



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

## ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΝΑΝΟΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ



ΣΠΥΡΟΣ ΚΙΝΤΖΙΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ  
ΔΡ. ΓΕΩΡΓΙΑ ΜΟΣΧΟΠΟΥΛΟΥ, ΕΡΕΥΝΗΤΡΙΑ  
ΔΡ. ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ ΦΛΑΜΠΟΥΡΗ, ΕΡΕΥΝΗΤΡΙΑ  
ΘΕΟΦΥΛΑΚΤΟΣ ΑΠΟΣΤΟΛΟΥ, ΥΠ. ΔΙΔΑΚΤΩΡ

ΑΘΗΝΑ 2016

## Πρόλογος

Το παρόν εγχειρίδιο εργαστηριακών ασκήσεων αποτελεί συνοδευτικό εκπαιδευτικό υλικό του μαθήματος «Νανοβιοτεχνολογία και Βιοαισθητήρες» το οποίο διδάσκεται στο 5<sup>ο</sup> εξάμηνο του Τμήματος Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Αποτελεί πραγματική πρόκληση η επιλογή ορισμένων μόνο θεματικών μεθόδων και εφαρμογών από την κυριολεκτικά τεράστια ποικιλία την οποία προσφέρει η επιστήμη της Νανοβιοτεχνολογίας για να αποτελέσουν αντικείμενα των ασκήσεων οι οποίες παρουσιάζονται διεξοδικά στο τεύχος αυτό. Βασικό κριτήριο για την επιλογή του περιεχομένου των ασκήσεων αποτέλεσε η αντιπροσωπευτικότητα των σκοπών των ασκήσεων ως προς την πρακτική εφαρμογή τους. Με βάση, λοιπόν, αυτό το κριτήριο, οι ασκήσεις εστιάσθηκαν στο θεματικό κλάδο των Βιοαισθητήρων με παραδειγματικές εφαρμογές στην ανάλυση και τη διάγνωση, αντικείμενα με άμεσο ενδιαφέρον για τη Βιοτεχνολογία αλλά και συναφείς κλάδους, όπως η Επιστήμη Τροφίμων.

Η πρώτη άσκηση αποτελεί μία εισαγωγή στις έννοιες της Χημικής Οργανολογίας, της δομής δηλαδή των οργάνων που χρησιμοποιούνται στη χημική ανάλυση. Ιδιαίτερα εξετάζεται η δομή και λειτουργία των ηλεκτροχημικών αισθητήρων και των τελεστικών ενισχυτών, δηλαδή των ηλεκτρονικών εκείνων διατάξεων οι οποίες επιτρέπουν τη διεξαγωγή ηλεκτροχημικών πειραμάτων που αποτελούν τα αντικείμενα των επόμενων ασκήσεων.

Η δεύτερη άσκηση αφορά την επεξήγηση της αμπερομετρικής μέτρησης γλυκόζης με βάση εμπορικά διαθέσιμο μετρητή σακχάρου αίματος, ένα κατεξοχήν αντιπροσωπευτικό παράδειγμα πρακτικής εφαρμογής των ενζυμικών βιοαισθητήρων.

Στην τρίτη άσκηση αναλύεται η εφαρμογή της ποτενσιομετρίας για τη μέτρηση του δυναμικού των κυτταρικών μεμβρανών με τη χρήση ενός ολοκληρωμένου βιοαισθητήρα βασισμένου στην αρχή της Βιοηλεκτρικής Μεθόδου Αναγνώρισης.

Η τέταρτη άσκηση συμπληρώνει την ομάδα των ηλεκτροχημικών μεθόδων με μία εισαγωγή στην κυκλική βολταμετρία (παραλλαγή της αμπερομετρίας) και την εφαρμογή της στον προσδιορισμό της ντοπαμίνης, ενός από τους σημαντικότερους νευρομεταβιβαστές του εγκεφάλου.

Τέλος, η πέμπτη άσκηση καθοδηγεί τον αναγνώστη στην παρασκευή νανοσωματιδίων χρυσού, κατεξοχήν εκπροσώπων των νανοϋλικών. Τα νανοσωματίδια αυτά χρησιμοποιούνται σε πληθώρα εφαρμογών, όπως διάγνωση και θεραπεία του καρκίνου, εξακρίβωση της νοθείας στα τρόφιμα, κ.ά.

Ελπίζουμε ότι το ανά χείρας εγχειρίδιο θα διευκολύνει την πρακτική γνωριμία και την εκμάθηση με βασικές τεχνικές του γοητευτικού, όσο και πρωτοποριακού επιστημονικού κλάδου της Νανοβιοτεχνολογίας και των Βιοαισθητήρων.

Οι συγγραφείς

# ΑΣΚΗΣΗ 1

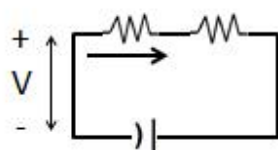
## ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΧΗΜΙΚΗ ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ – ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΑΣΗΣ - Η ΕΝΝΟΙΑ ΤΟΥ ΤΕΛΕΣΤΙΚΟΥ ΕΝΙΣΧΥΤΗ –ΠΟΤΕΝΣΙΟΜΕΤΡΙΑ - ΠΟΤΕΝΣΙΟΣΤΑΤΗΣ

### 1.1 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ


- Η εξοικείωση με τους θεμελιώδεις κανόνες επιλογής οργάνου μέτρησης τάσης.
- Η εξοικείωση με την έννοια και το κύκλωμα του τελεστικού ενισχυτή και τις διαφορετικές εκδοχές του.
- Η κατανόηση της λειτουργίας ενός ποτενσιοστάτη και της εφαρμογής του στην αμπερομετρία και τη βολταμετρία.

### 1.2 ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ

Θεμελιωδώς, κάθε χημική ή βιοχημική αντίδραση συνοδεύεται από ανταλλαγή ηλεκτρικών φορτίων, καθώς εμπεριέχει μία ή περισσότερες αντιδράσεις οξειδοαναγωγής. Κατά συνέπεια, κάθε αντίδραση χαρακτηρίζεται από μία ηλεκτρεγερτική δύναμη (ΗΕΔ), η οποία μπορεί να μετρηθεί με κατάλληλο ηλεκτρικό κύκλωμα, προσφέροντας έτσι τη δυνατότητα μέτρησης αυτής της αντίδρασης. Ένα τυπικό ηλεκτρικό κύκλωμα αποτελείται από έναν αγωγό, κατασκευασμένο από υλικό αγωγίμο στη διέλευση ηλεκτρικών φορτίων (π.χ. χαλκό ή άργυρο), δηλαδή στο *ρεύμα*. Τυπικά στοιχεία ενός ηλεκτρικού κυκλώματος είναι η πηγή **ηλεκτρικού δυναμικού (potential) (V)**, η οποία στην περίπτωση που εξετάζουμε συμπίπτει με την ΗΕΔ και η **ωμική αντίσταση (resistance (R))** του κυκλώματος (Σχήμα 1.1).



 = αντίσταση (R)

 = φορά ρεύματος

**Σχήμα 1.1:** Βασική διάταξη ηλεκτρικού κυκλώματος.

Η ωμική αντίσταση (μία ή περισσότερες) αντιπροσωπεύει μία περιοχή στο ηλεκτρικό κύκλωμα όπου η διέλευση του **ρεύματος (current) (I)** για διαφόρους λόγους παρεμποδίζεται, οπότε σε κάθε δεδομένη στιγμή ο αριθμός των ηλεκτρικών φορτίων που εξέρχεται από μία αντίσταση να είναι μικρότερος από τον αντίστοιχο αριθμό των εισερχόμενων φορτίων. Η λειτουργία της αντίστασης περιγράφεται από το **νόμο του Ohm**, σύμφωνα με τον οποίο:

$$V(\text{volt}) = I(\text{ampere}) \times R(\text{ohm}) \quad (1.1)$$

Από την εξίσωση είναι προφανές ότι, αυξανόμενης της αντίστασης, θα μειωθεί η τιμή της τάσης (*πτώση τάσης*, εφόσον η τιμή του ρεύματος παραμείνει σταθερή).

### 1.3 ΕΣΩΤΕΡΙΚΗ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΟΡΓΑΝΟΥ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΤΑΣΗΣ

Από τα παραπάνω συνεπάγεται ότι, για να μπορέσει να μετρήσει αξιόπιστα το μέγεθος μίας τάσης η οποία εφαρμόζεται στα άκρα του, ένα **όργανο μέτρησης τάσης** πρέπει να έχει όσο το δυνατόν μικρότερη (ιδανικά μηδενική) **εσωτερική αντίσταση**. Με άλλα λόγια, η υφιστάμενη εσωτερική αντίσταση του οργάνου μέτρησης (π.χ. λόγω καλωδίων) δεν θα πρέπει να είναι τέτοια που να αλλοιώνει την μέτρηση. Αυτό μπορεί να γίνει ακόμα καλύτερα κατανοητό από την ακόλουθη εξίσωση:

$$V = I (R_{\text{μετ}} + R_{\text{εσ}}) \quad (1.2)$$

Όπου  $R_{\text{μετ}}$  = η μετρούμενη αντίσταση του ηλεκτροχημικού κυκλώματος,  $R_{\text{εσ}}$  = η εσωτερική αντίσταση του οργάνου μέτρησης

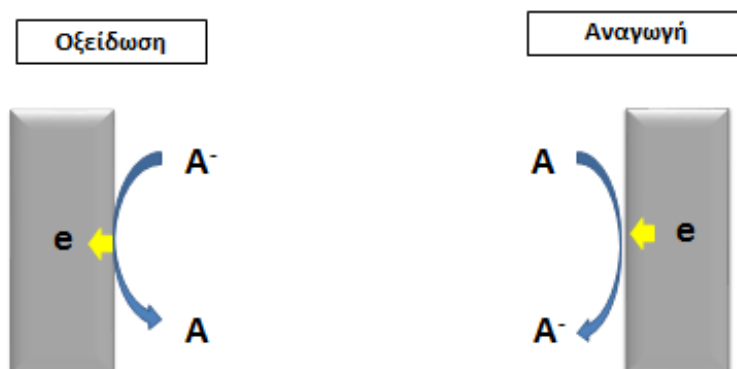
Ιδανικά, λοιπόν, θα πρέπει να ισχύει  $R_{\text{μετ}} + R_{\text{εσ}} \approx R_{\text{μετ}}$ , ή αλλιώς  $R_{\text{μετ}} \gg R_{\text{εσ}}$ .

Για το λόγο αυτό, τα περισσότερα κοινά όργανα μέτρησης τάσης έχουν εσωτερικές αντιστάσεις τάξης μεγέθους δεκάδων ή εκατοντάδων χιλιάδων Ohm (kΩ).

### 1.4 ΑΡΧΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΩΝ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ

Για την πραγματοποίηση ηλεκτροχημικών μετρήσεων είναι καταρχήν απαραίτητη η χρήση ενός ηλεκτροδίου, του **ηλεκτροδίου εργασίας (working electrode)**, το οποίο είναι κατασκευασμένο από αγώγιμο υλικό, όπως μέταλλο (π.χ. άργυρος, χρυσός, λευκόχρυσος), άνθρακα ή ακόμα και πολυμερές ειδικού τύπου, όπως το θειωμένο τετραφθοροαιθυλένιο, γνωστό και ως Nafion. Το υλικό αυτό δεν πρέπει να αντιδρά χημικά με τα συστατικά του διαλύματος. Στο ηλεκτρόδιο αναπτύσσεται δυναμικό το οποίο οφείλεται στην αλληλεπίδραση του ηλεκτροδίου εργασίας με τα συστατικά του διαλύματος και συγκεκριμένα στη μεταφορά ηλεκτρονίων προς το ηλεκτρόδιο (*οξειδωση*) ( $A^- - e \rightarrow A$ ) ή, αντίθετα, την προσφορά ηλεκτρονίων από το ηλεκτρόδιο προς τα συστατικά του διαλύματος (*αναγωγή*) ( $A + e \rightarrow A^-$ ). Με άλλα λόγια, το ηλεκτρόδιο γίνεται ο τόπος είτε οξειδωσης (ανοδικό ηλεκτρόδιο) ή αναγωγής (καθοδικό ηλεκτρόδιο) των συστατικών του διαλύματος μέτρησης, με ροή ηλεκτρονίων προς ή από το ηλεκτρόδιο, αντίστοιχα (Σχήμα

1.2). Το ρεύμα που οφείλεται στη ροή αυτών των ηλεκτροδίων ονομάζεται **φαρανταϊκό (faradaic current)**.



**Σχήμα 1.2:** Ροή ηλεκτρονίων προς/από το ηλεκτρόδιο κατά την οξείδωση/αναγωγή ουσιών σε αυτό.

Το δυναμικό υπολογίζεται με βάση την εξίσωση του Nernst:

$$E = E^{\circ} - \frac{2.3026RT}{nF} \times \log A \quad (1.3)$$

όπου

$E$  = το δυναμικό του ηλεκτροδίου στη συγκεκριμένη συγκέντρωση ηλεκτρολυτών (συστατικών του διαλύματος)

$E^{\circ}$  = το τυπικό δυναμικό του ηλεκτροδίου σε σχέση με το ηλεκτρόδιο αναφοράς

$R$  = η σταθερά αερίων ( $8.314\ 472(15)\ \text{J K}^{-1}\ \text{mol}^{-1}$ )

$T$  = η απόλυτη θερμοκρασία (K)

$n$  = ο αριθμός των ηλεκτρονίων που μεταφέρονται ανά αντίδραση (π.χ. ένα στην υποδειγματική αντίδραση ( $A^{-} - e \rightarrow A$ ))

$F$  = η σταθερά του Faraday ( $96485,3329\ \text{coulomb mol}^{-1}$ )

$A$  = η ιοντική ενεργότητα, η οποία στις συνηθισμένες χαμηλές συγκεντρώσεις πρακτικά ισούται με τη συγκέντρωση του συστατικού που οξειδώνεται ή ανάγεται.

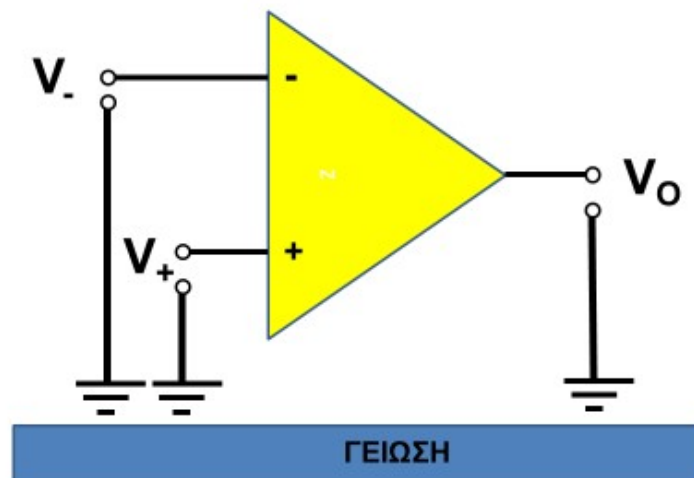
Για μετρήσεις στους  $25^{\circ}\text{C}$  η εξίσωση απλοποιείται ως εξής:

$$E = E^{\circ} - \frac{0.059}{nF} \times \log A \quad (1.4)$$

Κάθε ηλεκτρόδιο στο οποίο παρατηρείται μεταφορά ηλεκτρονίων σε ένα διάλυμα ονομάζεται **ημιστοιχείο (half-cell)** και το δυναμικό του δεν είναι δυνατόν να εκτιμηθεί κατά απόλυτο τρόπο. Για τον λόγο αυτό, το δυναμικό του ηλεκτροδίου εργασίας συγκρίνεται πάντα ως προς το δυναμικό ενός δεύτερου ηλεκτροδίου, του **αντισταθμιστικού ηλεκτροδίου (counter electrode)** όταν χρησιμοποιούνται δύο ηλεκτρόδια, ή του **ηλεκτροδίου αναφοράς (reference electrode)** όταν χρησιμοποιείται σύστημα τριών ηλεκτροδίων (όπως θα εξηγηθεί στην ενότητα 1.7).

## 1.5 Ο ΤΕΛΕΣΤΙΚΟΣ ΕΝΙΣΧΥΤΗΣ

Ένας τελεστικός ενισχυτής αποτελεί στην πραγματικότητα ένα σύνθετο ηλεκτρονικό κύκλωμα, το οποίο, όπως λέει και το όνομα του, μπορεί να ενισχύσει σημαντικά και με μεγάλη σταθερότητα ηλεκτρικά σήματα που εισέρχονται σε αυτόν, έχοντας ένα μεγάλο εύρος συχνοτήτων (0 Hz – 1 MHz). Για λόγους απλοποίησης, κάθε τελεστικός ενισχυτής συμβολίζεται ως ένα τρίγωνο με δύο εισόδους (-, +) στη μία πλευρά και μία έξοδο στην απέναντι κορυφή (Σχήμα 1.3). Το απεικονιζόμενο κύκλωμα ονομάζεται διάταξη ανοικτού βρόγχου σε αντίθεση με την περίπτωση του κλειστού βρόγχου που θα αναλύσουμε στην ενότητα 1.5.



**Σχήμα 1.3:** Συμβολισμός τελεστικού ενισχυτή με απεικόνιση της εφαρμογής τάσεων στις εισόδους του.

Οι δύο εισοδοί του τελεστικού ενισχυτή έχουν διαφορετική λειτουργία και για αυτό ονομάζονται αντίστοιχα **αναστρέφουσα (-)** και **μη αναστρέφουσα (+) είσοδος**. Ουσιαστικά αυτό σημαίνει ότι, εάν στις εισόδους του τελεστικού ενισχυτή εφαρμοστούν δύο διαφορετικές **τάσεις εισόδου** (π.χ.  $V_-$  και  $V_+$  αντίστοιχα στο Σχήμα 1.2), η τάση η οποία θα εμφανιστεί στην **έξοδο (τάση εξόδου,  $V_o$ )** θα εξαρτάται από τη διαφορά των δύο τάσεων εισόδου, σύμφωνα με την ακόλουθη σχέση:

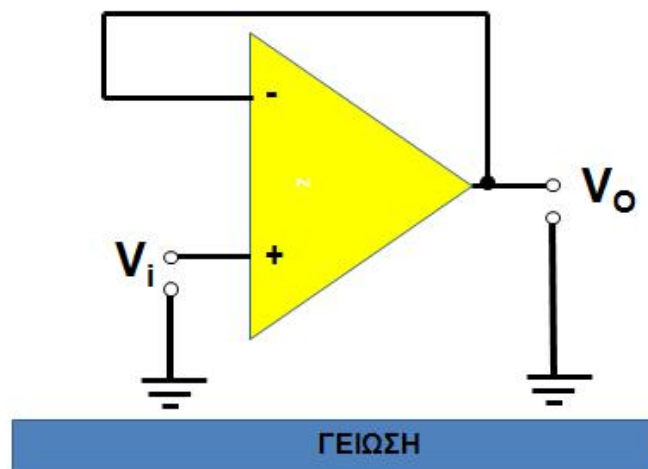
$$V_o = A (V_+ - V_-) \quad (1.5)$$

Όπου **A = συντελεστής ενίσχυσης (απολαβή)** του τελεστικού ενισχυτή, δηλαδή ο συντελεστής ο οποίος δείχνει πόσες φορές θα ενισχυθεί το σήμα το οποίο εισέρχεται στον τελεστικό ενισχυτή ως διαφορά των δύο τάσεων εισόδου. Συνήθως κυμαίνεται μεταξύ  $10^4$ - $10^6$ , με άλλα λόγια μπορεί να ενισχύσει το εισερχόμενο σήμα από δέκα χιλιάδες έως ένα εκατομμύριο φορές. Είναι λοιπόν φανερό ότι τα κυκλώματα τελεστικών ενισχυτών είναι κατάλληλα για την ανίχνευση και

παρακολούθηση εξαιρετικά ασθενών ηλεκτρικών δυναμικών, όπως αυτών που προκύπτουν από διάφορες βιοχημικές ή γενικά βιολογικές διεργασίες.

#### 1.6 Ο ΑΚΟΛΟΥΘΗΤΗΣ ΤΕΛΕΣΤΙΚΟΣ ΕΝΙΣΧΥΤΗΣ

Σε αρκετές περιπτώσεις, δεν είναι επιθυμητή η ενίσχυση του σήματος είτε επειδή επιθυμούμε την μέτρηση της επακριβούς, πραγματικής τιμής ενός φαινομένου ή επειδή, λόγω τεχνικών λόγων, η ενίσχυση του σήματος πέραν ενός ορίου (συνήθως  $\pm 15$  V) δεν είναι εφικτή, οπότε σήματα με αρχική τιμή υψηλότερη από αυτό το όριο απλά δεν θα διακρίνονται (με άλλα λόγια, η μέτρηση θα κορεσθεί). Σε αυτές λοιπόν τις περιπτώσεις χρησιμοποιούμε μία διάταξη **ακολουθητή ενισχυτή κλειστού βρόγχου** (Σχήμα 1.4).



**Σχήμα 1.4:** Διάταξη ακολουθητή τελεστικού ενισχυτή.  $V_i$ = τάση (δυναμικό) εισόδου,  $V_o$ = τάση εξόδου.

Όπως φαίνεται και στο Σχήμα, στη διάταξη του ακολουθητή ενισχυτή υφίσταται συνδεσμολογία κλειστού βρογχου μεταξύ της μίας εισόδου και της εξόδου του σήματος, με αποτέλεσμα τον πρακτικό μηδενισμό του ρεύματος που προέρχεται από την είσοδο (-). Για τον λόγο αυτό, και ως συνέπεια της εξίσωσης (1.1) η τελική τιμή του σήματος εξόδου ταυτίζεται με αυτήν του σήματος εισόδου, δηλαδή  $V_o = V_i$ .

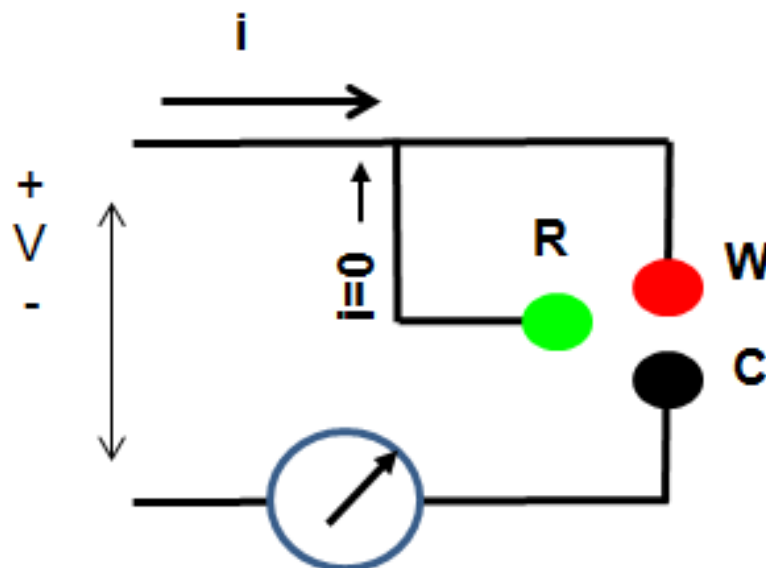
Ένα παράδειγμα εφαρμογής ακολουθητή ενισχυτή αποτελεί η μέτρηση του μεμβρανικού δυναμικού κυττάρων η οποία παρουσιάζεται διεξοδικά στην Άσκηση 3.

#### 1.7 Ο ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΤΗΣ ΤΑΣΗΣ (ΠΟΤΕΝΣΙΟΣΤΑΤΗΣ)

Σε διάφορες εφαρμογές της ηλεκτροχημικής ανάλυσης είναι απαραίτητη η σταθεροποίηση της τάσης (V) μίας μετρούμενης ηλεκτροχημικής αντίδρασης σε μία σταθερή τιμή. Με τον τρόπο αυτό, βάση της εξίσωσης (1.1), είναι εφικτή η μέτρηση μεταβολών της τιμής της έντασης του

ρεύματος ( $i$ ) ως της μεταβλητής παραμέτρου που απεικονίζει την πορεία ενός φαινομένου. Η μέθοδος αυτή ονομάζεται **αμπερομετρία** και αποτελεί την αρχή λειτουργίας των βιοαισθητήρων σακχάρου αίματος τους οποίους θα εξετάσουμε στην Άσκηση 2. Τόσο η αμπερομετρία όσο και η **βολταμετρία**, την οποία θα εξετάσουμε στη συνέχεια, αποτελούν ηλεκτροχημικές μεθόδους κατά τις οποίες εφαρμόζεται δυναμικό σε ένα ηλεκτρόδιο (το **ηλεκτρόδιο μέτρησης**) (δηλαδή δεν πρόκειται για αυθόρμητη αντίδραση) το οποίο, ανάλογα με την τιμή και το πρόσημο του προκαλεί οξείδωση (+) ή αναγωγή (-) (ονομαζόμενο, αντίστοιχα, ανοδικό ή καθοδικό) των ουσιών που πρόκειται να αναλυθούν. Με άλλα λόγια, η ηλεκτρική ενέργεια η οποία παρέχεται στο σύστημα μετατρέπεται σε χημική.

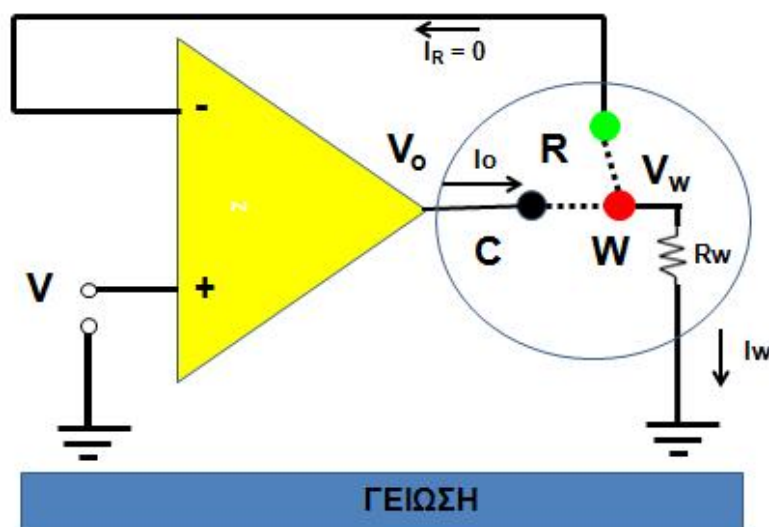
Οι αμπερομετρικές μετρήσεις πραγματοποιούνται συνήθως σε **βολταμετρικό σύστημα τριών ηλεκτροδίων**, δηλαδή τα ηλεκτρόδια **εργασίας**, **αναφοράς** και **αντισταθμισής**. Στα συστήματα αυτά, η εφαρμόζεται μία τάση (όπως ήδη προαναφέρθηκε) στο ηλεκτρόδιο εργασίας. Ωστόσο η τιμή αυτού της εφαρμοζόμενης τάσης δεν παραμένει σταθερή (όπως επιθυμούμε) αλλά μεταβάλλεται στο χρόνο λόγω της προοδευτικής μείωσης του αριθμού των ενεργών μορίων του αναλυτή: αυτό συμβαίνει, επειδή λόγω της συνεχούς οξείδωσης ή αναγωγής, μειώνεται η συγκέντρωση των μορίων που απομένουν ελεύθερα να συμμετάσχουν στις σχετικές αντιδράσεις στο ηλεκτρόδιο εργασίας. Για να διατηρηθεί σταθερή η διαφορά τάσης (δυναμικού) μεταξύ των ηλεκτροδίων εργασίας και αναφοράς χρησιμοποιείται ένα ειδικό όργανο που ονομάζεται **ποτενσιοστάτης (potentiostat)**. Ο ποτενσιοστάτης έχει μία διπλή λειτουργία: από τη μία πλευρά μετρά τη διαφορά δυναμικού μεταξύ των ηλεκτροδίων αναφοράς και εργασίας, ενώ από την άλλη αποκαθιστά διαρκώς κάθε απόκλιση (μεταβολή) του δυναμικού μέσω της εφαρμογής ενός αντισταθμιστικού δυναμικού μεταξύ του ηλεκτροδίου εργασίας και του τρίτου ηλεκτροδίου, το οποίο ονομάζεται **αντισταθμιστικό ή βοηθητικό**. στις σχετικές αντιδράσεις στο ηλεκτρόδιο εργασίας (Σχήμα 1.5).



**Σχήμα 1.5:** Διάταξη ποτενσιοστάτη με τρία ηλεκτρόδια. W = ηλεκτρόδιο εργασίας, R = ηλεκτρόδιο αναφοράς, C = βοηθητικό (αντισταθμιστικό) ηλεκτρόδιο.



Για να μπορέσει ένας ποτενσιοστάτης να διατηρήσει σταθερή τη διαφορά δυναμικού μεταξύ των ηλεκτροδίων εργασίας και αναφοράς, χρησιμοποιείται μία ειδική διάταξη τελεστικού ενισχυτή (Σχήμα 1.6). Στη διάταξη αυτή, η οποία αποτελεί τροποποιημένη μορφή ακολουθητή ενισχυτή (1.5), το δυναμικό ( $V$ ) το οποίο εφαρμόζεται στην μη αναστρέφουσα είσοδο (+) είναι το ίδιο με το δυναμικό που εμφανίζεται στην έξοδο ( $V_o$ ) και συνεπώς και στο ηλεκτρόδιο εργασίας ( $W$ ) ( $V_w$ ), δηλαδή  $V = V_o = V_w$ . Παράλληλα, το ρεύμα ( $I_o$ ) το οποίο εξέρχεται από τον τελεστικό ενισχυτή *διαιρείται*<sup>1</sup> σε δύο επιμέρους ρεύματα με αντίθετες φορές: το ρεύμα ( $I_R$ ) στο ηλεκτρόδιο αναφοράς, το οποίο μηδενίζεται λόγω άμεσης σύνδεσης με την αναστρέφουσα είσοδο (-), και το ρεύμα ( $I_w$ ) στο ηλεκτρόδιο εργασίας.



**Σχήμα 1.6:** Λειτουργία ακολουθητή τελεστικού ενισχυτή σε κύκλωμα ποτενσιοστάση με τρία ηλεκτρόδια (συγκρίνετε με Σχήμα 1.5).  $W$  = ηλεκτρόδιο εργασίας,  $R$  = ηλεκτρόδιο αναφοράς,  $C$  = βοηθητικό (αντισταθμιστικό) ηλεκτρόδιο. Οι υπόλοιποι συμβολισμοί περιγράφονται στο κείμενο. Οι διακεκομμένες γραμμές συμβολίζουν την ηλεκτρολυτική αγωγιμότητα μεταξύ των τριών ηλεκτροδίων (δηλαδή την αγωγιμότητα που οφείλεται στα ηλεκτρικά φορτισμένα μόρια του αναλυόμενου διαλύματος αντίδρασης, με άλλα λόγια του δείγματος).

Το δυναμικό στο ηλεκτρόδιο εργασίας ( $V_w$ ) παραμένει σταθερό και ανεξάρτητο από την μεταβολή της αντίστασης ( $R_w$ ) στο ηλεκτρόδιο εργασίας ( $W$ ) ως αποτέλεσμα διαφόρων οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων πάνω στο ηλεκτρόδιο. Ωστόσο, αυτό δεν ισχύει και **για την τιμή της έντασης του ρεύματος ( $I_w$ )** το οποίο διαρρέει το ηλεκτρόδιο εργασίας και το οποίο μεταβάλλεται ανάλογα με την πορεία των χημικών αντιδράσεων και σύμφωνα με την ακόλουθη σχέση:

<sup>1</sup> Βάσει του Νόμου του Ρεύματος του Kirchhoff, το ρεύμα που φθάνει σε κόμβο ενός κυκλώματος διαμοιράζεται σε επιμέρους ρεύματα.

$$I_w = V/R_w \quad (1.6)$$

Επομένως μετρώντας την ένταση του ρεύματος ( $I_w$ ) μπορούμε να παρακολουθήσουμε την πορεία των αντιδράσεων στο ηλεκτρόδιο εργασίας. Αυτή είναι η βασική αρχή της μεθόδου της αμπερομετρίας.

Στην ίδια αρχή στηρίζεται και η μέθοδος της **κυκλικής βολταμετρίας (cyclic voltametry)**, της οποίας την εφαρμογή θα δούμε στην Άσκηση 4. Στη μέθοδο αυτή, το δυναμικό το οποίο εφαρμόζεται στο ηλεκτρόδιο εργασίας εναλλάσσεται κυκλικά μεταξύ θετικών και αρνητικών τιμών, προκαλώντας με αυτό τον τρόπο περιοδική εναλλαγή φαινομένων οξειδωσης και αναγωγής των ουσιών υπό ανάλυση, η οποία εξαρτάται τόσο από τη φύση της αντίδρασης οξειδοαναγωγής όσο και της συγκέντρωσης των αναλυτών. Η τελική εκτίμηση τόσο της συγκέντρωσης όσο και των χαρακτηριστικών της αντίδρασης γίνεται με την ταυτόχρονη μέτρηση της έντασης του ρεύματος.

#### 1.8 ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ ΑΥΤΟΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ

- Να αναφέρετε τη βασική διαφορά μεταξύ ενός κλασσικού τελεστικού ενισχυτή και ενός ακολουθητή ενισχυτή. Σε ποιόν από τους δύο η τάση εξόδου μπορεί να διαφέρει από την τάση εισόδου;
- Να περιγράψετε την αρχή λειτουργίας ενός ποτενσιοστάτη.
- Σε σύστημα ποτενσιοστάτη τριών ηλεκτροδίων, πώς ονομάζεται το ηλεκτρόδιο το οποίο διατηρεί σταθερή την τιμή του δυναμικού;
- Ποια είναι η διαφορά μεταξύ αμπερομετρίας και κυκλικής βολταμετρίας;

#### 1.9 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ευσταθίου Κ. Η. (2002). Χημική Οργανολογία - Μικροϋπολογιστές. ISBN: 960-8028-16-7  
Προδρομίδης Μ (2014) Ηλεκτροχημικοί Αισθητήρες & Βιοαισθητήρες. Ευρυδίκη Π. Κωσταράκη, Αθήνα, 246 σελ., ISBN 978-960-99858-3-3.

---

## ΑΣΚΗΣΗ 2

### ΑΜΠΕΡΟΜΕΤΡΙΚΗ ΜΕΤΡΗΣΗ ΓΛΥΚΟΖΗΣ

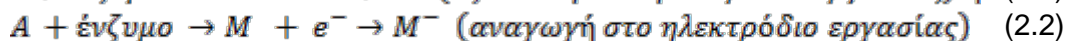
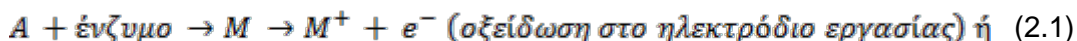
#### 2.1 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ

- Η κατανόηση της αρχής λειτουργίας του αμπερομετρικού ενζυμικού βιοαισθητήρα γλυκόζης.
- Η εξοικείωση με τον χειρισμό εμπορικής συσκευής μέτρησης σακχάρου στο αίμα.

#### 2.2 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι αμπερομετρικοί βιοαισθητήρες βασίζονται στη μέτρηση της έντασης του ρεύματος το οποίο διαρρέει το κύκλωμα μέτρησης προκειμένου να προσδιοριστεί η συγκέντρωση της ουσίας η οποία οξειδώνεται ή ανάγεται στο ηλεκτρόδιο εργασίας. Όπως προαναφέρθηκε στην Άσκηση 1 (Ενότητα 1.6), οι αμπερομετρικές μετρήσεις πραγματοποιούνται συνήθως σε βολταμετρικό σύστημα τριών ηλεκτροδίων, δηλαδή τα ηλεκτρόδια εργασίας, αναφοράς και αντιστάθμισης.

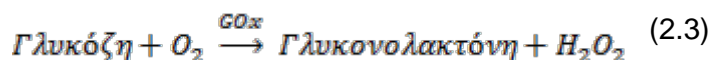
Η κυριότερη κατηγορία αμπερομετρικών βιοαισθητήρων είναι οι **ενζυμικοί αμπερομετρικοί αισθητήρες**, στους οποίους ο προσδιοριζόμενος αναλύτης (A) συμμετέχει ως υπόστρωμα και καταλύεται από μία κατά το δυνατόν εκλεκτική ενζυμική αντίδραση, η οποία παράγει ως τελικά προϊόντα μόρια (M) που μπορούν εύκολα να οξειδωθούν ή να αναχθούν στο ηλεκτρόδιο εργασίας, σύμφωνα με τις εξής αντιδράσεις:



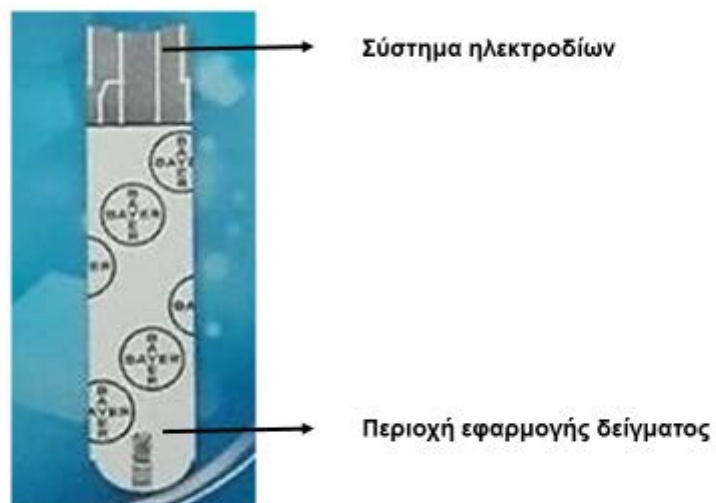
Στην παρούσα άσκηση, παρουσιάζεται η λειτουργία του βιοαισθητήρα γλυκόζης (μετρητή σακχάρου). Ο βιοαισθητήρας αυτός αποτελεί το πλέον αντιπροσωπευτικό παράδειγμα φορητής συσκευής για προσωποποιημένη διάγνωση, επιτρέποντας την εύχρηστη και αξιόπιστη μέτρηση του επιπέδου της γλυκόζης (σακχάρου) στο αίμα από τους ίδιους τους ασθενείς, προκειμένου να προσδιορισθεί ορθά η χορηγούμενη δόση της ινσουλίνης τουλάχιστον μία φορά ημερησίως.

#### 2.3 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Πάνω στο ηλεκτρόδιο εργασίας του βιοαισθητήρα γλυκόζης έχουν ακινητοποιηθεί μόρια ενός κατάλληλου ενζύμου για την παραγωγή ενός προϊόντος το οποίο μπορεί να οξειδωθεί ή να αναχθεί εύκολα στο ηλεκτρόδιο. Ένα τέτοιο ένζυμο είναι η **οξειδάση της γλυκόζης (glucose oxidase-GOx)** η οποία καταλύει τη γλυκόζη με τη μεσολάβηση  $O_2$  σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση:



Το ενζυμικά παραγόμενο  $H_2O_2$  μπορεί να μετρηθεί αμπερομετρικά σε ηλεκτρόδιο Pt ή Au (Σχήμα 2.1.).



**Σχήμα 2.1:** Αναλώσιμη ταινία μέτρησης γλυκόζης Contour® Next

## 2.4 ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

### Εξοπλισμός

- Σύστημα παρακολούθησης γλυκόζης αίματος Contour® XT (Bayer)

### Υλικά

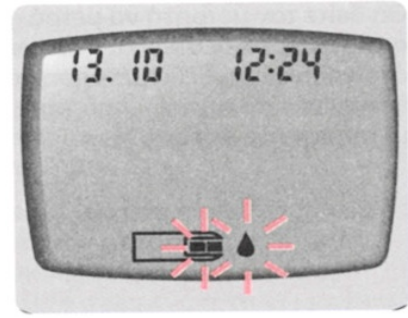
- Ταινίες μέτρησης Contour® Next (Bayer)
- Σειρά διαλυμάτων γλυκόζης

## 2.5 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. Παίρνατε μια ταινία μέτρησης και την εισάγετε στη θύρα του μετρητή, με το γκρι άκρο προς τα πάνω



2. Ο μετρητής θα ενεργοποιηθεί δείχνοντας την ένδειξη της εικόνας, ότι είναι έτοιμος για μέτρηση



3. Ανακινήστε καλά το φιαλίδιο του διαλύματος (περίπου 15 φορές) και βάλτε μια μικρή σταγόνα στο τρυβλίο
4. Ακουμπήστε αμέσως το άκρο της ταινίας μέτρησης στη σταγόνα διαλύματος



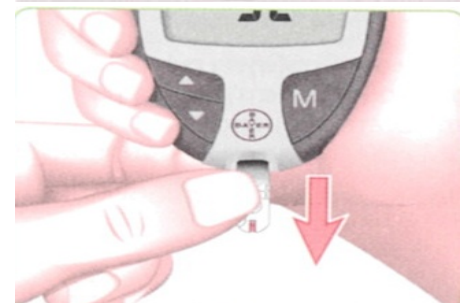
5. Κρατήστε το άκρο πάνω στη σταγόνα μέχρι να ακουστεί σύντομος χαρακτηριστικός ήχος. Θα δείτε τον μετρητή να μετρά αντίστροφα 5 sec



6. Ο μετρητής θα αναγνωρίσει αυτόματα και θα μαρκάρει ✓ το αποτέλεσμα ελέγχου



7. Για να κλείσετε το μετρητή, απλά αφαιρέστε τη ταινία μέτρησης



## 2.6 ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ ΑΥΤΟΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ

- Να συμπληρώσετε τον παρακάτω πίνακα σύμφωνα με τα αποτελέσματα των μετρήσεων της συσκευής Contour® XT

Συγκέντρωση γλυκόζης (mg/dL) διαλύματος (A)	<b>40</b>	<b>110</b>	<b>270</b>
Μετρηθείσα συγκέντρωση γλυκόζης (B)			
Παρατηρηθείσα απόκλιση (= [A- B/A]*100]			

- Ποια είναι η μέση απόκλιση μεταξύ των πραγματικών και των παρατηρηθέντων τιμών;

## 2.7 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Turner A.P.F. (2013) Biosensors: sense and sensibility. Chem. Soc. Rev. 42: 3184-3198.

## ΑΣΚΗΣΗ 3

### ΠΟΤΕΝΣΙΟΜΕΤΡΙΑ ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

#### 3.1 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ

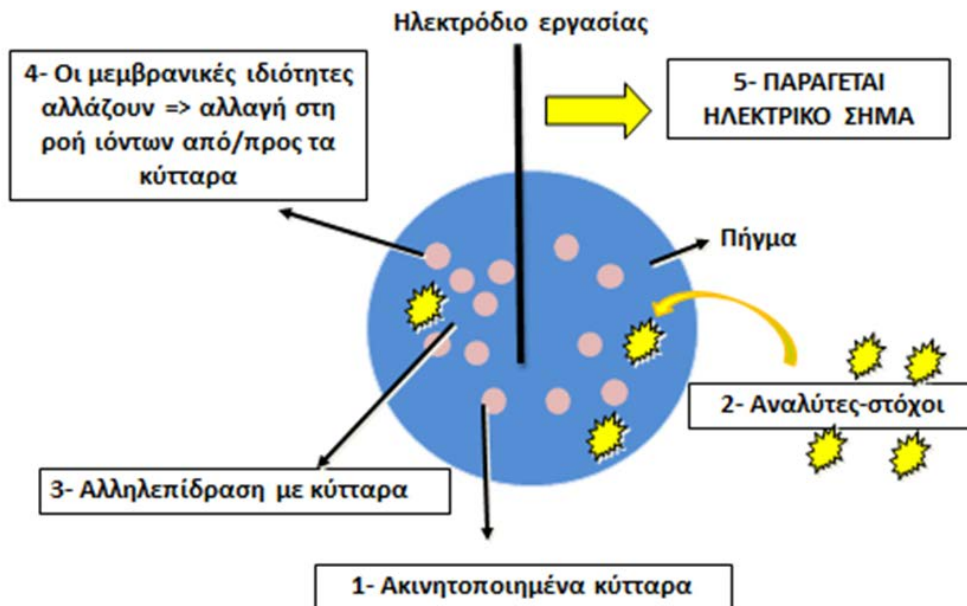
- Η εξοικείωση με μεθόδους μέτρησης δυναμικού ανοικτού κυκλώματος, όπως η Βιοηλεκτρική Μέθοδος Αναγνώρισης (Bioelectric Recognition Assay).
- Η εξοικείωση με τον χειρισμό εμπορικής συσκευής (FOODSCAN) μέτρησης βιοηλεκτρικών ιδιοτήτων.
- Η μελέτη της επίδρασης της ντοπαμίνης στο δυναμικό της μεμβράνης νευρικών κυττάρων.

#### 3.2 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ηλεκτρικά ενεργά κύτταρα ή ιστοί μπορούν να διασυνδεθούν με μικροηλεκτρόδια που επιτρέπουν τη σύλληψη εξωκυτταρικών σημάτων συσχετιζόμενων με την κυτταρική απόκριση ή την απόκριση ολόκληρου του ιστού. Συνήθως χρησιμοποιείται σύστημα δυο ζευγών ηλεκτροδίων (μέτρησης – αναφοράς) έτσι ώστε, να είναι δυνατή η μέτρηση του ρεύματος ή του δυναμικού μετά από εξωγενή εφαρμογή ρεύματος ή δυναμικού (αμπερομετρία – βολταμετρία).

#### 3.3 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΒΙΟΗΛΕΚΤΡΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗΣ

Η Μέθοδος Βιοηλεκτρικής Αναγνώρισης (Bioelectric Recognition Assay - BERA) είναι μια μέθοδος ανίχνευσης ιών και άλλων βιοενεργών ουσιών, η οποία βασίζεται στη μέτρηση μεταβολών των ηλεκτρικών ιδιοτήτων ομάδας κυττάρων κατάλληλα ακινητοποιημένων εντός πήγματος, έτσι ώστε να διατηρούνται οι φυσιολογικές κυτταρικές λειτουργίες κατά την αλληλεπίδραση με τους υπό ανίχνευση αναλύτες-στόχους (Σχήμα 3.1.). Η ευαισθησία της ανίχνευσης με BERA (0,1 ppt) και η ταχύτητα της (3 min) είναι υψηλότερη συγκριτικά με άλλες, προηγμένες χρωματογραφικές, ανοσολογικές, κυτταρολογικές και μοριακές τεχνικές.



Σχήμα 3.1: Αρχή λειτουργίας ενός βιοαισθητήρα BERA.

Η ντοπαμίνη (3,4-διϋδροξυφαινεθυλαμίνη) είναι ένας από τους κύριους νευρομεταβιβαστές, συμμετέχοντας σε διάφορες νοητικές και κινητικές λειτουργίες, όπως ο προσανατολισμός στο χώρο, ο συντονισμός εγκεφάλου-σώματος και τα κυκλώματα ανταμοιβών του εγκεφάλου. Ανάλογα με τη συγκέντρωσή της, η ντοπαμίνη μπορεί να προκαλέσει είτε (α) **αποπόλωση**, δηλαδή **μείωση** του αρνητικού μεμβρανικού δυναμικού των νευρικών κυττάρων και αύξηση του προς **θετικές** τιμές ή (β) **υπερπόλωση**, δηλαδή **αύξηση** του αρνητικού μεμβρανικού δυναμικού και αύξηση του προς **αρνητικές** τιμές. Στην πρώτη περίπτωση τα κύτταρα γίνονται περισσότερο περατά στο ηλεκτρικό ρεύμα (δηλ. μειώνεται η αντίστασή τους) και επομένως διευκολύνεται η αγωγή των νευρικών σημάτων.

### 3.4 ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

#### Εξοπλισμός:

- Συσκευή μετρήσεων FOODSCAN (βασισμένη στη μέθοδο BERA) (Σχήμα 3.2).
- Τυπωμένα ηλεκτρόδια (εργασίας: άνθρακα, αναφοράς: Ag/AgCl) (DropSens)
- Αυτόματη πιπέττα.

#### Υλικά:

- Αιώρημα κυττάρων νευροβλαστώματος ποντικού N2a.
- Διάλυμα ντοπαμίνης (100 μM)





**Σχήμα 3.2:** Το ολοκληρωμένο σύστημα κυτταρικού βιοαισθητήρα FOODSCAN.

### 3.5 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. Συνδέστε τη συσκευή στον υπολογιστή μέσω καλωδίου USB σε μια θύρα USB. Η συσκευή ενεργοποιείται αυτόματα.
2. Ανοίξτε την εντολή Foodscan από το μενού έναρξης.
3. Επιλέξτε τα κανάλια (1-8), όπου έχετε βάλει τα δείγματα σας για να μετρήσετε.
4. Ρυθμίστε το χρόνο μέτρησης (300sec) και το ρυθμό μέτρησης (2Hz).
5. Τοποθετήστε ένα μονό ή ένα πολλαπλό (οκτώ κανάλια) εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο άνθρακα στη συσκευή.
6. Τοποθετήστε 45  $\mu\text{L}$  κυττάρων ( $5 \times 10^4$ ) είτε στο μονό ή σε κάθε ένα από τα οκτώ κανάλια του εκτυπωμένου ηλεκτροδίου άνθρακα.
7. Προσθέστε 5  $\mu\text{L}$  του δείγματος πάνω στο μονό ή σε κάθε ένα από τα οκτώ κανάλια του εκτυπωμένου ηλεκτροδίου άνθρακα. Το μίγμα δείγματος-κυττάρων πρέπει να καλύπτει πλήρως κάθε ηλεκτρόδιο.
9. Κάντε κλικ στο κουμπί "Play" και στη συνέχεια επιλέξτε το φάκελο προορισμού στον οποίο θέλετε να αποθηκεύσετε τη μέτρηση και επιλέξτε "Save".
10. Μετά την επιλογή "Save", η μέτρηση ξεκινά αυτόματα.
11. Μετά από 5 λεπτά η μέτρηση σταματάει.
12. Από το μενού "Edit" επιλέξτε "Copydata".
13. Αντιγράψτε τα δεδομένα σε ένα αρχείο Excel για περαιτέρω επεξεργασία

### 3.6 ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ ΑΥΤΟΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ

Από την παρατηρηθείσα τιμή του μεμβρανικού δυναμικού, ποιο θεωρείτε ότι είναι το αποτέλεσμα της ντοπαμίνης στην κυτταρική μεμβράνη;

### 3.7 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Kintzios S., Pistola E., Panagiotopoulos P., Bomsel M., Alexandropoulos N., Bem F., Biselis I., Levin R. (2001) Bioelectric recognition assay (BERA). Biosensors and Bioelectronics, 16, 325-336.

## ΑΣΚΗΣΗ 4

### ΚΥΚΛΙΚΗ ΒΟΛΤΑΜΕΤΡΙΑ ΝΤΟΠΑΜΙΝΗΣ

#### 4.1 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ

- Η εξοικείωση με την μέθοδο της κυκλικής βολταμετρίας.
- Η εξοικείωση με τον χειρισμό ποτεσνιοστάτη.
- Η ηλεκτροχημική μελέτη της οξειδοαναγωγικής συμπεριφοράς της ντοπαμίνης και ο προσδιορισμός αυτής με κυκλική βολταμετρία.

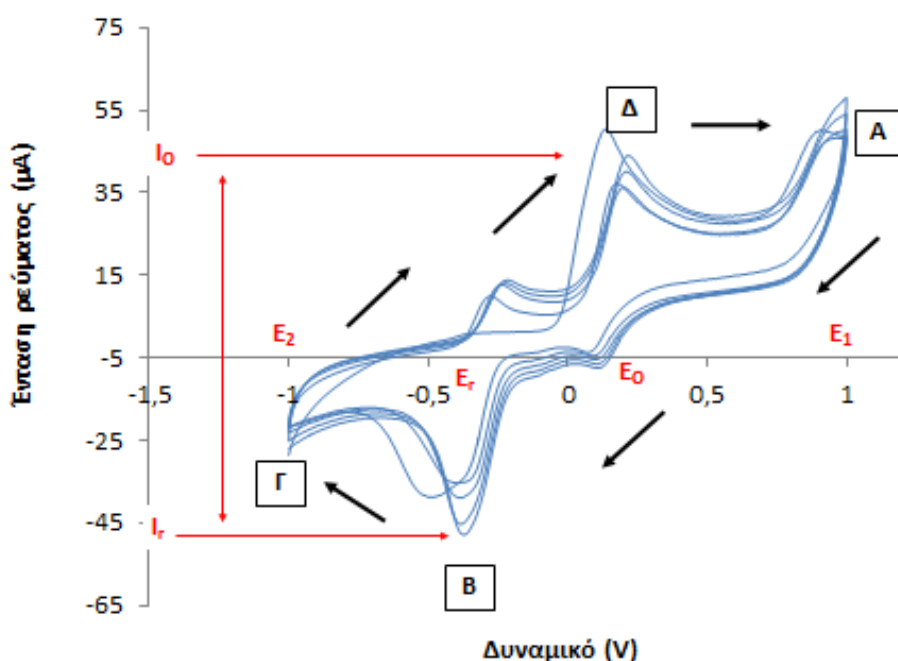
#### 4.2 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στην κυκλική βολταμετρία το δυναμικό το οποίο εφαρμόζεται στο ηλεκτρόδιο εργασίας εναλλάσσεται κυκλικά μεταξύ θετικών και αρνητικών τιμών, προκαλώντας με αυτό τον τρόπο περιοδική εναλλαγή φαινομένων οξειδωσης και αναγωγής των ουσιών υπό ανάλυση, η οποία εξαρτάται τόσο από τη φύση της αντίδρασης οξειδοαναγωγής όσο και της συγκέντρωσης των αναλυτών. Η τελική εκτίμηση τόσο της συγκέντρωσης όσο και των χαρακτηριστικών της αντίδρασης γίνεται με την ταυτόχρονη μέτρηση της έντασης του ρεύματος. Το δυναμικό μεταβάλλεται γραμμικά (δηλαδή βαθμιαία) μεταξύ μίας αριθμητικά μέγιστης ( $E_1$ ) και μίας αριθμητικά ελάχιστης τιμής ( $E_2$ ). Η διαδικασία αυτή ονομάζεται σάρωση.

#### 4.3 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Στο Σχήμα 4.1 παρουσιάζεται, ως αντιπροσωπευτικό παράδειγμα, ένα τυπικό κυκλικό βολταμμογράφημα της ντοπαμίνης, ενός από τους βασικούς νευρομεταβιβαστές και σημαντικό ρυθμιστή της λειτουργίας του εγκεφάλου. Το βολταμμογράφημα αυτό είναι χαρακτηριστικό για την περίπτωση μίας αντιστρεπτής οξειδοαναγωγικής αντίδρασης. Σε πρώτη φάση, το δυναμικό εφαρμόζεται στην μέγιστη τιμή εκκίνησης  $E_1$  (Σημείο A) η οποία είναι αλγεβρικά μεγαλύτερη από το τυπικό δυναμικό αναγωγής της ντοπαμίνης, οπότε δεν παρατηρείται καμία διαδικασία αναγωγής, ενώ το ηλεκτρόδιο εργασίας διαρρέεται από ρεύμα πολύ μικρής έντασης. Στη συνέχεια το δυναμικό μειώνεται αλγεβρικά (προς την ελάχιστη τιμή  $E_2$ ), ενώ η ένταση του μετρούμενου καθοδικού ρεύματος μειώνεται με αυξημένους ρυθμούς (μεγάλη κλίση καμπύλης μεταβολής έντασης-δυναμικού) μέχρις ότου αποκτήσει την αλγεβρικά ελάχιστη, αλλά απόλυτα μέγιστη τιμή  $I_r$  (σημείο B), η οποία αντιστοιχεί στην τιμή δυναμικού  $E_r$ . Σε όλη τη διάρκεια της μεταβολής του δυναμικού από το σημείο A στο σημείο B λαμβάνει χώρα η αναγωγή της ντοπαμίνης. Ωστόσο, στο διάστημα κατά το οποίο η τιμή του δυναμικού μεταβάλλεται από το  $E_r$  έως την ελάχιστη τιμή  $E_2$ , η ταχύτητα μεταβολής της έντασης του ρεύματος είναι μειωμένη (διαδρομή σημείων B-Γ). Αυτό συμβαίνει επειδή από το σημείο B και μετά η ταχύτητα μεταβολής του ρεύματος εξαρτάται από την ταχύτητα διάχυσης των μορίων της ντοπαμίνης από το διάλυμα προς το ηλεκτρόδιο εργασίας. Η ταχύτητα όμως της διάχυσης των μορίων της ντοπαμίνης είναι πλέον ελαττωμένη λόγω της μειωμένης συγκέντρωσης μορίων ντοπαμίνης που δεν έχουν ήδη αναχθεί. Στη συνέχεια (διαδρομή Γ-Δ) η φορά της σάρωσης αλλάζει και η τιμή του εφαρμοζόμενου δυναμικού αρχίζει να αυξάνει ξανά από την ελάχιστη τιμή  $E_2$  προς τη μέγιστη  $E_1$ . Όταν η τιμή του δυναμικού υπερβεί την τιμή του

δυναμικού οξειδωσης της ντοπαμίνης, αρχίζει η οξειδωση αυτής με απότομη αύξηση του μετρούμενου ανοδικού ρεύματος μέχρι τη μέγιστη τιμή  $I_0$  (σημείο Δ), η οποία αντιστοιχεί στην τιμή δυναμικού  $E_0$ . Περαιτέρω αύξηση της τιμής του δυναμικού μέχρι τη μέγιστη τιμή  $E_1$  (σημείο Α) συνοδεύεται από μία βραδύτερη αύξηση της έντασης του ανοδικού ρεύματος λόγω της περιορισμένης ταχύτητας διάχυσης των μη οξειδωμένων μορίων ντοπαμίνης, κατά αντιστοιχία με όσα αναφέρθηκαν στην περίπτωση του καθοδικού ρεύματος.



**Σχήμα 4.1:** Κυκλικό βολταμμογράφημα ντοπαμίνης σε συγκέντρωση 1 mM. Το ηλεκτρόδιο εργασίας είναι από άνθρακα. Οι διαφορετικοί βρόγχοι δυναμικού αντιστοιχούν στους διαφορετικούς κύκλους σάρωσης του δυναμικού μεταξύ της μέγιστης τιμής  $E_1$  και της ελάχιστης τιμής  $E_2$ . Τα μαύρα βέλη καταδεικνύουν τη φορά μεταβολής του δυναμικού που εφαρμόζεται στο ηλεκτρόδιο εργασίας.

#### 4.4 ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

##### Εξοπλισμός:

- Συσκευή ποτενσιοστάτη UNISCAN.
- Τυπωμένα ηλεκτρόδια (εργασίας: άνθρακα, αναφοράς: Ag/AgCl, αντισταθμιστικό: άνθρακα) (DropSens)
- Αυτόματη πιπέττα.

##### Υλικά:

- Διάλυμα ντοπαμίνης (100 μM)

#### 4.5 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. Συνδέστε το τροφοδοτικό στη συσκευή.
2. Συνδέστε την συσκευή στον υπολογιστή μέσω καλωδίου VGA σε μια θύρα VGA.
3. Ανοίξτε την εντολή UiEChem από το μενού έναρξης.
4. Από το παράθυρο που εμφανίζεται επιλέγετε την εντολή “CyclicVoltammetry”.
5. Εμφανίζεται το παράθυρο για την εισαγωγή των παραμέτρων του πειράματος. Για το συγκεκριμένο πείραμα εισάγετε τις εξής παραμέτρους:
  - Initial Potential (volts) : -1
  - Initial Potential Time (sec): 0
  - Sweep Potential 1 (volts): -1
  - Sweep Potential 2 (volts): 1
  - Sweep Potential 3 (volts): -1
  - Sweep Potential 4 (volts): -1
  - Sweep Rate (V/sec): 0.1
  - Volts per point: 0.005
  - Number of Cycles: 5
6. Αφού εισάγετε τις παραμέτρους κάντε κλικ στο κουμπί “OK”.
7. Τοποθετήστε ένα μονόεκτυπωμένο ηλεκτρόδιο άνθρακα στη συσκευή.
8. Τοποθετήστε 50  $\mu$ L Ντοπαμίνης στο μονόεκτυπωμένο ηλεκτρόδιο άνθρακα στη συσκευή. Το μίγμα δείγματος πρέπει να καλύπτει πλήρως το ηλεκτρόδιο.
9. Κάντε κλικ στο κουμπί “Play”, η μέτρηση ξεκινά αυτόματα.
10. Όταν τελειώσει η μέτρηση από το μενού “File” επιλέξτε “Save” και στη συνέχεια επιλέξτε το φάκελο προορισμού στον οποίο θέλετε να αποθηκεύσετε τη μέτρηση.
11. Αφού αποθηκεύσετε την μέτρηση κάνετε δεξιά κλικ στο γράφημα επιλέξτε “Copydata”.
12. Αντιγράψετε τα δεδομένα σε ένα αρχείο Excel για περαιτέρω επεξεργασία

#### 4.6 ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ ΑΥΤΟΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ

- Γιατί η συγκεκριμένη μέθοδος βολταμετρίας ονομάζεται κυκλική;
- Σε τι εξυπηρετεί η πιθανή αύξηση των βρόγχων δυναμικού; Πως αυξάνουν την αξιοπιστία της μέτρησης της συγκέντρωσης της αναλυόμενης ουσίας (π.χ. της ντοπαμίνης);
- Τι αναμένετε να συμβεί όσον αυξάνεται η συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας; Να αυξηθεί ή να μειωθεί η διαφορά  $[I_o-I_r]$  στην τιμή του ρεύματος (Σχήμα 4.1);

#### 4.7 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Mavrikou S., Flampouri E., Iconomou D., Kintzios, S. (2016) Development of a cellular biosensor for the detection of aflatoxin B1, based on the interaction of membrane engineered Vero cells with anti-AFB1 antibodies on the surface of gold nanoparticle screen printed electrodes. Food Control (in press)

## ΑΣΚΗΣΗ 5

### ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΟΛΛΟΕΙΔΩΝ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΧΡΥΣΟΥ

#### 5.1 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ

- Η εκμάθηση μεθόδου παρασκευής νανοσωματιδίων χρυσού σε εργαστηριακή κλίμακα.
- Η κατανόηση της σχέσης εκπομπής ακτινοβολίας (χρώματος) και μεγέθους νανοσωματιδίων.

#### 5.2 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα νανοσωματίδια αποτελούν συσσωματώματα ατόμων με διάμετρο 1-100 nm (σε ορισμένες περιπτώσεις έως 1000 nm), βρισκόμενα έτσι στο μεταίχμιο της ισχύος κβαντικών-κλασσικών νόμων της φυσικής και ιδιαίτερα της οπτικής. Καθώς οι διαστάσεις τους είναι ανάλογες των περισσότερων μεμονωμένων βιολογικών μορίων, τα νανοσωματίδια μπορούν να αξιοποιηθούν σε διάφορες βιολογικές εφαρμογές. Ωστόσο η πιο σημαντική ιδιότητα των νανοσωματιδίων αφορά την ικανότητα απορρόφησης ακτινοβολίας και επανεκπομπής της με εξαιρετικά υψηλή ένταση από ότι θα συνέβαινε με αντικείμενα μεγαλύτερου μεγέθους, ακριβώς λόγω του περιορισμού των διεγερμένων σωματιδίων σε ένα πολύ μικρό χώρο (**φαινόμενο κβαντικού περιορισμού διεγερμένων σωματιδίων**). Οι οπτικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων είναι συνυφασμένες με την συνύπαρξη πολλών εξ αυτών σε ένα κολλοειδές αιώρημα, ενώ όταν είναι μεμονωμένα οι ιδιότητες αυτές είναι πολύ εξασθενημένες.

Η συνηθέστερη μέθοδος για την χημική σύνθεση μεταλλικών νανοσωματιδίων (nanoparticles, NPs) βασίζεται στην αναγωγή μεταλλικών αλάτων (κυρίως  $\text{HAuCl}_4$ ,  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{PtCl}_4$ ,  $\text{AgClO}_4$ , κ.α.) σε διαλύματα μονής ή διπλής φάσης, με την παρουσία ενός σταθεροποιητικού παράγοντα. Με τη μέθοδο αυτή παράγονται κολλοειδή διαλύματα NPs. Στα κολλοειδή διαλύματα, τα νανοσωματίδια περιβάλλονται από ένα μονομοριακό οργανικό υμένιο και είναι διεσπαρμένα στον εκάστοτε διαλύτη (οργανικός ή υδατικός) χωρίς να διαλύονται μέσα σε αυτόν. Η οργανική επικάλυψη των νανοσωματιδίων εξαρτάται από τη μέθοδο σύνθεσης και καθορίζει τις φυσικές ιδιότητές τους, όπως οπτικές, ηλεκτρικές κ.α.

Τα μεταλλικά νανοσωματίδια χαρακτηρίζονται από ασυνήθιστες οπτικές ιδιότητες. Όταν ορατή ακτινοβολία προσπίπτει σε ευγενή μέταλλα νανομετρικών διαστάσεων μπορεί να προκαλέσει συντονισμένη διέγερση των ελεύθερων ηλεκτρονίων τους και απορρόφηση συγκεκριμένων συχνοτήτων του ορατού φάσματος. Αυτό συμβαίνει διότι το μήκος κύματος της ακτινοβολίας μπορεί να είναι μεγαλύτερο από το μέγεθος των νανοσωματιδίων. Σε αυτό οφείλονται τα λαμπρά και απρόσμενα (π.χ. τα NPs χρυσού φαίνονται κόκκινα) χρώματα των μεταλλικών νανοσωματιδίων.

#### 5.3 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ: ΣΥΝΘΕΣΗ AuNP ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ TURKEVICH ή ΜΕΘΟΔΟ CITRATE

Η μέθοδος Citrate ή Turkevich αποτελεί μία από τις παλαιότερες, απλούστερες αλλά και ευρέως χρησιμοποιούμενες τεχνικές χημικής σύνθεσης AuNP, μέσω της οποίας μπορούν να παραχθούν

νανοσωματίδια με διάμετρο 2nm - 100 nm. Βασίζεται στην αναγωγή ιόντων χρυσού από μόρια κιτρικού νατρίου. Τα ανηγμένα ιόντα χρυσού συναθροίζονται δημιουργώντας συσσωματώματα που σταδιακά αυξάνουν σε μέγεθος με αποτέλεσμα να μετατραπούν σε νανοσωματίδια χρυσού.

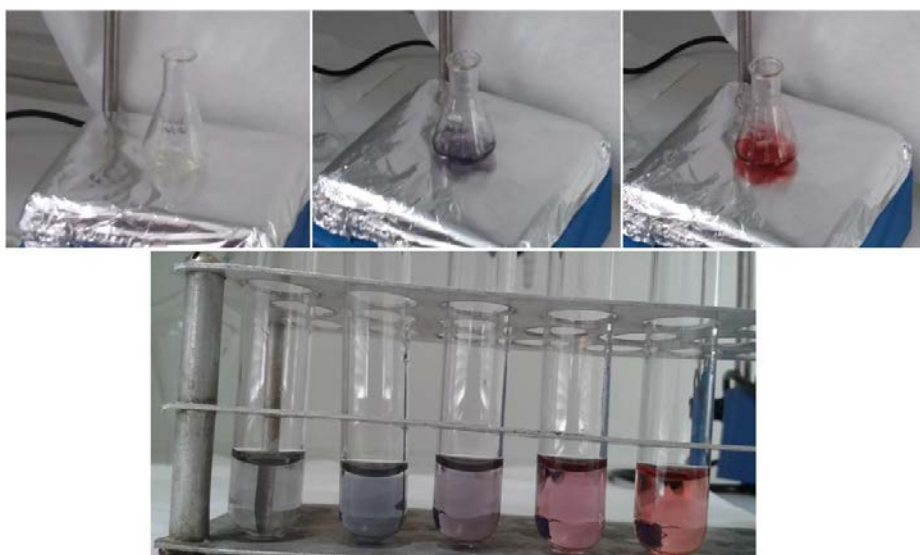
#### 5.4 ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

##### Εξοπλισμός:

- Θερμαινόμενος μαγνητικός αναδευτήρας
- Κωνικές φιάλες 50ml
- Μαγνητάκι ανάδευσης με κάλυψη teflon
- Δείκτης λείζερ

##### Διαλύματα:

- Διάλυμα χλωριούχου χρυσού ( $\text{HAuCl}_4$ ) 265 mM: **(διάλυμα A)**
- Διάλυμα κιτρικού νατρίου 0,5%: **(διάλυμα B)**



**Σχήμα 5.1:** Μέθοδος παρασκευής διαλύματος κolloειδούς χρυσού μέσω μεθόδου Turkevich. Σταδιακή αλλαγή χρώματος του διαλύματος καθώς τα ιόντα χρυσού ανάγονται από το κιτρικό νάτριο.

#### 5.5 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. Προσθέτουμε 19mL διαλύματος A και ένα μαγνητάκι ανάδευσης σε μια κωνική φιάλη των 50 mL. Κατόπιν το τοποθετούμε στον προθερμασμένο μαγνητικό αναδευτήρα και περιμένουμε μέχρι να φτάσει σε βρασμό.
2. Μόλις το υπό ανάδευση διάλυμα φτάσει σε βρασμό προσθέτουμε 1 mL διαλύματος B και συνεχίζουμε την υπό βρασμό ανάδευση.

3. Παρατηρούμε την σταδιακή αλλαγή στο χρώμα του διαλύματος καθώς το κιτρικό ανάγει τα ιόντα χρυσού. Απομακρύνουμε από την πηγή θερμότητας μόλις το διάλυμα πάρει βαθυκόκκινο ρουμπινί χρώμα (περίπου 1-2 λεπτά μετά την προσθήκη κιτρικού).
4. Στοχεύουμε το ποτήρι ζέσεως με τον δείκτη λέιζερ και παρατηρούμε την πορεία της ακτίνας λέιζερ μέσα από το διάλυμα.

#### 5.6 ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ ΑΥΤΟΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ

**A.** Βάλτε σε σωστή σειρά τους χρωματισμούς του διαλύματος και το αναμενόμενο μέγεθος των νανοσωματιδίων όπως αλλάζουν με την πάροδο των λεπτών κατά την διαδικασία της σύνθεσής τους. Γιατί συμβαίνει αυτό?

ΧΡΟΝΟΣ (sec)	ΧΡΩΜΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ
10	
20	
30	
60	
120	

**B.** Τι συμβαίνει όταν η ακτίνα λέιζερ περνάει μέσα από το διάλυμα και γιατί?

#### 5.6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Turkevich, J., Stevenson, P. C., & Hillier, J. (1951). A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*, 11, 55-75.