

Elektrochemické senzory

Bez elektrochemické transformace analyzované látky

Konduktometrické

Impedimetrické

Zahrnující elektrochemickou transformaci

Potenciometrické ($I=0$)

ISE

S vnitřním elektrolytem

Coated wire

FED

LAPS

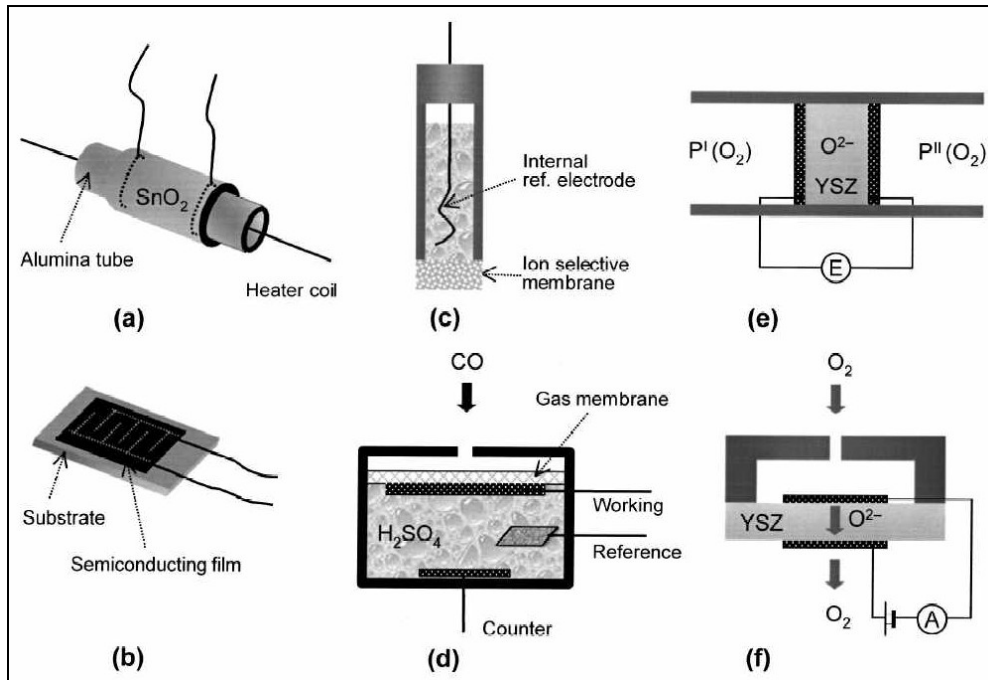
Amperometrické ($I < > 0$)

S membránou a vnitřním elektrolytem

S membránou

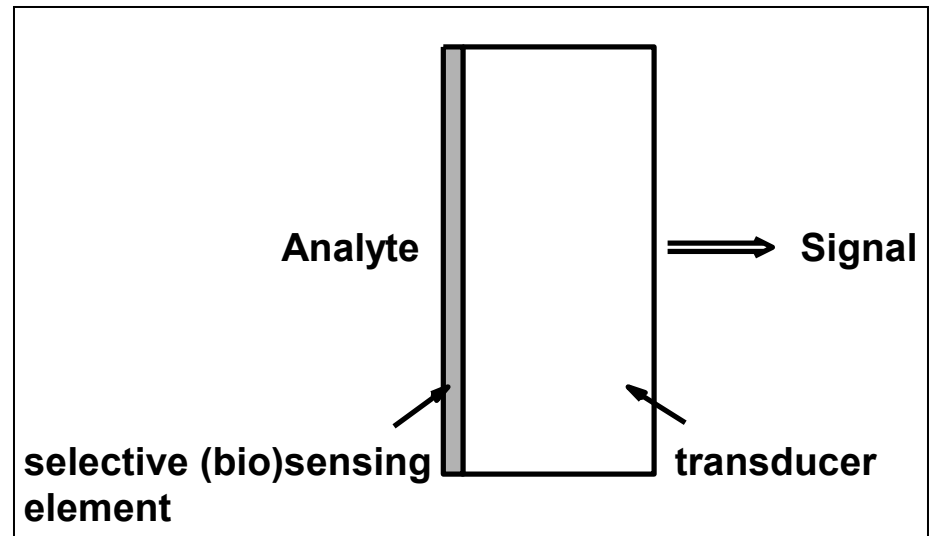
Elektrokatalytické

Mikroelektroodové



Požadavky kladené na senzory

- Vysoký stupeň specifity k cílovému analytu (resp. cílové skupině analytů)
- Stabilita při provozních podmínkách (teplota, pH, iontová síla)
- Opakovatelnost měření
- Bez kontaminace měřeného vzorku
- Reprodukovatelnost přípravy
- Doba odezvy
- Snadná údržba
- Nízká cena a vysoká doba života



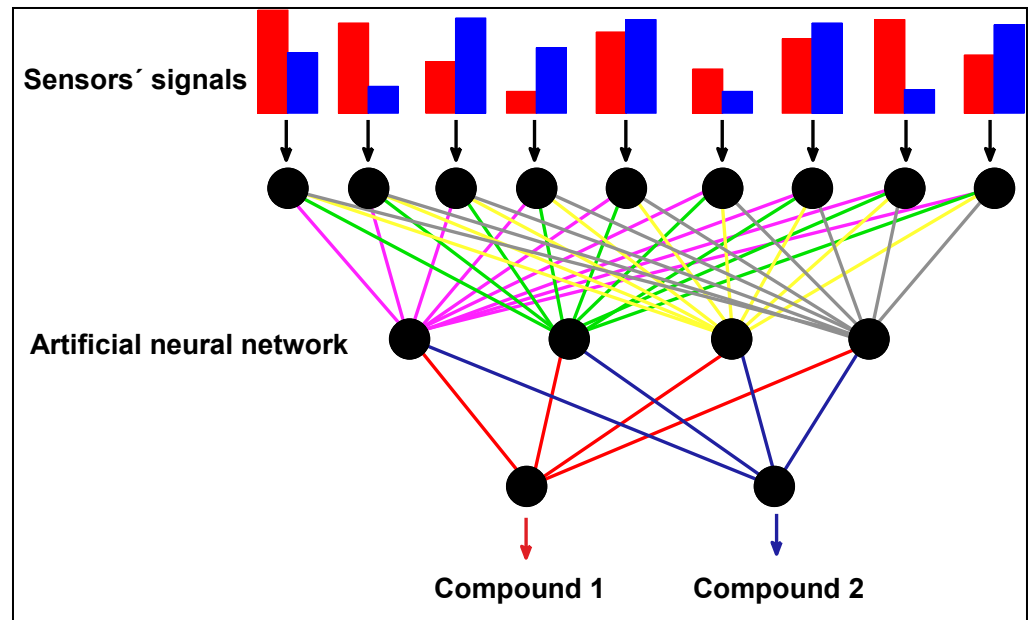
Specifikace senzoru

▪ **Citlivost** je změna signálu senzoru (po ustálení odezvy) v důsledku změny koncentrace analytu $S = \frac{dI_{out}}{dI_{in}}$

▪ **Detekční limit** (změna koncentrace analytu, která způsobí měřitelnou odezvu, $S/N=3$)

▪ **Selektivita:** Schopnost senzoru měřit pouze jeden parametr, u chemických sloučenin pouze jeden analyt.

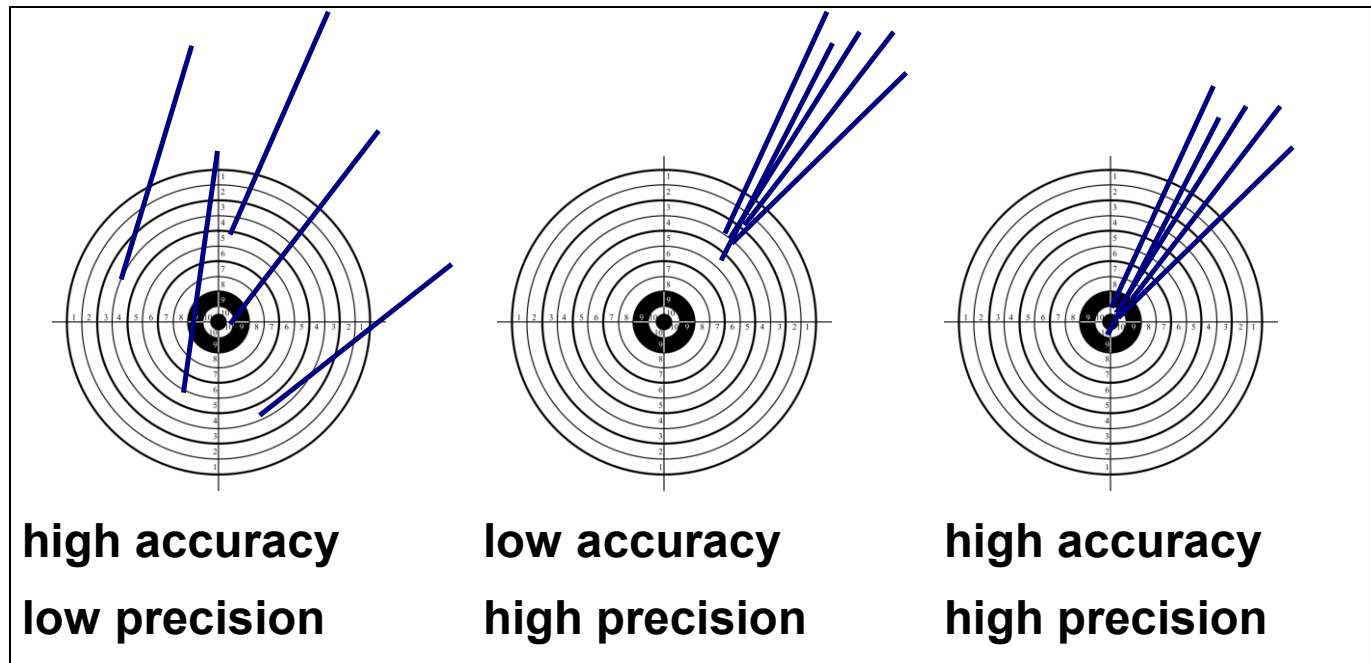
Senzory, které nejsou perfektně selektivní mohou být zapojeny do sensorových polí, analýza signálu využívá metod umělé inteligence.



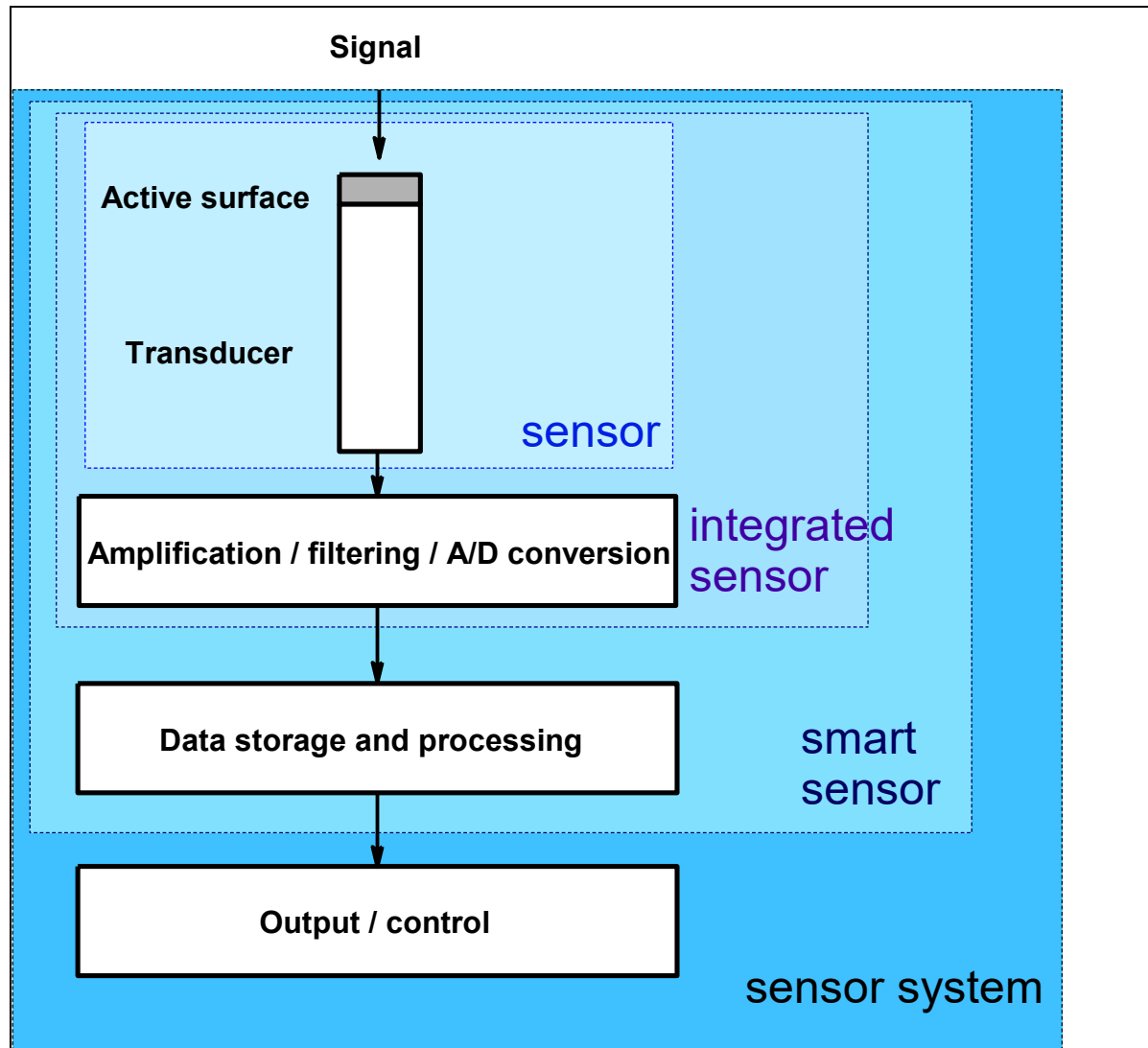
Pravdivost, přesnost, správnost

- **Správnost (accuracy):** Stupeň shody, se kterou měřicí systém poskytuje „opravdovou“ hodnotu měřené veličiny (vyjadřována ve formě odchylky, systematické chyby).
- **Přesnost (precision):** Rozdíl hodnot poskytovaných měřicím systémem při opakování měření (vyjadřována směrodatnou odchylkou).

Správnost + přesnost = pravdivost

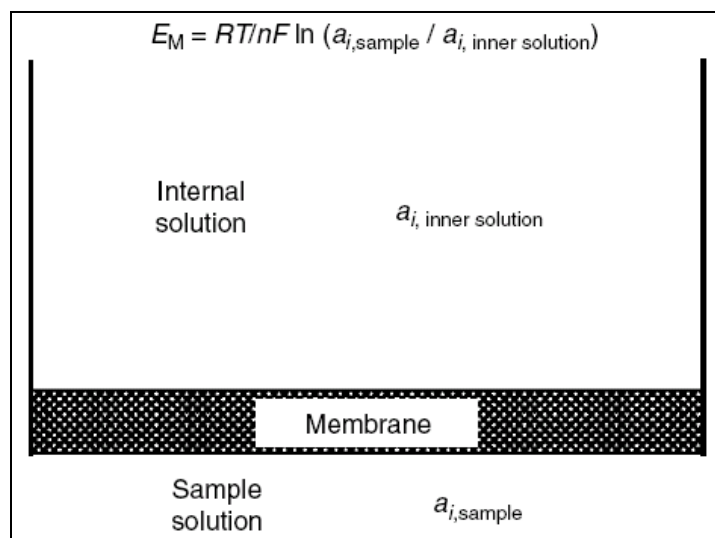


Integrace senzoru s elektronikou

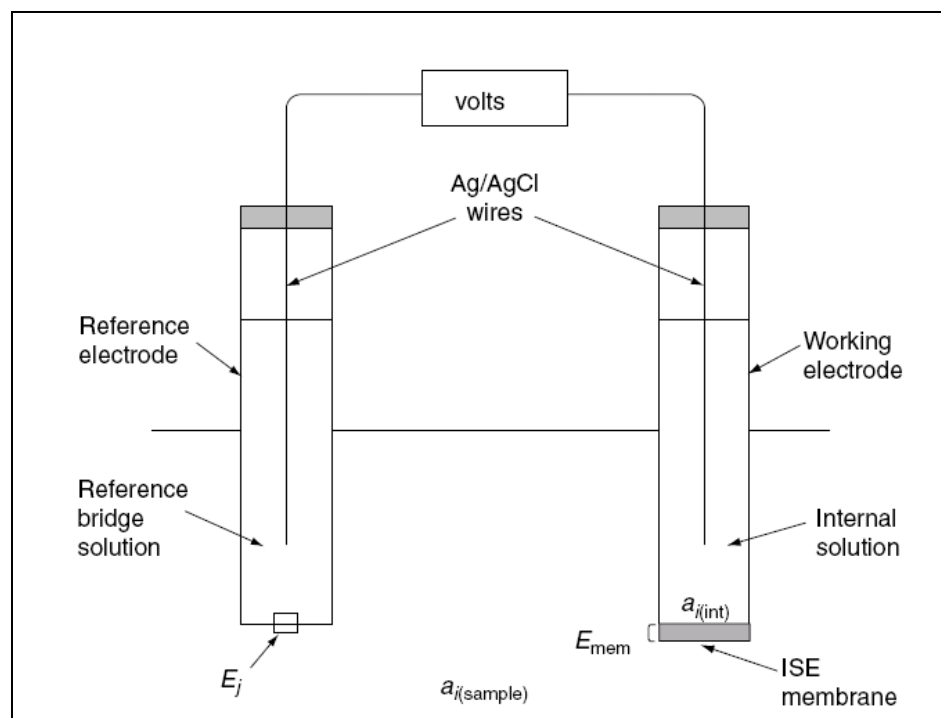


Potenciometrické senzory

- Vyžadují senzor a referentní elektrodu.
- Potenciál mezi nimi je měřen (mili)voltmetrem s (velmi) vysokým vstupním odporem.
- Široce využívány ve formě **iontově selektivních elektrod**.
- Lineární odezva na logaritmus koncentrace testované látky.



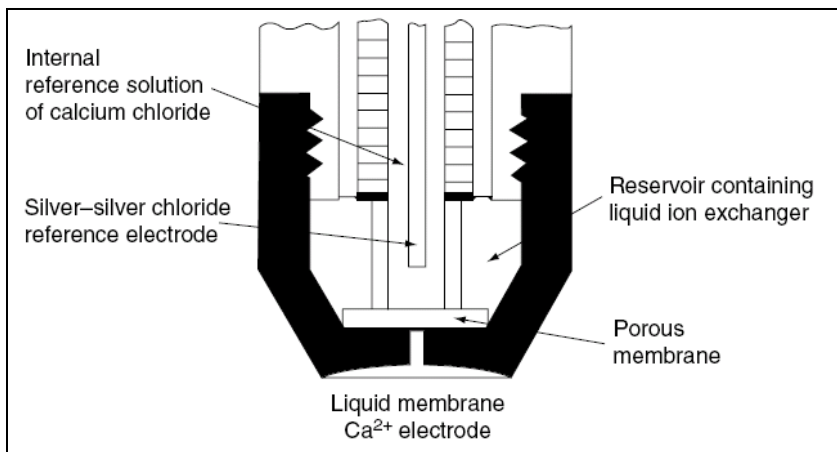
Membránový potenciál reflektuje gradient aktivity iontů analytu ve vnitřním a vnějším (měřeném) roztoku.



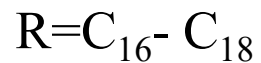
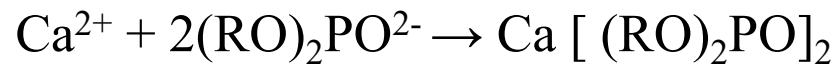
- pro konstrukci ISE je klíčové najít materiál, který je schopen selektivně vázat analyt
- tento materiál je inkorporován do membrány, která musí být vodivá (alespoň trochu).

Membrány:

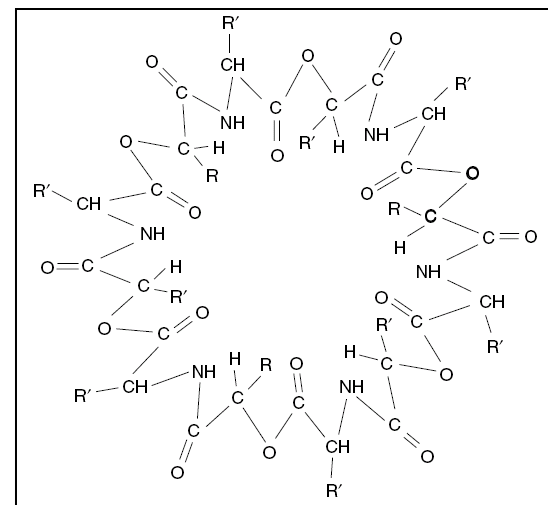
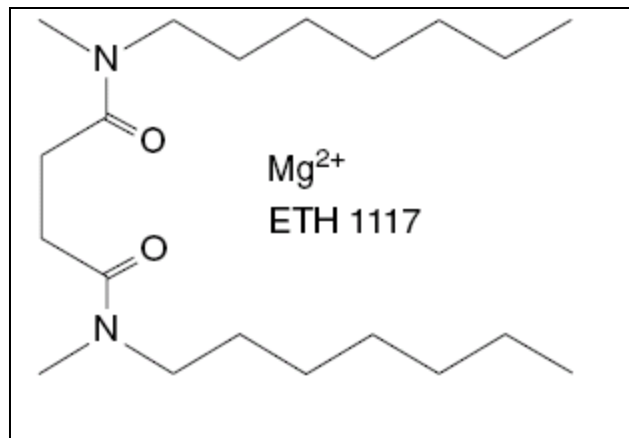
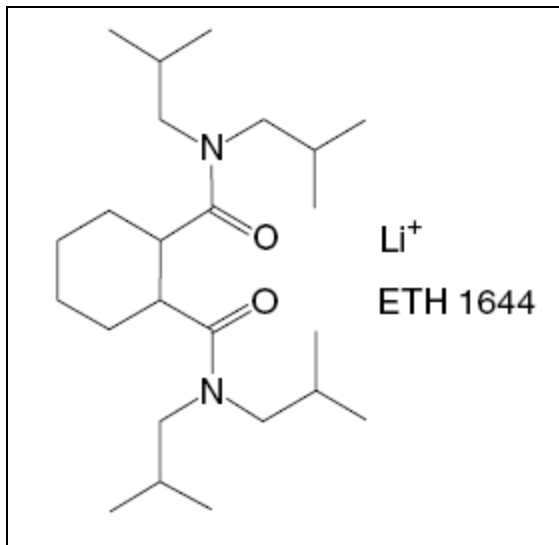
- **skleněné** (H^+ , pro ostatní kationty speciální skla (přídavek Al_2O_3 nebo B_2O_3 umožňuje navázání jiných kationtů než H^+ (Na^+ , Li^+ , NH_4^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ a Ag^+))
- **krystalické membrány** (monokrystal nebo homogenní směs rozpráškovaného materiálu slisovaná pod vysokým tlakem P, $d \sim 10$ mm, šířka: 1-2 mm. Vodivost: dopování nebo nestechiometrie, Ag^+ v $AgCl$ nebo Ag_2S , Cu^+ v Cu_2S . Fluoridová Elektroda: stanovení F^- , LaF_3 krystal dopovaný EuF_2).
- **kapalné membrány** (organické s vodou nemísitelné kapaliny, kterými je napuštěna pórovitá (PVC) membrána s iontověměničovými vlastnostmi nebo neutrální makrocyclické sloučeniny schopné selektivně navázat analyt v jejich kavitách)



Ca²⁺ elektroda

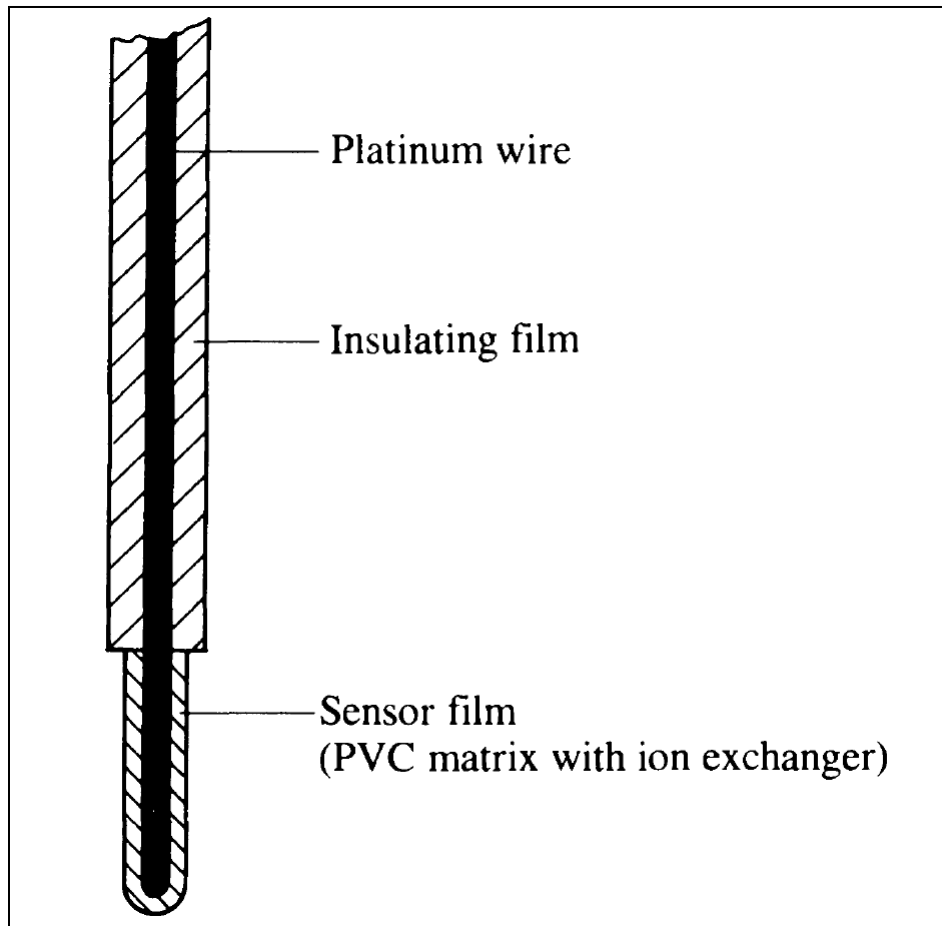


K⁺ elektroda - valinomycin



„Coated wire“ potenciometrické senzory

Iontově selektivní membrána je přímo nanесena na vodivý substrát



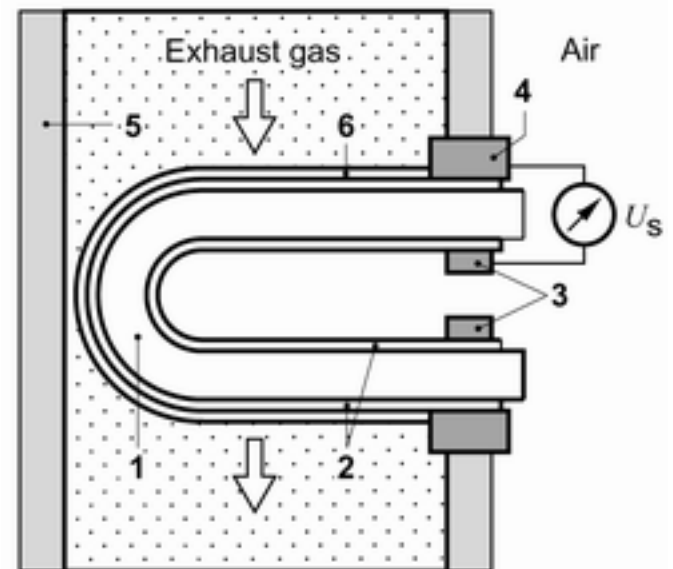
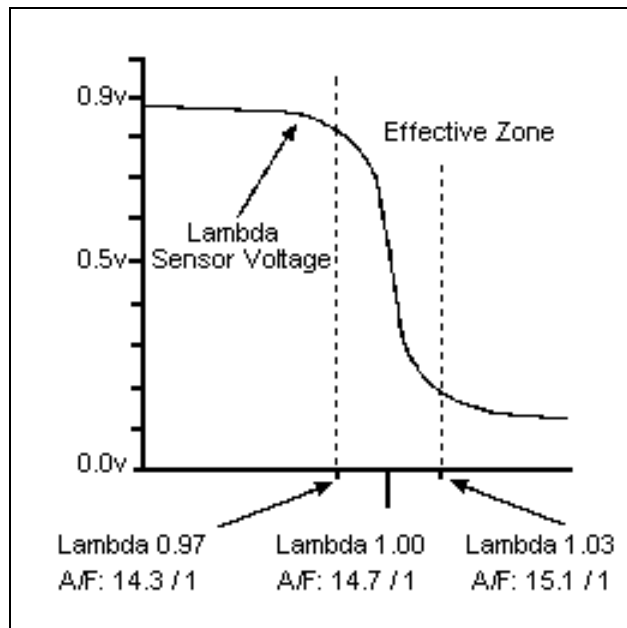
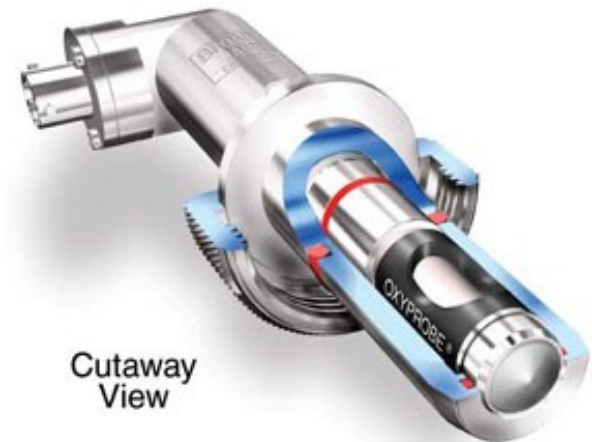
CWE může být zlepšena vložením vrstvy vodivého polymeru mezi kovovou elektrodu a iontově selektivní vrstvou. Na tuto modifikaci lze nahlížet jako na náhradu vnitřního elektrolytu tradiční ISE.

Další zjednodušení je přímá inkorporace rekogničního elementu do polymerní vrstvy.

Detailní teorie činnosti těchto zařízení neexistuje.

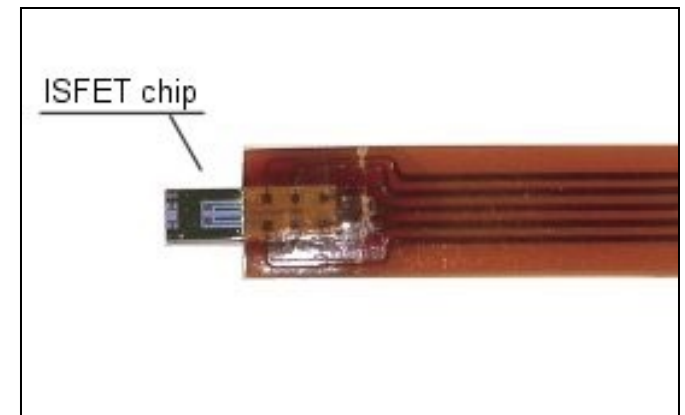
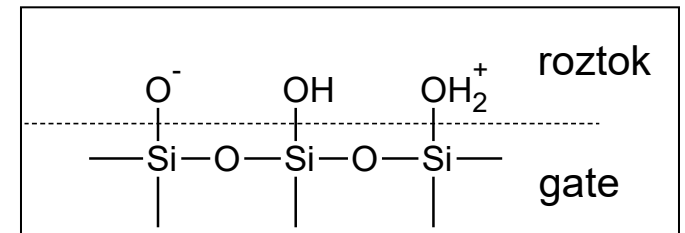
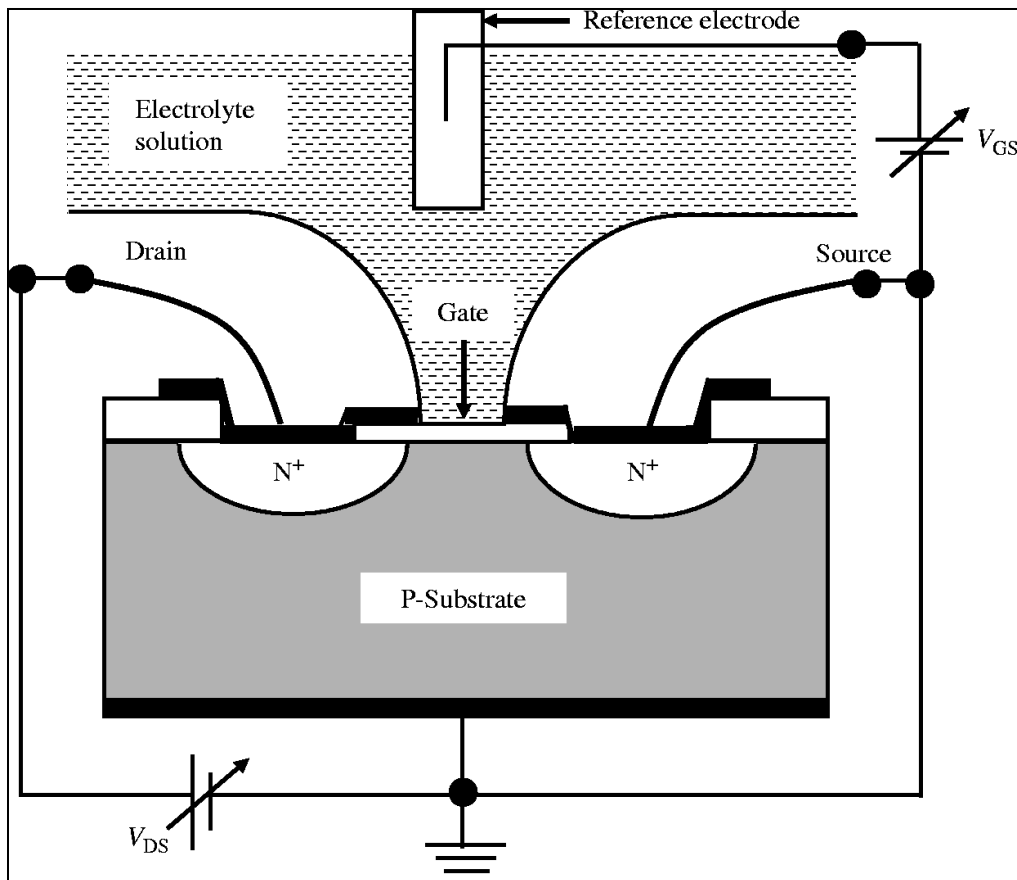
Lambda sonda

- Potenciometrický senzor podobný pH elektrodě
- Membrána je z ZrO_2 , pracovní teplota je $350^\circ C$
- Elektrody jsou z porézní platiny
- $\lambda < 1$: bohatá směs



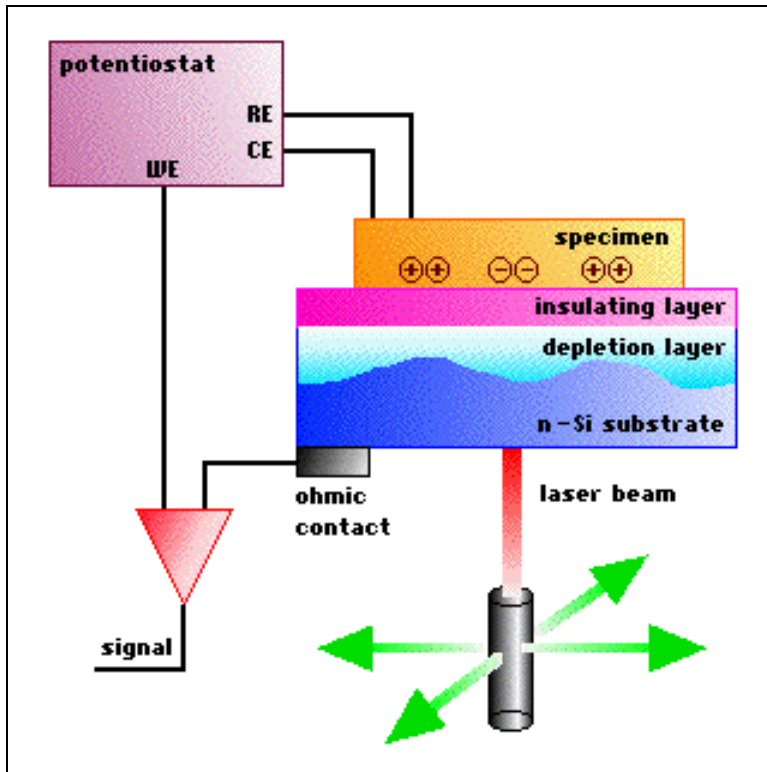
ISFET

ISFET = ion selective field effect transistor



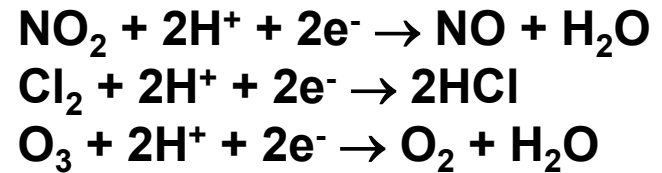
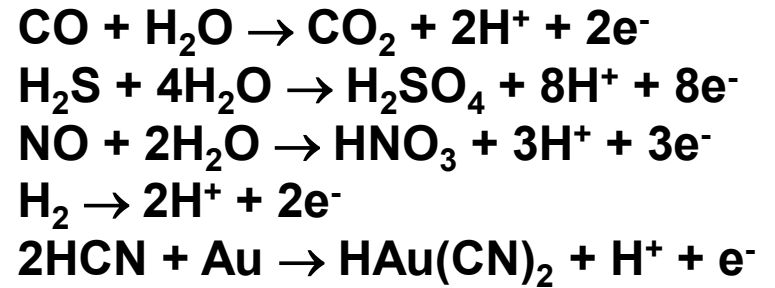
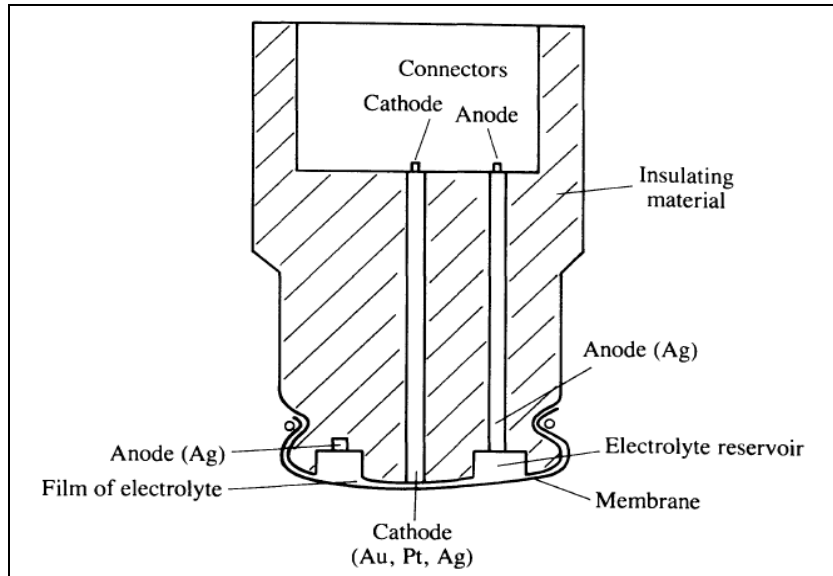
LAPS senzor

LAPS = light addressable potentiometric sensor

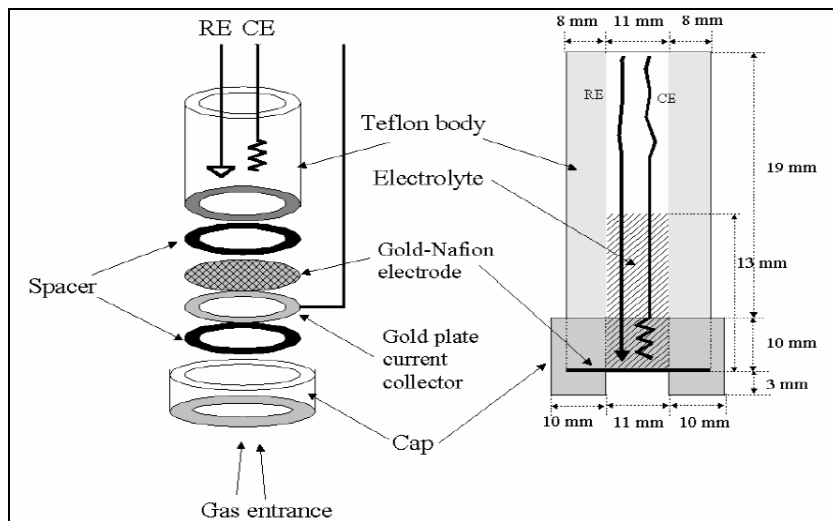


- čip má jen jeden kontakt (nevyžaduje přívody ze strany měřeného roztoku)
- ozářením modulovaným IR světlem dojde ke vzniku fotoproudu, který je ovlivněn nábojem na povrchu senzoru
- poziční citlivost (2D zobrazení)
- inherentní pH citlivost SiO_2 (Ta_2O_5 aj.) povrchu nebo běžné IS membrány

Amperometrické senzory s předřazenou membránou



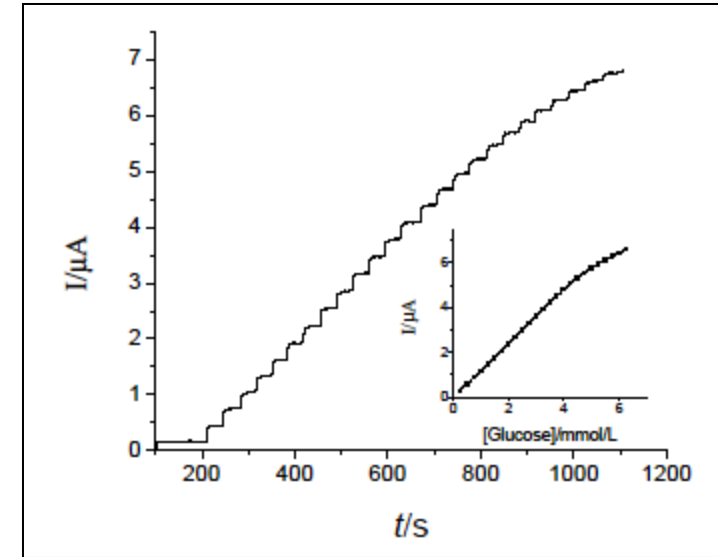
Clarkova kyslíková elektroda



Amperometrické senzory - biosenzory

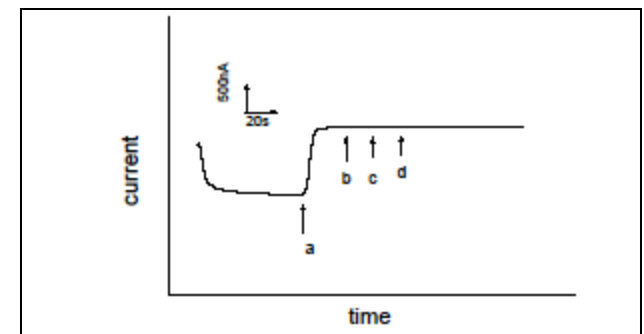


Prof. Leland C. Clark
Father of biosensors
1918-2005



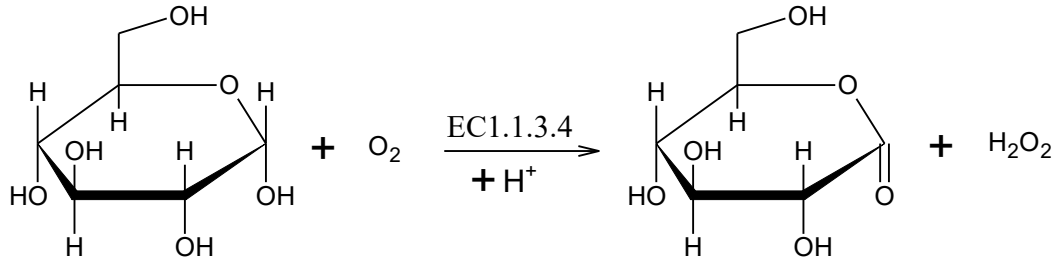
In 1956, Clark published his definitive paper on the oxygen electrode.

In 1962, he described "how to make electrochemical sensors more intelligent" by adding "enzyme transducers as membrane enclosed sandwiches".

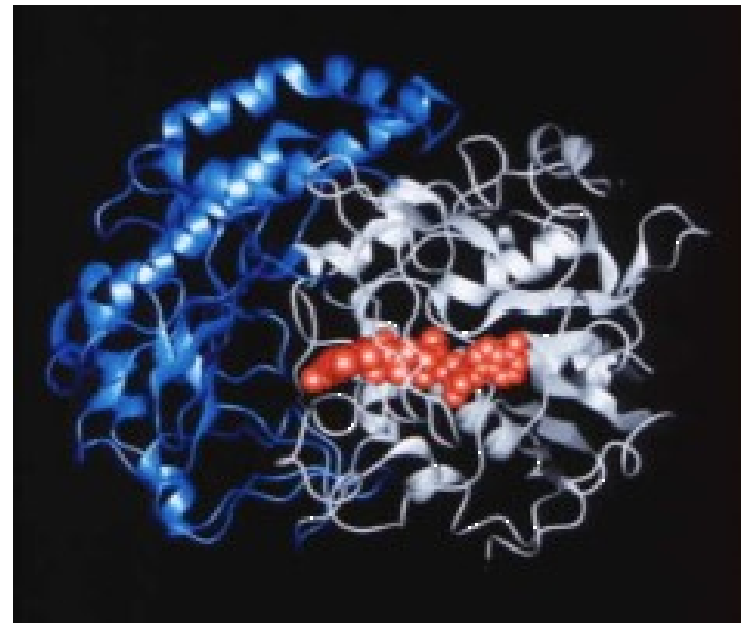
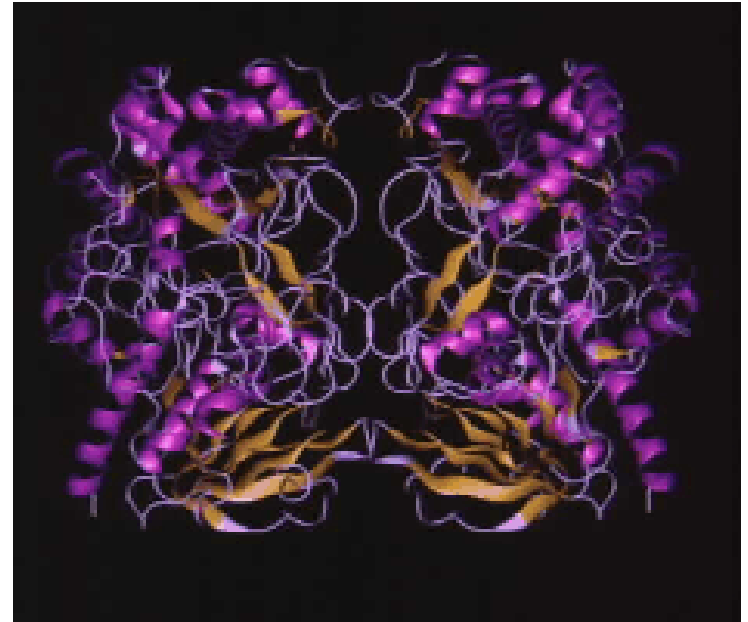


Glukosa oxidasa (EC1.1.3.4)

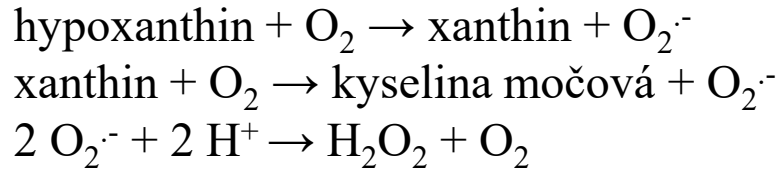
"A much used and much loved enzyme in biosensors"



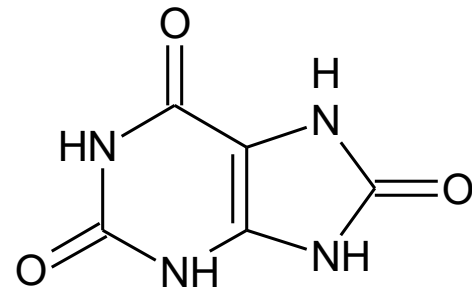
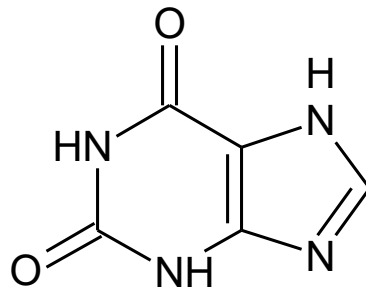
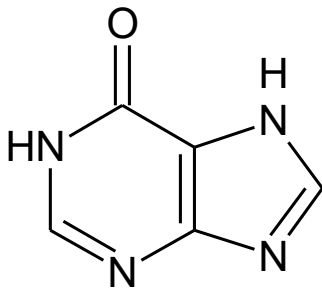
- holoenzym je tvořen dvěma identickými podjednotkami (80kDa)
- jedna podjednotka obsahuje FAD, druhá váže glukosu
- obsahuje FAD jako kofaktor
- levný, dostupný v gramových množstvích
- glykoprotein
- odolný – optimum 70°C
- mezi 20 a 30°C aktivita téměř nezávisí na teplotě
- nachází se např. na povrchu medu, kde reaguje s glukosou a kyslíkem, vzniklý peroxid vodíku působí antimikrobiálně



Xanthin oxidasa (1.14.21.1)



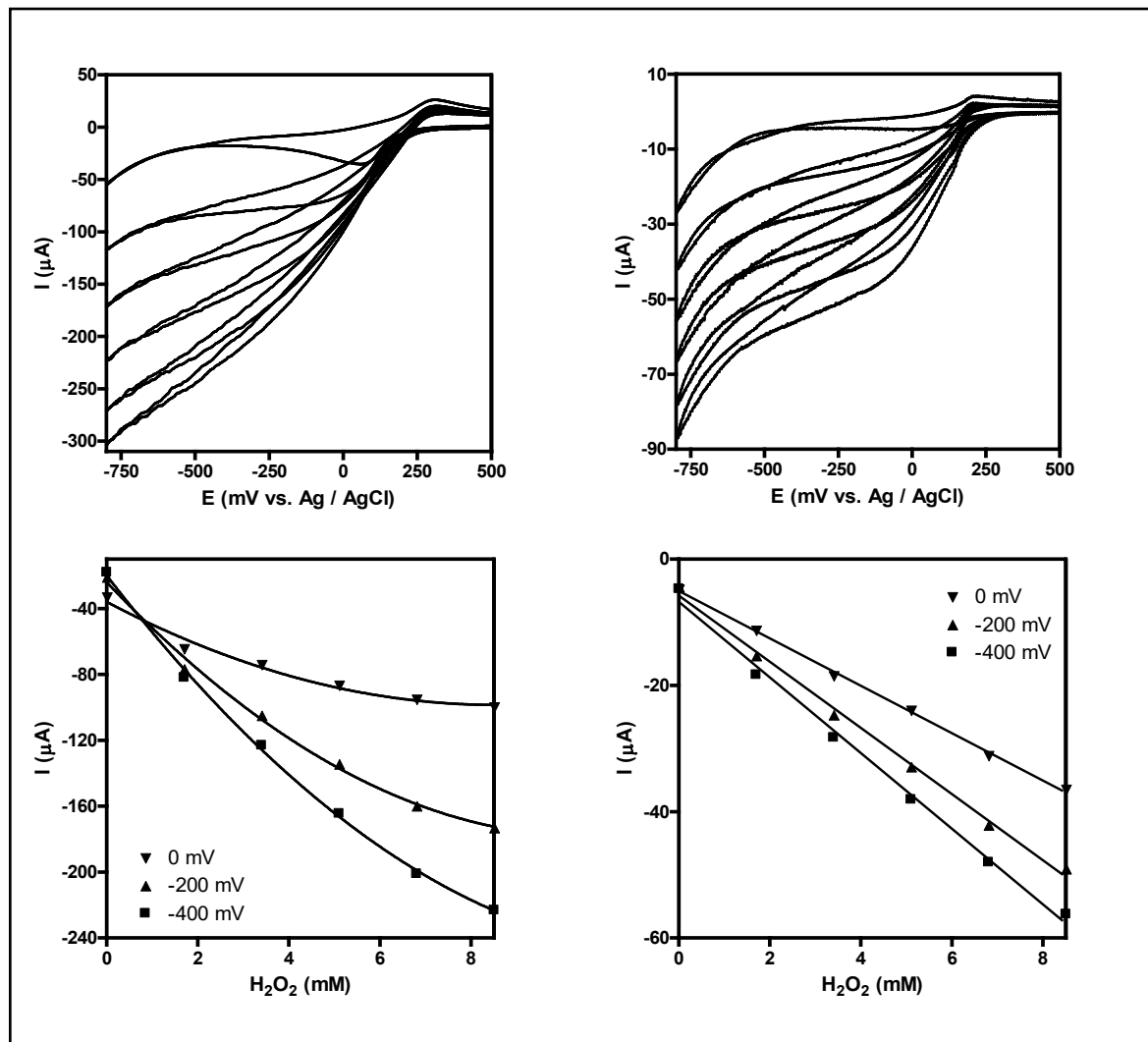
- 270kDa,
- 2xFAD, 2x molybdenopterin, 2x [2Fe-2S] ferredoxin
- hypoxanthin, xanthin a kyselina močová jsou produkty metabolismu purinů



Berlínská modř

▪ pravděpodobně nejlepší a
nejstudovanější mediátor
redukce H_2O_2

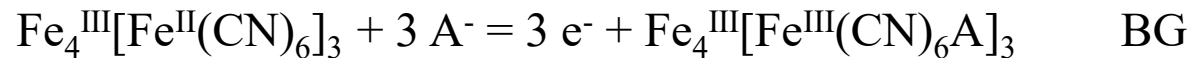
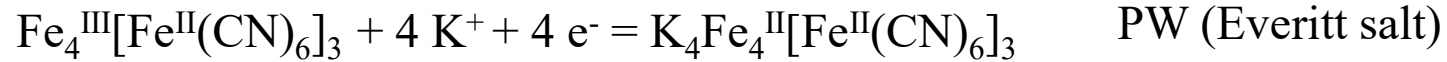
▪ „artificial peroxidase“



komerční
(mikrometrové rozměry) BM

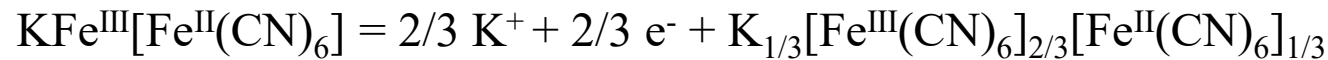
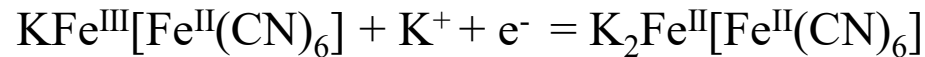
nano BM

Problém modifikace Berlínskou modří – redukováná forma (Prussian White) je rozpustná ve vodě. Existuje rozsáhlá literatura zabývající se stabilitou Berlínské modří vůči redox cyklování (proces je termodynamicky nestabilní, ale kineticky pomalý).



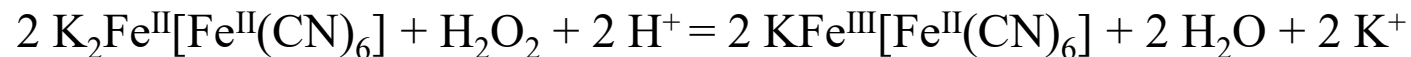
„nerozpustné“ PB

0.75 V vs. Ag/AgCl



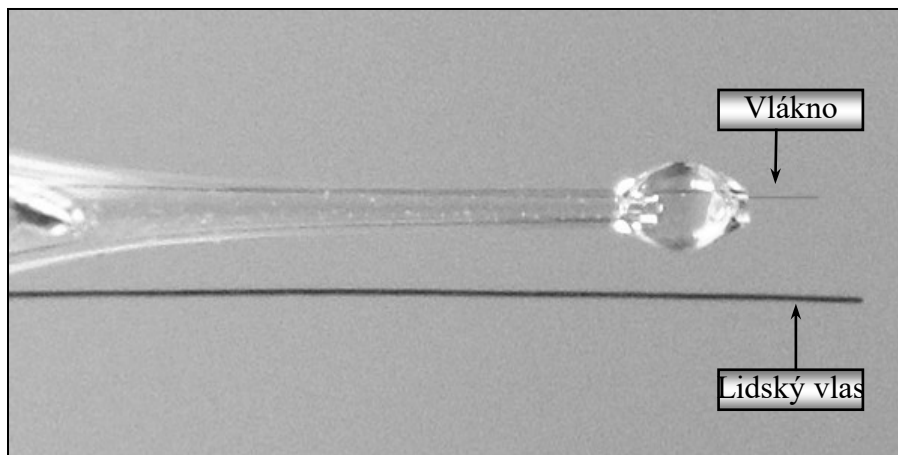
„rozpustné“ PB

0 V vs. Ag/AgCl

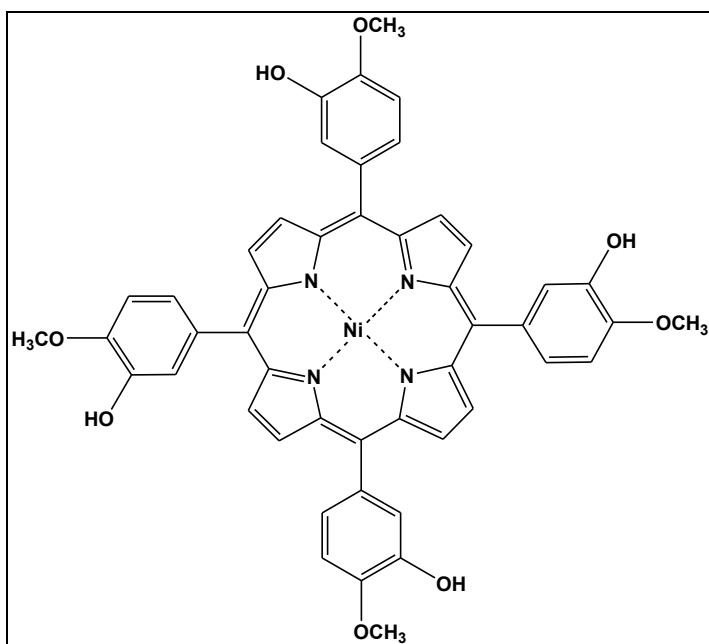
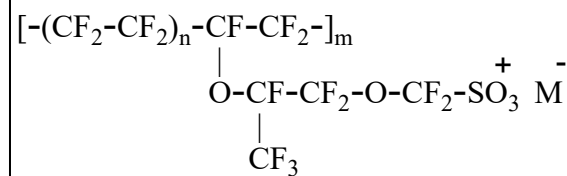


Většina sensorů využívá *in situ* vytvořené filmy BM. Nanostrukturování může, jak bylo ukázáno, zlepšit charakteristiky senzoru (reverzibilita, linearita). Nicméně, vrstvy jsou náchylné k dissoluci. Tvorba rozpustných forem BM je snadnější u vyšších pH. V literatuře lze nalézt poklesy katalytického proudu H_2O_2 3x – 20000x při přechodu od pH=3 k pH = 6.

Amperometrické elektrody s membránou – NO selektivní elektroda

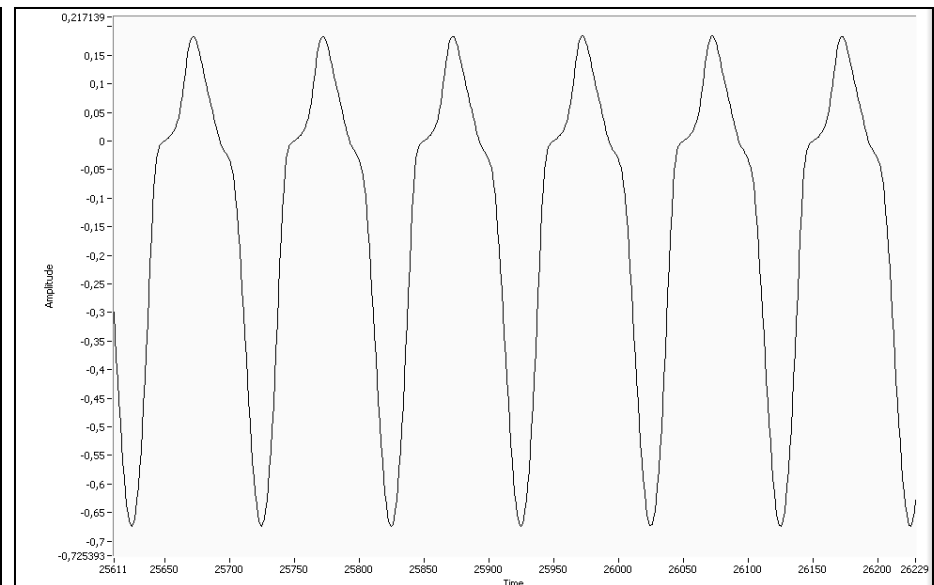
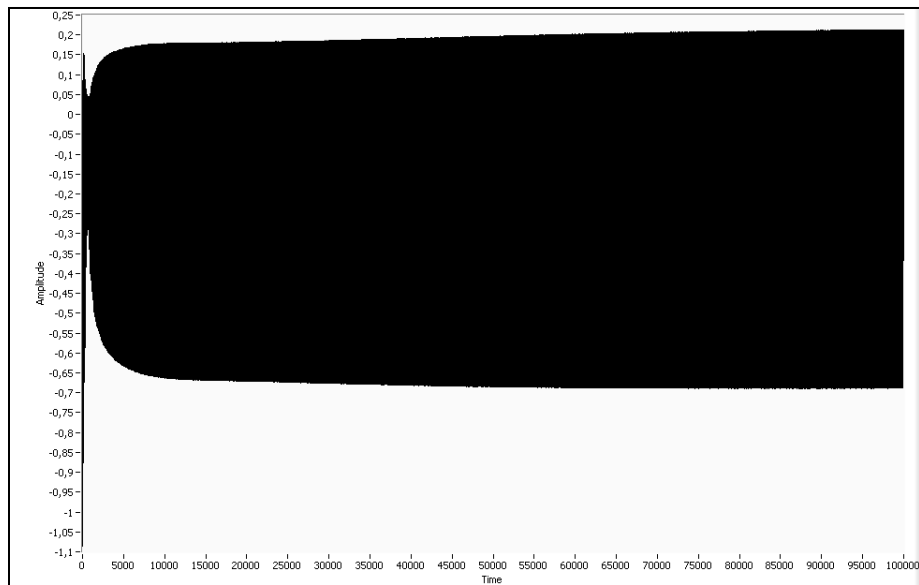


- pretreatment
- elektropolymerace NiTMHPP
- pokrytí Nafionem



„Pretreatment“

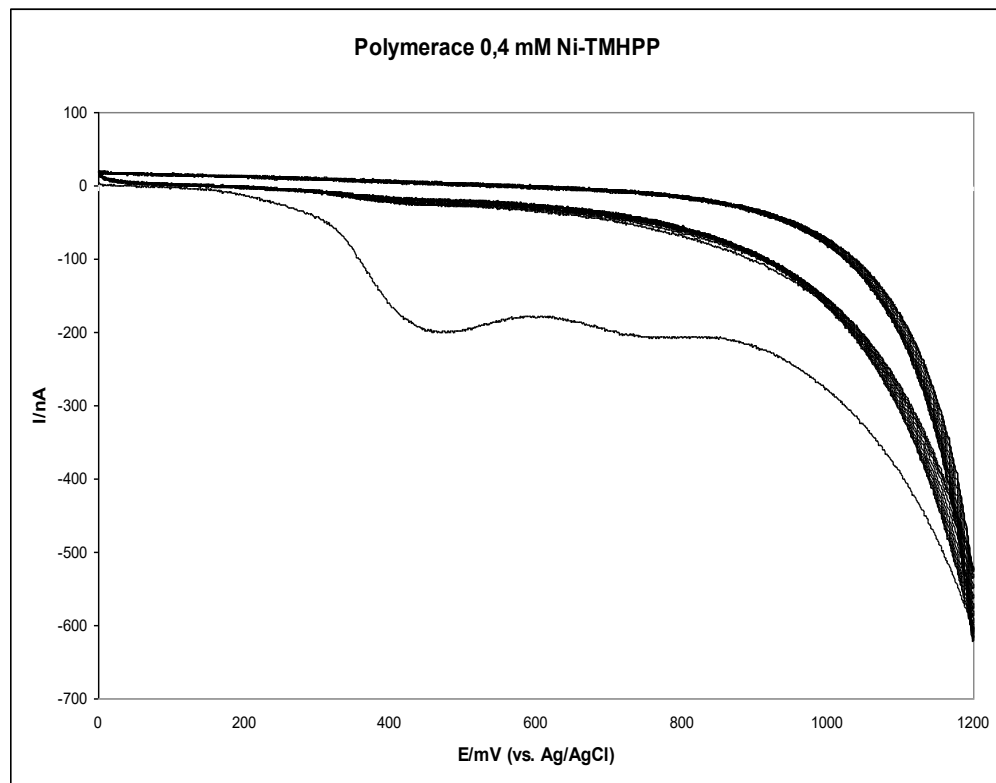
- mild pretreatment
- strong pretreatment



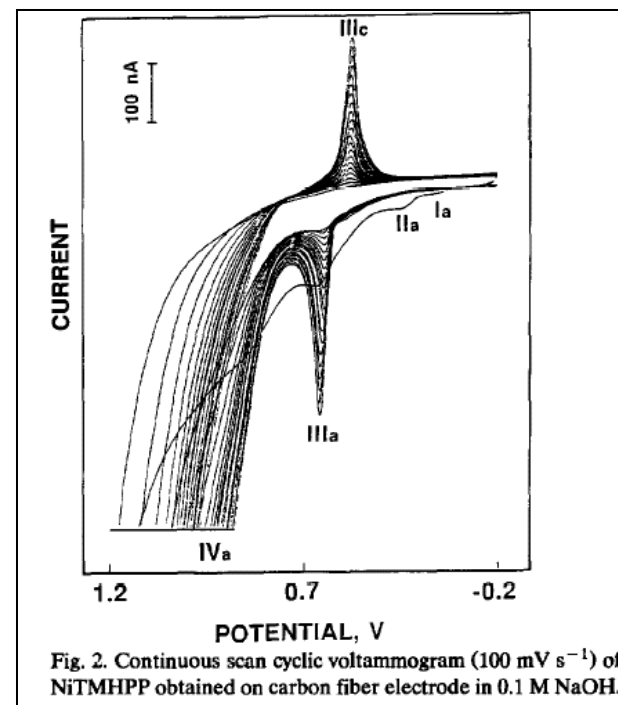
Proudové hodnoty (a. u.), dosahované v průběhu cyklování potenciálu (0 až 2,9 V, 50 Hz) při aktivaci povrchu uhlíkového vlákna senzoru v PBS (2 % NaCl). Znáznorněno prvních 10 sekund procesu.

Detail průběhu proudu (a.u.) v procesu aktivace uhlíkového vlákna mikroelektrody (výsek z levého obr.– cyklování potenciálu 0 až 2,9 V, 50 Hz)

Elektropolymerace NiTMHPP



- 100 cyklů, 100 mV/sec
- Voltamogramy neobsahují píky Ni(II)/Ni(III)



Vrstva Nafionu

- Zlepšuje „skladovací“ charakteristiky senzorů
- Téměř nepřispívá k selektivitě senzoru

T. Malinski, Z. Taha, S. Grunfeld, A. Burewicz, P. Tombouljian, F. Kiechle, Measurement of nitric oxide in biological materials using a porphyrinic microsensor. Anal. Chim. Acta 279 (1993) 135-140.

Vlastnosti NO senzoru

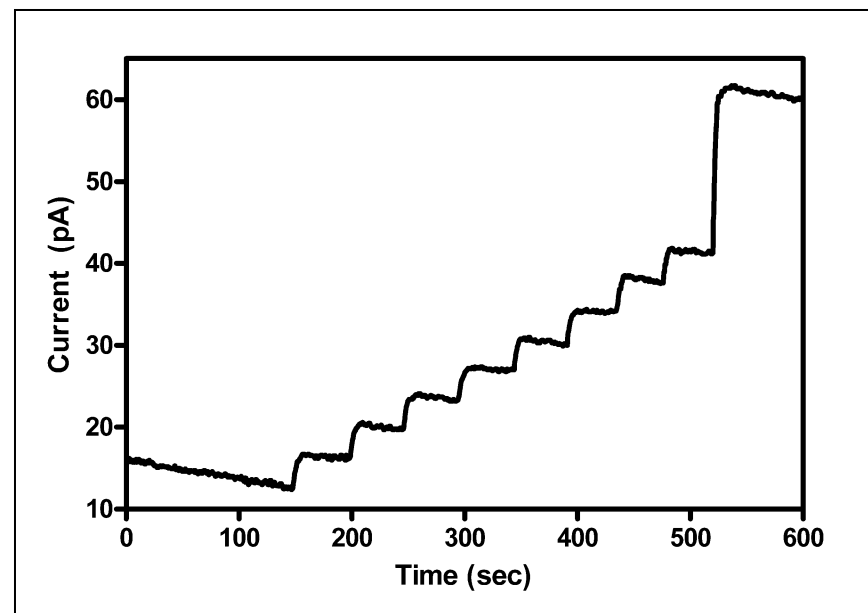
Carbon fiber modification	Selectivity:			Detection limit NO [nM]	Literature
	Ascorbate	Dopamine	Nitrite		
Ni-TMHPP / Ni	1 : 18000	1 : 400	1 : 600	1,5	
Nf./m-PD+resorcinol	1 : 2000	1 : 200	1 : 600	60 – 80	[1]
Nf./o-PD	1 : 750	1 : 18	1 : 780	6	[2]
Nf./o-PD:	1 : 756	1 : 175	1 : 935	35	[3]
Ni-TMHPP/Nf.:	1 : 986	1 : 4	1 : 181	76	[4]
Nf.:	1 : 612	1 : 2	1 : 302	47	[5]

Odezva senzoru v oblasti nanomolárních koncentrací NO

8 x 4 nM NO

1 x 20 nM NO

Před nástřiky roztoku NO byla elektroda několik hodin polarizována při pracovním potenciálu tak, aby proud pozadí poklesl až na cca 15 pA.



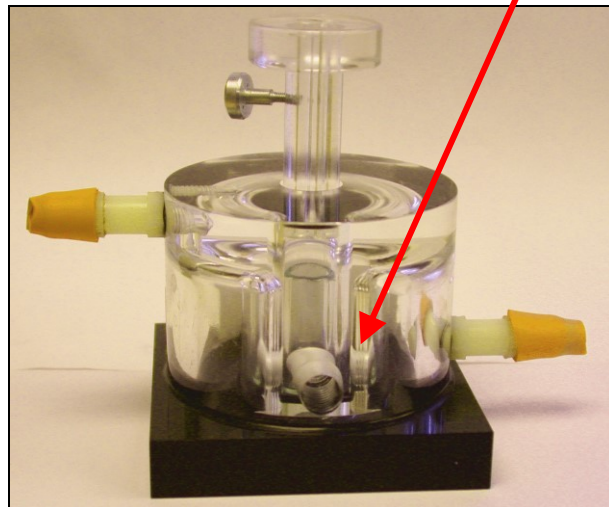
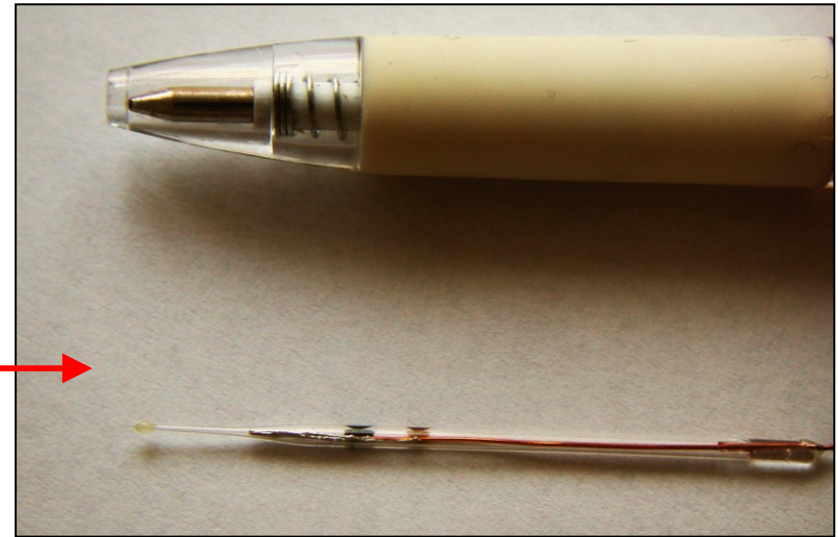
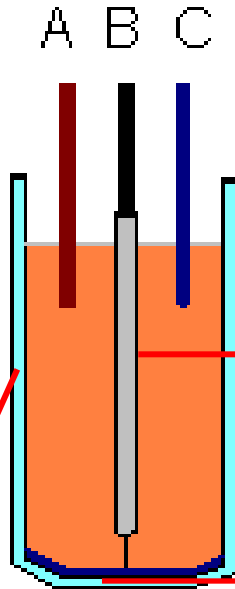
Měření NO produkovaného buňkami

Schéma experimentu:

RAW 264.7 vysadíme na kultivační misku

a kultivujeme v DMEM médiu v inkubátoru při 5% CO₂ a 37°C.

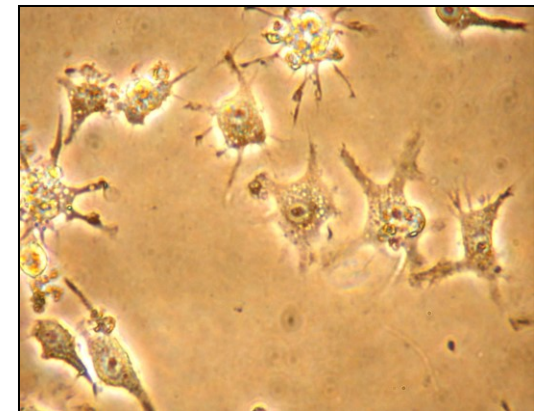
1. Počet buněk stanovujeme pomocou Coulter Countru (Coulter®, Coulter Electronics LTD, England)
2. Buňky o koncentraci $1 \times 10^6 / 800 \mu\text{l}$ inkubujeme 60 min. v 800 μl MEM média.
3. Následně do zkumavek s adherovanými buňkami aplikujeme lipopolysacharid (LPS) – 5 ng/ml.
4. Mikrozkumavku umístíme do měřicí komůrky a snažíme se umístit' elektrodu na dno, až k povrchu buněk.
5. Zapojíme elektrodu a spustíme měření.
6. Po ukončení pokusu a odpojení elektrody odpipetujeme médium.
7. V médiu následně pomocí Griessovy metody spektrofotometricky stanovujeme koncentraci dusitanů (NO₂⁻), které jsou hlavním koncovým metabolitem NO.



A – miniaturní Ag/AgCl elektroda

B – senzor

C – pomocná elektroda

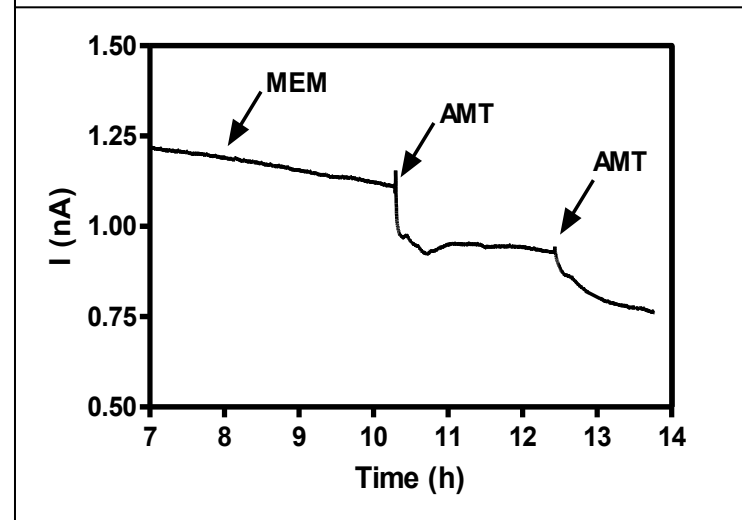
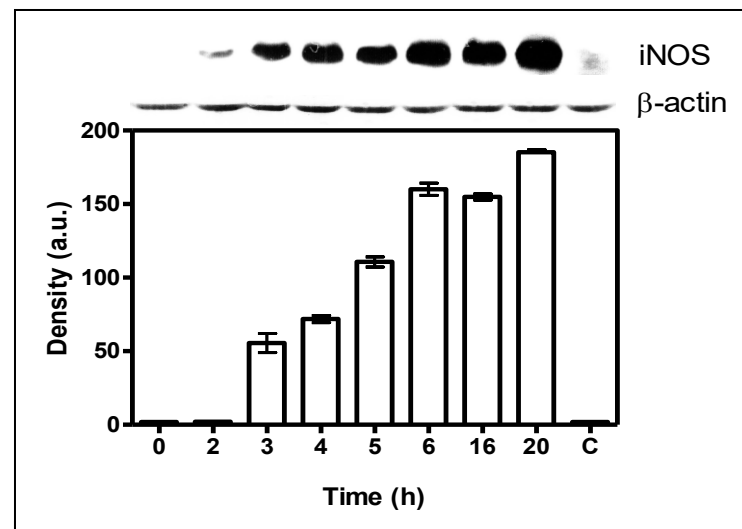
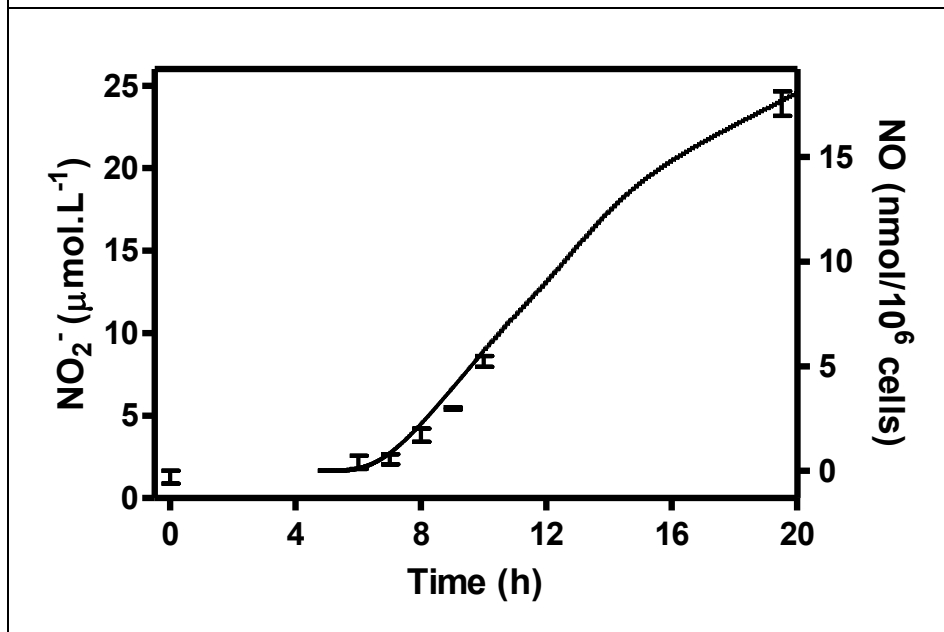
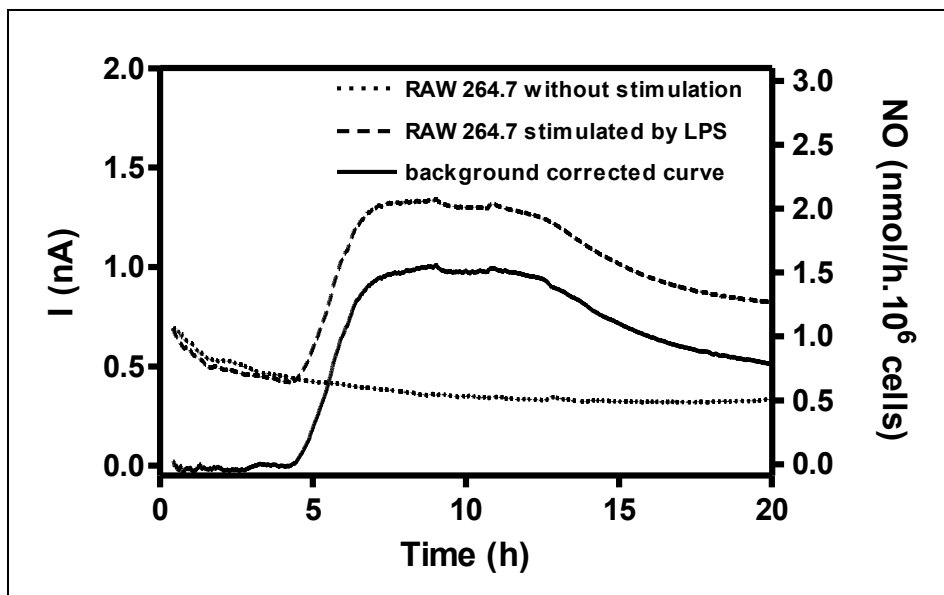


RAW 264.7 (1×10^6)

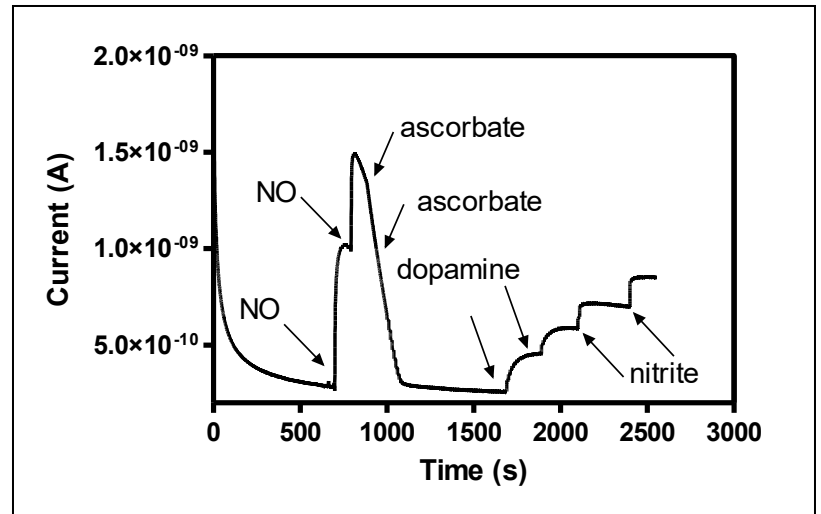
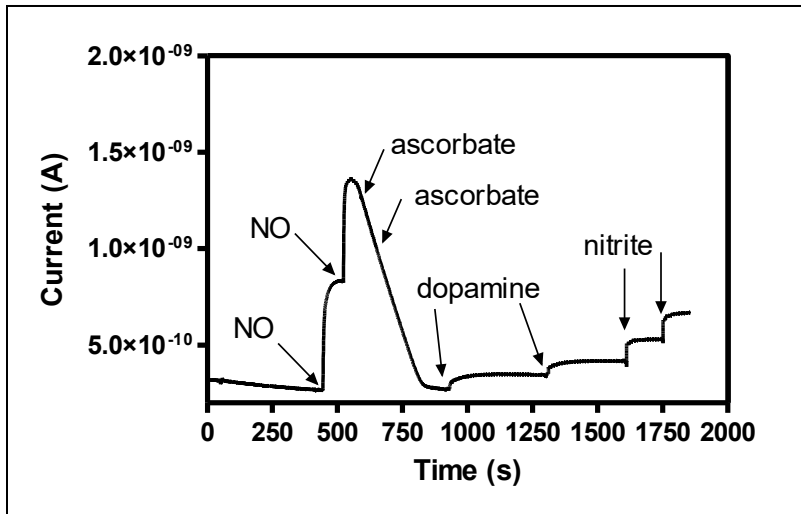
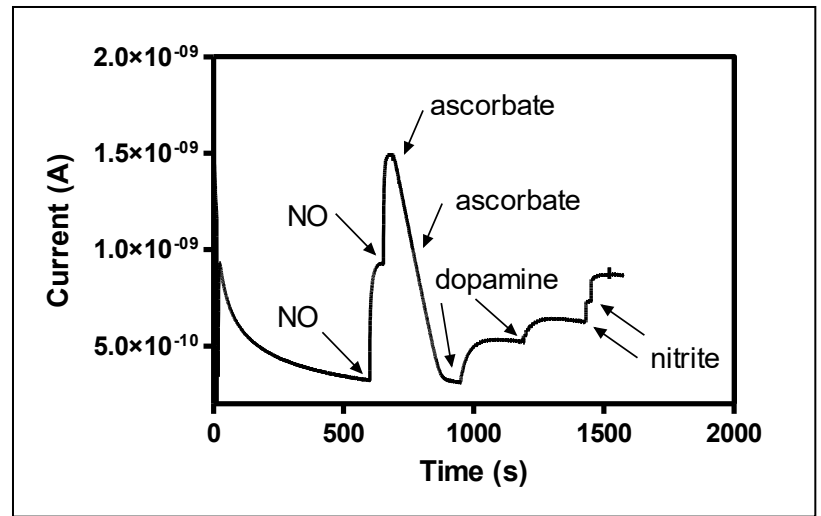
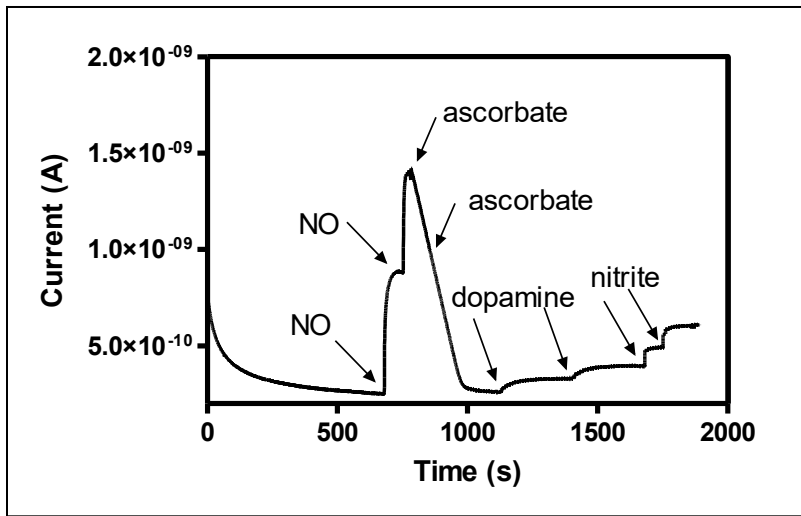
DMEM + 10% FBS (5% CO₂, 37°C)

MEM (NaHCO₃, konstantní pH)

Výsledky



2-amino-5,6-dihydro-6-methyl-4H-1,3-thiazin
(AMT)



Testování parametrů
senzorů před a po
experimentu s buňkami

	Sensitivity		Selectivity					
	(nA / μ M NO)		Dopamine		Nitrite		Ascorbate	
	before	after	before	after	before	after	before	after
Electrode 1	1.45	1.44	1:1060	1:443	1:570	1:542	>1:5000	>1:5000
Electrode 2	1.41	1.49	1:1156	1:335	1:500	1:428	>1:5000	>1:5000