

Hemin és torma-peroxidáz alapú amperometriás bioszenzor: előállítás, elektrokémiai jellemzés és a hidrogén-peroxid kimutatása

Amperometric Biosensor with Hemin and Horseradish Peroxidase: Preparation, Electrochemical Characterization and Hydrogen Peroxide Detection

Biosenzor Amperometric conținând Hemină (Hm) și Peroxidază din Hrean (HRP): Preparare, Caracterizare electrochimică și Detecția Peroxidului de Hidrogen

MARES Georgeta-Maria doktorandusz, Graziella Liana TURDEAN docens,
Ionel Cătălin POPESCU egyetemi tanár

Babeș-Bolyai Tudományegyetem, Kémia és Vegyészmérnöki Kar, Kolozsvár
Arany János utca. nr. 11, RO-400028, Cluj-Napoca, tel:40-264-593833, fax:40-264-590818
web: <http://chem.ubbcluj.ro>, e-mail: gmares73@yahoo.com

ABSTRACT

Iron(III)-protoporphyrin-IX (hemin, Hm) was attached by adsorption on the surface of a graphite (G). On the graphite/hemin modified electrode (G/Hm) was attached horseradish peroxidase (HRP) into a chitosan polymer film (Chit) in order to obtain an amperometric biosensor. Both modified graphite/hemin electrode (G/Hm) and the biosensor were used to amperometrically detect the hydrogen peroxide (H₂O₂).

Keywords: biosensor, graphite electrode, chitosan, horseradish peroxidase, H₂O₂.

ÖSSZEFOGLALÓ

A grafit(G) elektród felületére, vas(III)-protoporfirin-IX(Fe(III)P), azaz hemin (Hm) adszorpciójával, grafit/hemin (G/Hm) módosított elektród állítható elő. Ezen felületre peroxidáz (HRP) rögzítésével kitozán (Kit) polimerben, amperometriás bioszenzor nyerhető. A módosított grafit/hemin (G/Hm) elektród illetve az enzimes bioszenzor egyaránt alkalmas a hidrogén-peroxid kimutatására.

Kulcsszavak: bioszenzor, grafit elektród, kitozán, torma-peroxidáz, H₂O₂.

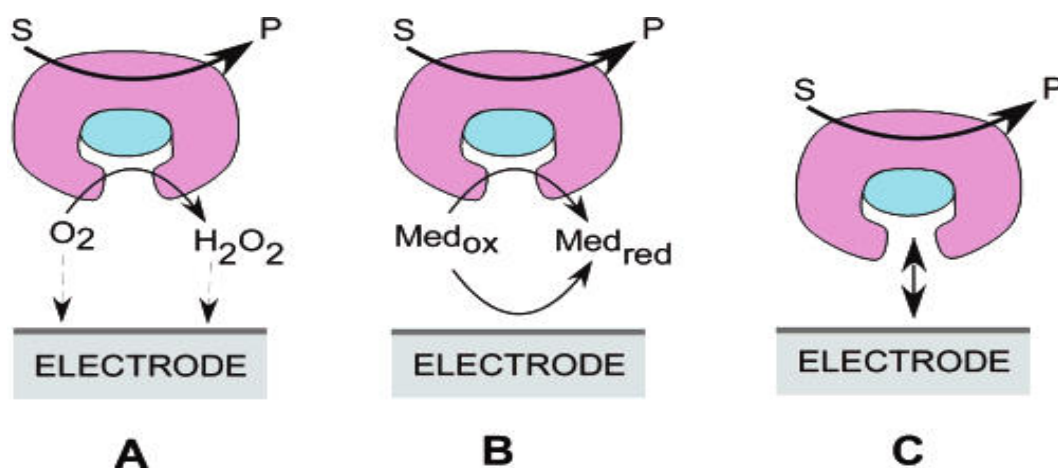
1. BEVEZETÉS

A kémiai és biológiai folyamatok követése, megértése szempontjából az analitikai kémia fejlődésének kiemelt szerepe van. Ennek a fejlődésnek három irányvonala az automatizálás, miniaturizálás és egyszerűsítés, melyben fontos szerep jut a gyors, megbízható érzékelők (szenzorok) fejlesztésének. A szenzor egy olyan technológiai eszköz vagy biológiai alapú egység, ami detektálja/érezkeli a jelet vagy fizikai változást.[1]

A bioszenzorok (biológiai szenzorok) a kémiai szenzorok alcsoportját alkotják, amelyeknél a felismerő anyag biológiai eredetű, és a szelektív felismerési lépés biológiai folyamatra épül. A különböző biológiai anyagok közül legáltalánosabban az enzimeket használják. A jelátvitel lehet elektrokémiai (amperometriás, potenciometriás), optikai vagy reakcióhő mérésén alapuló. A bioszenzor technológia egyedi tulajdonságai miatt valós mintákra alkalmazható eljárások lehetőségét ajánlja, s számos előnye (magasfokú szelektivitás és specifitás, megvalósíthatóság és tárolás relatív alacsony költsége, miniaturizálás lehetősége, automatizálhatóvá és hordozhatóvá tétel) alapanyag és minőségügyi laborok ellenőrző rendszereinek részévé teheti. A bioszenzor fejlesztések a legkülönbözőbb felhasználási területekre koncentrálnak, mint pl: klinikai, környezetvédelmi,

mezőgazdasági, biotechnológiai [2,3]. Bioszenzorral alapozott fejlesztések élelmiszertermékeknel is használhatóak lehetnek, főleg összetétel meghatározás, nyersanyag és késztermék szennyezettség, illetve fermentációs folyamatok beépített (on-line) ellenőrzése terén. A bioszenzorok megfelelő hőmérséklet és pH igénye a biológiai aktivitás biztosításáért szükséges. Az amperometriás bioszenzorok azt az áramot mérik, amit az elektródon egy elektroaktív anyag képez egy adott potenciálon. Ez a mért áram egyenes arányban áll a kérdéses anyag oldatbeli koncentrációjával. Az amperometriás bioszenzorok gyorsak, hiszen nem kell várni a termodinamikus egyensúly beállításáig, s érzékenyebbek, pontosabbak, mint a potenciometriás képviselőik. Ugyanakkor azonban szelektivitás terén a rendszerben jelenlévő elektroaktív anyagok redox potenciálja a meghatározó, ami ahhoz vezet, hogy a mért áram több anyag-együttes, különböző arányú jeléből tevődik össze. Az amperometriás bioszenzorok jelentik egyelőre a legsikeresebb osztályt a bioszenzorok történetében.[1]

Az első, glükóz mérésére alkalmas amperometriás bioszenzor glükóz oxidáz és Clark oxigén elektród felhasználásával készült [4], s a rendszerben bekövetkező oxigén fogyását követte nyomon. A termék keletkezésének vagy a reakciópartner (oxigén) fogyásának figyelemmel kíséréseivel követhetjük a vizsgálandó anyag koncentrációjára. Ezek a bioszenzorok az úgynevezett első generációsak. A mediátorral módosított amperometriás bioszenzorok jelentik a bioszenzorok második generációját, hiszen itt a mediátor redox tulajdonságai segítik az elektron transzfert az enzim és az elektród felszíne között. Direkt elektrontranszfert tesznek lehetővé a direkt enzim-elektrod kapcsolatos vagy mediátormentes bioszenzorok, melyek a szenzorok harmadik generációját jelentik. Ez utóbbi esetben az elektron közvetlenül jut el az elektródtól az enzimig, s onnan a szubsztrát molekulához (vagy fordítva) (1. ábra). Ebben a mechanizmusban az elektron egyfajta másodlagos szubsztrátként van jelen, s katalitikus áram képződését eredményezi. A szubsztrát átalakítása alapvetően egy katalitikus folyamat [5].

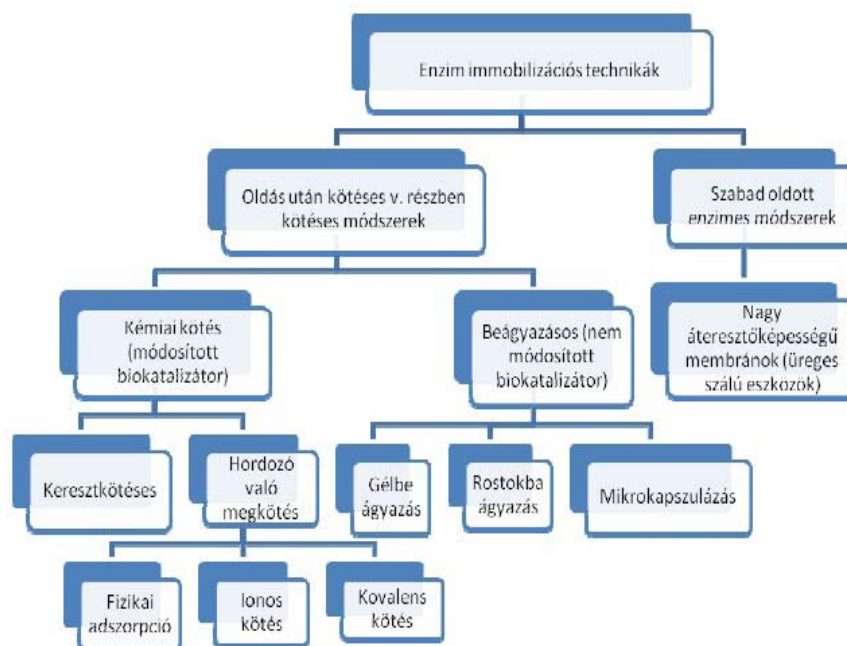


1. ábra

Amperometriás bioszenzorok: A-első generáció, B-második generáció, C-harmadik generáció [7].

Az élelmiszeranalízisek esetében a bioszenzorok többsége az amperometrián és valamilyen oxidáz kombinációján alapszik. Ezek a típusú szenzorok annak köszönhetik népszerűségüket, hogy az enzim általában jó aktivitást mutat, magas érzékenység érhető el velük, s könnyű a reakció nyomon követése[6].

A biológiai alapú szenzor alapanyagok valamilyen szilárd felszínen történő rögzítése számos módon történhet [8]. Ezen rögzítési módszerek között szerepel az adszorpció, keresztkötés, kovalens kötés, valamilyen hordozóba zárás vagy kapszulázás, szilárd kötést segítő mátrix. A rögzítő mátrix szerepet játszhat csak és kizárólag a kötésben, de akár a jelátalakításban is (mediátor). Mindegy, hogy milyen rögzítési módszerről beszélünk, mivel minden esetben a cél a biológiai komponens lehető legmagasabb aktivitása, hosszú stabilitásideje és a jelátviteli egységhez mért kis távolsága a rögzítés után. Meghatározó része a rögzítés hatékonyságának, hogy a vizsgálandó anyag tudjon ki- és bevándorolni a létrehozott rétegben. A megfelelő rögzítési módszer kiválasztása függ magától az alkalmazandó biológiai anyagtól, a jelátalakítás módjától, a célmolekula fizikai-kémiai tulajdonságaitól és a bioszenzor működési feltételeitől (2. ábra).



2. ábra

Enzim megkötésekre alkalmazott módszerek összefoglalása [8]

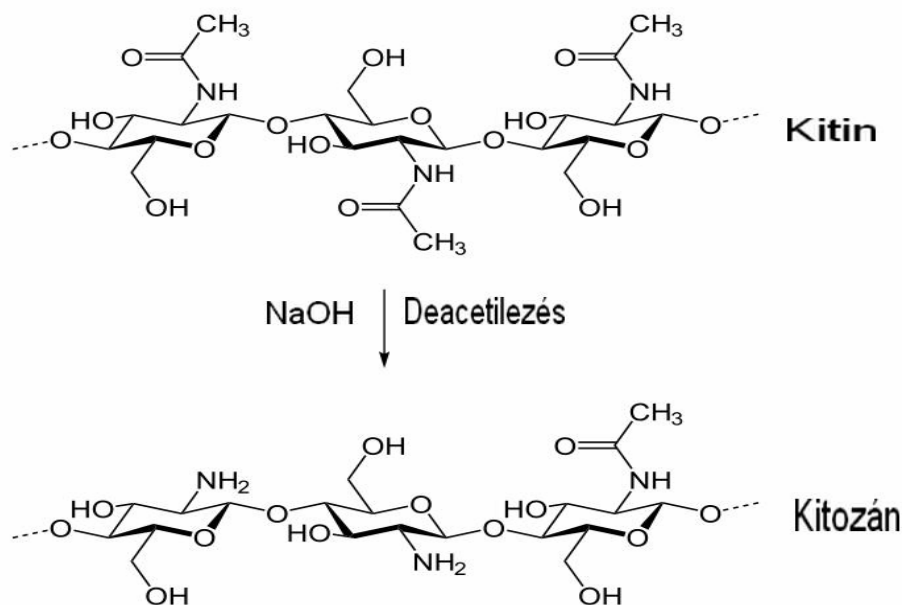
A leggyakrabban rögzítés céljából az adszorpció és a kovalens kötés módszerét alkalmazzák. A van der Waals erők vonzásán alapuló fizikai adszorpció a legegyszerűbb és legrégebben használt módszer. Ebben az esetben általában az enzimdát, sejt szuszpenzió vagy szövet metszet úgy kerül a jelátalakító felszínére, hogy egy, a célmolekulára féláteresztő membrán lefedi. Ezen módszer esetén nem szükséges a biológiai komponens kémiai módosítása, lehetőség van a membrán mátrix regenerálására. Főként az egyszerűség a nagy előnye ennek a megoldásnak, illetve, hogy egyszerre akár többféle biológiai komponens is használható, azonban jelentős aktivitás csökkenés tapasztalható, ha pH, ionerősség és hőmérsékletváltozás lép fel mérés közben. [1] A gélekbe, polimerekbe, pasztákba vagy tintákba történő bezárás jelentősen növelheti a stabilitást, s hasonló teljesítményhez vezethet, mint a kovalens kapcsolás.

Kovalens kötés során a biológiai komponens közvetlen a jelátalakító felszínéhez vagy a membrán mátrixához kapcsolható. Ezek a módszerek a fehérje terminális funkciók csoportjainak (a katalitikus aktivitást nem befolyásoló) és a felszín szabad funkciók csoportjainak reakcióin alapszanak. Enzimekben és fehérjékben ezek a lehetséges funkciók csoportok az aminosav oldalláncokon találhatóak (pl.: a lizin ϵ -amino, az aszpartát és glutamát karboxil, a cisztein szulfhidrid és a tirozin fenil-hidroxi csoportja). A különböző aktív funkciók csoportokat tartalmazó membránok nagy hatékonysággal képesek a biokomponensek megkötésére. Emellett arra is lehetőség van, hogy az enzimet vízoldható részecskékhez kötjük és két szelektíven átteresztő membrán közé zárjuk. Enzimek vagy fehérjék esetén ugyancsak használnak bifunkciós (homo vagy hetero funkciók) reagenseket, mely során makroszkópikus részecskék és térhálós szerkezet keletkezik a kovalens kötések kialakulása során a hordozó felszínén. A leggyakrabban használt homofunkciós vegyületek a glutaraldehyd, karbodiimid, míg heterofunkciósakból a trikloro triazin- és a 3-metoxidifenil metán-4,4' diizocianát.[1]

Az elektrokémiai polimerizációval történő rögzítés is gyakran használatos szerves molekulák esetén, s számos előnye közzé tartozik a mikroléptékű kivitelezés, film vastagság befolyásolása, homogenitás és ismételhetség.

1.1. Kitozán

A kitozán a második leggyakoribb természetes polimer a cellulóz után. Megtalálható a rákok páncéljában, gombákban. A kitozán, amelyet a kitin lúgos deacetilezésével állítanak elő (3. ábra), egy lineáris, kristályos szerkezetű biopolimer, mely számos előnyös tulajdonsággal rendelkezik: biológiailag lebontható, nem mérgező, valamint antimikrobiális hatása. A deacetilezési fok (DD) 60-100%-ig terjedhet. Ezen jellemzőknek köszönhetően széles körben alkalmazzák akár önmagában, akár egyéb, természetes illetve mesterséges polimerekkel keverve. [9]



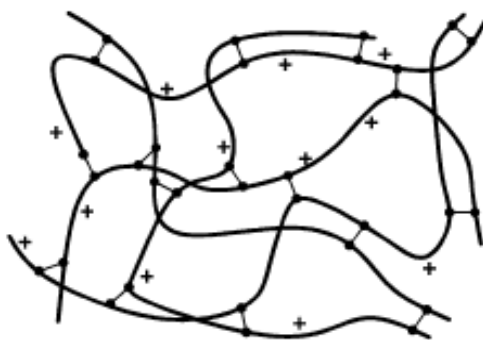
3. ábra

Kitozán előállítása a kitin deacetilezésével [10,11]

A kitozán biokompatibilis, nem toxikus, és jó adszorpciós tulajdonságokkal rendelkezik, ezért kiválóan alkalmas funkcionális anyagok előállítására. Híg savakban, például ecetsavban és hangyasavban könnyen oldódik. Az aminok jellegzetes reakcióit mutatja, ezek közül a legfontosabbak az N-acilezés és a Schiff-bázis képzés. Alkalmazása rendkívül széles körű. Kelátképző tulajdonsága miatt képes megkötni a mérgező nehézfémeket, például a higanyt, a nikkelt és a kadmiumot, ez lehetővé teszi használatát a szennyvíztisztításban. Antibakteriális és gombaölő hatása miatt előszeretettel használják kozmetikumok, pl. testápolók, krémek, körömlakkok adalékolására. A protonált aminocsoport kötést létesít a mikroorganizmusok alkotóinak anionos csoportjával, ami meggátolja a szaporodásukat. A kitozán rendelkezik az eddig említetteken kívül minden olyan kedvező tulajdonsággal (optikai tisztaság, mechanikai stabilitás, nedvesedés stb.), ami lehetővé teszi, hogy kontaktlencsét készítsenek belőle. A kitozán zsírmegkötő hatása sem elhanyagolható: képes kötést létesíteni vele a gyomorban még mielőtt az megemésztődne, ezzel megakadályozza a felszívódását a béltraktusban.

Az így megkötött zsírok természetes módon ürülnek ki a szervezetből. A kitozán az aminocsoport reaktivitásának köszönhetően megfelelő körülmények között könnyen térhálósodik.[12]

Ez lehetséges ionos mechanizmussal: mivel a kitozán aminocsoportja savas, semleges és gyenge lúgos közegben protonálódik, ilyen körülmények között képes reverzibilis kötést létesíteni negatív töltésű molekulákkal. A térháló létrehozásának másik lehetősége elsősorban kémiai kötések létrehozása a polimerláncok és egy többfunkciós molekula között.

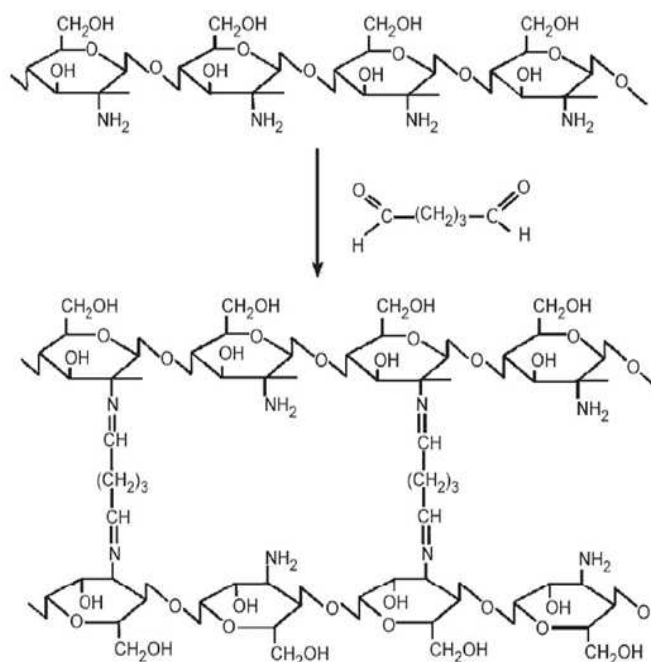


4. ábra

H-kötésekkel térhálósodott kitozán molekulák [13]

A kitozán polimer önmaga is egy fizikai térhálóval összetartott rendszer. Ha van olyan aminocsoport, ami nem protonálódott (és mindig van ilyen), akkor annak hidrogénje a szemközti hidroxil csoport oxigénjével hidrogénkötést létesít (4. ábra). Ennek a kölcsönhatásnak a valószínűsége a pH csökkenéssel ($-\text{NH}^{3+}$ -csoportok számának növekedésével) együtt csökken.[12]

A kitozánláncok közötti kapcsolat kiépíthető kismolsúlyú molekulák segítségével is (pl. dialdehidek). Az aldehidcsoportok a kitozán aminocsoportjaival Schiff-bázist képeznek, végül iminkötések jönnek létre köztük (5. ábra). A reakció segédanyagok nélkül, vizes közegben is végbemegy, ami a biokompatibilitás szempontjából nagyon fontos. A dialdehidek azonban gyakran mérgezőek (pl. a glutaraldehyd közepesen erős idegméreg), ezért a felhasználás előtt a szabad aldehidmaradékot alaposan ki kell mosni. Teljesen azonban lehetetlen, és ez egyelőre gátat szab az alkalmazásnak.[12]



5. ábra
Térhálósítás glutaraldehyddel [14]

A kovalens keresztkötés állandó vázat biztosít (kémiai térháló), ami lehetővé teszi a víz szabad diffúzióját a szerkezetbe, és javítja a mechanikai stabilitást is. Az így előállított rendszer tulajdonképpen porózus anyagként viselkedik, ennek köszönhetően a hatóanyag-hordozóként történő felhasználásakor a hatóanyag szabadon diffundál ki belőle. A kevésbé térhálós rendszerek szuperadszorbens hidrogélként viselkednek, a keresztkötések sűrűségének növekedésével csökken a duzzadási fok és a háló „pórusmérete”. A térhálósítószer koncentrációjának növelése csökkenti a kitozán és a vízmolekulák között létrejövő hidrogénkötések kialakulásának valószínűségét.

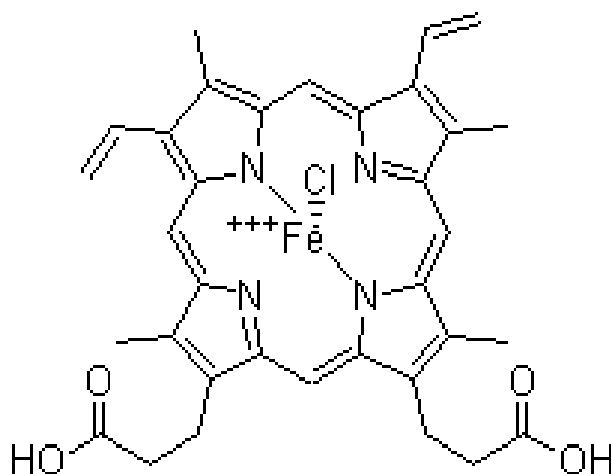
Minél kisebb a térháló sűrűség, annál hosszabb a polimerláncok relaxációs ideje, ami lassított hatóanyag-leadást jelent. [13]

1.2. HEMIN ($\text{C}_{34}\text{H}_{32}\text{ClFeN}_4\text{O}_4$) (HM)

A hemben levő kétértékű vas háromértékűvé oxidálható, mikoris ferihemnek nevezik. Ez képezhet hidroxidot (hematint) és kloridot, ez a hemin- $\text{C}_{34}\text{H}_{32}\text{ClFeN}_4\text{O}_4$ ($M=651,94$). Ez utóbbiak a Teichmann-féle kristályok: hosszúkas, vékony lemezek vagy jellegzetes letompított élű prizmakristályok, amelyek átnézéssel barnák, ráeső fényben acélkéken csillognak. Vízben és hígított savakban oldhatatlanok, erős szerves savakban és nátrium-hidroxidban, továbbá ammóniaoldatban oldódnak, miközben hematinná alakulnak. A hemin (a hemoglobin nem fehérje komponense) és a klorofill (a növényi sejtek kloroplasztiszainak alkotóeleme) a biológiai oxidációban, ill. a szén-dioxid asszimilációban döntő szerepet játszó vegyületek. A hemin és a klorofill különböznek egymástól: a pirrolgyűrűkön eltérő szubsztituensek találhatók. A hemin

koordinatív Fe^{2+} iont köt meg, míg a klorofill Mg^{2+} iont. Fischer szintetizált először hemint 1928-ban. Ezért, illetve a hemin és klorofill rokonságának bizonyításáért Nobel-díjat kapott 1930-ban. A hemin szerkezetének (6. ábra) felderítése során kezdetben a redukív lebontási termékek vizsgálatával valószínűsítették a négy pirrolváz jelenlétét.

Küster vázolta fel elsőként a hemin szerkezetét az oxidatív lebontási termékek alapján.[15,16,17]



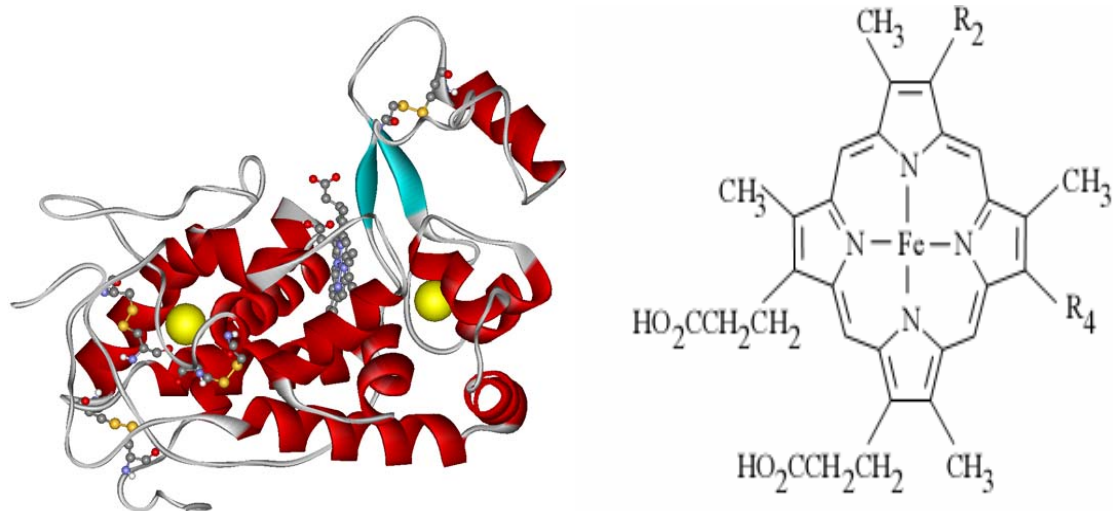
6. ábra
A hemin szerkezete

Mind a négy peptidlánc egy hemokromogénhez kapcsolódik, amelyben a vas hat koordinációs helye közül négyet a porfirinyűrű nitrogénjei foglalnak el. Az ötödik koordinációs helyhez kapcsolódik a peptidlánc egyik hisztidinje, a hatodik hely szabad, illetve nagyon gyengén vizet koordinál. A biológiai rendszerekben igen fontos szerepe van a pH változásnak, hiszen sok fiziológiai paraméter függ a pH-tól, például az enzimek aktivitása, a membránok permeabilitása. A hemin csak semleges vagy lúgos közegben stabilis, savak hatására lebomlik. A bomlás és az azt kísérő csapadékkiválás az oldat hemin- és savkoncentrációjától is függ. A hemin pH = 6-ig stabilis, pH ≥ 6 értékek esetén még nagyobb heminkoncentrációnál sem történik csapadékképződés. Viszont egész kis pH-csökkenés hatására ez megváltozik: már pH = 5,5-ön is – a heminkoncentrációtól függően – néhány perc, esetleg néhány óra elteltével kiválik a csapadék. Alacsonyabb pH-jú oldatokban ez már egészen kis heminkoncentráció esetén is szinte azonnal megtörténik. A leggyorsabb csapadékkiválás pH = 3 esetben tapasztalható, ez alatt a csapadék kiválása a savkoncentráció növelésével kismértékben lassul.[16, 24-27]

1.3. Tormaperoxidáz (HRP- horseradish peroxidase)

A tormaperoxidáz (horseradish peroxidase - HRP) egy glikoprotein, amelyet először a torma növény gyökeréből izoláltak. Nagyszámú aromás szubsztátot képes hidrogén donorként felhasználni. Az enzim natív állapotban egy ferri (Fe^{3+}) protoporfirint-IX-et (hem) tartalmaz, mint prosztetikus csoportot, amelyben a Fe^{3+} ötös koordinációjú helyzetben a proximális His-hez kötődik. Pontos szerkezetét Gajhede és társai derítették fel (1997) röntgen kristallográfiás módszerekkel. Funkciós csoportja és negyedleges szerkezete nagy hasonlóságot mutat a többi növényi peroxidázzal. A molekula tömege 44 kDa, amelynek kb. 18 %-át az aktív centrumot körülvevő aminosavak, az úgynevezett zseb teszi ki.

A fehérje két Ca^{2+} – disztális és proximális – iont, négy diszulfid hidat és egy Trp-t tartalmaz. A térszerkezetet a két Ca^{2+} ion stabilizálja (7. ábra), amelyek szükségesek a megfelelő felgombolyodáshoz, valamint a fehérjén belül a hem csoport számára kedvező környezet megteremtéséhez. [20]



7. ábra

A tormaperoxidáz röntgenkristallográfiával meghatározott térszerkezete a PDB (Protein Data Bank) adatbázis alapján

A hem peroxidázok szerepe az, hogy H_2O_2 mint elektron akceptor felhasználásával, oxidatív reakciókat katalizálnak. A peroxidázok által elektron akceptornak használt szubsztrátok nagyon különbözőek lehetnek az inorganikus ionoktól a nagy molekulatömegű szerves vegyületekig. A reakció mechanizmusa nagyon hasonló mindegyik peroxidáz esetében[20]

Célul tűztük ki a módosított G/Hm (grafit/hemin), G/Hm/Kit. (grafit/hemin/kitozán) elektródok elektrokémiai jellemzését és az amperometriás G/Hm/Kit/HRP/Ga bioszenzor előállítását illetve alkalmazását a hidrogén-peroxid detektálásában.

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1. Anyagok

Grafit rúd (Ringsdorff Németország), Hemin (vas protoporfirin IX) (Fluka), Kitozán (Sigma chemica CO), Tormaperoxidáz (HRP) (Boehringer Németország), Glutáraldehid (Sigma chemica CO), TRIS (trihidroximetilaminometán – $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ ($M=121,1$)) (Sigma chemica CO), Na_2HPO_4 és NaH_2PO_4 (Sigma chemica CO), HCl oldat (Reactivul Bukarest), ecetsav 96% (Reactivul Bukarest), H_2O_2 33% oldat (Merk Németország), desztillált víz.

Öt alapoldat készült a módosított elektródok előállítása és elektrokémiai viselkedésük tanulmányozására:

- 3.25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Hemin (Hm) oldat, 5mM, pH10 TRIS pufferoldatban
- 10,67 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Kitozán (Kit) oldat 0.1% -os ecetsavban (HAc)
- 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Tormaperoxidáz (HRP) 5mM, pH8 TRIS pufferoldatban. Sósav adagolásával csökkent a pH értéke.
- 2.5% Glutáraldehid (GA) desztilláltvízes oldat
- H_2O_2 0,1M oldat, desztilláltvízből és megfelelő mennyiségű H_2O_2 33% oldatból.

A megmaradt Hm és Kit oldatokat hűtőszekrényben tároltunk; a HRP és GA oldatokból annyi készült amennyi el lett használva.

2.2. Műszerek és mérési körülmények

A voltammetriás mérésekhez használt műszer egy PGStat 10 (Autolab, Hollandia), az amperometriás mérésekhez használt műszer a PAR volt. A háromelektrodos cellában a munkaelektrod: G/Hm; G/Hm/Kit

illetve G/Hm/Kit/HRP/Ga; a vonatkozáselektrod, $\text{Ag}|\text{AgCl},\text{KCl}_{\text{sat}}$. (Radiometer, Franciaország), a segédelektrod 1 cm^2 felületű Pt volt. A kombinált üvegelektroddal ellátott pH-mérő (Pracitronic, Németország) az oldatok pH értékének mérésére és beállítására szolgált.

Kísérleti körülmények: foszfátos puffer oldat $0,1\text{M}$, pH 7.02, hőmérséklet: $25\pm 2^\circ\text{C}$, argon (Ar) atmoszféra.

2.3. Módszerek

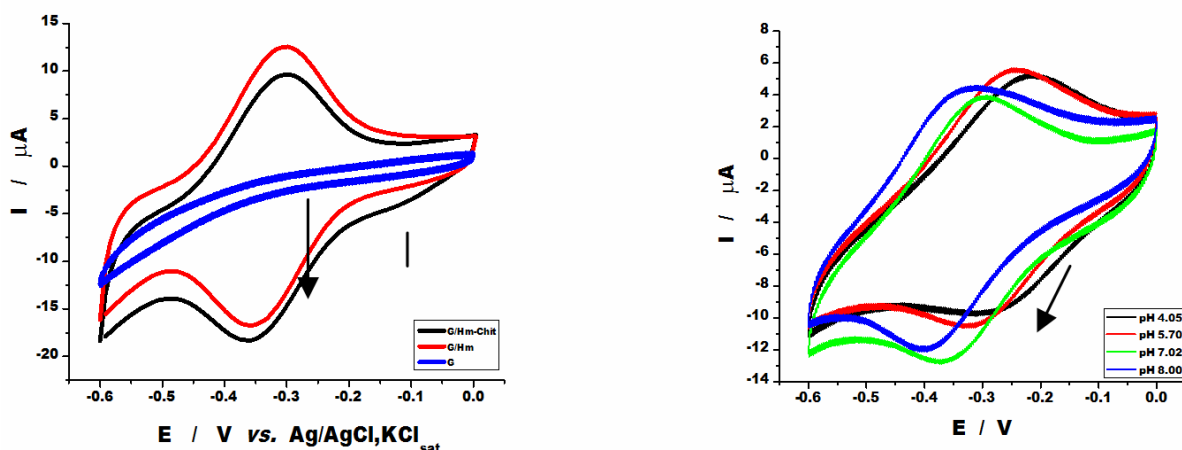
2.3.1. A G/Hm, G/Hm/Kit és G/Hm/Kit/HRP/Ga elektrodok előállítása

A grafit felületének csiszolópapírral (320 illetve P1200C) való megtisztítását 2 perces ultraszonálás követte. pH 7.02 foszfátos pufferoldatban (PB), 0 V kezdeti potenciálán vs. $\text{Ag}/\text{AgCl},\text{KCl}_{\text{sat}}$, 20 mV/s pásztázási sebességgel ciklikus voltamogrammok készültek, a felület tisztaságát bizonyítandó. Mikropipetta segítségével, $5\mu\text{L}$, $3.25\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Hm oldat került a grafit felületére és **G/Hm** elektrod keletkezett. A módosított **G/Hm/Kit** elektrod előállítható a Hm rétegre, $5\mu\text{L}$, $10.67\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Kit oldat csepegtetésével. Száradás után $5\mu\text{L}$, $10\mu\text{g}/\mu\text{L}$ tormaperoxidáz (HRP) és $5\mu\text{L}$, 2.5% glutaraldehid (Ga) oldat pipettával való adagolásával bioszenzor állítható elő, melynek jelölése: **G/Hm/Kit/HRP/Ga**.

3. MÉRÉSI EREDMÉNYEK

3.1. A G/HM, G/HM/KIT elektrodok elektrokémiai viselkedése

Száradás után, másnap került sor a **G/Hm** és **G/Hm/Kit** elektrodok elektrokémiai viselkedésének tanulmányozására CV módszerrel.

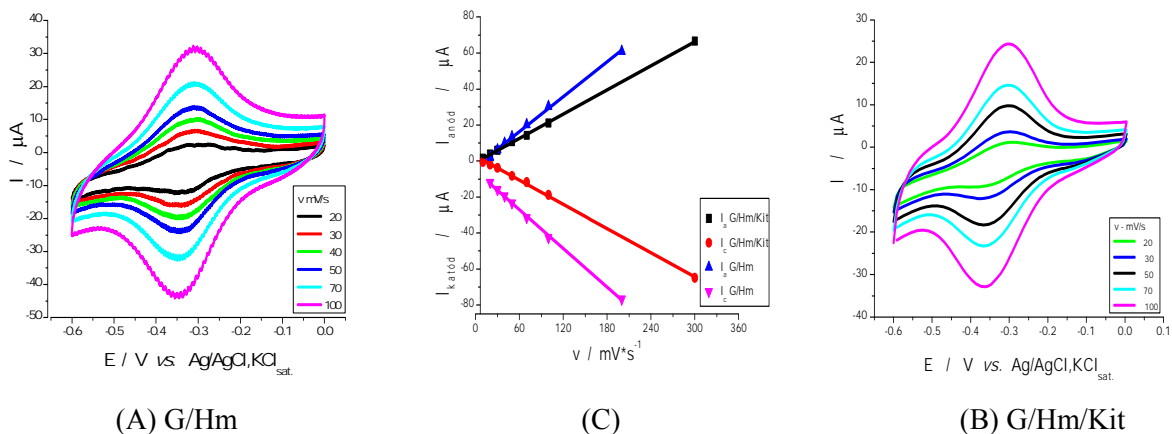


8. ábra

Voltamogrammok a G, G/Hm és G/Hm/Kit elektrodok esetében pH 7.02 (A) illetve a G/Hm elektrodra vonatkoztatva ha pH: 4.02, 5.7, 7.02, 8.02. (B).

Kísérleti körülmények : foszfátos pufferoldat $0,1\text{M}$, kezdeti potenciál 0 V vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}_{\text{sat}}$, Ar atmoszférában, hőmérséklet $25\pm 2^\circ\text{C}$, ciklikus voltametriaiban (CV), 30 ciklus, pásztázási sebesség 50mV/s (A), 2 ciklus, pásztázási sebesség 20mV/s (B).

Összehasonlítva a G/Hm és G/Hm/Kit voltamogrammjait, látható a katódos áramerősség növekedése illetve az anódos áramerősség csökkenése a kitozán jelenlétében (8 ábra, A). Az E–pH viszonya, a pH: 4-8 tartományban lineáris. $V/\Delta\text{pH}$ eltér (kisebb) mint 0.059 , ami 1H^+ , 1e^- cserére érvényes. Jelen esetben CV: $V/\Delta\text{pH} = -0.041\pm 0.005$, $R=0.962$ / $N=4$; értékeket eredményezett. A szakirodalom említi a Hm és a hozzá hasonló szerkezetű hemoglobin (Hb) esetében hasonló eltéréseket. Mivel 7.02 pH-jú közeg a legalkalmasabb bioszenzorok előállítására és viselkedésük tanulmányozására, a továbbiakban ezen a pH értéken történnek a mérések.



9. ábra

A pásztázási sebesség hatása a G/Hm és G/Hm/Kit elektródok elektrokémiai viselkedésére (A, B) illetve az $I - v$ viszonya a G/Hm és G/Hm/Kit elektródokra vonatkoztatva (C).

Kísérleti körülmények: foszfátos pufferoldat 0,1M, pH 7.02, kezdeti potenciál 0 V vs. Ag/AgCl/KCl_{sat}, 2 ciklus, Ar atmoszférában, hőmérséklet 25±2°C, (CV).

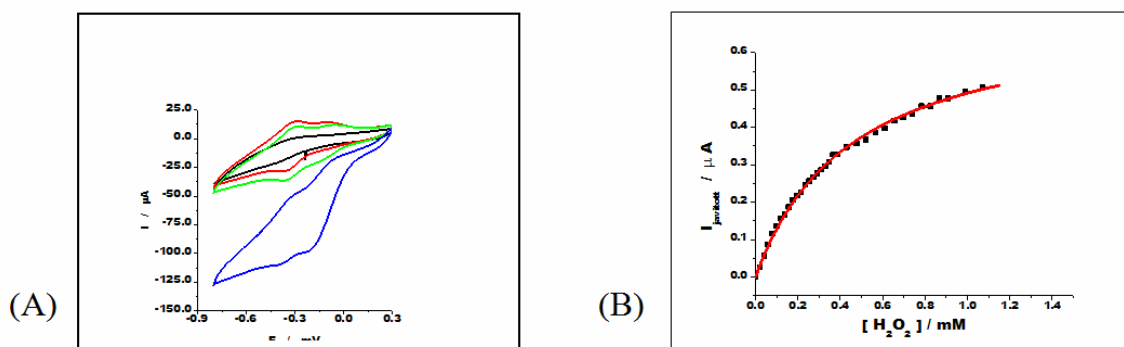
1. táblázat: I vs. v G/Hm és G/Hm/Kit elektródok esetében

Elektród	$\text{Log } I$ vs. $\text{Log } v$	R / n
G / Hm	$\log I_{p,a} = -6.907 + 1.184 \log v$	0.990 / 6
G / Hm/Kit	$\log I_{p,a} = -6.754 + 1.045 \log v$	0.999 / 6

Mivel a $\log I_{p,a}$ vs. $\log v$ linearizálási egyenletben az 1.184 illetve 1.045 meredekségi értékek (1. táblázat) megközelítik az elméleti értéket, 1, elmondható, hogy a hemin az elektród felületén rögzítve található. A pásztázási sebesség függvényében változik az anódos ($E_{p,a}$) illetve katódos ($E_{p,c}$) csúcspotenciál értéke. A módosított G/Hm elektród esetében: $E_{p,a} \sim -314$ mV, $E_{p,c} \sim -343$ mV, míg a G/Hm/Kit elektród esetében: $E_{p,a} \sim -306$ mV, $E_{p,c} \sim -356$ mV körül van. ΔE_p a G/Hm és G/Hm/Kit esetében 100mV/s pásztázási sebességen egyaránt a legnagyobb: 34mV illetve 50mV.

3.2. A hidrogén-peroxid (H_2O_2) elektrokatalízise a módosított G/Hm elektród illetve a g/hm/kit/hrp/ga bioszenzor esetében

A módosított G/Hm elektród használható H_2O_2 (10. ábra A) (illetve NO_2^-) kimutatására, ugyanakkor alkalmas bioszenzorok előállítására.

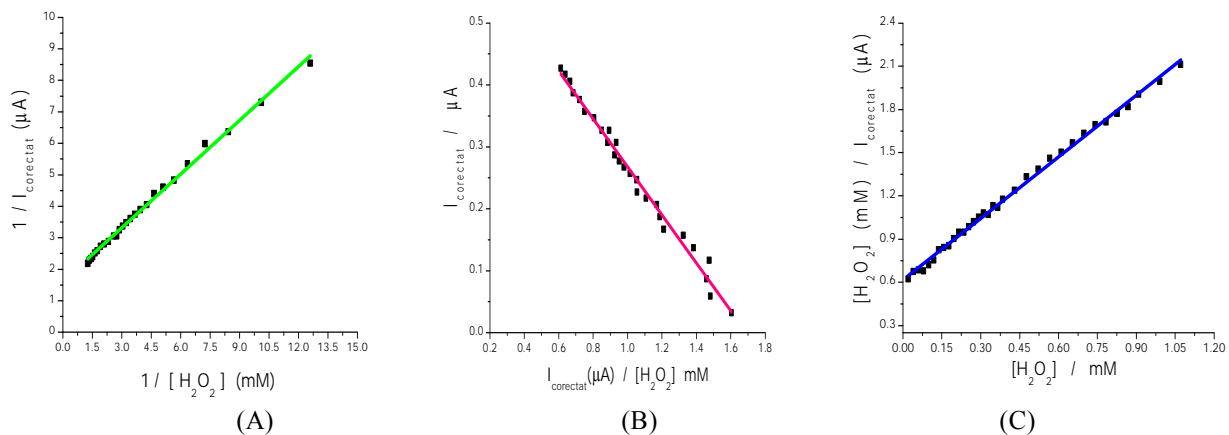


10. ábra

Ciklikus voltamogramok a G és G/Hm elektródok esetében H_2O_2 koncentrációjának függvényében (A) illetve az $I - [H_2O_2]$ viszonya a G/Hm/Kit/HRP/Ga bioszenzorra vonatkoztatva (B).

Kísérleti körülmények: foszfátos pufferoldat 0,1M, kezdeti potenciál 0 V vs. Ag/AgCl/KCl_{sat}, Ar atmoszférában, hőmérséklet 25±2°C, pH 7.02, 2 ciklus, pásztázási sebesség 20mV/s, az adagolt H_2O_2 10⁻²M volt (A); 500 rpm, potenciál -500mV vs. Ag/AgCl/KCl_{sat}. (B)

Esetünkben a biológiai módosító a tormaperoxidáz (HRP). A G/Hm/Kit/HRP/Ga bioszenzor viselkedése H_2O_2 jelenlétében látható a 10. ábrán (B), a kalibrációs görbén mely amperometriás méréstehnikával készült.



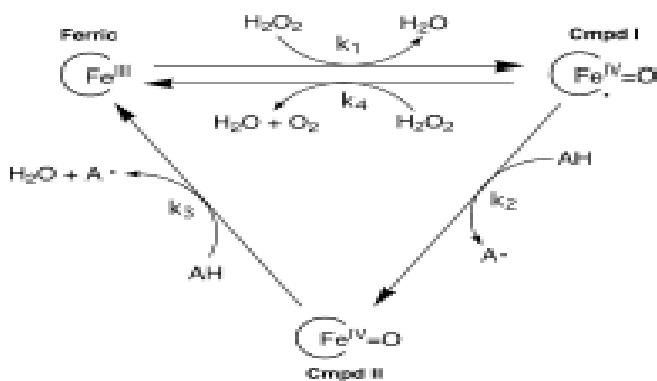
11. ábra

Lineweaver-Burk: $1/I=f(1/[H_2O_2])$ (A), Eadie-Hofstee: $I=f(I/[H_2O_2])$ (B) és Hanes-Woolf: $([H_2O_2]/I)=f([H_2O_2])$ (C) linearizálások a G/Hm/Kit/HRP/Ga bioszenzorra vonatkoztatva, amperometriás mérési módszer alkalmazásakor.

A 11. ábrán látható linearizálásból származó I_{max} , K_M , S , R/n értékek az alábbi, 2. táblázatban találhatók.

2. táblázat: A elektrokinetikus paraméterek értékei a G/Hm/Kit/HRP/Ga bioszenzorra vonatkozóan.

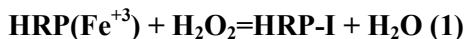
Linearizálás	Elektrokinetikai paraméterek			
	$I_{max} / \mu A$	K_M / mM	$S=I_{max}/K_M (\mu A/mM)$	R / n
Hyperbola (Origin)	0.71574 ± 0.02285	0.45636 ± 0.03172	1.56837 ± 0.15909	0.99 / 40
Lineweaver-Burk	0.88396 ± 0.13808	0.609678 ± 0.1124	1.44989 ± 0.04076	0.99 / 49
Eadie-Hofstee	0.65582 ± 0.019597	0.38805 ± 0.01426	1.69004 ± 0.112612	0.98 / 27
Hanes-Woolf	0.702524 ± 0.01898	0.433569 ± 0.02557	1.620325 ± 0.05177	0.99 / 34



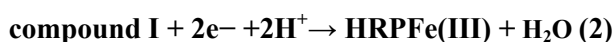
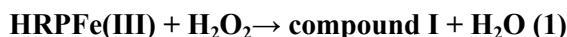
12. ábra.

A H_2O_2 elektrokatalízisének mechanizmusa Hm jelenlétében.

A szakirodalom a H₂O₂, Hm jelenlétében történő elektrokatalízisére a 12. ábrán látható mechanizmust jelöli meg, mely három lépésben történik, két intermedier képződésével. A folyamat hasonlít a HRP jelenlétében történő elektrodredukcióhoz, mivel a két anyag HRP és Hm szerkezete igen hasonló.



A három lépésben történő mechanizmus mellett az alábbi, két lépésben történő folyamatot is említ a szakirodalom. [21,22] [23]



3.3. A G/Hm elektród stabilitás

Az élettartam, stabilitás meghatározó az elektród elektrokémiai viselkedésében. A G/Hm elektród esetében a rövidtávú (672s) illetve hosszútávú (18300s) stabilitás megfigyelése során: a katódos áramerősség értéke csökken az idő függvényében. Két óra elteltével a csökkenés 2.017% (0.104 μA), öt óra elteltével pedig 2.735% (0.123 μA), ha a kísérleti körülmények: foszfátos pufferoldat 0,1M, pH 7.02, kezdeti potenciál 0 V vs. Ag/AgCl/KCl-sat, pásztázási sebesség 20mV/s, argon atmoszférában, hőmérséklet 25±2°C. A rövidtávú stabilitás (672s) a pásztázási sebesség 50mV/s. Az elektród tárolása, pufferoldatot tartalmazó közegben, hűtőszekrényben történik, 4°C hőmérsékleten.

4. KÖVETKEZTETÉSEK

- A Hemin szerkezetében jelenlévő Fe(III) könnyen redukálódik Fe(II) - re, reverzibilis folyamatban. Ezért elektrokémiai szempontból aktív anyag, mely igen jól rögzíthető adszorpcióval, polimérbe (Kitozán) való beágyazással, a grafit felületére és módosított elektród állítható elő, gyorsan, egyszerűen, jó reprodukciós képességgel: G/Hm illetve G/Hm/Kit.
- A vizsgálat tárgya: a pH hatása a stabilitás, a hidrogén-peroxid elektrokatalízise (G/Hm) illetve a pásztázási sebesség hatása a G/Hm és G/Hm/Kit elektród viselkedésére. Az E – pH viszonya, a pH: 4-8 tartományban lineáris. $V/\Delta\text{pH} = -0.041 \pm 0.005$, $R = 0.962$ / $N = 4$, eltér (kiseb) mint 0.059, ami 1H⁺, 1e⁻ cseréjére érvényes.
- Az áramerősség lineárisan változik a pásztázási sebességgel mindkét elektród esetében, CV méréstehnika alkalmazásakor. Az elektródok stabilitása jónak mondható.
- G/Hm/Kit/HRP/Ga szerkezetű amperometriás bioszenzor állítható elő, mely a H₂O₂ kimuttására szolgál. A válaszidő 5-10 s. Tárolás 4°C, hűtőszekrényben foszfátos pufferoldattal telített közegben.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet a kolozsvári „Babeş – Bolyai” Tudományegyetem, kémia és vegyészmérnöki kar, Elektrokémia tanszéke tanárainak, munkatársainak és doktoranduszainak.

IRODALOMJAGYZÉK

- [1] A. Víg, „Bioszenzorfejlesztés L-aszcorbinsav és aflatoxin M₁ mérésére”, 2011, Ph.D. fokozati dolgozat, Debreceni Egyetem
- [2] I.E.Tothill, „Biosensors developments and potential applications in the agricultural diagnosis sector”, *Comp. and Electron. in Agricult* 30, 2001, 205-218 [3] J. Wang, „Amperometric biosensors for clinical and therapeutic drug monitoring: a review”, *J.Pharmaceutical Biomed. Anal.* 19, 1999, 47-53
- [4] S. J. Updike, G. P. Hicks, „Enzyme electrode”, *Nature*, 1967, 214 (5092) 986

- [5] Katsunobu Yamamoto, Haisheng Zeng, Yi Shen, Md Mahiuddin Ahmed, Takeshi Kato, "Evaluation of an amperometric glucose biosensor based on a tuhenium complex mediator of low redox potential", *Talanta* 66, **2005**, 1175-1180
- [6] C. La Rosa, F. Pariente, L. Hernandez, E. Lorenzo, "Amperometric flow-through biosensor for determination of pesticides", *Anal. Chim. Acta* 308, **1995**, 129-136
- [7] J. Wang, "Electrochemical Glucose Biosensors", *Chem. Rev.* (**2008**), 108, 814-825
- [8] S. Zhang, G. Wright, Y. Yang, "Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction", *Biosens. Bioel.* 15, **2000**, 273-282
- [9] Ming. Kong, Xi Guang Chen, Ke Xing, Hyun Jin Park "Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review", *International Journal of Food Microbiology*, **2010**, 144, 51–63.
- [10] NEUROtiker, "Schematic drawing of the enzymatic synthesis of Chitosan", **2008**, Wikipédia.
- [11] K. Komlai, "Kitozán-zselatin hibrid filmek előállítása és tulajdonságai", **2010**, Szakdolgozat
- [12] Á. Jaksó, "Kitozán filmek térhálósítása ionos és nemionos molekulákkal", **2010**, Budapest.
- [13] J. Berger, et al., "Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications", *European Journal of Pharmaceutics and Bio-pharmaceutics* 57, **2004**, 19-34.
- [14] <http://www.greenpharmacy.info>. [Online] [Hivatkozva: 2010. december 12.]
- [15] K. Dénesné Rácz, "Porfírvázias vas(III)-komplekek bromátos oxidációjának vizsgálata", ELTE TTK, Budapest, **2008**
- [16] Dr. O.-A. Neumüller, "Römpp Vegyészeti Lexikon", Műszaki Könyvkiadó, Budapest, **1982**, 408-412.
- [17] G. Pál docens, "Bevezetés a biokémiába" – ELTE, **2012**
- [18] Protein Data Bank: www.rcsb.org/pdb/
- [19] L. Smeller "A fehérjék konformációs és dinamikai tulajdonságai. Új eredmények nagy nyomással kombinált infravörös és fluoreszcencia spektroszkópiai módszerekkel, Budapest, **2006-2007**
- [20] K. Szigeti, "A Ca²⁺ szerepe a tormaperoxidáz enzim aktív szerkezetében", Budapest, **2008**
- [21] Li Y., D.C. Goodwin, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **2004**, 318, 970.
- [22] J.A. Laszlo, D.L. Compton, *J. Mol. Cat. B. Enzy.*, **2002**, 18, 109.
- [23] Qin Xu, Chun Mao, Ni-Na Liu, Jun-Jie Zhu, Jian Sheng, "Direct electrochemistry of horseradish peroxidase based on biocompatible carboxymethyl chitosan-gold nanoparticle nanocomposite", *Biosensors and Bioelectronics* 22 (**2006**) 768–773.
- [24] G.L. Turdean, I.C. Popescu, A. Curulli, G. Palleschi, "Iron(III) protoporphyrin IX-single-wall carbon nanotubes modified electrodes for hydrogen peroxide and nitrite detection", *Electrochimica Acta*, **2006**
- [25] W.S. Wan Ngah, S. Ab Ghani, A. Kamari, "Adsorption behavior of Fe(II) and Fe(III) ions on chitosan and cross-linked chitosan beads", *Bioresource Technology*, **2005**, 96, 443-450.
- [26] J. Chen, U. Wollenberger, F. Lisdat, B. Ge, F.W. Scheller, "Superoxide sensor based on hemin modified electrode", *Sensors and Actuators*, **2000**, B 70, 115-120.
- [27] C.P. Baron, H.J. Andersen, "Myoglobin-Induced Lipid Oxidation", **2002**, *J. Agric. And Food Chem.*, 50, 3887-3897.