

ELEKTROCHEMICKÉ PŘEVODNÍKY

- ❖ nejčastěji konstruované biosensory
- ❖ jednoduchá konstrukce
- ❖ nízké náklady
- ❖ výborná citlivost

Pro sestavení měřicího systému je třeba nejméně 2 elektrody:

- ❖ referentní (srovnávací)
- ❖ pracovní (měřicí)

pracovní elektroda: imobilizace biorekogniční
vrstvy
bioelektroda
enzymová vrstva (nejčastěji)

Typy elektrochemických převodníků:

- ❖ amperometrické
- ❖ potenciometrické
- ❖ konduktometrické

Referenční elektrody

Slouží jako srovnávací bod k měření nebo nastavení potenciálu pracovních elektrod. Jejich potenciál je přesně definovaný a pokud možno 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 |

Komerčně dostupné jsou obvykle příliš **velké**, takže se přistupuje k laboratorní výrobě.

Klasické komerční elektrody se uchovávají v roztoku KCl a nesmí vyschnout.

U amperometrických biosensorů se obvykle používá **holý povrch stříbra** a jako elektrolyt slouží okolní prostředí.

Konstrukce miniaturní argentchloridové elektrody není složitá.

Protože do skla nejde zatavit Ag drátek, použije se Pt-drátek, který se postříbří. U vyráběných elektrod je třeba před použitím zkontrolovat hodnotu potenciálu vůči kvalitní referenční elektrodě.

Pomocné elektrody

musí být tvořeny z dobrého vodiče s dostatečnou plochou a elektrochemicky neaktivní.

Používá se **platina** (drátek, plíšku, síťka), uhlíková tyčinka, mnohdy stačí i nerezový drát.

Pracovní elektrody

materiál:

- ❖ ušlechtilé kovy (Pt, Au)
- ❖ skelný uhlík, grafit
- ❖ kompozitní směsi, vodivé polymery
- ❖ organické vodivé soli

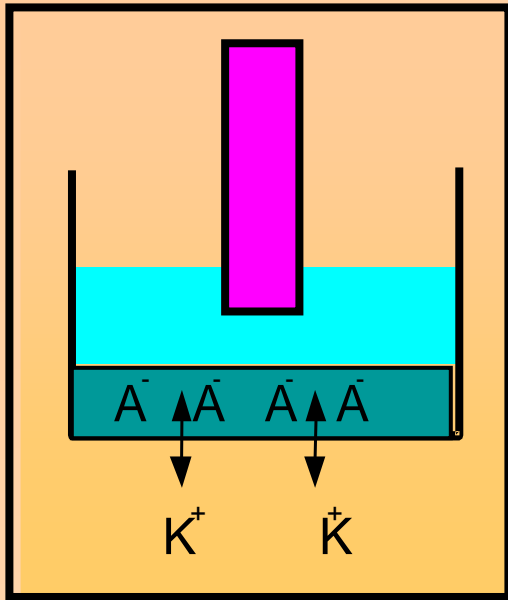
potenciál volit tak:

- ❖ aby nedocházelo k elektrochemickému rozkladu materiálu elektrody
- ❖ interferenčním reakcím (rozklad vody, pracovního roztoku, redukce rozpuštěného O_2)

úprava povrchu elektrody

- ❖ leštění brusnými prášky (diamantový prášek, oxid hlinitý, jemný smirkový papír)
- ❖ ozvučení ultrazvukem
- ❖ odstranit povrchové nečistoty pomocí kyselin anodizací

Potenciometrické bioelektrody



Základem potenciometrie je změna potenciálu na rozhraní elektrody s roztokem.

- Převodníkem je **iontově selektivní elektroda (ISE)** v kombinaci s enzymovou vrstvou.
- pro ISE: 10 mM až 0,1 M, pro konečný biosensor: 0,1 až 10 mM. Odezva je logaritmická.
- Referentní elektroda musí být kvalitní (většinou komerční systémy-kombinované elektrody)
- V systému neteče proud, je třeba měřicí **přístroj s velkým vstupním odporem** (dnes operační zesilovač)

Potenciál ISE

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

Potenciál E (ISE) pro sledovaný ion (aktivita a_i)
v přítomnosti rušivého iontu (a_j).

k_{ij} selektivní koeficient (čím je menší, tím vyšší
koncentrace rušícího iontu je tolerována)

z nábojové číslo pro stanovovaný ion
(kationty kladné číslo)

y nábojové číslo pro rušící ion

E_0 standardní potenciál

$R = 8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ plynová konstanta

$F = 96487 \text{ C.mol}^{-1}$ Faradayova konstanta

Druhy ISE

podle konstrukce:

- ponorné
- průtočné
- suché elektrodové systémy (slidy)

materiál membrány:

- ❖ sklovina
- ❖ anorganická sůl
- ❖ polymerní matrice
- ❖ iontoměničový roztok nasáklý do porézní struktury (kapalná membrána)

typy elektrod:

- ❖ skleněná citlivá sklovina, spojení citlivé membrány s koaxiálním kabelem pomocí kapalného kontaktu (Na^+ , pH)
- ❖ tuhá membrána tvořená anorganickou látkou z monokrystalu nebo lisovaného polykrystalického materiálu. Membrána je upevněna v epoxidovém pouzdře.
(F^- , Cl^- , Br^- , I^- , SCN^- , CN^- , S^{2-} , Ag^+ , Cu , Pb , Cd)
- ❖ plastická membrána tvořená polymerní matricí, ve které je zakotvena aktivní látka
kapalná membrána (F-B^{3-} , NO_3^- , NH_4^+ , K^+ , Ca^{2+} , Ba^{2+} , ClO_4^-)

- ❖ plynová elektroda - plynopropustná membrána uvnitř je skleněná kombinová elektroda, která je zakončena plochou skleněnou membránou. plochá skleněná membrána je z vnější strany překryta plynopropustným filtrem. Prostor mezi skleněnou membránou a plynopropustným filtrem je vyplněn tenkým filmem pufry. (CO_2 , NH_3)

Potenciometrické biosensory

spojení potencimetrického sensoru s biorekogniční vrstvou

většinou jsou výhodnější amperometrické

příklady:

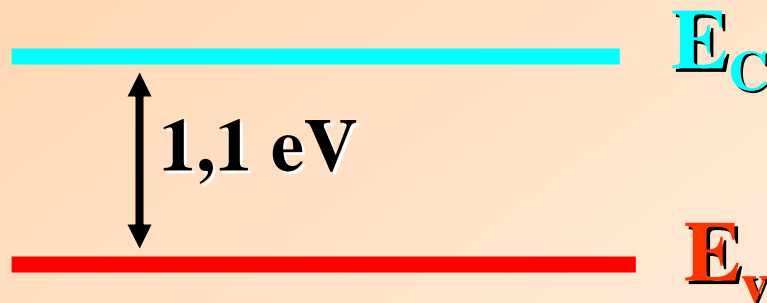
pH: penicilin (penicilinasa),
acetylcholin (cholinesterasa)
glukosa (glukosaoxidas)
esterasy, nukleové kyseliny (nukleasy)

NH₃/NH₄ močovina (ureasa)
aminokyseliny (glutamátdehydrogenasa nebo
oxidas L-/D-aminokyselin)
nitrát, nitrit (bakterie)

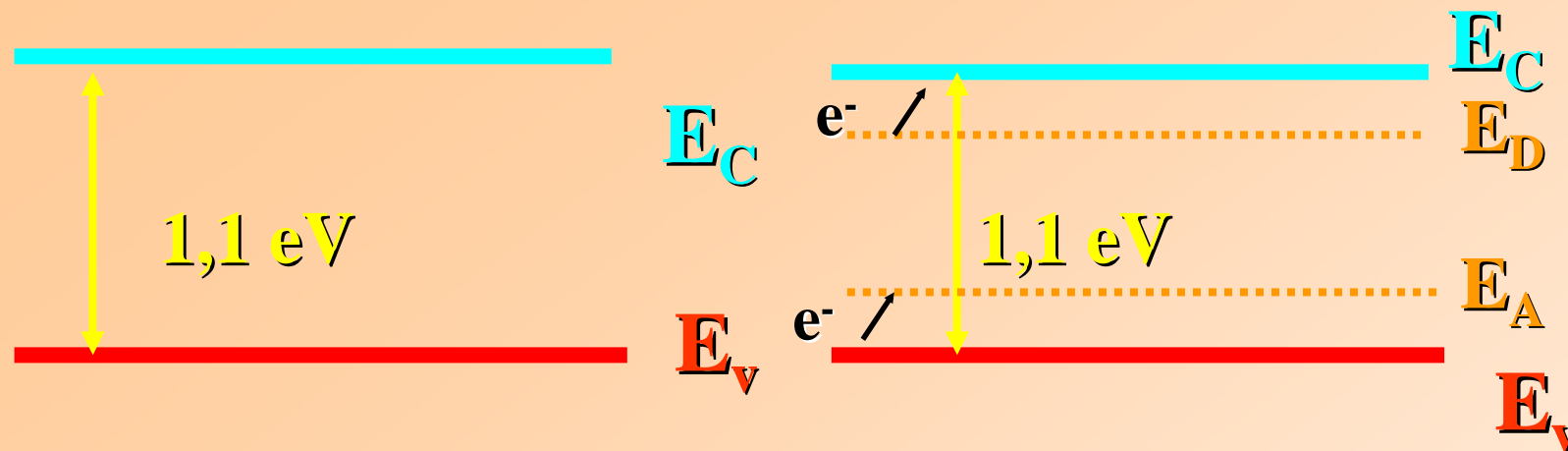
- CO₂** močovina (ureasa),
aminokyseliny (lysindekarboxylasa, tyrosindk)
laktát (laktát monooxygenasa-dekarboxylující)
- I-** detekce H₂O₂ (peroxidasa)
- F-** peroxid vodíku (peroxidasa-oxidace fluorofenolu)
- CN-** amygdalin (β-glukosidasa)

Polovodičové potenciometrické převodníky

Výhody: miniaturní rozměry, masová produkce a nízká cena. Základním konstrukčním materiálem je KŘEMÍK, jeho vodivost je nízká, ale přidavkem vhodných stopových příměsí lze jeho vodivost zvýšit, vzniká POLOVODIČ. Podmínkou vodivosti je možnost volného pohybu elektronů.



Energetické hladiny u čistého křemíku E_C a E_V (nevodivý)



Vlastní kinetická energie elektronů na E_V za běžných podmínek $0,04 \text{ eV}$, elektrony nepřeskočí na vodivostní hladinu E_C . Zvýšení vodivosti lze dosáhnout **DOPOVÁNÍM dopování:**

- ❖ negativní (atomů z V. podskupiny PT (P, As) **n-dopování**
- ❖ pozitivní (III. podskupiny PT (B, Al) **p-dopování**

Při **n dopování** se vytvoří donorová hladina elektronů E_D těsně pod hladinou vodivostní hladinou, takže přenos z E_D na E_C je snadný.

Při **p dopování** se po přidání atomů s volnými pozicemi pro elektrony (díry), se vytvoří akceptorová hladina E_A .

50% pravděpodobnost obsazení hladiny elektrony:
hladina Fermiho E_F
a nachází mezi E_V a E_C ,
poloha této hladiny = množství dopujících atomů.

ISFET

ion-sensitive field effect transistor

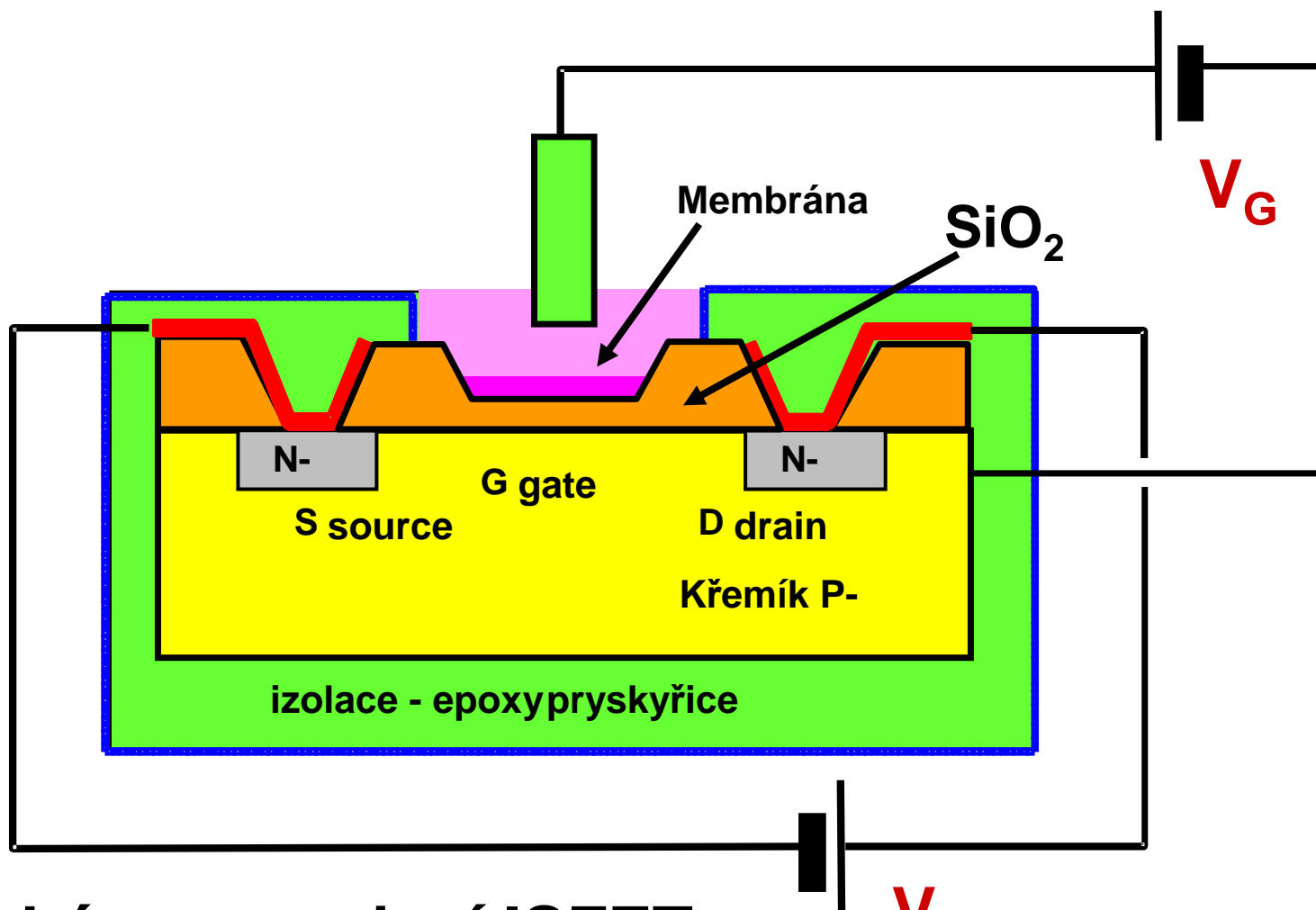


Schéma zapojení ISFETu

V_D

ISFET je tranzistor řízený polem fungující na principu změny vodivosti prostřednictvím elektrického pole.

Odpor cesty mezi oblastmi S (source) a D (drain) se změní, když na hradlo (gate) se přivede napětí (změní se elektrické pole).

Základem je křemík (P), elektrody S a D mají vodivost N. Povrch ISFETu mimo S a D je povlečen SiO_2 .

Oblast hradla je potažena selektivní membránou, která je v kontaktu s okolním roztokem, ostatní části jsou izolovány epoxypryskyřicí. Potenciál hradla se určuje vzhledem k referenční elektrodě.

membrána ISFETu:

- ❖ **solid-state** - změny pH
(S_3N_4 , Al_2O_3 , Ta_2O_5), odezva logaritmická
(52-59 mV/pH)
- ❖ **polymerní** - valinomycin/PVC stanovení K
- ❖ **heterogenní** AgCl, AgI, AgCN krystalky v PNF
(polyfluorovaný fosfazin)

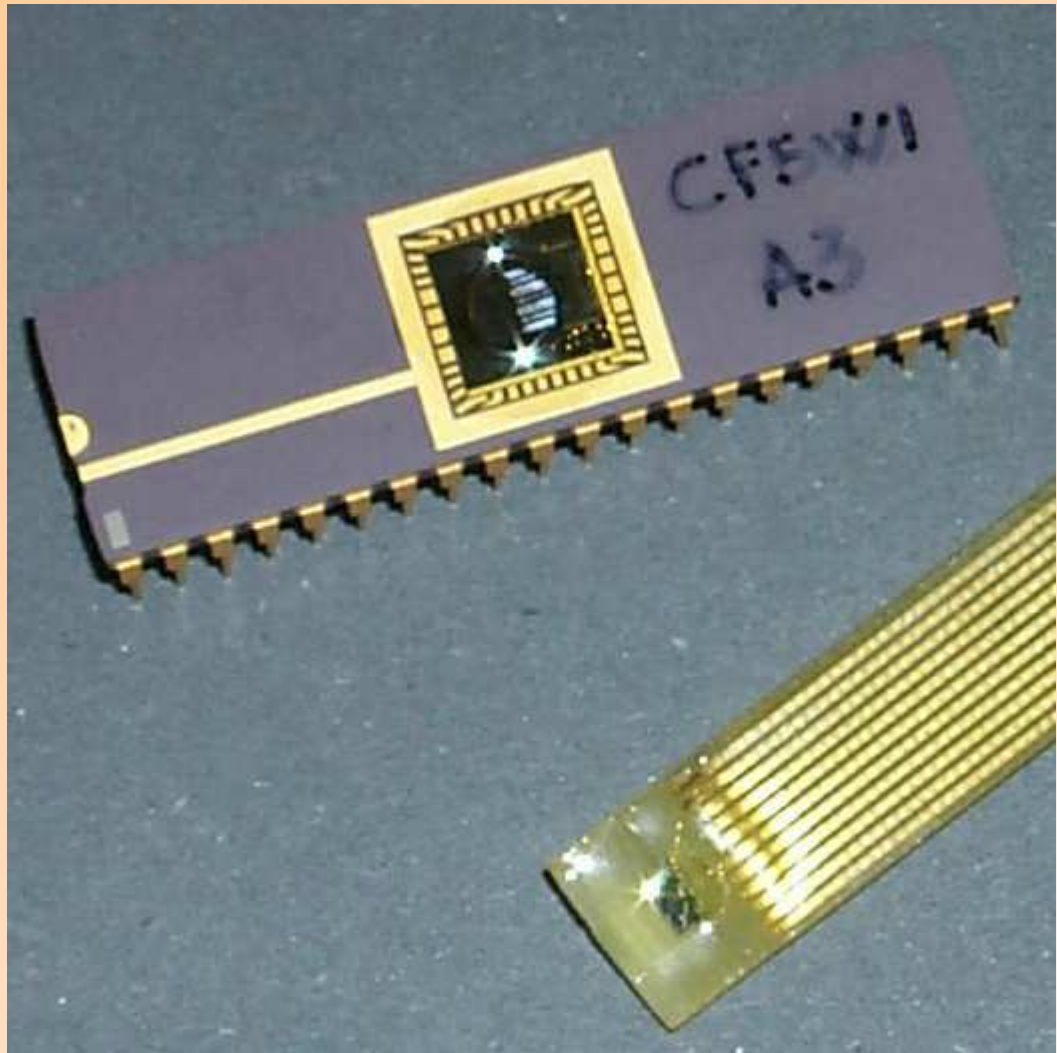
Při výrobě ISFETů se používá litografie
(nanášení jednotlivých vrstev, vytváření struktury
pomocí masek)

ENFET

je ISFET potažený enzymovou vrstvou

REFET

vrstva inertního proteinu

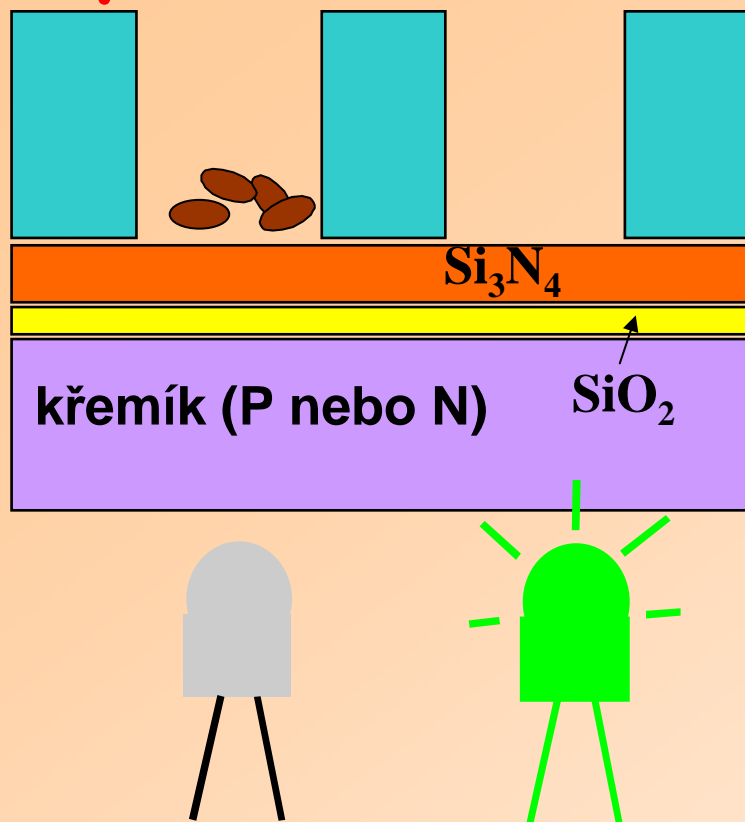


LAPS biosensory

light addressable potentiometric sensor
polovodičový převodník

- ❖ Základem je křemíkový čip potažený vrstvami SiO_2 a Si_3N_4 . Navíc je na povrchu rozdělen na několik aktivních oblastí pomocí další vrstvy SiO_2 . Celý čip má pouze jeden kontakt.
- ❖ V neosvětleném stavu je sensor neaktivní. Pokud se z druhé strany osvětlí (infračervená 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 je jednoduchá možnost vícekanálového měření.

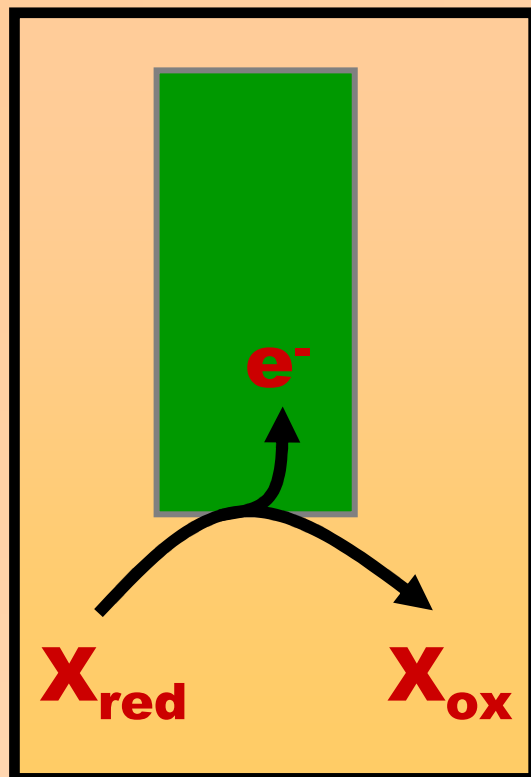
Cytosensor



Používá pro testování toxicity nebo fyziologických účinků léčiv. Do komůrek se imobilizují buňky (bakteriální nebo tkáňová kultura - fibroblasty, keratinocyty, rakovinné buňky). 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 biosensory



- jsou 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:

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

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

$F = 96487 \text{ C/mol}$ značí Faradayovu konstantu
oxidaci látek na anodě ($I > 0$),
redukce látek na katodě ($I < 0$)

Provedení amperometrických měření:

- ❖ dvouelektrodový systém
- ❖ třielektrodový systém

dvouelektrodový systém

napětí na pracovní elektrodě se nastavuje proti pomocné elektrodě (auxiliary). Část napětí se ztrácí vlivem odporu měřicího roztoku.

Se dvěma elektrodami se dá pracovat, pokud netečou velké proudy (asi pod 10 mA - mikroelektrody)

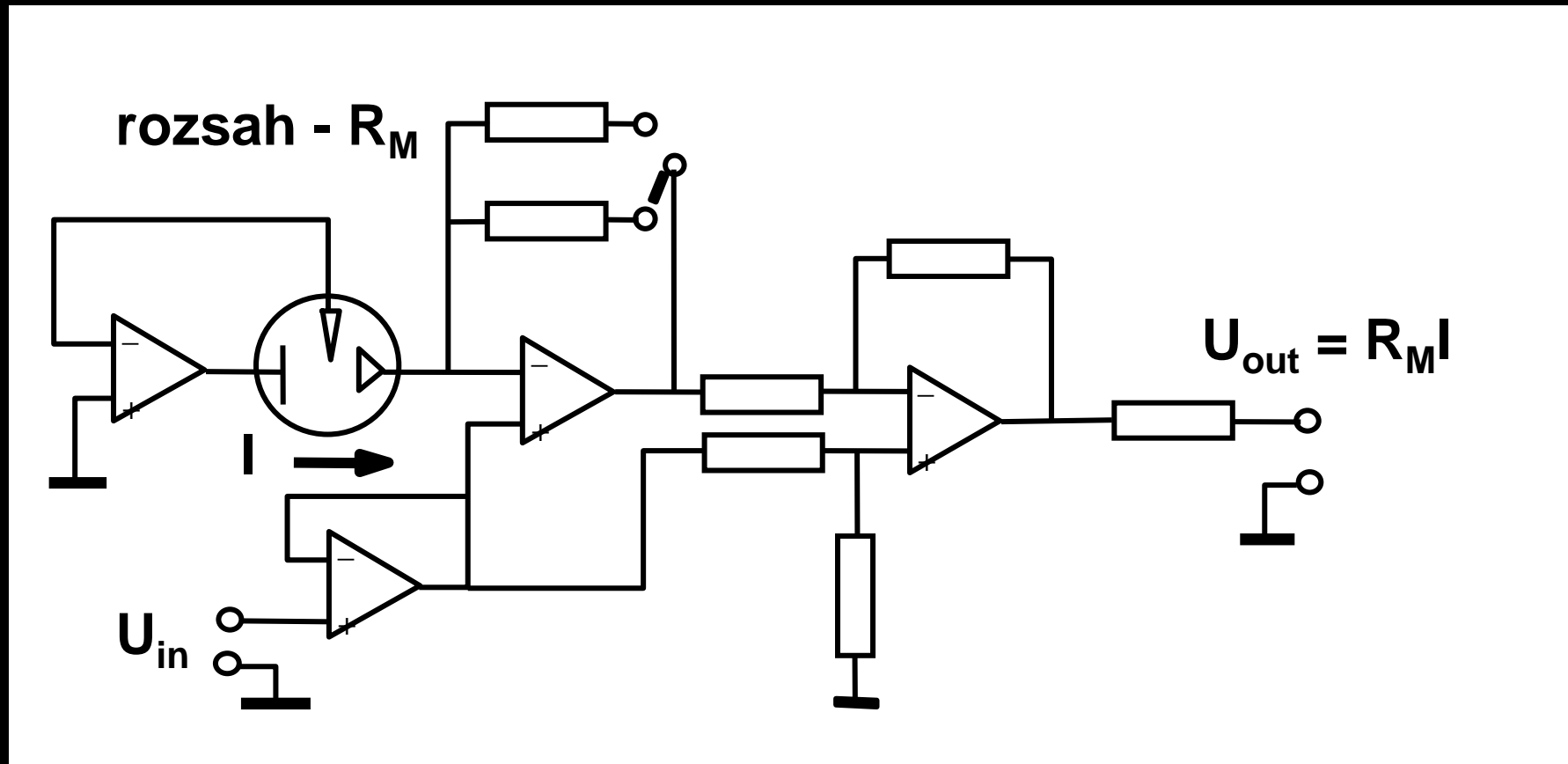
třielektrodový systém

Navíc se použije třetí referentní elektroda, vůči které se nastavuje potenciál pracovní elektrody, jeho velikost ovlivňuje velikost proudu procházejícího roztokem.

Třielektrodový systém je univerzální, ale vyžaduje POTENCIOSTAT

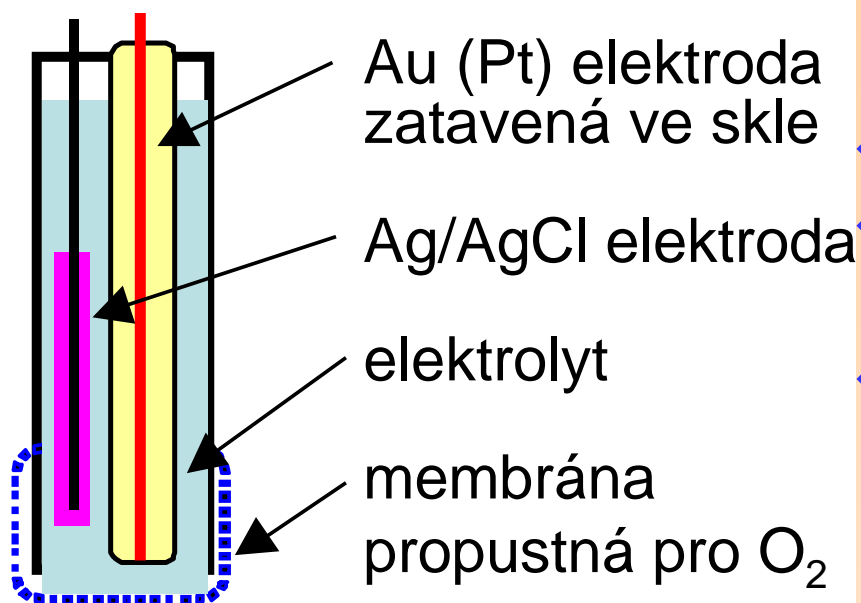
Potenciostat

Zařízení udržuje konstantní napětí pracovní elektrody vůči referentní nezávisle na velikosti proudu.



Elektronický obvod potenciostatu

Měření kyslíku



- ❖ Clarkova kyslíková elektroda
- ❖ potenciál pro redukci kyslíku: -650 mV vzhledem Ag/AgCl
- ❖ Elektroda má předřazenu membránu propustnou pouze pro O₂

Elektrodová redukce kyslíku je čtyřelektronový proces:



Měření peroxidu vodíku

Anodická oxidace peroxidu vodíku
potenciál: +600 mV



- ❖ lze použít kyslíkovou elektrodu bez membrány
- ❖ Pt, Ir, grafitové elektrody elektrolyticky platinizované (oxidace H_2O_2) na uhlíkových elektrodách vyžaduje značné přepětí
- ❖ interference oxidabilních látek
(např. v séru: kyselina askorbová, močová, paracetamol) - předřazení membrány

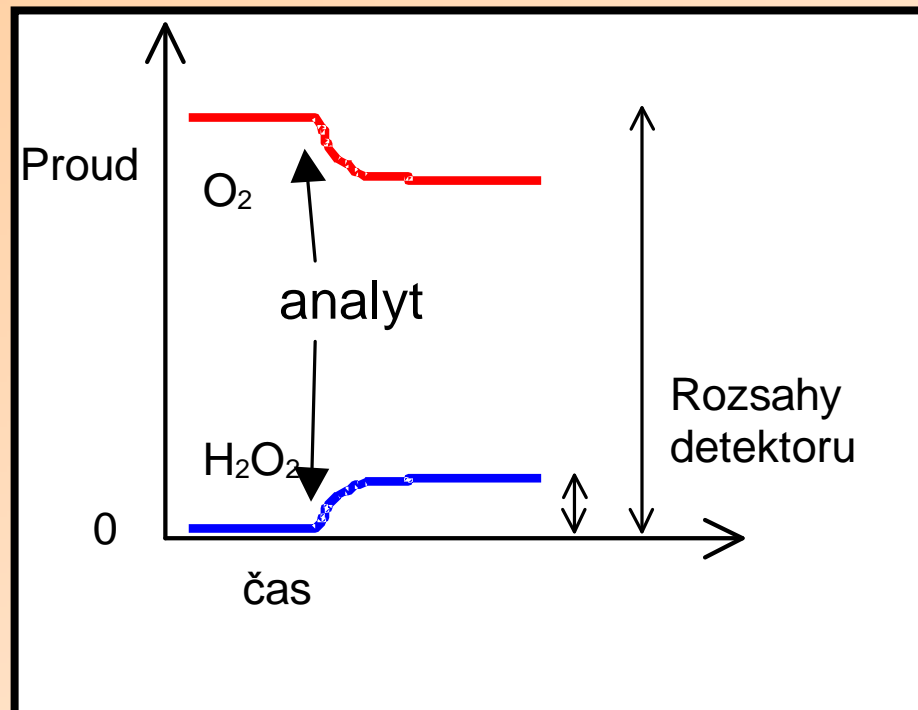
Enzymové elektrody s oxidasami

vznikají spojením kyslíkové nebo peroxidové elektrody s oxidasami jako biorekogniční vrstvou

Oxidasy: katalyzují oxidaci substrátu za vzniku H_2O_2 nebo vody



- ❖ vznik peroxidu vodíku je typický pro oxidasy, obsahující flavinový koenzym (žlutá barva) např. glukosoxidasa, laktát oxidasa apod.
- ❖ vznik vody převažuje u oxidas kuproteinů např. např. tyrosinasa



Kyslíková nebo peroxidová?

kyslíková

- ❖ koncentrace O_2 závisí na tlaku, teplotě a koncentraci použitého pufru
- ❖ před každým měřením nasytit roztok kyslíkem
- ❖ signál = proud
- ❖ měří se úbytek signálu = úbytek proudu

peroxidová

- ❖ měření peroxidu je citlivější
- ❖ na počátku je proud téměř 0
- ❖ lze nastavit citlivý rozsah a měřit nízké c
- ❖ nevýhodou je oxidace některých látek na elektrodě (předřadit membránu)

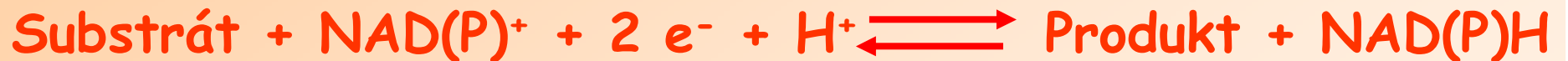
Přehled oxidas

| Substrát oxidasy | Zkratka | EC číslo | koenzym | H₂O₂ |
|----------------------------|----------------|------------------|----------------|-----------------------------------|
| 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 |
| Choiln | | 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) katalyzující redoxní reakce s účastí

NAD(P)⁺ / NAD(P)H:

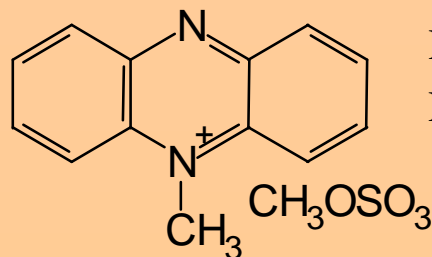


Reakce má rovnovážný průběh, oxidace obvykle probíhá v slabě alkalickém prostředí.

Přehled dehydrogenas

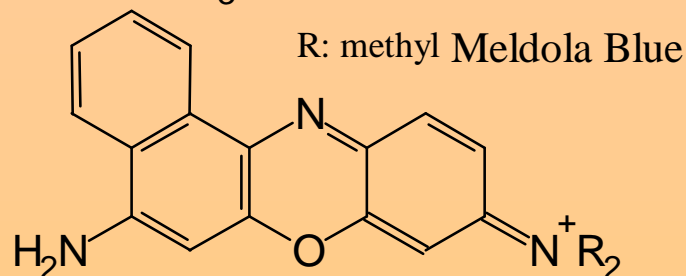
| Substrát | Zkratka | EC číslo | | | |
|-------------------------|----------------|-----------------|-------------------------|--------|----------|
| Alkohol | ADH | 1.1.1.1 | 3-Hydroxybutyrát | 3-HBDH | 1.1.1.30 |
| Aldehyd | AlDH | 1.2.1.5 | 3-Hydroxysteroid | 3-HSDH | 1.1.1.50 |
| Alanin | Ala-DH | 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 | GDH | 1.4.1.3 | Sorbitol | SDH | 1.1.1.14 |

Detekce NAD(P)H



PMS

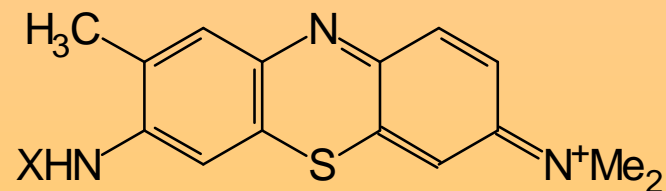
Fenazin methosulfát



R: methyl Meldola Blue



R: ethyl Nile Blue



X: H Toluidine Blue O

X: naphthoyl Naphthoyltoluidine Blue O

Elektrochemická detekce NADH pomocí reoxidace vznikajícího NADH

$$E^0 = -560 \text{ mV/SCE}$$

reakce je heterogenní

Přímá oxidace vyžaduje vysoký potenciál (přes 1 V na uhlíku) (zároveň nastává dimerizace a

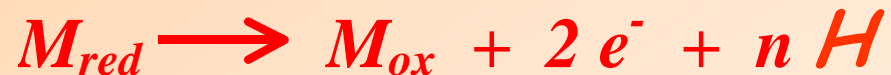
adsorpce produktů na povrch elektrody odezvy jsou nestabilní.

Reoxidace pomocí **modifikujících látek** ($E^0 = -200$ až -50 mV)

vázaných na povrchu elektrody:

modifikující látky

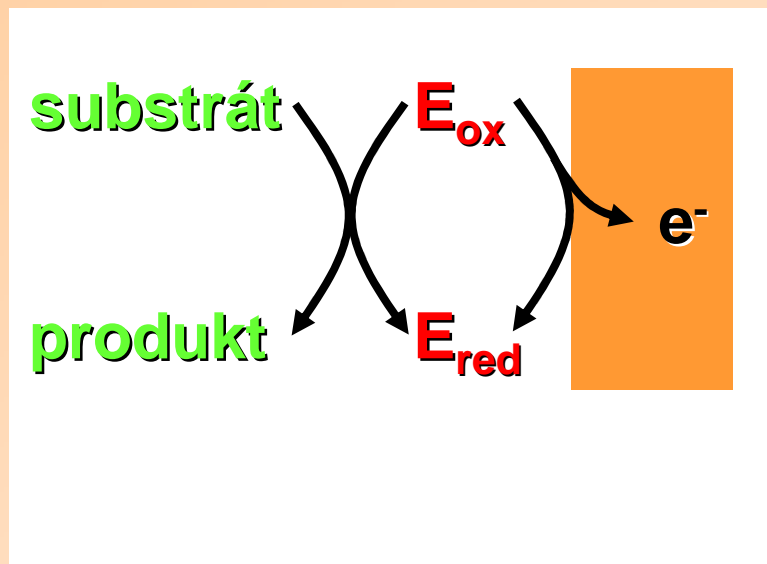
- ❖ substituované fenaziny, fenoxaziny, fenothiaziny
oxidace kolem 0 V/SCE
- ❖ hexakynoželezitan
- ❖ TTF.TCNQ
- ❖ reakce je homogenní



nejprve vzniká CT
(transfer komplex),
po rozpadu je reoxidován
mediátor
lze pracovat při mnohem
nižším potenciálu

Přímý přenos elektronů z biomolekul na elektrodu

- ❖ Přímý reverzibilní přenos elektronů z biomolekuly (bílkovina, nukleová kyselina) je ztížen:
- ❖ redoxní skupiny (disulfidické můstky, flaviny, hem, ionty kovů, Fe-S skupiny), ale uvnitř molekuly.
- ❖ kontakt s povrchem elektrody je možný jen při určité orientaci molekuly = snižuje proudové odezvy.



- ❖ velká molekula = pomalá difúze
- ❖ adsorbce na povrchu elektrody
- ❖ denaturace biomolekul

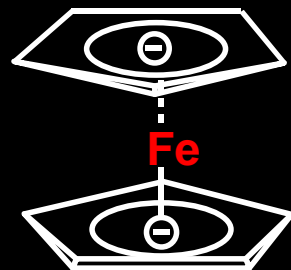
- ❖ přímý přenos elektronů zřídka
- ❖ výjimka. malé redoxní molekuly:
 - cytochrom c, cytochrom b, azurin, ferredoxin
 - lakasa, peroxidasa
- ❖ používají se uhlíkové nebo kovové elektrody modifikované pomocnými látkami které brání adsorbci biomolekul a napomáhají jejich orientaci
- ❖ mediátory, které umožňují přenos elektronů mezi biomolekulou a elektrodou (urychlují přenos nebo jej vůbec umožňují)

Požadavky na mediátory

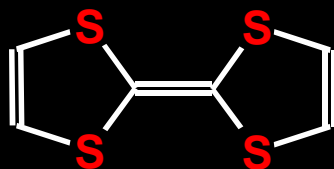
- ✓ reaguje s biokomponentou a elektrodou
- ✓ dostatečně rychlý přenos elektronů (měla by být známa stechiometrie a počet přenášených elektronů)
- ✓ stabilní formy (redukované i oxidované) za podmínek použití
- ✓ neúčastní se postraních reakcí (např. s O_2)
- ✓ vhodný redoxní potenciál (větší rozdíl redoxních potenciálů E^0 mezi enzymem a mediátorem sice zvětší proud, ale také naroste šum, nebezpečí interferencí a doba ustavování pozadí, (přiměřený rozdíl asi 100 mV)
- ✓ bez vlivu pH na průběh redoxní reakce
- ✓ netoxický (např. pro aplikace in vivo)
- ✓ vhodný k immobilizaci (nejlépe rozpustný nebo snadno adsorbovatelný např. na grafitu)

Mediátory

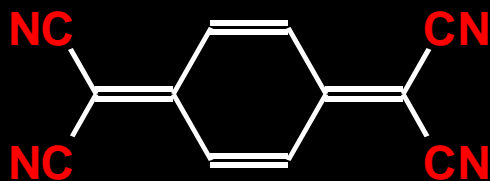
| Název | E°(V) |
|--|--------|
| tris-(2,2'-bipyridyl)ruthenium(III) | 1.031 |
| tris-(2,2'-bipyridyl)osmium(III) | 0.603 |
| ferrocen-1,1'-dikarboxylová kyselina | 0.403 |
| ferrocenylmethyltrimethylamonium | 0.388 |
| 1,1'-bis(hydroxymethylferrocen] | 0.224 |
| ferrokyanid $K^4[Fe(CN)_6]^{4-}$ | 0.190 |
| 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 |
| methylenová modř | -0.230 |
| tetramethyl-p-benzochinon (durochinon) | -0.191 |
| 2-hydroxy-1,4-naftochinon | -0.378 |
| fenosafranin | -0.493 |



ferrocen Fc



**tetrathiafulvalen
TTF**

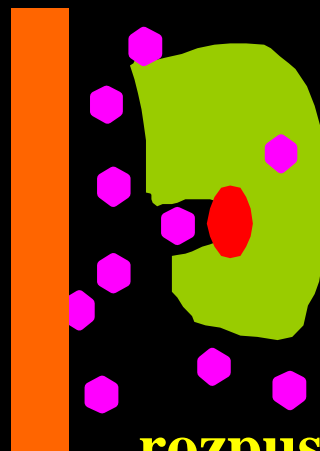


**tetrakyanochinodi-
methan TCNQ**

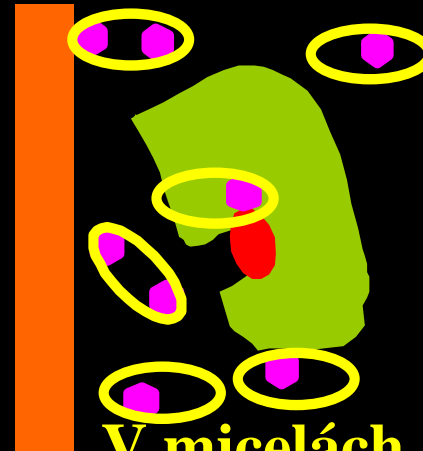
Jak začlenit mediátory do systému bioelektrody?



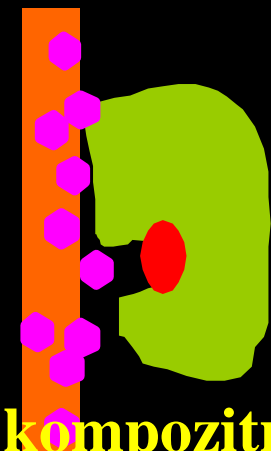
Přímý přenos



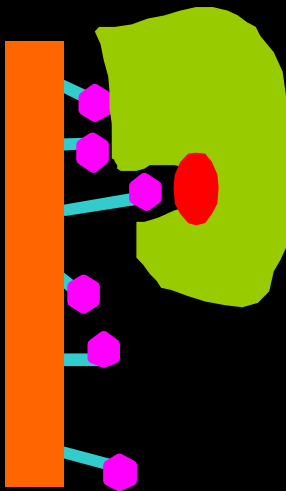
rozpuštěný



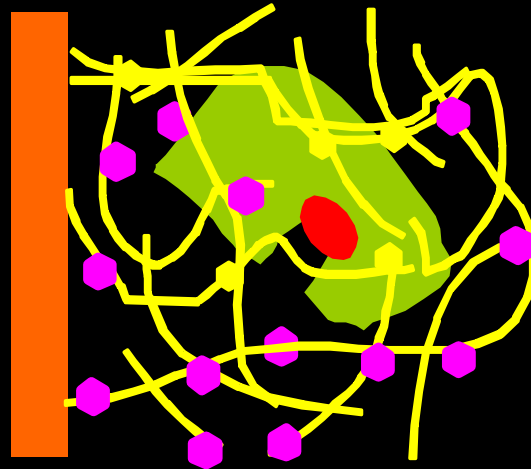
V micelách



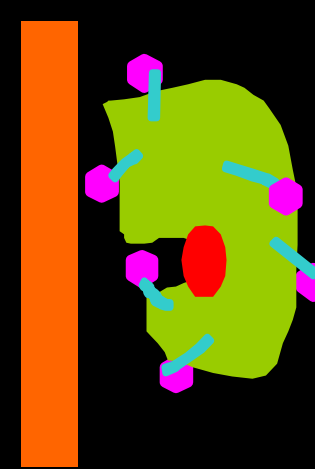
**V kompozitní
elektrodě**



**Kovalentně navázaný
na povrchu elektrody**



**Polymerní mediátor
zachycující enzym**



**Enzym modifikovaný
mediátorem**

k ideálnímu mediátoru se blíží ferrocen

Jak začlenit mediátor do systému bioelektrody?

- ❖ mediátor volně rozpustný v roztoku nebo uvnitř micel
- ❖ kompozitní směsi
(grafit+ mediátor+acetylcelulosa jako pojivo)
- ❖ na povrch kovových elektrod se kovalentně váže
- ❖ prostorové polymerní struktury obsahující mediátor mohou být použity k navázání enzymů na povrch elektrody
- ❖ navázat mediátor na povrch enzymu

Biosensor pro glukosu



Enzymová elektroda
na jedno použití



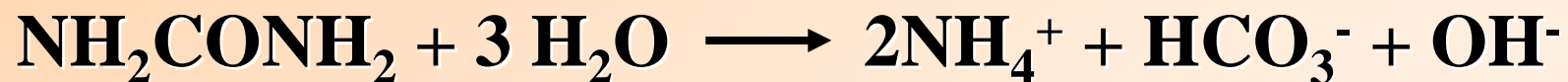
Konduktometrické převodníky

Změny vodivosti při biochemických reakcích

- ❖ produkce a spotřeba iontů
(účinek hydrolas a amidas)
- ❖ změna velikosti nabitých částic
(účinek fosfatas, sulfatas a nukleas)

Klasický příklad

Stanovení močoviny pomocí ureasy

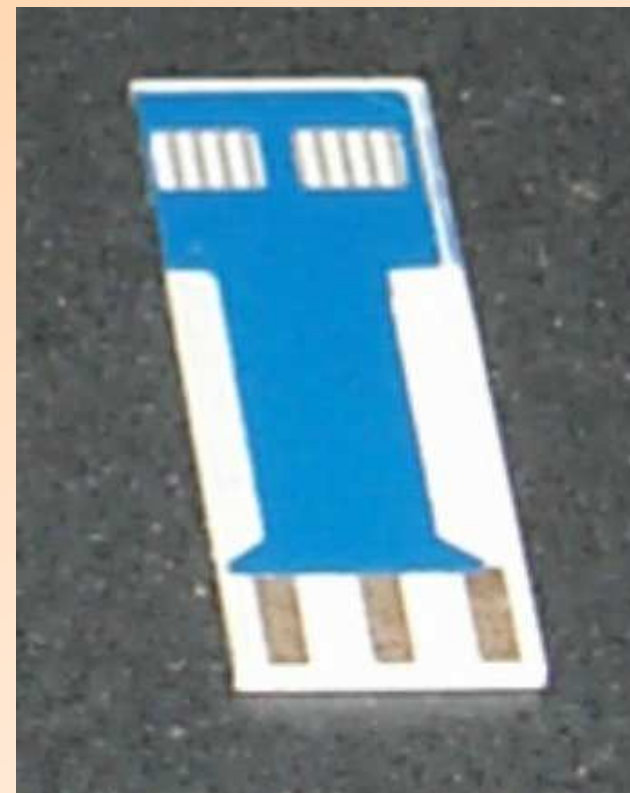
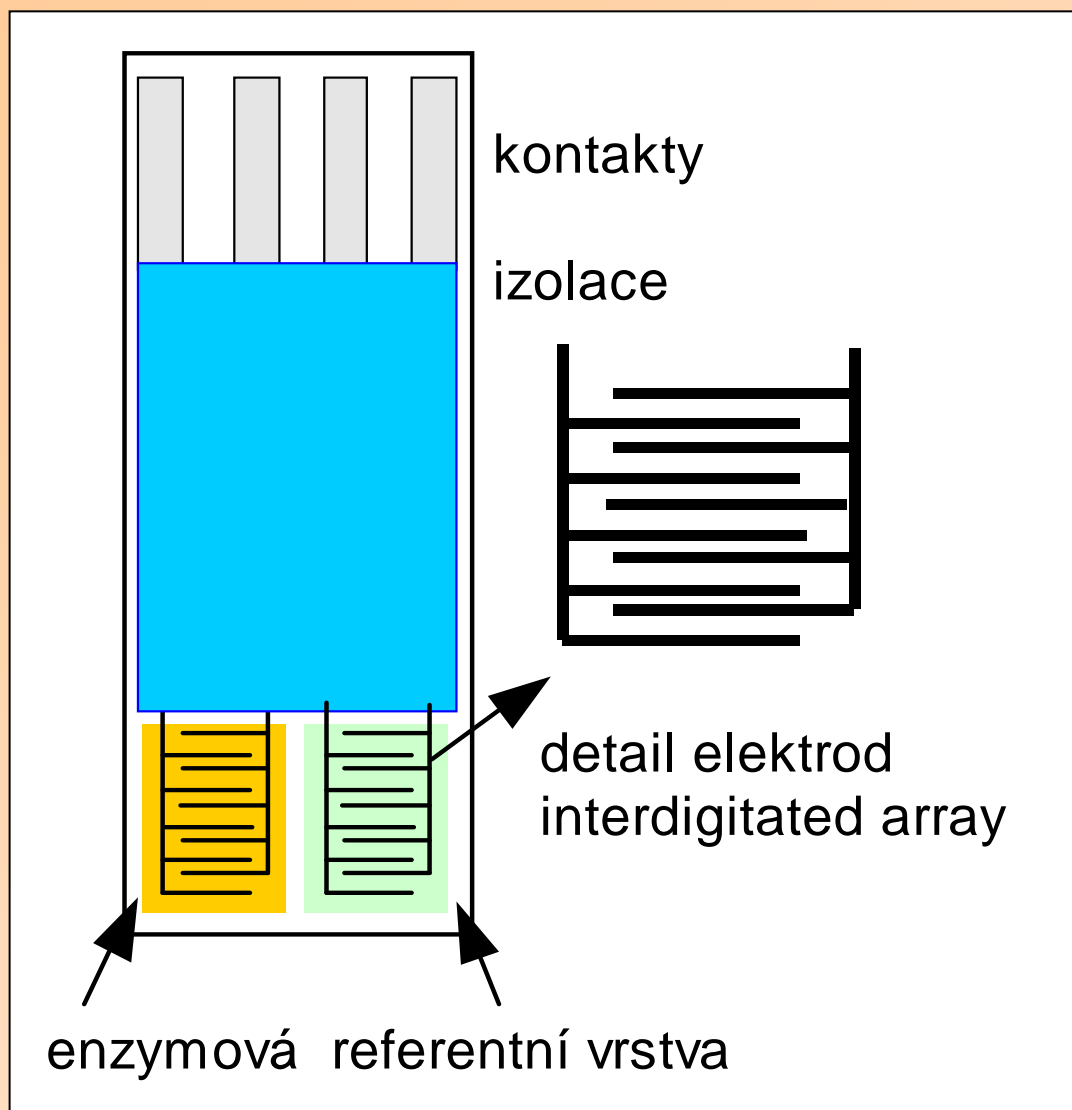


Problémy konduktometrických měření

Vlastní vodivost pracovního prostředí málo vodivé pufrů (imidazol)

- ❖ Je třeba odlišit změnu vodivosti vyvolanou přidávkou vzorku,
- ❖ Zanedbat změny vodivosti v celém roztoku a sledovat změny v okolí elektrod s imobilizovanými enzymy (vlastní signál bioreakce)
- ❖ Volit diferenční uspořádání (změny vodivosti v okolním roztoku vykompenzuje srovnávací elektroda).

Příklad konduktometrického převodníku



**ukázka dvojitého
konduktometrického
převodníku
(síťotisková technologie,
rozměry 7 x 25 mm)**