

## 1. Bevezetés

A szelektív elektrokémiai érzékelők a múlt század közepén indult intenzív kutatómunka eredményeként napjainkra a mennyiségi kémiai elemzés fontos, széles körben használatos eszközeivé váltak. Segítségükkel rendszerint különböző helyekről származó oldatok pH-ját, különböző ionkoncentrációját, elektroaktív anyag tartalmát mérik. Az ilyen hagyományos analitikai feladatok megoldására kezelhető méretű, robusztusnak mondható, hagyományos elektródokat használnak. Ezek mérőfelülete a néhány négyzetmilliméter és az egy-két négyzetcentiméter közötti tartományban található.

Felépítésük hasonló. A kézi íróeszközök mérettartományába eső, könnyen mérőcellába vezethető és rögzíthető elektródtestből, az annak végén képzett érzékelő felületből, valamint elektromos vezetékekből, érintkezőkből állnak. Különleges élettani-, elméleti- és mérés technikai feladatok megoldására speciális mérőérzékelőket készítettek különböző iskolák. Ezek közé sorolhatjuk a mikroelektródokat.

Napjainkra a mikroelektródok készítésével, felépítésével, tulajdonságaik vizsgálatával és természetesen a velük megoldott feladatokkal igen nagyszámú közlemény foglalkozik. Mérés technikai szempontból a mikroelektródok egyik legfontosabb előnyös tulajdonsága abban rejlik, hogy képesek igen kicsiny térfogatrészben kialakuló koncentráció viszonyokról információt adni. Ehhez járul az az előny, hogy kis méretüknek köszönhetően kevéssé zavarják a vizsgált közegben uralkodó viszonyokat. Más szóval kismértékű invázió okozása mellett működnek.

Nem véletlen ezek alapján, hogy az elektrokémiai mikro-érzékelők alkalmazásának egyik fő területe a kísérletes élettudományok. Az élettani vizsgálatok, az *in vivo* mérések igényeit figyelembe vevő követelmények a mikroelektródok fejlesztésére irányuló munka egyik fő hajtóerejét képezték és képezik napjainkban is.

Bard<sup>1</sup> és Engstrom<sup>2</sup> úttörő munkájának köszönhetően a mikroelektródok alkalmazásának egy fontos új területe jelent meg a múlt század második felében. Kialakult a pásztázó elektrokémiai mikroszkópia (PEKM) angolul Scanning ElectroChemical Microscopy (SECM). Ez, mint a mérőcsúcs mikroszkópiás technika egyik újabb módszere mikroelektródot alkalmaz pásztázó mérőcsúcsként. A jól használható mérőcsúccsal szembeni követelményeket az élettani vizsgálatokban

hatékony mikroelektrodok nem megfelelő mértékben elégítik ki. Különösen igaz ez az ultramikro ion-szelektív elektrodok esetében.

A Pécsi Tudományegyetem Általános és Fizikai Kémia Tanszékén intenzív kutatások folynak a pásztázó elektrokémiai mikroszkópiás módszerek fejlesztésével, alkalmazási területének kibővítésével kapcsolatban. A PTE Természettudományi Karának Kémiai Doktori Iskolájában végzett tanulmányaim során bekapcsolódtam a Tanszéken folyó ez irányú kutatómunkába.

A munkában célom volt a pásztázó elektrokémiai mikroszkópiás vizsgálatokban jól használható, szelektív mikroelektrodok kifejlesztése, azokat alkalmazó egyes újszerű módszerek kidolgozása, a kémiai mikroszkópiás módszer alkalmazási területének szélesítése, új alkalmazási lehetőségek tanulmányozása. A kísérletekbe célszerű volt mind ion-szelektív mikroelektrodokat, mind molekula szelektív bioszenzorokat bevonni.

A munkához rendelkezésre állt a Tanszéken korábban megépített pásztázó elektrokémiai mikroszkóp. Lehetőségem volt korszerű elektrokémiai mérőállomások és mikroelektrod-készítési technikák használatára. Támaszkodhattam a kutatócsoport korábbi tapasztalataira.

Anyagtranszport sajátságok és korróziós folyamatok vizsgálata területén látszott célszerűnek megvizsgálni a továbbfejlesztett mérőcsúcsokkal történő kémiai mikroszkópiás méréstechnika alkalmazásának lehetőségeit, előnyeit.

A dolgozat a területen végzett kutatómunkám eredményeiről ad áttekintést.

## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1. Mikroelektródok

A „mikroelektród” elnevezést igen széles körben használják különböző kutatási területeken különböző eszközökre és berendezésekre. A múlt század közepén az akár 1mm mérőfelület átmérőjű elektródot is mikroelektródnak nevezték.

Napjainkban a mikroelektród név rendszerint a néhány mikrométer mérőfelület átmérőjű érzékelőre utal, ultramikro-, illetőleg nanoelektród névvel szokás illetni a mikrométer körüli vagy annál kisebb elektródokat.

A mikroszondák és mikroérezékelők fejlesztése, alkalmazása rendkívüli módon az érdeklődés központjába került. A velük kapcsolatos munkában különböző tudományterületeken dolgozó kutatók vesznek részt. A szenzorok készítése során gyakran alkalmaznak magas technológiai lépéseket, mint például fotolitográfias struktúra kialakítást<sup>3</sup> vagy lézer eszközös megmunkálást.<sup>4</sup> A mikroelektródok különféle típusairól szóló évente megjelenő közlemények száma rohamosan nő.



1. ábra Tudományos cikkek száma a mikroelektródok alkalmazásáról, készítéséről, éves lebontásban a Science Direct adatbázisa alapján.

A dolgozatban nem célom részletes képet adni a mikroelektrodokkal foglalkozó szakirodalomról, inkább csak a munkámhoz közvetlenül kapcsolódó irodalmi előzményeket említem vázlatosan.

A voltammetriás mikroelektrodok és az ion-szelektív elektrodok mikroméretű verziói a leggyakrabban tanulmányozott és legjobban ismert elektroanalitikai mikroszenzorok. Készítésükről számos részletesen leírt, könnyen elsajátítható, reprodukálható módszer található a szakirodalomban.<sup>5,6</sup>

Számos tanulmány foglalkozik a mikroelektrodok speciális tulajdonságaival. A mikroelektrodok legnagyobb előnye a hagyományos elektrodokkal szemben az, hogy igen nagy felbontással képesek információt szolgáltatni mikrokörnyezeti koncentrációviszonyokról. Az érzékelők kis méretéből adódóan speciális mintakörnyezetbe, mint például biológiai struktúrákba vezethetők, és ott kevésbé befolyásolják az uralkodó viszonyokat. Más szóval csak kismérvű inváziót okoznak.

### **2.1.1. Voltammetriás mikroelektrodok**

A különböző célú voltammetriás mérésekben különböző anyagból készült mérőfelületű, különböző felépítésű, különböző méretű munkaelektrodokat alkalmaznak. Így a fémanalízis céljára kidolgozott elektrodok mérőfelületét megújuló vagy függő higanycsepp<sup>7</sup> - újabban higanyfilm - képezi. A fizikai kémiai vizsgálatokban a pozitív potenciál tartományban jól használható nemesfém – leggyakrabban platinából illetőleg platina-irídium<sup>8</sup> ötvözetből készült - korong, film, gyűrű, tű, félgömb alakú elektrodok használata vált gyakorivá. Elektrokémiailag oxidálható, azaz elektroaktív szerves anyagok koncentrációjának mérésére különböző szénelektrodok munkaelektrodoként való alkalmazása előnyös.

Ezek közül jól ismertek az Adams<sup>9</sup> által kidolgozott szénpaszta-elektrod különböző változatai, a pirolitikus grafit-elektrodok vagy az újabban talán legszélesebb körben alkalmazott üveges szénelektrodok - más néven Glassy Carbon elektrodok<sup>10</sup>. A fent említett voltammetriás munkaelektrodok ma már igen sok esetben csak alapérzékelőként használatosak kémiaailag módosított elektrodokban. Ezek az elektrodok ugyanis úgy készülnek, hogy a megválasztott voltammetriás munkaelektrod felületén előnyös funkciót biztosító réteget alakítanak

ki, vagy az elektród anyagát módosítják alkalmas módon. Elektrokatalizátorok<sup>11</sup>, biokatalizátorok<sup>12</sup>, nano-rétegek<sup>13</sup>, komplexképzők alkalmazásával igen nagyszámú – különböző célra használható – elektród kifejlesztésére, alkalmazására került sor. Az illető munkákról szóló szakirodalom rendkívül kiterjedt, így nem céлом e helyen a kémiailag módosított elektródokról részletes képet adni.

#### 2.1.1.1. A voltammetriás mikroelektródok speciális sajátosságai

A voltammetria gyakorlatában használt elektródok mérőfelülete rendszerint néhány négyzetmilliméter nagyságú. Ezeket az elektródokat szokásos hagyományos méretű elektródnak is hívni. Ugyanakkor a voltammetriás elektródok miniatürizált változatai mind nagyobb népszerűségnek örvendenek. Ennek oka két tényezőben keresendő.

Egyrészt, amint azt korábban említettem bizonyos típusú mérések csak igen kisméretű elektródokkal oldhatók meg. Gondoljunk például nagy térbeli felbontást lehetővé tevő, minimális inváziót okozó élettani mérésekre, vagy mikrokörnyezeti koncentrációmérésekre, felületi rétegek, aktív katalitikus helyek közelében.

Másrészt a voltammetriás elektródok miniatürizálása számos más mérés technikai előnyt biztosíthat.

Az egyik fontos ilyen mérés technikai előny abból adódik, hogy nagyméretű elektródfelület esetében az oldatminta koncentrációját jellemző, az elektród felületre irányuló diffúziós anyagtranszport nyugvó oldatban planáris jellegű. Elhanyagolható a felület szélein jelentkező szférikus diffúzió által szállított anyagmennyiség. Mikroelektródok esetében más a helyzet, ott a szférikus diffúzió dominálhat. A felületegységre irányuló anyagáram azonos koncentráció mellett lényegesen nagyobb lehet mikroelektródok esetében. A sok esetben zavaró kondenzátor áram ( $i_{ct}$ ) viszont a felülettel arányos kettősréteg kapacitástól (**C**) függ (1).

$$i_{ct} = \frac{\Delta E}{R} \exp\left[\frac{-t}{RC}\right] \quad (1)$$

Ahol  $\Delta E$  az elektród potenciálváltozás,

$t$  az idő,

$R$  az ellenállás

A kisebb elektródfelület, azaz kisebb felületi kettős réteg kapacitás gyors kondenzátor áram csökkenést okoz a potenciálváltozást követően.

Így a Faraday-áram / kondenzátor áram arány lényegesen nagyobb mikroelektródok esetében.

A kondenzátor áram mellett az idegen adszorbeált anyagok reakciójából adódó zavaró áramkomponensek nagysága is a felület nagyságától függ. A felület nagyság csökkenésével tehát a jel/zaj viszony jelentősen növekszik.

További előnyt jelenthet bizonyos esetekben, hogy az elektródfolyamatban keletkező átmeneti termékek kevesebb időt töltenek az elektród közelében. Gyorsan, szférikus diffúziós úton eltávozva kevesebb komplikációt, pl. elektród passzíválódást okoznak, vagy katalitikus regenerálódást szenvednek másodlagos kémiai folyamatok eredményeként.

Ismeretes, hogy nyugvó oldatban amperometriás körülmények mellett hagyományos méretű elektródok esetében az áram nem vesz fel stacionárius értéket. Folyamatosan csökken, majd nem kontrollálható konvekciós folyamatok következtében változik. Ezért hagyományos méretű elektródokkal amperometriás mérést áramló, vagy kevert oldatokban szoktunk végezni. Gyakran alkalmazott az elektród forgatása vagy vibráltatása. Mikroelektródok esetében azonban a diffúziós folyamatok az állandó elektródpotenciál beállítása után rövidesen stacionárius viszonyokba jutnak. Így nyugvó oldatokban is nyerhető a koncentrációra, illetőleg a diffúziós viszonyokra jellemző amperometriás jel. A voltametriás mikroelektródok ezen előnyös tulajdonsága tette lehetővé a pásztázó elektrokémiai mikroszkópia amperometriás, kezdeti változatának kialakulását.

Mikroelektródok esetében a mintaoldatokban előidézett konvekció intenzitásának változása jóval kisebb változást eredményez a voltametriás áramban, mint az hagyományos elektródok esetében észlelhető. Ennek megfelelően áramló folyadékban előnyös a mikro voltametriás elektródok alkalmazása.<sup>14</sup>

Az is jelenthet mérés technikai előnyt, hogy mikroelektródok esetében kicsiny az áram, így kicsiny az  $IR$  feszültségesés a voltametriás mérőcellában. Lehetőség

van ilyen módon kételektrodos üzemmódban méréseket végezni még relatíve nagy oldatellenállás esetében is.

### 2.1.1.2. A voltammetriás mikroelektrodok néhány típusa

A voltammetriás mikroelektrodok készítéséről, sajátosságairól, alkalmazásáról több összefoglaló tanulmány, monográfia jelent meg.<sup>15</sup>

A voltammetriás elektrodok történetének kezdetét a múlt század közepére tehetjük. Davis és Brink<sup>16</sup> kisméretű platina elektrodnak oldott oxigén koncentrációmérésre történő alkalmazásáról számol be 1942-ben megjelent közleményében. Az *in vivo* állatkísérletekben alkalmazható Clark<sup>17</sup> típusú oxigénelektrod kialakításának igénye nagymértékben hozzájárult a voltammetriás elektrodoknak a miniatürizálás irányába történő fejlesztéséhez. A platina mikroelektrodok napjainkban a pásztázó elektrokémiai mikroszkópia területén is a leggyakrabban alkalmazott mérőcsúcsok. Platina mikrokorong elektrod készítése nem okoz nehézséget. A közel azonos hőtágulási együtthatónak köszönhetően platina huzalok üveg kapilláris elektrodtestbe olvaszthatók. Több cég, köztük a Goodfellow forgalmaz különböző méretű platina huzalt. Néhány mikrométer átmérőjű platina huzal darabot vákuum alkalmazása mellett, zárt végű kapillárisba forrasztva készülnek leggyakrabban a platina mikroelektrodok. A zárt vég lecsiszolása, a véglapon felbukkanó platina mikrokorong polírozása, az elektrod test kónikusra „hegyezése” után a kapilláris belsejébe helyezett kontaktus huzal rögzítésével fejeződik be az elektrod készítése.

Igen kisméretű, 1-2  $\mu\text{m}$  átmérőjű korongelektrodok készítéséhez ezüsttel bevont úgynevezett Wollaston platina huzal használható. Az ezüst bevonat feloldása a rögzítés után történik az üveg kapillárisba olvasztás előtt. A platina huzal végének beolvasztás előtti elektrokémiai „hegyezésével” a huzalnál jelentősen kisebb méretű korongelektrod készíthető.

Talán a legkényelmesebb módja a szubmikron átmérőjű platina elektrodkészítésnek a kvarc kapillárisba olvasztva végzett „kihúzás”. Ehhez magas hőmérsékletet biztosító lézer pipettahúzó készülék alkalmazása szükséges.<sup>18</sup>

Thie'baud és munkatársai<sup>19</sup> platina mikroelektrod készítésének módszeréről számolnak be. A platinaelektrodokat gyakran alkalmazzák kémiaiailag módosított elektrodok, bioszenzorok alapérzékelőjeként. Ezek készítésekor a platina felületet különböző módosító rétegekkel vonják be. A platina alapérzékelőkre épített kémiaiailag módosított mikroelektrodok készítéséről, alkalmazásairól, sajátosságairól számos tudományos értekezés született.<sup>20,21</sup>

Ralph. N. Adams<sup>22</sup>, a múlt század hetvenes éveiben kezdett voltammetriás neuronkémiai vizsgálatokkal foglalkozni. Észrevette, hogy az élő szervezetekben levő extracelluláris folyadék állandó ionerőssége, pH-ja, vezetőképessége következtében jó voltammetriás alapelektrolitként szolgálhat. Kísérleti állatok központi idegrendszerében történő *in vivo* monoamin neurotranszmitter mérésekhez 150 $\mu$ m átmérőjű szénpaszta illetőleg grafit-epoxi elektrodokat készített. Az ő úttörő munkája nyomán többen sikeresen alkalmaztak szénpaszta, grafit-epoxi szén mikroelektrodokat.<sup>23,24</sup>

*In vivo* kísérletekben a néhány mikrométer átmérőjű szénszálból készített elektrodok bizonyultak sikeresnek. Ezeknek, illetőleg ezek elektromosan előkezelt változatainak alkalmazásában Buda és Gonon<sup>25</sup> jártak élen a múlt század '80-as éveiben. Az első pásztázó elektrokémiai mikroszkópiás mérésekben Engström és munkatársai<sup>26</sup> 10  $\mu$ m átmérőjű szénszál mikroelektrodot használt. Dressman és munkatársai<sup>27</sup> pedig *in vivo* körülmények között dopamin koncentrációt vizsgáltak 1  $\mu$ m átmérőjű szénszál elektrod segítségével.

Szénszál mikroelektrodok bioszenzorok alapérzékelőjeként is alkalmazhatónak bizonyultak. A '90-es években Csöregi és munkatársai<sup>28,29</sup> szénszál mikroelektrodokon, torma - peroxidáz és glükóz - oxidáz enzimeket immobilizálva készítettek mikroméretű enzimelektrodokat. Ge és munkatársai<sup>30</sup> avidin-biotin kötésen keresztüli felületi bioréteg készítés sajátosságait vizsgálták. Összehasonlították a szénszálon és arany felületen készített rétegek sajátosságait. Úgy találták, hogy avidin-biotin kapcsolással immobilizált enzimek aktivitása a biorétegben előnyösen nagy.



## 2.1.2. Ion-szelektív elektródok

A szelektív potenciometriás elektródok fejlesztése több mint száz évvel ezelőtt, Cremer<sup>31</sup> (1906) pH érzékeny üvegelektrod kifejlesztését eredményező kísérleteivel kezdődött. Az üvegelektrod napjainkban is szelektivitását, méréstartományát, egyszerű kezelhetőségét, stabilitását tekintve az egyik legjobb kémiai érzékelő. Széles körben elterjedt, egyike a leggyakrabban alkalmazott analitikai mérőeszközöknek. Kísérletek irányultak más ionok mérésére alkalmas üvegelektrodok készítésére. Jól használható nátriumion-szelektív elektródot Eisenmann<sup>32</sup> írt le elsőként 1957-ben. Ion-szelektív üvegmembránok fejlesztése területén Lengyel Béla<sup>33</sup>, Csákvári és Boksa<sup>34</sup> értek el kiváló eredményeket a hazai kutatók közül.

Az ion-szelektív elektródok fejlődésének fontos mérföldkövét jelenti Pungor és Hollós-Rokosinyi<sup>35</sup> ion-szelektív jodidelektrod kifejlesztéséről szóló közleménye. A Pungor iskola első, különböző anionok mérésére szolgáló elektródjai paraffin membránban diszpergált ezüst-halogenid csapadékot tartalmazó, heterogén mérőmembránnal készültek. Később a paraffin membránt a kedvezőbb mechanikai és elektrokémiai sajátságú, hidegen vulkanizált szilikongumi mátrixképző anyaggal váltották ki. A kifejlesztett anion-szelektív elektródokat a Radelkis hazai cég gyártotta. A Radelkis elektródok voltak világviszonylatban az első, kereskedelemben kapható, nem üvegalapú ion-szelektív elektródok.

A tématerületen elért kezdeti sikereknek köszönhetően mind több kutatóiskola kapcsolódott be az ion-szelektív elektródok kutatásába. Ennek köszönhetően fontos eredmények születtek. Közöttük feltétlenül említést érdemel Frant és Ross<sup>36</sup> europiummal szennyezett lantán-fluorid szilárd, homogén kristály mérőmembránnal készített fluorid-szelektív elektródja. A fluorid ionkoncentráció mérésére szolgáló, jól működő egyszerű módszer abban az időben nem állt rendelkezésre. Ugyanakkor nagy igény jelentkezett laboratóriumi, környezeti mintákban történő fluorid ionkoncentráció mérésre. Nem véletlen, hogy az ion-szelektív fluoridelektrodok rövidesen széles körben alkalmazást nyertek.

A szilárd halmazállapotú ion-szelektív mérőmembránok alkalmazása mellett megjelentek az úgynevezett folyadékmembrán elektródok.<sup>37</sup> Ezek mérőmembránja vízzel nem elegyedő, nem illékony folyadékkal átitatott porózus szűrőmembránból készült, amely különleges felépítésű elektródtestbe foglaltan került alkalmazásra. Az illető folyadék oldott állapotban tartalmazta a mérendő ionnal szelektív

kölcsönhatást mutató anyagot, ionofórt. Az ionofór szerencsés esetben semleges molekula, a potenciometriás válasz szelektivitását így az ionok közötti kölcsönhatás nem zavarja.

Az ionofór és az ionok közötti kölcsönhatásnak a reverzibilis válasz biztosítása érdekében viszonylag gyengének kell lennie, mely rendszerint a szupramolekuláris kölcsönhatások energiatartományába esik. Különböző ionokkal szelektív szupramolekuláris komplexet adó molekulák találásával, szintézisével kapcsolatban igen intenzív kutatások indultak meg és folynak napjainkban is különböző kutatócsoportokban. Az ion-szelektív elektródok válaszában keresztül bizonyos esetekben egyes kölcsönhatások sajátosságaira volt lehetséges kísérleti adatokat nyerni.

Semleges ionofórokkal kapcsolatos fejlesztő munkában W. Simon iskolája<sup>38,39</sup> ért el elsőként kimagasló eredményeket. A Simon iskola dolgozta ki a ma már a klinikai gyakorlatban széles körben alkalmazott valinomicin ionofóros kálium-elektrodokat. Valinomicin ionofórral működő folyadékmembrán káliumelektrodot Stefanac és Simon<sup>40,41</sup> készítették elsőként. Azonban a folyadékmembrán elektródok sérülékenysége, kezelésének nehézkessége többeket arra sarkallt, hogy megkísérelje a folyadékmembránt mechanikailag stabilabb membránnal helyettesíteni. Szilikongumi membránban oldott ionofórral készültek jól működő ammónium- és káliumelektrodok. Azonban széles körben Shatkay<sup>42</sup> és J.D.R. Thomas<sup>43</sup> munkája nyomán kifejlesztett, jól kialakított mérőmembrán, egy lágyított PVC mártix használata terjedt el.

A PVC mártix tetrahidrofuran oldószer alkalmazásával<sup>44</sup> egyszerű eljárást követve készíthető. A PVC oldatába juttatva a többi fontos membrán komponens, a szelektív komplexképző ionofórt, a lágyító anyagot, továbbá a működéshez sokszor szükséges lipofil sót, homogén oldat készül. Ezt alkalmas formába öntve és megvárva míg az oldószer elpárolog, készül el a membrán, amit alkalmas elektródtestre felvive kapjuk az elektródot. A PVC mártix biztosítja a mechanikai stabilitást. Előnyös tulajdonsága, hogy nem lép kölcsönhatásba a mérendő ionokkal, kémiaailag inert, valamint nem elegyedik vízzel. Az ionofórok olyan lipofil szerves molekulák, melyek a mérendő ionnal szelektív komplexet képeznek. Ezen kívül más összetevőknek, a lágyítóknak, a lipofil sónak is fontos szerepe van az ion-szelektív elektródok működésében. Csökkentik az elektromos ellenállást és megfelelő rugalmasságot, mechanikai stabilitást biztosítanak, valamint növelik a szelektivitást. Lágyítóként gyakran használnak bisz(2-etil-hexil)-szebacátot (DOS) vagy 2-

nitrofenil-oktil-étert (oNPOE), lipofil sóként kálium-[tetrakis-4-klórfenil]-borát alkalmazása fordul elő sok esetben.

Napjainkig rendkívül nagyszámú korona éter, kalixarén<sup>45</sup>, kriptand<sup>46</sup>, podand<sup>47</sup> és egyéb típusú ionofór szintéziséről szólnak közlemények. Az egyes mérésekben sikeresen alkalmazható ionofórok egy részét a Fluka cég forgalmazza. Az ionofórok szintéziséről, sajátságairól, az ionofórok és membrán összetevők kombinációjával készített ion-szelektív elektródokkal szerzett tapasztalatokról számos tanulmány jelent meg. Nem célom ezekről összefoglaló képet adni. Inkább itt néhány összefoglaló könyvre, tanulmányra utalok.<sup>48,49,50</sup>

A különböző ionokat mind jobb analitikai jellemzők mellett mérni tudó ionofórok szintézisével, membrán összetételek kidolgozásával, mérő módszerek fejlesztésével foglalkozó kutatásokkal párhuzamosan élettani kutatásokat végző laboratóriumokban és a klinikai területi alkalmazásokat szem előtt tartó, elektródgyártó cégek műhelyeiben intenzív munka folyik ion-szelektív elektródok miniatürizálásával, különleges feladatok megoldására alkalmas mikroelektródok készítésével kapcsolatban.

A miniatürizálási munka több irányban folyik:

- A mikroelektronikai eszközgyártó technológiával rendelkező iskolákban ion-szelektív térvezérlésű tranzistorok (ISFET) változatai készülnek.<sup>51,52</sup>

- Készülnek szitanyomással, vagy vékonyréteg technológiával egyszer használatos, planáris ion-szelektív mikroelektródot tartalmazó cellák különböző feladatok megoldására.

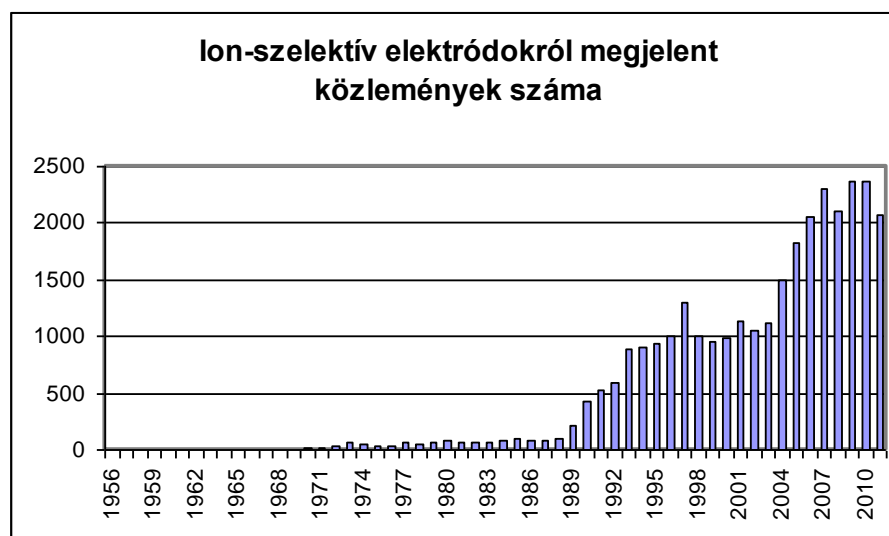
- Készülnek a fenti cellák több elektródos változatai különböző ionokat mérő micro-dot elektródok sorával vagy laterális felbontást lehetővé tevő azonos iont mérő micro-dot elektród hálózattal.<sup>53</sup>

- A mikropilláris elektródok néhány mikroliter klinikai minta elemzésére szolgálnak.

- Utolsóként említem a munkámban készített, fejlesztett, tanulmányozott és alkalmazott ion-szelektív elektród típust. Ez mikroméretű mérőfelülettel rendelkezik, vékony elektródtestre épül, a pásztázó elektrokémiai mikroszkópiában jól alkalmazható. Nevezhető PEKM mérőcsúcs típusú ion-szelektív mikroelektródnak. Ez az elektródforma a kis inváziót okozó *in vivo* ion-szelektív elektródokkal rokon.

Az elkövetkezőkben csak az ilyen, a PEKM mérésekben alkalmazható formátumú, felépítésű mikroelektrodokkal foglalkozó szakirodalomról adok vázlatos képet.

A szakirodalomban meglehetősen nagy gyakorisággal fordulnak elő az ion-szelektív elektrodok. Ennek alakulását láthatjuk az alábbi ábrán a Science Direct, Springer Link és a Web of Science folyóirat portálokon fellelhető tudományos publikációk alapján.



2. ábra Az ion-szelektív elektrodok használatáról, készítéséről megjelent közlemények számának publikálás éve szerinti eloszlása.

### 2.1.2.1. Az elektrokémiai mikroszkópiában alkalmazható különböző felépítésű ion-szelektív mikroelektrodok

Amint említettem az *in vivo* élettani vizsgálatok céljaira készített ion-szelektív mikroelektrodok egyes típusai felépítésüknek köszönhetően az elektrokémiai mikroszkóp mérőcsúcs befogószerkezetéhez rögzíthetők. Alkalmazásukkal pásztázó elektrokémiai mikroszkópiás vizsgálatok végezhetők. Az ilyen elektrodok kifejlesztése azonban évtizedekkel megelőzte ezen technika bevezetését. Az

említett elektródok három csoportba sorolhatók. Az egyik csoportba tartozó elektródok  $H^+$  vagy más kationok mérésére alkalmas üveg mérőcsúccsal készülnek. A másik csoportba a fémet tartalmazó mérőcsúcsú potenciometriás elektródok, míg a harmadik csoportba az ion-szelektív mikropipetták tartoznak.

#### 2.1.2.1.1. Üvegmembránnal készült mikroelektródok

Tarisznyarák nagyméretű izomnyalábjában történő pH mérés céljára Caldwell<sup>54</sup> készített, a hagyományos elektródokhoz hasonló felépítésű miniatürizált üvegelektrodot. A vékony kapilláris elektródtest és a kisméretű mérő gömböcske azonos összetételű üvegből készült. Az elektródtest szigetelését lakk bevonattal oldotta meg.

Hinke<sup>55</sup> nátrium- és káliummérő üvegekből túszerű mikroelektródokat készített. Az elektródokkal intracelluláris ionaktivitás méréseket igyekezett végezni. 100  $\mu m$  hosszú beforrasztott végű pipettákból állt a mérőcsúcs. Talán nem felesleges megjegyezni, hogy ilyen hosszú elektróddal nem érhető el elektrokémiai mikroszkópiás mérésekhez szükséges sztérikus felbontás. Lev és Buzhinsky<sup>56</sup> szigetelő, ragasztó gyanta alkalmazásával sikeresen csökkentette a mérőfelület mélységét néhány mikrométerre, azonban az elektród mérete még így is meghaladta az átlagos méretű sejtben való mérést lehetővé tevő nagyságot.

Thomas<sup>57</sup> elektródtestként szolgáló nyitott üvegkikapilláris belsejébe vezetve bezárt végű ion-szelektív üvegből készült mikropipetta alkalmazásával úgynevezett visszahúzó csúcsú (recessed tip) mikroelektródot készített. Pucacco és Carter<sup>58</sup> módszert dolgozott ki arra, hogy a szigetelő üvegből készült nyitott mikropipetta végét igen vékony, igen kisméretű üveg mérőmembrán filmmel vonja be. Ezzel kisméretű, kis mélységű mérőfelületet állítottak elő biológiai szövetekben történő pH mérésekre.

Levy és Coles<sup>59</sup> 4  $\mu m$  mérőcsúcs átmérőjű dupla csövű üvegelektrod készítéséről számol be. Yamaguchi és Stephens<sup>60</sup> elektródkészítéshez egy rövid pH érzékeny üvegkapillárist, szoros illeszkedéssel egy passzív üvegkapillárisba vezettek. Ezt a kettős kapillárist húzó készülékkel mikropipettává formálták. A pH

érzékeny pipetta vége beforradt, így kisméretű, visszahúzott (recessed) érzékelőjű mikroelektrodot kaptak.

NAS 11-18 üvegből készíthetők nátriumion-szelektív üvegelektrodok. Kezdetben káliumion-szelektív üveg mikroelektrodok is készültek NAS 27-8 illetőleg NAS 27-4 üvegekből, de ezek alkalmazása a sokkal kedvezőbb mérés technikai sajátosságokkal rendelkező mikropipetta elektrodok megjelenésével háttérbe szorult.<sup>61</sup>

#### **2.1.2.1.2. Fém tartalmazó potenciometriás mikroelektrodok**

Amint az jól ismert néhány fém/fémoxid felület képes jól definiált potenciometriás pH választ adni. Az illető felületnek megfelelő elektrodtestbe ágyazásával készíthetők pH mérő elektrodok. Közöttük tankönyvi szinten jól ismert az antimon elektrod. Az illető elektrodok miniatürizált változatairól számos közlemény szól.<sup>62</sup>

Bard és munkatársai<sup>63</sup> írják le jól alkalmazható módszert antimon mikroelektrod készítésre. A módszer szerint eljárva megolvasztott antimon fém vastag falú, szűk kapillárisba szívják, majd a lehűlés után az antimont tartalmazó kapillárisból vékony szálat húznak. A kapott szálból mikroszkóp alatt kiválasztva egy szakadásmentes szakaszt, azt elektromos ellenálláshurokkal megolvasztva és tovább vékonyítva készíthető, akár szubmikron méretű üvegtestbe ágyazott antimon mikrokorong elektrod. Érdemes megjegyezni, hogy ez az elektrod a pásztázó elektrokémiai mikroszkópiában amperometriás mérőcsúcsként is alkalmazható. Ez a lehetőség nagy előnyt jelent, ugyanis amperometriás üzemmódban az ott jelentkező visszacsatolási hatás lehetőséget nyújt a felület – mérőcsúcs távolság mérésére, azaz az elektrod pozícionálására. A kettős funkciójú antimon mérőcsúcs alkalmazásáról számos tanulmány szól.

Iridium-dioxid film bevonatú pH mérő mikroelektrodok sikeres készítéséről, alkalmazásáról többen számolnak be.<sup>64,65</sup>

Több cég forgalmaz irídium-oxid film bevonatú mérőfelületű „szilárd” pH mérőelektrodot. Ezek mérőfelülete gyakran a mikroelektrodok mérettartományába esik. Bezbaruah<sup>66</sup> irídium-dioxidos pH mikroelektrodja elektrokémiai redukcióval készített mérőfelületet alkalmaz.

Kis átmérőjű ezüst huzal alkalmazásával készültek biológiai vagy elektrokémiai mikroszkópiás célokra másodfajú mikroelektrodok. Így Mauro<sup>67</sup> tintahal (squid) óriás axonjában mért kloridion koncentrációt 15 µm átmérőjű ezüst huzal felhasználásával kialakított ezüst/ezüst-klorid elektróddal.

Sokkal kisebb mérőfelületű ezüstelektrodot készítettek Kerkut és Meech.<sup>68</sup> Úgy jártak el, hogy ammóniás ezüst-nitrát oldatot juttattak boroszilikát üveg mikropipetták belsejébe, majd a pipettákat 20%-os formalinoldatba helyezték. A szűk pipetta nyíláson bejutó formalin redukálva az ezüstionokat egy fémezüst dugót képzett a pipettahegyben.

Saunders és Brown<sup>69</sup> ezüst huzal végét „kihegyezte” lúgos nátrium-cianid oldatban végzett kontrollált cellafeszültség alkalmazása melletti elektrolízissel. A hegyes huzalvéget megfelelő elektródtestbe ragasztva készített a kloridion koncentráció mérésére alkalmas mikroelektrodot.

Denuault és munkatársai<sup>70</sup> 50 µm átmérőjű ezüst/ezüst klorid korongelektrodot használtak a pásztázó elektrokémiai mikroszkópiás méréseikben. Sikertelenül meghatározniuk az elektród közelében lévő polianilinfilm redox ciklizációja során a beépülő, illetőleg felszabaduló kloridionok fluxusát.

### **2.1.2.1.3. Ion-szelektív mikropipetták**

Üveg mikropipettákat biológiai, mikrobiológiai kísérletekben, biotechnológiai munkák különböző területein szövettani, farmakológiai vizsgálatokban gyakran használnak. Sejtek, sejt szervecskék izolálására, anyagok különböző mikrokörnyezeti helyekre történő bejuttatására nehéz volna jobb eszközt találni az átlátszó, szinte tetszőleges alakú, méretű formában könnyen elkészíthető pipettáknál. Használatosak nyitott végű pipetták iontoforetikus anyag bejuttatásra vagy lokális elektromos potenciál különbségek nyomon követésére is.

A kísérletes élettudományok művelői üveg mikropipettákat használtak a saját céljaikra jól használható elektródforma kialakítására. Ezzel létre jöttek az ion-szelektív mikropipetták.

Az analitikai mérőérzékelők, így az ion-szelektív érzékelők fontos tulajdonságai a koncentráció válasz (itt elektród potenciál - loga jel függvény), a

szelektivitás, az alsó méréshatár, a kalibrációs görbe meredeksége, a dinamikus méréstartomány és a válaszütem.

Az ion-szelektív elektródok esetében az analitikailag fontos jellemzők közül kitüntetett jelentőségű a potenciál válasz, a stabilitás, a reprodukálhatóság, az elektródok pH és redox érzékenysége és a válaszütem.

Amint az jól ismert a potenciometriás elektródok esetében a mérendő ionaktivitás és az elektródpotenciál közötti összefüggést a Nernst-egyenlet írja le (2).

$$E = E_i^0 + \frac{RT}{z_i F} \ln(a_i(I)) \quad (2)$$

Ahol az  $E_0$  a standard potenciál,  
 $R$  az egyetemes gázállandó,  
 $F$  a Faraday-állandó,  
 $T$  a hőmérséklet,  
 $z_i$  az ion töltésszáma,  
 $a_i(I)$  pedig az elsődleges ion aktivitása

Tíztes alapú ionaktivitási skálát figyelembe véve egyértékű ionok esetében ( $z_i=1$ ) egy nagyságrend ionaktivitás változás 59,2 mV elektródpotenciál változást eredményez 25 °C-on. Míg pH-mérő üvegelektrodok esetében ez az elméleti „válaszmeredekség” rendszerint teljesül, ion-szelektív mikropipetták kalibrációs görbéjének meredeksége rendszerint eltér ettől. 54/ $z$  mV/dekád körüli érték esetében az elektród működését a koncentrációmérés gyakorlatában megfelelőnek tartjuk.

A válaszgörbe meredeksége az igen kis koncentrációk tartományában jelentősen csökken (szub-Nernsti meredekség), bizonyos esetekben pedig meghaladja az elméleti értéket (szuper-Nernsti meredekség).

A jelenséget Sokalski, Pretsch<sup>71</sup> és Lewenstam<sup>72</sup> vizsgálatai alapján, a membránon keresztüli iontranszport hatásának tulajdoníthatjuk. Kis koncentrációk esetében az elektród belső töltetében nagyobb az ionaktivitás, mint a mintaoldatban. Ez a membránon keresztüli diffúzió hajtóerejeként jelentkezik. A belső töltetből az ionofór segítségével a minta-mérőmembrán határfelületre diffundáló ionok megnövelik a tényleges ionaktivitást a mérőfelületen. Ennek következtében a minta koncentrációjának csökkenésével nem jár együtt a



határfelületi koncentráció azonos méretű csökkenése. A szuper-Nernsti meredekség magyarázata a fentiekhez hasonló. Ha a belső töltetben az illető ion aktivitása rendkívül kicsiny, akkor ellenkező irányú a membránon keresztüli diffúzió hajtóereje. A mérőfelületi ionok koncentrációját csökkenti a diffúzió. Ez természetesen a látszólagos meredekség növekedését okozza.

A kis koncentrációk mérése esetén, a fentieknek megfelelően előnyös, ha a belső töltet saját ion koncentrációja nem különbözik nagymértékben a minta koncentrációtól. Ekkor a szuper-Nernsti meredekség nem jelentkezik és az alsó méréshatár jelentősen kiszélesedik a kis koncentrációk irányában. Tehát az alsó méréshatár kiszélesítése érdekében az elektród belső töltetében többen alkalmaznak komplexképző ligandumot a szabad saját ion koncentráció értékének beállítására. Az ion-szelektív mikropipetták alsó méréshatárának komplexképzőt tartalmazó belső töltettel történő kiszélesítésével kapcsolatos vizsgálatokról számolnak be Södergard és munkatársai<sup>78</sup>.

A szelektív potenciometriás elektródok másik, analitikailag fontos sajátossága a szelektivitás. Ion-szelektív mikropipetták esetében a szelektivitás lényegében az alkalmazott koktél által meghatározott. Kismértékben az úgynevezett „csúcs potenciál” befolyást gyakorolhat a szelektivitásra.

#### **2.1.2.1.3.1. Ion-szelektív mikropipetták néhány fajtája**

Az élettani vizsgálatok céljaira alkalmazott kálium-szelektív mikropipettákban a korábbiakban a Corning cég által forgalmazott, kálium-tetrafenil-borátot tartalmazó koktélt használták. Az igen kedvező szelektivitást biztosító ionofórok kidolgozásában Simon<sup>73</sup> csoportja végzett úttörő munkát. A napjainkban széles körben alkalmazott kálium-szelektív elektródok az ő általuk bevezetett valinomicin ionofóron alapulnak. Pungor<sup>74</sup> csoportja biszkoronaéter típusú, BME 44-nek nevezett semleges ionofórt alkalmazott káliummérésre készített mikropipettákban.

Gyurcsányi<sup>75</sup> és munkatársai potenciometriás PEKM méréshez fejlesztettek ki szilárd kontaktusú káliumion-szelektív elektródot. Ez egy 8  $\mu\text{m}$  átmérőjű szénszálat tartalmazott kónikus végű üvegtestbe forrasztva. A kapilláris elkeskenyedő véglapját lecsiszolták, hogy megjelenjen a szénszál mikrokorongként. A véglapot polírozták,

majd vezetőpolimer sajátosságú polipirrol réteggel vonták be. A polipirrol film biszkoronaéter típusú ionofór anyagot – BME 44-et – tartalmazott. Ez az elektród jól működő káliumion-szelektív elektródnak bizonyult. A kálium mikropipetta elektródoknál ez az elektród lényegesen nagyobb mérőcsúcs átmérővel rendelkezik, ami természetesen előnytelen.

Kalciummérésre használt korai mikroelektródok mérőmembránja dialkil foszforsavval kevert dioktilfenil-foszfónatot tartalmaztak ionofórként. Brown<sup>76</sup> és munkatársai olyan kalcium elektródról számolnak be, mely készítéséhez di-p-(1,1,3,3-tetrametilbutil)–fenil foszforsavval kevert di-n-oktil-fenilfoszfónatot alkalmaztak ionofórként. Simon csoportja<sup>77</sup> az ETH 1001-nek nevezett ionofórt találta leginkább alkalmasnak kalciumion koncentrációt mérő PVC mátrixú elektród készítéséhez. Az ETH 1001 ionofórt tartalmazó, kalcium mikropipetta elektród készítésére szolgáló koktélt a Fluka cég forgalmazza. A kalciumion-szelektív mikropipetta elektród alsó méréshatárának kiterjesztésével kapcsolatos eredményekről számolnak be Södergrad<sup>78</sup> és munkatársai. Ammónium-ion aktivitás mérésére nonaktin alapú ionofór bizonyult előnyösnek. Ammóniumion-szelektív mikropipetták alkalmazásáról számos közlemény szól.

Fontossággal bír a lítium-ion koncentráció mérése is. Lítium-ionokat a mániás depresszió kontrollálására lehet alkalmazni.<sup>79</sup> Ugyanakkor a terápiás dózis szint lítium-ionok esetében igen szűk. A lítium-ion koncentráció mérése szükséges a terápiás dózis beállításához.

A pH mérés során használt üvegelektródok élen járnak más eszközökkel szemben a szelektivitásuk és élettartamuk tekintetében, ennek ellenére a mikroméretű üvegelektródok elkészítése kissé bonyolult és nagy odafigyelést igényel. A pH mérésére is sok esetben ion-szelektív mikropipettákat használnak. A pH mérő mikropipetták ion-szelektív koktélnak ionofórként semleges tridodecil-amint tartalmaz.<sup>80</sup> Klusmann és Schultze<sup>81</sup> használtak üveg mikropipetta elektródot PEKM mérés során lokális pH profil tanulmányozásához. Az általuk használt elektród mérőcsúcsa 1  $\mu\text{m}$  átmérőjű volt. Az elektród készítéséhez a Fluka cégtől vásárolt hidrogén ionofór II-koktél A –t használtak.

### 2.1.2.1.3.1.1. Ion-szelektív cinkelektrodok

Munkámban új típusú ion-szelektív mikropipettákat készítettem és használtam. Ezért e helyen rövid áttekintést adok a potenciometriás cinkelektrodok sajátosságairól, alkalmazásáról szóló irodalmi előzményekről.

A cink az élővilágban esszenciális nyomelem. Az emberi test minden szövete tartalmaz cinket, így testünkben a cink összes mennyisége 2,3 g körül van. Több mint száz enzim működése függ a cink jelenlététől. A cink például fontos szerepet játszik a DNS-transzkripcióban, és az inzulin hormon is tartalmaz cinket.

A cink az emberi táplálék fontos nyomeleme. Számos iparág, így a vegyipar, a festékipar, elektronikus eszköz- illetve elemgyártás használ cinket. A fentiek miatt a cinknek különböző mintákban történő meghatározása az analitikai kémia egyik fontos feladatát jelenti. A feladat megoldására számos módszer kidolgozására került sor. Közülük legszélesebb körben az atomspektroszkópiai módszereket alkalmazzák. A cink-ionok higanyelektrodon redukálhatók, így különböző polarográfias módszerek is alkalmazhatók mérésükre.

Potenciometriás cinkion-szelektív elektrodok kifejlesztésére, alkalmazására is sor került. Zamani<sup>82</sup> és munkatársai olyan cinkion-szelektív elektródról számoltak be, mely PVC membránból készült, és 5,6-benzo-4,7,13,16,21,24-hexaoxa-1,10-diazabiciklo [8,8,8]hexakosz-5-én (BHDE) kriptand ionofórt tartalmazott. Ezt az elektródot sikerrel alkalmazták egyrészt komplexometriás titrálások végpont-indikálására, másrészt galvánfürdőkből származó ipari szennyvizek cink-ion tartalmának ellenőrzésére.

PVC mátrixban<sup>83</sup> elosztatott porfirin származék ionofórt tartalmazó membrán alkalmazásával is készültek ion-szelektív cinkelektrodok.

A cinkion-szelektív elektrodok kifejlesztésére irányuló kutatások főleg környezetvédelmi-, klinikai- vagy élelmiszer analitikai perspektivikus alkalmazási területeket céloztak. Ritkábban szerepeltek az alkalmazások között korróziós folyamatok vizsgálatával kapcsolatos<sup>84</sup> mérések. Cink rétegeket, filmeket vagy diszpergált cink részecskéket tartalmazó anyagrétegeket gyakran használnak katódos korrózióvédelem céljára. A cink „önfeláldozó” korrózióvédő sajátosságának vizsgálatára a közelmúltban pásztázó vibrációs referencia elektródos (Scanning Vibrating Electrode Technique - SVET)<sup>85,86,87</sup> és pásztázó elektrokémiai mikroszkópiás technika (Scanning Electrochemical Microscopy - SECM)<sup>88,89</sup> alkalmazására került sor.

A cinkion-szelektív PEKM mérőcsúcs kifejlesztésére irányuló munkánkban a mikropipetta elektródforma alkalmazását volt célszerű választanunk ugyanis az ion-szelektív mikropipetta elektródok<sup>90,91</sup> e területen is számos fontos előnnyel rendelkeznek. Az elektródforma fő előnye az, hogy nagyon kis mérőcsúcs átmérőjű - gyakran a nm tartományba eső – hegyet is kialakíthatunk. Az elkészítés technikája univerzális. A mérő "koktél" összetételétől függ, hogy milyen ionra szelektív választ ad az elektród. Így azonos készítmény alkalmazásával többféle ion mérésére alkalmas elektródokat lehet preparálni. Meg kell említenünk, hogy az ion-szelektív mikropipetták néhány előnytelen tulajdonsággal is rendelkeznek. Hátrányos nagymértékű törékenyséjük, és rövid élettartamuk. Mechanikai hatásokra, elektromos sokkra rendkívül érzékenyek, élettartamuk pedig ritkán hosszabb néhány napnál. Így készítésüket a felhasználás előtti időre célszerű időzíteni és használatuk nagy gondosságot igényel.

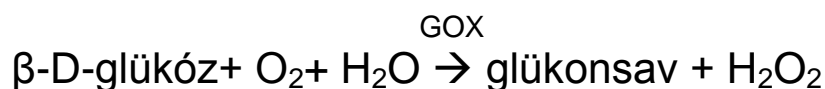
A PEKM mérésekben történő alkalmazás szempontjából hátrányt jelent, hogy minél nagyobb a mérőcella ellenállása, annál hosszabb időre van szükség az illető helyen uralkodó ionaktivitás értékének megfelelő elektródpotenciál kialakulásához.

Így kicsiny, tehát nagy ellenállású mikropipetta alkalmazása esetében csak lassú pásztázás mellett készíthető torzításmentes kémiai mikroszkópiás kép. Továbbá nagyobb ellenállású mérőkör igen érzékenyen reagál az elektromos zajokra. Denuault és munkatársai<sup>92</sup> munkája ad képet a potenciometriás mikropipetta csúcsokkal végezhető PEKM mérések előnyeiről és nehézségeiről.

### **2.1.3. Enzimelektrodok**

Az első bioszenzort Clark<sup>93</sup> készítette 1962-ben oxigén alapérzékelő alkalmazásával. Az elektród glükóz koncentráció mérésére szolgált. Készítése során Clark az általa korábban kifejlesztett amperometriás oxigén elektródot használta alapérzékelőként. Mint az jól ismert a Clark-féle oxigénelektrod platina munkaelektrodra épül, amely mérőfelületét a mintától egy csak gázok számára átjárható membrán választja el. Clark a gázáteresztő membrán mérőfelületén immobilizált glükóz-oxidáz enzimet tartalmazó filmet alakított ki.

Az elektród működése a



enzim katalizálta reakción alapul.

Clark eredeti elektródja az elektród felületén jelentkező oxigén koncentrációval lineáris függvénykapcsolatban levő amperometriás áramot, az oxigén redukció határáramát jelezte. Nagy glükóz koncentráció kicsi áramintenzitást eredményezett, ugyanakkor a mintaoldat eredeti oxigénkoncentrációja befolyást gyakorolt az áram intenzitására. Ez a két jellemző előnytelen.

Célszerűnek látszott a glükóz-oxidáz enzim által katalizált reakcióban keletkező hidrogén-peroxid detektálás alapján működő glükózmérő enzimelektrodot készíteni. E munkában a kezdeti lépéseket Guilbault csoportja<sup>94</sup> tette meg. Ők platinaelektrod mérőfelületére közvetlenül felvive poliakrilamid gélben immobilizált glükóz-oxidáz enzimet készítettek glükózmérő bioszenzorként. A platina munkaelektrodon alkalmas pozitív elektródpotenciált beállítva detektálták a hidrogén-peroxid oxidációs áramát. Ezzel kis koncentrációk esetében igen kicsiny jelet kaptak és bizonyos oxigén koncentráció felett a mintaoldat oxigénkoncentrációjától függetlenné vált az elektród válasza. Az oxigén és különböző szerves szubsztrátok – alkoholok, aldehidek, aminosavak, stb.- közötti hidrogén-peroxidot eredményező reakciót katalizáló oxidáz enzimek száma meghaladja a negyvenet. Ennek megfelelően az oxidáz enzim katalitikus hatását kihasználva számos más anyag mérésére készültek a glükóz elektródhoz hasonló felépítésű, hasonló működésű enzimelektrodok.<sup>95</sup>

A hidrogén-peroxidot detektáló amperometriás elektrodok hátrányos tulajdonsága, hogy a mintaoldatban jelenlevő más, az adott potenciálon elektroaktivitást mutató anyagok is amperometriás jelet adnak. Így a szubsztrát mérését zavarják. A zavaró hatás kiküszöbölésére több megoldás is született. Többen alkalmaztak torma-peroxidáz enzimet a reakciórétegben.<sup>96</sup> Ezt a hidrogén-peroxid oxidálja. Az oxidált enzim a platina elektródon redukálható, így a redukciós potenciálon az oxidálható anyagok nem zavarják a mérést. Más megoldás szerint<sup>97</sup> a platinaelektrod felületén méretkizárásos membránt lehet alkalmazni, melyen a hidrogén-peroxid kismolekula átjut, de a zavaró nagyobb méretű molekulák nem tudják megközelíteni az elektród felületét.

Az ez ideig kidolgozott és alkalmazott nagyszámú amperometriás enzimelektrod mellett számos potenciometriás alapérzékelőn alapuló biokatalitikus elektródot is kidolgoztak. Közöttük elsőként a kation-szelektív üvegelektrodra épülő karbamid elektródról jelent meg közlemény.<sup>98</sup> Az elektród működése az alapelektrod felületét burkoló, immobilizált ureáz-enzimet tartalmazó réteg katalitikus hatásán alapul. Az ureáz által katalizált hidrolízisben ammóniumionok keletkeznek. Ezt detektálja az alapérzékelő.<sup>99,100</sup> A karbamidelektrod számos továbbfejlesztett változatáról nagyszámú dolgozat szól.<sup>101,102</sup>

Készültek potenciometriás enzimelektrodok pH érzékeny üvegelektrodon, ion-szelektív jodid elektródon,<sup>103</sup> cianid elektródon stb. Ezen elektródok gyakorlati alkalmazása azonban lényegesen szűkebb körű, mint az amperometriás elektródoké. Ennek oka a kevésbé kedvező alsó méréshatárban és a nagyobb válaszidőben keresendő. Potenciometriás ion-szelektív mikropipetta elektródon alapuló bioszenzorról igen ritkán jelennek meg közlemények.

Munkámban méretkizárásos réteggel ellátott platina mikroelektrodra épülő glükózelektroddal végeztem méréseket. A bioszenzorok fejlődéséről, alkalmazásairól, fajtáiról szóló igen szerteágazó szakirodalomról nem kívánok összefoglaló képet adni.<sup>104,105</sup>

A biokatalitikus szelektív szenzorok fontos szerkezeti egysége az alapelektrod felületén kialakított reakcióréteg. Ez tartalmazza a szubsztrát és az irány szelektív reakciót katalizáló bioszenzort immobilizált formában. Az érzékelő működése a reakciórétegben lejátszódó kémiai reakción alapul. A mérendő anyag (szubsztrát) és a reakció partner/ek bejutnak a reakciórétegbe, ott a biokatalizátor hatására reakcióba lépnek. Lokális koncentrációváltozás jön létre. Ezt detektálja az alapérzékelő. A reakcióréteg szerkezete, vastagsága jelentős hatást gyakorol az érzékelő működésére. A reakcióréteg készítésének módjaival, működésével igen kiterjedt irodalom foglalkozik. Itt csak megemlítem, hogy az enzim immobilizálásnak a szenzorkészítésben használt módszereit négy csoportba szokás sorolni. Az immobilizálás történhet nagy fajlagos felületű rétegen történő adszorpcióval, kialakítható a nagyméretű enzim molekulák transzportját gátló, a mátrix anyagból képzett térhálóval, - dialízis membránnal gátolhatjuk az enzim eltávozását- és kialakítható alkalmas reagenssel kovalens kötés a mátrix anyag és az enzim molekula között. Az iparban szokásos a biokatalizátort mikrokapszulába zárt formában is alkalmazni. Ez a szenzorok esetében azonban kevésbé elterjedt. Munkámban glutáraldehid bifunkciós reagens segítségével térhálósított glükóz-

oxidáz réteget használtam glükóz-mikroelektród készítéséhez. Ez a módszer a bioszenzorok készítése területén jól ismert, széles körben alkalmazott.<sup>106,107</sup>

### **2.1.3.1. Glükóz diffúziós koefficiensének mérésével kapcsolatos előzmények**

Mint ismeretes a glükóz élettani folyamatokban rendkívül fontos szerepet játszik. Ennek megfelelően a különböző közegekben végbemenő glükóz transzport sebessége fontos adat fiziológiai folyamatok tanulmányozásához vagy biotechnológiai lépések optimálásához.

Növényi és állati szövetekben, sejt szuszpenziókban a glükóz felvételét különböző aktív transzport mechanizmusok szabályozzák. Ugyanakkor a kémiai potenciál által „hajtott” passzív transzport, a diffúzió is fontos eleme a transzportnak.

Különböző membránokon vagy géleken keresztül történő diffúzió koefficiensének mérésére gyakran egymástól az illető membránnal elválasztott, kétkompartmentű diffúziós cellát használnak. Alkalmas módon különböző időben mérik a donor és az akceptor rendszerben a vizsgált komponens koncentrációját. A különböző elrendezésű diffúziós cellákban általában lassú és bonyolult a mérés. Fontos, hogy a diffúziós közeg vastagsága ismert és állandó legyen. Zhang és Furusaki<sup>108</sup> egyik tanulmányukban összehasonlították a diffúziómérésre kialakított cellákat.

Mint az jól ismert a voltammetriás kísérletekben kapott áramerősség értéket megszabó paraméterek között az elektródon átalakuló anyagféleség diffúziós koefficiensé - gyakran annak négyzetgyöke - szorzó tényezőként szerepel.

Ennek megfelelően számos voltammetriás módszer – így a polarográfia, kronoamperometria, DC voltammetria - alkalmas a diffúziós koefficiens mérésére. Az elektródfolyamatok azonban rendszerint számos konszekutív lépésből álló komplex heterogén folyamatok. Így a voltammetriás mérések csak akkor adnak megbízható diffúziós együttható értékeket, ha az elektródfolyamatban a diffúzió a sebesség –meghatározó lépés.

A glükóz esetében az elektrokémiai diffúziós együttható mérési módszerek alkalmazása nehézségbe ütközik. A glükóz vizes oldata nem mutat elektroaktivitást savanyú és semleges közegekben a hagyományos voltammetriás elektródokkal elérhető potenciál ablak tartományában. Lúgos közegben réz- és nikkellelektrodokon egyes cukor komponensek, köztük a glükóz is koncentráció-mérést lehetővé tevő oxidációs hullámot adnak.<sup>109</sup> Lúgos közegben ugyanis ezen elektródok mérőfelületét elektrokatalitikus sajátosságú fém-oxid film vonja be. Az elektrokatalitikus oxidáció során nem keletkezik az elektród felületet passziváló bevonat. Az elektrokatalitikus oxidáció azonban bonyolult reakciómechanizmust követ. A diffúziós koeficiens voltammetriás mérési módszereinek összehasonlító vizsgálata<sup>110</sup> mutatta, hogy az egyes módszerek nagy bizonytalanságú eredményeket szolgáltatnak. Fontos szempont a módszerválasztáshoz az is, hogy fontosabb adat a semleges közegben mutatkozó passzív transzportot jellemző diffúziós koeficiens.

A pásztázó elektrokémiai mikroszkópiás módszer kifejlesztése egy korábban kidolgozott diffúziós koeficiens-mérő módszer megbízhatóságát, pontosságát, egyszerűségét növelve az illető módszert jelentősen vonzóbbá teszi. Az illető módszer az elektrokémiai repülési idő módszer (Electrochemical Time of Flight method - ECTOF). Angol kezdőbetűs névvel nevezhetjük a módszert SECM-TOF módszernek.

Az elektrokémiai repülési idő módszer nevet Feldman és munkatársai<sup>111</sup> vezették be. A TOF módszerek alkalmazásakor a vizsgált anyag egy forrás és egy az anyag koncentráció mérésére alkalmas detektor közötti, a vizsgált közeget tartalmazó diffúziós úton „repül”. A detektor által adott időpontban mért koncentrációtól függő jel és az idő közötti függvénykapcsolat alapján történik a diffúziós koeficiens kiszámítása a repülési távolság és szükséges más adatok ismeretében.

Slowinska és munkatársai<sup>112</sup> mikrosávós elektródokat, galvanosztikus generálást és potenciometriás detektálást használtak a diffúziós együtthatók mérésére. Bard és munkatársai<sup>113</sup> valamint Fosset és munkatársai<sup>114</sup> foglalkoztak az EC-TOF mérések elméletével. Mosbach kutató csoportja<sup>115</sup> kálium-hexaciano-ferrát és ferrocén részecskék diffúziós sajátosságát vizsgálta nagy pontossággal pozícionált forrás egység segítségével detektáló mikroelektrod közelébe bejuttatva az anyagok oldatát. Mirkin és munkatársai<sup>116</sup> bróm-ionok diffúziós koeficiensét mérték AgBr



filmben EC-TOF módszer segítségével. Munkájukban 50-200 ms ideig tartó elektródpotenciál impulzust alkalmaztak korong alakú Ag / AgBr generátor elektródon, és mérték az időt, míg az ionok átlépik a generátor és az érzékelő elektród közti „repülési hézagot”. Összehasonlították a vízben és AgBr - ban mért diffúziós koefficiens értékeket.

Ralph Adams<sup>117</sup> laboratóriumában a múlt század nyolcvanas éveiben különböző neurotranszmitter anyagok és azok metabolitjainak *in vivo* transzport sebességét mérték érzéstelenített kísérleti állatok, patkányok agyának különböző területein. Azokban a kísérletekben pneumatikus ejektor készülékhez kapcsolt mikropipettát használtak forrásként. Detektorként pedig amperometriás grafit mikroelektródot, vagy ion-szelektív mikropipettát. A detektor és a forrás testét egymáshoz rögzítve adott repülési távolságot alkalmaztak. A forrásból igen kisméretű cseppecskét kibocsátva az anyag az agyszöveten keresztül diffundálva jutott el az elektród terébe, majd a gömbi diffúzió sajátosságai szerint eloszlott a közegben. Ennek megfelelően csúcs alakú detektor jel – idő tranziens jelentkezett. A módszer egyszerűsége, gyorsasága előnyösnek mutatkozott, a mérések fontos eredményeket szolgáltatottak. A távolság pontos mérése azonban a mikron skálán nehezen megoldható. Ez hibaforrásként jelentkezett az *in vivo* kísérleteknél.

A Bard és munkatársai<sup>118,119</sup> által kidolgozott pásztázó elektrokémiai mikroszkópos módszer (PEKM) készülék együttese, az elektrokémiai mikroszkóp lehetőséget biztosít számunkra, hogy adott ismert távolságokkal változtassuk a forrás és a detektor közötti repülési távolságot. Így lehetőségünk van számos különböző távolság melletti tranziens nyerni. Ezek értékelésével nagymértékben növelhető az EC-TOF diffúziós koefficiens adatok megbízhatósága.

A multirepülési-idő módszer alkalmazásával kapcsolatban kedvező eredmények születtek<sup>120</sup> a PTE Általános és Fizikai Kémia Tanszékén. Az illető kísérletekben egyrészt elektrokémiailag reverzibilis elektródválaszt adó anyagok coulometriás generálásával, másrészt pneumatikus nanocsepp adagolóval történt a vizsgált anyag bejuttatása. A detektálás amperometriás mikroelektród mérőcsúccsal történt. Megállapítást nyert, hogy a módszer egyszerűsége, viszonylagos gyorsasága mellett azzal az előnnyel is rendelkezik, hogy koherens közegekben, gélekben, iszapban, üledékekben, élő szövetekben történő diffúziómérésre is használható, ugyanis a mérőcsúcs tengelyirányban mozoghat ezekben a közegekben is jelentős szerkezeti sérülés okozása nélkül.

Számos más diffúziós koefficiens mérőmódszer sikeres alkalmazásáról olvashatók közlemények. Az újabbak közül említést érdemel Martin és Unwin<sup>121</sup> dolgozata.

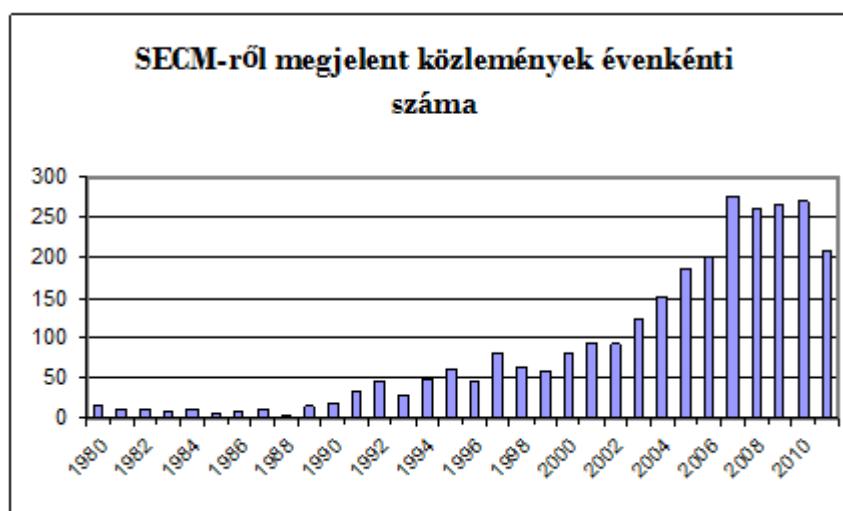
## **2.2. PEKM (Pásztázó elektrokémiai mikroszkópia)**

A mikrovilág vizsgálatának fontos eszközei a mikroszkópok. A hagyományos mikroszkópok elektromágneses hullám és a vizsgált céltárgy kölcsönhatása nyomán adnak számot a céltárgy sajátosságairól. Ezen eszközök felbontása, azaz a legkisebb távolság, amely két szélén látható pontok elkülönülnek, függ az alkalmazott sugárzás hullámhosszától. Kisebb hullámhossz, nagyobb felbontást tesz lehetővé. Ennek megfelelően alakultak ki az elektronmikroszkópiás módszerek. A gyorsított elektron igen kicsiny hullámhossza kedvezően nagy felbontás, nagy nagyítás elérését teszi lehetővé.

Az elektronmikroszkópia napjainkban is igen fontos, széles körben alkalmazott módszer. Hátránya azonban, hogy vákuum szükséges a képképzéshez, ez kizárja élő minták vizsgálatát. Azonban a mikroszkópiás módszerek fejlődése igen intenzív. Az elmúlt néhány évtizedben igen jelentős eredmények születtek. Gondoljunk a NIR (Near InfraRed Spectroscopy) technika, vagy a konfokációs módszerek fejlődésére.

Az 1980-as évek elején Binning<sup>122</sup> és Rohrer svájci kémikusok munkája nyomán egy egészen újszerű mikroszkópiás módszer született, a pásztázó alagút mikroszkópia (PAM, angolul Scanning Tunneling Microscopy STM). Ez a módszer érdekes módon nem elektromágneses sugárzás és az anyag kölcsönhatásán alapul. Ennek megfelelően eltérő sajátosságok vizsgálatát, nagy felbontást tesz lehetővé. A pásztázó alagútmikroszkópia a felfedezése óta eltelt mintegy harminc év alatt a felületi folyamatok vizsgálatára szolgáló egyik legfontosabb eszközzé vált. Működése pásztázó mérőcsúcs, nagy felbontású pozicionáló szerkezet és számítógépes adatgyűjtő, kiértékelő programok kombinált alkalmazásán alapul. A jelet működéséhez a mérőcsúcs és a minta felület közötti alagútáram segítségével képezi. A pásztázó alagútmikroszkóp kifejlesztését rövidesen más pásztázó mérőcsúcson alapuló módszerek követték. Elsőként létrejött az atomerő mikroszkópia (AEM, angolul Atomic Force Microscopy, AFM).<sup>123</sup> Itt a mérőcsúcs és a minta közötti lokális erőhatás detektálásán alapul a jelképzés. Az

elektrokémikusok egyrészt korán alkalmazni kezdték az említett mikroszkópiás módszereket az elektródok felületén lejátszódó folyamatok vizsgálatára, másrészt kifejlesztették a saját vizsgálataikra alkalmas mérőcsúcs mikroszkópiás módszert, a pásztázó elektrokémiai mikroszkópiát (PEKM). A fejlesztő munkában két kutatócsoport végzett úttörő munkát. Engstrom<sup>124,125,126,127</sup> mikroméretű szénszál elektródokkal elsőként tanulmányozott elektród felületek közelében diffúziós profilokat. Bard<sup>128</sup> kutatócsoportja alapvetően hozzájárult a módszer eszközeinek kifejlesztéséhez, a módszerrel kapcsolatos elméletek kidolgozásához és a módszer alkalmazási területének felméréséhez. A módszer nevét is Bard adta. A pásztázó elektrokémiai mikroszkóppal kapcsolatos kutatásairól Bard csoportja közleménysorozatban számol be (Scanning Electrochemical Microscopy 1-60.). A pásztázó elektrokémiai mikroszkópiás területen elért eredményekről kétévenként nemzetközi konferenciát, úgynevezett „workshopot” tartanak. 2013-ban került sor a hetedik összeövetel megrendezésére. A PEKM tématerületen elért eredményekről szóló közlemények évenként megjelenő számáról ad áttekintést a 3. számú ábra.

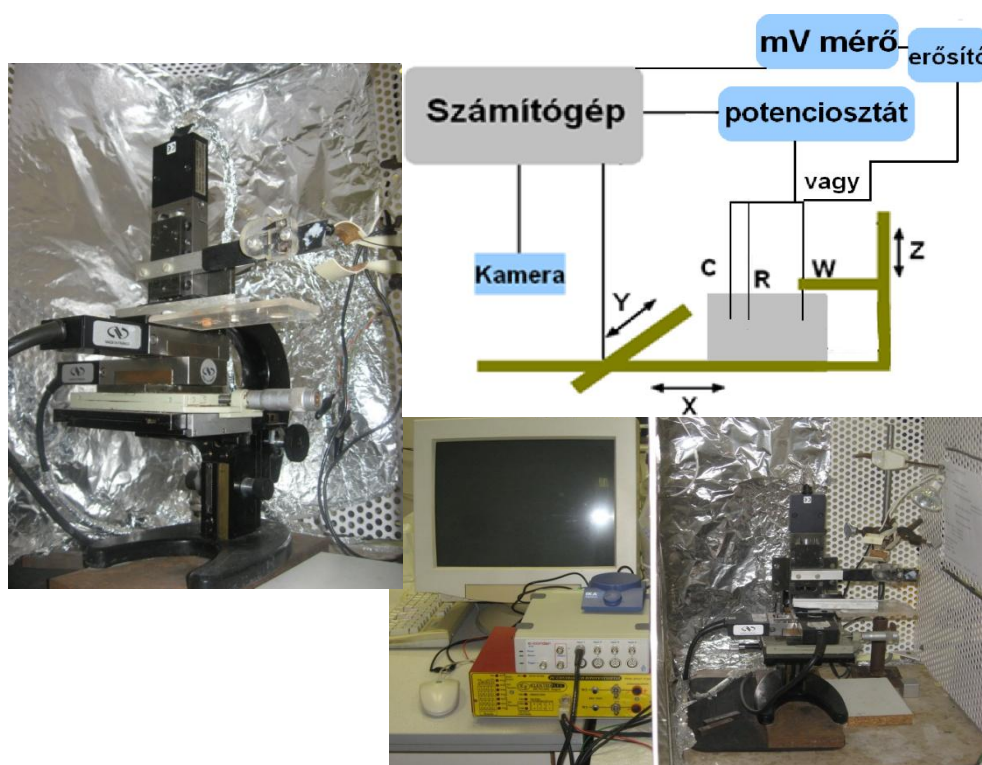


**3. ábra** Pásztázó elektrokémiai mikroszkópia fejlesztéséről, alkalmazásáról szóló publikációk száma éves felbontásban.

A Pécsi Tudományegyetemen, az Általános és Fizikai Kémia Tanszék laboratóriumaiban két pásztázó elektrokémiai mikroszkópiás készülék kialakítására került sor a korábbiakban. Az illető kémiai mikroszkópok három fő részből állnak, egy elektrokémiai mérőállomásból, egy mozgató egységből, és a mérőcellából. A készülékhez számítógép és optikai kamera csatlakozik.

A mikroszkóp működése során a mikroszkóp mikrométerű elektrokémiai érzékelője, mérőcsúcsa a mérési program által meghatározott úton, sorrendben és sebességgel, felkeresi a mérőcellában lévő mérési célpontokat. Ott az illető hely kémiai környezetét jellemző jelet képez. A számítógép tárolja az illető mérési pont koordinátáiból és a hozzájuk tartozó kémiai jelekből álló adatmezőt. Ennek értékelésével készíti el a kémiai mikroszkópiás képet.

Az egyik mikroszkóp pozicionáló egysége mechanikus léptető motorokon alapul. A legkisebb lépés hossz ez esetben 75 nm. A másik készülék piezoelektromos nagyfelbontású lineáris motorokra épül. Ez lehetővé teszi a nanométer tört része hosszúságú lépések alkalmazását is.



4. ábra Pásztázó elektrokémiai mikroszkóp működésének vázlatja és fényképe.

A mérés technika kidolgozása óta intenzív kutatások folynak a pásztázó elektrokémiai mikroszkópia alkalmazhatósági területének felderítésére. Ennek megfelelően egyre bővül a módszer segítségével előnyösen megoldható feladatok köre. Ez ideig három többé-kevésbé elkülöníthető területen bizonyult a technika kivételesen előnyösnek:

- A pásztázó elektrokémiai mikroszkóppal nagy felbontású, kémiai információt hordozó mikroszkópiás kép készíthető különböző céltárgyakról, felületekről. A módszer segítségével koncentráció profilok is megjeleníthetők. Meghatározható segítségével különböző anyagok adott időben jelentkező lokális koncentrációja biológiai rendszerekben, katalitikus sajátságú felületek közelében, gélekben, filmekben. Korróziós folyamatok tanulmányozása során volt segítségemre ez a lehetőség.

- A módszer kivételesen alkalmasnak bizonyult bizonyos fizikai kémiai anyagi jellemzők, transzport koeficiensek, reakció sebességi állandók stb. mérésére, sajátságok tanulmányozására. Talán nem felesleges itt is megemlítenem, hogy a diffúziós koeficiens mérésével kapcsolatos kísérleti munkámban a módszer ezen a területen jelentkező előnyeit sikerült kihasználnom.

- Használható a PEKM mikroméretű felületi struktúrák kialakítására, mint egy mikroeszköz. Létrehozható segítségével mikroüreg, -csatorna, enzim tartalmú „mikropötty” (microdot), adott helyen inaktiválható felületi katalitikus réteg, stb.

A pásztázó elektrokémiai mikroszkópiás technika (PEKM) korróziós folyamatok tanulmányozására szolgáló alkalmazásáról számos közlemény szól.<sup>129,130,131,132</sup> A PEKM-mel (lásd később) kémiai információt tartalmazó, nagy felbontású képeket készíthetünk.<sup>133,134</sup> Információt nyerhetünk különböző folyadékfázisokban, határfelületek, aktív centrumok közvetlen közelében kialakuló koncentráció profilokról.<sup>135,136,137</sup> A legtöbb PEKM kísérlet amperometriás detektálást és voltametriás ultramikroelektrodot alkalmaz mérőcsúcsként. Ion-szelektív elektródos mérőcsúccsal azonban lehetőség kínálkozik az alkalmazható potenciál ablakban elektroaktivitást nem mutató anyagféleségek koncentrációjának szelektív detektálására.

A potenciometriás PEKM technika alkalmazhatóságának igazolására Bard és munkatársai<sup>138</sup> mikroméretű cinkion-szelektív elektródot készítettek. Azzal pásztázva kisméretű cink-ion forrás felett sikerrel jelenítették meg mikroszkópiás kép formájában a kidiffundáló cink-ionok térbeli koncentráció eloszlását. Baston és munkatársai<sup>139</sup> a közelmúltban egy új cinkion-szelektív mikroelektrodot alkalmaztak korróziós folyamatok tanulmányozására.

### 2.3. Diffúzió

A diffúzió egy adott komponensnek többkomponensű rendszerben lejátszódó anyagtranszportja. A diffúzió hajtóereje a kémiai potenciál gradiens. Lévén, hogy a kémiai potenciál (3)

$$\mu = \mu_0 + RT \ln a = \mu_0 + RT \ln c\gamma \cong \mu_0 + RT \ln c \quad (3)$$

jól definiált módon függ a koncentrációtól, mondhatjuk, hogy a diffúziót a koncentráció rendszeren belüli inhomogenitása hozza létre.

A diffúziós anyagáram sajátosságainak leírására Fick törvényeit használjuk. Fick I törvénye azt mutatja, hogy a koncentráció gradiens *grad c* vagy  $\Delta c/\Delta x$  és a felületen időegység alatt átlépő anyagmennyiség, a fluxus (*J*) között egyenes arány áll fenn (4).

$$J = -D \left( \frac{\Delta c}{\Delta x} \right) \quad (4)$$

*D* a diffúziós együttható ( $\text{m}^2/\text{s}$  vagy  $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ), a diffúziós együttható értéke mindig pozitív, és a diffúziós áram mindig a csökkenő koncentráció irányába folyik.

A diffúziós folyamat során e következő koncentráció-változást Fick II törvénye (5) írja le.

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \left( \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \right) \quad (5)$$

Ez a parciális differenciál-egyenlet. Azt mutatja, hogy a koncentráció időbeli változása a koncentráció – hely függvény (*c(x)*) második deriváltjától, azaz a függvény görbületétől függ. Pozitív görbület (homorú *c(x)*) esetében a koncentráció nő az időben, negatív (domború) esetben csökken.

A diffúziós anyagtranszport következtében adott helyen adott időben kialakuló anyagkoncentráció meghatározásához ismerni kell az illető folyamat kezdeti és

peremfeltételeit. A különböző körülmények között kialakuló diffúziós koncentráció profilok számolásával, szimulálásával kiterjedt irodalom foglalkozik. A diffúziós transzport mennyiségi viszonyainak leírásához alapvető fontosságú adat az illető közegben jelentkező diffúziós koefficiens.

Az illető körülményektől függően a diffúziós transzport számos változatát különböztetjük meg. Így a molekuláris diffúzió egyik speciális formája az ekvimoláris szembediffúzió, mely során nincs eredő áramlás, az összmólnyi mennyiség állandó marad, csak a komponensek cserélődnek ki. A másik eset az unimoláris diffúzió, amikor csak az egyik alkotó diffundál egy másik, inert komponensen keresztül. Ezekon kívül találkozhatunk még a radiális irányú diffúzióval, mikor egy anyag egy adott térben minden irányban diffundál.<sup>140</sup>

Akkor beszélünk szabad diffúzióról, ha a vizsgált közeg végtelen méretű, és a diffundáló anyag nem éri el a mintatartó peremét.

### **2.3.1. Diffúziós koefficiens mérés elektrokémiai módszerei**

Különböző anyagoknak különböző közegekben, különböző feltételek mellett mutatózó diffúziós sajátsága fontos anyagi tulajdonság. A diffúziós anyagtranszport meghatározó jelentőségű egyes élettani folyamatokban, környezetszennyező anyagok terjedésében, heterogén katalízist, biotechnológiai lépéseket alkalmazó ipari folyamatokban, elektroanalitikai mérések, elektrokémiai vizsgálatok, technológiai lépések alkalmazása során. Amint az jól ismert, a diffúziós anyagtranszport jellemzésére a diffúziós koefficiens használatos. Ennek megfelelően a diffúziós koefficiens értékének meghatározása kiemelt fontosságú. Napjainkig számos diffúziós koefficiens-mérésre szolgáló módszer kidolgozására, alkalmazására került sor. Sok esetben a méréshez vibrációmentes helyszínen és viszonylag hosszú - a diffúziós profil kifejlődéséhez szükséges - idő kell.

Elektroaktív anyagok diffúziós koefficiensének mérésére előnyösen alkalmazhatók különböző elektrokémiai módszerek. Jól ismert a polarográfiás diffúziós koefficiens-mérési módszer.<sup>141,142</sup> Csepegő higanyelektrodon a különböző fémionok redukciója során mért diffúziós határáram értékét ( $i_d$ ) az Ilkovič egyenlet (6) alapján könnyen felhasználhatjuk a diffúziós koefficiens mérésére, ismerve a redukciós folyamat elektronszám változását ( $n$ ) és egy standard anyagnak az illető

körülmények között mutatkozó diffúziós koefficiensét és a vonatkozó egyéb adatokat.<sup>143</sup>

$$i_d = 708nD^{1/2}m^{2/3}t^{1/6}c \quad (6)$$

Ahol  $i_d$ - a diffúziós határáram,  
 $c$  - a koncentráció,  
 $n$  az elektronszám változás,  
 $m$  a higany kifolyási sebessége,  
 $t$  a csepegési idő

Szilárd elektródon diffúziós karakterű voltammetriás viselkedést mutató elektrokémiai reverzibilis anyagok esetében a voltammetriás csúcsáram intenzitás ( $i_p$ ) értékéből a Randles-Sevcik - egyenlet (7) alapján számolhatjuk a diffúziós koefficiens értékét.<sup>144</sup>

$$i_p = kn^{3/2}D^{1/2}v^{1/2}Ac \quad (7)$$

$i_p$  a csúcsáram értékét,  
 $v$  a polarizáció sebességét,  
 $c$  az elektroaktív anyag koncentrációját,  
 $n$  az elektronszám változást,  
 $A$  az elektród felület nagyságát,  
 $k$  pedig a Randles-Sevcik állandót ( $25\text{ °C}$ -on  $2.687 \times 10^5 \text{ C mol}^{-1}\text{V}^{-1/2}$ ) jelenti

A fenti két jól ismert elektrokémiai diffúziós koefficiensmérő módszer mellett számos más elektrokémiai módszer kidolgozására, alkalmazására került sor.<sup>145,146</sup>

Az elektródreakció során mért adatokból történő diffúziós koefficiensmérés csak abban az esetben ad megbízható eredményt, ha az elektródreakció sebesség meghatározó lépése a diffúziós anyagtranszport és más, a körülményeket jellemző adatok pontosan ismertek. Sok esetben az elektródfolyamat komplikált. Lassú kémiai átalakulások, lassú adszorpció, deszorpció folyamatok, elektród passzíválás bizonytalanná teszik a diffúziós koefficiens mérését.



Általánosan használható és viszonylag egyszerűen elvégezhető, gyors eredményt adó módszer a repülési idő, azaz „time of flight” módszer.<sup>147</sup> Ennek alkalmazásához mikrométerű detektor és mikrométerű anyagdózis beadását lehetővé tevő eszköz, forrás szükséges.

A módszer alkalmazásakor a detektor válaszüdejénél lényegesen nagyobb repülési időt biztosító, jól ismert távolságba helyezük a detektort a forrástól az illető közegben (oldat, gél, üledék stb.). Adott, pontosan regisztrált időpillanatban a forrásból igen kicsi, a vizsgálandó anyagot megfelelő koncentrációban tartalmazó oldatcseppecskét bocsátunk ki. A kibocsátott anyag rezgésmentes térben szférikus diffúzióval tovaterjed. Az illető anyag koncentrációját szelektíven jelző detektoron mért jel – idő függvény csúcs alakú, mutatván hogy a diffundáló anyag megérkezik a detektor felületére, majd tovább terjedve koncentrációja lecsökken az illető helyen.

Feltételezve, hogy a kibocsátott csepp sugara elhanyagolható a forrás – detektor távolsághoz képest, egyszerű egyenlet vezethető le a kibocsátási idő és a csúcs megjelenési ideje közötti repülési idő,  $\Delta t_{max}$  értékére. Az illető, a diffúziós koefficiens kiszámítását lehetővé tevő összefüggés a szférikus diffúzió általános egyenletéből (8) könnyen kiszámítható. Amint az ismeretes, ha pontszerű forrásból  $M$  mólnyi anyag  $t=0$  időpillanatban indulva a gömbi diffúziós transzport sajátosságait követve terjed homogén közegben, akkor az illető anyag koncentrációja  $t$  időpillanatban a forrástól  $d$  távolságban ( $C_{d,t}$ ) az alábbi egyenlettel adható meg.

$$C_{d,t} = \frac{M}{8(\pi Dt)^{3/2}} \exp\left(-\frac{d^2}{4Dt}\right) \quad (8)$$

Egy adott  $d$  távolságban az egyenlet alapján meghatározhatjuk a koncentráció maximum ( $C_{max}$ ) megjelenésének ( $t_{max}$  illetve  $\Delta t_{max}$ ) idejét.

Képezzük a (8) függvény első,  $t$  szerinti deriváltját, majd tegyük azt egyenlővé nullával (9).<sup>148</sup>

$$\frac{d}{dt} \left( \frac{u}{v} \right) = \frac{v \frac{du}{dt} - u \frac{dv}{dt}}{v^2}$$

$$\begin{aligned}
0 = \frac{dc}{dt} &= M \frac{\left[ \exp\left(\frac{-d^2}{4Dt}\right) \times \frac{d^2}{4Dt^2} \times 8(\pi Dt)^{3/2} \right] - \left[ \exp\left(\frac{-d^2}{4Dt}\right) \times 8 \frac{3}{2} (\pi D)^{3/2} \times t^{1/2} \right]}{64(\pi Dt)^3} \\
&= M \frac{\left[ \exp\left(\frac{-d^2}{4Dt}\right) \times 8(\pi Dt)^{3/2} \left[ \frac{d^2}{4Dt} t^{3/2} - \frac{3}{2} t^{3/2} \right] \right]}{64(\pi Dt)^3} \quad (9)
\end{aligned}$$

Amint az látható a kifejezés csak úgy lehet nulla, ha a számláló második tényezője nulla. Tehát ebből igen egyszerű összefüggés adódik (10).

$$\frac{d^2}{4Dt^{1/2}} = \frac{3}{2} t^{1/2} \quad t = \frac{d^2}{6D} \quad (10)$$

Így kapjuk, hogy  $\Delta t_{\max} = \frac{d^2}{6D}$  azaz  $D = \frac{d^2}{6\Delta t_{\max}}$

A forrástól mért távolság  $d$  és a diffúzió kezdete és a koncentráció maximum megjelenése közötti idő  $\Delta t_{\max}$  ismeretében tehát az illető anyag diffúziós koefficiense kiszámítható.

Problémát jelenthet az elméleti viszonyokat megközelítő kísérleti feltételek megteremtése. Mikrocseppecske beadását lehetővé tevő injektor, és alkalmas detektor szükséges. Előnyös a forrás - detektor távolságot nagynak választani. Ekkor elhanyagolhatóvá válik a csepp sugara a távolsághoz képest. A távolság növelésének a detektor alsó méréstartománya szab határt. A megfelelő pontosság eléréséhez azonban a távolságot rendszerint mikrométer pontossággal kell ismerni. Ez a feltétel nehezen valósítható meg.

A pásztázó elektrokémiai mikroszkóp képes jól ismert lépésekben változtatni a mérőcsúcs helyzetét. Ez lehetőséget biztosít a távolságmérés bizonytalanságából eredő hiba csökkentésére. Nem ismerjük pontosan az eredetileg beállított  $d$

távolságot. Azonban a mikroszkóp képes akár nagyszámú  $d \pm n_i \Delta x$  távolságot biztosítani, ahol  $n_i$  a lépés szám,  $\Delta x$  egy lépés hossza. Merve  $\Delta t_{i, \max}$  értékeit különböző  $n_i \Delta x$  alkalmazása mellett  $d$  kiszámítható, illetőleg a  $d$  pontos ismeretéből származó diffúziós koefficiens mérés hibája jelentősen csökkenthető.

$$D = \frac{(d + n_1 \Delta x)^2}{6\Delta t_{1, \max}} = \frac{(d + n_2 \Delta x)^2}{6\Delta t_{2, \max}} \quad (11)$$

A (11)-es egyenletbe egyszerűen beírva több  $n_i$  mellett kapott  $\Delta t_{i, \max}$  értékeket könnyen kiszámítható  $d$  pontos értéke. Ebből pedig az adott anyag diffúziós együtthatójára nyerhetünk megbízhatóbb értéket.

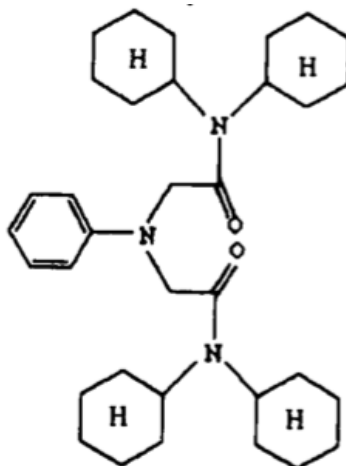
Munkámban a mikroszkóp által nyújtott lehetőséget kihasználva multi repülésidő módszert használtam oldatokban és gélekben történő diffúziós koefficiens mérésekben.

### 3. Kísérleti rész

#### 3.1. Felhasznált vegyszerek

Méréseim során valamennyi általam használt vegyszer analitikai tisztaságú volt, az oldatokat kétszeresen desztillált vízzel készítettem.

Az ion-szelektív cinkelektródhoz használt ionofórt Dr. Bitter István készítette.



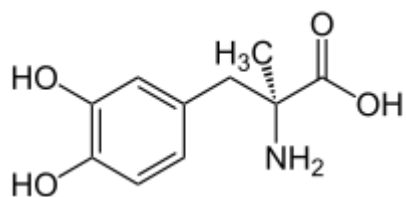
5. ábra Bitter István által készített cink ionofór [N-fenilimino diacétsav-bisz(N,N-diciklohexilamid)] szerkezeti képlete

A glükóz elektródhoz szükséges glükóz-oxidáz enzim pedig a Sigma terméke (EC 1.1.3.4. az enzim aktivitása 18,5 egység/mg) volt.

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

A további felhasznált vegyszereket pedig a Flukától, Sigma-Aldrichtól, Interkemiától valamint a Mercktől vásároltuk.

Az  $\alpha$ -metildopa fontos gyógyhatású molekula. Az EGIS Gyógyszergyár által gyártott DOPEGYT tableta hatóanyaga. Egy tableta 250 mg hatóanyagot tartalmaz.



6. ábra Az  $\alpha$ - metildopa szerkezeti képlete

### 3.2. Alkalmazott mérőműszerek

A voltammetriás mérésekben Autolab PGSTAT12 (Eco-Chemie, Utrecht, Hollandia) és CHI típusú 760C (CH Instruments, Austin, TX, USA) elektrokémiai mérőműszert alkalmaztunk.

A potenciometriás mérések során az ion-szelektív mikroelektrodokat házi készítésű feszültségkövető előerősítőhöz csatlakoztattuk. Ennek kimenete és a vonatkozási elektród közötti feszültséget digitális multiméter (METEX M-3630D Digital Multimeter) segítségével mértük.

A mikropipetták készítésére Sutter Instruments (type P-30, Novato, CA, USA)-től vásárolt kapilláris húzó készüléket alkalmaztunk.

Munkámban a Fizikai Kémia Tanszéken korábban kifejlesztett pásztázó elektrokémiai mikroszkópot használtam.

### 3.3. Sóhíd elkészítése

0,5 g szárított agar-agarat gázláng felett történő melegítés mellett oldottam fel 10 ml desztillált vízben, 0,1 g NaCl hozzáadásával. A gélesedés megindulása előtt az oldatot beletöltöttem egy U alakú 0,5 cm átmérőjű üvegcsőbe, majd megvártam, míg lehűl és gélesedik, így elkészült a méréshez szükséges áramkulcs.

### **3.4. Mérőcella elkészítése**

A cink céltárgy elkészítése során boroszilikát üvegkapillárisba felszívtam a megolvasztott cinket, majd kihűlés után az üveget óvatosan letörtem a felületéről, így kaptam egy 1 mm átmérőjű cink szálat. Ezt egy vas szállal együtt fogászati cement korongba ágyaztam. A beágyazást úgy végeztem, hogy egy öntőformaként szolgáló műanyag, 3 cm átmérőjű rövid csőnek a közepére helyeztem - egymáshoz közel, de elektromosan szigetelten a szálat. A cső végét előzetesen átlátszó műanyag ragasztószalaggal zártam le. Ebbe öntöttem a kereskedelmi forgalomban kapható kétkomponensű folyékony fogászati cementet. A folyadék néhány óra múlva megszilárdult. Az így készített kész, korong alakú céltárgyat kivettem a formából és az egyik véglapját políroztam. A polírozott felületen a cink- és vashuzalok kis korongként jelentek meg. Körbevéve ragasztószalaggal a korong oldalát úgy, hogy - a szalag kb 1 cm magasan túlérve a műanyag szélén - egy sekély edénykét képezett. Ez az edényke szolgált mérőcellaként. Lehetőség volt a cink- és a vashuzalok között a céltárgy hátoldalán elektromos kontaktust biztosítani. Így a korróziós folyamat során a kölcsönhatások tanulmányozhatók voltak.

### **3.5. Alkalmazott eszközök**

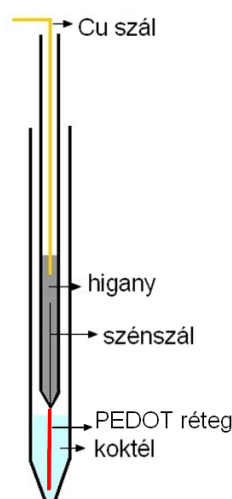
#### **3.5.1. Amperometriás platinaelektród készítése**

Az enzimelektród alapelektródját nagy tisztaságú, 25 $\mu$ m átmérőjű platina szálból készítettem (GoodFellows, UK) a következő eljárás szerint: egy kb 15 cm hosszú boroszilikát üvegkapillárist (belső átmérő: 1,16 mm; Sutter Instruments (Novato, CA, USA) egyik végén gázláng felett beolvasztottam, majd a kapilláris belsejébe 20 – 25 mm hosszú platina szálat juttattam úgy, hogy a beolvasztott véggel érintkezzen. Ezután vákuum alkalmazása mellett elektromos fűtőtekercs segítségével beleolvasztottam a kapilláris végét. Így 4-10 mm hosszán platina szálat tartalmazó üveg szálat kaptam. Ezután forrasztó ónt és rézhuzalt vezettem a kapilláris belsejébe. Óvatosan melegítve, a forrasztó ón megolvadt. Lehűlés után kis ellenállású elektromos kontaktus állt rendelkezésre a pipettán túlnyúló rézhuzal és a

platinafém között. A mikroelektród hegyét csiszoló papír segítségével megfelelő méretűre és alakúra formáztam, majd alumínium-oxid porral (Micropolish II, Buehler, USA) políroztam, ehhez rendre 1  $\mu\text{m}$ , 0,3  $\mu\text{m}$  és 0,05  $\mu\text{m}$  szemcseméretű alumínium-oxid port használtam. Ezen mikroelektród felületére vittem fel az enzimréteget.

### 3.5.2. Ion-szelektív mikroelektród készítése

A munkám során kialakított szilárd kontaktusú, kis ellenállású cinkion-szelektív mikropipetta elektródok két részből állnak ld. 7. ábra.



7. ábra Ion-szelektív mikropipetta elektród vázlatos rajza

Boroszilikát üvegapillárisokat (Sutter Instrument, 51 Digital Drive, Novato, CA. 94949) használtam a mikropipetták készítéséhez. Két különböző méretű pipettára volt szükség, mindkettő hossza 10 cm, a kisebb külső átmérője 1 mm, belső átmérője 0,5 mm, a nagyobb külső átmérője 2 mm, belső átmérője pedig 1,16 mm. A nagyobb belső átmérőjű boroszilikát pipetta tartalmazza az elektródválaszt biztosító koktélt (ld. később). A kisebb átmérőjű pipettát a nagyobb átmérőjű elektródtest belsejébe vezetve alkalmaztam. A belső kontaktust a vékonyabb kapillaris hegyében elhelyezett szénsszál biztosítja, melyhez higanyon vagy ezüst epoxi gyantán keresztül, réz kontaktus huzal csatlakozik. Az elektród belső részét

oldható módon rögzítettem. A külső rész sérülése esetén a belső részt új elektródtestben újra használhatónak találtam.

A készítés során a kapillárisokat először pár órán keresztül „Piranha-oldatban” (kénsav: hidrogén-peroxid (30%) 1:1 arány) áztattam a minél nagyobb tisztaság elérése érdekében, majd alaposan átmostam kétszeresen desztillált vízzel majd etanollal, ezután pedig szárítószekrényben 105 °C-on megszáritottam. A száradás után mindkét kapilláris típust elektródhúzó készülék segítségével alkalmas kúpszögű pipettává alakítottam, a hegyet pedig mikroszkóp alatt törtem megfelelő méretűre. A kisebb átmérőjű pipettába belehelyeztem, és Loctite (Hysol® 9466 A&B, Henkel Magyarország Kft.) ragasztóval rögzítettem a 33 µm-es szénszálat. A kontaktus biztosítására higanyt 15 - 20 mm-es vastagságban, majd réz vezetékot vittem a pipetta belsejébe. Ezután a szénszál felületén kialakítottam elektropolimerizációval a stabil belső határfázis potenciált biztosító poli(3,4-etiléndioxi)tiofén (PEDOT) vezető polimer réteget (3,4-etiléndioxi)tiofén oldat - EDOT (H.C. Starck GmbH, D-38615 Goslar) alkalmazásával.

A nagyobb átmérőjű pipetta belső felületét víztaszító réteggel kell bevonni, hidrofóbizálni kell. Munkámban a hidrofób bevonat készítéséhez a pipetta hegyét egy kis mennyiségű dimetil-diklór-szilán széntetraklorid oldószerrel készített 5%-os oldatában (Fluka) áztattam, majd szárítószekrényben 80 °C-on mintegy fél órán keresztül zárt Petri-csészében szárítottam. A kész pipettákat szobahőmérsékleten tároltam. A szilárd kontaktusú ion-szelektív mikropipetta elektródkészítés utolsó lépése a mérőkoktélnak a nagyobb pipetta csúcsába juttatása. A pipetta hátoldalán a széles nyíláson keresztül hosszúra kihúzott üvegapilláris és alkalmas fecskendő segítségével juttattam be a koktélt, 5-10 mm hosszú koktél oszlopot kapva a mikropipetta hegy csúcsában. A koktél összetétele: 98 mg tetrahydrofuran, 42 µl 2-nitrofenil-oktil éter, ami a lágyító, 2,26 mg PVC, 0,99 mg ionofór (N-fenilimino diacetilsav-bisz(N,N-diciklohexilamid), 0,22 mg kálium-[tetrakis-4-klorofenil]borát, ami a lipofil só, melynek szerepe az elektromos ellenállás csökkentése, valamint az „anion zavarás” kiküszöbölése.



### **3.5.3. Antimon elektród készítése**

Az elektródkészítéshez porcelán olvasztótégelyben erős gázlángon megolvasztottam a rendelkezésre álló fémantimon darabkákat. Az olvadékot nagyméretű (50ml-es) fecskendő segítségével, hirtelen mozdulattal vastag falú üvegkapillárisba szívattam (külső átmérő 10mm, belső átmérő 1,2mm). Ezt követően gázlángban felmelegítve fém csipesszel kihúztam az antimont tartalmazó kapillárist, hogy minél kisebb átmérőjű (0,5 $\mu$ m) antimon hegyet kapjak. A kapott antimon szálat tartalmazó vékony üveg szálból optikai mikroszkóppal vizsgálva összefüggő antimonszálas részt választottam. Azt leválasztva szélesebb kapillárisba ragasztottam, hogy a vékony szál 5-10 mm-re túlnyúljon az elektródtestként szolgáló kapilláris végén. Higany és rézhuzal segítségével biztosítottam a kontaktust.

### **3.5.4. Réz mikroelektród készítése**

A réz mikroelektród készítése megegyezik a 3.5.1. fejezetben leírt platinaelektród készítés technikájával, azonban itt a kapilláris belsejébe helyezett platina szál helyett 25 $\mu$ m-es réz szálat használtam.

### **3.6. Enzimiréteg felvitele**

Glükóz-oxidáz enzimet (EC 1.1.3.4, 18.5 U/mg, Sigma) alkalmaztam a 3.5.1. fejezetben leírt mikroelektród felületén, az enzimiréteget keresztkapcsolással immobilizáltam glutáraldehid segítségével. A réteget minden alkalommal frissen készítettem. 1  $\mu$ l glükóz-oxidáz enzimet - melynek aktivitása 3.2–4.7 U – és 1  $\mu$ l 4,5%-os glutáraldehid oldat keverékét mikrofecskendő segítségével vittem a felületre, mely 1 óra alatt szobahőmérsékleten térhálós réteget képezett a mikroelektród mérőfelületén. Végül egy vékony poliuretán filmet (Tecoflex SG-80A, Thermedics, Woburn, MA, USA) juttattam külső védőréteggé a felületre. Ehhez 0,1g poliuretánt oldottam 1 ml tetrahidrofuránban. Ebből az oldatból az elektród felületén szétterítettem 3  $\mu$ l-t. Becslésem szerint ez 1,2  $\mu$ m vastagságú réteget képezett az oldószer elpárolgása után.

### 3.7. A szénzál bevonása PEDOT réteggel

Butil-metil-imidazolium[hexafluoro-foszfát] ( $\text{BMIM}^+ \text{PF}_6^-$ ) ionfolyadékban 0,1 M-os EDOT oldatot készítettem, melyet nitrogéngáz segítségével oxigénmentesítettem. Ezüst huzal kvázi referenciaelektrod és platina huzal segédelektrod alkalmazásával a szénzál elektródra 15-ször -0,9- +1,3 közötti ciklikus elektródpotenciál – idő programot adtam 50mV/s polarizációs sebességgel. A keletkezett PEDOT bevonat „dopolása” érdekében 10 pásztázást végeztem  $\text{BMIM}^+ \text{PF}_6^-$  oldatban 50mV/s polarizációs sebességgel, -0,9 - +0,8V tartományban. Végül 0,1M KCl oldatban 5-ször pásztáztam -0,4 - +0,5 V tartományban 50mV/s sebességgel.

### 3.8. Agarózgél készítése

A 0,5%-os gél készítése során 50ml foszfát pufferben hevítés közben feloldottam 0,25g alacsony hőmérsékleten zselésedő agarózt (type I, low from Sigma), amit még a gélesedés megindulása előtt beöntöttem a mérőcellába, melyben már bent voltak az elektródok és az injektor mikropipetta is. A mérést a gélesedés befejeződése után kezdtem el.

## 4. Eredmények és értékelésük

### 4.1. Cinkion-szelektív mikropipetta elektróddal végzett mérések

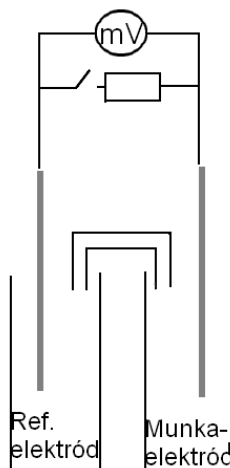
#### 4.1.1. A szilárdkontaktusú cinkion-szelektív elektród működésének vizsgálata

A közelmúltban a Pécsi Tudományegyetem Általános és Fizikai Kémia Tanszék laboratóriumában új típusú mikropipetta ion-szelektív elektródokat sikerült kifejleszteni.<sup>149,150</sup> Az illető elektródok szilárd belső kontaktussal készültek. Az elektródok esetében a belső referencia elektródot szilárd kontaktus helyettesíti. Ez egy vezető polimer filmmel bevont vékony szénszál. A szénszál a mikropipetta csúcsában lévő ion-szelektív koktélba nyúlik. A szilárd belső kontaktus alkalmazásával jelentősen csökkent a mikropipetta elektród ellenállása és egyben megnőtt az elektród élettartama. Korábban csak ammónium- és kálium-szelektív mikropipetták készültek ilyen szilárd kontaktussal. Ezek vizsgálatáról, tulajdonságairól és alkalmazásáról több tanulmány jelent meg.<sup>149,150</sup> Munkámban a cink-ionok mérésére szolgáló, új típusú mikropipetta ion-szelektív elektródokat készítettem. Vizsgáltam ezek méréstechnikailag fontos tulajdonságait és alkalmaztam őket korróziós folyamatok potenciometriás PEKM méréstechnikával történő tanulmányozására.

A potenciometriás mérőcella válaszidejét nagymértékben befolyásolja a cella ellenállása. A hagyományos mikropipetta elektródok nagy ellenállása miatt a válaszidő hosszú, így a pásztázó elektrokémiai mikroszkópiás méréseknél célszerű igen lassú pásztázási sebességet alkalmazni a válaszidő hosszúsága miatt bekövetkező torzítás kiküszöbölésére. A mikropipetta ellenállásának csökkenése nagyobb pásztázási sebesség elérését teszi lehetővé. Ennek megfelelően a mikropipetta ellenállása fontos paraméter a potenciometriás PEKM mérésekben való felhasználás szempontjából.

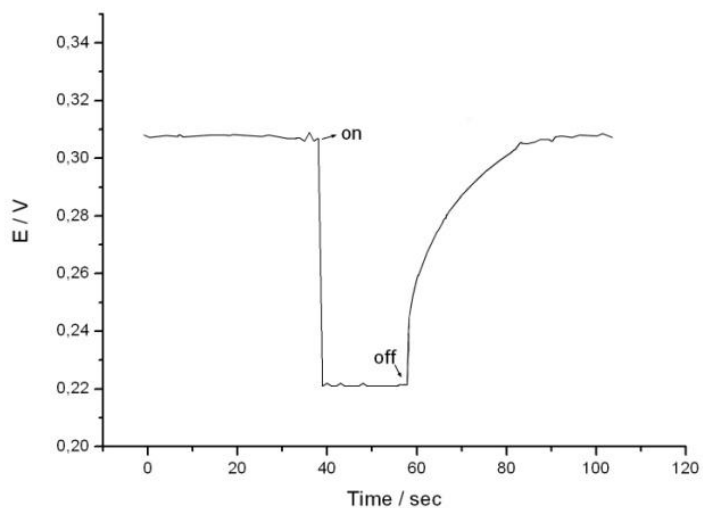
Munkámban a feszültségosztó technikát használtam a mikropipetták ellenállásának mérésére. A mérés során úgy jártam el, hogy egy nagy ellenállású feszültség követő, a hozzá kapcsolt feszültségmérő műszer (METEX Digitális multiméter- M-3640D) és számítógépes adatgyűjtő segítségével nyomon követtem a cinkelektrod és egy vonatkozási elektród közötti potenciál különbséget, a

cinkelektrodot adott cink-ion koncentrációjú oldatba merítve. Stacioner cellafeszültség, azaz elektromotoros erő (e.m.f.) elérése után egy ismert nagy ellenállást  $R_k$  iktattam a mikropipetta és a vonatkozási elektród közé, azaz az ellenálláson keresztül rövidre zártam a telepet és mértem az ellenállás két vége közötti elektromos feszültséget ( $U_k$ ). Az alkalmazott cellakapcsolást a 8.ábra mutatja.



8. ábra Cellakapcsolási rajz

A mérés során kapott regisztrátumot mutat be a 9. ábra.



9. ábra Ion-szelektív mikropipetta elektród ellenállásának mérésekor készített regisztrátum

Ismerve  $R_k$  értékét, mérve az ellenállás bekapcsolása utáni  $U_k$  értéket és a cella e.m.f.-jét kiszámíthatjuk az elektród belső ellenállását,  $R_i$ -t az alábbi képlet segítségével.

$$\Delta U = emf - U_k, \quad R_i = \frac{\Delta U \cdot R_k}{U_k} \quad (12)$$

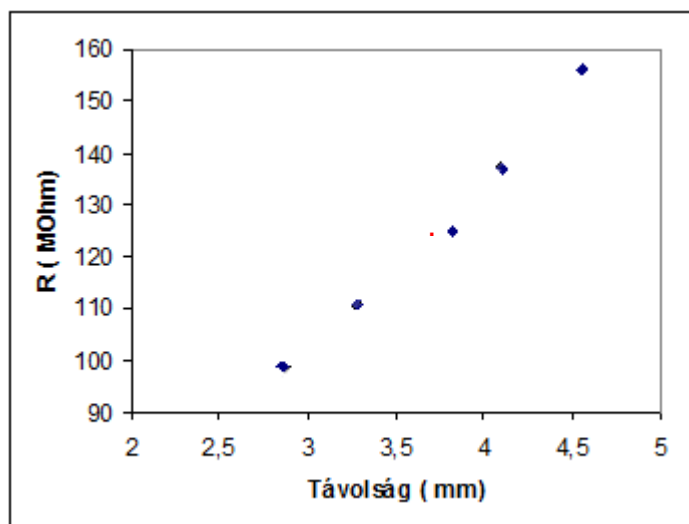
Természetesen a képlet használatakor feltételezzük, hogy  $R_k$  és  $R_i$  mellett az áramkörben lévő más egységek ellenállása elhanyagolható.  $R_i$  értékét minden esetben három párhuzamos mérésnél kapott  $\Delta U/U_k$  arányokból számolt értékek átlagaként határoztam meg.

Láthatjuk a 12. egyenleten, hogy ez esetben a cella elektromotoros ereje kb 31mV volt. Mint ismeretes a „ feszültségosztó” ellenállás mérési módszer akkor adná a legmegbízhatóbb eredményt, ha  $\Delta U \cong 1/2$  e.m.f., az optimális a  $\Delta U \cong 15,5$  mV érték volna. Nagyobb  $R_k$  ellenállás alkalmazásával volt lehetőség az optimálishoz közeli  $\Delta U$  értéket kapnunk.

A készített szilárd kontaktusú mikropipetták ellenállása ( $R_i$ ) nagymértékben függ azonos koktél összetétel esetében is a pipetta hegynyílás átmérőjétől, a pipetta geometriájától és attól, hogy a belső kontaktus milyen mélyen nyúlik be a koktélba. Minél közelebb van a szénszál vége a pipetta nyílásához, annál kisebb a nagyellenállású koktél rétegvastagsága, annál kisebb ellenállást kapunk.

A koktél rétegvastagsága és az elektród ellenállása közötti összefüggés vizsgálatára az elektród belső kontaktusát tartó üvegpipettát olyan befogó szerkezethez rögzítettem, amely tengely irányú mikrométer felbontású mozgást tesz lehetővé. Így lehetőségem volt a szénszálát tengely irányban mozgatni a mikropipetta elektród belsejében. A szénszál és a pipetta nyílása között különböző távolságokat tudtam beállítani. Így a „voltage divider” azaz feszültségosztó módszert alkalmazva mérni tudtam a távolság és a  $R_i$  ellenállás közötti függvénykapcsolatot.

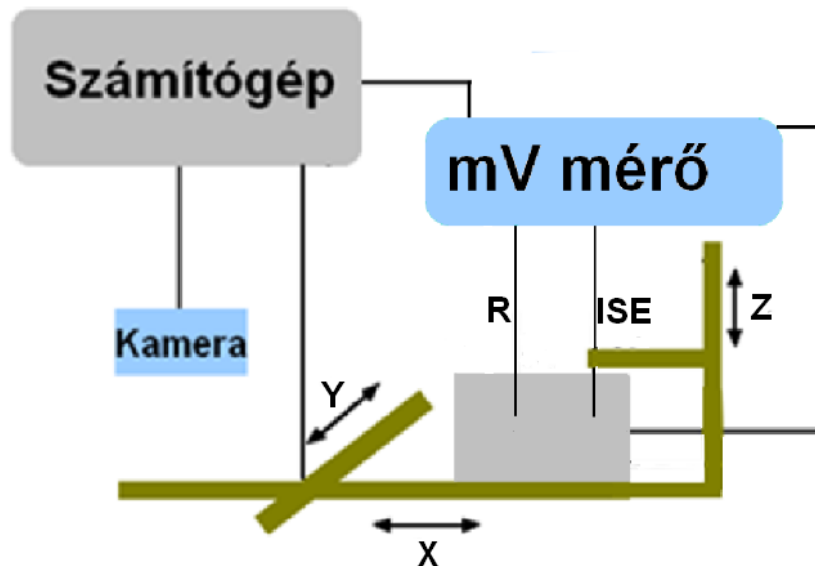
A 10. ábra ad áttekintést a kapott eredményekről. Látható, hogy a függvénykapcsolat közel lineáris. Tulajdonképpen a kónikus geometria és a szénszál koktélba merülő részének változó hossza miatt nem feltétlenül várhatunk lineáris függvényt.



**10. ábra** Ion-szelektív mikropipetta elektród ellenállás és a belső kontaktus merülési mélysége (szénszál és a külső mikropipetta csúcsának távolsága) közötti függvénykapcsolat

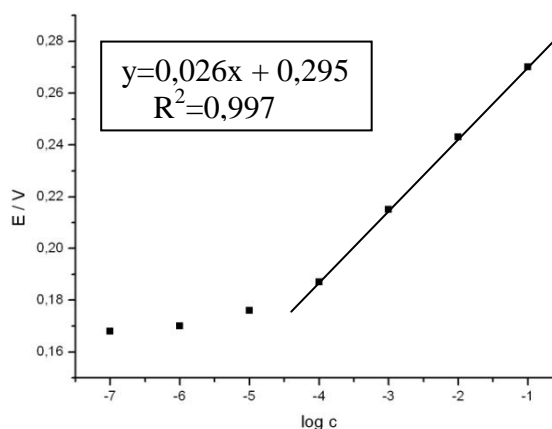
Úgy találtuk, hogy  $40,9 \text{ M}\Omega/\text{mm}$  az  $R_i$  értéke, de nagyban függ a hegy méretétől. A korábban leírt kálium és ammónium mikropipetták esetében is kisebb ellenállást mértek, mint a hasonló méretű hagyományos technikával készített mikropipetta elektródoknál.

A potenciometriás PEKM mérésekben való alkalmazhatóság szempontjából – mint említettem - nagy fontossággal bír az elektród ellenállása. Természetesen a hagyományos kémiai analízisben történő alkalmazhatóság szempontjából a koncentráció válasz, a szelektivitás és a koncentrációmérés alsó határa a meghatározó tulajdonság. Az általam készített cink mikropipetták vizsgálatához a 11. ábrán látható potenciometriás mérőelrendezést használtam.



11. ábra Ion-szelektív mikropipetta elektródok vizsgálatához használt mérőelrendezés rajza

Az elektródpotenciál és a cink-ion koncentráció logaritmusa közötti függvénykapcsolatot mutat be a 12. ábra. A mérést kb.  $7\mu\text{m}$  mérőcsúcs átmérőjű mikropipettával végeztem cink – szulfátból készített kalibráló oldatsor alkalmazásával.



12. ábra  $7\mu\text{m}$  mérőcsúcs átmérőjű ion-szelektív cinkmérő mikropipetta kalibrációs görbéje. A mérések cink - szulfátból készített kalibráló oldatsor használatával történtek.

Az ábrából látható, hogy  $10^{-4}$  –  $10^{-1}$  mol/dm<sup>3</sup> koncentráció tartományban az elektródválasz közel lineáris. A kalibrációs görbe meredeksége ebben a tartományban 26 mV/dekád közelíti az elméletileg várható értéket. Az elektródválasz megszűnik a  $10^{-7}$  mol/dm<sup>3</sup> -nél kisebb koncentrációk tartományában. Az elektród válasza csökkent meredekségű a  $10^{-6}$  –  $10^{-4}$  koncentráció tartományban.

Az alsó méréshatár a Nernsti választól való  $\Delta E = 9\text{mV}$  eltérés alapján  $4 \times 10^{-5}\text{ M}$ -nak adódott.

Vizsgáltam az elektródválasz stabilitását különböző koncentrációjú cink-szulfát oldatokban  $0,1\text{ mol/dm}^3$  trisz (hidroximetil)-aminometán puffer háttér elektrolit alkalmazása mellett. A mérések során frissen készített elektródok esetében folyamatosan regisztráltam a cellafeszültség értékét áram kulccsal elválasztott félcellába helyezett vonatkozási elektróddal szemben. A mért cellafeszültség adatok átlag körüli oszcillációja az elektromos hatásokkal szembeni nagy érzékenységet mutatott. A mérőcella körüli mozgás különösen nagy zajt generált. Faraday - kalitka alkalmazásával némileg sikerült csökkentenem a zajt, de mindenképpen szükség volt a regisztrátumok zajsűrésére.

Mértem az elektródok potenciál válasza időbeli változásának meredekségét ( $\Delta E/\Delta t$ ), a potenciál-idő függvény „drift”-jét. Általában a frissen készített elektród esetén  $0,1\text{-}10\text{ mM}$ -os cinkoldatban a drift  $0,05\text{-}0,08\text{ mV/min}$  közötti értékek adódtak 24 órás mérés során, óránkénti leolvasással.

A cinkelektrod szelektivitását különoldatos módszerrel mértem. A kapott szelektivitási koefficiens értékekről az 1. táblázat ad áttekintést.

<b>Szelektivitási vizsgálat különoldatos módszerrel</b>		
	Mért érték	Irodalmi adat*
logK Zn,Ca	-1,9949	-2,83
logK Zn,Mg	-2,821	-3,17
logK Zn,K	-1,8215	-3,77
logK Zn,Na	-3,275	-3,28
logK Zn,NH <sub>4</sub>	-3,0835	-3,25

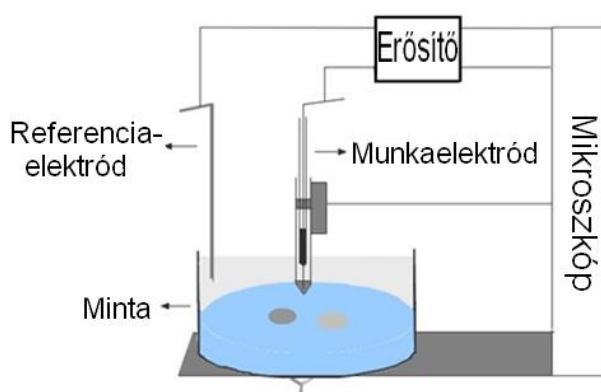
**1. táblázat** Szelektivitási együtthatók értékei cinkion-szelektív mikropipetta elektróddal mérve

\*Sigma-Aldrichnál kapható cinkionoforra vonatkozó értékek



#### 4.1.2. Korróziós vizsgálatok cinkion-szelektív mikropipetta elektróddal

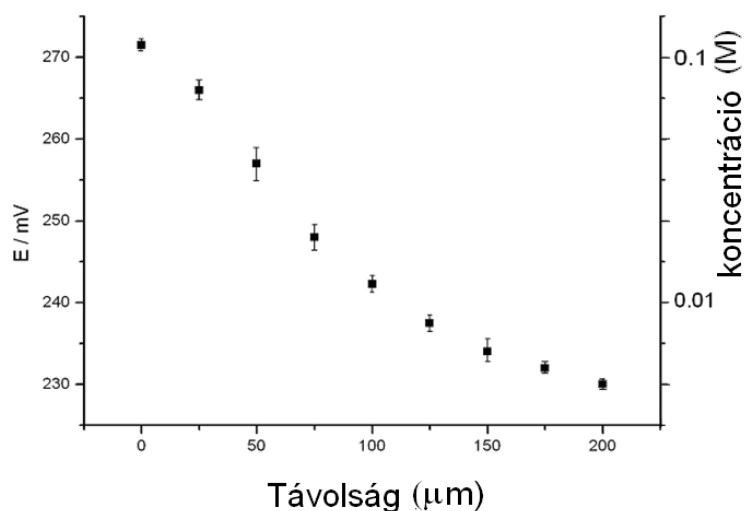
A 3.4 pontban bemutatott mérőcella sík, polírozott fenéklemezén egymástól kis távolságra helyezkedik el a vas és a cink korong. A vaskorrózió folyamatának vizsgálatára a mérőcellába 3-5 cm<sup>3</sup>, 10 mmol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú NaCl oldatot juttattam. A fenéklemezen túlnyúló huzalokat vezető huzallal rövidre zárva sikerült tanulmányozni a cink korrózióvédelemben szerepet játszó hatását. A kísérletekhez a mérőcellát az elektrokémiai mikroszkóp cellatartó lemezére rögzítettem. Gondosan vízszintbe állítottam a cella fenéklemezét, majd a cink mikropipetta elektródot a függőleges mozgást végző befogó szerkezethez rögzítettem. Az alkalmazott készülék elrendezés vázlatos rajzát mutatja a 13. ábra.



13. ábra A korróziós vizsgálatok során alkalmazott kísérleti elrendezés

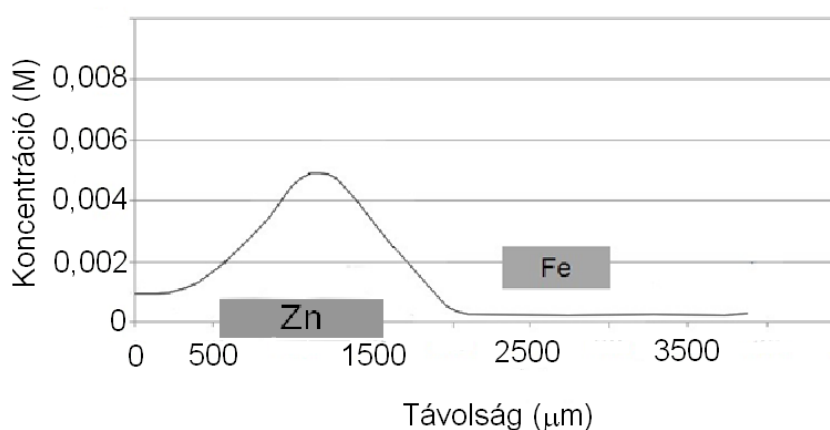
Jól ismert, hogy a vas elektrokémiai korróziós folyamata során első lépésben Fe<sup>2+</sup> ionok mennek oldatba, míg a fém felületen az oldat oxigénje redukálódik. A vassal érintkező fémes cink önfeláldozó módon képes katódos korrózió védelmet biztosítani. A folyamat során a cink oxidálódik. Az oxidáció során az anódtérben keletkező fémionok az oldatba diffundálnak.<sup>151</sup> A mikroszkóp segítségével így alkalmam volt a cink fém oxidációja során bekövetkező cink-ion koncentráció profil tanulmányozására. Ezzel a pásztázó elektrokémiai mikroszkóp és az általam készített cinkelektrod alkalmazhatósági területéről szereztem információt. A munka során az elektromos kontaktus létesítése után rövid idővel a cink korong felület fölé pozícionált mikropipetta elektród potenciálválasza egyértelműen jelezte a lokálisan megnövekedett cink-ion koncentrációt. 10-15 perc várakozás után a mérőcellát X majd Y irányban mozgatva megkerestem a korongtól adott vertikális (Z) irányban

mutatkozó maximális cink koncentráció helyét az XY síkon. E pontban Z irányú mozgást végezve az elektróddal, nyertem az elektródpotenciál – távolság függvényt, lásd 14. ábra. Az előzetesen felvett kalibrációs görbe alapján készítettem el a cink-ion koncentráció – távolság függvényt. A 14. ábra jobboldali függőleges skálája mutatja a lokális koncentráció értékeit.



**14. ábra** Elektródpotenciál - vertikális távolság, illetőleg cink-ion koncentráció – vertikális távolság függvény. Az X irányú koordináta érték feletti Z=25 μm távolságban.

A pásztázást a cink korong felett 25 μm Z irányú távolságra végezve a korong középpontján átmenő X irányban kaptam a 15. ábrán látható függvényt.



**15. ábra** Rövidre zárt korongok mellett készített, a cink korong közepén átmenő X irányú vonal menti pásztázás során kapott függvény. A függvény az X irányú koordináta érték feletti Z távolságban lévő cink- ionkoncentrációt mutatja. A minta korongok helyét a téglalapok jelölik.

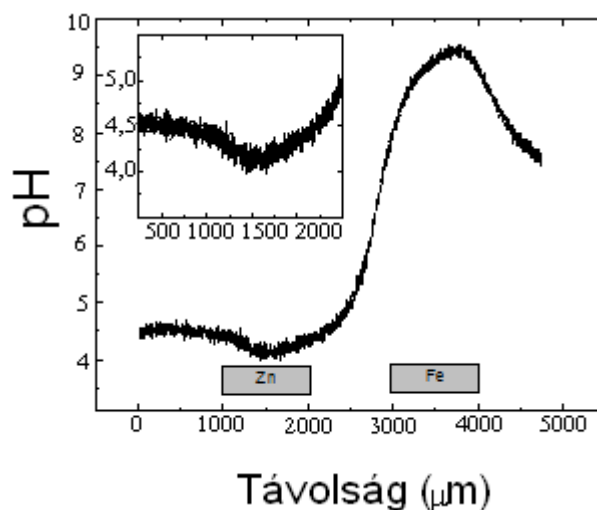
#### 4.1.3. Korróziós folyamatok vizsgálata antimon elektróddal

A korróziós folyamatok sebessége, részlépéseinek aránya függhet a korrozív közegek pH-jától, illetőleg a fémek korróziója lokális pH változásokat eredményezhet. Ennek megfelelően a cink - vas fém pár korróziós viselkedésének PEKM módszerrel történő tanulmányozására célszerű volt bevonni mikrokörnyezeti pH jelzésére, mérésére alkalmas mérőcsúcsot.

Az antimon elektródok pH mérő sajátága jól ismert. Horrocks és munkatársai<sup>152</sup> antimon mikroelektródot fejlesztettek ki PEKM mérésekhez. Az elektródot különböző enzim katalizálta heterogén folyamatok sajátosságainak tanulmányozására használták. Tudomásom szerint ez irányú munkám megkezdéséig antimon mikroelektród mérőcsúccsal nem vizsgáltak korróziós folyamatokat PEKM technikával. Az antimon mikroelektród kettős funkciójú. A potenciometriásan jelentkező pH mérő funkció mellett bizonyos amperometriás mérésekben is alkalmazható munkaelektródként.

Amperometriásan  $-0,65\text{ V}$  vs  $0,1\text{ mol/dm}^3\text{ Ag/AgCl}$  polarizáló feszültség mellett például alkalmazható oxigén koncentráció mérésére.

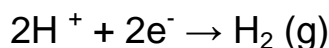
Munkámban a 13. ábrán látható kísérleti elrendezés mellett vizsgáltam  $0,1\text{ mol/dm}^3$  koncentrációjú NaCl oldatban az elektromos kontaktusban lévő fémkorong pár felett az oldat pH profilját. Mérőcsúcsként  $15\text{ }\mu\text{m}$  átmérőjű antimon elektródot alkalmaztam. A fém korongok középpontján átmenő vonal mentén X irányú vonalpásztázást végeztem. A mérőcsúcs – minta felület közötti Z irányú távolságot  $25\text{ }\mu\text{m}$ -re állítottam be. Ennek során úgy jártam el, hogy óvatosan süllyesztve a mérőcsúcsot a felület felé közelítettem. A felület elérését potenciálváltozás jelezte. Ezt a Z koordinátát tekintve nulla koordinátának, a mérőcsúcsot  $25\text{ }\mu\text{m}$ -rel feljebb emeltem. A kapott koncentráció profilt mutatja be a 16. ábra.



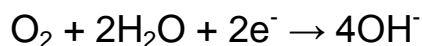
**16. ábra** Elektromos kontaktusban lévő cink-vas fém pár minta felett 25  $\mu\text{m}$  –rel készített pH – koordináta profil. Mérőcsúcs antimon mikroelektrod (átmérő 15  $\mu\text{m}$ ). Korrozív oldat 0,1 mol/dm<sup>3</sup> NaCl, pásztázási sebesség 5  $\mu\text{m/s}$ , pásztázási idő 120 perc.

Amint az ábra alapján jól látható a vas korong felett a pH nagymértékben megnőtt a korróziós folyamat következtében. Ugyanakkor a cink korong felett kismértékű pH csökkenés figyelhető meg. A jelenségek a korróziós folyamatok jellegének ismeretében könnyen értelmezhetők. A két fém közül természetesen a vas a „nemesebb”. Ezért a vas felületen redukciós folyamatok játszódnak le.

Savas közegben végbe mehet a

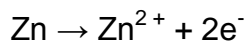


reakció, míg semleges és lúgos környezetben az oxigén redukció a valószínűbb.

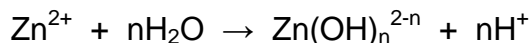


Mindkét reakció pH növekedést eredményez.

Érdekes módon a korrózió következtében a pH kismértékben csökken a cink korong felett. Ez magyarázatra szorul ugyanis a cink oxidációja, a cink-ionok keletkezését, oldatba jutását eredményező primer folyamat nem jár pH változással.



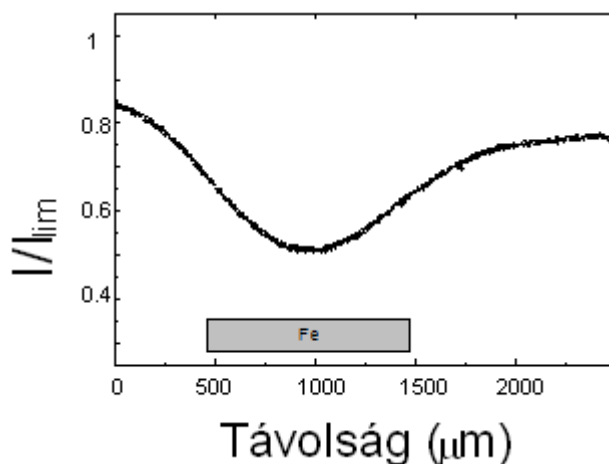
A pH változás indoklására fel kell tételeznünk, hogy az oldatba jutó cink-ionok egy része hidrolizál. Ez a puffer kapacitás nélküli oldatban lokális pH változást eredményez.



Érdekes, hogy a hidroxil-ionok nagy mobilitása mellett is ez a lokális pH csökkenés viszonylag nagy mértékű. Az oldat belsejében jelentkező pH - nál 0,5 egységgel kisebb a cink felülettől 25 $\mu\text{m}$  távolságban.

A galvanikus kapcsolatban lévő fém pár feletti oldatban vizsgáltam PEKM módszerrel az oxigén koncentráció eloszlását. Ehhez a pH detektálásra használt, ott bemutatott antimonelektrodot -0,65 V-ra polarizáltam (vs Ag/AgCl, 3 mol/dm<sup>3</sup> KCl) és így detektálva az oxigén redukciós amperometriás áramát 5  $\mu\text{m/s}$  pásztázási sebességgel egydimenziós pásztázásokat végeztem 25  $\mu\text{m}$  távolságban a fémfelületek felett.

A vas korong feletti egydimenziós pásztázás eredményeként kapott értékeket mutatja be a 17. ábra.



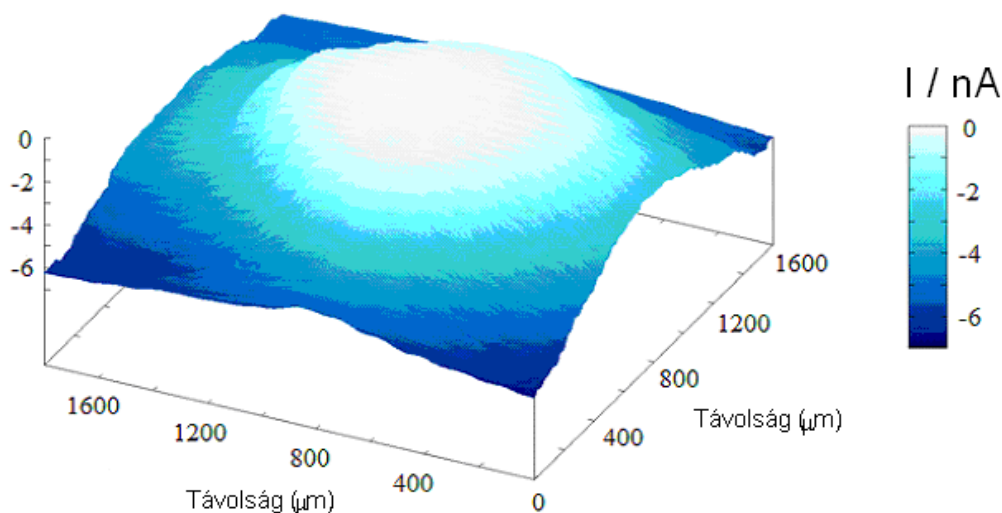
**17. ábra** Vas korong feletti pásztázással kapott normált áram – távolság függvény.  $I$  az illető helyen mért áramot,  $I_{lim}$  az oldat belsejében mért áramot jelenti, pásztázási sebesség 5  $\mu\text{m/s}$ , Z irányú távolság 25  $\mu\text{m}$ . Elektrod - antimon mikroelektrod, mérőkorong átmérő 15  $\mu\text{m}$ . Az elektrod amperometriásan működött - 0,65V polarizáló feszültség mellett.

Jól látható az ábra alapján, hogy a cink által védett vas korong feletti oldatban lecsökkent az oxigén koncentrációt jellemző normált áram. Ez messzemenően megfelel a várakozásnak.

A PEKM gyakorlatában legtöbbször platina mikrokorong elektródot használnak amperometriás mérőcsúcsként. A platinaelektród kiválóan alkalmas oxigén koncentráció detektálásán alapuló imázs készítésre.

A 18. ábra 25 $\mu\text{m}$  mérőcsúcs átmérőjű platinaelektróddal készített kémiai mikroszkópiás képet mutat. Az ábrán a redukciós áramintenzitást színek jelzik.

A mikroszkópiás kép a várakozásnak megfelelően a vas korong felett kisebb redukciós áramot, azaz kisebb oxigén koncentrációt mutat. A diffúziós folyamat tehát nem képes pótolni a galvanikus kapcsolatban levő fémkorong pár katódján redukálódó oxigén mennyiséget.



**18. ábra** Pásztázó elektrokémiai mikroszkópos felvétel a vas minta felett mérve az  $\text{O}_2$  szintet (0,1 mol/dm<sup>3</sup> NaCl oldatban 7 órán keresztül áztatva, munkaelektród Pt korong, átmérő 25  $\mu\text{m}$ , elektród potenciál -0,65 V, Ag/AgCl referencia elektród, elektród – minta távolság: 25  $\mu\text{m}$ , pásztázási sebesség 30  $\mu\text{m} / \text{s}$ )

## **4.2. Diffúziós koefficiens mérése PEKM készülékkel. Repülési idő (TOF) - módszer alkalmazása**

A különböző anyagoknak különböző közegekben mutatkozó diffúziós transzportját jellemző diffúziós koefficiens fontos fizikai kémiai anyagállandó. A diffúziós koefficiens mérése sok esetben hosszadalmas lehet. A repülési idő módszer lehetőséget kínál a mérés gyors elvégzésére. Ugyanakkor az előzőekben leírtak alapján a módszer egyetlen repülési távolság melletti alkalmazása pontatlanságot eredményezhet. A PTE Kémiai Intézetében kifejlesztésre került a PEKM készülék sajátosságát kihasználó repülési időn alapuló diffúziós koefficiens mérőmódszer. A módszert a 2.3.1. pontban mutattam be. A módszer teljesítőképességének vizsgálatába bekapcsolódva különböző anyagoknak mértem meg diffúziós koefficiensét oldatokban, gélekben elektrokémiai mikroszkópiás repülési idő módszerrel.

A módszerrel kapott tapasztalataim közül kettőt mutatok be e helyen. Egyrészt röviden megemlítem az elektroaktív metildopa (L- $\alpha$ -Metil-3,4-dihidroxi-fenilalanin) gyógyszermolekula agaróz gélben történő diffúziójának mérésével szerzett tapasztalataimat. Másrészt a glükóz diffúziós koefficiensének mikrométerű enzimelektrod alkalmazásával történő méréseimről számolok be.

### **4.2.1. Az $\alpha$ -metildopa diffúziós koefficiensének mérése**

A metildopa elektroaktív anyag, így voltammetriásan jól mérhető platina munkaelektrod alkalmazásával. Metildopát vérnyomás csökkentése céljából alkalmaznak, így fontos lehet annak diffúziója a szervezetben. Így mértem a metildopa diffúziós koefficiensét 0,8 %-os agaróz gélben és foszfát puffer oldatban. Metildopa diffúziójának mérésével foglalkozó szakirodalmat nem találtam.

A mérést pásztázó elektrokémiai mikroszkóppal végeztem, melyhez a vizsgálandó minta 5ml 100mM-os HCl oldatban feloldott Dopegyt tablettát tartalmazott, melyet fecskendőszűrő segítségével átszűrve a mikropipettába szívtam. A mikropipettát a mikroszkóp Z tengelyére helyeztem, hozzákötve az

injektorhoz, mely egy nitrogénpalackhoz csatlakozott. A mérőközeg foszfát-puffer (Sörensen, pH 7,4) és foszfát-pufferben oldott agaróz (0,8%) volt, melyet egy plexihengerbe töltve az elektrokémiai mikroszkóp X-Y irányban mozgatható asztalára erősítettem.

A mikropipettával szembe egy 25 $\mu$ m átmérőjű platina korong munkaelektrodót pozicionáltam. A mérést a már korábban ismertetett TOF- módszerrel végeztem 3 elektródos rendszerben, +0,4V-on – AgCl referencia elektród, Pt ellenelektrod alkalmazásával. A mérőelrendezést a 4.2.2. fejezet 21. ábrája mutatja, a kapott értékeket pedig a 2. táblázat tartalmazza.

Távolság ( $\mu$ m)	$t_{max/sec}$	PBS $D/10^{-6} \text{ cm}^2/s$	Távolság ( $\mu$ m)	0,8% agarózgél $10^{-6} \text{ cm}^2/s$
0	111,02	5,38	0	2,41
40	127,01	5,42	20	2,45
80	143,04	5,4	40	2,43
120	160,02	5,41	60	2,7

**2. táblázat**  $\alpha$ -Metildopa diffúziós koeficiens értékei 7,4 pH-jú foszfát pufferben és 0,8%-os agaróz gélben

A kapott értékek alapján elmondható, hogy jelentős különbség adódott a két közeg diffúziós koeficiens között. A különböző repülési távolságok mellett kapott diffúziós koeficiens értékek viszonylagos jó egyezése alapján megállapíthatjuk, hogy az alkalmazott módszerrel mérhető a diffúziós koeficiens.

#### 4.2.2. Glükóz diffúziójának mérése repülési-idő módszerrel

A voltammetriás mérések során kapott áram jel sok esetben jól definiált függvénykapcsolatban van a munkaelektrodon reagáló anyagféleség diffúziós koeficiensével. Ennek megfelelően több voltammetriás módszer felhasználható elektroaktív anyagok diffúziós koeficiensének mérésére. Természetesen, lévén hogy az elektródfolyamatok egymás után következő több lépésből állnak, ezért



hagyományos voltammetriás mérésrel csak olyan esetben mérhető a diffúziós koefficiens, amikor a nevezett konszekutív reakciósor sebesség-meghatározó lépése a diffúziós anyagtranszport. Kémiaileg bonyolult, irreverzibilis elektród folyamatok esetében ez a feltétel nem teljesül. Voltammetriás módszerrel nem sikerülhet megbízható diffúziós koefficiens értéket nyernünk.

Az  $\beta$ -D(+)-glükóz különböző közegekben mutatkozó diffúziós koefficiense fontos adat. Ugyanakkor az illető diffúziós koefficiens voltammetriás módszerrel történő mérése nehézségbe ütközik. Egyrészt a glükóz savas és semleges közegben nem mutat elektroaktivitást a voltammetria gyakorlatában általánosan használt munkaelektrodokon, az azokkal vizes oldatokban elérhető potenciál tartományban.

Másrészt a glükóznak egyes elektródokon lúgos közegben mutatkozó elektrokémiai oxidációja rendkívül bonyolult, semmiképpen sem diffúzió kontrollált folyamat.<sup>153,154</sup>

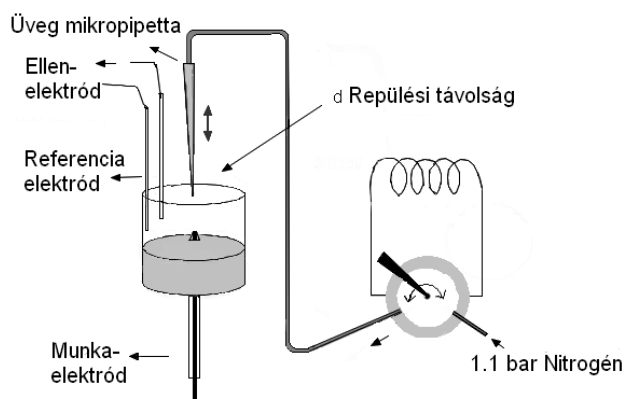
Munkámban megvizsgáltam, hogy a hagyományos voltammetriás módszerekkel kielégítő pontossággal nem mérhető glükóz diffúziós koefficiens milyen hatékonysággal mérhető a PEKM –repülési idő módszerrel.

A kísérletekben két eltérő detektálási technikát alkalmaztam. Az egyik esetben lúgos közegben dolgozva elektrokatalitikus sajátosságú rézoxid réteggel bevont réz mikrokorong elektródot használtam mérőcsúcsként.

A másik esetben, semleges közegben (pH = 7,4) mikroméretű enzimelektróddal detektáltam a glükóz lokális, pillanatnyi koncentrációját. Feltételeztem, hogy a mért koncentráció – idő függvény kialakításában a viszonylag hosszú diffúziós út megtételéhez szükséges időhöz képest kisebb reakcióidőt igénylő egyéb folyamatok csak elhanyagolható mértékű torzítást hoznak létre.

A két detektálási mód közül természetesen az enzimelektrodos gyakorlati jelentősége nagyobb, hiszen ritkán van szükség lúgos közegben való glükóz transzport jellemzésére.

A kísérletekben használt mérőcella és injektor egység elrendezését mutatja a 19. ábra.



19. ábra PEKM repülési idő (TOF) módszer során alkalmazott mérőcella.

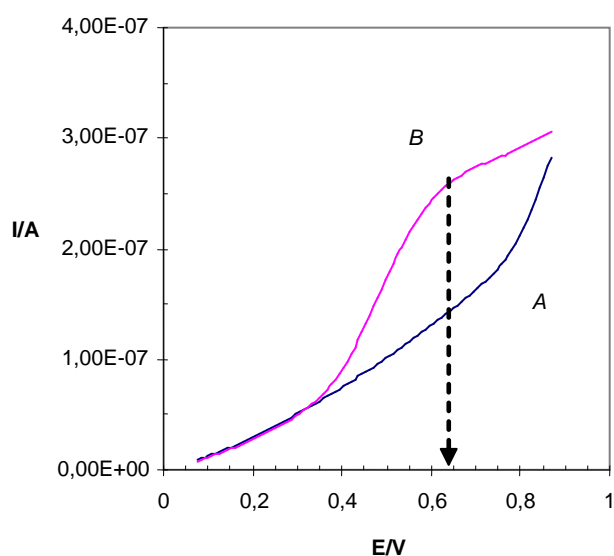
Az anyag nanocseppecskéjének bejuttatására használt mikropipetták nyílás átmérőjét 0,2–1  $\mu\text{m}$ -nek állítottam be. A pipettákat függőleges pipettahúzó készülékkel (Sutter Instrument. Novato, CA, USA) készítettem. A mérőrendszerben pedig megtöltés után a pipettát csatlakoztattam egy Rheodyne típusú (Rheodyne 9125i, CA, USA) hurok injektorhoz, mely egy magas nyomású nitrogén palackhoz csatlakozott. A cseppecskét manuálisan, az injektor segítségével juttattam a mérőcellába. Nagyon rövid nyomás impulzust alkalmaztam, hogy a pipettából nagyon kis anyagmennyiség jusson a cellába. Talán nem felesleges megjegyezni, hogy a módszer előnye, hogy nem szükséges azonos, vagy ismert anyagmennyiség bejuttatása.

Az elektród tesztelését kis átmérőjű üvegpohárban, míg a mérést egy ehhez a pártázó elektrokémiai mikroszkóphoz kialakított plexihengerben végeztem. A cella alján egy gumidugó helyezkedett el, mely közepére lyukat fúrtam, hogy azon éppen átférjen a munkaelektrod. Ez a cella helyezkedett el azon a tartólemezen, mely vízszintesen az Y és a X tengely irányába mozgatható, míg a mikropipetta pontosan szemben a munkaelektroddal, ráerősítve a függőlegesen mozgatható tartólemezen foglalt helyet.

Az oldatkészítéshez használt analitikai tisztaságú D(+)-glükózt a Sigma-Aldrich cégtől rendeltünk, háttér elektrolitként pedig frissen készített 7,4 pH-jú foszfát (Sörensen) puffert alkalmaztam. Minden oldat készítéséhez kétszer ioncserélt vizet (fajlagos vezetőképessége kevesebb, mint  $0,5 \mu\text{S cm}^{-1}$ ) használtam. Diffúziós koefficiens méréseket végeztem foszfát pufferrel készített 0,5%-os agaróz gélben is.

#### 4.2.2.1. Diffúziós koefficiens-mérés lúgos oldatban elektrokatalitikus rézelektróddal

Kísérleteimben vizsgáltam a lúgos közegben történő voltammetriás glükózmérés lehetőségét. Ennek kapcsán  $100 \text{ mmol/dm}^3$  nátrium-hidroxid háttérektrólit alkalmazása mellett egyenáramú voltammogramokat vettem fel réz mikrokorong munkaelektróddal. Ilyen voltammogramot mutat be a 20. ábra.

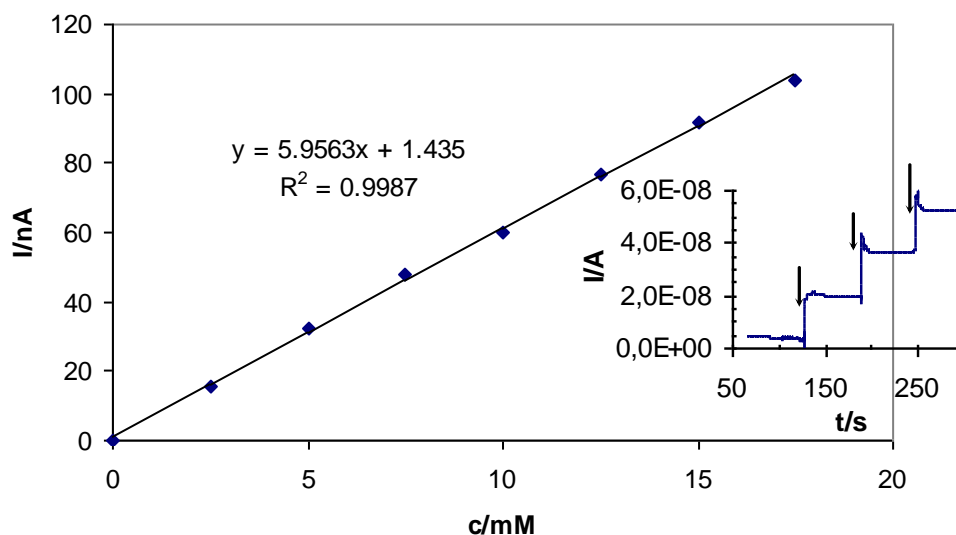


**20. ábra** 100mV/s polarizációs sebességgel készített egyenáramú voltammogramok. Háttér-elektrolit  $100 \text{ mmol/dm}^3$  NaOH, Ag/AgCl referencia elektród. A görbe glükóz koncentráció = 0, B görbe glükóz koncentráció =  $1 \text{ mmol/dm}^3$

Az ábrán látható, hogy a voltammogram jelzi a glükóz jelenlétét. A voltammogramok alapján megállapíthattam az amperometriás detektáláshoz célszerűen alkalmazható elektródpotenciált. Amint ez látható, ennek értéke 0,65 V.

Kérdés merülhet fel, hogy vajon nyugvó, nem kevert nátronlúg oldatban nyerhető-e állandó amperometriás áram a diffúziós koefficiens-mérésekhez tervezett körülmények között. Ennek vizsgálatára  $4 \text{ cm}^3$  nátrium-hidroxid alapoldatot pipettáztam a mérőcellába és 0,65 V elektród potenciál mellett regisztráltam az amperometriás áramintenzitást. Stabil áramerősség elérése után lépésenként  $100 \mu\text{l}$  térfogatú  $100 \text{ mmol/dm}^3$  koncentrációjú glükóz oldatdózisokat adtam az oldathoz. Az oldatdózis beadása után pár másodpercig mágneses keverést alkalmaztam.

A mérések során kapott áram – idő regisztrátumot és az abból szerkesztett áram – koncentráció függvényt a 21. ábra mutatja.

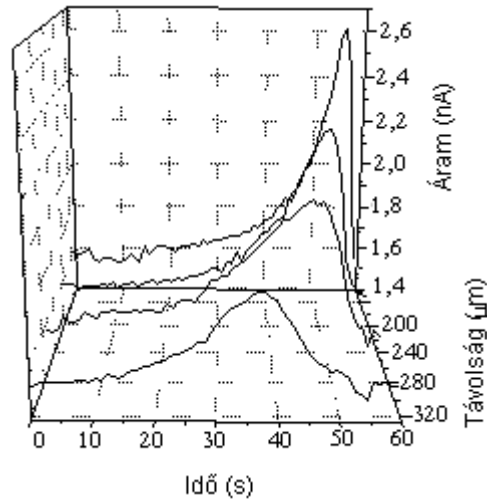


**21. ábra** Glükóz kalibrációs görbe és álló oldatban készített amperometriás áram – idő regisztrátum, elektród potenciál 0,65 V, Háttélektrolit 100 mmol/dm<sup>3</sup> NaOH

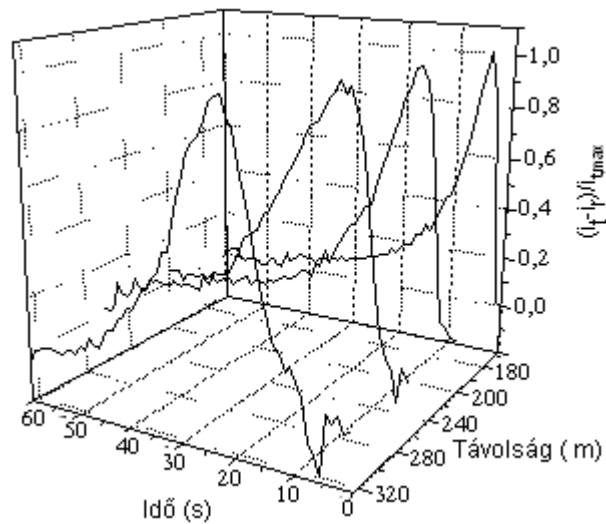
Az ábra alapján látható, hogy a réz mikroelektród álló oldatban a glükóz koncentrációtól lineárisan függő, jól definiált, stabil amperometriás áramjelet ad. Tehát alkalmazható PEKM mérésekben repülési idő módszerrel végzett glükóz diffúziós koefficiens mérésekre.

A diffúziós koefficiens mérések során az injektort, azaz forrás mikropipettát 100 mmol/dm<sup>3</sup> glükóz oldattal töltöttem meg, amely 0,1 mol/dm<sup>3</sup>-es nátronlúg oldattal készült. Különböző repülési távolságok ( $d=d_i + n\Delta x$ ) mellett mikro cseppecskéket injektáltam és folyamatosan regisztráltam az amperometriás áramot 0,65V elektródpotenciál mellett. Minden mikrocsepp beadása után a várakozásnak megfelelően csúcs alakú áram – idő tranziens jelent meg. Nulla időnek,  $t=0$ -nak tekintetem a cseppecske beadás pillanatát. Különböző repülési távolságok melletti

regisztrátumokat mutat be a 22. ábra. 22/A ábra mutatja a regisztrátumokat, 22/B ábra pedig az illető  $i_{t,max}$  értékekre normált áramcsúcs - idő tranzienseket, azaz  $(i_t - i_r)/i_{t,max} - t$  függvényeket.  $i_t$  jelenti az injektálás utáni  $t$  időben mérhető áramintenzitást,  $i_r$  jelenti a maradék áram értékét,  $i_{t,max}$  a tranziens csúcsánál mért áramintenzitás.



**22/A. ábra** Különböző repülési távolságok mellet kapott áram – idő regisztrátumok. Réz mikrokorong munkaelektrod, elektród potenciál = 0,65V



**22/B. ábra** A 22/A. ábrán látható különböző repülési távolságok mellet kapott áram – idő regisztrátumok a maximum értékeire normálva, réz mikrokorong munka elektród, elektród potenciál 0,65V.

Amint azt a korábbiakban (2.3.4.) láttuk a repülési idő módszerrel történő diffúziós koefficiens-mérés módszer elméleti alapját az előzőekben említett egyenlet jelenti.

Természetesen a mérés csak úgy ad pontos eredményt, ha az alkalmazott kísérleti feltételek nem térnek el nagymértékben az egyenlet levezetéséhez használt modell sajátosságaitól. Célszerű volt megvizsgálnunk, hogy a kapott áram - idő tranziensek mennyire térnek el az idealizált kísérleti feltételek mellett várható tranziensektől.

Munkámban ismert  $D$  és  $d=(d_r+n\Delta x)$  adatpárok alkalmazásával a 8. egyenlet alapján generáltam  $C_{d,t} - t$  függvényt. Origin 7 programot használtam e munkához. Ezt a generált elméleti tranzienszt illesztettem az egyik mért tranzienshez a következő módon. A  $K$  illesztési konstans számításához (13) a mért tranziens maximumánál mért áramértékből kivonva a maradékáram ( $i_r$ ) értékét képeztem az  $i_t - i_r = \Delta i_{t,d,max}$  értéket. Ezt osztottam a generált függvény  $C_{t,d}$  maximum értékével ( $C_{t,d,max}$ ).

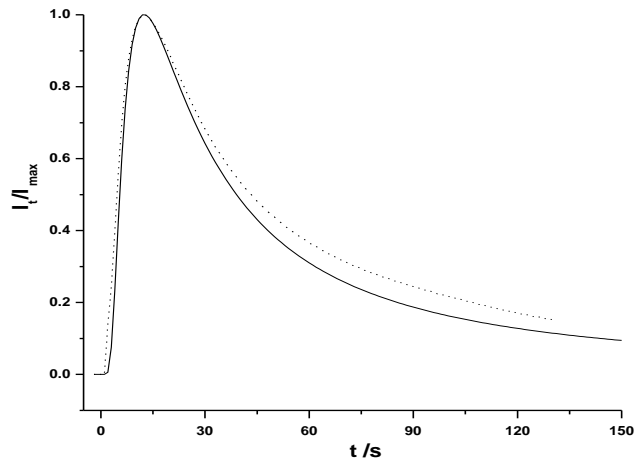
$$K = \frac{\Delta i_{t,d,max}}{C_{t,d,max}} \quad (13)$$

Az elméleti (számított) tranziens készítéséhez  $K$  értékével szoroztam az egyes  $t$  értékekhez tartozó generált  $C_{t,d}$  értékeket és ezeket ábrázoltam az idő függvényében (14). A 23. ábra mutatja az így egymáshoz illesztett számított (pontsorral jelzett) és mért (folyamatos vonallal jelzett) tranzienseket.

$$\Delta i_{t,d,theoretical} = C_{t,d} K \quad (14)$$

Lúgos közegben végezve a méréseket a glükóz diffúziós koefficiense  $6,3 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ -nak adódott a kapott értékek  $3,5 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$  standard deviációja mellett. Ez viszonylag jó egyezésben van a szakirodalomban található<sup>155</sup>  $6,76 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$  értékkel.

Az elméleti értékeket ábrázolva, és a mérés során egy maximummal ( $\Delta t_{max}$ ) rendelkező görbét kapunk.



**23. ábra** Számított és mért  $i_{\max}$  értékre normált tranziensek. Folyamatos vonal jelenti a mérés során kapott regisztrátumból készített tranziens (mérési körülmények), a pontsor jelzi az (13) egyenlet alapján számított értékeket.

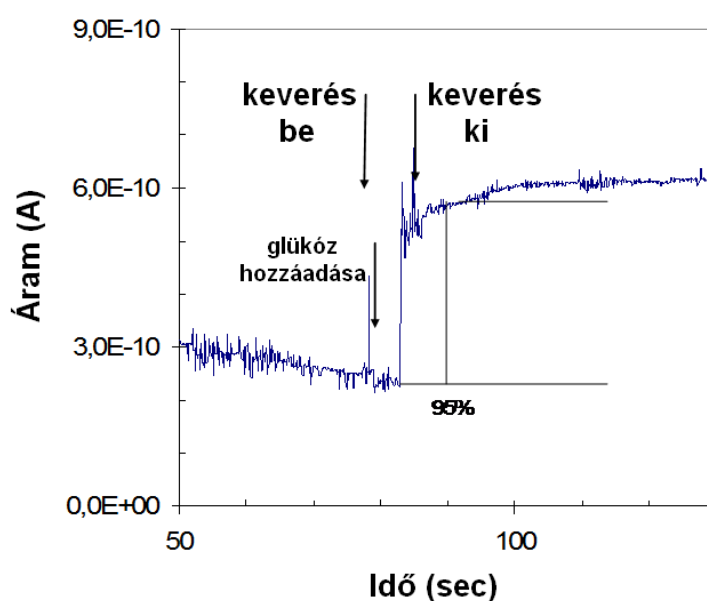
#### 4.2.2.2. Glükóz diffúziós koefficiensének mérése enzimelektrodos detektálással

Gyakorlati szempontból a glükóznak semleges közegben mutatkozó diffúziós koefficiense jóval fontosabb adat, mint a lúgos közegű. Célszerű volt megvizsgálni, hogy a glükóz koncentrációt semleges közegben mérni képes bioszenzor alkalmazható e repülési időn alapuló diffúziós koefficiens-mérésre. A bioszenzorok mérőfelületét biokatalitikus reakció réteg borítja. Ez feltehetően növeli az elektród válaszidejét. Kérdéses, hogy ez mekkora torzulást okozhat az elektród válasz – idő tranziensben.

A diffúzió meghatározásához amperometriás glükózmérő enzimelektrod mikro méretű változatát készítettem el, a 3.6. fejezetben leírtak szerint. A válaszidő-méréshez az elektródra ezüst huzal kvázi referencia elektróddal szemben 0,65 V polarizáló feszültséget kapcsoltam és  $10\text{cm}^3$  pH = 7,4 foszfát puffer oldatban regisztráltam az amperometriás áramot. Stacioner áram elérése után  $10\ \mu\text{l}$ ,  $100\text{mmol/dm}^3$  koncentrációjú glükóz oldatot juttattam a mérőcellába. A glükóz oldat

beadás után rövid idejű keveréssel homogenizáltam az oldatot. A kapott áram- idő regisztrátumot a 24. ábra mutatja.

Az ábra alapján látható, hogy az általam készített kisméretű bioszenzor válaszideje viszonylag rövid. A viszonylag nagy és hirtelen koncentráció változás esetében a teljes áramintenzitás változás 95%-ának eléréséhez 5-10 másodperc szükséges. A reakció réteggel nem borított felületű elektródok esetében tapasztalhatóanál kissé nagyobb válaszidő csak kismértékben torzítja az áram – idő tranzienszt, így csak kicsiny pontatlanságot eredményez a diffúziós koefficiensmérésben.



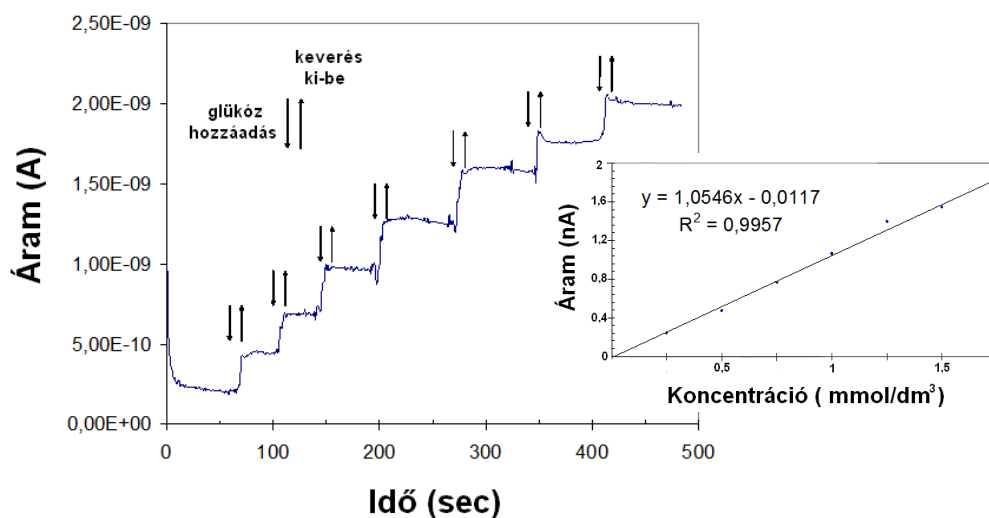
**24. ábra** Mikroméretű, amperometriás glükózelektrod válaszgörbéje ( $10\text{ cm}^3$  puffer,  $100\text{ }\mu\text{l}$   $100\text{mmol/dm}^3$  glükóz oldat, elektród potenciál  $0,65\text{ V}$ )

Szükséges volt megvizsgálni az enzimelektrod álló oldatban mutatkozó válaszábanak stabilitását és koncentrációfüggését. Ehhez a 22. ábrát eredményező kísérletet megismételtem glükózelektrod alkalmazásával. Háttélektrolitként  $10\text{ cm}^3$  foszfát puffer oldatot juttattam a mérőcellába, és ezüst szál kvázi referencia elektróddal szemben  $+0,65\text{ V}$  elektród potenciált kapcsoltam a glükóz enzimelektrodra. Stacioner elektródpotenciál elérése után  $100\text{mmol/dm}^3$  koncentrációjú glükóz oldat  $100\text{ }\mu\text{l}$ -es dózisait juttattam a mérőcellába. A glükóz adagok bejuttatása után rövid idejű mágneses keverés alkalmazásával homogenizáltam a mérőcella tartalmát. A kísérlet során kapott áram - idő



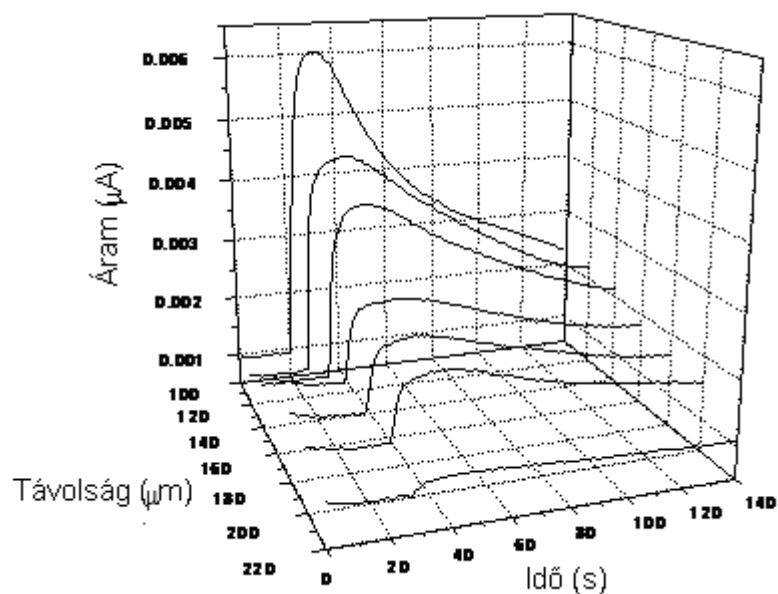
regisztrátumot és az annak alapján szerkesztett kalibrációs görbét, azaz áram – koncentráció függvényt a 25. ábra mutatja.

A 25. ábra alapján megállapítható, hogy az általam készített glükóz-elektrod a glükóz koncentrációtól függő stabil áramintenzitás jelet ad. Ennek megfelelően alkalmas semleges pH-jú közegben, repülési-idő módszerrel történő diffúziós koefficiensmérésre.

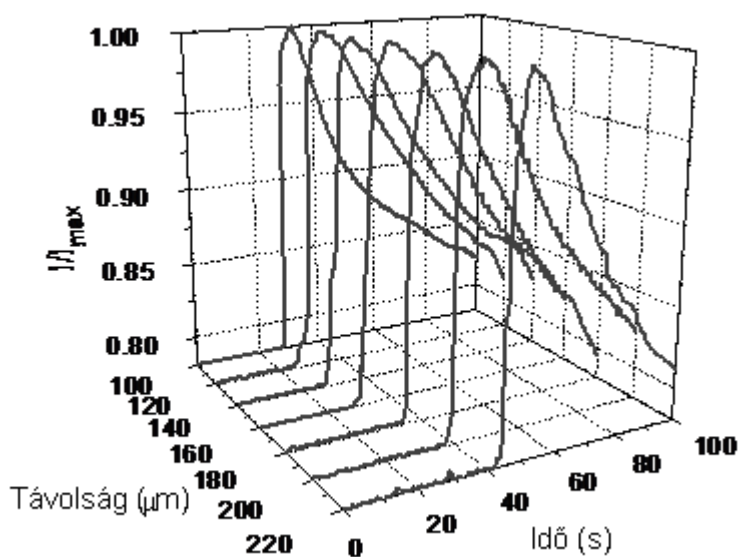


**25.ábra** Glükóz elektróddal kapott áram-idő regisztrátum. Az áram lépcsők 50 $\mu$ l 50mmol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú glükóz oldat dózisos hozzáadás hatására jöttek létre. Alapelektrolit 10 cm<sup>3</sup> foszfát puffer, pH = 7,4, elektród potenciál 0,65 V. A beékelte függvény a regisztrátum alapján készített kalibrációs görbe

A korábban leírt repülési idő kísérletet pH = 7,4 foszfát puffer oldatban, glükóz-mérő enzimelektrodos detektálással, különböző repülési távolságok alkalmazásával elvégezve nyertem a 26. ábrán látható áram – idő tranzienseket.



**26./A ábra** Különböző repülési távolság ( $d$ ) mellett, 7,4 pH-jú foszfát pufferben kapott áram-idő transziensek, detektálás 0,65V polarizációs feszültség mellett enzimelektóddal.



**26/B. ábra** A 26/A. ábrán mutatott transziensek  $i_{t_{max}}$  értékekre normált  $(i_t - i_r)/i_{t_{max}}$  képe

A távolságok ( $d_i + n_i \Delta x$ ) és kapott  $t$  maximumok ( $t_{max,i}$ ) felhasználásával a (15) egyenlet alapján kiszámítottam  $d_i$  legvalószínűbb értékét, majd ennek ismeretében az egyes adatpárokból adódó diffúziós koefficiens értékeket.

$$D = \frac{(d + n_1 \Delta x)^2}{6 \Delta t_{1,max}} = \frac{(d + n_2 \Delta x)^2}{6 \Delta t_{2,max}} \quad (15)$$

A kapott eredményekről ad áttekintést a 4. táblázat.

Repülési távolság ( $\mu\text{m}$ )	$t_{\text{max}}$ (s)	PEKM D értékek ( $\text{cm}^2/\text{s}$ )
100	13	$6,1 \cdot 10^{-8}$
120	15	$6,4 \cdot 10^{-6}$
140	17	$6,5 \cdot 10^{-7}$
160	19	$7,2 \cdot 10^{-7}$
180	23	$5,8 \cdot 10^{-8}$
200	26	$6,2 \cdot 10^{-8}$
220	30	$6,4 \cdot 10^{-9}$
240	35	$6,1 \cdot 10^{-8}$

**3. táblázat** Glükóznak foszfát puffer oldatban, különböző repülési távolságok mellett mért diffúziós koefficiens értékei és a számításhoz használt kísérleti adatok összessége.

A glükóz enzimelektrod kis mérete és kónikus alakjának köszönhetően képes tengely irányban mozogni gélekben, szövetekben, üledékekben anélkül, hogy megsérülne, illetőleg, hogy komolyabb sérülést okozna a vizsgált közeg szerkezetében. Ennek megfelelően pH = 7,4 pH - jú foszfát pufferrel készített agaróz gélekben is mértem a glükóz diffúziós koefficiensét. Az előzőekben leírt módon, 0,5%-os agaróz gélben végzett kísérletek eredményeit foglalja össze a 4. táblázat.

Repülési távolság ( $\mu\text{m}$ )	$t_{\text{max}}$ (s)	PEKM D értékek ( $\text{cm}^2/\text{s}$ )
100	62	$5,6 \cdot 10^{-6}$
120	66	$6,3 \cdot 10^{-6}$
140	69	$5,1 \cdot 10^{-7}$
160	71	$5,3 \cdot 10^{-7}$
180	83	$6,1 \cdot 10^{-8}$
200	88	$6,7 \cdot 10^{-8}$
220	95	$6,8 \cdot 10^{-9}$

**4. táblázat** Glükóz diffúziós együtthatóinak értéke glükóz enzimelektóddal mérve agaróz gélben

A diffúziós együttható értékek kiszámításához minden egyes kombinációt (távolság párt) figyelembe véve kiszámítottam  $d_i$  értékét. A kapott értékek átlagát fogadtam el  $d$ -nek. A két táblázat  $D$  adatainak összehasonlításával megállapíthatjuk, hogy jelentős különbség nincs az ilyen híg gélben és az oldatban kapott diffúziós koefficiens értékek között.

## 5. Összefoglalás

A pásztázó elektrokémiai mikroszkópia egy viszonylag új módszer. Számos területen bizonyult jól alkalmazhatónak. Munkám során céлом volt néhány újszerű méréstechnikai feladat megoldása kapcsán vizsgálni a kémiai mikroszkóp illető területen történő alkalmazásának lehetőségét, annak előnyeit.

Kísérleteimben a pásztázó elektrokémiai mikroszkópot korróziós folyamatok tanulmányozására és diffúziós koefficiens mérésére használtam.

A korróziós vizsgálatok céljára alkalmas pásztázó elektrokémiai mikroszkópiás mérőcellát készítettem műanyag korongba ágyazva vas és cink huzalokat. A mérőcella fenék lapján megjelenő kis átmérőjű fém korongok felett különböző elektródokkal pásztázva lehetőségem volt korróziós folyamatok során a felületen végbemenő folyamatok által létrehozott mikrokörnyezeti koncentráció profilok tanulmányozására. A cink korrózió-védő hatásának tanulmányozására új típusú, kis ellenállású, kedvezően megnövelt élettartamú ion-szelektív cink mikropipettát fejlesztettem ki. Az elektród elektrokémiailag kialakított vezető polimer réteggel bevont szénszálból készített szilárd kontaktust tartalmaz. A vezető polimer stabilis határfázis potenciált biztosít. Az elektród kialakításának – néhány mikron átmérőjű mérőcsúcs átmérő, kis ellenállás - köszönhetően előnyösen alkalmazható PEKM mérőcsúcsként.

Vizsgáltam az illető elektród méréstechnikailag fontos tulajdonságait. Az elektróddal sikerült a vassal elektromosan összekapcsolt cink felületén mérni az oldatba menő cink-ionok koncentrációját. A fémkorongok felületének közelében saját készítésű antimon mikroelektróddal pásztázva kémiai képet sikerült készíteni a lokális pH és oxigén koncentráció profilokról.

Méréseimben folytattam a tanszéken korábban kifejlesztett repülési idő detektálásán alapuló diffúziós koefficiens mérőmódszer alkalmazási területének tanulmányozását. A korábban alkalmazott repülési időn alapuló diffúzió mérőmódszerek esetében a repülési távolság mérés bizonytalansága kedvezőtlenül befolyásolta a kapott eredményeket. A PEKM készülék speciális sajátossága, azaz a pontosan kontrollált lépéshossz lehetőséget biztosít arra, hogy egy sorozat mérést végezzünk különböző repülési távolságok mellett úgy, hogy a repülési távolságok közötti különbség pontosan ismert. Ez nagymértékben megnöveli a kapott eredmények pontosságát, megbízhatóságát.

A mérésekhez saját készítésű elektródokat, mérőcellákat alkalmaztam. A glükóz rendkívül fontos szerepet tölt be az emberi szervezetben, így fontos annak diffúziójának tanulmányozása. Munkámban meghatároztam glükóz diffúziós koefficiensét különböző közegekben. Erősen bázikus közegben elektrokatalitikus oxid filmmel bevont fém réz mikrokorong elektródot, míg közel semleges közegben amperometriás enzimelektrodót használtam. Méréseket végeztem agaróz gélben is.

## 6. Publikációs jegyzék

### I. Az eljárás témakörében készült publikációk:

1. Electrochemical time of flight method for determination of diffusion coefficients of glucose in solutions and gels. *Ágnes Varga, Gergely Gyetvai, Livia Nagy, Géza Nagy* Analytical and Bioanalytical Chemistry (2009) 394:1955–1963 **IF: 3.841**
2. Development of solid contact micropipette Zn ion selective electrode for corrosion studies *Ágnes Varga, Livia Nagy, Javier Izquierdo, István Bitter, Ricardo M. Souto, Géza Nagy* Analytical Letters Vol.44, Issue 18, (2011) 2876-2886 **IF: 0.920**
3. Spatially-resolved measurement of electrochemical activity and pH distributions in corrosion processes by scanning electrochemical microscopy using antimony microelectrode tips *J. Izquierdo, L. Nagy, Á. Varga, J.J. Santana, G. Nagy, R.M. Souto*. Electrochimica Acta 56 (2011), pp. 8846-8850) **IF: 3.642**
4. Scanning electrochemical microscopy for the investigation of corrosion processes: measurement of Zn<sup>2+</sup> spatial distribution with ion selective microelectrodes *J. Izquierdo, L. Nagy, Á. Varga, I. Bitter, G. Nagy, R. M. Souto*. Electrochimica Acta Volume 59, (2012) 398-403 **IF: 3.642**

### - Egyéb publikációk:

1. Facile, high yielding synthesis of deepened cavitands. A synthetic and theoretical study *Csók Zsolt; Kégl Tamás; Párkányi László; Varga Ágnes; Kunsági-Máté Sándor; Kollár, László*; Supramolecular Chemistry Vol.23 Issue 10 (2011) 710-719 **IF: 1.940**
2. Simultaneous Monitoring of the Transport of Anions and Cations across Polypyrrole Based Composite Membranes *Marceline N. Akieh, Ágnes Varga, Rose Marie Latonen, Stephen F. Ralph, Johan Bobacka, Ari Ivaska*. Electrochimica Acta Volume 56, Issue 10 (2011) 3507-3515. **IF: 3.642**

II. Az eljárás témakörében készült nem referált konferencia absztraktok:

1. XXXII. KEN (Kémiai Előadói Napok) 2009. Október 26-28., Szeged, (előadás)

**Varga Ágnes, Nagy Lívia, Nagy Géza**

Elektrokémiai repülési idő módszer használata glükóz diffúziós együtthatójának meghatározása oldatban és gélben

2. MKN 2010 (Magyar Kémikus Napok) 2010. Április 27-29. Veszprém, (előadás)

**Varga Ágnes, Nagy Lívia, Nagy Géza**

Kis ellenállású Zn ionszelektív mikropipetta elektród korróziós folyamatok pásztázó elektrokémiai mikroszkóppal történő vizsgálatához

3. CECE 2009 (6th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis) 2009. November 6-7. Pécs (poszter)

**Ágnes Varga, Lívia Nagy, Géza Nagy**

Determination of diffusion coefficients of glucose in solutions and gels by electrochemical TOF method

4. IC-ANMBES 2010 (Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences) 2010. Június 18-20. Brasov, Románia (előadás)

**Ágnes Varga, Lívia Nagy, Géza Nagy**

Development of low resistance Zn ionselective electrodes for Scanning Electrochemical Microscopic investigation of corrosion processes

5. CECE 2010 (7th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis) Pécs, 2010. Október 5-6. (poszter)

**Ágnes Varga, Javier Izquierdo, Lívia Nagy, Ricardo M. Souto, Géza Nagy**

SECM study of corrosion measurement of  $Zn^{2+}$  with ion selective microelectrodes

6. Bioszenzor Workshop III , 2010. Október 28-29. Pécs (előadás)

**Varga Ágnes, Gyetvai Gergely, Javier Izquierdo, Nagy Géza**

Kis ellenállású  $NO_3^-$  szelektív mikropipetta elektródok SECM mérésekhez

7. MKE I. Nemzeti Konferencia, 2011. május 22-25. Sopron (előadás)

**Varga Ágnes, Nagy Lívia, Juan José Santana Rodríguez, Nagy Géza**

Kis ellenállású ion-szelektív mikropipetta elektródok kifejlesztése és alkalmazása korróziós folyamatok pásztázó elektrokémiai mikroszkópiás vizsgálatához



Egyéb:

1. MKE I. Nemzeti Konferencia, 2011. május 22-25. Sopron (poszter)  
**Ágnes Varga, Zsolt Csók, Tamás Kégl, László Kollár, Sándor Kunsági-Máté**  
Complex formation ability of functionalized cavitand derivatives towards 4-chloro-benzotrifluoride

---

## 7. Irodalomjegyzék

- <sup>1</sup> M.V. Mirkin, Fu-Ren F. Fan, A. J. Bard. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 328.1-2.47-62. **1992**
- <sup>2</sup> R. C. Engstrom, M. Weber, D. J. Wunder, R. Burgess, S. Winqvist. *Anal. Chem.* 58.844-848. **1986**
- <sup>3</sup> C Puig-Lleixà, C Jiménez, J Bartrolí. *Sensors and Actuators B: Chemical*,72. 1. 56-62. **2001**
- <sup>4</sup> B.J. Seddon, Y. Shao, J. Fost, H.H. Giraults. *Electrochimica Acta*.39. 6.783-791. **1994**
- <sup>5</sup> M. A. McRipley, R. A. Linsenmeier. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 414.235-246. **1996**
- <sup>6</sup> S. Myler, F. Davis, S.D. Collyer, S.P.J. Higson. *Biosensors and Bioelectronics*. 20.408–412. **2004**
- <sup>7</sup> K.Winkler, R. Mojsa. *Analytical Chemistry*.70.24.5244. **1998**
- <sup>8</sup> R.G. Freitas, E.P. Antunes, E.C. Pereira. *Electrochimica Acta*. 54. 7.1999-2003. **2009**
- <sup>9</sup> Carter Olson, Ralphin N. Adams. *Analytica Chimica Acta*.29.358-363. **1963**
- <sup>10</sup> B.Haghighi, M. A. Tabrizi. *Electrochimica Acta*. In Press, Accepted Manuscript. Available online. **2011**
- <sup>11</sup> A. P. Doherty, R. J. Forster, M. R. Smyth, J. G. Vos. *Analytica Chimica Acta*. 255. 1. 45-52. **1991**
- <sup>12</sup> A.Miyabayashi, B. Mattiasson. *Analytica Chimica Acta*.213. 121-130. **1988**
- <sup>13</sup> A. Kishi, M. Umeda. *Applied Surface Science*. 255. 22. 9154-9158. **2009**
- <sup>14</sup> Ch. Amatore, A. Oleinick, I. Svir. *Electrochemistry Communications*. 6. 11. 1123-1130. **2004**
- <sup>15</sup> M.I. Montenegro, M.A. Queirós, J.L. Daschbach, Eds, *Microelectrodes: Theory and Applications*, Lkuwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London **1990**
- <sup>16</sup> P.W. Davies, F. Brink, Jr. *Rev. Sci. Instrum.*13. 524-. **1942**
- <sup>17</sup> Clark, L.C., *Trans. Am. Soc. Int. Org.* 2, 41–46. **1956**
- <sup>18</sup> Y.H. Shao, M.V. Mirkin, G. Fish, S. Kokotov, D. Palanker, A. Lewis, *Anal. Chem.* 69(8), 1627-1634., **1997**
- <sup>19</sup> P. Thie'baud, C. Beuret, N.F. de Rooij, M. Koudelka-Hep. *Sensors and Actuators*.70..51–56. **2000**
- <sup>20</sup> M.A. El Mhammedi, M. Achak, M. Bakasse, A. Chtaini. *Chemosphere*.76.8.1130-

---

1134.2009

- <sup>21</sup> M.A. El Mhammedi, M. Achak, M. Bakasse. *Arabian Journal of Chemistry*. In Press. Av. online. **2010**
- <sup>22</sup> R.N. Adams: *Anal. Chem.*, 48. 1125A. **1976**
- <sup>23</sup> M.E. Rice, Z. Galus, R.N. Adams, *J. Electroanal. Chem.*, 143(1-2), 89-102. **1983**
- <sup>24</sup> M.E. Rice, G.A. Gerhardt, P.M. Hierl, G. Nagy, R.N. Adams. *Neuroscience*. 15(3), 891-902. **1985**
- <sup>25</sup> F.G. Gonon, C.M. Fombarlet, M.J. Buda, J.F. Pujol, *Anal. Chem.* 53(9). 1386-1389. **1981**
- <sup>26</sup> R. C. Engstrom, M. Weber, D. J. Wunder, R. Burgess, S. Winqvist. *Anal. Chem.* 58. 844-848. **1986**
- <sup>27</sup> S.F. Dressman, J.L. Peters, A.C. Michael. *J. Neurosci. Meth.* 119(1). 75-81. **2002**
- <sup>28</sup> E. Csöregi, L. Gorton, Gy. Marko-Varga. *Electroanal.* 6(11-12). 925-933. **1994**
- <sup>29</sup> E. Csöregi, L. Gorton, Gy. Marko-Varga. *Anal. Chim. Acta.* 273(1-2). 59-70. **1993**
- <sup>30</sup> F.Y. Ge, R.C. Tenent, D.O. Wipf. *Anal. Sci.* 17(0). 27-35. **2001**
- <sup>31</sup> M. Cremer, *Z. Biol.* 47. 562. **1906**
- <sup>32</sup> G. Eisenmann, D.O. Rudin, J.V. Casby. *Science*. 126. 831. **1957**
- <sup>33</sup> Z. Boksay, B. Lengyel. *Journal of Non-Crystalline Solids*. 14. 1. 79-87. **1974**
- <sup>34</sup> B. Csákvári, Z. Boksay, G. Bouquet. *Analytica Chimica Acta*. 56. 2. 279-284. **1971**
- <sup>35</sup> E. Pungor, E. Hollós-Rokosinyi, *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* 27. 63. **1961**
- <sup>36</sup> M.S. Frant, J.W. Ross, *Science*. 154. 1553. **1966**
- <sup>37</sup> L. Campanella, M. Tomassetti, M. Cordatore. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 4.2. 155-162. **1986**
- <sup>38</sup> P. Gehrig, B. Rusterholz, W. Simon. *Analytica Chimica Acta*. 233. 295-298. **1990**
- <sup>39</sup> H. Ruprecht, P. Oggenfuss, U. Oesch, D. Ammann, W.E. Morf, W. Simon. *Inorganica Chimica Acta*. 79. 67-68. **1983**
- <sup>40</sup> Z. Stefanac, W. Simon, *Microchem. J.* 12. 125. **1967**
- <sup>41</sup> D. Amman, W.E. Morf, P. Anker, P.C. Meier, E. Pretsch, W. Simon, *Ion-Selective El. Rev.* 5.3. **1983**
- <sup>42</sup> René Bloch, Adam Shatkay, H.A. Saroff. *Biophysical Journal*. 7. 6. 865-877. **1967**
- <sup>43</sup> L. Keil, G.J. Moody, J.D.R. Thomas. *Analytica Chimica Acta*. 96. 1. 171-175. **1978**
- <sup>44</sup> A. Demirel, A. Doğan, E. Canel, S. Memon, M. Yilmaz, E. Kilic. *Talanta*. 62. 1. 123-129. **2004**
- <sup>45</sup> Young Hee Kim, Na Ri Cha, Suk-Kyu Chang. *Tetrahedron Letters*. 43. 21. 3883-3886. **2002**

- 
- <sup>46</sup> A. P. Marchand, S. Alihodžić, A. S. McKim, K. A. Kumar, K. Mlinarić-Majerski, T. Šumanovae, S.G.Bott. *Tetrahedron Letters*. 39. 14. 1861-1864.**1998**
- <sup>47</sup> T. Iimori, S. D. Erickson, A. L. Rheingold, W.Clark Still. *Tetrahedron Letters*. 30. 50. 6947-6950.**1989**
- <sup>48</sup> A. R. L. Fraga, A. Collins, G. Forte, A.Rescifina, F. Punzo. *Journal of Molecular Structure* 929 .174–181.**2009**
- <sup>49</sup> Ł. Górskia, A. Matusevicha, P. Parzuchowskib, I. Łuciukb, E. Malinowska. *Analytica Chimica Acta*.665.39–46.**2010**
- <sup>50</sup> P. Singh, A. K. Singh, A.K. Jain. *Electrochimica Acta*. 56. 5386–5395.**2011**
- <sup>51</sup> K-Y Park, S-B Choi, M. Lee, B-K Sohn, S-Y. Choi. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 83.1-3.90-97.**2002**
- <sup>52</sup> R. K. Franklin, S. M. Martin, T. D. Strong, R.B. Brown. *Comprehensive Microsystems*.2.12. 433-461.**2008**
- <sup>53</sup> S. F. Biagi, J. Bordas, D. Duxbury, E. Gabathuler. *Nuclear Ins.and Meth. in Phys. Res.Section A:Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*.392.1-3.131-134.**1997**
- <sup>54</sup> P.C. Caldwell, J. *Physiol.Lond.*,126.169. **1954**
- <sup>55</sup> J.A.M. Hinke, *Nature,Lond.* 184.1257. **1959**
- <sup>56</sup> A.A. Lev, E.P. Buzhinsky, *Tsitologiya*, 3. 614. **1961**
- <sup>57</sup> R.C. Thomas, W.J. Moody. *Trends in Biochemical Sciences*.5. 4. 86-87.**1980**
- <sup>58</sup> L.R. Pucacco, N.W. Carter. *Anal. Biochem*.73.501-512. **1976**
- <sup>59</sup> S. Levy, J.A. Coles, *Experienta*. 33.553-554. **1977**
- <sup>60</sup> H. Yamaguchi, N.L. Stephens, *Fed.Proc*.36.499.**1977**
- <sup>61</sup> A.P.Oliver. *Electroenc. and Clinical Neurophys*. 31.3. 284–286 **1971**
- <sup>62</sup> Ch.Giaume, R.T. Kado. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Res*. 762. 2. 337-343.**1983**
- <sup>63</sup> B. R. Horrocks, M. V. Mirkin, D. T. Pierce, A. J. Bard, G. Nagy, K. Toth. *Chem*. 65. 1213.**1993**
- <sup>64</sup> J. Li, Y. Du, Ch. Fang . *Electroanalysis*.19.5. 608–611.**2007**
- <sup>65</sup> P. VanHoudt, Z. Lewandowski B. Little. *Biotechnology and Bioengineering*.40. 601–608. **1992**
- <sup>66</sup> A.N. Bezbaruah , T. C. Zhang. *Anal. Chem.*, 74.5726-5733.**2002**
- <sup>67</sup> A.Mauro. *Biophysical Journal*.1.4.353-372. **1961**
- <sup>68</sup> G.A. Kerkut, R.W. Meech. *Comp. Biochem. Phisiol*.19.819-932.**1966**
- <sup>69</sup> J.H. Saunders, H.M. Brown. *J.Gen.Physiol*.70.507-530.**1977**

- 
- <sup>70</sup> HM Troise-Frank, G. Denuault, LM Peter Faraday Discussion 94.23. **1992**
- <sup>71</sup> A.Ceresa, T. Sokalski, E. Pretsch. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 501. 1-2. 70-76. **2001**
- <sup>72</sup> T. Sokalski, A.Lewenstam. *Electrochemistry Communications*. 3. 3. 107-112. **2001**
- <sup>73</sup> H. Ruprecht, P. Oggenfuss, U. Oesch, D. Ammann, W.E. Morf, W. Simon. *Inorganica Chimica Acta*.79.67-68. **1983**
- <sup>74</sup> J. Tarcali, G. Nagy, K. Tóth, E. Pungor, G. Juhász, T. Kukorelli. *Anal.Chim.Acta*.178.231. **1985**
- <sup>75</sup> E.R. Gyurcsányi, A.S. Nyback, K. Tóth, G. Nagy, A. Ivaska. *Analyst*.123.1339-1344. **1998**
- <sup>76</sup> H.M. Brown, J.P. Pemberton, J.D. Owen. *Anal.Chim.Acta*.85.261-276. **1976**
- <sup>77</sup> M. Oehme, W. Simon. *Analytica Chimica Acta*. 86. 21-25. **1976**
- <sup>78</sup> M. Södergard, B. Csóka, G. Nagy, A. Ivaska, *Anal. Letters*.36.14.2909-2923. **2003**
- <sup>79</sup> Rif S El-Mallakh. *Medical Hypotheses*. 12.3. 269-282. **1983**
- <sup>80</sup> P. Schulthess, Y. Shijo, H.V. Pham, E. Pretsch, D. Amman, W. Simin. *Anal Chim. Acta*. 131.111-116. **1981**
- <sup>81</sup> E. Klusmann, J.W. Schultze, *Electrochim.Acta*.42(20-22).3123-3134. **1997**
- <sup>82</sup> Zamani H.A., M.R. Ganjali, M.J. Pooyamanesh. *Journal of the Braz. Chem. Soc*. 17:149-155. **2006**
- <sup>83</sup> Gupta V.K., D.K. Chauhan, V.K. Saini, S. Agarwal, M.M. Antonijevic, H. Lang. *Sensors*. 3:223-235. **2003**
- <sup>84</sup> Lamaka S.V., R.M. Souto, M.G.S. Ferreira. *Microscopy: Science, technology, applications and education*. 4 .**2010**
- <sup>85</sup> Ogle K., S. Morel, D. Jacquet. *Journal of the Electrochemical Society*. 153: B1-B5. **2006**
- <sup>86</sup> Souto R.M., Y. González-García, A.C. Bastos, A.M. Simões. *Corrosion Science*. 49:4568-4580. **2007**
- <sup>87</sup> Simões A.M., J. Torres, R. Picciochi, J.C.S. Fernandes. *Electrochimica Acta*. 54 3857-3865. **2009**
- <sup>88</sup> Simões A.M., A.C. Bastos, M.G. Ferreira, Y. González-García, S. González, R.M. Souto. *Corrosion Science*. 49:726-739. **2007**
- <sup>89</sup> Y.González-García. Ph.D. Thesis. *University of La Laguna (Tenerife, Spain)*. Ch. 5. **2007**
- <sup>90</sup> M.A.Messerli, L.P.Collis, P.J.S.Smith. *Biophysical Journal*.96:1597–1605. **2009**
- <sup>91</sup> Messerli M.A., L. P. Collis, P. J. S. Smith. *Electroanalysis*. 21:1906–1913. **2009**

- 
- <sup>92</sup> G.Denuault, G. Nagy, K. Toth. *Dekker, New York: A. J. Bard and M. V. Mirkin, eds.* **2001**
- <sup>93</sup> J.L.C. Clark, C. Lyons, *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 102.29. **1962**
- <sup>94</sup> G. Guilbault, J.G. Montalvo, *J.Am.Chem. Soc.* 91.2164. **1969**
- <sup>95</sup> B. Cem Özer, H. Özyörük, S. S. Çelebi, A. Yıldız. *Enzyme and Microbial Technology.* 40. 2. 262- 265.**2007**
- <sup>96</sup> Ph. N Bartlett; P. R Birkin, Jin Hai Wang; F. Palmisano, G. De Benedetto. *Analytical Chemistry.*70.17.3685.**1998**
- <sup>97</sup> L. Nagy, G. Nagy, R. E. Gyurcsányi, E. Lindner, M. R. Neuman. *J. Biochem. and Biophys.Methods.*53165-175.**2002**
- <sup>98</sup> G.G. Guilbault, J. Montalvo, J. Amer. *Chem. Soc.* 92. 2533.**1970**
- <sup>99</sup> G.G. Guilbault, G. Nagy..*Anal. Chem.* 45. 417.**1973**
- <sup>100</sup> G.G. Guilbault, G. Nagy, S.S. Kuan .*Anal.Chim.Acta.* 67.195.**1973**
- <sup>101</sup> D. Kirstein, L. Kirstein, F. Scheller. *Biosensors.* 1. 1.117-130.**1985.**
- <sup>102</sup> N. Tinkilic, O. Cubuk, I. Isildak. *Analytica Chimica Acta.* 452. 1. 29-34. **2002**
- <sup>103</sup> G. Nagy, L.H. von Storp, G.G. Guilbault. *Anal. Chim. Acta.* 66.443. **1973**
- <sup>104</sup> G. Davis. *Biosensors.* 1. 2. 161-178.**1985**
- <sup>105</sup> P.T. Kissinger. *Biosensors and Bioelectronics* . 20. 12. 2512-2516. **2005**
- <sup>106</sup> M. A. McRipley, R.A. Linsenmeier .*Journal of Electroanalytical Chemistry.*414. 2. 235-246.**1996**
- <sup>107</sup> D-M.Zhou, H-X. Ju, H-Y. Chen.*Sensors and Actuators B: Chemical.* 40. 2-3. 89-94. **1997**
- <sup>108</sup> Zhang W, Furusaki S .*Biochem Eng J.* 9.73.**2001**
- <sup>109</sup> L. Nagy, G. Nagy.*Microchemical Journal* 84. 70-74.**2006**
- <sup>110</sup> Livia Nagy, Gergely Gyetvai, Géza Nagy. *Electroanalysis.* 21. 542-549.**2009**
- <sup>111</sup> Feldman BJ, Feldberg SW, Murray RW. *J Phys Chem.*91.6558.**1987**
- <sup>112</sup> Slowinska K, Feldberg SW, Majda M. *J Electroanal Chem.*554–555.61.**2003**
- <sup>113</sup> Bard AJ, Crayston JA, Kittlesen GP, Shea TV, Wrighton.MS.*Anal.Chem.* 58.2321.**1986**
- <sup>114</sup> Fosset B, Amatore C, Bartlet J, Wightman RM. *Anal Chem.*63.1403.**1991**
- <sup>115</sup> Mosbach M, Laurell T, Nilsson J, Csöregi E, Schuhmann W.*Anal Chem.* 73.2468.**2001**
- <sup>116</sup> Mirkin MV, Arca M, Bard AJ.*J Phys Chem* .97.10790.**1993**
- <sup>117</sup> Rice ME, Gerhardt GA, Hierl PM, Nagy G, Adams RN.*Neuroscience.* 15.891.**1985**

- 
- <sup>118</sup> Bard AJ, Fan FRF, Kwak J, Lev O. *Anal Chem.* 61.132. **1989**
- <sup>119</sup> Bard AJ, Mirkin MV (eds) *Scanning electrochemical microscopy*. Wiley, New York. **2001**
- <sup>120</sup> Csóka B, Nagy G. *J Biochem Biophys Methods.* 61.57. **2004**
- <sup>121</sup> Martin RD, Unwin PR. *J Electroanal Chem.* 593.19. **2006**
- <sup>122</sup> G. Binning, H. Rohrer, Ch. Gerber, E. Weibel, *Appl. Phys. Lett.* 40.178. **1982**
- <sup>123</sup> I. Koyuncu, J. Brant, A. Lüttge, M. R. Wiesner. *Journal of Membrane Science.* 278. 1-2. 410-417. **2006**
- <sup>124</sup> R.C. Engstrom, C.M. Pharr, *Anal. Chem.* 61.1099A. **1989**
- <sup>125</sup> R.C. Engstrom, M. Weber, D.J. Wunder, R. Burgess, S. Winqvist, *Anal. Chem.* 58.844. **1986**
- <sup>126</sup> R.C. Engstrom, R.M. Wightman, E.W. Kristensen, *Anal. Chem.* 60.652. **1988**
- <sup>127</sup> R.C. Engstrom, M. Weber, J. Werth, *Anal. Chem.* 57. 933. **1985**
- <sup>128</sup> A.J. Bard, F.-R.F. Fan, J. Kwak, O. Lev, *Anal. Chem.* 61.132. **1989**
- <sup>129</sup> S.E. Pust, W. Maier, G. Wittstock. *Zeitschrift für Physikalische Chemie.* 222:1463-1517. **2008**
- <sup>130</sup> Niu L., Y. Yin, W. Guo, M. Lu, R. Qin, S. Chen. *Journal of Materials Science.* 44:4511-4521. **2009**
- <sup>131</sup> Y. González-García, J.J. Santana, J. González-Guzmán, J. Izquierdo, S. González, R.M. Souto. *Progress in Organic Coatings.* 69:110-117. **2010**
- <sup>132</sup> Souto R.M., S.V. Lamaka, S. González. *Microscopy: Science, technology, applications and education.* 4. **2010**
- <sup>133</sup> Y. González-García, G.T. Burstein, S. González, R.M. Souto. *Electrochemistry Communications.* 6:637-642. **2004**
- <sup>134</sup> J.J. Santana, J. González-Guzmán, L. Fernández-Mérida, S. González, R.M. Souto. *Electrochimica Acta.* 55:4488-4494. **2010**
- <sup>135</sup> A.C. Bastos, A.M. Simões, S. González, Y. González-García, R.M. Souto. *Electrochemistry Communications.* 6:1212-1215. **2004**
- <sup>136</sup> C. Gabrielli, E. Ostermann, H. Perrot, V. Vivier, L. Beitone, C. Mace. *Electrochemistry Communications.* 7:962-968. **2005**
- <sup>137</sup> E. Volker, C.G. Inchauspe, E.J. Calvo. *Electrochemistry Communications.* 8:179-183. **2006**
- <sup>138</sup> Wei Ch., A.J. Bard, G. Nagy, K. Tóth. *Analytical Chemistry.* 67:1346-1356. **1995**
- <sup>139</sup> Bastos A.C., M.G. Taryba, O.V. Karavai, M.L. Zheludkevich, S.V. Lamaka, M.G.S. Ferreira. *Electrochemistry Communications.* 12:394-397. **2010**

- 
- <sup>140</sup> Szentgyörgyi S., Molnár K., Parti M.: *Transzportfolyamatok*, Tankönyvkiadó Budapest **1986**
- <sup>141</sup> A. Lehmani, T. Cartailier, S. Rossy-Delluc, P. Turq. *Journal of Electroanalytical Chemistry*.416. 1-2.121-125.**1996**
- <sup>142</sup> V. Danel, V. Plichon .*Electrochimica Acta*. 27. 6. 771-774.**1982**
- <sup>143</sup> H.C. Gaur, H.L. Jindal. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*. 16. 3.437-439.**1968**
- <sup>144</sup> Allan J. MacLeod. *Applied Mathematics and Computation*. 57 . 2-3.305-31.**1993**
- <sup>145</sup> Ana L. Magalhães, Francisco A. Da Silva, Carlos M. Silva *The Journal of Supercritical Fluids*. 55.3.898-923.**2011**
- <sup>146</sup> Qing-Lin Liu, Hao-Qi Gao. *Journal of Membrane Science*. 214. 1. 131-142.**2003**
- <sup>147</sup> Ch. Amatore, C. Sella, L. Thouin.*Journal of Electroanalytical Chemistry*.593. 194–202.**2006**
- <sup>148</sup> A.Varga,G.Gyetvai,L.Nagy,G.Nagy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 394:1955–196.**2009**
- <sup>149</sup> Gyetvai G., L. Nagy, A. Ivaska, I. Hernadi, G. Nagy.*Electroanalysis*. 21:1970-1976. **2009**
- <sup>150</sup> Gyetvai G., S. Sundblom, L.Nagy, A. Ivaska, G. Nagy.*Electroanalysis*. 19:1116-1122. **2007**
- <sup>151</sup> L. Niu, Y. Yin, W. Guo, M. Lu, R. Qin, S. Chen.*J. Mater. Sci*. 44 .4511–4521. **2009**
- <sup>152</sup> B. Horrocks, M.V. Mirkin, D.T. Pierce, A.J. Bard, G. Nagy, K. Toth. *Anal. Chem*. 65 .1213-1224. **1993**
- <sup>153</sup> Torto N, Ruzgas T, Gorton L. *J Electroanal Chem*. 464.252.**1999**
- <sup>154</sup> Ye R, Balvin P. *J Chromatogr A*. 687.141.**1994**
- <sup>155</sup> Lide D R *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, CRC Press.**1995**