

VĚDECKÉ SPISY VYSOKÉHO UČENÍ TECHNICKÉHO V BRNĚ

Edice Habilitační a inaugurační spisy, sv. 614

ISSN 1213-418X

Pavel Neuzil

**NANOTECHNOLOGIE
A MIKROKALORIMETR**

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

doc. Ing. Pavel Nežil, DSc.

NANOTECHNOLOGIE A MIKROKALORIMETR

NANOTECHNOLOGY AND MICROCALORIMETER

TEZE PŘEDNÁŠKY
K PROFESORSKÉMU JMENOVACÍMU ŘÍZENÍ



BRNO 2018

KLÍČOVÁ SLOVA

Bolometr, uhlíkové nanotrubičky, detekce infračerveného záření, mikrokalorimetr, monitorování energetické balance biologických procesů, nanostrukturované zlato, pole zlatých mikroelektrod, stripování voltametrie, monitorování iontů As ve vodě

KEYWORDS

Bolometer, carbon nanotubes, detection of infrared radiation, microcalorimeter, energy balance monitoring of biological reactions, nanostructured gold, array of gold microelectrodes, striping voltammetry, detection of Au ions in water

MÍSTO ULOŽENÍ PRÁCE

Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií,
Ústav Mikroelektroniky, Technická 3058/10, 616 00 Brno

© Pavel Neužil, 2018

ISBN 978-80-214-5676-1

ISSN 1213-418X

Obsah

1	Předmluva.....	5
2	Úvod	5
1	Uhlíkové nanotrubičky pro detekci infračerveného záření.....	6
1.1	Návrh a výroba mikrobolometru.....	7
1.2	Charakterizace mikrobolometru.....	7
1.3	Monitorování růstu CNT.....	8
1.4	Vlastnosti vrstvy CNT.....	9
1.5	Závěr	10
2	Mikrokalorimetrie	11
2.1	Úvod	11
2.2	Návrh velmi citlivého μC	12
2.2.1	Komora μC	13
2.2.2	Tepelná Izolace.....	13
2.2.3	Manipulace s kapalinami	13
2.2.4	Měření teploty	14
2.3	Příklady a aplikace μC	15
2.4	Trendy a očekávaný vývoj	18
2.5	Závěr	18
3	Nanostrukturovaná pole mikroelektrod	19
3.1	Abstrakt.....	19
3.2	Úvod	19
3.3	Experimentální část	21
3.3.1	Výroba polí nanostrukturovaných elektrod	21
3.3.2	Aktivace povrchu Au	22
3.4	Výsledky a diskuze.....	23
3.5	Závěr	24
4	Příští aktivity	25
5	Závěr.....	26
6	Abstrakt.....	27
7	Literatura.....	28

CURRICULUM VITAE



Doc. Ing. Pavel Neuzil, DSc.
Ústav Mikroelektroniky
Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií
Vysoké učení technické v Brně
Technická 2082/10
616 00 Brno
Tel.: 737 351 901
E-mail: pavel.neuzil@ceitec.vutbr.cz

Autor působí a podílí se na práci VUT FEKT a CEITEC od roku 2011. Před tím absolvoval inženýrské a doktorandské studium na FEL ČVUT, která dokončil v roce 1987 a 1995. Po ukončení studia autor pracoval v různých výzkumných ústavech a univerzitách, jako je Ústav radiokomunikace A.S. Popova v Praze, University of Illinois at Chicago a Stanford University, obě USA, Institute of Microelectronics a Institute of Bioengineering and Nanotechnology, obě Singapur, KIST-Europe (Německo) a Northwestern Polytechnical University v X'an (ČLR).

V rámci své pedagogické činnosti vede autor studenty magisterského a doktorského studia a výuku v mezioborových předmětech jako je mikrofluidika, kde se jedná o kombinaci fyziky, fyzikální chemie, molekulární biologie, MEMS technologií a instrumentace. Autor také učí moderní metody „full custom design“ layoutu MEMS a mikrofluidických součástek. Součástí výuky jsou praktika, kde studenti používají vysoce výkonné mikroskopy na sledování jevů v mikrofluidních kanálech.

Autorova vědecká práce se zpočátku týkala elektrického inženýrství, a to vývoje technologií typu CMOS a biCMOS, dále výkonových součástek, jejich výroby a testování. Pak ho začaly zajímat MEMS součástky a chemická a fyzikální čidla. Pro Office of Naval Research (ONR), USA vyvinul systém na bezkontaktní detekci mechanického napětí uvnitř pláště ponorek, skener elektromagnetického pole pro Defense Advanced Research Project Agency (DARPA). S prof. G. Kinem vyvinuli magnetooptický záznamový systém nové generace založený na Kerrově jevu. V „Institute of Microelectronics“ v Singapuru autor vedl tým, který vyvíjel kameru na noční vidění a inerciální čidla založená na MEMS strukturách. V „Institute of Bioengineering and Nanotechnology“ autor vedl tým, který vyvíjel přenosné systémy PCR na včasnou detekci infekčních chorob, jako je ptačí chřipka a SARS. V KIST-Europe vedl tým, který vyvíjel mikrofluidické systémy pro vývoj léků, separační techniky a přenosné systémy pro diagnostiku infekčních chorob a pyrosekvenování. V minulosti se také zabýval nanotechnologiemi, jako jsou uhlíkové nanotrubičky, křemíkové nanodráty a dále přírodní systémy, jako přilnavý systém gekona a povrch listů lotosu.

Nejvíce si autor cení objevení kapilárních sil jako dominantních sil způsobující přilnavost gekona a metodu na její přesné stanovení. Dále vývoje rychlého a laciného systému pro PCR, v současnosti držícího primát „nejmenší na světě“.

1 Předmluva

Profesorská přednáška pokrývá několik oborů, ve kterých jsem aktivní s velkou podporou svých spolupracovníků. Výsledkem našeho snažení je několik unikátních systémů, o kterých budu ve své přednášce hovořit.

2 Úvod

V minulých desetiletích se překotně rozvíjely nanotechnologie, a to jak na základě uhlíku, od fulerenů (uhlík 60), přes uhlíkové nanotrubičky (CNT) až po grafen a také 2D materiálů založených na dalších prvcích či sloučeninách. Po objevu fulerenů nastala až hysterie, že máme k dispozici unikátní materiál vhodný skoro na vše. To se opakovalo v podstatě stejně po objevu uhlíkových trubic a stejně tak po objevu grafenu. Každopádně se jedná o materiály s unikátními vlastnostmi, ať už jsou to mechanické, elektrické nebo povrchové a má cenu se jim věnovat. V této práci se zmíním o využití integrované vrstvy CNT na bolometrech pro detekci infračerveného záření a jednoduché metodě měření jejich elektrických, mechanických a povrchových vlastností.

Podobně se rozvíjely další obory na základě planárních technologií pro výrobu integrovaných obvodů, jako jsou mikroelektromechanické systémy (MEMS) a z nich odvozená mikrofluidika. Můj tým se zabývá mezioborovým studiem teploty buněk na základě mikrokalorimetrů. Jsou to teplotně izolované struktury s možností přesného snímání teploty na nich. Zde spojujeme mnohaleté zkušenosti s měřením IR bolometrů, MEMS technologií, fyziky, přenosu a sdílení tepla, optiky, mikroskopie, znalosti instrumentace, elektrického a strojního inženýrství, chemie a biochemie. V současné době pomocí mikrokalorimetru měříme reakční kinetiku rozkladu peroxidu vodíků pomocí nanorobotů.

Další oblastí, ve které pracuji, je molekulární diagnostika. Konkrétně mě zajímá polymerázová řetězová reakce v reálném čase (qPCR). Vyvinuli jsme nejmenší qPCR, které váží asi 100 gramů a bude se testovat v Ústřední Vojenské Nemocnici na polní detekci patogenů. Dále pracujeme na vývoji digitálního PCR, které je schopné zjišťovat absolutní počet molekul DNA ve vzorku, stejně tak detekovat vzácné DNA.

Elektrochemií se také zabývám hodně dlouho, v rámci této přednášky se zmíním o systému na multiplexovanou elektrochemickou detekci a dále budu hovořit o polích nanostrukturovaných zlatých elektrod na detekci těžkých kovů, jako je arzén.

1 Uhlíkové nanotrubičky pro detekci infračerveného záření

Detekce infračerveného záření v oblasti vlnových délek od 8 μm do 14 μm známé také jako termovize našla široké uplatnění v mnoha oblastech inženýrství a v živé i neživé vědě. Termovize, ať s využitím chlazeného senzoru nebo pracujícího při pokojové teplotě, se využívá pro preventivní kontrolu elektrických zařízení, noční vidění, v medicínských aplikacích a pro bezpečnostní a vojenské účely¹. Pro detekci emitovaného tepla se skládají nechlazené bolometry² do matic nazývaných “focal plane arrays (FPA)”. Jedná se o třídu integrovaných dvourozměrných systémů, kde jsou MEMS bolometry a pod nimi jsou elektronické obvody, které multiplexují signály bolometrů, případně je také zpracovávají do vhodného výstupního video signálu. Systémy založené na bolometrech mají na rozdíl od kryogenicky chlazených systémů řadu výhod jako vysokou spolehlivost, nízkou spotřebu elektrické energie a malé rozměry.

Moderní bolometry pracující za pokojové teploty jsou založeny na tepelně izolované membráně integrované s čidlem teploty. Dopadající záření na membránu tuto membránu zahřívá a její změna teploty (ΔT_{IR}) odpovídá amplitudě záření (P_{IR}) absorbované v membráně:

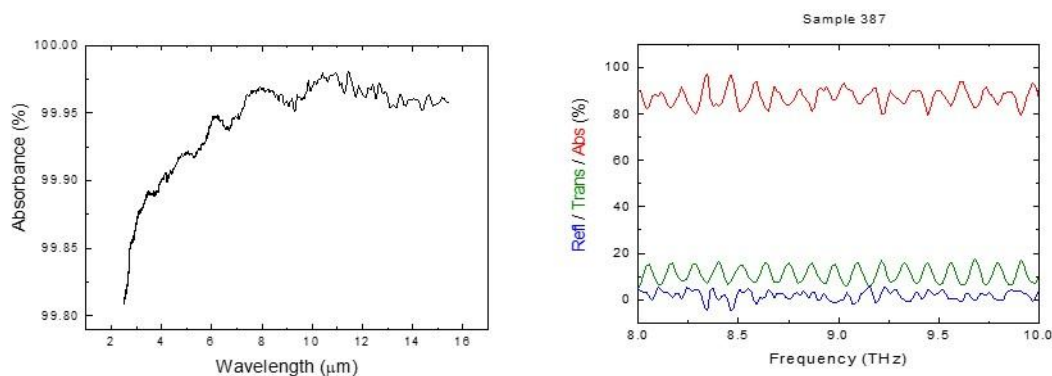
$$\Delta T_{\text{IR}} = \frac{P_{\text{IR}}}{G}, \quad (1)$$

kde G je tepelná vodivost mikrobolometru.

FPA matice se hromadně vyrábí na křemíkových substrátech technologií “complementary metal-oxide-semiconductor (CMOS)” a po vyrobení CMOS obvodu se na stejném substrátu nad CMOS obvodem vyrobí membrány mikrobolometrů integrované s čidly teploty MEMS technologiemi. Čidla jsou pak mechanicky i elektricky spojena s CMOS obvodem. Membrána mikrobolometru je vyrobena s materiály kompatibilními s CMOS technologiemi, jako jsou SiO_2 , Si_3N_4 , $\alpha\text{-Si}$ or $\alpha\text{-SiGe}$. Absorpce IR (η) v zájmové oblasti od 8 μm do 14 μm v těchto materiálech závisí na jeho složení a tloušťce. Například SiO_2 s tloušťkou $\approx 0.6 \mu\text{m}$ má velikost η v rozmezí od $\approx 35\%$ ³ to $\approx 48\%$ ⁴. Klíčový problém je zvýšení velikosti η za použití CMOS kompatibilního procesu. Byla vyvinuta řada technik za účelem zvýšení η , ale vesměs docházelo k neúměrnému zvýšení ceny výrobního procesu a jeho komplexitě.

Vertikálně srovnané CNT (VACNT) jsou od pohledu zajímavé tím, že jsou tak černé, takže je například vůbec není možné pozorovat optickým mikroskopem neboť množství světla, které odrážejí zpět, je tak zanedbatelné, že nejsou vůbec vidět (Obrázek 1).

VACNT využití pro absorpci IR radiace byly poprvé implementovány na pyroelektrické detektory⁵, což vyvolalo zájem o jejich využití na absorpci elektromagnetické radiace^{6,7}.



Obrázek 1 (vlevo) Absorpce záření v pásmu od 2,5 μm do 15 μm v VACNT a (vpravo) v pásmu THz (nepublikované výsledky autora).

Řízený růst VACNT vyžaduje využití reaktoru na depozici z chemických par (CVD) při teplotě nad $550\text{ }^{\circ}\text{C}$ ⁸ po té, co se materiál potřebný pro katalytický růst CNT litograficky vytvaruje⁹. Nejvyšší teplota, které je možné obvody CMOS vystavit, je obvykle $475\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo méně. Je to hodnota tání eutektické slitiny Al-Si v kontaktech CMOS součástek. Moderní CMOS čipy používající bariérové materiály jako je TiSi_2 , TaN a NiSi ¹⁰ či jiné mezi Al a Si mohou být ohřáty i na vyšší teplotu. Ohřev CMOS obvodů na teplotu $550\text{ }^{\circ}\text{C}$ ⁸, potřebnou pro růst VACNT je krajně nežádoucí, a je tedy potřeba najít jinou cestu pro vytvoření VACNT na membránách bolometrů. Jeden z možných způsobů byl publikován Shulakerem a kolegy¹¹. Dokázali pomocí složitého procesu narůst CNT na jednom substrátu a pak je přenést na jiný čip s CMOS obvodem. Není to ale vůbec jednoduchý způsob a pro bolometry se nehodí.

V naší práci jsme ukázali, že je možné lokálně ohřát membránu bolometru pomocí Joulova tepla na tak vysokou teplotu, že je na ní možné nechat narůst VACNT s vysokou IR absorpcí. V celé době tohoto procesu jsme udržovali vlastní čip při pokojové teplotě, takže není problém tuto metodu implementovat pro FPA s CMOS obvody.

1.1 Návrh a výroba mikrobolometru

Mikrobolometr jsme navrhli pomocí softwaru Nanolithography Toolbox¹² s rozměry membrány $40\text{ }\mu\text{m} \times 40\text{ }\mu\text{m}^4$ a s použitím podobného procesu jako dříve. Mikrobolometry jsme vyrobili technikou “bulk micromachining” s membránou z SiO_2 a s integrovaným odporovým čidlem teploty (RTD) vytvořené z tenké vrstvy Ti. Titan má vhodné vlastnosti pro tuto funkci, má slušný teplotní koeficient odporu (α) a velmi nízký koeficient tepelné vodivosti. Před předposledním výrobním krokem, což bylo podleptání membrány, jsme změřili vlastnosti čidla teploty, jako je jeho parametr α a odpor při teplotě $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ (R_0). Desky jsme položili na plotnu s řízenou teplotou a zjistili jsme, že hodnoty R_0 a α jsou $(7,726 \pm 0,250)\text{ k}\Omega$ a $(0,53 \pm 0,01)\text{ m}\cdot\text{K}^{-1}$, obě hodnoty představují (střední hodnotu \pm směrodatnou odchylku). Následně jsme podleptali membrány pomocí par XeF_2 , čímž jsme pod membránami odstranili Si. CNT vrstva pak byla vytvářena na individuálních čipech.

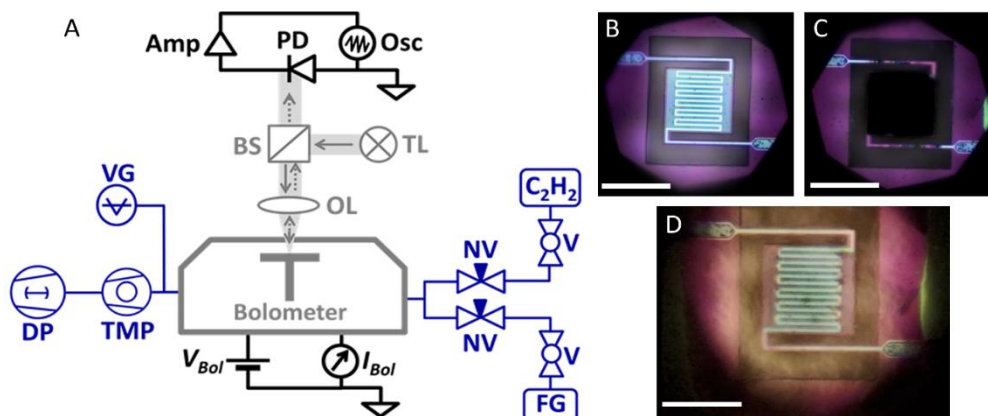
1.2 Charakterizace mikrobolometru

Poté, co jsme podleptali membrány mikrobolometrů, jsme čipy přilepili do pouzder pro integrované obvody typu LCC 68 a elektricky jsme k nim připojili mikrobolometry pomocí ultrazvuku Al drátky o průměru $25\text{ }\mu\text{m}$. Tato pouzdra s mikrobolometry jsme umístili do vakuové komory s oknem z Ge a tlakem $\approx 7,7 \times 10^{-4}\text{ Pa}$. Použili jsme stejnou metodu, popsanou Gu a dalšími¹³ s použitím dlouhého elektrického pulsu o amplitudě (V_b) $\approx 0,6\text{ V}$ na extrakci parametrů bolometru. Z výsledků měření a předchozí znalosti R_0 a α jsme spočítali teplotní kapacitu mikrobolometru (H), G a tepelnou časovou konstantu ($\tau = H/G$). Z měření na třech bolometrech jsme zjistili následující hodnoty parametrů: $H = (3,113 \pm 0,009)\text{ nJ}\cdot\text{K}^{-1}$, $G = (160,9 \pm 2,7)\text{ nW}\cdot\text{K}^{-1}$ a $\tau = (19,35 \pm 0,34)\text{ ms}$, vše uvedeno ve tvaru (střední hodnota \pm směrodatná odchylka).

Při konstantním tlaku $\leq 5\text{ Pa}$ a teplotě okolí $\approx 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ je tepelná ztráta způsobená konvekcí a radiací zanedbatelná a hodnota G je daná pouze tepelnou vodivostí nohou mikrobolometru (P_C)¹⁴. Jakmile se ale membrána mikrobolometru zahřeje Joulovým teplem (P_J), ztráty způsobené radiací (P_R) dané Stefan-Boltzmannovým zákonem nemohou být dále zanedbávány.

Amplituda P_J je pak rozložena v ustáleném stavu mezi P_R a P_C :

$$P_J = P_R + P_C = A \cdot \cdot \cdot T^4 + G \cdot \Delta T, \quad (2)$$

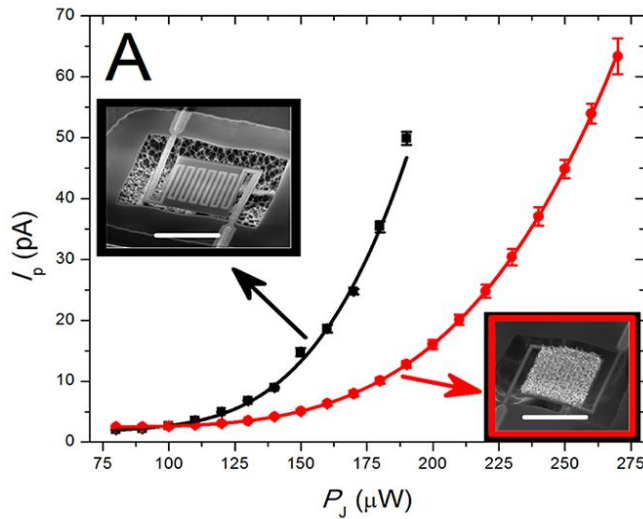


Obrázek 2 Schéma aparatury na depozici CNT metodou CVD z par acetylénu v proudu vodíku (A) . Fotografie pomocí optického mikroskopu membrány mikrobolometru před (B) a po (C) depozicí CNT. Obrázek z videa v době růstu CTN (D). Bílá čára v (B)- (D) představuje délku $\approx 40 \mu m$.

kde $A = 2 \cdot a^2$ je součet horní i dolní plochy čtvercové membrány bolometru o straně a , ϵ je emisivita materiálu membrány bolometru, σ je Stefan-Boltzmanova konstanta, T je termodynamická teplota a ΔT je rozdíl teplot mezi teplotou membrány bolometru a substrátem. Z odezvy na obdélníkový napěťový puls¹³ jsme spočítali hodnoty $G = (180,4 \pm 1,2) \text{ nW} \cdot \text{K}^{-1}$, $H = (3,602 \pm 0,024) \text{ nJ} \cdot \text{K}^{-1}$ a $\tau = (19,96 \pm 0,02) \text{ ms}$ (všechny hodnoty jsou střední hodnota \pm chyba fitování).

1.3 Monitorování růstu CNT

Zapouzdřený bolometr jsme umístili do vakuové nádoby (Obrázek 2) v prostředí acetylénu. Při tlaku ≈ 5 Pa jsme membránu bolometru zahřáli Joulovým teplem o hodnotě $\approx 650 \mu\text{W}$ a pozorovali mikroskopem růst CNT. Výsledky jsme buď



Obrázek 3 (A) Měření fotoemise jako funkce Joulova tepla rozptýleného v membráně bolometru. (B) Obrázek z optického mikroskopu ukazuje žhnoucí membránu bolometru. Bílé čáry představují délku $40 \mu\text{m}$.

zaznamenávali videokamerou, nebo jsme měřili foto proud fotodiody, který odpovídal emisi záření ve viditelné oblasti z membrány bolometru a tudíž i její teplotě. Zajímavé bylo, že v průběhu růstu CNT klesala teplota membrány bolometru, i když na ní byl celou dobu rozptýlován výkon $\approx 650 \mu\text{W}$. Je to dané rovnicí 2, protože se postupně zvyšuje emisivita povrchu a tím pádem se celkově fotoemisí ztrácel větší výkon, v důsledku čehož klesala teplota membrány bolometru.

Po dokončení růstu CNT jsme změřili amplitudu fotoemise z bolometru pomocí fotodiody na c-mount portu mikroskopu jako funkci rozptýleného výkonu v membráně bolometru. Došlo opět k potvrzení předchozího závěru, že membrána bolometru vyzařuje více tepla, pokud má na povrchu vrstvu CNT s vysokou emisivitou (Obrázek 3).

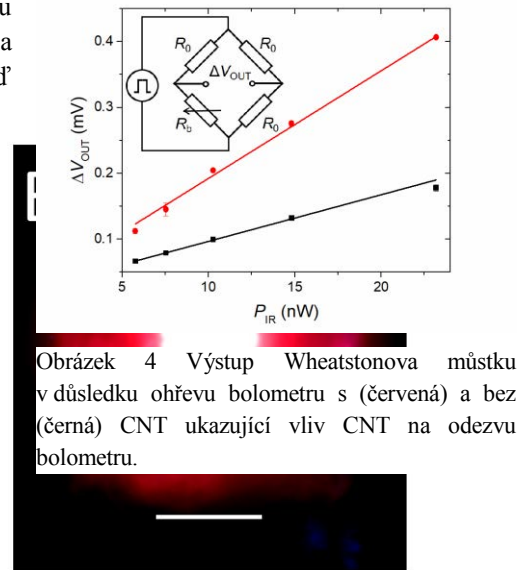
1.4 Vlastnosti vrstvy CNT

Bolometr připojený do vyváženého Wheatstonova můstku jsme umístili do vakuové komory a monitorovali jeho odezvu na P_{IR} , která byla řízena vzdáleností bolometru od absolutně černého tělesa (D) s teplotou $T = 673,15 \text{ K}$. Hodnota D byla $D \approx (59,5; 74,5; 89,5; 104,5 \text{ a } 119,5) \text{ mm}$. P_{IR} byl odhadnut pomocí rovnice⁴

$$P_{\text{IR}} = a^2 \cdot \varepsilon_{\text{bb}} \cdot \tau_{\text{F}} \cdot M \left[\frac{\left(\frac{d}{2}\right)^2}{D^2 + \left(\frac{d}{2}\right)^2} \right], \quad (3)$$

kde ε_{bb} je emise černého tělesa s amplitudou $\approx 0,95$ (hodnota od výrobce černého tělesa), τ_{F} je průměrná experimentálně určená propustnost Ge okna s hodnotou $\tau_{\text{F}} \approx 0,76$, M je integrovaný výstup radiantu černého tělesa podle Planckova zákona o záření s amplitudou $\approx 2588 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ a $d \approx 10,5 \text{ mm}$ je průměr otvoru černého tělesa. Odezva bolometru na IR je definována jako:

$$\mathfrak{R}_{\text{IR}} = \frac{\Delta V_{\text{out}}}{P_{\text{IR}}}. \quad (4)$$



Obrázek 4 Výstup Wheatstonova můstku v důsledku ohřevu bolometru s (červená) a bez (černá) CNT ukazující vliv CNT na odezvu bolometru.

Naše výsledky ukazují, že přidáním vrstvy absorbující CNT se hodnota \mathfrak{R}_{IR} zvýšila o faktor $(2,3 \pm 0,1)$ (střední hodnota \pm směrodatná odchylka) (Obrázek 4Obrázek 4).

1.5 Závěr

Naše práce, která je zde prezentována, poprvé demonstrovala růst CNT na povrchu mikrobolometrických membrán na substrátu o pokojové teplotě. Využitím tepelně izolované mikrobolometrové membrány pro růst CNT umožňuje tuto vrstvu absorbující IR záření integrovat s CMOS obvody včetně FPA. Naše výsledky vykazují $\approx 2,3$ násobný nárůst hodnoty \mathfrak{R}_{IR} s maximální hodnotou \mathfrak{R}_{IR} $(16,35 \pm 0,48) \text{ kV} \cdot \text{W}^{-1}$. Tato absorpce, která je prakticky 100%, je dána výhradně CNT vrstvou bez ohledu na materiál membrány, její tloušťku, a dutinu pod ní atd. Jedná se o velmi slibnou techniku růstu vrstev absorbující IR, jako je CNT na membránách bolometrů a tím se otevírá možnost jejich aplikací pro efektivní detekci IR jak na relativně jednoduchých individuálních bolometrech, tak i na komplikovanějších FPA.

2 Mikrokolorimetrie

Mikrokolorimetrie je široce používána k měření a charakterizaci změny entalpie chemických a biochemických reakcí. V tomto přehledu proberu pokrok ve vývoji vysoce výkonných mikrokolorimetrů vyrobených technologií MEMS od návrhu čipů, přes manipulaci s tekutinami až po měření teploty s důrazem na návrh čipů. Dále představím několik aplikací a porovnáám jejich parametry. Nakonec prodiskutuji trendy a vyhlídky mikrokolorimetrů pro vysoce výkonné aplikace, jako jsou měření entalpie v miniaturních objemech chemikálií vhodných k výzkumu nových léků, pro bio-aplikace, jako je sledování energetické bilance živých buněk a monitorování jejich termogeneze.

2.1 Úvod

Kolorimetrie je technika měření změn stavu kapaliny pro určení hodnoty přenosu tepla spojeného s těmito změnami, jako jsou fyzikální změny, chemické a biochemické reakce, jakož i sledování buněčné biologie¹⁵⁻¹⁸. Kolorimetr je založen buď na monitorování, nebo regulaci teploty v tepelně izolovaném systému vybaveným teplotním čidlem. Metoda kolorimetrie je známa od roku 1761, kdy ji vynalezl Joseph Black. Od té doby prošla dramatickým vývojem, zlepšením jejich parametrů a stala se "zlatým standardem" pro charakterizaci molekulárních interakcí, pro vyhodnocení entalpie, entropie, volné Gibbsovy energie, specifického tepla a mnoha dalších parametrů¹⁹.

Existuje mnoho typů kolorimetrů založených na měření toku tepla, tepelné bilance, kompenzace výkonu a tepelného toku. Nejčastěji používanými metodami jsou diferenční skenovací kolorimetrie (DSC)²⁰ a izotermická titrační kolorimetrie (ITC)²¹.

Aplikace konvenčních kolorimetrů²² vede k určení termodynamických parametrů s vysokou spolehlivostí a reprodukovatelností. Bohužel velká spotřeba objemu vzorku neúměrně zvyšuje cenu kolorimetrie. Kromě toho také způsobuje dlouhou dobu měření a tím pádem nízkému počtu zpracovaných vzorků.

Několik výzkumných skupin pracuje na zlepšení citlivosti kolorimetrů pro zpracování malých vzorků, jako je například malý kousek svalového řezu o velikosti ≈ 1 mm pro měření tepelné bilance při elektricky stimulované práci svalů. Dosáhli tepelného rozlišení (ΔT) v rozsahu mK s kolorimetrem obklopeným vzduchem²³. Další zvýšení citlivosti by vyžadovalo menší kolorimetr a přechod od svalového řezu na práci s jednotlivými buňkami, což je extrémně náročná úloha pro běžný kolorimetr. Konvenční kolorimetry nejsou také praktické pro stanovení kinetiky enzymatických reakcí nebo pro zkoumání dalších biologických reakcí kvůli jejich velké spotřebě a nedostatečné citlivosti.

Mikrokolorimetry (μC) jsou vyráběné pomocí MEMS technologií. Tyto technologie dosáhly v posledních letech výrazného pokroku a je možné pomocí nich vyřešit problémy, které mají konvenční kolorimetry. μC má samozřejmě podstatně menší rozměry než klasický kolorimetr, s čímž souvisí jejich podstatně menší tepelná kapacita a také spotřeba vzorku. Dále je možné je řadit paralelně a tím významně zvýšit počet měření za jednotku času. Nízké náklady na jejich sériovou produkci mohou dosáhnout toho, že budou μC vyráběny na jedno použití, čímž se kompletně eliminuje kontaminace vzorku v μC čipu. Nicméně, μC mají také problémy. Za prvé, μC mají vyšší poměr povrch/objem než konvenční kolorimetry, což vede k vyšším tepelným ztrátám. Menší množství vzorku také znamená menší změnu teploty/výkonu a z toho plyne, že je zapotřebí citlivější čidlo teploty. Také odpařování vzorku v době měření, tepelné ztráty a omezená tepelná kapacita mohou ovlivnit přesnost měření.

V tomto přehledu se zaměřuji na nejmodernější, vysoce výkonné μC a jejich aplikace v analytické, bioanalytické chemii a v buněčné biologii. Nejprve projdu základní způsoby konstrukce μC včetně tepelné izolace, možné manipulace s tekutinami a použité senzory teploty. Pak se budu věnovat publikacím z posledních deseti let s typickými aplikacemi a dále porovnáám typy μC , objemy vzorků a jejich vlastnosti. Nakonec se budu zabývat způsoby, jak je možné zlepšit stávající parametry, které by mohly vést k vývoji μC s rozlišením výkonu

lepším než pW, potřebným pro monitorování termogeneze, což je problematika, která mně dlouhodobě velmi zajímá.

2.2 Návrh velmi citlivého μC

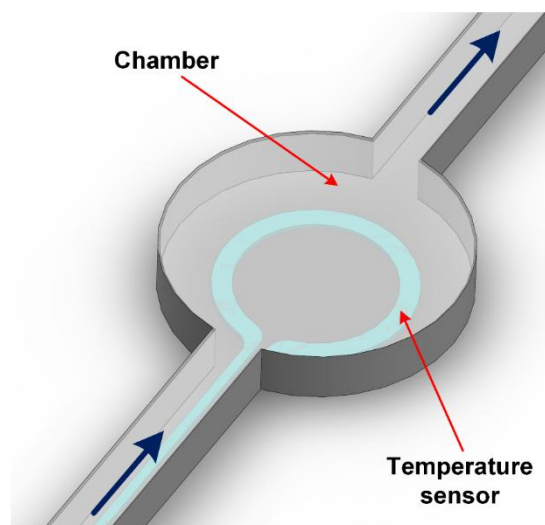
Na začátku této sekce tezí přednášky bych rád zdůraznil, že principy, které se uplatňují v návrhu bolometrů, jsou prakticky totožné s principy v návrhu μC , o fyzikálních principech se dokonce dá říci, že jsou totožné.

μC má čtyři základní části, které v konečném důsledku určují jeho parametry: reakční komora, její tepelná izolace, manipulace s tekutinami a citlivost čidla teploty (Obrázek 5). Absolutně klíčový parametr je ale tepelná vodivost kalorimetru (G), která určuje jeho odezvu na změnu rozptýleného výkonu v kalorimetru podle rovnice

$$\Delta T = \Delta P / G, \quad (5)$$

kteřá ukazuje, že nižší hodnota G vede k větší změně teploty (ΔT) se stejnou změnou výkonu v μC (ΔP). Cílem je tedy vytvořit μC s hodnotou G co nejmenší.

Existují čtyři typy tepelných ztrát v μC , ze kterých se v konečném důsledku skládá amplituda G : ochlazování vzorku v důsledku odpařování, tepelného vedení, konvekce a vyzařování. Odpařování vzorku v μC může významně ovlivnit experiment a samozřejmě způsobí chybu měření. Tento problém může být odstraněn použitím uzavřených mikrokanálů, kde k odpařování nedochází. Jakmile je tento problém vyřešen, hlavní složka G je vedení tepla vzduchem obklopující komoru μC , materiál spojující komoru se substrátem, mikrofluidní kanály naplněné vzorkem a elektrické vývody. Vysoce citlivé μC jsou provozovány ve vakuu, čímž se odstraní problém s tepelnou vodivostí vzduchu a s tím spojenou konvekcí. Nižší tepelná fluktuaace μC také dramaticky snižuje vliv okolního prostředí na tepelnou stabilitu (šum) μC . Poté zůstává už jen jediná tepelná ztráta, kterou je vyzařování. Tato složka ale nezpůsobuje významnou chybu měření a je obvykle zanedbávána, dokud se bude pracovat s konstantní teplotou²⁴. Efekt vyzařování je navíc možný potlačit prací s μCs v diferenčním režimu²⁴.



Obrázek 5 Zjednodušený obrázek mikrokalorimetru. Tmavomodrá šipka ukazuje směr proudění kapaliny.

Vedle vlivu vzduchu je tepelná vodivost μC daná tepelnou vodivostí a přenosem tepla mikrofluidními kanály a komorami naplněnými vzorkem. Tyto komponenty jsou typicky vyrobeny z materiálu s nízkou tepelnou vodivostí a minimálním průřezem. Také je nutné dbát na výběr vhodných materiálů s minimální tepelnou vodivostí pro elektrické připojení k teplotnímu čidlu, které je v komoře μC .

Rychlost odezvy μC na změnu parametrů uvnitř je dalším důležitým parametrem a je určen jeho H a G , jejichž poměr určuje τ jako

$$\tau = \frac{H}{G}. \quad (6)$$

Rychlé systémy vyžadují buď nižší hodnotu H nebo vyšší hodnotu G . Snižování H je velmi výhodné, protože neovlivňuje negativně odezvu systému, stejně jako adekvátní zvyšování velikosti G rovnice (6). Snižování hodnoty H může být dosaženo navržení reakční komory s menším objemem. Ačkoli to znamená použití menšího objemu čidla, menší objem komory vede k nižší amplitudě ΔP a tím k menší hodnotě ΔT , která vyžaduje vyšší citlivost teplotního čidla. Kromě toho tím také získáme méně příznivý poměr povrch/objem, což má v konečném

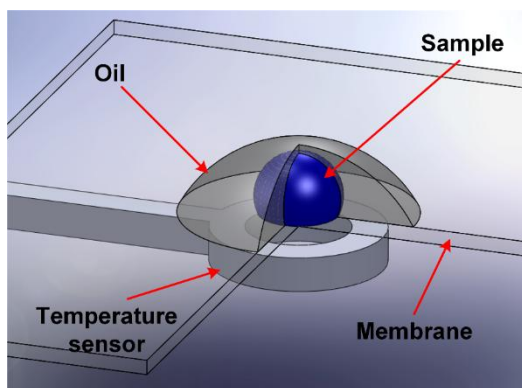
důsledku za následek poměrně vysokou složku tepelných ztrát způsobených vodivostí, konvekcí a zářením. Zároveň omezená tepelná kapacita negativně ovlivňuje přesnost měření.

2.2.1 Komora μC

Klíčovou částí každého μC je reakční komora, kam je uveden vzorek a kde nastává jeho zpracování. Na základě způsobu manipulace s kapalným vzorkem mohou být komory rozděleny do dvou typů: otevřené a uzavřené. Oba typy mají místo, kde jsou umístěny reakční komory a čidla teploty. V otevřené komoře μC^{25-29} jsou kapičky vzorku přímo přiváděny mikropipetou nebo inkoustovou tryskou, takže reakce nastává při vystavení vzduchu z okolí. Naproti tomu u uzavřených komor μC^{30-33} se vzorky zavádějí do komory uzavřenými mikrofluidními kanály.

2.2.2 Tepelná Izolace

V otevřené komoře μC může odpaření vzorku významně ovlivnit experiment, což vede k chybě měření. To může být eliminováno použitím virtuální reakční komory (VRC), kde je vzorek umístěn v minerálním oleji (Obrázek 6). Tento VRC systém je používán pro provádění polymerázových řetězových reakcí³⁴⁻³⁶, štěpení sporů³⁷ a pyrosekvenování³⁸. Kromě toho, koncept uzavřené komory může snadno vyřešit problém odpařování tím, že umožní zpracování vzorku, jeho míchání a reakci s vyloučením odpařování.



Obrázek 6 Schématické znázornění VRC

Jakmile je problém odpařování vyřešen, primární zdroj tepelných ztrát je způsoben tepelnou vodivostí materiálu, který spojuje komoru se substrátem, a dále také mikrofluidními kanály naplněnými vzorkem a elektrické vodiče.

S vývojem MEMS technologií byly pro μC používány tradiční materiály jako Si, SiO_2 a nitrid křemíku (Si_3N_4)^{31,39-41}. I když vyrobené μC byly funkční, jejich parametry nebyly pro mnoho aplikací vyhovující. Za účelem zlepšení jejich parametrů, jako je například menší tepelná vodivost, μC začaly být vyráběny z polymerů. Staly se oblíbenými materiály pro technologie μC vzhledem k jejich nízké tepelné vodivosti ve srovnání s tepelně vodivým křemíkem a jinými anorganickými materiály (tabulka 1). Mezi polymery používané při výrobě μC patří Parylen, polydimethylsiloxan (PDMS), polymethylmetakrylát (PMMA), SU-8 a polyimid^{19,32,33,42-44}. Tyto materiály zajišťují lepší tepelnou izolaci v důsledku nižší tepelné vodivosti a kapacity. Polymery jsou také flexibilní, jedná se o levné materiály a mohou být vyrobeny jednoduchým výrobním procesem. Některé z nich jsou také biokompatibilní.

Parylen se jako materiál pro výrobu vysoce výkonných μC těší zvláštnímu zájmu díky své úžasné nízké tepelné vodivosti, která je pouze $\approx 3,15$ krát vyšší než má vzduch³⁰. Parylen je možné nanést s tloušťkou pod $1 \mu\text{m}$ a vzniklá vrstva je konformní a neobsahuje díry obvyklé pro vrstvy jako je SiO_2 . Jedná se o chemicky inertní materiál s nízkou propustností pro plyny. Dokonce i vrstvy o tloušťce několika μm mohou vydržet vakuové zapouzdření se zanedbatelnou deformací, a proto parylen může být použit pro výrobu vysoce výkonných μC pro sledování bioreakcí, jako je metabolismus buněk a proteinové vazby^{17,33}.

2.2.3 Manipulace s kapalinami

Každý μC pracující s tekutinami, což jsou prakticky všechny, musí mít vyřešen systém dodávání tekutin. V otevřených komorách μC jsou vzorky v kapkách s objemy v rozmezí od stovek pL do několika μL a jsou přiváděny přímo mikropipetou nebo hlavou inkoustové tiskárny (inkjet) a poté míchány pomocí magnetů⁴⁵ nebo

Tabulka 1 Tepelné vlastnosti materiálů používaných pro výrobu μC^{24}

Materiál	Tepelná vodivost ($\text{W}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$)	Specifické teplo ($\text{J}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$)
Si	130	710
Si_xN_y	15-30	700
PDMS	0,15	1460
PMMA	0,19–0,24	1465
Parylene	0,082	710
SU-8	0,20	1500
Polyimide	0,12	1090
Voda	0,58	4186
Vzduch při tlaku 1 bar	0,026	1010
Nerezová austenická ocel	11–16	450–550
Au	315	130
Ni	90,7	440
Ti	19-23	520

metodou „eletrowetting”⁴⁶. Mikropipety jsou pomalé a nemohou současně zpracovávat více vzorků, zatímco inkjet může dodat vzorky s vysokou výkonností a přesností. Rychlá dodávka vzorku však má zároveň velkou kinetickou energii, která vytváří další teplo a mechanické narušení systému. Magnetické ovládání kapek je poměrně pomalá metoda a má problém s paralelním zpracováním vzorků. Metoda elektrowetting je schopna paralelního zpracování vzorků, ale nevýhodou je složitější substrát nepříliš vhodný pro μC .

Vzorky se do uzavřených komor μC obvykle dostávají mikrofluidními kanály ovládanými čerpadly. Reakční objem je přesně určen objemem reakční komory. Kanály připojující komoru by měly mít minimální průřez, aby se snížila tepelná vodivost. Minimální průřez kanálu však znamená velkou tlakovou ztrátu, která by v případě práce s buňkami je mohla poškodit. Je třeba zvolit kompromis mezi minimální tepelnou vodivostí a tlakovým rozdílem (Δp) podle Hagen-Poiseulovy rovnice:

$$\Delta p = \frac{8\mu \cdot L \cdot Q}{\pi \cdot R^4}, \quad (7)$$

kde μ je dynamická viskozita kapaliny, L je délka kanálu, Q je objemový průtok a R je poloměr kanálu za předpokladu, že má kanál kruhový průřez. Průřez kanálu je pak nutné zvolit s ohledem na maximální velikost Δp s dostatečnou amplitudou Q pro plánované experimenty. Pokusy s živými buňkami mají také požadavky na minimální šířku kanálu, aby se minimalizoval vliv smykové síly na buňky. Uzavřené komory μC jsou nicméně výkonná zařízení pro přesné zacházení se vzorky a jejich tepelnou charakterizaci.

2.2.4 Měření teploty

Klíčovým požadavkem na přesné kalorimetrické měření je stabilita a citlivost čidla teploty v μC , která sleduje buď ΔT nebo požadovanou ΔP při konstantní teplotě. Tři nejčastější typy čidel teploty jsou termočlánky, termistory a RTD.

Termočlánky jsou elektrická zařízení sestávající ze dvou kovů s různými Seebeckovými koeficienty (S) a se dvěma spoji umístěnými při různých teplotách. Vytváří stabilní rozdíl napětí, který je úměrný ΔT mezi horkým a studeným koncem kvůli rozdílným hodnotám kovů S . Teplotní citlivost termočlánků může být zvýšena spojením v sérii nazývaných "termopile"^{39,40,42,43,47-49}. Další výhodou termočlánku je skutečnost, že se při jeho použití prakticky nehřeje, protože na něm pouze měříme napětí pomocí voltmetru s vysokou vstupní impedancí,

tudíž neexistuje žádný významný proud tekoucí termočlánkem. Termočlánky se vyrábí vakuovým napařováním nebo naprašováním vhodných kovů za použití nízké teploty, takže je to proces vhodný pro integraci membrán vyrobených z polymeru⁴⁵. Běžně používané kombinace kovů jsou typu Au/Ni³⁰, Ni/Cr⁵⁰, p nebo n typ polykrystalického Si^{39,51,52} a Sb/Bi^{29,40,42,43}. Existuje však několik nevýhod. Za prvé, termočlánky musí být ze dvou různých kovů, což komplikuje jejich výrobní proces. Kromě toho musíme zvolit kovy podle velikosti rozdílů jejich S koeficientů a zároveň použité kovy nesmí být příliš teplotně vodivé. A na závěr, připojení termočlánků v sérii vyžaduje relativně hodně prostoru na čipu μC .

Hodnota odporu termistorů^{19,33,44,53,54} se nelineárně mění s teplotou. Jejich výhoda je jednoduchost výroby a kromě toho potřebují pouze dvě elektrická spojení mezi termistorem v reakční komoře a substrátem, tudíž vyžadují jen malou plochu čipu. Během provozu musí být termistory elektricky napájené, což způsobuje ohřev μC v důsledku rozptýleného Joulova tepla. Tento efekt lze kompenzovat během kalibrace zařízení, jinak by mohl ovlivnit přesnost měření. Některé typické termistory jsou vyrobeny z polykrystalického Si⁵³, $\alpha\text{-Si}$ ¹⁹ a VO_x ^{33,44,54}.

RTD jsou vyrobeny z čistých kovů, jako je Ti, Pt, Ni a Au. Jejich odpor je také funkcí teploty a vztah mezi teplotou a jejich odporem je možné aproximovat polynomem třetího řádu

$$R = R_0(1 + \alpha\Delta T + \beta\Delta T^2 + \gamma\Delta T^3), \quad (8)$$

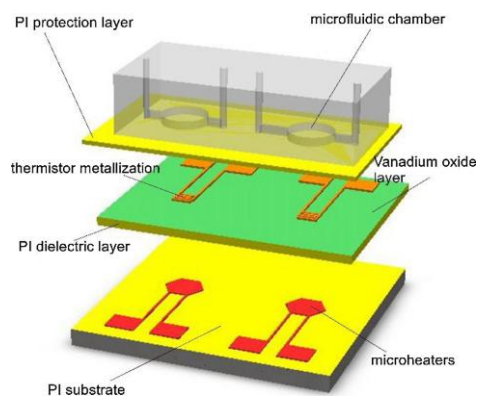
kde R_0 je odpor RTD při 0 °C a α , β a γ jsou koeficienty polynomu. Hodnoty β a γ jsou malé, tedy rovnice (8) je obvykle zjednodušena na

$$R = R_0(1 + \alpha\Delta T). \quad (9)$$

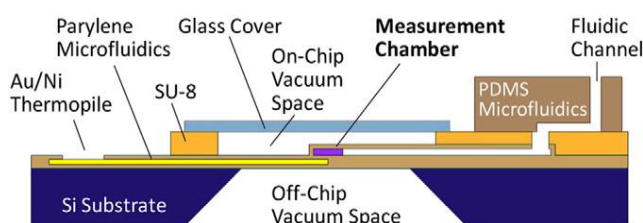
RTD mají ve srovnání s termistory vysokou přesnost, stabilitu a reprodukovatelnost⁴⁵. Kromě toho použití jednoho čistého kovu je jednodušší pro jejich výrobu. Oba typy čidel, ať už termistor, nebo RTD, mohou být připojeny k vyváženému Wheatstonovu můstku pro potlačení vlivu okolí a nežádoucího šumu z okolí^{31,54}. Některé kompenzační systémy byly také použity pro optimalizaci experimentů s konstantním výstupem signálu³³. Tyto metody výrazně zlepšily citlivost, přesnost a stabilitu systémů μC .

2.3 Příklady a aplikace μC

Vysoce citlivé systémy μC mají dobrou tepelnou izolaci, jsou schopné účinné manipulace s tekutinami a jsou vybaveny vysoce citlivým teploměrem schopným rozlišit hodnoty ΔT v desítkách nebo stovkách μK ⁴⁴, což má za následek rozlišení systému a pohledu energie a výkonu v rozsahu nJ a nW, respektive^{30,42,43,54}.

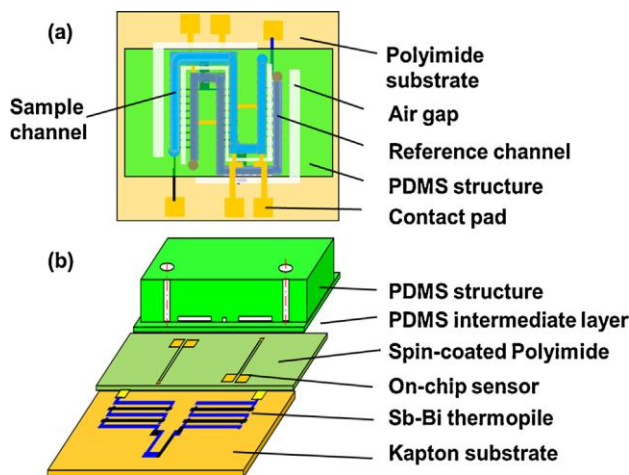


Obrázek 8 Vysoce citlivý μC s kompenzací tepla



Obrázek 7 μC vyrobený z Parylenu umístěný ve vakuu

Typický představitel μC pro biologické a chemické aplikace byl publikován před několika roky (Obrázek 7)³⁰. Čip μC měl uzavřenou komoru o objemu $\approx 3,5$ nL s mikrokanály vyrobenými z parylenu. Pro snímání teploty byl použit termočlánek z Au/Ni. Čerpadlo pro manipulaci s kapalinami bylo vyrobené z PDMS, stejně jako ventily a vstupy/výstupy pro kapalinu. Čip fungoval ve vakuu a měl hodnotu $G \approx 16 \mu\text{W}\cdot\text{K}^{-1}$. Tento μC byl využíván k měření reakčního tepla hydrolýzy močoviny a entalpie míchání vody s metanolem, přičemž bylo dosaženo energetického rozlišení $\approx 4,2$ nW a ≈ 10 nJ.



Obrázek 9 μC vyrobený z polymerů: (a) pohled se zhora, (b) vzduchu isometrický pohled.

mezerou. μC byl použitý k měření změny molární entalpie a teploty “rozbalení” enzymu lysozymu s citlivostí $\approx 4,78 \text{ V} \cdot \text{W}^{-1}$ a detekčním limitem $\approx 10 \text{ nW}^{47}$.

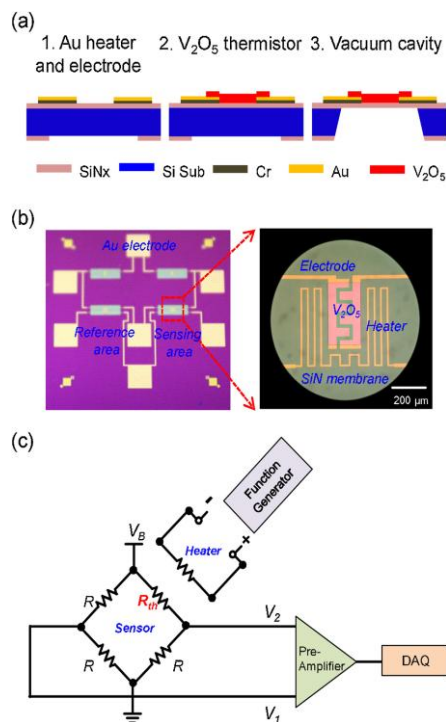
Byl navržen, vyroben a otestován μC s uzavřenou komorou s vysokou citlivostí (Obrázek 10)⁵⁴. Komora byla vyrobena ze zavěšené membrány z Si_xN_y s integrovaným termočlánkem z VO_x s teplotní citlivostí $\approx -2,2\% \cdot \text{K}^{-1}$. μC měl tepelnou vodivost $\approx 12 \mu\text{W} \cdot \text{K}^{-1}$ a odhadovaný limit detekce $\approx 570 \text{ pW}$ (data byla pouze simulována). K potlačení “common mode” a šumu a k zvýšení přesnosti měření byl na čipu μC částečně integrován Wheatstonův můstek.

Byl vytvořen trojrozměrný μC s několika uzavřenými komorami (Obrázek 11)³¹. Každá komora byla zavěšena a uzavřena membránou z Si_xN_y a polyimidovým filmem tvořícím opačnou stranu komory. Tento μC jako čidlo teploty typu RTD využil tenkovrstvý Ni s hodnotou TCR $\approx 0,258\% \cdot \text{K}^{-1}$. Topení a snímač teploty byly integrovány do různých stran reakční komory pomocí MEMS technologie. Vzorky byly vstříkovány do komory a jejich reakce nastávaly v místech mezi topením a čidlem teploty. Toto vedlo ke zvýšení citlivosti systému, což bylo prokázáno měřením tepelných vlastností kapalných vzorků.

Rád bych uzavřel tuto část tezí přednášky. Představil jsem několik typických představitelů μC s vysokou citlivostí včetně aplikací. Jejich srovnání s ohledem na typ komory, objem vzorku, termometrii, tepelnou vodivost, rozlišení a citlivost je souhrnně uvedeno v Tabulce 2.

Stabilita proteinů byla testována na výkonově kompenzovaném μC s uzavřeným kanálem vyrobeným z polyimidu (Obrázek 8)³³. Kanály a komory s objemem $\approx 1 \mu\text{L}$ byly vyrobeny metodou “měkké” litografie z PDMS. Jako čidlo teploty byl použitý termistoru z VO_x a systém měl citlivost $\approx 6 \text{ V} \cdot \text{W}^{-1}$, která byla prokázána na vzorku protilátek IgG1.

Na Obrázek 9 je MEMS μC na bázi polymeru s termočlánkem z Sb/Bi jako teplotním čidlem pro termodynamickou charakterizaci biomolekul^{42,43,47}. Kanály a komory s objemem $\approx 1 \mu\text{L}$ byly vyrobeny z PDMS a polyimidu s tepelnou izolací provedenou

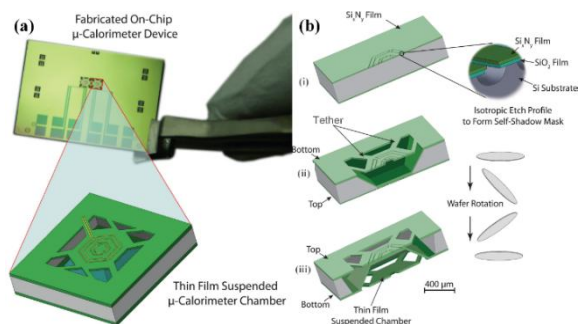


Obrázek 10 μC s uzavřenou komorou s vysokou citlivostí: (a) výrobní proces μC , (b) fotografie vyrobeného čipu, (c) zapojení celého systému do Wheatstonova můstku.

Tabulka 2 Porovnání reprezentativních μC v posledních deseti letech

Work	Materiál membrány	Reakční nádoba		Čidlo teploty		Tepelná vodivost ($\mu\text{W}\cdot\text{K}^{-1}$)	Parametry		Citlivost (V/W)
		Typ	Objem (nL)	Typ	Materiál		Výkon (mW)	Energie (nJ)	
Lee et al. ³²	Parylene	zavřený	3.5	termočlánek	Au/Ni	16	4.2	10	N.A.
Wang et al. ²	Polyimide	zavřený	1000	termočlánek	VO_x	N.A.	N.A.	N.A.	6
Jia et al. ⁴⁴	Polyimide/PDMS	zavřený	1000	termočlánek	Sb/Bi	N.A.	N.A.	N.A.	4.78
Koh et al. ⁵⁵	Si_xN_y	zavřený	3.0	termočlánek	VO_x	12	10	N.A.	N.A.
Davaji et al. ³³	Si_xN_y /polyimide	zavřený	200	RTD	Ni	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
Wang et al. ⁵¹	SU-8 on Si	zavřený	800	termočlánek	Cr/Ni	1500	50	5000	0.87-1.2
Xu et al. ²⁹	$\text{SiO}_2/\text{Si}_x\text{N}_y$	otevřený	5-50	termočlánek	Si	N.A.	22	132	2.90 (4)

N.A.: data nejsou k dispozici.



Obrázek 11 (a) 3D μ C s uzavřenou reakční komůrkou, (b) jeho výrobní proces

nemožné. Jedna buňka totiž nemůže podstatně lokálně zvýšit teplotu endogenní termogenezi s ΔP s amplitudou ≈ 100 pW nad ≈ 10 mK. Tato analýza vážně zpochybňuje interpretaci nejnovějších teplotních heterogenních charakteristik naměřených uvnitř jediné živé buňky⁵⁸. Použití vysoce citlivých μ C s výkonovým rozlišením v řádu jednotek pW by však vneslo světlo do tohoto problému.

V poslední době vědci začali studovat energetickou bilanci živých buněk a mapovat jejich vnitřní teplotu. Tato práce je extrémně náročná a vyžadující nejen špičkové technické vybavení, ale také nový způsob myšlení⁵⁵. Bylo publikováno mnoho přístupů, které mapují rozložení teplot v buňkách ať už je to použitím fluorescenčních metod⁵⁶, nebo nanostrukturovaných diamantů⁵⁷. Vědci došli patrně ke klamným závěrům, že se v buňkách významně zvyšuje teplota, což je z termodynamického pohledu

2.4 Trendy a očekávaný vývoj

V předchozí části jsem popsal principy a ukázal na několika příkladech μ C s rozlišením výkonu a energie v rozsahu nW a nJ. Jsou to součástky s vynikajícími parametry, které ale bohužel nejsou dostatečné pro další aplikace jako je monitorování termogeneze v buňkách, kde se očekává měření výkonu v řádu pW nebo ještě méně⁵⁸. Co je tedy potřeba udělat pro zlepšení citlivosti μ C a splnění těchto požadavků?

Konstrukce μ C s extrémním rozlišením pro aplikace v analytické chemii, stejně jako pro molekulární a buněčnou biologii by se měla řídit závěry popsaným v předchozích odstavcích. μ C vyrobený z parylenu s kanálem o délce ≈ 500 μ m a průřezem (10×20) μ m² ve vakuu by měl mít velmi nízkou hodnotu $G \approx 200$ nW·K⁻¹. Tepelná fluktuace okolního prostředí může být potlačena tepelnou stabilizací použitím vícestupňového stínění, jak je tomu u konvenčních kalorimetrů. Další potlačení tohoto účinku lze dosáhnout systémem diferenciálního režimu, kde je změna teploty na měřicím kalorimetru částečně potlačena změnou teploty na referenčním kalorimetru. Obě jednotky by měly být vybaveny identickými snímači teploty ideálně typu RTD zapojené do Wheatstonova můstku⁵⁹. Poměr signál/šum je možné dále zlepšit pomocí napájení můstku AC napětím a zpracováním jeho výstupního signálu pomocí lock-in zesilovače⁶⁰, čímž by se citlivost μ C mohla dostat do řádu stovek fW.

Je ale velmi vysoká šance, že systém popsaný v předchozím odstavci bude příliš pomalý., tj. bude mít velkou hodnotu své tepelné časové konstanty dané rovnicí (6). μ C pracující s živými buňkami mají samozřejmě uvnitř vodný roztok a voda je materiál s jednou z nejvyšších hodnot specifického tepla, což bohužel má za následek, že systém s vysokou citlivostí bude také zároveň pomalý a je proto potřeba při návrhu μ C tyto okolnosti zvážit.

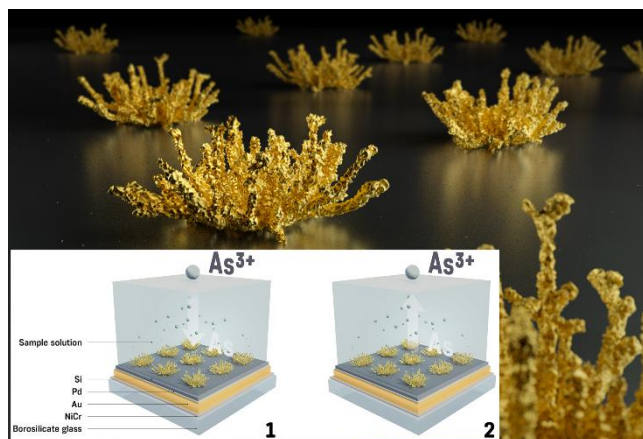
2.5 Závěr

Během posledních deseti let bylo vyvinuto množství vysoce citlivých mikrokolorimetrů, které dokázali svůj potenciál v analytické chemii, fyzikální chemii, elektrochemii, výzkumu léků a molekulární a buněčné biologii. V této kapitole jsem uvedl několik aplikací, stejně jako očekávaný budoucí vývoj ještě citlivějších μ C pro studium buněčného metabolismu včetně termogeneze, apoptózy či mitózy.

3 Nanostrukturovaná pole mikroelektrod

3.1 Abstrakt

Dostupnost pitné vody je problém zejména v rozvojových zemích, protože jejich vodní zdroje jsou často kontaminovány jak biologicky, tak i těžkými kovy. Elektrochemické metody jsou vhodné pro detekci kontaminace těžkými kovy i v polních podmínkách. Pracovní elektrody vyrobené z ušlechtilých kovů s velkou plochou povrchu jsou předmětem intenzivního vývoje, protože mohou přinést lepší poměr signál/šum, zvýšenou



Obrázek 12 Schematické znázornění práce s nanostrukturovanými poli elektrod

citlivost a nižší limity detekce (LOD). Zabýváme se dlouhodobě těmito materiály a v dnešní přednášce budu hovořit o nanostrukturovaném poli Au mikroelektrod. Nanostrukturované zlato na litograficky definovaných kruzích elektrochemicky narostlo ve vrstvě částečně zpolymerizované želatiny, čímž jsme zvýšili geometrickou plochu elektrod 1440× ve srovnání s původní geometrickou plochou připravenou litograficky. Povrchová morfologie Au je daná stupněm zesíťování želatinové vrstvy. Toto pole jsme použili pro ultracitlivou detekci obsahu iontů As^{3+} ve vodě pomocí metody stripovací voltametrie a dosáhli jsme $LOD \approx 0,0212$ ppb (při limitním poměru signál/šumu = 3,3), což je 470× pod limitem obsahu doporučeným Světovou

zdravotnickou organizací (WHO) pro pitnou vodu. Tato pole nanostrukturovaných Au elektrod mohou být použita i k detekci dalších iontů kovů, jako je Cr, Cd, Hg, Cu a Sb. V kombinaci s přenosným elektrochemickým přístrojem tato metoda představuje ultracitlivý systém detekce těžkých kovů (Obrázek 12).

3.2 Úvod

Dostupnost pitné vody je klíčovým problémem v počtu rozvojových zemí, protože jejich vodní zdroje jsou kontaminovány biologickými nebo iontovými znečišťujícími látkami. Biologická kontaminace může být jednoduše chemicky nebo fyzikálně odstraněna, ale klíčovým problémem znečištění jsou stále ionty kovů, jako je As, Cr, Cd, Hg, Pb a Zn^{61,62}. I v rozvinutých zemích je kontaminace těžkými kovy velký problém, protože trpí přítomností znečišťujících látek kovových iontů především v průmyslových odpadech. Jedním z nejzávažnějších problémů je vysoce toxický arsen. Celkový obsah iontů (As^{3+} a As^{5+}) v pitné vodě je omezen na úroveň $10 \mu g \cdot L^{-1}$ (10 ppb) podle pokynů Světové zdravotnické organizace (WHO)⁶³⁻⁶⁵.

Běžně užívané analytické metody pro monitorování kontaminace ionty lze rozdělit na dvě skupiny: spektroskopické a elektrochemické. Spektroskopické metody, jako je generace hydridů spolu s atomovou absorpční a emisní spektrometrií nebo indukčně vázanou plazmou následováno s hmotovou spektrometrií, mají detekční limity hluboko pod doporučenou úroveň a jsou zvláště vhodné pro centralizovanou rutinní analýzu vody a mineralizovaných pevných vzorků, jako jsou vzorky půdy nebo tkání^{64,66}.

Jednou z nejčastěji používaných elektrochemických metod detekce iontů kovů je anodická stripovací (lineární nebo diferenciální) voltametrie⁶⁶ s LOD srovnatelnými s klasickými spektrometrickými metodami⁶⁷. Přístroje jsou poměrně jednoduché a lze je miniaturizovat pro měření v terénu, jako je například monitorování odpadních vod nebo zdrojů pitné vody.

Anodická stripovací voltametrie (ASV) je velmi citlivá metoda, která se používá k detekci stopových koncentrací těžkých kovů v environmentálních, klinických a průmyslových vzorcích. Metoda je založena na

využití tříelektrodeového systému, který se skládá z elektricky uzemněné pracovní elektrody (WE), referenční elektrody (RE) a pomocné elektrody (AUX). Vlastní ASV se skládá ze dvou kroků: předkoncentrace (PR) a stripování (ST) iontů. Prodloužení kroku PR při redukčním potenciálu vybraných kovů vede k tomu, že dojde k vyloučení významného množství tohoto kovu na povrchu WE, vcelku bez ohledu na původní koncentraci iontů ve vzorku roztoku, která mohla být původně i velmi nízká. Poté se začne potenciál na referenční elektrodě zvyšovat, čímž dojde k oxidaci absorbovaných iontů do formy kationtů na jejich specifických potenciálech. Vede to k detekci elektrického proudu (I_{WE}) s maximální amplitudou ($I_{WE (Peak)}$) odpovídající na množství předem uloženého kovu a tím i koncentraci analytu ve vzorku.



A tudíž se jedná o citlivou, kvalitativní a kvantitativní detekci iontů kovů⁶⁸.

Stripovací voltametrie s WE na bázi Hg se často používá s vysokou reprodukovatelností a citlivostí pro detekci těžkých kovů. Existuje však stále rostoucí poptávka po senzorech a nástrojích s vyloučením Hg a jejich slitin. Využití Ag naráží na problém jeho interference s elektrolyzou vody a kromě toho, Ag také reaguje s SO₂ přítomným ve stopových koncentracích ve vzduchu⁶⁹. WE vyrobené z Au poskytují citlivější odezvu na oxidaci As než jiné materiály pro WE. Zlato také má vyšší nadbytečný potenciál kyslíku než Pt, a proto je Au vynikajícím materiálem pro WE^{67,70,71}. V minulosti byly použity četné konfigurace Au elektrod, jako jsou diskové elektrody, rotující disky, polykrystalické Au.

Nanostrukturované materiály vykazují odlišné a v mnoha případech lepší vlastnosti ve srovnání s planárním povrchem. Elektrody s nanostrukturovanými povrchy mají někdy specifické interakce s analytem, což může vyvolat snížení požadovaného přepětí pro elektrochemický proces a následně dokonce vést k vyšším a ostřejším proudovým špičkám při méně extrémních potenciálech⁷².

Nanostrukturní materiály mají typicky 2 - 1000× větší plochu než planární povrchy o stejné velikosti a mají buď orientovanou nebo náhodnou morfologii. Zvětšení plochy povrchu umožňuje citlivější měření chemických reakcí a zejména v elektrochemii zlepšení citlivosti a snížení LOD. Zvětšená plocha také umožňuje imobilizaci většího množství činidla nebo analytu na povrchu beze změny celkových rozměrů elektrody. To vede k větším proudům, jelikož Faradaický proud obvykle lineárně závisí na velikosti plochy elektrod a významně větší plocha elektrody poskytuje lepší poměr signál/šum (SNR), zvýšenou citlivost a nižší LOD^{72,73}.

Nanostrukturované povrchové elektrody jsou předmětem intenzivního vývoje a byly vyrobeny za použití různých metod⁷³⁻⁷⁵, které můžeme rozdělit do dvou hlavních skupin:

1) Techniky „top down“ jsou založeny na rozrušování materiálu elektrody, jako je leptání, laserová ablace nebo litografie.

2) „bottom up“ techniky vytváří nanostrukturovaný materiál ze základny například prostřednictvím elektrodepozice, dále růstem různých typů dendritických struktur. Tyto metody používají masky z pevných materiálů, jako je Al₂O₃, zeolity, porézní materiály, sférické částice a také měkké masky pomocí tvorby bublinek, smáčedel, kapalných krystalů nebo polymerů. Další podskupinou technik „bottom up“ jsou různé způsoby „self assembly“, které používají kovové nano- a mikročástice různých tvarů a používají řadu různých strategií^{72,76,77}.

Arzén je metaloid se specifickým elektrickým odporem $\approx 333 \text{ n}\Omega \cdot \text{m}$ při 20 °C, tedy $\approx 15 \times$ vyšší než má Au. Plocha WE je nasycena As během PR kroku, jakmile uložený As⁰ překročí tvorbu monovrstvy. Poté monovrstva začne omezovat přenos elektronů v důsledku zvýšení odporu, čímž potlačuje rychlost nanášení As z roztoku. Výsledkem je nelineární vztah mezi koncentrací As a maximem stripovacího proudu⁷⁸.

Účinnost předkoncentrace je ovlivněna aplikovaným napětím, které klesá z 0 V na - 0,4 V, avšak pro negativní potenciály se účinnost PR opět snižuje díky generování H_2 , který blokuje povrch elektrody a tím snižuje přenos elektronů a elektrický proud. Bylo zjištěno, že PR potenciál od -0,25 V do - 0,5 V poskytuje $\approx 50\%$ účinnost PR⁷⁹. V minulosti byla efektivita PR a prevence saturace elektrod zvýšena co-depozicí As s Cu, tvořící vodivou intermetalickou fází^{80,81}.

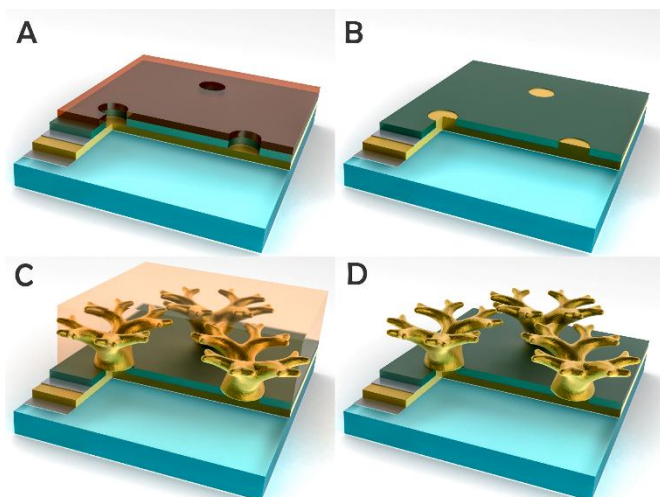
Celková koncentrace iontů As je součet elektrochemicky aktivního As^{3+} a elektrochemicky inertního As^{5+} . V prvním kroku se stanoví koncentrace As^{3+} . Potom se As^{5+} zredukuje na As^{3+} , a jeho koncentrace se opět stanoví. Redukce As^{5+} může být prováděna buď elektrochemicky nebo různými sloučeninami kompatibilními se stripovací voltametrií, jako je kyselina askorbová⁸¹, siřičitan sodný⁸² nebo α -cystein^{83,84}. Redukce se musí provádět v kyselém prostředí, jako je HCl, HNO_3 nebo $HClO_4$, takže As^{5+} po redukcí na As^{3+} je stabilizován ve formě trojmocné kationtové formy. Citlivost metody stoupá se snižujícím se pH, i když při $pH < 1$ se citlivost metody zase snižuje kvůli nízkému přepětí Au na H_2 . Obvykle se jako základní elektrolyt v ASV protokolech používá kompromisní koncentrace kyselin 1M. Během ASV je také nutná eliminaci rozpuštěného O_2 , aby se zabránilo tomu, že se stripovací signál s časem začne snižovat⁸⁵. Obvykle se v průběhu reakce roztok vzorku probublává inertním plynem jako je N_2 nebo Ar a tak vytěsňuje O_2 , nebo chemicky přidáním hydrazinhydrochloridu do roztoku jako stabilizačního činidla pro eliminaci rozpuštěného O_2 ⁸⁴.

LOD As^{3+} prováděná ASV se výrazně zlepšila vývojem metod za posledních 50 let a je nyní hluboko pod úroveň ppb. Zatím je nejnižší publikovaná hodnota LOD $\approx 0,0096$ ppb na uhlíkové WE modifikované nanočásticemi Au a metodou lineární separační voltametrie (LSV) s dobou PR (t_p) ≈ 180 s⁶⁷.

3.3 Experimentální část

3.3.1 Výroba polí nanostrukturovaných elektrod

Pole elektrod ve formě čipů jsme vyrobili na skleněném substrátu (desce) o průměru ≈ 100 mm. Nejprve byly desky pokryty naprášenou sendvičovou vrstvou NiCr, Au, Pd a Si o tloušťce postupně ≈ 50 nm, ≈ 200 nm, ≈ 20 nm a ≈ 200 nm, kde Pd sloužil jako adhezivní vrstva pro Si⁸⁶. Poté jsme provedli optickou litografií a ve vrstvě Si otevřeli kolečka o průměru 4 μm metodou „ion milling“. Leptání jsme zastavili na vrstvě Au pomocí detekce koncového bodu založeného na sekundární iontové hmotnostní spektroskopii. Následně jsme nařezali



Obrázek 13 (A) NiCr/Au/Pd/Si sendvičová struktura na skleněné desce s fotolitograficky otevřenými kolečkami leptanými ion milling technikou (B) Čip po odstranění fotoresisty (C) Čip s nanostrukturovaným zlatem v matrici želatiny a (D) po jejím odstranění.

desky na jednotlivé čipy o rozměrech ($\approx 10 \times \approx 20$) mm diamantovou pilou a odstranili vrstvu fotoresisty. Čipy jsme umyli deionizovanou (DI) vodou a následně etanolem. Jejich povrch byl potom vyčištěn O_2 plazmou po dobu ≈ 300 s o výkonu ≈ 100 W a následně jsme na povrch nanесли fluorosilan FAS-17 metodou CVD. FAS-17 tvořil hydrofobní vrstvu na Si zabraňující Au elektrodepozici v oblastech pokrytých Si v případě, že tam jsou drobné defekty (Obrázek 13).

Dále jsme zvýšili tloušťku Au vrstvy v otevřených kolečkách o ≈ 200 nm elektrolytickým vyloučením Au z roztoku $KAu(CN)_2$ ^{87,88} po dobu ≈ 10 min při potenciálu $\approx 0,7$ V s použitím Ag/AgCl/KCl RE. Vyloučená vrstva Au zároveň pokryla boční stěnu Pd vrstvy, čímž se zabránilo její následné interferenci s elektrochemickým měřením.

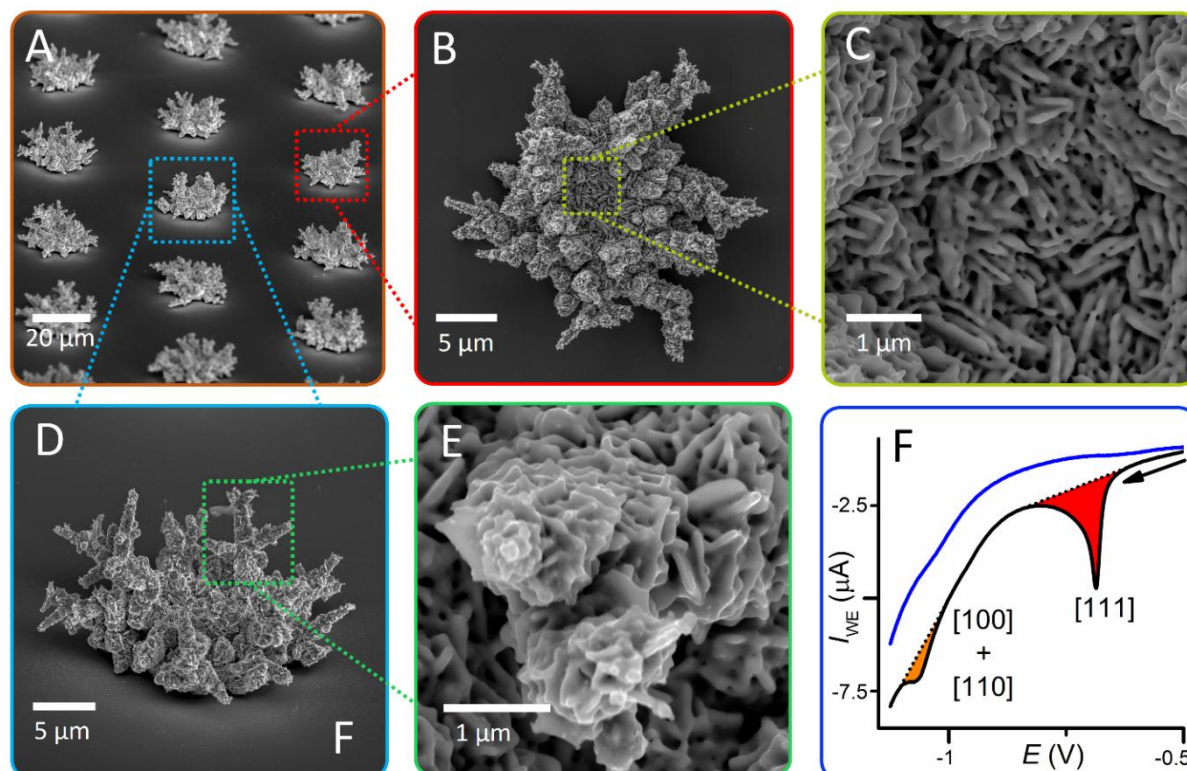
Čipy byly potom ošetřeny opět O_2 plazmou po dobu ≈ 25 s o výkonu ≈ 100 W, abychom vytvořili hydrofilní povrch, aniž bychom odstranili FAS17 z defektů ve vrstvě Si. Čipy byly ponořeny do $\approx 12\%$ roztoku želatiny udržované na teplotě $\approx 40^\circ C$. Čipy jsme pak zvedali rychlostí ≈ 75 $mm \cdot min^{-1}$. Tloušťka vrstvy želatiny v suchém stavu byla $(3,28 \pm 0,11)$ μm (střední hodnota \pm směrodatná odchylka).

Poté byla želatinová vrstva zesíťována 0,05% roztokem glutaraldehydu po dobu 12 hodin při teplotě $4^\circ C$ a následně byl glutaraldehyd odstraněn promytím v DI vodě. Optimalizovali jsme stupeň zesíťování želatiny změnou reakčního času v lázni glutaraldehydu, abychom dosáhli maximální plochy povrchu nanostrukturovaného Au⁷⁴. Čip byl ponořen do ferokyanidového zlatičího roztoku po dobu 1 min a došlo k nabobtnání želatiny. Au nanostruktury byly potom deponovány při konstantním potenciálu $\approx 1,8$ V při RE za ≈ 2400 s. Průměrná hodnota elektrického proudu i_{WE} byla $\approx 84,9$ mA, což odpovídá proudové hustotě ≈ 103 $mA \cdot cm^{-2}$. Celkový elektrický náboj byl $\approx 0,204$ C, což odpovídá $\approx 415,8$ μg Au v deponovaných nanostrukturách.

Jakmile byla elektrodepozice Au ukončena, želatina byla rozložena $\approx 0,5\%$ trypsinovým roztokem po dobu ≈ 48 hodin při teplotě $\approx 40^\circ C$ a všechny její stopy pak odstraněny použitím $\approx 5\%$ roztoku KOH při teplotě $40^\circ C$.

3.3.2 Aktivace povrchu Au

Před elektrochemickými experimenty s roztokem As^{3+} byly nanostrukturované Au elektrody nejprve vyčištěny, aby se odstranily adsorbované organické stopy pomocí směsi tří částí roztoku NH_3 ($\approx 25\%$ NH_3) a jedné části vodného roztoku H_2O_2 ($\approx 30\%$) po dobu ≈ 5 min při pokojové teplotě a následným opláchnutím DI vodou a osušením v proudu N_2 . Následně byl povrch elektrod aktivován cyklickou voltametří (CV) v roztoku 0,5 M H_2SO_4 při nastavené skenovací rychlosti 100 $mV \cdot s^{-1}$ mezi potenciály ≈ -200 mV a ≈ 1500 mV na Ag/AgCl/KCl RE, dokud nebyl pozorován stabilní voltamogram, který typicky vyžadoval cyklus CV opakovat 40 až 60 krát. Jakmile byl aktivační proces dokončen, byla elektroda omyta vodou, vysušena proudem N_2 a okamžitě použita.



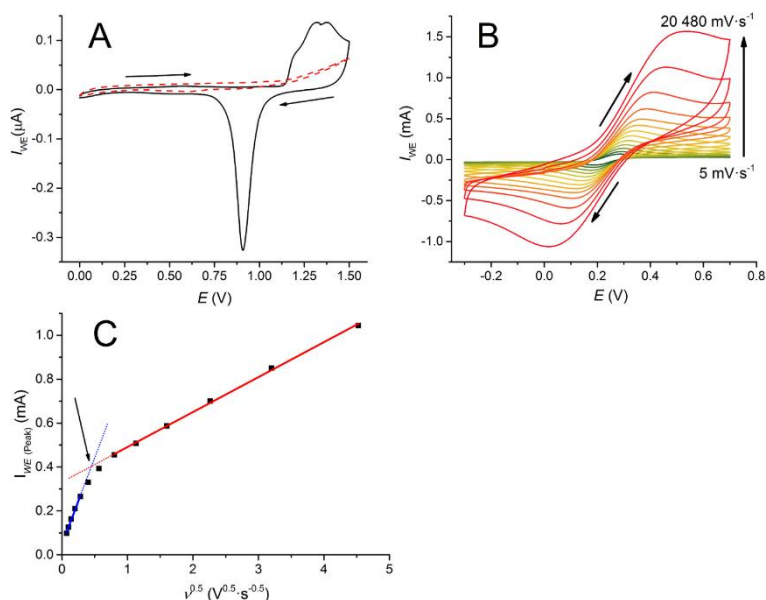
Obrázek 14 Mikrofotografie vyrobených polí s nanostrukturovaným zlatem (A) Přehled (B) Detail jedné struktury (C) a její vnitřek. (D) Pohled z boku (E) a detail jedné větve. (F) Výsledky desorbce cysteinu.

Jako podpůrný elektrolyt pro všechny experimenty se stanovením ionů jsme použili $\approx 0,01$ M roztoku HNO_3 . Každý vzorek byl před analýzou nejprve propláchnut N_2 po dobu 10 min a reakční nádoba s objemem ≈ 100 ml byla trvale promíchávána a probublávána N_2 , aby se zabránilo kontaminaci vzdušným O_2 .

3.4 Výsledky a diskuze

Strukturu pole elektrod jsme navrhli softwarem Nanolithography Toolbox¹². Pole obsahovalo elektrody o průměru $5 \mu\text{m}$ s roztečí $50 \mu\text{m}$ v šestistranné konfiguraci pokrývající plochu $3 \text{ mm} \times 3 \text{ mm}$. Kombinovaná geometrická plocha všech kruhových elektrod byla $\approx 8,24 \cdot 10^{-2} \text{ mm}^2$.

Vyrobené čipy jsme nejprve prozkoumali pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu a určili morfologii deponovaného nanostrukturovaného Au (Obrázek 14A - E), které mělo hierarchickou konfiguraci a jeho hlavní „tělo“ připomínalo kmen stromu rostoucí z litograficky definovaných kruhových oblastí. Poté se hlavní „kmen“ rozdělil na jednotlivé větve, přičemž každá z nich se dále dělila. Všechny tyto struktury byly tvořeny vzájemně propojenými Au „listy“ o tloušťce $\approx 100 \text{ nm}$ s průměry pórů mezi nimi o velikosti od $\approx 50 - 300 \text{ nm}$, což značně zvyšovalo celkovou povrchovou plochu nanostrukturovaného Au a bylo významně odlišné od dendritických struktur získaných jinými metodami⁸⁹ (Obrázek 14D, E). Nanostrukturovaný Au měl samozřejmě podstatně větší povrch s ohledem na původní kolečko o průměru $5 \mu\text{m}$.



Obrázek 15 (A) CV v roztoku $0,5\text{M H}_2\text{SO}_4$ se skenovací rychlostí $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ s WE z nanostrukturovaného Au (černá) a bez (červená). (B) CV nanostrukturovaného Au pole v $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ roztoku s různými hodnotami v . (C) Sklon $I_{\text{WE(peak)}}$ v závislosti na \sqrt{v} .

orientace povrchu nanostrukturovaného Au (Obrázek 14F). Poměr povrchové domény Au [111] k součtu povrchové plochy s doménami Au [100] a Au [110] byl $\approx 4,35:1$.

Pak jsme stanovili celkovou elektrochemicky aktivní plochu (A) metodou založenou na amplitudě přenosu náboje během elektrochemické redukce monovrstvy oxidů zlata v roztoku $\approx 0,5 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ podle rovnice:

$$A = \frac{Q_d}{S} \cdot v, \quad (22)$$

kde Q_d je hustota náboje potřebná k redukci oxidu zlata, S je plocha katodického píku a v je rychlost skenování (Obrázek 15A)⁹³. Zjistili jsme, že A mělo velikost $\approx 110,87 \text{ mm}^2$, což bylo 1440násobné zvětšení aktivní plochy oproti původní velikosti $\approx 0,0824 \text{ mm}^2$.

Nanostrukturované Au povrchy se skládaly ze tří hlavních krystalografických orientací, Au [111], Au [100] a Au [110], přičemž každá z nich vykazuje různé vazebné síly vůči thiolu nanoseném pomocí „self assembly monolayer (SAM)“ techniky. Způsob stanovení krystalografické orientace je založen na desorpci molekul thiolu s krátkým řetězcem, jako je cystein nebo kyselina merkaptopropionová, během CV. Desorpce cysteinu během CV vykazuje tři rozlišené vrcholy při potenciálech -700 mV , -1000 mV a -1100 mV vzhledem k Ag/AgCl/KCl RE pro Au s orientací Au [111], Au [100] a Au[110]. Poměry mezi amplitudami maximálního elektrického proudu ukazují poměr krystalografických domén⁹⁰⁻⁹². Tuto metodu jsme použili k charakterizaci krystalografické

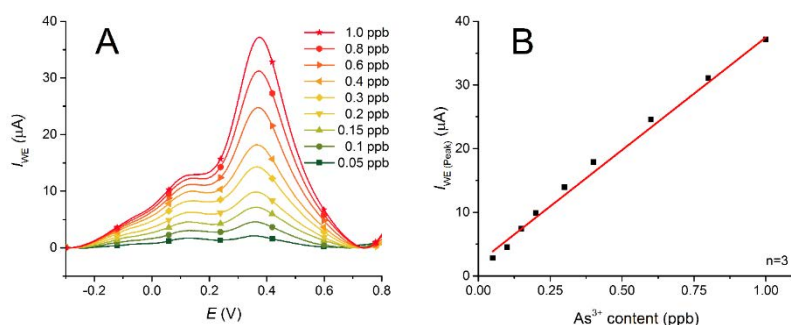
Poté jsme opět stanovili A pomocí měření CV v roztoku ≈ 10 mM $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ v základním elektrolytu roztoku ≈ 100 mM KCl s různou hodnotou v (Obrázek 15B) podle Randlesovy-Ševčíkovy rovnice⁹⁴:

$$I_{\text{WE (Peak)}} = 0.4463 \cdot n \cdot F \cdot A \cdot C \left(\frac{n \cdot F \cdot v \cdot D}{R \cdot T} \right)^{0.5}, \quad s = \frac{dI_{\text{WE (Peak)}}}{d\sqrt{v}} = 0.4463 \cdot n \cdot F \cdot A \cdot C \left(\frac{n \cdot F \cdot D}{R \cdot T} \right)^{0.5} \quad \text{a}$$

$$A = \frac{s}{268600 \cdot n^2 \cdot D^2 \cdot C}, \quad (13)$$

kde s je definováno jako $dI_{\text{WE (Peak)}}/d\sqrt{v}$, n je počet přenesených elektronů v redoxní reakci, F je Faradayova konstanta, D je difúzní koeficient iontů Fe^{2+} , C je koncentrace (aktivita), R je univerzální plynová konstanta a T je termodynamická teplota. Zjistili jsme, že nanostrukturované pole Au vykazuje dvě rozdílné oblasti s různými amplitudami $A_1 = (10,95 \pm 0,45) \text{ mm}^2$ a $A_2 = (2,21 \pm 0,04) \text{ mm}^2$ (střední hodnota \pm směrodatná odchylka) pro nižší a vyšší hodnoty v , respektive, což představuje ≈ 132 nebo $\approx 26,8$ násobné zvýšení A (Obrázek 15C).

Existuje významný rozdíl ≈ 50 nebo ≈ 10 krát mezi hodnotami A určenými těmito dvěma metodami. První způsob



Obrázek 16 (A) Stripovací voltametrie As^{3+} a (B) jeho LOD.

určení plochy je založen na odstranění povrchové Au oxidové monovrstvy z prakticky celého povrchu elektrody. Tato metoda je také ovlivněna experimentálními podmínkami, jako je oxidační potenciál, rychlost skenování a doba oxidačního potenciálu⁹⁵.

Druhá metoda závisí na difuzi z roztoku, takže pouze periferní části struktury Au jsou stále aktivní se zvětšující se amplitudou v , zatímco vnitřní části struktury pracují v lokálně vyčerpaném roztoku.

Zkušební sekvence detekce iontu As^{3+} se sestávala z čistícího kroku (CS) s potenciálem ≈ 400 mV po dobu ≈ 30 s a PR při potenciálu ≈ -400 mV po dobu ≈ 300 s. Pro stanovení LOD (Obrázek 16A) jsme provedli řadu testů pro vytvoření kalibrační křivky s koncentracemi As^{3+} v rozmezí $\approx 0,05$ ppb až ≈ 1 ppb. LOD jsme definovali jako $3,3 \times SD/S$, kde SD je směrodatná odchylka a S je sklon kalibrační křivky. Limit kvantifikace (LOQ) je pak definován jako $\approx 10 \times SD/S$ ⁹⁶. Hodnotu LOD jsme stanovili na $\approx 0,0212$ ppb a LOQ na $\approx 0,0643$ ppb (Obrázek 16B).

Nakonec jsme změřili kalibrační křivku pro koncentraci As^{3+} v rozmezí $\approx 0,125$ ppb – 5 ppb a zjistili LOD $\approx 0,0423$ ppb a LOQ $\approx 0,128$ ppb. Poté jsme testovali oblast lineární odezvy pole nanostrukturovaných elektrod, aby se prodloužila doba t_p s použitím koncentrace As^{3+} v roztoku $\approx 5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ a stanovili maximální hodnotu $t_p \approx 800$ s, kde další zvyšování t_p již způsobilo odchylku od lineárního chování systému. Po optimalizaci jsme našli nejvhodnější hodnotu $v \approx 10 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$ jako dobrý kompromis mezi maximem $I_{\text{WE (Peak)}}$ a nežádoucím rozšířením jeho píku.

3.5 Závěr

Vyvinuli jsme proces vytváření řady pole nanostrukturovaných Au elektrod na skleněném substrátu. Tato pole byla definována UV litografií a nanostrukturované Au bylo vytvořeno selektivní elektrodepozicí Au s pomocí želatinové matrice. Vzniklé nanostrukturované Au mělo plochu povrchu $\approx 1440 \times$ větší, než byla původní plocha. Povrch nanostrukturovaného Au sestával z $\approx 81\%$ elektricky aktivní plochy Au s krystalografickou orientací [111]. Vlastnosti těchto polí je možné upravovat pomocí litografické masky, jako je tvar, velikost nebo rozteč jednotlivých elektrod nebo parametry selektivní elektrodepozice zlata, jako je stupeň zesíťování želatiny, potenciál při elektrodepozici nebo čas.

Nanostrukturované pole Au jsme použili k určení koncentrace As^{3+} ve vodě metodou LSV. Dosáhli jsme jedné z nejlepších hodnot LOD s hodnotou $\approx 0,0212$ ppb s dobou předkoncentrace ≈ 300 s v nádobě o objemu ≈ 100 ml^{67,70,83}. Další zlepšení LOD by mohlo být dosaženo použitím ≈ 1 M HCl jako základního elektrolytu, který je doporučen pro nejlepší účinnost předkoncentrace při detekci iontů As^{3+69} .

Měření LSV s využitím nanostrukturovaného systému Au mělo dobrou reprodukovatelnost, takže tento materiál je vhodný pro dlouhodobé sledování kontaminace As^{3+} nebo jiných iontů těžkých kovů v pitné a odpadní vodě. Tento systém je možné integrovat do jednoduchého přístrojového vybavení jako klíčovou součást přenosného systému pro monitorování životního prostředí⁹⁷.

4 Příští aktivity

Rozdělím to na dvě části, vědeckou a pedagogickou.

V té vědecké bych se v rámci skupiny doc. Hubálka věnoval práci na vývoji mikrokalorimetrů a chtěl bych se dostat na výkonové rozlišení na úrovni pW nebo ještě lepší. To nám umožní monitorovat metabolismus jednobuněčných organismů a následně i malých buněk ve spolupráci s Biocevem a RECAMEM. Dále ve spolupráci s doc. Martinem Pumerou bych rád pracoval na měření vlastností 2D FETů založených na nových materiálech. Kromě toho máme slibně se rozvíjející spolupráci s ÚVN na vývoji detekce patogenů v polních podmínkách pomocí přenosného PCR systému. A nakonec bych také rád rozvíjel nadále mikrofluidiku a v rámci toho metody molekulární diagnostiky.

Co se týká pedagogické praxe, letos nám končí dva studenti doktorského studia a máme v týmu několik dalších a pak především dva zkušené postdoky. Ti by měli oba v brzké době napsat a také obhájit docentskou habilitační práci, aby u nich obou pokračoval zdravý rozvoj jejich kariéry. Kromě toho přijímáme dva další postdoky, od kterých se očekává, že kromě podání grantů u GAČRu také budou vědecky pracovat a publikovat.

A samozřejmě budeme dále udržovat spolupráci s pracovišti jako je NIST v USA, NPU v Xi'anu a dalšími, a to v rámci jak společných projektů, tak výměnných stáží pro studenty doktorandského studia a postdoky. V Xi'anu byli zatím 3 zaměstnanci VUT na několika měsíčních stážích, na CEITECu z NPU je jeden student teď podruhé a druhý poprvé.

5 Závěr

Práce v oboru mikrofluidika pro detekci infekčních chorob je multidisciplinární a je k ní potřebná hluboká znalost řady oborů. Moje práce sumarizovaná v těchto tezích profesorské přednášky by nikdy nebyla na této úrovni bez pomoci mnoha kolegů a spolupracovníků, kterým bych tímto rád poděkoval. Nemohu bohužel uvést všechny, je jich příliš mnoho. Následný výčet uvádí hlavní spolupracovníky:

Juergen Pipper, Institute of Bioengineering and Nanotechnology
Sun Wanxin, Institute of Bioengineering and Nanotechnology, nyní Bruker Asia
Petr Muller, Institute of Molecular and Cell Biology Singapore.
Lukáš Novák, ČVUT Praha, nyní ČEZ.
Julian Reboud, Institute of Microelectronics, Singapore, nyní University of Glasgow.
Wong Chee Chung, Institute of Microelectronics, Singapore, nyní Becton, Dickinson & comp, Singapore.
Soon Jeffrey B. W., Institute of Microelectronics, Singapore.
Bojan Robert Ilic, Cornell University, US, nyní NIST, USA.
Andreas Manz, KIST-Europe, Germany.
Christian Ahrberg, KIST-Europe, Germany.
Ana-Vanessa Almeida, KIST-Europe, Germany, nyní Willey, Německo
Camilla C.D. Campos, KIST-Europe, Germany, nyní Instituto de Química, Brazílie.
Jan Pekárek, VUT Brno, Česká Republika
Vojtěch Svatoš, VUT Brno, Česká Republika
Imrich Gablech, VUT Brno, Česká Republika
Jaroslav Klempa, VUT Brno, Česká Republika
Zdenka Fohlerová, VUT Brno, Česká Republika
Jaromír Hubálek, VUT Brno, Česká Republika
Vladislav Musil, VUT Brno, Česká Republika
Jianguo Feng, NPU, ČLR
Haoqing Zhang, NPU, ČLR
Xiaocheng Liu, NPU, ČLR
Hanliang Zhu, NPU, ČLR
Pavel Podešva, NPU, ČLR
Huanan Li, NPU, ČLR

Jak jsem předeslal již dříve, pomohlo mi v minulosti ještě mnoho dalších spolupracovníků, které zde není možné vyjmenovat včetně mých kolegů z Ústavu Mikroelektroniky, VUT, kteří mi výrazně pomohli s editováním této práce a s jejím odevzdáním a bez jejichž pomoci by tato práce nevznikla.

Dne 25. 9. 2018 Pavel Neuzil



Abstrakt

V této práci jsem popsal tři odvětví, kterými se zabývám a které jsou předmětem mé profesorské přednášky.

Jedná se především o vývoj nechlazených bolometrů a jejich využití pro detekci infračerveného záření (IR) a také záření na frekvencích v oblasti THz. Je to zajímavá oblast z hlediska přenosu a sdílení tepla, optiky, fyziky, MEMS technologií, elektronických obvodů na zpracování jejich téměř zanedbatelných signálů, kdy se hledají jakékoliv možnosti na zvýšení jejich citlivosti. My jsme šli cestou zvýšení absorpce IR v absorpční vrstvě na membráně bolometru nárůstem vrstvy uhlíkových nanotrubic (CNT). V průběhu výroby bolometru jsme v předposledním kroku litograficky definovali vrstvu katalického materiálu (Fe), pak membránu podleptali a v proudu acetylénu za nízkého tlaku jsme lokálně ohřáli membránu bolometru na tak vysokou teplotu, že na ní došlo k rozkladu acetylénu a nárůstu CNT, zatímco čip bolometru byl na pokojové teplotě. Je to technika vhodná k integrování CNT s “focal plane arrays” pro vysoce účinné IR kamery.

Oblast, která mě extrémně zajímá, jsou mikrokolorimetry. Fyzika a instrumentace u mikrokolorimetrů je prakticky totožná s fyzikou bolometrů, se kterou mám kolem 20 roků zkušeností. Povedlo se nám zatím měřit teplotu s přesností kolem 100 μK , což není vůbec špatné. Ve své přednášce se zmíním obecně o kalorimetrech a o tom, co v této oblasti děláme my. Testujeme teď reakční teplo, které vzniká rozkladem H_2O_2 , nanoroboty, což je vznešené slovo pro Pt trubičku. Každopádně na jednoduchém kalorimetru, který teď máme, se uvolněním výkonu kolem 60 μW kalorimetr ohřeje o 0.1 K, což je velmi pohodlně měřitelná hodnota. Snažíme se ale teď vyrobit mikrokolorimetr s výrazně (o tři řády) vyšší citlivostí pro monitorování termogeneze v buňkách, což je náš cíl.

Třetí část mé přednášky se týká polí mikroelektrod z nanostrukturovaného zlata. Zlato jsme připravili selektivní elektro depozicí ve vrstvě částečně zesíťované želatiny. Došlo tak k růstu nanostrukturovaného zlata s velkým povrchem. Použili jsme toho pole elektrod na vysoce citlivou detekci koncentrace arzenu stripovací voltametrií. Jedná se o systém pracující v mikroelektrodovém režimu a vykazuje tudíž vysokou citlivost.

Abstract

In this work, I have described three areas of my interest, which are also the subjects of my professor's lecture.

I worked for last 20 years in the development of uncooled bolometers and their use for infrared (IR) detection as well as electromagnetic radiation in frequencies in THz region. It is an interesting area in terms of heat transfer, optics, physics, MEMS technologies, electronic circuits for processing their almost non-negligible signals constantly looking for options to increase bolometers and their system sensitivity. We investigated increasing the absorption of IR using an IR absorbing layer made of carbon nanotube layer (CNT) deposited on the top of the bolometer's membrane. During the bolometer fabrication in the last but one step, we photo lithographically defined a layer of catalytic material (Fe) at the bolometer membrane. Once the membrane was release by its undercutting we heated the membrane in an acetylene at low pressures to elevated temperature causing acetylene to decomposed and CNT grew while the bolometer chip was maintained at room temperature. It is a technique resulting in 100% IR absorption suitable for the integration with focal plane arrays for high-performance IR cameras.

In last few years I became extremely interested in microcalorimeters. Physics and instrumentation of microcalorimeters are practically identical to the physics of bolometers I am familiar with. In my lecture I will talk about calorimeters in general and what we plan to do with them including our achievements. So far we have built a device with temperature measurement resolution of $\approx 100 \mu\text{K}$. We now test the temperature changes due to decomposition of H_2O_2 by “nanorobots” (a noble word for tiny Pt tubes) on a glass chip-based μC . Power dissipation with an amplitude of $\approx 60 \mu\text{W}$ due to the reaction warms the calorimeter by $\approx 0.1 \text{ K}$, very comfortable value to monitor. We are now trying to produce a microcalorimeter with significantly higher sensitivities (three orders of magnitude) to monitor cell thermogenesis, which is our ultimate goal.

The third part of my lecture will be regarding array of microelectrodes made of nanostructured gold. We have prepared them by a selective electrodeposition in a layer of partially cross linked gelatin. The surface area of nanostructured Au increased dramatically with respect of the bare Au electrode. We used these electrodes for highly sensitive detection of As³⁺ contamination using stripping voltammetry method.

Literatura

- (1) Rogalski, A. *Infrared Phys Technol* **2011**, 54, 136-154.
- (2) Liddiard, K. C. *Infrared Phys* **1984**, 24, 57-64.
- (3) Neuzil, P.; Liu, Y.; Feng, H. H.; Zeng, W. J. *IEEE Electron Device Lett* **2005**, 26, 320-322.
- (4) Mei, T.; Neuzil, P.; Karunasiri, G.; Zeng, W. *Appl. Phys. Lett.* **2002**, 80, 2183-2185.
- (5) Lehman, J. H.; Engtrakul, C.; Gennett, T.; Dillon, A. C. *Appl. Opt.* **2005**, 44, 483-488.
- (6) Yang, Z.-P.; Ci, L.; Bur, J. A.; Lin, S.-Y.; Ajayan, P. M. *Nano Letters* **2008**, 8, 446-451.
- (7) Lehman, J.; Sanders, A.; Hanssen, L.; Wilthan, B.; Zeng, J.; Jensen, C. *Nano Lett* **2010**, 10, 3261-3266.
- (8) Meyyappan, M.; Lance, D.; Alan, C.; David, H. *Plasma Sources Sci Technol* **2003**, 12, 205.
- (9) Huang, S. M.; Dai, L. M.; Mau, A. W. H. *Adv Mater* **2002**, 14, 1140-1143.
- (10) Zhang, S.-L.; Östling, M. *Crit Rev Solid State Mater Sci* **2003**, 28, 1-129.
- (11) Shulaker, M. M.; Hills, G.; Patil, N.; Wei, H.; Chen, H.-Y.; PhilipWong, H. S.; Mitra, S. *Nature* **2013**, 501, 526-+.
- (12) Balram, K. C.; Westly, D. A.; Davanco, M.; Grutter, K.; Li, Q.; Michels, T.; Ray, C. H.; L. Yu; R. Kasica; Wallin, C. B.; Gilbert, I.; Bryce, B. A.; Simelgor, G.; Topolancik, J.; Lobontiu, N.; Liu, Y.; Neuzil, P.; Svatos, V.; Dill, K. A.; Bertrand, N. A., et al. *J. Res. Natl. Inst. Stand.* **2016**, 121, 464-475.
- (13) Gu, X.; Karunasiri, G.; Chen, G.; Sridhar, U.; Xu, B. *Appl. Phys. Lett.* **1998**, 72, 1881-1883.
- (14) He, X.; Karunasiri, G.; Mei, T.; Zeng, W. J.; Neuzil, P.; Sridhar, U. *IEEE Electron Device Lett* **2000**, 21, 233-235.
- (15) Bataillard, P. *Trends Anal. Chem.* **1993**, 12, 387-394.
- (16) Maskow, T.; Harms, H. *Eng. Life Sci.* **2006**, 6, 266-277.
- (17) Lerchner, J.; Maskow, T.; Wolf, G. *Chem. Eng. Process.* **2008**, 47, 991-999.
- (18) Maskow, T.; Schubert, T.; Wolf, A.; Buchholz, F.; Regestein, L.; Buechs, J.; Mertens, F.; Harms, H.; Lerchner, J. *Appl. Microbiol. Biot.* **2011**, 92, 55-66.
- (19) Zuo, L.; Chen, X. M.; Yu, S. F.; Lu, M. *J. Micromech. Microeng.* **2017**, 27, 1-8.
- (20) Watson, E. S.; Justin, J.; Brenner, N.; Oneill, M. J. *Anal. Chem.* **1964**, 36, 1233-1238.
- (21) Freire, E.; Mayorga, O. L.; Straume, M. *Anal. Chem.* **1990**, 62, A950-A959.
- (22) Yu, S.; Wang, S.; Lu, M.; Zuo, L. *Front. Mech. Eng.* **2017**, 12, 526-538.
- (23) Barclay, C. J.; Woledge, R. C.; Curtin, N. A. *Prog Biophys Mol Bio* **2010**, 102, 53-71.
- (24) Lee, W.; Lee; Koh. *Nanobiosensors in Disease Diagnosis* **2012**, 1, 17-29.
- (25) Torres, F. E.; Kuhnt, P.; De Bruyker, D.; Bell, A. G.; Wolkin, M. V.; Peeters, E.; Williamson, J. R.; Anderson, G. B.; Schmitz, G. P.; Recht, M. I.; Schweizer, S.; Scott, L. G.; Ho, J. H.; Elrod, S. A.; Schultz, P. G.; Lerner, R. A.; Bruce, R. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, 101, 9517-9522.
- (26) Recht, M. I.; De Bruyker, D.; Bell, A. G.; Wolkin, M. V.; Peeters, E.; Anderson, G. B.; Kolatkar, A. R.; Bern, M. W.; Kuhn, P.; Bruce, R. H.; Torres, F. E. *Anal. Biochem.* **2008**, 377, 33-39.
- (27) Xu, J.; Reiserer, R.; Tellinghuisen, J.; Wikswo, J. P.; Baudenbacher, F. J. *Anal. Chem.* **2008**, 80, 2728-2733.
- (28) Recht, M. I.; Torres, F. E.; De Bruyker, D.; Bell, A. G.; Klumpp, M.; Bruce, R. H. *Anal. Biochem.* **2009**, 388, 204-212.
- (29) Lubbers, B.; Baudenbacher, F. *Anal. Chem.* **2011**, 83, 7955-7961.
- (30) Lee, W.; Fon, W.; Axelrod, B. W.; Roukes, M. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**, 106, 15225-15230.
- (31) Davaji, B.; Jeong Bak, H.; Chang, W. J.; Hoon Lee, C. *Biomicrofluidics* **2014**, 8, 034101.
- (32) Wang, B.; Jia, Y.; Lin, Q. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, 78, 438-446.
- (33) Wang, S.; Yu, S.; Siedler, M.; Ihnat, P. M.; Filoti, D. I.; Lu, M.; Zuo, L. *Sens. Actuators B Chem.* **2018**, 256, 946-952.
- (34) Neuzil, P.; Pipper, J.; Hsieh, T. M. *Mol Biosyst* **2006**, 2, 292-298.
- (35) Neuzil, P.; Zhang, C.; Pipper, J.; Oh, S.; Zhuo, L. *Nucleic Acids Res* **2006**, 34, e77.
- (36) Novak, L.; Neuzil, P.; Pipper, J.; Zhang, Y.; Lee, S. *Lab Chip* **2007**, 7, 27-29.
- (37) Ahberg, C. D.; Manz, A.; Neuzil, P. *Sci Rep* **2015**, 5, 11479.
- (38) Almeida, A. V.; Manz, A.; Neuzil, P. *Lab Chip* **2016**, 16, 1063-1071.
- (39) Adrega, T.; van Herwaarden, A. W. *Sensors Actuators A Phys.* **2011**, 167, 354-358.
- (40) Koppaarthi, V. L.; Tangutooru, S. M.; Nestorova, G. G.; Guilbeau, E. J. *Sens. Actuators B Chem.* **2012**, 166-167, 608-615.
- (41) Vereshchagina, E.; Tiggelaar, R. M.; Sanders, R. G. P.; Wolters, R. A. M.; Gardeniers, J. G. E. *Sens. Actuators B Chem.* **2015**, 206, 772-787.
- (42) Wang, B.; Lin, Q. *Sens. Actuators B Chem.* **2013**, 180, 60-65.
- (43) Jia, Y.; Wang, B.; Zhang, Z.; Lin, Q. *Sensors Actuators A Phys.* **2015**, 231, 1-7.
- (44) Wang, S. Y.; Yu, S. F.; Siedler, M. S.; Ihnat, P. M.; Filoti, D. I.; Lu, M.; Zuo, L. *Rev. Sci. Instrum.* **2016**, 87, 105005.
- (45) Khaw, M. K.; Mohd-Yasin, F.; Nguyen, N. T. *Microelectron. Eng.* **2016**, 158, 107-117.
- (46) Mugele, F.; Baret, J. C. *J. Phys.: Condens. Matter* **2005**, 17, R705-R774.
- (47) Wang, B.; Lin, Q. *J. Microelectromech. S.* **2012**, 21, 1165-1171.
- (48) Hartmann, T.; Barros, N.; Wolf, A.; Siewert, C.; Volpe, P. L. O.; Schemberg, J.; Grodrian, A.; Kessler, E.; Hänschke, F.; Mertens, F.; Lerchner, J. *Sens. Actuators B Chem.* **2014**, 201, 460-468.
- (49) Wolf, A.; Hartmann, T.; Bertolini, M.; Schemberg, J.; Grodrian, A.; Lemke, K.; Förster, T.; Kessler, E.; Hänschke, F.; Mertens, F.; Paus, R.; Lerchner, J. *Thermochim. Acta* **2015**, 603, 172-183.
- (50) Wang, L.; Sipe, D. M.; Xu, Y.; Lin, Q. *J. Microelectromech. S.* **2008**, 17, 318-327.
- (51) Iervolino, E.; van Herwaarden, A. W.; Sarro, P. M. *Thermochim. Acta* **2009**, 492, 95-100.
- (52) Mathot, V.; Pyda, M.; Pijpers, T.; Vanden Poel, G.; van de Kerkhof, E.; van Herwaarden, S.; van Herwaarden, F.; Leenaers, A. *Thermochim. Acta* **2011**, 522, 36-45.

- (53) Vereshchagina, E.; Wolters, R. A. M.; Gardeniers, J. G. E. *Sensors Actuators A Phys.* **2011**, 169, 308-316.
- (54) Koh, J.; Lee, W.; Shin, J. H. *Sensors Actuators A Phys.* **2016**, 241, 60-65.
- (55) Yue, Y.; Wang, X. *Nano Rev.* **2012**, 3, 11586.
- (56) Okabe, K.; Inada, N.; Gota, C.; Harada, Y.; Funatsu, T.; Uchiyama, S. *Nat. Commun.* **2012**, 3, 705.
- (57) Kucsko, G.; Maurer, P. C.; Yao, N. Y.; Kubo, M.; Noh, H. J.; Lo, P. K.; Park, H.; Lukin, M. D. *Nature* **2013**, 500, 54-58.
- (58) Baffou, G.; Rigneault, H.; Marguet, D.; Jullien, L. *Nat Methods* **2014**, 11, 899-901.
- (59) Neuzil, P.; Mei, T. *IEEE Sens. J.* **2004**, 4, 207-210.
- (60) Svatoš, V.; Gablech, I.; Pekárek, J.; Klempa, J.; Neuzil, P. *Infrared Physics & Technology* **2018**.
- (61) Schwarzenbach, R. P.; Egli, T.; Hofstetter, T. B.; Gunten, U. v.; Wehrli, B. *Annu. Rev. Env. Resour.* **2010**, 35, 109-136.
- (62) Nriagu, J. O.; Pacyna, J. M. *Nature* **1988**, 333, 134-139.
- (63) (ATSDR), A. f. T. S. a. D. R., Toxicological profile for Arsenic; Department of Health and Human Services; Public Health Service **2007**.
- (64) Guidelines for drinking-water quality, fourth edition: World Health Organisation, **2011**.
- (65) Smedley, P. L.; Kinniburgh, D. G. *Appl. Geochem.* **2002**, 17, 517-568.
- (66) Hong, C. L.; Wong, A.; Pumera, M. *RSC Advances* **2012**, 2, 6068-6072.
- (67) Dai, X.; Nekrassova, O.; Hyde, M. E.; Compton, R. G. *Anal. Chem.* **2004**, 76, 5924-5929.
- (68) Kaplin, A. *Zhur. Anal. Khim.* **1973**, 28, 2192-2196.
- (69) Forsberg, G.; O'Laughlin, J. W.; Megargle, R. G.; Koirtiyhann, S. *Anal. Chem.* **1975**, 47, 1586-1592.
- (70) Jena, B. K.; Raj, C. R. *Anal. Chem.* **2008**, 80, 4836-4844.
- (71) March, G.; Nguyen, T. D.; Piro, B. *Biosensors* **2015**, 5, 241-275.
- (72) Seeber, R.; Terzi, F.; Zanardi, C. *Functional materials in amperometric sensing: polymeric, inorganic, and nanocomposite materials for modified electrodes*; Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, 2014.
- (73) Collinson, M. M. *ISRN Anal. Chem.* **2013**, 2013, DOI: 10.1155/2013/692484.
- (74) Jufík, T.; Podešva, P.; Farka, Z.; Kovář, D.; Skládal, P.; Foret, F. *Electrochim. Acta* **2016**, 188, 277-285.
- (75) Zhang, Y.; Chu, W.; Foroushani, A.; Wang, H.; Li, D.; Liu, J.; Barrow, C.; Wang, X.; Yang, W. *Materials* **2014**, 7, 5169-5201.
- (76) Kassing, R.; Petkov, P.; Kulisch, W.; Popov, C. *Functional properties of nanostructured materials*; Springer: Netherlands, 2007.
- (77) Koch, C. C. *Nanostructured materials: processing, properties and applications*, 2nd ed.; William Andrew: Norwich, NY, U.S.A., 2006.
- (78) Davis, P. H.; Dulude, G. R.; Griffin, R. M.; Matson, W. R.; Zink, E. W. *Anal. Chem.* **1978**, 50, 137-143.
- (79) Feeney, R.; Kounaves, S. *Anal. Chem.* **2000**, 72, 2222-2228.
- (80) Adeloju, S.; Young, T.; Jagner, D.; Batley, G. *Anal. Chim. Acta* **1999**, 381, 207-213.
- (81) Barra, C. M. d. S.; Margarida M Correia. *Electroanal.* **2001**, 13, 1098-1104.
- (82) Mrzljak, R. I.; Bond, A. M.; Cardwell, T. J.; Cattrall, R. W.; Newman, O.; Champion, B.; Hey, J. *Analyst* **1994**, 119, 1051-1055.
- (83) Mardegan, A.; Scopece, P.; Lamberti, F.; Meneghetti, M.; Moretto, L. M.; Ugo, P. *Electroanal.* **2012**, 24, 798-806.
- (84) Švancara, I.; Vytřas, K.; Bobrowski, A.; Kalcher, K. *Talanta* **2002**, 58, 45-55.
- (85) Franke, J. P.; De Zeeuw, R. A. *Pharm. Weekblad* **1981**, 3, 1042-1047.
- (86) Lambrechts, M.; Sansen, W. *Biosensors: microelectrochemical devices*; CRC Press: Boca Raton, FL, U.S.A., 1992.
- (87) Panda, H. *Handbook on Electroplating with Manufacture of Electrochemicals*; Asia Pacific Business Press Inc.: Delhi, India, 2017.
- (88) Schlesinger, M.; Paunovic, M. *Modern electroplating*, 5th ed.; John Wiley & Sons: NJ, U.S.A., 2011.
- (89) Lin, T.-H.; Lin, C.-W.; Liu, H.-H.; Sheu, J.-T.; Hung, W.-H. *Chem. Comm.* **2011**, 47, 2044-2046.
- (90) Arihara, K.; Ariga, T.; Takashima, N.; Arihara, K.; Okajima, T.; Kitamura, F.; Tokuda, K.; Ohsaka, T. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2003**, 5, 3758-3761.
- (91) El-Deab, M. S. *Electrochim. Acta* **2009**, 54, 3720-3725.
- (92) El-Deab, M. S.; Arihara, K.; Ohsaka, T. *J. Electrochem. Soc.* **2004**, 151, E213-E218.
- (93) Trasatti, S.; Petrii, O. A. *J. Electroanal. Chem.* **1992**, 327, 353-376.
- (94) Kissinger, P. T.; Heineman, W. R. *J. Chem. Educ.* **1983**, 60, 702.
- (95) Sukeri, A.; Saravia, L. P. H.; Bertotti, M. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, 17, 28510-28514.
- (96) Miller, J. N.; Miller, J. C. *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*; Pearson Education, 2005.
- (97) Neuzil, P.; Campos, C. D. M.; Wong, C. C.; Bo, J. W. S.; Reboud, J.; Manz, A. *Lab. Chip.* **2014**, 14, 2168.