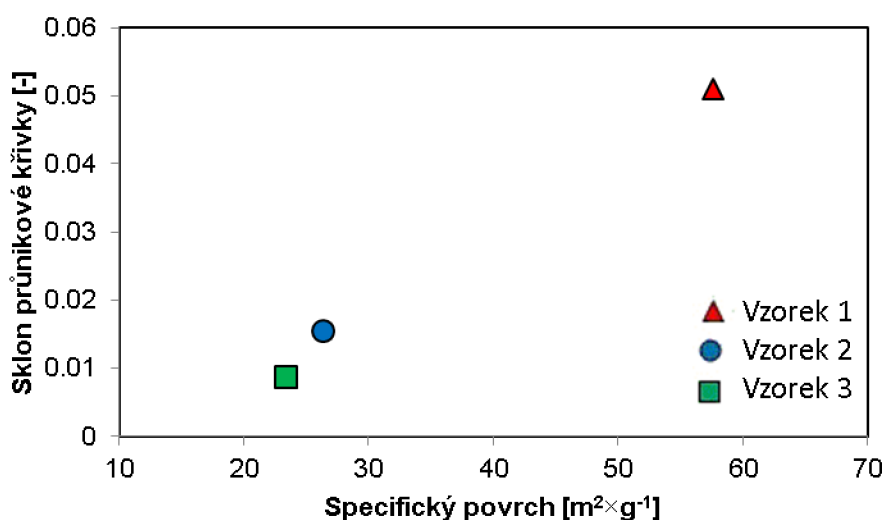
Jednoduché difuzní experimenty byly provedeny v difuzních celách (Obr. 29) za účelem vyhodnocení propustnosti připravených membrán pro modelování nízkomolekulárních iontů. Průnikové křivky určené pro difuzi chloridu draselného jsou uvedeny v grafu závislosti vodivosti na čase (Obr. 72). Je zřejmé, že strukturní rozdíly testovaných membrán vedly k odpovídajícím změnám bariérových vlastností. Regrese lineárně rostoucí části průlomové křivky poskytuje dva důležité parametry, které umožňují kvantitativní hodnocení transportních vlastností membrán.



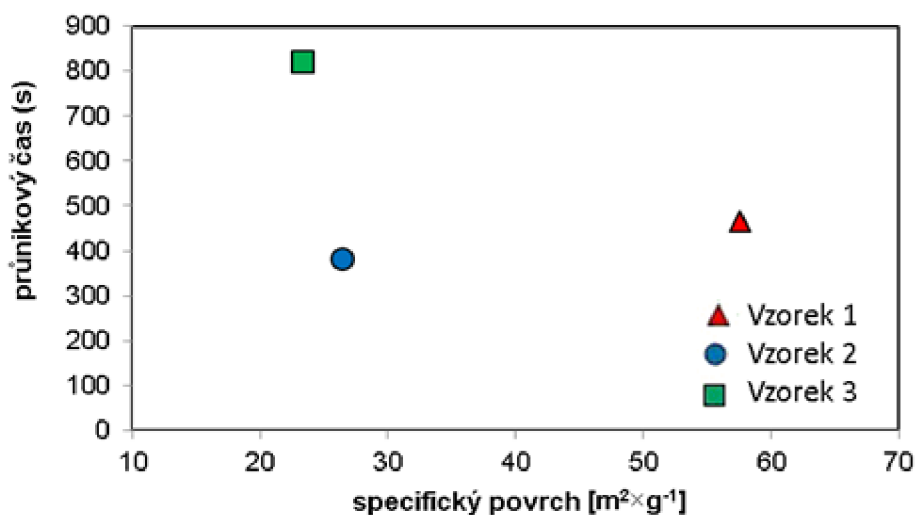
Obr. 72: Průnikové křivky určené pro difuzi chloridu draselného.

Sklon rostoucí části průnikové křivky představuje hlavní experimentální výsledek, pokud jde o propustnost membrány. Dále by měl být sklon zásadním způsobem ovlivněn strukturou materiálu, zejména jeho pórovitostí, což bylo experimentálně potvrzeno.

Sklon se zvyšuje se specifickým povrchem membrán, jak je znázorněno v grafu na obr. 73 - tj. s jejich rostoucí mikroporozitou.



Obr. 73: Sklon průlomových křivek jako funkce specifické povrchové plochy.



Obr. 74: Doba průniku jako funkce specifického povrchu.

Na druhou stranu, doba průniku (určená jako přírůstek osy x regresní přímky) je čas potřebný rozpuštěnou látkou k průniku membránou. Doba průniku je ovlivněna celkovou tloušťkou membrány v kombinaci s konkrétní cestou transportu rozpuštěné látky v

jednotlivých pórech (tj. trajektorií transportu). Jak je vidět na další závislosti (Obr. 74), nebyla nalezena žádná jasná korelace mezi časy průniku a odpovídajícími tloušťkami membrány. To naznačuje, že se specifická difuzní cesta může u jednotlivých membrán lišit a to i navzdory skutečnosti, že se u AAO membrán předpokládá jednoduše tubicovitý tvar pórů membrány a pomocí SEM nebyly detekovány žádné významné rozdíly v průměrech pórů.

5.4.3 Shrnutí

Bariérové vlastnosti hliníkových membrán byly studovány technikou horizontální difúzní cely difúzí chloridu draselného. Bylo zjištěno, že schopnost pronikání chloridu draselného přes nanoporézní aluminové membrány silně závisí na specifickém povrchu (bylo pozorováno lineární zvýšení sklonu průlomové křivky se zvětšením specifického povrchu). Také bylo zjištěno, že propustnost silně závisí na velikosti pórů a distribuci pórů ve struktuře membrány. Toto očekávání bylo experimentálně potvrzeno korelací rastrovací elektronové mikroskopie s difuzními experimenty. Sklon křivky průniku je nejnižší pro membránu připravenou anodizací v kyselině sírové - vzorek 3 (viz. obr. 71), který má zcela odlišné rozdělení pórů, nejnižší drsnost povrchu ve srovnání se vzorky anodizovanými v kyselině šťavelové.

6 Závěr

V předložené dizertační práci byla zpracována problematika zaměřená na základní výzkum a vývoj moderních nanostrukturovaných materiálů na bázi aluminy směřovaný k jejich využití v elektrochemických senzorech a biosenzorech. Nejdříve byla provedena rozsáhlá rešerše na téma přípravy a využití nanoporézní aluminy jako levného a efektivního prostředku pro přípravu uspořádaných nanostrukturovaných AAO membrán, ale také jako prostředku pro přípravu elektrod modifikovaných hexagonálně uspořádanými poli nanostruktur, při jejichž výrobě je nanoporézní alumina využita jako maska, do níž mohou být deponovány různé materiály. Byla studována optimalizace přípravy nanoporézní aluminy metodou anodické oxidace hliníku za vzniku hexagonálně uspořádaných rovnoběžných nanopórů a následně i postup přípravy nanostrukturovaných elektrod metodou elektrochemické depozice zlata do pórů AAO s cílem zlepšení elektrochemických vlastností výsledných elektrod modifikovaných zlatými nanostrukturami.

První část práce plynule navazovala na poznatky získané v rámci řešení diplomové práce. Zabývala se výběrem optimálního materiálu substrátové vrstvy potřebné pro přípravu elektrod modifikovaných zlatými nanosloupky, studiem elektrochemických vlastností připravených povrchů a využití připravených elektrod k detekci protirakovinného léčiva doxorubicinu, jako reálného analytu, metodou diferenčně pulzní voltametrie. Testovány byly dva typy materiálů substrátových vrstev a to titan a wolfram. Po anodizaci horní hliníkové vrstvy tak docházelo k pokračování anodické oxidace těchto následných vrstev. Titan se oxidoval za vzniku oxidu titaničitého a wolfram za vzniku oxidu wolframového. V dalším kroku byly takto vzniklé oxidové nanostruktury odleptány. Tím měly vzniknout ve spodní části nanopórů tzv. „nanodůlky“, které by složily jako základny pro budoucí deponované zlaté nanostruktury, které jsou pak díky nim výrazně stabilnější a odolnější proti mechanickému poškození např. při elektrochemických měřeních. Zde se titanová substrátová vrstva projevila jako méně vhodná, protože struktury z oxidu titaničitého se nikdy nepodařilo zcela selektivně odleptat, aniž by se přitom neponičila i aluminová maska. To potvrdily i následné elektrochemické charakterizace výsledných nanostrukturovaných povrchů. Povrchy připravené na titanu měly horší elektrochemické vlastnosti a menší stabilitu nanostruktur v porovnání s povrchy připravenými na wolframové vrstvě a to v důsledku přítomnosti problematicky odstranitelných TiO_2 nanočástic mezi zlatými nanosloupky a substrátovou titanovou vrstvou, jak je uvedeno v kapitole 5.1. Od titanové substrátové vrstvy bylo proto upuštěno a pro další experimenty byla dále využívána pouze vrstva wolframová, na které byla úspěšně optimalizována příprava nanostruktur, jak je uvedeno v kapitolách 5.2 a 5.3.

Další část práce uvedená v kapitole 5.2 se zabývala přípravou nového a dosud jedinečného typu nanostrukturovaného povrchu – nanostruktur ve tvaru tzv. „nanoskleniček“, které vznikly proleptáním vrchní části nanopórů v připravené AAO masce. Takto připravené nanostrukturované povrchy byly dále využity pro studium vlivu žihání při atmosférickém tlaku a žihání ve vakuu na elektrochemické vlastnosti elektrod. U takto modifikovaných elektrod žihání byly metodou elektrochemické impedanční spektroskopie studovány a vzájemně porovnávány jejich elektrochemické vlastnosti. Předpokládalo se, že žihání při atmosférickém tlaku způsobí zoxidování spodní wolframové vrstvy a ta se pak nebude účastnit dějů při elektrochemických měřeních. Naopak u nanostrukturovaného povrchu ošetřeného žiháním ve vakuu se předpokládalo, že žihání zapříčiní lepší propojení wolframového a zlatého materiálu a zlepší se tak přenos signálu mezi zlatou nanostrukturou a substrátovou vrstvou. Vzorky byly žihány v rozsahu teplot od 100 °C do 800 °C při atmosférickém tlaku a v rozsahu teplot od 100 °C do 600 °C při žihání ve vakuu, v obou případech s krokem 100 °C. Elektronovým rastrovacím mikroskopem byl průběžně sledován vliv obou typů žihání na morfologii testovaných „nanoskleniček“. Jak je uvedeno v podkapitolách 5.2.1 a 5.2.2, nejvyšší teplota žihání, při které nanostrukturované povrchy nevykazovaly žádné strukturální změny, byla teplota 400 °C. Vzorky žihané při této teplotě byly společně s nežihanými vzorky nadále elektrochemicky charakterizovány a porovnávány. Bylo zjištěno, že výsledná elektroaktivní plocha vzorku žihaného při atmosférickém tlaku klesla, což mělo za následek zvýšení impedance. Tento fakt tak přinesl dvě možné hypotézy o chování elektrod. První hypotézou je, že během žihání při atmosférickém tlaku došlo k oxidaci spodní wolframové vrstvy mezi nanostrukturami. To by rovněž dokazovalo, že spodní wolframová vrstva se běžně účastní elektrochemických interakcí a elektrolyt proniká hluboko mezi nanostruktury a účastní se elektrodových procesů. Druhou hypotézou je možnost, že došlo k oxidaci nejen wolframové vrstvy mezi nanostrukturami, ale i části wolframové vrstvy pod nanostrukturami, čímž došlo ke zhoršení přenosu náboje mezi zlatými nanostrukturami a spodní wolframovou vrstvou. To by ovšem znamenalo, že se spodní vrstva běžně nemusí účastnit elektrochemických dějů, protože elektrolyt běžně neproniká tak hluboko mezi nanostruktury. Ke zvýšení impedance by v tomto případě došlo pouze v důsledku zhoršení vodivého kontaktu mezi „nanoskleničkami“ a substrátovou vrstvou. Pro ověření těchto hypotéz by bylo třeba v rámci dalších experimentů provést například žihání vzorků s rozdílnými časy a porovnat elektrochemické výsledky nebo modelovat průnik elektrolytu mezi nanostruktury daných dimenzí, z uvedených materiálů a s použitím daných typů elektrolytů. Další možností by bylo provést prvkovou analýzu vzorků v řezu.

V další části práce uvedené v kapitole 5.3 byl hledán tvarově optimální zlatý nanostrukturovaný povrch, který bude mít vhodné elektrochemické vlastnosti pro

plánované využití v elektrochemických senzorech nebo biosenzorech. Celkem bylo připraveno 5 typů nanostrukturovaných povrchů, které byly porovnávány nejen mezi sebou, ale i s hladkou zlatou elektrodou bez nanočástic. Všechny připravené povrchy byly vyrobené na wolframové substrátové vrstvě. Prvním připraveným povrchem byly velmi malé nanostruktury – tzv. „nanokopečky“, které měly menší délku, než byl jejich průměr. Dále byly připraveny tři typy povrchů modifikovaných zlatými nanosloupky o vzrůstajících délkách a posledním typem byl unikátní povrch modifikovaný tzv. zlatými „nanoskleničkami“, který jsem převzala z předešlé studie o žihání. Všechny typy připravených elektrod byly elektrochemicky charakterizovány metodou elektrochemické impedanční spektroskopie (vč. modelování náhradního modifikovaného Randlesova obvodu), jako vhodného nástroje pro zkoumání vlastností povrchově modifikovaných elektrod a dále i cyklickou voltametrií, z jejichž výsledků byla pomocí Randles–Ševčíkovy rovnice empiricky určována elektroaktivní plocha připravených elektrod. Jako klíčový krok elektrochemického měření zde byl sledován proces elektrochemického čištění / aktivace elektrod cyklováním v 1M kyselině sírové. Bylo zjištěno, že tento krok přináší opakovatelné výsledky jednotlivých měření. Z výsledků uvedených v podkapitole 5.3.5.3 vyplývá, že překvapivě velkou elektroaktivní plochu vykazovaly nanostrukturované elektrody pokryté tzv. „nanoskleničkami“. Jejich elektroaktivní plocha se blížila strukturám s největší výškou nanosloupků. Vůbec největší elektroaktivní plocha byla ovšem nečekaně dosažena hladkou elektrodou bez nanočástic. To může být vysvětleno tím, že hladká elektroda je tvořena pouze tlustou vrstvou zlatého materiálu, měřený signál je veden pouze přes zlatý materiál a tak nedochází ke ztrátám signálu z procesů na elektrodovém povrchu v porovnání s nanostrukturovanými elektrodami, kde signál vzniká na zlaté nanostrukturuře, je veden zlatou nanostrukturou až do substrátové wolframové vrstvy, z ní přechází do neanodizované vrstvy hliníku a tam je kontaktován s měřicí celou, která je připojena k potenciostatu. Lze také předpokládat, že v místě rozhraní zlaté nanostruktury a wolframu mohla při výrobním procesu narůst tenká vrstva oxidu, která vytváří další přechod (kov – izolant – kov), který způsobuje odpor a snižuje tak detekovaný signál. Ze získaných výsledků je také možno předpokládat, že nanostruktury s větší délkou (cca nad 210 nm) by mohly poskytnout ještě lepší elektrochemické výsledky. Po elektrochemické charakterizaci byly připravené elektrody dále modifikovány 11–merkaptoundekanovou kyselinou (viz podkapitola 5.3.5.4) a byl sledován vliv modifikace na výsledky elektrochemických měření. MUA byla použita jako biomodifikační činidlo pro modifikaci nanostrukturovaných elektrod a hladké zlaté elektrody karboxylovými funkčními skupinami, které by v budoucnu měly sloužit jako místa pro potenciální navázání dalších biomolekul. Po této modifikaci bylo pozorováno zvýšení hodnot reálné části impedance a delší difuzní části impedančních průběhů. Nejvýraznější zvýšení impedance bylo pozorováno u nanostrukturované elektrody připravené depozicí s 10-ti pulzy. Naopak v případě hladké zlaté elektrody byla změna

půlkruhovitě části Nyquistova diagramu po modifikaci merkaptoundekanovou kyselinou zanedbatelná. Bylo však pozorováno prodloužení difuzní části průběhu. Po modifikaci elektrod MUA byla provedena analýza pomocí cyklické voltametrie obdobně jako před modifikací. Proudová odezva voltamogramů poklesla oproti odezvě měřené před modifikací u všech nanostrukturovaných elektrod, což potvrdilo zachycení MUA na povrchu.

Poslední část práce se zabývala přípravou a studiem iontové propustnosti AAO membrán (viz. kapitola 5.4). Ta byla řešena ve spolupráci s kolegy z Fakulty chemické v rámci projektu Interní grantové agentury VUT v Brně FCH/FEKT-J-15-2663 „Vývoj senzorů na bázi nanoporéznych membrán s řízenou iontovou propustností“. Bariérové vlastnosti hliníkových membrán byly studovány technikou horizontální difúzní cely difúzí chloridu draselného. Bylo zjištěno, že schopnost pronikání chloridu draselného přes nanoporézny aluminové membrány silně závisí na specifickém povrchu (bylo pozorováno lineární zvýšení sklonu průlomové křivky se zvětšením specifického povrchu). Dále bylo zjištěno, že propustnost také silně závisí na velikosti pórů a distribuci pórů ve struktuře membrány. Toto očekávání bylo experimentálně potvrzeno korelací rastrovací elektronové mikroskopie s difuzními experimenty, jak je uvedeno v podkapitole 5.4.2.

Během řešení práce byly jednotlivé postupy, přístupy a metody postupně optimalizovány tak, aby byl připraven nanostrukturovaný povrch s co možná nejvhodnějšími vlastnostmi. To se částečně podařilo a částečně i odkrylo další cesty, kudy by bylo možné výzkum a vývoj dále směřovat. Z dosud provedené práce spatřuji další možnosti výzkumu v detailnějším studiu skutečné penetrace elektrolytu mezi nanostruktury, a to nejen elektrochemickými měřeními, ale například i podrobnějším modelováním proudění kapalin, modelováním procesů na rozhraní elektrody a elektrolytu, testováním širší škály různých typů nanostrukturovaných povrchů a také optimalizací elektrochemického experimentu (uspořádání experimentu, opakovatelnost měření, elektrochemické čištění elektrod a podobně).

Jádro dizertační práce bylo publikováno v impaktovaném časopisech *Analytical letters* a časopise *Applied Mechanics and Materials*. Dílčí části práce byly prezentovány na mezinárodních konferencích (4th International Conference on Nanotechnology and Biosensors, NANOCON, Heyrovsky Discussion on Electrochemistry of Organic and Bioactive Compounds, Czech Chemical Society Symposium Series) a na několika národních konferencích a workshopech.

Závěrem lze konstatovat, že tato práce přinesla nové významné poznatky v oblasti nového typu nanostrukturovaného povrchu – tzv. nanoskleníček a studia vlivu žihání na

elektrochemické vlastnosti nanostrukturovaných povrchů. Lze konstatovat, že dílčí plány vytyčené v kapitole 3 byly postupně splněny.

Seznam použité literatury

- [1] MICHAEL V. MIRKIN a AMEMIYA, S. *Nanoelectrochemistry*. New York: CRC Press Taylor & Francis Group, 2015. s. ISBN 978-1-4665-6122-9.
- [2] SINGH, M. a DAS, G. Highly ordered anodic porous alumina membrane and its surface modification approaches for biomedical application. *Journal of applied chemistry*, 2014, sv. 7, č. 1, s. 17-34. ISSN 2278-5736.
- [3] STROEVE, P. a ILERI, N. Biotechnical and other applications of nanoporous membranes. *Trends in Biotechnology*, 2011, sv. 29, č. 6, s. 259-266. ISSN 0167-7799.
- [4] INGHAM, C. J. et al. Where bio meets nano: The many uses for nanoporous aluminum oxide in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 2012, sv. 30, č. 5, s. 1089-1099. ISSN 0734-9750.
- [5] POINERN, G. E. J. et al. Progress in Nano-Engineered Anodic Aluminum Oxide Membrane Development. *Materials*, 2011, sv. 4, č. 3, s. 487-526. ISSN 1996-1944.
- [6] JANI, A. M. M. et al. Nanoporous anodic aluminium oxide: Advances in surface engineering and emerging applications. *Progress in Materials Science*, 2013, sv. 58, č. 5, s. 636-704. ISSN 0079-6425.
- [7] HA, Y. C. a JEONG, D. Y. Fast Fabrication of a High-aspect-ratio, Self-ordered Nanoporous Alumina Membrane by Using High-field Anodization. *Journal of the Korean Physical Society*, 2010, sv. 57, č. 6, s. 1661-1666. ISSN 0374-4884.
- [8] BOSS, C. et al. Size-selective diffusion in nanoporous alumina membranes for a glucose affinity sensor. *Journal of Membrane Science*, 2012, sv. 401, s. 217-221. ISSN 0376-7388.
- [9] SKLÁDAL, P. *Biosenzory*. Brno: Masarykova univerzita, 2002. s.
- [10] FERANCOVÁ, A. L., JÁN. *Use of nanomaterial at chemical sensors* [online]. Senzory. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 978-80-86238-20-3].
- [11] ZHAI, J. et al. DNA based biosensors. *Biotechnology Advances*, 1997, sv. 15, č. 1, s. 43-58. ISSN 0734-9750.
- [12] MELGARDT M DE VILLIERS et al. *Nanotechnology in drug delivery*. New York, NY: AAPS Press, c2009. s. ISBN 978-0-387-77667-5.
- [13] WU, B. et al. Biosensors for determination of glucose with glucose oxidase immobilized on an eggshell membrane. *Talanta*, 2004, sv. 64, č. 2, s. 546-553. ISSN 0039-9140.
- [14] SHAO, Y. Y. et al. Graphene Based Electrochemical Sensors and Biosensors: A Review. *Electroanalysis*, 2010, sv. 22, č. 10, s. 1027-1036. ISSN 1040-0397.
- [15] VIDOTTI, M. et al. Biosensors Based on Gold Nanostructures. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2011, sv. 22, č. 1, s. 3-20. ISSN 0103-5053.
- [16] DHANEKAR, S. a JAIN, S. Porous silicon biosensor: Current status. *Biosensors & Bioelectronics*, 2013, sv. 41, s. 54-64. ISSN 0956-5663.
- [17] KOROTCENKOV, G., WATSON, J. *Chemical Sensors: Fundamentals of Sensing Materials In.*, 2010, sv. 2, s. 370.
- [18] TIWARI, J. N. et al. Zero-dimensional, one-dimensional, two-dimensional and three-dimensional nanostructured materials for advanced electrochemical energy devices. *Progress in Materials Science*, 2012, sv. 57, č. 4, s. 724-803. ISSN 0079-6425.
- [19] BOSI, S. et al. Fullerene derivatives: an attractive tool for biological applications. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2003, sv. 38, č. 11-12, s. 913-923. ISSN 0223-5234.

- [20] NOWITZKE, G. et al. EXAFS study of local structure at the alkali ions in superconducting K₂RbC₆₀, K₂CsC₆₀, Rb₂CsC₆₀, and Rb₃C₆₀. *Phys Rev B Condens Matter*, 1996, sv. 54, č. 18, s. 13230-13241. ISSN 0163-1829
- [21] LIBISCH, F. The Wonder Material Graphene. [online]. Vienna, Austria: [cit. 27.9. 2020]. Dostupné z: <<https://analyticalscience.wiley.com/do/10.1002/gitlab.15487>>.
- [22] GACIA, P. D. Fullerene C₆₀. [online]. 22.6. [cit. 27.9. 2020]. Dostupné z: <<https://grabcad.com/library/fullerene-c60-1>>.
- [23] CHOUDHARY, V. a GUPTA, A. Polymer/Carbon Nanotube Nanocomposites. In., 2011.
- [24] MARCOTTE-U., B. Discovery could take guesswork out of making quantum dots. [online]. University of Rochester, [cit. 27.9.2020 2020]. Dostupné z: <<https://www.futurity.org/quantum-dots-creation-1640772/>>.
- [25] ULF, N. Magnetic gold. [online]. [cit. 27.9.2020] Dostupné z: <<https://www.materials-talks.com/blog/2013/01/10/magnetic-gold/>>.
- [26] COLEMAN, J. N. et al. Small but strong: A review of the mechanical properties of carbon nanotube–polymer composites. *Carbon*, 2006, sv. 44, č. 9, s. 1624-1652. ISSN 0008-6223.
- [27] SPITALSKY, Z. et al. Carbon nanotube–polymer composites: Chemistry, processing, mechanical and electrical properties. *Progress in Polymer Science*, 2010, sv. 35, č. 3, s. 357-401. ISSN 0079-6700.
- [28] SANATI, A. et al. A review on recent advancements in electrochemical biosensing using carbonaceous nanomaterials. *Microchimica Acta*, 2019, sv. 186, č. 12, s. 22. ISSN 0026-3672.
- [29] Magazine Article HLAVÁČEK, A., SKLÁDAL, P. *Kvantové tečky: Příprava, konjugace a využití bioanalytické chemii a biologie*. Praha: Česká společnost chemická, 0009-2770.
- [30] MATEA, C. T. et al. Quantum dots in imaging, drug delivery and sensor applications. *International journal of nanomedicine*, 2017, sv. 12, s. 5421-5431. ISSN 1178-2013, 1176-9114.
- [31] SONGJUN, L., SINGH, J., HE, L. . *Biosensor Nanomaterials*. Weinheim, Germany WILEY-VCH, 2011. s. ISBN 978-3-527-32841-3.
- [32] FRASCO, M. F. a CHANIOTAKIS, N. Semiconductor Quantum Dots in Chemical Sensors and Biosensors. *Sensors*, 2009, sv. 9, č. 9, s. 7266-7286. ISSN 1424-8220.
- [33] SUN, Y. G. a XIA, Y. N. Increased sensitivity of surface plasmon resonance of gold nanoshells compared to that of gold solid colloids in response to environmental changes. *Analytical Chemistry*, 2002, sv. 74, č. 20, s. 5297-5305. ISSN 0003-2700.
- [34] MAHENDRA, R., NELSON, D. *Metal nanoparticle in microbiology*. Berlin: Springer, 2011. s. ISBN 978-3-642-18312-6.
- [35] OLOFSSON, L. et al. Surface-Based Gold-Nanoparticle Sensor for Specific and Quantitative DNA Hybridization Detection. *Langmuir*, 2003, sv. 19, č. 24, s. 10414-10419. ISSN 0743-7463.
- [36] YU, A. et al. Nanostructured Electrochemical Sensor Based on Dense Gold Nanoparticle Films. *Nano Letters*, 2003, sv. 3, č. 9, s. 1203-1207. ISSN 1530-6984.
- [37] YANEZ-SEDENO, P. a PINGARRON, J. M. Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2005, sv. 382, č. 4, s. 884-886. ISSN 1618-2642.

- [38] TORRES-CHAVOLLA, E. et al. Characterization and Functionalization of Biogenic Gold Nanoparticles for Biosensing Enhancement. *Ieee Transactions on Nanotechnology*, 2010, sv. 9, č. 5, s. 533-538. ISSN 1536-125X.
- [39] CARRIE L. JOHN, S. X., YUHUI JIN *Trace Analysis with nanomaterials: Synthesis and Applications of Gold Nanorods*. Willey-VCH, 2010. s. ISBN 987-3-527-32350-0.
- [40] HRDY, R. et al. Electrochemical Impedance Spectroscopy Behaviour of Guanine on Nanostructured Planar Electrode. *International Journal of Electrochemical Science*, 2013, sv. 8, č. 4, s. 4384-4396. ISSN 1452-3981.
- [41] SHAH, M. et al. Gold nanoparticles: various methods of synthesis and antibacterial applications. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 2014, sv. 19, s. 1320-1344.
- [42] ANANDAN, V. et al. Role of reaction kinetics and mass transport in glucose sensing with nanopillar array electrodes. *Journal of Biological Engineering*, 2007, sv. 1.
- [43] Basics of Electrochemical Impedance Spectroscopy. [online]. Gamry Instruments, [cit. 8.11.2020 2020]. Dostupné z: <<https://www.gamry.com/application-notes/EIS/basics-of-electrochemical-impedance-spectroscopy/>>.
- [44] EVGENIJ BARSOUKOV , J. R. M. *Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment, and Applications, 2nd Edition*. 2005. 616 s. ISBN 978-0-471-64749-2.
- [45] KATZ, E. a WILLNER, I. Probing biomolecular interactions at conductive and semiconductive surfaces by impedance spectroscopy: Routes to impedimetric immunosensors, DNA-Sensors, and enzyme biosensors. *Electroanalysis*, 2003, sv. 15, č. 11, s. 913-947. ISSN 1040-0397.
- [46] RIBEIRO, D. V. et al. Use of Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) to monitoring the corrosion of reinforced concrete. *Revista IBRACON de Estruturas e Materiais*, 2015, sv. 8, č. 4, s. 529-546. ISSN 1983-4195.
- [47] MACDONALD, D. D., MCKUBRE, C.H., *Impedance Measurement in Electrochemical Systems*. 2005. 616 s. ISBN 978-0-471-64749-2.
- [48] KISZA, A. The capacitance of the electric double layer of electrodes in molten salts. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2002, sv. 534, č. 2, s. 99-106. ISSN 1572-6657.
- [49] JAYASINGHE, M. Heavy-metal-ion transport in nanoporous selective-membranes; theory and experiment 2007.
- [50] JORCIN, J.-B. et al. CPE analysis by local electrochemical impedance spectroscopy. *Electrochimica Acta*, 2006, sv. 51, č. 8, s. 1473-1479. ISSN 0013-4686.
- [51] A Review of Techniques for Electrochemical Analysis [online]. Princeton Applied Research, 17.10.2020 [cit. Dostupné z: <https://nanobioelectronics.weebly.com/uploads/3/8/8/6/38862535/review_of_techniques_for_electrochemical_analysis.pdf>.
- [52] PIERPAOLO, P. Introduction to modern voltammetric and polarographic analysis techniques. *AMEL elektrochemistry* [online]. [cit. 2020]. Dostupné z: <http://www.uobabylon.edu.iq/eprints/publication_4_6202_250.pdf>.
- [53] MIRCESKI, V. et al. Square-wave voltammetry. *ChemTexts*, 2018, sv. 4, č. 4, s. 17. ISSN 2199-3793.

- [54] DRBOHLAVOVA, J. et al. Gold Nanostructured Surface for Electrochemical Sensing and Biosensing: Does Shape Matter? *Analytical Letters*, 2016, sv. 49, č. 1, s. 135-151. ISSN 0003-2719.
- [55] F.G. THOMAS, G. H. *Introduction to Voltammetric Analysis - Theory and Practice*. Australia: CSIRO Publishing, 2001. s. ISBN 0 643 06593 8.
- [56] HARVEY, D. Analytical Chemistry 2.0-an open-access digital textbook. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2011, sv. 399, č. 1, s. 149-152. ISSN 1618-2642.
- [57] LU, W. F. et al. Effective optimization of surface passivation on porous silicon carbide using atomic layer deposited Al₂O₃. *Rsc Advances*, 2017, sv. 7, č. 14, s. 8090-8097. ISSN 2046-2069.
- [58] J. D. EDWARDS, F. C. F., AND Z. JEFFRIES The aluminum industry. Vol. I.-Aluminum and its Production. Pp. xii + 358. Vol. II.-Aluminum Productions and their Fabrication. *Journal of the Society of Chemical Industry*, 1931, sv. 50, č. 18, s. 367-367. ISSN 0368-4075.
- [59] FURNEAUX, R. C. et al. The formation of controlled-porosity membranes from anodically oxidized aluminium. *Nature*, 1989, sv. 337, č. 6203, s. 147-149. ISSN 1476-4687.
- [60] NOH, K. et al. GUIDED NANOSTRUCTURES USING ANODIZED ALUMINUM OXIDE TEMPLATES. *Nano*, 2011, sv. 6, č. 6, s. 541-555. ISSN 1793-2920.
- [61] DENG, J. J. a TOH, C. S. Impedimetric DNA Biosensor Based on a Nanoporous Alumina Membrane for the Detection of the Specific Oligonucleotide Sequence of Dengue Virus. *Sensors*, 2013, sv. 13, č. 6, s. 7774-7785. ISSN 1424-8220.
- [62] KIPKE, S. a SCHMID, G. Nanoporous alumina membranes as diffusion controlling systems. *Advanced Functional Materials*, 2004, sv. 14, č. 12, s. 1184-1188. ISSN 1616-301X.
- [63] Thesis LEE, K. P. *Fabrication and Applications of Nanoporous Alumina Membranes*. Department of Chemical Engineering. Bath: University of Bath, August 2013.
- [64] ZARASKA, L. et al. Anodic alumina membranes with defined pore diameters and thicknesses obtained by adjusting the anodizing duration and pore opening/widening time. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 2011, sv. 15, č. 11, s. 2427-2436. ISSN 1433-0768.
- [65] SERRY, M. et al. High sensitivity optochemical and electrochemical metal ion sensor. *Micro & Nano Letters*, 2013, sv. 8, č. 11, s. 775-778. ISSN 1750-0443.
- [66] ELAM, J. W. et al. Conformal coating on ultrahigh-aspect-ratio nanopores of anodic alumina by atomic layer deposition. *Chemistry of Materials*, 2003, sv. 15, č. 18, s. 3507-3517. ISSN 0897-4756.
- [67] YUAN, H. et al. Characterization of the electrophoretic mobility of gold nanoparticles with different sizes using the nanoporous alumina membrane system. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2008, sv. 134, č. 1, s. 127-132. ISSN 0925-4005.
- [68] PEH, A. E. K. a LI, S. F. Y. Dengue virus detection using impedance measured across nanoporous alumina membrane. *Biosensors & Bioelectronics*, 2013, sv. 42, s. 391-396. ISSN 0956-5663.
- [69] CHEOW, P.-S. et al. Transport and separation of proteins across platinum-coated nanoporous alumina membranes. *Electrochimica Acta*, 2008, sv. 53, č. 14, s. 4669-4673. ISSN 0013-4686.

- [70] SONI, V. et al. A general model for membrane-based separation processes. *Computers & Chemical Engineering*, 2009, sv. 33, č. 3, s. 644-659. ISSN 0098-1354.
- [71] OSMANBEYOGLU, H. U. et al. Thin alumina nanoporous membranes for similar size biomolecule separation. *Journal of Membrane Science*, 2009, sv. 343, č. 1-2, s. 1-6. ISSN 0376-7388.
- [72] SHI, W. et al. Functionalized anodic aluminum oxide (AAO) membranes for affinity protein separation. *Journal of Membrane Science*, 2008, sv. 325, č. 2, s. 801-808. ISSN 0376-7388.
- [73] ROMERO, M. R. et al. Amperometric Biosensor for Direct Blood Lactate Detection. *Analytical Chemistry*, 2010, sv. 82, č. 13, s. 5568-5572. ISSN 0003-2700.
- [74] DE LA ESCOSURA-MUNIZ, A. et al. Nanochannels for diagnostic of thrombin-related diseases in human blood. *Biosensors & Bioelectronics*, 2013, sv. 40, č. 1, s. 24-31. ISSN 0956-5663.
- [75] LIU, Z. B. et al. A microfluidic chip with poly(ethylene glycol) hydrogel microarray on nanoporous alumina membrane for cell patterning and drug testing. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2010, sv. 143, č. 2, s. 776-783. ISSN 0925-4005.
- [76] TSOU, P. H. et al. Rapid antibiotic efficacy screening with aluminum oxide nanoporous membrane filter-chip and optical detection system. *Biosensors & Bioelectronics*, 2010, sv. 26, č. 1, s. 289-294. ISSN 0956-5663.
- [77] BHARATH BHUSHAN et al. *Handbook of Nanomaterials Properties*. Heidelberg: Springer Verlag, 2014. s. ISBN 978-3-642-31106-2.
- [78] YE, W. W. et al. A nanoporous membrane based impedance sensing platform for DNA sensing with gold nanoparticle amplification. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2014, sv. 193, s. 877-882. ISSN 0925-4005.
- [79] LIN, K. C. et al. Biogenic nanoporous silica-based sensor for enhanced electrochemical detection of cardiovascular biomarkers proteins. *Biosensors & Bioelectronics*, 2010, sv. 25, č. 10, s. 2336-2342. ISSN 0956-5663.
- [80] BINH, T. T. N. et al. Electrochemical impedance spectroscopy characterization of nanoporous alumina dengue virus biosensor. *Bioelectrochemistry*, 2012, sv. 88, s. 15-21. ISSN 1567-5394.
- [81] CHENG, M. S. et al. Development of an electrochemical membrane-based nanobiosensor for ultrasensitive detection of dengue virus. *Analytica Chimica Acta*, 2012, sv. 725, s. 74-80. ISSN 0003-2670.
- [82] KOH, G. et al. Development of a membrane-based electrochemical immunosensor. *Electrochimica Acta*, 2007, sv. 53, č. 2, s. 803-810. ISSN 0013-4686.
- [83] RAI, V. et al. Electrochemical nanoporous alumina membrane-based label-free DNA biosensor for the detection of Legionella sp. *Talanta*, 2012, sv. 98, s. 112-117. ISSN 0039-9140.
- [84] BRÜGGEMANN, D. et al. Fabrication, Properties and Applications of Gold Nanopillars. In., 2014, s. 317-354.
- [85] MILAN PAUNOVIC a SCHLESINGER, M. *Fundamentals of electrochemical deposition*. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2006. 373 s. ISBN 978-0-471-71221-3.
- [86] DUAY, J. a LEE, S. Template-Directed Controlled Electrodeposition of Nanostructure and Composition. In., 2015, s. 357-394.

- [87] PARI, S. et al. Pulse Electrodeposited Au-WO₃ Catalyst from a Water-Ionic Liquid Microemulsion for Photoaccelerated Methanol Electrooxidation. *Journal of Physical Chemistry C*, 2020, sv. 124, č. 40, s. 21957-21967. ISSN 1932-7447.
- [88] ANANDAN, V. et al. Nanopillar array structures for enhancing biosensing performance. *International journal of nanomedicine*, 2006, sv. 1, č. 1, s. 73-79. ISSN 1176-9114.
- [89] FORRER, P. et al. Electrochemical preparation and surface properties of gold nanowire arrays formed by the template technique. *Journal of Applied Electrochemistry*, 2000, sv. 30, č. 5, s. 533-541. ISSN 0021-891X.
- [90] CAO, H. Q. et al. Generation and growth mechanism of metal (Fe, Co, Ni) nanotube arrays. *Chemphyschem*, 2006, sv. 7, č. 7, s. 1500-1504. ISSN 1439-4235.
- [91] YOO, W. C. a LEE, J. K. Field-Dependent Growth Patterns of Metals Electroplated in Nanoporous Alumina Membranes. *Advanced Materials*, 2004, sv. 16, č. 13, s. 1097-1101. ISSN 0935-9648.
- [92] KYNCLOVA, H. et al. Nanostructured Surface Effect of Electrode on Doxorubicin Determination. In BABU, A.S. *Mechanical Design and Power Engineering, Pts 1 and 2*. Stafa-Zurich: Trans Tech Publications Ltd, 2014, sv. 490-491, s. 262-266.
- [93] KYNCLOVA, H. et al. Comparison of gold nanostructured electrode and flat gold electrode on doxorubicin measurement. *Nanocon 2013, 5th International Conference*, 2014, s. 215-219.
- [94] ZHANG, J. P. et al. Controllable fabrication of porous alumina templates for nanostructures synthesis. *Materials Chemistry and Physics*, 2010, sv. 122, č. 1, s. 295-300. ISSN 0254-0584.
- [95] JUNG, M. et al. *Fabrication and optical properties of size-controlled Ag nanodot Array via Nanoporous Alumina Mask*. New York: Ieee, 2012. s. ISBN 978-1-4673-2200-3.
- [96] JUNG, M. et al. Two-dimensional silver nanodot array fabricated using nanoporous alumina for a chemical sensor platform of localized surface plasmon resonance. In VONFREYMANN, G., et al. *Advanced Fabrication Technologies for Micro/Nano Optics and Photonics IX*. Bellingham: Spie-Int Soc Optical Engineering, 2016, sv. 9759.
- [97] SANTOS, A. et al. Cobalt and Nickel Nanopillars on Aluminium Substrates by Direct Current Electrodeposition Process. *Nanoscale Research Letters*, 2009, sv. 4, č. 9, s. 1021-1028. ISSN 1556-276X.
- [98] PRIKRYLOVA, K. et al. Fabrication of highly ordered short free-standing titania nanotubes. *Monatshefte Fur Chemie*, 2016, sv. 147, č. 5, s. 943-949. ISSN 0026-9247.
- [99] CARRIE L. JOHN, S. X., YUHUI JIN *Trace Analysis with nanomaterials: Synthesis and Applications of Gold Nanorods*. Willey-VCH, 2010. 359-381 s. ISBN 987-3-527-32350-0.
- [100] ULMAN, A. Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. *Chemical Reviews*, 1996, sv. 96, č. 4, s. 1533-1554. ISSN 0009-2665.
- [101] DELVAUX, M. et al. Electrocatalytic H₂O₂ amperometric detection using gold nanotube electrode ensembles. *Analytica Chimica Acta*, 2004.
- [102] DELVAUX, M. a DEMOUSTIER-CHAMPAGNE, S. Immobilisation of glucose oxidase within metallic nanotubes arrays for application to enzyme biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 2003, sv. 18, č. 7, s. 943-951. ISSN 0956-5663.

- [103] LEE, S.-J. et al. Electrochemical fabrication and evaluation of highly sensitive nanorod-modified electrodes for a biotin/avidin system. *Biosensors & Bioelectronics*, 2008, sv. 23, s. 1117-1124.
- [104] HAQ, F. et al. Neurite development in PC12 cells cultured on nanopillars and nanopores with sizes comparable with filopodia. *International journal of nanomedicine*, 2007, sv. 2, č. 1, s. 107-115. ISSN 1176-9114,1178-2013.
- [105] BRÜGGEMANN, D. et al. Adhesion and survival of electrogenic cells on gold nanopillar array electrodes. *International Journal of Nano and Biomaterials*, 2012, sv. 4, s. 108-127.
- [106] GANGADHARAN, R. et al. Optimizing the functionalization process for nanopillar enhanced electrodes with GOx/PPY for glucose detection. *Nanotechnology*, 2008, sv. 19, č. 39, s. 395501. ISSN 0957-4484 (Print).
- [107] GAO, H. et al. Plasmon-Enhanced Photocatalytic Activity of Iron Oxide on Gold Nanopillars. *ACS Nano*, 2012, sv. 6, č. 1, s. 234-240. ISSN 1936-0851.
- [108] LAUREYN, W. et al. Nanoscaled interdigitated titanium electrodes for impedimetric biosensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2000, sv. 68, č. 1, s. 360-370. ISSN 0925-4005.
- [109] MA, K.-S. et al. DNA hybridization detection by label free versus impedance amplifying label with impedance spectroscopy. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2006, sv. 114, č. 1, s. 58-64. ISSN 0925-4005.
- [110] ThesisKYNČLOVÁ, H. *Studium interkalace a kovalentní vazby doxorubicinu do deoxyribonuklové kyseliny za využití voltametrie a impedanční spektroskopie*. Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií. Brno: Vysoké učení technické v Brně,
- [111] ThesisKYNČLOVÁ, H. *Charakterizace nanostrukturovaných elektrod pro elektrochemické biosenzory*. Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií. Brno: Vysoké učení technické v Brně,
- [112] ThesisBEDLEK, M. *Elektrochemická příprava fluorescenčního senzoru s vysoce uspořádaným nanostrukturovaným povrchem*. Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií. Brno: Vysoké učení technické v Brně,
- [113] SMILEK, J. K., H.; SEDLÁČEK, P.; PRÁŠEK, J.; KLUČÁKOVÁ, M. Characterization of Nanoporous Membranes with Controlled Permeability. *Czech Chemical Society Symposium Series*, 2015, sv. 13, č. 2, s. 133-137. ISSN 2336-7210.
- [114] BHATTACHARJEE, J. et al. Small angle neutron scattering study of doxorubicin-surfactant complexes encapsulated in block copolymer micelles. *Pramana-journal of Physics - PRAMANA-J PHYS*, 2009, sv. 71, s. 991-995.
- [115] MASUDA, H. a FUKUDA, K. Ordered Metal Nanohole Arrays Made by a Two-Step Replication of Honeycomb Structures of Anodic Alumina. *Science*, 1995, sv. 268, č. 5216, s. 1466.
- [116] KYNČLOVA, H. et al. *THERMAL STABILITY OF GOLD NANOSTRUCTURED ELECTRODES AND INFLUENCE OF ANNEALING ON ELECTROCHEMICAL IMPEDANCE MEASUREMENTS*. Slezska: Tanger Ltd, 2015. s. ISBN 978-80-87294-53-6.
- [117] BISQUERT, J. et al. Impedance of constant phase element (CPE)-blocked diffusion in film electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1998, sv. 452, č. 2, s. 229-234. ISSN 1572-6657.
- [118] LI, H.-Y. et al. Rapid and highly sensitive detection of Enterovirus 71 by using nanogold-enhanced electrochemical impedance spectroscopy. *Nanotechnology*, 2013, sv. 24, č. 28, s. 285102. ISSN 0957-4484, 1361-6528.

- [119] KUMERIA, T. et al. Nanoporous Anodic Alumina Platforms: Engineered Surface Chemistry and Structure for Optical Sensing Applications. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 2014, sv. 14, s. 11878-11918.
- [120] SANTOS, A. et al. Nanoporous anodic aluminum oxide for chemical sensing and biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2013, sv. 44, s. 25-38. ISSN 0165-9936.
- [121] STEPANOVA, M. a DEW, S. *Nanofabrication: Techniques and principles*. 2012. s.
- [122] POINERN, G. E. J. et al. Progress in Nano-Engineered Anodic Aluminum Oxide Membrane Development. *Materials (Basel)*, 2011, sv. 4, č. 3, s. 487-526. ISSN 1996-1944.
- [123] ROMERO, V. et al. Ionic transport across tailored nanoporous anodic alumina membranes. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2012, sv. 376, č. 1, s. 40-46. ISSN 0021-9797.
- [124] SEDLACEK, P. et al. How the interactions with humic acids affect the mobility of ionic dyes in hydrogels – Results from diffusion cells. *Reactive and Functional Polymers*, 2013, sv. 73, s. 1500–1509.
- [125] KLUCAKOVA, M. Agarose Hydrogels Enriched by Humic Acids as the Complexation Agent. *Polymers*, 2020, sv. 12, s. 687.

Publikační aktivity

- 2017

HRDÝ, R.; KYNCLOVÁ, H.; KLEPÁČOVÁ, I.; BARTOŠÍK, M.; NEUŽIL, P. Portable Lock-in Amplifier-Based Electrochemical Method to Measure an Array of 64 Sensors for Point-of-Care Applications. *Analytical Chemistry*, 2017, roč. 86, č. 17, s. 8731-8737. ISSN: 0003-2700.

- 2016

KYNCLOVÁ, H. Study of electrochemical behaviour of gold nanostructured surfaces. *In Proceedingd of 22nd conference.* první. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních, 2016. s. 675-679. ISBN: 978-80-214-5350-0.

DRBOHLAVOVÁ, J.; KYNCLOVÁ, H.; HRDÝ, R.; PŘIKRYLOVÁ, K.; ŠETKA, M.; HUBÁLEK, J. Nano in electrochemistry. *In XVI. Workshop of Physical Chemists and Electrochemists.* první. Brno: Masaryk University, 2016. s. 11-13. ISBN: 978-80-210-8267-0.

HRDÝ, R.; PŘIKRYLOVÁ, K.; KYNCLOVÁ, H. Preparation of silver nanorods via template based method. *In XVI. Workshop of Physical Chemists and Electrochemists.* 1. Brno: Masaryk University, 2016. s. 157-160. ISBN: 978-80-210-8267-0.

DRBOHLAVOVÁ, J.; KYNCLOVÁ, H.; HRDÝ, R.; PŘIKRYLOVÁ, K.; SVATOŠ, V.; HUBÁLEK, J. Gold Nanostructured Surface for Electrochemical Sensing and Biosensing: Does Shape Matter?. *Analytical letters*, 2016, roč. 49, č. 1, s. 135-151. ISSN: 0003-2719.

KYNCLOVÁ, H.; LEDNICKÝ, T.; HRDÝ, R.; PRÁŠEK, J.; HUBÁLEK, J. Gold nanostructured surfaces based on alumina template. *In XVI. Workshop of Physical Chemists and Electrochemists.* 1. Brno: Masaryk University, 2016. s. 100-103. ISBN: 978-80-210-8267-0.

NEUŽIL, P.; KYNCLOVÁ, H.; BARTOŠÍK, M.; HRDÝ, R.; HUBÁLEK, J. A method to concurrently measure an array of electrochemical biosensors for point-of-care applications. *In 20th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, MicroTAS 2016.* 2016. s. 1248-1249. ISBN: 978-09-7980-649-0.

- 2015

SMILEK, J.; KYNCLOVÁ, H.; SEDLÁČEK, P.; PRÁŠEK, J.; KLUČÁKOVÁ, M. Characterization of Nanoporous Membranes with Controlled Permeability. *Czech Chemical Society Symposium Series*, 2015, roč. 13, č. 2, s. 133-137. ISSN: 2336-7210.

KYNCLOVÁ, H.; SMILEK, J.; SEDLÁČEK, P.; PRÁŠEK, J.; KLUČÁKOVÁ, M.; HUBÁLEK, J. Fabrication of nanoporous alumina membranes for electrochemical sensors. *XV. Workshop of Physical Chemists and electrochemists. Book of abstracts.* Brno: Masaryk University, 2015. s. 107-110. ISBN: 978-80-210-7857-4.

SMILEK, J.; KYNCLOVÁ, H.; SEDLÁČEK, P.; PRÁŠEK, J.; KLUČÁKOVÁ, M. SPECIFIC PERMEABILITY OF NANOPOROUS ALUMINA MEMBRANES STUDIED BY DIFFUSION CELL TECHNIQUE. *In NANOCON 2015: 7th International Conference on Nanomaterials - Research and Application*. 1. Ostrava: Tanger Ltd., 2015. s. 348-353. ISBN: 978-80-87294-63-5.

KYNCLOVÁ, H.; SMILEK, J.; PRÁŠEK, J.; SEDLÁČEK, P.; KLUČÁKOVÁ, M. Preparation and Utilization of Alumina Oxide Membranes for Sensor Devices. *Materials Science Forum*, 2015, roč. 9, č. 851, s. 159-164. ISSN: 0255-5476.

KYNCLOVÁ, H.; SMILEK, J.; PRÁŠEK, J.; KLUČÁKOVÁ, M.; SEDLÁČEK, P.; HUBÁLEK, J. Study of nanoporous alumina membranes by electrochemical method. *In Proceedings of abstracts*. 1. Ostrava: Tanger, 2015. s. 354-359. ISBN: 978-80-87294-59-8.

KYNCLOVÁ, H. Electrochemical properties and thermal stability of cup- like shape gold nanostructures. *In Proceedings of the 21st Conference STUDENT EEICT 2015*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních, 2015. s. 366-370. ISBN: 978-80-214-5148- 3.

- 2014

KYNCLOVÁ, H.; MAJZLÍKOVÁ, P.; PRÁŠEK, J.; LEDNICKÝ, T.; HRDÝ, R.; HUBÁLEK, J. Production and study of nanoporous alumina membranes by electrochemical methods. *47th Heyrovsky Discussion on Electrochemistry of Organic and Bioactive Compounds*. Praha: J. Heyrovsky Institute of Physical Chemistry of the AS CR, v.v., 2014. s. 36-36. ISBN: 978-80-87351-29-1

KYNCLOVÁ, H.; PŘIBYL, J.; HRDÝ, R.; DRBOHLAVOVÁ, J.; PRÁŠEK, J.; HUBÁLEK, J. Nanostructured surface effect of electrode on doxorubicin determination. In 4th International Conference on Nanotechnology and Biosensors. *Applied Mechanics and Materials*. Switzerland: Trans Tech Publications Inc., 2014. s. 262-266. ISBN: 978-3-03835-001- 9. ISSN: 1660- 9336.

KYNCLOVÁ, H.; DRBOHLAVOVÁ, J.; SVATOŠ, V.; HRDÝ, R.; PRÁŠEK, J.; HUBÁLEK, J. Thermal stability of gold nanostructured electrodes and influence of annealing on electrochemical impedance measurements. *In Nanocon 2014 Conference proceedings*. Ostrava: Tanger, Ltd., 2014. s. 158-163. ISBN: 978-80-87294-53- 6.

- 2013

HRDÝ, R.; HUBÁLEK, J.; VRBOVÁ, E.; DRBOHLAVOVÁ, J.; KYNCLOVÁ, H.; SVATOŠ, V. Glutathione Modified Gold Nanoelectrodes and Electrochemical Characterization. *In Sborník příspěvků XIII. Pracovní setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků*. 2013. s. 64-65. ISBN: 978-80-7375-757- 1.

KYNCLOVÁ, H.; PŘIBYL, J.; HRDÝ, R.; DRBOHLAVOVÁ, J.; PRÁŠEK, J.; HUBÁLEK, J. Comparison of gold nanostructured electrode and flat gold electrode on doxorubicin measurements. *In Conference Proceedings 5th International Conference NANOCON 2013*. Ostrava: Tanger, Ltd., 2013. s. 215-219. ISBN: 978-80-87294-47- 5.

KYNCLOVÁ, H.; PŘIBYL, J.; HRDÝ, R.; DRBOHLAVOVÁ, J.; PRÁŠEK, J.; HUBÁLEK, J. Interaction of DNA and doxorubicin on gold nanostructured electrode. *XIII. Pracovní setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků - sborník příspěvků*. Brno: Litera BRNO, 2013. s. 165-166. ISBN: 978-80-7375-757- 1.

HRDÝ, R.; **KYNCLOVÁ, H.**; DRBOHLAVOVÁ, J.; SVATOŠ, V.; PEKÁRKOVÁ, J.; PRÁŠEK, J.; MAJZLÍKOVÁ, P.; PEKÁREK, J.; TRNKOVÁ, L.; KIZEK, R.; HUBÁLEK, J. Electrochemical Impedance Spectroscopy Behaviour of Guanine on Nanostructured Planar Electrode. *International journal of electrochemical science*, 2013, roč. 8, č. 4, s. 4384-4396. ISSN: 1452-3981.

DZURO, M.; DRBOHLAVOVÁ, J.; SVATOŠ, V.; **KYNCLOVÁ, H.**; HRDÝ, R.; HUBÁLEK, J. ELECTROCHEMICAL PREPARATION OF GOLD NANORODS FOR ELECTRODE SURFACE MODIFICATION. *XIII. Pracovní setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků*. Brno: Mendelova univerzita, 2013. s. 62-63. ISBN: 978-80-7375-757- 1.

- **2012**

HRDÝ, R.; HUBÁLEK, J.; **KYNCLOVÁ, H.**; BUŠINOVÁ, P.; DRBOHLAVOVÁ, J.; CHOMOUCÁ, J.; PRÁŠEK, J. Electro Impedance Spectroscopy Characterization Of Nanostructured Electrochemical Sensors. *In XII. Pracovní setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků - sborník příspěvků*. Brno: 2012. s. 73-74. ISBN: 978-80-7375-618- 5.

HRDÝ, R.; **KYNCLOVÁ, H.**; DRBOHLAVOVÁ, J.; CHOMOUCÁ, J.; PRÁŠEK, J.; SOLOVEI, D.; BUŠINOVÁ, P.; PEKÁREK, J.; HUBÁLEK, J. Characterization of Ordered Metal Gold Nanowires Fabrication Property Via Hexagonal Ordered Nanoporous Alumina. *In NANOCON 2012 - Conference Proceedings*. Ostrava: TANGER Ltd., 2012. s. 1-6. ISBN: 978-80-87294-27- 7.

- **2010**

MASAŘIK, M.; **KYNCLOVÁ, H.**; HÚSKA, D.; HUBÁLEK, J.; ADAM, V., BABULA, P.; ECKSCHLAGER, T.; STIBOROVÁ, M., KIZEK, R. DNA- doxorubicin interactions revealed by electrochemistry. *International journal of molecular medicine*, 2010. s. S46 (S46 s.)ISSN: 1107- 3756.

HÚSKA, D.; **KYNCLOVÁ, H.**; HUBÁLEK, J.; BABULA, P.; ECKSCHLAGER, T.; STIBOROVÁ, M.; KIZEK, R. MONITORING OF DNA- DOXORUBICIN INTERACTIONS BY ELECTROCHEMICAL METHODS. *In X. Pracovní setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků*. Brno: Mendelová univerzita v Brně, 2010. s. 96-98. ISBN: 978-80-7375-396- 2.

Produkty

HRDÝ, R.; **KYNCLOVÁ, H.**; DRBOHLAVOVÁ, J.; SVATOŠ, V.; HUBÁLEK, J.; *Nanostrukturovaná pracovní elektroda pro elektrochemické senzory*. T10 0.66. URL: <http://www.umel.feec.vutbr.cz/LabSensNano/products.aspx?id=51>. (funkční vzorek).

HRDÝ, R.; **KYNCLOVÁ, H.**; HUBÁLEK, J.; PRÁŠEK, J.; DRBOHLAVOVÁ, J.: *Nanoporézní elektroda*; Laboratoř 0.66 UMEL, VUT, Technická 10, Brno. URL: <http://www.umel.feec.vutbr.cz/LabSensNano/products.aspx?id=50>. (funkční vzorek).

HRDÝ, R.; HUBÁLEK, J.; **KYNCLOVÁ, H.**; PEKÁREK, J.: *Nanostrukturovaná elektroda pro měření plynů na bázi polovodivých oxidů*. LabSensNano, UMEL. URL: <http://labsensnano.umel.feec.vutbr.cz/products.aspx?id=60>. (funkční vzorek).

Seznam použitých zkratek

Zkratka	Význam
AAO	alumina (z angl. Anodic Alumina Oxide)
ALD	depozice atomových vrstev (z angl. Atomic Layer Deposition)
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. Bovine Serum Albumine)
cDNA	komplementární DNA (z angl. Complementary DNA)
CPE	prvek s konstantní fází (z angl. Constant Phase Element)
CRP	C- reaktivní protein
CV	cyklická voltametrie
CVD	chemická depozice z plynné fáze (z angl. Chemical Vapor Deposition)
DME	kapající rtuťová elektroda (z angl. Dropping Mercury Electrode)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EIS	elektrochemická impedanční spektroskopie
FIB	fokusovaný iontový svazek (z angl. Focus Ion Beam)
GCE	elektroda ze skelného uhlíku (z angl. Glassy Carbon Electrode)
HMDE	visící rtuťová kapková elektroda (z angl. Hanging Mercury Drop Electrode)
IBAD	depozice s asistencí iontového svazku (z angl. Ion Beam-Assisted Deposition)
IR	infračervené záření (z angl. Infra - Red)
IUPAC	Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii (z angl. International Union of Pure and Applied Chemistry)
LOD	Limit detekce (z angl. Limit Of Detection)
MPO	myeloperoxidáza
MUA	merkaptoundekanová kyselina
MWCT	vícestěnné uhlíkové nanotrubičky (z angl.. Multi-Walled Carbon Nanotube)
NIL	nanootisková litografie (z angl. Nano Imprint Lithography)
NIR	blízké infračervené záření (z angl. Near Infrared Radiation)
PBS	fosfátový pufr (z angl. Phosphate Buffer Saline)
PVD	fyzikální depozice z plynné fáze (z angl. Physical Vapor Deposition)
SAM	samospořádaná monovrstva (z angl. Self-Assembled Monolayer)
SCS	standard Clean Solution
SEM	rastrovací elektronový mikroskop (z angl. Scanning Electron Microscope)
SMDE	statická rtuťová kapková elektroda (z angl. Static Mercury Drop Electrode)
ssDNA	jednořetězcová DNA (z angl. Single-Stranded DNA)
SWCT	jednostěnné uhlíkové nanotrubičky – Single-Walled Carbon Nanotube

TEM	transmisní elektronový mikroskop (z angl. Transmission Electron Microscopy)
TMFE	tenká rtuťová filmová elektroda (z angl. Thin Mercury Film Electrode)
UV	Ultrafialové záření (z angl. Ultra Violet)

Seznam použitých symbolů

Symbol	Význam	Jednotka
A	plocha elektrody	cm^2
a	aktivita částic v roztoku	--
c	koncentrace	$\text{M} \times \text{dm}^3$
C_{DL}	kapacita dvouvrstvy	F
D_{Ox}	difuzní koeficient oxidované fáze	$\text{cm}^2 \times \text{s}^{-1}$
D_{Red}	difuzní koeficient redukované fáze	$\text{cm}^2 \times \text{s}^{-1}$
E_0	standardní elektroodový potenciál	V
dE/dl	potenciálový gradient	$\text{V} \times \text{m}^{-1}$
E	rovnovážný elektroodový potenciál	V
f	frekvence	Hz, s^{-1}
F	Faradayova konstanta	$9,65 \text{ C} \times \text{mol}^{-1}$
ϕ	úhel	rad
γ	konduktivita	$\Omega^{-1} \times \text{cm}^{-1} = \text{S} \times \text{cm}^{-1}$
γ_+	rychlost pohybu kovových kladných iontů	$\text{m} \times \text{s}^{-1}$
γ_-	rychlost pohybu kovových záporných iontů	$\text{m} \times \text{s}^{-1}$
i_{pa}	výška anodického píku v CV	A
i_{pc}	výška katodického píku v CV	A
I_{C}	kapacitní proud	A
I_{F}	faradaický proud	A
Im	imaginární část impedance	Ω
l	délka	m
n	počet přenesených elektronů	--
ω	úhlová frekvence	$\text{rad} \times \text{s}^{-1}$
R	plynová molární konstanta	$8,31 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \times \text{mol}^{-1}$
Re	reálná složka impedance	Ω
R_{CT}	odpor přenosu náboje	Ω
ρ	rezistivita	$\Omega \times \text{cm}$
σ	Warburgův koeficient	$\Omega \times \text{s}^{-1/2}$
T	teplota	K
U_+	mobilita kladných iontů kovů	$\text{m}^2 \times \text{s}^{-1} \times \text{V}^{-1}$
U_-	mobilita záporných iontů kovů	$\text{m}^2 \times \text{s}^{-1} \times \text{V}^{-1}$
v	rychlost skenování – scan rate	$\text{mV} \times \text{s}^{-1}$

Z	impedance	Ω
Z_w	Warburgova impedance	Ω

Seznam obrázků

Obr. 1: Schéma uspořádání biosenzoru.	13
Obr. 2: Příklady nanostruktur pro sensoriku: Grafen [21], Fulleren C ₆₀ [22], jednostěnné a vícestěnné uhlíkové nanotrubic [23], kvantové tečky [24] a zlaté nanočástice [25].	16
Obr. 3: Zlaté nanotyčinky s různým poměrem délky k průměru. TEM (Transmisní Elektronový Mikroskop) snímky a jejich zabarvení ve viditelné oblasti spektra, velikost měřítka 100 nm [41].	18
Obr. 4: Fázový posuv napětí oproti proudu (vlevo) a Lissajův graf (vpravo) [43].	21
Obr. 5: Náhradní elektrický obvod impedance, upraveno dle [46].	22
Obr. 6: Nyquistův diagram, upraveno dle [46].	23
Obr. 7: Elektrodová dvouvrstva, upraveno dle [49].	25
Obr. 8: Elektrický model elektrodové dvouvrstvy – průběh potenciálu na elektrodě.	25
Obr. 9: Cyklická voltametrie: průběh přikládaného napětí (vlevo), cyklický voltamogram (vpravo), upraveno dle [53].	28
Obr. 10: Pulzní voltametrie – excitační signály a voltamogramy: a) normální pulzní voltametrie b) diferenčně pulzní voltametrie, c) staircase voltametrie d) voltametrie čtvercových vln, i_p je proud [A], Δi_p je změna proudu [A], i_l je limitující (omezující proud) [A], τ je délka cyklu [s], ΔE_p je napětí (výška) pulzu [V], ΔE_s je změna potenciálu mezi cykly [V] a t_p je doba trvání pulzu [s], upraveno dle [56].	30
Obr. 11: Anodická oxidace v kyselině šťavelové.	31
Obr. 12: Schéma hexagonálního uspořádání nanoporézní aluminy (A) a schéma zvýšení objemu hliníkové vrstvy během anodizace (B), upraveno dle [60].	32
Obr. 13: Zobrazení anodizačních napětí a výsledných vzdáleností nanopórů při „mild“ a „hard“ anodizaci v různých typech elektrolytů, upraveno dle [60].	33
Obr. 14: Schéma znázorňující jednotlivé fáze vzniku samsopřádaných nanopórů při elektrochemické anodizaci: tvorba oxidové vrstvy (fáze I); tvorba jamek v důsledku lokálních nehomogenit elektrického pole (fáze II); počáteční tvorba pórů (fáze III); růst pórů za ustálených podmínek (fáze IV). Uspořádání anodizační aparatury (vlevo nahoře), závislost hustoty proudu na délce anodizace v jednotlivých fázích (vpravo nahoře), schéma tvorby nanopórů v jednotlivých fázích (dole) [6].	34
Obr. 15: Výroba nanoporézní aluminové membrány: jednokroková a dvoukroková anodizace – upraveno dle [63].	35
Obr. 16: Mechanismus plnění nanopórů kovem upraveno dle [90]. Růst nanosloupek (A) znamená, že rychlost růstu ve směru rovnoběžném ke směru proudu v_{\parallel} je přibližně stejná k rychlosti růstu ve směru kolmém ke směru proudu v_{\perp} ($v_{\parallel} \approx v_{\perp}$). Růst nanotrubic (B) znamená, že růst ve směru rovnoběžném ke směru proudu je výrazně větší, než ve směru kolmém ke směru proudu ($v_{\parallel} \gg v_{\perp}$).	44

Obr. 17: Výroba zlatých nanosloupků využitím nanoporézní aluminové masky: a) depozice hliníkové vrstvy na povrch elektrody, b) první krok anodizace, c) odstranění masky vzniklé v prvním anodizačním kroku, d) druhý krok anodizace, e) proražení bariérové vrstvy, f) elektrochemická depozice zlata do aluminové masky, g) odstranění masky, upraveno dle [99].	46
Obr. 18 Schéma difuze převládajících na povrchu pokrytém nanosloupky: individuální nelineární případ (a), případ úplného překryvu (b), limitní lineární difuzní případ (c) [89].	49
Obr. 19: Graf koncentrace $K_4Fe(CN)_6$ v blízkosti elektrody, převzato z [42].	50
Obr. 20: Graf koncentrace glukózy v blízkosti elektrody, převzato z [42].	51
Obr. 21: IBAD Naprašovačka se dvěma Kaufmanovými iontovými zdroji.	54
Obr. 22: Schéma aparatury pro výrobu nanostrukturovaných povrchů – upraveno dle [57, 112].	56
Obr. 23: Fotografie aparatury pro výrobu nanostrukturovaných povrchů.	56
Obr. 24: μ AutolabIII/FRA 2 (nahore) a základní měřicí uspořádání ve Faradayově kleci (dole).	57
Obr. 25: Pomocná platinová elektroda (vlevo), referentní Ag/AgCl elektroda (vpravo).	57
Obr. 26: Aparatura pro přípravu nanoporézních membrán.	59
Obr. 27: Dvoudílná forma pro zalévání membrán do polymerní hmoty.	60
Obr. 28: Připravené vzorky aluminových membrán.	60
Obr. 29: Schéma horizontální difuzní cely, upraveno dle [113].	61
Obr. 30: Rastrovací elektronový mikroskop MIRA II/LMU s instalovaným detektorem EDX a WDX.	62
Obr. 31: Doxorubicin, upraveno dle [114].	63
Obr. 32: Postup výroby nanostrukturovaných elektrod na Ti / W substrátu.	65
Obr. 33: SEM snímky připravených zlatých elektrod na titanovém substrátu.	66
Obr. 34: SEM snímky připravených zlatých elektrod na wolframovém substrátu.	67
Obr. 35: Připravené elektrody: elektroda se zlatými nanosloupky (nahore) a hladká zlatá elektroda (dole).	68
Obr. 36: Impedanční spektra pro tři typy připravených elektrod získaná v 0,1M roztoku K_2SO_4 .	69
Obr. 37: Závislosti reálné složky impedance Re v bodě lokálního maxima v závislosti na koncentraci elektrolytu K_2SO_4 .	69
Obr. 38: Diferenčně pulzní voltamogram měřený na ploché zlaté elektrodě bez nanosloupků pro různé koncentrace doxorubicinu.	70
Obr. 39: Diferenčně pulzní voltamogram měřený na elektrodě se zlatými nanosloupky na wolframovém substrátu pro různé koncentrace doxorubicinu.	71
Obr. 40: Kalibrační křivky - velikost anodického píku v závislosti na koncentraci doxorubicinu - měřené na ploché zlaté elektrodě a elektrodě se zlatými	

- nanosloupky na wolframovém substrátu po desetiminutové akumulaci doxorubicinu.72
- Obr. 41: Postup výroby zlatých „nanoskleniček“: A) příprava vrstev na substrát; B) anodizace hliníkové vrstvy; C) anodizace spodní wolframové vrstvy za vzniku WO₃; D) selektivní odstranění WO₃ a rozšíření vrchní části nanopórů; E) depozice zlata a F) selektivní odstranění aluminové masky.73
- Obr. 42: Wolframový povrch s nanodůlky po odleptání WO₃ struktur a aluminové masky (vlevo), rozhraní aluminové masky a místa s odtrženou maskou, kde lze pozorovat WO₃ nanostruktury (vpravo).74
- Obr. 43: Aluminová maska (vlevo), zlato deponované v nanoporézní masce (vpravo). 75
- Obr. 44: Povrch elektrody tvořený zlatými „nanoskleničkami“: pohled shora (vlevo), řez elektrodou (vpravo).75
- Obr. 45: Řezy nanostrukturovanou elektrodou s „nanoskleničkami“76
- Obr. 46: SEM snímky nanostrukturovaných povrchů po žihání za atmosférického tlaku při teplotách od 100 °C do 800 °C po dobu 1 hodiny.77
- Obr. 47: Muflová pec pro žihání při atmosférickém tlaku (vlevo) a pec pro žihání ve vakuu (vpravo).78
- Obr. 48: SEM snímky nanostrukturovaných povrchů po žihání ve vakuu (4×10^{-4} Pa) při teplotách od 100 °C do 600 °C po dobu 1 hodiny.79
- Obr. 49: Řez nanostrukturovanou elektrodou po žihání ve vakuu při 600 °C po dobu 1 hodiny.79
- Obr. 50: Měřicí cela ve Faradayově kleci (vlevo), SEM snímek zlatého nanostrukturovaného povrchu v místě po kontaktu s celou (vpravo).80
- Obr. 51: Impedanční spektrum pro nanostrukturované povrchy nežíhané, žíhané při atmosférickém tlaku a žíhané na vzduchu – měřeno ve vodivostním roztoku $706 \mu\text{S} \times \text{cm}^{-1}$81
- Obr. 52: Impedanční spektrum pro „nanoskleničkami“ nanostrukturované povrchy nežíhané, žíhané při atmosférickém tlaku a žíhané na vzduchu – měřeno ve vodivostním roztoku $100 \mu\text{S} \times \text{cm}^{-1}$82
- Obr. 53: Závislosti reálné části impedance v bodě lokálního maxima na vodivosti všech měřených standardních roztoků pro všechny typy nanostrukturovaných povrchů: nežíhaných, žíhaných při atmosférickém tlaku při 400 °C a žíhaných ve vakuu při 400 °C.83
- Obr. 54: Schéma vyrobených nanostruktur v závislosti na počtu depozičních pulsů a parametrech aluminových masek (tloušťka, rozměry pórů): (A) Au „nanokopečky“, 2 pulzy, maska ze 100 nm vrstvy hliníku, (B) nanosloupky, 5 pulzů, maska ze 100 nm vrstvy hliníku, (C) nanosloupky, 10 pulzů, maska ze 100 nm vrstvy hliníku, (D) nanosloupky, 10 pulzů, maska z 500 nm vrstvy hliníku a (E) „nanoskleničky“, 2 pulzy, maska ze 100 nm vrstvy hliníku po rozšíření pórů.85
- Obr. 55: Nyquistův diagram pro nanostrukturovanou zlatou elektrodu o geometrické ploše cca 7 mm² připravenou 5 pulzovou depozicí do masky ze 100 nm hliníku (Tabulka 3-B).89

Obr. 56: Nyquistův diagram pro nanostrukturovanou zlatou elektrodu o geometrické ploše cca 7 mm ² připravenou 10 pulzovou depozicí do masky ze 100 nm hliníku (Tabulka 3-C).....	90
Obr. 57: Nyquistův diagram pro nanostrukturovanou zlatou elektrodu o geometrické ploše cca 7 mm ² připravenou 2 pulzovou depozicí do masky ze 100 nm hliníku po rozšíření pórů – tzv. „nanoskleničky“(Tabulka 3-E).....	90
Obr. 58: Nyquistův diagram pro hladkou zlatou elektrodu o geometrické ploše cca 7 mm ² bez nanočástic.	91
Obr. 59: Cyklický voltamogram zlatých nanostrukturovaných elektrod připravených depozicí s 5 pulzy do aluminové masky ze 100 nm Al (Tabulka 3-B).	95
Obr. 60: Cyklický voltamogram pro zlaté nanostrukturované elektrody tzv. „nanoskleničky“ připravené depozicí s 2 pulzy do aluminové masky ze 100 nm hliníku po proleptání pórů (Tabulka 3-E).....	95
Obr. 61: Nyquistův diagram nanostrukturované zlaté elektrody připravené 10-ti pulzy do aluminové masky z 500 nm vrstvy hliníku (viz. Tabulka 3-D) po modifikaci 11–merkaptoundekanovou kyselinou.....	96
Obr. 62: Nyquistův diagram nanostrukturované zlaté elektrody připravené 2 pulzy do aluminové masky ze 100 nm vrstvy hliníku s rozšířenými póry – tzv. „nanoskleničky“ (viz. Tabulka 3-E) po modifikaci 11–merkaptoundekanovou kyselinou.....	97
Obr. 63: Cyklický voltamogram nanostrukturované zlaté elektrody připravené 10-ti pulzy do aluminové masky z 500 nm vrstvy hliníku (Tabulka 3-D) po modifikaci 11–merkaptoundekanovou kyselinou.....	97
Obr. 64: Cyklický voltamogram nanostrukturované zlaté elektrody připravené 2 pulzy do aluminové masky ze 100 nm vrstvy hliníku s rozšířenými póry – tzv. „nanoskleničky“ (Tabulka 3-E) po modifikaci 11–merkaptoundekanovou kyselinou.....	98
Obr. 65: Náhradní elektrický obvod.....	98
Obr. 66: Postup přípravy nanoporézních membrán: předpříprava surového materiálu (A), první krok anodizace (B), odstranění aluminu vzniklé při první anodizaci (C), druhý krok anodizace (D), odstranění neanodizované Al vrstvy (E), odleptání bariérové vrstvy a otevření nanopórů (F).	102
Obr. 67: SEM snímek struktury surového hliníkového plechu.....	102
Obr. 68: SEM snímek hliníkového plechu po elektrochemickém leštění.	103
Obr. 69: SEM snímek spodní (bariérové) vrstvy membrán před jejím odleptáním.	104
Obr. 70: SEM snímek připravených membrán: Vzorek 1 – průměr nanopórů 100 nm, tloušťka membrány 160 μm, anodizace v 0,3 M (COOH) ₂ , 40 V, 20 h..	105
Obr. 71: SEM snímek připravených membrán: Vzorek 3 - průměr nanopórů 50 nm, tloušťka membrány 103 μm, anodizace v 0,1 M H ₂ SO ₄ , 20 V, 20 h.....	105
Obr. 72: Průnikové křivky určené pro difuzi chloridu draselného.	107
Obr. 73: Sklon průlomových křivek jako funkce specifické povrchové plochy.....	108
Obr. 74: Doba průniku jako funkce specifického povrchu.....	108

Curriculum Vitae

Jméno: Hana Kynclová
Narozena: 25. 4. 1988 v Ústí nad Orlicí
Kontakt: kynclovahana@seznam.cz



Vzdělání

- 9/2012 – 2020 VUT v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Ústav mikroelektroniky, Technická 3058/10, 616 00 Brno**
Doktorské studium
Program: Elektrotechnika a komunikace
Obor: Mikroelektronika a technologie
- 9/2010 – 6/2012 VUT v Brně, Fakulta elektroniky a komunikačních technologií, Ústav biomedicínského inženýrství, Technická 12, 616 00 Brno**
Magisterské studium
Obor: Biomedicínské inženýrství a bioinformatika
- 9/2008 – 6/2010 VUT v Brně, Fakulta elektroniky a komunikačních technologií, Ústav biomedicínského inženýrství, Technická 12, 616 00 Brno**
Bakalářské studium
Obor: Biomedicínská technika a bioinformatika
- 9/2007 – 9/2008 Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Kotlářská 267/2, 611 37 Brno**
Bakalářské studium – přerušené – přestup na VUT
Program: Fyzika
Obor: Lékařská fyzika
- 9/2003 – 6/2007 Gymnázium Aloise Jiráska v Litomyšli, T.G.Masaryka 590, 57001 Litomyšl**

Praxe

- 1/2017 – dosud** **Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně**, Pekařská 664/53, 65691 Brno
 Biomedicínský inženýr
 Zástupce vedoucího Odboru zdravotnické techniky, dispečink servisu zdravotnických přístrojů, zajištění bezpečnostně – technických kontrol, servis a nákup zdravotnických přístrojů (monitory vitálních funkcí, anesteziologické přístroje, plicní ventilátory, encefalografie, přístroje pro diagnostiku plic, oxymetrie, nebulizace a další), servisní smlouvy, investiční plánování zdravotnické techniky.
- 9/2016 – 6/2017** **SZŠ a VOŠZ Merhautova Brno**, Merhautova 590/15, 61300 Brno
 Externí učitel
 předmět: Instrumentální technika (optické metody, chromatografie, elektromigrační metody, mikroskopie apod.)
- 1/2013 – 12/2015** **Central European Institute of Technology (CEITEC)**, Purkyňova 123, 61200 Brno
 Technicko-hospodářský pracovník – výzkumný pracovník Ph.D. student
 Výzkumné aktivity v oblasti elektrochemie a nanotechnologie.
- 9/2012 – 12/2015** **Vysoké učení technické v Brně, Ústav mikroelektroniky, LabSensNano**. Technická 3058/10 61600 Brno
 Technicko-hospodářský pracovník
 Výzkumné aktivity v oblasti nanostrukturovaných elektrod pro využití v biosenzorice. Správa chemické laboratoře pro výrobu senzorů a nanotechnologie.

Jazyky

Angličtina, Francouzština

Dovednosti a znalosti

Microsoft office (Word, Excel, Power point, Publisher). Matlab, Statistica, nemocniční systém FAMA+.

Řidičský průkaz skupiny B.

Zájmy

Jóga, vaření a pečení, skauting, četba, hudba, příroda, biomedicína.

Ocenění

2015 Studentská soutěž EEICT - Electrochemical properties and thermal stability of cup- like shape gold nanostructures– 3. místo, 2015

Další aktivity

Spolupráce s průmyslem:

2016 Spolupráce s firmou Honeywell, spol. s.r.o. na testování chemické odolnosti zalévacích hmot pro elektroniku

Spolupráce s jinými institucemi:

2015-2016 Spolupráce s Chemickou fakultou VUT na testování propustnosti membrán.

Odborné stáže a kurzy:

9/2013 Čtrnáctidenní stáž na Univerzitě Pavla Jozefa Šafárika, Košice, Slovensko
Studium nanoporézních membrán

Účast na řešení projektů:

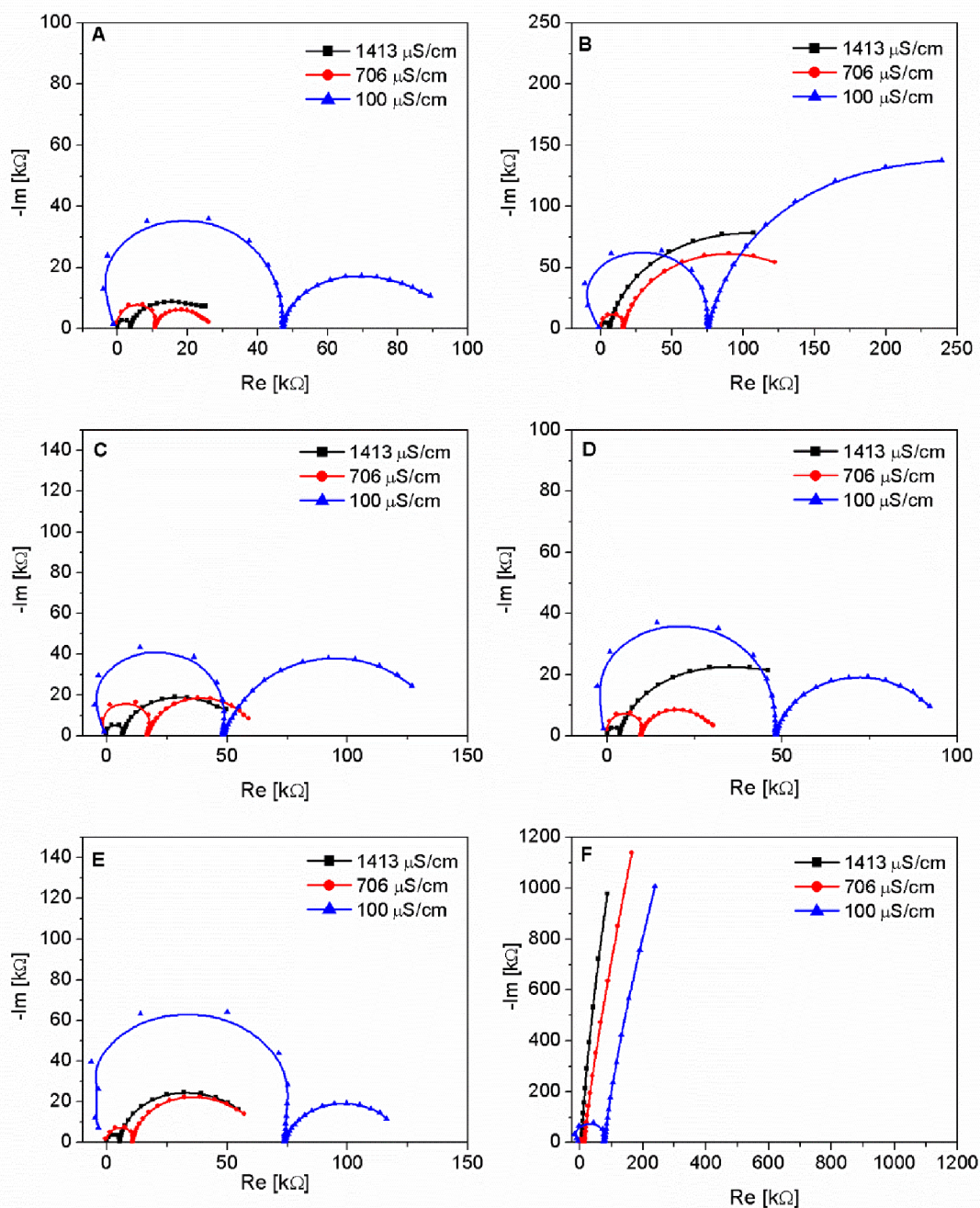
2015

- Vývoj senzorů na bázi nanoporézních membrán s řízenou iontovou propustností, zahájení: 01.01.2015, ukončení: 31.12.2015

2014

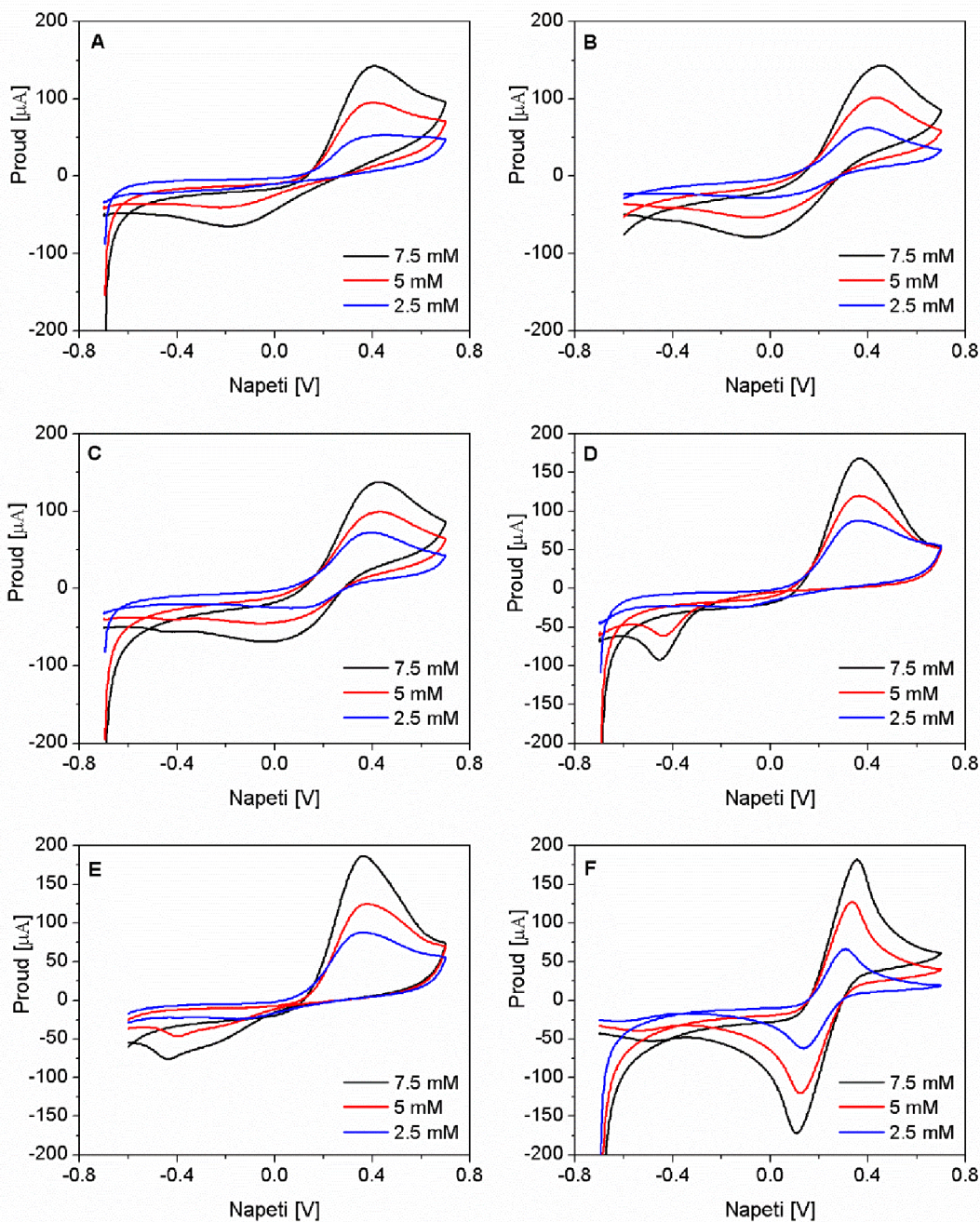
- Nové typy elektronických obvodů a senzorů pro specifické aplikace, zahájení: 01.01.2014, ukončení: 31.12.2016

Příloha A



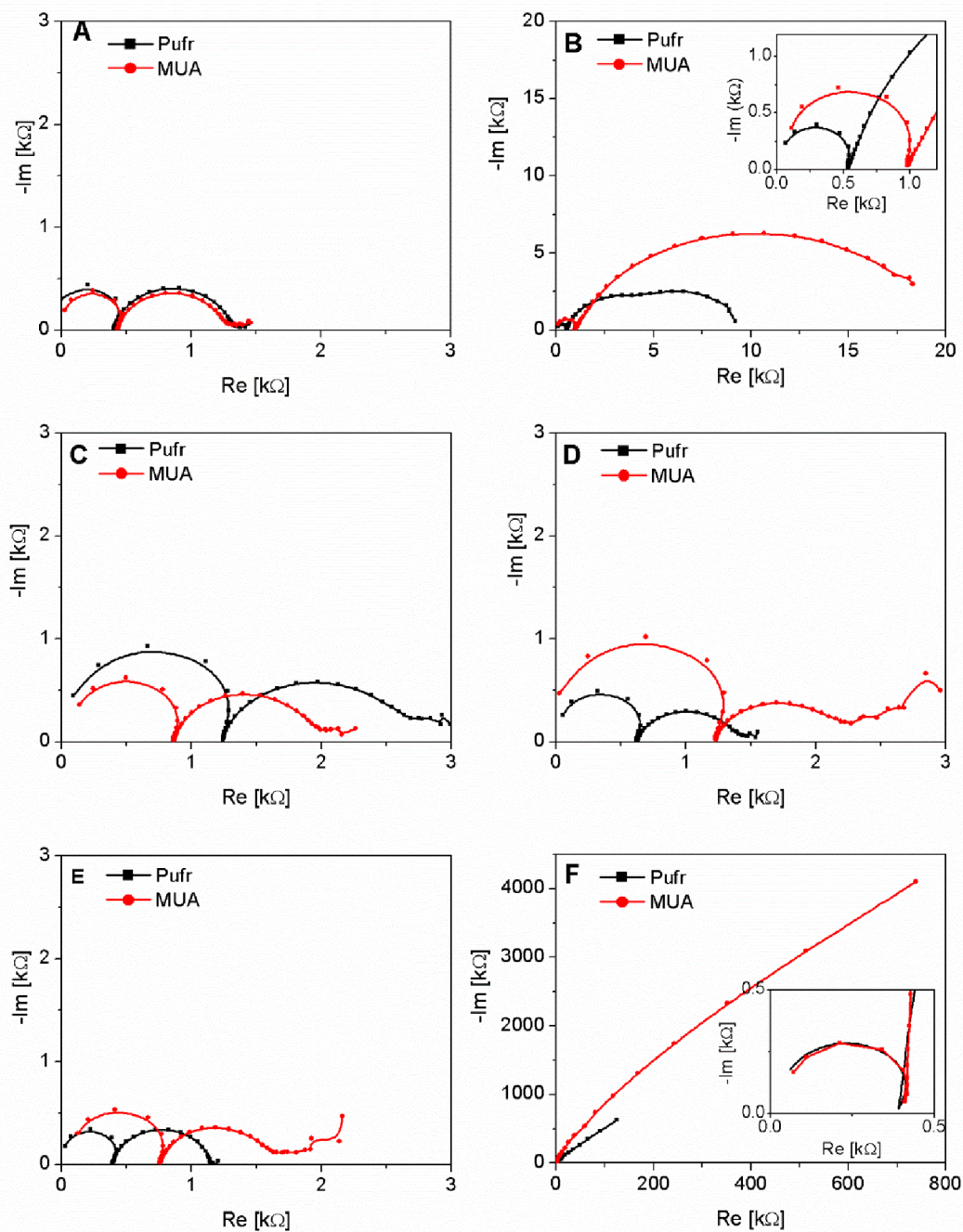
Nyquistovy diagramy pro všechny nanostrukturované zlaté elektrody a hladkou zlatou elektrodu o geometrických plochách cca 7 mm^2 : A – tzv. „nanokopečky“ - 2 pulzová depozice do masky ze 100 nm Al; B – 5-ti pulzová depozice do masky ze 100 nm Al; C – 10-ti pulzová depozice do masky ze 100 nm Al; D – 10-ti pulzová depozice do masky z 500 nm; E – tzv. „nanoskleničky“, 2-ti pulzová depozice do masky ze 100 nm Al s rozšířenými nanopóry, F – hladká zlatá elektroda.

Příloha B



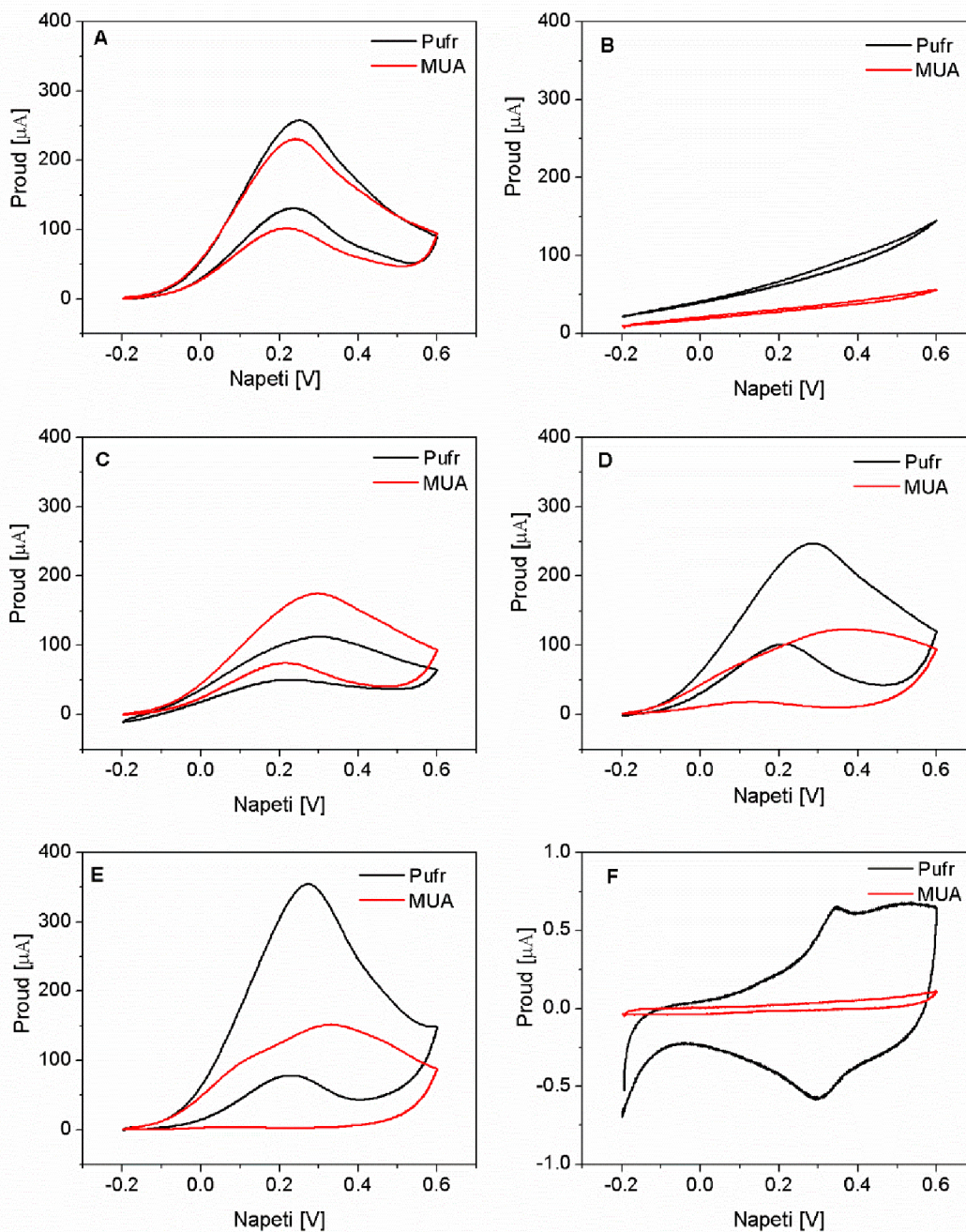
Cyklické voltamogramy pro všechny nanostrukturované zlaté elektrody a hladkou zlatou elektrodu o geometrických plochách cca 7 mm^2 : A – tzv. „nanokopečky“ - 2 pulzová depozice do masky ze 100 nm Al; B – 5-ti pulzová depozice do masky ze 100 nm Al; C - 10-ti pulzová depozice do masky ze 100 nm Al; D - 10-ti pulzová depozice do masky z 500 nm; E – tzv. „nanoskleničky“, 2-ti pulzová depozice do masky ze 100 nm Al s rozšířenými nanopóry, F – hladká zlatá elektroda.

Příloha C



Nyquistovy diagramy po modifikaci 11-merkaptoundekanovou kyselinou pro všechny nanostrukturované zlaté elektrody a hladkou zlatou elektrodu o geometrických plochách cca 7 mm²: A – tzv. „nanokopečky“ - 2 pulzová depozice do masky ze 100 nm Al; B – 5-ti pulzová depozice do masky ze 100 nm Al; C - 10-ti pulzová depozice do masky ze 100 nm Al; D - 10-ti pulzová depozice do masky z 500 nm; E – tzv. „nanoskleničky“, 2-ti pulzová depozice do masky ze 100 nm Al s rozšířenými nanopóry, F – hladká zlatá elektroda.

Příloha D



Cyklické voltamogramy po modifikaci 11-merkaptoundekanovou kyselinou pro všechny nanostrukturované zlaté elektrody a hladkou zlatou elektrodu o geometrických plochách cca 7 mm^2 : A – tzv. „nanokopečky“ - 2 pulzová depozice do masky ze 100 nm Al; B – 5-ti pulzová depozice do masky ze 100 nm Al; C - 10-ti pulzová depozice do masky ze 100 nm Al; D - 10-ti pulzová depozice do masky z 500 nm; E – tzv. „nanoskleničky“, 2-ti pulzová depozice do masky ze 100 nm Al s rozšířenými nanopóry, F – hladká zlatá elektroda.