

# IMPEDANCE SPECTROSCOPY OF ELECTROCHEMICAL MICROSENSORS

**Václav Feber**

Master Degree Programme (2), FEEC BUT

E-mail: xfeber01@stud.feec.vutbr.cz

Supervised by: Jaromír Hubálek

E-mail: hubalek@feec.vutbr.cz

## ABSTRACT

The aim of this work was focused on the determination of pesticides concentration in water solution. Pesticides are indissoluble in aqueous solutions and impedance or voltametric/ampereometric response of the pure water and water with pesticides is identical. Therefore was necessary find a way how rapidly, effectively and economically measure the pesticides concentration. One way is measurement of conductivity with electrochemical microsensors after enzymatic reaction.

## 1. ÚVOD

Práce se zabývá impedančním chováním mikroelektrod a jeho využití pro měření koncentrace pesticidů v roztoku vody. Pesticidy vykazují hydrofobní chování, a proto jsou ve vodě téměř nerozpustné. Nemohou proto ani ovlivnit impedanční chování roztoku a měření jejich koncentrace pomocí elektrochemických mikrosenzorů je přímou cestou nemožné.

Řešením je využití mikrobiálních enzymů haloalkan dehalogenázy (dále jen enzymy), které štěpí vazbu uhlík-halogen v halogenovaných sloučeninách a nahrazují halový prvek hydroxylovou skupinou z vodní molekuly. Pro všechna měření byl použit 1-chlorhexan  $C_6H_{13}Cl$  (dále jen chlorhexan), jakožto zástupce pesticidu.

## 2. ROZBOR

Pokud srovnáme molární hmotnost enzymu a chlorhexanu zjistíme, že je zde rozdíl o dva řády. Přibližně stejný je pak rozdíl obou molekul. Navíc povrch dehalogenázy je také velmi hydrofobní a molekuly chlorhexanu k sobě přirozeně přitahuje. Povrch molekuly enzymu spolu s přitahovaným chlorhexanem je znázorněn na Obr. 1. Je zde patrný útvar podobný kapse, který je zakončený tunelem vyústěným na povrchu molekuly (označeno šipkami). Do něj je právě vtahována molekula chlorhexanu. Povrch kapsovitého útvaru je pokryt halogenid-stabilizujícími rezidui Asn, Trp, Pro, His, Glu a dalšími (v obrázku znázorněno červeně a modře). Po přilnutí molekuly chlorhexanu k povrchu pokrytému rezidui se spouští složitá chemická reakce, která je obecně znázorněna níže (1).

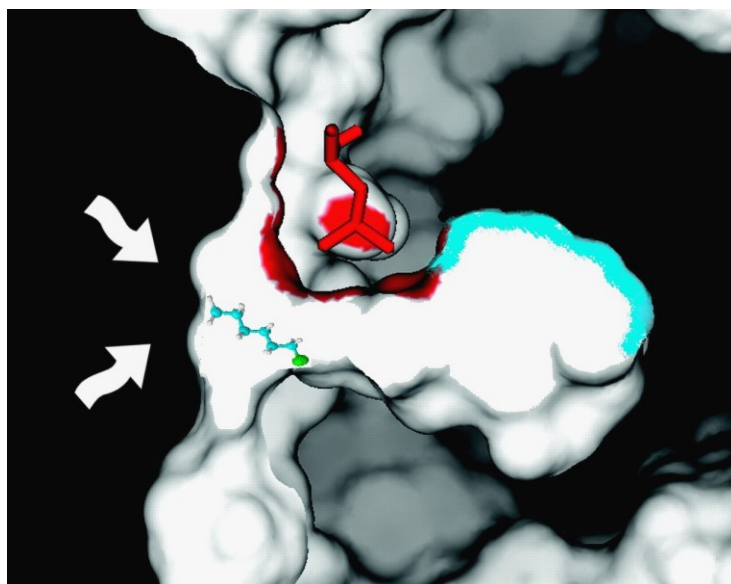


Na konci reakce vystupuje volný iont halového prvku, v našem případě chlóru (na obrázku znázorněn zeleně), zbytek halogen-uhlíku a nespotřebovaný enzym, který zde funguje jako katalyzátor.

Díky volným chloridovým iontům se zvýší vodivost roztoku a tuto změnu je možné naměřit pomocí vyrobeného elektrochemického mikrosenzoru. [1]

## 2.1. PŘÍPRAVA SENZORŮ

Jako senzor byla použita hřebínková elektroda, která byla zhotovena z chemicky velmi odolné platiny tlustovrstvou technologií. Senzor je vyroben na keramickém substrátu metodou tlustých vrstev. Jednotlivé vrstvy byly nanášeny na síťotiskovém poloautomatu



Obrázek 1: Povrch enzymu haloalkan dehalogenázy.

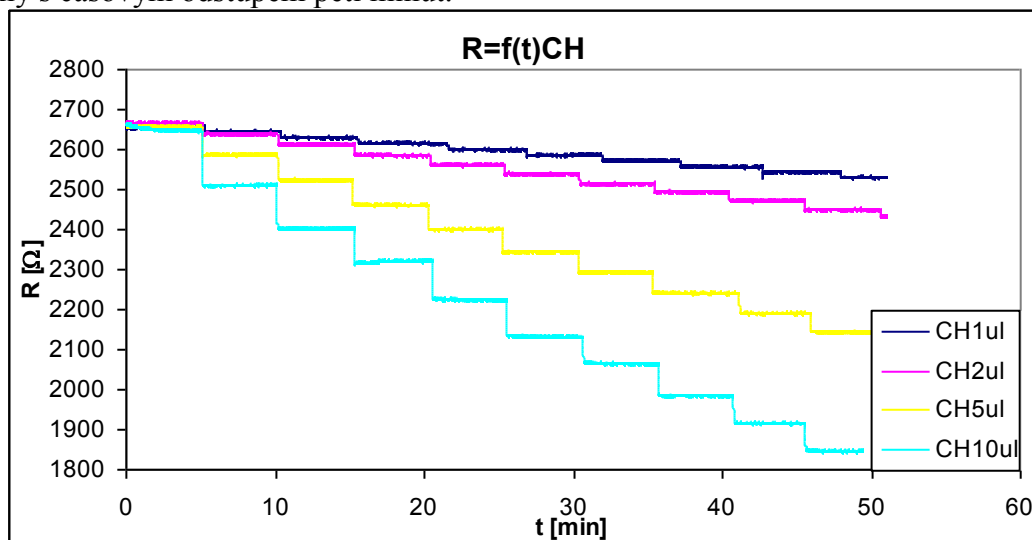
v tomto sledu:

1. vodivá vrstva (přívody k elektrodám), Ag-Pd pasta: ESL9562G
2. elektrody, Pt pasta: ESL5545
3. dvojitá krycí vrstva, dielektrická pasta: ESL4901

Ve stejném sledu byly jednotlivé vrstvy postupně zasušovány a vypalovány. Nakonec byl keramický substrát nařezán laserovou řezačkou na jednotlivá čidla. Povrch elektrod byl poté galvanicky modifikován platinou.

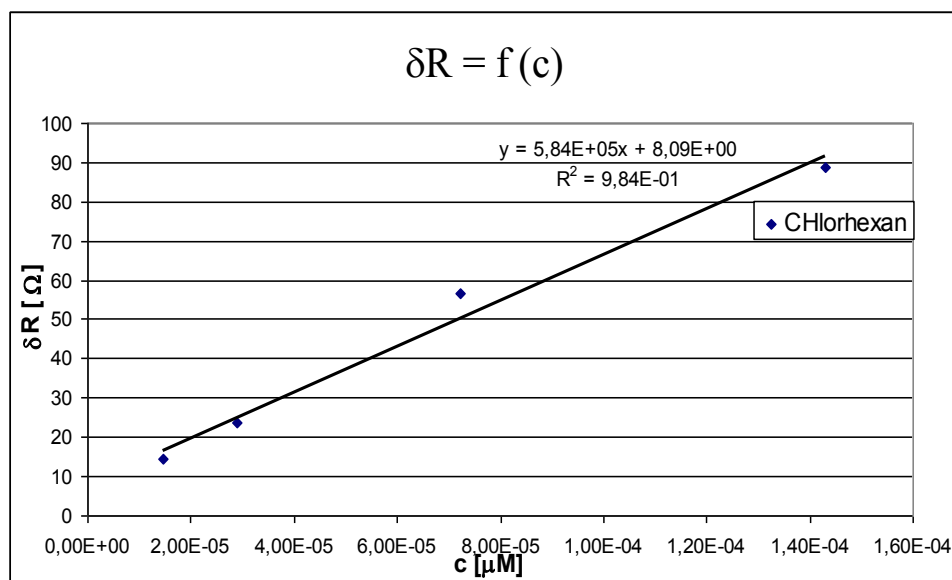
## 2.2. MĚŘENÍ KONCENTRACE

Do roztoku pufru ohřátého na teplotu 25°C byl za stálého míchání přidáván roztok enzym-fosfátový pufr-chlorhexan. Tyto roztoky byly postupně přidávány v dávkách o objemu 20  $\mu\text{l}$  avšak o různých koncentracích. V tomto roztoku byla provedena měření pomocí  $\mu\text{konduktometru}$ . Ten byl připojen přes USB rozhraní k PC a naměřené hodnoty byly ukládány do souborů. Do základního roztoku pufru byly přidávány přídavky, takže se koncentrace enzymu v pufru postupně zvyšovala a hodnota naměřeného odporu postupně klesala. Po vynesení naměřených hodnot do grafu byly získány následující průběhy (Obr. 2). Jednotlivé křivky odpovídají přídavkům výše zmíněných koncentrací, které byly do roztoku postupně přidávány s časovým odstupem pěti minut.



Obrázek 2: I Časové průběhy naměřených hodnot odporů v roztoku enzym-chlorhexan.

přestože jednotlivá měření vycházela pokaždé z čistého pufru, je možné vidět jistý rozptyl ve velikosti poklesu hodnoty odporu se změnou koncentrace. Ten je způsoben nárůstem velikosti objemu měřeného roztoku o jednotlivé přídávky. Celkově se tedy změnil objem z původních 5 ml na 5,2 ml. Proto je nutné před dalším zpracováním hodnot provést korekci. Poté je možné vynést průběh rozdílu změn odporu mezi přídávkem bez chlorhexanu a s chlorhexanem v závislosti na koncentraci do grafu. Průběh pro roztok chlorhexanu s enzymem je zobrazen na Obr. 3.



**Obrázek 3:** Závislost změny odporu na koncentraci.

### 3. ZÁVĚR

Měření koncentrace pesticidů je v současné době možná jen pomocí zdlouhavých laboratorních metod. Proto bylo měření provedeno novým způsobem s využitím spojení mikrosenzoru a enzymu haloalkan dehalogenázy. Výsledky ukazují poměrně dobrou citlivost s limitem detekce na úrovni ppm [3].

### 4. PODĚKOVÁNÍ

Práce vznikla za podpory GAAV 1QS201710508 a Výzkumného záměru MSM 0021630503 MIKROSYN.

### 5. LITERATURA

- [1] Feber, V.; Hubálek, J. Impedance spectroscopy of electrochemical microsensors. In *Proceeding of EDS'08 IMAPS CZ Conference*. Brno, 2008, s. 157-160
- [2] Monincova, M., Prokop, Z., Vevodova, J., Nagata, Y., Damborsky, J., 2007: Weak Activity of Haloalkane Dehalogenase LinB with 1,2,3-Trichloropropane Revealed by X-ray Crystallography and Microcalorimetry. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 2005-2008.
- [3] Hubálek, J.; Feber, V.; Hrdý, R.; Kuchta, R.; Stehlík, J.; Adam, V.; Kizek, R.; Fajcik, L.; Prokop, R. New Microchip Performing Bipolar Pulse Technique for Conductometric Pesticides Detection. In *EUROSENSORS XXII 2008*. Dresden, 2008. p. 1022-1024.