

SZELEKTÍV KÉMIAI SZENZOROK ÉS MÓDSZEREK FEJLESZTÉSE

Ph.D. értekezés tézisei

Nagy Livia

Témavezető:

Dr. Kollár László
egyetemi tanár

Kémiai Doktori Iskola

A doktori iskola vezetője:

Dr. Kilár Ferenc
egyetemi tanár



Pécsi Tudományegyetem
Természettudományi Kar
Kémia Intézet
Pécs
2008

1. Bevezetés

Az amperometria az elektroanalízis voltammetriás módszereinek sorába tartozik. A legegyszerűbb voltammetriás mérőprogramnak tekinthető. Napjainkig igen nagyszámú, egymástól többé-kevésbé különböző voltammetriás módszer kidolgozására került sor.

Általánosan szólva, a voltammetriás módszerek alkalmazásakor az elektrolízises mérőcellába helyezett munkaelektrodra valamilyen idő-függvény által meghatározott elektródpotenciált adva a cellán átfolyó áram értékét regisztráljuk valamilyen alkalmas adatgyűjtési program szerinti időpillanatokban. A célszerűen meghatározott áramértékek és a mintaoldat koncentrációja közötti függvénykapcsolat alapján jutunk az analitikai információhoz.

A hagyományos amperometriás módszerek esetében állandó elektródpotenciál, esetleg állandó cellafeszültség mellett folyamatosan regisztráljuk az áramot. A cellában jelenlevő elektroaktív anyag koncentrációját a pillanatnyi áramintenzitás és a maradékáram közötti különbség jelzi. A mérőcellában rendszerint intenzív konvekciót idézünk elő az elektród forgatásával, az oldat áramoltatásával vagy keverő alkalmazásával.

Az amperometria kedvezően kis alsó méréshatár elérését tesz lehetővé, azonban az általa biztosított szelektivitás nem kielégítő. Emellett gyakran jelenthet problémát a munkaelektrod felületének, az elektrolízis terméke által előidézett passzíválódása, beszennyeződése.

A műszeres elemzés fejlődésének korai szakaszában az említett hátrányok miatt az amperometriás módszereket elsősorban redoxi titrálások végpontjának indikálására használták. Folk és Badwen a múlt század húszas éveiben jodometriás titrálások esetében jól használható „új típusú elektrometriás” módszerről számolt be.

A jól ismert, két egyforma elektródot használó biamperometriás, „dead stop” technikáról Stock közöl tanulmányt, a módszert ekkor már amperometriás titrálásnak nevezve. John.T. Stock (1911-2005) hosszú, aktív élete során nagymértékben hozzájárult az amperometriás végpontindikáció népszerűségének növeléséhez. Összefoglaló monográfiáját napjainkig alapműnek tekintik az elektrokémikus szakmai körök.

A voltammetriás módszerek fejlődését döntően meggyorsította Heyrowsky iskolája a csepegő higany munkaelektrod alkalmazásával, a polarográfia kidolgozásával. A csepegése során önmagát reprodukáló, megújuló higanyelektrod kiküszöböli az elektród passzíválódásból eredő bizonytalanságot. A csepegő higanyelektroddal már kellően pontos direkt analitikai mérések is elvégezhetővé váltak voltammetriás úton. A szilárdelektrodos detektációt alkalmazó titrimetriás eljárások ily módon kissé háttérbe szorultak. Rövidesen a polarográfia az ötödik leggyakrabban alkalmazott műszeres analitikai módszerré vált. A mérések elektródpotenciál – áram függvények felvételét jelentették, az értékelés az áram – potenciál ($i = f(E)$) függvények alapján történt. A polarográfia analitikai alkalmazásai főleg a fémanalízis területére koncentráálódtak.

A potenciál pásztázásos technika szerves analízisben történő elterjedését lassította, hogy a csepegő higanyelektroddal alkalmazható potenciálablak mellett csak viszonylag kevés analitikai szempontból fontos szerves anyag mutat elektroaktivitást. Emellett a szükséges potenciálablakot biztosító szilárdelektrodok voltammetriás alkalmazásától a már említett elektród passzíválódás gyakori jelentkezése sokakat eltántorított.

Annak ellenére, hogy mind hatékonyabb polarográfiás módszerek jelentek meg, a polarográfia népszerűsége a múlt század hetvenes éveire nagymértékben lecsökkent. Megjelentek a hatékony atomspektroszkópiai módszerek, és a gyors méréseket biztosító készülékek.

A voltammetriás módszert fejlesztő iskolák érdeklődése a szerves analízis felé fordult. Ezek jelentős része elektrokémiaileg oxidálható. Így a szerves molekulák elektrokémiai

oxidációjához szükséges potenciálablakot biztosító elektródokra volt szükség. Előtérbe kerültek a szilárd munkaelektrodok. A szilárdelektrodokkal kapcsolatos elektrokémiai munkáról, az elektródok sajátságairól, vizsgálati módszereiről, alkalmazásairól Ralph N. Adams (1969) írt napjainkban is használt, „klasszikus alapműnek” számító monográfiát.

A voltammetriás mérések során használt szilárd munkaelektrodok sok esetben pusztán elektronforrásként vagy elektronnyelőként szerepelnek. A munkaelektrod mérőfelületén kialakulhat, vagy kialakítható olyan változás, felületi réteggépzés, amely az elektród mérő sajátságait valamilyen módon kedvezően befolyásolja. Ennek a lehetőségnek tudatos kihasználása hozta létre a kémiaileg módosított elektródokat. Napjainkban a kémiaileg módosított elektródok kutatása, alkalmazása az elektroanalízis egyik legdinamikusabban fejlődő területét jelenti.

Az alkalmasan megválasztott módosító réteg bizonyos esetekben képes az elektródok passziválódásának megakadályozására, biztosíthat szelektivitást is. Ily módon kémiaileg megfelelően módosított elektródok alkalmazásakor az amperometriás módszer hátrányos tulajdonságai kiküszöbölhetők. Az amperometria népszerűsége ennek megfelelően jelentősen megnőtt. Igen elterjedtek például a szelektív detektálást biztosító enzimréteggel módosított amperometriás bioszenzorok.

A másik, az amperometria alkalmazási körét kiterjesztő, jelentőségét növelő tényező az elválasztástechnikai módszerek fejlődése. A folyadékkromatográfiás oszlopon, vagy elektroforetikus kapilláris segítségével elválasztott elektroaktív anyagok „csúcseinak” detektálására számos amperometriás detektorcella kifejlesztésére került sor. Közülük sok a kereskedelemben is kapható napjainkban.

Mintegy tíz éve kapcsolódtam be a voltammetriás mennyiségi elemző módszerek fejlesztésére irányuló kutatómunkába. Kísérleteimet a Pécsi Tudományegyetem Természettudományi Karának Kémiai Intézetében, valamint a Memphisi Egyetem 'Biomedical Engineering' Karának Elektroanalitikai Laboratóriumában végeztem.

A dolgozat munkám három, többé-kevésbé elkülöníthető területen elért eredményeiről ad áttekintést:

- Az első, leghosszabb részben írom le az elektrokatalitikus sajátságú rézoxid réteggel bevont fémréz elektródon lejátszódó elektródreakció tanulmányozásával kapcsolatos vizsgálataimat. Ennek kapcsán beszámolok fém rézelektrodra épülő, amperometriás HPLC detektorcellák kifejlesztéséről, azok cukor analízisben történő alkalmazásával kapcsolatos tapasztalataimról.

- Külön részben adok számot oxidoredoktáz enzimeken alapuló amperometriás bioszenzorok fejlesztésével, alkalmazásával kapcsolatos vizsgálataimról.

- A dolgozat harmadik része számol be az új, periódikusan megszakított amperometriás (PMA, 'Periodically Interrupted Amperometry', PIA) módszer kifejlesztéséről, vizsgálatáról, alkalmazásáról.

2. Célkitűzések

Munkám célja a klinikai diagnosztikában, élelmiszer- és környezeti analízisben előnyösen használható nagyhatékonyságú elektroanalitikai mérő módszerek, szelektív szenzorok kifejlesztése volt. A munka megkezdésekor kirajzolódott, hogy a területen történő előrelépés kémiaileg módosított elektródok fejlesztését, alkalmazását igényli. Célszerűnek látszott a voltammetriás módszerek közül az amperometriás detektálás alkalmazását, fejlesztését,

amperometriás mérésekhez jól használható speciális mérő és detektor cellák kialakítását előtérbe helyezni.

Irodalmi utalások, valamint saját elővizsgálataim arra utaltak, hogy a fém rézből készített munkaelektrodok lúgos közegben alkalmazhatók cukrok egyes karbonsavak voltametriás meghatározására. A meghatározást lehetővé tevő elektród folyamat tulajdonságaira vonatkozó ismeretek azonban hiányosak voltak. Céлом volt megvizsgálni az illető elektrokémiai oxidációs folyamatok jellegét, sajátosságait. Emellett céljaim között szerepelt kromatográfiás elválasztásokhoz, FIA mérésekhez jól alkalmazható átfolyó, rézelektrodos detektorcellák kifejlesztése. Célszerűnek látszott a különböző felépítésű detektorcellák mérés technikai sajátosságainak vizsgálata és az alkalmazhatóság igazolása valós problémák megoldására kidolgozott módszerek kapcsán.

A Szénhidrátok HPLC analízisében kevésbé érzékeny, gyakran származékképzést igénylő fotometriás detektorok, vagy nehézkes pulzáló amperometriás detektorok terjedtek el. Ennek megfelelően a rézelektrod alkalmazása a cukor analízisben mérés technikai előnyök szempontjából ígéretesnek látszott.

A fentieknek megfelelően céлом volt:

• **Elektrokatalitikus sajátosságú rézoxid réteggel bevont fémréz elektródon, lúgos közegben lejátszódó, mono- és diszacharidok elektródreakcióinak tanulmányozása, az elektród alkalmazása:**

- lúgos közegben lejátszódó elektrokémiai oxidáció vizsgálata
- fémréz elektródra épülő, amperometriás HPLC detektorcellák kifejlesztése,
- a kifejlesztett amperometriás detektorcellát tartalmazó IC rendszer alkalmazása cukor analízisben

A bioszenzorok legszélesebb körben alkalmazott csoportját az oxidoreduktáz enzimeken alapuló amperometriás enzimelektrodok képezik. Annak ellenére, hogy e szenzorok első használható képviselői közel negyvenöt éve jelentek meg, fejlesztésük napjainkban is az érdeklődés középpontjában állnak. Továbbfejlesztésük fontos mérés technikai sajátosságok területén, úgy mint stabilitás, érzékenység, szelektivitás, *in vivo* alkalmazhatóság stb. területen számos feladat megoldásához szükséges. Munkámban céлом volt néhány speciális területen az **oxidoreduktáz enzimeken alapuló amperometriás bioszenzorok fejlesztése és alkalmazása területén** a munkához hozzájárulni:

- Céлом volt a putreszcin mérő amperometriás bioszenzor mérés határát a reakció réteg szerkezetének optimalizálásával a klinikai diagnózisban történő felhasználást lehetővé tevő koncentráció tartományba kiterjeszteni. Ez az alsó mérés határ jelentős csökkentését jelentette.

- Céлом volt állatkísérletekben *in vivo* körülmények között jól használható, megfelelő felépítésű, stabilitású amperometriás glükóz mérőcella kifejlesztése, *in vivo* körülmények közötti alkalmazhatóságának vizsgálata.

Munkám során ötletként merült fel, hogy az álló réteggel bevont elektródok, pl. enzim szenzorok, amperometriás jele nagymértékben megnövelhető, ha a hagyományos amperometriás, folyamatos elektrolízissel járó adatgyűjtési módszert, az elektrolízist periódikusan megszakító adatgyűjtési program alkalmazásával váltjuk fel. Az elképzelések szerint ezzel jelentős jel/zaj viszony növelés, alsó mérés határ kiterjesztés érhető el.

Céлом volt ennek a lehetőségnek a kísérleti vizsgálata, azaz érzékenység növelés mértékének felmérése és az ötleten alapuló újszerű mérés technika kidolgozása:

Új amperometriás mérés technika kifejlesztése, membránnal bevont elektródok teljesítőképességének növelésére

- a periódikusan megszakított amperometria (PMA, 'Periodically Interrupted Amperometry', PIA)
- a PMA technika alkalmazásai.

3. Módszerek

A munkát a Pécsi Tudományegyetem Természettudományi Karának Kémiai Intézetében, valamint a Memphisi Egyetem 'Biomedical Engineering' Karának Elektroanalitikai Laboratóriumában rendelkezésre álló eszközökkel és műszerekkel végeztem.

Az elektródok készítése, vizsgálata, alkalmazása során végzett voltammetriás kísérletekben számítógépes Princeton Applied Research 273A (EG&G, PAR, USA) típusú potenciosztát/galvanosztát egységet, Autolab12 potenciosztát/galvanosztát munkaállomást (EchoChemie B.V., Hollandia) és CHI 760C elektrokémiai munkaállomást használtam (Shanghai CH Instruments, Kína). Az Autolab készülék működtetéséhez a GEPES 4.9.005 mérő, értékelő programot alkalmaztam, míg a CHI 760C munkaállomáshoz a cég által biztosított szoftvert (6.20 verziót) használtam. Mindkét munkaállomás bipotenciosztátos kiépítettségű és rendelkezik mikroelektródos előerősítővel.

Az elektronszám változás méréséhez, továbbá a reakció termékek analíziséhez szükséges makroelektrolíziseket az integrátor egységből, potenciosztátból és kontroller egységből álló Radelkis (Magyarország) OH 404-es coulométerrel végeztem, használva a készülék elektrolízis celláját és mágneses keverőjét.

Perkin-Elmer (Perkin-Elmer Germany) 372 típusú, lángatomizációs atomabszorpciós spektrofotométert használtam a réz munkaelektrodos makroelektrolízis során kapott oldatok réz koncentrációjának mérésére. A készülékhez eredetileg x-t regisztráló csatlakozott. Ezt a kisebb alsó mérési határ elérése érdekében számítógépes adatgyűjtő megjelenítő egységre cseréltük. A működési programot a tanszék munkatársai írták.

A pH méréseket Orion 720 A és Thermo Orion 420A plusz (Orion Research Inc. Beverly, MA, USA) készülékeken végeztem.

Putreszcin-oxidáz és glükóz-oxidáz enzimoldatok fajlagos aktivitását standard spektrofotometriás eljárásokat követve látható tartományban, spektrofotometriás úton, száloptikás Ocean Optics (Ocean Optics Inc. Dunedin, Fl. USA), valamint hagyományos felépítésű Zeiss gyártmányú (Carl Zeiss Jena, Németország) Spekord UV-VIS spektrofotométerekkel határoztam meg.

Az elektródkészítés lépéseit, a beforrasztások jóságát, a csiszolt felület simaságát, az egymásra helyezett rétegek helyzetét Zeiss gyártmányú (Karl Zeiss Jena, Németország) optikai mikroszkóppal vizsgáltam.

A mikrochip alapú elektród rétegeinek folytonosságát Olympos CKX31 (Olympos UK LTD.) inverziós mikroszkóppal ellenőriztem.

Forgókorong elektróddal végzett kísérletekhez cserélhető elektródos Radiometer Copenhagen (Radiometer Analytical S.A. Franciaország) EDI101 forgó testet és CVT101 sebesség szabályozó egységet használtam.

Bandelin Sanorex RK 52H típusú ultrahang készüléket (Bandelin electronics, Németország) használtam esetenként oldatkészítéshez és az elektródpolírozást követő tisztításhoz.

Az elektródok, illetőleg detektor cellák vizsgálatára laboratóriumunkban összeállított áramló oldatos analízis 'flow injection analízis' (FIA) készüléken végeztem.

Az ionkromatográfiás mérésekhez használt készüléket Waters 600 HPLC (Waters, Milford, MA, USA) és Dionex CD25 vezetőképességi detektor, Dionex AMMS-III típusú szupresszor, Dionex CarboPac PA1 és IonPac AS5A analitikai és előtétoszlopok (Sunnyvale, CA, USA) készülék egységekből és házi készítésű detektor cellák állítottam össze.

Elektronszám változás meghatározása:

I. makroelektrolízises módszerrel: Kis térfogatú lúgos oldatban nagy felületű Cu elektródon potenciosztatikus körülmények között elektrokémiaileg oxidáltam a szénhidrát

mintákat. Mértém a cellán átfolyt töltésmennyiséget (ΔQ) és a koncentráció változást (Δc). Az anyagmérleg alapján számoltam az egy molekula oxidációjához szükséges elektronok számát, $n = \frac{M\Delta Q}{F\Delta m}$, ($\Delta Q = Q_{\text{minta}} - Q_{\text{alapadat}}$, $\Delta m = \Delta cV$).

II. Koutecky-Levich módszerrel: Forgó korong elektródon mértem különböző koncentrációjú oldatokban különböző forgási sebesség mellett az alkalmas elektród potenciálon jelentkező áramintenzitásokat. Ezekből az ismert függvényeket megszerkesztve számítottam az elektronszám változást (n). Az oxidfilm borítottság (Γ) mérésével az elektron átlépési folyamat másodrendű sebességi koefficiensét (k_2) számítottam. Kis forgási sebesség esetén a konduktív diffúziós áram értéke $i_d = 0,620nFAD^{2/3}\omega^{1/2}\nu^{-1/6}C$, nagy forgási sebesség esetén a kinetikus áram értéke $i_k = nFAk_f C$ vagy $i_k = nFAk_f \Gamma C$. A teljes áram a két komponens összege, $i_t = i_k + i_d$. A Koutecky – Levich egyenlet egyszerűen az áramintenzitás összeg reciprokából adódik. $\frac{1}{i_t} = \frac{1}{nFAk_2 \Gamma C} + \frac{1}{0,62nFAD^{2/3}\nu^{1/6}C\omega^{1/2}}$, ahol:

n az elektronszám változás, A az elektródfelület nagysága (cm^2), D az átalakuló anyag diffúziós koefficiense (cm^2s^{-1}), C annak koncentrációja (mól cm^{-3}), ω a forgás sebesség (rad s^{-1}), ν a közeg kinematikus viszkozitása (cm^2s^{-1}), k a reakció sebességi koefficiensét jelenti.

Putreszcín-oxidáz aktivitásának mérése a Toyobo gyártó és forgalmazó által megadott enzim assay szerint történt.

A kinon-imin festék fotometriásan 510 nm hullámhosszon mérhető. Az egységnyi enzimaktivitás definíciója: Az alábbiakban ismertetett körülmények között egy perc alatt egy egységnyi enzimaktivitás egy mikromol hidrogén-peroxid képződést eredményez (amely fél mikromol kinon-imin festék mennyiség változásnak felel meg.)

Glükóz-oxidáz aktivitásának mérése Sigma enzim assaynek megfelelően történt.

Az o-dianizidin (oxidált) fotometriásan 500 nm hullámhosszon mérhető. Az egységnyi enzimaktivitás definíciója: az alábbiakban ismertetett körülmények között egy perc alatt egy egységnyi enzimaktivitás egy mikromol hidrogén-peroxid képződést eredményez (amely egy mikromol o-dianizidin mennyiség oxidációjának felel meg).

4. Eredmények és tézisek

Elektroaktív anyagot nem tartalmazó lúgos alapoldatban tanulmányoztam a rézelektrod felületén lejátszódó elektród folyamatokat potenciálpásztázásos technikával. A voltammogramon jelentkező három oxidációs hullám és két redukciós csúcs képződése során a felületi rétegben bekövetkező változások jellegét valószínűsítettem. E munkában megújított és elektrokémiaiag előkezelte elektródokat használtam. A redukciós csúcsok által képviselt töltés mennyiség alapján becsültem az elektród felületét bevonó oxid film vastagságát.

Glükóz tartalmú oldatokban a rézelektrod potenciál ablakának végéhez közel, 600 mV-nál egy jól fejlett, könnyen értékelhető hullámot találtam. Vizsgáltam ennek analitikai jelként való használhatóságát.

Forgó korong elektródos mérések során megállapítottam, hogy nem lépnek fel emlékező jelenségek, elektród passzíválódás glükóz és más egyes más szacharidok amperometriás detektálásakor. Megállapítottam néhány más szacharid amperometriás jelének glükózra vonatkoztatott relatív érzékenységét

Munkámban két módon meghatároztam néhány cukor rézelektrodon, lúgos közegben végbemenő oxidációs reakciójának elektronszám változását. Az egyik esetben

makroelektrolízist végezve mértem a mérőcellán áthaladó töltésmennyiséget és a vizsgált anyag koncentrációjának csökkenését a reakció elegyben. Az anyagmérleg alapján számítottam az elektronszám változás, n értékét.

A másik esetben forgó elektród alkalmazásával végezve méréseket a Koutecky-Levich módszert követtem. Ez a módszer az elektronszám változás, n meghatározása mellett a heterogén, elektrokatalitikus reakció sebességi koefficiensének, k_2 becslését is lehetővé teszi.

A makroelektrolízis során kapott oldatban meghatároztam voltammetriásan az elfogyott cukor mennyiségét, az oldatba került rézionok mennyiségét. IC méréssel azonosítottam az elektród folyamat fő termékét (formiát ionok) és meghatároztam annak mennyiségét. A keletkezett termék oldaláról is meghatároztam az elektron szám változást. Ezek alapján sikerült az oxidációs folyamat jellegéről és természetéről, mechanizmusáról a korábbi feltételezéseket igazoló mennyiségi adatokat nyernem. Ezek szerint: A réz elektródfelületén lúgos közegben cukrok elektrokémiai oxidációjának fő terméként formiát ionok keletkeznek. A reakcióban az elektródfelületen lévő rézoxid film elektrokatalizátorként vesz részt. Egy glükóz molekula oxidációjakor hat formiát ion keletkezik. A réz korrózió igen kis mértékű.

A kapott eredmények alapján valószínűnek látszik az, hogy az elektródreakció az alábbi, Lou és Baldwin (1999) által javasolt, de mostanáig mások által nem bizonyított mechanizmus szerint játszódik le.

Az elektrokatalitikus rézelektrod stabilis működése kézenfekvővé tette, hogy megvizsgáljam kromatográfias elválasztások detektálásában való alkalmazhatóságának lehetőségeit. Ennek megfelelően három különböző felépítésű kromatográfias, réz munkaelektrodos detektorcellát készítettem:

- 1./ Kissinger – Adams típusú vékonyréteg cella
- 2./ Wall-jet típusú detektorcellát és
- 3./ Nyitott kolonnavég detektorcellát mikro-szál rézelektroddal.

A detektorcellák működését tanulmányoztam. Modellanyagként mono- és diszacharidokat használtam. Ezek alkalmas ionkromatográfias oszlopon lúgos közegben elválaszthatók. Szerencsés egybeesés, hogy a rézelektrod működése is bázikus közeget igényel. Cukor komponensek analízisére az élelmiszeranalízis, a növénytani kutatások, a klinikai diagnosztika stb. területén számos probléma kapcsán van szükség.

Valós mintákon, méz és nektár mintákban végeztem cukor meghatározásokat. Virág mintául piros árvasalánt (*Lamium purpureum*) és pongyola pitypangot (*Taraxacum officinale*) választottam. Glükóz, fruktóz és szacharóz visszanyerési vizsgálata méz mátrixban végeztem.

Tanulmányi utam keretében az Észak-Karolinai Duke Egyetemen a klinikai mérések céljára szolgáló lapos mikrocellák fejlesztésével, alkalmazásával kapcsolatos kísérleteket végeztem. Ez a munka folytatódott a PTE laboratóriumaiban, illetőleg a Memphisi Egyetem Biomedical Engineering fakultásán nyári tanulmányutak során. Feladatként jelentkezett, hogy a korábban viszonylag nagy putreszcín koncentrációjú klinikai minták analízisére kidolgozott mikrocella méréstartományát a kis koncentrációk irányába kiterjesszük. A vérben levő igen kis koncentrációjú putreszcín szintjének kismértékű növekedése ugyanis rosszindulatú daganatos megbetegedésekkel jár együtt.

A dolgozatban részletesen leírt, újszerű enzim immobilizációs eljárást alkalmazva, optimalva a belső méretkizárásos, valamint külső hidrogél és védő rétegek szerkezetét az elektród méréstartományát sikerült a kis koncentrációk irányába jelentősen kiterjeszteni.

A putreszcín visszanyerési kísérleteket tengerimalac vér és plazma mintákban végeztem.

Együttműködő partnereim kérésére háromelektrodos, glükózmérő amperometriás enzimelektrodot tartalmazó, kisméretű, könnyen kezelhető mérőcellát készítettem. Tanulmányoztam a cella *in vivo* glükóz mérésekre történő alkalmazásának lehetőségeit és

korlátait. Sikerült módszert kidolgozni a glükóz koncentráció — érzéstelenített kísérleti állatok testszövetekben történő — változásainak nyomonkövetésére. A munkámban kialakított háromelektrodos lapos mérőcellát kisméretű résen keresztül alvó patkányokba vezetve a hasizom felszínére pozícionálva folyamatosan regisztráltam az amperometriás áramot. Gyomor szondán keresztül történő glükóz beadást, illetve iv. inzulin bejuttatást a biocella árama megbízhatóan jelezte.

Az alsó méréshatárnak a kis koncentrációk irányába történő kiterjesztése az analitikai kémiában gyakran jelentkező feladat. Általában előnyös, ha egy érzékelő nagyobb analitikai jelet produkál adott mintakonzentráció esetén. Más szóval, a nagyobb érzékenység rendszerint előnyös. Munkámban kidolgoztam egy újszerű, a membránnal borított felületű elektródok, így amperometriás bioszenzorok esetében alkalmazható mérési módszert, melynek alkalmazásával jelentősen sikerült az amperometriás detektálás érzékenységét, alsó detektálás küszöbét kedvező irányba befolyásolni. A dolgozatban különböző modell kísérletek bemutatásával igazoltam a periódikusan megszakított amperometriának (PMA) nevezett, PMA módszer jó működését, előnyös sajátosságait.

A dolgozatban foglalt eredmények tézis szerű összefoglalója:

1. Hazai kutatók közül elsőként készítettem különböző méretű rézelektrodokat voltammetriás kísérletek céljára. A rézelektrodok voltammetriás viselkedésének tanulmányozásával kapcsolatos eredményeimről a nemzetközi szaksajtóban dolgozatokat közöltem.

2. A rézelektrod felületén lévő film lúgos közegben végbemenő redoxi folyamatainak tanulmányozása során becsültem az oxid film vastagságát, megállapítottam a szénhidrát analízis céljaira alkalmas mérési körülményeket.

3. Két jelentősen eltérő módszerrel meghatároztam néhány szénhidrát lúgos közegben, réz elektród felületén végbemenő elektrokémiai oxidációjának elektronszám változását. Ezzel igazoltam, hogy az egy molekula oxidációja során a cellán átfolyó töltésmennyiség szokatlanul nagy ($n=2x C_N$).

4. A makroelektrolízis termékének IC, és AA analízisével kvantitatív bizonyítékot nyertem a szénhidrátok lúgos közegben, réz elektródon végbemenő elektrokémiai oxidációjának jellegével kapcsolatos korábbi feltételezések valószínűsítésére. Ezek szerint az elektrokémiai oxidáció elektrokatalitikus jellegű, az oxidáció fő terméke formiát ion.

5. Három különböző felépítésű, réz munkaelektrodot tartalmazó átfolyó detektorcellát készítettem. FIA és IC körülmények között vizsgáltam azok működését. A detektor cellák alkalmazásával módszereket dolgoztam ki valós analitikai feladatok megoldására.

6. Újszerű, nagy fajlagos aktivitást biztosító enzimimmobilizációs módszert alkalmaztam putreszcin oxidáz enzimnek elektród felületen történő megkötésére.

7. Amperometriás putreszcin mérő elektród készítési technológiájának optimalálásával, a mérőmódszer finom hangolásával sikerült a klinikai diagnózis szempontjából fontos tartományba hozni a korábban bakteriális fertőzöttség detektálására kidolgozott bioszenzor méréstartományát.

8. *In vivo* állatkísérletek céljaira glükózmérő amperometriás bioszenzort tartalmazó, bőr alá beépíthető mikro-mérőcellát kísérletezem ki. Ennek glükóz tolerancia vizsgálatokra történő alkalmazhatóságát érzéstelenített patkányokkal végzett kísérletek során igazoltam.

9. Újszerű amperometriás mérőmódszert dolgoztam ki. A periódikusan megszakított amperometriának nevezett (PMA) mérőmódszer a membránnal bevont elektródok, bioszenzorok esetében jelentősen növeli az analitikai jelet. Kedvező jel/zaj viszony biztosításával az alsó méréshatárt a kis koncentrációk irányába kiterjeszti.

10. A PMA módszer alkalmazhatóságát, előnyös voltát különböző elektródokkal, amperometriás bioszenzorokkal végzett kísérletekben igazoltam.

A PhD értekezés alapját képező közlemények jegyzéke

L. Nagy, G. Nagy: Spectroscopic confirmation of electrocatalytic behavior of amperometric carbohydrate detection on copper.

Microchemical Journal, 84 (1-2) 2006, 70-74 (IF 1.237)

L. Nagy, N. Kálmán, G. Nagy: Periodically interrupted amperometry. A way of improving analytical performance of membrane coated electrodes.

Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 69(1-2), 2006, 133-141 (IF 1.403)

L. Nagy, G. Nagy, R. E. Gyurcsányi, M. R. Neuman, E. Lindner: Development and study of an amperometric biosensor for the in vitro measurement of low concentration of putrescine in blood.

Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 53(1-3) 2002, 165-175 (IF 1.403)

L. Nagy, G. Nagy, P. Hajós: Copper electrode based amperometric detector cell for sugar and organic acid measurements.

Sensors and Actuators B: Chemical, 76(1-3) 2001, 494-499 (IF 2,331)

A disszertáció alapjául szolgáló konferencia összefoglalók

Nagy L., Nagy G: Biosensors for clinical diagnosis.

Bridges in Life Sciences, Annual Scientific Review Meeting of the Regional Cooperation for Health, Science and Technology (RECOOP HST) Consortium. October 5, 2007 Pecs, Hungary.

Nagy L., Nagy G: Periodikusan megszakított amperometria (PMA) – új lehetőség membránnal bevont elektródok méréstartományának kiterjesztésére.

MKE Centenárium Vegyészkonferencia Sopron 2007. május 29-június 1.

L. Nagy, M. Tamaskó, G. Nagy, A. Somogyi, I. Wittmann, G. Nagy: Improved detection limit with membrane coated sensor of minimal invasion.

AIDPIT meeting and 1st European Diabetes Technology and Transplantation, Montpellier Franciaország, 2007. február 4-6.

Nagy L., Kálmán N., Nagy G.: Periodikusan megszakított amperometria (PMA) 3. Klasszikus amperometriás és PMA detektálásos módszer összehasonlítás putreszcint mérő elektród esetén.

Műszaki Kémiai Napok'06, Veszprém 2006. április 25-27. Abstract book, p.197-200.

L. Nagy, G. Nagy: Spectroscopic confirmation of electrocatalytic behavior of amperometric Carbohydrate detection on copper electrode.

XII Hungarian – Italian Symposium on Spectrochemistry: Environmental Pollution and Human Health. 23-27 October, 2005, Pécs, Abstract book, p.111.

L. Nagy, G. Nagy, R. Gyurcsányi, E. Lindner, M. R. Neuman: Microchip based cell for Purtescine measurements in biological samples.

6th international Symposium on Instrumental Analysis, 2001. June 24-27, Graz.

G. Nagy, **L. Nagy**, R. Gyurcsányi, E. Lindner, R.P. Buck: Enzyme activity measuring biosensors.

6th international Symposium on Instrumental Analysis, 2001. June 24-27, Graz.

R. E. Gyurcsányi, G. Nagy, **L. Nagy**, A. Cristalli, A. E. Bereczki, R. P. Buck, M. R. Neuman, H. Troy Nagle, S. Ufer, E. Lindner: Amperometric microcells for enzyme assay.

Pittcon 2001, New Orleans.

R. P. Buck, S. Ufer, E. Lindner, R. Gyurcsányi. G. Nagy, **L. Nagy**: Flexible, Flat-form, Microfabricated Sensors for Substrate Concentrations and Enzyme Activities.

Symposium of Sensors Symposium, ECS meeting, San Francisco, CA, Sept 2-7, 2001.

G. Nagy, **L. Nagy**, R. Gyurcsányi, E. Lindner, R. P. Buck: Recent results with enzyme activity measuring biosensors.

Gordon Conference on Chemical Sensors and Interfacial Design, 2001, May 6-11, Il Ciocco, Italy.

L. Nagy, G. Nagy, P. Hajós: Copper electrode based amperometric detector cell for sugar and organic acid measurements.

8th International Conference on Chemical Sensors Basel, 2000. July 2-5.

L. Nagy, G. Nagy, P. Hajós: Amperometric HPLC sensor for detection of sugars and organic acids.

Balaton Symposium'99 on High-Performance Separation Methods, September 1-3, 1999. Siófok.