

Elektrochemické převodníky

- elektrochemický měřicí systém tvoří nejméně dvě elektrody - pracovní (měřicí) a referenční
- imobilizací biorekogniční vrstvy vzniká bioelektroda, nejčastěji se jedná o enzymovou elektrodu
- potenciometrické / amperometrické / konduktometrické



Referenční elektrody

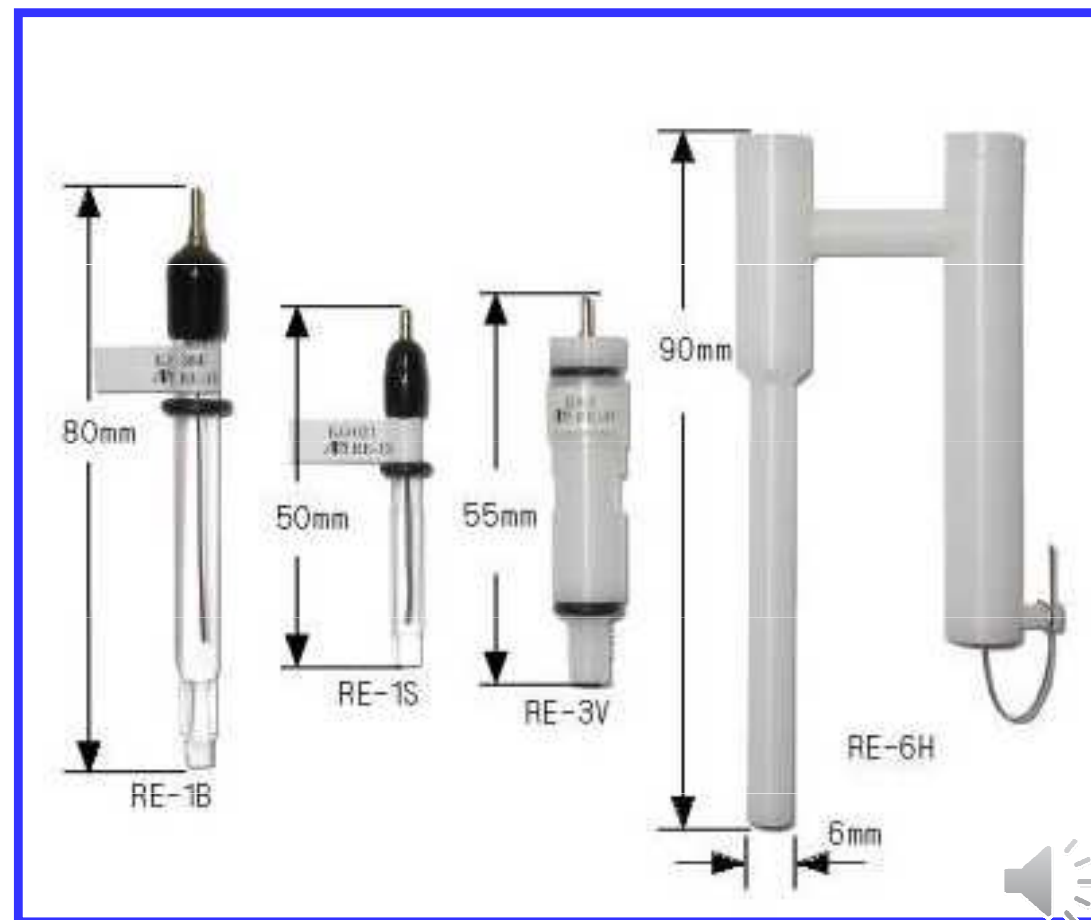
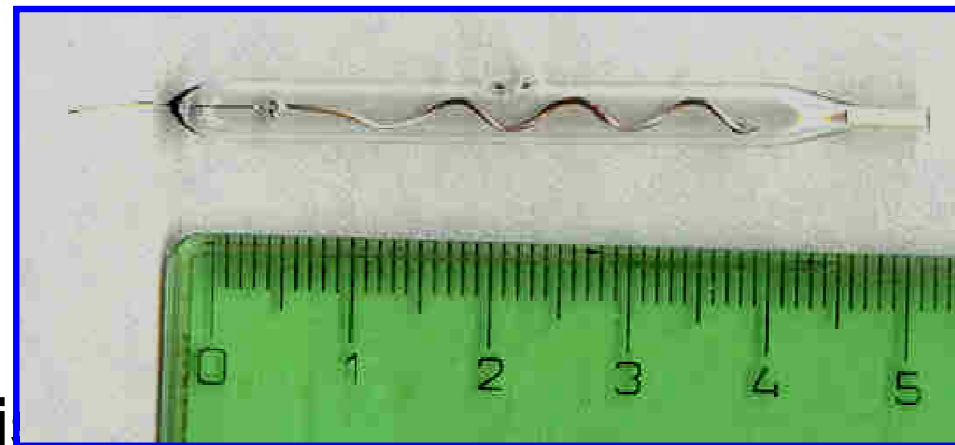
- slouží jako srovnávací bod k měření nebo nastavení potenciálu pracovních elektrod
- potenciál je přesně definovaný a pokud možno časově stálý

Typ	Zkratka	E_{NHE} (V)	E_{SCE} (V)
Normální vodíková elektroda Pt, H ₂ (1 atm) H ⁺ (a=1)	NHE	0	0.2412
Kalomelové elektrody Hg Hg ₂ Cl ₂ KCl			
nasycená (sat.)	SCE	0.2412	0
normální (1 M)	NCE	0.2801	0.0389
nasycená NaCl (sat.)	SSCE	0.2360	0.0052
Argentchloridové elektrody Ag AgCl KCl			
nasycená (sat.)		0.197	-0.045
(3 M)		0.2042	0.037
normální (1 M)		0.2362	-0.005
Ag AgCl LiCl (sat. v EtOH)		0.140	-0.101
Merkurosulfátová elektroda Hg HgSO ₄ K ₂ O ₄ (sat.)		0.655	0.414



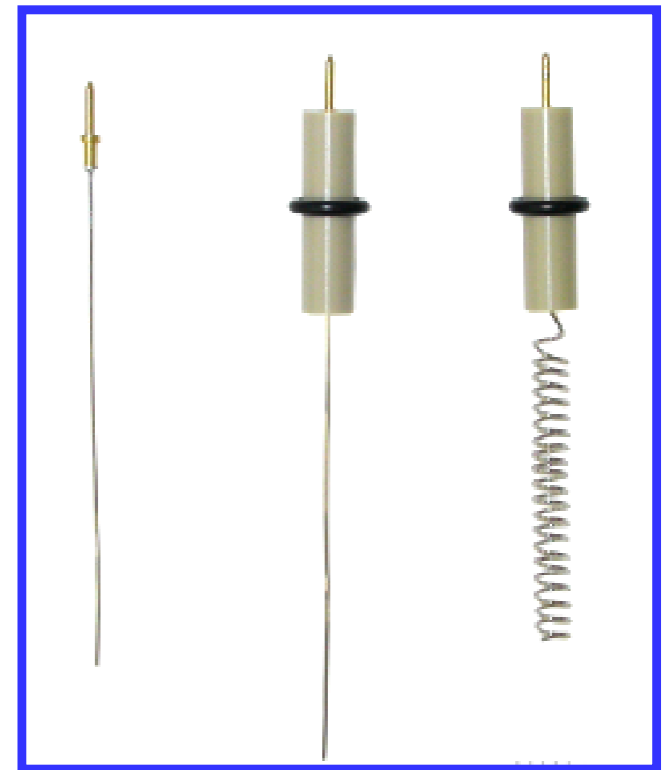
Referentní elektrody

- miniaturní Ag/AgCl
- u biosensorů často kompromis
 - pouze stříbro (drátek, ploška, ...), občas potaženo AgCl



Pomocné elektrody

- tvořeny z dobrého vodiče s dostatečnou plochou a elektrochemicky neaktivní
- platina (drátek, plíšku, síťka), uhlíková tyčinka, mnohdy stačí i nerezový drát



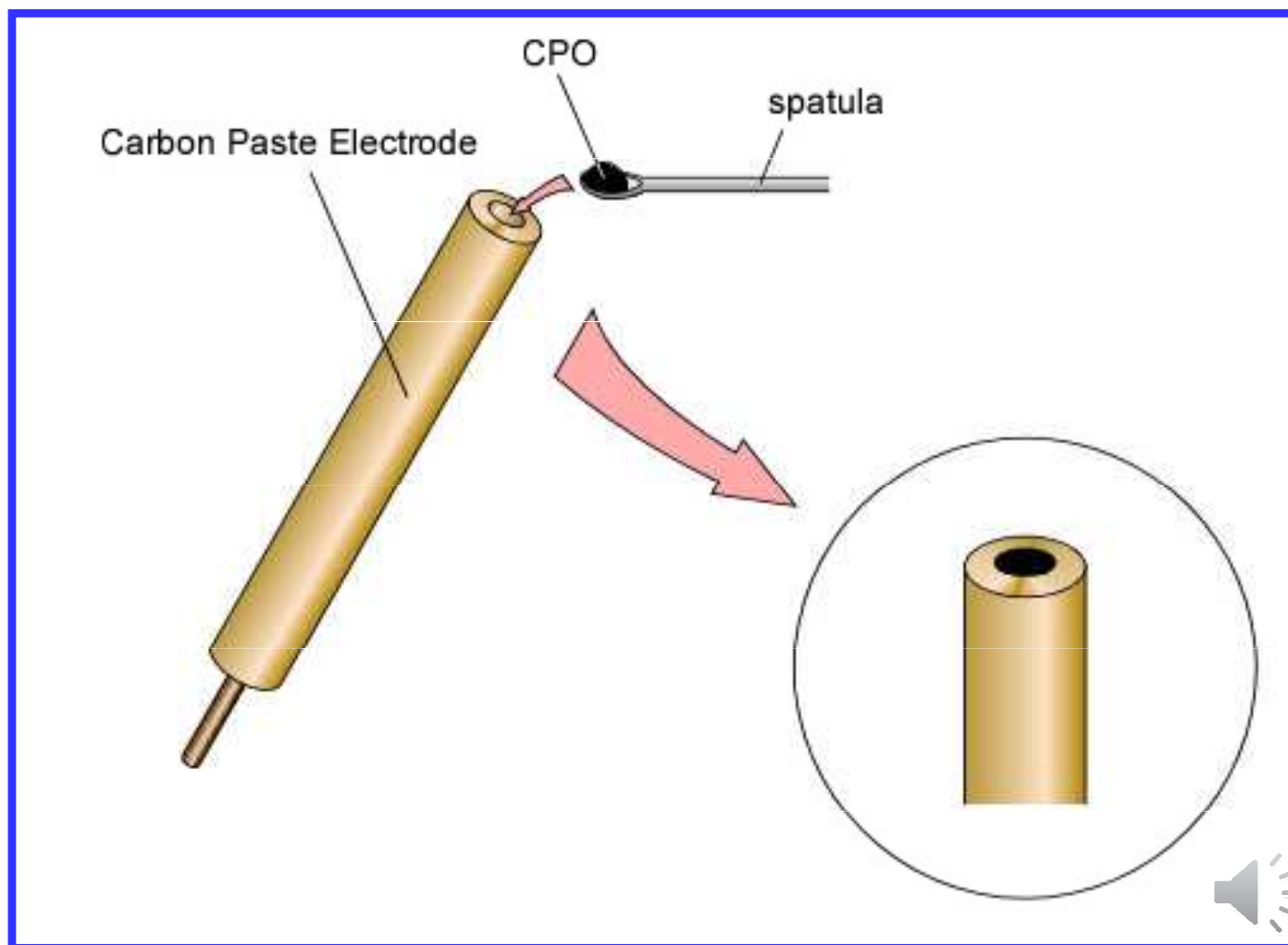
- **Pracovní elektrody** pro biosensory zahrnují velmi širokou škálu materiálů i konfigurací: ušlechtilé kovy (Pt, Au), skelný uhlík, grafit a nejrůznější kompozitní směsi, grafen, vodivé polymery, organické vodivé soli
- **rozsah pracovního potenciálu** je třeba volit tak, aby nedošlo k elektrochemickému rozkladu materiálu elektrody nebo k interferenčním reakcím (rozklad vody nebo jiných složek pracovního roztoku, redukce rozpuštěného kyslíku)
- důležitá je **příprava povrchu** elektrody před vlastním měřením nebo imobilizací biomolekul
 - provádí se leštění povrchu brusnými prášky (diamantový nebo oxid hlinitý), následuje opláchnutí a případně ozvučení ultrazvukem
 - někdy je třeba odstranit povrchové nečistoty (oxidy kovů) buď pomocí kyselin nebo anodizací





Uhlíkové pastové elektrody (CPE)

- carbon paste electrode
- směs vodivého grafitového prášku a spojovací kapaliny (olej, polymer)
- snadná příprava a regenerace povrchu

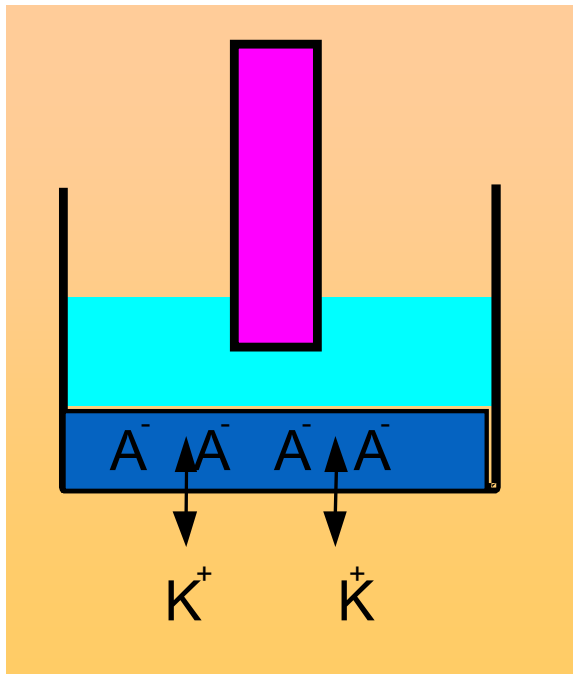


Pomůcky

- cely – míchané, průtočné
- stojany
- míchací systémy, temperace
- Faradayova klec pro stínění
- leštící zařízení
- propojovací vodiče a konektory



Potenciometrické bioelektrody



- základem potenciometrie je změna potenciálu vyvolaná akumulací náboje na rozhraní elektrody s roztokem

- převodníkem je iontově selektivní elektroda (ISE) v kombinaci s enzymovou vrstvou
- rozsah měřitelných koncentrací je dán ISE: $10 \mu\text{M}$ až 0.1 M , pro konečné biosensory typicky 0.1 až 10 mM
- **odezva je logaritmická** (změna potenciálu ΔE přímo úměrná **$\log c$**)
- měří se potenciál pracovní elektrody proti referentní elektrodě - ta musí být kvalitní (časově stálá), přitom v systému **neteče proud** - je třeba měřicí přístroj s velkým vstupním odporem (operační zesilovač)



Potenciometrické enzymové elektrody

potenciál ISE pro sledovaný iont (aktivita a_i)
v přítomnosti rušivého iontu (aktivita a_j)

$$E = E_0 + \frac{RT}{zF} \ln(a_i + k_{ij} a_j^{z_i/y_j})$$

- skleněná elektroda - H^+ - měření pH, běžně dostupná
- pevné ISE (solid state) - tenká vrstva iontového vodiče: monokrystal nebo směs krystalů, precipitát; homogenní nebo heterogenní (mnohonásobně levnější, vlastní materiál dispergován v inertní matrici (PVC, silikon, ...))
- na bázi oxidů kovů pro měření pH:



nebo dva oxidační stavy:

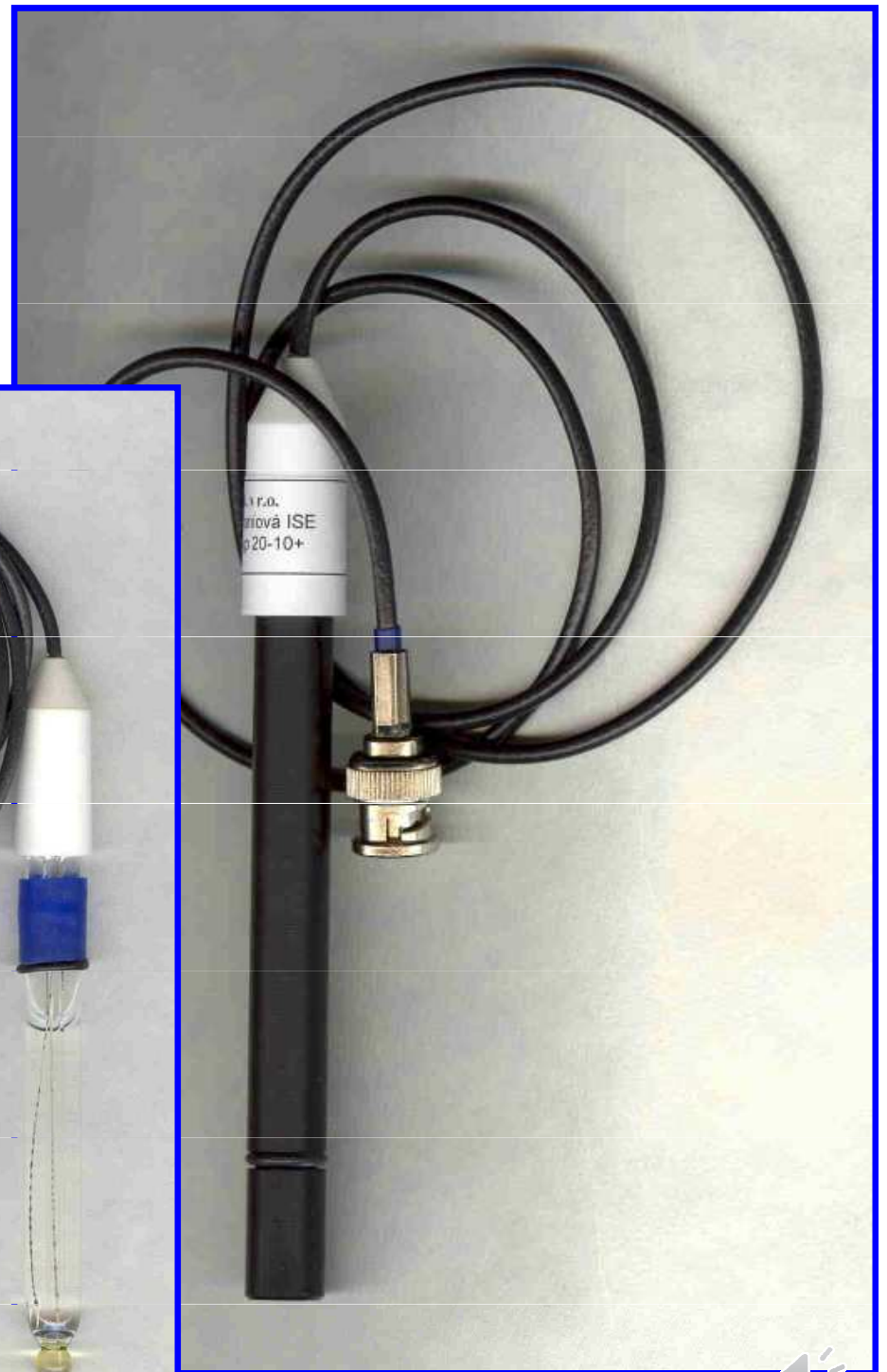
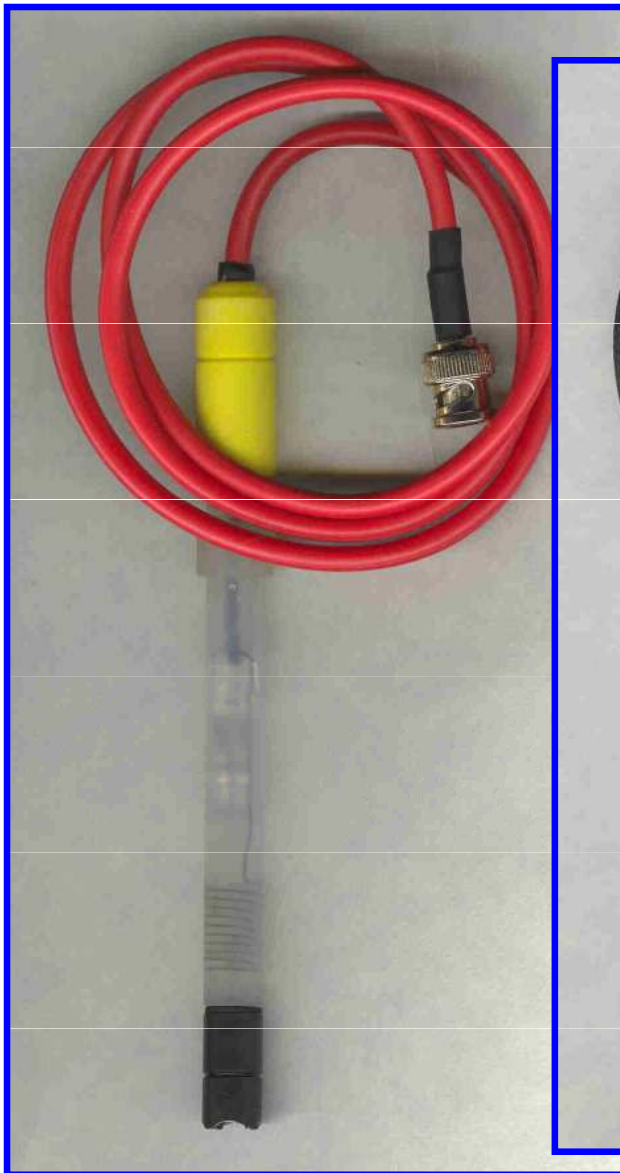


antimonová elektroda Sb/Sb_2O_3 , dále Ir/IrO_2 nebo Pd/PdO_2



ISE

- ukázka NH₃ a CO₂ ISE Crytur



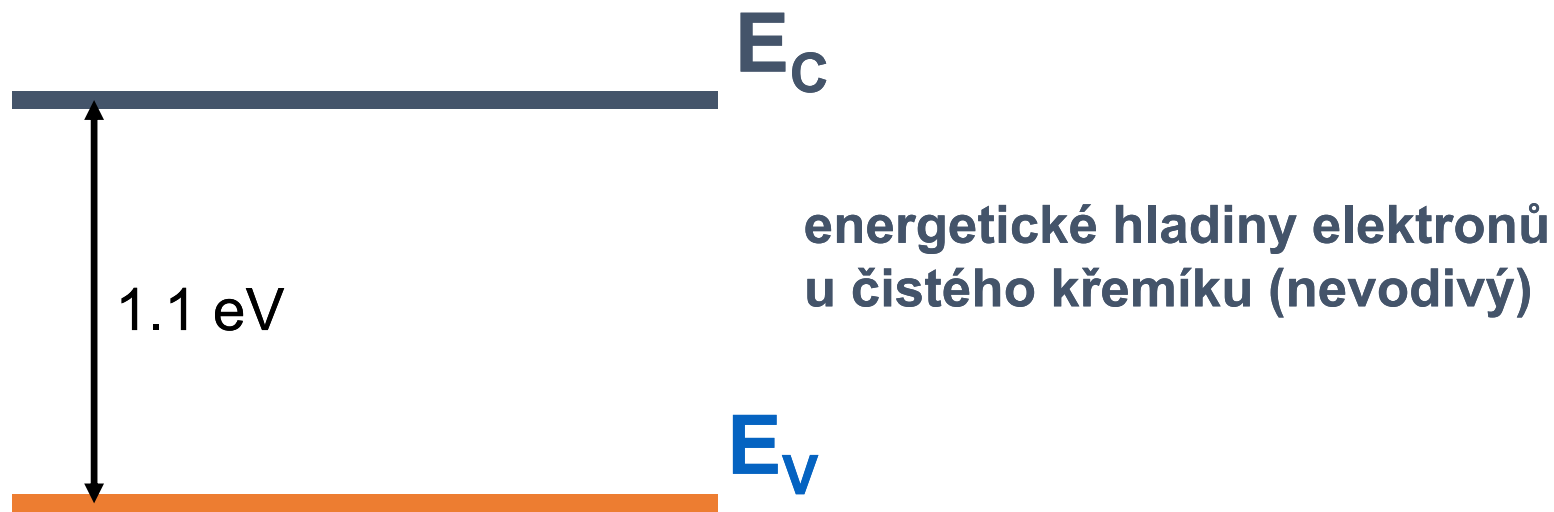
Příklady potenciometrických enzymových elektrod


- **pH** : penicilin (penicilinasa), acetylcholin (cholinesterasa), esterasy, nukleové kyseliny (nukleasy)
- **NH₃ / NH₄⁺** : **močovina** (ureasa), aminokyseliny (oxidační deaminace - glutamát DH, oxidasa L- / D-aminokyselin; α,γ-eliminace amoniaku – L-methionin γ-lyáza), nitrát a nitrit (bakterie)
- **CO₂** : močovina (ureasa), aminokyseliny (lysin dekarboxylasa, tyrosin dekarboxylasa), laktát (laktát monooxygenasa - dekarboxylující oxidasa)
- **I⁻** : potenciometrická detekce peroxidu vodíku v přítomnosti peroxidasy
- **F⁻** : peroxid vodíku (peroxidasa - oxidace fluorofenolu)
- **CN⁻** : amygdalin (β-glukosidasa)



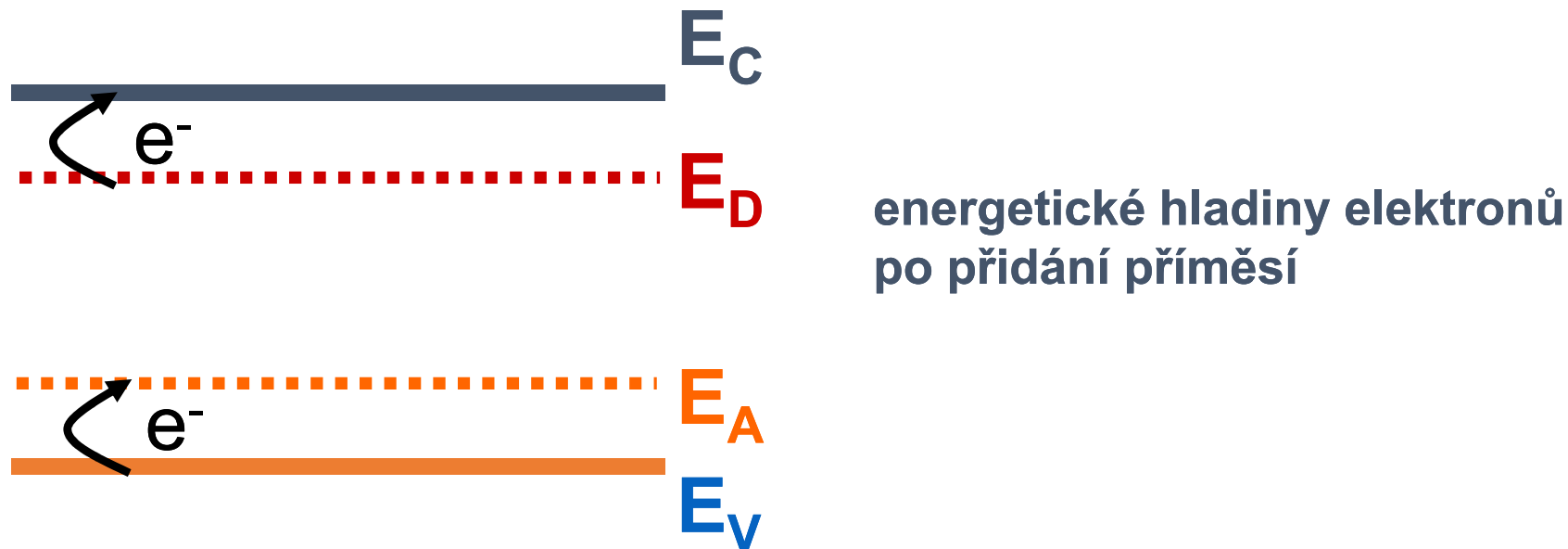
Polovodičové sensory

- výhodou jsou miniaturní rozměry, masová produkce a tudíž nízká cena ve srovnání s klasickými ISE.
- základním konstrukčním materiálem je křemík. Jeho vodivost je velmi nízká, avšak přidavkem vhodných stopových příměsí – **dopováním** - lze jeho vodivost zvýšit - získá se **polovodič**
- podmínkou vodivosti je možnost volného pohybu elektronů



u křemíku je základní **valenční** hladina E_V plně obsazena, ale elektrony se na ní nemohou pohybovat. Na **vodivostní** hladině E_C je místo pro pohyb, ale nejsou zde elektrony. Kinetická energie elektronů na E_V je za běžných podmínek kolem 0.04 eV, takže **nemohou přeskočit** na vodivostní hladinu 

- zvýšení vodivosti se dosáhne dopováním - atomy z V. (P, As, **negativní** - n) nebo ze III. (B, Al, **pozitivní** - p) skupiny periodické tabulky
 - tak při n dopování se vytvoří donorová hladina elektronů E_D těsně pod vodivostní hladinou, takže přenos elektronů z E_D na E_C je snadný
 - opačně působí přidání atomů s volnými pozice elektronů (díry, pozitivní dopování), vytvoří se tak akceptorová hladina E_A



U polovodičových materiálů se pak hladina, na které je pravděpodobnost obsazení elektrony 50%, nazývá Fermiho (E_F). Nachází se mezi E_V a E_C , její poloha odpovídá množství dopujících atomů.



ISFET ion-sensitive field effect transistor

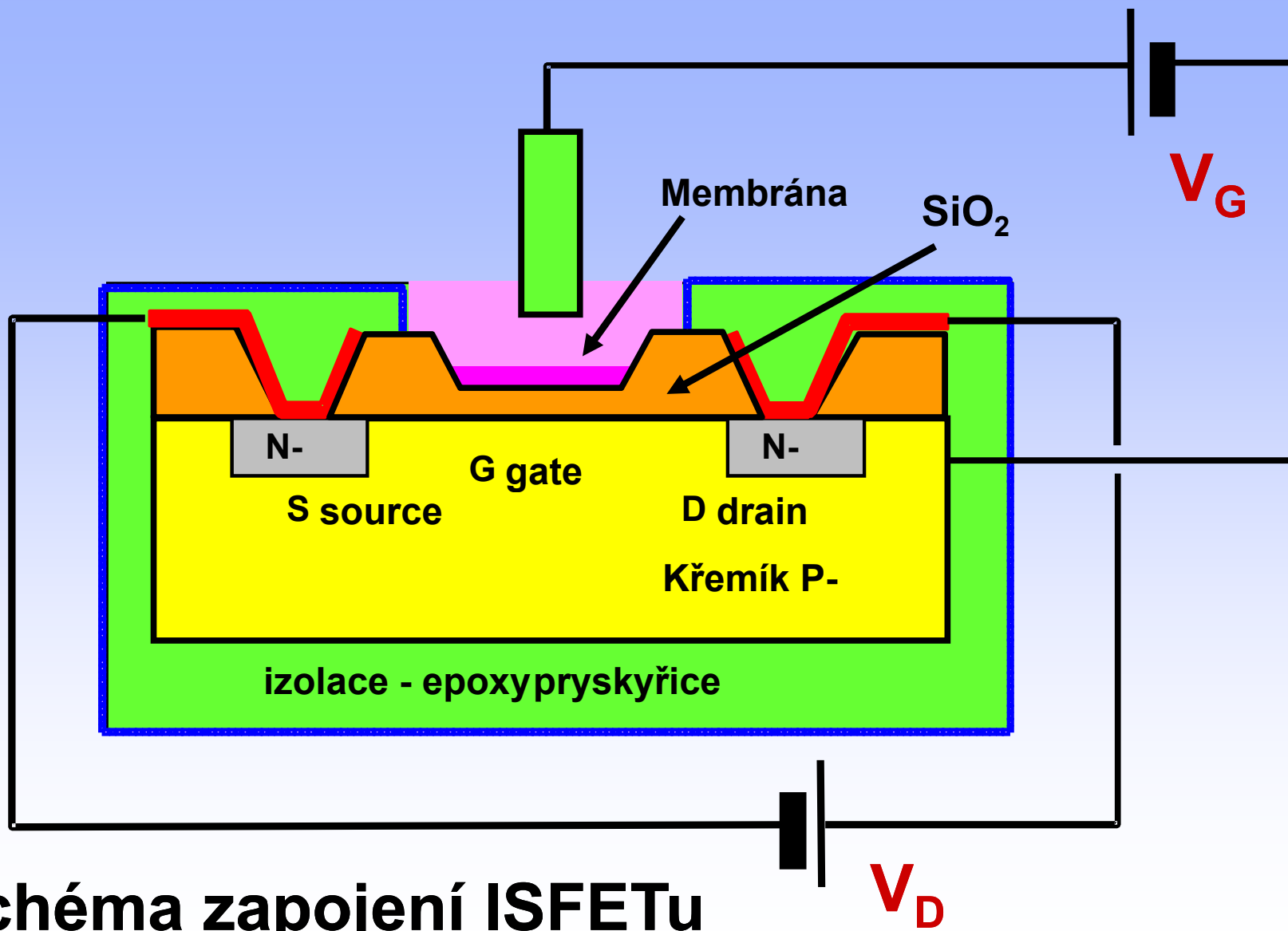


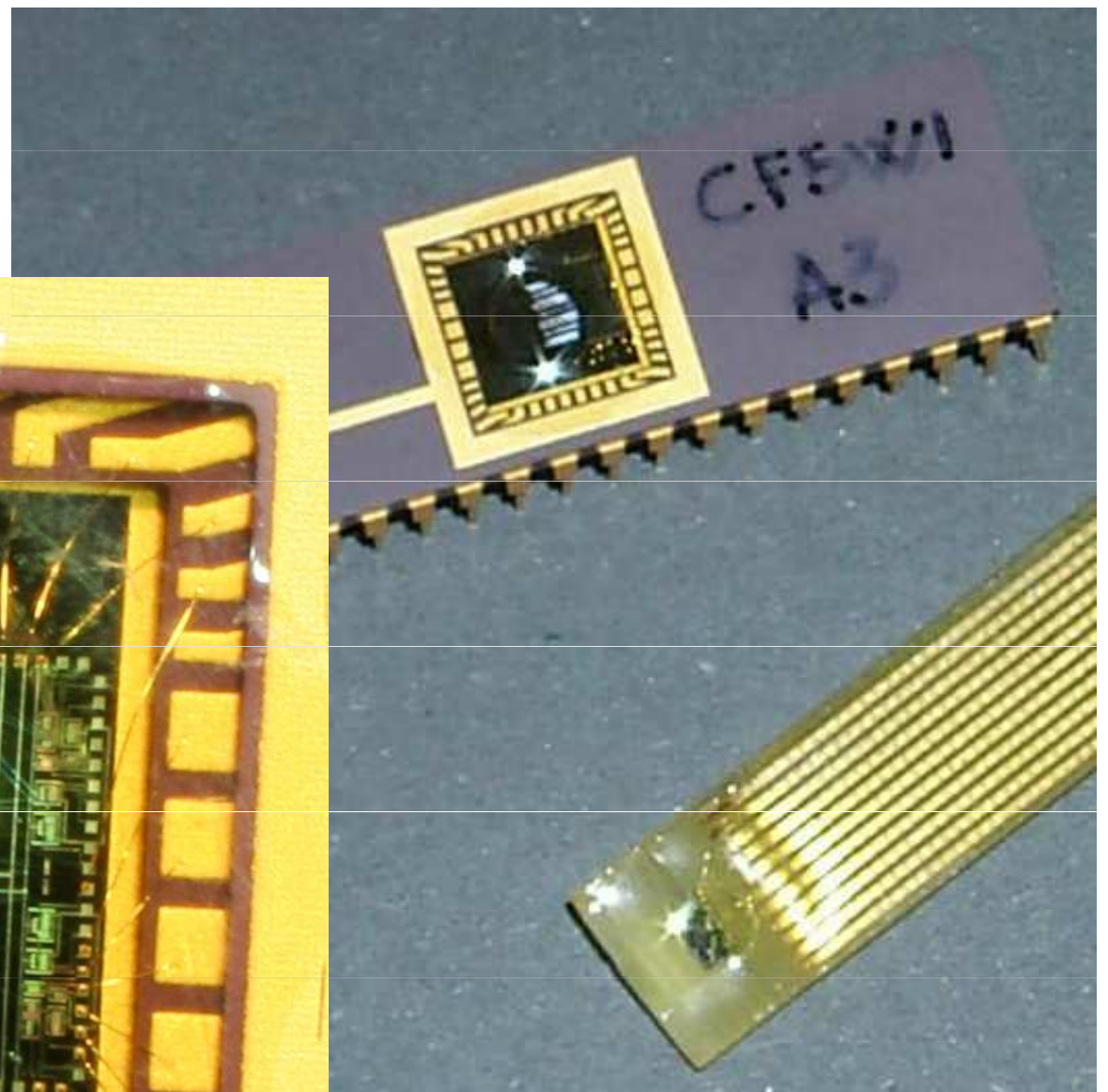
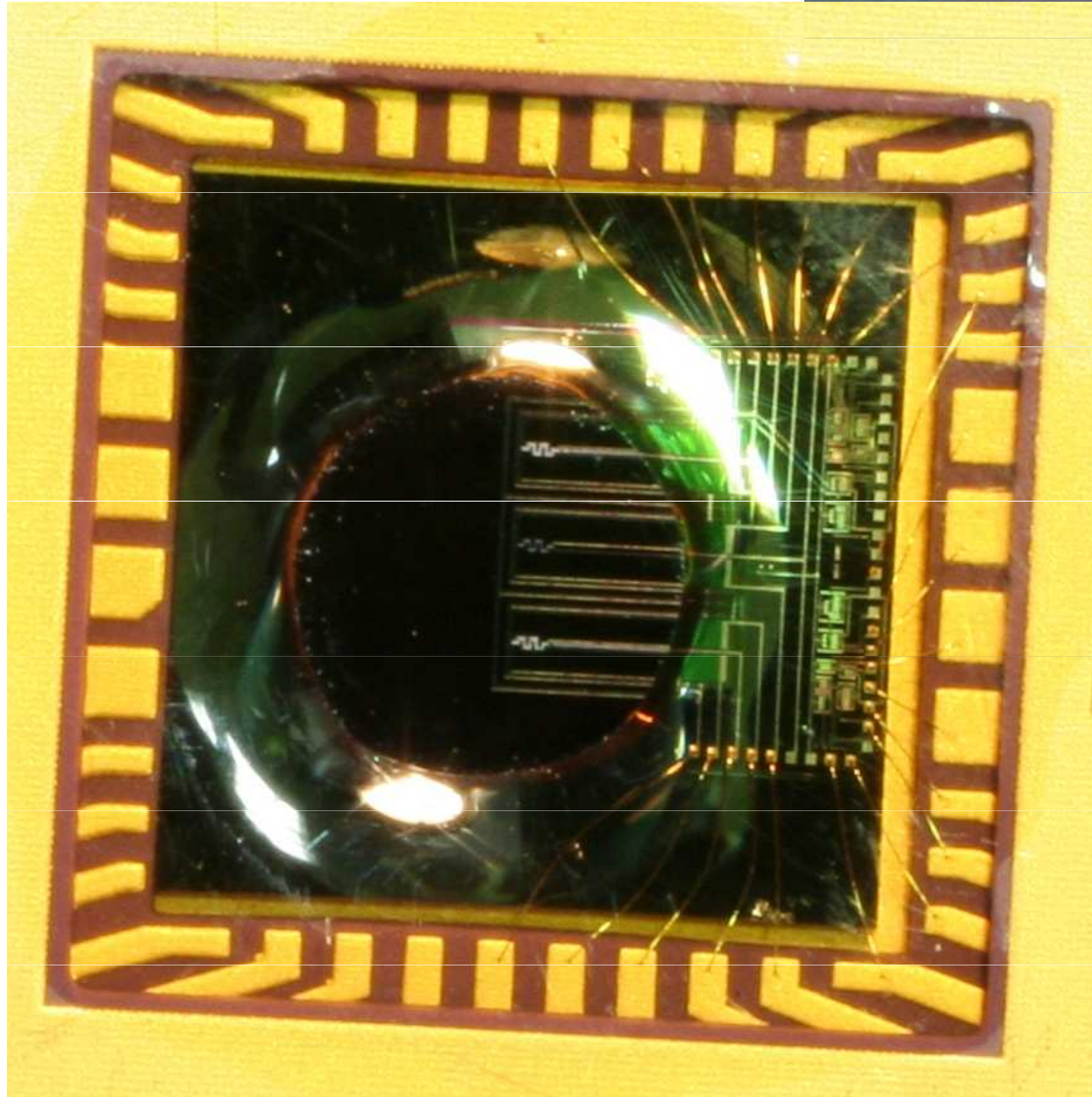
schéma zapojení ISFETu



- odpor mezi S (source) a D (drain) se změní, když se na hradlo G (gate) přivede napětí (změní se **elektrické pole**)
 - povrch ISFETu mimo S a D pokryt oxidem křemičitým, oblast hradla G (gate) je potažena selektivní membránou, která je v kontaktu s okolním roztokem
 - ostatní části jsou izolovány epoxypryskyřicí
 - potenciál hradla se určuje vzhledem k referentní elektrodě.
- jako **iontově-selektivní membrány** lze použít řadu materiálů
- **solid-state** membrány pro sledování změn **pH**, materiál Si_3N_4 , Al_2O_3 , Ta_2O_5
- odezva ISFETů je logaritmická (52-59 mV/pH), masová produkce
- **polymerní** membrány mohou být např. valinomycin/PVC pro stanovení draslíku
- **heterogenní** membrány
 - tvoří AgCl, AgI, AgCN krystalky v PNF (polyfluorovaný fosfazin).
 - při výrobě ISFETů se používá **litografie**
- **Jiří Janata** – jeden z průkopníků
(University of Georgia, Atlanta)



ISFETy



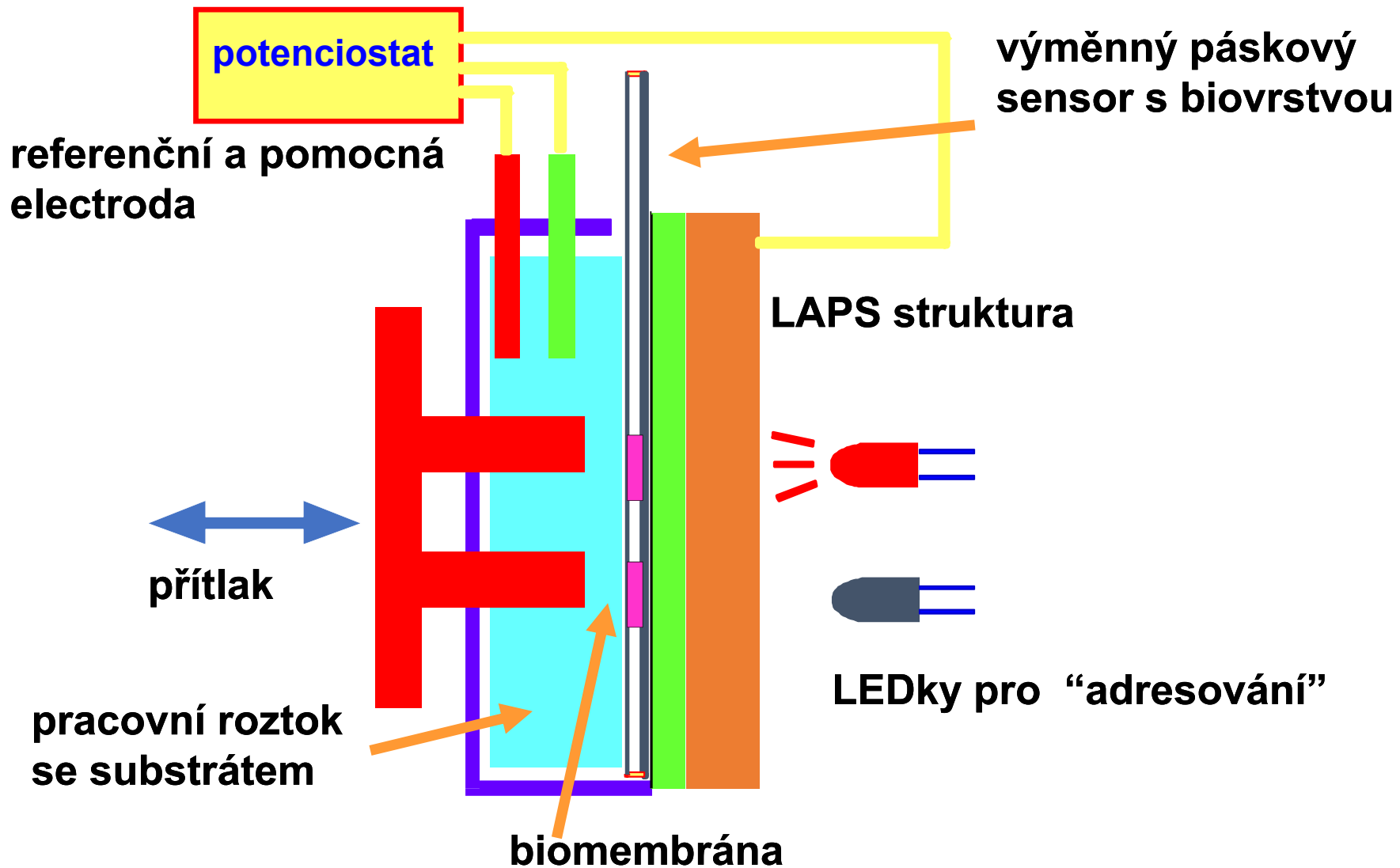
LAPS biosensory

- konstrukčně jednodušší než ISFETy, možné připojení kontaktů ze strany, která není v kontaktu s roztokem
- základem křemíkový čip potažený vrstvami oxidu křemičitého a nitridu křemíku
- povrch rozdělen na několik aktivních oblastí pomocí další vrstvy SiO_2 , celý čip má pouze jeden kontakt
- v neosvětleném stavu neaktivní
- pokud se z druhé strany osvětlí (IR LED, při 940 nm pronikne světlo do křemíku 50 nm hluboko), dojde k lokální aktivaci a získá se signál odpovídající změnám pH v aktivované („**adresované**“) zóně
- výhodou jednoduché vícekanálové měření



LAPS

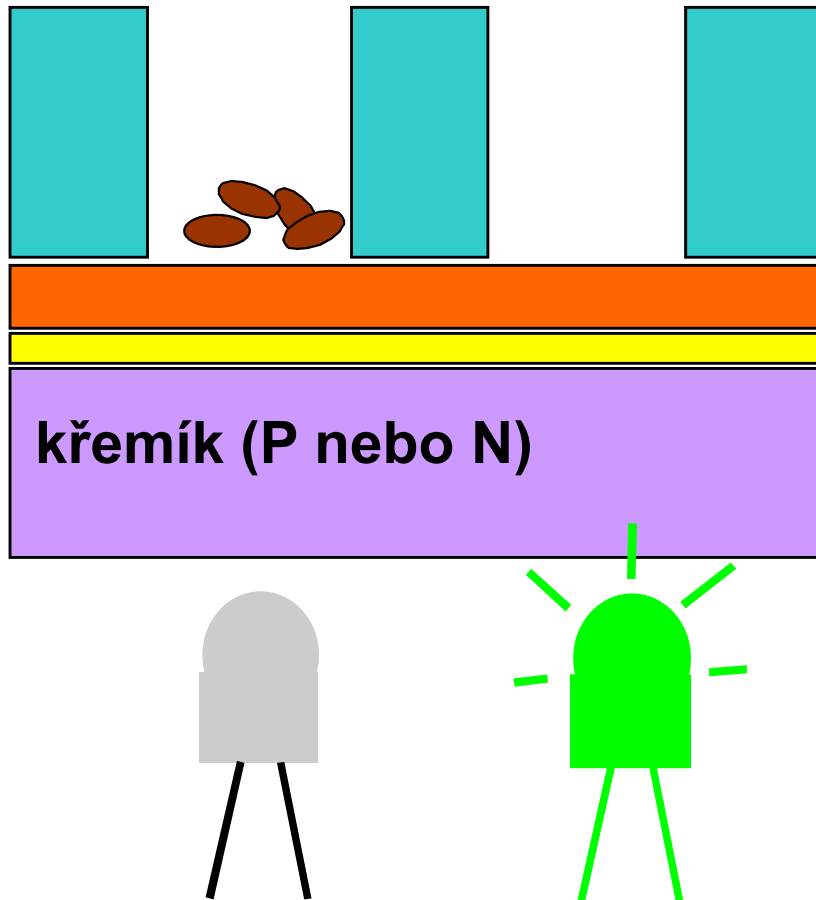
„light addressable potentiometric sensor“



LAPS biosensor Threshold



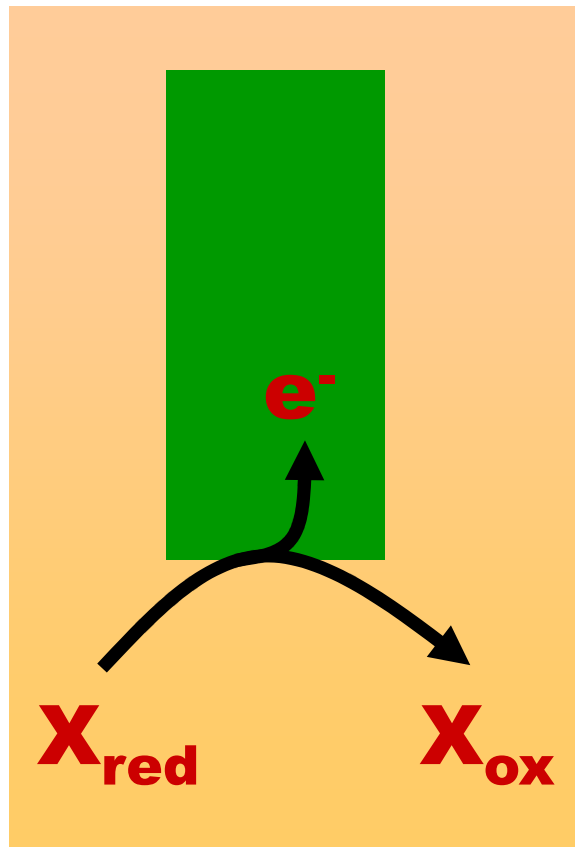
Cytosensor



- Cytosensor microphysiometer (Molecular Devices) se používá pro testování toxicity nebo fyziologických účinků léčiv. Do komůrek se imobilizují buňky (bakteriální nebo tkáňová kultura - fibroblasty, keratinocyty, rakovinné buňky, 10^4 až 10^6).
- Při mírném průtoku média se část buněk zachytí na povrch a v přítomnosti substrátu vyvolávají určitou změnu pH, která je úměrná metabolické aktivitě; např. respirací glukózy vzniká kyselina mléčná a oxid uhličitý.
- Po přidavku testované látky se pak zaznamená odezva jako časová změna dpH/dt . Na konci pokusu se rychlým průtokem buňky z komůrek vypláchnou a lze začít další cyklus.
- Vhodné účinek růstových regulátorů, hormonů, lymfokinů, virů nebo virostatik.



Amperometrické sensory



- založeny na heterogenním **přenosu elektronů** mezi **elektrodou** a redoxním párem molekul
- poskytují jako signál proud, který je úměrný koncentraci analytu. Proud I se obvykle měří při konstantním napětí (potenciál E) pracovní elektrody
- velikost proudu prošlá za daný čas t v systému udává náboj Q , který odpovídá molárnímu množství látky přeměněné na elektrodách:

$$Q = I t = n F m / M_r$$

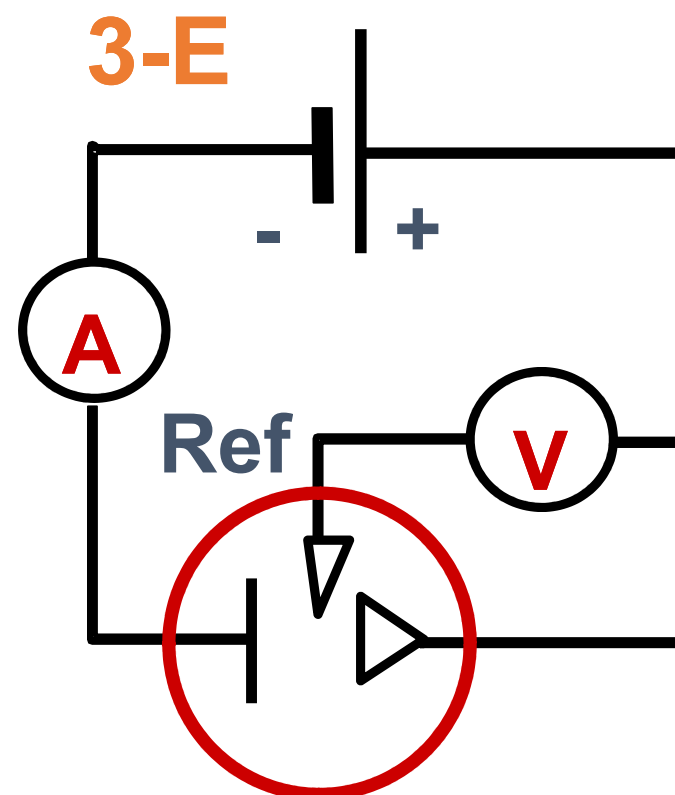
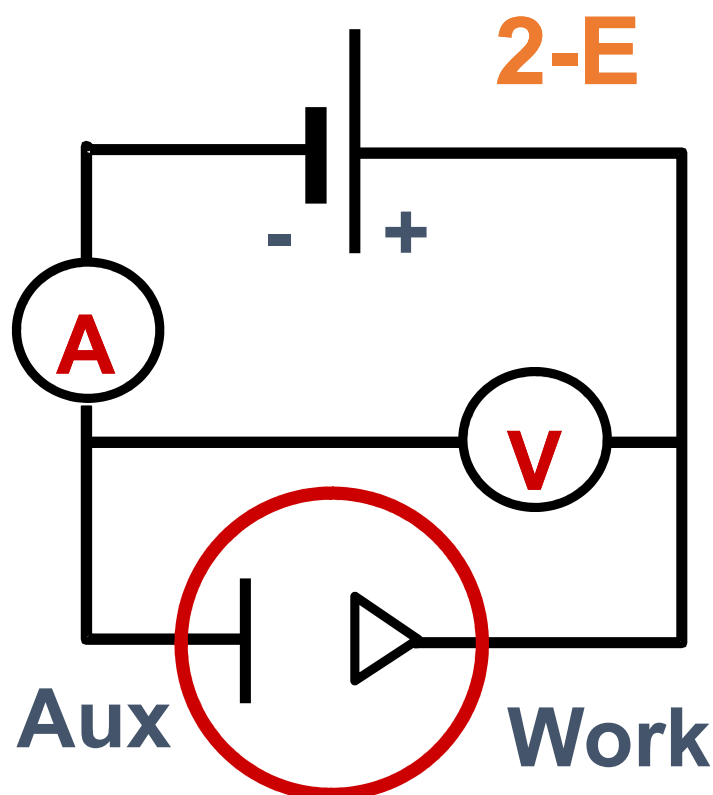
$F = 96487$ C/mol značí Faradayovu konstantu

- k elektrochemické **oxidaci** látek dochází na **anodě** ($I > 0$), **redukční** děje ($I < 0$) probíhají na **katodě**
- směr proudu je totožný se směrem toku pozitivních ekvivalentů (nábojů)



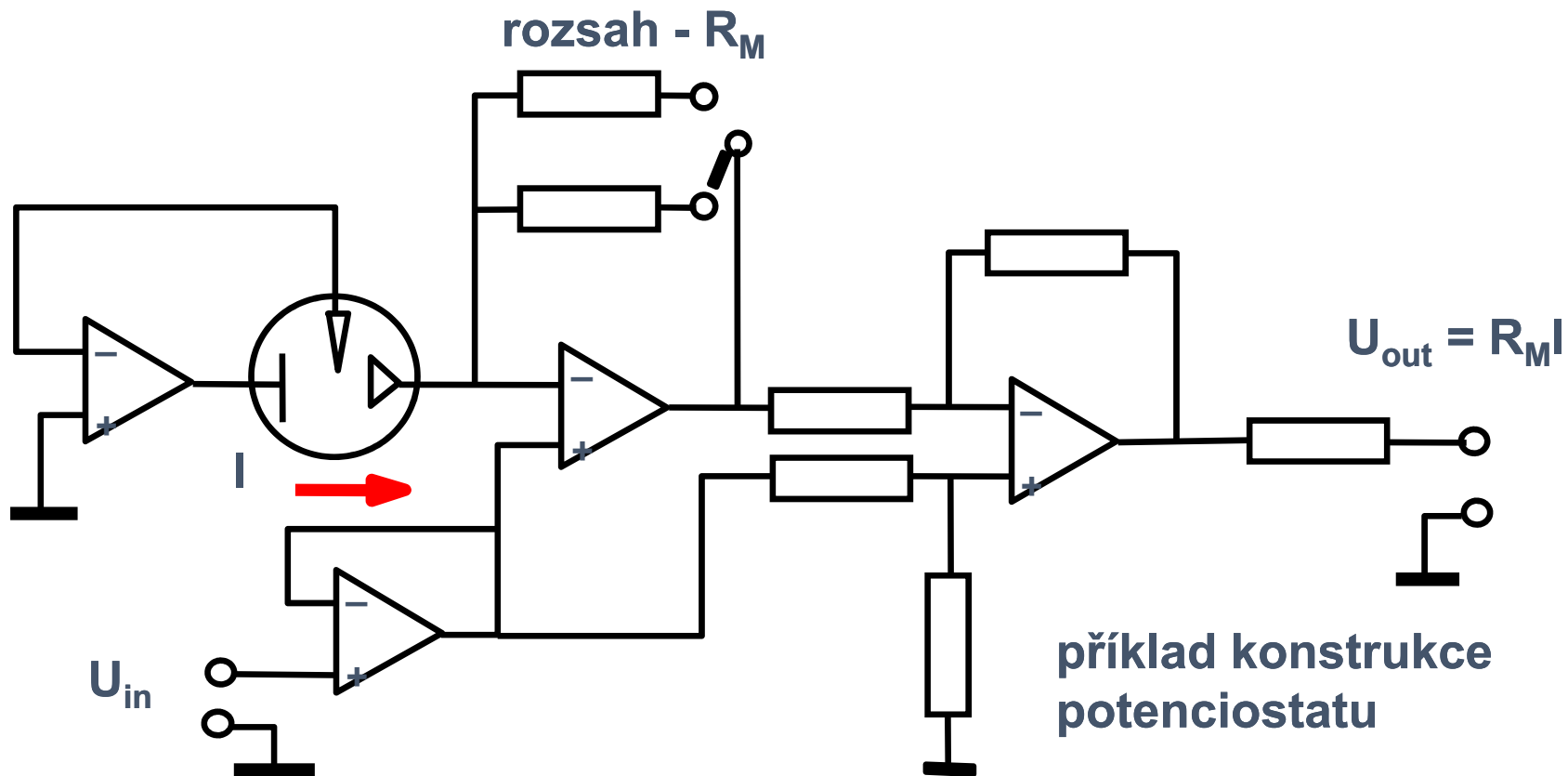
Amperometrické měření

- je možné provádět v dvou- nebo tříelektrodovém uspořádání;
- pro první systém se napětí na pracovní elektrodě **W** (working) nastavuje proti pomocné elektrodě **A** (auxiliary, resp. counter)
- v tříelektrodovém uspořádání se navíc použije referenční elektroda **R**, vůči které se nastavuje potenciál pracovní



Potenciostat

- zařízení, které udržuje konstantní potenciál pracovní elektrody vůči referentní nezávisle na procházejícím proudu

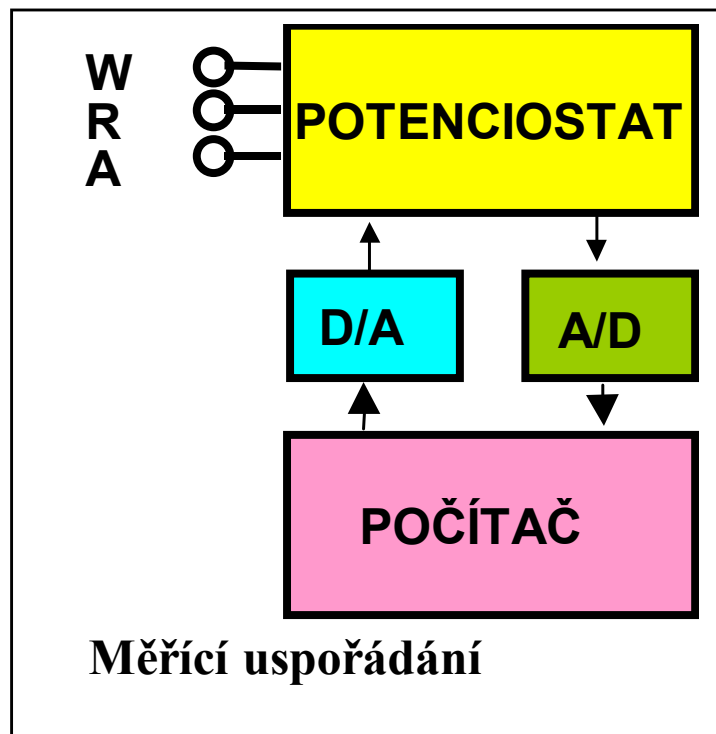


- zpracování měřených signálů lze provádět pomocí zapisovače, nebo lépe použitím počítače vybaveného analogově-digitálním převodníkem (A/D); pomocí digitálně-analogového převodníku (D/A) lze řídit pracovní napětí



Potenciostat

- moderní digitální konstrukce - analogový obvod řízený A/D (sběr dat) a D/A (nastavení excitačního potenciálu) převodníky

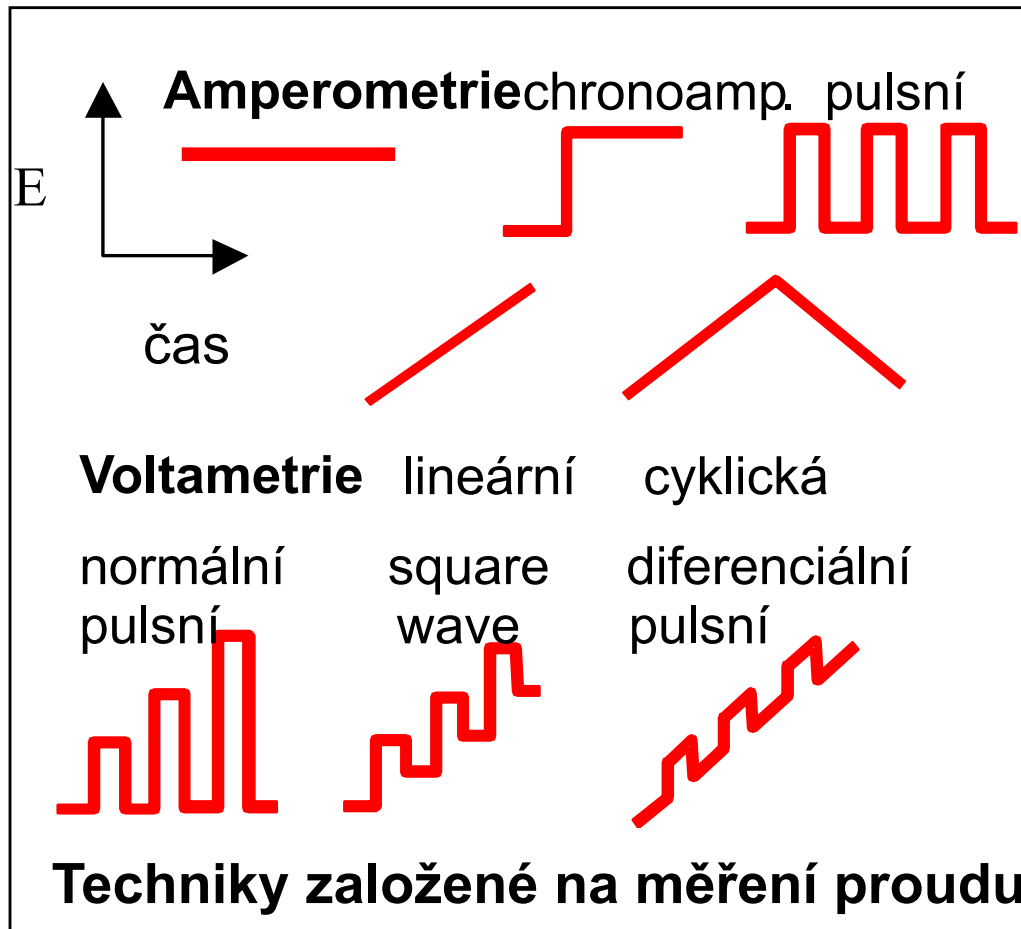


- obr. - mikroprocesorem řízený osmikanálový potenciostat, výstup dat na externí počítač přes RS232 rozhraní



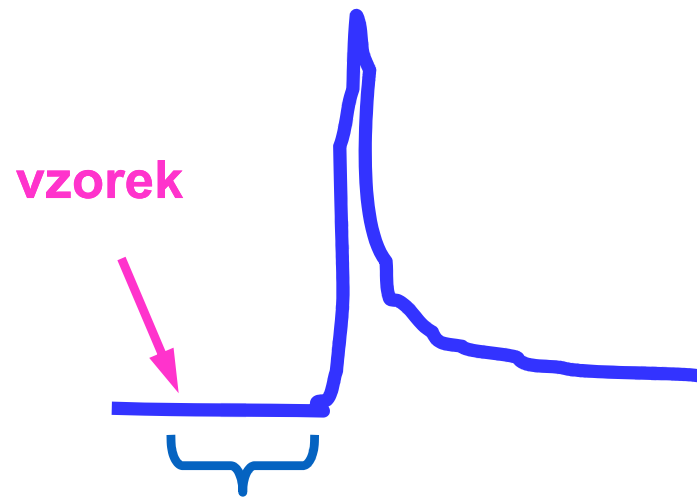
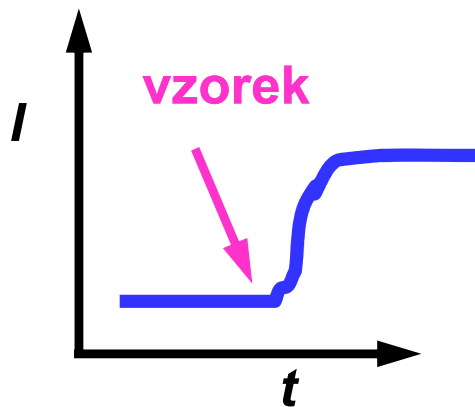
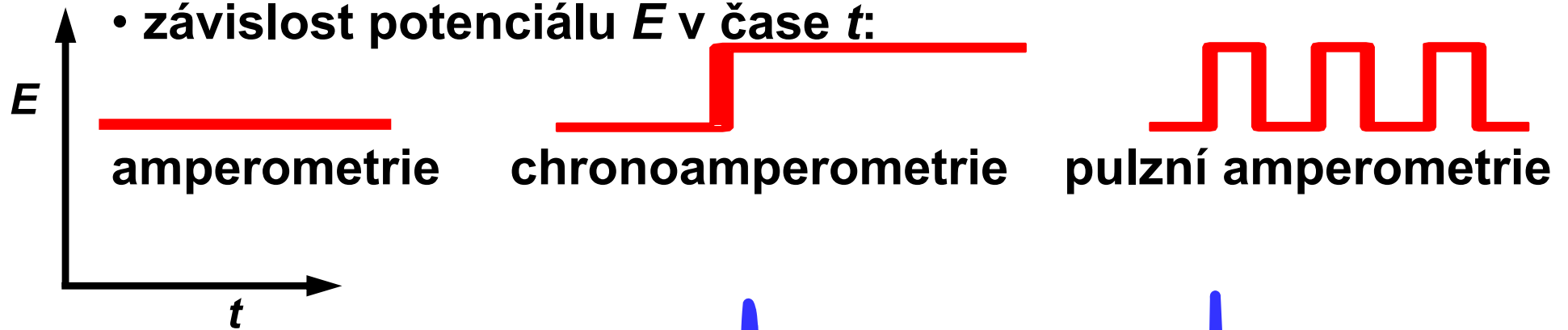
Měřicí techniky

- dle časového průběhu potenciálu na pracovní elektrodě
- nejjednodušší je **amperometrie**
- **chronoamperometrie** umožňuje získat informace o přechodných elektrodových jevech po skokové změně potenciálu
- **pulsní amperometrie** zvyšuje podíl signálu vůči šumu
- **lineární** a zejména **cyklická voltametrie** mají důležitou úlohu při vývoji amperometrických biosensorů
- pulsní voltametrické techniky již vyžadují poměrně drahé přístrojové vybavení, i když potřebné pulsy lze relativně snadno generovat pomocí počítače s D/A převodníkem.

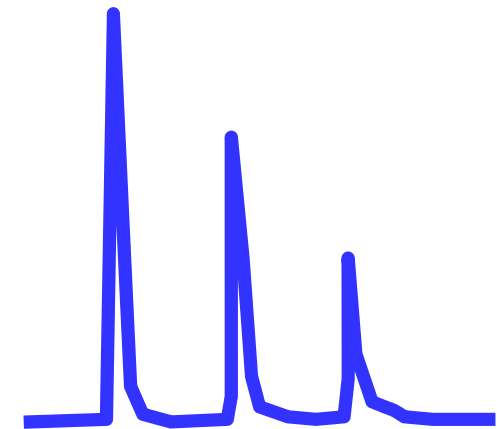


Amperometrické techniky

• závislost potenciálu E v čase t :



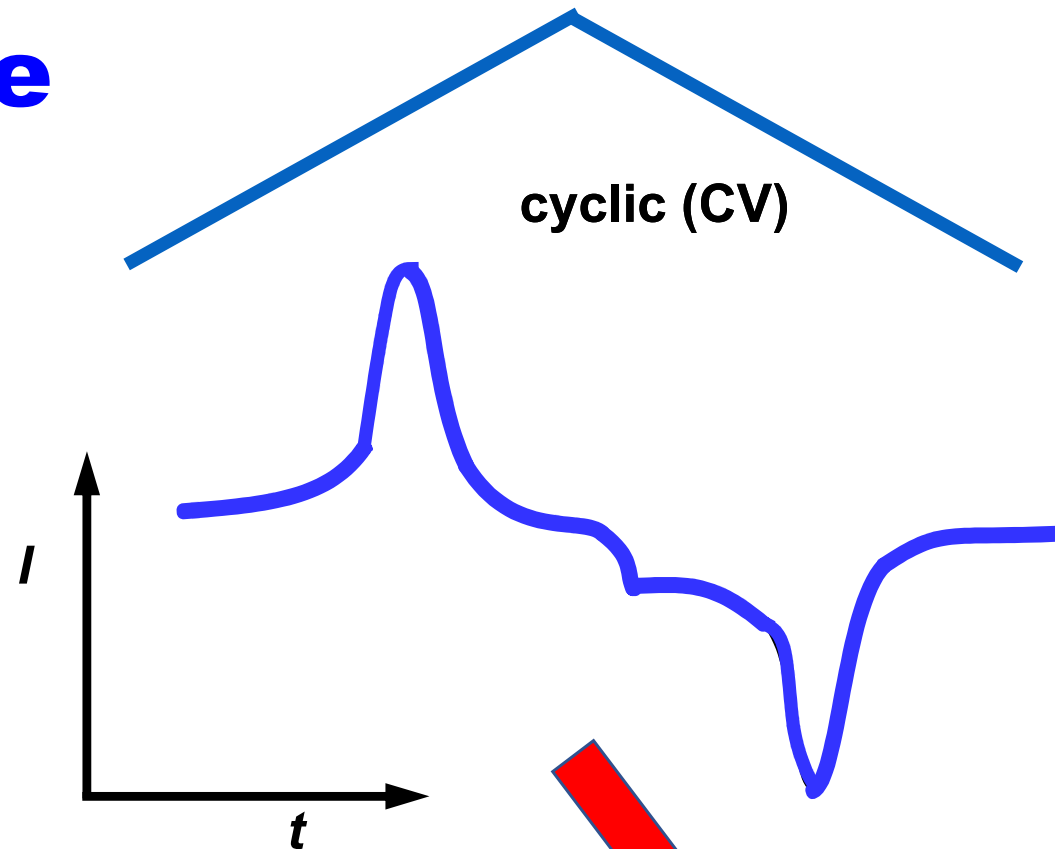
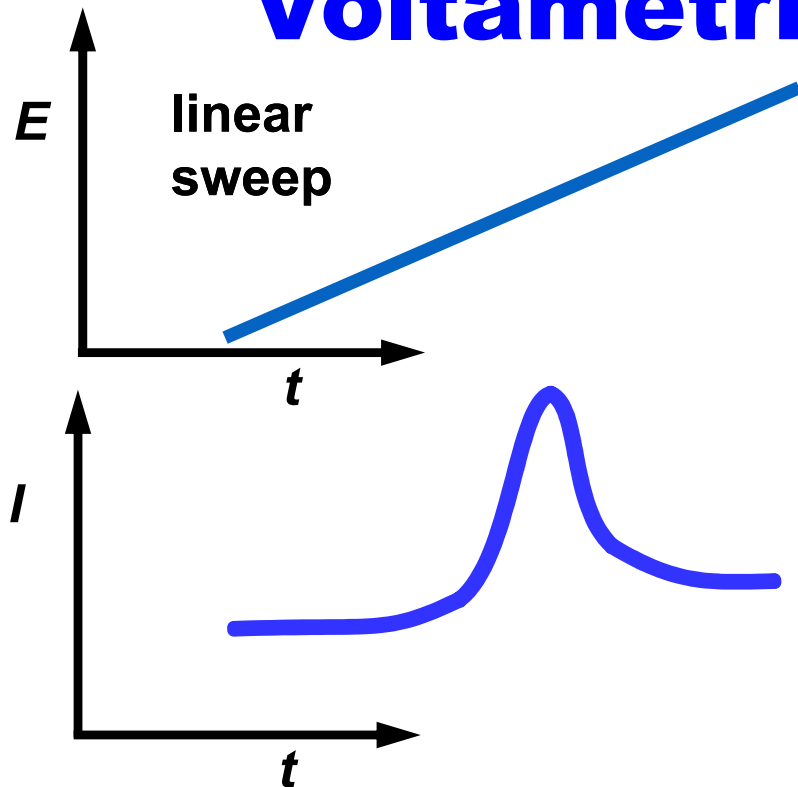
akumulace produktu
= lepší citlivost



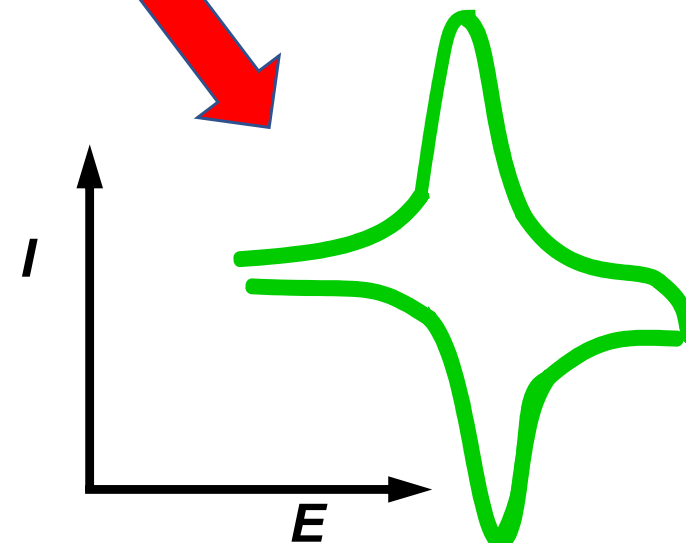
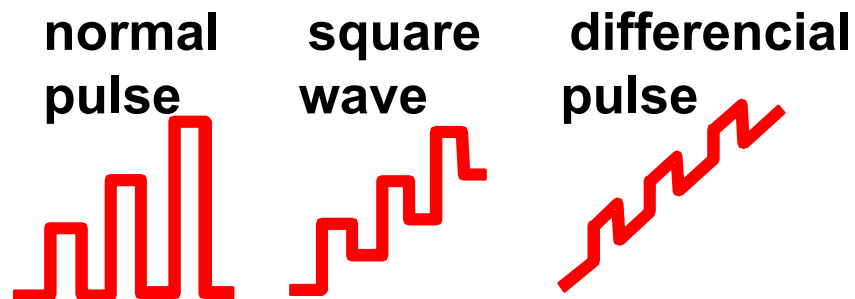
lepší signál/šum



Voltametrie



- užitečné zejména při vývoji enzymových elektrod - optimalizace
- pulzní voltammetrické techniky



Elektrochemické měřicí zařízení

- „laboratorní verze“
- enzymová elektroda v míchané nádobce
- potenciostat s LCD a zapisovačem
- jednoúčelový systém
- ... ~ 1990



Analyzátor



- Metrohm Polarecord
- EGG PAR 173
- EGG PAR 263
- Autolab

Amperometrické detektory



- ABD (Universal Sensors)
- ADLC2 (Lab. Přístroje)
- ... ~ 1995



Ruční systémy



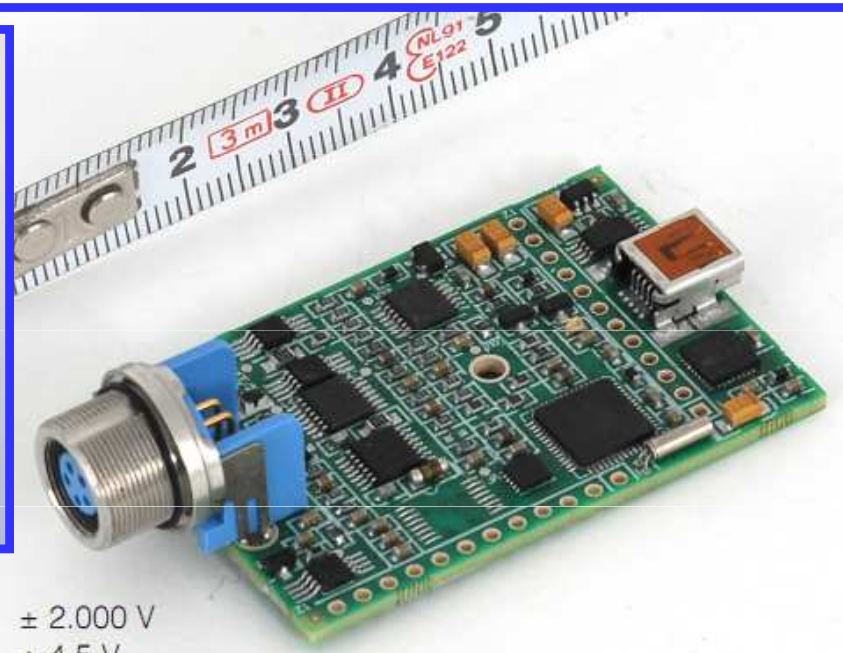
- PalmSens
- Univ. Florence
- MEB (MU)
- iStat
- ... ~ 2000



Kapesní systémy



Plugin systémy



Specifications:

- dc-potential range $\pm 2.000\text{ V}$
- compliance voltage $\pm 4.5\text{ V}$
- current ranges 1 nA to $100\text{ }\mu\text{A}$ (6 ranges)
- max. measured current $\pm 200\text{ }\mu\text{A}$
- max. output current $\pm 10\text{ mA}$
- current resolution 0.1% of current range
 1 pA at lowest current range



• Emstats (Palm Instruments)

• Microflow system (BVT Technologies)

• **připojte k USB portu ...**

(nebo k Bluetooth)

... ~ 2020



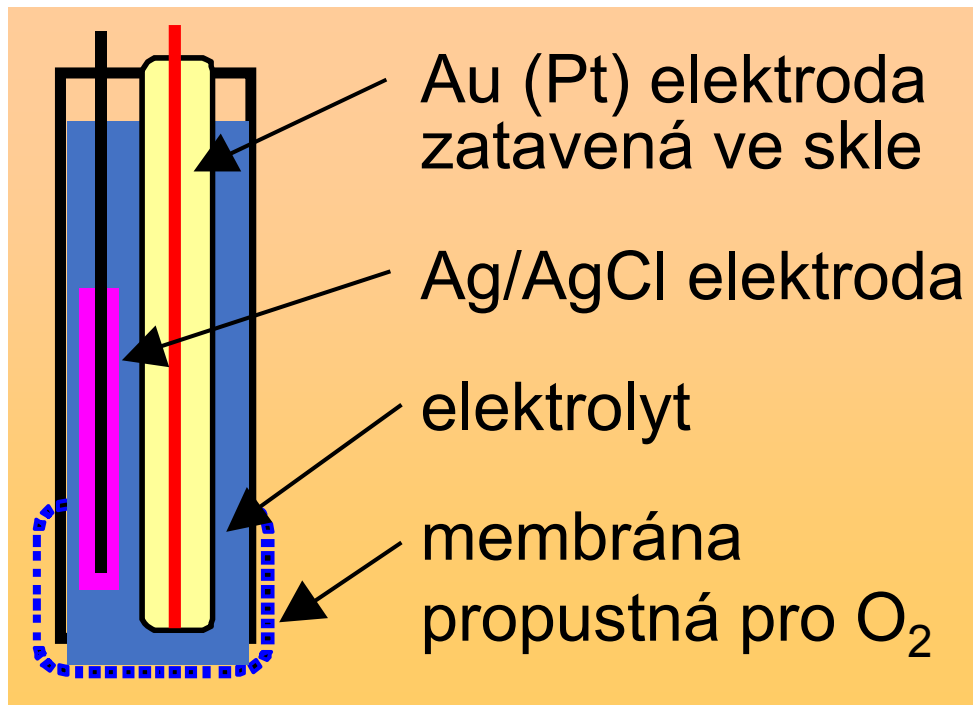
Konektory...



- opravdu různorodé (trochu to uživateli zkomplikovat)



Měření kyslíku a H_2O_2 • Clarkův sensor



výhodou sensoru je prakticky absolutní specifita pouze ke kyslíku - rušivé látky nemohou projít předřazenou membránou. Konstrukce elektrody pro stanovení **peroxidu vodíku** je podobná kyslíkové s tím rozdílem, že není použita plynopropustná membrána a používá se pozitivní polarizace, při které nastává **anodická oxidace peroxidu**

Elektrodová **redukce kyslíku** (-750 mV) je čtyřelektronový proces:



Elektrodová oxidace peroxidu vodíku (> 600 mV):



Kyslíkový sensor (ne elektroda)

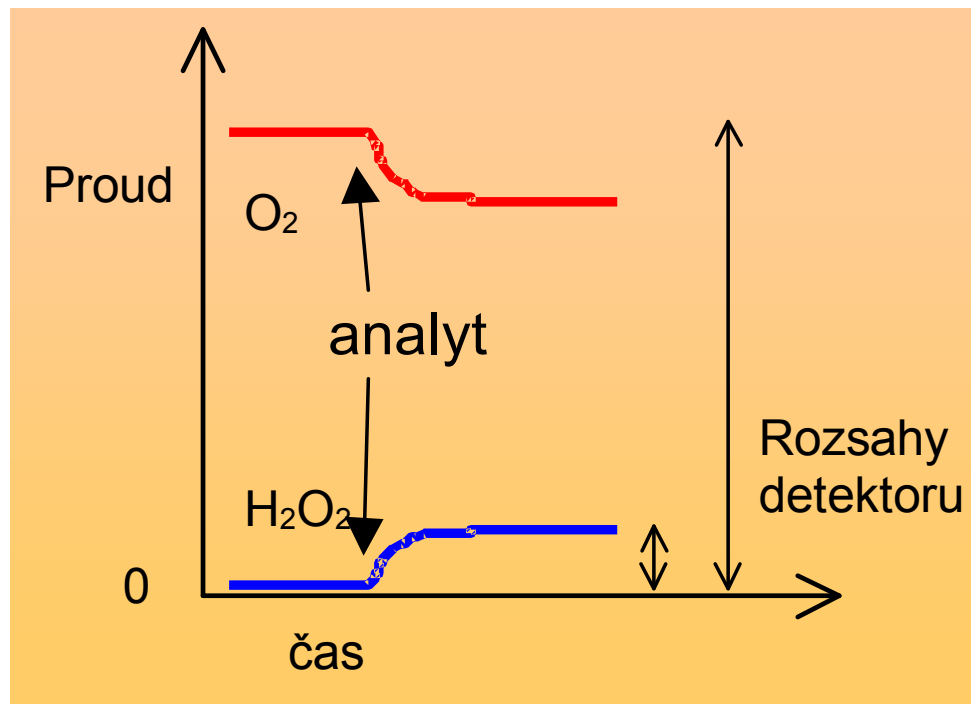


Enzymové elektrody s oxidasami

- tyto enzymy oxidují molekulu substrátu (analytu) za účasti kyslíku, přitom vzniká buď peroxid vodíku nebo voda:



- detekce peroxidu je obecně citlivější (nulová výchozí hladina)



- oxidace peroxidu vodíku je spojená s nebezpečím interference ze strany jiných oxidabilních látek, např. v séru mohou vadit kyseliny askorbová a močová či paracetamol
- specifita se dá zlepšit předřazením kontrolní membrány, která omezí přístup interferujících látek



Přehled oxidas

Substrát oxidasy	Zkratka	EC číslo	koenzym	H ₂ O ₂
Alkohol	AOD	1.1.3.13	FAD	ano
L-Aminokyseliny		1.4.3.2	FAD	ano
D-Aminokyseliny		1.4.3.3	FAD	ano
Askorbát		1.10.3.3	Cu	ne
Bilirubin	BRO	1.3.3.5		ne
Diaminy	DAO	1.4.3.6	Cu	ano
Fenol (Tyrosinasa)		1.14.18.1	Cu	ne
Galaktosa		1.1.3.9	Cu	ano
Glukosa	GOD	1.1.3.4	FAD	ano
L-Glutamát		1.4.3.11	FAD	ano
Cholin		1.1.3.17	FAD	ano
Cholesterol	COD	1.1.3.6	FAD	ano
p-difenoly (Lakasa)		1.10.3.2	Cu	ne
L-Laktát	LOD	1.1.3.2	FAD	ano
L-Laktát (dekarb.)	LMO	1.13.12.4	FMN	ne
L-Lyzin		1.4.3.14		ano
Monoaminy	MAO	1.4.3.4	FAD	ano
NADH				ano
Oxalát		1.2.3.4	Fp	ano
Pyruvát		1.2.3.3	FAD	ano
Sulfit		1.8.3.1	Mo	ano
Urát(Urikasa)		1.7.3.3	Cu	ano
Xanthin	XOD	1.1.3.22	Mo	ano



Enzymové elektrody s dehydrogenasami

- největší skupinou oxidoreduktas jsou dehydrogenasy (existuje přes 250 NAD⁺ a 150 NADP⁺ dependentních enzymů), analyticky významné druhy jsou shrnuty v tabulce
- katalyzující redoxní reakce s účastí NAD(P)⁺ / NAD(P)H:

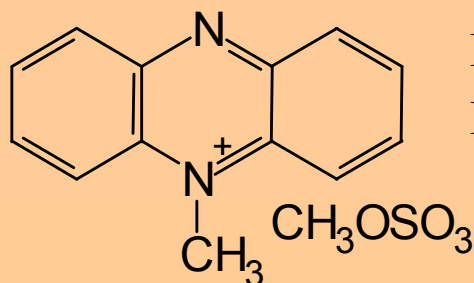


Přehled dehydrogenas

Substrát	Zkratka	EC číslo			
Alkohol	ADH	1.1.1.1	3-Hydroxybutyrát	3-HBDH	1.1.1.30
Aldehyd	AIDH	1.2.1.5	3-Hydroxysteroid	3-HSDH	1.1.1.50
Alanin	Ala-DH	1.4.1.1	Isocitrát	ICDH	1.1.1.42
Formiát	FDH	1.2.1.2	Inositol	IDH	1.1.1.18
Galaktosa	Gal-DH	1.1.1.48	L-Laktát	L-LDH	1.1.1.27
Glycerol	Gly-DH	1.1.1.6	D-Laktát	D-LDH	1.1.1.28
Glukosa	GDH	1.1.1.47	L-Leucin	L-LeDH	1.4.1.9
Glukosa-6-fosfát	G6P-DH	1.1.1.49	L-Malát	L-MDH	1.1.1.37
Glutamát	GIDH	1.4.1.3	Sorbitol	SDH	1.1.1.14

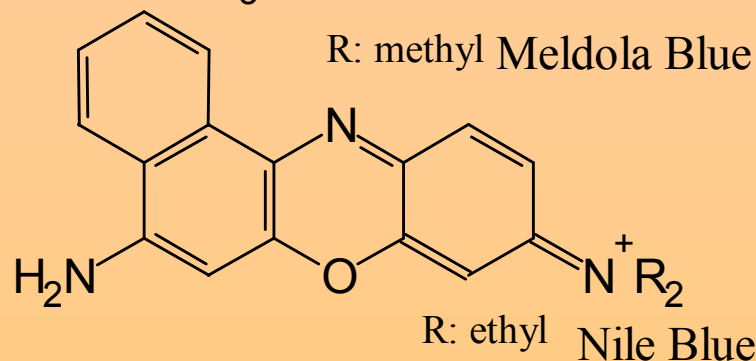


Detekce NAD(P)H



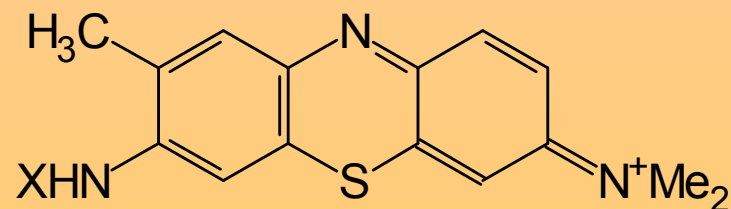
PMS

Fenazin methosulfát



R: methyl Meldola Blue

R: ethyl Nile Blue



X: H Toluidine Blue O

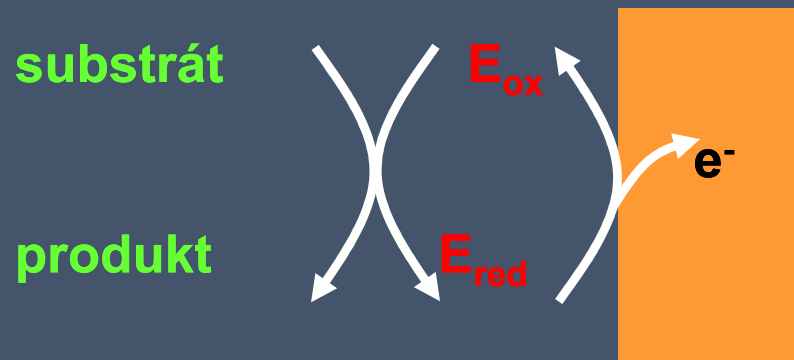
X: naphthoyl Naphthoyltoluidine Blue O



- elektrochemická detekce NADH je možná amperometrickou reoxidací vznikajícího NADH ($E^\circ -560 \text{ mV/SCE}$); přímá oxidace vyžaduje vysoký potenciál (přes 1 V na uhlíku), nastává dimerizace a adsorpce produktů na povrch elektrody
- reoxidace se může provést lépe prostřednictvím modifikujících látek ($E^\circ -200$ až -50 mV) vázaných na povrchu elektrody
- nejčastěji se používají fenaziny, fenoxaziny a fenothiaziny, oxidace nastává již kolem 0 V/SCE
- lze užít také hexakynoželezitan nebo TTF.TCNQ
- průběh reakce je homogenní - vzniká charge transfer komplex CT, po rozpadu je pak reoxidován mediátor, přitom $E > E^\circ$
- lze pracovat při nižším potenciálu



Přenos elektronů z biomolekul

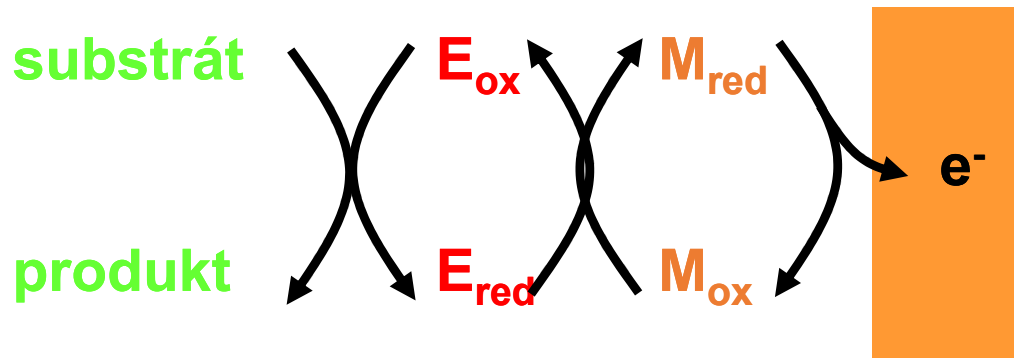


- přímý přenos elektronů pro konstrukci biosensorů je tento proces atraktivní - zjednodušil by konstrukci; bohužel, přímý přenos elektronů z biomolekul na elektrody byl pozorován u malých redoxních bílkovin (cytochromy *c* a *b*, azurin, ferredoxin) a některých enzymů (lakáza, peroxidáza).

- přímý reversibilní přenos elektronů z biomolekuly (bílkovina, nukleová kyselina) je obvykle ztížen řadou faktorů.
- v bílkovinách se sice vyskytuje celá řada redoxně aktivních skupin (disulfidické můstky, Fe-S skupiny, flaviny, hem, řada iontů kovů), ale nachází se obvykle uvnitř molekuly
- kontakt redoxní skupiny s povrchem elektrody je možný pouze pro určitým způsobem orientované molekuly, což výrazně snižuje proudové odezvy. Velikost molekuly zase vede k velmi pomalé difúzi.
- navíc se biomolekuly často adsorbují pevně na povrch elektrod a dochází tím současně k jejich denaturaci.



Přenos elektronů z biomolekul



- pro usnadnění výměny elektronů mezi enzymy a elektrodou se používají nízkomolekulární redoxní látky – **mediátory**
- použití mediátorů urychluje a obvykle vůbec umožňuje výměnu elektronů mezi aktivním centrem enzymu a elektrodou.

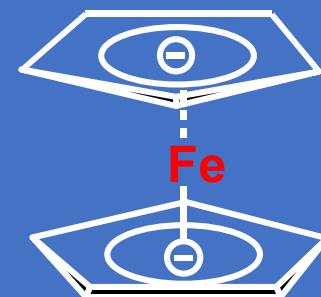
Požadavky na mediátor

- reaguje s biokomponentou a elektrodou
- dostatečně rychlý přenos elektronů (měla by být známa stechiometrie a počet přenášených elektronů)
- stabilní formy (redukováná i oxidovaná) za podmínek použití
- neúčastní se postranních reakcí (např. s kyslíkem)
- vhodný redoxní potenciál (větší rozdíl redoxních potenciálů E° mezi enzymem a mediátorem sice zvětší užitečný proud, současně však naroste také šum, nebezpečí interferencí a doba ustalování pozadí)
- bez vlivu pH na průběh redoxní reakce
- netoxický (např. pro aplikace in vivo)
- vhodný k imobilisaci (nerozpustný či snadno adsorbovatelný)

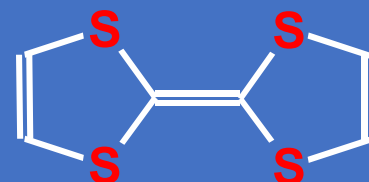


Mediátory

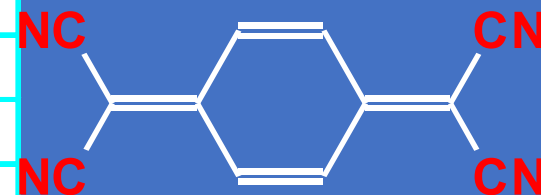
Název	E° (V)
tris-(2,2'-bipyridyl)ruthenium(III)	1.031
tris-(2,2'-bipyridyl)osmium(III)	0.603
ferrocen-1,1'-dikarboxylová kyselina	0.403
ferrocenylmethyltrimethylamonium	0.388
1,1'-bis(hydroxymethylferrocen]	0.224
ferrokyanid $K^4[Fe(CN)_6]^{4-}$	0.190
hydroxyethylferrocen	0.161
N,N'-dimethyl-p-fenylendiamin	0.139
ferrocenoctová kyselina	0.124
p-benzochinon	0.039
N,N,N',N'-tetramethyl-p-fenylendiamin	0.029
2,6-dichlorfenolindofenol (DCIP)	-0.016
1,2-naftochinon	-0.090
fenazin methosulfát (PMS)	-0.161
metylenová modř	-0.230
tetramethyl-p-benzochinon (durochinon)	-0.191
2-hydroxy-1,4-naftochinon	-0.378
fenosafranin	-0.493



ferrocen Fc



tetrathiafulvalen
TTF



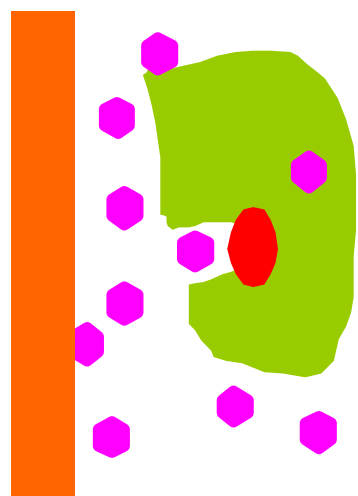
tetrakyanochinodi-
methan TCNQ



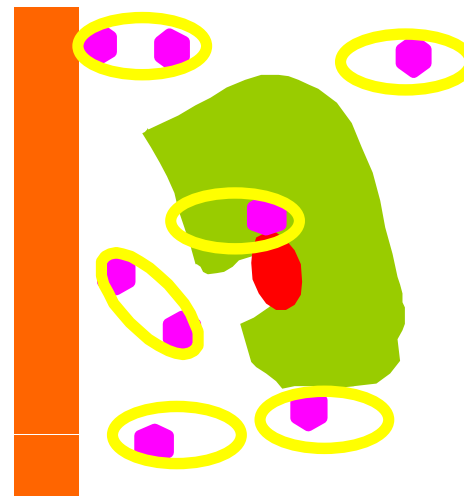
Použití mediátorů



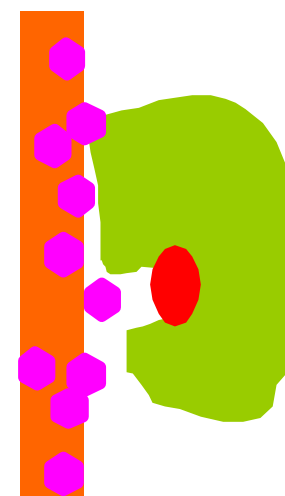
přímý přenos



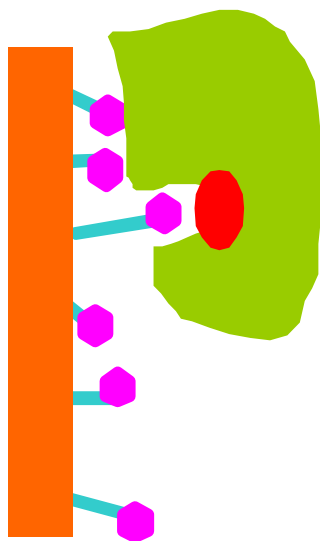
v roztoku



v micelách



v elektrodě

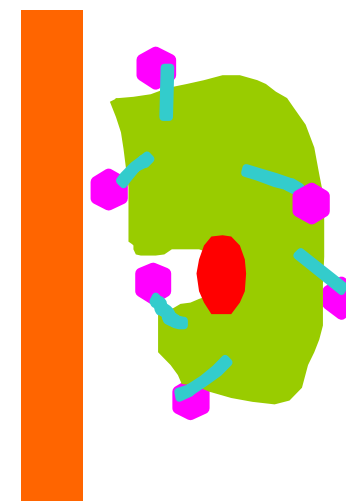


kovalentně na elektrodě



3D-polymerní mediátor

navázaný na



enzym



Biosensor pro glukosu



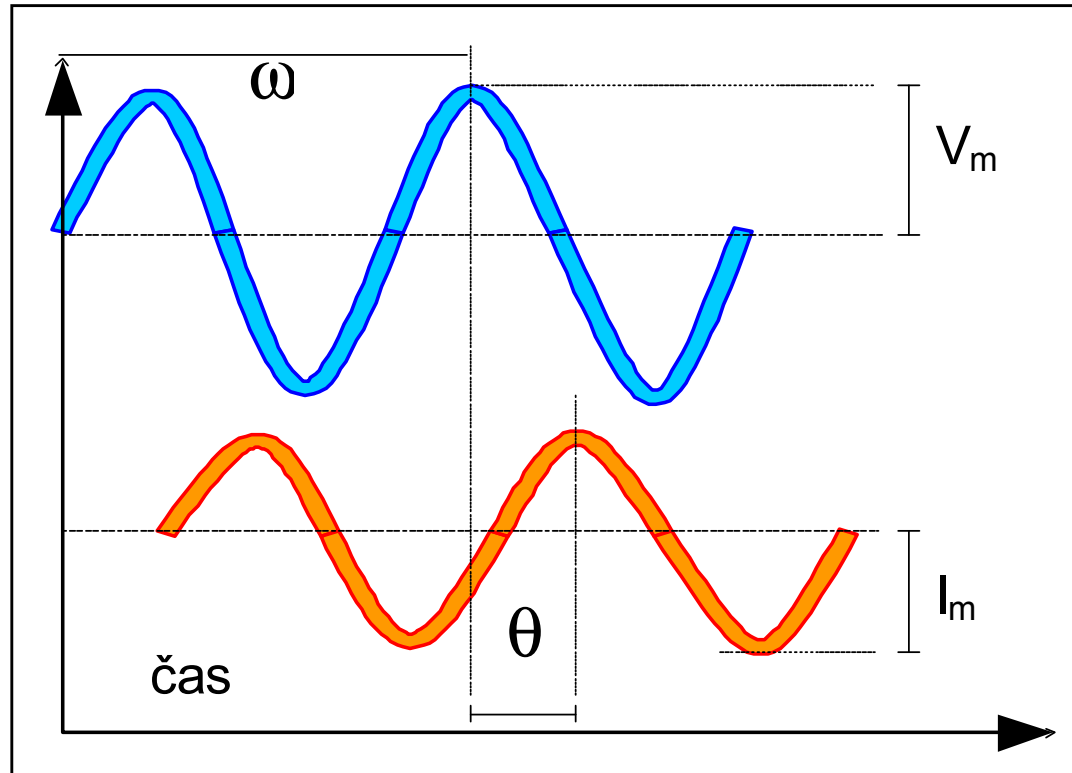
Enzymová elektroda
na jedno použití



Měřicí jednotka



Konduktometrie



- střídavé napětí (sinusoidální vlnění) se přivádí na dvouelektrodivý systém
- neuplatní se faradaické procesy, konc. polarizace, nabíjení dvojvrstvy
- mimo velikosti napětí V_m (běžně kolem 100 mV) lze měnit i frekvenci f ($\omega = 2\pi f$ "spektroskopie")
- studuje se odezva systému (elektrody a prostředí mezi nimi), měří se proud i a jeho fázový posun θ .

■ Impedance

- Impedance Z je vektorová veličina charakterisující chování systému v přítomnosti střídavého napětí. Jako komplexní veličina má velikost $|Z|$ a úhel θ , nebo složky reálnou R (resistance) a imaginární X (reaktance). Platí pro ni následující vztahy:

- $Z = R + jX$ $\text{tg}\theta = -X/R$ $|Z| = (R^2 + X^2)^{1/2}$ $|Z| = V_m/i_m$



Konduktometrické biosensory

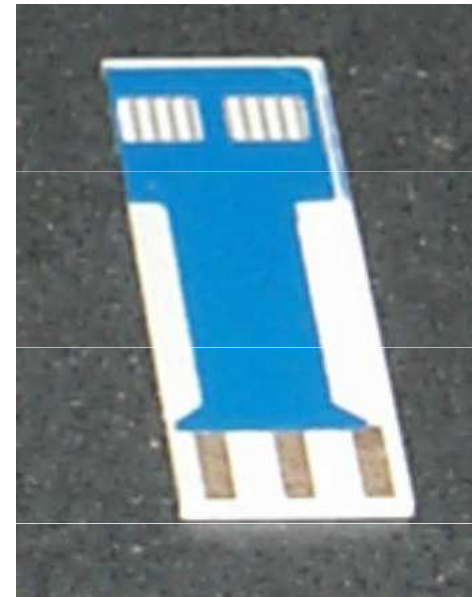
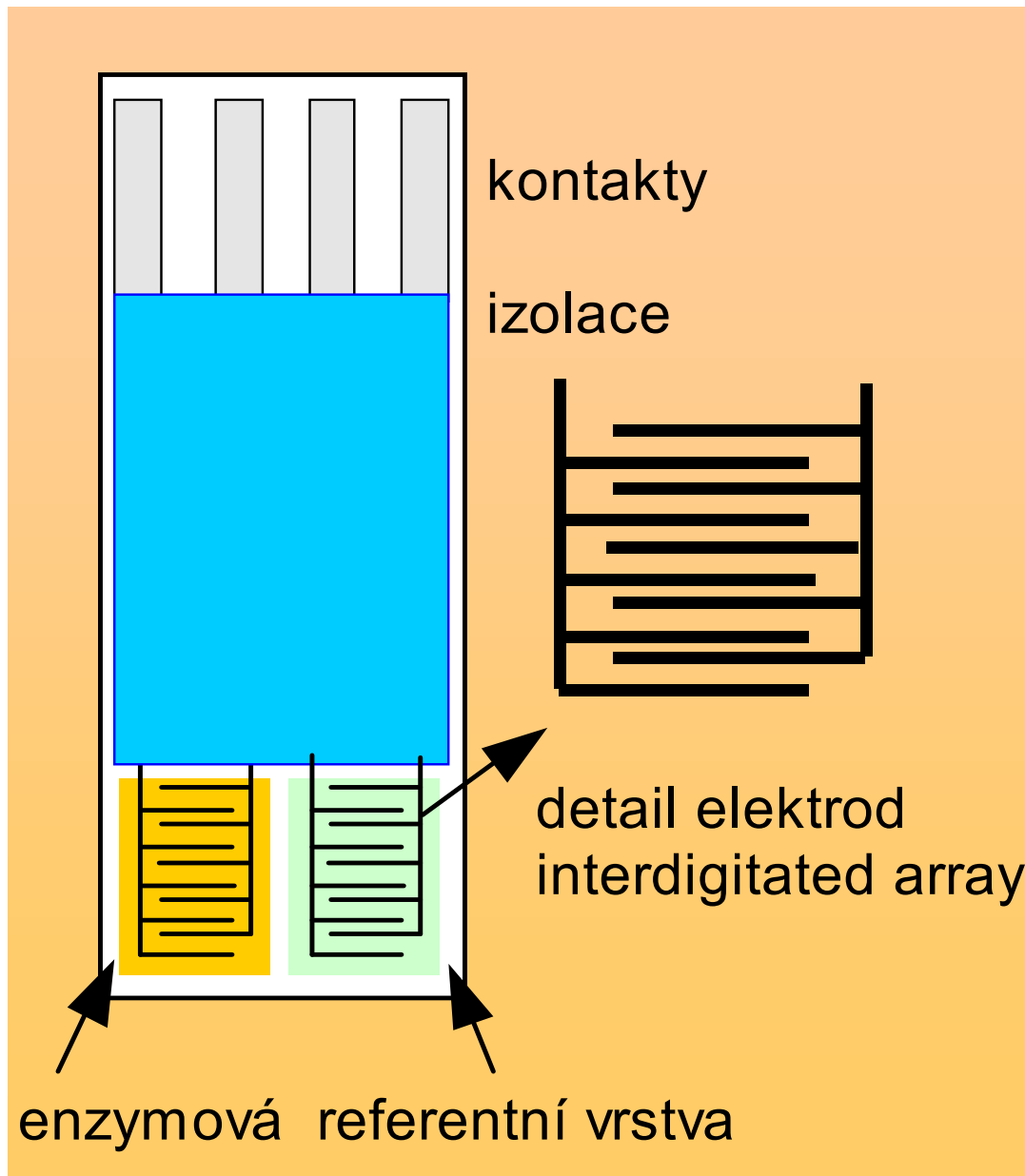
- sledování změn vodivosti při biochemických reakcích vyžaduje produkci či spotřebu iontů nebo změny velikosti nabitých částic. Produkce iontů je spojena s účinkem hydrolas a amidas, změna velikosti nabitých částic probíhá u reakcí fosfatas, sulfatas či nukleas. Velmi pohodlně tak lze např. provádět stanovení neutrálních lipidů, které po naštěpení lipasou poskytují ionty. Klasickým příkladem je však reakce ureasy při stanovení močoviny:



- problémem je vlastní vodivost pracovního prostředí (použití málo vodivých pufrů - organické, např. imidazol); také změnu vodivosti vyvolanou samotným přidavkem vzorku je třeba odlišit, je žádoucí zanedbat změny vodivosti v celém roztoku a sledovat především těsné okolí elektrod s imobilisovanými enzymy (vlastní signál v důsledku bioreakce), proto se výhodně používá diferenční uspořádání.



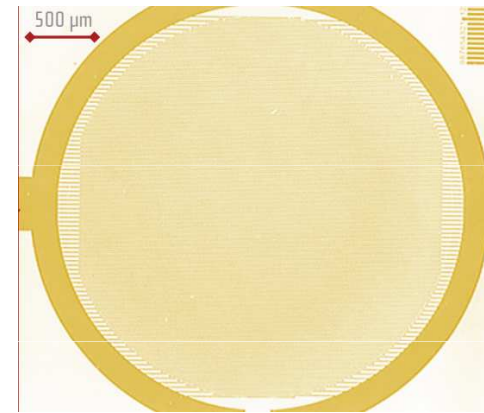
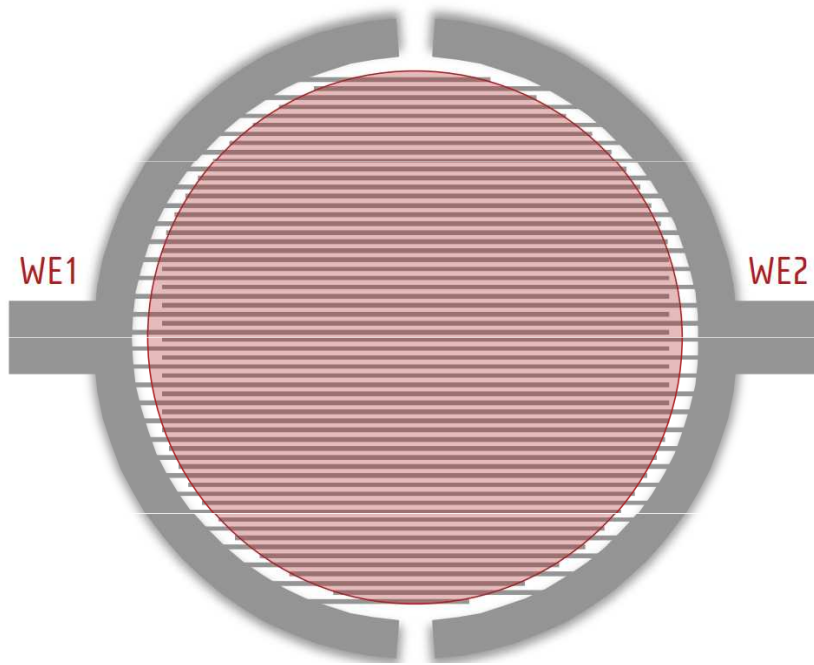
Konduktometrické převodníky



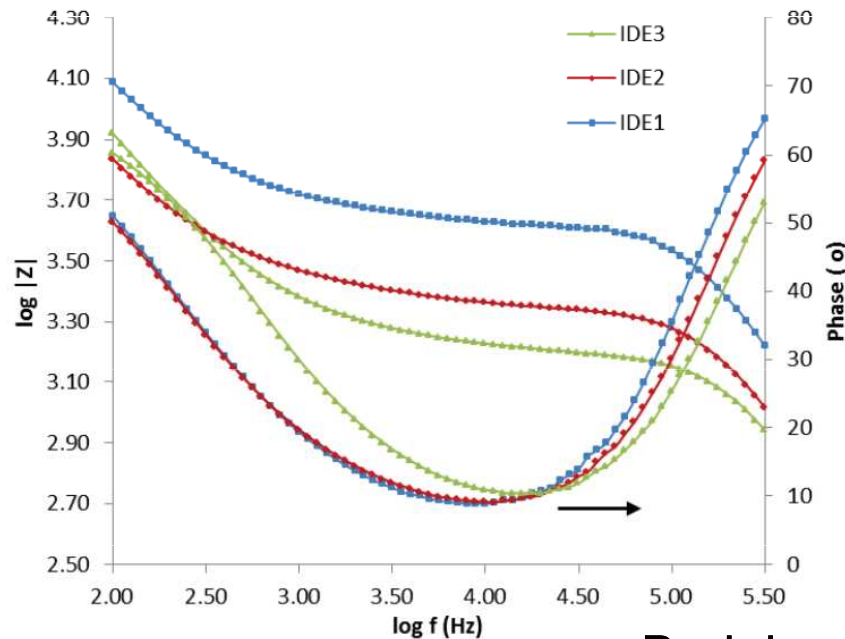
ukázka dvojitého konduktometrického převodníku (sítotisk, rozměry 7 x 25 mm)



„Interdigitated“ elektrody (IDE)



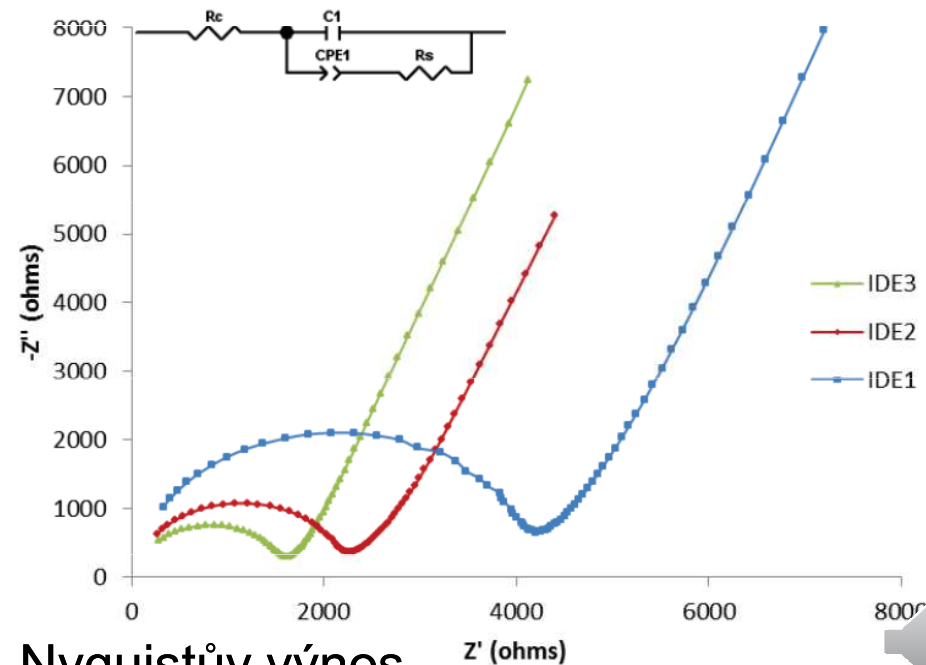
■ prstovité elektrody



Bodeho

vs.

Nyquistův výnos



Optické převodníky

- **zdroje světla:**

- lasery
- světloemitující diody (LED)
- výbojky (pro UV oblast - Xe)
- lampy (halogenové, deuteriové)

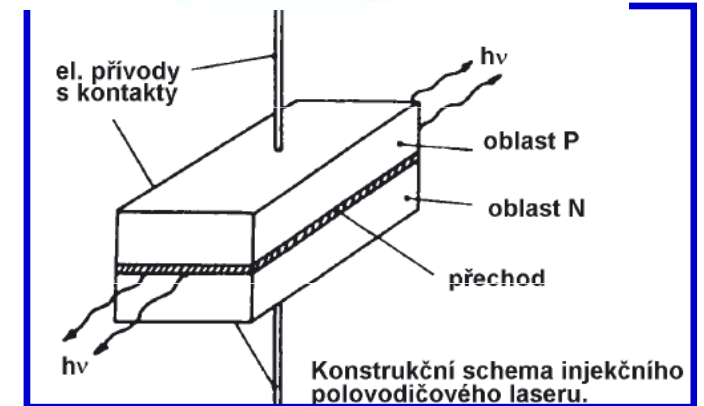
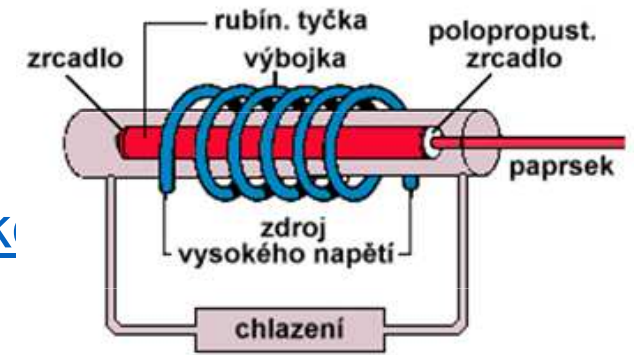
- **detektory pro měření intenzity světla:**

- fotonásobiče - jsou nejcitlivější, nevýhodou je potřeba vysokého napětí
- fotodiody „avalanche“ - o něco méně citlivé, větší šum
- obyčejné fotodiody (1000x méně než fotonásobiče), vykazují větší šum (malý vnitřní odpor), velmi levné, mechanicky stabilní a vhodné zejména pro přenosná zařízení
- fotodiodová pole - DAD „diode array detector“ - lineární řada fotodiod vedle sebe (100 - 2000), profil intenzity v závislosti na úhlu dopadu (spektrum)
- CCD resp. CMOS prvky (videokamery) - plošný profil intenzity, „image“ techniky

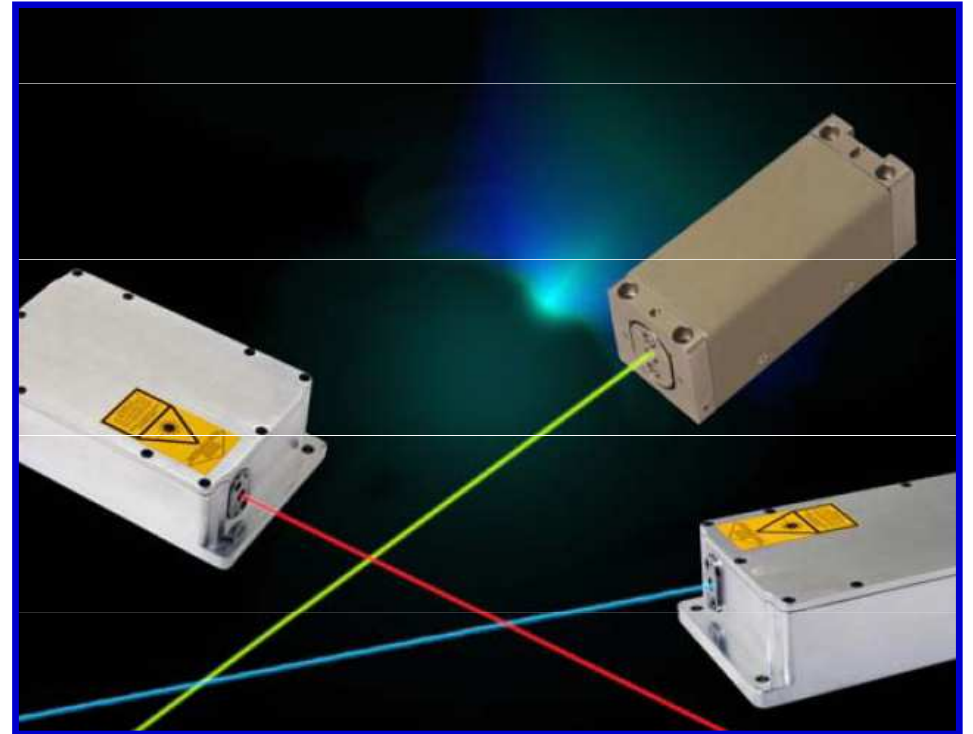
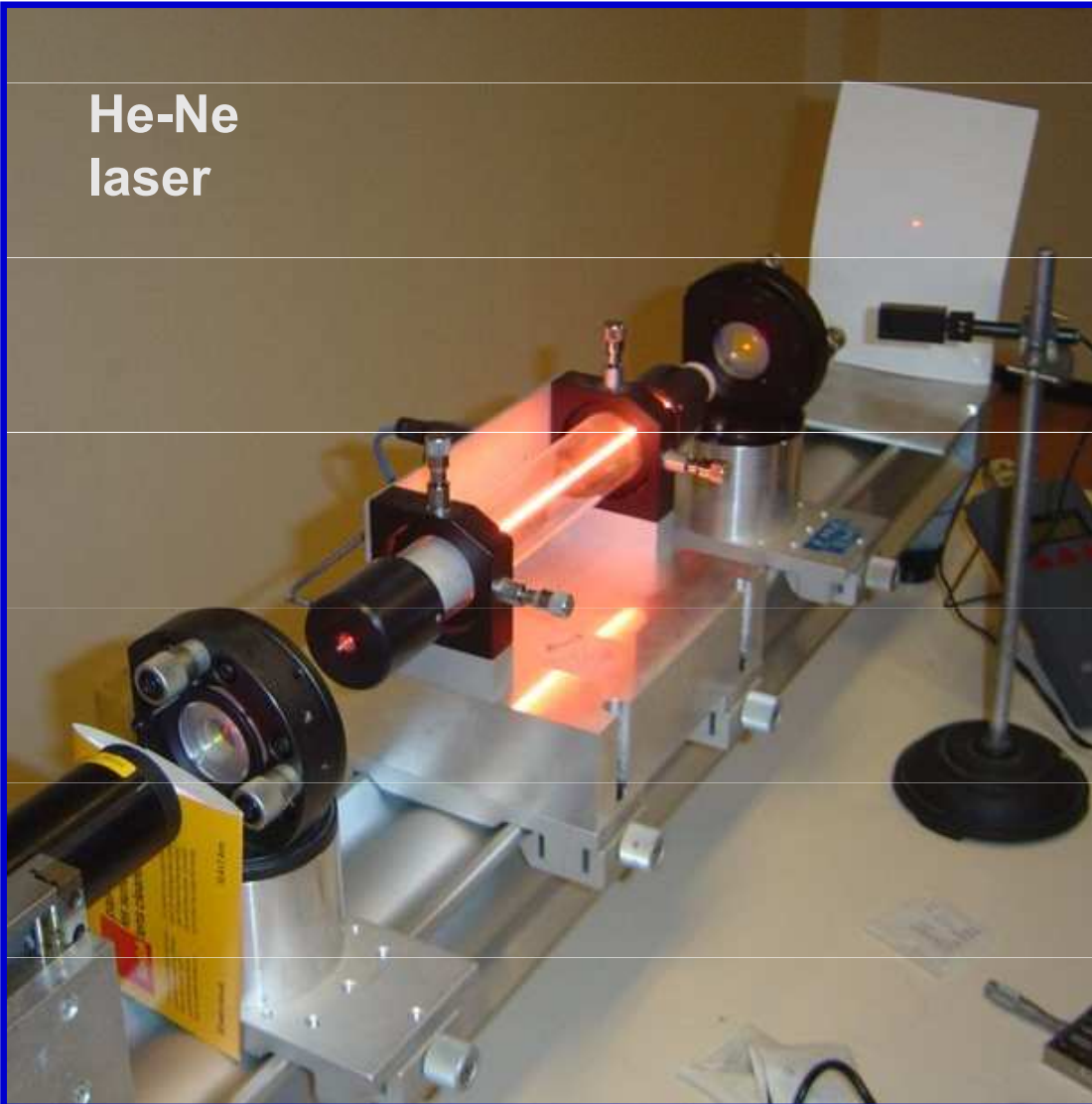


Princip laseru

- Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation (zesilování pomocí stimulované emise)
- světlo ve formě úzkého svazku, je polarizované, monochromatické
- složky: aktivní prostředí, rezonátor, zdroj energie
- funkce: zdrojem energie je do aktivního média pumpována energie, vybudí elektrony, ty při pádu na nižší energetickou hladinu vyzáří fotony
- fotony následně vrážejí do dalších elektronů, zase je vybudí = zesilování toku fotonů, jestliže tok dopadne na zrcadlo s odrazivostí 100% je zpátky odražen do zesilovacího procesu, nebo narazí na polopropustné zrcadlo, které paprsek propustí ven
- aktivní prostředí - oddělené kvantové energetické hladiny elektronů
 - plyn nebo směs plynů (plynové lasery)
 - monokrystal - hladiny vznikají dopováním (pevnotátkové)
 - polovodič s p-n přechodem (u diodových laserů)
 - polovodičové multivrstvy – jsou základem kvantových kaskádních laserů
- přechod elektronů z vyššího do nižšího stavu při současném vyzáření fotonu:
 - spontánní emise (při nízkém stupni obsazení vyšší hladiny)
 - stimulovaná emise (generace laserového záření) - je třeba čerpáním dosáhnout tzv. populační inverze, kdy vyšší hladina je obsazena více elektrony než nižší

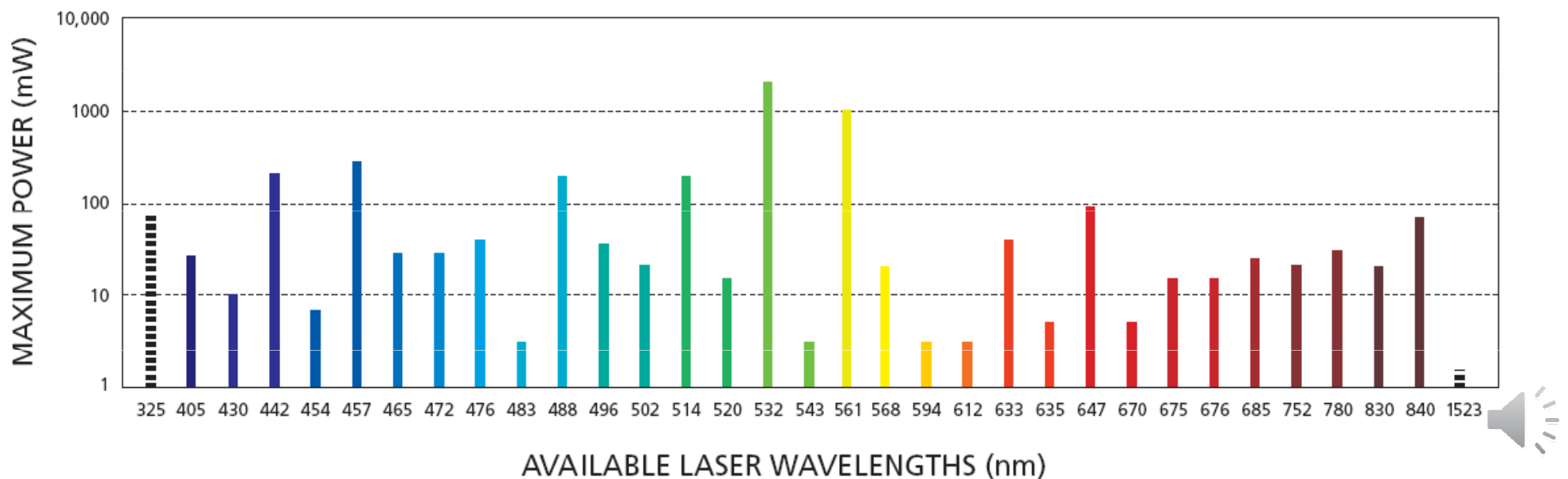


He-Ne laser



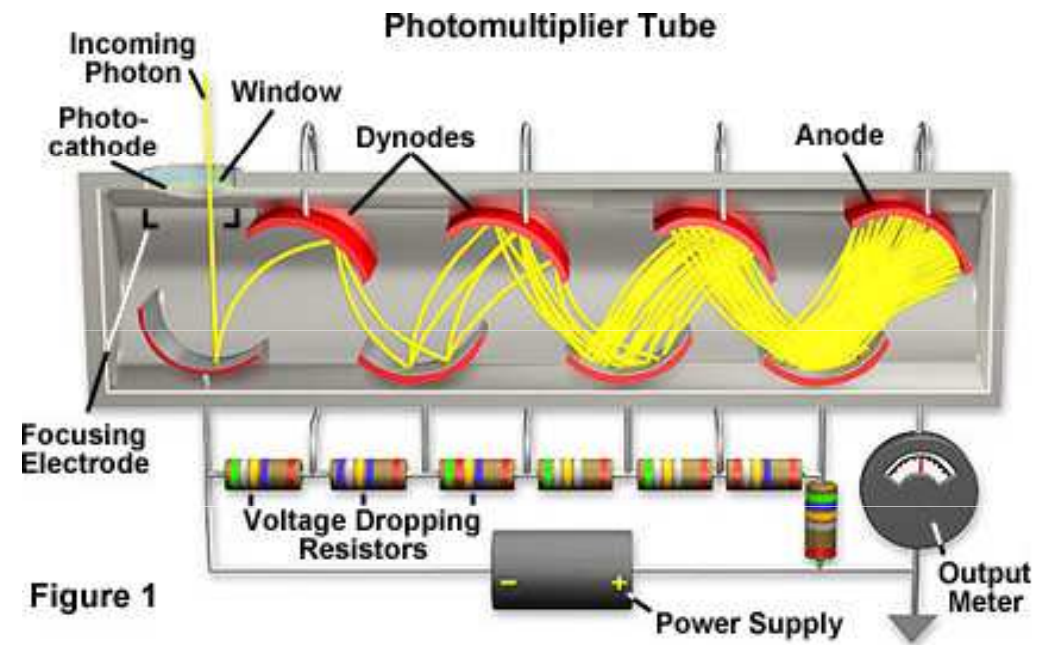
Lasery

TECHNOLOGY	WAVELENGTHS (nm)	ATTRIBUTES and OPTIONS*
Diode Laser Assemblies	360-440, 635-830, 1550	1-100 mW turnkey and OEM assemblies, high speed modulation, guaranteed performance using telecom standards
Diode-Pumped Solid-State	457-488, 532, 561	Superior stability +10 to 40° C. Verification data for performance and reliability. Modules for unique/constrained mounting
Argon-Ion	457-488, 496-514	Air-cooled to 500 mW. Remote cooling. Single-line, tunable, and multiline for fluorescence applications
Krypton / Argon	476-514, 568, 647-752	Economical multiline source for microscopy, fluorescence, and other applications. Mirrors can be replaced for other outputs
Helium Neon	543, 594- 633, 1523	Frequency stabilized, Brewster's tubes, plasma tubes, laser heads, power supplies, integrated assemblies with beam delivery
Helium Cadmium	325, 442	Single or dual wavelength output. Economical UV and violet light sources for inspection, stereolithography, and fluorescence

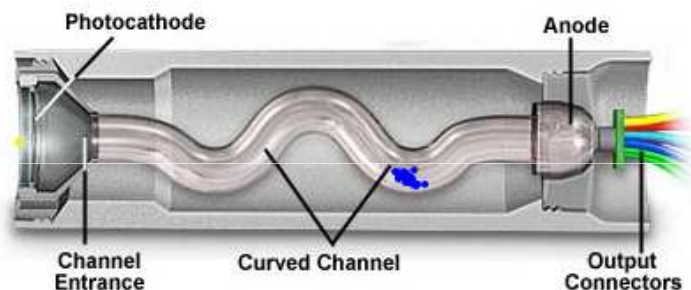


Fotonásobič

- PMT, Photo Multiplier Tube
- citlivá el. součástka k registraci slabého záření



- princip:
 - záření dopadající na fotokatodu z ní uvolní několik primárních elektronů
 - v el. poli jsou tyto elektrony urychlovány k dalším elektrodám (dynodám), na každé z nich uvolní další sekundární elektrony
 - vzniká stále silnější proud elektronů, který vyvolá v měřicích obvodech fotonásobiče elektrický impulz
- kanálová konstrukce



Další fotodetektory

- **Fotorezistor**

- princip - vnitřní fotoelektrický jev, nelineární, pomalý (závisí na osvětlení), snižuje odpor s rostoucím ozářením
- monokrystal polovodiče nebo polykrystalická tenká vrstva (CdS) nanesená na nosné destičce, dva kontakty, hermetické pouzdro zaručujícím přístup záření

- **Fotodioda**

- PN a PIN, foton vstupující do polovodiče s dostatečnou energií může být absorpován, přičemž vzniklý volný elektron a díra vytváří v polovodiči napětí (fotovoltaický jev) nebo zvětšují jeho vodivost (fotovodivostní jev)
- lavinové (avalanche) PIN fotodiody - vykazují vlastní zesílení. Toto zesílení fotoproudu je způsobeno přiložením napětí, které urychluje dopadajícími fotony vzniklé nosiče náboje natolik, že při srážce s mřížkou krystalu polovodiče dojde k vyražení dalších (sekundárních) elektronů

- **Fototranzistor**

- místo báze dopadá světlo, zesílení 10 až 100x



CCD detector AvaSpec



Focussing mirror

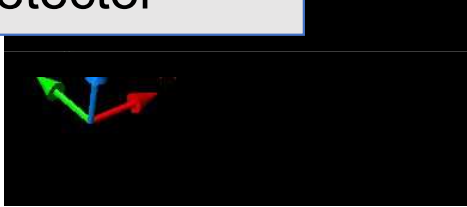
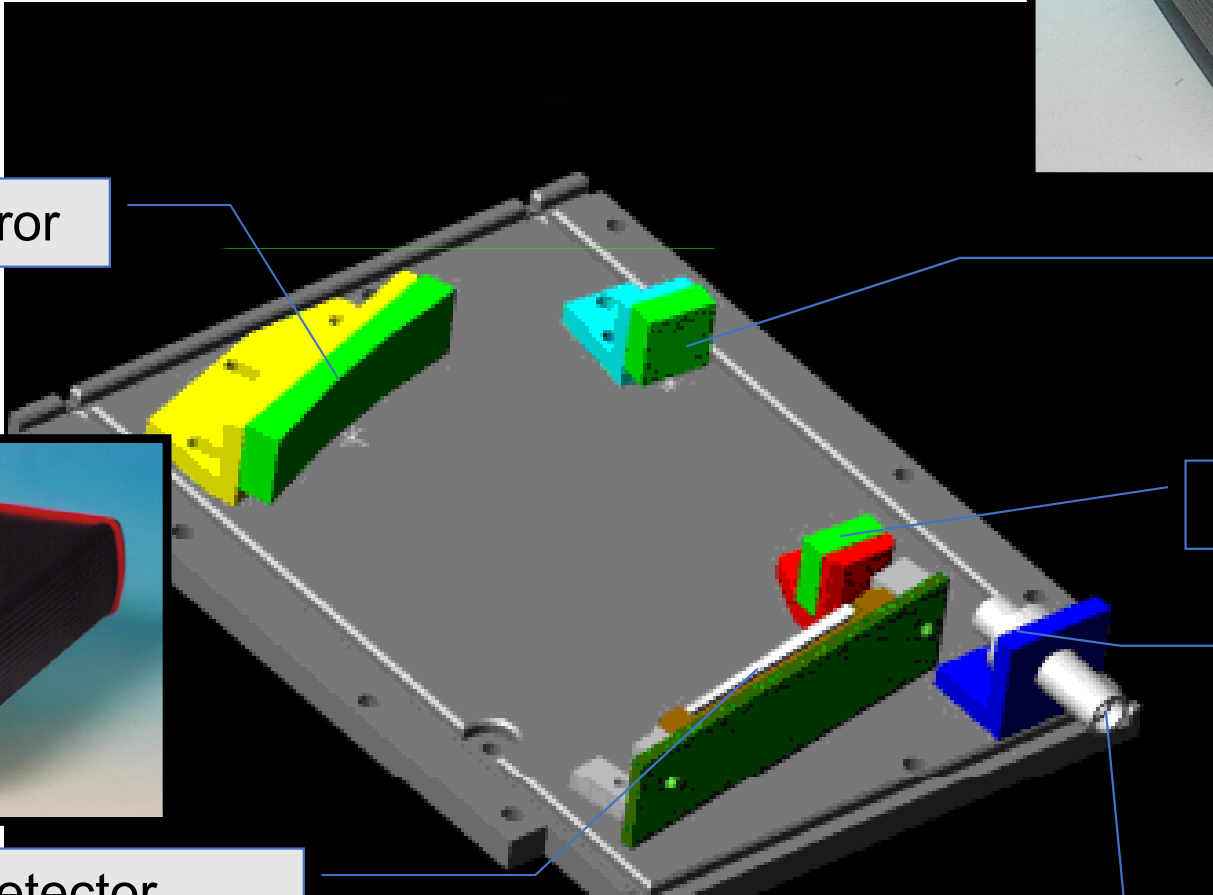
Collimating mirror

Grating

Slit, mode stripper

SMA connector

Detector



Porovnání detekčních elementů

Detector	TAOS 102	HAM256	HAM1024	SONY2048
Type	Photo diode array	CMOS linear array	CMOS linear array	CCD linear array
# Pixels, pitch	102, 85 μm	256, 25 μm	1024, 25 μm	2048, 14 μm
pixel width/height	77 x 85 μm	25 x 500 μm	25 x 500 μm	14 x 56 μm
Sensitivity (HL2000, 8 μm fiber)	3400 counts @ 5ms int. time (AvaSpec-102)	3000 counts @ 100 ms int. time	3000 counts @ 200 ms int. time	13000 counts @ 2ms int. time
Peak wavelength	750 nm	500 nm	500 nm	500 nm
Signal/Noise	1000:1	10.000 :1	10.000 :1	1000 :1
Dark noise	Ca. 11 counts			Ca. 22 counts
Wavelength range	360-1100 nm	200-1000 nm	200-1000 nm	200*-1100 nm
Frequency	2 MHz	330 kHz	330 kHz	2 MHz



Optické převodníky

- **pomocné prvky**

- zrcadla (normální, polopropustná), hranoly
- mřížky, filtry
- štěrbin, závěrky
- polarizátory, depolarizátory
- lampy (halogenové, deuteriové)

- **světlovodné prvky**

- planární (vrstvy)
- cylindrické (optická vlákna)

přesná výroba, nákladné



Optická vlákna

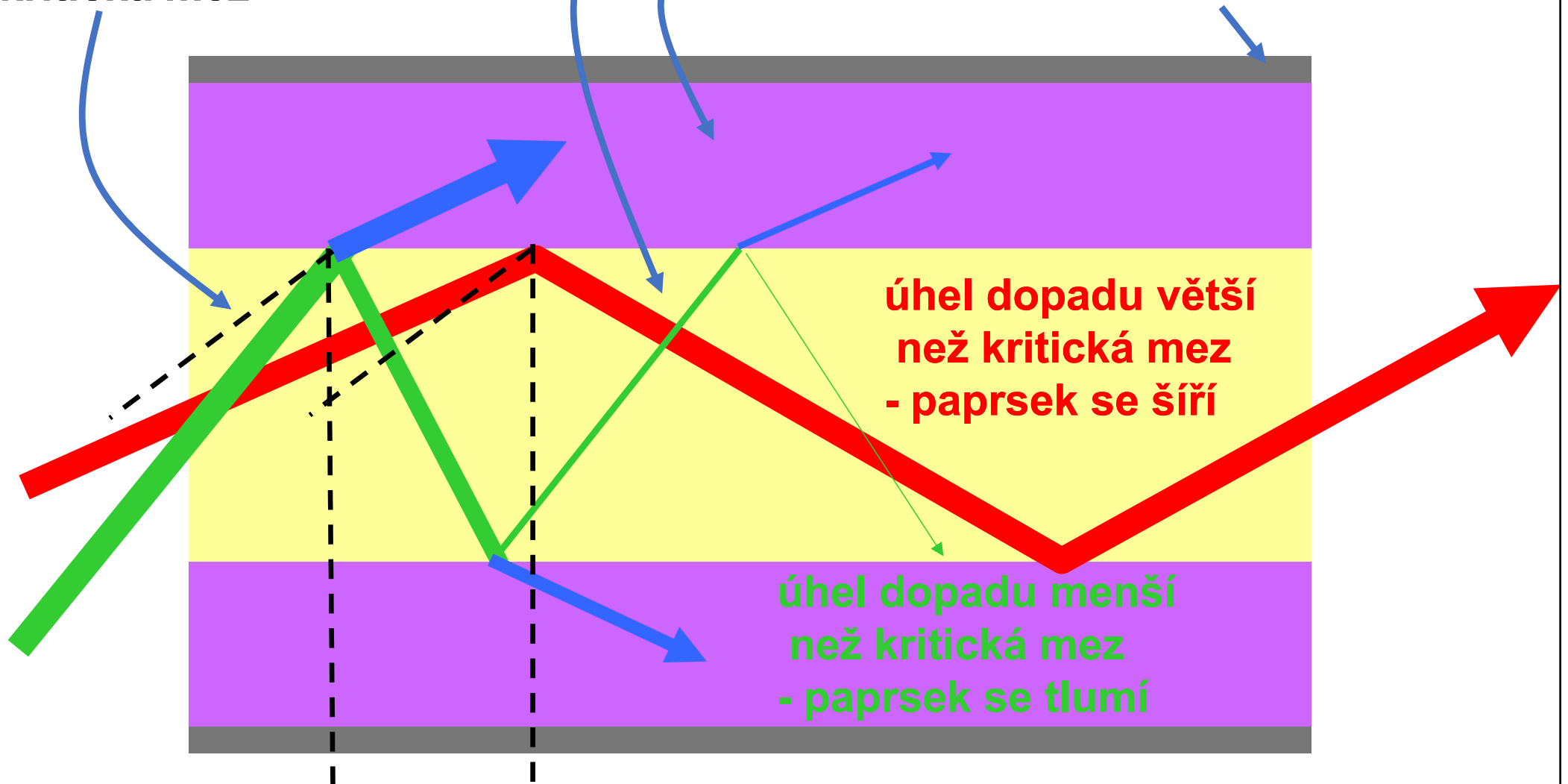
šíření paprsku ve světlovodu

jádro (core) - index lomu n_1

plášť (cladding) - n_2 , $n_2 < n_1$

mechanický obal

kritická mez



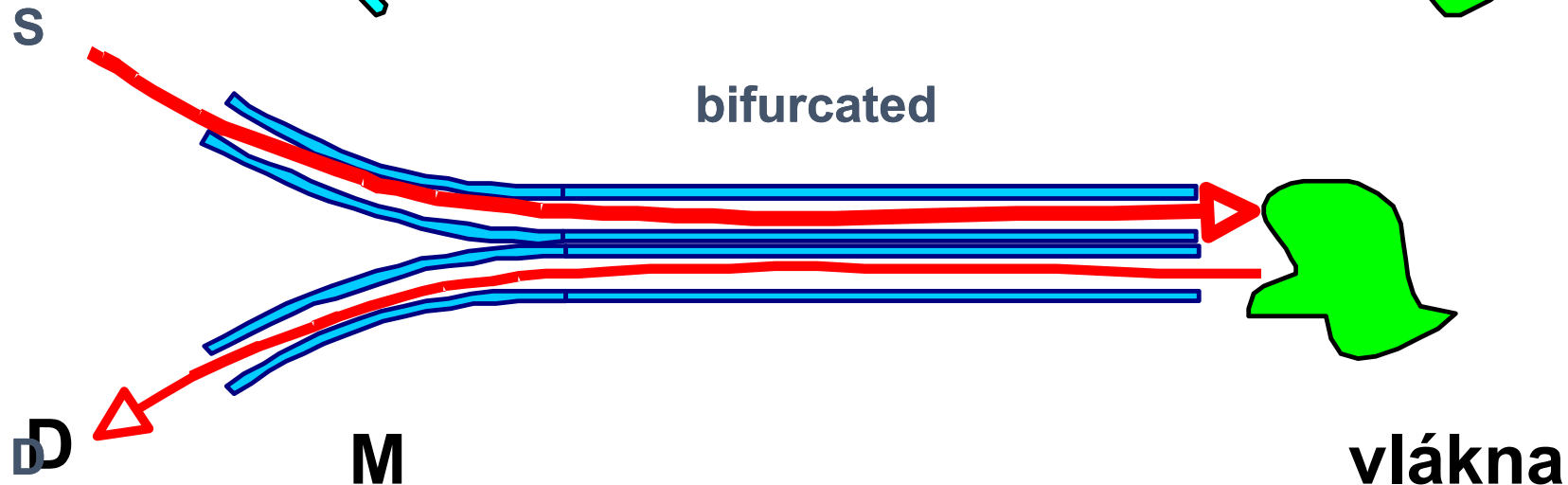
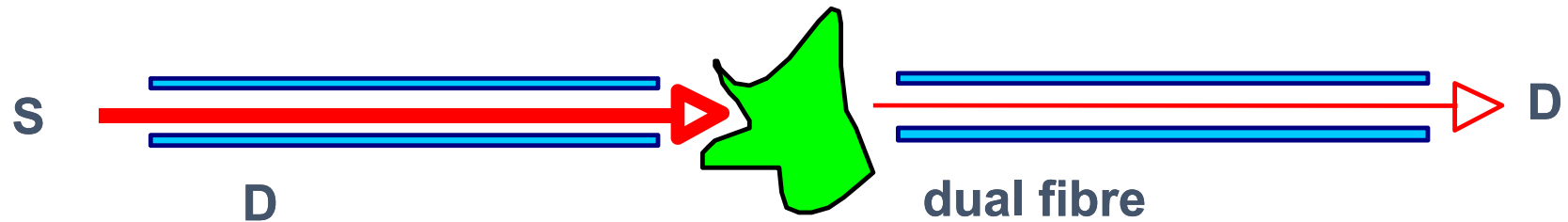
numerická apertura - úhel dopadu menší než kritická mez



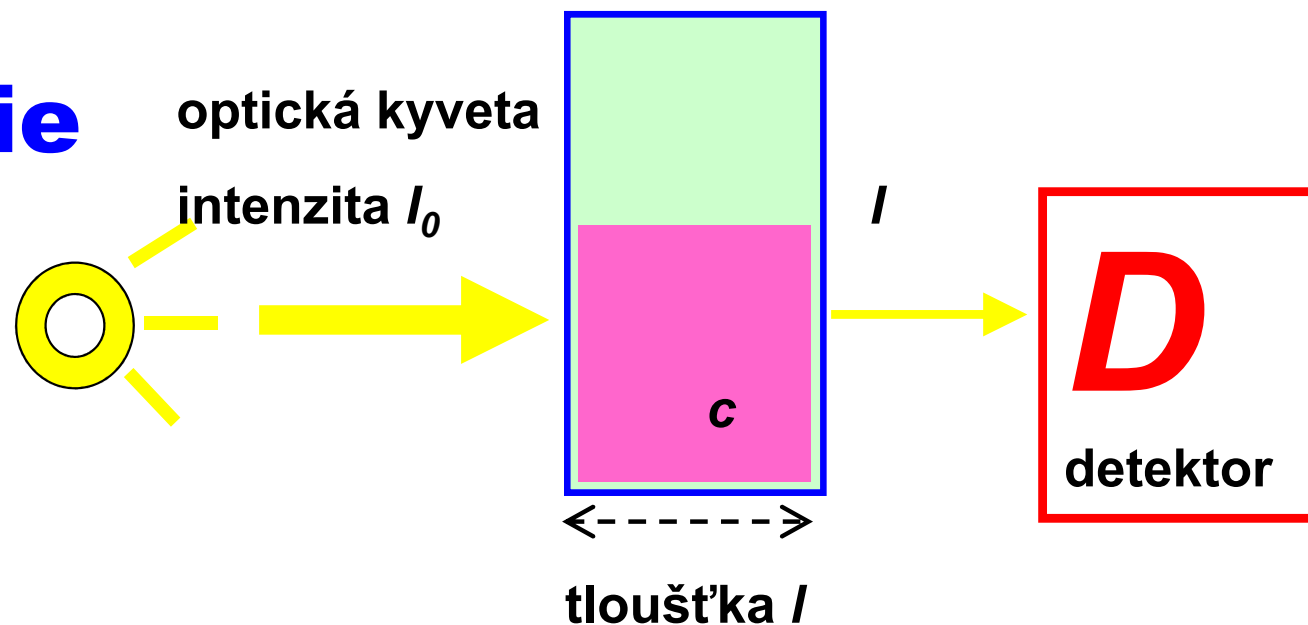
Měřicí konfigurace



- nejběžněji se optická vlákna v oblasti biosensorů používají pro přímé ozařování vzorků (extrinsic sensing), interakce se tedy uskutečňují na konci vlákna:



Fotometrie



$$A = \varepsilon c l$$

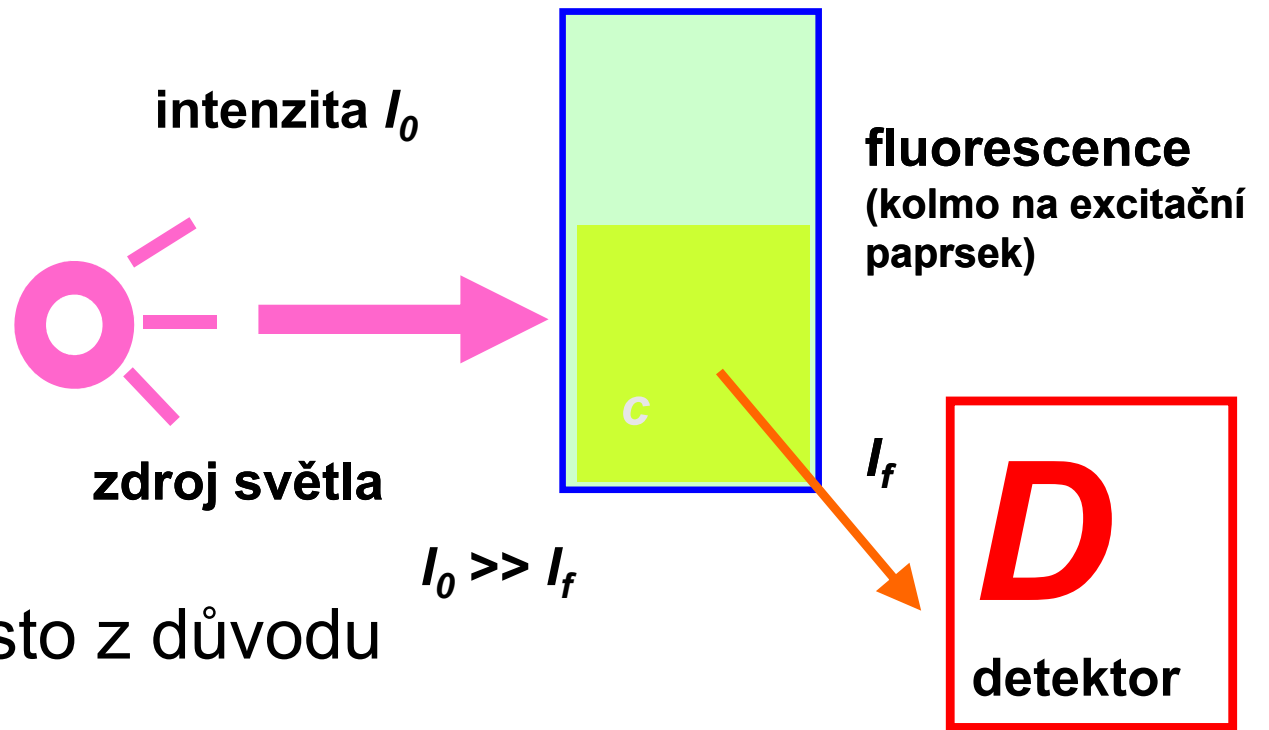
Lambert-Beerův zákon

- pokles intenzity (absorbce) světelného paprsku po průchodu kyvetou s barevnou látkou je úměrný koncentraci stanovované látky
- v praxi se používá **absorbance** A , která je přímo úměrná koncentraci c (extinkční koeficient ε při dané vlnové délce je konstantou úměrnosti) a velikosti l kyvety
- absorbance je bezrozměrná veličina
- (rozptyl světla se obvykle zanedbává)



Fluorescence

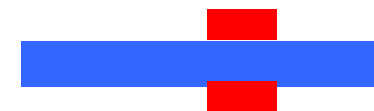
$$I_f = k\Phi \varepsilon c l$$



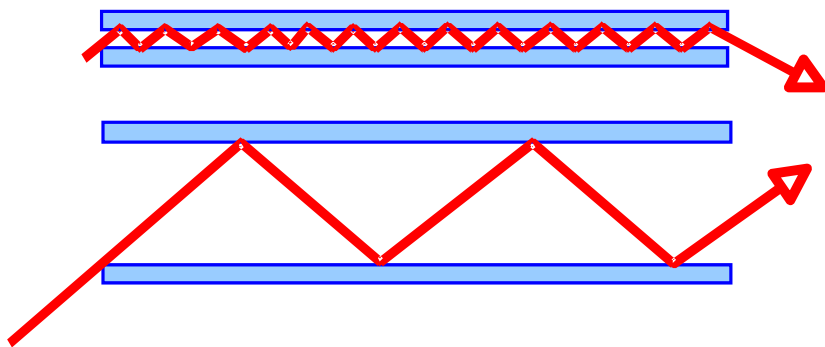
- je využívána velmi často z důvodu vysoké citlivosti
- absorbcí energie přechází molekula do excitovaného stavu, návrat do základního stavu je provázen emisí záření – fluorescence
- intenzita fluorescence I_f závisí na absorbanci a kvantovém výtěžku Φ
- emisní spektrum látky je oproti excitačnímu posunuto k vyšším vlnovým délkám (Stokesův posuv)
- pro budící záření se často používá světlo laseru, je také výhodné používat polarizované záření



Měřicí konfigurace



- při tzv. **intrinsic sensing** optický vodič neslouží jen pasivně pro vedení světla, ale chemické změny v těsném okolí světlovodu se sledují na základě vyvolaných změněných podmínek pro vedení uvnitř světlovodu

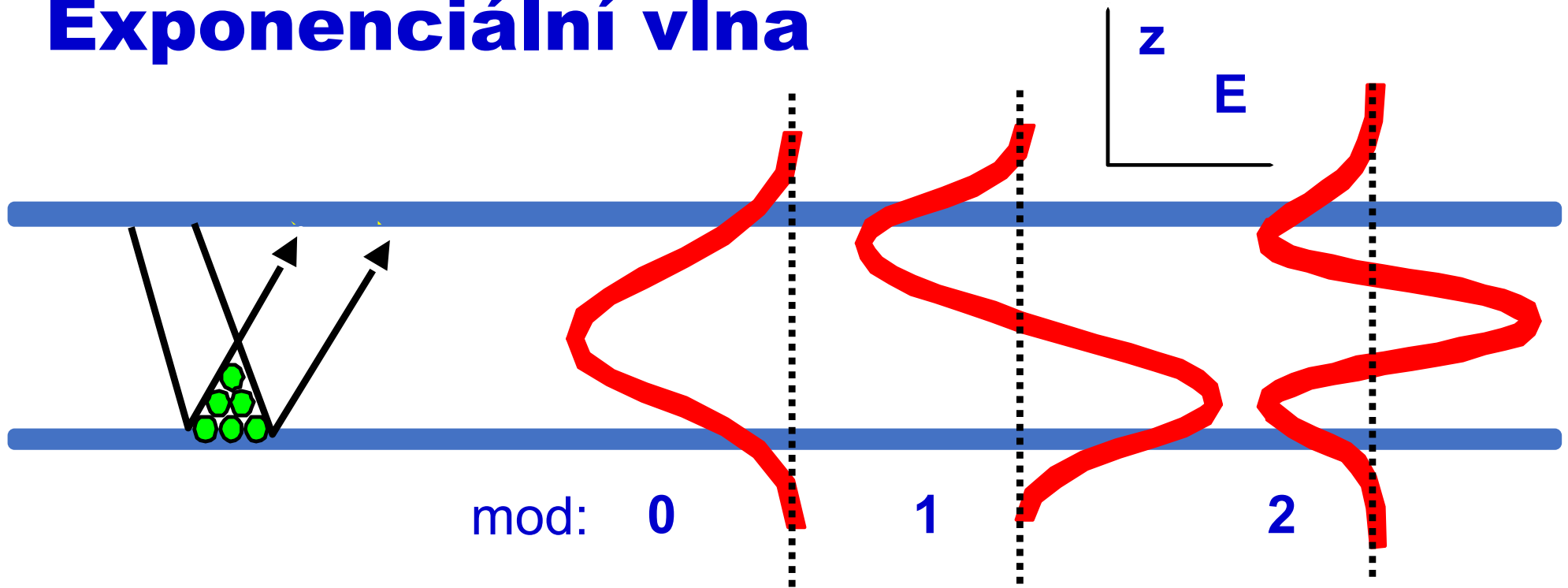


Při vedení světla uvnitř světlovodu dochází k interferenci mezi dopadajícím a odraženým světelným paprskem a tím vzniká elektromagnetické stojaté vlnění kolmé k odrážejícímu povrchu (**tlumená vlna, evanescent wave**)

V tenkém světlovodu připadá na jednotku délky mnohem více odrazů. Světlo se začíná šířit pouze v určitých diskrétních modech, daných pouze určitými úhly dopadu. Mody lze určit na základě průměru světlovodu, indexů lomu a vlnové délky světla. Za těchto podmínek se mimo jiné zachovává fázová koherence laserového paprsku.



Exponenciální vlna



- elektromagnetická vlna se šíří do okolí mimo světlovod, přitom její intenzita klesá exponenciálně se vzdáleností od rozhraní („exponenciální vlna“)
- na vnějším povrchu světlovodu může docházet k interakcím s přítomnými látkami
- energetické profily exponenciální vlny jsou pro tři základní mody ukázány na obrázku
- pro vyšší mody narůstá podíl „vnější energie“ a zvětšuje se penetrační hloubka.



Enzymové optody

- **Přímé typy** - opticky měřená látka (nejčastěji fluorofor) se přímo vyskytuje v biokatalytické reakci.
- **NADH** - poměrně „slabý“ fluofofor ($\Phi_f = 0.02$), extinkční a emisní maxima jsou při 350 a 450 nm. Biorekogničním elementem jsou dehydrogenasy imobilisované před koncem optického vlákna. Aby se i koenzym dal zachytit v systému biosensoru, používá se jeho konjugát s polyethylenglykolem, který neprochází dialyzační membránou. Výhodná je konstrukce sensoru pro alkohol, kde je vzorek oddělen mikroporézní teflonovou membránou, NADH se nachází ve vnitřním roztoku sensoru.
- Existuje řada pokusů využít fluorescenci **flavinových koenzymů** (FADH_2 , FMNH_2) vázaných pevně v molekule mnoha oxidas. Při vyšší koncentraci substrátu se zpomaluje zpětná oxidace redukované formy kyslíkem a intenzita „vnitřní“ (intrinsic) fluorescence redukovaného koenzymu narůstá. Výhodou je reversibilita takového systému
- U sensorů využívajících celé **buňky** se sleduje vnitřní fluorescence NADH (je úměrná metabolické aktivitě).
- **Chlorofylové** optické sensory se konstruují pro detekci toxicity působené látkami inhibujícími fotosystém u rostlin.

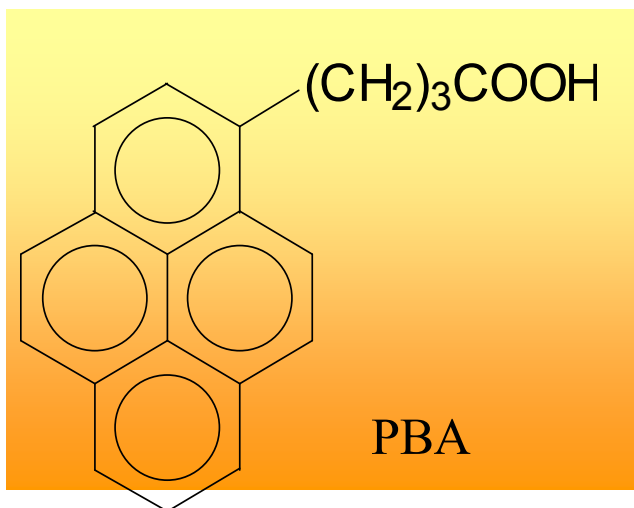


Enzymové optody

- **Nepřímé** („mediované“, extrinsic) optické biosensory využívají optické indikátory. Nejčastější jsou optické sensory pro měření kyslíku a pH.
- sledování **kyslíku** využívá zhášení fluorescence indikační molekuly, pokles intensity fluorescence je dán Stern-Volmerovým vztahem:

$$I_f = I_{f0} / (1 + K_{SV} [O_2])$$

- Indikátor se obvykle nachází v silikonové vrstvě před čelem optického vlákna. Nejčastěji se používá kyselina pyrenmásečná (pyrenebutyric acid, PBA), excitace při 350 až 400 nm; další možnosti jsou perylen a dekacyklen, organokovové komplexy ruthenia lze výhodně excitovat při 460 nm, takže jako zdroj může sloužit modrá LED.



- pH změny lze sledovat pomocí acidobasických indikátorů. Z fluorescenčních lze použít např. 1-hydroxypyren-3,6,8-trisulfonovou kyselinu (HPTS, pH přechod 5 až 8) nebo 4-methylumbelliferon. Absorbčních indikátorů je celá řada, kresolová zeleň a bromthymolová mo

Optoda pro kyslík



ISM

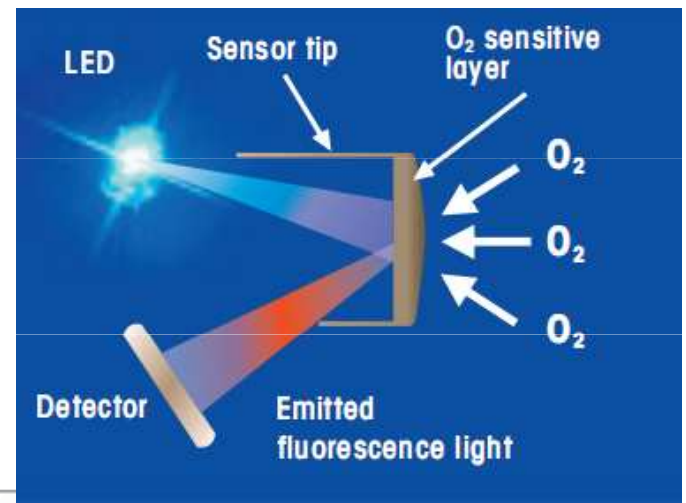
Complete oxygen measurement system



Replaceable sensing element



Fast and convenient OptoCap replacement



- Mettler-Toledo



Luminiscence



aktivace

rozpad

- je to emise světla z molekuly v excitovaném stavu, který vznikl jako důsledek chemických reakcí
- kvantový výtěžek luminiscence odpovídá podílu počtu vyzářených fotonů a excitovaných molekul, u přírodních systémů může dosahovat až 90%
- intenzita I vyzářovaného světla je závislá na čase, v určitém okamžiku prochází maximem (t_{max})

$$I \approx [A_0] \frac{k_1 k_2}{k_1 - k_2} [\exp(-k_1 t) - \exp(-k_2 t)]$$

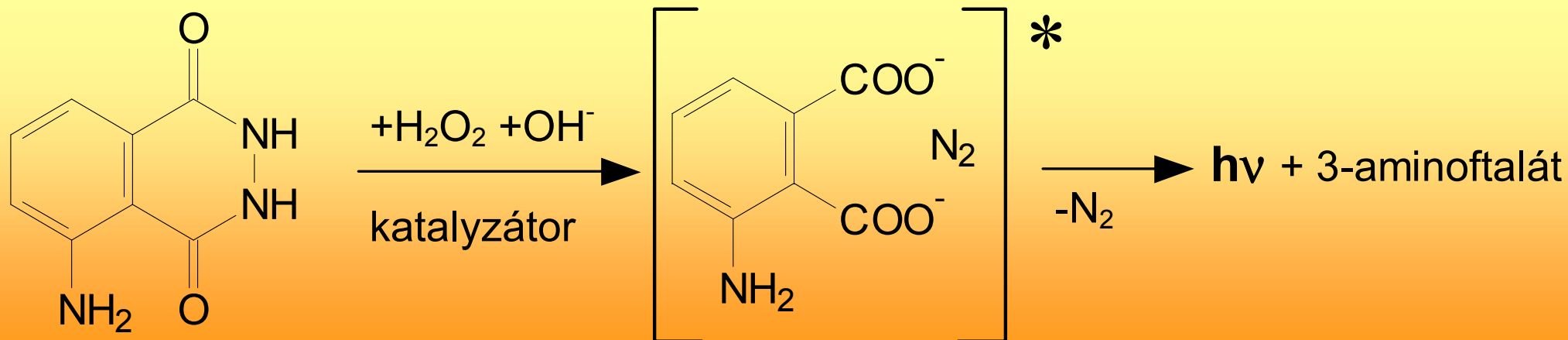
$$t_{max} = \frac{\ln \frac{k_2}{k_1}}{k_2 - k_1}$$

vztah mezi luminiscencí a látkovým množstvím analytu se určí kalibrací



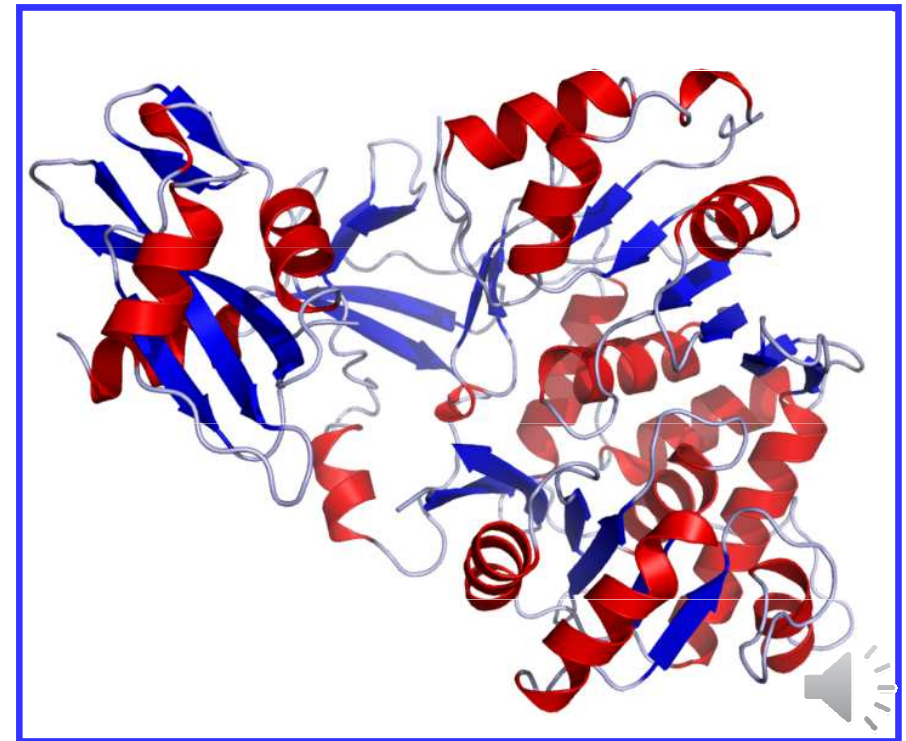
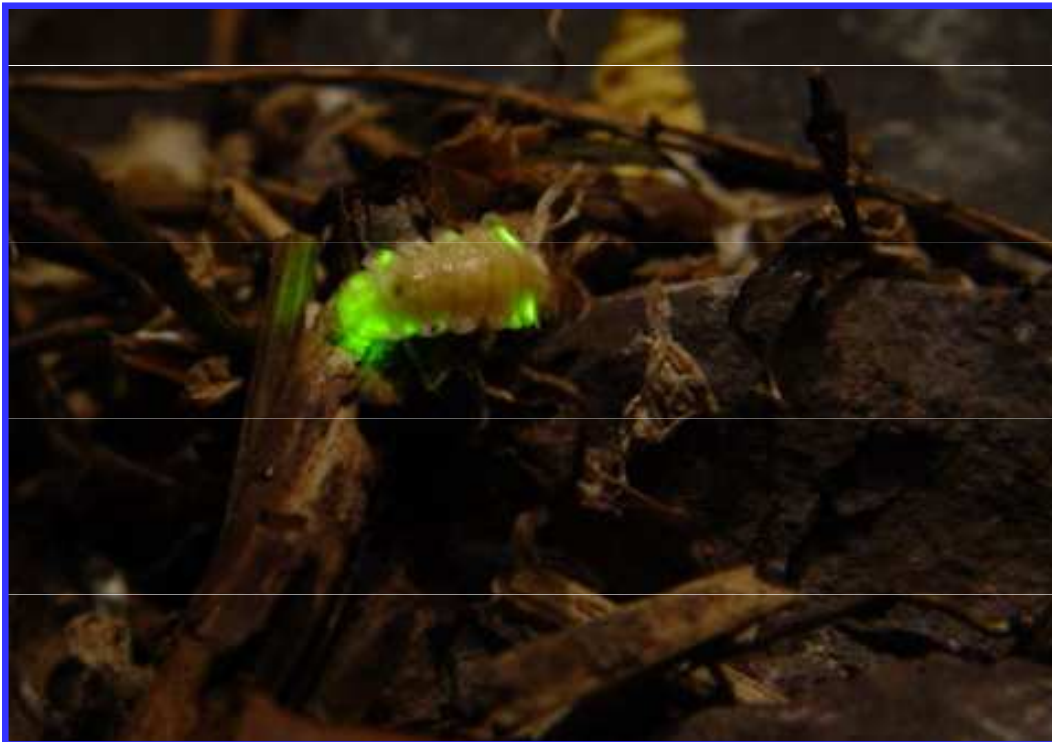
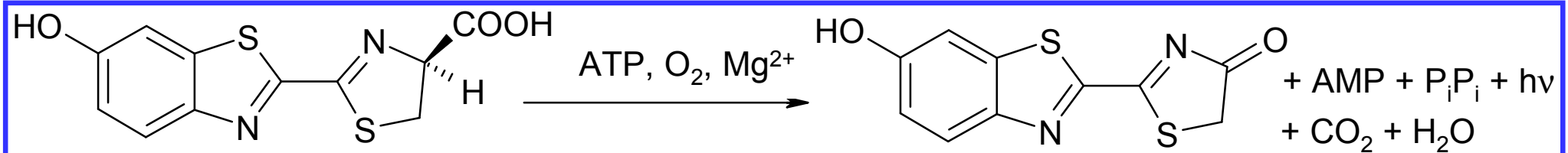
Chemiluminescence

- účinnost luminiscence závisí na chemickém výtěžku reakce poskytující aktivovaný meziprodukt (B^*), podílu excitovaných molekul a konečně na fluorescenčním výtěžku (ten by se měl blížit 1)
- aktivovaný meziprodukt je výhodnější v singletovém stavu; delší životnost tripletového stavu zvyšuje pravděpodobnost „zhasnutí“ ve vedlejší reakci.
- pro citlivou detekci peroxidu vodíku se používá luminol (5-amino-2,3-dihydroftalazin-1,4-dion); intenzita světla je úměrná koncentraci H_2O_2 , jako katalyzátor se může uplatnit ferrikyanid, hemin nebo v neutrálním prostředí peroxidasa, v nevodném prostředí vyvolá luminiscenci jen kyslík a báze
- celkový výtěžek je pouze 0.01 (špatná fluorescence)

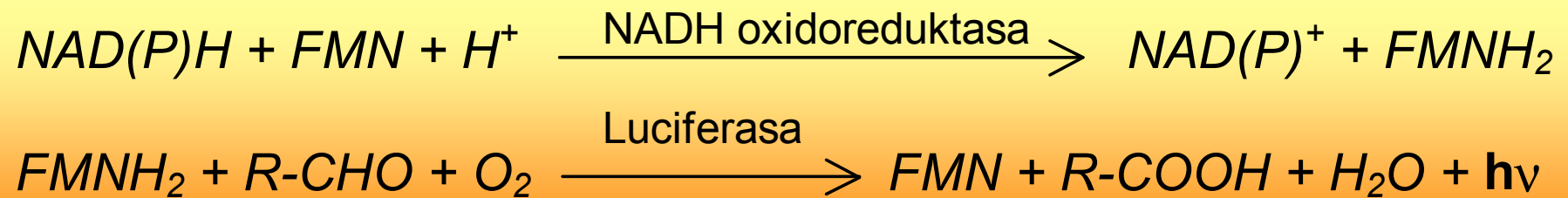


Bioluminescence

- emise světla při (bio)chemické reakci v živém organismu (cca 1000 druhů) se účastní enzymy luciferasy; tyto enzymy štěpí substrát luciferin (různé druhy dle organismu), přičemž dochází k emisi světla
- **světluška** (firefly, *Photinus pyralis*) luciferasa (EC 1.13.12.7) oxiduje příslušný luciferin za účasti ATP, emise při 560 nm, výtěžek asi 0.88 (!):



- **mořské bakterie** (*Vibrio fischeri*, *V. harveyi*, *Photobact. phosphoreum*) luciferasa (EC 1.14.14.3) až 5% obsahu buňky, oxiduje aldehydy (>C₈, dekanal, tetradekanal); v buňce obsahují i NAD(P)H:FMN oxidoreduktasu:



- což umožňuje napojení na dehydrogenasy - spolu s bakt. luciferasou jsou imobilisovány na konec optického vlákna



Aplikace bioluminiscence

- citlivá detekce ATP - 10^{-12} M, stanovení biomasy
- stanovení s účastí ATP (kreatin kinasa, ATPasa, pyruvát kinasa, ...)
- specifická detekce druhu mikroorganismů pomocí bakteriofágů nesoucích *lux* gen (z *Vibria*, u světlušek *lux* geny)
- citlivá detekce těžkých kovů (rtuť, arsen): genový konjugát *mer-lux* (*mer* je promotor aktivovaný Hg) je vpraven do plasmidů v *E. coli*, v přítomnosti rtuti se aktivuje, proběhne exprese luciferasy a následuje luminiscence, citlivost 200 nM rtuti
- stanovení Ca^{2+} - působí rozpad a luminiscenci fotoproteinu (peroxoforma luciferinu vázaná v komplexu s luciferasou, *Aequorea*)



Zhodnocení optod

- **Výhody:**

není třeba referentní prvek

imobilizovaná fáze nemusí být ve fyzikálním kontaktu s optickým systémem (snadná výměna biovrstvy)

stabilní kalibrace (zvláště při použití dvou vlnových délek)

současně mohou reagovat na několik analytů (různé reagenty, různé vlnové délky) - vysoká hustota přenosu informací

nemají vliv interference elektromagnetické povahy (lze provádět měření na velké vzdálenosti)

při použití v živém organismu nehrozí elektrický šok (při zkratu)

- **Nevýhody:**

není reference při měření intenzity světla (svítivost zdroje kolísá), proto je třeba kalibrace ve dvou bodech

dynamický rozsah je omezený (pro pH 2 až 6 řádů, elektrochemicky 12!)

odezvy jsou často pomalé

dlouhodobá stabilita je limitována vyčerpáním indikátoru (fotorozklad, raději "svítit" méně intenzivně)

vadí světlo z okolí

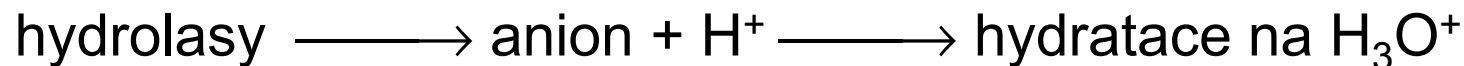
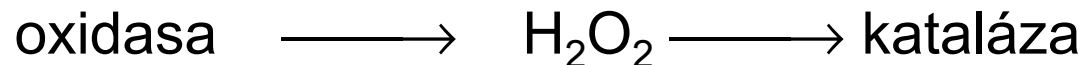


Kalorimetrické biosensory

- využívají změny teploty v průběhu enzymových reakcí (některé typické příklady jsou uvedeny v tabulce). Při konstrukci biosensorů to je spíše okrajová záležitost, ale existují některé analyty, pro které mohou být kalorimetrické převodníky zvláště výhodné. Meze detekce bývají do 10 μM , rozlišení 0.001 $^{\circ}\text{C}$; vývoj tepla při biochemických reakcích ($-\text{kJ/mol}$):

Katalasa	GOD	Hexokinasa	Laktát DH	Ureasa	Urikasa
H_2O_2	glukosa	glukosa	pyruvát	močovina	kys. močová
100	80	28	62	61	49

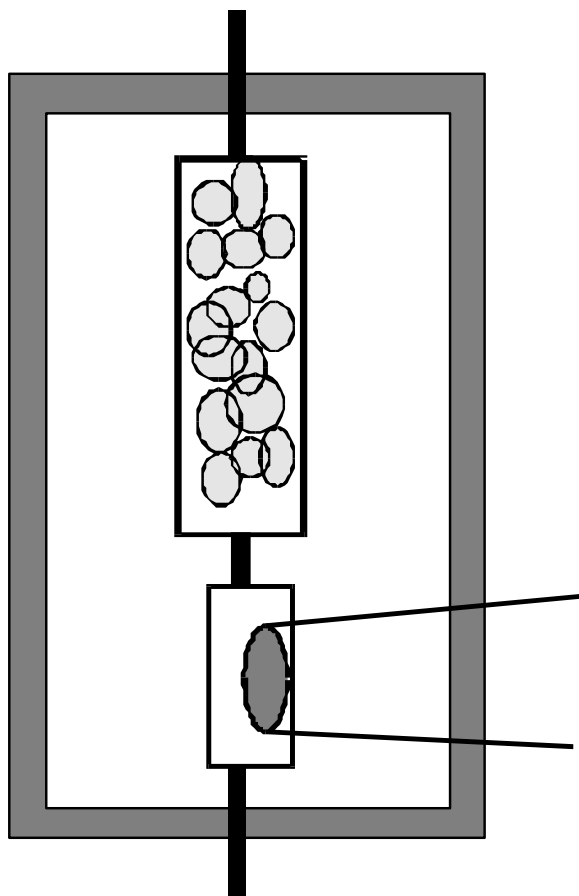
- pokud vlastní reakce s analytem neuvolňuje teplo, lze zařadit následný krok uvolňující teplo:



- hydratační teplo protonu činí v Tris pufri $\Delta H = -48 \text{ kJ/mol}$, ve fosfátu je $\Delta H = -4.7 \text{ kJ/mol}$
- recyklační pochody umožňují produkci tepla několikanásobně zvýšit



Termistor



Enzymový reaktor s termistorem

Výhodou je, že nevadí částice ve vzorku, interferující látky nebo zbarvení. Někdy také jiné metody mohou být dost těžkopádné, např. stanovení triglyceridů lipázou se sleduje kalorimetricky velmi výhodně

- převodníkem je obvykle termistor, jeho odpor R závisí na teplotě T :

$$1/T = a + b \ln R + c (\ln R)^2$$

- často se pracuje v průtočném systému s enzymovým reaktorem tepelně izolovaným od okolí
- použití diferenciálního uspořádání umožňuje pracovat při teplotě místnosti
- měření odporu termistoru se provádí pomocí Wheatstoneova můstku
- jiný převodník může být termočlánek (CMOS)

