## SZELEKTÍV KÉMIAI SZENZOROK ÉS MÓDSZEREK FEJLESZTÉSE

## Ph.D. értekezés

Nagy Lívia

Témavezető: Dr. Kollár László



Pécsi Tudományegyetem Természettudományi Kar Kémia Doktori Iskola

> Pécs 2008

# KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm témavezetőmnek, *Dr. Kollár Lászlónak* egyetemi tanárnak, a disszertáció megírása során nyújtott segítséget és részletekre is kiterjedő figyelmét.

Hálás vagyok *Dr. Nagy Géza* egyetemi tanárnak és *Dr. Lindner Ernő* egyetemi tanároknak, hogy számomra érdekes témát jelöltek ki és jó tanácsaikkal munkámat támogatták.

Köszönet illeti *Dr. Kilár Ferencet*, a PTE TTK Kémiai Doktori Iskola vezetőjét, hogy témámat a Doktori Iskola befogadta.

Szeretném megköszönni szerzőtársaimnak Bátai Rékának, Dr. Csóka Balázsnak, Dr. Gyurcsányi Róbertnek, Dr. Hajós Péternek, Kálmán Nikolettának és Takátsy Anikónak a közös munkát.

Köszönetemet fejezem ki az Általános és Fizikai Kémia Tanszéken dolgozó munkatársaimnak azt a kellemes és aktív munkahelyi légkört, amely munkámra ösztönzően hatott.

Köszönöm családomnak szerető támogatását, megértését és türelmét.

### Rövidítések jegyzéke

 $CHIT/BMIM \cdot BF_4 \quad citozán/butil-metil-imidazolium tetrafluoro-borát$ 

CME Chemically modified electrod, kémiailag módosított elektród

DAO diamin-oxidáz enzim

DPV differenciál impulzus voltammetria

5-HIAA 5-hidroxi-indolecetsav

HPLC High-performance liquid chromatography

5-HT 5-hidroxi-triptamin

HSAB principe Pearson féle "kemény-lágy" sav-bázis elmélet

ELISA 'enzyme-linked immuno sorbent assay'

ESL 2,5-dihidroxi-benzolszulfonsav-dietanolamin (Ethamsylate)

FAD/FADH<sub>2</sub> flavin adenin dinukleotid

FIA 'flow injection' analízis, áramló oldatos analízis

FIA fluorescence immuno assay

FPIA fluorescence polarisation immuno assay

IC-IPAD ionkromatográfia - integráló pulzáló amperometriás detektálás

ISE ionszelektív elektródok

IUPAC International Union of Pure and Applied Chemistry

MAO monoamin-oxidáz enzim

MK meldola kék

MWCNT többrétegű szén nanocsövek

NAD/NADH nikotinsav adenin dinukleotid

PA pulzáló amperometria

PAD pulzáló amperometriás detektálás

PAN polianilin

PAN-NAS anilin és β-naftalin-szulfonsav elektrokémiai kopolimer

PEDOT poli(3,4-etiléndioxitiofén)

PIA Periodically interrupted amperometry

PMA periódikusan megszakított amperometria

PuO putreszcine-oxidáz enzim

PV pulzáló voltammetria

QCMB kvarc kristály mikromérleg

RIA radioactive immuno assay

SAW akusztikus felületi hullám érzékelő

SELEX systematic evolution of ligands by exponential enrichment

SPR 'Surface Plasmon Resonance', felületi plazmon rezonancia szenzor

TEOS tetraetil-ortoszilikátot

TKE telített kalomelelektród

WHO World Health Organization

# Tartalomjegyzék

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	2
1. BEVEZETÉS	6
2. IRODALMI RÉSZ	9
2.1. KÉMIAILAG MÓDOSÍTOTT ELEKTRÓDOK	9
2.1.1. A módosító réteg hatása	. 10
2.1.2 Kémiailag javított sajátságú voltammetriás munkaelektródok	. 11
2.1.2.1. Elektrokatalitikus hatással, vagy más módon szelektivitást biztosító	ý
elektródok	. 11
2.1.2.2. Az elektrokatalitikus rézelektród	. 17
2.1.2.3. Elődúsítás kémiailag módosított elektródokkal	. 18
2.1.2.4. Különleges funkciójú módosított elektródok	.20
2.2. ELEKTROKÉMIAI BIOSZENZOROK: A KÉMIAILAG MÓDOSÍTOTT ELEKTRÓDOK	
SPECIÁLIS TÍPUSAI	.21
2.2.1. Szelektív felismerő biológiai rendszerek	.23
2.2.1.1. Biokatalitikus reakción alapuló bioszenzorok	.23
2.2.1.2. A biológiai felismerést végző anyag (enzim) immobilizálás	.24
2.2.2. Glükóz mérő bioszenzorok	.29
2.2.3. Putreszcin bioszenzorok	. 30
2.2.3.1. Putreszcin elektrokémiai úton történő meghatározása	. 31
2.2.4. Katalitikus sajátságú természetes anyagon alapuló bioszenzorok	. 32
2.2.5. Receptor-agonista kölcsönhatáson alapuló bioszenzorok	. 33
2.2.6. Antitest – antigén kölcsönhatáson alapuló bioszenzorok	. 33
2.2.7. Aptamer receptorok	. 34
2.3. AMPEROMETRIÁS PULZÁLÓ DETEKTÁLÁST ALKALMAZÓ TECHNIKÁK	.35
2.3.1. Pulzáló amperometria	. 36
3. KÍSÉRLETI RÉSZ	.39
3.1. A KÍSÉRLETI MUNKA SORÁN FELHASZNÁLT MÉRŐBERENDEZÉSEK ÉS	
MÉRŐESZKÖZÖK	.39
3.2. ALKALMAZOTT ELEKTROKÉMIAI CELLÁK	.41
3.2.1. Kissinger – Adams típusú vékonyréteg cella réz munkaelektróddal	141
3.2.2. Nyitott kolonnavég detektorcella mikro-szál rézelektróddal	. 42
3.2.3. Wall-jet típusú detektorcella 1.2 mm átmérőjű rézelektróddal	. 42
<b>3.3. A</b> KÍSÉRLETEK SORÁN ALKALMAZOTT ELEKTRÓDOK	.43
3.3.1 Voltammetriás mikroelektródok, korong alakú réz mikroelektród	.43
3.3.2. Voltammetriás makroelektródok	. 44
<b>3.4. ELEKTROKATALITIKUS OXIDRÉTEG KIALAKÍTÁSA RÉZELEKTRÓD FELÜLETÉN</b>	.45
3.5. BIOSZENZOROK KÉSZÍTÉSE	.45
3.5.1. Platina korong munkaelektródos szenzor	. 45
3.5.1.1. Az elektródfelületek polírozása és tisztítása	. 45
3.5.1.2. Enzimelektród készítése	. 45
3.5.2. Mikrochip alapú bioszenzor készítése	. 47

3.6.1. Elektródok készítéséhez használt anyagok	48
3.6.2. Alkalmazott enzim készítmények	48
3.6.3. Elektródkészítéshez alkalmazott egyéb anyagok	49
3.6.4. Egyéb vegyszerek	49
3.7. ALKALMAZOTT MÓDSZEREK	50
3.7.1. Putreszcin-oxidáz aktivitásának mérése	50
3.7.2. Glükóz-oxidáz aktivitásának mérése	51
3.7.3. Mikrochip alapú szenzor aranyelektródok elektrokémia platinázás	a
	53
3.7.4. Mikrochip alapú szenzor referenciaelektródjának kialakítása	54
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	55
4.1. Az elektrokatalitikus oxidfilmmel bevont rézelektród viselkedése	
LÚGOS KÖZEGBEN	55
4.1.1. Az elektródreakció jellegének vizsgálata	62
4.1.2. Elektronszám változás mérése makroelektrolízissel	63
4.1.3. A Koutecky- Levich módszerrel végzett mérések	64
4.2. Az elektrokatalitikus rézelektród alkalmazásai	71
4.2.1. Méz és nektár fő cukor komponenseinek analízise	72
4.2.2. Detektor mérőpotenciáljának megállapítása	73
4.2.2.1. A komponens azonosítása és reprodukálhatósága	76
4.2.2.2. Az amperometriás detektálás alsó méréshatárának megállapítása	77
4.2.3. A módszer alkalmazása valós mintákban	78
4.3. BIOSZENZOROK	80
4.3.1. Putreszcin meghatározás vérben	80
4.3.3. Putreszcin meghatározás vérben és plazmában	86
4.4. GLÜKÓZMÉRŐ ENZIMELEKTRÓD ALKALMAZÁSA ÁLLATKÍSÉRLETEKBEN	87
4.6. PERIÓDIKUSAN MEGSZAKÍTOTT AMPEROMETRIÁS MÉRÉSEK	91
4.6.1. A módszer elve	91
5. ÖSSZEFOGLALÁS	102
6. IRODALOMJEGYZÉK	104

# 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 munkaelektródra valamilyen időfüggvény 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 munkaelektród felületének, az elektrolízis terméke által előidézett passziválódása, beszennyeződése.

A műszeres elemzés fejlődésének korai szakaszában az említett hátrányok miatt az amperometriás módszereket elsősorban redoxi titrálások végpontjának indikálására használták. Folk és Badwen [1] 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 [2] 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 [3] napjainkig alapműnek tekintik az elektrokémikus szakmai körök.

A voltammetriás módszerek fejlődését döntően meggyorsította Heyrowsky iskolája a csepegő higany munkaelektród alkalmazásával, a polarográfia kidolgozásával [4]. A csepegése során önmagát reprodukáló, megújuló higanyelektród kiküszöböli az elektród passziválódásból eredő bizonytalanságot. A csepegő higanyelektróddal már kellően pontos direkt analitikai mérések is elvégezhetővé váltak voltammetriás úton. A szilárdelektródos detektálást 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 koncentrálódtak [5].

A potenciál pásztázásos technika szerves analízisben történő elterjedését lassította, hogy a csepegő higanyelektróddal alkalmazható potenciálablak mellett, csak viszonylag kevés analitikai szempontból fontos szerves anyag mutat elektroaktivitást. Emellett a szükséges potenciálablakot biztosító szilárdelektródok voltammetriás alkalmazásától a már említett elektród passziválódás 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 elektrokémiailag oxidálható. Így a szerves molekulák elektrokémiai oxidációjához szükséges potenciálablakot biztosító elektródokra volt szükség. Előtérbe kerültek a szilárd munkaelektródok. A szilárdelektródokkal kapcsolatos elektrokémiai munkáról, az elektródok sajátságairól, vizsgálati módszereiről, alkalmazásairól Ralph N. Adams [6] írt napjainkban is használt, "klasszikus alapműnek" számító monográfiát.

A voltammetriás mérések során használt szilárd munkaelektródok sok esetben pusztán elektronforrásként vagy elektronnyelőként szerepelnek. Természetesen anyagi sajátságaik, felületi állapotuk döntő hatást gyakorolhat az elektródreakció különböző lépéseire. A munkaelektród mérőfelületén kialakulhat, vagy kialakítható olyan változás, felületi rétegképzés, amely az elektród mérősajátságait valamilyen módon kedvezően befolyásolja. Ennek a lehetőségnek tudatos kihasználása hozta létre a kémiailag módosított elektródokat. Napjainkban a kémiailag 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 kémiailag 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 "csúcsainak" 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. A munka célja a klinikai diagnosztikában, élelmiszerés környezeti analízisben előnyösen használható nagyhatékonyságú mérő módszerek, szelektív szenzorok kifejlesztése volt. A munka megkezdésekor kirajzolódott, hogy a területen történő előrelépés kémiailag 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.

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

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

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

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

- Munkám során újszerű méréstechnika kidolgozásával, a diffúziós réteggel, pl. enzim tartalmú reakcióréteggel bevont elektródok alsó méréshatárát jelentős mértékben sikerült a kis koncentrációk irányában kiterjeszteni. A dolgozat harmadik része számol be az új periódikusan megszakított amperometriás (PMA, 'Periodically Interrupted Amperometry', PIA) módszer kifejlesztéséről, vizsgálatáról, alkalmazásáról.

# 2. IRODALMI RÉSZ

Munkámban kémiailag módosított elektródok továbbfejlesztésével, sajátságaik vizsgálatával, azok alkalmazásával foglalkoztam. Sikeresen alkalmaztam és továbbfejlesztettem az amperometriás méréstecnikát, az amperometriás mérések elválasztástechnikai alkalmazásait. Ennek megfelelően a munkámmal kapcsolatos szakirodalmi előzmények áttekintését e két területre koncentrálva adom meg.

### **2.1. KÉMIAILAG MÓDOSÍTOTT ELEKTRÓDOK**

A szilárdelektródokon lejátszódó elektródfolyamatok sajátságait, sebességét nagymértékben befolyásolja az elektródfelület anyaga, kristálytani orientációja, adszorpciós készsége, a mérőfelület geometriája, azaz alakja és tényleges mérete, felületi durvasága. Lehetőség van, ennek megfelelően arra, hogy a felület célszerű módosításával az elektród-folyamat bizonyos sajátságait az alkalmazás szempontjából kedvező irányba megváltoztassuk. Az elektródfelület módosításával számos területen, így a galvánelemgyártásban, az elektrolízises iparokban, a tüzelőanyag-cella fejlesztésben, a korrózió gátlásában, elektrokróm kijelzők fejlesztésben értek el jelentős eredményeket, illetőleg ezeken a területeken folyik az elektródfelület célszerű irányba történő megváltoztatására irányuló intenzív kutatómunka.

A módosított munkaelektródok [7] a voltammetriás analízis területén is mind nagyobb népszerűségre tesznek szert. Fejlesztésükkel, alkalmazásukkal rendkívül kiterjedt irodalom foglalkozik. A voltammetriában kémiailag módosított elektródoknak (Chemically Modified Electrodes, CME) nevezett munkaelektródok széles körű elterjesztésében az Észak-Karolinai Állami Egyetemen (UNC, Chapel Hill, USA) tanító Royce W. Murray kutató csoportja játszott úttörő szerepet. A munkáról közleménysorozatban [8-11], könyvfejezetben [12], monográfiában [13] számolt be.

A kémiailag módosított elektródokról számos összefoglaló tanulmány [14-18] jelent meg. Az egyes területeken való alkalmazásaikat külön közlemények tekintik át. Baldwin és Thomsen [19] a kromatográfiás detektálás területén használt kémiailag módosított elektródokról ad áttekintést, Wang [20] az áramló oldatos mérésekkel kapcsolatos eredményeket foglalja össze. Külön közlemény szól a gyógyszeranalízis [21], a környezeti fémanalízis [22], az ionkromatográfia [23] területén való alkalmazás lehetőségeiről.

A voltammetriás analízis szempontjából előnyös kémiailag módosított elektródokkal kapcsolatos kutatások eredményeiről szóló közlemények nagyszámú felületmódosító anyag készítéséről, alkalmazásáról számolnak be. Az egyes módosító lépések az elektródok különböző sajátságait befolyásolják kedvezően, esetleg új feladatok megoldására teszik azt alkalmassá. Szólnak közlemények különböző előnyösen használható elektródmódosító

eljárásokról, foglalkoznak a kémiailag módosított elektródok sajátságainak magyarázatával, azokkal kapott áram – potenciál, áram – idő függvények értelmezésével, a függvények alakját befolyásoló hatásokkal.

Az irodalom rendkívüli kiterjedt volta miatt nem törekszem annak részletes, rendszerezett áttekintésére. Inkább e helyütt csak rövid általános összefoglalást adok a kémiailag módosított elektródokkal kapcsolatos ismeretekről. Részletesebben tárgyalom a munkámhoz szorosan kapcsolódó irodalmi előzményeket.

#### 2.1.1. A módosító réteg hatása

A voltammetriás elektródon végrehajtott módosítás az eredeti alapelektród különböző sajátságait változtathatja meg a kedvező irányba. Ezek a változások a következők lehetnek:

Szelektivitás biztosítása, növelése

Méretkizárásos réteg segítségével

Permszelektív réteg alkalmazásával

Hidrofil - hidrofób kölcsönhatás alapján

A dinamikus tartomány kedvező befolyásolása

Felületi mintaanyag dúsítást előidéző film alkalmazásával, ez lehet;

Extrakciós sajátságú film

Komplexképző réteg

Anyagtranszportot sebességét csökkentő réteg

Az elektronátlépési folyamat befolyásolása

- Az átlépési folyamat gyorsítása felületi katalizátor alkalmazásával
- Az alkalmazandó elektródpotenciál csökkentése
- Az elektród passziválódás megakadályozása elektrokatalizátor segítségével

Új anyagféleség szelektív mérését lehetővé tevő felületi szelektív szenzorréteg kialakítása

- Biokatalitikus reakcióréteg alkalmazása

Különleges funkciót biztosító elektródmódosítás

- Kis mennyiségű anyag adott mennyiségének elektrolízissel történő bejuttatása
- Nem elektroaktív anyag voltammetriás mérésének megvalósítása
  Kapcsoló funkció létrehozása

Az alkalmazott módosító rétegek gyakran több irányú hatást gyakorolnak az elektród működésére. Így például kation cserélő sajátságú permszelektív réteg az anionok számára átjárhatatlan, ugyanakkor egyes kationos anyagféleségeket dúsíthat a felületen. Egyben befolyást gyakorolhat a diffúziós viszonyokra is.

Számos eljárást dolgoztak ki az alapelektródok kémiai módosítására. Ezek két többé-kevésbé elkülönülő csoportba sorolhatók Beszélhetünk **tömbben módosított-** és **felületen módosított elektródokról.** 

A tömbben módosított elektródok készítésekor az elektród anyagába ágyazzuk a módosító anyagot, és így viszonylag vastag szenzorréteget hozunk létre. Módosított szénpaszta

elektródok, grafit-epoxi elektródok, módosító anyaggal adalékolt szol-gél rétegű elektródok tartoznak ezen elektródok közé.

A felületi réteg módosítására, a módosító felületi réteg felvitelére számos eljárás ismeretes. Szén elektródok esetében elektromos előkezeléssel sikerülhet előnyös sajátságú felületi filmet kialakítani [24]. Az elektromos előkezelés puffer oldatban történő viszonylag nagy pásztázási sebesség melletti potenciál ciklizálásból áll (-0.5 – +3.0 V, v = 5 V/s). Elektromosan előkezelt szénszál elektródot használtak Gonon és munkatársai [25] *in vivo* agykémiai mérésekben. Az előkezelt elektród képes volt kis koncentrációban jelenlevő dopamin voltammetriás meghatározására aszkorbinsav jelenlétében. Nagy és munkatársai [26] üvegszerű szén (Glassy Carbon) elektródfelületének adszorpciós képességét növelték meg elektromos előkezeléssel.

A korábban említett összefoglaló tanulmányokhoz csatlakozva említést érdemel néhány, a kémiailag módosított elektródok sajátságaival foglalkozó közlemény [7,12, 13,27].

#### 2.1.2 Kémiailag javított sajátságú voltammetriás munkaelektródok

Az előzőekben felsorolt előnyös sajátságok egyik másik elektród típus esetében együttesen jelentkeznek. Így például a szelektivitást kedvezően befolyásoló kémiai módosító réteg, vagy adalék gyakran elektrokatalitikus sajátsága következtében megakadályozza az elektród passziválódását, vagy alacsonyabb elektródpotenciál melletti detektálást tesz lehetővé. Ennek megfelelően az alábbiakban — három többé-kevésbé átfedő részben — néhány kémiailag módosító réteget, módosítot elektródot ismertetek.

#### 2.1.2.1. Elektrokatalitikus hatással, vagy más módon szelektivitást biztosító elektródok

A különböző anyagok elektródfolyamatai gyakran gátoltak. Az elektród felületén csak viszonylag nagy túlfeszültség hatására mennek végbe kellő sebességgel. Ilyen esetekben elektrokatalizátor alkalmazásával van lehetőség a szükséges túlfeszültség csökkentésére, az illető anyag redoxi reakciójának gyorsítására. Elektrokatalitikus folyamatok alkalmazása, kutatása az elektrolízis iparokkal, a szenzorfejlesztéssel, a megújuló energiahordozók előállításával foglalkozó elektrokémikusok érdeklődésének a középpontjában van. Számos közlemény foglalkozik új elektrokatalitikus sajátságú anyagok kifejlesztésével, sajátságaik megismerésével, alkalmazási területének felderítésével. Az elektrokatalízisről több összefoglaló tanulmány jelent meg [28-30].

Elektrokatalitikus folyamat esetében, az elektródfelületén a katalizátor anyag alakul át megfelelő sebességgel végbemenő elektronátlépési reakcióban. A vizsgált, átalakítandó anyag találkozva a katalizátor megfelelő redoxi állapotú formájával, azzal kémiailag reagál. Az elektrokatalitikus reakció heterogén, ha a katalizátor anyag az elektródfelületén kötött állapotban kerül alkalmazásra. Ha a katalizátor az elektrolízis-cellában lévő folyadékban oldott, homogén katalízisről beszélünk. A homogén és a heterogén elektrokatalitikus folyamat működési sémáját mutatja be az alábbi két ábra.



 2.1 ábra Heterogén elektrokatalitikus reakció sémája S–átalakítandó anyag, P – a termék
 Ox és Red a katalizátor oxidált és redukált formája



2.2. ábra Homogén elektrokatalitikus reakció sémája

A heterogén folyamat az alábbi lépésekből áll:

- 1. Az elektród és a felülethez kötött elektrokatalizátor [31] között gyors elektronátlépési folyamat gondoskodik arról, hogy a katalizátor megfelelő oxidációs állapotban legyen.
- 2. Az átalakítandó anyag transzportja az elektródfelülethez (és adszorpció).
- 3. Az elektronátlépés (redukció, oxidáció) az immobilizált elektrokatalizátor segítségével az elektród és az illető részecske között.
- 4. A termék eltávozása a felületről (deszorpció után).

Az elektronátlépés gyakran két lépésben történik: az elektródfelület és az immobilizált katalizátor között, majd pedig a katalizátor és az átalakítandó anyag között. A katalizátor sokszor elektronátvivőként ('electron shuttle') működik. Szokásos az elektrokatalizátort mediátornak, az átalakítandó anyagot az enzimkatalízisből vett analógia alapján szubsztrátnak nevezni.

A homogén elektrokatalitikus folyamat esetében mind a szubsztrát, mind a mediátor oldott formában van jelen. Az elektródfelületén a mediátor lép elektródreakcióba. Az átalakult mediátor az oldat belsejébe jutva ott kémiai reakcióban alakítja át a szubsztrátot.

Mind ipari folyamatok, mind analitikai alkalmazás esetén előnyös, ha heterogén katalízis játszódik le. Ipari folyamatok esetében így nincs szükség a termék és a mediátoranyag elválasztására a reakció befejeztével. Analitikai alkalmazás esetén az immobilizált mediátor "reagens nélküli" szenzorfunkciót biztosíthat.

A különböző anyagok elektródreakciójának katalízisére rendkívül nagyszámú, különböző típusú elektrokatalizátor kifejlesztésére, kipróbálására, alkalmazására került sor. Közöttük nagyszámú benzofenoxazin, fenotiazin származék, különböző átmeneti fémek szerves ligandummal alkotott komplexei, fémoxidok, diszpergált fémrészecskék, egyéb szervetlen anyagok, nanoméretű bevonatok, önszerveződő redoxicsoportot tartalmazó rétegek találhatók.

A ruténium oxokomplexeinek mediátorként való alkalmazása igen népszerű. Példaképpen említem Meyer és munkatársai [32,33] közleményeit, amelyek a cis-[Ru<sup>ll</sup>(2,2-bipiridil)<sub>2</sub>(piridin)(OH<sub>2</sub>)]<sup>2+</sup>-nek különböző anyagok elektrokatalitalitikus oxidációra történő sikeres alkalmazásairól szólnak.

Mind a Ru<sup>II</sup>/Ru<sup>IV</sup>, mind a Ru<sup>III</sup>/Ru<sup>IV</sup> reverzibilis redoxpárt képez. Így a hidroxokomplex oxokomplexszé alakítható az elektródfelületén. Az oxokomplex oxidálószerként működik bizonyos anyagok jelenlétében. Vas-[34], mangán-[35], króm-[36], nikkel-[37], kobalt-[38], palládium-[39] porfirinkomplexek ugyancsak használható elektrokatalizátornak bizonyultak. A nitrogén-monoxid (NO) voltammetriás méréséhez átmenetifémek ftalocianin komplexeit [40,41] is sikerrel alkalmazták.

A glükóz maga a voltammetriás analízisben általában használt munkaelektródokkal, vizes oldatokban, az elérhető potenciáltartományban nem elektroaktív, nem mérhető voltammetriásan. A glükózmérő amperometriás szenzorok enzim katalízisen alapulnak.

A glükóznak glükóz-oxidáz enzim által katalizált reakciójában az enzim redukált formáját regeneráló reakciópartner az oxigén. Ennek helyettesítésére, az enzim oxidált formájának visszanyerésére előnyös volna elektrokémiai oxidációt használni. Az enzim redoxi csoportja (FAD/FADH<sub>2</sub>, flavin adenin dinukleotid) azonban a fehérjestruktúra belsejében foglal helyet, így közvetlen elektródreakcióba nem vihető. Különböző elektrokatalizátor anyagok használatával sikerült a glükóz enzimatikus oxidációjának oxigénkoncentrációtól való függését kiküszöbölni. Közöttük különböző ferrocén [42] származékok és ozmium-bipiridil komplexek [43,44] terjedtek el széles körben.

Heller és Gregg [45,46] polimer láncra felfűzött ozmium komplexből molekuláris huzalt készített, amely segítségével lehetőség van arra, hogy hidrogél rétegbe ágyazott enzim redoxi csoportját az elektród anyagához "drótozzuk", elősegítve az elektród és a FAD csoport közötti elektron "forgalmat". Ez a molekuláris huzal [47] kapható a kereskedelmi forgalomban is a BAS cég termékeként.

Sikerült többeknek átmenetifém-organikus ligandumokkal alkotott egyes komplexeit a glükóz oxidációját segítő elektrokatalizátorként használni.

Így Kokoh és munkatársai [48] RuCl<sub>2</sub>(2-phenylazopiridin) mediátorral szereztek kedvező tapasztalatokat. Araki csoportja [49,50] elektropolimerizált porfirin származék segítségével oxidáltak glükózt elektrokatalitikus folyamatban. Különböző fémekből, így rézből, nikkelből készült elektródok felületét bevonó oxid film lúgos közegben képes szénhidrátok, egyes karbonsavak elektrokémiai oxidációját katalizálni. A dolgozat egy részének anyagát képező kísérleti munkámban fémréz munkaelektródok viselkedését tanulmányoztam. Ezért a

fémoxid bevonatú elektródokkal kapcsolatos irodalmi előzményeket külön fejezetben foglalom össze.

A nikotinsav adenin dinukleotid — NAD/NADH (NAD(P)/NAD(P)H) — koenzim számos enzimatikus redox folyamatban vesz részt. Nagyszámú, széles területen használt analitikai módszer alapul a NADH koncentrációváltozás spektrofotometriás nyomon követésén. Annak ellenére, hogy a NADH/NAD<sup>+</sup> reakció, kedvezően kicsiny standard elektródpotenciállal rendelkezik (-0,65 V vs. TKE (telített kalomelelektród) semleges pH-n, 25 °C-on) közvetlen elektrokémiai oxidáción keresztül, voltammetriásan nem mérhető [51]. A folyamat a különböző elektródok felületén igen nagy túlfeszültséggel játszódik le. Még kellemetlenebb, hogy az oxidáció terméke az elektródfelületét bevonja, passziválja azt. Különböző elektrokatalizátorok alkalmazásával sikerült a NADH voltammetriás mérésén, nyomon követésén alapuló voltammetriás analitikai módszereket kidolgozni. Egy benzofenoxazin származék, a meldola kék (MK) kiváló elektronátvivő mediátornak bizonyult. Például a MK jól adszorbeálódó réteg formájában képes néhány napon át katalizátorként működni [26,52]. A réteg stabilitásának növelésére számos próbálkozás történt. Újabban szén nanocsövekre adszorbeált MK katalitikus hatásáról [53], elektrokémiailag készített, megfelelő stabilitású cink-oxid/MK felületi filmnek [54] a NADH oxidációt elősegítő működéséről jelentek meg tanulmányok.

Kínai kutatók közlik [55], hogy citozán/butil-metil-imidazolium tetrafluoro-borát/többfalú szén-nanocső (CHIT/BMIM·BF4/MWNT) kompozit elektród anyag használatával a NADH oxidáció túlfeszültségét jelentősen sikerült csökkenteni. Az elektród passziválódás sem jelentkezett ezen elektródanyag használatakor.

Glutamát-mérő, amperometriás bioszenzort írnak le Maalouf és munkatársai [56]. Az elektród módosított üvegszerű szén elektród alapérzékelőre épül. Az elektródfelületén a N,Nbipiridil származékot, metil-viologént tartalmazó elektrokatalitikus filmet hoznak létre. A metil-viologén jól oldódik vízben, így a felületen történő rögzítés külön gondot igényel. A szerzők nafion filmmel vonják be az elektródfelületét. A metil-viologén hidrofób része a nafion hidrofób részeivel lép kölcsönhatásba, míg a kation természetű piridinium rész a nafion polimer lánc szulfonált csoportjaival ioncsere folyamatban vesz részt. Így a mediátor helyhezkötése, immobilizálása megvalósul. Az elektródfelületén glutáraldehiddel térhálósított glutamát-oxidáz réteget képeztek ki. Az elektród működésekor az enzim szelektíven katalizálja a glutamát és az oxigén között lejátszódó reakciót. A jelet a lokális oxigén koncentráció csökkenés amperometriás detektálásával képzik az oxigén redukció alábbi, metil-viologén által "mediált" reakció alapján.

$$[(SO_3^{-})_2MV^{2+}] + 1e^{-} \rightarrow [(SO_3^{-})_2MV^{+}]$$
$$[(SO_3^{-})_2MV^{+}] + 1/2O_2 + H^{+} \rightarrow [(SO_3^{-})_2MV^{2+}] + 1/2H_2O_2$$

Üvegszerű szén elektródfelületén a fenotiazin származék, *o*-toluidin-kék multiciklusos voltammetriás program alkalmazásával elektrokatalitikus polimer réteggé alakítható. Nafion filmmel befedve nitrogén-oxid (NO) mérésére alkalmas, igen kedvező alsó méréshatárral (1.8x10<sup>-8</sup> mol/dm<sup>3</sup>) működő elektródot sikerült készíteni [57].

Elektrokatalitikus sajátságú elektródmódosító film készítésére sok esetben jól bevált a berlini kék ('Prussian blue') réteg Fe<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]<sub>3</sub> [58,59]. A berlini kék elektrokatalitikus sajátságát már a múlt század hetvenes [60], nyolcvanas [61] éveiben vizsgálták. Kafi és munkatársai [62] üvegszerű szén elektród (Glassy Carbon) felületén az úgynevezett csepp módszerrel készítettek berlini kék réteget. A készítéskor úgy jártak el, hogy savas kálium-[hexaciano-ferrát(II)] és vas(III)-klorid savas oldatából egy cseppet (20  $\mu$ l) az elektródfelületén szétoszlattak. 15 perc reakcióidő múlva az elektródot lemosták, és 100 °C-os kemencében stabilizálták a réteget. Tiol vegyületek (2-amino-etántiol) amperometriás mérésére jól alkalmazható elektródot kaptak.

A berlini kék redox mediátor anyagként való használatát némileg korlátozza, hogy pH>6 esetben Fe(OH)<sub>3</sub> képződés mellett oldódik. Ennek megfelelően kísérletek történtek más átmeneti fém hexaciano-komplexeinek elektródmódosító redox mediátorként történő felhasználására. Gallium-hexacianoferrát adalék anyag segítségével sikerült [63] a semleges pH-n is kellő stabilitású elektródot készíteni, amely a hidrogén-peroxid redukción keresztüli mérésére jól alkalmazhatónak bizonyult. A hidrogén-peroxid redukciója olyan elektródpotenciál mellett történik (0.2 V) ahol más elektrokémiai folyamatok szénpaszta elektródon nem igen mennek végbe jelentős sebességgel biológiai közegekben. Így az elektród alapérzékelőként használható oxidáz enzimen alapuló amperometriás bioszenzor készítésére is.

Az amperometriás hidrogén-peroxid mérés az alábbi elektrokatalitikus reakció soron alapul:

$$Ga^{III}[Fe^{III}(CN)_6] + K^+ + e^- \rightarrow Ga^{III}K[Fe^{II}(CN)_6]$$
$$Ga^{III}K[Fe^{II}(CN)_6] + \frac{1}{2}H_2O_2 \rightarrow Ga^{III}[Fe^{III}(CN)_6] + K^+ + OH^-$$

Elektropolimerizáció alkalmazásával készített palládium-hexacianoferrát réteggel módosított üvegszerű szén elektródot neurotranszmitterek kromatográfiás analízisére sikerrel használtak. Patkányok agyából mikrodialízissel vett mintákat analizáltak kínai kutatók [64].

Az elektródok sajátságainak módosítására használt szervetlen anyagok sorában nagy fontosságra tettek szert a különböző természetes vagy szintetikus hidratált aluminoszilikátok, a zeolitok. A  $(M^{n+})_x[(AlO_2^-)_{n^*x}(SiO_2)_y]$  m(H<sub>2</sub>O) (M=kation) általános összegképlettel jellemezhető zeolitokat széles körben használják adszorbensként, ioncserélő anyagként, katalizátorként, molekulaszitaként. Szerkezetükkel, sajátságaikkal, alkalmazásukkal igen kiterjedt irodalom foglalkozik (pl. [65, 66]).

A zeolitok alumínium és szilícium központú, egymáshoz oxigén kettős hidakkal kapcsolódó tetraéderekből felépülő térbeli struktúrák. Ezek között különböző méretű csatornák, üregek találhatók, amelyek meghatározzák a zeolitok molekulaszita sajátságait. Az alumínium központú tetraéderek extra negatív töltést hordoznak, ezek töltéskiegyenlítő kationok ( $M^{n+}$ ) jelenlétét igénylik. A kationok többé-kevésbé szabadon mozoghatnak a struktúrán belül, helyettesíthetők, részt vehetnek ioncsere folyamatokban. A struktúrán belül található csatornák mérete méretkizárásos jellegű szelektivitást biztosíthat.

A megfelelő sajátságú zeolittal módosított elektród képes lehet akkumulálni a mérendő elektroaktív kationt, megakadályozhatja interferáló anyagoknak az elektródfelületre jutását, elősegítheti potenciometriás elektródpotenciál válasz kialakulását.

A zeolittal módosított elektródok készítésére különböző módszerek váltak be [67, 68]. Ezek a következő csoportokba sorolhatók:

1. A zeolit részecskék szilárd mátrixban történő diszpergálása.

- 2. A zeolit porának és vezető anyagnak (pl. grafit pornak) összesajtolása.
- 3. Szilárd elektródfelületének bevonása zeolitot tartalmazó polimer filmmel.
- 4. Zeolit részecskék kovalens kötése elektródfelülethez.

Elektródok felületén képzett vezető polimer rétegek is rendelkezhetnek elektrokatalitikus sajátsággal [69]. Bello és munkatársai [70] aszkorbinsav elektrokémiai oxidációja esetében, platinaelektródra leválasztott poli(3,4-etiléndioxitiofén) (PEDOT) réteg elektrokatalitikus sajátságát tanulmányozva tapasztaltak kedvező méréstechnikai jellemzőket.

Az elektródok felületén kialakított polianilin (PAN) filmek sajátságait, alkalmazásuk lehetőségeit sokan tanulmányozták. A megfelelően képzett réteg a pH<4 tartományban rendelkezik elektrokatalitikus sajátsággal [71-75]. A pH tartomány kiszélesítésére többen tettek kísérletet. Savas komponens membránba történő beépítésével értek el eredményeket [76,77]. A kémiailag képzett PAN oldatba vihető és savas szennyezőkkel keverhető. Sikerült ily módon mind az elektromos vezető, mind az elektrokatalitikus sajátságot a semleges tartományban is megőrző filmeket készíteni [78,79].

Zhang [80] platina elektródfelületén anilin és  $\beta$ -naftalin-szulfonsav elektrokémiai kopolimerizációjával elektrokatalitikus PAN-NAS réteget hozott létre. Az így módosított elektródon az aszkorbinsav oxidációja jelentősen alacsonyabb elektródpotenciál mellett megy végbe, a voltammetriás csúcspotenciál 0.62V-ról 0.34 V-ra változik a kompozit film hatására. Ciklikus voltammetriás és forgóelektródos vizsgálatok során a képződött naftalin-szulfonsav hatására a felületi réteg elektrokatalitikus sajátsága intenzívebbé vált és a felületi réteg által mediált elektroncsere folyamat a gyengén lúgos pH tartományban is végbement.

A pirrol elektropolimerizációjával készített polipirrol,- nano huzalokból álló - vezető polimer réteggel módosított szénelektródon a nitrit ionok redukciója igen nagy sebességgel, viszonylag alacsony elektródpotenciál mellett megy végbe [81]. A nanohuzal réteg elektrokatalitikus sajátsága nagyon stabilnak bizonyult.

Igen nagyszámú közlemény jelent meg különböző anyagok, festékek elektródfelületén történő elektropolimerizációjával képzett, kémiailag módosított elektródok készítéséről, vizsgálatáról. A festékek elektropolimerizációja során megnövekedett elektrokatalitikus sajátságú térhálós oligomerek keletkezhetnek [82].

A *Coccus cacti* rovar nősténye által kibocsátott festékanyag, a carmin [83] elektropolimerizációjával állított elő igen kedvező elektrokatalitikus sajátságú polimer filmet Wang és munkatársai [84]. Az elektród jól használhatónak bizonyult trinidazol mérésére.

Üvegszerű szén elektródfelületén brómfenol kék festéket elektropolimerizálva stabil elektrokatalitikus réteget sikerült kialakítani [85]. Az így módosított elektród

folyadékkromatográfiás detektorként is jól működött. Segítségével vizelet mintákban kielégítő pontossággal sikerült a klinikai diagnosztikában gyulladás markerként használható 5-hidroxi-indolecetsav (5-HIAA) és 5-hidroxi-triptamin (5-HT) kromatográfiás mérését elvégezni.

Kationcserélő sajátságú titán foszfát réteggel bevont szilikagél tömbmódosító anyag segítségével sikerült [86] a neurotranszmitter dopamin koncentráció aszkorbinsav jelenlétében történő meghatározásra alkalmas szénpaszta elektródot készíteni. A biológiai közegekben gyakran, viszonylag nagy koncentrációban jelenlevő aszkorbinsav mellett nehéz a nagyságrendekkel kisebb koncentrációjú transzmitter anyagokat mérni. Ez esetben a módosító anyag kationcserélő sajátsága teszi lehetővé a szelektív mérést. A dopamin ugyanis a semleges pH mellett kationként fordul elő, míg az aszkorbinsav anion. A titán-foszfát módosító anyag taszítja az anionokat.

Katalitikus sajátságú fém részecskék elektródfelületén való immobilizálásával az elektródok analitikai sajátságai kedvezően befolyásolhatók. Nano méretű, hidrofobizált arany részecskéket kötöttek kínai kutatók üvegszerű szén elektródfelületéhez [87] oktadodecilamin kapcsoló ágens segítségével. Így sikerült stabil, elektrokatalitikus sajátságú, a 2,5-dihidroxibenzolszulfonsav – dietanolamin (Ethamsylate, ESL) mérésére kiválóan alkalmas elektródot készíteni.

#### 2.1.2.2. Az elektrokatalitikus rézelektród

Munkám során az elektrokatalitikus rézelektród működését részletesen vizsgáltam, ezért itt részletesebben említem az illető elektróddal kapcsolatos irodalmi előzményeket.

A potenciál pásztázó voltammetriás módszerek alkalmazásakor munkaelektródnak a széles potenciál ablakot biztosító, elektronforrásként, vagy elektronnyelőként működő inert nemesfém vagy szénelektródok előnyösek. Amperometriás mérésekben azonban jól működhetnek a szűk potenciál ablak mellett stabil elektródok is. Ezek között találjuk a fémrézből készített elektródokat, a szénpasztában diszpergált réz- vagy nikkel szemcséket tartalmazó mérőfelülettel készített elektródokat.

A múlt század nyolcvanas évei közepén Stulik és munkatársai [88] vizsgálták a voltammetriás rézelektródnak HPLC detektálás célra való alkalmazhatóságát. Két különböző detektorcellát készítettek és különböző paramétereknek a rézelektródos detektorcellára gyakorolt hatását vizsgálták. Minta anyagként aminosavakat és kolint használtak. Más munkáikban dipeptideket [89] és etilén tiokarbamidot [90] analizáltak HPLC technikával. A réz munkaelektródos detektorcella használata szükségtelenné tette a más detektoroknál szükséges származékképzést. Baldwin és munkatársai [91] a kilencvenes években aminosavak és peptidek elektrokémiai oxidációját vizsgálták réz elektródfelületén. Két különböző oxidációs mechanizmust valószínűsítettek. Gyengén lúgos közegben 0 V körüli potenciálon az elektród anyaga oxidálódott Cu<sup>2+</sup> komplexet alkotva az aminosavakkal, peptidekkel. Erősen lúgos közegben magasabb elektródpotenciál mellett az elektrokatalitikus oxidációt találták dominánsnak.

Singhal és Kuhr [92] sikeresen detektált réz mikroelektróddal nukleotidokat. Munkájukban szinuszos váltóáramú voltammetriás mérőprogramot használtak. Ez lehetővé tette a pmol tartományban történő detektálást. Megfigyelésük szerint a molekulák cukor része biztosította az elektródválaszt.

Lin, Xu és Chen [93] kapilláris elektroforézises elválasztásokhoz használtak amperometriás detektálást. Purin bázisokat, ribonukleozidokat és ribonukleotidokat választottak el. Széles koncentrációtartományban érzékeny, lineáris választ adó réz mikroelektródot tartalmazó 'wall jet' típusú cellát használtak munkájukban.

Casella, Guascito és Benedetto [94] rézzel módosított aranyelektródot alkalmaztak tiocianát ionok ionkromatográfiás (IC) elválasztásához és meghatározásához. Ennek működését megfelelőnek találták vizeletminták analízise során. Hasonlóan vizelet mintákat elemeztek Hong és Baldwin [95]. IC elválasztást és rézelektródon történő oxidáción keresztüli detektálást alkalmaztak. Módszerükkel a kémiai metabolizáció számos fontos markerét, aldolitokat, szénhidrátokat, aminosavakat meg tudtak határozni megfelelő érzékenységgel és precizitással. Baldwin [96] kapilláris elektroforézises elválasztás detektálására is sikerrel alkalmazott korong alakú réz mikroelektródot aminosavak és peptidek analíziséhez. Korábbi munkájukban [97] üvegszerű szénelektródot elektrokémiailag leválasztott réz réteggel módosítottak. Így alkalmassá tették azt szénhidrátok amperometriás detektálására.

Tizenöt különböző cukor komponens kapilláris zóna elektroforézises elválasztással megoldott analíziséhez sikerrel alkalmaztak lúgos közegben működő amperometriás rézelektródot Colon és munkatársai [98]. Munkájukban 25 µm átmérőjű rézdrótból készítettek elektródot, így femtomol tartományba eső anyagmennyiségeket tudtak analizálni. A kalibrációs görbe három nagyságrenden át lineárisnak mutatkozott.

#### 2.1.2.3. Elődúsítás kémiailag módosított elektródokkal

Szénpaszta elektródok esetében gyakran az elektród módosító anyagot a szénpaszta készítésekor a szénporhoz adják oldat vagy por formában. Az anyagot és a szénport a pasztásító adalékként használt paraffinolajjal alaposan elkeverve készítik az úgynevezett tömbben módosított szénpasztát. Természetesen, ha a módosító anyag költséges, akkor az elektród összeállításakor a pasztacsésze aljába módosító anyagot nem tartalmazó "passzív pasztát" préselnek és csak az elektród felszínéhez közeli részbe juttatják az "aktív" módosított pasztát.

Riboflavin mérésre alkalmas, koronaéterekkel tömbben módosított szénpaszta elektródokkal végzett sikeres kísérleteket írnak le Kotkar és munkatársai [99].

A szén nanocsövek szénpasztában való ágyazásával, eloszlatásával többeknek sikerült kedvezően befolyásolni az alapelektród analitikai sajátságait pl. [100,101].

A tömbben módosított szénpaszta elektród alkalmasan megválasztott módosító anyag alkalmazásakor a minta elődúsításával hozzájárulhat az alsó méréshatár kedvező kiterjesztéséhez. Kubai kutatók [102] furoil tiokarbamid származékokat vizsgálva készítettek nyomnyi mennyiségben jelenlevő kadmium mérésére alkalmas szénpaszta elektródot. Az illető komplexképző tiokarbamid származékok, amelyek az ionszelektív elektródok készítéséhez korábban alkalmasnak bizonyultak, a pasztában eloszlatva akkumulálják a

mintában levő kadmium ionokat. Az analízis során az összegyűjtött kadmium ionokat az elektródfelületén redukálják, majd az anódos sztripping analízis munkamódszerét követve képzik az inverz voltammetriás jelet.

A szol-gél technika számos esetben mutatkozott alkalmasnak biokatalitikus sajátságú rétegek kialakítására. Ezek készítésekor a gélképző szilikátot pl. tetraetil-ortoszilikátot (TEOS) a beágyazandó anyag oldatával és a reagenssel összekeverve képezik a rendszerint üvegszerűen átlátszó, a kis molekulák számára átjárható xerogélt. Szén nanocső réteggel módosított üvegszerű szén elektródfelületén laktát-oxidáz enzimet tartalmazó szol-gél réteget kialakítva stabil, gyors válaszú laktátmérő bioszenzort készítettek Huang és munkatársai [103].

Szol-gél mátrixba ágyazott, összetett módosító réteggel ellátott kerámia szénelektród alkalmasnak bizonyult inzulin koncentráció mérésére [104]. Amperometriásan detektált FIA készülék alkalmazásakor, közel semleges közegben (pH=7.4) az elektróddal 4 pM alsó méréshatárt és 100-500 pM dinamikus méréstartományt értek el. Az elektród módosító rétegébe 2-3  $\mu$ m átmérőjű nikkel fémrészecskéket és [oktacianomolibdát(IV)]-iont tartalmazó (K<sub>4</sub>[Mo(CN)<sub>8</sub>]) mediátor anyagot ágyaztak be. Az elektród működése az alábbi reakció soron alapul:

$$Mo(CN)_8^{4-} \rightarrow Mo(CN)_8^{3-} + e-$$

 $Mo(CN)_8^{3-}$  +Inzulin(redukált forma)  $\rightarrow Mo(CN)_8^{4-}$ +Inzulin(oxidált forma)

A nikkel az elektronátlépési folyamatot katalizálja.

A *p-terc*-butil-calix[6]arénnel tömbben módosított szénpaszta elektródfelületén a mintában lévő fólsav akkumulálódik [105]. Az elektród úgy készül, hogy a kalixarén származék acetonos oldatát szénporral homogenizálják. Az így keletkező zagyból az aceton elpárolgása után paraffinolaj pasztásító anyaggal, hagyományos módon készült a kémiailag módosított szénpaszta. A folsavmérés alsó méréshatárát differenciál impulzus voltammetriás (DPV) technika alkalmazásával 1.24x10<sup>-12</sup> mol/dm<sup>3</sup>-nek találták a szerzők.

A kadmium sztripping analíziséhez használt, tömbben módosított szénpaszta elektród készítésekor Hernandez és munkatársai [102] a szénpor adott százaléknyi mennyiségét helyettesítik szilárd porként hozzáadott módosító anyaggal, például 1-furoil-3-benzil-3-feniltiokarbamiddal. A porkeverékhez adva a pasztásító olajat, készítik el a szénpasztát. Az analízis során a mintaoldatból a kadmium az elektródfelületén komplexképződés hatására akkumulálódik. A komplexképzés utáni elektrokémiai redukció, majd a differenciál impulzus voltammetriásan detektált anódos sztripping lépés használatával igen kis koncentrációjú oldatokban volt lehetőség a kadmium mérésére.

Diacetildioximmal, tömbben módosított szénpaszta elektróddal [106] ólom és kadmium mérés bizonyult előnyösen megoldhatónak differenciál impulzus voltammetriás méréstechnikát alkalmazva. A módosító anyagot alkoholos szuszpenzió formában homogenizálták a szénporral.

Szitanyomással készített, különböző, elődúsító ágenssel kémiailag módosított szén elektródokról többen számolnak be [107,108]. Vízben nem oldódó kalixarén származékkal módosított, szitanyomással készített elektróddal végzett kísérletekről szól Hart és munkatársai [109] közleménye. Módszert dolgoztak ki nyomnyi mennyiségben jelenlevő ólom mérésére. Módszerük szerint az elektróddal nyílt áramkör mellett 10 percig tartó kémiai elődúsítást végezve, az elektródot ezután lemosva, megfelelő puffer oldatba helyezve differenciál impulzus anódos sztripping voltammetriás módszerrel 5-100 ng/cm<sup>3</sup> tartományba eső ólomion koncentráció meghatározható.

Üvegszerű szén elektródfelületét Langmuir-Blodget filmben eloszlatott komplexképző sajátságú *p*-allil-kalix[4]arén származékkal módosították kínai kutatók [110]. Jól alkalmazhatónak találták az elektródot nyomokban jelenlevő kadmium és tallium anódos sztripping technikával történő mérésére. A sztripping mérésekkor alkalmazott elektrokémiai dúsítás során nagy koncentrációban jelenlevő ólom, vagy indium ionok redukálódva az elektród felületén, és az anódos visszaoldáskor nagy áramcsúcsot produkálva a meghatározást zavarhatják. A kalixarén származék a szupramolekuláris kölcsönhatáson alapuló kelátképzésben az elektród felületén többé-kevésbé szelektíven akkumulálja a tallium és kadmium ionokat. A szelektív kelátképzés a Pearson féle "kemény-lágy" sav-bázis elmélet alapján magyarázható (HSAB principe) [111]. A tallium<sup>1</sup> (TI<sup>+</sup>) és a kadmium<sup>II</sup> (Cd<sup>2+</sup>) ionok ugyanis könnyen polarizálható, kis effektív magtöltésű, viszonylag nagy ionrádiuszú lágy "soft" ionok (savak). Az illető kelátképző mint (az allil csoport és a benzol gyűrű miatt) lágy bázis, előnyben részesíti a lágy ionokat a kemény indium és az átmeneti jellegű ólom ionokkal szemben.

#### 2.1.2.4. Különleges funkciójú módosított elektródok

Megfelelően készített, kémiailag módosított elektródokkal sikerült egyes esetekben [112,113] elektroaktivitást nem mutató anyagféleségek mérésére alkalmas módszert kidolgozni. Az illető dolgozatok szerzői detektálásra pulzáló amperometriás módszert használtak. Munkaelektródként vezető polimer sajátságú polipirrol réteggel bevont elektród szolgált. A polipirrol réteget az analizálandó fenol típusú anyagokra szelektív antitestet tartalmazó oldatból elektrokémiai polimerizációval állították elő. Így a polipirrol réteg magába zárt jelentős mennyiségű antitestet. A mérés során az elektródpotenciálját megfelelő program szerinti potenciál pulzusok alkalmazásával változtatták, és regisztrálták a pulzusok hatására kialakult áram - idő jelet. A potenciál pulzus hatására a vezető polimer réteg periódikusan redukált állapotából oxidált állapotába jutott, majd visszaalakult. A redoxi reakció ilyenkor együtt jár a töltést egyensúlyozó ionoknak az oldat és a membrán közötti transzportjával. Az oxidáció során az anionok a membránba jutnak, a kationok pedig elhagyják azt. Redukció esetén a transzport iránya fordított. Az illető ionok mobilitása nagymértékben befolyásolhatja az egymással ellentétes ionmozgás mennyiségi arányait. Áramló oldatos (FIA) üzemmódban az analizálandó antigén anyagok annak ellenére, hogy nem elektroaktívak, injektált mennyiségüktől függő pulzáló amperometriás jelet hoztak létre. A jel kialakulását a szerzők annak tulajdonították, hogy az antigén – antitestkötődés megváltoztatta a töltés kiegyenlítő transzport folyamatok sajátságait.

A jelenséget nyúl Ig antigén minta anyag - anti nyúl Ig antitest- ('rabbit IgG antigen - antirabbit IgG antibody') esetében 200 ms hosszúságú -0.2 - +0.4V vs. Ag/AgCl potenciál pulzus alkalmazásával részletesebben megvizsgálva [114] szelektív, reverzibilis pulzáló amperometriás választ kaptak FIA körülmények között.

A jelenség szokatlan. Az antigén- antitestkötődés ugyanis nem reverzibilis. Az immunokomplex nehezen bontható. Az illető szenzor azonban egymás utáni mintainjektálás során reprodukálható jelet adott. Magyarázatként a szerzők feltételezik, hogy az antigénantitest kötődési reakció két lépésből áll. Az elsődleges lépés coulomb és van der Waals erőhatásokon alapul. Ezek viszonylag nagy kötéstávolságon keresztül (100 nm) ható erők. Gyorsan hatnak, de a teljes kötési energiához csak kis mértékben járulnak hozzá. A második lépés rövidtávú erőhatásokon, azaz hidrogén hidak kialakulásán, hidrofób hatásokon alapul. A kötési energia nagy részét ezek a viszonylag lassú folyamatok szolgáltatják. Ezek felelősek az immunkötődés effektív irreverzibilitásáért.

A pulzáló amperometriás FIA körülmények közötti detektálás a reakció első gyors lépésén alapul. Valószínűsíthető, hogy ez a lépés reverzibilis.

### **2.2. ELEKTROKÉMIAI BIOSZENZOROK: A KÉMIAILAG MÓDOSÍTOTT ELEKTRÓDOK** SPECIÁLIS TÍPUSAI

A kémiai érzékelők az analitikai kémia fontos, napjainkban igen gyorsan fejlődő eszközei. Segítségükkel információ szerezhető különböző anyagok különböző közegekben, mintákban lévő koncentrációjáról. A kémiai szenzorok működését a vizsgált anyagok jelenlétéből adódó változások, jelenségek teszik lehetővé. A szenzorfunkció alapulhat abszorbancia-, vezetőképesség-, törésmutató-, hővezetési tényező-, frekvencia-, elektródpotenciál- stb. változáson, reakcióhő detektálásán, hogy csak néhányat említsek. Ennek megfelelően rendkívül sokféle kémiai szenzort fejlesztettek ki. Közülük számos alkalmazása széleskörűvé vált napjainkra.

A kémiai szenzorok működése, teljesítőképessége is széles skálán mozog. Egyes szenzorok csak bizonyos anyagféleségek jelenlétét, küszöbértéket meghaladó koncentrációját képesek jelezni, mások egy anyagra vonatkozó, szelektív, pontos koncentráció adatot szolgáltatnak. Egyes szenzorok képesek reverzibilisen működni, megbízhatóan használhatók folyamatos monitorálásra, más szenzorok csak egyszer használhatók, regenerálásuk nehéz, vagy nem is lehetséges. Jelentős különbségek lehetnek az egyes kémiai szenzorok raktározási és munkastabilitásai között.

A IUPAC az alábbiak szerint definiálja a kémiai szenzorok fogalmát [115]:

"Chemical sensor: A device that transforms chemical information, ranging from the concentration of a specific sample component to total composition analysis, into an analytically useful signal. The chemical information, mentioned above, may originate from a chemical reaction of the analyte or from a physical property of the system investigated. Chemical sensors contain two basic functional units: a receptor and a transducer part. Some sensors may include a separator which is, for example a membrane."

#### Azaz

'A kémiai szenzor olyan eszköz, amely analitikailag hasznos jellé alakítja a speciális minta komponens koncentrációjától egészen a teljes minta-összetétel analízisig terjedő kémiai információt. A nevezett kémiai információ származhat az analizálandó minta kémiai reakciójából vagy a vizsgált rendszer fizikai sajátságaiból. A kémiai szenzorok két funkcionális alapegységet tartalmaznak: a receptort (anyag felismerő egységet) és a transzducert (jelképző alapegységet). Egyes szenzorok tartalmazhatnak elválasztó részt, amely például egy membrán is lehet.'

Így kémiai szenzor a pH mérő üvegelektród, az éghető gázok jelenlétét jelző zárt téri monitor, vagy a környezeti  $NO_x$  monitor.

A kémiai érzékelők speciális csoportját képezik a bioszenzorok. Tulajdonképpen a bioszenzor név, — különösen a régebbi közleményekben — jelenthetett olyan szenzort, amely felépítése, mérete, sajátságai következtében különösen alkalmas volt biológiai közegekben történő mérésekre. Ily módon a klinikai gyakorlat számára készült pH mérő gyomor-szonda, vagy a kísérleti állatok testszöveteiben történő mérésekre használatos tűszerű voltammetriás vagy potenciometriás elektródokat is nevezhetjük bioszenzoroknak.

A bioszenzorok név napjainkban inkább az olyan szenzorok megkülönböztetésére használatos, amelyek esetében a szenzor receptor (anyagfelismerő) alapegysége valamilyen biológiai jellegű mechanizmus alapján működik. (Nevezhetjük [116] ezt a fajta bioszenzort biomimetikus szenzornak, míg a biológiai minták analízisére használatosat biomátrix szenzornak).

A "biomimetikus" bioszenzorok tehát a biológiából ismert, sok esetben nagy szelektivitást biztosító anyagfelismerő jelenségeket használják az analízis céljaira. A bioszenzor készítéshez természetesen megfelelő jelképző (szignál transzdukciós) egységről is gondoskodni kell. Ennek megfelelően a viszonylag nagyszámú biológiai jellegű anyagfelismerő receptor és a lehetséges számos jelképző alapegység kombinációja igen nagyszámú, különböző bioszenzor kifejlesztését tette, illetőleg teszi lehetővé. A bioszenzorok kutatásával, alkalmazásával igen kiterjedt szakirodalom, a széles spektrumú analitikai és biokémiai szakfolyóiratok mellett több, csak erre specializálódó folyóirat, illetőleg nemzetközi konferencia sorozat foglalkozik. (Pl. Biosensors and Bioelectronics, Sensors (<u>http://www.mdpi.org/sensors/</u>), World Congress on Biosensors Series). A bioszenzorok kutatása közel fél évszázados múltra tekint vissza.

Az első bioszenzort az amperometriás oxigén elektród kifejlesztésével híressé vált Leland C. Clark (1918-2005) írta le 1962-ben [117]. Az ő munkája nyomán 1974-ben a Yellow Springs Instruments cég bocsájtotta piacra az első kereskedelmi bioszenzort. A korai bioszenzorok elektrokémiai jelképzőkre épültek és biokatalitikus reakciót alkalmaztak a szelektív anyagfelismerési lépés biztosítására. Ezeket a bioszenzorokat szokásos enzimelektródoknak nevezni. Igen gyakran az enzimelektródokat a kémiailag módosított elektródok egy fontos csoportjaként szokásos tárgyalni.

Ez a szemlélet tükröződik a IUPAC "Orange Book"[115] kiadványában szereplő definícióban is:

#### "Biosensor

A special type of International Union of Pure and Applied Chemistry based on a biochemical recognition process; the biosensor surface is modified by the attachment of a biocomponent (e.g., enzyme, antigen/antibody, certain Langmuir-Blodgett films, liposomes, plant or animal tissue, etc.) which functions as the chemoreceptor. (Alternative term: *bioanalytical sensor*)."

#### Azaz

A bioszenzorok a kémiailag módosított elektródok (CME) vagy ionszelektív elektródok (ISE) egy speciális típusát képezik, amelyek biokémiai anyagfelismerő folyamaton alapulnak; a bioszenzorok felületét egy ahhoz kapcsolódó biológiai komponens (pl. enzim, antigén/antitest, bizonyos Langmuir-Blodget filmek, liposzómák, növényi és állati szövetek) módosítja. Ez a biokomponens kémiai receptorként működik.

A IUPAC összefoglaló fogalomgyűjtemény és nevezéktan megjelenése, 1997 óta eltelt időben a bioszenzorok jelentősen fejlődtek, a fenti definícióba nem illeszthető új bioszenzorok jelentek meg. A közelmúltban születtek meg például az első aptamer típusú kémiai receptorokon alapuló bioszenzorok. A jelképzésre használt alapegységek fajtái is jelentősen bővültek, így optódmembránokon, kvarc mikromérlegen, plazmon rezonanciás detektoron, felületi akusztikus hullám detetektoron alapuló bioszenzorok széles skálájának kifejlesztéséről, alkalmazásáról olvashatunk a szakirodalomban.

A bioszenzorokról számos monográfia és összefoglaló tanulmány jelent meg [118,119]. Ezen helyen nem célom a területen folyó munkáról, az azzal foglakozó igen kiterjedt szakirodalomról részletes összefoglalást adni. E helyett a területen folyó munka irányainak rövid említése mellett részletesen csak a munkámhoz közvetlenül kapcsolódó, a munka során tanulmányozott irodalmi előzményekről adok számot.

#### 2.2.1. Szelektív felismerő biológiai rendszerek

#### 2.2.1.1. Biokatalitikus reakción alapuló bioszenzorok

Amint azt korábban említettem, az elsőként kidolgozott bioszenzorok működése enzim katalízisen alapul. Ezek készítése során valamely alapérzékelő mérőfelületét biokatalitikus réteggel vonják be, immobilizálják a bioréteget a felületen. A szenzor működése a szubsztrát és reakcióirány specifikus kémiai reakción alapul. Azaz, ha a szenzor szubsztrátot nem tartalmazó közeggel érintkezik, akkor az alapérzékelő mérőfelületén lévő koncentráció viszonyok megegyeznek az oldat belsejében lévőkkel, nem megy végbe kémiai folyamat. Azonban, ha a közegbe szubsztrátot juttatunk, akkor, amint az a felületi reakciórétegbe jut, koncentrációtól függő sebességgel kémiai folyamat indul. Ennek hatására az alapérzékelő felületén lokálisan megváltoznak a koncentráció viszonyok, entalpiaváltozás is létrejön. Az alapérzékelő a változást jelezve képzi az analitikai jelet. Természetesen a diffúzió igyekszik a lokális koncentráció különbséget kiegyenlíteni. Ennek megfelelően gyors reakció eredményez érzékeny detektálást. A stacionárius jel elérése érdekében célszerű konstans diffúziós rétegvastagságot biztosító intenzív konvekciót alkalmazni az illető közegben. A biokatalitikus rétegben kialakuló koncentráció profilok mennyiségi viszonyainak leírásával, modellezésével számos közlemény foglalkozik [120-124].

A szenzorkészítésre alkalmazott biokatalitikus folyamatok sokfélék. Sok esetben az analitikai funkció több enzim szekvenciális, kompetitív vagy a szubsztrátot reciklizáló hatására jön létre.

#### 2.2.1.2. A biológiai felismerést végző anyag (enzim) immobilizálás

A bioszenzorok szelektív anyagfelismerést végző funkcionális egységét, — enzimszenzorok esetében az enzimet magát — az alapérzékelő felületéhez kell rögzíteni.

Szilárd hordozóhoz kötött enzimek alkalmazása széles körű. A bioszenzorok reakciórétegének készítése mellett előnyös egyes ipari biokémiai folyamatokban is immobilizált enzimeket használni [125,126]. Reaktor oszlopokban levő töltethez, vagy egyéb formában alkalmazott enzim katalizátor ugyanis többször felhasználható, emellett a reakció lejátszódása után nem jelent külön, — sokszor nehéz technológiai — problémát az enzim katalizátor eltávolítása. Immobilizált enzimek alkalmazásának a gyógyászatban is jövőt jósolnak [127-129].

Az enzimek immobilizálására fizikai és kémiai módszereket használnak.

A **fizikai** immobilizálás módszerek között fontos helyet foglal el a szilárd porózus felületen történő adszorpció. A nagy molekulatömegű enzimek szívesen adszorbeálódnak porózus alumínium oxid, szilikagél vagy aktív szén felületén. Természetesen a deszorpció is könnyen bekövetkezhet, így az adszorpcióval készített biokatalizátorok esetében nem zárható ki, hogy az enzim eltávozva a reakcióelegybe jut. Az immobilizált enzimekkel foglalkozó korai közlemények [130] az adszorbeált invertáz sajátságairól szóltak.

Ioncserélő sajátságú hordozón stabilabb fizikai jellegű enzimkötődés alakítható ki. A bioszenzorok készítésekor gyakran alkalmazott fizikai enzimkötési módszer a hidrofil gélbe zárás. Ekkor a gélképző anyag oldatában oldják az immobilizálni kívánt enzimet, illetőleg enzimeket, majd alkalmas térhálósító ágenssel a közeg gélesedését idézik elő. A nagyméretű fehérje molekulák mozgását a gél szerkezete megakadályozza, míg az enzim katalizálta reakcióban résztvevő kisebb molekulák gélen belüli mozgása kevésbé gátolt. Így az enzim katalitikus hatása érvényesülhet. Gélképző anyagként sok esetben *N,N*-metilén-biszakrilamid ágenssel térhálósított akrilamid-oldat szolgál [131]. Amint az jól ismert, ezt használják némileg más arányú térhálósítás mellett a gélelektroforézis gyakorlatában elválasztó fázisként.

Újabban előnyösen alkalmaznak alkoxi-szilán származékokból készített szol-gél mátrixot [132] gélbe zárt enzimkészítmények előállítására. A szol-gél típusú xerogélből apró szemcseméretű katalizátor töltet előállításával a diffúziós gát csökkenthető.

Úgynevezett mikrokapszulás enzimkatalizátor készítmények [133] preparálhatók oly módon, hogy enzim oldat cseppecskéket vízzel nem elegyedő monomer oldatban eloszlatnak, majd szál vagy membrán alakú polimer mátrixot képeznek, amely tartalmazza a mikrokapszulákba zárt enzim oldatot. Az így készített enzim preparátumok mind ipari folyamatokban, mind a gyógyászatban alkalmazást nyertek.

Langmuir-Blodget filmbe zárt enzimkészítmények [134] vizsgálatáról is olvashatunk a szakirodalomban. Az enzim katalízisen alapuló bioszenzorok esetében sokszor az

alapérzékelő mérőfelületére viszkózus enzim oldatot viszünk fel. A megfelelő rétegvastagság biztosítására távtartó szűrő, papírszövet korong vagy nylonháló szolgálhat. Majd a felületet féligáteresztő sajátságú membránnal burkoljuk be. Ez a megoldás alkalmas a működési koncepció ellenőrzésére, rövid ideig tartó vizsgálatára. Alapérzékelő felületének biokatalitikus réteggel történő bevonására alkalmazható, hasonlóan egyszerű módszer agaróz gélbe záráson alapul. Az enzim pufferrel készített oldatát alacsony hőfokon gélesedő agaróz oldatba keverjük, a szenzor felületén szétterítjük az oldatot. A gélesedés után az enzimréteg működésre kész. Így például katekol mérő bioszenzort készítettek Tembe és munkatársai [135] tirozináz enzimet agaróz és guar gumi keverék-gélbe zárva.

Az enzim és a hordozó között kialakított kovalens kötésen alapuló **kémia enzimimmobilizálás**sal igen sokan foglalkoztak. A kidolgozott módszerek három csoportba sorolhatók.

A módszerek jelentős része első lépésben vízoldhatatlan mátrix anyagot alkalmas reagenssel aktivál, annak felületén az enzim fehérje OH- vagy NH<sub>2</sub>- csoportjaival enyhe körülmények között reagálni képes csoportot alakít ki. Második lépésben történik az enzim és az aktív hordozó anyag reakciója. A kötődés ilyen esetben stabil, ugyanakkor a kovalens kötés létrejöttével megváltozhatnak az enzim tulajdonságai. Jelentősen csökkenhet az aktivitása, megváltozhat a működés pH optimuma, kedvezően alakulhat a hőstabilitása, élettartama. A kémiai kötési procedúrák nagy gondot igényelnek. Könnyen előfordul, hogy a kapott preparátum nem rendelkezik kellő aktivitással.

A bioszenzorok készítése során igen gyakran alkalmaznak polírozott arany felülettel rendelkező alapérzékelőt. Az amperometriás alapelektród mellett az SPR ('Surface Plasmon Resonance') detektor, a kvarc mikromérleg, vagy egyes hullámvezető, vagy egyes felületi hullám terjedési sebesség detektorok mérőfelületén is találhatunk vékony arany filmet. Amint az jól ismert, megfelelő szerkezetű, SH- csoportot tartalmazó molekulák hajlamosak kompakt önszerveződő bevonatot képezni arany felületen szulfhidril csoportjukkal a fém felé fordulva, egymással párhuzamosan elrendeződve. Ha az SH-csoportot tartalmazó molekula másik részén alkalmas reaktív csoportot tartalmaz, akkor ehhez kovalensen bioreagenst kötve előnyös tulajdonságú, gyors válaszú bioszenzor készíthető. Ezt többeknek sikerült pl. [136] különböző bioszenzorok esetében kétséget kizáróan igazolni.

A másik lehetőség az enzim fehérje oldatának alkalmas bifunkciós reagenssel történő térhálósítása. A célra jól megfelel a glutáraldehid reagens oldata vagy gőze. A térhálósítás előtt az enzim oldatához szokásos inert fehérjét, marha szérum-, vagy tojás albumint adni, ezzel mintegy hígítani azt, így csökkenteni a térháló kötőhelyeinek kialakulása következtében blokkolt katalitikusan aktív helyek számát az enzimgélben.

Néhány gyakran alkalmazott kovalens kötéssel működő enzim immobilizálás módszer reakciósémáját mutatja be a következő 2.3. ábra.





izo-karbamid

N-szubsztituált karbamát

Cellulóz - hangysav-klorid-etilészter immobilizálás



Enzim immobilizálása acil-izo-karbamiddal karboxil gyökkel rendelkező mátrixra



Enzim immobilizálás glutáraldehiddel







2.3. ábra Néhány enzim-immobilizálásra alkalmazott kémiai reakció sémája

Munkámban a glutáraldehides térhálósítás módszerét, a bioszenzor készítésről szóló szakirodalomban olvasható, elterjedten használatos eljárást alkalmaztam kissé módosítva.

A dolgozatba foglalt bioszenzoros kísérleteimben glükózmérő és putreszcinmérő amperometriás bioszenzorokat készítettem, azok működését, alkalmazhatósági körét tanulmányoztam. Mindkét elektródfajta oxidoreduktáz enzimet, glükóz-oxidázt, illetve putreszcin-oxidázt tartalmazó reakciórétegben. Az elektródok működése az illető szubsztrát enzim-katalizálta oxidációja során keletkező hidrogén-peroxid amperometriás detektálásán alapul. Ez a megoldás jól ismert. A kereskedelemben kapható bioszenzorok közül több működése alapul erre a sémára.

#### 2.2.2. Glükóz mérő bioszenzorok

A glükóz bioszenzorok kutatása igen széleskörű. Amint azt már említettem, az első bioszenzor is a glükóz meghatározására szolgált.

A fejlett országok lakosságának több mint öt százaléka szenved a diabetes mellitus valamelyik válfajában. Az 1-es típusú diabétesz a hasnyálmirigy  $\beta$  sejtjeinek autoimmun destrukciója következtében jön létre, míg a 2-es típusút az inzulinnal szembeni érzéketlenség kialakulása okozza. 2000-ben a WHO (World Health Organization) 171 millióra becsülte a cukorbetegek számát. Úgy vélik, hogy az ázsiai országok lakosságának étkezési szokásainak megváltozása miatt ez a szám megduplázódik 2030-ra.

A betegség kontrollálása a vércukorszint gyakori ellenőrzését, és ha szükséges, az azt követő megfelelő beavatkozást jelenti. Ideális megoldást jelentene a betegség kezelésére glükóz szenzorból és visszacsatolt inzulinadagolóból álló, folyamatosan működő, a betegbe építhető vércukorszint szabályozó készülék kifejlesztése, alkalmazása. A glükóz szenzorokról, glükózelektródokról szóló, a Scienece Direct adatbázis által számontartott tudományos közlemények számáról, azok megjelenésének időbeli eloszlásáról adnak áttekintést a következő ábrák.



**2.4. ábra** 1964-től a Scienece Direct adatbázis által számontartott glükóz szenzorokról, glükózelektródokról szóló tudományos közlemények számának változása



**2.5. ábra** A Scienece Direct adatbázisban megtalálható glükóz szenzorokról és glükózelektródokról szóló tudományos közlemények számának változása 2000-től napjainkig

A különböző iskolák szinte minden enzim immobilizálás módszert, minden szelektivitásnövelő megoldást, minden alapérzékelőt megkíséreltek alkalmazni különböző szempontból előnyös méretű-, stabilitású-, funkciójú glükóz szenzor kifejlesztésére. Közülük több, különböző cégek termékeként a kereskedelmi forgalomban is beszerezhető.

#### 2.2.3. Putreszcin bioszenzorok

A putreszcin koncentrációmérés gyakorlati jelentősége lényegesen kisebb, ennek megfelelően putreszcin mérő bioszenzor kifejlesztésével is lényegesen kisebb számú közlemény foglalkozik.

#### 2.2.3.1. Putreszcin elektrokémiai úton történő meghatározása

A poliaminok előfordulnak növényekben, részt vesznek azok biokémiai folyamataiban. Így a putreszcin, a spermin és a spermidin a növekedési folyamat szabályozásában játszik szerepet [137,138]. Előfordulnak különböző élelmiszerekben, borban [139,140], sörben [141], salátákban. Tulajdonképpen toxikusak az emberi szervezet számára, de szervezetünkbe kerülő kis mennyiségük a monoamin-oxidáz, diamin-oxidáz, és poliamin-oxidáz enzimek katalitikus hatására átalakulva indifferenssé válik [142]. Nagy mennyiségben fogyasztva hányingert, légzési nehézséget, izzadást, hiper- vagy hipotenziót, szívműködési rendellenességeket okozhatnak [143].

Alkohol vagy antidepresszáns gyógyszerek [144], gátolva az amin-oxidáz enzimek működését, a poliaminok toxicitási küszöbét leszállíthatják.

A poliaminok nagy koncentrációban való jelenléte élelmiszer mintákban utalhat az élelmiszer romlottságára. Klinikai minták putreszcin tartalma bakteriális fertőzöttségre utalhat [145,146]. A vérben lévő megnövekedett poliamin koncentráció daganatos folyamatot [147] jelezhet.

A biológiai jelentőségű poliaminok különböző mintákban történő analízisére leggyakrabban HPLC módszerek kerülnek alkalmazásra. A detektáláshoz gyakran szükséges származékképzéses módszert választani.

A biogén aminok mérésére többen készítettek szelektív bioszenzort. Így oxigénelektród alapérzékelőt és monoamin-oxidáz enzimet (MAO) alkalmaz a Toul és Macholan [148] és Karube és munkatársai [149] által kifejlesztett putreszcin szenzor.

Palleschi és munkatársai [150] platina elektródfelületére vitt nylon-háló membránon diaminoxidáz enzimet (DAO) glutáraldehid reagenssel immobilizálva alakítottak ki szelektív mérőérzékelőt. Az elektród működése az enzimatikus reakcióban keletkező hidrogén-peroxid amperometriás detektálásán alapul. A szerzők sózott szardella minták putreszcin, kadáverin, hisztamin, tiramin és spermidin tartalmának mérési esetét vizsgálva összehasonlították a bioszenzorral végzett analízis és az IC-IPAD (ionkromatográfia - integráló pulzáló amperometria) (lásd később) módszer teljesítőképességét. A bioszenzor alkalmasnak bizonyult a teljes amin koncentráció jelzésére. A hal mintában a putreszcin volt a fő amin komponens. Azonos koncentrációjú biogén aminok közül a szenzor a putreszcint és a kadáverint azonos, a hisztamint és a spermidint azokkal közel azonos érzékenységgel jelezte.

Chemnitius és Bilitewski [151] szitanyomással készített és szililezett platinaelektród felületén immobilizált glutáraldehid térhálósító ágens segítségével micrococcus rubens-ből származó putreszcine-oxidáz (PuO) enzimet. Az így készített bioszenzort tőkehal frissességének jelzésére tudták használni. Az elektród a putreszcin enzimatikus oxidációja során keletkezett hidrogén-peroxidot detektálta amperometriásan.

A hidrogén-peroxid amperometriás detektálásával működő bioszenzorok esetében a szelektivitás biztosítására alkalmazható méretkizárásos felületi film. Ennek készítése történhet elektrokémiai úton megfelelő monomer anyag elektropolimerizációjával. Buck és Madaras [152] fenilén-diaminokból készített hatékony méretkizárásos membránt platina elektródfelületen. Újabban Carelli és munkatársai [153] végeztek kísérleteket,

összehasonlítva elektrokémiailag készített poli-β-naftol, túloxidált poli-pirrol/poli-ofeniléndiamin, poli-*o*-feniléndiamin, túloxidált poli-pirrol, túloxidált poli-pirrol/poli-*o*feniléndiamin és túloxidált poli-pirrol/poli-β-naftol méretkizárásos rétegekkel és térhálósított diamin-oxidáz (DAO disznó veséből 'Porcine kidney' E.C. 1.4.3.6) enzim katalizátorral készített biogén amin mérő enzimelektródok működését.

Az alapérzékelő felületét bevonó méretkizárásos filmet biogén amin elektródok esetében is gyakran készítik cellulóz-acetát oldatából [154,155]. A cellulóz-acetát film talán kevésbé sérülékeny, de rendszerint a hidrogén-peroxid átjutását is gátolva jelentősen csökkenti az amperometriás jelet. A cellulóz-acetát film átjárhatóságát tömény kálium-hidroxidban adott ideig való áztatással lehet növelni, vigyázva arra, hogy nehogy az interferáló nagyobb molekulák számára is átjárhatóvá váljon.

Rochette és munkatársai [156] üvegszerű szén elektródfelületén poli-(diallil-dimetilammónium)-klorid segítségével többrétegű szén nanocsöveket (MWCNT) és putreszcinoxidáz enzimet diszpergáltattak. Úgy találták, hogy a nanocsövek direkt elektromos kontaktust biztosítanak az enzim elektroaktív FAD csoportja és az elektród között. Így az enzim elektrokémiai regenerálásával működő amperometriás putreszcin elektródot sikerült készíteniük.

Az elektród működése az alábbi reakciókon alapul:

 $\begin{aligned} &Putreszcin + PuO(FAD) \rightarrow 4 - aminobutanal + PuO(FADH_2) \\ &PuO(FADH_2) \xrightarrow{-0.45V(Ag/AgCl)} PuO(FAD) + 2H^+ + 2e \end{aligned}$ 

#### 2.2.4. Katalitikus sajátságú természetes anyagon alapuló bioszenzorok

A különböző biológiai forrásokból, növényi szövetekből, mikroorganizmusokból, állati testrészekből származó kipreparált, megtisztított, majd az alap szenzor felületén kialakított rétegben immobilizált enzimek alkalmazása helyett sok esetben előnyösnek bizonyult magát a katalitikus sajátságú szövetet, organellát közvetlenül felhasználni bioszenzor készítésre. Az így készített elektródok közül híressé vált, Sidwell és Rechnitz [157] banán szövet katalitikus hatásán alapuló dopamin elektródja. A szerzők az elektródot "bananotrode" –nak nevezték. Talán ez a név alapozta meg a szenzor hírét. Középiskolás kutató diák tanitványaimmal laboratóriumunkban is készítettünk jól működő "banánotrod"-ot. A növényi vagy állati szövetek felhasználásával készült bioszenzorokról kiterjedt irodalom szól (pl.[158]).

Bioszenzor készíthető élő mikroorganizmus kultúrát tartalmazó reakcióréteggel. Az alapérzékelő ebben az esetben detektálhatja a mérendő anyagból a mikroorganizmusok által termelt és a környezetbe kibocsátott anyagféleséget, vagy az élettevékenységhez szükséges, a környezetből felvett reagens, például oxigén, lokális koncentráció csökkenését. Más esetben a szenzor az illető kultúra élettevékenységét, metabolizmusát kedvezőtlenül befolyásoló toxikus anyag mérésére szolgál. Ilyenkor a jelet a metabolizmus által létrehozott lokális koncentrációváltozás – pl. oxigén koncentráció csökkenés, vagy pH változás – jelentheti. A toxikus anyag jelenlétével a metabolizmus sebességének csökkenése jár együtt. Ezt jelzi az alapérzékelő.

Érdekes bioszenzor típus alapul génsebészettel kifejlesztett fénykibocsátó baktérium kultúrákon [159].

A toxicitás jelző mikroorganizmus egy olyan módosított plazmidot tartalmaz, amelyben a luciferáz enzim-termelést kódoló géneket a jelzendő anyagféleséget felismerő promotor kontrollálja [160,161]. Az illető toxikus anyag jelenléte aktiválja a promotor géneket, ezzel genetikus jel keletkezik, amely a bioreporter expressziót nem csak kiváltja, hanem annak intenzitását is szabályozza. A toxikus anyag jelenlétében a mikroorganizmus fényt bocsát ki.

#### 2.2.5. Receptor-agonista kölcsönhatáson alapuló bioszenzorok

A sejtmembránokban lévő receptorok gyakran úgy fejtik ki hatásukat, hogy az agonista megjelenése és kötődése hatására a receptorhoz tartozó, a membránon keresztüli ion forgalmat lehetővé tevő szelektív ioncsatorna rövid időre megnyílik. Ez a membrán két oldalán elhelyezkedő vezetőképességi elektródok segítségével detektálható. Az ioncsatorna megnyílását a vezetés növekedése impulzusszerűen jelzi. Számos kísérlet történt [162] ennek a biológiai mechanizmusnak kémiai szenzorok molekula felismerő funkciójaként való alkalmazására. A legtöbb esetben az illető ioncsatorna receptort valamilyen elektromosan szigetelő, vékony, lipid karakterű kettős réteg membránba építik. Technikai problémát jelent a membrán mechanikai stabilitásának, kellő hosszúságú élettartamának biztosítása. Membránkészítésre gyakran a Langmuir-Blodget technikát alkalmazzák. Az ion csatornát szabályozó receptoron alapuló bioszenzoroknak a mindennapi analitikai gyakorlatban történő elterjedése még várat magára. Itt példaképpen említem Kuwana és munkatársai [163] korai közleményét, amely patkány agyból kipreparált glutamát ioncsatorna receptorokon alapuló, L- glutamátot detektáló bioszenzorról szól. A szerzők, un. 'patch-clamp' típusú mikropipetta végében kialakított foszfolipid kettős rétegbe zárt receptorral egycsatornás szenzort is és multicsatornás szenzort is készítettek. Újabban az influenza A vírus detektálására dolgoztak ki ioncsatornás detektálást alkalmazó- kapcsoló "switch típusú" bioszenzort ausztrál kutatók [164]. A szenzor a gazda-vendég kötődés által szabályozott Gramicidin ioncsatorna elektromos vezetését nyomon követve képezi az analitikai jelet.

#### 2.2.6. Antitest – antigén kölcsönhatáson alapuló bioszenzorok

Amint az jól ismert, az antitestek a globulinok közé sorolható, határozott struktúrával rendelkező fehérjék. Ezeket a gerinces élőlények immunrendszere használja idegen anyagok káros hatásának kivédésére. B sejteknek nevezett fehér vértestek termelik az antitesteket. Szerkezetüket szokásos Y-szerűnek ábrázolni, feltüntetve, hogy két hosszú láncból (H) és két rövidebb fehérje láncból (L) állnak. Az élőlények vérében, testnedveiben fordulnak elő.

Élettani funkciójuknak megfelelően a B sejtek a behatoló, kellően nagyméretű molekulákhoz szelektív kötőhellyel rendelkező antitesteket termelnek. Ezek megfelelő elválasztási eljárás alkalmazásával kinyerhetők az illető antigénnel immunizált állatok véréből, és különböző célra, így bioszenzor készítésre is felhasználhatók. Az immunizált állatokból poliklonális antitestek nyerhetők. A poliklonális antitestek sajátságai, így kötés erőssége, specificitása különböző.

Újabban egérből származó immunizált lép sejtet mieloma sejttel fuzionálva, ennek klónjait tartalmazó sejttenyészeteket hoznak létre és ezzel egységes monoklonális antitest reagenseket termeltetnek. A monoklonális antitest egységes lévén hatékonyabban használható. Emellett előnyös, hogy termeléséhez nincs szükség az állatvédők által gyakran támadott, meglehetősen inhumánus immunizálással, nagymennyiségű vérvétellel járó gyártási folyamatra.

Az antigén-antitest ('host-guest') reakciót az analitikai kémia a klinikai analízisben, sportolók dopping használatának ellenőrzésére széles területen használja. Rendszerint a kötődést jelzett reagens alkalmazásával detektálják. Analitikai tankönyvek részletesen tárgyalják a rádióaktivan– (RIA, radioactive immuno assay), a fluoreszcenciásan– (FIA, FPIA, fluorescence polarisation immuno assay) az enzimmel– (ELISA, 'enzyme-linked immuno sorbent assay') jelzett immuno analitikai módszereket, a kompetitív immuno analízist és a két különböző antitestet igénylő szendvics módszert.

Az antigén–antitest kötődésen alapuló bioszenzorok három különböző detektálási módszert követhetnek.

- Történhet a detektálás valamilyen nyomjelzett reagens alkalmazásával. Ekkor az optikai, elektrokémiai, fluoreszcenciás, stb. alapérzékelő a kötödést a jelző anyag lokális koncentrációjának növekedésén keresztül jelzi. Enzimmel jelzett reagens kötődésekor a lokális enzimaktivitás lehet az analitikai jel. Így például alkalikus foszfatáz jelző enzim aktivitásának amperometriás detektálásával működő bioszenzort készítettek Gyurcsányi és munkatársai [165].

- Alkalmas alapérzékelőn immobilizált immun reagens és a minta anyag kötődését lehetséges közvetlenül is detektálni. Ha sikerül a mintából a felületen nem szelektíven adszorbeált anyagtól megszabadulni, akkor ez a módszer a legelőnyösebb. A kötődést kvarc kristály mikromérleg (QCMB), felületi plazmon rezonancia szenzor (SPR), akusztikus felületi hullám érzékelő (SAW), vagy az evanescens rétegen keresztül a felületen bekövetkező változást jelző hullámvezető szenzor jelezheti. Ezek közül mindegyik alapérzékelő alkalmazásával működő bioszenzor készítésről olvashatunk a szakirodalomban. Gyurcsányi és munkatársai [166] szűrő membrán lyukaiban elektrokémiailag arany nanocsöveket készítettek. A nanocsövek belső falán kialakított szenzor réteg segítségével érzékenyen tudtak szelektív immuno-kémiai kötődést közvetlenül detektálni a membrán két oldala közötti vezetés regisztrálásával.

-A liposzóma belsejébe zárt jelző anyag oldatával működő, nagy jelerősítést biztosító, a lízisen alapuló bioszenzorokról is szólnak közlemények [167].

#### 2.2.7. Aptamer receptorok

A molekula felismerő biológiai receptorok közelmúltban felfedezett csoportját képezik az aptamerek. Ezek tulajdonképpen oligonukleotidek, DNS vagy RNS szerkezetűek. A génpróbákban alkalmazott oligonukleotidoktól abban különböznek, hogy ezek nem a komplemens részt tartalmazó lánc hibridizáción keresztüli felismerésére, detektálására szolgálnak, hanem segítségükkel a különböző target molekulák széles spektruma jelezhető, analizálható. Az aptamerek analitikai alkalmazásáról az azokkal végzett kezdeti kísérletekről szóló közlemények megjelenése [168-170] után nem sokkal írt összefoglaló tanulmányt Mascini [171]. Az adott molekula jelzésére alkalmas aptamert rendkívül sokféle random szekvenciájú oligonukleotidot tartalmazó elegyből, "könyvtárból" *in vitro* választják ki a SELEX "acronym"- mel nevezett (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) módszerrel. A target molekulával összehozott könyvtárból az illető anyagféleséghez szelektíven és nagy affinitással kötődő aptamert viszonylag hosszadalmas több lépéses technikával kiválasztják, majd multiplikálják és használják analitikai célokra, köztük bioszenzor készítésre. Az aptamer – target kötődés detektálására az antigén - antitest kötődés detektálásához hasonló nyomjelzéses vagy direkt [172] módszerek használhatók. Gyakran alkalmaznak "beacon" típusú aptamert. Ezek esetében az oligonukleotid lánc két vége egymásnak komplemense, így összekapcsolódik, míg a középső rész hurkot képez. A szelektív kötő hely a hurok részben található, míg a két vég dupla spirálja a detektálás megkönnyítését teszi lehetővé. Példaképpen említem, hogy beacon aptameren, metilén kék elektroaktív jelző anyagon alapuló, trombint mérő bioszenzorról olvashatunk [173] a szakirodalomban.

Az aptamerek antitestekkel szembeni előnyös tulajdonsága, hogy szintetikusan előállíthatók, nincs szükség állatok, állati sejttenyészet alkalmazására előállításukhoz. Az oligonukleotid típusú aptamerek stabilitása jelentősen nagyobb, mint a fehérje típusú antitesteké.

Az aptamerek perspektívikus alkalmatási köre messze túl nyúlik a bioszenzor készítés területén. Különösen a gyógyászatban jósolnak nagy jövőt ezeknek a specifikusan kötődni képes anyagoknak.

### 2.3. AMPEROMETRIÁS PULZÁLÓ DETEKTÁLÁST ALKALMAZÓ TECHNIKÁK

A szilárdelektródok voltammetriás analitikai alkalmazását nehezíti, hogy sok esetben előfordul, hogy az elektródreakcióban keletkező anyagok nem távoznak el az elektród felületéről. Így megváltoztatják az elektródfelület sajátságait. Amint az jól ismert a műszeres analízis tankönyveiből [174] a csepegő higanyelektród egyik fő előnye a periodikus megújulásban rejlik. A redukált fém részecskéket a leeső higanycsepp magával viszi, így az elektródfelülete regenerálódik. Szilárdelektródok alkalmazásakor akár a mérendő anyagból, akár más jelenlevő anyagokból keletkezhet az elektród felületét bevonó, passzíváló lerakódás, film. Ez esetben nincs lehetőség a voltammetriás áramjelből a koncentrációra következtetnünk.

A szilárdelektródok felületének megújítására különböző módszerek használatosak. Gyakran kielégítő polírozó por és szövet alkalmazása a felület mechanikusan megújításához. Platinaelektródok esetében az óvatos izzítás is célra vezethet. Természetesen a minden voltammetriás felvétel után szükséges felületmegújítás a mérési protokollt bonyolítja, az analízis reprodukálhatóságát kedvezőtlenül befolyásolja. A kromatográfiás detektorcellába épített, folyamatosan működő amperometriás munkaelektród, vagy az érzékenyítő réteggel (bioréteggel) bevont elektródok esetében a mechanikus vagy izzításos megújítás nem jöhet számításba.

#### 2.3.1. Pulzáló amperometria

A múlt század 80-as évei kezdetén főleg D.C. Johnson [175,176] és munkatársai úttörő munkája nyomán elektrokémiai felületmegújítási módszerek fejlődtek ki. Ezek alkalmazásakor az elektródra rövid ideig a passzíváló réteget erélyes oxidációval vagy redukcióval eltávolító potenciált kapcsolnak. Ennek hatására, az elektródfolyamatban átalakult anyag oldhatóvá válik, és az elektróddal érintkező oldatba távozik. Gyakran szükséges a szélsőségesen polarizált elektródfelület teljes regenerálására egy alkalmas regeneráló potenciál pulzust alkalmazni, mielőtt az ismételt mérési lépést beiktatjuk. A megfelelően kidolgozott, a minta anyaghoz és a mérési körülményekhez is illeszkedő, elektromos regenerálás jól reprodukálható. Alkalmazható a mérőcella vagy a módosított elektród kiszerelése, mechanikai megújítása nélkül.

Az elektromos regenerálást alkalmazó módszereket korábban pulzáló voltammetriának nevezték (PV). A kromatográfiás detektálás jelentőségének köszönhetően napjainkban a pulzáló amperometriás detektálás (PAD 'Pulsed Amperometric Detection', vagy PA Detector) név vált uralkodóvá.

Munkám egyes részei és a PAD detektálás közötti kapcsolat két vonatkozásban szembetűnő:

- Egyrészt az elektrokatalitikus sajátságú rézelektród munkámban vizsgált sajátságai, az annak alkalmazásával kidolgozott detektor cella és detektálási módszer a PAD-nak cukor analízisben történő alkalmazását nem igénylő, egyszerű lehetőséget ajánl.

- Másrészt a membránnal bevont elektródok (bioszenzorok) analitikai paramétereit javító, periódikusan megújuló amperomertia (PMA, Periodically Interrupted Amperometry, PIA) mérési programja látszik formailag hasonlónak [177] a kromatográfiás PAD módszerekkel. (Itt kell megemlítenem, hogy a pulzáló mérőprogram alkalmazásának célja a két módszer esetében gyökeresen más.)

A pulzáló amperometriás detektorok alkalmazásával, a detektálásos módszerek fejlesztésével igen kiterjedt irodalom foglalkozik. A dolgozat anyagába foglalt kísérleti munkámban szigorúan véve nem használtam pulzáló amperometriás detektálást. Ezért az alábbiakban csak röviden említek meg néhány, a PAD módszer fejlődésével, alkalmazásával kapcsolatos közleményt.

LaCourse és Johnson [178] kiterjedt vizsgálatokat folytattak szénhidrátok arany munkaelektródon történő HPLC detektálásához szükséges, alkalmas mérési program kidolgozására. Három részből álló periódikusan ismétlődő E–t programot dolgoztak ki, amely mérő, oxidációs és redukciós pulzusokból áll. Az oxidációs pulzus szolgál az elektródfelület tisztítására.

Négylépéses, az elektród tisztítását redukcióval végző mérőprogram segítségével jobb reprodukció volt elérhető [179].

Possari és munkatársai [180] az l-cisztein mérésére dolgoztak ki pulzáló amperometriás módszert. Közismert, hogy a cisztein elektrokémiai oxidációs terméke erősen szennyezi az elektródot, passziválja azt. Így közvetlen elektrokémiai mérése nehézségekbe ütközik. A kidolgozott módszer érdekessége, hogy anódos polarizáció mellett, 0.1 V (vs. TKE) alkalmazásával  $t_1$ =700 ms ideig akkumulálják a ciszteint megfelelően polírozott és tisztított arany munkaelektród felületen. Ezután -0.6 V-os elektródpotenciál mellett  $t_2$ =30 ms ideig gyűjtik az áramintenzitás adatokat. A redukciós áramintenzitás adatokból képzik az analitikai
jelet. Az elektród tisztítására egy viszonylag hosszú  $t_3=2000$  ms időperiódus szolgál, amely alatt az elektródpotenciálját -1.3 V-ra állítják.

Tiolok arany felületen az alábbi reakció szerint akkumulálódnak.

$$X(CH_2)_n SH + Au \rightarrow X(CH_2)_n S - Au + e^- + H^+$$

A mérő pulzus során az akkumulálódott anyag redukciója következik be. Az elektródot a hosszú redukciós pulzus megtisztítja.

A kromatográfiában a pulzáló amperometriás detektálásnál kedvezőbb alsó méréstartományt érnek el, ha a mérési pulzus esetében kapott áramot bizonyos idő intervallum alatt integrálják. Ezt a detektálásos módszert szokás integrált pulzáló amperometriás detektálásnak (IPAD, 'Integrated Pulsed Amperometric Detection') nevezni. Ilyen detektálási módszernek tiokarbamid mérésére történő sikeres alkalmazásáról számol be Joon-Woo Lee és In-Hyeong Yeo [181]. Munkájukban 0.1 mol/dm<sup>3</sup> NaOH eluens oldattal történő kromatográfiás elválasztás mellett, vékonyréteg típusú, arany munkaelektródot tartalmazó amperometriás detektorcellát alkalmaztak. Az elektrokémiai mérőprogram 400 ms ideig tartó, 620 mV-os mérő pulzusból, 50 ms-ig tartó, 1000 mV-os tisztító pulzusból és egy 300 mV potenciál, 600 ms paraméterekkel jellemezhető kondicionáló pulzusból állt.

A pulzáló amperometriás detektáláshoz alkalmazott legegyszerűbb három pulzusból álló mérési program mellett több pulzusból álló mérőprogramok kipróbálására sikeres alkalmazására is sor került. Clarke és munkatársai [182] hatlépéses programot dolgoztak ki aminosavak IPAD detektálására. Japán szerzők [183] hasonlóan hatlépéses programot alkalmaznak. A hullám adszorpció/iniciáló (E1, E2), pulzusokból, két áram integráló pulzusból (E3, E4) és tisztító/aktiváló elektródpotenciál-idő pulzusokból áll.

Pulzáló amperometriás detektálás a kapilláris elektroforetikus elválasztások esetében is alkalmazható. Itt problémát jelenthet, hogy maga a folyamat gyors, így a kellő felbontással történő detektáláshoz minél rövidebb ciklust kell választani.

Ruttinger és Drager [184] növényi kaliszteginek kapilláris elektroforetikus analíziséhez alkalmazott háromlépéses PAD detektálást.

A kereskedelmi gyakorlatban beszerezhető elektrokémiai detektorok közül néhány képes PAD mérési program szerint funkcionálni. Közülük jól ismert a Dionex cég ED40 típusú készüléke [185]. A detektor gépkönyve arany munkaelektróddal 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  $E_1$  elektródpotenciál melletti  $t_{del}$  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 ( $E_2$ ,  $t_{clean}$ ) alkalmazására, amit a relaxációs pulzus ( $E_3$ ,  $t_{rel}$ ) követ. Az  $E_2$ ,  $t_{clean}$  és  $E_3$ ,  $t_{rel}$  értékek a készüléken beállíthatók, de a javasolt programok egyike redukciós tisztítást ( $E_2$ =-2,0 V,  $t_{clean}$ =10 ms), míg a másik két oxidációs tisztítást

 $E_2$ =+0.75, ill. +0.6 V-on, és t<sub>clean</sub>=20, ill. 10 ms ideig írja elő. Az oxidációs tisztítás esetében az arany elektród elektrokémiai aktivitása csökkenhet.

A redukciós tisztítás esetében legjobb a reprodukció 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.

# 3. KÍSÉRLETI RÉSZ

# **3.1. A** KÍSÉRLETI MUNKA SORÁN FELHASZNÁLT MÉRŐBERENDEZÉSEK ÉS MÉRŐESZKÖZÖK

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.

A CHI készülékhez Faraday kalitka tartozik. A mikroelektródos kísérletek jelentős részét a Faraday kalitkában voltam kénytelen végezni.

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 munkaelektródos 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 electxonics, Németország) használtam esetenként oldatkészítéshez és az elektródpolírozást követő tisztításhoz. Az 1 dm<sup>3</sup> térfogatú berendezésben, 15 perc időtartamig 1 perces pontossággal beállítható és végtelen ideig tartó ultrahangos kezelés, maximálisan 80 °C-on végezhető.

Az elektródok, illetőleg detektor cellák vizsgálatára összeállított áramló oldatos analízis ('flow injection analízis' FIA) készülék vázlatos rajzát a 3.1. ábra mutatja. A készülék működésekor HPLC pumpa szállította az alapoldatot (100 mmol/dm<sup>3</sup> nátrium hidroxid) a tartó edényből a megfelelő térfogatú bemérő hurokkal (leggyakrabban 20 µl) rendelkező Rheodyne gyártmányú injektorba (9725i). A hurok után az oldat egy diszperziós spirálba jutott. Ezt 1 m hosszú, 1 mm belső átmérőjű műanyag csőből készítettem, azt egy kb. 4 mm átmérőjű üveg botra csévélve. A diszperziós szakaszt elhagyó oldat a detektorcellába jutott. A detektor cella kimenő ágához csatlakozott a vonatkozási- és a segédelektródot tartalmazó edény. A cella és az edény közötti elektromos kontaktust az áramló oldat biztosította. Az edényből az oldat perisztaltikus szivattyún (Ismatec MS-CA2/620) keresztül a lefolyóba jutott.



3.1. ábra FIA mérőberendezés elrendezési rajza

Az ionkromatográfiás mérésekhez használt készüléket Waters 600 HPLC (Waters, Milford, MA, USA) és Dionex ionkromatográf (Sunnyvale, CA, USA) alábbi készülék egységekből állítottam össze.

Waters 600E komputer egység Waters SSV oldat kiválasztó szelep Waters 610 Fluid Unit (HPLC pumpa) Rheodyne kézzel működtethető bemérő szelep – a modell száma 9725i Dionex CarboPac PA1 és IonPac AS5A analitikai és előtétoszlopok Dionex AMMS-III típusú szupresszor Dionex CD25 vezetőképességi detektor Házi készítésű detektor cellák Formiát analízishez elválasztó oszlopként Dionex IonPac AS5A-5 $\mu$  típusú kolonnát használtam, amely 5  $\mu$ m átmérőjű hordozóra felvitt anioncserélő latex anyagot tartalmazott. A kolonna ioncserekapacitása 20  $\mu$ eqv/kolonna. Az elválasztó kolonna (4 x 250 mm) szervetlen anionok és szerves sav anionok széles spektrumának nátrium-hidroxid eluenssel történő elválasztását, analízisét teszi lehetővé. Az elválasztáshoz 1.0 cm<sup>3</sup>/perc sebességgel áramoltatott 3 mmol/dm<sup>3</sup> nátrium-hidroxid eluens oldat szükséges.

Dionex AMMS-III típusú szupresszor egységet és Dionex CD25 vezetőképességi detektort használtam. Ez nagy érzékenységű detektálást biztosított.

A szupresszort max. 0.75 cm<sup>3</sup>/perc térfogatsebességgel áramoltatott 25 mmol/dm<sup>3</sup> kénsavval regeneráltam folyamatosan.

A cukrok elválasztásához általános felhasználásra szánt Dionex CarboPac PA1 (2 x 250 mm) anioncserélő kolonnát, és 0.2-0.25 cm<sup>3</sup>/perc térfogatsebességgel áramoltatott 100 mmol/dm<sup>3</sup> nátrium-hidroxid eluenssel történő izokratikus elválasztást használtam.

A mintákat 5 és10 µl-es bemérő hurokkal ellátott, 9725i típusú, Rheodyne injektor segítségével mértem be.

# **3.2. ALKALMAZOTT ELEKTROKÉMIAI CELLÁK**

#### 3.2.1. Kissinger – Adams típusú vékonyréteg cella réz munkaelektróddal

Magam készítettem Kissinger – Adams típusú detektorcellát. Ezt két 6 mm vastagságú 20x20 mm méretű plexi lemezből alakítottam ki. A két lemezt a sarkainál négy csavar tartja össze. Az egyik lemez közép vonalán szimmetrikusan, egymástól 10 mm távolságra fúrt lyukakba oldat be- és kivezető csövet ragasztottam. A másik lemez középpontján átfúrt lyukba ragasztottam a 1.2 mm vastag rézhuzalból készült munkaelektródot megfelelő tömítettségről gondoskodva. A munkaelektród korongját a plexi lemezzel egy síkba pozícionálva políroztam. Az elektromos kontaktust a huzal külső végén keresztül csatlakoztattam. A két lemez közé 100 µm vastagságú 20x20 mm–es teflon lemezt helyeztem, amelynek közepébe az oldat be- és kivezető nyílásokat összekötő oldatvezető csatornát (15x 3 mm) vágtam. A detektorcella vázlatos rajza a 3.2. ábrán látható.



3.2. ábra Kissinger – Adams típusú vékonyréteg cella réz munkaelektróddal

#### 3.2.2. Nyitott kolonnavég detektorcella mikro-szál rézelektróddal

A munkaelektród miniatürizálásával lehetőség van a detektorcella által okozott visszakeveredés minimalizálására. Ennek egyik lehetséges módja a munkaelektród nyitott kolonna végébe vezetett huzal formájú kialakítása. A detektálás ekkor közvetlenül a kolonna végénél történik. Ezt a ritkán alkalmazott detektor cellát a 3.3. ábrán mutatom be.



3.3. ábra Mikro-szál rézelektróddal készült nyitott kolonnavég detektorcella

## 3.2.3. Wall-jet típusú detektorcella 1.2 mm átmérőjű rézelektróddal

Ebben az esetben a kolonnát elhagyó eluens oldat nagy sebességgel egy szűk fúvókán áthaladva az elektród felületére, annak a centrumába érkezik (ld. 3.4. ábra). Az elektród felületén radiálisan áramolva a további elektródokat tartalmazó térbe jut, majd onnan a lefolyóba. A detektálás után az oldat keveredik, az elválasztott komponensek a teljes cellatérfogatba jutnak. Nincs lehetőség az egyes csúcsokat tartalmazó eluens frakciók szeparált gyűjtésére. Az eluens a munkaelektródot körülvevő nagyobb térfogatú edénybe érkezve hagyja el a cellát. Az effektív cellatérfogat, amit csak az elektróddal érintkező vékony folyadékréteg képez, sokkal kisebb, mint az elektródot tartalmazó edényrész. A walljet típusú cellák a vékonyrétegű cellákkal összehasonlítva érzékenyebben reagálnak az áramlási sebesség pulzálására.



Oldat be

3.4. ábra 1.2 mm átmérőjű rézelektróddal készült wall-jet típusú detektorcella

# **3.3. A** KÍSÉRLETEK SORÁN ALKALMAZOTT ELEKTRÓDOK

A kísérleti munkámat sajátkészítésű indikátor-, illetve munkaelektródokkal végeztem.

Vonatkozásielektródként a mérések jelentős részében ezüst huzalból vagy ezüst-kloriddal bevont ezüst huzalból készített kvázi referenciaelektródot használtam. Bizonyos mérésekben kereskedelmi forgalomból származó vonatkozásielektródokat választottam. Alkalmaztam kettős sóhidas OP-0820P Ag/AgCl elektródot, és OP-0830P kalomelelektródot (Radelkis, Budapest, Magyaroszág).

Kereskedelemben beszerezhető pH Triode<sup>™</sup> 91-57 Orion® (Orion Research Inc. Beverly, MA, USA) kombinált pH mérő elektród segítségével ellenőriztem, illetőleg állítottam be a puffer oldatok pH-ját.

## 3.3.1 Voltammetriás mikroelektródok, korong alakú réz mikroelektród

20 µm átmérőjű szigetelés nélküli nagy tisztaságú rézhuzalból (Goodfellow, Egyesült Királyság) kb. 30 mm hosszúságú szakaszt vágtam le. Ezt két üveglemez között sodorva kiegyenesítettem, majd kb. 10 cm hosszú, 1.2 mm belső és 1.8 mm külső átmérőjű, egyik végén beforrasztott kapilláris belsejébe vezettem. A kapillárist előzetesen cc. kénsav:30% hidrogén-peroxid 3:1 (pirhana oldat) oldatban áztatva, ezt követően desztillált vízzel alaposan átöblítve tisztítottam, majd szárítószekrényben 105 <sup>0</sup>C-on szárítottam. A kapilláris végének beforrasztásához mikro gázlángot, és közönséges üvegtechnikai fogást használtam. Ejtőcső segítségével a rézszálat a beforrasztott vég eléréséig hajtottam előre, a pozícióját mikroszkóppal ellenőriztem. Ezután a kapilláris nyitott végéhez vízsugár szivattyú vákuum csövét csatlakoztattam, a kapillárist a laboratóriumunkban összeállított elektromos készülékhez illesztettem, és a beforrasztott végéről indulva lassú ütemben a kapillárist izzított hurok közepén átvezetve beolvasztottam a rézhuzalt az üvegbe kb. 10-20 mm hosszan. A kapilláris belsejébe kis darab huzalszerű forrasztó ónt, 0.5 mm átmérőjű szigetelésétől megfosztott rézhuzalt juttattam. Mikro lánggal kívülről melegítve, rázogatva megolvasztottam a forrasztó ónt. Így a mikrohuzal és a kivezető rézhuzal között megteremtettem az elektromos kontaktust. A beforrasztott véget a kapilláris hossztengelyére merőleges irányban dörzspapírral nedvesen lecsiszoltam, míg mikroszkóppal láthatólag megjelent a véglapon a réz korongocska. Ezután nedves alumínium-oxid polírozó porok alkalmazásával a véglapot políroztam. E művelet során szekvenciálisan alkalmaztam 1, 0.3, 0.05 majd végül 0.03 szemcseméretű polírozó port. Az egyes lépések között az elektródot ultrahangos, desztillált vizes fürdőben rázattam. Szükség esetén az elektród végét óvatosan kihegyeztem.

## Rézhuzal mikroelektród készítése

A nyílt kolonna végbe vezethető mikrohuzal elektród készítésekor úgy jártam el, hogy nagytisztaságú rézhuzal (20 µm átmérőjű) vagy elektronikai alkatrész tekercséből származó szigetelt rézhuzal (30 µm átmérőjű) adott hosszúságú (4-5 cm) darabját beszűkített végű kapillárisba forrasztottam. Forrasztó ón és rézhuzal segítségével elektromos kontaktust biztosítottam a kapilláris belsején keresztül. Az így készített elektród mikrohuzal részét az

elválasztó kolonna végébe tudtam bevezetni. A huzalt U alakban meghajlítva a tartó kapillárist a kolonnához, azzal párhuzamosan rögzítettem a kromatográfiás vizsgálatokban.



3.5. ábra A nyitott kolonnavég detektor cella réz munkaelektródja

Az ellenelektródként használt platina tűelektródot hasonló képpen készítettem, amelyhez 1mm átmérőjű 1 cm hosszú szálat használtam fel.

## 3.3.2. Voltammetriás makroelektródok

## Makroméretű rézelektród

A makroelektrolízisekhez használt réz munkaelektródot 4 mm átmérőjű rézhuzalból készítettem. Ebből egy kb. 20 mm-es szakaszt levágtam, egyik végéhez réz kontaktust forrasztottam. Ezután a huzalt alaposan megtisztított üvegcső végébe vezettem úgy, hogy egyik végén 6 mm-rel túlnyúljon a cső végén, másik oldalon pedig a kontaktus huzal nyúljon túl az üvegen. Az üvegcső belsejét fogászati cementtel (Duracryl) öntöttem ki. Az elektród kb. 100 mm<sup>2</sup> nagyságú aktív mérőfelületét nedvesen políroztam több lépésben különböző szemcseméretű alumínium-oxid polírozó por alkalmazásával. Ebből az elektródból csak egy darabot készítettem.

#### Platina korong elektród

A bioszenzor munkaelektródját 1 mm átmérőjű és 8 mm hosszúságú platina huzalból készítettem. A levágott huzal egyik végéhez réz kontaktust forrasztottam. Ezután azt az alaposan megtisztított, 4 mm belső átmérőjű, egyik végén beforrasztott üvegcső aljára helyeztem. Az üvegcső belsejét fogászati cementtel (Duracryl) kiöntöttem. Az elektród mérőfelületét durva nedves csiszolással szabaddá tettem, majd több lépésben különböző szemcseméretű alumínium-oxid polírozó por alkalmazásával nedvesen políroztam. Ebből az elektródból három darabot készítettem.

#### Voltammetriás forgó korong elektródok

Nagy tisztaságú 1.2 és 2 mm átmérőjű réz huzalt alkalmaztam réz korong alakú hengeres testű munkaelektród készítéséhez.

Forgókorong elektródos vizsgálatokhoz, a cserélhető Teflon csavaros kupak síkra csiszolt lapjának közepébe 1.95 mm átmérőjű lyukat fúrtam, amelybe 10 mm hosszú rézhuzalt illesztettem. A teflon sík felületébe elhelyezett rézhuzalt simára políroztam.

# **3.4. ELEKTROKATALITIKUS OXIDRÉTEG KIALAKÍTÁSA RÉZELEKTRÓD** FELÜLETÉN

A megtisztított, újra polírozott rézelektród felületén kialakított elektrokatalitikus oxidréteget elektrokémiai úton hoztam létre. Úgy jártam el, hogy 0.1 mol/dm<sup>3</sup> nátrium-hidroxid oldatban, 600 mV polarizációs potenciálon, háromelektródos cellában, ezüsthuzal referenciaelektród és platina ellenelektród alkalmazása mellett néhány másodpercig elektrolízist végeztem. Más mérésekhez kettős sóhídas telített Ag/AgCl referenciaelektródot (Radelkis) vagy ezüsthuzal kvázi referenciaelektródokat használtam.

# **3.5. BIOSZENZOROK KÉSZÍTÉSE**

## 3.5.1. Platina korong munkaelektródos szenzor

Az elektródtestbe ültetett három elektród egy sorban helyezkedik el (3.6. ábra). Platinahuzalból készül a korong alakú munkaelektród (középen) és az ellenelektród, míg a vonatkozásielektród készítéséhez ezüsthuzalt használtam. Az elektródokat Duracryl fogászati cementbe ágyaztam. A készítéshez megfelelő öntőformát készítettem.

#### 3.5.1.1. Az elektródfelületek polírozása és tisztítása

Az elektródok felületén nedves polírozást alkalmazva, 0.1-0.05  $\mu$ m alumíniumoxid csiszolóporral, karcolásmentes felületeket hoztam létre. A felülethez tapadt csiszolóanyag szemcséket az egyes csiszolási fázisok között, ioncserélt vizes fürdőben ultrahanggal eltávolítottam, majd az elektródot ioncserélt vízzel (0.8  $\mu$ S) öblítettem. A szerves szennyezéseket alkoholos ultrahangos mosással sikerült eltávolítani.



3.6. ábra Elektródtest és csatlakozója

## 3.5.1.2. Enzimelektród készítése

#### Méretkizárásos réteg készítése

A szelektív  $H_2O_2$  detektálás érdekében a platina munkaelektród felületén elektrokémiai polimerizációval, pH= 7.4 0.1 mol/dm<sup>3</sup> foszfát pufferrel készült 0.01 mol/dm<sup>3</sup> *m*-

feniléndiamin oldat alkalmazásával, polimer *m*-feniléndiamin, méretkizárásos réteget alakítottam ki.

#### Elektrokémiai tisztítás

A munkaelektród felületét a bevonat képzés előtt 0.5 mol/dm<sup>3</sup> kénsavoldatban, 2 ciklusban, elektrokémiai úton tisztítottam. 0.2 - 0.8 V potenciáltartományban, Ag/AgCl referenciaelektróddal szemben, 2 mV/sec pásztázási sebességet alkalmaztam.

#### Polimer m-feniléndiamin réteg készítése

A polimer *m*-feniléndiamin réteget ciklikus voltammetriás eljárással alakítottam ki oly módon, hogy a munkaelektród potenciálját 0.2 - 0.8 V tartományban, Ag/AgCl referenciaelektróddal szemben, 2 mV/sec sebességet alkalmazva pásztáztam 5 ciklusban [152].

#### Polimer m-feniléndiamin réteg ellenőrzése

A módosított platinaelektródokon kialakított poli-*m*-feniléndiamin méretkizárásos réteg megfelelő működéséről minden esetben kronoamperometriás mérésekkel győződtem meg. Foszfát puffer oldathoz L-aszkorbinsav, acetaminofen és húgysav oldatot adagoltam. 0.2 m mol/dm<sup>3</sup> fiziológiás koncentrációjú L-aszkorbinsav, 0.2 m mol/dm<sup>3</sup> acetaminofen és 0.50 m mol/dm<sup>3</sup> húgysav oldatokat készítettem. Ha a módosított platinaelektródon, a hozzáadások utáni jelváltozás a zavaró elektroaktív anyag jelenlétében 5 nA-nél nagyobb lett, (jelezve a szelektivitás nem kielégítő voltát) a réteget hibásnak tekintettem, és újra formálásáról gondoskodtam.

#### Enzimtartalmú reakcióréteg készítése

Az enzimtartalmú reakcióréteg, közvetlenül a működési helyszínen, a munkaelektród felületén készül. Ez bovine szérum albumint (BSA) és glükóz-oxidáz enzim oldat és glutáraldehid bifunkcionális térhálósító ágenst tartalmazó oldat közvetlen egymás utáni felcseppentésével történt. Az 1-1  $\mu$ l oldatrészeket Hamilton mikro-fecskendőkkel cseppentettem fel az elektródfelületre, így az 1000-1500U/cm<sup>2</sup> enzimet és azonos tömegű BSA-t tartalmazó oldatot és az 5%-os koncentrációjú glutáraldehid oldatot. A polimer kialakulása szobahőmérsékleten rendszerint 20 perc alatt megtörténik. (Rendszerint a felcseppentés után hűtőszekrényben 6 órás pihentetést alkalmaztam.)

#### Diffúziót szabályozó réteg kialakulása

Az enzim réteg kialakulását követően poliuretán 1%-os tetrahidrofuránnal készített oldatából 2  $\mu$ l-t cseppentettem az enzim tartalmú, térhálósított polimer rétegre. Az oldat gyorsan megszárad.

#### Külső védő réteg készítése

A diffúziót szabályozó réteg megszáradása után 30% poli(2-hidroxi-etil-metakrilát) (PHEMA) metanolos oldatából 4 µl-t helyeztem az elektródokra. Ez a réteg fedi mind a három elektródot, rögzíti az enzimréteget a munkaelektród felületére, összefüggő biokompatibilis réteget képez és a mérés során közvetlenül érintkezik a mérendő mintával.

#### 3.5.1.2. Az elkészített elektródok tárolása

Az elkészített elektródokat a használaton kívüli időben hűtőszekrény normál terében (~5 °Con) tároltam. Megfelelő tárolással egy elektród egy hónapig is használható (Megfelelő működéséről, alkalmankénti kalibrációval győződtem meg.)

## 3.5.1.3. Az elkészített elektródok tesztelése

A szárazon tartott elektródoknak a mérendő közegbe helyezés után bizonyos időre van szükségük, hogy stabil mérési funkcióra alkalmas állapotba kerüljenek. A mérésre alkalmas alapáram értéket az elektród rendszerint 1000 másodperccel az oldatba helyezés után elérte.

Az elektród teszteléséhez alkalmazott 375 m mol/dm<sup>3</sup> D-glükóz oldatot szobahőmérsékleten, 24 órával a felhasználás előtt készítetem, hogy a mutarotációs egyensúly kialakuljon.

## 3.5.2. Mikrochip alapú bioszenzor készítése

Putreszcin detektálásra alkalmas enzimelektródot mikrochip alapú elektródra készítettem. A mikrochip elektród alapjául szolgáló biokompatibilis Kapton®-ra vitt króm, arany vékony (125µm) réteges nyers wafer-t a Biomedical Microsensor Laboratory North Carolina State University munkatársai készítették együttműködésben, közös projektünkön dolgozva.

Az elektródok geometria méretei:

munkaelektród ( $A_{WE}$ )1.767 mm<sup>2</sup>, ellenelektród ( $A_{CE}$ )6.872 mm<sup>2</sup> referenciaelektród( $A_{RE}$ ) 2.291 mm<sup>2</sup>

$$\frac{A_{CE}}{A_{RE}} = 3.0 \qquad \frac{A_{CE}}{A_{WE}} = 3.9$$



3.7. ábra Lapos mikrochip alapú elektród cella

Az arany munka- és ellenelektródot elektrokémiai eljárással platináztam, a referenciaelektródot ezüstöztem, majd a felületen ezüst-kloridot választottam le.

#### Az enzimréteg készítése

A putreszcin-oxidáz enzimet a munkaelektród felületén gázfázisú glutáraldehiddel immobilizáltam.

A foszfát pufferrel frissen készített enzim oldatból 1  $\mu$ l térfogatot mikrofecskendővel a munkaelektród felületére mértem. Az elektródfelületre helyezett enzim oldat 140-210 U putreszcin-oxidáz/cm<sup>2</sup> között változott.

Ezután az elektródot glutáraldehiddel telített gáztérbe helyeztem, ahol a szükséges mértékű polimerizáció szobahőmérsékleten 10 perc alatt lejátszódott.

## 3.6. FELHASZNÁLT ANYAGOK, VEGYSZEREK

#### 3.6.1. Elektródok készítéséhez használt anyagok

Az amperometriás elektródok készítéséhez szükséges fémszálakat a Goodfellow Corporation (Cambridge, Nagy Britannia) és Sigma-Aldrich (St. Luis, Mo, USA) cégektől szereztük be.

3.1. táblázat

Jili tublazat					
Elektródok készítéséhez használt fémszálak					
és elektród any	agok				
Anyag	Átmérő				
Réz	20 µm				
Réz	1.2 mm				
Réz	2 mm				
Réz	4 mm				
Platina	1 mm				
Platina	2 mm				
Arany	2 mm				
Ezüst	1.5 mm				
Ezüst	1 mm				
Üvegszerű	3 mm				
szénelektród					

Az elektródtestként szolgáló alacsony lágyulási pontú boroszilikát üvegkapillárisokat a Sutter Instrument (Novato, Ca. USA) cég szállította.

#### 3.6.2. Alkalmazott enzim készítmények

A putreszcin enzimelektródok elkészítéséhez Micrococcus Roseussal előállított putreszcinoxidáz (EC 1.4.3.10) Toyobo (Osaka, Japán) által forgalmazott enzimet használtam. A putreszcin-oxidáz enzim, a gyártó által garantált minimális fajlagos 37 U/mg aktivitása a méréseim szerint 38 U/mg-nak adódott.

Asperillus nigerből előállított glükóz-oxidáz (EC 1.1.3.4.) enzimet alkalmaztam glükózelektródok készítéséhez, amelyeket Sigma Aldrich és SEMPEX termékek voltak. A Serva Electrophoresis (Heidelberg, Németország) glükóz-oxidáz gyártó által garantált enzim minimális fajlagos aktivitása 220 U/mg. Ezt 299 U/mg-nak mértem.

A tormából előállított peroxidáz enzimet (EC 1.11.1.7), amelynek aktivitása 298 purpurogallin egység/mg volt, a Sigma-Aldrich vegyszerellátótól (St. Luis Mo. USA és Steinheim, Németország) vásároltam.

Az enzimeket szükség szerint hűtőszekrényben 2-8 °C-on és fagyasztószekrényben -18 °C-on tároltam.

Felhasználáskor az enzim aktivitását spektrofotometriás úton ellenőriztem.

#### 3.6.3. Elektródkészítéshez alkalmazott egyéb anyagok

Az elektród testeket kétkomponensű akril alapú polimerből, az ún. fogászati cementből (Duracryl Fast-Setting Basal Resin, Dental a.s. Praha) készítettem.

Az elektródok felületét nedves polírozással csiszoltam alumínium-oxiddal (BUEHLER, Lake Bluff, IL, USA) csiszoló bársonyon (Microcloth with adhesive backing, (BUEHLER Gmbh Düsseldorf, Németország). Ebben a folyamatban 1, 0.3, 0.05 és 0.03 µm átmérőjű polírozó port használtam csökkenő szemcseméret sorrendjében. A használat során, ha szükségesnek mutatkozott az elektródfelületének megújítása, nedves polírozással, a 0.03 µm átmérőjű alumínium-oxid polírozóporral dolgoztam.

Enzim elektródkészítéskor az 1-2 µl enzim oldatot 5 és 10 µl térfogatú Hamilton mikrofecskendőkkel mértem ki és cseppentettem a munkaelektród felületére.

## 3.6.4. Egyéb vegyszerek

Az alkalmazott vegyszerek közül a putreszcin'2HCl, és a glutáraldehid (25%-os oldat) a glükóz, fruktóz, aszkorbinsav, 30% hidrogén-peroxid, citromsav, borkősav Sigma (Steinheim, Németország) termékek. Az arabinózt, galaktózt, D(+)-glükóz monohidrátot, szacharózt, az eluens készítéshez használt kálium-hidroxidot a Fluka-tól (Bucch, Svájc), a húgysavat Reanal Kft-től (Budapest, Magyaroszág) vettem.

Az enzimelektród készítéshez felhasznált *m*-feniléndiamin, poli-(2-hidroxi-etil-metakrilát), acetaminofen, bovine szérum albumin Aldrich termékek voltak.

Standard puffer oldatokat pH=4.01, pH= 7.01 és pH=10.01 Hanna Instrument Hungary Kfttől (Szeged, Magyarország) vásároltam.

Izotóniás foszfát puffert alkalmaztam az enzimelektródok készítéshez és a velük való munka során.

Az ionkromatográfiás elválasztáshoz ultra-tiszta nátrium-hidroxid pelletből (Panreac (Barcelona, Spanyolország)) készítettem az eluens oldatot. A hidrogénkarbonát-ion erősen kötődik az ionkromatográfiás kolonnához, károsítva azt, lerontva elválasztó képességét [186]. A levegőből származó széndioxid elnyelése miatti karbonátosodás mértékének csökkentésére igyekeztem az eluenst tároló edényben a légcserét gátolni csak kis nyomáskiegyenlítő rést hagyva. Az eluens oldatot naponta frissen készítettem és azt a felhasználás előtt ultrahanggal gáz-mentesítettem.

Felhasználtam még Linde gyártmányú 4.6 tisztaságú nitrogén gázt (Linde Gáz Magyarország). Nitrogén gáz átbuborékoltatásával oxigén-mentesítettem az oldatokat, amikor arra szükség volt.

A beszerzett nagytisztaságú vegyszereket további tisztítás nélkül használtam. Az oldatokat és a kromatográfiás eluenst kétszer ioncserélt vízből, naponta frissen készítettem.

## **3.7. ALKALMAZOTT MÓDSZEREK**

#### 3.7.1. Putreszcin-oxidáz aktivitásának mérése

Az enzimaktivitás mérés elve [187]

putreszcin-oxidáz  $Putreszcin + O_2 + H_2O \xrightarrow{(EC 1.4.3.10)} 4 - a \min o - butyraldehid + NH_3 + H_2O_2$  $2H_2O_2 + 4 - amino - antipirin + 2,4 - diklór - fenol \xrightarrow{peroxidáz} kinon - imin festék + 4H_2O_2$ 

A kinon-imin festék fotometriásan 510 nm hullámhosszon mérhető. A putreszcin-oxidáz aktivitásának meghatározása folyamatos kinetikus fotometriás detektálással történt.

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.)

#### Reagensek

Destas a sim al data	10 $\frac{1}{10}$ $\frac{3}{10}$ $\frac{1}{10}$ $\frac{3}{10}$ $\frac{3}{1$			
Putreszcin oldat:	10 mmol/am putreszcin (32mg putreszcin nidrogen-			
	kloridot M <sub>w</sub> =161.07) oldunk 20 ml vízben.			
Trisz—HCl puffer:	koncentrációja 0.1 mol/dm <sup>3</sup> , pH=8.0,			
4-aminoantipirin oldat:	12 % (1200 mg 4-aminoantipirint oldunk 1000 ml vízben			
2,4-diklór-fenol oldat:	0.48% (Feloldunk 480 mg 2,4-diklór-fenolt 100 ml 40%			
	(V/V) etanolban.)			
Peroxidáz oldat:	400 U/ml (feloldunk 400 mg peroxidázt (110 purpurogallin			
	egység/mg) 10 ml vízben.)			
Enzimhígító oldat:	20 mmol/dm <sup>3</sup> trisz—HCl puffer, pH=8.0 felhasználásig			
	jégen hűtjük.			
Enzim oldat*	0.1-0.3 U/ml enzim oldatokat jégen hűtött enzimhígító			
	oldattal készítjük. Az enzim oldatok hígításához szintén			
	enzimhígító oldatot használunk. * Az oldatot közvetlen			
	felhasználás előtt mérjük össze.			
eliárás lépései				

Az elja

1. Kombinált oldat készítése, amelyet sötét üvegben és hűtve tárolunk. 20 ml putreszcin oldat 97 ml Trisz—HCl puffer, pH=8.0 1.0 ml 4-aminoantipirin oldat 1.0 ml 2,4-diklór-fenol 1.0 ml peroxidáz oldat Az elkészült kombinált oldat alkotóinak koncentrációja:  $1.58 \text{ m mol/dm}^3$ putreszcin 78 m mol/dm<sup>3</sup> Trisz—HCl puffer  $0.47 \text{ m mol/dm}^3$ 4-aminoantipirin  $0.23 \text{ m mol/dm}^3$ 2,4-diklór-fenol peroxidáz 3.2 U/ml

- 2. A kombinált oldatból 2.85 ml-t küvettába (d=1 cm) pipettázunk és 30 °C-on tartjuk a hőkiegyenlítődésig, kb.5 percig.
- 3. A küvettába 0.15 ml frissen készített enzim oldatot mérünk, és óvatosan összekeverjük.
- 4. A mintát 5 perces 30 °C-os termosztálás után, vízzel szemben 510 nm-en mérjük fotometriásan. A mérési görbe lineáris szakaszából állapítjuk meg a percenkénti jelváltozás ( $\Delta A$ ) értékét.

Ugyanakkor megmérjük a 'vak oldat' percenkénti jelváltozását ( $\Delta Bv$ ), alkalmazva az enzimoldatok mérésére alkalmazott módszert. A 'vak oldat' készítésekor az enzim oldat helyett az enzimhígító oldatot mérjük a küvettába.

Enzimaktivitás kiszámítása

$$fajlagos - aktivitás(U / ml) = \frac{(\Delta A / perc)x(\Delta Am - \Delta Bv)xV_T xH}{29x1/2x1.0xV_m}$$
  
Enzimaktivitás (U/mg)=(U/ml)x1/C

Ahol:  $V_T$  : teljes térfogat (3 ml)

- V<sub>m</sub> : minta térfogat
  - 29 : a kinonimin festék milimolos abszorbancia koefficiense a vizsgálati körülmények között (cm<sup>3</sup>/µmol)
  - $^{1\!\!/_2}$ : Egy molekula  $H_2O_2$  hatására képződik egy fél molekula kinonimin festék
  - 1.0 : a fényút hossza (cm)
- H : hígítási tényező
- C : az enzimoldat koncentrációja (mg/ml)

#### 3.7.2. Glükóz-oxidáz aktivitásának mérése

Az aktivitás mérési elve [188]

$$\begin{array}{c} Gl\"ukoz-oxidaz"\\ \beta-D-Gl\"ukoz+O_2+H_2O & (EC\ 1.1.3.4) \end{array} \\ D-gl\"ukono-1.5-lakton+H_2O_2 \end{array}$$

$$H_2O_2 + o - dianizidin(redukált) \xrightarrow{Peroxidáz} o - dianizidin(oxidált) + H_2O_2$$

A dianizidin (oxidált) fotometriásan 500 nm hullámhosszon mérhető. Az egységnyi enzimaktivitás definíciója: az alábbiakban ismertetett körülmények között egy perc alatt egy egységnyi enzimaktivitás egy mikromól hidrogén-peroxid képződést eredményez (amely egy mikromól dianizidin mennyiség változásnak felel meg). Az aktivitás meghatározás folyamatos kinetikus fotometriás detektálással történt.

Reagensek

Nátrium-acetát puffer:

200 ml 50 mmol/dm<sup>3</sup> nátrium-acetát puffer (pH=5.1) 35 °C-on. A pH beállítása 1 mol/dm<sup>3</sup> sósavval történik.

o-dianizidin oldat:	0,21 m mol/dm <sup>3</sup> <i>o</i> -dianizidin oldatotot készítünk, 50 mg <i>o</i> -diazinidin dikloridot 7.6 ml ioncserélt vízben oldásával.		
	Az oldat 1 ml-ét 100 ml-re hígítjuk az 50 mM nátrium- acetát pufferrel.		
Reakció elegy:	10 ml 10% (w/v) β-D(+)glükóz szubsztrát oldat.		
	29 ml 0.17 mM o-dianizidin és 1.72% (w/v) glükóz oldat.		
	Közvetlenül felhasználás előtt készítjük 24 ml 0.21		
	mmol/dm <sup>3</sup> o-dianizidin oldat és 5 ml 10% (w/v) ß-		
	D(+)glükóz szubsztrát oldat		
Peroxidáz enzim oldat: Hideg ioncserélt vízzel, közvetlenül felhaszná			
	készítjük a peroxidáz 60 purpurogallin egység/ml oldatát.		
	(Peroxidáz II, Prod No. P-8250)		
Glükóz-oxidáz enzim oldat:	Lehűtött nátrium-acetát pufferrel készítünk el 20-40		
	egység/ml oldatot. Közvetlenül felhasználás előtt tovább		
	hígítjuk 0.4-0.8 egység/ml koncentrációra hűtött nátrium-		
	acetát pufferrel.		
Az eljárás lépései			

1. A következő oldatokat pipettázzuk 1 cm-es küvettába.

	Minta (Am) (ml)	Vak (Av) (ml)
Reakció elegy	2.9	2.9
Peroxidáz enzim oldat	0.1	0.1

Keverés után 35 °C-on temperáljuk a küvettában elkészített oldatokat. Termosztálható fotométerben 500 nm-en állandó abszorbancia (Am) értékig mérjük. Ezután adjunk az oldatokhoz az enzim oldatot és az enzimoldatnak megfelelő térfogatú puffer oldatot.

	Minta (Am)(ml)	Vak (Av)(ml)
Enzim oldat	0.1	-
Nátrium-acetát puffer	-	0.1

Azonnal keverjük meg az oldatot (a zárt küvetta megfordításával) s mérjük az abszorbancia növekedését 500 nm hullámhosszon kb. 5 percig. A minta és a vak oldat esetére számítsuk ki a  $\Delta A$ /perc értékeket.

Enzimaktivitás kiszámítása

$$T\acute{e}rfogati - aktivit\acute{a}s(U / ml) = \frac{\Delta Am / perc - \Delta Av / perc )xV_T xH}{7.5 xV}$$

Enzimaktivitás (U/mg)=Térfogati-aktivitás(U/ml)x1/C

Ahol: V<sub>T</sub> : teljes térfogat (3.1 ml)

H : hígítás

- 7.5 : az oxidált o-dianizidin 500 nm hullámhosszon mért milimólos abszorbancia koefficiense
- 0.1 : az alkalmazott enzimoldat térfogata (ml)
- C :enzim oldat koncentrációja (mg/ml)

Percenként egy egység oxidál 1,0 µmol  $\beta$ -D-glükózt D-glukonolaktonná és H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dá, ha a mérési körülmények a következők: pH=5.1, a hőmérséklet 35 °C. Az O<sub>2</sub> felhasználás 22.4 µl-nek felel meg percenként. Ha a reakcióelegy oxigénnel telített, az aktivitás 100 %-ig növelhető.

A 3.10 ml reakcióelegy végső koncentrációja:

48 mmol/dm<sup>3</sup> nátrium-acetát,
0.16 mmol/dm<sup>3</sup> o-dianizidin,
1.61% (w/v) glükóz
6 egység peroxidáz, (a koncentráció változik a hozzáadott glükóz oxidáztól függően).

#### 3.7.3. Mikrochip alapú szenzor aranyelektródok elektrokémia platinázása

A szenzor arany munka- és segédelektródját elektrokémiai úton platina réteggel vontam be. A platinázó vizes oldatot klór-platina savból, ammónium-hidrogénfoszfátból és nátriumhidrogénfoszfátból készítettem receptúra alapján [189].

Egy liter platinázó oldat elkészítéséhez a következő vegyszerekre van szükség a jelzett mennyiségben:

$H_2PtCl_6 \cdot 6 H_2O$	13 g
(ami Pt <sup>IV</sup> ekvivalens	5 g)
$(NH_4)_2HPO_4$	45 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	240 g

Az oldat egyes komponenseit vízben külön-külön feloldottam. Az ammóniumhidrogénfoszfát oldatot a klór-platina sav oldattal elegyítettem. Reakciótermékként ammónium-[hexakloro-platinát(IV)],  $(NH_4)_2[PtCl_6]$ , sárga csapadék keletkezik. Szűrés nélkül ehhez az oldathoz adtam a nátrium-hidrogénfoszfát oldatot. Az így kapott elegyet néhány órán át enyhén forraltam, míg az ammónium szagát már nem éreztem, miközben az oldat fakó citrom sárga lett.

A keletkezett oldat a platinát Pt<sup>IV</sup> állapotban, ammin komplexként tartalmazza. A platinázást 70 °C-on 0.2-0.5 A/dm<sup>2</sup> áramsűrűség alkalmazásával végezzük.

A platinázó lépést az aranyfelület elektrokémiai tisztítása előzte meg (+500 mA/cm<sup>2</sup>, 25 perc) a platinázó oldatban.

A fényes platinafelületet galvanosztatikus úton, 10 mA/cm<sup>2</sup> áramsűrűséggel, 15 percig 5 cm átmérőjű platinaháló ellenelektródot alkalmazva végeztem.

#### 3.7.4. Mikrochip alapú szenzor referenciaelektródjának kialakítása

#### Elektródfelület tisztítás

A referenciaelektród arany felületét annak elektrokémiai ezüstözése előtt, az ezüstöző oldatban elektrokémiai tisztítási folyamatnak vetettem alá. A tisztító lépéshez 30 másodperc időtartamig 5 mA/cm<sup>2</sup> oxidációs áramsűrűséget alkalmaztam.

#### Mikrochip arany elektród elektrokémiai ezüstözése

A pszeudo Ag/AgCl referenciaelektródot galvanosztatikus ezüstözéssel készítettem 1% (m/v) K[Ag(CN)<sub>2</sub>] oldatban -5 mA/cm<sup>2</sup> áramsűrűséggel 10 perc időtartamig végezve az elektrolízist.

#### Ag/AgCl referenciaelektród készítése elektrokémiai úton

Az aranyfelületre leválasztott ezüstréteg egy részét (~25%-át) AgCl-dá alakítottam 1 mol/dm<sup>3</sup> NaCl elektrolitban 5 mA/cm<sup>2</sup> áramsűrűséggel 2.5 perc időtartamig végezve az elektrolízist.

# 4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

## 4.1. AZ ELEKTROKATALITIKUS OXIDFILMMEL BEVONT RÉZELEKTRÓD VISELKEDÉSE LÚGOS KÖZEGBEN

Amint azt a korábbiakban említettem, a réz munkaelektród nem tekinthető az analitikai kémiában elterjedten használatos eszközök egyikének. A réz nem nemes fém, oxidációs potenciál alkalmazásakor viszonylag könnyen oxidálódik, emellett nem rendelkezik a higany felület esetében tapasztalható előnyösen nagy hidrogén leválási túlfeszültséggel. Savas és semleges vizes közegben, igen szűk potenciálablakot képes biztosítani. Az elektródfelület oxidációs, korróziós viselkedését komplexképzők jelenléte jelentősen befolyásolhatja.

Kísérleti munkám során lúgos közegben vizsgáltam az elektród sajátságait. A 4.1. ábra 1.2 mm átmérőjű korong alakú munkaelektróddal, 100mV/s polarizációs sebességgel, 50 mmol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú oxigénmentesített nátrium-hidroxid alapoldatban készített ciklikus voltammogramokat (CV) mutat. Az ábrán látható *a* voltammogram friss polírozással megújított elektróddal, míg a *b* CV masszív oxidációt eredményező elektrokémiai előkezelésnek alávetett elektróddal készült. Az elektrokémiai előkezelés abból állt, hogy 120 másodpercen át az elektródpotenciálját 50 mmol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú nátrium-hidroxid alapoldatban Ag/AgCl vonatkozásielektróddal szemben 3.0 V-on tartottam.



4.1. ábra Réz munkaelektródon felvett ciklikus voltammogramok (50 mmol/dm<sup>3</sup> NaOH, v= 100mV/s)
a) frissen polírozással megújított elektród, b) elektrokémiai oxidációnak alávetett elektród

55

Látható, hogy az elektromosan előkezelt rézelektróddal jelentősen intenzívebb, de lényegében azonos potenciálon jelentkező csúcsokat, illetőleg hullámokat kaptam, mint a frissen megújítottal. Lúgos közegben tehát elektródfolyamatban résztvevő redoxi sajátságú film vonja be az elektródfelületét.

A 4.2. ábra azonos körülmények között, előkezelés és megújítás nélküli 1.2 mm átmérőjű rézelektróddal készített voltammogramokat mutat be.





Mindkét voltammogram oxidációs szakaszában a 4.1. ábrán látható voltammogramokkal megegyezően felfedezhetünk két viszonylag kicsiny csúcsot. Az egyik –320 mV-nál (1.csúcs), a másik –107 mV-nál (2.csúcs) található. A redukciós szakaszban két éles, sokkal szembetűnőbb csúcs található, –530mV-nál (4.csúcs) és –850 mV (5.csúcs) (Az elektródpotenciál adatok kettős sóhidas ezüst/ezüst klorid elektróddal szemben mérve értendők).

A potenciál ablak végéhez közel, 600 mV-előtt egy nehezen észrevehető, a 4.2. ábrán azonban jól látható hullámot láthatunk. A glükóz jelenlétének tudható be a 750 mV-nál csak a *B* voltammogramon található csúcs (3.csúcs). Fontos megjegyezni, hogy a *B* voltammogramon a két redukciós csúcs (4. és 5.csúcs) kisebb, mint az *A* görbén.

A glükóz tartalmú oldatokban jelentkező voltammetriás csúcs analitikai jelként való használhatóságának vizsgálatára, különböző glükóz koncentrációjú, 50 mmol/dm<sup>3</sup> nátriumhidroxid alapoldatban 0.0-1.0 V tartományban, egyenáramú voltammogramokat vettem fel álló oldatban 10-200 mV/s tartományba eső pásztázási sebességek alkalmazásával. Két voltammogram készítése között 30 s ideig mágneses keverővel intenzív oldatkeverést alkalmaztam.

A kísérlet alapján két előnyös tulajdonságot sikerült igazolnom. Egyrészt az azonos körülmények között, egymás után kapott voltammogramok nem mutattak a mérések sorszámától függő tendenciózus változást, emlékezési jelenséget, vagy elektród passziválódást. Másrészt az azonos felvételi sebességgel készített voltammogramokon jelentkező csúcsokhoz (3.csúcs) tartozó áramintenzitások ( $i_p$ ) és a glükóz koncentráció között lineáris függvénykapcsolatot találtam.

A 4.3. ábra mutat be egy 100 mV/s pásztázási sebességgel készített  $i_p$  – glükóz koncentráció kalibrációs görbét a regressziós egyenes adataival együtt. Hasonló viselkedést tapasztaltam más szacharidok esetében is. Így az irodalmi utalásoknak megfelelően megállapítható, hogy a rézelektród, így az általam készített is, alkalmazható szénhidrátok voltammeriás analízisére.



**4.3. ábra** Glükóz kalibrációs görbéje csúcsáram ( $i_p$ ) – glükóz koncentráció (c), v=100mV/s, 100 mmol dm<sup>-3</sup> NaOH a lapoldatban

Az elektród működésének, stabilitásának, különböző anyagokkal szembeni érzékenységének összehasonlító vizsgálatára forgó korong elektróddal amperometriás méréseket végeztem. A kísérletek során 25 ml-es főzőpohárba 10 cm<sup>3</sup> 50 mmol/dm<sup>3</sup> nátrium-hidroxid alapoldatot juttattam és a 1000 ford/perc sebességgel forgatott 1.2 mm átmérőjű rézelektróddal 0.6 V polarizációs potenciál mellett regisztráltam az áramot az időben. Stacionárius áramértékek elérése után a vizsgálandó anyag 10 mmol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú oldatából 20 μl-es dózisokat adtam a cellába. Így lépcsőszerű áram-idő regisztrátumokat kaptam. Glükóz esetében kapott regisztrátumot mutat be a 4.4. ábra.



**4.4. ábra** Forgó korong elektróddal (1000 fordulat/perc, elektródpotenciál 0.6 V) felvett áram (i)-idő (t) görbe. A nyilak 20  $\mu$ l 10 mmol/dm<sup>3</sup> glükóz oldat hozzáadását jelzik. Az alapelektrolit 10 ml 50 mmol/dm<sup>3</sup> NaOH.

Az ábrán az oldatdózisok beadási időpontját nyilak jelzik. Látható, hogy az áramlépcsők alakja nem utal elektród passziválódásra. A teljes koncentráció függvényében ábrázolva az amperometriás áramot a vizsgált tartományban lineáris függvényeket kaptam. A mérés során kapott áramlépcsők glükóz lépcsőre normált értékét mutatja a 4.1. táblázat.

0.1 Innol/din Cukol oldatbali				
Vizsgált		Glükózra vetített relatív		
anyagok	i /10 <sup>-6</sup> A	érzékenysége		
Arabinóz	0.37	1.6		
Galaktóz	0.39	1.7		
Glükóz	0.23	1.0		
Mannóz	0.29	1.2		
Borkősav	0.13	0.56		

**4.1. táblázat** A réz forgókorong elektród relatív érzékenysége<sup>a</sup> 0.1 mmol/dm<sup>3</sup> cukor oldatban

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup>A forgási sebesség 1000 fordulat/ perc. 50 mmol/dm<sup>3</sup> NaOH alapelektrolit, az elektródpotenciál 0.6 V.

A voltammetriás görbén jelentkező csúcsok természetének vizsgálatára 100 mmol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú nátrium-hidroxid oldatban különböző polarizációs sebességekkel ciklikus voltammetriás felvételeket készítettem. Vizsgáltam az egyes csúcsmagasságok  $(i_p)$  és a polarizáció sebesség (v) közötti függvénykapcsolatot. Amint az ismeretes, lineáris  $i_p$ -v függvény adott mennyiségű, az elektródfelületen adszorbeált anyag átalakulására utal. Ha az  $i_p - v^{-1/2}$  függvény mutatkozik lineárisnak, az a nyugvó oldatban végzett mérés esetére érvényes Randles-Sevcik egyenlet értelmében, az elektródfolyamat diffúzió által kontrollált jellegét valószínűsíti.

A vizsgált négy csúcs közül egyik sem mutatott tisztán diffúziós sajátságot, de mindegyik esetében az  $i_p - v^{1/2}$  függvény inkább közelítette a lineáris viselkedést, mint az  $i_p - v$ . A 4.csúcs és 5.csúcs keskeny, éles alakja nagymértékben adszorbeált anyagféleség redukciójára utal.

A két redukciós csúcs alatti terület által képviselt töltésmennyiség és a pásztázási sebesség közötti függvénykapcsolatot mutatja be a következő 4.5. ábra. Az A görbe a 4. csúcsra, *B* görbe pedig az 5.csúcsra vonatkozik. A méréshez 1.2 mm átmérőjű korong alakú rézelektródot használtam.



**4.5. ábra** A csúcs alatti töltésmennyiség (Q) és a pásztázási sebesség (v) közötti függvénykapcsolat vizsgálata

Amint látható, kicsi polarizációs sebességek nagyobb áramintegrált, nagyobb mennyiségű redukálható, az elektródfelületen adszorbeált anyag keletkezését eredményezik. A ciklikus voltammetriás görbék alapján láthatjuk, hogy a potenciál pásztázás során a réz elektródfelülete lúgos közegben oxidálódik. Az oxidáció során keletkezett anyag a felületen marad és ez megfelelő elektródpotenciál mellett redukálható.

Kisebb pásztázási sebességek mellett hosszabb az oxidációs folyamatok reakcióideje, így több oxidált, felületen adszorbeálódó anyagféleség keletkezik.

A ciklikus voltammogrammok alapján az is megállapítható, hogy lúgos közegben az elektrokémiai oxidáció során keletkezett anyag nem passziválja a rézelektród felületét.

Amint az a 4.5. ábrán látható, glükóz jelenléte hatást gyakorol a két redukciós csúcs nagyságára. Méréseimben megvizsgáltam a glükóz koncentrációnak a 4. csúcs és 5.csúcs i<sub>p</sub> értéke és a glükóz koncentráció közötti függvénykapcsolatot. A méréseket 1.2 mm átmérőjű korong elektróddal 100 mV/s polarizációs sebességgel 50 mmol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú nátrium hidroxid alapoldatban végeztem. A 4. és 5. csúcsokra kapott csúcsáram és glükóz koncentráció függvényeket a 4.5. ábra mutatja.



**4.6. ábra** A -530 mV-on (*A* görbe) és -823 mV-on (*B* görbe) mért redukciós áraminteziás  $(i_p)$ és glükóz koncentráció (c) függvénykapcsolata

Látható, hogy nagyobb glükóz koncentráció kisebb redukciós csúcsokat (4.csúcs) eredményez. Az 5.csúcsot kevéssé befolyásolja a glükóz koncentráció. A glükóz jelenléte kevéssé csökkenti az alacsonyabb redukciós potenciálon átalakuló anyag felületi mennyiségét.

A rézelektródon lúgos közegben lejátszódó elektródreakciókról a pásztázási sebességi vizsgálatok és a redukciós csúcsok alakja alapján megállapítható, hogy az oxidációs reakcióban keletkező anyag adszorbeálódik a felületen. Valószínű, korábbi közlemények is ezt mondják, hogy az 1.csúcs a  $Cu^{0}/Cu^{+}$  reakció lejátszódását jelzi, míg 2.csúcs létrejötte  $Cu^{0}/Cu^{+}$  és  $Cu^{+}/Cu^{2+}$  reakciók együttes lejátszódásának köszönhető. Az 50-300 mV tartományban jelentkező hullám a  $Cu^{2+}/Cu^{3+}$  oxidációt jelzi. 730 mV közelében, a potenciál ablak határán az oxidfilm oldódása és egyéb oxidációs folyamatok játszódnak le.

A redukciós ágon látható két éles csúcs a rézion kétlépésben, fémrézzé történő redukciója következtében jön létre.  $Cu^{2+}/Cu^{+}$  redukció –530mV-nál (4.csúcs) és  $Cu^{+}/Cu^{0}$  redukció –823 mV (5.csúcs). (Mindkét potenciál érték Ag/AgCl elektróddal szemben értendő.)

A redukciós csúcsok alatti áramintegrál értékét mérve, ismerve a korongelektród felületének nagyságát, durva becslést tehetünk az oxid film vastagságára vonatkozóan.

A rendszeresen használt elektród esetében, a csúcs alatti terület által reprezentált töltésmennyiség alapján számított, a redukció során átalakult rézion mennyiség a 7-9 x  $10^{-10}$  mól tartományba esik. Érdekes módon az 5. csúcs területe rendszerint nagyobbnak adódik, mint a 4. csúcsé. Elektromosan előkezelt elektród esetében, amint az nyilvánvaló, lényegesen nagyobb, 4.7 x  $10^{-9}$  mól értéket kaptam.

Ha egy oxid molekula sugarának nagyságát 0.6 Å-nak becsüljük, az oxid film vastagsága kissé nagyobbnak adódik a monomolekulárisnál (100 mV/s polarizációs sebességgel, alapoldatban kapott ciklikus voltammogrammok alapján), de jelentősen kisebbnek a bimolekuláris borítottságnál. Az elektrokémiailag előkezelt elektródnál a felületi film vastagsága a tíz monomolekuláris réteg körüli.

Megvizsgáltam, hogy a vastagabb felületi film milyen hatást gyakorol a glükóz oxidációs hullámára. A 4.7. ábra frissen regenerált és elektromosan előkezelt elektród voltammetriás viselkedését hasonlítja össze. Mindhárom voltammogram 100 mV/s polarizációs sebességgel azonos, 1.2 mm átmérőjű réz elektróddal készült 50 mmol/dm<sup>3</sup> nátrium-hidroxid alapelektrolitban, *a* és *b* görbék polírozással frissen megújított elektróddal, *c* görbe elektrokémiailag frissen előkezelt rézelektróddal készült. *b* és *c* voltammogramot 1 mmol/dm<sup>3</sup> glükóz koncentrációjú oldatban készítettem, míg *a* voltammogram az alapelektrolit voltammogramja.



4.7. ábra Rézelektród voltammetriás viselkedésének összehasonlítása NaOH alapoldatban a) – megújított Cu elektróddal NaOH alapoldatban felvett voltammogram b) – megújított Cu elektróddal mért 1 mmol/dm<sup>3</sup> glükózoldat voltammogramja c) – elektromosan előkezelt Cu elektródon 1 mmol/dm<sup>3</sup> glükózoldat voltammogramja

Az ábra alapján látható, hogy az elektromos előkezelés jelentősen csökkentette a glükóz oxidációs hullámának elektródpotenciálját. Ez előnyös a szelektivitás szempontjából, ugyanis

ha más anyagok oxidációs potenciálja nem csökken, akkor a kisebb detektálás potenciál alkalmazásával kisebb a mérésünket esetlegesen zavarni képes anyagok száma. A koncentrációra jellemző áramintenzitás értéket azonban csak jelentéktelen mértékben növelte. Ez összhangban van Torto és munkatársai [190] eredményeivel. Tehát a vastagabb oxid film nem növelte a voltammetriás mérés érzékenységégét. A túloxidált felület idővel változásokat szenvedhet, ezzel a detektálás potenciál is változhat. Mérlegelve az előnyöket és hátrányokat, a további méréseimben nem használtam elektromosan előkezelt rézelektródokat.

#### 4.1.1. Az elektródreakció jellegének vizsgálata

Kérdéses, hogy a szénhidrátok, vagy más vicinális hidroxi csoportokat tartalmazó molekulák jelenléte milyen mechanizmus szerint változtatja meg a felületi folyamatokat. A glükóz esetében a hatás jól látszik a 4.2. A és B., valamint a 4.6. A és B ábrákon. A glükóz jelenléte csökkenti a redukciós csúcsok nagyságát. Két különböző hatásnak tulajdoníthatjuk a jelenséget. Az egyik elképzelés szerint a jelenlévő anyag, a glükóz, redukálja az elektródfelületén az oxidációs reakcióban keletkező anyagot, így saját maga oxidálódik. A másik mechanizmus szerint a glükóz oldódó komplexbe viszi az elektródot bevonó oxidált anyagféleséget. A Faraday áram a felületi film regenerációját eredményezi. Ennek megfelelően a 4. csúcsot eredményező folyamat lehet elektrokatalitikus vagy korróziós karakterű. A szakirodalomban mindkét elképzelésre találhatunk többé-kevésbé bizonyított példákat.

A folyamat jellegére vonatkozó fontos információt az elektródreakció elektronszám változásának meghatározásával, valamint a reakció termékeinek azonosításával, a reakció elegy analízisével szerezhetünk. Az elektronszám változás meghatározására számos módszer ismeretes, azonban a módszerekkel kapott eredmények szórása rendszerint nagy.

Munkámban két módon határoztam meg különböző anyagoknak rézelektródon, 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 értékét.

A másik esetben forgó elektród alkalmazásával végezve méréseket a Koutecky-Levich módszert követtem. Ez a módszer a heterogén, elektrokatalitikus reakció sebességi koefficiensének mérését is lehetővé teszi.

Az elektrolízis termékének vizsgálatára a nagyméretű elektróddal makroelektrolízist végeztem, és a kapott reakcióelegyet ionkromatográfiás és voltammetriás úton elemeztem, mérve a reakcióban keletkező és átalakuló anyagok koncentrációját, és az elektrolízis során, a cellán áthaladt töltésmennyiséget. A makroelektrolízissel kapott elegy réztartalmát atomspektroszkópiás módszerrel határoztam meg.

#### 4.1.2. Elektronszám változás mérése makroelektrolízissel

A coulométer üvegcellájába 1-5 mmol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú minta anyagot tartalmazó, 5 cm<sup>3</sup> 100 mmol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú nátrium-hidroxid alapoldatot juttattam. A cellába helyeztem a nagyméretű réz munkaelektródot, nagyméretű platina segédelektródot (Radelkis) és agaragar kocsonya áramkulccsal elválasztott terű Ag/AgCl vonatkozásielektródot. Mágneses keverőt, nagytisztaságú nitrogén bevezetést alkalmazva 0.5-0.6 V elektródpotenciál mellett hosszan tartó elektrolízist végeztem. Mértem az elektrolízis idejét és a cellán áthaladó töltésmennyiséget.

A makroelektrolízist azonos ideig alapoldatban végezve meghatároztam a maradékáramként a cellán átfolyó töltésmennyiségét. Ezzel korrigáltam a minta esetében kapott áramintegrált. A mintaoldat elektrolízisekor kapott oldatot kvantitatív 10 cm<sup>3</sup>-es mérőlombikba vittem és álló oldatban végzett voltammetriás méréssel meghatároztam a vizsgálandó anyag koncentrációját. A mérések során három párhuzamos voltammogramot vettem fel. A csúcsáram intenzitások átlagából kalibrációs görbe segítségével határoztam meg az elektródreakcióban át nem alakult anyag koncentrációját. Ismerve az eredeti koncentrációt és a töltésmennyiséget, lehetőségem volt az elektronszám változás (n) kiszámítására az alábbi egyszerű képlet segítségével.

$$n = \frac{\Delta c \Delta Q}{100 F}$$
$$\Delta c = c_{ere \, det \, i} - c_{megmaradt},$$
$$\Delta Q = Q_{minta} - Q_{alapoldat}$$

Természetesen a hígítást figyelembe kell vennünk  $C_{eredeti}$  megadásakor. A különböző anyagok esetében három párhuzamos mérést végeztem. A kapott elektronszám változás adatokat a 4.2. táblázat tartalmazza.

Vizsgált minták	"n" értékek
Arabinóz	8.2
Galaktóz	10.5
Glükóz	11.5
Mannóz	9,7

4.2. táblázat Monoszacharidok elektrokatalitikus
oxidációiakor mért elektronszám változás

#### 4.1.3. A Koutecky- Levich módszerrel végzett mérések

A jól ismert [191], széles körben használt Koutecky - Levich egyenlet lehetőséget biztosít az elektródfolyamatok egyes sajátságainak meghatározására. Az egyenlet a teljesen transzport kontrollált esetre vonatkozó Levich egyenlet és a transzport által egyáltalán nem befolyásolt kinetikus áramot leíró egyenlet kombinációjából adódik.

Forgó korong elektródra a Levich egyenlet:

$$i_c = 0.620 n FAD^{2/3} \omega^{1/2} v^{-1/6} C$$

ahol *n* az elektronszám változás, *A* az elektródfelület nagysága (cm<sup>2</sup>) *D* az átalakuló anyag diffúziós koefficiense (cm<sup>2</sup>s<sup>-1</sup>), C annak koncentrációja (mol/ cm<sup>3</sup>),  $\omega$  a forgás sebesség (rad s<sup>-1</sup>), v a közeg kinematikus viszkozitása (cm<sup>2</sup>s<sup>-1</sup>).

A kinetikus áramot  $(i_k)$  leíró egyenlet:

 $i_k = nFAk_f C$  $k_f$  a reakció sebességi koefficienst jelenti

Az elektródfelületen adszorbeált mediátor anyag esetében a kémiai reakció másodrendű. A reakció sebessége függ a mediátor felületi koncentrációjától, a borítottságtól ( $\Gamma$ ) is. Ekkor a tisztán kinetikus áram komponenst leíró egyenlet a következő:

$$i_k = nFAk_f\Gamma C$$

A teljes áram a két komponens összege:

$$i_t = i_k + i_d$$

A Koutecky – Levich egyenlet egyszerűen a fenti áramintenzitás összeg reciprokából adódik.

$$\frac{1}{i_t} = \frac{1}{i_k} + \frac{1}{i_d}$$

azaz,

$$\frac{1}{i_t} = \frac{1}{nFAk_fC} + \frac{1}{0.62nFAD^{2/3}v^{1/6}C\omega^{1/2}}$$

vagy

$$\frac{1}{i_t} = \frac{1}{nFAk_f \Gamma C} + \frac{1}{0.62nFAD^{2/3} v^{1/6} C \omega^{1/2}}$$

64

Jól látható, hogy az egyenletek jobb oldalának első tagja tartalmazza a reakció sebességi koefficiensét, továbbá, hogy a jobb oldal második tagjában nem szerepel a sebességi koefficiens, sem a katalizátor felületi koncentrációja ( $\Gamma$ , mol/cm<sup>2</sup>). Látható, hogy ha az egyenlet érvényességi tartományában választott paraméterek mellett, forgó korong elektróddal végzünk méréseket, akkor a különböző forgássebesség ( $\omega$ ) mellett kapott áramintenzitás értékek reciprokát a forgássebesség négyzetgyöke reciprokának függvényében ábrázolva, azaz képezve  $1/i_t - 1/\omega^{1/2}$  függvényt, egyenest kell kapnunk. Az egyenes tengelymetszetéből *n*, *A és C* (és elektrokatalitikus reakció esetén  $\Gamma$ ) ismeretében a  $k_f$  érték kiszámítására van lehetőségünk. Az egyenes meredeksége a többi paraméter (*D*, *C*, *A*,  $\nu$ ) ismeretében a folyamat elektronszám változásának (*n*) meghatározására ad lehetőséget.

A Koutecky – Levich egyenlet alapján nyert adatokat rendszerint csak tájékoztató pontosságúnak tekinthetjük.

A lúgos közegben rézelektróddal végzett voltammetriás mérésekkor az elektródfelületét bevonó oxid film szerepel – feltételezésünk szerint – elektrokatalizátorként. Ennek, az adott elektródpotenciál mellett katalizátorként való működésekor kialakuló pontos sztöchiometriai összetételét nem ismerjük. Tekinthetjük CuO-nak, vagy Cu<sub>2</sub>O-nak. A feltételezett összetételű filmek felületi koncentrációjának becslésére a ciklikus voltammogramokon mutatkozó jól definiált redukciós csúcsok által képviselt áramintegrálok alapján van lehetőségünk, amint azt korábban megmutattam.

A rézelektród felületén lejátszódó folyamat vizsgálatára követve a Koutecky – Levich módszert, forgó elektródos vizsgálatokat végeztem a Radiométer gyártmányú forgó elektród test végéhez csavarosan illeszkedő teflon henger centrumába préselt rézhuzalból készített, megfelelően polírozott, és előkészített elektróddal.

Az elektródot kisméretű főzőpohárból kialakított mérőcellába helyezve, ezüst huzal vonatkozásielektród ( $\phi =1$ mm) és platina huzal segédelektród ( $\phi =1$ mm) alkalmazásával az előzetesen megállapított 0,650 mV vs. Ag kvázi vonatkozásielektród polarizációs potenciál mellett, különböző elektród forgássebesség mellett regisztráltam az amperometriás áramot. Úgy jártam el, hogy a mérőcellába a 100 mmol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú frissen készített nátriumhidroxid alapoldat pontosan bemért térfogatát juttattam, majd különböző forgássebességek mellett regisztráltam az alapáramot. Ezután a vizsgált anyag adott oldatának, adott térfogatát juttattam a mérőcellába és elvégeztem az áram - forgássebesség függvény regisztrálását. Újabb oldatdózisok beadása után a mérőcella oldattartalmának megújítása nélkül 4-6 különböző koncentrációjú oldatra vonatkozó regisztrátumot készítettem. A 4.8. ábra különböző glükóz koncentrációjú oldatok esetében kapott regisztrátumok közül mutat be néhányat.



**4.8. ábra** Áram (i) - idő (t) regisztrátumok különböző glükóz koncentrációjú oldatok esetében. A jelentkező lépcsők a forgássebességet indikálják.

A kapott áram értékeket korrigáltam az alapoldatra vonatkozó értékekkel. Az így kapott  $i_r - \omega$  értékekből képeztem a Koutecky- Levich függvényeket. Különböző koncentrációjú glükóz oldatok esetében kapott Koutecky – Levich függvényeket mutat a 4.9. ábra.(A függvények szerkesztéséhez a 4.8 ábrán látható regisztrátumokból vett adatokat használtam.)



**4.9. ábra** 1.3-6.4 mmol/dm<sup>3</sup> glükóz oldatok mérésével kapott Koutecky – Levich függvények

A 4.3. táblázat példa képpen a különböző mérési paraméterek mellett kapott és az értékeléshez használt adatokat mutatja a 6.4 mmol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú glükóz meghatározás esetén.

$\omega$ /rad s <sup>-1</sup>	i <sub>t alap</sub> /10 <sup>-6</sup> A	$i_{t glükóz}/10^{-6}A$	$\Delta i_t / 10^{-6} A$	$1/\sqrt{\omega}$	$1/\Delta i_t$
7.2	2.0	7.00	5.00	0.37211	0.20000
15.0	1.9	14.55	12.65	0.25848	0.07905
31.0	2.0	16.29	14.29	0.17966	0.06998
47.2	2.0	17.70	15.70	0.14555	0.06369
63.4	2.0	18.32	16.32	0.12556	0.06127
79.2	2.0	18.77	16.77	0.11234	0.05963
94.8	2.0	18.85	16.85	0.10269	0.05935
110.5	1.8	19.07	17.27	0.09512	0.05790

**4.3. táblázat** Különböző mérési paraméterek mellett kapott és az értékeléshez használt adatok

A kapott egyenesek meredekségéből számoltam a reakció elektronszám változásának értékét. A számoláshoz a Faraday konstanst 96486.6 C/mol-nak vettem. A diffúzió állandó és a 100 mmol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú, 25 °C-os nátrium-hidroxid oldat kinematikus viszkozitás értékeit  $D_{glükóz} = 6.7 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ ,  $\nu_{100 \text{ mmol/dm}^3 \text{ NaOH}} = 0.01023 \text{ cm}^2/\text{s}$  az irodalomból [192] vettem.

A meredekség adatokból kapott elektronszám változás értékeket a 4.4. táblázat foglalja össze.

Slektronszam valtozas ertekek				
Vizsgált anyagok	n	Szórás		
Glükóz	12.11	$\pm 0.33$		
Galaktóz	11.60	$\pm 0.41$		
Arabinóz	9.65	± 0.25		

**4.4. táblázat** Koutecky – Levich függvény meredekségéből számolt Elektronszám változás értékek

A Koutecky – Levich egyenesek tengelymetszete alapján számolhatjuk a reakció sebességi koefficienseket. Ehhez, mivel elektrokatalitikus reakcióról van szó, meg kellett határoznom az oxid film felületi koncentrációját, a borítottságot ( $\Gamma$ ). Ennek meghatározásához 100 mmol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú NaOH oldatban ciklikus voltammetriás görbéket készítettem különböző módon előkezelt, különböző méretű réz korongelektródokkal az előzőekben megadott vonatkozási- és segédelektród mellett álló oldatban. A két határozott redukciós csúcs alatti áramintegrálokból (lásd 4.2. ábra) és a korong alakú elektródfelületek geometriai nagyságából számoltam a réz-oxid film felületi koncentrációját ( $\Gamma$ mol/cm<sup>2</sup>).

Az alábbi táblázat tartalmazza a felületi borítottságra vonatkozó kísérleti eredményeimet.

Elektród	Geometriai	Redukciós	Borítottság	Redukciós	Borítottság
	méret /cm <sup>2</sup>	4.csúcs	$\Gamma/\mu$ mol cm <sup>-2</sup>	5.csúcs	$\Gamma/\mu$ mol cm <sup>-2</sup>
		(Ep=-0.560V)		(Ep=-0.820V)	
		(µC)		/μC)	
Frissen polírozott	0.0234	44.5	0.0197	56.0	0.0124
Huzamosan	0.0234	34.1	0.0151	30.27	0.0067
használt					
Elektrokémiailag	0.0234	306.7	0.1358	279.8	0.0620
előkezelt					

4.5. táblázat Felületi borítottságra vonatkozó kísérlet eredményei

A számolás eredményeként kapott heterogén másodrendű elektrokatalitikus reakció sebességi koefficienseket a 4.6. táblázat tartalmazza.

reakció szamított sebességi koefficiensei							
Vizsgált anyagok	$k/10^{-3} dm^3 mol^{-1} s^{-1}$						
Glükóz	3.9						
Galaktóz	4.9						
Arabinóz	2.9						

**4.6. táblázat** A heterogén másodrendű elektrokatalitikus reakció számított sebességi koefficiensei

A vizsgált anyagok esetében mindkét módszerrel viszonylag nagy értéket kaptam elektronszám változásra. A két módszerrel kapott eredmények, a módszerek nem különösebben jó reprodukálhatóságát figyelembe véve egymással elfogadható egyezésben vannak. Hasonlóan nagy elektronszám változásokat kaptak különböző cukrokra Torto és munkatársai [190], Kano és munkatársai [194] valamint Baldwin csoportja [195].

Kérdéses, hogy mi az elektrokémiai oxidáció terméke. A monoszacharidok esetében kapott nagy elektronszám változás csak a C-C kötés hasadásával, oxidált állapotú fragmentumok keletkezésével képzelhető el. A makroelektrolízis során kapott elegyek ionkromatográfiás analízise alkalmasnak látszott arra, hogy az oxidáció termékeiről információt szerezzek [193].

Ennek megfelelően az előzőekben leírt módon végzett makroelektrolízissel kapott oldatokat ionkromatográfiás analízisnek vetettem alá. Az elválasztást IonPac AS5A kolonnán végeztem, eluensként 0.5 cm<sup>3</sup>/perc sebességgel áramoltatott 3mmol/dm<sup>3</sup> nátrium-hidroxid oldatot használtam. A bemérő hurok térfogata 10 µl volt. A makroelektrolízissel készített és 10 cm<sup>3</sup>-re kiegészített mintaoldatokat 21-szeres hígítás után injektáltam.

Szupresszor kolonna alkalmazása mellett vezetőképességi detektorral követtem nyomon az elválasztást. Példaképpen egymás utáni injektálás során regisztrált kromatogramokat mutat be a 4.10. ábra. Az ábrán "1. minta" az 50 mmol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú fruktóz. a "2. minta" 50 mmol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú glükóz makroelektrolízisével készített oldatot jelöli.



**4.10. ábra** Vezetőképesség mérő detektorral regisztrált kromatogrammok "1. minta" az 50 mmol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú fruktóz -, "2. minta" 50 mmol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú glükóz makroelektrolízisével készített oldatot jelöli.

A kromatográfiás mérések segítségével minden egyes makroelektrolízissel kapott oldatban jelentős mennyiségű formiát jelenlétét sikerült kimutatnom. Kalibrációs görbe segítségével kiértékeltem a kromatogramokat. Voltammetriás méréssel meghatároztam az elektrolízis során oxidálódott, azaz az elegyből eltűnt szénhidrát mennyiséget. Ismerve a makroelektrolízis során, a cellán áthaladt korrigált töltésmennyiséget ( $\Delta Q$ ), lehetőségem volt anyagmérleget készíteni. Glükózra vonatkozó eredményekről ad áttekintést a 4.7. táblázat. Az oxidált glükóz molekulák számát a talált formiát molekulák számával összevetve úgy találtam, hogy a mólarány közel 1:6, azaz egy glükóz molekula oxidációja hat formiátion keletkezéssel jár együtt.

Korróziós jellegű elektród folyamat esetében a makroelektrolízis során jelentős mennyiségű rézion kerül az oldatba. A makroelektrolízissel kapott elegyek rézion tartalmát atomspektroszkópiás módszerrel mértem réz vájtkatód lámpát és 324.7 nm hullámhosszat használva. A makroelektrolízissel kapott, 10 cm<sup>3</sup>-re kiegészített oldatot közvetlenül, hígítás nélkül porlasztottam a készülék acetilén – levegő lángjába. Az értékelést kereskedelmi standardok alkalmazásával készített kalibrációs görbe segítségével végeztem. A 4.7. táblázat tartalmazza az atomabszorpciós módszerrel kapott adatokat is. A táblázatba foglaltam a rézoldódást előidéző számított töltésmennyiség és az összes töltés százalékos arányát,  $\eta$ -t is

$$\eta = \frac{m_{Cu}nF}{M_{Cu}\Delta Q} * 100$$

ahol,  $m_{Cu}$  a talált réz mennyiség,  $M_{Cu}$  a réz atomtömege = 65.55g  $n \text{ a } Cu^{\circ} \rightarrow Cu^{+}$  reakció elektronszám változása, n=1 Látható, hogy a réz elektródfelületén lúgos közegben végbemenő elektrokémiai oxidációban fő termékként formiát ionok keletkeznek. A reakcióban az elektródfelületén lévő rézoxid film elektrokatalizátorként vesz részt. Egy glükóz molekula oxidációjakor hat formiát ion keletkezik. Továbbá a réz korrózió igen kis mértékű.

#	Glükóz c/10 <sup>-6</sup> mol	Töltés/ Cb	Mért formiát m/10 <sup>-6</sup> mol	Glükóz eqv. formiát /10 <sup>-6</sup> mol	Tömeg glükóz eqv. /10 <sup>-5</sup> mol	п	Mért Cu c/ ppm	m <sub>Cu</sub> /10 <sup>-6</sup> g	η /%
1	30.0	9.4069	50.82	8.47	6.50	11.50	2.51	7.5	0,121
2	30.0	8.1760	42.90	7.15	7.15	11.85	1.10	4.5	0.084
3	30.0	7.2052	37.98	6.33	6.33	11.79	2.72	8.1	0.171

4.7. táblázat Glükóz oldat makro-elektrolízisének analitikai eredményei

A kapott eredmények alapján valószínűnek látszik az, hogy az elektródreakció az alábbi, Lou és Baldwin által javasolt [195], de ezideig tudomásom szerint két oldalról senki által nem bizonyított mechanizmus szerint játszódik le.



Korábban <sup>1</sup>H és <sup>13</sup>C jelzett NMR mérések alapján indirekt úton igazolták a formiát ionok jelenlétét a reakció elegyben. [194]. Mások [195] galaktóz lúgos közegben végzett elektrokatalitikus oxidációja során csak nyomnyi mennyiségű formiátot találtak.

Érdemes összevetnünk a 4.2 és a 4.4 táblázatokban szereplő elektronszám változások adatait a 4.7 táblázat adataival. Ennek megfelelően a feltételezhető, hogy a 4.7 táblázat adatai alapján tett megállapítások némiképpen általánosíthatók. Feltételezhető, hogy más szacharidok esetében is a rézelektródon lúgos közegben végbemenő oxidációs reakció fő terméke formiát ion. Ugyancsak igaznak tűnik, hogy más szacharidok esetében is elektrokatalitikus jellegű a lúgos közegben végbemenő elektrooxidáció. Az elektród korrózió pedig elhanyagolható mértékű. A 4.4. táblázat adatai — elektronszám változások glükóz, fruktóz, arabinóz esetén — világosan mutatják, hogy mindegyik monoszacharid esetében szénatomonként kételektronos oxidációval kell számolnunk: a hat szénatomos glükóznál és fruktóznál az elektronszám változás 12, az öt szénatomos arabinóznál 10. Korábbi, a dolgozat anyagában nem szereplő vizsgálataim során vicinális hidroxi csoportot tartalmazó más vegyületek, pl. borkősav is elektrokatalitikus oxidációs reakció során a vicinális hidroxi részt tartalmazó láncrész szén-szén kötése felhasad. A kapott elektronszám változás szokatlanul nagy. Hasonlóan hexózok elektrokémiai oxidációja esetében 12 körüli elektronszám változásról számolnak be svéd kutatók [30]. Természetesen a nagy elektronszám változás analitikai szempontból előnyös.

## 4.2. AZ ELEKTROKATALITIKUS RÉZELEKTRÓD ALKALMAZÁSAI

Az elektrokatalitikus rézelektród stabilis működése kézenfekvővé tette, hogy megvizsgáljam kromatográfiás elválasztások detektálásában való alkalmazhatóságának lehetőségeit. Ennek megfelelően három különböző felépítésű kromatográfiás detektorcellát készítettem és tanulmányoztam azok működését. Modellanyagként borkősavat, mono- és diszacharidokat használtam. Ezek alkalmas ionkromatográfiás oszlopon lúgos közegben elválaszthatók. Szerencsés egybeesés, hogy a rézelektród működése is bázikus közeget igényel. Cukor komponensek analízisére az élelmiszeranalízis, a növénytani kutatások, a klinikai diagnosztika stb. területén számos probléma kapcsán van szükség.

Amint az a korábbiakban bemutatásra került, Adams - Kissinger típusú átfolyó vékonyréteg cellát, wall jet típusú detektorcellát és nyitott kolonna végbe helyezett huzal típusú mikrocellát készítettem.

A detektorcellák működését áramló oldatos injektálásos ('flow injection analysis', FIA) rendszerbe iktatva vizsgáltam. Tanulmányoztam a detektálás érzékenységét, az effektív cella térfogatot, a működés reprodukálhatóságát, a kezelhetőséget [196].

Adams – Kissinger cellával FIA technikával készült áram – idő regisztrátumot mutat be a 4.11. ábra. A mérések során 1 cm<sup>3</sup>/perc áramlási sebességet, 0.6 V elektródpotenciált és 50  $\mu$ l térfogatú minta hurkot használtam. A kisebb csúcsok esetében 10<sup>-7</sup> mol/dm<sup>3</sup>, míg a nagyobbak esetében 10<sup>-5</sup> mol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú borkősavat injektáltam.

A 4.12. ábrán hasonló körülmények közötti injektálások esetében kapott áramcsúcsok alapján szerkesztett glükóz kalibrációs görbét mutatok be.



**4.11. ábra** FIA technikával készített készült áram (i) – idő (t) regisztrátum. (1 cm<sup>3</sup>/perc 50 mmol/dm<sup>3</sup> nátrium-hidroxid vivőoldat áramlási sebesség, 0.6 V elektródpotenciál és 50  $\mu$ l minta hurok térfogat. Injektált oldat: 10<sup>-7</sup> és 10<sup>-5</sup> mol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú borkősav oldat.)



**4.12. ábra** FIA technikával készített glükóz kalibrációs görbe (mérési körülmények megegyeznek az előző ábrán közöltekkel)

A cella megfelelően működött, viszonylag kis alsó méréshatár elérését tette lehetővé, azonban amint az a csúcsok "tailinges" karakteréből látható, kedvezőtlenül nagy diszperziót okozott. Az oldatvezető csatornába bejutó levegő buborékok eltávolítása technikai nehézséget okozott. További kromatográfiás méréseimben ezért a másik két cella típust előnyben részesítettem.

#### 4.2.1. Méz és nektár fő cukor komponenseinek analízise

A természetes mintákban lévő cukor komponensek koncentrációjának, azok egymáshoz viszonyított arányának meghatározása gyakori, különböző területeken jelentkező analitikai feladat. Így például virágos növények nektárjának összetétele botanikusokat, a mezőgazdaság területén dolgozó kutatókat érdekli [197]. A méz analízise az élelmiszeripari minőségellenőrzés, a forrás azonosítás vagy a hamisítás feltárása szempontjából fontos [198].

A feladat megoldására igen nagyszámú analitikai módszert dolgoztak ki. Szilanizálással illékonnyá tett komponensek gázkromatográfiásan mérhetők (pl. [198,199]). A HPLC módszerek gyakran a kevésbé érzékeny törésmutatós detektálást alkalmazzák (pl.[199]). Justino és munkatársai [200] HPLC módszerrel tanulmányozták méz öregedésekor az összetételben bekövetkező változásokat, NMR és FTIR-ATR detektálásos technikát is használtak.

A különböző növények által kiválasztott nektárok fő komponensei a glükóz, fruktóz és szacharóz. A mézben csak a glükóz és a fruktóz a jelenti a fő cukor komponenseket. A szacharóz koncentráció ritkán haladja meg a teljes szénhidrát mennyiség 4%-át. Nagy szacharóz koncentráció mézhamisítást jelez [201].

Kereskedelemben kapható kromatográfiás oszlopok jól használhatók cukor komponensek elválasztására nátrium-hidroxid eluens alkalmazásával. Lévén, hogy lúgos közegben nemesfém elektródon a mono- di- és oligo-szacharidok oxidálhatók, a közismerten előnyös
alsó méréshatárt biztosító amperometriás detektálás alkalmazására is sor került [202]. Azonban a nemesfém elektród passziválódik, így pulzáló amperometriás méréstechnika használatára van szükség.

Botanikus kollegák javaslatára kézenfekvő volt megkísérelni a munkámban készített és vizsgált rézelektródok, illetőleg detektor cellák nektár, illetőleg méz analízisre történő alkalmazását.

#### 4.2.2. Detektor mérőpotenciáljának megállapítása

A mézben előforduló cukor komponensek amperometriásan detektált kromatográfiás analízisével többen foglalkoztak [203-205]. A hatékony detektáláshoz alapvető jelentőségű a detektálási elektródpotenciál helyes megválasztása. Ezt célszerű az úgynevezett dinamikus voltammogram alapján meghatározni. A dinamikus voltammogramot FIA vagy kromatográfiás készülék alkalmazásával készítjük. Úgy járunk el, hogy az elektródpotenciál lépésenként történő változtatása mellett azonos koncentrációjú oldatok azonos dózisait injektáljuk. A kapott regisztrátumok alapján csúcsáram intenzitás ( $i_p$ ) – elektródpotenciál függvényt szerkesztünk. Ezt az  $i_p$  – E függvényt nevezzük dinamikus voltagrammnak.

Munkámban a dinamikus voltammogramot úgy készítettem, hogy CarboPac PA1 analitikai kolonnával ellátott kromatográfhoz kapcsoltam nyitott kolonna végbe vezetett réz huzal detektor cellát. Ennek munkaelektródján rendre 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700 mV elektródpotenciált állítottam be, eközben 0.1 mol/dm<sup>3</sup> nátrium-hidroxid eluens oldatot áramoltattam. 10  $\mu$ l-es bemérő hurok alkalmazásával azonos mintaoldat dózisait injektáltam és regisztráltam a kialakult áramot az időben. A mintaoldat 10  $\mu$ l-e 0.55 nmol glükózt, 0.83 nmol fruktózt és 1.46 nmol szacharózt tartalmazott. A különböző potenciálok mellett kapott kromatogramokat mutatja be a 4.13. ábra.



**4.13. ábra** Különböző elektródpotenciálok mellett kapott kromatogramok (CarboPac PA1 analitikai kolonna, 10μl-es bemérő hurok, 0.1 mol/dm<sup>3</sup> nátrium-hidroxid eluens, 0.55 nmol glükóz, 0.83 nmol fruktóz és 1.46 nmol szacharóz 10 μl mintában)

A regisztrált kromatogramokat egybevető ábra (4.13.) alapján lehetőségünk van a dinamikus voltammogramok megrajzolása nélkül is megválasztani az optimális detektor potenciált. A kromatogramok kezdeti szakaszán jól látszik a bemérés által okozott áram tranziens. Ezután a fruktóz csúcsa már 0.2 V elektródpotenciál mellett megjelenik. A fruktóznál kisebb retenciós idejű glükóz csúcs 0.35 V-nál, míg a szacharóz csúcsa csak 0.4 V-nál mutatkozik. Az egyes csúcsok az elektródpotenciál növelésével nőnek, majd 0.6 V után csökkenés következik be.

A kromatogramok összevetése alapján célszerűnek tartottam 0.6 V elektródpotenciál mellett végezni a kromatográfiás méréseket.

A kromatogramokon látható egyes csúcsmagasságokat a detektálási elektródpotenciál függvényében ábrázolva nyerjük a dinamikus voltammogramokat. A három anyagra vonatkozó, a kromatogramok adataiból szerkesztett dinamikus voltammogramokat mutatja be a 4.14. ábra. A dinamikus voltammogramok is mutatják, hogy mérési potenciálnak célszerű 0.6 V –ot választani. Emellett a 0.6 V-nál jelentkező i<sub>p</sub> értékek és a bemért egyes anyagmennyiségek ismeretében a detektálás relatív érzékenysége az egyes anyagokra vonatkozóan könnyen kiszámítható.



**4.14. ábra** A 4.13 ábra alapján szerkesztett dinamikus voltammogramok

A CarboPac PA1 analitikai kolonnán 1mol/dm<sup>3</sup> nátrium-hidroxid eluenst használva elvégeztem néhány cukorkomponens, arabinóz, mannit, glükóz, fruktóz, szacharóz kromatográfiás elválasztását. Az eluens áramlási sebességét 0.20-0.25 cm<sup>3</sup>/percnek választottam. A bemért minta mennyiség 1-10 μl között változott.

A különböző nektárokban esetlegesen előforduló szacharidok (főleg monoszacharidok) közül néhány elkülönülő komponens kromatogramját szemléltetem a 4.15.-4.17. ábrákon.



**4.15. ábra** Arabinóz és mannit kromatogramja (áramlási sebesség 0.25 cm<sup>3</sup>/perc)



**4.16. ábra** Glükóz, fruktóz és szacharóz kromatogramja (áramlási sebesség  $0.20 \text{ cm}^3$ /perc)



**4.17. ábra** Arabinóz, glükóz, fruktóz és szacharóz kromatogramja (áramlási sebesség 0.25 cm<sup>3</sup>/perc)

#### 4.2.2.1. A komponens azonosítása és reprodukálhatósága

Ionkromatográfiás elválasztás esetén a komponensek azonosítására a retenciós idő szolgál. 50 mérés átlagából kiszámítottam az egyes komponensek retenciós idejének szórását. Az egyes retenciós időket és a hozzátartozó szórás értékeket 4.8. táblázatban foglaltam össze.

no ubiuzut ofunce. fruntez es seucharde feteneros neo effener es seora						
Komponens	Retenciós idő/perc	Szórás / %				
Glükóz	4.26	2.33				
Fruktóz	4.91	2.24				
Szacharóz	9.32	2.25				

4.8 táblázat Glükóz. fruktóz és szacharóz retenciós idő értékei és szórása

A glükóz, fruktóz és szacharóz mennyiségének megállapításához 0 - 2 nmol/dm<sup>3</sup> tartományban kalibrációs görbéket készítettem. Az egyes kalibrációs görbéket a 4.18. ábrán mutatom be.



4.18. ábra Glükóz, fruktóz és szacharóz kalibrációs egyenesei

#### 4.2.2.2. Az amperometriás detektálás alsó méréshatárának megállapítása

A módszer analitikai paramétereit, így az elválasztás hatékonyságát, a detektálás alsó határát glükóz és fruktóz komponensekre határoztam meg. Az alsó méréshatár meghatározásához a detektor eluens oldat esetében mutatkozó jelének standard deviációját számoltam ( $\sigma$ ). Ez 4.2 nA-nek adódott. Ennek háromszorosát a kalibrációs görbe extrapolált szakaszára vetítettem. Glükóz esetére 13 pM, fruktózra 20 pM alsó méréshatár értéket számoltam.

#### 4.2.2.3. Visszanyerési kísérlet

A kromatográfiás meghatározás valós minták esetében mutatkozó megbízhatóságának ellenőrzésére mézből készített mintamátrixhoz ismert mennyiségű cukor komponenseket adtam és kromatográfiásan mértem a hozzáadás előtt és a hozzáadás utáni koncentrációkat. Az így végzett "szpájking" kísérletek eredményét mutatja a 4.9. táblázat.

A méz mátrixot 0.1 mol/dm<sup>3</sup> nátrium-hidroxid hozzáadással, hígítással készítettem. A mátrix mintához 0.1 mol/dm<sup>3</sup> nátrium-hidroxid oldatban készült standard glükóz, fruktóz és szacharóz oldat ismert mennyiségét adtam. Az egyes cukor meghatározásokat ötször megismételtem. Az illető cukor komponensek koncentrációját kalibrációs görbe segítségével határoztam meg.

Minta	Cukor mennyiség	Hozzáadott mennyiség	Talált mennyiség	Visszanverés/
winna	cukor mennyiseg	11022addott mennyiseg	ratate mennyiseg	v isszan yeres/
	$m/10^{9} \pm S.D.\%$	m/10 <sup>-</sup> g	$m/10^{9} \pm R.S.D.\%$	%±R.S.D.%
	a mátrixban		_	
1	Glükóz: 0.59±1.08	0.26	0.86±1.35	101.2±1.46
2	Fruktóz: 0.63±2.31	0.38	0.99±1.82	97.9±4.21
3	Szacharóz: 0.01±3.15	0.91	0.89±2.01	98.3±6.33
4	Glükóz: 0.27±2.78	0.26	0.51±2.65	99.7±7.10
5	Fruktóz: 0.34 ±3.11	0.38	0.69±2.06	98.0±6.41
6	Szacharóz: 0.00±3.94	0.91	0.90±1.93	96.0±7.60

4.9. táblázat Glükóz, fruktóz és szacharóz visszanyerési vizsgálata 10µl méz mátrixban

#### 4.2.3. A módszer alkalmazása valós mintákban

#### Mintaelőkészítés és mérés

Virág mintául piros árvacsalánt (Lamium purpureum) és pongyola pitypangot (Taraxacum officinale) választottam.

A nektárminta készítéséhez a virágokat kistérfogatú, 0.1 mol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú nátriumhidroxid oldatba helyeztem és 5 perces folyamatos rázogatás mellett kioldottam cukor tartalmukat. A piros árvacsalán virágzatának különböző részeiről választottam egy - egy virágot. Az egyes virágokhoz 2 cm<sup>3</sup>, míg a pongyola pitypang egy virágjához 20 cm<sup>3</sup> 0.1 mol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú nátrium-hidroxid oldatot adtam a kioldáshoz.

Az ily módon készített nektár mintából, ülepítés és szűrés után 10  $\mu$ l térfogatot injektáltam, majd 0.25 cm<sup>3</sup>/perc áramlási sebességű, 0.1 mol/dm<sup>3</sup> nátrium-hidroxid eluenssel CarboPac PA1 oszlopon kromatografáltam. A 4.19 – 4.20. ábrák a nektármintákból nyert kromatogramok.



**4.19. ábra** A piros árvacsalán nektároldatának kromatogramjai (Lamium purpureum) A virágzaton felül- *a*), középmagasságban- *b*) és alul- *c*) elhelyezkedő virágok



4.20. ábra Pongyola pitypangból (Taraxacum officinale) származó extraktum kromatogramja

A nektárokban előforduló mintegy 32 féle cukor komponensből a CarboPac PA1 oszlopon 0.1 mol/dm<sup>3</sup> nátrium-hidroxid eluenst alkalmazva, a fő komponenseket a glükóz, fruktóz és szacharóz komponenseket azonosítottam retenciós idő alapján a vizsgált virágok nektárjaiban.

Az árvacsalán minden egyes virága tartalmazott glükózt, fruktózt, szacharózt, azonban ezek mennyisége eltérő volt. Ennek oka valószínűleg az alsóbb virágok öregedése és a kevesebb napfényellátottság.

A fő komponensek mellett kisebb mennyiségben egyéb komponensek pl. arabinóz is megtalálhatók a nektárban. A kromatogramok alapján megállapítható volt, hogy a pongyola pitypang több cukorkomponenst tartalmaz, mint a piros árvacsalán.

## 4.3. BIOSZENZOROK

#### 4.3.1. Putreszcin meghatározás vérben

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

Munkámban flexibilis 125 µm vastagságú poliimid (Kapton®, DuPont) filmen, vékonyréteg technológiával előállított háromelektródos alapelektród rendszerből készítettem putreszcin mérő amperometriás enzimcellát. A cella felépítése a 4.21. ábrán látható



4.21. ábra A réteges szerkezetű, lapos mikrochip alapú bioszenzor

Az amperometriás alapcellák 10x10 cm-es lemezre nyomtatva készültek, egy lemez 27 egységet is tartalmazott. A kapton lemezen króm, majd ezt beborító arany füst réteg szolgált az egyes elektródok, a vezetékek és az elektromos kontaktus kialakítására. A kontaktus lemezeken és az elektródok felületén kívüli részeket szigetelő film fedte be. Az egyes lapos cellákat ollóval szeparáltam. A kontaktus lemezekhez a végükön a szigetelő rétegüktől megfosztott vékony rézdrótot kötöttem ezüst epoxi réteg segítségével. Az ezüst epoxi paszta kötését gyorsítandó a cellát egy órára 60 °C-os szárító szekrénybe helyeztem. Ezután szilikongumi ragasztóból szigetelő réteget képeztem a kontaktus lemezek tartományát beborítva.

A munkaelektródként szolgáló kör alakú középső elektródot (felület nagyság 1.77 mm<sup>2</sup>) és a hosszabb koncentrikus körgyűrű szakaszt elektrokémiailag kialakított platina réteggel vontam be. A körgyűrű kisebb részére ezüstöt, majd ezüst-klorid réteget választottam le az előzőekben leírt recepteket követve.

A bioszenzoros mérőcella működése az alábbi enzimkatalizálta reakción alapult.

 $H_2N - (CH_2)_4 - NH_2 + O_2 + H_2O \xrightarrow{putreszcin-oxidáz} H_2N - (CH_2)_3 - CHO + NH_3 + H_2O_2$ 

A korábban mások által alkalmazott poliamin-oxidáz (E.C. 1.5.3.3.) és diamin-oxidáz (E.C. 1.4.3.6) enzimek helyett sikerült kedvező fajlagos aktivitású és stabilitású, és igen kedvező specificitású putreszcin-oxidáz (E.C. 1.4.3.10.) enzim készítményt beszereznünk.

A analitikai jel a reakcióban keletkező hidrogén-peroxid amperometriás oxidációja során kialakult áram. A hidrogén-peroxid viszonylag magas elektródpotenciál mellett mérhető aperometriásan. Így a mérést számos elektroaktív anyag jelenléte zavarná. Szükséges volt az elektród felületét szelektivitást biztosító réteggel bevonni. Irodalmi előzmények [206,207], valamint saját kísérleti munka alapján kialakított elektrokémiai eljárást követve készítettem a kisméretű hidrogén-peroxidot átengedő, más molekulák transzportját gátló úgynevezett belső réteget a munkaelektród felületén.

 $0.1 \text{ mol/dm}^3$  koncentrációjú pH= 7.2 foszfát pufferben oldott 10 mmol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú *m*-feniléndiamin oldatban. 0.2–0.8 V (vs. Ag/Ag Cl) potenciál tartományban 2 mV/s polarizáció sebességgel ciklikusan polarizáltam az elektródot 10-szer pásztázva a tartományt. A keletkezett belső réteg méretkizárási hatékonyságát minden esetben megvizsgáltam. A mérést úgy végeztem, hogy kevert foszfát pufferbe (pH= 7.2) helyeztem az elektródot, és 0.65 V polarizációs feszültség mellett mértem az áramerősséget. Az oldatban acetaminofen koncentrációját nulláról 0.21 mmol/dm<sup>3</sup>-ra változtatva meghatároztam az áramerősség változást. A méretkizárásos réteget megfelelőnek fogadtam el, ha a változás kisebb volt 5 pA-nál.

Két különböző módszert használtam a szenzor biokatalitikus sajátságú reakció rétegének kialakítására. Mindkét módszer glutáraldehid (GA) bifunkciós reagenssel való térhálósításon alapul. Az egyik módszer esetében a térhálósító ágenst oldat formában alkalmaztam. Oldatban alkalmazott reagenssel végzett módszer szerint eljárva 1µl (2.5-3.7 U) putreszcin-oxidáz enzim oldatot és 1 µl 9%-os glutáraldehid oldatot (mindkettő pH = 8.0 foszfát pufferrel készült) frissen elegyítettem és az elektródfelületén azonnal szétterítettem Hamilton mikrofecskendő segítségével. Egy órán át szobahőmérsékleten tartva az elektródot létrejött a térhálósodás.

A második, kevésbé szokványos módszer esetében a térhálósító ágenst a gázfázison keresztül juttattam az enzim tartalmú filmbe. Ekkor 1 µl (2.5-3.7 U) putreszcin-oxidáz enzim oldatot szétterítettem a munkaelektród felületén. 20 percig szobahőfokon tartva megszárítottam. Ezután az amperometriás mikrocellát 50 cm<sup>3</sup> térfogatú hengeres üveg immobilizáló edény légterébe juttattam. Az aktív felületet vízszintesen, lefelé fordítva pozicionáltam. Az edény aljába előzetesen 10 cm<sup>3</sup> 12.5%-os glutáraldehid oldatot juttattam és ezen át lassú áramban nitrogén gázt buborékoltattam. Az edényt elhagyó gáz áram gázmosó palackon keresztül távozott az edényből. A nedves, 25 °C-os glutáraldehid tartalmú atmoszférában 5, 10, 15, 25 és 30 percen át tartva a cellát végeztem a térhálósítást. Ezután a cellát 4 °C-os hűtőszekrényben tároltam egy éjszakán át.

A biokatalitikus réteget vékony poliuretán védőréteggel (külső réteg) vontam be, amelyet  $2\mu$ l. ciklohexán: tetrahidrofurán 1:1 arányú elegével készített poliuretán oldatot a felületen szétterítve készítettem. A külső réteg vastagságát Alpha-Step model 500 profilométerrel (KLA-Tencor. San Jose. CA) mértem.  $2\mu$ l 1%-os poliuretán oldatból (Thermedics 85A) kb. 3.5 µm vastagságú réteg képződött a felületen (0.16 cm<sup>2</sup>). Vastagabb membrán készítéséhez a teljes száradás után ismételten 2 µl poliuretán oldatot terítettem szét a felületen. A megszárított, kész elektródokat pH= 8 foszfát pufferrel mostam és 4 °C-os hűtőszekrényben tároltam.

Az amperometriás mikrocella szelektív működését mutatja a 4.22 ábra. Az ábra készítésekor egy kisméretű főzőpohárból készített mérőcellába 30 cm<sup>3</sup> PBS (pH= 7.2) pufferoldatot juttattam. Oldatkeverés és 0.6 V (vs. Ag/AgCl) polarizációs elektródpotenciál mellett regisztráltam az áramot az idő függvényében. Alkalmas időpillanatokban 5 mmol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú aszkorbinsav 50  $\mu$ l-es dózisait, illetőleg 10 mmol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú hidrogén-peroxid 20  $\mu$ l-es dózisait adtam a cellába. Az ábrán, amely a kapott áram – idő regisztrátumot mutatja, látható, hogy a poli-*m*-feniléndiamin méretkizárásos réteg jól működik. Az amperometriás cella érzékenyen jelzi a hidrogén-peroxid jelenlétét, ugyanakkor az ugyancsak elektroaktív aszkorbinsav beadás nem idézett elő áramintenzitás növekedést.



**4.22. ábra** Az elektródfelületen kialakított p-*m*-feniléndiamin méretkizárásos réteg ellenőrző vizsgálata.

A putreszcin bioszenzor válasza aszkorbinsav és hidrogén-peroxid koncentrációnövekedésre. A cellában 30 cm<sup>3</sup> kevertetett (pH=7.2) PBS pufferoldat, elektródpotenciál 0.6 V (*vs.* Ag/AgCl), 50  $\mu$ l 5mmol/dm<sup>3</sup> aszkorbinsav (AA) és 20  $\mu$ l 10 mmol/dm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hozzáadások.

#### 4.3.2. A putreszcin szenzor érzékenysége

A putreszcin-oxidáz enzim működési pH optimuma pH 8.0 - 8.5 között van. Érdekes módon a putreszcin-oxidázon alapuló, munkám során készített szenzor érzékenyégét 8.5 pHjú borát pufferben nagyobbnak találtam, mint az azonos pH-jú foszfát vagy Trisz pufferben. Azonban azonos koncentrációjú putreszcin-oxidáz enzim oldatok aktivitását spektrofotometriásan vagy elektrokémiailag vizsgálva a különböző pufferekben pH = 8.5mellett közel egyformának találtam.

Tekintettel arra, hogy célunk volt az alsó méréshatárnak a kis koncentrációk irányába való kiterjesztése, borát pufferben végeztem további méréseimet.

A mikrocella működésének vizsgálatára 50 cm<sup>3</sup> intenzíven kevert borát puffer oldatban 0.65 V (vs. Ag/AgCl) elektródpotenciál mellett regisztráltam az amperometriás áramot az idő függvényében. A stacionárius jelszint elérése után 10 mmol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú putreszcin oldat ismert mennyiségeit (5-20 µl) adtam az oldathoz. Az egyes dózisok beadása után a várakozásoknak megfelelően az áram növekedett, majd állandó értéket vett fel. A kapott áramerősség értékekből ( $i_c$ ) kivonva a puffer esetében kapott áramot ( $i_0$ ) képeztem a  $\Delta i_c = i_c$  $i_0$  értéket, amelyet a koncentráció függvényében ábrázolva nyertem a kalibrációs görbét (lásd 4.23 ábra). A mikrocella készítésekor gáz fázison keresztül történő enzim térhálósítást alkalmaztam.



**4.23. ábra** A mikrocellával készített putreszcin kalibrációs függvény ( $\Delta i_c = (i_c - i_0) - c$ ) Kevert 50cm<sup>3</sup> borát puffer alapoldat (pH=8.5), elektródpotenciál 0.65 V (vs. Ag/AgCl). A felső sarokban a kis koncentrációk tartományára vonatkozó kinagyított szakasz látható.

Megvizsgáltam, hogy az enzimréteg készítés módja és a külső réteg vastagsága mennyiben befolyásolja a putreszcin meghatározás érzékenységét, azaz a kalibrációs egyenes meredekségét. Úgy találtam, hogy a gáz fázison keresztüli glutáraldehid bejuttatással végzett enzim térhálósítás mindig nagyobb meredekséget eredményezett, mint a glutáraldehid oldat formájában történő alkalmazása. A gáz fázison keresztüli térhálósítás expozíciós idejének növelése és a külső réteg vastagságának növelése (több réteg alkalmazásával) csökkentette a mérés érzékenységét. A 25 perces expoziciós idővel és egyrétegű külső membránnal készített mikrocella 0.57  $\pm$  0.035 nA/µmol/dm<sup>3</sup> meredekséget eredményezett optimumként.

Az "oldatos immobilizálás" módszerrel készített, de ugyanolyan vastagságú külső membránt hordozó cella körülbelül fele akkora putreszcin mérési érzékenységet mutatott (0.24 nA/µmol/dm<sup>3</sup>). A gáz fázison keresztül bejuttatott glutáraldehiddel történő térhálósítás esetében mutatkozó előnyökről mások [208] is beszámolnak acetil-kolint mérő bioszenzorral végzett mérésekről írva.

Különböző módon készített mikrocellákkal kapott kalibrációs görbéket mutat a 4.24. ábra.



**4.24. ábra** Gázfázisos immobilizálás és a külső poliuretán réteghatása a kalibrációs görbe meredekségére

Különböző módon készített mikrocellákkal pH= 8.5 borát pufferben kapott putreszcin kalibrációs görbék.

- a) nem immobilizált enzim réteg
- b) gázfázisos immobilizálással készült enzim réteg (25 perces expozíciós idővel készített elektród külső membrán nélkül
- c) gázfázisos immobilizálással készült enzim egy réteg (3.5 µm) külső membránnal készítve
- d) gázfázisos immobilizálással készült enzim két réteg (7.0 µm) külső membránnal ellátva.

A gázfázisos immobilizálás expozíciós ideje és a külső réteg vastagsága befolyást gyakorol a válaszidőre is. A válaszidőt azzal az időszakasszal jellemeztem, amely szükséges a koncentrációváltozást (növekedés irányában) követő teljes áramintenzitás 95%-ának eléréséhez. A legkisebb válaszidőt — kb 45 szekundum.  $\Delta c = 0.20 \,\mu$ mol/dm<sup>3</sup> - akkor kaptam, amikor az enzim oldatot a munkaelektród felületén beszárítottam és glutáraldehid térhálósítás nélkül külső membránnal bevontam. Az oldatos immobilizálással készített elektródok adták a legnagyobb válaszidő értéket (kb. 65 szekundum.  $\Delta c \rightarrow 0$ -ról 20  $\mu$ mol/dm<sup>3</sup>).

A gázfázisú glutáraldehiddel térhálósított cellák válaszideje a fenti két érték közöttinek mutatkozott. A külső membrán vastagságának növelése minden esetben jelentős válaszidő növekedéssel járt együtt.

#### 4.3.3. Putreszcin meghatározás vérben és plazmában

A humán vér és plazma mintákban történő putreszcin meghatározások szempontjából diagnosztikailag fontos a 1.25-45  $\mu$ mol/dm<sup>3</sup> koncentrációtartomány. Egészséges személy vérében a putreszcin koncentráció 0.7-1.0x10<sup>-6</sup>mol dm<sup>-3</sup>, beteg vérében 7.2-24x10<sup>-6</sup>mol dm<sup>-3</sup> [209]. Ez közel egy nagyságrenddel kisebb, mint a korábban közölt [210] alsó méréshatár. A munkámban készített optimális sajátságú mikrocellákkal puffer oldatokban sikerült 0.05-1  $\mu$ mol/dm<sup>3</sup> közötti tartományba eső alsó méréshatárt elérni. Kérdéses volt a diagnosztikai alkalmazhatóság megítélése szempontjából, hogy vajon ez a detektálási határ elérhető-e teljes vér, illetve vérplazma mintákban. Ez a kimutatási határ még a klinikai minták kismértékű hígítását is megengedné. A hígítás lehetősége fontos előny. Lehetőséget biztosíthat a mérést esetleg zavaró anyagok maszkírozására, továbbá a pH pontos beállítására.

A mikrocellával megvizsgáltam érzéstelenített tengeri malac kísérleti állatból frissen vett vérminta putreszcin tartalmát. Ehhez 1 cm<sup>3</sup>, mágneses mikropálcával kevert, pH= 7.7 borát pufferben mértem 0.65 V polarizáló feszültség mellett az amperometriás áramot. A stacianárius áramerősség elérése után 1 cm<sup>3</sup> heparinozott vér, illetve plazma mintát juttattam a cellába. Ezek hatására szignifikáns áramerősség változást nem észleltem, így a tengerimalac vérmintákat putreszcinmentesnek tekintettem.

Így lehetőségem volt kalibrációs görbéket készíteni puffer oldatban és pufferrel hígított vér és plazma oldatokban putreszcin standard oldatok felhasználásával. A kapott kalibrációs függvényeket a 4.25. ábra mutatja.



**2.25. ábra** Különböző közegekben, 0-18µmol/dm<sup>3</sup> koncentráció tartományban készített putreszcin kalibrációs görbék összehasonlítása.

- 1- pH = 7.7 borát puffer közegben
- 2- tengerimalac vérplazma : borát puffer 1:1 térfogat arányú elegyében
- 3- tengerimalac heparinozott teljes vér : borát puffer 1:1 térfogat arányú elegyében

A kalibrációs görbékben mutatkozó jelentős eltérések szembetűnők. Adódhatnak a diffúziós állandó és a viszkozitás különböző közegekben jelentkező különbségéből, vagy a munkaelektród felületére rakódó anyagok transzport gátló hatásából. A jelenség vizsgálata

helyett inkább a standard addíciós méréstechnika alkalmazásával vizsgáltam a kialakított mikrocellával végzett putreszcin meghatározások megbízhatóságát.

Úgy jártam el, hogy adott kis térfogatú putreszcin oldat térfogatokat ( $10^{-4}$  mol/dm<sup>3</sup>) adva tengerimalac (putreszcinmentes) plazma és teljes vérmintákhoz ismert, 2, 5, 10, és 37.5  $\mu$ mol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú oldatmintákat állítottam elő. Ezek 250  $\mu$ l térfogatú részét 1:1 térfogat arányban hígítottam pH= 7.7 borát puffer oldattal. A mikrocellát az elegybe juttatva a vonatkozásielektródhoz képest 0.6 V feszültséget beállítva intenzív konvekció biztosításával regisztráltam az áramot. A stacionárius áramintenzitás elérése után  $10^{-4}$  mol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú putreszcin oldat 5, 12.5, 25 és 100  $\mu$ l térfogatát adtam a cellába. Igyekeztem az eredeti koncentráció kétszeresét elérni a beadással. A mért áramintenzitás növekedéséből az ismert adatok alapján számoltam a "mért" koncentrációt. Ilyen módon minden esetben öt párhuzamos standard addíciós analízist végeztem. A beadott és a "visszanyert", azaz mért értékekről és az öt mérésből számított standard deviációs adatokról a 4.10. táblázat ad áttekintést.

Vér : Borát puffer (1:1)		Plazma : Borát puffer (1:1)			
Hozzáadott standard m/ 10 <sup>-6</sup> mol	Visszanyerés m/ $10^{-6}$ mol $\pm$ S.D. $10^{-6}$ mol	Visszanyerés/ % <u>+</u> R.S.D %	Hozzáadott standard m/ 10 <sup>-6</sup> mol	Visszanyerés m/ 10 <sup>-6</sup> mol <u>+</u> S.D. 10 <sup>-6</sup> mol	Visszanyerés/ % <u>+</u> R.S.D %
2.00	2.00 <u>+</u> 0.07	100.2 <u>+</u> 3.5	4.99	4.95 <u>+</u> 0.07	99.3 <u>+</u> 3.3
10.00	10.02 <u>+</u> 0.17	100.2 <u>+</u> 1.87	10.00	9.98 <u>+</u> 0.07	99.8 <u>+</u> 2.2
37.48	37.52 <u>+</u> 0.27	100.1 <u>+</u> 0.7	37.48	37.15 <u>+</u> 0.07	99.3 <u>+</u> 0.7

4.10. táblázat Vér és plazma mintákhoz adott putreszcin visszanyerése

A táblázatba foglalt eredmények igazolják, hogy a mikrocellával vér és plazma mintákban lévő putreszcin koncentráció a klinikai diagnózis szempontjából fontos koncentráció tartományban detektálható.

Összefoglalásként megállapítható, hogy a mikrocella készítési módszerének és a mérési módszer finom hangolásával, az enzim immobilizálás módszerének fejlesztésével sikerült a bioszenzorral történő putreszcin meghatározás alsó méréshatárát kiterjeszteni [211]. A klinikai diagnózisban történő alkalmazhatóság felmérése azonban további részletes vizsgálatra szorul.

## 4.4. GLÜKÓZMÉRŐ ENZIMELEKTRÓD ALKALMAZÁSA ÁLLATKÍSÉRLETEKBEN

A glükóz-tolerancia teszt a klinikai gyakorlatban az egyik leggyakrabban használt módszer, melynek segítségével információ szerezhető be a pankreáz működéséről [212]. A módszer alkalmazásakor nagy koncentrációban glükóz oldatot juttatnak a vizsgált személy gyomrába, és nyomon követik a glükóz koncentráció változását az illető vérében, vagy testszöveteiben. Megfelelően működő hasnyálmirigy esetén a glükóz koncentráció hirtelen növekedés után rövid idő alatt a fiziológiás értékre csökken. A vizsgálathoz rendszerint megfelelő időkben vett minták glükóz koncentrációjának analízisét végzik. A glükóz szint folyamatos nyomon követése azonban nyilvánvaló előnyöket nyújthat.

Állatkísérletekhez eszközöket fejlesztő együttműködő partnerek kérésére érzéstelenített kísérleti állatok testszöveteibe vezethető, kisméretű háromelektródos glükózmérő bioszenzort készítettem. Ennek állatkísérletekben történő alkalmazhatóságát szakavatott kollegákkal közösen tanulmányoztuk. A munkában érzéstelenített patkányokkal glükóz tolerancia teszteket végeztünk.

Az alábbiakban röviden bemutatom a vizsgálatokat anélkül, hogy részletesen kitérnék a levonható élettani következtetésekre, vagy statisztikusan elemezném a viszonylag nagyszámú mérés során kapott eredményeket.

A kísérletekben 150 g tömegű, a kísérlet előtt 12 órán át éheztetett hím Wistar patkányokat alkalmaztunk. Az érzéstelenítésre 50 mg/kg ip. (intraperitonális) Trapanolt használtunk. Az érzéstelenített állatok tracheájába, az egyik odali arteria carotis cummunisába és a vena jugularisába kanült kötöttünk, a gyomrába szondát vezettünk. Az artériás és vénás kanülöket kevés heparint tartalmazó (10 NE/ml) fiziológiás sóoldattal, a gyomorszondát 40 %-os glükóz oldattal töltöttük fel. A kísérleti állatokat melegítő "pad"-ra helyeztük (Supertech), rektális hőmérsékletüket digitális hőmérővel ellenőriztük. A vérveszteség kompenzálására az állatok időnként intravénás (iv.) fiziológiás sóoldatot kaptak. Az artériás kanülön keresztül időként vérmintát vettünk a párhuzamos glükóz meghatározás céljára. A bioszenzort a medianon végzett bemetszés után a hasbőr alá, a hasizom felszínére helyeztük. Ügyeltünk arra, hogy a behelyezéskor ne keletkezzen vérzés, és az elektród körüli tokban felgyülemlő szövetnedv biztosítsa a voltammetriás méréshez szükséges oldat környezetet, és az elektromos kontaktust.

A beültetés előtt elvégeztem a bioszenzor kalibrációját. Ezt megismételtem a kísérlet befejezése után, kivéve a szenzort a feláldozott állatból. A kalibrációt 5 cm<sup>3</sup> pH = 7.4 izotóniás foszfát pufferben végeztem, amelyet 10 cm<sup>3</sup> térfogatú főzőpohárba pipettáztam. Ezután a szenzort a főzőpohárba helyeztem. Intenzív mágneses keverést, és 0.65 V elektródpotenciált alkalmazva megvártam a stacionárius áram kialakulását. Ezután 375 mmol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú glükózoldat kis térfogatú dózisait adtam a cellába, megvárva az egyes dózisok után a stacionárius áramintenzitás kialakulását. A regisztrátum alapján szerkesztett kalibrációs görbét mutat be a 4.26. ábra.



**4.26. ábra** Glükóz bioszenzor kalibrációs görbéje pH = 7.4 izotóniás foszfát pufferben, 0.65 V elektródpotenciál mellett.

A kísérleti állatba helyezett elektródra is 0.65 V elektródpotenciál kapcsoltam, majd folyamatosan regisztráltam az amperometriás áram intenzitását. A stacionárius áramerősség érték elérése utáni időpontban a gyomorszonda segítségével bejuttatunk 1.3 cm<sup>3</sup> térfogatú 40 % -os glükóz oldatot.

Amint az várható volt, az érzékelő jelezte áramintenzitás növekedésével a testszövetben létrejövő glükóz koncentrációnövekedést. Majd hosszabb – rövidebb idő múlva az áram az eredeti értéket megközelítő szintre csökken. A folyamat során vett vérminták glükóz koncentrációjának becslését kolorimetriás kis kézi készülékkel (Accu Check gükózmérővel) végeztük. A növekedés – csökkenés jelensége rendszerint a periódikusan vett vérminták esetében is jelentkezett.

A jugularis vénába helyezett kanülön keresztül lehetőségünk volt inzulin beadásra is. Ez esetben a várakozásnak megfelelően a beadást az amperometriás áram viszonylag rohamos csökkenése jelezte (lásd 4.28.ábra). Összehasonlításként a gyomorszondán keresztül beadott glükózra kapott amperometriás áram változás görbét szemlélteti a 4.29. ábra.

A kiterjedt, itt nem részletezett vizsgálatok tanulsága alapján megállapítható volt, hogy a kidolgozott bioszenzor alkalmas kísérleti állatokban végzett glükóz tolerancia vizsgálatok során a változások nyomon követésére. Azonban a regisztrált amperometriás áramintenzitás és a tényleges, lokális glükózkoncentráció közötti függvénykapcsolat a vizes oldatban végzett kalibrációval csak jelentős bizonytalansággal adható meg.

A kísérletek során alkalmazott elrendezés fényképe és a kísérletek során nyert áram- idő regisztrátumok láthatók a 4.27., 4.28. és a 4.29. ábrákon.



**4.27. ábra** Az érzéstelenített kísérleti állat a beültetett glükózmérő cellával.



**4.28. ábra** Érzéstelenített patkány hasizmának felszínére helyezett amperometriás glükózmérő cella árama - idő regisztrátuma. Nyilak jelzik a gyomorszondán keresztüli glükóz oldat beadás és az iv. inzulin beadás idejét.





### 4.6. PERIÓDIKUSAN MEGSZAKÍTOTT AMPEROMETRIÁS MÉRÉSEK

#### 4.6.1. A módszer elve

Amint azt az irodalmi részben megemlítettem, a pulzáló amperometriás (PAD. IPAD) módszerek jól ismertek az elektrokémiai detektorokat alkalmazó kromatográfiás szakemberek körében. A pulzáló elektródpotenciál – idő program ekkor az elektród passziválódásának megakadályozására, a passziválódást okozó bevonat elektrokémiai eltávolítására szolgál. A mérő pulzus utáni tisztító majd, kondicionáló pulzus regenerálja magát a felületet.

A kromatográfiás detektorok áramló oldatokban működnek, a munkaelektród felülete áramló oldattal érintkezik. Más a helyzet a membránnal bevont felületű elektródok esetében. Ekkor viszonylag nagy vastagságú álló réteg található az elektródfelületén. Az anyagtranszport ezen keresztül, diffúzióval történik. Ilyen diffúziós réteget hordoznak egyes kémiailag módosított elektródok. Az amperometriás enzimelektródok felületét például immobilizált biokatalizátort tartalmazó réteg vonja be.

A folyamatos, vagy "klasszikus" amperometriás detektálás alkalmazása esetében jelentősen lecsökken a diffúziós rétegben az elektródfelületén átalakuló anyag koncentrációja. Periódikusan megszakítva az áramot, lehetőséget adunk arra, hogy a diffúziós réteg feltöltődjön, így nagyobb amperometriás áram jelet nyerhetünk. Látható tehát, hogy a periódikusan megszakított amperometriás (PMA, 'periodically interrupted amperometry', PIA) mérőprogram alkalmazásának más a célja, mint a PAD módszereké. A bevonattal ellátott elektródok esetében előnyös – tudomásom szerint korábban nem alkalmazott – PMA módszerek mérőprogramja csak formális hasonlóságot mutat a bevonat nélküli elektródok esetében már elterjedten alkalmazott PAD módszerekkel.

A PMA módszer működését, előnyeit könnyen magyarázhatjuk a Cottrell kísérlet alapján. Jól ismert, hogy álló oldatban planáris korongelektródon mért áram ( $i_t$ ) alkalmas elektródpotenciál bekapcsolása utáni (t) időpontban az alábbi egyenlettel írható le, ha az elektrolízis sebesség-meghatározó lépése a sík diffúzió;

$$i_t = nFAc_o \sqrt{\frac{D}{t\Pi}}$$

ahol *n* az elektronszám változás. *A* az elektródfelület nagysága.  $c_0$  és *D* az elektroaktív anyag koncentrációja és diffúziós állandója az illető közegben. Az áramintenzitás csökken, mivel a diffúziós rétegben az elektroaktív anyag koncentrációja csökken. Ha időnként megszakítjuk az elektrolízist, akkor időt adunk arra, hogy a diffúzió kiegyenlítse az elektródfelületén bekövetkező koncentráció csökkenést.

Egyik munkatárasam által írt verzatív PMA mérőprogram illusztrációjára szolgál a 4.30 ábra. Az elektródpotenciál  $t_2$  ideig  $E_1$  értéket vesz fel,  $t_1$  ideig pedig  $E_2$  értéket.  $E_2$  potenciál mellett megy végbe a detektálás alapját képező folyamat.  $E_1$  potenciálon ez az elektródfolyamat szünetel. Az ábrán látható az elektródpotenciál mellett kialakuló áramintenzitás  $i_t - t$ függvény. (Az  $E_1$  melletti áram különböző idő függvény szerint változhat az elektródpotenciál és az illető anyag elektrokémiai reverzibilitásától függően). A  $t_1$  idő perióduson belül választhatjuk meg a mérési adatok (Faraday áram) gyűjtésére szánt időt ( $t_4$ ) (kb. 10 ms). Előtte egy  $t_3$  várakozási idő periódust szükséges beiktassunk, hogy a kondenzátor áramot kiküszöböljük (kb. 25ms).  $t_1 - (t_3 + t_4)$  idő alatt tovább folyik az elektrolízis, ezért ezt az időt célszerű rövidre, célszerűen nullának választani.



**4.30. ábra** A PMA általános mérőprogram.  $E_2$  mérési elektródpotenciál.  $t_4$  az adatgyűjtés ideje,  $t_3$  a kondenzátor áram lecsengési ideje,  $t_2$  relaxációs idő,  $E_1$  relaxációs elektródpotenciál

Az egyenlet alapján látható, hogy a PMA-val végzett koncentrációmérés érzékenysége függ az adatgyűjtési időtől.

$$\frac{\Delta i_t}{\Delta c_0} = nFA \sqrt{\frac{D}{t\Pi}}$$

A E2 potenciál elektródra adása után hosszabb várakozás kisebb érzékenységet eredményez.

A jelenség vizsgálatára 3mm átmérőjű szénpaszta elektród mérőfelületét dialízis membránnal burkoltam. Az elektróddal különböző koncentrációjú, pH=7.4 izotóniás foszfát pufferrel készített, intenzíven kevert aszkorbinsav oldatokban kronoamperometriás felvételeket készítettem. A kapott, azonos kezdeti időpillanatra hozott görbéket hasonlítja össze az alábbi 4.31. ábra.



**4.31. ábra** Különböző koncentrációjú, kevert aszkorbinsav oldatokban, dialízis membránnal burkolt szénpaszta elektróddal készített kronoamperometriás görbék (elektródpotenciál 0.4 V *vs.* Ag/AgCl)

Látható, hogy rövidebb ideig tartó polarizáció nagyobb  $\Delta i/\Delta c$  hányadost, azaz rövidebb polarizációs idő nagyobb érzékenységet eredményez. A folyamatos polarizáció tehát a bevont elektróddal történő amperometriás mérés érzékenysége szempontjából kedvezőtlen.

A  $t_4$  adatgyűjtési idő alatt lehetőség van az áramértékek átlagolására. Megvizsgáltam, - pH= 7.4 PBS pufferrel készített 7.93x10<sup>-4</sup> mol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú hidrogén-peroxid oldatban, dialízis membránnal bevont, 1mm átmérőjű platina elektróddal - hogy az alkalmazott  $t_4$ időperiódus hossza hogyan befolyásolja a mért kronoamperometriás áramot. A 4.32. ábrán az átlagolt áram intenzitás adatokat az adatgyűjtési periódus hosszának függvényében láthatjuk.



**3.32. ábra** Az adatgyűjtési periódus hatása az átlagost áramértékekre. (mérés: 7.93x10<sup>4</sup> mol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú pH= 7.4 PBS pufferrel készített hidrogén-peroxid oldatban. Dialízis membránnal burkolt Pt korongelektród.  $E_2$ = 0.6V vs. Ag/AgCl )

A rövidebb  $t_4$ . a várakozásnak megfelelően nagyobb átlagolt áramot eredményez. Természetesen a rövidebb integrálási idő nagyobb zajjal jár együtt. Ezért 10 ms-nál rövidebb idők alkalmazása célszerűtlennek látszott.

A 4.33. ábra hagyományos amperomertiával és PMA módszerrel készített regisztrátumokat hasonlít össze. A regisztrátum készítése során 1000 ford/min sebességgel forgatott dialízis membránnal bevont, 3 mm átmérőjű szénpaszta elektródot polarizáltam 10 cm<sup>3</sup> pH = 7.4 PBS pufferben. (konstans elektródpotenciál, illetve  $E_2 = 0.4$  V. Ag/AgCl vonatkozásielektróddal szemben). Bizonyos időpillanatokban 100 mmol/dm<sup>3</sup> aszkorbinsav oldat 25 µl-es mennyiségeit adtam az oldathoz. A PMA méréshez  $t_3 = 25$  ms,  $t_4 = 10$  ms, regenerációs idő  $t_2 = 1500$  ms ( $E_1=0.0V$ ) időprogramot állítottam be. Az ábrán jól látszik, hogy az aszkorbinsav dózisok beadását – az ábrán ezt nyilak jelzik – mindkét esetben az áramintenzitás növekedése követi. A PMA módszer esetében kapott érzékenység növekedés azonban szembetűnő. Az regisztrátumok alapján készült áram- koncentráció görbéket a 4.34 ábra mutatja. Látható, hogy az illető feltételek mellett a PMA módszer alkalmazása mintegy tízszeres érzékenység növekedést eredményezett. A legkisebb koncentráció esetében nyert 50 áramintenzitás adatok standard deviációját mindkét esetben kiszámítottam és annak háromszorosát (3 $\sigma$ ) a kalibrációs görbék extrapolált szakaszára vetítve kaptam az alsó méréshatár becslésére szolgáló adatokat. (DL<sub>PIA</sub> = 4.5x10<sup>-7</sup>mol/dm<sup>3</sup>. DL<sub>CA</sub>=4.5x10<sup>-6</sup>mol/dm<sup>3</sup>)



**4.33. ábra** Hagyományos (CA) és periódikusan megszakított amperometriás (PMA) technikával, 1000 ford/perc sebességgel forgatott szénpaszta elektróddal készített regisztrátumok. (munkaelektród potenciál 0.4 V vs. Ag/AgCl; 100 mmol/dm<sup>3</sup> aszkorbinsav oldat 25 µl-es dózisai adagolva 10 cm<sup>3</sup> pH = 7.4 PBS puffer oldathoz. A PMA méréshez használt program paraméterei  $t_3 = 25$  ms,  $t_4 = 10$  ms, regenerációs idő  $t_2 = 1500$  ms.



**4.34. ábra** Az előző ábra alapján szerkesztett kalibrációs görbék. A beillesztett diagram a kalibrációs görbe kezdeti szakaszait mutatja. Az áramértékek standard deviációjának háromszorosánál (3σ) megszerkesztett szakaszok az alsó méréshatárt jelzik.

Az enzimelektródok egy széles körben használt típusa enzim által katalizált reakcióban keletkező hidrogén-peroxid amperometriás detektálásával képezi az analitikai jelet. A szelektivitás biztosítása érdekében az alapelektród felületén igen vékony filmet célszerű alkalmazni, amely a hidrogén-peroxidot átengedi, nagyobb molekulák transzportját azonban gátolja.

Glükóz- és putreszcin mérő enzimelektródokat vizsgálva *m*-fenilén-diamin elektropolarizációjával kialakított méretkizárásos rétegeket alkalmasnak találtam a jelenlévő elektroaktív anyagok zavaró hatásának kiküszöbölésére. Lévén, hogy a PMA módszer alkalmazásának előnyei amperometriás enzimelektródok esetében nyilvánvaló előnyöket nyújthatnak, célszerű volt megvizsgálni, hogy ez a réteg hogyan befolyásolja a PMA jelet.

Méréseimben méretkizárásos réteggel ellátott és anélküli 1 mm átmérőjű platina korongelektródokkal végeztem kísérletet hagyományos és periódikusan megszakított amperometriás méréstechnikát alkalmazva. Az elektródokat intenzíven kevertetett 10 cm<sup>3</sup> térfogtú pH=7.4 PBS pufferbe helyeztem, 0.7 V polarizációs potenciált alkalmaztam és 0.01 mol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú hidrogén-peroxid 20 µl térfogatú dózisait adtam az oldathoz egymás után megvárva az egyes hozzáadások után a stacionárius jel kialakulását. A méréshez AUTOLAB 12 mérőállomás programcsomagjából választottam mérőprogramot. A PMA vonatkozásában ez csak az alábbi ábrán (4.35.) látható pulzáló program alkalmazását tette lehetővé.



**4.35. ábra** Az Autolab 12 pulzáló amperometriás mérőprogramja. A legrövidebb periódus 30 ms, t<sub>1</sub> kondenzátor áram kiküszöbölés, t<sub>2</sub> adatgyűjtés, t<sub>3</sub> relaxáció, E<sub>2</sub> mérési. E<sub>1</sub> relaxációs elektródpotenciál

A méréshez  $t_1=0$ ,  $t_2=30$ ms (0-30) és  $t_1=30$ ,  $t_2=60$  ms (30-60)  $t_3=1$ s időket,  $E_1=0$  V relaxációs potenciált választottam. A különböző módszerekkel és elektródokkal kapott koncentráció – áram függvényeket a 4.36. ábra mutatja. Mint látható, mind a négy függvény lineáris. A meredekségeik azonban jelentősen eltérnek.



**4.36. ábra** Különböző módszerrel, különböző elektródon készített hidrogén-peroxid kalibrációs görbék. 1 mm átmérőjű platinaelektród, 0.7 V mérési potenciál, kevert oldat, pH =7.4 PBS puffer. *a.*, méretkizárásos réteggel  $t_1$ = 0,  $t_2$ =30. *b.*, méretkizárásos réteggel  $t_1$ =30,  $t_2$ =60. *c.*, méretkizárásos réteg nélkül hagyományos amperometriás technikával, *d.*, méretkizárásos réteggel hagyományos amperometriás technikával.

Látható, hogy a legnagyobb meredekségű a rövidebb idejű PMA módszerrel kapott, bevont elektródos egyenes, míg a hagyományos tecnikával kapott és bevont elektróddal kapjuk a legkisebb meredekségűt. A hosszabb idejű PMA egyenes is a bevonat nélküli elektródos

hagyományos amperometriás kalibrációs görbe felett fut. A rendkívül vékony méretkizárásos réteg esetében is jelentkezik tehát a PMA módszer érzékenységet növelő hatása.

A glükóz-, illetőleg a putreszcin-mérő enzimelektród alapelektródjának mérőfelületén, a méretkizárásos rétegen felül egy annál jelentősen vastagabb réteg, a reakció réteg helyezkedik el. Ez esetben várható, hogy a PMA módszer alkalmazása előnyös.

Munkámban azonos glükóz enzimelektród mérőfunkcióját vizsgáltam hagyományos és a PMA módszerrel végezve a mérést intenzíven kevert pH = 7.4 PBS pufferben 0.7 V munkaelektród potenciál alkalmazásával ( $E_2$ = 0.7 V;  $E_1$ = 0.0V vs. Ag/AgCl). A hagyományos amperometriával kapott áram - idő regisztrátum a 4.37/a ábrán látható. Ennek készítésekor 5 cm<sup>3</sup> pufferhez 90 mmol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú glükóz oldat 0.5 cm<sup>3</sup> –es részleteit mértem a stacionárius jelszint elérése után. A 4.37/a. ábra felső részére beillesztett regisztrátumot kisebb koncentrációk estében kaptam. Ekkor 30 mmol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú glükóz oldat 100 µl mennyiségeit adtam a kevert alapoldat 5 cm<sup>3</sup>-es térfogatához. Az ábrán látható a regisztrátum alapján készült kalibrációs görbe is.

A 4.37/*b* ábrán látható a PMA módszerrel végzett mérések eredménye. Ez esetben  $t_1=0$ ,  $t_2=30$  ms,  $t_3=700$  ms mérési időprogramot használtam. A regisztrátum készítésekor 30 mmol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú glükóz oldat 100 µl-es dózisait adtam a kevert alapoldat 5 cm<sup>3</sup>-es térfogatához. Az ábra felső sarkában látható a regisztrált lépcsők alapján szerkesztett kalibrációs görbe. A jobb felső sarokba illesztett regisztrátum pedig 30 mmol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú glükóz oldat 0.5 cm<sup>3</sup>-es dózisának hozzáadása után kapott PMA elektród választ mutat.

A kalibrációs görbék meredeksége ( $\Delta i/\Delta c$ ) alapján összehasonlíthatjuk a két különböző módszerrel, de azonos elektródokkal végzett mérések érzékenységét.

$$S_{hagyományos} = \frac{\Delta i_{hagyományos}}{\Delta c_{hagyományos}} = 1.925 nA(mol / dm^3)$$
$$S_{PMA} = \frac{\Delta i_{PMA}}{\Delta c_{PMA}} = 1.204 \mu A(mol / dm^3)$$
$$\frac{S_{PMA}}{\Delta c_{PMA}} = 625$$

S hagvományos



**4.37. ábra** Ugyanazzal a glükózelektróddal, de különböző amperometriás módszerrel kapott eredmények összehasonlítása. 1mm átmérőjű platina korong elektródra épülő glükózelektróddal 5 cm<sup>3</sup> PBS pufferben történt a mérés intenzíven kevert oldatban  $E_1=0$ , ill.  $E_2 = 0.7$  V.

- (a) Hagyományos amperometriás technikával kapott regisztrátumok és kalibrációs görbe.
- (b) PMA módszerrel kapott regisztrátumok és kalibrációs görbe (t<sub>1</sub>=0, t<sub>2</sub>=30 ms, t<sub>3</sub>= 700 ms).

Az illető glükózelektród kétféle detektálásos módszerrel kapható válaszát összehasonlítottam a klinikai kémiai mérések szempontjából fontos koncentráció tartományban. A két módszerrel kapott kalibrációs görbék láthatók a 4.38/a. (hagyományos) és 4.38/b. (PMA) ábrán. A lineáris szakaszokon a meredekségek aránya 400. Ez azt jelenti, hogy a klinikailag fontos

koncentráció tartományban a PMA módszer alkalmazása 400 szoros érzékenység növekedést eredményezett.

A PMA kalibrációs görbe a nagy koncentrációk tartományában elhajlik. Ez a jelenség enzim szenzorok esetében gyakran megfigyelhető. Az enzim katalízis Michaelis Menten kinetikájával magyarázható. Itt azonban a PMA detektálás természete is hozzájárulhat a jelenség kialakulásához.



**4.38. ábra** Különböző módszerrel, a klinikai diagnózis szempontjából fontos koncentráció tartományban készült glükóz kalibrációs görbék. A mérési körülmények az előző ábrával azonosak.

A PMA alkalmazásakor a mérési időprogram megválasztása kritikus. Célszerű minden feladathoz optimálni azt. Ennek illusztrálására mutatok be két azonos elektróddal, azonos körülmények között, de eltérő PMA időprogrammal regisztrált áram - idő függvényt. A mérés

során 5 cm<sup>3</sup> kevertetett puffer oldathoz, 100  $\mu$ l térfogatú oldat mennyiségeket adtam 30 mmol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú glükóz oldatból. A 4.39/a. ábra készítésekor t<sub>1</sub>=0, t<sub>2</sub>=30 ms, t<sub>3</sub>=700 ms mérőprogramot, 4.39/b. ábra készítésekor pedig t<sub>1</sub>=30 ms, t<sub>2</sub>=30 ms, t<sub>3</sub>=700 ms mérőprogramot használtam, E<sub>1</sub>= 0.0V, E<sub>2</sub>= 0.7 V (*vs.* Ag/AgCl)

Látható, hogy a  $t_1$ = 0 program (a regisztrátum) esetében nagyobb áramot mértem. Természetesen a kondenzátor áram kiküszöbölésére célszerű alkalmas  $t_1$  időt a programba építeni.



**4.39. ábra** Különböző időprogramokkal készített glükózelektród válaszgörbék *a.* t<sub>1</sub>=0, t<sub>2</sub>=30ms, t<sub>3</sub>=700ms, *b.* t<sub>1</sub>=30ms, t<sub>2</sub>=30ms, t<sub>3</sub>=700ms.

A t<sub>3</sub> periódus hossza nyilvánvalóan jelentős hatást gyakorol a PMA módszerrel végzett mérések érzékenységére. Túl rövid t<sub>3</sub> idő esetében a diffúziós réteg feltöltődése kismértékű. Igen hosszú idő alkalmazására ugyanakkor nincs szükség, hiszen az árammentes állapotban kialakuló stacionárius viszonyok elérése után további érzékenység növekedésre nem számíthatunk. A mondottak igazolására mutatom be az előzőekben leírtak szerint készített putreszcin elektróddal kapott mérések alapján készített i<sub>t</sub> – t<sub>3</sub> függvényt a 4.40 ábrán. A mérést 1 mmol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú, intenzíven kevert puffer oldatban végeztem (E<sub>1</sub>=0V, E<sub>2</sub>= 0.7V, t<sub>1</sub>=30ms, t<sub>2</sub>= 30ms). A t<sub>3</sub> időt 0-10s tartományban változtattam.



4.40. ábra. A relaxációs (pihentetési) idő hatása a PMA jelre.

Az ábrán jól látszik, hogy az illető körülmények és reakcióréteg vastagság és szerkezet mellett 1 s-nál hosszabb relaxációs idő alkalmazása nem eredményez érzékenyég növekedést.

Összefoglalva megállapítható, hogy a laboratóriumunkban kidolgozott PMA módszer bevonattal ellátott amperometriás elektródok esetében jelentős méréstechnikai előnyöket nyújthat kis koncentrációban jelenlevő anyagok mérése során.

# 5. ÖSSZEFOGLALÁS

Az elválasztástechnikai módszerek széles körű elterjedésének és a bioszenzorok megjelenésének, fejlődésének köszönhetően az amperometriás méréstechnika az érdeklődés középpontjába került. Kísérleti munkámban amperometriás méréstechnika fejlesztésével, alkalmazási területének felmérésével, kiszélesítésével és valós problémák megoldásához történő alkalmazásával foglalkoztam.

A dolgozat első része rézelektród lúgos közegben mutatkozó viselkedéséről szól. Munkám során különböző méretű és alakú rézelektródokat készítettem és vizsgáltam egyes mono- és diszacharidoknak a rézelektród felületén lejátszódó oxidációját. Különböző elektrokémiai eljárással meghatároztam az oxidációs folyamatok elektronszám-változását. Kimutattam, hogy az elektródfolyamat elektrokatalitikus jellegű. Egyben igazoltam, hogy szénhidrátok elektrokémiai oxidációja során, lúgos közegben a rézelektród korrózióját eredményező folyamat elhanyagolható mértékű.

A kimerítő elektrolízis termékét ionkromatográfiás módszerrel analizálva igazoltam, hogy a szénhidrátok rézelektródon, lúgos közegben végbemenő oxidációs reakciójában fő termékként formiát ionok keletkeznek. Ezzel igazoltam egy korábban feltételezett reakció mechanizmust.

Három különböző típusú kromatográfiás detektorcellát készítettem különböző méretű fém réz munkaelektródok alkalmazásával. A cellák működését tanulmányoztam. Azokat FIA vagy kromatográfiás rendszerekhez kapcsolva gyakorlatilag fontos feladatok megoldására dolgoztam ki mérő módszereket.

- Méz és virágos növényekből extrahált nektár fő cukor komponenseinek elemzésére sikerült jól működő kromatográfiás módszert kidolgoznom.

- A 'wall jet' típusú detektorcellámat FIA rendszerhez kapcsolva tanulmányoztam egy mikroméretű előtét kolonna glükóz megkötési és elúciós sajátságát. Ezzel sikeresen járultam hozzá a kolonna megcélzott alkalmazásához szükséges körülmények helyes megválasztásához.

- Amperometriás enzimelektródokat, enzim réteggel bevont munkaelektródos mikrocellákat készítettem glükóz és putreszcin meghatározásra.

- A putreszcin mérő cella alsó méréshatárát új típusú enzim-immobilizálás módszer adaptálásával, az amperometriás mérés finom hangolásával sikerült jelentősen, a kis koncentrációk irányába kiterjeszteni. Sikerült a klinikai diagnózis szempontjából fontossággal bíró koncentráció tartományban, tengerimalac vér és plazma mintákban jól működő, amperometriás putreszcin mérő módszert kidolgozni.

- A készített glükóz mérő cellát használtam a már említett előtét kolonna működésének vizsgálatára.
- Tanulmányoztam a cella *in vivo* glükóz meghatározásokra történő alkalmazásának lehetőségeit és korlátait. Sikerült módszert kidolgozni a glükóz koncentráció érzéstelenített kísérleti állatok testszöveteiben történő — változásainak nyomon követésére. A munkámban kialakított háromelektródos 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 mintakoncentráció 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 periódikusan megszakított amperometriának (PMA) nevezett módszer formailag rokon a kromatográfiás mérésekben újabban használatos pulzáló amperometriás detektálással (PAD). Ahhoz hasonlóan a hagyományos amperometriában megszokott állandó elektródpotenciálos mérőprogram helyett periódikusan ismétlődő elektródpotenciál szakaszok sorozatát alkalmazza. Itt azonban a pulzáló program célja más, mint PAD módszernél. Ott az elektródot passzíváló réteg eltávolítására tisztító majd kondicionáló pulzus szolgál. Az elektródfelület áramló oldattal érintkezik, amely magával ragadja az elektrokémiailag eltávolított szennyeződéseket.

A kidolgozott mérőmódszer esetében az elektródfelületén membrán film, pl. enzim tartalmú reakcióréteg foglal helyet. Ezen keresztül diffúzióval jut az elektroaktív anyag az elektródreakció helyéhez. Az elektrolízis periodikus megszakításával időt biztosítunk arra, hogy az elektrolízissel előidézett koncentrációhiány csökkenjen az elektródfelület közelében, ily módon nagyobb jelet kapjunk.

A dolgozatban különböző modell kísérletek bemutatásával igazoltam a PMA módszer jó működését, előnyös sajátságait. A méréseket passzív cellofán membránnal bevont elektród, glükóz és putreszcin enzimelektród alkalmazásával végeztem. Összehasonlítottam a hagyományos és a PMA módszerrel kapott kalibrációs adatokat.

## 6. IRODALOMJEGYZÉK

- [1] Folk C.W., Badwen A.T.: New type o fend-point in electrometric titration and its application to iodometry, *Journal of the American Chemical Society* 48 (1926) 2045-2051
- [2] Stock J. T.: Amperometric titration with two indicator electrodes and allied techniques, *Microchemical Journal* 3 (1959) 543-555
- [3] Stock J.T.: Amperometric Titrations, Interscience Publ. New York, 1965
- [4] Heyrovsky J.: The trends of polarography, Nobel Lecture, December 11, 1959 http://nobelprize.org/nobel\_prizes/chemistry/laureates/1959/heyrovsky-lecture.pdf Heyrovsky J., Berezický S.: Collection Czeckoslov. Chem. Communs., 1 (1929). 19
- [5] Kolthoff I.M., Lingane J.J.: Polarography 2. kiadás, Vol. 1, Vol. 2, Interscience, NY 1952
- [6] Adams R.N.: Electrochemistry at Solid Electrodes, Marcel Dekker 1969 New York, ISBN 0-8247-1005-3
- [7] Murray R.W., Ewing A.G., Durst R.A.: Chemically modified electrodes Molecular design for electroanalysis, *Analytical Chemistry* 59 (1987) 379A
- [8] Untereker D.F., Lennox J.C., Wier L.M., Moses P.R., Murray R.W.: Chemically modified electrodes: Part IV. Evidence for formation of monolayers of bonded organosilane reagents, *Journal of Electroanalytical Chememistry* 81 (1977) 309-318
- [9] Moses P.R., Murray R.W.: Chemically modified electrodes: part V. Covalent binding of a reversible electrode reactant to RuO2 electrodes, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 77 (1977) 393-399
- [10] Lennox J.C., Murray R.W.: Chemically modified electrodes: VI. Binding and reversible electrochemistry of tetra-(aminophenyl)porphyrin on glassy carbon, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 78 (1977) 395-401
- [11] Lenhard J.C., Murray R.W.: Chemically modified electrodes: VII. Covalent bonding of a reversible electrode reactant to Pt electrodes using an organosilane reagent, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 78 (1977) 195-201
- [12] Murray R.W.: Chemically Modified Electrodes, in Electroanalytical Chemistry, Vol. 13, Bard A.J., Ed., M. Dekker, NY, 1984. 192.
- [13] Murray R.W.(ed): Molecular Design of Electrode Surfaces, Wiley-Interscience, NY, 1992
- [14] Redepenning J.G.: Chemically modified electrodes: a general overview, *Trends in Analytical Chemistry*, 6 (1987) 18-22
- [15] Labuda J.: Chemically modified electrodes as sensors in analytical-chemistry, *Rev.*, *Selective Electrode* 14 (1992) 33-86
- [16] Cox J.A., Tess M.E., Cummings T.E.: Electroanalytical methods based on modified electrodes, A review of recent advances, *Analytical Chemistry* 15(3) (1996) 173-223
- [17] Alegret S.: Rigid carbon Polymer biocomposites for electrochemical sensing, Analyst 121(12) (1996) 1751-1758
- [18] Kulesza P.J, Cox J.A.: Solid-state voltammetry Analytical prospects, *Electroanalysis* 10(2) (1998) 73-80
- [19] Baldwin R.P., Thomsen K.N.: Chemically modified electrodes in liquid chromatography detection, *Talanta* 38(1) (1991) 1-16
- [20] Wang J.: Modified electrodes for electrochemical detection in flowing streams, *Analytica Chimica Acta* 234 (1990) 41-48

- [21] Khodari M., Kauffmann J-M., Patriarche G.J., Ghandour M.A.: Applications in drug analysis of carbon paste electrodes modified by fatty acids, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 7 (1989) 1491-1497
- [22] Barančok D., Cirák J., Tomčík P., Gmucová K.: Surface modified microelectrodes for selective electroanalysis of metal ions in environmental components, *Bioelectrochemistry* 55 (2002) 153-155
- [23] Mariaulle P., Sinapi F., Lamberts L., Walcarius A.: Application of electrodes modified with ion-exchange polymers for the amperometric detection of non-redox cations and anions in combination to ion chromatography, *Electrochimica Acta* 46 (2001) 3543-3553
- [24] Engstrom R. C., Strasser V. A.: Characterization of Electrochemically Pretreated Glassy Carbon Electrodes, *Analytical Chemistry* 56 (1984) 136-141
- [25] Gonon F.G., Fombarlet C.M., Buda M.J., Pujol J.F.: Electrochemical treatment of pyrolytic carbon fiber electrodes, *Analytical Chemistry* 53 (1981) 1386-1389
- [26] Nagy G., Kapui I., Gorton L.: Effect of surface-active agents on amperometric NADH measurements with chemically modified electrodes, *Analytica Chimica Acta*. 305 (1995) 65-73
- [27] Murray R.W.: Chemically modified electrodes, *Accounts of Chemical Research* 13 (1980) 135-141
- [28] Deronzier A., Moutet J.C.: Polypyrrole films containing metal complexes: Syntheses and applications, *Coordination Chemistry Reviews* 147 (1996) 339-371
- [29] Deronzier A., Moutet J.C.: Chapter 9 in Comprehensive Coordination Chemistry, Vol. II (Szerkesztők: McCleverty J.A, Meyer T.J) 471–507, Elsevier, Oxford 2004
- [30] Cheung K.C., Wong W.L., Ma D.L., Lai T.S., Wong K.Y.: Transition metal complexes as electrocatalysts—Development and applications in electro-oxidation reactions, *Coordination Chemistry Reviews* 251(17-20) (2007) 2367-2385
- [31] Hagen J.: Industrial Catalysis: a Practical Approach, 2nd ed., Wiley–VCH, Weinheim, 2006
- [32] Moyer B.A., Thompson M.S., Meyer T.J.: Chemically catalyzed net electrochemical oxidation of alcohols, aldehydes, and unsaturated-hydrocarbons using the system (trpy)(bpy)Ru(OH2)2+ (trpy)(bpy)RuO2+, *Journal of the American Chemical Society* 102(7) (1980) 2310-2312
- [33] Thompson M.S., De Giovani W.F., Moyer B.A, Meyer T.J.: Novel electrocatalytic procedure for the oxidation of alcohols, aldehydes, cyclic-ketones, and C-H bonds adjacent to olefinic or aromatic groups, *Journal of Organic Chemistry* 49(25) (1984) 4972-497
- [34] Groves J.T., Gilbert J.A.: electrochemical generation o fan iron(IV) porphyrin, *Inorganic Chemistry* 25(2) (1986) 123-125
- [35] Creager S.E., Murray R.W.: Electrochemical reactivity of manganese(II) pophyrins Effect of dioxygen, benzoic anhydride, and axial ligands, *Inorganic Chemistry* 26(16) (1987) 2612-2618
- [36] Cheng C.F., Hung C.L., Su Y.O., Cheng S.H.: Speciation of a water-soluble chromium porphyrin by spectral and electrochemical method, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 566(1) (2004) 169-175
- [37] Golabi S.M., Nozad A.: Electrocatalytic oxidation of methanol on a nickel-porphyrin IX complex modified glassy carbon electrode in alkaline medium, *Electroanalysis* 16(3) (2004) 199-209

- [38] Santos L.M., Baldwin R.P.: Liquid-chromatography electrochemiical detection of carbohydrates at a cobalt phtalocianine containing chemically modified electrode, *Analytical Chemistry* 59(14) (1987) 1766-1770
- [39] Diab N., Oni J., Schulte A., Radtke I., Blochl A., Schuhmann W.: Pyrrole functionalised metalloporphyrins as electrocatalysts for the oxidation of nitric oxide, *Talanta* 61(1) (2003) 43-51
- [40] Caro C.A., Zagal J.H., Bedioui F.: Electrocatalytic activity of substituted metallophthalocyanines adsorbed on vitreous carbon electrode for nitric oxide oxidation, *Journal of Electrochemical Society* 150(2) (2003) E95-E103
- [41] Obirai J., Nyokong T.: Electrochemical and catalytic properties of chromium tetraaminophthalocyanine, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 573(1) (2004) 77-85
- [42] Hill H.A.O., Sanghera G.S.: (Szerkesztő: Cass A.E.G.) Mediated AmperometricEnzyme Electrodes, in Biosensors, A Practical Approach, Oxford University Press, New York, 1990
- [43] Zakeeruddin S.M., Fraser D.M., Nazeeruddin M.K., Gratzel M.: Towards mediator design – characterisation of tris-(4,4'-substituted-2,2'-bipiridine) complexes of iron(II), ruthenium(II) and osmium(II) as mediators for glucose-oxidase of Aspergillus-niger and other redox proteinens, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 337(1-2) (1992) 253-283
- [44] Battaglini F., Bartlett P.N., Wang J.H.: Covalent attachment of osmium complexes to glucose oxidase and the application of the resulting modified enzyme in an enzyme switch responsive to glucose, *Analytical Chemistry* 72(3) (2000) 502-509
- [45] Gregg B.A., Heller A.: Redox polymer-films containing enzymes 1. A redoxconducting epoxy cement – synthesis, characterization, and electrocatalytic oxidation of hydroquinon, *Journal of Physical Chemistry* 95(15) (1991) 5970-5975
- [46] Heller A.: Electrical connection of enzyme redox centers to electrodes, *Journal of Physical Chemistry* 96(9) (1992) 3579-3587
- [47] Mao F., Mano N., Heller A.: Characteristics of a miniature compartment-less glucose-O-2 biofuel cell and its operation in a living plant, *Journal of the American Chemical Society* 125(21) (2003) 4951-4994
- [48] Bamba K., Leger J.M., Garnier E., Bachmann C., Servat K., Kokoh K.B.: Selective electro-oxidation of D-glucose by RuCl2(azpy)(2) complexes as electrochemical mediators, *Electrochimica Acta* 50(16-17) (2005) 3341-3346
- [49] Araki K., Winnischofer H., Viana H.E.B., Toyama M.M., Engelmann F.M., Mayer I., Formiga A.L.B., Toma H.E.: Enhanced electrochemical and electrocatalytic activity of a new supramolecular manganese-porphyrin species containing four bis(bipyridine)(aqua)ruthenium(II) complexes, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 562(2) (2004) 145-152
- [50] Quintino M.S.M., Winnischofer H., Nakamura M., Araki K., Toma H.E., Angnes L.: Amperometric sensor for glucose based on electrochemically polymerized tetraruthenated nickel-porphyrin, *Analytica Chimica Acta* 539(1-2) (2005) 215-222
- [51] Gorton L., Dominguez E.: Electrochemistry of NAD(P)+/NAD(P)H, encyclopedia of electrochemistry, in: G.S. Wilson (Ed.), Bioelectrochemistry, vol. 9, Wiley-VCH, Weinheim, 2002
- [52] Ladiu C.I., Popescu I.C., Gorton L.: Electrocatalytic oxidation of NADH at carbon paste electrodes modified with Meldola Blue adsorbed on zirconium phosphate: effect of Ca2+ and polyethyleneimine, *Journal of Solid State Electrochemistry* 9(5) (2005) 296-303

- [53] Zhu L.D., Zhai J.G., Yang R.L., Tian C.Y., Guo L.P. Electrocatalytic oxidation of NADH with Meldola's blue functionalized carbon nanotubes electrodes, *Biosensors and Bioelectronics* 22(11) (2007) 2768–2773
- [54] Kumar S.A., Chen S.M.: Fabrication and characterization of Meldola's blue/zinc oxide hybrid electrodes for efficient detection of the reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide at low potential, *Analytica Chimica Acta* 592(1) (2007) 36–44
- [55] Wang Q., Tang H., Me Q.J., Tan L., Zhang Y.Y., Li B., Yao S.Z.: Room-temperature ionic liquids/multi-walled carbon nanotubes/chitosan composite electrode for electrochemical analysis of NADH, *Electrochimica Acta* 52(24) (2007) 6630–6637
- [56] Maalouf R., Chebib H., Sa¨ıkali Y., Vittori O., Sigaud M., Jaffrezic-Renault N.: Amperometric and impedimetric characterization of a glutamate biosensor based on Nafion® and a methyl viologen modified glassy carbon electrode, *Biosensors and Bioelectronics* 22(11) (2007) 2682–2688
- [57] Wang Y.Z., Hu S.S.: A novel nitric oxide biosensor based on electropolymerization poly(toluidine blue) film electrode and its application to nitric oxide released in liver homogenate, *Biosensors and Bioelectronics* 22 (2006) 10–17
- [58] Ricci F., Palleschi G.: Sensor and biosensor preparation, optimisation and applications of Prussian Blue modified electrodes, *Biosens Bioelectronics* 21(3) (2005) 389-407
- [59] Chen S.M.: Electrocatalytic oxidation of thiosulfate by metal hexacyanoferrate film modified electrodes, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 417(1-2) (1996) 145–153
- [60] Neff V.D.:Electrochemical oxidation and reduction of thin films of prussian blue, Journal of Electrochemical Society 125 (1978) 886-887
- [61] Itaya K., Ataka T., Toshima S.: Electrochemical preparation of prussian blue analog iron-ruthenium cyanide, *Journal of the American Chemical Society* 104(13) (1982) 3751-3752
- [62] Kafi A.K.M., Fan Yin, Hoon-Kyu Shin, Young-Soo Kwon.: Amperometric thiol sensor based on Prussian blue-modified glassy carbon electrode, *Current Applied Physics* 7 (2007) 496–499
- [63] Yu H., Sheng Q.L., Bin Zheng J.:Preparation, electrochemical behavior and performance of gallium hexacyanoferrate as electrocatalyst of H2O2, *Electrochimica Acta* 52(13) (2007) 4403–4410
- [64] Xu H.H., Wang D., Zhang W., Zhu W., Yamamoto K., Jin LT.: Determination of isatin and monoamine neurotransmitters in rat brain with liquid chromatography using palladium hexacyanoferrate modified electrode, *Analytica Chimica Acta* 577(2) (2006) 207–213
- [65] Corma A.: Inorganic solid acids and their use in acid-catalised hydrocarbon reactions, *Chemical Reviews* 95(3) (1995) 559-625
- [66] Sayari A.: Studies in Surface Science and Catalysis. (Recent Advances and New Horizons in Zeolite Science and Technology102, (Szerksztők: Chon H., Woo S.I., Park S.-E..)) Elsevier, Amsterdam (1996) 1-46
- [67] Walcarius A.: Zeolite-modified electrodes: Analytical applications and prospects, *Electroanalysis* 8(11) (1996) 971-986
- [68] Walcarius A.: Zeolite-modifed electrodes in electroanalytical chemistry, *Analytica Chimica Acta* 384 (1999) 1-16
- [69] Malinauskas A.: Electrocatalysis at conducting polymers, *Synthetic Metals* 107(2) (1999) 75-83
- [70] Bello A., Giannetto M., Mori G., Seeber R., Terzi F., Zanardi C.: Optimization of the DPV potential waveform for determination of ascorbic acid on PEDOT-modified electrodes, *Sensors and Actuators B* 121 (2007) 430–435

- [71] Karyakin A.A., Vuki M., Lukachove L.V., Karyakina E.E., Orlov A.V., Karpachova G.P., Wang J.: Processible polyaniline as an advanced potentiometric pH transducer. Application to biosensors, *Analytical Chemistry* 71(13) (1999) 2534-2540
- [72] Prasad KR., Munichandraiah N.: Fabrication and evaluation of 450 F electrochemical redox supercapacitors using inexpensive and high-performance, polyaniline coated, stainless-steel electrodes, *Journal of Power Sources* 112 (2) (2002) 443-451
- [73] Zhou D., Xu J., Chen H., Fang H.: Ascorbate sensor based on 'self-doped' polyaniline, *Electroanalysis* 9(15) (1997) 1185-1188
- [74] Mandi Z., Dui L.: Polyaniline as an electrocatalytic material, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 403 (1996) 133–141
- [75] Nassef H.M., Radi A.E., O'sullivan C.K.: Electrocatalytic oxidation of hydrazine at oaminophenol grafted modified glassy carbon electrode: Reusable hydrazine amperometric sensor, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 592 (2006) 139-146
- [76] Tucceri R.: The change of the electron scattering at the gold film-poly-(oaminophenol) film interface after partial degradation of the polymer film: its relation with the electron transport process within the polymer film, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 562(2) (2004) 173-186
- [77] Shah A.A., Holze R.: Copolymers and two-layered composites of poly(o aminophenol) and polyaniline, *Journal of Solid State Electrochemistry* 11 (2006) 38-51
- [78] Cao Y., Qiu J., Smith P.: Effect of solvents and cosolvents on the processibility of polyaniline 1. Solubility and conductivity studies, *Synthetic Metals* 69(1-3) (1995) 187-190
- [79] Lukachova L.V., Shkerin E.A., Puganova E.A., Karyakina E.E., Kiseleva S.G., Orlov A.V., Karpacheva G.P., Karyakin A.A.: Electroactivity of chemically synthesized polyaniline in neutral and alkaline aqueous solutions Role of self-doping and external doping, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 544 (2003) 59-63
- [80] Zhang L.: The electrocatalytic oxidation of ascorbic acid on polyaniline film, synthesized in the presence of  $\beta$ -naphthalenesulfonic acid, *Electrochimica Acta* 52 (2007) 6969–6975
- [81] Tian Y., Wang J., Wang Z., Wang S.: Electroreduction of nitrite at an electrode modified with polypyrrole nanowires, *Synthetic Metals* 143 (2004) 309–313
- [82] Somasundrum M., Bannister J.V.: Mediatoless electrocatalysis at a conducting polymer electrode application to ascorbate and NADH measurement, *Journal of the Chemical Society-Chemical Communication* 21 (1993) 1629-1631
- [83] Garcia-Gasca T., Paz-Gonzalez V., Moncada-Alvarez M.C., Blanco-Labra A.: Colorimetric quantitation of in vitro cell density using carmine, a chromosomespecific stain, *Toxicology in Vitro* 16(5) (2002) 573-579
- [84] Wang C., Wang F., Li C., Xu X., Li T., Wang C.: Voltammetric sensor for tinidazole based on poly(carmine) film modified electrode and its application, *Dyes and Pigments* 75 (2007) 213-217
- [85] Xu H.H., Zhang W., Wang D., Zhu W., Jin L.T.: Simultaneous determination of 5hydroxyindoleacetic acid and 5-hydroxytryptamine in urine samples from patients with acute appendicitis by liquid chromatography using poly(bromophenol blue) film modified electrode, *Journal of Chromatography B* 846 (2007) 14–19
- [86] Kooshki M., Shams E.: Selective response of dopamine in the presence of ascorbic acid on carbon paste electrode modified with titanium phosphated silica gel, *Analytica Chimica Acta* 587 (2007) 110–115
- [87] Yang G.J., Qu X.L., Shen M., Wang C.Y., Qu Q.S., Hu X.Y.: Preparation of glassy carbon electrode modified by hydrophobic gold nanoparticles and its application for the determination of ethamsylate in the presence of cetyltrimethylammonium bromide, *Sensors and Actuators B* 128(1) (2007) 258-265
- [88] Stulik K., Pacakova V., Weingart M., Podolak M.: Operational parameters of vpltammetric high-performance liquid-chromatographic detectors with copper electrodes and application to a determination of some fodder biofactors, *Journal of Chromatography*, 367(2) (1986) 311-21
- [89] Stulik K., Pacakova V., Jokuszies, G.: Analysis of dipeeptides by reversed phase highperformance liquid-chromatography without derivatization using amperometric detection on a copper *Journal of Chromatography* 436 (1988) 334-337
- [90] Wang, H.P., Pacakova V., Stulik K.: Determination of ethylenethiourea in beverages without sample pretreatment using highperformance liquid-chromatography and amperometric detection on copper electrode, *Journal of Chromatography* 457 (1988) 398-402
- [91] Luo P., Prabhu S.V., Baldwin R.P.: Constant Potential Amperometric Detection of Underivatized Amino Acids and Peptides at a Copper Electrode, *Analytical Chemistry* (17)63 (1991) 1702-1707
- [92] Singhal P., Kuhr W.G.: Ultrasensitive voltammetric detection of underivatized oligonucleotides and DNA, *Analytical Chemistry* 69 (1997) 4828-32)
- [93] Lin H., Xu D. K., Chen H.Y.: Simultaneous determination of purine bases, ribonucleosides and ribonucleotides by capillary electrophoresis electrochemistry with a copper electrode, *Journal of Chromatography A* 760 (1997) 227-33
- [94] Casella I.G., Guascito M.R., Benedetto G. E.: Electrooxidation of theocyanate on the copper-modified gold electrode and its amperometric determination by ion chromatography, *Analyst* 123 (1998) 1359-63
- [95] Hong J. Baldwin R. P.: Profiling clinically important metabolites in human urine by capillary electrophoresis and electrochemical detection, *Journal of Capillary Electrophoresis*, 4(2) (1997) 65-71
- [96] Jiannong Ye; Richard P. Baldwin: Determination of Amino Acids and Peptides by Capillary Electrophoresis and Electrochemical Detection at a Copper Electrode, *Analytical Chemistry* 66 (17) (1994) 2669-2674
- [97] Peifang Luo; Sunil V. Prabhu; Richard P. Baldwin: Constant Potential Amperometric Detection at a Copper-Based Electrode: Electrode Formation and Operation, *Analytical Chemistry* 62 (1990) 752-755.
- [98 Luis A. Colon; Rajeev Dadoo; Richard N. Zare: Determination of Carbohydrates by Capillary Zone Electrophoresis with Amperometric Detection at a Copper Microelectrode, *Analytical Chemistry* 1993, 65 : 4 476-481
- [99] Rahul M. Kotkar, Purvi B. Desai, Ashwini K. Srivastava.: Behavior of riboflavin on plain carbon paste and aza macrocycles based chemically modified electrodes, *Sensors and Actuators B* 124 (2007) 90–98
- [100] Rubianes M.D., Rivas G.A.: Carbon nanotubes paste electrode, *Electrochemical Communication* 5 (2003) 689–694
- [101] Zheng L, Song JF.: Voltammetric behavior of urapidil and its determination at multiwall carbon nanotube paste electrode, *Talanta* 73(5) (2007) 943-947
- [102] Estevez-Hernandez O., Naranjo-Rodriguez I., de Cisneros J.L. H.H., Reguera E.: Evaluation of carbon paste electrodes modified with 1-furoylthioureas for the analysis of cadmium by differential pulse anodic stripping voltammetry, *Sensors and Actuators B* 123 (2007) 488–494

- [103] Huang J.D., Song Z., Li J., Yang Y., Shi H.B., Wu B.Y., Anzai J.I., Osa T., Chen Q.: A highly-sensitive L-lactate biosensor based on sol-gel film combined with multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs) modified electrode, *Materials Science and Engineering* C 27 (2007) 29–34
- [104] Salimi A., Roushani M., Haghighi B., Soltanian S.: Amperometric detection of insulin at renewable sol-gel derived carbon ceramic electrode modified with nickel powder and potassium octacyanomolybdate(IV), *Biosensors and Bioelectronics* 22 (2006) 220–226
- [105] Vaze V.D., Srivastava A.K.: Electrochemical behavior of folic acid at calixarene based chemically modified electrodes and its determination by adsorptive stripping voltammetry, *Electrochimica Acta* 53(4) (2007) 1713-1721 Sp. Iss. SI
- [106] Hu C.G., Wu K.B., Dai X., Hu S.S.: Simultaneous determination of lead(II) and cadmium(II) at a diacetyldioxime modified carbon paste electrode by differential pulse stripping voltammetry, *Talanta* 60(1) (2003) 17-24
- [107]. Ugo P, Moretto L.M., Bertnoello P., Wang J.: Determination of trace mercury in seltawters at screen-printed electrodes modified with sumichelate QIOR, *Electroanalysis* 10(15) (1988) 1017-1021
- [108] Wang J., Nascimento V.B., Lu J., Park S.D., Agnes L.: Disposable nickel screenprinted sensor based on dimethylglyoxime coating ink, *Electroanalysis* 8(7) (1996) 635-538
- [109] Honeychurch K.C., Hart J.P., Cowell D.C., Arrigan D.W.M.: Voltammetric studies of lead at calixarene modified screen-printed carbon electrodes and its determination in water by stripping voltammetry, *Sensors and Acruators B* 77(3) (2001) 642-652
- [110] Dong H.M., Zheng H., Lin L., Ye B.X.: Determination of thallium and cadmium on a chemically modified electrode with Langmuir–Blodgett film of p-allylcalix[4]arene, *Sensors and Actuators B* 115(1) (2006) 303–308
- [111] Pearson R.G., Hard and soft acids and bases, *Journal of the American Chemical* Society 85 (1963) 3533–3539
- [112] Sadik O.A., Wallace G.G., Pulsed amperometric detection of proteins using antibody containing conducting polymers, *Analytica Chimica Acta* 279,(1993) 209–212
- [113] Barnett, D., Laing, D.G., Skopec, S., Sadik, O., Wallace, G.G.: Determination of pcresol (and other phenolics) using a conducting polymer-based electro-immunological sensing system, *Analytical Letters* 27 (1994) 2417–2429
- [114] Gooding J.J., Wasiowych C., Barnett D., Hibbert D.B., Barisci J.N., Wallace G.G.: Electrochemical modulation of antigen–antibody binding, *Biosensors and Bioelectronics* 20 (2004) 260–268
- [115] International Union of Pure and Applied Chemistry, Analytical Chemistry Division ("The Orange Book"), Compendium of Analytical Chemistry Nomenclature, Definitive Rules 1997 (7.4) Szerkesztők: Inczédy J., Lengyel T., Ure Allan M., Gelencsér A., Hulanicki A., Harmadik kiadás (http://www.iupac.org/publications/analytical\_compendium/)
- [116] Nagy G., Pungor E.: Bioelectroanalytical sensors and analytical problems in their application, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 20 (1988) 1-19
- [117] Clark Jr., L.C., Lyonas, C.: Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery, Ann.N.Y.Acad.Sci., 105 (1962) 20-45
- [118] Turner A.P.F.: Biosensors Fundamentals and Applications, Oxford University Press, New York (1987)
- [119] Buerk D.G.:Biosensors, Theory and Applications, Technomic Publishing Co, Inc. Lancaster - Basel (1993) ISBN No. 0-87762-975-7

- [120] Mell, L.D., Maloy, J.T.: A model for the amperometric enzyme electrode obtained through digital simulation and applied to the immobilized glucose oxidase system,. *Analytical Chemistry* 47 (2), (1975), 299-307
- [121] Bleadel, W.J., Kissel, T.R., Boguslaski, R.C.: Kinetic behavior of enzymes immobilized in artificial membranes. *Analytical Chemistry* 44 (12) (1972) 2030-2037
- [122] Baronas R., Kulys J., Ivanauskas F.: Modelling amperometric enzyme electrode with substrate cyclic conversion, *Biosensors and Bioelectronics* 19(8) (2004) 915–922
- [123] Eddowes, M.J.: Response of an enzyme-modified pH-sensitive ion selective device; consideration of the influence of the buffering capacity of the analyte solution, *Sensors and Actuators* 7, (1985) 97-/115
- [124] Csóka B., Kovács B. Nagy G.: Investigation of concentration profiles inside operating biocatalytic sensors with scanning electrochemical microscopy (SECM), *Biosensors* and Bioelectronics (1)(2003) 141-149
- [125] Shahani K.A.: The use of immobilized enzymes in the food industry: a review, CRC Crit Rev Food Sci Nutr.12(2) (1979) 161-98
- [126] Cao L.: Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design Wiley (2006) ISBN: 978-3-527-31232-0
- [127] Ambrus J., Sr. Ambrus J., Jr. Ambrus C.: Therapy of newly emerging mutant viral disorders and role in bioterrorism, *Medical Hypotheses* 64( 6)(2005) 1248-1249
- [128] Comfort A.R., Albert E.C., Langer R.: Immobilized enzyme cellulose hollow fibers: I. Immobilization of heparinase, *Biotechnology and Bioengineering* 34 (11) (2004) 1366
  - 1373
- [129] Ambrus C.M., Ambrus J.L., Horvath C., Pedersen H., Sharma S. és Kant C.: Phenylalanine depletion for the management of phenylketonuria. Use of enzyme reactors with immobilized enzymes, *Science* 201 (1978), 837–839
- [130] Nelson J.M., Griffin E.G.: Adsorption of invertase, Journal of the American Chemical Society 38 (1916) 1109–1115
- [131] Guilbault G.G., Nagy G.: Improved Urea Electrode, Analytical Chemistry 45 (1973) 417-421
- [132] Shin M.J., Park J.Y., Park K., Song S.H., Yoo Y.J.: Novel Sol-Gel Immobilization of Horseradish Peroxidase Employing a Detergentless Micro-Emulsion System, *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 12 (2007) 640-645
- [133] Chang T.M.S., Prakash S.: Procedures for microencapsulation of enzymes, cells and genetically engineered microorganisms, *Molecular Biotechnology* 17(3)(2001) 249-260
- [134] Pastorino L., Nicolini C.: Langmuir–Blodgett films of lipase for biocatalysis, *Materials Science and Engineering*, C 22(2) (2002) 419-422
- [135] Tembe S., Inamdar S., Haram S., Karve M., D'Souza S.F.: Electrochemical biosensor for catechol using agarose–guar gum entrapped tyrosinase, *Journal of Biotechnology* 128 (2007) 80-85
- [136] Wink T., van Zuilen S.J., Bult A., van Bennecom W.P.: Self-assembled Monolayers for Biosensors, Tutorial Review, *Analyst*, 122 (1997) 43R–50R
- [137] Santos M.H.S.: Biogenic amines: Their importance in foods, *International Journal of Food Microbiology* 29(2-3) (1996) 213-231
- [138] Soleas G.J., Carey M., Goldberg D.M.: Method development and cultivar-related differences of nine biogenic amines in Ontario wines, *Food Chemistry* 64(1) (1999) 49-58

- [139] De Borba B.M., Rohrer J.S.: Determination of biogenic amines in alcoholic beverages by ion chromatography with suppressed conductivity detection and integrated pulsed amperometric detection, *Journal of Chromatography A* 1155(1) (2007) 22–30
- [140] Gardini F., Zaccarelli A., Belletti N., Faustini F., Cavazza A., Martuscelli M., Mastrocola D., Suzzi G.: Factors influencing biogenic amine production by a strain of Oenococcus oeni in a model system, *Food Control* 16(7) (2005) 609-616
- [141] Kalaë P., Krížek M.: A Review of Biogenic Amines and Polyamines in Beer, Journal of the Institute of Brewing 109 (2003) 123-128
- [142] Bardocz S.: Poliamines in food and their consequences for food quality and human health, *Trends in Food Science and Technoogy* 6(10) (1995) 341-346
- [143] Tenbrink B., Damink C., Joosten H.M.L.J., Tveld J.H.J.H.I.: Occurence and formation of biologically-active amines in foods, *Inernational Journal of Food Microbiology* 11(1) (1990) 73-84
- [144] McCabe-Sellers B.J., Staggs C.G., Bogle M.L.: Tyramine in foods and monoamine oxidase inhibitor drugs: A crossroad where medicine, nutrition, pharmacy, and food industry converge, *Journal of Food Compositon and Analysis* 19 (2006) S58-S65
- [145] Chen K.C.S., Forsyth P.S., Buchanan T.M., Holmes K.K.: Amine content of vaginal fluid from untreated and treated patients with nonspecific vaginits, *Journal of Clinical Investigation* 68(5) (1979) 828–835
- [146] Marzouk S.A.M., Xu C.X., Cosofret V.V., Buck R.P., Hassan S.S.M., Neuman M.R.: Amperometric flow injection determination of putrescine and putrescine oxidase, *Analytica Chimica Acta* 363 (1998) 57–65
- [147] Fujita K., Nagatsu T.: Urinary putrescine, spermidine, and spermine in human blood and solid cancers and in experimental gastric tumor of rats, *Cancer Research* 36 (1976) 1320–1324.
- [148] Toul Z., Macholan L.: Enzyme electrode for rapid determination of biogenic polyamines, *Collection of Czechoslovak Chemical Communication* 40, (1975) 2208-2217.
- [149] Karube, I., Satoh, I., Araki, Y., Suzuki, S.: Monoamine oxidase electrode in freshness testing of meat, *Enzyme and Microbial Technology* 2, (1980) 117-120
- [150] Draisci R., Volpe P.G., Lucentini O.L., Cecilia A., Federico R., Palleschi G.: Determination of biogenic amines with an electrochemical biosensor and its application to salted anchovies, *Food Chemistry* 62(2), (1998) 225-232
- [151] Chemnitius G.C, Bilitewski U.: Development of screen-printed enzyme electrodes for the estimation of fish quality, *Sensors and Activators B* 32 (1996) 107-111
- [152] Madaras M.B., Buck R.P.: Miniaturized biosensors employing electropolymerized permselective films and their use for creatinine assays in human serum, *Analytical Chemistry* 68 (21) (1996) 3832-3839
- [153] Carelli D., Centonze D., Palermo C., Quinto M., Rotunno T.: An interference free amperometric biosensor for the detection of biogenic amines in food products, *Biosensors and Bioelectronics* 23(5) (2007) 640–647
- [154] Compagnone D., Isoldi G., Moscone D., Palleschi G.: Amperometric detection of biogenic amines in cheese using immobilised diamine oxidase, *Analytical Letters* 34(6) (2001) 841–854
- [155] Tombelli S., Mascini M.: Electrochemical biosensors for biogenic amines: a comparison between different approaches, Analytica Chimica Acta 358(3) (1998) 277–284

- [156] Rochette J.F., Sacher E., Meuniera M., Luong J.H.T.: A mediatorless biosensor for putrescine using multiwalled carbon nanotubes, *Analytical Biochemistry* 336 (2005) 305–311
- [157] Sidwell J.S., Rechnitz G.A.: Bananatrode an electrochemical biosensor for dopamine, *Biotechnology Letters* 7(6) (1985) 419-422
- [158] Arnold M.A., Rechnitz G.A., in Turner A.P.F., Karube I., Wilson G.S. (Szerkesztők) Biosensors: Fundamentals and Applications, Oxford University, New York, 1987 p30-59
- [159] Daunert S., Barrett G., Feliciano J.S., Shetty R.S., Shrestha S., Smith-Spencer W.: Genetically engineered whale-cell sensing systems: Coupling biological recognition with reporter genes. *Chemical Reviews* 100(7) (2000) 2705-2738.
- [160] Ripp S., Daumer K.A., McKnight T., Levine L.H., Garland J.L., Simpson M.L., Sayler G.S.: Bioluminescent bioreporter integrated-circuit sensing of microbial volatile organic compounds, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 30(11) (2003) 636-642
- [161] Pedahzur R., Polyak B., Marks R.S., Belkin S.: Water toxicity detection by a panel of stress-responsive luminescent bacteria, *Journal of Applied Toxicology* 4(5) (2004) 343-348.
- [162] Hirano A., Wakabayashi M., Matsuno Y., Sugawara M.: A single-channel sensor based on gramicidin controlled by molecular recognition at bilayer lipid membranes containing receptor, *Biosensors and Bioelectronics* 18(8) (2003) 973-983
- [163] Uto M., Michaelis E.K., Hu I.F., Umezawa Y., Kuwana T.: Biosensor Development Reconstituted in a Lipid with a Glutamate Bilayer Receptor Ion-Channel, *Analytical Sciences* 6(2) (1990) 221-225
- [164] Oh S.Y., Cornell B., Smith D., Higgins G., Burrell C.J., Kok T.W.: Rapid detection of influenza A virus in clinical samples using an ion channel switch biosensor *Biosensors* and *Bioelectronics* 23(7) (2008) 1161-1165
- [165] Gyurcsányi R.E., Bereczki A., Nagy G., Neuman M,R., Lindner E.: Amperometric microcells for alkaline phosphatase assay, *Analyst* 127 (2002) 235-240
- 166] Jagerszki G., Gyurcsanyi R.E., Hofler L., Pretsch E.: Hybridization-Modulated Ion Fluxes through Peptide-Nucleic-Acid-Functionalized Gold Nanotubes. A New Approach to Quantitative Label-Free DNA Analysis, *Nano Letters* 7(6) (2007) 1509-1612
- [167] Bäumner A.J. and Schmid R.D.: Development of a new immunosensor for pesticide detection: a disposable system with liposome-enhancement and amperometric detection, *Biosensors and Bioelectronics* 13(5) (1998) 519-529
- [168] Jayasena, S.: Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics, *Clinical Chemistry* 45 (1999)1628–1650
- [169] Ellington A.D., Szostak, J.W.: In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands, *Nature* 346 (1990) 818–822
- [170] Ellington A.D., Szostak J.W.: Selection in vitro of single-stranded DNA molecules that fold into specific ligand-binding structures, *Nature* 355 (1992) 850–852
- [171] Tombelli S., Minunni M., Mascini M.: Analytical applications of aptamers, Review, *Biosensors and Bioelectronics* 20 (2005) 2424–2434
- [172] Schlensog M.D., Gronewold, T.M.A., Tewes, M., Famulok, M., Quandt, E.: A Lowewave biosensor using nucleic acids as ligands, *Sensors and Actuators B* 10(2004) 308–315
- [173] Bang G.S., Cho S., Kim B.G.: A novel electrochemical detection method for aptamer biosensors, *Biosensors and Bioelectronics* 21 (2005) 863–870

- [174] Burger Kálmán: A mennyiségi analízis Alapjai, Semmelweis Kiadó, Budapest 1992, 313-351, ISBN 963 815 406 3
- [175] Hughes S., Meschi P.L., Johnson D.C.: Amperometric detection of simple alcohols in aqueous solutions by application of a triple-pulse potential waveform at platinum electrodes, *Analytica Chimica Acta* 132 (1981) 1-10.
- [176] Hughes S., Johnson D.C.: Amperometric detection of simple carbohydrates at platinum electrodes in alkaline solutions by application of a triple-pulse potential waveform, *Analytica Chimica Acta* 132 (1981) 11-22
- [177] Nagy L., Kálmán N., Nagy G.: 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
- [178] Lacourset W.R., Johnson D.C.: Optimization of Waveforms for Pulsed Amperometric Detection of Carbohydrates Based on Pulsed Voltammetry, *Analytical Chemistry* 65 (1993) 50-55
- [179] Rocklin R.D., Clarke A.P., Weitzhandler M.: Improved Long-Term Reproducibility for Pulsed Amperometric Detection of Carbohydrates via a New Quadruple-Potential Waveform, *Analytical Chemistry* 70 (1998) 1496-1501
- [180] Possari R., Carvalhal R.F., Mendes R.K., Kubota L.T.: Electrochemical detection of cysteine in a flow system based on reductive desorption of thiols from gold, *Analytica Chimica Acta* 575 (2006) 172–179
- [181] Lee J.W., Yeo I.H.: Integrated pulsed amperometry for the analysis of organic compounds, *Microchemical Journal* 70 (2001) 173-177
- [182] Clarke A.P., Jandik P., Rocklin R.D., Liu Y., Avdalovic N.: An integrated amperometry waveform for the direct, sensitive detection of amino acids and amino sugars following anion-exchange chromatography, *Analytical Chemistry* 71(14) (1999) 2774-2781
- [183] Sato K., Jin J.Y., Takeuchi T., Miwa T., Suenami K., Takekoshi Y., Kanno S.: Integrated pulsed amperometric detection of glufosinate, bialaphos and glyphosate at gold electrodes in anion-exchange chromatography, *Journal of Chromatography A* 919(2) (2001) 313–320
- [184] Ruttinger H.H., Drager B.: Pulsed amperometric detection of calystegines separated by capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A* 925(1-2) (2001) 291–296
- [185] Optimal Settings for Pulsed Amperometric Detection of Carbohydrates Using Dionex Pulsed Electrochemical and Amperometric Detectors; Technical Note 21; Dionex Corp.: Sunnyvale, CA, 1996.
  Dionex Technical Note 21 (www.dionex.com.cn/technic/Afiles/TN21.PDF)
- [186] Weitzhandler M., Barreto V., Pohl C., Jandik P., Cheng, J., Avdalovic N.: CarboPac (TM) PA20: a new monosaccharide separator column with electrochemical detection with disposable gold electrodes, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 60 (2004) 309-317
- [187] Toyobo enzim katalógus 2000-2001
- [188] http://www.sigmaaldrich.com, Enzymatic assay of glucose oxidase (EC 1.1.3.4) 2005
- [189] Blum W., Hogaboom G.B.: Principles of Eectroplating and Electroforming 3rd ed. McGraw-Hill, NY 1949 p 382
- [190] Toro N., Ruzgas T., Gorton L.: Electrochemical oxidation of mono and disacharides at fresh as well as oxidized copper electrodes in alkaline media, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 464 (1999) 252-258
- [191] Bard A.J., Faulkner L.R.: Electrochemical methods, John Wiley and Sons (1980) 189-293

- [192] Larew L.A., Johnson D.C.: Concentration dependence of the mechanism of glucoseoxidation at gold electrodes in alkaline media, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 262(1-2) (1989)167-182
- [193] Nagy L., Nagy G.: Spectroscopic confirmation of electrocatalytic behavior of amperometric carbohydrate detection on copper, *Microchemical Journal*, 84(1-2) (2006) 70-74
- [194] Kano K., Torimura M., Esaka Y., Goto M., Ueda T.: Electrocalatytic oxidation of carbohydrates at copper(II)-modified electrodes and its application to flow-through detection, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 372 (1994) 137-143
- [195] Luo M.Z., Baldwin R.P.: Characterization of carbohydrate oxidation at copper electrodes, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 387(1-2) (1995) 87-94
- [196] Nagy L., Nagy G., Hajós P.: Copper electrode based amperometric detector cell for sugar and organic acid measurements, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 76(1-3) (2001) 494-499
- [197] van Wyk B.E.: Nectar sugar composition in Southern African Papilionoideae (Fabaceae), *Biochemical Systematics and Ecology* 21(2) (1993) 271-277
- [198] Petersson G.: Gas-chromatographic analysis of sugars and related hydroxy acids as acyclic oxime and ester trimethylsilyl derivatives, *Carbohydrate Research* 33, (1974) 47-61
- [199] Soria A.C., Gonzalez M., de Lorenzo C., Martinez-Castro I., Sanz J.: Characterization of artisanal honeys from Madrid (Central Spain) on the basis of their melissopalynological, physicochemical and volatile composition data, *Food Chemistry* 85(1) (2004) 121-130
- [200] Justino L.G., Caldeira M., Gil M.S.V., Baptista M.T., ProenÇa Da Cunha A., Gil A.: Determination of changes in sugar composition during the aging of honey by HPLC, FTIR and NMR spectroscopy, *Carbohydrate Polymers* 34(4) (1997) 435-439
- [201] Baker H.G., Baker I.: A brief historical review of the chemistry of nectaries, In The Biology of Nectaries, (Szerkesztők: Bentley B.és Elias T.) Columbia University Press, New York (1982) p.126-151
- [202] Larew L.A., Johnson D.C.: Concentration-dependence of the mechanism of the mechanosm of gucose-oxidation at gold electrodes in alkaline media, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 262(1-2) (1989) 167-182
- [203] Hu Q., Zhou T., Hu, G., Fang, Y.: Determination of sugars in Chinese traditional drugs by CE with amperometric detection, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 30(4) (2002) 1047-1053
- [204] Chen, Z.L., Hibbert, D.B.: Simultaneous amperometric and potentiometric detection of sugars, polyols and carboxylic acids in flow systems using copper wire electrodes, *Journal of Chromatography A* 766, (1997) 27-33
- [205] Casella, J.G., Cataldi, T.R.I., Guerrieri, A., Desimoni, E.: Copper dispersed into polyaniline films as an amperometric sensor in alkaline solutions of amino acids and polyhydric compounds, *Analytica Chimica Acta*, 335 (1996) 217-225
- [206] Marzouk S.A.M., Xu C.X., Cosofret B.R., Buck R.P., Hassan S.S.M., Neuman M.R., et al.: Amperometric flowinjection determination of putrescine and putrescine oxidase, *Analytica Chimica Acta* 363 (1998) 57–65
- [207] Emr S.A., Yacynych A.M.: Use of polymer-films in amperometric biosensors. *Electroanalysis* 7 (1995) 913–923
- [208] Gyurcsányi R.E., Vágföldi Z., Tóth K., Nagy G.: Fast response potentiometric acetylcholine biosensor, *Electroanalysis* 11 (1999) 712–718

- [209] Khuhawar M.Y., Memon A.A., Jaipal P.D., Bhanger M.I.: Capillary gas chromatographic determination of putrescine and cadaverine in serum of cancer patients using trifluoroacetylacetone as derivatizing reagent, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 723 (1-2) (1999) 17–24
- [210] Xu C.X., Marzouk S.A.M., Cosofret V.V., Buck R.P., Neuman M.R., Sprinkle R.H.: Development of a diamine biosensor, *Talanta* 44 (1997) 1625–1632
- [211] Nagy L., Nagy G., Gyurcsányi R. E., Neuman M. R., Lindner E.: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
- [212] Cobelli C., Toffolo G.M., Dalla M.C., Campioni M., Denti P., Caumo A.: Assessment of beta cell function in humans, simultaneously with insulin sensitivity and hepatic extraction, from intravenous and oral glucose test, *American Journal of Physiology*, *Endocrinology and Metabolism*, 293 (2007).E1–E15