

Összefoglalás:

A voltammetriás módszerek számos változata az elektród felületén átalakuló anyag transzportjától függő jelet produkál. Ennek megfelelően elektrokémiai módszerek széles körben használatosak különböző közegekben végbemenő diffúziós anyagtranszport vizsgálatára. A pályázat keretében végzett munkában elektrokémiai módszerekkel tanulmányoztuk diffúziós anyagtranszportok sajátosságait. A munka eredményei az alábbi területeken jelentkeztek:

-a., Újszerű, a pásztázó elektrokémiai mikroszkópia (scanning electrochemical microscopy, SECM)speciális sajátosságán alapuló egyszerű, gyors, megbízható diffúzió állandó mérő módszert dolgoztunk ki.

-b., Megépítettünk az elektrokémiai mikroszkóp egy új, a korábbi saját építésű készüléknél nagyobb térbeli felbontást lehetővé tevő változatát.

-c., Új, a pásztázó elektrokémiai mikroszkópos mérések sajátosságaihoz jól alkalmazkodó, kisméretű, de egyben kis ellenállású, nagy stabilitású mérőcsúcs elektródokat fejlesztettünk ki és alkalmaztunk.

-d., Vizsgálatokat végeztünk hagyományos elektrokémiai diffúzió állandó mérő elektrokémiai módszereket összehasonlítva az általunk kidolgozott mérőmódszerrel.

-e., Kidolgoztuk a periódikusan megszakított amperometria módszerét. Amely egyes kémiaiilag módosított amperometriás munkaelektrod esetében nagyságrendekkel képes a detektálás érzékenységét megnövelni. A növekedés abból adódik, hogy az elektród folyamat periódikus megszakításával időt biztosítunk a diffúziós réteg feltöltődésére, az elektroaktív anyag lokális koncentrációjának diffúzió által történő növekedésére.

-f., Ha a voltammetriás mérés ismeretlen diffúziós karakterű közegben történik, akkor a vizes oldatokban készített kalibrációs görbe csak korlátozottan használható a voltammetriás jel koncentráció adattá történő konverziójára. Ilyen esetek az in vivo voltammetriás mérések, vagy szuszpenziókban, bonyolult matrixú ismeretlen viszkozitású, tortuozus közegekben történő mérések. Kísérleteinkben vizsgáltuk az ilyen esetekben történő koncentrációmérések megbízhatóságát, illetőleg a megbízhatóság növelésének lehetőségeit.

Az egyes fent említett területeken kapott eredményeinkről folyóirat cikkek, előadások, poszterek és egy megvédett és egy összeállítás alatt lévő Ph.D. disszertáció szól. Az alábbiakban röviden összefoglaljuk az eredményeket.

a., Újszerű diffúzió állandó mérő módszer kidolgozása.

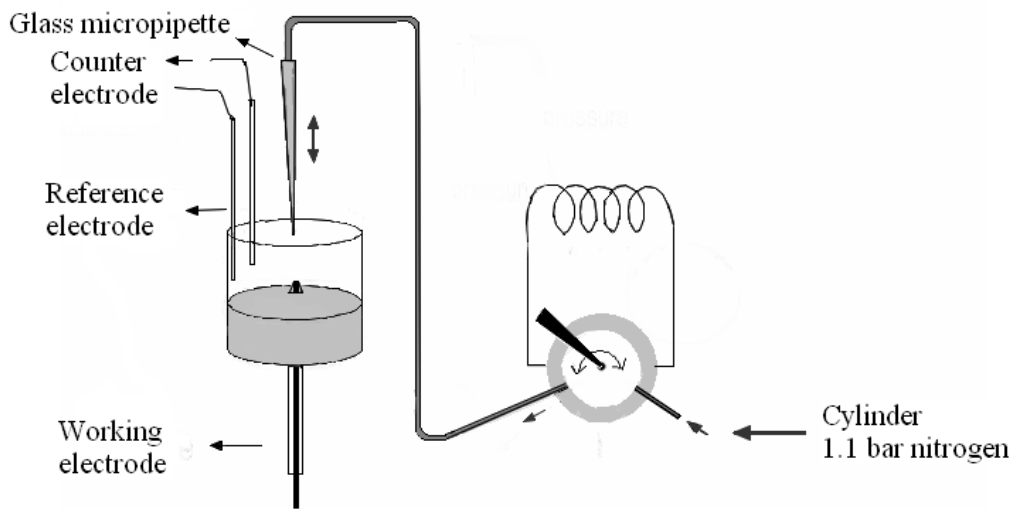
A kidolgozott módszer az elektrokémiai repülési idő, (elektrokémiai time of flight ETOF) módszerek közé sorolható. Ezt a kifejezést – tudomásunk szerint- elsőként Murry ¹ használta. Azóta számos más, többé-kevésbé különböző^{2,3,4,5,6} ETOF módszerről olvashatunk a szakirodalomban.

A kidolgozott módszer előzményének tekinthető egy korábbi ⁷ munkánk, amely során érzéstelenített kísérleti állatok központi ideg rendszerében különböző anyagok migrációjának sebességét mértük elektrokémiai úton. Ez esetben egy mikroinjektorból és egy ultramikro elektródból álló együttest készítettünk, ezt az illető vizsgálandó agy szövetbe vezettük. Az injektorvól egy nano cseppecskét – alkalmas pneumatikus készülék alkalmazásával kibocsátva regisztráltuk az ultramikro elektródon kialakuló elektrokémiai jel tranzienszt. A tranziens jel maximumának megjelenése és az injektálás időpontja közötti idő és az injektor – detektor közötti repülési távolság adatokból számoltuk a transzport sebességét. A módszer alkalmazásakor bizonytalanságot jelentett, hogy a repülési távolság mikron skálán történő meghatározása meglehetősen pontatlan.

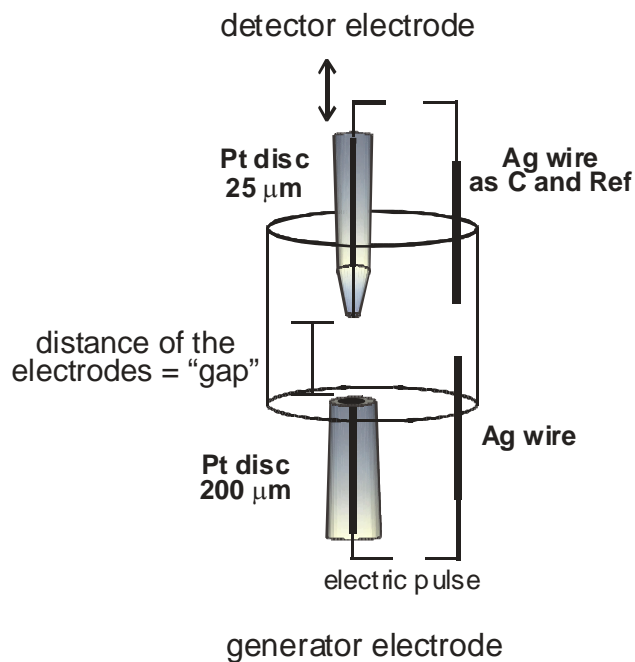
Más a helyzet, ha a repülési távolságot pásztázó elektrokémiai mikroszkóppal állítjuk be. Jóllehet az eredeti távolság általában nem ismert, de a mikroszkóp pozicionáló szerkezetének lépés hossza nagy pontossággal beállítható. Így számos lépés hossz állítható be. Az így különböző repülési idők melletti idő adatok készletéből nagy pontossággal meghatározható a transzport sebesség.

A kidolgozott diffúzió állandó mérő módszer működése könnyen megérthető az alábbiak alapján.

Az alkalmazott készülékek vázlatos képei az 1.a és 1b. ábrán láthatók



1.a. ábra. Az alkalmazott készülék vázlatos rajza (mikropipettás injektoros változat).



1.b ábra. Az alkalmazott készülék vázlatos rajza (coulometriás injektoros változat)

A mérés a pásztázó elektrokémiai mikroszkóp cellájában történik. A Z irányú pozicionáló motorhoz rögzített mikropipettát (1a ábra) a vizsgálandó anyag oldatával töltjük meg. A pipetta a pneumatikus injektorhoz kapcsolódik. Az injektorral szembe pozicionáljuk a mérőelektrodot. A másik, elektrokémiailag bejuttatható anyagok esetében sikerrel alkalmazott megoldás esetében (1.b. ábra) a mikroszkóp detektáló csúcsát rögzítjük a Z pozicionáló motorhoz. Vele szemben helyezük el a generáló elektrodot amely az elektrod folyamathoz szükséges szabályozott áramforráshoz kapcsolódik.

Az injektor – detektor illetve generátor – detektor közötti repülési távolság kezdeti, nagy pontossággal be nem állítható értéke d_i . A pozicionáló szerkezet n számú pontosan ismert lépéssel (Δx) meg tudja változtatni a távolságot Így számos forrás - detektor repülési távolság érték állítható be amelyek közötti különbséget pontosan ismerjük ($d = d_i \pm n\Delta x$).

A diffúziós koefficiens méréshez a kisméretű forrásból mikro-mennyiségű anyagot (M) bocsátunk ki adott időpontban és regisztráljuk a detektor jel - idő függvényét. Ha a konvekció elhanyagolható mértékű és ugyancsak kicsiny a repülési távolsághoz képest a forrás és a detektor mérete, továbbá ezek "árnyékolási hatása" is elhanyagolható, akkor érvényes a jól ismert, a szférikus diffúzióra vonatkozó

$$C_{d,t} = \frac{M}{8(\pi Dt)^{\frac{3}{2}}} e^{-\frac{d^2}{4Dt}} \quad (1)$$

egyenlet, amely megadja a kezdeti időpontban bejuttatott M anyag mennyiség koncentrációját t időpontban d helyen. ($C_{d,t}$), D az illető anyag diffúzió állandója az illető közegben.

Az anyag bejutása után d távolságban nyomon követve a koncentráció – idő ($C_{d,t} - t$) függvényét egy maximummal rendelkező görbét kapunk. A maximum megjelenési ideje „repülési idő” (Δt_{max}) a fenti egyenlet alapján könnyen kifejezhető:

$$\Delta t_{max} = \frac{d^2}{6D} \quad (2)$$

Látható, hogy a repülési idő és a diffúzió állandó közötti függvénykapcsolat nem tartalmazza M értékét. d és Δt_{max} ismeretében a diffúzió állandó kiszámítható. Felhasználva a pásztázó elektrokémiai mikroszkóp sajátosságát számos $d = (d_i \pm n\Delta x) - \Delta t_{max}$ értékpár nyerhető így a diffúzió állandó mérés megbízhatósága jelentősen növelhető a viszonylag egyszerű, gyors méréstechnika alkalmazása mellett. Lévé, hogy a mikropipetta, illetve mikro elektrodok képesek gélekben szuszpenziókban, biológiai szövetekben is mozogni, működni így a diffúziós állandó mérő módszer széles körben alkalmazható.

A repülési időn alapuló diffúziós állandó mérés megbízhatóságának növelését tehát a pásztázó elektrokémiai mikroszkóp alkalmazása eredményezi. Több repülési távolság alkalmazásával a d_i érték pontosan kiszámíthatóvá válik felhasználva a kapott $\Delta t_{max} - d_i + n\Delta x$ adatpárokat az alábbiak szerint:

Használjunk itt csak két adat párt ($d_1 - \Delta t_{max1}$ és $d_2 - \Delta t_{max2}$) az egyszerűség kedvéért

$$D = \frac{d_1^2}{6\Delta t_{max1}} ; \quad D = \frac{d_2^2}{6\Delta t_{max2}}$$

$$\text{Ahol } d_1 = d_i + n_1 \Delta x, d_2 = d_i + n_2 \Delta x$$

$$\text{ebből } \frac{d_1^2}{\Delta t_{\max 1}} = \frac{d_2^2}{\Delta t_{\max 2}} \quad \text{és} \quad d_1^2 \Delta t_{\max 2} = d_2^2 \Delta t_{\max 1}$$

$$(d_i + n_1 \Delta x)^2 \Delta t_{\max 2} = (d_i + n_2 \Delta x)^2 \Delta t_{\max 1}$$

$$(d_i^2 + 2d_i n_1 \Delta x + (n_1 \Delta x)^2) \Delta t_{\max 2} = (d_i^2 + 2d_i n_2 \Delta x + (n_2 \Delta x)^2) \Delta t_{\max 1}$$

$$\text{Legyen } A = (\Delta t_{\max 2} - \Delta t_{\max 1})$$

$$A d_i^2 + 2(n_1 - n_2) \Delta x A d_i + (n_1^2 - n_2^2) \Delta x^2 A = 0$$

Mivel A , n_1 , n_2 , Δx és a megfelelő Δt_{\max} értékek ismertek, a másodrendű egyenletet megoldva d_i értéke meghatározható. A diffúzió állandó értéke így a Stokes Einstein egyenlet alapján kiszámítható. Több mérést végezve, a kapott értékeket átlagolva a mérés megbízhatósága nagymértékben növelhető.

b., Új pásztázó elektrokémiai mérőkészülék (SECM) megépítése

A korábbi munkánkban az OTKA támogatása segítségével megépített pásztázó elektrokémiai mikroszkóp léptető motoros pozicionáló szerkezeten alapult. A három térirányú mozgatást lehetővé tevő motorokat egy régi, használaton kívül helyezett optikai mikroszkóp vázára szereltük. A manuális mozgatást, „durva” pozicionálást az optikai mikroszkóp fogas léces célzó és beállító szerkezete teszi lehetővé. A készülék számítógépes finom pozicionáló mechanizmusa 75nm-es laterális felbontást tesz lehetővé.

Az illető készülék megépítése óta a sokkal nagyobb, akár atomi méretű felbontást is lehetővé tevő piezoelektromos lineáris motorok ára jelentősen csökkent ezért lehetőségünk volt egy piezoelektromos pozicionálón és megfelelő manuális pozicionáló szerkezeten alapuló korszerűbb pásztázó elektrokémiai mikroszkópot építeni. A mikroszkóp mérő, adatgyűjtő és kiértékelő programját a munka keretében magunk fejlesztettük ki. A korábbi készülék továbbra is működőképes maradt.

c., Kisméretű, kis ellenállású stabil mérőcsúcsok kifejlesztése pásztázó elektrokémiai mikroszkópos mérések céljára.

A potenciometriás szelektív mérőérzékelők között legkisebb, ultramikro mérőcsúccsal a mikropipetta típusú elektródok készíthetők. Sajnálatos módon ezek ellenállása igen nagy. Ennek megfelelően csak igen nagy ellenállású, nagy RC idő állandóval rendelkező mérő kör alkalmazásával használhatók koncentráció mérésre. A nagy időállandó megnehezíti pásztázó elektrokémiai mikroszkópiás alkalmazásukat. Csak igen kis pásztázási sebesség mellett képesek koncentráció profilokról, lokális viszonyokról reális, torzítás mentes képet adni. Hasonlóan a repülési időn alapuló diffúzió állandó mérések esetében is a mérőkör „beállási ideje” a tényleges koncentráció – idő függvényt jelentősen torzíthatja. Szükség volt nagy felbontást lehetővé tevő rendkívül kisméretű, de egyben kis elektromos ellenállású stabilisan működő potenciometriás SCEM mérőcsúcs kifejlesztésére.

Munkánkban szilárd kontaktusú mikropipetta elektród típus kifejlesztésével értünk el jelentős eredményt. Az elektród két részből áll. Az elektród mintával érintkező része egy megfelelően kicsiny mérőcsúccsal készített mikropipetta. Ennek csúcsát hidrofobizáljuk

és a mérőcsúcs belsejébe visszük az alkalmas ionofort tartalmazó, vízzel nem elegyedő szerves oldószerrel készített olyan oldatát, amely 5-10%-ban nagymolekula tömegű PVC-t is tartalmaz. Az elektród másik része a belső szilárd kontaktus. Ezt egy kisméretű üvegcsőbe forrasztott 33 μ m átmérőjű szénszálból képezzük. A szénszálat 3, 4-etilendioxithiofen (EDOT) elektrokémiai polimerizációjával képzett vezető polimer PEDOT réteggel vonjuk be. A polimer réteg megfelelő előkészítés (dopolás) után képes stabil belső határfelületi kontaktus potenciált biztosítani. Az illető szénszálat a mikropipetta belsejébe vezetjük. Ott úgy rögzítjük, hogy a szénszál vége a pipetta nyílásához közel kerüljön. Ezzel minimális vastagságúra választjuk a szilárd kontaktus és a mintaoldat közötti organikus folyadék réteg vastagságát. Az elektród belső vizes töltet, belső vonatkozási elektródot nem tartalmaz. Az elektród ellenállása a konstrukciónak köszönhetően jelentősen csökkent.

A konstrukcióból adódó nem várt előnyös tulajdonság a megnövekedett működési és raktározási stabilitás. A hagyományos felépítésű, belső töltettel készített ion szelektív mikropipetták élettartama ritkán hosszabb egy két napnál. A mérési funkció elvesztését valószínűleg az üvegfal hidrofob karakterének megszűnése, a fal átnedvesedése okozza. A szilárd kontaktusú elektród esetében a belső vizes töltet hiánya késlelteti az átnedvesedést, különösen, ha az elektródot szárazon tároljuk. Tapasztalataink szerint a készített kis ellenállású ultramikro mikropipetták mérő funkciójukat hónapokig megőrizték.

Előnyös sajátosság, hogy az elektród mikropipetta részének meghibásodása, törése esetén a belső kontaktus más mikropipettába vezetve továbbra is használható.

Két féle szilárd kontaktusú mikropipetta elektróddal végeztünk kísérleteket. Készítettünk ion szelektív ammónium és ion szelektív kálium elektródokat. Mindkét elektród mérés technikailag fontos sajátosságait tanulmányoztuk. Alkalmaztuk őket pásztázó elektrokémiai mikroszkópiás mérésekben. Az ammónium mikropipettáról szóló közleményünk megjelent⁸, a kálium szelektív elektród sajátosságairól, alkalmazásáról szóló közlemény megjelenés alatt van⁹ az Elektroanalízis folyóiratban. A kálium elektródot sikerrel alkalmazuk a SECM alkalmazások mellett növényekben és érzéstelenített kísérleti állatok (patkányok) agyában történő mérésekben is.

d., Elektrokémia diffúzió állandó mérő módszerek összehasonlítása az általunk kidolgozott ECTOF módszerrel

Elektrokémiai módszerek sok esetben jól alkalmazhatók diffúziós állandó mérésre. Az ismert módszerek akkor adnak jó eredményt, ha az elektród folyamat komplikáció mentes, és a jelképzésben a transzport folyamat a sebesség meghatározó lépés. A kidolgozott, és az előzőekben ismertetett ECTOF módszerünk alkalmazhatóságának igazolására egy elektrokémiailag bonyolult folyamatot választottunk. Az illető elektród reakción keresztül megkíséreltünk különböző anyagok diffúziós koefficienseinek meghatározását különböző elektrokémiai módszerekkel. Az eredményeket összehasonlítottuk az illető reakción alapuló ECTOF módszerrel kapott eredményekkel.

Az összehasonlításhoz egyes cukrok lúgos közegben, elektrokatalitikus sajátosságú réz elektródon végbemenő oxidációját választottuk. Ez esetben az elektród folyamat rendkívül bonyolult, az illető cukor molekula szénatom számának kétszeresét éri el az oxidációs folyamat elektron szám változása.

Méréseket végeztünk hagyományos méretű rézelektroddal a Cottrell módszert, és a Randles Sevcik egyenletet alkalmazó módszerrel meghatározva a diffúziós állandót. Mikro rézelektroddal kronoamperometriás kísérleteket végezve követtük Aoki - Osteryoung, Shoup-Szabo módszerét, és a hosszú idejű kronoamperometriás egyenlet szerinti diffúziós állandó számítások módszereit. A kapott eredményeket összehasonlítva

a mikro méretű réz elektródos ECTOF diffúzió állandó mérés eredményeivel az utóbbi módszer előnyös megbízható voltát sikerült kétséget kizáróan igazolnunk. A kísérletekről egy közleményünk megjelent¹⁰ és egy megjelenés alatt van¹¹

e., Periódikusan megszakított amperometria (PIA) módszerének kidolgozása membránnal bevont felületű kémiailag módosított amperometriás elektródok érzékenységének növelésére

A kémiailag módosított amperometriás elektródok egyes típusai, például az enzim szenzorok mérőfelületükön kisebb nagyobb vastagságú diffúziós réteget hordoznak. A hagyományos amperometriás mérés során az elektród potenciálja állandó, így a jelet biztosító anyag átalakulása folyamatos. Ennek megfelelően az illető anyag koncentrációját a felületi rétegben az elektród folyamat csökkenti. Diffúziós folyamat juttatja az illető anyagot a rétegbe, vagy azt lokális kémiai reakció, például enzim által katalizált folyamat termeli a rétegben. Nyilvánvaló, ha az elektród reakciót megszakítjuk, akkor az elektród reakcióban átalakuló anyag koncentrációja növekedhet a felületi rétegben. A nagyobb lokális koncentráció az elektród reakció ismételt megindulásakor nagyobb jelet, nagyobb áramot eredményezhet.

Ezt a hatást használja ki a periodikusan megszakított amperometria, munkánk nyomán kidolgozott módszere. Kísérleteinkben különböző felületi réteggel ellátott amperometriás elektródokkal, enzim szenzorokkal végeztünk kísérleteket. Részben saját magunk által írt mérő programokat, részben korszerű elektrokémiai munkaállomások által biztosított mérőprogramokat használtunk. A módszerrel nagyságrendekkel sikerült megnövelni az amperometriás mérések érzékenységét. A kapott eredményekről közlemény¹² szól. A munka egyes részleteit summa cum laude minősítéssel megvédett Ph.D. dolgozat foglalja össze.

f., Kísérlet ismeretlen diffúziós viszonyokkal rendelkező közegben történő voltammetriás koncentráció mérési módszer kidolgozására.

In vivo körülmények közötti voltammetriás módszerekkel különböző szövetekben elvileg lehetséges különböző élettanilag fontos anyagok, például monoamin neurotranszmitter anyagok koncentrációjának mérése. A magasabb rendű állatok szervezetében az élő szövetek extra celluláris terében lévő folyadék nagy, viszonylag állandó só koncentrációja, hőmérséklete, pH-ja alapján voltammetriás mérések háttérelektrodjaként alkalmazható, azaz *in vivo* körülmények között végezhető voltammetriás mérések a szövetbe vezetett megfelelő mikroelektrodokkal.

Az *in vivo* voltammetriás méréseket elterjedten alkalmazzák a kísérletes élettan tudományok területén. Az *in vivo* körülmények között készített voltammogramoknak lokális koncentrációk becslésére való alkalmazása azonban nem problémamentes. A koncentráció becslés ugyanis voltammogramok kalibrációs adatok alapján történhet. Az élő szövetekben a különböző anyagok diffúziós transzportja jelentős mértékben eltér a kalibrációra használható oldatokban jelentkező diffúziós viszonyoktól. *In vivo* körülmények között a transzport rendelkezésre álló oldattérfogat töredéke az egész szöveti térfogatnak. Emellett a diffúzió zögös, tortuozus úton történhet.

Munkánkban igyekeztünk az *in vivo* voltammetriás koncentráció mérést lehetővé tevő módszereket kidolgozni. Élő giliszták testszövegeiben való méréseinkről közlemények^{13,14} szólnak. Tanulmányoztuk az oxidatív stressz által okozott szöveti hatások *in vivo* állatkísérletekben, voltammetriás úton történő vizsgálatának lehetőségeit. Az eredményekről közlemény¹⁵ szól.

Az eltérő diffúziós karakterű közegben történő voltammetriás koncentráció mérés lehetőségének tanulmányozására szuszpenziókat választottunk modell rendszernek. Diffúziós réteggel bevont és anélküli munkaelektrodokkal végeztünk kronoamperometriás méréseket a vizes oldat fázisban és a vizes fázisból leülepedett, különböző szemcseméretű kvarc por szuszpenzióban. A kapott, a tortuozus közegben lévő koncentrációk mérése szempontjából biztató eredményekről a közeljövőben készülünk tanulmányt írni.

¹. Feldman BJ, Feldberg SW, Murray RW (1987) J. Phys Chem 91: 6558

². Slowinska K, Feldberg S W, Majda M (2003) Journal of Electroanalytical Chemistry 554-555:61

³ Bard AJ, Crayston JA, Kittlesen GP, Shea TV, Wrighton MS (1986) Anal. Chem. 58:2321

⁴ . Fosset B, Amatore C, Bartlet J, Wightman RM (1991) Anal Chem 63:1403

⁵ . Amatore C, Sella C, T houin L (2006) J Electroanal Chem 593:,194

⁶ Mosbach M, Laurell T, Nilsson J, Csöregi E, Schuhmann W, (2001) Anal Chem 73,:2468

⁷ M.E. Rice, G.A. Gerhardt, P.M. Hierl, G. Nagy, R.N. Adams, Neuroscience **1985**, *15*, 891.

⁸ . G. Gyetvai, S. Sundblom, L. Nagy, A. Ivaska **G.Nagy**
Solid Contact Micropipette Ion Selective Electrode for Potentiometric SECM
Electroanalysis18 (2007) 116-1122, (IF: 2.94)

⁹ G. Gyetvai¹, L. Nagy¹, A. Ivaska², I. Hernadi³, G. Nagy
Solid contact micropipette ion selective electrode II, potassium electrode for SECM and in vivo applications
Electroanalysis (in press)

¹⁰ L. Nagy, G. Gyetvai, G. Nagy, Determination of the Diffusion Coefficient of Monosaccharides with Scanning Electrochemical Microscopy (SECM), Electroanalysis 21 (2009), 542-549 (IF₂₀₀₇ 2.94)

¹¹ Á. Varga, G. Gyetvai, L. Nagy, G. Nagy, Electrochemical Time of Flight Method for Determination of Diffusion Coefficients of Glucose, megjelenés alatt

¹² . L. Nagy, N. Kálmán, G. Nagy, Periodically interrupted amperometry. A way of improving analytical performance of membrane coated electrodes J. Biochem. Biophys. Methods 69 (2006) 133–141, (IF: 1.403)

¹³ B. Takács, M. Csoknya, R. Gábrriel and **G. Nagy**
Correlative morphometric and electrochemical measurements of serotonin content in earthworm muscles, J. Biochem. Biophys. Methods, 70 (2007) 713-720

¹⁴ B Takács., M Csoknya., R Gábrriel., G.Nagy , Összehasonlító morfológiai és elektrokémiai vizsgálatok földigiliszták izomzatának szerotoninerg beidegzésében.,Műszaki szemle 39-40 (2007) 73-77

¹⁵ . M. Tamasko, L. Nagy, E. Mikolas, G. Molnar, I. Wittmann, G. Nagy, An approach to in situ detection of hydrogen peroxide: application of a commercial needle-type electrode, Physiol. Meas. 28 (2007) 1533-1542 (IF: 1.43)