

FILOTÁS DÁNIEL
TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI DOLGOZAT

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
KÉMIA INTÉZET

ÁLTALÁNOS ÉS FIZIKAI KÉMIA TANSZÉK

TDK DOLGOZAT

Kén-hidrogén elektrokémiai detektálása

H₂S szenzor alkalmazás és fejlesztés

TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI DOLGOZAT

FILOTÁS DÁNIEL

KÉMIA BSc. III. ÉVFOLYAM

**PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
KÉMIA INTÉZET**

ÁLTALÁNOS ÉS FIZIKAI KÉMIA TANSZÉK

Témavezetők:

Nagyné Dr. Zengő Livia

Tudományos főmunkatárs

Prof. Dr. Nagy Géza

Egyetemi tanár

Pécs, 2012

TARTALOMJEGYZÉK

Köszönetnyilvánítás	vi
Rövidítések jegyzéke	vii
1. Bevezetés	1
1.1. Célkitűzés	2
2. Szakirodalmi áttekintés	3
2.1. Kén-hidrogén élettani szerepe	3
2.2. Kén-hidrogén mérés módszerei	6
2.2.1. Spektrofotometriás módszerek	6
2.2.2. Elektrokémiai módszerek	7
2.2.3. Clark elektród	9
2.3. Elektródkészítési módszerek, mediátor alkalmazása	10
2.3.1. Platinaréteg leválasztása fém felületekre	11
2.4. A pH szerepe a kén-hidrogén gáz detektálásában	13
3. Kísérleti Rész	16
3.1. Felhasznált eszközök és anyagok	16
3.1.1. Eszközök	16
3.1.2. A kísérletekhez felhasznált elektródok	17
3.1.3. Anyagok	18
3.1.4. Felhasznált oldatok	18
3.2. Az kísérlethez készített mérőcellák	19
3.3. Mediátor szerepe	21
3.4. Munkaelektrod készítésének lépései	23
3.5. Alkalmazott mérőpotenciál kiválasztása	25
3.6. Kalibrációs görbe felvétele és az alsó méréshatár megállapítása	26
3.7. Munkaelektrod elkészítése, platina leválasztás	26

3.7.1. A Pt elektródfelület ellenőrzése	27
4. Elektródkészítés <i>in vivo</i> méréshez	29
4.1. In vivo mérés	29
4.2. In vivo mérések előzményei.....	30
4.3. In vivo kísérletek	31
5. Összefoglalás/Eredmények értékelése	33
5.1. Eredmények.....	33
5.2. További tervek.....	34
6. Felhasznált források.....	35

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Nagyné Dr. Zengő Livia tudomány főmunkatárs asszonynak szeretném megköszönni az áldozatos munkáját, a munkám során nyújtott rengeteg segítséget, ösztönzést.

Dr. Nagy Géza professzor úrnak szeretném megköszönni támogatását, a téma megkedveltetését, a fizikai kémiai ismeretanyag megtanítását, munkám során adott hasznos tanácsait.

Kiss András PhD. hallgatónak a gyakorlati munkában, elektródkészítésben nyújtott segítségét, tanácsait.

Boros Melinda PhD. hallgatónak az állatkísérletekben való közreműködéséért, segítségéért.

Pécs, 2012

Filotás Dániel

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

A táblázatban a többször előforduló jelölések magyar és *angol* nyelvű elnevezése, valamint a fizikai mennyiségek esetén annak mértékegysége található. Az egyes mennyiségek jelölése – ahol lehetséges – megegyezik hazai és a nemzetközi szakirodalomban elfogadott jelölésekkel. A ritkán alkalmazott jelölések magyarázata első előfordulási helyüknél található.

Latin betűk

Jelölés	Megnevezés, megjegyzés, érték	Mértékegység
A	felület	m ²
c	koncentráció	mol/dm ³ , M, g/L, ppm
D	diffúzióállandó	m ² /s
t	idő	s
E	potenciál	V
i	áramintenzitás	A

CBS	Cisztatoín-β-szintáz
CE	Segédelektród
CSE	Cisztatoín-γ-liáz
HCPA	Hidrogén-[hexakloro-platinát(II)], platinasav
M	mol/dm ³
PB	Berlini-kék
PG	Berlini-zöld
PW	Berlini-fehér
RE	Referenciaelektród
SCE	Telített kalomel elektród
WE	Munkaelektród

1. BEVEZETÉS

A Tudományos Diákköri tevékenységemet 2011. őszén kezdtem a Pécsi Tudományegyetem Általános és Fizikai Kémia Tanszékén. Nyertes Baross Gábor pályázat keretében, az Általános Orvostudományi Karral közös projektbe kapcsolódhattam így be, mely fő célkitűzése a harkányi termálvíz balneológiai kutatása volt.

A harkányi víz régóta ismert gyógyhatása összefüggésben áll a termálvíz nagy, mintegy 12,4 mg/L kén-hidrogén koncentrációjával.

Nagy koncentrációban a kén-hidrogén erős mérge, kis koncentrációban az élő szervezetben is termelődik, a kéntartalmú fehérjék valamint az aminosavak lebontásával. A kén-hidrogén a NO, CO és a H₂O₂-hoz hasonlóan, élettani jelentőségű gáz. Fiziológiai szerepének pontos megismerése az elmúlt években a tudományos figyelem középpontjába került, jelenleg is folynak a kutatások a témában, újabb és újabb eredményeket produkálva.

Fontos kérdés volt, hogy milyen úton jut be a gáz a termálvízből a szervezetbe. A termálvíz nagy hőmérséklete miatt a H₂S diffundál a levegőbe, így a légutakon keresztül is, valamint a fürdőzők bőrén keresztül történő diffúzióval bejuthat az élő szervezetbe.

Az elektrokémiai mérési módszerek elegáns mérési lehetőséget biztosítanak *in vivo* és *in vitro* elektrokémiailag aktív komponensek esetében. Az elektrokémiai cella kialakítása a mérési környezethez előnyösen változtatható.

Az Általános és Fizikai Kémia Tanszéken működő, elektrokémiával foglalkozó kutató csoport az *in vitro* mérésekhez fejlesztett ki voltammetriás szenzort, majd *in vivo* méréseket végzett, a bőrön keresztüli diffúzió felderítésére.

Dolgozatomban, az Irodalmi összefoglaló részben bemutatom a kén-hidrogén élettani hatására vonatkozó újabb felfedezéseket, az irodalomban található H₂S mérésére alkalmas elektrokémiai módszereket, ezek *in vivo* alkalmazásának lehetőségeit. A Kísérleti részben beszámolok az elért eredményekről, a szenzor kialakításáról, fejlesztéséről.

1.1. Célkitűzés

A mérésekhez szükséges volt alkalmas elektrokémiai mérőcella kialakítása. Az elektrokémiai cella tervezésénél, a vonatkozó szakirodalom áttekintése során tapasztalható nehézségek kiküszöbölésre kerültek (elektrodfelület passzíválódása a H_2S oxidációjának hatására, szelektivitás kérdése voltammetriánál, stb.).

Céлом volt az elektródkészítési módszerek megismerése, saját elektród készítése és azok szakszerű tesztelése. Kellően kisméretű mérőcellát terveztem, hogy az *in vivo* alkalmazás, minél kisebb inváziót okozzon a kísérleti állatban.

Fontosnak tartottam az *in vivo* szenzor kialakítása során az alkalmazás körülményeinek optimalizálását is. Az *in vivo* mérés körülményei számos eltérést, újabb kihívásokat jelentenek az *in vitro* mérésekhez képest. A mérések során mutatkozó nehézségeket (pl.: vastag egérbőrön keresztüli nehezebb diffúzió), is céлом volt figyelembe venni és lehetőség szerint kiküszöbölni.

Az állatkísérletekben az elektrokémiai mérőcella alkalmazásával a kén-hidrogén bőrön keresztül történő diffúziójának felderítését céloztam meg.

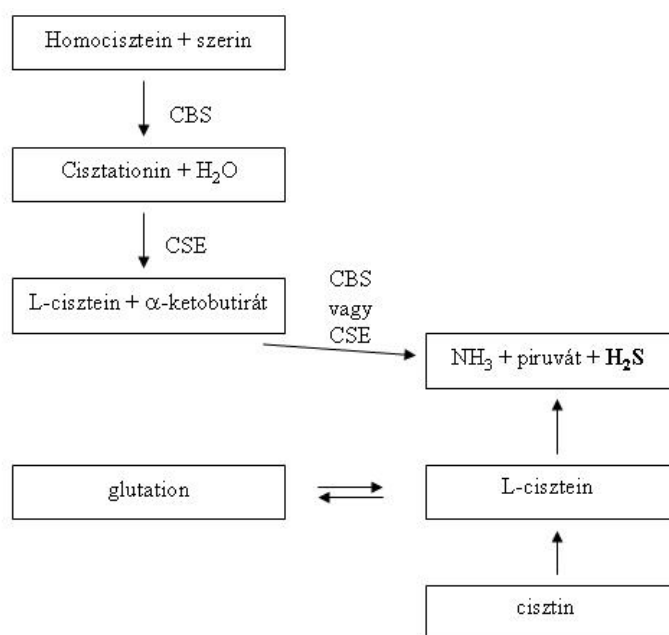
2. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Kén-hidrogén élettani szerepe

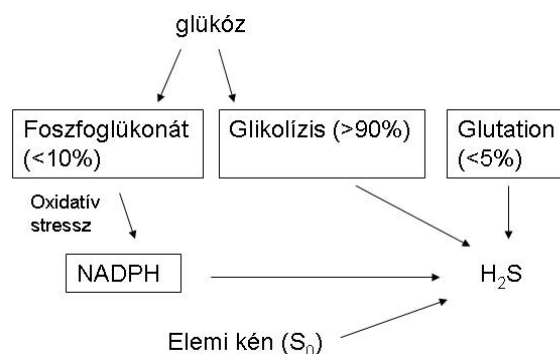
A kén-hidrogén nagy koncentrációban toxikus volta mintegy 300 éve ismert. Károsítja az agy légzőközpontjait [1]. Bár orrunk a mérgező koncentráció kb. 400-ad részét érzékelni képes, a hidrogén-szulfid hamar érzéketlenné teszi a szagló receptorokat.

A kén-hidrogén az utóbbi időben egyre gyakrabban témája a fiziológiai kutatásoknak. Kis mennyiségben élő emlős sejtekben is termelődik, például a patkány vérérumában koncentrációja kb. 46 μM [2]. Agyi szövetekben a H_2S koncentráció ennél nagyobb, 50-160 μM [3]. A H_2S változó koncentrációja az élő szervezet fontos egységeiben sejteti jelentős élettani szerepét.

A kis molekulájú H_2S átjut a plazmamembránon, mivel lipofil oldószerekben ötször jobb oldhatóságot mutat, mint vízben. Endogén keletkezése cisztatoin- β -szintáz és cisztatoin- γ -liáz [4] enzimeknek köszönhető. Nem enzimátikus termelődését a 2.1.1. ábra mutatja.



2.1.1. ábra – H_2S enzimátikus keletkezése élő szervezetben [5]



2.1.2. ábra A H_2S nem-enzimatikus keletkezése élő szervezetben [5]

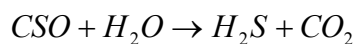
A H_2S neuromodulátor szerepét is betölti a szervezetben [6]. Jelző molekulaként szabályozó szerepe van gyulladásoknál, inzulintermelődéknél, a barlangos test simaizom szöveteire is hat [7]. A CO és a NO gázokkal együtt, a harmadik endogén gázállapotú neurotranszmitterek („gazotranszmitter”) közé sorolják. Ezáltal bizonyos ioncsatornákra is hat, melyek szignifikáns befolyást jelentenek a sejtműködésre. Hiperpolarizálja a sejtmembránt, a vaszkuláris simaizomszövetet lazítja, csökkenti az idegi ingerlékenységet.

A kén-hidrogént pikkelysömör kezelésében sikeresen alkalmazzák évtizedek óta.

A somatostatin (növekedést serkentő hormon inhibitora, somatotropin felszabadulásának inhibitora, peptidhormon) neurotransmissziót, sejtburjánzást szabályozó hormon, melyet a kén-hidrogén képes felszabadítani, stimulálja a hormont termelő mirigyeket. Különböző gyulladásos sejteken vannak receptorai a somatostatinnak.

Vérnyomáscsökkentő (vazorelaxáns) hatására R. Wang kutatócsoportja derített fényt [2] Kedvező hatással rendelkezik iszkémiás betegség kialakulása esetén, a mitokondriális funkciók védelmén keresztül. Down-kóros személyek esetén fokozott H_2S termelés tapasztalható, ami csökkenti a betegekben az érlemeszesedés kialakulásának valószínűségét [8]. A homociszteinuria hiánybetegségben, és elmezavar is szerepet játszik [9].

A harkányi és egyéb gyógyvizek egészségre kedvező hatása jól ismert, hosszú idők óta alkalmazzák balneoterápiában, jóllehet a pontos gyógyító mechanizmusok még nincsenek tökéletesen feltárva. A harkányi víz, a vulkáni eredetű kőzetekben is természetesen előforduló vegyületet, karbonil-szulfidot (CSO) tartalmaz. A CSO vízben oldódik és lassú folyamatban hidrolizál az (1) egyenlet szerint.

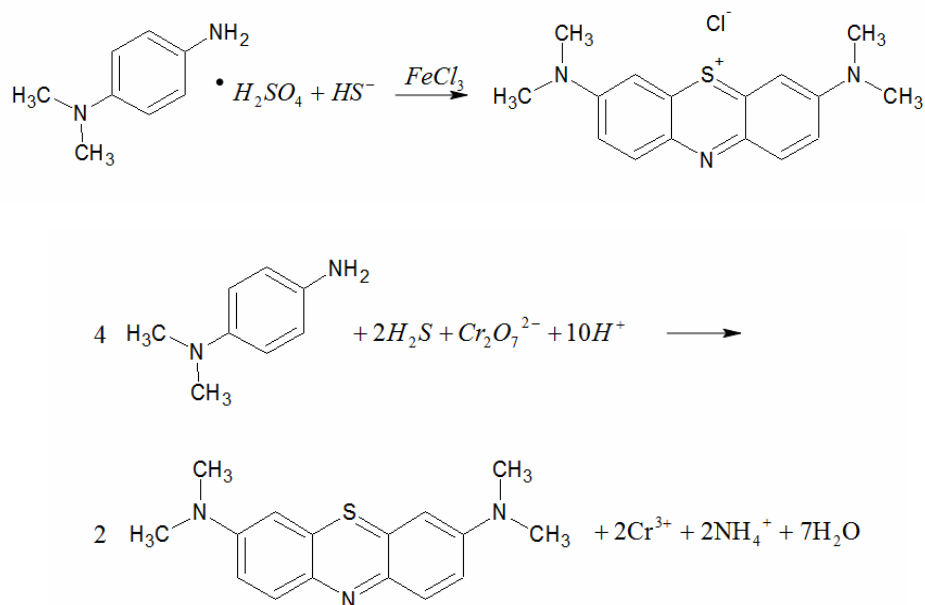


2.2. Kén-hidrogén mérés módszerei

A kén-hidrogén mérésére számos módszert kifejlesztettek. A legérzékenyebb és szelektív módszerek a spektrofotometriás és az elektrokémiai eljárások.

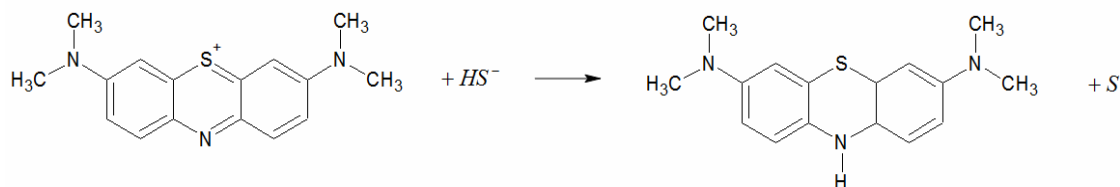
2.2.1. Spektrofotometriás módszerek

A hidrogén-szulfid N, N-dimetil-p-fenilén diammin reagenssel, vas-(III)-klorid ($FeCl_3$) jelenlétében reagálva metilénkék képződését eredményezi, amely 663 nm-nél detektálható fotometriásan [10,11]. A módszer szelektivitásának növelése és alsó méréshatárának csökkentése érdekében, cink-acetát reagenssel cink-szulfidként (ZnS) megkötik a kén-hidrogént [12] [13].



2.2.1. ábra Kén-hidrogén metilénkékes spektrofotometriás detektálásának kétféle módszere

A szulfidok elszíntelenítik a metilénkéket, ami újabb spektrofotometriás detektálási lehetőséggel szolgált, a metilénkék abszorbanciájának csökkenésének mérésével nyomon követik



2.2.2. ábra Metilénkék abszorbanciacsökkenését követő spektrofotometriás hidrogén-szulfid detektálási módszer

2.2.2. Elektrokémiai módszerek

Potenciometriás módszerek

A különböző szulfidok mérésére számos kereskedelemben is kapható ionszelektív elektród áll rendelkezésre. A szelektivitást biztosító rész ezüst-szulfid csapadékból vagy ezüst-szulfidból készített kristály membránból áll. Az Ag_2S vízoldhatóság igen csekély: $8,5 \cdot 10^{-12}$ g/L [14]. A zavaró ionok a Hg^{2+} , Hg_2^{2+} , valamint a tiolok is mérési pontatlanságot eredményeznek. Ez az elektród csak az ionos állapotban levő szulfidokat méri, a H_2S -t nem. Ahhoz, hogy a különböző szulfidféleségek kizárólag ionos formában forduljanak elő az oldatban, 10-es pH értékre van szükség, ami biológiai mintákban nagyon ritka, így a módszer *in vivo* alkalmazása nem kívánatos.

Amperometriás módszerek

Az amperometria a legegyszerűbb voltametriás elektroanalitikai módszer. Állandó potenciál mellett regisztrált áramérték (pontosabban az áramintenzitás és a maradékáram különbsége) a mintában jelenlevő elektroaktív komponensek koncentrációjával arányos. Az alsó méréshatár alacsony, a szelektivitása a módszernek azonban nem kielégítő. Éppen ezért először titrálások végpontjelzésére alkalmazták, egy, illetve két polarizált elektródot (biamperometria, dead stop

technika) tartalmazó rendszerekben. A módosított felületű (pl.: enzimmel) elektródok esetén a szelektivitás problémája megoldott, így napjainkra az amperometria az egyik legdinamikusabban fejlődő elektroanalitikai módszerre nőtt ki magát. Az áram-koncentráció közötti kapcsolatot F. G. Cottrell adta meg 1903-ban [15]:

$$i(t) = \frac{nFAcD^{1/2}}{\pi^{1/2}t^{1/2}} = kt^{-1/2},$$

ahol n elektronszám változása, F a Faraday állandó, A az elektród felülete, c a koncentráció, D a diffúzióállandó, t az idő.

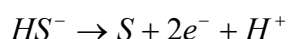
Higanyfilmmel bevont platinaelektródon, megfelelő potenciál megválasztása mellett szulfidok jelenlétében HgS bevonat alakul ki az elektródon. Ennek elektrokémiai redukciója során mérhető áramintenzitás szolgál analitikai jelként, illetve lehetőség van a redukcióhoz szükséges töltésmennyiség ismeretében a szulfid koncentráció meghatározására.

Wang és munkatársai a kén-hidrogén elektrokémiai oxidációs folyamatát vizsgálták szén nanocsővel módosított glassy carbon munkaelektródokkal. A módosított elektrokatalitikus réteg csökkentette az oxidációs potenciált, növelte a módszer érzékenységét.

Úgy találták, hogy savas közegben szulfát-ionokig megy el az oxidáció, 8 elektronos folyamatban,



míg lúgos közegben elemi kén keletkezik:



Bizonyos biológiai méréseknél a módosított felületű elektródokat preferálják a megfelelő szelektivitás eléréséhez, ugyanis a gázáteresztő membrán a CO és NO gázokat átereszt, ami zavarhatja a mérést, különösen, ha egymástól függetlenül szeretnénk meghatározni például egy szövetmintában e három gáz biológiai szerepét.

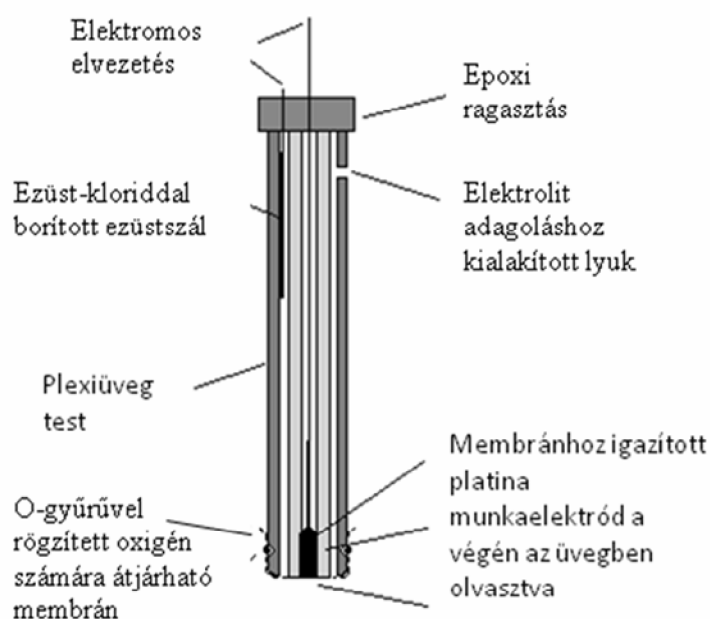
Az irodalomban fellelhetőek V_2O_5 -dal [16] módosított felületű kén-hidrogén detektálására alkalmas elektródok, illetve vezető polimerrel, poli-etiléndioxi-tiofén és berlinikék réteggel módosított felületű elektród, amit a szerzők hidrogén-peroxid mérésére szántak, de kedvezőnek tűnhet kipróbálni kén-hidrogén szenzorként is [17].

2.2.3. Clark elektród

Amperometriás méréstechnikát alkalmaz a Clark-féle oxigénmérő szenzor, mely platina munkaelektrodát és ezüst referencia elektrodát tartalmazó elektrolíziscella. Kálium-klorid elektrolit tölti be a vezetőső szerepét. A platina katód felületére polipropilén membrán feszül, melyen a mérendő oldat oldott oxigén gáz tartalma képes átjutni, ám ionok, oldószer nem, ez szelektív mérési körülményeket biztosít.

Az amperometriás mérés során, $-0,6$ V kényszer feszültséget kapcsolnak a két elektród közé úgy, hogy a platina korong legyen a negatív pólus. Tehát a működéshez külső tápforrás szükséges. A kialakuló áram intenzitása arányos a mintában oldott oxigén koncentrációjával. A mérőérzékelőt rendszerint precíziós műszerhez, potenciosztáthoz (polarográf, elektrokémiai mérőállomás) kapcsoljuk. A Clark elektród mind a környezetminősítési, mind a klinikai kémiai mérésekben, széles körben használt eszköz [18].

A elektrokémiai cella felépítését a 2.2.3. *ábra* mutatja.



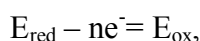
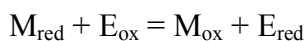
2.2.3. ábra: Clark-féle O₂ szenzor rajza

A cella a membránnak köszönhetően szelektíven képes mérni az oxigént, hiszen oldatban csak kevés oldott gázkomponens található. Kísérleteinkhez hasonló felépítésű cellát használtunk. A kén-hidrogén gáz méréséhez azonban meg kellett találni a megfelelő membránt és alkalmas mediátort. (A Clark-elektrod volt az első glükózmérő szenzor, amely az oxigén szenzor módosításával készült [19], [20]).

2.3. *Elektródkészítési módszerek, mediátor alkalmazása*

Elektródok készíthetők egy kiválasztott fém és elektromos elvezetés összeforrasztásával, illetve a fém felületének módosításával. Gyakran az elektród csupán az elektromos vezető szerepét tölti be, felületének módosításával azonban szelektívvé tehető. Ehhez elterjedten alkalmaznak vezető polimereket, melyeknek kettős szerepük van: a vezetés biztosítása és a katalizátor anyag rögzítése. Az elektrokatalizátor használata nagyon fontos olyan esetekben, ahol az elektródfelületen lejátszódó reakció passzíválná a fémeket. Bekövetkezhet az elektródfelület passziválódása is PtS, illetve PtS₂ szigetelőréteg keletkezése miatt. [21] Ez a felület időnkénti megújítását teszi szükségessé.

Az elektródfelület elektrokémiai aktivitása elektrokatalizátor (mediátor) alkalmazásával megőrizhető. A mediátor komplikációmentes folyamatban alakul át a mérendő komponenssel reagálva, majd az elektródfelületen redukálódik, vagy oxidálódik. Elvárás az elektrokatalizátorral szemben, hogy gyors, egyszerű folyamatban reagáljon a mérendő komponenssel, egyértelmű sztöchiometriát követve. A folyamatok általános egyenletei:



Ahol M, a mérendő komponens, E pedig az elektrokatalizátor. A munkaelektrodon átfolyó áram a mérendő komponens koncentrációjával arányos.

2.3.1. Platinaréteg leválasztása fém felületekre

A nem-nemesfémek bevonása nemesfém réteggel széleskörűen elterjedt. Számos módszer létezik elektrolitikus felületbevonás vizes oldatból vagy sóolvadékból, termikus úton, párologtatással vagy felületre felvitt paszták elégetésével [22]. A technológiát, a nemesfémek párologtatásával (gőzölés) történő bevonást, az ékszeripar számára fejlesztették ki, s az elektronikai ipar rohamos fejlődésének köszönhetően e területre is új módszerek alakultak ki. A tiszta arany puha fém, ezért könnyen alakítható, nyújtható, egészen vékonyra is, akár 0,0001 mm-es vékonyságig. Az aranyfüst létrehozása költséges, és nagy szakértelem szükségeltetik hozzá. Az elektrokémiai módszerek jóval elterjedtebbek, különösen az elektronika területén.

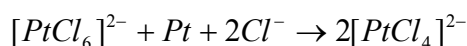
A platinafelület létrehozása széleskörű alkalmazása miatt a téma különösen jelentős területe. Vezetőképesség-mérő cellákban, hidrogén referencia elektród bázisaként, tüzelőanyag-cellákban elektrokatalizátorként használják [23]. D. Ott. és Ch. J. Raub beszámolnak munkájukban egy 700 °C-on történő kezelésről, amely során minden esetben a réz és a platina szétválását tapasztalták [24]. A megfelelő bázis fém kiválasztásával szép rétegek készíthetők. Különböző módszerekkel, különböző minőségű rétegek hozhatók létre, ennek megfelelően az alkalmazási területük is eltér.

Vizes oldatokból elektrolitikus eljárással fényes, többnyire porózus rétegek hozhatók létre, amelyeket dekorációs, illetve az elektronikai iparban speciális célokra alkalmaznak. A sóoldadékokból leválasztott platinarétegek kevésbé fényesek, kevésbé porózusak, az üveg-, az elektronikai- és kémiai iparágak használják.

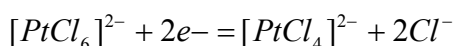
A fémréteg leválasztása elektrokémiai úton a leválasztandó fém ion redukciójával történik az elektrolitból (2.4.1. ábra). Ez esetben a katód a bevonandó fém.

Egyes források tesznek említést az ún. Kirkendall-üregek képződéséről platinával bevont réz-felületek esetén [25]. Az irodalom nagy hőmérsékleten történő vizsgálatokról számol be, feltételezhetően nem következik be szobahőmérsékleten [26] az üregképződés nem következik be.

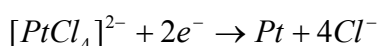
A platina legalább három különböző oxidációs állapotban fordul elő az eljárás során, Simadzu és munkatársai [27] a következő folyamat lejátszódását valószínűsíti a diffúz rétegben:



Gollas és kutatótársai [28] vizsgálták a platina leválasztását és ők is elméleti megfontolásokat tettek a folyamat lehetséges lépéseire. Szerintük, hexakloro-platinasavból (HCPA) kiindulva, a platina képződés során legalább két heterogén elektrontranszfer lépés történik, eltérő standard potenciálon [29].



$E^0=0,485$ V vs. Kalomel segédelektrod



$E^0=0,517$ V vs. Kalomel segédelektrod

Vizes oldatos elektrokémiai leválasztáshoz szükséges, pontos platinafürdő receptúrákat, és a részletes eljárásokat Hogaboom és Blum írja le könyvükben [30].

A jól működő módszerről Roseleur 1855-ben számol be először [32], aki kétféle fürdőt javasol, hidrogén-[hexakloro-platinát (IV)], ammónium-hidrogénfoszfát és dinátrium-hidrogénfoszfát oldatát, illetve a második esetben ez utóbbi komponens helyett bórsavat tartalmazó oldatot. Munkánkhoz az ő módszerüket használjuk.

A platina réteg minősítése

A platinázott felület minőségét minden esetben célszerű megállapítani. Jól bevált minősítő mutató Kessler és munkatársai [31] által javasolt módszert követve, a platinázási fok (w) meghatározása.

$$w = m/A,$$

ahol m a leválasztott platina tömege, A pedig a beborított felület.

2.4. A pH szerepe a kén-hidrogén gáz detektálásában

A kén-hidrogén gyenge sav, kétlépéses egyensúlyi savi disszociációs folyamat játszódik le vizes oldatában.

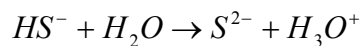
Az első disszociációs egyensúly:



A folyamat egyensúlyi állandója

$$K_1 = \frac{[HS^-][H_3O^+]}{[H_2S]}$$

A második disszociációs egyensúly:



E folyamat egyensúlyi állandója

$$K_2 = \frac{[S^{2-}][H_3O^+]}{[HS^-]}$$

A különböző szulfidok anyagmérlege

$$[S^{2-}_{tot}] = [H_2S] + [HS^-] + [S^{2-}]$$

Kifejezve a H_2S koncentrációt:

$$[H_2S] = [S^{2-}_{tot}] / \left(1 + \frac{K_1}{[H_3O^+]} + \frac{K_1 K_2}{[H_3O^+]^2} \right)$$

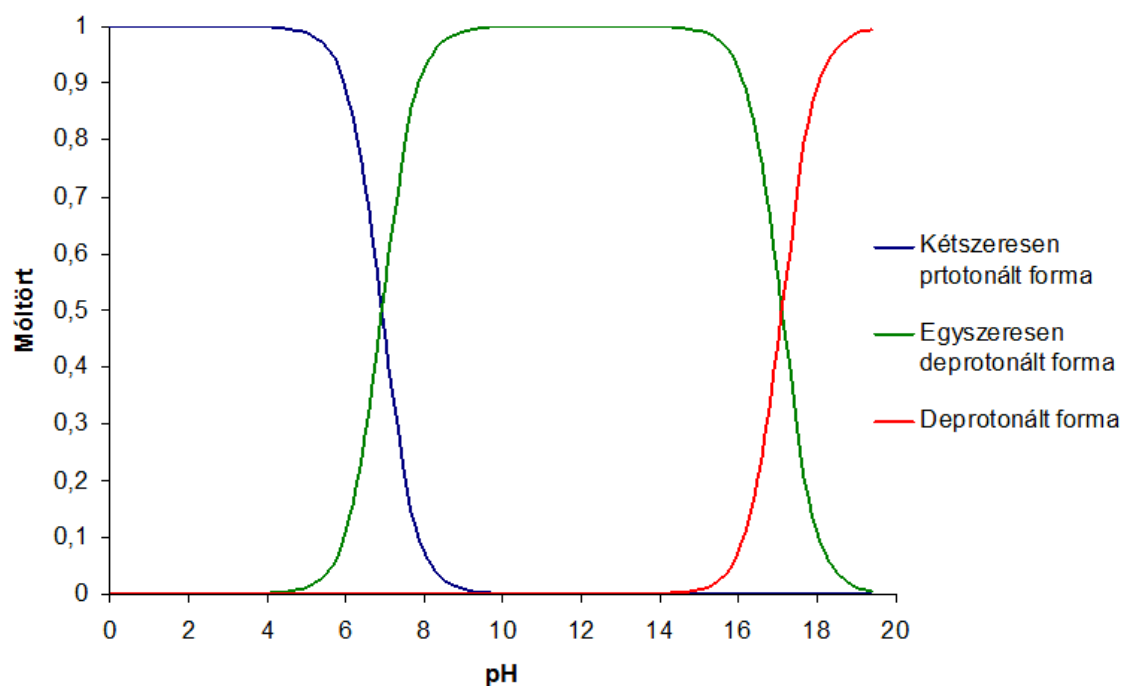
A pK_1 értéke 6,919 és a $pK_2=17,1$ [32].

A gázállapotú komponensek jutnak át, azaz a kétszeresen protonált forma. A teljes szulfidmennyiség kétszeresen protonált formában $pH < 5$ esetén van jelen. A mintaoldatokban ennek megfelelően kontrolláltam a pH -t.

$$[H_2S] = [S^{2-}_{tot}] / \left(1 + \frac{K_1}{[H_3O^+]} \right)$$

Kén-dioxid jelenléte erősen savas oldatokban zavaró lehet, $pH=2$ felett azonban nem. A következő ábrán a különböző szulfidok (H_2S , HS^- , S_2^-) egyensúlyi egyenletekből számított megoszlása látható a pH függvényében.

Szulfidféleségek megoszlása a pH függvényében



2.5.1. ábra Hidrogén-szulfid móltörtfüggvénye

Az ábra szemléletesen mutatja, hogy a H_2S kétszer protonált, azaz 90-100 %-ban gáz állapotú pH=4-6 tartományban és 50 %-ban pH=7 esetén.

3. KÍSÉRLETI RÉSZ

3.1. Felhasznált eszközök és anyagok

3.1.1. Eszközök

A mérésekhez, elektródok teszteléséhez, elektrokémiai felületleválasztásához Autolab12 potenciosztát/galvanosztát munkaállomást (EchoChemie B.V., Hollandia) és CHI 760C elektrokémiai munkaállomást (Shanghai CH Instruments, Kína) használtam. Az Autolab működtetésére a GEPES 4.9.005 mérő, értékelő programot alkalmaztam, a CHI 760C munkaállomáshoz a cég által biztosított szoftvert (6.20 verziót) használtam.

Az *in vivo* mérésekhez hordozható mérőberendezést alkalmaztam, amely magában foglalta az EChem mérőprogrammal ellátott eDAQ 161 potenciosztátot, és a négy csatornás E-corder 210 készüléket (eDAQ Pty Ltd. Denistone East, Australia).

Az elektródkészítésnél fontos az egyes lépések után mikroszkópos vizsgálat (pl.: forrasztások, csiszolás, polírozás ellenőrzése). Ehhez Zeiss gyártmányú (Karl Zeiss Jena, Németország) optikai mikroszkópot használtam.

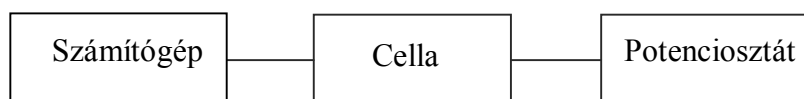
Az elektródpolírozás utáni tisztításhoz Bandelin Sanorex RK 52H típusú ultrahang készüléket (Bandelin electronics, Németország) használtam.

Az amperometriás méréseket mágneses kevertetéssel végeztem, ehhez MS 3000 típusú Boeco, Germany) mágneses keverőt használtam.

3.1.2. A kísérletekhez felhasznált elektródok

A mérésekhez sajátkészítésű platina munkaelektrodot, kloridozott ezüstsál referenciaelektrodot használtam. A forrasztásokhoz Fahrenheit forrasztóállomást használtam (UK, European Union). A forrasztások minőségét METEX multiméterrel ellenőriztem. Az elektródtest készítéséhez használt üvegcső szilánkos felületét Fermi multifunkciós gázpisztollyal tűntettem el. A pufferek pH-jának pontos beállításához pH Triode™ 91-57 Orion® (Orion Research Inc. Beverly, MA, USA) kombinált pH-mérő elektrodot használtam. A platinaréteg leválasztásánál saját készítésű 1,9 mm átmérőjű réz-, illetve 2,0 mm átmérőjű aranykatódot, és szintén házi készítésű platinaháló anódot alkalmaztam. Az elkészült felületek tesztelésénél kereskedelem-ben kapható OP-0830P kalomel elektrodot (Radelkis, Budapest, Magyarország) használtam. Készítettem mikroszkópos felvételeket (Microscop-kamera USB-version, Conrad Electronics SE, Hirschau)

Az elektródok felületét 1, 0,3, 0,05 μm szemcseméretű polírozó frakcióval (BUEHLER, Lake Bluff, IL, USA) csiszoló bársonyon (Microcloth with adhesive backing, (BUEHLER GmbH Düsseldorf, Németország) karcolásmentesítettem csökkenő szemcseméret sorrendjében. Az elektród felületéhez tapadó csiszolóanyag szemcséit ioncserélt vizes fürdőben ultrahangos kezeléssel távolítottam el, ioncserélt vízzel öblítettem.



3.1.1. ábra A rendszer blokksémája

3.1.3. *Anyagok*

A szulfid-törzsoldat készítéséhez $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (E. Merck. Darmstadt) min. 99% tisztaságú vegyszert és ioncserélt vizet használtunk. A mediátor Reanal Finomvegyszergyár ZRt. által gyártott min. 99,5% tisztaságú $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, a vezető só KCl (min. 99,5% tisztaságú; Panreac spanyol vegyszergyártól rendelt) 0,1 M-os oldatában feloldva. A mérésekhez használt acetát puffer a debreceni Spektrum 3D által előállított min. 99,5%-os tisztaságú ecetsavból, és a Reanal Finomvegyszergyár ZRt. által gyártott nátrium-acetátból készült. Az elektrokémiai platinafelület leválasztásához a „platinázó” oldathoz platinasav (HCPA), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, és Na_2HPO_4 vegyszerek mindegyike Sigma-Aldrich Chemie GmbH-től származik, és a platinasav 99,9%-os, az utóbbi két vegyszer 99,5%-nál nagyobb tisztaságú. Az elektródkészítéshez az epoxigyanta és 'hardener' segédanyag a Struers által gyártott EpoFix csomagból származik. Az polimerizációt elősegítő adalékanyag trietilén-tetraammin.

3.1.4. *Felhasznált oldatok*

A kén-hidrogén törzsoldata 6 mg $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 5 ml kétszeresen ioncserélt vízben oldásával készült. A kétszeresen ioncserélt víz fajlagos vezetőképessége $4\ \mu\text{S}/\text{cm}$. A törzsoldatot elkészülte után szintén lefedtem. A nátrium-szulfid adagolása pH=5 acetát pufferbe történt. Használtunk még ezen kívül Britton Robinson puffert (pH=5), és 0,5 M kénsavat is. A mérések közben mágneses keverőt használtam. A mérésekhez Autolab PGStat12 (Eco-Chemie, Utrecht, Hollandia) és CHI 760c (CH Instruments, Austin, TX, USA) elektrokémiai mérőműszereket alkalmaztam.

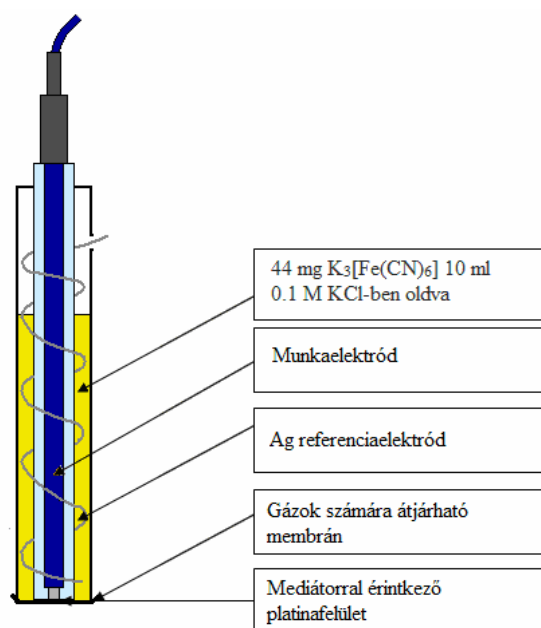
A mediátort is tartalmaz elektrolit 44 mg $K_3[Fe(CN)_6]$ 10 ml 0,1M KCl vizes oldatában oldásával készült, ezt alkalmaztam a kísérletek során.

3.2. Az kísérlethez készített mérőcellák

Ebben az alfejezetben röviden bemutatom a kialakított mérőcellát, amelyet *in vitro* mérésekhez alkalmaztam. A membrán kiválasztására végzett kísérletekben nem vettem részt, ezért ebben a munkában nem térek ki rá részletesen. Több membrántípus (pl.: polietilén, poliuretán, PVC, teflon stb.) kipróbálásra került, a H_2S számára átjárhatóság szempontjából a szilikongumi membrán tűnt a legmegfelelőbbnek. Ezt használtam a kísérletek során. Mediátornak $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ rendszert használtam, a mérések előtt 44 mg $K_3[Fe(CN)_6]$ 10 ml 0,1 M KCl oldatával töltöttem fel az üvegcsövet. A mediátor a $K_3[Fe(CN)_6]$, a KCl a vezető só szerepét tölti be.

A referenciaelektród kloridozott ezüst-szál, a munkaelektród 1 mm átmérőjű platina. A referenciaelektród ezüst-klorid bevonata az ezüstszál vas(II)-kloridba való bemártásával történt, melyet sósavas mosás követett. A használt elektrodok a 3.2.1. ábrán láthatók. Az *A* jelű elektród egy kereskedelembe is kapható Clark-elektród átalakításával készült mérőcella. Kedvező kialakításának köszönhetően, az elektródtesthez a membrán rögzítése egyszerűen cérnával is történhet. A *B* jelű cella már házi készítésű, hasonló felépítésű, itt a vonatkozási elektród ezüstszál, mely könnyedén megújítható. Ez azért szükséges, mert bár a Clark-féle elektródon oxigén mérése közben a vonatkozási elektródon oxidáció játszódik le, kén-hidrogén mérésénél redukció. A *C* jelű *in vivo* mérésekhez kifejlesztett kisméretű cella. A hosszú vezeték és a zárt elektródtest lehetővé teszi azt, hogy az állat bőre alá beültethető.

Kezdetben nyitott edényben történtek a mérések, azonban a nagyobb kén-hidrogén adagolásoknál, a gáz távozása miatt bekövetkező áramintenzitás-csökkenés indokoltá tette a zárt edény használatát. Az edény alkalmazásával mérséklődött az áramcsökkenés, ami igazolta a sejtést, hogy a kén-hidrogén levegőbe történő diffúziója okozza ezt. A zárt edényke az alábbi 3.2.2. ábrán látható. Az oldalsó „üvegsapkával” ellátott bemérőcsonkon keresztül történik a kén-hidrogén törzsoldatának adagolása.



3.2.1 ábra Az *in vitro* mérésekhez használatos mérőcella rajza



3.2.2. ábra A kísérletekhez használt mérőedényke



3.2.3. ábra A kísérletekhez készített elektródok fényképe

3.3. Mediátor szerepe

Az elektrokémiai oxidáció terméke elemi kén, ami jelentősen megnehezíti a mérést. A kén vizes közegben rosszul oldódó elem, voltammetriás mérés közben a kén-hidrogén oxidálódik, kénréteg alakulhat ki a platinafelületen, ami a felület időnkénti megújítását teszi szükségessé.

Elektrokatalizátor alkalmazásával a probléma kiküszöbölhető. Az elektrokatalizátor redukálódik, a kén-hidrogén oxidálódik, de nem a platinafelületen történik meg a kénkiválás. A mediátor elektrokémiai oxidációjából származó áram intenzitása analitikai jelként szolgál.

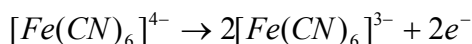
Mediátorként olyan reverzibilis redoxi rendszerek alkalmazhatók, amelyek gyors, jól definiált sztöchiometria szerint lépnek reakcióba a kén-hidrogénnel, Célszerűnek tűnt, kálium-[hexaciano-ferrát(III)] (ferricianid) mediátor alkalmazása.

A 3.3.1. ábra mutatja a szenzor elektrolitjában lejátszódó reakciókat. A pufferből a membránon átjutó H_2S redukálja a ferricianidot, kálium-[hexaciano-ferrát(II)] (ferrocianid) keletkezik. A ferrocianid az elektródfelületen oxidálva amperometriás áramot hoz létre, mely a minta oldat kén-hidrogén tartalmáról mennyiségi információval szolgál. A referencia elektródon redukció játszódik le.

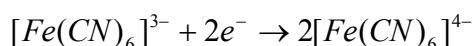
Kémiai lépés



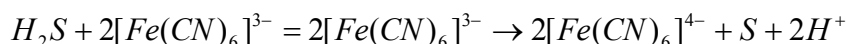
Elektrokémiai lépés

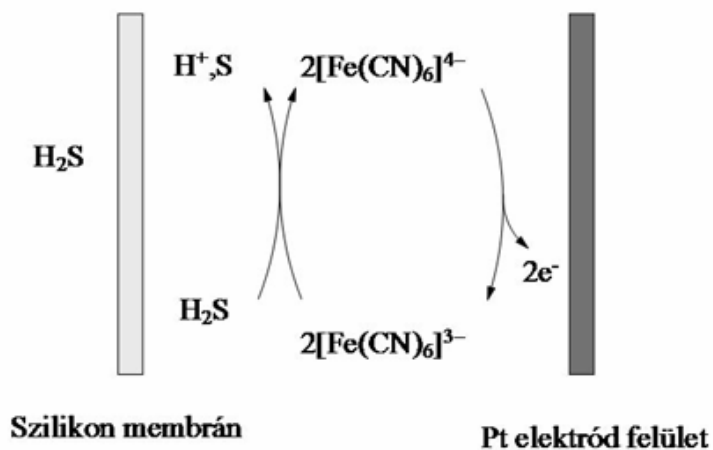


(Katódon) Elektrokémiai lépés



Bruttó reakció

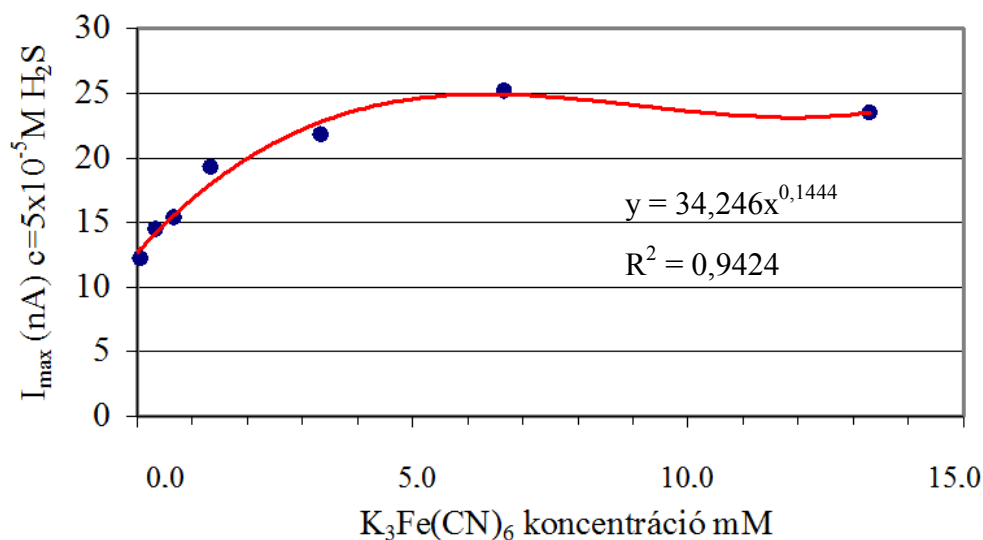




3.3.1. ábra Az elektrokatalizátor reakciói H_2S -dal, ill. platinafelületen

Mediátor optimális koncentrációjának kísérletes meghatározása

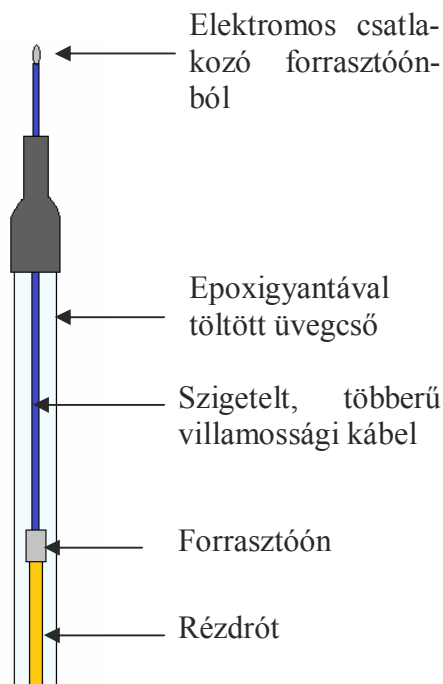
Megvizsgáltam a mediátor koncentrációjának a mérésre gyakorolt hatását, ehhez oldatából hígítási sort készítettem, majd az elektródtestbe töltve megmértem az elektród válaszjelét a nátrium-szulfid koncentrációjának 0-ról $5 \cdot 10^{-5}$ M-ra történő változtatásakor. A beállított potenciál 0,4 V volt, a kapott mérési eredmények a 3.1.2. ábrán láthatóak. 5,0-13,4 mmol/dm³ koncentrációtartományban gyakorlatilag független az áram értéke a mediátor koncentrációjától. A további mérésekben, mint 13,4 mmol/dm³-re állítottam a mediátor koncentrációját.



3.3.2. ábra Mediátor koncentráció hatása az amperometriás áramra

3.4. Munkaelektrod készítésének lépései

Munkaelektrodként platinaelektrodot használtam a mérésekhez. A platina réteg leválasztásához más fémekből készítettem elektrodokat. Az elektrod összeállítását a 3.4.1. ábra jól szemlélteti. Kezdetben célszerűnek tűnt réz munkaelektrodot készíteni, hiszen ez még költségkímélőbbé tenné a mérőmódszert. Az elektrodhoz réz villamossági vezetékét használtam. 4-5 cm-es darabot vágtam le, majd kiegyenesítettem. Lecsiszoltam a végeit csiszolóvásznon, majd összeforrasztottam többérű rézvezetékekkel. A többérű rézvezetéket is célszerű lecsiszolni (a forrasztás helyén a szigetelést el kell távolítani). A forrasztás helyét zsugor teflonnal borítottam be, ennek rögzítő szerepe volt. Megfelelő méretű zsugor teflont vágtam, ráhúztam a forrasztás helyére, hőpuskával melegítettem; ráidomult a vezetékre.



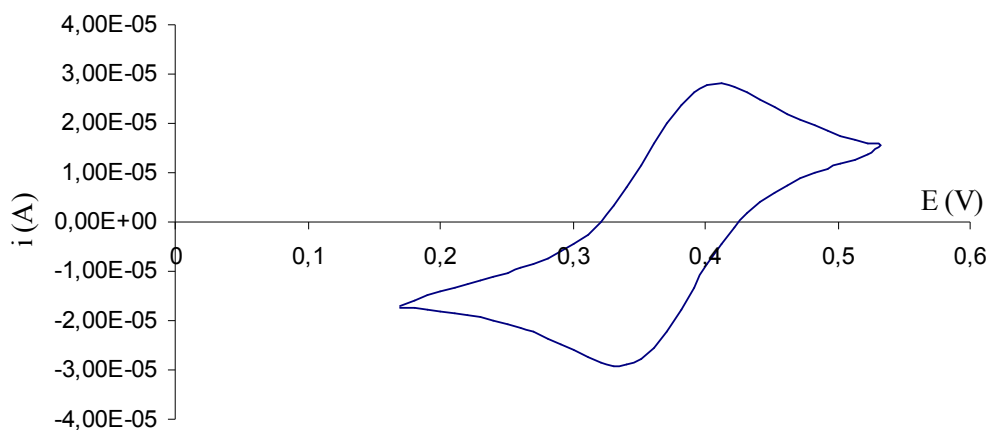
*3.4.1. ábra: Saját készítésű
réz munkaelektrod rajza*

A többesű vezeték végéből csatlakozót készítettem a rézsálak összeforrasztásával. Az elektródtesthez szükséges 10-12 cm hosszú üvegcsövet vágtam, majd a végeit csiszoltam; adott esetben, ha szilánkos volt a törés, a törés helyét kissé beolvasztottam. Az elektródtest robusztuságának, növelése érdekében epoxigyanta műanyaggal töltöttem meg az üvegcsövet. Teflonszalaggal gondosan körütekertem az alját, hogy ne folyjon ki a még nem polimerizálódott műanyag. Igyekeztem a rézdrótot minél közelebb helyezni a teflonszalaghoz, ellenkező esetben sokkal tovább tart a csiszolással eltöltött idő. A műanyag polimerizációja kb. 12 óra alatt játszódott le.

Ezután következett a teflonszalag eltávolítása, csiszolás és polírozás. Minden esetben nedves csiszolást, polírozást alkalmaztam. A csiszolást háromféle csiszolópapíron végeztem, durvábbtól a finomabb felé haladva. Ezt követően háromféle alumínium-oxid polírozóporral polírbáronson políroztam az elektródot. A finom felület eléréséhez 1; 0,3; 0,05 mikron méretű polírozó frakciókat alkalmaztam. Egy-egy polírozási folyamat elvégzése után lemostam az elektródot, az esetlegesen fennmaradó szemcséket szonikálóval távolítottam el.

3.5. Alkalmazott mérőpotenciál kiválasztása

Amperometrás mérések állandó potenciálon történnek. A megfelelő mérőpotenciál érték kiválasztásához a mediátor ciklikus voltammetriás vizsgálatára volt szükség. Ehhez 50 cm³ 25 mM-os K₃[Fe(CN)₆] oldatot készítettem ennek vettem fel a ciklikus voltammogramját, 100 mV/s-os pásztázási sebességgel 100-600 mV potenciáltartományban. A kapott voltammogrammot a 3.4.1. ábra mutatja.

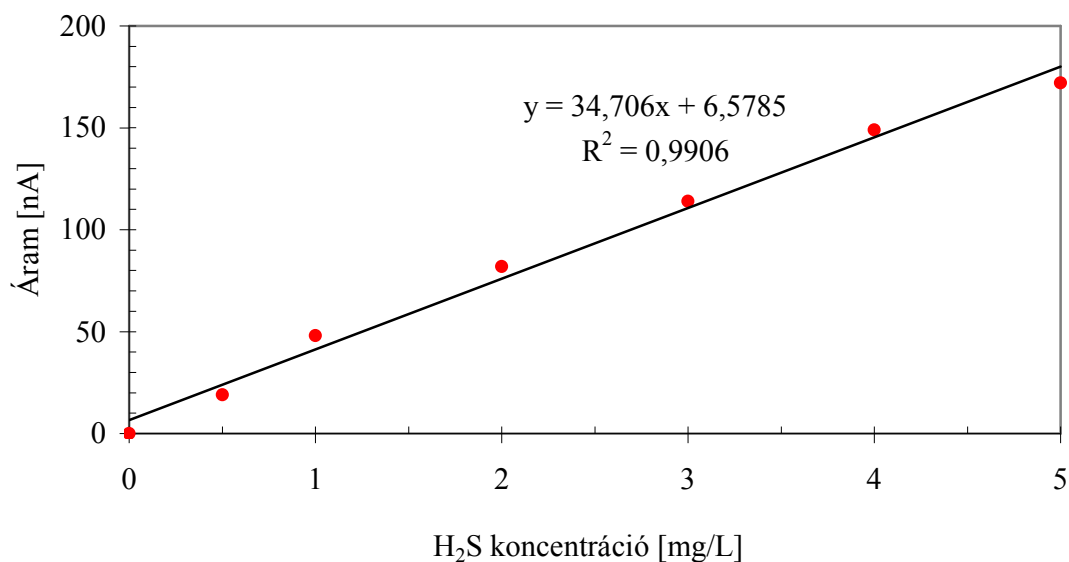


3.4.1 25 mM-os K₃[Fe(CN)₆] ciklikus voltammogramja

A K₃[Fe(CN)₆] reverzibilis ciklikus voltammogrammot ad. Célszerűnek tűnt a 400 mV-os potenciál alkalmazása a méréseknél.

3.6. Kalibrációs görbe felvétele és az alsó méréshatár megállapítása

Az amperometriás mérések nagy előnye az alacsony méréshatár. Ennek értéke ppm-ppb koncentrációban is lehet. Az alábbi 3.6.1-es ábrán látható kalibrációs görbe szilikongumi membránnal készült, 150 mM koncentrációjú mediátor alkalmazásával. Mint ismeretes, a görbe meredeksége az érzékenységet adja meg, azaz: 34,706 nA/mg/L. A zaj átlagos értéke 3 nA az alsó méréshatár ebből 9 nA, ami 0,26 mg/L, azaz 0,26 ppm H₂S koncentrációnak felel meg.



3.6.1 ábra A kén-hidrogén kalibrációs görbéje

3.7. Munkaelektród elkészítése, platina leválasztás

Fontos koncepció volt a platina munkaelektród minél költséghatékonyabb előállítása, így rézelektród-készítéssel ismerkedtem eleinte, majd ennek a mérésre használatos néhány mm² – es felületét vontam be platínával. A réteg elkészítése elektrokémiai úton történt, Autolab PGSTAT12 (Eco-Chemie, Utrecht, Hollandia) mérőműszer chrono-method, galvanostatic programjával végeztem. A rézelektród volt a katód, nagy felületű platinahálót alkalmaztam

anódként. Az elektrolit különleges platinázó oldat, amely hidrogén-[hexakloro-platinát(IV)] (H_2PtCl_6) (0,1 N), ammónium-hidrogén-foszfát (1,0 N), és dinátrium-hidrogén-foszfát (2,0 N) felhasználásával készült. A Pt leválasztásához galvanosztatikus módszert alkalmaztam. Az áramérték változtatásával különböző minőségű felületek képződtek. Csillogó, összefüggő felület létrehozása volt a cél, ehhez kerestem a megfelelő áramértéket. 0,3 mA-nél alacsonyabb áramértéknél részleges platinabevonatú felületet kaptam, ennél nagyobbánál pedig matt bevonat képződött. A bevont felületekről digitális mikroszkópos képeket készítettem.

3.7.1. *A Pt elektródfelület ellenőrzése*

A felületi bevonás tesztelésére ciklikus voltammetriát alkalmaztam. A hexacianoferrát (II)/hexacianoferrát (III) kénsavas közegben platina munkaelektrodon reverzibilis ciklikus voltammogrammot eredményez. A munkaelektrod platina, referenciaelektrod kalomel elektrod volt, segédelektrodként nagy felületű platinaelektrodot használtam. A geometriai és az elektrokémiai felület gyakran nem egyezik meg, a ciklikus voltammetriás kísérleti eredményekből, a Randles-Sevcik egyenlet segítségével az elektrokémiai felület meghatározható.

A létrehozott felület szemrevételezéssel és fénymikroszkópos vizsgálattal szép, egybefüggő. Mivel nem ismeretlen a szakirodalomban [33], és alaposan vizsgált, a meglévő receptúra alapján (amelyet a rézfelületére történő leválasztáshoz is használtam), aranyra is kipróbáltam a platinafelület elektrokémiai leválasztását.

A receptúra 70 °C-on javasolja az eljárás kivitelezését, kipróbáltam azonban szobahőmérsékleten is. Nagyobb hőmérsékleten az állandó áramsűrűség mellett elért potenciál alacsonyabb, mint szobahőn, illetve itt a potenciálértékek nagymértékű szórását is tapasztaljuk. Az aranyelektrod esetében csak szobahőmérsékleten végeztem el a platinaleválasztást.

Végeztem Pt leválasztásokat az áramerősség változtatásával 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 mA-en. 0,1 mA-en a potenciál átlagos értéke ~1,5 V, 0,2 mA-en ~ 1,7-1,8 V, 0,3 mA és e fölött az potenciál átlagos értéke szignifikánsan nem változott, 2,1 V volt.

	i (mA)	E (V)	t (s)	Felület minősége
1.	0,1	1,4-1,5	150	foltos
2.	0,2	1,7-1,8	150	kevésbé foltos
3.	0,3	1,8-1,9	150	egybefüggő, csillogó
4.	0,4	1,9-2,0	150	kevésbé csillogó
5.	0,5	>2,1	150	matt

4.6.4. ábra A leválasztott platinaréteg minőségének változása, az áramerősség változtatásával



4.6.5. ábra Platinázott felületű réz elektród, és arany elektród képe

4. ELEKTRÓDKÉSZÍTÉS *IN VIVO* MÉRÉSHEZ

4.1. *In vivo* mérés



5.1.1. ábra Az *in vivo* mérésekhez használatos mérőcella

Az *in vivo* mérések nem az Általános és Fizikai Kémia Tanszéken történtek, hanem az Általános Orvostudományi Kar Farmakológiai és Farmakoterápiai Karán. A mérések kísérleti állatban (laboratóriumi fehér egér – *Mus musculus musculus*) történő végzéséhez szükséges volt kisebb méretű cellát létrehozni. Ennek képe az 5.1.1-es ábrán látható. Az elektród felépítése és működési elve az *in vitro* mérésekben használt cellához hasonlatos volt. Vékonyfalú üvegcső elektródtestben helyezkednek el az elektródok, üvegbe olvasztott 1 mm átmérőjű platina munkaelektrod, és az elektródtartó üvegcső köré tekercselt 250 μ m átmérőjű kloridozott ezüsthuzal vonatkozási elektród. Az elektromos kontaktust vékony szigeteléssel ellátott huzalok biztosítják.

A kezdeti kísérleti tapasztalatok alapján több módosításra is szükség volt. Más elektromos szigetelési, más membránrögzítési megoldásokra volt szükség. Az elektródokat minden mérés előtt és után kalibráltam. Egyidejűleg több *in vivo* méréshez használatos elektród készült, mivel a szenzor építése soklépéses folyamat, a készítés során szerzett tapasztalatokkal mindig megfelelőbb lesz az eszköz.

Az elektródok tárolása nem kedvező száraz környezetben, azonban oldatban, vízben sem, ezért telített gőztérben tároltam hűtőszekrényben. A mérésekhez EDAQ potenciosztátot és E-corder műszert használtam.

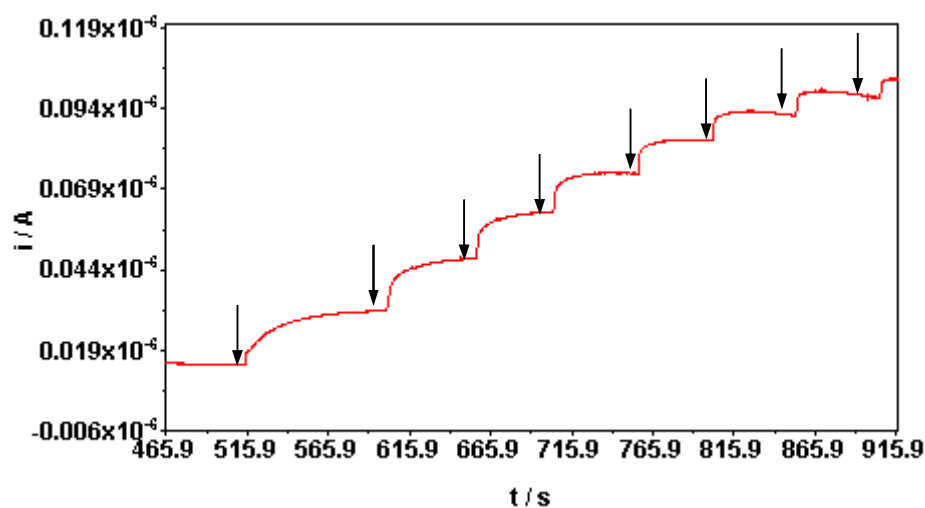
4.2. *In vivo* mérések előzményei

Kezdetben feláldozott egerekről frissen levett bőrmintán keresztüli kén-hidrogén transzport mérésével végeztünk kísérleteket. Ehhez az elektródot pipettahegyből kialakított csőbe helyeztük, erre rögzítettük az egérbőrt szőrös felével kifelé. A csőbe $1,5\text{ cm}^3$ 5,5 pH-jú acetát puffert került, a csövet 5 cm^3 pH=5,5 acetát puffert tartalmazó főzőpohárba állítottam. Mágneses keverő használata mellett az amperometriás alapáram stabilizálódása után Na_2S törzsoldatból adagoltunk a pufferbe.

Ezeknél a méréseknél az elektród válaszeje romlott, ha levegő került a bőr és az elektród közé.

A diffúzió hajtóereje közismerten a koncentrációkülönbség. A H_2S koncentráció a szervezetben 20-50 μM , a harkányi fürdővíz 12,4 ppm, ami körülbelül 360 μM H_2S koncentrációjú. A koncentráció gradiens fennáll.

Későbbi mérésekben az egérbőrt a membránra rögzítettem. Sikeres H_2S kalibrációt végeztem, megfelelő válaszidoeket kaptam.



4.2.1. H_2S amperometriás mérőgörbe. A nyilak a hozzáadott kén-hidrogén adagok idejét mutatják.

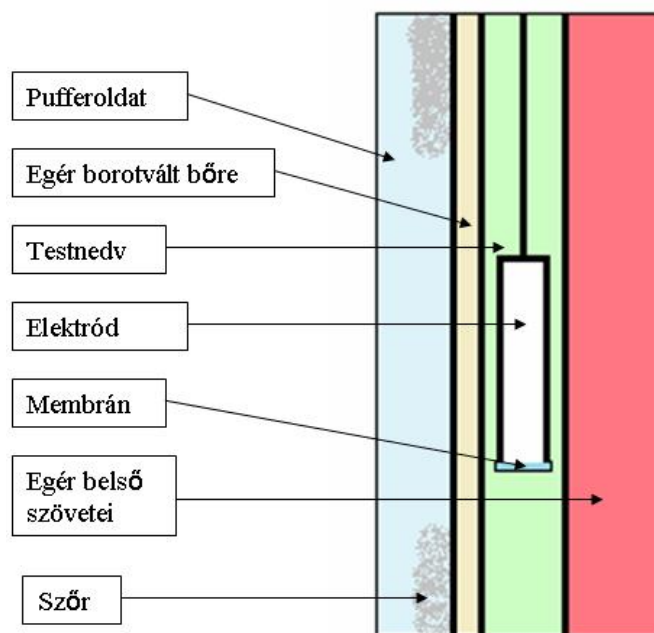
4.3. *In vivo* kísérletek



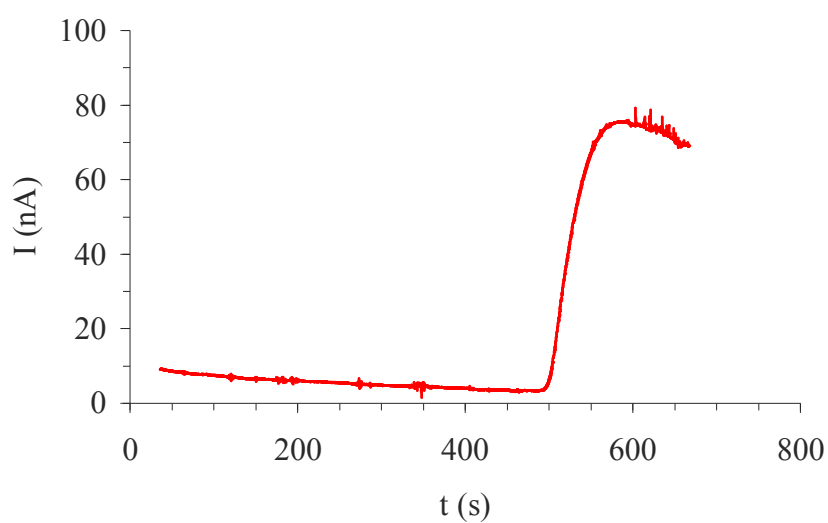
4.3.1. ábra Preparált kísérleti állat képe.

Az *in vivo* kísérletekhez hőmérővel termosztált egér-fürdető kádat használtam. Ennek célja az egér bőrének felpuhítása a bőrön keresztüli diffúzió elősegítésére. Előzetes kísérletek tapasztalatai sugallták ezt a megoldást. A fürdést követően a kísérleti állat altatására került sor. Biológus kutatótársunk bemetszést végzett a nyakán, leborotválta az állat hasát, az elektródot a bemetszésen át a bőr alá helyezte a hasi tájékra. Az operáció közben előkészítettem az elektrokémiai mérést, ilyenkor történt a mérőrendszer összeállítása, helyszíni kalibráció. Ez követően az egeret rögzítették egy fém-állványhoz, és egy 2000 cm³ pufferral töltött hengerbe állítottuk az állványt, úgy hogy az egér feje a folyadékfelszín felett legyen, a tájék ahol az elektród elhelyezkedik viszont alatta. Az egér altatása 0,1 g ketamin 10 ml vizes törzsoldatából történt. Az altatás hatása körülbelül 30-35 perc, ez alatt kellett a kísérleti állatot preparálni a méréshez (has borotválása, bemetszés a nyaknál, elektród bőr alá helyezése, az egér rögzítése az állványhoz, kondicionálás a pufferverben, amperometriás alapáram stabilizálódásának kivárása, nátrium-szulfid oldat adagolása). Az elektród a bemetszés helye alatt kb. 5 cm-rel, helyezkedik el a mérések során, emiatt különös gondossággal kell behelyezni a bőr alá. A mérés értékelése: a tapadó szilikongumi nehezítette a behelyezést, csipesszel óvatosan rá kellett segíteni. Az idő rövidsége mellett nehézséget okozott, hogy az egér bőre vastag, gazdag érhálózattal rendelkezik, ez pedig a diffundáló kén-hidrogént elszállítja. Ez tükröződik a relatív hosszú válaszidőn, illetve az amperometriás áram csökkenésében. A nátrium-szulfid törzsoldat 4 mol/dm³ volt, ebből adagoltam a pufferverbe. A kén-hidrogén útja az oldatban háromféle lehet. Nem elhanyagolható része távozik az oldatból, ennek kiküszöböléséért parafilmmelel fedtem az edényt. Egy része az oldatban marad. Egy része pedig a bőrbe diffundál, itt újabb két lehetőség adódik: érrendszeren keresztül a vérbe jut, és távozik, illetve a detektálható formában marad. A kísérlet előtt és után is ellenőriztem a pufferv pH-ját: előtte

4,7 volt, a végén 4,9. Az elektródot kipróbáltam *in vitro* is a mérés után kalibrációval. Egy-azon elektróddal végezhettem több egérkísérletet is. A 4.3.3. ábrán látható az elektrokémiai válaszjel 2 cm³ kén-hidrogén törzsoldat 2000 cm³ pufferhez adagolásának hatására. A jel nagysága 69,21 nA volt. A 34,706 nA/ppm érzékenységű *in vitro* kalibrációval összevetve körülbelül 2 ppm a detektált mennyiség.



4.3.2. ábra *In vivo* mérés modellje.



4.3.3. ábra Elektród válaszele nátrium-szulfid adagolás hatására

5. ÖSSZEFOGLALÁS/EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

5.1. Eredmények

A balneológiai kutatásban szerepünk egy olyan kén-hidrogén mérésére alkalmas mérőcella létrehozása, mely alkalmas *in vivo* kísérletekre és képes kimutatni az esetleges bőrön keresztüli H_2S transzportot, igazolva az előzetes feltevéseket, miszerint nem kizárólag a légző szervrendszeren keresztül juthat be az élő szervezetbe.

A kutatásba szinte az indulástól kezdve kapcsolódtam be. A kutatás kezdetén az alkalmazott mérőmódszerrel, a voltammetriás módszerekkel ismerkedtem meg. A mérőrendszert, a mérőprogramot, a kísérleti körülményeket kalibrációs görbék felvételével tanulhattam meg.

Mérőelektrodok készítésével is megismerkedhettem. A kutatás külön fejezete volt a platinafelület kialakítása. Az ezzel kapcsolatos irodalom megismerése utáni kísérleteket is én végeztem, a mérési paraméterek módosításával vizsgáltam a leválasztott felület minőségét, a kialakult felületet ciklikus voltammetriával teszteltem. Sikerült platinázott felületű aranyelektrodot készíteni, mellyel a platina korongelektrodhoz hasonlóan jól detektálható a kén-hidrogén. *In vivo* mérésekben is részt vettem, állatkísérleteket végeztem az *in vitro* mérésekhez alkalmazott mérőcella alapján készített kisméretű elektróddal, mely kedvezően kismértékű inváziót okoz a kísérleti állatban. Az *in vivo* körülmények okozta nehézségeket sikerült úgy kezelni, hogy elektroanalitikai módszerünk a mérések céljának megfeleljen. A mérések alapján a kutatás elérte célját: igazolhatóan történik a bőrön keresztüli H_2S diffúzió.

5.2. További tervek

A kén-hidrogén élettani szerepére vonatkozó kutatások az utóbbi, kb. másfél évtizedben előtérbe kerültek, ezért azt gondolom, bár a kitűzött célt elértük, a kutatásunk folytatása nem veszti értelmét, hiszen az élettani kutatásokhoz elengedhetetlenek a valós idejű *in vivo* mérésekhez alkalmas mérőmódszerek. Jelentkezett igény olyan elektrokémiai cellákra, melyekkel különböző szövetmintákban nyomon követhető a kén-hidrogén koncentrációváltozása, biokémiai folyamatok mechanizmusának, kinetikájának felderítésére, a kén-hidrogén szerteágazó szerepének minél részletesebb megismerésére. A borászatban is hasznosak a kén-dioxid mérése az *in vitro* mérésekhez kifejlesztett elektródok.

A kutatás vezetőjéhez több érdeklődés is érkezett a szenzorral kapcsolatban, különböző feladatokhoz, ezért a kutatás a közeljövőben még folytatódik.

6. FELHASZNÁLT FORRÁSOK

- [1] GUIDOTTI, T. L., Hydrogen sulfide. *Occup. Med.* 46, (1996) 367–371.
- [2] ZHAO W., ZHANG J., LU Y. AND WANG R., *The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K_{ATP} channel opener* The EMBO Journal Vol. 20 No. 21 (2001) 6008-6016.
- [3] ABE, K., AND KIMURA, H., The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J. Neurosci.* 16, (1996) 1066–1071.
- [4] STIPANUK, M.H., BECK, P.W., Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat *Biochem. J.* 206 (1982) 267-277.
- [5] WANG R., Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? The FASEB Journal Vol.16 (2002), 1792-1798.
- [6] KIMURA, H., Hydrogen Sulfide as a Neuromodulator *Molecular Neurobiology*, (2012) ol. 26, No. 1., pp. 13-19.
- [7] KIMURA, H., Hydrogen sulfide: its production and functions *Experimental Physiology* 96 (2011), 833-835.
- [8] KAMOUN, P., BELARDINELLI MC., CHABLI A., LALLOUCHI K., CHADEFOUX-VEKEMANS B. Endogenous hydrogen sulfide overproduction in Down syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 116 (2003) 310-311.
- [10] KIMURA, H., Hydrogen sulfide and the regulation of neuronal activities, in: WANG R. (Ed.), *Signal Transduction and the Gasotransmitters: NO, CO, and H₂S in Biology and Medicine*, Humana Press Inc., Totowa, NJ, (2004), 315–321.
- [10] ALMY, L., A method for the estimation of hydrogen sulfide in proteinaceous food products *J. Am. Chem. Soc.* 47 (1925) 1381-1390.
- [11] MARCELO S.P., SILVA S D., ABATE I., MASINI G., JORGE C., Spectrophotometric determination of acid volatile sulfide in river sediments by sequential injection analysis exploiting the methylene blue reaction *Talanta* 53 (2001) 843–850.
- [12] FOGO J.K, POPOWSKY M., Spectrophotometric Determination of Hydrogen Sulfide-Methylene Blue Method, *Anal Chem* 21. (1949) 732-734.

-
- [13] SIEGEL, L.M., A direct microdetermination for sulfide, *Anal. Biochem.* 11 (1965) 126-132.
- [16] GREENWOOD N. N., EARNSHAW A., *Chemistry of the Elements*, 2nd ed., Butterworth-Heinemann, Oxford, UK, (1997). p. 1600.
- [15] COTTRELL F.G., Residual current in galvanic polarization, regarded as a diffusion problem *Zeitschrift für Physikalische Chemie* 42. (1903) 385-431.
- [16] BENNETT J. A., PANDER J. E. III, Neiswonger M. A., Investigating the viability of electrodeposited vanadium pentoxide as a suitable electrode material for in vivo amperometric hydrogen sulfide detection *Journal of Electroanalytical Chemistry* 654 (2011) 1–7.
- [17] LUPU S., In situ electrochemical preparation and characterization of PEDOT-Prussian blue composite materials. *Synthetic Metals*. 161 (2011) 384-390.
- [18] MADIHALLY S. V., *Principles of biomedical engineering Artech House* (2010) 370.
- [19] CLARK JR, LC, WOLF, R; GRANGER, D; TAYLOR, Z., "Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography". *Journal of applied physiology* 6 (3) (1953) 189–193.
- [20] CLARK, L.C., LYIONS C., Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery *Acad. Sci.* 102 (1962), 29-45.
- [21] KAPUSTA S., VIEHBECK, A., WILHELM, S.M., The anodic oxidation of sulfide on platinum electrodes, *J. Electroanal. Chem.* 153 (1983) 157-174.
- [22] BAUMGARTNER M., RAUB CH. J., The Corrosion Behaviour of Objects Electroplated with Platinum -Important influence of intermediate layers *Platinum Metals Rev.*, 29, (4), (1985) 155-162.
- [23] FELTHAM A. M., SPIRO M., Platinized Platinum Electrodes *Chemical Reviews*, Vol. 71, No. 2 (1971), 177-193.
- [24] OTT D., RAUB CH. J., Copper and Nickel Alloy clad with platinum and its alloys *Platinum Metals Rev.* 31, (1987) 64-71.
- [25] DINI J. W., Electrodeposition – The materials science of coatings and substrates *Noyes Publications*, New Jersey (1993) p. 367.
- [26] SCHLESINGER M., PAUNOVIC M., *Fundamentals of electrochemical deposition John Wiley and Sons Inc.* (2006) second edition p. 301.
- [27] SHIMAZU K., WEISSHAAR D., KUWANA T., Electrochemical dispersion of Pt microparticles on glassy carbon electrodes. *J. Electroanal. Chem.* 223 (1987) 223-234.

-
- [28] GOLLAS B., ELLIOTT J. M., BARTLETT P. N., Electrodeposition and properties of nanostructured platinum films studied by quartz crystal impedance measurements at 10 MHz *Electrochimica Acta* 45 (2000) 3711-3724.
- [29] COLOM F., IN : BARD A.J., PARSONS R., JORDAN J., (Eds) Standard potentials in aqueous solutions, Marcell Dekker, New York, (1985), p. 339.
- [30] BLUM W., HOGABOOM J.B.G., Platinum deposition, Principles of electroplating and electroforming *McGraw Hill Inc.* (1949) p. 392.
- [31] KESSLER T., CASTRO LUNA A. M., TRIACA W. E., ARVIA A., J The behaviour of platinized platinum electrodes in acid solutions: correlation between voltammetric data and electrode structure *Journal of Applied Electrochemistry* 16 (1986) 693-702.
- [32] BRODERIUS, S. J., SMITH, L.L., Direct determination and calculation of aqueous hydrogen sulfide *Anal. Chem.*, 49 (1977) 424-428.
- [33] WAIBEL H.-F., KLEINERT M., KIBLER L.A., KOLB D.M., Initial stages of Pt deposition on Au(111) and Au(100) *Electrochimica Acta* (2002) 1461-1467.