

**ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**



**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**ΣΤΗ ΧΗΜΕΙΑ**  
**ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ «ΠΡΟΧΩΡΗΜΕΝΗ ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ»**  
**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΣΚΟΡΒΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ**  
**ΜΕ ΧΗΜΙΚΑ ΜΟΡΦΟΠΟΙΗΜΕΝΟ, ΜΕ dsDNA, ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΟ**  
**ΠΑΣΤΑΣ ΑΝΘΡΑΚΑ**

**ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ Χ. ΣΟΥΡΟΥΤΖΙΔΗΣ, ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΣΤΕΛΛΑ ΓΗΡΟΥΣΗ**

**ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2017**

**ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**



**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**ΣΤΗ ΧΗΜΕΙΑ**  
**ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ «ΠΡΟΧΩΡΗΜΕΝΗ ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ»**  
**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΣΚΟΡΒΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ**  
**ΜΕ ΧΗΜΙΚΑ ΜΟΡΦΟΠΟΙΗΜΕΝΟ, ΜΕ dsDNA, ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΟ**  
**ΠΑΣΤΑΣ ΑΝΘΡΑΚΑ**

**ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ Χ. ΣΟΥΡΟΥΤΖΙΔΗΣ, ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΣΤΕΛΛΑ ΓΗΡΟΥΣΗ**

**ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2017**

**ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**



**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**ΣΤΗ ΧΗΜΕΙΑ**

**ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ «ΠΡΟΧΩΡΗΜΕΝΗ ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ»**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΣΚΟΡΒΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ  
ΜΕ ΧΗΜΙΚΑ ΜΟΡΦΟΠΟΙΗΜΕΝΟ, ΜΕ dsDNA, ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΟ  
ΠΑΣΤΑΣ ΑΝΘΡΑΚΑ**

**ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ Χ. ΣΟΥΡΟΥΤΖΙΔΗΣ, ΧΗΜΙΚΟΣ Α.Π.Θ.**

Εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Τομέα Φυσικής  
Αναλυτικής και Περιβαλλοντικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του  
Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Καθηγήτρια ΣΤΕΛΛΑ ΓΗΡΟΥΣΗ - Επιβλέπτουσα Καθηγήτρια

Καθηγητής ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΖΑΧΑΡΙΑΔΗΣ - Μέλος εξεταστικής επιτροπής

Καθηγητής ΑΡΙΣΤΕΙΔΗΣ ΑΝΘΕΜΙΔΗΣ - Μέλος εξεταστικής επιτροπής

Η τριμελής εξεταστική επιτροπή που ορίστηκε σύμφωνα με την απόφαση της Γ.Σ.Ε.Σ. του Τμήματος στη συνεδρίασή της αριθμ. 645/15-09-2017, για την κρίση της Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας του Αναστάσιου Σουρουτζίδη, Χημικού, συνήλθε σε συνεδρίαση στο Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης την 25/10/2017, όπου παρακολούθησε την υποστήριξη της εργασίας με τίτλο «Ηλεκτροχημικός προσδιορισμός ασκορβικού οξέος με χημικά μορφοποιημένο, με dsDNA, ηλεκτρόδιο πάστας άνθρακα» και την ενέκρινε με βαθμό επτά (07).



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πρόλογος.....	9
<b>I. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>12</b>
<b>1. ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ .....</b>	<b>12</b>
<b>1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>12</b>
<b>1.2 ΒΟΛΤΑΜΜΕΤΡΙΑ .....</b>	<b>16</b>
1.2.1 Γενικά .....	16
1.2.2 Ηλεκτροχημικές κυψέλες και αντίσταση κυψέλης στη βολταμετρία .....	18
1.2.3 Ηλεκτρόδια εργασίας που χρησιμοποιούνται στην βολταμετρία...21	
<b>1.3 ΠΟΛΑΡΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>24</b>
<b>1.4 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΣΑΡΩΣΗΣ ΤΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ .....</b>	<b>25</b>
1.4.1 Βολταμμετρία γραμμικής σάρωσης του δυναμικού .....	25
1.4.2 Παλμική βολταμμετρία.....	25
1.4.3 Κανονική παλμική βολταμμετρία .....	26
1.4.4 Διαφορική παλμική βολταμμετρία.....	26
1.4.5 Κυκλική βολταμμετρία.....	28
<b>1.5 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΔΙΑΛΥΣΕΩΣ.....</b>	<b>30</b>
1.5.1 Ανοδική Αναδιαλυτική Βολταμμετρία.....	30
1.5.2 Καθοδική Αναδιαλυτική Βολταμμετρία .....	31
1.5.3 Προσροφητική Αναδιαλυτική Βολταμμετρία.....	32
1.5.4 Προσροφητική βολταμμετρία αλλαγής μέσου .....	34
<b>1.6 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΑΝΑΔΙΑΛΥΤΙΚΗ ΒΟΛΤΑΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ .....</b>	<b>34</b>
1.6.1 Ο φέρων ηλεκτρολύτης .....	34
1.6.2 Επίδραση pH.....	35
1.6.3 Επίδραση συμπλεκτικών μέσων .....	36
1.6.4 Επίδραση χρόνου και δυναμικού προσροφήσεως .....	37
1.6.5 Επίδραση αλάτων .....	37
1.6.6 Επίδραση τασενεργών ουσιών και οργανικών διαλυτών.....	38

<b>2. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ DNA.....</b>	<b>39</b>
<b>2.1 ΝΟΥΚΛΕΪΚΑ ΟΞΕΑ ΚΑΙ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ.....</b>	<b>39</b>
<b>2.2 ΔΟΜΗ ΤΟΥ DNA .....</b>	<b>43</b>
2.2.1 Οι A, B και Z DNA δομές.....	46
<b>2.3 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ.....</b>	<b>47</b>
<b>2.4 ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ DNA ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ.....</b>	<b>48</b>
<b>2.5 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ DNA .....</b>	<b>48</b>
<b>2.6 ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ ΤΟΥ DNA ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΤΗΝ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ .....</b>	<b>49</b>
<b>2.7 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΟΥ DNA .....</b>	<b>50</b>
<b>3. ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ.....</b>	<b>51</b>
<b>3.1 ΟΡΙΣΜΟΣ–ΑΡΧΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΕΙΑΣ.....</b>	<b>51</b>
<b>3.2 ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΟΙ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ.....</b>	<b>53</b>
<b>3.3 ΑΜΠΕΡΟΜΕΤΡΙΚΟΙ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ.....</b>	<b>55</b>
3.3.1 Αρχή λειτουργίας.....	55
3.3.2 Κατασκευή των αμπερομετρικών βιοασθητήρων .....	57
<b>3.4 ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΟΙ DNA ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ.....</b>	<b>60</b>
<b>4. ΑΝΑΓΩΓΗ, ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΤΑ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΑ .....</b>	<b>62</b>
<b>4.1 ΗΛΕΚΤΡΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ.....</b>	<b>62</b>
4.1.1 Αναγωγή.....	62
4.1.2 Οξείδωση .....	63
4.1.3. Τεχνικές αναδιάλυσης.....	65
<b>4.2 ΗΛΕΚΤΡΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ.....</b>	<b>67</b>
4.2.1 Αναγωγή.....	67
4.2.2 Οξείδωση .....	67
4.2.3 Αλλαγές στη δομή του DNA .....	69
4.2.4. Προσροφητικές αναδιαλυτικές τεχνικές.....	70
4.2.5 DNA-τροποποιημένα ηλεκτρόδια.....	71
4.2.6 Προσρόφηση σε ηλεκτρόδια άνθρακα.....	73

5. BITAMINEΣ.....	74
5.1 BITAMINH C (ΑΣΚΟΡΒΙΚΟ ΟΞΥ) .....	75
5.2 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΣΤΗΝ ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ ΤΟΥ ΑΣΚΟΡΒΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ .....	75
5.3 ΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΑΣΚΟΡΒΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ.....	76
5.4 ΠΗΓΕΣ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ C.....	79
5.5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΟΥ ΑΣΚΟΡΒΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ.....	81
6. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....	82
II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	83
7. ΟΡΓΑΝΑ – ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ – ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ.....	83
7.1 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ .....	83
7.2 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ.....	84
8. ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΣΚΟΡΒΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΕ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΟ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΟ ΠΑΣΤΑΣ ΑΝΘΡΑΚΑ (CPE) ΜΕ dsDNA.....	85
8.1 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΩΝ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....	85
8.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....	85
8.3 ΒΟΛΤΑΜΜΕΤΡΙΚΗ ΣΥΝΠΕΡΙΦΟΡΑ ΤΟΥ ΑΣΚΟΡΒΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΤΑ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΑ CPE ΚΑΙ dsDNA-CPE.....	86
8.4 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΡΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΔΙΑΛΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΣΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΟΥ ΑΣΚΟΡΒΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΤΟ dsDNA-CPE .....	88
8.5 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΛΑΤΩΝ ΣΤΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΔΙΑΛΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΣΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΟΥ ΑΣΚΟΡΒΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΤΟ dsDNA-CPE .....	89
8.6 ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΤΟΥ ΟΡΓΑΝΟΥ ΣΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΟΥ ΑΣΚΟΡΒΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΤΟ dsDNA-CPE.....	91

<b>8.7. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΠΡΟΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΟΥ ΑΣΚΟΡΒΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΤΟ dsDNA-CPE.....</b>	<b>93</b>
8.7.1 Επίδραση του δυναμικού προσυγκέντρωσης .....	93
8.7.2 Επίδραση του χρόνου προσυγκέντρωσης .....	94
<b>8.8. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΕΠΙΔΟΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ .....</b>	<b>96</b>
<b>III. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>100</b>
<b>IV. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>101</b>



## Πρόλογος

Εξαιτίας του σημερινού περιβάλλοντος και τρόπου ζωής υπάρχει μια αυξανόμενη ανάγκη για περισσότερο εύχρηστες, σταθερές, γρήγορες και σχετικά οικονομικές τεχνολογίες. Οι τεχνολογίες αυτές θα διευκόλυναν την ανάλυση δειγμάτων πεδίου ('on-site' ανάλυση), με αποτέλεσμα τον περιορισμό του αριθμού των δειγμάτων που θα αποστέλλονταν για περαιτέρω ανάλυση στο εργαστήριο. Συνεπώς, υπάρχει σαφής ανάγκη για απλούστερα, εναλλακτικά συστήματα ανάλυσης που επιτρέπουν την καταγραφή αποτελεσμάτων πραγματικού χρόνου (real-time) και στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι βιοαισθητήρες.

Η ανάπτυξη των βιοαισθητήρων, κατά κύριο λόγο, υπαγορεύτηκε από τις ανάγκες της ιατρικής διάγνωσης καθώς και η ταχεία ανάλυση των κλινικών δειγμάτων. Οι βιοαισθητήρες, όμως, μπορεί να αξιοποιηθούν με επιτυχία και σε άλλους τομείς, όπως η κτηνιατρική, η αναπαραγωγή των ζώων, ο έλεγχος των τροφίμων και η προστασία του περιβάλλοντος. Η βιομηχανία διαγνωστικών μέσων είναι πολυποίκιλη και εξυπηρετεί αγορές με απαιτήσεις για διαφορετικά προϊόντα. Οι κύριες παράμετροι που επηρεάζουν την αγορά είναι: η τιμή του εξοπλισμού και των αναλώσιμων για την εφαρμογή της μεθόδου, η ακρίβεια, η ευαισθησία, ο αριθμός των απαιτούμενων παραμέτρων για τη διενέργεια της μέτρησης, η ταχύτητα και η φορητότητα του εξοπλισμού.

Οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες έχουν τη δυνατότητα να ανιχνεύουν το ηλεκτροχημικό σήμα μίας οξειδοαναγωγικής αντίδρασης που προκύπτει από την πρόσδεση του βιοϋποδοχέα με τον αναλύτη και να το μετατρέπουν σε μετρήσιμο σήμα. Ο βιοϋποδοχέας αφενός επιλέγεται αναλόγως τη χρήση του αισθητήρα. Ωστόσο, πρέπει αφετέρου να επιλεγθεί και η τεχνική εναπόθεσης αυτού πάνω στην επιφάνεια του αισθητήρα.

Ακίνητοποίηση βιομορίων σε μια επιφάνεια ονομάζεται η διαδικασία της σύνδεσης ενός βιομορίου σε κάποιο υπόστρωμα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση ή την απώλεια της κινητικότητάς του. Για την καθήλωση μιας βιολογικής οντότητας σε μια επιφάνεια, είναι απαραίτητη η σύνδεση μιας ομάδας της βιολογικής ουσίας με μια ομάδα της επιφάνειας.

Η επιλεκτική ακίνητοποίηση βιομορίων αποτελεί τεχνολογία που βρίσκει εφαρμογές σε κλάδους της βιοτεχνολογίας και της βιοϊατρικής. Έτσι, καθίσταται

δυνατή η δημιουργία βιοαναλυτικών διατάξεων με εφαρμογές που εκτείνονται από τη βασική βιολογική έρευνα μέχρι τη διαγνωστική. Σημαντική παράμετρος είναι η δημιουργία κατάλληλα τροποποιημένων επιφανειών μέσω της ακινητοποίησης βιομορίων με τέτοιο τρόπο, ώστε να επιτευχθούν η ευαισθησία, η επιλεκτικότητα και η διάρκεια ζωής.

Η τροποποίηση επιφανειών μέσω της ακινητοποίησης βιομορίων, βρίσκει εφαρμογές σε πολλούς κλάδους, όπως η βιοϊατρική, η βιοχημεία και η ανοσοχημεία. Βιομόρια που έχουν ενδιαφέρον και επιλέγονται συχνά για καθήλωση σε μια επιφάνεια περιλαμβάνουν ένζυμα, νουκλεϊκά οξέα, βιταμίνες, αντιγόνα/αντισώματα, κύτταρα, πρωτεΐνες κ.ά.).

Έτσι, αναπτύχθηκαν ευαίσθητες, εκλεκτικές φθηνότερες και λιγότερο χρονοβόρες μέθοδοι, στις οποίες συγκαταλέγονται οι ηλεκτροχημικοί DNA βιοαισθητήρες, που λειτουργούν χωρίς την ανάγκη σύμπραξης κάποιας διαχωριστικής τεχνικής και οι οποίοι βασίζονται σε ειδικές αλληλεπιδράσεις του DNA με ενώσεις και οι οποίες μπορεί να περιλαμβάνουν φαινόμενα υβριδισμού του DNA, αλληλεπιδράσεις με φάρμακα ή τοξικές ή και καρκινογόνες ουσίες και βλάβες στη δομή του DNA. Οι ηλεκτροχημικοί DNA βιοαισθητήρες είναι διατάξεις, που μετατρέπουν φαινόμενα υβριδισμού σε αναλυτικό σήμα με στόχο την ανάκτηση πληροφοριών για συγκεκριμένες αλληλουχίες ολιγονουκλεοτιδίων του DNA.

Το ασκορβικό οξύ (ascorbic acid) είναι η πιο γνωστή από όλες τις υδατοδιαλυτές βιταμίνες. Ευρύτερα το L-ασκορβικό οξύ είναι γνωστό ως βιταμίνη C, αν και η ονομασία αυτή είναι γενική και περιγράφει όλες τις χημικές ενώσεις που παρουσιάζουν ποιοτικώς τη βιολογική δραστηριότητα του ασκορβικού οξέος.

Ο ρόλος του L-ασκορβικού οξέος για την υγεία των ζωικών οργανισμών και ιδιαίτερα του ανθρώπου και των νεαρών ατόμων είναι σημαντικότερος και ως βιταμίνη είναι αναντικατάστατη. Αν και τα περισσότερα θηλαστικά μπορούν να συνθέσουν τη βιταμίνη C, δυστυχώς τη δυνατότητα αυτή στερείται ο άνθρωπος, όπως και άλλα ανώτερα πρωτεύοντα, και πρέπει να τη λαμβάνει σε καθημερινή βάση μέσω της διατροφής του.

Εξαιτίας της σημαντικής βιολογικής δράσης της βιταμίνης C και της ολοένα αυξανόμενης χρήσης βιοαισθητήρων, αντικείμενο της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας αποτέλεσε η κατασκευή ενός DNA βιοαισθητήρα ηλεκτροδίου πάστας άνθρακα, με γεννητικά τροποποιημένο DNA (dsDNA) από θύμο αδένα βοοειδούς και ο ηλεκτροχημικός προσδιορισμός βιταμίνης C με αυτό.

Το σύνολο του πειραματικού μέρους της εργασίας αυτής πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, του τμήματος Χημείας, του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, υπό την επίβλεψη της καθηγήτριας **Δρ. Στέλλας Γηρούση**, την οποία ευχαριστώ για την υπόδειξη του θέματος, την καθοδήγηση και παρακολούθηση αλλά και την βοήθεια υλική και ηθική, καθόλη τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας.

Ακόμη ευχαριστώ όλα τα μέλη του Εργαστηρίου της Αναλυτικής Χημείας για την ευχάριστη ατμόσφαιρα συνεργασίας που μου πρόσφεραν.

Παράλληλα υπήρξε σπουδαία και η συμβολή της **Δρ. Σοφίας Καραστογιάννη** καθώς με την καθοδήγηση και τις συμβουλές που απλόχερα μου παρείχε, βοήθησε στη διεκπεραίωση της εργασίας μου καθώς και στην ερμηνεία των πειραματικών αποτελεσμάτων. Θα ήθελα να την ευχαριστήσω ολόψυχα για την στήριξη της και την συνεργασία της.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ από καρδιάς οφείλω **στην οικογένειά μου**, που χωρίς τη συμβολή τους τίποτε δε ήταν εφικτό να επιτευχθεί. Η εργασία μου αφιερώνεται σε αυτήν ως μια μικρή ενδειξη ευγνωμοσύνης για την πολύπλευρη και αμέτρητη στήριξη που μου παρείχε.

*Αναστάσιος Χ Σουρουτζίδης*

*Θεσσαλονίκη 2017*

# **I. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## **1. ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ**

### **1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Οι ηλεκτροχημικές τεχνικές ανάλυσης περιλαμβάνουν μία μεγάλη ποικιλία τεχνικών, καθεμία από τις οποίες βασίζεται σε ένα ιδιαίτερο φαινόμενο, που πραγματοποιείται σε ένα ηλεκτροχημικό στοιχείο. Το πειραματικό ηλεκτροχημικό σύστημα αποτελείται από τον ηλεκτρολύτη, που άγει το ρεύμα, τα ηλεκτρόδια και από το κύκλωμα μέτρησης ή το εξωτερικό κύκλωμα, που χρησιμοποιείται για την εφαρμογή και μέτρηση ηλεκτρικών σημάτων. Μετρούνται διάφορα ηλεκτρικά μεγέθη, όπως π.χ. ένταση ρεύματος, δυναμικό, αντίσταση (αγωγιμότητα), μόνα ή σε συνδυασμούς, και με βάση τις μετρούμενες τιμές επιτελείται ποσοτική ή ποιοτική ανάλυση. Σε μία ηλεκτροχημική ανάλυση, είτε καθορίζεται η σχέση μεταξύ μεγέθους ηλεκτρικού σήματος και ενεργότητας (συγκεντρώσεως), είτε το ηλεκτρικό σήμα χρησιμοποιείται για τον καθορισμό του τελικού σημείου μίας τιτλομέτρησης, είτε το ηλεκτρικό ρεύμα μετατρέπει την προσδιοριζόμενη χημική οντότητα σε μία καθορισμένη μορφή που προσδιορίζεται, είτε σταθμικά, είτε από την ποσότητα του ηλεκτρικού φορτίου που καταναλώθηκε.

Οι ηλεκτροαναλυτικές τεχνικές, σε σύγκριση με άλλες γενικές κατηγορίες ενόργανων τεχνικών ανάλυσης, μπορούν να θεωρηθούν ότι υπερτερούν σε χαρακτηριστικά, όπως το κατώτερο όριο ανιχνεύσεως των προσδιορισμών, ο μικρότερος χρόνος ανάλυσης και το χαμηλότερο κόστος. Έτσι, παρουσιάζουν μεγάλη ευαισθησία μέσα σε ένα εύρος της τάξης τιμών από mg ως ng και ακρίβειας που κυμαίνεται από 0,1 ως 10 %. [1]

### **Ταξινόμηση ηλεκτροχημικών τεχνικών αναλύσεως**

Οι κυριότερες ηλεκτροχημικές τεχνικές αναλύσεως παρέχονται στον πίνακα 1.1. Κάθε τεχνική απαιτεί τον άμεσο έλεγχο τουλάχιστον μίας από τις τρεις βασικές παραμέτρους – ένταση ρεύματος  $I$ , δυναμικό  $E$ , χρόνος  $t$ - και την μέτρηση μίας άλλης παραμέτρου.

**Πίνακας 1.1.** Ηλεκτροχημικές τεχνικές ανάλυσεως

Τεχνική	Ελεγχόμενη ηλεκτρική παράμετρος	Μετρούμενη φυσική ιδιότητα
Ποτενσιομετρία	$i=0$	E
Ποτενσιομετρική ογκομέτρηση	$i=0$	E συναρτήσει V
Χρονοποτενσιομετρία	i	E συναρτήσει t
Βολταμμετρία	E	i συναρτήσει E
Αναδιαλυτική Βολταμμετρία	E	i συναρτήσει E
Πολαρογραφία	E	i συναρτήσει E
Αμπερομετρική ογκομέτρηση	E	i συναρτήσει V
Κουλομετρία	E ή i	Ποσότητα ηλεκτρισμού
Κουλομετρική ογκομέτρηση	i	t
Ηλεκτροσταθμική ανάλυση	E ή i	Βάρος αποτιθέμενης ουσίας
Αγωγιγομετρία	E (AC)	1/R
Αγωγιμετρική ογκομέτρηση	E (AC)	1/R συναρτήσει V

$i$  = ένταση ρεύματος, E =τάση, V = όγκος τιτλοδότη, t = χρόνος, AC = εναλλασόμενο ρεύμα, 1/R = αγωγιμότητα

### Ορισμοί

Τα ηλεκτρόδια του ηλεκτροχημικού στοιχείου αποτελούν την **άνοδο** και την **κάθοδο** του στοιχείου. Ανεξάρτητα από το είδος του στοιχείου, στην κάθοδο πραγματοποιούνται πάντοτε αντιδράσεις αναγωγής και στην άνοδο αντιδράσεις οξειδωσης. **Ενδεικτικό ηλεκτρόδιο** (indicator electrode) είναι το ηλεκτρόδιο, που εμφανίζει δυναμικό εξαρτώμενο από τη συγκέντρωση του διαλύματος, **ηλεκτρόδιο αναφοράς** (reference electrode) είναι το ηλεκτρόδιο, που εμφανίζει σταθερό και επαναλήψιμο δυναμικό, ανεξάρτητο από τη σύσταση του διαλύματος και τις μεταβολές στην ένταση του ρεύματος, **ηλεκτρόδιο εργασίας** (working electrode)

είναι το ηλεκτρόδιο στο οποίο πραγματοποιείται η ελεγχόμενη η παρακολουθούμενη ηλεκτροδιακή αντίδραση και **βοηθητικό ή αντίθετο ηλεκτρόδιο** (counter electrode) το οποίο αποτελείται από ένα αδρανές μέταλλο, διαμέσου του οποίου διέρχεται το ρεύμα, αποφεύγοντας έτσι τη διέλευση ρεύματος από το ηλεκτρόδιο αναφοράς.

### **Ηλεκτροδιακές διεργασίες**

Στα ηλεκτρόδια πραγματοποιούνται δύο τύποι διεργασιών, **φαρνανταϊκές** (faradaic processes) και **μη φαρνανταϊκές** (nonfaradaic processes). Στις φαρνανταϊκές διεργασίες, που διέπονται από το νόμο του Faraday (δηλαδή ότι η ποσότητα της ουσίας που οξειδώνεται ή ανάγεται, είναι ανάλογη της ποσότητας του ηλεκτρισμού, που διέρχεται από το διάλυμα) γίνεται μεταφορά ηλεκτρονίων διαμέσου της διεπιφάνειας (μεσόφαση) ηλεκτροδίου – διαλύματος και επομένως λαμβάνει χώρα οξείδωση ή αναγωγή, γιατί δεν είναι δυνατόν να επιβιώσει ελεύθερο ηλεκτρόνιο στο διάλυμα. Τα ηλεκτρόδια στις φαρνανταϊκές διεργασίες ονομάζονται ηλεκτρόδια μεταφοράς φορτίου και το παρατηρούμενο ρεύμα ονομάζεται **φαρνανταϊκό ρεύμα (faradaic current),  $i_F$** . Στις μη φαρνανταϊκές διεργασίες δε γίνεται μεταφορά ηλεκτρονίων διαμέσου της διεπιφάνειας ηλεκτροδίου-διαλύματος, γιατί δεν ευνοείται κινητικά ή θερμοδυναμικά. Τέτοιες διεργασίες είναι η προσρόφηση και η εκρόφηση ουσιών στο ηλεκτρόδιο και η αλλαγή ιδιοτήτων της διεπιφάνειας κατά τις αλλαγές του δυναμικού του ηλεκτροδίου ή της συστάσεως του διαλύματος. Παρόλο όμως που δε διακινούνται ηλεκτρόνια στις μη φαρνανταϊκές διεργασίες, εντούτοις μπορεί να παρατηρηθεί διέλευση ρεύματος, έστω και παροδικά, όταν αλλάζει το δυναμικό ή η επιφάνεια του ηλεκτροδίου ή η σύσταση του διαλύματος. Το ρεύμα αυτό ονομάζεται **χωρητικό ρεύμα (capacitive current),  $i_c$** . Ένα ενδιαφέρον παράδειγμα μη φαρνανταϊκής διεργασίας είναι η φόρτιση ενός ηλεκτροδίου, κατά την οποία το χωρητικό ρεύμα φορτίζει την ηλεκτρική διπλοστοιβάδα, που υπάρχει στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, στην τιμή ισορροπίας, που αντιστοιχεί στο δυναμικό του ηλεκτροδίου.

Ένα ηλεκτρόδιο, στο οποίο δε λαμβάνει χώρα μεταφορά φορτίου διαμέσου της διεπιφάνειας μετάλλου-διαλύματος για οποιαδήποτε τιμή εφαρμοζόμενου δυναμικού από μία εξωτερική πηγή τάσεως, ονομάζεται ιδανικά πολωμένο ηλεκτρόδιο. Μόνο μη φαρνανταϊκές διεργασίες μπορούν να πραγματοποιηθούν σε ένα τέτοιο ηλεκτρόδιο. Εάν όμως προστεθεί στο διάλυμα ένας αποπολωτής, δηλαδή μία ηλεκτρενεργός

ουσία, που μπορεί να αναχθεί ή να οξειδωθεί, τότε διέρχεται φαρανταϊκό ρεύμα και το ηλεκτρόδιο αποπολώνεται.

Όταν αρχίσει η ροή φαρανταϊκού ρεύματος, η ισορροπία μεταξύ οξειδωμένης και ανηγμένης μορφής διαταράσσεται, μπορεί όμως να επαναποκαθίσταται συνεχώς, αρκεί οι ηλεκτροδιακές αντιδράσεις να είναι αντιστρεπτές και όλα τα στάδια της ηλεκτροδιακής αντιδράσης, χημικές αντιδράσεως, που προηγούνται ή έπονται της μεταφοράς των ηλεκτρονίων κλπ) να είναι γρήγορα. Εάν όμως υπάρχει καθυστέρηση, τότε το πραγματικό δυναμικό  $E$  του ηλεκτροδίου είναι διαφορετικό από το δυναμικό  $E_{eq}$  στην κατάσταση ισορροπίας.

Η διαφορά  $n=E-E_{eq}$  αποτελεί το **υπερδυναμικό** (υπέρταση) του ηλεκτροδίου (καθοδικό ή ανοδικό).

Όταν το υπερδυναμικό (υπέρταση) οφείλεται στο ότι η συγκέντρωση του αποπολωτή στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου είναι πολύ μικρότερη από τη συγκέντρωσή του στο κυρίως διάλυμα, λόγω βραδείας μετακινήσεως του αποπολωτή προς το ηλεκτρόδιο, τότε μιλάμε για πόλωση συγκεντρώσεως (concentration polarization). Όταν το υπερδυναμικό (υπέρταση) οφείλεται στη βραδεία μετακίνηση ηλεκτρονίων λόγω αδράνειας του χημικού συστήματος, ομιλούμε για πόλωση ενεργοποίησεως (activation polarization). Τα δυο είδη πολώσεως είναι δυνατόν να συνυπάρχουν. Εάν η ηλεκτροδιακή διεργασία γινόταν με άπειρη ταχύτητα, θα ήταν δυνατόν να τραβήξουμε ρεύμα χωρίς αυτό να προκαλέσει την εμφάνιση υπερδυναμικού (υπέρτασης) στο ηλεκτρόδιο. Ένα τέτοιο ηλεκτρόδιο θα αποτελούσε ένα ιδανικά μη πολώσιμο ηλεκτρόδιο. Στην πράξη, υπάρχουν ηλεκτρόδια με αμελητέα υπερδυναμικά, που επιτρέπουν τη διέλευση σημαντικών ρευμάτων. Τέτοια μη πολώσιμα ηλεκτρόδια χρησιμοποιούνται ως ηλεκτρόδια αναφοράς.

### **Τρόποι μεταφοράς μάζας**

Προϋπόθεση για τη διατήρηση ενός φαρανταϊκού ρεύματος είναι η μεταφορά ηλεκτρενεργού ουσίας από την κύρια μάζα του διαλύματος στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, που μπορεί να γίνει με τους εξής τρόπους:

1) Την ταχύτητα με την οποία οι ηλεκτροδραστικές ενώσεις μεταφέρονται από το διάλυμα στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Η διαδικασία αυτή καλείται **μεταφορά μάζας**.

2) Την ταχύτητα με την οποία τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται από ενώσεις του διαλύματος στο ηλεκτρόδιο και αντίστροφα. Η διαδικασία αυτή καλείται **μεταφορά φορτίου**.

Στις περισσότερες ηλεκτροχημικές τεχνικές η μεταφορά μάζας με όδευση δεν εξυπηρετεί κανένα αναλυτικό σκοπό, γι' αυτό και πρακτικά εξαλείφεται με κατάλληλη ρύθμιση των συνθηκών. Ειδικότερα στην βολταμμετρία (πολαρογραφία), η μεταφορά της ηλεκτρενεργού ουσίας γίνεται πρακτικά μόνο με διάχυση, γιατί η φυσική ροή ελαχιστοποιείται με πλήρη αταραξία του διαλύματος (απουσία ανάδευσης), ενώ η μεταφορά με ηλεκτροστατικές έλξεις καθίσταται αμελητέα με προσθήκες μεγάλης ποσότητας φέροντος ηλεκτρολύτη, σε συγκέντρωση τουλάχιστον 100 πλάσια της συγκέντρωσης της ηλεκτρενεργού ουσίας. Με αυτό τον τρόπο, ο φέρον ηλεκτρολύτης γίνεται ο κύριος μεταφορέας φορτίου μέχρι το ηλεκτρόδιο, όπου η μεταφορά φορτίου γίνεται μόνο από την ηλεκτρενεργό ουσία, γιατί αυτός είναι ηλεκτρικά ανενεργός στη χρησιμοποιούμενη περιοχή τάσεων. Σε αυτές τις συνθήκες, υπάρχουν γραμμική σχέση μεταξύ εντάσεως ρεύματος διαχύσεως και συγκεντρώσεως της ηλεκτρενεργού ουσίας. [2]

## 1.2 ΒΟΛΤΑΜΜΕΤΡΙΑ

### 1.2.1 Γενικά

Η βολταμμετρία είναι μία ηλεκτροαναλυτική τεχνική, η οποία βασίζεται στην παρατήρηση της σχέσεως που συνδέει την ένταση του ρεύματος, στο ηλεκτρόδιο εργασίας, και την εφαρμοζόμενη σε αυτό τάση. Το δυναμικό του ηλεκτροδίου εργασίας αποτελεί την ελεγχόμενη παράμετρο, η οποία αναγκάζει τα μόρια ή τα ιόντα που βρίσκονται στο διάλυμα να αναχθούν ή να οξειδωθούν πάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου.

Η ηλεκτροδιακή δράση ακολουθεί το γενικό σχήμα:



Η εξίσωση του Nernst δίνει τη σχέση μεταξύ του δυναμικού του ηλεκτροδίου και της συγκέντρωσης της οξειδωμένης ή της ανηγμένης μορφής στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου (στους 25°C):

$$E = E^0 + (0.059/n) \log(C_{\text{ox}}/C_{\text{red}}) \quad (1.1)$$



Στην οποία  $C_{ox}$  και  $C_{red}$  είναι οι συγκεντρώσεις της οξειδωμένης και της ανηγμένης μορφής.

Το φαρανταϊκό ρεύμα εξαρτάται από:

(α) Από φαινόμενα μεταφοράς μάζας, δηλαδή την ταχύτητα με την οποία οι ηλεκτροδραστικές ενώσεις μεταφέρονται από το διάλυμα επάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου.

(β) Από φαινόμενα μεταφοράς φορτίου, την ταχύτητα με την οποία τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται από ενώσεις του διαλύματος επάνω στο ηλεκτρόδιο και αντίστροφα.

Στην οξειδοαναγωγή είναι δυνατόν να συμβούν επιφανειακές ή άλλες χημικές αντιδράσεις. Το βραδύτερο στάδιο καθορίζει το μέγεθος του ρεύματος. Για τη διαδικασία που ελέγχεται από τη μεταφορά μάζας στην οποία οι ηλεκτροδραστικές ενώσεις είναι δυνατόν να φτάσουν στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου με διάχυση, το ρεύμα που προκύπτει περιγράφεται από την εξίσωση Cottrell:

$$i = nFA(D/\pi t)^{1/2} C \quad (1.2)$$

όπου  $i$ =ρεύμα διάχυσης (ampere) που διαρρέει το σύστημα σε χρόνο  $t$  (sec) από την έναρξη του πειράματος

$n$  =πλήθος ηλεκτρονίων της ηλεκτροδιακής δράσης

$F$  =σταθερά Faraday

$A$  =επιφάνεια ( $\text{cm}^2$ ) του ηλεκτροδίου

$D$  =συντελεστής διάχυσης ( $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ )

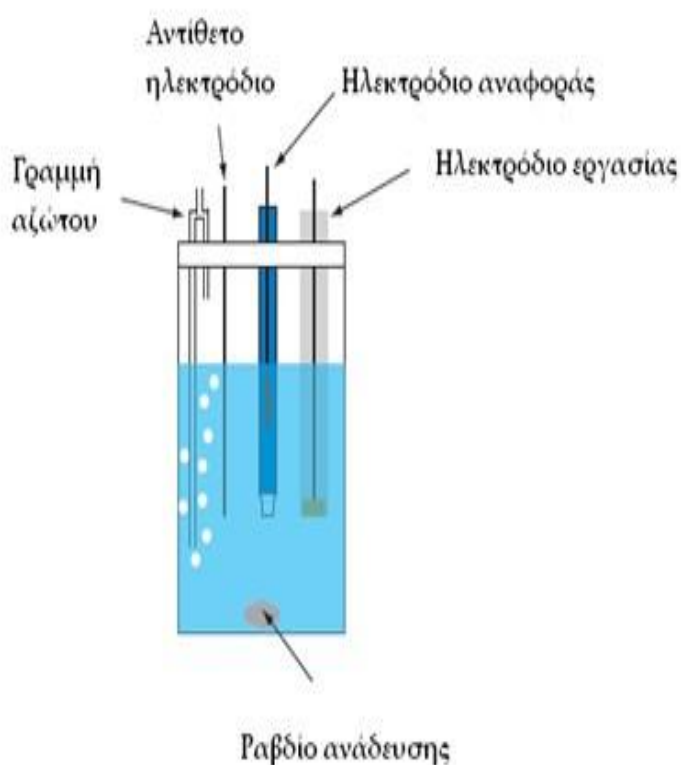
$C$  =συγκέντρωση των ηλεκτροδραστικών ενώσεων στο διάλυμα (M)

Επιπλέον από το φαρανταϊκό ρεύμα, το ρεύμα υποβάθρου (υπολειμματικό) το οποίο διαρρέει το σύστημα απουσία των ηλεκτροδραστικών ενώσεων που ενδιαφέρουν, είναι σύνθετο και προέρχεται από τη συνεισφορά του ρεύματος φόρτισης της διπλοστιβάδας, της αντίδρασης οξειδοαναγωγής των προσμίξεων καθώς και του διαλύτη, του ηλεκτρολύτη ή του ηλεκτροδίου. Το ρεύμα φόρτισης είναι το κύριο συστατικό του υπολειμματικού ρεύματος. Το διάγραμμα ρεύματος-δυναμικού καλείται βολταμμογράφημα. Από το βολταμμογράφημα, το δυναμικό στο ανερχόμενο τμήμα του κύματος ή της κορυφής αποδίδεται στο  $E^0$  για το οξειδοαναγωγικό ζεύγος και παρέχει ποιοτικές πληροφορίες, ενώ το φαρανταϊκό ρεύμα είναι ανάλογο με την συγκέντρωση των ηλεκτροδραστικών ενώσεων και μπορεί να αξιοποιηθεί στην

ποσοτική ανάλυση. Το όριο ανίχνευσης προσδιορίζεται από το σχετικό μέγεθος του φαρανταϊκού ρεύματος συγκρινόμενο με το υπολειμματικό ρεύμα.

Στη βολταμετρία τρεις είναι οι σημαντικότεροι πειραματικοί παράμετροι που ελέγχονται. Ο πρώτος αφορά τη μεταβολή του εφαρμοζόμενου δυναμικού στο ηλεκτρόδιο εργασίας. Ο δεύτερος σχετίζεται με τη μέθοδο επιλογής της μέτρησης του ρεύματος και ο τρίτος έχει να κάνει με την επιλογή ανάδευσης του ηλεκτρολυτικού διαλύματος [3]

### 1.2.2 Ηλεκτροχημικές κυψέλες και αντίσταση κυψέλης στη βολταμετρία

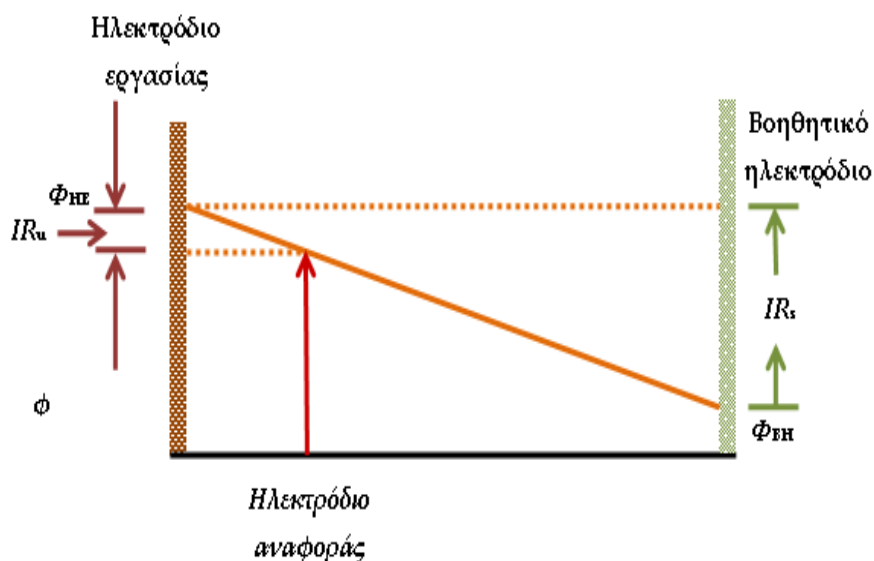


**Σχήμα 1.1** Πρακτική διάταξη ηλεκτροχημικής κυψελίδας τριών ηλεκτροδίων.

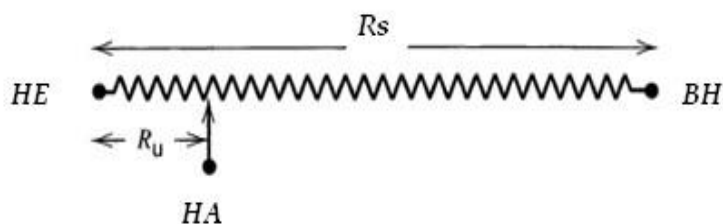
Όταν μετράται το δυναμικό ενός ηλεκτροδίου σε σχέση με το δυναμικό ενός μη πολώσιμου ηλεκτροδίου αναφοράς, τότε κατά τη διέλευση του ρεύματος μια ωμική πτώση τάσης ίση με  $IR_s$  πάντοτε περιλαμβάνεται στη μετρούμενη τιμή δυναμικού. Η αντίσταση  $R_s$  αντιστοιχεί στην αντίσταση, που συναντούν τα φορτία, όταν κινούνται μεταξύ των ηλεκτροδίων, η οποία συμπεριφέρεται ως συμβατική αντίσταση σ' ένα

μεγάλο εύρος συνθηκών, σε αντίθεση με τη σύνθετη αντίσταση, η οποία περιγράφει τη μεταφορά μάζας και τα στάδια ενεργοποίησης κατά την ηλεκτροδιακή αντίδραση. Η ωμική πτώση τάσης στο διάλυμα δεν πρέπει να συγχέεται με το υπερδυναμικό (ή αλλιώς υπέρταση), επειδή είναι χαρακτηριστική του bulk διαλύματος και δεν σχετίζεται με την ηλεκτροδιακή αντίδραση. Η ελαχιστοποίηση της συνεισφοράς της στο μετρούμενο δυναμικό πραγματοποιείται με τον κατάλληλο σχεδιασμό της ηλεκτροχημικής κυψέλης και την κατάλληλη οργανολογία. Τις περισσότερες φορές ενδιαφέρουν οι αντιδράσεις που πραγματοποιούνται μόνο στο ένα ηλεκτρόδιο, το οποίο καλείται ηλεκτρόδιο εργασίας (ή ενδεικτικό ηλεκτρόδιο) και είναι συνδεδεμένο με το ηλεκτρόδιο αναφοράς.

Σε πειράματα, όπου η ωμική πτώση τάσης,  $IR_s$ , είναι μεγάλη, χρησιμοποιούνται οι ηλεκτροχημικές κυψέλες τριών ηλεκτροδίων. Στο Σχήμα 1.1 δίνεται η διάταξη μιας κυψελίδας που χρησιμοποιείται σε πρακτικές εφαρμογές. Στη διάταξη αυτή περνάει από το ηλεκτρόδιο εργασίας και το βοηθητικό ηλεκτρόδιο. Το βοηθητικό ηλεκτρόδιο μπορεί να είναι ένα οποιοδήποτε βολικό ηλεκτρόδιο, μιας και οι ηλεκτροχημικές του ιδιότητες δεν επηρεάζουν τις ηλεκτροχημικές ιδιότητες του ηλεκτροδίου εργασίας. Συνήθως, επιλέγονται ηλεκτρόδια τα οποία δεν παράγουν ουσίες κατά την ηλεκτρόλυση, που θα μπορούσαν να προσεγγίσουν την επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας και να δημιουργήσουν παρεμποδιστικές αντιδράσεις. Το δυναμικό του ηλεκτροδίου εργασίας παρακολουθείται σε σχέση με το ηλεκτρόδιο αναφοράς. Το όργανο που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της διαφοράς δυναμικού πρέπει να διαθέτει μεγάλη σύνθετη αντίσταση, ώστε να περνάει απειροελάχιστο ρεύμα από το ηλεκτρόδιο αναφοράς. Συνεπώς, το δυναμικό του ηλεκτροδίου αναφοράς παραμένει σταθερό και ίσο με την τιμή ανοιχτού κυκλώματος. Ακόμη και σ' αυτές τις διατάξεις η ωμική πτώση τάσης δεν έχει εξαλείψει πλήρως από τη διάταξη μέτρησης του δυναμικού.



(α)



(β)

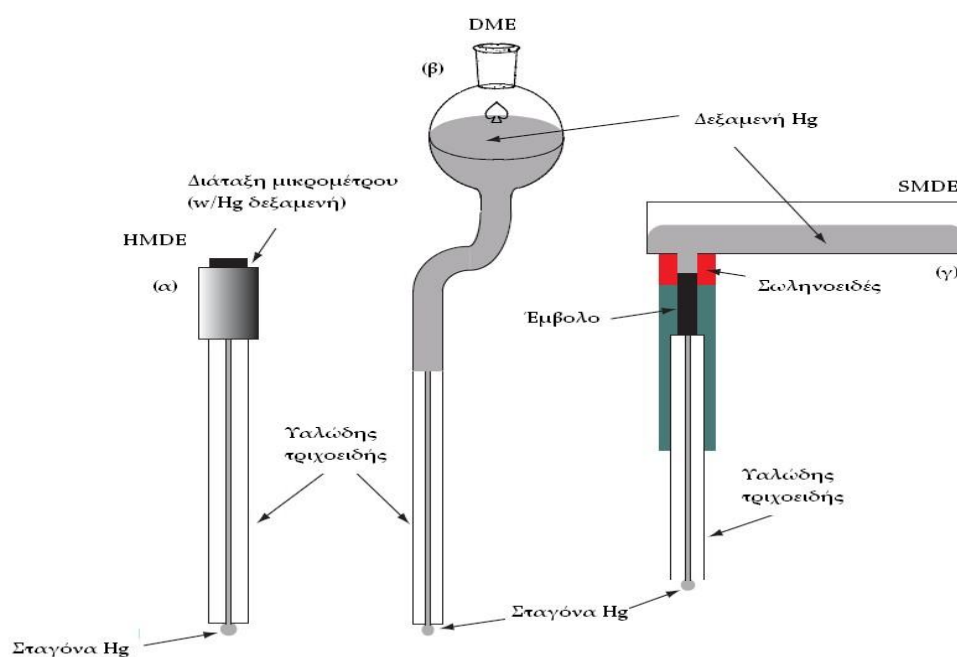
**Σχήμα 1.2 (α)** Πτώση τάσης μεταξύ ηλεκτροδίων εργασίας και αναφοράς σε διάλυμα και μετρούμενη πτώση τάσης  $IR_u$  στο ηλεκτρόδιο αναφοράς και **(β)** αναπαράσταση της κυψελίδας με τη μορφή ποτενσιόμετρου (όπου HE είναι το ηλεκτρόδιο εργασίας, HA είναι το ηλεκτρόδιο αναφοράς και BH είναι το βοηθητικό ηλεκτρόδιο. Το διάλυμα μεταξύ των ηλεκτροδίων μπορεί να θεωρηθεί ως ποτενσιόμετρο, το οποίο όμως δεν είναι απαραίτητα και γραμμικό.

Έστω ότι ισχύει το προφίλ δυναμικού μεταξύ των ηλεκτροδίων εργασίας και βοηθητικό που περιγράφεται από το Σχήμα 1.2. Πρέπει να σημειωθεί ότι το πραγματικό προφίλ δυναμικού εξαρτάται από το σχήμα των ηλεκτροδίων, τη γεωμετρία των ηλεκτροδίων, την αγωγιμότητα του ηλεκτρολυτικού διαλύματος και άλλους παράγοντες.

Αν το ηλεκτρόδιο αναφοράς τοποθετηθεί σε οποιοδήποτε σημείο, εκτός από την επιφάνεια του ηλεκτροδίου, κάποια ποσότητα της ωμικής πτώσης τάσης  $IR_s$  (που

ονομάζεται πτώση τάσης  $IRu$ , όπου  $Ru$  αντιστοιχεί στη μη συμπιεσμένη αντίσταση του ηλεκτρολυτικού διαλύματος) θα συμπεριλαμβάνεται στη μέτρηση του δυναμικού. Ακόμη και αν το ακροφύσιο του ηλεκτροδίου αναφοράς έχει σχεδιαστεί με τέτοιο τρόπο, ώστε να βρίσκεται σε κοντινή απόσταση με την επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας, όπως συμβαίνει στην περίπτωση του λεπτού τριχοειδούς ακροφυσίου **Luggin - Haber**, μια μικρή μη συμπιεσμένη αντίσταση είναι συνήθως υπαρκτή. Εκτός από τα ηλεκτρόδια εργασίας, αναφοράς και αντίθετο, η κυψελίδα περιλαμβάνει και γραμμή αζώτου για την απομάκρυνση του διαλυμένου οξυγόνου καθώς επίσης προαιρετικά και μαγνητικό ραβδί ανάδευσης. Οι ηλεκτροχημικές κυψελίδες διατίθενται σε ποικιλία μεγεθών επιτρέποντας τη χημική ανάλυση όγκων διαλύματος που κυμαίνεται από 100 mL ως 50  $\mu$ L. [7]

### 1.2.3 Ηλεκτρόδια εργασίας που χρησιμοποιούνται στην βολταμετρία



**Σχήμα 1.3** Τρία παραδείγματα ηλεκτροδίου υδραργύρου. (α) Κρεμάμενης σταγόνας (HMDE), (β) σταγονικό ηλεκτρόδιο (DME) και (γ) στατικό σταγονικό ηλεκτρόδιο (SMDE).

Στο ηλεκτρόδιο εργασίας πραγματοποιούνται οι ελεγχόμενες ηλεκτροδιακές αντιδράσεις και μπορεί να επιλεγεί για το σκοπό αυτό ένα μεγάλο εύρος υλικών συμπεριλαμβανομένου του υδραργύρου, του λευκόχρυσου, του χρυσού, του αργύρου

και του άνθρακα. Οι αρχαιότερες βολταμετρικές τεχνικές συμπεριλαμβανομένου και της πολαρογραφίας χρησιμοποιούσαν τον υδράργυρο ως ηλεκτρόδιο εργασίας. Ο υδράργυρος βρίσκεται σε υγρή μορφή και για αυτό συνήθως χρησιμοποιείται με τη μορφή σταγόνας που εκρέει από την άκρη ενός τριχοειδούς σωλήνα. Στο ηλεκτρόδιο κρεμάμενης σταγόνας υδραργύρου (*hanging mercury drop electrode, HDME*) η σταγόνα του υδραργύρου εκρέει από την περιστροφή ενός μικρομετρικού κοχλία, ο οποίος ωθεί τον υδράργυρο να στάξει από μια δεξαμενή μέσω ενός στενού τριχοειδή σωλήνα (Σχήμα 1.3 α).

Το ηλεκτρόδιο κρεμάμενης σταγόνας υδραργύρου είναι ευαίσθητο στις δονήσεις (μπορεί να αποκολληθεί το σφαιρίδιο κατά τη διάρκεια της αναδεύσεως), αλλά οι μετρήσεις με αυτό παρουσιάζουν πολύ καλή επαναληπτικότητα, γιατί παράγονται σταγόνες με επακριβώς ελεγχόμενο και επαναλήψιμο μέγεθος.

Επίσης, επειδή κάθε μέτρηση γίνεται σε καινούργια σταγόνα υδράργυρου, ελαχιστοποιούνται τα φαινόμενα απενεργοποίησης του ηλεκτροδίου. Μειονέκτημα του ηλεκτροδίου αποτελεί η μεγάλη ποσότητα υδραργύρου που απορρίπτεται με τους γνωστούς κινδύνους που επιφέρει το μέταλλο αυτό.

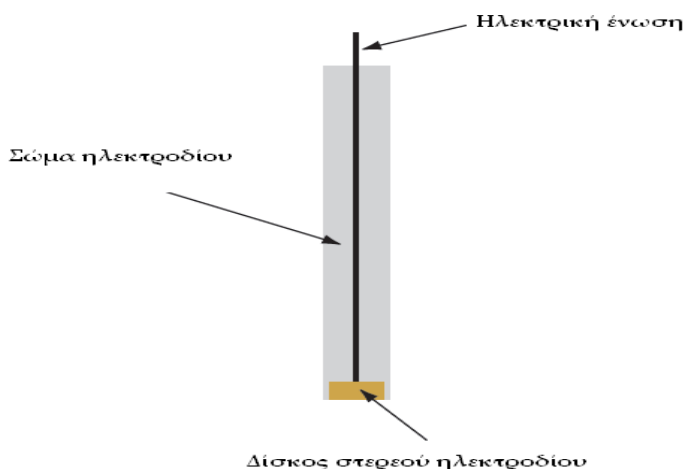
Στο σταγονικό ηλεκτρόδιο υδραργύρου (*dropping mercury electrode, DME*) ο υδράργυρος πέφτει από το ακροφύσιο ενός τριχοειδή σωλήνα ως αποτέλεσμα της βαρύτητας (Σχήμα 1.3 β). Σε αντίθεση με το κρεμάμενης σταγόνας ηλεκτρόδιο, η σταγόνα του υδραργύρου στο σταγονικό ηλεκτρόδιο αναπτύσσεται συνεχόμενα, καθώς ο υδράργυρος ρέει από τη δεξαμενή με την επίδραση της βαρύτητας και έχει πεπερασμένο χρόνο ζωής μερικών δευτερολέπτων. Στο τέλος της διάρκειας ζωής της σταγόνας αυτή αποβάλλεται είτε χειροκίνητα ή από μόνη και αντικαθίσταται με καινούργια σταγόνα.

Στο στατικό σταγονικό ηλεκτρόδιο υδραργύρου (*static mercury dropping electrode, SMDE*) χρησιμοποιείται ένα έμβολο, που κινείται με τη βοήθεια ενός σωληνοειδούς, για τον έλεγχο της ροής της σταγόνας του υδραργύρου (Σχήμα 1.3 γ). Η ενεργοποίηση του σωληνοειδούς στιγμιαία σηκώνει το έμβολο επιτρέποντας μ' αυτό τον τρόπο στον υδράργυρο να ρέει μέσα στον τριχοειδή σωλήνα και να σχηματίσει μια μονή κρεμάμενη σταγόνα υδραργύρου. Έτσι, το στατικό ηλεκτρόδιο υδραργύρου μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε ως ηλεκτρόδιο κρεμάμενης σταγόνας ή ως σταγονικό ηλεκτρόδιο υδραργύρου.

Υπάρχει ακόμη ένας τύπος ηλεκτροδίου υδραργύρου, το λεγόμενο ηλεκτρόδιο υμενίου υδραργύρου (*film mercury electrode*). Ένα στερεό ηλεκτρόδιο, όπως για

παράδειγμα το ηλεκτρόδιο λευκόχρυσου ή άνθρακα, τοποθετείται σε διάλυμα  $Hg^{2+}$  και διατηρείται σε δυναμικό όπου ευνοείται η αναγωγή του  $Hg^{2+}$  σε Hg, σχηματίζοντας μ' αυτόν τον τρόπο λεπτό υμένιο Hg στην επιφάνεια του στερεού ηλεκτροδίου. Το ηλεκτρόδιο υμενίου υδραργύρου πλεονεκτεί έναντι του ηλεκτροδίου κρεμάμενης σταγόνας υδραργύρου και κατά το ότι μπορεί να περιστρέφεται γύρω από τον κύριο άξονά του κατά τη διάρκεια της αποθέσεως χωρίς απώλεια του στρώματος υδραργύρου, με συνακόλουθη μείωση του χρόνου αποθέσεως, αφού η περιστροφή του ηλεκτροδίου προκαλεί εντονότερη μεταφορά μάζας από ότι π.χ. ένα τυπικό σύστημα αναδέυσεως μαγνητικού ραβδίου. Το ηλεκτρόδιο υμενίου υδραργύρου μειονεκτεί γενικά ως προς την επαναληπτικότητα των μετρήσεων.

Τα στερεά ηλεκτρόδια ,που κατασκευάζονται από λευκόχρυσο, χρυσό, άργυρο και άνθρακα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ένα μεγάλο εύρος δυναμικού συμπεριλαμβανομένου θετικών και αρνητικών δυναμικών. Για παράδειγμα, το παράθυρο δυναμικού για το ηλεκτρόδιο λευκόχρυσου, βρίσκεται κατά προσέγγιση στο εύρος +1,2 V ως -0,2 V vs SCE σε όξινα διαλύματα και από +0.7 V ως -1,0 V vs SCE σε αλκαλικά διαλύματα. Τα στερεά ηλεκτρόδια μπορεί να αντικαταστήσουν τον υδράργυρο σε πολλές αναλύσεις, οι οποίες απαιτούν αρνητικά δυναμικά και αποτελούν ηλεκτρόδια επιλογής σε πολύ πιο θετικά δυναμικά οξειδώσεως και αναγωγής του υδραργύρου. Γενικώς, τα στερεά ηλεκτρόδια προσαρμόζονται σε ένα δίσκο και σφραγίζονται στο τελικό τους άκρο από ένα αδρανές υποστηρικτικό υλικό με μια ηλεκτρική ένωση (Σχήμα 1.4). [1]



**Σχήμα 1.4** Σχηματική αναπαράσταση στερεού ηλεκτροδίου.

Τα ηλεκτρόδια άνθρακα κατασκευάζονται γεμίζοντας την κοιλότητα ενός υποστηρικτικού από αδρανές υλικό σώματος με μια πάστα από άνθρακα και κάποιου συνδετικού υλικού (συνήθως mineral oil). Το κυριότερο μειονέκτημα των στερεών ηλεκτροδίων είναι η ευκολία με την οποία μεταβάλλεται η επιφάνεια του ηλεκτροδίου από την προσρόφηση ειδών από το διάλυμα ή το σχηματισμό στιβάδας οξειδίων. Έτσι, τα στερεά ηλεκτρόδια χρειάζονται καθάρισμα (*conditioning*), είτε με την εφαρμογή κατάλληλου δυναμικού, είτε με το γυάλισμα της επιφάνειάς τους.

Το ηλεκτρόδιο πάστας άνθρακα (CPE) [4], το οποίο δημιουργείται με ανάμιξη σκόνης άνθρακα με κάποιο οργανικό διαλύτη, είναι φθινό, μπορεί να κατασκευασθεί και να ανανεωθεί γρήγορα και το βασικό του ρεύμα είναι πολύ μικρό. Επιπλέον, πολλές υδρόφοβες οργανικές ουσίες, εκτός από προσρόφηση, υφίστανται και εκχύλιση στον οργανικό διαλύτη κατά τη φάση της προσυγκέντρωσης και έτσι βελτιώνεται η απόδοση του σταδίου της προσυγκέντρωσης. Επιπλέον, έχει αποδειχτεί ότι ο άνθρακας τείνει να είναι περισσότερο συμβατός με τους βιολογικούς ιστούς σε σχέση με άλλα ηλεκτροδιακά υλικά [5]. Η επιφάνεια της πάστας άνθρακα είναι πορώδης και αναπαραγωγίμη. Τέλος, το ηλεκτρόδιο πάστας άνθρακα μπορεί να αποτελέσει κατάλληλο υπόστρωμα για την προετοιμασία μορφοποιημένων ηλεκτροδίων.

Τα τελευταία χρόνια άρχισε να εφαρμόζεται ευρέως η τεχνική της τροποποίησης των στερεών ηλεκτροδίων [6]. Αυτή, βασίζεται σε συμπλεκτικά αντιδραστήρια η ιοντοανταλλακτικά υλικά που ενσωματώνονται στη μάζα του υλικού του ηλεκτροδίου (η τεχνική που εφαρμόζεται σε ηλεκτρόδια πάστας άνθρακα) ή τοποθετούνται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου με τη χρήση μεμβρανών από πολυμερή υλικά. Το κυριότερο πρόβλημα των τροποποιημένων ηλεκτροδίων είναι η δυσκολία ανανέωσης της επιφάνειάς τους και η επαναληψιμότητάς του.

### 1.3 ΠΟΛΑΡΟΓΡΑΦΙΑ

Η πολαρογραφία αποτελεί περίπτωση της βολταμετρίας όπου το ηλεκτρόδιο εργασίας είναι το σταγονικό ηλεκτρόδιο υδραργύρου (Dropping Mercury Electrode). Το πλεονέκτημα αυτού του ηλεκτροδίου έναντι άλλων είναι η υψηλή υπέρταση υδρογόνου που επεκτείνει την περιοχή σάρωσης του καθοδικού δυναμικού και η συνεχώς ανανεούμενη επιφάνειά του. Μειονέκτημα, αποτελεί ότι ο υδράργυρος



οξειδώνεται εύκολα και συνεπώς περιορίζεται η περιοχή σάρωσης του ανοδικού δυναμικού.

Σε χαμηλές συγκεντρώσεις ηλεκτροδραστικών ουσιών το ρεύμα φόρτισης γίνεται μεγαλύτερο από το φαρανταιϊκό και είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθούν πιο ευαίσθητες τεχνικές, όπως είναι οι παλμικές τεχνικές.

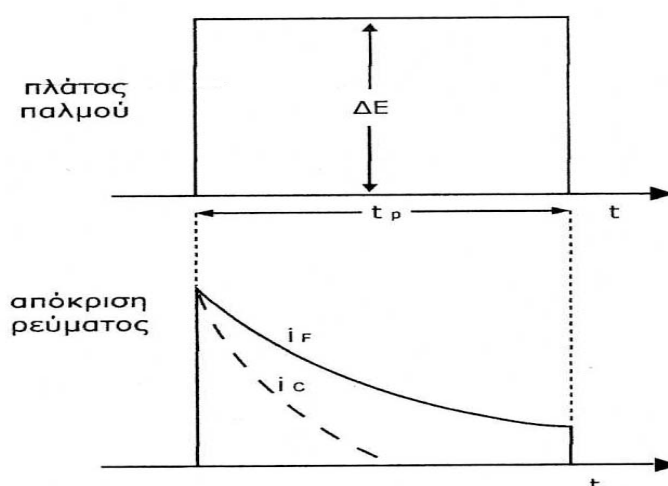
## 1.4 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΣΑΡΩΣΗΣ ΤΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ

### 1.4.1 Βολταμμετρία γραμμικής σάρωσης του δυναμικού

Στην τεχνική αυτή το δυναμικό μεταβάλλεται γραμμικά σε σχέση με τον χρόνο. Η κορυφή του ρεύματος μπορεί να αυξηθεί με ταχύτερη σάρωση του δυναμικού. Το χωρητικό ρεύμα, όμως, που φορτίζει το ηλεκτρόδιο στο εφαρμοζόμενο δυναμικό, είναι επίσης ανάλογο της ταχύτητας σάρωσης του δυναμικού. Έτσι αύξηση της ταχύτητας σάρωσης του δυναμικού έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του ρεύματος φόρτισης. Δηλαδή το χωρητικό ρεύμα περιορίζει το όριο ανίχνευσης.

### 1.4.2 Παλμική βολταμμετρία

Με τη συγκεκριμένη μέθοδο προκαλείται σημαντική μείωση του ανεπιθύμητου χωρητικού ρεύματος και βελτίωση της ευαισθησίας των προσδιορισμών.



Σχήμα 1.5 Δυναμικό και ρεύμα κατά τη διάρκεια του παλμού.

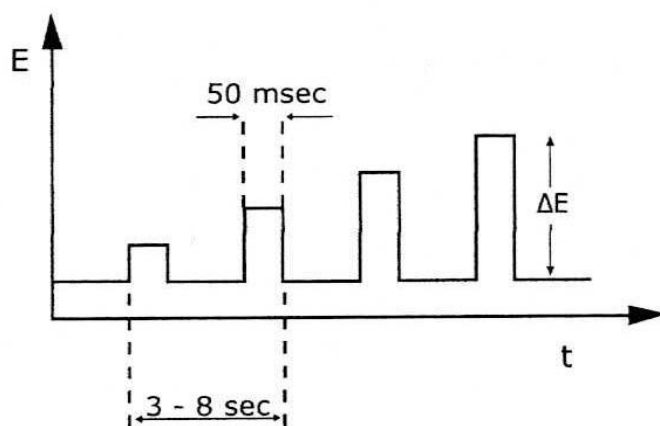
Η τεχνική στηρίζεται στην εφαρμογή παλμού σε σταθερό ή αυξανόμενο δυναμικό επάνω στο ηλεκτρόδιο εργασίας και διακρίνεται σε κανονική και διαφορική παλμική [7]. Μετά την εφαρμογή του παλμού, το χωρητικό ρεύμα φθίνει ταχέως, ενώ το φαρανταιϊκό βραδύτερα. Εξετάζοντας το ρεύμα στα τελευταία χιλιοστοδευτερόλεπτα της διάρκειας του παλμού, το ρεύμα είναι σχεδόν φαρανταιϊκό. Η ευαισθησία αυξάνεται 5 έως 7 φορές συγκρινόμενη με αυτή της κλασσικής πολαρογραφίας.

### 1.4.3 Κανονική παλμική βολταμετρία

Εδώ το δυναμικό του ηλεκτροδίου εργασίας μεταβάλλεται με τη βοήθεια παλμών αυξανόμενου πλάτους που υπερτίθεται σε ένα αρχικά σταθερό δυναμικό (Σχήμα 1.6). Η εφαρμογή των παλμών γίνεται προς το τέλος ζωής της σταγόνας του σταγονικού ηλεκτροδίου υδραργύρου. Η μέτρηση του ρεύματος γίνεται προς το τέλος της εφαρμογής του παλμού, αφού τότε το χωρητικό ρεύμα έχει ελαττωθεί σημαντικά. Το ολικό ρεύμα που λαμβάνεται με αυτόν τον τρόπο δίνεται από την εξίσωση:

$$i = nFA(D/\pi t_p)^{1/2} C \quad (1.3)$$

όπου  $t_p$  είναι η διάρκεια του παλμού σε sec

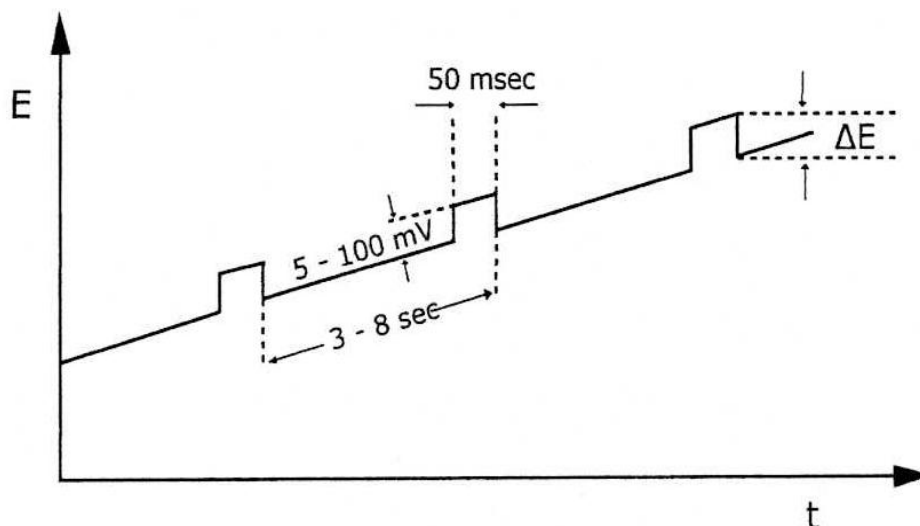


Σχήμα 1.6 Συμπεριφορά δυναμικού-χρόνου στην κανονική παλμική βολταμετρία

### 1.4.4 Διαφορική παλμική βολταμετρία

Σε αυτή την τεχνική οι παλμοί είναι σταθερού πλάτους και υπερτίθενται σε γραμμικώς μεταβαλλόμενο δυναμικό [8]. Οι παλμοί εφαρμόζονται στο ηλεκτρόδιο εργασίας τη χρονική στιγμή αμέσως πριν το τέλος του χρόνου ζωής της σταγόνας. Η

μέτρηση του ρεύματος γίνεται δύο φορές: πριν την εφαρμογή και αμέσως μετά το τέλος του παλμού. Το μέγεθος του πρώτου ρεύματος αφαιρείται αυτόματα από το μέγεθος του δεύτερου και αυτή η διαφορά του ρεύματος παριστάνεται γραφικά σε σχέση με το εφαρμοζόμενο δυναμικό.



**Σχήμα 1.7** Συμπεριφορά δυναμικού-χρόνου στην κανονική παλμική βολταμετρία

Η ηλεκτροδιακή δράση δίνεται από την εξίσωση:

$$i_p = nFAc(D/t_p)^{1/2} (\sigma-1)/(\sigma+1) \quad (1.4)$$

όπου:  $t_p$  = το εύρος του παλμού

$$\sigma = \exp(nF\Delta E/2RT)$$

$\Delta E$  = το πλάτος του παλμού

Αν  $\Delta E$  είναι μικρότερο από τον παράγοντα  $RT/nF$ , το  $(\sigma-1)/(\sigma+1)$  γίνεται  $nF\Delta E/4RT$  και η εξίσωση απλοποιείται στην:

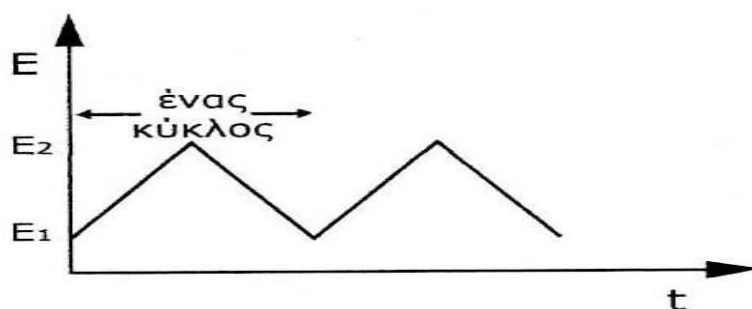
$$i_p = (n^2F^2/4RT)AC\Delta E(d/\pi t_p)^{1/2} \quad (1.5)$$

Το ρεύμα της κορυφής είναι ευθέως ανάλογο με τη συγκέντρωση της προσδιοριζόμενης χημικής οντότητας, ενώ το δυναμικό στο οποίο εμφανίζεται η κορυφή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίησή του αφού συνδέεται με το δυναμικό ημίσεως κύματος με την σχέση:

$$E_p = E_{1/2} - \Delta E/2 \quad (1.6)$$

Τυπικά η διαφορική παλμική τεχνική είναι πιο ευαίσθητη από την κανονική παλμική κατά μια τάξη μεγέθους και το όριο ανίχνευσης μπορεί να είναι  $10^{-7} - 10^{-8} M$ , ενώ στην κανονική παλμική είναι  $10^{-6} - 10^{-7} M$  και στην κλασική συνεχούς ρεύματος περίπου  $10^{-4} - 10^{-5} M$ .

#### 1.4.5 Κυκλική βολταμετρία



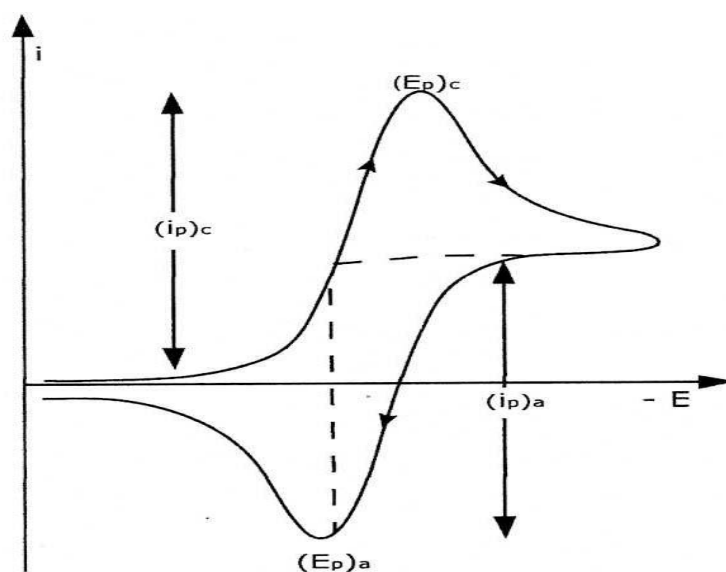
**Σχήμα 1.8** Εφαρμογή της κυματομορφής του δυναμικού στην κυκλική βολταμετρία συναρτήσει του χρόνου.

Η κυκλική βολταμετρία χρησιμοποιείται κυρίως για τη μελέτη του μηχανισμού οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων και το χαρακτηρισμό των οξειδοαναγωγικών ιδιοτήτων των διαφόρων ενώσεων συχνά αποτελεί το πρώτο πείραμα το οποίο εκτελείται σε μια ηλεκτροχημική μελέτη.

Στην κυκλική βολταμετρία εφαρμόζεται επί του ηλεκτροδίου εργασίας τριγωνικό κύμα δυναμικού, πρώτα προς μία διεύθυνση και ύστερα συμμετρικά στην αντίθετη διεύθυνση, που επαναλαμβάνεται ταχέως [9]. Το δυναμικό σαρώνεται στην καθοδική κατεύθυνση στη διαδικασία αναγωγής και στη συνέχεια αντίστροφα στην ανοδική κατεύθυνση μετά τον τερματισμό του κύματος αναγωγής. Το δυναμικό είναι δυνατό να σαρώνεται σαν απλός ή σαν πολλαπλός κύκλος και η ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού μπορεί να φτάσει και τα  $100 \text{ Vs}^{-1}$  [2]. Το τυπικό κυκλικό βολταμμογράφημα για ένα αντιστρεπτό σύστημα αναγωγής φαίνεται στο Σχήμα 1.9.

Οι μετρούμενες παραμέτροι σε ένα κυκλικό βολταμμογράφημα είναι ο λόγος των ρευμάτων των κορυφών  $i_{pa}/i_{pc}$ , καθώς και η διαφορά  $E_{pa} - E_{pc}$  όπου  $E_{pa}$  και  $E_{pc}$  είναι το ανοδικό και καθοδικό δυναμικό αντίστοιχα.

Οι ανεξάρτητες μεταβλητές που χρησιμοποιούνται για διαγνωστικούς σκοπούς είναι η ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού καθώς και η περιοχή σάρωσης του δυναμικού.



**Σχήμα 1.9** Τυπικό αντιστρεπτό κυκλικό βολταμμογράφημα.

Η μορφή του βολταμμετρικού κύματος κατά την αναστροφή εξαρτάται από το δυναμικό αναστροφής,  $E_{λ}$ , ή από το πόσο πέρα από την καθοδική κορυφή συνεχίζεται η σάρωση πριν την αναστροφή.

Οι θεωρητικές σχέσεις για την κυκλική βολταμμετρία αναπτύχθηκαν από τους Nicholson και Shain [10]. Για ένα απλό αντιστρεπτό σύστημα ο λόγος των ρευμάτων  $i_{pa} / i_{pc}$  είναι ίσος με την μονάδα, ενώ η τιμή του ρεύματος του δυναμικού δίνεται από την εξίσωση:

$$i_p = 2,67105 n^{3/2} A D^{1/2} C v^{1/2} \quad (1.7)$$

όπου:  $i_p$  = ρεύμα κορυφής (Ampere)

$n$  = πλήθος ηλεκτρονίων της ηλεκτροδιακής δράσης

$F$  = σταθερά Faraday

$A$  = επιφάνεια του ηλεκτροδίου ( $cm^2$ )

$D$  = συντελεστής διάχυσης ( $cm^2 \cdot s^{-1}$ )

$C$  = συγκέντρωση των ηλεκτροδραστικών ενώσεων στο διάλυμα (M)

$v$  = ρυθμός σάρωσης του δυναμικού ( $Vs^{-1}$ )

Η απόκλιση του λόγου  $i_{pa}/i_{pc}$  από την μονάδα είναι ενδεικτική κινητικών ή άλλων περιπλοκών στην ηλεκτροδιακή διαδικασία.

## 1.5 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΔΙΑΛΥΣΕΩΣ

Οι τεχνικές αναδιάλυσης είναι συνδυαστικές πολυσταδιακές τεχνικές, με το χαρακτηριστικό ότι ο προσδιορισμός στηρίζεται αρχικά στην προσυγκέντρωση της αναλυόμενης χημικής οντότητας επάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας με ηλεκτρόλυση. Ακολουθεί ηλεκτροχημική αναδιάλυση της ουσίας και το παραγόμενο ρεύμα είναι ανάλογο της ηλεκτροχημικά δραστικής ουσίας [8]. Η αναδιάλυση των προσυγκεντρωμένων συστατικών πραγματοποιείται με εφαρμογή βολταμμετρίας συνεχούς ή εναλλασσόμενου ρεύματος, καθώς και με διαφορική παλμική βολταμμετρία. Έχουν επιτευχθεί όρια ανίχνευσης μέχρι και  $10^{-9}$  Μ.

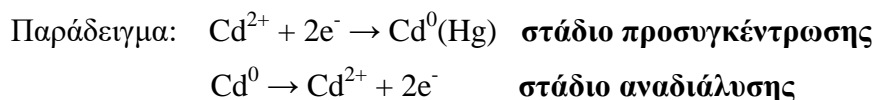
### 1.5.1 Ανοδική Αναδιαλυτική Βολταμμετρία

Σημαντική αύξηση της ευαισθησίας των πολαρογραφικών και βολταμμετρικών μεθόδων μπορεί να επιτευχθεί με αύξηση της συγκέντρωσης των ουσιών οι οποίες πρόκειται να προσδιοριστούν. Αυτή η αύξηση της συγκέντρωσης είναι δυνατόν να επιτευχθεί πριν τον προσδιορισμό, συνήθως με ηλεκτρόλυση σε ένα στατικό ηλεκτρόδιο εργασίας.

Κατά το στάδιο της προσυγκέντρωσης, η οποία μπορεί να παρομοιαστεί με ηλεκτρολυτική εκχύλιση και συμβαίνει κάτω από κατάλληλες συνθήκες, το αμάλαμα, περιέχει υψηλότερη συγκέντρωση του στοιχείου το οποίο μελετάται από τη συγκέντρωση την οποία έχει όταν βρίσκεται στο υδατικό διάλυμα. Η συγκέντρωση του μετάλλου στο αμάλαμα εξαρτάται από τις συνθήκες της ηλεκτρόλυσης (όπως π.χ. ο χρόνος). Ο βολταμμετρικός προσδιορισμός γίνεται στη συνέχεια στο 'ηλεκτρόδιο αμάλαμα'. Εάν υποθεθεί ότι σχεδιάζεται το διάγραμμα ρεύματος/δυναμικού ανοδικά (από αρνητικά σε θετικότερα δυναμικά) το ύψος της κορυφής του ρεύματος είναι συνάρτηση της συγκέντρωσης του μετάλλου στο αμάλαμα και με δεδομένες συνθήκες ηλεκτρόλυσης, με τη συγκέντρωση του μετάλλου στο διάλυμα.

Η διαδικασία του προσδιορισμού χαρακτηρίζεται ως αντίστροφη γιατί γενικά λαμβάνει χώρα προς την αντίθετη κατεύθυνση από αυτή η οποία χρησιμοποιήθηκε κατά τον 'ηλεκτροχημικό εμπλουτισμό' ή ηλεκτρολυτική απόθεση. Στην απλούστερη περίπτωση, η ηλεκτρολυτική απόθεση αποτελείται από την αναγωγή του κατιόντος στην μεταλλική μορφή, η οποία για παράδειγμα είναι δυνατόν να είναι διαλυτή σε ένα

στατικό ηλεκτρόδιο υδραργύρου εξαιτίας σχηματισμού αμαλγάματος. Στη συνέχεια ακολουθεί το στάδιο της αναδιάλυσης, όπου το διαλυμένο στον υδράργυρο μέταλλο αναδιαλύεται με οξείδωση, κατά τη σάρωση του δυναμικού προς θετική (ανοδική) κατεύθυνση.

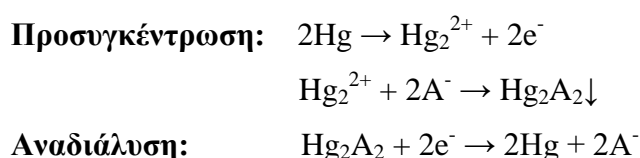


Η αναδιαλυτική βολταμμετρία είναι εξαιρετικά ευαίσθητη μέθοδος. Είναι δυνατός ο προσδιορισμός της τάξης των ppb, είναι επίσης αποτελεσματική καθώς και σχετικά μη δαπανηρή. Μετά το διαχωρισμό είναι δυνατόν να προσδιοριστούν τα παρακάτω μέταλλα ως αμάλγαμα με τον υδράργυρο όπως: Pb, Bi, Cu, Zn, Cd.

### 1.5.2 Καθοδική Αναδιαλυτική Βολταμμετρία

Η καθοδική αναδιαλυτική βολταμμετρία χρησιμοποιείται στον προσδιορισμό οργανικών καθώς και ανόργανων ενώσεων οι οποίες σχηματίζουν δυσδιάλυτα άλατα με το ηλεκτροδιακό υλικό. Συνήθως, ως ηλεκτρόδιο εργασίας χρησιμοποιείται ηλεκτρόδιο υδραργύρου καθώς επίσης και το ηλεκτρόδιο αργύρου το οποίο χρησιμοποιείται στον προσδιορισμό αλογονούχων καθώς και θειούχων ιόντων.

Οι σχετικές αντιδράσεις στο ηλεκτρόδιο του υδραργύρου είναι:



όπου  $\text{A}^-$  είναι το προσδιοριζόμενο ανιόν το οποίο για λόγους απλούστευσης θεωρούμε ότι είναι μονοσθενές και  $\text{Hg}_2\text{A}_2$  είναι η δυσδιάλυτη ένωση η οποία σχηματίστηκε στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου.

Η ευαισθησία του προσδιορισμού εξαρτάται από την ποσότητα του προσδιοριζόμενου συστατικού το οποίο είναι δυνατόν να αποθεθεί ηλεκτρολυτικά σε δεδομένο χρονικό διάστημα. Αυτή η ποσότητα είναι συνάρτηση της κινητικής του σχηματισμού καθώς και της διαλυτοποίησης της ένωσης η οποία αποτέθηκε, του συντελεστή διάχυσης του αντιδρώντος ιόντος στη λεπτή στοιβάδα που σχηματίστηκε καθώς και της πυκνότητας της λεπτής στοιβάδας. Η ευαισθησία εξαρτάται επίσης από την ταχύτητα διάστασης της δυσδιάλυτης ένωσης κατά τη διάρκεια της αναδιάλυσης.

Η τεχνική αυτή εφαρμόστηκε στον προσδιορισμό ανιόντων όπως αλογονούχων ιόντων, ιόντων σεληνίου, θειούχων ιόντων, οξυανιόντων καθώς και οργανικών ενώσεων οι οποίες περιέχουν θειούχες ομάδες (π.χ. θειόλες).

### 1.5.3 Προσροφητική Αναδιαλυτική Βολταμετρία

Η ανάπτυξη της προσροφητικής βολταμετρίας είναι αποτέλεσμα της εκμετάλλευσης της αυθόρμητης τάσης των αντιδρώντων να προσροφώνται, για την αύξηση της ευαισθησίας των βολταμετρικών προσδιορισμών. Το φαινόμενο της προσρόφησης θεωρήθηκε πρόβλημα και αποδόθηκαν σε αυτό πολλά ανεξήγητα αποτελέσματα. Εξάλλου, η αύξηση λόγω προσρόφησης του ρεύματος η οποία παρατηρήθηκε κατά τις πολαρογραφικές μελέτες πολλών οργανικών και ανόργανων μορίων ή ιόντων, προσέφερε πολλά αναλυτικά πλεονεκτήματα.

Η διαφορά της προσροφητικής βολταμετρίας από την ανοδική και την καθοδική αναδιαλυτική βολταμετρία βρίσκεται στο στάδιο της προσυγκέντρωσης. Το σύμπλοκο μετάλλου (κυρίως ιόντα μεταβατικών στοιχείων) – συμπλεκτικού (ligand) προσυγκεντρώνεται στη διαφασική επιφάνεια ηλεκτροδίου – διαλύματος. Η αυξημένη κατά 5 και 10 φορές ευαισθησία, αποδόθηκε στην παρουσία ηλεκτροενεργών συστατικών στην επιφάνεια του σταγονικού ηλεκτροδίου. Η χρήση αυτού του τύπου του ηλεκτροδίου, δεν επιτρέπει την πλήρη εκμετάλλευση της ευαισθησίας με τη διαφασική συσσώρευση, γι' αυτό το λόγο προτιμήθηκαν στατικά ηλεκτρόδια. Έτσι, η προσυγκέντρωση βασίζεται εξ ολοκλήρου στη διαφασική συσσώρευση και δεν περιλαμβάνει καμιά φαρανταϊκή δράση. Η προσροφητική βολταμετρία εκτός απ' την αυξανόμενη σπουδαιότητα της σαν αναλυτική τεχνική, χρησιμεύει και για τη διευκρίνιση των διαφασικών και οξειδοαναγωγικών ιδιοτήτων των τασενεργών ουσιών.

Στην ηλεκτροχημεία προσρόφηση σημαίνει συγκράτηση των μορίων ή των μοριακών ιόντων ή των ιόντων στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Η διεπιφάνεια μεταξύ ηλεκτροδίου και διαλύματος εμφανίζει ιδιότητες οι οποίες διαφέρουν απ' αυτές του διαλύματος ή του ηλεκτροδίου. Η τάση της διεπιφάνειας να έλξει και να συγκρατήσει τα αντιδρώντα είναι από τις πιο σημαντικές ιδιότητές της.

Η προσρόφηση της διαλυμένης ουσίας είναι μια διαδικασία αντικατάστασης, κατά την οποία τα μόρια του διαλύτη αντικαθίστανται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου από μόρια ή ιόντα της διαλυμένης ουσίας. Η τελευταία δεν αντικαθιστά



πάντα εξολοκλήρου τα μόρια του διαλύτη, το μέγεθος της προσρόφησης εξαρτάται από το Μοριακό Βάρος καθώς και από τη διαλυτότητα του αντιδρώντος σε δεδομένο διαλύτη, αφού μικρότερη διαλυτότητα οδηγεί σε ισχυρότερη προσρόφηση. Επίσης και άλλες δυνάμεις οδηγούν σε προσρόφηση, όπως ηλεκτροστατική έλξη μεταξύ του ιόντος και του φορτισμένου ηλεκτροδίου, δυνάμεις διπόλου-πεδίου, δράση μεταξύ της ηλεκτροδιακής διπλοστιβάδας και των χαρακτηριστικών ομάδων των οργανικών αντιδρώντων, καθώς και χημειορόφηση συγκεκριμένων ομάδων στις επιφάνειες των μεταλλικών ηλεκτροδίων.

Το ρεύμα είναι ευθέως ανάλογο της συγκεντρώσεως της προσροφημένης ουσίας στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου και αυτή με τη σειρά της ανάλογη της συγκεντρώσεως της διαλυμένης ουσίας. Η κατανόηση αυτής της σχέσης είναι δυνατή από την ισόθερμη προσρόφησης. Οι ισόθερμες είναι σχέσεις ισορροπίας μεταξύ της συγκέντρωσης της ουσίας στην επιφάνεια που έχει προσροφηθεί και της συγκεντρώσεώς της στο διάλυμα.

Η πιο γνωστή είναι η ισόθερμη του Langmuir:

$$\Gamma = \Gamma_m [BC / (1 + BC)] \quad (1.8)$$

όπου  $\Gamma$  είναι η συγκέντρωση της προσροφημένης ουσίας,  $\Gamma_m$  η επιφανειακή συγκέντρωση που αντιστοιχεί σε μονομοριακή στιβάδα,  $C$  η συγκέντρωση της ουσίας στο διάλυμα,  $B$  ο συντελεστής προσροφήσεως (ο οποίος εξαρτάται από την αλληλεπίδραση μεταξύ της προσροφημένης ουσίας και της επιφάνειας, που με τον τρόπο αυτό σχετίζεται με την ελεύθερη ενέργεια προσροφήσεως).

Η ισόθερμη του Langmuir επίσης μπορεί να γραφεί ως:

$$BC = \theta / (1 - \theta) \quad (1.9)$$

όπου  $\theta = \Gamma / \Gamma_m$  είναι η κλασική επιφανειακή κάλυψη.

Όταν  $1 \gg BC$  η εξίσωση παίρνει τη μορφή:

$$\Gamma = \Gamma_m BC \quad (1.10)$$

Για πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις της ουσίας στην επιφάνεια η συγκέντρωση της προσροφημένης ουσίας είναι ευθέως ανάλογη της συγκεντρώσεως της ουσίας το διάλυμα. Η ισόθερμη του Langmuir ανταποκρίνεται σε φυσικό μοντέλο σύμφωνα με το οποίο η μέγιστη κάλυψη επιφάνειας αντιστοιχεί σε μονομοριακή στιβάδα, εκτίμηση η οποία σε πολλές περιπτώσεις δεν είναι εφαρμόσιμη, κι αυτό γιατί έτσι λανθασμένα συμπεραίνεται, ότι δεν υπάρχουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ των προσροφημένων ουσιών στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Σε τέτοιες περιπτώσεις εφαρμόζεται η ισόθερμη του Frumkin:

$$BC=[\theta/(\theta-1)]\exp(-2g\theta) \quad (1.11)$$

όπου  $g$  είναι η παράμετρος της αλληλεπιδράσεως μεταξύ των μοριών των προσροφημένων ουσιών (και είναι θετική όταν η αλληλεπίδραση οφείλεται σε έλξη και αρνητική όταν οφείλεται σε άπωση). Όταν το  $g$  είναι ίσο με μηδέν, τότε έχουμε την ισόθερμη του Langmuir.

Οι εφαρμογές της προσροφητικής βολταμμετρίας στον προσδιορισμό οργανικών ενώσεων, βαρέων μετάλλων και ανιόντων την καθιστά ιδιαίτερα ελκυστική, η υψηλή της ευαισθησία, η οποία επιτυγχάνεται με το στάδιο της προσυγκέντρωσης, χωρίς να είναι απαραίτητη προηγουμένως κάποια διαδικασία απομόνωσης του συστατικού το οποίο πρόκειται να προσδιοριστεί (π.χ. με εκχύλιση) είναι γεγονός που ελαττώνει τον απαιτούμενο χρόνο ανάλυσης και την πιθανότητα επιβάρυνσης του δείγματος, ενώ επιτρέπει και την αυτοματοποίησή της.

#### 1.5.4 Προσροφητική βολταμμετρία αλλαγής μέσου

Η βολταμμετρία αλλαγής μέσου ενδείκνυται σε περιπτώσεις όπου είναι απαραίτητη η αποφυγή παρεμποδίσεων. Έτσι είναι δυνατή η παρακολούθηση διεργασιών που λαμβάνουν χώρα μόνο πάνω στην ηλεκτροδιακή επιφάνεια. Στην περίπτωση ανάπτυξης των ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων είναι απαραίτητη η αλλαγή μέσου καθώς ενδιαφέρει η διαμόρφωση βιομορίων πάνω στην ηλεκτροδιακή επιφάνεια χωρίς την ύπαρξη παρεμποδίζουσων συστατικών.

### 1.6 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΑΝΑΔΙΑΛΥΤΙΚΗ ΒΟΛΤΑΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

#### 1.6.1 Ο φέρων ηλεκτρολύτης

Η επιλογή του φέροντα ηλεκτρολύτη γίνεται με βάση τα πολαρογραφικά δεδομένα των ουσιών οι οποίες μελετώνται. Η θέση του δυναμικού ημίσεως κύματος εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις συνθήκες της ηλεκτρόλυσης και επιτρέπει να γίνουν προβλέψεις σχετικά με τη διευκρινιστική ικανότητα των ανοδικών κορυφών.

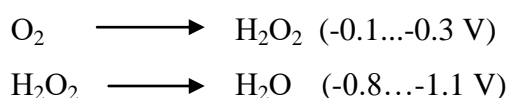
Τα δυναμικά των ανοδικών κορυφών, στην περίπτωση της βολταμμετρίας δίνονται από την εξίσωση:

$$E_p = E_{1/2} + 0.029/n \quad (1.12)$$

και πρέπει οπωσδήποτε να υπολογίζονται με βάση τα πολαρογραφικά δεδομένα, όταν οι συνθήκες αντιστρεπτότητας της ηλεκτροδιακής δράσης είναι γνωστές. Με αυξανόμενη την μη αντιστρεπτότητα, τα ανοδικά δυναμικά τείνουν να μετακινηθούν σε θετικότερη κατεύθυνση.

Ο φέρων ηλεκτρολύτης στην ιχνοανάλυση πρέπει να έχει τη μέγιστη δυνατή καθαρότητα, ενώ η συγκέντρωσή του πρέπει να είναι η κατάλληλη για την επίτευξη συγκεκριμένου βαθμού αγωγιμότητας.

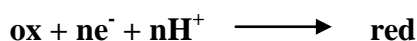
Απαραίτητη είναι η απαρέωση του διαλύματος που επιτυγχάνεται με τη διέλευση ρεύματος αναλυτικώς καθαρού αζώτου. Το διαλελυμένο οξυγόνο ανάγεται σε δυο στάδια:



Όταν η απομάκρυνση του οξυγόνου είναι ανεπαρκής, τότε σύμφωνα με τις δυο παραπάνω αντιδράσεις παράγονται ρεύματα τα οποία αυξάνουν τη βασική γραμμή. Ακόμη, ταυτόχρονα με την ηλεκτροκαταλυτική οξείδωση του αμαλγάματος, είναι δυνατή η απευθείας αντίδραση μεταξύ του αμαλγάματος και του διαλελυμένου οξυγόνου, η οποία τείνει να ελαττώσει τα ανοδικά ρεύματα. Τελικά, ο σχηματισμός των υδροξυλιόντων σε ουδέτερα διαλύματα είτε σε διαλύματα στα οποία δεν υπάρχει ρυθμιστικό σύστημα οδηγεί σε καταβύθιση υδροξειδίων, και στην ελάττωση του ρεύματος αναδιάλυσης, καθώς και στην παραμόρφωση των βολταμογραφημάτων κατά τη διάρκεια του προσδιορισμού.

### 1.6.2 Επίδραση pH

Τα υδρογονοκατιόντα υπεισέρχονται στην αναγωγή των περισσότερων οργανικών ενώσεων. Η αναγωγή προϋποθέτει προσθήκη ηλεκτρονίων σε ουδέτερο μόριο, έτσι ώστε να σχηματιστεί η ανηγμένη μορφή, οπότε και απαιτείται ίσος αριθμός υδρογονοκατιόντων προκειμένου να διατηρηθεί η ουδετερότητα.



Η συγκέντρωση των υδρογονοκατιόντων υπεισέρχεται στην εξίσωση του Nernst η οποία είναι για την παραπάνω αντίδραση:

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \left[ \frac{C^{\text{ox}} C_{\text{H}^+}^n}{C^{\text{red}}} \right] \quad (1.13)$$

Έτσι γίνεται φανερό ότι το δυναμικό εξαρτάται από τη συγκέντρωση των υδρογονοκατιόντων, δηλαδή από το pH του διαλύματος.

Η εξίσωση του Nernst εφαρμόζεται σε όλα τα θερμοδυναμικώς αντιστρεπτά συστήματα, αλλά μια ισοδύναμη έκφραση η οποία περιλαμβάνει τη συγκέντρωση των υδρογονοκατιόντων εφαρμόζεται σε όλες τις οξειδώσεις και τις αναγωγές.

Το δυναμικό ημίσεως κύματος εξαρτάται από το pH και δίνεται από τη σχέση:

$$E_{1/2} = E_{\text{const}} + \frac{RT}{nF} \ln C_{\text{H}^+} \quad (1.14)$$

$$E_{1/2} = E_{\text{const}} - (p) \frac{RT}{nF} \text{pH} \quad (1.15)$$

Για θερμοδυναμικά μη αντιστρεπτή διαδικασία η εξίσωση γίνεται:

$$E_{1/2} = E_{\text{const}} - (p) \frac{RT}{\alpha nF} \text{pH} \quad (1.16)$$

όπου  $0 < \alpha < 1$

Έτσι, φαίνεται ότι το δυναμικό ημίσεως κύματος για την αναγωγή ή την οξείδωση μιας ουσίας μετατοπίζεται σταθερά ανά μονάδα pH, και εξαρτάται από τον αριθμό των υδρογονοκατιόντων και των ηλεκτρονίων στο στάδιο που καθορίζει το δυναμικό. Για αναγωγή, το δυναμικό μετατοπίζεται σε αρνητικότερα δυναμικά με αύξηση του pH, οπότε η αναγωγή γίνεται δυσκολότερα, ενώ και στην οξείδωση συμβαίνει το ίδιο, οπότε αυτή γίνεται ευκολότερα.

Η αναγωγή των μεταλλικών ιόντων συνήθως δεν προϋποθέτει υδρογονοκατιόντα αλλά η σταθερότητα πολλών συμπλόκων τα οποία σχηματίζονται μεταξύ κατιόντος και συμπλεκτικού (ligand) εξαρτάται από το pH, γι' αυτό απαιτείται η παρουσία ρυθμιστικών συστημάτων.

### 1.6.3 Επίδραση συμπλεκτικών μέσων

Όταν σχηματίζεται σταθερότερη χημική οντότητα μεταξύ του μεταλλικού ιόντος και ενός συμπλεκτικού (ligand) στο διάλυμα, τότε εκλύεται ένα ποσό ενέργειας. Αυτό το επιπλέον ποσό ενέργειας πρέπει να επιστραφεί στο ιόν για την απομάκρυνση του συμπλεκτικού (ligand). Αυτή η επιπλέον ενεργειακή απαίτηση εκφράζεται με αύξηση (σε αρνητικότερα δυναμικά) τόσο του δυναμικού της αναγωγής όσο και του δυναμικού ημίσεως κύματος του πολαρογραφικού κύματος.

Αν το συμπλεκτικό είναι σε ικανοποιητική περίσσεια, έτσι ώστε το ιόν  $M^{n+}$  να είναι επαρκώς συμπλεγμένο ως  $MI_q$ , τότε η μετατόπιση του δυναμικού δίνεται από τη σχέση:

$$\Delta E_{1/2} = -(RT/nF)\ln K_q - qRT/nF \ln C_L \quad (1.17)$$

Σε μερικές περιπτώσεις το πολαρογραφικό κύμα είναι δυνατό να οφείλεται σε μεταβολή της βαθμίδας οξειδώσεως του μεταλλικού ιόντος και όχι σε αναγωγή του στη στοιχειακή μεταλλική μορφή π.χ. αναγωγή του  $Fe^{3+}$  σε  $Fe^{2+}$ . Αν η οξειδωμένη μορφή σχηματίζει σταθερότερη χημική οντότητα με τον υποκαταστάτη, τότε το δυναμικό ημίσεως κύματος μετατοπίζεται σε αρνητικότερα δυναμικά. Το αντίθετο συμβαίνει αν η σταθερότερη χημική οντότητα σχηματίζεται με την ανηγμένη μορφή.

Αν το προϊόν της ηλεκτρόλυσης σχηματίζει σταθερότερη χημική οντότητα τότε η ηλεκτρόλυση διευκολύνεται, ενώ στην αντίθετη περίπτωση η ηλεκτρόλυση δυσχεραίνεται.

#### 1.6.4 Επίδραση χρόνου και δυναμικού προσροφήσεως

Κατά τη διάρκεια του σταδίου της προσυγκεντρώσεως το προσδιοριζόμενο συστατικό προσυγκεντρώνεται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, οπότε όπως είναι προφανές μεγάλοι χρόνοι προσυγκεντρώσεως οδηγούν σε αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου, δεν συνιστώνται όμως, γιατί οδηγούν σε απώλεια της αναλογικότητας μεταξύ του τελικού σήματος και της προσυγκεντρώσεως του προσδιοριζόμενου συστατικού. Ο χρόνος προσυγκεντρώσεως είναι προτιμότερο να ρυθμίζεται, ώστε μόνο το 2% του συστατικού που προσδιορίζεται να προσυγκεντρώνεται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου.

#### 1.6.5 Επίδραση αλάτων

Στο τελικό διάλυμα που πρόκειται να αναλυθεί είναι δυνατό να υπάρχουν μεγάλες ποσότητες αλάτων που προέρχονται είτε από το ίδιο το δείγμα είτε από την προσθήκη οξέων κατά το στάδιο της πέψης του δείγματος ή κατά το διαχωρισμό της ουσίας, που εξουδετερώνεται πλήρως ή μερικώς με προσθήκη κάποιου ηλεκτρολύτη προκειμένου να πραγματοποιηθεί ο προσδιορισμός. Υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων μεταβάλλουν το ιξώδες του διαλύματος οπότε σύμφωνα με το νόμο των Stokes-Einstein μεταβάλλεται ο συντελεστής διάχυσης:

$$D \cdot n = \text{σταθερό} \quad (1.18)$$

όπου  $D$  = συντελεστής διάχυσης και  $n$  = ιξώδες.

Στην ιχνοανάλυση υπάρχει πάντα μια βέλτιστη συγκέντρωση αλάτων, η οποία αν ξεπεραστεί, ελαττώνεται η ευαισθησία του προσδιορισμού.

### 1.6.6 Επίδραση τασενεργών ουσιών και οργανικών διαλυτών

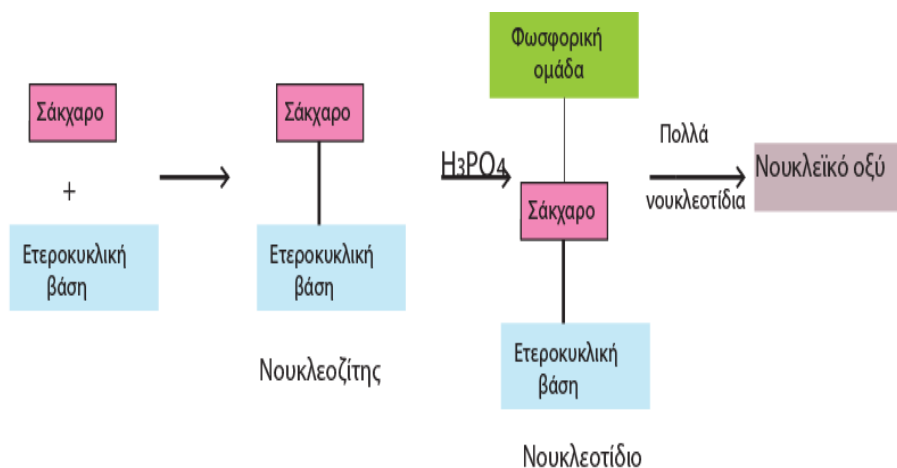
Οι τασενεργές ουσίες, οι οποίες είναι δυνατόν να συνυπάρχουν με το δείγμα είτε ως ακαθαρσίες είτε λόγω της φύσης του δείγματος, κατά τη διάρκεια της ηλεκτρολύσεως τείνουν να προσροφώνται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, είναι δυνατόν επίσης να βρίσκονται παρούσες σε μεγάλες συγκεντρώσεις οπότε εμποδίζουν μηχανικά τη διάχυση του προσδιοριζόμενου συστατικού προς την επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Πάντως με τον ένα ή τον άλλο τρόπο παρεμποδίζουν τον προσδιορισμό επηρεάζοντας τις ηλεκτροδιακές δράσεις κατά τη διάρκεια της αναδιάλυσης. Το μέγεθος καθώς και η φύση αυτών των επιδράσεων εξαρτάται από το είδος των τασενεργών ουσιών (ανιονικές, κατιονικές ή ουδέτερες) και από την ουσία που μελετάται.

Το αποτέλεσμα είναι συνήθως ελάττωση του βολταμμετρικού σήματος καθώς επίσης και μετατόπισή του σε θετική κατεύθυνση, είτε ακόμη παραμόρφωση του βολταμμογραφήματος και σχάση των κορυφών. Σ' αυτές τις περιπτώσεις η ταυτοποίηση των κορυφών πρέπει να γίνεται με τη μέθοδο των σταθερών προσθηκών.

Η επίδραση των οργανικών διαλυτών είναι ανάλογη μ' αυτή των αλάτων και των τασενεργών ουσιών, επιπλέον μεταβάλλουν το ιξώδες του συστήματος και επομένως τον συντελεστή διάχυσης όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. [2]

## 2. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ DNA

### 2.1 ΝΟΥΚΛΕΪΚΑ ΟΞΕΑ ΚΑΙ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ

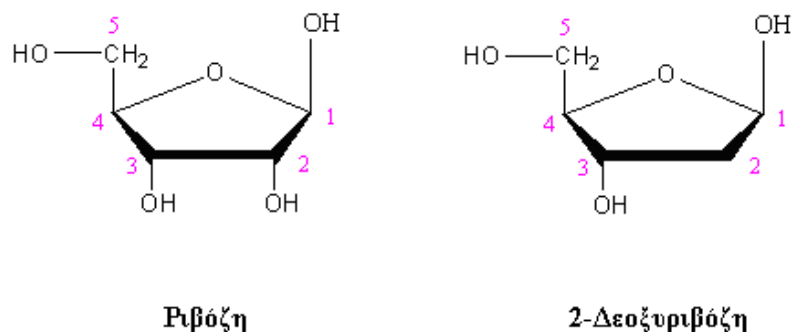


**Σχήμα 2.1** Σχηματισμός νουκλεϊκού οξέος

Τα νουκλεϊκά οξέα ,δεοξυριβονουκλεϊνικό οξύ (DNA) και ριβονουκλεϊκό οξύ (RNA), είναι τα μόρια –φορείς της γενετικής πληροφορίας ενός κυττάρου. Στα μόρια των DNA βρίσκονται κωδικοποιημένες όλες οι πληροφορίες οι οποίες προσδιορίζουν τη φύση του κυττάρου, ελέγχουν την ανάπτυξη και τη διαίρεση του και κατευθύνουν τη βιοσύνθεση των ενζύμων και των άλλων πρωτεϊνών που είναι απαραίτητες για τις φυσιολογικές λειτουργίες του.

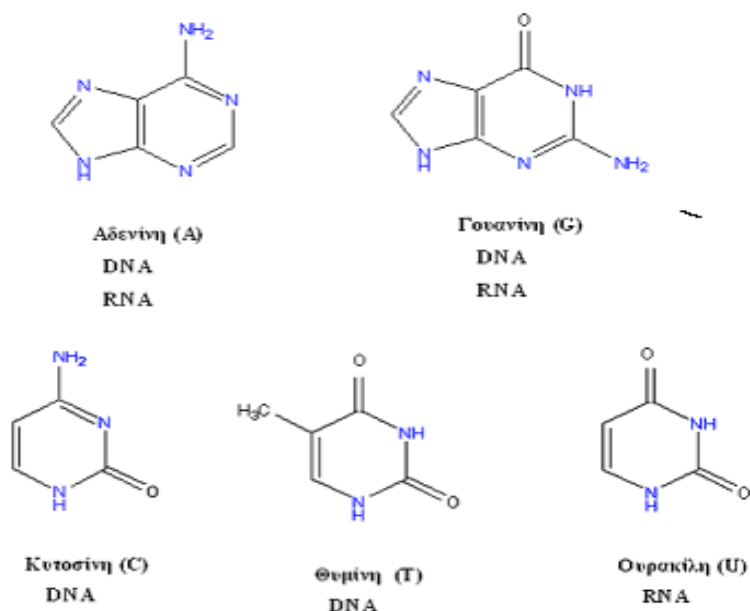
Όπως οι πρωτεΐνες είναι βιοπολυμερή που αποτελούνται από αμινοξέα, έτσι και τα νουκλεϊκά οξέα είναι βιοπολυμερή που απαρτίζονται από νουκλεοτίδια, τα οποία ενώνονται μεταξύ τους σχηματίζοντας μακριές αλυσίδες. Κάθε νουκλεοτίδιο αποτελείται από έναν νουκλεοζίτη συνδεδεμένο με μια φωσφορική ομάδα, ενώ κάθε νουκλεοζίτης αποτελείται από ένα σάκχαρο (αλδοπεντόζη) συνδεδεμένο με μια ετεροκυκλική βάση πουρίνης ή πυριμιδίνης .

Το σάκχαρο που συμμετέχει στα RNA είναι η ριβόζη, ενώ αυτό που συμμετέχει στα DNA είναι η 2' - δεοξυριβόζη . (Το πρόθεμα 2' - δεοξυ υποδηλώνει ότι δεν υπάρχει άτομο οξυγόνου στη θέση 2' της ριβόζης. Οι αριθμοί που τονίζονται αναφέρονται σε θέσεις του σακχάρου του νουκλεοτιδίου, ενώ οι αριθμοί χωρίς τονισμό αναφέρονται σε θέσεις του ετεροκυκλικού δακτυλίου της βάσης ).



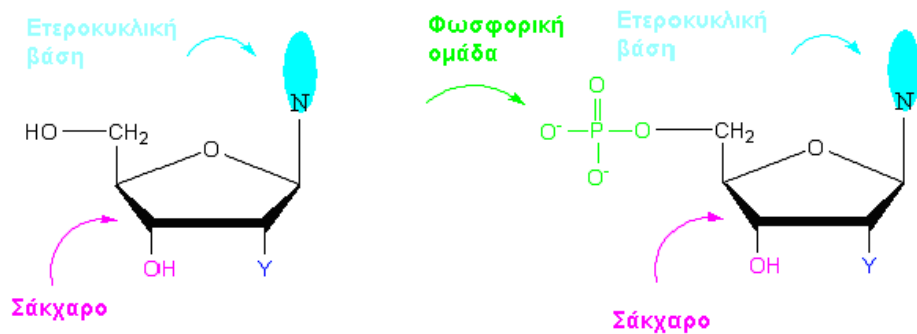
**Σχήμα 2.2** Σάκχαρα νουκλεοτιδίων

Στα δεοξυριβονουκλεοτίδια απαντούν τέσσερις διαφορετικές ετεροκυκλικές βάσεις. Οι δύο είναι υποκατεστημένες πουρίνες ( **αδενίνη** και **γουανίνη** ), ενώ οι άλλες δύο είναι υποκατεστημένες πιριμιδίνες ( **κυτοσίνη** και **θυμίνη** ). Η αδενίνη, η γουανίνη και η κυτοσίνη αποτελούν, επίσης συστατικά των RNA, όμως η θυμίνη δεν απαντά σε αυτά και αντικαθίσταται από μία άλλη πιριμιδινική βάση που λέγεται **ουρακίλη**.



**Σχήμα 2.3** Οι βάσεις του DNA





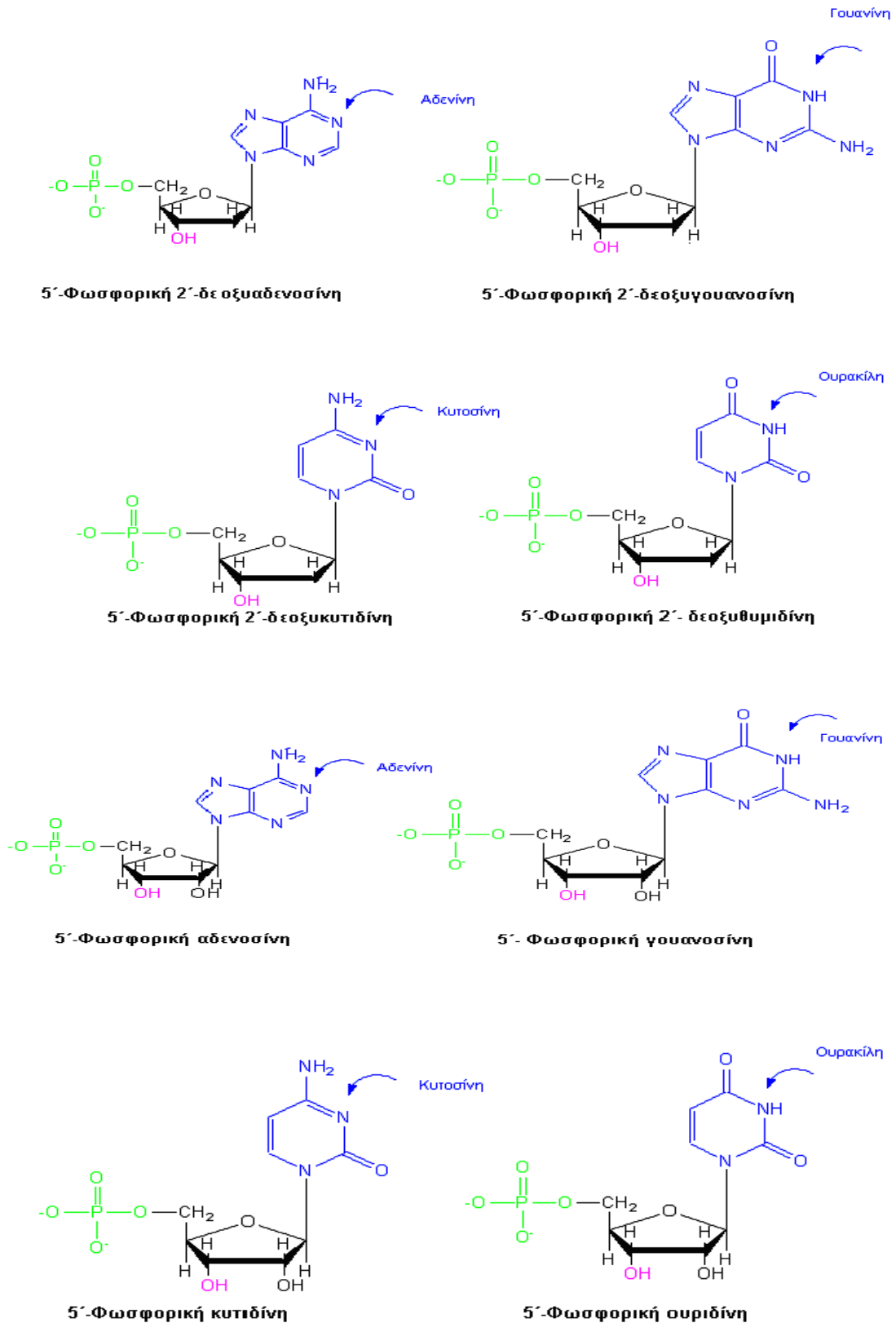
α) Νουκλεοζίτης

β) Νουκλεοτίδιο

**Σχήμα 2.4** α) Ένας νουκλεοζίτης και β) ένα νουκλεοτίδιο. Όταν  $Y=H$ , το σάκχαρο είναι η δεοξυριβόζη. Όταν  $Y=OH$ , το σάκχαρο είναι η ριβόζη.

Τόσο στα DNA όσο και στα RNA, οι ετεροκυκλικές αμίνες ( οι βάσεις ) ενώνονται με τον C 1' του σακχάρου, ενώ η φωσφορική ομάδα ενώνεται μέσω εστερικού δεσμού με τον C5' του σακχάρου. Έτσι, οι νουκλεοζίτες και τα νουκλεοτίδια παρουσιάζουν τη γενική δομή που φαίνεται στο Σχήμα 2.4. Οι πλήρεις δομές των τεσσάρων δεοξυριβονουκλεοτιδίων και των τεσσάρων ριβονουκλεοτιδίων παρατίθεται στο Σχήμα 2.5.

Παρόλο που τα DNA και τα RNA είναι παρόμοια από χημική άποψη, έχουν διαφορετικό μέγεθος και διαφορετικούς βιολογικούς ρόλους μέσα στο κύτταρο. Τα μόρια των DNA είναι τεράστια. Έχουν μοριακά βάρη που μπορεί να φτάσουν τα 150 δισεκατομμύρια, μήκος μέχρι 12cm και απαντούν κυρίως στους πυρήνες των κυττάρων. Τα μόρια των RNA, αντίθετα είναι πολύ μικρότερα (το μοριακό βάρος τους δεν υπερβαίνει τις 35.000) και απαντούν κυρίως έξω από τον πυρήνα του κυττάρου.

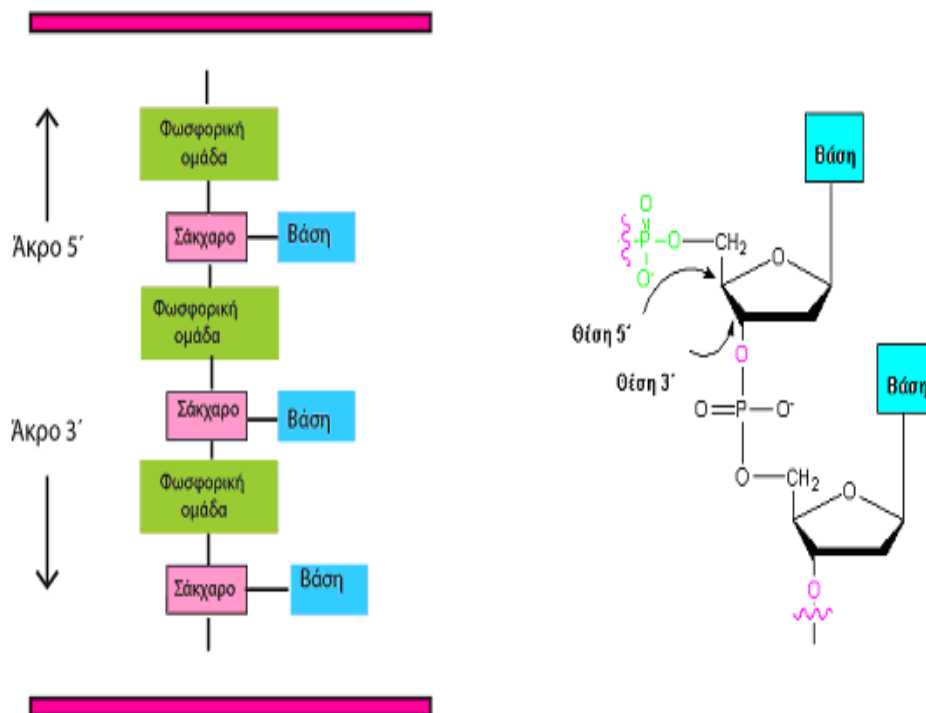


**Σχήμα 2.5** Ονομασίες και δομές των τεσσάρων δεοξυριβονουκλεοτιδίων και των τεσσάρων ριβονουκλεοτιδίων.

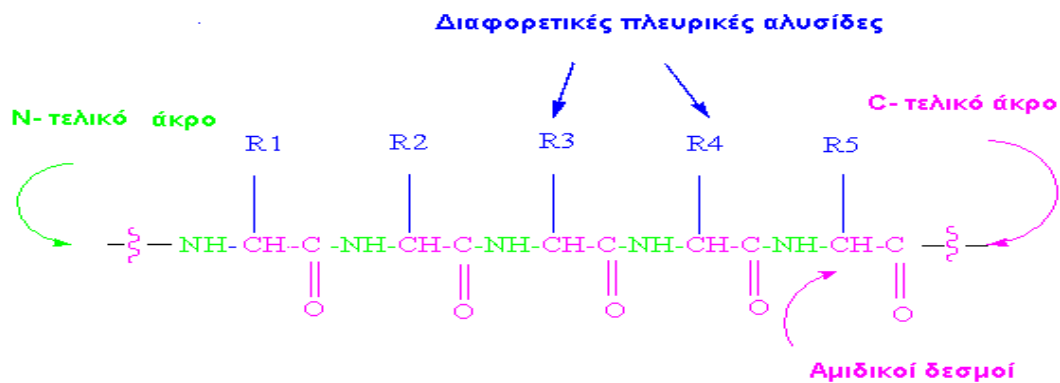
## 2.2 ΔΟΜΗ ΤΟΥ DNA

Τα νουκλεοτίδια συνδέονται μεταξύ τους στα DNA, μέσω ενός φωσφορικού δεσμού, ανάμεσα στην 5'-φωσφορική ομάδα του ενός νουκλεοτιδίου και την 3'-υδροξυλομάδα του σακχάρου ενός άλλου νουκλεοτιδίου (Σχήμα 2.6). Το ένα άκρο του πολυμερούς νουκλεϊκού οξέος έχει μία ελεύθερη υδροξυλομάδα στον C3' ( το **άκρο 3'**), ενώ το άλλο άκρο έχει μία ελεύθερη φωσφορική ομάδα στον C5' ( το **άκρο 5'**).

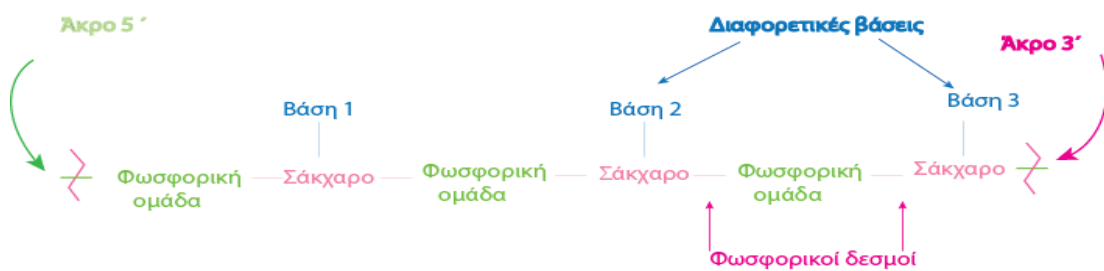
Όπως η δομή μιας πρωτεΐνη (Σχήμα 2.7) εξαρτάται από την ακολουθία με την οποία είναι ενωμένα τα αμινοξέα, έτσι και η δομή των νουκλεϊκών οξέων (Σχήμα 2.8) εξαρτάται από την ακολουθία των νουκλεοτιδίων. Κατ' αναλογία, όπως μια πρωτεΐνη αποτελείται από πολυαμιδική αλυσίδα με διάφορες πλευρικές ανθρακικές αλυσίδες συνδεδεμένες σε αυτή, έτσι και στο σκελετό του νουκλεϊκού οξέος υπάρχει μία εναλλαγή μορίων σακχάρου –φωσφορικής ομάδας με διάφορες βάσεις.



Σχήμα 2.6 Γενικευμένη δομή των DNA



**Σχήμα 2.7** Μία πρωτεΐνη



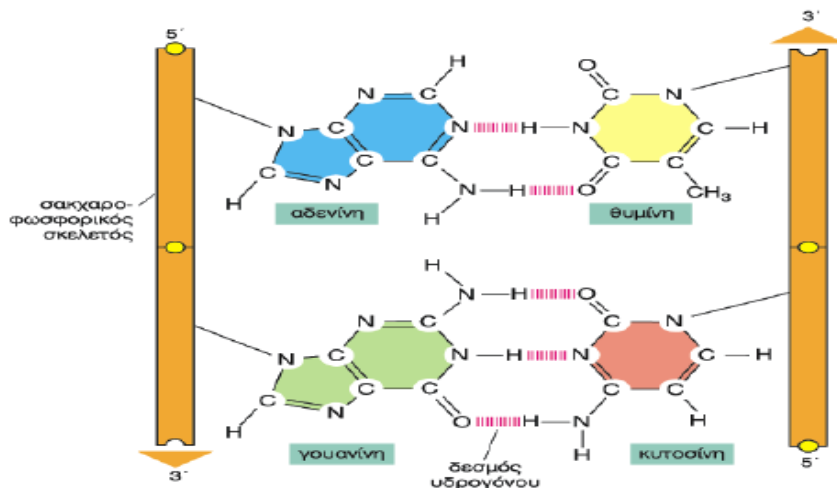
**Σχήμα 2.8** Ένα νουκλεοτίδιο

Ο τρόπος με τον οποίο συνδέονται μεταξύ τους τα νουκλεοτίδια προσδίδει σ' έναν κλώνο DNA χημική πολικότητα. Η πολικότητα μιας αλυσίδας DNA υποδεικνύεται με τον ορισμό του ενός άκρου ως 3' και του άλλου ως 5'. Ο συμβατικός αυτός ορισμός βασίζεται στις λεπτομέρειες του χημικού δεσμού μεταξύ των νουκλεοτιδικών υπομονάδων.

Οι δυο πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες στη διπλή έλικα (double helix) του DNA συγκρατούνται με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των βάσεων των διαφορετικών κλώνων. Επομένως, όλες οι βάσεις βρίσκονται στο εσωτερικό της έλικας, ενώ ο σακχαρο-φωσφορικός σκελετός στο εξωτερικό της. Ωστόσο, οι βάσεις δεν ζευγαρώνουν στην τύχη: η αδενίνη ζευγαρώνει πάντα με τη θυμίνη και η γουανίνη πάντα με την κυτοσίνη (Σχήμα 2.9). Σε κάθε περίπτωση, μια πιο ογκώδη βάση με δυο δακτυλίους (μια βάση πουρίνης) ζευγαρώνει με μια βάση με έναν δακτύλιο (μια βάση

πυριδίνης). Το «ζευγάρι» ανάμεσα στις συμπληρωματικές βάσεις επιτρέπει στα ζεύγη των βάσεων (base pairs) να παρατάσσονται στο εσωτερικό της διπλής έλικας στην πιο ευνοϊκή, από ενεργειακή άποψη, διάταξη. Σε αυτή τη διάταξη, κάθε ζεύγος βάσεων έχει παρόμοιο εύρος, ώστε να διατηρεί τον σακχαρο- φωσφορικό σκελετό σε ίση απόσταση κατά μήκος του μορίου του DNA (Σχήμα 2.9), ενώ επιπρόσθετα, οι σακχαρο-φωσφορικοί σκελετοί περιελίσσονται ο ένας γύρω από τον άλλο για να σχηματίσουν μια διπλή έλικα (Σχήμα 2.9) που περιέχει 10 βάσεις ανά στροφή. Αυτή περιέλιξη επίσης συνεισφέρει στην ενεργειακά ευνοϊκή διαμόρφωση της διπλής έλικας του DNA. [11]

Τα μέλη κάθε ζεύγους βάσεων προσαρμόζονται μέσα στη διπλή έλικα μόνο όταν οι δυο κλώνοι της είναι αντιπαράλληλοι (antiparallel), δηλαδή μόνο όταν η πολικότητα του ενός κλώνου έχει αντίθετο προσανατολισμό από την πολικότητα του άλλου. Για το λόγο αυτό ο κάθε κλώνος ενός μορίου DNA περιέχει μία αλληλουχία νουκλεοτιδίων η οποία είναι ακριβώς συμπληρωματική (complementary) προς την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων του άλλου. Αυτό έχει ζωτική σημασία για την αντιγραφή του DNA.

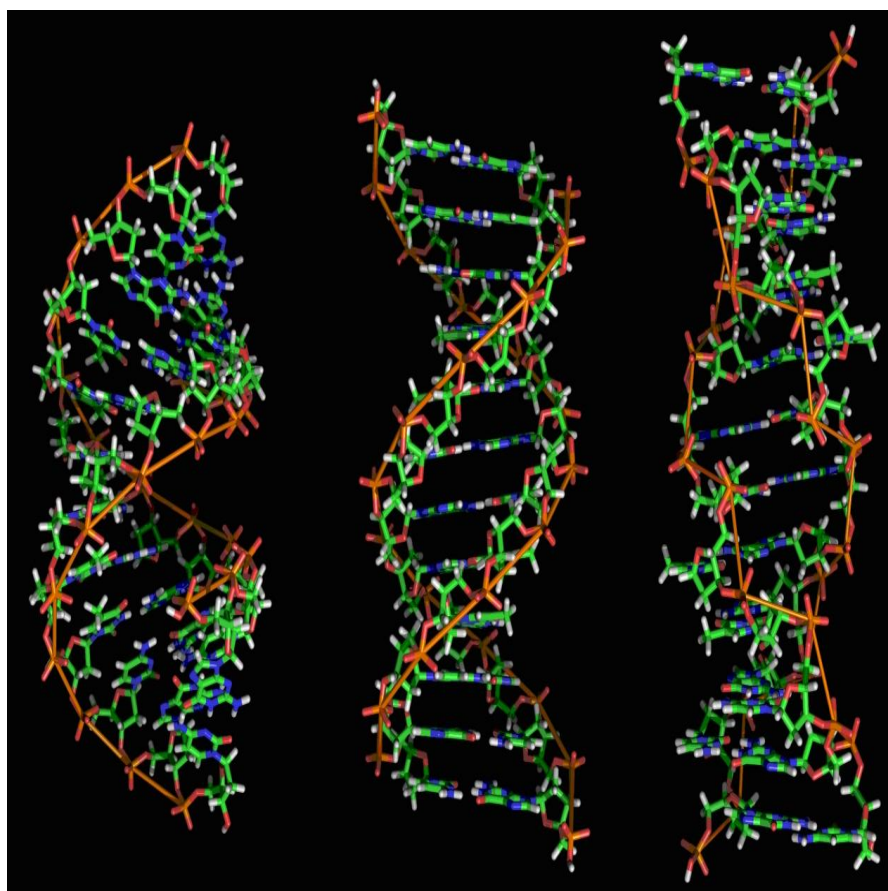


**Σχήμα 2.9** Τα ζεύγη των συμπληρωματικών βάσεων στη διπλή έλικα του DNA. Το σχήμα και η χημική δομή των βάσεων επιτρέπουν να σχηματίζονται δεσμοί υδρογόνου μόνο μεταξύ των βάσεων A και T και μεταξύ των βάσεων G και C. Σε αυτά τα ζεύγη βάσεων, τα άτομα τα οποία μπορούν να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου πλησιάζουν χωρίς να διαταράσσεται η διπλή έλικα. Ανάμεσα στις βάσεις A και T σχηματίζονται δυο δεσμοί υδρογόνου, ενώ ανάμεσα στις G και C τρεις. Οι βάσεις ζευγαρώνουν με αυτόν τον τρόπο μόνο όταν οι πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες είναι αντιπαράλληλες.

### 2.2.1 Οι A, B και Z DNA δομές

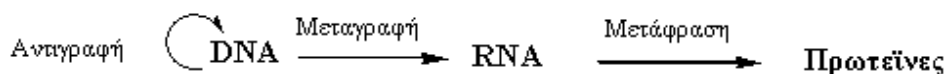
Η διπλή έλικα του DNA εμφανίζεται με διαφορετικές πιθανές δομές. Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται οι δεξιόστροφες A και B καθώς και η αριστερόστροφη Z (Σχήμα 2.10). Η A-δομή, προκύπτει με αφυδάτωση της B-δομής και σε κάθε στροφή της έλικάς της υπάρχουν 11 βάσεις, ενώ στη B-δομή 10. Τα επίπεδα των βάσεων στην A-δομή έχουν μια κλίση ως προς τον άξονα της έλικας, ενώ στη B-δομή οι βάσεις είναι κάθετες ως προς τον άξονα. Η B-δομή είναι η μόνη δεξιόστροφη δομή που απαντιέται σε ζωντανούς οργανισμούς.

Η μόνη αριστερόστροφη, η Z-δομή, δημιουργείται σε περιοχές του DNA που αποτελούνται από εναλλασσόμενες βάσεις γουανίνης και κυτοσίνης. Η μορφή αυτή είναι ενδιαφέρουσα γιατί έχει αντιγονικές ιδιότητες, δηλαδή προκαλεί τη δημιουργία αντισωμάτων. Χρησιμοποιώντας τέτοια αντισώματα βρέθηκε η Z-δομή σε φυσικό DNA. [12]



**Σχήμα 2.10** Σχηματική αναπαράσταση των δομών του δίκλωνου DNA. A, B, και Z DNA δομή από αριστερά προς δεξιά.

### 2.3 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ



**Σχήμα 2.11** Ροή γενετικών πληροφοριών.

Τα μόρια των DNA αποτελούν το χώρο αποθήκευσης της γενετικής πληροφορίας ενός οργανισμού, οι οποίες αποθηκεύονται στην αλυσίδα των DNA ως συγκεκριμένη ακολουθία δεοξυριβονουκλεοτιδίων.

Αυτό που ο Crick ονόμασε «κεντρικό δόγμα της μοριακής γενετικής» λέει ότι η λειτουργία των DNA σχετίζεται με την αποθήκευση μίας γενετικής πληροφορίας και τη μεταφορά της στα RNA την κατάλληλη στιγμή. Η λειτουργία των RNA σχετίζεται με την ανάγνωση, την αποκωδικοποίηση και τη χρήση της πληροφορίας που λήφθηκε από τα DNA, με σκοπό τη σύνθεση των πρωτεϊνών. Αποκωδικοποιώντας το σωστό τμήμα των DNA την κατάλληλη στιγμή και στο σωστό μέρος, ένας οργανισμός μπορεί να χρησιμοποιήσει γενετικές πληροφορίες για να συνθέσει τις πολλές χιλιάδες πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για την πραγματοποίηση των βιοχημικών του διεργασιών. [13]

Ουσιαστικά λοιπόν η ροή των γενετικών πληροφοριών γίνεται από το DNA στο RNA και τέλος στις πρωτεΐνες, όπως φαίνεται και από το Σχήμα 2.11. [14]

Αρχικά συντίθενται υβρίδια DNA-RNA, δηλαδή μόρια που ο ένας κλώνος είναι DNA και ο συμπληρωματικός του είναι RNA. Τα περισσότερα γονίδια (αλληλουχία νουκλεοτιδίων, η οποία περιέχει το γενετικό μήνυμα) των ευκαρυωτικών οργανισμών είναι ασυνεχή, αποτελούνται δηλαδή από εξόνια, τα οποία είναι αλληλουχίες νουκλεοτιδίων που η κάθε μία κωδικοποιεί μέρος του τελικού πρωτεϊνικού προϊόντος, αλλά και από ιντρόνια, τα οποία είναι ενδιάμεσες αλληλουχίες που δεν περιέχουν πληροφορίες. Η πολυμεράση του RNA μεταγράφει το σύνολο του γονιδίου, τόσο τα εξόνια όσο και τα ιντρόνια σε ένα μόριο RNA, το οποίο αποτελεί το πρόδρομο αγγελιοφόρο RNA (διεθνώς mRNA). Στη συνέχεια οι περιοχές που προέρχονται από μεταγραφή των ιντρονίων απομακρύνονται ενζυμικά, ενώ οι περιοχές που προέρχονται από μεταγραφή των εξονίων ενώνονται μεταξύ τους και έτσι προκύπτει το mRNA, το οποίο θα μεταφέρει την πληροφορία από το DNA στις πρωτεΐνες. [15]

## 2.4 ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ DNA ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ

Τα διαλύματα του DNA παρουσιάζουν μεγάλο ιξώδες. Καταστροφή της δευτεροταγούς δομής, ουσιαστικά των δεσμών υδρογόνου, έχει ως αποτέλεσμα δραματική ελάττωση του ιξώδους.

Η δευτεροταγής φωσφορική ομάδα του DNA είναι ιοντισμένη πάνω από pH 4,0. Διάφορες ομάδες των αζωτούχων βάσεων επίσης ιοντίζονται σε διάφορα pH. Οι ενολικές υδροξυλομάδες ιοντίζονται σε pH 12,0, ενώ σε pH 2,0-3,0 οι αμινομάδες πρωτονιώνονται. Επειδή η δυνατότητα δημιουργίας δεσμών υδρογόνου μεταξύ βάσεων εξαρτάται από την ιοντική τους μορφή, γι' αυτό και σε ακραίες τιμές pH (κάτω από 4,0 και πάνω από 11,0), οι δεσμοί υδρογόνου καταστρέφονται και η διπλή έλικα μετατρέπεται σε δύο μονόκλωνα μόρια. Η μετουσίωση αυτή της διπλής έλικας μπορεί να γίνει και με άλλους τρόπους εκτός από μεταβολές του pH. Έτσι αύξηση της θερμοκρασίας έχει σαν αποτέλεσμα την καταστροφή δεσμών υδρογόνου και τη μετουσίωση του DNA. Μάλιστα επειδή το ζεύγος G-C έχει τρεις δεσμούς υδρογόνου ενώ το A-T δύο, γι' αυτό τα μόρια DNA με μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε G-C μετουσιώνονται σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Το δίκλωνο μόριο του DNA, όταν είναι σε υδατικό διάλυμα, μπορεί να μετουσιωθεί, να μετατραπεί δηλαδή σε μονόκλωνο, είτε με ακραίες τιμές pH, κάτω από 4,0 και πάνω από 11,0, είτε με θέρμανση. Η μετουσίωση του DNA έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της απορροφητικότητας του διαλύματος στο υπεριώδες (υπερχρωμία) και ελάττωση του ιξώδους των διαλυμάτων.

Διαλύματα DNA παρουσιάζουν μεγάλο ιξώδες επειδή η διπλή ελικοειδής δομή είναι δύσκαμπτη και τα μόρια είναι ραβδοειδή. Καταστροφή της δευτεροταγούς δομής, δηλαδή των δεσμών υδρογόνου έχει σαν αποτέλεσμα δραματική μείωση του ιξώδους. [15]

## 2.5 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ DNA

Τα νουκλεϊκά οξέα δίνουν ένα πολύ χαρακτηριστικό φάσμα στην περιοχή της υπεριώδους ακτινοβολίας με μέγιστο στα 260nm και ελάχιστο στα 230nm. Το 1950 αναφέρθηκε για πρώτη φορά το φαινόμενο της «υπερχρωμίας», δηλαδή αύξηση της απορρόφησης στα 260nm μετά από θέρμανση. Με θέρμανση οι δεσμοί υδρογόνου



καταστρέφονται, οι βάσεις απομακρύνονται μεταξύ τους και η απορρόφηση στα 260nm πλησιάζει εκείνη των ελεύθερων νουκλεοτιδίων. [14]

## 2.6 ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ ΤΟΥ DNA ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΤΗΝ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ

Αποδιάταξη του DNA ονομάζεται το φαινόμενο κατά το οποίο διαχωρίζονται οι κλώνοι της έλικας με αποτέλεσμα τη δημιουργία δύο μονόκλωνων κομματιών. Για την επίτευξη της, απαιτείται το σπάσιμο των δεσμών υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ των βάσεων στη δίκλινη έλικα. Από θερμοδυναμική προσέγγιση, την πιο σημαντική συνεισφορά στη σταθερότητα της δίκλινης έλικας δίνει η επιστοίβαξη των βάσεων μεταξύ τους. Οπότε, πρέπει να ξεπεραστεί το εμπόδιο του αυστηρού πακεταρίσματος που καθορίζεται από υδρόφοβες δυνάμεις (stacking energy), ώστε να γίνει καταστροφή της δευτεροταγούς δομής του DNA.

Η αποδιάταξη του DNA, δηλαδή το σπάσιμο των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων και επομένως η καταστροφή της δευτεροταγούς δομής, μπορεί να προκληθεί από πολλούς παράγοντες όπως το χαμηλό pH και η χαμηλή συγκέντρωση αλάτων, αλλά κυρίως προκαλείται από την αύξηση της θερμοκρασίας. [11]



Σχήμα 2.12 Δίκλωνο και αποδιατεταγμένο DNA.

## 2.7 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΟΥ DNA

Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται συχνότερα στην ανάλυση του DNA είναι :

❖ **Χρωματογραφία.** Σχεδόν όλες οι κλασικές μέθοδοι χρωματογραφίας που χρησιμοποιούνται για απομόνωση και καθαρισμό των πρωτεϊνών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για απομόνωση των νουκλεϊκών οξέων.

❖ **Ηλεκτροφόρηση.** Ο διαχωρισμός των κλασμάτων του DNA με διαφορετικά μεγέθη μπορεί να γίνει με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης ή ακρυλαμίδης. Η ανίχνευση των διαφορετικών κλασμάτων του DNA μέσα στο πήκτωμα, μπορεί να γίνει: 1) με χρώση με ουσία που φθορίζει στο υπεριώδες φως,

2) με υβριδοποίηση με ανιχνευτή σημασμένο με ραδιοϊσότοπο (συνήθως P32) και αυτοραδιογραφία (Southern blot).

❖ **Κόψιμο του DNA** σε ειδικές θέσεις με νουκλέασες περιορισμού για την απομόνωση και το χειρισμό των γονιδίων.

❖ **Κλωνοποίηση** του DNA με κατάλληλους φορείς (cloning vectors) ή με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR), έτσι ώστε ένα μόριο DNA να μπορεί να αντιγραφεί εκατομμύρια φορές.

❖ **Υβριδισμός** νουκλεϊνικών οξέων, για την εύρεση μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA ή RNA σε έναν οργανισμό, στο ζευγάρι αυτής με μία άλλη, που έχει συμπληρωματική αλληλουχία νουκλεοτιδίων.

❖ **Καθορισμός της αλληλουχίας** των νουκλεοτιδίων των τμημάτων του DNA (sequencing) για την αναγνώριση των γονιδίων.

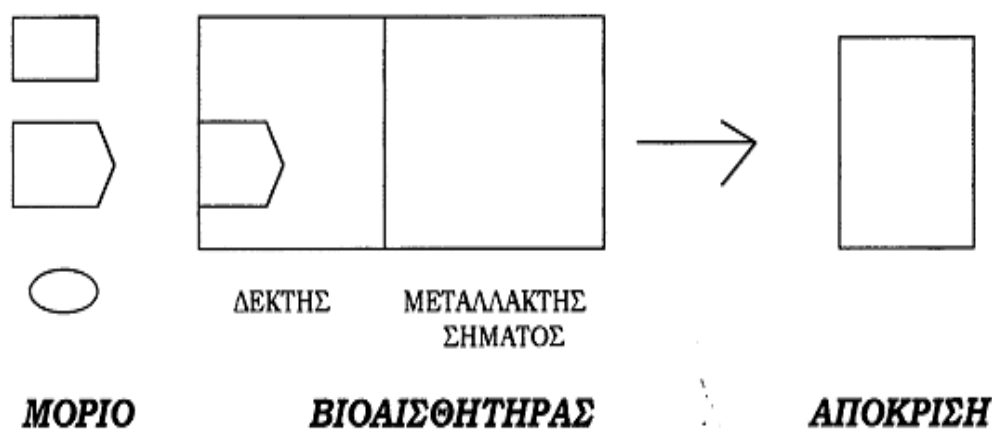
❖ **Καταγραφή** της έκφρασης κάθε γονιδίου σε έναν κυτταρικό πληθυσμό με τη χρήση DNA μικροσυστοιχιών (microarrays).

### 3. ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ

#### 3.1 ΟΡΙΣΜΟΣ –ΑΡΧΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ

Οι βιοαισθητήρες αποτελούν διατάξεις στις οποίες η χημική αναγνώριση επιτελείται με τη βοήθεια ενός βιοχημικού μηχανισμού. Πιο συγκεκριμένα οι βιοαισθητήρες είναι αυτοτελείς διατάξεις ικανές να παράγουν ποσοτικές ή ημιποσοτικές αναλυτικές πληροφορίες αναγνώρισης. [11]

Οι βιοαισθητήρες αποτελούνται από δύο βασικά τμήματα συνδεδεμένα σε σειρά: Το βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης και το φυσικοχημικό μεταλλάκτη σήματος.



*Σχήμα 3.1. Σχηματική αναπαράσταση ενός βιοαισθητήρα.*

#### **Βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης**

Το τμήμα αυτό μεταφράζει πληροφορίες βιοχημικού χαρακτήρα, συνήθως την συγκέντρωση του αναλυτή, σε φυσικό ή χημικό σήμα εξόδου, με συγκεκριμένη ευαισθησία. Πρόκειται συνήθως για ένα μακρομόριο το οποίο μπορεί είτε να αποικοδομεί το υπόστρωμα, ή μπορεί να υφίσταται κάποια δομική αλλαγή ή να αλλάζει τις βιολογικές ή φυσικοχημικές του ιδιότητες κατά τη διαδικασία δέσμευσης. Το μακρομόριο αυτό βρίσκεται ακινητοποιημένο στη διεπιφάνεια του αισθητήρα με το προς ανάλυση δείγμα. Βάση του τρόπου αλληλεπίδρασης του βιομορίου με τον αναλυτή οι βιοαισθητήρες διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες. [11]

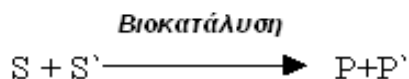
### **i) Βιοαισθητήρες Συγγένειας (χημικής αγχιστείας)**

Η λειτουργία του βιοαισθητήρα βασίζεται στη αλληλεπίδραση του αναλυτή με βιολογικά μακρομόρια . Η αναγνώριση και δέσμευση του αναλυτή οφείλεται στην αντιστρεπτή δέσμευση μεταξύ υποδοχέα – υποστρώματος που παρουσιάζουν συμπληρωματικές δομές, και την αποκατάσταση ισορροπίας. Στην κατηγορία αυτή ο βιολογικός υποδοχέας μπορεί να αποτελείται από αντισώματα, ολιγονουκλεοτίδια ή λεκτίνες. Βασικό μειονέκτημα των συστημάτων αυτών είναι η ισχυρή σύμπλεξη μεταξύ υποδοχέα - αναλυτή που δεν επιτρέπει τη γρήγορη αναγέννηση του βιοαισθητήρα.

### **ii) Βιοαισθητήρες Κατάλυσης**

Οι βιοαισθητήρες κατάλυσης βασίζονται στην καταλυτική δράση βιολογικών υποδοχέων-μακρομορίων που βρίσκονται προστατευμένα στο βιολογικό τους περιβάλλον (κύτταρα, μικροοργανισμοί κ.τ.λ.) ή έχουν προηγούμενα απομονωθεί από αυτό, ενώ επίσης μπορεί να έχουν υποστεί και γενετική τροποποίηση.

Στους βιοαισθητήρες κατάλυσης, ο αναλυτής αντιδρά παρουσία του βιομορίου προς το προϊόν P.



Η ανίχνευση του αναλυτή / υποστρώματος S μπορεί να βασίζεται:

- Στην κατανάλωση του υποστρώματος S και την συνεπακόλουθη μείωση του σήματος.
- Στην παραγωγή του προϊόντος P και την επακόλουθη αύξηση του σήματος.
- σήματος.

### **Μεταλλάκτης σήματος**

Οι φυσικοχημικές μεταβολές που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της αλληλεπίδρασης μεταξύ του βιολογικού τμήματος του βιοαισθητήρα και του αναλυτή πρέπει να μετατραπούν σε σήμα, το οποίο ακολούθως θα υποστεί την κατάλληλη

επεξεργασία ώστε να ληφθεί η αναλυτική πληροφορία. Η επιλογή του μεταλλάκτη σήματος εξαρτάται από το αποτέλεσμα της βιολογικής αναγνώρισης και το είδος των αλλαγών που επιφέρει στο σύστημα. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης είναι δυνατό να μεταβάλλονται ταυτόχρονα διαφορετικές παράμετροι δίνοντας έτσι τη δυνατότητα επιλογής και χρήσης διάφορων μεταλλακτών σήματος.

Οι βιοασθητήρες ανάλογα με τον χρησιμοποιούμενο μεταλλάκτη σήματος κατηγοριοποιούνται σε:

- ✓ Ηλεκτροχημικούς (αμπερομετρικός, ποτενσιομετρικός,αγωγιμομετρικός)
- ✓ Οπτικούς (UV/Vis απορρόφηση,φθορισμομετρία)
- ✓ Θερμικούς
- ✓ Μάζας

### 3.2 ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΟΙ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ

Οι ηλεκτροχημικοί βιοασθητήρες αποτελούν την κυριότερη κατηγορία βιοασθητήρων. Αυτού του είδους οι βιοασθητήρες παρουσιάζουν μία σειρά από πλεονεκτήματα που τους καθίστα ιδιαίτερα ελκυστικούς για χρήση. Έτσι χρησιμοποιούνται σε ποσοστό 66% με πρώτους σε εφαρμογή τους ποτενσιομετρικούς και αμπερομετρικούς ενώ ακολουθούν οι βιοασθητήρες με μεταλλάκτη επαγόμενου πεδίου και οι αγωγιμομετρικοί [16]. Καταρχήν, με τη βοήθεια της νανοτεχνολογίας είναι δυνατή η μαζική παραγωγή τους ως συμπαγείς, μικρού μεγέθους και χαμηλού κόστους διατάξεις που παρουσιάζουν μηχανική αντοχή, απλότητα και αξιοπιστία στη χρήση.

Επίσης:

- ✓ Μπορούν να εφαρμοστούν σε πολύπλοκα δείγματα.
- ✓ Καλή ευαισθησία.
- ✓ Είναι συμβατοί με αρκετά βιοχημικά συστήματα.
- ✓ Απλή ενσωμάτωση με τα ηλεκτρονικά συστήματα.
- ✓ Αξιοπιστία και ταχύτητα κατά την *in vivo* και *in vitro* βιοανάλυση.
- ✓ Λειτουργικότητα σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος (χαμηλή κατανάλωση ενέργειας δηλ. ιδανικοί για φορητά συστήματα).

Οι κυριότεροι περιορισμοί στην χρήση των ηλεκτροχημικών βιοασθητήρων είναι οι εξής:

- ✓ Η ύπαρξη ηλεκτροδραστικών ουσιών στο δείγμα οι οποίες παρεμποδίζουν τον προσδιορισμό.
- ✓ Παθητικοποίηση της ηλεκτροδιακής επιφάνειας (fouling).

Παρακάτω δίνεται μία σύντομη περιγραφή της αρχής λειτουργίας των διαφόρων ηλεκτροχημικών μεταλλακτών σήματος. [11,17]

### **Ποτενσιομετρικοί Βιοαισθητήρες**

Οι ποτενσιομετρικές μετρήσεις περιλαμβάνουν τον προσδιορισμό της διαφοράς δυναμικού που αναπτύσσεται μεταξύ του ηλεκτροδίου εργασίας και ενός αναφορικού ηλεκτροδίου σε συνθήκες μηδενικού ρεύματος και μετά την αποκατάσταση ισορροπίας. Η διαφορά δυναμικού που αναπτύσσεται οφείλεται σε επιλεκτική δέσμευση του αναλυτή στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας και είναι ανάλογη του λογαρίθμου της ενεργότητας του αναλυτή, όπως περιγράφεται στην εξίσωση του Nernst. [18]

### **Βιοαισθητήρες Επαγόμενου Πεδίου (Field Effect transistor, FET)**

Οι αισθητήρες επαγόμενου πεδίου είναι συσκευές που βασίζουν τη λειτουργία τους στην τεχνολογία ημιαγωγών και κύρια στην τεχνολογία των ημιαγώγων οξειδίων των μετάλλων όπως είναι το  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$  κ.τ.λ. (MOS, Metal Oxide Semiconductor). Η αρχή λειτουργίας τους βασίζεται στην αλληλεπίδραση της επιφάνειας του αισθητήρα με τα ιόντα του διαλύματος, η οποία επηρεάζει μέσω φαινομένων επαγόμενου πεδίου την αντίσταση του ημιαγωγού. Οι αισθητήρες επαγόμενου πεδίου στην επιφάνεια των οποίων έχει προσαρτηθεί μια μεβράνη βιομορίου ονομάζονται συνήθως ENFET (enzyme FET) ή IMFET (immunological FET).

### **Αμπερομετρικοί Βιοαισθητήρες**

Η αγωγιμότητα ενός διαλύματος είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης των ιόντων που υπάρχουν στο διάλυμα και η αλγεβρική τιμή της εξαρτάται από το φορτίο των ιόντων, την κινητικότητα τους και τη σταθερά διάστασης τους. Πολλές ενζυμικές αντιδράσεις οδηγούν σε μεταβολή του αριθμού, του φορτίου ή της κινητικότητας των ιόντων με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η χρήση αγωγιμομετρικών μεταλλακτών. Προκειμένου η μέτρηση να μην παρεμποδίζεται από την αγωγιμότητα του

διαλύματος συνήθως πραγματοποιούνται διαφορετικές μετρήσεις μεταξύ του ενζυμικού ηλεκτροδίου και ενός πανομοιότυπου χωρίς ένζυμο.

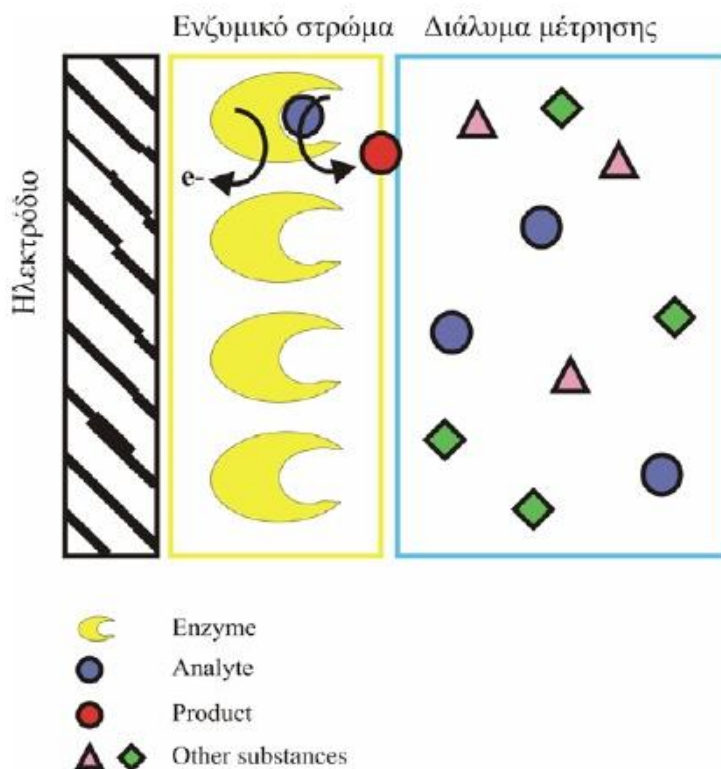
Η θεωρία που διέπει τη λειτουργία των αμπερομετρικών βιοαισθητήρων εξετάζεται πιο αναλυτικά στην επόμενη παράγραφο.

### **3.3 ΑΜΠΕΡΟΜΕΤΡΙΚΟΙ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ**

#### **3.3.1 Αρχή λειτουργίας**

Οι αμπερομετρικοί βιοαισθητήρες βασίζονται στην ανίχνευση ηλεκτροχημικά ενεργών ουσιών που παράγονται ή καταναλώνονται κατά τη διαδικασία της βιολογικής αναγνώρισης. Οι ενώσεις αυτές οξειδώνονται ή ανάγονται απευθείας στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας και το αναλυτικό σήμα προέρχεται από τη μέτρηση των παραγόμενων ηλεκτρονίων. Αποτελούν το πιο ευαίσθητο σύστημα μετάλλαξης της βιολογικής αναγνώρισης σε αναλυτικό σήμα καθώς η καταγραφή ρευμάτων της τάξης των  $10^{-9}$  A απαιτεί την αντίδραση μόλις  $10^{-14}$  mol/s (για οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις 1 ηλεκτρονίου) [11].

Για την κατασκευή αμπερομετρικών βιοαισθητήρων συνήθως χρησιμοποιούνται ένζυμα αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθούν επίσης κύτταρα και μικροοργανισμοί. Παρακάτω παρουσιάζεται (Σχήμα 3.2) η αρχή λειτουργίας ενός αμπερομετρικού βιοαισθητήρα στον οποίο το βιολογικό σύστημα είναι ένα ακινητοποιημένο ένζυμο. Η μεμβράνη με το ακινητοποιημένο ένζυμο είναι σε στενή επαφή με το ηλεκτρόδιο εργασίας:



**Σχήμα 3.2.** Αρχή λειτουργίας αμπερομετρικών βιοαισθητήρων κατάλυσης,  
 όπου: κίτρινο χρώμα: ένζυμο  
 μπλέ: αναλύτης  
 κόκκινο: προϊόν  
 πράσινο και ροζ: άλλα υποκατάστατα

Τα αντιδρώντα ένα εκ των οποίων είναι συνήθως η προς ανάλυση ουσία (αναλύτης) διαχέονται προς το ενζυμικό στρώμα, όπου καταλύεται η μετατροπή τους σε προϊόντα από τα ακινητοποιημένα ένζυμα. Η επίτευξη της μέτρησης απαιτεί ένα τουλάχιστον από τα αντιδρώντα ή τα προϊόντα να είναι ηλεκτροχημικά ενεργό. Η οξείδωση ή αναγωγή στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου παράγει το μετρούμενο σήμα (ένταση ρεύματος). Αν η ηλεκτροενεργή ουσία είναι κάποιο από τα προϊόντα της αντίδρασης τότε κατά την προσθήκη του δείγματος καταγράφεται αύξηση στο ρεύμα ανάλογη της συγκέντρωσης του αναλύτη. Αν η ηλεκτροενεργός ουσία είναι συμπαραγόντας της ενζυμικής αντίδρασης τότε η ποσότητα αυτής πρέπει να είναι σταθερή και σε σχετική αφθονία. Με τον τρόπο αυτό η ενζυμική αντίδραση επηρεάζεται μόνο από τον αναλύτη, και τυχόν μεταβολή του ρεύματος συσχετίζεται με την ποσότητα του αναλύτη στο δείγμα .

Όπως φαίνεται και από το Σχήμα 3.2, η ενζυμική αντίδραση λαμβάνει χώρα σε μια μεμβράνη που εκτείνεται σε μια στενή περιοχή στη διεπιφάνεια με τον κύριο όγκο



του διαλύματος. Τα μόρια του υποστρώματος φθάνουν στη επιφάνεια της ενζυμικής μεμβράνης μέσω διάχυσης και ανάμιξης και ακολούθως διαχέονται στο εσωτερικό της ενζυμικής μεμβράνης οπότε και λαμβάνει χώρα η αντίδραση, με ταχύτητα που καθορίζεται από την κινητική του ενζύμου. [11]

Το προφίλ του ρεύματος σε σχέση με το χρόνο μειώνεται εκθετικά και μετά την αποκατάσταση ισορροπίας (όπου το ρεύμα έχει αποκτήσει σταθερή τιμή) η τιμή του δίνεται από την εξίσωση Cottrell [19]:

$$i = nFADC / \delta \quad (3.1)$$

όπου n: αριθμός ηλεκτρονίων που συμμετέχουν στην οξειδοαναγωγική αντίδραση  
F: η σταθερά Faraday, D: ο συντελεστής διάχυσης της ουσίας, C: η συγκέντρωση της ουσίας και  $\delta$  είναι μια σταθερά που σχετίζεται με το πάχος του στρώματος διάχυσης

### 3.3.2 Κατασκευή των αμπερομετρικών βιοαισθητήρων

Τα βασικά στάδια στην ανάπτυξη και κατασκευή ενός βιοαισθητήρα αναλύονται παρακάτω[11,20]:

**Ακίνητοποίηση Ενζύμου.** Το πιο βασικό στάδιο στην κατασκευή ενός αξιόπιστου βιοαισθητήρα είναι η ακίνητοποίηση του βιολογικού μορίου στο αισθητήριο στοιχείο και η πρόσδεση αυτού στον μεταλλάκτη σήματος. Η ακίνητοποίηση του ενζύμου σε ένα υλικό επηρεάζει τα χαρακτηριστικά του διαμόρφωση, σταθερότητα και καταλυτική δράση ) με αποτέλεσμα να επηρεάζονται κατ' επέκταση και τα αναλυτικά χαρακτηριστικά του βιοαισθητήρα [21]. Η μέθοδος ακίνητοποίησης πρέπει να εξασφαλίζει την υψηλότερη δυνατή ενεργότητα του ενζύμου, τη δυνατότητα πρόσβασης του υποστρώματος στα ενεργά κέντρα και την γρήγορη μεταφορά μάζας υποστρωμάτων και προϊόντων προς και διαμέσου του στρώματος ακίνητοποίησης.[22].

Οι κυριότεροι μέθοδοι ακίνητοποίησης περιγράφονται στο Σχήμα 3.3.

**Προσρόφηση.** Το ένζυμο ακίνητοποιείται με απλή προσρόφηση είτε στην επιφάνεια ενός βοηθητικού υλικού είτε απευθείας στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας. Η προσρόφηση διακρίνεται σε δύο τύπους: Τη φυσιορρόφηση, η οποία λαμβάνει χώρα μέσω ασθενών Van derWaals δεσμών, δεσμών υδρογόνου ή υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, και τη χημειορρόφηση που λαμβάνει χώρα μέσω ομοιοπολικών

δεσμών. Κατά την προσρόφηση δεν απαιτείται προηγούμενη ενεργοποίηση ή άλλη κατεργασία της επιφάνειας και η όλη διαδικασία ολοκληρώνεται σε ένα μόνο στάδιο. Το μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι συνήθως η δέσμευση είναι ασθενής ενώ παράλληλα το ένζυμο είναι εκτεθειμένο σε αλλαγές pH, θερμοκρασίας και ιονικής ισχύος.

**Παγίδευση.** Ένα λεπτό φιλμ ενζύμου τοποθετείται στην επιφάνεια του ηλεκτροχημικού ανιχνευτή και παγιδεύεται εκεί με την βοήθεια μιας πολυμερικής μεμβράνης (συνήθως οξική κυτταρίνη, κολλαγόνο, Teflon και πολυουραιθάνη) διαπερατής στον αναλυτή. Η μέθοδος αυτή εφαρμοζόταν στις αρχικές κατασκευές βιοαισθητήρων και έχει το πλεονέκτημα ότι περιορίζει την επιμόλυνση των ενζύμων από συστατικά του δείγματος το οποίο ταυτόχρονα διατηρείται στη φυσιολογική του κατάσταση. Το κυριότερο μειονέκτημα της μεθόδου είναι η μικρή σταθερότητα.

**Εγκλωβισμός.** Τα ένζυμα αναμιγνύονται με διαλύματα μονομερών, τα οποία στη συνέχεια πολυμερίζονται κάτω από κατάλληλες συνθήκες εγκλωβίζοντας το βιομόριο. Πολυμερικές μεμβράνες που χρησιμοποιούνται συνήθως περιλαμβάνουν το πολυακρυονιτρίλιο αλλά και πυριτικές πηκτές (sol-gel). Τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιούνται επίσης και αγώγιμα πολυμερή, όπως το πολυπυρρόλιο προκειμένου να επιτευχθεί ταχύτερη μεταφορά ηλεκτρονίων από το ένζυμο στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Τα κυριότερα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι ο μεγάλος χρόνος απόκρισης, λόγω της αργής διάχυσης του υποστρώματος διάμεσου του πολυμερούς καθώς και ο μικρός χρόνος ζωής που καθορίζεται κυρίως από τη σταθερότητα του πολυμερικού πλέγματος.

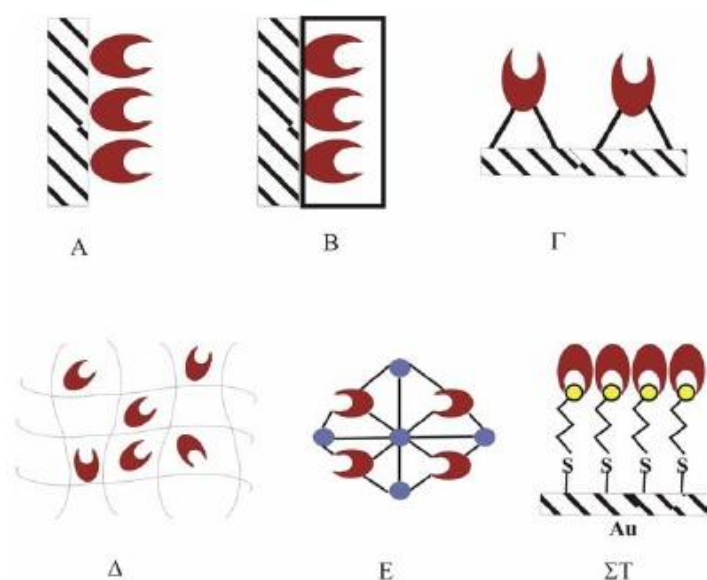
**Ομοιοπολική Δέσμευση.** Τα βιολογικά μόρια προσδένονται απευθείας στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου με δεσμούς που σχηματίζονται μεταξύ δραστικών ομάδων της επιφάνειας του ηλεκτροδίου και δραστικών ομάδων καταλοίπων αμινοξέων της εξωτερικής επιφάνειας του ενζύμου. Η μέθοδος ευνοεί την ακινητοποίηση των ενζύμων με ελεγχόμενο προσανατολισμό. Τα ένζυμα διατηρούνται σε στενή επαφή με το ηλεκτρόδιο ευνοώντας τη γρήγορη μεταφορά ηλεκτρονίων ενώ επίσης δεν υπάρχουν εμπόδια στη διάχυση του υποστρώματος. Ωστόσο, η μέθοδος αυτή οδηγεί σε βιοασθητήρες με μικρή μηχανική σταθερότητα ενώ απαιτείται και προσοχή ώστε η πρόσδεση να γίνεται μέσω αμινοξέων που δεν είναι απαραίτητα για την καταλυτική δράση.

**Διαμοριακή Σύνδεση.** Τα ένζυμα προσδένονται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου ή του υλικού στήριξης με τη βοήθεια διδραστικών αντιδραστηρίων όπως είναι η

γλουταραλδεϋδη και το καρβαδιϋμίδιο. Τα ένζυμα συνδέονται είτε μεταξύ τους είτε με άλλες μη δραστικές πρωτεΐνες σχηματίζοντας διαμοριακούς δεσμούς. Το βασικό μειονέκτημα της μεθόδου είναι η μεγάλη απώλεια της ενζυμικής ενεργότητας λόγω της χρήσης χημικών αντιδραστηρίων και οργανικών διαλυτών.

**Δημιουργία Αυτοσυγκροτούμενων Μονομοριακών Στρωμάτων (Self –Assembled Monolayers).** Τα τελευταία χρόνια μια μέθοδος ακινητοποίησης που έχει αναπτυχθεί βασίζεται στη δημιουργία αυτοσυγκροτούμενων δομών [25,26]. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην αυθόρμητη οργάνωση μικρότερων μορίων σε μακρομοριακές δομές. Σε αντίθεση με τη παραδοσιακή οργανική σύνθεση, όπου τα διάφορα συνθετικά στάδια περιλαμβάνουν τη λύση και τη δημιουργία δεσμών και πραγματοποιούνται υπό κινητικό έλεγχο, η δημιουργία των SAMs βασίζεται στην ανάπτυξη ασθενών δεσμών (Van der Waals, δεσμών υδρογόνου κ.τ.λ.) και η διαδικασία γίνεται υπό θερμοδυναμικό έλεγχο.

Μέχρι σήμερα δεν έχει αναπτυχθεί κάποια μέθοδος ακινητοποίησης που να βρίσκει γενική εφαρμογή σε όλα τα βιολογικά μόρια και σε όλα τα υλικά στήριξη. Τα κυριότερα προβλήματα που αντιμετωπίζονται αφορούν τη σταθερότητα και την επαναληψιμότητα των συστημάτων. Για κάθε βιολογικό μόριο βελτιστοποιείται ανάλογα και η μέθοδος και ακινητοποίησης. [23,24]



**Σχήμα 3.3** Μέθοδοι ακινητοποίησης βιολογικών μορίων στους βιοαισθητήρες.

*A) Προσρόφηση, B) Παγίδευση, Γ) Ομοιοπολική Δέσμευση, Δ) Εγκλωβισμός, E) Διαμοριακή Σύνδεση και ΣΤ) Δημιουργία SAMs.*

### 3.4 ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΟΙ DNA ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ

Στους ηλεκτροχημικούς DNA βιοαισθητήρες το DNA ακινητοποιείται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου και μελετάται η ηλεκτροχημική συμπεριφορά του σε σχέση με ενώσεις που εμφανίζουν αγχιστεία με αυτό.

Στο DNA μονό τα νουκλεϊνικά οξέα και συγκεκριμένα οι βάσεις είναι ηλεκτρενεργές και παράγουν ηλεκτροχημικά σήματα.

Με βάση το είδος της αλληλεπίδρασης ανάμεσα στο DNA και στις ενώσεις ή φάρμακα μπορούν να διακριθούν δύο κατηγορίες ηλεκτροχημικών DNA-βιοαισθητήρων

- Ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες για την ανίχνευση βλαβών στο DNA ή βιοαισθητήρες δομής.
- Ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες για την ανίχνευση υβριδισμού στο DNA ή βιοαισθητήρες υβριδισμού.

Οι **βιοαισθητήρες δομής** αξιοποιούν τα παρακάτω φαινόμενα:

❖ Η μεταβολή στο ηλεκτροχημικό σήμα των βάσεων του DNA και ιδιαίτερα της γουανίνης αποτελεί ένδειξη βλάβης στο DNA.

❖ Πολλές ενώσεις που αλληλεπιδρούν με το DNA παράγουν το δικό τους ηλεκτροχημικό σήμα και αυτό αποτελεί ένδειξη της δέσμησης τους στο DNA.

❖ Με το ηλεκτρόδιο υδραργύρου είναι δυνατή η ανίχνευση του «σπασίματος» της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας .

Η αλληλεπίδραση μεταξύ του DNA και των διαφορών ενώσεων πραγματοποιείται με τους τρόπους που προαναφέρθηκαν.

Η πιο διαδεδομένη τεχνική για την ανίχνευση των βλαβών στο DNA είναι η τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή. Τα μειονεκτήματα της τεχνικής αυτής αφορούν τον μεγάλο συνολικό χρόνο ανάλυσης και την μικρή ευαισθησία καθώς αδυνατεί να ανιχνεύσει μικρές βλάβες λόγω ιονίζουσας ακτινοβολίας, έκθεσης σε χημικά κ.τ.λ

Οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες παρουσιάζουν πολλά πλεονεκτήματα όπως σχετικά φτηνή οργανολογία, ταχύτητα, εκλεκτικότητα, αναλυτική ευαισθησία και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε προκαταρκτικές μεθόδους ανάλυσης (screening methods) ενώσεων που παρουσιάζουν αγχιστεία με το DNA ή που προκαλούν βλάβες

στο DNA( αντικαρκινικά φάρμακα, τοξικές ενώσεις) καθώς και σε επιγενετικές αναλύσεις (όπως είναι η μεθυλίωση της κυτοσίνης (C)). [28]

Η ηλεκτροχημική ανίχνευση των βλαβών του DNA αντανακλά το γεγονός ότι η ηλεκτροχημική απόκριση του DNA εξαρτάται ισχυρά από τη δομή του. [11]

Επίσης, οι βιοαισθητήρες δομής μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό ιχνών DNA ή RNA (επίπεδα ng), για τον ηλεκτροχημικό χαρακτηρισμό του ssDNA , του dsDNA και του scDNA και για την ταυτοποίηση των διαφόρων μορφών του DNA.

Στους **βιοαισθητήρες υβριδισμού** μία συγκεκριμένη αλληλουχία ακινητοποιείται στην ηλεκτροδιακή επιφάνεια (DNA probe) που μπορεί να έχει μήκος 15 έως 20 νουκλεοτιδίων, και έπειτα το DNA-μορφοποιημένο ηλεκτρόδιο εμβαπτίζεται σε διάλυμα που περιέχει το DNA-στόχο (target DNA), το οποίο αναγνωρίζει εάν έχει συμπληρωματική αλληλουχία. Αν η αλληλουχία βάσεων του DNA-στόχου είναι ακριβώς η συμπληρωματική της ακινητοποιημένης στην ηλεκτροδιακή επιφάνεια, τότε σχηματίζεται ένα προϊόν υβριδισμού στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Σε περίπτωση μη συμπληρωματικότητας, δεν δημιουργείται υβρίδιο [27,29]. Δύο είναι τα πολύ σημαντικά στάδια στην όλη διαδικασία: (α) ο σχηματισμός του υβριδίου και (β) η μετατροπή του παραπάνω φαινομένου σε μετρήσιμο ηλεκτρικό σήμα. Έκθεση του αισθητήρα σε διάλυμα το οποίο περιέχει έναν ηλεκτροχημικό δείκτη (π.χ. ένα οξειδοαναγωγικό κατιονικό μεταλλικό σύμπλοκο) αντιδρά ισχυρά και αντιστρεπτά με το υβριδισμένο DNA. Αύξηση του ηλεκτροχημικού σήματος λόγω της οξειδοαναγωγής του ηλεκτροχημικού δείκτη, ο οποίος συνδέεται με τη νεοσχηματισθείσα διπλή έλικα, χρησιμεύει ως αναλυτικό σήμα για την παρακολούθηση του υβριδισμού [30]. Οι βιοαισθητήρες υβριδισμού χρησιμοποιούνται, κυρίως, για την ταυτοποίηση γονιδίων.

## 4. ΑΝΑΓΩΓΗ, ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΤΑ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΑ

### 4.1 ΗΛΕΚΤΡΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

Τα συστατικά των νουκλεϊκών οξέων (NAs), οι βάσεις, τα νουκλεοτίδια και οι νουκλεοζίτες είναι ηλεκτροενεργά. Τα ηλεκτρόδια υδραργύρου είναι κατάλληλα για μελέτες που αφορούν την αναγωγή των νουκλεϊκών οξέων (NAs) ενώ τα στερεά ηλεκτρόδια και ειδικά αυτά του άνθρακα χρησιμοποιούνται για διεργασίες οξείδωσης.

#### 4.1.1 Αναγωγή

Πολαρογραφική αναγωγή των βάσεων των νουκλεϊκών οξέων (NAs) παρατηρήθηκε σε σταγονικό ηλεκτρόδιο υδραργύρου (DME) γύρω στα μέσα του 20<sup>ου</sup> αιώνα, με την αδενίνη (A) να είναι η πρώτη βάση που εμφανίστηκε ως ηλεκτροενεργή [31]. Περαιτέρω μελέτες αποκάλυψαν ότι η αδενίνη (A) και η κυτοσίνη (C), μαζί με τα νουκλεοσίδια και τα νουκλεοτίδια τους, ανάγονται σε υδατικά μέσα σε όξινο pH, με τα δυναμικά ημίσεως-κύματος ( $E_{1/2}$ ) να είναι -1,33V για την αδενίνη (A) και -1,44V για την κυτοσίνη (C) (vs SCE) σε pH 4,2. [33-36]

Τα δυναμικά αναγωγής για τα νουκλεοτίδια της κυτιδίνης και της κυτοσίνης εμφανίζονται πιο θετικά από εκείνα της ελεύθερης βάσης. Το δυναμικό ημίσεως-κύματος ( $E_{1/2}$ ) της κυτοσίνης (C) και των παραγώγων της μετατοπίζονται προς αρνητικότερες τιμές με την αύξηση του pH, υποδηλώνοντας το σημαντικό ρόλο της πρωτονίωσης [32]. Η αναγωγή της αδενίνης (A) πραγματοποιείται σε πιο θετικό δυναμικό από την αναγωγή της κυτοσίνης (C) και παρατηρείται μεταφορά 4e (σε σύγκριση με τη μεταφορά 3e που παρατηρείται στην περίπτωση της κυτοσίνης (C)). Επιπλέον, η πολαρογραφική συμπεριφορά της αδενίνης (A) δε διαφέρει σημαντικά είτε βρίσκεται ελεύθερη είτε ενσωματωμένη σε νουκλεοσίδια ή νουκλεοτίδια. Η γουανίνη (G) ανάγεται, επίσης, σχηματίζοντας ένα ασταθές προϊόν. Οξείδωση του προϊόντος αναγωγής της γουανίνης (G) παρατηρήθηκε χρησιμοποιώντας π.χ., κυκλική ή ανοδική αναδιαλυτική βολταμετρία, η τελευταία αποτελείται από

εφαρμογή αρνητικού δυναμικού (περίπου  $-1,8\text{V}$  σε ουδέτερο μέσο, συνήθως μικρής διάρκειας), ακολουθούμενη από ανοδική σάρωση. [37]

Αναγωγή της ουρακίλης (U) και της θυμίνης (T) δεν παρατηρήθηκε σε υδατικά διαλύματα, τουλάχιστον εντός του παράθυρου δυναμικού των ηλεκτροδίων υδραργύρου. Για την αποκάλυψη των σημάτων αναγωγής της ουρακίλης (U) και της θυμίνης (T), που συνήθως περιπλέκεται από την αναγωγή των πρωτονίων (από τα μόρια του νερού), μη υδατικοί διαλύτες με ευρύτερα παράθυρα δυναμικού χρησιμοποιήθηκαν. Χρησιμοποιώντας λοιπόν διμεθυλοσουλφοξείδιο ή ακετονιτρίλιο, η ουρακίλη (U) και η θυμίνη (T) υποβλήθηκαν σε πολύπλοκες διαδικασίες αναγωγής, σε πολύ αρνητικά δυναμικά, στις οποίες συμμετέχουν πολλές ρίζες [38,39]. Πρόσφατα, ιοντικά υγρά σε συνδυασμό με ηλεκτρόδια λευκοχρύσου εφαρμόστηκαν για τη μελέτη της αναγωγής της γουανίνης (G), η οποία έλαβε χώρα σε δυναμικό  $2,2\text{ V}$  (vs Ag/AgCl). [40]

#### 4.1.2 Οξείδωση

Τα ηλεκτρόδια άνθρακα είναι κατά πάσα πιθανότητα τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα ηλεκτρόδια σε μελέτες οξείδωσης των βάσεων των νουκλεϊκών οξέων (NAs), των νουκλεοτιδίων ή νουκλεοσιδίων τους. Οι βάσεις των πουρινών απαιτούν χαμηλότερο υπερδυναμικό για την οξείδωση τους από αυτές των πυριμιδίων, με τη γουανίνη (G) να οξειδώνεται πιο εύκολα. Και οι δύο βάσεις, η αδενίνη (A) και η γουανίνη (G) παράγουν κορυφές οξείδωσης σε ένα ευρύ φάσμα pH (από 0 έως 12,5). Έχει αποδειχθεί ότι η αδενίνη (A) οξειδώνεται με μία διαδικασία που περιλαμβάνει έξι ηλεκτρόνια ανά μόριο αδενίνης (A) με τον ενδιάμεσο σχηματισμό διακαρβονικών ιόντων. Το ενδιάμεσο αυτό προϊόν είναι ασταθές και υφίσταται μία σειρά από περαιτέρω αντιδράσεις. Η γουανίνη (G) οξειδώνεται ηλεκτροχημικά με μία διαδικασία που περιλαμβάνει τέσσερα ηλεκτρόνια με τον ενδιάμεσο σχηματισμό ενός ασταθούς προϊόντος το οποίο υφίσταται περαιτέρω αντιδράσεις και τελικά μετατρέπεται είτε σε παραβανικό οξύ είτε σε οξαλική γουανίνη. [41,42]

Αν και οι βάσεις των πουρινών αποτέλεσαν το επίκεντρο των περισσότερων μελετών, η θυμίνη (T) και η κυτοσίνη (C) έχουν επίσης αποδειχθεί ότι οξειδώνονται παράγοντας ηλεκτροχημικά σήματα [43-47]. Ταυτόχρονος προσδιορισμός και των τεσσάρων μονοφωσφορικών DNA νουκλεοζιτών χρησιμοποιώντας βολταμμετρία

διαφορικού παλμού (DPV) σε ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GCE), με το όριο ανίχνευσης να είναι μικρότερο από 1μM για κάθε νουκλεοτίδιο, έχει δημοσιευτεί [44]. Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν επίσης σε ηλεκτρόδιο πάστας άνθρακα (CPE), χρησιμοποιώντας βολταμμετρία τετραγωνικού παλμού (SWV). Τα δυναμικά κορυφής των επιμέρους νουκλεοτιδίων, σε ουδέτερο pH, ήταν +1,00V για τη μονοφωσφορική γουανοσίνη (GMP), +1,28V για τη μονοφωσφορική αδενοσίνη (AMP), +1,47V για τη μονοφωσφορική θυμιδίνη (TMP) και + 1,53V για τη μονοφωσφορική κυτιδίνη (CMP) (vs Ag/AgCl). [45]

Κορυφές οξείδωσης και των τεσσάρων νουκλεοτιδίων παρατηρήθηκαν, επίσης, σε ηλεκτρόδια γραφενίου [46] και σε ηλεκτρόδια που κατασκευάστηκαν με υμένια νανοάνθρακα με τη μέθοδο του ηλεκτρονικού συντονισμού κυκλοτρονίου (ECR) [47]. Σε σύγκριση με τα ηλεκτρόδια υαλώδους άνθρακα (GCEs), τόσο τα ηλεκτρόδια γραφενίου όσο και τα ηλεκτρόδια από υμένια νανοάνθρακα παρουσιάζουν κορυφές οξείδωσης και των τεσσάρων νουκλεοτιδίων ακόμη και όταν αυτά βρίσκονται σε κάποιο ολιγονουκλεοτίδιο (ODN). Χρησιμοποιώντας μία μη λεία επιφάνεια εποξειδικού γραφίτη παρατηρήθηκαν χαμηλότερα υπερδυναμικά κατά την οξείδωση των βάσεων του DNA (σε σχέση με τις προαναφερθείσες επιφάνειες). Η ελεύθερη γουανίνη (G) οξειδώνεται σε δυναμικό 0,35 V και η ελεύθερη αδείνη (A) σε δυναμικό 0,63V (vs Ag / AgCl). Για την κυτοσίνη (C) και την ινωσησίνη, ωστόσο, δεν παρατηρήθηκαν κορυφές [48]. Τράχυνση της επιφανείας οδήγησε σε πιο ευαίσθητο προσδιορισμό των βάσεων του DNA (κυρίως πουρινών), όπως αποδεικνύεται με τη χρήση ενός επιφανειακά-αγριεμένου ηλεκτροδίου υαλώδους άνθρακα (GCE) [49] ή ενός ηλεκτροδίου πυρολιθικού γραφίτη μηχανικά αλεσμένου [50].

Λόγω του ευρύ παράθυρου δυναμικού ενός ηλεκτροδίου από διαμάντι ενισχυμένο με βόριο (BDD), άμεση οξείδωση της γουανοσίνης και αδενοσίνης σε υδατικά μέσα, παρατηρήθηκε [51]. Για να επιτευχθεί αυτό όμως, απαιτείται μια ενεργοποίηση του ηλεκτροδίου με την εφαρμογή εξαιρετικά υψηλών οξειδωτικών δυναμικών. Όταν η αδείνη (A) και η γουανίνη (G) περιέχονταν σε ένα ολιγονουκλεοτίδιο (ODN), οι κορυφές οξείδωσης τους ήταν ανεπαρκώς σχηματισμένες λόγω της προσρόφησης του προϊόντος της οξείδωσης της γουανίνης (G). Πρόσφατα, το ηλεκτρόδιο BDD χρησιμοποιήθηκε σε σύνδεση με την υγρή χρωματογραφία για την ταυτόχρονη ανίχνευση αδείνης (A), γουανίνης (G), κυτοσίνης (C), θυμίνης (T) και 5-μεθυλοκυτοσίνης (mC) σε ένα ενιαίο μίγμα, χρησιμοποιώντας αμπερομετρικό ανιχνευτή [52]. Ωστόσο, δεδομένου ότι μόνο μία

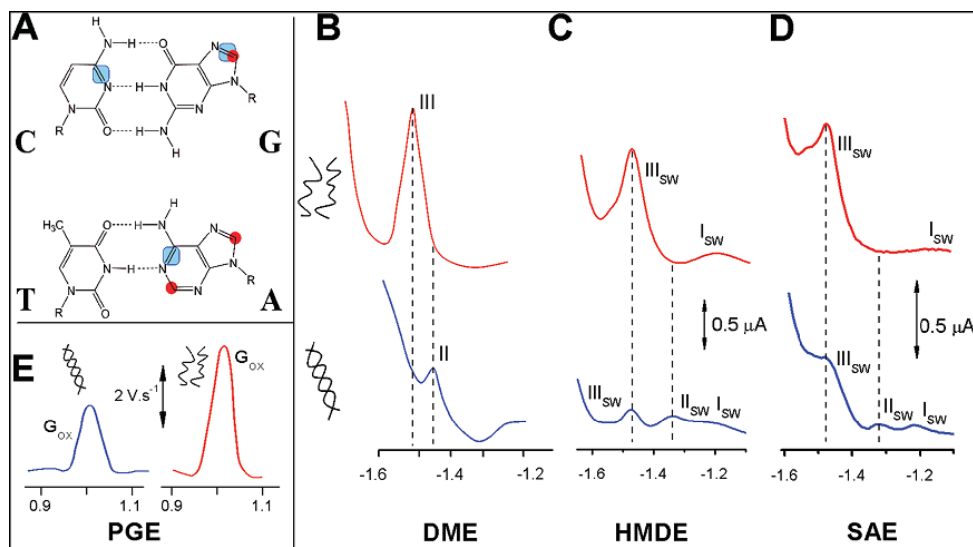


τιμή του δυναμικού στα 1,6 V (vs Ag / AgCl) επιλέχθηκε για την αμπερομετρική ανίχνευση, χαμηλά ρεύματα οξείδωσης για την κυτοσίνη (C) και τη θυμίνη (T) (σε σύγκριση με αυτά της γουανίνης (G) και της αδενίνης (A)), κοντά στο θόρυβο υποβάθρου, ελήφθησαν. Ανοδικά οξειδωμένο το παραπάνω ηλεκτρόδιο (BDD) χρησιμοποιήθηκε, επίσης, για τη μελέτη της οξείδωσης της γουανίνης (G) και της αδενίνης (A) σε υδρολυμένα με οξύ ολιγονουκλεοτίδια (ODNs) παρουσία ιόντων χαλκού [53].

Αρκετοί ερευνητές προσπάθησαν να χρησιμοποιήσουν και άλλους τύπους στερεών ηλεκτροδίων εκτός από αυτά του άνθρακα. Ενδιαφέρον παρουσίασε το γεγονός ότι τα νουκλεοτίδια της αδενίνης (A) και της κυτοσίνης (C) μπορούσαν να ανιχνευθούν κάτω από μικρομοριακές συγκεντρώσεις με ηλεκτρόδια χαλκού λόγω της παρουσίας του σακχάρου που είναι ηλεκτροενεργό στην επιφάνεια του χαλκού [54]. Πρόσφατα εξετάστηκε η συμπεριφορά της γουανίνης, της γουανοσίνης, και της μονοφωσφορικής γουανοσίνης σε ηλεκτρόδια από οξείδιο του ινδίου του κασσιτέρου (ITO), τροποποιημένα με οξειδοαναγωγικές μεμβράνες διαφόρων πολυμερών [55]. Η προτεινόμενη μέθοδος βασίζεται στην παρακολούθηση της καταλυτικής οξείδωσης της γουανίνης (G) από τα διαφορετικά ηλεκτρόδια εργασίας με δυναμικά οξείδωσης 0,81 V για τη γουανίνη (G) και 1,02 V για τη γουανοσίνη και τη μονοφωσφορική γουανοσίνη (GMP) (NHE). Ηλεκτροχημική οξείδωση των καταλοίπων της γουανίνης (G) σε πολυκρυσταλλικά ηλεκτρόδια χρυσού έχει επίσης δημοσιευτεί. [56]

#### 4.1.3. Τεχνικές αναδιάλυσης

Για την αύξηση της ευαισθησίας της ανίχνευσης, χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρόδιο κρεμάμενης σταγόνας υδραργύρου (HMDE) σε συνδυασμό με την καθοδική αναδιαλυτική βολταμμετρία (CVS), επιτρέποντας τον προσδιορισμό των συστατικών των νουκλεϊκών οξέων (NAs) σε συγκεντρώσεις κάτω των  $10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup>. Η καθοδική αναδιαλυτική βολταμμετρία (CVS) βασίζεται στο σχηματισμό δυσδιάλυτων ενώσεων των νουκλεοσιδίων πουρινών των νουκλεϊκών οξέων (NAs) με το ηλεκτρόδιο του υδραργύρου σε θετικά δυναμικά και στη συνέχεια στη σάρωση του δυναμικού προς την αρνητική κατεύθυνση, ανάγοντας (ή αναδιαλύοντας) έτσι τις ενώσεις που δημιουργήθηκαν με τον υδράργυρο. Τα νουκλεοσίδια των πυριμιδινών δεν σχηματίζουν δυσδιάλυτες ενώσεις με τον υδράργυρο εξαιτίας της παρουσίας του σακχάρου στη θέση N1. [57]



**Σχήμα 4.1..A)** Θέσεις οξείδωσης και αναγωγής των βάσεων. Τα τετράγωνα υποδηλώνουν θέσεις που μπορούν να αναχθούν σε ηλεκτρόδια υδραργύρου και οι κύκλοι δείχνουν τις θέσεις οξείδωσης στα ηλεκτρόδια άνθρακα. **(B-E)** Σύγκριση των διαφορετικών μεθόδων και ηλεκτροδίων για την ανάλυση φυσικού (*dsDNA*, μπλε) και μετουσιωμένου DNA (*ssDNA*, κόκκινο). **(B)** Πολαρογραφία διαφορική παλμού (DPP) σε σταγονικό ηλεκτρόδιο υδραργύρου (DME) του *dsDNA* ( $470 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) και του *ssDNA* ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Σημειώστε την απουσία της κορυφής III του *dsDNA* και τη μεγάλη διαφορά στις συγκεντρώσεις του *ds*- και του *ssDNA*. **(C-D)** Βολταμμογράφημα τετραγωνικού παλμού (SWV) του *dsDNA* ( $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) και *ssDNA* ( $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) σε **(C)** ηλεκτρόδιο κρεμάμενης σταγόνας υδραργύρου (HMDE) και σε **(D)** στερεό ηλεκτρόδιο από αμάλαμα (SAE), χρόνος ακινητοποίησης,  $t_A=60 \text{ s}$ . **(E)** Κορυφή οξείδωσης της γουανίνης ( $G_{ox}$ , έπειτα από διόρθωση της βασικής γραμμής) του *dsDNA* ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), και του *ssDNA* ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) σε ηλεκτρόδιο από πυρολυτικό γραφίτη (PGE) που μετράται με αναδιαλυτική σταθερή χρονοποτενσιομετρία (CPS) έπειτα από διόρθωση της βασικής γραμμής.

Μια άλλη επιλογή για την ενίσχυση του σήματος των βάσεων του DNA στηρίζεται στον σχηματισμό δυσδιάλυτων συμπλόκων ιόντων χαλκού με την αδενίνη (A) και τη γουανίνη (G) που οδηγεί σε ένα ευαίσθητο προσδιορισμό των βάσεων των νουκλεϊκών οξέων (NAs) σε ηλεκτρόδια υδράργυρου [58-62] και άνθρακα [63,64]. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε και στον υβριδισμό του DNA. Μετά τον υβριδισμό του μη επισημασμένου στόχου DNA με την ακινητοποιημένη με μαγνητικά σφαιρίδια αλληλουχία -ανιχνευτή, το DNA-στόχος υδρολύθηκε και απελευθερώθηκαν βάσεις πουρινών οι οποίες ανιχνεύθηκαν είτε βολταμμετρικά σε ηλεκτρόδιο κρεμάμενης σταγόνας υδραργύρου (HMDE) [60] ή ποτενσιομετρικά σε ηλεκτρόδιο άνθρακα [65].

## 4.2 ΗΛΕΚΤΡΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

Οι οξειδοαναγωγικές δράσεις των νουκλεϊκών οξέων (NAs) αφορούν κυρίως την αναγωγή και την οξείδωση των βάσεων. Η αναγωγή των νουκλεϊκών οξέων (NAs) παρατηρήθηκε μόνο σε ηλεκτρόδια υδραργύρου, ενώ η οξείδωση σε διαφορετικές επιφάνειες συμπεριλαμβανομένων του άνθρακα, του λευκόχρυσου, του χρυσού, του αργυρού και άλλες.

### 4.2.1 Αναγωγή

Παρόμοια με τη συμπεριφορά των ελεύθερων συστατικών των νουκλεϊκών οξέων (NAs) που περιγράφηκε στην παράγραφο 4.1, τα κατάλοιπα της αδενίνης (A) και της κυτοσίνης (C) ανάγονται σε ηλεκτρόδια υδραργύρου σε μονόκλινα νουκλεϊκά οξέα διαφόρων μηκών (από μικρού μήκους ολιγονουκλεοτίδια (ODNs) έως το πολύ μακρύ χρωμοσωμικό DNA. Παρόλο που η ουρακίλη (U) και η θυμίνη (T) βρέθηκαν να είναι ηλεκτροχημικές ανενεργές σε υδατικά μέσα, αναγωγή της ουρακίλης (U) σε αλυσίδες πολύ-ουρακίλης (poly(U)) παρατηρήθηκε σε μη υδατικά διαλύματα [66]. Αναγωγή της θυμίνης (T) στο DNA δεν έχει παρατηρηθεί ακόμη. Η γουανίνη (G) ανάγεται σε πολύ αρνητικά δυναμικά (περίπου -1.8 V σε ουδέτερο pH), αλλά είναι πιο ωφέλιμο να μελετήσει κανείς την οξείδωση του προϊόντος της αναγωγής της, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 4.2.2.

Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός πως τα κατάλοιπα της αδενίνης (A) σε νουκλεϊκά οξέα (NAs) ανάγονται σε ουδέτερο pH (σε σύγκριση με την ελεύθερη αδενίνη (A) που ανάγεται μόνο σε όξινο pH) εάν χρησιμοποιηθεί ο κατάλληλος ηλεκτρολύτης που να περιέχει ιόντα που να εξουδετερώνουν αποτελεσματικά τα αρνητικά φορτία των φωσφορικών ομάδων. Εν τη απουσία κατιόντων, το πολυανιονικό DNA θα απωθηθεί έντονα, σε ουδέτερο pH, από το αρνητικά φορτισμένο ηλεκτρόδιο. Για το σκοπό αυτό, άλατα με μεγάλα κατιόντα, για παράδειγμα μυρμηκικό αμμώνιο ή CsCl έχουν χρησιμοποιηθεί. [67, 68, 69]

### 4.2.2 Οξείδωση

Τα σήματα οξείδωσης των βάσεων των νουκλεϊκών οξέων (NAs) μετρούνται, επί το πλείστον, σε στερεά ηλεκτρόδια. Εκτός από τα ηλεκτρόδια άνθρακα, που είναι

αναμφίβολα τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα για τη χωρίς-ετικέτα (label free) ανίχνευση του DNA σε βιοαισθητήρες, και άλλα στερεά ηλεκτρόδια, όπως για παράδειγμα αργύρου, πλατίνας [40,70,71], χαλκού [54], ή χρυσού [56], έχουν χρησιμοποιηθεί σε μικρότερο βαθμό. Επιπλέον, υγρά ηλεκτρόδια υδραργύρου χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της οξειδωσης του προϊόντος αναγωγής της γουανίνης (G). Το σήμα οξειδωσης της γουανίνης (G) σε ηλεκτρόδια άνθρακα χρησιμοποιείται, για παράδειγμα, για την παρακολούθηση της δραστηριότητας της τελομεράσης [72] ή των βλαβών στο DNA που προκαλούνται από την επίδραση ακτινοβολίας [73,74], χρωμίου [75], υπεροξεινιτρικού [76] και άλλων παραγόντων.

#### **4.2.2.1 Ηλεκτρόδια άνθρακα**

Διάφορα υλικά άνθρακα χρησιμοποιούνται στην ανάλυση των νουκλεϊκών οξέων (NAs), συμπεριλαμβανομένων του προσανατολισμένου πυρολυτικού γραφίτη (HOPG), βασική άκρη ή αεροπλάνοπυρολυτικό γραφίτη, του γραφίτη από μολύβι, των λιθογραφικά εκτυπωμένων ηλεκτροδίων του άνθρακα, τα ηλεκτρόδια πάστας άνθρακα (CPE), τα ηλεκτρόδια υαλώδους άνθρακα (GCE), τα ηλεκτρόδια από διαμάντι εμποτισμένα με βόριο (BDD), τα αγώγιμα υμένια από διαμάντι, το γραφένιο, τους νανοσωλήνες άνθρακα (CNTs) κλπ. Μερικά από τα υλικά αυτά έχουν συγκριθεί σε μία μελέτη, που δείχνει ότι τα ηλεκτρόδια πάστας άνθρακα (CPE), πυρολυτικού γραφίτη, του προσανατολισμένου πυρολυτικού γραφίτη (HOPG) και τα λιθογραφικά εκτυπωμένα ηλεκτρόδια άνθρακα (SPCE) είναι κατάλληλα για την ανάλυση των ιχνών DNA ενώ τα ηλεκτρόδια ινών άνθρακα και υαλώδους άνθρακα απαιτούν υψηλότερες συγκεντρώσεις DNA. [20]

Οξείδωση των καταλοίπων της αδενίνης (A) και της γουανίνης (G) στα ηλεκτρόδια άνθρακα, παρατηρήθηκε στα τέλη της δεκαετίας του 1970 με κατώτερη όμως ευαισθησία σε σύγκριση με τα ηλεκτρόδια υδραργύρου. Τα ηλεκτρόδια άνθρακα ανταγωνίστηκαν τα ηλεκτρόδια υδραργύρου στην ευαισθησία μόνο μετά την εφαρμογή αναδιαλυτικής σταθερής χρονοποτενσιομετρικής ανάλυσης (CPS) ή βολταμμετρία τετραγωνικού παλμού (SWV) με διόρθωση της βασικής γραμμής, οπότε και επιτράπηκε ο προσδιορισμός υπομικρομοριακών συγκεντρώσεων ολιγονουκλεοτιδίων (ODNs) [79].

Οι νανοσωλήνες άνθρακα (CNTs) έφεραν περαιτέρω εξελίξεις στον ραγδαία εξελισσόμενο τομέα των αισθητήρων του DNA. Η συνεισφορά των νανοσωλήνων άνθρακα (CNTs) έγκειται κυρίως στις μοναδικές ηλεκτρικές, θερμικές, χημικές,

μηχανικές και χωρικές 3-D ιδιότητες τους [82]. Αρκετές μελέτες επίσης, αφιερώθηκαν και στην άμεση οξείδωση των καταλοίπων της γουανίνης (G) του DNA σε ηλεκτρόδια νανοσωλήνων άνθρακα [83-89]. Η μέθοδος βασίζεται στην ενίσχυση του σήματος της οξείδωσης της γουανίνης (G) λόγω της μεγάλης επιφάνειας των νανοσωλήνων άνθρακα (CNTs) η οποία προσφέρει μια αύξηση του αριθμού των μορίων των νουκλεϊκών οξέων (NAs) που προσροφώνται.

Το γραφένιο, είναι ένα άλλο πολλά υποσχόμενο υλικό για την ανάλυση των εγγενών σημάτων οξείδωσης του DNA [46, 90-93]. Παρόλο που παραδοσιακά παρασκευάζεται με απολέπιση του προσανατολισμένου πυρολυτικού γραφίτη (HOPG) [94,95], ο πιο οικονομικός τρόπος για την προετοιμασία γραφενίου θεωρείται η χημική [96] ή η θερμική [97] αναγωγή του οξειδίου του γραφενίου.

### 4.2.3 Αλλαγές στη δομή του DNA

Στο μονόκλωνο DNA (ssDNA) με τη πολαρογραφία διαφορικού παλμού (DPP) παράγονται δύο κορυφές: κορυφή I (~ -1,2 V) χωρητικής φύσης, και κορυφή III (μεταξύ -1,4 και -1,5 V), που οφείλεται στην αναγωγή της αδενίνης (A) και της κυτοσίνης (C) (σχηματίζοντας μία μοναδική κορυφή Σχήμα 4.1(B)). Η αναγωγή ήταν μη αναστρέψιμη και πραγματοποιήθηκε σε ένα πρωτονιωμένο στάδιο [68]. Στο δίκλωνο DNA (dsDNA) παράγεται η χωρητική κορυφή I, ακολουθούμενη από μία πολύ μικρότερη κορυφή II (~ 80 mV πιο θετικά από την κορυφή III του ssDNA), αλλά η κορυφή III δεν εμφανίζεται. Η κορυφή II αποδίδεται στις ανοιχτές περιοχές του δίκλωνου DNA (dsDNA), όπως σε μονόκλινα σπασίματα (ssb) ή στα άκρα των μορίων του, όπως τεκμηριώνεται από την απουσία της κορυφής II σε ομοιοπολικά κλειστό κυκλικό DNA (υπερλικωμένο DNA, scDNA) σε θερμοκρασία δωματίου [98]. Ιικό RNA(viral RNA), στην A-μορφή, εμφανίζει αποκρίσεις με πολαρογραφία διαφορικού παλμού (DPP) παρόμοιες με εκείνες του δίκλωνου DNA (dsDNA) στη B-μορφή [99]. Μετουσιωμένο RNA εμφάνισε υψηλή κορυφή III παρόμοια με εκείνη του μετουσιωμένου DNA (Σχήμα 4.1 (B)).

Οι αναγόμενες περιοχές στην αδενίνη (A) και την κυτοσίνη (C) αποτελούν τμήμα των δεσμών υδρογόνου και κρύβονται στο εσωτερικό της διπλής έλικας του DNA. Η αναγόμενη περιοχή της γουανίνης (G) στα ηλεκτρόδια υδραργύρου, καθώς και οι περιοχές οξείδωσης στην αδενίνη (A) και στη γουανίνη (G) σε ηλεκτρόδια άνθρακα, δεν συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου, και βρίσκονται πλησιέστερα προς την

επιφάνεια του μορίου. Σε συμφωνία με τις θέσεις των αναγόμενων περιοχών της αδενίνης (A) και της κυτοσίνης (C) που συμμετέχουν στους δεσμούς υδρογόνου στο μοντέλο των Watson-Crick, τα σήματα αναγωγής του DNA δείχνουν μια υψηλή ευαισθησία στη δομή του DNA. Τα σήματα αυτά σχετίζονται με την δευτεροταγή δομή του DNA σε συνδυασμό με τις σχετικές θέσεις των αναγόμενων τμημάτων. Ένας σημαντικός παράγοντας για την αναγωγή της αδενίνης (A) και της κυτοσίνης (C) είναι η πρωτονίωση τους, η οποία μπορεί να λάβει χώρα στην περιοχή ουδέτερων pH αρκεί το άζωτο στη θέση 1 της αδενίνης (A) ή αυτό στη θέση 3 της κυτοσίνης (C) να μπορούν να δεχθούν το πρωτόνιο. Στα ηλεκτρόδια άνθρακα, η διαφορά μεταξύ του ύψους της κορυφής της γουανίνης (G) στο μονόκλωνο (ssDNA) και στο δίκλωνο DNA (dsDNA) ήταν ουσιαστικά μικρότερη ε σύγκριση με τις διαφορές στην κορυφή III μέτρηση με πολαρογραφία διαφορικού παλμού (DPP) / βολταμμετρία διαφορικού παλμού (DPV) στο ηλεκτρόδιο υδραργύρου), σε συμφωνία με την τοποθεσία της θέσης οξείδωσης της γουανίνης (G) κοντά στην επιφάνεια του μορίου.

Όπως προαναφέρθηκε, οι οξειδούμενες περιοχές στην αδενίνη (A) και (G) δεν αποτελούν τμήμα των δεσμών υδρογόνου και γι' αυτό το λόγο οι διαφορές στη βολταμμετρική συμπεριφορά του δίκλωνου και του μονόκλωνου DNA καθορίζονται κυρίως από τις διαφορές στην ευκαμψία των δύο μορφών του DNA. Έτσι, το μονόκλωνο DNA είναι σχετικά ευλύγιστο και κατά την προσρόφιση στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου γραφίτη παίρνει θέση προς την επιφάνεια με αποτέλεσμα περισσότερα κατάλοιπα αδενινών και γουανινών να είναι προσβάσιμα και δίνουν μεγαλύτερα ρεύματα κορυφής σε σύγκριση με το δίκλωνο DNA το οποίο έχει πιο άκαμπτη δομή.

#### **4.2.4. Προσροφητικές αναδιαλυτικές τεχνικές**

Για την αύξηση της ευαισθησίας των ηλεκτροχημικών αναλύσεων των νουκλεϊκών οξέων (NAs) χρησιμοποιήθηκε η προσροφητική αναδιαλυτική τεχνική (AdS), αξιοποιώντας την ισχυρή προσροφήση των νουκλεϊκών οξέων (NAs) στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου κρεμάμενης σταγόνας υδραργύρου (HMDE). Με ανάδευση, τα μόρια των νουκλεϊκών οξέων (NAs) μεταφέρονται ταχύτερα και ακινητοποιούνται πάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου κρεμάμενης σταγόνας υδραργύρου (HMDE) για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (από ότι στο σταγονικό

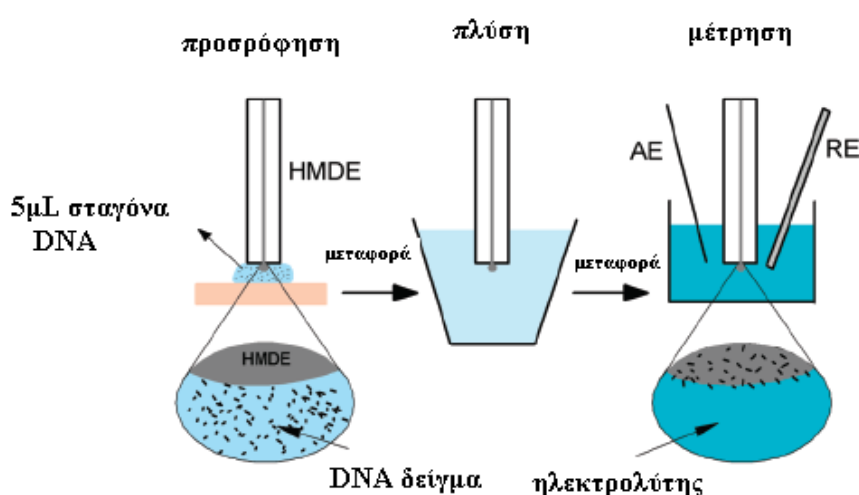
ηλεκτρόδιο υδραργύρου (DME)), με αποτέλεσμα αυξημένα αναγωγικά ή οξειδωτικά σήματα από τα προσροφημένα νουκλεϊκά οξέα (NAs).

Εφαρμογή της αναδιαλυτικής βολταμετρίας διαφορικού παλμού (DPV) ή αναδιαλυτικής βολταμετρίας γραμμικής σάρωσης (LSV) για τη μέτρηση των σημάτων αναγωγής των καταλοίπων της αδενίνης (A) και της κυτοσίνης (C) δεν απέδωσε την επιθυμητή αύξηση της ευαισθησίας, διότι σε χαμηλές συγκεντρώσεις οι καθοδικές κορυφές συγχωνεύτηκαν με το ρεύμα υποβάθρου [100]. Καλύτερα αποτελέσματα ελήφθησαν χρησιμοποιώντας προσροφητική αναδιαλυτική (AdS) κυκλική βολταμετρία (CV) για τη μέτρηση της ανοδικής κορυφής της γουανίνης (G) σε πιο θετικά δυναμικά ( $\sim -0,3$  V) [101] ή βολταμετρία εναλλασσόμενου ρεύματος (ACV) αποδίδοντας μη φαρανταϊκά (τενσαμετρικά) σήματα [102]. Αν και η ευαισθησία βελτιώθηκε κατά 2 τάξεις μεγέθους, ανταγωνίζοντας την ηλεκτροφόρηση πηκτής, για πρώτη φορά, ο όγκος του δείγματος που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα ήταν ακόμη σχετικά μεγάλος ( $\geq 1$  mL). Πρόσφατα, μια καλά αναπτυγμένη καθοδική κορυφή  $SW_{III}$  ελήφθη με προσροφητική αναδιαλυτική βολταμετρία τετραγωνικού παλμού (AdSSWV) (Σχήμα 4.1(C)), συγκρίσιμη με την κορυφή III από την πολαρογραφία διαφορικού παλμού (DPP) (Σχήμα 4.1(B)). Χρησιμοποιώντας την κορυφή  $SW_{III}$  παρατηρήθηκε καλύτερη ευαισθησία από αυτή που λαμβάνεται με την ανοδική κορυφή της γουανίνης (G). Αυτή η κορυφή, αν και ελάχιστα λιγότερο σχηματισμένη από ότι στο ηλεκτρόδιο κρεμάμενης σταγόνας υδραργύρου (HMDE), παρήχθη επίσης και σε στερεά ηλεκτρόδια αμαλγάματος (Σχήμα 4.1(D)). [103]

#### **4.2.5 DNA-τροποποιημένα ηλεκτρόδια.**

Ποσότητα του DNA σε ένα mL δειγμάτων ήταν ακόμη μάλλον υψηλή, σε σύγκριση με εκείνη της τεχνικής της ηλεκτροφόρησης πηκτής που χρησιμοποιείται συνήθως για τις μελέτες των πλασμιδιακών και των ιικών DNAs. Προσπάθειες έγιναν, ως εκ τούτου, για τη μείωση του όγκου των δειγμάτων DNA που απαιτούνται για ηλεκτροχημική ανάλυση. Σημαντική μείωση του όγκου επιτεύχθηκε με τη προσρόφηση μορίων νουκλεϊκών οξέων (NAs) από μικρές σταγόνες του δείγματος (3-5  $\mu$ L), ακολουθούμενη από τη μεταφορά του NA-τροποποιημένου ηλεκτρόδιου σε έναν ηλεκτρολύτη [100,104] Η τεχνική αυτή η οποία ονομάζεται προσροφητική αναδιαλυτική τεχνική αλλαγής μέσου (ADTs, *ex situ*, Σχήμα 4.2) κατέστησε δυνατό τον προσδιορισμό και χαρακτηρισμό των δειγμάτων νουκλεϊκών οξέων (NAs) τα

οποία συνήθως βρίσκονται σε χαμηλές ποσότητες, όπως για παράδειγμα δείγματα πλασμιδιακών και ικών DNAs και των θραυσμάτων τους, συνθετικών ολιονουκλεοτιδίων (ODNs) και άλλα. Η προσροφημένη στιβάδα των μορίων των νουκλεϊκών οξέων (NAs) ήταν σχετικά σταθερή, αντιστεκόταν στην πλύση παρέχοντας έτσι τα πρώτα DNA- ή RNA-τροποποιημένα ηλεκτρόδια. Τα σήματα που λαμβάνονται με την τεχνική αυτή δεν διαφέρουν ουσιαστικά από αυτά που λαμβάνονται με τη συμβατική προσροφητική αναδιαλυτική (AdS) τεχνική. Αποδείχθηκε ότι μετά τη μεταφορά, το dsDNA διατηρούσε τη διαμόρφωσή του και θα μπορούσε να διακριθεί από το ssDNA.



**Σχήμα 4.2.** Απλοποιημένο σχήμα της αναδιαλυτικής προσροφητικής τεχνικής αλλαγής μέσου (AdTS, *ex situ*). Το DNA προσροφάται από μικρές σταγόνες και προσροφάται στο ηλεκτρόδιο κρεμάμενης σταγόνας υδραργύρου (HMDE). Το DNA-τροποποιημένο ηλεκτρόδιο στη συνέχεια πλένεται, και μεταφέρεται στον ηλεκτρολύτη όπου πραγματοποιείται η ηλεκτροχημική μέτρηση.

Η προσροφητική αναδιαλυτική τεχνική αλλαγής μέσου (AdTS) προσφέρει επίσης και πολλά πρόσθετα πλεονεκτήματα, όπως για παράδειγμα:

(α) πολλές ουσίες χαμηλού μοριακού βάρους (MB), αλλά όχι το DNA, θα μπορούσαν εύκολα να απομακρυνθούν κατά την πλύση και έτσι να μην παρεμποδίζουν την ανάλυση

(β) ο διαχωρισμός του μέσου προσροφήσεως από τον ηλεκτρολύτη κατέστησε δυνατή την ξεχωριστή βελτιστοποίηση των συνθηκών για την προσρόφηση και για την ηλεκτροχημική μέτρηση



(γ) είναι δυνατό να μελετηθούν αλληλεπιδράσεις του DNA-τροποποιημένου ηλεκτροδίου με άλλα μόρια που υπάρχουν στο διάλυμα χωρίς να επηρεάζονται από τις αλληλεπιδράσεις του DNA με το εσωτερικό του διαλύματος (bulk) [100,104]. Η προσροφητική αναδιαλυτική τεχνική αλλαγής μέσου (AdTS) φαίνεται να είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική και σε ηλεκτρόδια άνθρακα. [81]

#### **4.2.6 Προσρόφηση σε ηλεκτρόδια άνθρακα**

Τα νουκλεϊκά οξέα (NAs) προσροφώνται σταθερά και μη αναστρέψιμα σε ηλεκτρόδια άνθρακα. Λόγω της υδρόφιλης φύσης της επιφάνειας του άνθρακα (που επιτυγχάνεται π.χ. με μία οξειδωτική προκατεργασία), τα νουκλεϊκά οξέα (NAs) προσροφώνται μέσω του φωσφορικού σκελετού, αφήνοντας τις βάσεις προσβάσιμες για υβριδισμό. Εάν το ηλεκτρόδιο άνθρακα είναι θετικά φορτισμένο, η ηλεκτροστατική έλξη με τον αρνητικά φορτισμένο σκελετό καθιστά την προσρόφηση ακόμη ισχυρότερη. Αναλογικά, μία μετατόπιση προς αρνητικότερα δυναμικά έχει ως αποτέλεσμα την εκρόφηση του DNA που προκαλείται από μία ηλεκτροστατική απόθεση. Εκτός από το δυναμικό ακινητοποίησης και άλλες παράμετροι, συμπεριλαμβανομένων της ιοντικής ισχύς ή τον τύπο του ηλεκτρολύτη, μπορούν να επηρεάσουν τη συμπεριφορά προσρόφησης του DNA στα ηλεκτρόδια άνθρακα. Αντίθετα, το ουδέτερο PNA έδειξε διαφορετική συμπεριφορά. Η προσρόφηση του PNA στα ηλεκτρόδια άνθρακα χαρακτηρίζεται από αύξηση στο "πακετάρισμα" της επιφάνειας, κυρίως λόγω διαμοριακών επιφανειακών αλληλεπιδράσεων και από μια ασθενέστερη προσρόφηση σε θετικά δυναμικά, σε σύγκριση με DNA. [80]

## 5. BITAMINEΣ

Η ποιότητα των τροφίμων είναι υπεύθυνη για διάφορες ασθένειες του ανθρώπινου είδους, και όχι μόνο, από την αρχαιότητα ακόμη. Αρχικά οι ασθένειες αυτές αντιμετωπίζονταν με εμπειρικούς τρόπους, από τις αρχές του εικοστού αιώνα όμως και έπειτα, άρχισε η συστηματική μελέτη τους. Τελικά αποδείχτηκε ότι οι καταστάσεις αυτές οφείλονταν στην έλλειψη ορισμένων παραγόντων από τη διαίτα, που ονομάστηκαν **βιταμίνες** από τον Funk το 1912, νομίζοντας ότι όλες ήταν αμίνες. Όταν όμως άρχισε η απομόνωση των πρώτων βιταμινών σε καθαρή κατάσταση το 1930, η παραπάνω υπόθεση αποδείχτηκε λανθασμένη. Ωστόσο, η ονομασία αυτή έχει επικρατήσει μέχρι σήμερα.

Πλέον είναι γνωστό, ότι οι βιταμίνες είναι μικρά οργανικά μόρια που βρίσκονται στις τροφές, τις οποίες ο ανθρώπινος οργανισμός δε μπορεί να συνθέσει, ή συνθέτει σε πολύ μικρές ποσότητες, μικρότερες από τις απαιτούμενες για την διατήρηση της υγείας του. Εκτός από την βιταμίνη C, για την οποία θα γίνει λόγος παρακάτω, οι υπόλοιπες βιταμίνες χρειάζονται σε ιχνοποσότητες στην καθημερινή διατροφή.

Οι βιταμίνες συμβολίστηκαν με λατινικά γράμματα και οι ονομασίες που έλαβαν σχετίζονταν με τη χημική δομή ή τη βιολογική τους δράση. Διαφέρουν μεταξύ τους στη δομή και τη λειτουργία τους και κατατάσσονται σε δύο βασικές κατηγορίες, στις **υδατοδιαλυτές** και στις **λιποδιαλυτές**. Ο σημαντικότερος ρόλος τους είναι να ρυθμίζουν τις διάφορες αντιδράσεις του μεταβολισμού. Η έλλειψη κάποιας βιταμίνης διακόπτει τις ειδικές μεταβολικές διεργασίες και είναι δυνατό να μεταβάλλει την μεταβολική ισορροπία του οργανισμού. Οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες συμμετέχουν στη μεταφορά ενέργειας και στον μεταβολισμό πρωτεϊνών, υδατανθράκων και λιπαρών οξέων των κυτταρικών μεμβρανών, ενώ οι λιποδιαλυτές αποτελούν βασικό τμήμα των βιολογικών μεμβρανών και παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της λειτουργίας τους και στην προστασία τους από οξειδωτικές βλάβες ή λιπιδικές υπεροξειδώσεις τους. Ορισμένες βιταμίνες έχουν δράση στο γενετικό υλικό του οργανισμού και ελέγχουν την σύνθεση ορισμένων ενζύμων. [15,105]

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι διαταραχές στον οργανισμό μπορούν να προκληθούν όχι μόνο από την έλλειψη των βιταμινών (υποβιταμίνωση ή αβιταμίνωση) αλλά και από την πολύ μεγάλη δόση τους (υπερβιταμίνωση).

## 5.1 ΒΙΤΑΜΙΝΗ C (ΑΣΚΟΡΒΙΚΟ ΟΞΥ)

Η βιταμίνη C ανήκει στις υδατοδιαλυτές βιταμίνες και αποτελεί μια φυσική οργανική ένωση με αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Σε καθαρή μορφή είναι ένα κρυσταλλικό στερεό λευκού χρώματος, ενώ όταν επιμολυνθεί ή αποκτήσει προσμίξεις εμφανίζεται ελαφρώς κίτρινο. Είναι ευδιάλυτη στο νερό και τα διαλύματά της χαρακτηρίζονται ελαφρώς όξινα. Η ονομασία «ασκορβικό οξύ» προέρχεται από το στερητικό πρόθεμα α- και το σκορβούτο, μια αιμορραγική νόσο γνωστή από την αρχαιότητα, που οφείλεται στην έλλειψη της βιταμίνης C.

Η βιταμίνη C είναι παράγωγο της γλυκόζης και πολλοί ζωικοί οργανισμοί μπορούν να την παράγουν μόνοι τους. Ο άνθρωπος μαζί με τα υπόλοιπα πρωτεύοντα θηλαστικά, τα ινδικά χοιρίδια, τις νυχτερίδες, τα πουλιά και άλλα είδη ανήκει στην κατηγορία των σπονδυλωτών που δε μπορούν να την συνθέσουν μόνοι τους, αλλά είναι απαραίτητο θρεπτικό συστατικό της διατροφής τους. Απαιτείται για την αύξηση και επιδιόρθωση του συνδετικού ιστού, των δοντιών, των οστών και των χόνδρων, καθώς συμμετέχει και στην υδροξυλίωση του κολλαγόνου [106].

## 5.2 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΣΤΗΝ ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ ΤΟΥ ΑΣΚΟΡΒΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

Κατά το παρελθόν, το σκορβούτο εμφανίζονταν κυρίως στους ναυτικούς που παρέμεναν στη θάλασσα για πολύ μεγάλα χρονικά διαστήματα. Τα πρώιμα συμπτώματα της νόσου είναι μια γενική αδυναμία και τάση για λίθαργο και ακολουθούν μυική αδυναμία, εμφάνιση εξανθημάτων στα πόδια, πόνοι των αρθρώσεων, αιμορραγία στα ούλα, απώλεια δοντιών, δύσκολη επούλωση πληγών και γενικά μια ψυχοσωματική κατάρρευση του ασθενή. Αν η ασθένεια δεν αντιμετωπιστεί έγκαιρα, ακολουθεί αναιμία, ίκτερος, καρδιακή ανεπάρκεια και τελικά θάνατος [107]. Στα μέσα του 18<sup>ου</sup> αιώνα παρατηρήθηκε ότι η λεμονάδα προστάτευε τους ναυτικούς από σκορβούτο. Στην αρχή, αυτή η ευεγερτική δράση αποδόθηκε στα οξέα του λεμονιού. Γρήγορα όμως παρατηρήθηκε ότι άλλα όξινα τρόφιμα π.χ. το ξύδι δεν είχαν την ίδια προστατευτική δράση. Ωστόσο το σκορβούτο δεν υπήρξε αποκλειστική ασθένεια των ναυτικών, αλλά έκανε την εμφάνιση του και στη στεριά. Πολλές από τις πρώτες αποικίες στις περιοχές του σημερινού Καναδά είχαν πληγεί από σκορβούτο (16<sup>ος</sup>-17<sup>ος</sup> αιώνας), ενώ εμφανιζόταν και σε περιπτώσεις λιμού, όπως

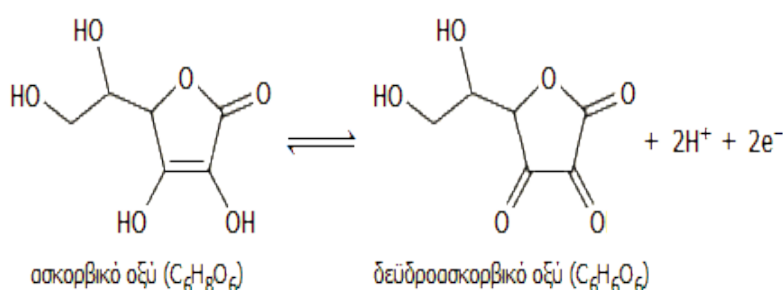
το 1845 στο μεγάλο λιμό της πατάτας στην Ιρλανδία. Ήδη, από το 1734 ο Ολλανδός συγγραφέας Johann Bachstrom ήταν απόλυτα βέβαιος ότι η ολική αποχή από φρέσκα λαχανικά και φρούτα ήταν η κύρια αιτία της ασθένειας. Το 1907 δύο Νορβηγοί ιατροί απομόνωσαν την χημική ουσία που ήταν υπεύθυνη για την ασθένεια Beri-Beri. Η μελέτη τους βασίστηκε πάνω σε ένα νέο μοντέλο ζώου, το ινδικό χοιρίδιο, το οποίο μπορούσε να νοσήσει από σκορβούτο. Σύντομα βρέθηκε η υπεύθυνη ουσία η οποία ονομάστηκε «βιταμίνη C».

### 5.3 ΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΑΣΚΟΡΒΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

Το ασκορβικό οξύ δρα ως διπρωτικό οξύ. Η πρώτη του διάσταση γίνεται εύκολα ( $pK_1=4,17$ , δηλαδή περίπου 4 φορές ισχυρότερο από το οξικό οξύ), αλλά η δεύτερη διάστασή του είναι αρκετά ασθενής ( $pK_2=11,57$ ). Συνεπώς, το ασκορβικό οξύ σε υδατικά διαλύματα συμπεριφέρεται ως μονοπρωτικό οξύ, παρέχοντας ένα μόνο ισοδύναμο σημείο κατά την ογκομέτρησή του με διάλυμα ισχυρής βάσης.

Το ασκορβικό οξύ είναι ένα ήπιο έως αρκετά ισχυρό αναγωγικό μέσο, πολύ ισχυρότερο από τα απλά αναγωγικά σάκχαρα, και αυτό εξαιτίας της ύπαρξης της εξαιρετικά δραστικής και πιθανόν σπάνιας ενεδιολικής ομάδας  $-C(OH)=C(OH)-$ . Έτσι, οξειδώνεται από ήπια οξειδωτικά μέσα προς δεϋδροασκορβικό οξύ, μέσω μιας πλήρους χημικά αντιστρεπτής αντίδρασης. Αναγωγικά μέσα όπως τα HI, H<sub>2</sub>S και οιθειόλες ανάγουν ποσοτικά το δεϋδροασκορβικό οξύ σε ασκορβικό οξύ. Στον οργανισμό ανάγεται από την γλουταθειόνη και άλλες θειολικές ενώσεις.

Η οξειδοαναγωγική ισορροπία έχει ως εξής:



**Σχήμα 5.1** Οξειδοαναγωγική Ισορροπία.

Το δεϋδροασκορβικό οξύ διατηρεί τις βιοχημικές ιδιότητες της βιταμίνης C, εκτός βέβαια από την αντιοξειδωτική της ικανότητα. Επίσης, το ασκορβικό οξύ δεν

μπορεί να εισέλθει στον εγκέφαλο μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, σε αντίθεση με το δεϋδροασκορβικό οξύ. Έτσι το ασκορβικό οξύ που βρίσκεται στον εγκέφαλο (και μάλιστα σε αυξημένες συγκεντρώσεις σε σχέση με άλλα όργανα του σώματος) είναι αποτέλεσμα της βιοχημικής αναγωγής του δεϋδροασκορβικού οξέος. Το ασκορβικό οξύ οξειδώνεται εύκολα σε υδατικά διαλύματα από το οξυγόνο του αέρα. Η αντίδραση αυτή ευνοείται σε ουδέτερα και αλκαλικά διαλύματα (σε όξινα διαλύματα είναι αρκετά αργή) και καταλύεται από ιχνοποσότητες ιόντων μετάλλων, κυρίως του  $\text{Cu}^{+2}$ .

Το μόριο του ασκορβικού οξέος διαθέτει δύο στερεογονικά κέντρα και έτσι μπορεί να πάρει τέσσερις το πολύ στερεοϊσομερείς μορφές (SR, RS, SS, RR). Όλα τα στερεοϊσομερή θα είναι χειρόμορφα και θα συνιστούν δύο διαστεροϊσομερή (ασκορβικό και ερυθροβικό), το καθένα εξ' αυτών ως ζεύγος δύο εναντιομερών. Από αυτά τα εναντιομερή, στη φύση συναντώνται τα SR (L-ασκορβικό οξύ) και RR (D-ερυθροβικό οξύ ή D-ισοασκορβικό οξύ). [109]

Στον παρακάτω πίνακα παραθέτονται ορισμένες φυσικές και χημικές ιδιότητες των διαστερομερών του ασκορβικού οξέος.

**Πίνακας 5.1:** Φυσικοχημικές ιδιότητες των διαστερομερών του ασκορβικού οξέος.

	Διαστερομερές 1		Διαστερομερές 2	
	Εναντιομερή		Εναντιομερή	
Συντακτικός τύπος διαστερομερούς:				
Ονομασία*:	L-ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) (φυσική ουσία)	D-ασκορβικό οξύ	L-ερυθροβικό οξύ (L-ισοασκορβικό οξύ)	D-ερυθροβικό οξύ (D-ισοασκορβικό οξύ) (φυσική ουσία)
Σημείο τήξεως:	190-192°C	190-192°C	164-171°C	164-171°C
pK <sub>1</sub> :	4,17	4,17	2,1	2,1
Ειδική στροφική ικανότητα:	+ (20,5 έως 21,5°)	- (20,5 έως 21,5°)	+ (16,5 έως +18°)	- (16,5 έως -18°)

Το D-ασκορβικό οξύ έχει την ίδια αντιοξειδωτική ικανότητα με το L-ασκορβικό οξύ (φυσικό ασκορβικό οξύ), αλλά η δραστηριότητά του ως βιταμίνη είναι πολύ ασθενέστερη. Έτσι, αποδεικνύεται ότι η βιταμίνη C δε δρα απλά σαν ένας αντιοξειδωτικός παράγοντας, αλλά εμπλέκεται σε στερεοειδικές αντιδράσεις και έχει δράση συνενζύμου. Το L-ερυθροβικό οξύ είναι φυσικό προϊόν που συναντάται στα λαχανικά. Παρασκευάζεται με ζύμωση του καλαμοσάκχαρου με τη βοήθεια ειδικών μικροοργανισμών. Χρησιμοποιείται ως αντιοξειδωτικό και αντιμικροβιακό συντηρητικό τροφίμων (E315) και εμφανίζει περίπου το 1/20 της βιταμινικής δράσης του L-ασκορβικού οξέος. Η παρουσία του στα τρόφιμα δεν επηρεάζει την πρόσληψη του L-ασκορβικού οξέος δηλαδή δεν εμφανίζεται κάποια ανταγωνιστική προς αυτό δράση. [108]

Το ασκορβικό οξύ, θεωρείται μια απαραίτητη βιταμίνη, καθώς το ανθρώπινο σώμα δεν μπορεί να το συνθέσει από επιμέρους στοιχεία με αποτέλεσμα να πρέπει να το λαμβάνει αποκλειστικά μέσω της διατροφής.

Η κυριότερη δράση του ασκορβικού οξέος βασίζεται στην αντιοξειδωτική του ικανότητα, δηλαδή στην αλληλεπίδρασή του με τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και στην προστασία των κυττάρων από οξειδωτικές βλάβες.

Μια πρόσφατη μελέτη της ερευνητικής ομάδας και συνεργατών του Έλληνα καθηγητή και προέδρου του τμήματος παθολογίας της ιατρικής σχολής του πανεπιστημίου της Νέας Υόρκης Dr. Γιάννη Αϋφαντή, έδειξε ευεργετικές ιδιότητες της βιταμίνης C που δημιουργούν ελπίδα για την αντιμετώπιση αιματολογικών καρκίνων. Η βιταμίνη C μπορεί να οδηγήσει σε ωρίμανση και θάνατο τα ελαττωματικά βλαστοκύτταρα του μυελού των οστών, τα οποία αλλιώς θα πολλαπλασιάζονταν για να προκαλέσουν καρκίνο του αίματος.

Σε μια άλλη μελέτη στο πανεπιστήμιο του Τέξας έδειξε ότι η αύξηση της ημερήσιας προσλαμβανόμενης ποσότητας βιταμίνης C μπορεί να βοηθήσει στη βελτίωση της γονιμότητας του άνδρα, συμβάλλοντας στην παραγωγή περισσότερων και ισχυρότερων σπερματοζωαρίων με αυξημένη κινητικότητα. Επιπλέον, η βιταμίνη C φαίνεται να κάνει το σπέρμα λιγότερο κολλώδες, με αποτέλεσμα να κινείται με περισσότερη ευκολία προς το ωάριο.

Η αντιοξειδωτική δράση της βιταμίνης C φαίνεται να βοηθά στην προστασία του σπέρματος και του DNA του από βλάβες, που μπορεί να προκαλέσουν ουσίες, όπως αυτές που βρίσκονται στη μολυσμένη ατμόσφαιρα ή τον καπνό του τσιγάρου. Ο

κατακερματισμός του σπερματικού DNA μπορεί, για παράδειγμα, να προκαλέσει γενετικές ανωμαλίες στο βρέφος ή να καταστήσει αδύνατη μια εγκυμοσύνη.

Η βιταμίνη C είναι χρήσιμη και για τη γυναικεία γονιμότητα, ιδιαίτερα εάν τα επίπεδα προγεστερόνης είναι χαμηλά. Το 77% των γυναικών με χαμηλή προγεστερόνη, που λάμβαναν 750mg βιταμίνης C ημερησίως στο πλαίσιο μελέτης, παρουσίασε αύξηση στα επίπεδα της συγκεκριμένη ορμόνης, γεγονός που οδήγησε σε αύξηση των ποσοστών κύησης. Επίσης, το 53% των γυναικών με ανεπάρκεια της ωχρινικής φάσης (δυσλειτουργία του ωχρού σωματίου, το οποίο παράγει ανεπαρκή ποσότητα προγεστερόνης) εμφάνισε επιμήκυνση της φάσης αυτής σε σχέση με το 22% των γυναικών που δε λάμβαναν συμπλήρωμα βιταμίνης C.

Πέρα από τις ευεργετικές του ιδιότητες, το ασκορβικό οξύ σύμφωνα με μελέτες από ερευνητές στην Πενσυλβάνια των Η.Π.Α., όταν λαμβάνεται σε χάπια από υγιείς ανθρώπους, μπορεί να επηρεάσει το ανθρώπινο DNA, καθώς μέσω της αντιοξειδοτικής του δράσης, μπορεί να δράσει ως καταλύτης στην μετατροπή λιπιδίων υδροπεροξειδίου σε γενό-τοξίνης που αποδεικνύεται επιβλαβής για το ανθρώπινο γενετικό υλικό.

Συνοψίζοντας, μπορούμε να πούμε πως η βιταμίνη C μπορεί να κάνει κάποιο καλά πράγματα, αλλά μπορεί να κάνει και κάποια κακά πράγματα εξίσου.

Αν θέλουμε λοιπόν να είμαστε προσεκτικοί, δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούμε συμπληρώματα διατροφής (ιδιαίτερα χάπια) για την πρόσληψη Βιταμίνης C, αλλά κύριος στόχος μας θα πρέπει να είναι η πρόσληψη της μέσα από τροφές, μέσω μιας ισορροπημένης διατροφής που περιλαμβάνει φρούτα, λαχανικά και δημητριακά.

## 5.4 ΠΗΓΕΣ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ C

Η βιταμίνη C απαντάται στο σύνολο των κυττάρων των υλών φυτικής ή ζωικής προέλευσης, κυρίως στην ελεύθερη μορφή της. Στα φυτά συναντάται και δεσμευμένη σε πρωτεΐνες, ενώ στα λαχανικά συναντάται και με τη μορφή του δεϋδροασκορβικού οξέος (2-8%). Πλούσια σε βιταμίνη C είναι ορισμένα φρούτα και πολλά λαχανικά, αλλά και το συκώτι (20-35mg/100g). Το κρέας και το γαλά είναι φτωχές πηγές της βιταμίνης C (έως 2mg/100g). Στα πλούσια σε βιταμίνη C φρούτα, που καταναλώνονται και με τη μορφή χυμού ή νέκταρ, ανήκουν αρκετοί ραγώδεις καρποί, το ακτινίδιο και τα εσπεριδοειδή. Λαχανικά πλούσια σε βιταμίνη C είναι αυτά που προέρχονται από φυτά της οικογένειας Brassicaceae.

Στη συνέχεια παρατίθεται ένας πίνακας με φρούτα και λαχανικά που είναι πλούσια σε βιταμίνη C. [110]

**Πίνακας 5.2:** Περιεκτικότητα ορισμένων φρούτων και λαχανικών σε βιταμίνη C.

Φρούτο	Περιεκτικότητα σε Βιταμίνη C (mg/100g)	Λαχανικό	Περιεκτικότητα σε Βιταμίνη C (mg/100g)
Μαύρο φραγκοστάφυλλο	177	Μαϊντανός	161
Φράουλα	63	Πιπεριά	121
Λεμόνι	51	Κοχλιάριο	114
Πορτοκάλι	49	Λαχανάκι Βρυξελλών	112
Ακτινίδιο	46	Λαχανίδα	105
Grape fruit	44	Μπρόκολο	100
Μοσχολέμονο	44	Νεροκάρδαμο	96
Μάνγκο	37	Μάραθο	93
Κόκκινο φραγκοστάφυλλο	36	Γλυστρίδα	72
Άσπρο φραγκοστάφυλλο	35	Πικροράδικο	68
Λαγοκέρασο	35	Κουνουπίδι	67



## 5.5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΟΥ ΑΣΚΟΡΒΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

Το ασκορβικό οξύ αποτελεί συστατικό ζωτικής σημασίας για τον οργανισμό, καθώς τον προστατεύει από διάφορες ασθένειες και διαταραχές, αλλά χρειάζεται και για τη σύνθεση του κολλαγόνου, μιας οικογένειας πρωτεϊνών που στηρίζουν δομικά τον σκελετό του σώματος, το δέρμα, τα αιμοφόρα αγγεία, το έντερο και τα ινώδη περιβλήματα των οργάνων. Ωστόσο υψηλά επίπεδα ασκορβικού οξέος στο σώμα συνδέονται με προβλήματα στους νεφρούς και γαστρικό ερεθισμό. Έτσι λοιπόν απαιτείται συχνά ο προσδιορισμός του σε δείγματα τροφίμων και ποτών.

Ένας μεγάλος αριθμός αναλυτικών τεχνικών προσφέρεται για τον προσδιορισμό του ασκορβικού οξέος σε διάφορα υποστρώματα. Σε αυτές τις τεχνικές περιλαμβάνονται τιτλοδοτήσεις [111,112], φθορισμομετρικές μέθοδοι [113], χρωματογραφικές [114-116] αλλά και ηλεκτροχημικές τεχνικές [117-123].

Ωστόσο κάποιες από αυτές τις τεχνικές είναι χρονοβόρες, κάποιες είναι φτωχές σε ευαισθησία και εκλεκτικότητα, ενώ άλλες είναι υψηλού κόστους ή χρειάζονται ειδικά καταρτισμένους χειριστές. Οι ηλεκτροχημικές τεχνικές προσφέρουν τα πλεονέκτημα του χαμηλού κόστους αγοράς και λειτουργίας των οργάνων, της υψηλής ευαισθησίας, και της απλότητας της μεθόδου.

Η αναδιαλυτική βολταμμετρία είναι ένα χρήσιμο εργαλείο που επιτρέπει τον ηλεκτροχημικό προσδιορισμό πολλών ενώσεων συμπεριλαμβανομένου και του ασκορβικού οξέος. Τα ηλεκτρόδια εργασίας που χρησιμοποιούνται ευρέως στην αναδιαλυτική βολταμμετρία είναι τα στερεά ηλεκτρόδια πάστας άνθρακα (CPE), υαλώδους άνθρακα (GCE) και διαφόρων μετάλλων (Pt, Au, Cu..). Προκειμένου να αυξηθεί η ευαισθησία των προσδιορισμών, η επιφάνεια των ηλεκτροδίων πολλές φορές μορφοποιείται με διάφορα υλικά και ενώσεις, με κυρίαρχη την μορφοποίηση ηλεκτροδίων με νανοσωματίδια. Τα όρια αντίχνευσης αυτών των μεθόδων είναι της τάξης των  $\mu\text{m}$ .

## 6. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Για τον προσδιορισμό και τη μελέτη της αλληλεπίδρασης του ασκορβικού οξέος με βιομόρια, όπως το DNA, στη βιβλιογραφία είναι περιορισμένος για αυτό και επιλέχθηκε ως θέμα προς εξέταση στη συγκεκριμένη εργασία.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί οι ηλεκτροχημικοί DNA βιοαισθητήρες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε προκαταρκτικές μεθόδους ανάλυσης (screening methods) ενώσεων που παρουσιάζουν αγγιστεία με το DNA ή που προκαλούν βλάβες στο DNA (αντικαρκινικά φάρμακα, τοξικές ενώσεις, βιταμίνες και άλλα).

Χρησιμοποιούνται, επίσης, για την ταυτοποίηση διαφόρων μορφών του DNA, γονιδίων και για την αναγνώριση διαφόρων τροποποιήσεων του DNA καθώς και στερεοχημικών αλλαγών που προκύπτουν από την επίδραση ενώσεων, που μπορεί να είναι φάρμακα ή ουσίες με βιολογικό ενδιαφέρον όπως είναι και η βιταμίνη C, της οποίας η βιολογική δράση όπως αναφέρθηκε, είναι πολύ σημαντική.

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροχημικός προσδιορισμός του ασκορβικού οξέος με χρήση ενός DNA βιοαισθητήρα.

Για τον ηλεκτροχημικό προσδιορισμό, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της προσροφητικής αναδιαλυτικής βολταμμετρίας, με τεχνική σάρωσης δυναμικού αυτή του διαφορικού παλμού.

Ο DNA βιοαισθητήρας δημιουργήθηκε με την μορφοποίηση ενός ηλεκτροδίου πάστας άνθρακα, με dsDNA από θύμο αδένα βοοειδούς.

Για τον προσδιορισμό, υπήρξε μια βελτιστοποίηση παραμέτρων όπως ο χρόνος προσυγκέντρωσης του ασκορβικού οξέος στο μορφοποιημένο ηλεκτρόδιο, η εφαρμογή, ή μη, δυναμικού κατά την αλληλεπίδραση, καθώς και η εύρεση του ιδανικού pH των διαλυμάτων διαλυτοποίησης και μέτρησης του ασκορβικού οξέος αλλά και η παρουσία, ή μη, αλάτων σε αυτά. Επίσης, πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση των παραμέτρων του ποτενσιοστάτη όπως η ταχύτητα σάρωσης, το βήμα δυναμικού και το δυναμικό του παλμού.

Στόχος ήταν η ανάπτυξη των ιδανικών συνθηκών ανίχνευσης του ασκορβικού οξέος με τη χρήση DNA βιοαισθητήρα και η δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς της μεθόδου, για μελλοντική εφαρμογή σε πραγματικά δείγματα.

## II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 7. ΟΡΓΑΝΑ –ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ -ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

#### 7.1 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

- Ποτενσιοστάτης PalmSens με το αντίστοιχο λογισμικό για τον ηλεκτρονικό υπολογιστή (IVIUM Technologies, The Netherlands, [www.ivium.nl](http://www.ivium.nl)), για τις βολταμμετρικές μετρήσεις.
- Ηλεκτρόδιο πάστας άνθρακα (CPE) με εσωτερική διάμετρο του πλαστικού σωλήνα ίση με 3 mm και εξωτερική ίση με 6 ή 9 mm (Metrohm, Switzerland, [www.metrohm.com](http://www.metrohm.com)), ως ηλεκτρόδιο εργασίας.
- Ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GCE) με εμβαδό επιφάνειας σταγόνας ίσο με  $2,22 \text{ mm}^2$  (τύπος 6.0335.000, EA 290 Metrohm, Switzerland), ως ηλεκτρόδιο εργασίας.
- Ηλεκτρόδιο Ag / AgCl με κορεσμένο διάλυμα 3 mol/L KCl (Metrohm, Switzerland), ως ηλεκτρόδιο αναφοράς.
- Ηλεκτρόδιο λευκοχρύσου (Metrohm, Switzerland), ως βοηθητικό ηλεκτρόδιο.
- Μαγνητικός αναδευτήρας (Metrohm, Switzerland), για ανάδευση των διαλυμάτων.
- Πεχάμετρο (Consort C830, Belgium, [www.consort.be](http://www.consort.be)), για μέτρηση του pH των ρυθμιστικών διαλυμάτων.
- Vortex (Velp Scientifica, Italy, [www.velp.com](http://www.velp.com)), για την ανάδευση των διαλυμάτων των ολιγονουκλεοτιδίων.
- Φυγόκεντρος (Eppendorf 5417, Italy, [www.eppendorf.com](http://www.eppendorf.com)), για την κατεργασία των διαλυμάτων των ολιγονουκλεοτιδίων.

## 7.2 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- Σκόνη γραφίτη (Fluka, Buchs, Germany, [www.sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com)), για τη σύνθεση της πάστας άνθρακα, καθαρότητας 99,9% και μέγεθος σωματιδίων < 0,1 mm.
- Ορυκτό έλαιο (mineral oil) (Sigma-Aldrich, Seize, Germany, [www.sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com)), για τη σύνθεση της πάστας άνθρακα.
- Διπλά απιονισμένο νερό ως διαλύτης
- Οξέα, βάσεις και άλατα καθαρότητας pro analysi, για την παρασκευή διαλυμάτων:
  - Χλωριούχο νάτριο (Merck, Darmstadt, Germany).
  - Καυστικό νάτριο (Sigma-Aldrich, Seize, Germany).
  - Ασκορβικό Οξύ (Sigma-Aldrich, Seize, Germany)
  - Υδροχλωρικό οξύ (Sigma-Aldrich, Seize, Germany).
  - Νιτρικό οξύ (Sigma-Aldrich, Seize, Germany).
  - Δισόξινο φωσφορικό κάλιο (Merck, Darmstadt, Germany).
  - Μονόξινο φωσφορικό κάλιο (Merck, Darmstadt, Germany).
  - Οξικό οξύ (Merck, Darmstadt, Germany).
  - Φωσφορικό οξύ (Merck, Darmstadt, Germany).
  - Χλωριούχο κάλιο (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany).
  - Αιθυλενο-διαμινο-τετρα-οξικό οξύ [EDTA] (Merck, Darmstadt, Germany).
  - Τρι-υδροξυμεθυλο-αμινο-μεθάνιο [Tris] (Merck, Darmstadt, Germany).
- Δίκλωνο DNA (deoxyribonucleic acid sodium salt) από θύμο αδένα βοοειδούς (Sigma-Aldrich, Steinheim, German

## **8. ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΣΚΟΡΒΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΕ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΟ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΟ ΠΑΣΤΑΣ ΑΝΘΡΑΚΑ (CPE) ΜΕ dsDNA**

### **8.1 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΩΝ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

Το ηλεκτρόδιο πάστας σκόνης γραφίτη άνθρακα (CPE) κατασκευάστηκε με ανάμιξη, σε μία κάψα, σκόνης γραφίτη άνθρακα και ορυκτού ελαίου σε αναλογία 75:25 (w/w) μέχρι να σχηματιστεί μία ομογενοποιημένη πάστα.

Στη συνέχεια οι ομογενοποιημένες πάστες μεταφερόταν μέσα στο ηλεκτρόδιο και η επιφάνεια του ηλεκτροδίου γυαλιζόταν με ειδικό χαρτί, για να είναι όσο το δυνατόν πιο λεία

### **8.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ**

- **Προκατεργασία των ηλεκτροδίων εργασίας**

Σε όλες τις περιπτώσεις τα ηλεκτρόδια προκατεργάζονταν, εφαρμόζοντας σταθερό δυναμικό +1,7V για ορισμένο χρόνο 60sec, χωρίς ανάδευση, σε καθαρό ρυθμιστικό διάλυμα  $\text{CH}_3\text{COOH} - \text{CH}_3\text{COONa}$   $0,2 \text{ mol L}^{-1} + 20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ NaCl}$ , pH 4,6.

- **Ακίνητοποίηση του DNA**

Μετά την προκατεργασία της επιφάνειας του ηλεκτροδίου, το ηλεκτρόδιο εργασίας μεταφερόταν σε κυψελίδα που περιείχε διάλυμα dsDNA, συγκέντρωσης  $120 \text{ mg L}^{-1}$  ( $432 \mu\text{L dsDNA} + 3,168 \text{ ml καθαρό ρυθμιστικό διάλυμα } \text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa } 0,2 \text{ mol L}^{-1} + 20 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ NaCl}$ , pH 4,6). Η ακίνητοποίησή του γινόταν με εφαρμογή σταθερού δυναμικού +0,5V για ορισμένο χρόνο 300sec, υπό συνεχή ανάδευση.

- **Αλληλεπίδραση με Ασκορβικό Οξύ (Βιταμίνη C)**

Μετά την ακίνητοποίηση του dsDNA στη επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας, το ηλεκτρόδιο μεταφερόταν σε κυψελίδα που περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα  $\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0,5M), pH 6,2 και ασκορβικό οξύ συγκεκριμένης συγκέντρωσης κάθε

φορά. Η αλληλεπίδραση του ασκορβικού οξέος με το dsDNA γινόταν χωρίς εφαρμογή δυναμικού για ορισμένο χρόνο 180sec υπό συνεχή ανάδευση.

- **Μετάλλαξη σήματος – Μέτρηση**

Μετά την αλληλεπίδραση της βιταμίνης C με το dsDNA, το ηλεκτρόδιο μεταφερόταν σε κυψελίδα που περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα μέτρησης  $\text{CH}_3\text{COOH-NaOH}$   $0,1\text{mol L}^{-1}$  pH 4,6 και εφαρμόστηκε βολταμμετρία διαφορικού παλμού με σάρωση του δυναμικού από 0 έως +1,4V, ταχύτητα σάρωσης  $0,050\text{V s}^{-1}$ , δυναμικό παλμού 0,025V, βήμα δυναμικού 0,005.

Στο συγκεκριμένο εύρος δυναμικού γίνεται οξείδωση του ασκορβικού οξέος σε δυναμικό περίπου ίσο με +0,2 έως +0,3V, καταλοίπων γουανίνης σε δυναμικό περίπου ίσο με +0,9 με +1,1V και αδενίνης σε δυναμικό περίπου ίσο με +1,2 έως +1,3V. Η κορυφή οξείδωσης καταλοίπων της γουανίνης χρησιμοποιήθηκε ως το υπό παρακολούθηση αναλυτικό σήμα καθώς της αδενίνης δεν μπορούσε να δώσει αξιόπιστα αποτελέσματα και η παρουσία της δεν ήταν συστηματική.

Επαναλαμβανόμενες μετρήσεις διεξήχθησαν με αναγέννηση της επιφάνειας του ηλεκτροδίου με κοπή και λείανση της σε ένα ειδικό χαρτί. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνονταν πριν από κάθε μέτρηση. Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν σε θερμοκρασία δωματίου.

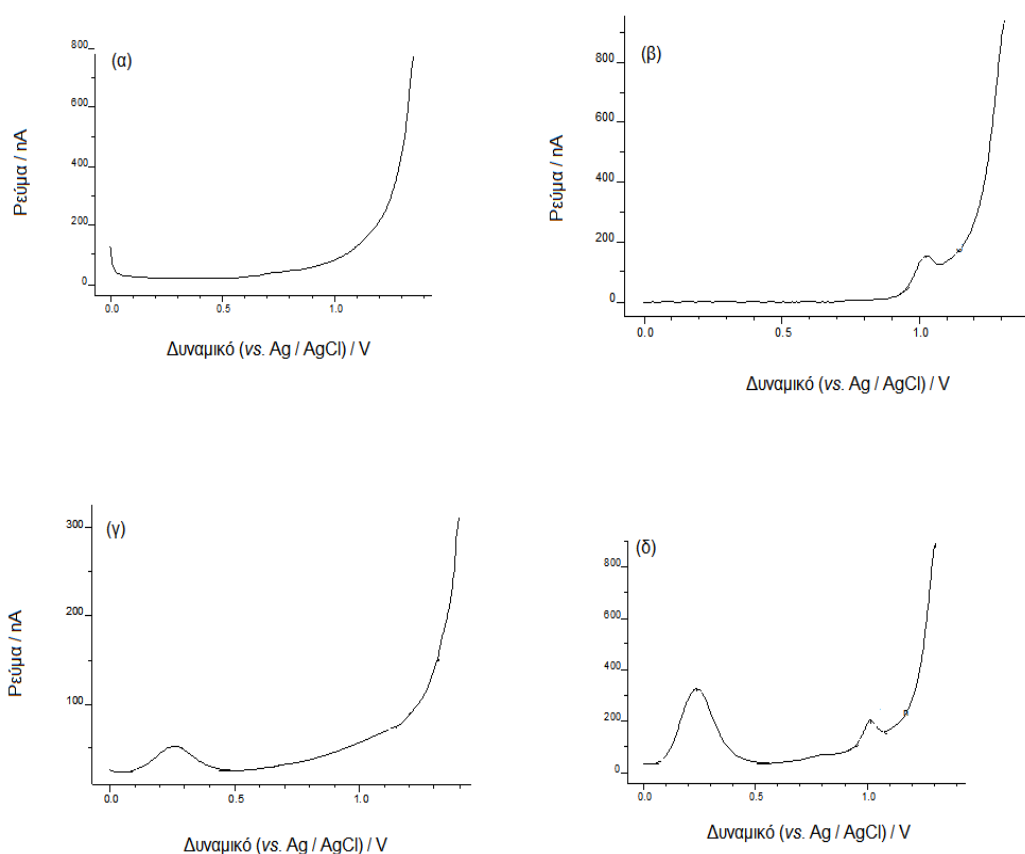
### **8.3 ΒΟΛΤΑΜΜΕΤΡΙΚΗ ΣΥΝΠΕΡΙΦΟΡΑ ΤΟΥ ΑΣΚΟΡΒΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΤΑ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΑ CPE ΚΑΙ dsDNA - CPE**

Η ηλεκτροχημική συμπεριφορά του ασκορβικού οξέος μελετήθηκε στο CPE και στο dsD-CPE, με την τεχνική σάρωσης της διαφορικής παλμικής βολταμμετρίας (DPV).

Στο Σχήμα 8.1 δίνονται χαρακτηριστικά διαφορικά βολταμμογραφήματα της οξείδωσης του CPE (καμπύλη α), του dsDNA -CPE (καμπύλη β), του ασκορβικού οξέος στο CPE (καμπύλη γ) και του ασκορβικού οξέος στο dsDNA-CPE (καμπύλη δ).

Στην καμπύλη β του σχήματος εμφανίζεται μια κορυφή οξείδωσης περίπου στα +1,056V, που οφείλεται στην οξείδωση των καταλοίπων της γουανίνης του dsDNA. Από την καμπύλη γ του Σχήματος 8.1 προκύπτει πως όταν χρησιμοποιείται το ηλεκτρόδιο CPE, το ασκορβικό οξύ προκαλεί την εμφάνιση μιας κορυφής στα +0,256V. Όταν χρησιμοποιείται το ηλεκτρόδιο dsDNA-CPE, το ασκορβικό οξύ

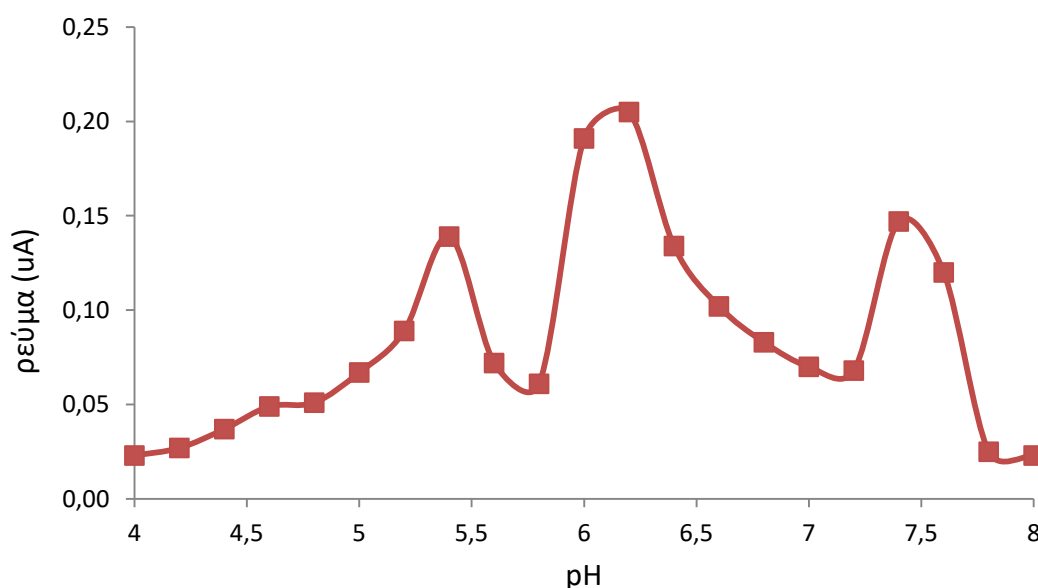
εμφανίζει μια κορυφή στα βολταμμογραφήματα, περίπου στα +0,219V (καμπύλη δ στο Σχήμα 8.1). Η κορυφή περίπου στα +1,016V στην περίπτωση του dsDNA-CPE (καμπύλη δ στο Σχήμα 8.1) οφείλεται στην οξείδωση των καταλοίπων της γουανίνης. Επιπλέον, έπειτα από επαναλαμβανόμενες μετρήσεις, παρατηρήθηκε ότι η ένταση του ρεύματος της κορυφής οξείδωσης του ασκορβικού οξέος αυξάνει, ενώ η ένταση του ρεύματος κορυφής οξείδωσης των καταλοίπων της γουανίνης του dsDNA μειώνεται, όταν το CPE μορφοποιείται με το dsDNA (σύγκριση των καμπυλών β, γ και δ). Ως συμπέρασμα, προέκυψε πως η χρήση μορφοποιημένου ηλεκτροδίου dsDNA-CPE βελτιώνει το σήμα της οξείδωσης του ασκορβικού οξέος.



**Σχήμα 8.1** Βολταμμογραφήματα οξείδωσης του CPE (καμπύλη α), του dsDNA-CPE (καμπύλη β), του ασκορβικού οξέος στο CPE (καμπύλη γ) και του ασκορβικού οξέος στο dsDNA-CPE (καμπύλη δ) (οι υπόλοιπες πειραματικές και βολταμμετρικές συνθήκες αναφέρονται στην παράγραφο της πειραματικής διαδικασίας).

#### 8.4 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ pH ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΔΙΑΛΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΣΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΟΥ ΑΣΚΟΡΒΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΤΟ dsDNA-CPE

Η οξύτητα των διαλυμάτων αποτελεί μια παράμετρο που παίζει σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση του ασκορβικού οξέος με το dsDNA. Για την εύρεση του κατάλληλου pH στο διάλυμα διαλυτοποίησης της βιταμίνης, χρησιμοποιήθηκαν ρυθμιστικά διαλύματα με τιμές pH από 4,0 μέχρι 8,0. Στο διάγραμμα που ακολουθεί (Σχήμα 8.2) δίνεται η μεταβολή του σήματος (ρεύμα) στην οξείδωση του ασκορβικού οξέος στις διάφορες τιμές pH στο μορφοποιημένο με dsDNA ηλεκτρόδιο πάστας άνθρακα (CPE). Όπως φαίνεται από το διάγραμμα, μέγιστο σήμα οξείδωσης καταγράφεται στην τιμή pH 6,2. Για τη συνέχεια των πειραμάτων και τη βελτιστοποίηση των υπολοίπων παραμέτρων, το pH του διαλύματος διαλυτοποίησης του ασκορβικού οξέος ρυθμιζόταν στην τιμή 6,2.

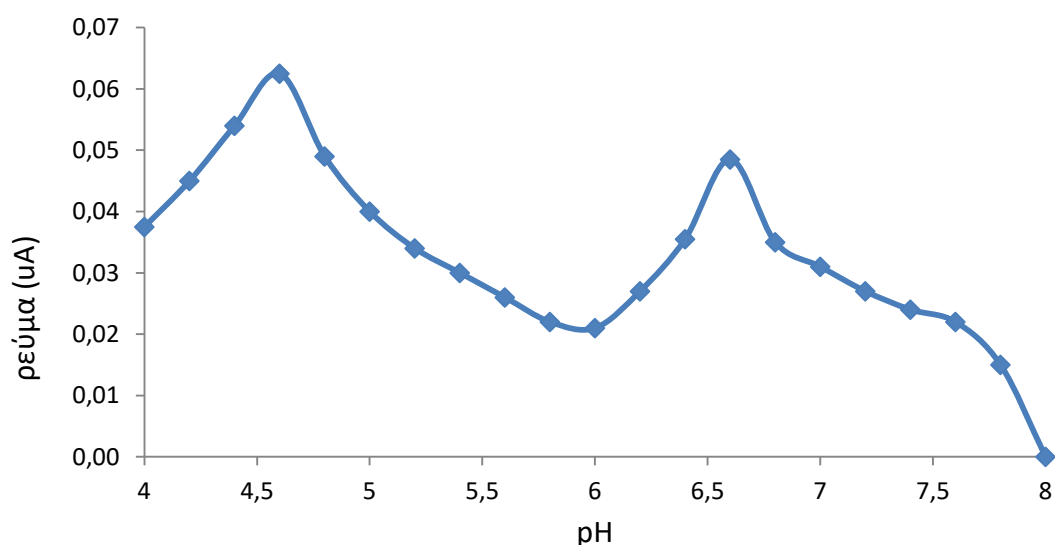


**Σχήμα 8.2** Μεταβολή του ρεύματος κορυφής του ασκορβικού οξέος μετά την αλληλεπίδρασή του με το dsDNA-CPE σε συνάρτηση με τη μεταβολή του pH στο διάλυμα διαλυτοποίησης του ασκορβικού οξέος.

Στο Σχήμα 8.3 δίνεται το διάγραμμα της μεταβολής του σήματος οξείδωσης του ασκορβικού οξέος σε σχέση με το pH στο διάλυμα μέτρησης του ασκορβικού οξέος. Για τη μελέτη της παραμέτρου αυτής χρησιμοποιήθηκαν ρυθμιστικά διαλύματα με τιμές pH από 4,0 έως 8,0. Μέγιστο σήμα οξείδωσης του ασκορβικού οξέος



λαμβάνεται στην τιμή pH 4,6, για το λόγο αυτό επιλέχθηκε το pH του διαλύματος μέτρησης της να είναι 4,6.



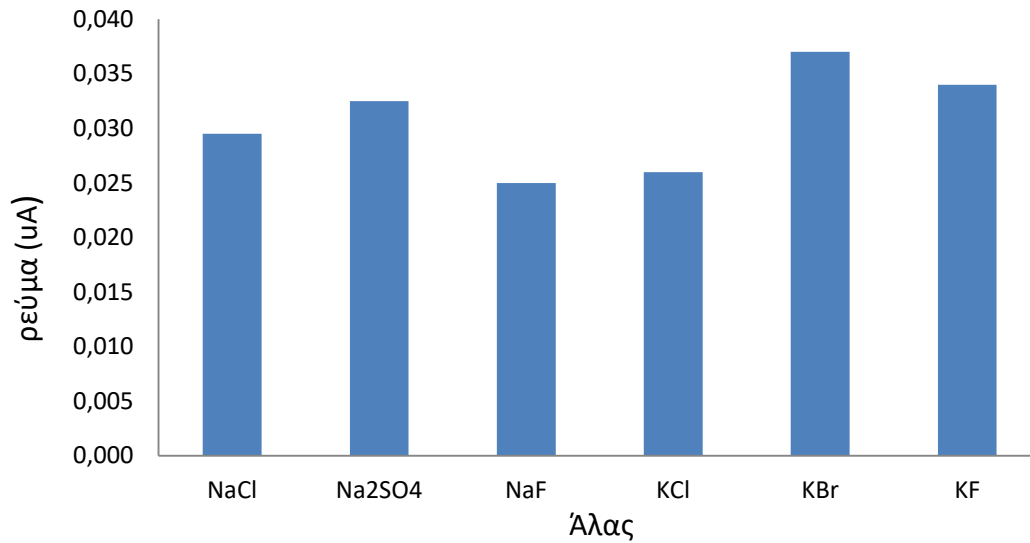
**Σχήμα 8.3** Μεταβολή του ρεύματος κορυφής του ασκορβικού οξέος μετά την αλληλεπίδρασή του με το dsDNA-CPE, σε συνάρτηση με τη μεταβολή του pH στο διάλυμα μέτρησης του ασκορβικού οξέος.

### 8.5 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΛΑΤΩΝ ΣΤΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΔΙΑΛΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΣΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΟΥ ΑΣΚΟΡΒΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΤΟ dsDNA-CPE

Η διάλυση κάποιου άλατος στα διαλύματα μέτρησης και διαλυτοποίησης του ασκορβικού οξέος μπορεί να συμβάλλει σημαντικά στην ενίσχυση του σήματος. Για το λόγο αυτό δοκιμάστηκαν διάφορα άλατα ώστε να διαπιστευτεί αν έχουν κάποια θετική ή αρνητική επίδραση στο σήμα που μας ενδιαφέρει. Τα άλατα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματά μας ήταν τα NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaF, KCl, KBr και KF σε συγκέντρωση 0,1M.

Στο Σχήμα 8.4 δίνεται η επίδραση του καθενός από αυτά κατά την παρουσία τους στο διάλυμα διαλυτοποίησης του ασκορβικού οξέος.

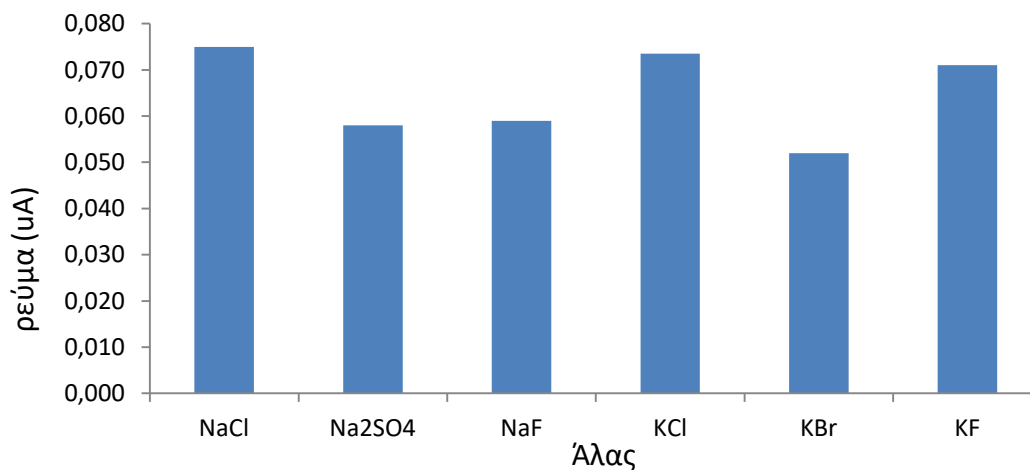
Όπως φαίνεται στο διάγραμμα, η παρουσία άλατος δεν επηρεάζει σημαντικά το σήμα οξειδωσης του ασκορβικού οξέος. Για το λόγο αυτό, επιλέχθηκε να μην προστίθεται κάποιο άλας στο διάλυμα διαλυτοποίησης του οξέος.



**Σχήμα 8.4** Επίδραση διαφόρων αλάτων στο διάλυμα διαλυτοποίησης του ασκορβικού οξέος μετά την αλληλεπίδρασή του με το dsDNA-CPE.

Τα ίδια άλατα μελετήθηκαν και στο διάλυμα μέτρησης. Παρακάτω φαίνεται η επίδραση του καθενός από αυτά (Σχήμα 8.5).

Επίσης, και σε αυτή την περίπτωση, η παρουσία άλατος δεν επηρεάζει σημαντικά το σήμα οξειδωσης του ασκορβικού οξέος. Για το λόγο αυτό, επιλέχθηκε να μην προστίθεται κάποιο άλας στο διάλυμα διαλυτοποίησης του οξέος.

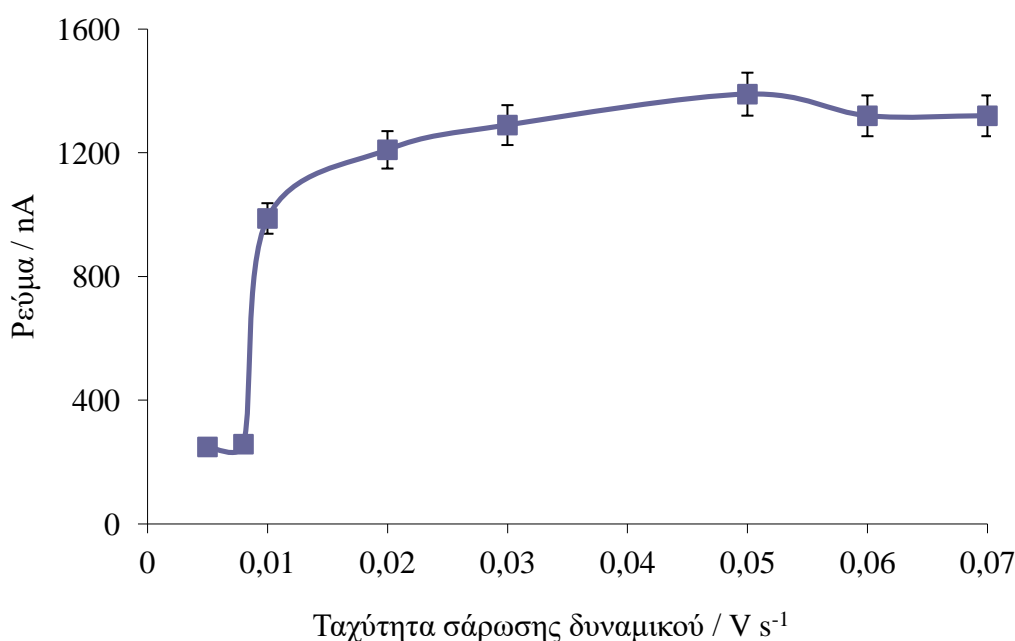


**Σχήμα 8.5** Επίδραση διαφόρων αλάτων στο διάλυμα μέτρησης του ασκορβικού οξέος μετά την αλληλεπίδρασή του με το dsDNA-CPE.

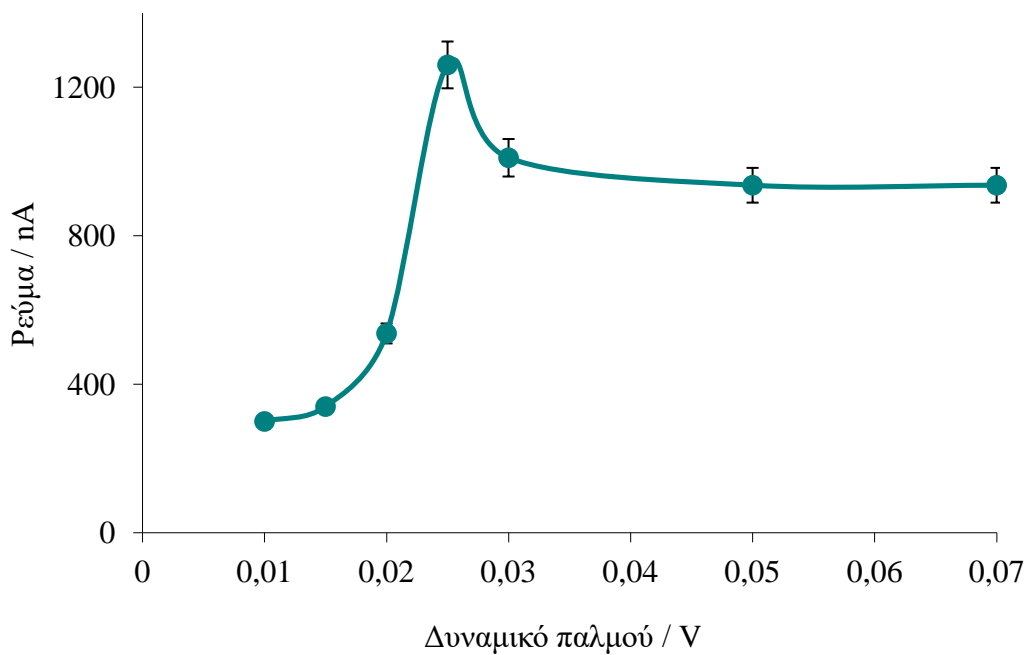
## 8.6 ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΤΟΥ ΟΡΓΑΝΟΥ ΣΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΟΥ ΑΣΚΟΡΒΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΤΟ dsDNA-CPE

Ένας ακόμη σημαντικός αλλά και αναγκαίος παράγοντας ήταν η βελτιστοποίηση των παραμέτρων του οργάνου. Οι παράμετροι αυτοί ήταν η ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού, το δυναμικό του παλμού και το βήμα του δυναμικού. Για την βελτιστοποίηση των παραμέτρων, πραγματοποιήθηκαν επαναλαμβανόμενες μετρήσεις του σήματος οξείδωσης ασκορβικού οξέος με μορφοποιημένο ηλετρόδιο dsDNA-CPE. Τα διαλύματα διαλυτοποίησης και μέτρησης του ασκορβικού, ήταν τα ιδανικά που είχαν επιλεγθεί και αναφέρθηκαν στις προηγούμενες παραγράφους.

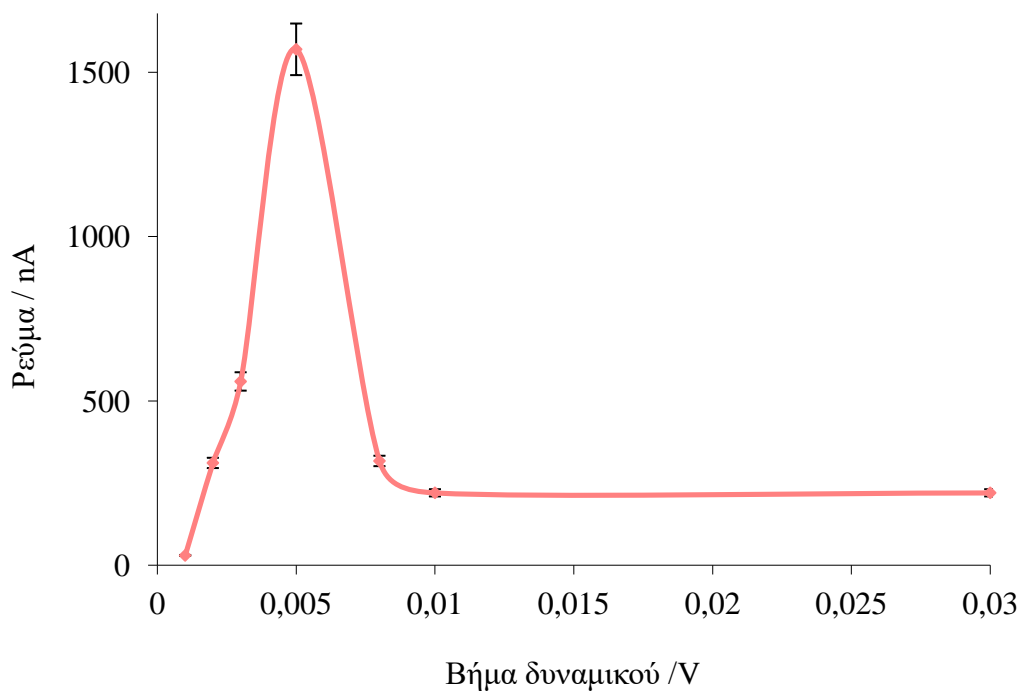
Στη συνέχεια (Σχήματα 8.6-8.8) δίνεται η μεταβολή του σήματος στις διάφορες τιμές των παραμέτρων αυτών.



**Σχήμα 8.6.** Μεταβολή του ρεύματος οξείδωσης του ασκορβικού οξέος στο dsDNA-CPE σε συνάρτηση με την ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού της βολταμμετρίας διαφορικού παλμού.



**Σχήμα 8.7** Μεταβολή του ρεύματος οξείδωσης του ασκορβικού οξέος στο *dsDNA-CPE* σε συνάρτηση με το δυναμικό του παλμού της βολταμμετρίας διαφορικού παλμού.



**Σχήμα 8.8** Μεταβολή του ρεύματος οξείδωσης του ασκορβικού οξέος στο *dsDNA-CPE* σε συνάρτηση με το βήμα δυναμικού της βολταμμετρίας διαφορικού παλμού.

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω διαγράμματα, μέγιστο σήμα λήφθηκε σε τιμές βήματος δυναμικού, δυναμικό παλμού και ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού 0,005V, 0,025V και 0,050V s<sup>-1</sup> αντίστοιχα. Αυτές ήταν που επιλέχθηκαν για τη συνέχεια των πειραμάτων.

## **8.7. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΠΡΟΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΟΥ ΑΣΚΟΡΒΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΤΟ dsDNA-CPE**

Η ακινητοποίηση του ασκορβικού οξέος στην επιφάνεια του μορφοποιημένου με dsDNA ηλεκτροδίου διαδραματίζει ένα καθοριστικό ρόλο στην συνολική απόδοση του ηλεκτροχημικού προσδιορισμού. Η ακινητοποίηση του, μπορεί να πραγματοποιηθεί με την προσροφήση του από ένα αναδεδυόμενο διάλυμα διαλυτοποιησής του. Οι συνθήκες που επηρεάζουν την παραπάνω διαδικασία (δυναμικό και χρόνος προσρόφησης), μελετήθηκαν χρησιμοποιώντας την πιο ευαίσθητη τεχνική της βολταμμετρίας του διαφορικού παλμού .

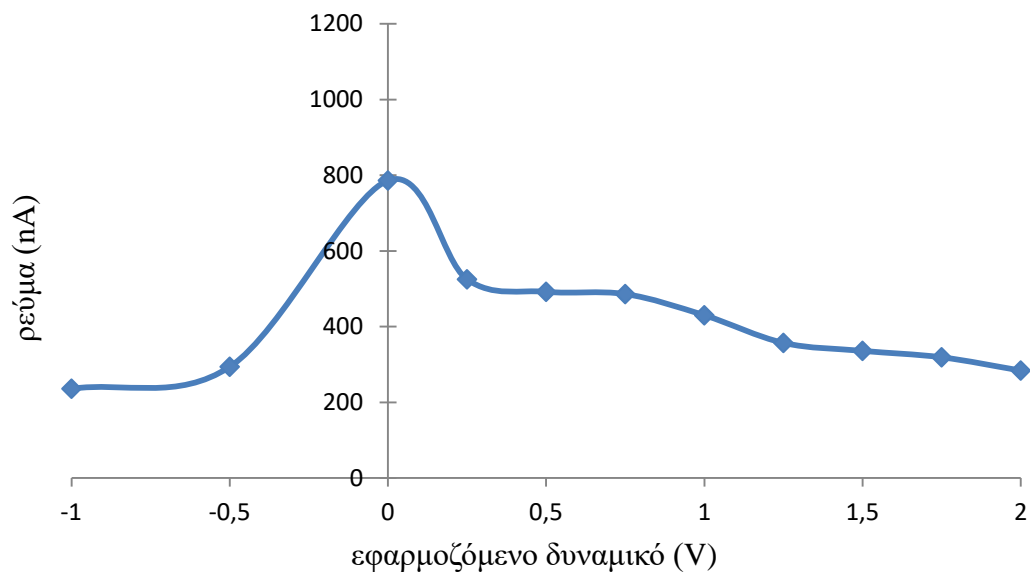
### **8.7.1 Επίδραση του δυναμικού προσυγκέντρωσης**

Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για την βελτιστοποίηση του δυναμικού προσυγκέντρωσης του ασκορβικού οξέος στο μορφοποιημένο ηλεκτρόδιο dsDNA-CPE, έγιναν με εφαρμογή διαφόρων τιμών δυναμικού στο εύρος -1,0V έως +2,0V.

Για κάθε τιμή δυναμικού πραγματοποιήθηκαν 3 σειρές μετρήσεων, από τις οποίες πάρθηκαν οι μέσοι όροι και τοποθετήθηκαν σε συγκεντρωτικό διάγραμμα (Σχήμα 8.9).

Παρατηρήθηκε, πώς σε σειρές μετρήσεων, η εφαρμογή δυναμικού στο στάδιο προσυγκέντρωσης της βιταμίνης, ελαττώνει την ένταση του ρεύματος κατά την προσρόφηση του ασκορβικού οξέος στο μορφοποιημένο ηλεκτρόδιο σε αντίθεση με την μη εφαρμογή δυναμικού (0V), που έδινε σταθερά μια καλή κορυφή.

Επομένως, αποφασίστηκε να μην εφαρμόζεται δυναμικό στο στάδιο προσυγκέντρωσης της βιταμίνης.

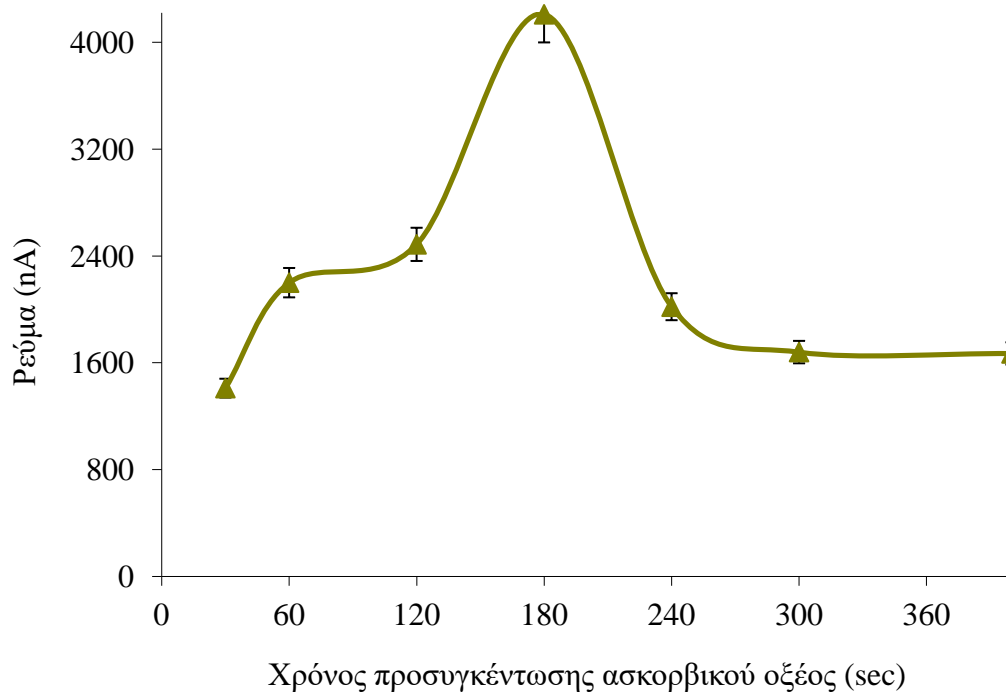


**Σχήμα 8.9** Επίδραση του δυναμικού προσυγκέντρωσης του ασκορβικού οξέος στο dsDNA-CPE.

### 8.7.2 Επίδραση του χρόνου προσυγκέντρωσης

Ο χρόνος προσυγκέντρωσης αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζουν την ευαισθησία της μεθόδου. Καθορίζει το βαθμό αύξησης του σήματος ενώ ταυτόχρονα επηρεάζει και τη συχνότητα ανάλυσης, λαμβάνοντας υπόψη ότι το στάδιο της προσυγκέντρωσης είναι το πιο χρονοβόρο στάδιο της ανάλυσης.

Η μελέτη της επίδρασης του χρόνου προσυγκέντρωσης του ασκορβικού οξέος στο μορφοποιημένο ηλεκτρόδιο, dsDNA-CPE, έγινε σε εύρος τιμών από 30sec έως 400sec.



**Σχήμα 8.10** Επίδραση του χρόνου προσυγκέντρωσης του ασκορβικού οξέος στο *dsDNA-CPE*.

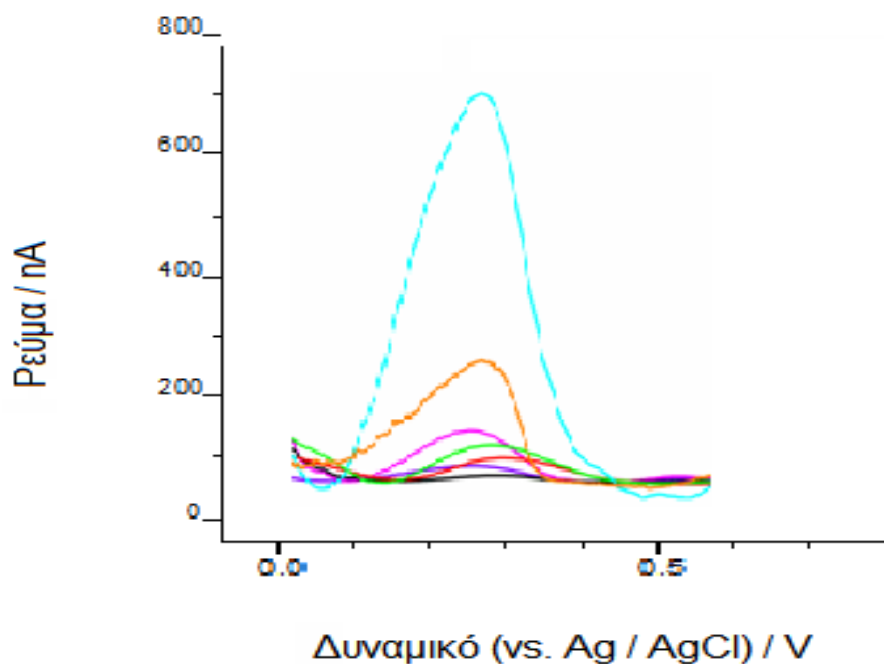
Από το παραπάνω διάγραμμα, παρατηρείται ότι με την αύξηση του χρόνου προσυγκέντρωσης, η ένταση του ρεύματος οξειδωσης αυξάνεται ως ένα σημείο, μειώνεται στη συνέχεια και τελικά υπάρχει μια σχετική σταθεροποίησή του.

Συμπεραίνεται λοιπόν ότι η μέθοδος εφαρμόζεται καλύτερα στους χρόνους μεταξύ 120sec και 240sec, όπου το σήμα είναι υψηλότερο.

Για το λόγο αυτό, ως χρόνος προσυγκέντρωσης επιλέχθηκε η τιμή των 180sec, όπου το σήμα παίρνει τη μέγιστη τιμή του.

## 8.8. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΕΠΙΔΟΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Τα DPVs μετά την αλληλεπίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων μάζας του ασκορβικού οξέος στο dsDNA-CPE καταγράφηκαν και παρουσιάζονται στο παρακάτω σχήμα.



**Σχήμα 8.11** *Ανοδικά βολταμμογραφήματα διαφορικού παλμού του Ασκορβικού Οξέος διαφορετικών συγκεντρώσεων μάζας στις επιλεγμένες συνθήκες, μετά από αλληλεπίδρασή του με dsDNA-CPE (έγρος συγκεντρώσεων μάζας ασκορβικού οξέος: 0,0100-6,000 g L<sup>-1</sup> και οι υπόλοιπες πειραματικές και βολταμμετρικές συνθήκες αναφέρονται στην παράγραφο της πειραματικής διαδικασίας).*

Για τη χάραξη της καμπύλης διακρίβωσης και τη μελέτη των χαρακτηριστικών απόδοσης της προτεινόμενης μεθόδου, για τον προσδιορισμό του ασκορβικού οξέος, χρησιμοποιήθηκαν οι επιλεχθείσες τιμές των παραμέτρων, οι οποίες δίνονται στον πίνακα που ακολουθεί.



**Πίνακας 8.1** Βέλτιστες τιμές των παραμέτρων της μεθόδου

Παράμετρος	Βέλτιστη τιμή
ρΗ διαλύματος διαλυτοποίησης ασκορβικού οξέος	6,2
ρΗ διαλύματος μέτρησης της συγκέντρωσης ασκορβικού οξέος	4,6
Άλας διαλύματος διαλυτοποίησης	-
Άλας διαλύματος μέτρησης	-
Βήμα δυναμικού	0,005 V
Δυναμικό παλμού	0,025 V
Ταχύτητα σάρωσης δυναμικού	0,050 V
Χρόνος προσυγκέντρωσης	180 s

Παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα με κατάλληλη αραιώση πρότυπου διαλύματος 0.05mg/L ασκορβικού οξέος και αναλύθηκαν με την προτεινόμενη μέθοδο.

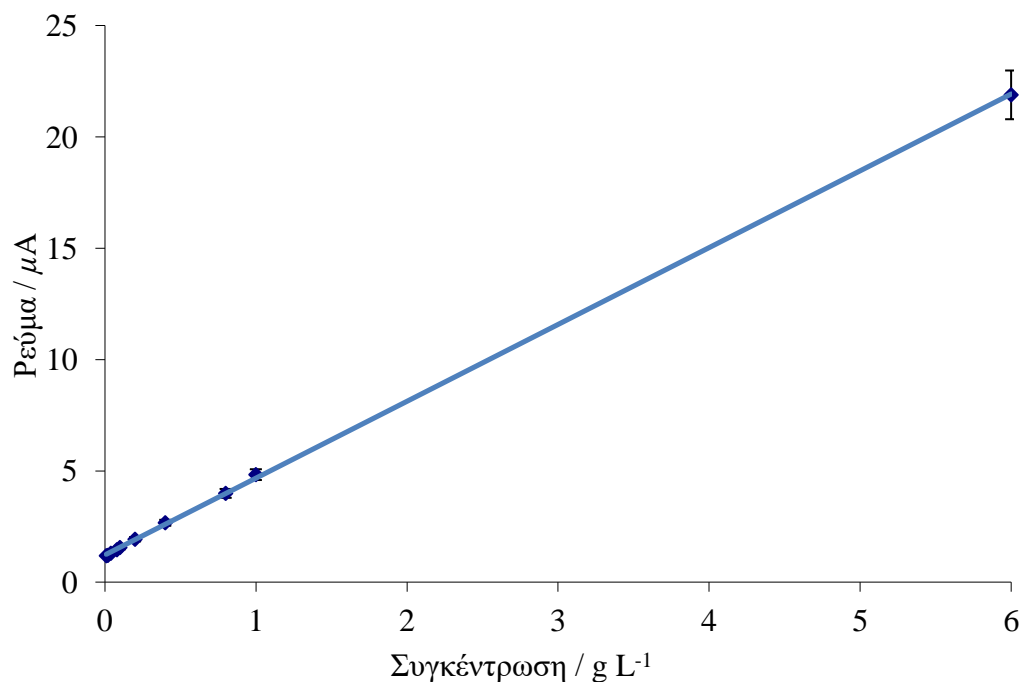
Για το μελετώμενο σύστημα χαράχθηκε η καμπύλη διακρίβωσης η οποία παρουσιάζεται στο Σχήμα 8.12. Για κάθε πρότυπο διάλυμα ασκορβικού οξέος λαμβάνονταν πέντε μετρήσεις απορρόφησης και υπολογίζονταν ο μέσος όρος.

Στη συνέχεια υπολογίστηκε η εξίσωση παλινδρόμησης και ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης R, για χρόνο προσυγκέντρωσης 180sec.

$$A = 0.290 (\pm 0,001) \gamma_{\text{οξ}} + 0.353 (\pm 0,009)$$

$$R = 0,9998$$

όπου A: η μετρούμενη τιμή του ρεύματος αναγωγής του ασκορβικού οξέος και  $\gamma_{\text{οξ}}$ : η συγκέντρωση μάζας του ασκορβικού οξέος σε  $\text{g L}^{-1}$ .



**Σχήμα 8.12** Πρότυπη καμπύλη διακρίβωσης προσδιορισμού του ασκορβικού οξέος με την προτεινόμενη μέθοδο με χρόνο προσυγκέντρωσης 180 s.

Στον Πίνακα 8.2 που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αναλυτικά χαρακτηριστικά της προτεινόμενης μεθόδου για τον προσδιορισμό του ασκορβικού οξέος.

**Πίνακας 8.2** Αναλυτικά χαρακτηριστικά της προτεινόμενης μεθόδου για τον προσδιορισμό του ασκορβικού οξέος

<b>Χρόνος προσυγκέντρωσης, (s)</b>	<b>180 s</b>
<b>Γραμμική περιοχή, (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>0,0100 – 6,000</b>
<b>Εξίσωση παλινδρόμησης, (γ<sub>οξ</sub>, μg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>A = 0. 290 (± 0,001) γ<sub>οξ</sub> + 0.353 (± 0,009)</b>
<b>Συντελεστής γραμμικής συσχέτισης, R</b>	<b>0,9998</b>
<b>Όριο ανίχνευσης, LOD, (μg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>0,099</b>
<b>Σχετική τυπική απόκλιση, s<sub>r</sub> (%)</b>	<b>3,8-4,2*</b>
<b>Όριο ποσοτικού προσδιορισμού, LOQ, (μg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>0,301</b>

\*Σχετική τυπική απόκλιση στα 0,8 και 4 μg L<sup>-1</sup>.

Ως όριο ανίχνευσης, LOD, ορίζεται η ελάχιστη συγκέντρωση του προσδιοριζόμενου συστατικού σε διάλυμα η οποία μπορεί να ανιχνευθεί. Το όριο ποσοτικού προσδιορισμού, LOQ είναι η μικρότερη συγκέντρωση (ή ποσότητα ουσίας) που μπορεί να αναφερθεί ποσοτικά με ικανοποιητικό βαθμό εμπιστοσύνης.

Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού ( $c_L$  και  $c_Q$ , αντίστοιχα) υπολογίστηκαν, ώστε να ισούνται με  $3,3 \times s_b / a$  και  $10 \times s_b / a$  αντίστοιχα, όπου  $s_b$  αντιστοιχεί στην τυπική απόκλιση της τεταγμένης επί της αρχής των αξόνων και  $a$  η κλίση του γραμμικού τμήματος της καμπύλης βαθμονόμησης. [124]

Η επαναληψιμότητα της μεθόδου, εκφρασμένη ως σχετική απόκλιση,  $s_r$ , προτύπου διαλύματος ασκορβικού οξέος, μετρήθηκε σε δυο επίπεδα συγκεντρώσεων μάζας του ασκορβικού οξέος, τα 0,8 και 4 g L<sup>-1</sup> και υπολογίστηκε ως  $s_r = 3,8 \%$  και ως  $s_r = 4,2 \%$ , αντίστοιχα, τιμές που υποδηλώνουν την καλή αναπαραγωγιμότητα του προτεινόμενου προσδιορισμού.

### III. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία κατασκευάστηκε ένα μορφοποιημένο ηλεκτρόδιο dsDNA-πάστας άνθρακα, για την ηλεκτροχημική ανίχνευση ασκορβικού οξέος.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η χρήση του DNA βιοαισθητήρα, βελτίωσε σημαντικά τα χαρακτηριστικά του μορφοποιημένου ηλεκτροδίου κατά την αλληλεπίδραση με την βιταμίνη και υπήρξε μια ενίσχυση της προσρόφησης του ασκορβικού οξέος στην επιφάνεια του. Αυτό, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του σήματος οξειδωσης της βιταμίνης.

Το μορφοποιημένο ηλεκτρόδιο παράγαγε σήματα διαφορετικού παλμού ανάλογα με τη συγκέντρωση μάζας της βιταμίνης C, στο εύρος τιμών 0,0100 – 6,000 g L<sup>-1</sup>.

Η οργανολογία της μεθόδου, αλλά και ο σύντομος χρόνος αλληλεπίδρασης του ασκορβικού οξέος με το dsDNA, όπως αποδείχθηκε, επιτρέπουν μια απλή, γρήγορη και σχετικά οικονομική μεθοδολογία για τον ηλεκτροχημικό προσδιορισμό του ασκορβικού οξέος.

Το όριο ανίχνευσης αλλά και το όριο ποσοτικοποίησης ήταν χαμηλά, ενώ η ευρεία γραμμική περιοχή στις τιμές συγκέντρωσης του ασκορβικού, δείχνει την υψηλή ευαισθησία αλλά και επαναληψιμότητα της μεθόδου.

Τέλος, με βάση τα παραπάνω συμπεράσματα, η μέθοδος που αναπτύχθηκε στην παρούσα εργασία για τον προσδιορισμό ασκορβικού οξέος, μπορεί να εφαρμοστεί με επιτυχία σε πραγματικά δείγματα.

#### IV. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Καραστογιάννη Σ., Σύνθεση, χαρακτηρισμός και αναλυτικές εφαρμογές στην ανάπτυξη ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων του συμπλόκου [Mn(thiophenyl-2-carboxylic acid)<sub>2</sub> (triethanolamine)], Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, 2016.
2. Σέρπη Κ., Ανάπτυξη Ηλεκτροχημικών DNA βιοαισθητήρων με τη χρήση νανοϋλικών και εφαρμογές τους στη βιοανάλυση, Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, 2013.
3. Ι.Α. Μουμτζής, Δ. Π. Σαζού, στο Ηλεκτροχημεία, Ζήτη (εκδ.), Θεσσαλονίκη, 1997.
4. K. Brainina, E. Neyman, στο Electroanalytical Stripping Methods, John Wiley (εκδ.), New York, 1993.
5. R. M. Wightman, L. J. May, A. C. Michael, Anal. Chem. 60 (1998) 769 A.
6. J. Wang, στο Electroanalytical Chemistry, A. J. Bard (εκδ.), Vol 16, Marcel Dekker, New York, 1989, σελ 1.
7. A. J. Bard, L. R. Faulkner, στο Electrochemical Methods Fundamentals and Applications Fundamentals and Applications, John Wiley & Sons, Inc (εκδ.), New York, 2001.
8. L. R. Faulkner, Chem. Educ 60 (1983) 262.
9. J. T. Maloy, J. Chem. Educ. 60 (1983) 285.
10. Κ. Η. Ευσταθίου. Θ. Π. Χατζηϊωάννου, στο Ενόργανες Τεχνικές Αναλύσεως, Εκδόσεις Μαυρομάτη, Αθήνα, 1992.
11. Ioannou A., Alexiadou D., Kouidou S., Girousi S., Voulgaropoulos A., Electroanalysis, 21 (2009) 2685.
12. J. D. Watson, F. H. C. Crick, Nature 171 (1953) 737.
13. J. McMurry, στο Οργανική Χημεία, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 2000.
14. R. Thomas, The denaturation of DNA, Gene 135 (1993) 77.
15. Ι.Γ.Γεωργιάτσου, Εισαγωγή στη Βιοχημεία, Εκδόσεις Γιαχούδη, Θεσσαλονίκη, 2015.
16. Heath J. C., Nature, 158 (1946) 23.
17. Smith D. L., Elving P. J. J., Am. Chem. Soc., 84 (1962) 1412.

18. Smith D. L., Elving P. J., *J. Am. Chem. Soc.*, 84 (1962) 2741.
19. Palecek E., Janik B., *Arch. Biochem. Biophys.* 98(1962) 527.
20. Cummings T. E., Jensen M. A., Elving P., *J. Bioelectrochem. Bioenerg.* 4 (1977) 425.
21. Janik B., Elving P. J., *Chem. Rev.*, 689 (1968) 295.
22. Palecek E., Jelen F., Trnkova L. *Gen. Physiol. Biophys.*, 5 (1986) 315.
23. Cummings T. E., Elving P. J. J., *Electroanal. Chem.*, 94 (1978) 123.
24. Cummings T. E., Elving P. J., *J. Electroanal. Chem., Interfacial Electrochem.* (1979) 237.
25. Zaroni M.V. B., Rogers E. I., Hardacre C., Compton R. G., *Anal. Chim. Acta*, 010) 115.
26. Dryhurst G., Pace G. F., *J. Electrochem. Soc.*, 117 (1970) 1259.
27. Stempkowska I., Liga M., Jasnowska J., Langer J., Filipiak M., *Bioelectrochem.* 70 (2007) 488.
28. Girousi S., Serpi C., Karastogianni S., Ioannou A., *Curr.Org. Chem.*,14 (2010) 2300.
29. Zhou M., Zhai Y. M., Dong S., *J. Anal. Chem.*, 81 (2009) 5603.
30. Kato D., Sekioka N., Ueda A., Kurita R., Hirono S., Suzuki K., Niwa O., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 47 (2008) 6681.
31. Yang T., Zhang W., Du M., Jiao K., *Talanta*, 75 (2008) 987.
32. Liu H., Wang G., Chen D., Zhang W., Li C., Fang B., *Sensors and Actuators B*,128 (2008) 414.
33. Tang C., Yogeswaran U., Chen S.-M., *Anal. Chim. Acta*, 636 (2009) 19.
34. Zeng X., Li X., Liu X., Liu Y., Luo S., Kong B., Yang S., Wei W., *Biosens.Bioelect.*, 25 (2009) 896.
35. Ran X.-Q., Yuan R., Chai Y.-Q., Hong C.-L., Qian X.-Q., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 79 (2010) 421.
36. Zhang Y., Wang J. , Xu M., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75 (2010)179.
37. Skoog D.A., Holler F.J., Nieman T.A., *Principles of instrumental analysis*, Saunders College Publishing 1988.
38. Qiu Y., Fan H., Liu X., Ai S., Tang T., Han R., *Microchim. Acta*, 171 (2010)363.

39. Chen Q., Ai S., Fan H., Cai J., Ma Q., Zhu X., Yin H., *J. Solid State Electrochem.*, 14 (2010) 1681.
40. Wang X., Jiao K., *Analytica Chimica Acta*, 664 (2010) 34.
41. Wang J., Li S., Zhang Y., *Electrochim. Acta*, 55 (2010) 4436.
42. Gutiérrez A., Gutiérrez S., García G., Galicia L., Rivas G. A., *Electroanalysis*, 23 (2011) 1221.
43. Zeng G., Li Z., Tang L., Wu M., Lei X., Liu Y., Liu B., Pang Y., Zhang Y., *Electrochim. Acta*, 56 (2011) 4775.
44. Bian C.-L., Zeng Q.-X., Yang L.-J., Xiong H.-Y., Zhang X.-H., Wang S.-F., *Sensors and Actuators B*, 156 (2011) 615.
45. Yang K., Zhang C.-Y., *Biosens. Bioelectr.* 28 (2011) 257.
46. Girousi S., Karastogianni S., Serpi C., *Sens. Electroanal.* 6 (2011) 65.
47. Ye Y., Ju, H., *Biosens. Bioelectr.* 21 (2005) 735.
48. Ovádek R., Jantová S., Letašiová S., Štěpánek I., Labuda J., *Anal. Bioanal. Chem.*, 386 (2006) 2055.
49. Ziyatdinova G., Galandova J., Labuda J., *Int. J. Electrochem. Sci.*, 3 (2008) 223.
50. Karadeniz H., Erdem A., Caliskan A., *Electroanalysis*, 20 (2008) 1932.
51. Galandova J., Trnkova L., Mikelova R., Labuda J., *Electroanalysis*, 21 (2009) 563.
52. Galandova J., Ovádek R., Ferancová A., Labuda J., *Anal. Bioanal. Chem.*, 394 (2009) 855.
53. Wang Z., Xiao S., Chen Y., *J. Electroanal. Chem.*, 589 (2006) 237.
54. Tang H., Chen J., Cui J., Nie L., Kuang Y., Yao S., *J. Electroanal. Chem.*, 587 (2006) 269.
55. Caliskan A., Erdem A., Karadeniz H., *Electroanalysis*, 21 (2009) 2116.
56. Karadeniz H., Caliskan A., Uguz C., *Anal. Scienc.* 26 (2010) 1065.
57. Goyal R. N., Bishnoi S., *Biosens. Bioelect.* 26 (2010) 463.
58. Goyal R.N., Chatterjee S., Rana A.R.S., *Electroanalysis*, 23 (2010) 1383.
59. Yapasan E., Caliskan A., Karadeniz H., Erdem A., *Mater. Scienc. Engin. B*, 169(2010) 169.
60. Canavar E., Kuralay F., Erdem A., *Electroanalysis*, 23 (2011) 2343.

61. Δούκας Α., Σύνθεση και μελέτη ιοντικών υγρών ως διαλύτες σε οργανικές αντιδράσεις και έλεγχος της βιοαποικοδομησιμότητάς του ζ, Διπλωματική Εργασία, Αθήνα , 2012.
62. Μαρούλης Α. Ι. Χατζηαντωνίου Κ., Τσιτσιριδάκη Α.,Εναλλακτικοί διαλύτες, Ιοντικοί διαλύτες, ΑΠΘ, Τμήμα Χημείας Θεσσαλονίκη.
63. Νταής Σ., Μελέτη του εκγλωβισμού ιοντικών υγρών σε ζεόλιθους: Φυσικοχημικός και ηλεκτροχημικός χαρακτηρισμός , Μεταπτυχιακή Διατριβή, Πάτρα, 2011.
64. Renner R., Environ. Sci. Technol., 35 (2001) 410A.
65. Yang Q., Dionysiou D. D., J. Photochem. Photobiol. A: Chem., 165 (2004) 229.
66. Malekii N., Safavi A., Tajabadi F., Anal. Chem., 78 (2006) 3820.
67. Heidz, F.,Van Mau, N., Biochim. Biophys. Acta, 1597 (2002) 1.
68. Kato D., Sekioka N., Ueda A., Kurita R., Hirono S., Suzuki K., Niwa O., J. Am.Chem. Soc., 130 (2008) 3716.
69. Zhang, Y., Zheng J.B., Electrochim. Acta, 52 (2007) 7210.
70. Zhang Y.-M., Duan C.-Q., Gao Z.-N., J. Serb. Chem. Soc., 78 (2013) 281.
71. Ji H., Zhu L., Liang D., Liu Y., Cai L., Zhang S., Liu S., Electrochim. Acta, 54(2009) 7429.
72. Zhang Y., Zheng J., Talanta, 77 (2008) 325.
73. Wang S. F., Xiong H.Y., Zeng Q.X., Electrochem. Commun. 9 (2007) 807.
74. Sun W., Li Y., Yang M., Li J., Jiao K., Sensors and Actuators B, 133 (2008) 387.
75. Afsharmanesh E., Karimi-Maleh H., Pahlavan A. Vahedi J. J., Molec. Liqu., (2013) 8.
76. Bijad M., Karimi-Maleh H., Khalilzadeh M. A., Food Anal. Methods: DOI 10.1007/s12161-013-9585-9.
77. Palecek E., Jelen F., Trnkova L. Gen. Physiol. Biophys., 5 (1986) 315.
78. Young Ly S., Sun Chob N., J. Clinic. Virol., 44 (2009) 43.
79. Sun W., Wang X., Zhu H., Sun X., Shi F., Li G., Sun Z., Sensors and Actuators B, 178 (2013) 443.
80. Fojta M., Havran L., Horáková P., Pivonková H., Sens. Electroanalysis, 6 (2011) 64



81. Mel'nikov S.M., Sergeev V.G., Yoshikawa K.. J. Am.Chem.Soc., 117 (1995) 9951.
82. Jelen F., Tomschik M., Palecek E., J. Electroanal. Chem., 423 (1997) 141.
83. Malekia N., Safavi A., Farjami E., Tajabadi F., Anal. Chim. Acta, 611 (2008)
84. Sun W., L Y.Z., Duan Y.Y., Jiao K., Biosens. Bioelectron. 24 (2008) 994.
85. Sun W., Li Y.Z., Yang M.X., Liu S.F., Jiao K., Electrochem. Commun. 10 (2008) 298.
86. Sun W., Duan Y., Li Y., Gao H., Jiao K., Talanta 78 (2009) 695.
87. Sun W., Li Y., Duan Y., Jiao K., Electrochim. Acta, 54 (2009) 4105.
88. Sun W., Xi M., Zhang L., Zhan T., Gao H., Jiao K. J., Electroanal. Chem., 56 (2010) 222.
89. Zhu Z., Sun Z., Wang Y., Zeng Y., Sun W., Huang X. J., Electr. Chem., 650 (2010) 31.
90. Guo Y., Hu S., Qi X., Xiang J., Sun W., Acta Chim. Slov., 59 (2012) 129.
91. Gao H., Xi M., Qi X., Lu M., Zhan T., Sun W. J., Electroanal. Chem., 664 (2012) 88.
92. Zhang X., Jiao K., Wang X., Electroanalysis, 20 (2008) 1361.
93. Zhang W., Zheng X., Jiao K., Sensors and Actuators B, 162 (2012) 396.
94. Ξιάρχος Ι., Συμβουλος στο χαρακτηρισμό των μεμβρανών: Εκτίμηση της υδροφοβητότητας με χρησιμοποίηση διαλθμάτων επιφανειακά ενεργών ουσιών, Διδακτορική Διατριβή, Αθήνα, 2006.
95. Κόνιαρη Α., Μελέτη προσρόφησης και σχηματισμού υμενίων, τασιενεργών, ουσιών ή/ και μιγμάτων τους στη διεπιφάνεια υδραργύρου/ ηλεκτρολυτικού διαλύματος, Διδακτορική Διατριβή , Θεσσαλονίκη, 2012.
96. Atta F. N., Galal A., Ahmed R.A., J. Electrochem. Soc., 4 (2011) 158.
97. Atta F. N., Galal A., Abu-Attia F.M., Azab S. M., Electrochim. Acta, 56 (2011) 2510.
98. Duan X., Ma F., Yuan Z., Chang L., Jin X., J. Electroanal. Chem., 677 (2012).
99. Goyal R. N., Bishnoi S., Coll. Surf. B: Biointerf. 77 (2010) 200.
100. Nicholson R.S., Shain, I., Anal. Chem., 37 (1965) 178.
101. Karthikeyan N., Giridhar V.V., Vasudevan D., J. Solid State Electrochem., 14 (2010) 877.
102. Luo L.-Q., Li Q.-X., Ding Y.-P., Zhang Y., Shen X., J. Solid State Electrochem., 14 (2010) 1311.

103. Safavi A., Maleki N., Moradlou O., Sorouri M., *Electrochem. Commun.* 10 (2008) 420.
104. Gong M., Han T., Cai C., Lu T., Du J., *J. Electroanal. Chem.* 623 (2008) 8.
105. Bolander FF, "Vitamins: not just for enzymes", *Cur. Opin. Invenstig. Drugs* 7 (10): 912-5, 2006
106. Lachapelle, M.Y., Dronin, G., Inactivation dates of the human and guinea pig vitamin C genes, *Genetica* 139 (2): 199-207, 2010.
107. Bradley S Buckler MD, Anjali Parish MD, *Scurvy, E.Medicine.*
108. Θ.Βαλαβανίδη, Κ.Ευσταθίου, Η χημική ένωση του μήνα, [www.chem.noa.gr/chemicals/chem\\_ascorbicacid.htm](http://www.chem.noa.gr/chemicals/chem_ascorbicacid.htm)
109. Dr R.Walker, Erythorbic acid and its sodium salt, Department of Biochemistry, University of Surrey, England.
110. Β.Κιοσέογλου, Μ.Τσιμίδου, Γ.Μπλέκας, Βιταμίνες, Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων, Τμήμα Χημείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.
111. AM. Pisoschi; A Pop; GP Negulescu; A Pisoschi. *Molecules*, 2011, 16, 1349-1365.
112. W. Okiei; M Ogunlesi; L Azeez; V Obakachi; M Osunsanmi; G Nkenchor. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 2009, 4,276 – 287.
113. J. Wawrzyniak, A Ryniecki, W.Zembrzuski. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.*, 2005, 4(2), 5-16.
114. AM Pisoschi, AF Danet, S Kalinowski. *Journal of Automated Methods and Management in Chemistry*, 2008, 5,8.
115. Md Kanafe; Shamsul Azri. *Universiti Teknologi MARA*. 2009, 1, 1-24.
116. Z. Gazdik, O. Zitka, Jitka Petrlova, VAdam, J Zehnalek, A Horna, V Reznicek, M Beklova, Rene Kizek. *Sensors*, 2008, 8(11), 7097-7112.
117. A.A. Behfar Nafiseh, Sadeghi, B. Jannat, M.R. Oveisi. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 2010, 9 (2), 123-128.
118. S. Sharifan, A. Nezamzadeh-Ejhien, Modification of carbon paste electrode with Fe(III)-clinoptilolite nano-particles for simultaneous voltammetric determination of acetaminophen and ascorbic acid, *Materials Science and Engineering: C*, 2016, 510-520.
119. H. Chiniforoshan, A.A. Ensafi, E. Heydari-Bafrooei, S.B. Khalesi, L. Tabrizi, Polymeric nanoparticle of copper(II)-4,4'-dicyanamidobiphenyl

- ligand: Synthetic, spectral and structural aspect, application to electrochemical sensing of dopamine and ascorbic acid, *Applied Surface Science*, 2015, 315-320.
120. M. Taei, F. Hasanpour, N. Tavakkoli, M. Bahrameian, Electrochemical characterization of poly(fuchsine acid) modified glassy carbon electrode and its application for simultaneous determination of ascorbic acid, epinephrine and uric acid, *Journal of Molecular Liquids*, 2015, 353-362.
121. Vlasta Cunja, Maja Miculic-Petkovsek, Anka Zupan, Franci Stampar, Valentina Schmitzer, Frost decreases content of sugars, ascorbic acid, and some quercetin glycosides but stimulates selected carotenes in *Rosa canina* hips, *Journal of Plant Physiology*, 2015, 55-63.
122. Yugandhar Parepalli, T. Ravi Sankar, P. T. S. R. K. Prasada Rao, Manju Shree Nair, Sudhakar Reddy Pamanji and Murthy Chavali, Sensing Ascorbic Acid with DNA/Prussian Blue Carbon Paste Electrode, *Eur. Chem. Bull.*, 2014, 3(12), 1136-1141.
123. R.S Rimal Isaac; U. Manjusree Nair; P.K Praseetha, An electrochemical DNA-Prussian blue-carbon paste biosensor for the detection of ascorbic acid in pharmaceuticals, *International Conference on Control, Instrumentation, Communication and Computational Technologies (ICCICCT)*, 2014.
124. M.-N. Collorab-Dunand-Sauthier, A. Deronzier, *J. Electroanal. Chem.* 391 (1995) 211.