

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Katedra analytické chemie



Uhlíkové tištěné elektrody modifikované chitosanem pro přípravu
enzymových biosenzorů

Bc. Anna Kostelníková

Diplomová práce

2018

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology
Department of Analytical chemistry



Modification of screen-printed carbon electrodes by chitosan for the
preparation of enzyme biosensors

Bc. Anna Kostelníková

Thesis

2018

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Anna Kostelníková**
Osobní číslo: **C16543**
Studijní program: **N1407 Chemie**
Studijní obor: **Analytická chemie**
Název tématu: **Uhlíkové tištěné elektrody modifikované chitosanem pro přípravu enzymových biosenzorů**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Z odborných publikací zpracujte literární rešerši na téma vlastnosti a použití chitosanu v elektrochemických senzorech a biosenzorech na bázi uhlíkových tištěných elektrod.
2. V experimentální části modifikujte různými způsoby uhlíkovou pracovní elektrodu tištěného senzoru vhodným mediátorem přenosu elektronů a chitosanem. Studujte vliv přítomnosti chitosanu a elektronového mediátoru na proudovou odezvu peroxidu vodíku a kyseliny askorbové.
3. Připravte modelový biosenzor pro stanovení glukózy s využitím enzymu glukózooxidáza, chitosanu a vybraného mediátoru. Porovnejte a diskutujte jeho elektrochemické vlastnosti a analytické parametry s dalšími elektrochemickými biosenzory pro stanovení glukózy.


Rozsah grafických prací:
Rozsah pracovní zprávy:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:
Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Radovan Metelka, Ph.D.**
Katedra analytické chemie
Konzultant diplomové práce: **Sylvia Smarzewska, PhD.**
Department of Inorganic and Analytical Chemistry,
University of Lodz, Poland
Ostatní konzultanti: **prof. RNDr. Miroslav Pohanka, PhD., DSc.**
Katedra molekulární patologie a biologie, Fakulta vo-
jenského zdravotnictví, Univerzita obrany
Datum zadání diplomové práce: **20. února 2018**
Termín odevzdání diplomové práce: **11. května 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2018

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne

Anna Kostelníková

Ráda bych tímto poděkovala svému konzultantovi pplk.. prof. RNDr. Miroslavu Pohankovi, Ph.D., DSc. za velkou pomoc a že si na mě vždycky našel čas. Dále Mgr. Adamu Kostelníkovi a Mgr. Pavle Martínkové za zasvěcení do problematiky biosenzorů. Ing. Radovanu Metelkovi, Ph.D. za vedení práce. Samozřejmě svým rodičům za umožnění studia na Univerzitě, jejich psychickou a materiální podporu. A Viktorovi, za všechno.

ANOTACE

Tato diplomová práce se zabývá studiem chitosanem modifikovaných, uhlíkových, tištěných elektrod s možným uplatněním při konstrukci enzymových biosenzorů na bázi oxidáz. Teoretická část práce je zaměřena na popis vlastností chitosanu, jeho výrobu, přípravu uhlíkových tištěných elektrod a možnosti jejich modifikace. Několik kapitol je věnováno biosenzorům, jejich základnímu rozdělení a principu. V experimentální části jsou studovány uhlíkové tištěné elektrody modifikované chitosanem a mediátorem elektronového přenosu a jejich vliv na elektrochemické vlastnosti těchto elektrod.

KLÍČOVÁ SLOVA

- Chitosan
- Uhlíkové tištěné elektrody
- Modifikace
- Enzymové biosenzory
- Chronoamperometrie

ANNOTATION

This thesis is focused on the study of chitosan modified, screen printed carbon electrodes with possible application in the preparation of enzyme biosensors based on oxidases. The first part of this work is aimed on the theoretical explanation of chitosan's properties, its production, preparation of screen printed carbon electrodes and their modifications. Several chapters are devoted to biosensors, their basic classification and principle. In experimental part a study of screen printed carbon electrodes modified with chitosan and mediators of electron transfer is conducted and their influence on electrochemical properties of the electrodes is studied.

KEYWORDS

- Chitosan
- Screen printed carbon electrodes
- Modification
- Enzyme biosensors
- Chronoamperometry

Obsah

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Úvod..... | 11 |
| 2 | Teoretická část | 12 |
| 2.1 | Chitosan..... | 12 |
| 2.1.1 | Vlastnosti | 12 |
| 2.1.2 | Výroba | 12 |
| 2.1.3 | Použití chitosanu v elektrochemických biosenzorech | 14 |
| 2.2 | Uhlíkové tištěné elektrody | 14 |
| 2.2.1 | Konstrukce uhlíkových tištěných elektrod | 14 |
| 2.2.2 | Příprava | 15 |
| 2.2.3 | Použití | 16 |
| 2.3 | Tištěné elektrody z dalších materiálů..... | 17 |
| 2.4 | Modifikace uhlíkových tištěných elektrod polymery | 17 |
| 2.4.1 | Redoxní polymery..... | 19 |
| 2.4.2 | Iontově-výměnné polymery | 19 |
| 2.4.3 | Vodivé polymery | 20 |
| 2.4.4 | Nevodivé polymery..... | 20 |
| 2.5 | Biosenzory..... | 20 |
| 2.5.1 | Konstrukce biosenzorů | 21 |
| 2.5.2 | Dělení biosenzorů dle biologického elementu..... | 22 |
| 2.5.3 | Dělení biosenzorů dle fyzikálně chemického převodníku..... | 22 |
| 2.5.4 | Biosenzory na bázi chitosanu a uhlíkových tištěných elektrodách..... | 24 |
| 3 | Experimentální část..... | 27 |
| 3.1 | Použité zařízení a chemikálie..... | 27 |
| 3.2 | Příprava zásobních roztoků | 28 |
| 3.3 | Příprava roztoků chitosanu..... | 29 |
| 3.4 | Příprava elektronových mediátorů | 29 |
| 3.5 | Příprava modifikovaných SPCE | 29 |
| 3.6 | Příprava glukózových biosenzorů | 29 |
| 3.7 | Cyklická voltametrie | 30 |
| 3.8 | Chronoamperometrie..... | 31 |
| 4 | Výsledky a diskuze | 32 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4.1 | Volba uhlíkové elektrody | 32 |
| 4.2 | Cyklická voltametrie SPCE modifikovaných elektronovým mediátorem | 32 |
| 4.3 | Cyklická voltametrie SPCE modifikovaných mediátorem a chitosanem | 33 |
| 4.4 | Chronoamperometrie modifikovaných elektrod | 35 |
| 4.4.1 | Elektrody s PtO ₂ | 35 |
| 4.4.2 | Elektrody s Rh ₂ O ₃ | 38 |
| 4.4.3 | Elektrody s PdO | 40 |
| 4.4.4 | Elektrody s IrO ₂ | 43 |
| 4.4.5 | Elektrody s RuO ₂ | 45 |
| 4.4.6 | Elektrody s MnO ₂ | 48 |
| 4.4.7 | Uhlíková tištěná elektroda | 50 |
| 4.4.8 | Srovnání citlivosti modifikovaných elektrod při různých potenciálech detekce | 53 |
| 4.4.9 | Elektrody modifikované ionty kovů | 58 |
| 4.5 | Chronoamperometrická detekce glukózy..... | 59 |
| 4.6 | Stanovení stability membrány..... | 63 |
| 4.7 | Snímky povrchů modifikovaných elektrod ze SEM | 66 |
| 5 | Závěr | 70 |
| 6 | Literatura..... | 71 |
| 7 | Seznam obrázků, grafů a tabulek | 75 |

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

| | |
|-----------------|---|
| AAS | Atomová absorpční spektrometrie |
| CV | Cyklická voltametrie |
| GO _x | Glukózaoxidáza |
| GR | Chemikálie zaručené analytické kvality |
| HPLC | Vysokoúčinná kapalinová chromatografie |
| ICP-OES | Optická emisní spektrometrie s indukčně vázanou plazmou |
| p.a. | Čistota chemikálie pro analytické účely |
| PAU | Polyaromatické uhlovodíky |
| PET | Polyethylentereftalát |
| puriss p.a. | Nejčistší pro analytické účely |
| PVC | Polyvinylchlorid |
| QCM | Křemenný mikrováhový senzor (Quartz crystal microbalance) |
| SEM | Skenovací elektronová mikroskopie |
| SPCE | Uhlíkové tištěné elektrody (Screen-printed carbon electrodes) |
| SPE | Tištěné elektrody (Screen-printed electrodes) |
| SWV | Voltametrie čtvercových vln (Square-wave voltametry) |
| UHPLC | Ultra účinná kapalinová chromatografie |

1 Úvod

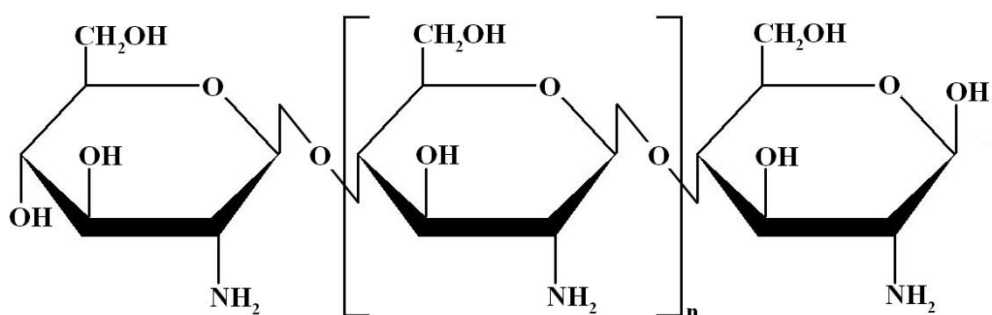
V současné době zažívá biosenzorika obrovský rozmach. Dnes už bychom těžko hledali odvětví, ve kterém biosenzory nemají své místo. Analýza biomarkerů ve zdravotnictví, monitoring pesticidů a těžkých kovů v životním prostředí, zjišťování patogenů v potravinách a mnoho dalších jsou oblasti, ve kterých je možné biosenzory s úspěchem využít. V posledních letech jsou stále více rozšířené biosenzory na bázi uhlíkových tištěných elektrod, zejména díky svým nízkým výrobním a provozním nákladům, mobilitě a možnostem (bio)modifikace.

Samotná elektroda má většinou poměrně nízkou citlivost, proto jsou nejčastěji využívány různé modifikace, které vylepšují požadované vlastnosti výsledného senzoru, např. modifikace povrchu elektrody polymery. Chitosan je snadno biologicky odbouratelný a biokompatibilní polymer, který je stále více používán k přípravě elektrochemických mikro a nanosenzorů ve formě tenké membrány na povrchu elektrody. Díky svým vlastnostem může ovlivnit citlivost elektrochemických senzorů a biosenzorů při detekci elektroaktivních látek a zabraňuje interferencím v rušení měření. V rámci této diplomové práce byl studován vliv přítomnosti chitosanu spolu s vhodným mediátorem elektronového přenosu na citlivost elektrochemické detekce na uhlíkových tištěných elektrodách a byly zjišťovány možnosti jejich následného použití v enzymovém biosenzoru.

2 Teoretická část

2.1 Chitosan

Chitosan, neboli poly-D-glukosamin (**Obrázek 1**), je polysacharid, který je díky své struktuře velmi často přirovnáván k celulóze, která se skládá z dlouhých řetězců glukózy spojených navzájem. Jinou látkou strukturně příbuznou chitosanu je chitin, neboli poly-N-acetyl-D-glukosamin. Stejně jako chitin je chitosan obsažen zejména ve skořápkách všech korýšů, hmyzu a dalších organismech jako jsou houby, řasy a kvasinky [1]. Komerčně se chitosan připravuje z chitinu procesem deacetylace, jak je uvedeno v kapitole 2.1.1.



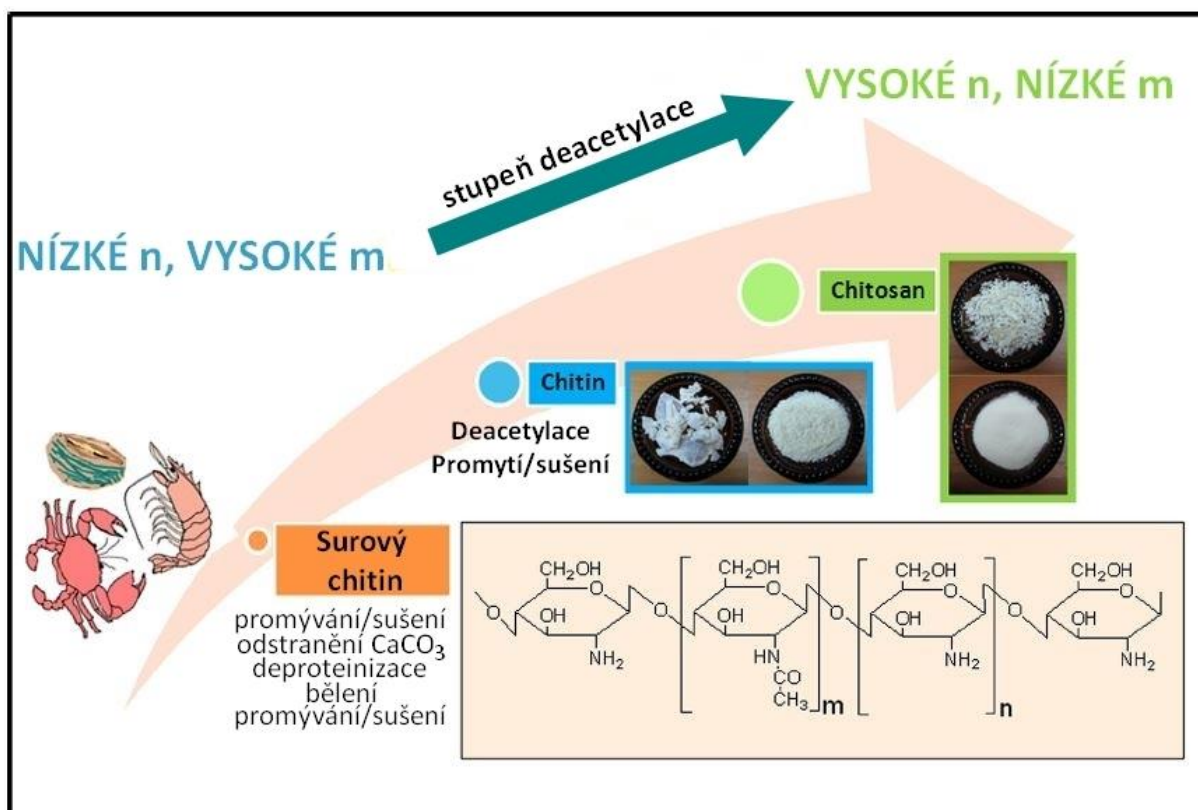
Obr. 1 Struktura chitosanu.

2.1.1 Vlastnosti

Chitosan je molekula s velkým potenciálem a to zejména díky své biokompatibilitě a snadné biologické rozložitelnosti. Ve své struktuře obsahuje mnoho funkčních skupin na bázi kyslíku a dusíku, které mohou posloužit jako výchozí body pro síťování řetězců anebo kovalentní modifikaci. Významnou vlastností je jeho rozpustnost v mírně kyselých, vodných roztocích a schopnost vytvářet tuhé hydrogely a jejich následná depozice na povrch elektrody ve formě tenkého filmu. Filmotvorné vlastnosti jsou klíčové pro aplikace v biosenzorice, pro výrobu mikro a nanobiosenzorů [2, 3].

2.1.2 Výroba

Výchozí látkou pro výrobu chitosanu je chitin, který se získává jako odpad ze zpracování mořských plodů: skořápky krevet, garnátů, raků, ústřic, škeblí, humrů, dále řasy nebo houby. Jako alternativní zdroj pro výrobu byl navržen i biologický odpad ze zpracování hedvábí a medu [2]. Tento postup byl doposud testován pouze v laboratoři a nebyl komerčně zaveden. Jako příklad je uvedena výroba chitosanu ze skořápek krevet *Penaenus monodon*.



Obr. 2 Schéma výroby chitosanu, upraveno podle [3].

Celkový odpad z průmyslového zpracování krevet činí asi 40-50 % jeho celkové hmotnosti. Pouze 5 % odpadu je skutečně využito, nejčastěji jako zvířecí krmivo, zbytek je vyřazen a představuje velký problém pro životní prostředí.

Skořápky se nejdříve důkladně promyjí pod tekoucí vodou a následně destilovanou, aby byly odstraněny zbytky tkání, rozpustné organické látky, anorganické a další nečistoty. Pro odstranění přilnavých tkání se skořápky vaří asi 1 hodinu ve vodě. Následuje sušení, asi po dobu 2 hodin, to činí skořápky křehkými a napomáhá rozbít krystalickou strukturu chitinu.

Usušené skořápky se namelou na jemný prášek a následuje demineralizace. Hlavní anorganickou složkou skořápek je CaCO₃. K jeho odstranění se využívá zředěné HCl, společně se míchají, pak jsou demineralizované skořápky odfiltrovány, promyty destilovanou vodou do neutrálního stavu a opět vysušeny. Dalším krokem je odstranění adherentních proteinů. K tomuto je využito NaOH, který je míchán společně se skořápkami. Skořápky jsou pak opět promyty a usušeny. K odbarvení se využívá NaClO. Posledním stupněm výroby je deacetylace chitinu. Směs se míchá s 50% NaOH při 90°C. Asi hodinu potom, co směs začne pění, se zfiltruje a zneutralizuje destilovanou vodou. Chitosanový zbytek se nakonec zpracuje

s 80% alkoholem a vysuší se. Připravený chitosan se skladuje ve vzduchotěsných nádobách, ve formě bílého prášku [2].

2.1.3 Použití chitosanu v elektrochemických biosenzorech

Díky svým vynikajícím vlastnostem (elektrická vodivost, biokompatibilita, brání interferujícím látkám), je chitosan vhodný pro široké spektrum použití. Nejvýznamnější aplikací je depozice chitosanu ve formě filmu na elektrodách a jeho kombinace s biologicky aktivními molekulami za vzniku biosenzorů. Tyto senzory jsou používány nejen v lékařské diagnostice (např. detekce biomarkerů hepatitidy B, obsah železa v krvi) ale i pro screening potravin (detekce *E.coli*, *Shigella flexneri*) a analýze životního prostředí (detekce kontaminantů, depozice těžkých kovů). V kapitole 2.5.4 jsou popsány vybrané senzory a jejich konkrétní využití v dané oblasti [3].

2.2 Uhlíkové tištěné elektrody

Tištěné elektrody byly vyvinuty jako jednorázové senzory pro různorodé aplikace. Běžné pevné nebo pastové elektrody, mají problém s povrchovým znečištěním. Tato nevýhoda u SPE odpadá, jelikož jsou díky své nízké ceně používány jako jednorázové elektronické zařízení. Kromě nízkých nákladů na výrobu mají mnoho dalších výhod, jako jsou snadné použití, menší nároky na obsluhu, mobilita, menší spotřeba vzorku (v některých případech jsou objemy vzorku menší než 10 μ l) a možnosti (bio)modifikace [4, 5].

2.2.1 Konstrukce uhlíkových tištěných elektrod

Pokrok v sítotiskové technologii vedl k masové produkci komerčních SPE. V **tabulce 1** jsou uvedeny společnosti dodávající komerční SPE.

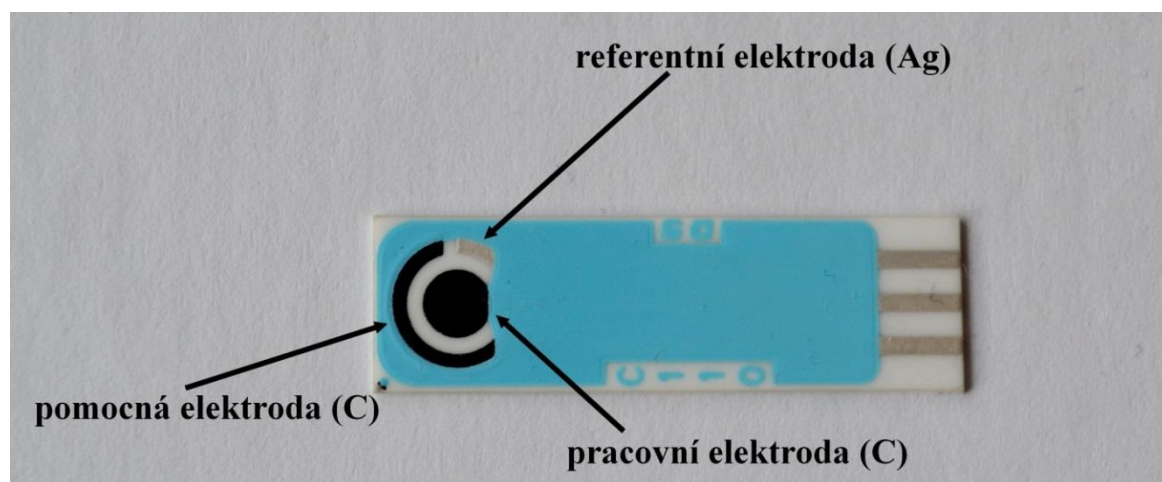
Tab. 1 Firmy dodávající komerční SPE [5].

| Firma | Země |
|-----------------------------|------------------|
| PINE Instrument Company | Pensylvánie, USA |
| BI Technologies Corporation | Kalifornie, USA |
| Dropsens | Španělsko |
| Kanichi Research | Velká Británie |
| BVT Technologies | Česká Republika |

| | |
|----------------------------|----------------|
| Gwent Electronic Materials | Velká Británie |
| Uniscan Instruments | Velká Británie |
| Ecobioservices&Research | Itálie |
| ALS Global | Japonsko |

Dnes je na trhu dostupná široká škála komerčních SPCE. Jedná se o PET, PVC nebo keramickou destičku na kterou je technologií sítotisku natištěn tří elektrodový systém: pracovní uhlíková, referentní stříbrná a pomocná uhlíková elektroda. Tvar a upořádání elektrod se mohou lišit, v závislosti od výrobce. Pracovní elektroda má nejčastěji kruhový nebo obdélníkový tvar. Pro sítotisk byly vyvinuty speciální vodivé inkousty. Inkoust musí být dostatečně viskózní, pro snadnou manipulaci, adhezní, aby snadno přilnul k nosiči, pružný, aby nedocházelo ke vzniku prasklin na povrchu a samozřejmě elektricky vodivý. Tyto elektrody jsou napojeny ke kontaktům, natištěným inkoustem s vysokou vodivostí a obsahujícím kovové prášky, typicky Au, Pt, Ag. Celá elektroda je pak pokryta izolační vrstvou, většinou o tloušťce 7-13 μm [5, 6].

Navzdory výše zmíněným výhodám těchto zařízení, jejich citlivost není tak dobrá jako například u pastových elektrod. Řešením tohoto problému je modifikace povrchu pracovní elektrody za účelem zvýšení vodivosti, zvětšení její plochy nebo zlepšení přenosu elektronů [7].



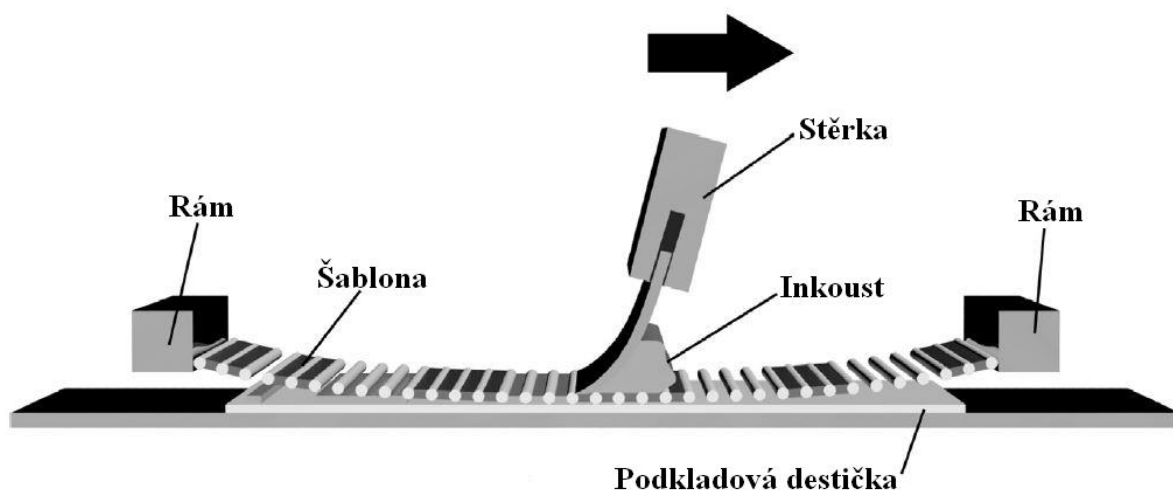
Obr. 3 Příklad tříelektrodeho senzoru s uhlíkovými tištěnými elektrodami (DropSens).

2.2.2 Příprava

Tištěné elektrody si lze v laboratorních podmínkách připravit poměrně snadno. Sítotiskový proces, potřebné vybavení, metody i materiály jsou velmi dobře zavedeny

pro výrobu elektronických součástek, např. kondenzátorů a vodičů v tištěných obvodech. Tento proces v podstatě spočívá v protlačování inkoustu sítím. K přípravě elektrod je použito kombinace různých inkoustů a sít pro vytvoření požadovaného vzoru. Zjednodušené schéma je zobrazeno na **obrázku 4**.

Základními kroky při výrobě elektrod jsou výběr a příprava inkoustu, výběr podkladové destičky, samotný tisk, sušení a vytvrzování. Proces je opakován pro každou následující vrstvu, i když sušení a vytvrzování se velmi často provádí v jediném kroku a to v rozmezí teplot od pokojové teploty (nizkoteplotní proces) až do teploty 1000°C (vysokoteplotní proces). Někdy tištěný materiál požaduje zahřátí, kvůli polymeraci inkoustu a to ještě předtím než je vrstva připravena pro další tisk [6, 7].



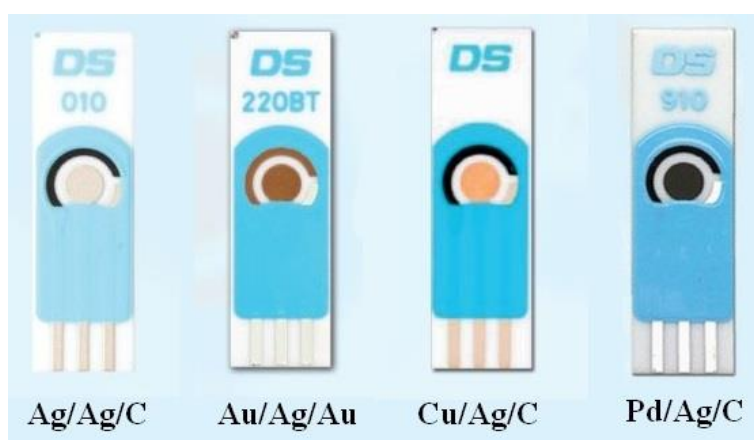
Obr. 4 Sítotiskový proces [8].

2.2.3 Použití

I přestože největší uplatnění nacházejí SPCE pro následné (bio)modifikace, mají nemodifikované elektrody taktéž širokou škálu použití. Jejich rozměry a rovinná konstrukce jim umožňuje fungovat jako elektrochemické senzory v průtokových systémech. Například jako elektrochemická detekce v HPLC. Dále plní funkci jako vysoce citlivé senzory pro stanovení polutantů životního prostředí (např. stanovení PAU, aminofenoly, hydrochinony, a další). Například v analýze potravin se jedná o úspěšné stanovení antibiotika linkomycinu v mléce, krmivech, medu a vitamínu B₂ v obilovinách a doplňcích stravy. Svě místo zaujímají v zdravotnictví a farmacii, třeba ke stanovení prokainu v lécích [5].

2.3 Tištěné elektrody z dalších materiálů

Mimo uhlíkových, je na trhu dostupná i velká řada elektrod z jiných materiálů. Například v nabídce španělské firmy DropSens, můžeme najít pracovní elektrody ze zlata, stříbra, platiny, palladia, mědi, bismutu, titanu, antimonu, chromu, niklu, hliníku, molybdenu, tantalu, wolframu a olova. Kromě čistých kovů lze nalézt i SPE s pracovními elektrodami ze slitin. A to třeba cínové, ocelové anebo borem dopované diamantové elektrody. Referentní a pracovní elektrody, jsou ve většině případů stejné jako u SPCE, tedy stříbrná referentní a uhlíková pomocná. Lze však nalézt i SPE u nichž je pomocná elektroda vyrobena ze zlata nebo z platiny. Některé elektrody jsou znázorněny na **obrázku 5** [9].



Obr. 5 Příklady SPE. Uspořádání pracovní/referentní/pomocná elektroda [9].

2.4 Modifikace uhlíkových tištěných elektrod polymery

Jako modifikovanou elektrodu označujeme takovou elektrodu, která na nebo ve svém povrchu obsahuje jednu nebo více složek, které mění vlastnosti a důsledkem toho i chování elektrody žádoucím způsobem.

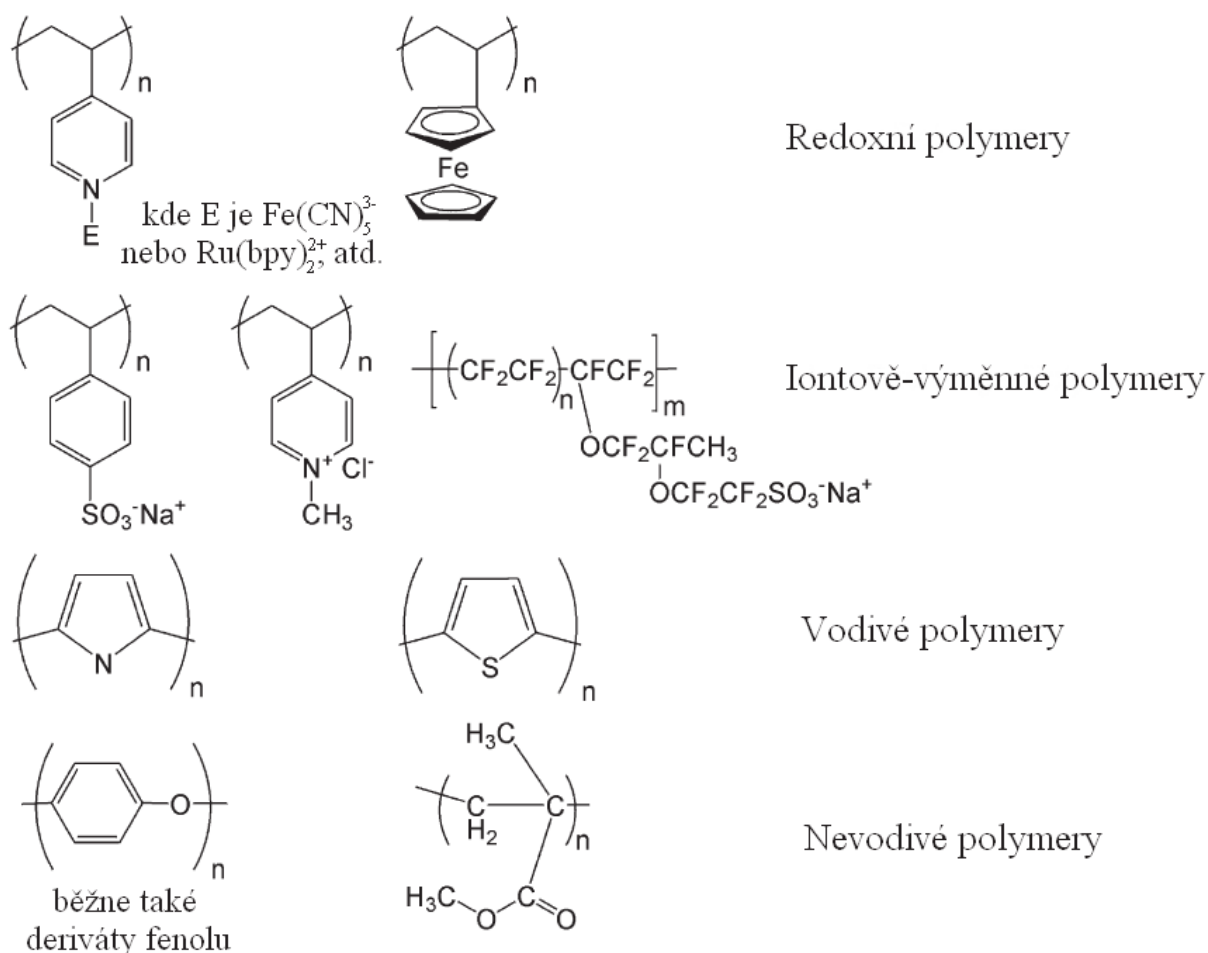
Cílem tohoto procesu je zlepšení elektrochemické reakční kinetiky, zvýšení citlivosti, selektivity a změna fyzikálně-chemických vlastností povrchu.

Modifikaci lze provést dvěma způsoby: před tiskem a po tisku. Modifikace před tiskem spočívá ve smíchání vybrané látky s uhlíkovým inkoustem a následný tisk modifikovaného elektrodového materiálu. Výsledkem je vrstva, která obsahuje modifikátor v celém svém objemu. Dodatečnou modifikací je myšleno nanesení modifikátoru na povrch již vtištěné elektrody [10]. Tento typ modifikace byl používán v rámci této diplomové práce.

Polymery jsou běžnými materiály pro tvorbu biosenzorů, ale častokrát jsou méně chemicky odolné než jeho ostatní části. Avšak povaha polymerní sítě nabízí jedinečné

možnosti modifikace povrchu pro zvýšení citlivosti elektroanalytických měření. Takto modifikované elektrody slouží ke studiu přenosu náboje, popř. zprostředkování přenosu elektronů. Polymerní modifikátory řadíme do 4 skupin: redoxní (polymery na bázi ferrocenu), iontově-výměnné (Nafion), vodivé (na bázi pyrolu) a nevodivé (deriváty fenolu). Tři z těchto tříd se přímo účastní přenosu elektronů, rozdíl spočívá pouze ve způsobu transportu. Nevodivé polymery se využívají k vytvoření fyzické bariéry nebo pro pasivaci elektrodového povrchu.

Ukotvení na povrchu může probíhat dvojím způsobem. Buďto nanesením předem připraveného polymeru na povrch anebo ponořením elektrody do roztoku monomeru, následovaného polymerací za vzniku elektrody pokryté polymerním filmem [11, 12].

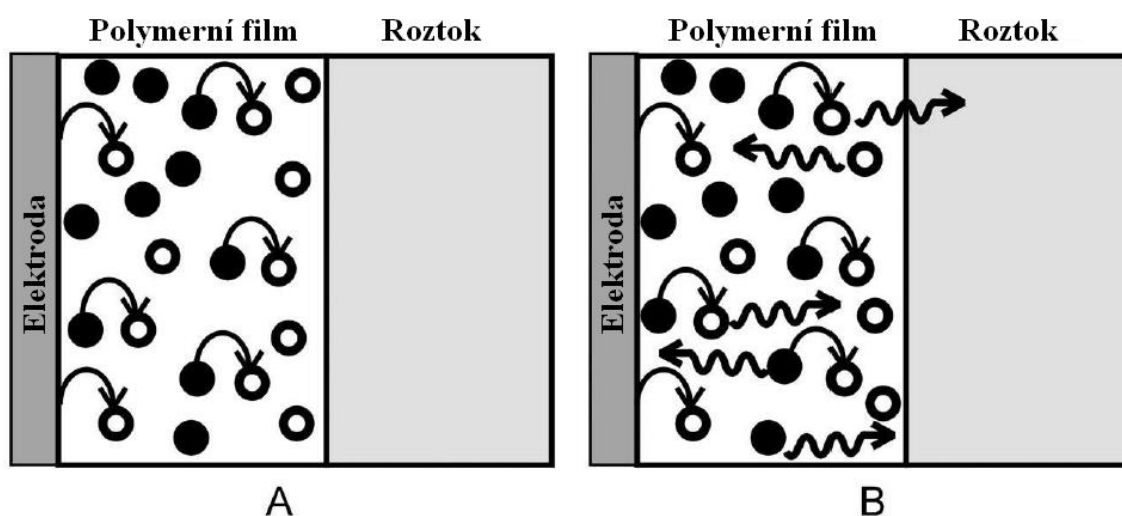


Obr. 6 Polymery používané k modifikaci povrchu elektrod, upraveno podle [11].

2.4.1 Redoxní polymery

Tyto polymery (popř. kopolymery) obsahují redox-aktivní molekuly, kovalentně vázané do své struktury. Každé toto aktivní místo, je schopno vyměňovat elektrony s jinými aktivními místy (**Obrázek 7.A**). Přenosu elektronů mezi polymerním filmem a roztokem se účastní pouze ta aktivní místa, vyskytující se v těsné blízkosti rozhraní kapalina-film. Stejně tak přenos elektronů mezi samotnou elektrodou a filmem probíhá pouze v těsné blízkosti. Výsledný analytický signál je tedy závislý na počtu elektronů, které jsou účinně přemístěny elektronovými přeskoky skrz polymerní film.

Redoxní polymery se nejčastěji syntetizují před depozicí na elektrodu a to buď polykondenzační reakcí nebo adiční polymerací s nejméně jedním redox aktivním monomerem. Největší problém spočívá v řízení koncentrace a prostorového rozložení aktivních míst ve filmu. Toto omezení lze odstranit použitím iontově-výměnných polymerů. Redoxní polymery jsou široce používány v bioelektrochemických aplikacích, např. v amperometrických biosenzorech a v bioelektrokatalýze [11, 13].



Obr. 7 Přenos signálu v redoxním polymeru (A) a přenos signálu v iontově-výměnném polymeru B [11].

2.4.2 Ionově-výměnné polymery

Do této třídy modifikátorů se řadí jakýkoli polymer schopný výměny nativního iontu za vhodně nabitý elektroaktivní iont. Takto vyměněný iont slouží jako přenašeč elektronů uvnitř i na povrchu filmu (**Obrázek 7.B**).

Imobilizaci vhodného iontoměničového polymeru (např. Nafionu) na povrchu elektrody lze provést třemi způsoby: nakapáním, spin-coatingem nebo ponořením do roztoku. Dále následuje iontová výměna za iont s příslušným nábojem.

Výhodou je rychlejší přenos elektronů, než u redoxních polymerů a koncentrace těchto redoxních míst lze snadno řídit výměnou iontů. Na druhou stranu je tento elektroaktivní iont náchylný na vymytí z polymerního filmu [11, 14].

2.4.3 Vodivé polymery

Tyto materiály obsahují konjugované π -vazby, které usnadňují vedení elektronů přes delokalizované vazby. Přenos tedy probíhá pohybem elektronů přes překrývající se a neobsazené energetické hladiny.

Vodivost většiny polymerů se pohybuje v rozmezí $10^{-14} - 10^2 \Omega^{-1}\text{cm}^{-1}$. Pro zvýšení vodivosti je tak materiál často dopován přísadkou pozitivního nebo negativního náboje a to pomocí chemických činidel nebo elektrochemickou reakcí. Takto vzniknou nosiče náboje buď ve formě děr, nebo nadbytečných elektronů.

Polymerace probíhá přímo na povrchu elektrody elektrochemickou reakcí. Elektropolymerace má řadu výhod: rychlost, snadné řízení tloušťky filmu, vysoká reprodukovatelnost, snadné dopování. Navíc podmínky polymerace jsou mírné, což nabízí možnosti zachycení biologicky aktivních molekul (např. enzymů) při současném zachování jejich biologické aktivity. Proto jsou tyto polymery používány k přípravě senzorů nejen pro organickou a anorganickou analýzu, ale i v biologickém odvětví [11, 15].

2.4.4 Nevodivé polymery

Nejsou zapojeny do přenosu elektronů, vytváří tedy jakousi bariéru a částečně nebo zcela pasivují povrch elektrody. Jsou používány k přípravě molekulárně rozlišujících filmů. K roztoku monomeru je přidána rozlišující molekula, která se během polymerační reakce zachytí ve vznikající síti. Po ukončení reakce je ze struktury odstraněna a zanechá za sebou dutinky, které jsou komplementární k rozlišující molekule [11].

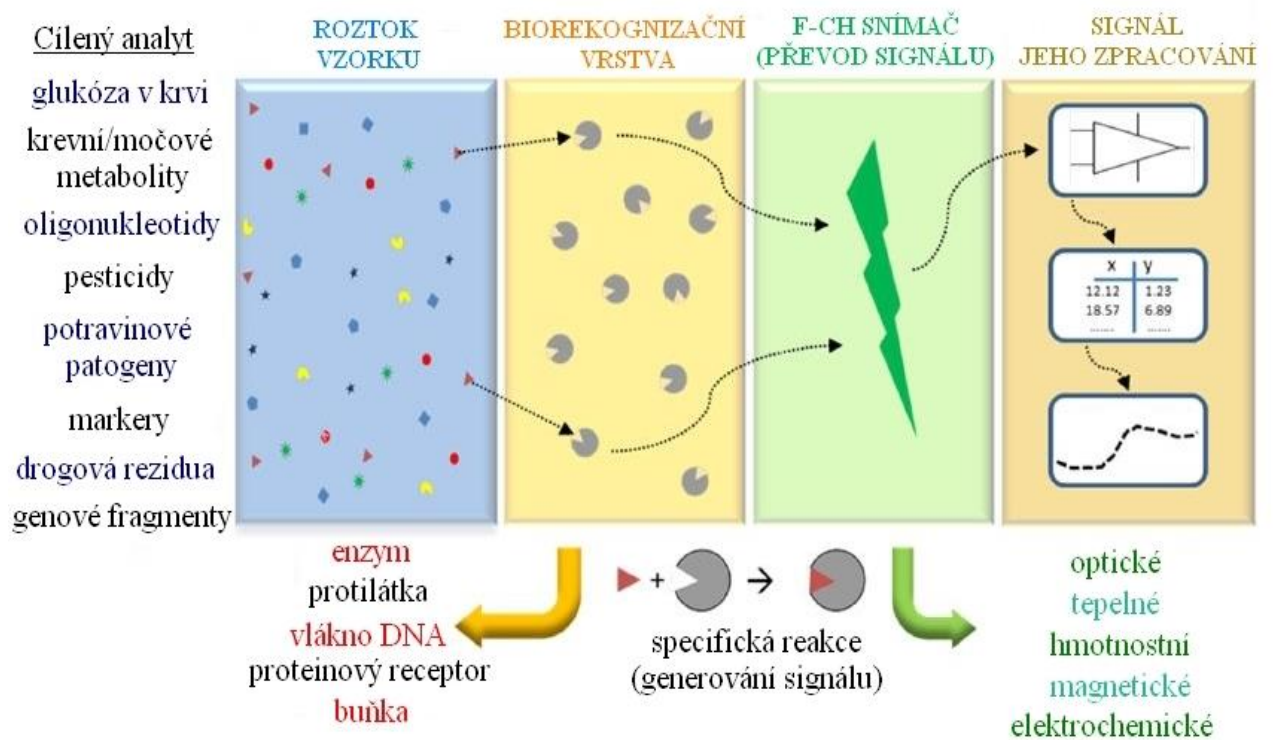
2.5 Biosenzory

Pod pojmem biosenzor, si můžeme představit jednoduché měřicí zařízení s rychlou odezvou a vhodně imobilizovanou molekulou s biologickou aktivitou vůči stanovovanému analytu, na povrchu použitého převodníku. Díky rychlé odezvě jsou biosenzory vhodné pro měření biologických nebo chemických markerů v širokém spektru praktických aplikací.

Konstrukce prvních biosenzorů začala již ve druhé polovině minulého století, kdy Clark a Lyons zkonstruovali první enzymatický senzor pro detekci glukózy v krvi. Od té doby získávají biosenzory stále větší pozornost a to zejména díky své vysoké selektivitě a snadnému použití [16, 17].

2.5.1 Konstrukce biosenzorů

Biosenzory jsou přístroje složené ze dvou částí. První částí je biologická molekula neboli biorekognizační prvek, který zprostředkovává selektivní biokatalýzu nebo specifickou vazbu analytu. Biologická molekula dokáže stanovený analyt rozpoznat až na molekulové úrovni, což zaručuje vysokou citlivost a specifičnost senzoru. Jako tento prvek lze použít enzym (např. glukózooxidáza), protilátku, nukleovou kyselinu nebo buňku popř. mikroorganismus (např. kvasinky) [16, 18].



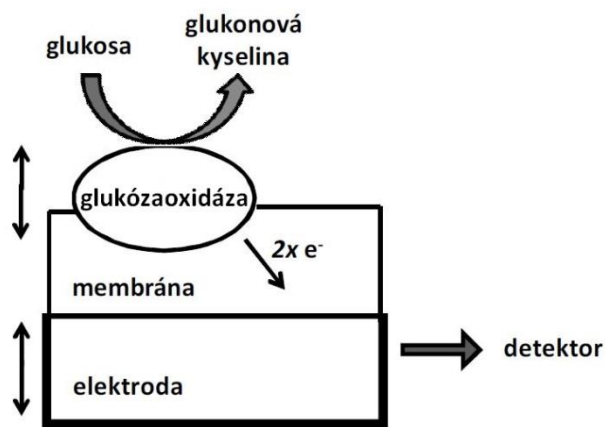
Obr. 8 Schéma biosenzorů, upraveno podle [3].

Druhou částí, na kterou je pevně vázán rozpoznávací prvek, je fyzikálně-chemický převodník. Ten je schopen měřit signál generovaný specifickou reakcí. Schéma biosenzoru je na **obrázku 8**.

2.5.2 Dělení biosenzorů dle biologického elementu

Dle biorekognizačního prvku lze senzory rozdělit na bioafinitní a biokatalytické. Bioafinitní elementy selektivně reagují s analytem. Nejtypičtějším příkladem je stanovení protilátky specifickou reakcí s antigenem a naopak. Do této skupiny se řadí i chromozomy, úsek DNA nebo málo rozšířené specifické receptory.

Biokatalytické elementy katalyzují přeměnu stanovovaného analytu do jiné formy. Produkt této přeměny je pak stanovován. Nejvíce rozšířenými prvky jsou enzymy, lze ale použít i celé buňky nebo tkáně. Do této skupiny patří již výše zmiňovaný Clarkův-Lyonsův senzor pro stanovení glukózy v krvi za použití enzymu glukózaoxidáza. Tento enzym katalyzuje přeměnu glukózy na glukonovou kyselinu (**Obrázek 9**) [16, 19].

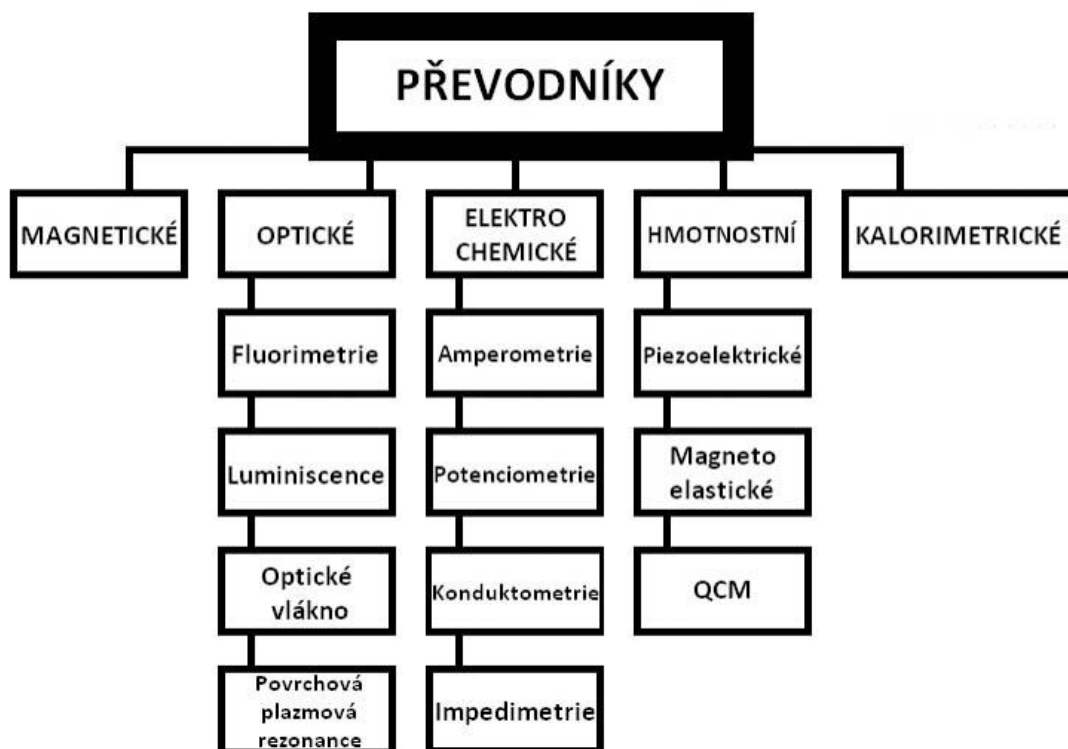


Obr. 9 Schéma glukózového biosenzoru [19].

2.5.3 Dělení biosenzorů dle fyzikálně chemického převodníku

Biologicky aktivní složku lze monitorovat podle řady vlastností: spotřeba kyslíku, tvorba peroxidu vodíku, změny koncentrace enzymu, absorpce, fluorescence, změny pH, vodivosti teploty nebo hmotnosti. Fyzikálně-chemické převodníky tak klasifikujeme (**Obrázek 10**):

- optické (fotometrické, fluorometrické, luminiscenční)
- kalorimetrické
- hmotnostní (piezoelektrické)
- elektrochemické (amperometrické, voltametrické, potenciometrické, konduktometrické)



Obr. 10 Dělení fyzikálně-chemických převodníků, upraveno podle [16].

V případě optických převodníků interaguje elektromagnetické záření s chemickými látkami. Zdrojem tohoto záření může být laser, výbojky nebo lampy. Měříme intenzitu absorpce popř. emise záření jako následek biochemické reakce [20, 21].

Kalorimetrické převodníky zaznamenávají změnu teploty v průběhu biochemických reakcí. Jedná se nejčastěji o termistor, jehož odpor je závislý na teplotě. Biosenzory s takovýmto typem převodníku mají omezené použití, protože nelze přesně říct, kolik tepla se uvolnilo [20].

Převodníky reagující na změnu hmotnosti látky jsou hmotnostní neboli piezoelektrické. Jedná se o přírodní krystaly (např. křemen, turmalín, apod.), který kmitá určitou frekvencí. Pokud se na povrch senzoru naváže stanovovaná látka, dojde ke změně rezonanční frekvence, která je přímo úměrná hmotnosti navázané látky [22, 23].

Nejstaršími typy převodníků jsou elektrochemické. Díky nízkým nákladům na pořízení a provoz a rychlou odezvou se dodnes řadí mezi nejvíce využívané převodníky. Podle měřící techniky se dále dělí na nejvíce využívané amperometrické (závislost proudu na konstantním vloženém potenciálu), voltametrické (závislost proudu na měnícím se napětí), potenciometrické (měření rovnovážného napětí galvanického článku) a konduktometrické (měření vodivosti) [24].

2.5.4 Biosenzory na bázi chitosanu a uhlíkových tištěných elektrodách

V roce 2013 publikoval S. Jampasan a kol. výzkum, v němž se zabývali konstrukcí biosenzoru na bázi imobilizované peptidové nukleové kyseliny, značené antrachinonem a ukotvené na chitosanem modifikované SPCE, pro selektivní detekci lidského papilomaviru 16 (HPV 16). Tento typ HPV se řadí mezi typy s vysokým rizikem a je příčinou vzniku rakoviny děložního čípku [25].

Dalším úspěšným použitím je SPCE modifikovaná chitosanem, ZnO a uhlíkovými nanotrubičkami, k simultánnímu stanovení noradrenalinu a serotoninu metodou CV a SWV. Noradrenalin (NE) je důležitým neurotransmiterem katecholaminu v centrální nervové soustavě savců, jehož poruchy způsobují roztroušenou sklerózu, tumory periferního nervového systému a Parkinsonovu chorobu. Serotonin (5-HT) je také neurotransmiterem a v centrální nervové soustavě se účastní procesů, podílejících se zejména na regulaci nálad a spánku. Mnoho, již publikovaných výzkumů ukázalo, že nízká hladina NE a 5-HT souvisí s depresemi, migrénou a úzkostí. Proto je zvláště důležité, vyvinout rychlý, citlivý a selektivní senzor pro simultánní stanovení NE a 5-HT. Kombinace SPCE, ZnO a uhlíkových nanotrubiček, rozptýlených v chitosanové membráně, poskytla senzor s velmi dobrou citlivostí, stabilitou i selektivitou [26].

Za zmínku určitě stojí i využití chitosanem modifikované, komerčně využívané SPCE, pro komplexní vyšetření poškození DNA. Zjišťování poškození je prováděno pomocí SWV, CV a elektrochemické impedanční spektroskopie. Při tomto stanovení dochází k interkalaci redox aktivní molekuly nebo iontu do helixu DNA. Tato látka ve struktuře šroubovice vyvolává vysokou voltametrickou odezvu. V případě velkého poškození DNA dojde k výraznému snížení signálu tohoto interkalátu [27].

V nedávno publikovaném výzkumu, byla zaměřena pozornost na stanovení indolu. Indol je produktem rozkladu tryptofanu, vyskytující se zejména ve střevech. Studie z roku 2015 ukazují, že dysregulace indolu, jsou úzce spjaté s metabolickými poruchami (např. diabetes mellitus). K jeho stanovení se používá několik metod jako je například plynová chromatografie, HPLC, UHPLC, ale většina těchto metod je drahá a časově náročná. Řešením jsou elektrochemické techniky. Byl zkonstruován senzor na bázi SPCE, modifikované chitosanovou membránou s uhlíkovými nanotrubičkami, který poskytuje rychlou a citlivou odezvu [28].

Amperometrický senzor na bázi SPCE, modifikované uhlíkovými nanotrubičkami a monoaminoxidázou imobilizovanou v chitosanu, byl použit ke stanovení hladiny antidepresiv (imipraminu, afobazolu) v krvi. Takto modifikovaná SPCE dosahuje nejnižších detekčních limitů, ze všech zkoušených senzorů, a to až 3 nM [29].

Z farmaceutického odvětví lze uvést jako příklad stanovení izoniazidu. Tato látka se řadí mezi tzv. antituberkolotika a působí bakteriocidně na *Mycobacterium tuberculosis bacili*, která způsobuje tuberkulózu. Lze ji použít jak ve formě tablet, sirupů nebo intramuskulární injekce. Bohužel dlouhodobé užívání izoniazidu vede až k epilepsii a jaternímu selhání v důsledku vzniku toxického metabolitu hydrazinu. Běžně užívané analytické metody jako například HPLC, kapilární elektroforéza, spektroskopické techniky jsou časově a ekonomicky náročné. Elektrochemické metody tak přinášejí východisko s použitím SPCE modifikované chitosanovou membránou v níž jsou imobilizovány nanočástice zlata, potažené uhlíkovými nanovláknými. Díky rychlým odezvám lze tyto senzory použít při průtokové injekční analýze a minimální spotřebě vzorku [30].

Další významnou částí je aplikace v potravinářství. Například elektrochemický imunosenzor, jehož pracovní elektroda byla modifikována vícevrstevnými uhlíkovými nanotrubičkami a alginátem sodným, které byly imobilizovány v karboxymethylchitosanu k detekci patogenu *Escherichia coli* O157:H7 a *Enterobacter sakazakii* v potravinách a vodních zdrojích. Jeden z nejnebezpečnějších sérotypů *E. coli* je sérotyp O157:H7, způsobující život ohrožující onemocnění a to zejména u dětí a starších osob. *E.sakazakii* je proti tomu méně se vyskytující patogen, avšak také způsobuje velmi závažné, život ohrožující onemocnění jako je například meningitida novorozenců, nekrotizující enterokolitida a sepse, s úmrtností až 80 %. Tento imunosenzor zajišťuje rychlou a citlivou simultánní detekci těchto patogenů a tím i rychlé zajištění účinné léčby [31].

V neposlední řadě je také využití v analýze životního prostředí pro stanovení těžkých kovů. Protože nejsou biologicky odbouratelné, tak představují hrozbu jak pro životní prostředí, tak pro lidské zdraví. Proto je monitorování stopových množství těžkých kovů stále důležitější. Pro jejich stanovení je využívána AAS, ICP-OES, rentgenové fluorescence, avšak provoz této analytické instrumentace je ekonomicky velmi náročný. Vynikající alternativou jsou v tomto případě elektrochemické techniky, zejména rozpouštěcí voltametrie s využitím rtuťových nebo bizmutových filmových elektrod. Z důvodu zabránění práce s toxickou rtuť, je možné použít chitosanem modifikované SPCE [32].

Dalším využitím pro screening životního prostředí, je sledování aromatických sloučenin, například úspěšné stanovení 4-nitrofenolu ve vodě za použití SPCE modifikované ZnO nanočásticemi imobilizovanými v chitosanové membráně. 4-nitrofenol je silně dráždivá látka, způsobující záněty očí, kůže a dýchacích cest. Při průniku do krve tvoří methemoglobin, způsobující methemoglobinémií. Methemoglobin nemá afinitu ke kyslíku a nemůže proto přenášet žádný kyslík do tkání, což způsobuje modrání kůže a sliznic, zmatenost až bezvědomí. Takto modifikovanou SPCE lze stanovit koncentraci 4-nitrofenolu v řádech μM [33].

3 Experimentální část

3.1 Použité zařízení a chemikálie

CHEMIKÁLIE

| Látka | Čistota | Dodavatel |
|--|-------------|-------------------|
| Oxid platičitý | p.a. | Sigma |
| Oxid rhoditý | p.a. | Sigma |
| Oxid paladnatý | p.a. | Sigma |
| Oxid rutheničitý | p.a. | Sigma |
| Oxid itidičitý | p.a. | Sigma |
| Oxid manganičitý | p.a. | Sigma |
| Chitosan izolovaný z krabů (vysoko viskozitní) | p.a. | Sigma |
| Chitosan izolovaný z krevet (nízko viskozitní) | p.a. | Sigma |
| Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného | p.a. | Penta |
| Monohydrát dihydrogenfosforečnanu sodného | p.a. | Penta |
| Kyselina askorbová | p.a. | Penta |
| Kyselina močová | p.a. | Fisher Scientific |
| Hexakynoželeznan draselný | p.a. | Lachema |
| Glukóza | p.a. | Lachema |
| Glukózaoxidáza (163400 jednotek/g) | p.a. | Sigma |
| Kyselina octová 30% | p.a. | Penta |
| Peroxid vodíku 30% | GR | Merck |
| Chlorid draselný | p.a. | Metrohm |
| Uhlíkový inkoust | puriss p.a. | Gwent group |
| Pt [AAS standard] | puriss p.a. | Merck |
| Mn [AAS standard] | puriss p.a. | Merck |
| Pd [AAS standard] | puriss p.a. | Merck |
| Fe [AAS standard] | puriss p.a. | Merck |
| Ru [AAS standard] | puriss p.a. | Merck |
| Rh [AAS standard] | puriss p.a. | Merck |

ZAŘÍZENÍ

| Zařízení | Výrobce |
|----------------------------------|----------------------------|
| Analytické váhy ADB 600-C3 | Kern Optics |
| PGSTAT 30 | EcoChemie - Nizozemsko |
| Automatické pipety | Eppendorf |
| Farradayova klec | Metrohm |
| Magnetické míchadlo | IKA |
| pH metr IonoLab pH 720 | Gemini BV |
| Předvážky | Kern Optics |
| SEM VEGA3 SBU | TESCAN – Česká Republika |
| SPCE | DropSens |
| SPCE s uhlíkovými nanotrubičkami | Orion High Technologies SL |
| Ultrazvuk | Bandelin SONOREX |

3.2 Příprava zásobních roztoků

Pro přípravu fosfátového pufru byl připraven roztok $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ o koncentraci 0,2M (roztok A) a roztok $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ o koncentraci 0,2M (roztok B). 1 l fosfátového pufru o pH přibližně 7 byl připraven smícháním 305 ml roztoku A a 195 ml roztoku B. Objem byl doplněn na 1 litr redestilovanou vodou a přesné pH změřeno pH metrem.

K přípravě 0,1M zásobního roztoku $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ bylo naváženo vypočítané množství chemikálie a rozpuštěno v redestilované vodě. 0,001M roztok této soli byl připraven zředěním zásobního roztoku, přidáno 100 μl 0,1M standardního roztoku KCl a doplněno redestilovanou vodou na výsledný objem 3ml.

Pro přípravu roztoků peroxidu vodíku, bylo vypočítané množství 30% peroxidu odpipetováno do zásobní baňky a doplněno roztokem pufru. Připravené koncentrace peroxidu byly 1 mg l^{-1} a 20 mg l^{-1} .

Množství potřebné pro přípravu roztoku kyseliny askorbové a koncentraci 1 mg l^{-1} a 50 mg l^{-1} bylo odváženo na analytických vahách a doplněno redestilovanou vodou.

Roztok kyseliny močové o koncentraci 50 mg l^{-1} , byl připraven navážením vypočítaného množství na analytických vahách a toto množství rozpuštěno v redestilované vodě.

3.3 Příprava roztoků chitosanu

K dispozici byly dva typy chitosanu. Chitosan izolovaný z krabů a chitosan izolovaný z krevet. Hlavním rozdílem mezi těmito druhy je stupeň deacetylace a tedy i molekulová hmotnost. Z obou byly připraveny 1% roztoky v 1% kyselině octové. Chitosan izolovaný z krevet, vytvořil tekutý roztok, se kterým se snadno pracovalo. Naproti tomu chitosan izolovaný z krabů, tvořil vysoce viskózní roztok, se kterým se velmi špatně manipulovalo.

3.4 Příprava elektronových mediátorů

Vybrané oxidy kovů (PtO_2 , Rh_2O_3 , PdO , RuO_2 , IrO_2 a MnO_2) byly navázeny a smíchány s uhlíkovým inkoustem tak, aby jejich výsledná koncentrace byla 5% w/w. Takto připravené směsi byly ponechány v ultrazvuku asi po dobu 30 minut, aby došlo k lepší disperzi částic.

3.5 Příprava modifikovaných SPCE

Modifikace byla prováděna třemi způsoby. U prvního způsobu byla na povrch pracovní elektrody nanášena vrstva směsi inkoustu a mediátoru, která byla následně překryta 10 μl chitosanu. U druhého způsobu, byl chitosan přímo míchán s čistým oxidem kovu a v dalším kroku bylo 10 μl této suspenze nanášeno na pracovní elektrodu.

Takto byly připraveny celkem 4 sady elektrod. Pro každý typ modifikace a pro oba chitosany. Takto modifikované SPCE byly charakterizovány cyklickou voltametrií a chronoamperometrií.

Posledním typem modifikace bylo míchání chitosanu izolovaného z krevet s ionty kovů, které jsou používány jako standardy pro AAS a mají koncentraci 1 g l^{-1} (Pt, Mn, Pd, Fe, Ru, Rh), aby výsledná koncentrace činila 5% v/v. Tato sada elektrod byla charakterizována cyklickou voltametrií na peroxid vodíku. Signál poskytovaly pouze 3 elektrody a to elektrody modifikované ionty manganu, rhodia a ruthenia. Ty byly dále charakterizovány chronoamperometricky.

Vybrané konfigurace byly nafoceny na elektronovém mikroskopu VEGA3 SBU, s urychlovacím napětím 5 kV a detektorem sekundárních elektronů.

3.6 Příprava glukózových biosenzorů

Směs vybraných mediátorů a uhlíkového inkoustu byla nanášena na čistou SPCE. Biorekognizační vrstva byla připravena rozpuštěním 1 mg glukózaoxidazy (aktivita enzymu

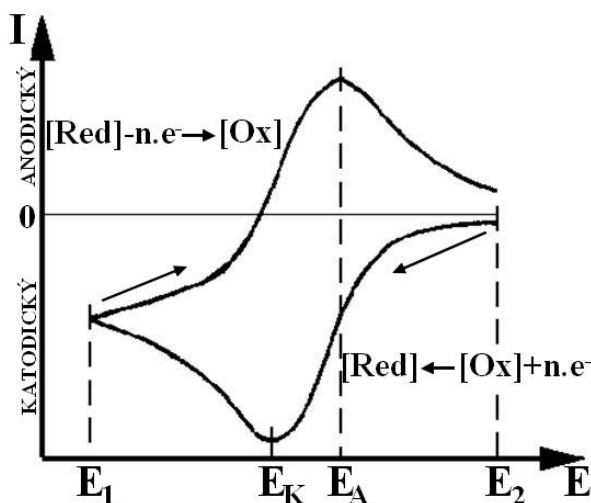
163400 jednotek/g) ve 20 μl 0,1M fosfátového pufru a k tomuto roztoku přidáno stejné množství krevetového chitosanu. Tato směs byla dávkována na mediátorem modifikovanou SPCE v objemu 10 μl [34, 35].

Stejně byla připravena i biorekognizační vrstva na bázi Nafionu. 1 mg glukózaoxidázy bylo rozpuštěno ve 20 μl fosfátového pufru a přidáno ekvivaletní množství 1% Nafionu.

3.7 Cyklická voltametrie

Při voltametrickém měření je používán elektrochemický článek, který tvoří polarizovatelná, pracovní elektroda, nepolarizovatelná referentní elektroda a v případě tříelektrodeového systému i pomocná elektroda. Na pracovní elektrodu je vkládán rostoucí potenciál od počáteční hodnoty E_1 až do koncové E_2 a naopak. Při změnách potenciálu jsou zaznamenávány změny proudové odezvy.

Tento měřicí cyklus lze jakkoliv libovolně opakovat a výsledkem je cyklický voltamogram (**Obrázek 11**). Osa x je představuje vkládaný potenciál (E), zatímco osa y zaznamenává proudovou odezvu (I). Hlavními charakteristikami jsou anodický proud a potenciál (I_A , E_A), ty odpovídají oxidaci analytu a katodický proud a potenciál (I_K , E_K), charakterizující redukci analytu. Kvalitativní veličinou je potenciál (E_A , E_K) v maximu píku, jež je charakteristický pro danou látku. Proud v maximu píku (I_A, I_K) je kvantitativní veličinou a je úměrný koncentraci analytu v roztoku.



Obr. 11 Ukázka cyklického voltamogramu.

Roztoky peroxidu vodíku o koncentraci 1 mg l^{-1} , kyseliny močové o koncentraci 50 mg l^{-1} a kyseliny askorbové o koncentraci 1 a 50 mg l^{-1} , byly naneseny na SPCE v objemu 50 μl a měřeny v rozsahu potenciálu -0,3 V – 1 V, při rychlosti snímání 50 mV/s. Po celou

dobu trvání měření, byl systém uzavřen ve Faradayově kleci k odstínění rušivých elektrostatických polí.

3.8 Chronoamperometrie

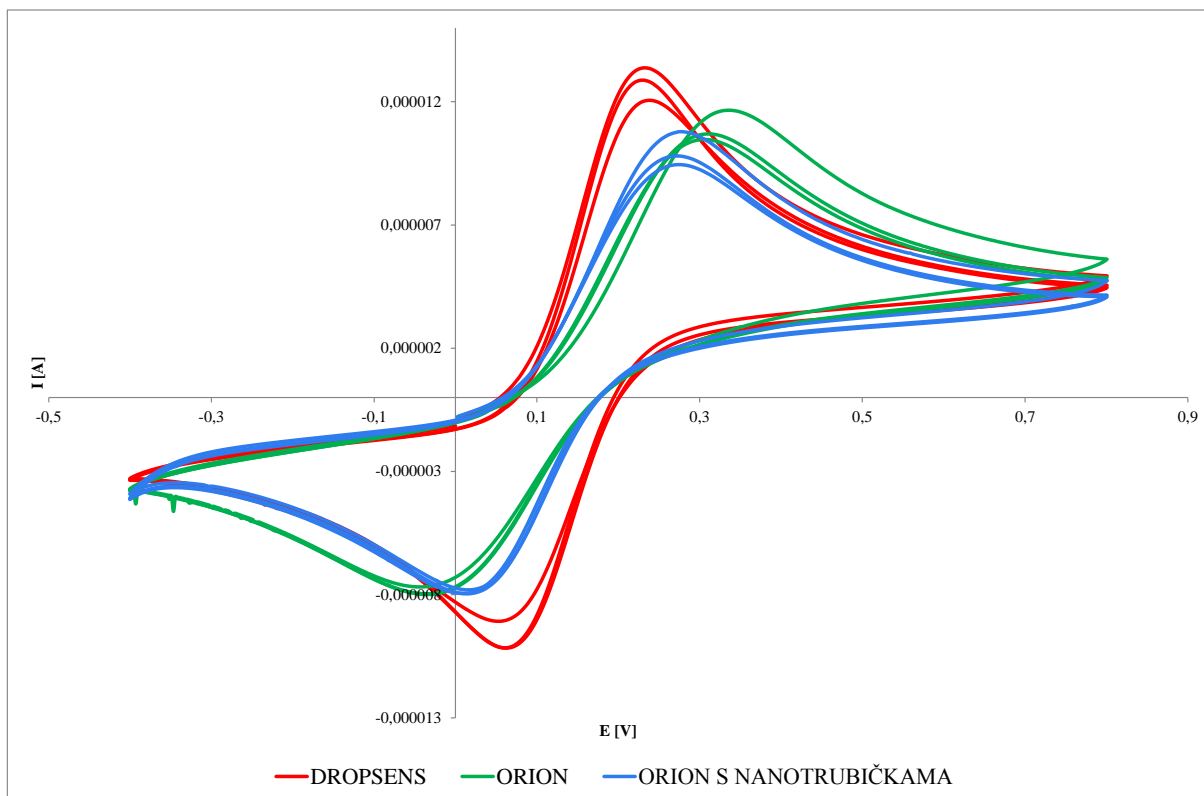
Chronoamperometrie je elektrochemická metoda, při níž sledujeme proudovou odezvu v závislosti na koncentraci stanovované látky v roztoku a při skokové změně potenciálu, vkládaném na pracovní elektrodu. Tento potenciál bývá nejčastěji stanoven výše zmiňovanou cyklickou voltametrií.

Všechny elektrody byly ponořeny do 20 ml míchaného roztoku fosfátového pufru o pH přibližně 7. Byl navolen konstantní potenciál v rozsahu od 0 V – 0,8 V a přidávány 100 μ l, standardní přídávky peroxidu vodíku o koncentraci 20 mg l⁻¹. Přídavek bylo celkem 10 a každý další byl přidán až po ustálení proudové odezvy. Výsledné chronoamperometrické křivky byly vyhodnoceny a získané hodnoty byly vyneseny do kalibračních křivek, jako závislost proudu na aktuální koncentraci peroxidu vodíku v roztoku.

4 Výsledky a diskuze

4.1 Volba uhlíkové elektrody

K dispozici byly 3 druhy SPCE. První elektroda španělské firmy Dropsens, další dvě značky Orion High Technologies, přičemž jedna z nich měla povrch pokrytý vrstvou uhlíkových nanotrubiček. U těchto elektrod byly změřeny cyklické voltamogramy pro hexakynoželeznatan draselný a ty pak vzájemně porovnány (**Obrázek 12**).



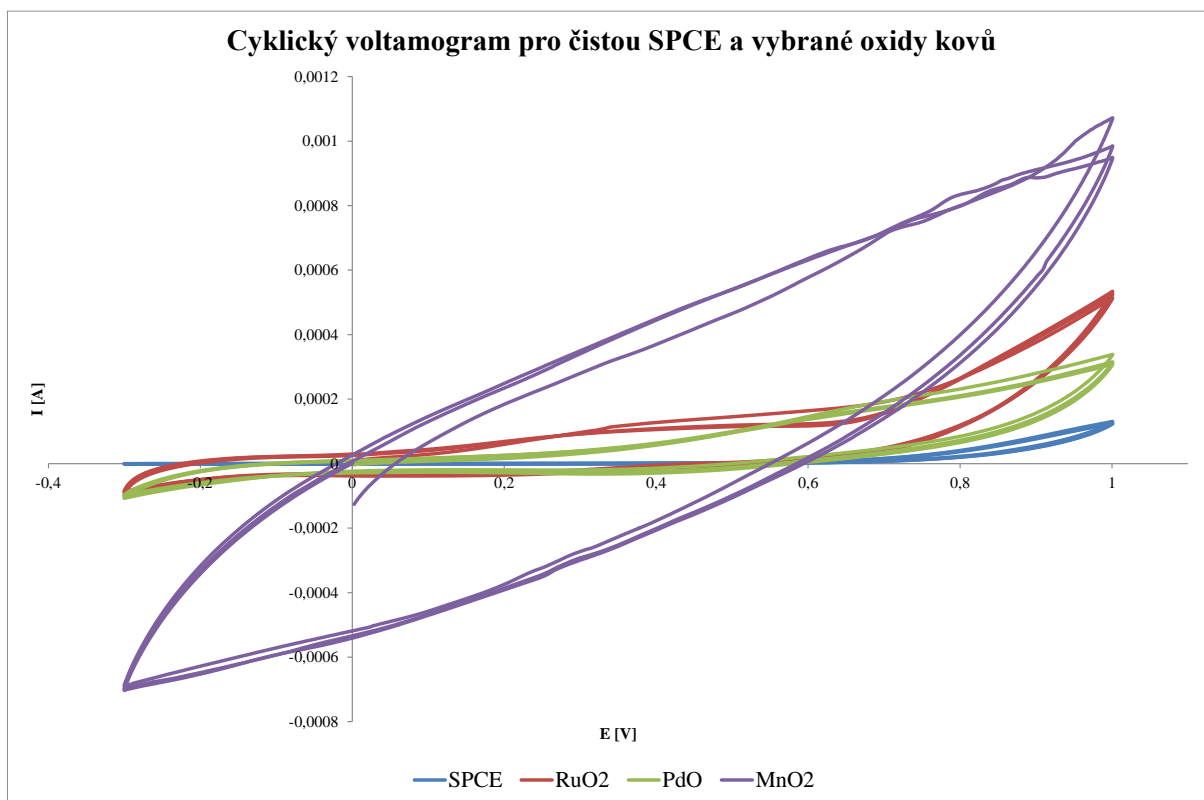
Obr. 12 Cyklické voltamogramy pro elektrody značky Dropsens, Orion a Orion s uhlíkovými nanotrubičkami.

Nejlepší je elektroda od firmy DropSens. V porovnání s dalšími dvěma na ní dochází k rychlejší oxidaci a zpětné redukci železa. Rozdíl potenciálů maximálních píků je menší a proudová odezva je větší oproti elektrodám značky Orion. Proto byly veškeré modifikace a měření prováděny pouze na elektrodách značky DropSens.

4.2 Cyklická voltametrie SPCE modifikovaných elektronovým mediátorem

Měření bylo provedeno dle postupu uvedeného v kapitole 3.8. Všechny modifikované elektrody poskytovaly několikasetkrát vyšší signál než čistá SPCE. Na **Obrázku 13** je

srovnání čisté SPCE, elektrody modifikované RuO₂, PdO a MnO₂. Je patrné, že přítomnost mediátoru přenosu elektronů zvyšuje proudové odezvy oxidace H₂O₂ a posouvá pík k menším potenciálům. Ostatní kovy nevykazovaly zvýšenou odezvu na H₂O₂.



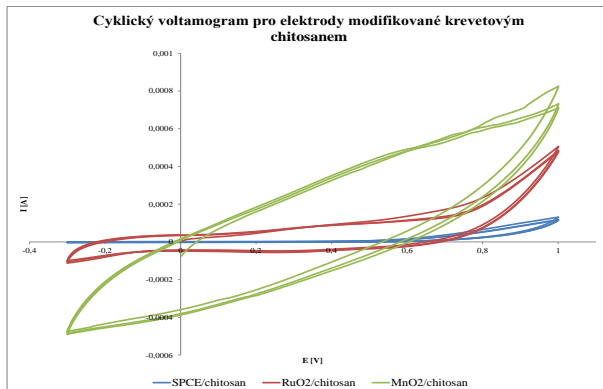
Obr. 13 Cyklický voltamogram pro čistou SPCE, SPCE modifikovanou RuO₂, PdO a MnO₂.

4.3 Cyklická voltametrie SPCE modifikovaných mediátorem a chitosanem

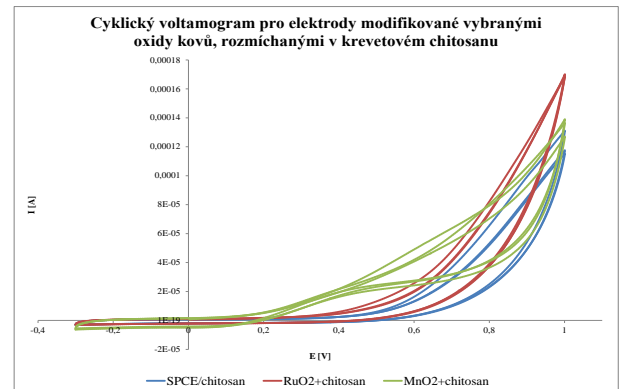
Elektrody byly modifikovány několika způsoby, jak je uvedeno v kapitole 3.6. Na **Obrázcích 14-15**, jsou zobrazeny vybrané mediátorem modifikované SPCE, překryté 10 μ l chitosanu izolovaného z krevet a krabů. Pro druhý typ modifikace byly oxidy kovů rozmíchány v chitosanu tak, aby jejich výsledná koncentrace byla stejná, jako pro předchozí modifikace, kde se oxid rozmíchal v uhlíkovém inkoustu v koncentraci 5% w/v. Tyto záznamy jsou na **obrázcích 16-17**. Měřítka grafů byla stejná pro všechny měření, aby byla možná rychlá srovnání.

Z křivek jde vidět, že jako nejlepší konfigurace pro budoucí použití se jeví elektrody modifikované oxidem kovu, rozmíchaném v uhlíkovém inkoustu a překrytém vrstvou chitosanu izolovaného z krevet. Chitosan izolovaný z krabů kvůli své viskozitě vytvořil na povrchu pracovní elektrody membránu, která částečně utlumila přenos elektronů a důsledkem toho nedošlo k tak vysokému nárůstu proudu jako u chitosanu izolovaného

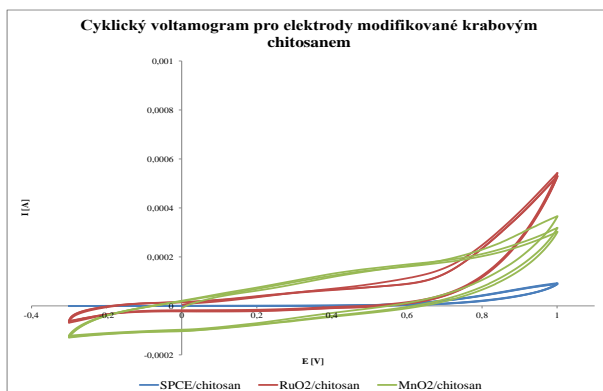
z krevet. V případě druhé modifikace docházelo ke sloupávání chitosanové membrány společně s natištěnou elektrodou z povrchu substrátu.



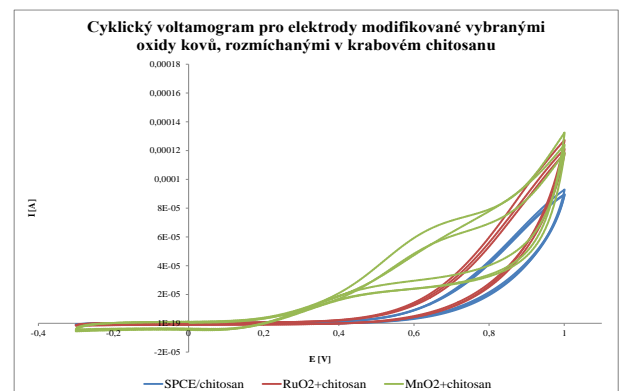
Obr. 14 Cyklický voltamogram pro elektrody modifikované mediátorem a překryté vrstvou chitosanu izolovaného z krevet.



Obr. 16 Cyklický voltamogram pro elektrody modifikované mediátorem rozmíchaným v chitosanu izolovaném z krevet.



Obr. 15 Cyklický voltamogram pro elektrody modifikované mediátorem a překryté vrstvou chitosanu izolovaného z krabů.



Obr. 17 Cyklický voltamogram pro elektrody modifikované mediátorem rozmíchaným v chitosanu izolovaném z krabů.

4.4 Chronoamperometrie modifikovaných elektrod

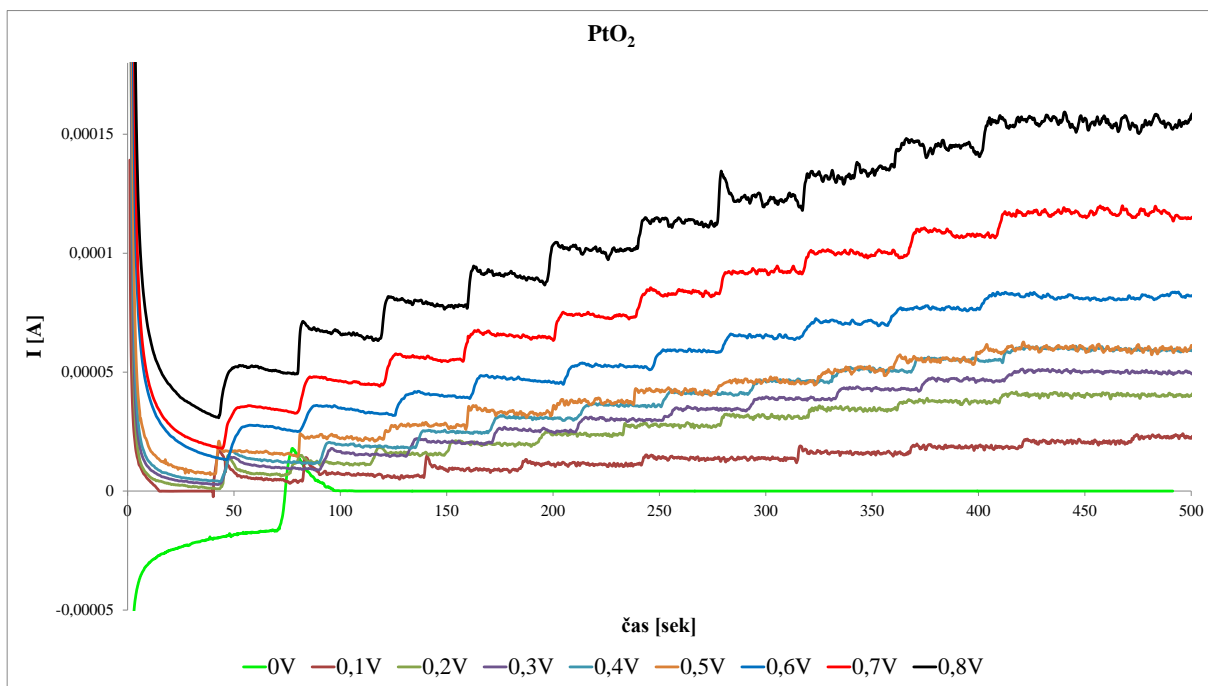
Pro zjištění citlivosti elektrody bylo provedeno chronoamperometrické měření peroxidu vodíku dle postupu uvedeném v kapitole 3.8. V prvním kroku bylo měření provedeno na SPCE modifikovaných pouze mediátorem a v druhém kroku na elektrodách modifikovaných mediátorem a krevetovým chitosanem.

4.4.1 Elektrody s PtO₂

V **grafu 1** je zobrazena závislost proudu na koncentraci H₂O₂ pro elektrodu modifikovanou PtO₂ a na **grafu 2** pro elektrodu modifikovanou PtO₂/chitosan. Veškeré data byly získány z chronoamperometrických křivek uvedených na **obrázku 18 a 19**.

Nejvyšší proudové odezvy je dosaženo při potenciálu 0,6 V u elektrody bez chitosanu a to 68,1 μA. Pro potenciály v rozsahu 0,1 – 0,6 V je velikost proudové odezvy větší u elektrod modifikovaných pouze PtO₂. Elektroda PtO₂/chitosan poskytuje v tomto rozsahu téměř 2x nižší odezvy. To je pravděpodobně způsobeno chitosanovou membránou, která v tomto případě utlumuje přenos elektronů. Ve vyšších potenciálech už lze vidět zašumění křivky. U elektrody modifikované PtO₂/chitosan je při potenciálu 0,6 V vidět výrazná proudová špička. To může být způsobeno nadávkováním H₂O₂ blízko elektrody nebo k neočekávaným napěťovým rušením v proudové síti.

Pro potenciály 0,7 V a 0,8 V jsou proudové odezvy téměř shodné. Při 0,7 V je pro elektrodu s PtO₂ proudová odezva 51,3 μA a pro PtO₂/chitosan 51,2 μA. Při 0,8 V pro elektrodu s PtO₂ 61,0 μA a elektrodu s PtO₂/chitosan 60,8 μA. V takto vysokých potenciálech se ale projevují interference, proto se snažíme najít takovou modifikaci, která bude poskytovat co nejvyšší odezvu při co nejnižším potenciálu.



Obr. 18 Chronoamperometrické křivky H₂O₂ pro elektrodu modifikovanou PtO₂ při různých potenciálech detekce.

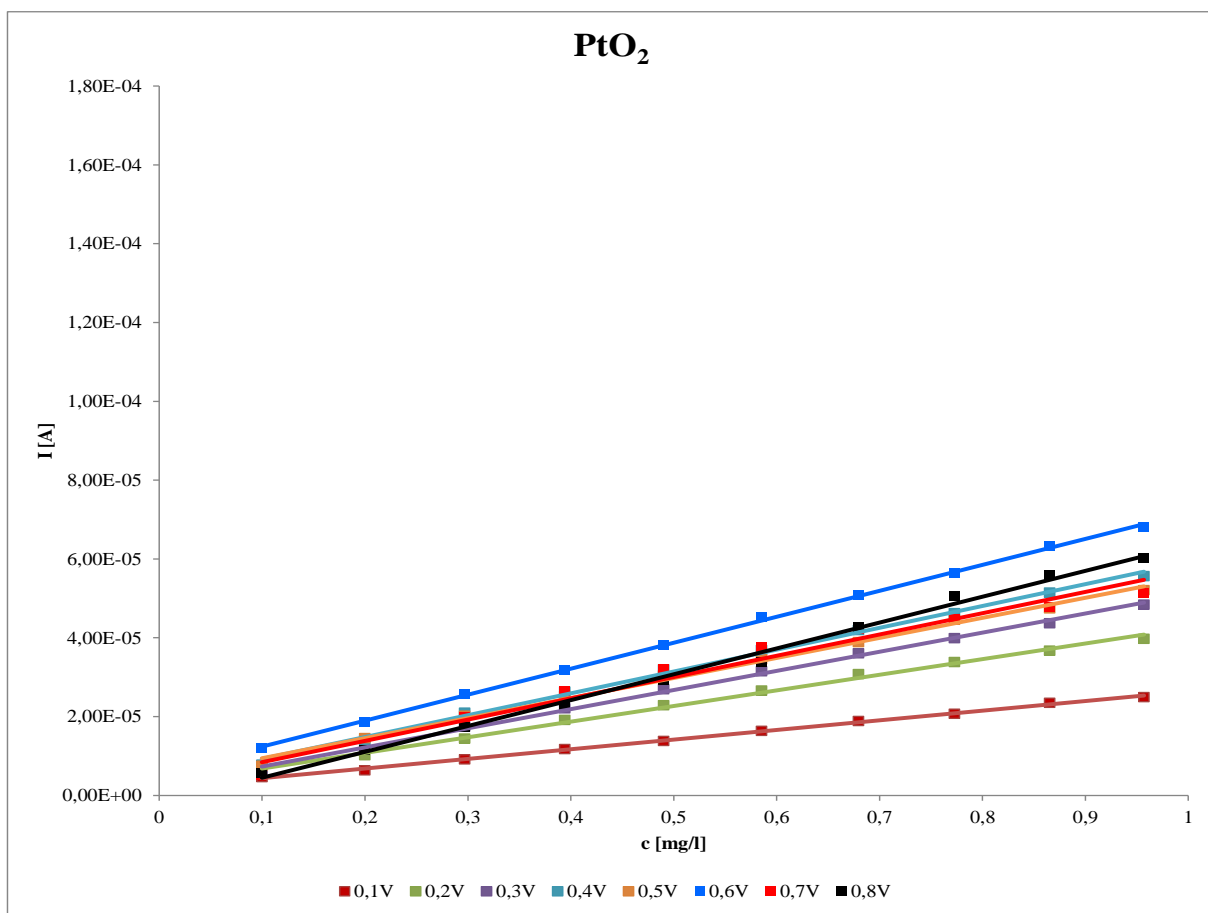
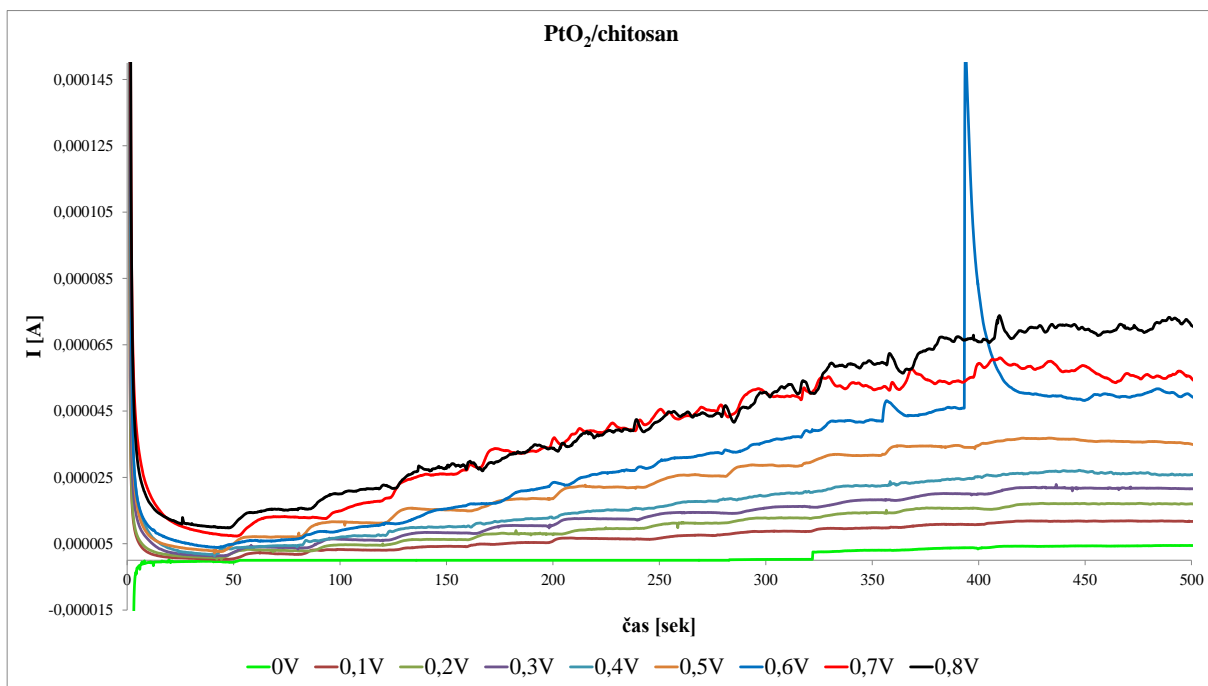


Fig. 1 Závislost proudu na koncentraci H₂O₂ pro elektrodu modifikovanou PtO₂ při různých potenciálech detekce.



Obr. 19 Chronoamperometrické křivky H₂O₂ pro elektrodu modifikovanou PtO₂/chitosan při různých potenciálech detekce.

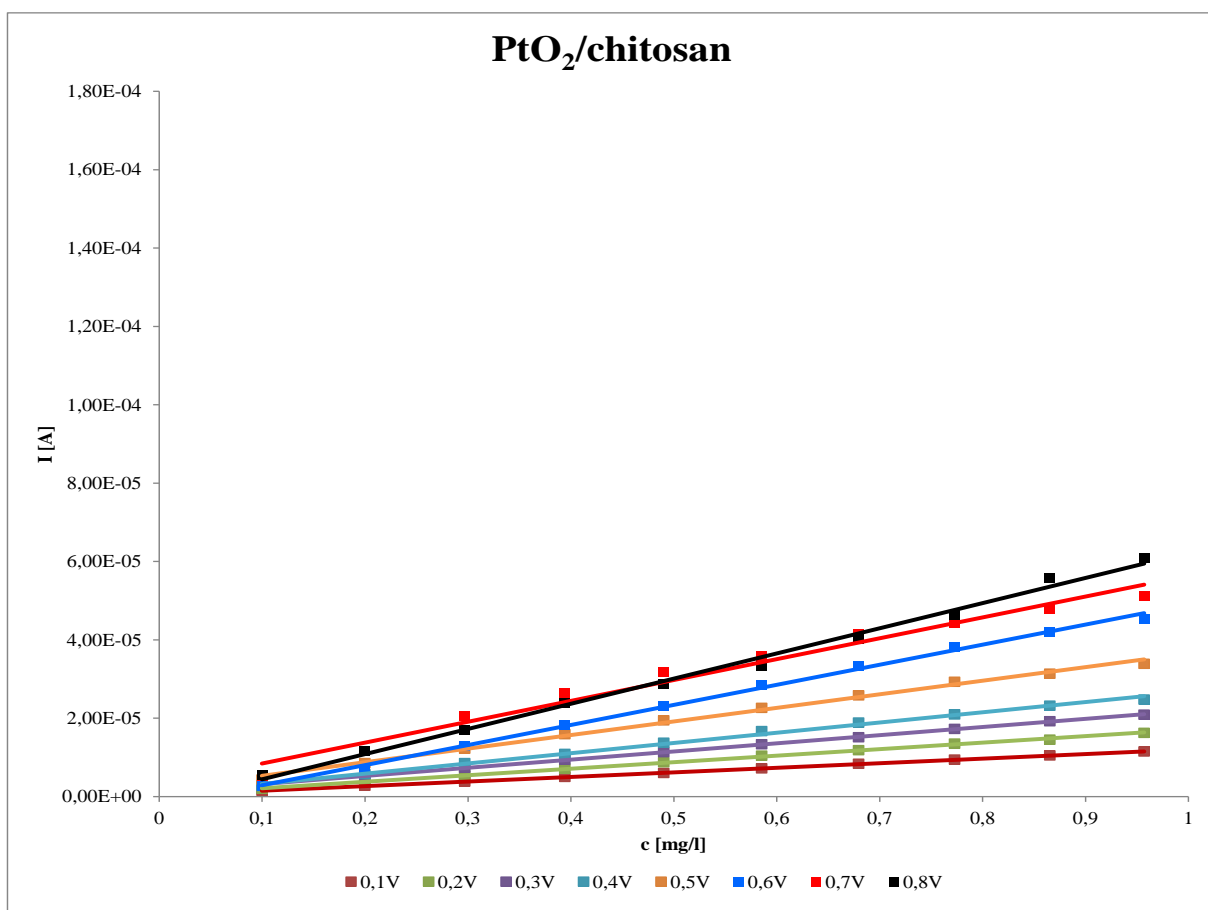
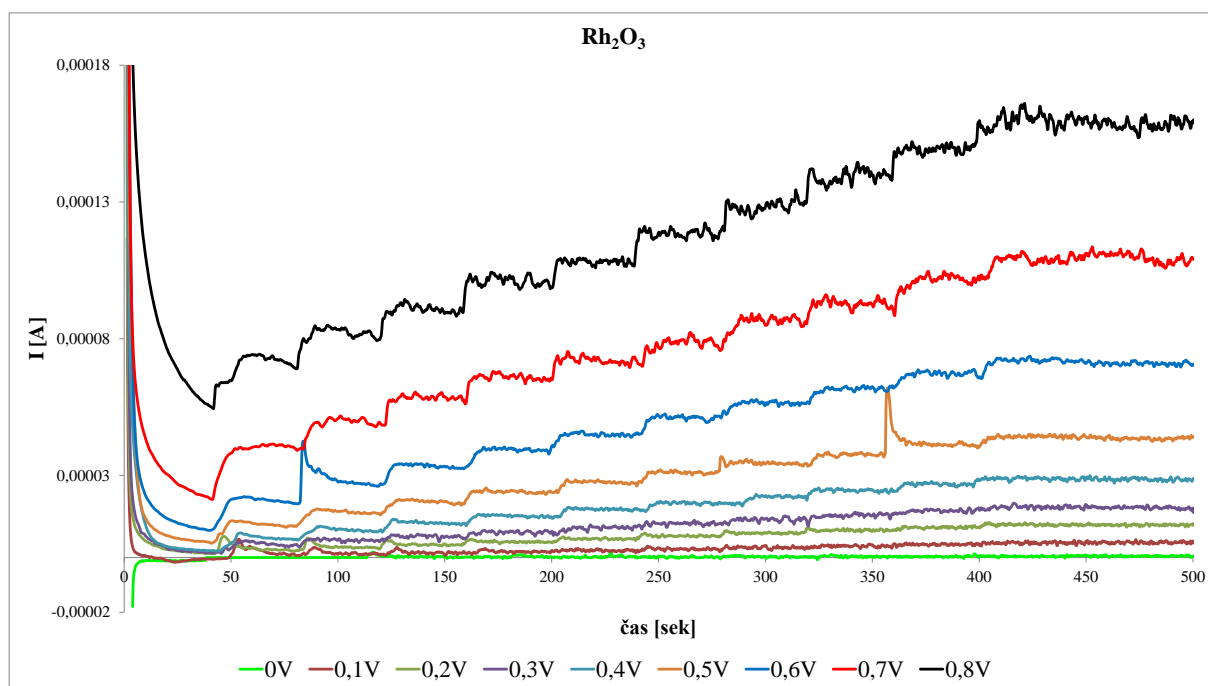


Fig. 2 Závislost proudu na koncentraci H₂O₂ pro elektrodu modifikovanou PtO₂/chitosan při různých potenciálech detekce.

4.4.2 Elektrody s Rh_2O_3

Pro elektrody modifikované Rh_2O_3 (**Graf 3**) a Rh_2O_3 /chitosan (**Graf 4**) jsou v nižších potenciálech vyšší odezvy pro elektrody bez chitosanu. Tyto rozdíly však pro zvyšující se potenciály klesají a v rozmezí 0,3 V – 0,5 V se hodnoty proudu pohybují v rozmezí od 16,2 μA do 39,2 μA pro Rh_2O_3 a 14,8 μA až 38,6 μA pro Rh_2O_3 /chitosan. Nejvyšší odezvy se dosaženo pro 0,8 V Rh_2O_3 a to 104 μA . Stejně jako v případě elektrod s PtO_2 jsou chronoamperometrické křivky pro elektrodu s Rh_2O_3 značně zašuměné. U elektrody s Rh_2O_3 /chitosan se zašumění neprojevuje ani při vyšších potenciálech.



Obr. 20 Chronoamperometrické křivky H_2O_2 pro elektrodu modifikovanou Rh_2O_3 při různých potenciálech detekce.

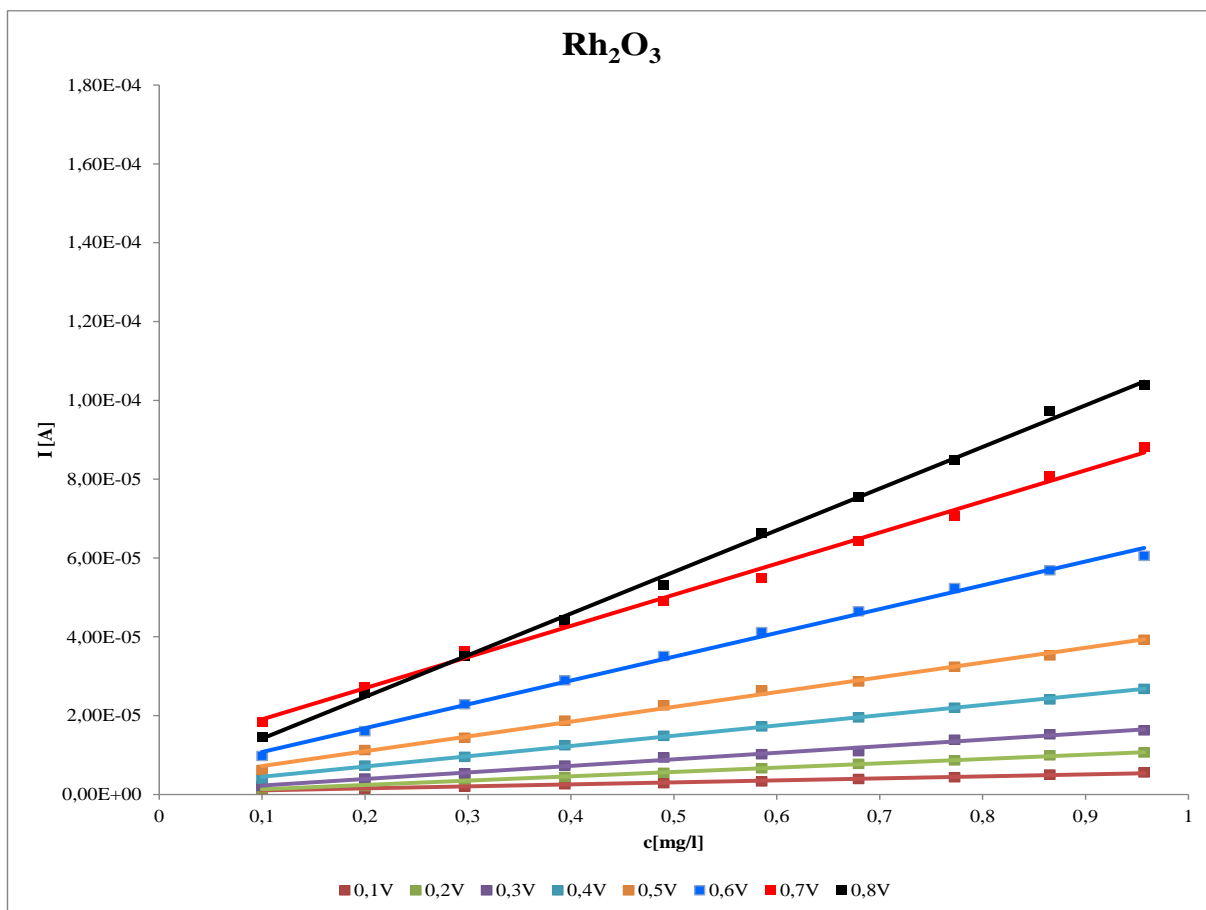
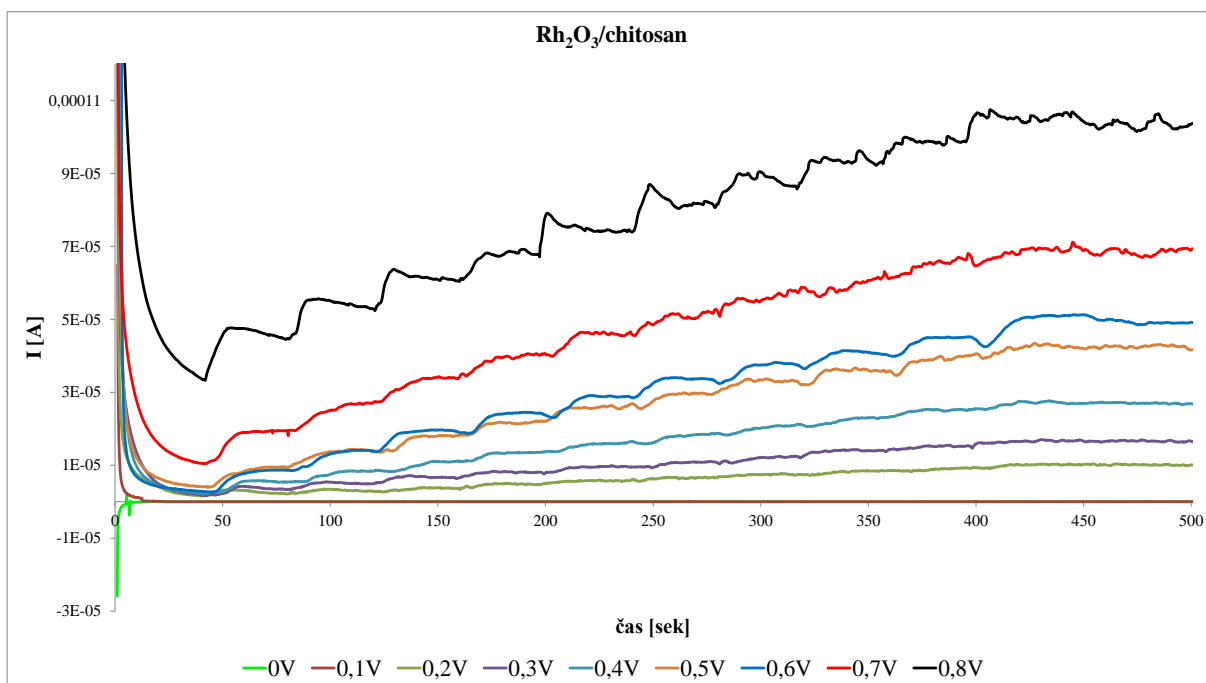


Fig. 3 Závislost proudu na koncentraci pro elektrodu modifikovanou Rh₂O₃ při různých potenciálech detekce.



Obr. 21 Chronoamperometrické křivky H₂O₂ pro elektrodu modifikovanou Rh₂O₃/chitosan při různých potenciálech detekce.

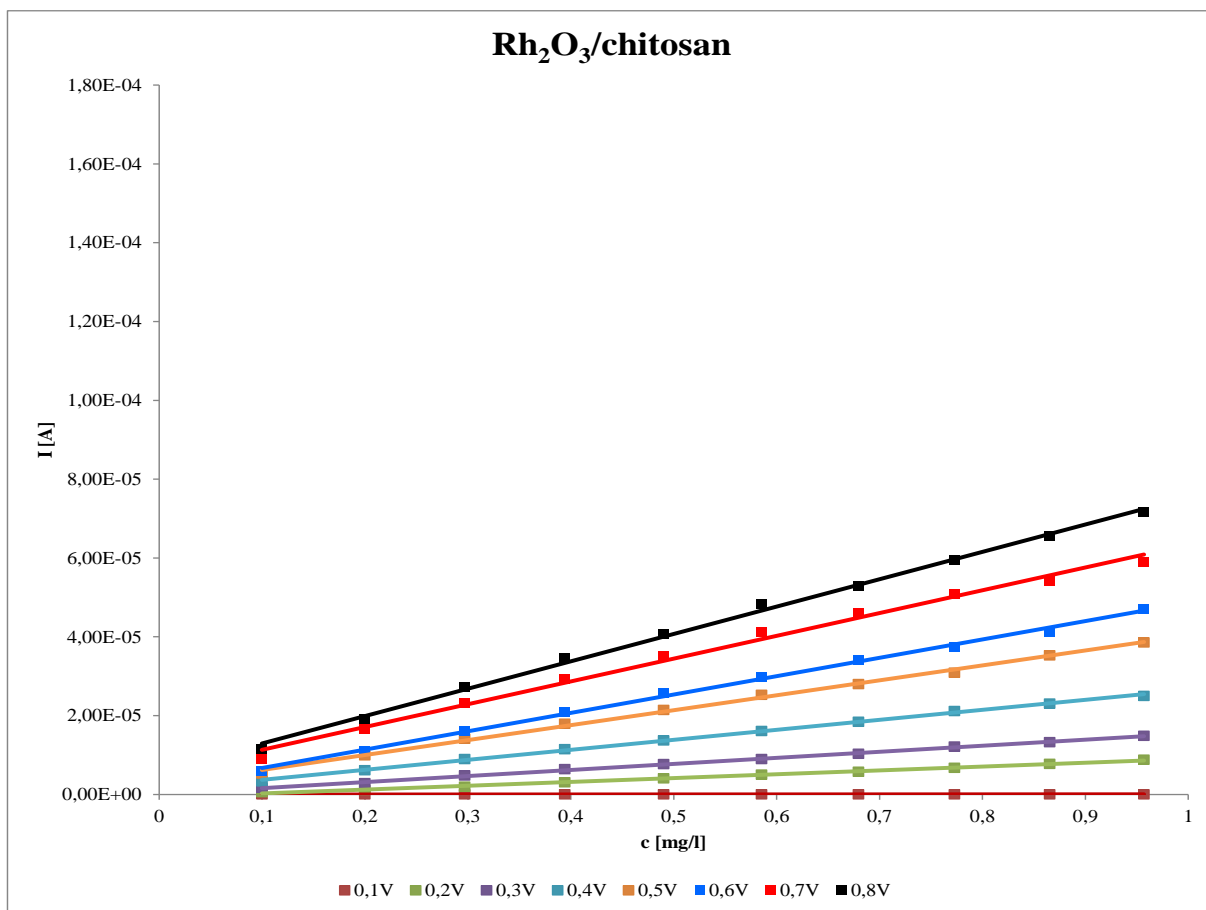
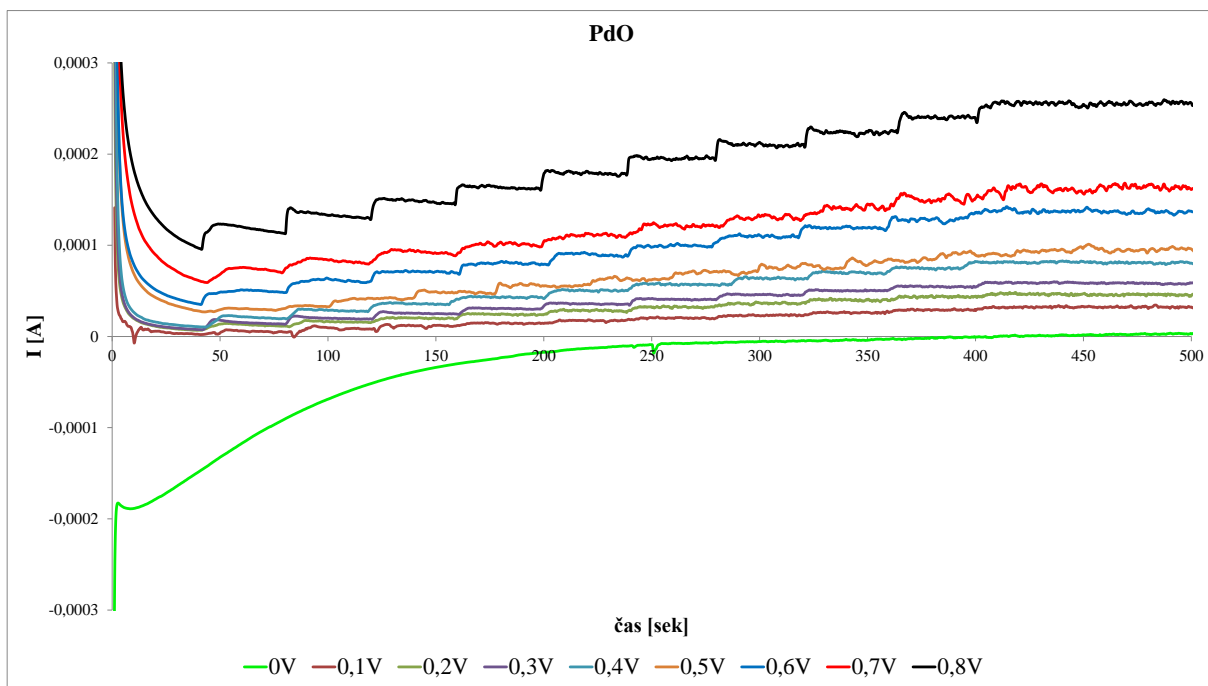


Fig. 4 Závislost proudu na koncentraci H₂O₂ pro elektrodu modifikovanou Rh₂O₃/chitosan při různých potenciálech detekce.

4.4.3 Elektrody s PdO

Elektrody modifikované PdO (**Graf 5**) a PdO/chitosan (**Graf 6**) měly nejnižší odezvy ze všech pevných mediátorů přenosu elektronů. PdO/chitosan mají stejně jako v případě Rh₂O₃/chitosan nižší odezvy než elektrody bez chitosanu. Při potenciálu 0 V pro elektrodu bez chitosanu, lze pozorovat proudy v katodické části a je možné, že mediátor při tomto potenciálu může redukovat H₂O₂. Nejvyšší odezvy bylo dosaženo při 0,8 V pro PdO a to 159 μA. Pro PdO/chitosan se proudové odezvy ve vyšších potenciálech téměř shodují.



Obr. 22 Chronoamperometrické křivky H_2O_2 pro elektrodu modifikovanou PdO při různých potenciálech detekce.

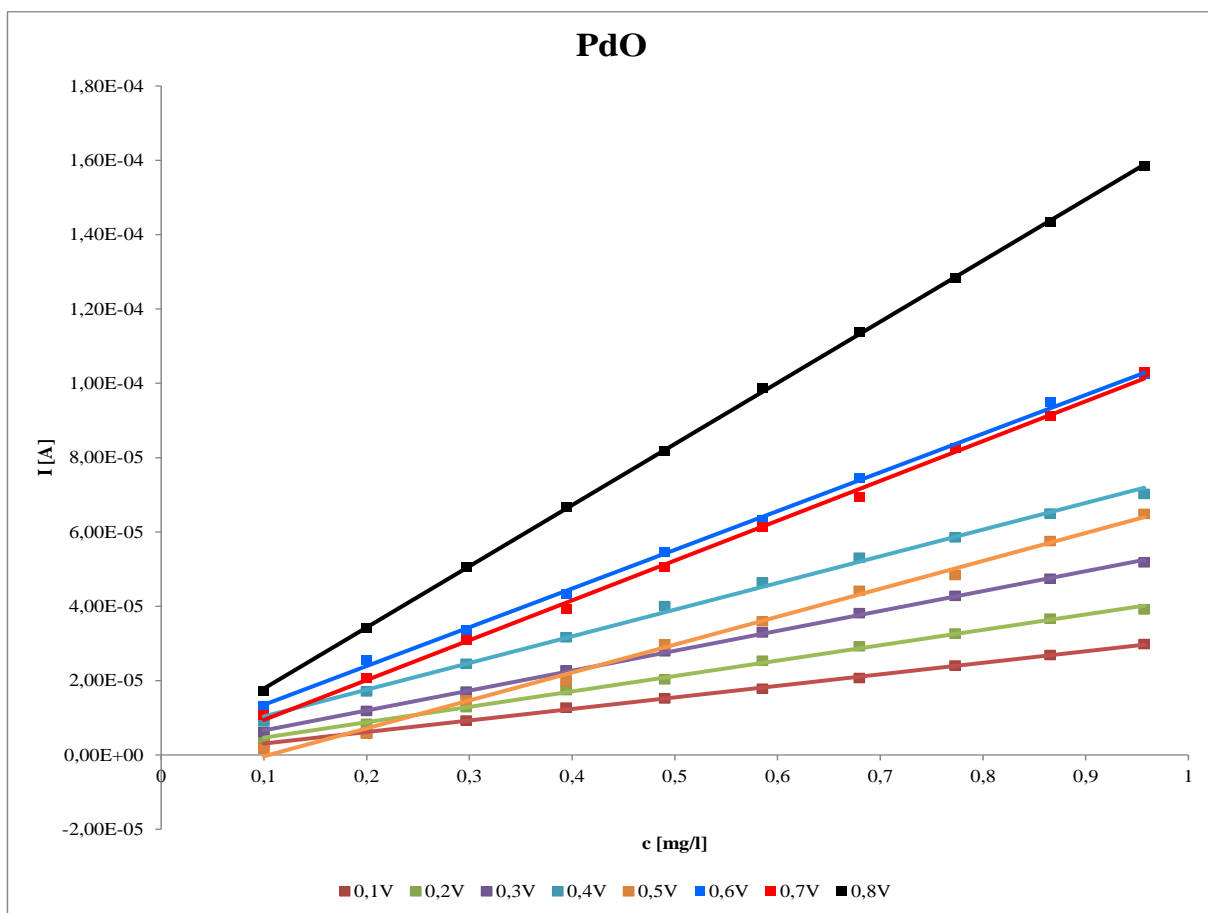
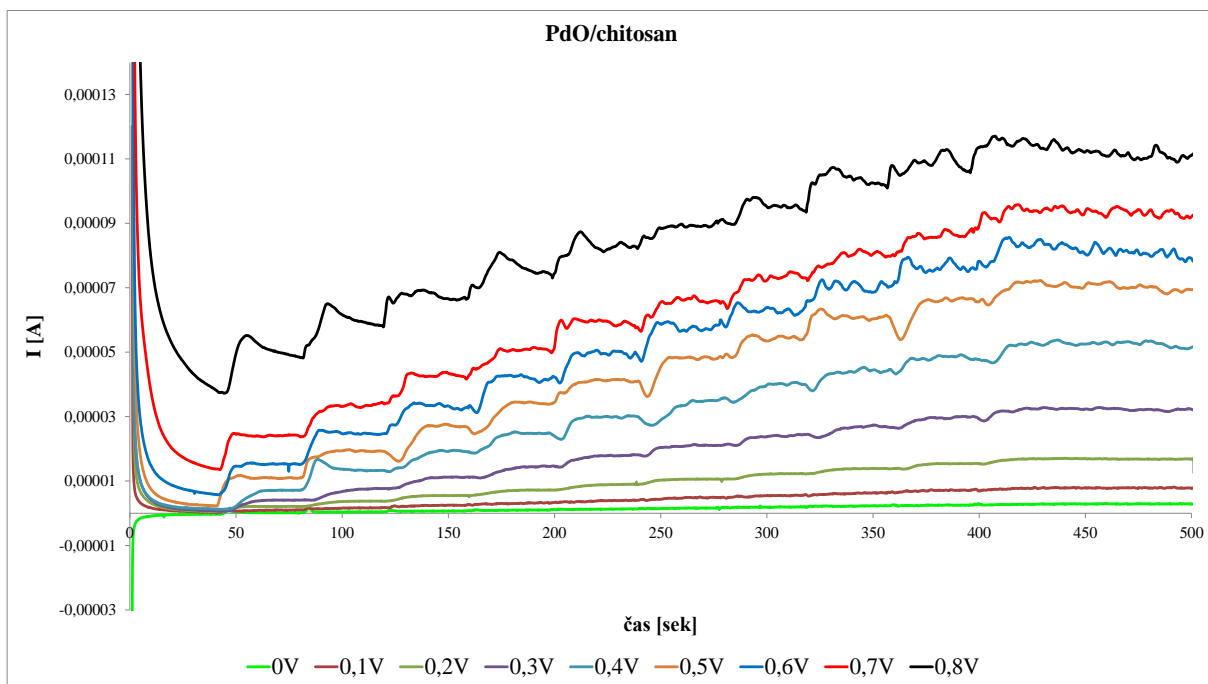


Fig. 5 Závislost proudu na koncentraci H_2O_2 pro elektrodu modifikovanou PdO při různých potenciálech detekce.



Obř. 23 Chronoamperometrické křivky H_2O_2 pro elektrodu modifikovanou PdO/chitosan ři řůzných potenciálech detekce.

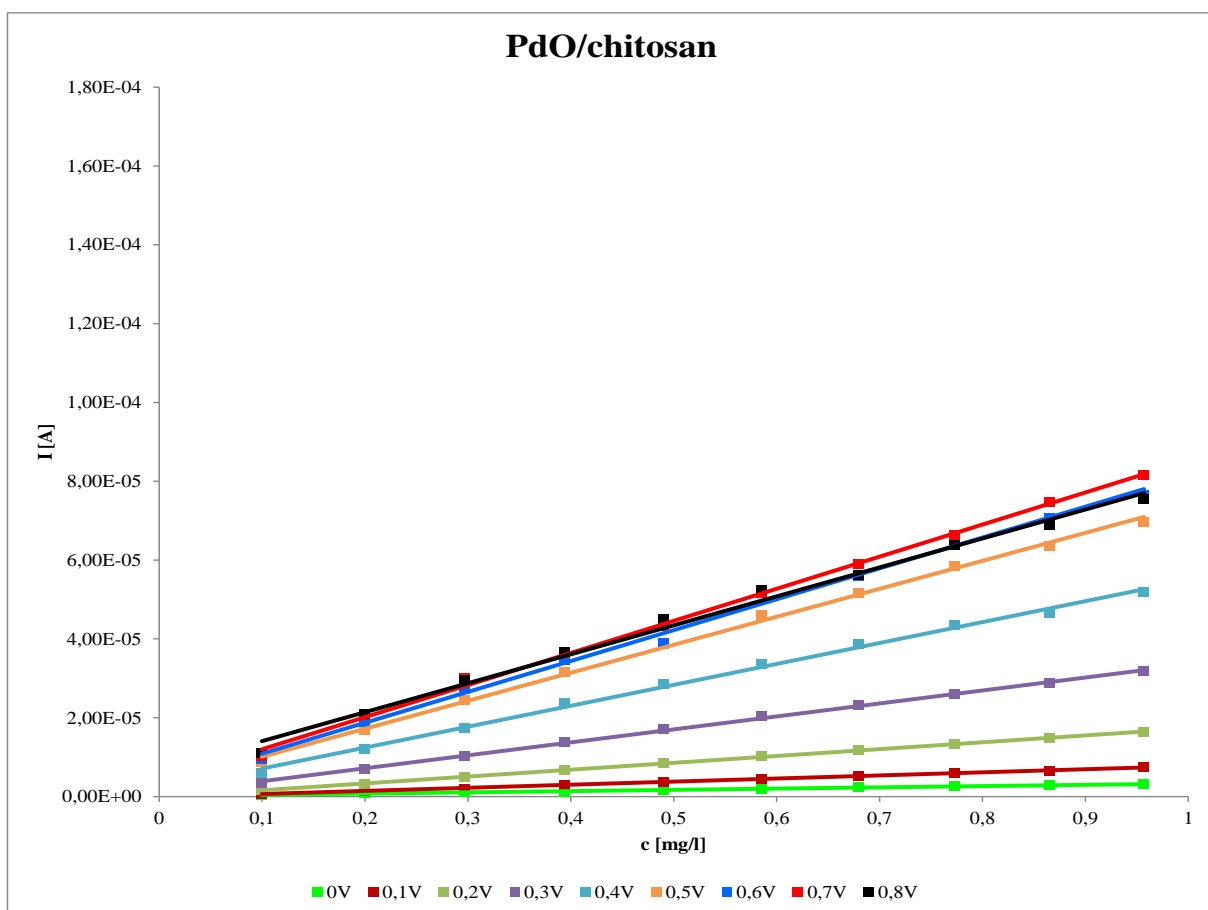
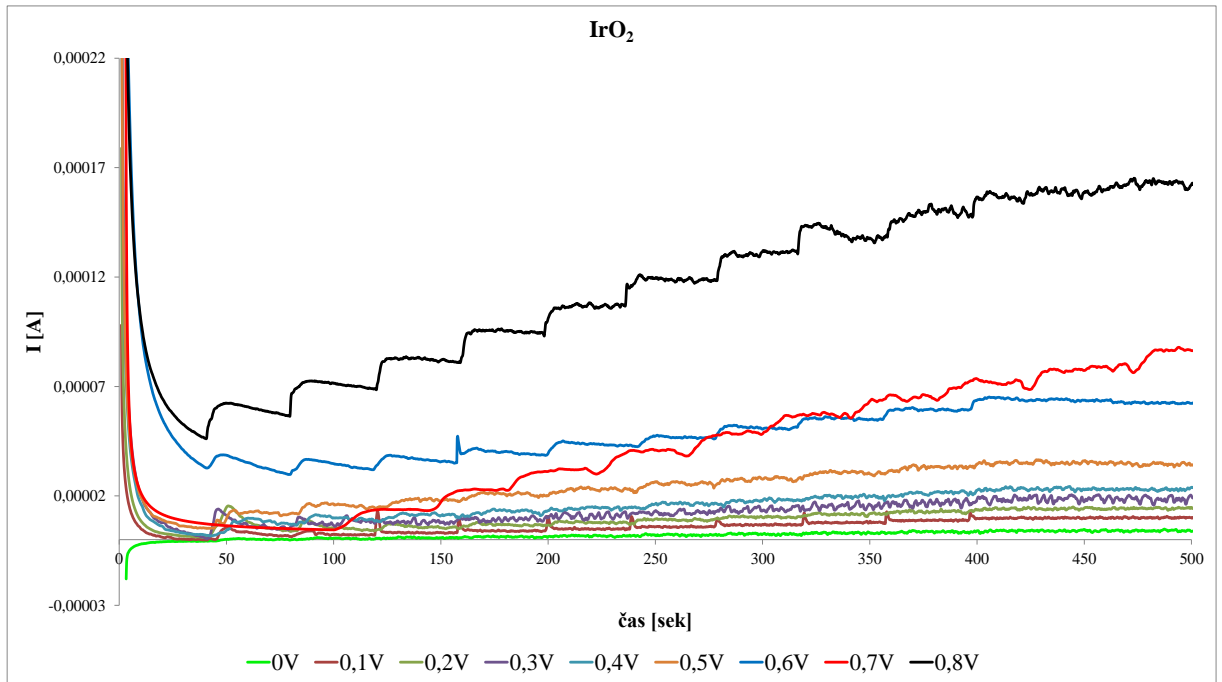


Fig. 6 Zřavislost proudu na koncentraci H_2O_2 pro elektrodu modifikovanou PdO/chitosan ři řůzných potenciálech detekce.

4.4.4 Elektrody s IrO₂

Elektrody IrO₂ (**Graf 7**) a IrO₂/chitosan (**Graf 8**) jsou srovnatelné s elektrodami Rh₂O₃, R₂O₃/chitosan. Stejně jako v případě rhodia bylo nejvyšší odezvy dosaženo u 0,8 V pro IrO₂ a to 113 μA (Rh₂O₃ dosahovalo 104 μA). Ale stejně jako u Rh₂O₃ se vyšší proudové odezvy projevují až při vyšších potenciálech, kde se stejně tak projevují i interferenty.



Obr. 24 Chronoamperometrické křivky H₂O₂ pro elektrodu modifikovanou IrO₂ při různých potenciálech detekce.

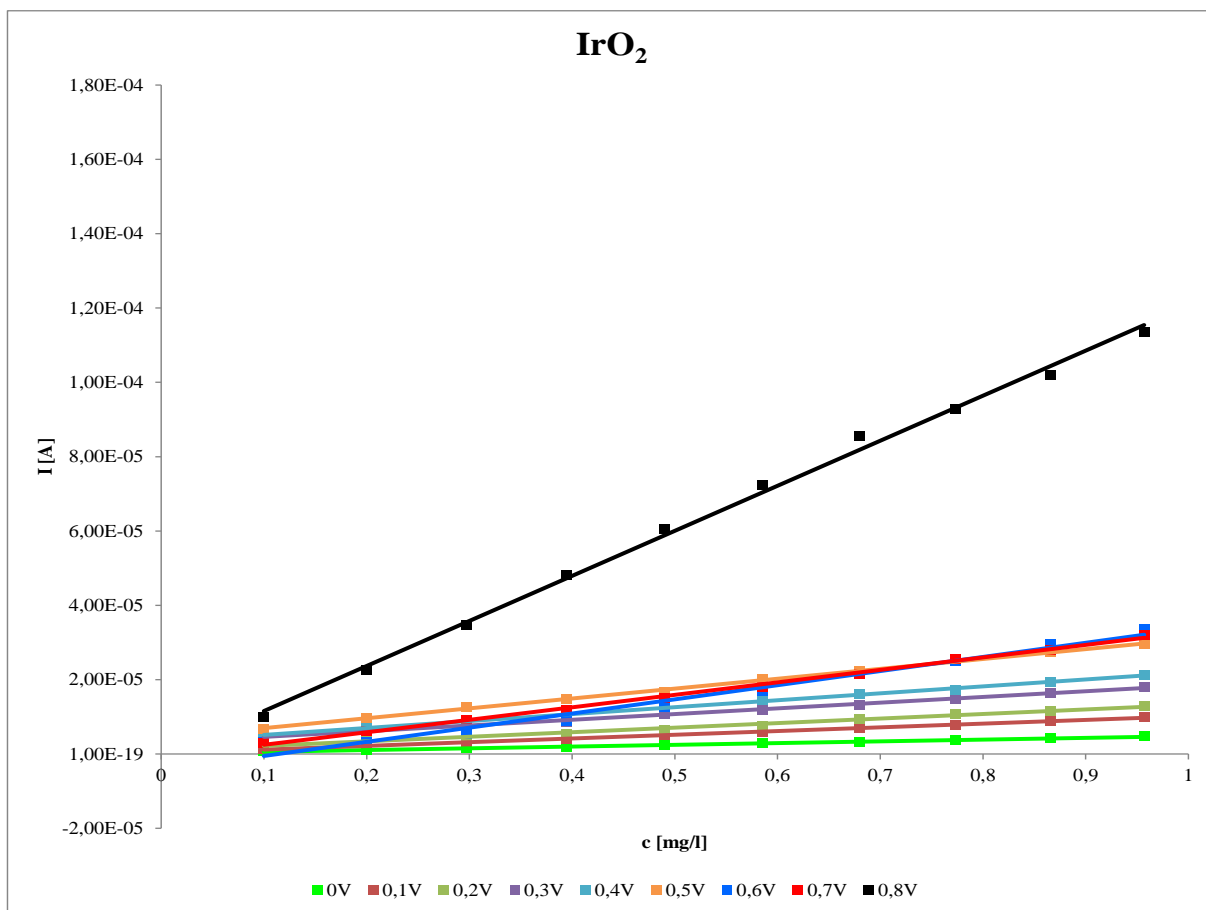
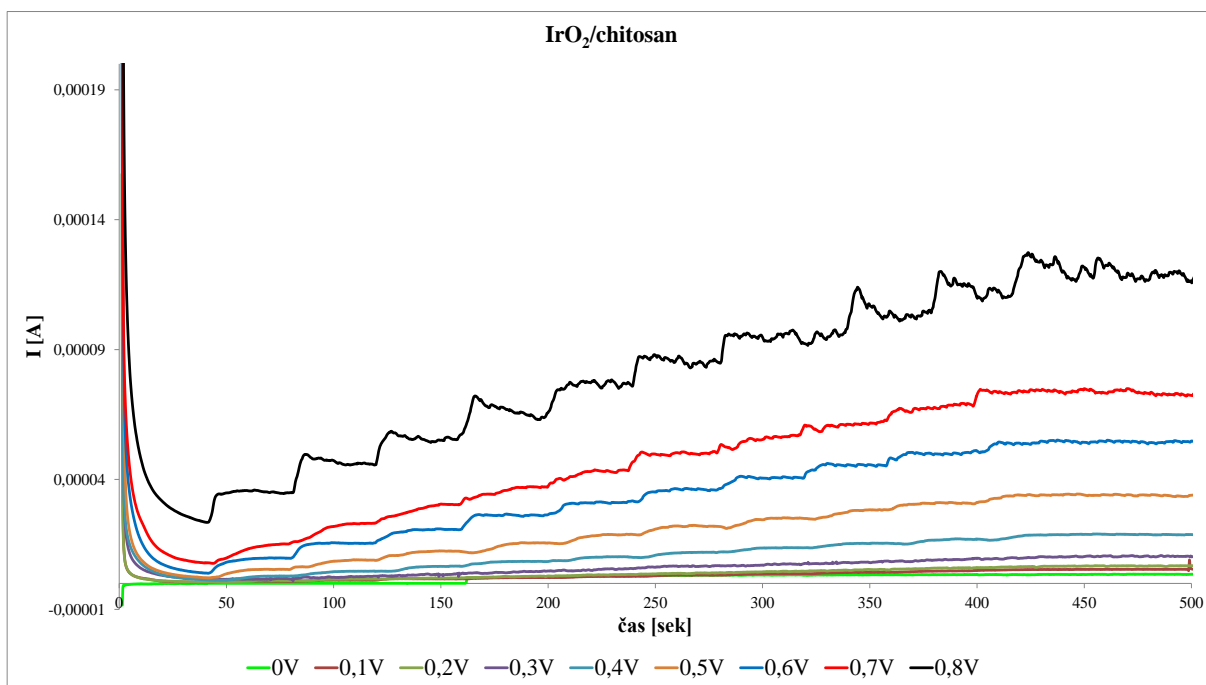


Fig. 7 Závislost proudu na koncentraci H_2O_2 pro elektrodu modifikovanou IrO_2 při různých potenciálech detekce.



Obr. 25 Chronoamperometrické křivky H_2O_2 pro elektrodu modifikovanou IrO_2 /chitosan při různých potenciálech detekce.

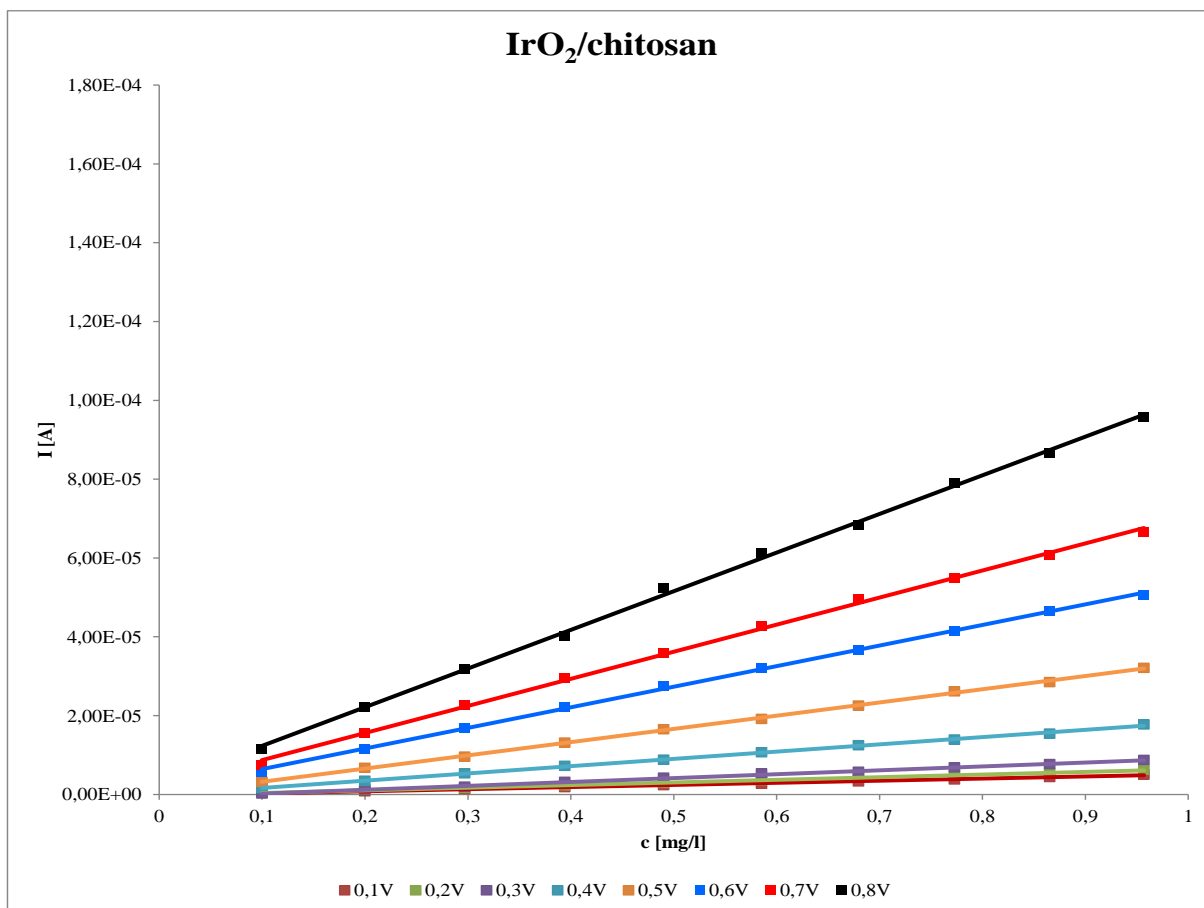
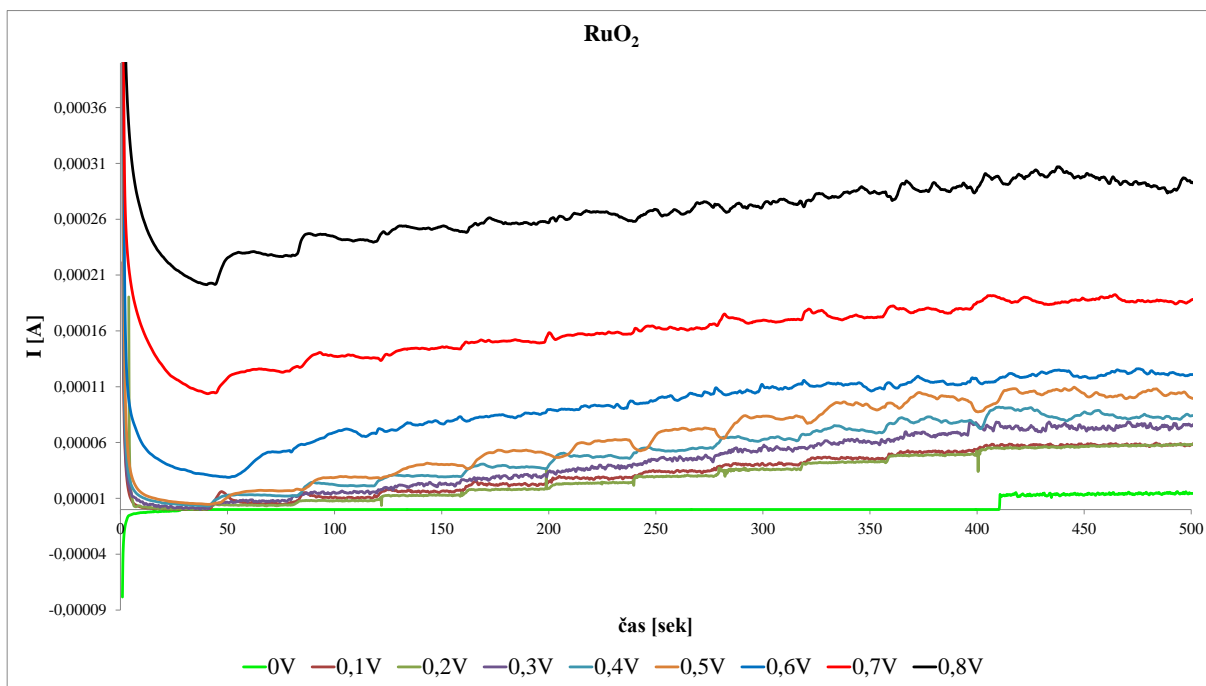


Fig. 8 Závislost proudu na koncentraci H_2O_2 pro elektrodu modifikovanou $\text{IrO}_2/\text{chitosan}$ při různých potenciálech detekce.

4.4.5 Elektrody s RuO_2

Nejlepších výsledků bylo dosaženo pro elektrody modifikované RuO_2 , $\text{RuO}_2/\text{chitosan}$, MnO_2 a $\text{MnO}_2/\text{chitosan}$. Proudové odezvy RuO_2 v nízkých potenciálech jsou srovnatelné pro odezvy elektrod modifikovaných PtO_2 ve vysokých potenciálech. Pro 0,1 V RuO_2 dosahovala proudová odezva 57 μA . Elektroda s RuO_2 má vyšší odezvy než $\text{RuO}_2/\text{chitosan}$. Ve vysokých potenciálech je opět patrné značné zašumění křivky pro elektrodu bez chitosanu. Pro elektrodu s chitosanovou membránou k zašumění křivky nedochází a jde snadno sledovat všech deset přídavek H_2O_2 . Oproti tomu, MnO_2 a $\text{MnO}_2/\text{chitosan}$ mají odezvy při všech potenciálech srovnatelné.



Obr. 26 Chronoamperometrické křivky H₂O₂ pro elektrodu modifikovanou RuO₂ při různých potenciálech detekce.

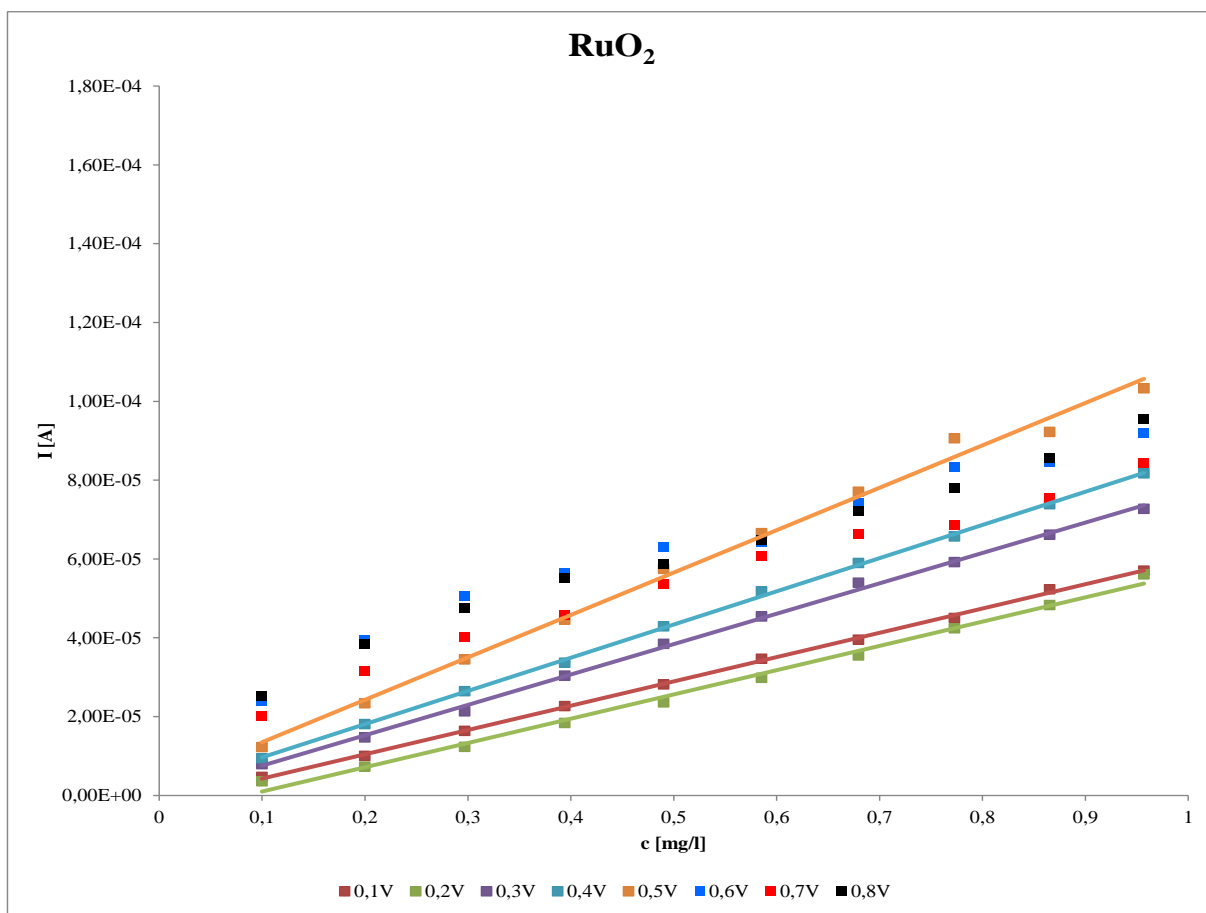
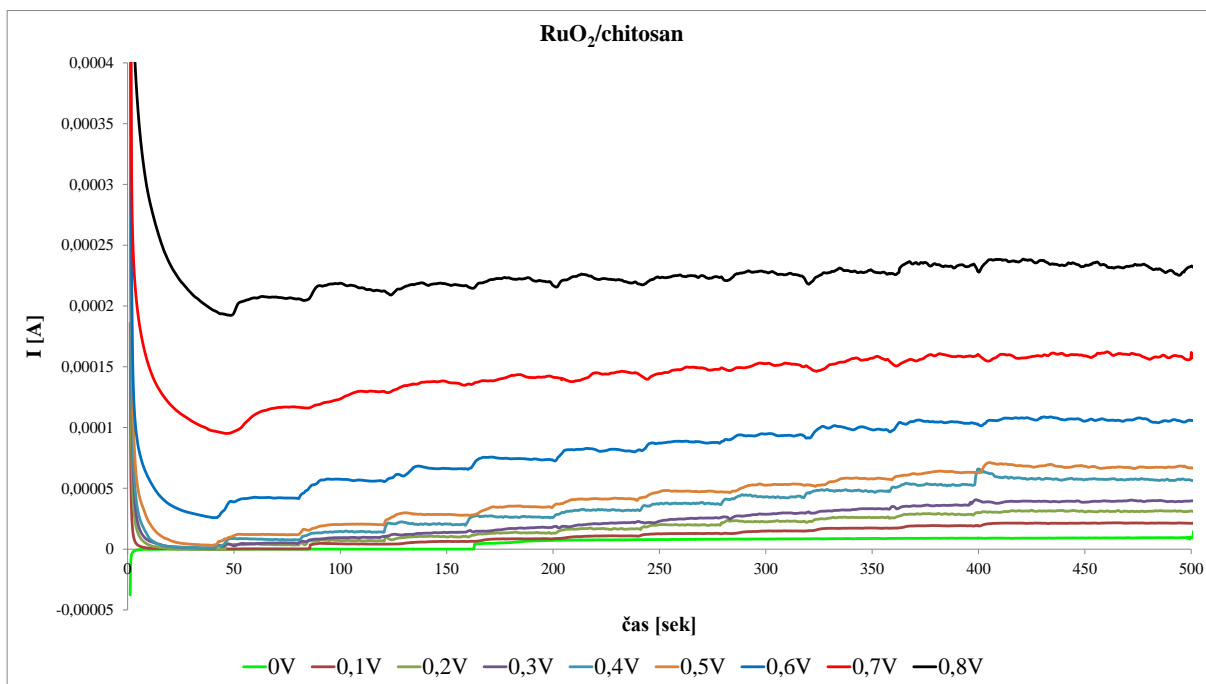


Fig. 9 Závislost proudu na koncentraci H₂O₂ pro elektrodu modifikovanou RuO₂ při různých potenciálech detekce.



Obr. 27 Chronoamperometrické křivky H₂O₂ pro elektrodu modifikovanou RuO₂/chitosan při různých potenciálech detekce.

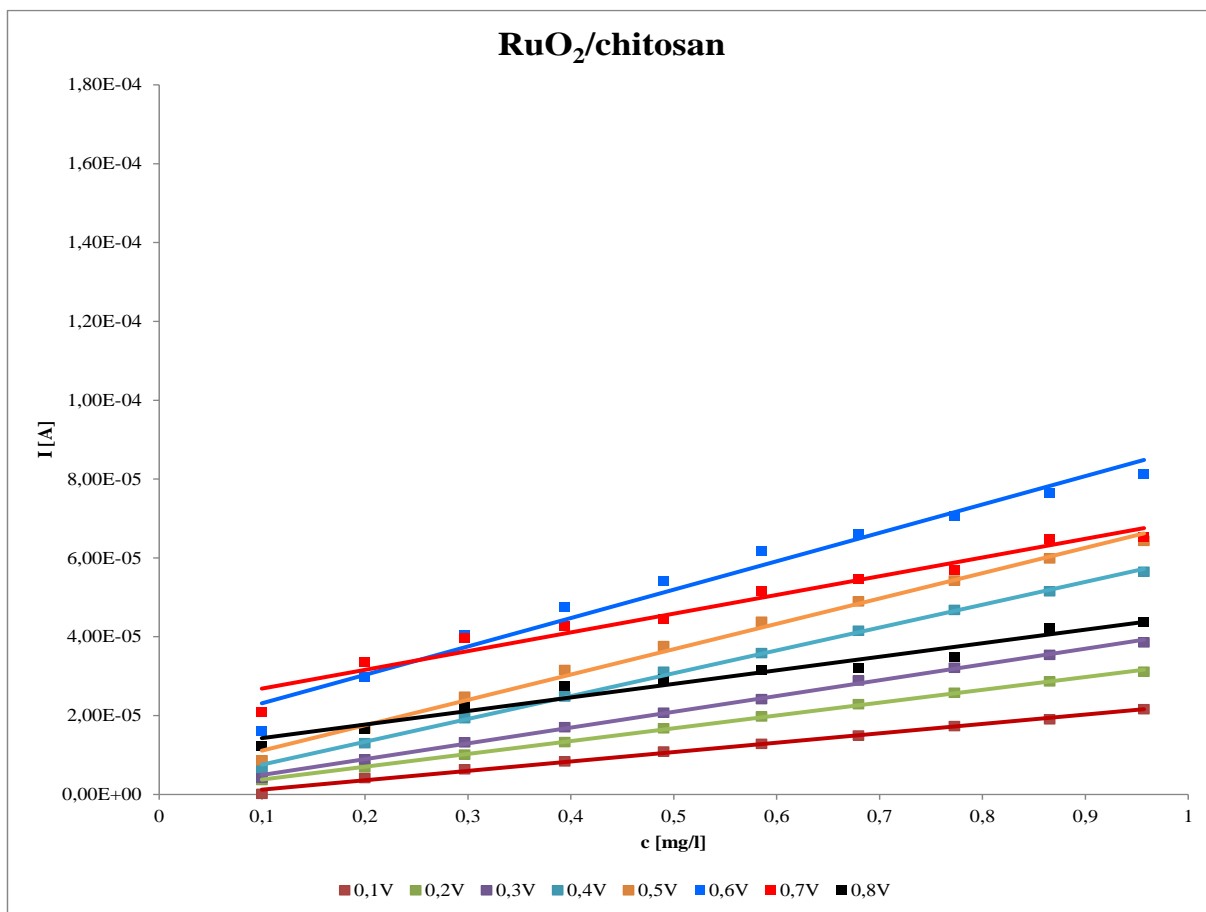
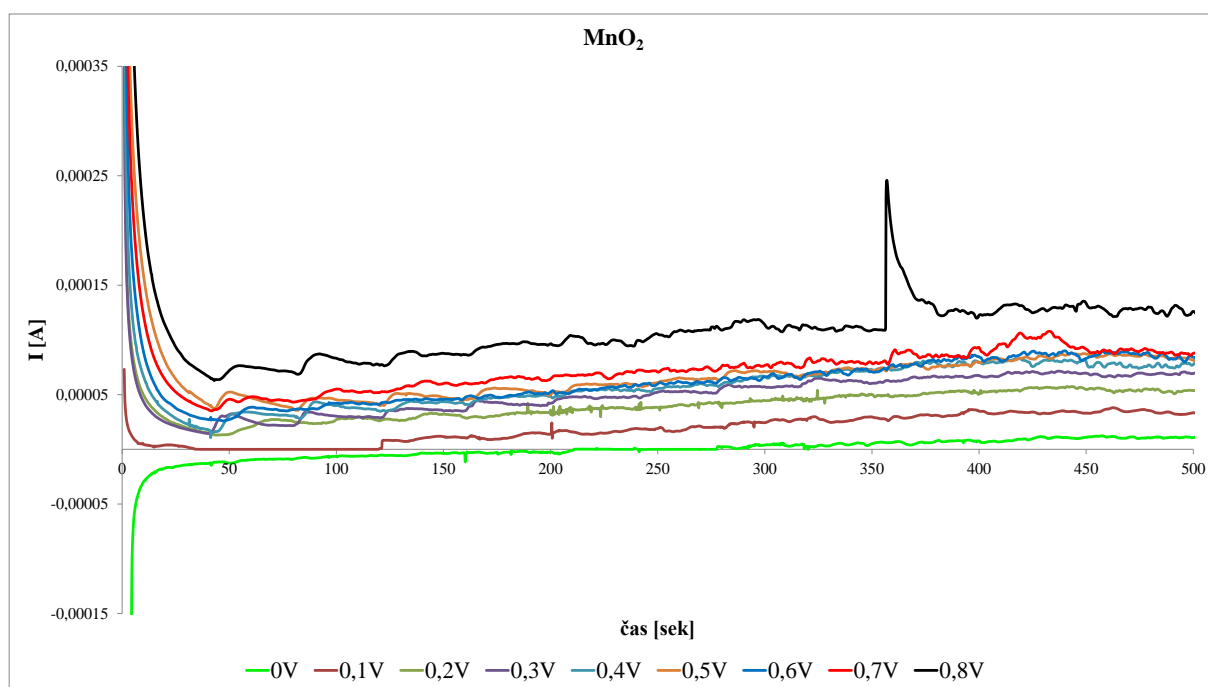


Fig. 10 Závislost proudu na koncentraci H₂O₂ pro elektrodu modifikovanou RuO₂/chitosan při různých potenciálech detekce.

4.4.6 Elektrody s MnO₂

Nejvyšší proudové odezvy bylo dosaženo u elektrody s chitosanovou membránou. Zatímco u všech uvedených elektrod chitosanová membrána utlumila proudový přírůstek, v případě MnO₂ je nejvyšší odezva 69,3 μA pro elektrodu s chitosanem (elektroda bez chitosanu 67,4 μA). Stejně jako elektrody s RuO₂, i v tomto případě byly proudové odezvy poměrně vysoké, i v nízkých potenciálech. Na záznamech amperometrických křivek lze vidět, že elektroda bez chitosanu je zašuměná už při potenciálu 0,6 V. Navíc při 0,8 V lze vidět výraznou proudovou špičku.

S přítomností chitosanu se šum ztrácí, křivky jsou lépe čitelnější a při potenciálu 0 V pozorujeme proud v katodické oblasti, přesně jako u PdO.



Obr. 28 Chronoamperometrické křivky H₂O₂ pro elektrodu modifikovanou MnO₂ při různých potenciálech detekce.

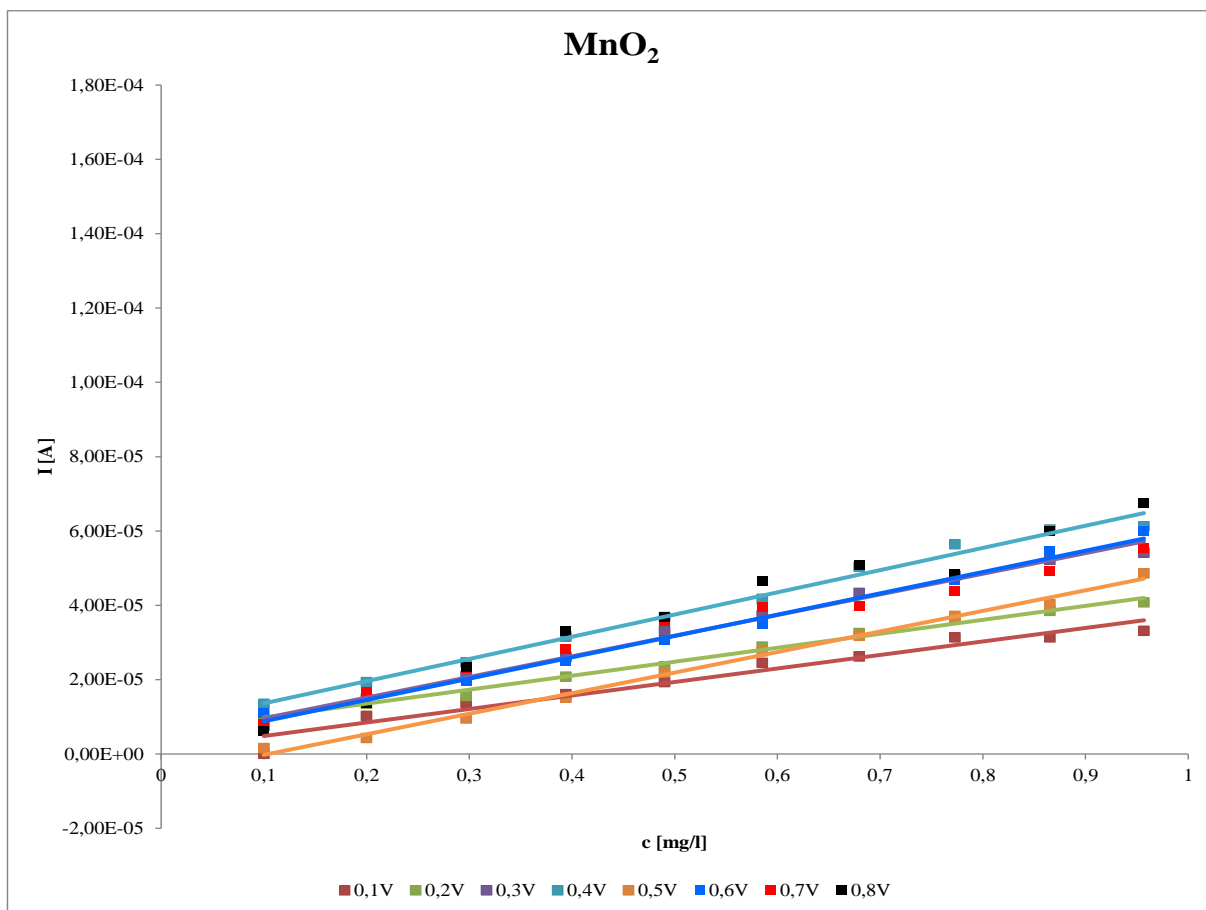
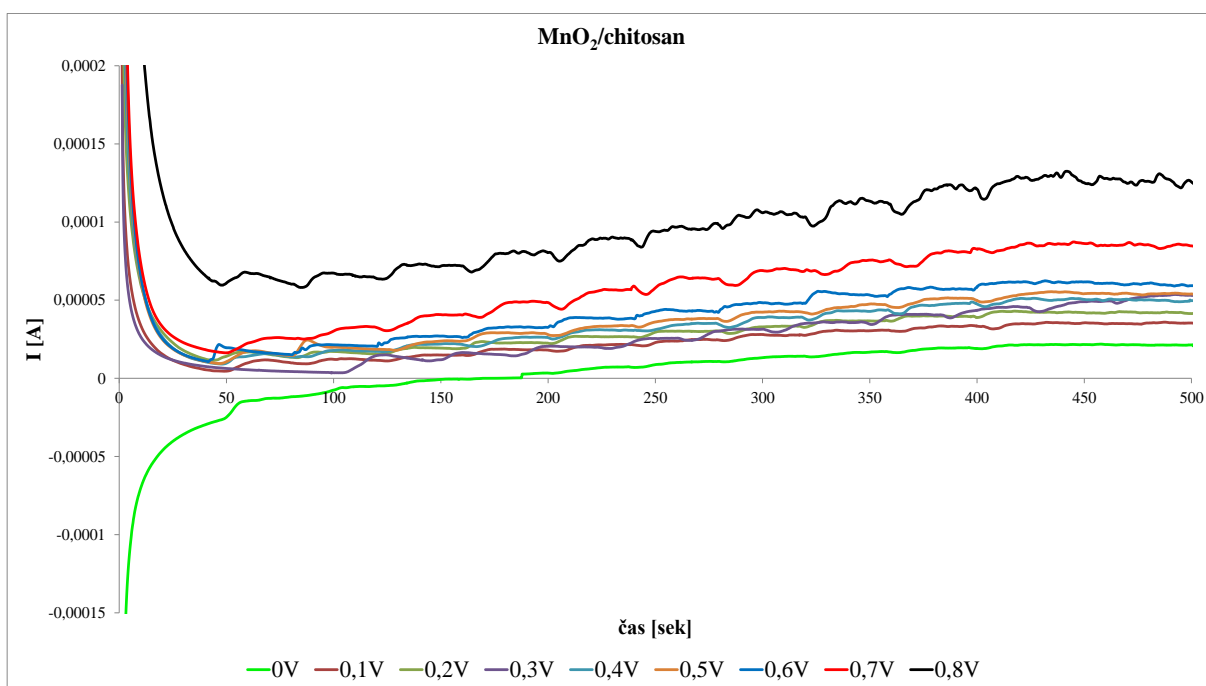


Fig. 11 Závislost proudu na koncentraci H₂O₂ pro elektrodu modifikovanou MnO₂ při různých potenciálech detekce.



Obr. 29 Chronoamperometrické křivky H₂O₂ pro elektrodu modifikovanou MnO₂/chitosan při různých potenciálech detekce.

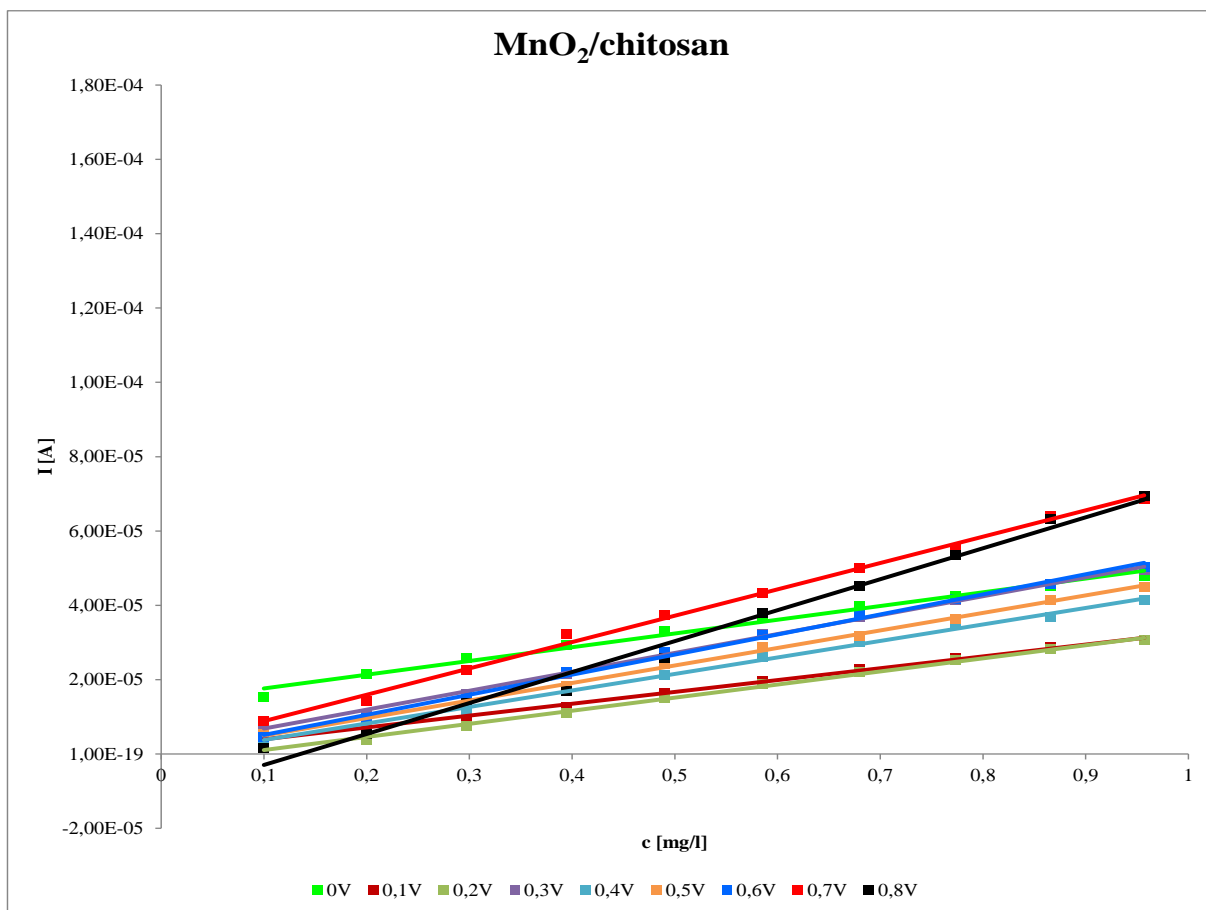
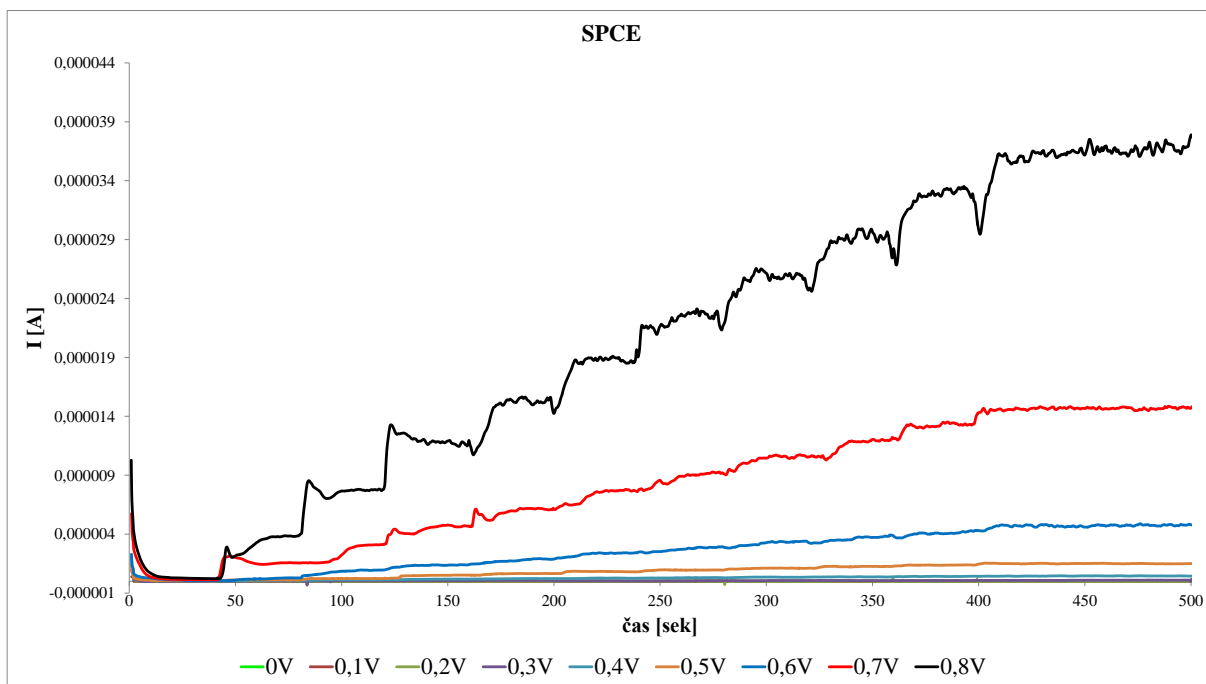


Fig. 12 Závislost proudu na koncentraci H₂O₂ pro elektrodu modifikovanou MnO₂/chitosan při různých potenciálech detekce.

4.4.7 Uhlíková tištěná elektroda

Pro srovnání bylo provedeno měření i na čisté SPCE a SPCE s chitosanem. Chitosan výrazně urychluje přenos elektronů a zvyšuje proudové odezvy. Při 0,1 V je pro SPCE/chitosan odezva 202x větší než pro čistou SPCE. Pro vyšší potenciály jsou pak odezvy srovnatelné s ostatními modifikovanými elektrodami.



Obr. 30 Chronoamperometrické křivky H_2O_2 pro čistou SPCE při různých potenciálech detekce.

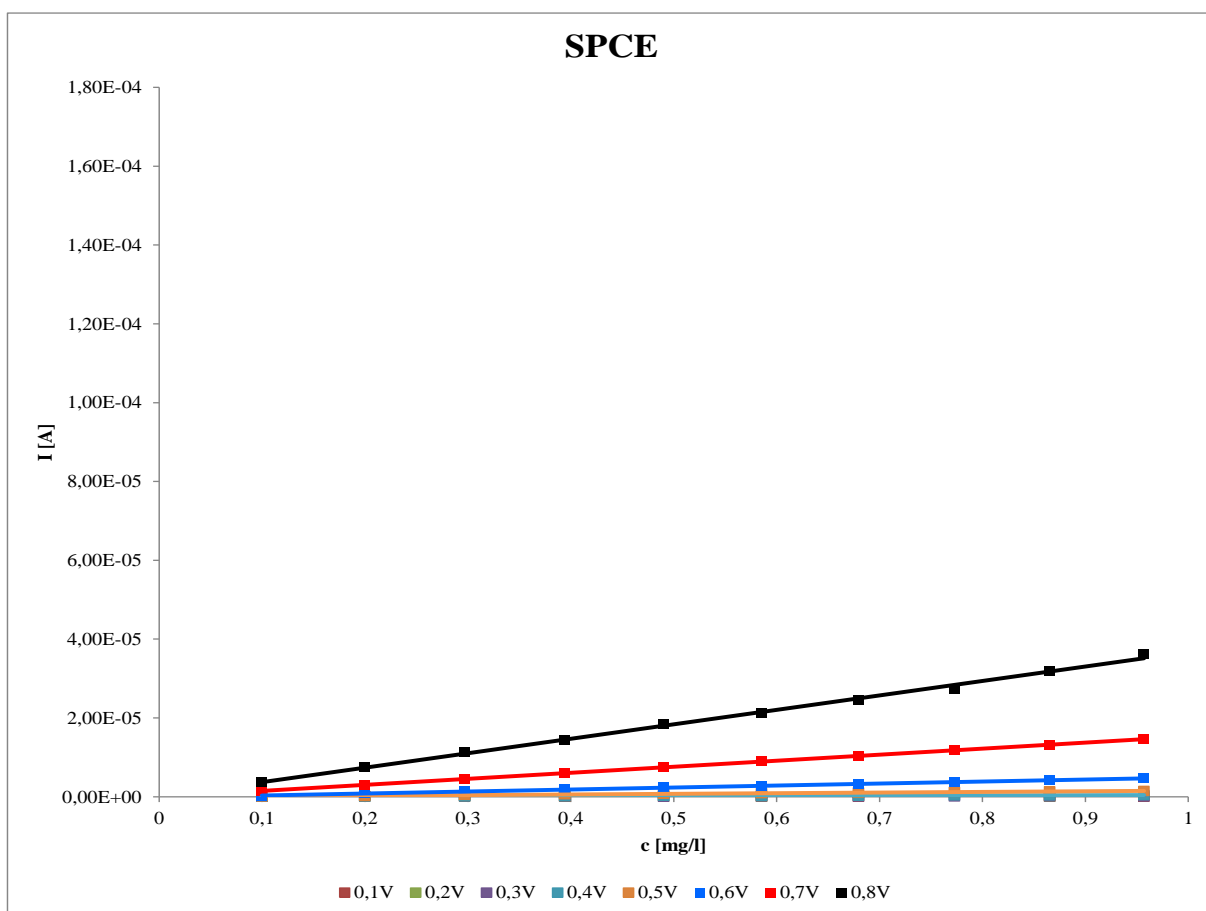
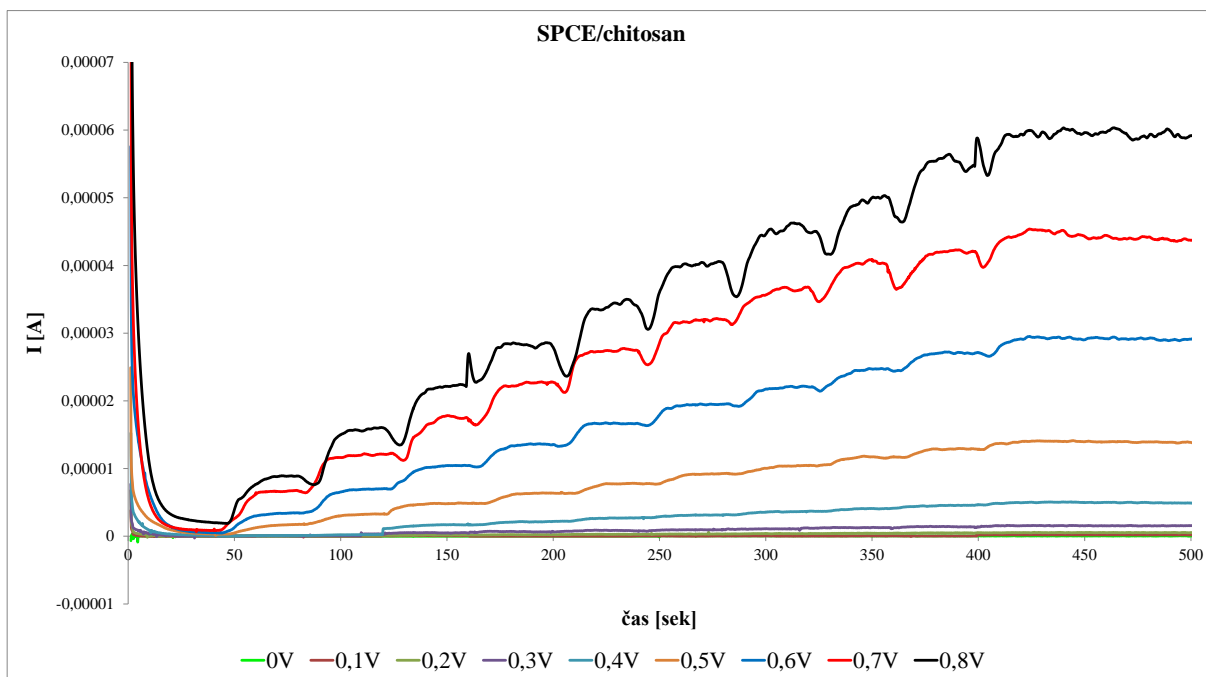


Fig. 13 Závislost proudu na koncentraci H_2O_2 pro čistou SPCE při různých potenciálech detekce.



Obř. 31 Chronoamperometrické křivky H_2O_2 pro SPCE modifikovanou chitosanem při různých potenciálech detekce.

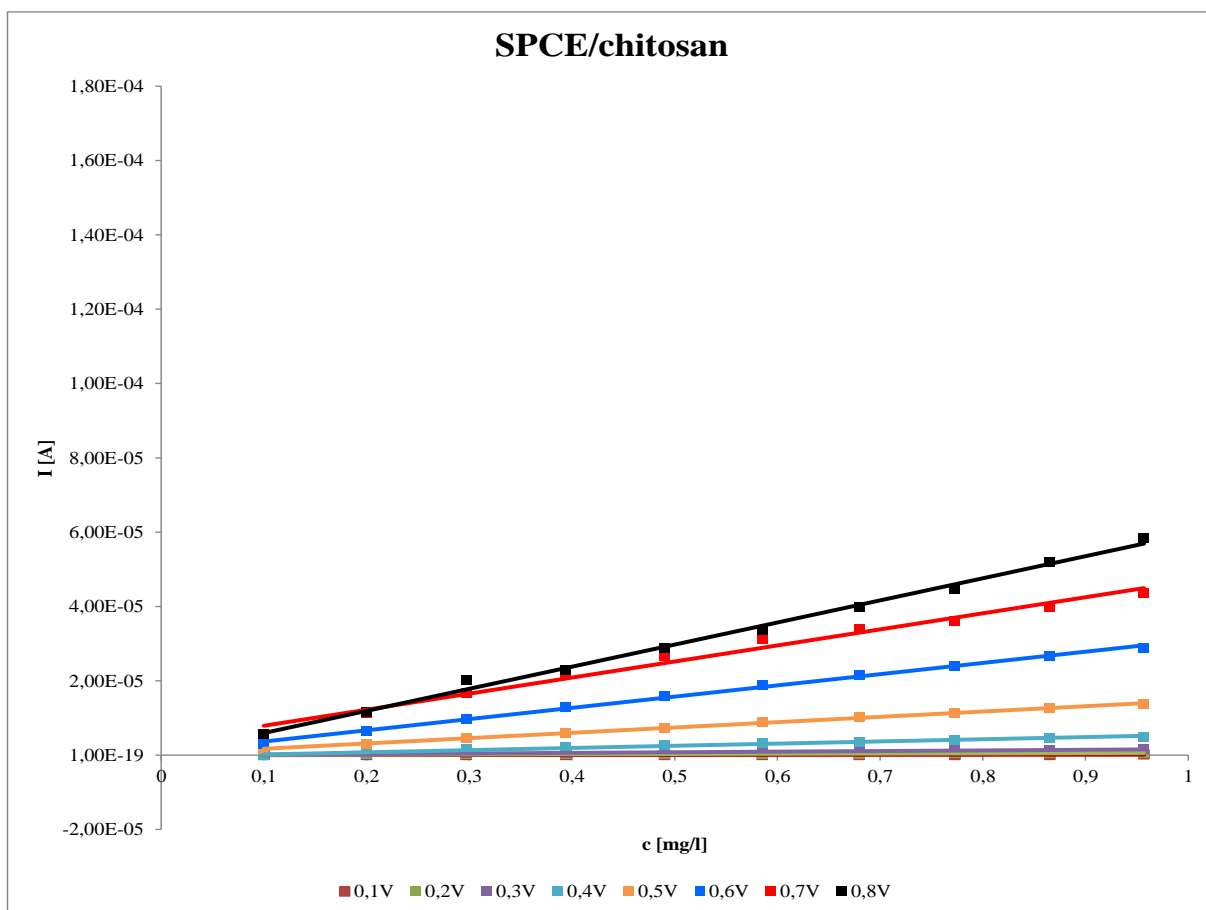


Fig. 14 Závislost proudu na koncentraci H_2O_2 pro čistou SPCE modifikovanou chitosanem při různých potenciálech detekce.

4.4.8 Srovnání citlivosti modifikovaných elektrod při různých potenciálech detekce

Pro lepší srovnání jsou proudové odezvy elektrod pro potenciály v rozsahu 0,1 V – 0,5 V zobrazeny na **grafech 15 – 19**. Jsou zobrazeny pouze lineární regrese, experimentální body jsou vynechány pro větší přehlednost. Největších směrnic dosahovaly elektrody při potenciálu 0,5 V, proto bylo dále pracováno pouze s tímto potenciálem. Na základě těchto vyhodnocení byly vybrány k dalšímu studiu elektrody s mediátory RuO₂ a MnO₂.

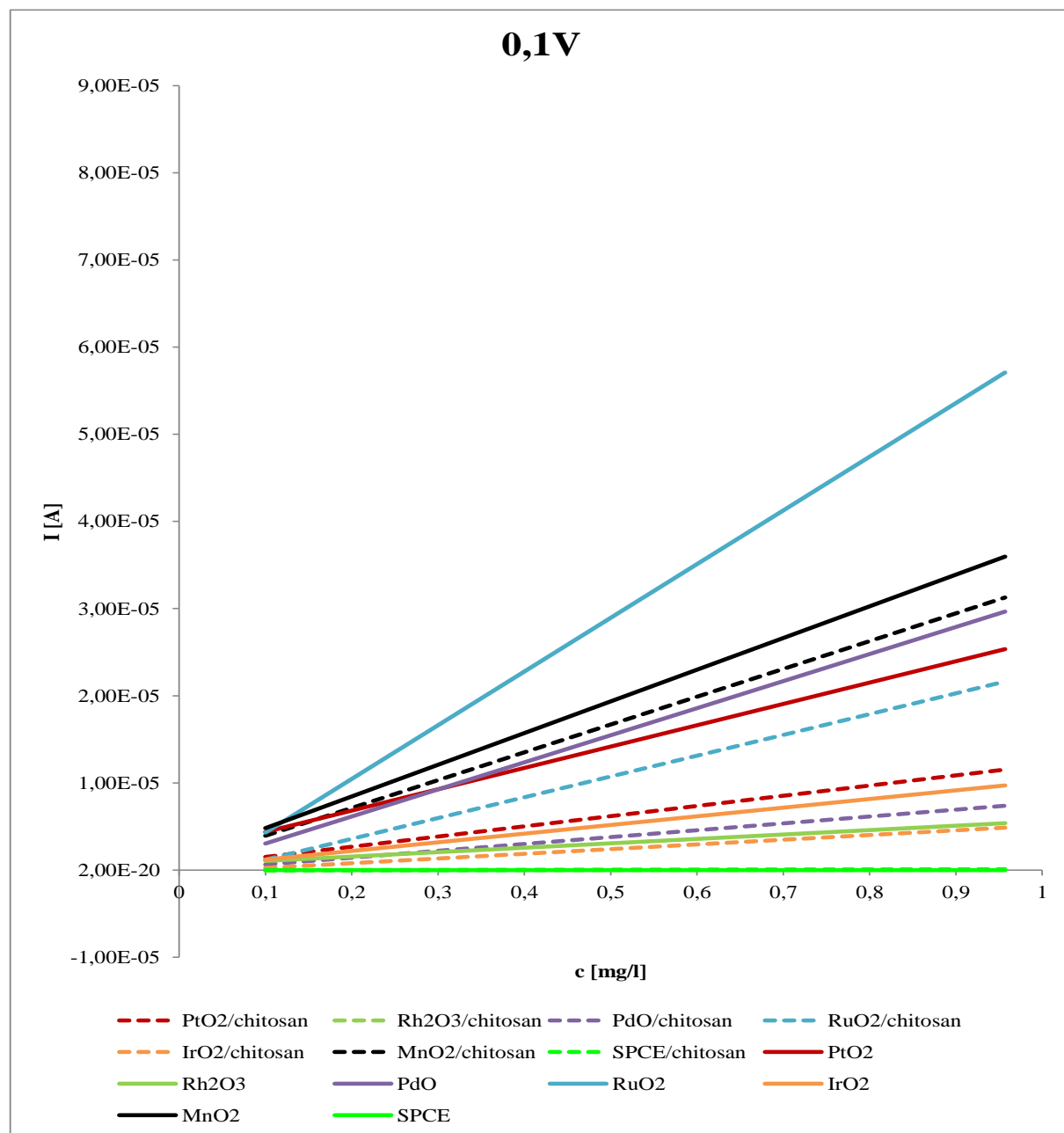


Fig. 15 Srovnání proudových odezvy modifikovaných elektrod v závislosti na koncentraci H₂O₂ pro potenciál 0,1 V.

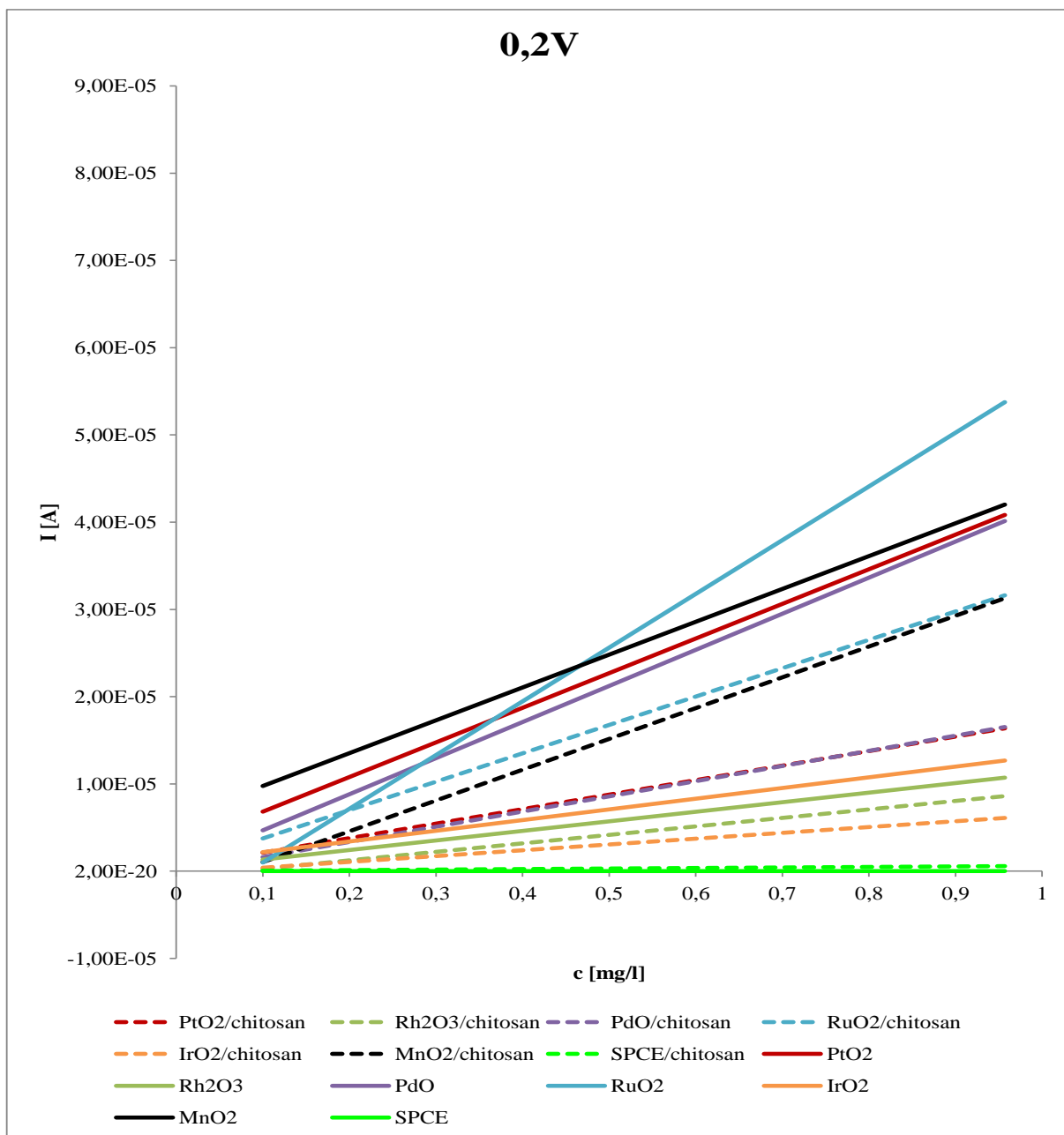


Fig. 16 Srovnání proudových odezev modifikovaných elektrod v závislosti na koncentraci H₂O₂ pro potenciál 0,2 V.

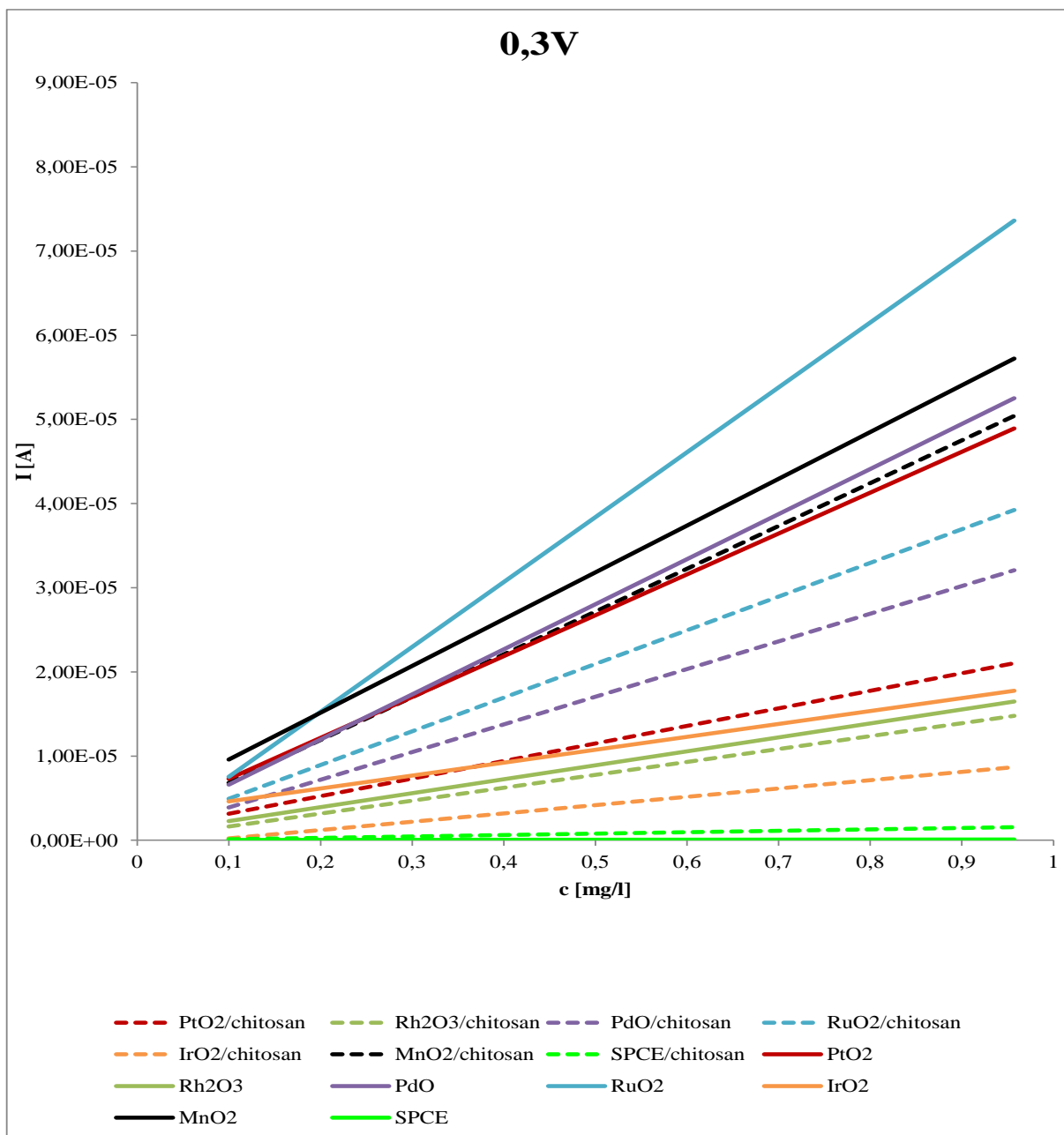


Fig. 17 Srovnání proudových odezví modifikovaných elektrod v závislosti na koncentraci H₂O₂ pro potenciál 0,3 V.

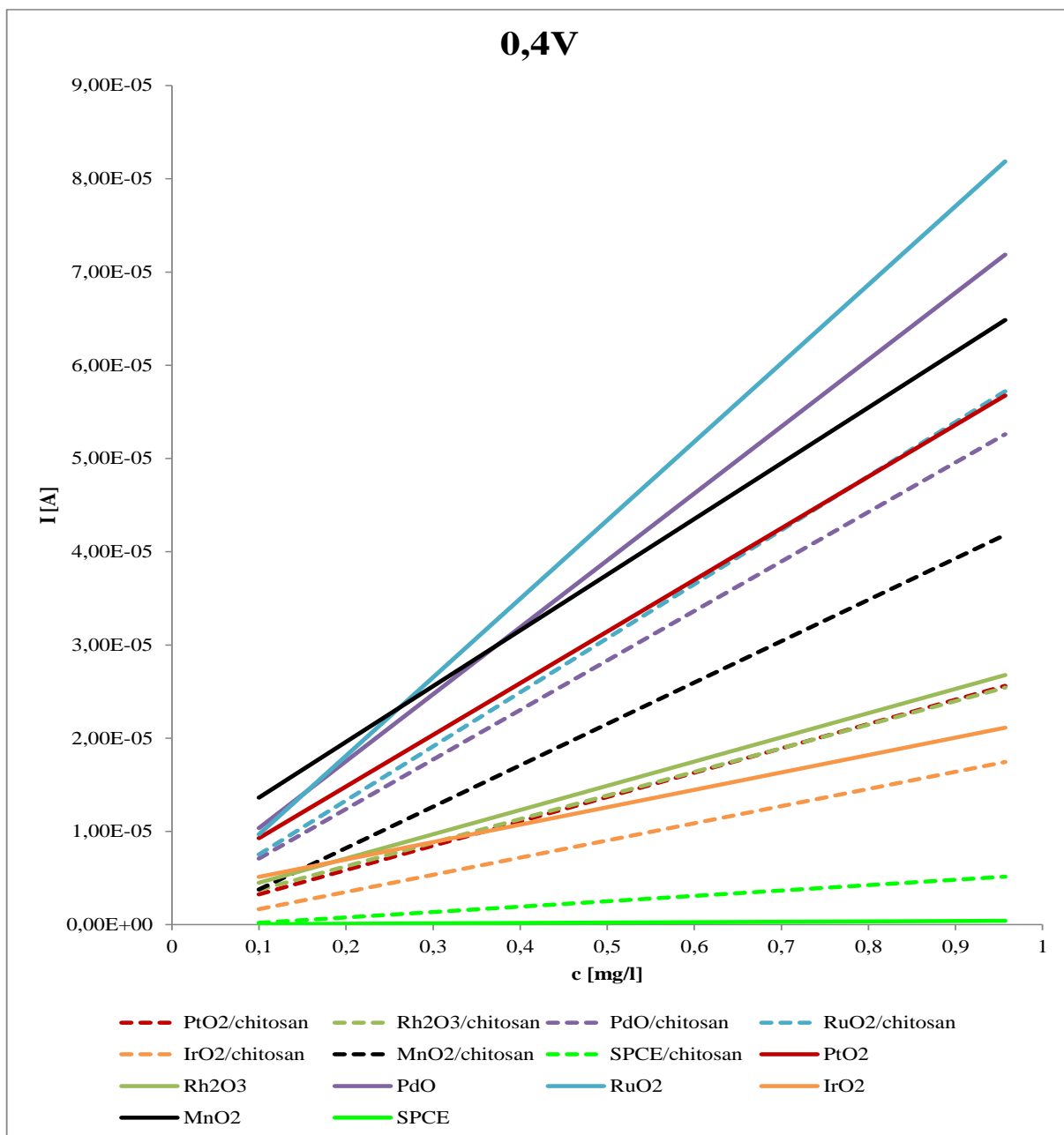


Fig. 18 Srovnání proudových odezví modifikovaných elektrod v závislosti na koncentraci H_2O_2 pro potenciál 0,4 V.

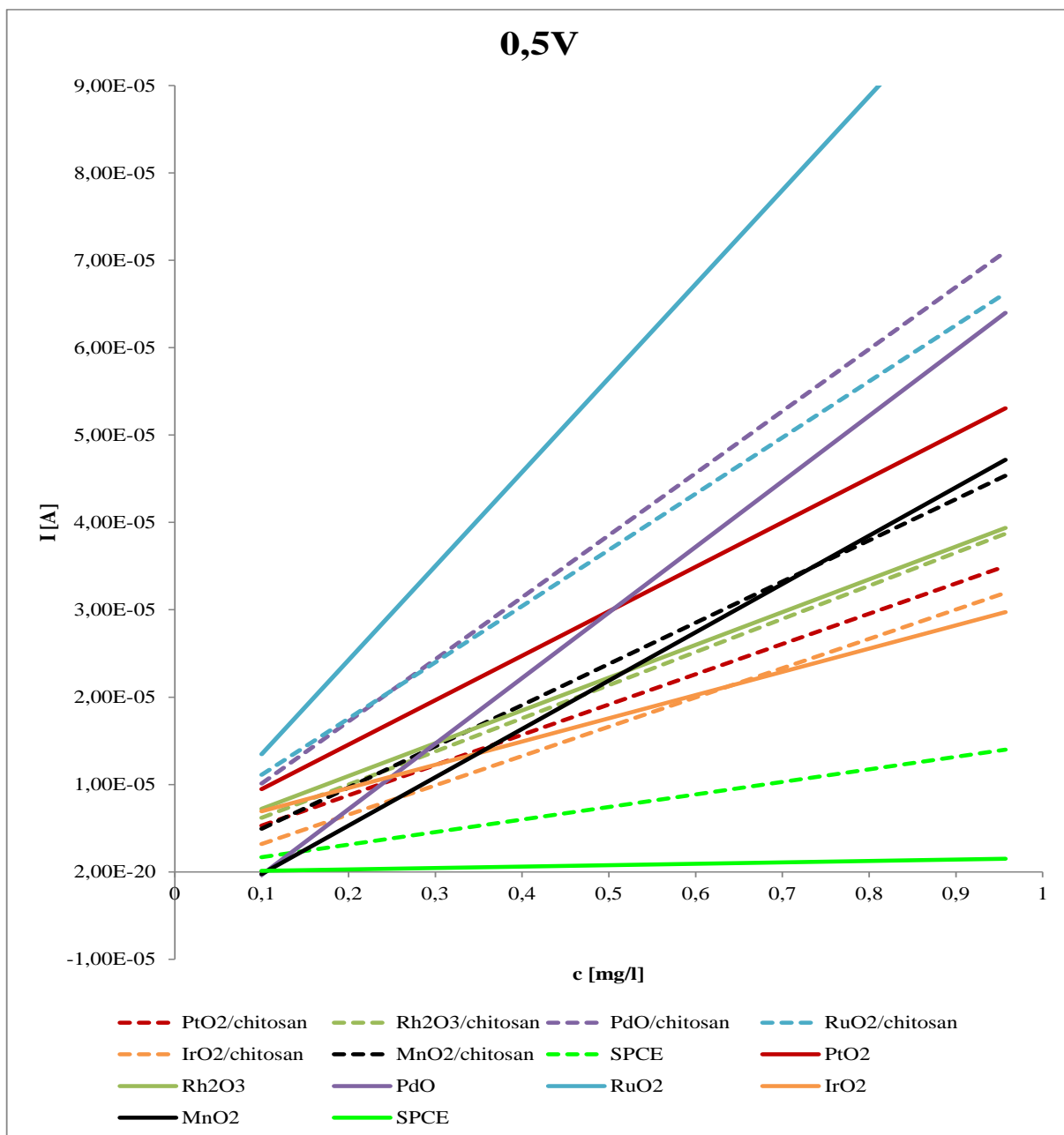
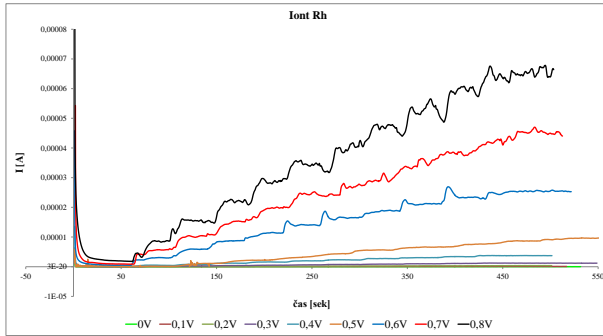


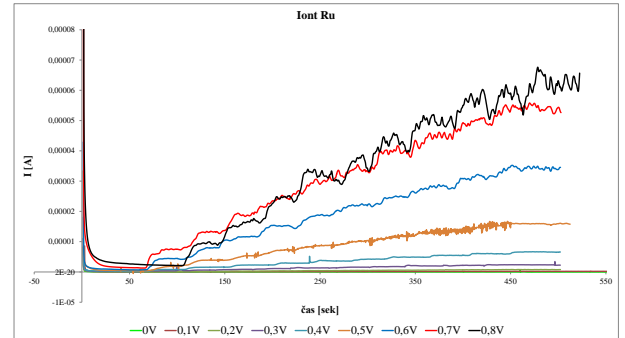
Fig. 19 Srovnání proudových odezev modifikovaných elektrod v závislosti na koncentraci H_2O_2 pro potenciál 0,5 V.

4.4.9 Elektrody modifikované ionty kovů

V případě elektrod modifikovaných ionty Ru, Rh a Mn nedocházelo k žádným výrazným odezvám. Ani jedna z výše zmíněných elektrod nedosahovala citlivosti elektrod modifikovaných oxidem kovu, rozmíchaným v uhlíkovém inkoustu. Na **obrázcích 32-34** jsou záznamy měření, ale dále s tímto typem modifikace nebylo pracováno.



Obr. 32 Chronoamperometrické křivky H_2O_2 pro elektrodu modifikovanou iontem Rh v chitisanové membráně.



Obr. 33 Chronoamperometrické křivky H_2O_2 pro elektrodu modifikovanou iontem Ru v chitisanové membráně.

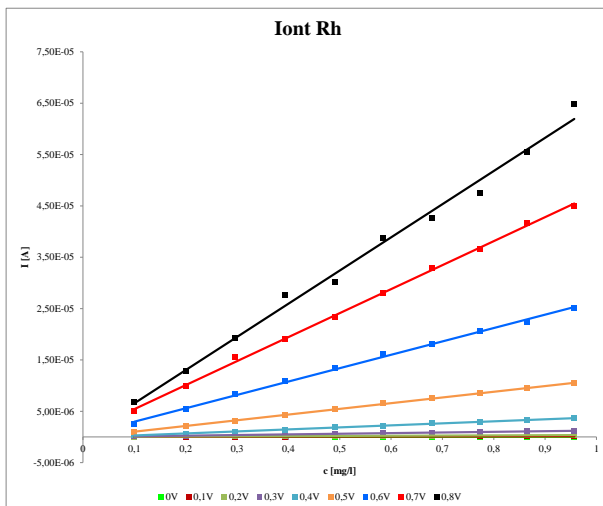


Fig. 20 Závislost proudu na koncentraci H_2O_2 pro elektrodu modifikovanou iontem Rh v chitisanové membráně.

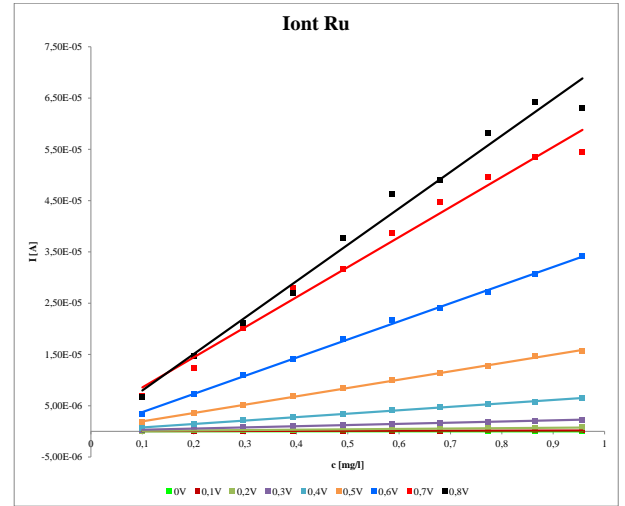
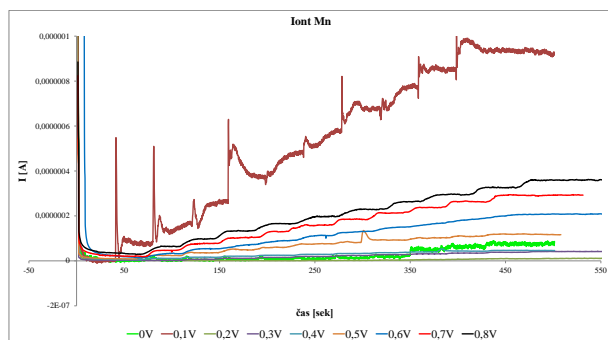


Fig. 21 Závislost proudu na koncentraci H_2O_2 pro elektrodu modifikovanou iontem Ru v chitisanové membráně.



Obr. 34 Chronoamperometrické křivky H_2O_2 pro elektrodu modifikovanou iontem Mn v chitosanové membráně.

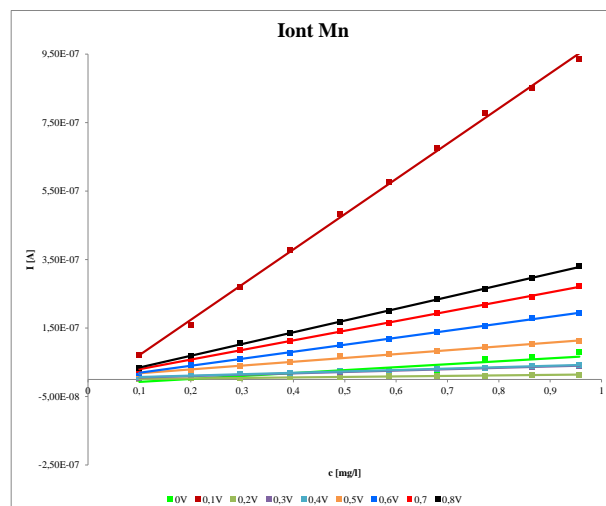


Fig. 22 Závislost proudu na koncentraci H_2O_2 pro elektrodu modifikovanou iontem Mn v chitosanové membráně.

4.5 Chronoamperometrická detekce glukózy

K detekci glukózy v roztoku byly připraveny biosenzory dle postupu uvedeného v kapitole 3.7. Pro všechny biosenzory byly zároveň proměřeny i hlavní interferenty (kyselina askorbová, kyselina močová) při potenciálu 0,5 V. Ani v jednom z případů tyto kyseliny nerušily stanovení. V **tabulce 2** jsou uvedeny směrnice křivek pro závislost proudu na koncentraci glukózy, vycházející z **grafu 23**.

Tab. 2 Směrnice pro vybrané konfigurace glukózových biosenzorů.

| Biosenzor | Směrnice [$\text{A} \cdot \text{mg}^{-1} \text{l}^{-1}$] |
|---|--|
| $\text{RuO}_2/\text{chitosan}/\text{GOx}$ | $8 \cdot 10^{-6}$ |
| $\text{MnO}_2/\text{chitosan}/\text{GOx}$ | $4 \cdot 10^{-6}$ |
| $\text{RuO}_2/\text{Nafion}/\text{GOx}$ | $6 \cdot 10^{-6}$ |
| $\text{MnO}_2/\text{Nafion}/\text{GOx}$ | $7 \cdot 10^{-6}$ |

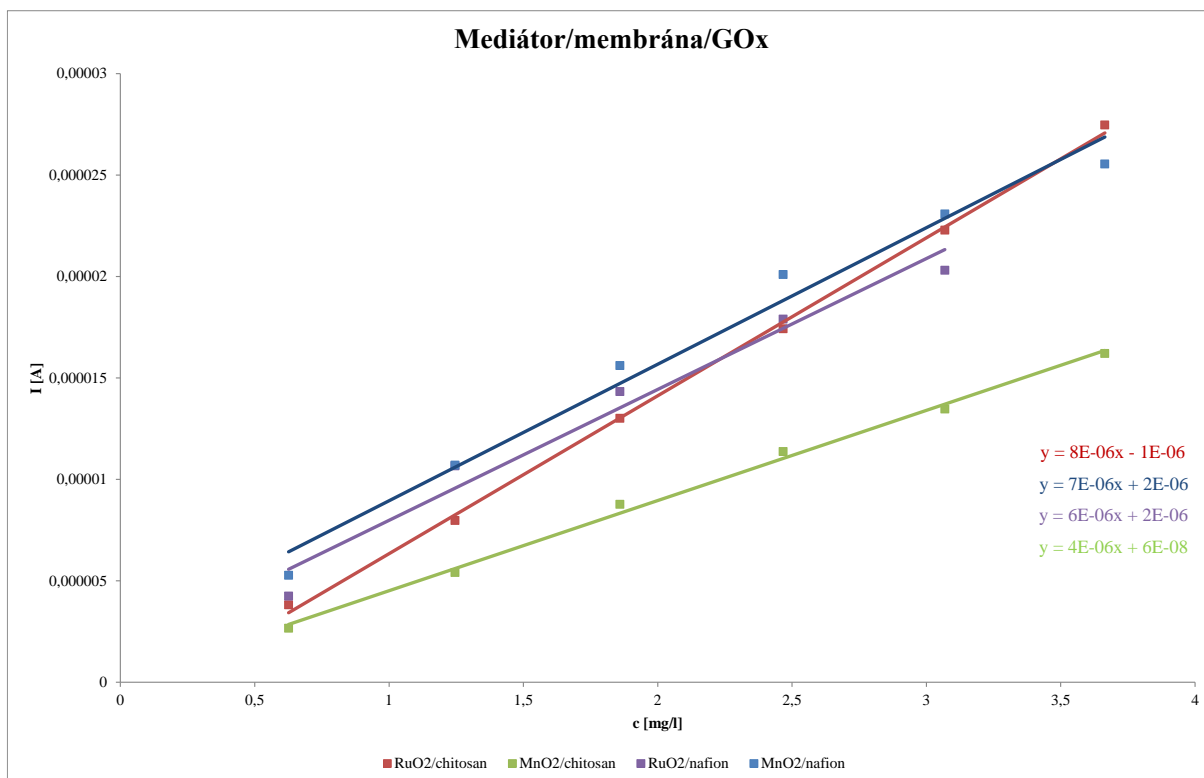
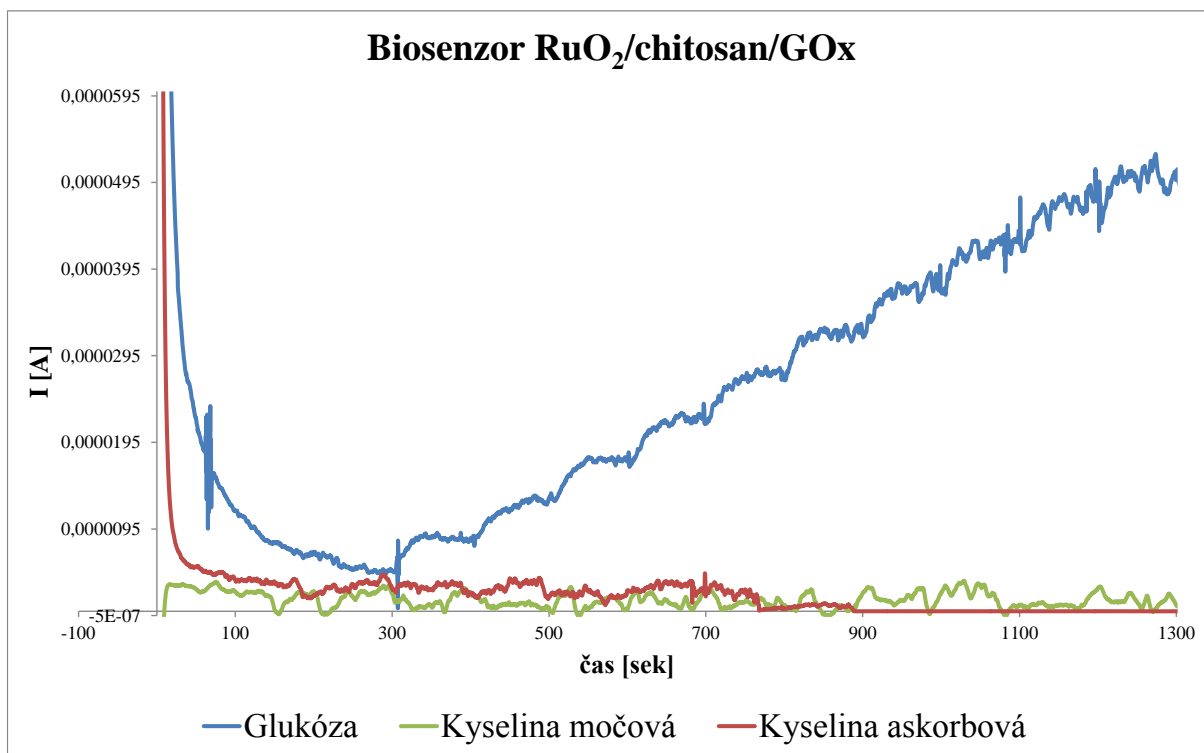
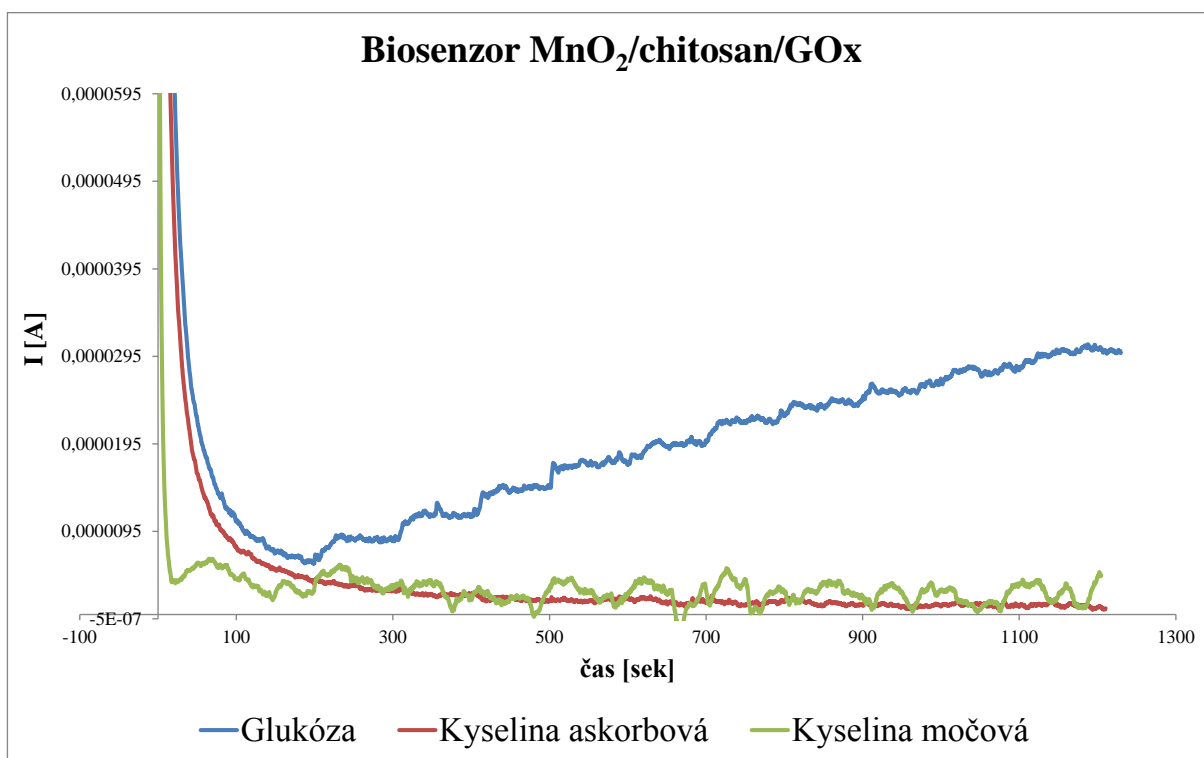


Fig. 23 Závislost proudu na koncentraci glukózy pro vybrané biosenzory při potenciálu 0,5 V.

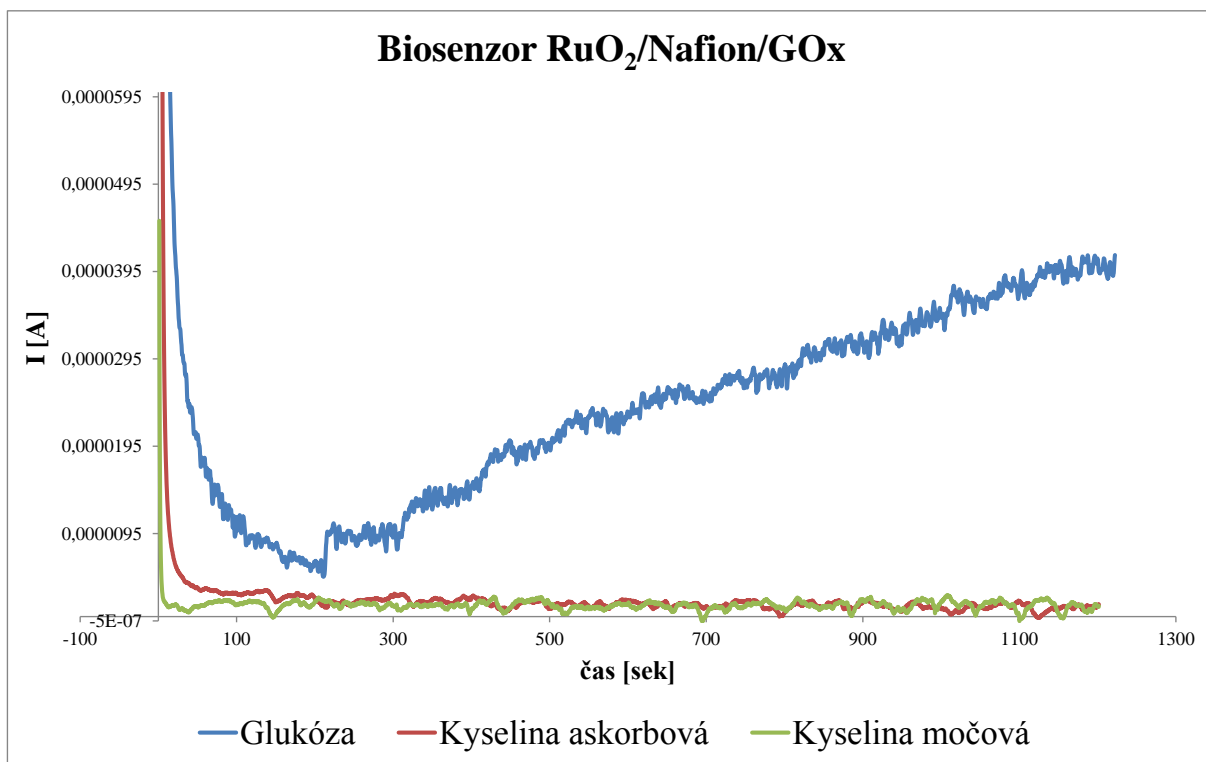
Největší směrnici a tudíž největší citlivosti bylo dosaženo v případě SPCE modifikované RuO₂ a překryté chitosanovou membránou. Téměř shodné citlivosti bylo dosaženo i u MnO₂ s Nafionovou membránou. S rostoucí koncentrací, ale přestává být nárůst lineární. Koncentrace glukózy se pohybuje v rozmezí přibližně 0,5 – 4 mg l⁻¹, což odpovídá koncentraci přibližně 0,3 – 0,7 mM. Chronoamperomerické záznamy všech biosenzorů jsou na **obrázcích 35-38**.



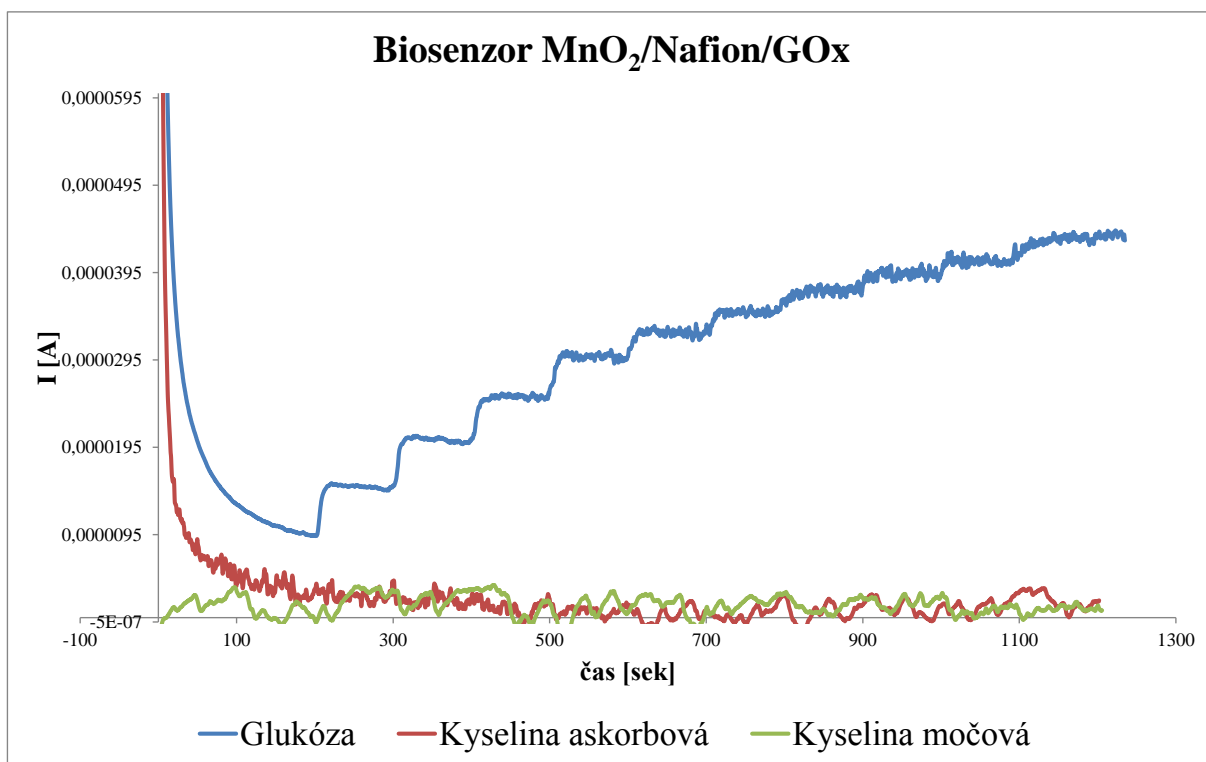
Obr. 35 Chronoamperometrické křivky biosenzoru RuO₂/chitosan/GOx pro glukózu a interferenty.



Obr. 36 Chronoamperometrické křivky biosenzoru MnO₂/chitosan/GOx pro glukózu a interferenty.



Obr. 37 Chronoamperometrické křivky biosenzoru RuO₂/Nafion/GOx pro glukózu a interferenty.

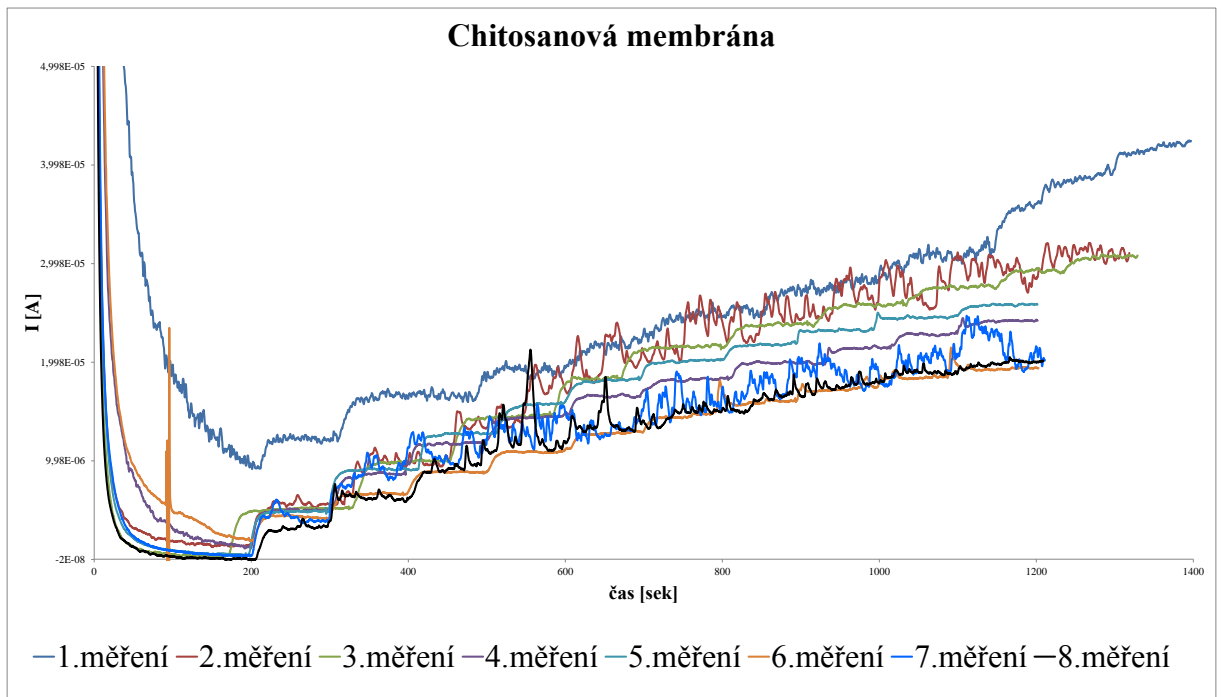


Obr. 38 Chronoamperometrické křivky biosenzoru MnO₂/Nafion/GOx pro glukózu a interferenty.

4.6 Stanovení stability membrány

Pro určení stability biorekognizační vrstvy bylo provedeno měření stability. Stejný biosenzor byl vystaven několika, po sobě jdoucím kalibračním měřením glukózy. Všechny chornoamperometrické křivky byly vzájemně porovnány. Z **obrázku 39** jde vidět, že při prvních dvou měřeních je křivka kalibrace značně zašuměná. Při třetím až šestém měření lze snadno rozpoznat všech deset přidávek glukózy. To je nejspíše způsobeno tím, že chitosanová membrána musí nejdříve nabobtnat ve vodném prostředí. Proto byly všechny použité chitosanové biosenzory před měřením ponechány 10 minut ve fosfátovém pufru. Ale se zvyšujícím počtem měření můžeme vidět, že se proudová odezva snižuje. To může být způsobeno vymýváním GOx z membrány. Poslední dvě měření nelze skrz šum odečítat.

Biosenzor s chitosanovou membránou lze použít, po předchozím nabobtnání, nejvýše pro 4 měření.



Obr. 39 Chronoamperometrické křivky glukózy pro měření stability chitosanové membrány při 0,5 V.

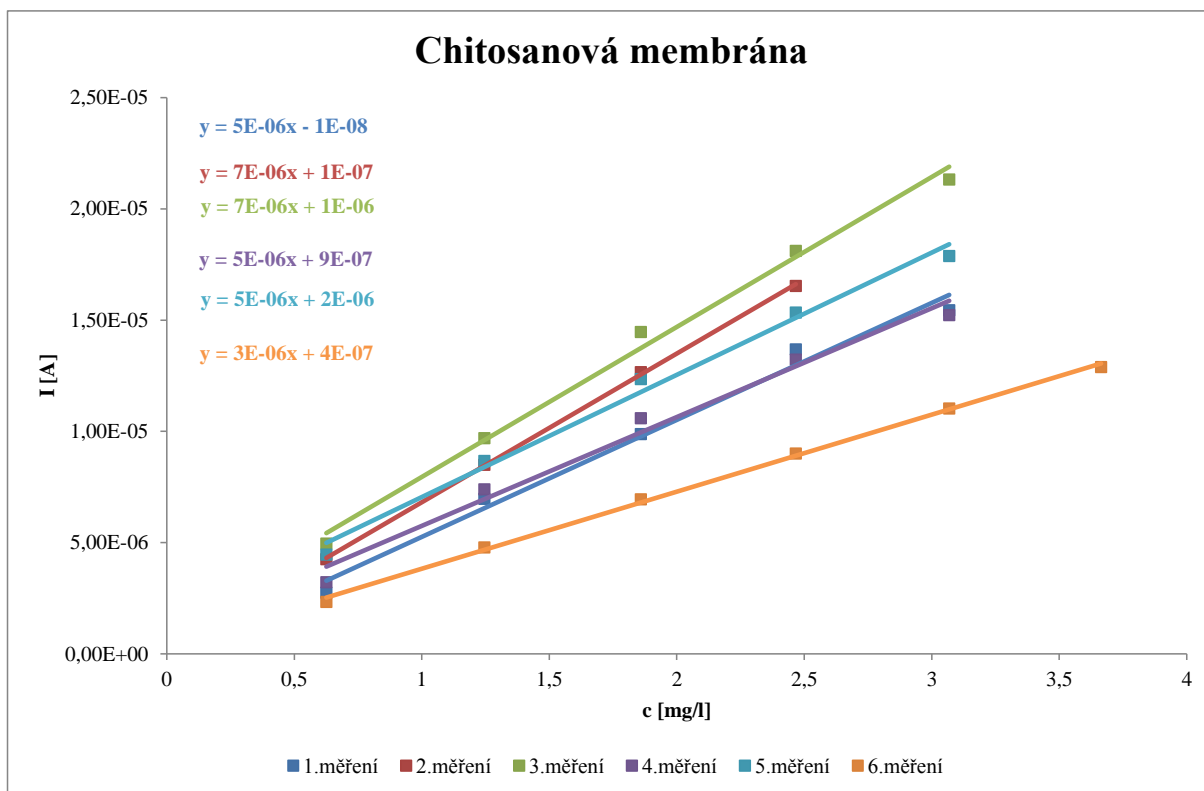


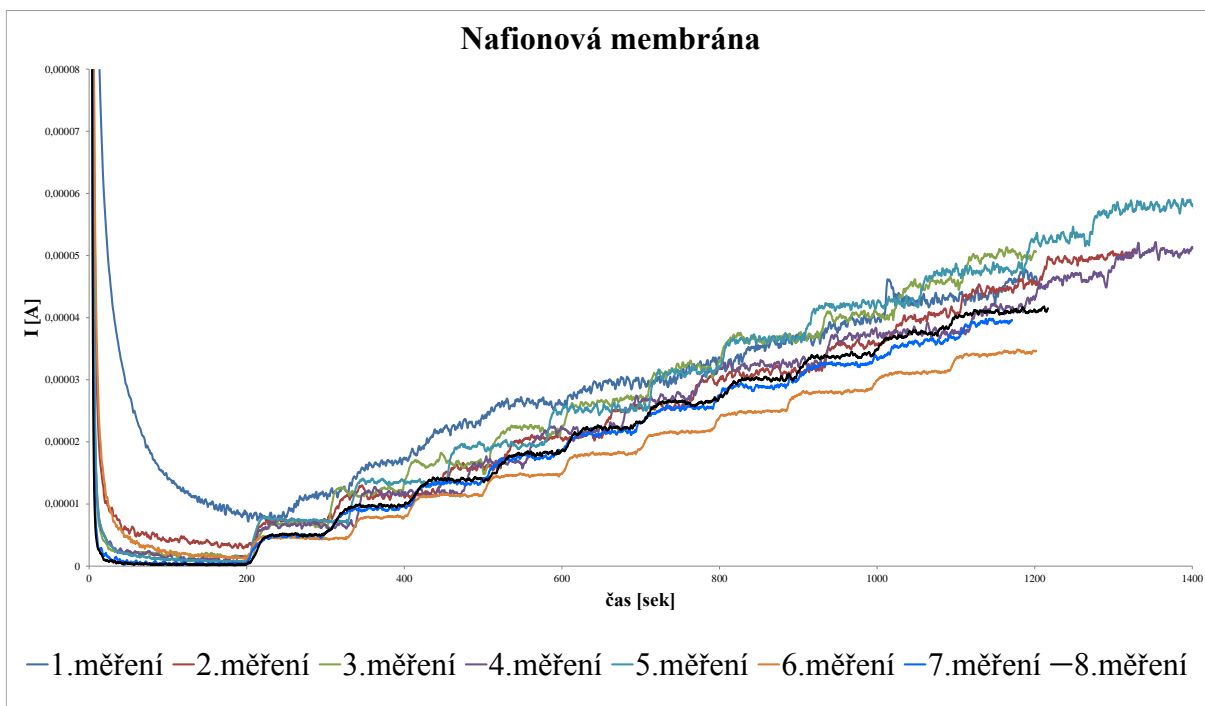
Fig. 24 Závislost proudu na koncentraci glukózy pro stanovení stability chitosanové membrány při 0,5 V.

Tab. 3 Směrnice opakovaných měření pro chitosanovou membránu.

| Měření | Směrnice [A mg ⁻¹ l ⁻¹] | Měření | Směrnice [A mg ⁻¹ l ⁻¹] |
|--------|--|--------|--|
| 1. | 5.10 ⁻⁶ | 5. | 5.10 ⁻⁶ |
| 2. | 7.10 ⁻⁶ | 6. | 3.10 ⁻⁶ |
| 3. | 7.10 ⁻⁶ | 7. | NELZE ODEČÍST |
| 4. | 5.10 ⁻⁶ | 8. | NELZE ODEČÍST |

V případě Nafionové membrány nedochází v žádném z případů k výraznému zašumění křivky. Oproti chitosanovému senzoru ani nedochází k výraznému poklesu proudových odezev. U všech osmi měření nedochází k vymývání GOx z membrány.

Nafionové biosenzory lze tedy použít pro několikanásobné měření, aniž by docházelo k poškození biorekognizační vrstvy.



Obr. 40 Chronoamperometrické křivky glukózy pro měření stability Nafionové membrány při 0,5 V.

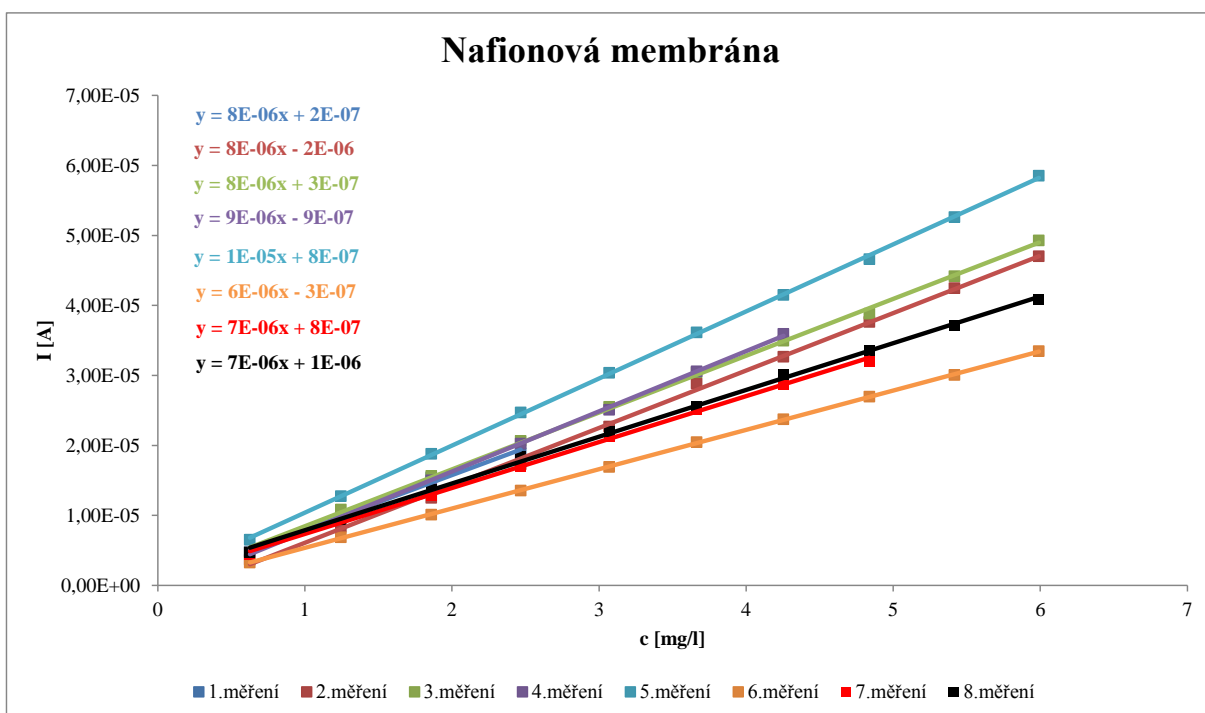


Fig. 25 Závislost proudu na koncentraci glukózy pro stanovení stability Nafionové membrány při 0,5 V.

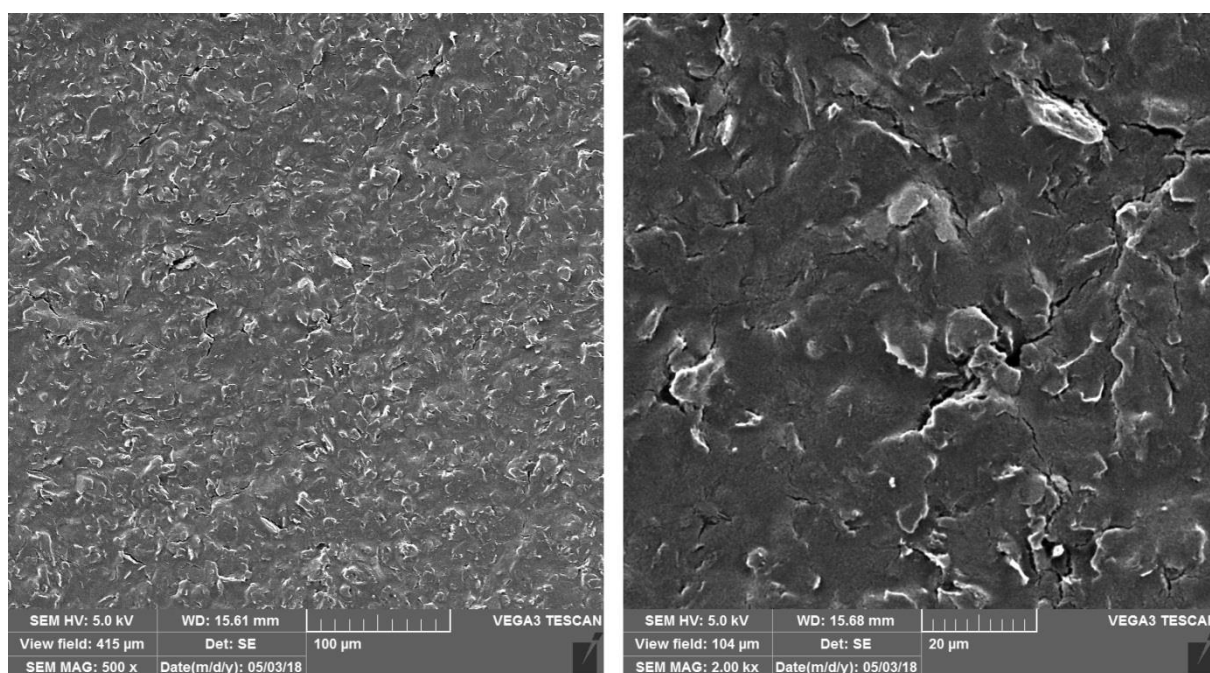
Tab. 4 Směrnice opakovaných měření pro Nafionovou membránu

| Měření | Směrnice [$A\ mg^{-1}\ I^{-1}$] | Měření | Směrnice [$A\ mg^{-1}\ I^{-1}$] |
|--------|-----------------------------------|--------|-----------------------------------|
| 1. | 8.10^{-6} | 5. | 1.10^{-5} |
| 2. | 8.10^{-6} | 6. | 6.10^{-6} |
| 3. | 8.10^{-6} | 7. | 7.10^{-6} |
| 4. | 9.10^{-6} | 8. | 7.10^{-6} |

4.7 Snímky povrchů modifikovaných elektrod ze SEM

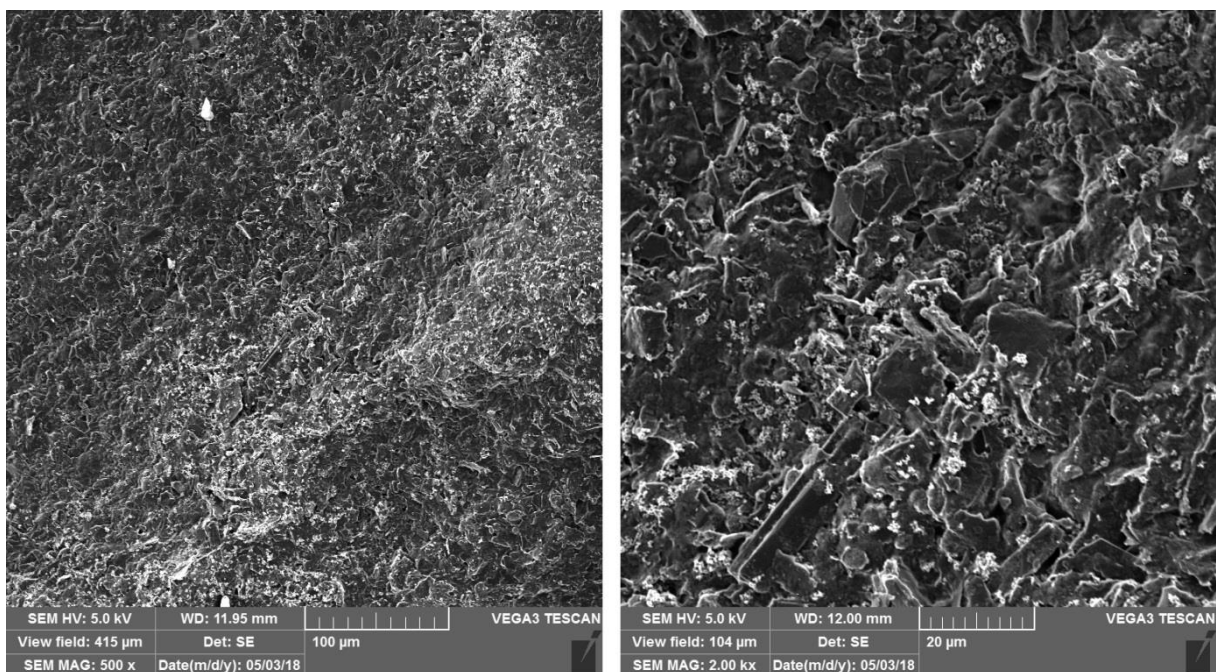
Modifikovaný povrch pracovní elektrody byl snímán skenovacím elektronovým mikroskopem, při budícím napětí 5 kV a detektorem sekundárním elektronů.

Na **obrázku 41** je povrch čisté SPCE v přiblížení 500 (levý snímek) a 2000 (pravý snímek). Lze vidět typickou strukturu polymerního inkoustu s rovnoměrně dispergovanými uhlíkovými částicemi.

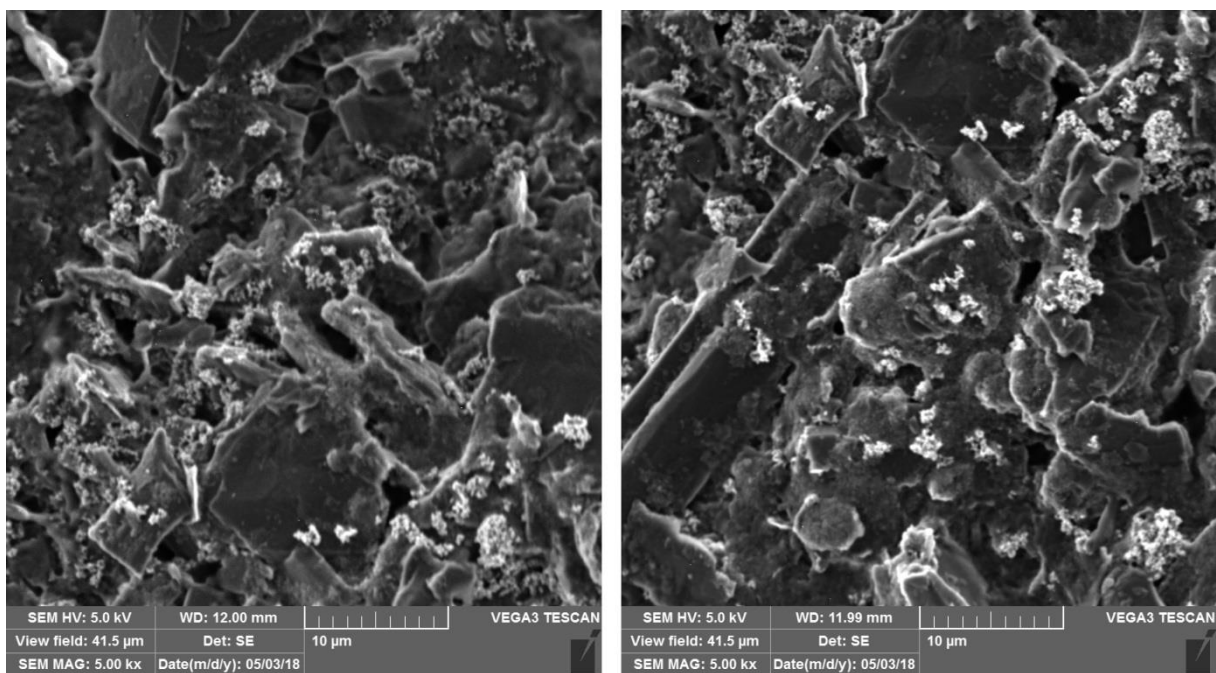


Obr. 41 Povrch čisté SPCE při zvětšení 500 (vlevo) a 2000 (vpravo).

Povrch modifikovaný RuO_2 v uhlíkovém inkoustu už je morfologicky odlišný. Kvůli ruční modifikaci není vrstva tak jednodušá jako v případě čisté SPCE a tvoří členitý, nerovný povrch. Uhlíkové částice jsou obnaženější a disperze RuO_2 není rovnoměrná. To lze nejlépe vidět na **obrázku 42** vlevo, při přiblížení 500. RuO_2 jde vidět jako světlejší shluky částic (**Obrázek 43**, zvětšeno 5000krát).



Obr. 42 SPCE modifikovaná RuO₂. Snímáno při zvětšení 500 (vlevo) a 2000 (vpravo).



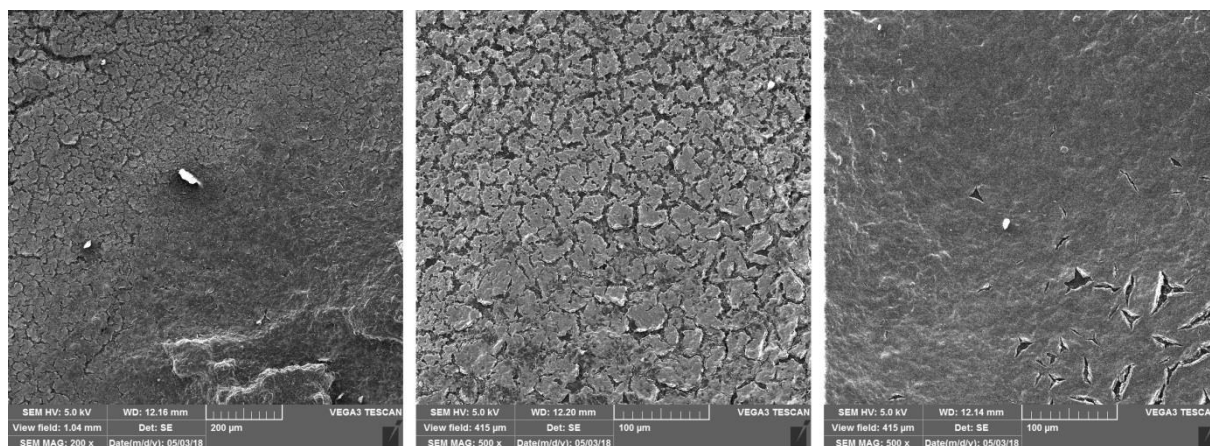
Obr. 43 SPCE modifikovaná RuO₂. Snímáno při zvětšení 5000. RuO₂ jako světlejší částice.

Chitosanová vrstva tvoří buďto souvislý povlak nebo šupiny, které tak mohou odkrývat elektrodu pod ní. Nejlépe viditelné na **obrázku 45** při zvětšení 2000.

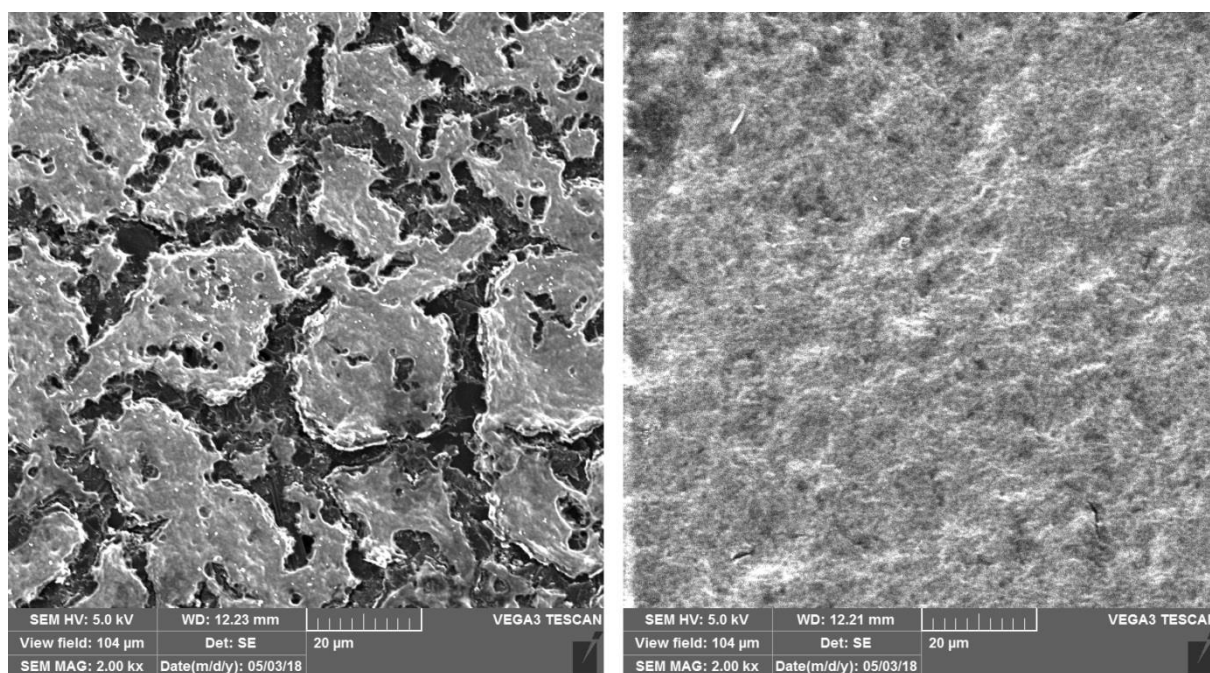
Výsledný vzhled chitosanové membrány je ovlivněn hlavně členitostí povrchu pod ním a množstvím naneseného chitosanu. V rámci této diplomové práce jsem veškeré modifikace prováděla ručně. To v prvním případě způsobilo nedokonalou disperzi mediátoru do celého

objemu uhlíkového inkoustu a v druhém případě nerovnou vrstvu. Pokud by byla modifikace prováděna před sítotiskovým procesem, tak by výsledná vrstva byla jednodušší, kompaktnější a pravděpodobně by nedocházelo k popraskání chitosanového filmu.

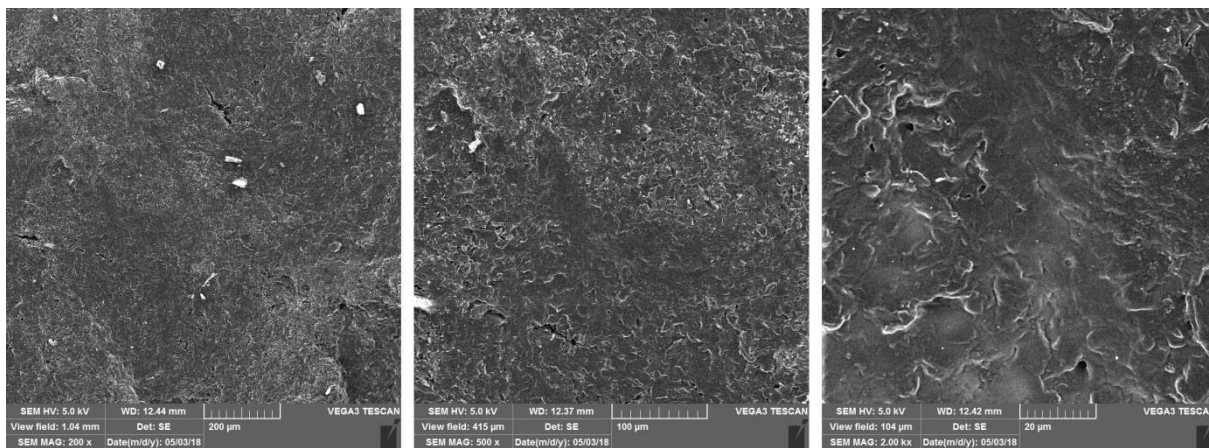
Povrch konfigurace RuO₂/chitosan/GOx (**Obrázek 46**) se od předchozího případu téměř neliší.



Obr. 44 Chitosanová vrstva. Levý snímek zvětšeno 200x, prostřední a pravý snímek 500x.



Obr. 45 Chitosanová vrstva na dvou různých místech při zvětšení 2000.



Obr. 46 Biosenzor RuO₂/chitosan/GOx. Zvětšeno 200x (vlevo), 500x (uprostřed) a 2000x (vpravo).

5 Závěr

V rámci této práce byly zkoumány různé konfigurace uhlíkových tištěných elektrod, oxidů kovů a iontů kovů jako mediátoru elektronového přenosu a chitosanových membrán, k přípravě enzymových biosenzorů s oxidázami. Pro přípravu membrány se ukázal jako nejvhodnější chitosan o nízké molekulové hmotnosti izolovaný z krevet. Chitosan izolovaný z krabů tvořil velmi viskózní roztok, se kterým se velmi špatně manipulovalo, a tvořil tuhou membránu způsobující útlum proudové odezvy. Nejlepším typem modifikace je pracovní elektroda modifikovaná oxidem kovu rozmíchaným v uhlíkovém inkoustu. Modifikace, kdy byl pevný mediátor rozptýlen v chitosanu, vykazovala několikanásobně nižší proudové odezvy než v předchozím případě. Velmi často se celá vrstva chitosanové membrány sloupávala, společně s natištěnou pracovní elektrodou z povrchu podkladové destičky. Stejně tak byly zaznamenány malé proudové odezvy i pro modifikaci iontem kovu přímo v chitosanu.

Nejlepším mediátorem přenosu elektronů je RuO_2 a MnO_2 . Velmi zajímavé je, že ve všech studovaných případech byla citlivost elektrody vyšší pro konfiguraci bez chitosanu. Pouze v případě MnO_2 bylo dosaženo vyšší proudové odezvy pro elektrodu s chitosanovou membránou. Tyto mediátory pak byly použity ke konstrukci enzymových biosenzorů s glukózaoxidázou. Jako nejlepší se ukázala konfigurace $\text{RuO}_2/\text{chitosan}/\text{GOx}$, která je 2x citlivější než $\text{MnO}_2/\text{chitosan}/\text{GOx}$. V porovnání s Nafionovým senzorem je citlivost srovnatelná. Ani v jednom ze studovaných případů nebyla stanovení rušena vybranými interferenty – kyselinou askorbovou a močovou. Nafion však vykazuje větší stabilitu membrány při opakovaných měřeních. V případě chitosanu nejspíše dochází k vymývání GOx z membrány a tak ke snižování citlivosti senzoru.

6 Literatura

- [1] Bjornson A., Chitosan; Poly-D-glucosamine Fact sheet. *Environmental Protection Agency* **2001**.
- [2] Srinivasan H., Velayutham K., Ravichandran R., Chitin and chitosan preparation from shrimp shells *Penaeus monodon* and its human ovarian cancer cell line, PA-1. *International Journal of Biological Macromolecules* **2018**, 107, 662-667.
- [3] Suginta W., Khunkaewla P., Schulte A., Electrochemical biosensor applications of polysaccharides chitin and chitosan. *Chemical Reviews* **2013**, 113, 5458-5479.
- [4] <https://www.pineresearch.com/shop/products/electrodes/screen-printed-electrodes/carbon-spes/#documentation> [cit. 2018-01-12]
- [5] Dědík J., Janovcová M., Dejmková H., Barek J., Pecková K., Utilization of unmodified screen-printed carbon electrodes in electroanalysis of organic compounds. *Sensing in Electroanalysis* **2011**, 6, 129-138.
- [6] Nascimento B. B., Angnes L., Eletrodos Fabricados por "Silk-Screen". *QUÍMICA NOVA* **1998**, 21, 5.
- [7] Dago Á., Navarro J., Ariño C., Díaz-Cruz J. M., Esteban M., Carbon nanotubes and graphene modified SPCE as sensitive sensors for the determination of phytochelatin in plants using liquid chromatography with amperometric detection. *Journal of Chromatography A* **2015**, 1409, 210-217.
- [8] Novaković D., Kašiković N., Vladić G., Pál M., Printing on polymers **2016**, 247-261.
- [9] http://www.dropsens.com/en/screen_printed_electrodes_pag.html#unmodified_spes [cit. 2018-02-23]
- [10] Štulík K., Pacáková V., *Nové směry v analytické chemii III* (Editované vydání Zýka J.), *SNTL Praha* **1988**, 30-65.
- [11] Grant A. E., Bergren A. J., Porter M. D., *Chemically Modified Electrodes* (Editované vydání Zoski C. G.). *Iowa State University Press* **2007**, 310-322.

- [12] Heinemeyer C., Loh V. D. M., Wagner M.-N., Länge K., Surface modification procedure for biosensor chips made of chemically sensitive polymers. *Procedia Technology* **2017**, 27, 165-166.
- [13] Ruff A., Redox polymers in bioelectrochemistry: Common playgrounds and novel concepts. *Current Opinion in Electrochemistry* **2017**, 5, 66-73.
- [14] Rhodes C. P., Long J. W., Rolison D. R., Direct electrodeposition of nanoscale solid polymer electrolytes via electropolymerization of sulfonated phenols. *Electrochemical and Solid State Letters* **2005**, 8, 11.
- [15] Pal R. K., Pradhan S., Narayanan L., Yadavalli V. K., Micropatterned conductive polymer biosensors on flexible PDMS films. *Sensors and Actuators B* **2017**, 259, 498-504.
- [16] Martinková P., Kostelník A., Valek T., Pohanka M., Main streams in the Construction of Biosensors and Their Applications. *International Journal of Electrochemical Science* **2017**, 12, 7386-7403.
- [17] Panjan P., Virtanen V., Sesay A. M., Determination of stability characteristics for electrochemical biosensors via thermally accelerated ageing. *Talanta* **2017**, 170, 331.
- [18] Turner A. P. F., Karube I., Wilson G. S., Biosensors: Fundamentals and Applications. *Oxford University Press* **1987**.
- [19] Pohanka M., Studijní pomůcka: Biosenzory pro stanovení chemických a biologických agens. *Univerzita Obrany-Fakulta vojenského zdravotnictví, Hradec Králové* **2009**, svazek 360.
- [20] Seitz W. R., Biosensors: Fundamentals and applications (Editované vydání Turnes A. P. F., Karube I., Wilson G. S.). *Oxford University Press* **1987**, 599-605.
- [21] Ramsden J. J., Optical Biosensors. *Journal of molecular Recognition* **1998**, 10, 3.
- [22] Abad J. M., Pariente F., Hernández L., Abruña H. D., Lorenzo E., Determination of Organophosphorus and Carbamate Pesticides Using a Piezoelectric Biosensor. *Analytical chemistry* **1998**, 70, 2848.

- [23] Skládal P., Macholán L., Biosensory – Současný stav a perspektivy. *Chemické listy* **1997**, 91, 105-113.
- [24] Prodromidis M. I., Karayannis M. I., *Electroanalysis* **2002**, 14, 241-261.
- [25] Jampasa S., Wonsawat W., Rodthongkum N., Siangproh W., Yanatatsaneejit P., Vilaivan T., Chailapakul O., Electrochemical detection of human papillomavirus DNA type 16 usin pyrrolidinyl peptide nucleic acid probe immobilized on screen-printed carbon electrodes. *Biosensors and Bioelectronics* **2014**, 54, 428-434.
- [26] Wang Y., Wang S., Tao L., Min Q., Xiang J., Wang Q., Xie J., Yue Y., Wu S., Li X., Ding H., A disposable electrochemical sensor for simultaneous determination of norepinephrine and serotonin in rat cerebrospinal fluid based on MWNTs-ZnO/chitosan composites modified screen-printed electrode. *Biosensors and Bioelectronics* **2015**, 65, 31-38.
- [27] Ziyatdinova G., Labuda J., Complex electrochemical and impedimetric evaluation of DNA damage by using DNA biosensor based on a carbon screen-printed electrode. *Analytical Methods* **2011**, 3, 2777.
- [28] Jin M., Zhang X., Zhen Q., He Y., Chen X., Lyu W., Han R., Ding M., An electrochemical sensor for indole in plasma based on MWCNTs-chitosan modified screen-printed carbon electrode. *Biosensors and Bioelectronics* **2017**, 98, 392-397.
- [29] Medyantseva E. P., Brusnitsyn D. V., Varlamova R. M., Baibararova M. A., Budnikov G. K., Fattakhova A. N., Determination of antidepressants using monoamine oxidase amperometric biosensors based on screen-printed graphite electrodes modified with multi-walled carbon nanotubes. *Farmaceutical Chemistry Journal* **2014**, 48, 7.
- [30] Nellaiappan S., Kumar A. S., Electrocatalytic oxidation and flow injection analysis of isoniazid drug using a gold nanoparticles decorated carbon nanofibers-chitosan modified carbon screen printed electrode in neutral pH. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2017**, 801, 171-178.
- [31] Dou W., Tang W., Zhao G., A disposable electrochemical immunosensor arrays using 4-channel screen-printed carbon electrode for simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Enterobacter sakazakii*. *Electrochimica Acta* **2013**, 97, 79-85.

- [32] Khaled E., Hassan H.N.A., Habib I.H.I., Metelka R., Chitosan modified screen-printed carbon electrode for sensitive analysis of heavy metals. *International Journal of Electrochemical Science* **2010**, 5, 158-167.
- [33] Thirumalraj B., Rajkumar Ch., Chen S.-M., Lin K.-Y., Determination of 4-nitrophenol in water by use of a screen-printed carbon electrode modified with chitosan-crafted ZnO nanoneedles. *Journal of Colloid and Interface Science* **2017**, 499, 83-92.
- [34] Soukup J., Polan V., Kotzian P., Kalcher K., Vytřas K., Rhodium and Its Compounds in Amperometric Biosensors Based on Redox Enzymes. *International Journal of Electrochemical Science* **2011**, 6, 231-239.
- [35] Kotzian P., Brázdilová P., Kalcher K., Handlíř K., Vytřas K., Oxides of platinum metal group as potential catalysts in carbonaceous amperometric biosensors based on oxidases. *Sensors and Actuators B* **2007**, 124, 297-302.

7 Seznam obrázků, grafů a tabulek

SEZNAM OBRÁZKŮ

| | |
|---|----|
| Obr. 1 Struktura chitosanu. | 12 |
| Obr. 2 Schéma výroby chitosanu, upraveno podle [3]. | 13 |
| Obr. 3 Příklad tříelektrodového senzoru s uhlíkovými tištěnými elektrodami (DropSens). | 15 |
| Obr. 4 Sítotiskový proces [8]. | 16 |
| Obr. 5 Příklady SPE. Uspořádání pracovní/referentní/pomocná elektroda [9]. | 17 |
| Obr. 6 Polymery používané k modifikaci povrchu elektrod, upraveno podle [11]. | 18 |
| Obr. 7 Přenos signálu v redoxním polymeru (A) a přenos signálu v iontově-výměnném polymeru B [11]. | 19 |
| Obr. 8 Schéma biosenzorů, upraveno podle [3]. | 21 |
| Obr. 9 Schéma glukózového biosenzoru [19]. | 22 |
| Obr. 10 Dělení fyzikálně-chemických převodníků, upraveno podle [16]. | 23 |
| Obr. 11 Ukázka cyklického voltamogramu. | 30 |
| Obr. 12 Cyklické voltamogramy pro elektrody značky Dropsens, Orion a Orion s uhlíkovými nanotrubičkami. | 32 |
| Obr. 13 Cyklický voltamogram pro čistou SPCE, SPCE modifikovanou RuO ₂ , PdO a MnO ₂ | 33 |
| Obr. 14 Cyklický voltamogram pro elektrody modifikované mediátorem a překryté vrstvou chitosanu izolovaného z krevet. | 34 |
| Obr. 15 Cyklický voltamogram pro elektrody modifikované mediátorem a překryté vrstvou chitosanu izolovaného z krabů. | 34 |
| Obr. 16 Cyklický voltamogram pro elektrody modifikované mediátorem rozmíchaným v chitosanu izolovaném z krevet. | 34 |
| Obr. 17 Cyklický voltamogram pro elektrody modifikované mediátorem rozmíchaným v chitosanu izolovaném z krabů. | 34 |
| Obr. 18 Chronoamperometrické křivky H ₂ O ₂ pro elektrodu modifikovanou PtO ₂ při různých potenciálech detekce. | 36 |
| Obr. 19 Chronoamperometrické křivky H ₂ O ₂ pro elektrodu modifikovanou PtO ₂ /chitosan při různých potenciálech detekce. | 37 |
| Obr. 20 Chronoamperometrické křivky H ₂ O ₂ pro elektrodu modifikovanou Rh ₂ O ₃ při různých potenciálech detekce. | 38 |

| | |
|---|----|
| Obr. 21 Chronoamperometrické křivky H_2O_2 pro elektrodu modifikovanou Rh_2O_3 /chitosan při různých potenciálech detekce. | 39 |
| Obr. 22 Chronoamperometrické křivky H_2O_2 pro elektrodu modifikovanou PdO při různých potenciálech detekce. | 41 |
| Obr. 23 Chronoamperometrické křivky H_2O_2 pro elektrodu modifikovanou PdO/chitosan při různých potenciálech detekce. | 42 |
| Obr. 24 Chronoamperometrické křivky H_2O_2 pro elektrodu modifikovanou IrO_2 při různých potenciálech detekce. | 43 |
| Obr. 25 Chronoamperometrické křivky H_2O_2 pro elektrodu modifikovanou IrO_2 /chitosan při různých potenciálech detekce. | 44 |
| Obr. 26 Chronoamperometrické křivky H_2O_2 pro elektrodu modifikovanou RuO_2 při různých potenciálech detekce. | 46 |
| Obr. 27 Chronoamperometrické křivky H_2O_2 pro elektrodu modifikovanou RuO_2 /chitosan při různých potenciálech detekce. | 47 |
| Obr. 28 Chronoamperometrické křivky H_2O_2 pro elektrodu modifikovanou MnO_2 při různých potenciálech detekce. | 48 |
| Obr. 29 Chronoamperometrické křivky H_2O_2 pro elektrodu modifikovanou MnO_2 /chitosan při různých potenciálech detekce. | 49 |
| Obr. 30 Chronoamperometrické křivky H_2O_2 pro čistou SPCE při různých potenciálech detekce. | 51 |
| Obr. 31 Chronoamperometrické křivky H_2O_2 pro SPCE modifikovanou chitosanem při různých potenciálech detekce. | 52 |
| Obr. 32 Chronoamperometrické křivky H_2O_2 pro elektrodu modifikovanou iontem Rh v chitosanové membráně. | 58 |
| Obr. 33 Chronoamperometrické křivky H_2O_2 pro elektrodu modifikovanou iontem Ru v chitosanové membráně. | 58 |
| Obr. 34 Chronoamperometrické křivky H_2O_2 pro elektrodu modifikovanou iontem Mn v chitosanové membráně. | 59 |
| Obr. 35 Chronoamperometrické křivky biosenzoru RuO_2 /chitosan/GOx pro glukózu a interferenty. | 61 |
| Obr. 36 Chronoamperometrické křivky biosenzoru MnO_2 /chitosan/GOx pro glukózu a interferenty. | 61 |

| | |
|---|----|
| Obr. 37 Chronoamperometrické křivky biosenzoru RuO ₂ /Nafion/GOx pro glukózu a interferenty..... | 62 |
| Obr. 38 Chronoamperometrické křivky biosenzoru MnO ₂ /Nafion/GOx pro glukózu a interferenty..... | 62 |
| Obr. 39 Chronoamperometrické křivky glukózy pro měření stability chitosanové membrány při 0,5 V..... | 63 |
| Obr. 40 Chronoamperometrické křivky glukózy pro měření stability Nafionové membrány při 0,5 V..... | 65 |
| Obr. 41 Povrch čisté SPCE při zvětšení 500 (vlevo) a 2000 (vpravo). | 66 |
| Obr. 42 SPCE modifikovaná RuO ₂ . Snímáno při zvětšení 500 (vlevo) a 2000 (vpravo)..... | 67 |
| Obr. 43 SPCE modifikovaná RuO ₂ . Snímáno při zvětšení 5000. RuO ₂ jako světlejší částice. | 67 |
| Obr. 44 Chitosanová vrstva. Levý snímek zvětšeno 200x, prostřední a pravý snímek 500x... .. | 68 |
| Obr. 45 Chitosanová vrstva na dvou různých místech při zvětšení 2000. | 68 |
| Obr. 46 Biosenzor RuO ₂ /chitosan/GOx. Zvětšeno 200x (vlevo), 500x (uprostřed) a 2000x (vpravo)..... | 69 |

SEZNAM GRAFŮ

| | |
|--|----|
| Fig. 1 Závislost proudu na koncentraci H ₂ O ₂ pro elektrodu modifikovanou PtO ₂ při různých potenciálech detekce. | 36 |
| Fig. 2 Závislost proudu na koncentraci H ₂ O ₂ pro elektrodu modifikovanou PtO ₂ /chitosan při různých potenciálech detekce. | 37 |
| Fig. 3 Závislost proudu na koncentraci pro elektrodu modifikovanou Rh ₂ O ₃ při různých potenciálech detekce. | 39 |
| Fig. 4 Závislost proudu na koncentraci H ₂ O ₂ pro elektrodu modifikovanou Rh ₂ O ₃ /chitosan při různých potenciálech detekce. | 40 |
| Fig. 5 Závislost proudu na koncentraci H ₂ O ₂ pro elektrodu modifikovanou PdO při různých potenciálech detekce. | 41 |
| Fig. 6 Závislost proudu na koncentraci H ₂ O ₂ pro elektrodu modifikovanou PdO/chitosan při různých potenciálech detekce. | 42 |
| Fig. 7 Závislost proudu na koncentraci H ₂ O ₂ pro elektrodu modifikovanou IrO ₂ při různých potenciálech detekce. | 44 |

| | |
|---|----|
| Fig. 8 Závislost proudu na koncentraci H_2O_2 pro elektrodu modifikovanou IrO_2 /chitosan při různých potenciálech detekce. | 45 |
| Fig. 9 Závislost proudu na koncentraci H_2O_2 pro elektrodu modifikovanou RuO_2 při různých potenciálech detekce. | 46 |
| Fig. 10 Závislost proudu na koncentraci H_2O_2 pro elektrodu modifikovanou RuO_2 /chitosan při různých potenciálech detekce. | 47 |
| Fig. 11 Závislost proudu na koncentraci H_2O_2 pro elektrodu modifikovanou MnO_2 při různých potenciálech detekce. | 49 |
| Fig. 12 Závislost proudu na koncentraci H_2O_2 pro elektrodu modifikovanou MnO_2 /chitosan při různých potenciálech detekce. | 50 |
| Fig. 13 Závislost proudu na koncentraci H_2O_2 pro čistou SPCE při různých potenciálech detekce. | 51 |
| Fig. 14 Závislost proudu na koncentraci H_2O_2 pro čistou SPCE modifikovanou chitosanem při různých potenciálech detekce. | 52 |
| Fig. 15 Srovnání proudových odezev modifikovaných elektrod v závislosti na koncentraci H_2O_2 pro potenciál 0,1 V. | 53 |
| Fig. 16 Srovnání proudových odezev modifikovaných elektrod v závislosti na koncentraci H_2O_2 pro potenciál 0,2 V. | 54 |
| Fig. 17 Srovnání proudových odezev modifikovaných elektrod v závislosti na koncentraci H_2O_2 pro potenciál 0,3 V. | 55 |
| Fig. 18 Srovnání proudových odezev modifikovaných elektrod v závislosti na koncentraci H_2O_2 pro potenciál 0,4 V. | 56 |
| Fig. 19 Srovnání proudových odezev modifikovaných elektrod v závislosti na koncentraci H_2O_2 pro potenciál 0,5 V. | 57 |
| Fig. 20 Závislost proudu na koncentraci H_2O_2 pro elektrodu modifikovanou iontem Rh v chitosanové membráně. | 58 |
| Fig. 21 Závislost proudu na koncentraci H_2O_2 pro elektrodu modifikovanou iontem Ru v chitosanové membráně. | 58 |
| Fig. 22 Závislost proudu na koncentraci H_2O_2 pro elektrodu modifikovanou ionte Mn v chitosanové membráně. | 59 |
| Fig. 23 Závislost proudu na koncentraci glukózy pro vybrané biosenzory při potenciálu 0,5 V. | 60 |

| | |
|--|----|
| Fig. 24 Závislost proudu na koncentraci glukózy pro stanovení stability chitosanové membrány při 0,5 V. | 64 |
| Fig. 25 Závislost proudu na koncentraci glukózy pro stanovení stability Nafionové membrány při 0,5 V. | 65 |

SEZNAM TABULEK

| | |
|---|----|
| Tab. 1 Firmy dodávající komerční SPE [5]. | 14 |
| Tab. 2 Směrnice pro vybrané konfigurace glukózových biosenzorů..... | 59 |
| Tab. 3 Směrnice opakovaných měření pro chitosanovou membránu. | 64 |
| Tab. 4 Směrnice opakovaných měření pro Nafionovou membránu | 66 |

ÚDAJE PRO KNIHOVNICKOU DATABÁZI

| | |
|---------------|--|
| Název práce | Uhlíkové tištěné elektrody modifikované chitosanem pro přípravu enzymových biosenzorů |
| Autor práce | Bc. Anna Kostelníková |
| Obor | Analytická chemie |
| Rok obhajoby | 2018 |
| Vedoucí práce | Ing. Radovan Metelka, Ph.D. |
| Anotace | Tato diplomová práce se zabývá studiem chitosanem modifikovaných, uhlíkových, tištěných elektrod s možným uplatněním při konstrukci enzymových biosenzorů na bázi oxidáz. Teoretická část práce je zaměřena na popis vlastností chitosanu, jeho výrobu, přípravu uhlíkových tištěných elektrod a možnosti jejich modifikace. Několik kapitol je věnováno biosenzorům, jejich základnímu rozdělení a principu. V experimentální části jsou studovány uhlíkové tištěné elektrody modifikované chitosanem a mediátorem elektronového přenosu a jejich vliv na elektrochemické vlastnosti těchto elektrod. |
| Klíčová slova | <ul style="list-style-type: none"> - Chitosan - Uhlíkové tištěné elektrody - Modifikace - Enzymové biosenzory - Chronoamperometrie |