

Újszerű amperometriás mérés technika
fejlesztése
célszerűen módosított elektródokkal működő
hatékony módszerek kidolgozására

Doktori (Ph.D.) értekezés

Óri Zsuzsanna Emese

Doktori Iskola vezető: Dr. Kilár Ferenc
Témavezető: Dr. Nagy Géza



Pécsi Tudományegyetem
Természettudományi Kar
Kémia Doktori Iskola

Pécs
2020

Köszönetnyilvánítás

Ezúton mondok köszönetet témavezetőmnek, **Dr. Nagy Géza** emeritus professzornak az egyetemi képzettségemhez kapcsolódó, ösztönző témaválasztásért, a hasznos és lelkesítő konzultációkért, a közlemények és a dolgozat elkészítéséhez nyújtott fáradhatatlan és önzetlen segítségéért.

Hálás vagyok **Nagyné Dr. Zengő Livia** tudományos főmunkatársnak az együttműködések, konferenciák során nyújtott támogatásáért, a kísérleti feltételek biztosításáért.

Köszönettel tartozom a **Richter Gedeon Talentum Alapítványnak** és Munkatársainak, hogy ösztöndíjkkal támogattak.

Köszönetet mondok továbbá **Dr. Kunsági-Máté Sándor** egyetemi docensnek, hogy kutatómunkám mellett a dolgozat befejezését számomra lehetővé tette, mindvégig támogatott.

Szerzőtársaimnak és a **PTE TTK Általános és Fizikai Kémia Tanszék minden dolgozójának** hálás vagyok a szakmai konzultációkért, együttműködésekért, baráti támogató légkörért.

Ezúton mondok köszönetet **Dr. Petr Skládal** egyetemi docensnek, a brnoi Masaryk Egyetem Biokémia Tanszéke vezetőjének és kutatócsoportjának, hogy a négy hónapos Erasmus szakmai gyakorlatomat hasznos tapasztalatszerzéssel, barátságos légkörben tölthettem.

Külön köszönetemet fejezem ki **Szüleimnek, Családomnak, Szeretteimnek** a sokrétű támogatásukért, a munkámat kísérő érdeklődő figyelemért, az elismerő szavaikért, biztatásért. Továbbá hálás vagyok **Barátaim** lelkesítéséért, törődő és érdeklődő figyeleméért, megbecsüléséért.

Végezetül megköszönöm **Dr. Kilar Ferenc** egyetemi tanárnak, a Kémia Doktori Iskola vezetőjének, a dolgozat benyújtásához adott hasznos támogató segítséget.

Tartalomjegyzék

1	Bevezetés.....	5
2	Irodalmi áttekintés.....	9
2.1	Bioszenzorok.....	9
2.2	Natív enzimforrást tartalmazó, növényi szövet alapú bioszenzorok	18
2.3	Pásztázó elektrokémiai mikroszkópiás mérések a bioszenzor fejlesztésben.....	25
2.4	Mérés tortuózus közegekben	29
2.5	L-aszorbinsav meghatározás valós mintákban	31
2.6	Amperometriás pulzáló detektálást alkalmazó technikák	33
2.7	Oldott oxigén mérése	38
3	Kísérleti rész.....	43
3.1	Felhasznált anyagok és vegyszerek	43
3.1.1	Nyers enzimkivonat készítése banánból, enzimaktivitás mérés céljára:.....	44
3.2	Alkalmazott eszközök, műszerek.....	45
3.2.1	Áramló oldatos rendszer	45
3.2.2	Modell bioszenzor mérőcella	46
3.2.3	Elektródok	48
3.2.3.1	Szénpaszta mikroelektród készítése.....	48
3.2.3.2	Banánotród bioszenzor készítése	48
3.2.3.3	GC munkaelektrod L-aszorbinsav mérésére, tortuózus közegben	49
3.2.3.4	Clark-elektrod készítése.....	50
3.3	Referencia-módszer a polifenol-oxidáz enzim aktivitásának meghatározásához	51
4	Eredmények és értékelés.....	53
4.1	Natív enzimforráson alapuló, dopaminmérő bioszenzor	53
4.1.1	Az optimális elektródpotenciál meghatározása.....	54
4.1.2	Banán szövet kiválasztása bioszenzor készítés céljára	57
4.1.2.1	Enzimaktivitás mérése	57
4.1.3	A bioszenzor reakcióréteg optimális vastagságának meghatározása	61
4.1.4	A periódikusan megszakított amperometriás detektálás alkalmazása.....	64

4.1.5	A hagyományos amperometriás és a PMA üzemmódban működtetett banánotród összehasonlítása	67
4.2	L-aszkorbinsav mérés modell tortuózus közegben	71
4.2.1	Diffúziós réteggel módosított elektród és rövid idejű kronoamperometriás detektálás	76
4.2.2	A diffúziós réteg vastagságának hatása.....	78
4.3	Közvetlen L-aszkorbinsav meghatározás paprikában.....	80
4.3.1	A módosított elektród feltöltődéséhez szükséges időtartam	83
4.3.2	A viszkozitás hatása	84
4.3.3	L-aszkorbinsav tartalom mérése rostos paprika lében	87
4.3.4	Különböző anyagból készült kések hatása a paprika hús aszkorbinsav tartalmára..	89
4.4	Oxigénmérés üledékekben.....	92
5	Összefoglalás.....	97
6	Tézispontok.....	99
7	Publikációs jegyzék.....	101
8	Irodalomjegyzék.....	106

1 Bevezetés

Az elektrokémiai módszerek a műszeres kémiai elemzés kialakulásában, fejlődésének egyes szakaszaiban fontos szerepet játszottak. A több mint 150 éve, Wolcott, Gibbs és Roots által kidolgozott elektrogravimetria, a legkorábban alkalmazott kvantitatív analitikai módszerek között említhető. Hasonlóan, a 18. századra nyúlik vissza a coulometria, a vezetőképesség mérés analitikai alkalmazásának kezdete is. Robert Behrend 1883-ban a titrálások végpontjának indikálására potenciometriás módszert alkalmazott. A direkt potenciometria alkalmazásához elméleti háttérrel nyújtó Nernst egyenlet 1889 óta vált ismertté. A pH mérésre napjainkban is használt potenciometriás üvegelektrodát Max Cremer a múlt század első éveiben (1908) vezette be a gyakorlatba. A csepegő higanyelektrod és a potenciálpásztázást lehetővé tevő mechanika fejlődésével volt lehetőség a polarográfia módszerének kifejlesztéséhez. A módszert Jaroslav Heyrovsky dolgozta ki, a polarográfiáról szóló első közlemény 1922-ben jelent meg.

Az elektroanalitika egyes módszereinek fejlődéséhez, teljesítőképességének növeléséhez, népszerűvé tételéhez sokszor járult hozzá más területen elért eredmény, illetőleg annak elektroanalitikai alkalmazása. Gondoljunk csak arra, mennyire megnövelte az ionszelektív elektródok felfedezése a potenciometria népszerűségét. Hasonlóan az elektronikus potenciosztátok megjelenése, vagy a számítógépek alkalmazása a voltammetria területén okozott ugrásszerű fejlődést.

Disszertációm alapjául szolgáló kísérleti munkámat az elektroanalitikai módszerek fejlesztése területén végeztem. A munka kezdetén észrevettem, hogy az elektrokémia eszközeinek, módszereinek a közelmúltban bekövetkezett fejlődése lehetőséget biztosíthat egyes elektroanalitikai módszerek teljesítőképességének növelésére, új alkalmazási lehetőségeinek feltárására.

A múlt század második felében számos natív, enzim tartalmú növényi, vagy állati szövetből készített bioszenzort írtak le különböző iskolákban dolgozó kutatók. Az így készített reakciórétegek stabilitása összehasonlítva koncentrált enzimmészítmények alkalmazásával kialakított bioszenzorokéval jelentősen nagyobbak bizonyult. Emellett az ebbe a csoportba tartozó

szenzorok ára jelentősen kisebb. Ennek ellenére ezen mérőérzékelők egyetlen változata sem terjedt el a mindennapi analitikai kémia gyakorlatában. Ez azzal magyarázható, hogy a natív réteg szerkezete, mérete, enzim aktivitása nem teszi lehetővé, hogy a gyakorlati minták koncentráció tartományában megfelelő megbízhatóságú analízist végezzünk. Célszerűnek látszott megvizsgálni, hogy vajon újabban kifejlesztett kémiailag módosított elektródok, optimált rétegvastagság és újszerű elektrokémiai adatgyűjtési módszer kombinált alkalmazásával kedvező irányba befolyásolható-e az illető bioszenzorok analitikai teljesítőképessége.

Különböző mintákban lévő komponensek koncentrációjának mérése során előnyös, ha mintavétel nélkül elvégezhető az analízis. A mintavétel hibája, a minta instabilitása által előidézett pontatlanságok ez esetben nem jelentkeznek. Szelektív elektrokémiai mérőérzékelők elvileg egyszerűen bevezethetők oldatmintákba, és az ott mért jel alkalmas kalibráció alapján jelzi a mintaközpontot. Voltametriás mérések esetében azonban két probléma merül fel. Egyrészt a minta mátrixban és a kalibráló oldatokban eltérő lehet a mintaanyag diffúziós sajátsága, másrészt az elektrolízis során a mintában lévő anyagok passziválhatják az elektródot. Ezek a hatások struktúrával rendelkező mintákban, tortuózus üledékekben, biológiai mintákban gyakran jelentkeznek.

Célszerűnek látszott annak megvizsgálása, hogy ezen hatások mennyire zavarják az in line analízis lehetőségét. Tanulmányozni kívántam azt, hogy a voltametriás adatgyűjtési program alkalmas megváltoztatásával, illetőleg a módosított elektródok területén elért újabb eredmények felhasználásával mennyiben küszöbölhetők ki a jelzett mérés technikai problémák.

Kísérleti munkám során bekapcsolódtam a Pécsi Tudományegyetem Természettudományi Karának Általános és Fizikai Kémia Tanszékén, a szelektív elektroanalitikai érzékelők és módszerek fejlesztésére irányuló munkába. Céлом volt konkrét gyakorlati feladatokat választva megvizsgálni, hogy az adott esetekben mennyire van lehetőség új megoldások alkalmazásával az említett érzékelők és módszerek teljesítőképességét növelve azok alkalmazási területét kiszélesíteni.

Összefoglalva céloom volt:

1., Natív enzimforráson alapuló, dopaminmérő amperometriás bioszenzor mérés technikailag fontos sajátságait kedvező irányba kívántam befolyásolni a reakcióréteg tirozináz aktivitásának

növelésével, optimális reakciórétegvastagság és újszerű amperometriás mérési módszer (PMA) alkalmazásával.

2., Meg kívántam vizsgálni, hogy amperometriás mérések esetében a minták viszkozitásának eltérő volta, vagy tortuózus szerkezete miatt jelentkező, a kiértékelést zavaró hatások kiküszöbölése mennyiben végezhető el alkalmas elektródmodosító és mérési technika alkalmazásával.

3., Gyakorlatilag fontos analitikai feladatot választottam az elektród passziválódást okozó tortuózus mintában történő közvetlen amperometriás analízist lehetővé tevő technika kidolgozására. A választott feladat friss paprika szelet felületén történő közvetlen L-aszkorbinsav mérés volt.

4., A Clark-féle amperometriás oxigénmérő cella esetében meg kívántam vizsgálni, hogy újszerű detektálási módszer alkalmazásával mennyiben növelhető a mérési eredmények megbízhatósága.

A munkámhoz alkalmazni kívánt, rendelkezésre álló eszközök:

1., Hagyományos méretű platina, üvegszerű szén (Glassy Carbon) munkaelektrodok, mikroméretű szénpaszta elektród, saját készítésű amperometris enzimaktivitást mérő cella, saját készítésű Clark-elektrod.

2., Pásztázó elektrokémiai mikroszkóp

3., Elektrokémiai mérőállomások, pH mérő, spektrofotométer

Munkám során amperometriás szenzorok analitikai alkalmazhatósági körét igyekeztem kiterjeszteni. A vizsgált érzékelők minden esetben voltametriás alapelektrodok módosításával készültek. Készítettem és vizsgáltam biokatalitikus réteggel módosított munkaelektrodot és diffúziós réteggel módosított elektrodokat. Alkalmazásukkal többé-kevésbé különálló területeken, eltérő komponensek meghatározására szolgáló módszereket tanulmányozva, azokat módosítva sikerült a módszerek analitikai jellemzőit kedvező irányba változtatnom. Minden esetben viszonylag új, ez ideig kevesek által alkalmazott amperometriás detektációs módszer használata alapvetően hozzájárult az eredmények eléréséhez. A dolgozatban tárgyalt részterületek között

fontos összekötő kapocsként szolgál az újszerű amperometriás detektálás továbbfejlesztése, alkalmazása.

A munkámhoz kapcsolódó szakirodalmi előzményeket az egyes területek szerint csoportosítva mutatom be.

2 Irodalmi áttekintés

2.1 Bioszenzorok

A bioszenzor olyan eszköz, melynek érzékelési funkcióját ellátó egysége valamilyen biológiai mechanizmus szerint működik, s ez jelátalakítóhoz (transzducerhez) kapcsolódik. A jelátalakító valamilyen észlelhető változást (fizikai vagy kémiai) mérhető jellé alakít át.¹

Az International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC, Nemzetközi Elméleti és Alkalmazott Kémiai Szövetség) ajánlása szerint² a bioszenzor olyan integrált eszköz, amely speciális biokémiai reakciókat használ fel egy kimutatni kívánt vegyület kvantitatív vagy félkvantitatív meghatározására oly módon, hogy a biológiai felismerő egység (enzim, antigén, antitest, szövet, sejt organelum, teljes sejt) közvetlen kapcsolatban áll a jelátalakítóval (transzducer).

A detektálás alapja a kimutatni kívánt vegyület specifikus kapcsolódása a komplementer biológiai felismerő elemhez (bioreceptor), amelyet egy megfelelő hordozó felületen rögzítenek.³ A molekuláris interakció egy vagy több fizikai, kémiai jellemző változását (pl. pH változás, elektron transzfer, tömegváltozás, hő fejlődés, gázok vagy ionok felvétele, ill. leadása) eredményezi, amely a jelátalakítóval mérhető. Gyakori cél a kimutatni kívánt anyag koncentrációjával arányos nagyságú vagy frekvenciájú elektromos jel detektálása.^{4, 5, 6}

Az első mai értelemben vett bioszenzort Clark és Lyons írták le 1962-ben,⁷ akik glükóz-oxidázt (GOX) rögzítettek egy amperometriás oxigén elektród felületére egy féligáteresztő dialízismembrán segítségével, hogy a minta glükóz koncentrációját közvetlenül meghatározhassák. Glükóznak biológiai közegekben történő mérésére Updike és Hicks is készített bioszenzort. A munkájukról szóló tanulmány 1967-ben⁸ a Nature folyóiratban jelent meg. Clark Jr.-nak glükóz mérő bioszenzorával kapcsolatos úttörő munkáját követően a bioszenzorok fejlesztése és alkalmazása jelentősen felgyorsult. A Yellow Springs Instrument vállalat újraindításával, 1975-ben jelent meg a Clark ötlete alapján - hidrogén-peroxid detektáláson keresztül - működő amperometriás glükóz mérő bioszenzor a kereskedelmi forgalomban.^{9, 10} 1963-ban G.A. Rechnitz és S. Katz¹¹ mutatták be az első tanulmányaikat a karbamid közvetlen potenciometriás meghatározása területén. G. Gilbault 1969-ben publikálta a potenciometriás karbamid elektródot.¹² 1973-ban P. Racine és W. Mindt tejsav bioszenzort fejlesztettek.¹³ 1976-ban készítették az első mikroba alapú bioszenzort és 1977-ben K. Cammann vezette be a bioszenzor fogalmát.¹⁴ 1979-ben

J. Kulys mesterséges redox mediátorokat használt úttörő munkája során,¹⁵ majd 1984-ben Cass és munkatársai bevezették az első ferrocén-mediált amperometriás glükóz bioszenzort,¹⁶ melyet a MediSense vállalat hozott kereskedelmi forgalomba 1987-ben. A IUPAC 1997-ben vezette be először a bioszenzor fogalmát, melyet a kemoszenzorok definíciójának analógiájára fogalmazott meg. A következő mérföldkő a 2007-ben beültetett glükóz bioszenzor volt, ami öt napig folyamatosan üzemelt.¹⁷ A bioszenzorokkal kapcsolatos munka napjainkban is tovább folytatódik az enzimek, antitestek, mikróbák előnyeinek kihasználásával és a különböző típusú transzducer-ek alkalmazásával. Napjainkra a bioszenzorok az analitikai kémia fontos eszközeivé váltak.

A bioszenzorok elterjedése a hagyományos analitikai technikákhoz képest előnyeikkel magyarázható.³ A biológiai eredetű felismerő elem olyan mértékű szelektivitást tesz lehetővé, hogy összetett minták valós idejű analízise lehetséges egyszerű mintaelőkészítés mellett, vagy akár mintaelőkészítés nélkül. További előny a nagy érzékenység, a reprodukálható mérések, a gyorsan és egyszerűen megvalósítható analízis, a gazdaságos működtetés. További lényeges szempont, hogy a hagyományos analitikai elemzésekén túl egyéb különleges célokra is alkalmazhatóak: például a karcinogenitás, mutagenitás, citotoxicitás jellemzésére.¹⁸

A manapság használt bioszenzorokat csoportosíthatjuk szerkezeti alapon, a bennük alkalmazott biológiai eredetű vagy azt imitáló felismerő rendszerek alapján és a detektálás típusa szerint.⁶ A bioszenzorokat két általános csoportba szokás sorolni az alkalmazott biológiai felismerő folyamat természete szerint: a biokatalitikus eszközök és a bioaffinitáson alapuló¹⁹ érzékelők. (1. táblázat)

Felismerő rendszer		Fizikokémiai jelátalakítás	
funkció alapján	felismerő egység	detektálás alapján	transzducer
biokatalitikus ¹⁹	enzimek ^{20, 21} mikroorganizmusok ²² szövetek ²³ immob.biokomponensek ²⁴	elektrokémiai	amperometria ²⁵ potenciometria ^{26, 27, 28, 29} voltammetria ^{30, 31, 32, 33} konduktometriá, stb.
bioaffinitás ¹⁹ nem katalitikus	antitestek ³⁴ receptorok ³⁵ nukleinsavak ³⁶ aptamerek ³⁷	optikai	optikai szálak ³⁸ OWLS ³⁹ SPR, ⁴⁰ stb.
		akusztikus ⁴¹	pl. TSM ⁶
		kolorimetriás ⁴²	
		termikus	termisztor ⁴¹
		mágneses ⁴³	
		frekvenciaváltozás	QCM ⁴⁴

1. táblázat: Bioszenzorok csoportosítása felépítésük és működésük alapján^{6, 19, 45}

Az elektrokémiai detektálású szenzorokat alkalmazták legkorábban^{7, 8} és ezek a mai napig igen széles körben elterjedtek. Az elektrokémiai módszereken belül a potenciometriás^{26, 27, 28, 29} és a voltammetriás^{30, 31, 32, 33} érzékelőket használják leggyakrabban. Az amperometriás bioszenzorok esetében két elektród között a potenciál értéket állítják be és az elektroaktív anyag oxidációja vagy redukciója során keletkező áramot mérik, s azt a mért anyag koncentrációjával hozzák összefüggésbe. A potenciometriás bioszenzorokhoz többnyire ionszelektív elektródokat használnak a vizsgált ion koncentrációjának meghatározására.¹⁰

Az optikai elven működő rendszerek a telekommunikációs technikában használt optikai szálak elterjedésével váltak egyre ismertebbé a bioszenzorok készítésére irányuló munkában^{46, 47, 48, 49} és mind a biokatalitikus, mind a bioaffinitáson alapuló reakciók detektálására⁶ szívesen alkalmazzák. Az optikai bioszenzorok egy fényforrásból és számos optikai elemből állnak, hogy speciális tulajdonságú fénysugárt hozzanak létre és a fénysugárt a modulátorba, a módosított érzékelő részbe, majd a fotodetektorba juttassák. A bioszenzorokban az optikai detektálás különböző lehetőségeinek alkalmazására került sor, így a csoporton belül, a működés elve alapján megkülönböztethetünk többek között abszorpciós spektroszkópiás, fluoreszcencia spektroszkópiás, lumineszcencia spektroszkópiás szenzorokat.¹ Egyes optikai bioszenzorok a hullámvezetőben belső visszaverődéssel terjedő fény elnyelődését követik nyomon, (attenuated internal reflection spectroscopy: ATIRS), mások a felületi plazmon rezonancia kialakulást (SPR: surface plasmon resonance) vagy a fényszóródás intenzitását (light scattering) detektálják.⁵⁰ Az optikai hullámvezető fénymódus spektroszkópia⁵¹ (Optical Waveguide Lightmode Spectroscopy: OWLS) jelölésmentes optikai módszer, amelynél a lézernyaláb fénye a szenzoron található rácson megtörik és meghatározott szögértékeknél belép a hullámvezetőbe, ahol teljes visszaverődések sorozatával terjed. A fény becsatolásának szöge függ a szenzor feletti evanescens térben elhelyezkedő anyag törésmutatójától, a szenzor a jellemző becsatolási szög megváltozásával reagál a határfelületen történő változásokra.

Szelektív gazda – vendég (host – guest) kötődésen alapuló bioszenzorok működhetnek a tömegváltozás nagyérzékenységű jelzését lehetővé tevő kvarc kristály mikromérleg (quartz crystal microbalance, QCM) jelátalakítóra épülő kivitelben.⁵² Ugyancsak a piezoelektromos hatáson alapuló akusztikus eszközöket is széleskörűen alkalmazzák detektálásra: többek között a felületi hullámok terjedési sebességét jelző alapérzékelőre⁵³ (surface acoustic wave sensors, SAW) is épülnek bioszenzorok. A kvarc oszcillátorok⁵⁴ (TSM: thickness shear mode, azaz tömbi

transzverzális módus) esetében valamilyen anyag kötődése az érzékelő felületén mérhető frekvenciaváltozást is okoz a tömegváltozásnak megfelelően. A miniatürizált mágneses bioszenzorok lényeges csoportját képezik azok, amelyeknél a jelképzés az ún. magnetorezisztív jelenségen alapul. A különböző típusok működésének alapja az, hogy a magnetorezisztív érzékelő ellenállása megváltozik, amint változó mágneses térbe kerül. Ezáltal lehetőség nyílik arra, hogy megfelelő elektronika alkalmazásával a változó mágneses teret elektromos jelként, áramváltozásként detektálják. Ezekkel a szenzorokkal mérhető például a szervek körül kialakuló biomágneses tér, de kimutathatóak a közel kerülő mágneses mikro- és nanorészecskék is, melyek számos különböző biológiai felismerő rendszerrel funkcionálizálhatók, mikrofluidikai csatornáknban, áramló oldatos rendszerekben alkalmazhatók.^{55,56} A biokatalitikus folyamatok során keletkező reakcióhőt, azaz a lokális hőmérsékletváltozást használják analitikai jelként egyes bioszenzorok, ezek miniatürizált hőelemre vagy termisztorra épülnek.^{57,1}

Ezen jelképzési módszerek eltérő előnyökkel és hátrányokkal rendelkeznek,⁵⁸ például a fluoreszcenciás technika kiváló érzékenységgű, de az eszköz költsége igen magas. Az elektrokémiai transzducer-ek használatával jó érzékenység is elérhető, viszonylag olcsó, azaz költségghatékony műszerezettség mellett. Ezen utóbbi technika további lényeges előnye a könnyű miniatürizálhatóság, s ennek köszönhetően elektrokémiai alapérzékelőt szívesen alkalmaznak hordozható, in-situ mérésekhez készülő mérési eszközök fejlesztésénél. A miniatürizált mágneses bioszenzorok igen jó alternatívát jelentenek az analitikai érzékenység és a méretezés szempontjából.⁵⁵ Különösen előnyösek azok a jelképzési módszerek, melyeknél a szelektív anyagfelismerést jelző specifikus kötődés létrejöttének észleléséhez nem szükséges külön nyomjelzést alkalmazni. Az antigén–antitest kötés létrejöttét például a piezoelektromos jelenségen alapuló QCM, stb. és az SPR technikák közvetlenül képesek jelezni. A jelölésmentes stratégiák rövid válaszidőt, egyszerű működési eljárást eredményeznek és az ismert, kedvezőtlen mellékhatások (sztérikus akadályok, kötődési torzulások, a jelzőanyag instabilitása) nem lépnek fel.⁵⁸

A legszélesebb körben tanulmányozott és használt bioszenzorok működése enzim katalízisen alapul. Az enzimek specifikusan felismerik szubsztrátjaikat és a megfelelő irányú reakciót katalizálják.^{1, 58} Így az illető szubsztrát jelenlétében, annak koncentrációjától függő sebességű, szelektív katalitikus reakció megy végbe. Adott alapérzékelő felületéhez kötött, enzim tartalmú rétegben a reakció sebességétől függő mértékű koncentráció-változás jön létre. Ez alapján képzi az

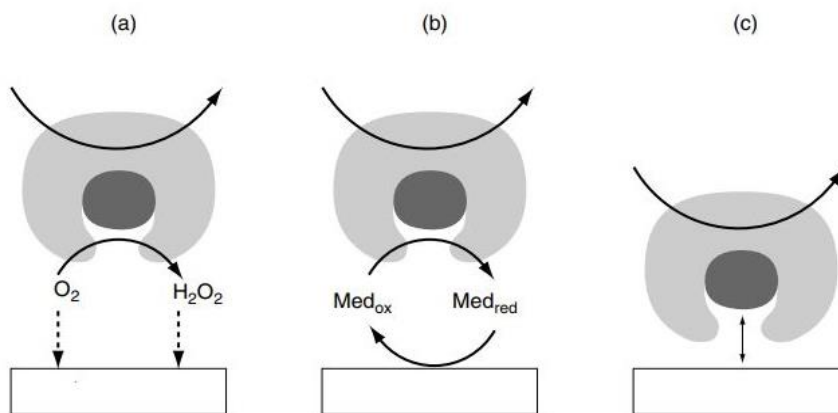
alapérzékelő az analitikai jelet. Az enzimkatalízisen alapuló bioszenzorokkal bonyolult mátrixban jelenlevő egyes komponensek analízise nagy szelektivitással elvégezhető. Sajnálatos módon azonban az enzimek szobahőmérsékleten lassabb – gyorsabb ütemben veszítenek aktivitásukból. Ebből adódóan az enzim szenzorok munkastabilitása nem tartozik kedvező tulajdonságaik közé.¹

Az immunszenzorok⁵⁵ azon a jelenségen alapulnak, hogy az antitesteknek nagy affinitása van a megfelelő antigénjeik felé, pl. az antitestek szelektíven kötnek a patogénekhez vagy toxinokhoz, továbbá kölcsönhatásba lépnek az ún. másodlagos antitesttel (kompetitív indirekt technikáknál),⁵⁹ melyet egy előzetes immunreakció eredményeként termelnek egy másik élőlényben/sejtkultúrában és tisztított formájában alkalmazzák analitikai célokra. Az immunszenzorok érzékenysége kiemelkedően magas.¹ A DNS bioszenzorokat⁵⁵ azon a tulajdonságon alapulva dolgozták ki, hogy az egyszálú nukleinsav molekula képes felismerni és kötődni a komplementeréhez egy mintában. A kölcsönhatás a stabil hidrogén kötéseknek köszönhető a két nukleinsav szál között. A nukleinsavakon alapuló bioszenzorok a többi típushoz képest kevésbé elterjedtek.¹ A bioaffinitás elvén működő bioszenzorok^{6, 37} mesterségesen kiválasztott DNS vagy RNS oligonukleotid aptamerek és mérendő mintaanyagok (ionok, makromolekulák, stb.) közötti kölcsönhatáson is alapulhatnak. Bioszenzorok készíthetők sejtorganellumok, izolált sejtstruktúrák (membránok, kloroplasztok, mitokondriumok és mikroszómák⁵⁵), sejtek, mikroorganizmus kultúrák, sőt akár egész élőlény, pl. rovar felhasználásával. A sejtek és egész organizmusok szenzorokban történő alkalmazásakor a detektálandó kémiai anyagok jelenlétét légzés, növekedés, fluoreszcencia vagy biolumineszcencia intenzitásának változása indikálhatja.⁵⁸ Szelektív anyagfelismerő funkciót biztosíthat biokatalizátort tartalmazó állati vagy növényi szövet. A vizsgált anyag inhibitora vagy szubsztrátja lehet a folyamatnak. Ezeknél a szenzoroknál a stabilitás általában nagy, de a válaszidő hosszú és a szelektivitás kicsi.⁵⁵ A receptorok¹ a sejtet határoló lipid kettősréteg plazma membránban található fehérjék, melyeket nehéz izolálni, azonban jó szelektív felismerést tesznek lehetővé. Bioreceptorokra ható agonista anyagokat jelző bioszenzorok anyagfelismerő sajátága alapulhat receptort tartalmazó réteg által létrehozott változásokon.^{45, 60}

Doktori munkám során enzim tartalmú biokatalitikus réteg felhasználásával készítettem bioszenzort, ezért a továbbiakban az enzimszenzorok és a természetes szövetek felhasználásával készített bioszenzorok irodalmi bemutatása következik.

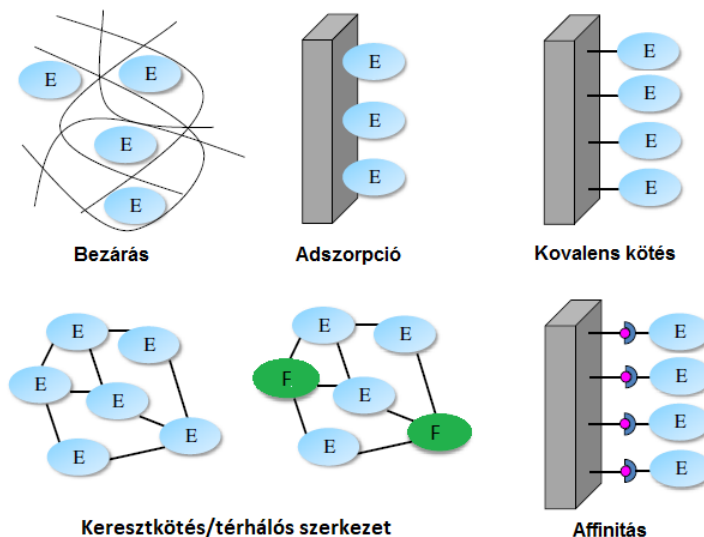
Az amperometriás enzimelektrodok esetében fontos kihívás a megfelelő elektromos kapcsolat létesítése az enzim aktív centruma és az elektródfelület között. A kapcsolatot különböző mechanizmusok szerint hozhatjuk létre,¹⁹ ez alapján az enzimelektrodok működése alapvetően három csoportra osztható,⁶¹ ahogy azt az 1. ábra is bemutatja.

1. Az elektród az enzimreakció termékét (vagy reaktánsát),⁶² esetleg a másodlagos szubsztrátját¹⁹ detektálja.
2. Homogén fázisú elektronátvivőt, közvetítő anyagot, ún. mediátort alkalmaznak, ami az enzimet alakítja vissza aktív állapotába.⁶³
3. Maga az enzim reagál az elektródon,⁶⁴ azaz közvetlen az elektronátmenet az enzim és az elektród között¹⁹.



1. ábra: Az amperometriás enzimelektrodok három generációja: (a) természetes másodlagos szubsztráton alapul (b) mesterséges redoxmediátorokon alapul (c) közvetlen elektronátmeneten alapul az enzim és az elektródfelület között¹⁹

Az enzim immobilizálások kulcsfontosságúak az enzim és az egész bioszenzor teljesítménye szempontjából. A rögzítés során a cél egy közvetlen kapcsolat biztosítása az enzim és az érzékelő felülete között, miközben az enzim stabilitást fenntartjuk, ill. tovább javítjuk.¹⁹ Számos fizikai és kémiai eljárást lehet alkalmazni az enzim - elektród felületre történő - rögzítésére, ezek közül a legelterjedtebb módszerek⁶⁵ sematikus bemutatása a 2. ábrán látható.



2. ábra: Fő enzim rögzítési eljárások sematikus ábrázolása.⁶⁵ E: enzim, F: semleges fehérje

Számos könyvet és összefoglaló tudományos áttekintést írtak már az enzim immobilizálási eljárásokról, melyek több ezer protokollt mutatnak be.^{66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73}

	Kötés	Előnyök	Hátrányok
Adszorpció	Gyenge kölcsönhatások	<ul style="list-style-type: none"> • Egyszerű és olcsó • Mérsékelt enzimaktivitás csökkenés 	<ul style="list-style-type: none"> • Deszorpció • Nem-specifikus adszorpciója más fehérjéknek, szennyezőknek • Gyenge működési és tárolási stabilitás
Kovalens kötés	Kémiai kötés az enzim és a hordozó funkció csoportjai között	<ul style="list-style-type: none"> • Nincs diffúziós gátlás • Stabil • Rövid válaszüthő 	<ul style="list-style-type: none"> • Nem megújítható mátrix • Nagymértékű enzimaktivitás csökkenés
Bezáras	Gélbe vagy polimerbe ágyazás, membrán mögé zárás	<ul style="list-style-type: none"> • Nincs kémiai reakció a monomer és az enzim között, ami az aktivitást befolyásolhatná • Számos enzimet lehet ugyanabba a polimerbe ágyazni 	<ul style="list-style-type: none"> • Diffúziós gátlás • Csak a pórusméretnél kisebb molekulák esetében • Enzimszivárgás • A monomer és az enzim nagy koncentrációja szükséges
Keresztkötés	Kötés az enzim/ a keresztkötő (pl. glutáraldehid)/közömbös molekula (pl. BSA) között	<ul style="list-style-type: none"> • Egyszerű 	<ul style="list-style-type: none"> • Nagymértékű enzimaktivitás csökkenés
Affinitás	Affinitás kötések a hordozó funkció- (pl. avidin) és a fehérje szakaszon egy affinitás csoport (pl. biotin) között	<ul style="list-style-type: none"> • Szabályozott és irányított immobilizáció 	<ul style="list-style-type: none"> • Speciális csoportok jelenléte szükséges az enzimen (pl. His, biotin)

2. táblázat: A fő enzimrögzítési módszerek előnyei és hátrányai⁶⁵

A 2. táblázat a fő enzimrögzítési típusokat és mindegyik technika fő előnyeit és hátrányait mutatja be. Néhány esetben az enzim immobilizálási eljárást többféle technika együttes alkalmazásával⁶⁵ valósítják meg, például az enzimet előzőleg gyöngyökre rögzítik adszorpcióval, affinitás vagy kovalens kötésen keresztül, majd egy porózus polimer mátrixba zárják.

Az enzimoldat bezárását a legegyszerűbben úgy lehet kivitelezni, hogy azt az elektródfelületre felvisszük, majd dialízismembránnal rögzítjük.¹⁹ Háromdimenziós polipirrol elektropolimerizált mátrixba zárás útján készített amperometriás glükóz mérő bioszenzort Njagi és Andrescu,⁷⁴ míg Shan és munkatársai⁷⁵ polianilin mátrixot alkalmaztak a szenzorkészítésnél. Az elektropolimereket redox mediátorként szolgáló nanoanyagokkal együtt is gyakran alkalmazzák az elektronátmenet elősegítésére. Zhu és munkatársai⁷⁶ GOX és torna-peroxidáz enzimet együttesen rögzítettek elektropolimerizáció útján polipirrol filmbe zárással, szén nanocsövekkel bevont munkaelektrod felületére. A bezárásra használt mátrix amfipatikus dimetil-polisziloxán,⁷⁷ fotopolimer,⁷⁸ szilika gél,⁷⁹ poliszacharid⁸⁰ vagy szénpaszta⁸¹ is lehet.

Az adszorpciós rögzítési technika legegyszerűbb változata az igen elterjedt fizikai adszorpció. Ezt az eljárást alkalmazták Bonnet és munkatársai⁸² is rovarölő anyagok mérésére alkalmas, szitanyomott bioszenzorok készítésénél. A deszorpció és a korai működési stabilitáscsökkenés megelőzése érdekében, az acetilkolin-észteráz enzim felületi adszorpcióját követően, sorozatos mosást végeztek egy megfelelő pufferrel, ezáltal eltávolították a gyengén kötődött enzimet. Az adszorpciós eljárás során az elektrosztatikus kölcsönhatásokra is lehet alapozni:⁶⁵ amennyiben az enzim izoelektromos pontja alacsonyabb az oldat pH értékénél, az enzim negatív töltésű lesz és a pozitívan töltött felülethez kötődik. Az elektrosztatikus kölcsönhatásokat használták ki Zhao és munkatársai⁸³ ellentétes töltésű enzim és polielektrolit rétegenkénti adszorpciója, Zhang és munkatársai⁸⁴ elektrokémiai dopping, Sassolas és munkatársai⁸⁵ a polimerbe ágyazást megelőzően az oxidáz enzimek pozitív töltésű anion cserélő gyöngyökre történő adszorpciója során.

A legelterjedtebb keresztkötést alkalmazó módszerek esetében az enzimeket glutáraldehid, ill. más bifunkcionális reagensekkel: pl. glioxál, hexametilén-diamin immobilizáljuk⁶⁵. További lehetőség tisztán - vagy funkcionálisan közömbös fehérje, szarvasmarhaszérum-albumin (BSA) jelenlétében - az enzimek közti keresztkötések létrehozása. Kong és munkatársai⁸⁶ a keresztkötéses eljárást GOX enzim cink-oxid nanocsövekre történő előzetes immobilizációjára használták. Kombinált immobilizációs eljárást alkalmaztak tejsav kimutatására alkalmas bioszenzor készítés

során Pereira és munkatársai is:⁸⁷ keresztkötés mellett szénpasztába zárással rögzítették az enzimet. Ehhez metilénkéssel, enzimmel, glutáraldehiddel és marhaszérum-albuminnal módosított szén-nanocső keveréket adtak a grafit-porhoz, majd ezt ásványolajjal homogén pasztává keverték és üvegcsőbe töltötték.

A bioszenzorok jelentős részénél az enzimeket kémiai módszerrel, kovalens kötéssel rögzítik a polimer hordozókhoz.⁶⁵ Ennek során a biokatalitikus anyag olyan funkciós csoportjait használják fel a felülethez rögzítésére, melyeket eleve tartalmaz és a katalitikus funkció szempontjából nélkülözhetők. Az immobilizálás során általában a hordozó felület kezdeti aktiválását végzik többfunkciós reagensek (pl. glutáraldehid, karbodiimid) segítségével, majd az enzimet kapcsolják az aktivált felülethez, végül eltávolítják a felesleges és nem kötődött biomolekulákat. A hordozó lehet szerves anyag (pl. szabályozott pórusú üveg), természetes anyag (pl. cellulóz) vagy szintetikus polimer (pl. nejlón), de előzetesen aktivált membránok (pl. Immodyne, Ultrabind) is léteznek. A kovalens immobilizálás közvetlenül a transzducer felületén, vagy egy arra rögzített membrán felületén is alkalmazható. A felületek aktiválási eljárását számos protokollban^{88, 89, 90} leírták már. A 3. táblázat a kovalens enzim immobilizálás módszereit⁶⁵ ismerteti.

Enzim csoport	Felületi csoport	Rögzítési/immobilizációs módszer
-NH ₂	-NH ₂	glutáraldehid ^{91, 92}
	-OH	epiklórhidrin ^{90, 93, 94} epoxi-szilán ⁹⁵ cianogén-bromid ^{96, 90} tozil-klorid ^{90, 97} tiol-szilán+ szukcinimid észter ⁹⁸ klór-triazin ⁹⁹
	-COOH	karbodiimid ^{90, 100} savazid ¹⁰¹ karbonil-diimidazol ¹⁰²
-COOH	-NH ₂	karbodiimid ¹⁰³
-SH	-SH	2,2'-dipiridil-diszulfid ⁹⁰

3. táblázat: A kovalens enzim immobilizálás módszerei

A kovalens rögzítési technikák között a kemisorpció eljárás is ismert. A tiol tartalmú enzimeket közvetlenül lehet arany hordozó felülethez kapcsolni a tiol csoportok és az arany közti erős affinitás miatt. Az enzimeket módosítani is lehet tiol csoportok bevitelével. McRipley és Linsenmeier¹⁰⁴ Traut reagenst használtak a GOX enzim primer aminocsoportjainak tiol csoporttal történő helyettesítésére és ezt már kovalens kötéssel rögzítették arany felületre.

A nagy affinitású kapcsolaton alapú módszerek esetében irányított, helyspecifikus enzim immobilizáció történik.⁶⁵ A stratégia alapján (bio)affinitás kötéseket hoznak létre az aktivált hordozó (pl. lecitinnel, avidinnel, fém kelátokkal) és egy speciális fehérjecsoport (pl. szénhidrát maradék, biotin, hisztidin) között, ezáltal a biomolekula orientálható és nem fordul elő sem enzim dezaktiválódás, sem az aktív helyek blokkolódása. Számos nagy affinitású - (sztrept)avidin-biotin, lecitin-szénhidrát és fém kation-kelát - kapcsolaton alapuló módszert közöltek már. Az enzim tartalmazhatja az affinitást biztosító csoportot (pl. cukor rész), azonban néhány esetben az affinitási csoportot (pl. biotint) a fehérje szakaszhoz genetikai mérnökség útján kell kapcsolni,¹⁰⁵ pl. irányított mutagenézissel, fehérje fúziós technológiával és poszt-transzkripció módosítással. A biotin és (sztrept)avidin közti nagyon erős affinitást ($K_d=10^{-15}$) használja ki a biotin-(sztrept)avidin stratégia. A fehérjék biotinálása¹⁰⁶ biotin molekula fehérjéhez történő kovalens kapcsolásával történik, melyet a lizin csoportokat kedvelő biotin-észter reagensek hozzáadásával lehet kivitelezni. Zhang és Cass¹⁰⁷ a genetikai biotinálást másként valósította meg: biotin akceptor fehérje szakaszokat fuzionáltattak az enzim C-terminusra. Az erős affinitású kapcsolódást egy fém kation és egy kelátképző: nitrilotriecetsav, iminodiacetsav vagy polihisztidin között, szintén ki lehet használni bioszenzor készítésre. Halliwell és munkatársai¹⁰⁸ ezen az elven készítettek tejsav érzékelőt: először polianilin-poliakrilát filmréteget alakítottak ki az elektród felületén, ezt Ni^{2+} ionokkal lehetett tölteni, melyek koordinációs helyként működtek a laktát-dehidrogenáz enzim hisztidin részei számára. Affinitáson alapuló immobilizálást közöltek¹⁰⁵ már néhány enzimben (pl. acetilkolin-észterázban) természetesen előforduló cukor részek és felülethez rögzített concanavalin A között is.

2.2 Natív enzimforrást tartalmazó, növényi szövet alapú bioszenzorok

A múlt század 80-as éveiben Kuriyama és Rechnitz¹⁰⁹ glutamát-dekarboxiláz enzimet tartalmazó sárga tök szövetből készített katalitikus réteget. Szén-dioxidmérő gázelektrod mérőfelületére rögzítve a termés vékony szövetét glutaminsav mérésére alkalmazható bioszenzort

alakítottak ki. Azóta igen sokféle növényi szövet felhasználásával sikerült különböző anyagok szelektív mérését lehetővé tevő bioszenzort készíteni. Ezekről kiváló áttekintést nyújt Campás⁵⁸ 2008-as összefoglaló közleményében. A növényi szövetek alkalmazásával kialakított bioszenzorok több fontos előnnyel rendelkeznek az izolált enzimek felhasználásával készítettekkel szemben:

- A természetes szövetekben az enzimek természetes környezete eredendően biztosított, ezáltal jelentősen stabilabbak, mint a szövetekből kivont, koncentrált, nagyobb aktivitású enzim készítmények.
- A nagy stabilitás miatt általában hosszabb a velük készített szenzorok élettartama.
- Stabilitásukat jobban megőrzik különböző komponensek inhibíciós hatásának ellenére, ill. a pH és a hőmérséklet változása mellett.
- A növényi szövetekkel végzett enzimológiai kísérletek jól reprodukálhatóak.
- A növényi szövetek általában könnyen beszerezhetőek és olcsók.
- A hosszas és költséges enzim kivonási és tisztítási lépések elkerülhetők.
- Az enzimműködéshez szükséges kofaktorok jelen vannak a szövetben, ezáltal a bioszenzor készítése egyszerűsödik.
- A növények igen nagy változatosságának köszönhetően igen sokféle bioszenzor elkészíthető a felhasználásukkal.

Hátrányaik:

- A szelektivitás viszonylag kismértékű annak köszönhetően, hogy a biológiai szövetek általában többféle enzim keverékét tartalmazzák.
- Az enzimet tartalmazó növényi szövet diffúziót lassító hatással rendelkezhet, emiatt annak felhasználásával készített szenzor válasz ideje kedvezőtlenül nagy lehet.
- A natív szövetek fajlagos enzimaktivitása rendszerint kisebb, mint a koncentrált preparátumoké.⁵⁸

A natív szövet felhasználásával készített bioszenzorok a költséghatékonyság és a jó stabilitási tulajdonság ellenére nem terjedtek el a mindennapi analitikai gyakorlatban. Ennek a legvalószínűbb oka az, hogy a natív biológiai forrás közvetlen felhasználásával készített reakcióréteg viszonylag kis specifikus enzimaktivitással rendelkezik. Az élettanilag fontos biológiai-, ill. élelmiszerminták

elemzéséhez szükséges mérési tartomány és érzékenység eléréséhez a legtöbb esetben nagyobb enzimaktivitás és speciális szerkezetű reakcióréteg kialakítása szükséges.¹¹⁰

Ha a biokatalitikus érzékenyítő rétegben többféle enzim van jelen, az nyilvánvalóan a szelektivitás csökkenését eredményezheti. A csökkent szelektivitás azonban akár előnyként is jelentkezhet olyan esetekben, amikor az illető bioszenzort vegyületcsoport egyes tagjai koncentrációjának becslésére kívánjuk használni. Ilyen esetet ír le Eggins,¹¹¹ aki közleményében banán szövettel (*Musa cavendishii*) készített bioszenzor alkalmazásával sörökben és borokban aromaanyagokként jelenlévő különböző anyagok, pirocatechin és flavonolok együttes mérésének lehetőségét mutatja be.

A többféle enzim együttes jelenlétéből adódó szelektivitás csökkenést a mérési körülmények alkalmas megválasztásával csökkenthetjük. Megfelelő feltételeket biztosítva egy-egy biokatalitikus folyamathoz, lehetővé tesszük különféle szubsztrátok egyazon biokatalitikus szövettel készített szenzorral történő mérését.¹¹² Megfelelő enzim inhibitorok, aktivátorok¹¹³ és stabilizáló anyagok¹¹⁴ szintén alkalmasak lehetnek enzim szenzorok szelektivitásának és élettartamának növelésére.

A növényi szövet alapú bioszenzorok készítése során általában az illető szövetből vékony szeletet, vagy zúzalékot készítenek. Azt vékony filmként rögzítik az alapérzékelő felületére valamilyen módon. Sok esetben a rögzítést dialízismembrán sapkával történő burkolással végzik. Szénpaszta elektródra épített amperometriás bioszenzorok esetében sokszor a szövet zúzalékot a szénpasztába keverik. Az előbbinél a membrán feladata, hogy az enzim „kiázását”, felületről történő eltávozását megakadályozza, ugyanakkor a szubsztrát diffúzióját lehetővé tegye. A katalitikus réteg szerkezete lényegesen befolyásolja a bioszenzor válaszidejét.

A szövet szeletet alkalmazó változat esetében a diffúziós ellenállás hosszú válaszidőhöz vezethet.^{58, 115} Clark-elektrodon 0,25-1 mm vastag banán réteg rögzítésével 1-3 perc a szenzor válaszideje, ugyanezen banán szövet homogenizálásával a válaszidő 30-40 másodpercre rövidül.¹¹⁶ Olasz kutatók^{117, 118} kísérletei azt mutatják, hogy a nagyobb reakcióréteg vastagság hosszabb szenzor élettartamot eredményez, cserébe a válaszidő növekszik. Ezen két paraméter szempontjából optimális szövet vastagságot kísérleti úton állapították meg. Ez burgonya (*Solanum tuberosum*)-, avokádó (*Persea americana*)-, és gomba (*Agaricus bisporus*) szövet-metszetből készített réteg esetében 100 μm -nek adódott. A szénpasztába kevert szövet zúzalék változat

esetében a válaszüő jóval rövidebbnek adódott, a Wang és Lin¹¹⁹ munkájában bemutatott szénpaszta alapérzékelős bioszenzor válaszüideje mindössze 12 másodperc.

A különböző növényi szövetek számos különböző enzimet tartalmazhatnak. A bioszenzor készítés szempontjából nagy jelentőségűek: a polifenol-oxidáz- (PPO),^{120, 121} a peroxidáz,-^{122, 123} a savas-foszfátáz,-^{124, 125}, az ureáz,-¹²⁶, az oxalát-oxidáz,-¹²⁷, az aszkorbát-oxidáz,-¹²⁸ a piruvát-dekarboxiláz,-¹²⁹ a diamin-oxidáz,-^{130, 131} a pektinészteráz,-¹³² a szulfít-oxidáz enzim,¹²⁸ ill. a kettős enzim (pl. peroxidáz- és glikolát-oxidáz)^{133, 134} tartalmú növényi szövetek.⁵⁸

Munkám során pirocatechin-oxidáz (difenoláz) és krezoláz (monofenoláz) aktivitással rendelkező tirozináz (EC 1.14.18.1) tartalmú növényi banán szövetet (*Musa cavendishii*)¹³⁵ használtam bioszenzor készítésére, ezért csak a PPO tartalmú-, fenolos komponensek mérésére alkalmas bioszenzorok készítésével, vizsgálatával, alkalmazásával foglalkozó irodalmi előzményekről adok az alábbiakban áttekintést.

A banán gyümölcs belsejében viszonylag nagy PPO aktivitású, laza szövet található. Többen kíséreltek meg ennek felhasználásával fenol típusú anyagok szelektív mérésére alkalmazható bioszenzort készíteni. Közöttük Sidwell és Rechnitz¹¹⁶ jelentetett meg elsőként közleményt a munkáról. Az 1985-ben publikált közleményben a készített bioszenzort „bananatrode”-nak nevezik. Az első banánotród úgy készült, hogy Clark-típusú oxigén elektród gázáteresztő membrános felületére egy vékony rétegű banán zúzalék membránt rögzítettek dialízismembrán sapka segítségével. A bioszenzor funkciójának vizsgálatához minta anyagként monoamin neurotransmitter anyagot, a dopamint (DA) választották és amperometriás detektálást alkalmaztak. Az elektród működése azon alapul, hogy a dopamin a kevert mintaoldatba helyezett bioszenzor reakciórétegébe diffundál a dialízismembránon keresztül. Ott a pirocatechin-oxidáz enzim katalitikus hatására reagál a jelenlévő oxigénnel. Az enzimatis oxidáció során, az oldott oxigén fogyasztása mellett, a dopamin 1,2-benzokinon származékká alakul. Az alapelektrod, a Clark oxigén elektród amperometriás jelként mutatja a lokális oxigén koncentráció csökkenését. Az így képzett jel annál nagyobb, minél nagyobb a dopaminnak a reakció rétegbe irányuló diffúziós anyagárama. Ennek megfelelően alkalmasan megválasztott körülmények között a Clark-elektrod amperometriás áramának csökkenése a mintában lévő dopamin koncentráció növekedését jelzi. Bizonyos idő elteltével, ha a minta dopamin koncentrációja állandó, és az oxigén anyagárama megfelelően nagy, a diffúziós anyagtranszportok és a katalitikus reakció stacionárius állapotba kerülhet. Ezt az amperometriás áram állandóvá válása jelzi.

A kísérletek alapján a lineáris mérési tartomány 2×10^{-4} - $1,2 \times 10^{-3}$ mol/dm³ DA, ezért a szerzők vizeletben jelenlévő mikromólos DA koncentráció méréséhez alumínium-oxid vagy különböző gél rétegeken történő adszorpciós elődúsítást és tisztítást javasolnak, ahogyan korábban Krustolvic kromatográfiai mérések során is ezt a megközelítést alkalmazta.^{136, 116} Egy frissen készített bioszenzort legalább két hétig tudtak DA analízisre használni.

Három évvel később, Wang és Lin¹¹⁹ a banán szövetet szénpasztába keverték és az így készített aktivált szénpaszta alkalmazásával amperometriás szénpaszta elektródra épülő bioszenzort készítettek. Az így előállított érzékelő kedvezően rövid, 12 másodperces válaszidejűnek bizonyult. Ennek köszönhetően áramló oldatos méréstechnikát alkalmazva a szerzők 60 dopamin mintát tudtak analizálni óránként.¹¹⁹ Az elektród működése ugyancsak a dopamin és az oxigén közötti enzim katalizálta folyamat sebességének detektálásán alapult. Ebben az esetben azonban az amperometriás alapérezékelő nem az oxigén koncentráció csökkenését követi nyomon, hanem a reakcióban keletkező kinon termék lokális koncentrációját jelzi elektrokémiailag redukálva azt. Negatív potenciálon a kinon redukálódik katekollá, a katódos áram szolgáltatja az analitikai jelet. Sidwell és Rechnitz banánotródja esetében a minta oldott oxigén koncentrációja befolyásolja a jelet és kis szubsztrát koncentrációnövekedés a mintában csak kicsi helyi oxigén koncentráció csökkenést, kis analitikai jelet, azaz nagy áramintenzitást eredményez. Ezért a kinon redukció útján képzett amperometriás jelképzés előnyösebb detektálási mód. Kis mintakonzentráció kis áramot produkál, emellett az alkalmasan választott körülmények mellett az oldott oxigén koncentráció nem befolyásolja az áramot.

Eggs és munkatársai hasonló banán elektródot használtak a sör minőségét jellemző flavonolok, pirocatechin és dimerjei, trimerjei meghatározásához.¹³⁷ Az így végzett mérések azonban nem szolgáltatott kielégítő eredményeket, valószínűsíthetően a banán szövetben eleve természetesen meglévő, magas flavonolkoncentráció zavaró hatása miatt. A szerzők készítettek bioszenzorokat a szintén magas PPO enzim tartalmú burgonya-, alma (*Malus domestica*)- és szárított alma szövetekből is, s az ezekkel a szenzorokkal kapott analízis eredmények már jó egyezést mutattak a kolorimetriás és kromatográfiai meghatározások eredményeivel.

Cummings és munkatársai¹³⁸ hasonlóan, érzékenyített szénpasztán alapuló bioszenzort készítettek. Munkájukban alma zúzalékot keverték szénpasztába az elektród készítéséhez. A szenzor elektromos, elektrokémiai, morfológiai és analitikai tulajdonságait vizsgálták. Igyekeztek optimalni a bioszenzor analitikailag fontos jellemzőit. Úgy találták, hogy a nagyobb növényi

szövet/szénpaszta arány esetében kialakuló inhomogén hidrofobicitású felület esetében a vízben oldott szubsztrát könnyebben kötődhet a PPO enzim aktív helyeihez. Ez kedvezően hat az elektród működésére.

A PPO enzimek számos növényi szövetben megtalálhatóak, azonban fontos megjegyezni, hogy az egyes enzimek eltérő aktivitást mutathatnak különböző fenolos szubsztrátok oxidációs reakcióját illetően.¹³⁹ A banánban található PPO a dopamin,¹⁴⁰ a padlizsánban (Solanum melongena) jelenlévő PPO pedig a pirocatechin oxidációját katalizálja a legnagyobb aktivitással.¹⁴¹ A padlizsánból készített, szénpaszta alapú szenzorral 10^{-6} mol/dm³-es kimutatási határt értek el, s az aktív szénpaszta 4C°-on 23 napig tárolhatónak bizonyult.¹⁴²

Lima és munkatársai¹⁴³ kókuszdió (Cocos nucifera) szövetet alkalmaztak pirocatechin mérésére készített áramló oldatos (flow-injection) rendszerükben. Munkájukban átfolyó analitikai reaktort készítettek, növényi szövetet alkalmas csőszerű üvegedénykébe tömörítve. A reaktoron átáramoltatott reakcióelegybe helyezett elektródon -0,1 V vs. Ag/AgCl potenciálon végezték az amperometriás detektálást. A bioreaktort sikeresen alkalmazták folyóvízben és papíripari szennyvízben történő pirocatechin mérésére. A kimutatási határ 2×10^{-6} mol/dm³ volt, s a rendszerrel óránként 60-90 mintát lehetett mérni. A reaktort jó néhány napig lehetett használni csekély aktivitás csökkenés mellett, annak ellenére, hogy a szöveten a biokatalitikus folyamat eredményeként fenolos polimer szennyeződés adszorpciója következett be.

Az avokádó szövet szintén jó PPO enzimforrás.¹²¹ Fatibello-Filho és munkatársai paracetamol mérésére alkalmas bioszenzor fejlesztését írták le 2001-ben, ennek a készítésénél grafit/vazelin keveréket módosítottak avokádó szövet porral. Az avokádó szövet katalizálta a paracetamol oxidációját, s a képződő N-acetil-p-benzokinont -0,12 V vs. Ag/AgCl potenciálon redukálták vissza paracetammollá. A kimutatási határt $8,8 \times 10^{-5}$ mol/dm³-nek találták.

Inhalációsan adagolt gyógyszer epinefrin tartalmának meghatározására fejlesztettek ki áramló oldatos rendszerben működő bioszenzort Felix és munkatársai.¹⁴⁴ A bioszenzor elkészítéséhez pálmafa gyümölcs rostjait használták szénpaszta elektródba keverve. Az érzékelő működése a szövet PPO enzim tartalmán alapul. Az enzim katalitikus hatására az epinefrin epinefrinkinonná oxidálódik. Analitikai jelként a kinon -0,1 V vs. Ag/AgCl elektródpotenciál mellett végbemenő elektrokémiai redukciója során jelentkező áram szolgál. A kimutatási határt kedvezően kicsinynek, mindössze $1,5 \times 10^{-5}$ mol/dm³-nek találták. Ez az elektrokémiai módszer az epinefrin mérésre elterjedten alkalmazott spektrofotometriás módszerrel szemben fontos előnnyel

rendelkezik. A fotometriás módszernél problémát jelentő benzoészav zavaró hatása a bioszenzoros módszer esetében nem jelentkezik.

Brazil és portugál kutatók¹⁴⁵ enzim tartalmú szűrszop (*Annona muricata*) húsát tartalmazó szénpasztába 15% -nyi mennyiségben 7,7,8,8-tetracianokinodimetán redox mediátor anyagot is alkalmaztak. Ez esetben 0,1 V vs. Ag/AgCl munkielektrod potenciál mellett tudták a dopamint mérni. Ezzel sikerült több nagyobb elektródpotenciál mellett elektroaktivitást mutató anyag zavaró hatását kiküszöbölni. Az elektródot FIA rendszerben 60 napon át tudták használni, gyógyszerkészítményekben lévő DA meghatározására, 2×10^{-2} - 2×10^{-4} mol/dm³ közti lineáris mérési tartomány mellett.

A peszticidek meghatározásánál komoly problémát jelent a szenzorok romlása, rövid élettideje, ezért alternatívaként merülnek fel a nagyobb enzim stabilitást biztosító növényi szövetekből készülő bioszenzorok. Burgonya szövet felhasználásával készítették atrazin herbicid koncentrációt mérő bioszenzort Mazzei és kutatócsoportja.¹⁴⁶ Az elektród fenol típusú anyagok jelenlétét detektálja. A herbicid mérést az teszi lehetővé, hogy a fenolos komponensek felismerését gátolja a mintában jelenlévő herbicid. Adott fenol koncentráció alkalmazása mellett az amperometriás áram csökkenése jelzi a mintában jelenlévő atrazin koncentrációját. Tehát a módszer a herbicid jelenlétében jelentkező enzim inhibíció jelenségén alapul. A kimutatási határ mindössze 10^{-5} mol/dm³ volt, szerves foszfor és karbaminsav származékot tartalmazó peszticidek nem zavarták a mérést. A szenzor élettartama 8-14 napnak adódott, s bár ez lényegesen rövidebb a fenol vagy pirocatechin meghatározásnál tapasztaltakhoz képest, a szenzor hegy mérések közötti vizes mosásával, a visszamaradó atrazin rendszeres eltávolításával, az élettartam növelhetőnek bizonyult.

Chen és Tan munkájában¹²⁰ banán-, alma-, burgonya-, avokádó- és gomba szövetek felhasználásával készült bioszenzorok esetében jelentkező mikrobiológiai fertőzés élettartamcsökkentő szerepére mutatnak rá. A hatás akkor is megfigyelhető volt, amikor a szenzort -10 C°-on tárolták.^{116, 117, 147, 148} Megoldást jelenthet valamilyen antimikrobiális anyag alkalmazása,¹⁴⁹ azonban a szingapúri szerzők más megoldást alkalmaztak a zavaró hatás megelőzésére: az alma-, banán-, burgonya- és gomba szövetet felhasználás előtt előkezelték. A gyümölcsöt/zöldséget feldarabolása után levegőn hagyták állni, hogy a PPO enzimek és a jelenlévő szubsztrátok oxidációja lejátsszódhasson, majd vizes mosással eltávolították a mikroorganizmusok számára különösen vonzó komponenseket –cukrokat és észtereket-, végül szobahőmérsékleten

vákuum szárították a darabokat és finom port készítettek belőlük. A szövet porból és polivinil alkoholból vékony biofilmet készítettek, s ezt kiszárítva helyezték fel Clark-elektrod gázáteresztő membránjára, polikarbonát sapkával rögzítve. Ezekkel a szenzorokkal 3-4 hónapig tudtak analizálni, kiváló analitikai teljesítményjellemzők mellett. Az elektrodokat használaton kívül, megfelelő pH-jú pufferben, szobahőmérsékleten tárolták.

Ugyanezen szenzoroknak, a még jobb szelektivitás irányába történő továbbfejlesztését¹⁵⁰ mutatta be a szingapúri szerzőpáros, következő publikációjukban. A biofilmet rögzítő dialízismembránt Nafion membránra cserélték, s ezáltal az anionos és egyes semleges zavaró anyagok (pl. DOPAC, L-DOPA, L-cisztein) reakció rétegbe jutását megakadályozták. Az illető komponensek reakciórétegbe jutásának gátlása további kedvező hatást eredményezett. Csökkent az enzim dezaktiválódás sebessége, s így a szerzők igen nagy stabilitást, reprodukálhatóságot és 200 napos szenzor élettartamot értek el. A technika hátránya, hogy a Nafion membrán megnövekedett diffúziós ellenállást képvisel, s így megduplázódik a 6-24 perc közötti eredeti válaszidő.¹⁵¹

2.3 Pásztázó elektrokémiai mikroszkópiás mérések a bioszenzor fejlesztésben

Bard és kutatócsoportja¹⁵² a múlt század 80-as éveinek végén vezették be, illetőleg fejlesztették ki a pásztázó elektrokémiai mikroszkópiás (PEKM) módszert, mely a felületi jelenségek vizsgálatára már korábban alkalmazott, úgynevezett pásztázó mérőcsúcs mikroszkópiás módszerek, így a pásztázó alagútmikroszkóp (Scanning Tunneling Microscope STM) és atomerő mikroszkóp (Atomic Force Microscopy AFM) módszerek újabb változatát jelenti. A PEK mikroszkópiában egy mikro-/nanoméretű elektrokémiai szenzorcsúcs precíziós mozgásával a vizsgált terület adott pontjaiban kémiai információ hordozó jelet gyűjtünk. Az egyes adatgyűjtési pontok koordinátáit és az azokhoz tartozó áramintenzitás vagy elektródpotenciál jelet tároljuk. A tárolt adatmezőből mikroszkópikus, kémiai képet készítünk. A módszer egy igen hatékony technika nagy felbontás melletti koncentráció profilok megjelenítésére, illetőleg felületek kémiai sajátosságait jelző mikroszkópiás kép készítésére. Bard, ill. Engström több publikációban bemutatták^{152, 153, 154} az általuk épített készülékek felépítését, működését, s a technika alkalmazása során felmerülő alapjelenségeket. A kutatócsoportok kezdetben a kereskedelmi forgalomban beszerezhető alkatrészekből házilag összeállított kémiai mikroszkópokat használtak. Ma már több

cég gyárt pásztázó elektrokémiai mikroszkópot. Ezek meglehetősen borsos áron vásárolhatók meg.¹⁵⁵

A PEKM módszer fejlesztéséről, vizsgálatáról, alkalmazásáról ez ideig megjelent közlemények száma megközelíti az 1400-at. Több összefoglaló munka^{156, 157, 158, 159, 160} és könyv¹⁶¹ ismerteti a fejlesztés és alkalmazás során elért eredményeket.

A PEKM hatékony eszközként használható immobilizált enzimek működésének vizsgálatában is. A biokatalitikus réteg felett elhelyezkedő elektrolit fázisban pásztázva az enzimaktikus aktív helyek feltérképezhetők. Erre a célra a PEKM módszert mind potenciometriás,¹⁶² mind amperometriás¹⁶³ üzemmódban sikerrel alkalmazták.

Pierce és munkatársai¹⁶⁴ a PEKM-iában leginkább elterjedt amperometriás, visszacsatolós üzemmód alkalmazásával végeztek méréseket GOX tartalmú biokatalitikus réteg feltérképezésére. Kísérleteik során a biokatalitikus felülettel érintkező elektrolit ferrocén-karbonsav mediátort tartalmazott. A felület felett, attól állandó távolságban lévő síkban pásztázva az amperometriás mérőcsúccsal, a mediátor oxidációs áramát követték nyomon.¹⁵⁵ Ily módon sikerült a katalitikus aktivitást mutató mikroszkópiás képet készíteniük.

A biológiailag aktív rendszerek tanulmányozására elterjedten alkalmazott PEKM módszer¹⁶⁵ az amperometriás generátor/kollektor üzemmód, melynek során a mérőcsúcs az enzimreakció során képződő és diffundáló termék, vagy a tömbfázisból fogyó reaktáns lokális koncentráció eloszlását méri. Kísérleti elrendezéstől függően alkalmazható a mérőcsúcs generátor/minta kollektor (TG/SC) vagy a minta generátor/mérőcsúcs kollektor (SG/TC) üzemmód.

Oliveira olyan PEKM kísérletekről számolt be,¹⁶⁶ melyekkel hasznos információkat nyert titán-dioxid felületen GOX és torna-peroxidáz enzimeket immobilizáló, önszerveződő monoréteg (self-assembled monolayer SAM) kialakításának optimális körülményeiről. A munka során különböző eljárás alkalmazásával kialakított rétegek felett közvetlenül a készítés után, majd pár nap elteltével készítettek PEKM-iás képeket. Így az enzimaktivitás és stabilitás összehasonlításával lehetőségük nyílt az enzim immobilizálási folyamatok sajátosságainak, hatékonyságának vizsgálatára.

Hussein és munkatársai¹⁶⁷ polimer struktúrába ágyazott pirrolo-kinolin-kinon függő glükóz-dehidrogenáz (PQQ-GDH) enzim működését, valamint az immobilizálás eredményességét vizsgálták folyadékfázisban végzett PEKM-iás mérésekkel. Munkájukban negatív visszacsatolós üzemmódot alkalmaztak a topográfia felderítésére. Az enzim katalitikus hatásának- és két

természetes szubsztrátja versengése következtében létrejövő enzim reakció vizsgálatára pedig az enzimes visszacsatolós üzemmódot választották. A kísérletek során a minta felülettel érintkező elektrolit oldatba egyrészt külön-külön glükózt és maltózt juttattak többféle koncentrációban. Másrészt, a két szubsztrát többféle arányú keverékének alkalmazásával végeztek kémiai mikroszkópiás méréseket. Az elektrolit ezen felül oxidált formájú mediátort is tartalmazott mindegyik vizsgált esetben. Az oldatban található glükóz, maltóz és oxidált formájú mediátor szabadon diffundálhat a polimerbe, ahol az enzimreakció következtében oxidált szubsztrátok és redukált mediátor képződik. A mérőcsúc felületén a mediátor oxidációs reakciója megy végbe. Az enzim katalizálta reakció a redukált mediátor koncentráció lokális növekedését hozza létre. Ez a katalitikus aktivitású helyek közelében pásztázó mérőcsúcson amperometriás áram növekedést, pozitív visszacsatolást hoz létre. A pozitív visszacsatolás nagyságát a diffúzió és az enzimreakció sebességei, valamint a szomszédos enzimikus aktív helyek hatása együttesen határozzák meg.

Girault híres iskolájának 2015-ben megjelenő közleményében¹⁶⁸ polivinilidén fluorid membránon banánhéj szelet felhasználásával létrehozott tirozináz enzimes aktív helyek PEKM vizsgálatáról olvashatunk. A banánhéj szeletet 1 perc időszakra a membránra helyezték (microcontact printed), majd megszáritás után 25 μ m átmérőjű platina mérőcsúc alkalmazásával, három módszerrel térképezték fel a membránon található enzim tartalmú aktív helyeket és vizsgálták az enzim működést. Az első módszer során az elektrolitot tartalmazó folyadékrétegben, amperometriás üzemmódban, -0,8 V potenciálon (vs. Ag kvázi referenciaelektrod) az oxigén redukciós áramot detektálták, miközben a membrán felett horizontálisan, 5-10 μ m-es állandó távolságban pásztáztak. A hidrofób membrán pórusokban nagy mennyiségű levegő adszorbeálódott, míg azokon a területeken, ahova enzim fehérje került (és esetlegesen egyéb komponensek), a membrán pórusainak hidrofobicitása lecsökkent, a folyadék a pórusokba beáramlott, ezáltal alacsonyabb oxigén koncentrációt eredményezve ezeken a helyeken. A második vizsgálati módszer során az elektrolitba L-Dopa szubsztrátot is juttattak, s 0,7 V vs. Ag potenciálon végezték a felülethez közeli horizontális pásztázást. Az enzimatikusan aktív helyek felett az anódos áram növekedését mérték, melyet azzal magyaráztak, hogy az enzimreakció termékeként képződött dopakinon 5,6-dihidroxiindollá alakul tovább, s a mért áram ezen elektroaktív komponens oxidációjának eredményeként alakul ki. A harmadik módszer során a tirozináz enzimet tartalmazó helyek feltérképezése immunkémiai reakción alapult. Az enzimre specifikus elsődleges, majd torma-peroxidázzal jelzett másodlagos antitest oldattal inkubálták a felületet, s végül a hidrogén-

peroxidot és 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin festéket tartalmazó elektrolit oldatban -1,15 V vs. Ag potenciálon a torna-peroxidáz enzimreakció következtében keletkező oxidált festék redukciója útján készítettek képet a tirozináz enzimet tartalmazó helyekről. A három módszer eredményeinek és a mikroszkópos képeknek az összevetése viszonylag jó egyezést mutat, azonban lényeges különbségek is megfigyelhetők pl. a tirozináz enzim működésén keresztül készített képek és az oxigén koncentráció lokális eloszlásának meghatározásával készített képek között. Magyaróztatul szolgál, hogy a banánhéjban a tirozináz enzim eloszlása nem homogén, s valós minta révén, sok egyéb komponenst is tartalmaz.

Egy svájci-orsz kutatócsoport 2014-ben megjelent közleményében¹⁶⁹ lágy mikroelektród (soft stylus probe) PEKM-iás mérőcsúcsként történő alkalmazását írja le, mellyel a durva, nem vízszintes felületek is jól vizsgálhatók. A szénpasztából készített mikroelektród a céltárgyhoz érve kissé behajlik, s a polietilén tereftalát „elektród test” a céltárggyal végig érintkezésben marad. Így az elektród ún. kontakt üzemmódban használható. A mérőcsúcs aktív felülete a pásztázás során konstans távolságra van a céltárgytól. Ezt a technikát laktát-oxidáz tartalmú polimer film gyors, felületi pásztázására használták minta generátor/mérőcsúcs kollektor (SG/TC) üzemmódban, s a kapott eredmények alapján az immobilizálás szempontjából fontos paraméterről, a polimer mátrix optimális sűrűségéről nyertek hasznos információt.

Az enzimek vizsgálatára végzett, PEK mikroszkópiát alkalmazó kísérletek jelentős részében az enzimatikusan aktív helyek felett, a minta felülettel érintkező elektrolit oldatban történik a pásztázás. Ugyanakkor az enzimtartalmú fázis belsejében, a katalitikus reakció idején kialakuló viszonyok tanulmányozásával viszonylag kevés tanulmány foglalkozik. Ennek oka a kísérleti nehézségekkel magyarázható. A PEKM azonban ideális eszköz erre a célra is, hiszen a mérőhegy mozoghat enzim tartalmú gélfázisban, vagy a szubsztrát oldatával érintkező, de attól elkülönülő enzim oldatban is.

Csóka és munkatársai¹⁶⁵ enzim szenzorok reakciórétegében kialakuló koncentrációprofilok vizsgálatához, elsőként alkalmaztak PEK mikroszkópot. Ezen méréseknek több távlati célja is van: a bioszenzorok reakciórétegének alaposabb megismerése, ill. a több enzimréteget alkalmazó elrendezések optimálisabb tervezhetősége. A kísérletekhez speciális mérőcellát készítettek, amelyben a szubsztrátot (glükózt) tartalmazó elektrolitot és a modell bioszenzor reakcióréteget celofán membrán választotta el egymástól. A reakcióréteg pufferbe kevert, illetve keresztkötésekkel, poli-akrilamid gélbe immobilizált GOX enzim volt. Az enzim tartalmú

biokatalitikus réteget a levegőtől felületen úszó vékony olaj réteg zárta el. A méréseket megelőzően az elektrolitba glükózt adagoltak, s az a celofánon a reakciórétegbe jutva beindította az enzimátikus reakciót, melynek során glükonolakton és hidrogén-peroxid képződött oxigénfelhasználás mellett. A PEKM-iás mérés során amperometriásan detektálták a hidrogén-peroxid (+600 mV vs. Ag/AgCl ref. potenciálon) és az oxigén (-600 mV vs. Ag/AgCl ref. potenciálon) áramát, s kalibrációt követően kapták meg a koncentráció értékeket. A pásztázás során a 25 μm átmérőjű Pt mikroelektrodot az elválasztó membrántól kiindulónan vertikálisan mozgatták, ezáltal a reakciórétegben az oxigén és a hidrogén-peroxid koncentráció lokális, pillanatnyi értékét tudták megmérni és a membrántól mért távolság függvényében ábrázolni. Különböző glükóz koncentráció értékek mellett megállapították, hogy a szubsztrát-enzim határfázist elválasztó celofántól kb 200 μm távolságban minimum mutatkozott az oxigén koncentrációban, s kb ugyanitt maximum értéket mértek a hidrogén-peroxidra nézve. Ezek a PEKM alkalmazásával készített amperometriás koncentrációprofilok jó egyezést mutattak a modellszámítások eredményeivel.

Scheller kutatócsoportja¹⁷⁰ glükóz jelenlétében szacharóz szelektív meghatározására alkalmas összetett enzimelektrodot dolgozott ki. A mintával érintkező eliminátor típusú reakcióréteg GOX-t és katalázt tartalmaz, az ezt követő mérő reakcióréteg pedig invertáz, mutarotáz és GOX enzimet is. A jelképzés végül a hidrogén-peroxid oxidációján keresztül történik. Ezen igen összetett, kettős biokatalitikus réteget tartalmazó bioszenzor modelljét is elkészítették Csóka és munkatársai,¹⁷¹ s a rétegekben PEKM-iás méréseket végeztek az oxigén és a hidrogén-peroxid koncentráció feltérképezésre.

2.4 Mérés tortuózus közegekben

A voltammetriás mérések a munkaelektrod felületén lejátszódó elektrodreakción alapulnak, ezért a jel a legtöbb esetben a transzport folyamatok függvénye. Ideális esetben a mérendő komponens diffúziós együtthatója a kalibráló oldatokban és a vizsgált oldatmintában megegyezik. Olyan esetekben, amikor ez eltérő és a kalibrációs adatokat nem lehet a kiértékelésnél használni, sztenderd addíciós módszer használata ad lehetőséget a koncentráció mérésére, a voltammetriás mérések kiértékelésére. Azonban számos olyan gyakorlati analitikai feladat jelentkezik, ahol a sztenderd addícióra nincs lehetőség. Ilyen például az élő szövetekben, kísérleti állatok bizonyos testrészeiben végzendő koncentrációmérés,^{172, 173, 174, 175, 176} vagy gél fázisban,^{177, 178} talajban, üledékekben lévő anyagok adott környezetben lévő lokális koncentrációjának meghatározása.¹⁷⁹

Ha egy közegben a mérendő anyag szabad mozgását fizikai akadályok lassítják, akkor azonos koncentrációk mellett a mért voltametriás áramok általában kisebbek a szabad diffúziót biztosító közegben mérhető értékekhez képest. A csökkent tömegtranszport mögött két tényező áll: egy részről a mérendő anyag molekulái egy hosszabb, „cikk-cakk” úton jutnak el az elektródfelületre, más részről egy adszorpciós-deszorpciós folyamat mehet végbe a fázisok határfelületén.

A környezet diffúziós transzport csökkentő hatását gyakran nevezik tortuozitásnak, definíciója (1. egyenlet):

$$\lambda = \sqrt{\frac{D}{D^*}} \quad (1)$$

Ahol D a diffúziós együttható egy akadályoktól mentes közegben, D^* a tényleges diffúziós együttható egy akadályokat tartalmazó, porózus közegben.¹⁸⁰ A tortuozitás elnevezés a diffúzió során a részecske által megtett, akadályok miatt megnövekedett út hosszát jelenti. A tortuozitást befolyásolja a térfogati faktor, melyet gyakran porozitásnak nevezünk. Ez a diffundáló molekula számára elérhető maximális rendszer térfogatot jelenti.

A tortuozitást úgy is definiálhatjuk, hogy a fluidumban az A és B pont közti valós út hossza a két pont közti egyenes út távolságához viszonyítva, tehát értéke mindig nagyobb 1-nél.

Az élettudományokban a visszatartási tényező (retardation factor) használata is elterjedt, mellyel a környezet transzportfolyamatokra gyakorolt hatása jellemezhető.¹⁸¹ Definíciója (2. egyenlet):

$$\theta = \frac{D^*}{D} = \frac{1}{\lambda^2} \quad (2)$$

A tortuozitásnak fontos szerepe van az élő rendszerekben, a komponensek szöveteken, ill. sejteken belüli, strukturális szerkezetből adódó transzportjának szabályozásában.¹⁸² Modellszámításokat és kísérleti technikákat alkalmazó, nagyszámú közlemény foglalkozik a diffúziós folyamatok vizsgálatával porózus közegekben,^{183, 184, 185, 186} üledékekben^{187, 188, 189} és élő szövetekben.

Tao és Nicholson¹⁹⁰ az agy sejt közötti állományában (extracelluláris tér), mint porózus közegben mérhető tortuozitást és az általuk felállított geometriai modellek és szimulációk eredményeként kapott értéket hasonlították össze. Három geometria alapján - kockákból, csonka oktaéderekből és egy többféle alakzatok keverékéből- összeállított, több tízezer „sejtes” modellt készítettek el és ezekkel 3-D diffúziós Monte Carlo szimulációt végeztek. Az eredmények azt

mutatják, hogy az egymáshoz képest egyenletesen elhelyezkedő, konvex „sejteket” körülvevő sejt közötti térben a geometriai akadályoztatás független a „sejtek” alakjától, csupán a térfogathányad (sejt közötti térfogat és a teljes szöveti térfogat hányados) függvénye. Az összefüggés (3. egyenlet):

$$\lambda = \sqrt{\frac{3-\alpha}{2}} \quad (3)$$

Ahol α a térfogathányadot jelöli. Az ezekkel a modellekkel számított λ értékek - az irodalomban számos más kutatócsoport munkájával megegyezően -^{191, 192} maximum 1,225-nek adódtak, míg az agyban ugyanez az érték tipikusan 1,6. Az egyik lehetséges magyarázat szerint az eltérés oka az, hogy „zsákutca pórusok” is vannak az agyi extracelluláris térben,^{193, 194} a másik lehetséges ok, hogy a sejt közötti folyadék viszkozitása lényegesen nagyobb a modellben figyelembe vett átlagos értékhez képest.¹⁹⁵

Adams kutatócsoportja^{196, 197} kísérleti állatok agyának különböző helyein lévő monoamin neurotranszmitter koncentráció meghatározására tettek kísérletet. *In vivo*, rövid idejű kronoamperometriás méréseket végeztek. A helyi monoamin koncentráció meghatározása a vizes sztenderd oldatokban készített kalibráció alapján történt. Az agyszövetben nyilvánvalóan mások a diffúziós koefficiensek, mint a vizes kalibráló pufferoldatokban. Kérdéses, hogy mennyiben várható megbízható koncentráció adat, ha a mérések értékelése a vizes oldatos kalibráció alapján történt. Talán az feltételezhető, hogy az állati szövetbe juttatott mikroelektrod mérőfelületére egy vékony folyadékfilm tapad. Rövid idejű kronoamperometriás mérés alatt a diffúziós réteg ebben a vizes folyadékfilmben marad, s ez által a közeg tortuozitásának nem mutatkozik meg a hatása a mért jel értékére. Így a vizes oldatban végzett kalibráció segítségével számított koncentráció adatok valóságosak.

Napjainkban, az *in vivo* voltametriás mérések esetében igen nagysebességű ciklikus voltametriás technikát alkalmaznak a kutatók.^{198, 199} A kalibrációt szintén vizes sztenderd oldatokban végzik. Az ez esetben alkalmazott 400 V/s sebességű pásztázás azonban nagy kondenzátor áram komponens ad a mért jelhez.

2.5 L-aszkorbinsav meghatározás valós mintákban

Az L-aszkorbinsav (LAS) egy kis molekulatömegű, vízoldható antioxidáns vitamin, mely számos biokémiai reakcióban vesz részt,²⁰⁰ továbbá élelmiszerek és italok minőségét jellemző

indikátor molekula.²⁰¹ A C-vitamin tartalom gyors mérése az élelmiszergyártás egyes fázisaiban és az élelmiszerminőség ellenőrzése során egy fontos analitikai feladat.²⁰² A laboratóriumot igénylő, nagyműszeres technikákhoz képest,^{203, 204, 205, 206, 207} az elektrokémiai módszer fő előnyei az eljárás egyszerűsége, a gyors eredmény és az alacsony költségek.²⁰⁸ Az elektrokémiai meghatározás alapja az, hogy az LAS könnyen oxidálható dehidro-L-aszkorbinsavvá.²⁰⁹ Számos példát találunk a szakirodalomban hagyományos, nem módosított „csupasz” elektródokkal kivitelezett LAS meghatározásra különböző mátrixokban, zavaró anyagok jelenléte esetében. Ezek az eljárások minta előkészítési lépéseket tartalmaznak, gyümölcslevek esetében pl. centrifugálást^{210, 211} vagy szűrést és hígítást.²¹² Az oxidáció során képződő termékek felhalmozódása az elektródválasz romlásához vezethet, ezért hosszas elektródtisztítási lépések szükségesek a mérések között.²¹³

Türke és munkatársai²¹³ polietilén-dioxi-tiofén (PEDOT) vezető polimerrel módosított arany munkaelektrodot készítettek és az elektród modell borbán történő ciklikus voltammetriás viselkedésének tanulmányozása során, az LAS oxidációjához tartozó csúcs potenciálját 240 mV vs. SCE (Saturated Calomel Elektrode, Telített Calomel Electrode: Hg/Hg₂Cl₂) értéknél találták, a fő polifenol oxidációs csúcstól jól elkülönülten. Azonban a szerzők ugyanazon elektród ismételt alkalmazhatóságát valós bor mintában nem vizsgálták.

Kilmartin és munkatársai²¹⁴ polisztirol szulfonát (PSS) és polivinil szulfonát (PVS) ionokkal doppolt vékony polianilin (PANI) filmmel módosított platina mikroelektrodot készítettek. Az elektródot különböző italokban tesztelték és az eredmények alapján az LAS oxidációs csúcs már 0,1 V vs. SCE potenciálnál jelentkezik, ezáltal mérhető, az egyéb oxidálható komponensek minimális zavaró hatása mellett. Azonban a szenzorválasz jelentős, azonnali romlása következik be a különböző komponensek adszorpciója révén, bor és narancslé minták mérése esetén.

Fuenmayor és munkatársai²¹⁵ egy közelmúltban megjelent publikációban mutatták be szitanyomott elektród nanoszálal nylon membránnal módosított változatát, mellyel minta előkészítés nélkül, közvetlenül mérték az LAS koncentrációt lédús gyümölcsökben (alma, körte, citrom, kivi, narancs, mandarin és eper). A gyümölcsök héját késsel eltávolították egy kis területen, majd az előzetesen kalibrált, módosított elektródot a gyümölcsbe szúrták. A membrán hidrofobicitás különbség alapján szelektív diffúziós gátként viselkedik a gyümölcsökben található számos zavaró-, pl. fenolos komponenssel szemben. A membránnal módosított elektród a csupasz változathoz képest lényegesen nagyobb linearitási tartománnyal jellemezhető (10-400 mg/l helyett 10-1300 mg/l LAS mérhető), azonban az érzékenység a membrán diffúziós gátló hatása miatt

negyedére csökkent. A mérés folyamatos, amperometriás detektálással történik úgy, hogy a szenzort az optimálisan megállapított 6 másodperces kontaktidő alatt a gyümölcsbe szúrják, majd kiemelik. Egy-egy mérés során összesen 4-10 alkalommal mártják a mintába az elektródot, majd öblítik. A pár másodperces kontaktidő alatt zajlik a membrán mintával történő impregnálódása, a mérés, valamint a termék elektród felületéről történő távozása. A valós mintákban történő méréseknél a harmadik-negyedik szúrásnál/mártásnál detektálható a legnagyobb jel, s ez arra utal, hogy az impregnálódáshoz több - 6 másodperces - szakasz is szükséges. A kontaktidő optimalizálása során úgy tapasztalták, hogy 6-10 másodpercnél nagyobb értéknél a mért jel már jelentősen csökken, - a szerzők feltételezése alapján - az elektródreakcióban képződő termékek akkumulációja miatt. Az elektród 22 egymást követő mérésig mutatkozott stabilnak. A HPLC-UV referencia-módszerhez képest a mért eredmények 7-18%-os változó irányú eltérést mutatnak. A max. 18%-ban eltérő mérési eredmények mellett a mérések szórás (sztenderd hiba) értékei is lényegesen nagyobbak a vizsgált amperometriás módszer esetében, mint a referencia-módszer alkalmazásakor. A szerzők ezt azzal magyarázzák, hogy a komplex gyümölcs mátrix természetes változékonyságot mutat és így ennek a tényezőnek a szórása a módszer saját szórásával összeadódik. Az amperometriás módszer in situ, helyi koncentrációt mér, míg a referencia-módszer homogenizálási lépést tartalmaz a mintelőkészítés során. A módszer saját szórásának, ismételhetőségének szempontjából az egyik fontos tényező a kontaktidő, ami azt az időtartamot jelenti, ameddig az elektródot a gyümölcsbe mártják. Kellően hosszú idő szükséges ahhoz, hogy a szenzor a mintával érintkezzen, átnedvesítse, azonban túl hosszú időknél megkezdődik az elektród passzíválódása.

2.6 Amperometriás pulzáló detektálást alkalmazó technikák

A pulzáló elektrokémiai detektálási (PED) technikákkal a szilárd elektródos elektrokémiai mérések körében viszonylag gyakran találkozunk. Ezeknek a közös vonása, hogy alkalmazásukkor egy ismétlődő program részeként, különböző időtartamokig, különböző potenciál értékeket adnak rá a munkaelektrodra. Az alkalmazás többféle céllal történhet.

A nemesfém elektródokon lehetőség van az alifás vegyületek oxidációjának mérésére azáltal, hogy elektrokatalitikus felületük stabilizálja a szabad gyök intermediereket, azonban a nagy katalitikus aktivitásuknak köszönhetően a felületen adszorbeálódott anyagok felhalmozódhatnak, s ez gyakran az elektród szennyeződéséhez vezet. Az elektród aktív felületének passzíválódása a

folyamatos mérést ellehetetleníti, a reprodukálhatóság fontos korlátját jelentheti. Az elektródfelület regenerálásának kézenfekvő módja a mechanikai megújítás (polírozással). Platina elektród esetében az elektród felület izzítása is alkalmazható szennyező anyagok eltávolítására. A kromatográfiás detektorcellába-, áramló rendszerekbe épített, vagy kapilláris elektroforézishez kapcsolt, folyamatosan működő munkaelektrod, vagy az érzékenyítő- (bio) réteggel bevont elektródok esetében, a mechanikus vagy izzításos megújítás, nem jöhet számításba.²¹⁶ Ezekben az esetekben a PED detektálás jó alternatívát jelent.

A pulzáló potenciál programmal megvalósított elektródtisztítás története a 20. század elejére nyúlik vissza.²¹⁷ Az elsők között, Hammet 1924-ben²¹⁸ és Armstrong 1934-ben²¹⁹ a szénhidrogén tüzelőanyag cellák fejlesztésekor felmerült nemesfémek szennyeződésének eltávolítására alkalmaztak ilyen technikát. A 60-70-es években a folyadék kromatográfiás módszerek rohamos fejlődése a PED technikák fejlesztésének is jelentős lökést adott, s a 80-as évek elején Johnson és munkatársai az áramló oldatos rendszerekben (flow-injection systems) alkalmazták a pulzáló amperometriás detektálást (PAD) platina elektróddal, egyszerű alkoholok és szénhidrogének mérésére.^{220, 221} A PAD elnevezés a nemesfém munkaelektrodra adott, három lépésből álló potenciál programot jelöli.

Az első lépésben a mérendő komponens elektrokémiai oxidációja történik (és a detektálás), ezt követően egy erősen oxidáló potenciál pulzus következik, melynek során a nemesfém elektród felületén hidroxid, ill. oxid képződik, s a harmadik szakaszban erősen katódos potenciál értékkel érik el a felületi oxidréteg eltávolítását.²²²

A PAD mérési programot a HPLC detektoroknál 0,5-2 Hz frekvencia mellett használják, lúgos közegben arany elektródokkal, platina elektródokkal pedig savas és lúgos közegben egyaránt mérnek, szénhidrátokat,²²³ alditolokat, aminoglikozidokat,²²⁴ aminosavakat²²⁵ és alkoholokat.²²⁶

Az alapvető mérési séma: mérés, oxidok képzése, majd oldatba vitele, többféle feltételezett mechanizmus szerint történhet. Ezek közül az egyik eset az, amelynek során a mérendő anyag a nemesfém elektrokatalitikus felületén adszorbeálódik, s közvetlen oxidációja az oxidoktól mentes fém felületén zajlik. Egy másik feltételezett mechanizmus szerint a felületi oxidréteg az, ami közvetlenül katalizálja az elektródreakciót. PAD technika esetén az oxidréteg képződése és az elektródreakció egyszerre történik a detektációs potenciálon, s a két folyamathoz tartozó áram változásokat nehéz szétválasztani, az analitikai szempontból fontos jelet, jelentős háttér jel kíséri. Ennek a problémának a megoldására további mérőprogramokat dolgoztak ki.

A fordított pulzus amperometriás detektálás során (RPAD- reverse pulsed amperometric detection) az enyhén oxidáló mérő pulzus után erősen redukáló pulzus következik a tisztítás céljából, majd ezt követi egy erősen oxidáló szakasz, hogy az elektrokatalitikus oxid réteg a mérő szakasz előtt már kialakuljon. Polta és Johnson²²⁷ ezt a programot az aminok és a kén tartalmú vegyületek mérése során sikeresen alkalmazta, azonban az erős oxidatív tisztítást mellőző program hosszas üzemelés esetén már nem bizonyult megfelelőnek.

A fejlesztés következő lépéseként a PAD detektációt négylépéses programmá alakították úgy, hogy annak három lépése elé beiktattak egy oxidációs aktiváló szakaszt is az elektrokatalitikus fém-oxid kialakítására. Ez már megfelelő tisztítást tett lehetővé és az oxid-képződésből származó háttér jel a detektáció alatt alacsony maradt. Williams és Johnson²²⁸ ilyen módon végezték arzén (III) meghatározását, savas környezetben, platina elektródon, míg Johl²²⁹ cisztein meghatározásra alkalmazta ezt a technikát.

A HPLC rendszerek fejlődésével a pH-, ionerősség-, hőmérséklet-, szerves módosító gradiens használata elterjedt, s ezzel az elektrokatalitikus oxidréteg kialakulásának feltételei a mérés során folyamatosan változtak.²³⁰ Ezen kihívás inspirálta a kutatókat az integrált pulzus amperometriás detektálás (IPAD- integrated pulsed amperometric detection) kifejlesztésére.²¹⁷ Ennél a programnál a detektálási szakasz során egy ciklikus pásztázás is történik: az induló, alsó potenciál értéken még semmilyen elektródreakció nem történik, majd a pozitív irányú pásztázás során rendre lejátszódik a méréshez szükséges felületi oxidképződés, a mérendő komponens oxidációja – a termék az oldatba diffundál – és a visszirányú pásztázás során a képződött oxidréteg is eltávozik. Így a ciklikus pásztázás során mért áramok elektronikus összegzése lehetővé teszi, hogy csupán a mérendő komponens oxidációjából származó áram értéket kapjuk meg. Ennél a módszernél a HPLC gradiens program alkalmazása és az IPAD egyszerre működik. A ciklikus szakaszt a PAD technikánál ismertetett tisztítási szakaszok követik. Ezzel a technikával jó eredménnyel sikerült aminokat, aminosavakat, peptideket, fehérjéket és tiol vegyületeket mérni.^{231, 232, 233, 234, 235}

A kutatók több hetes üzemelés során jelentős problémaként észlelték az arany elektród nagymértékű fogyását az alkalmazott detektálási program során, mivel minden ciklus során oxidképződési-, detektálási-, majd tisztítási periódust iktattak be. Detektálási programfejlesztéseik során szempont volt, hogy az arany munkaelektrod fogyása csökkenjen az oxidációs-redukációs szakaszok következtében. Ezért a szerzők igyekeztek a korábbiakhoz képest még hatékonyabb,

optimalizált programok kidolgozására, a hosszú távú reprodukálhatóság, a maximális jel/zaj viszony arány biztosítására.²³⁶ Clarke és munkatársai²³⁷ hat lépéses programot dolgoztak ki aminosavak IPAD detektálására. Japán szerzők²³⁸ hasonlóan hatlépéses programot alkalmaznak. A potenciálprogram adszorpció/iniciálós (E1, E2), pulzusokból, két áram integráló pulzusból (E3, E4) és tisztító/aktiváló pulzusokból áll.²¹⁶

A HPLC technikák fejlődése és a kapilláris elektroforetikus elválasztások olyan detektort igényelnek, amelyek kellő felbontással tudják követni a gyors folyamatot. Johnson és munkatársai^{239, 240} olyan programot dolgoztak ki szénhidrátok meghatározására, amely 6,2, ill. 6,7 Hz frekvenciával működik.

A kereskedelmi gyakorlatban beszerezhető elektrokémiai detektorok közül néhány képes PAD mérési program szerinti működésre. Közülük jól ismert a Dionex cég ED40 típusú készüléke.²⁴¹ A detektor gépkönyve arany munkaelektroddal történő szénhidrát analízishez három különböző mérési programot javasol. Mindhárom program, különböző hosszúságú és különböző elektródpotenciál mellett mérő, tisztító és relaxációs pulzus, egymást folyamatosan követő pulzusok sorozatából áll.

Mindhárom program mérő pulzusa két szakaszra oszlik. Az első E1 elektródpotenciál mellett t_{del} ideig tartó idő periódus a kondenzátor áram „lecsengéséhez” szükséges (200 ms). A tulajdonképpeni detektálás a t_{det} (200 ms) második szakaszban történik. Lehetőség van az áram integrálására, az ezen idő alatt átfolyó töltésmennyiség regisztrálására. Ezután következik a tisztító potenciál pulzus (E2, t_{clean}), amit a relaxációs pulzus (E3, t_{rel}) követ. Az E2, t_{clean} és E3, t_{rel} értékek a készüléken beállíthatók, de a javasolt programok egyike redukciós tisztítást (E2=-2,0 V, t_{clean} =10 ms), míg a másik két oxidációs tisztítást E2=+0,75 ill. +0,6 V-on, és t_{clean} =20, ill. 10 ms tartó ideig írja elő. Az oxidációs tisztítás esetében az arany elektród elektrokémiai aktivitása csökkenhet. A redukciós tisztítás esetében legjobb a reprodukálhatóság és ekkor akár 500 ms-os teljes mérési ciklus is alkalmazható. Az érzékenység viszont kedvezőbb az oxidációs tisztítás esetében, bár ekkor a teljes ciklus idő 1000 ms.²¹⁶

Jelentős számú közleményben olvashatunk a pulzáló amperometriás detektálás alkalmazásának egy másik területéről is. Wu és munkatársai²⁴² polipirrol vezető polimerbe ágyazott oligonukleotid szakaszokat tartalmazó réteggel módosították a munkaelektrodot és PAD detektálás alkalmazásával a komplementer DNS szakaszok hibridizációját elektrokémiailag követni tudták, áramló oldatos rendszerben. A detektálás során két potenciál pulzusból álló

programot alkalmaztak, az optimális potenciál értékeket kísérleti úton határozták meg. A szelektív és érzékeny detektálás mechanizmusára lehetséges magyarázatokat adnak, azonban elismerik, hogy a folyamatot még nem ismerik teljes körűen. Wang és munkatársai²⁴³ úgy magyarázzák a jelenséget, hogy a komplementer oligonukleotid kötődésekor a polipirrol réteg vezetése, elektron környezete megváltozik, s a PAD detektálás a folyó áram változását felerősíti.

Ausztrál kutatók^{244, 245} immunszenzorok fejlesztése terén alkalmazták a PAD detektálást. Polipirrol rétegbe ágyazott antitestekkel módosított elektródot készítettek, s így humán szérum albumin (HSA) áramló oldatos, szelektív, érzékeny és reprodukálható elektrokémiai detektálását valósították meg. A két potenciál értékből álló programot ez esetben is kísérleti úton állapították meg. Magyarázatuk szerint az antitest-antigén kölcsönhatását elősegíti a pulzáló potenciál program, s az amperometriás detektálás során tapasztalt irreverzibilis kapcsolódás az általuk optimalizált programmal elkerülhető. A szerzők szerint a jelet a vezető polimerbe be- és kilépő iontranszport változása generálja.

A dolgozatban bemutatott kutatómunkám során periódikusan megszakított amperometriás (PMA) detektálást alkalmaztam, mely a PAD mérési programmal formailag hasonlóságot mutat, azonban az alkalmazott potenciál periódusok szerepe és az alkalmazás célja teljesen eltérő az eddigiekben bemutatott esetektől. A PMA detektálás során a pihentetési szakasz alatt a mérendő komponens feldúsul az elektród környezetében, s ezt követi egy igen rövid detektálási szakasz. A mérés során alkalmazott elektródpotenciál értékét úgy kell megválasztani, hogy az elektródfolyamatot csak a diffúzió útján pótlódó anyagtranszport limitálja. Kutatócsoportunk korábbi munkája során^{246, 247} a PMA detektálás alkalmazásának előnyeit vizsgálta hidrofíl membránnal módosított elektródok és glükóz mérő bioszenzor esetében. Az előbbi vizsgálatoknál membrán réteggel módosított, szénpaszta és platina elektródokat használtak L-aszkorbinsav és H₂O₂ mérésére. A pihentetési periódus 1500 ms volt, a mérési szakasz 200 ms, s a 25 ms kondenzátor áram lecsengést követően 10 ms időtartamig rögzítették az áram értékeket. L-aszkorbinsav mérés esetén a PMA mérés érzékenysége 10-szerese volt a hagyományos amperometriás (A) detektálás értékének, a kimutatási határ (LOD) pedig tized részére lecsökkent. Hidrogén-peroxid meghatározásnál is jelentős érzékenység növekedést tapasztaltak és a mérési határ kis koncentrációk irányába történő kiterjedését.²⁴⁶ A glükóz mérésére alkalmas bioszenzor elkészítésénél egy vékony, méretkizárásos rétegre vitték fel az immobilizált, GOX tartalmú reakcióréteget. A bioszenzor érzékenysége PMA detektálás mellett 625-szörös értéknek adódott a

hagyományos amperometriás detektáláshoz képest, kis koncentrációk tartományában pedig ez az arány 400-szoros.²⁴⁷

2.7 Oldott oxigén mérése

Orvosi, ipari és környezetvédelmi területeken fontos feladat az O₂, H₂, SO₂, NO_x, CO₂, H₂S, Cl₂, NH₃, ózon, propán, etilén-oxid gázfázisú komponensek mérése.²⁴⁸ Mivel ezek a molekulák elektroaktívak, ezért közvetlen elektrokémiai meghatározásuk kézenfekvő. A különböző elveken alapuló szenzorok közül az amperometriás gáz szenzorok az egyik legjelentősebb csoportot képezik, ezeket számos összefoglaló szakirodalom mutatja be.^{249, 250, 251, 252} Az amperometriás elektrokémiai cellák tartalmazzák a munkaelektrodot, az ellen- és referenciaelektrodot, s az ezeket befoglaló elektrolit fázist. Kifejlesztésük Leland C. Clark (1918-2005) nevéhez fűződik, aki az oldott oxigén-mérő Clark-elektrodot 1956-ban írta le közleményben.²⁵³ Az általa kifejlesztett cella kialakítást alkalmazó gáz szenzorok, oxigén-érzékelők napjainkig igen elterjedtek.²⁵⁴ A platina munkaelektrodot és az ezüst –ellen, és egyben referencia-elektrodot tartalmazó cellát gázáteresztő membrán választja el a mintatértől, s az oxigén azon átjutva a belső elektrolitba oldódik.

Amperometriás üzemmódban, megfelelő elektrodpotenciál mellett a platina katódon az oxigén hidroxid ionokká redukálódik az alábbi (4., 5.) egyenleteknek megfelelően, s az oxigén koncentrációtól lineárisan függő jelet, azaz áramot mérhetünk.²⁵⁵



Az anódon lejátszódó reakció:



A Clark-elektrodok jó szelektivitási és érzékenységi sajátsággal rendelkeznek, abból kifolyólag, hogy a cellát a mintatértől elválasztó membrán csak gázok számára átjárható. Így egyéb komponensek nem kerülhetnek a belső elektrolitba. A modern Clark-elektrodok jelentős része porózus, hidrofób tulajdonságú poli(tetrafluoretilén) (PTFE) membránnal készül, tipikusan 10 µm-es pórus átmérő mellett.²⁴⁸

A jó analitikai jellemzők biztosítása szempontjából fontos az is, hogy a membrán szorosan illeszkedjék a munkaelektrod mérőfelületére, ezáltal csak egy vékony elektrolit réteget hagyva a membrán és a platina elektrod között. Így a membránon átjutó oxigén molekulák kis térfogatú

elektrolitban oldódva viszonylag nagy koncentrációjú oldatot képeznek és a diffúziós út rövidege miatt az amperometriás áram viszonylag kis késéssel követi a minta koncentrációját.

A Clark-elektrodok további előnye a membrán nélküli oxigén mérő amperometriás platina elektrodokhoz képest, hogy a munkaelektrod szennyeződésének esélye jelentősen csökken a membrán elválasztó, védelmi funkciójánál fogva. Lényeges azt is megemlíteni, hogy a belső elektrolitot tartalmazó cella a mintától függetlenül megfelelő kémiai feltételeket biztosít az oxigénmérés számára. Így kellő biztonsággal alkalmazható az elektrod erősen savas vagy lúgos, akár nem vizes közegekben is és maga a cella biztosítja a megfelelő háttér elektrolit koncentrációt is. Az anódos elektrodreakcióban résztvevő, és az állandó referenciapotenciált biztosító klorid ionok is rendelkezésre állnak a belső elektrolit részeként.

A Clark-cella alkalmazásánál felmerülő problémákat, korlátokat is figyelembe kell venni.²⁵⁶ Így például az élettartam szempontjából kritikus lehet az elektrolit pH-jának változása (az oxigén fogyasztás eredményeként keletkező OH^- ionok hatására) és az ezüst anód felületének csökkenése (a rajta kialakuló AgCl csapadék következtében), ami a reakció leállításához vezethet. A hosszú időn át stabil potenciált biztosító referenciaelektrod kialakítása pedig elsősorban a miniatürizálás, integrálás során jelent komoly kihívást.²⁵⁷ Egy japán kutatócsoport közleményében olvasható,²⁵⁸ hogy az AgCl csapadék mennyisége bár folyamatosan növekszik az üzemelés alatt, a megbízható eredményekhez a kellő mennyiségű és minőségű AgCl csapadék már az üzemelés kezdetétől, folyamatosan szükséges. A Suzuki és munkatársai által javasolt kialakításban a vékony Ag réteget szigetelő poliimid réteg fedi úgy, hogy annak csak a szélei maradnak szabad érintkezésben az elektrolittal. Az így kialakuló résekben, az Ag réteg széleiről indul a csapadékképződés, s folytatódik a poliimid réteg alatt továbbhaladva. Ez a kialakítás jelentősen növeli a mérőcella élettartamát és biztosítja a vonatkozási elektrodpotenciál állandóságát változó áramok esetén is.

A Clark-cella hosszú válaszidejét, túl nagy oxigén fogyasztását, keverési/áramlási sebesség érzékenységét és a körülményes miniatürizálhatóságot, integrálhatóságot kritizálják Krommenoek és munkatársai²⁵⁹ 2007-ben megjelent közleményükben, ezért az oxigénmérésre más megoldást alkalmaznak. Munkájukban oldott oxigén, pH, hőmérséklet és biomassa koncentráció párhuzamos, on-line mérésére alkalmas, élesztő fermentorokba tervezett szenzorplatform kialakítást mutatnak be. A komplex szenzoruk működése során az oxigénmérés a mintaoldattal közvetlenül érintkező, burkoló membrán nélküli, ultramikroelektrod sorozattal (UMEA) történik.

A mikroelektród sorozat kialakítása során egy nagy felületű platina makroelektródra 1 μm vastag poliimid szigetelő réteget vittek fel úgy, hogy az előzőleg kiszámolt távolságoknak megfelelően, 2 μm átmérőjű kör területeket szabadon hagytak.

A mikroelektródok előnye, hogy a mért jel a minta oldatban lévő konvekciós viszonyoktól szinte független, továbbá a számos mikroelektródon mért kicsiny áramok eredőjeként kialakuló érték –a közös kivezetés miatt- már megfelelő jel/zaj viszonyt eredményezhet. Az oldattal közvetlenül érintkező mikroelektród sorozat igen rövid válaszideje szintén vonzó tulajdonság.

Egy évvel később megjelent közleményükben²⁶⁰ a szenzor platform mikrotiter lemezek adottságaihoz igazított microchip változatát mutatták be. A továbbfejlesztett szenzort sorozatos, élesztő fermentációs tesztek nyomon követésére jól alkalmazhatónak találták. Meglepő módon, a tesztelés során jóval zajosabb jelet mértek a hagyományos Clark-elektróddal összehasonlítva az oxigén koncentráció mérésénél, melyet az elektromágneses tér zavaró hatásával magyaráztak. Ennek csökkentésére az elektródfelületet növelték, ill. alaposabb szigetelések kialakítását végezték el.

Csupasz, membránnal nem védett elektródfelületek és megfelelő mérőközeg jelenléte nélküli amperometriás mérések során gyakrabban fordul elő az elektródfelület passzíválódása. A szerzők közleményükben beszámolnak arról, hogy a több órán át tartó kísérlet során, közvetlenül a habzástgátló beadagolását követően, az UMEA érzékenysége jelentősen csökkent. Továbbá a szelektivitás biztosítása céljából a szokásosnál kisebb redukciós elektródpotenciálon (-0,4 V vs. Ag/AgCl) végezték az amperometriás detektálást, s ezzel az elméletileg elérhető értékhez képest lényegesen kisebb érzékenységgel detektáltak.²⁶⁰

A kihívások ellenére is az integrálható, miniatürizált Clark-típusú elektród kialakításokkal találkozunk leggyakrabban a sejt kultúrák, mikrobiológiai tenyészetek biológiai aktivitásának nyomon követésére.^{261, 262} Ennek egyik példjaként említhető az a Wu és munkatársai által kifejlesztett miniatürizált Clark-szenzor kialakítás,²⁶² mely kis térfogatú baktérium szuszpenziók oxigén fogyasztásának mérésére alkalmas és mikrofluidikai rendszerbe (micro total analysis system, μ -TAS) könnyen integrálható. Az oxigén koncentráció változásának hatására a jel új egyensúlyi értéket vesz fel, s ennek a változásnak a 90%-ához tartozó idő, mindössze 6,8 másodperc. Ez utóbbi annak köszönhető, hogy a mérőcellát csupán 7 μm -es dimetil-polisziloxán membrán választja el a minta tértől, továbbá a munkaelektród az elválasztó membránhoz igen közel helyezkedik el.

A Clark-cella előnyei inspirálták Revsbech-et és munkatársait,²⁶³ hogy annak mikroelektrod változatát is elkészítsék, s ezzel az oxigén eloszlás mérésére alkalmazott, egyszerű platina és arany mikroelektrodok felváltását célozták meg, több alkalmazási területen. Az 1983-ban publikált Clark-típusú mikroelektrod hegyének átmérője mindössze 2,5 μm , szilikongumi membránt tartalmaz és a belső kapillárisba olvasztott, aranyozott platina korong katód átmérője 2 és 20 μm közötti. A mikroelektroddal eredményesen vizsgálták a savas környezetben élő, fotoszintetizáló Cyanidium algatelepben kialakuló oxigén koncentráció mélységi eloszlását. Az alga telep felszínétől 4 mm-es mélységig gyűjtöttek adatokat, 0,1 mm-es lépésközzel. Az elektrodnak a 90%-os válaszideje 0,4 s volt, ezzel a fotoszintézis folyamatának követéséhez alkalmasnak bizonyult.

Ez a mikroelektrod azonban túl sérülékeny, törékeny szilárd közegek vizsgálatához, ezért egy olyan változatot is kidolgoztak, ahol a kis belső kapilláris átmérő mellett az elektrodhegyet vastagabb fallal erősítették meg – bár ennél a kialakításnál a válaszidő is hosszabb lett.²⁶³ A talaj aggregátumokban kialakuló oxigén eloszlás lokális feltérképezésére Teidje és munkatársai²⁶⁴ ilyen megerősített, mikro Clark-elektrodot használtak, lényeges információkat szolgáltatva a talajokban zajló anaerob folyamatok megértéséhez.

Az oxigénfogyasztástól függő, keverési és a diffúziós körülmények változásával összefüggő érzékenységet - a Clark-mikroelektrodok esetében is - az alkalmazhatóság fontos korlátjaként említi a szakirodalom.^{265, 266} Felszíni légmozgással áramlásba hozott víz és porózus üledék határán kialakuló lokális oxigénkoncentráció mérésre alkalmazott mikroelektrodok eredményeit mutatja be Revsbech, fent hivatkozott publikációiban. Gust 1987-ben publikált mikroelektrodjának válasza 10-50%-kal nagyobbak mutatkozott konvekció jelenlétében.²⁶⁷ Ehhez képest a dán kutató által fejlesztett mikroelektrodok áramlási sebesség érzékenysége mindössze 1 és 6% voltak. A kapilláris hegyének belső átmérője mindössze pár mikronos volt, a katód a belső kapillárisból 10-20 μm hosszan kilógó kitüremkedő vékony platina szálból készült, melyet porózus arany bevonattal láttak el a kellően stabil áram értékek biztosítása érdekében. A csökkentett áramlási sebesség érzékenységet és az üledékekben tapasztalt áramcsökkenés mérséklését úgy érte el Revsbech,²⁶⁵ hogy a mikroelektrodokban az azonos méretű katódok membrántól mért távolságát változtatta (ez akár 60 μm -t is elérte), ezáltal az oxigénfogyasztást csökkentette. Ez a változtatás természetesen a válaszidő növekedésével járt és az érzékenység csökkenése kísérte.

A közelmúltból is olvashatunk a Clark-mikroelektrod fejlesztéséről és alkalmazásáról publikációkat. Így például tengeri üledékek „oxigén minimum zónájában” történő mérésekre

dolgozott ki Revsbech és kutatócsoportja speciális mikroelektrodot.²⁶⁸ Az igen kis koncentrációk mérésének lehetővé tétele érdekében az elektród testet 50-100 mikronos belső átmérőjű kapillárisból készítették és ezzel arányosan megnövelték a porózus aranyozott platina „gömb” katód méretét is. Ezek a példák azt mutatják, hogy munkájuk során a Clark-cella felépítését évtizedek óta megőrizték és az elektród kialakítást több kisebb lépésben változtatják az adott analitikai felhasználás sajátosságainak megfelelően.

Az oxigénmérés témakörében a rohamosan terjedő optikai szenzorok is figyelmet érdemelnek, ezek polimer mátrixba ágyazott szenzor molekulákat tartalmaznak. Működésük rendszerint azon alapul, hogy a szenzor molekula által kibocsátott fluoreszcenciás fény intenzitása oxigén jelenlétében annak koncentrációjától függő mértékben csökken. Az optikai oxigén szenzorok nagy előnye, hogy működésük során nem fogyasztanak oxigént. Ezáltal keverésre és a diffúziós viszonyok változására érzéketlenek,²⁵⁴ azonban hátrányként említhető, hogy méréstartományuk viszonylag szűk és rendszerint csak az igen kicsiny oxigén koncentráció mérésére alkalmazhatók. A területen dolgozók jelentős része az optikai oxigénérzékelők megjelenése után is a legmegbízhatóbb eszköznek a Clark-cellát tartja.²⁶⁰

3 Kísérleti rész

3.1 Felhasznált anyagok és vegyszerek

A mérések során analitikai tisztaságú vegyszerekkel dolgoztam, melyeket a Flukától, Sigma-Aldrich-től, Interkemiától, valamint a Merck-től vásároltunk. Az egyes speciális vegyszerek eredetét felhasználásuk leírásánál közlöm. A vásárolt vegyszereket olyan formában használtam fel, ahogy azok a gyártótól érkeztek.

Az elektródok felületének polírozásához szükséges, különböző átmérőjű alumínium-oxid port a Micropolish II (Buehler, USA) – től vettük.

Az oldatokat kétszeresen ioncserélt vízzel készítettem. A víztisztító készülék típusa: Merck Millipore, Elix Advantage 10, (Franciaország). A készülék fő egysége fordított ozmózis elvén működik. A kész víz vezetőképessége $0,076 \mu\text{S}/\text{cm}$ alatt volt.

A modell tortuózus közegként felhasznált és szitán fracionált homokot előkezelést követően használtam fel. Az építkezési homokbányából származó 400 g homokmintából először a szemmel látható szennyeződések távolítottam el. Aztán egymást követően háromszor ioncserélt vizes mosáson (a homok térfogatához képest kb. háromszoros mennyiségű vízzel), szárításon (szárítószekrényben, $90 \text{ }^\circ\text{C}$ -on), tömény salétromsavas kezelésem (szerves és szervetlen szennyeződések eltávolítására), majd ismét sorozatos (5x) vizes mosáson és szárításon ($90 \text{ }^\circ\text{C}$ -on) esett át. A teljesen száraz homok szemcseméret szerinti osztályozását szitasorral végeztem. A szita lyukméretei: 125, 150, 315, 400 μm , 1 mm.

A $0,1 \text{ mol}/\text{dm}^3$ koncentrációjú dopamin törzsoldatot és az L-aszkorbinsav oldatokat mindig frissen, a felhasználás napján készítettem és az oldatok készítése során 10 perces nitrogén átbuborékolatást alkalmaztam az oxigén kiűzésére. Felhasználásig az oldatokat sötétben, hűtőszekrényben, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ -on tároltam.

Az L-aszkorbinsav oldatok koncentrációját az élelmiszertudományok területén elterjedt egységben, mg AS/100 g oldat egységben adtam meg.

A kísérletek során felhasznált banánt és paprikát a helyi piacról szereztem be és hűtőszekrényben, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ -on tároltam a felhasználásig.

A sárga, ill. zöld paprikát (*Capsicum annum* Linn.) felhasználás előtt csapvízzel mostam, majd a mérés célja szerint kiválasztott eszközökkel dolgoztam fel. Paprika lé és zúzalék készítése során kerámia és műanyag eszközöket használtam, kerültem a fém használatát, ugyanis pl. a kés

pengéről származó fémionok,-mint ismeretes- katalizálhatják az LAS oxidáció folyamatát. Az eljárás során a mosott paprikát kerámia késsel szeleteltem, majd egy konyhai műanyag reszelőn aprítottam. A keletkező darabos pépet konyhai szűrő alkalmazásával lé és zúzalék frakciókra választottam szét.

A paprika szeleteken kivitelezett, közvetlen LAS meghatározásra végzett mérések esetében a munka célja éppen a fémionok hatásának vizsgálata a folyamatra. Ennek megfelelően a minták készítése során kerámia-, rozsdamentes acél-, vagy vas kést használtam a paprika szelet felületén található sejtek óvatos felsértésére. A pengék kb. 2-3 percig voltak érintkezésben a paprika szövevel.

Viszkozitásméréshez a paprika szűrt levét 10.000 fordulat/perc sebességgel, 5 percen át centrifugáltam, majd az átlátszó felülúszót 0,2 mikronos fecskendőszűrőn (VWR International Kft, Budapest) szűrtem át.

A különböző viszkozitású L-aszkorbinsav törzsoldatok készítése az alábbiak szerint történt: 150 mg LAS-at 10 ml puffer oldatban, illetve a további oldatok esetében a 150-150-150 mg LAS-at rendre 9,75 ml puffer és 0,25 ml glicerin elegyében, 9,5 ml puffer és 0,5 ml glicerin elegyében, valamint 8,75 ml puffer és 1,25 ml glicerin elegyében oldottam fel.

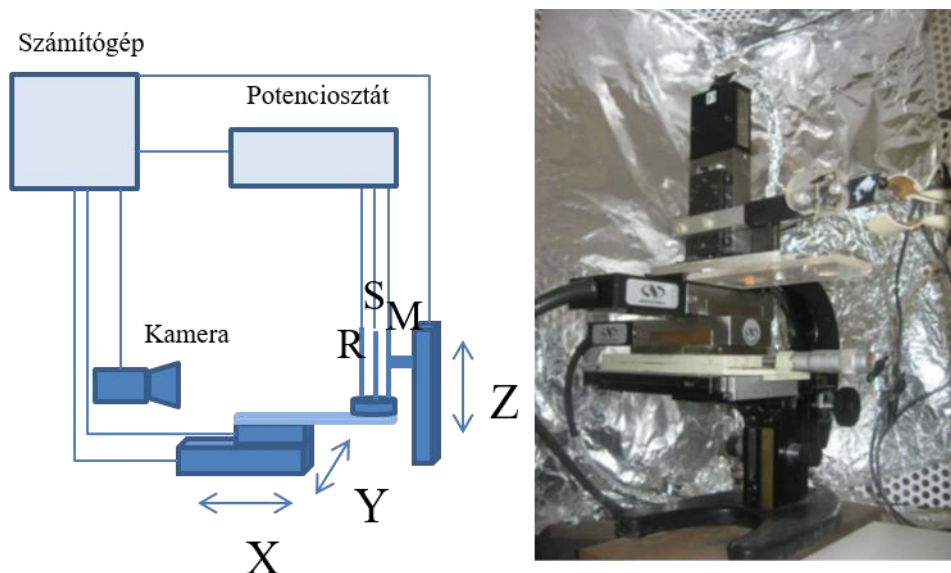
3.1.1 Nyers enzimkivonat készítése banánból, enzimaktivitás mérés céljára:²⁶⁹

Az 50 g hámozott, feldarabolt banánt egy megfelelő méretű főzőpohárban annyi foszfátpufferbe (pH=7,33) helyeztem, amennyi éppen ellepte. Ez az oldat amellet, hogy fenntartotta az enzim működéséhez szükséges optimális pH-t, a hő közvetítő közegeként is szolgált. A főzőpoharat vízfürdőbe helyeztem (40 °C, 20 perc). A hőkezelés után a pufferoldatot leszűrtem a banánról, és kézi mozsár segítségével homogenizáltam. Az így kapott homogenizált mintát centrifugáltam (5000 rpm, 10 perc). A centrifugálás eredményeként, a szöve-törmelék felett, egy enzimtartalmú folyadékfázist kaptam. A nyers enzimkivonatot egyes esetekben a mezokarpium különböző részeiből készítettem. A nyers enzimkivonatban már néhány órás tárolás során is megfigyelhető az enzimkatalizálta oxidáció által előidézett barnulás jelensége. A létrejövő melaninokat a kivonat 20 µm pórusátmérőjű fecskendőszűrőn való leszűrésével távolítottam el, ezzel csökkentve az enzimaktivitás mérések során a makromolekulák okozta hibás eredmények előfordulását. A szűrés az enzimkivonat viszkozitását is jelentősen csökkentette. Az enzimkivonat tárolása hűtőben, 4°C-on történt.

3.2 Alkalmazott eszközök, műszerek

A voltammetriás mérésekben CHI típusú 760C (CH Instruments, Austin, TX, USA) elektrokémiai mérőműszert alkalmaztam.

A pásztázó elektrokémiai mikroszkópiás mérésekhez a Pécsi Tudományegyetem, Általános és Fizikai Kémia Tanszék laboratóriumában kialakított egyik készüléket használtam, a kémiai mikroszkóp három fő részből áll: egy elektrokémiai mérőállomásból –eDAQ Picostat (model EA 162) és e-cable ED410 (eDAQ, Ausztrália)-, egy mozgató egységből, és a mérőcellából. A készülékhez számítógép és optikai kamera csatlakozik. (3. ábra)

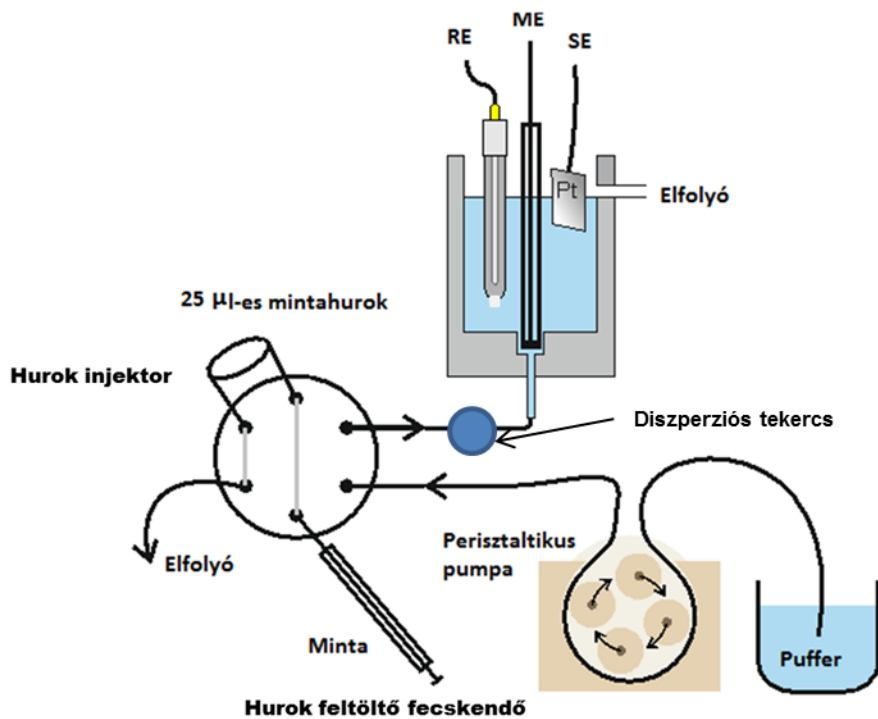


3. ábra: A pásztázó elektrokémiai mikroszkóp sematikus felépítése és a Pécsi Tudományegyetem, Általános és Fizikai Kémia Tanszéken található, általam használt egyik elektrokémiai mikroszkóp fényképe R: referencia-, S: segéd-, M: munkaelektrod.

3.2.1 Áramló oldatos rendszer

A kísérleteimhez házilag készített áramló oldatos rendszer (Flow Injection System) szintén házilag készített wall-jet típusú mérőcellát tartalmaz, melyben az áramló oldat egy szűk fúvókán áthaladva az elektród felületére érkezik, annak a centrumába. Az elektród felületén radiálisan áramolva a további elektródokat tartalmazó térbe jut, majd onnan a lefolyóba. A rendszer további egységei: perisztaltikus pumpa (ISMATEC SA Mini-s 620m Ismatec SA, Svájc), injektor (Labor MIM, Budapest, Magyarország), injektor hurok térfogata: 25 μ l, diszperziós tekercs. Ez utóbbit házilag készítettem el 1,15 m hosszú, 1 mm belső átmérőjű csőből, ceruzára feltekerve.

Alkalmazásának célja: a megfelelő Taylor-diffúzió/diszperzió kialakulását segíti. Áramló oldatos rendszerben, elektrokémiai detektálás alkalmazásával kivitelezett sorozatos minta mérés esetén szerencsés, ha az oldat ionkoncentrációja, a háttér elektrolit összetétele állandó. A diszperziós tekercsben a Taylor-diffúzió elmélete szerint a minta és a vivőoldat között a szükséges mértékű keveredés megtörténik. Korábbi kísérleti munkákból tudjuk, hogy ez a diszperziós tekercs méret közel optimális eredményre vezet. (4. ábra)



4. ábra: Az áramló oldatos mérésekben használt, munkám során összeállított injektálásos (FIA) készülék felépítését, működését mutató rajz. RE: referencia-, SE: segéd-, ME: munkaelektrod.

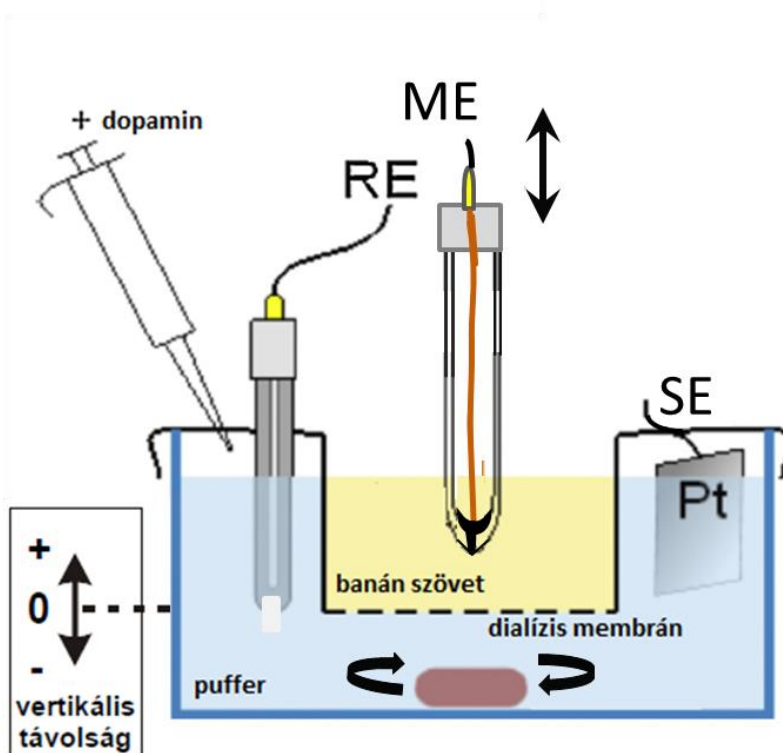
3.2.2 Modell bioszenzor mérőcella

A banánotród bioszenzor optimális vastagságú enzimrétegének meghatározása céljából modell bioszenzor mérőcellát készítettem. Ebben a kísérletben lehetőség nyílik az enzimrétegben kialakuló dopamin és dopamin–kinon koncentrációviszonyainak tanulmányozására.

A reakcióréteg egy 15 mm belső átmérőjű üvegcső alsó részében helyezkedett el, a cső hossza kb. 20 mm volt, ebben könnyen tudott mozogni a PEKM készülék mérőcsúcsa. A modell bioszenzor esetében a jelátvivő PEKM mérőcsúcs szénpaszta mikroelektrod volt. A reakcióréteg kialakítására banán szövetet foszfátpufferrel (pH=7,33) homogenizáltam egy porcelán mozsár

segítségével (5:1 V/V arányban), majd a kapott pépet az üvegcsőbe töltöttem, melynek egyik végét előzetesen 50 µm vastag dialízismembránnal (Technikon Autoanalyzer accessories) zártam le.

Az enzimetartalmú reakciórétegben végzett PEKM méréseknél alkalmazott kísérleti berendezés felépítését az 5. ábra mutatja. A reakcióréteget tartalmazó, a bioszenzort modellező üvegcső egy 30 ml mintaoldatot tartalmazó mérőcellába nyúlik. Mérőcellaként egy 5 cm átmérőjű kristályosítócsésze szolgált. Mágneses keverővel intenzív konvekciót idéztem elő a mérőcellában, mellyel a membrán mintaoldat felőli oldalán stacionárius transzport viszonyok kialakulását kívántam biztosítani. Az enzimeréteget tartalmazó, bioszenzort reprezentáló üvegcsövet ebbe az oldatba helyeztem, a membránnal lezárt végével lefelé. Az üvegcsövet úgy pozicionáltam, hogy a reakcióréteg levegővel érintkező vízszintes felülete és a mintaoldat felszíne azonos magasságban legyenek, így megakadályoztam a hidrosztatikus nyomáskülönbség kialakulását a két térrész között. A referencia- és az ellenelektrodokat a pufferbe helyeztem és a potenciosztáthoz csatlakoztattam. A PEKM-hoz rögzített munkaelektrod az enzimeréteget tartalmazó csőben mozoghatott.



5. ábra: A modell bioszenzor működésének vizsgálata során használt mérőcella vázlatos rajza. RE: referencia-, SE: segéd-, ME: munkaelektrod.

3.2.3 **Elektródok**

Minden mérésnél OP-0830P típusú telített kalomel referenciaelektrodot (Radelkis, Budapest, Magyarország) és 1 cm² felületű platina lemez ellenelektrodot használtam, ezek alól azok az esetek képeznek kivételt, ahol azt külön megemlítem.

3.2.3.1 *Szénpaszta mikroelektrod készítése*

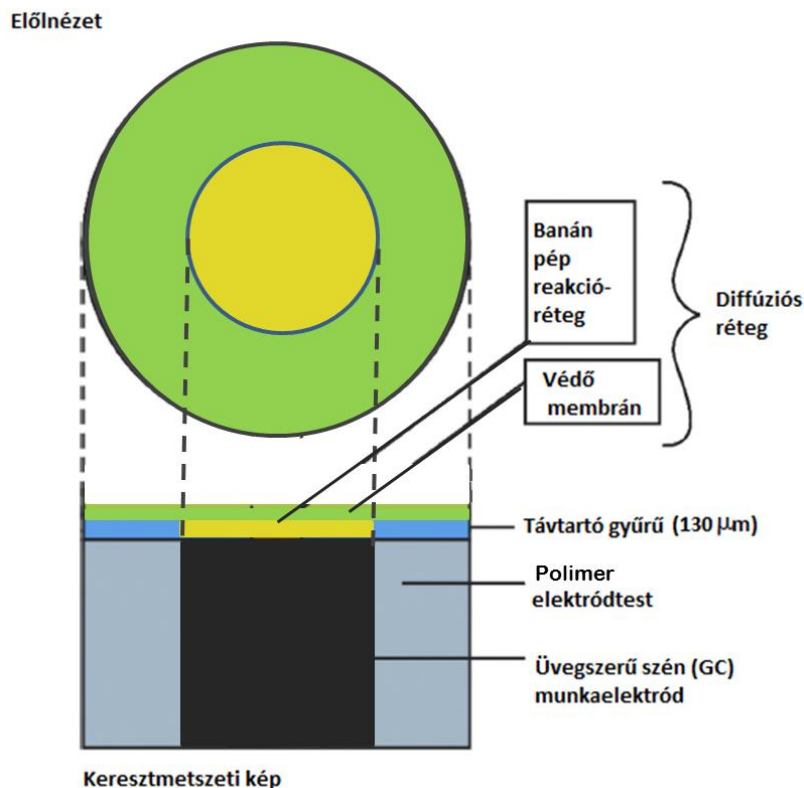
A szénpaszta elkészítéséhez 2 g grafit port (<20 µm szemcseméret, ALDRICH Chemistry, synthetic, CAS: 7782-42-5. Svájc) és 0,5 g paraffin olajat (PARAFFINUM LIQUIDUM, a közeli Pannon Patika gyógyszerárban vettem, gyógyszerkönyvi minőség, BP, Ph. Eur. Grade., CAS: 8012-95-1.) porcelánmozsárban homogenizáltam. Az elektrodtest elkészítéséhez 1,5 mm-es külső és 1,1 mm-es belső átmérőjű boroszilikát kapillárist (Sutter Instruments Co., USA) láng felett kihúztam, majd az elkeskenyedő végét beolvasztottam. A mikroelektrod hegyének kialakításához a lezárt vég felől óvatosan csiszoltam a kapillárist addig, amíg a megfelelő méretű belső átmérőt elértem (50 µm), majd alumínium polírozó porral simára políroztam. Az így elkészített kapillárisba hátsó vége felől vékony réz szálát fűztem az elektromos csatlakozás biztosítására, a kapillárist elkeskenyedő vége felől pedig a szénpasztával megtöltöttem, felületét simára políroztam.

3.2.3.2 *Banánotród bioszenzor készítése*

Glassy Carbon (Alfa Aesar, VWR International Kft, Budapest) rúd 0,5 cm hosszúságú része és egy megfelelő rézdrót között ezüst-epoxy (Epo-Tek, ET-H20E-8-0028, ET-PMS-0028, J. P. Kummer GmbH.) vezető ragasztóval hoztam létre a csatlakozást, majd ezt egy megfelelő átmérőjű üvegcsőbe helyezve, EpoFix (Struers GmbH) polimerbe ágyaztam. A polimerizáció után az elektrodfelületet csiszolással és nedves polírozással készítettem elő, melynek során egymást követően 1, 0,3 és 0,05 µm szemcseméretű alumínium oxid polírozó port használtam, az egyes lépések között pedig ultrahangos mosást végeztem.

A banánotród bioszenzor esetében a 4 mm átmérőjű GC elektródra szigetelő szalagból kialakított, 130 µm vastag távtartó gyűrűt helyeztem, s a létrejövő mélyedésbe az előzetesen homogenizált banán pépet egy spatula segítségével egyenletesen betöltöttem úgy, hogy vízszintes felületet képezzek a távtartó gyűrű felszínével. A dialízismembránt ezt követően rögzítettem az elektródra és ez szépen kifeszült a rétegen. Látványos a különbség a túltöltött ill. alultöltött reakciórétegek között. Néhány kísérletben a dialízismembrán helyett Tecoflex membránt

használtam védőréteggként. Ehhez 1 g poliuretánt (Tecoflex SG-80A, Thermedics Inc, Woburn, MA, USA) 100 ml tetrahidrofuránban oldottam (1%-os oldat), majd az oldatból 10 μ l-t a banán pépre és az azt körülvevő távtartó gyűrűre szétosztatva rácseppentettem. Pár másodperces párolgást követően kialakult a védőmembrán. A banánotród sematikus rajzát a 6. ábra mutatja be.



6. ábra: Banánotród felépítése

3.2.3.3 GC munkaelektrod L-aszorbinsav mérésére, tortuózus közegben

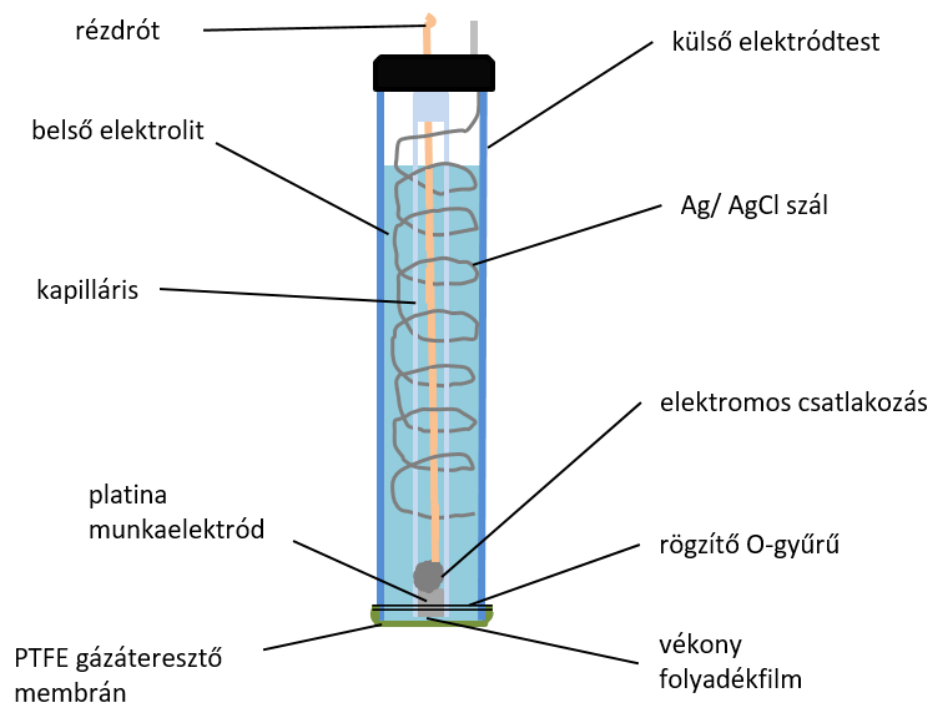
1 mm átmérőjű, házilag készített GC munkaelektrodot használat előtt megtisztítottam, egymást követően 1, 0,3 és 0,05 μ m szemcseméretű alumínium oxid polírozó porral políroztam, az egyes lépések között pedig ultrahangos mosást végeztem. Ezt követően L-aszorbinsav oldatban ciklikus voltammogramot vettem fel (potenciáltartomány: 0-0,9 V, szkennelési sebesség: 0,1 V/s, LAS koncentráció: 100 mg/100g) a megújított felületű, bevonat nélküli “csupasz” elektróddal, hogy ellenőrizsem az elektród működését. Amennyiben a voltammogram alapján az elektródfelület kellően tisztának és megfelelő aktivitásúnak mutatkozott, megnedvesített dialízismembránnal

(Technikon TM Pre-mount type "C", Technikon Instruments, USA) borítottam vigyázva, hogy a felület és a membrán közé levegő ne szoruljon, s a membránt cérnával szorosan rögzítettem. A bevont felületű munkaelektrod működését ismételten ellenőriztem ciklikus voltammogram felvételével. Az L-aszkorbinsav oxidációs áramcsúcsának a pozitív elektródpotenciál irányába történő jelentős eltolódása utal a membrán bevont nem megfelelő illeszkedésére.

3.2.3.4 Clark-elektrod készítése

A kísérletekben használt oxigén-mérő Clark-cellát magam készítettem az alábbi eljárást követve:

3 mm hosszú, 1 mm átmérőjű platina drótot 1,1 mm belső átmérőjű kapilláris végébe olvasztottam mikroláng és vákum alkalmazásával, majd a kapilláris hátsó vége felől behelyeztem egy kis darab forrasztóönt, s egy vékony rézdrótot. A kapilláris láng felett történő melegítésével megolvasztva a forrasztó ón darabot, ezzel kialakítottam az elektromos csatlakozást. Az üvegcső beolvasztott végét óvatosan csiszoltam míg a közepén megjelent a platina korong. Ezután a véglapot egymást követően 1, 0,3 és 0,05 μm szemcseméretű alumínium-oxid polírozó porral políroztam nedvesen, az egyes polírozási lépések között pedig ultrahangos mosást végeztem. Az így elkészített munkaelektrod mellé ellen- és referenciaelektrodként szolgáló, kloridozott ezüst szálat rögzítettem. 0,4 cm belső átmérőjű, 7 cm hosszú üvegcső végét kifeszített poli(tetrafluoretilén) membrán (Radelkis, Budapest, Magyarország) sapkával zártam le. Az így készített érzékelő cellatest belsejébe 0,1 M KCl tartalmú, 25 mM-os, 9,5 pH-jú bikarbonát puffer belső elektrolitot töltöttem, majd az elektródokat tartalmazó üvegtestet úgy helyeztem és rögzítettem a csőbe, hogy a platina korong munkaelektrod a Teflon membránhoz közvetlenül illeszkedett, csupán egy vékony folyadékfilmet hagyva közöttük. Az így elkészített Clark-cella sematikus rajzát a 7. ábrán mutatom be.



7. ábra: Az oldott gázok mérésére alkalmas Clark-típusú cella sematikus rajza.

3.3 Referencia-módszer a polifenol-oxidáz enzim aktivitásának meghatározásához

A banánból készített enzimkivonat polifenol-oxidáz aktivitásának meghatározásához referencia-módszerként a Sigma-Aldrich spektrofotometriás enzimaktivitás mérési módszerét követtem.²⁷⁰ A meghatározás alapja egy indirekt spektrofotometriás eljárás, amely a polifenol-oxidáz aszkorbinsav-oxidáló képességét használja ki.²⁷¹ A polifenol-oxidáz pirocatechin-oxidáz aktivitása a pirocatechin o-benzokinonná alakítása mellett az L-aszkorbinsavat dehidro-L-aszkorbinsavvá oxidálja. Az L-aszkorbinsavnak 265 nm hullámhosszon elnyelési maximuma van, így a meghatározás során az L-aszkorbinsav fogyását mérjük azáltal, hogy az enzimreakció előrehaladtával csökken a reakcióelegy abszorbanciája.

A reakcióelegy összetevőinek listája, koncentrációja: 50 mM KH_2PO_4 puffer (pH=6,5; 25°C-on); 5 mM pirocatechin oldat; 2,1 mM L-aszkorbinsav(LAS) oldat; 0,065 mM EDTA oldat, tirozináz enzim oldat.

A reakcióelegy végső koncentrációja:

3 ml reakcióelegyben a végső koncentrációk: 50 mM KH_2PO_4 puffer (pH=6,5; 25°C-on); 0,17 mM pirocatechin; 0,07 mM LAS; 0,0022 mM EDTA és 50-100 U enzim.

A meghatározás megkezdése előtt a készüléket nulláztam L-aszkorbinsavat nem tartalmazó, vak oldattal. A polifenol-oxidáz enzimkivonatot közvetlenül a mérés előtt adtam hozzá az elegyhez, és homogenizáltam össze, ezzel indítva el az enzimreakciót.

Az L-aszkorbinsav abszorbancia maximumának megfelelő hullámhosszon, 265 nm-en végeztem a másodpercenkénti detektálást, s a mérési adatokra illesztett egyenes meredekségéből meghatároztam az abszorbancia percenkénti változását ($\Delta A_{265}/\text{min}$). A kapott értéket behelyettesítve a 6. egyenletbe, kiszámítható az enzimkivonat specifikus enzimaktivitása.

$$\frac{U}{\text{mg enzim}} = \frac{\left(\frac{\Delta A_{265}}{\text{min}}\right)_{\text{minta}} - \left(\frac{\Delta A_{265}}{\text{min}}\right)_{\text{vak}}}{(0,001) \left(\frac{\text{mg enzim}}{\text{RM}}\right)} \quad (6)$$

Ahol RM: reakcióelegy (reaction mixture); ΔA_{265} : 265 nm-es hullámhosszúságon mért abszorbanciaváltozás. U: Egység, U

0,01 = 3 ml reakcióelegyben, 1 U (Egység) tirozináz enzimre vonatkozó, 265 nm-en mért abszorbanciaváltozás ($\Delta A_{265\text{nm}}$) pH= 6,5 és 25°C mellett.

1 U (Egység) definíciója: 1 (U) Egység megfelel a percenkénti, 265nm-en mért 0,001 értékű abszorbanciaváltozásnak ($\Delta A_{265}/\text{min}$), pH=6,5 és pirocatechint, valamint LAS-at tartalmazó 3 ml reakcióelegy mellett.

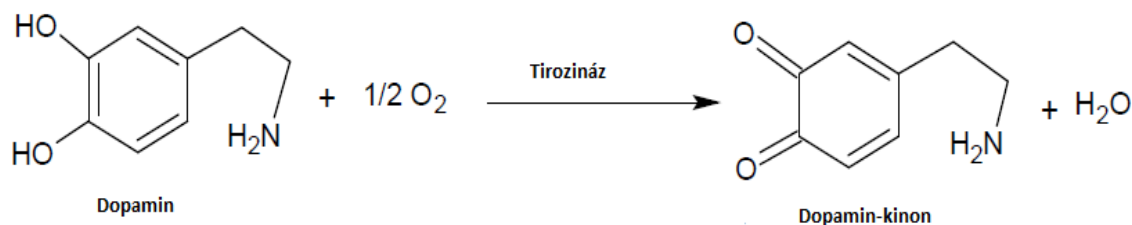
A számoláshoz szükség van a reakcióelegyben lévő enzimkivonat enzimtartalmának tömegére is. Ezért 100 μl enzim tartalmú kivonatot 20 órán keresztül 105 °C-on szárítottam, majd a visszamaradt szárazanyag tömegét lemértem, és ezt vettem a reakcióelegy enzimtartalmának. A reakcióelegyben lévő 100 μl enzimoldat enzimtartalmának tömege a vásárolt polifenol-oxidáz készítmény esetén 0,076 mg. A banánból nyert polifenol-oxidáz enzimoldat esetén ugyanezen mennyiségű oldat a szárításos kísérlet alapján 2,13 mg szárazanyagot tartalmaz. Itt ezt vettem az enzimkivonat teljes enzimtartalmának, ez természetesen nem helyesen tükrözi a tényleges enzim tömegét, mert a banánból készített nyers enzim tartalmú kivonat más vegyületeket, egyéb fehérjéket, szénhidrátokat is tartalmaz.

4 Eredmények és értékelés

4.1 Natív enzimforráson alapuló, dopaminmérő bioszenzor

A natív szövet felhasználásával készített bioszenzorok előnyeit és alkalmazhatóságuk korlátjait a bevezetésben és az irodalmi áttekintés 2.2. fejezetében mutattam be. Ezen előzmények alapján tűztem ki munkám célját: vizsgálni kívántam a banán szöveten alapuló, dopaminmérő bioszenzor analitikai teljesítményének javítási lehetőségeit. Ehhez natív enzimforrást, banán pépet tartalmazó modell bioszenzort készítettem.

A banán szövetben található polifenol oxidáz (PPO) enzimek (EC 1.14.18.1) az o- vagy p-difenolok molekuláris oxigénnel történő-, a megfelelő kinont eredményező reakcióját katalizálják. Ezeket az aktív biokatalizátorokat sikerült egyes polifenolok, így dopamin mérésére szolgáló amperometriás bioszenzorok készítésére használni. A banánotród bioszenzor működése is a dopamin PPO enzim által katalizált oxidációján alapul. Az elektród működésekor a mintaoldatból a dopamin a dialízismembránon át a banános reakciórétegbe diffundál. Itt az enzim katalitikus hatására dopamin-kinonná alakul. A reakcióban az enzim redukált alakja képződik. A keletkező dopamin-kinon diffúzió útján a mintaoldatba és az alapelektrod közelébe jut. A megfelelő elektródpotenciál alkalmazásával a dopamin kinon lokális koncentrációjától függő amperometriás áram regisztrálható. A redukált enzimet a reakciórétegben oldott oxigén eredeti, oxidált állapotába viszi. Ha kellően nagy az oldott oxigén koncentráció a reakciórétegben, akkor a dopamin oxidáció sebessége jól definiált módon függ a dopamin koncentrációtól. Így a dopamin-kinon redukció következtében létrejövő amperometriás áram a minta dopamin koncentrációjának mérésére használható. A banánotród működését lehetővé tevő reakció sémáját a 7. egyenlet mutatja be.

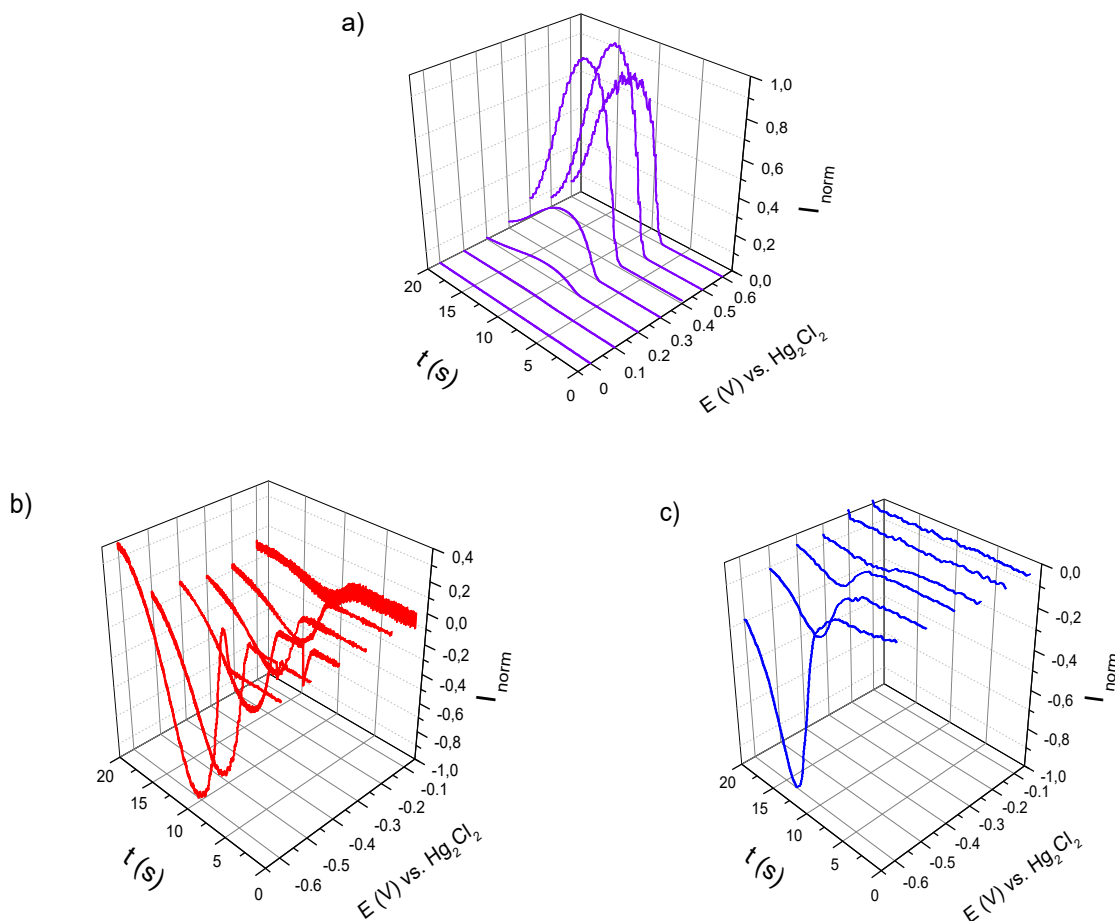


(7)

Lévéen, hogy a reakcióban résztvevő anyagok a reakció rétegben diffúzióval közlekednek, ezért az enzim tartalmú réteg vastagsága alapvetően befolyásolja az elektród működését. Így hatással van a mind a válaszüldre, mind a jel nagyságára, azaz a mérés érzékenységére.

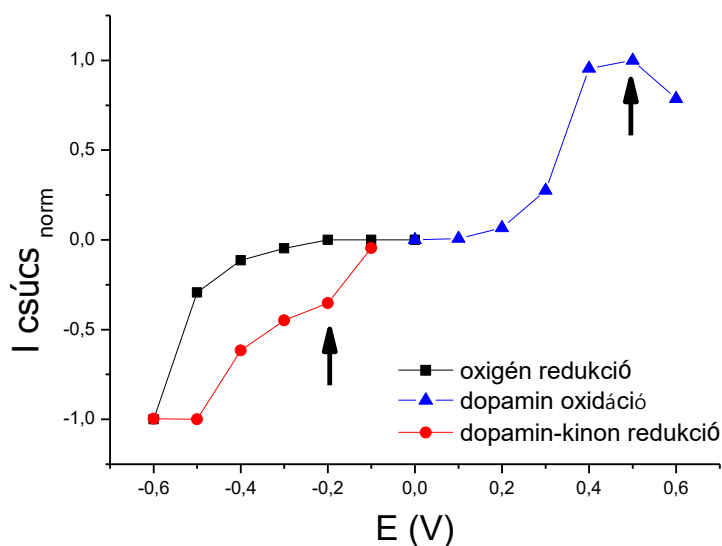
4.1.1 Az optimális elektródpotenciál meghatározása

A dopamin elektrokémiai mérése során a munkaelektrodon alkalmazott potenciál értéke kulcsfontosságú. A munkapotenciáltól nagymértékben függ a szenzor érzékenysége, szelektivitása és a mérőfelület esetleges szennyeződésének mértéke. Az optimális elektródpotenciál meghatározásához wall-jet cellát tartalmazó áramló oldatos rendszerben végeztem méréseket. A kísérletek során 10^{-3} mol/dm³-es dopamin-kinon, vagy dopamin oldat 25 µl-es dózisait injektáltam a 2,8 ml/perc térfogatsebességgel áramoltatott pH=7,33 foszfát puffer vivőoldatba és az amperometriás áram változásokat a mérőcellába helyezett GC munkaelektrodra adott különböző elektródpotenciál értékek mellett detektáltam. Az enzimreakcióban résztvevő oxigén redukciós folyamatának elektródpotenciál függése alapvető információ a bioszenzor működtetése szempontjából, hiszen a termék képződésével egyidejűleg fogy az oldott oxigén. Ezért az áramló oldatos rendszerben méréseket végeztem ennek vizsgálatára is. Ennek során az oxigén mentesített, áramló puffer oldatba oxigénnel telített puffer oldatot injektáltam. Az áramló oldat oxigén tartalmának eltávolítására a dinamikus voltammogramok készítését közvetlenül megelőzően nitrogén átbuborékolatást, míg az oldatok oxigén szintjének növelésére az injektálást megelőzően 10 percig levegő átbuborékolatást végeztem. A mérési eredményeket a 8. ábra mutatja.



8. ábra: Normalizált áram-idő csúcsok, melyeket különböző potenciál értékeknél detektáltam. Injektált oldat: a) 10^{-3} mol/dm³ koncentrációjú dopamin oldat, b) előzetesen készített dopamin-kinon, c) oxigénnel telített puffer oxigénmentesített puffer vivőoldatba (pH=7,33) történő injektálása. Áramlási sebesség: 2,8 ml/perc. Az anódos és katódos áram értékeket a legnagyobb csúcsáram értékekre normáltam ($I_{norm}=I \text{ csúcs}/I \text{ csúcs}_{max}$).

A dinamikus voltammogramokat ezekből úgy készítettem, hogy a dopamin-kinon redukcióhoz, az oxigén redukcióhoz és a dopamin oxidációhoz tartozó ($I \text{ csúcs}_{norm}$) áramcsúcs értékeket a hozzájuk tartozó elektródpotenciál értékek függvényében ábrázoltam. A dinamikus voltammogramokat egyesített formában a 9. ábra mutatja. Ezen az ábrán jól látható, hogy a dopamin oxidáció esetében kb. 0,5 V elektródpotenciál értéknél a csúcsáram értékben maximum (nyíllal jelölve), magasabb értéknél pedig csökkenés jelentkezik. Ennek a jelenségnek a legvalószínűbb magyarázata, hogy az elektródfelület magasabb potenciál értéknél szennyeződik, dezaktiválódik.



9. ábra: A dopamin oxidációhoz (▲), a dopamin-kinon redukcióhoz (●) és az oxigén redukcióhoz tartozó (■) dinamikus voltammogramok. Az anódos és katódos csúcsáramokat a hozzájuk tartozó maximum értékekre ($I_{csúcs_{max}}$) normalizáltam: $I_{csúcs_{norm}} = I_{csúcs_E} / I_{csúcs_{max}}$. A detektálás szempontjából optimális potenciál értékeket nyíl jelöli.

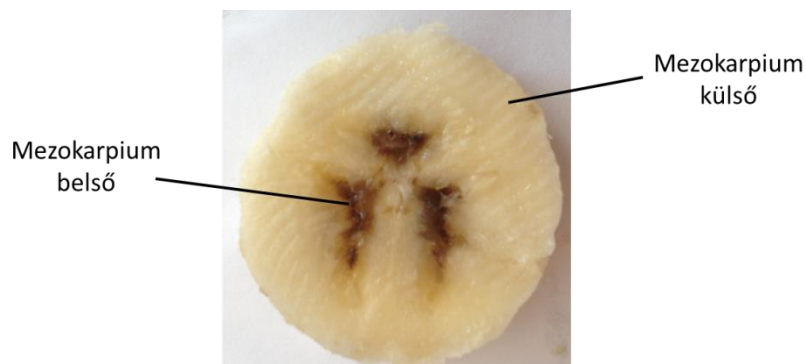
A kapott dinamikus voltammogram jól mutatja, hogy a dopamin 0,5 V vs. Hg/Hg₂Cl₂ potenciálon amperometriásan detektálható. Ekkor az elektród felületén elektrokémiai oxidáció játszódik le. Két dolog miatt azonban a dopamin oxidáción keresztüli mérése nem látszik célszerűnek. Egyrészt sorozatos mérések folyamán az elektród lassú szennyeződése szignifikáns, ugyanis az oxidáció során keletkező termék a felület passziválását okozhatja. Másrészt az oxidációs munkapotenciálok régiójában a természetes mintákban található egyéb komponensek elektrokémiai reakciója is igen valószínű, ennek megfelelően nem biztosítható a dopamin mérés szelektivitása. A banánotród működésekor a szelektivitást az enzim katalízis szubsztrát specificitása biztosíthatja. Ezért célszerű a reakció termékeként keletkező kinon redukción keresztüli detektálását választani az elektród működéséhez.

A dopamin-kinon és oxigén redukcióhoz tartozó katódos áram értéket tekintve a bioszenzor működtetéséhez optimális elektródpotenciál érték -0,2 V vs. Hg₂Cl₂ -nak adódik, mivel itt a mérendő anyag redukciója már szignifikáns mértékű, ugyanakkor az oxigén redukció ezen az elektródpotenciálon elhanyagolható mértékű. A dinamikus voltammogram szemléletesebb nagyításának tanulmányozásával megállapítható, hogy -0,02 V és -0,03 V értékek között a rendszeren anódos és katódos átfolyó áram sem mérhető, ezért periódikusan megszakított

amperometriás detektálásnál ez lehet az alkalmas megszakítási elektródpotenciál érték, amely alkalmazásakor a diffúzió rétegben növekedhet a detektálandó kinon koncentrációja, azaz feltöltődhet a diffúziós réteg.

4.1.2 Banán szövet kiválasztása bioszenzor készítés céljára

Szeletelt banán esetében megfigyelhető, hogy levegővel érintkezve, a belső területek gyorsabban és intenzívebben barnulnak. A színes termék keletkezésének sebessége jelzi az enzim katalizálta folyamat sebességét. Ezt a jelenséget jól mutatja a 10. ábra. Szenzor készítés céljára a legnagyobb enzim aktivitású területről kívántam banán szövetet nyerni. A színes termék keletkezési sebességét az enzim lokális aktivitása mellett a jelenlévő oxidálható anyag lokális koncentrációja is befolyásolja. Így az alkalmas banán szövetrész kiválasztásához a szemmel megfigyelhető barnulási tapasztalaton túl a lokális enzim aktivitás mérésre is szükség volt. Munkám során elektrokémiai enzimaktivitás méréseket végeztem a különböző területekről vett banán szövet enzimaktivitásának összehasonlítására.

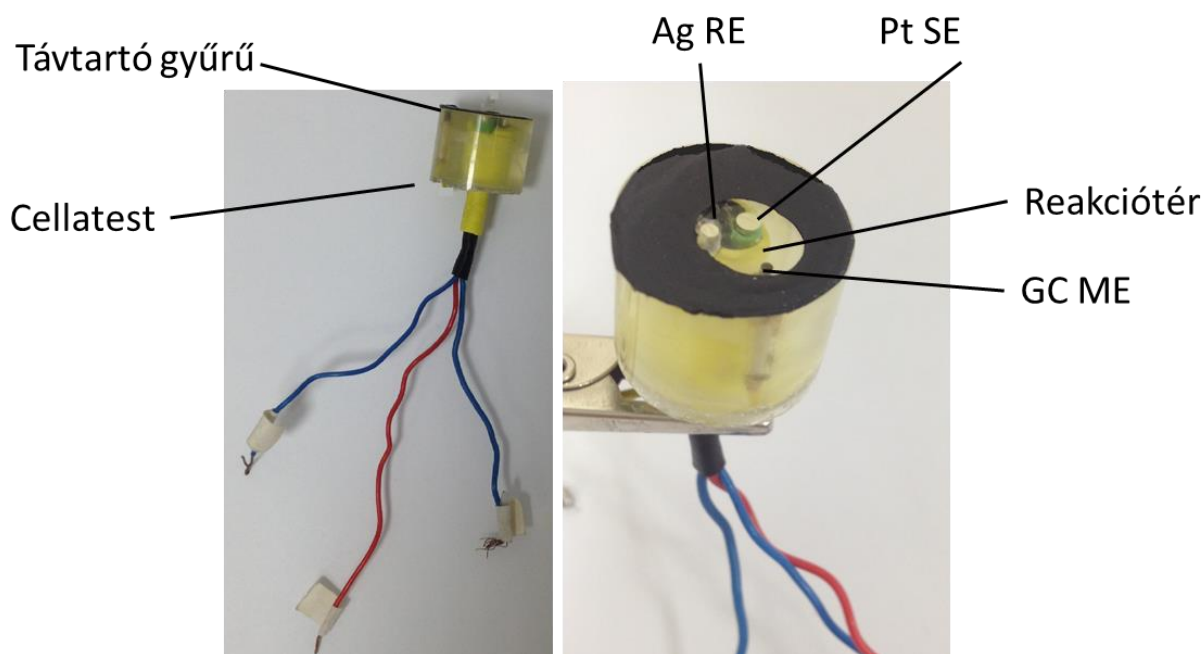


10. ábra: Banán szelet fényképe. A sötét részek az intenzív katalitikus oxidáció helyét jelzik.

4.1.2.1 Enzimaktivitás mérése

Munkám során speciális amperometriás vékonyréteg cellát készítettem a különböző növényi szövetekből származó katalitikus rétegek enzimaktivitásának összehasonlító vizsgálatára. A cella két különböző nézetből készített fényképe a 11. ábrán látható. A mérőcella teste EpoFix (Struers GmbH) polimerből készült a monomer folyadék alkalmas üvegcső formában történő polimerizációjával. Az ábrán jól látható a polimerbe ágyazott (GC ME, $d=1$ mm) munkaelektrod,

az ezüst kvázi referenciaelektrod (Ag RE, $d=2$ mm) és a platina ellenelektrod (Pt SE, $d=3$ mm), továbbá az elektrodokhoz csatlakozó vezetékek.



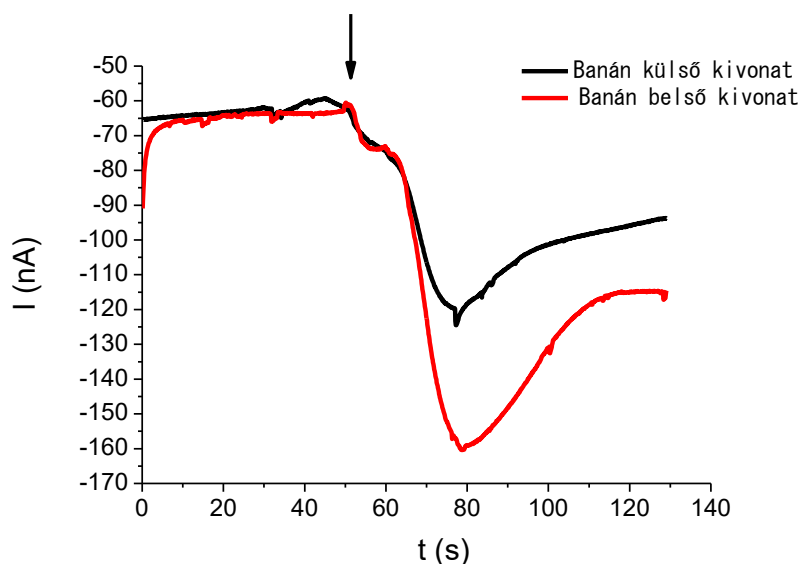
11. ábra: Enzimaktivitás mérésre alkalmas amperometriás cella felépítése. RE: referencia-, SE: segéd-, ME: munkaelektrod.

A vékonyréteg típusú reakcióteret egy elektromos szigetelő szalag alkalmazásával készítettem a cella polírozott véglapjának, az elektrodokat tartalmazó kör alapú területe felett. Előzetesen bőrlyukasztó segítségével egy korongot vágtam ki a szigetelő szalagból, ennek közepéről eltávolítottam egy koncentrikus helyzetű korongot. Az így készített gyűrűszerű távtartót ragasztottam a cella véglapjára úgy pozicionálva, hogy a gyűrű üres része az elektrodok felett foglaljon helyet. A szigetelő szalaggal határolt korongszerű, a cellatest elektrodokat tartalmazó felületén kialakított reakcióteret térfogata $60 \mu\text{l}$. A mérés során a cellatest elektrodokat tartalmazó felületére szűrőpapír korongot helyeztem, hogy biztosítsam a reakcióelegy egyenletes vastagságban történő eloszlását a vékonyréteg cellában. A mérések során a reakcióteret egy kupakkal fedtem le, a reakcióelegy párolgás okozta térfogatcsökkenésének megelőzésére.

A reakcióteret aljára helyezendő szűrőpapír-korongot $12 \mu\text{l}$ foszfát pufferrel itattam át, majd kiszárítottam, hogy a sókkal együtt felvett víz ne befolyásolja a reakcióelegy koncentrációit, illetve térfogatát. Ezt követően $50 \mu\text{l}$ enzim tartalmú kivonatot pipettáztam a mikrocella reakcióterébe, és az elektrodokat a potenciosztárhoz kapcsoltam, $-0,2$ V potenciál alkalmazása mellett figyeltem az

amperometriás áramot. Állandó áramerősség érték megjelenése után mikrofecskendővel a vékonyréteg cellába juttattam $10 \mu\text{l}$ $0,01 \text{ mol/dm}^3$ koncentrációjú dopaminoldatot. Folyamatosan regisztráltam az áramerősséget. Minden egyes mérés előtt alaposan kimostam a mikrocellát desztillált vízzel, átöblítettem foszfát pufferrel és új szűrőpapír korongot vittem a felületre.

A dopamin oldat hozzáadása után, ahogy a reakció következtében a dopamin-kinon az elektród felületén megjelent és mind nagyobb koncentrációt ért el, mind nagyobb redukciós amperometriás áramot kaptam. Az áramerősség-változás sebessége jelzi az enzim katalizálta reakció sebességét. Az amperometriás mérés során kapott jel meredekségével lehet jellemezni az előkészített, adott helyről származó minta szövet fajlagos enzimaktivitását. Az alábbiakban három alkalommal, három különböző banánból nyert kivonattal, legalább ötször elvégzett mérések alapján kiválasztott, reprezentatív mérési ábrákat és számított eredményeket mutatok be. A banán mezokarpium belső és külső részéből készített, natív enzim kivonatokkal felvett elektrokémiai mérés eredménye a 12. ábrán látható.

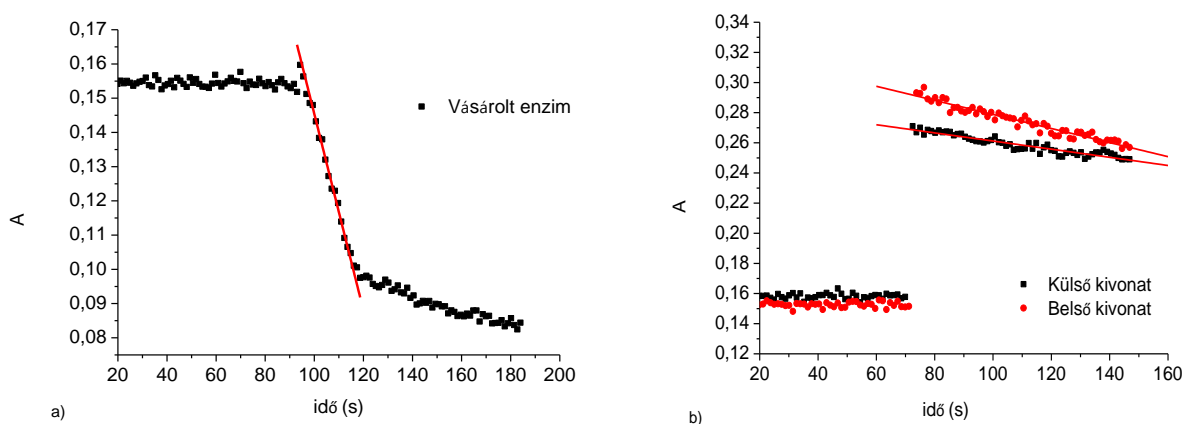


12. ábra: Különböző szövetminták enzimaktivitásának összehasonlító vizsgálata során kapott áram – idő regisztrátumok, (—) a mezokarpium külső részéből, ill. a (—) mezokarpium belső részéből készített enzimkivonatok esetében. A nyíl a dopaminoldat ($10 \mu\text{l}$ $0,01 \text{ mol/dm}^3$) hozzáadását jelöli.

A 12. ábrán bemutatott áram-idő görbék alapján, a mezokarpium belső részéből készített kivonat esetében $7,6 \text{ nA/s}$ aktivitást határoztam meg, míg a külső rész esetében $4,3 \text{ nA/s}$ érték adódott.

A banánból készített enzimek kivonatok polifenol-oxidáz aktivitásának meghatározására spektrofotometriás enzimaktivitás mérési módszert is végeztem, mely a Sigma-Aldrich sztenderd módszerén alapul.²⁷⁰ A módszer részletes leírását már a kísérleti részben ismertettem.

A spektrofotometriás mérés során 265 nm hullámhosszúsnál végeztem a másodpercenkénti detektálást a reakcióelegyekben, s a mérési adatokra illesztett egyenes meredekségéből meghatároztam az abszorbancia percenkénti változását. (13. ábra) Az így kiszámított értékekből határoztam meg az enzimaktivitás értékeket.



13. ábra: Spektrofotometriás enzimaktivitás meghatározás során kapott mérési eredmények, a) vásárolt enzim b) a banán mezokarpium (■) külső, ill. (●) belső részéből készített enzimek kivonat esetében.

Mezokarpium külső enzimek kivonat	Mezokarpium belső enzimek kivonat	Gyári enzimek készítmény
7,5 U/mg enzim	13,9 U/mg enzim	2310,8 U/mg enzim

4. táblázat: Spektrofotometriás enzimaktivitás mérések eredményei

A 4. táblázat a 13. ábrán bemutatott, reprezentatív spektrofotometriás enzimaktivitás mérések eredményeit foglalja össze. A gyári enzimek készítmény (gombából származó TYROSINASE EC 1.14.18.1, SIGMA, T-7755, 50000U, 20 mg szárazanyag, 2590 U/ szárazanyag mg névleges aktivitású készítmény) esetében mért 2310,8 U/mg enzim érték 10%-kal tér el a készítmény névleges, 2590 U/mg enzimaktivitás értékétől. A banánból nyert kivonatok specifikus enzimaktivitás értékei (7,5 U/mg és 13,9 U/mg) jelentősen elmaradnak a gyári enzimek készítmény esetében mért értéktől, azonban az eredmény értelmezésénél figyelembe kell venni, hogy a nyers enzimek kivonat szárazanyagtartalmának egyéb összetevői jelentősen növelik a reakcióelegyben lévő,

100 μ l-re vonatkoztatott tömeget. Nyilvánvaló, hogy egy nem koncentrált natív enzimforrás fajlagos aktivitása jelentősen kisebb a dúsított kereskedelmi preparátuménál.

A gyári, referencia készítménnyel is lehet amperometriás mérést végezni. Azért nem vettem figyelembe ennek a kísérletnek a számszerű eredményét, mert a gyári tirozináz készítmény gombából származik, nem banánból vonták ki. Az enzim származásától függően, a különböző polifenol-oxidáz enzimek szubsztrát specificitása és az enzimreakciót jellemző paraméterek (pl. K_M érték) némiképp különböznek. A gyártó által ajánlott enzimaktivitásmérő módszer az általam referenciaként használt spektrofotometriás módszer, mely az enzimaktivitás meghatározásához pirocatechin szubsztrátot használ. Célkitűzéseim során banán szövet felhasználásával, dopamin mérésére terveztem a bioszenzort, az enzimaktivitás méréseim kifejezett célja az volt, hogy a legnagyobb aktivitású szövet részt kiválasszam.

A mérések eredményeként megállapítható, hogy mind az amperetriás, mind a spektrofotometriás meghatározás esetében a banán mezokarpium belső részéből készített enzimkivonat enzimaktivitása nagyobb, közel kétszerese (1,8-1,9x) a banán mezokarpium külső részéből készített kivonat aktivitásához viszonyítva, tehát a szemmel is megfigyelhető gyorsabb enzimatis barnulási folyamatot a mérési eredmények alátámaszták. Éppen ezért, a további kísérletek során, a banán belső részéből nyert szövetet alkalmaztam szenzor készítés céljára.

4.1.3 A bioszenzor reakcióréteg optimális vastagságának meghatározása

A bioszenzorok analitikai teljesítményjellemzőinek javításához az enzimatis reakcióréteg alapvető tanulmányozása szükséges, az elektrokémiai jelátalakítóhoz közel kialakuló koncentráció értékek ismerete pedig kulcsfontosságú. A bioszenzorok működését optimalizálni lehet a biokatalitikus folyamatban résztvevő reaktánsok és termékek koncentráció profiljainak ismeretében. A legcélszerűbb reakcióréteg vastagságának megállapításához PEKM méréseket végeztem egy modell bioszenzor felhasználásával, melynek a felépítését az 5. ábra mutatja. A dialízismembránnal lezárt bioszenzor egy 30 ml, pH=7,33 foszfátpuffert tartalmazó mérőcellába merül, folyamatos keverés alkalmazása mellett. 5 perces várakozási időt követően adott mennyiségű dopamin törzsoldatot juttattam a mérőcellába. A dopamin, a dopamin-kinon és az oxigén olyan kis molekulák, hogy könnyedén át tudnak diffundálni a diffúziós membránon. További 5 perces várakozási időt követően függőleges PEKM pásztázást indítottam, 6,4 μ m/s sebességgel, Z=3000 μ m-es koordinátától a Z=0 μ m-es koordinátáig (Z=0 μ m-nél a mérőhegy

megéri a membránt). A rövid üvegcső közepére pozícionált PEKM mérőhegy függőlegesen mozgathat (a Z koordináta mentén) a reakciórétegben. A mérőhegy membrántól mért távolságát a mérést és a banán pép betöltését megelőzően, puffer oldatban, oxigén negatív visszacsatolás mérés alapján állapítottam meg. Lehetőségem volt a membrán-mérőcsúcs távolság optikai megfigyelésére is. A mérőcsúcsot óvatosan közelítve a membránhoz észrevettem, hogy az amperometriás áram hirtelen megváltozik, ahogy a csúcs a membránhoz ér. Ezáltal egy függőleges $Z=0 \mu\text{m}$ -es viszonyítási pontot volt lehetőségem megállapítani. A helyi, pillanatnyi dopamin és dopamin-kinon koncentrációk mérése a PEKM mikro mérőcsúcs banán pépben történő, függőleges irányú mozgata közben történt megfelelő elektródpotenciál alkalmazása mellett. A mérés során a modell bioszenzor kevertetett mintaoldatba merült. Mivel a visszahúzott hegy a gélszerű reakció rétegen kisebb-nagyobb átmérőjű csatornát hagyhat maga után, ezért egy pontban csak egy közelítő görbét vettem fel. Egy függőleges pásztázás kivitelezése után egy másik X-Y pozíciójú helyen végezhető újabb mérés, melyhez ugyanazon kalibrációnál megállapított, $Z=0 \mu\text{m}$ -es viszonyítási pont használható. Az áram folyamatosan rögzítésre kerül a függőleges Z koordináta függvényében a kísérletileg megállapított elektródpotenciálok alkalmazása mellett. A munkaelektrod kellően kicsi ahhoz, hogy az áram értékek a viszonylag nagy pásztázási sebesség mellett is állandósult értéket vehessenek fel.

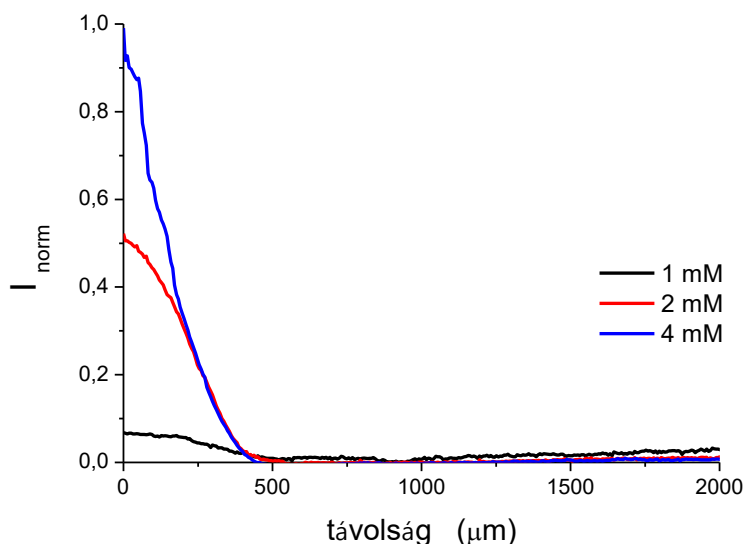
A mikroszkóp mérőcsúcsán a megfelelő elektródpotenciálokat alkalmazva, a dopamin és a dopamin-kinon amperometriásan mérhető. A mikroszkóp mérőhegyét a banán réteg belsejében, a felső réteg felől a membrán felé mozgatva, az állandósult koncentrációviszonyok kialakulása után a PEKM mérőhegyen mérhető határáram értékét az alábbi egyenlet (8) írja le:

$$I_{l,\infty} = 4nFDc^*a \quad (8)$$

Ahol I- áram (A), n- az elektródreakcióban résztvevő elektronok száma, F- a Faraday állandó 96485 (C/mól), D- az elektroaktív anyag diffúziós együtthatója az adott közegben (cm^2/s), c^* - az elektroaktív komponens koncentrációja ($\text{mól}/\text{dm}^3$) és a- a mikroelektrod mérőfelületének sugara (m).

Az alábbi ábrák az áram-távolság „közelítő” görbéket tartalmazzák, melyeket az enzim rétegben a dopamin oxidációjához szükséges 0,5 V vs. Hg/Hg₂Cl₂ potenciálon (14. ábra), ill. a dopamin-kinon redukációjához szükséges -0,2 V vs. Hg/Hg₂Cl₂ potenciálon (15. ábra) készítettem, három különböző dopamin koncentráció (1, 2 és $4 \cdot 10^{-3} \text{mól}/\text{dm}^3$) mellett.

Az anódos áramváltozás a mérőhegyen, 0,5 Volton mérhető dopamin pillanatnyi, térbeli eloszlását mutatja a reakciórétegben. Amint az látható, az áram érték a 8. egyenletnek megfelelően egy állandósult értéket mutat, azonban a reakciórétegben a membránhoz közelítve, a dopamin oxidálódik, s az áram érték a távolság csökkenésével növekszik. Az áram növekedése a membrántól kb. 400 μm -es távolságban kezdődik és a membránig folyamatos, gyors növekedési tendenciát mutat. Mindebből azt a következtetést lehet levonni, hogy a natív banán pép rétegbe kerülő dopamin teljes mértékben oxidálódik egy 400 μm -es diffúziós szakasz alatt.

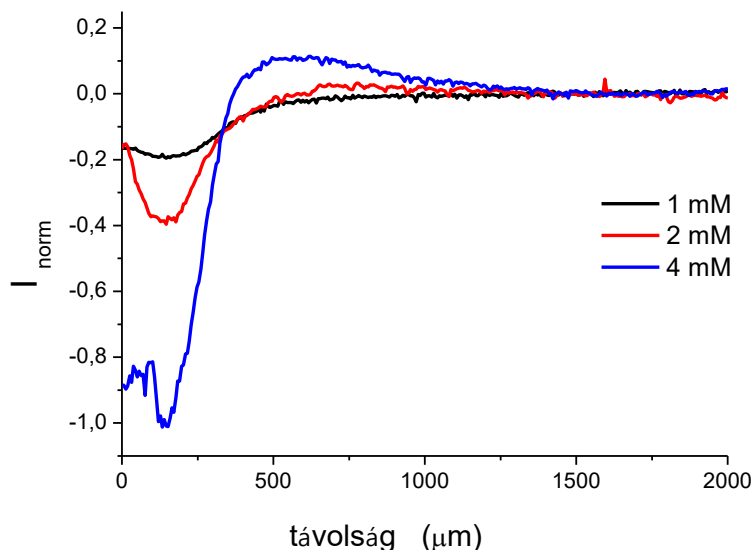


14. ábra: Az enzim rétegben, 0,5 V vs. $\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ potenciálon, a dopamin oxidációja során mért, normalizált áram-távolság "közelítő" görbék, különböző dopamin koncentrációk ($1, 2, 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$) mellett. Az anódos áram értékeket a legnagyobb koncentráció esetében mérhető, maximum áram értékre normalizáltam: $I_{\text{norm}} = I/I_{\text{max}, 4 \text{ mM}}$.

A katódos áram változások a rétegben található, az enzimreakció termékeként képződő dopamin-kinon térbeli eloszlását mutatják. A katódos áram –amint az a 15. ábrán látható-, a minta/banán szövet határrétegtől kb. 400 μm távolságban kezdődik, és helyi maximum (koncentráció maximum) figyelhető meg, kb. 130-160 μm -es távolságban. Az eredmények megerősítik, hogy az enzim reakció termékének koncentrációjában helyi maximum alakul ki. Ennek a magyarázata könnyen érthető, hiszen az oxidáció terméke a mintatérbe is távozni tud diffúzió útján. Ezért a membrán/reakcióréteg határfázisban kis koncentráció kialakulása várható. Más részről a rétegbe kerülő dopamin teljes mennyisége oxidálódik a membránhoz közel és ezért

csökken a kinon koncentráció a nagyobb távolságoknál. Megjegyzendő azonban, hogy ezen modell esetében, nagyon hosszú időknél és igen nagy mérőcella térfogatnál a maximum eltűnik.

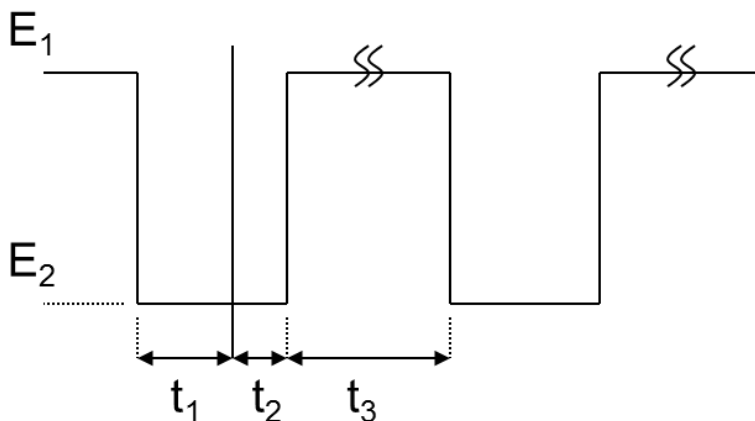
A PEK mikroszkópiás mérések alapján levonható az a következtetés, hogy a banánotród készítésénél alkalmazandó, optimális reakcióréteg vastagság 130 és 160 μm között van.



15. ábra: Az enzim rétegben, $-0,2\text{ V vs. Hg/Hg}_2\text{Cl}_2$ potenciálon, a dopamin-kinon redukciója során mért, normalizált áram-távolság "közelítő" görbék, különböző dopamin koncentrációk ($1, 2, 4 \cdot 10^{-3}\text{ mol/dm}^3$) mellett. A katódos áram értékeket a legnagyobb koncentráció esetében mérhető, maximum áram értékre normalizáltam: $I_{norm}=I/I_{max,4\text{ mM}}$.

4.1.4 A periódikusan megszakított amperometriás detektálás alkalmazása

Hagyományos amperometriás detektálás esetében a mérési potenciált folyamatosan alkalmazva a GC munkaelektrodon, az elektródfelület mintegy nyelőként viselkedik az elektroaktív anyagra nézve. Ezzel szemben a periódikusan megszakított amperometriás mérések esetében két, váltakozó potenciálértékből álló potenciálprogramot alkalmazunk a GC munkaelektrodon. Az alkalmazott potenciál programot a 16. ábra mutatja.

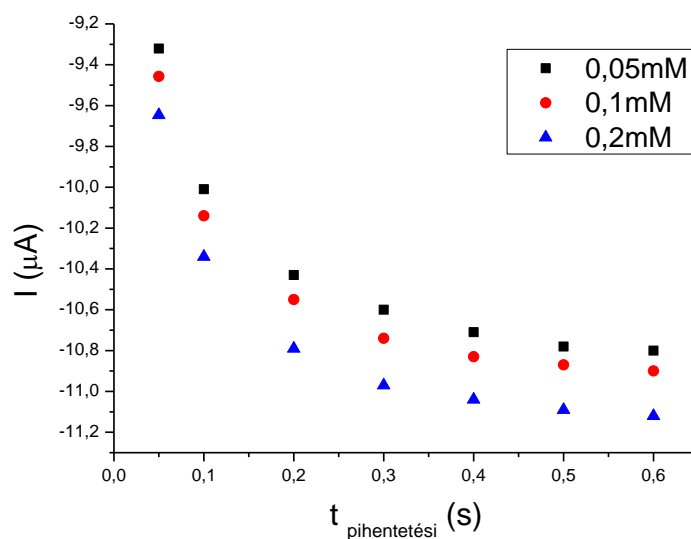


16. ábra: PMA mérések során alkalmazott potenciálprogram. t_1 - a kondenzátor áram lecsengési folyamata miatt alkalmazott várakozási periódus, t_2 - az amperometriás áram mérés ideje, t_3 - a réteg újratöltéséhez szükséges elektrolízis megszakításának időszaka, $E_1 = -0,02$ V feltöltődéshez szükséges elektródpotenciál, $E_2 = -0,2$ V vs. Hg/Hg₂Cl₂ mérőpotenciál.

A hosszú várakozási periódusokat (E_1 , t_3) rövid mérési periódusok (E_2 , t_2) követnek. A pihentetési periódusok alatt az alapelektóddal érintkező rétegben az elektroaktív anyagok koncentrációja nő, a diffúziós réteg újra tud töltődni, ezáltal a mérési periódus alatt az áram lényegesen nagyobb lesz. A mérési potenciál periódus első részében (E_2, t_1), lecseng a kapacitív áram és ezt követően kezdődik az áram mérési periódus (E_2, t_2). A kondenzátoráram lecsengésének ideje alatt az áram exponenciálisan csökken az idő függvényében, míg a Faraday-áram a Cottrell-egyenletben leírtak szerint, $t^{1/2}$ függvény szerint változik az idővel. A kondenzátoráram nem arányos a koncentrációval, ezért célszerű megvárni, míg értéke elhanyagolhatóvá válik. Amint a Faraday-áram válik dominánssá, a leghamarabb és a legrövidebb időtartamig mért áramok eredményezik a legkedvezőbb analitikai teljesítményjellemzőket. t_1 és t_2 időtartamok megismerésére végzett kísérletek alapján látszott, hogy 15 ms-nál jelentősen rövidebb t_1 időtartam alatt a mérések nem eredményeztek koncentrációtól függő választ és zajosabbá váltak, míg 15 ms-nál hosszabb t_1 idő mellett az érzékenység csökkent. A t_2 intervallum esetében az elektrokémiai mérőállomáson beállítható legrövidebb időtartam 5 ms volt, mely elméletileg a legnagyobb érzékenységet eredményezné, azonban ennél a beállításnál gyakran kiértékelhetetlenül zajos mérést kaptam (a műszer kézikönyvében olvasható, hogy a rövidebb időtartam kevesebb mérési pontból kialakuló jelet, ezáltal várhatóan nagyobb zajt eredményez). A következő beállítható érték

10 ms volt, mely már stabilan és reprodukálhatóan értékelhető eredményt adott és minden, ennél hosszabb t_2 beállított értékhez képest nagyobb érzékenységet eredményezett.

A 9. ábrán látható dinamikus voltammogramok alapján választottam ki a PMA méréseknél alkalmazott, pihentetési E_1 és a mérési E_2 potenciál értékeket. Ahogy azt a korábbiakban már megjegyeztem, $-0,02$ V vs. Hg/Hg₂Cl₂ potenciál alkalmazása tűnt megfelelőnek a pihentetési periódus során (E_1), a mérési potenciált pedig $-0,2$ V vs. Hg/Hg₂Cl₂ értéknek választottam (E_2). A t_3 -mal jelzett pihentetési periódus optimális hossza azonban kérdéses volt, s ennek meghatározására kísérletsorozatot végeztem, különböző várakozási idők alkalmazása mellett. A mérések során a banánotród áram válaszait rögzítettem, mialatt 10 ml kevert puffer oldatba (pH=7,33) 5, 10 és 20 μ l 0,1 mól/dm³-es dopamin törzsoldatot pipettáztam. A fent leírt elektródpotenciál értékek, $t_1=15$ ms és $t_2=10$ ms idők alkalmazása mellett, a pihentetési t_3 időt változtattam. A 17. ábra az észlelt áram változás értékeket a pihentetési idők függvényében ábrázolja.

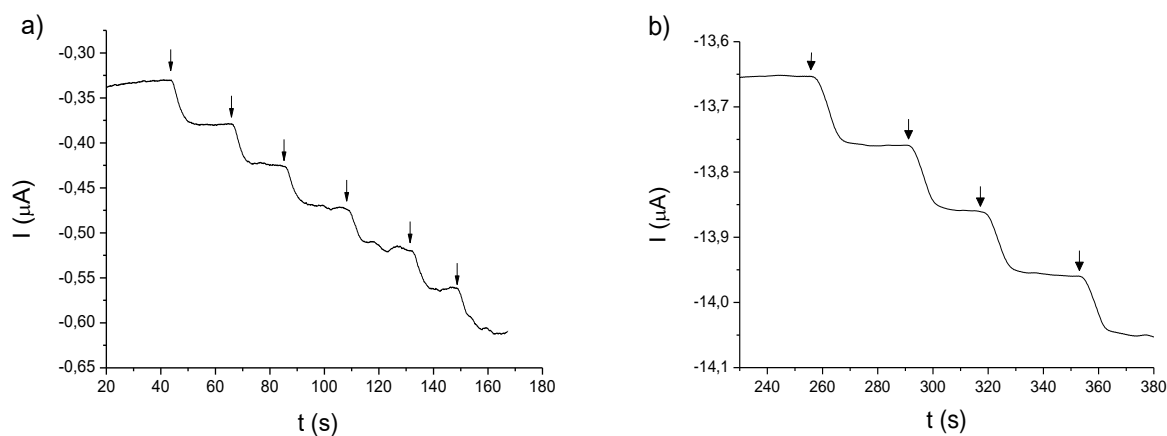


17. ábra: Redukciós áramok a pihentetési (feltöltődési) idő (t_3) függvényében, különböző dopamin koncentrációk mellett. Kísérleti körülmények: $E_1=-0,02$ V, $E_2=-0,2$ V vs. Hg/Hg₂Cl₂, $t_1=15$ ms és $t_2=10$ ms.

A 17. ábra alapján megállapítható, hogy a pihentetési idő növelésével nő a redukciós áram, azonban 0,5 másodpercnél hosszabb időknél további érzékenység növekedés már nem következik be. Ezért a 0,5 s értéket fogadtam el a pihentetési idő optimális hosszaként.

4.1.5 A hagyományos amperometriás és a PMA üzemmódban működtetett banánótród összehasonlítása

Az optimális reakciórétegvastagság figyelembevételével készített banánótróddal, az optimalizált elektródpotenciál alkalmazása mellett hagyományos és PM amperometriás méréseket végeztem. A natív szövet felhasználásával készített enzimszenzort, a referencia- és az ellenelektrodokat egy 50 ml foszfátpuffert (pH=7,33) tartalmazó, mérőcellaként alkalmazott, 100 ml-es főzőpohárba merítettem. Intenzív keverés mellett az áram értékeket az idő függvényében regisztráltam. Az állandósult érték kialakulása után, ismétlődően, 25 μl 0,1 mól/dm^3 -es dopamin dózist adtam a mérőcellába. Egy-egy hozzáadást követően, a redukációs áram érték növekedni kezdett és elért egy állandósult értéket. Ekkor végeztem az újabb dopamin hozzáadást. A 18. a) ábra egy hagyományos amperometriás mérés során készült felvételt mutat. A megállapított működési paraméterek alkalmazásával végzett PMA detektálás mellett, 0,1 mól/dm^3 -es dopamin törzsoldatok hozzáadása során észlelt áramváltozás regisztrátuma a 18. b) ábrán látható.



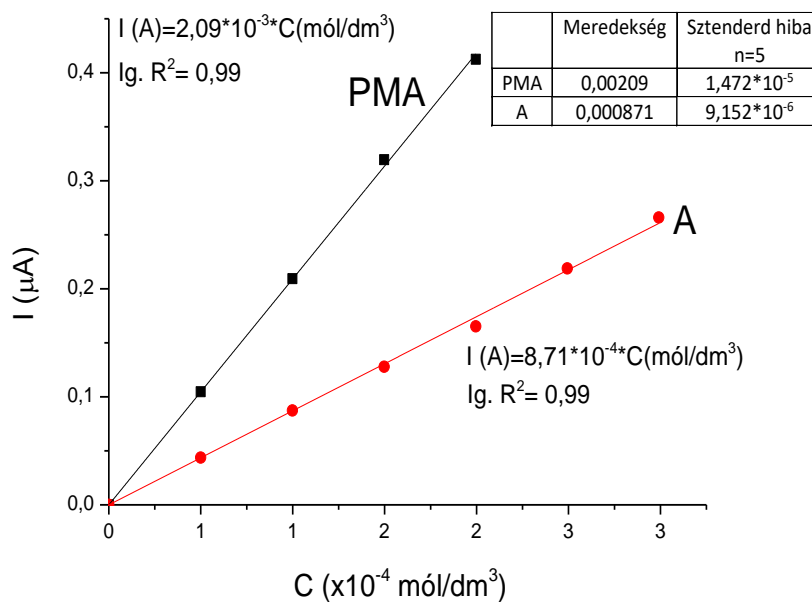
18. ábra: a) Hagományos amperometriás (A) áram-idő görbe -0,2 V vs. Hg/Hg₂Cl₂ potenciál, b) periódikusan megszakított amperometriás (PMA) áram-idő görbe – a korábban meghatározott paramétereknek megfelelő mérőprogram alkalmazásával működő banánótród esetében, 25 μl 0,1 mól/dm^3 -es dopamin dózis, 50 ml pufferbe adagolása mellett.

Az egyes injektálás hatására bekövetkező áramváltozásokat az 5. táblázat tartalmazza.

Injektálás sorszáma	Hagyományos amperometria, Áram (A)	PMA, Áram (A)
1.	$4,7 \cdot 10^{-8}$	$1,07 \cdot 10^{-7}$
2.	$4,8 \cdot 10^{-8}$	$1,01 \cdot 10^{-7}$
3.	$4,6 \cdot 10^{-8}$	$1 \cdot 10^{-7}$
4.	$4,5 \cdot 10^{-8}$	$0,94 \cdot 10^{-7}$
5.	$4,7 \cdot 10^{-8}$	
6.	$4,7 \cdot 10^{-8}$	
Átlag, szórás	$4,67 \cdot 10^{-8} \pm 1,033 \cdot 10^{-9}$	$1,01 \cdot 10^{-7} \pm 5,323 \cdot 10^{-9}$

5. táblázat: Az áramváltozások értéke $25 \mu\text{l}$ $0,1 \text{ mól/dm}^3$ -es dopamin oldat, 50 ml pufferbe adagolásának hatására, amperometriás és PM amperetriás detektálás esetén, a 18. ábra alapján.

Azonos bioszenzorral készített, páronként közvetlenül egymás után felvett, öt hagyományos (A) és öt PM amperometriás (PMA) mérés átlagához tartozó kalibrációs görbéket mutat be a 19. ábra.



19. ábra: Banánotród kalibrációs görbék PMA és hagyományos amperetriás (A) detektálás alkalmazása mellett, minden egyes mérési pont 5 mérés átlagából származik.

Amint a 19. ábra alapján egyértelműen látható, az enzimatis reakció terméke elektrokémiaiilag redukálódik és a keletkező áram egyenes arányban van a dopamin koncentrációval. A hagyományos amperometriás detektálás esetében $3 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³, míg PMA detektálás esetében $2 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³ értékig lineárisak a kalibrációs görbék. Az alsó kimutatási határ értékét (limit of detection- LOD) úgy kaptam meg, hogy a pufferben mért áram 3-szoros σ értékeit vettem, s ebből az extrapolált kalibrációs görbék alapján kiszámítottam. Hagyományos amperometriás detektálás esetében a LOD értéke $1,05 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³ dopamin. A bioszenzor lényegesen megnövelt érzékenységgel működtethető az optimális elektródpotenciál és reakcióréteg vastagság, valamint a PMA mérés technika alkalmazása mellett. A LOD értéke PMA meghatározás mellett $2 \cdot 10^{-6}$ mol/dm³.

Caruso²⁷² gumós jamszgyökérből nyert (*Dioscorea bulbifera*) polifenol-oxidáz nyers kivonattal módosított, dopamin meghatározásra alkalmas bioszenzor alkalmazását írja le. Ennél a bioszenzornál az alsó kimutatási határ értéke $7,5 \cdot 10^{-4}$ mol/dm³ dopamin, foszfát pufferben, pH=7,0 és $E_{csúcs,k}=+0,15$ V vs. Ag/AgCl mellett. Az irodalomban ennél alacsonyabb LOD értékekről is olvashatunk, burgonya szövet felhasználásával készített bioszenzor esetében $2,5 \cdot 10^{-6}$ mol/dm³ dopamin értéket közölnek Forzani és munkatársai,²⁷³ míg egy alma por felhasználásával készített enzim szenzor esetében $4 \cdot 10^{-6}$ mol/dm³ a feltüntetett LOD érték.¹⁵¹ Hasonló, vagy nagyobb kimutatási határokról közölt adatok olvashatók nanoméretű kobalt-ftalocianin részecskékkel módosított szénpaszta elektród esetében, miszerint az LOD érték $1 \cdot 10^{-6}$ mol/dm³ dopamin,²⁷⁴ míg polipirrol/ferrocianid réteggel történő módosítás esetében ez az érték $3,86 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³ dopamin.²⁷⁵

A tárolási és munkastabilitást vegyesen jellemző adatokat mutat be a 6. táblázat. A munka során öt különböző bioszenzorral, egymást követő napokon végeztem méréseket. A cellákban látható adatok sorra: napi átlagos érzékenység az első nap értékéhez képest (%); injektálások száma az adott napon; mérési időtartam az adott napon (s).

Nap	1. elektród	2. elektród	3. elektród	4. elektród	5. elektród
	Átlagos érzékenység az első naphoz képest (%); injektálások száma az adott napon; mérési időtartam (s)				
1.	100%; 102 db; 4,51*3600 s	100%; 6 db; 0,31*3600 s	100%; 120 db; 6,42*3600 s	100%; 12 db; 1,79*3600 s	100%; 54 db; 2,84*3600 s
2.	57%; 12 db; 0,91*3600 s	75%; 78 db; 5*3600 s	88%; 24 db; 1,78*3600 s	73%; 42 db; 4,44*3600 s	--
3.	57%; 12 db; 0,58*3600 s	18%; 12 db; 2,29*3600 s	69%; 12 db; 0,48*3600 s	--	--
4.	32%; 24 db; 2,27*3600 s	--	--	8%; 12 db; 0,91*3600 s	106%; 12 db; 1,43*3600 s
5.	--	--	--	--	16%; 6 db; 1,11*3600 s

6. táblázat: Öt bioszenzor mérési és tárolási stabilitását jellemző adatok az egymást követő napokon elvégzett mérések alapján. A cellákban látható adatok sorra: napi átlagos érzékenység az első nap értékéhez képest (%); injektálások száma az adott napon; napi mérési időtartam (s).

A mérések időszakában többnyire 29-34 °C hőmérséklet volt a laboratóriumban, a bioszenzorokat a mérések között ezen a hőmérsékleten, a napi munka befejezését követően puffer oldatban, 4 °C-on, hűtőszekrényben tároltam. A 6. táblázat adatai alapján megállapítható, hogy a bioszenzorok ezen körülmények mellett az elkészítést követő 1. nap után még 1-2 napig csökkenő érzékenység mellett használhatóak, amennyiben ez még kielégítő lehet az adott minta elemzéséhez. Az ötödik elektród esetében az első nap után, két nap tárolást követően végeztem újra méréseket, meglepően jó érzékenységgel. Ez a tárolási stabilitás szempontjából figyelemreméltó adat.

A tárolási stabilitás és javíthatóságának szempontjából lényeges információt jelentenek azok az előkísérleti tapasztalatok, melyeknél ún. aktív szénpasztával készítettem (szénpasztába kevert 1-3% banán szövet) a banánotródokat. Ezekben az esetekben az aktív szénpasztát min. 2 hétig alkalmazni lehetett szenzorkészítés céljára.

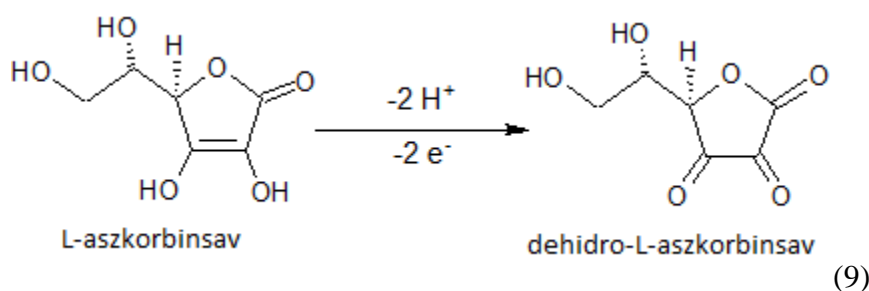
A doktori munkám során alkalmazott bioszenzor kialakítás esetében (GC alapelektrod banán réteggel módosítva) az elkészítés napján megkezdtem a munkát, a tárolhatóság javítási lehetőségeinek tanulmányozása nem volt céлом. A bioszenzorral végzett mérések reprodukálhatósága az optimális reakcióréteg működésétől és épségétől függ, melyet szükség esetén, gyorsan, költséghatékonyan és jól reprodukálhatóan lehet kivitelezni.

A bioszenzor elkészítésének sikeressége több hónapos gyakorlati tapasztalatok elsajátítása után: 10 esetből 10 működő bioszenzor. Ezek meredekségéből számolt reprodukálhatóságot 33%-os szórás adattal lehet jellemezni. Az elkészítés után az első három kalibráció alapján döntöttem az adott elektród alkalmazásáról, illetve újbóli elkészítéséről.

A kalibrálást minden nap minimum egyszer szükséges elvégezni, de célszerű minden alkalommal közvetlenül a mérések előtt és ellenőrzésképpen a mérések végén is megismételni.

4.2 L-aszkorbinsav mérés modell tortuózus közegben

A tortuózus közegekben kivitelezett kísérleti munkám folyamán L-aszkorbinsav elektrokémiai meghatározásának lehetőségeit vizsgáltam. Az LAS megfelelő potenciál alkalmazásával, az alábbi reakció szerint elektrokémiaailag könnyedén oxidálható (9. egyenlet). Az amperometriás mérések során, GC munkaelektrodon alkalmazott 0,6 V vs. Hg/Hg₂Cl₂ munkapotenciál értékét, előzetesen készített ciklikus voltammogram felvételek alapján választottam ki.

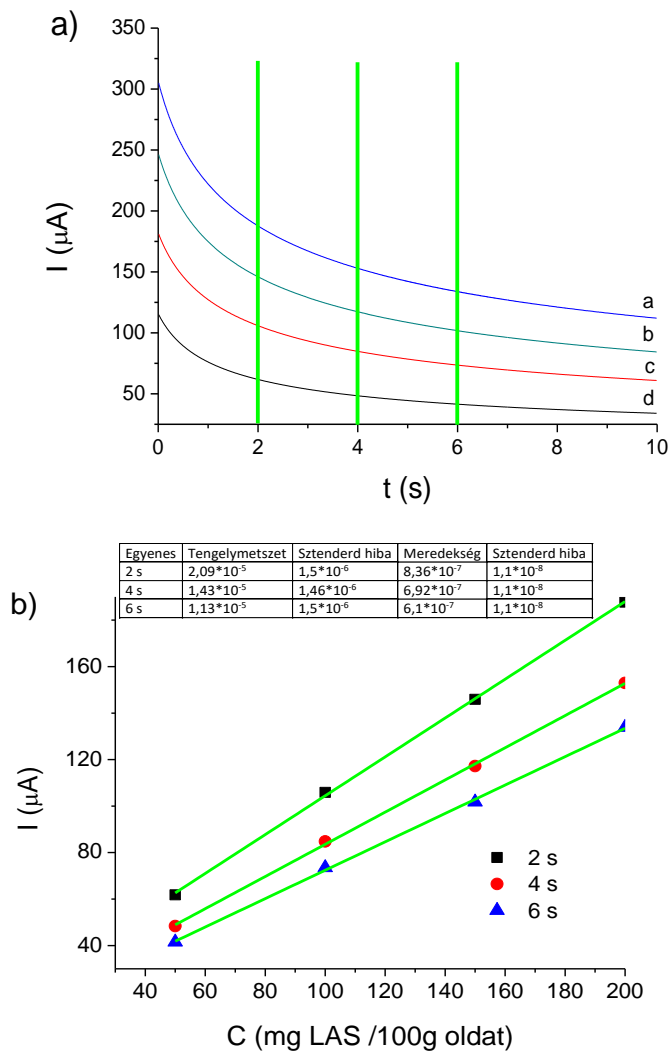


Amennyiben kronoamperetriás technikát kívánunk koncentráció mérés céljára használni, a kiértékeléshez kalibrációs görbe szükséges. Az agyban végzett, monoamin neurotranszmitter anyagok mérésére szolgáló in vivo kutatások kezdeti időszakában a kronoamperetriás áram-idő görbék bizonyos szakaszait integrálták és az így eredményezett töltésmennyiség értéket használták a mintában mérhető koncentráció kiszámításánál.²⁷⁶ A kalibrációt vizes oldatokban végezték, míg a mérések a kísérleti állatok központi idegrendszerének különböző területein történtek. Az áram integrálást közvetlenül a kondenzátor áram lecsengését követően kezdték, és rövid ideig folytatták, hogy az elektródfelület közelében kialakult diffúziós profil, két mérés között, kiegyenlítődhessen.

A kronoamperetriás technika - kémiai analitikai célokra történő - alkalmazásának másik lehetséges módja, hogy a mérési potenciál bekapcsolása után egy meghatározott időpillanatban (Δt_i) mért áram értéket tekintjük analitikai jelként. Ennek megfelelően, nagyszámú, különböző

időpillanatokhoz tartozó kalibrációs görbét készíthetünk. A minta koncentráció kiértékeléséhez az azonos időpontokhoz tartozó kalibrációs adatokat kell használni. Azaz a kalibráló oldatokban mért, adott időpillanathoz (Δt_i) tartozó koncentráció és áram ($I_{c,\Delta t_i}$) értékeket kell használni az adott időpillanathoz tartozó, mintában mért áram értékeket ($I_{s,\Delta t_i}$) alapján történő minta koncentráció meghatározására. Amennyiben a különböző Δt_i időpillanatokhoz tartozó kalibrációs adatokat és ezen megfelelő Δt_i időpillanatokhoz tartozó, mintában mért áram értékeket ($I_{s,\Delta t_i}$) használjuk, akkor mindig azonos minta koncentráció értékeket kell eredményül kapnunk. Ha azonban a minta mátrix és a kalibráló sztenderd oldatok diffúziós viszonyai egymástól eltérőek, akkor a különböző Δt_i időpillanatokhoz tartozó, mintabeli számított koncentráció értékek különbözőek lesznek.

Ennek szemléltetésére a 20. a) ábra, különböző LAS koncentrációknál felvett 0,6 V elektródpotenciál mellett készített kronoamperometriás felvételeket mutat. Az LAS koncentráció értékek ezen az ábrán - a zöltségek és gyümölcsök esetében szokásos koncentráció tartományt magába foglalóan -, rendre 50, 100, 150, és 200 mg/100 g LAS egységben vannak megadva.



20. ábra: a) Vizes LAS oldatban felvett kronoamperometriás görbék (d, c, b, a), rendre 50, 100, 150, 200 mg/100 g oldat koncentráció esetében. Mérési potenciál: 0,6 V vs. Hg/Hg₂Cl₂, háttérelektrolit: pH=7,0 PBS puffer. b) Rendre, 2, 4, és 6 másodperchez tartozó $I_{c,\Delta t_i}$ kronoamperometriás adatokból készített kalibrációs görbék.

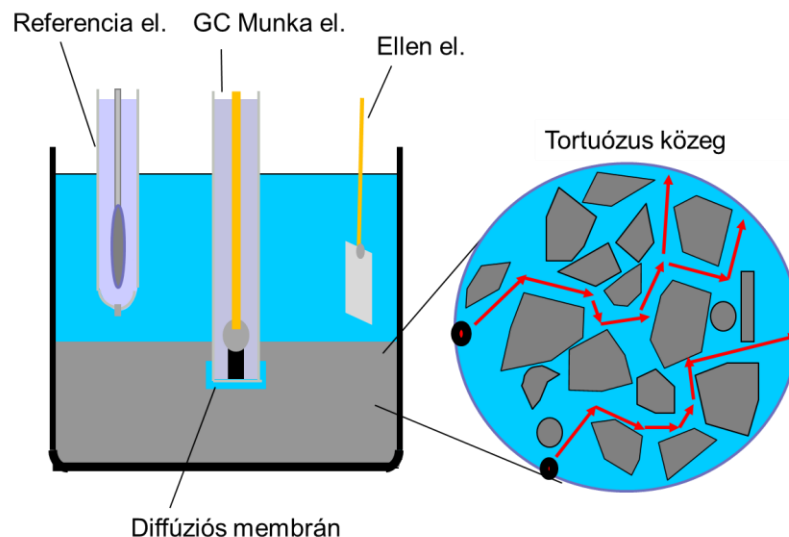
Az ábrán látható regisztrátumokat úgy készítettem, hogy $\Delta t_i=0$ időpillanatban, álló sztenderd oldatba helyeztem, membrán bevonatot nem tartalmazó “csupasz” GC elektródra 0,6 V elektród potenciált kapcsoltam és regisztráltam az időben az áramot. A három függőleges vonal azokat az időpillanatokat jelzi, amelyeknél az $I_{c,\Delta t_i}$ áram értékeket kiválasztva, belőlük a 20. b) ábrán látható kalibrációs görbét készítettem. Amint az jól ismert, a planáris elektródok esetében a kronoamperometriás görbe a Cottrell-egyenlettel (10) írható le

$$I(c, \Delta t_i) = nFAc\left(\frac{D}{\pi}\right)^{\frac{1}{2}}t^{-\frac{1}{2}} = kc \quad (10)$$

Ahol I: áram (A), F: Faraday állandó: 96485 (C/mól), A: elektrokémiaailag aktív felület nagysága (cm²), c: elektroaktív anyag koncentrációja a tömbfázisban (mól/cm³), D: elektroaktív anyag diffúziós együtthatója (cm²/s), t: idő (s), k: konstans.

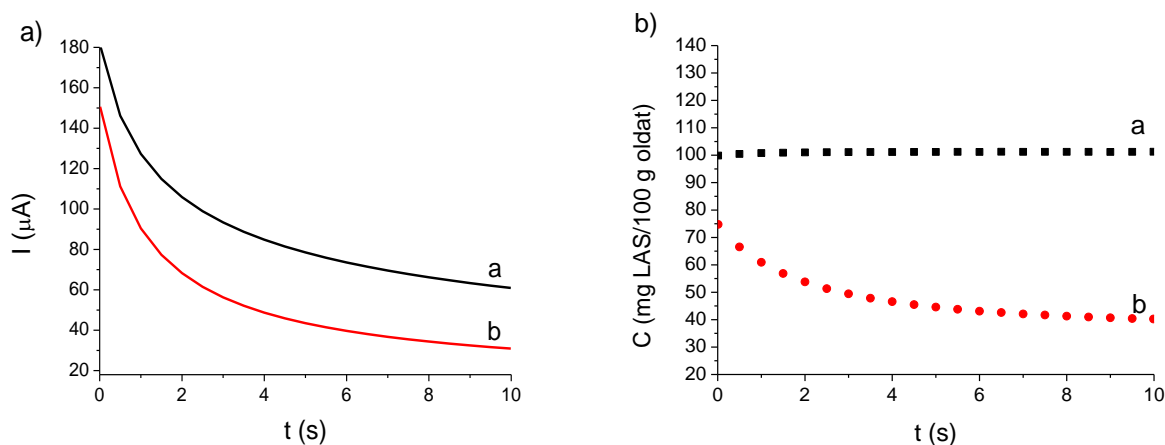
A következőkben azt kívántam megvizsgálni, hogy a kronoamperometriás mérési módszer mennyire alkalmas elektroaktív anyagok koncentrációjának tortuózus közegben történő meghatározására. Ezért bevonat nélküli GC elektróddal kalibrációs görbéket vettem fel vizes oldatokban, különböző LAS koncentrációk mellett. Ezt követően 100 g, pH=7,0 PBS pufferből készített, 100 mg LAS/100 g oldat koncentrációjú oldatot 100 cm³-es főzőpohárba öntöttem, s ehhez kb. 5 g homokot adtam. Ebben a rendszerben Hg/Hg₂Cl₂ referencia- és platina lemez ellenelektrod, valamint GC munkaelektrod alkalmazásával kronoamperometriás méréseket végeztem. Egymást követően, öt 10 s hosszúságú kronoamperometriás felvételt készítettem, köztük öt perces várakozási időket tartva. A kiértékeléskor az első két felvételt figyelmen kívül hagytam és a maradék három átlagolt értékét használtam kalibrációhoz, értékeléshez.

A mérések egy részében a munkaelektrodot az oldatban, a leülepedett homok fölé pozicionáltam, míg a másik részükben leengedtem az üledékbe. Ebben az esetben az elektród mérőfelülete kb. 5 mm-rel a homok-folyadék határfázis szintje alá került. Az elektród leengedése előtt mindig intenzív keverést alkalmaztam, az elektród felületének kopását és a homok összetömörülésének elkerülésére. A mérést a keverés leállítására és az ülepedés után kezdtem. Az alkalmazott mérési elrendezést a 21. ábra mutatja.



21. ábra: Tortuózus közegekben kivitelezett mérés sematikus elrendezése

A 22. ábra az oldatban (a görbe) és a homokban (b görbe) készített felvételek összehasonlítását mutatja be. Amint az előre várható, az üledékben felvett áram görbe az oldatban készített felvétel alatt fut, hiszen az üledékben kialakuló diffúziós fluxus kisebb az oldatbelinél.



22. ábra: a) LAS oldatban (a görbe) és üledékben (b görbe), csupasz GC elektróddal felvett kronoamperometriás görbék összehasonlítása. LAS koncentráció: 100 mg/100 g oldat, mérési potenciál: 0,6 V vs. Hg/Hg₂Cl₂. B) Megfelelő koncentráció értékek, melyeket a vizes kalibráció során felhasználásával számítottam.

A 22. a) ábrán látható áram görbéket a vizes sztenderd oldatokkal felvett kalibrációs összefüggés alapján értékeltem ki, s az így számított koncentráció értékeket a megfelelő Δt_i időpillanatok függvényében ábrázoltam, amint azt a 22. b) ábra mutatja. Látható, hogy az oldat fázisban kivitelezett kalibráció adatai alapján számított koncentráció értékek bármely $I_{S,\Delta t_i}$ értéknél

megfelelő eredményt jelentenek, azonban az üledékben mért $I_{S,\Delta t_i}$ értékeknél a számított koncentráció értékek nem megfelelőek.

Csupasz elektróddal, az oldatfázisban végzett mérések eredményei az alkalmazott kalibráció és kiértékelés után azt a koncentráció értéket adták, amiről tudom, hogy valós, mert az oldatkészítés során én magam ilyen koncentráció értéket állítottam be. Tehát ezzel a modell oldatban kivitelezett kísérlettel bebizonyítottam, hogy a mérési és kiértékelési módszer alkalmazható erre a célra.

Csupasz elektróddal, üledékben végzett mérések eredményei az alkalmazott kalibráció és kiértékelés után azt a koncentráció értéket adták, amiről tudom, hogy nem valós, mert az oldatkészítés során én magam töményebb oldatot készítettem, mint amit itt ezzel a módszerrel megmértem és a kiértékelés során eredményként kaptam. Tehát ezzel a modell oldatban kivitelezett kísérlettel bebizonyítottam, hogy a csupasz elektróddal kivitelezett, üledékbeli mérési és kiértékelési módszer nem alkalmazható erre a célra.

Ezen mérések alapján egyértelműen látszik, hogy a diffúziós anyagtranszporton alapuló egyéb voltammetriás mérések is hasonló bizonytalansággal rendelkeznek, s előfordulhat, hogy a tortuózus közegekben lévő elektroaktív anyagok koncentráció meghatározásai hibásak. Amint az analitikai kémia alapjaiként ismeretes, a kalibrációt a mintához hasonló tulajdonságokkal jellemezhető sztenderdek segítségével kell végezni. Azonban olyan minták esetében, ahol a diffúziós tulajdonságok térbeli és időbeli változékonysága áll fenn, nem könnyű megfelelő kalibráló sztenderd oldatokat készíteni.

4.2.1 Diffúziós réteggel módosított elektród és rövid idejű kronoamperometriás detektálás

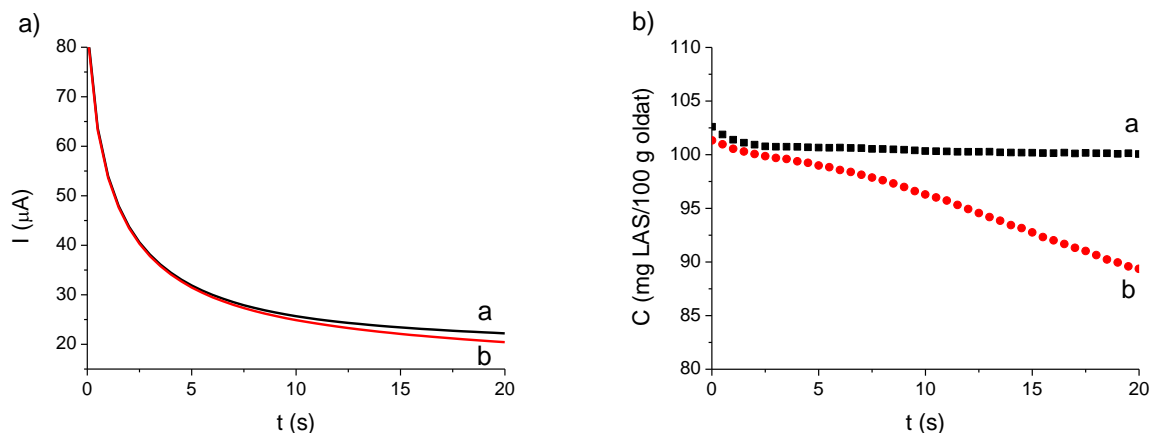
Elképzelésünk szerint egy vékony, elektródfelületet borító, beépített diffúziós réteg alkalmazása megoldást jelenthet. Ilyen módosított munkaelektrod használatával, megfelelő koncentráció értékek nyerhetők, s ehhez csupán egy kellően rövid mérési idő szükséges. Ilyen rövid mérési időket alkalmaznak a kronoamperometriás mérések során.

A magyarázathoz a Cottrell-kísérlet azon ábrájára szükséges emlékezni, amelyen a mérőpotenciál bekapcsolását követően a különböző Δt_i időpillanatokhoz tartozó, sík elektródfelület közelében kialakuló áram-távolság görbéket láthatjuk. $\Delta t_i=0$ időpillanatban a koncentráció az elektródfelületen és a tömbfázisban megegyezik. Amint kellően nagy reakció sebességet eredményező elektródpotenciált kapcsolunk a munkaelektrodra, a felületi koncentráció nullára csökken, miközben kis távolságokban, a koncentráció még nem változik. Az idő előrehaladtával,

koncentráció gradiens alakul ki a nyugvó közegben, s az elektródfelület és a tömbfázisbeli koncentrációval jellemezhető rész között a távolság folyamatosan növekszik. Amennyiben az elektródfelületen beépített diffúziós réteget alkalmazunk, ki tudunk választani egy olyan rövid mérési időszakot, amelynek során az elektroaktív anyag diffúziós profilja még a diffúziós membránban helyezkedik el, természetesen a kondenzátor áram lecsengését követően.

Amennyiben a mintában, illetve a sztenderd oldatokban lévő mérendő anyag koncentrációja minden kronoamperometriás felvétel előtt kiegyenlítődik a diffúziós rétegben, akkor a vizes oldatokban felvett kalibrációs összefüggés felhasználásával kiértékelt tortuózus minták koncentráció értékei megbízható eredményre kell, hogy vezessenek.

Ennek az elképzelésnek az alkalmazatóságát úgy teszteltem, hogy a GC elektród mérőfelületét dialízismembránnal borítottam és 10-20 s hosszúságú kronoamperometriás felvételeket készítettem, 5 perces várakozási idők közbeiktatásával. A korábban említettekhez hasonlóan, öt felvételt készítettem, melyekből az utolsó három átlagait használtam. A 23. ábra a vizes oldatban és az üledékben készített felvételek összevetését mutatja. Amint az látható, rövid mérési időknél a két görbe átlapol egymással, majd a 2 másodperces mérési időszak körül szétválnak és innentől kezdődően, az idő előrehaladtával, fokozatosan távolodnak egymástól.



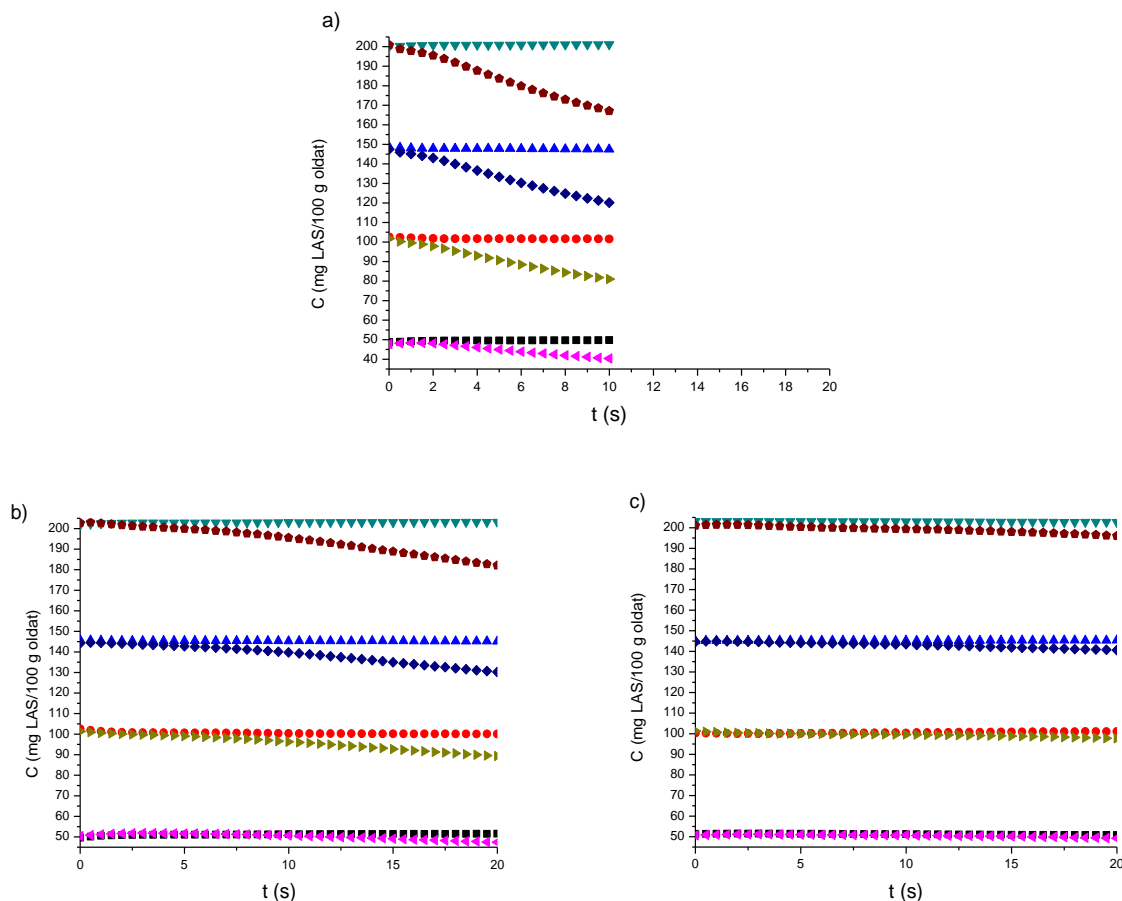
23. ábra: a) LAS oldatban (a görbe) és üledékben (b görbe), membránnal bevont GC elektróddal felvett kronoamperometriás görbék összehasonlítása. LAS koncentráció: 100 mg/100 g oldat, mérési potenciál: 0,6 V vs. Hg/Hg₂Cl₂. B) Megfelelő koncentráció értékek, melyeket a vizes kalibráció felhasználásával számítottam.

A 23. a) ábrán látható áram tranzienseket a vizes fázisban kivitelezett kalibrációs adatok felhasználásával értékeltem ki, s a koncentráció értékeket a Δt_i időpillanatok függvényében ábrázoltam, ezt a 23. b) ábra mutatja. Kis Δt_i értékek esetén, az üledékre vonatkozó (b görbe) és az

oldat fázisra vonatkozó (a görbe), számított koncentráció értékek jól megközelítik egymás. Ez az eredmény a fent ismertetett hipotézist támasztja alá.

4.2.2 A diffúziós réteg vastagságának hatása

Tortuózus közegben végzett voltammetriás mérés tervezése esetén az elektródfelületet borító diffúziós réteg vastagsága kritikus paraméterként merül fel. Nagyon vékony rétegek nagyon rövid mérési időt tesznek lehetővé, azonban igen rövid Δt_i értékek esetén a kondenzátor áram túl nagy értéke jelentkezhet problémaként. Más részről a túl nagy membránvastagság esetén hosszú várakozási idő szükséges minden mérést követően. Kísérleteim során, különböző diffúziós rétegvastagsággal ellátott elektródokat készítettem, különböző számú dialízismembrán réteg alkalmazásával. Különböző LAS koncentrációk mellett, kronoamperometriás felvételeket készítettem ezekkel az elektródokkal, az üledékben és az üledék feletti folyadék fázisban. A koncentráció értékeket a vizes kalibrációs adatok felhasználásával számítottam ki mind a folyadék, mind az üledék fázisra vonatkozóan. A 24. ábra ezeket a koncentráció értékeket a Δt_i idők függvényében ábrázolja. Amint az látható, egy membrán réteggel ellátott elektród esetében az igen rövid: 15- kb. 500 ms tartományba eső Δt_i értékek esetében kapunk megbízható koncentráció értékeket, ennél hosszabb időknél az üledék fázisban jelentősen kisebb értékeket mérünk a valósnál, ill. a folyadék fázisban meghatározotthoz viszonyítva: 24. a) ábra. Ezen eredmények alapján megállapítható, hogy a 15 ms értéknél felvett első Δt_i időpontokhoz tartozó koncentráció értékek már a valós eredményt szolgáltatják és csak a koncentrációval arányos Faraday-áramot tükrözik. Jól látható, hogy a folyadék és üledék fázishoz meghatározott C- Δt_i pontok folyamatosan távolodnak egymástól, amint a diffúziós koncentrációprofil elhagyja a membránt és a tömbfázisba ér, s ez a különbség az LAS koncentráció növekedésével mind nagyobb mértékű.



24. ábra: Koncentráció-idő görbék négy különböző LAS koncentrációra vonatkozóan, oldatban és üledékben, a) egy-, b) két-, és c) három membrán réteggel fedett GC munkaelektrod alkalmazása esetében.

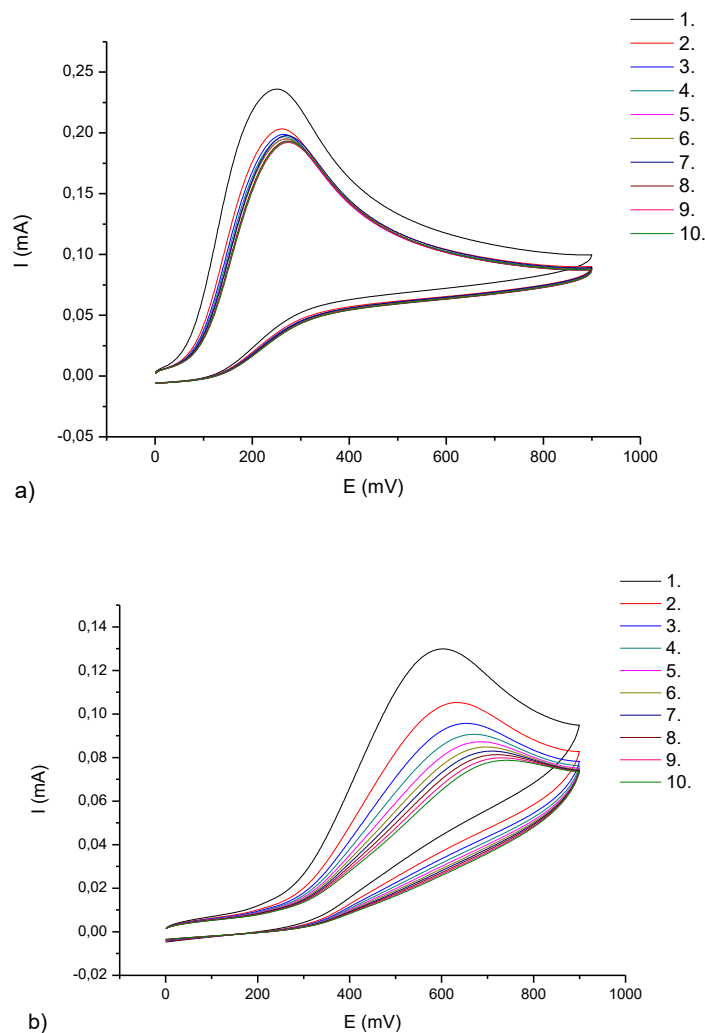
A 24. a), b), c) ábra mérési eredményei az elméleti feltevést jól alátámasztják, az üledékfázisban is valós eredményt szolgáltató Δt_i idők egyre hosszabbodnak a membrán rétegek számával. A 24. b) ábráról leolvasható, hogy a két réteggel ellátott elektród és az alkalmazott mérési módszer kb. 1500-2000 ms időnkig eredményez megfelelő értékeket. A 24. c) ábra alapján megállapítható, hogy a három réteggel ellátott elektród és az alkalmazott mérési módszer kb. 3000-4000 ms időnkig eredményez valós értékeket. Látható, hogy ezek az időtartamok a rétegszám növekedéséhez viszonyítva valamivel nagyobb mértékben hosszabbodnak, ami például azzal magyarázható, hogy a később rögzített rétegek kissé lazábbak lehetnek, köztük vastagabb folyadékréteg szorulhatott. Megállapítható, hogy a kitűzött analitikai feladat megoldására mindössze 15 ms hosszúságú kronoamperometriás mérési idő és egy réteg dialízismembránnal (vagy akár egy még vékonyabb diffúziós réteggel) bevont elektród is elegendő. Általánosságban igaz, hogy a réteg tervezésénél

érdemes minden esetben az adott analitikai alkalmazás meghatározó szempontjait figyelembe venni.

4.3 Közvetlen L-aszkorbinsav meghatározás paprikában

Az L-aszkorbinsav vizes oldatokban történő meghatározása, különböző voltammetriás módszerek alkalmazásával, viszonylag könnyű feladat. Gyümölcsök és zöldségek leve szintén alkalmas háttérektrólitot jelenthet voltammetriás mérések kivitelezéséhez, a viszonylag nagy elektrolit koncentrációnak és a többé-kevésbé puffertelt pH-nak köszönhetően. Ezért feltételezhető, hogy a zöldségek és gyümölcsök LAS tartalmát közvetlenül meg lehet határozni voltammogramok felvételével, a szövetükbe helyezett, vagy facsart levükbe mártott speciális munkaelektrod alkalmazásával.

Célul tűztem ki a sárga paprikában, mintaelőkészítés és elválasztási lépés alkalmazása nélkül, közvetlenül kivitelezhető voltammetriás LAS meghatározási módszer kidolgozását. Első lépésként a paprika levében, GC munkaelektroddal, egymást követően ciklikus voltammogramokat vettem fel 0,1 V/s pásztázási sebesség mellett. A voltammogramok között 60 másodperc várakozási időt tartottam. A voltammogramokon jól látható csúcs jelezte az LAS jelenlétét a paprika lében (25. b) ábra). Ezeket a méréseket 100 mg/100 g koncentrációjú, puffertelt LAS oldatokban is elvégeztem. A foszfát puffer pH-ját 5,9 értékre állítottam be, a paprika lében mérhető értékkel megegyezően (25. a) ábra).

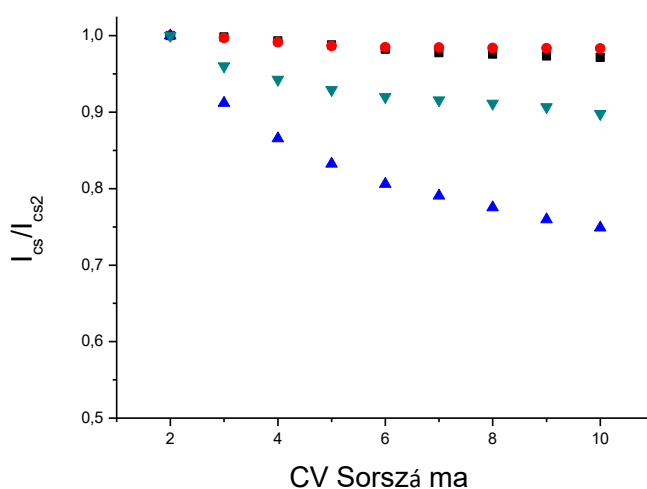


25. ábra: a) 100 mg/100 g koncentrációjú, pufferelt L-aszkorbinsav oldatban, b) szűretlen paprika lében, GC munkaelektóddal felvett ciklikus voltammogramok. A felvételek között 60 s várakozási idő telt el.

Amint az a 25. ábrán megfigyelhető, a pufferelt LAS oldatban kb. 250 mV-nál, míg a paprika lében kb. 600 mV-nál jelentkezik a csúcs. A jelenség egyik, igen valószínűsíthető magyarázható, hogy a mérés előtt tisztított, polírozott elektród az LAS oldatban nem (elhanyagolható mértékben) szennyeződik, míg a rostos paprika lébe mártott csupaszc elektród felületére már az első ciklikus voltammogram felvételét megelőzően egy ohmikus potenciálesést eredményező réteg tapad. Ezt az elképzelést támasztja alá az is, hogy a további CV-k felvétele során, tehát ahogy az elektród egyre több időt van a paprika lében, a csúcspotenciál folyamatosan továbbtolódik a csúcsáram értékek csökkenésével összhangban. Tehát ez az ohmikus potenciálesést okozó réteg, ill. hatás

folyamatosan növekszik a paprika lében töltött idő múlásával. További lehetséges magyarázatként szolgálhat a paprika lében található egyéb biokémiai komponensek interferencia hatása.

A voltammogramokon a csúcsáramok értékét (I_{cs}) vettem figyelembe az összehasonlító értékeléshez. Az első felvételt figyelmen kívül hagytam, a többi esetében a csúcsáramokat (I_{cs}) a második voltammogramnál leolvasott értékhez (I_{cs2}) viszonyítva normalizáltam. Az így kiszámított i_{cs}/i_{cs2} arányokat a sorozatos felvétel sorszámának függvényében ábrázoltam. Ugyanezen méréseket dialízismembránnal bevont elektród alkalmazásával is elvégeztem. Az eredményeket a 26. ábra mutatja be.



26. ábra: Sorozatosan felvett ciklikus voltammogramokhoz tartozó normalizált csúcsáramok, melyeket (■) csupasz, illetve (●) membránnal bevont GC elektróddal készítettem, pufferelt LAS oldatban (100 mg/100 g), továbbá melyeket (▲) csupasz, illetve (▼) membránnal bevont GC elektróddal készítettem paprika lében. Potenciálablak: 0-0,9 V vs. Hg/Hg₂Cl₂, pásztázási sebesség: 0,1 V/s, a CV-okat megelőzően, illetve közöttük alkalmazott pihentetési idő 60 s volt.

Látható, hogy a pufferelt LAS oldatokban felvett, ismételt voltammogramok csúcsáram értékei szinte azonosak mindkét elektród típus alkalmazása esetében. Azonban a vizsgált paprika lében, csupasz elektróddal készített voltammetriás csúcsok folyamatosan csökkennek. Ez az elektród szennyeződését jelzi. A paprikalé néhány összetevője az elektródreakció során folyamatosan csökkenti a GC aktív elektródfelületét. A tizedik, paprika lében mért I_{cs} érték a második érték 75%-ánál is kisebb. Az elektródszennyeződés által okozott érzékenység csökkenés nagy mértékben nehezíti a közvetlen voltammetriás mérés útján történő LAS meghatározást a paprika lében. Jóval kisebb mértékű elektródszennyeződés figyelhető meg abban az esetben,

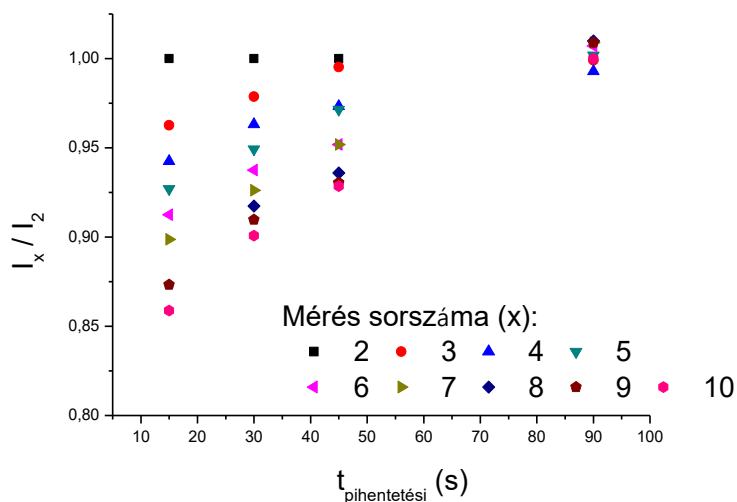
amikor a voltammogramokat membránnal borított elektróddal vettem fel. Valószínűsíthető, hogy a dialízismembrán, mint egy méretkizárásos réteg viselkedik, s ezáltal csökken a veszélyes komponensek elektród felületére irányuló transzportja.

Ciklikus voltammetriás mérések esetén az oxidáló elektródpotenciált (tartományt) viszonylag hosszú ideig alkalmazzuk. A hosszan tartó oxidáló potenciál fennállása pedig nagymértékű szennyeződéshez vezet. Megfelelő potenciálon történő, rövid idejű kronoamperometriás mérések alkalmazásával, a mérési idő drasztikusan rövidíthető. Várható, hogy dialízismembránnal borított elektród és rövid időtartamig alkalmazott kronoamperometriás mérés technika esetén, a paprika lében fellépő elektródszennyeződés zavaró hatása, lényegesen csökkenthető.

Amennyiben a munkaelektrodot a paprika húzában történő, közvetlen LAS meghatározásra szeretnénk használni, a fentiekén kívül figyelembe kell venni a tortuozitás problémáját is. A sztenderd addíciós módszer alkalmazása ez esetben nem kínál megoldási lehetőséget, azonban - a modell mérések során bemutatottaknak megfelelően -, ígéretesnek tűnik egy diffúziós réteggel módosított munkaelektrod, és rövid idejű kronoamperometriás mérés technika alkalmazása.

4.3.1 A módosított elektród feltöltődéséhez szükséges időtartam

A módszer alkalmazásának kidolgozása során első lépésként, a mérések során diffúziós réteggént szolgáló dialízismembrán feltöltődéséhez szükséges pihentetési időtartam hosszát állapítottam meg. A kísérletek során egymást követően, tíz kronoamperometriás felvételt készítettem LAS oldatban, dialízismembránnal bevont GC munkaelektroddal, egyforma várakozási időtartamot alkalmazva a mérések előtt, ill. közöttük. A tízes mérési sorozatokat 15, 30, 45 és 90 másodperc várakozási idők mellett is elkészítettem. A 0,6 V vs. Hg/Hg₂Cl₂ potenciálugrás alkalmazását követően, 0,3 másodpercnél mért, normalizált áram értékeket a pihentetési idő függvényében ábrázoltam (27. ábra). Amint az ábrán látható, 15 s-os várakozási idő esetében a tizedik kronoamperometriás görbéhez tartozó áram értéke csupán 86%-a második felvételhez tartozó értéknek. Jól látható, hogy hosszabb pihentetési idők alkalmazása során a pontok egyre közelebb kerülnek egymáshoz. 90 másodperces várakozási idő esetén az utolsó pont kb. 100%-a a második pont értékének, tehát igen közel vannak egymáshoz. Ezért a további kísérletek során, 90 másodperces várakozási időt alkalmaztam a nyugvó közegben lévő elektroaktív komponens koncentráció-kiegyenlítésének biztosítására.



27. ábra: Különböző várakozási idők mellett, sorozatosan ismételt kronoamperometriás felvételek, 0,3 s-nál vett, normalizált áram értékei. Az ismétlésekhez tartozó áram értékeket, a második kronoamperometriás felvételek értékeire normalizáltam (I_x/I_2). Dialízismembránnal bevont GC munkaelektrodát alkalmaztam, pH=5,9 puffer oldatból készített LAS oldat koncentrációja: 100 mg/100 g. Az áramkör megszakításához tartozó kiegyenlítődési időt 15, 30, 45 és 90 másodpercnek választottam. A szimbólumok a sorozatosan felvett I_{300ms} értékek sorszámát jelzik.

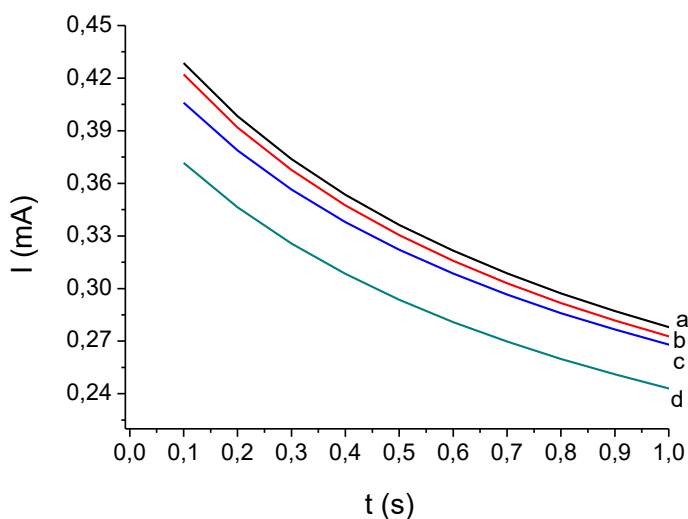
Amint az a kísérleti eredmények alapján valószínűsíthető, diffúziós réteggel módosított munkaelektrod, rövid idejű kronoamperometriás mérések és kellően hosszú pihentetési idő alkalmazásával, a sárga paprika LAS tartalma közvetlenül, mintaelőkészítés és elválasztási lépés nélkül meghatározható. A minta tortuozitása és az elektródszennyeződést okozó mátrixalkotó komponensek zavaró hatása; elfogadható szintre csökkenthető. Azonban a mérés bizonytalanságát egy további minta-függő tulajdonság is befolyásolhatja, s ez a viszkozitás.

4.3.2 A viszkozitás hatása

A kronoamperometriában, a diffúziós anyagtranszport körülményei mellett, az áram az elektroaktív anyag diffúziós együtthatójának függvénye. A diffúziós együttható pedig, – többek között – a dinamikus viszkozitástól függ. A mátrix komponensek a diffúziós rétegbe juthatnak, megváltoztatva a viszkozitást. Ez a hatás megkérdőjelezheti a vizes oldatokban felvett kalibrációs adatok megbízhatóságát.

A viszkozitás változás rövid idejű kronoamperometriás mérésekre gyakorolt, esetleges hatásának vizsgálatára, különböző viszkozitású, 150 mg LAS/100 ml oldat koncentrációjú modell oldatokat készítettem. Ezen oldatok esetében az oldószer készítése során PBS puffert és glicerint

használtam a következő térfogatarányokban (%-ban) keverve: 87,5/12,5; 95/5; 97,5/2,5; 100/0. A különböző viszkozitású oldat keverékekben végzett, LAS oxidációs, kronoamperometriás méréseket a 28. ábra mutatja.



28. ábra: Különböző viszkozitású oldószer keverékekben, LAS oxidáció során készített, kronoamperometriás áram tranziensek. A modell oldatok 150 mg LAS és 100 ml oldat felhasználásával készültek, a modell oldatok vizes PBS puffert és glicerint változó arányban tartalmaztak: d- 87,5/12,5; c- 95/5; b- 97,5/2,5; a- 100/0. (V/V% puffer/V/V% glicerin) Mérés potenciál: 0,6 V vs. Hg/Hg₂Cl₂, Munkaelektrod: csupasz GC.

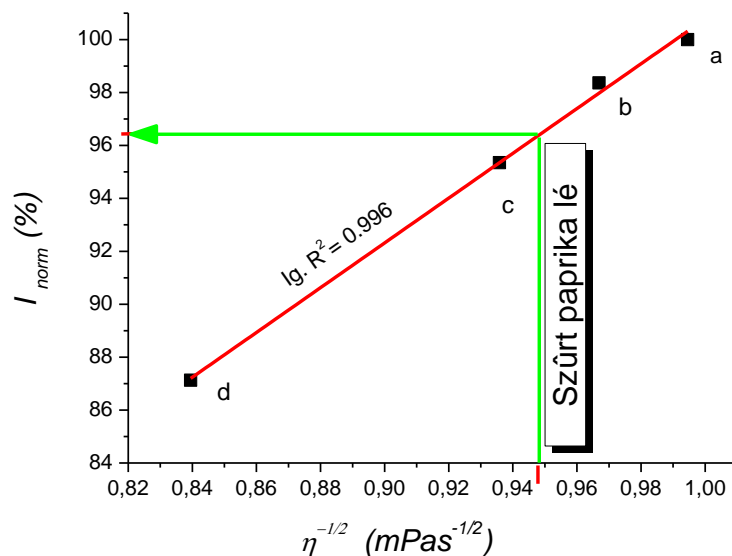
Amint az a 28. ábrán látható, a kronoamperometriás görbék egyre kisebb áram értékeket mutatnak, az oldószer elegyben lévő glicerin arányának emelkedésével összhangban. Amennyiben a megfelelő potenciálugrást követően az elektródreakció sebességmeghatározó lépése a lineáris diffúzió, a kronoamperometriás görbéket a Cottrell-egyenlet (10) írja le és a diffúziós együttható a viszkozitás függvénye – a Stokes-Einstein egyenletnek megfelelően (11):

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta a} \quad (11)$$

, ahol k: Boltzmann állandó: 1,380649•10⁻²³ (J/K); T: abszolút hőmérséklet (K); a: a molekula effektív átmérője (m); η: a közeg viszkozitása (Pas), D: elektroaktív anyag diffúziós együtthatója (cm²/s) -, ezért az áram (I) és a viszkozitás reciproka négyzetgyöke (η^{-1/2}) között lineáris függvénykapcsolat feltételezhető, amennyiben a molekula effektív sugara a vizsgált összetételű oldószer tartományban állandó. Méréseim során kapott, I_{norm} vs. η^{-1/2} függvényt mutat a 29. ábra. Az egyes áram értékeket (I_{norm}) a 28. ábrán bemutatott kronoamperometriás görbék

100% puffer tartalmú LAS oldatban mért áram értékekre vonatkoztattam. A modell oldatok hidrodinamikus viszkozitás értékeit kapilláris viszkoziméterrel és piknométerrel határoztam meg.

Mivel ennek a kísérletnek a célja a vizes LAS oldat és a membrán pórusaiba kerülő paprika folyadék viszkozitás eltérésből eredő áram különbség becslése, ezért a centrifugált és szűrt paprika folyadék dinamikus viszkozitását ugyanolyan módon határoztam meg, mint ahogy azt a glicerinn-puffer modell oldatelegyek esetében tettem. A mért értékek a 29. ábrán láthatók. A centrifugált, szűrt paprika lére meghatározott normált áram (I_{norm}) értéket, az ugyanezen mintára kísérletileg meghatározott η érték alapján számítottam ki.



29. ábra: Kísérletileg meghatározott normált áram (I_{norm}) értékek a mért viszkozitás (η) értékek négyzetgyök reciprokának függvényében ábrázolva. A modell oldatok 150 mg LAS és 100 ml oldat felhasználásával készültek, a modell oldatok vizes PBS puffert és glicerint változó térfogatarányban tartalmaztak: d- 87,5/12,5; c- 95/5; b- 97,5/2,5; a- 100/0. (V/V% puffer/V/V% glicerin). A normált áram (I_{norm}) értékeket a 100% vizes pufferelt áram értékekre vonatkoztattam ($I_{norm} = (I/I_a) \times 100$). A centrifugált, szűrt paprika lére vonatkozó normált áram (I_{norm}) érték számítása az ugyanezen mintára kísérletileg meghatározott viszkozitás (η) érték alapján történt.

Amint az a 29. ábrán látható, a modell oldatok pontjai egy egyenes vonalon fekszenek, melyet $R^2=0,996$ érték jellemez, tehát a két egyenlet alapján történő feltételezés ezen kísérleti körülmények mellett igaznak bizonyult.

A centrifugált, szűrt paprika lé kísérletileg meghatározott $\eta=1, 111$ mPa*s dinamikus viszkozitás értékét a 100%-ig pufferrel készült LAS oldat értékéhez ($\eta=1, 011$ mPa*s) viszonyítva,

az igazolt összefüggés alapján, a paprika lé számított áram értéke a 100%-ban vizes pufferrel készült LAS oldat áram értékének körülbelül 96,36%-a. Tehát, amennyiben az effektív sugara az LAS molekulának állandónak tekinthető, kb. 3,6%-os áram csökkenés várható a viszkozitás különbségből adódóan.

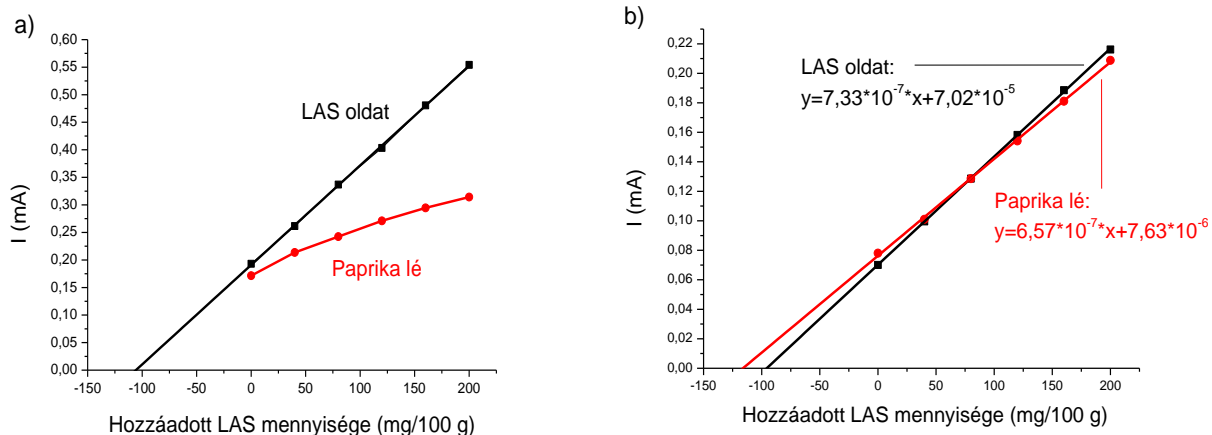
4.3.3 L-aszkorbinsav tartalom mérése rostos paprika lében

A diffúziós réteggel ellátott elektród –és a meghatározott paraméterek: 90 s kiegyenlítődési idő, 0,3 s hosszú mérési periódus- analitikai teljesítményjellemzőinek és a paprika lében történő alkalmazhatóságának vizsgálatára sztenderd addíciós méréseket végeztem szűretlen paprika lében és ezzel párhuzamosan, 100 mg/100 g LAS oldatban.

A kronoamperometriásan követett sztenderd addíciós mérések során, sorozatosan 20-20 µl 1000 mg LAS/5 ml PBS puffer törzsoldatot injektáltam, Hamilton-fecskendő segítségével, 10 ml mintaoldatba. A mérések előtt és között tíz percen át nagy tisztaságú nitrogént buborékolttam a mintaoldat és a sztenderd oldattal addicionált mintaoldatokon át.

Minden egyes addíciós lépés 40 mg/100 g koncentráció növekedést eredményezett (a hígulást elhanyagolva). Egy kronoamperometriás mérést követően az elektródot eltávolítottam az oldatból, egy adagot injektáltam, majd 30 s keverést követően merítettem ismét az oldatba.

A 30. b) ábra mutatja a membránnal módosított elektródok esetében kapott eredményeket, míg a membrán bevonat nélküli, "csupasz"/borítás nélküli GC elektróddal készített (ugyanezen mérési körülmények között felvett) mérési eredményeket a 30. a) ábra mutatja be.



30. ábra: 100 mg LAS/100g PBS oldatban és párhuzamosan, szűretlen paprika lében végzett sztenderd addíciós mérések. a) membrán nélküli, csupasz GC elektróddal, b) dialízismembránnal borított GC elektróddal felvett kronoamperometriás mérések.

Az új elektrokémiai mérési módszerrel kapott eredményeket jodometriás titrálással, mint referencia-módszerrel meghatározott eredményekkel vettem össze. Ebben az esetben 10 ml mintaoldatot (LAS oldat vagy paprika lé megfelelően dúsítva), 75 ml desztillált vizet és 1 ml keményítő indikátort tartalmazó oldatot Erlenmeyer lombikban, jód oldattal titráltam. A sztenderd addíciós mérések eredményeinek összefoglalását az 7. táblázat mutatja be.

	Csupasz GC, kronoamperometriás mérés	Módosított GC, kronoamperometriás mérés	Redox titrálással mért
Linearitás	Folyamatos elhajlás	$I_g \cdot R^2 = 0,999$	$I_g \cdot R^2 = 0,996$
Visszanyerés %	---	89,5±9,3 93,1±9,3 #	93,9±1,6
LAS konc. mg/100g	---	115,9±6,11	115,5±1,16

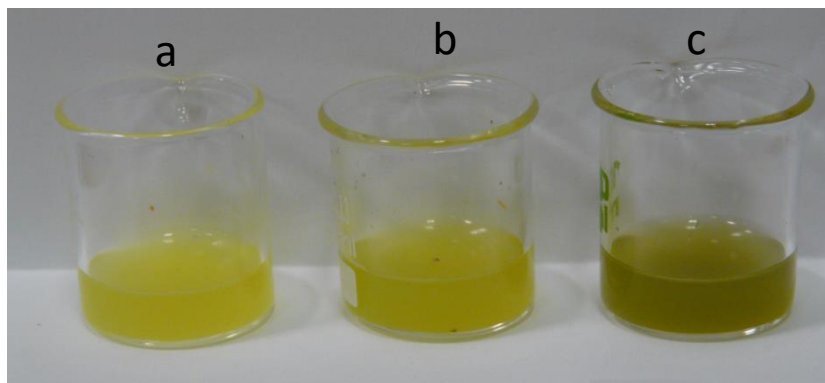
7. táblázat: Szűretlen paprika lében végzett sztenderd addíciós mérések eredményeinek összefoglalása; # viszkozitási korrekcióval számított érték.

A javasolt kronoamperometriás módszerrel mért koncentráció a titrálással kapott eredménnyel meglehetősen közelinek bizonyult, kimagasló linearitás érték mellett. A membránnal

módosított elektródot alkalmazó, kronoamperometriás módszer visszanyerési értéke 4,3%-kal kisebb a titrálási módszerrel mérténél. Ez a különbség nagyrészt a vizes oldat és a paprika lé viszkozitása közötti különbségnek köszönhető. A paprikalé viszkozitása a vizes oldathoz képest nagyobb - a korábban bemutatott mérés alapján -, s ez kb. 3,6%-os áram csökkenést eredményez (a paprikalében, a vizes oldathoz képest). Ezért a jövőbeli kísérletek során egy korrekciós faktor használata javasolt, membránnal módosított elektróddal, ugyanezen mátrixban végzett kronoamperometriás mérések esetében. A további 6-7% visszanyerési veszteség valószínűleg a szűretlen paprika belső mátrix hatását tükrözi.

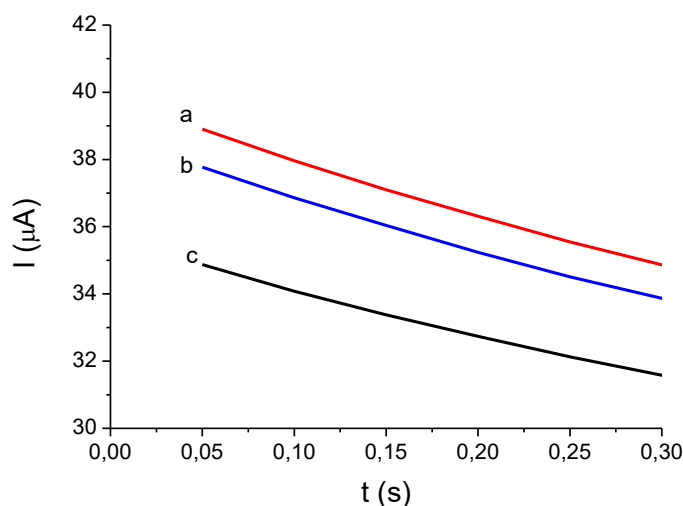
4.3.4 Különböző anyagból készült kések hatása a paprika hús aszkorbinsav tartalmára

A kidolgozott módszert különböző anyagból készült pengéjű késsel vágott, sárga paprika szeletekben történő közvetlen LAS meghatározásra kívántam használni. Az előkészítő kísérletek során a paprikából szűretlen levet nyertem, s három 25 ml-es főzőpohárba szétosztottam. Az elsőt fedetlenül, levegőn hagytam pihenni, a másodikba egy rozsdamentes acélkést, míg a harmadikba egy régi típusú vas kést állítottam. Egy óra elteltével a késeket eltávolítottam, s amint azt a 31. ábra is mutatja, a három paprika lé minta között szemmel is látható színbeli különbséget tapasztaltam.



31. ábra: Szűretlen paprikalé minták 60 perces várakozást követően, a) kezeletlen paprikalé, b) acélkéssel kezelt paprikalé, c) vas késsel kezelt paprikalé.

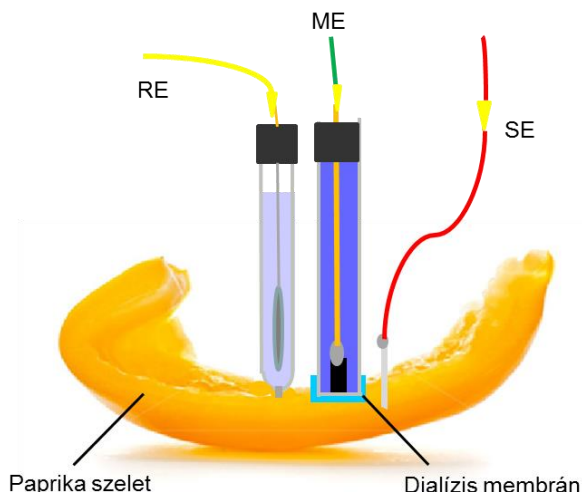
Az acélkéssel kezelt paprikalé színe egy óra elteltével már észrevehetően sötétebb volt, a vas késsel kezelt minta esetében pedig, a sötétebb szín szembeötlő. A módosított GC elektród felhasználásával, rövid idejű kronoamperometriás méréseket végeztem ezekben a szűretlen, különböző késekkel kezelt paprika levekben. (32. ábra)



32. ábra: Különböző késekkel kezelt, szűretlen paprika lé mintákban, módosított GC elektróddal készített kronoamperometriás felvételek: a) kezeletlen, b) acél késsel-, c) hagyományos vas késsel kezelt paprikalé.

A három mintában felvett kronoamperometriás felvételeket összehasonlítva elmondható, hogy a kezeletlen paprika lében mért áram értékek a legnagyobbak, az acélkéssel kezelt minta esetében mért áram értékek kicsit alacsonyabbak, míg a vas késsel kezelt paprika lében felvett kronoamp fut a legalacsonyabb áram értékeknél.

Sárga paprika szeleteket párhuzamosan kerámia, rozsdamentes acél és egy hagyományos típusú vas késsel vágtam fel, majd a felületi sejtfalat ezekkel a késekkel enyhén felsértettem. A mintákat a mérésig párás környezetben, főzőpohárban, óraüveggel lefedve tároltam. A mérési elrendezést a 33. ábra mutatja.



33. ábra: Az elektródok mérési elrendezése közvetlenül paprika szeleten végzett LAS meghatározás során. RE: telített kalomel referenciaelektrod, ME: membránnal módosított GC munkaelektrod, SE: platina tű segédelektrod.

A munkaelektrodot a mintával érintkezésbe hoztam, s a megfelelő feltöltődési időt követően (90 s) kronoamperometriás mérést végeztem, majd az LAS értékeket a vizes oldatokban felvett kalibráció alapján számítottam. A méréseket a kerámia kést alkalmazó előkészítést követően pár percen belül, mindhárom minta típus esetében pedig 60-80 perc elteltével végeztem el. Az eredményeket a 8. táblázat tartalmazza.

	Paprika szelet Kerámia kés $t=(0-10)*60$ s	Paprika szelet Kerámia kés $t=(60-80)*60$ s	Paprika szelet Rozsdamentes acél kés $t=(60-80)*60$ s	Paprika szelet Vas kés $t=(60-80)*60$ s
Meghatározott érték	110,6±5,6 mg/100g	102,4±5,8 mg/100g	98,1±6,1 mg/100g	83,4±6,6 mg/100g
Korrigált érték	114,5±5,8 mg/100g	106,1±6,0 mg/100g	101,6±6,3 mg/100g	86,4±6,8 mg/100g

8. táblázat: Különböző anyagból készült pengéjű késekkel előkészített paprika szeleteken, különböző várakozási időknél kivitelezett, közvetlen LAS meghatározás eredményei. A korrigált értékek számítása a javasolt viszkozitási korrekció figyelembevételével történt.

Látható, hogy az LAS koncentráció meglehetősen nagy mértékben csökkent azon paprika szelet felületén, melyet hagyományos vas késsel készítettem. Lényegesen magasabb LAS koncentráció értéket mértem rövidesen a kerámia kés alkalmazását követően, s ezen minta esetében

az oxidáció is lassabb. A rozsdamentes acél kés nyomán jóval kisebb mennyiségű katalizátor kerülhetett a felületre, mint a vas kés nyomán. A 8. táblázatban bemutatott szórás értékek 5 és 5,9% között mozognak a kerámia késsel készített- és 6,2-7,9% között a további szeleteken végzett mérések esetében.

Az itt bemutatott technika egy olcsó, hatékony módszer a reagens mentes, gyors, paprikában történő in-situ LAS meghatározásra. Az L-aszkorbinsav helyi koncentrációja a mintaelőkészítés bizonytalansága nélkül mérhető és megbízható eredmény nyerhető a javasolt viszkozitási korrekció figyelembevételével. A helyi LAS koncentráció változása meghatározható, ezáltal becsülhető a gyakorlatban alkalmazott különböző késekből a paprikába kerülő fémionok hatása. A diffúziós réteggel módosított elektród, a viszonylag hosszú feltöltődési- és igen rövid kronoamperometriás detektálási program betartása mellett, jó működési stabilitást mutatott: 30 felvétel után megfigyelhető egy gyenge elektród jel csökkenés. Továbbá a mátrix tortuozításában jelen lévő különbségek nem befolyásolják az eredményt, s nem növelik a különböző helyeken végzett mérések közötti szórás értéket.

Azonban a módszer korlátait is meg kell említeni, s az alkalmazásnál javasolt figyelembe venni. A paprikában az LAS koncentráció kis mértékben különbözik a zöldség különböző részeiben, ezért a meghatározott érték függ a munkaelektrod helyétől. Az LAS inhomogenitása az eredmények szórás értékeiben mutatkozik meg. Továbbá, ezen technika alkalmazásával, csupán a sejtközötti folyadék LAS tartalma becsülhető. Az adszorbeált molekulák vagy az érintkező sejteken belül található folyadék csak különböző egyensúlyokon keresztül befolyásolja a sejtközötti folyadék LAS tartalmát.

4.4 Oxigénmérés üledékekben

A szakirodalom alapján jól látható, hogy az oxigénmérés ún. tortuózus közegekben (az üledékekben, silókban, fermentációs folyamatok nyomonkövetése során, stb.) a mai napig valós kihívást jelent. A diffúziós réteggel eleve módosított Clark-cellák esetében az oxigén fogyasztás és ezáltal a közeg diffúziós viszonyainak változására mutatott érzékenység csökkentésének egy hatékony és újszerű módja lehet a hagyományos amperometria (A) helyett a periódikusan megszakított amperometriás (PMA) detektálás alkalmazása. Munkám során különböző szemcseméretű üledékekben végeztem méréseket, a két mérőprogram alkalmazhatóságának vizsgálatára.

Az elektród kétpontos kalibrálása során a min. 10 perces nitrogén átbuborékoltság után mért áram értéket tekintettem a nulla koncentrációhoz tartozó pontnak, míg a min. 10 perces levegő átbuborékoltság után mért áram érték a 21%-os oxigén tartalmú levegővel egyensúlyban kialakuló, 8,6 mg/l oldott oxigén koncentrációnak felel meg (Henry-konstans alapján számolva).

A mérés során 30 g homokot és 150 cm³ vizet tartalmazó kristályosító csészében 10 perces levegő átbuborékoltságot és alapos keverést végeztem, majd az üledéket a csésze egyik felére halmoztam. A Clark-elektrodát a csésze másik részére pozicionáltam úgy, hogy a folyadékba merüljön, s kb. 1 cm távolságban legyen az edény alja felett. A mérést elindítottam és az áram érték beállása után hirtelen keveréssel a félrehalmozott homok üledéket a csészében felkevertem, mely szabad ülepedéssel az egész csésze aljára terült az elektródát is körülveve. A teljes ülepedés után kb. 1 cm-es mélységbe került az elektród a homokban. Mindeközben és további legalább 200 másodperc időtartamig regisztráltam az áram értékeket. A kiértékelés során a felülúszóban mért és az üledékben a 200 s-os időtartamnál leolvasott áram értékeket hasonlítottam össze. (9. táblázat)

A mérést hagyományos amperometria esetén -0,7 V vs. Ag/AgCl potenciálon végeztem, míg PMA esetében a detektálás: -0,7 V vs. Ag/AgCl potenciálon, 15 ms kondenzátor áram lecsengési periódus után 15 ms ideig tartott. A várakozási/regenerálódási szakasz 0,1 V vs. Ag/AgCl potenciálon, a táblázatban megjelölt időtartam hosszúságú volt. A mérést ioncserélt víz közegben, durva (szemcseméret: 0,315-0,4 mm) és finom (szemcseméret: 0,125-0,16 mm) homok üledékben végeztem.

Várakozási idő	Vizes közegű kalibráció meredeksége	200 s alatt bekövetkezett áram csökkenés	
		finom üledékben	durva üledékben
s	$A^*/l/mg$	A	A
0,0	$5,74 \cdot 10^{-8}$	$1,20 \cdot 10^{-7}$	$1,12 \cdot 10^{-7}$
0,5	$3,58 \cdot 10^{-7}$	$4,12 \cdot 10^{-7}$	$3,70 \cdot 10^{-7}$
1,0	$4,42 \cdot 10^{-7}$	$3,47 \cdot 10^{-7}$	$3,06 \cdot 10^{-7}$
2,0	$5,57 \cdot 10^{-7}$	$2,65 \cdot 10^{-7}$	$1,77 \cdot 10^{-7}$
3,0	$5,85 \cdot 10^{-7}$	$1,93 \cdot 10^{-7}$	$7,00 \cdot 10^{-8}$
4,0	$5,99 \cdot 10^{-7}$	$1,65 \cdot 10^{-7}$	$3,76 \cdot 10^{-8}$
5,0	$5,88 \cdot 10^{-7}$	$1,39 \cdot 10^{-7}$	$1,70 \cdot 10^{-8}$

9. táblázat: A különböző várakozási idők mellett végzett amperometriás mérések eredményeinek összefoglalása; 0 s a hagyományos amperometriás detektálást jelzi, 0,5-5 s közötti értékek pedig a PMA programnál alkalmazott beállítások. A vizes közegű kalibrálás eredménye a nulla oxigén szint mellett és a levegővel telített oldatban mért értékekből származik. Az áram csökkenés adatok a szabad oldatban, majd az üledék réteg kialakítása után 200 s-nál mért áram értékek különbségei.

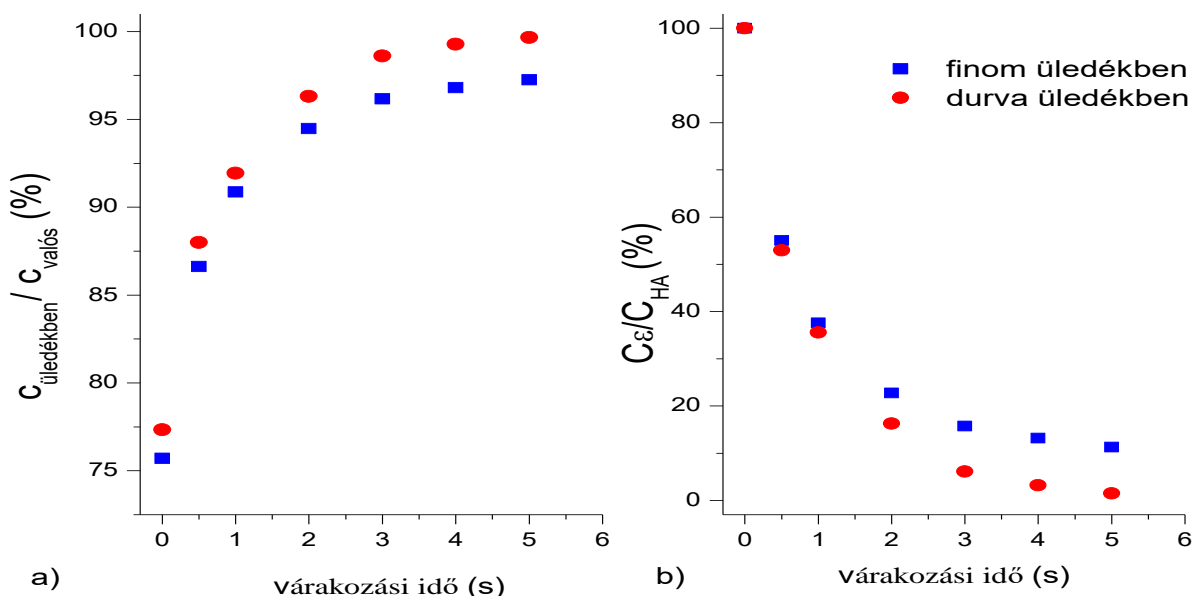
A 9. táblázat mérési eredményei alapján jól látható, hogy a kétpontos kalibrációs egyenes meredeksége körülbelül egy nagyságrenddel nő PMA detektálás esetében a hagyományos amperometriás detektáláshoz viszonyítva. PMA detektálásnál a várakozási idő növelése kb. 40%-os érzékenység növekedést eredményezett. A tortuozitás miatt fellépő, üledékekben tapasztalt áram csökkenés kb. 200 s után állandósult, ezért választottam ezt az időtartamot a mérés leolvasási pontjának. A hagyományos amperometriás detektáláshoz viszonyítva a rövid várakozási idők mellett felvett PMA detektálás esetében 3-4-szer nagyobb áramcsökkenés értéket tapasztaltam az üledékekben – a megnövekedett érzékenység miatt –, mely jelentősen csökken a várakozási idők hosszabodása során, tehát a kisebb oxigén fogyasztás hatása szembeötlő. Az elméletileg vártakkal összhangban, a finom üledék esetében, minden programnál nagyobb áram csökkenés mérhető, a nagyobb tortuozitásnak megfelelően.

A 10. táblázat és grafikusán a 34. ábra a különböző detektálási módszerek esetében, a kalibráció alapján számított, üledékbeli koncentráció értékeket ($C_{\text{üledékben}}$) a valós koncentráció

értékekhez ($C_{\text{valós}}$) viszonyítva tünteti fel. A kiszámított koncentráció meghatározási hiba értékeket ($C_{\varepsilon} = (1 - C_{\text{üledékben}}/C_{\text{valós}}) \times 100$) a hagyományos amperometriás detektálás esetében fellépő hiba ($C_A = (1 - C_{\text{üledékben,A}}/C_{\text{valós}}) \times 100$) értékére vonatkoztattam.

Várakozási idő	$C_{\text{üledékben}}/C_{\text{valós}}$		Koncentráció meghatározási hiba a hagyományos amperometriás detektálási értékhez viszonyítva C_{ε}/C_A	
	finom üledékben	durva üledékben	finom üledékben	durva üledékben
<i>s</i>	%	%	%	%
0,0	75,7	77,3	100,0	100,0
0,5	86,6	88,0	55,1	53,0
1,0	90,9	91,9	37,6	35,6
2,0	94,5	96,3	22,8	16,3
3,0	96,2	98,6	15,8	6,1
4,0	96,8	99,3	13,2	3,2
5,0	97,3	99,7	11,3	1,5

10. táblázat: A különböző várakozási idők mellett végzett amperometriás mérések eredményei; 0 s a hagyományos amperometriás detektálást jelzi, 0,5-5 s közti értékek pedig a PMA programnál alkalmazott beállítások. A táblázat az üledékben kiszámított koncentráció értékeket a valós koncentráció értékekhez viszonyítva ($C_{\text{üledékben}}/C_{\text{valós}}$), a PMA detektálás mellett jelentkező koncentráció meghatározási hiba értékeket a hagyományos amperometriás detektálás ugyanezen értékeihez viszonyítva (C_{ε}/C_A) tünteti fel.



34. ábra: A finom és durva üledékben meghatározott a) koncentráció értékek a valós adatokhoz viszonyítva, b) koncentráció meghatározási hiba értékek a PMA detektálásnál ($C_{\epsilon} = (1 - C_{\text{üledékben}} / C_{\text{valós}}) \times 100$) a hagyományos amperometriás detektálás melletti hiba ($C_A = (1 - C_{\text{üledékben,A}} / C_{\text{valós}}) \times 100$) értékére normalva. A várakozási időknél 0 s a hagyományos amperometriás detektálást jelzi, 0,5-5 s közti értékek pedig a PMA programnál alkalmazott beállításokat jelölik.

Az eredmények alapján látható, hogy a hagyományos amperometriás detektálás esetében, üledéktől függően, a valós koncentrációnak csupán 75,7% ill. 77,3%-át mértem. PMA program alkalmazása esetében a valós értékekhez lényegesen közelebbi eredményt kaptam: 86,6% és 88%-ot 0,5 s-os várakozási időnél, s ez az érték folyamatosan növekedett a pihentetési érték hosszabbodásával. 5 másodperces várakozási periódus esetében a valós érték közel 100%-át mértem. A grafikus ábrázolás is jól mutatja, hogy a beépített diffúziós réteggel rendelkező Clark-elektrod esetében, a megfelelően megválasztott PMA mérőprogram alkalmazása jelentősen csökkenti, s akár ki is küszöbölheti a környezet diffúziós viszonyai változására mutatott érzékenységet.

5 Összefoglalás

Kísérleteim első szakaszában banán szöveten alapuló, dopamin meghatározására alkalmas amperometriás bioszenzor érzékenysége és analitikai teljesítmény-jellemzőinek javítása céljából végeztem kísérleteket. A dopamin mérésére leginkább alkalmas munkapotenciált $-0,2\text{ V}$ vs. $\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ értéken állapítottam meg áramló oldatos rendszerben, dinamikus voltammogramok felvétele útján. Ez a potenciál érték az, ahol az oxigén vagy más zavaró komponensek árama kicsi és a háttéráram is minimális mértékű. A banán szelet mezokarpium belső része esetében enzimaktivitásmérő elektrokémiai cella segítségével jelentősen nagyobb tirozináz aktivitást mutattam ki, mint a mezokarpium külső részeiben, ezért minden esetben a belső részt használtam bioszenzor készítéshez. Az enzimreakcióban résztvevő anyagok koncentráció eloszlását a modell bioszenzor reakciórétegében pásztázó elektrokémiai mikroszkóppal vizsgáltam, ennek eredményeképp helyi maximum értéket állapítottam meg a dopamin-kinon koncentrációprofilban a mintaoldatot és a banán szövetet elválasztó membrán rétegtől $130\text{-}160\ \mu\text{m}$ távolságban. Az enzimréteg vastagságának optimalizálása rövidebb válaszidőt és nagyobb katódos áramot eredményezett. A dinamikus voltammogramok alapján válaszoltam ki a periódikusan megszakított amperometriás detektálás során alkalmazott pihentetési/feltöltődési periódus $-0,02$ és $-0,03\text{ V}$ vs. $\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ közötti optimális potenciál értéket, mivel ezen értéknél nem tapasztaltam mérhető anódos vagy katódos áramot. A kísérletek során a PMA detektálás esetében optimalizált hosszúságú pihentetési időt (t_3) válaszoltam, mely $0,5\text{ s}$ értéknek adódott. A dopamin koncentráció meghatározására használt banánotród bioszenzor érzékenysége nőtt, a kimutatási határ pedig lényegesen csökkent az optimális elektródpotenciálok és reakcióréteg vastagság, valamint a PMA detektálási program alkalmazása mellett. Hagyományos amperometriás detektálás esetében a dopaminra vonatkozó kimutatási határ értéke $1,05 \cdot 10^{-5}\text{ mol}/\text{dm}^3$, míg PMA detektálás mellett $2 \cdot 10^{-6}\text{ mol}/\text{dm}^3$ értéknek adódott, ezáltal már a mikromólos koncentrációtartományba tartozó vizelet és oldott gyógyszer minták esetében is alkalmazható – akár alumínium-oxid rétegen vagy gélen történő elődúsítási lépést követően – az így elkészített bioszenzor. A banán szövet reakcióréteg mindezek mellett gyorsan és reprodukálhatóan megújítható. A költséghatékony előállíthatóság és a viszonylag hosszú élettartam további fontos előnyei ennek a bioszenzornak.

Egy adott anyag diffúziós együtthatója üledékekben, élő szövetekben, gyümölcsökben, stb. lényegesen különbözhet a sztenderd kalibráló oldatokban mérhető értékétől, ezért a diffúziót gátló,

akadályokat tartalmazó közegben végzett elektroaktív anyag koncentrációjának voltametriás meghatározása nem megfelelő eredményt ad. Munkám második részében diffúziós membrán réteggel módosított glassy carbon munkaelektrodot készítettem és rövid idejű kronoamperometriás mérés technikát alkalmaztam. A meghatározandó modellanyag L-aszkorbinsav volt, míg a modell minta mátrix homok üledék. Bebizonyítottam, hogy a vizes kalibráló sztenderd oldatokban felvett adatok felhasználásával valós koncentráció értékek nyerhetők mindaddig, amíg az elektródfolyamat során kialakuló L-aszkorbinsav diffúziós profil a beépített diffúziós rétegben van. Megmutattam, hogy ez az időtartam az elméleti elképzeléssel megegyezően a diffúziós rétegvastagság növelésével arányosan növekszik.

További kísérleteimben a friss, sárga paprika szeletek L-aszkorbinsav tartalmának közvetlen, mintaelőkészítési és elválasztási lépéseket mellőző meghatározását tűztem ki célul. Ciklikus voltametriás mérés sorozattal szemléltettem az elektród passzíválódás, szennyeződés komoly jelentőségét. A viszkozitás zavaró hatásának tanulmányozását LAS tartalmú víz-glicerin modell oldatsorozat segítségével végeztem. Többek között a tortuozitás problémájának megoldására alkalmazott diffúziós réteggel módosított glassy carbon elektród és rövid idejű kronoamperometriás mérési módszer optimális feltöltődési idejét 90 s hosszúságúnak állapítottam meg. Mindezek alkalmazásával méréseket végeztem rostos paprika lében, az ennek során kapott eredmények a javasolt viszkozitási korrekciót követően a klasszikus jodometriás titrálási módszerhez viszonyítva, már elfogadhatóak. Közvetlenül, paprika szeleteken kivitelezett helyi mérések alapján megmutattam, hogy a sárga paprika hús jelentősen gyorsabb ütemben veszít LAS tartalmából, amennyiben azokat vas késsel vágtam el, mint rozsdamentes acél- vagy kerámia kés alkalmazása esetében.

Doktori kutatómunkám záró szakaszában az oxigén mérésére elterjedten alkalmazott, diffúziós réteget eleve tartalmazó Clark-cella alkalmazhatóságát vizsgáltam tortuózus közegekben. A különböző szemcseméretű modell homok üledékekben jelentkező oxigénkoncentráció mérési hiba kb. 23-24% a hagyományos amperometriás detektálás esetében, míg optimalizált 5 s hosszúságú feltöltődési/pihentetési időszakokat és rövid mérési periódusokat tartalmazó periódikusan megszakított amperometriás mérés technika esetében minimálisra csökkenthető.

6 Tézispontok

- I. Elsőként szemléltettem dinamikus voltammogramok felvétele útján, hogy a banánotród bioszenzor esetében az optimális munkapotenciál kiválasztása kulcsfontosságú, ennek alkalmazásával a szelektivitás és az érzékenység javul a mérendő dopamin-kinonra nézve, mivel a nem kívánt zavaró hatások minimálisra csökkenthetők, pl. az enzimreakcióban szintén résztvevő oxigén árama. Ezt $-0,2\text{ V vs. Hg/Hg}_2\text{Cl}_2$ értéken állapítottam meg. Továbbá elsőként alkalmaztam természetes szöveten alapuló bioszenzor esetében periódikusan megszakított amperometriás detektálási módszert, a programot az optimális potenciálok és mérési időtartamok meghatározásával alakítottam ki. Az így működtetett bioszenzor érzékenysége a hagyományos amperometriás detektáláshoz képest jelentősen növekedett, míg a kimutatási határ értéke $1,05 \cdot 10^{-5}$ mól/dm^3 -ről $2 \cdot 10^{-6}$ mól/dm^3 -re csökkent.

- II. A bioszenzor természetes reakciórétegben kialakuló dopamin és dopamin-kinon koncentrációprofilok feltérképezésére sikeresen alkalmaztam pásztázó elektrokémiai mikroszkópiás módszert és szénpaszta mikroelektrod mérőcsúcsot, ezáltal megállapítottam, hogy a reakciórétegben a mintaoldat felőli határoló membrántól kb. $130\text{-}160\ \mu\text{m}$ távolságban a dopamin-kinon koncentrációban lokális maximum alakul ki. A banánotród reakcióréteg vastagságát ez alapján terveztem.

- III. Helyszíni mérésekkel igazoltam üledékben, mint modell tortuózus közegben kivitelezett amperometriás L-aszkorbinsav meghatározás során a mérés hibáját. A zavaró hatás kiküszöbölésére módszert dolgoztam ki: diffúziós réteggel módosított glassy carbon munkaelektrodot és rövid idejű kronoamperometriás detektálást alkalmaztam. Bebizonyítottam, hogy a diffúziós rétegvastagság növelésével egyre hosszabbodott az az időtartam, amíg a diffúziós koncentrációprofil a módosított rétegben van, ezáltal amíg a környezet diffúziós viszonyainak változására érzéketlen.

- IV. Módszert dolgoztam ki a rostos sárga paprika lé mintelőkészítés nélküli, közvetlen L-aszkorbinsav tartalmának meghatározására. A kísérletekkel igazolt elektród passziválódás, viszkozitás különbség és a tortuozitás okozta mérési hibát dialízismembránnal, mint diffúziós réteggel módosított glassy carbon munkaelektrod, 90 s hosszúságú feltöltődési idő és rövid idejű kronoamperometriás detektálás, valamint viszkozitási korrekció alkalmazásával oldottam meg. Közvetlenül, paprika szeleteken kivitelezett elektrokémiai méréseket végeztem és ezek alapján bizonyítottam, hogy a sárga paprika hús jelentősen gyorsabb ütemben veszít LAS tartalmából, amennyiben azt vas késsel hoztam érintkezésbe, mint rozsdamentes acél- vagy kerámia kés alkalmazása esetében.
- V. Helyszíni mérésekkel bizonyítottam, hogy az oxigénmérő Clark-cella üledékben történő alkalmazása jelentős mérési hibával jár a tortuozitás problémája miatt. Megmutattam, hogy az alkalmasan megválasztott periódikusan megszakított amperometriás detektálási program a valós értékekhez közeli eredményeket szolgáltat.

7 Publikációs jegyzék

Cikkek:

A PhD fokozatszerzési eljárás tárgykerében készült publikációk:

Zsuzsanna Óri, Livia Nagy, László Kiss, Barna Kovács, Géza Nagy: Direct voltammetric determination of ascorbic acid in natural paprika fruits without sample pretreatment, *Electroanalysis* 27: (3) p. 808–816. (2015) IF: 2.502

Zsuzsanna Óri, András Kiss, Anton Alexandru Ciucu, Constantin Mihailciuc, Cristian Dragos Stefanescu, Livia Nagy, Géza Nagy: Sensitivity enhancement of a "bananatrode" biosensor for dopamine determination based on SECM studies inside its reaction layer, *Sensors and Actuators B-Chemical* (ISSN: 0925-4005) 190: pp. 149-156. (2014) IF: 3.84

László Kiss, Zsuzsanna Óri, Livia Nagy, Barna Kovács, Géza Nagy: Voltammetric concentration measurements in diffusion-hindered media, *Journal of Solid State Electrochemistry* 17:(12) p. 3039-3045. (2013) IF: 2.234

Ez utóbbi cikket részben használok fel, a Kiss László dolgozatában –nyilatkozattal elismerten-szereplő részek kihagyásával.

A PhD fokozatszerzési eljárás tárgykerén kívül készült publikációk:

Edina Lempel, Zsuzsanna Óri, József Szalma, Bálint Viktor Lovász, Adél Kiss, Ákos Tóth, Sándor Kunsági-Máté: Effect of extended exposure time and pre-heating on the conversion degree of conventional, bulk-fill, fiber reinforced and polyacid-modified resin composites. *Dent Mater.* 35: (2) p. 217-228. (2019) IF: 4.44 D1

J. Izquierdo, B. M. Fernández-Pérez, D. Filotás, Zs. Óri, A. Kiss, R. T. Martín-Gómez, L. Nagy, G. Nagy, R. M. Souto: Imaging of Concentration Distributions and Hydrogen Evolution on

Corroding Magnesium Exposed to Aqueous Environments Using Scanning Electrochemical Microscopy, *Electroanalysis* 28: (10) p. 2354-2366. (2016) IF: 2.417

Bugyi Zs, Kovács A, Óri Zs, Tömösközi S. Study of food processing effects on the results of allergen determination in a wheat flour based model system. In: *Gluten Proteins 2009*, ed: Gérard Branlard, INRA. 320-322. (2009)

Előadások:

A PhD fokozatszerzési eljárás tárgykerében tartott előadások:

2015. november 20. MTA Fizikai Kémiai Szakbizottsági ülés, Pécs. Óri Zsuzsanna, Nagy Géza: Amperometriás szenzorok újszerű alkalmazása biológiai rendszerekben.

2015. január 22-23. Szentágothai János Kutatóközpont, Kémiai Szenzorok Workshop VI. Pécs. Óri Zsuzsanna, Nagy Géza: Módosított felületű voltammetriás szenzorok alkalmazásának új lehetőségei.

2014. december 16. MTA Szegedi Akadémiai Bizottság Székháza, Elektrokémiai Munkabizottság ülése. Óri Zsuzsanna, Nagy Géza: Amperometriás szenzorok alkalmazása biológiai rendszerekben.

2013. április 25-27. CECE 2013, 10th Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis Magyarország, University of Pécs. László Kiss, Zsuzsanna Óri, Lívia Nagy, Géza Nagy: Modified, layer coated amperometric sensor for measuring in natural, porous matrices.

2013. április 18-19. A szenzorkutatás újabb eredményei Workshop V., Pécs. Óri Zsuzsanna, Kiss László, Nagy Lívia, Nagy Géza: Diffúziós réteggel módosított munkaelektrod tortózus közegben való analízisre.

2012. október 29-31. XXXV. KÉMIAI ELŐADÓI NAPOK, Szeged. Őri Zsuzsanna Emese: Banán szöveten alapuló dopamin mérő bioszenzor továbbfejlesztése, az optimális működési paraméterek meghatározása.

2012. április 24-26. Műszaki Kémiai Napok, Veszprém. Őri Zsuzsanna, Nagy Géza: Natív enzimforráson alapuló dopamin-mérő bioszenzor vizsgálata, mérés technikailag fontos sajátosságainak fejlesztése.

A PhD fokozatszerzési eljárás tárgykörén kívül tartott előadások:

2019. május 17-19. 4th Symposium on Weak Molecular Interactions. Shimane, Japán. E. Lempel, Zs. Őri, J. Szalma, B. V. Lovász, A. Kiss, Á. Tóth, S. Kunsági-Máté: Effect of extended exposure time and pre-heating on the conversion degree of conventional, bulk-fill, fiber reinforced and polyacid-modified resin composites in different model cavities.

2011. november 2-4. XXXIV. KÉMIAI ELŐADÓI NAPOK, Szeged. Őri Zsuzsanna Emese: Búzafehérjék meghatározására alkalmas ELISA módszer teljesítményjellemzőinek vizsgálata.

Poszterek:

A PhD fokozatszerzési eljárás tárgykörében készült poszterek:

2015. január 22-23. Szentágothai János Kutatóközpont, Kémiai Szenzorok Workshop VI., Pécs. Őri Zsuzsanna, Nagy Livia, Kiss László, Kovács Barna, Nagy Géza: Közvetlen „in situ” C-vitamin meghatározás paprikában.

2014. június 11-15. ESEAC2014, 15th International Conference on Electroanalysis, Malmö, Svédország. Zsuzsanna Őri, Livia Nagy, Géza Nagy: Towards direct voltammetric determination of Ascorbic acid in natural pepper fruits without sample treatment.

2014. június 15-20. Mátrafüred 2014, International Conference on Electrochemical Sensors, Visegrád. Zsuzsanna Óri, Livia Nagy, Géza Nagy: Towards direct voltammetric determination of Ascorbic acid in natural pepper fruits without sample treatment.

2012. október 3. 1st International Doctoral Workshop on Natural Sciences, Szentágothai Research Center, University of Pécs. Zsuzsanna Óri: Plant tissue based biosensor with improved sensitivity. Dopamine determination under optimized working conditions.

2012. április 26-27. Kémiai Szensorok Workshop IV., Pécs. Óri Zsuzsanna, Nagy Livia, Nagy Géza: Banánszöveten alapuló amperometriás bioszenzor PMA detektálással.

A PhD fokozatszerzési eljárás tárgykörén kívül készült posztterek:

2015. január 22-23. Szentágothai János Kutatóközpont, Kémiai Szensorok Workshop VI., Pécs. Livia Nagy, Ioana S. Hosu, Zsuzsanna Óri, András Kiss, Serban F.Peteu, Geza Nagy Zsuzsanna Óri, Livia Nagy, Géza Nagy: Microbiosensor-based scanning electrochemical microscopy (SECM) for detection of the nitro-oxidative species.

2015. január 22-23. Szentágothai János Kutatóközpont, Kémiai Szensorok Workshop VI., Pécs. Livia Nagy, Zsuzsanna Óri, Mihaela Calugareanu, Rusandica Stoica, Bibiana Maria Fernandez-Perez, András Kiss, Florin Oancea, Geza Nagy: Potentiometric SECM in biological application for characterisation of potassium ultra micropipette ion selective electrode.

2014. október 30-31. PRIOCHEM 10th, Priorities of Chemistry for a sustainable development, Bukarest, Románia. Mihaela Calugareanu, Rusandica Stoica, Bibiana Maria Fernandez-Perez, Zsuzsanna Óri, András Kiss, Livia Nagy, Florin Oancea, Géza Nagy: Characterisation of potassium ultra micropipette ion selective electrode for potentiometric SECM in biological application.

2014. október 30-31. PRIOCHEM 10th, Priorities of Chemistry for a sustainable development, Bukarest, Románia. Livia Nagy, Ioana S. Hosu, Zsuzsanna Óri, András Kiss, Serban F. Peteu, Géza Nagy: Detection of the nitro-oxidative species by microbiosensor-based scanning electrochemical microscopy (SECM)

2013. május 27-30. XVth International Conference „Heterocycles in Bio-organic Chemistry” 27th. Bioheterocycles. Riga, Lettország. János B. Czirok, Márton Bojtár, Gyula Jágorszki, Zsuzsanna Óri, Géza Nagy, István Bitter: Click immobilization of calix[4]arene ionophores on azide-modified PVC matrices.

2009. szeptember 7-9. Xth International Gluten Workshop, Diocesan Center, Clermont-Ferrand, Franciaország. Zsuzsanna Bugyi, Annamária Kovács, Zsuzsa Óri, Sándor Tömösközi: Study of effects influence the results of allergen determination in wheat flour based model system.

8 Irodalomjegyzék

- ¹ EGGINS, B. R., (1996) Biosensors: An Introduction, Wiley/Teubner, Chichester/Stuttgart.
- ² THÉVENOT, D.R., TOTH, K., DURST, R.A., WILSON, G.S. (1999) Electrochemical Biosensors Recommended Definitions and Classification - IUPAC Report. Pure Appl. Chem, 71 (12) 2333-2348.
- ³ VELASCO-GARCIA, M.N., MOTTRAM, T. (2003) Biosensor Technology addressing Agricultural Problems. Biosystems Engineering, (84) 1–12.
- ⁴ TURNER, A.P.F; KARUBE, I., WILSON, S.W. (1986) Biosensors. Fundamentals and Applications. Oxford Science Publications, Oxford.
- ⁵ POWNER, E.T., YALCINKAYA, F. (1997) Intelligent biosensors. Sensor Review, 17 (2) 107-116
- ⁶ SZALONTAI, H. (2015) Jelölésmentes immunszenzorok fejlesztése probiotikus baktériumok és aflatoxin M1 kimutatására, Egyetemi doktori (PhD) értekezés, Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar
- ⁷ CLARK, LC., LYONS, C., (1962) Electrode systems for monitoring in cardiovascular surgery. Ann. NY Acad. Sci.,(102) 29–45.
- ⁸ UPDIKE, S. J., HICKS, G., P. (1967) The enzyme electrode. Nature, 214 (5092) 986-988.
- ⁹ TURNER, A. P. F., KARUBE, I., WILSON, G., S. (1987) Biosensors Fundamentals and Applications. Oxford University Press, Oxford.
- ¹⁰ AURORA, N., (2013) Recent Advances in Biosensors Technology: A Review. Octa Journal of Biosciences ISSN 2321 – 3663.
- ¹¹ KATZ, S., A., RECHNITZ, G., A. (1963) Direct potentiometric determination of urea after urease hydrolysis. Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie (196) 248–251.
- ¹² GUILBAULT, G., G., MONTALVO, J, G., JR, (1969) Urea-specific enzyme electrode. J. Am. Chem. Soc. 91 (8) 2164-2165.
- ¹³ RACINE, P., MINDT, W., SCHLAEPF, P., (1973) Electrochemical sensor for lactate. Journal of the Electrochemical Society 120 (3) C115.
- ¹⁴ CAMMANN, K., (1977) Bio-sensors based on ion-selective electrodes. Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie (287) 1–9.
- ¹⁵ KULYS, J., J., SVIRMICKAS, G., J., S., (1979) Biochemical cell for the determination of lactate. Anal. Chim. Acta 109 (1) 55-60.
- ¹⁶ CASS, A., E., G., DAVIS, G., FRANCIS, G., D., HILL, H., A., O., ASTON, W., J., HIGGINS, I., J., PLOTKIN, E., SCOTT, L., D., L., TURNER, A., P., F., (1984) Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose. Anal. Chem. 56 (4) 667-671.
- ¹⁷ BORGMANN, S., SCHULTE, A., NEUGEBAUER, S., SCHUHMANN, W. (2011) Amperometric Biosensors. Advances in

Electrochemical Science and Engineering.

- ¹⁸ KRÖGER, S., PILETSKY, S., TURNER, A.P.F. (2002) Biosensors for marine pollution research, monitoring and control. *Marine Pollution Bulletin* (45) 24–34.
- ¹⁹ WANG, J. (2006) *Analytical electrochemistry*. Third edition, Hoboken New Jersey, John Wiley & Sons Inc.
- ²⁰ LUONG, J. H. T., MULCHANDANI, A., GUILBAULT, G. G., (1988) Developements and applications of biosensors *Trends in Biotechnology* 6 (12) 310-316.
- ²¹ REYES-DE-CORCUERA, J. I., OLSTAD, H. E., GARCIA-TORRES, R., (2018) Annual Review of Food Science and Technology. Stability and Stabilization of Enzyme Biosensors: The Key to successful Application and Commercialization. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* (9) 293-322.
- ²² PARK, M., TSAI, S.L., CHEN, W., (2013) Microbial Biosensors: Engineered Microorganisms as the Sensing Machinery. *Sensors (Basel)*. 13 (5) 5777-5795.
- ²³ ACHA. V., ANDREWS. T., HUANG, Q., SARDAR, D., K., HORNSBY, P., J., (2010) Chapter 9: Tissue-based biosensors. *Recognition Receptors in Biosensors*. (ed.: ZOUROB. M.) Springer.
- ²⁴ VERMA, N., KAUR, G., (2016) *Wilson & Wilson's Compehensive Analytical Chemistry* (ed.: BARCELO, D.), Chapter 2: Trends on Biosensing Systems for Heavy Metal Detection. *Biosensors for Food Safety*, Elsevier, (74) 48-51.
- ²⁵ WANG, J., (1999) Amperometric biosensors for clinical and therapeutic drug monitoring: a review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (19) 47-53.
- ²⁶ KNOCKY, R., (2007) Recent developments in potentiometric biosensors for biomedical analysis. *Anal. Chim. Acta.*,599 (1) 7-15.
- ²⁷ SAURINA, J., HERNÁNDEZ-CASSOU, S., ALEGRET, S., FÀBREGAS, E. (1999) Determination of lysine in pharmaceutical samples containing endogenous ammonium ions by using a lysine oxidase biosensor based on an all-solid-state potentiometric ammonium electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, (14) 67-75
- ²⁸ PELLEGRINI, G.E., CARPICO, G., CONI, E. (2004) Electrochemical sensor for the detection and presumptive identification of quinolone and tetracycline residues in milk. *Analytica Chimica Acta*, (520) 13-18.
- ²⁹ TANG, D.P., YUAN, R., CHAI, Y.Q., ZHONG, X., LIU, Y., DAI, J.Y., ZHANG, L.Y. (2004) Novel potentiometric immunosensor for hepatitis B surface antigen using a gold nanoparticle-based biomolecular immobilization method. *Analytical Biochemistry*, (333) 345-350.
- ³⁰ Wang, J. (2005) Carbon-Nanotube Based Electrochemical Biosensors: A Review. *Electroanalysis*, 17, (1) 7-14.
- ³¹ EISSA, S., TLILI, C., L'HOCINE, L., ZOUROB, M. (2012) Electrochemical immunosensor for the milk allergen β -lactoglobulin based on electrografting of organic film on graphene modified screen-printed carbon electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, (38) 308-313.
- ³² ENSAFI, A.A., AMINI, M., REZAEI, B. (2013) Biosensor based on ds-DNA decorated chitosan modified multiwall carbon nanotubes for voltammetric biodetection of herbicide amitrole. *Colloids and Surfaces B*, (109) 45-51.
- ³³ PISOSCHI, A.M., POP, A., SERBAN, A.I., FAFANEATA, C. (2014) Electrochemical methods for ascorbic acid determination. *Electrochimica Acta*, (121) 443-460.

- ³⁴ SHARMA, S., BYRNE, H., O'KENNEDY, R., J., (2016) Antibodies and antibody-derived analytical biosensors. *Essays Biochem.*, 60 (1) 9-18.
- ³⁵ WU, C., DU, L., ZOU, L., ZHAO, L., HUANG, L., WANG, P. (2014) Recent advances in taste cell-and receptor based biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, (201) 75-85.
- ³⁶ VERMA, N., KAUR, G. (2016) *Wilson & Wilson's Comprehensive Analytical Chemistry* (ed.: BARCELO, D.), Chapter 2: Trends on Biosensing Systems for Heavy Metal Detection. *Biosensors for Food Safety*, Elsevier, (74) 58-61.
- ³⁷ SZEITNER, Z., ANDRÁS, J., GYURCSÁNYI, R., E., MÉSZÁROR, T. (2014) Is less more? Lessons from aptamer selection strategies. *J Pharm Biomed Anal.* (101) 58-65.
- ³⁸ KO, S., GRANT, S., A., (2005) A novel FRET-based optical fiber biosensor for rapid detection of *Salmonella typhimurium*. *Biosensors and Bioelectronics*, 20 (7) 1283-1290.
- ³⁹ MORENO-SERENO, M., DARWISH-MIRANDA, N., GIMÉNEZ-CONEJO, M., PALACIO-BONET, F., BERNAT-UBIAGA, I., ROMANO-RODRIGUEZ, A., (2018) A compact Robust OWLS System for Biosensing of Multiple Samples. *Proceedings of Eurosensors 2018*, 2 (13) 863.
- ⁴⁰ SINGH, P. (2016) SPR Biosensors: Historical Perspectives and Current Challenges. *Sensors and Actuators B* (229) 110-130.
- ⁴¹ VÍG, A. (2011) *Bioszenzorfejlesztés L-Aszkorbinsav és Aflatoxin M₁ mérésére*. Egyetemi doktori (PhD) értekezés, Debreceni Egyetem. 21.
- ⁴² ZHENG, L., CAI, G., WANG, S., LIAO, M., LI, Y., LIN, J. (2019) A microfluidic colorimetric biosensor for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 using gold nanoparticle aggregation and smart phone imaging. *Biosensors and Bioelectronics* (124-125) 143-149.
- ⁴³ LLANDRO, J., PALFREYMAN, J., J., IONESCU, A., BARNES, C., H., W. (2010) Magnetic biosensor technologies for medical applications: a review. *Medical & Biological Engineering & Computing*, (48) 977-998.
- ⁴⁴ ZHANG, Q., CUI, H., XIONG, X., CHEN, J., WANG, Y., SHEN, J., LUO, Y., CHEN, L. (2018) QCM-nanomagnetic beads biosensor for lead ion detection. *Analyst*, 143 (2) 549-554.
- ⁴⁵ SHARMA, S.K., SEHGAL, N., KUMAR, A. (2003) Biomolecules for development of biosensors and their applications. *Current Applied Physics*, (3) 307-316.
- ⁴⁶ WANDERMUR, G., RODRIGUES, D., ALLIL, R., QUEIROZ, V., PEIXOTO, R., WERNECK, M., MIGUEL, M. (2014) Plastic optical fiber-based biosensor platform for rapid cell detection. *Biosensors and Bioelectronics*, (54) 661-666.
- ⁴⁷ AMIN, R., KULKARNI, A., KIM, T., PARK, S.H. (2012) DNA thin film coated optical fiber biosensor. *Current Applied Physics*, (12) 841-845.
- ⁴⁸ HERRANZ, S., MARAZUELA, M.D., MORENO-BONDI, M.C. (2012) Automated portable array biosensor for multisample microcystin analysis in freshwater samples. *Biosensors and Bioelectronics*, (33) 50-55.
- ⁴⁹ CHEN, L.H., CHAN, C.C., MENON, R., BALAMURALI, P., WONG, W.C., ANG, X.M., HU, P.B., SHAILLENDER, M., NEU, B., ZU, P., TOU, Z.Q., POH, C.L., LEONG, K.C. (2013) Fabry-Perot fiber-optic immunosensor based on suspended layer-by-layer (chitosan/polystyrene sulfonate) membrane. *Sensors and Actuators B*, (188) 185-192.
- ⁵⁰ FAN, X., WHITE, IM., SHOPOVA, SI., ZHU, H., SUTER, JD., SUN, Y. (2008) Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: a review. *Anal. Chim. Acta* 620 (1-2) 8-26.

- ⁵¹ KOVÁCS, B., (2017) Flagellin alapú biomimetikus felületek jellemzése és élő sejtek adhéziójának nyomon követése jelölésmentes optikai bioszenzorokkal. Doktori (PhD) értekezés, MTA Energiatudományi Kutatóközpont és Pannon Egyetem, Vegyészmérnöki és Agrártudományok Doktori Iskola.
- ⁵² LISS, M., PETERSEN, B., WOLF, H., PROHASKA, E.M. (2002) An aptamer-based quartz crystal protein biosensor. *Anal. Chem.* 74 (17) 4488-4495.
- ⁵³ LANGE, K., RAPP, BE., RAPP, M.,K. (2008) Surface acoustic wave biosensors: a review. *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (5) 1509–1519.
- ⁵⁴ OLSEN, E., VAINRUBAND, A., VODYANOY, V. (2008) Acoustic Wave (TSM) Biosensors: Weighing Bacteria. M. Zourob et al. (eds.), *Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems*, Springer Science+Business Media, LLC 2008
- ⁵⁵ MEHROTRA, P. (2016) Biosensors and their applications – A review. *J. of Oral Biology and Craniofacial Research.* 6 (2) 153-159.
- ⁵⁶ SU, D., WU, K., SAHA, R., PENG, C., J-P., WANG. (2020) Advances in Magnetoresistive Biosensors. Review. *Micromachines* 11, 34
- ⁵⁷ RAMANATHAN, K., DANIELSSON, B. (2001) Principles and applications of thermal biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* 16 (6) 417-423.
- ⁵⁸ CAMPÁS, M., CARPENTIER, R., ROUILLON, R. (2008) Plant tissue-and photosynthesis-based biosensors. *Biotechnol. Adv.*, 26 (4) 370–378.
- ⁵⁹ WANG, S., ZHAO, S., WEI, X., ZHANG, S., LIU, J., DONG, Y. (2017) An Improved Label-Free Indirect Competitive SPR Immunosensor and Its Comparison with Conventional ELISA for Ractopamine Detection in Swine Urine. *Sensors (Basel)* 17 (3) 604.
- ⁶⁰ LUONG, J., H., T., MULCHANDANI, A., GUILBAULT, G., G. (1988) Developments and Applications of Biosensors. *Trends in Biotechnology.* 6 (12) 310-316
- ⁶¹ BUDAVÁRI, V. (2004) Módosított felületű elektródok. Doktori (PhD) értekezés, Szegedi Tudományegyetem, Kémia Doktori Iskola.
- ⁶² BOURDILLON, C., BOUGEOIS, J. P., THOMAS, D. (1980) Covalent linkage of glucose oxidase on modified glassy carbon electrodes. Kinetic phenomena. *J. Am. Chem. Soc.* 102 (12), 4231-4235.
- ⁶³ CASS, A.E., DAVIS, G., FRANCIS G.D., HILL H.A., ASTON W.J., HIGGINS I.J., PLOTKIN E.V., SCOTT L.D., TURNER A.P. (1984) Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose. *Anal. Chem.* 56 (4), 667-71.
- ⁶⁴ ALBERY, W.J., BARTLETT P.N., CRASTON D.H. (1985) Amperometric enzyme electrodes Part II. Conducting salts as electrode materials for the oxidation of glucose oxidase. *J. Electroanal. Chem.* ,194: 223-235.
- ⁶⁵ SASSOLAS, A., BLUM, L., J., LECA-BOUVIER, B., D. (2012) Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. Research review paper. *Biotechnology Advances.* (30) 489-511.
- ⁶⁶ CAO, L. (2005) Carrier-bound immobilized enzymes — principles, applications and design. Wiley-VCH.
- ⁶⁷ CAO, L. (2005) Immobilised enzymes: science or art? *Curr. Opin. Chem. Biol.* (9) 217–26.

- ⁶⁸ GUISAN, JM. (2006) *Methods in biotechnology: immobilization of enzymes and cells*. Second edition. New Jersey: Humana Press Totowa.
- ⁶⁹ HERMANSON, GT., MALLIA, AK., SMITH, PK. (1992) *Immobilized affinity ligand techniques*. San Diego: Academic Press.
- ⁷⁰ HERMANSON, GT. (2008) *Bioconjugate techniques*. San Diego: Academic Press.
- ⁷¹ MULCHANDANI, A., ROGERS, KR. (1998) *Enzyme and microbial biosensors: techniques and protocols*.
- ⁷² MATEO, C., PALOMO, JM., FERNANDEZ-LORENTE, G., GUISAN, JM., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. (2007) Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb. Technol.* (40) 1451–63.
- ⁷³ MINTEER, SD. (2011) *Enzyme stabilization and immobilization: methods and protocols*. Methods in molecular biology Humana Press.
- ⁷⁴ NJAGI, J., ANDREESCU, S. (2007) Stable enzyme biosensors based on chemically synthesized Aupolypyrrole nanocomposites. *Biosens. Bioelectron.* (23) 168–75.
- ⁷⁵ SHAN, D., WANG, S., HE, Y., XUE, H. (2008) Amperometric glucose biosensor based on in situ electropolymerized polyaniline/poly(acrylonitrile-co-acrylic acid) composite film. *Mat. Sci. Eng.* (28) 213–7.
- ⁷⁶ ZHU, L., YANG, R., ZHAI, J., TIAN, C. (2007) Bienzymatic glucose biosensor based on co-immobilization of peroxidase and glucose oxidase on a carbon nanotubes electrode. *Biosens. Bioelectron.* (23) 528–35.
- ⁷⁷ HANKO, M., BRUNS, N., TILLER, J.C., HEINZE, J. (2006) Optical biochemical sensor for determining hydroperoxides in nonpolar organic liquids as archetype for sensors consisting of amphiphilic conetworks as immobilisation matrices. *Anal Bioanal. Chem.* (386) 1273–83.
- ⁷⁸ VALDES-RAMIREZ, G., CORTINA, M., RAMIREZ-SILVA, M., MARTY, J. (2008) Acetylcholinesterase-based biosensors for quantification of carbofuran, carbaryl, methylparaoxon, and dichlorvos in 5% acetonitrile. *Anal. Bioanal. Chem.* (392) 699–707.
- ⁷⁹ NOORBAKHS, A., SALIMI, A., SHARIFI, E. (2008) Fabrication of glucose biosensor based on encapsulation of glucose-oxidase on sol-gel composite at the surface of glassy carbon electrode modified with carbon nanotubes and Celestine blue. *Electroanal.* (20) 1788–97.
- ⁸⁰ AZMI, NE., AHMAD, M., ABDULLAH, J., SIDEK, H., HENG, LY., KARUPPIAH, N. (2009) Biosensor based on glutamate dehydrogenase immobilized in chitosan for the determination of ammonium in water samples. *Anal. Biochem.* (388) 28–32.
- ⁸¹ FRITZEN, GARCIA, MB., OLIVEIRA, IRWZ., ZANETTI-RAMOS, BG., FATIBELLO-FILHO, O., SOLDI, V., PASA, AA. et al. (2009) Carbon paste electrode modified with pine kernel peroxidase immobilized on pegylated polyurethane nanoparticles. *Sens. Actuators B Chem.* (139) 570–5.
- ⁸² BONNET, C., ANDRESCU, S., MARTY, JL. (2003) Adsorption: an easy and efficient immobilisation of acetylcholinesterase on screen-printed electrodes. *Anal. Chim. Acta* (481) 209–11.
- ⁸³ ZHAO, W., XU, J-J., CHEN, H-Y. (2006) Electrochemical biosensors based on layer-by-layer assemblies. *Electroanal.* (18) 1737–48.

- ⁸⁴ ZHANG, J., SHAN, D., MU, SL. (2007) Improvement in selectivity and storage stability of a choline biosensor fabricated from poly(aniline-co-o-aminophenol). *Front Biosci.* (12) 783–90.
- ⁸⁵ SASSOLAS, A., BLUM, LJ., LECA-BOUVIER, BD. (2009) New electrochemiluminescent biosensors combining poly(luminol) and an enzymatic matrix. *Anal. Bioanal. Chem.* (394) 971–80.
- ⁸⁶ KONG, T., CHEN, Y., YE, Y., ZHANG, K., WANG, Z., WANG, X. (2009) An amperometric glucose biosensor based on the immobilization of glucose oxidase on the ZnO nanotubes. *Sens. Actuators. B Chem.* (138) 344–50.
- ⁸⁷ PEREIRA, A., AGUIAR, M., KISNER, A., MARCEDO, D., KUBOTA, L. (2007) Amperometric biosensor for lactate based on lactate dehydrogenase and Meldola blue coimmobilized on multi-wall carbon-nanotube. *Sens. Actuators B Chem.* (124) 269–76.
- ⁸⁸ CAO, L. (2005) Carrier-bound immobilized enzymes — principles, applications and design. Wiley-VCH.
- ⁸⁹ CHOI, MMF. (2004) Progress in enzyme-based biosensors using optical transducers. *Microchim. Acta* (148) 107–32.
- ⁹⁰ HERMANSON, GT., MALLIA, AK., SMITH, PK. (1992) Immobilized affinity ligand techniques. San Diego: Academic Press.
- ⁹¹ DELVAX, M., DEMOUSTIER, -CHAMPAGNE, S. (2003) Immobilisation of glucose oxidase within metallic nanotubes arrays for application to enzyme biosensors. *Biosens. Bioelectron.* (18) 943–51.
- ⁹² FERREIRA, L., RAMOS, M., DORDICK, J., GIL, M. (2003) Influence of different silica derivatives in the immobilization and stabilization of a *Bacillus licheniformis* protease (Subtilisin Carlsberg). *J. Mol. Catalysis B* (21) 189–99.
- ⁹³ TUMTURK, H., AKSOY, S., HASIRCI, N. (1995) Covalent immobilization of alpha-amylase onto poly(methyl methacrylate-2-hydroxyethyl methacrylate) microspheres and the effect of Ca²⁺ ions on the enzyme activity. *Starch-Starke* (51) 211–7.
- ⁹⁴ TUMTURK, H., AKSOY, S., HASIRCI, N. (2000) Covalent immobilization of alpha-amylase onto poly(2-hydroxyethyl methacrylate) and poly(styrene-2-hydroxyethyl methacrylate) microspheres and the effect of Ca²⁺ ions on the enzyme activity. *Food Chem.* (68) 259–66.
- ⁹⁵ PETRI, A., GAMBICORTI, T., SALVADORI, P. (2004) Covalent immobilization of chloroperoxidase on silica gel and properties of the immobilized biocatalyst. *J. Mol. Catalysis B* (27) 103–6.
- ⁹⁶ WILHECK, M., MIRON, T. (2003) Oriented versus random protein immobilization. *J. Biochem. Biophys. Methods* (55) 67–70.
- ⁹⁷ MORENO, J., ARROYO, M., HEMAIZ, M., SINISTERRA, J. (1997) Covalent immobilization of pure isoenzymes from lipase of *Candida rugosa*. *Enz. Microb. Technol.* (21) 552–8.
- ⁹⁸ BHATIA, S., COONEY, M., SHRIVERLAKE, L., FARE, T., LIGLER, F. (1991) Immobilization of acetylcholinesterase on solid surfaces: chemistry and activity studies. *Sens. Actuators B* (3) 311–7.
- ⁹⁹ MORENO, J., ARROYO, M., HEMAIZ, M., SINISTERRA, J. (1997) Covalent immobilization of pure isoenzymes from lipase of *Candida rugosa*. *Enz. Microb. Technol.* (21) 552–8.
- ¹⁰⁰ DELVAUX, M., DEMUSTIER-CHAMPAGNE, S. (2003) Immobilisation of glucose oxidase within metallic nanotubes arrays for application to enzyme biosensors. *Biosens. Bioelectron.* (18) 943–51.

- ¹⁰¹ COULET, PR., JULLIARD, JH., GAUTHERON, DC. (1974) A mild method of general use for covalent coupling of enzymes to chemically activated collagen films. *Biotechnol. Bioeng.* (16) 1055–68.
- ¹⁰² HERMANSON, GT., MALLIA, AK., SMITH, PK. (1992) *Immobilized affinity ligand techniques*. San Diego: Academic Press.
- ¹⁰³ WU, H., OLIER, R., JAFFREZIC-RENAULT, N., CLECHET, P., NYAMSI, A., MARTELET, C. (1994) Covalent immobilization of glucose oxidase onto graphitic electrodes. *Electrochimica Acta* (39) 327–31.
- ¹⁰⁴ MCRIPLEY, MA., LINSSENMEIER, RA. (1996) Fabrication of a mediated glucose oxidase recessed microelectrode for the amperometric determination of glucose. *J. Electroanal. Chem.* (414) 235–46.
- ¹⁰⁵ ANDREESCU, S., MARTY, JL. (2006) Twenty years research in cholinesterase biosensors: from basic research to practical applications. *Biomol. Eng.* (23) 1-15.
- ¹⁰⁶ NILSSON, J., STAHL, S., LUNDEBERG, J., UHLÉN, M., NYGEREN, P-A. (1997) Affinity fusion strategies for detection, purification, and immobilization of recombinant proteins. *Protein Expr. Purif.* (11) 1-16.
- ¹⁰⁷ ZHANG, J., CASS, AEG. (2000) Electrochemical analysis of immobilised chemical and genetic biotinylated alkaline phosphatase. *Anal. Chim. Acta* (408) 241–7.
- ¹⁰⁸ HALLIWELL, CM., SIMON, E., TOTH, CS., BARTLETT, PN., CASS, AEG. (2002) Immobilisation of lactate dehydrogenase on poly(aniline)-poly(acrylate) and poly(aniline)-poly-(vinyl sulphonate) films for use in a lactate biosensor. *Anal. Chim. Acta* (453) 191–200.
- ¹⁰⁹ KURIYAMA, S., RECHNITZ, G. A. (1981) Plant tissue-based bioselective membrane electrode for glutamate. *Anal. Chim. Acta* 131, 91-96.
- ¹¹⁰ ÓRI, ZS., KISS, A., CIUCU, A., MIHAILCIUC, C., STEFANESCU, C., D., NAGY, L., NAGY, G. (2014) Sensitivity enhancement of a “bananatrode” biosensor for dopamine based on SECM studies inside its reaction layer. *Sensors and Actuators B* 190, 149– 156.
- ¹¹¹ EGGINS, B., R. (1994) *Proceedings of Conference on Analytical Advances in the Biosciences*, University of Ulster, 1994 Jun. 23-24., 16.
- ¹¹² MA, Y.,L., RECHNITZ, G., A. (1985) Porcine Kidney Tissue Based Membrane Electrode for Glucosamine-6-Phosphate. *Anal. Biochem. and Clin. Anal.* 18 (13) 1635-1646.
- ¹¹³ ARNOLD, M., A., RECHNITZ, G. A. (1981) Selectivity enhancement of a tissue-based adenosine-sensing membrane electrode. *Anal. Chem.* 53 (3) 515-518.
- ¹¹⁴ Arnold, M., A. (1982) *Tissue-Based Biocatalytic Membrane Electrodes*. Diplomamunka, University of Delaware
- ¹¹⁵ KOBOS, R.K. (1980) Potentiometric enzyme methods. In “*Ion-Selective Electrodes in Analytical Chemistry*” (H. Freiser, ed.) Vol. II., Plenum Press, New York, 1-84.
- ¹¹⁶ SIDWELL, J.S., RECHNITZ, G.,A. (1985) “Banatrode” — An electrochemical biosensor for dopamine. *Biotechnol. Lett.* 7, 419–422.
- ¹¹⁷ MAZZEI, F., BOTRE, F., LANZI, M., LORENTI, G., PORCELLI, F., BOTRÉ, C. (1992) Plant metabolism as an analytical tool: some applications of plant tissue electrodes for the selective determination of catecholamines. *Sens. Actuators B Chem.* 7 (1-3) 427–430.

- ¹¹⁸ BOTÉ, F., MAZZEI, F., LANZI, M., LORENTI, G., BOTRÉ, C. (1991) Plant-tissue electrode for the determination of catechol. *Anal. Chim. Acta* 255 (1) 59–62.
- ¹¹⁹ WANG, J., LIN, M., S. (1988) Mixed plant tissue-carbon paste bioelectrode. *Anal. Chem.* 60, 1545–1548.
- ¹²⁰ CHEN, Y., TAN, T., C. (1995) Dopamine-sensing efficacy and characteristics of pretreated plant tissue powder sensors. *Sensors and Actuators B Chem.* 28 (1) 39-48.
- ¹²¹ FATIBELLO-FILHO, O., OMURO LUPETTI, K., VIEIRA, I., C. (2001) Chronoamperometric determination of paracetamol using an avocado tissue (*Persea americana*) biosensor. *Talanta* 55 (4) 685-692.
- ¹²² FERNANDES, S., C., DE OLIVEIRA, I., R., W., Z., VIEIRA, I., C. (2007) A green bean homogenate immobilized on chemically crosslinked chitin for determination of caffeic acid in white wine. *Enzyme Microb. Tech.* 40 (4) 661–668.
- ¹²³ KOZAN, J., V., B., SILVA, R., P., SERRANO, S., H., P., LIMA, A., W., O., ANGNES, L. (2007) Biosensing hydrogen peroxide utilizing carbon paste electrodes containing peroxidases naturally immobilized on coconut (*Cocos nucifera* L.) fibers. *Anal. Chim. Acta* 591, 200–207.
- ¹²⁴ CAMPANELLA L., CORDATORE, M., MAZZEI, F., TOMASSETTI, M. (1990) Determination of inorganic phosphate in drug formulations and biological fluids using a plant tissue electrode. *Pharmaceut. Biomed. Anal.* 8 (8-12) 711–716.
- ¹²⁵ CAMPANELLA, L., CORDATORE, M., MAZZEIA, F., TOMASETTI, M., VOLPE., G. (1992) Phosphate determination in foodstuffs using a plant tissue electrode. *Food Chem.* 44 (4) 291–297.
- ¹²⁶ QIN, W., ZHANG, Z., J., PENG, Y., Y. (2000) Plant tissue-based chemiluminescence flow biosensor for urea. *Anal. Chim. Acta* 407, 81–86.
- ¹²⁷ SEZGINTÜRK, M., K., DINCKAYA, E. (2003) A novel amperometric biosensor based on spinach (*Spinacia oleracea*) tissue homogenate for urinary oxalate determination. *Talanta* 59, 545–551.
- ¹²⁸ SEZGINTÜRK, M., K., DINCKAYA, E. (2004) An amperometric inhibitor biosensor for the determination of reduced glutathione (GSH) without any derivatization in some plants. *Biosensors and Bioelectronics* 19 (8) 835–841.
- ¹²⁹ HE, G., RECHNITZ, G., A. (1995) Plant tissue-based pyruvate fiberoptic sensor. *Anal. Chim. Acta* 316 (1) 57–63.
- ¹³⁰ BOTRÉ, F., BOTRÉ, C., LORENTI, G., MAZZEI, F., PORCELLI, F., SCIBONA, G. (1993) Plant tissue biosensors for the determination of biogenic diamines and of their amino acid precursors: effect of carbonic anhydrase. *Sensors and Actuators B Chem.* 15 (1-3) 135–140.
- ¹³¹ MEI, Y., RAN, L., YING, X., YUAN, Z., XIN, S. (2007) A sequential injection analysis/chemiluminescent plant tissue-based biosensor system for the determination of diamine. *Biosensors and Bioelectronics* 22: 871-876.
- ¹³² HORIE, H., RECHNITZ, G., A. (1995) Hybrid tissue/enzyme biosensor for pectin. *Analytica Chmica Acta* 306 (1) 123-127.
- ¹³³ LIAWRUNGRATH, S., PURACHAT, P., OUNGPIPAT, W., DONGDUEN, C. (2008) Sunflower leaves tissue-based bioelectrode with amperometric flow-injection system for glycolic acid determination in urine. *Talanta* 77 (2) 500-506.
- ¹³⁴ ZHU, L., LI, Y., ZHU, G. (2004) A novel renewable plant tissue-based electrochemiluminescent biosensor for glycolic acid *Sensors and Actuators B Chem.* 98 (2-3) 115–121.

- ¹³⁵ ÜNAL, M. Ü. (2007) Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana (*Musa cavendishii*). *Food Chem.* 100, 909–913.
- ¹³⁶ KRUSTOLVIC, A. M. (1979) The current state of the art in the analysis of catecholamines. *Adv. cromatogr.* 17, 279-309.
- ¹³⁷ EGGINS, B., R., HICKEY, C., TOFT, S., A., ZHOU, D., M. (1997) Determination of flavonols in beers with tissue biosensors. *Anal. Chim. Acta* 347, 281–288.
- ¹³⁸ CUMMINGS, E., A., MAILLEY, P., LINQUETTE-MAILLEY, S., EGGINS, B., R., MCADAMS, E., T., MCPADDEN, S. (1998) Amperometric carbon paste biosensor based on plant tissue for the determination of total flavonol content in beers. *Analyst* 123 (10) 1975-1980.
- ¹³⁹ SAKAMURA, S., SHIBUSA, S., OBATAS, Y. (1966) Separation of a Polyphenol Oxidase for Anthocyanin-Degradation in Eggplant. *J. Food. Sci.* 31 (3) 317.
- ¹⁴⁰ PALMER, J., K. (1963) Banana Polyphenoloxidase. Preparation and Properties. *Plant Physiol.* 38 (5) 508-513.
- ¹⁴¹ KNAPP, F., W. (1965) Some Characteristics of Eggplant and Avocado Polyphenolases. *J. Food Sci.* 30 (6) 930.
- ¹⁴² NAVARATNE, A., LIN, M., S., RECHNITZ, G., A. (1990) Eggplant-based bioamperometric sensor for the detection of catechol. *Anal. Chim. Acta* 237, 107–113.
- ¹⁴³ LIMA, A., W., O., NASCIMENTO, V. B., PEDROTTI, J., J., ANGNES, L. (1997) Coconut-based plant tissue reactor for biosensing of catechol in flow injection analysis. *Anal. Chim. Acta* 354 (1-3) 325-331.
- ¹⁴⁴ FELIX, F., S., YAMASHITA, M., ANGNES, L. (2006) Epinephrine quantification in pharmaceutical formulations utilizing plant tissue biosensors. *Biosensors and Bioelectronics.* 21 (12) 2283-2289.
- ¹⁴⁵ BEZERRA, V., S., DE-LIMA-FILHO, J., L., MONTENEGRO, M., C., B., S., M., ARAUJO, A., N., DA-SILVA, V., L. (2003) Flow-injection amperometric determination of dopamine in pharmaceuticals using a polyphenol oxidase biosensor obtained from soursop pulp. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33 (5) 1025-31.
- ¹⁴⁶ MAZZEI, F., BOTRÉ, F., LORENTIA, G., SIMONETTIA, G., PORCELLI, F., SCIBONA, G., BOTRÉ, C. (1995) Plant tissue electrode for the determination of atrazine. *Anal Chim Acta* 316 (1) 79-82.
- ¹⁴⁷ DESHPANDE, M., V., HALL, E., A., H. (1990) An electrochemically grown polymer as an immobilisation matrix for whole cells: application in an amperometric dopamine sensor. *Biosensors and Bioelectronics* 5, 431-448.
- ¹⁴⁸ NAVARATNE, A., RECHNITZ, G., A. (1992) Improved plant tissue-based biosensor using in vitro cultured tobacco callus tissue. *Anal. Chim. Acta* 257 (1) 59-66.
- ¹⁴⁹ ARNOLD, M., A., RECHNITZ, G., A. (1987) Biosensors Based on Plant and Animal Tissue. *Biosensors Fundamentals and Applications*, Oxford University Press, Oxford. 3.fejezet, 30–59.
- ¹⁵⁰ CHEN, Y., TAN, T., C. (1995) Dopamine sensing and selectivity of Nafion-coated plant tissue powder sensors. *Talanta* 42 (8) 1181–1188.
- ¹⁵¹ CHEN, Y., TAN, T., C. (1994) Selectivity enhancement of an immobilized apple powder enzymatic sensor for dopamine. *Biosensors and Bioelectronics.* 9 (6) 401–410.
- ¹⁵² BARD, A., J., FAN, F., R., F., KWAK, J., LEV, O. (1989) Scanning electrochemical microscopy. Introduction and principles. *Anal. Chem.* 61 (2) 132–138.

- ¹⁵³ KWAK, A., J., BARD, A., J. (1989) Scanning electrochemical microscopy. Theory of the feedback mode. *Anal. Chem.* 61 (11) 1221-1227.
- ¹⁵⁴ ENGSTRÖM, R., C., PHARR, C., M. (1989) Scanning Electrochemical Microscopy. *Anal. Chem.* 61 (19) 1099A-1104.
- ¹⁵⁵ CSÓKA, B. (2004) Bioszenzorok reakciórétegének vizsgálata pásztázó elektrokémiai mikroszkópiás mérés technikával. Doktori (PhD) értekezés, Pécsi Tudományegyetem
- ¹⁵⁶ BARD, A., J., FAN, F., R., MIRKIN, M., V. (1994) In *Electroanalytical Chemistry: A Series of Advances*. Marcel Dekker: New York 18, 243.
- ¹⁵⁷ MIRKIN, M., V. (1999) High-Resolution Studies of Heterogeneous Processes with the Scanning Electrochemical Microscope. *Mikrochim Acta* 130 (3) 127-153.
- ¹⁵⁸ NAGY, G., NAGY, L. (2000) Scanning electrochemical microscopy: a new way of making electrochemical experiments. *Fresenius J. Anal. Chem.* 366 (6-7) 735-744.
- ¹⁵⁹ WAIN, A., J. (2014) Scanning electrochemical microscopy for combinatorial screening applications: A mini-review. *Electrochemistry Communications*. 46, 9-12.
- ¹⁶⁰ KRANZ, C. (2014) Recent advancements in nanoelectrodes and nanopipettes used in combined scanning electrochemical microscopy techniques. 139 (2) 336-352.
- ¹⁶¹ BARD, A., J., MIRKIN, M., V. (Eds.) (2012) *Scanning Electrochemical Microscopy*, CRC Press, Boca Raton/ London/ New York.
- ¹⁶² HORROCKS, B., R., MIRKIN, M., V. (1998) Evidence for a potential-dependent reversible inactivation of urease adsorbed on a gold electrode. *Journal of Chemical Society, Faraday Trans.* 94 (8) 1115-1118.
- ¹⁶³ WITTSTOCK, G., SCHUMANN, W. (1997) Formation and Imaging of Microscopic Enzymatically Active Spots on an Alkanethiolate-Covered Gold Electrode by Scanning Electrochemical Microscopy. *Anal. Chem.* 69 (24) 5059–5066.
- ¹⁶⁴ PIERCE, D., T., UNWIN, P., R., BARD, A., J. (1992). Scanning Electrochemical Microscopy .17. Studies of Enzyme Mediator Kinetics for Membrane-Immobilized and Surface-Immobilized Glucose-Oxidase. *Anal Chem* 64(17) 1795-1804.
- ¹⁶⁵ CSOKA, B., KOVACS, B., NAGY, G. (2003). Investigation of concentration profiles inside operating biocatalytic sensors with scanning electrochemical microscopy (SECM). *Biosensors and Bioelectronics* 18 (2-3) 141-149.
- ¹⁶⁶ OLIVEIRA, E., M., BEYER, S., HEINZE, J. (2007) SECM characterization of immobilised enzymes by self-assembled monolayers on titanium dioxide surfaces. *Bioelectrochemistry*. 71, 186–191.
- ¹⁶⁷ HUSSEIN, E., M., ERICHSEN, T., SCHUHMANN, W., MACIEJEWSKA, M. (2008) SECM visualization of the spatial variability of enzyme-polymer spots. 3. Enzymatic feedback mode. *Anal. Bioanal. Chem.* 391, 1773–1782.
- ¹⁶⁸ LIN, T., E., CORTÉS-SALAZAR, F., LESCH, A., QIAO, L., BONDARENKO, A., GIRAULT, H., H. (2015) Multiple scanning electrochemical microscopy mapping of tyrosinase in micro-contact printed fruit samples on polyvinylidene fluoride membrane. *Electrochim. Acta* 179, 57-64.

- ¹⁶⁹ PRIBIL, M., CORTÉS-SALAZAR, F., ANDREJEV, E., A., LESCH, A., KARYAKINA, E., E., VORONIN, O., G., GIRAULT, H., H., KARYAKIN, A., A. (2014) Rapid optimization of a lactate biosensor design using soft probes scanning electrochemical microscopy. *J. of Electroanal. Chem.* 731, 112-118.
- ¹⁷⁰ SCHELLER, F., RENNEBERG, R. (1983) Glucose-eliminating enzyme electrode for direct sucrose determination in glucose-containing samples. *Anal. Chim. Acta* 152 (1) 265-9.
- ¹⁷¹ CSOKA, B., KOVACS, B., and Nagy, G. (2003) Scanning electrochemical microscopy inside the biocatalytic layer of biosensors, investigation of a double function complex multienzyme reaction layer. *Electroanalysis* 15 (15-16) 1335-1342.
- ¹⁷² O'NEILL, R., D., LOWRY, J., P., MAS, M. (1998) Monitoring Brain Chemistry In Vivo: Voltammetric Techniques, Sensors, and Behavioral Applications *Crit. Rev. Neurobiol.* 12 (1-2) 69-127.
- ¹⁷³ WIGHTMAN, R., M., STROPE, E., PLOTSKY, P., ADAMS, R., N. (1978) In vivo voltammetry: Monitoring of dopamine metabolites in CSF following release by electrical stimulation. *Brain. Res.* 159 (1) 55-68.
- ¹⁷⁴ GARRIS, P., A., CHRISTENSEN, J., R., C., REBEC, G., V., WIGHTMAN, R., M. (1997) Real-Time Measurement of Electrically Evoked Extracellular Dopamine in the Striatum of Freely Moving Rats. *J Neurochem.* 68 (1) 152-161.
- ¹⁷⁵ ADAMS, R., N. (1976) Probing brain chemistry with electroanalytical techniques. *Anal. Chem.* 48 (14) 1128A-1138A.
- ¹⁷⁶ JOHNSON, M., A. (2013) In vivo electrochemical measurements: past, present and future. *Bioanalysis* 5 (2) 119-122.
- ¹⁷⁷ COX, J., A., ALBER, K., S., TESS, M., E., CUMMINGS, T., E., GORSKI, W. (1995) Voltammetry in the absence of a solution phase with solids prepared by a sol-gel process as the electrolytes: facilitation of an electrocatalytic anodic process in the presence of ammonia. *J. Electroanal. Chem.* 396 (1-2) 485-490.
- ¹⁷⁸ HO, H., L., DRYFE, R., A. (2009) Transport of neutral and ionic solutes: the gel/electrode and gel/electrolyte interfaces. *Langmuir* 25 (21) 12757-12765.
- ¹⁷⁹ AMEMIYA, S., BARD, A., J., FAN, F., R., MIRKIN, M., V., UNWIN, P., R. (2008) Scanning electrochemical microscopy. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)* 1, 95-131.
- ¹⁸⁰ NICHOLSON, C. (2001) Diffusion and related transport mechanisms in brain tissue. *Rep. Progr. Phys.* 64, 815-884.
- ¹⁸¹ HRABE, J., HRABETOVA, S., SEGETH, K. (2004) A Model of Effective Diffusion and Tortuosity in the Extracellular Space of the Brain. *Biophys J.* 87 (3) 1606-1617.
- ¹⁸² KISS, L., Óri, ZS., NAGY, L., KOVÁCS, B., NAGY, G. (2013) Voltammetric concentration measurements in diffusion-hindered media. *J. Solid. State Electrochem.* 17 (12), 3039-3045.
- ¹⁸³ EPSTEIN, N. (1989) On tortuosity and the tortuosity factor in flow and diffusion through porous media. *Chem. Eng. Sci.* ISSN 0009-2509 (44) 777-779.
- ¹⁸⁴ SHEN, L., CHEN, Z. (2007) Critical review of the impact of tortuosity on diffusion. *Chem. Eng. Sci.* 62 (14) 3748-3755.
- ¹⁸⁵ ASSAF, Y., BASSER, P., J. (2005) Composite hindered and restricted model of diffusion (CHARMED) MR imaging of the human brain. *NeuroImage* 27 (1) 48-58.

- ¹⁸⁶ ARMATAS, G., S. (2006) Determination of the effects of the pore size distribution and pore connectivity distribution on the pore tortuosity and diffusive transport in model porous networks. *Chem. Eng. Sci.* 61 (14) 4662-4675.
- ¹⁸⁷ DASGUPTA, R., ROY, S., TARAFDAR, S. (2000) Correlation between porosity, conductivity and permeability of sedimentary rocks — a ballistic deposition model *Physica A* 275 (1-2) 22-32.
- ¹⁸⁸ MAERKI, M., WEHRLI, B., DINKEL, C., MÜLLER, B. (2004) The influence of tortuosity on molecular diffusion in freshwater sediments of high porosity. *Geochim Cosmochim A* 68 (7) 1519-1528.
- ¹⁸⁹ CORWIN, D., L. (1986) A One-dimensional Model of Chemical Diffusion and Sorption in Saturated Soil and Aquatic Systems. *J. Environ. Qual.* 15 (2) 173-182.
- ¹⁹⁰ TAO, L., NICHOLSON, C. (2004) Maximum geometrical hindrance to diffusion in brain extracellular space surrounding uniformly spaced convex cells. *Journal of Theoretical Biology* 229 (1) 59-68.
- ¹⁹¹ MATHIAS, R., T. (1983) Effect of tortuous extracellular pathways on resistance measurements. *Biophys J.* 42 (1) 55-59.
- ¹⁹² EL-KAREH, A., W., BRAUNSTEIN, S., L., SECOMB, T., W. (1993) Effect of cell arrangement and interstitial volume fraction on the diffusivity of monoclonal antibodies in tissue. *Biophys J.* 64 (5) 1638-1646.
- ¹⁹³ PATLAK, C., S., HOSPOD, F., E., TROWBRIDGE, S., D., NEWMAN, G., C. (1998) Diffusion of Radiotracers in Normal and Ischemic Brain Slices. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 18 (7) 776-802.
- ¹⁹⁴ HRABETOVÁ, S., NICHOLSON, C. (2000) Dextran Decreases Extracellular Tortuosity in Thick-Slice Ischemia Model. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 20, 1306-1310.
- ¹⁹⁵ NOVAK, U., KAYE, A., H. (2000) Extracellular matrix and the brain: components and function. *J. Clin. Neurosci.*, 2000, 7 (4) 280-290.
- ¹⁹⁶ NAGY, G., MOGHADDAM, B., OKE, A., ADAMS, R., N. (1985) Simultaneous monitoring of voltammetric and ion-selective electrodes in mammalian brain. *Neurosci. Lett.* 55 (2) 119-124.
- ¹⁹⁷ GERHARDT, G., A., OKE, A., F., NAGY, G., MOGHADDAM, B., ADAMS, R., N. (1984) Nafion-coated electrodes with high selectivity for CNS electrochemistry. *Brain Res.* 290 (2) 390-395.
- ¹⁹⁸ HERR, N., R., PARK, J., MCELLIGOTT, Z., A., BELLE, A., M., CARELLI, R., M., WIGHTMAN, R., M. (2012) In vivo voltammetry monitoring of electrically evoked extracellular norepinephrine in subregions of the bed nucleus of the stria terminalis. *AJP - JN Physiol* 107(6):1731–1737.
- ¹⁹⁹ ZACHHEK, M., K., HERMANS, A., WIGHTMAN, R., M., MCCARTY, G., S. (2008) Electrochemical dopamine detection: comparing gold and carbon fiber microelectrodes using background subtracted fast scan cyclic voltammetry. *J. Electroanal. Chem.* 614, 113–120.
- ²⁰⁰ BEKER, B., Y., SÖNMEZOĞLU, I., IMER, F., APAK, R. (2011) Protection of ascorbic acid from copper(II)-catalyzed oxidative degradation in the presence of flavonoids: quercetin, catechin and morin. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 62(5), 504-512.
- ²⁰¹ POPA, C., V., DANET, A., F., JIPA, S., ZAHARESCU, T. (2012) Determination of Total Antioxidant Capacity of Some Fruit Juices and Noncarbonated Soft Drinks by a FIA-CL Method. *Rev. Chim-Bucharest* 63 (10) 978-983.

- ²⁰² HSU, P., F., CIOU, W., CHEN, P., Y. (2008) Voltammetric study of polyviologen and the application of polyviologen-modified glassy carbon electrode in amperometric detection of vitamin C. *J. Appl. Electrochem.*, 38, 1285-92.
- ²⁰³ SKOOG, D., A., WEST, D., M., HOLLER, F., J. (1998) *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 7th ed. Saunder College publishing, Philadelphia 845.
- ²⁰⁴ BOROWSKI, J., SZAJDEK, A., BOROWSKA, E., J., CISKA, E., ZIELINSKI, H. (2008) Content of selected bioactive components and antioxidant properties of broccoli (*Brassica oleracea* L.)*Eur. Food Res. Technol.* 226, 459-465.
- ²⁰⁵ RODRIGUEZ-COMESANA, M., GARCIA-FALCON, M., S., SIMAL-GÁNDARA, J. (2002) Control of nutritional labels in beverages with added vitamins: screening of β -carotene and ascorbic acid contents. *Food Chem.* 79 (2) 141-44.
- ²⁰⁶ VERMEIER, S., HERTOOG, M., L., A., T., M., SCHENK, A., BEULLENS, K., NICOLAI, B., M., LAMMERTYN, J. (2008) Evaluation and optimization of high-throughput enzymatic assays for fast l-ascorbic acid quantification in fruit and vegetables. *Anal. Chim. Acta*, 618, 94-101.
- ²⁰⁷ GÜCLÜ, K., SÖZGEN, K., TÜTEM, E., ÖZYÜREK, M., APAK, R. (2005) Spectrophotometric determination of ascorbic acid using copper(II)-neocuproine reagent in beverages and pharmaceuticals. *Talanta* 65 (5) 1226–1232.
- ²⁰⁸ PISOSCHI, A., M., ANDREEA, A., P., SERBAN, I., FAFANEATA, C. (2014) Electrochemical methods for ascorbic acid determination. *Electrochim. Acta* 121, 443-460.
- ²⁰⁹ ADAMS, R., N. (1976) Probing brain chemistry with electroanalytical techniques. *Anal Chem.* 48 (18) 1126A-1138A.
- ²¹⁰ PISOSCHI, A., M., POP, A., NEGULESCU, G., P., PISOSCHI, A. (2011) Determination of Ascorbic Acid Content of Some Fruit Juices and Wine by Voltammetry Performed at Pt and Carbon Paste Electrodes. *Molecules* 16 (2) 1349-1365.
- ²¹¹ YILMAZ, S., SADIKOGLU, M., SAGLIKOGLU, G., YAGMUR, S., ASKIN, G. (2008) Determination of Ascorbic Acid in Tablet Dosage Forms and Some Fruit Juices by DPV. *Int. J. Electrochem Sci.* 3, 1534-42.
- ²¹² OKIEI, W., O., OGUNLESI, M., AZEEZ, L., OBAKACHI, V., OSUNSANMI, M., NKENCHOR, G. (2009) The voltammetric and titrimetric determination of ascorbic acid levels in tropical fruit samples. *Int. J. Electrochem. Sci.* 4, 276.
- ²¹³ TÜRKE, A., FISCHER, W., J., BEAUMONT, N., KILMARTIN, P., A. (2012) Electrochemistry of sulfur dioxide, polyphenols and ascorbic acid at poly(3,4-ethylenedioxythiophene) modified electrodes. *Electrochim Acta* 60 (0) 184-192.
- ²¹⁴ KILMARTIN, P., A., MARTINEZ, A., BARTLETT, P., N. (2008) Polyaniline-based microelectrodes for sensing ascorbic acid in beverages. *Curr. Appl. Phys.* 8 (3-4) 320-24.
- ²¹⁵ FUENMAYOR, C., E., BENEDETTI, S., PELLICANO, A., COSIO, M., S., MANNINO, S. (2014) Direct In Situ Determination of Ascorbic Acid in Fruits by Screen-Printed Carbon Electrodes Modified with Nylon-6 Nanofibers. *Electroanalysis* 26 (4) 704-710.
- ²¹⁶ NAGY, L., (2008) Gyakorlati problémák megoldására alkalmas szelektív kémiai szenzorok és módszerek fejlesztése. Doktori (PhD) értekezés, Pécsi Tudományegyetem
- ²¹⁷ FEDOROWSKI, J., LACOURSE, W., R. (2015) A review of pulsed electrochemical detection following liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Anal. Chim. Acta* 861, 1-11.

- ²¹⁸ HAMMET, L., P. (1924) The velocity of the hydrogen electrode reaction on platinum catalysts. *J. Am. Chem. Soc.* 46 (1) 7-19.
- ²¹⁹ ARMSTRONG, G., HIMSWORTH, F., R., BUTLER, J., A., V., KENDALL, J., P. (1934) The kinetics of electrode processes. –Part III. The behaviour of platinum and gold electrodes in sulphuric acid and alkaline solutions containing oxygen. *Proc. Roy. Soc. London (A)* 143 (848) 89-103.
- ²²⁰ HUGHES, S., MESCHI, P., L., JOHNSON, D., C. (1981) Amperometric detection of simple alcohols in aqueous solutions by application of a triple-pulse potential waveform at platinum electrodes. *Anal. Chim. Acta.* 132, 1–10.
- ²²¹ S. Hughes, D.C. Johnson, (1981) Amperometric detection of simple carbohydrates at platinum electrodes in alkaline solutions by application of a triple-pulse potential waveform. *Anal. Chim. Acta.* 132, 11–22.
- ²²² LACOURSE, W., R., DASENBROCK, C., O. (1998) High performance liquid chromatography-pulsed electrochemical detection for the analysis of antibiotics. *Adv. Chromatogr.* 38, 189–232.
- ²²³ PASKACH, T., J., LIEKER, H., P., REILLY, P., J., THIELECKE, K. (1991) High-performance anion-exchange chromatography of sugars and sugaralcohols on quaternary ammonium resins under alkaline conditions. *Carbohydr. Res.* 215, 1–7.
- ²²⁴ POLTA, J., A., JOHNSON, D., C., MERKEL, K., E. (1985) Liquid chromatographic separation of aminoglycosides with pulsed amperometric detection. *J. Chromatogr.* 324, 407–414.
- ²²⁵ POLTA, J., A., JOHNSON, D., C. (1983) The Direct Electrochemical Detection of Amino Acids at a Platinum Electrode in an Alkaline Chromatographic Effluent. *J. Liq. Chromatogr.* 6 (10) 1727–1743.
- ²²⁶ EDWARDS, P., HAAK, K., K. (1983) A pulsed amperometric detector for ion chromatography. *Am. Lab.* 15 (4) 78–87.
- ²²⁷ POLTA, T., Z., JOHNSON, D., C. (1986) Pulsed amperometric detection of sulfur compounds: Part I. Initial studies of platinum electrodes in alkaline solutions. *J. Electroanal. Chem. and Interf. Electrochem.* 209 (1) 159–169.
- ²²⁸ WILLIAMS, D., G., JOHNSON, D., C. (1992) Pulsed voltammetric detection of arsenic(III) at platinum electrodes in acidic media. *Anal. Chem.* 64 (17) 1785–1789.
- ²²⁹ JOHLL, M., E., WILLIAMS, D., G., JOHNSON, D., C. (1997) Activated pulsed amperometric detection of cysteine at platinum electrodes in acidic media. *Electroanal.* 9 (18) 1397–1402.
- ²³⁰ NEUBERGER, G., G., JOHNSON, D., C. (1988) Pulsed coulometric detection with automatic rejection of background signal in surface-oxide-catalyzed anodic detections at gold electrodes in flow-through cells. *Anal Chem* 60: 2288-2293.
- ²³¹ VANDEBERG, P., J., JOHNSON, D., C. (1993) Pulsed electrochemical detection of cysteine, cystine, methionine, and glutathione at gold electrodes following their separation by liquid chromatography. *Anal. Chem.* 65 (20) 2713–2718.
- ²³² JOHNSON, D., C., DOBBERPUHL, D., ROBERTS, R., VANDEBERG, P. (1993) Pulsed amperometric detection of carbohydrates, amines and sulfur species in ion chromatography —the current state of research. *J. Chromatogr. A* 640 (1-2) 79–96.
- ²³³ VANDEBERG, P., J., JOHNSON, D., C. (1994) Vandeberg, D.C. Johnson, Comparison of pulsed amperometric detection and integrated voltammetric detection for inorganic sulfur compounds in liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta* 290 (3) 317–327.

- ²³⁴ ANDREWS, R., W., KING, R., M. (1990) Selection of potentials for pulsed amperometric detection of carbohydrates at gold electrodes. *Anal. Chem.* 62 (19) 2130–2134.
- ²³⁵ WELCH, L., E., LACOURSE, W., R., MEAD, D., A., JOHNSON, D., C., HU, T. (1989) Comparison of pulsed coulometric detection and potential-sweep-pulsed coulometric detection for underivatized amino acids in liquid chromatography. *Anal. Chem.* 61 (6) 555–559.
- ²³⁶ CATALDI, T., R., I., CAMPA, C., DE BENEDETTO, G., E. (2000) Carbohydrate analysis by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection: The potential is still growing. *J. Anal. Chem.* 368, 739–758.
- ²³⁷ CLARKE, A., P., JANDIK, P., ROCKLIN, R., D., LIU, Y., AVDALOVIC, N. (1997) An Integrated Amperometry Waveform for the Direct, Sensitive Detection of Amino Acids and Amino Sugars Following Anion-Exchange Chromatography. *Analytical Chemistry* 71(14) 2774-2781.
- ²³⁸ SATO, K., LIN, J-Y., TAKEUCHI, T., MIWA, T., SUENAMI, K., TAKEKOSHI, Y., KANNO, S. (2001) Integrated pulsed amperometric detection of glufosinate, bialaphos and glyphosate at gold electrodes in anion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A* 919 (2) 313–320.
- ²³⁹ ROBERTS, R., E., JOHNSON, D., C. (1995) Variation in PED response at a gold microelectrode as a function of waveform parameters when applied to alditols and carbohydrates separated by capillary electrophoresis. *Electroanalysis* 7 (11) 1015–1019.
- ²⁴⁰ JENSEN, M., B., JOHNSON, D., C. (1997) Fast Wave Forms for Pulsed Electrochemical Detection of Glucose by Incorporation of Reductive Desorption of Oxidation Products. *Anal. Chem.* 69 (9) 1776–1781.
- ²⁴¹ ROHRER, J. (2013) Optimal Settings for Pulsed Amperometric Detection of Carbohydrates Using the Dionex ED40 Electrochemical Detector. Application Note Note 21; Thermo Fischer Scientific, Dionex Corp. Sunnyvale, CA, USA.
- ²⁴² WU, Y., MOULTON, S., E., TOO, C., O., WALLACE, G., G., ZHOU, D. (2004) Use of inherently conducting polymers and pulsed amperometry in flow injection analysis to detect oligonucleotides. *Analyst* 129 (7) 585-588.
- ²⁴³ WANG, J.; JIANG, M., FORTES, A., MUKHERJEE, B. (1999) New label-free DNA recognition based on doping nucleic-acid probes within conducting polymer films. *Anal. Chim. Acta* 402, 7–12.
- ²⁴⁴ BARISCI, J., N., HUGHES, D.; MINETT, A., WALLACE, G., G. (1998) Characterisation and analytical use of a polypyrrole electrode containing anti-human serum albumin. *Anal. Chim. Acta* 371, 39–48.
- ²⁴⁵ SADIK, O., A., WALLACE, G., G. (1993) Pulse damperometric detection of proteins using antibody containing conducting polymers. *Analytica Chimica Acta* 279 (2) 209-212.
- ²⁴⁶ TAKÁTSY, A., CSÓKA, B.; NAGY, L., NAGY, G. (2006) Periodically interrupted amperometry at membrane coated electrodes: A simplified pulsed amperometry. *Talanta* 69, 281-285.
- ²⁴⁷ NAGY, L., KÁLMÁN, N., NAGY, G. (2006) Periodically interrupted amperometry. A way of improving analytical performance of membrane coated electrodes. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 69 (1-2) 133–141.
- ²⁴⁸ KNAKE, R., JACQUINOT, P., HODGSON, A., W., E., HAUSER, P., C. (2005) Amperometric sensing in the gas-phase. *Anal. Chim. Acta* 549 (1-2) 1-9.
- ²⁴⁹ CHANG, S., C., STETTER, J., R., CHA, C., S. (1993) Amperometric gas sensors- a review. *Talanta* 40, 461-477.

- ²⁵⁰ CAO, Z., BUTTNER, W., J., STETTER, J., R. (1992) The properties and applications of amperometric gas sensors. *Electroanalysis* 4 (3) 253-266.
- ²⁵¹ BONTEMPELLI, G., COMISSO, N., TONIOLO, R., SCHIAVON, G. (1997) Electroanalytical sensors for nonconducting media based on electrodes supported on perfluorinated ion-exchange membranes. *Electroanalysis* 9 (6) 433-443.
- ²⁵² ALBER, K., S., COX, J., A., KULESZA, P., (1997) J. Solid-state amperometric sensors for gas phase analytes: A review of recent advances. 1997, 9 (2) 97-101.
- ²⁵³ CLARK, L., C. (1956) Monitor and control of blood and tissue oxygen tensions. L.C. Clark, Am. Soc. Artif. Intern. Organs/Trans. 2, 41-48.
- ²⁵⁴ BENCSIK, G., LUKÁCS, ZS., VISY, CS. (2010) Photo-electrochemical sensor for dissolved oxygen, based on a poly(3,4-ethylenedioxythiophene)/iron oxalate hybrid electrode. *Analyst* 135, 375-380.
- ²⁵⁵ WALKER, D. (1990) The Use of the Oxygen Electrode and Fluorescence Probes in Simple Measurements of Photosynthesis. Oxygraphics Ltd., Robert Hill Institute, The University of Sheffield
- ²⁵⁶ RAMAMOORTHY, R., DUTTA, P., K., AKBAR, S., A. (2003) Oxygen sensors: Materials, methods, designs and applications. *Journal of Materials Science*. 38, 4271-4282.
- ²⁵⁷ SUZUKI, H., OZAWA, K., SASAKI, S., KARUBE, I. (1998) A novel thin-film Ag/AgCl anode structure for microfabricated Clark-type oxygen electrodes. *Sensors and Actuators B* 53 (3) 140-146.
- ²⁵⁸ SUZUKI, H., HIRAKAWA, T., SASAKI, S., KARUBE, I. (2000) An integrated module for sensing pO₂, pCO₂, and pH. *Analytical Chimica Acta* 405 (1-2) 57-65.
- ²⁵⁹ KROMMENHOEK, E., E., GARDENIERS, J., G., E., BOMER, J., G., LI, X., OTTENS, M., VAN DEDEM, G., W., K., VAN LEEUWEN, M., VAN GULIK, W., M., VAN DER WIELEN, L., A., M., HEIJNEN, J., J., VAN DEN BERG, A. (2007) Integrated electrochemical sensor array for on-line monitoring of yeast fermentation. *Anal. Chem.* 79 (15) 5567-5573.
- ²⁶⁰ KROMMENHOEK, E., E., VAN LEEUWEN, M., GARDENIERS, H., VAN GULIK, W., M., VAN DEN BERG, A., LI, X., OTTENS, M., VAN DER WIELEN, L., A., M., HEIJNEN, J., J. (2008) Lab-scale fermentation tests of microchip with integrated electrochemical sensors for pH, temperature, dissolved oxygen and viable biomass concentration. *Biotechnology and Bioengineering* 99 (4) 884-892.
- ²⁶¹ *Bioelectrochemistry*. Ed: BARD, A., J., STRATMANN, M., WILSON, G., S. (2002) Wiley, New York 40., 46.
- ²⁶² WU, C., YASUKAWA, T., SHIKU, H., MATSUE, T. (2005) Fabrication of miniature Clark oxygen sensor integrated with microstructure. *Sens. Actuators, B Chem.* 110, 342-349.
- ²⁶³ REVSBECH, N., WARD, D. (1983) Oxygen Microelectrode That Is Insensitive to Medium Chemical Composition: Use in an Acid Microbial Mat Dominated by *Cyanidium caldarium*. *Applied and Environmental Microbiology*. 45, 755-759.
- ²⁶⁴ TIEDJE, J., M., SEXSTONE, A., J., PARKIN, T., B., REVSBECH, N., P. (1984) Anaerobic processes in soil Plant and Soil. 76, 197-212.
- ²⁶⁵ REVSBECH, N., P. (1989) An oxygen microsensor with a guard cathode. *Limnol. Oceanogr.* 34 (2), 474-478.
- ²⁶⁶ KÜHL, M., REVSBECH, N., P. (2001) Biogeochemical microsensors for boundary layer studies. In: BOUDREAU, B., P., JORGENSEN, B., B. (eds.) *The Benthic Boundary Layer*, Oxford University Press, New York 180-210.

- ²⁶⁷ GUST, G., BOOIJ, K., HELDER, W., SUNDBY, W. (1987) On the velocity sensitivity (stirring effect) of polarographic oxygen microelectrodes. *J. Sea Res.* 21 (4) 255-263.
- ²⁶⁸ REVSBECH, N., P. LARSEN, L., H., GUNDERSEN, J., DALSGAARD, T., ULLOA, O., THAMDRUP, B. (2009) Determination of ultra-low oxygen concentrations in oxygen minimum zones by the STOX sensor. *Limnol. Oceanogr. Methods* 7 (5) 371-381.
- ²⁶⁹ BÁNFAI, ZS. (2011) Fenolos vegyületek detektálására alkalmas bioszenzorhoz felhasználható enzimoldat izolálása és jellemzése. Diplomamunka, Pécsi Tudományegyetem 23.
- ²⁷⁰ Enzimatic Assay of Tyrosinase Catechol Oxidase Activity (EC 1.14.18.1)
[https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/General Information/tyrosinase_cat_oxidase_activity.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/General%20Information/tyrosinase_cat_oxidase_activity.pdf) 2020. 07. 01.
- ²⁷¹ KANDESWAMI, C., VAIDYANATHAN, C., S. (1973) Oxidation of Catechol in Plants. *J. Biol. Chem.* 248 (11) 4035-4039.
- ²⁷² CARUSO, S., S., VIEIRA, I., C., FATIBELLO-FILHO, O. (1999) Determination of Epinephrine and Dopamine in Pharmaceutical Formulations Using a Biosensor Based on Carbon Paste Modified with Crude Extract of Cara Root (*Dioscorea bulbifera*). *Analytical Letters* 32 (1), 39-50.
- ²⁷³ FORZANI, E., S., RIVAS, G., A., SOLIS, V., M. (1995) Amperometric determination of dopamine on an enzymatically modified carbon paste electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 382, 33-40.
- ²⁷⁴ YANG, G., J., XU, J., J., WANG, K., CHEN, H.-Y. (2008) Electroanalytic oxidation of dopamine and ascorbic acid on carbon paste electrode modified with nanosized cobalt phthalocyanine particles: Simultaneous determination in the presence of CTAB. *Electroanalysis* 18, 282-290.
- ²⁷⁵ RAOOF, J., B., OJANI, R., NADIMI, S., R. (2005) Voltammetric determination of ascorbic acid and dopamine in the same sample at the surface of a carbon paste electrode modified with polypyrrole/ferrocyanide films. *Electrochim. Acta* 50, 4694-4698.
- ²⁷⁶ NAGY, G., TARCALI, J., JUHÁSZ, G., GRATZL, M., PUNGOR, E. (1986) Analytical problems of different in vivo voltammetric methods used in brain studies. *Mátrafüred, 1st Bioelectroanalytical Symposium.* 95-123.