



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar
Fizikai Kémiai és Anyagtudományi Tanszék
MTA-SZTE Lendület Biokolloidok Kutatócsoport
Vegyész MSc

OTDK dolgozat

**POROSZKÉK NANORÉSZECSKÉK
KOLLOIDSTABILITÁSA ÉS ANTIOXIDÁNS AKTIVITÁSA
KÖZÖTTI ÖSSZEFÜGGÉSEK KÜLÖNBÖZŐ
SZERVETLEN SÓK JELENLÉTÉBEN**

Péter Tamás

Témavezetők: Dr. Szilágyi István
Takács Dóra

Szeged

2024

Tartalmi összefoglaló

A kutatásunk során poroszkék (PB) nanorészecskéket szintetizáltunk, majd felmértük azok töltésviszonyait, aggregációs sajátságait, és antioxidáns aktivitását különböző szervesetlen ionok jelenlétében.

Első lépésként együttes lecsapással előállítottuk a PB nanorészecskéket. A kialakult termék szerkezeti, és morfológiai tulajdonságait UV-Vis spektroszkópiával, transzmissziós elektronmikroszkópiával és dinamikus fényszórásmérés segítségével jellemeztük.

Ezt követően feltérképeztük a PB részecskéket tartalmazó diszperziók kolloidstabilitását különböző összetételű és koncentrációjú szervesetlen ionok jelenlétében. A meghatározott elektroforetikus mobilitás értékek alapján megállapítottuk, hogy az egy vegyértékű ionok adszorpciós affinitása a $\text{Cs}^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+$, míg a különböző vegyértékű ionoké a $\text{La}^{3+} > \text{Ca}^{2+} > \text{K}^+$ sorrendet követi a negatív töltésű PB részecskék felületéhez. Mindezt a stabilitási arány segítségével meghatározott CCC értékek is alátámasztják, tehát a mért adatok tendenciái jól korreláltak a töltésviszonyok változásaival.

A kísérleti eredményeket különböző kolloidkémiai modellekkel vetettük össze, és az összehasonlítás alapján az egy vegyértékű ionok adszorpciós affinitása a Hofmeister sorozattal, míg a különböző vegyértékű ionok adszorpciójának mértéke a Schulze–Hardy-szabállyal mutat egyezést. Ez alapján az aggregációs hajlamot mind a töltésárnyékolás, mind pedig az adszorpció együttesen okozza. Az aggregáció mechanizmusa a részecskék között ható erők eredetével együtt kvantitatívan értelmezhető a töltéssel rendelkező részecskék kolloid stabilitására kidolgozott DLVO-elmélet segítségével.

Utolsó lépésként felmértük a PB antioxidáns aktivitása és kolloidstabilitása közötti összefüggéseket a vizsgált sók jelenlétében HRP teszt segítségével. A vizsgálatokat a lassú aggregációs tartományban ($W > 100$) alacsony sókoncentrációnál, közepes aggregációs sebességnél ($W \sim 10$), és a gyors aggregációs tartományban ($W \sim 1$) magas sókoncentrációnál is elvégeztük. Az eredmények alapján megállapítottuk, hogy mind az ionerősség, mind a sók anyagi minősége hatással van az antioxidáns aktivitásra. Az ionok felülethez való affinitásának valamint koncentrációjának növelése az elektromos kettősréteg egyre nagyobb mértékű beszűkülését eredményezi, ami által a részecskék felülete könnyebben megközelíthetővé válik a szubsztrát számára, így a PB hatékonyabban katalizálja a reakciót.

Kulcsszavak: Poroszkék, kolloidstabilitás, elektroforetikus mobilitás, ionspecifikus hatás, antioxidáns aktivitás

Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék	4
1. Bevezetés	5
2. Irodalmi áttekintés	7
2.1 Szabadgyökök és Nanozyme-ok.....	7
2.2 Poroszkék nanorészecskék	8
2.3 Kolloidstabilitás elektrolitok jelenlétében	10
2.4 Elektrolitok hatása az enzimaktivitásra	13
3. Célkitűzés	15
4. Kísérleti rész	16
4.1 Felhasznált vegyszerek	16
4.2 PB nanorészecskék szintézise.....	16
4.3 Vizsgálati módszerek.....	16
4.3.1 Transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM).....	16
4.3.2 Elektroforézis.....	16
4.3.3 Időfüggő dinamikus fényszórás.....	17
4.3.4 UV-látható spektrofotometria.....	18
4.4 Antioxidáns teszt	18
5. Eredmények.....	21
5.1 Szintetizált PB nanorészecskék karakterizálása	21
5.2 Elektrolitok hatása a PB részecskék kolloidstabilitására.....	22
5.3 Kolloidstabilitás enzimaktivitásra gyakorolt hatása	27
6. Összefoglalás	31
Irodalomjegyzék	33
Köszönetnyilvánítás	37

Rövidítésjegyzék

Rövidítés	Angol megfelelő	Magyar megfelelő
PB	<i>Prussian blue</i>	Poroszkék vagy Berlinkék
CCC	<i>Critical coagulation concentration</i>	Kritikus koagulációs koncentráció
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>	Reaktív oxigén származékok
CAT	<i>Catalase enzyme</i>	Kataláz enzim
GPx	<i>Glutathione Peroxidase enzyme</i>	Glutation-peroxidáz enzim
POD	<i>Peroxidase enzyme</i>	Peroxidáz enzim
SOD	<i>Superoxide dismutase enzyme</i>	Szuperoxid-dizmutáz enzim
HRP	<i>Horseradish peroxidase enzyme</i>	Torma-peroxidáz enzim
DLS	<i>Dynamic light scattering</i>	Dinamikus fényszórás
DLVO	<i>Derjaguin, Landau, Verwey and Overbeek</i>	Derjaguin, Landau, Verwey és Overbeek
EDL	<i>Electrical double layer</i>	Elektromos kettősréteg
IEP	<i>Isoelectric point</i>	Izoelektromos pont

1. Bevezetés

Napjainkban a reaktív oxigénszármazékok (ROS) közé tartozó szabadgyökök számos tudományos kutatás témáját képzik [1-3]. Ezek az anyagok ugyanis párosítatlan elektronjuk révén károsító hatást fejtenek ki a környezetükre, egészségünkre és ipari folyamatokra. Például, az olajipari termékekben képződő szabadgyökök láncreakciókat indíthatnak, ami a különböző összetevők bomlásához és degradációjához vezethet. Emellett az élelmiszeripari és kozmetikai készítményekben is jelentős egészségkárosító hatásuk lehet. Az oxidatív stressz révén szív- és érrendszeri, valamint daganatos megbetegedések kialakulásáért is felelősek. A természetes eredetű enzimek ugyan képesek megakadályozni az ROS-ok által kiváltott redoxireakciókat, viszont előállításuk költséges, továbbá az alkalmazandó közeg pH-ja, ionerőssége és hőmérséklete jelentősen befolyásolja a katalitikus aktivitásukat. Ezek okán új, az enzimeket helyettesítő anyagok fejlesztése fontos szegmense lett a tudományos kutatásoknak.

Egyik legígéretesebb alternatívát az ún. nanozyme-ok kínálják, melyek szervesetlen anyagokból álló antioxidáns aktivitással rendelkező nanorészecskék [4]. A nanozyme-ok olcsón előállíthatóak, fizikai-kémiai tulajdonságaik finomhangolhatóak, így képesek megtartani katalitikus aktivitásukat szélsőséges körülmények között [5]. Az utóbbi években számos kutatás foglalkozott a poroszkék (PB) részecskékkel, melyek Fe(II) és Fe(III) ionokat tartalmazó komplex vegyületből épülnek fel. A különböző oxidációs számú vasionok jelenléte miatt a PB antioxidánsként és elektrokémiai reakciók katalizátoraként is alkalmazható. Egy PB-t tartalmazó kolloid diszperzió felhasználhatóságának fő feltétele a megfelelő kolloidstabilitás. A kolloidstabilitást számos tényező befolyásolja, mint például a részecskék felületi töltéssűrűsége, a diszperziós közeget képző oldószer összetétele, illetve minden olyan komponens – mint például az ionok, felületaktív anyagok vagy polimerek – jelenléte, melyek képesek befolyásolni a részecskék felületi töltésviszonyait. Ezen tényezők változtatásával lehetőségünk nyílik a kolloidstabilitás hangolására, ami elősegíti a nanozyme-ok gyakorlati alkalmazhatóságának kiterjesztését.

Az ismertetett tényezők közül az oldott ionok jelenléte kiemelt jelentőségű, hiszen szinte minden olyan közegben megtalálhatóak, amelyekben a nanozyme-ok alkalmazásra kerülnek. Az oldott ionok a specifikus kölcsönhatások révén eltérő mértékben befolyásolják a felületi töltéssűrűséget, ezáltal hatással vannak a részecskék közötti vonzó és taszító kölcsönhatásokra, ami kihat az aggregációs folyamatokra. Ez okból kifolyólag az azonos vegyértékű ionokra definiálták a Hofmeister-sorozatot [6], mely az ionokat a kolloid

részecskék felületéhez való affinitásuk alapján rendezi. Az ionok vegyértékének a hatását pedig a tapasztalati úton létrehozott a Schulze–Hardy-szabály foglalja magába [7].

Mivel a PB diszperziókban való alkalmazása dinamikusan fejlődő terület, ezért elengedhetetlen egy ilyen rendszer töltés- és aggregációs viszonyainak felmérése. Továbbá rendkívül fontos annak a tisztázása is, hogy egy esetleges háttélelektrolit jelenléte milyen mértékben befolyásolja a PB részecskék enzimszerű aktivitását. A szervesetlen ionok PB nanorészecskéket tartalmazó vizes diszperziók kolloidstabilitására gyakorolt hatásának vizsgálatáról azonban nem született olyan publikáció, mely értelmezi a részecskék kolloidstabilitása és katalitikus aktivitása közötti összefüggéseket.

A dolgozatom elkészítése során ezért kolloid méretű PB nanorészecskéket szintetizáltam, majd vizsgáltam ezen részecskék kolloidstabilitását és enzimaktivitását különböző szervesetlen ionok jelenlétében. A töltésviszonyokat és az aggregációs folyamatokat fényszórásmérésen alapuló technikák segítségével követtük nyomon, az enzimaktivitás felméréséhez pedig UV-Vis spektrofotométert alkalmaztunk. A kísérletek során szisztematikusan változtattuk az ellenionok anyagi minőségét, és számszerűsítettük azok adszorpciójának mértékét. A kísérleti eredményeinket a DLVO-elmélet, a Schulze–Hardy-szabály és a Hofmeister-sorozat segítségével értelmeztük. Utolsó lépésként vizsgáltuk a szervesetlen sók enzimaktivitásra gyakorolt hatását a különböző aggregációs tartományokban.

A kutatás eredményei alapján lehetőség nyílik a különböző szervesetlen ionok rendezésére a PB nanorészecskék felületéhez való affinitásuk alapján, továbbá a kolloidstabilitás és az enzimaktivitás közötti összefüggések értelmezésére. Ez által fontos információt szolgáltatunk a PB-t tartalmazó antioxidáns aktivitású nanokompozitok fejlesztéséhez.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 Szabadgyökök és Nanozyme-ok

A szabadgyökök olyan atomok, ionok vagy molekulák, melyek párosítatlan elektronnal rendelkeznek. Nagy reaktivitásuk miatt káros hatást fejthetnek ki az élelmiszer-ipari és kozmetikai termékekben, vagy akár az élő szervezetben is. Az ilyen anyagok nagyobb csoportját képezik a reaktív oxigénszármazékok (ROS), melyek UV-, Röntgen- vagy γ -sugárzás hatására alakulnak ki. Az ROS-ok képesek elpusztítani a sejteket, továbbá károsíthatják a fehérjéket, nukleinsavakat és a lipideket [8, 9]. A legkárosabb ROS-ok közé tartozik a szuperoxidgyök-anion (O_2^-) és a hidroxilgyök ($\text{OH}^\cdot$), melyek akár daganatos vagy szív- és érrendszeri megbetegedések kialakulását is okozhatják. A szervezetben a ROS-ok és az antioxidánsok egyensúlyban vannak, a szabadgyökök azonban képesek felborítani ezt az egyensúlyt, miáltal képesek felhalmozódni és kifejteni káros hatásukat. Ezt a folyamatot nevezzük oxidatív stressznek [10, 11].

Az antioxidánsok azonban redoxireakciókon keresztül megakadályozzák az ROS-ok által indukált oxidációs folyamatokat. Ez a vegyületsalád csoportosítható egyrészt az alapján, hogy milyen mechanizmus által akadályozza meg szabadgyökök által kifejtett negatív hatásokat. A nem enzimatisz antioxidánsok – például a vitaminok és a polifenolok – a láncreakciók megszakításával fejtik ki hatásukat. Az enzimatisz antioxidánsok viszont a különböző oxigéntartalmú szabadgyököket bontják. A kataláz (CAT) enzim például a peroxidionokat (O_2^{2-}) bontja, a glutation-peroxidáz (GPx) pedig a H_2O_2 -ot redukálja vízzé. A természetes eredetű enzimek azonban számos hátrányos tulajdonsággal rendelkeznek. Rendkívül érzékenyek olyan környezeti tényezőkre, mint a közeg pH-ja, a hőmérséklet vagy az ionerősség. Előállításuk költséges és fáradtságos, valamint a tárolásuk is nehézségekbe ütközhet a nagyfokú érzékenységük miatt. Nem megfelelő körülmények között az enzimek részlegesen, vagy akár teljesen elveszíthetik az antioxidáns aktivitásukat [12]. A fent említettek miatt indokoltta vált a természetes eredetű enzimek helyettesítése. Ehhez olyan anyagok fejlesztése szükséges, melyek nagy mennyiségben, olcsón és egyszerűen előállíthatók, továbbá fizikai és kémiai tulajdonságaik egy adott rendszerre hangolhatóak, ami által a környezeti hatásokkal szemben sokkal ellenállóbbak, mint a természetes megfelelőik.

Erre nyújthatnak megoldást az ún. nanozyme-ok, amelyek enzimatisz aktivitással rendelkező, szervetlen anyagokból felépülő nanorészecskék. Nanozyme-ok lehetnek például fém nanorészecskék (Au, Ag, Pt) [13, 14], fém-oxidok (CeO_2 , V_2O_5) [15, 16], vagy fém-kalkogenidek (FeS , MoS_2) [17, 18]. Mivel ezek az anyagok stabil szerkezettel

rendelkezik, képesek megtartani katalitikus aktivitásukat szélsőséges körülmények között is. Emellett előállításuk olcsó, valamint fizikai-kémiai tulajdonságaik az adott rendszerre optimalizálhatók, így antioxidáns aktivitásuk meghaladhatja a hasonló feladatot végző természetes enzimekét [4]. Biokompatibilitásuk és alacsony toxicitásuk alkalmassá teszi a nanozyme-okat olyan biológiai és orvosi alkalmazásra, mint a szabályozott hatóanyag leadás [19], kemoterápia vagy az ROS-hoz köthető betegségek kezelése [20]. Emellett az iparban is alkalmazhatóak katalizátorként [21], energiatárolóként [22], továbbá a szennyvíztisztításban is fontos szerepük lehet [23]. Az utóbbi években ezért számos kutatás foglalkozott nanozyme-ok előállításával és antioxidáns aktivitásuk vizsgálatával [24-26].

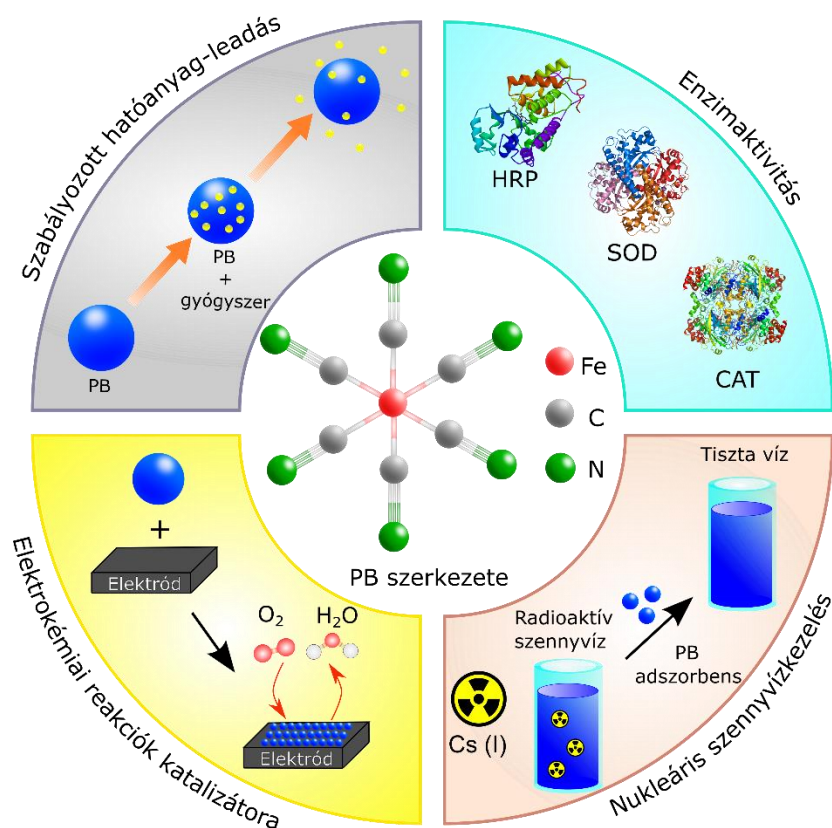
A nanozyme-ok katalitikus aktivitását rendkívüli mértékben befolyásolják a részecskék felületi tulajdonságai. A különböző kísérleti körülményektől függően – mint a pH, az ionerősség vagy az oldószer jellege – a részecskék felületi töltésviszonyai megváltozhatnak. Számos nanorészecske esetén megfigyelhető egy ún. izoelektromos pont (IEP) [27]. Az IEP az a pont – például elektrolitkoncentráció, pH, polimer dózis – ahol a részecskék össz felületi töltése nulla. Ennél az elektrolitkoncentrációnál a részecskék közötti elektrosztatikus taszítás megszűnik, és a van der Waals-féle vonzó kölcsönhatásból kifolyólag bekövetkezhet a részecskék aggregációja. Ez a fajlagos felület jelentős mértékű csökkenését okozza, ami miatt a nanozyme-ok veszíthetnek katalitikus aktivitásukból [28]. Az antioxidáns aktivitással rendelkező nanokompozitok fejlesztése során tehát rendkívül fontos a rendszer kolloidstabilitásának felmérése.

2.2 Poroszkék nanorészecskék

A poroszkék vagy berlini kék (PB), egy jellegzetes kék színű, Fe(II) és Fe(III) ionokat tartalmazó vas-cianid komplex [29]. A 18. század elején fedezték fel és festékanyagként alkalmazták, ugyanis az addig használt ultramarinnál olcsóbb, könnyebben előállítható és stabilabb vegyületről van szó.

A PB a természetben nem található meg, szintetikusán – például együttes lecsapással vagy termikus leválasztással – azonban többféle kristályos formában is előállítható. A szintézis ugyan történhet nemvizes és vizes közegben is, utóbbi esetben azonban a részecskék olcsóbban és nagyobb mennyiségben állíthatóak elő. Különböző morfológiájú PB nanorészecskék (például kockák, nanocsövek és nanogömbök) is kialakíthatóak módszertől függően [29]. A szintézis során a részecskék alakja mellett a mérete is kontrollálható. Mivel alacsony a toxicitásuk, továbbá jelenlétük a sejtekben nem vált ki szabadyök-képződést, a PB nanorészecskéket széles körűen alkalmazzák az

egészségügyben [28]. 2010-ben az Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatala (FDA) a tallium mérgezés ellenszereként jegyezte [30]. A PB nanorészecskék kristályszerkezete alkalmas az ioncserére, így képesek a fel nem szívódott talliumot megkötni, mely később vizelet formájában ürül a szervezetből, mindez a belekben lévő tallium koncentráció jelentős csökkenéséhez vezet. A szabályozott hatóanyag-leadó rendszerként történő alkalmazhatóságuk miatt a PB-alapú nanokompozitok a daganatos betegségek kezelésében is ígéretesnek bizonyultak [29]. Elektrokémiában az oxigén redukciós reakciók katalizátoraként is felhasználhatóak, ugyanis egy kutatás során igazolták, hogy a PB-t tartalmazó katalizátorok szelektívebben és stabilabban működnek, valamint a CO-ot is jobban tolerálják, mint a Pt alapú megfelelőik [31]. Erős mágneses tulajdonságai miatt a PB-t kontrasztanyagként alkalmazzák MRI vizsgálatokban [29].



1. ábra: A PB nanorészecskék szerkezete és lehetséges alkalmazásai.

A PB nanorészecskék egyik leghasznosabb tulajdonsága, hogy képesek lebontani a különböző ROS-okat, ezáltal gátolják az oxidációs folyamatokat. Ez a tulajdonságuk a hidroxilgyökök ($\cdot\text{OH}$) iránti affinitásukhoz köthető. Korábbi kutatások igazolták, hogy a PB nanorészecskék képesek helyettesíteni a kataláz (CAT), a peroxidáz (POD), valamint a szuperoxid-dizmutáz (SOD) enzimet is, miáltal képesek megvédeni a sejteket az oxidatív

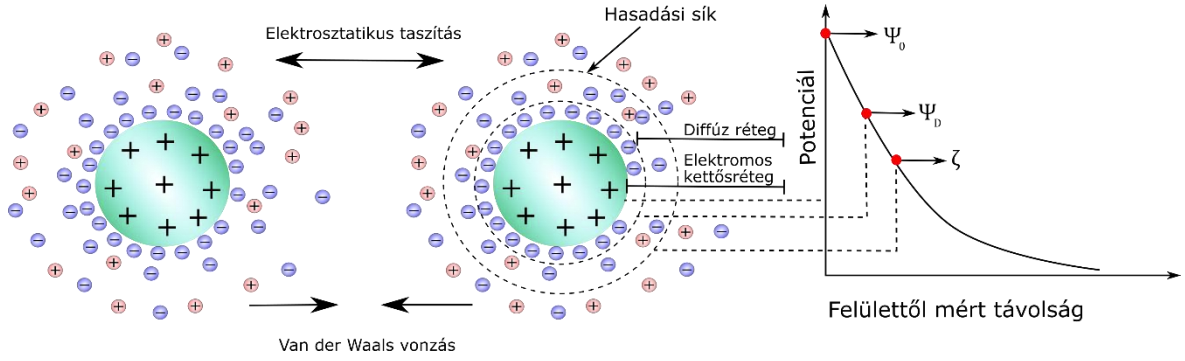
stressz okozta károsodástól [30]. A PB enzimaktivitása a különböző oxidációs számú vasionok redoxipotenciáljaihoz köthető.

A PB-tartalmú diszperziók kolloidstabilitása kulcsszerepet játszik a hasznosításra való alkalmasságukban, hiszen a legtöbb alkalmazás során a PB folyadék közegben van jelen, például vérben, sejtek citoplazmájában, valamint az iparban használt alapanyagokban is. Egy vizes közegű PB-t tartalmazó diszperzióban többek között a részecskék felületi tulajdonságai határozzák meg a katalitikus aktivitást. Az alacsony felületi töltés a részecskék aggregációját eredményezi, ami fajlagos felület csökkenéssel jár. Ennek hatására pedig a részecskék veszíthetnek antioxidáns aktivitásukból [28].

2.3 Kolloidstabilitás elektrolitok jelenlétében

A nanozyme-ok diszperziókban történő alkalmazásához elengedhetetlen a kolloidstabilitás ismerete, illetve annak hangolása. A vizes közegű diszperz rendszerek kolloidstabilitása – azaz azon képessége, hogy mennyire képes megtartani diszperzításfokát, valamint viszonylag homogén méreteloszlását – nagy mértékben függ a részecskék felületén kialakuló töltéstől. Ezt a töltést leginkább a részecskék szerkezete, a közeg pH-ja, valamint a töltéssel rendelkező komponensek esetleges adszorpciója befolyásolja.

A töltéssel rendelkező szilárd részecskék elektroneutralításra való törekvése miatt semlegessé válnak az ellentétes töltésű ionok (ellenionok) töltésárnyékolása révén, aminek eredményeként kialakul az ún. elektromos kettősréteg (EDL) [32]. Az EDL szerkezetét egyrészt egy ellenionokból álló rögzített réteg jellemzi, mely az elektrosztatikus kölcsönhatások révén a részecske felületéhez kötődik. Ezek a kölcsönhatások olyan erősek, hogy az ionok hőmozgása nem számottevő. A részecske felületétől távolabb lévő ionoknak azonban a felület vonzása ellenére jelentős a hőmozgásuk, aminek következtében egy diffúz réteg is megfigyelhető a részecskék körül (2. ábra). Ebben a rétegben az ellenionok és a mellékionok aránya más, mint a tömbfázisban. A felületen erősen adszorbeálódott ionok, valamint a diffúz réteg határán mérhető a diffúz réteg potenciálja (Ψ_D). Amikor a részecske vagy a diszperziós közeg elektromos erőter, koncentrációgradiens vagy nyomás hatására elmozdul, akkor a felületéhez tapadó folyadék és a diszperziós közeg között egy hasadási sík alakul. A folyadék és a hasadási sík között mérhető a zéta potenciál (ζ), mely kísérletileg meghatározható és értékéből a felület töltésére következtethetünk.



2. ábra: Bal oldal: A DLVO kölcsönhatások bemutatása két, töltéssel rendelkező részecske esetén. Jobb oldal: Egy pozitív töltésű részecske körüli EDL sematikus ábrázolása, valamint az elektrosztatikus potenciál távolságtól való függése.

A részecskék között kialakuló kölcsönhatásokat a határfelületen kialakuló EDL szerkezete határozza meg. A taszító potenciál értéke a diffúz rétegben a részecskék közötti távolság függvényében exponenciális lecsengést mutat [33]:

$$\Psi = \Psi_0 * e^{-\kappa x} \quad (1)$$

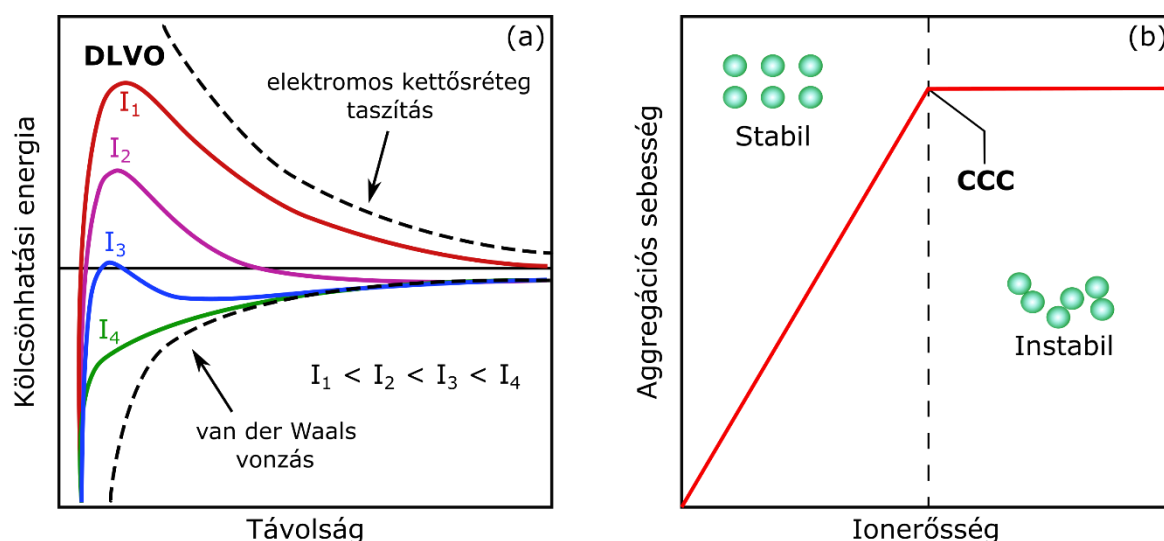
ahol Ψ_0 a felületen, Ψ az adott x távolságban mérhető potenciál, κ pedig a Debye-hossz reciproka, a Debye-paraméter. A Debye-hossz segítségével becsülni tudjuk az EDL vastagságát, mely a hőmérséklettől (T) és az ionerősségtől (I) egyaránt függ:

$$\kappa^{-1} = \sqrt{\frac{\varepsilon \varepsilon_0 k_B T}{2 N_A e^2 I}} \quad (2)$$

ahol ε a dielektromos állandó, ε_0 a vákuumpermittivitás, k_B a Boltzmann-állandó, N_A az Avogadro-állandó, e pedig az elemi töltés. Az elektromos kettősréteg vastagsága töltéssel rendelkező részecskék közötti elektrosztatikus taszítás mértékét befolyásolja. Ezzel szemben töltéssel nem rendelkező részecskék folyadékban diszpergálva vonzzák egymást, ugyanis hat rájuk a van der Waals-féle vonzó kölcsönhatás.

Az előzőekben ismertetett felismerés vezetett a Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) elmélet kialakulásához [34], amely szerint a részecskék közötti kölcsönhatási energia a van der Waals-féle vonzó és az és az EDL-ek átlapolódásából származó elektrosztatikus taszító erő eredőjeként adható meg (3.(a) ábra). Míg a vonzó potenciál a részecskék geometriájától, anyagi minőségétől és a közöttük lévő távolságtól függ, addig a taszító potenciál az elektromos kettősrétegből származó átlapolódással magyarázható. Az ionerősség növelésével azonban a (2) egyenlet szerint az EDL vastagsága lecsökken, ezzel párhuzamosan pedig részecskék közötti taszító kölcsönhatás is egyre kisebb mértékű lesz. Ennek következtében a részecskék jobban meg tudják közelíteni egymást,

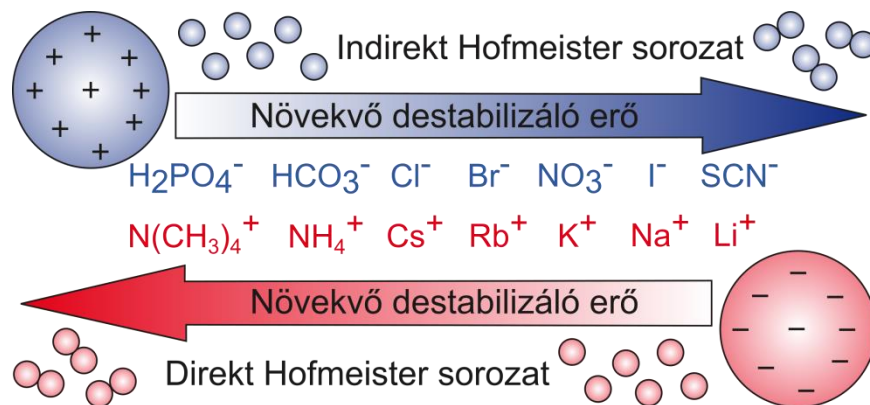
miáltal olyan távolságba kerülhetnek, amelyen belül a van der Waals-féle vonzó potenciál dominál. Ebben a tartományban nagy elektrolitkoncentráció miatt a potenciálgát mely megakadályozza a dimer képződést eltűnik, így az aggregáció diffúziókontrolláltá válik. Ez magyarázza, hogy az elektrolitok miért okoznak aggregációt, vagyis miért destabilizálnak egy kolloid rendszert. Kizárólag a DLVO-típusú erőhatásokat figyelembe véve az aggregációs sebességben meredek növekedés figyelhető meg az ionerősség növelésével (3.(b) ábra), mígnem az aggregáció sebessége el nem ér egy határértéket [35]. A gyors és a lassú aggregációs tartomány közötti elektrolit koncentrációt kritikus koagulálási koncentrációnak (CCC) nevezzük, miáltal számszerűsíthető és összehasonlítható a különböző sók destabilizáló ereje.



3. ábra: (a) A kölcsönhatási energia távolságtól való függése különböző ionerősségek esetén DLVO kölcsönhatásokat feltételezve. (b) Az aggregációs sebesség ionerősségtől való függésének illusztrációja töltéssel rendelkező kolloid részecskék esetén.

Egy kolloid rendszer elektrolittartalma tehát befolyásolja az EDL szerkezetét, ez pedig lehetőséget nyújt, a kolloidstabilitás hangolására. A DLVO-elmélet magyarázatot ad a különböző vegyértékű ionok kolloidstabilitásra gyakorolt hatására. Az elmélet szerint a CCC az ionok vegyértékének növekedésével csökken, amely összefüggést Schulze–Hardy-szabálynak nevezünk [33]. A tapasztalat szerint azonban az azonos vegyértékű, de különböző anyagi minőségű elektrolitok is eltérő CCC értékeket eredményeznek [36]. Eredetileg Franz Hofmeister rendezte sorba a különböző anionokat és kationokat a fehérjék denaturációjára gyakorolt hatásuk alapján. Később azonban beigazolódott, hogy az ionok ezen sorrendje alkalmazható a vizes diszperziókkal szembeni destabilizáló hatásuk értelmében is. Az egyes ionok Hofmeister-sorozatban elfoglalt helyét, az adott ion

szolvatációjának mértéke mellett, az alkalmazott kolloid részecske hidrofóbicitása és felületi töltése is befolyásolja. A negatív töltésű hidrofób részecskék esetén a direkt, míg a pozitív töltésű részecskékénél az indirekt (fordított) Hofmeister sorozat érvényesül (4. ábra) [37].



4. ábra: Kationok és anionok Hofmeister-sorozata különböző töltésű, hidrofób felületű kolloid részecskék esetén.

A jól szolvatált (hidrofil) ionok – mint a Li^+ és a Na^+ – a sorozat jobb oldalán helyezkednek el, míg a kevésbé szolvatált NH_4^+ a bal oldalon. A kolloid részecskék jelentős részének hidrofób felülete miatt, azokon a kevésbé szolvatált, szintén hidrofób ionok könnyebben adszorbeálódnak, így hatékonyabban leárnýékolják a felületi töltéseket, csökkentve ezzel az EDL vastagságát. A részecskék közötti elektrosztatikus taszítás ezáltal legyengül, ami aggregációhoz, vagyis kolloidstabilitás csökkenéséhez vezet. Mindezek alapján belátható, hogy különböző elektrolitok adagolásával egy kolloid rendszer stabilitása nagy mértékben befolyásolható.

2.4 Elektrolitok hatása az enzimaktivitásra

Az elektrolitok a biológiai rendszerek fontos részét képezik, hiszen komoly szerepük van számos, a szervezet működéséhez létfontosságú enzimreakciókban. Az elektrolitok vízben disszociálnak és ezáltal kihatással vannak a rendszer sav-bázis egyensúlyára. Egy enzimet tartalmazó rendszerbe, elektrolitot adagolva az enzim felületi töltése, szolvatációs és szerkezeti tulajdonságai, ezáltal pedig az enzim katalitikus aktivitása is megváltozik. Általános tapasztalat, hogy a pH hatása enzimreakciókra azzal magyarázható, hogy enzimek pH-tól függően más és más töltéssel rendelkeznek, azonban csak egy bizonyos formájuk nyújt optimális katalitikus teljesítményt. Más szóval, van egy olyan optimális pH-érték, amely esetén maximális az enzim-szubsztrát intermedier koncentrációja. Amennyiben viszont a pH vagy az ionok adszorpciója az enzim felületi tulajdonságait megváltoztatja, az

kihatással van a szubsztrát megkötődésére. Korábbi kutatások során felismerték az ionok aktiváló és deaktiváló hatását, amit egyes esetekben Hofmeister effektusnak, más esetekben egyéb tényezőknek tulajdonítottak [38]. A jelenlévő elektrolitok inhibítorként való működése azzal is magyarázható, hogy képesek az enzim aktív centrumához kötődni, vagy megváltoztatni annak szerkezetét. Ez mindkét esetben gátolja a szubsztrát megkötődését, ezáltal csökkenti a katalitikus aktivitást. Mindez megmutatkozott a Na^+ ionok ribonukleáz enzim katalitikus aktivitására gyakorolt hatásának vizsgálata során, ugyanis az csökkentette az enzim és a szubsztrát közötti elektrosztatikus kölcsönhatások számát, így gátolta a reakció lejátszódását [39]. A NaCl azonban az oxidatív stresszt is képes fokozni a 'O_2^- gyökök mennyiségének növelése révén, amire a szervezet az SOD enzim aktivitásának növekedésével válaszol [40].

Egy kutatás során a lipáz enzim katalitikus aktivitását vizsgálták különböző elektrolitok jelenlétében [38]. Azt tapasztalták, hogy a szulfátion (SO_4^{2-}) aktiváló hatású, a kloridion (Cl^-) nincs nagy hatással, a tioszulfátion (SCN^-) pedig erősen deaktiváló hatású. A kapott eredményeket a Michaelis–Menten-modell alapján nem tudták értelmezni, ugyanis az az egyértékű sók esetén hasonló hatást várt volna a reakciósebességre. A sók hozzáadása a töltésárnyékolás révén jelentősen módosítja egy proteinek tartalmazó rendszer töltésviszonyait [41, 42]. Megállapították, hogy az oldatfázisban és a fehérje/oldat határfelületen eltérő a pH, ugyanis az olyan rosszul szolvatálódó ionok mint az SCN^- jobban megközelítik a fehérje felületét, így az a nagyobb negatív töltésnek köszönhetően jobban vonzza hidrónium ionokat [38]. Mindez kihat az enzim szerkezetére, a szubsztrát ionizáltsági fokára, miáltal az enzim-szubsztrát intermedier kialakulásának lehetőségét is befolyásolta.

A különböző ionok adszorpciójának mechanizmusát, illetve azok fehérjék felületéhez való affinitását, és ezáltal a biokatalizátorok enzimaktivitására gyakorolt hatását széles körben tanulmányozták, a nanozyme-ok esetén azonban hasonló összefüggés még nem került meghatározásra. Bár korábban vizsgálták már, hogy a különböző ionok szolvatációjuktól, illetve szerkezetüktől függően milyen kölcsönhatást létesítenek a kolloid méretű nanorészecskék felületével, azonban specifikusan a nanozyme-ok kolloidstabilitására gyakorolt hatásának kvantitatív (például aggregációs állandók, CCC vagy töltéssűrűség adatok) meghatározásáról és ennek a részecskék katalitikus aktivitásra gyakorolt hatásáról még nem született publikáció.

3. Célkitűzés

Az utóbbi években az antioxidáns aktivitással rendelkező nanokompozitok kifejlesztése számos tudományos kutatás célját szolgálta. Ezek a szervesetlen nanorészecskék az enzimekhez hasonló működéssel bírnak, azonban kevésbé érzékenyek a környezeti hatásokra. Már több tanulmány is bizonyította, hogy rendszerben lévő elektrolitok kihatással vannak az enzimek szerkezetére és ezáltal rendkívül nagy mértékben befolyásolják a katalitikus aktivitást. Mivel a nanozyme-okat gyakran olyan vizes közegben diszpergálva alkalmazzák, melyek szervesetlen sókat nagy mennyiségben tartalmaznak, ezért kiemelten fontos a kolloidstabilitásuk és antioxidáns aktivitásuk közötti összefüggések feltérképezése.

A kutatási munkánk során PB nanorészecskéket állítottunk elő együttes lecsapással. A szintézis során fő célunk volt, hogy egységes méretű és megfelelő töltéssel rendelkező részecskék alakuljanak ki. Ezek után a kialakult termék szerkezetét és morfológiáját szeretnénk volna feltérképezni, amihez UV-Vis spektrofotométert és transzmissziós elektronmikroszkópot használtunk.

Az ionspecifikus hatások érvényesülését a PB részecskék töltés- és aggregációs viszonyaira elektroforetikus és dinamikus fényszórás mérés segítségével tanulmányoztuk. A kísérletek során szisztematikusan változtattuk az ellenionok minőségét, így a felületi töltéssűrűség, valamint a CCC értékek segítségével számszerűsíteni kívántuk az egyes ionok adszorpciós affinitását a PB részecskék felületéhez. A kísérletek során meghatározott és a DLVO-elmélet segítségével számolt eredmények összehasonlításával a részecskék közötti kölcsönhatások eredetére próbáltunk következtetni. Az antioxidáns aktivitás sófüggését HRP enzimteszt segítségével vizsgáltuk. A tesztet minden só esetén három különböző aggregációs tartományban – azaz három különböző ionerősség mellett – végeztük el. A célunk az volt, hogy összefüggést találjunk a PB nanorészecskék kolloidstabilitása és enzimatis aktivitása között.

Az eredményeink segítségével jellemezhetjük a PB nanorészecskék viselkedését egy reaktív oxigénszármazékokat és szervesetlen ionokat egyaránt tartalmazó rendszerben. A fő konklúziók ismeretében lehetőség nyílt a PB tartalmú diszperziók tulajdonságainak megértésére, és ezáltal alkalmazhatóságuk kiterjesztésére.

4. Kísérleti rész

4.1 Felhasznált vegyszerek

A munkám során poroszkék nanorészecskéket állítottunk elő, és vizsgáltuk azok töltés- és aggregációs viszonyait különböző szervesetlen elektrolitok jelenlétében. A szintézis és a kolloidkémiai vizsgálatok során alkalmazott szervesetlen sók – $K_3Fe(CN)_6$, $FeCl_2 \cdot 4H_2O$, NaCl, KCl, CsCl, $CaCl_2$ és $LaCl_3$ – a VWR nevű cégtől kerültek beszerzésre és ezeket további tisztítási eljárás nélkül használtuk fel. A szintézisnél alkalmazott acetont (99.8 %) szintén a VWR-től szereztünk be. Az antioxidáns tesztek elvégzése során felhasznált H_2O_2 (30%) a VWR, a Gvajakol pedig az Acros Organics nevű cégtől lett megvásárolva.

A minták elkészítése során fordított ozmózissal tisztított ultratiszta vizet alkalmaztunk, amit VWR Puranity berendezéssel állítottunk elő. A mérések során alkalmazott hőmérséklet $25\text{ }^{\circ}C$ volt, a 4-es pH sósavoldat (VWR) hozzáadásával volt biztosítva. A szilárd szennyeződések elkerülése érdekében a mintákat $0,1\text{ }\mu m$ -es fecskendőszűrővel (Millex) szűrtük.

4.2 PB nanorészecskék szintézise

A PB nanorészecskéket együttes lecsapással állítottuk elő. Kezdetben egy-egy 100 ml-es 1 mM-os $K_3Fe(CN)_6$ és $FeCl_2$ oldatot készítettünk. A $K_3Fe(CN)_6$ oldatot cseppenként a $FeCl_2$ oldathoz adagoltuk, majd az elegyhez 400 ml acetont adtunk, mely ennek hatására sötétkék színűvé vált. A mintát ezek után 4200 rpm-en 30 percig centrifugáltuk, majd három acetonos és három desztillált vizes mosást követően szárító szekrénybe helyeztük egy éjszakára $50\text{ }^{\circ}C$ -ra. A kapott szilárd anyagból 1000 mg/l koncentrációjú pH 4-es törzsoldatot készítettünk.

4.3 Vizsgálati módszerek

4.3.1 Transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM)

A részecskék morfológiáját transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltuk, melyhez FEI Tecnai G2 20 X Twin típusú mikroszkópot használtunk, 200 kV gyorsítófeszültség mellett.

4.3.2 Elektroforézis

A töltéssel rendelkező részecskék külső elektromos térerősség (E) jelenlétében egy bizonyos sebességgel (v) elmozdulnak:

$$v = uE \quad (3)$$

ahol u az elektroforetikus mozgékonyság. Az elektromos erőter hatására történő elmozdulásakor, az oldószer bizonyos vastagságban a részecskéhez tapad. Ennek következtében elektromos feszültség mérhető a tapadó folyadékréteg és a diszperziós közeg között. Ezt a potenciálkülönbséget zéta potenciálnak nevezzük, mely a Smoluchowski-elmélet segítségével meghatározható a mért elektroforetikus mobilitás értékéből [33]:

$$\zeta = \frac{u\eta}{\varepsilon_0\varepsilon} \quad (4)$$

A zéta potenciál két szempontból is nagy jelentőséggel bír. Egyrészt ez a részecskék felületi töltéséhez legközelebb álló, kísérleti úton meghatározható érték. Másrészt a zéta potenciál sófüggéséből becsülhető a hasadási síkban tapasztalható töltéssűrűség, aminek meghatározásához a Debye–Hückel-modellt használtuk [43]:

$$\sigma = \varepsilon\varepsilon_0\kappa\zeta \quad (5)$$

Az elektroforetikus mobilitás méréséhez LitesizerTM 500 (Anton Paar) műszert használtunk. A mérésekhez minden esetben 2 ml mintát készítettünk. Az előkészítés során először a meghatározott mennyiségű elektrolitoldatot mértük ki, majd ezt hígítottuk a megfelelő pH-ra beállított szűrt vízzel. Ezt követően adtuk a mintához megfelelő mennyiségű PB részecskéket. A méréseket 700 μ l-es réz elektródokat tartalmazó Ω -alakú kapillárisok segítségével végeztük 175°-os szórási szög mellett.

4.3.3 Időfüggő dinamikus fényszórás

A kolloidstabilitás jellemzéséhez az aggregáció korai szakaszát vizsgálatuk. A részecskeméret időbeli változását dinamikus fényszórásmérés (DLS) segítségével követtük nyomon, amihez ALV-NIBS HPPS (ALV GmbH) műszert használtunk 633 nm hullámhosszon és 173°-os szórási szög mellett.

A korrelációs függvények felvételét követően a „Cumulant” illesztés által határozzuk a dekorreláció sebességét (Γ). Ehhez minden esetben 100 egymást követő mérést végeztünk, mely mindegyike 20 másodpercig tartott. A dekorreláció sebességéből számolható a részecskék diffúziós állandója (D) az alábbi egyenlet szerint:

$$D = \frac{\Gamma}{q^2} \quad (6)$$

ahol q a szórási vektor, mely a műszer paramétereinek ismeretében az alábbi egyenlet által meghatározható:

$$q = \left(\frac{4\pi n}{\lambda}\right) \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (7)$$

ahol n a közeg törésmutatója, λ az alkalmazott hullámhossz, és θ a szórási szög. A diffúziós együttható (D), valamint a közeg törésmutatójának (n) és viszkozitásának (η) ismeretében meghatározható a részecskék hidrodinamikai sugara (R_h), amit a Stokes–Einstein-egyenlet segítségével számoltunk:

$$R_h = \frac{k_B T}{6\eta\pi D} \quad (8)$$

ahol (T) a rendszer hőmérséklete és k_B a Boltzmann-állandó. Az aggregáció kezdeti szakaszában a folyamat másodrendű, ami lehetőséget ad a látszólagos aggregációs sebességi állandó (k) meghatározására a hidrodinamikai sugár kezdeti változásának üteméből [44]:

$$k = \frac{1}{R_h^1} \left(\frac{dR_h}{dt} \right)_{t \rightarrow 0} \quad (9)$$

ahol t a mérési idő, R_h^1 pedig a primer részecskék hidrodinamikai sugara.

A kolloidstabilitást az ún. stabilitási aránnyal (W) szokás jellemezni. Ez az érték a gyors (k_{gyors}), valamint a vizsgált állapotú rendszert jellemző aggregációs sebességi együttható (k) hányadosaként írható fel:

$$W = \frac{k_{gyors}}{k} \quad (10)$$

Minél nagyobb értékű a stabilitási arány, annál lassabb az aggregáció, vagyis annál stabilabb a rendszer. Ha viszont a két aggregációs sebességi együttható értéke közel megegyező – $W \sim 1$ – úgy egy gyorsan koaguláló, azaz instabil rendszerről beszélünk, amelyben a részecskeütközések mindegyike aggregátum képződéssel jár.

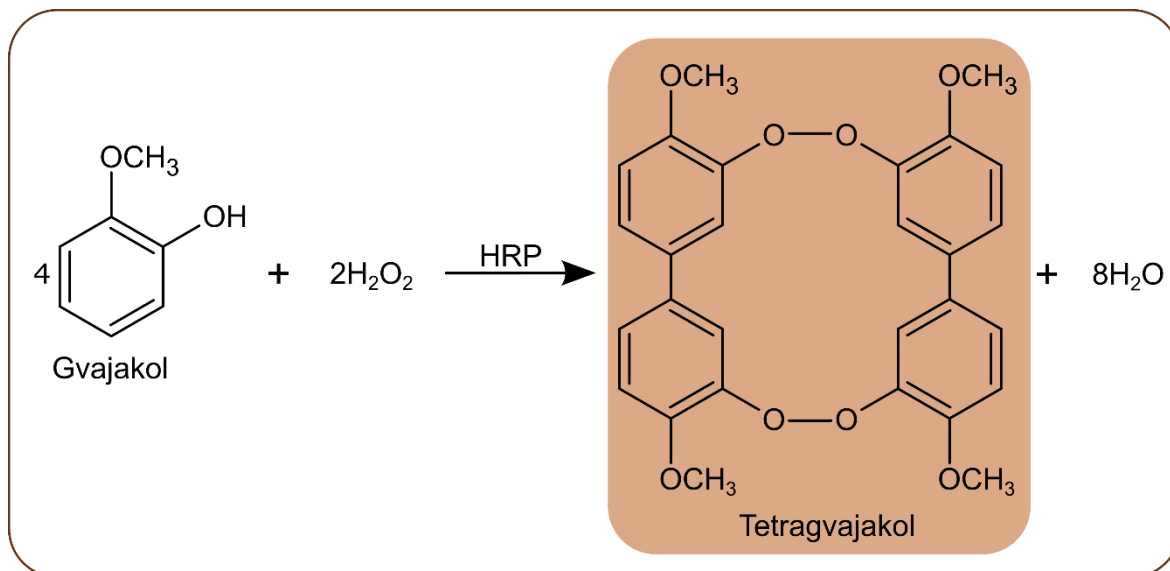
4.3.4 UV-látható spektrofotometria

Az antioxidáns tesztek során Thermo Fisher Genesys 10S típusú UV-VIS spektrofotométer segítségével vettük fel a minták színeképeit. A HRP tesztek során 470 nm-en végeztük el a méréseket.

4.4 Antioxidáns teszt

A torna-peroxidáz (HRP) egy hem-csoportot tartalmazó enzim, mely aktív centrumában lévő vasion képes kölcsönhatásba lépni a hidrogén-peroxiddal, ezáltal pedig oxidálni a különböző szerves molekulákat [45]. A HRP teszt során a gvajakol H_2O_2 hatására végbemenő oxidációját vizsgáljuk (5. ábra), ahol a katalizátor szerepét – mely alapesetben maga a HRP enzim – a feltételezett antioxidáns aktivitással rendelkező részecske tölti be. A

szubsztrát oxidációjából létrejövő tetragvajakol egy barna színű vegyület, mely fényelnyelési maximuma 470 nm-en található, így a reakció UV-Vis spektrofotométer segítségével nyomon követhető.



5. ábra: Gvajakol torna-peroxidáz enzim és hidrogén-peroxid hatására végbemenő oxidációja

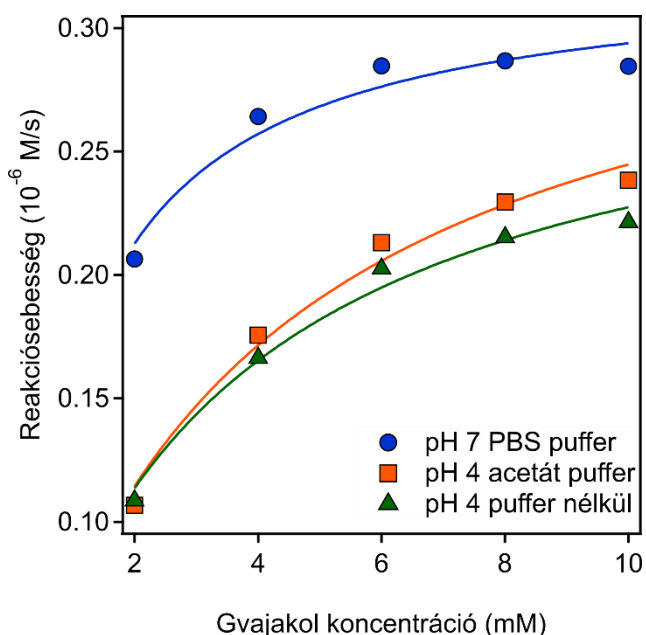
Mivel a PB részecskék enzimaktivitásának sófüggését is vizsgáltuk, ezért a mérések elvégzéséhez a mintákba különböző sóoldatokat adagoltuk, melyek mennyiségét attól függően határoztuk meg, hogy stabil vagy instabil kolloid rendszerben szeretnénk mérni. Az enzimet helyettesítő PB részecskék koncentrációját állandó értéken tartottuk, mely 10 mg/l volt, a gvajakol koncentrációt pedig folyamatosan növeltük 0,1 mM – 12 mM tartományban. Utolsó lépésként a mintákat 0,35 ml, 9 mM-os H₂O₂ oldattal egészítettük ki úgy, hogy annak össztérfogata 1,2 ml legyen. A mintában és a törzsoldatokban is pH 4-es szűrt vizet alkalmaztunk oldószerként. Ezek után az abszorbanciát 10 percen keresztül rögzítettük 470 nm-en.

Az abszorbancia-idő függvények meredekségeként megkaptuk a reakciósebességet 1/s értékben, melyet a Lambert–Beer-törvény segítségével alakítottunk át mM/s-ba (optikai fényút 1 cm, a gvajakol moláris extinkciós koefficiense 26,6 mM⁻¹ cm⁻¹). A reakciósebesség értékeket a gvajakol [S] koncentráció függvényében ábrázoltuk, és a kapott adatpontokra a Michaelis–Menten-modell alapján illesztettünk [46]:

$$v = \frac{v_{max}}{K_m + [S]} \quad (11)$$

ahol v a reakciósebesség, v_{max} a reakciósebesség maximális értéke, K_m pedig a Michaelis–Menten-állandó, ami a maximális reakciósebesség feléhez tartozó szubsztrát koncentráció.

A HRP enzimtesztek során az oldatok 7-es pH-ját általában foszfát puffer segítségével tartják állandó értéken [28, 47-49]. Mivel azonban kolloidstabilitást felmérő tesztek során a megfelelő negatív töltés biztosítása érdekében pH 4-en dolgoztunk, így az enzimaktivitást is ilyen körülmények között vizsgáltuk. Tekintve, hogy a PB részecskék enzimaktivitásának sófüggését is vizsgáltuk, ezért az oldatban a puffer által belekerülő ionok zavaró elektrosztatikus hatását célszerű volt kiküszöbölni. A puffer okozta hatás vizsgálatához elvégeztünk három HRP tesztet különböző körülmények között. Az első esetben pH 7-es közegben foszfát puffer jelenlétében, majd pH 4-en acetát puffer jelenlétében, végül pedig puffer mentes körülmények között is, ahol minden bemért oldat pH 4-es vízből készült. Az eredmények (6. ábra) alapján látható, hogy a pH 4-es oldatban kisebb aktivitással ugyan, de működik a HRP teszt. A pH 4-es pufferált és a puffert nem tartalmazó rendszereknél viszont nem tapasztaltunk különbséget. Ezek alapján megállapítottuk, hogy a kolloidstabilitást felmérő tesztekkel azonos körülmények között lehetséges vizsgálni a PB nanorészecskék enzimaktivitását.



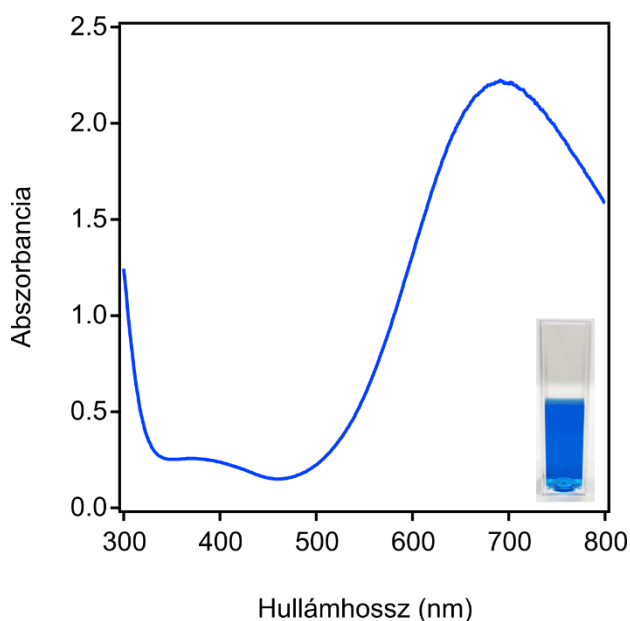
6. ábra: HRP enzim aktivitása, pH 7-es PBS puffertartalmú, pH 4-es acetát tartalmú, valamint pH 4-es puffert nem tartalmazó oldatban. A vonalak a (11)-es egyenlet általi illesztésnek felelnek meg.

5. Eredmények

5.1 Szintetizált PB nanorészecskék karakterizálása

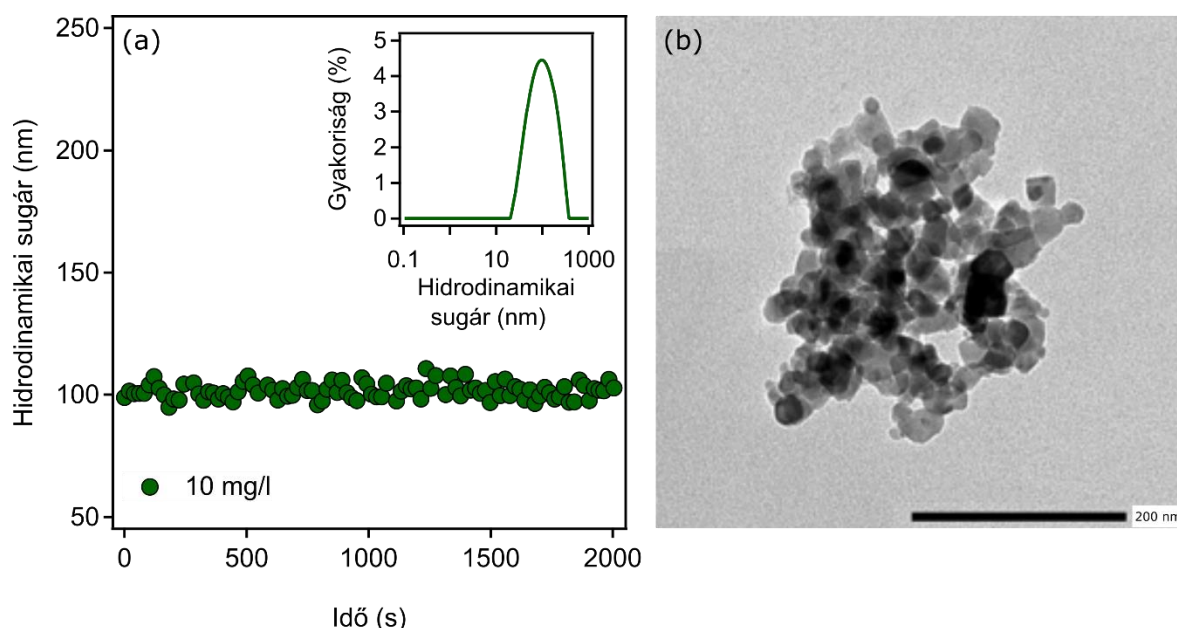
Ahhoz, hogy a szintetizált PB nanorészecskék felületi töltésviszonyait, aggregációs viselkedését, valamint antioxidáns aktivitását vizsgáljuk, elengedhetetlen meghatározni, hogy a kívánt tulajdonságokkal rendelkező anyagot sikerült-e előállítanunk. Az együttes lecsapással szintetizált részecskék anyagi minőségéről UV-Vis spektroszkópiával kaptunk információt, a morfológiai tulajdonságokat TEM felvételek, a méreteloszlást pedig DLS segítségével határoztuk meg.

A 7. ábrán a PB részecskék UV-Vis spektruma látható. A spektrumot egy széles abszorpciós sáv jellemzi 700 nm-en, mely a Fe(II) és a Fe(III) ionok közötti töltésátviteli sávokra jellemző a Fe(II) – CN – Fe(III) kötés mentén [50]. A színekép megerősíti a kívánt PB részecskék sikeres szintézisét.



7. ábra: A PB UV-Vis spektruma pH 4-es oldatban, 100 mg/l részecskekoncentrációnál.

Mivel a PB részecskék vízben diszpergálva kolloid rendszert képeznek, ezért a rendszer stabilitását 1 mM KCl háttélelektrolit jelenlétében vizsgáltuk (8.(a) ábra). A PB nanorészecskék vizes közegben pH 4-en 1 mM KCl koncentráció mellett $1.56 \mu\text{m}\cdot\text{cm}/\text{Vs}$ elektroforetikus mobilitás értékkel rendelkeznek – ez a Smoluchowski egyenlet (4) szerint -21.6 mV zéta potenciált jelent – a felületen jelenlévő deprotonálódott hidroxil és karboxil csoportoknak köszönhetően [28]. Látható, hogy a hidrodinamikai átmérő az időben nem változik számottevően, vagyis stabil kolloid rendszerről beszélhetünk.



8. ábra: (a) PB hidrodinamikai sugarának változása az idő függvényében 10 mg/l részecskekoncentrációnál 1 mM ionerősség mellett. A belső ábra a PB intenzitással súlyozott méreteloszlását ábrázolja pH 4-nél. (b) A PB részecskékről készült TEM felvétel.

A belső ábrán az intenzitással súlyozott méreteloszlás látható. A görbe maximuma 100 nm-nél található, ami alátámasztja, hogy egy megfelelően stabil, monodiszperz kolloid rendszert sikerült előállítani. A szintetizált részecskék méretét és morfológiáját TEM felvételekkel is vizsgáltuk (8.(b) ábra). A TEM felvételeken látható, hogy átlagosan kb. 30 nm-es gömbszerű részecskék alakultak ki. Megfigyelhető, hogy a TEM felvételeken, illetve a DLS segítségével meghatározott részecskeméretetek különböznek egymástól. Ez a különbség valószínűleg a 8.(b) ábrán is látható részecskeaggregátumok jelenlétével magyarázható. Emellett kisebb mértékben az is hozzájárul a különbséghez, hogy vizes közegben a töltést hordozó szilárd felülethez folyadék tapad, mely az elektromos erőter hatására történő elmozduláskor együtt mozog a részecskével, ami miatt a DLS műszer nagyobb részecske méretet érzékel.

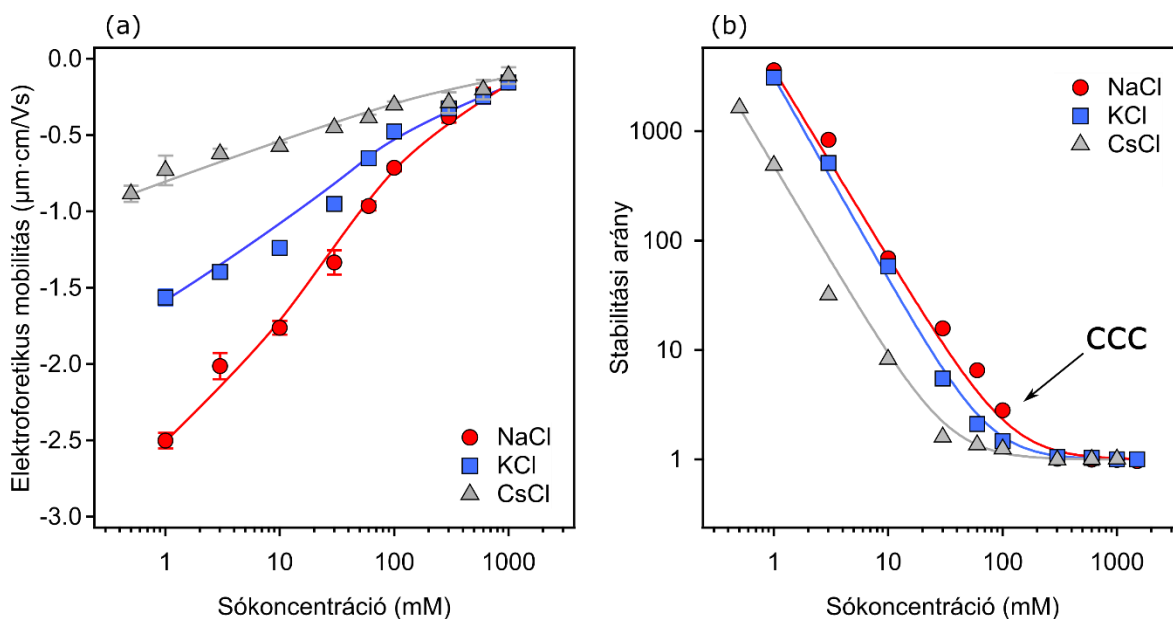
A karakterizálás során kapott eredmények alapján elmondható, hogy sikeresen reprodukáltuk a korábbi publikációkban leírt szintézist [28, 51]. Az így előállított PB szuszpenzió alkalmas a részecskék kolloidstabilitása és antioxidáns aktivitása közötti összefüggések vizsgálatára.

5.2 Elektrolitok hatása a PB részecskék kolloidstabilitására

A részecske diszperziók alkalmazhatósága erősen függ olyan tényezőktől, mint az alkalmazandó közeg ionerőssége vagy a háttélektrolitok összetétele [52, 53]. Emiatt vizsgáltuk a PB részecskéket tartalmazó rendszer kolloidstabilitását különböző anyagi

minőségű és koncentrációjú szervesen sók jelenlétében. Mivel a PB pH 4-es oldatban negatív felületi töltéssel rendelkezik, ezért különböző kationokat tartalmazó – NaCl, KCl, CsCl, valamint CaCl_2 és LaCl_3 – sóoldatokat jelenlétében végeztük el méréseinket. A vizsgált kationok ezen kísérleti körülmények között nem hidrolizálnak [54].

Először az egyértékű szervesen elektrolitok hatását vizsgáltuk a PB rendszer töltésviszonyaira és aggregációs viselkedésére nézve. Az elektroforetikus mobilitás sókoncentrációtól való függését a 9.(a) ábra szemlélteti. A görbék alakja a só összetételétől függetlenül hasonló lefutású. Kezdetben a PB részecskék negatív töltéssel rendelkeznek, mivel alacsony ionerősségnél még nem jut kifejezésre az ellenionok töltésárnyékoló hatása. Ebben a tartományban a részecskék és az ellenionok ellentétes töltése miatt a vonzó elektrosztatikus kölcsönhatás dominál, ami elősegíti a kationok adszorpcióját. Ebből kifolyólag a sókoncentráció növelésével az elektroforetikus mobilitás értékek folyamatosan csökkennek. Látható, hogy az adott ionerősség esetén mért mobilitás megfelel a direkt Hofmeister-sorozatnak: $\text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Cs}^+$. Ezt a sorrendet a (5) egyenlettel meghatározott felületi töltéssűrűség értékek is alátámasztják (1. táblázat).



9. ábra: A PB részecskék elektroforetikus mobilitás (a) és stabilitási arány (b) értékeinek sókoncentrációtól való függése. Az (a) ábrán látható vonalak a jobb átláthatóságot biztosítják, a (b) ábrán látható vonalak pedig a (12)-es egyenlettel történő illesztésnek felelnek meg.

A 9.(b) ábra a stabilitási arány sókoncentrációtól való függését mutatja be. Látható, hogy kezdetben magas stabilitási arány értékeket mértünk, ami az ionerősség növekedésével folyamatos csökkenést mutat egészen addig, amíg a görbe eléri az egységnyi értéket, amit

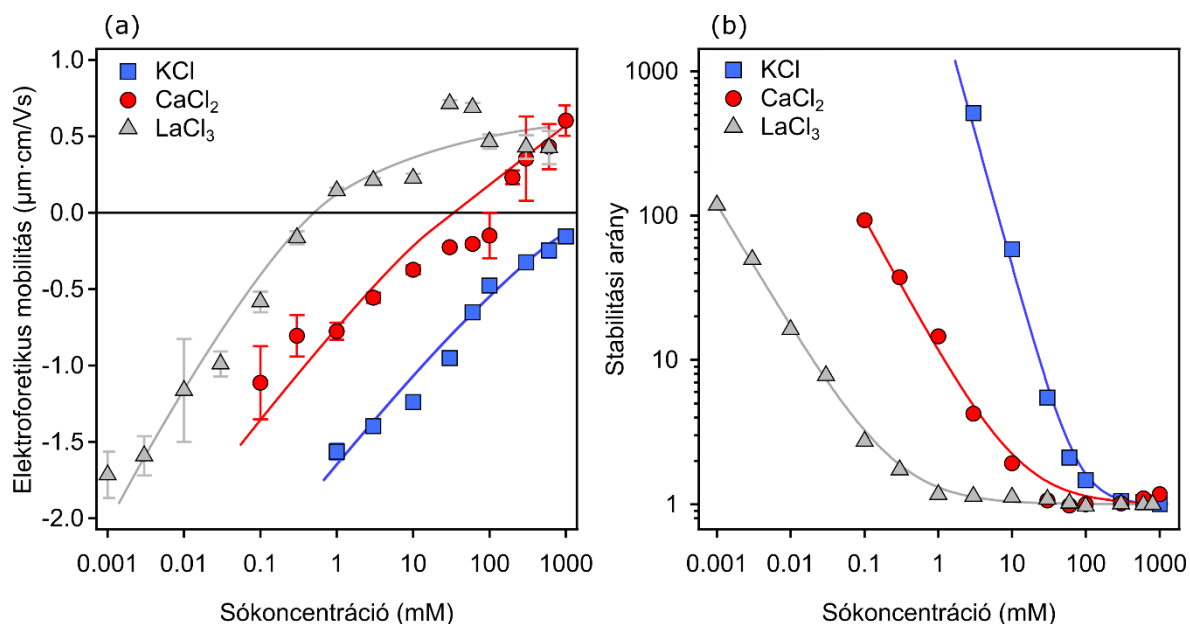
gyors aggregációs szakasznak nevezünk. Innentől kezdve az ionerősség növelésével már nem változik a stabilitási arány. Mindez a mobilitás értékek segítségével számszerűsített felületi töltésviszonyokkal jól magyarázható. Alacsony sókoncentrációnál a részecskék akkora töltéssel rendelkeznek, hogy az EDL átlapolódásából származó taszító erők dominálnak. Ebben a tartományban ezért stabil a rendszer, amit a magas stabilitási arány értékek jeleznek. A sókoncentráció növelésével azonban a stabilitási arány értékek csökkennek, ugyanis az ellenionok leárnýékolják a felületi töltéseket, aminek következtében a részecskék közötti vonzó kölcsönhatás dominál. A két szakaszt elválasztó CCC értékeket az alábbi egyenlettel határoztuk meg:

$$W = 1 + \left(\frac{CCC}{c}\right)^{-\beta} \quad (12)$$

ahol c a moláris koncentráció, és β a lassú aggregációs tartományban meghatározott stabilitási arány értékek meredekségéből számolható.

A CCC értékek segítségével össze tudtuk hasonlítani a sók kolloidstabilitásra gyakorolt hatását, mely a $\text{NaCl} > \text{KCl} > \text{CsCl}$ sorrendben csökkent. Ebből látható, hogy a legkevésbé hidratált Cs^+ ionnak a legnagyobb, míg a leginkább hidratált Na^+ ionnak a legkisebb a PB részecskék felületéhez való affinitása.

Ezt követően felmértük a különböző anyagi minőségű és vegyértékű kationok stabilitásra és felületi töltésekre gyakorolt hatását is (10. ábra). A görbék alakja – akárcsak az egyértékű sók esetén – független az anyagi minőségtől. A PB nanorészecskék töltésviszonyait illetően általános tendencia, hogy az elektroforetikus mobilitás értékek az ionerősség növelésével párhuzamosan csökkennek. Ha azonban adott ionerősségnél vizsgáljuk a mobilitás értékeket, megmutatkozik az eltérő vegyértékű kationok okozta különbség. Látható, hogy a Ca^{2+} és a La^{3+} ionok esetében a töltésneutralizációt követően az ionerősséget tovább növelve, az elektroforetikus mobilitás értékek is tovább növekednek. Ezek alapján elmondható, hogy az adszorpció, az IEP pont után is folytatódik, és a többértékű kationok képesek csekély mértékben áttölteni a PB nanorészecskék felületét, így az enyhén pozitív töltöttségűvé válik. Hasonló viselkedést megfigyeltek már többvegyértékű ionok ellentétes töltésű kolloid részecskék felületén történő adszorpciójakor vizes disperziókban [55, 56].



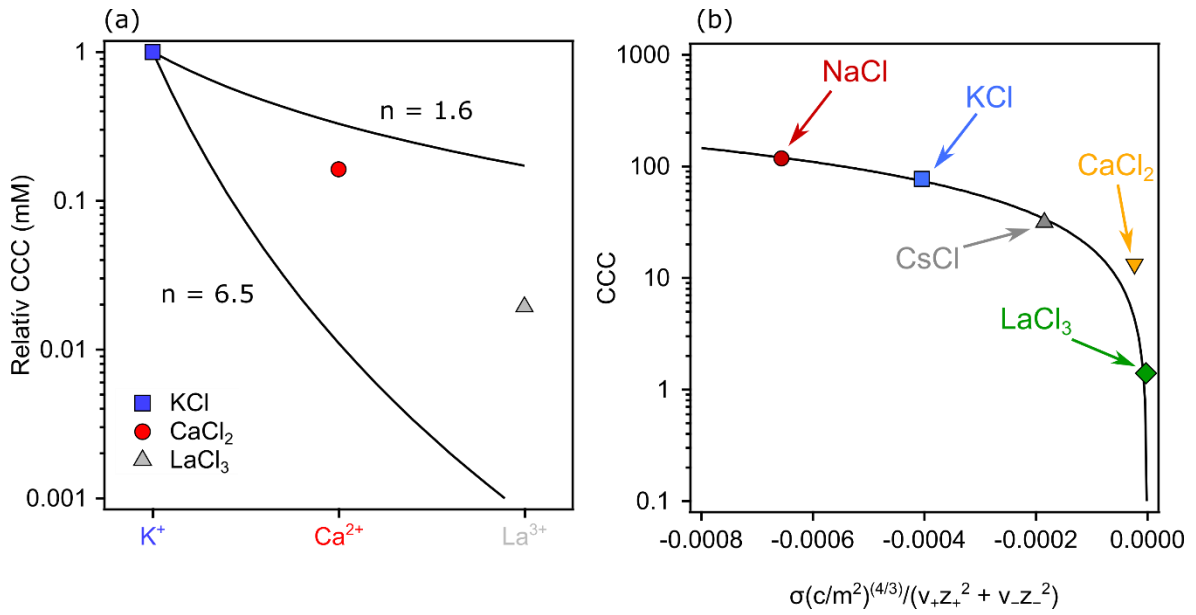
10. ábra: Az elektroforetikus mobilitás (a) és stabilitási arány (b) adatok a különböző sók koncentrációjának függvényében, PB részecske diszperzióban. Az (a) ábrán látható vonalak a jobb átláthatóságot biztosítják, a (b) ábrán látható vonalak pedig a (12)-es egyenlet segítségével lettek megillesztve.

A 10.(b) ábra a stabilitási arány sókoncentrációtól való függését mutatja be. Az általános tendencia megegyezik az egyértékű elektrolitok esetén megfigyelttel. Az ionerősség növelésével a felületi töltés folyamatosan csökken, miáltal a részecskék közötti vonzás egyre kifejezettebbé válik, így az aggregáció sebessége növekszik. A CCC értékek a $KCl > CaCl_2 > LaCl_3$ sorrendet követték, ami összhangban van felületi töltéssűrűség értékekkel (1. táblázat). A CCC értékeket összehasonlítva megállapítható, hogy a K^+ ionhoz képest a Ca^{2+} és a La^{3+} ionok sokkal nagyobb affinitást mutatnak a negatív töltésű PB nanorészecskék felületéhez. Ez azzal magyarázható, hogy a többvegyértékű ionok nagyobb hatékonysággal semlegesítik a felületi töltéseket, mivel nagyobb mértékben adszorbeálódnak a felületen [7]. Megfigyelhető továbbá, hogy a többértékű ionok át is töltik a PB részecskék felületét, azonban a töltés alacsony marad, így az áttöltést követően csak a gyors aggregációs tartomány figyelhető meg.

A többvegyértékű ellenionok esetén kapott tendencia a Schulze–Hardy-szabállyal értelmezhető, amin a CCC ionok vegyértékétől való függését az alábbi egyenlet adja meg [57]:

$$CCC \propto \frac{1}{z^n} \quad (13)$$

ahol z az ion töltése, n pedig a felületi töltéssűrűségtől és a részecskék hidrofobicitásától függő érték. A DLVO-elméletből levezethető, hogy az alacsony felületi töltéssel rendelkező részecske esetén $n = 1,6$, míg magas felületi töltésű részecskék esetén $n = 6,5$ [58]. A 11.(a) ábrán a különböző vegyértékű ionok esetén meghatározott relatív CCC értékek (KCl esetén mért CCC-re normalizálva), valamint a (13) egyenlet szerint várható értékek láthatóak az említett határok között. Megfigyelhető, hogy a CaCl_2 -hoz és a LaCl_3 -hoz tartozó CCC ebben a tartományban van, ami alapján feltételezhető, hogy a PB részecskék közepes felületi töltéssel rendelkeznek.



11. ábra: (a) A relatív CCC -k (KCl jelenlétében mért CCC -re normalizálva) ion vegyértéktől való függése, valamint a (13)-as egyenlettel illesztett görbék $n = 1,6$ és $6,5$ esetén. (b) ábrán a (14)-es egyenlettel számolt, és a kísérletileg meghatározott CCC értékek láthatóak a sztöchiometriai állandókkal, és töltésekkel normalizált felületi töltéssűrűség függvényében.

A különböző sók esetén meghatározott felületi töltéssűrűség értékeken (1. táblázat) látható, hogy ez a paraméter erős függést mutat az ionok vegyértékétől. Ez azzal magyarázható, hogy a többértékű ellenionok az egyértékűeknél nagyobb affinitást mutatnak az ellentétes töltésű felülethez, és így jobban csökkentik a felületi töltést [7]. Az EDL erők okozta taszítás az ion vegyértékének növekedésével egyre kisebb ionerősségnél szűnik meg, ami alacsonyabb CCC értékeket eredményez.

A részecskék közötti kölcsönhatások eredetének további vizsgálatára ad lehetőséget a DLVO-elméletből származtatott összefüggés, ami a CCC értékek és felületi töltéssűrűség között teremt kapcsolatot, a diffúzió kontrollált aggregációs tartományban [59, 60]:

$$CCC = \frac{0,94}{N_A L_B (H \epsilon \epsilon_0)^{2/3} (\nu_+ z_+^2 + \nu_- z_-^2)} \sigma^{4/3} \quad (14)$$

ahol H a Hamaker állandó, L_B az ún. Bjerrum-hossz (az a távolság, ahol a hőmozgás kompenzálja két elemi töltés elektrosztatikus energiáját egy adott közegben), mely értéke szobahőmérsékleten vízben 0,72 nm [61], ν_+ és ν_- a kationokra és anionokra jellemző sztöchiometriai állandó, z_+ és z_- pedig az ionok töltésszáma.

A 11.(b) ábrán a számolt és a kísérletileg meghatározott CCC értékek láthatóak a sztöchiometriai állandókkal és töltésekkel normalizált felületi töltéssűrűség függvényében. A (14)-es egyenlettel történő illesztés eredményeként $1,8 \cdot 10^{-21} J$ lett a Hamaker állandó értéke. A viszonylagosan jó egyezést mutató számolt és mért adatok megerősítik, hogy a részecskék közötti kölcsönhatások főként a DLVO erők által vezéreltek. Az ionspecifikus hatás azonban fontos szerepet játszik az aggregációban, ugyanis az ionok anyagi minősége befolyásolja az adszorpció mértékét. Ez okozza a különböző felületi töltéssűrűség értékeket, valamint az EDL-ből származó taszítás eltérő mértékét. Ezek alapján az ionok adszorpciós affinitását az ionok vegyértéke, valamint a részecskék és az ionok hidrofobicitása együttesen határozza meg.

1. táblázat: A PB részecskék töltés- és aggregációs viszonyaira jellemző paraméterek különböző egy- és többvegyértékű elektrolitok jelenlétében.

Sók	CCC (mM) ^a	σ (mC/m ²) ^b
NaCl	117,9 ± 1,76	-6,9 ± 0,17
KCl	77,4 ± 0,47	-4,8 ± 0,10
CsCl	33,6 ± 0,15	-2,7 ± 0,027
CaCl ₂	12,6 ± 0,077	-1,4 ± 0,12
LaCl ₃	1,5 ± 0,011	-0,38 ± 0,036

^aKritikus koagulációs koncentráció, valamint szórása (12)-es egyenlet segítségével meghatározva. ^b(5)-ös egyenlet segítségével meghatározott felületi töltéssűrűség és szórása.

5.3 Kolloidstabilitás enzimaktivitásra gyakorolt hatása

Az eddigiekben felmértük az elektrolitok hatását a PB nanorészecskéket tartalmazó diszperziók kolloidstabilitására. Megállapítottuk, hogy az ionerősség befolyásolja a részecskék közötti elektrosztatikus kölcsönhatásokat és ezáltal az aggregáció sebességét. Alacsony sókoncentrációnál az EDL-ből származó taszítás dominál, így ekkor lassú aggregációs szakaszcól beszélhetünk. Magas sókoncentrációnál, a részecskék felületi töltései

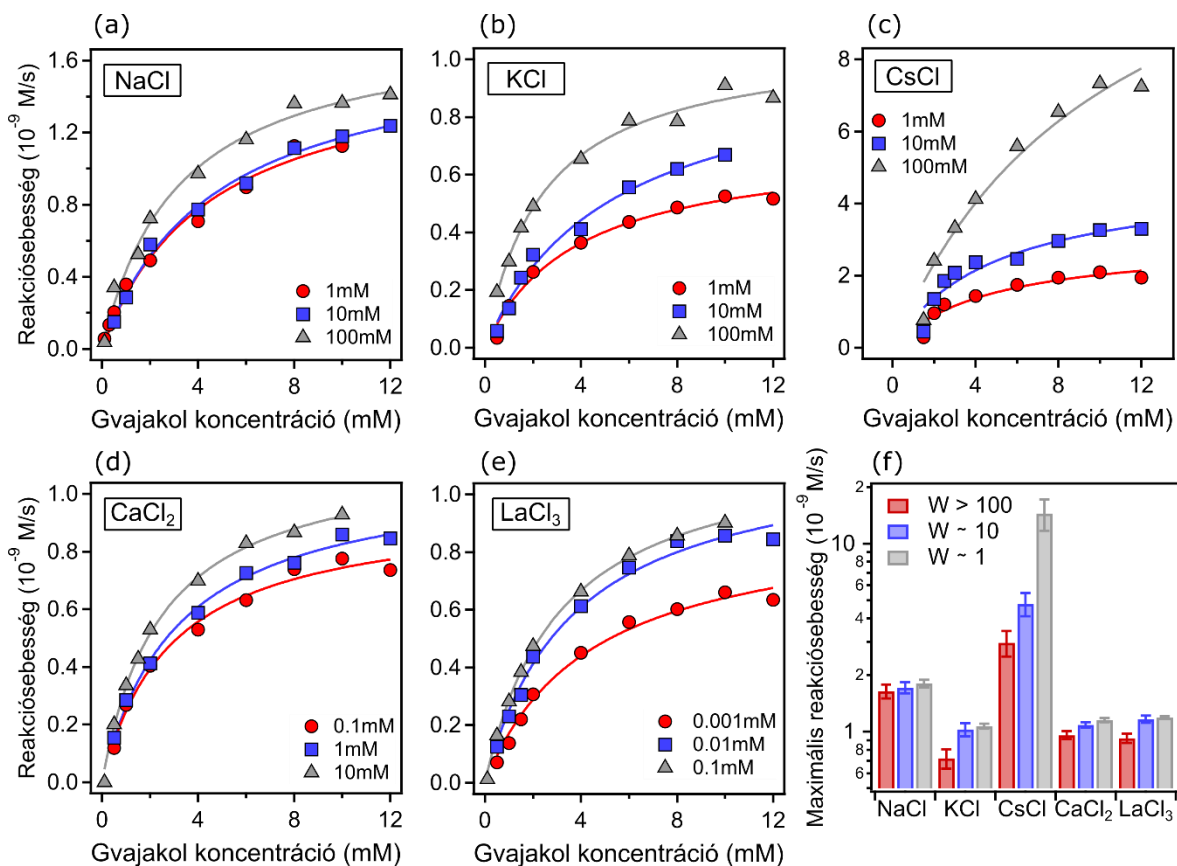
leárnnyékolódnak az ellenionok által, így az elektrosztatikus taszítás megszűnik és a vonzó kölcsönhatás érvényesül. Utóbbit nevezzük gyors aggregációs szakasznak.

A PB nanorészecskék számos természetes eredetű enzim molekulát képesek helyettesíteni [28, 30, 62, 63]. Egyik ilyen a torma-peroxidáz (HRP), mely a H_2O_2 bomlásával járó reakciókat képes katalizálni. A HRP teszt során a gvajakol szubsztrát H_2O_2 hatására történő oxidációját vizsgáltuk PB nanorészecskék jelenlétében, melyek az antioxidáns szerepét töltötték be. A gvajakol a reakcióban átalakul oxidált formájává, mely barna színű, így a reakció UV-Vis spektrofotométer segítségével nyomon követhető volt.

Mivel a kutatásunk során a kolloidstabilitás enzimaktivitásra gyakorolt hatását szerettük volna feltérképezni, ezért minden eddigiekben használt elektrolit hatását három különböző koncentráció mellett vizsgáltuk. Egyrészt alacsony sókoncentrációnál, lassú aggregációs tartományban ($W > 100$), köztes aggregáció sebességek esetén ($W \sim 10$), illetve a gyors aggregációs tartományban ($W \sim 1$). Az eredmények a 12. ábrán láthatóak.

A reakciósebesség értékekből, illetve a Michaelis–Menten-modell pontosságából látható, hogy a PB nanorészecskék valóban rendelkeznek HRP aktivitással. A szubsztrát koncentráció növelésével a reakciósebesség értékei is növekednek, majd egy bizonyos koncentrációnál a görbe telítésbe hajlik. Innentől kezdve a szubsztrát mennyiségének növelésével a reakciósebesség nem változik, ugyanis az enzim – ebben az esetben a részecske – összes katalitikus helye telített. A kapott adatpontokra a Michaelis–Menten-egyenlet (11) segítségével illesztettünk, így megkaptuk a maximális reakciósebességet ($v_{\max}$). A NaCl esetében (12.(a) ábra) 1 mM és 10 mM koncentráció esetén nem tapasztaltunk nagy különbséget, azonban 100 mM koncentrációnál nagyobb maximális reakciósebességet határoztunk meg. A KCl jelenlétében (12.(b) ábra) hasonló tendencia volt megfigyelhető, azzal a különbséggel, hogy itt már 1 mM és 10 mM sókoncentráció esetén is eltérő a $v_{\max}$, valamint már egészen alacsony szubsztrát koncentrációnál is nagyobb sebességgel játszódik le a reakció magasabb ionerősség mellett. A CsCl hatása (12.(c) ábra) a legjelentősebb a PB részecskék HRP aktivitására. Már 1 mM sókoncentráció mellett is jelentősen nagyobb $v_{\max}$ érték lett meghatározva, mint bármelyik másik só esetén. Ez feltehetőleg a Cs^+ PB részecskék felületéhez való affinitásával magyarázható, ugyanis a Cs^+ ion a felület adszorpciója mellett ioncsere révén PB kristályrács hibahelyeibe is beépül [64, 65]. Megfigyelhető továbbá, hogy az ionerősség növelésével a reakciósebesség is nagyobb ütemben növekszik, mint a többi só jelenlétében. Ez egyezést mutat egy korábbi kutatás

során meghatározott eredménnyel, miszerint a Cs^+ ion koncentrációjának növelésével annak adszorpciója is jelentős mértékben megnövekszik a PB nanorészecskék felületén [65].



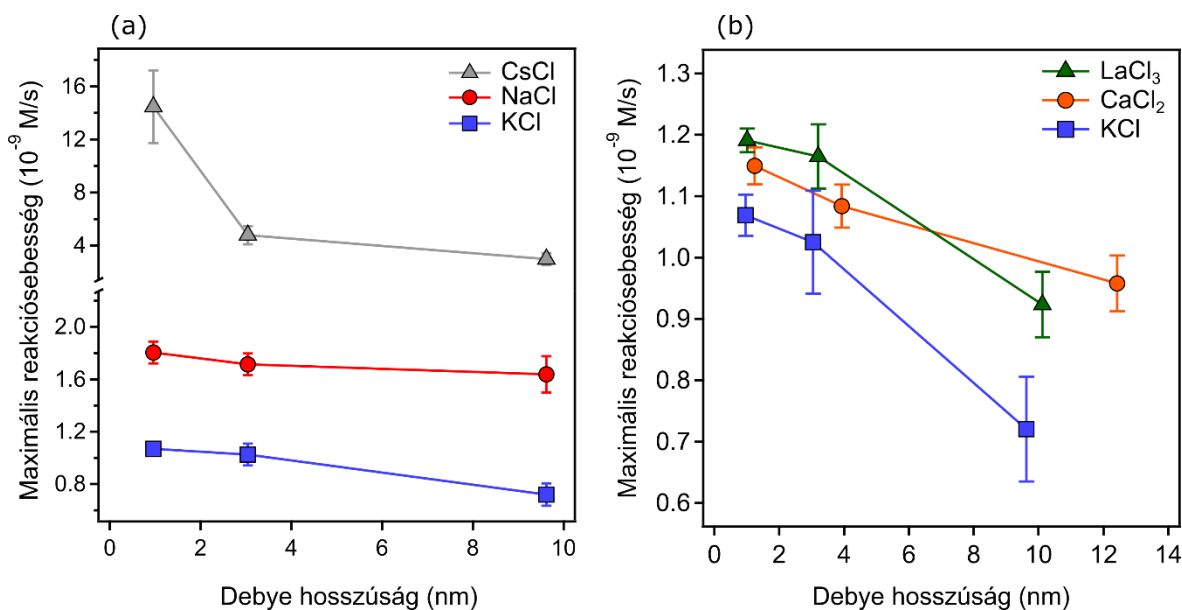
12. ábra: A reakciósebesség változása a Gvajacol koncentráció függvényében különböző koncentrációjú NaCl (a), KCl (b), CsCl (c), valamint CaCl_2 (d), és LaCl_3 (e) jelenlétében. A vonalak a Michaelis-Menten modell (11) alapján történő illesztésnek felelnek meg. Az (f) ábrán a különböző stabilitási arányú rendszerekben meghatározott v_{max} értékek láthatók.

A Ca^{2+} és a La^{3+} ionok (12.(d és e) ábra) hasonló viselkedést mutatnak. Mindkét ion jelenlétében az elektrolit koncentrációjának növelése – ahogyan az eddigi összes elektrolit esetében – növelte a reakció sebességét, amit a v_{max} értékek is igazolnak.

A 12.(f) ábrán látható, hogy sókoncentráció növelésével a maximális reakció sebesség is növekszik minden só esetén. Ez alapján egyértelmű, hogy a PB nanorészecskék töltésviszonyai, aggregációs viselkedése, valamint a katalitikus aktivitása között összefüggés van. Egy töltéssel rendelkező részecskéket tartalmazó kolloid szuszpenzióban az ionerősség növekedése az elektromos kettősréteg vastagságát befolyásolja a (2) egyenlet szerint.

A 13. (a) ábrán látható, hogy a Cs^+ ionokat tartalmazó közegben a Debye-hosszúság – amely az elektromos kettősréteg vastagságáról ad információt – csökkenésével egyre nagyobb ütemben növekszik a maximális reakciósebesség. A Na^+ és a K^+ ionok esetében

kisebbs mértékben ugyan, de hasonló tendencia figyelhető meg. Az adott Debye-hosszúsághoz tartozó maximális reakciósebesség a $\text{Cs}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+$ sorrendben csökkent, azonban a Cs^+ ion PB nanorészecskék felületéhez való affinitása miatt sokkal nagyobb hatást gyakorol. A 13.(b) ábrán látható, hogy a Ca^{2+} és a La^{3+} ionok jelenlétében is fenti tendencia érvényesül miszerint a Debye-hosszúság növekedésével a maximális reakciósebesség csökken. A v_{max} értékek – a lassú aggregációs tartományon ($W > 100$) kívül – a $\text{La}^{3+} > \text{Ca}^{2+} > \text{K}^+$ sorrendet követték, mely egyezést mutat a Schulze–Hardy-szabállyal. Eszerint a többértékű ionok felülethez való affinitásának növekedésével a reakciósebességre gyakorolt hatásuk is jobban érvényesül.



13. ábra: A maximális reakciósebesség Debye-hosszúságtól ((2) egyenlet alapján számolva) való függése, azonos vegyértékű (a) és különböző vegyértékű (b) ellenionok esetén.

Egy másik megközelítés szerint a nagyobb kationok, melyek kevésbé hidratáltak jobban megközelítik a katalizátor felületét. Ennek hatására a felületet borító hidrátburok jobban átjárhatóvá válik a reaktánsok számára, melyek így nagyobb mértékben hatnak kölcsön az aktív centrumokkal. Ilyen tendenciát figyeltek meg az egyértékű kationok hatását vizsgálva oxigén felszabadulással járó elektrokémiai reakciók hatékonyságára nézve [66].

A fenti eredmények alapján kijelenthetjük, hogy a PB nanorészecskék enzimatiszus aktivitása nagymértékben függ a jelenlévő oldott sók kémiai minőségétől, koncentrációjától és az ionok vegyértékétől. Ezek az ionok a felületi adszorpció révén csökkentik a részecskék töltését, és így az elektromos kettősréteg vastagságát. Ennek következtében a szubsztrát molekula könnyebben megközelítheti a PB nanorészecskék felületét, ezáltal pedig hatékonyabban játszódik le a reakció.

6. Összefoglalás

A kutatásunk során poroszkék nanorészecskéket állítottunk elő, majd a töltésviszonyok és aggregációs folyamatok feltérképezése révén vizsgáltuk a rendszer kolloidstabilitását, végül pedig felmértük az ionerősség hatását a részecskék antioxidáns aktivitására. A mérések kivitelezéséhez fényszórásmérésen alapuló technikákat, valamint UV-Vis spektrofotométert alkalmaztunk.

Először kálium-hexaciano-ferrátból ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) és vas(II)-kloridból (FeCl_2) együttes lecsapással szintetizáltuk a részecskéket. Az optimális $\text{Fe(II)}/\text{Fe(III)}$ arány beállításával biztosítottuk, hogy a megfelelő tulajdonságokkal rendelkező részecskék alakuljanak ki. A szintetizált terméket UV-Vis spektroszkópiával, transzmissziós elektronmikroszkópiával és dinamikus fényszórásmérés által karakterizáltuk.

Ezek után különböző ionerősségnél végzett elektroforetikus mobilitás és időfüggő dinamikus fényszórásmérés segítségével értelmeztük a PB diszperzió kolloidstabilitását. Az ellenionok szisztematikus változtatása révén vizsgáltuk a sók PB részecskék töltésviszonyaira és aggregációs viselkedésére gyakorolt hatását. Az elektroforetikus mobilitás ionerősségtől való függéséből meghatároztuk a PB töltését különböző egy- és többvegyértékű ionok jelenlétében. Az azonos vegyértékű ionok esetén a részecskék felületi töltéssűrűsége a $\text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Cs}^+$ sorrendet követte. A stabilitási arányok segítségével meghatározott CCC értékek ugyan ezt a tendenciát adták vissza. Mindez azt bizonyítja, hogy a különböző ionok – szolvatációjuktól függően – eltérő mértékű kölcsönhatást létesítenek a PB felületével, így különböző mértékben módosítják a szilárd/folyadék határfelületi EDL szerkezetét, ezáltal befolyásolják a részecskék közötti kölcsönhatásokat. Ezek alapján a PB követi a negatív töltésű hidrofób részecskére jellemző Hofmeister-sorozatot.

Ezt követően ugyanezekkel a módszerekkel vizsgáltuk a különböző vegyértékű ionok hatását is. Az elektroforetikus és a dinamikus fényszórásmérések segítségével ismét meghatároztuk a felületi töltéssűrűség és a CCC értékeket, melyek a $\text{K}^+ > \text{Ca}^{2+} > \text{La}^{3+}$ sorrendben csökkentek. A destabilizáló hatás tendenciája megfelel a Schulze–Hardy-szabálynak, mely szerint a többvegyértékű ionok vegyértékének növekedésével azok felülethez való affinitása is növekszik. Megjegyzendő, hogy a Ca^{2+} és a La^{3+} ionok képesek a PB részecskék felületi töltését enyhén áttölteni, ami alapján ezek az ionok a töltésárnyékolás mellett számottevő mértékben adszorbeálódnak is.

A kolloidkémiai vizsgálatok során meghatározott és a DLVO-elmélet segítségével számolt eredmények összehasonlításával vizsgáltuk a részecskék között ható erők eredetét.

Ez alapján megállapításra került, hogy a PB diszperziókban a sók által indukált aggregáció a DLVO-elméletben szereplő erőhatások által vezérelt. Megállapítottuk továbbá, hogy a különböző anyagi minőségű szervesetlen ionok eltérő mértékben módosítják a részecskék felületi töltéssűrűség értékeit, és így a CCC értékekben is eltéréseket tapasztaltunk.

Végül az enzimaktivitás háttéreléktrólit jelenlététől való függését is vizsgáltuk. Ehhez HRP tesztet végeztünk három különböző aggregációs tartományban – $W \sim 1$, $W \sim 10$, és $W > 100$ stabilitási arányokhoz tartozó ionerősség mellett – ahol a PB az antioxidáns szerepét töltötte be. A reakciósebesség gvaajakol koncentrációtól való függését a Michaelis–Menten-modell alapján értelmeztük. Megállapítottuk, hogy minden só esetében az ionerősség növelése növelte a reakciósebességet is, amit az illesztésekből meghatározott maximális reakciósebesség értékekkel igazoltunk. A kapott tendenciát azzal magyaráztuk, hogy az elektromos kettősréteg a növekvő sókoncentráció hatására beszűkül, miáltal a szubsztrát molekulák könnyebben megközelítik a részecskék felületét, így azok hatékonyabban katalizálják a reakciót. A legnagyobb hatást a Cs^+ ion gyakorolta a PB enzimaktivitására, ami feltehetően a Cs^+ ion PB kristályrács hibahelyeibe való beépülésével magyarázható.

A kapott eredmények segítségével értelmezni tudtuk PB részecskék közötti kölcsönhatások eredetét elektrolitot tartalmazó diszperz rendszerekben. Elmondhatjuk, hogy a felülettel ellentétes töltésű ionok adszorpcióját, ezáltal pedig az ionok kolloidstabilitásra és az enzimaktivitásra gyakorolt hatását olyan kísérleti körülmények befolyásolják, mint a részecskék és az elektrolitok anyagi minősége és koncentrációja. Az eredményeink segítséget nyújtanak a nanozyme-ok kolloidstabilitása és katalitikus aktivitása a közötti összefüggések értelmezésében, ami kiemelt jelentőségű a PB részecskék kolloid rendszerekben történő felhasználása során.

Irodalomjegyzék

1. Alfadda AA, Sallam RM: **Reactive oxygen species in health and disease.** *J Biomed Biotechnol* 2012, **2012**:936486.
2. Brieger K, Schiavone S, Miller FJ, Krause KH: **Reactive oxygen species: from health to disease.** *Swiss Med Wkly* 2012, **142**:13659.
3. Sies H, Jones DP: **Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2020, **21**(7):363-383.
4. Zandieh M, Liu JW: **Nanozymes: Definition, activity, and mechanisms.** *Advanced Materials* 2023:2211041.
5. Wei M, Lee J, Xia F, Lin PH, Hu X, Li FY, Ling DS: **Chemical design of nanozymes for biomedical applications.** *Acta Biomater* 2021, **126**:15-30.
6. Lopez-Leon T, Santander-Ortega MJ, Ortega-Vinuesa JL, Bastos-Gonzalez D: **Hofmeister effects in colloidal systems: Influence of the surface nature.** *J Phys Chem C* 2008, **112**(41):16060-16069.
7. Lyklema J: **Coagulation by multivalent counterions and the Schulze-Hardy rule.** *Journal of Colloid and Interface Science* 2013, **392**:102-104.
8. D'Autreaux B, Toledano MB: **ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007, **8**(10):813-824.
9. Winterbourn CC: **Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species.** *Nat Chem Biol* 2008, **4**(5):278-286.
10. Wang YQ, Li LL, Zhao WB, Dou Y, An HJ, Tao H, Xu XQ, Jia Y, Lu S, Zhang JX *et al*: **Targeted therapy of atherosclerosis by a broad-spectrum reactive oxygen species scavenging nanoparticle with intrinsic anti-inflammatory activity.** *ACS Nano* 2018, **12**(9):8943-8960.
11. Jiang QY, Fan L, Sun JL, Hu JL, He M, Hu B, Wang FA, Liu XQ: **Modulation of oxidative stress in cancer cells with a biomineralized converter.** *ACS Mater Lett* 2021, **3**(12):1778-1785.
12. Zhang RF, Yan XY, Fan KL: **Nanozymes inspired by natural enzymes.** *Accounts Mater Res* 2021, **2**(7):534-547.
13. Jiang H, Chen ZH, Cao HY, Huang YM: **Peroxidase-like activity of chitosan stabilized silver nanoparticles for visual and colorimetric detection of glucose.** *Analyst* 2012, **137**(23):5560-5564.
14. Lin YH, Ren JS, Qu XG: **Nano-gold as artificial enzymes: Hidden talents.** *Advanced Materials* 2014, **26**(25):4200-4217.
15. Ghosh S, Roy P, Karmodak N, Jemmis ED, Muges G: **Nanoisozymes: Crystal-facet-dependent enzyme-mimetic activity of V₂O₅ nanomaterials.** *Angew Chem-Int Edit* 2018, **57**(17):4510-4515.
16. Sun LF, Ding YY, Jiang YL, Liu QY: **Montmorillonite-loaded ceria nanocomposites with superior peroxidase-like activity for rapid colorimetric detection of H₂O₂.** *Sens Actuator B-Chem* 2017, **239**:848-856.
17. Dai ZH, Liu SH, Bao JC, Jui HX: **Nanostructured FeS as a mimic peroxidase for biocatalysis and biosensing.** *Chem-Eur J* 2009, **15**(17):4321-4326.
18. Nandu N, Hizir MS, Roberston NM, Ozturk B, Yigit MV: **Masking the peroxidase-like activity of the molybdenum disulfide nanozyme enables label-free lipase detection.** *Chembiochem* 2019, **20**(14):1861-1867.
19. Wang LJ, Xing HY, Zhang SJ, Ren QG, Pan LM, Zhang K, Bu WB, Zheng XP, Zhou LP, Peng WJ *et al*: **A Gd-doped Mg-Al-LDH/Au nanocomposite for CT/MR**

- bimodal imagings and simultaneous drug delivery.** *Biomaterials* 2013, **34**(13):3390-3401.
20. Ren XY, Chen DX, Wang Y, Li HF, Zhang YB, Chen HY, Li X, Huo MF: **Nanozymes-recent development and biomedical applications.** *J Nanobiotechnol* 2022, **20**(1):92.
 21. Li SH, Qi MY, Tang ZR, Xu YJ: **Nanostructured metal phosphides: from controllable synthesis to sustainable catalysis.** *Chemical Society Reviews* 2021, **50**(13):7539-7586.
 22. Li B, Zhao YF, Zhang ST, Gao W, Wei M: **Visible-light-responsive photocatalysts toward water oxidation based on NiTi-layered double hydroxide/reduced graphene oxide composite materials.** *ACS Appl Mater Interfaces* 2013, **5**(20):10233-10239.
 23. Yan LK, Zhang G, Zhang L, Zhang W, Gu JC, Huang YJ, Zhang JW, Chen T: **Robust construction of underwater superoleophobic CNTs/nanoparticles multifunctional hybrid membranes via interception effect for oily wastewater purification.** *J Membr Sci* 2019, **569**:32-40.
 24. Vernekar AA, Sinha D, Srivastava S, Paramasivam PU, D'Silva P, Mughesh G: **An antioxidant nanozyme that uncovers the cytoprotective potential of vanadia nanowires.** *Nat Commun* 2014, **5**:5301.
 25. Bhushan B, Gopinath P: **Antioxidant nanozyme: a facile synthesis and evaluation of the reactive oxygen species scavenging potential of nanoceria encapsulated albumin nanoparticles.** *J Mat Chem B* 2015, **3**(24):4843-4852.
 26. Huang YY, Liu Z, Liu CQ, Ju EG, Zhang Y, Ren JS, Qu XG: **Self-assembly of multi-nanozymes to mimic an intracellular antioxidant defense system.** *Angew Chem-Int Edit* 2016, **55**(23):6646-6650.
 27. Parks GA: **The isoelectric points of solid oxides, solid hydroxides, and aqueous hydroxo complex systems.** *Chemical Reviews* 1965, **65**(2):177-198.
 28. Alsharif NB, Samu GF, Sáringer S, Muráth S, Szilagyi I: **A colloid approach to decorate latex particles with Prussian blue nanozymes.** *J Mol Liq* 2020, **309**:113066.
 29. Gautam M, Poudel K, Yong CS, Kim JO: **Prussian blue nanoparticles: Synthesis, surface modification, and application in cancer treatment.** *Int J Pharm* 2018, **549**(1-2):31-49.
 30. Zhang W, Hu SL, Yin JJ, He WW, Lu W, Ma M, Gu N, Zhang Y: **Prussian Blue nanoparticles as multienzyme mimetics and reactive oxygen species scavengers.** *Journal of the American Chemical Society* 2016, **138**(18):5860-5865.
 31. Sanetuntikul J, Shanmugam S: **Prussian blue-carbon hybrid as a non-precious electrocatalyst for the oxygen reduction reaction in alkaline medium.** *Electrochim Acta* 2014, **119**:92-98.
 32. Derjaguin B, Landau L: **Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes.** *Prog Surf Sci* 1993, **43**(1-4):30-59.
 33. Delgado AV, Gonzalez-Caballero F, Hunter RJ, Koopal LK, Lyklema J: **Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena.** *Journal of Colloid and Interface Science* 2007, **309**(2):194-224.
 34. Derjaguin B: **On the repulsive forces between charged colloid particles and on the theory of slow coagulation and stability of lyophobic sols.** *Transactions of the Faraday Society* 1940, **35**(3):0203-0214.

35. Oncsik T, Desert A, Trefalt G, Borkovec M, Szilagyí I: **Charging and aggregation of latex particles in aqueous solutions of ionic liquids: Towards an extended Hofmeister series.** *Physical Chemistry Chemical Physics* 2016, **18**(10): 7511-7520.
36. Lopez-Leon T, Jodar-Reyes AB, Bastos-Gonzalez D, Ortega-Vinuesa JL: **Hofmeister effects in the stability and electrophoretic mobility of polystyrene latex particles.** *Journal of Physical Chemistry B* 2003, **107**(24):5696-5708.
37. Schwierz N, Horinek D, Netz RR: **Reversed anionic Hofmeister series: The interplay of surface charge and surface polarity.** *Langmuir* 2010, **26**(10):7370-7379.
38. Salis A, Bilanicová D, Ninham BW, Monduzzi M: **Hofmeister effects in enzymatic activity: Weak and strong electrolyte influences on the activity of *Candida rugosa* lipase.** *Journal of Physical Chemistry B* 2007, **111**(5):1149-1156.
39. Park C, Raines RT: **Quantitative analysis of the effect of salt concentration on enzymatic catalysis.** *Journal of the American Chemical Society* 2001, **123**(46):11472-11479.
40. Elkahoui S, Hernández JA, Abdelly C, Ghrir R, Limam F: **Effects of salt on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Catharanthus roseus* suspension cells.** *Plant Sci* 2005, **168**(3):607-613.
41. Salis A, Ninham BW: **Models and mechanisms of Hofmeister effects in electrolyte solutions, and colloid and protein systems revisited.** *Chemical Society Reviews* 2014, **43**(21):7358-7377.
42. Boström M, Tavares FW, Finet S, Skouri-Panet F, Tardieu A, Ninham BW: **Why forces between proteins follow different Hofmeister series for pH above and below pI.** *Biophys Chem* 2005, **117**(3):217-224.
43. Trefalt G, Szilagyí I, Borkovec M: **Poisson-Boltzmann description of interaction forces and aggregation rates involving charged colloidal particles in asymmetric electrolytes.** *Journal of Colloid and Interface Science* 2013, **406**:111-120.
44. Holthoff H, Egelhaaf SU, Borkovec M, Schurtenberger P, Sticher H: **Coagulation rate measurements of colloidal particles by simultaneous static and dynamic light scattering.** *Langmuir* 1996, **12**(23):5541-5549.
45. Maehly AC, Chance B: **The assay of catalases and peroxidases.** *Methods of Biochemical Analysis* 1954, **1**:357-424.
46. Johnson KA, Goody RS: **The original Michaelis constant: Translation of the 1913 Michaelis-Menten paper.** *Biochemistry* 2011, **50**(39):8264-8269.
47. Hernandez-Ruiz J, Arnao MB, Hiner ANP, Garcia-Canovas F, Acosta M: **Catalase-like activity of horseradish peroxidase: relationship to enzyme inactivation by H₂O₂.** *Biochem J* 2001, **354**:107-114.
48. Pavlovic M, Rouster P, Somosi Z, Szilagyí I: **Horseradish peroxidase-nanoclay hybrid particles of high functional and colloidal stability.** *Journal of Colloid and Interface Science* 2018, **524**:114-121.
49. Alsharif NB, Samu GF, Saringer S, Szerlauth A, Takacs D, Hornok V, Dékány I, Szilagyí I: **Antioxidant colloids via heteroaggregation of cerium oxide nanoparticles and latex beads.** *Colloids Surf, B* 2022, **216**:112531.
50. Uemura T, Kitagawa S: **Prussian Blue nanoparticles protected by poly(vinylpyrrolidone).** *Journal of the American Chemical Society* 2003, **125**(26):7814-7815.
51. Zhang WM, Ma D, Du JX: **Prussian Blue nanoparticles as peroxidase mimetics for sensitive colorimetric detection of hydrogen peroxide and glucose.** *Talanta* 2014, **120**:362-367.

52. Ruiz-Cabello FJM, Trefalt G, Oncsik T, Szilagyí I, Maroni P, Borkovec M: **Interaction forces and aggregation rates of colloidal latex particles in the presence of monovalent counterions.** *Journal of Physical Chemistry B* 2015, **119**(25):8184-8193.
53. Wei XY, Pan DQ, Xu Z, Xian DF, Li XL, Tan ZY, Liu CL, Wu WS: **Colloidal stability and correlated migration of illite in the aquatic environment: The roles of pH, temperature, multiple cations and humic acid.** *Sci Total Environ* 2021, **768**:144174.
54. Baes CF, Mesmer RE: **The hydrolysis of cations.** Malabar Krieger Publishing; 1976.
55. Schneider C, Hanisch M, Wedel B, Jusufi A, Ballauff M: **Experimental study of electrostatically stabilized colloidal particles: Colloidal stability and charge reversal.** *Journal of Colloid and Interface Science* 2011, **358**(1):62-67.
56. Parsons DF, Ninham BW: **Charge reversal of surfaces in divalent electrolytes: The role of ionic dispersion interactions.** *Langmuir* 2010, **26**(9):6430-6436.
57. Takács D, Péter T, Vargáné Árok Z, Katana B, Papovic S, Gadzuric S, Vranes M, Szilagyí I: **Structure-stability relationship in aqueous colloids of latex particles and gemini surfactants.** *Journal of Physical Chemistry B* 2022, **126**(44):9095-9104.
58. Trefalt G, Szilagyí I, Tellez G, Borkovec M: **Colloidal stability in asymmetric electrolytes: Modifications of the Schulze-Hardy rule.** *Langmuir* 2017, **33**(7):1695-1704.
59. Yu WY, Du N, Gu YT, Yan JG, Hou WG: **Specific ion effects on the colloidal stability of layered double hydroxide single-layer nanosheets.** *Langmuir* 2020, **36**(23):6557-6568.
60. Evans DF, Wennerstrom H: **The colloidal domain.** New York: John Wiley; 1999.
61. Oncsik T, Trefalt G, Borkovec M, Szilagyí I: **Specific ion effects on particle aggregation induced by monovalent salts within the Hofmeister series.** *Langmuir* 2015, **31**(13):3799-3807.
62. Zhang XQ, Gong SW, Zhang Y, Yang T, Wang CY, Gu N: **Prussian Blue modified iron oxide magnetic nanoparticles and their high peroxidase-like activity.** *J Mater Chem* 2010, **20**(24):5110-5116.
63. Oh H, Lee JS, Sung D, Lee JH, Moh SH, Lim JM, Choi WI: **Synergistic antioxidant activity of size controllable chitosan-templated Prussian Blue nanoparticle.** *Nanomedicine* 2019, **14**(19):2567-2578.
64. Lee JH, Kwak SY: **Mechanochemically synthesized Prussian Blue for efficient removal of cesium ions from aqueous solutions.** *ACS Omega* 2022, **7**(4):3222-3229.
65. Nguyen MN, Yaqub M, Kim S, Lee W: **Optimization of cesium adsorption by Prussian blue using experiments and gene expression modeling.** *J Water Process Eng* 2021, **41**:102084.
66. Khani H, Santiago APR, He TW: **An interfacial view of cation effects on electrocatalysis systems.** *Angew Chem-Int Edit* 2023, **62**(43):10.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Prof Dr. Tóth Ágotának, a Fizikai Kémia és Anyagtudományi Tanszék vezetőjének, aki biztosította számomra annak lehetőségét, hogy a tanszéken készítsem el dolgozatom.

Szeretném megköszönni, Dr. Szilágyi Istvánnak, hogy lehetőséget nyújtott számomra az MTA-SZTE Lendület Biokolloidok Kutatócsoportban elkészíteni a dolgozatom.

Köszönöm továbbá Takács Dóra PhD hallgatónak a kutatás során nyújtott kiemelt segítséget, valamint azt, hogy mindig bizalommal fordulhattam hozzá.