



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

TECHNOLOGIE PRO SENZORY NOSITELNÉ NA TĚLE

TECHNOLOGY OF WEARABLE SENSORS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Adrián Javor

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Jaromír Hubálek, Ph.D.

BRNO 2017

Bakalářská práce

bakalářský studijní obor **Mikroelektronika a technologie**

Ústav mikroelektroniky

Student: Adrián Javor

ID: 173666

Ročník: 3

Akademický rok: 2016/17

NÁZEV TÉMATU:

Technologie pro senzory nositelné na těle

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

Prostudujte techniky vytváření senzitivních mikrostruktur na flexibilní substráty různými technologiemi. Zaměřte se na techniky tenkých nebo tlustých vrstev, jejich kombinaci, případně dalších alternativních technik, jež jsou potřebné pro dosažení cíle.

Realizujte elektrochemický převodník pro detekci laktátu za využití amperometrické metody měření. Stanovte kalibrační křivku v rozsahu koncentrací vyskytujících se v potu člověka. Navrhněte jednoduchý elektronický detektor, který by mohl sloužit k měření a převodu koncentrace na napětí.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

Podle pokynů vedoucího práce.

Termín zadání: 6.2.2017

Termín odevzdání: 8.6.2017

Vedoucí práce: doc. Ing. Jaromír Hubálek, Ph.D.

Konzultant:

doc. Ing. Jiří Háze, Ph.D.
předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

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

ABSTRAKT

Táto bakalárska práca sa zaoberá hrubovrstvými a tenkovrstvými technológiami vytvárania senzorov nositeľných na ľudskom tele, ktoré snímajú látky v ľudskom pote. Časť je venovaná ich rozdeleniu a následným návrhom flexibilných trojelektrodových biosenzorov využívajúcich 4 rôzne elektrochemické prevodníky. Všetky tieto biosenzory snímajú koncentráciu laktátu v ľudskom pote a sú založené na imobilizácii enzýmu laktát oxidázy na povrchu pracovnej elektródy. Technologický postup výroby biosenzorov pozostáva z kombinácii hrubovrstvových a tenkovrstvových technológií. Záver tejto práce obsahuje amperometrické stanovenia koncentrácie laktátu pomocou biosenzorov, z ktorých boli vytvorené kalibračné krivky.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Tlačený senzor, elektrochemický prevodník, biosenzor, elektródy, laktát

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with thick-film and thin-film technology of creating wearable sensors on human body, that sense substances in perspiration. Part is devoted to their classification and making subsequent proposal of flexible three-electrode biosensors using 4 different electrochemical transducers. All of these biosensors sense concentration of lactate in human sweat, and are based on immobilization lactate oxidase enzyme on the working electrode. Technological process of production is based on combination of thick-film and thin-film technology. Conclusion of this bachelor thesis contains amperometric evaluations of the lactate concentration, from which calibration curves were created.

KEYWORDS

Screen-printed sensor, electrochemical transducer, biosensor, electrodes, lactate

BIBLIOGRAFICKÁ CITÁCIA

JAVOR, A. *Technologie pro senzory nositelné na tele*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií. Ústav mikroelektroniky, 2016. 30 s. Bakalárska práca. Vedúci práce: doc. Ing. Jaromír Hubálek, Ph.D.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že svoju bakalársku prácu na tému Technológie pre senzory nositeľné na tele som vypracoval samostatne pod vedením vedúceho bakalárskej práce a s použitím odbornej literatúry a ďalších informačných zdrojov, ktoré sú všetky citované v práci a uvedené v zozname literatúry na konci práce.

Ako autor uvedenej bakalárskej práce ďalej prehlasujem, že v súvislosti s vytvorením tejto bakalárskej práce som neporušil autorské práva tretích osôb, najmä som nezasiahol nedovoleným spôsobom do cudzích autorských práv osobnostných a/alebo majetkových a som si plne vedomí následkov porušenia ustanovenia § 11 a nasledujúcich zákona č. 121/2000 Sb., o práve autorskom, o právach súvisiacich s právom autorským a o zmene niektorých zákonov (autorský zákon), v znení neskorších predpisov, vrátane možných trestnoprávných dôsledkov vyplývajúcich z ustanovenia časti druhej, hlavy VI. diel 4 Trestného zákonníku č. 40/2009 Sb.

V Brne dňa

.....

(podpis autora)

POĎAKOVANIE

Ďakujem vedúcemu bakalárskej práce doc. Ing. Jaromíru Hubálkovi, Ph.D. za účinnú metodickú, pedagogickú a odbornú pomoc a ďalšie cenné rady pri spracovaní mojej bakalárskej práce a ďalej tiež Ing. Janu Práškovi, Ph.D a Mgr. Zdenke Fohlerovej, Ph.D. za neoceniteľné rady a hlavne odbornú pomoc pri realizácii bakalárskej práce.

V Brne dňa

.....

(podpis autora)

Obsah

ÚVOD	6
1 SENZORY	7
1.1 Chemické senzory	7
1.1.1 Rozdelenie chemických senzorov	8
1.1.2 Statické vlastnosti senzorov	8
1.1.3 Dynamické vlastnosti senzorov	10
1.2 Elektrochemické senzory	10
1.2.1 Biosenzory	10
1.3 OTFT	10
1.3.1 OFET	11
1.3.2 OECT	11
2 Elektroanalytické metódy	13
2.1 Cyklická voltametria	13
2.2 Amperometria	13
3 HRUBOVRSTOVÁ TECHNOLOGIA	15
3.1 Materiály pre hrubé vrstvy	15
3.1.1 Cermetová hrubovrstvová technológia	16
3.1.2 Polymérna hrubovrstvová technológia	16
3.2 Metódy nanášania hrubých vrstiev	16
3.2.1 Sieťotlač	16
3.2.2 Šablónová tlač	17
4 TENKOVRSŤOVÁ TECHNOLOGIA	18
4.1 Spray-coating	18
4.2 Drop-coating	18
5 LAKTÁT	19
5.1 Vzťah medzi koncentráciou laktátu v pote a v krvi	19
5.2 Elektrochemické stanovenie laktátu	20
6 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	21
6.1 Návrh designu a šablón	21

6.2	Zhotovenie motívov na sitách.....	24
6.3	Zhotovenie šablóny.....	24
6.4	Vytvorenie trojelektrodových systémov.....	25
6.5	Nanášanie multistenových karbónových nanotrubiiek.....	27
6.6	Imobilizácia enzýmu laktát oxidázy.....	27
6.7	Príprava 0,1 M K-fosfátového pufru.....	28
6.8	Stanovenie oxidačného potenciálu.....	29
6.9	Amperometrická detekcia laktátu.....	31
6.10	Stanovenie kalibračných kriviek biosenzorov.....	34
6.11	Zhodnotenie dosiahnutých výsledkov.....	37
7	Záver	38
	LITERATÚRA	39
	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK	41
	ZOZNAM PRÍLOH	42

ÚVOD

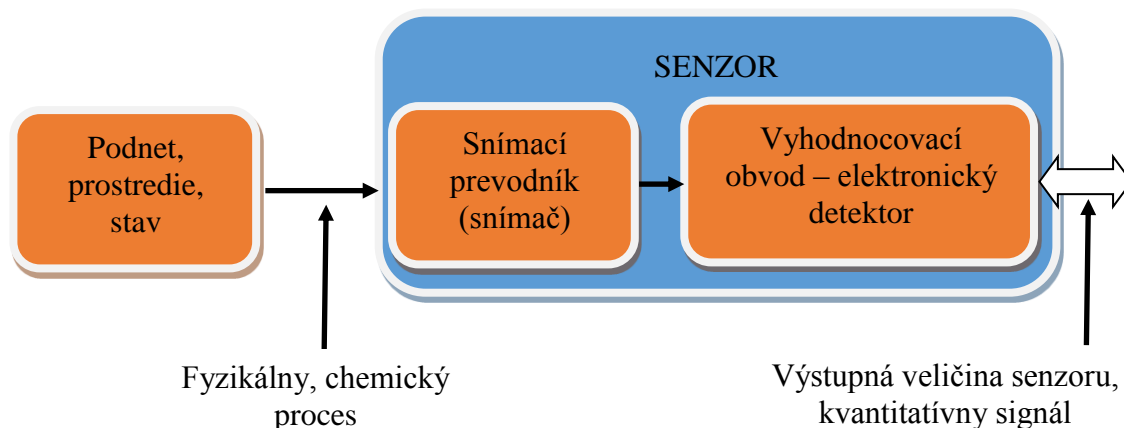
Senzory nositeľné na tele vzbudzujú čoraz väčší záujem najmä v odvetviach, kde je dôležité nepretržité monitorovanie vitálnych funkcií človeka a to najmä v športe, medicíne a armáde. Zaujímavú kategóriu tvoria senzory nositeľné na tele, ktoré snímajú zložky v ľudskom pote. Trendom takýchto senzorov je aby spĺňovali požiadavky ako odolnosť, nízka hmotnosť, malá veľkosť a pohodlné nosenie. Existuje viacero druhov senzorov ktoré využívajú na snímanie pot napr. senzory založené na princípe organického elektrochemického tranzistoru (OECT), organického pol'om riadeného tranzistoru (OFET) a elektrochemické senzory ktoré využívajú trojelektrodový systém. Táto bakalárska práca je zameraná na biosenzory snímajúce množstvo laktátu v ľudskom pote.

Laktát je soľ kyseliny mliečnej ktorého meraním zisťujeme fyzickú aktivitu človeka. K zvýšeniu koncentrácie laktátu dochádza pri anaeróbnom procese. Kludová hodnota laktátu sa v krvi pohybuje medzi 0,5-2 mmol.l⁻¹. Pri intenzite rozvíjajúcej vytrvalosť sa pohybuje hodnota laktátu medzi 2-4 mmol.l⁻¹. Hladina 4 mmol.l⁻¹ sa považuje za anaeróbný prah, je to hranica pri ktorej laktát vzniknutý v tele je aj spotrebovaný.

Cieľom tejto práce je vytvorenie trojelektrodových biosenzorov laktátu využívajúcich 4 rôzne elektrochemické prevodníky. Tieto biosenzory sú založené na imobilizácii enzýmu laktát oxidázy na povrchu pracovnej elektródy. Technologický postup výroby biosenzoru je zameraný na použitie hybridnej technológie, tj. kombinácii technológii hrubých a tenkých vrstiev. Stanovenie koncentrácie laktátu prebieha pomocou amperometrickej metódy. V závere tejto práce sú vytvorené kalibračné krivky jednotlivých biosenzorov.

1 SENZORY

Slovo senzor je odvodené z latinčiny a znamená „citlivý“. Zjednodušene môžeme teda senzor chápať ako zariadenie citlivé na podnet, stav alebo prostredie (meranú veličinu) a ďalej prevádzajúci podnet na výslednú odozvu alebo informáciu (výstupnú elektrickú veličinu). Definícia pojmu senzor však zatiaľ nie je ustálená, určité zovšeobecnenie tohoto pojmu môžeme vyjadriť nasledujúcim spôsobom: „Senzor je zariadenie, ktoré sníma sledovanú fyzikálnu, chemickú alebo biologickú veličinu a podľa určitého definovaného princípu ju transformuje fyzikálnym prevodom na výstupnú veličinu, často elektricky kvantitatívnu.“ Stav sledovanej veličiny sníma citlivá časť senzoru označovaná ako snímač alebo prevodník (viz. obr. 1.1). Jeho výstupom je zmena meranej fyzikálnej veličiny, ktorú ďalej prevádza a spracováva vyhodnocovací obvod senzoru. Výstupná informácia z vyhodnocovacieho obvodu senzoru je kvantitatívna, obvykle elektrický signál, ktorý je vytvorený elektronickým detektorom a môžeme ho ďalej spracovať elektronickými obvodmi [1].



Obr. 1.1: Schematické znázornenie senzoru (prevzaté z [1])

1.1 Chemické senzory

Vlastný senzor je kompozitné zariadenie, ktoré sa skladá z niekoľko funkčných častí. Pri chemických senzoroch sa využíva viacnásobný prevod meranej veličiny. Aktívna vrstva môže byť umelo vytvorená vrstvička pri prefabrikácii senzoru, ale tiež napr. elektródová dvojvrstva vytvorená automaticky na povrchu kovovej elektródy pri styku s elektrolytom. Pri modulačných metódach, kde sa sledujú zmeny charakteristických vlastností frekvenčného signálu (napr. amplitúda či fáza), býva aktívnou vrstvou iba analyzovaná vzorka alebo časť sledovaného systému, ktorým prechádza „čistý“ signál (signál s nulovou informáciou). Prítomnosť analytu (detegované látky) generuje chemickú či fyzikálnu zmenu v aktívnej vrstve senzoru. Nakoniec však musí dôjsť k trvalej či prechodnej zmene určitej merateľnej fyzikálnej veličiny. Rozdelenie senzorov podľa prevodu meranej (chemickej) veličiny na fyzikálnu je objasnené v nasledujúcej

podkapitole. Pokiaľ došlo interakciou s analytom ku zmene chemického zloženia aktívnej vrstvy doprevádzanej fyzikálnou zmenou, potom túto zmenu spracuje fyzikálny prevodník signálu, ktorého výstupom je informácia v elektrickej forme. [1]

1.1.1 Rozdelenie chemických senzorov

Podľa spôsobu prevodu meranej veličiny na fyzikálnu:

- elektrochemické,
- gravimetrické,
- teplotné,
- optické,
- fluorescenčné. [1]

Na základe nosiča informácie:

- elektrické - poskytujú elektrický vstupný signál (elektronické, polovodičové a mikroelektronické),
- neelektrické – mechanické, optické. [2]

Podľa druhu snímanej veličiny:

- mechanické (poloha, otáčky),
- tepelné (teplota, tepelný tok),
- elektrické (prúd, napätie, výkon),
- magnetické (magnetická indukcia, intenzita poľa),
- radiačné (intenzita žiarenia vo viditeľnej oblasti, UV),
- chemické (koncentrácia iónov, pH). [1,2]

Podľa správania sa výstupu:

- aktívne - sú zdrojom energie,
- pasívne - samy o sebe nie sú zdrojom energie. [2]

Podľa spôsobu interakcie s meraním prostredím:

- dotykové,
- bezdotykové. [2]

1.1.2 Statické vlastnosti senzorov

- **selektivita** - určuje mieru, s akou je senzor citlivý na určitý analyt. Táto miera je relatívna vzhľadom k ostatným analytom poprípade interferentom (nameraným zložkám ovplyvňujúcich signál), ktoré sa vyskytujú v sledovanom prostredí. Selektivita sa určuje rôznymi spôsobmi, pretože senzory rôznych typov majú odlišné vlastnosti. Môžeme tiež určiť koeficient selektivity udávajúci koľkokrát nižší signál poskytne senzor pri meraní interferentu než pri meraní sledovaného

analytu, pričom interferent a analyt majú rovnakú koncentráciu. Pomocou tohto koeficientu môžeme charakterizovať rôzne interferenty vzhľadom k určenému analytu. Veľkosť koeficientu selektivity má byť čo najnižšia. [2]

- **hranica detekcie** - tento limitný štatistický parameter udáva najnižšiu možnú koncentráciu analytu, ktorá je v prostredí detekovateľná danou metódou. [3]
- **plný rozsah (horná hranica meracieho rozsahu)** - je najvyššia hodnota meranej veličiny, ktorá môže byť senzorom detekovaná. [1]
- **rozsah senzoru** - alebo tiež koncentračný rozsah senzoru udáva rozmedzie koncentrácie, v ktorej je možno stanoviť koncentráciu analytu. Pokiaľ je koncentrácia analytu medzi dolným detekčným limitom a dolnou hranicou koncentračného rozsahu, môžeme určiť iba prítomnosť detekovaného analytu. Rovnaká situácia nastane pokiaľ sa koncentrácia analytu nachádza medzi hornou hranicou koncentračného rozsahu a horným detekčným limitom. [2,3]
- **citlivosť** - tento parameter udáva zmenu výstupného signálu na jednotkovú zmenu koncentrácie analytu. [2]
- **statická prenosová charakteristika (kalibračná krivka)** - udáva vzťah medzi výstupnou a meranou veličinou. [1]
- **časová konštanta senzoru** - dlhodobá časová stálosť popisovaná poklesom citlivosti ktorá sa udáva v percentách za jednotku času. [2]
- **linearita (tiež chyba linearity, nelinearita alebo integrálna nelinearita)** - udáva maximálnu odchýlku ktoréhokoľvek kalibračného bodu od odpovedajúceho bodu na ideálnej statickej prenosovej charakteristike. [1]
- **hysteréza** - je maximálny rozdiel vo vstupe pri akejkoľvek hodnote meraného rozsahu, keď je hodnota meraná najskôr pri zvyšovaní a potom pri znižovaní meranej veličiny. [1]
- **rozlíšenie (rozlišiteľnosť)** - je najmenší inkrement výstupu senzoru, ktorý senzor zaznamená pri zmene vstupu. Odpovedá absolútnej alebo relatívnej chybe senzoru. [1]
- **rýchlosť odozvy** - je určovaná najmä fyzikálnymi vlastnosťami senzoru (veľkosť). Závisí na rýchlosti pôsobenia meranej veličiny na prevodník (na elektrickú veličinu) alebo na rýchlosti premeny na elektrické veličiny (väčšinou elektróny). [1]
- **doba odozvy** - čas potrebný k dosiahnutiu určitej veľkosti signálu v konečnom ustálenom stave ($t \rightarrow \infty$). [1]
- **signál pozadia** - je signál v základnom stave v neprítomnosti analyzovanej látky. [1]
- **reprodukovateľnosť (opakovateľnosť merania)** - je daná odchýlkou medzi nameranými hodnotami, ktoré boli merané pri nemennej vstupnej veličine a nemenných rušivých vplyvov v krátkom časovom slede. [1]
- **dlhodobá stabilita** - je podmienená zmenami citlivosti senzoru v čase. Citlivosť obvykle klesá ale môže aj prechodne vzrásť. [1]

1.1.3 Dynamické vlastnosti senzorov

- **prechodová charakteristika** - je priebeh výstupnej veličiny v závislosti na čase pri skokovej zmene vstupnej veličiny. [1]
- **frekvenčná charakteristika** - udáva závislosť prenosu a fázového uhlu na frekvencii. Teda rozdiel amplitúdy na fáze výstupného signálu oproti vstupnému signálu v závislosti na frekvencii. [1]

1.2 Elektrochemické senzory

Základný princíp tejto skupiny senzorov je daný elektrochemickými reakciami ktoré nastávajú na určitej elektróde v danom elektrolyte. K týmto reakciám dochádza na troch fázových rozhraniach medzi analyzovanou kvapalinou (resp. plynom), kovovou elektródou a elektrolytom v tekutej alebo tuhej fáze. U elektródy dochádza buď k anodickej oxidácii alebo katodickej redukcii (teda k odovzdávaniu alebo prijímaniu elektrónov). Reakciu môžeme ovplyvniť voľbou elektródy, elektrolytu alebo prípadne elektródovým potenciálom. [4]

1.2.1 Biosenzory

Biosenzor obsahuje citlivý prvok biologického pôvodu (biorekognizačnú časť), spojenú s fyzikálne-chemickým prevodníkom. V tomto prípade s elektrochemickým prevodníkom. Biologicky citlivý element (receptor) je nanosený (imobilizovaný) na povrchu prevodníka. Receptorom môže byť protilátka, enzým, bunka, mikroorganizmus, DNA sekvencie, apod. Biosenzor poskytuje priebežný elektronický signál, ktorý je úmerný koncentrácii jednej alebo niekoľkých chemických látok vo vzorku. [1,5]

1.3 OTFT

Organické tenkovrstvové tranzistory (organic thin-film transistors) vykazujú sľubné uplatnenie v rôznych chemických a biologických senzoroach. Výhody v senzoroach tohto typu zahŕňujú vysokú citlivosť, nízku cenu, ľahkú vyrobiteľnosť, flexibilitu a biokompatibilitu. Tranzistory OTFT sa môžu rozdeliť do dvoch druhov tranzistorov a to:

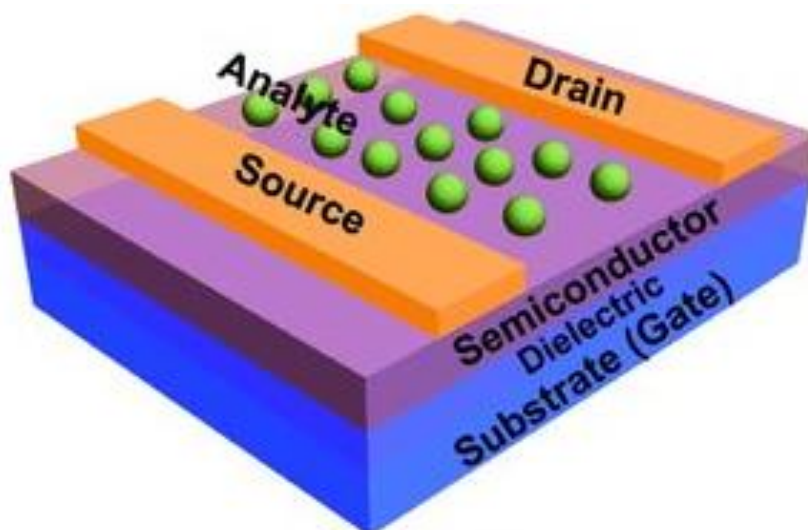
- OFETs (organic field effect transistors) - organické poľom riadené tranzistory,
- OECTs (organic electrochemical transistors) – organické elektrochemické tranzistory. [6]

Tieto tranzistory sa skladajú z trojice elektród source, drain a gate. Medzi elektródami source a drain sa nachádza aktívny organický polovodičový materiál ktorý môže byť vyrobený napríklad z: pentacenu, polyanilinu (PANI), CuPc a poly(3,4-ethylendioxythiofen) polystyrensulfonát (PEDOT:PSS). Tieto polovodičové vrstvy môžu byť nanosené technológiou spin-coating, naparovaným, sieťotlačou a atramentovou tlačou. Tento typ tranzistoru sa môže použiť či už ako chemický alebo biologický senzor. Ako chemický senzor je schopný detegovať ióny ako napríklad K^+ , Ca^{2+} , určiť vlhkosť

a pH. Druhou variantou je použitie OTFT ako biologického senzoru ktorý je schopný detegovať napr. bielkovinu, DNA, močovinu, glukózu, ale aj laktát čo je cieľom našej práce. [6,7]

1.3.1 OFET

Organický pol'om riadený tranzistor sa skladá najčastejšie z kovových elektród drain a source medzi ktorými je organická polovodičová vrstva a gate elektróda je od tejto štruktúry oddelená vrstvou dielektrika (viz. obr. 1.2). Po pripojení napätia medzi elektródami source a drain sa vytvorí prúdový kanál pretekajúci cez aktívnu organickú polovodičovú vrstvu ktorý je spôsobený prenosom nosičov elektrického náboja. Tento prúdový kanál môže byť modulovaný pomocou napätia priloženého na elektróde gate. Vo väčšine senzoroch založených na princípe OFET je polovodičová vrstva vystavená skúmanému analytu. Tento analyt následne môže meniť prúdový kanál kvôli obohacovaniu elektrického náboja alebo jeho odchytu. V porovnaní s anorganickými pol'om riadenými tranzistormi organické vykazujú relatívne menšiu pohyblivosť nosičov náboja a stabilitu ale zas väčšiu flexibilitu, biokompatibilitu. Preto sú tieto tranzistory vhodné do aplikácii jednorazových senzorov. [6,7]

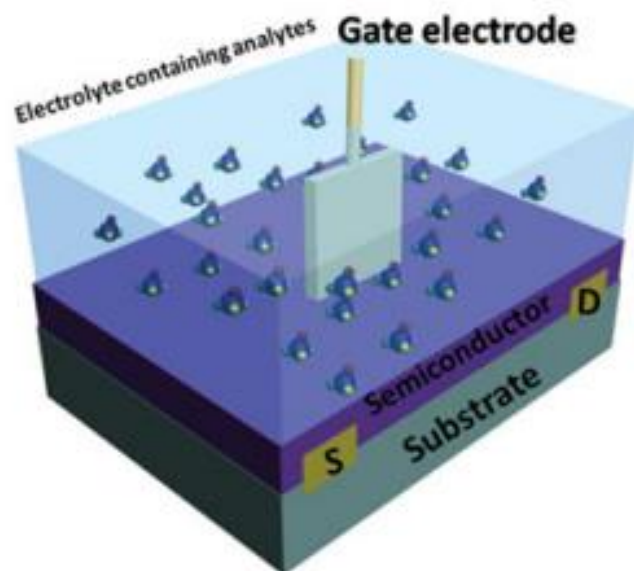


Obr. 1.2: Schematická štruktúra senzoru založeného na OFET [6]

1.3.2 OECT

Organický elektrochemický tranzistor sa vyznačuje tým, že elektróda gate prichádza do priameho styku s analytom (viz. obr. 1.3). Gate elektróda môže byť tvorená kovovým drôtikom alebo plieškom. Prúd prechádzajúci medzi elektródami source a drain je modulovaný elektrochemickým obohacovaním alebo ochudobňovaním aktívnej vrstvy organického polovodivého materiálu spojujúceho tieto dve elektródy iónmi z roztoku elektrolytu obsahujúceho analyt aplikáciou napätia na gate elektródu. Vzdialenosť medzi elektródou gate a štruktúrou drain–organický polovodivý materiál–source je flexibilná

a môže dosahovať až niekoľko centimetrov. V porovnaní so senzormi založených na princípe OFET, OECT senzory vykazujú oveľa nižšie pracovné napätie ktoré je bežne menšie než 1 V. Na druhej strane je výroba OECT jednoduchšia kvôli oddelenej elektróde gate, vďaka čomu je výhodnejšie zakomponovať takýto tranzistor do komplikovaných systémov. [6,7]

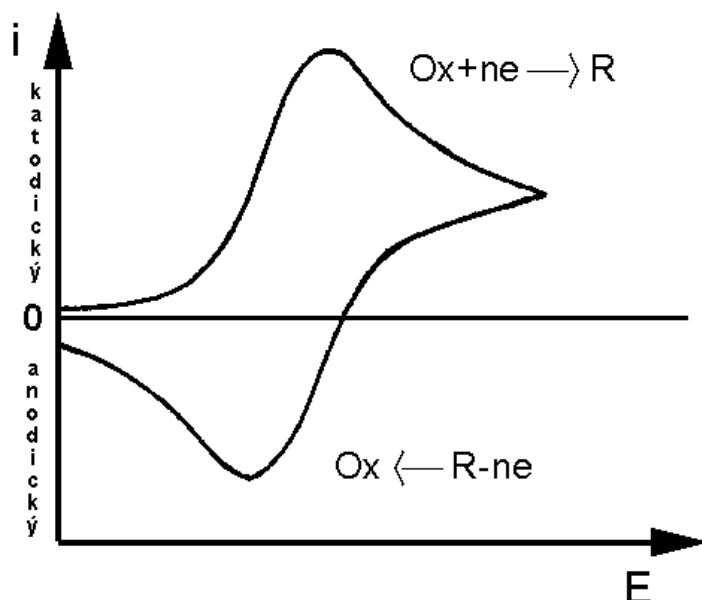


Obr. 1.3 : Schematická štruktúra senzoru založeného na OECT [8]

2 ELEKTROANALYTICKÉ METÓDY

2.1 Cyklická voltametria

Cyklická voltametria patrí medzi základné voltametrické techniky, pri ktorej je sledovaná prúdová závislosť na potenciálu v tvare píly a výstupná prúdová odozva je odozvou reverzibilného systému. Využíva sa trojelektrodové zapojenie a zaznamenáva sa závislosť prúdu v obvode pracovnej a pomocnej elektródy na napätí vkladanom medzi pracovnú a referenčnú elektródu. Voltametrická krivka (voltamogram) je zdrojom informácií o charaktere elektrodového procesu a čiastočne o zložení elektrolyzovaného roztoku. V prípade reverzibilného elektrodového procesu dostávame cyklický voltamogram (viz. obr. 2.1) s katodickým a anodickým píkcom. V tejto práci bola využitá cyklická voltametria na určenie oxidačného potenciálu laktát oxidázy.[1,9]



Obr. 2.1: Cyklický voltamogram (prevzaté z [10])

2.2 Amperometria

Amperometrická metóda je založená na meraní celkového prúdu medzi pracovnou (polarizovateľnou) a referenčnou (nepolarizovateľnou) elektródou, na ktorej je aplikovaný konštantný potenciál. Pri jednoduchej redoxnej reakcii meraný prúd závisí na rýchlosti difúzie analytu k elektróde. Zmenu prúdu s ohľadom na čas v amperometrii udáva Cottrellova rovnica:

$$I_L = nFAc_R^b \sqrt{\frac{D_R}{\pi t}} \quad (1.1)$$

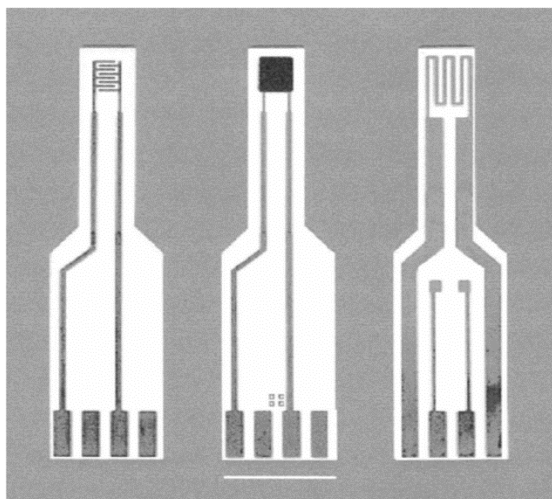
I_L je limitný prúd [A], n je počet elektrónov pre oxidáciu/redukciu u jednej molekuly

analytu R, F je Faradayova konštanta (98,485 C/mol), A je povrch elektródy [cm^2], c_R^b je počiatočná koncentrácia redukovateľného analytu R [mol/cm^3], D_R je difúzny koeficient analytu R [cm^2/s] a t je čas [s]. [11,12]

Signál vyjadrený ako $I > 0$ odpovedá oxidačnému deju prebiehajúcemu na anóde, a signál $I < 0$ zase redukčnému deju prebiehajúcemu na katóde. Pri amperometrických meraniach sa využívajú dvojelektrodové alebo trojelektrodové systémy. Nevýhodou dvojelektrodového systému ktorý sa skladá z pracovnej a referenčnej elektródy je ten, že nepoznáme presný potenciál pracovnej elektródy. Dôvodom je strata časti napätia na odpore roztoku. U trojelektrodového systému zloženého z pracovnej, referenčnej a pomocnej elektródy sa meria celkový prúd pretekajúci medzi pracovnou a pomocnou elektródou. Potenciál pracovnej elektródy sa nastavuje proti referenčnej elektróde. Avšak u trojelektrodového usporiadania je nutná prítomnosť potenciostatu, ktorý udržiava konštantný potenciál medzi pracovnou a referenčnou elektródou nezávisle na zmene prúdu. Z amperometrických meraní sú získavané lineárne prúdové iónovo-koncentračné charakteristiky. [1,11]

3 HRUBOVRSTOVÁ TECHNOLOGIA

Pojem hrubá vrstva označujeme vrstvu, ktorej hrúbka je podstatne väčšia než stredná voľná dráha elektrónov. Stredná voľná dráha je dráha, ktorú urazia častice medzi dvoma zrážkami. Typická hrúbka hrubých vrstiev sa pohybuje v desiatkach μm . Táto technológia sa tradične používa napríklad k tvorbe hybridných integrovaných obvodov, senzorov (viz. obr. 3.1) apod. Vďaka svojej ekonomickej efektívnosti a nenáročnosti si udržuje pevnú pozíciu pri použití v elektrotechnike. [13,14]



Obr. 3.1: Príklad senzorov vyrobených s použitím hrubovrstvovej technológie [15]

3.1 Materiály pre hrubé vrstvy

Materiály používané pre vytváranie pasívnych sietí sú dodávané vo forme pást (inks). Tieto pasty predstavujú heterogénny termodynamický systém, teda systém s viacerými zložkami o rôznych chemických a fyzikálnych vlastnostiach s oddeleným povrchovým rozhraním. Pasty sa vyznačujú radou špecifických parametrov, z ktorých sú dôležité predovšetkým tixotropné vlastnosti. Tixotropné chovanie materiálov je charakterizované predovšetkým tým, že ich viskozita sa mení v závislosti na mechanickom tlaku. Hrubovrstvové pasty sa skladajú z troch základných zložiek :

- funkčná zložka,
- laková zložka,
- spojivová zložka. [16]

Okrem týchto troch základných zložiek hrubovrstvových pást môžu pasty ešte obsahovať modifikátory vlastností, ktoré slúžia na zmenu viskozitného chovania systému. [16]

Hrubovrstvové pasty sa na základe určenia delia na :

- vodivé,
- odporové,
- dielektrické, izolačné a krycie,
- špeciálne. [17]

Technológiu hrubých vrstiev triedime podľa materiálu matriky nasledovne :

- Cermetovú hrubovrstvovú technológiu (cermet thick film),
- Polymérnu hrubovrstvovú technológiu (polymer thick film). [14,18]

3.1.1 Cermetová hrubovrstvová technológia

Materiálom matriky cermetových hrubovrstvových technológií býva najčastejšie sklo vo forme jemného prášku (frity). Tieto vrstvy sa vypaľujú najčastejšie okolo teploty 850 °C. [14]

3.1.2 Polymérna hrubovrstvová technológia

Pri polymérnej hrubovrstvovej technológii sa ako plnivo používa polymér (napr. polyester). Nižšia teplota vytvrdzovania polymérnych vrstiev umožňuje použitie na viac druhov podložiek. Takéto hrubé vrstvy sa vypaľujú pri teplote okolo 200 °C. Hlavné nevýhody polymérnych vrstiev sú väčší odpor vodivých vrstiev, obmedzená pracovná teplota, obmedzené výkonové zaťaženie a nižšia tepelná vodivosť v porovnaní s cermetovými vrstvami. Obmedzené je tiež pájanie takýchto vrstiev. Tieto vrstvy nie sú odolné voči vlhkosti, preto to obmedzuje ich stabilitu. Táto bakalárska práca sa zameriava na tlač polymérnych hrubovrstvových pást a to konkrétne vodivej karbónovej a špeciálnej argentchloridovej. Tiež sa zameriava na tlač izolačnej pasty. [14]

3.2 Metódy nanášania hrubých vrstiev

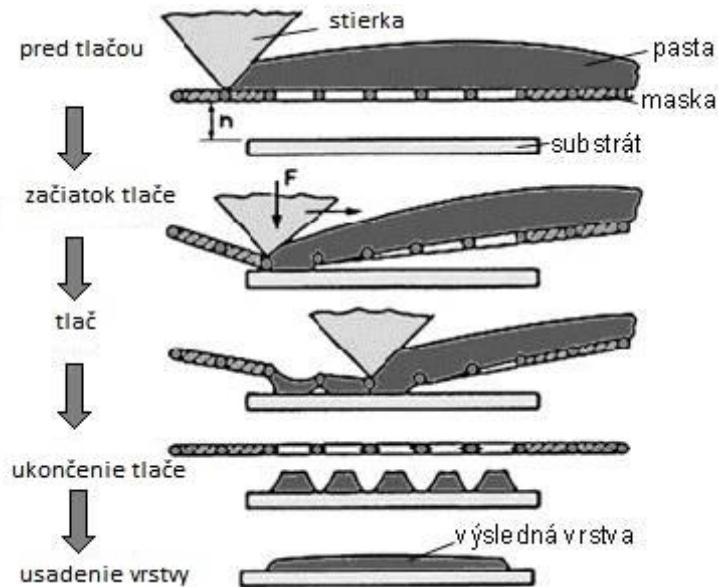
Nanášanie hrubých vrstiev sa môže prevádzať nasledujúcimi spôsobmi:

- Sieťotlačou,
- šablónovou tlačou,
- striekaním (riadene rozprašovacie hlavice),
- namáčaním. [17,18]

3.2.1 Sieťotlač

Sieťotlač je metóda určená pre nanášanie tixotropných materiálov, ktorá využíva ich hlavnú charakteristiku, a to zníženie viskozity pri nanášaní a následné zvýšenie po nanesení. Výhodou je nevákuovaný, relatívne nenáročný spôsob nanášania definovaného množstva materiálu cez sieťotlačové šablóny na nosný substrát. Pasta nanesená na sito je

pretlačovaná cez sito stierkou na substrát (viz. obr. 3.2). Po odskoku sita zostane na substráte požadovaný motív. Motív šablóny je spravidla vytvorený fotolitografickou cestou. Sieťotlačové šablóny sa skladajú z kovového rámu a sieťotlačovej tkaniny. Materiály z ktorých sú najčastejšie vyrobené vlákna tkaniny sú nehrdzavejúca oceľ, polyester alebo nylon. Vrstvy sa tlačia najčastejšie na keramický, sklenený alebo polymérny substrát, ktorý musí byť hladký, rovný a homogénny povrch. [17,18]



Obr. 3.2: Proces sieťotlače (prevzaté z [18])

3.2.2 Šablónová tlač

Šablónová tlač je metóda nanášania podobná sieťotlače, rozdiel je v tom že namiesto sita je použitá do rámu upnutá kovová šablóna s vytvoreným motívom. Tento motív je vytvorený pomocou laseru alebo leptaním. Šablóna je priložená priamo na substrát a jej odskok je prevedený po nanosení pasty do voľných priestorov celoplošne. Tento spôsob tlače je vhodný pre nanášanie súvislých plôch, nie však zložitých čiar.[17]

4 TENKOVRSŤOVÁ TECHNOLOGIA

Pomocou tenkovrstvovej technológie môžeme vytvárať anorganické vrstvy s hrúbkou do 1 μm . Najčastejšie sa táto technológia využíva na realizáciu vodivých, odporových a dielektrických vrstiev. V oblasti sensorovej techniky sú však vytvárané aj špeciálne vrstvy. Medzi technológie tenkých vrstiev patria fyzikálne a chemické depozície z plynnej fázy. Do fyzikálnych depozícií z plynnej fázy patrí termálne naparovanie a naprašovanie. Do chemických depozícií z plynnej fázy zahrňujeme tie, u ktorých je deponovaný materiál produktom chemickej reakcie plynov, napr. disproportionácia, polymerizácia, redukcia, oxidácia a nitridácia. Medzi depozitné techniky patria tiež nevákuové spôsoby ako elektrodepozícia a rôzne techniky nanášania z roztoku (dip-coating, spin-coating, spray-coating a drop-coating). [1]

4.1 Spray-coating

Nanášanie striekaním je prevádzané sol-gel procesom. Využíva sa tu jednoduchá selektívna depozícia cez šablónu. Hrúbka vrstvy je určená veľkosťou a množstvom častíc v suspenzii a dobou striekania, pri ktorej sa jednotlivé vrstvičky usádzajú na seba. Nevýhodou je menšia presnosť deponovaných plôch, pretože môže dochádzať k podtekaniu povrchovej masky vplyvom kapilárnych síl. [1]

4.2 Drop-coating

Technika nakvapkávania je tiež prevádzaná sol-gel procesom. Využíva sa tu jednoduchá depozícia priamym určením miesta. Hrúbku vrstvy určuje okrem veľkosti a koncentrácie častíc v suspenzii aj množstvo deponovaného materiálu v závislosti na veľkosti deponovanej plochy. Nevýhodou je menšia presnosť deponovaných plôch, obvykle kruhových, ktoré sú ovplyvnené zmáčanlivosťou deponovaného povrchu. [1]

5 LAKTÁT

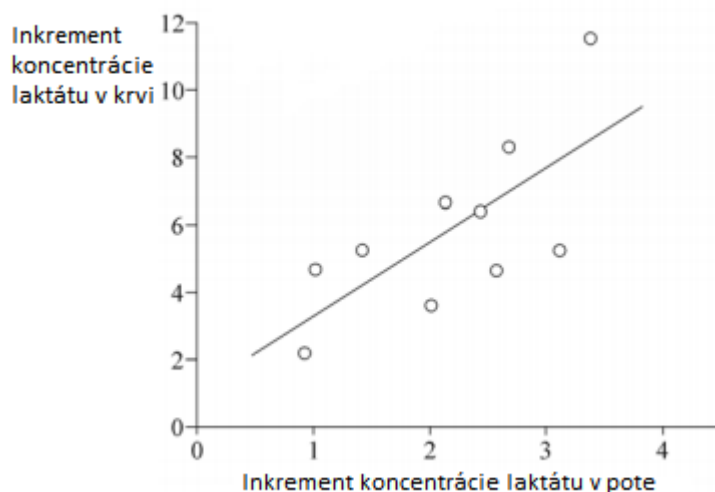
Laktát je soľ kyseliny mliečnej a vzniká predovšetkým v kostrovom svalstve. Približne 65% laktátu je spracovaných v pečeni. Je to jeden z najdôležitejších biomarkerov tkanivovej oxygenácie, a teda má najväčší význam pri posudzovaní fyzického výkonu v športe, armáde a aplikáciách zdravotnej starostlivosti. Počas intenzívnej fyzickej aktivity bežný aeróbnny metabolizmus nie je schopný uspokojiť energetické požiadavky ľudského tela. Tento prípad nastáva pri vytrvalostných aktivitách ako napríklad triatlon, box, cyklistika. V takomto prípade je vyvolaný anaeróbnny proces pri ktorom je uložený glykogén spotrebovaný na vytvorenie energie a laktátu svalovými bunkami. Tento dej je tiež známy pod pojmom glykolýza alebo laktátová acidóza a zapríčiňuje zvýšenie úrovne laktátu. Nadmerná tvorba laktátu ktorú nestíha pečeň odbúrať spôsobuje okyslenie vnútorného prostredia organizmu čo vedie k svalovej únave. Hladina laktátu v krvi je daná pomerom medzi jeho tvorbou a odbúraním v pečeni. [19,20,21]

V medicínskej praxi sa vyšetruje hodnota laktátu pri:

- nedostatočnom oksylení tkanív (choroba pľúc, srdca, šok, chudokrvnosť),
- nádorových ochoreniach, ochoreniach pečene a obličiek,
- pri príznakoch prekyslenia vnútorného organizmu – svalová slabosť, zrýchlený dych, nevoľnosť, zvracanie a potenie,
- pri kritických stavoch (bezvedomie, šok, závažné infekcie, srdcový záchvat, zlyhanie srdca, kóma pri cukrovke),
- pri podozrení na poškodenie či infekciu centrálného nervového systému. [21]

5.1 Vzťah medzi koncentráciou laktátu v pote a v krvi

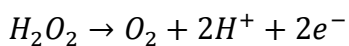
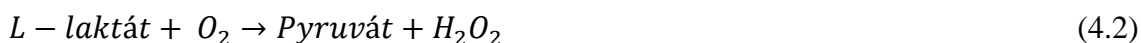
Sakharov a kolektív v práci [22] skúmali reláciu medzi vyplavovaním laktátu v pote a v kapilárnej krvi pred a po cvičení. Došli k záveru že nárast laktátu v pote je priemerne o 50,3 % menší ako v kapilárnej krvi (viz. obr. 5.1) a koncentrácia laktátu môže dosahovať hodnôt $20,4 \pm 6,7$ mmol/l pred cvičením a $62,2 \pm 16,3$ mmol/l po cvičení.



Obrázok 5.1: Graf závislosti inkrementu koncentrácie laktátu v pote na inkrementu koncentrácie v krvi [22]

5.2 Elektrochemické stanovenie laktátu

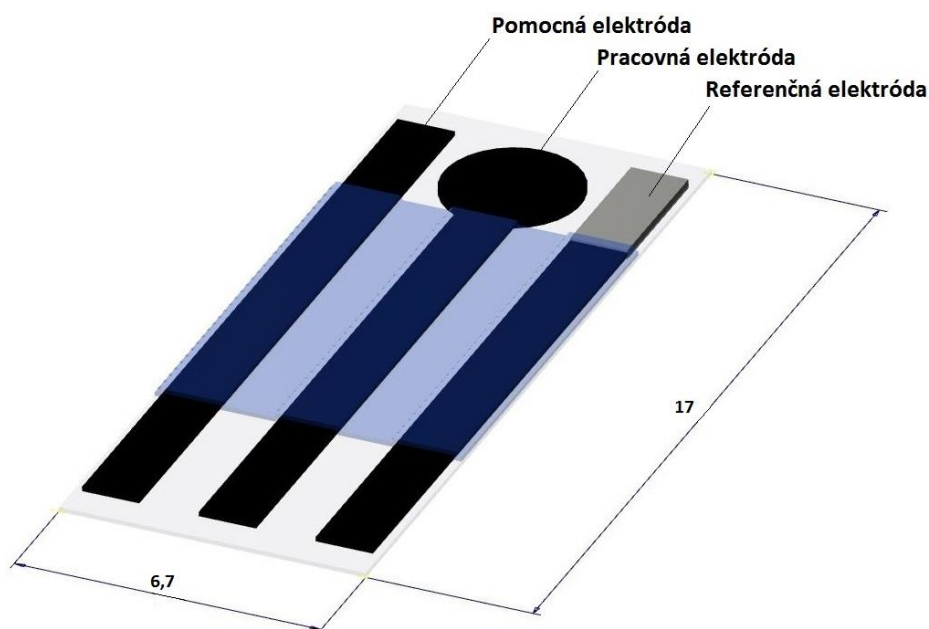
Pri elektrochemickom stanovení laktátu pomocou laktát oxidázy (LOD) sa tento enzým musí zabudovať do biosenzoru. V našom trojelektrodovom systéme sa musí stabilizovať na povrch pracovnej elektródy pomocou glutaraldehydu. Tento enzým následne katalyzuje oxidáciu laktátu na pyruvát v prítomnosti rozpusteného kyslíka a vytvoreného peroxidu vodíka, ktorý je elektrochemicky aktívny a môže redukovať alebo oxidovať podľa rovnice [2], čím sa získa prúd ktorý je úmerný koncentrácii laktátu. Takto generovaný prúd sa potom stanovuje amperometricky. [23]



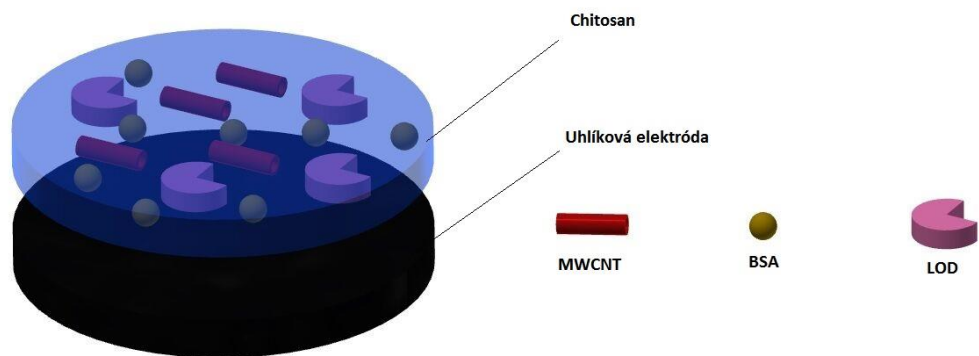
6 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

6.1 Návrh designu a šablón

V prvej etape bolo potrebné navrhnuť celkový design trojelektrodového elektrochemického biosenzoru, ten bol navrhnutý v programe Inventor s rozmermi 6,7 x 17 mm, s priemerom pracovnej elektródy 3 mm, rozstupom kontaktov 1,25 mm (viz. obr. 6.1), a zloženie citlivostnej vrstvy na povrchu pracovnej elektródy (viz. obr. 6.2). Všeobecné zloženie pracovnej elektródy pozostáva z modifikovanej pracovnej elektródy pomocou multistenových karbónových nanotrubiiek (MWCNTs) na ktorej sa nachádza citlivostná vrstva tvorená hovädzím sérovým albumínom (BSA), biopolymerným chitosanom a enzýmom LOD zosieťovaným pomocou glutaraldehydu.

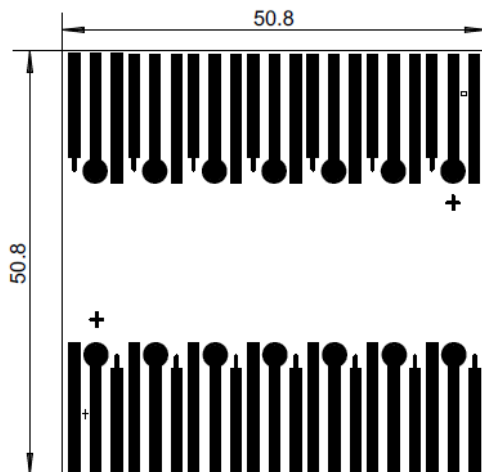


Obr. 6.1: Návrh designu biosenzoru v programe Inventor



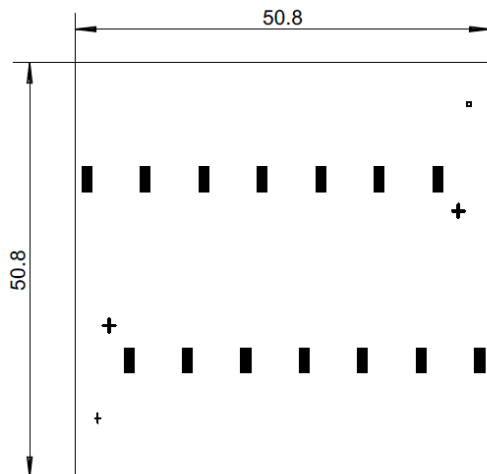
Obrázok 6.2: Všeobecné zloženie pracovnej elektródy (MWCNT- multistenová karbónová nanotrúbka, LOD – laktát oxidáza, BSA – hovädzí sérový albumín)

Na technologický postup výroby zvoleného biosenzoru bolo potrebné vytvoriť 3 šablóny pre sieťotlač a jednu šablónovú masku. Jednotlivé motívy boli vytvorené v programe Eagle. Ako prvé bol vytvorený vodivý motív (viz. obr. 6.3) vďaka ktorému bolo možné vytvoriť sieťotlačovú šablónu a následne pomocou sieťotlače s použitím karbónovej pasty vytvoriť vodivý motív.



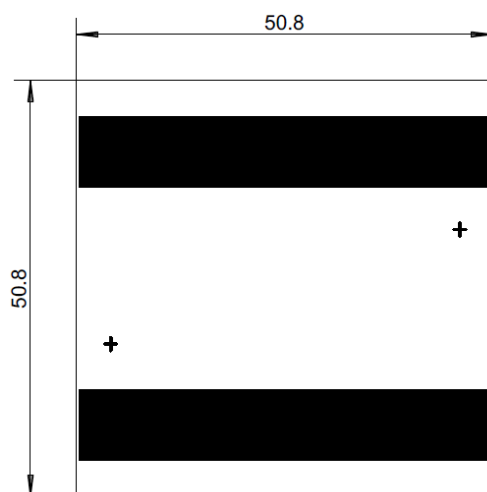
Obr. 6.3: Vodivý multimotív vytvorený v programe Eagle

Ďalší vytvorený motív (viz. obr. 6.4) slúži na vytvorenie referenčnej elektródy pomocou sieťotlače s použitím argentchloridovej pasty.



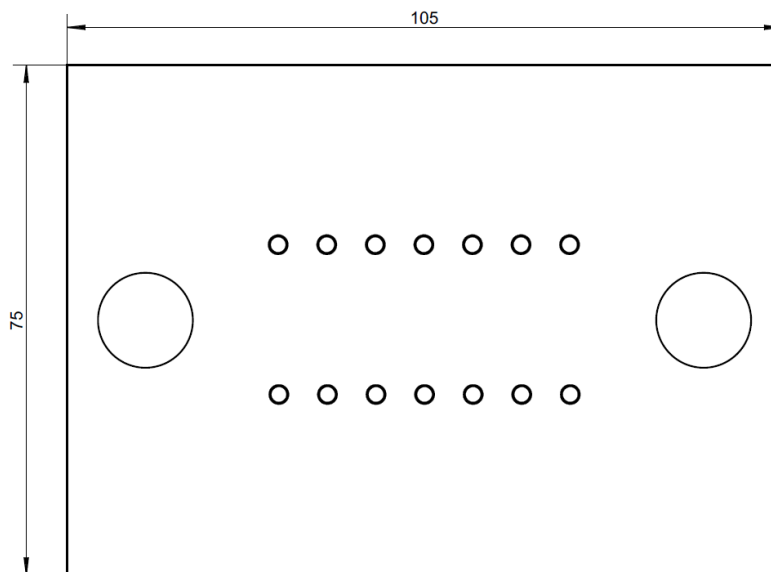
Obr. 6.4: Motív slúžiaci na tlač referenčnej elektródy

Nasledujúci motív (viz. obr. 6.5) slúži na vytvorenie sieťotlačovej šablóny pomocou ktorej sa naniesie izolačná vrstva ktorá bude odokrývať iba elektródy a kontaktné plôšky.



Obr.6.5: Motív slúžiaci na sieťotlač izolačnej vrstvy

Posledný motív (viz. obr. 6.6) slúži na vytvorenie šablóny, ktorá bola použitá pri technológii spray-coating za účelom nanosenia suspenzie MWCNTs/N,N-dimetylformamidu (DMF) na pracovnú elektródu.



Obr. 6.6: Motív šablóny využitý pri technológii spray-coating

6.2 Zhotovenie motívov na sitách

Na zhotovenie trojelektrodového systému bolo potrebné vytvoriť 3 motívy na sitách. Na začiatku boli sita odmastené odmasťovacím prípravkom a ošetrené prípravkom Universal Mesh Prep ktorý zlepšuje zmáčaciu charakteristiku sieťoviny. Sita sa následne namočili do destilovanej vody a po vytiahnutí bol na ne nanesený kapilárny film. Zasušenie kapilárneho filmu na sitách bolo zabezpečené pomocou studeného vzduchu použitím fěnu. Po zasušení bola následne odstránená krycia fólia z kapilárneho filmu. Takto pripravené sitá boli postupne vložené do osvitovej komory spolu s osvitovou fóliou a vystavené UV svetlu po dobu 45 sekúnd. Vyvolanie motívu prebiehalo v nádobe s destilovanou vodou a pod prúdom vody z umývadla. Nakoniec sa všetky tri sita nechali v digestore vyschnúť.

6.3 Zhotovenie šablóny

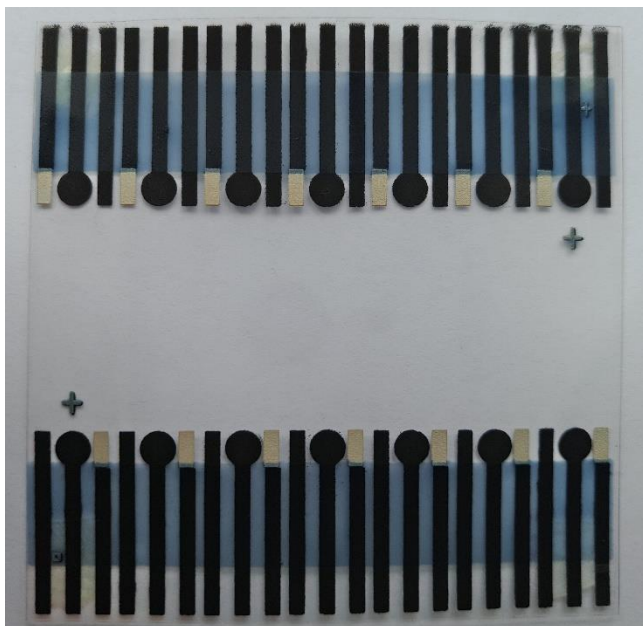
Z kovového plechu bol vystrihnutý obdĺžnikový tvar o niečo väčší ako rozmer navrhnutého motívu (viz. obr. 6.6). Na tento výstrižok plechu bol následne vypálený vzor šablóny a to pomocou kontinuálneho YAG laseru v zariadení AUREL 300 (viz. obr. 6.7). Kvôli bezpečnej manipulácii so šablónou boli ostré hrany zbrúsené pomocou orezávacieho noža.



Obr. 6.7: Laserové zariadenie AUREL 300

6.4 Vytvorenie trojelektródových systémov

Pri tvorbe trojelektródových systémov (viz. obr. 6.8) boli použité 3 rôzne polymérne substráty. Folanorm s hrúbkou 175 μm , Polyetylén (PE) s hrúbkou 135 μm a FR4 s hrúbkou 150 μm , ktoré boli narezané na štvorce s rozmermi 50,8 x 50,8mm a následne očistené v isopropylalkohole. Kvôli vákuovej výveve sieťotlačového poloautomatu AUREL C880 (viz. obr. 6.9) boli všetky polymérne substráty pripevnené obojstrannou lepiacou páskou k štvorcum z korundovej keramiky totožných rozmerov, aby sa zabránilo prehybu polymérnych substrátov vplyvom tejto vývevy pri sieťotlačí. Rovnako ako aj polymérne substráty bola táto korundová keramika očistená v isopropylalkohole. Kvôli zmršťovaniu substrátov bolo nutné substráty vložiť do sušičky Memmert UF 75 PLUS kde boli vystavené teplote 150 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 20 minút. Pred sieťotlačou bolo potrebné vytiahnuť z chladničky polymérne hrubovrstvové pasty a ponechať ich pri izbovej teplote určitú dobu, aby sa ich teplota vyrovnala teplote okolia. Následne boli postupne rozmiešané jednotlivé polymérne hrubovrstvové pasty, za cieľom zníženia ich viskozity. Postupne boli do sieťotlačového poloautomatu pripevnené sitá podľa ktorých bolo potrebné zosúladiť substráty. Pri vhodne zvolenom prítlaču terky a odtrhu bola natlačená prvá vodivá vrstva pomocou karbónovej polymérnej hrubovrstvovej pasty DuPont BQ221. Po natlačení boli substráty vložené do sušičky kde bola zvolená teplota 130 $^{\circ}\text{C}$ a substráty v nej boli ponechané po dobu 10 minút. Ako druhá vrstva bola natlačená plôška referenčnej elektródy pomocou argenchloridovej polymérnej hrubovrstvovej pasty DuPont 5874 ktorá bola vytvrdená v sušičke pri teplote 120 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 5 minút. Ako posledná bola natlačená ochranná polymérna hrubovrstvová pasta ESL 243-S ktorá bola vytvrdená v sušičke pri teplote 150 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 15 minút.



Obr. 6.8: Vytvorené trojelektrodové systémy



Obr. 6.9: Sieťotlačový poloautomat AUREL C880

6.5 Nanášanie multistenových karbónových nanotrubiiek

Vopred pripravená suspenzia 0,1 g multistenových karbónových nanotrubiiek v 10 ml DMF bola vystavená pôsobeniu ultrazvuku po dobu 20 minút za účelom dosiahnutia homogénnej suspenzie. Boli použité MWCNTs (Aldrich) s vonkajším priemerom 40 - 70 nm, vnútorným priemerom 5 – 40 nm a dĺžkou 0,5 - 2 μm . Na substrát na ktorom sa nachádzali trojelektrodové systémy bola pripevnená šablóna (viz. obr. 6.6), odokrývajúca iba plochy pracovných elektrod. Následne bol substrát s pripevnenou šablónou položený na výhrevnú platničku ktorej teplota bola 140 °C. Pomocou dávkovača bol objem 60 μL suspenzie MWCNTs/DMF vložený do striekacej pištole Fengda BD 208 a rozprášený na povrchu pracovných elektrod. Takto modifikovaný povrch pracovnej elektródy slúži na zlepšenie prenosu elektrónov medzi aktívnou stranou imobilizovaného enzýmu a povrchom elektródy, čo vedie k zvýšeniu citlivosti biosenzoru.

6.6 Imobilizácia enzýmu laktát oxidázy

V tejto práci boli vytvorené celkovo 4 druhy imobilizovaných vrstiev (immobilized layers) -ILs (viz. Tab. 6.1) na povrchu pracovných elektrod. Ako enzým v IL1-3 bola použitá LOD (Roche) s aktivitou 90,9 U/mg a pri IL4 LOD (Roche) s aktivitou 166 U/mg. Pri IL1, IL2 bol použitý biopolymer chitosan, využívajúci sa ako matrice pre imobilizáciu enzýmu, ktorý disponuje atraktívnymi vlastnosťami ako: výborná schopnosť tvorby filmu, vysoká permeabilita voči vode, dobrá adhézia, netoxicitá a biologická kompatibilita. Pri IL3, IL4 bol chitosan nahradený glycerolom. Ako stabilizátor enzýmu pri skladovaní a enzymovej reakcie bol použitý hovädzí sérový albumín (Aldrich). Pri príprave všetkých ILs bol použitý fosfátový pufr s pH 7,2 a koncentráciou 10 mM pripravený v 200 ml demineralizovanej vody Millipore. Na zosieťovanie enzýmu bol použitý 25 % glutaraldehyd (Aldrich), ktorý sa riedil s vodou. [24]

Na IL1 boli pripravené 2 roztoky. Prvý roztok pozostával z 1ml fosfátového pufru s koncentráciou 4 mg/ml LOD a 10 mg/ml BSA. Ďalej bol pripravený 1 ml roztoku glutaraldehydu (2 %) a 1 ml roztoku chitosanu (1 wt %) v kyseline octovej (1 wt %). Následne bol 1ml roztoku glutaraldehydu zmiešaný s 1ml roztoku chitosanu. Na povrch 14 pracovných elektrod bol pomocou striekačky nanosený 1 μL roztoku fosfátového pufru (LOD s BSA) a 0,5 μL roztoku glutaraldehydu s chitosanom.

IL2 bola vytvorená 1 ml roztoku fosfátového pufru s koncentráciou 4 mg/ml LOD a 10 mg/ml BSA, 1 ml roztoku 8 % glutaraldehydu a 1ml roztoku chitosanu (1 wt %) v kyseline octovej (1 wt %). Následne bol postupne nakvapnutý 1 μL roztoku fosfátového pufru (LOD s BSA), 0,6 μL roztoku chitosanu a 0,3 μL roztoku 8% glutaraldehydu na povrch 14 pracovných elektrod.

Na IL3 boli zmiešané roztoky 1 ml fosfátového pufru s koncentráciou 4 mg/ml LOD a 50 mg/ml BSA s 1 ml 2 % glutaraldehydu a 1 ml 5 % glycerolu. Na povrch 14 pracovných elektrod bol nanosený objem 1 μL takto zmiešaného roztoku.

IL4 bola vytvorená zmiešaním 1 ml fosfátového pufru s koncentráciou 4,4 mg/ml LOD a 10 mg/ml BSA s 1 ml roztoku 8 % glutaraldehydu a 1 ml roztoku 5 % glycerolu. Následne sa nakvapol objem 3 μL takto zmiešaného roztoku na povrch 14 pracovných

elektrod.

Všetky ILs sa nechali vyschnúť pri okolnej teplote a po vyschnutí boli vložené do chladničky v ktorej bola teplota 6 °C za účelom imobilizácie enzýmu a skladovania.

Tab. 6.1: Zloženie jednotlivých ILs

IL	Zloženie	Postup prípravy
1.	1 µL PBS (4 mg/ml LOD, 10 mg/ml BSA)	postupné nanášanie jednotlivých vrstiev
	0,5 µL 2 % glutaraldehyd, 1 wt % chitosan	
2.	1 µL PBS (4 mg/ml LOD, 10 mg/ml BSA)	postupné nanášanie jednotlivých vrstiev
	0,6 µL 1 wt % chitosan	
	0,3 µL 8 % glutaraldehyd	
3.	1 µL 4 mg/ml LOD, 50 mg/ml BSA, 2 % glutaraldehyd, 5 % glycerol	zmiešanie roztokov a následné nanesenie
4.	3 µL 4,4 mg/ml LOD, 10 mg/ml BSA, 8 % glutaraldehyd, 5 % glycerol	zmiešanie roztokov a následné nanesenie

6.7 Príprava 0,1 M K-fosfátového pufru

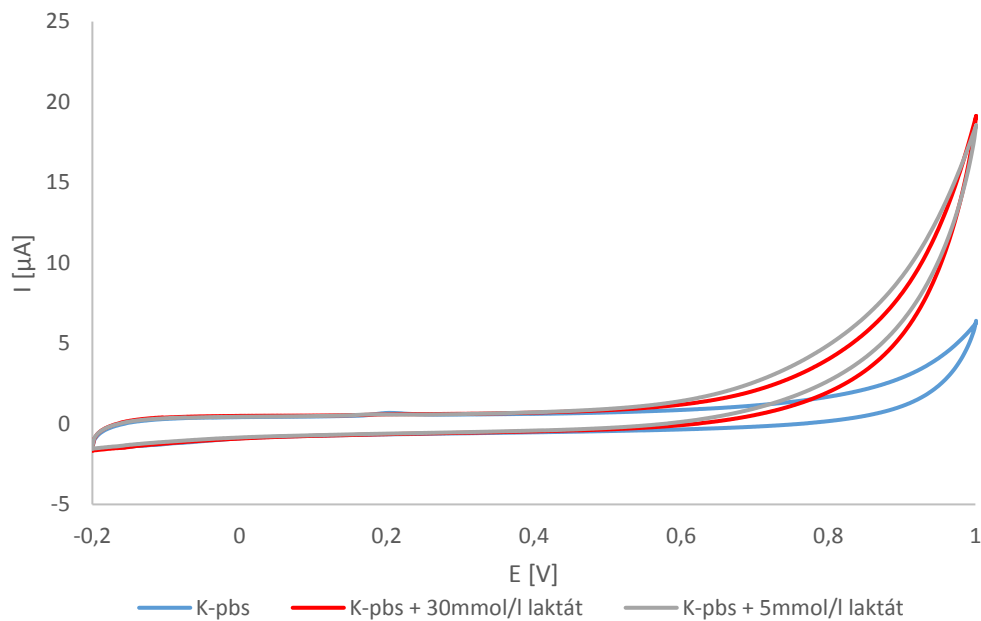
Na začiatku bolo potrebné pripraviť 0,2 molárny roztok K_2HPO_4 (hydrogenfosforečnan draselný, $M_r = 174,18$ g/mol). Tento roztok bol pripravený zmiešaním 3,48 g hydrogenfosforečnanu draselného v 100 ml demineralizovanej vody Millipore. Ako druhý bol pripravený 0,2 M roztok KH_2PO_4 (dihydrogenfosforečnan draselný, $M_r = 136,09$ g/mol) zmiešaním 2,72 g dihydrogenfosforečnanu draselného v 100 ml demineralizovanej vody Millipore. Pre prípravu 0,1 M K-fosfátového pufru konkrétneho pH bolo potrebné zmiešať obidva roztoky na základe objemov uvedených v Tab. 6.2 a doplniť demineralizovanou vodou Millipore do objemu 200 ml. V tomto prípade bolo zvolené pH 7,0.

Tab. 6.2: Pomery objemov roztokov pre prípravu K-fosfátového pufru daného pH (prevzaté z [25])

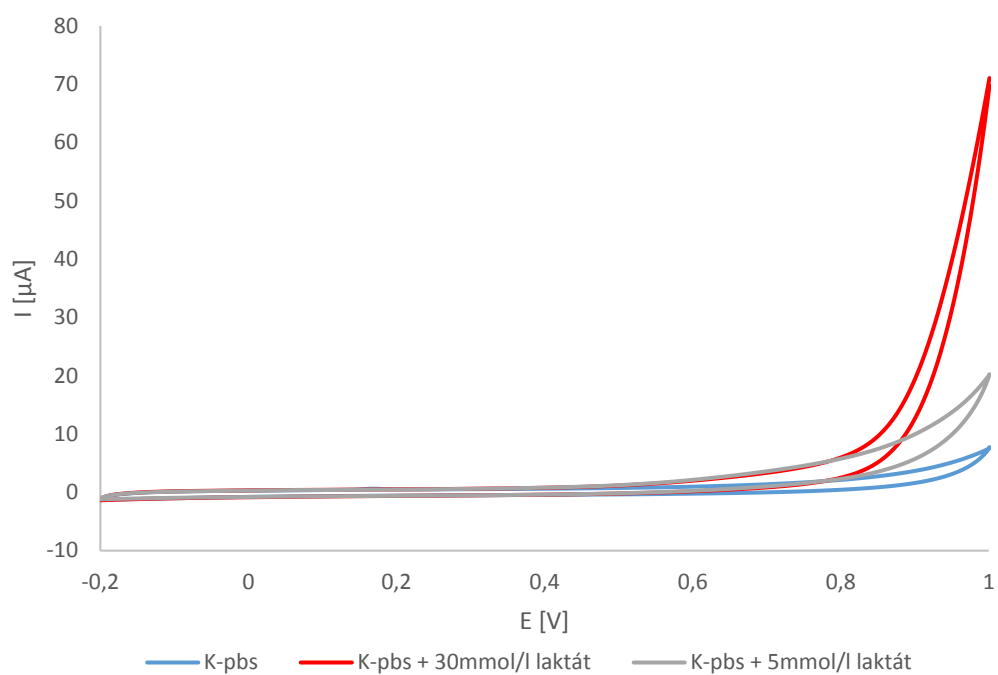
pH	0,2 M roztok K_2HPO_4 [ml]	0,2 M roztok KH_2PO_4 [ml]
6,0	12,3	87,7
6,5	31,5	68,5
7,0	61,0	39,0
7,5	84,0	16,0
8,0	94,7	5,3

6.8 Stanovenie oxidačného potenciálu

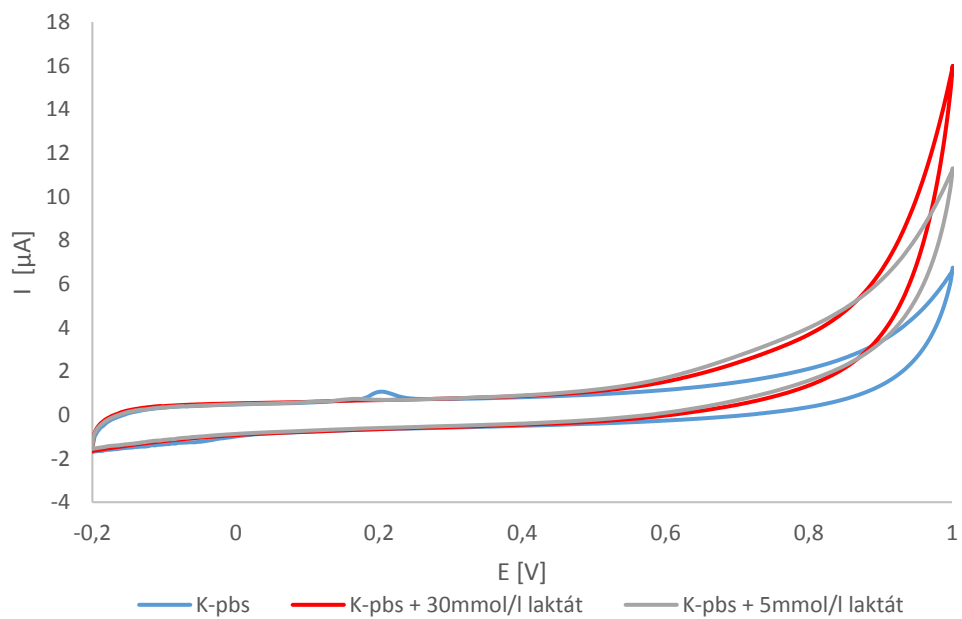
Na stanovenie oxidačného potenciálu biosenzoru laktátu bola použitá metóda cyklickej voltametrie v trojelektrodovom zapojení na potenciostate μ AUTOLABIII/FRA2. Za účelom dosiahnutia dobrej aktivity enzýmu prebiehalo meranie v 10 ml pripraveného K-fosfátového pufru. Vstupné napätie bolo rozmiatané od - 0,2 V do 1 V s polarizačnou rýchlosťou 0,05 V/s v 10 cykloch. Meranie bolo vykonávané v troch roztokoch K-fosfátového pufru s rôznou koncentráciou kyseliny mliečnej. Prvý roztok obsahoval len K-fosfátový pufr. Ďalší meraný roztok bol okrem pufru doplnený o objem 9,3 μ L kyseliny mliečnej (40 wt % v H₂O) a výsledná koncentrácia roztoku bola 5 mmol/l. Posledný roztok obsahoval pufr doplnený o objem 55,8 μ L kyseliny mliečnej aby výsledná koncentrácia roztoku bola 30 mmol/l. Z voltamogramov biosenzorov na ktorých boli vytvorené rôzne ILs (viz. obr. 6.10-13) je viditeľný nárast prúdu v oblasti okolo 0,6 V, tento nárast prúdu sa prejavil ako dôsledok oxidačného deja spôsobeného prítomnosťou laktátu v pufr. Pre amperometrické meranie všetkých biosenzorov bola zvolená hodnota napätia 0,9 V, kvôli vyššej prúdovej odozve na prítomnosť laktátu.



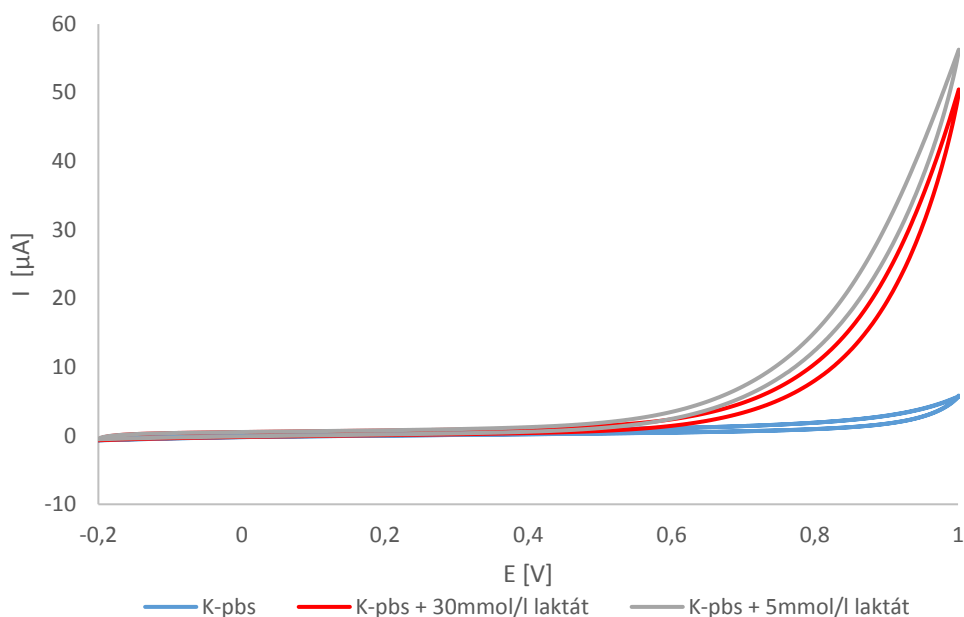
Obr. 6.10: Voltamogram biosenzoru s IL1



Obr. 6.11: Voltamogram biosenzoru s IL2



Obr. 6.12: Voltamogram biosenzoru s IL3



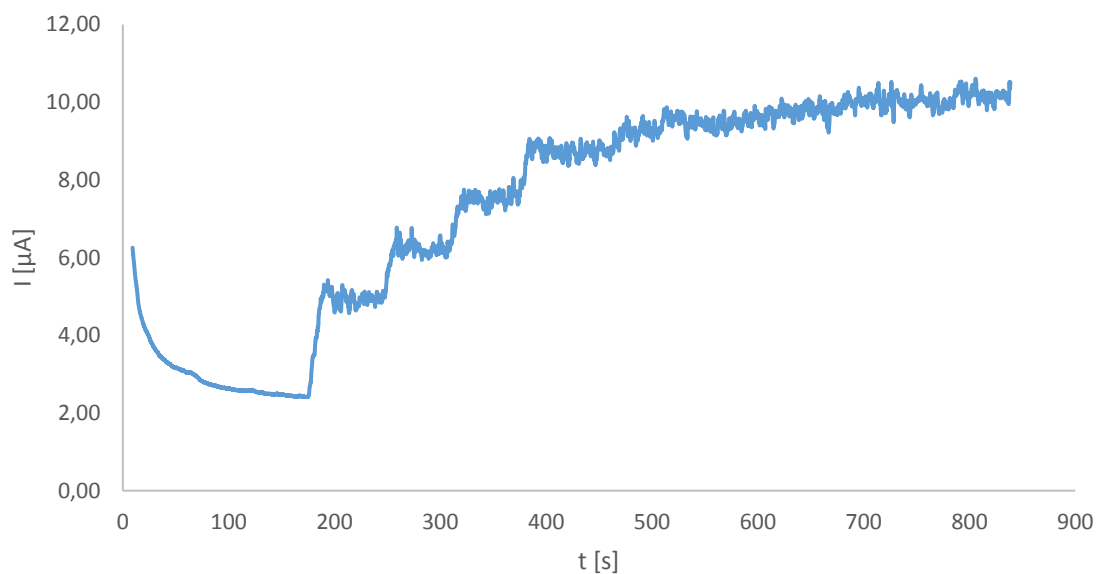
Obr. 6.13: Voltamogram biosenzoru s IL4

6.9 Amperometrická detekcia laktátu

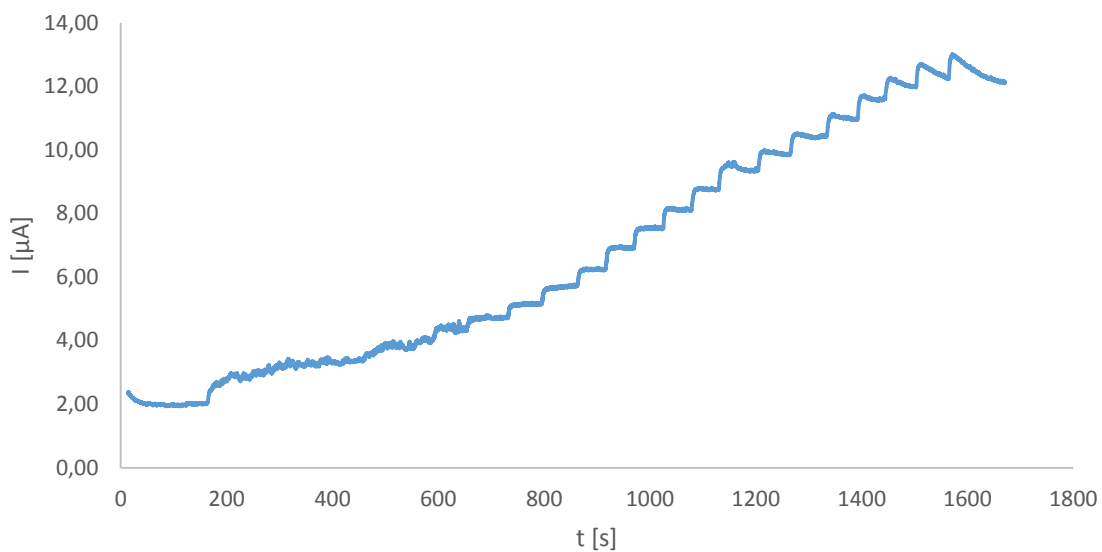
Na detekciu laktátu pomocou amperometrickej metódy bola zvolená hodnota vstupného napätia 0,9 V, ktorá bola určená z cyklickej voltametrie. Toto meranie prebiehalo v trojelektrodovom zapojení na potenciostate μ AUTOLABIII/FRA2 v 10 ml roztoku K-fosfátového pufru, ktorý bol premiešavaný elektromagnetickou miešačkou Heidolph MR 1000, ktorej rýchlosť otáčania bola nastavená na hodnote 2000 ot/min. Roztok bol premiešavaný za účelom zníženia doby odozvy biosenzoru na prítomnosť laktátu. Po ustálení prúdu pracovnej elektródy sa pomocou automatickej pipety postupne dávkoval do pufru objem kyseliny mliečnej zodpovedajúci koncentrácii v Tab. 6.3. Biosenzor s IL1 reagoval na koncentráciu kyseliny mliečnej v K-fosfátovom pufré v rozsahu 0,25 – 1,5 mmol/l (viz. obr. 6.14). Pri vyššej koncentrácii kyseliny mliečnej už nedochádzalo k zvyšovaniu prúdu. Biosenzor s IL2 bol schopný detegovať koncentráciu kyseliny mliečnej v rozsahu 4 – 36 mmol/l (viz. obr. 6.15). Pri koncentráciách 0,25 – 2 mmol/l kyseliny mliečnej síce došlo k zvýšeniu prúdu, ale tento prúd sa nemohol ustáliť a nebolo možné určiť množstvo koncentrácie v danom rozsahu. Biosenzor s IL3 bol schopný detegovať koncentráciu kyseliny mliečnej v rozsahu 6 – 33 mmol/l (viz. obr. 6.16). Biosenzor pri koncentrácii kyseliny mliečnej v rozsahu 0,25 – 4 mmol/l síce vykazoval prúdovú odozvu, ale táto prúdová odozva sa nedokázala ustáliť a postupne s časom narastala. V oblasti koncentrácie vyššej ako 36 mmol/l kyseliny mliečnej nedochádzalo u biosenzoru k ustáleniu prúdovej odozvy a po jej zvýšení dochádzalo následne k poklesu. Biosenzor s IL4 detegoval koncentráciu kyseliny mliečnej v rozmedzí 0,25 – 12 mmol/l (viz. obr. 6.17). Pri ďalšom zvyšovaní koncentrácie kyseliny mliečnej už nedochádzalo k nárastu prúdu.

Tab. 6.3: Prúdová odozva na jednotlivé typy ILs pri rôznej koncentrácii laktátu

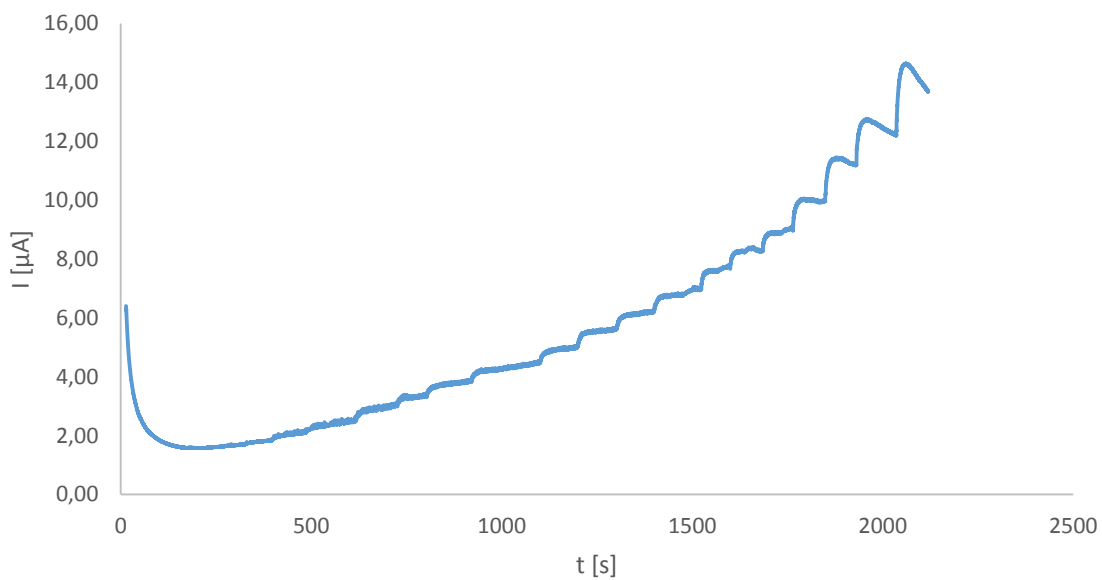
C [mmol/l]	V [μ L]	IL1 [μ A]	IL2 [μ A]	IL3 [μ A]	IL4 [μ A]
0,25	0,5	4,9	-	-	0,93
0,5	1	6,0	-	-	1,37
1	1,93	7,6	-	-	1,84
1,5	2,86	8,9	-	-	2,4
2	3,79	-	-	-	3,0
4	7,51	-	4,4	-	4,6
6	11,23	-	4,7	3,75	6,28
9	16,81	-	5,15	4,4	8,7
12	22,39	-	5,7	4,9	10,5
15	27,97	-	6,25	5,55	-
18	33,55	-	6,9	6,17	-
21	39,13	-	7,5	6,8	-
24	44,71	-	8,07	7,6	-
27	50,29	-	8,7	8,27	-
30	55,87	-	9,3	8,86	-
33	61,45	-	9,83	9,9	-
36	67,03	-	10,4	-	-



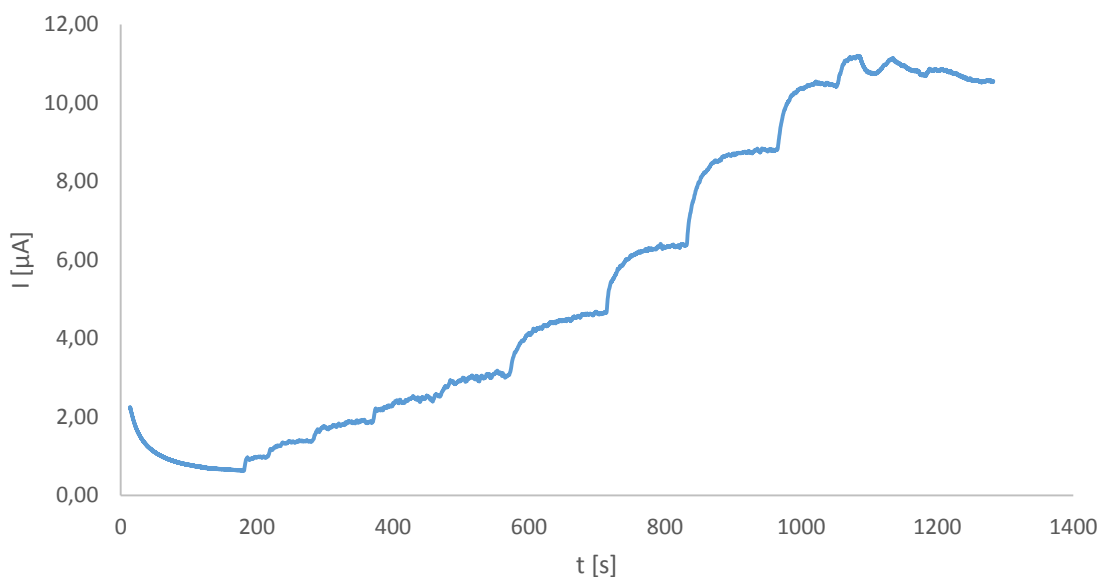
Obr. 6.14: Amperometrické meranie biosenzoru s IL1



Obr. 6.15: Amperometrické meranie biosenzoru s IL2



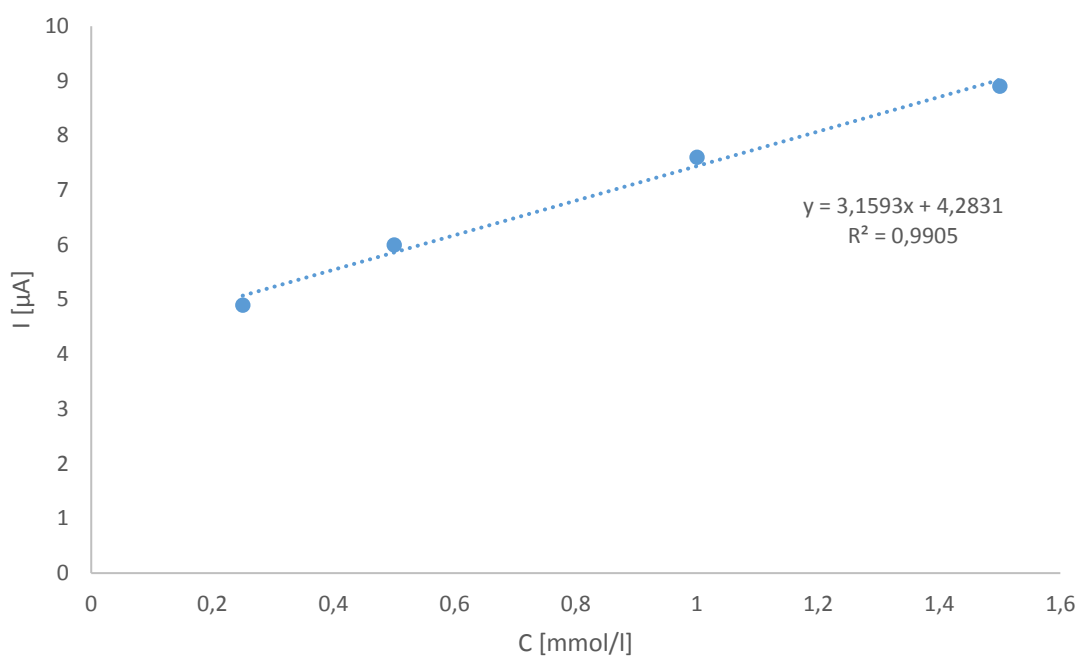
Obr. 6.16: Amperometrické meranie biosenzoru s IL3



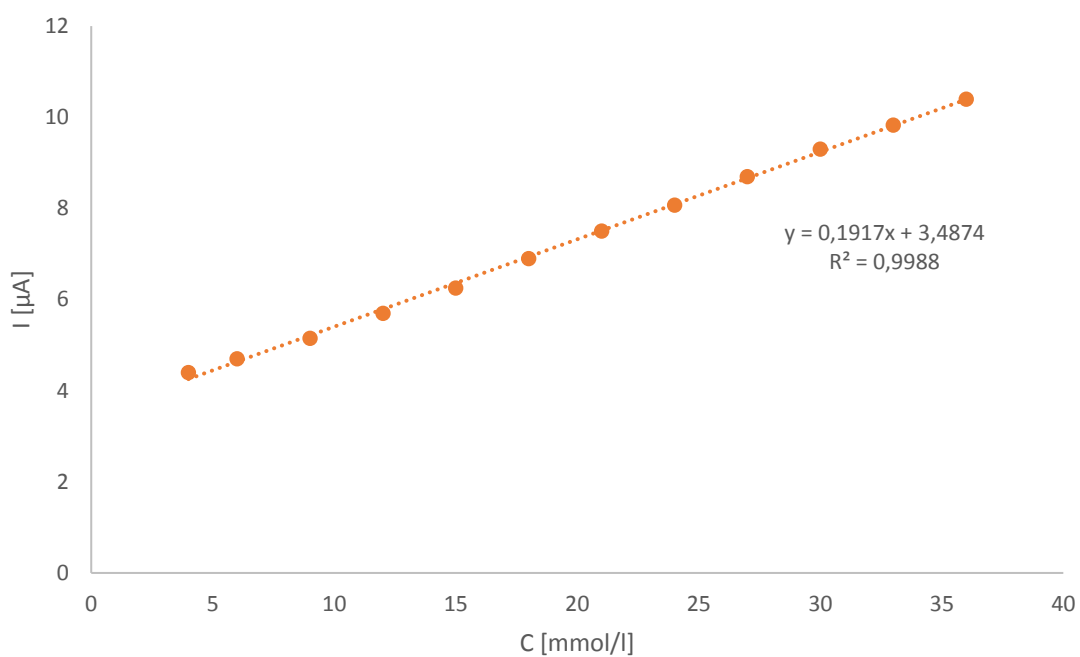
Obr. 6.17: Amperometrické meranie biosenzoru s IL4

6.10 Stanovenie kalibračných kriviek biosenzorov

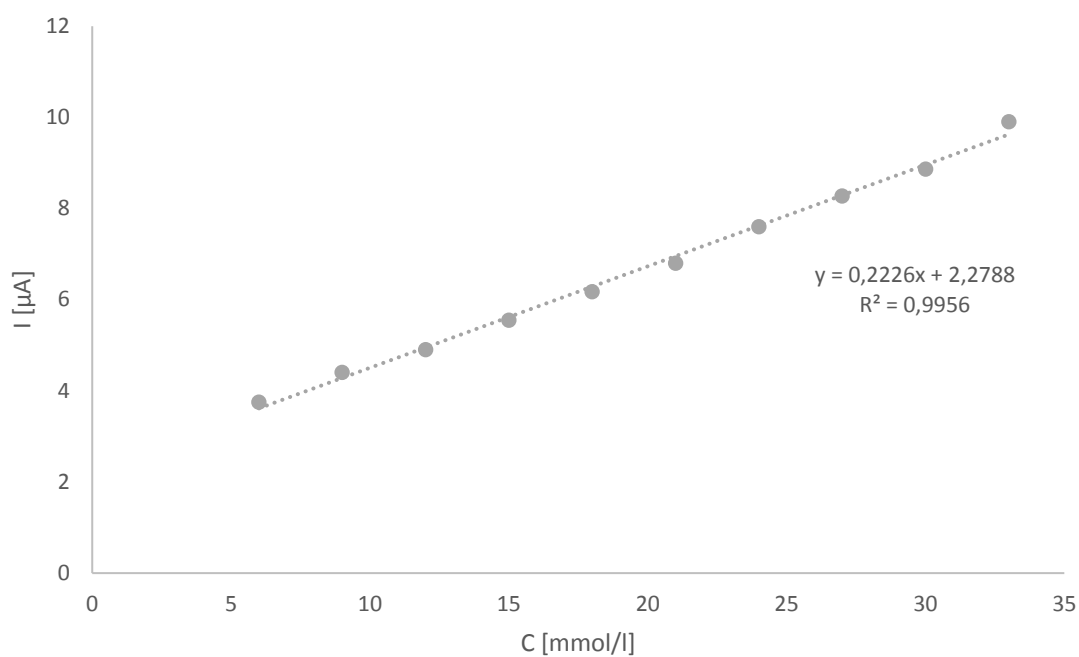
Na základe prúdovej odozvy na prítomnosť rôznej koncentrácie laktátu získanej z amperometrických meraní (viz. Tab. 6.3) boli stanovené kalibračné krivky biosenzorov s IL1-4 (viz. obr. 6.18-21) preložením lineárnej spojnice. Kalibračná krivka biosenzoru s IL1 (viz. obr. 6.18) má zo všetkých kalibračných kriviek najmenší rozsah detekovateľnej koncentrácie kyseliny mliečnej 0,25 – 1,5 mmol/l z dôvodu ustálenia prúdovej odozvy biosenzoru pri ďalšom zvyšovaní koncentrácie laktátu. A najväčší rozsah detekovateľnej koncentrácie kyseliny mliečnej má kalibračná krivka biosenzoru s IL2 (viz. obr. 6.19) v rozmedzí 4 – 36 mmol/l.



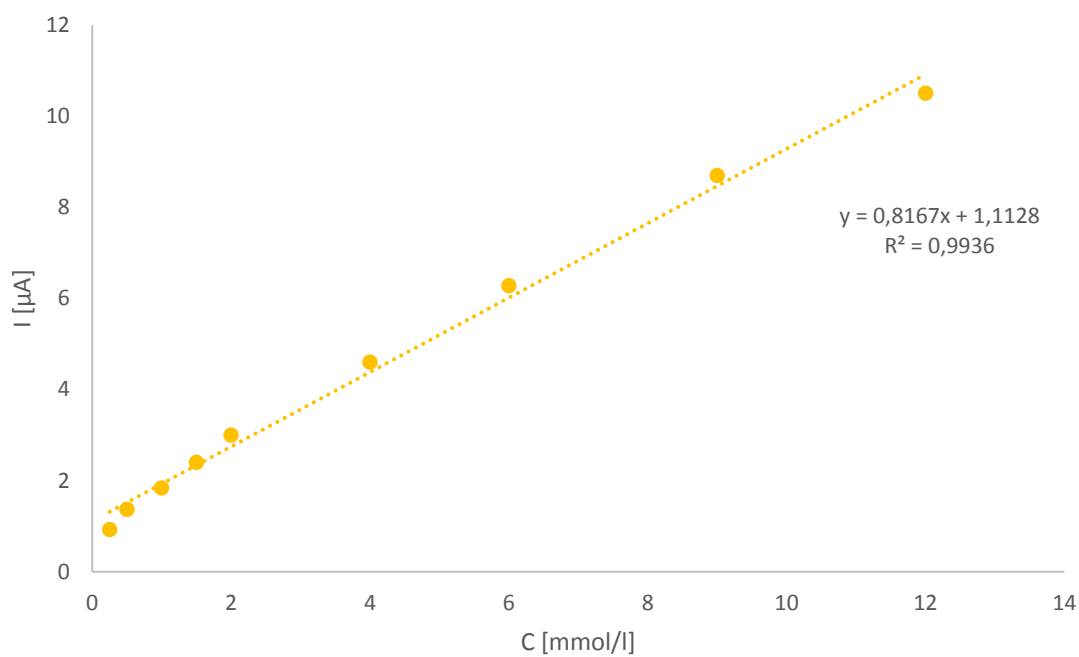
Obr. 6.18: Kalibračná krivka biosenzoru s IL1



Obr. 6.19: Kalibračná krivka biosenzoru s IL2



Obr. 6.20: Kalibračná krivka biosenzoru s IL3



Obr. 6.21: Kalibračná krivka biosenzoru s IL4

6.11 Zhodnotenie dosiahnutých výsledkov

V predloženej práci boli zhotovené celkovo 4 druhy flexibilných elektrochemických biosenzorov laktátu s rôznymi ILs. Jednotlivé ILs sa od seba líšili :

- množstvom LOD alebo BSA,
- použitím LOD s rôznou aktivitou,
- použitím glutaraldehydu s rôznou koncentráciou,
- využitím chitosanu alebo glycerolu,
- ale aj objemom nanesej citlivostnej vrstvy na povrchu pracovnej elektródy (viz. Tab. 6.1).

Pri amperometrickom meraní bol prítomný šum s veľkosťou 30 nA spôsobený elektromagnetickou miešačkou. Na základe tejto skutočnosti musela byť splnená podmienka stanovenia detekčného limitu, kedy hodnota detekčného limitu nesmie byť menšia ako trojnásobok šumu. Najväčšiu citlivosť vykazoval biosenzor s IL1 a to 3,16 $\mu\text{A}/\text{mmol}$ (viz. Tab. 6.4) avšak vo veľmi malom rozsahu 0,25 - 1,5 mmol/l s limitom detekcie 0,25 mmol/l. Biosenzor s IL4 vykazoval veľmi dobrú citlivosť 0,82 $\mu\text{A}/\text{mmol}$ a aj detekčný limit 0,25 mmol/l avšak pomerne malý rozsah 0,25 – 12 mmol/l. Sakharov a kolektív v práci [22] došli k záveru že koncentrácia laktátu môže v pote nadobúdať hodnôt 20,4 \pm 6,7 mmol/l pred cvičením a 62,2 \pm 16,3 mmol/l po cvičení. Koncentrácia laktátu v pote je podmienená viacerými faktormi a to napríklad pohlavím, vekom, pravidelnou fyzickou aktivitou apod. Na základe toho vykazujú najlepšie výsledky biosenzory s IL2 a IL3 ktoré majú široký lineárny rozsah detekcie 4 – 36 mmol/l a 6 – 33 mmol/l, ktorý ale nepostačuje na snímanie koncentrácie laktátu v pote pri ťažkej fyzickej záťaži. Biosenzory s IL2 a IL3 majú pomerne postačujúcu citlivosť a to 0,19 $\mu\text{A}/\text{mmol}$ a 0,22 $\mu\text{A}/\text{mmol}$ a ich detekčný limit je 4 mmol/l a 6 mmol/l. Malý detekčný limit pri snímaní koncentrácie laktátu z potu človeka nie je rozhodujúci parameter, pretože každý človek ma v pokoji určité množstvo laktátu v pote, ktoré môže nadobúdať hodnôt 20,4 \pm 6,7 mmol/l.[22]

Tab. 6.4: Statické vlastnosti vytvorených biosenzorov laktátu

Biosenzor	Detekčný limit [mmol/l]	Linearita [mmol/l]	Citlivosť [$\mu\text{A}/\text{mmol}$]
IL1	0,25	0,25 - 1,5	3,16
IL2	4	4 - 36	0,19
IL3	6	6 - 33	0,22
IL4	0,25	0,25 - 12	0,82

7 ZÁVER

Predložená bakalárska práca je venovaná oblasti senzoričky, kde pojednáva o základnej podstate senzorov a princípoch ich fungovania. Sensory sú následne klasifikované na základe niekoľkých hľadísk, a to:

- nosič informácie,
- druh snímanej veličiny,
- správanie sa na výstupe
- spôsobu interakcie s meraním prostredím.

Ďalšia časť práce bližšie rozoberá a popisuje senzory snímajúce látky z potu človeka. Pojednáva o senzoroch založených na princípe OFET, OECT a elektrochemických senzoroch. Nasledovná časť práce je venovaná elektroanalytickým metódam použitých v experimentálnej časti. Konkrétne bola použitá cyklická voltametria a amperometria. V závere teoretickej časti sú popísané hrubovrstvové a tenkovrstvové technológie vytvárania uvádzaných senzorov.

Experimentálna časť obsahuje návrh a technologický postup výroby flexibilných trojelektrodových elektrochemických biosenzorov laktátu so 4 rôznymi citlivostnými vrstvami. Technologický postup výroby pozostával z kombinácie hrubovrstvových (sieťotlač) a tenkovrstvových (spray-coating, drop-coating) technológií. Biosensory boli vytvorené na troch rôznych flexibilných substrátoch a to FR4, Folanorm a PE. Povrch pracovných elektród bol modifikovaný suspenziou MWCNTs/DMF pomocou technológie spray coatingu. Na takto modifikované pracovné elektródy boli vytvorené citlivostné vrstvy IL1-4 pomocou technológie drop coating, imobilizovaním enzýmu laktát oxidázy. Pomocou cyklickej voltametrie bol stanovený oxidačný potenciál laktát oxidázy na hodnotu 0,9 V, ktorý bol nastavený počas všetkých amperometrických meraní. Na základe nastavenej malej hodnoty maximálneho napätia (1 V) pri cyklickej voltametrii bol nevhodne zvolený oxidačný potenciál laktát oxidázy, ktorý v skutočnosti bol o niečo vyšší ako 0,9 V. Amperometrické stanovenia koncentrácie laktátu by v prípade nastavenia vyššieho pracovného potenciálu dosahovali vyššej prúdovej odozvy pri prítomnosti laktátu a zvýšila by sa citlivosť biosenzorov. Najlepšie výsledky pre snímanie koncentrácie laktátu z potu človeka dosahujú biosensory s IL2 a IL3, ktoré dokážu snímať koncentráciu laktátu v rozsahu 4 – 36 mmol/l a 6 – 33 mmol/l. Ich detekčný limit je 4 mmol/l a 6 mmol/l a citlivosť 0,19 $\mu\text{A}/\text{mmol}$ a 0,22 $\mu\text{A}/\text{mmol}$. Kvôli malému rozsahu však nepostačujú na snímanie koncentrácie laktátu z potu človeka.

LITERATÚRA

- [1] HUBÁLEK, J.; DRBOHLAVOVÁ, J.; PRÁŠEK, J.; BUŠINOVÁ, P.; BENDOVIÁ, M. *Mikrosenzory a mikromechanické systémy*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2012
- [2] KRÁL, V.; KRONĎÁK, M.; ŠŤASTNÝ M.; VOLF, R.; BRONCOVÁ, G.; SHISHKANOV, T.; HLÁVKA, K.; KEJÍK, Z.: *Senzory*, VŠCHT Praha, ISBN 978-80-86238-20-3.
- [3] THÉVENOT, R. T.; TOTH, K.; DURST, A. R.; WILSON, S. G.: Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification, *PureAppl.Chem.*, Vol. 71, No. 12, s. 2333-2348, 1999 IUPAC.
- [4] *Chemické senzory a biosenzory*. [online]. [cit. 11.11.2016]. Dostupné z : http://measure.feld.cvut.cz/system/files/files/cs/vyuka/predmety/A3B38SM E/11_chemicke%20senzory%20t ext.pdf.
- [5] *Biosensory*. [online]. [cit. 6.6.2017]. Dostupné z : <http://orion.chemi.muni.cz/pskl/vyuka/bio sensory.pdf>.
- [6] LIN, P., YAN, F. *Organic Thin-Film Transistors for Chemical and Biological Sensing*. *Adv. Matererials*. 2012, vol. 24, issue 1, s. 34–51. doi:10.1002/adma.201103334
- [7] EHLICH, J. *Příprava organických elektrochemických tranzistorů pro biosenzoriku*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie, 2015. 48s. Bakalárska práca. Vedúci práce: doc. Ing. OTA SALYK, CSc.
- [8] CAIZHI, L., FENG, Y. *Organic Semiconductors in Organic ThinFilm Transistor-Based Chemical and Biological Sensors*, *Polymer Reviews*. 2013, vol. 53, issue 3, s. 352-406. DOI: 10.1080/15583724.2013.808665
- [9] ZERZÁNKOVÁ, L. *Elektrochemické studium bází nukleových kyselin na grafitových elektrodách v přítomnosti mědi*. Brno: Masaryková univerzita, Přírodovědecká fakulta. Ústav fyziky kondenzovaných látek, 2007. 83 s. Diplomová práce. Vedúci práce: RNDr. Libuše Trnková, CSc.
- [10] MARKUŠOVÁ, K. *VOLTAMPÉROMETRIA S LINEÁRNE PREMENNÝM POTENCIÁLOM A CYKLICKÁ VOLTAMPÉROMETRIA (CVA)*. [online]. [cit. 13.12. 2015]. Dostupné z : http://archiv.eurochem.cz/polavolt/obecne/zaklady/markusova/elektrochem_met/02/02.htm < > .
- [11] KUBESA, O. *Sledování enzymů a enzymových směsí pro stanovení alkoholu a glycerolu ve víně*. Brno: Masaryková univerzita, Přírodovědecká fakulta. Ústav biochemie, 2010. 55 s., 2 s. příloh. Bakalárska práca. Vedúci práce: Mgr. Jiří Ťeravík, Ph.D.
- [12] GURECKÝ, Libor. *Elektroanalytická a spektrální studie oligonukleotidů bohatých na cytosin a guanin* [online]. Brno, 2013 [cit. 2017-06-07]. Dostupné z : <<http://theses.cz/id/x94j8c/>>. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce doc. RNDr. Libuše Trnková, CSc.
- [13] BUJALOBOKOVÁ, M. a TRNKA, P. *Progresivní tlustovrstvé technologie v elektronických aplikacích*. [online]. [cit. 22.10.2016]. Dostupné z : <http://www.odbornecasopisy.cz/elektro /casopis/tema/progresivni-tlustovrstvetehnologie-v-elektronickyh-aplikacich--11693>.
- [14] FELD, M. *Tlusté vrstvy-tisk, vytvrzení, měření*. [online]. [cit. 25.10.2016] Dostupné z : <http://martin.feld.cvut.cz/~pelikano/vyuka/EMT/tlustvrsvy.pdf>

- [15] LEE, M.S., MEYER, J.U. *A new process for fabricating CO₂ sensing layers based on BaTiO₃ and additives*. *Sensors Actuators B*. 2000, vol 68, issue 3, s. 293–299. DOI: 10.1016/S0925-4005(00)00447-0
- [16] SZENDIUCH, I. *Laboratorní cvičení - realizace hybridního integrovaného obvodu*. [online]. [cit. 7.12.2015]. Dostupné z: <https://moodle.vutbr.cz/pluginfile.php/190407/mod_resource/content/1/LC1_navod.pdf>.
- [17] SZENDIUCH, I. *Mikroelektronika a technologie součástek*. Vyd. 1. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Ústav mikroelektroniky, 2009, 190 s. ISBN 9788021439603.
- [18] ADÁMEK, M. *Technologie výroby a používané materiály*. [online]. [cit. 1.12.2016]. Dostupné z: http://www.umel.feec.vutbr.cz/~adamek/uceb/DATA/s_2_2_2.htm.
- [19] JIA, Wenzhao, Amay J. BANDODKAR, Gabriela VALDÉS-RAMÍREZ, Joshua R. WINDMILLER, Zhanjun YANG, Julian RAMÍREZ, Garrett CHAN a Joseph WANG. *Electrochemical Tattoo Biosensors for Real-Time Noninvasive Lactate Monitoring in Human Perspiration*. *Analytical Chemistry* [online]. 2013, 85(14), 6553-6560 [cit. 2016-12-5]. DOI: 10.1021/ac401573r. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac401573r>.
- [20] *Laktát*. [online]. [cit. 11.11.2016]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1411/jaro2008/BLKB0322p/um/Skripta_opravy.pdf.
- [21] KOTAČKOVÁ, L. *Laktát*. [online]. [cit. 11.11.2016]. Dostupné z: <http://www.toplekar.cz/laboratorni-hodnoty/laktat.html?znak=L>.
- [22] SAKHAROV, D. A., M. U. SHKURNIKOV, M. Yu. VAGIN, E. I. YASHINA, A. A. KARYAKIN a A. G. TONEVITSKY. *Relationship between Lactate Concentrations in Active Muscle Sweat and Whole Blood*. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* [online]. 2010, 150(1), 83-85 [cit. 2016-12-15]. DOI: 10.1007/s10517-010-1075-0. ISSN 0007-4888. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10517-010-1075-0>
- [23] RATHEE, Kavita, Vikas DHULL, Rekha DHULL a Sandeep SINGH. *Biosensors based on electrochemical lactate detection: A comprehensive review*. *Biochemistry and Biophysics Reports* [online]. 2016, 5, 35-54 [cit. 2016-11-11]. DOI: 10.1016/j.bbrep.2015.11.010. ISSN 24055808. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405580815001302>.
- [24] LUO, Xi-Liang, Jing-Juan XU, Ying DU a Hong-Yuan CHEN. *A glucose biosensor based on chitosan–glucose oxidase–gold nanoparticles biocomposite formed by one-step electrodeposition*. *Analytical Biochemistry* [online]. 2004, 334(2), 284-289 [cit. 2017-06-01]. DOI: 10.1016/j.ab.2004.07.005. ISSN 00032697. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269704005998>
- [25] GALUSZKA, Petr a Lenka LUHOVÁ. *Laboratorní technika pro biochemiky*. Olomouc: Univerzita Palackého, 2003. ISBN 80-244-0640-3.

ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

OFET	Organický pol'om riadený tranzistor
OECT	Organický elektrochemický tranzistor
OTFT	Organický tenkovrstvový tranzistor
LOD	Laktát oxidáza
MWCNTs	Multistenové karbónové nanotrúbky
BSA	Hovädzí sérový albumín
DMF	N,N-dimetylformamid
PE	Polyetylén
IL	Immobilized layer
K_2HPO_4	Hydrogenfosforečnan draselný
KH_2PO_4	Dihydrogenfosforečnan draselný
UV	Ultrafialové
H_2O	Voda
I_L	Limitný prúd
F	Faradayova konštanta (98,485 C/mol)
n	Počet elektrónov u jednej molekuly
A	Povrch elektródy
c_R^b	Počiatková koncentrácia redukovateľného analytu R
D_R	Difúzny koeficient
t	Čas
O_2	Kyslík
H_2O_2	Peroxid vodíka
M	Jednotka molárnej koncentrácie – molarita
M_R	Molekulová hmotnosť
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
CuPc	Ftalocyanín meďe
PANI	Polyanilín

ZOZNAM PRÍLOH

A Motív trojelektrodového systému v programe Eagle (CD)

B Motív šablóny v programe Eagle (CD)