

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**BIOSZENZORFEJLESZTÉS L-ASZKORBINSAV ÉS AFLATOXIN M<sub>1</sub>  
MÉRÉSÉRE**

**DEVELOPMENT OF BIOSENSOR FOR MEASURING L-ASCORBIC  
ACID AND AFLATOXIN M<sub>1</sub>**

**Víg Attila**

Témavezető: Dr. Gyémánt Gyöngyi Egyetemi adjunktus



DEBRECENI EGYETEM

Kémia Doktori Iskola

Debrecen, 2011



## 1. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉSEK

A kémiai és biológiai folyamatok követése, megértése szempontjából az analitikai kémia fejlődésének kiemelt szerepe van. Ennek a fejlődésnek három irányvonala az automatizálás, miniatürizálás és egyszerűsítés, melyben fontos szerep jut a gyors, megbízható érzékelők (szenzorok) fejlesztésének. A szenzorok fejlesztését az elmúlt században a szelektivitásnövelés motiválta, s ennek egyik legismertebb eredménye a pH mérésre használatos hidrogén szelektív üvegelektrod. A szenzorfejlesztés az analitikai kémián belül egy olyan dinamikusan fejlődő terület, melyet elsősorban a környezeti és egészségügyi előírások igényei irányítanak. A kémiai összetétel mérő kémiai szenzorok a kémiai információ (koncentráció, szerkezet) fizikai-kémiai jellé való átalakítását végzik. A kémiai szenzor két részegységből áll: egy molekuláris felismerést biztosító anyagot tartalmazó felismerő részből és egy fizikai-kémiai jelátvivő egységből. A felismerő egység funkciója kettős: szelektív kölcsönhatás révén a szenzor szelektivitásának biztosítása, és a kémiai paraméter (általában koncentráció) analitikailag mérhető, hasznos jellé való átalakítása, amelyre a jelátvivő egység reagál. Jellemző módon a kémiai felismerést végző elem és a jelátalakító egység egy analitikai eszközben található meg.

A bioszenzorok a kémiai szenzorok alcsoportját alkotják, amelyeknél a felismerő anyag biológiai eredetű, és a szelektív felismerési lépés biológiai folyamatra épül, így lehet enzim-szubsztrát, antigén-antitest, receptor-antagonista kölcsönhatás vagy nukleinsav hibridizáció. A különböző biológiai anyagok közül legáltalánosabban az enzimeket használják. A jelátvitel lehet elektrokémiai (amperometriás, potenciometriás), optikai vagy reakcióhő mérésén alapuló. Készítenek felületi plazmon-rezonancia detektáláson vagy tömegváltozás mérésén alapuló (kvarckristály mikromérleg alapú) kémiai és bioszenzorokat is. Fontos megemlíteni, hogy a szenzorok működését megszabó folyamatok általában reverzibilisek, ami biztosítja a szenzorok ismételt felhasználhatóságát, folyamatos üzemmódú alkalmazását.

A minőségbiztosítási folyamatok során az élelmiszer minőség és frissesség egyre inkább a figyelem középpontjába kerül mind a fogyasztók, mind az élelmiszeripar szempontjából, melyeknek ellenőrzésére időszakos kémiai és mikrobiológiai elemzéseknek vetik alá a termékeket. Az említett vizsgálatok olyan módszereket sorakoztatnak fel, mint kromatográfia, spektrofotometria, elektroforézis, titrálás, amelyek azonban nem teszik lehetővé az egyszerű,

folyamatos elemzést. Olcsó, gyors, roncsolásmentes vizsgálati módszer lehetőséget a bioszenzor, mely a valós mintákra is megvalósítható szelektivitáson és specifitáson túl a miniatürizálás és automatizálás lehetőségét biztosítja.

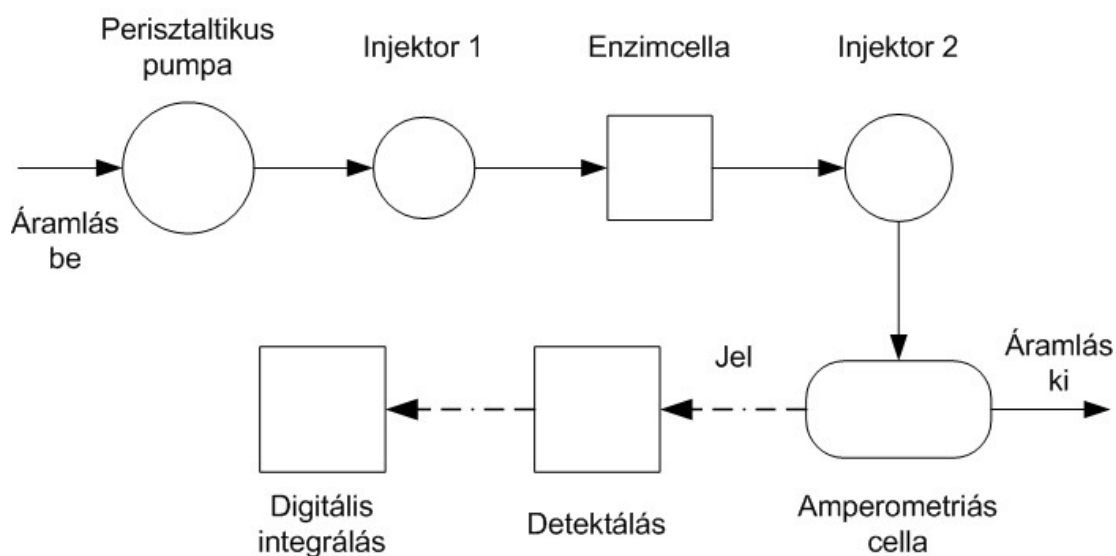
A 2006 óta az Eszterházy Károly Főiskola keretein belül indított egri Regionális Tudásközpont egyik kutatócsoportja az élelmiszeripari bioszenzor fejlesztésekre összpontosít, melyen belül főbb élelmiszer összetevők (antioxidánsok, biogén aminok) ellenőrzése a cél. A kutató laboratórium főként elektrokémiai módszereket (amperometria) alkalmaz munkájában. A kutatási tevékenységek során elengedhetetlen a hazai és nemzetközi csoportokkal (Lund-Svédország, Perpignan- Franciaország) történő együttműködés. Egy ilyen együttműködés keretein belül sikerült a magyar állami Eötvös ösztöndíj segítségével, fél éves kutatómunkát végezni a dél-francia perpignan-i egyetemen, ahol jelentősebb immunoszenzor fejlesztések is folynak.

Alapvető célkitűzésünk volt egy L-aszkorbinsav mérésére alkalmas amperometriás bioszenzor kialakítása, mivel az antioxidánsok szerepe jelentős többek között az élelmiszertartósításban, minőség megőrzésben, s mennyiségük meghatározása fontos visszajelzés lehet a termék élettartamára vonatkozóan. Az L-aszkorbinsav (antioxidás) mérésére alkalmas rendszer fejlesztésében az optimális elemzési paraméterek kiválasztása után, reális minták vizsgálatát végeztük (multivitamin pezsgőtabletta, multivitamin ivólé, fehér bor).

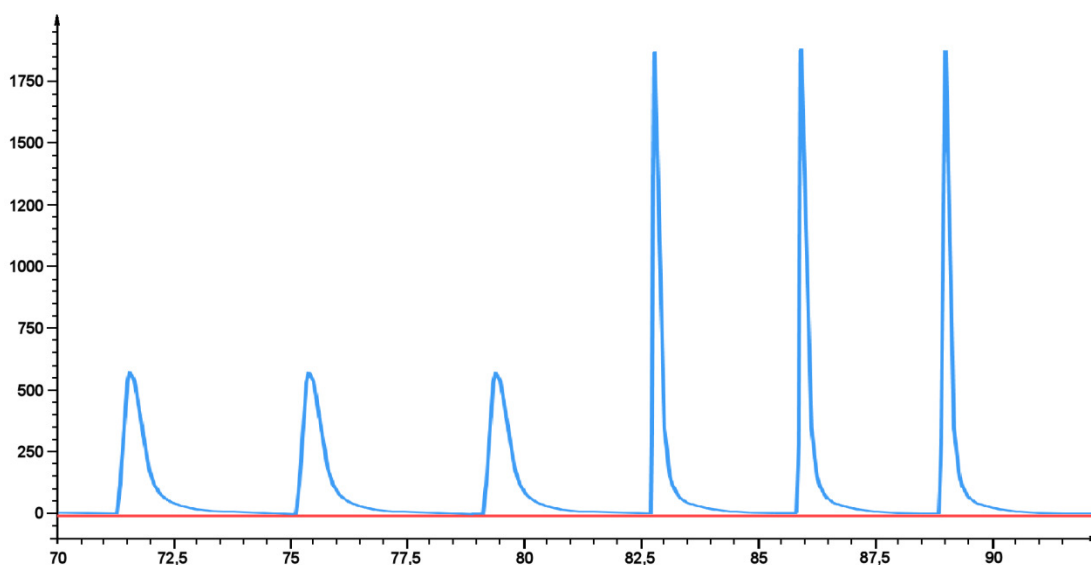
A francia kutatócsoport segítségével aflatoxin M<sub>1</sub> vizsgálatára alkalmas mérőmódszer kifejlesztését tűztük ki célul. Ez a toxin egy olyan élelmiszer-szennyező, ami az emlősök tejében mutatható ki, s a táplálékkal elfogyasztott aflatoxin B<sub>1</sub> metabolikus változata. Mennyiségének meghatározása fontos a tej minőségének, emberi fogyaszthatóságának megállapításában. A toxin mérésére használható módszer kifejlesztésénél megfelelő jelerősítési eljárás kidolgozása után a toxin tejben, mint mátrixban történő kimutatását és mennyiségének mérését végeztük el.

## 2. ALKALMAZOTT VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

Amperometriás bioszenzor: Az injektálásos, átfolyásos vizsgálati rendszer (FIA) felépítése a következő volt (1. ábra): puffer tároló edény, perisztaltikus pumpa (Gilson Minipuls3), 2 manuális injektor (20 µl mintabemérő hurok, Rheodyne 7725i, Cotati, CA), plexi alapanyagú enzimcella és egy vékonyrétegű amperometriás cella (Model. 5040, ESA, USA) összekapcsolva egy elektrokémiai detektorral (Coulchem III, ESA, USA) s digitális jelfeldolgozó egységgel (személyi számítógép), Assistant<sup>®</sup> vízfürdő, digitális kontakt-hőmérő.



1.ábra: Az alkalmazott FIA rendszer sematikus ábrája



2.ábra: A 2 injektoros készülék összeállítással kapott csúcsok 100 µM aszkorbinsav cella előtti és cella utáni injektálásával. A csúcsalakok nagy különbsége miatt a digitális jelfeldolgozás elengedhetetlen.

Az állandó munkapotenciált az amperometriás cellába beépített referenciaelektród biztosította. A jelek digitális jelfeldolgozása (2. ábra) után a kiértékeléshez Agilent Chemstation® programot használtunk.

UV-látható spektrofotometria: Az L-aszkorbinsav oldat stabilitásának méréséhez 265 nm-hez tartozó elnyelést figyeltük meg, mivel az oxidációs folyamatok során bekövetkező L-aszkorbinsav csökkenése jól nyomon követhető ezen csúcs nagyságának változásain.

Ciklikus voltametria: Az impedimetriás immunoszenzor fejlesztéséhez alkalmazott nyomtatott elektrodok munkaelektrodjának előkezelését a grafitfelszín módosítása előtt 10 ciklus ciklikus voltametriával végeztük a -0,5 V és 1,1 V közti tartományban, 0,1 V/mp pásztázással, 0,01 V potenciál lépésközzel 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-ban. A kondicionálás szükségessége a mérések reprodukálhatósága és összehasonlíthatósága szempontjából volt jelentős.

Kronoamperometria: Az elektródfelületen lejátszódó immunoreakció után az impedimetriás mérési módszer jelerősítéséhez ezüst elektroülepítését végeztük a nyomtatott elektródon. Az elektroülepítést katalizálta az antitestekhez kapcsolódó kolloidális arany jelenléte. Az ezüstréteg elektroülepítése -110 mV-on történt 45 mp-ig. Az adott időintervallum alatt egyenletes ezüstréteg alakult ki a munkaelektród felületén.

Elektrokémiai impedancia spektroszkópia (EIS): Az EIS hatékony módszer a vezető tulajdonságú anyagok és felületek tanulmányozásában, melynek során gerjesztő áramot vagy feszültséget irányítunk a munkaelektrodra, s az erre adott válasz reakciókat vizsgáljuk, ami számos információval szolgál a rendszer kinetikai, termodinamikai és mechanikai sajátosságairól. Az impedanciás mérések kivitelezése 0.1 M-os NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> oldatban történt -20 mV-on 10 mV amplitúdóval 1 kHz-től 0.1 Hz-ig 30 pontos elemzéssel (adatfeldolgozás Zview szoftverrel történt).

Lineáris pásztázó voltametria: Az EIS-ben kapott mérési eredmények összefüggésben állnak az elektród felületén elektroülepített ezüst mennyiségével, melynek ellenőrzésére alkalmaztuk a lineáris pásztázó voltametriát 0.1 M-os NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> oldattal -100 mV- 700 mV tartományban 0.05 V/s szkennelési arány és 0.00442 V potenciállépés paraméterek mellett.

A ciklikus voltametriát, a kronoamperometriás, impedimetriás és lineáris pásztázó voltametria méréseket AUTOLAB PGSTAT12 potenciosztáttal végeztük.

### 3. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

Az L-askorbinsav mérésére egy amperometriás detektort és egy enzimreakciót kombináltunk. Az askorbát oxidázt tartalmazó enzimcella egy injektálós átfolyó rendszerrel kapcsolódott az amperometriás detektor üveges szén elektródjához. Kidolgoztuk az amperometriás mérőcellában használt üveges szén elektród megfelelő előkezelési módszerét. A mérések optimalizálása során két minta injektort alkalmaztunk a zavaró háttérjel kiküszöbölésére, egyet az enzimcella előtt és egyet utána. A kapott jelek feldolgozása digitális formában történt. Az enzimcella előtti mintainjektálás jelentette az enzimes ill. a cella utáni a vak askorbinsav jelet, melyek különbsége arányos az askorbinsav tartalommal. Az injektálásokat adott, folyamatos pufferáramlási sebesség mellett végeztük.

Az aflatoxin M<sub>1</sub> mérésére alkalmas bioszenzor fejlesztésnél antitest-antigén kölcsönhatásra alapozott indirekt ELISA típusú kompetíció szolgáltatja a kimutatási alapot. Az előre legyártott kis léptékű (cm) nyomtatott elektródok munkaelektrodján adszorbeáltattuk az aflatoxin M<sub>1</sub> ellen kifejlesztett antitesteket, s a kolloidális arannyal módosított antigének és szabad antigének kompetíciója után ezüst elektroülepítésével erősítettük az impedimetriás jelet, melyek tej mátrixában is jó összefüggést mutattak a szabad antigén koncentrációval.

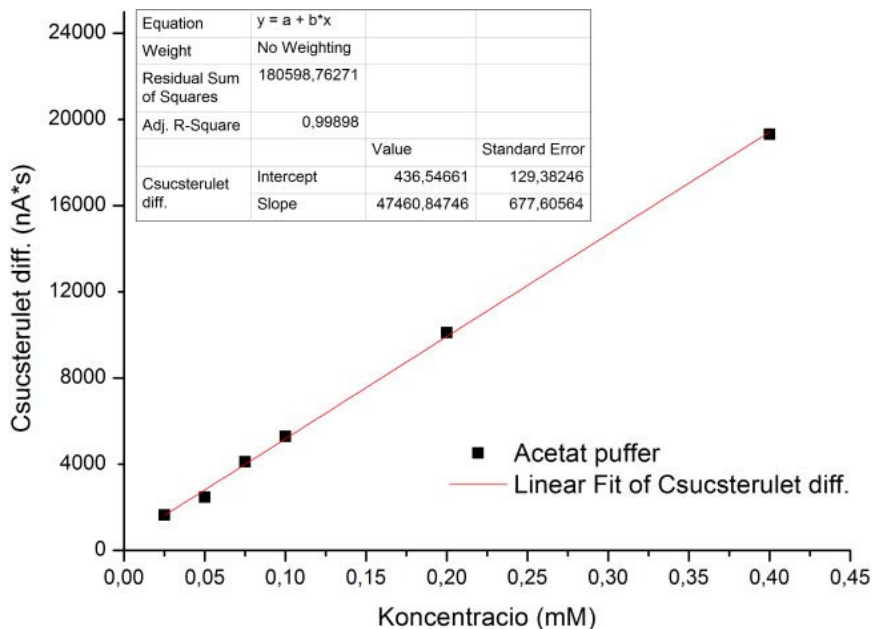
#### 3.1. Aszkorbinsav kalibráció

A bioszenzor alapját képező enzim tulajdonságai a fehérjemembránhoz kötés során megváltoznak, ezért szükséges volt a legnagyobb aktivitás érdekében a megfelelő működési paraméterek megállapítása. A vizsgálatok során a készülék következő paramétereit és azok jelre gyakorolt hatását elemeztük: oxidálási potenciál, áramlási sebesség, puffer pH, cella hőmérséklet, ionerősség, regenerálódási idő. Az optimális paraméterek meghatározása után a pufferes kalibráció a 25-400  $\mu\text{M}$  askorbinsav koncentráció tartományban jó lineáris illeszkedést mutatott  $R^2 = 0.99$  (3. ábra). A relatív standard deviáció (RSD) 5% alatt (5 ismételt mérés, 400  $\mu\text{M}$  konc.) és a detektálási határ (LOD) 5  $\mu\text{M}$  volt.

#### 3.2 Reális minta mérése askorbinsavra

A reális minták mérése esetén a mintában található adott oxidációs potenciálon elektroaktív anyagok adnak amperometriás jelet, azonban az enzim specifikitása biztosítja, hogy a jelek különbsége az askorbinsav koncentrációval arányos. Acetát pufferes kalibrációval multivitamin pezsgótablettát, mint élelmiszer mátrixot vizsgáltuk, melynek 1 tablettájában 60

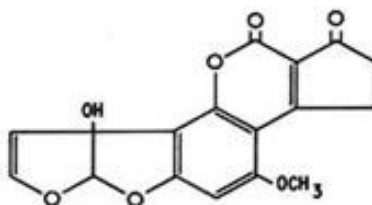
mg aszkorbinsav található. A visszamérés hatékonysága  $96-114\% \pm 5\%$  volt a  $85-340 \mu\text{M}$  vizsgált koncentráció tartományban. A bor és multivitamin ivólé esetén könnyen oxidálható és az elektród felszínét befolyásoló mátrix komponensek (valószínűleg polifenolok) zavaró hatásúak voltak a standard addíciós aszkorbinsav meghatározásra.



**3.ábra:** Az aszkorbát oxidáz alapú bioszenzor kalibráció felvétele a  $25-400 \mu\text{M}$  aszkorbinsav koncentráció tartományban.

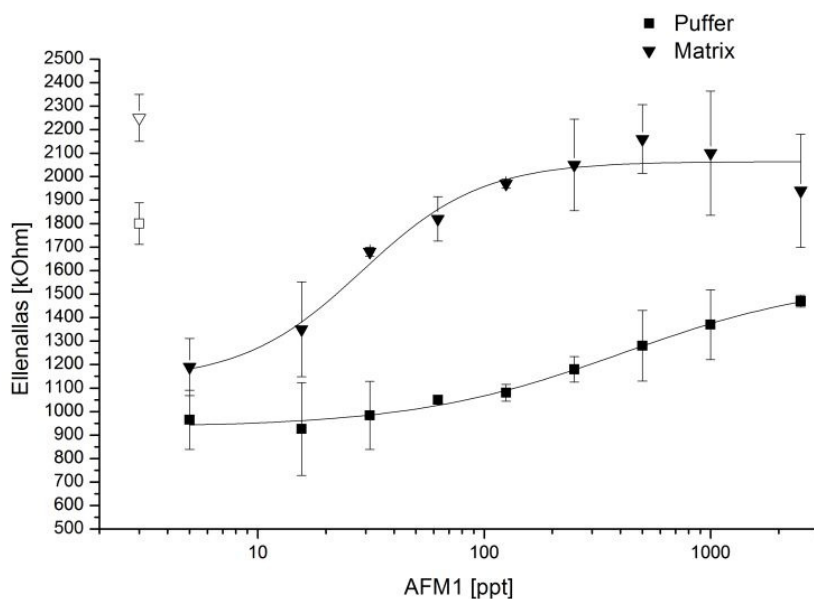
### 3.3 Aflatoxin $M_1$ mérése ezüst jelerősítéssel

Az impedimetriás immunoszenzor esetén arannyal jelölt anti-aflatoxin  $M_1$  antitestek és ezüst elektroülepítésének együttes alkalmazására került sor az aflatoxin  $M_1$  (4. ábra) detektálására.



**4.ábra:** Az aflatoxin  $M_1$  szerkezete

Az indirekt típusú kompetíciós ELISA eljárást nyomtatott elektródok felszínén valósítottuk meg. Az ezüst kronoamperometriás elektroülepítése állandó potenciálon, meghatározott ideig történt a jel erősítése érdekében. A nyomtatott elektródok megfelelő előkezelési módszerét meghatároztuk. Az elektród felszínén történt antitest adszorpciót és blokkolási lépést optimalizáltuk. Kiválasztottuk az ezüst megfelelő ülepítési potenciálját és ülepítési idejét.



**5.ábra: Pufferben és 1/2 v/v tejben (mátrix) kivitelezett AFM<sub>1</sub> kompetíciós reakció eredménye az 5-2000 ng/L tartományban.**

A számított töltésátviteli ellenállás ( $R_{ct}$ ) jó egyezést mutatott az AFM<sub>1</sub> koncentrációjával. A leírásra került AFM<sub>1</sub> immunoszenzor lineáris tartománya 15 és 1000 ng/L közzé tehető (5. ábra) 15 ng/L-nek megfelelő kimutatási határral (RSD= 20%). Az impedimetriás eredmények a kontroll lineáris pásztázó voltametria eredményeivel jó egyezést mutattak.

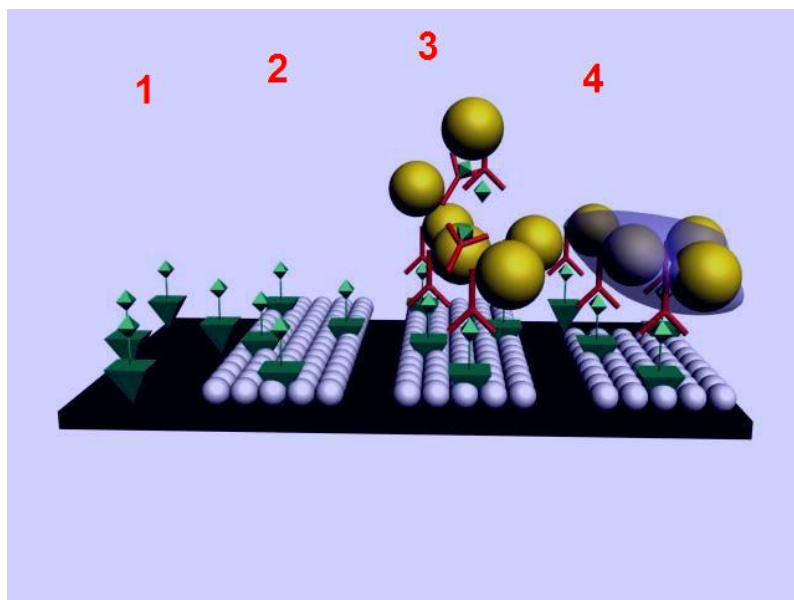
Kísérleteink során be akartuk mutatni, hogy az ezüst irányított elektroülepítése megfelelőbb lehet, mint ezüst redukáló oldatok használata, mert az utóbbiak reprodukálhatóságát jobban befolyásolja az idő, hőmérséklet ingadozás és fény kitétség.

A töltés átviteli ellenállásban bekövetkező változások a felszínen közvetlenül megfigyelhetők impedancia spektroszkópiával. Az ilyen típusú EIS alapú felszín vizsgálatnak megvan az az előnye, hogy elhagyható a redox párok használata a folyamatban, de az így kapott jel érzékenyebb lehet a helyi környezeti tényezőkre, a felszíni és az adszorbeált antitestek által létrehozott réteg hibái nehezen észlelhetők.

### 3.4 Tej mátrixban végzett aflatoxin mérések

A tejben történő mátrix hatás tanulmányozása során töltésátviteli ellenállás növekedés volt megfigyelhető valószínűleg az arannyal jelölt AFM<sub>1</sub> antitesteken adszorbeálódó fehérje komponenseknek köszönhetően. Tej mátrixban a lineáris tartomány egy nagyságrenddel

kisebnek adódott (25–125 ng/L) mint pufferban, és a kimutatási határ 25 ng/L-nek felelt meg. 25, 50 és 100 ng/L-es koncentrációk standard addíciós visszanyerési százaléakai sorrendben 112%, 122%, 115%. A visszamérési hatékonyság átlaga a standard addíciós minták eredményeinek kiértékelése után  $116\pm 6\%$  volt. Az elektród felszín módosítását és a kompetíciós reakciót a 6. ábra szemlélteti.



**6.ábra: A kompetíció után felszínen megkötött kolloidális arany elektrokatalitikus hatása az ezüst ülepítésére. 1- Antigének kötése, 2- Elektródfelszín blokkolása BSA-val, 3- Arannyal jelzett antitest-aflatoxin kompetíció, 4- Ezüst katalitikus ülepítése**

Ez a típusú impedimetriás immunoszenzor elég érzékeny volt, hogy ppt tartományban kimutassa az AFM<sub>1</sub> toxint, azonban a tejben található fehérjék befolyásolták, azaz megemelték a kapott töltésátviteli ellenállásból származó jelet.

#### **4. AZ EREDMÉNYEK VÁRHATÓ HASZNOSÍTÁSI LEHETŐSÉGEI**

A fejlesztett aszkorbát oxidáz alapú bioszenzor továbbfejleszthetővé tehető minden olyan oxidáción alapuló enzim reakció esetére, ahol a kiindulási anyag jól detektálható jelet ad pozitív potenciálon, de a keletkező termékek nem (esetünkben víz, dehidro-aszkorbinsav). Így megfelelő kivitelezés esetén a mérendő komponenstől függően csak az enzimcella kicserélése, új paraméterek beállítása és új kalibráció szükséges az új enzimen alapuló bioszenzor használatához. A viszonylag egyszerű kivitelezés a hordozhatóvá tétel és a miniatürizálás lehetőségét is magában hordozza.

Az aflatoxint tej mátrixban is mérni képes fejlesztés az európai szabványok alapján megadott 25 ng/L határérték felett már képes kimutatni és mennyiségileg meghatározni a toxin mennyiségét, mely a gyerekeknél felhasznált tej gyors és egyszerű ellenőrzését teheti lehetővé. A vizsgálati módszer nyomtatott elektródos kivitele viszonylag olcsó és eldobhatóság lehetőségét erősíti.

## 1. INTRODUCTION, PURPOSE

Analytical chemistry has an important role in terms of understanding chemical and biological processes. The three main directions of development are automation, miniaturization and simplification, in which the development of quick, reliable sensors have great importance. In the last century the main motivation for developing sensors was the increase of selectivity, thus one of the most famous result is the hydrogen selective glass electrode measuring pH. The development of sensors within analytical chemistry is an area, which is directed by the regulations of environment, health and safety. The chemical sensors measuring chemical composition transform the chemical information (concentration, structure) into physico-chemical signal. A chemical sensor has two main parts: material for molecular recognition and physico-chemical transducer unit. The function of recognition unit is dual: providing sensor selectivity through selective interaction and transforming the chemical parameter (generally concentration) into useful, analytical signal, which triggers the transducer. Usually the unit of chemical recognition and transducer is inside of one analytical device.

A subgroup of chemical sensors is biosensor, where the recognition element is of biological origin and the selective recognition step is based on a biological process such as enzyme-substrate, antigen-antibody, receptor-antagonist or nucleic acid hybridization. The most common biological materials in use are enzymes. The transducing can be based on electrochemical (amperometry, potentiometry), optical or reaction heat measurement. Chemical and biosensors based on surface plasmon resonance or weight changes (quartz crystal microbalance) are also made. Important to mention, that the regeneration of sensors and the continuous application is due to reversible reaction mechanisms.

In quality assurance processes there is more and more focus on food quality and freshness from customer and food industry point of view, thus regular chemical and microbiological control analyses are performed on products. These methods such as chromatography, spectrophotometry, electroforesis, titration do not allow continuous and simple analysis. Biosensor could be an offer for the request of cheap, quick, damageless analysis method, where selectivity and specificity can be combined with miniaturization and automation.

Since 2006 one of the research groups of Regional Research Center in Eger at Eszterházy Károly College have been working on biosensor development for food industry focusing on

food components (antioxidants, biogenic amines). The research laboratory mainly uses electrochemical methods (amperometry). In research activities the cooperation with local and foreign groups is inevitable (Lund- Sweden, Perpignan- France). During one of these cooperations the Eötvös Hungarian State Fellowship helped me to work six months in University of Perpignan, South France, where significant immunosensor development is going on.

One of our main purposes was to develop an amperometric biosensor measuring L-ascorbic acid, since the role of antioxidants in preserving food and keeping food quality is remarkable, and their quantification is valuable feedback of food lifetime. After finding the optimal process parameters for the system L-ascorbic acid (antioxidant) real samples were analysed (multivitamin effervescent tablet, multivitamin juice, white wine).

With the help of French research group a development of measurement method for aflatoxin  $M_1$  was another goal. This food-contaminating toxin can be found in milk of mammals after the metabolism of consumed aflatoxin  $B_1$ . The quantification of the toxin is a key question from milk quality and human health point of view. After developing a signal amplification for the method able to detect the toxin the quality and quantity analysis of milk matrix was performed.

## 2. APPLIED ANALYSIS METHODS

Amperometric biosensor: The elements of flow injection analysis system (FIA) were the following (Figure 1.): buffer container, peristaltic pump (Gilson Minipuls3), 2 manual injector (20  $\mu$ l sample loop, Rheodyne 7725i, Cotati, CA), enzymecell made of plexi and thin layer amperometric cell (Model. 5040, ESA, USA) connected with a elektrochemical detector (Coulchem III, ESA, USA) and digital analysing unit (personal computer), Assistant<sup>®</sup> waterbath, digital contact-thermometer.

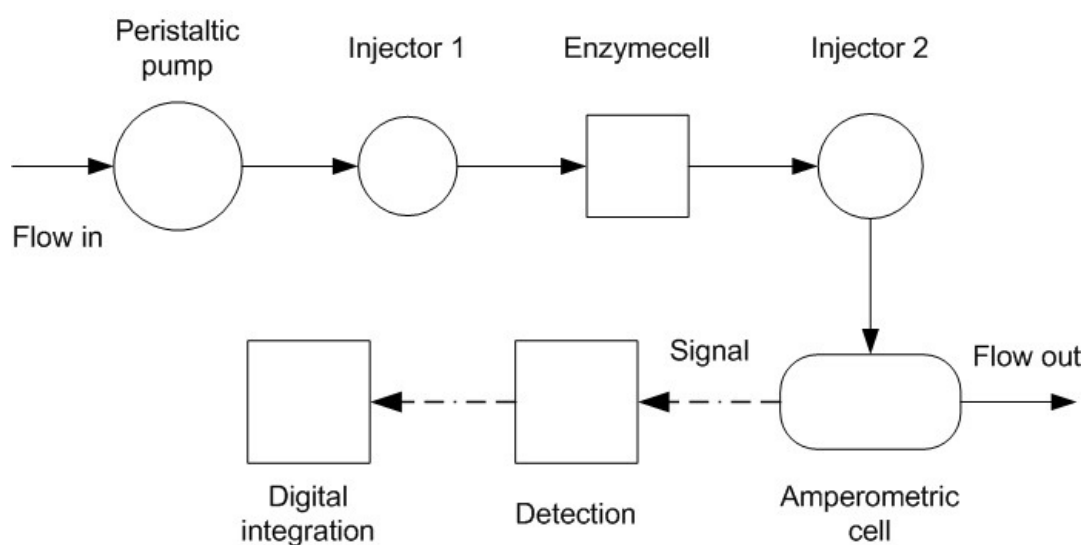
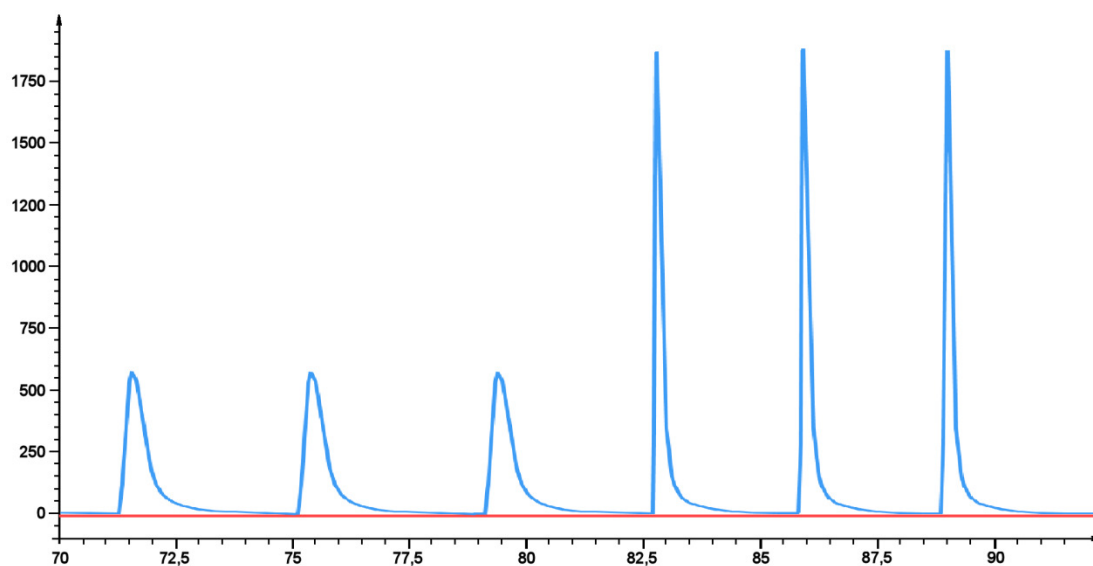


Figure 1.: The schematic drawing of FIA system



2.figure: The peaks of 100  $\mu$ M ascorbic acid given by the system with 2 injectors after injection before and after the enzyme cell. Because of the difference of peak shapes the digital evaluation is inevitable.

The constant working potential was provided by the reference electrode built into the amperometric cell. For the evaluation of digital signals (Figure 2.) Agilent Chemstation<sup>®</sup> software was used.

UV-VIS spectrophotometry: For the measurement of L-ascorbic acid solution stability absorption at 265 nm was followed, since L-ascorbic acid oxidation process can be monitor through the changes of peak at this wavelength.

Cyclic voltametry: The pretreatment of working electrode of screen-printed electrodes used in impedimetric immunosensor was performed with 10 cycles of cyclic voltametry between -0,5 V and 1,1 V potential range, 0,1 V/s scanrate, 0,01 V potential step in 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The need of conditioning was significant from measurement reproducibility and comparability point of view.

Cronoamperometry: For the signal amplification of impedimetric method electrodeposition of silver was performed on the electrode surface after the competition reaction. The electrodeposition was catalysed by the colloidal gold attached to antibodies. The electrodeposition of silver layer was done at -110 mV potential for 45 s. During this time interval an even silverlayer built up on working electrode surface.

Electrochemical impedance spectroscopy (EIS): EIS is efficient method for studying conducting type materials and surfaces. During measurement an exciting potential is superposed on working electrode and the feedback signal is monitored which contains information about kinetic, thermodynamic and mechanical features of system. The impedimetric measurements were made in 0.1 M NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> solution at -20 mV potential with 10 mV amplitude from 1 kHz to 0.1 Hz in 30 point analysis (data processing with Zview software).

Linear sweep voltametry: The measurement results of EIS have a relation to the quantity of silver electrodeposited on electrode surface which was checked by linear sweep voltametry in 0.1 M NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> solution from -100 mV to 700 mV range with 0.05 V/s scan rate and 0.00442 V potential step.

Cyclic voltametry, chronoamperometry, impedimetry and linear sweep voltametry was performed with AUTOLAB PGSTAT12 potentiostat.

### 3. NEW SCIENTIFIC RESULTS

An amperometric detector and an enzymatic reaction were combined for the measurement of L-ascorbic acid. The enzyme cell (containing immobilized ascorbate oxidase) was connected to a flow injection analyzer (FIA) system with a glassy carbon electrode as an amperometric detector. The pretreatment protocol of glassy carbon electrode was found. During optimization and measurements two sample injectors were used, one before and one after the enzyme cell, thus eliminating the background interferences. The signals were digitally processed. Subtraction of the signal area given in the presence of enzyme from the one given in the absence of enzyme was applied for measuring analyte concentrations. Injections were performed in given, continuous buffer flow.

For the detection of aflatoxin M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) an impedimetric immunosensor based on colloidal gold and silver electrodeposition was developed. An indirect like competitive ELISA procedure was performed on screen-printed electrodes (SPEs) in presence of anti-AFM<sub>1</sub> gold-labelled antibodies. Silver was chronoamperometrically electrodeposited at a fixed applied potential and for a determined period of time to amplify the impedimetric signal. The signals also showed good correlation with free aflatoxin concentration in milk matrix.

#### 3.1. Ascorbic acid calibration

The fetures of enzyme change during the binding reaction to protein membrane, so the optimal process parameters were determined for activity as high as possible. During examinations the following parameters and their effect to signal was analysed: oxidation potential, flow speed, buffer pH, cell temperature, ionic strength, regeneration time. After finding the optimal parameters the calibration in buffer showed a good linear fit in 25-400  $\mu\text{M}$  ascorbic acid concentration range  $R^2 = 0.99$  (Figure 3.). The relative standard deviation (RSD) was below 5% (5 times repeated, 400  $\mu\text{M}$  conc.), linearity up to 400  $\mu\text{M}$ , limit of detection (LOD) 5  $\mu\text{M}$ .

#### 3.2 Measurement of real samples

In case of real samples the electroactive components of sample provide the amperometric signal at given oxidation potential, although the specificity of enzyme ensures that the signal differences are directly proportional to ascorbic acid concentration. With calibration in acetate buffer multivitamin effervescent tablet containing 60 mg ascorbic acid, as food matrix was

examined. The recovery efficiency was  $96-113\% \pm 5\%$  in  $85-340 \mu\text{M}$  examined concentration range. At low potential oxidizing and electrode influencing matrix components (probably polyphenols) disturbed the standard addition determination of ascorbic acid in wine and multivitamin juice.

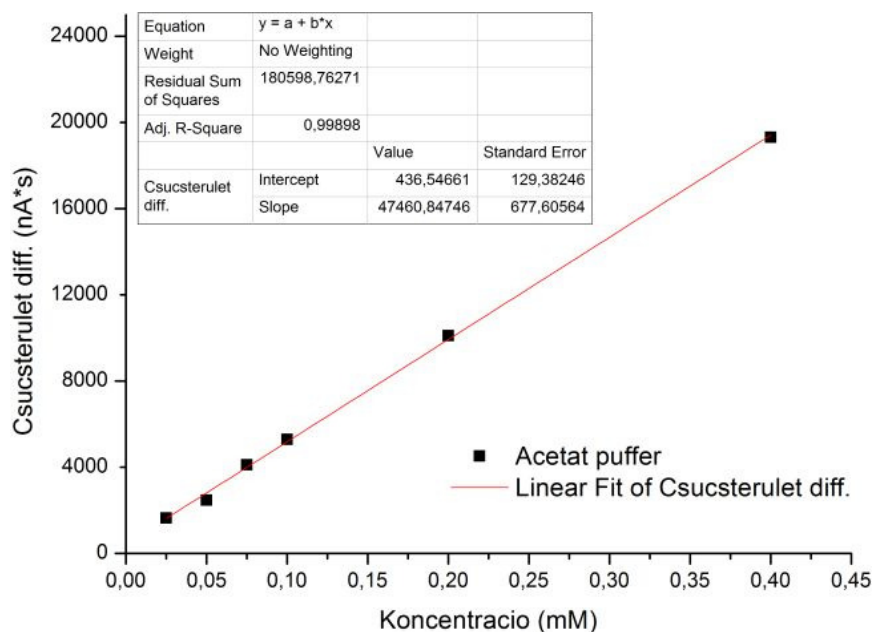


Figure 3.: The biosensor calibration based on ascorbate oxidase in  $25-400 \mu\text{M}$  concentration range.

### 3.3 Measurement of aflatoxin $M_1$ with silver signal amplification

An impedimetric immunosensor based on colloidal gold and silver electrodeposition for the detection of aflatoxin  $M_1$  ( $AFM_1$ ) (Figure 4.) was developed.

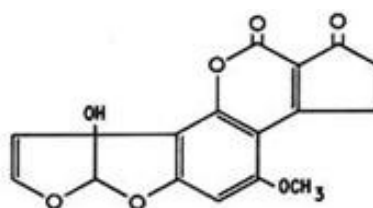
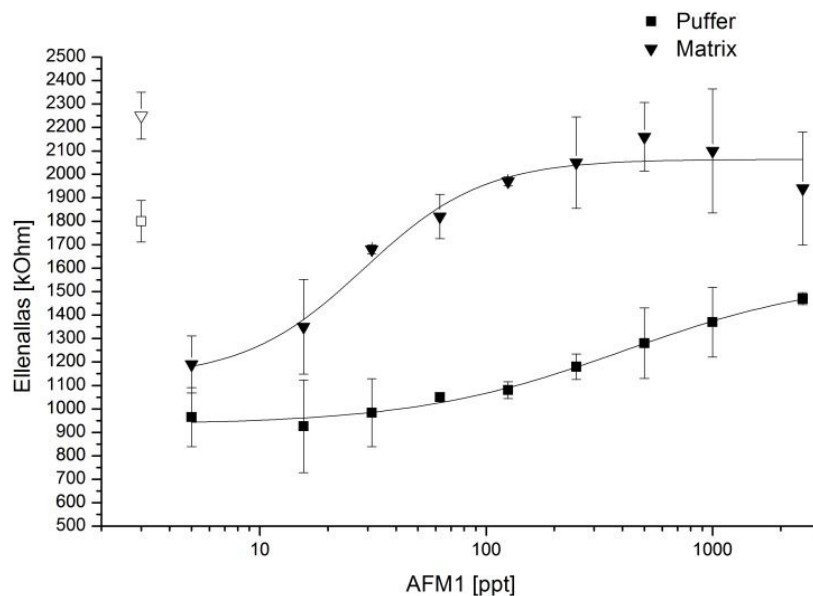


Figure 4.: Structure of aflatoxin  $M_1$

An indirect like competitive ELISA procedure was performed on screen-printed electrodes (SPEs). Silver was chronoamperometrically electrodeposited at a fixed applied potential and for a determined period of time to amplify the signal. The right conditioning method of screen-printed electrodes was found as well as the antibody adsorption and blocking of electrode was optimized. The proper silver electrodeposition time and potential was chosen.



**Figure 5.: Result of AFM<sub>1</sub> competition reaction carried out in buffer and 1/2 v/v milk (matrix) in the range of 5-2000 ng/L.**

The calculated charge transfer resistance ( $R_{ct}$ ) was found to correlate well with the concentration of AFM1. The linear working range of the described AFM1 immunosensor ranged between 15 and 1000 ng/L (Figure 5.) with a limit of detection (LoD) equal to 15 ng/L (R.S.D. = 20%). Impedimetric results were confronted with linear sweep voltametry (LSV) and corresponded well to this technique.

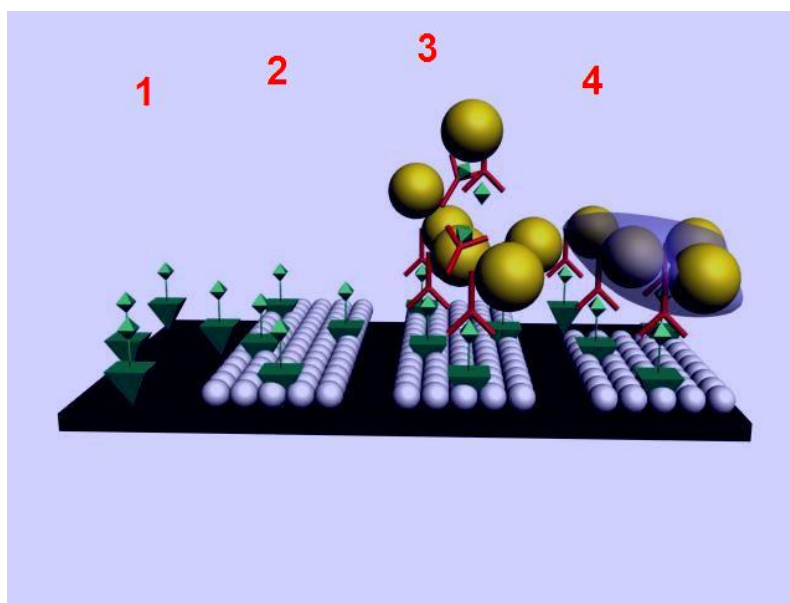
We wanted to demonstrate that the controlled electrochemical deposition of silver is more attractive than the use of silver enhancing solutions, because these are more prone to be influenced by the time and temperature variations, and also by light exposure.

Changes in charge transfer resistance can be detected and interpreted directly from impedance spectroscopy observations at the interface. This type of interface interrogation by EIS has the advantage to eliminate the use of redox species during the process, but in the same time the signal obtained is very sensible to local environmental conditions and because a redox probe is not use, small defects in the layer/layers of adsorbed immunoreagents are not easily detectable.

### 3.4 Aflatoxin measurements in milk matrix

By investigating the matrix effect in milk we observed an increase of charge transfer resistance possibly attributed to the presence of the proteic compounds adsorbed on the gold-labelled AFM<sub>1</sub> antibody. In milk matrix the linear working range was one order of magnitude less (25–125 ng/L) than in buffer, and the limit of detection corresponded to 25 ng/L. The recovery percentages of 25, 50 és 100 ng/L standard addition concentrations were 112%, 122%, 115%. The recovery percentage of spiked samples was evaluated and the mean of recovery was 116±6%.

The modification of electrode surface and the competition reaction demonstrated on Figure 6.



**Figure 6.:** The electrocatalytic effect of bound colloidal gold on silver electrodeposition after competition.

**1- Adsorption of antigens, 2- Blocking of surface with BSA, 3- Competition between gold labelled antibody-aflatoxin, 4- Electrocatalytic deposition of silver**

The developed impedimetric immunosensor was sensitive enough to detect the AFM<sub>1</sub> in ppt range, but was also influenced by the presence of milk proteins which generated an increase of charge transfer resistance.

#### **4. POSSIBLE APPLICATION OF RESULTS**

The biosensor based on ascorbate oxidase could be developed further with all kind of oxidizing enzyme reactions where only the substrate gives a signal on positive potential but the products do not (in our case water and dehydro-ascorbic acid). Thus with proper application only the change of enzyme cell would be necessary depending on the analyte, then after new process parameters settings and calibration the system could be used. The relatively simple design support the possibility of portability and miniaturization.

The method measuring aflatoxin in milk matrix is able to detect and quantify the toxin, thus meets the requirements of detection limit (25 ng/L) in European Regulations. The method makes possible the quick and simple control measurement of milk used for children. The screen-printed design provides a relatively cheap and disposable analysis method.

## 5. Tudományos publikációk (Publications)

### Az értekezéshez kapcsolódó közlemények (articles connected to the thesis)

1. **Víg Attila**, Iglói Attila, Adányi Nóra, Bóka Beáta, Csutorás Csaba, Kiss Attila: Élelmiszer minták mérésére alkalmas aszkorbinsav bioszenzor fejlesztése FIA (flow injection analysis) rendszerben, Developing of ascorbic acid biosensor in FIA (flow injection analysis) system suitable for food samples, **Erdélyi Műszaki Szemle (2007) 39-40. p. 88**
2. **Attila Víg**, Attila Iglói, Nóra Adányi, Gyöngyi Gyémánt, Csaba Csutorás, Attila Kiss: Measuring antioxidants in food with biosensor techniques, microCAD 2008 **International Scientific Conference Papers, Miskolc (2008), pp. 63-68**
3. **Attila Víg**, Antonio Radoi, Xavier Munoz-Berbel, Gyongyi Gyemant, Jean Louis Marty: Impedimetric aflatoxin M<sub>1</sub> immunosensor based on colloidal gold and silver electrodeposition, **Sens. Act. B 134 (2009) p. 214-220 Impact: 3.083**
4. **Attila Víg**, Xavier Munoz-Berbel, Antonio Radoi, Montserrat Cortina-Puig, Jean Louis Marty: Characterization of the gold catalysed deposition of silver on graphite screen printed electrodes and their application to the development of impedimetric immunosensors, **Talanta 80 (2009), issue 2, p. 942-946 Impact: 3.29**
5. **Attila Víg**, Attila Igloi, Nora Adanyi, Gyongyi Gyemant, Csaba Csutoras, Attila Kiss: Development and characterization of a FIA system for selective assay of L-ascorbic acid in food samples, **Bioprocess Biosyst. Eng., (published online 2010), DOI: 10.1007/s00449-010-0418-6 Impact: 1.823**

**Össz impakt faktor: 8,196**

### Az értekezés témájához kapcsolódó konferencia előadások és poszterek:

1. **VÍG Attila, IGLÓI Attila, ADÁNYI Nóra, BÓKA Beáta, CSUTORÁS Csaba, KISS Attila** *Aszkorbát oxidáz alapú aszkorbinsav bioszenzor fejlesztése FIA (flow injection analysis) rendszerben* **XXII. Nemzetközi Vegyészkonferencia, Csíkszereda, Erdély, 2006 október (poszter)**
2. **VÍG Attila, IGLÓI Attila, ADÁNYI Nóra, CSUTORÁS Csaba, KISS Attila** *L-Aszkorbinsav mérésére alkalmas aszkorbát oxidáz bioszenzor fejlesztése FIA (flow injection analysis) rendszerben* **Centenáriumi Vegyészkonferencia, Sopron, 2007 május (poszter)**

3. Iglói Attila, Víg Attila, Adányiné Kisbocskói Nóra, Csutorás Csaba, Kiss Attila *Glassy carbon elektród előkezelési eljárásainak kidolgozása szulfít bioszenzor kifejlesztésére* **Centenárium Vegyészkonferencia, Sopron, 2007 május (poszter)**
4. A. VÍG, A. IGLOI, N. ADANYI, Gy. GYÉMÁNT, Cs. CSUTORÁS, A. KISS *Development of Ascorbate Oxidase Based Biosensor for Measuring Food Samples* **Relatenz 2007, Nemzetközi Enzimtechnológiai Konferencia, University of Matanzas, Matanzas, Kuba, 2007 június (poszter)**
5. Attila Igloi, Attila Vig, Nora Adanyi, Csaba Csutoras, Attila Kiss *Development of a sulfite oxidase based amperometric biosensor used in FIA system for the determination of sulfite* **Euroanalysis XIV, Antwerpen, Belgium, 2007 szeptember (poszter)**
6. VÍG Attila, IGLÓI Attila, ADÁNYINÉ Kisbocskói Nóra, CSUTORÁS Csaba, KISS Attila *FIA rendszerű aszkorbát oxidáz bioszenzor fejlesztése L-askorbinsav meghatározására* **Környezetvédelmi Analitikai és Technológiai Konferencia, Eger, 2007 október (poszter)**
7. Víg Attila, Iglói Attila, Adányi , Gyémánt , Csutorás Csaba, Kiss Attila *Új analitikai eljárás fejlesztése élelmiszer antioxidánsok vizsgálatára- Development of new analytical procedure for investigation of food antioxidants* „Lippay János – Ormos Imre - Vas Károly Tudományos Ülésszak”, **Corvinus Egyetem, Budapest, 2007. november (poszter)**
8. Víg Attila, Iglói Attila, Csutorás Csaba, Kiss Attila, Szováti Katalin *C-vitamin sorozatmérésére alkalmas új analitikai mérő-műszer kifejlesztése* **XVI. Élelmiszer Minőségellenőrzési Tudományos Konferencia, Tihany, 2008. április (poszter)**
9. Attila Vig, Xavier Munoz-Berbel, Antonio Radoi, Jean-Louis Marty *Impedimetric detection of aflatoxin M<sub>1</sub> with biomolecular interaction using colloidal gold* **XII Trobada Transfronterera Andorra 2008, 2008 szeptember (előadás)**