

SKENOVACÍ ELEKTROCHEMICKÁ MIKROSKOPIE

KAREL LACINA^a, PETR SKLÁDAL^{a,b}
a GÉZA NAGY^c

^a Ústav biochemie, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 602 00 Brno, ^b CEITEC, Masarykova univerzita, Kamenice 5, 602 00 Brno, ^c Department of General and Physical Chemistry, University of Pécs, Ifjúság útja 6, H-7601, Pécs
lacinak@chemi.muni.cz

Došlo 9.6.11, přepracováno 18.10.11, přijato 8.12.11.

Klíčová slova: skenovací elektrochemická mikroskopie, (ultra)mikroelektroda, skenování průbrou

Obsah

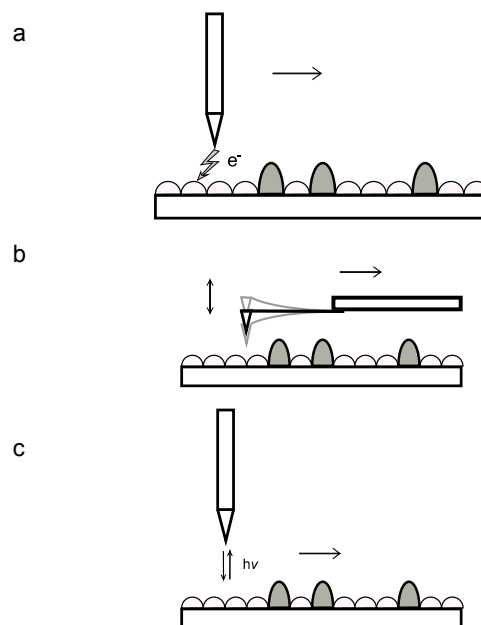
1. Úvod
2. Měřicí aparatura SECM
 - 2.1. (Ultra)mikroelektroda jako sonda
 - 2.2. Polohovací zařízení, potenciostat a další instrumentace
3. Metody SECM
 - 3.1. Režim zpětné vazby (feedback mode)
 - 3.2. Generující/sběrný režim (generation/collection mode, G/C režim)
 - 3.3. Penetrační měření
 - 3.4. Měření transportu přes rozhraní dvou fází
 - 3.5. Měření kinetických parametrů a reakčních rychlostí
 - 3.6. Mikro-litografie s využitím mikroelektrody
4. Další vybrané aplikace SECM
 - 4.1. Biosenzory
 - 4.2. Buněčné studie
 - 4.3. Kombinace SECM s dalšími metodami
 - 4.4. Detekce jediné molekuly
5. Závěr

1. Úvod

Metody skenování sondou (scanning probe microscopy, SPM, mikroskopie rastrovací sondou) získávají díky svým jedinečným vlastnostem – rozlišení v řádech nanometrů, pseudotřídídimenzionální zobrazení a dnes běžné možnosti měření bez potřeby vakua a u mnoha technik přímo v kapalném prostředí¹ – stále větší popularitu. Mezi tyto metody patří např. skenovací tunelová mikroskopie (scanning tunneling microscopy, STM, obr. 1a), mikroskopie atomárních sil (atomic force microscopy, AFM,

obr. 1b) či skenovací optická mikroskopie blízkého pole (near-field scanning optical microscopy, NSOM, obr. 1c). Všechny tyto techniky jsou určeny ke studiu povrchů za použití sondy. Sondou je většinou hrot specificky interagující se studovaným povrchem². Z velikosti a charakteru interakce se určují vlastnosti daného povrchu. Výsledkem měření skenovacími technikami je nejčastěji trojrozměrný obrázek, ve kterém se na osy X a Y vynášejí souřadnice (poloha sondy v horizontální rovině) a na osu Z právě velikost měřené vlastnosti povrchu. Mezi tyto techniky se také řadí skenovací elektrochemická mikroskopie (scanning electrochemical microscopy, SECM, obr. 1a; stejnou zkratku nese i přístroj skenovací elektrochemický mikroskop někdy též označovaný jako „chemický mikroskop“^{3,4}). Jako sonda zde slouží mikroelektroda (viz níže).

Objev SECM je úzce provázán s technikou STM, kterou poprvé představili Binnig a Rohrer na začátku 80. let a za niž obdrželi v roce 1986 Nobelovu cenu. Při použití techniky STM dochází k toku elektronů mezi sondou a vodivým povrchem tzv. tunelováním^{3,4}. Oproti tomu při technice SECM jsou procházející proudy faradaické, tzn. pocházející z elektrodové reakce nejčastěji ve vodném prostředí. Zmínky o technice zvané SECM spadají do konce 80. let a byly podány dvěma různými laboratořemi.



Obr. 1. Schematické znázornění nejrozšířenějších skenovacích technik založených na elektrochemické interakci např. STM nebo SECM (a), přitažlivých či odpuzivých silách např. AFM (b), interakci záření s povrchem např. NSOM (c)

Engström popsal možnost měření koncentračních profilů v roztoku a stanovení reakčních meziproduktů s krátkou životností⁵, zatímco skupina Barda⁴ vycházela ze základů STM a zaměřila se na interakci sondy s povrchem. Právě Bard popsal jev zpětné vazby⁶, která je pro SECM zásadní a bez níž by tato metoda nezískala svou současnou podobu (pojem zpětná vazba, který bude zmíněn v odstavci o měřicím režimu zpětné vazby, nemá v případě SECM stejný smysl jako všeobecně rozšířený pojem zpětné vazby např. v elektronice nebo v AFM či STM přístrojích).

Jako SECM je tedy označována technika, kdy nad zkoumaným povrchem je diskontinuálně (po malých krocích) pohybováno sondou (zde mikroelektrodou) a v každém bodě jsou změřeny elektrochemické vlastnosti – tok faradaických proudů vyvolaných elektrochemickými procesy. Během pohybu mikroelektrody je z měřených elektrochemických vlastností získávána informace o skenovaném povrchu. Tato informace je spojena buď s elektrochemickými vlastnostmi povrchu nebo se týká topografie zkoumaného vzorku. Rozlišení této techniky se jako u ostatních podobných metod odvíjí od velikosti sondy, u SECM se nejčastěji jedná o řády mikrometrů.

Přestože o metodě SECM a jejím použití již byla vydána samostatná monografie³⁴, napsáno několik kapitol v knihách s různým elektrochemickým zaměřením⁷ či publikována řada kvalitních rešeršních prací zabývajících se jak obecným použitím SECM (cit.^{1,14,26,29}) tak i specializovaných^{19–21,30,32,33,35}, začínajícím zájemcům lze doporučit práci²³, která se sice blíže zaměřuje na použití SECM v kombinaci s imobilizovanými enzymy, ale úvodní část je natolik dobře zpracována (stručná, výstižná, s upozorněním na v literatuře často opakující se chyby a chybná pojmenování), že je možné ji samostatně vyzdvihnout.

Jak již bylo dříve správně upozorněno^{21,36}, v používané terminologii se skenovaný povrch označuje jako „substrát“ (pojem zavedený Bardem). Z důvodu možných nedorozumění v případě studia enzymatických reakcí touto metodou byly navrhovány možné pojmy jako „terč“³⁶ nebo „vzorek“²¹. V této práci bude zkoumaný povrch označován jako „vzorek“, „skenovaný povrch“ či „studovaný povrch“.

Použití techniky SECM je velice široké a mohou jí být studovány např. rychlé homogenní i heterogenní reakce^{1,7,8} společně s jejich kinetickými faktory⁹ (zde můžeme často nalézt srovnání s rotující diskovou elektrodou^{10–14}, která se používá pro studium kinetik, její vlastnosti jsou totiž podrobně popsány). Dále lze díky SECM studovat děje adsorpce-desorpce na povrchy^{1,2} a určovat vlastnosti látek (jako např. difuzní koeficienty¹⁵), vlastnosti vodivých či nevodivých polymerů, polymerních^{7,16} a polovodičových struktur^{7,14}. SECM je také možné využít při studiu elektrokatalýzy^{10,11,14,17,18} nebo koroze¹⁹. Metodou SECM byly charakterizovány mono- a dvojvrstvy^{14,27}, transport přes různé umělé membrány^{18,20,21} a propustnost rozhraní dvou nemisitelných fází^{9,20,22}. Dále je možno SECM použít pro vývoj a charakterizaci biosenzorů, zvláště pak enzymatických^{13,20,23–25}.

Široké uplatnění našla SECM v oblasti biologických systémů při pozorování elektrochemických dějů na úrovni nebuněčné (aktivita imobilizovaných enzymů^{20,26,27}, mitochondrií² či DNA²⁸) i buněčné (fotosyntéza, respirační pochody, buněčné redoxaktivní procesy^{20,21}). Elektrochemické děje byly také sledovány přímo v tkáních a dokonce v organismech *in vivo*³¹. Tímto způsobem byly monitorovány fyziologické děje *in vivo*³² (v mozcích krys¹²), transport látek tkáněmi (kůže¹², dentin²⁰, hovězí chrupavka²⁸) nebo resorpce kostí²⁸. V neposlední řadě je možné SECM využít k různorodým modifikacím povrchů^{11,18,24,33}, dokonce i v mikroelektronice³³.

I z tohoto neúplného výčtu aplikací je patrné, že použití metody SECM je velice široké. Některé aplikace budou později popsány podrobněji.

2. Měřicí aparatura SECM

2.1. (Ultra)mikroelektroda jako sonda

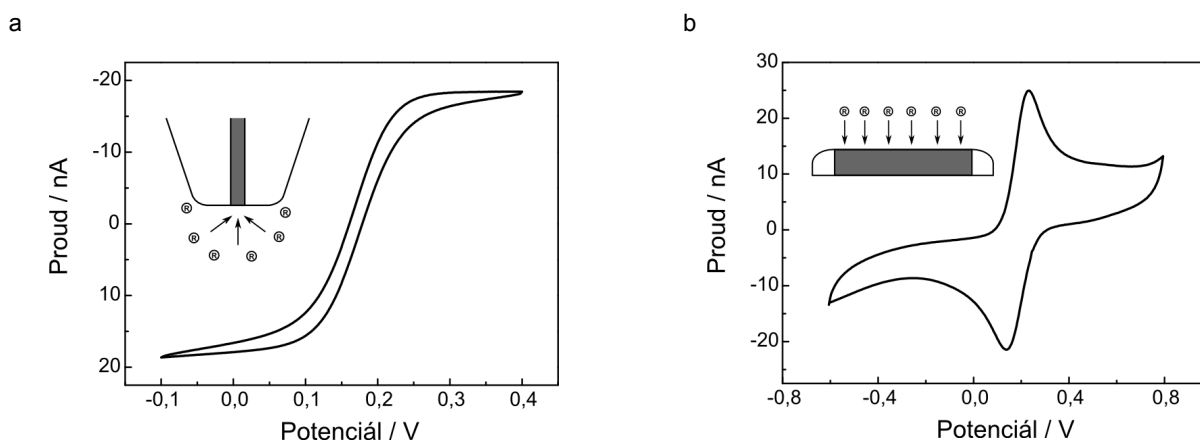
Nejdůležitější částí SECM je mikroelektroda (ME). Popis a rozbor jejích výhodných vlastností, které využívá technika SECM, lze nalézt v literatuře^{12,37–40}.

Mikroelektroda je obecně definována jako elektroda, která má aspoň jeden rozměr v řádu mikrometrů. Ačkoliv se s touto definicí spokojí mnoho autorů, pojem mikroelektroda byl v roce 2000 definován IUPAC jako elektroda, jejíž charakteristické rozměry jsou za daných experimentálních podmínek srovnatelné nebo menší s tloušťkou difuzní vrstvy, δ , a za těchto podmínek je dosaženo ustálení rovnovážného stavu³⁹. Často se používá pojem ultramikroelektroda (UME)^{29,34,40}, jenž je ale spíše chápán v kontextu vývoje elektrochemického názvosloví než odvozen od rozměru elektrod⁴⁰. Nicméně dle IUPAC pojmenování „ultramikroelektroda“ není konzistentní s obecnou terminologií a upřednostňuje název mikroelektroda.

Nejdůležitějším faktorem ovlivňujícím chování elektrody je přenos hmoty (mass transfer) v roztoku v blízkosti elektrody. Tento proces může být zajišťován třemi různými mechanismy:

- migraci – pohyb nabitých částic v závislosti na elektrickém poli,
- konvekci – hydrodynamický pohyb částic způsobený mícháním nebo průtokem,
- difuzí – pohyb částic v závislosti na koncentračním gradientu.

Přenos hmoty řízený čistou difuzí je dobře definovaný a snadno reprodukovatelný, proto je žádoucí pracovat za takových podmínek⁴⁰. U makroskopických elektrod ($r \geq 1$ mm) se uplatňuje pouze planární difuze kolmo k povrchu elektrody (vzhledem k velikosti elektrody se zde příspěvek difuze k okrajům elektrody neuplatňuje, či je spíše zanedbatelný, obr. 2b). Naproti tomu lze říci, že u ME je přenos hmoty podpořen, protože se zde výrazně uplatňuje vedle difuze planární také difuze k okrajovým částem elektrody. V případě diskových elektrod získává difuzní



Obr. 2. Cyklická voltametrie s mikroelektrodou o průměru 25 µm (a) makroelektrodou 1 mm (b) (10 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ v 0,1 M-KCl, rychlost skenu 100 mV/s vs. Ag/AgCl) se schematicky znázorněnou difúzí polokulovitou a planární

vrstva polokulovitý tvar (sférická difuze, obr. 2a) a tudíž, v porovnání s klasickou elektrodou, je tok elektroaktivní látky k povrchu větší³⁵. Z tohoto důvodu se u mikroelektrod velice rychle ustaví rovnovážný stav faradaických procesů, neboť velikost mikroelektrody je srovnatelná s difuzní vrstvou analytu. Výhodné vlastnosti mikroelektrod lze rozdělit do několika skupin podle znaků, ze kterých tyto vlastnosti plynou:

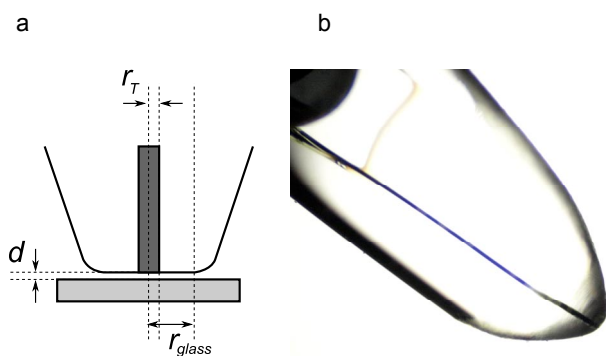
- vyšší látkový tok – vyšší proudové hustoty^{12,32,37–39,41} a vyšší poměr signál/šum^{37,39},
- malý součinn iR – ME jsou měřeny proudy v řádech nano- až pikoamper, tudíž je napěťový pokles iR zanedbatelný (napěťový úbytek na odporu systému pracovní elektroda, elektrolyt); je možné pracovat v roztocích s vysokým odporem (bez přídavku elektrolytu⁴²) a měnit vložený potenciál rychlostí až 10^6 V/s (cit.^{12,35,37–39}) bez většího vlivu na proudovou odezvu,
- nízká kapacita – kapacitní vrstva u ME se nabíjí v časech mili- až mikrosekund¹², lze proto studovat rychlé elektrodové děje (ME poskytuje rychlou odezvu) či chemické reakce doprovázející nestálé reaktanty a produkty^{38,39}.

Mezi další výhody ME patří malý vliv konvekce roztoků. Měření probíhá v ustáleném stavu řízeném sférickou difúzí i v míchaných roztocích (tzn. je zde malý vliv pohybu okolní kapaliny)^{39,40} a dochází k minimálnímu ovlivnění chemických rovnováh elektrolyzou na elektrodě. Tím se rozšiřují aplikace na měření v proudících kapalinách³⁹, studium nejrůznějších objektů v mikrometrovém rozlišení a v malých objemech^{35,37,40}, měření přímo v organismech *in vivo* atp.^{12,32}. Výhodou je také již zmíněná podobnost kinetik elektrodových reakcí s rotující diskovou elektrodou, která je detailně prostudována^{12,40}, tudíž se ME používají ke sledování chemických mechanismů^{39,40} a určení kinetiky daných procesů. Všechny zmíněné vlastnosti jsou přímým důsledkem malých rozměrů elektrody.

Ačkoliv první zmínky o mikroelektrodách pocházejí

ze 40. let 20. století⁴⁰, větší rozšíření mikroelektrod ve smyslu voltametrických senzorů související s rozvojem výrobních postupů spadá do počátku 80. let (cit.^{32,40}). Tyto elektrody jsou nejčastěji tvořeny drátkem nebo vláknem z vodivého materiálu (Au, Pt, C) o průměru 25 µm a menším²⁹ (výjimečně dosahující rozměrů pod 100 nm, cit.^{18,20}), který je zataven ve skleněné kapiláře. Může být použit i jiný izolant (různé polymery, epoxidy, polyimidy, roztažený vosk). Výsledný mikrodisk se leští tak, aby bylo dosaženo reprodukovatelných vlastností ME. Opačný konec vlákna je vodivě spojen se silnějším vodičem pomocí dřívě používané rtuti, dnes pomocí vodivého epoxidu, vodivých laků či pomocí slitin určených k pájení.

Jelikož je ME zásadní částí SECM rozhodující o většině výsledných parametrů měření, podrobný popis její přípravy je součástí řady publikací (např. cit.^{6,31,35}) a kapitola věnovaná této tematice je součástí mnoha přehledů^{1,14,20,26,37,38}. Mikroelektrody jsou většinou připravovány klasickou cestou (umístění vodivého vlákna do izolačního materiálu), ale používají se i litografické postupy^{42,43}. V takové podobě však nejsou použitelné pro metodu SECM. Výrobou klasických ME se podrobněji zabývá literatura^{18,35,44}. Mikroelektrody nemusí vždy být nutně jednotlivé diskové, mohou být svazkové^{25,41–43} nebo i jiného tvaru jako válce, hroty, drátky, kuličky s mikrometrovými rozměry³⁷. Zajímavou alternativou jsou dvojité mikroelektrody, kdy je možné umístit do jednoho kanálu elektrody pracovní a do druhého referentní či druhou pracovní¹. Taková ME byla použita pro detekci NO generovaného buňkou – první pracovní platinová elektroda sloužila ke stanovení vzdálenosti od povrchu a druhá pracovní pro selektivní stanovení NO (cit.³⁵). Nevýhodou je stále neúplně zvládnutá metodika přípravy. Jindy byl elektrodový systém tvořen Pt mikroelektrodou (Pt drátek zatavený ve skle), jejíž vnější stěny byly opatřeny vrstvičkou Ag, nanesenou ve formě stříbrné barvy představující referentní a pomocnou elektrodu³⁰. ME použitou v SECM nemusí být vždy jen kovový drátek či uhlíkové vlákno



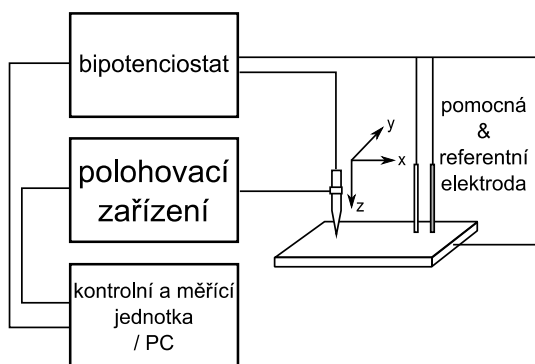
Obr. 3. Základní parametry pro charakterizaci ME (a); mikroelektroda – 33 μm uhlíkové vlákno ve skleněné kapiláře (b)

zatavené do skla. Vedle těchto běžných²⁰ modifikovaných ME se pro potenciometrická měření využívají iontově selektivní mikroelektrody ve formě mikropipet. Jedná se o kapiláru naplněnou iontově selektivním médiem nemísitelným s měřeným roztokem, v němž je ponořena pevná referenční elektroda^{20,22,31,48}.

Vlastnosti ME platí i pro jiné geometrie než je disk³², modelování odezvy a matematická analýza měřených proudů jsou však díky složitějším difuzním podmínkám obtížnější. Z rozměrů mikroelektrod jsou nejdůležitější poloměr použitého vlákna, r_T , a poloměr celkové elektrody tvořené vodičem a izolačním materiálem, r_{glass} (obr. 3a)²³. Mikroelektrody jsou často nazývány hrotem (z angl. tip), od čehož se odvozuje spodní index veličin spojených s ME.

2.2. Polohovací zařízení, potenciostat a další instrumentace

Ve srovnání s ostatními skenovacími technikami je metoda SECM svými nároky na instrumentaci relativně skromná (obr. 4). Ke konstrukci celého mikroskopu je zapotřebí pouze polohovací zařízení s vysokým rozlišením pro pohyb ve třech osách, zařízení umožňující elektroche-



Obr. 4. Blokové znázornění přístrojových částí SECM

mické měření – potenciostat, elektrochemická cela (součástí je i ME) a počítač s odpovídajícím řídicím programem^{1,18,20}.

Pro polohování ME je nejlepší kombinace krokových servomotorů s piezoelektrickými elementy. Krokové motory slouží k rychlejším, hrubým přesunům (stovky mikrometrů), piezoelektrické elementy k jemným pohybům při skenování. V takovém uspořádání je možné dosáhnout nejmenšího kroku až v řádech jednotek nanometrů. Pro většinu SECM aplikací jsou však dostačující samostatné krokové motory, které jsou schopné docílit rozlišení až 40 nm.

Fakt, že proudy měřené ME jsou v řádech nanoamper a nižších, klade vyšší nároky na kvalitu použitého potenciostatu. Mezi jeho důležité parametry tudíž patří hlavně citlivost. Tuto podmínku dnes našťastí splňuje většina komerčně nabízených přístrojů. Často se také setkáme s použitím bipotenciostatu, který slouží k aplikaci potenciálu i na skenovaný povrch. Ten poté funguje jako druhá pracovní elektroda. Z důvodů měření proudů v řádech pA či sub-pA je vhodné použít Faradayovu klec k odstínění okolních elektromagnetických šumů, které by nevhodně ovlivňovaly výsledky měření⁴⁴.

Volitelnou součástí může být antivibrační stolek vyrovnávající otřesy okolí.

3. Metody SECM

3.1. Režim zpětné vazby (feedback mode)

Zpětná vazba zde má poněkud jiný význam než známý pojem používaný v elektronice. Jedná se o pojmenování děje, který zajišťuje redoxní recyklaci elektrochemicky aktivní látky během měření (viz níže). Režim zpětné vazby představuje jeden ze dvou základních měřících přístupů SECM. Při měření v módu zpětné vazby se uplatňuje tzv. bráněná difuze a recyklace mediátoru. V roztoku je přítomen reverzibilní redox mediátor, který podléhá elektrochemické reakci $R \leftrightarrow O + ne^-$. Na ME, která se nachází nad zkoumaným povrchem, je proti referenční elektrodě vložen potenciál (v tříelektrodovém systému pak měřený proud prochází mezi pracovní a pomocnou elektrodou). Pokud je na pracovní mikroelektrodě dostatečně kladný potenciál zabezpečující elektrochemickou oxidaci R a je současně ve vzdálenosti od povrchu větší než je několikanásobek jejího poloměru (6- (cit.¹²) nebo 20násobek²³), protéká jí proud $i_{T\infty}$ úměrný vztahu:

$$i_{T\infty} = 4nFD_Rc_Rr_T$$

Zde $i_{T\infty}$ představuje proud v nekonečnu nebo proud ustáleného stavu (steady-state current), n je počet elektronů prošlých během reakce, F je Faradayova konstanta ($96\,485\text{ C mol}^{-1}$), D_R je difuzní koeficient a c_R koncentrace mediátoru R a r_T je poloměr pracovní mikroelektrody (vztah platí pro diskovou mikroelektrodu, matematicky však byly popsány i jiné geometrie¹⁸). V této situaci je difuze mediátoru R k povrchu elektrody hemisférická, má

polokulovitý tvar (obr. 2a). Jakmile se bude ME přibližovat směrem k povrchu, v závislosti na jeho vlastnostech se bude měnit její proudová odezva. Pokud se bude ME přibližovat k nevodivci (izolantu), difuzní profil mikroelektrody bude narušen – povrch nevodivce bude bránit přístupu mediátoru R k povrchu elektrody. Mediátor nebude volně difundovat z okolí, ale bude přistupovat pouze z okrajových částí elektrody, odezva tedy bude klesat. Tento jev je způsoben tzv. bráněnou difuzí a je označován jako negativní zpětná vazba (negative feedback, obr. 5a). Další přiblížení (možný je i mechanický kontakt ME s povrchem vzorku) způsobí další pokles měřené odezvy až se mediátoru R přístup zcela znemožní a odezva klesne na nulu.

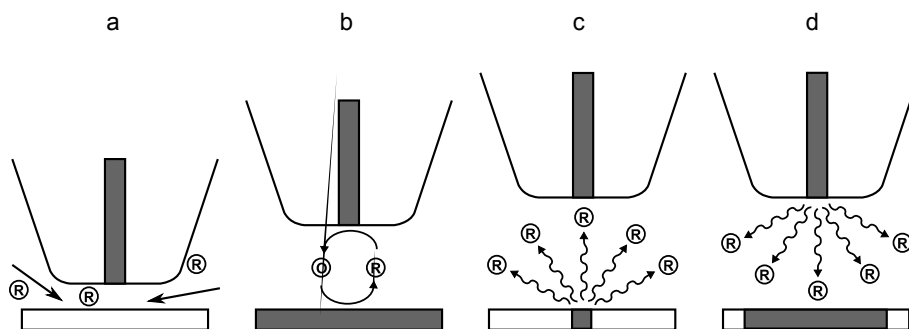
V opačném případě, kdy se ME přibližuje k vodivému povrchu, je situace jiná. Difuzní profil je sice také narušován a oxidovatelný mediátor R přistupuje také pouze z okrajových částí elektrody, avšak zde je oxidovaná forma O na studovaném povrchu redukována a opět může být oxidována na druhé straně mikroelektrodou, dochází k recyklaci mediátoru. Tento jev se označuje jako pozitivní zpětná vazba (positive feedback, obr. 5b). Takto uzavřená smyčka má za následek, že po přiblížení ME k vodivému povrchu stoupá měřená odezva (rychlost recyklace je mnohem vyšší než volná difuze mediátoru R z okolí v případě nekonečného oddálení). Po kontaktu s povrchem proud roste přese všechny meze (pokud je na vzorku napětí, tak dochází ke zkratu). Na sledovaný povrch účastníci se recyklace mediátoru může, ale nutně nemusí být aplikován potenciál. V diskutovaném případě, kdy na skenovaném povrchu není aplikováno napětí, se zde mediátor recykluje i bez vnějšího vloženého potenciálu. Potenciál povrchu je přirozeně kladný, pokud na povrchu elektrody neběží jiná boční reakce a pokud je koncentrace R mnohem vyšší než koncentrace O ($c_R \gg c_O$) – řídí se Nernstovou rovnicí. Studovaný povrch však může v experimentu vystupovat jako druhá pracovní elektroda, tzn. je na něj vložen potenciál proti použité referenční elektrodě (tento postup se používá, pokud je např. nutné zajistit regeneraci mediátoru řízenou přenosem hmoty k elektrodě – nezávislou na pře-

nosu elektronu). Výhody vnesené zapojením skenovaného povrchu jako druhé pracovní elektrody samozřejmě s sebou přináší i některé obtíže, mezi které patří pochopitelná nutnost použití bipotenciostatu či možná vazba kapacitních proudů⁸.

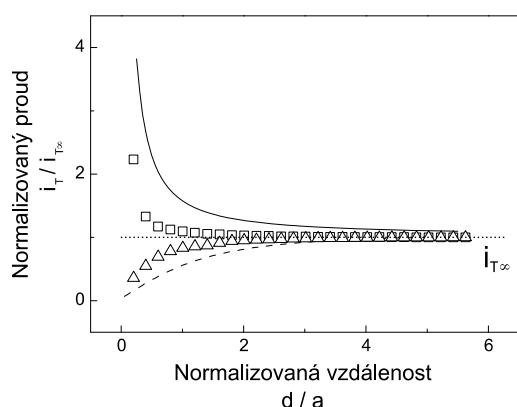
Při měření technikou zpětné vazby má na výsledky velký vliv poměr poloměru elektroaktivního povrchu r_T (dáno tloušťkou použitého drátku při výrobě ME) k poloměru celého hrotu mikroelektrody r_{glass} (obr. 3a), $RG = r_{\text{glass}} / r_T$. Běžně se hodnota RG pohybuje mezi 2 až 10 (cit.^{18,20}).

Pokud vyneseme proud mikroelektrodou proti její vzdálenosti od povrchu, získáme tzv. přibližovací křivku (approach curve nebo i_T - d curve, obr. 6)^{7,9,26,30,34}. Užitečnost přibližovacích křivek tkví v množství informací, které obsahují. Po podrobnější analýze těchto křivek (zvláště jejich tvaru) lze získat informace o povrchu, nad kterým se ME nachází^{6,45}, dále o tvaru hrotu ME (cit.^{22,20,45}), je možné stanovit kinetické parametry homogenních i heterogenních reakcí^{7,26} či transportu látek přes různé membrány^{28,46}. Je možné dokonce i separovat elektronový transport od transportu iontů⁹. Pokud bychom vynášeli přímo měřené parametry (např. i_T v pA a vzdálenost v μm), informativní hodnota grafu by byla velice nízká. Data získaná pomocí hrotu jsou samozřejmě silně ovlivněna kvalitou zpracování dané mikroelektrody. Proto byl zaveden normalizovaný záznam – vynesení normalizovaných veličin $i_T / t_{T\infty}$ na normalizované vzdálenosti od povrchu L , kde $L = d/a$ (d je vzdálenost ME od povrchu v μm a a je poloměr ME v μm). Matematický popis přibližovacích křivek byl numericky vyřešen pro oba typy povrchů, vodič i nevodivce⁴⁵. Důležitým poznatkem je, že při pozitivní vazbě nezáleží na poloměru izolační vrstvy, ale pouze na poloměru použitého vodivého vlákna, zatímco při negativní zpětné vazbě záleží i na poloměru izolantu, tedy celého hrotu mikroelektrody⁴⁵.

Zatím byly popsány pouze experimenty, kdy byla zaznamenávána závislost proudové odezvy na pohybu ME ve směru osy Z (kolmé k měřenému povrchu). Častější varianta měření se provádí tak, že je ME zafixována v určité výšce nad povrchem a je jí pohybováno ve směru



Obr. 5. Základní měřící režimy skenovacího elektrochemického mikroskopu: (a) režim zpětné vazby negativní – uplatňující se v blízkosti nevodivého povrchu, (b) pozitivní – uplatňující se v blízkosti vodivého povrchu, (c) režim tvorba sběr – SG/TC (surface generation / tip collection), kdy se elektrochemické částice tvořené vzorkem zpracovávají elektrochemickou reakcí na hrotu a (d) TG/SC, kdy jsou částice generované hrotem zpracovávány skenovaným povrchem

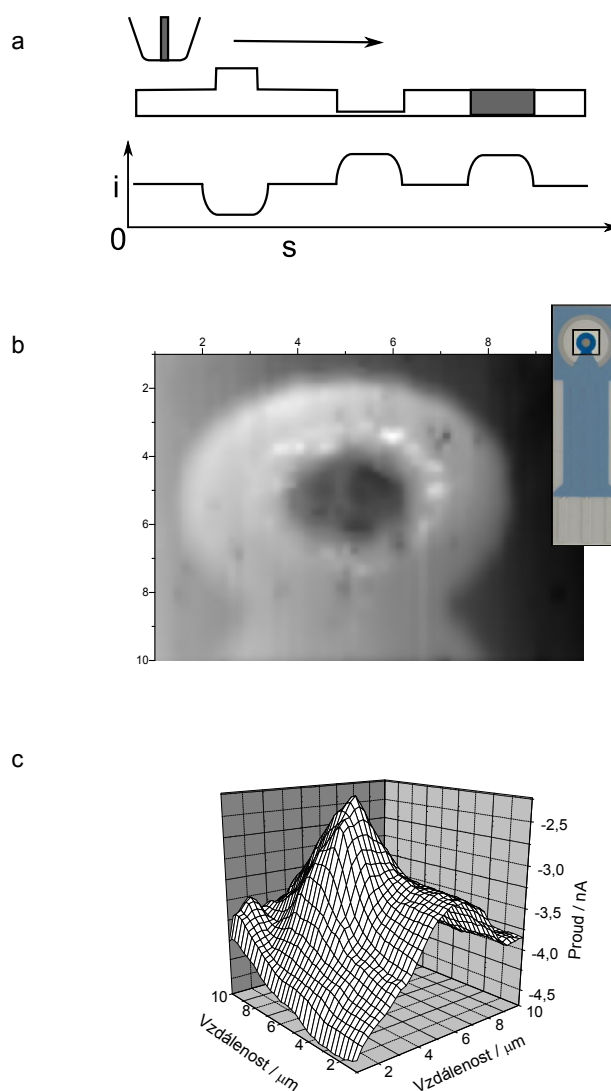


Obr. 6. Znázornění závislosti proudu na vzdálenosti mikroelektrody od povrchu (přibližovací křivka), teoretická hodnota měření nad vodivým (plná čára) a nevodivým (čárkovaně) povrchem, proud v nekonečnu $i_{T\infty}$ (tečkovaná čára); záznam měření přibližovacích křivek s Pt ME o průměru 25 μm při potenciálu -650 mV (vs. Ag/AgCl) v prostředí 5 mM $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ ve 100 mM-KCl, měření nad vodivým povrchem (□) měření nad nevodivým povrchem (Δ)

os X a Y (rovnoběžně s povrchem, obr. 7a). Ze změn měřené odezvy je pak možné získat informace o topografii či charakteru povrchu ve formě trojrozměrného obrazu (obr. 7b,c). V takovémto případě se ME nejčastěji nastaví do vzdálenosti, kdy jí protéká 60–80 % $i_{T\infty}$. Zde je nutné zopakovat, že rozlišení metody se mimo jiné odvíjí od velikosti použité ME – je obtížné sledovat objekty menší než je samotná mikroelektroda^{2,46}. Se zmenšujícím se poloměrem ME sice rozlišení metody roste, ale snižuje se vzdálenost ME od povrchu. Tím vzrůstá nebezpečí poničení ME o prudce se měnící reliéf nebo špatně umístěný povrch vzorku¹⁴. Řešení nabízí zpětnovazební smyčka (tentokrát elektronická) udržující konstantní proud mikroelektrodou⁴⁷, což zajišťuje pohyb hrotu ve stále stejné vzdálenosti od povrchu jako např. v metodě STM.

Topografii povrchu lze s výhodou studovat za pomoci bráněné difuze s nutnou podmínkou homogenity povrchu. Pro elektrochemickou charakterizaci povrchu se využívá bráněné difuze (pokud je ME nad nevodivým povrchem) i recyklace mediátoru (vodič). Z míry recyklace mediátoru se známým elektrochemickým chováním lze usuzovat na vlastnosti daného povrchu. O měření v režimu zpětné vazby se jedná také v případech, kdy se mediátor recykluje pomocí povrchově vázaného redoxního enzymu. Zajímavou možností v režimu zpětné vazby je měření recyklace mediátoru na rozhraní dvou nemísitelných fází iontem difundujícím přes mezifázi^{9,18,20}. Z uvedených podmínek pro měření topografie a charakteru povrchu lze poukázat na možná úskalí těchto technik. Při měření se mohou vyskytnout problémy v případě, že povrch není homogenní z hlediska jeho elektrochemických vlastností – při měření topografie (např. střídají se částmi vodivé s částmi nevodivými

mi), a povrch není rovný – při měření elektrochemického charakteru (nerovnosti povrchu jsou pomocí SECM měřitelné⁴¹). Těmito problémy se zabývali Wipf a spol. a navrhli techniku TPM-SECM (tip position modulation SECM), kdy hrot osciluje kolmo k rovině skenovaného povrchu. Amplituda oscilace byla zhruba 0,1 násobek poloměru elektrody^{2,47}. Za stejným účelem byla vyvinuta podobná metoda s oscilací ME v rovině paralelní se skenova-



Obr. 7. Znázornění závislosti měřeného proudu na topografii a charakteru skenovaného povrchu (a), bílá místa označují elektrochemicky neaktivní povrch, šedá místa aktivní; (b) příklad měření povrchu sítotiskové elektrody (BVT Technologies) v režimu zpětné vazby – světlá místa představují nevodivý, tmavá vodivý povrch měřené oblasti, měřená oblast je zvýrazněna na přiloženém obrázku elektrody; (c) příklad měření imobilizovaného enzymu glukosaoxidasy v G/C režimu (Pt mikroelektroda 25 μm , -650 mV vs. Ag/AgCl, 50 mM glukosa ve 100 mM KCl)

ným povrchem¹⁶. Problémy lze samozřejmě řešit nejjednodušším možným přístupem, kdy se povrch proskenuje dvakrát – jednou s aktivním mediátorem účastnícím se studované reakce a podruhé s mediátorem, který je pasivní a vzhledem k povrchu zůstává inertním.^{18,20} Další možností je kombinace SECM s AFM (cit.^{18,20,22}). Zde dochází k současnému skenování elektrochemických i topografických vlastností povrchu. Také byla publikována elegantní metoda, kdy na měřený stejnosměrný proud byl superponován střídavý signál. Změny ve střídavé složce (změny v impedanci roztoku) byly vztaženy ke změnám vzdálenosti hrotu od povrchu, změny ve stejnosměrné složce odpovídaly klasickému měření v režimu zpětné vazby¹³.

Mezi redoxními mediátory používanými pro režim zpětné vazby stojí kyslík na významném místě – jeho vsudypřítomnost a v případě pozorování aerobních organismů nutnost lze s výhodou využít pro určení vzdálenosti hrotu od povrchu¹⁷ a při měření topografie (režim negativní zpětné vazby). Není třeba zdůrazňovat, že se také často používá při studiu buněk a jejich metabolismu.

3.2. Generující/sběrný režim (generation/collection mode, G/C režim)

Z názvu je patrné, že jeden partner z dvojice mikroelektroda – skenovaný povrch elektrochemicky aktivní částice tvoří, druhý je spotřebává. Jsou rozlišovány dvě možnosti.

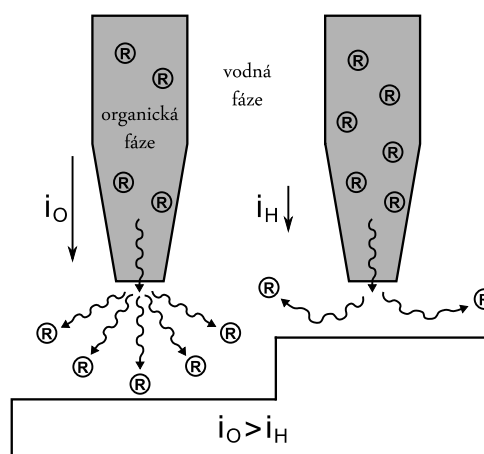
V první z nich generuje zkoumaný povrch elektrochemicky aktivní látku, která podléhá oxidaci/redukci na ME (hrotu). Tato možnost se podle anglického pojmenování substrate generation / tip collection označuje zkratkou SG/TC a lze se s ní setkat častěji (obr. 5c). Informace získané při SG/TC měření popisují prostorový koncentrační profil určité látky ve spojitosti se studovaným povrchem, běžné užití je proto právě studium koncentračních profilů např. nad stomaty v listech či v blízkosti transmembránových kanálů. Častým použitím této varianty je charakterizace enzymů imobilizovaných na povrchu (glukosaoxidasa, křenuv peroxidasa, ureasa, diaforasa, nitritreduktasa, alkalická fosfatasa)^{20,23,28,48}. Využití je také možné při dějích spojených s korozi¹⁹, obecnou difuzí¹⁵, metabolismem atp.^{1,26}. Výhodou je, že při dostatečné vzdálenosti ME od povrchu není v roztoku přítomna redox aktivní látka a měřený proud $i_{T_{\infty}} \approx 0$ na rozdíl od metody zpětné vazby, kdy je redoxní látka v roztoku a její reakce na ME by mohla překrýt stanovení malých změn v koncentraci pozorované látky²⁶.

V druhém případě TG/SC (tip generation/substrate collection, obr. 5d) je situace opačná, kdy ME tvoří látku elektrochemicky přeměňovanou na studovaném povrchu. Díky rozdílu velikosti povrchů se zde dosahuje až 100% účinnosti této přeměny. Tento přístup byl využit např. pro studium homogenních reakcí²⁶. Vlastnosti v daném místě sledovaného povrchu se získají ze závislosti proudu prošlého substrátem na poloze ME. Nevýhodou této techniky je, že procházející proudy jsou relativně malé – množství látky generované hrotem sondy je v porovnání s velkým

povrchem vzorku minimální. Měřený signál proto může být silně rušen proudy pozadí. Diskutovaný problém byl řešen použitím tzv. redoxního kompetičního režimu SECM (redox competition, RC-SECM), kdy mediátor podstupuje stejnou reakci na hrotu i na povrchu. Nejedná se o G/C režim jako takový, ale spíše o jeho modifikaci, kdy je substrát zpracováván na obou elektrodách (tedy na ME a povrchu). Při dostatečném přiblížení ME k povrchu dochází k prostupu difuzních vrstev obou elektrod a na ME je zaznamenán pokles měřeného proudu. Tímto způsobem byla studována elektrokatalytická redukce kyslíku^{10,11}.

Nevýhodou G/C režimu je, že vlivem difuze měřené látky se zvětšuje velikost studovaného objektu, který tuto látku generuje – jeho obraz se „rozostřuje“. Tento děj lze do jisté míry eliminovat spřaženou homogenní reakcí spotřebávající látky difundující volně do roztoku směrem od generující elektrody. Toho lze dosáhnout třemi různými způsoby – malým přidavkem enzymu zpracovávajícího měřenou látku^{23,27}, použitím systému generujícího nestabilní produkty^{8,18} nebo použitím látky volně reagující s detekovanou za vzniku nestabilních produktů²⁶. Zmíněné ztenčení difuzní vrstvy vede ke zvýšení rozlišení získaného obrazu. Výše popsané řešení problému „rozostření“ se nazývá „chemická čočka“^{8,27}. G/C režim může být také použit pro screening optimálního složení slitin pro různé elektrokatalytické procesy^{10,14,17,18} nebo pro studium průchodu neutrálních látek a iontů přes rozhraní dvou nemísitelných kapalin^{9,18}. S tím souvisí způsob měření, tzv. iontově-vodivostní mikroskopie, kde je po vložení potenciálu měřena migrace iontů směrem z nebo do mikropipety (obr. 8). Průchod iontů je samozřejmě ovlivněn blízkým okolím (přítomností povrchu bránícího difuzi iontů od pipety)²².

Jako elektrochemickou metodu pro G/C režim lze použít i potenciometrii^{20,31,48}. Metodou potenciometrické varianty G/C režimu byla studována kinetika reverzibilní in/aktivace imobilizovaného enzymu⁴⁸. Tyto dvě diskuto-



Obr. 8. Použití mikropipety pro měření topografie v režimu zpětné vazby (bráněné difuze), elektrický proud tvořený tokem iontů se mění v závislosti na reliéfu povrchu

vané metody (režim zpětné vazby a G/C režim) tvoří základ celé metodologie SECM. Další zmíněné metody jsou spíše aplikováním základních postupů při zkoumání určitých jevů.

3.3. Penetrační měření

Tato varianta využívá vpichování ME do materiálu. Tomuto způsobu měření musí být tvarově uzpůsobená elektroda – tenká s minimálním stíněním, které nejčastěji zprostředkovávají různé nevodivé polymery. Nejčastějšími sledovanými materiály jsou různé tenké vrstvy (v řádech mikronů a méně) s proměnlivou koncentrační charakteristikou redoxní látky jako např. polymerní vrstvy, gely a biologické tkáně. Velice důležitým objektem pro studium penetračním měřením jsou imobilizované enzymové vrstvy studované především pro vývoj enzymových biosenzorů. Penetrační měření se provádí v ose kolmé k povrchu se studovanou vrstvou, přičemž větší pohyb v osách X a Y není možný. Výsledkem měření není obvyklý plošný obrázek povrchu, ale záznam spíše podobný přibližovací křivce. V tomto případě lze získat informace o změnách koncentrace redoxaktivní látky, kinetických parametrech a parametrech pro přenos hmoty v závislosti na hloubce penetrace^{1,14,26,30}. Cílem studia penetračního měření nemusí být vždy jen vodivý polymer či membrána, ale i celý biologický systém jako je buňka. Zde je pozorována distribuce redoxaktivních látek a potenciálů uvnitř buňky nebo přenos náboje skrz biologickou membránu¹⁸.

3.4. Měření transportu přes rozhraní dvou fází

Tak jako je tomu u obou obecných režimů SECM, i zde se v závislosti na poloze ME zaznamenává signál. V tomto případě se však neměří aktivita povrchu, ale spíše propustnost detekovaných látek či obecně náboje přes rozhraní dvou fází^{9,18,20}. Tyto fáze mohou být nemísitelné (vodná a organická fáze)⁹ nebo mohou být odděleny separátorem – např. dentin²⁰ či jiné tkáně, lipidové mono- a dvojevrstvy napodobující přirozené buněčné membrány^{14,22}. Do této kategorie spadá i měření indukovaného přenosu mediátoru (induced transfer, SECM-IT), které se používá pro mapování permeability. Zde je výsledný proud řízen difuzí mediátoru z jedné fáze do druhé po vyčerpání mediátoru mikroelektrodou v blízkosti fázového rozhraní. Výhodou tohoto měření je neinvazivnost, čehož je využíváno pro experimenty s biologickými vzorky^{20,28}. Touto metodou lze získat informace o propustnosti separačních membrán, koncentraci a difuzních vlastnostech mediátoru v jednotlivých fázích.

3.5. Měření kinetických parametrů a reakčních rychlostí

Jelikož recyklace redox látky nad vodivým povrchem a bráněná difuze nad izolantem jsou dva extrémy, měřené hodnoty se spíše pohybují mezi těmito hranicemi. Pokud je studována chemická reakce účastnící se recyklace, pak

právě rychlost recyklace vypovídá o jejich rychlostních konstantách². Ze závislosti i na $L = d/a$, jinak řečeno z analýzy přibližovacích křivek za různých reakčních podmínek, lze získat rychlostní konstanty přenosu elektronů elektrodové reakce na ME či rychlost adsorpce/desorpce^{1,7}. Na rozhraní dvou nemísitelných kapalin byla sledována recyklace mediátoru (transport elektronů) nebo průchod iontů⁹. Vedle heterogenních reakcí⁸ je možné režim zpětné vazby použít pro stanovení kinetických parametrů homogenních reakcí^{1,7}. Tyto lze stanovit i G/C režimem, kdy je detekován produkt reakce, z jejichž substrátů je jeden generován elektrochemicky – proud ve vzdálenosti od povrchu se mění v závislosti na rychlosti druhé reakce¹⁸. Po přiblížení hrotu na vzdálenost 10 nm od povrchu lze stanovit rychlost reakcí prvního řádu až do $k \approx 10^7 \text{ s}^{-1}$ (10 nm představuje zhruba nejvyšší přiblížení, při kterém ještě nedochází k průchodu tunelového proudu²).

3.6. Mikro-litografie s využitím mikroelektrody

ME lze použít i k jiným než analytickým účelům. Bylo publikováno mnoho prací, které popisují využití SECM k modifikaci různých povrchů a materiálů. Modifikace mohou být provedeny dvěma způsoby^{1,18}, buď vylučováním materiálu na povrch (depozice), nebo jeho desorpcí (leptáním). Takto získaný (aktivovaný) povrch může být následně modifikován za účelem zisku jiných specifických vlastností (modifikace 2. stupně). Pokud se tento postup provádí za přítomnosti látky pro modifikaci 2. stupně, zvýší se tak kvalita výsledného modifikovaného povrchu. Omezí se přístup nečistot blokujících povrch aktivovaný pro další úpravy²³, jako je např. navázání enzymu²⁷.

S modifikacemi na mikroskopické úrovni se započalo koncem 80. let krátce po objevu SECM. První modifikace byly prováděny vylučováním (redukcí iontů) kovů na povrchu, nad kterým se pohyboval hrot SECM (cit.³³). Následovaly postupy místně specifického rozpouštění buď substrátu nebo přímo ME. Elektrochemickému leptání byly podrobeny i různé polovodiče. Byla publikována také tzv. neelektrochemická (electroless) metoda³³; kdy vzorkem neprochází elektrický proud – vzorek se elektrochemické reakce přímo neúčastní. V blízkosti vzorku se generují určité reaktivní částice (např. protony), dochází k chemické reakci a tím i modifikaci povrchu. Je možné povrch jak leptat, tak i na něj deponovat různé látky.

Průchodem velkých proudů²³ či generováním reaktivních látek byly desorbovány také samoorganizované monovrstvy (self-assembled monolayer, SAM)²⁷. Místně specificky generované reaktivní částice (HOBr) byly použity také na deaktivaci imobilizovaného enzymu diaforasy²⁴. Techniky modifikace povrchu na úrovni mikrometrů mají mnoho přímých aplikací např. v mikroelektronice při výrobě svítivých diod (LED) či nabíjecích baterií na bázi polymerních materiálů³³. Některé zmíněné postupy se používají při studiu koroze pro lokálně iniciovanou tvorbu korozivních center¹⁹. S modifikací povrchů depozicí je příbuzná zajímavá metoda představená skupinou

W. Schuhmanna¹⁶. Na povrchu byly elektropolymerizací připraveny válcovité pyrolové útvary vysoké 140 μm , s průměrem 40 μm .

4. Další vybrané aplikace SECM

4.1. Biosenzory

SECM může sloužit pro vývoj a charakterizaci biosenzorů^{13,23,25} na všech stupních výroby od modifikace povrchů (lokalizovaná modifikace^{24,27}, optimalizace imobilizační podmínky²⁸) až po ověření funkčnosti sensorické části např. u elektrochemických vícekanálových biosenzorů. Zde je častým nedostatkem tzv. křížení měřených odpovědí, které je způsobeno překrývajícími se difúzními profily a které lze pomocí SECM studovat²⁵.

SECM lze s vynikajícími výsledky použít pro kontrolu kvality např. sítotiskem vyrobených svazkových elektrod, které tvoří základ vícekanálových biosenzorů. Izolační vrstva zde vždy nemusí dokonale krýt přívodní kontakty a tvar elektrody určený nanosenou izolační vrstvou také nemusí vždy odpovídat původní představě. Mohou se zde vyskytovat poruchy v jednotlivých vrstvách, které nelze odhalit běžným světelným mikroskopem⁴¹.

Pokud jde o to, který pracovní režim použít, nelze v tomto případě s určitostí rozhodnout. Oba měřicí režimy mají své výhody i nevýhody. Nevýhoda režimu zpětné vazby již byla nastíněna výše – při studiu enzymatické aktivity na povrchu je detekována relativně vysoká odezva faradaického proudu (mediátoru v roztoku), která se v blízkosti vzorku zvyšuje jen mírně. Dokonce zde hrozí i „průsaky“ od mediátoru, který prostoupil enzymovou vrstvou a recykloval se na podkladním povrchu²⁷. Nevýhoda při použití G/C režimu tkví ve zvyšujícím se pozadí generovaném vzorkem v průběhu měření. Dochází k již opět zmíněnému „rozostření“ analyzovaného objektu.

4.2. Buněčné studie

Rozlišení SECM se nejčastěji pohybuje v řádech mikrometrů. Této velikosti mezi biologickými vzorky odpovídají rozměry buněk. Proto není divu, že se tématem studia buněk pomocí SECM zabývalo množství prací. Biologické vzorky (buňky, buněčné kultury, tkáně a živé soustavy obecně) lze studovat neinvazivně *in vivo* – přímo v živném médiu, tudíž odpadá nutnost jakékoli úpravy vzorku^{20,28}. Při použití dostatečně citlivých komponent přístroje je možné získat informace na úrovni jednotlivých buněk. Hrot se přiblíží bezprostředně ke vzorku a je zaznamenáváno uvolňování různých látek. V takovémto případě je možné pozorovat fyziologické pochody odehrávající se v řádech mili- nebo mikrosekund¹². Vedle reliéfu jednotlivých buněk⁴⁶ je další měřenou vlastností prostupnost redoxních mediátorů buněčnými membránami, zvláště kyslíku^{28,30}. Pro možnost poměrování prostupnosti různých látek buněčnou membránou byl definován tzv. koeficient

permeability P_m (cit.²¹). Na základě detekce redoxních látek v blízkosti membrán buněk byly studovány fyziologické pochody a reakce na různé podněty, jejichž výsledkem je např. oxidativní stres, exocytóza nebo transport látek¹². Mezi studované fyziologické elektrochemicky aktivní látky patří např. inzulin, katecholaminy či různé léky³⁰, elektroaktivní chemické přenašeče – NO (cit.²⁰), neurotransmitery jako dopamin, nor-/epinefrin, ale také reaktivní formy kyslíku jako např. superoxidový kation, hydroxylový radikál a peroxid vodíku generované jako odpověď na buněčný stres^{21,28,32}. Fotosyntetická aktivita, respirace a také cytotoxické účinky různých látek (KCN, ethanol, antimycin A) byly studovány na základě monitorování kyslíkového profilu v blízkosti buňky³⁰. Aktivitu buněk lze samozřejmě také jednoduše sledovat pomocí měření pH na úrovni jednotlivých buněk²⁸.

Pomocí SECM bylo možné detekovat genetické mutace²⁸ či rozlišit mezi metastatickými a nemetastatickými buňkami na základě jejich fyziologických projevů²⁰. Podobně jako při screeningu elektrokatalyticky aktivních slitin je možné SECM použít pro screening protirakoviných léčiv²⁸.

Dalším logickým krokem bylo měření redoxních dějů přímo uvnitř buňky. Za tímto účelem je nutné, aby ME měla tvar a rozměry umožňující průnik cytoplazmatickou membránou, tzn. průměr vlákna či drátku $\leq 1 \mu\text{m}$ ale i izolantu (celkový průměr ME zde nesmí přesáhnout 5 μm , cit.³⁵). Tímto způsobem byly studovány koncentrační poměry různých mediátorů (např. NO)³⁵, respirační pochody v buňce, cytotoxické účinky látek a transport buněčnou membránou. Ačkoliv přímé měření uvnitř buňky nabízí obrovské experimentální možnosti, je třeba si uvědomit, že celistvost buňky je tímto porušena a měřená odpověď je pak samotným experimentem ovlivněna (byl pozorován prudký nárůst koncentrace H_2O_2 po vpichu mikropipety do buňky)^{21,28}.

4.3. Kombinace SECM s dalšími metodami

V poslední době se SECM kombinuje i s jinými typy metod. Výsledkem jsou tzv. hybridní metody jako dnes již téměř samostatně přijímaná metoda SECM-AFM (cit.^{14,18,20}). Dalšími metodami, se kterými je SECM kombinována, jsou povrchová rezonance plazmonů (SPR)^{18,20}, elektrochemické křemenné mikrováhy (EQCM)^{14,18}, různé typy optické mikroskopie (skenovací konfokální mikroskopie^{14,28}, skenovací chemiluminiscenční mikroskopie²⁸, fotoelektrochemická mikroskopie²⁰, skenovací optické mikroskopie blízkého pole^{14,18}) a mnohé další. Kombinace metod se SECM je vždy uskutečňována za účelem získu více informací, které by lépe charakterizovaly měřený vzorek nebo eliminovaly nedostatky, kterými SECM trpí (problematika separace elektrochemických vlastností a topografie)¹⁹.

4.4. Detekce jediné molekuly

Metodou SECM již byl také proveden experiment, při kterém byl zaznamenán elektrochemický signál jediné molekuly mediátoru (ferocen). Tuto studii uveřejnili v roce 1995 Bard a Fan⁴⁹, ME byla při této studii překryta voskem a odhalen diskový povrch s průměrem 15 nm, který byl zanořen dovnitř. Stěny izolačního vosku tak tvořily mírnou bariéru po stranách. Při koncentraci 2 mM mediátoru byla uzavřena statisticky jediná molekula ferocenu v cca. zeptolitrovém objemu (10^{-18} l) vytvořeném mezi takto upravenou ME a vodivým povrchem.

5. Závěr

Byly shrnuty hlavní rysy skenovací elektrochemické mikroskopie, u které tak jako u ostatních skenovacích technik platí, že rozlišení roste s klesajícími rozměry sondy. Zde je nutné podotknout, že rozlišení SECM nebude nikdy na atomární úrovni. Při přiblížení na 1 nm, které by k tomu bylo potřeba, již tečou tunelové proudy^{2,4} a metoda by se pak stala obdobou STM. Možná námitka, že SECM je pouze STM s nižším rozlišením, není objektivní. SECM je oproti STM schopna charakterizovat i nevodivé povrchy (rozlišení elektrochemicky rozdílných míst) či odhalit jejich topografii. Další velkou výhodou SECM je pracovní prostředí – vodivé roztoky elektrolytů, mezi které se samozřejmě řadí i fyziologické podmínky různých organismů a vodné roztoky pufříků obecně. SECM je jedinečná díky možnosti jediným přístrojem a v jediném experimentu pozorovat nejen tvar sledovaných entit, ale i jejich funkci, aktivitu nebo procesy, ve kterých tyto entity vystupují. Ačkoliv jsou základní teoretické aspekty metody SECM již velice podrobně zpracovány^{26,45}, stále se setkáváme s novými poznatky, které jsou však vesměs spojeny jen se složitějšími a speciálními případy měření¹⁸. Stále častěji se také můžeme setkat s matematickým modelováním signálu mikroelektrody v různých měřících situacích^{18,20}. Od první zmínky o metodě známé jako skenovací elektrochemická mikroskopie v 80. letech 20. století neuplynulo mnoho času a již lze hovořit o robustní a dobře zavedené metodě. Nyní čeká na další praktické aplikace, z nichž zde některé byly představeny.

Tato práce vznikla díky projektu “CEITEC – Středoevropský technologický institut” (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) z Evropského fondu regionálního rozvoje a bilaterální česko-maďarské spolupráci v rámci KONTAKT MEB 040 914 „Electrochemical biosensing with enzymes, antibodies and cells based on scanning probe microscopies“ podporované MŠMT.

LITERATURA

- Nagy G., Nagy L.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 366, 735 (2000).
- Bard A. J., Fan F.-R. F., Pierce D. T., Unwin P. R., Wipf D. O., Zhou F.: *Science* 254, 68 (1991).
- Salemink H., v knize: *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry* (Settle F. A., ed.), kap. 41, Prentice-Hall, Inc., New Persey 1997.
- Liu H.-Y., Fan F.-R. F., Lin C. W., Bard A. J.: *J. Am. Chem. Soc.* 108, 3838 (1986).
- Engstrom R. C., Weber M., Wunder D. J., Burgess R., Winquist S.: *Anal. Chem.* 58, 844 (1986).
- Bard A. J., Fan F.-R. F., Kwak J., Lev O.: *Anal. Chem.* 61, 132 (1989).
- Bard A. J., Fan F.-R., Mirkin M., v knize: *Physical Electrochemistry, Principles, Methods and Applications* (Rubinstein, I., ed.), kap. 4. Marcel Dekker, New York 1995.
- Engstrom R. C., Small B., Kattan L.: *Anal. Chem.* 64, 241 (1992).
- Wei C., Bard A. J., Mirkin M. V.: *J. Phys. Chem.* 99, 16033 (1995).
- Eckhard K., Schuhmann W.: *Electrochim. Acta* 53, 1164 (2007).
- Okunola A. O., Nagaiah T. C., Chen X., Eckhard K., Schuhmann W., Bron M.: *Electrochim. Acta* 54, 4971 (2009).
- Wightman R. M.: *Anal. Chem.* 53, 1125A (1981).
- Horrocks B. R., Schmidtke D., Heller A., Bard A. J.: *Anal. Chem.* 65, 3605 (1993).
- Amemiya S., Bard A. J., Fan F.-R. F., Mirkin M. V., Unwin P. R.: *Annu. Rev. Anal. Chem.* 1, 95 (2008).
- Csóka B., Nagy G.: *J. Biochem. Biophys. Methods* 61, 57 (2004).
- Kranz Ch., Gaub H. E., Schuhmann W.: *Adv. Mater.* 8, 634 (1996).
- Lin Ch.-L., Rodríguez-López J., Bard A. J.: *Anal. Chem.* 81, 8868 (2009).
- Sun P., Laforge F. O., Mirkin M. V.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 9, 802 (2007).
- Niu L., Yin Y., Guo W., Lu M., Qin R., Chen S.: *J. Mater. Sci.* 44, 4511 (2009).
- Edwards M. A., Martin S., Whitworth A. L., Macpherson J. V., Unwin P. R.: *Physiol. Meas.* 27, R63 (2006).
- Yasukawa T., Kaya T., Matsue T.: *Electroanalysis* 9, 653 (2000).
- Amemiya S., Bard A. J.: *Anal. Chem.* 72, 4940 (2000).
- Wittstock G.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 370, 303 (2001).
- Shiku H., Takeda T., Yamada H., Matsue T., Uchida I.: *Anal. Chem.* 67, 312 (1995).
- Strike D. J., Hengstenberg A., Quinto M., Kurzawa Ch., Koudelka-Hep M., Schuhmann W.: *Mikrochim. Acta* 131, 47 (1999).
- Mirkin M. V., Horrocks B. R.: *Anal. Chim. Acta* 406, 119 (2000).
- Wittstock G., Schuhmann W.: *Anal. Chem.* 69, 5059 (1997).
- Roberts W. S., Lonsdale D. J., Griffiths J., Higson S. P. J.: *Biosens. Bioelectron.* 23, 301 (2007).
- Bard A. J.: *J. Chem. Ed.* 84, 644 (2007).

30. Bard A. J., Li X., Zhan W.: *Biosens. Bioelectron.* 22, 461 (2006).
31. Gyetvai G., Nagy L., Ivaska A., Hernadi I., Nagy G.: *Electroanalysis* 21, 1970 (2009).
32. Wightman R. M.: *Science* 311, 1570 (2006).
33. Radtke V., Heinze J.: *Z. Phys. Chem.* 218, 103 (2004).
34. Bard A. J., Mirkin M. V.: *Scanning Electrochemical Microscopy*. Marcel Dekker, New York 2001.
35. Schulte A., Schuhmann W.: *Angew. Chem., Int. Ed.* 46, 8760 (2007).
36. Nagy G., soukromé sdělení.
37. <http://www.eurochem.cz/polavolt/obecne/prislusenstvi/elektrody/opakar/mikroelektrody.htm>, staženo 7. června 2011.
38. Koryta J.: *Chem. Listy* 84, 347 (1990).
39. Štulík K., Amatore Ch., Holub K., Mareček V., Kuttner W.: *Pure Appl. Chem.* 72, 1483 (2000).
40. Amatore C., v knize: *Physical Electrochemistry, Principles, Methods and Applications* (Rubinstein I., ed.), kap. 4. Marcel Dekker, New York 1995.
41. Zoski C. G., Simjee N., Guenat O., Koudelka-Hep M.: *Anal. Chem.* 76, 62 (2004).
42. Thormann W., van den Bosch P., Bond A. M.: *Anal. Chem.* 57, 2764 (1985).
43. Chidsey Ch., Feldman B. J., Lundgren C., Murray R. W.: *Anal. Chem.* 58, 601 (1986).
44. http://www.scitopics.com/Electrochemistry_at_disc_microelectrode_arrays.html, staženo 7. června 2011.
45. Kwak J., Bard A. J.: *Anal. Chem.* 61, 1221 (1989).
46. Liebetrau J. M., Miller H. M., Baur J. E., Takacs T. A., Anupunpisit V., Garris P. A., Wipf D. O.: *Anal. Chem.* 75, 563 (2003).
47. Wipf D. O., Bard A. J., Tallmann D. E.: *Anal. Chem.* 65, 1373 (1993).
48. Horrocks B. R., Mirkin M.V.: *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 94, 1115 (1998).
49. Fan F.-R. F., Bard A. J.: *Science* 267, 871 (1995).

K. Lacina^a, P. Skládal^{a,b}, and G. Nagy^c
 (^a*Department of Biochemistry and* ^b*CEITEC, Masaryk University, Brno* ^c*Department of General and Physical Chemistry, University of Pécs, Hungary*): **The Scanning Electrochemical Microscopy**

A combination of unique properties of microelectrodes (ME) with a XYZ positioning system and simple potentiostat provides an outstanding tool for surface-confined electrochemical studies affording a method called scanning electrochemical microscopy (SECM). Since the first reports in the late 1980's, SECM has transformed to a well characterized and widespread method based on commercially available instrumentation. The principle of SECM stems from discrete movements of the probe (ME) above the studied surface while electrochemical signal is measured in every position. SECM employs two principal measuring modes – (1) the feedback mode (the mediator electrochemically consumed by ME is regenerated by the conducting surface) and (2) generation/collection mode (the active substance generated by the studied surface is determined by ME). Due to its simplicity and robustness, SECM is used in diverse fields and applications including basic electrochemistry, materials science, biochemistry and cellular biology.