



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**“ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΩΝ ΚΑΙ
ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΩΝ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ
ΒΑΣΙΣΜΕΝΩΝ ΣΕ ΝΑΝΟΔΟΜΗΜΕΝΑ ΣΩΜΑΤΙΔΙΑ ΡΟΔΙΟΥ”**

**ΒΑΣΙΛΙΚΗ Α. ΓΑΤΣΕΛΟΥ
ΧΗΜΙΚΟΣ M.Sc.**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2018



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**“ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΩΝ ΚΑΙ
ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΩΝ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ
ΒΑΣΙΣΜΕΝΩΝ ΣΕ ΝΑΝΟΔΟΜΗΜΕΝΑ ΣΩΜΑΤΙΔΙΑ ΡΟΔΙΟΥ”**

**ΒΑΣΙΛΙΚΗ Α. ΓΑΤΣΕΛΟΥ
ΧΗΜΙΚΟΣ M.Sc.**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2018

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Χημείας της Σχολής
Θετικών Επιστημών, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή
των γνωμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2»

Ημερομηνία **αίτησης** της κ. Βασιλικής Γατσέλου:14-11-17

Ορισμός **Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής** από τη Γ.Σ.Ε.Σ.:881/ 10-4-14

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

Γκιώκας Δημοσθένης, Επίκουρος Καθηγητής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων,
Τμήματος Χημείας

Μέλη:

Βλεσσίδης Αθανάσιος, Καθηγητής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Τμήματος Χημείας
Φωκάς Δημοσθένης, Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων,
Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών

Ημερομηνία **ορισμού θέματος:**19-3-14

Θέμα: «ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΩΝ ΚΑΙ ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΩΝ
ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΒΑΣΙΣΜΕΝΩΝ ΣΕ ΝΑΝΟΔΟΜΗΜΕΝΑ ΣΩΜΑΤΙΔΙΑ
ΡΟΔΙΟΥ»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από τη Γ.Σ.Ε.Σ.:959/24-11-17

1. Γκιώκας Δημοσθένης, Επίκουρος Καθηγητής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Τμήματος Χημείας, Επιβλέπων.
2. Βλεσσίδης Αθανάσιος, Καθηγητής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Τμήματος Χημείας, Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής.
3. Φωκάς Δημοσθένης, Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών, Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής.
4. Προδρομίδης Μάμαντος, Καθηγητής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Τμήματος Χημείας, Μέλος.
5. Μπαδέκα Αναστασία, Επίκουρος Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Τμήματος Χημείας, Μέλος.
6. Γαρούφης Αχιλλέας, Καθηγητής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Τμήματος Χημείας, Μέλος.

7. Dionysios Christodouleas, Assistant Professor, University of Massachusetts (Lowell), Department of Chemistry, USA, Μέλος.

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «**ΑΡΙΣΤΑ**» στις 12-2-18

Η Πρόεδρος του Τμήματος Χημείας

Η Γραμματέας του Τμήματος

Μαρία-Ελένη Λέκκα, Καθηγήτρια

Ξανθή Τουτουτζόγλου

**Αφιερώνεται
στους γονείς μου**

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	i
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	vi
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ ΚΑΙ ΣΧΗΜΑΤΩΝ.....	viii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	xiv
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	xvi

Θ Ε Ω Ρ Η Τ Ι Κ Ο Μ Ε Ρ Ο Σ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Εισαγωγή στην νανοτεχνολογία-νανοχημεία.....	3
1.2. Νανοςωματίδια : Δομικές μονάδες νανοτεχνολογίας.....	4
1.3. Ιδιότητες νανοςωματιδίων.....	6

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ

2.1. Μέθοδοι σύνθεσης νανοςωματιδίων.....	11
2.2. Φυσικές και χημικές μέθοδοι σύνθεσης νανοςωματιδίων.....	18
2.2.1. Φυσικές μέθοδοι : Συμπύκνωση ατμών μετάλλων.....	20
2.2.2. Μηχανική άλεση.....	21
2.2.3. Ηχοχημική, Φωτοχημική, Θερμική Σύνθεση.....	23
2.2.4. Χημική Αναγωγή Αλάτων Ευγενών Μετάλλων.....	27
2.2.5. Ηλεκτροχημική αναγωγή.....	31
2.2.6. Βιολογικές μέθοδοι σύνθεσης νανοςωματιδίων.....	33
2.3. Μεταλλικά νανοςωματίδια.....	33
2.3.1. Νανοςωματίδια Au.....	33
2.3.2. Νανοςωματίδια Cu.....	35
2.3.3. Νανοςωματίδια Ag.....	36
2.3.4. Νανοςωματίδια Pt.....	37
2.3.5. Νανοςωματίδια Παλλαδίου και Ρουθηνίου.....	38
2.3.6. Νανοςωματίδια Ροδίου (RhNPs).....	38
2.3.7. Μαγνητικά Νανοςωματίδια.....	41
2.3.7.1. Νανοςωματίδια Fe.....	42
2.3.7.2. Νανοςωματίδια Co.....	42
2.3.7.3. Νανοςωματίδια Ni.....	43

2.4. Διμεταλλικά νανοσωματίδια.....	44
-------------------------------------	----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ

3.1. Εφαρμογές των Νανοσωματιδίων στην Αναλυτική Χημεία.....	47
3.2. Εφαρμογές στη Χορήγηση Φαρμάκων και στη Βιοϊατρική.....	60
3.3. Περιβαλλοντικές και βιομηχανικές εφαρμογές.....	61

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

4.1. Ορισμός Φαινολικών Ενώσεων.....	63
4.2. Χημεία Φαινολικών Ενώσεων.....	63
4.3. Αντιοξειδωτική δράση φαινολικών ενώσεων.....	69
4.4. Μέθοδοι Προσδιορισμού Αντιοξειδωτικής Ικανότητας.....	70
4.4.1. Μέθοδος Ικανότητας Απορρόφησης Ριζών Οξυγόνου (ORAC).....	73
4.4.2. Μέθοδος Ολικών Αντιοξειδωτικών TRAP.....	74
4.4.3. Μέθοδος Καροτενίου ή Αποχρωματισμού της Κροκίνης.....	75
4.4.4. Μέθοδος Προσδιορισμού Ολικής Φαινολικής Περιεκτικότητας Folin-Ciocalteu (F-C).....	76
4.4.5. Μέθοδος TEAC.....	78
4.4.6. Δοκιμασία Ικανότητας Απορρόφησης Ριζών DPPH.....	79
4.4.7. Μέθοδος FRAP.....	80
4.4.8. Μέθοδος CUPRAC.....	81

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	83
-------------------	----

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ ΣΕ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΤΣΑΓΙΟΥ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΟΞΥΓΟΝΟΥ ΜΕ ΕΚΤΥΠΩΜΕΝΑ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΑ ΓΡΑΦΙΤΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΜΕ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ ΡΟΔΙΟΥ.

Περίληψη.....	95
1.1. Εισαγωγή.....	97
1.2. Πειραματικό μέρος	
1.2.1. Αντιδραστήρια.....	100
1.2.2. Παρασκευή εναιωρήματος νανοσωματιδίων ροδίου (RhNPs).....	100
1.2.3. Κατασκευή εκτυπωμένων ηλεκτροδίων.....	101
1.2.4. Οργανολογία.....	101
1.2.5. Προετοιμασία των εκχυλισμάτων τσαγιού.....	102
1.2.6. Πειραματική πορεία.....	103
1.3. Αποτελέσματα και συζήτηση	
1.3.1. Ηλεκτροχημική συμπεριφορά των SPEs/RhNPs.....	103
1.3.2. Ηλεκτροκατάλυση και δημιουργία των αισθητήρων.....	104
1.3.3. Βελτιστοποίηση πειραματικών συνθηκών.....	110
1.3.4. Αναλυτική απόδοση.....	113
1.3.5. Εφαρμογή σε πραγματικά δείγματα.....	114
1.4. Συμπεράσματα	118
Βιβλιογραφία.....	119

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΕ ΦΥΤΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΤΙΣ ΦΑΣΜΑΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΧΡΩΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΤΩΝ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΤΟΥ ΡΟΔΙΟΥ.

Περίληψη.....	123
2.1. Εισαγωγή.....	125
2.2. Πειραματικό μέρος.....	128
2.2.1. Αντιδραστήρια.....	128
2.2.2. Εξοπλισμός.....	128
2.2.3. Σύνθεση νανοσωματιδίων ροδίου με επικάλυψη κιτρικών ιόντων.....	129

2.2.4. Σύνθεση νανοσωματιδίων ροδίου τροποποιημένα με γαλλικό οξύ.....	130
2.2.5. Ανάλυση της ολικής περιεκτικότητας φαινολικών ενώσεων σε δείγματα τσαγιού.....	130
2.2.6. Ανάλυση της ολικής περιεκτικότητας κατεχίνης σε δείγματα τσαγιού.....	130
2.2.7. Προσδιορισμός ολικών φαινολικών ενώσεων (Μέθοδος Folin Ciocalteu).131	
2.2.8. Μέθοδος συμπλοκοποίησης αργιλίου.....	131
2.3. Αποτελέσματα.....	132
2.3.1. Χαρακτηρισμός RhNPs με επικάλυψη κιτρικών ιόντων (RhNPs@CA)...132	
2.3.2. Αλληλεπιδράσεις των RhNPs με φαινολικές ενώσεις.....	136
2.3.3. Μικροσκοπικός και οπτικός χαρακτηρισμός της αλληλεπίδρασης των πολυφαινολών με RhNPs.....	144
2.3.4. Πειραματική πορεία βασισμένη στα RhNPs για την ανάλυση της ολικής περιεκτικότητας φαινολικών ενώσεων (TPC) σε δείγματα τσαγιού.....	146
2.3.5. Πειραματική πορεία βασισμένη στα RhNPs για την ανάλυση της ολικής περιεκτικότητας κατεχινών (TCC) σε δείγματα τσαγιού.....	152
2.4. Συμπεράσματα.....	158
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	159

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΧΡΩΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ ΚΑΙ ΓΛΥΚΟΖΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΡΟΔΙΟΥ ΩΣ ΕΝΖΥΜΟΜΙΜΗΤΙΚΑ ΤΗΣ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗΣ

Περίληψη.....	167
3.1. Εισαγωγή.....	169
3.2. Πειραματικό μέρος.....	173
3.2.1. Εξοπλισμός.....	173
3.2.2. Σύνθεση νανοσωματιδίων RhNPs.....	173
3.2.3. Κινητική ανάλυση σταθερής κατάστασης.....	173
3.2.4. Χρωματομετρική ανάλυση H ₂ O ₂ χρησιμοποιώντας RhNPs.....	174
3.2.5. Χρωματομετρική ανάλυση της γλυκόζης χρησιμοποιώντας RhNPs ως ενζυμομιμητικά της υπεροξειδάσης.....	175
3.2.6. Πραγματικά δείγματα.....	175
3.3. Αποτελέσματα και συζήτηση.....	176
3.3.1. Επιλογή των RhNPs ως ενζυμομιμητικών της υπεροξειδάσης.....	176

3.3.2. Δράση των RhNPs παρόμοια με της υπεροξειδάσης.....	177
3.3.3. Βελτιστοποίηση των πειραματικών συνθηκών.....	179
3.3.4. Κινητικές μελέτες και μηχανισμός αντίδρασης.....	183
3.3.5. Εκλεκτικότητα.....	188
3.3.6. Αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου.....	190
3.3.7. Εφαρμογή της μεθόδου.....	193
3.4. Συμπεράσματα.....	195
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	196

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Με την ολοκλήρωση της διατριβής μου θα ήθελα να ευχαριστήσω όσους στάθηκαν δίπλα μου σε αυτή την προσπάθεια με την πολύτιμη συνεργασία τους και με βοήθησαν να την φέρω εις πέρας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος τον επιβλέποντα μου Επίκουρο Καθηγητή κ. Δημοσθένη Γκιώκα, για την ανάθεση του θέματος, την εμπιστοσύνη, την καθοδήγηση, τις πολύτιμες συμβουλές και την ποικιλόμορφη στήριξή του καθ' όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών. Όλα αυτά τα χρόνια μου έμαθε πολλά πράγματα, από ερευνητικά θέματα, όπως το πως να προσεγγίζω και να πραγματοποιώ το πείραμά μου, πως να αναλύω τα αποτελέσματά μου, πως να λειτουργώ μέσα στο εργαστήριο κ.α.

Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, τον Καθηγητή Αναλυτικής Χημείας κ. Βλεσσίδα Αθανάσιο και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Χημικών και Φυσικών Μεθόδων Παραγωγής Βιοϊατρικών Ενώσεων κ. Φωκά Δημοσθένη για τις σημαντικές συμβουλές, τις εύστοχες υποδείξεις και διορθώσεις και για την εποικοδομητική κριτική τους.

Στον Καθηγητή Αναλυτικής Χημείας κ. Προδρομίδα Μάμαντο οφείλω ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ για την άριστη συνεργασία που είχαμε, το συνεχές ενδιαφέρον και την ουσιαστική του συμβολή στην υλοποίηση του 1^{ου} πειραματικού κεφαλαίου της διδακτορικής μου διατριβής.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω και στα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής μου επιτροπής: τον Καθηγητή Ανόργανης Χημείας κ. Γαρούφη Αχιλλέα, την Επίκουρη Καθηγήτρια Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων κ. Μπαδέκα Αναστασία και τον Επίκουρο Καθηγητή Αναλυτικής Χημείας κ. Διονύσιο Χριστοδουλέα (UMASS, Lowell, USA) για τις εύστοχες παρατηρήσεις τους.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Αναλυτικής χημείας. Πρώτα απ' όλα τον Δρ. κ Τσόγκα Γεώργιο για την ουσιαστική βοήθειά του στην ολοκλήρωση της διατριβής, όπως και τις μεταπτυχιακές φοιτήτριες Κάππη Φωτεινή, Χολέβα Τατιάνα, Βούλγαρη Ασημίνα και Μανδύλα Σπυριδούλα για την αμέριστη βοήθεια και άριστη συνεργασία που μου προσέφεραν.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την πολύπλευρη συμπαράσταση κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής αυτής.

Βασιλική Α. Γατσέλου

Ιωάννινα, Φεβρουάριος 2018

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ ΚΑΙ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Εικόνα 1.1. Δομή νανοσωματιδίου.....	3
Εικόνα 1.2. Παραδείγματα μεγεθών στη νανοκλίμακα.....	4
Εικόνα 1.3. Νανοσωματίδια διαφόρων σχημάτων και μεγεθών.....	5
Εικόνα 1.4. Διάφορα χαρακτηριστικά που συμβάλλουν στην ποικιλομορφία των σχηματιζόμενων νανοσωματιδίων. Η ίδια χημική ουσία μπορεί να δημιουργήσει μια ευρεία ποικιλία νανοσωματιδίων.....	6
Εικόνα 1.5. Φωτογραφίες της διάσημης "κούπας-κύπελλο του Λυκούργου" (Lycurgus cup) που εμφανίζει διαφορετικό χρώμα ανάλογα με το αν φωτίζεται (α) εξωτερικά ή (β) εσωτερικά	7
Εικόνα 1.6. Ηλεκτρική συμπεριφορά νανοσωλήνων.....	8
Εικόνα 2.1. Μεταλλικά νανοσωματίδια που σταθεροποιούνται από πολυμερή (α), υποκαταστάτες χαμηλού μοριακού βάρους (b), μικύλλια (c).....	17
Εικόνα 2.2. Σχηματικό διάγραμμα της πειραματικής συσκευής για εκτομή με laser..	21
Εικόνα 2.3. Σχηματική απεικόνιση της αρχής της μηχανικής άλεσης.....	22
Εικόνα 2.4. Ακτινοβολία φθορισμού προκαλεί μετασχηματισμό των σφαιρικών νανοσωματιδίων Ag σε τριγωνικά νανοπρίσματα.....	37
Εικόνα 2.5. Ευγενές μέταλλο Ροδίου (Rh).....	39
Εικόνα 3.1. Νανοϋλικά με διάφορες μορφολογίες.....	47
Εικόνα 4.1. Παραδείγματα υδροξυβενζοϊκών (α) και υδροξυκιναμμομικών (β) οξέων	65
Εικόνα 4.2. Βασικές φυτικές φαινολικές δομές με παραδείγματα.....	68

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

- Εικόνα 1.1. Δεδομένα δυναμικής σκέδασης φωτός.....101
- Εικόνα 1.2. Κυκλικά βολταμμογραφήματα (CVs) "γυμνών" (σάρωση a) και τροποποιημένων με RhNPs SPEs (σάρωση b) σε διάλυμα $0,5 \text{ molL}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ απαερωμένο με υψηλής καθαρότητας N_2 . Ρυθμός σάρωσης $0,1 \text{ Vs}^{-1}$ 104
- Εικόνα 1.3. (A) Κυκλικά βολταμμογραφήματα (CVs) των (a και a') "γυμνών" SPEs, (b και b') SPEs/RhNPs και (c και c') SPEs/PEI(0.2%)/RhNPs σε $0,1 \text{ molL}^{-1} \text{ PBS}$ pH 7 περιέχοντας $0,1 \text{ molL}^{-1} \text{ KCl}$ (a–c) πριν και (a', b', c') μετά την προσθήκη $5 \text{ mmolL}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$. Ρυθμός σάρωσης $0,1 \text{ Vs}^{-1}$, (B) Χρονοαμπερομετρικά διαγράμματα των SPEs/PEI/RhNPs αισθητήρων τροποποιημένων με (a) 0, (b) 2 και (c) 0,2% w/vPEI σε αιθανόλη σε εύρος συγκεντρώσεων $5\text{--}1090 \text{ }\mu\text{molL}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ στα $0,0 \text{ V}$ σε $0,1 \text{ molL}^{-1} \text{ PBS}$ pH 7 περιέχοντας $0,1 \text{ molL}^{-1} \text{ KCl}$ παρουσία διαλυμένου οξυγόνου.....106
- Εικόνα 1.4. Γραφήματα των αισθητήρων σε διάφορα στάδια τροποποίησης : (σάρωση a, κύκλοι) "γυμνό" SPE, (σάρωση b, τετράγωνα) SPEs/PEI(0,2%), και (σάρωση c, ρόμβοι) SPEs/PEI(0,2%)/RhNPs σε $0,1 \text{ molL}^{-1} \text{ PBS}$ pH 7 περιέχοντας 5 mmolL^{-1} σιδηροκυανιούχων (II)/(III). Χρωματισμένα σύμβολα, προφίλ αντίστασης; κενά σύμβολα, προφίλ φάσης.....107
- Εικόνα 1.5. Εικόνες SEM των (A) "γυμνών" SPEs, (B) SPEs/PEI(0,2%) και (C) SPEs/PEI(0,2%)/RhNPs (D) EDX στοιχειακή μικροανάλυση χάρτη (C).....109
- Εικόνα 1.6. EDX στοιχειακή μικροανάλυση σε μεγενθυμένη κλίμακα σε SPEs/PEI(0,2%)/RhNPs.....110
- Εικόνα 1.7. (A) Κυκλικά βολταμμογραφήματα (CVs) των SPEs/PEI(0,2%)/RhNPs σε απαερωμένο (a και a') και μη απαερωμένο (b και b') διάλυμα $0,1 \text{ molL}^{-1} \text{ PBS}$ pH 7 που περιέχει $0,1 \text{ molL}^{-1} \text{ KCl}$, Τα CVs (a και b) ελήφθησαν πριν την προσθήκη $5 \text{ mmolL}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ ενώ τα CVs (a' και b') μετά την προσθήκη $5 \text{ mmolL}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$. Ρυθμός σάρωσης, $0,1 \text{ Vs}^{-1}$, (B) Χρονοαμπερομετρικά διαγράμματα των SPEs/PEI(0,2%)/RhNPs σε εύρος συγκεντρώσεων $5\text{--}1090 \text{ }\mu\text{molL}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ στα (a) $0,050$, (b) $0,0$, (c) $-0,050$, (d) $-0,100$, (e) $-0,200$ και (f) $-0,300 \text{ V}$ σε $0,1 \text{ molL}^{-1} \text{ PBS}$ pH 7 παρουσία $0,1 \text{ molL}^{-1} \text{ KCl}$ και διαλυμένου οξυγόνου.....111
- Εικόνα 1.8. Χρονοαμπερομετρικά διαγράμματα διαφορετικών SPEs/PEI(0,2%)/RhNPs σε εύρος συγκεντρώσεων $5\text{--}150 \text{ }\mu\text{molL}^{-1}$ ($5\text{--}1090 \text{ }\mu\text{molL}^{-1}$

- ¹ για το ηλεκτρόδιο που χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή της ένθετης καμπύλης αναφοράς) H_2O_2 στα 0,0 V σε $0,1 \text{ molL}^{-1}$ PBS pH 7 περιέχοντας $0,1 \text{ molL}^{-1}$ KCl παρουσία διαλυμένου οξυγόνου. Το ένθετο γράφημα απεικονίζει την καμπύλη $I=f[\text{H}_2\text{O}_2]$114
- Εικόνα 1.9. Χρονοαμπερομετρικά διαγράμματα για τον προσδιορισμό H_2O_2 σε δείγμα πράσινου τσαγιού, δείγμα 1. Τα γραφήματα a και b δείχνουν την απόκριση του αισθητήρα μετά από τρεις διαδοχικές προσθήκες των $25 \mu\text{molL}^{-1}$ ασκορβικού οξέος σε διάλυμα καθαρού ηλεκτρολύτη, και στο δείγμα με καταλάση, αντίστοιχα. Μέθοδος σταθερής προσθήκης (δείγμα +3 διαδοχικές προσθήκες των $50 \mu\text{molL}^{-1}$ H_2O_2) μετά από χρόνο παραμονής (διάγραμμα c) 24 h,(διάγραμμα d) 48 h και (διάγραμμα e) 72 h. Το διάγραμμα f αναφέρεται σε 72 h -παλαιωμένο δείγμα μετά από εμβολιασμό με $22,0 \mu\text{molL}^{-1}$ H_2O_2 . Οι μετρήσεις διεξήχθησαν στα 0,0 V σε $0,1 \text{ molL}^{-1}$ PBS pH 7 περιέχοντας $0,1 \text{ molL}^{-1}$ KCl παρουσία διαλυμένου οξυγόνου.....115
- Εικόνα 2.1. UV-Vis φάσματα των RhNPs χωρίς επικάλυψη κιτρικών ιόντων (μαύρη γραμμή) και των RhNPs@CA (πράσινη γραμμή) παρασκευάστηκαν κάτω από τις ίδιες πειραματικές συνθήκες και τα ίδια αντιδραστήρια.....131
- Εικόνα 2.2. XPS ανάλυση και στοιχειακή σύνθεση των RhNPs@CA (a) φάσμα XPS (b) φάσμα φωτοηλεκτρονίων C1s (c) φάσμα φωτοηλεκτρονίων ροδίου 3d.....133
- Εικόνα 2.3. AFM εικόνες (ανάλυση βάθους, προφίλ διατομής και 3D εικόνα) και DLS ανάλυση μεγέθους των RhNPs@CA (κάτω δεξιά). Με βάση την ανάλυση της διατομής το μέγεθος των σωματιδίων κυμαίνονταν μεταξύ 3,5 και 8,0 nm με μέσο μέγεθος τα 7,2 nm (προφίλ ανάλυσης βάθους), ενώ πειράματα DLS υπολόγισαν τη μέση υδροδυναμική διάμετρο των σωματιδίων ίση με 8,7 nm.....135
- Εικόνα 2.4. Κανονικοποιημένα φάσματα UV-Vis και φωτογραφική απεικόνιση των χρωματικών μεταβολών των RhNPs@CA παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων (a) γαλλικού οξέος, (b) πυρογαλλόλης, (c) κατεχίνης και (d) καφεϊκού οξέος. Οι φασματικές γραμμές έχουν κανονικοποιηθεί με "τυφλό" (RhNPs@CA χωρίς φαινολικές ενώσεις). Οι διακεκομμένες γραμμές δείχνουν τα φάσματα απορρόφησης των φαινολικών ενώσεων σε υδατικό διάλυμα σε συγκέντρωση 0,5 mM.....138

Εικόνα 2.5. Κανονικοποιημένες UV-Vis φασματοσκοπικές και χρωματικές μεταβολές των RhNPs παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων διάφορων πολυφαινόλων (a) κατεχόλη, (b) κουμαρικό οξύ, (c) βανιλλικό οξύ, (d) κινναμωμικό οξύ, (e) επιγαλλοκατεχίνη. Οι φασματικές γραμμές έχουν κανονικοποιηθεί με βάση το "τυφλό" (CA-RhNPs).....	140
Εικόνα 2.6. Εικόνα TEM των RhNPs@CA περιέχοντας 0,5 mM γαλλικό οξύ.....	145
Εικόνα 2.7. Σχηματική απεικόνιση του πιθανού μηχανισμού αλληλεπίδρασης των φαινολικών οξέων (γαλλικό οξύ) με τα RhNPs@CA. Μόρια και νανοσωματίδια δεν είναι ισοσταθμισμένα και η αναπαράσταση δεν λαμβάνει υπόψη την σχετική αναλογία των συγκεντρώσεων μεταξύ φαινολικών ενώσεων και RhNPs@CA.....	146
Εικόνα 2.8. Επίδραση των πειραματικών συνθηκών στην απορρόφηση του γαλλικού οξέος-RhNPs. (a) Συγκέντρωση ροδίου (χρόνος αντίδρασης 10 λεπτά, δεν απαιτείται ρύθμιση pH), (b) pH διαλύματος (0,25 mM $\text{RhCl}_3 \times 3\text{H}_2\text{O}$, χρόνος αντίδρασης 10 λεπτά), (c) χρόνος αντίδρασης (pH = 8,0, 0,25 mM $\text{RhCl}_3 \times 3\text{H}_2\text{O}$), (d) αναλογία όγκου RhNPs-δείγματος (0,25 mM $\text{RhCl}_3 \times 3\text{H}_2\text{O}$, pH 8, χρόνος αντίδρασης 20 λεπτά).....	147
Εικόνα 2.9. (α) UV-Vis φάσματα των RhNPs@CA με εκχυλίσματα τσαγιού διαφόρων ποικιλιών (οι φασματικές γραμμές (τα φάσματα δεν έχουν κανονικοποιηθεί ως προς τη μάζα του δείγματος τσαγιού) (b) Συσχέτιση της συνολικής περιεκτικότητας φαινολικών ενώσεων που προσδιορίστηκε από την πορεία που βασίζεται στα RhNPs και της Folin-Ciocalteu (οι συγκεντρώσεις έχουν κανονικοποιηθεί ως προς τη μάζα του δείγματος τσαγιού).....	152
Εικόνα 2.10. Φάσματα απορρόφησης εναιωρήματος RhNPs τροποποιημένων με γαλλικό οξύ με αυξανόμενη συγκέντρωση διαφόρων φαινολικών ενώσεων: a) Καφεϊκό οξύ, β) Κατεχόλη, c) Κινναμωμικό οξύ, d) Κουμαρικό οξύ, e) Φερουλικό οξύ, f) Βανιλλικό οξύ, g) Ταννικό οξύ, h) Κατεχίνη. Τα τροποποιημένα με γαλλικό οξύ RhNPs παρασκευάζονται με αντίδραση RhNPs@CA με 0,25 mM γαλλικό οξύ.....	154

Εικόνα 2.11. Λογαριθμικές καμπύλες αναλυτικής απόκρισης του εναιωρήματος των RhNPs τροποποιημένων με γαλλικό οξύ με αυξανόμενη συγκέντρωση διαφόρων φαινολικών ενώσεων.....	155
Εικόνα 2.12. α) UV-Vis φάσματα των τροποποιημένων με γαλλικό οξύ RhNPs (0,25 mM γαλλικό οξύ) με εκχυλίσματα τσαγιού διαφόρων ποικιλιών (τα φάσματα δεν έχουν κανονικοποιηθεί ως προς τη μάζα του δείγματος τσαγιού), (β) Διάγραμμα απόκρισης της ολικής περιεκτικότητας κατεχινών που καθορίστηκε από την πορεία που βασίζεται στα RhNPs και της μεθόδου συμπλοκοποίησης αργιλίου (οι συγκεντρώσεις έχουν κανονικοποιηθεί ως προς τη μάζα του δείγματος τσαγιού).....	157
Εικόνα 3.1. Τυπικό διάγραμμα Lineweaver-Burk της κινητικής μελέτης Michaelis-Menten.....	174
Εικόνα 3.2. Τυπικά φάσματα UV-Vis της οξειδωσης του TMB από το H ₂ O ₂ που καταλύεται από RhNPs (συμπαγής γραμμή) και απουσία των RhNPs ως καταλύτης (διακεκομμένη γραμμή). Πειραματικές συνθήκες : TMB 1,5 mM, H ₂ O ₂ 100 μM, RhNPs 140 pM, pH = 4.....	178
Εικόνα 3.3. Η επίδραση των πειραματικών παραμέτρων (α) συγκέντρωση των RhNPs (β) pH του διαλύματος (γ) θερμοκρασία και (δ) συγκέντρωση της TMB στην ενζυμομιμητική δράση των RhNPs. Οι απεικονιζόμενες ράβδοι αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα που προέρχεται από τρεις επαναλαμβανόμενες μετρήσεις.....	181
Εικόνα 3.4. α) Η επίδραση των RhNPs στο σχηματισμό ρίζας υδροξυλίου με τερεφθαλικό οξύ ως ανιχνευτή φθορισμού. ΔF ορίζεται ως η διαφορά μεταξύ της ολικής έντασης φθορισμού του διαλύματος και της έντασης μόνο από τα RhNPs.β) Επίδραση του χρόνου αντίδρασης στην ενζυμομιμητική δράση των RhNPs.....	182
Εικόνα 3.5. Καταλυτική δράση των RhNPs με αυξανόμενες συγκεντρώσεις H ₂ O ₂ σε σταθερό χρόνο αντίδρασης 10 λεπτών στους 35°C. Άλλες πειραματικές συνθήκες : 1,5 mM TMB, pH=4.....	182
Εικόνα 3.6. Κινητική μελέτη καθαρής κατάστασης και καταλυτικός μηχανισμός των RhNPs. (α) Διάγραμμα αρχικής ταχύτητας έναντι συγκέντρωσης H ₂ O ₂ σε σταθερή συγκέντρωση TMB 1,5 mM. (β) Διάγραμμα αρχικής ταχύτητας έναντι	

συγκέντρωσης TMB σε σταθερή συγκέντρωση H ₂ O ₂ 0,1 mM. (c) Διπλά- αντίστροφο διάγραμμα αρχικής ταχύτητας έναντι συγκέντρωσης TMB σε 3 διαφορετικές σταθερές συγκεντρώσεις H ₂ O ₂ (0,001, 0,05 και 0,1 mM). (δ) Διπλά- αντίστροφο διάγραμμα αρχικής ταχύτητας έναντι συγκέντρωσης H ₂ O ₂ σε 3 διαφορετικές σταθερές συγκεντρώσεις TMB (0,25, 0,75 και 1,5 mM). Άλλες πειραματικές συνθήκες: 175 pM RhNPs σε 2 mL 0,01M NaAc, pH 4, στους 35°C.....	184
Εικόνα 3.7. Ανάλυση της εκλεκτικότητας για την ανίχνευση γλυκόζης με μελέτη της σχετικής απορρόφησης. Μπάρες σφαλμάτων αντιστοιχούν στο τυπικό σφάλμα τριών ανεξάρτητων μετρήσεων.....	189
Εικόνα 3.8. Καμπύλες βαθμονόμησης (α) του H ₂ O ₂ και (β) της γλυκόζης. Οι μετρήσεις απορρόφησης πραγματοποιήθηκαν στα 652 nm.....	191

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Πίνακας 2.1. Συνθετικές πορείες νανοσωματιδίων ευγενών μετάλλων με εξαίρεση τη χημική αναγωγή.....	12
Πίνακας 2.2. Διαδικασίες χημικής αναγωγής νανοσωματιδίων ευγενών μετάλλων με διαφορετικούς αναγωγικούς και σταθεροποιητικούς παράγοντες.....	14
Πίνακας 2.3. Σύνοψη διαφόρων διαδικασιών αναγωγής που χρησιμοποιούνται για να παρασκευάσουν μεταλλικά NPs.....	31
Πίνακας 3.1. Σχέση μεταξύ του τύπου και των ιδιοτήτων των νανοσωματιδίων που χρησιμοποιούνται για αναλυτικούς σκοπούς.....	48
Πίνακας 3.2. Προσυγκέντρωση και εκχύλιση μεταλλικών ιόντων από νανοσωματίδια.....	49
Πίνακας 3.3. Εφαρμογές νανοσωματιδίων άνθρακα στην εκχύλιση ανόργανων ιόντων, οργανικών μορίων και βιομορίων από περιβαλλοντικά δείγματα, δείγματα τροφίμων και βιολογικά δείγματα.....	50
Πίνακας 3.4. Διάφορες λειτουργίες των νανοσωματιδίων σε συστήματα αισθητήρων	53
Πίνακας 3.5. Πλασμονικοί αισθητήρες και βιοαισθητήρες για τον προσδιορισμό φυτοφαρμάκων.....	54
Πίνακας 3.6. Πλασμονικοί αισθητήρες και βιοαισθητήρες για τον προσδιορισμό αλλεργιογόνων.....	55
Πίνακας 3.7. Πλασμονικοί αισθητήρες και βιοαισθητήρες για την ανίχνευση ιών.....	55
Πίνακας 3.8. Πλασμονικοί αισθητήρες και βιοαισθητήρες για την ανίχνευση βακτηρίων.....	56
Πίνακας 3.9. Ηλεκτροχημικοί αισθητήρες και βιοαισθητήρες για τον προσδιορισμό επιμολύνσεων σε τρόφιμα.....	57
Πίνακας 3.10. Εφαρμογή μεταλλικών νανοσωματιδίων σε βολταμμετρικούς /αμπερομετρικούς αισθητήρες μεταξοτυπίας (SPE) και βιοαισθητήρες και	

εφαρμογές τους στην - περιβαλλοντική ανάλυση (Env), στην ανάλυση τροφίμων (food), ιατρική διάγνωση (Med) και στην Φαρμακευτική ανάλυση.....	59
Πίνακας 3.11. Ενδεικτικές εφαρμογές των μεταλλικών νανοσωματιδίων στην κατάλυση.....	62
Πίνακας 4.1. Διάφορες κατηγορίες φαινολικών ενώσεων.....	64

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Πίνακας 1.1. Μελέτη προσδιορισμού και ανάκτησης H_2O_2 σε διάφορα δείγματα από εκχυλίσματα τσαγιού μετά από αραιώση 65φορές σε $0,1 \text{ molL}^{-1}$ PBS pH 7 περιέχοντας $0,1 \text{ molL}^{-1}$ KCl. Οι συγκεντρώσεις αναφέρονται στη συγκέντρωση H_2O_2 στην κυψελίδα μέτρησης.....	117
Πίνακας 2.1. Η μέση υδροδυναμική διάμετρος και η κατανομή μεγέθους σωματιδίων των αντιοξειδωτικών-RhNPs@CA.....	144
Πίνακας 2.2. Αναλυτικές καμπύλες απόκρισης της απορρόφησης (στα 450 και/ή 580 nm) σε σύγκριση με τη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων.....	150
Πίνακας 2.3. Αναλυτικές καμπύλες απόκρισης της απορρόφησης (στα 450 και/ή 580 nm) για διαφορετικές συγκεντρώσεις φαινολικών ενώσεων.....	156
Πίνακας 3.1. Κινητικές παράμετροι της αντίδρασης οξείδωσης TMB/ H_2O_2 καταλυόμενης από RhNPs.....	185
Πίνακας 3.2. Σύγκριση των φαινόμενων κινητικών παραμέτρων των RhNPs με εκείνες των προηγούμενων αναφερθέντων μιμητικών νανοϋλικών υπεροξειδάσης.....	186
Πίνακας 3.3. Σύγκριση των μιμητικών νανοϋλικών υπεροξειδάσης που χρησιμοποιούνται για τον χρωματομετρικό προσδιορισμό της γλυκόζης.....	192
Πίνακας 3.4. Εφαρμογή της μεθόδου στην ανάλυση πραγματικών δειγμάτων και αποτελέσματα από την ανάλυση των εμβολιασμένων δειγμάτων. (α) Προσδιορισμός του H_2O_2 σε υγρό καθαρισμού φακών επαφής (β) Προσδιορισμός γλυκόζης σε ενεργειακά και αθλητικά ποτά και ορό ανθρώπινου αίματος.....	194

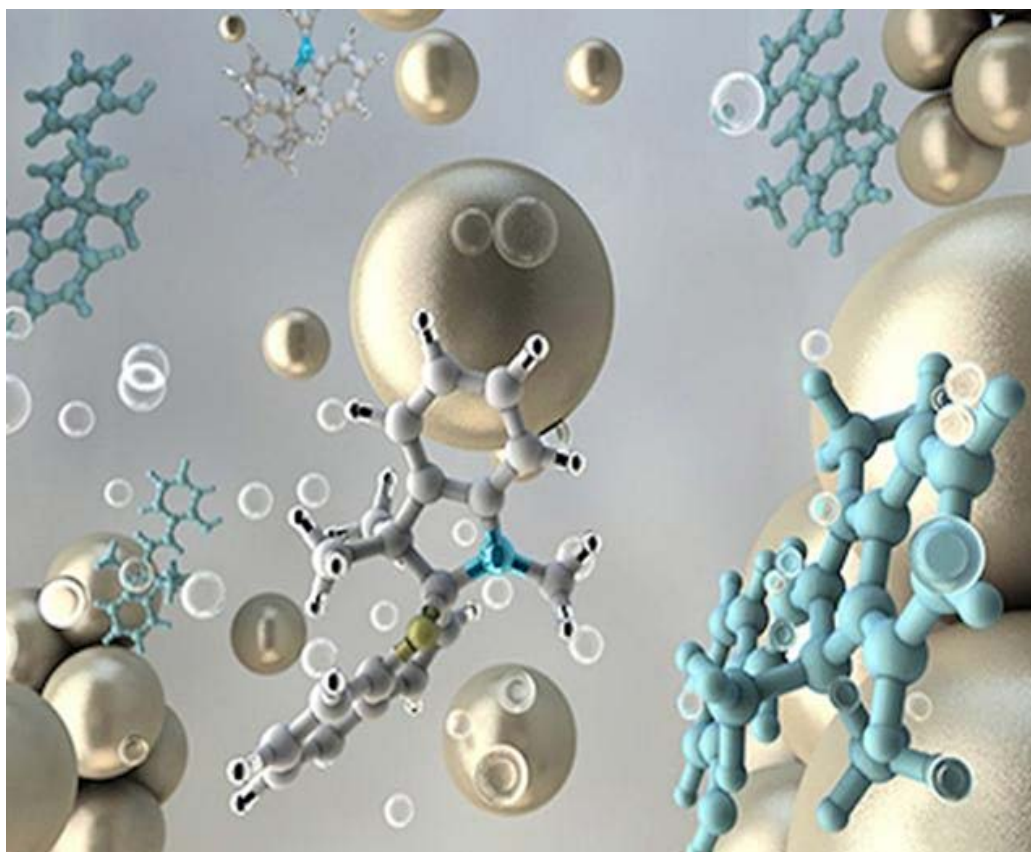
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ABP	Τεχνητό πλάσμα αίματος
AFM	Μικροσκοπία ατομικών δυνάμεων
Ag	Άργυρος
AgCl	Χλωριούχος άργυρος
Al	Αργίλιο
AlCl ₃	Τριχλωριούχο αργίλιο
AlCl ₃ •6H ₂ O	Εξαένυδρο-τριχλωριούχο αργίλιο
Au	Χρυσός
AuNPs	Νανοδοματίδια χρυσού
Bar	Μονάδα μέτρησης πίεσης που ισοδυναμεί με 10 ⁵ Pascal
BSA	<i>δισ(τριμεθυλοσιλλο)ακεταμίδιο</i>
CA	Κιναμμομικό οξύ
CAF	Καφεϊκό οξύ
CAT	Κατεχίνη
CE	Ισοδύναμη συγκέντρωση κατεχίνης
CO	Κουμαρικό οξύ
-COOH	Καρβοξυλική ομάδα
CV	Κυκλικό βολταμμογράφημα
DDW	Δις απεσταγμένο ύδωρ
DLS	Δυναμική σκέδαση φωτός
ECG	Επιγαλλοκατεχίνη
EDX	Ενεργειακή κατανομή ακτίνων X
EIS	Ηλεκτροχημική φασματοσκοπία εμπέδησης

eV	Ηλεκτρονιοβολτ (μονάδα μέτρησης ενέργειας)
GA	Γαλλικό οξύ
GAE	Ισοδύναμα γαλλικού οξέος
GOx	Γλυκόζη οξειδάση
H ₂ O ₂	Υπεροξειδίο του υδρογόνου
H ₂ SO ₄	Θειϊκό οξύ
Hv	Ενέργεια
Hz	Μονάδα μέτρησης συχνότητας (1κύκλος/sec)
•H	Ρίζα υδρογόνου
HRP	Υπεροξειδάση αγριοραφανίδων
Ir	Ιρίδιο
KCl	Χλωριούχο κάλιο
Km	Σταθερά Michaelis Menten
LSPR	Φαινόμενο συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων
μM	Συγκέντρωση 10 ⁻⁶ mol ανά λίτρο
M.B.	Μοριακό βάρος
Mg	Μαγνήσιο
NaBH ₄	Βοροϋδρίδιο του νατρίου
Na ₂ CO ₃	Ανθρακικό νάτριο
-NH ³⁺	Ομάδα θετικών αμινομάδων
Nm	Νανόμετρα
NaNO ₂	Νιτρώδες νάτριο
NaOH	Υδροξειδίο νατρίου
-OH	Υδροξυλική ομάδα
•OH	Ρίζα υδροξυλίου
PBS	Φωσφορούχο ρυθμιστικό διάλυμα άλατος

Pd	Παλλάδιο
PG	Προπυλικός εστέρας γαλλικού οξέος
PGEs	Στοιχεία ομάδας λευκόχρυσου
PEI	Πολυαιθυλενιμίνη
Pt	Λευκόχρυσος
Rh	Ρόδιο
RhCl ₃	Τριχλωριούχο ρόδιο
RhCl ₃ •3H ₂ O	Τριένυδρο-τριχλωριούχο ρόδιο
RhNPs	Νανοδοματίδια ροδίου
RhNPs@CA	Νανοδοματίδια ροδίου με επικάλυψη κιτρικών ιόντων
RSD	Συντελεστής σχετικής τυπικής απόκλισης
SEM	Μικροσκοπία σάρωσης ηλεκτρονίων
Si	Πυρίτιο
SPEs	Εκτυπωμένα ηλεκτρόδια
TA	Ταννικό οξύ
t-BC	Τετραβουτυλ-κινναμωμικό οξύ
TCC	Ολική περιεκτικότητα κατεχινών
TMB	3,3',5,5'-τετραμεθυλοβενζιδίνη
TPC	Ολική περιεκτικότητα φαινολικών ενώσεων
UV	Ακτινοβολία υπεριώδους
UV-Vis	Ακτινοβολία υπεριώδους-ορατού
VA	Βανιλλικό οξύ
V _{max}	Μέγιστος ρυθμός αντίδρασης
XPS	Φωτοηλεκτρονική φασματομετρία ακτίνων-X

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

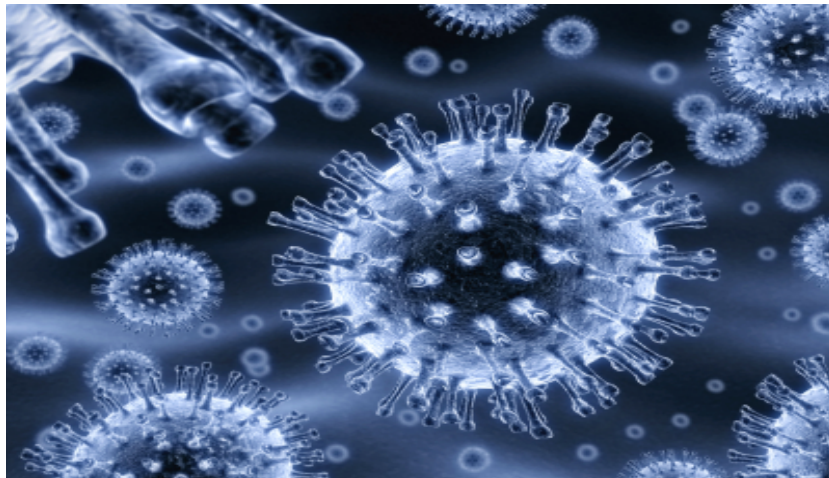


ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

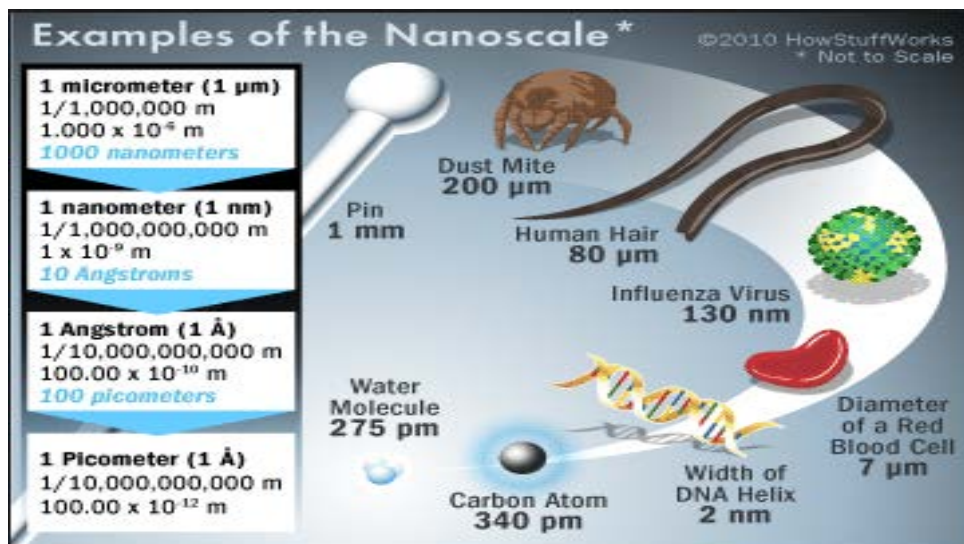
1.1 Εισαγωγή στην νανοτεχνολογία-νανοχημεία

Κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας του 20^{ου} αιώνα, τα νανοϋλικά βρέθηκαν στο επίκεντρο της έρευνας και έδωσαν ξεχωριστή ώθηση στην ανάπτυξη της επιστήμης των υλικών, η οποία στηρίζει πλέον σε μεγάλο βαθμό την πρόοδό της στην εφαρμογή των νανοϋλικών ως τη νέα γενιά λειτουργικών υλικών. Μέσα σε ένα σύντομο χρονικό διάστημα, έχουν συσσωρευτεί πολλές γνώσεις σχετικά με τη σύνθεση και τις ιδιότητες των διάφορων νανοσωματιδίων, με αποτέλεσμα νέες τεχνολογίες και εφαρμογές να αναπτύσσονται καθημερινά.



Εικόνα 1.1. Δομή νανοσωματιδίου [Deerika M., 2015]

Με τον όρο νανοεπιστήμη εννοούμε την επιστήμη που ασχολείται με την δημιουργία, την παραγωγή, τον χειρισμό και την απεικόνιση υλικών που έχουν τουλάχιστον μία χωρική διάσταση στην κλίμακα μεγέθους 1-100 nm. Η νανοτεχνολογία αποτελεί μία συσκευή ή μηχανήμα, προϊόν ή διαδικασία, που βασίζεται σε ατομικά ή πολλαπλά ολοκληρωμένα συστατικά νανοκλίμακας.



Εικόνα 1.2. Παραδείγματα μεγεθών στην νανοκλίμακα.

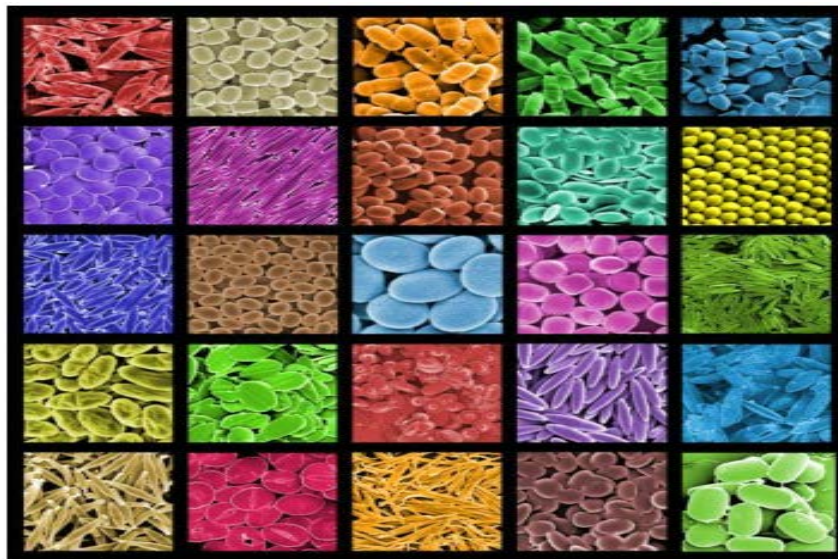
Όσον αφορά την νανοχημεία, με την ευρύτερη έννοια του όρου, το κυρίαρχο χαρακτηριστικό της είναι η αξιοποίηση της συνθετικής χημείας για να δημιουργήσει δομικές μονάδες νανοκλίμακας διαφορετικού μεγέθους και σχήματος, δομής, επιφάνειας, φορτίου και λειτουργικότητας. Αυτές οι δομικές μονάδες μπορούν να είναι χρήσιμες από μόνες τους ή μπορούν να σχηματίζουν αρχιτεκτονικές που παρουσιάζουν μια «έξυπνη» λειτουργία και προορίζονται για συγκεκριμένη χρήση [Ozin A.G., et al., 2009].

1.2 Νανοςωματίδια : Δομικές μονάδες νανοτεχνολογίας

Ως νανοςωματίδια ορίζονται τα σωματίδια με μέγεθος από 1 έως 100 nm, τουλάχιστον σε μία από τις τρεις διαστάσεις (πλάτος, μήκος ή πάχος). Σε αυτό το εύρος μεγέθους, οι φυσικές, χημικές και βιολογικές ιδιότητές τους αλλάζουν με θεμελιώδεις τρόπους από τις ιδιότητες των μεμονωμένων ατόμων/μορίων.

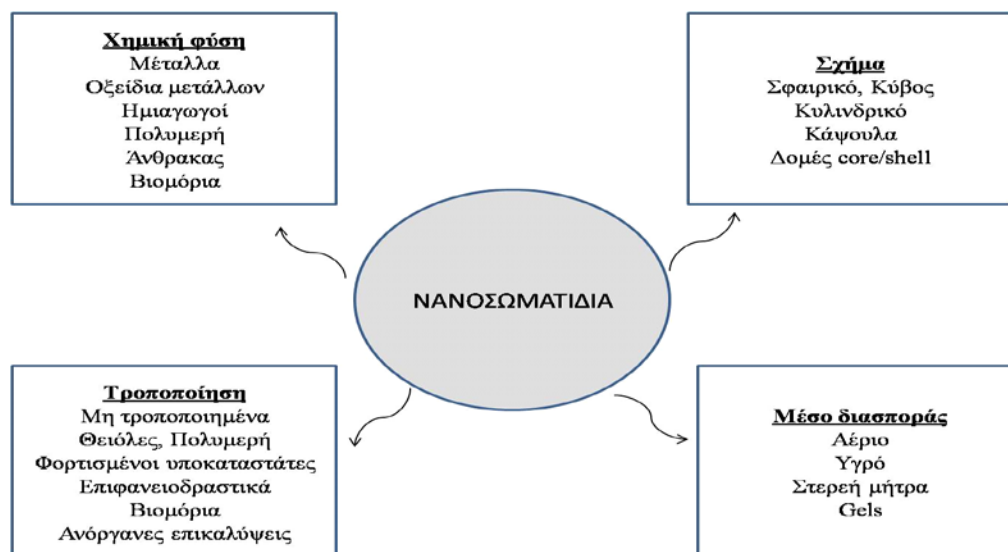
Τα νανοςωματίδια μπορούν να παρασκευαστούν από διάφορες χημικές ενώσεις όπως μέταλλα, οξείδια μετάλλων, πυριτικά άλατα, πολυμερή, οργανικά μόρια, άνθρακα

και βιομόρια. Εμφανίζονται με μορφή διάφορων γεωμετρικών σχημάτων [Nagarajan R., et al., 2008]. Κάποιες από αυτές τις γεωμετρικές μορφολογίες είναι οι μονοδιάστατοι ράβδοι, νανοσωλήνες, τα νανοφύλλα δύο διαστάσεων, οι τρισδιάστατες νανοκυψέλες, κ.α. (**Εικόνα 1.3**). Τα νανοσωματίδια αποτελούν την πιο σταθερή θερμοδυναμικά μορφή σε σύγκριση με τα υπόλοιπα υλικά νανοκλίμακας λόγω της μικρότερης επιφανειακής ενέργειας. Συνήθως, ακολουθεί επιφανειακή τροποποίησή τους, ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ειδικές εφαρμογές. Η πιο σημαντική ίσως ιδιότητά τους είναι ότι αυτά τα υλικά, συμπεριφέρονται σαν μόρια από την άποψη της διαλυτότητας τους και την δυνατότητα της κρυστάλλωσης σε υπερδομές.



***Εικόνα 1.3.** Νανοσωματίδια διαφόρων σχημάτων και μεγεθών.*

Η χημική φύση, η μορφολογία, το μέσο διασποράς, η κατάσταση διασποράς και η επιφανειακή τροποποίηση (**Εικόνα 1.4**) είναι παράγοντες που οδηγούν στο σχηματισμό μεγάλης ποικιλίας νανοσωματιδίων [Tan Y., et al., 2004, Nagarajan R., et al., 2008].



Εικόνα 1.4. Διάφορα χαρακτηριστικά που συμβάλλουν στην ποικιλομορφία των σχηματιζόμενων νανοσωματιδίων. Η ίδια χημική ουσία μπορεί να δημιουργήσει μια ευρεία ποικιλία νανοσωματιδίων.

1.3. Ιδιότητες Νανοσωματιδίων

Τα δομικά χαρακτηριστικά των νανοϋλικών κυμαίνονται μεταξύ των χαρακτηριστικών τους ατόμων και της κύριας πρώτης ύλης από την οποία κατασκευάζονται. Ενώ τα περισσότερα μικροδομημένα υλικά έχουν παρόμοιες ιδιότητες με την αντίστοιχη πρώτη ύλη, οι ιδιότητες των υλικών με νανομετρικές διαστάσεις είναι πολύ διαφορετικές από εκείνες των ατόμων και των αρχικών υλικών. Αυτό οφείλεται κυρίως στο μέγεθος των νανοδομημένων υλικών τα οποία διαθέτουν υψηλή επιφανειακή ενέργεια, περιορισμένη χωροταξική διάταξη, και λιγότερες ατέλειες σε αντίθεση με την πρώτη ύλη. Οι σημαντικότερες ιδιότητες των νανοϋλικών είναι οι εξής :

α) Οπτικές Ιδιότητες : μία από τις πιο χρήσιμες και συναρπαστικές πτυχές των νανοϋλικών αποτελούν οι οπτικές τους ιδιότητες. Οι οπτικές ιδιότητες των νανοϋλικών εξαρτώνται από παραμέτρους όπως το χαρακτηριστικό μέγεθος, το σχήμα, τα

χαρακτηριστικά της επιφάνειας αλλά και η αλληλεπίδραση με το περιβάλλον ή άλλες νανοδομές [Alagarasi A., 2009].

Οι οπτικές ιδιότητες αποτελούν ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό ενός νανοσωματιδίου. Για παράδειγμα, ένα νανοσωματίδιο χρυσού 20 nm έχει ένα χαρακτηριστικό κόκκινο χρώμα, όπως το κρασί. Ένα νανοσωματίδιο αργύρου είναι κιτρινωπό-γκρι. Τα νανοσωματίδια πλατίνας και παλλαδίου είναι μαύρα. Δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι τα οπτικά χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων έχουν χρησιμοποιηθεί πριν από τον 4^ο αιώνα μ.Χ. σε γλυπτά και πίνακες ζωγραφικής. Το πιο γνωστό παράδειγμα αποτελεί το κύπελλο Lycurgus (τέταρτος αιώνας μ.Χ.) που απεικονίζεται στην **εικόνα 1.5**.

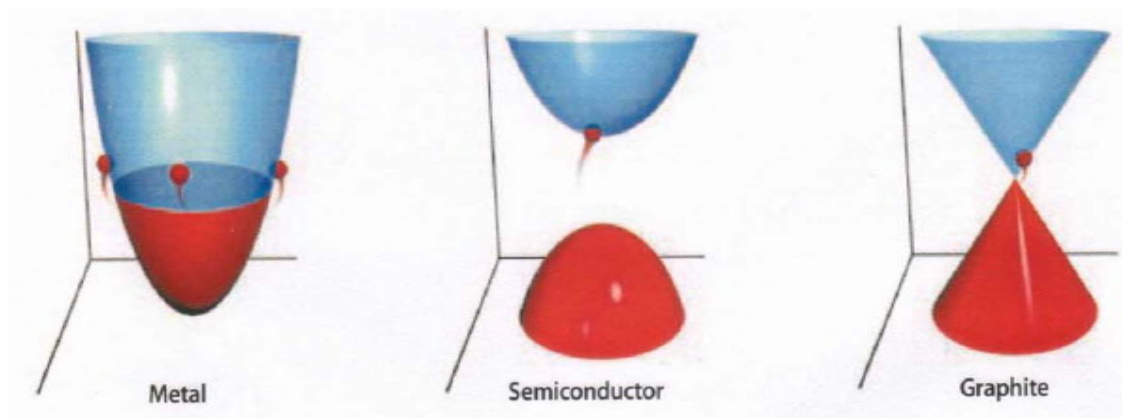


Εικόνα 1.5. Φωτογραφίες της διάσημης "κούπας-κύπελλο του Λυκούργου" (*Lycurgus cup*) που εμφανίζει διαφορετικό χρώμα ανάλογα με το αν φωτίζεται (α) εξωτερικά ή (β) εσωτερικά.

Αυτό το εξαιρετικό κύπελλο είναι το μοναδικό ιστορικό παράδειγμα ενός πολύ ιδιαίτερου τύπου γυαλιού, γνωστού ως διχρωμικού γυαλιού, που αλλάζει χρώμα με το φως. Το αδιαφανές πράσινο χρώμα του μετατρέπεται σε λαμπερό ημιδιαφανές κόκκινο

όταν το εσωτερικό του το διαπερνά το φως (δηλαδή το φως φτάνει στο κύπελλο 90° προς την κατεύθυνση θέασης) [Horikoshi S., et al., 2013].

β) Ηλεκτρικές ιδιότητες : Οι ηλεκτρικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων σχετίζονται με τις βασικές αρχές της ηλεκτρικής αγωγιμότητας σε νανοσωλήνες και νανοράβδους, σε νανοσωλήνες άνθρακα, στην φωτοαγωγιμότητα των νανοραβδών, και στην ηλεκτρική αγωγιμότητα των νανοςύνθετων υλικών. Μία ενδιαφέρουσα μέθοδος που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για να αποδείξει την αγωγιμότητα είναι η μηχανική σμίκρυνση ενός νανοσωλήνα και η μέτρηση του ηλεκτρικού ρεύματος σε μια σταθερή εφαρμοζόμενη τάση. Το σημαντικό σημείο εδώ είναι ότι με τη μείωση της διαμέτρου του σύρματος ο αριθμός των ηλεκτρικών κυμάτων που συμβάλλουν στην ηλεκτρική αγωγιμότητα γίνεται όλο και μικρότερος από καλά καθορισμένα κβαντισμένα στάδια. Σε ηλεκτρικά αγωγίμους νανοσωλήνες άνθρακα παρατηρείται μόνο ένα είδος ηλεκτρονικών κυμάτων που μεταφέρουν το ηλεκτρικό ρεύμα.



Εικόνα 1.6. Ηλεκτρική συμπεριφορά νανοσωλήνων [Collins P.G., et al., 2000].

γ) Μηχανικές ιδιότητες : Οι "μηχανικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων" σχετίζονται με την πρόδρομη μεταλλική και κεραμική πρώτη ύλη, την επίδραση του

πορώδους, την επίδραση του μεγέθους των κόκκων, την υπερπλαστικότητα, τα σύνθετα πολυμερή, τα νανοσύνθετα πολυμερή, τα σύνθετα πολυμερή με νανοσωλήνες άνθρακα. Η μελέτη των μηχανικών ιδιοτήτων των νανοϋλικών είναι, σε κάποιο βαθμό, μικρού ενδιαφέροντος, γιατί είναι δύσκολη η παραγωγή μακροσκοπικών σωμάτων με υψηλή πυκνότητα και μέγεθος κόκκων στην περιοχή κάτω των 100 nm. Ωστόσο, διάφορα πολυμερή υλικά, τα οποία δεν παράγονται με πίεση και πυροσυσσωμάτωση, έχουν παρουσιάσει πολύ μεγάλο ενδιαφέρον, καθώς θα έχουν αναμφίβολα μεγάλη βιομηχανική σημασία. Αυτά τα πολυμερή υλικά περιέχουν νανοσωματίδια ή νανοσωλήνες για να βελτιώσουν τη μηχανική τους συμπεριφορά. Ωστόσο, λόγω του μεγάλου μεγέθους των κόκκων τους, δεν γίνονται γενικά αποδεκτά ως νανοϋλικά.

δ) Μαγνητικές ιδιότητες : Ο χρυσός και ο λευκόχρυσος ως πρώτη ύλη μετάλλων δεν είναι μαγνητικά υλικά, αλλά σε μεγέθη της νανοκλίμακας εμφανίζουν μαγνητικές ιδιότητες. Στην περίπτωση του Pt και Pd, ο σιδηρομαγνητισμός προκύπτει από τις δομικές αλλαγές που σχετίζονται με τις αλλαγές του μεγέθους [Alagarasi A., 2009].

Επίσης, διαπιστώθηκε ότι ορισμένες ιδιότητες των μεταλλικών νανοσωματιδίων μπορεί να είναι συγκρίσιμες με εκείνες των ημιαγωγικών σωματιδίων. Δεν υπάρχουν βασικές διαφορές μεταξύ των μεταλλικών και των ημιαγωγικών νανοσωματιδίων, δεδομένου ότι πολλές ιδιότητες των ημιαγωγικών νανοσωματιδίων, όπως για παράδειγμα, η ευαισθησία των φωτοαντιδράσεων, οι αλλαγές στις ηλεκτρονικές ιδιότητες κατά την τροποποίηση της επιφάνειας και η εκπομπή φωτοηλεκτρονίων, μπορούν να ισχύουν και για τα μεταλλικά νανοσωματίδια.

ε) Καταλυτικές ιδιότητες : Τα κolloειδή εναιωρήματα των μεταλλικών νανοσωματιδίων συνήθως λειτουργούν σε σχετικά χαμηλή θερμοκρασία ως ομοιογενείς

καταλύτες. Σε αυτό το σημείο, τα μεταλλικά νανοσωματίδια είναι παρόμοια με τα ένζυμα και θεωρούνται συχνά ως τεχνητά ένζυμα. Τα νανοσωματίδια θεωρούνται επίσης ως ένα μοντέλο βιομηχανικών καταλυτών στα πλαίσια της πράσινης χημείας (λιγότερη ενέργεια, λιγότερα παραπροϊόντα, περισσότερη αποτελεσματικότητα, υψηλή εκλεκτικότητα, κτλ). Έτσι τα μεταλλικά νανοσωματίδια θα μπορούσαν να προωθήσουν την ύπαρξη και τη χρήση ιδανικών καταλυτών.

Ένας καταλύτης μεταλλικών νανοσωματιδίων παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με τους συμβατικούς καταλύτες, όπως:

- α) τα κολλοειδή εναιωρήματα μπορούν να σχηματίσουν ομοιογενή διαλύματα,
- β) η προστασία που παρέχεται (μέσω για παράδειγμα μιας επίστρωσης πολυμερούς) μπορεί να λειτουργήσει σαν ασπίδα των μεταλλικών νανοσωματιδίων ως καταλύτη, για δηλητήρια καταλυτών ή τον αέρα,
- γ) οι προστατευτικές ομάδες μπορούν να αλληλεπιδράσουν ελκτικά ή απωθητικά με τα υποστρώματα, με αποτέλεσμα την υψηλή εκλεκτικότητα και/ή κάποιες φορές την υψηλή ενεργότητα, και
- δ) τα κολλοειδή εναιωρήματα των μεταλλικών νανοσωματιδίων μεταδίδουν φως πιο εύκολα από ότι σε στερεά μορφή.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ

2.1 Μέθοδοι σύνθεσης νανοσωματιδίων

Η ακριβής σύνθεση των κolloειδών διαλυμάτων δεν είναι ποτέ απλή δεδομένου ότι οι μικρές αλλαγές στη διαδικασία σύνθεσης μπορούν να οδηγήσουν σε εντελώς διαφορετικά αποτελέσματα. Επιπλέον, η χημική διαδικασία παρασκευής νανοκolloειδών διαλυμάτων, μπορεί να παράγει νανοσωματίδια με διαφορετική κρυσταλλική δομή. Τα μεταλλικά νανοσωματίδια των ευγενών μετάλλων παρασκευάζονται φυσικά ή χημικά, από άτομα ευγενών μετάλλων, και στη συνέχεια λαμβάνει χώρα μία διεργασία συσσωμάτωσης (μέθοδοι διασποράς και συμπύκνωσης) των ατόμων των ευγενών μετάλλων παρουσία ή απουσία προστατευτικών ομάδων όπως τα πολυμερή, οι επιφανειοδραστικές ουσίες, ή ισχυρά συνδετικοί υποκαταστάτες.

Η μελέτη και ο έλεγχος του μεγέθους και του σχήματος των νανοσωματιδίων των ευγενών μετάλλων δεν έχουν μόνο θεωρητική σημασία στον τομέα των νανοϋλικών, αλλά βοηθούν σημαντικά στη διαμόρφωση των καταλυτικών, όπως και κάποιων άλλων ιδιοτήτων των μεταλλικών νανοσωματιδίων. Μεγάλο μέρος της έρευνας έχει κατευθυνθεί στην παρασκευή μεταλλικών νανοσωματιδίων ελεγχόμενου σχήματος. Στις αναφερόμενες χημικές συνθετικές πορείες υπάρχουν δύο είδη μεθόδων για να ελεγχθεί η μορφολογία των μεταλλικών νανοσωματιδίων. Η μία μέθοδος βασίζεται στην σταδιακή αναγωγή των μεταλλικών ιόντων ή των συμπλόκων των μετάλλων ενώ η άλλη μέθοδος βασίζεται στη χρήση κατάλληλων προστατευτικών παραγόντων και αναγωγικών μέσων.

Οι Πίνακες 2.1 και 2.2 [Tan Y., et al., 2004] παρουσιάζουν πρόσφατες ερευνητικές δραστηριότητες που αφορούν τη σύνθεση νανοσωματιδίων ευγενών μετάλλων.

Πίνακας 2.1. Συνθετικές πορείες νανοσωματιδίων ευγενών μετάλλων με εξαίρεση τη χημική αναγωγή [Tan Y., et al., 2004].

Ευγενές μέταλλο	Συνθετική πορεία
Cu (5–100 nm)	Εκτομή με λέιζερ
Cu (20–100 nm)	γ-ραδιόλυση
Cu (7.5 nm)	Θερμική διάσπαση
Cu (elongated)	Ηχοχημική σύνθεση
Ag (4–40 nm)	Εκτομή με λέιζερ
Ag (4–6 nm)	Εξάτμιση μετάλλων
Ag (13–34 nm)	Ηχοχημική σύνθεση
Ag (6.5–12.5 nm)	γ-ραδιόλυση
Ag (2–120 nm)	γ-ραδιόλυση
Ag (5–10 nm)	UV ακτινοβολία
Ag (10–20 nm)	UV ακτινοβολία
Ag (~4 nm)	UV ακτινοβολία
Ag (nanoprism)	Φθορισμός
Au (1–10 nm)	Εκτομή με λέιζερ
Au (1.7–5.5 nm)	Εκτομή με λέιζερ
Au (10–30 nm)	Εξάτμιση μετάλλων
Au (7–15 nm)	Εξάτμιση μετάλλων
Au (~2 nm)	Εξάτμιση μετάλλων

Au (2–10 nm)	Εξάτμιση μετάλλων
Au (2–9, 60 ± 30 nm)	Ηχοχημική σύνθεση
Au (15–22 nm)	γ-ραδιόλυση
Au (7.5–12.5 nm)	UV ακτινοβολία
Au (10–20 nm)	UV ακτινοβολία
Au (~6 nm)	UV ακτινοβολία
Au (0.2–5 nm)	UV ακτινοβολία
Au (triangle, hexagon)	UV ακτινοβολία
Au (platelets)	UV ακτινοβολία
Pt (1.7–3.5 nm)	Ηχοχημική σύνθεση
Pt (1–10 nm)	Ηχοχημική σύνθεση
Pt (1–3 nm)	γ-ραδιόλυση
Pt (1.1 nm)	UV ακτινοβολία
Pt (0–5 nm)	UV ακτινοβολία
Pt (2–4 nm)	Μικροκυματική ακτινοβολία
Pt (0.6–2.2 nm)	Μικροκυματική ακτινοβολία
Pt (2.5–5.0 nm)	Ηλεκτροχημική αναγωγή
Pd (8 nm)	Εξάτμιση μετάλλων
Pd (6–110 nm)	Ηχοχημική σύνθεση
Pd (1–6 nm)	Ηχοχημική σύνθεση
Pd (0.1–12 nm)	Ηχοχημική σύνθεση
Pd (2.0–40 nm)	UV ακτινοβολία
Pd (0.6–3.0 nm)	Μικροκυματική ακτινοβολία
Pd (1.4–4.8 nm)	Ηλεκτροχημική αναγωγή
Pd (8–10 nm)	Θερμική διάσπαση του συμπλόκου του Pd

Ru (3.5 nm)	Ηλεκτροχημική αναγωγή
Rh (2.5 nm)	Ηλεκτροχημική αναγωγή
Os (2.0 nm)	Ηλεκτροχημική αναγωγή
AgcoreAushell	γ-ραδιόλυση
AucoreAgshell (60 nm)	UV ακτινοβολία
AucorePtshell	γ-ραδιόλυση
PtcoreAushell	γ-ραδιόλυση
Ag/Pt alloy	γ-ραδιόλυση
Ag/Pd alloy (3–11 nm)	UV ακτινοβολία
Au/Pt alloy (1.6–13.6 nm)	γ-ραδιόλυση
Pt/Cu alloy (2.5 nm)	Ηλεκτροχημική αναγωγή
Pt/Pd alloy (3.5 nm)	Ηλεκτροχημική αναγωγή

Πίνακας 2.2. Διαδικασίες χημικής αναγωγής νανοσωματιδίων ευγενών μετάλλων με διαφορετικούς αναγωγικούς και σταθεροποιητικούς παράγοντες [Tan Y., et al., 2004].

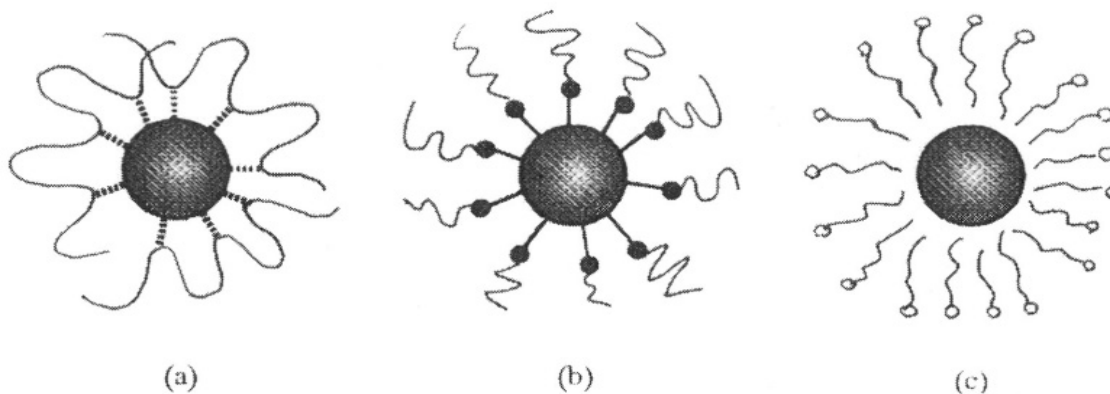
Ευγενές μέταλλο (διασπορά nm)	Αναγωγικός Παράγοντας	Σταθεροποιητής
Cu (<5 nm)	H ₂	carbonnanotube (templateandsupport)
Cu (4.8–15.0 nm)	NaBH ₄	PVP, PVA, dextrin, amylopectin, cellulose
Cu (<1.8 nm)	NaBH ₄	Polyamidoamine
Cu (<5 nm)	NaBH ₄	Alkylxanthate
Cu (4.5–6.0 nm)	N ₂ H ₄	Polyamidoamine
Cu (6.6–22.7, 15.5–30.2 nm)	N ₂ H ₄ · H ₂ O	PVP
Cu (4–7, 6–9, 3–12 nm)	N ₂ H ₄	AOT reverse micelles
Cu (3–30 nm)	N ₂ H ₄ · H ₂ O	Methanol
Cu (5–40 nm)	NaBH ₄	glycerol monooleate
Cu (5.5–12.5 nm)	NaBH ₄	AOT reverse micelles
Ag (5–20 nm)	Methanol	poly[(vinyl alcohol)-co-(N-vinylpyrrolidone)]
Ag (3.3 nm)	KBH ₄	polystyrene- <i>b</i> -poly(ethylene oxide)
Ag (1.6–38.6 nm)	KBH ₄	cationic polyelectrolytes
Ag (<5 nm)	NaBH ₄	Polyamidoamine

Ag	NaBH ₄ , N ₂ H ₄	polystyrene- <i>b</i> -polyvinylpyridine
Ag (4–12 nm)	NaBH ₄	unsaturated long-chain carboxylate
Ag (4–9 nm)	NaBH ₄	substituted long-chain alkanethiol
Ag (2–20 nm)	N ₂ H ₄	anisic acid
Ag (hexagonal nanoplate)	N ₂ H ₄	Aniline
Ag (1–9.4 nm)	N ₂ H ₄	AOT reverse micelles
Ag (1–3 nm)	Cu nanocluster	Polyamidoamine
Ag (10–60 nm)	Formaldehyde	sodium dodecylbenzenesulfonic acid
Ag (25 nm)	Tannins	carboxylated polystyrene latex
Ag (20–30 nm)	NaH ₂ PO ₂ –tannins	carboxylated polystyrene latex
Ag (nanodisk)	aging of triangular Ag nanoplate	CTAB
	<i>N,N</i> -dimethyl formamide	PVP
Ag (polygonal nanoprism)	ascorbic acid	CATB
Ag (truncated triangular nanoplate)	(seed-mediated growth)	
Ag (3–16, 40–60 nm)	Citrate	Citrate
Ag (2.5–25 nm)	nonionic surfactant	nonionic surfactant
Ag (1.5–5 nm)	Triethylamine	Dodecanethiol
Au	CO	polyvinyl sulfate
Au (2–14 nm)	ethylene glycol	PVP
Au (1–8 nm)	(CH ₃) ₂ NH · BH ₃	Polyamidoamine
Au (3 nm)	KBH ₄	polystyrene- <i>b</i> -poly(methacrylic acid)
Au (5 nm)	KBH ₄	polystyrene- <i>b</i> -poly(ethylene oxide)
Au (1.8–3.7 nm)	NaBH ₄	Polyamidoamine
Au (1.0–4.2 nm)	tetra(hydroxymethyl) phosphonium chloride	tetra(hydroxymethyl) phosphonium Chloride
Au (5.1–7.4 nm)	NaBH ₄	Polymethylphenylphosphazene
Au (1–3 nm)	NaBH ₄	Alkanethiol
Au (5.5 nm) (refluxing with thiol)	NaBH ₄	Alkanethiol
Au (4.5–10.5 nm)	NaBH ₄	tetraalkylammonium halide
Au (0–6 nm)	Dimethylamineborane	hydrophobic polyamidoamine
Au (1–3 nm)	Cu, Ag nanocluster	Polyamidoamine
		CTAC, SDS, hexadecylpyridinium chloride
Au (15–40 nm)	N ₂ H ₄	polystyrene- <i>b</i> -polyvinylpyridine
Au (9 nm)	N ₂ H ₄	
Au (18, 32, 41, 56, 116 nm)	NH ₂ OH (seed-mediated growth)	sodium citrate
Au	ascorbic acid	sodium citrate
	(seed-mediated growth)	
Au (10–900 nm)	sodium citrate	sodium citrate
Au (26–36 nm)	Formamide	PVP
Au (20, 50–200 nm)	Polyaniline	<i>N</i> -methyl-2-pyrrolidone, polyaniline
Au (0–3 nm)	<i>o</i> -anisidine	<i>N</i> -methyl-2-pyrrolidone, (C ₇ H ₁₅) ₄ NBr
Au (platelets)	potassium bitartrate	thiocyanuric acid
Au (~15 nm)	Oligothiophene	Polyelectrolytes
Pt (1–5 nm)	Methanol	PVA, PVP, poly(methyl vinyl ether)
Pt (1.7–2.2 nm)	methanol, ethanol	Polyelectrolytes
		poly[(vinyl alcohol)-co-(<i>N</i> -vinylpyrrolidone)]
Pt (2–4 nm)	Methanol	polystyrene- <i>b</i> -poly(methacrylic acid)
Pt (2.2, 2.8 nm)	Ethanol	polystyrene- <i>b</i> -poly(ethylene oxide)
Pt (2.6, 2.8 nm)	Ethanol	poly(<i>N</i> -isopropylacrylamide)
Pt (0.25–5.5 nm)	Ethanol	poly(<i>N</i> -vinylisobutyramide)
Pt (0.5–4.5 nm)	Ethanol	

Pt (1.9–3.3 nm)	alcohol (MeOH, EtOH, 1-PrOH)	PVP
Pt (0.4–3.6 nm)	H ₂	PVP
Pt (0–15.0 nm)	H ₂	SDS, dodecyltrimethylammonium chloride
Pt (5–10 nm)	H ₂	sodium citrate, NaOH
Pt (cube, tetrahedron, icosohedron, cubic octahedron, irregular prism)	H ₂	sodium polyacrylate
Pt (5–8 nm)	H ₂	sodium polyacrylate, polyphosphate
Pt (1–3, 3–5 nm)	H ₂	polyethyleneoxide–polyethyleneimine
Pt (3–10 nm) (cube)	H ₂	Oxalate
Pt (cube)	H ₂	poly(N –isopropylacrylamide)
Pt (1.2, 1.5 nm)	CO	nitrocellulose, cellulose acetate
Pt (0.8–2.0 nm)	ethylene glycol	ethylene glycol
Pt (0–5.5 nm)	ethylene glycol	poly(N –sulfonatopropyl–p–benzamide)
Pt (2–12 nm)	ethylene glycol formaldehyde, benzaldehyde	PVP
Pt (0.25–3 nm)	benzaldehyde	trioctylmethylammonium chloride, TOPO
Pt (1.3–2.2 nm)	KBH ₄	Polyelectrolytes
Pt (3.3 nm)	KBH ₄	polystyrene–b–poly(methacrylic acid)
Pt (2.2 nm)	KBH ₄	polystyrene–b–poly(ethylene oxide)
Pt (0.25–4.5 nm)	NaBH ₄	poly[(vinylamine)–co–(N - vinylisobutyramide)]
Pt (0.5–4.0 nm)	NaBH ₄	Polyamidoamine
Pt (3–10 nm) (cubic)	NaBH ₄ (0 °C)	
Pt (2–5 nm) (highly faceted)	LiBH ₄ , LiB(C ₂ H ₅) ₃ H, LiAlH ₄	nonionic surfactants
Pt (1.3 nm)	Dimethylamineborane	Polyamidoamine
Pt	N ₂ H ₄ · H ₂ SO ₄	PVA
Pt (2.5–4.0 nm)	N ₂ H ₄	cetyltrimethylammonium bromide
Pt (2.5–3.5 nm)	N ₂ H ₄	pentaethylene glycol dodecyl ether
Pt (1–5 nm)	Li (or Na,K)[B(Et) ₃ H], H ₂ , LiH, BEt ₃	tetraalkylammonium halide
Pt (1–3 nm)	Cu, Ag nanocluster	Polyamidoamine
Pt (2.0–4.0 nm)	sodium citrate	sodium citrate
Pd (1.0, 3.4, 7.8 nm)	Ethanol	polystyrene–b–poly(methacrylic acid)
Pd (2.1, ~5, 6)	Ethanol	polystyrene–b–poly(ethylene oxide)
Pd (1–4 nm)	alcohol (MeOH, EtOH, 1-PrOH)	PVA, PVP, poly(methyl vinyl ether)
Pd (7.5 nm)	Methanol	PVP
Pd (1.5–7 nm)	Ethanol	Polyacids
Pd (10, 19 nm)	ethylene glycol	PVP
Pd (1–12 nm)	H ₂	polyethyleneoxide–polyethyleneimine
Pd (1.7–3.7 nm)	H ₂	PVP
Pd (1.0 nm)	CO	PVP
Pd (3.5 nm)	CO	nitrocellulose, cellulose acetate
Pd (5–15 nm)	N ₂ H ₄	poly(acrylic acid)
Pd (5 nm)	N ₂ H ₄	pentaethylene glycol dodecyl ether
Pd (2.7–10.7 nm)	N ₂ H ₄	CTAB, SDS, polyoxyethylene isoocetyl phenyl ether
Pd (3.3 nm)	N ₂ H ₄	polystyrene–b–polyvinylpyridine
Pd (6.5 nm)	N ₂ H ₄	polystyrene–block–poly–m– vinyltriphenylphosphine
Pd (1.0–3.7 nm)	KBH ₄	Polyelectrolytes

Pd (1.3–2.1 nm)	KBH ₄	polystyrene–b–poly(methacrylic acid)
Pd (1.7–3.6 nm)	KBH ₄	polystyrene–b–poly(ethylene oxide)
Pd (1–3 nm)	NaBH ₄	Polyamidoamine
Pd (1–2.7 nm)	NaBH ₄ , LiB(C ₂ H ₅) ₃ H	polystyrene–b–polyvinylpyridine
Pd (2.7–9.3 nm)	NaBH ₄	CTAB, SDS, polyoxyethylene isoocetyl phenyl ether
Pd (1–2 nm)	LiB(C ₂ H ₅) ₃ H	polystyrene–block–poly–m–
Pd (1–5 nm)	NaBH ₄	vinyltriphenylphosphine
	Li (or Na,K)[B(Et) ₃ H],	Alkanethiolate
Pd (1–6 nm)	H ₂ ,	tetraalkylammonium halide

Όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε από τους παραπάνω πίνακες τα περισσότερα νανοσωματίδια τροποποιούνται με κατάλληλα χημικά μόρια μεγάλου ή μικρού μοριακού βάρους που δρουν ως σταθεροποιητές. Πολλά είδη χημικών ενώσεων έχουν χρησιμοποιηθεί ως σταθεροποιητές για μεταλλικά νανοσωματίδια. Σε αρκετά κολλοειδή εναιωρήματα μετάλλων έχουν χρησιμοποιηθεί φορτισμένα μόρια (ανιόντα ή κατιόντα) που επιτυγχάνουν την σταθεροποίηση μέσω ηλεκτρικής άπωσης. Μία άλλη μέθοδος για τη σταθεροποίηση του εναιωρήματος των μεταλλικών σωματιδίων είναι η χωρική άπωση μεταξύ των σταθεροποιητών που προσροφώνται στα μεταλλικά σωματίδια. Τα υδατοδιαλυτά πολυμερή χρησιμοποιούνται συχνά για τον σκοπό αυτό (**Εικόνα 2.1a**).



Εικόνα 2.1. Μεταλλικά νανοσωματίδια που σταθεροποιούνται από πολυμερή (α), υποκαταστάτες χαμηλού μοριακού βάρους (β), μικύλλια (γ).

Ειδικά οι πολυμερικοί σταθεροποιητές μπορούν να αλληλεπιδρούν με τα μεταλλικά σωματίδια σε πολλές θέσεις. Η πολυ-αλληλεπίδραση αυτή οδηγεί σε ισχυρή προσρόφηση του μορίου του πολυμερούς στην επιφάνεια του μεταλλικού σωματιδίου. Στην περίπτωση των μορίων με μικρό μοριακό βάρος, ο δεσμός μεταξύ του μορίου και του μεταλλικού σωματιδίου πρέπει να είναι πολύ ισχυρός (**Εικόνα 2.1b**). Σε αντίθετη περίπτωση, ο σταθεροποιητής μπορεί να αποσπαστεί από την επιφάνεια των μεταλλικών νανοσωματιδίων με αποτέλεσμα τη συσσωμάτωση των νανοσωματιδίων.

Μικρά οργανικά μόρια μπορούν επίσης να λειτουργήσουν ως σταθεροποιητές. Σε αυτή την περίπτωση πολλά οργανικά μόρια συνδέονται ισχυρά στην επιφάνεια των μεταλλικών σωματιδίων ως υποκαταστάτες του μετάλλου. Αν τα μόρια χαμηλού μοριακού βάρους αλληλεπιδρούν ισχυρά με την επιφάνεια του μετάλλου σαν σταθεροποιητές, το υπόστρωμα δεν μπορεί να προσεγγίσει την επιφάνεια και καμία αντίδραση δεν καταλύεται στην επιφάνεια των μεταλλικών νανοσωματιδίων. Παρόλα αυτά, τα μεταλλικά νανοσωματίδια μπορούν να λειτουργήσουν ως καταλύτες όταν η αλληλεπίδραση μεταξύ των σταθεροποιητικών οργανικών μορίων και των μεταλλικών σωματιδίων δεν είναι αρκετά ισχυρή για να εμποδίσει την προσέγγιση των υποστρωμάτων. Σε αυτή την περίπτωση τα μεταλλικά νανοσωματίδια σταθεροποιούνται με τη χρήση μικκυλίων (**Εικόνα 2.1c**). Σε αυτή την περίπτωση τα μόρια του υποστρώματος μπορούν να προσεγγίσουν την επιφάνεια των μεταλλικών νανοσωματιδίων [Toshima N., et al., 2004].

2.2 Φυσικές και χημικές μέθοδοι σύνθεσης νανοσωματιδίων

Οι γενικοί μέθοδοι σύνθεσης των νανοσωματιδίων διαχωρίζονται σε δύο κατηγορίες : τις φυσικές και τις χημικές μεθόδους. Όταν οι μέθοδοι σύνθεσης ξεκινούν

από την κύρια πρώτη ύλη καλούνται top-down μέθοδοι και κάποιες από αυτές είναι : η μηχανική άλεση, η εξάτμιση μετάλλων, η πυρόλυση με λέιζερ, η εκτομή με λέιζερ [Sreepasad S.T., et al., 2013]. Στις top-down μεθόδους, μία εξωτερική δύναμη εφαρμόζεται σε ένα στερεό που οδηγεί στη διάσπασή του σε μικρότερα σωματίδια [Horikoshi S., et al., 2013]. Ελέγχοντας το περιβάλλον στο οποίο θα γίνει η εξάτμιση, μπορούμε να ελέγξουμε τη σύσταση του προκύπτοντος υλικού. Για παράδειγμα, αν η εξάτμιση των μετάλλων πραγματοποιηθεί παρουσία οξυγόνου, μπορούν να παραχθούν οξειδία. Αυτές οι μέθοδοι μπορούν να παρασκευάσουν αποτελεσματικά μεγάλες ποσότητες υλικών. Ωστόσο, αυτές οι μέθοδοι μπορούν να παράγουν μόνο υλικά με μεγάλη κατανομή μεγέθους.

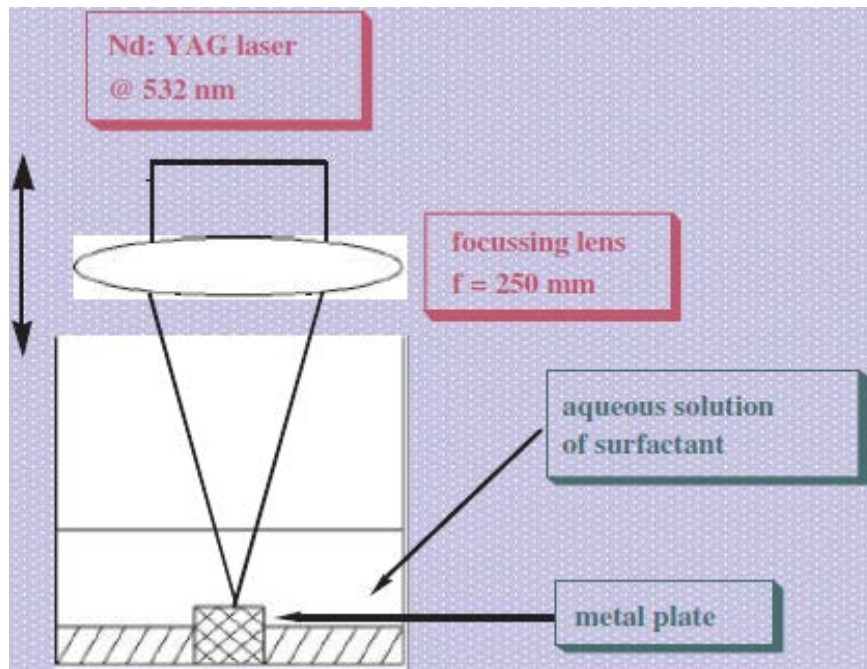
Στις χημικές μεθόδους από την άλλη πλευρά, τα νανοϋλικά παρασκευάζονται από άτομα που προέρχονται από ιόντα, σε διάλυμα, και συσσωματώνονται για να δημιουργήσουν τα νανοϋλικά. Καθώς η σύνθεση ξεκινά από άτομα, αυτές οι μέθοδοι καλούνται *bottom-up* μέθοδοι και σε αυτή την κατηγορία ανήκουν : η χημική αναγωγή, η ηλεκτροχημική σύνθεση, η φωτοχημική σύνθεση, η ηχοχημική σύνθεση, η θερμική διάσπαση, οι βιολογικές μέθοδοι κ.α. Όταν τα νανοςωματίδια προέρχονται από άτομα δημιουργείται ένα κολλοειδές διφασικό σύστημα που αποτελείται από τη διεσπαρμένη φάση και το μέσο διασποράς. Η διεσπαρμένη φάση και το μέσο διασποράς μπορούν να βρίσκονται στην αέρια, στην υγρή, ή στη στερεά κατάσταση εκτός από συνδυασμό αέριο σε αέριο [Sreepasad S.T., et al., 2013].

2.2.1 Φυσικές μέθοδοι : Συμπύκνωση ατμών μετάλλων

Η αρχή των φυσικών μεθόδων είναι η συμπύκνωση ατμών μετάλλων με οργανικούς διαλύτες σε υδατικό ή μη υδατικό μέσο. Αυτές οι μέθοδοι περιλαμβάνουν την εξάτμιση των μετάλλων [Benfield F.W.S., et al., 1973, Klabunde K.J., et al., 1979, Andrews M., et al., 1981, Klabunde K.J., 1992, Klabunde K.J., et al., 1994] και την πυρόλυση με λέιζερ [Rice G.W., 1993, Fojtik A., et al., 1993, Prochazka M., et al., 1997, Neddersen J., et al., 1993, Sibbald M.S., et al., 1996, Yeh M.S., et al., 1999, Mafune F., et al., 2000, Mafune F., et al., 2001, Mafune F., et al., 2002]. Οι ατμοί των μετάλλων συνήθως παράγονται σε μειωμένη πίεση σχετικά πτητικών μετάλλων από μία ωμικά θερμαινόμενη εστία ή δέσμη ηλεκτρονίων και στη συνέχεια συμπυκνώνονται στα τοιχώματα του αντιδραστήρα μαζί με τους οργανικούς ατμούς του διαλύτη, σε χαμηλή θερμοκρασία. Στη συνέχεια, λαμβάνεται μία κολλοειδής διασπορά του μετάλλου με θέρμανση του κατεψυγμένου μίγματος μετάλλου/οργανικού διαλύτη. Με τον τρόπο αυτό ο Klabunde και οι συνεργάτες του παρασκεύασαν διάφορα εναιωρήματα νανοσωματιδίων Au και Pd με μία ευρεία κατανομή μεγέθους 5–30 nm [Lin S.T., et al., 1986, Cardenas-Trivino G., et al., 1987, Klabunde K.J., et al., 1989, Olsen A.W., et al., 1991, Zuckerman E.B., et al., 1989, Klabunde K.J., et al., 1992, Mason (Ed.) T.J., 1990, 1991, 1993]. Τα μηδενικού σθένους παραγόμενα νανοσωματίδια μπορούν να είναι σταθερά για αρκετούς μήνες αλλά η κατανομή μεγέθους είναι δύσκολο να ελεγχθεί.

Οι τεχνικές εκτομής με λέιζερ, ως ένα τυπικό παράδειγμα μίας μεθόδου διασποράς, επιτρέπει την παρασκευή νανοσωματιδίων ευγενών μετάλλων χωρίς τη χρήση κάποιου αναγωγικού παράγοντα. Πιο συγκεκριμένα, μία μεταλλική πλάκα βυθισμένη σε ένα διάλυμα που περιέχει έναν σταθεροποιητή ακτινοβολείται με μία

δέσμη λέιζερ. Τα άτομα του μετάλλου εξατμίζονται και στη συνέχεια υγροποιούνται με τη βοήθεια της ενέργειας του λέιζερ. Η **Εικόνα 2.2** παρουσιάζει τη σχηματική απεικόνιση της τεχνικής εκτομής με λέιζερ για την παρασκευή μεταλλικών νανοσωματιδίων.

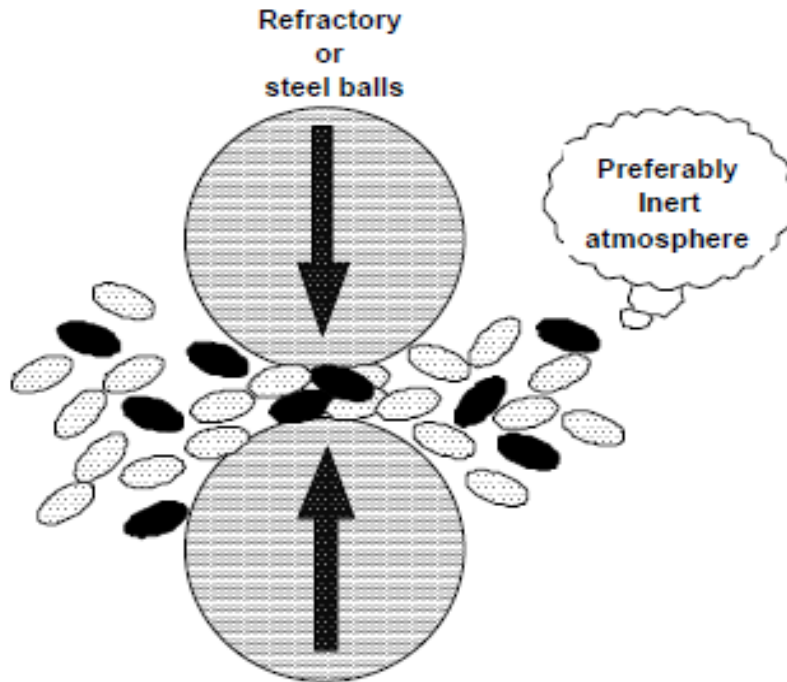


Εικόνα 2.2. Σχηματικό διάγραμμα της πειραματικής συσκευής για εκτομή με laser.

2.2.2 Μηχανική άλεση

Η μηχανική τριβή αποτελεί ένα τυπικό παράδειγμα των 'top down' μεθόδων σύνθεσης νανοσωματιδίων, όπου τα σωματίδια παρασκευάζονται όχι από συγκροτήματα κατά συστάδες αλλά από τη δομική διάσπαση μεγαλύτερων δομών, ως αποτέλεσμα πλαστικής παραμόρφωσης. Αυτή η μέθοδος έχει γίνει ιδιαίτερα δημοφιλής για την παρασκευή νανοκρυσταλλικών υλικών λόγω της απλότητας, του σχετικά φθηνού εξοπλισμού που απαιτείται, και της δυνατότητας της εφαρμογής της ουσιαστικά στη σύνθεση όλων των κατηγοριών των υλικών. Το κύριο πλεονέκτημα που συχνά

αναφέρεται είναι η δυνατότητα εύκολης κλιμάκωσης της χωρητικότητας των ποσοτήτων των υλικών για διάφορες εφαρμογές. Τα μειονεκτήματα της μεθόδου που αναφέρονται είναι η μόλυνση από τα μέσα άλεσης και/ή την ατμόσφαιρα, και η συσσωμάτωση του προϊόντος σε σκόνη χωρίς εκτράχυνση της νανοκρυσταλλικής μικροδομής.



Εικόνα 2.3. Σχηματική απεικόνιση της αρχής της μηχανικής άλεσης.

Η μηχανική άλεση επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας αναδευτήρα υψηλής ενέργειας, πλανητικές σφαίρες ή μύλο άλεσης. Η ενέργεια που μεταφέρεται στο κράμα από πυρίμαχες ανθεκτικές ή χαλύβδινες σφαίρες εξαρτάται από την ταχύτητα περιστροφής (δονητική), το μέγεθος και τον αριθμό των σφαιρών, τον χρόνο άλεσης και την ατμόσφαιρα άλεσης. Τα νανοσωματίδια παράγονται με διάτμηση κατά την άλεση. Όπως συμβαίνει και σε κάθε διαδικασία που παράγει λεπτά σωματίδια, είναι απαραίτητο ένα κατάλληλο βήμα για την πρόληψη της οξειδωσης. Απαιτείται λοιπόν αδρανής ατμόσφαιρα και τα σωματίδια σκόνης πρέπει να μεταφερθούν σε κατάλληλο σύστημα

κενού. Αυτή η μέθοδος σύνθεσης είναι κατάλληλη για την παραγωγή σωματιδίων άμορφου ή ναοκρυσταλλικού κράματος, στοιχειακών ή σύνθετων κραμάτων [Alagarasi A., 2009].

2.2.3 Ηχοχημική, Φωτοχημική και Θερμική Διάσπαση

Ένα ισχυρό εργαλείο για την παρασκευή ναοδομημένων υλικών αποτελεί ο υψηλής έντασης υπέρηχος, λόγω της «υπερηχητικής ή ακουστικής σπηλαίωσης» που προκαλείται από την υπερηχητική ακτινοβολία ενός υγρού. Η «ακουστική σπηλαίωση» περιλαμβάνει τον σχηματισμό, την ανάπτυξη και την εκρηκτική (προς τα έξω) κατάρρευση των φυσαλίδων σε ένα υγρό. Οι φυσαλίδες της σπηλαίωσης καταρρέουν άμεσα, η θερμοκρασία και η πίεση των φυσαλίδων φτάνουν αρκετές χιλιάδες βαθμούς και εκατοντάδες ατμόσφαιρες, αντίστοιχα, που συνοδεύεται από παραγωγή κρουστικών κυμάτων [Mason (Ed.) T.J., 1990, 1991, 1993, Didenko Y.T., et al., 1999]. Η ηχοχημική σύνθεση των νέων ναοδομημένων υλικών στηρίζεται σε τέτοιες ακραίες συνθήκες. Η ηχοχημική αναγωγή των αλάτων μεταφοράς συνήθως πραγματοποιείται σε τρία στάδια. Τα στάδια είναι η παραγωγή των δραστικών ειδών, η αναγωγή του μετάλλου, και η ανάπτυξη των κolloειδών. Αυτά τα τρία στάδια λαμβάνουν χώρα σε διαφορετικά τμήματα : 1) στην αέρια φάση εντός των φυσαλίδων σπηλαίωσης που η υψηλή θερμοκρασία και πίεση επιτρέπει την πυρόλυση του νερού προς σχηματισμό $\bullet\text{H}$ και $\bullet\text{OH}$, 2) στη διεπιφάνεια μεταξύ των φυσαλίδων σπηλαίωσης και του διαλύματος και τελικά 3) στο διάλυμα. Ο Henglein πρώτος ανακάλυψε ότι οι $\bullet\text{H}$ και $\bullet\text{OH}$ σχηματίστηκαν κατά τη διάρκεια της ηχόλυσης του νερού [Henglein A., 1987] και μελέτησε την αναγωγή του AuCl_4^- σε Au^0 σε ένα υδατικό διάλυμα με υπερηχητική ακτινοβολία κάτω από συνθήκες

Ag-H₂ [Gutierrez M., et al., 1987]. Στη συνέχεια η σύνθεση σταθερών μεταλλικών κolloειδών σιδήρου από την ηχοχημική διάσπαση του σιδήρου περιείχε σύμπλοκα όπως Fe(CO)₅ [Suslick K.S., et al., 1991, Suslick K.S., et al., 1996]. Στην περίπτωση της αναγωγής των ιόντων ευγενών μετάλλων, η ηχοχημική διαδικασία ακολουθεί μετά την ηχόλυση του νερού και των οργανικών πρόσθετων που παράγουν •OH και •H, καθώς και τις ακόλουθες •R και •H, αντίστοιχα. Για παράδειγμα, μία παλιότερη εργασία των Nagata και των υπολοίπων [Nagata Y., et al., 1992] ανέφερε ότι η αναγωγή των ιόντων Ag⁺ σε μεταλλικό Ag, σε ατμόσφαιρα Ar, πραγματοποιήθηκε μέσω σχηματισμού ατόμων υδρογόνου στην ηχόλυση του νερού και οι επακόλουθες δευτερογενείς αναγωγικές ρίζες δημιουργήθηκαν από την αντίδραση διάσπασης μεταξύ οργανικών πρόσθετων και ριζών OH και ατόμων υδρογόνου. Λόγω της χαμηλής πίεσης ατμών των μεταλλικών αλάτων, η αναγωγή δεν μπορεί να συμβεί στην αέρια φάση. Η αναγωγή λαμβάνει χώρα κυρίως στη διεπιφάνεια φυσαλίδας/διαλύματος και στο διάλυμα. Με αυτόν τον τρόπο πολλά είδη μεταλλικών νανοσωματιδίων έχουν παρασκευαστεί παρουσία προστατευτικών παραγόντων ή υποστρωμάτων σταθεροποίησης [Tan Y., et al., 2004].

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, η ραδιόλυση διαλυμάτων αλάτων μετάλλων έχει εφαρμοσθεί για την παρασκευή μεταλλικών νανοσωματιδίων. Η αναγωγή των μεταλλικών ιόντων πραγματοποιείται από αναγωγικά είδη όπως οργανικές ρίζες [(CH₃)₂C[•](OH)] οι οποίες παράγονται κατά τη ραδιόλυση υδατικού διαλύτη (τα διαλυμένα ηλεκτρόνια ή •H και •OH που προέρχονται από τη ραδιόλυση του νερού μπορεί να αντιδράσουν με οργανικά μόρια για να δώσουν νέες ρίζες για να ανάγουν τα άλατα μετάλλων). Κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, ένας μεγάλος αριθμός ατόμων παράγεται ομοιογενώς και ακαριαίως κατά τη διάρκεια της ακτινοβόλησης προωθώντας

την παρασκευή σωματιδίων με μικρή κατανομή μεγέθους. Για παράδειγμα με την ακτινοβόληση ενός διαλύματος υπερχλωρικού χαλκού ($\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$) που περιέχει μυρμηκικό νάτριο, σχηματίζονται νανοσωματίδια Cu με αναγωγή των ιόντων Cu^{2+} , και από τα δύο διαλυμένα ηλεκτρόνια και CO^{2-} που παράγονται κατά τη ραδιόλυση [Ershov B.G., et al., 1991]. Η ακτινοβόληση ενός διαλύματος που περιέχει AgClO_4 , κιτρικό νάτριο, 2-προπανόλη, και υποξείδιο του αζώτου οδηγεί στον σχηματισμό εικοσάεδρων και κυβικά οκτάεδρων νανοσωματιδίων [Henglein A., et al., 1999]. Επίσης, παρατηρήθηκε [Rafaeloff R., et al., 1983], ότι τόσο τα νανοσωματίδια όσο και το προστατευτικό πολυμερές παράγονται ταυτόχρονα από ραδιόλυση ενός διαλύματος που περιέχει το μονομερές ακρυλαμίδιο και τα άλατα μετάλλων (H_2PtCl_6) σε ένα παράδειγμα ραδιολυτικής σύνθεσης κολλοειδούς Pt. Παρουσία μικρών σωματιδίων, η ραδιολυτική αναγωγή έχει εφαρμοσθεί για την μεγένθυση των σωματιδίων. Νανοσωματίδια χρυσού με διάμετρο από 2 έως 120 nm έχουν παρασκευαστεί με αυτή την τεχνική [Henglein A., et al., 1991, Henglein A., et al., 1999]. Αυτή η πορεία μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή διμεταλλικών νανοσωματιδίων του τύπου πυρήνας-κέλυφος. Για παράδειγμα, το $\text{Au}(\text{CN})_2^-$ ανάχθηκε σε νανοσωματίδια αργύρου [Mulvaney P., et al., 1993] και λευκόχρυσου [Henglein A., 2000]. Επιπλέον, η ραδιολυτική προετοιμασία της μετάπτωσης των μεταλλικών νανοσωματιδίων είναι επίσης δυνατή σε οργανωμένα περιβάλλοντα όπως τα μικκύλια ή τα μικρογαλακτώματα [Kurihara K., et al., 1983].

Μία αργή UV-αναγωγική τεχνική είναι αρκετά αποτελεσματική για την παρασκευή νανοσωματιδίων με καλά καθορισμένα σχήματα με την οποία παράχθηκαν μακριές νανοράβδοι Ag, καλοσχηματισμένοι δενδρίτες Ag [Zhou Y., et al., 1999], και μεγάλα νανοσωματίδια Au με τριγωνικό και εξαγωνικό σχήμα [Zhou Y., et al., 1999],

αντίστοιχα. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι η συγκέντρωση των ιόντων του ευγενούς μετάλλου και η ποσότητα του προστατευτικού πολυμερούς είναι υψίστης σημασίας για τον έλεγχο και καθορισμό του σχήματος. Άλλες αναφορές σχετικά με τη φωτόλυση των μεταλλικών αλάτων περιλαμβάνει την UV-ορατή ακτινοβολία των αλάτων Au, Ag, ή Pt σε αντίστροφα μικρογαλακτώματα παρουσία επιφανειοδραστικών ουσιών ή πολυμερών για να σχηματιστούν μεταλλικά νανοσωματίδια. Με την παρουσία των μικκυλίων από ένα ευρύ φάσμα επιφανειοδραστικών ουσιών ο Toshima και οι συνεργάτες του συνέθεσαν κολλοειδή Pt [Toshima N., et al., 1985, Toshima N., et al., 1992] και Pd [Toshima N., et al., 1992] με φωτόλυση και αναγωγή του υδρογόνου. Παρατήρησαν πως η τεχνική της UV-ορατής ακτινοβολίας παράγει μικρότερα και καλύτερα διεσπαρμένα νανοσωματίδια. Οι Mayer και Esumi περιέγραψαν τη UV-ορατή φωτολυτική σύνθεση νανοσωματιδίων χρυσού σταθεροποιημένα από συστάδα συμπολυμερών, πολυηλεκτρολύτες [Mayer A.B.R., et al., 1997, Mayer A.B.R., et al., 1997, Mayer A.B.R., et al., 1998, Mayer A.B.R., et al., 1998] και δενδριμερή (πολυαμιδοαμίνη:PAMAM) [Esumi K., et al., 1998]. Πρόσφατα, η τεχνική της ακτινοβολίας μικροκυμάτων έχει αναπτυχθεί για την σύνθεση νανοσωματιδίων ευγενών μετάλλων [Yu W., et al., 1999]. Κατ' αρχήν, η ακτινοβολία μικροκυμάτων διαφέρει από την UV φωτόλυση και την ραδιόλυση ακτίνων X. Η παραγωγή των μεταλλικών νανοσωματιδίων προέρχεται από την επίδραση της θέρμανσης και όχι από την ενέργεια κβάντου στην περιοχή μικροκυμάτων. Τα πολικά μόρια μπορούν να θερμανθούν γρήγορα κάτω από την ακτινοβολία μικροκυμάτων αλλά τα μη πολικά μόρια δεν μπορούν να συζευχθούν με τα μικροκύματα έτσι ώστε το πολικό διάλυμα της αντίδρασης να θερμανθεί σε υψηλή θερμοκρασία γρήγορα και ομοιογενώς με τη χρήση μικροκυμάτων. Σε σύγκριση με τη

συμβατική θέρμανση, θα επιτευχθεί πιο ομοιόμορφη πυρήνωση και μικρότερος χρόνος κρυστάλλωσης για τον σχηματισμό κολλοειδών.

2.2.4 Χημική Αναγωγή Αλάτων Ευγενών Μετάλλων

Η χημική αναγωγή ενός άλατος μετάλλου σε ένα οργανικό ή υδατικό μέσο είναι η πιο δημοφιλής και οικονομική μέθοδος και γι αυτό τον λόγο έχει βρεί ευρεία εφαρμογή. Πληθώρα πειραμάτων χημικής αναγωγής έχουν χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή μεταλλικών νανοσωματιδίων στα οποία τους αναγωγικούς παράγοντες αποτέλεσαν ενώσεις όπως το H_2 [Ahmadi T.S., et al., 1996, Yu W., et al., 1998, Henglein A., 2000, Henglein A., et al., 2000], $NaBH_4$, N_2H_4 [Underhill R.S., et al., 2000, Burshtain D., et al., 1999, Chiang C.L., et al., 2001, Wu M.L., et al., 2001], NH_2OH [Brown K.R., et al., 2000], $(CH_3)_2NH \cdot BH_3$ [Torigoe K., et al., 2001], Cu ή Ag [Zhao M., et al., 1999], αιθανόλη [Hirai H., et al., 1978, Siiman O., et al., 1986, Pathak S., et al., 2000], αιθυλενογλυκόλη [Wang Y., et al., 2000], κιτρικό οξύ και κιτρικά [Turkevich J., et al., 1951, Frens G., 1973, Munro C.H., et al., 1995], φορμαμίδιο [Han M.Y., et al., 1999], φορμαλδεΰδη [Mayer A.B.R., et al., 2000, Meguro K., et al., 1998], ασκορβικό οξύ [Jana N.R., et al., 2001, Chen S., et al., 2002], πολυανιλίνη [Wang J.G., et al., 2001], ο-ανισιδίνη [Dai X., et al., 2002], και όξινο τρυγικό κάλιο [Tan Y., et al., 2002]. Σε αυτές τις παρασκευαστικές διαδικασίες, ο σχηματισμός μεταλλικών νανοσωματιδίων, διέπεται από την ισοστάθμιση του ρυθμού πυρήνωσης και την ανάπτυξη των σωματιδίων. Ο έλεγχος του μεγέθους των νανοσωματιδίων μπορεί να επιτευχθεί με απλή αλλαγή στην αναλογία του ρυθμού πυρήνωσης προς την αύξηση των σωματιδίων. Αν ο ρυθμός ανάπτυξης των σωματιδίων είναι πολύ μικρότερος από εκείνον της πυρήνωσης, αυτό θα

έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή ενός μεγάλου αριθμού μικρών "εμβρύων" ή «σπόρων», και στη συνέχεια αυτοί οι "σπόροι" αναπτύσσονται περαιτέρω προς σχηματισμό νανοσωματιδίων. Επίσης, απαιτείται η επίτευξη του ακριβούς ελέγχου της σταθερότητας και της δραστηριότητας των σωματιδίων για να επιτραπεί η προσκόλληση στην επιφάνεια των υποστρωμάτων σταθεροποίησης ή άλλων σωματιδίων χωρίς να οδηγηθούν σε συνένωση.

Η αναρροή (reflux) της αλκοόλης και κάποιων αλάτων ευγενών μετάλλων έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για τον σχηματισμό νανοσωματιδίων παρουσία σταθεροποιητών. Σε αυτή την διαδικασία η αλκοόλη δρά τόσο ως διαλύτης όσο και ως αναγωγικός παράγοντας. Γενικά, οι αλκοόλες περιέχουν α-υδρογόνο. Έτσι, η αιθανόλη, η μεθανόλη, η ισοπροπανόλη αποτελούν αντιπροσωπευτικά παραδείγματα αναγωγικών παραγόντων. Κατά τη διάρκεια της αναγωγής οι αλκοόλες οξειδώνονται στις αντίστοιχες καρβονυλικές ενώσεις. Για την αντίδραση αυτή απαιτείται η παρουσία νερού. Ο Hirai, και πιο πρόσφατα ο Delmas, έχει χρησιμοποιήσει εκτενώς υδατικά διαλύματα αλκοολών ως αναγωγικά μέσα για τη σύνθεση κολλοειδών Rh, Pt, Pd, Os, και Ir [Hirai H., et al. 1978, Hirai H., et al., 1978 Hirai H., et al., 1979, Hirai H., 1979, Toshima N., et al., 1981, Komiyama M., et al., 1983, Hirai H., 1985, Borsla A., et al., 2001]. Αποτελεσματικοί σταθεροποιητές μπορεί να είναι μία σειρά από πολυμερή υλικά ή ολιγομερή, όπως η πολυβινυλική αλκοόλη (PVA), η πολυ(N-βινυλπυρρολιδινόνη) (PVP), ο πολυβινυλικός αιθέρας (PVE), ή η κυκλοδεξτρίνη. Έχουν χρησιμοποιηθεί και άλλα είδη πολυμερών για την σταθεροποίηση των κολλοειδών Au, Pd, και Pt που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της αναγωγής των αλάτων των μετάλλων και αυτά είναι διάφορα πολυοξεία [Mayer A.B.R., et al., 1996, Mayer A.B.R., et al., 1996, Mayer A.B.

R., et al., 1998, Mayer A.B.R., et al., 1998], πολυηλεκτρολύτες [Mayer A.B.R., et al., 1996, Mayer A.B.R., et al., 1997, Youk J.H., et al., 2001], συστάδες συμπολυμερών [Mayer A.B.R., et al., 1998, Chen C.W., et al., 2000], πολυ (N-ισοπροπυλακρυλαμίδιο) (PNIPAAm) [Chen C.W., et al., 1997, Chen C.W., et al., 2000, Chen C.W., et al., 1997], πολυ (N-σουλφονατοπροπυλ-ρ-βενζαμίδιο) [Dalmia A., et al., 1998], και συμπολυμερή PVA/PVP [Meguro K., et al., 1998]. Κάποιες συνθήκες όπως η μεταβολή της ποσότητας του σταθεροποιητή, η δομή και η ποσότητα της αλκοόλης, οι μεταλλικές πρόδρομες ενώσεις [Teranishi T., et al., 1998, Teranishi T., et al., 1997], όπως επίσης και η προσθήκη μίας βάσης [Yu W., et al., 1999] έχουν αντίκτυπο στην κατανομή του μεγέθους των σωματιδίων. Αρκετές συστηματικές μελέτες αποκάλυψαν ότι η αναγωγή του H_2PdCl_4 , H_2PtCl_6 , και $RhCl_3$ οδηγεί σε μικρότερα σωματίδια όταν η αλκοόλη που χρησιμοποιήθηκε είχε ένα υψηλότερο σημείο βρασμού. Κατά τον ίδιο τρόπο, η προσθήκη NaOH κατά τη διάρκεια της αναγωγής του H_2PtCl_6 ή $PdCl_2$ με μεθανόλη οδηγεί σε μείωση του μεγέθους των σωματιδίων που σχηματίζονται [Yu W., et al., 1999]. Επιπλέον, η θέρμανση φαίνεται να επιδρά κατά καιρούς στο μέγεθος των σωματιδίων. Η γρήγορη θέρμανση με μικροκύματα ενός υδατικού αλκοολικού διαλύματος H_2PtCl_6 επιτρέπει τον σχηματισμό σχεδόν μονοδιασπαρμένων νανοσωματιδίων Pt.

Η μέθοδος αναγωγής με υδρογόνο είναι μία μέθοδος που βρίσκει ευρεία εφαρμογή για την παρασκευή νανοσωματιδίων ευγενών μετάλλων. Με χρήση του PVA ως προστατευτικό παράγοντα παρασκευάστηκαν κolloειδή διαλύματα Au, Ag, Ir, Pt, Pd, Rh, και Ru με αναγωγή του υδρογόνου των αντίστοιχων χλωριούχων αλάτων [Tan C.K., et al., 1987]. Κατά συνέπεια, παρασκευάστηκαν νανοσωματίδια Pt, σταθεροποιημένα με υδραζίνη πολυακρυλικό οξύ [Kiwi J., et al., 1979]. Επίσης, ένα

πρωτόκολλο αναγωγής υδρογόνου σε μικρογαλακτώματα εφαρμόστηκε επιτυχώς για τη σύνθεση νανοσωματιδίων ευγενών μετάλλων Rh, Pt, Pd, και Ir [Moutonnet M., et al., 1982, Moutonnet M., et al., 1986]. Σε άλλες αναφορές, νανοσωματίδια Rh συντέθηκαν με αναγωγή υδρογόνου υδατικού διαλύματος RhCl_3 παρουσία τρισουλφονικού επιφανειοδραστικού [Larrent C., et al., 1988, Larrent C., 1991]. Η αναγωγή του RhCl_3 στο νερό περιλαμβάνοντας τριοκτυλαμίνη ακολουθούμενη από εκχύλιση σε CH_2Cl_2 έδωσε μία σταθερή διασπορά νανοσωματιδίων ροδίου.

Τα βοροϋδρίδια (NaBH_4 ή KBH_4) είναι πολύ ισχυρά αναγωγικά μέσα και μπορούν να ανάγουν τα περισσότερα άλατα μετάλλων μετάπτωσης σε στοιχειακά μέταλλα. Με τη μέθοδο αναγωγής με βοροϋδρίδια, έχουν παρασκευαστεί νανοσωματίδια Cu σταθεροποιημένα με πολυμερή (PVP, PVE, και PVA) και πολυσακχαρίτες, νανοσωματίδια Pt σταθεροποιημένα με PVP, κολλοειδή Ag, Au, Pt και Pd προστατευμένα με σταθεροποιητικούς πολυμερικούς παράγοντες όπως κατιονικοί πολυηλεκτρολύτες, πολυοξέα, συστάδες πολυμερών κτλ, σε υδατικό διάλυμα. Η αναγωγή με βοροϋδρίδιο χρησιμοποιήθηκε επίσης για την σύνθεση νανοκolloειδών Au, Ag, Pt, και Cu, προστατευμένα με δενδριμερή, όπως η πολυαμιδοαμίνη ή PAMAM [Tan Y., et al., 2004]. Στον **Πίνακα 2.3** παρουσιάζονται παραδείγματα παρασκευής μεταλλικών νανοσωματιδίων με χημική αναγωγή.

Πίνακας 2.3. Σύνοψη διαφόρων διαδικασιών αναγωγής που χρησιμοποιούνται για να παρασκευάσουν μεταλλικά NPs [Sreepasad S.T., et al., 2013].

Μέθοδος	Μέταλλο/αναγωγικός παράγοντας	Δείγμα
Πορεία με NaBH ₄	Μεταλλικό ιόν/ BH ₄ ⁻	Au, Ag
Πορεία με αμίνη	Μεταλλικό ιόν/ APS ^a /AES ^b	Ag
Πορεία με πολυόλη	Μεταλλικό ιόν/αιθυλενογλυκόλη	Ag, Pd
Πορεία με κιτρικά	Μεταλλικό ιόν / Cit ³⁻	Au, Ag
Πορεία με Πολυβινυλοπυρρολιδόνη	Μεταλλικό ιόν /PVP ^c	Pd

^aAPS: 3-aminopropyltrimethoxysilane

^bAES: 3-(2-aminoethylaminopropyl)trimethoxysilane

^cPVP: polyvinylpyrrolidone

2.2.5 Ηλεκτροχημική αναγωγή

Η πρωτοπόρα εργασία για την ηλεκτροχημική σύνθεση των νανοσωματιδίων των ευγενών μετάλλων πραγματοποιήθηκε από τον Reetz και τους συνεργάτες του [Reetz M.T., et al., 1996, Reetz M.T., et al., 1994]. Αυτή η συνθετική πορεία μπορεί να προσφέρει νανοσωματίδια ελεγχόμενου μεγέθους. Μία άνοδος που οξειδώνεται παρουσία άλατος τεταρτοταγούς αμμωνίου, χρησιμοποιείται ως πηγή μετάλλου. Το άλας τεταρτοταγούς αμμωνίου δεν είναι μόνο ένας ηλεκτρολύτης αλλά και ένας σταθεροποιητικός παράγοντας. Στη συνέχεια, τα ιόντα ανάγονται στην κάθοδο για να

σχηματίσουν τα μεταλλικά νανοσωματίδια. Με αυτόν τον τρόπο, ο Reetz και οι συνεργάτες του συνέθεσαν νανοσωματίδια Pd με διάφορα μεγέθη διεσπαρμένα σε ακετονιτρίλιο/THF. Ο μηχανισμός σχηματισμού αποτελείται από πέντε βήματα : 1) η διάλυση της ανόδου για τον σχηματισμό μεταλλικών ιόντων (οξείδωση του Pd σε Pd²⁺), 2) η κατεύθυνση των μεταλλικών ιόντων στην κάθοδο, 3) η αναγωγή των μεταλλικών ιόντων στην επιφάνεια της καθόδου, 4) η συσσωμάτωση των σωματιδίων σταθεροποιημένων από ιόντα αμμωνίου γύρω από τους μεταλλικούς πυρήνες, 5) η καθίζηση των νανοσωματιδίων Pd. Αυτή η μέθοδος επιτρέπει την παραγωγή νανοσωματιδίων με καλά ελεγχόμενο μέγεθος μεταβάλλοντας την ένταση του ρεύματος (υψηλότερη ένταση ρεύματος οδηγεί σε μικρότερα νανοσωματίδια) και τη λήψη υψηλών αποδόσεων (>95%) [Reetz M.T., et al., 1996]. Αυτή η συνθετική πορεία μπορεί επίσης να εφαρμοσθεί σε μέταλλα μετάπτωσης που οξειδώνονται εύκολα, όπως το Ni και ο Cu. Η διαλυτότητα των κολλοειδών που λαμβάνονται μπορεί να μεταβληθεί από μη πολικούς διαλύτες όπως το πεντάνιο, σε πολικούς διαλύτες όπως το νερό, αλλάζοντας την πολικότητα του προστατευτικού παράγοντα (αλογονίδιο τετρααλκυλαμμωνίου για μη πολικούς διαλύτες ή σουλφοβηταΐνη για πολικούς διαλύτες) [Reetz M.T., et al., 1995]. Για μέταλλα που οξειδώνονται λιγότερο εύκολα όπως Pt, Rh και Ru, η άνοδος και η κάθοδος χρησιμοποιήθηκαν για τον σχηματισμό Pt, και η μεταλλική πρόδρομη ένωση είναι ένα άλας μετάλλου μετάπτωσης. Σε αυτή τη νέα διαδικασία, η άνοδος δεν είναι τόσο εύκολο να οξειδωθεί και η μεταλλική πρόδρομη ένωση ανάγεται με ηλεκτρόλυση παρουσία άλατος τεταρτοταγούς αμμωνίου το οποίο λειτουργεί τόσο ως ηλεκτρολύτης όσο και ως σταθεροποιητικός παράγοντας [Tan Y., et al., 2004].

2.2.6 Βιολογικές μέθοδοι σύνθεσης νανοσωματιδίων

Ως εναλλακτική λύση στη χρήση χημικών ουσιών, η βιολογική σύνθεση έγινε γνωστή ως μία ασφαλής και φιλική προς το περιβάλλον μέθοδος για τη σύνθεση νανοσωματιδίων. Στην μέθοδο αυτή, τα νανοσωματίδια παρασκευάζονται χρησιμοποιώντας οργανισμούς όπως βακτήρια και μύκητες, διάφορα μέρη φυτών, βιολογικά εκχυλίσματα, κτλ. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι αποδίδει νανοσωματίδια που επικαλύπτονται από βιολογικά μόρια, τα οποία κατά συνέπεια βελτιώνουν τη βιοσυμβατότητα ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πολλές βιοϊατρικές εφαρμογές. Νανοσωματίδια ευγενών μετάλλων διαφόρων σχημάτων όπως ράβδοι, σφαίρες, πλάκες, έχουν συντεθεί μέσω αυτής της μεθόδου. Ένα κλασσικό παράδειγμα είναι η σύνθεση υψηλής απόδοσης λεπτών επίπεδων μονοκρυσταλλικών νανοτριγωνικών σωματιδίων χρυσού με αναγωγή των $[\text{AuCl}_4]^-$ χρησιμοποιώντας ένα εκχύλισμα από λεμονόχορτο (*Cymbopogon flexuosus*). Ο αναγωγικός παράγοντας στην αντίδραση βρέθηκε ότι είναι αλδόζες (αναγωγικά σάκχαρα) που υπάρχουν στο εκχύλισμα του λεμονόχορτου [Sreepasad T.S., et al., 2013].

2.3 Μεταλλικά νανοσωματίδια

2.3.1 Νανοσωματίδια Au

Τα νανοσωματίδια χρυσού αποτελούν μία εξαιρετικής σημασίας και ευρέως χρησιμοποιούμενη κατηγορία μεταλλικών νανοσωματιδίων στον τομέα της έρευνας. Τα κolloειδή διαλύματα του χρυσού παρασκευάζονται εύκολα και αναγνωρίζονται από το χρώμα που μπορεί να ποικίλει από βαθύ κόκκινο, μωβ μέχρι μπλε. Αν και για την παρασκευή των κolloειδών διαλυμάτων χρυσού πρέπει να ανατρέξουμε στην εποχή του

Faraday, τις τελευταίες δεκαετίες έχει αναπτυχθεί πολύ η παραγωγή των νανοσωματιδίων χρυσού. Μεταξύ αυτών, δύο σημαντικές μέθοδοι είναι η υδατική μέθοδος του Turkevich και η μέθοδος "του καταλύτη μεταφοράς φάσεως" οι οποίες προσφέρουν ομοιόμορφα και σταθερά νανοσωματίδια Au σε υδατικό διάλυμα και σε οργανικό διαλύτη, αντίστοιχα. Με τη μέθοδο Turkevich, τα νανοσωματίδια χρυσού παρασκευάζονται αρκετά εύκολα με αναγωγή του αραιού υδατικού διαλύματος HAuCl_4 με κιτρικό οξύ ή κιτρικό τρινάτριο. Είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος (~12 nm) από τα τυπικά νανοσωματίδια που είναι σταθεροποιημένα με αλκανθειόλες (<4 nm) που παρατηρούνται στην μέθοδο "καταλύτη μεταφοράς φάσεως" αλλά έχουν μικρή κατανομή μεγέθους με τυπική απόκλιση 10%. Τα νανοσωματίδια αυτά σταθεροποιούνται από τις ιονικές αλληλεπιδράσεις στην επιφάνειά τους. Οι ιοντικές αυτές αλληλεπιδράσεις προέρχονται από τα κιτρικά ιόντα καθώς και από προϊόντα οξείδωσης/αποκαρβοξυλίωσης των κιτρικών ιόντων που προσροφώνται στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων. Τα νανοσωματίδια αυτά συσσωματώνονται μη αναστρέψιμα με απομάκρυνση του διαλύτη. Σε συνδυασμό με υδροξυλαμίνη [Brown K.R., et al., 2000] ή ασκορβικό οξύ [Jana N.R., et al., 2001] πριν την αναγωγή των αλάτων του χρυσού μεσολαβεί ένα ενδιάμεσο στάδιο αυξητικής μεθόδου η οποία μπορεί να παράγει μεγαλύτερα νανοσωματίδια. Τα αρχικά σχηματιζόμενα νανοσωματίδια Au χρησιμοποιούνται σαν τα μικρότερα σωματίδια («σπόροι») πάνω στην επιφάνεια των οποίων θα λάβει χώρα η αναγωγή των μεταλλικών αλάτων για την παρασκευή μεγαλύτερων σωματιδίων. Στη συνέχεια, αν αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται συνεχώς θα σχηματίζονται όλο και μεγαλύτερα νανοσωματίδια με διάμετρο από 20 έως 100 nm και μικρή κατανομή μεγέθους (<20% σχετική τυπική απόκλιση).

Όταν χρησιμοποιούνται θειόλες μακράς αλυσίδας για σταθεροποίηση και για παραγωγοποίηση κατά τη διάρκεια διφασικών συνθέσεων μικρών κolloειδών χρυσού, τότε τα κolloειδή χρυσού συμπεριφέρονται σαν μοριακά διαλύματα και έχουν πολλά σημαντικά πλεονεκτήματα. Τα προκύπτοντα κolloειδή υλικά λαμβάνονται όχι μόνο ως σταθερά συμπυκνωμένα διαλύματα αλλά επίσης σε στερεή μορφή (σκόνη) τα οποία εύκολα επαναδιασπείρονται με την προσθήκη οργανικών διαλυτών που εξακολουθούν να δίνουν σταθερά διαλύματα ακόμη και σε υψηλότερες συγκεντρώσεις. Εν τω μεταξύ, τα νανοσωματίδια που είναι σταθεροποιημένα με αλκανοθειόλες παρασκευάζονται εύκολα σε μια ποικιλία μεγέθους πυρήνων και κελύφους και επίσης μπορούν να υποβληθούν σε αντιδράσεις υποκατάστασης θειόλης με στόχο το σχηματισμό συγκεκριμένων νανοδομών. Παρ'όλα αυτά τα πλεονεκτημάτα, η διαλυτότητα των νανοσωματιδίων αυτών περιορίζεται σε οργανικούς διαλύτες. Για την διαλυτοποίησή τους στο νερό τα νανοσωματίδια αυτά πρέπει να τροποποιηθούν με κατάλληλους υποκαταστάτες-σταθεροποιητές όπως $\text{Ph}_2\text{P}(m\text{-C}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{Na})$ και $\text{P}(m\text{-C}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{Na})$ [Schmid G., et al 1989, Schmid G., et al., 1990].

2.3.2 Νανοσωματίδια Cu

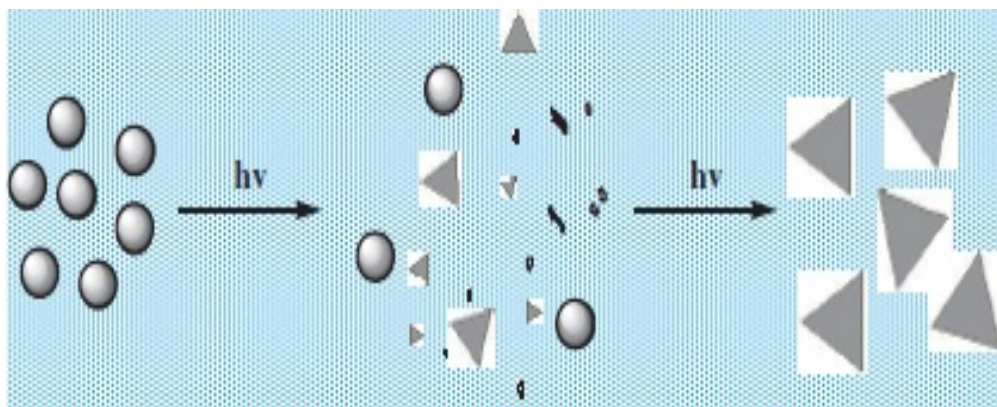
Ο μεταλλικός χαλκός έχει αποδείξει την καταλυτική του ικανότητα στον σχηματισμό αλδευδών από τη μετατροπή της μεθανόλης και της αιθανόλης [Bowker M., et al., 1980, Bowker M., et al., 1982]. Η παρασκευή των νανοσωματιδίων Cu πραγματοποιείται σε αδρανή ατμόσφαιρα λόγω του ότι τα νανοσωματίδια χαλκού οξειδώνονται πιο εύκολα σε σύγκριση με τα νανοσωματίδια των ευγενών μετάλλων. Ένα ευρύ φάσμα τεχνικών έχει αναπτυχθεί για τη σύνθεση σφαιρικών νανοσωματιδίων όπως

η χημική αναγωγή (χρησιμοποιώντας ισχυρά αναγωγικά, όπως η υδραζίνη (N_2H_4) και το βοροϋδρίδιο του νατρίου ($NaBH_4$) τα οποία μπορούν να ανάγουν ταχύτατα τα άλατα του χαλκού σε στοιχειακό χαλκό) [Huang H.H., et al., 1997, Tzhayik O., et al., 2002], η ραδιολυτική αναγωγή [Delcourt M.O., et al., 1973, Khatouri J., et al., 1992, Henglein A., 2000], και η αναγωγή των ιόντων χαλκού σε υπερκρίσιμα ρευστά [Cason J.P., et al., 2000, Ziegler K.J., et al., 2001]. Ειδικά, τα νανοσωματίδια του χαλκού με μικρή κατανομή μεγέθους μπορούν να παρασκευαστούν με συσταδοποίηση ακετόνης/διαλυμένων ατόμων Cu μέσω σύνθεσης ατμών μετάλλου [Vitulli G., et al., 2002]. Επιπλέον, εκτός από τα νανοσωματίδια Cu μορφολογίες όπως οι ράβδοι και οι ίνες επιτυγχάνονται παρουσία, αντίστοιχα, μαλακού εκμαγείου-Cu(AOT)₂-ισοοκτάνιο-άλας-νερό, κολλοειδών συγκροτημάτων και σκληρού εκμαγείου-νανοσωλήνες άνθρακα [αναγωγή του άλατος χαλκού με H_2 σε υψηλή θερμοκρασία ($500^\circ C$)], [Pileni M.P., et al., 1998, Chen P., et al., 1999]. Με την παρουσία των μαλακών επιφανειοδραστικών (cetyltrimethylammonium p-toluene sulfonate), επιμήκη νανοσωματίδια χαλκού με μήκος 500 nm και πλάτος 50 nm παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο ηχοχημικού παλμού [Salkar R.A., et al., 2000].

2.3.3 Νανοσωματίδια Ag

Τα νανοσωματίδια αργύρου παρασκευάζονται εύκολα με συμβατικές μεθόδους χημικής αναγωγής. Η μέθοδος της αναγωγής με κιτρικά (Turkevich μέθοδος) [Lee P.C., et al, 1982, Kamat P.V., et al., 1998] και της αναγωγής με $NaBH_4$ [Lee P.C., et al, 1982, Matějka P., et al., 1992, Vlčková B., et al., 1993, Fullam S., et al., 2000] είναι οι δύο συνηθισμένες χημικές πορείες παρασκευής νανοσωματιδίων αργύρου. Η σύνθεση

νανοσωματιδίων αργύρου σε αντίστροφα μικκύλια του ανιονικού επιφανειοδραστικού AOT επιτυγχάνεται αναμιγνύοντας διαλύματα αντίστροφων μικκυλίων που περιέχουν Ag(AOT) και N_2H_4 ή $NaBH_4$ προσφέροντας ένα σταθερό κolloειδές διάλυμα Ag και εύκολο έλεγχο στο μέγεθος των σωματιδίων [Petit C., et al., 1993]. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα ελέγχου του σχήματος των νανοσωματιδίων αργύρου αναφέρθηκε από τον Mirkin και τους συνεργάτες του [Jin R., et al., 2001]. Παρατήρησαν ότι χρησιμοποιώντας κατάλληλο σταθεροποιητικό παράγοντα αναπτύσσονται μεγάλες ποσότητες νανοπρισμάτων αργύρου από τα αρχικά σφαιρικά νανοσωματίδια μέσω ακτινοβολίας φθορισμού (Εικόνα 2.4).



Εικόνα 2.4. Ακτινοβολία φθορισμού προκαλεί μετασχηματισμό των σφαιρικών νανοσωματιδίων Ag σε τριγωνικά νανοπρίσματα [Jin R., et al., 2001]

2.3.4 Νανοσωματίδια Pt

Τα κolloειδή λευκοχρύσου χαρακτηρίζονται από το καφέ τους χρώμα. Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των νανοσωματιδίων Pt αποτελεί η τάση τους να σχηματίζουν σωματίδια με πολύπλευρες και ακανόνιστες επιφάνειες. Επιπλέον, αυτά τα μη σφαιρικά σωματίδια είναι γενικά απλοί κρύσταλλοι. Τα κolloειδή του λευκόχρυσου που παρασκευάζονται με αναγωγή των Pt (II) και Pt (IV) ενώσεων, έχουν περιγραφεί από το

1941. Αυτή η μέθοδος τώρα αναγεννάται, ιδίως κατά την παρασκευή νανοσωματιδίων Pt με ελεγχόμενο μέγεθος. Ένα από τα χαρακτηριστικά πειράματα είναι η αλλαγή της αναλογίας της συγκέντρωσης του πολυμερικού υλικού κάλυψης (πολυακρυλικό νάτριο) με εκείνη των κατιόντων λευκόχρυσου που χρησιμοποιήθηκαν στην αναγωγική σύνθεση (με H₂ αναγωγικό παράγοντα) των κolloειδών νανοσωματιδίων Pt σε διάλυμα σε θερμοκρασία δωματίου. Με τον τρόπο αυτό παρασκευάστηκαν νανοσωματίδια με κυβικό (80%), τετραεδρικό (60%), και κόλουρο οκταεδρικό (TO) σχήμα σε μεγάλες ποσότητες, καθιστώντας έτσι ικανή τη μελέτη των καταλυτικών ιδιοτήτων των νανοσωματιδίων με διαφορετικό σχήμα και κρυσταλλική δομή.

2.3.5 Νανοσωματίδια Παλλάδιου και Ρουθηνίου

Το παλλάδιο και το ρουθίνιο αποτελούν δύο βασικά μέταλλα που χρησιμοποιούνται για καταλυτικές εφαρμογές. Οι συνθετικές πορείες είναι κοινές με εκείνες των νανοσωματιδίων χρυσού και λευκόχρυσου. Για παράδειγμα, η αναγωγή του H₂PdCl₄ και RuCl₃, αντίστοιχα, με κιτρικά οδηγεί σε χαρακτηριστικά καφέ χρωματισμένα κolloειδή διαλύματα.

2.3.6 Νανοσωματίδια Ροδίου (RhNPs)

Το ρόδιο (Rh) είναι ένα ευγενές μέταλλο που ανήκει στην ομάδα του λευκόχρυσου (PGEs) και βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στο φλοιό της γης, σε συγκέντρωση περίπου 0,001 ppm (**Εικόνα 2.5**). Το ρόδιο βρίσκει βιομηχανική εφαρμογή στην κατάλυση, καθώς και στις ηλεκτρικές και ηλεκτρονικές συσκευές. Η κυριότερη

εφαρμογή του ροδίου είναι ως δραστικός καταλύτης στους σύγχρονους τριοδικούς μετατροπείς αυτοκινήτων [Iavicoli I., et al., 2014, Shelar Y.S., et al., 2012].

Επίσης, χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο στον τομέα της υαλουργίας καθώς επίσης στο πεδίο της διακόσμησης, των κοσμημάτων και των χημικών. Η κύρια ιατρική χρήση του ροδίου είναι στη ραδιοθεραπεία, για παράδειγμα του ρετινοβλαστώματος, χρησιμοποιώντας το ισότοπο ^{106}Rh .



Εικόνα 2.5. Ευγενές μέταλλο Ροδίου (Rh).

Τα νανοσωματίδια του ροδίου εμφανίζουν μεγάλο ενδιαφέρον λόγω του ευρύ φάσματος εφαρμογών τους. Τα νανοσωματίδια ροδίου χρησιμοποιούνται ως ενεργοί και εκλεκτικοί καταλύτες σε διάφορες διαδικασίες όπως η υδρογόνωση των ακόρεστων ενώσεων, η αντίδραση υδρογονολύσεως, η οξειδωση, η αντίδραση σύζευξης C\C, και ο ηλεκτροχρωμισμός. Επίσης, τα νανοσωματίδια ροδίου παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην ανίχνευση βιολογικών μορίων και στην ηλεκτροαναγωγή των νιτρικών.

Αρκετές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για τη σύνθεση του ροδίου σε διάφορες μορφές. Μεταξύ των μεθόδων είναι η δημιουργία μεταλλικών φιλμ επικαλυμμένων με ρόδιο με διασκόρπιση λυχνίας στα μεταλλικά υποστρώματα, η επιταξιακή ανάπτυξη των σωματιδίων ροδίου πάνω σε VOx υπόστρωμα και η εναπόθεση με λέιζερ σε ομαλό δίσκο γραφίτη. Επίσης, έχουν χρησιμοποιηθεί χημικές πορείες για τη σύνθεση νανοσωματιδίων ροδίου. Οι Nakao και Kaeriyama [Nakao Y., et al., 1986] συνέθεσαν νανοσωματίδια Rh σταθεροποιημένα από διάφορες επιφανειοδραστικές ουσίες μέσω αναγωγής με βοροϋδρίδιο του νατρίου σε υδατικό μέσο. Ο Boutonnet [Boutonnet M., et al., 1982] και η ομάδα του συνέθεσαν νανοσωματίδια Rh σε σταγονίδια ενός μικρογαλακτώματος ύδωρ/δωδεκυλ-αιθέρα πεντααιθυλενογλυκόλη/εξάνιο. Οι Chandra S., et al., 2009, παρασκεύασαν νανοσωματίδια Rh χρησιμοποιώντας N,N δις-ηλεκτραμίδιο δενδριμερές ως σταθεροποιητή. Νανοσωματίδια ροδίου που σταθεροποιήθηκαν με χλωρίδιο του στεαρυλοτριμεθυλαμμωνίου, με δωδεκυλοβενζολοσουλφονικό νάτριο και πολυαιθυλενογλυκόλη, συντέθηκαν με επίσης αναγωγή του RhCl₃ με NaBH₄, όμως το μέγεθος των νανοσωματιδίων που παρατηρήθηκε κυμαινόταν μεταξύ 1 και 20 nm και ήταν πολυδισπαρμένα. Ένα κοινό χαρακτηριστικό αυτών των μεθόδων είναι η προστασία και η σταθεροποίηση των αρχικών σωματιδίων από τη συσσωμάτωση που προκύπτει λόγω των δυνάμεων VanderWaals. Τα μέσα σταθεροποίησης που χρησιμοποιούνται περισσότερο είναι επιφανειοδραστικές ουσίες και πολυμερή με τη βοήθεια των οποίων τα κolloειδή εναιωρήματα περιέχουν νανοσωματίδια του εύρους μεγεθών που συντέθηκαν [Chandra S., et al., 2008].

Τα νανοσωματίδια ροδίου έχουν επίσης προσελκύσει το ενδιαφέρον λόγω εμφάνισης τοπικού συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων (LSPR) στην περιοχή του

υπεριώδους. Και αυτό διότι πολλά μεταλλικά νανοσωματίδια, όπως τα νανοσωματίδια αργύρου (Ag), χρυσού (Au), χαλκού (Cu), κ.α. δεν εμφανίζουν τοπικό συντονισμό επιφανειακών πλασμονίων στην υπεριώδη ακτινοβολία. Αρχικά οι μελέτες επικεντρώθηκαν στο αργίλιο και στο γάλλιο. Τόσο το αργίλιο όσο και το γάλλιο χαρακτηρίζονται από το χαμηλό κόστος, την υψηλή διαθεσιμότητα, την μεγάλη αγωγιμότητα, κτλ. Όμως, το αργίλιο όπως και άλλα μέταλλα, π.χ. το μαγνήσιο, το τιτάνιο, ο κασσίτερος, ο μόλυβδος, έχει το μειονέκτημα του σχηματισμού μίας παχιάς φυσικής στιβάδας οξειδίου αρκετών νανομέτρων. Το γάλλιο και το χρώμιο είναι αρκετά πιο ελκυστικά UV πλασμονικά μέταλλα λόγω του ότι το φυσικό οξειδίό τους είναι αρκετά πιο λεπτό της τάξης λίγων μονοστιβάδων. Από αυτά τα ευγενή μέταλλα μία πρόσφατη θεωρητική μελέτη απέδειξε ότι μόνο το ρόδιο (Rh) έχει μία σκληρή UV πλασμονική απόκριση και είναι δυνατό να παρασκευαστούν νανοσωματίδια ροδίου με χημικά μέσα μικρότερα από 10 nm. Το Rh αντιπροσωπεύει ένα εξαιρετικά ελπιδοφόρο μέταλλο για τον συνδυασμό πλασμονικής και κατάλυσης [Watson A.M., et al., 2015].

2.3.7 Μαγνητικά Νανοσωματίδια

Τα μεταλλικά νανοσωματίδια παρουσιάζουν μεγαλύτερο μαγνητισμό σε σύγκριση με τα οξείδια των μετάλλων, με αποτέλεσμα τη χρήση τους σε πολλές εφαρμογές. Παρόλα αυτά, τα μεταλλικά μαγνητικά νανοσωματίδια δεν είναι σταθερά και οξειδώνονται εύκολα με αποτέλεσμα τη μείωση ή την απώλεια (πλήρης ή μερική) του μαγνητισμού τους.

2.3.7.1 Νανοσωματίδια Fe

Ο σίδηρος είναι ένα σιδηρομαγνητικό υλικό με υψηλή πυκνότητα μαγνητικής ροπής (περίπου 220 emu/g) και είναι μαγνητικά μαλακό υλικό. Τα νανοσωματίδια σιδήρου στην κλίμακα μεγέθους κάτω από 20 nm είναι υπερμαγνητικά. Οι διαδικασίες που οδηγούν σε μονοδιεσπαρμένα νανοσωματίδια σιδήρου είναι καλά τεκμηριωμένες [Zhang W.J., 2003]. Παρόλα αυτά η παρασκευή νανοσωματιδίων, που αποτελούνται από καθαρό σίδηρο, είναι ένα δύσκολο έργο, επειδή συχνά περιέχουν οξειδία, καρβίδια και άλλες προσμίξεις.

Οι συνήθεις χημικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τις παρασκευές είναι η θερμική διάσπαση του FeCO_5 , η αναγωγική διάσπαση αλάτων Fe(II) , ή η αναγωγή του ακετυλακετονικού σιδήρου (III), όπως και η χημική αναγωγή με καλυπτικό αντιδραστήριο TOPO [Guo L., et al., 2001]. Επίσης, αναπτύχθηκε μία ηχοχημική μέθοδος για τη σύνθεση άμορφου σιδήρου [Suslick K.S., et al., 1996]. Η μέθοδος χημικής αναγωγής με NaBH_4 έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για τη σύνθεση νανοσωματιδίων σιδήρου σε οργανικούς διαλύτες [Ponder S.M., et al., 2001].

2.3.7.2 Νανοσωματίδια κοβαλτίου Co

Τα νανοσωματίδια κοβαλτίου εξαρτώνται από την συνθετική πορεία που θα ακολουθηθεί όσον αφορά τη μορφολογία τους. Μπορούν να παρατηρηθούν σε τουλάχιστον τρεις κρυσταλλικές φάσεις : την τυπική για την κύρια ύλη του Cohcp , την κυβική e-Co [Dinega D.P., et al., 1999] ή πολλαπλές εικοσαεδρικές fcc [Kitakami O., et al., 1997]. Οι συνθήκες των αντιδράσεων σύνθεσης επηρεάζουν την τελική δομή του προϊόντος. Συχνά απαιτείται η επιλογή μεγέθους και φάσης για να παρατηρηθούν

νανοκρύσταλλοι κοβαλτίου με συγκεκριμένο μέγεθος και ομοιόμορφο σχήμα. Έχουν περιγραφεί λεπτομερώς μέθοδοι για τη σύνθεση και τις μαγνητικές ιδιότητες των διαφορετικών δομών νανοσωματιδίων [Gubin S.P., et al., 2002].

Μία δημοφιλής μέθοδος είναι η σύνθεση κολλοειδών σωματιδίων με αναστροφή σύνθεσης μικκυλίου. Τα αντίστροφα μικκύλια ορίζονται ως ένας μικροαντιδραστήρας. Προκειμένου να ληφθούν σταθερά νανοσωματίδια κοβαλτίου με περιορισμένη κατανομή μεγέθους χρησιμοποιούνται αντίστροφα μικκύλια $\text{Co}(\text{AOT})_2$. Η αναγωγή τους επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας ως αναγωγικό μέσο το NaBH_4 . Τέτοια νανοσωματίδια σταθεροποιούνται από τασιενεργές ενώσεις και συχνά είναι μονοδιεσπαρμένα σε μέγεθος, αλλά είναι επίσης ασταθή εκτός αν διατηρούνται σε ένα διάλυμα. Παρόλα αυτά η χημική επιφανειακή επεξεργασία με λαυρικό οξύ βελτιώνει σημαντικά τη σταθερότητα και τα νανοσωματίδια κοβαλτίου μπορούν να αποθηκευτούν χωρίς συσσωμάτωση ή οξείδωση για τουλάχιστον μία εβδομάδα [Pileni M.P., et al., 1997]. Σε πολλές περιπτώσεις είναι δυνατό να ληφθούν νανοσωματίδια κοβαλτίου επικαλυμένα με άλλους υποκαταστάτες οι οποίοι μπορούν είτε να διασπαρούν σε ένα διαλύτη είτε να εναποτεθούν σε ένα υπόστρωμα.

2.3.7.3 Νανοσωματίδια Ni

Σε αντίθεση με το κοβάλτιο και το σίδηρο, σχετικά λίγες αναφορές ασχολούνται με τις φυσικές ιδιότητες και τη σύνθεση των μαγνητικών νανοσωματιδίων νικελίου. Ωστόσο, τα σιδηρομαγνητικά νανοσωματίδια νικελίου είναι ευρέως γνωστά και παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για εφαρμογές όπως η μαγνητική αποθήκευση, η ιατρική διάγνωση, οι πολυστρωματικοί πυκνωτές και ιδιαίτερα η κατάλυση. Επειδή

αυτές οι ιδιότητες και οι εφαρμογές μπορούν να συντονιστούν με τον έλεγχο του μεγέθους και της δομής των σωματιδίων, η ανάπτυξη ευέλικτων και ακριβών συνθετικών πορειών υπήρξε ένας ενεργός τομέας της έρευνας. Για την παρασκευή νανοσωματιδίων νικελίου χρησιμοποιήθηκε μία ευρεία ποικιλία τεχνικών όπως η θερμική διάσπαση [Bi L., et al., 2004], η πυρόλυση [Wang W.N., et al., 2004], η άλεση με σφαίρα υψηλής ενέργειας [Dorriu S., et al., 2004]. Οι οργανομεταλλικές πρόδρομες ενώσεις όπως το $Ni(CO)_4$, $Ni(COD)_2$, και $Ni(Cp)_2$ έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση και τις φασματοσκοπικές μελέτες των νανοσωματιδίων νικελίου [Estourne's C., et al., 1997, D. deCaro, et al., 1997]. Επίσης, τα νανοσωματίδια Ni παρασκευάζονται γενικά με τεχνικές μικρογαλακτώματος, χρησιμοποιώντας βρωμιούχο κετυλοτριμεθυλαμμώνιο (CTAB) [Chen D.H., et al., 2000] ή με αναγωγή ιόντων Ni παρουσία αλκυλαμινών ή οξειδίου τριοκτυλφωσφίνης (TOPO) [Tsai K.L., et al., 1993].

2.4 Διμεταλλικά Νανοσωματίδια

Το ενδιαφέρον στη σύνθεση των διμεταλλικών και ακόμη και των τριμεταλλικών νανοσωματιδίων προέρχεται από τις μοναδικές ιδιότητες που διαθέτουν σε σύγκριση με τα μονομεταλλικά κolloειδή. Αυτές οι ιδιότητες μπορούν να αποδοθούν σε μια συνέργεια μεταξύ των δύο μετάλλων που σχηματίζουν τα νανοσωματίδια. Η σύνθεση διμεταλλικών κolloειδών μπορεί να υλοποιηθεί είτε με ταυτόχρονη είτε με διαδοχική αναγωγή δύο μεταλλικών πρόδρομων ενώσεων. Οι περισσότερες από τις συνθετικές διαδικασίες που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή μονομεταλλικών σωματιδίων μπορεί να είναι κατάλληλες για τη σύνθεση διμεταλλικών σωματιδίων.

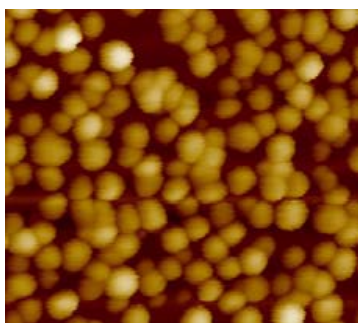
Τα διμεταλλικά νανοσωματίδια σταθεροποιημένα με πολυμερή σε υδροαλκοολικά μέσα μπορούν να παρασκευαστούν με την ταυτόχρονη αναγωγή δύο αλάτων ευγενούς μετάλλου με αναρροή (reflux) αλκοόλης. Τα διμεταλλικά σωματίδια Pd/Pt σταθεροποιημένα με PVP παράχθηκαν με αναγωγή ενός μίγματος νερού/αλκοόλης που περιείχε PdCl_2 και H_2PtCl_6 . Ακολουθώντας την ίδια διαδικασία, κolloειδή Au/Pd, Pt/Rh, Pt/Ru, Pd/Ru και Ag/Pd σταθεροποιημένα με PVP συντέθηκαν με αναρροή (reflux) αλκοόλης των αντίστοιχων μεταλλικών αλάτων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

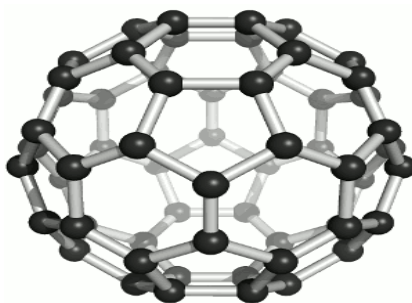
ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ

3.1 Εφαρμογές των Νανοςωματιδίων στην Αναλυτική Χημεία

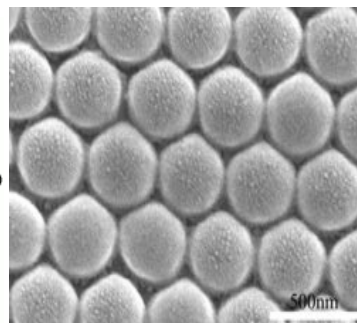
Η μεγάλη ποικιλία των νανοςωματιδίων έχει ως αποτέλεσμα την ευρεία εφαρμογή τους στην Αναλυτική Χημεία. Οι εφαρμογές των νανοςωματιδίων αφορούν τα στάδια της προκατεργασίας του δείγματος, του διαχωρισμού του αναλύτη και την ανίχνευση. Τα νανοςωματίδια που χρησιμοποιούνται κυρίως για αναλυτικούς σκοπούς είναι α) πυριτίου, β) άνθρακα (κυρίως φουλλερένια και νανοςωλήνες άνθρακα), γ) οργανικών πολυμερών, δ) μεταλλικά (χρυσού, αργύρου, μαγνητικά, κβαντικές κουκίδες κ.α) και ε) υπερμοριακά συσσωματώματα (νανομικκύλια).



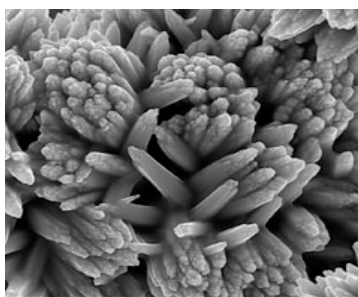
Νανοςωματίδια Χρυσού



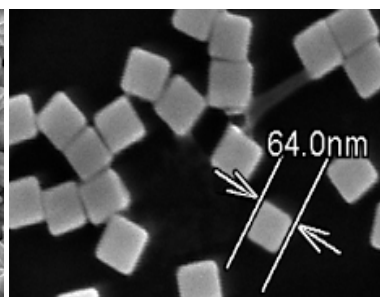
Buckminsterfullerene



FePt νανόςφαιρες



Νανοςωματίδια Τιτανίου



Νανोकύβοι Αργύρου



SnO₂ Νανοςωματίδια

Εικόνα 3.1. Νανοϋλικά με διάφορες μορφολογίες.

Στον **Πίνακα 3.1** φαίνεται η σχέση μεταξύ του τύπου των νανοσωματιδίων και των κύριων ιδιοτήτων τους που χρησιμοποιούνται για αναλυτικούς σκοπούς.

Πίνακας 3.1 Σχέση μεταξύ του τύπου και των ιδιοτήτων των νανοσωματιδίων που χρησιμοποιούνται για αναλυτικούς σκοπούς.

<i>Ιδιότητες Νανοσωματιδίων</i>	<i>Τύπος Νανοσωματιδίων</i>				
	Πυριτίου	Μεταλλικά	Άνθρακα	Πολυμερών	Νανομικκάλια
Χημικές	**	*	**	**	**
Ηλεκτρικές	—	**	**	*	—
Οπτικές	—	**	**	—	—
Θερμικές	—	*	*	—	—
Μαγνητικές	—	**	—	—	—

Τα νανοσωματίδια είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά στον διαχωρισμό και στην προσυγκέντρωση των αναλυτών από τη μήτρα του δείγματος. Μοριακά εκτυπωμένα πολυμερή και νανοσωλήνες άνθρακα έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως ως στερεά προσροφητικά υλικά σε εκχυλίσσεις στερεάς φάσης καθώς και για την βελτίωση της διαχωριστικής ικανότητας σε τεχνικές χρωματογραφίας. Ανάλογα με τη συμμετοχή και το ρόλο τους στο βήμα αυτό τα νανοσωματίδια μπορούμε να τα κατατάξουμε [Lucena R. et al., 2011].:

- Ως προσροφητικά υλικά. Στην περίπτωση αυτή υπάρχει απευθείας αλληλεπίδραση μεταξύ αναλύτη και νανοσωματιδίων.
- Ως αδρανή στηρικτικά υλικά. Για παράδειγμα νανοσωματίδια πυριτίου ενεργοποιημένα με ένα συμπλεκτικό αντιδραστήριο (complexation agent).

- Ως μαγνητικά υλικά. Στην περίπτωση αυτή η χρήση μαγνητικού πεδίου απλοποιεί την αναλυτική πορεία. Τα νανοσωματίδια αυτά μπορούν είτε να προσροφούν απευθείας τον αναλύτη είτε μπορούν να ενεργοποιηθούν με οργανικές ομάδες.
- Ως υλικά για την απευθείας ανάλυση δειγμάτων με φασματομετρία μαζών δευτερογενούς ιονισμού.

Μερικά παραδείγματα της χρήσης των νανουλικών για την κατεργασία δειγμάτων και την εκχύλιση αναλυτών δίνονται στον **Πίνακα 3.2** και **3.3**.

Πίνακας 3.2. Προσυγκέντρωση και εκχύλιση μεταλλικών ιόντων από νανοσωματίδια [Kaur A., et al., 2009].

Νανοςωματίδια	Αναλυτική μέθοδος	Αναλύτης	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Δείγμα
		Cr(III)	1.14	
TiO ₂	FAAS	Mn(II)	0.52	Υδατικά περιβαλλοντικά δείγματα
		Ni(II)	1.78	
		Zn(II)	0.8	
		Cd(II)	3.0	Τζημα, υδατικά δείγματα
TiO ₂	GFAAS	Se(IV)	0.16	
		Se(VI)	1.14	Γεωλογικά δείγματα
TiO ₂	ICP-AES	Au(III)	0.016	
		Pd(II)	0.012	
		Ag(I)	0.006	Ιζήματα ποταμών
TiO ₂	ICP-AES	La(III)	0.124	
		Yb(III)	0.108	
		Y(III)	0.108	
		Eu(III)	0.28	
		Dy(III)	0.36	Υδατικά δείγματα
TiO ₂	ICP-AES	Cr(III)	0.32	Υδατικά δείγματα
MWCNs	ICP-OES	La(III)	3-57	
		Yb(III)		

Al ₂ O ₃	ICP-MS	Eu(III) Dy(III)	0.0067	Υδατικά περιβαλλοντικά δείγματα Υδατικά περιβαλλοντικά δείγματα
		Y(III)		
		Mn(II)		
		Zn(II)		
Environmentalwatersamples : υδατικά περιβαλλοντικά δείγματα, WaterSamples : Δείγματα νερού, Sediment : ίζημα, Geologicalsamples : Γεωλογικά δείγματα, Streamsediments : ίζημα ποταμού.				

Πίνακας 3.3. Εφαρμογές νανοσωματιδίων άνθρακα στην εκχύλιση ανόργανων ιόντων, οργανικών μορίων και βιομορίων από περιβαλλοντικά δείγματα, δείγματα τροφίμων και βιολογικά δείγματα. [Linnan X., et al., 2016]

Υλικά άνθρακα	Τροποποίηση	Μέθοδος	Αναλύτης	Μήτρα	Τεχνική Ανίχνευσης
Graphene	–	SPDE	PAHs	Enironmental water	GC-MS
MWCNT	–	dSPE	OPPs	Cereal based food	GC-NPD
MWCNT	–	dSPE	OPPs	Environmetal water tap water/ drink sample	GC-NPD
Graphene	–	SPE cartridge	PAEs	environmental water water plasma Tap water/ drink sample	HPLC-UV
Graphene	–	dSPE	PAEs	Enironmental water	GC-MS
Graphene	–	dSPE	SsDNA	Water	SELDI-ToF- MS
MWCNT	–	dSPE	Peptides	Plasma	20-nano-LC-

					MS/MS
MWCNT	–	dSPE	Triazine herbicides	Environmental water	UPIC-UV
oMWCNT	Oxidation	On-line SPE	Cd ²⁺	Serum Proteins	ETAAS
oMWCNT	Oxidation	dSPE	Cd ²⁺ , Pd ²⁺	Environmental water	TXRF
GO	Oxidation	dSPE	Cd ²⁺ , Pd ²⁺	Water	ICP-OES, APS
oMWCNT	Oxidation	dSPE	Quinolone antibiotics	Water	CE-DAD
GO	Oxidation	SPE cartridge	Chlorophenoxy acid herbicides	Environmental water	CE-UV
MWCNT	Tris-(5-Bromoalkylidene-1,3-propandiamine)	SPE column	Pd ²⁺	Vegetables	FAAS
MWCNT	Diphenylcarbazide	SPE column	Cd ²⁺	Water food	FAAS
MWCNT	3-Mercaptopropylsilanetriolate	SPE cartridge	Cu ²⁺ , Ag ⁺ , Cd ²⁺ , Pd ²⁺	Rosemary, spinach, thymus	FAAS
MWCNT	BSA	On-line SPE	Mn ²⁺ , Zn ²⁺	Human serum	FAAS
Graphene	Acrylamide	On-line SPE	Cd ²⁺	Food	UPIC-UV
Graphene	Amine	r-DSPE for fatty acid clean-up	Heterocyclic amine Pesticides	Oil crops	ETAAS
Graphene	Guanidyl	dSPE	Phosphopeptides	Milk digest	TXRF
CNT	Boronic acid/MNP	Magnetic SPE	Glycopeptides	Water	ICP-OES, APS
GO	Trypsin	In situ digestion	Proteins	Human lens Tissue	CE-DAD
Graphene	Supported on silica	SPE cartridge	Chlorophenol	Water	CE-UV
GO	Supported on silica	SPE cartridge	OH-PBDE	Hexane	FAAS
CNT	MNP/amino or carboxyl	Magnetic SPE	Estrogens	Milk	HPLC-UV
MWCNT	Fabricated with MNPS	Magnetic SPE	PAEs	Urine	GC-MS
Graphene	Fe ₃ O ₄ @SiO ₂	Magnetic SPE	Proteins/peptides	Water	MALDI-ToF MS

oMWCNT	Fabricated with MNPs	Magnetic SPE	NAaP	Cell hysates	LC-MS/MS
oMWCNT	Fabricated with MNPs	Magnetic SPE	NAaP	Living cells	LC-MS/MS

SPDE : εκχύλιση δίσκου στερεάς φάσης, dSPE : εκχύλιση διασποράς στερεής φάσης, SELDI : επιφανειακά ενισχυμένος ιονισμός/εκρόφηση με λέιζερ, ETAAS: φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης με ηλεκτροθερμικό ψεκασμό, TFXS : φασματομετρία φθορισμού ακτίνων X ολικής ανάκλασης, ICP-OES : φασματόμετρο οπτικής εκπομπής επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος, AFS : φασματόμετρο ατομικού φθορισμού, IMS : φασματομετρία μάζας εικόνας, OH-PHDE : Υδροξυλιωμένοι πολυβρωμοφαινυλαιθέρες.

Νανοσωματίδια άνθρακα και διαφόρων μετάλλων έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη ηλεκτροχημικών και οπτικών αναλυτικών μεθόδων καθώς και για την ανάπτυξη (βιο)αισθητήρων [Valcárcel M., et al., 2008]. Οι περισσότεροι αισθητήρες παρέχουν ποσοτικά αποτελέσματα άλλοι όμως είναι σχεδιασμένοι για να παρέχουν μόνο ποιοτικά αποτελέσματα όπως για παράδειγμα οι αισθητήρες ποιότητας τροφίμων. Οι αισθητήρες αυτοί χρησιμοποιούνται ενσωματωμένοι στη συσκευασία τροφών για την ταχεία ανίχνευση και ταυτοποίηση της ποιότητας των τροφίμων για την αποφυγή τροφικής δηλητηρίασης. Η λειτουργία τους βασίζεται στην ανίχνευση τοξινών ή/και μικροοργανισμών γεγονός που σηματοδοτεί χρωματικές μεταβολές ορατές δια γυμνού οφθαλμού [Sharma D., et al., 2017].

Χαρακτηριστικά είδη ηλεκτροχημικών και χημικών αισθητήρων, η αρχή λειτουργίας τους καθώς και τα πλεονεκτήματά τους συνοψίζονται στον **Πίνακα 3.4**.

Πίνακας 3.4. Διάφορες λειτουργίες των νανοσωματιδίων σε συστήματα αισθητήρων
[Yuanyuang Li., et al., 2010]

Είδη αιθητήρων	Αρχή ανίχνευσης	Λειτουργία των νανοσωματιδίων	Ιδιότητες	Πλεονεκτήματα ανίχνευσης
Οπτικοί βιοαιθητήρες	Μεταβολές στις οπτικές ιδιότητες	Βελτίωση στις μεταβολές του δείκτη διάθλασης	Μεγάλη διηλεκτρική σταθερά, υψηλή πυκνότητα, μεγάλο μοριακό βάρος	Βελτιωμένη ευαισθησία
		Βελτίωση στη μεταφορά ηλεκτρονίων	Αγωγιμότητα, κβαντική διάσταση	Βελτιωμένη ευαισθησία
Ηλεκτροχημικοί βιοαιθητήρες	Μεταβολές στις οπτικές ιδιότητες	Πλατφόρμα ακινητοποίησης	Βιοσυμβατότητα, μεγάλη επιφάνεια επαφής	Βελτιωμένη ευαισθησία και σταθερότητα
		Κατάλυση αντιδράσεων	Υψηλή επιφανειακή ενέργεια	Βελτιωμένη ευαισθησία και εκλεκτικότητα
Πιεζοηλεκτρικοί βιοαιθητήρες	Μεταβολές στη μάζα	Ακινητοποίηση βιομορίων, Ενίσχυση μεταβιλών μάζας	Βιοσυμβατότητα, υψηλή επιφανειακή ενέργεια, μεγάλη αναλογία επιφάνεια προς όγκο	Βελτιωμένη ευαισθησία

Στους πίνακες που ακολουθούν συνοψίζονται μερικές εφαρμογές των νανουλικών και των νανοσωματιδίων για την ανάπτυξη αισθητήρων και βιοαιθητήρων για τον προσδιορισμό και ανίχνευση φυτοφαρμάκων, βακτηρίων, αλλεργιογόνων και ιών.

Πίνακας 3.5. Πλασμονικοί αισθητήρες και βιοαισθητήρες για τον προσδιορισμό φυτοφαρμάκων [Boken J., et al., 2017].

Φυτοφάρμακο που ανιχνεύθηκε	Αισθητήρες	Όριο/εύρος ανίχνευσης	Οργανολογία/είδος αισθητήρα
Fenamithion and acetamiprid in water	Cd–Te quantum dots with p-sulfonatocalix arene	0.12 nM and 0.34 nM	Luminescence
Parathion	Gold electrode	291.26 Da	Quartz crystal microbalance
Aldrin, dieldrin, chlorpyrifos	Tissue fats and rendering oils	0.005–0.1 $\mu\text{g g}^{-1}$	Laser induced breakdown Spectroscopy
Organophosphorus	O-ethyl O-4-nitrophenyl Phenylphosphonothioate	0.01 mg mL^{-1}	Immuno-chromatographic based sensor
Carbaryl	Inhibition immunoassay using BSACNH Conjugate	1.3 mg mL^{-1}	b-SPR
Atrazine	Competition immunoassay using atrazine-HRP-conjugate	5 ng mL^{-1}	Biacore-2000
Melamine	18-Crown-6 ether functionalized Au NPs	6 ppb	Optica
Pirimicarb	Molecular imprinted nano-polymers (methacrylic acid with carboxyl functional groups)	$8 \times 10^{-6} \text{M}$	Piezoelectric
Methyl parathion	Nano-ZrO ₂ /graphite/paraffin	2 ng mL^{-1}	Electrochemical
Methyl parathion	Fe ₃ O ₄ @Au nanocomposite	0.1 ng mL^{-1}	Inhibition-based enzyme Biosensors
Chlorpyrifos and fenthion	Tangerine juices	0.20 \pm 0.04 mg L^{-1} and 0.50 \pm 0.06 mg L^{-1}	Immunoassays-based Biosensors
16 pesticides from different chemical groups in water	Polydimethylsiloxane and Polyacrylate	0.015–0.13 mg L^{-1}	Gas chromatography based sensor
Paraxon	Indirect immunoassay	1–100 ppb	LSPR

SPR : συντονισμός επιφανειακών πλασμονίων, LSPR : τοπικός συντονισμός επιφανειακών πλασμονίων, NPs : νανοσωματίδια.

Πίνακας 3.6. Πλασμονικοί αισθητήρες και βιοαισθητήρες για τον προσδιορισμό αλλεργιογόνων [Boken J., et al., 2017].

Αναλύτης	Μέθοδος	Όριο ανίχνευσης	Είδος αισθητήρα/Οργανολογία
Shrimp allergen Pen a 1 (tropomyosin)	L-cysteine modified gold electrode	0.15 μgml^{-1}	Electrochemical
Cytokine allergen β -Casein	Label-free immunoassay	19 ng ml^{-1}	Label-free biosensor
Peanut protein	Sandwich assay	85 ng ml^{-1}	Biacore 3000
Soluble extracts of Lolium perenne pollen	Direct immunoassay	0.7 ng ml^{-1}	SPR biosensor
Histamine	Indirect competitive immunoassay	0.1-1 $\mu\text{g ml}^{-1}$	Biacore
		3 ppb	SPR biosensor

Πίνακας 3.7. Πλασμονικοί αισθητήρες και βιοαισθητήρες για την ανίχνευση ιών [Boken J., et al., 2017].

Είδη ιών	Μέθοδος	Όριο/εύρος ανίχνευσης	Είδος αισθητήρα/Οργανολογία
Epstein-Barr	Direct Immunoassay	0.2 ng mL^{-1}	Wavelength division multiplexing based sensor
Maize chlorotic mottle	Enzyme-based immunosorbent assay	1-1000 ppb	SPR biosensor
Avian leukosis	Fe_3O_4 @gold quantum dots	115 TCI $D_{50} \text{ mL}^{-1}$	Immuno-based sensor
Hepatitis B virus DNA	AuNPs and fluorescein	15 pmol L^{-1}	Fluorescence spectrometer
Hepatitis B virus DNA	Sandwich immunoassay	50 aM	SERS based sensor
Herpes simplex virus type 1	Direct Immunoassay	10^{-4} fringes	Young interferometer sensor

SPR : συντονισμός επιφανειακών πλασμονίων, SERSbasedsensor: Αισθητήρας επιφανειακής ενίσχυσης της σκέδασης RAMAN

Πίνακας 3.8. Πλασμονικοί αισθητήρες και βιοαισθητήρες για την ανίχνευση βακτηρίων [Boken J., et al., 2017].

Αναλύτης	Μέθοδος	Όριο/εύρος ανίχνευσης	Οργανολογία/είδος αισθητήρα
Listeria monocytogenes	Subtractive inhibition	10^5 cfu mL ⁻¹	Biacore 3000
Ecoli O157:H7	Immunoassay Sandwich assay	10^3 - 10^7 cfu mL ⁻¹	Optical fiber probes
Ecoli O157:H7	Sandwich assay	2 cfu mL ⁻¹ /30- $3*10^4$ cfu mL ⁻¹	SPR biosensor
Ecoli O157:H7	Sandwich assay	10^3 cfu mL ⁻¹	SPR biosensor
Ecoli O157:H7	Direct Immunoassay	10^7 cfu mL ⁻¹ / $8.7*10^6$ cfu mL ⁻¹	Commerdally available Spreeta sensor
Yersinia enterocolitica	Direct Immunoassay	10^2 - 10^7 cfu mL ⁻¹	Wavelength division multiplexing SPR biosensor
Legionella pneumophila	ELISA immunosorbent assay	10^8 cfu mL ⁻¹	
Staphylococcus aureus	Direct Immunoassay	10 cfu mL ⁻¹	SPR biosensor
Campylobacter jejuni	Indirect Immunoassay	10^3 cfu mL ⁻¹	SPR biosensor
Listeria monocytogenes	Direct Immunoassay	10^7 cfu mL ⁻¹	Biacore 3000
Vibrio cholerae O1	Direct Immunoassay	$3.7*10^5$ cfu mL ⁻¹	SPR biosensor
Addovoraxavenaesubsp. citrulli	Direct, subtractive, sandwich Immunoassay	$1.6*10^{-6}$ cfu mL ⁻¹	SPR biosensor

SPR : συντονισμός επιφανειακών πλασμονίων

Οι μοναδικές φυσικές και χημικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων τα καθιστούν επίσης κατάλληλα για τον σχεδιασμό νέων και βελτιωμένων ηλεκτροχημικών αισθητήρων και βιοαισθητήρων. Πολλά είδη νανοσωματιδίων, όπως των μετάλλων, έχουν χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή ηλεκτροχημικών αισθητήρων. Τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα που παρέχουν τα νανοσωματίδια είναι η ακινητοποίηση βιομορίων, η κατάλυση ηλεκτροχημικών αντιδράσεων και η διευκόλυνση της μεταφοράς

ηλεκτρονίων μεταξύ της επιφάνειας του ηλεκτρολύτη και των αναλυτών [Luo X., et al., 2005].

Ακολούθως παρουσιάζονται εφαρμογές νανοσωματιδίων στην ανάπτυξη ηλεκτροχημικών αισθητήρων και βιοαισθητήρων [Trojanowicz M., 2016].

Πίνακας 3.9. Ηλεκτροχημικοί αισθητήρες και βιοαισθητήρες για τον προσδιορισμό επιμολύνσεων σε τρόφιμα [Rotariu L., et al., 2016].

Αναλύτες	Βιοαισθητήρας	Μεταλλάκτης (Transducer)	Όριο ανίχνευσης
<i>Enzyme biosensors based on substrate detection</i>			
Histamine	histamine dehydrogenase	TTF/SPE	8.1 μM
Putresceine	putrescine oxidase	TTF/SPE	10 μM
Spermine	spermine oxidase	PB/SPE	2 μM
Xanthine	xanthine oxidase	MWCNTs – poly(GMA-co-VFc)/ PGE	0.12 μM
Lysine	lysine oxidase	MWCNTs-MNPs/Au	0.05 μM
Phenols	laccase	PDA-NiCNFs/MGCE	0.69 μM catechol
Phenols	laccase	RGO-PdCu NCs/GCE	1.5 μM catechol
Phenols	laccase	chitosan/ZnO sol-gel /GCE	0.29 μM catechol
Phenols	peroxidase	SWCNTs/SPE	110 nM catechol 50 nM pyrogallol
Phenols	peroxidase	AuNPs/GCE	74 μM hydroquinone
Phenols	peroxidase	AgNPs-SiSG /poly L-arginine/CPE	0.57 μM hydroquinone 6.2 μM pyrogallol
2-chlorophenol	peroxidase	Co-Al layered double hydroxide/GCE	2 nM
alkyl-phenols	Peroxidase	alkyl-phenols peroxidase MnO ₂ /SPE	0.8 μM TBP 0.7 μM OP 1.7 μM NP
Dopamine	laccase	SiO ₂ -PA NPs/GCE	0.26 μM
bisphenol A	tyrosinase	TiO ₂ /MWCNTs/PDDA/Nafion/graphite	0.066 μM
bisphenol A	tyrosinase	RGO-chitosan/ITO	0.74 nM

bisphenol A	tyrosinase	MWCNTs/BDD	10 pM
Nitrite	nitrite reductase	carbon ink/SPE	0.6 μM
Glutamate	glutamate dehydrogenase	MWCNTs-chitosan/MB-SPE	3 μM
penicillin G	β-lactamase	CoPC/CPE	0.079 μM

Inhibition-based enzyme biosensors

Cyanide	HRP	Au sonoparticles/sonogel-carbon Electrode	0.03 μM
Paraoxon	AChE	Ni-NTA – GO/GCE	3 μM
organophosphate pesticides	AChE	AuNPs-PPy-RGO	0.5 nM paraoxon-ethyl
Methyl parathion	methyl parathion hydrolase	AuNPs/GCE	0.07 ppb
Carbamates	laccase-tyrosinase	AuNPs–chitosan/graphene doped CPE	1.68 nM
Pirimicarb	laccase	MWCNTs paste electrode	0.18 μM

Affinity sensors – MIP sensors

Estradiol	MIP (p-aminothiophenol functionalized gold nanoparticles)	Au	1.09 fM
aflatoxin B1	MIP (p-aminothiophenol functionalized gold nanoparticles)	Au	3 fM
Tetracycline	MIP (p-aminothiophenol functionalized gold nanoparticles)	Au	0.22 fM
quinoxaline-2-carboxylic acid	3-aminopropyl triethoxysilane and tetraethoxysilane	MWCNTs-chitosan/GCE	0.44 μM
Sulfadimethoxine	overoxidized PPy	Au	70 μM
Isocarboxiphos	poly(o-phenylenediamine-co-gallic acid-co-m-aminobenzoic acid)	GCE	20 nM

TTF -tetrathiafulvalene, PB - μπλε Πρωσσίας, MWCNTs - νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων, SWCNTs - νανοσωλήνες άνθρακα με μονό τοίχωμα, VFcβινυλογεροκένιο, GMA - μεθακρυλικό γλυκιδύλιο, PGE - ηλεκτρόδιο γραφίτη, MNP - μαγνητικά νανοσωματίδια, GCE - ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα, PDA–πολυντοπαμίνη, NiCNF– νανοίνες άνθρακα με νανοσωματίδια Ni, RGO - ανηγμένο οξείδιο του γραφένιου, PdCuNCs - νανοσωματίδια κράματος παλλαδίου-γαλκού, SiO₂-PANPs - νανοσωματίδια διοξειδίου του πυριτίου με φυτικό οξύ, TBP - 4-τ-βουτυλοφαινόλη, OP-4-τ-οκτυλοφαινόλη, NP-4-η- εννεανυλοφαινόλη, PDDA-

πολυ (χλωριούχο διαλλυλοδιμεθυλαμμώνιο) CPE - ηλεκτρόδιο πάστας άνθρακα, AgNPs - νανοσωματίδια αργύρου, SiSG - αερόλυμα πυριτίου, CoPC - φθαλοκυανίνη κοβαλτίου, PPy - πολυπυρρόλη.

Πίνακας 3.10. Εφαρμογή μεταλλικών νανοσωματιδίων σε βολταμμετρικούς /αμπερομετρικούς αισθητήρες μεταξοτυπίας (SPE) και βιοαισθητήρες και εφαρμογές τους στην - περιβαλλοντική ανάλυση (Env), στην ανάλυση τροφίμων (food), ιατρική διάγνωση (Med) και στην Φαρμακευτική ανάλυση [Trojanowicz M., 2016].

Νανοςωματίδιο	Αναλύτες	Συστατικά ηλεκτροδίων	Τεχνική ανίχνευσης	Απόκριση	Εφαρμογές
AgNP	Lamotrigine	CSPE, AgNP	DPASV	0.33–1.5 μM (0.37 μM)	Pharm
	Oxcarbazepine	CSPE, AgNP	AdSV	(25.4 μM)	Pharm
	Dopamine	CSPE, AgNP	DPV	0.05–45.3 μM (17 nM)	Pharm
AuNP	Allergen Ara h 1	CSPE, AuNP, antibody	ASV	12.6–2000 $\mu\text{g/L}$ (3.8 $\mu\text{g/L}$)	Food
	As(III)	CSPE, ibuprofen modified AuNP	CV	0.1–1800 $\mu\text{g/L}$ (0.018 $\mu\text{g/L}$)	Env
	Chloramphenicol	CSPE, Au nanotubes, aptamer	SWV	0.03–6 μM (4 nM)	Med
	Cholesterol	Rhodium-graphite SPE, AuNPs, cytochrome P450scc	Amp	10–70 μM	–
	Cr(VI)	CSPE, AuNP	ASV	0.7–35 $\mu\text{g/L}$ (1.6 ng/L)	Env
	Dengue virus NS1 protein	CSPE, thiophene, AuNP, protein A, antibody	CV	0.04–0.6 mg/L (0.015 mg/L)	Med
	Dopamine	CSPE, AuNP	SWV	0.2–100 μM both (8 nM DA, 22 nM HIAA)	Farm
	5-Hydroxyindole acetic acid				
	Dissolved oxygen	CSPE, antrquinone-cysteamine modified AuNP	CV	0.2–6.1 mg/L (0.131 mg/L)	Env
	Disulfiram (D)	CSPE, AuNP	Amp (HPLC)	0.5–15 mg/L D (0.165 mg/L)	Food
	Thiram (T)			0.067–15 mg/L T (22 $\mu\text{g/L}$)	
	Gluconic acid	CSPE, tetrathiafulvalene enzymes specific for each analyte	Amp	0.79–6.9 μM GA (0.87 μM)	Food
	Malic acid			1.89–13.6 μM MA (1.84 μM)	
Homocysteine	CSPE, AuNP with immobilized cytochrome c	Amp	0.4–700 μM (0.3 μM)	Med	
IgG human and	CSPE, AuNP, ALP-	LSV	0.01–250 mg/L	Med	

	mouse	labeled Antibody		both (4.8 ng.L H, 6.1 ng.L M IgG)	
	Mathamphetamine	CSPE, MWCNT, AuNP, Nafion	SWASV	0.0037–9.2 mg/L (1.1 µg/L)	–
	Pb(II)	CSPE modified with aminophenyl functions, AuNP	SWASV	2.5–25 nM	–
	Pb(II), Cu(II)	Au-SPE, AuNP	SWASV (simultaneous determ.)	20–200 µg/L Pb (2.2 µg/L) 20–300 µg/L Cu (1.6 µg/L)	–
	Salmonella	CSPE, ionic liquid, AuNP, Antibody	CV	104–109 cfu/mL (3000 cfu/mL)	Food
	Sildenafil citrate	CSPE, AuNP	CV	1.8–33 mM (0.52 nM)	Med, Pharm
	Thrombin	CSPE, AuNP, antibody, HRP	Amp	10 pM–100 nM (1.5 pM)	Med
	Tumor marker MUC1	CSPE, AuNP, thiolated aptamer	DPV	Up to 10 µg/L (0.95 µg/L)	Med
	W(VI)	CSPE, AuNP. ALP	Chronoamp	3–30 µM (0.29 µM)	Env
CuNP	Amino acids	CSPE, CuNP	Amp (FIA, HPLC)	(24 nM–2.7 µM)	Med, Food
	Creatinine	CSPE, CuNP	Amp (HPLC)	0.1–250 µM creatinine (250 nM)	Med
	Organic acids			0.05–10 µM uric acid (10 nM)	
FeNP	Glucose	CSPE, hexacyanoferrate, GOD	Amp	Up to 600 mg/L	–
NiNP	Carbohydrates	CSPE, Ni wires	Amp (FIA)	(20 µM)	Med, Pharm
PdNP	Dissolved oxygen	CSPE, PdNP	CV	Up to 8 mg/L	Env
	H ₂ O ₂	CSPE, CNT, PdNP	Amp (FIA)	0.1–1.0 mM (20 µM)	Food
PtNP	As(III)	CSPE, PtNP	CV	0.16–1.3 µM (77 nM)	Env
RhNP	H ₂ O ₂	CSPE, polyethyleneimine, RhNP	Chronoamp	5–600 µM (2 µM)	Food

AgNP - νανοσωματίδια αργύρου, AuNP - νανοσωματίδια χρυσού, CuNP - νανοσωματίδια χαλκού, FeNP - νανοσωματίδια σιδήρου, PdNP - νανοσωματίδια παλλαδίου, PtNP - νανοσωματίδια πλατίνας, RhNP - νανοσωματίδια ροδίου, cfu - μονάδα σχηματισμού συσσωματωμάτων.

3.2 Εφαρμογές στη Χορήγηση Φαρμάκων και στην βιοϊατρική

Η χορήγηση φαρμάκων με τη βοήθεια νανοσωματιδίων μπορεί να ρυθμίσει τη βιοδιανομή ενός φαρμάκου μέσα σε ένα ζωντανό σύστημα και να ελαχιστοποιήσει τις

δυσμενείς επιδράσεις, βελτιώνοντας έτσι τον θεραπευτικό δείκτη ενός δεδομένου φαρμάκου [Sharma D., et al., 2017]. Τα νανοσωματίδια χρυσού καθώς και τα μαγνητικά νανοσωματίδια έχουν βρει πολλές εφαρμογές στον τομέα της βιολογικής επισήμανσης, της χημικής και βιολογικής ανίχνευσης, της φωτοθερμικής θεραπείας, της βιοϊατρικής απεικόνισης, της φωτοακουστικής απεικόνισης, της φαρμακοκινητικής, και της θεραπείας του καρκίνου [Khan AK., et al., 2014].

3.3 Περιβαλλοντικές και βιομηχανικές εφαρμογές

Διάφοροι ημιαγωγοί όπως το CdS, ZnO, WO₃, TiO₂ και Fe₂O₃ μπορούν να δράσουν ως φωτοκαταλύτες για χημικούς μετασχηματισμούς που προκαλούνται από το φως λόγω της μοναδικής τους ηλεκτρονικής δομής, η οποία χαρακτηρίζεται από μια ζώνη σθένους και μια ζώνη αγωγιμότητας. Κατά τη διάρκεια μιας διαδικασίας διέγερσης, ένα ηλεκτρόνιο στη ζώνη σθένους διεγείρεται στη ζώνη αγωγιμότητας, αφήνοντας μια θετική οπή στη ζώνη σθένους. Επίσης, τα νανοσωματίδια χρησιμοποιούνται ως καταλύτες σε πληθώρα βιομηχανικών εφαρμογών. Σήμερα, είναι διαθέσιμη μια ποικιλία μορφολογιών νανοδομημένων υλικών για καταλυτικές και φωτο-καταλυτικές εφαρμογές, συμπεριλαμβανομένων των νανοσωματιδίων, των νανοραβδών, των νανοσωλήνων, των νανοδομημένων μεμβρανών ή επικαλύψεων, των νανοσωληνίσκων και των μεσοπορώδων ή νανοπορώδων δομών [Sharma D., et al., 2017].

Πίνακας 3.11. Ενδεικτικές εφαρμογές των μεταλλικών νανοδομημάτων στην κατάλυση [Long N.V., et al., 2012].

Μεταλλικά NPs	Μέγεθος και σχήμα	Εφαρμογές
PtNPs	PtNPs : τετραεδρικά, κυβικά, ακανόνιστα, πρισματικά, εικοσαεδρικά και κυβο-οκταεδρικά σχήματα σωματιδίων σε περιοχές μεγέθους των 10nm και 20nm	Ιατρική και βιολογία
PdNPs	PdNPs : Διάφορα σχήματα τριγωνικών, τετραεδρικών, τετραγωνική πυραμίδα, ρομβοεδρική, πενταγωνική, εξαγωνική με μέσο μέγεθος περίπου 12,6 στα νανοδομημάτια των 20 nm	Κατάλυση και Ηλεκτροκατάλυση
RuNPs	RuNPs: Διάφορα μη προσδιορισμένα σχήματα νανοδομημάτων κυμαίνονται μεταξύ 1,2-6,5 nm και 3,8-7,3 nm	Κατάλυση και Ηλεκτροκατάλυση
RhNPs	RhNPs: Σφαιρικά σχήματα RhNPs: Νανοδομημάτια με εύρος μεγέθους από 2 έως 20 nm, μέσο μέγεθος περίπου 7 nm	Κατάλυση και Ηλεκτροκατάλυση
CuNPs	CuNPs : 2 nm	Κατάλυση και Ηλεκτροκατάλυση
CoNPs	CoNPs : 3.2-171.4 nm	Κατάλυση και Ηλεκτροκατάλυση
NiNPs	Ni nanopowders : εικοσάεδρα, μικροσφαιρίδια και clusters με μέσο μέγεθος 1 μ m. NiNPs : εύρος μεγέθους από 30 ως 100 nm	Κατάλυση και Ηλεκτροκατάλυση
Au, Pt, Pd, Ru, and Ir NPs	Μέσο μέγεθος < 10 nm	Κατάλυση και Ηλεκτροκατάλυση
Noble NPs	PtNPs: 2 nm, PtRuNPs: 2.5 nm, Pt:2.5 nm, PtCr: 3 nm, in patent US20020034675	Κατάλυση και Ηλεκτροκατάλυση

Catalysis : Κατάλυση, Electrocatalysis : Ηλεκτροκατάλυση, Medicine : Ιατρική, Biology : Βιολογία.

Τα νανοδομημάτια μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ως προσροφητικά για την απομάκρυνση ρύπων από περιβαλλοντικά συστήματα. Οι ιδιότητες προσρόφησης των νανοδομημάτων εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τα χαρακτηριστικά των στερεών π.χ. την μορφολογία, την κρυσταλλική δομή, την διαθεσιμότητα υδροξυλίων, κτλ. Κατά κανόνα τα στερεά προσροφητικά νανοδομημάτια δεν παρέχουν υψηλή εκλεκτικότητα. Για να ξεπεραστεί το πρόβλημα αυτό, απαιτείται φυσική ή χημική τροποποίηση της επιφάνειας του προσροφητή με κατάλληλες οργανικές ενώσεις (πχ. χηλικές για την δέσμευση μεταλλο-ιόντων) [Kaur A., et al., 2009].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

4.1 Ορισμός Φαινολικών ενώσεων

Οι φαινολικές ενώσεις είναι δευτερογενείς μεταβολίτες της φωσφορικής πεντόζης και των φαινυλοπροπανοειδών στα φυτά [Randhir, et al., 2004]. Αυτές οι ενώσεις διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και στην αναπαραγωγή των φυτών παρέχοντας προστασία όσον αφορά τα βακτήρια και τους παθογόνους οργανισμούς [Bravo, 1998]. Επίσης, συμβάλλουν στο χρώμα και στις οργανοληπτικές ιδιότητες των φρούτων και των λαχανικών [Alasalvar., et al., 2001].

Οι ενώσεις αυτές παρουσιάζουν σημαντικές ιδιότητες, όπως αντι-αλλεργικές, αντι-αρθριτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντι-μικροβιακές, αντι-οξειδωτικές, αντι-θρομβωτικές, καρδιοπροστατευτικές και αγγειοδιασταλτικές [Benavente-Garcia, et al., 1997, Manach., et al., 2005, Middleton et al., 2000, Puurponen-Pimia., et al., 2001, Samman., et al., 1998]. Επίσης, έχουν συνδεθεί με οφέλη για την υγεία που προέρχονται από τα υψηλά επίπεδα στα φρούτα και τα λαχανικά [Hertog, et al., 1993, Parr., et al., 2000]. Η ευεργετική τους δράση οφείλεται στις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες [Heim, et al., 2002]. Οι φαινολικές ενώσεις θα μπορούσαν να αποτελέσουν έναν καθοριστικό παράγοντα της αντιοξειδωτικής δράσης των τροφίμων [Parr., et al., 2000], και θα μπορούσαν ως εκ τούτου να αποτελέσουν μία φυσική πηγή αντιοξειδωτικών.

4.2 Χημεία Φαινολικών ενώσεων

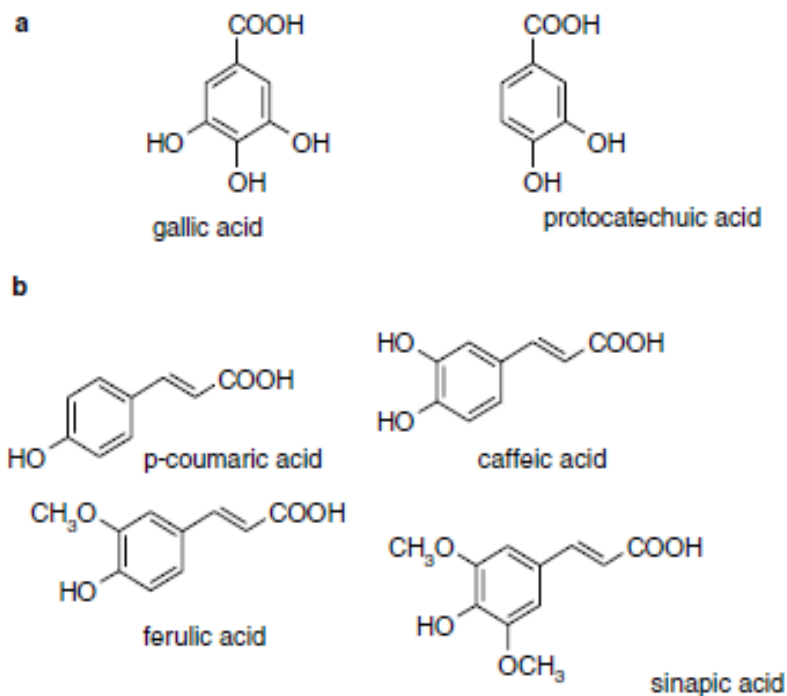
Δομικά, οι φαινολικές ενώσεις περιλαμβάνουν έναν αρωματικό δακτύλιο που φέρει έναν ή περισσότερους υδροξυλικούς υποκαταστάτες και κυμαίνονται από απλά

φαινολικά μόρια έως υψηλά πολυμερισμένες ενώσεις [Bravo, 1998]. Λόγω της δομικής ποικιλομορφία τους, η ομάδα των ενώσεων αυτών καλείται συχνά ως πολυφαινόλες. Οι περισσότερες φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν στη φύση παρουσιάζονται ως προϊόντα σύζευξης με μονο-και πολυ-σακχαρίτες που συνδέονται με μία ή περισσότερες φαινολικές ομάδες και μπορούν επίσης να εμφανιστούν ως λειτουργικά παράγωγα, όπως εστέρες και μεθυλεστέρες. Αυτή η δομική ποικιλομορφία έχει ως αποτέλεσμα μέσα από το ευρύ φάσμα των φαινολικών ενώσεων που απαντώνται στη φύση, οι φαινολικές ενώσεις να μπορούν βασικά να ταξινομηθούν σε διάφορες κατηγορίες όπως φαίνεται στον **Πίνακα 4.1** [Harborne, 1989, Harborne, et al., 1999]. Από αυτές, τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή και οι ταννίνες θεωρούνται ως οι βασικές διατροφικές Φαινολικές ενώσεις [King & Young, 1999].

Πίνακας 4.1. Διάφορες κατηγορίες φαινολικών ενώσεων.

Class	Structure
Simple phenolics, benzoquinones	C_6
Hydroxybenzoic acids	C_6-C_1
Acetophenones, phenylacetic acids	C_6-C_2
Hydroxycinnamic acids, phenylpropanoids (coumarins, isocoumarins, chromones, chromenes)	C_6-C_3
Napthoquinones	C_6-C_4
Xanthones	$C_6-C_1-C_6$
Stilbenes, anthraquinones	$C_6-C_2-C_6$
Flavonoids, isoflavonoids	$C_6-C_3-C_6$
Lignans, neolignans	$(C_6-C_3)_2$
Biflavonoids	$(C_6-C_3-C_6)_2$
Lignins	$(C_6-C_3)_n$
Condensed tannins (proanthocyanidins or flavolans)	$(C_6-C_3-C_6)_n$

Τα φαινολικά οξέα αποτελούνται από δύο ομάδες οι οποίες είναι τα υδροξυβενζοϊκά οξέα και τα υδροξυκιναμωμικά οξέα (**Εικόνα 4.1**). Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα περιλαμβάνουν το γαλλικό οξύ, το p-υδροξυβενζοϊκό οξύ, το πρωτοκατεχουϊκό οξύ, το βανιλικό οξύ, τα οποία έχουν κοινή δομή C₆-C₁. Τα υδροξυκιναμωμικά οξέα, από την άλλη πλευρά, είναι αρωματικές ενώσεις με μία πλευρική αλυσίδα τριών ανθράκων (C₆-C₃), με καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ, p-κουμαρικό οξύ και σιναπικό οξύ να είναι τα πιο κοινά [Bravo, 1998].



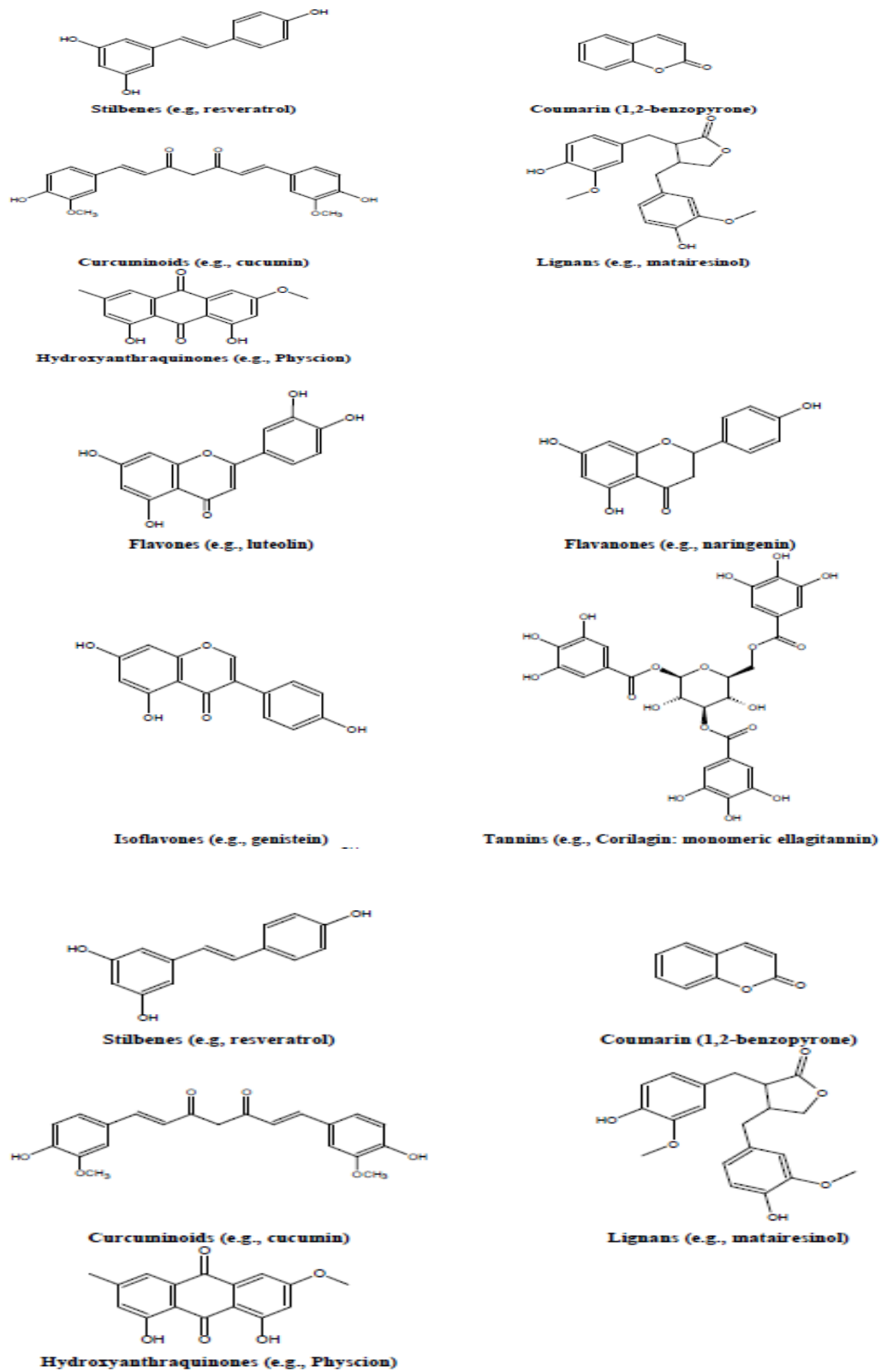
Εικόνα 4.1. Παραδείγματα υδροξυβενζοϊκών (α) και υδροξυκιναμωμικών (β) οξέων.

Τα φλαβονοειδή αποτελούν τη μεγαλύτερη ομάδα φαινολικών ενώσεων στα φυτά, αντιπροσωπεύοντας πάνω από το μισό των οκτώ χιλιάδων φυσικά απαντώμενων

φαινολικών ενώσεων [Harborne., et al., 1999]. Τα φλαβονοειδή είναι ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους, αποτελούμενες από δεκαπέντε άτομα άνθρακα, με μια διαμόρφωση C₆-C₃-C₆. Ουσιαστικά, η δομή αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους A και B, ενωμένους με γέφυρα 3-άνθρακα, συνήθως με τη μορφή ετεροκυκλικού δακτυλίου C [Bohm, 1998, Merken & Beecher, 2000]. Οι μεταβολές στα πρότυπα υποκατάστασης στον δακτύλιο C καταλήγουν σε διάφορες κατηγορίες φλαβονοειδών, δηλαδή σε φλαβονόλες, φλαβόνες, φλαβανόνες, φλαβανόλες (ή κατεχίνες), ισοφλαβόνες, φλαβανόλες και ανθοκυανιδίνες (**Εικόνα 4.1**) (Hollman & Katan, 1999), εκ των οποίων οι φλαβόνες και οι φλαβονόλες είναι οι πιο ευρέως γνωστές και ποικίλουν δομικά. Αντικαταστάσεις στους δακτυλίους A και B δημιουργούν διαφορετικές ενώσεις εντός κάθε κατηγορίας φλαβονοειδών. Αυτές οι υποκαταστάσεις μπορεί να περιλαμβάνουν οξυγόνωση, αλκυλίωση, γλυκοσυλίωση, ακυλίωση και σούλφωση [Bohm, 1998, Hollman & Katan, 1999].

Οι ταννίνες (εστέρες γαλλικού οξέος), οι οποίες είναι ενώσεις υψηλού μοριακού βάρους, αποτελούν την τρίτη σημαντικότερη ομάδα φαινολικών ενώσεων και μπορεί να χωριστούν σε υδρολύσιμες και συμπυκνωμένες [Porter, 1989]. Η πρώτη ομάδα είναι οι εστέρες του γαλλικού οξέος (γαλλο- και ellagi-ταννίνες), ενώ η τελευταία (επίσης γνωστοί ως προανθοκυανιδίνες) είναι πολυμερή μονομερών πολυδροξυφλαβαν-3-όλης. Μια τρίτη υποδιαίρεση, οι φλωροταννίνες (phlorotannins) που αποτελούνται εξ ολοκλήρου από phloroglucinol, έχουν απομονωθεί από διάφορα είδη από καφέ φύκια [Porter, 1989], αλλά δεν είναι σημαντικές ενώσεις στην ανθρώπινη διατροφή [Bravo, 1998, Balasundram N., et al., 2006].

Η αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών ενώσεων οφείλεται στην ικανότητά τους να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες, δίνοντας άτομα υδρογόνου ή ηλεκτρόνια. Στην περίπτωση των φαινολικών οξέων για παράδειγμα, η αντιοξειδωτική δράση εξαρτάται από τον αριθμό και τις θέσεις των υδροξυλομάδων σε σχέση με τις λειτουργικές ομάδες καρβοξυλίου. Τα μονουδροξυβενζοϊκά οξέα με την υδροξυλομάδα σε όρθο- ή πάρα-θέση ως προς την ομάδα $-COOH$ δεν εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση σε αντίθεση με το m-υδροξυβενζοϊκό οξύ. Η αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών οξέων αυξάνει όταν αυξάνεται ο βαθμός υδροξυλίωσης, όπως στην περίπτωση του τριυδροξυλωμένου γαλλικού οξέος, το οποίο δείχνει υψηλή αντιοξειδωτική δράση. Τα υδροξυκιναμωμικά οξέα από την άλλη πλευρά, εμφανίζουν μεγαλύτερη οξειδωτική δράση σε σύγκριση με τα υδροξυβενζοϊκά οξέα. Η δράση αυτή οφείλεται στην ομάδα $CH=CH-COOH$ που μπορεί να προσφέρει πιο εύκολα $-H$ και σταθεροποίηση ριζών σε σύγκριση με την ομάδα $-COOH$ στα υδροξυβενζοϊκά οξέα. Στην **Εικόνα 4.2** παρουσιάζονται διάφορες φαινολικές δομές με παραδείγματα [Balasundram N., et al., 2006].



Εικόνα 4.2. Βασικές φυτικές φαινολικές δομές με παραδείγματα [Apar R., et al., 2007].

4.3 Αντιοξειδωτική δράση φαινολικών ενώσεων

Έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες σχετικά με τη σημασία των αντιοξειδωτικών στα βιολογικά συστήματα, τα οποία εξουδετερώνουν το οξειδωτικό στρες που προκαλεί αρκετές ανθρώπινες ασθένειες. Τέτοιες ασθένειες είναι η αθηροσκλήρωση, ο σακχαρώδης διαβήτης, η χρόνια φλεγμονή, οι νευροεκφυλιστικές διαταραχές και ορισμένοι τύποι καρκίνου. Έτσι, υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον όσον αφορά την ποσοτικοποίηση των αντιοξειδωτικών και τον προσδιορισμό των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων ορισμένων ειδικών ενώσεων των τροφίμων.

Στην επιστήμη των τροφίμων, το αντιοξειδωτικό ορίζεται ως μια ουσία στα τρόφιμα που, όταν υπάρχει σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με τη συγκέντρωση ενός οξειδωσιμου υποστρώματος, μειώνει σημαντικά ή εμποδίζει τις δυσμενείς επιδράσεις δραστικών ειδών, όπως οι δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου (ROS/RNS), σε κανονικές φυσιολογικές λειτουργίες στον άνθρωπο [Halliwell, et al., 1995, Huang, et al., 2005]. Σύμφωνα με αυτόν τον ορισμό, δεν είναι όλα τα αναγωγικά που λαμβάνουν μέρος σε μια χημική αντίδραση αντιοξειδωτικά. Ως αντιοξειδωτικά καλούνται μόνο οι ενώσεις που είναι ικανές να προστατεύουν τον βιολογικό στόχο από την οξείδωση.

Οι μηχανισμοί αντιοξειδωτικής δράσης βοηθούν στη δημιουργία : (1) φυσικών φραγμών για την πρόληψη της δημιουργίας ROS ή της πρόσβασης ROS σε σημαντικές βιολογικές θέσεις, π.χ. φίλτρα υπεριώδους, κυτταρικές μεμβράνες, (2) χημικών παγίδων που "απορροφούν" ενέργεια και ηλεκτρόνια, απομακρύνουν τα ROS, π.χ., καροτενοειδή, ανθοκυανιδίνες, (3) καταλυτικών συστημάτων που εξουδετερώνουν ή εκτρέπουν τα ROS, π.χ. τα αντιοξειδωτικά ένζυμα SOD (δισμουτάση υπεροξειδίου), καταλάση και

υπεροξειδάση γλουταθειόνης [Chaudiere, et al., 1999], (4) βοηθούν και στη δέσμευση/αδρανοποίηση μεταλλικών ιόντων για πρόληψη δημιουργίας ROS, π.χ., φερριτίνη, κερουλοπλασμίνη, κατεχίνες, και (5) αλυσιδωτών αντιοξειδωτικών τα οποία απομακρύνουν και καταστρέφουν τα ROS, π.χ. ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C), τοκοφερόλες (Βιταμίνη E), ουρικό οξύ, γλουταθειόνη, φλαβονοειδή [Benzie, 2003]. Πολλές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί και μελετηθεί στη βιβλιογραφία, όπως και τα πλεονεκτήματα και οι περιορισμοί αυτών των μεθόδων έχουν επίσης συζητηθεί. Δεν φαίνεται να μπορεί κάποιος να καταλήξει για το ποια μέθοδος είναι η πιο κατάλληλη για να θεωρηθεί ως πρότυπη μέθοδος για τον προσδιορισμό της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας, λόγω των περιορισμών για τον προσδιορισμό των υδρόφιλων αντιοξειδωτικών, των προβλημάτων που εμφανίζονται στον προσδιορισμό του τελικού σημείου αντίδρασης, της ευαισθησίας στο φως των εκκινητών ή ανιχνευτών, της τιμής pH, της πιθανής παρεμπόδισης ορισμένων συστατικών τροφίμων, της χρήσης διαφορετικών προτύπων για την διεξαγωγή των αποτελεσμάτων που προκαλούν δυσκολίες στη σύγκριση.

4.4 Μέθοδοι Προσδιορισμού Αντιοξειδωτικής Ικανότητας

Τα χαρακτηριστικά οποιασδήποτε μεθόδου αντιοξειδωτικής ικανότητας είναι ένας καταλύτης οξειδωσης, ένα κατάλληλο υπόστρωμα και μία κατάλληλη μέτρηση του τελικού σημείου. Οι καταλύτες μπορεί να υφίστανται αυξημένη θερμοκρασία [Laguette, et al., 2007] και μερική πίεση οξυγόνου, προσθήκη καταλυτών μετάλλων μετάπτωσης [Ou, et al., 2002a], έκθεση στο φως για την πραγματοποίηση της φωτοευαίσθητης οξειδωσης με απλό οξυγόνο [Min, et al., 2002, Lee, et al., 2004] και μεταβλητή

ανάδευση για την ενίσχυση της επαφής των αντιδραστηρίων και των πηγών ελευθέρων ριζών [Pulido, et al., 2000]. Ωστόσο, θα πρέπει να γίνει αντιληπτό ότι οι αναλυτικές μέθοδοι μέτρησης και οι συνθήκες κάτω από τις οποίες πραγματοποιήθηκε η ανάλυση μπορούν να οδηγήσουν σε διαφορετικά αποτελέσματα για τους ίδιους τύπους τροφίμων [Antolovich, et al., 2002, Nilsson, et al., 2005]. Για παράδειγμα, ενώ η αύξηση της θερμοκρασίας μπορεί να αλλάξει τον μηχανισμό οξειδωσης δίνοντας διαφορετικά αποτελέσματα για διαφορετικές θερμοκρασίες.

Πολλές αναλυτικές πορείες υπάρχουν για τις μετρήσεις του τελικού σημείου. Αυτές οι μέθοδοι περιλαμβάνουν (1) την μέτρηση σε καθορισμένο χρονικό σημείο, (2) την μέτρηση του ρυθμού αντίδρασης, (3) την μέτρηση της φάσης υστέρησης όπου μετράται το μήκος του χρόνου υστέρησης έως την αλλαγή του τελικού σημείου, τα δείγματα με μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα επιβραδύνουν την αλλαγή, και (4) την ολοκληρωμένη μέτρηση του ρυθμού η οποία περιλαμβάνει την ολοκλήρωση της καμπύλης τελικού σημείου έναντι του χρόνου και χρησιμοποιείται όταν η κινητική της αντίδρασης δεν είναι απλής τάξης [Antolovich, et al., 2002].

Αρκετές χρωματομετρικές και φθορομετρικές πορείες προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασισμένες στον μηχανισμό HAT, εφαρμόζουν μια αντίδραση ριζικού πολυμερισμού. Γενικά, το προστιθέμενο αντιοξειδωτικό ανταγωνίζεται με τους ανιχνευτές (υποστρώματα) για τις ρίζες και αναστέλλει ή επιβραδύνει την οξειδωση του ανιχνευτή. Οι διαδικασίες με αυτό το χαρακτηριστικό περιλαμβάνουν την διαδικασία της συνολικής αντι-οξειδωτικής παγιδεύσεως ριζών (TRAP), την μέθοδο ικανότητας απορρόφησης ριζών οξυγόνου (ORAC) και την μέθοδο αποχρωματισμού της κροκίνης [Huang, et al., 2005]. Οι διαδικασίες αυτές έχουν τα

ακόλουθα στοιχεία : α) έναν θερμοευαίσθητο καταλύτη που δίνει ρίζες (R[•]) οι οποίες αντιδρούν γρήγορα με το O₂ για να δώσουν μία σταθερή ροή ROO[•] (οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες ενώσεις που δημιουργούν ρίζες είναι το υδατοδιαλυτό AAPH και το λιποδιαλυτό AMVN), (B) έναν οξειδώσιμο στόχο και έναν μοριακό ανιχνευτή (UV ή φθορισμός) για την μελέτη της προόδου της αντίδρασης, (Γ) ένα αντιοξειδωτικό, η παρουσία του αναστέλλει ή επιβραδύνει την οξείδωση του ανιχνευτή. Συνεπώς, στην αρχή της ανάλυσης θα παρατηρηθούν ασήμαντες φασματοσκοπικές μεταβολές του ανιχνευτή (περίοδος επαγωγής ή φάση υστέρησης). Καθώς προχωρά η αντίδραση, τα αντιοξειδωτικά καταναλώνονται από ρίζες και η οξείδωση του ανιχνευτή θα συνεχιστεί με βραδύτερο ρυθμό σε σύγκριση με τον έλεγχο. Τέλος, όταν τα αντιοξειδωτικά εξαντλούνται, ο ρυθμός αντίδρασης της οξείδωσης του ανιχνευτή θα είναι παρόμοιος με εκείνον που λαμβάνεται για τις κινητικές παραμέτρους της αντίδρασης ελέγχου (Δ) [Huang, et al., 2005, Magalhaes, et al., 2008]. Η αντιοξειδωτική ικανότητα μπορεί να μετρηθεί από τις επιδράσεις του αντιοξειδωτικού ελέγχοντας την έκταση της οξείδωσης. Οι μέθοδοι προσδιορισμού αντιοξειδωτικής ικανότητας μπορούν επίσης να βασιστούν στην απορρόφηση ριζών υπεροξυλίου, όπως η ORAC [Ou, et al., 2001] και η TRAP [Schlesier, et al., 2002], στην αναγωγική δύναμη του μετάλλου, όπως η αναγωγική/αντιοξειδωτική δύναμη σιδήρου στη συλλογή οργανικών ριζών όπως η ABTS [Miller, et al., 1993] και η DPPH [Rivero, et al., 2004] και στην οξείδωση λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL) ή στην ποσοτικοποίηση των προϊόντων που σχηματίζονται κατά την υπεροξειδωση των λιπιδίων, όπως οι δραστικές ουσίες του θειοβαρβιτουρικού οξέος. Η μεγάλη διαφορά μεταξύ αυτών των αναλύσεων εντοπίζεται στις προσεγγίσεις ποσοτικοποίησης. Για παράδειγμα, ο προσδιορισμός με τη μέθοδο ORAC εφαρμόζει το

εμβαδό κάτω από την καμπύλη της κινητικής προσέγγισης. Η μέθοδος TRAP εξαρτάται από τον χρόνο υστέρησης και η μέθοδος απχρωματισμού της κροκίνης χρησιμοποιεί τον αρχικό ρυθμό αντίδρασης [Huang, et al., 2005].

4.4.1 Μέθοδος Ικανότητας Απορρόφησης Ριζών Οξυγόνου (ORAC)

Η μέθοδος ORAC μετρά την αντιοξειδωτική παρεμπόδιση των οξειδώσεων που προκαλούνται από υπεροξειδίο και αντικατοπτρίζει την κλασσική ριζική αλυσωτή αντιοξειδωτική ικανότητα μέσω της μεταφοράς ατόμων H [Ou, et al., 2001]. Στη βασική μέθοδο, οι ρίζες υπεροξυλίου παράγονται από τη θερμική διάσπαση του AAPH σε υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα ή ρίζες υδροξυλίου που παράγονται από Cu^{2+} - H_2O_2 [Cao, et al., 1997] αντιδρούν με έναν φθορίζοντα ανιχνευτή, για να σχηματιστεί ένα μη φθορίζον προϊόν, το οποίο μπορεί να ποσοτικοποιηθεί εύκολα με φθορισμό. Η αντίδραση της ανίχνευσης με ρίζες υπεροξυλίου ακολουθείται από μείωση της έντασης του φθορισμού με το χρόνο. Η πρώτη έκδοση της μεθόδου ORAC χρησιμοποίησε την Β-φυκοερυθρίνη (B-PE, μία φθορίζουσα πρωτεΐνη) ως ανιχνευτή. Η Β-PE επιλέχθηκε λόγω της υψηλής απόδοσης φθορισμού, της ευαισθησίας σε ROS και της υδατοδιαλυτότητας [MacDonald-Wicks, et al., 2006].

Το πλεονέκτημα της μεθόδου ORAC είναι η ικανότητα χρήσης διαφορετικών ενώσεων που παράγουν ελεύθερες ρίζες ή οξειδωτικών. Αυτό είναι σημαντικό επειδή η μετρηθείσα αντιοξειδωτική ικανότητα μιας ένωσης εξαρτάται από το ποια ελεύθερη ρίζα ή οξειδωτικό χρησιμοποιείται στην ανάλυση. Για παράδειγμα, η δοκιμασία ORAC που χρησιμοποιεί AAPH (παράγει $\text{ROO}\cdot$) μετρά όλα τα παραδοσιακά αντιοξειδωτικά όπως το ασκορβικό οξύ, α-τοκοφερόλη, β-καροτένιο, γλουταθειόνη, χολερυθρίνη, ουρικό οξύ και

μελατονίνη, ενώ ο προσδιορισμός ORAC χρησιμοποιώντας Cu^{2+} - H_2O_2 (που παράγει $\cdot\text{OH}$) μετρά ενώσεις όπως η μαννιτόλη, η γλυκόζη, το ουρικό οξύ και οι χηλικοί παράγοντες μετάλλων μετάβασης αλλά όχι το ασκορβικό οξύ και η α -τοκοφερόλη (Cao κ.ά., 1997). Η ανάλυση ORAC μετρά μόνο την αντιοξειδωτική ικανότητα έναντι των ριζών υπεροξυλίου και υδροξυλίου και όχι έναντι όλων των δραστικών μορφών οξυγόνου (π.χ., υπεροξειδία και απλό οξυγόνο [Arap, et al., 2004]).

Όσον αφορά τα μειονεκτήματα της μεθόδου, η χρήση της B-PE σε αντιοξειδωτικές διαδικασίες έχει ορισμένες δυσκολίες, όπως μεγάλες διαφορές μεταξύ των διαστάσεων, φωτοευαισθησία της B-PE μετά την έκθεση στο φως διεγέρσεως και αλληλεπίδραση με πολυφαινόλες μέσω μη ειδικών πρωτεϊνικών δεσμών. Αυτοί οι παράγοντες προκαλούν ασυνέπεια στα αποτελέσματα της ανάλυσης και λανθασμένες χαμηλές τιμές.

4.4.2 Μέθοδος Ολικών Αντιοξειδωτικών TRAP

Η μέθοδος TRAP μελετά την ικανότητα των αντιοξειδωτικών ενώσεων να παρεμβαίνουν στην αντίδραση μεταξύ υπεροξυλικών ριζών που παράγονται από AAPH ή ABAP και ενός φθορίζοντος μορίου που δρα ως «ανιχνευτής» [Schlesier, et al., 2002]. Η μέθοδος TRAP χρησιμοποιεί R-φυκοερυθρίνη (R-PE) ως φθορίζον μόριο και η πρόοδος της αντίδρασης της R-PE με AAPH μελετάται σε μήκος κύματος διέγερσης $\lambda_{(ex)} = 495 \text{ nm}$ και εκπομπής $\lambda_{(em)} = 575 \text{ nm}$.

Οι Valkonen και Kuusi (1997) εφάρμοσαν διχλωροφθοροεσκεΐνο-διοξικό (DCFH-DA) ως φθορίζον οξειδώσιμο υπόστρωμα. Η οξείδωση DCFH-DA με ρίζες υπεροξυλίου αποδίδει τον σχηματισμό προϊόντος υψηλά φθορίζουσας διχλωροφλουορεσκεΐνης (DCF)

(ex 480 nm, em 526 nm) και επίσης έχει απορρόφηση στα 504 nm. Αυτό επέτρεψε τον προσδιορισμό TRAP με απλή φασματοφωτομετρία. Η παρουσία αντιοξειδωτικών ενώσεων αναστέλλει ανταγωνιστικά την αύξηση του σήματος φθορισμού.

Πλεονέκτημα της μεθόδου TRAP αποτελεί το γεγονός ότι η μέθοδος περιλαμβάνει την έναρξη της υπεροξειδωσίας των λιπιδίων δημιουργώντας υδατοδιαλυτές υπεροξυλικές ρίζες και ότι είναι ευαίσθητη σε όλα τα γνωστά αντιοξειδωτικά. Η ιδέα ήταν πολύ χρήσιμη για την ποσοτικοποίηση και τη σύγκριση της αντιοξειδωτικής ικανότητας.

Το μεγαλύτερο πρόβλημα της μεθόδου είναι ίσως η μικρή εκλεκτικότητα. Επίσης, η δοκιμασία TRAP είναι σχετικά σύνθετη και χρονοβόρα για την εκτέλεση, απαιτώντας υψηλό βαθμό εμπειρίας και δεξιότητας. Ένα άλλο μειονέκτημα της ανάλυσης TRAP είναι η χρήση του χρόνου υστέρησης που απαιτείται για να προκύψει η έγχρωμη ρίζα στο μέσο αντίδρασης [Apar, et al., 2007]) για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας καθώς κάθε αντιοξειδωτικό δεν έχει μια συγκεκριμένη και αυστηρά ορισμένη φάση υστέρησης [Magalhaes, et al., 2008].

4.4.3 Μέθοδος Καροτενίου ή Αποχρωματισμού της Κροκίνης

Ο καροτενοειδής αποχρωματισμός μέσω αυτοοξειδωσίας επάγεται από το φως ή τις θερμικές ή υπεροξυλικές ρίζες (π.χ. AAPH ή οξειδωτικά λιπίδια). Η προσθήκη δείγματος που περιέχει αντιοξειδωτικό, μεμονωμένων αντιοξειδωτικών ή φυτικών εκχυλισμάτων προκαλεί την αναστολή του αποχρωματισμού του β-καροτενίου [Laguette, et al., 2007]. Η μέθοδος μετρά τη μείωση του ρυθμού διάσπασης της β-καροτίνης ή κροκίνης που παρέχεται από τα αντιοξειδωτικά. Η απώλεια χρώματος μελετάται οπτικά στα 443 nm σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (pH 7,0), επομένως δεν

απαιτείται ειδική όργανολογία. Ο ρυθμός αποχρωματισμού γίνεται γραμμικός περίπου σε 1 λεπτό μετά την προσθήκη AAPH και παρακολουθείται για 10 λεπτά [Huang, et al., 2005].

Αν και το β-καροτένιο χρησιμοποιείται συχνά ως ο στόχος (ανιχνευτής), ο αποχρωματισμός του στα 470 nm μπορεί να συμβεί με πολλαπλούς τρόπους, κι έτσι η ερμηνεία των αποτελεσμάτων μπορεί να είναι δύσκολη. Για να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα, έχει επιλεγεί το καροτενοειδές παράγωγο κροκίνης, μια φυσική ένωση με εξαιρετικά ισχυρή απορρόφηση σε ορατό εύρος. Η κροκίνη έχει απλές αντιδράσεις και υφίσταται αποχρωματισμό μόνο από ρίζα υπεροξυλίου [Prior, et al., 2005]. Δεν είναι σαφές αν, παρουσία ορισμένων αντιοξειδωτικών, όπως το Trolox, το ασκορβικό οξύ ή το ουρικό οξύ, μπορεί να παρατηρηθεί μια φάση υστέρησης ή μία περίοδος μέγιστης προστασίας της κροκίνης από την οξείδωση με ρίζες υπεροξυλίου. Αυτή η μέθοδος έχει βρει περιορισμένες εφαρμογές σε δείγματα τροφίμων μέχρι στιγμής επειδή η κροκίνη δεν είναι διαθέσιμη στο εμπόριο και πρέπει να εξαχθεί από το σαφράν που μπορεί να οδηγήσει σε χαμηλή επαναληψιμότητα μεταξύ των αναλύσεων.

4.4.4 Μέθοδος Προσδιορισμού Ολικής Φαινολικής Περιεκτικότητας χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (F-C) Reagent

Ο προσδιορισμός της ολικής φαινολικής περιεκτικότητας γίνεται με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu το οποίο περιέχει σύμπλοκα φωσφομολυβδικού/φωσφοροβολφραμικού οξέος. Η χημεία πίσω από τον προσδιορισμό της ολικής φαινολικής περιεκτικότητας με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu στηρίζεται στη μεταφορά ηλεκτρονίων σε αλκαλικό μέσο από φαινολικές ενώσεις και άλλα

αναγωγικά είδη σε μολυβδαίνιο, σχηματίζοντας μπλε σύμπλοκα που μπορούν να μελετώνται φασματοφωτομετρικά στα 750-765 nm [Magalhaes, et al., 2008]. Οι τιμές απορρόφησης είναι συνήθως ανάλογες με τον αριθμό των αντιδρώντων φαινολικών υδροξυλικών ομάδων και επίσης εξαρτώνται από τη δομή του μορίου. Εάν το πρότυπο που χρησιμοποιείται για την βαθμονόμηση είναι εξαιρετικά δραστικό και δίνει υψηλή απορρόφηση, τότε οι μετρηθείσες τιμές των δειγμάτων θα είναι χαμηλές. Για παράδειγμα, η τιμή απορρόφησης για καφεϊκό οξύ (δύο αντιδράσεις OH) είναι περίπου δύο φορές και για την κατεχίνη (τρία αντιδρώντα OH) τρεις φορές υψηλότερη από αυτή της φαινόλης (η μία αντιδρά OH).

Οι φαινολικές ενώσεις αντιδρούν με το αντιδραστήριο F-C μόνο υπό βασικές συνθήκες (ρυθμίζονται με διάλυμα ανθρακικού νατρίου σε pH ~ 10) [MacDonald-Wicks, et al., 2006]. Προσδιόρισαν τις συνθήκες βελτίωσης της επαναληψιμότητας και εξάλειψης των λανθασμένων αποτελεσμάτων βελτιστοποιώντας : (1) την αναλογία όγκου αλκαλίων και F-C, (2) τον χρόνο και τη θερμοκρασία αντίδρασης για την ανάπτυξη χρώματος, (3) την επιλογή μήκους κύματος στα 765 nm που επιτρέπει την ελαχιστοποίηση της παρεμβολής από τη μήτρα δείγματος, η οποία είναι συχνά χρωματισμένη, (4) την χρήση προτύπων αναφοράς όπως το γαλλικό οξύ [Prior, et al., 2005].

Η ανάλυση της Ολικής Φαινολικής Περιεκτικότητας με το αντιδραστήριο F-C είναι βολική, απλή και αναπαραγωγίμη (Huang, et al., 2005). Πολλές δημοσιεύσεις συσχέτισαν τα αποτελέσματα της μεθόδου F-C με τα αποτελέσματα άλλων μεθόδων όπως η DPPH, FRAP, TEAC, ORAC και βρήκαν εξαιρετικούς γραμμικούς

συσχετισμούς μεταξύ της ολικής συγκέντρωσης των φαινολών και της «αντιοξειδωτικής ικανότητας».

4.4.5 Μέθοδος Ισοδύναμης Αντιοξειδωτικής Ικανότητας Trolox (TEAC)

Η μέθοδος TEAC αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τους Miller et al. (1993) και έχει βελτιστοποιηθεί και χρησιμοποιείται ευρέως στην μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας δειγμάτων τροφίμων. Το ABTS είναι ένα υπόστρωμα υπεροξειδάσης, το οποίο όταν οξειδώνεται από ρίζες υπεροξυλίου ή άλλα οξειδωτικά παρουσία H_2O_2 παράγει μετασταθερό ριζικό κατιόν $ABTS^{+}$ το οποίο είναι έντονα χρωματισμένο και μπορεί να μελετηθεί φασματοφωτομετρικά στην περιοχή των 600-750 nm. Η αντιοξειδωτική ικανότητα υπολογίζεται ως η ικανότητα των δοκιμαστικών ενώσεων να μειώνουν το χρώμα αντιδρώντας άμεσα με την ρίζα $ABTS^{+}$ και εκφράζεται σε σχέση με το Trolox (Trolox equivalents–TEAC) [Roginsky, et al., 2005]. Το $ABTS^{+}$ μπορεί να διαλυτοποιηθεί τόσο σε υδατικά όσο και σε οργανικά μέσα και δεν επηρεάζεται από την ιοντική ισχύ, οπότε η αντιοξειδωτική ικανότητα μπορεί να μετρηθεί τόσο σε υδατικά όσο και σε μη υδατικά δείγματα [Arnao, 2000].

Η μέθοδος TEAC είναι λειτουργικά απλή και επιτρέπει τη μελέτη σε ευρεία κλίμακα pH. Αν και συχνά χρησιμοποιείται σε pH 7,4, η σταθερότητα της ρίζας ABTS σε αυτό το pH έχει αναφερθεί ότι είναι προβληματική. Για πρότυπα αντιοξειδωτικά όπως το Trolox ή το ασκορβικό οξύ, η ρίζα ABTS σε pH 7,4 παρείχε αξιόπιστες τιμές τελικού σημείου μετά από 10 λεπτά. Επίσης, με ρίζα ABTS σε pH 7,4, οι τιμές για την αντιοξειδωτική ικανότητα των πρότυπων φαινολικών ενώσεων ήταν 5-20% μεγαλύτερες από τις τιμές που προσδιορίστηκαν σε pH 4,5 [Ozgen, et al., 2006].

Όσον αφορά τους περιορισμούς αυτής της μεθόδου, η τιμή TEAC χαρακτηρίζει στην πραγματικότητα την ικανότητα του δείγματος να αντιδρά με την ρίζα ABT5^{•+} παρά να εμποδίζει την οξειδωτική διαδικασία. Η αντίδραση TEAC με πολλές φαινόλες και δείγματα φυσικών προϊόντων μπορεί να διαρκέσει πολύ χρόνο για να φθάσει σε ένα τελικό σημείο. Έτσι, λαμβάνοντας αυτό το σταθερό τελικό σημείο βραχείας διάρκειας (4 ή 6 λεπτά), οι ψευδώς χαμηλές τιμές TEAC μπορούν να διαβαστούν πριν ολοκληρωθεί η αντίδραση [Huang, et al., 2005].

4.4.6 Δοκιμασία Ικανότητας Απορρόφησης Ριζών DPPH

Η ρίζα DPPH είναι μια οργανική ρίζα αζώτου μακράς διάρκειας και έχει βαθύ πορφυρό χρώμα. Σε αυτή τη μέθοδο, η πορφυρή ρίζα χρωμογόνου ανάγεται με αντιοξειδωτικές/αναγωγικές ενώσεις στην αντίστοιχη ωχροκίτρινη υδραζίνη. Η αναγωγική ικανότητα των αντιοξειδωτικών έναντι της DPPH μπορεί να εκτιμηθεί με μελέτη της μείωσης της απορρόφησης στα 515-528 nm έως ότου η απορρόφηση παραμείνει σταθερή. Αυτή η ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τους Brand-Williams et al. (1995). Το ποσοστό της DPPH (% DPPHrem) που παραμένει υπολογίζεται ως :

$$\%DPPHrem = 100 \times [DPPH]_{rem} / [DPPH]_{T=0}$$

Το % ποσοστό DPPHrem είναι ανάλογο της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού και η συγκέντρωση που προκαλεί μείωση της αρχικής συγκέντρωσης DPPH κατά 50% ορίζεται ως EC₅₀. Ο χρόνος που απαιτείται για την επίτευξη σταθερής κατάστασης με EC₅₀ ορίζεται ως T_{EC50}.

Ο προσδιορισμός DPPH είναι τεχνικά απλός και γρήγορος και χρειάζεται μόνο ένα φασματοφωτόμετρο UV-Vis. Υπάρχουν όμως ορισμένα μειονεκτήματα που περιορίζουν την εφαρμογή του. Το DPPH μπορεί να διαλυθεί μόνο σε οργανικούς διαλύτες (ειδικά σε αλκοόλες) και όχι σε υδατικά διαλύματα, γεγονός που περιορίζει την εφαρμογή της σε υδατικά διαλύματα για τον προσδιορισμό των υδρόφιλων αντιοξειδωτικών. Παρόλο που χρησιμοποιείται ευρέως για τη μέτρηση και τη σύγκριση της αντιοξειδωτικής κατάστασης των φαινολικών ενώσεων και των τροφίμων, η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας από τις μεταβολές στην απορρόφηση της DPPH θα πρέπει να εκτιμηθεί προσεκτικά επειδή η απορρόφηση της ρίζας DPPH στα 517 nm μετά την αντίδραση με ένα αντιοξειδωτικό μειώνεται από το φως [Et al., 2003], το οξυγόνο και τον τύπο του διαλύτη [Aparak, et al., 2007].

4.4.7 Μέθοδος Προσδιορισμού Αντιοξειδωτικής Ισχύς Αναγωγής τρισθενούς Fe (FRAP)

Η μέθοδος FRAP βασίζεται στην ικανότητα των φαινολικών ενώσεων να ανάγουν το συμπλόκο Fe (III) -TPTZ σε σύμπλοκο τριπυριδυλοτριαζίνης Fe (II) -TPTZ με τη δράση αντιοξειδωτικών που δίνουν ηλεκτρόνια. Το προκύπτον μπλε χρώμα μετράται φασματοφωτομετρικά στα 593 nm και σχετίζεται γραμμικά με τη συνολική αναγωγική ικανότητα των αντιοξειδωτικών που δίνουν ηλεκτρόνια. Το άλας σιδήρου χρησιμοποιείται ως οξειδωτικό και το δυναμικό οξειδοαναγωγής του (<0,70 V) είναι συγκρίσιμο με αυτό του ABTS (0,68 V). Ως εκ τούτου, ουσιαστικά, δεν υπάρχει μεγάλη διαφορά μεταξύ της ανάλυσης TEAC και της ανάλυσης FRAP, εκτός του ότι το TEAC διεξάγεται σε ουδέτερο pH, ενώ η ανάλυση FRAP απαιτεί όξινες συνθήκες (μη

φυσιολογικές χαμηλές τιμές pH = 3,6) για να διατηρηθεί η διαλυτότητα του σιδήρου. Μια μονάδα FRAP ορίζεται ως η αναγωγή 1 mol Fe (III) σε Fe (II) [Huang, et al., 2005].

Η ανάλυση FRAP είναι απλή, γρήγορη, φθηνή και ανθεκτική και δεν απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό. Η ανάλυση FRAP μπορεί να διεξαχθεί χρησιμοποιώντας αυτοματοποιημένες, ημιαυτόματες ή χειροκίνητες μεθόδους [Prior, et al., 2005].

4.4.8 Ολική ανάλυση αντιοξειδωτικού δυναμικού χρησιμοποιώντας Cu (II) ως οξειδωτικό

Η μέθοδος βασίζεται στην αναγωγή του Cu (II) σε Cu (I) από τα αναγωγικά (αντιοξειδωτικά) που υπάρχουν σε ένα δείγμα. Έχει γίνει γνωστή ως Bioxytech AOP-490 και CUPRAC που αναπτύχθηκε από τους Arak et al., 2004. Στην μέθοδο Bioxytech AOP-490, η βαθοκουπροΐνη (2,9-διμεθυλ 4,7-διφαινυλ-1,10-φαινανθρολίνη) σχηματίζει σύμπλοκο 2:1 με Cu (I), παράγοντας χρωμοφόρο με μέγιστη απορρόφηση στα 490 nm. Ο ρυθμός αντίδρασης και η συγκέντρωση των προϊόντων ακολουθούνται από τη συμπλοκοποίηση της βαθοκουπροΐνης του παραγόμενου Cu (I) [Prior, et al., 2005]. Η μέθοδος CUPRAC χρησιμοποιεί το αντιδραστήριο χαλκού (II)-νεοκουπροΐνη ως χρωμογόνο οξειδωτικό. Περιλαμβάνει την ανάμιξη του αντιοξειδωτικού διαλύματος (απευθείας ή μετά από όξινη υδρόλυση) με διαλύματα CuCl₂, νεοκουπροΐνης και οξικού αμμωνίου σε pH 7 και μέτρηση της απορρόφησης στα 450 nm μετά από 30 λεπτά. Τα αντιοξειδωτικά που αντιδρούν αργά χρειάζονται αυξημένη θερμοκρασία επώασης για να ολοκληρώσουν την οξείδωσή τους με το αντιδραστήριο CUPRAC [Arak, et al., 2008].

Οι τιμές CUPRAC είναι συγκρίσιμες με τις τιμές TEAC για πολυφαινόλες, ενώ οι τιμές FRAP είναι συνήθως σημαντικά χαμηλότερες [Arak, et al., 2004]. Λόγω του

χαμηλότερου οξειδοαναγωγικού δυναμικού του αντιδραστήριου CUPRAC, τα αναγωγικά σάκχαρα και το κιτρικό οξύ, τα οποία δεν είναι αληθινά αντιοξειδωτικά αλλά οξειδώσιμα υποστρώματα σε άλλες παρόμοιες δοκιμασίες, (π.χ. FRAP) δεν οξειδώνονται με το αντιδραστήριο CUPRAC [Apar, et al., 2008]. Ταυτόχρονα, λόγω του χαμηλού δυναμικού οξειδοαναγωγής η αναγωγή του χαλκού μπορεί να είναι ακόμη πιο ευαίσθητος δείκτης της πιθανής αντιοξειδωτικής δράσης των αντιοξειδωτικών [Prior et al., 2005]. Άλλα πλεονεκτήματα της μεθόδου CUPRAC σε σχέση με άλλες παρόμοιες δοκιμασίες είναι : (α) το αντιδραστήριο CUPRAC είναι αρκετά γρήγορο για την οξείδωση αντιοξειδωτικών που περιέχουν θειόλες, ενώ η μέθοδος FRAP δεν μετράει ορισμένα αντιοξειδωτικά που περιέχουν θειόλες, όπως η γλουταθειόνη, β) το αντιδραστήριο είναι πιο σταθερό από άλλα χρωμογόνα αντιδραστήρια (π.χ., ABTS, DPPH), γ) εφαρμόζεται εύκολα, δ) οι καμπύλες απορρόφησης είναι γραμμικές σε ένα ευρύ φάσμα συγκεντρώσεων σε αντίθεση με εκείνες άλλων μεθόδων που δίνουν πολυωνυμικές καμπύλες, ε) η δοκιμασία CUPRAC ολοκληρώνεται σε λίγα λεπτά για ασκορβικό οξύ, ουρικό οξύ, γαλλικό οξύ και κερκετίνη, αλλά απαιτεί 30-60 λεπτά για πιο πολύπλοκα μόρια. Οι διαδικασίες αναγωγής του χαλκού όμως έχουν προβλήματα στην εφαρμογή τους σε ένα σύνθετο μίγμα αντιοξειδωτικών όσον αφορά την επιλογή του κατάλληλου χρόνου αντίδρασης [Prior, et al., 2005, Karadag A., et al., 2009].

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alagarasi A., Introduction To Nanomaterials, *Food Anal Methods* 2 (2009) 41–60.
- Alasalvar C., Grigor J.M., Zhang D., Quantick P. C., Shahidi F., *J Agric Food Chem* 49 (2001) 1410.
- Ahmadi T.S., Wang Z.L., Green T.C., Henglein A., El-Sayed M.A., *Science* 272 (1996) 1924.
- Andrews M., Ozin G.A., Francis C.G., *Inorg Synth* 22 (1981) 116.
- Antolovich M., Prenzler P.D., Patsalides E., McDonald S., Robards K., *The Analyst* 127 (2002) 183.
- Apak R., Guclu K.G., Ozyurek M., Karademir S.E., *J Agric Food Chem* 52 (2004) 79.
- Apak R., Guclu K., Demirata B., Ozyurek M., Celik S.E., Bektasoglu B., *Molecules* 12 (2007) 1496.
- Apak R., Guclu K., Ozyurek M., Celik S.E., *Microchim Acta* 160 (2008) 413.
- Arnao M.B., *Trends Food Sci Technol* 11 (2000) 419.
- Balasundram N., Sundram K., Samman S., *Food Chem* 99 (2006) 191–203.
- Benavente-Garcia O., Castillo J., Marin F.R., Ortuno A., DelRio J.A., *J Agric Food Chem*, 45, (1997) 4505–4515.
- Benfield F.W.S., Green M.L.H., Ogden J.S., Young D., *J Chem Soc, Chem Commun* (1973) 886-7.
- Benzie I.F.F., *Comp Biochem Physiol Part A* (2003) 136:113.
- Bi L., Li S., Zhang Y., Youvei D., *J Magn Magn Mater* 277 (2004) 363.
- Bohm B.A., Introduction to flavonoids, *Amsterdam: Harwood Academic Publishers* (1998).
- Boken J., Khurana P., Thatai Sh., Kumar D., Prasad S., *Applied Spectroscopy Reviews* (2017) 1520-569X.
- Bonet F., Delmas V., Grugeon S., Herrera Urbina R., Silvert P.Y., Tekaia-ElhsissenK., *Nanostruct Mater* 11 (2000) 1277.
- Borsla A., Wilhelm A.M., Delmas H., *Catal Today* 66 (2001) 389.
- Boutonnet M., Kizling J., Stenius P., *Colloids Surf* 5 (1982) 209.
- Bowker M., Madix R.J., *Surf Sci* 95 (1980) 190.

Bowker M., Madix R.J., *Surf Sci* **116** (1982) 549.

Bravo L., *Nutrition Reviews* **56** (1998) 317–333.

Brown K.R., Walter D.G., Natan M.J., *Chem Mater* **12** (2000) 306.

Burshtain D., Zeiri L., Efrima S., *Langmuir* **15** (1999) 3050.

Busser G.W., Van Ommen J.G., Lercher J.A., *Adv Catal Nanostruct Mater* (1996) 213.

Cao G., Sofic E., Prior R., *Free Radic Biol Med* **22**(5) (1997) 749.

Cardenas-Trivino G., Klabunde K.J., Brock Dale E., *Langmuir* **3** (1987) 986.

Cason J.P., Roberts C.B., *J Phys Chem B* **104** (2000) 1217.

Chandra S., Lokesh K.S., Nicolai A., Lang H., *Anal Chim Acta* **632** (2009) 63–68.

Chaudiere J., Ferrari-Iliou R., *Food Chem Toxicol* **37** (1999) 949.

Chen S., Fan Z., Carroll D.L., *J Phys Chem B* **106** (2002) 10777.

Chen C.W., Arai K., Yamamoto K., Serizawa T., Akashi M., *Macromol Chem Phys* **201** (2000) 2811.

Chen P., Wu X., Lin J., Tan K.L., *J Phys Chem B* **103** (1999) 4559.

Chen C.W., Akashi M., *Langmuir* **13** (1997) 6465.

Chen C.W., Takezako T., Yamamoto K., Serizawa T., Akashi M., *Colloids Surf A* **169** (2000) 107.

Chen C.W., Akashi M., *J Polym Sci A: Polym Chem* **35** (1997) 1329.

Chen D.H., Wu S.H., *Chem Mater* **12** (2000) 1354.

Chiang C.L., *J Colloid Interface Sci* **239** (2001) 334.

Cinti S., Arduini F., Moscone D., Palleschi G., Killard A.J., *Sensors* **14** (2014) 14222-14234.

Collins P.G., Avouris Ph., *Scientific American* **62** (2000) 283.

Dalmia A., Lineken C.L., Savinell R.F., *J Colloid Interface Sci* **205** (1998) 535.

Delcourt M.O., Belloni J., *Radiochem Radioanal Lett* **13** (1973) 329.

Delcourt M.O., Belloni J., *Radiochem Radioanal Lett* **13** (1973) 329.

Deepika M., An Overview on Nanoparticles, *J Pharmacol Nanotech* (2015).

Didenko Y.T., McNamara W.B., III, Suslick K.S., *J Am Chem Soc* **121** (1999) 5817.

Dinega D.P., Bawendi M.G., *Angew Chem Int Ed Engl* **38** (1999) 1788.

Doppiu S., Langlais V., Sort J., Surinach S., Baro'M.D., Zhang Y., Hadjinapayis G., *J Nogue's, Chem Mater* **16** (2004) 5664.

D. de Caro, J.S. Bradley, *Langmuir* **13** (1997) 3067.

Ershov B.G., Janata E., Michaelis M., Henglein A., *J Phys Chem* **95** (1991) 8996.

Estourne's C., Lutz T., Happich J., Quaranta T., Wissler P., Guille J.L., *J Magn Magn Mater* **173** (1997) 83.

Esumi K., Suzuki A., Aihara N., Usui K., Torigoe K., *Langmuir* **14** (1998) 3157.

Fojtik A., Henglein A., Laser ablation of films and suspended particles in a solvent: formation of cluster and colloid solutions *Ber, Bunsenges Phys Chem* **97** (1993) 252-254.

Frens G., *Nature* **241** (1973) 20.

Fullam S., Rao S.N., Fitzmaurice D., *J Phys Chem B* **104** (2000) 6164.

Guo L., Huang Q.J., Li X.Y., Yang S.H., *Phys Chem Chem Phys* **3** (2001) 1661.

Gutierrez M., Henglein A., Dohrmann J.K., *J Phys Chem* **91** (1987) 6687.

Halliwell B., Murcia M.A., Chirico S., Aruoma O.I., *Crit Rev Food Sci Nutr* **35** (1995) 7.

Halliwell B., Clement M.V., Long M.L.H., *FEBS Lett* **486** (2000) 10-13.

Han M.Y., Quek C.H., Huang W., Chew C.H., Gan C.M., *Chem Mater* **11** (1999) 1144.

Harborne J.B., General procedures and measurement of total phenolics. *Methods in plantbiochemistry : Plant Phenolics 1* (1989) 1-28.

Harborne J.B., Baxter H., Moss G.P. (Eds.) Phytochemical dictionary: Handbook of bioactive compounds from plants (2nd ed.), *London: Taylor & Francis* (1999) 992.

Hayat A., Marty J.L., *Sensors* **14** (2014) 10432-10453.

Heim K.E., Tagliaferro A.R., & Bobilya D.J., *J Nutr Biochem* **13** (2002) 572-584.

Henglein A., Giersig M., *J Phy Chem B* **103** (1999) 9533.

Henglein A., Meisel D., *Langmuir* **14** (1998) 7392.

Henglein A., *Langmuir* **15** (1999) 6738.

Henglein A., Sonochemistry : historical developments and modern aspects, *Ultrason* **25** (1987) 6.

Henglein A., *J Phys Chem B* **104** (2000) 6683.

Henglein A., *J Phys Chem B* **104** (2000) 2201.

Henglein A., *J Phys Chem B* **104** (2000) 1206.

Henglein A., Giersig M., *J Phys Chem B* **104** (2000) 6767.

- Hertog M.G., Feskens E.J., Hollman P.C., Katan M.B., Kromhout D., Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study, *Lancet* **342** (1993) 1007–1011.
- Hirai H., Nakao Y., Toshima N., *Chem Lett* (1978) 545.
- Hirai H., Nakao Y., Toshima N., *J Macromol Sci Chem A13* (1979) 727.
- Hirai H., *J Macromol. Sci. Chem A13* (1979) 633.
- Hirai H., *Makromol Chem Suppl 14* (1985) 55.
- Hirai H., Nakao Y., Toshima N., *J Macromol Sci Chem A12* (1978) 1117.
- Hollman P.C.H., Katan M.B., *Food Chem Toxicol* **37** (1999) 937–942.
- Horikoshi S., Serpone N., Introduction to Nanoparticles, *Microwaves in Nanoparticle Synthesis: Fundamentals and Applications*, (2013).
- Huang H.H., Yan F.Q., Kek Y.M., Chew C.H., Xu G.Q., Ji W., Oh P.S., Tang S.H., *Langmuir* **13** (1997) 172.
- Huang D., Ou B., Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Deemer EK, *J Agric Food Chem* **50** (2002b) 4437.
- Huang D., Ou B., Prior R.L., *J Agric Food Chem* (2005) 53:1841.
- Iavicoli I., Leso V., Fontana L., Marinaccio A., Bergamaschi A., Calabrese E.J., *Chemosphere* **104** (2014) 120-125.
- Jana N.R., Gearheart L., Murphy C.J., *Chem Mater* **13** (2001) 2313.
- Jin R., Cao Y., Mirkin C.A., Kelly K.L., Schatz G.C., Zheng J.G., *Science* **294** (2001) 1901.
- Johnson D., Perera P., O’Shea M.J., *J Appl Phys* **79** 5299.
- Kamat P.V., Flumiani M., Hartland G.V., *J Phys Chem B* **102** (1998) 3123.
- Karadag A., Ozcelik B., Saner S., Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities, *Food Anal Methods* **2** (2009) 41–60.
- Khatouri J., Mostafavi M., Amblard J., Belloni J., *Chem Phys Lett* **191** (1992) 351.
- King A., Young G., Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals, *J Amer Diet Assoc* **99** (1999) 213–218.
- Kitakami O., Sato H., Shimada Y., Sato F., Tanaka M., *Phys Rev* **56** (1997B) 849.
- Kiwi J., Gratzel M., *J Am Chem Soc* **101** (1979) 7214.

Klabunde K.J., Cardenas-Trivino G., "In Active Metals : Preparation, Characterization, Applications" (A. Furstner, Ed.), *VCH New York (1996) 237–278*.

Klabunde K.J., Habdas J., Cardenas-Trivino G., *Chem Mater 1 (1989) 481*.

Klabunde K.J., Timms P., Skell P.S., Ittel S.D., Metal Atoms Synthesis, *Inorg Synth 19 (1979) 59-86*.

Klabunde K.J., Youngers G., Zuckerman E.J., Tan B.J., Antrim S., Sherwood P.M., *Eur J Solid State Inorg Chem 29 (1992) 227*.

Klabunde K.J., Zhang D., Glavee G.N., Sorensen C.M., Hadjipanayis G.C., *Chem Mater 6 (1994) 784*.

Klabunde K.J., *Platinum Met Rev 36 (1992) 80*.

Komiyama M., Hirai H., *Bull Chem Soc Jpn 56 (1983) 2833*.

Kurihara K., Fendler J.H., Ravet I., Nagy J., *J Mol Catal 34 (1986) 325*.

Kurihara K., Kizling J., Stenius P., Fendler J.H., *J Am Chem Soc 105 (1983) 2574*.

Laguerre M., Lecomte J., Villeneuve P., Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges, *Prog Lipid Res 46 (2007) 244*.

Larpent C., Patin H., *J Mol Catal 44 (1988) 191*.

Larpent C., Brisse-Le Menn F., Patin H., *New J Chem 15 (1991) 361*.

Lee P.C., Meisel D., *J Phys Chem 86 (1982) 3391*.

Lee J., Koo N., Min D.B., Reactive oxygen species, aging and antioxidative nutraceuticals, *Compr Rev Food Sci Saf 3(1) (2004) 21*.

Lin S.T., Franklin M.T., Klabunde K.J., *Langmuir 2 (1986) 259*.

Linnan X., Xiaoyue Qi., Xianjiang Li., Yu Bai., Huwei Liu, *Talanta 146 (2016) 714-726*.

Lucena R., Simonet B.M., Cardenas S., Valcarcel M., *J Chromatogr A 1218 (2011) 620–637*.

Luo X., Morrin A., Killard A.J., Smyth M.R., *ELECTROANALYSIS 18 (2006) 319-326*.

MacDonald-Wicks L.K., Wood L.G., Garg M.L., *J Sci Food Agric (2006) 86(13):2046*.

Mafune F., Kohno J., Takeda Y., Kondow T., Sawabe H., *J Phys Chem B 104 (2000) 9111*.

Mafune F., Kohno J., Takeda Y., Kondow T., Sawabe H., *J Phys Chem B 105 (2001) 5114*.

Mafune F., Kohno J., Takeda Y., Kondow T., *J Phys Chem B* **106** (2002) 7575.

Manach C., Mazur A., Scalbert A., Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases, *Current Opinions in Lipidology* **16** (2005) 77–84.

Matějka P., Vlčková B., Vohlidal J., Pančoška P., Baumruk V., *J Phys Chem* **96**, (1992) 1361.

Mayer A.B.R., Mark J.E., *Colloid Polym Sci* **275** (1997) 333.

Mayer A.B.R., Mark J.E., *J Macromol Sci Pure Appl Chem* **A34** (1997) 2151.

Mayer A.B.R., Mark J. E., *Eur Polym J* **34** (1998) 103.

Mayer A.B.R., Antonietti M., *Colloid Polym Sci* **276** (1998) 769.

Mayer A.B.R., Grebner W., Wannemacher R., *J Phys Chem B* **104** (2000) 7278.

Mayer A.B.R., Mark J.E., *Macromol Rep* **A33** (1996) 451.

Mayer A.B.R., Mark J.E., *Polym Bull* **37** (1996) 683.

Mayer A.B.R., Mark J.E., Hausner S. H., *J Appl Polym Sci* **70** (1998) 1209.

Mayer A.B.R., Mark J.E., Hausner S. H., *Angew Makromol Chem* **259** (1998) 45.

Mayer A.B.R., Mark J.E., *J Polym Sci A: Polym Chem* **35** (1997) 3151.

Mayer A.B.R., Mark J.E., Morris R.E., *Polym J* **30** (1998) 197.

Meguro K., Nakamura Y., Hayashi Y., Torizuka M., Esumi K., *Bull Chem Soc Jpn* **61** (1988) 347.

Meguro K., Torizuka M., Esumi K., *Bull Chem Soc Jpn* **61** (1988) 341.

Merken H.M., Beecher G.R., *J Agric Food Chem* **48** (2000) 577–599.

Middleton E., Kandaswami C., Theoharides T.C., *Pharm Rev* **52** (2000) 673–751.

Miller N.J., Rice-Evans C.A., Davies M.J., Gopinathan V., Milner A., *Clin Sci* **84** (1993) 407.

Min D.B., Boff J.M., *Compr Rev Food Sci Saf* **1** (2002) 58.

Moutonnet M., Kizling J., Stenius P., Maire G., *Colloids Surf* **5** (1982) 209.

Moutonnet M., Kizling J., Touroude R., Maire G., Stenius P., *Appl Catal* **20** (1986) 163.

Mulvaney P., Giersig M., Henglein A., *J Phys Chem* **97** (1993) 7061.

Munro C.H., Smith W.E., Garner M., Clarkson J., White P.C., *Langmuir* **11** (1995) 3721.

Nagarajan R., Alan Hatton T., *Americ Chem Soc* (2008) 3.

Nagata Y., Watanabe Y., Fujita S., Dohmaru T., Taniguchi S., *J Chem Soc, Chem Commun* (1992) 1620.

Nakamura Y., Tsuji S., Tonogai Y., *J Agric Food Chem* **51** (2003) 331.

Nakao Y., Kaeriyama K., *J Colloid Interface Sci* **110** (1986) 82-87.

Naoki Toshima, Metal Nanoparticles for Catalysis, *Nanoscale Materials* (2004) 79-96.

Neddersen J., Chumanov G., Cotton T.M., *Appl Spectrosc* **47** (1993) 1959.

Olsen A.W., Kafafi Z.H., *J Am Chem Soc* **113** (1991) 7758.

Ou B., Woodill-Hampsch M., Prior R.L., *J Agric Food Chem* **49** (2001) 4619.

Ozgen M., Reese R.N., Tulio A.Z., Scheerens J.C., Miller R., *J Agric Food Chem* **54** (2006) 1151.

Ozin G.A., Arsenault A.C., Cademartiri L., Nanochemistry: A Chemical Approach to Nanomaterials, *RSC publishing* (2009).

Papp S., Szel J., Oszko A., Dekany I., *Chem Mater* **16** (2004) 1674-1685.

Pulido R., Bravo L., Saura-Calixto F., *J Agric Food Chem* **48** (2000) 3396.

Parr A.J., Bolwell G.P., *J Science Food Agric* **80** (2000) 985-1012.

Pathak S., Greci M.T., Kwong R.C., Mercado K., Prakash G.K.S., Olah G.A., Thompson M.E., *Chem Mater* **12** (2000) 1985.

Petit C., Lixon P., Pileni M.P., *J Phys Chem* **97** (1993) 12974.

Pileni M.P., Gulik-Krzywicki T., Tanori J., Filankembo A., Dedieu J.C., *Langmuir* **14** (1998) 7359.

Pileni M.P., *Langmuir* **13** (1997) 3266.

Ponder S.M., Darab J.G., Bucher J., Caulder D., Craig I., Davis L., Edelstein N., Lukens W., Nitsche H., Rao L., Shuh D.K., Mallouk T.E., *Chem Mater* **13** (2001) 479.

Porta F., Ragaini F., Cenini S., Scari G., *Gazz Chim Ital* **122** (1992) 361.

Porter L.J., Tannins, In J.B. Harborne (Ed.), plant phenolics, *Methods in plant biochemistry* **1** (1989) 389-419.

Prior R.L., Hoang H., Gu L., Wu X., Bacchiocca M., Howard L., Hampsch-Woodill M., Huang D., Ou B., Jacob R., *J Agric Food Chem* **51** (2003) 3273.

Prior R.L., Wu X., Schaich K., *J Agric Food Chem* **53**(8) (2005) 3101-3113.

Prochazka M., Mojzeš P., Štěpanek J., Vlčková B., Turpin P.Y., *Anal Chem* **69** (1997) 5103.

Puupponen-Pimia R., Nohynek L., Meier C., Kähkönen M., Heinonen M., Hopia A., *J Applied Microb* **90** (2001) 494-507.

- Randhir R., Lin Y.T., Shetty K., *Asia Pacific J Clinic Nutr* 13 (2004) 295–307.
- Rafaeloff R., Haruvy Y., Binenboym J., Baruch G., Rajbenbach L.A., *J Mol Catal* 22 (1983) 219.
- Reetz M.T., Helbig W., Quaiser S.A., in “Active Metals: Preparation, Characterization, Applications”, *VCH New York* (1996) 279–297.
- Reetz M.T., Helbig W., *J Am Chem Soc* 116 (1994) 7401.
- Reetz M.T., Quaiser S.A., *Angew Chem Int Ed Engl.* 34 (1995) 2240.
- Rice G.W., "In Laser Chemistry of Organometallics" (J. Chaiken,Ed.), *Americ Chem Soc: Washington DC* (1993) 273.
- Roginsky V., Lissi E.A., *Food Chem* 92 (2005) 235.
- Rotariu L., Lagarde F., Jaffrezic-Renault, Bala C., *Trends Anall Chem* 79 (2016) 80-87.
- Salkar R.A., Jeeranandam P., Kataby G., Aruna S.T., Kolytyn Y., Palchik O., Gedanken A., *J Phys Chem B* 104 (2000) 893.
- Samman S., Lyons Wall P.M., Cook N.C., Flavonoids and coronary heart disease: Dietary perspectives. In C.A. Rice-Evans & L. Packer (Eds.), Flavonoids in health and disease, *New York: Marcel Dekker* (1998) 469–482.
- Schmid G., Lehnert A., *Angew Chem Int Ed Engl* 28 (1989) 780.
- Schmid G., Lehnert A., Kreibig U., Adamczyk Z., Belouschek P.Z., *Naturforsch* 45b (1990) 989.
- Shelar Y.S., Kuchekar S.R., Han S.H., *J Saudi Chemic Soc* 19 (2015) 616–627.
- Sibbald M.S., Chumanov G., Cotton T.M., *J Phys Chem* 100 (1996) 4672.
- Siiman O., Hsu W.P., *J Chem Soc Faraday Trans* 82 (1986) 851.
- Sreepasad T.S., Pradeep T., Noble Metal Nanoparticles, *Springer Handbook of Nanomaterials* (2013).
- Suslick K.S., Choe S.B., Cichowlas A.A., Grinstaff M.W., *Nature* 253 (1991) 414.
- Suslick K.S., Fang M., Hyeon T., *J Am Chem Soc* 118 (1996) 11960.
- Suslick K.S., Seok-burn C., Cichowlas A.A., Grinstaff M.W., *Nature* 353 (1996) 414.
- Tabet-Aoul A., Mohamedi M., *Thin Solid Films* 534 (2013) 270–274.
- Tan C.K., Newberry V., Webb T.R., McAuliffe C.A., *J Chem Soc Dalton Trans* (1987) 1299.

Tan Y., Li Y., Zhu D., Noble Metal Nanoparticles, *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology* 8 (2004) 9–40.

Tan Y., Li Y., Zhu D., *Langmuir* 18 (2002) 3392.

Teranishi T., Hosoe M., Miyake M., *Adv Mater* 9 (1997) 65.

Teranishi T., Miyake M., *Chem Mater* 10 (1998) 594.

Torigoe K., Esumi K., *Langmuir* 8 (1992) 59.

Torigoe K., Suzuki A., Esumi K., *J Colloid Interface Sci* 241 (2001) 346.

Toshima N., Kuriyama M., Yamada Y., Hirai H., *Chem Lett* (1981) 793.

Toshima N., Takahashi T., Hirai H., *Chem Lett* (1985) 1245.

Toshima N., Takahashi T., *Bull Chem Soc Jpn* 65 (1992) 400.

Trojanowicz M., *Trends in Anal Chem* 84 (2016) 22–47.

Tsai K.L., Dye J., *Chem Mater* 5 (1993) 540.

Turkevich J., Stevenson P.C., Hillier J., *J Discuss Faraday Soc* 11 (1951) 55.

Tu W., Liu H., *Chem Mater* 12 (2000) 564.

Tzhayik O., Sawant P., Efrima S., Kovalev E., Klug J.T., *Langmuir* 18 (2002) 3364.

Underhill R.S., Liu G., *Chem Mater* 12 (2000) 3633.

Valcárcel M., Simonet B.M., Cárdenas S., *Anal Bioanal Chem* 391 (2008) 1881–1887.

Vičková B., Matějka P., Simonova J., Cermakova K., Pančoška P., Baumruk V., *J Phys Chem* 97 (1993) 9719.

Vitulli G., Bernini M., Bertozzi S., Pitzalis E., Salvadori P., Coluccia S., Martra G., *Chem Mater* 14 (2002) 1183

Wang J., Chen X.j., Liao K-m., Wang G-h., Han M., *Nanoscale Research Letters* 10 (2015) 311.

Wang J.G., Neoh K.G., Kang E.T., *J Colloid Interface Sci* 239 (2001) 78.

Wang Y., Ren J., Deng K., Gui L., Tang Y., *Chem Mater* 12 (2000) 1622.

Watson A.M., Zhang X., Alcaraz de la Osa R., Sanz J.M., Fernández F.G., Moreno F., Finkelstein G., Liu J., Everitt H.O., *Nano Lett* 15 (2015) 1095-1100.

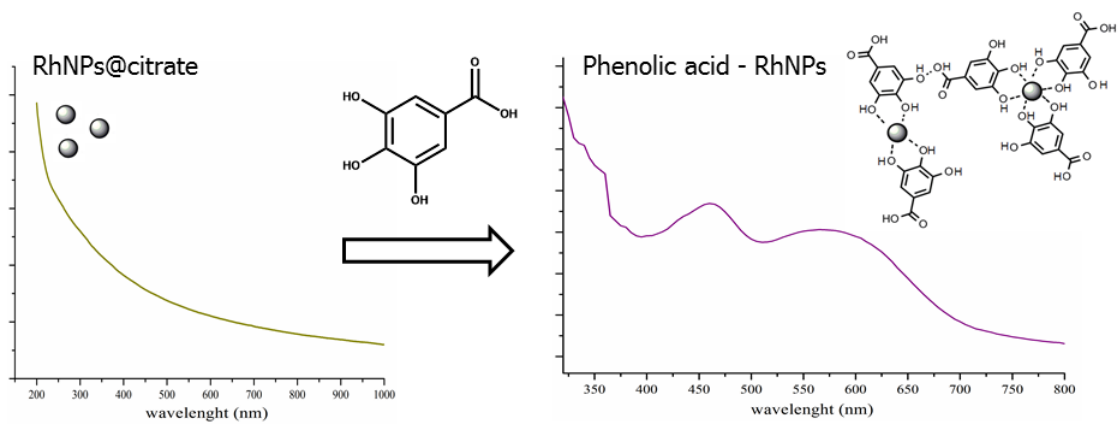
Wen X.G., Wang S.H., Ding Y., Wang Z.L., Yang S.H., *J Phys Chem B* 109 (2005) 215.

Wu M.L., Chen D.H., Huang T.C., *Chem Mater* 13 (2001) 599.

W.A. de Heer, Milani P., Chatelain A., *Phys Rev Lett* 65 (1990) 488.

- Wang W.N., Yoshifimi I., Wuled-Lengorro I., Okuyama K., *Mater Sci Eng B* **111** (2004) **69**.
- Yeh M.S., Yang Y.S., Lee Y.P., Lee H.F., Yeh Y.H., Yeh C.S., *J Phys Chem B* **103** (1999) **6851**.
- Youk J.H., Locklin J., Xia C., Park M.K., Advincula R., *Langmuir* **17** (2001) **4681**.
- Yu W., Liu H., *Chem Mater* **10** (1998) **1205**.
- Yu W., Liu M., Liu H., Zheng J., *J Colloid Interface Sci* **210** (1999) **218**.
- Yu W., Tu W., Liu H., *Langmuir* **15** (1999) **6**.
- Yuanyuang Li., Schluesener H.J., Shunqing Xu., *Gold Bulletin* **43** (2010).
- Zhang W.J., *Nanopart Res* **5** (2003) **323**, (b) D.L. Huber, *Small* **1** (2005) **482**.
- Zhao M., Crooks R.M., *Chem Mater* **11** (1999) **3379**.
- Zhou Y., Wang C.Y., Zhu Y.R., Chen Z.Y., *Chem Mater* **11** (1999) **2310**.
- Zhou Y., Yu S.H., Wang C.Y., Li X.G., Zhu Y.R., Chen Z.Y., *Adv Mater* **11** (1999) **850**.
- Ziegler K.J., Doty C., Johnston K.P., Korgel B.A., *J Am Chem Soc* **123** (2001) **7797**.
- Zuckerman E.B., Klabunde K.J., Olivier B.J., Sorensen C.M., *Chem Mater* **1** (1989) **12-14**.
- Γατσέλου Β.Α., Προσδιορισμός διαλυτής οργανικής ύλης μέσω φωτοαναγωγής των ιόντων αργύρου σε μεταλλικά νανοσωματίδια, *Μεταπτυχιακή διατριβή ειδίκευσης, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 2014*.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ ΣΕ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΤΣΑΓΙΟΥ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΟΞΥΓΟΝΟΥ ΜΕ ΕΚΤΥΠΩΜΕΝΑ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΑ ΓΡΑΦΙΤΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΜΕ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ ΡΟΔΙΟΥ

Περίληψη

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζεται μια νέα αναλυτική μέθοδος για τον ηλεκτροχημικό προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου που παράγεται σε αφεψήματα τσαγιού από την αυτο-οξείδωση των πολυφαινολών. Για τον προσδιορισμό χρησιμοποιήθηκαν νανοδομημένες καταλυτικές επιφάνειες ροδίου ακινητοποιημένες σε εκτυπωμένα ηλεκτρόδια γραφίτη. Πιο συγκεκριμένα, νανοσωματίδια ροδίου συντέθηκαν υδρο-χημικά από ένυδρο τρι-χλωριούχο άλας του ροδίου (Rh) παρουσία κιτρικών ανιόντων και βοροϋδριδίου του νατρίου. Στη συνέχεια τα νανοσωματίδια ακινητοποιήθηκαν πάνω σε ηλεκτρόδια γραφίτη μέσω ελκτικών ηλεκτροστατικών δυνάμεων με ένα λεπτό υμένιο θετικά φορτισμένης πολυαιθυλενιμίνης (PEI). Οι αισθητήρες σε 0,0 V vs. Ag/AgCl/3MKCl, παρουσίασαν γραμμική απόκριση μεταξύ ρεύματος και συγκέντρωσης H₂O₂ για περιοχή συγκεντρώσεων από 5 έως 600 μmoLL⁻¹ H₂O₂, και όριο ανίχνευσης τα 2,0 μM H₂O₂. Η επαναληψιμότητα της μεθόδου σε επίπεδο συγκέντρωσης 10 μM H₂O₂ (n=10) βρέθηκε μικρότερη από 3% ενώ μεταξύ διαφορετικών αισθητήρων (n=4) ήταν μικρότερη από 5%.

Οι αισθητήρες χρησιμοποιήθηκαν με μεγάλη επιτυχία για τον προσδιορισμό του H_2O_2 που παράγεται, με την πάροδο του χρόνου, σε εκχυλίσματα από λευκό, πράσινο και μαύρο τσάι, μέσω της αυτοοξειδωσης των πολυφαινολών. Καμία παρεμπόδιση δεν παρατηρήθηκε σε εμβολιασμένα δείγματα τσαγιού με καταλάση ή ασκορβικό οξύ. Τα ποσοστά ανάκτησης κυμαίνονταν μεταξύ 97 και 104%. Ως συμπέρασμα, τα συγκεκριμένα ηλεκτρόδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη μικρής κλίμακας και χαμηλού κόστους χημικών αισθητήρων για χρήση σε επί τόπου εφαρμογές, καθώς σε αντίθεση με τους περισσότερους αισθητήρες, δεν απαιτούν απαέρωση του δείγματος.

1.1 Εισαγωγή

Τα εγγενή πλεονεκτήματα που συνδέονται με την ηλεκτροχημική ανίχνευση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (π.χ. υψηλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα, ταχεία απόκριση, χαμηλό κόστος, απλή οργανολογία) έχουν φέρει τις μεθόδους που χρησιμοποιούν ηλεκτροχημικούς αισθητήρες και βιοαισθητήρες στην πρώτη γραμμή της επιστημονικής έρευνας. Παρόλο που μία μεγάλη σειρά από ηλεκτροχημικούς αισθητήρες έχουν αναπτυχθεί με βάση το κυανό της Πρωσίας [Ricci F., et al., 2005, Karyakin A.A., et al., 2001] όπως και άλλους ηλεκτροκαταλύτες [Giannoudi L., et al., 2006, Sun N., et al., 2006, Wang T., et al., 2013], αγώγιμα πολυμερή [Raffa D., et al., 2003, Li G., et al., 2007] και βιοαισθητήρες βασιζόμενους σε ένζυμα [Giannoudi L., et al., 2006, Song H., et al., 2013, Ahammad A.J.S., 2013, Chen W., et al., 2012], η έρευνα τείνει κατά τη διάρκεια των τελευταίων ετών υπέρ των αισθητήρων με βάση τα μεταλλικά νανοσωματίδια (NPs) [Pingarron J.M., et al., 2011, Chen S., et al., 2013]. Και αυτό διότι οι αισθητήρες αυτοί παρέχουν μοναδικά πλεονεκτήματα όσον αφορά την ευαισθησία, την εκλεκτικότητα, τη συμβατότητα με ζώντες οργανισμούς και τη σταθερότητα. Επιπλέον, λόγω των εξαιρετικά μικρών διαστάσεων των νανοσωματιδίων και της υψηλής ηλεκτροενεργής επιφάνειάς τους προσφέρονται για προσρόφηση σε μικρογραφικά και χαμηλού κόστους υποστρώματα, με αποτέλεσμα τη χρήση τους σε μεθόδους χημικής ανίχνευσης όπως σε επί τόπου εφαρμογές κ.λ.π. [Kuhlmeier D., et al., 2012, Doria G., et al., 2012].

Ένα μεγάλο εμπόδιο στη χρήση των αισθητήρων υπεροξειδίου του υδρογόνου με βάση τα νανοσωματίδια είναι η εγγενής ηλεκτροκαταλυτική ικανότητά τους στην αναγωγή του διαλυμένου οξυγόνου, η οποία περιορίζει τη χρήση τους μόνο σε απαερωμένα διαλύματα. Πέρα από τις πρακτικές δυσκολίες που σχετίζονται με την

απαέρωση του δείγματος (ειδικά σε εφαρμογές πεδίου), η αποξυγόνωση του δείγματος μπορεί να επηρεάσει και την ανάλυση, λόγω της ευαισθησίας του H_2O_2 [Gu Y., et al., 2008]. Μέχρι σήμερα, οι μόνοι ηλεκτροχημικοί αισθητήρες με βάση τα νανοσωματίδια που έχουν αναφερθεί και καθιστούν εφικτή την εκλεκτική αναγωγή του H_2O_2 παρουσία οξυγόνου βασίζονται σε φωσφονικά ενεργοποιημένα νανοσυμπλέγματα Pt [Xu J., et al., 2012], αλλά παρουσιάζουν μέτρια σταθερότητα ως προς το χρόνο (~1μήνα) ενώ η αναλυτική εφαρμογή τους έχει επαληθευτεί μόνο σε πρότυπα διαλύματα.

Μεταξύ της ευρείας ποικιλίας ηλεκτροχημικών αισθητήρων με βάση τα νανοσωματίδια, τα νανοσωματίδια ροδίου (RhNPs) έχουν αναφερθεί ίσως λιγότερο από όλα. Οι μόνες προσπάθειες που καταβάλλονται για την αξιοποίηση της πιθανής χρήσης των RhNPs σε αναλυτικές εφαρμογές επικεντρώνονται σε υβριδικά υλικά όπως δενδριμερή-RhNPs [Chandra S., et al., 2009] και πορώδη νανοσωλήνες Rh [Muench F., et al., 2012] για την ανίχνευση υπεροξειδίου του υδρογόνου, νανοϊνες άνθρακα με RhNPs για προσδιορισμό υδραζίνης [Hu G., et al., 2010] και νανοσφαίρες άνθρακα με RhNPs για ανίχνευση H_2 [Sathe B.R., 2013]. Πέρα από τις απαιτητικές πειραματικές πορείες, όλοι αυτοί οι αισθητήρες βρίσκονται ακόμα σε πρώιμο στάδιο ανάπτυξης και ως εκ τούτου η χρήση τους σε πραγματικά δείγματα δεν έχει αξιολογηθεί επαρκώς. Επιπλέον, η απομάκρυνση του οξυγόνου από όλα τα διαλύματα είναι αναγκαία για την αντιμετώπιση της παρεμπόδισής του, γεγονός που περιορίζει την εφαρμογή τους για αναλύσεις στο πεδίο (in-situ). Επομένως, υπάρχει ένα μεγάλο κενό όσον αφορά τη χρήση των RhNPs σαν ηλεκτροχημικούς αισθητήρες.

Στο κεφάλαιο αυτό, παρουσιάζουμε για πρώτη φορά έναν ηλεκτροχημικό αισθητήρα βασισμένο σε RhNPs για τον προσδιορισμό του H_2O_2 σε σύνθετα δείγματα

παρουσία διαλυμένου οξυγόνου. Οι αισθητήρες τροποποιήθηκαν με απλή εναπόθεση σταγόνας υδατικού αιωρήματος RhNPs στην επιφάνεια των εκτυπωμένων ηλεκτροδίων γραφίτη. Η ακινητοποίηση επιτεύχθηκε με ηλεκτροστατική έλξη μεταξύ του αρνητικού φορτίου της επιφάνειας των RhNPs και της θετικά φορτισμένης πολυαιθυλενιμίνης (PEI), η οποία ακινητοποιήθηκε προηγουμένως στην επιφάνεια των ηλεκτροδίων. Τα ηλεκτρόδια αυτά, παρουσίασαν αξιοσημείωτη ηλεκτροκαταλυτική απόκριση κατά την αναγωγή του H_2O_2 ακόμα και παρουσία οξυγόνου, αποφεύγοντας έτσι την απαέρωση του δείγματος. Ο νέος αισθητήρας εφαρμόστηκε για τον έλεγχο της παραγωγής H_2O_2 σε υδατικά εκχυλίσματα τσαγιού, το οποίο παράγεται μέσω αυτοοξειδωσης των πολυφαινολών και μπορεί να επηρεάσει αρνητικά τα ζωντανά συστήματα λόγω της προ-οξειδωτικής του δράσης [Akagawa M., et al., 2003]. Η εύκολη διαδικασία κατασκευής των ηλεκτροδίων μαζί με τη βελτιωμένη αναλυτική απόδοση όσον αφορά την εκλεκτικότητα, την ευαισθησία και την εξαιρετική σταθερότητα εργασίας του αισθητήρα υπό ρεαλιστικές συνθήκες υποδηλώνουν ότι τα RhNPs υπόσχονται πολλά για την κατασκευή χαμηλού κόστους αισθητήρων, διαθέσιμων για ανίχνευση H_2O_2 στο πεδίο.

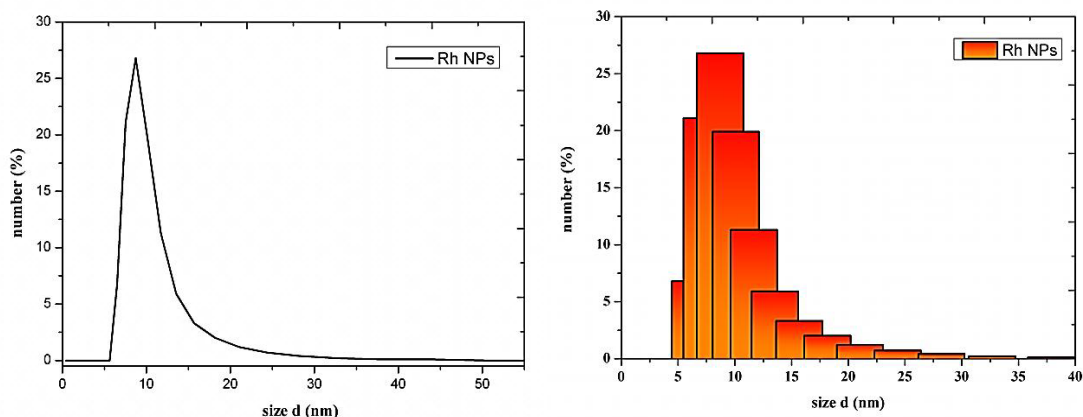
1.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.2.1 Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν όλα αναλυτικής καθαρότητας. Κιτρικό οξύ, πολυαιθυλενιμίνη (PEI, διακλαδισμένη, M.B. ~2000 από LS), και βοροϋδρίδιο του νατρίου αγοράστηκαν από τη Sigma-Aldrich. Η καταλάση από βοδινό ήπαρ (M.B. ~240,000, >200,000U mL⁻¹) και RhCl₃·3H₂O (38% σε Rh) προέρχονται από Fluka και Merck, αντίστοιχα. Όλα τα υπόλοιπα αντιδραστήρια ήταν αναλυτικού βαθμού και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Δις απεσταγμένο νερό (DDW) χρησιμοποιήθηκε σε όλη τη διαδικασία. Πρότυπο διάλυμα 0,1 molL⁻¹ H₂O₂ παρασκευάζονταν εβδομαδιαία με κατάλληλη αραιώση από πυκνό διάλυμα (30% H₂O₂, Fluka) σε DDW και διατηρούνταν στους 4°C.

1.2.2 Παρασκευή εναιωρήματος νανοσωματιδίων ροδίου (RhNPs)

Τα νανοσωματίδια ροδίου παρασκευάστηκαν σύμφωνα με προηγούμενη αναφορά [Jin C., et al., 2010] με αναγωγή 0,765 mmolL⁻¹ RhCl₃·3H₂O με 5 mmolL⁻¹ NaBH₄ παρουσία 0,5 mmolL⁻¹ κιτρικών ιόντων ως σταθεροποιητές με συνεχή ανάδευση για 15 λεπτά. Το χρώμα του εναιωρήματος των RhNPs ήταν σκούρο καφέ-πράσινο ενώ η μέση υδροδυναμική διάμετρος των νανοσωματιδίων προσδιορίστηκε με την τεχνική της δυναμικής σκέδασης φωτός (Dynamic Light Scattering) και βρέθηκε ίση με 8,7 nm (Εικόνα 1.1).



Εικόνα 1.1. Δεδομένα δυναμικής σκέδασης φωτός.

1.2.3 Κατασκευή εκτυπωμένων ηλεκτροδίων

Χαμηλού κόστους, εκτυπωμένα ηλεκτρόδια γραφίτη (SPEs) κατασκευάστηκαν πάνω σε ένα εύκαμπτο υπόστρωμα πολυεστέρα πάχους 125 μm (MacDermid) χρησιμοποιώντας ένα DEK 247 εκτυπωτή και οθόνες πολυεστέρα (280 mesh, DEK). Μελάνι γραφίτη (PF-407A, Acheson) τοποθετήθηκε μέσω ενός γαλακτώματος πάχους 13–20 μm χρησιμοποιώντας μία σπάτουλα πολυουρεθάνης σκληρότητας 75. Πριν από τις μετρήσεις το αγώγιμο τμήμα καλύφθηκε με μονωτική ταινία. Πληροφορίες για την κατασκευή των ηλεκτροδίων δίνονται σε προηγούμενη δημοσιευμένη εργασία [Lezi N., et al., 2013].

1.2.4 Οργανολογία

Τα πειράματα κυκλικής βολταμετρίας (CV), αμπερομετρίας και ηλεκτροχημικής φασματοσκοπίας εμπέδησης (EIS) πραγματοποιήθηκαν με ηλεκτροχημικό αναλυτή Autolab PGSTAT12/FRA2 σε ένα σύστημα τριών ηλεκτροδίων. Τροποποιημένα ή μη τροποποιημένα SPEs και ένα σύρμα πλατίνας χρησιμοποιήθηκαν ως ηλεκτρόδια εργασίας και ως βοηθητικό ηλεκτρόδιο, αντίστοιχα. Το ηλεκτρόδιο αναφοράς ήταν

Ag/AgCl/3M KCl (IJ Cambria). Τα πειράματα της κυκλικής βολταμετρίας και της αμπερομετρίας πραγματοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών $0,1 \text{ molL}^{-1}$ pH 7, που περιείχε $0,1 \text{ molL}^{-1}$ KCl, σε θερμοκρασία δωματίου, χρησιμοποιώντας ρυθμό σάρωσης $0,1 \text{ Vs}^{-1}$ και δυναμικό πόλωσης $0,0 \text{ V}$, αντίστοιχα. Τα φάσματα εμπέδησης καταγράφηκαν στην περιοχή συχνοτήτων 10^{-1} – 10^5 Hz , χρησιμοποιώντας ένα ημιτονοειδές σήμα διέγερσης πάνω σε ένα δυναμικό DC $0,200 \text{ V}$. Χρησιμοποιήθηκε πλάτος διέγερσης 10 mV (rms). Μετρήσεις EIS πραγματοποιήθηκαν σε ένα διάλυμα $0,1 \text{ molL}^{-1}$ PBS, pH 7, σε θερμοκρασία δωματίου, παρουσία 5 mmolL^{-1} σιδηροκυανιούχων (II)/(III) (1+1 μίγμα), που χρησιμοποιείται ως αισθητήρας οξειδοαναγωγής. Εικόνες ηλεκτρονικής σάρωσης και στοιχειακή μικροανάλυση πραγματοποιήθηκαν με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (JEOLJSM-6510LV) εξοπλισμένο με ένα INCA PentaFETx3 (Oxford Instruments) ενεργειακό ανιχνευτή διασποράς ακτίνων X (EDX). Η λήψη των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με επιταχυνόμενη τάση 20 kV και 60 s χρόνο συσσώρευσης. Τα δείγματα επικαλύπτονται με ένα φιλμ Au πάχους 15 nm χρησιμοποιώντας μια διάταξη επίχρισης με εκτίναξη (sputtercoater) Polaron SC7620 (Thermo VG Scientific).

1.2.5 Προετοιμασία των εκχυλισμάτων τσαγιού

$3,00 \text{ g}$ δείγματος τσαγιού (μαύρο και πράσινο) προστέθηκε σε $50,00 \text{ mL}$ $0,1 \text{ molL}^{-1}$ PBS pH 7. Στη συνέχεια το μίγμα θερμάνθηκε στους 90°C για 30 λεπτά , υπό ανάδευση. Το μίγμα αφέθηκε να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου, φυγοκεντρήθηκε στις 5000 στροφές για 30 λεπτά και ύστερα διηθήθηκε μέσω μεμβράνης Millipore (μέγεθος πόρων $0,45 \mu\text{m}$). Για τη μελέτη ανακτήσεων το δείγμα εμπλουτίστηκε με $1,43 \text{ mmolL}^{-1}$

H₂O₂. Επίσης, μελετήθηκαν δείγματα που παρασκευάστηκαν με παρόμοιο τρόπο προσθέτοντας 10 μL καταλάση.

1.2.6 Πειραματική πορεία

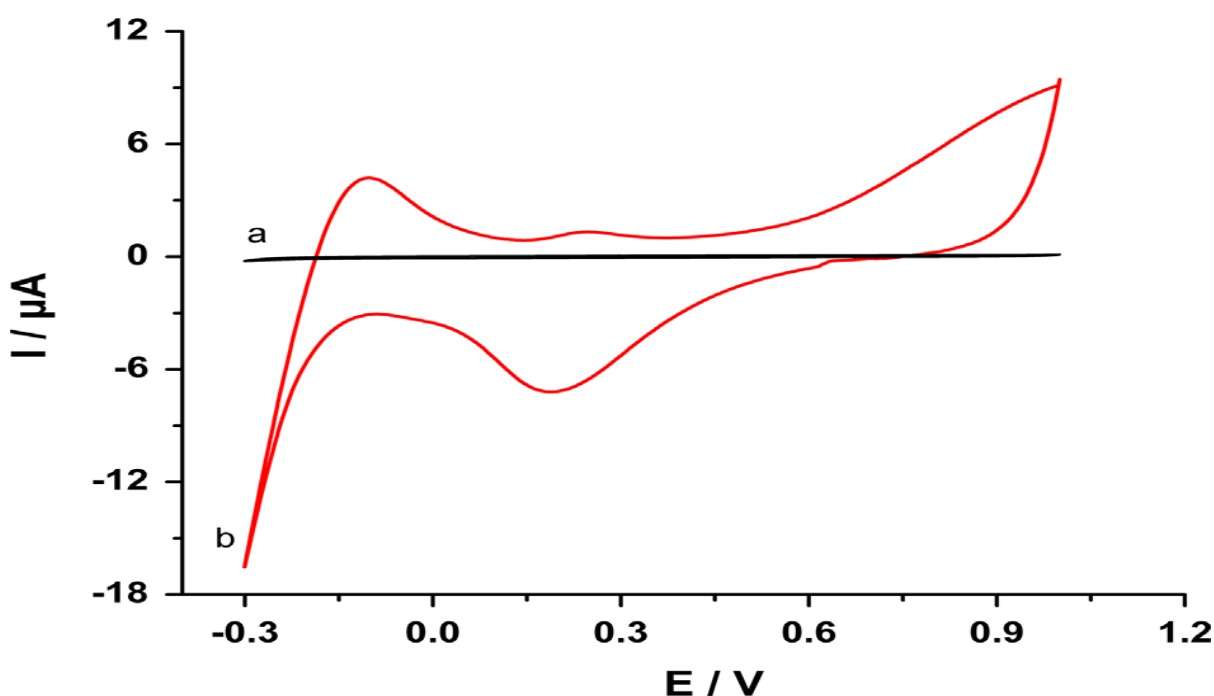
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (65,00-x) mL προστέθηκε σε κυψελίδα υπό συνεχή ανάδευση (σε μέτρια ταχύτητα). Όταν σταθεροποιήθηκε η ένταση του μετρούμενου ρεύματος προστέθηκαν κατάλληλες ποσότητες (x mL) H₂O₂ ή εκχυλισμένων δειγμάτων τσαγιού και καταγράφηκαν οι τρέχουσες αλλαγές λόγω της ηλεκτροαναγωγής του H₂O₂ στα 0,0 V. Η σταθερή απόκριση ρεύματος λαμβάνεται ως μέτρο της συγκέντρωσης του αναλύτη. Καμπύλες βαθμονόμησης σε διαφορετικές περιοχές εργασίας κατασκευάστηκαν προσθέτοντας 5 (2 πρώτες προσθήκες), 10 (18 επόμενες προσθήκες) και 100 (επόμενες 9 προσθήκες) μmolL⁻¹ H₂O₂ στην κυψελίδα.

1.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1.3.1 Ηλεκτροχημική συμπεριφορά των SPEs/RhNPs

Τα κυκλικά βολταμογραφήματα (CV plots) των τροποποιημένων και μη τροποποιημένων με RhNPs εκτυπωμένων ηλεκτροδίων σε 0,5 molL⁻¹ απαερωμένο διάλυμα H₂SO₄ απεικονίζονται στην **Εικόνα 1.2**. Στην περιοχή του υδρογόνου, η απότομη αύξηση του ρεύματος σε τιμές δυναμικού που είναι καθοδικές περισσότερο από -0,100 V μπορεί να οφείλονται στην προσρόφηση των ιόντων υδρογόνου, ενώ η κορυφή που εμφανίστηκε στα -0,125 V, κατά τη διάρκεια της ανοδικής σάρωσης, σχετίζεται με

την οξείδωση του προσροφημένου υδρογόνου [Tabet-Aoul A., et al., 2013]. Σε μεγαλύτερες θετικές τιμές δυναμικού κατά τη διάρκεια της ανοδικής σάρωσης, η κορυφή στα 0,270 V μπορεί να αποδοθεί στη φόρτιση διπλής στιβάδας λόγω της προσρόφησης των όξινων θεικών ιόντων [Tabet-Aoul A., et al., 2013, Xu Q., et al., 2009], ενώ ο συνολικός σχηματισμός επιφανειακών οξειδίων ροδίου εμφανίζεται στα 0,500 V. Τέλος, η μεγάλη κορυφή στα 0,180 V κατά την διάρκεια της καθοδικής σάρωσης αντιστοιχεί στην αναγωγή της στιβάδας οξειδίου ροδίου.

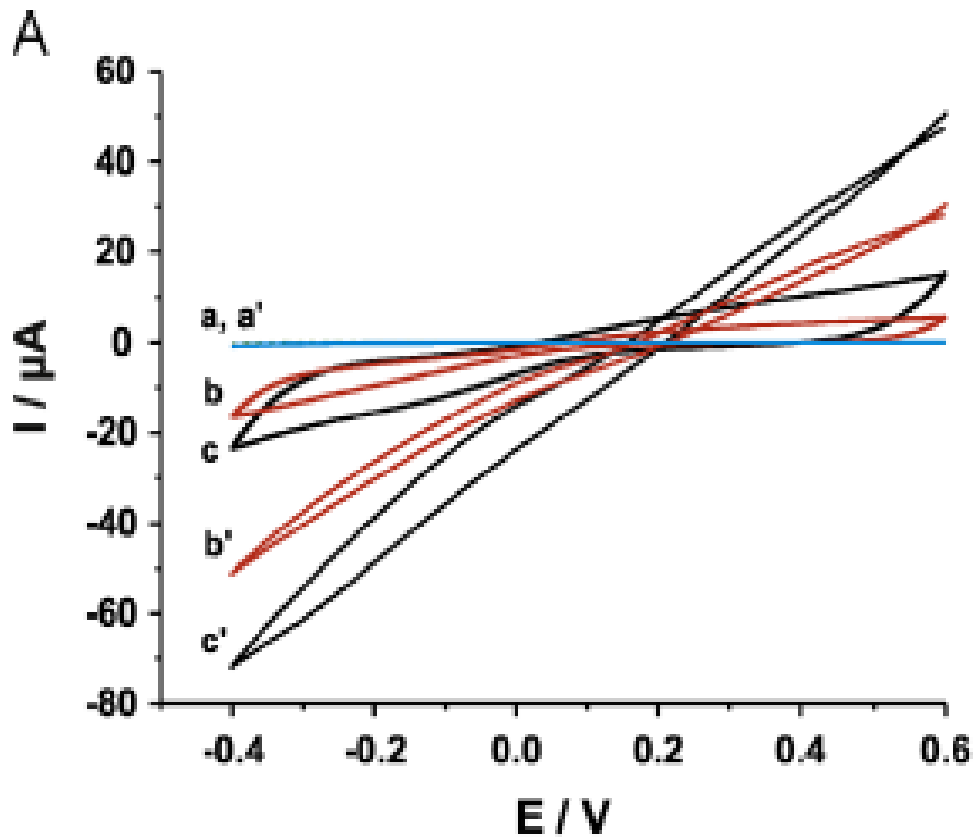


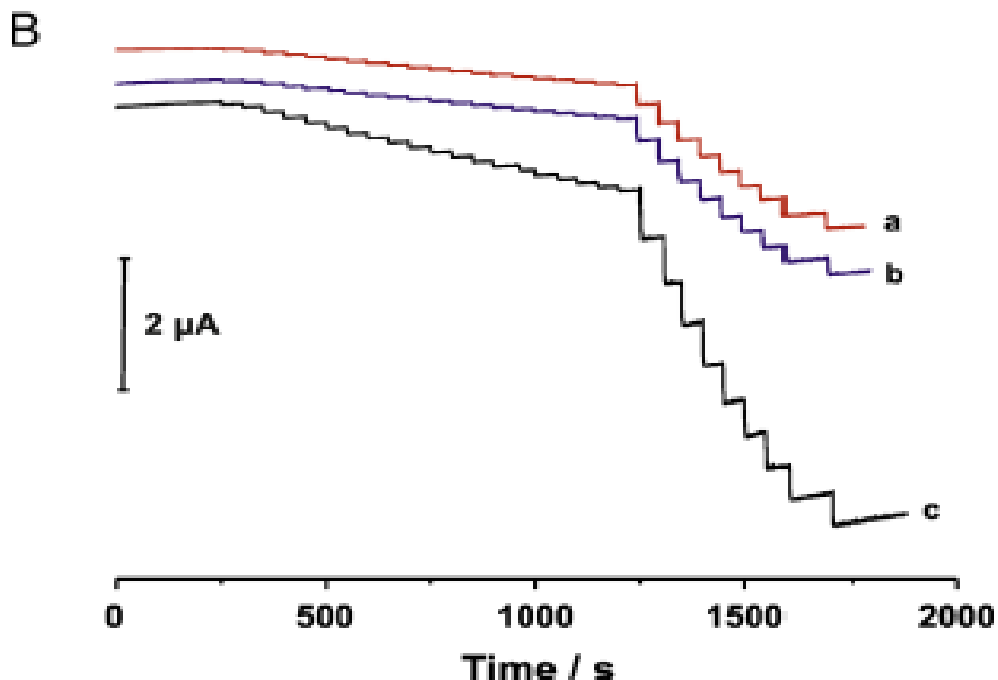
Εικόνα 1.2. Κυκλικά βολταμμογραφήματα (CVs) "γυμνών" (σάρωση a) και τροποποιημένων με RhNPs SPEs (σάρωση b) σε διάλυμα $0,5 \text{ molL}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ απαερωμένο με υψηλής καθαρότητας N_2 . Ρυθμός σάρωσης $0,1 \text{ Vs}^{-1}$.

1.3.2 Ηλεκτροκατάλυση και δημιουργία των αισθητήρων

Στα κυκλικά βολταμμογραφήματα (CV) που απεικονίζονται στην **Εικόνα 1.3A**, παρατηρούμε ότι τα τροποποιημένα με **RhNPs** εκτυπωμένα ηλεκτρόδια γραφίτη εμφανίζουν βελτιωμένες ηλεκτροκαταλυτικές ιδιότητες τόσο κατά την οξείδωση όσο και

την αναγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Ενώ τα μη τροποποιημένα SPEs δεν παράγουν καταλυτικό ρεύμα κατά την προσθήκη υπεροξειδίου του υδρογόνου (σαρώσεις a, a'), τα τροποποιημένα με **RhNPs** ηλεκτρόδια SPEs (είτε μέσω φυσικής προσρόφησης (σαρώσεις b, b') είτε μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων (σαρώσεις c, c') με PEI), έδωσαν μεγάλες τιμές καταλυτικού ρεύματος. Συγκρίνοντας το μέγεθος των καταλυτικών ρευμάτων σε SPEs/RhNPs (σαρώσεις b, b') και SPEs/PEI/RhNPs (σαρώσεις c, c') είναι προφανές ότι η παρουσία ενός λεπτού φιλμ από PEI στην επιφάνεια των SPEs γραφίτη βοηθά στην ηλεκτροκαταλυτική απόδοση του αισθητήρα.



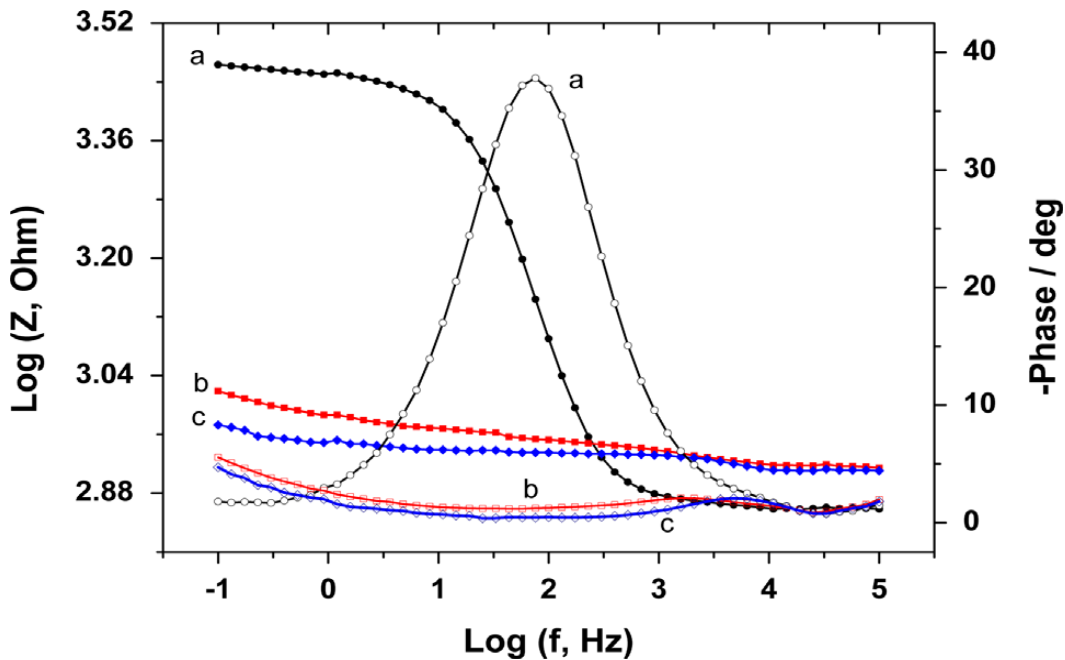


Εικόνα 1.3. (A) Κυκλικά βολταμογραφήματα (CVs) των (a και a') "γυμνών" SPEs, (b και b') SPEs/RhNPs και (c και c') SPEs/PEI(0.2%)/RhNPs σε $0,1 \text{ molL}^{-1}$ PBS pH 7 περιέχοντας $0,1 \text{ molL}^{-1}$ KCl (a–c) πριν και (a', b', c') μετά την προσθήκη 5 mmolL^{-1} H_2O_2 . Ρυθμός σάρωσης $0,1 \text{ Vs}^{-1}$, (B) Χρονοαμπερομετρικά διαγράμματα των SPEs/PEI/RhNPs αισθητήρων τροποποιημένων με (a) 0, (b) 2 και (c) 0,2% w/v PEI σε αιθανόλη σε εύρος συγκεντρώσεων $5\text{--}1090 \text{ }\mu\text{molL}^{-1}$ H_2O_2 στα $0,0 \text{ V}$ σε $0,1 \text{ molL}^{-1}$ PBS pH 7 περιέχοντας $0,1 \text{ molL}^{-1}$ KCl παρουσία διαλυμένου οξυγόνου.

Η επίδραση της PEI μελετήθηκε σε πέντε επίπεδα συγκεντρώσεων (0,1, 0,2, 0,5, 1,0 και 2,0% w/v σε αιθανόλη) με την πραγματοποίηση συγκριτικών καταλυτικών πειραμάτων κυκλικής βολταμετρίας παρουσία 5 mmolL^{-1} H_2O_2 . Οι υψηλότερες τιμές καταλυτικού ρεύματος παρατηρήθηκαν για συγκέντρωση PEI 0,2% (SPEs/PEI(0,2%)/RhNPs). Ελαφρώς χαμηλότερες τιμές καταλυτικού ρεύματος παρατηρήθηκαν για 0,1% PEI (SPEs/PEI(0,1%)/RhNPs), ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις PEI (0,5–2,0% w/v σε αιθανόλη) δεν παρατηρήθηκε βελτίωση στην καταλυτική απόδοση. Σε όλες τις περιπτώσεις, τα καταλυτικά ρεύματα ήταν υψηλότερα από εκείνα που λαμβάνονται χωρίς την χρήση PEI (SPEs/RhNPs). Συγκριτικά

χρονοαμπερομετρικά διαγράμματα για τρεις επιλεγμένους αισθητήρες που τροποποιήθηκαν με 0, 0,2 και 2,0% w/v PEI σε αιθανόλη απεικονίζονται στην **Εικόνα 1.3B**.

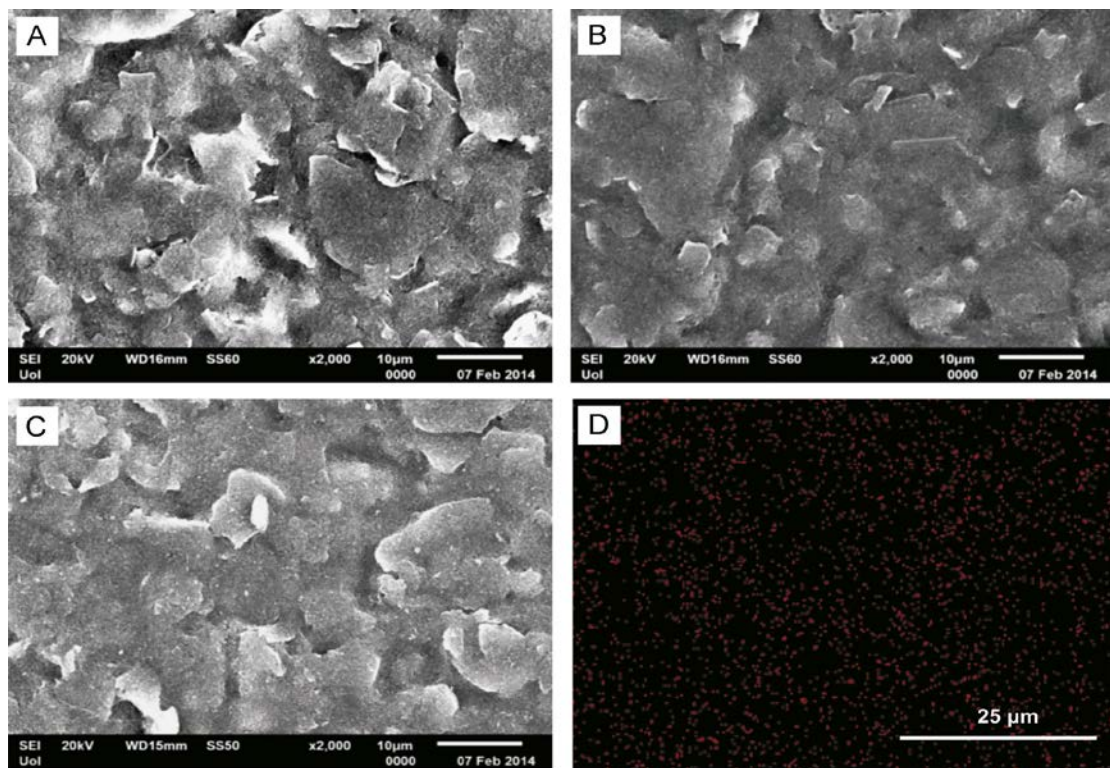
Ο σχηματισμός της κάθε στιβάδας μελετήθηκε με τη χρήση ηλεκτροχημικής φασματοσκοπίας εμπέδησης (faradic EIS) κατά τα διάφορα στάδια τροποποίησης. Όπως φαίνεται στα γραφήματα που απεικονίζονται στην **Εικόνα 1.4**, σε φάσμα χαμηλής συχνότητας, η οποία περιγράφει την εμπεδησιομετρική συμπεριφορά της διεπιφάνειας ηλεκτροδίου/ηλεκτρολύτη, τα μη τροποποιημένα ηλεκτρόδια γραφίτη SPEs (σάρωση a, χρωματισμένοι κύκλοι) παρουσιάζουν αυξημένη την τιμή της εμπέδησης (σύνθετης αντίστασης) ($\log|Z|=3,47 \Omega$ σε 0,1 Hz) η οποία μειώνεται δραματικά (σε $\log|Z|=3,02 \Omega$ σε 0,1 Hz) στα SPEs/PEI (0,2%) (σάρωση b, χρωματισμένα τετράγωνα).



Εικόνα 1.4. Γραφήματα των αισθητήρων σε διάφορα στάδια τροποποίησης : (σάρωση a, κύκλοι) "γυμνό" SPE, (σάρωση b, τετράγωνα) SPEs/PEI(0,2%), και (σάρωση c, ρόμβοι) SPEs/PEI(0,2%)/RhNPs σε $0,1 \text{ molL}^{-1}$ PBS pH 7 περιέχοντας 5 mmolL^{-1} σιδηροκυανιούχων (II)/(III). Χρωματισμένα σύμβολα, προφίλ αντίστασης; κενά σύμβολα, προφίλ φάσης.

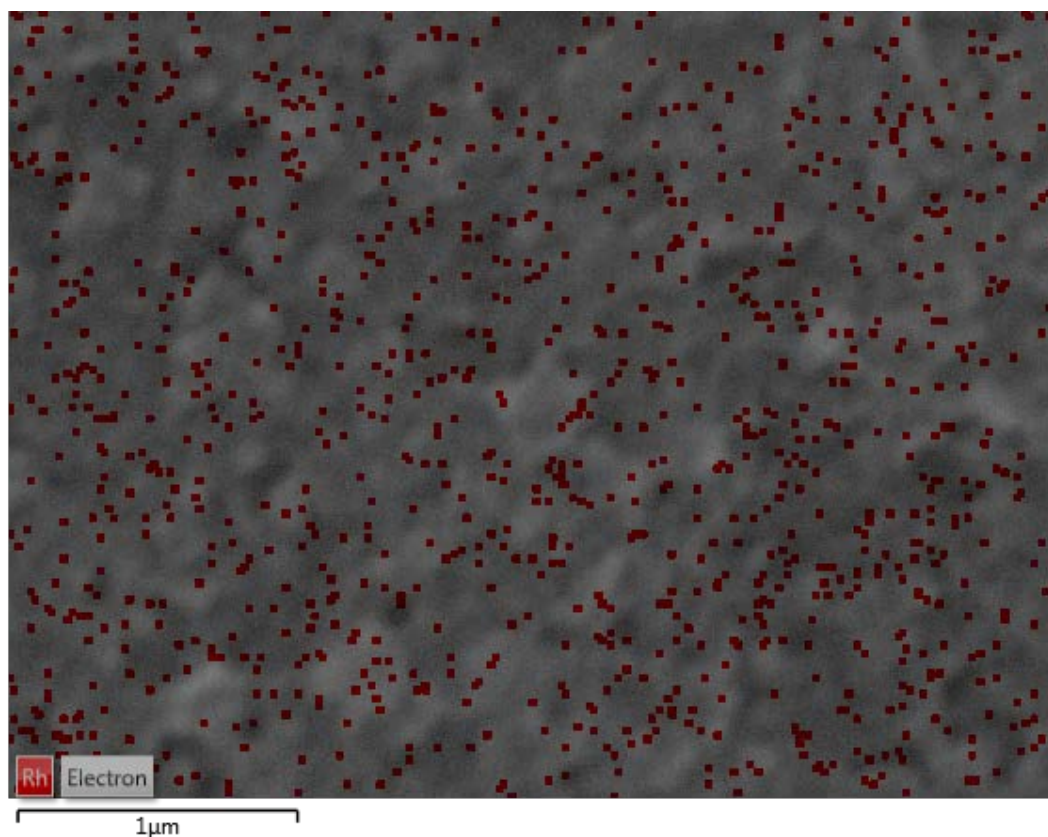
Αυτή η δραστική μείωση της διεπιφανειακής αντίστασης οφείλεται στην αυξημένη ροή της κυψελίδας οξειδοαναγωγής στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, λόγω της ηλεκτροστατικής έλξης των αρνητικά φορτισμένων σιδηροκυανιούχων (II)/(III) μορίων από τις θετικά φορτισμένες αμινομάδες ($-\text{NH}_3^+$) στην στρώση PEI. Περαιτέρω μείωση της διεπιφανειακής αντίστασης ($\log|Z|=2,96 \ \Omega \ \text{σε} \ 0,1 \ \text{Hz}$) στα SPEs/PEI(0,2%)/RhNPs (σάρωση c, γεμάτοι ρόμβοι) μπορεί να αποδοθεί συλλογικά στην ενίσχυση της ηλεκτροκαταλυτικής απόδοσης της επιφάνειας του ηλεκτροδίου και στη μείωση της αντίστασης του φιλμ PEI/RhNPs λόγω της παρουσίας των μεταλλικών νανοσωματιδίων. Στην υψηλή περιοχή συχνοτήτων, η παρατηρούμενη διαφορά στις σύνθετες τιμές μεταξύ μη τροποποιημένου και δύο τροποποιημένων SPEs μπορεί να αποδοθεί σε μεταβολές της ωμικής αντίστασης της ενεργής επιφάνειας λόγω της έκθεσης σε αιθανόλη κατά τη διάρκεια της εναπόθεσης της PEI [Devan S., et al., 2004]. Και στις τρεις περιπτώσεις (**Εικόνα 1.4**), τα κενά σύμβολα δείχνουν τα αντίστοιχα προφίλ φάσης.

Από τις εικόνες SEM που απεικονίζονται στην **Εικόνα 1.5**, συμπεραίνουμε ότι η προσθήκη της PEI πάνω στα εκτυπωμένα ηλεκτρόδια γραφίτη εξομαλύνει τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους (**Εικόνα 1.5B και 1.5Γ**) αποτρέποντας την ένταξη και την επακόλουθη συσσώματωση των RhNPs μέσα στις κοιλότητες του γραφίτη.



Εικόνα 1.5. Εικόνες SEM των (A) "γυμνών" SPEs, (B) SPEs/PEI(0,2%) και (C) SPEs/PEI(0,2%)/RhNPs (D) EDX στοιχειακή μικροανάλυση χάρτη (C).

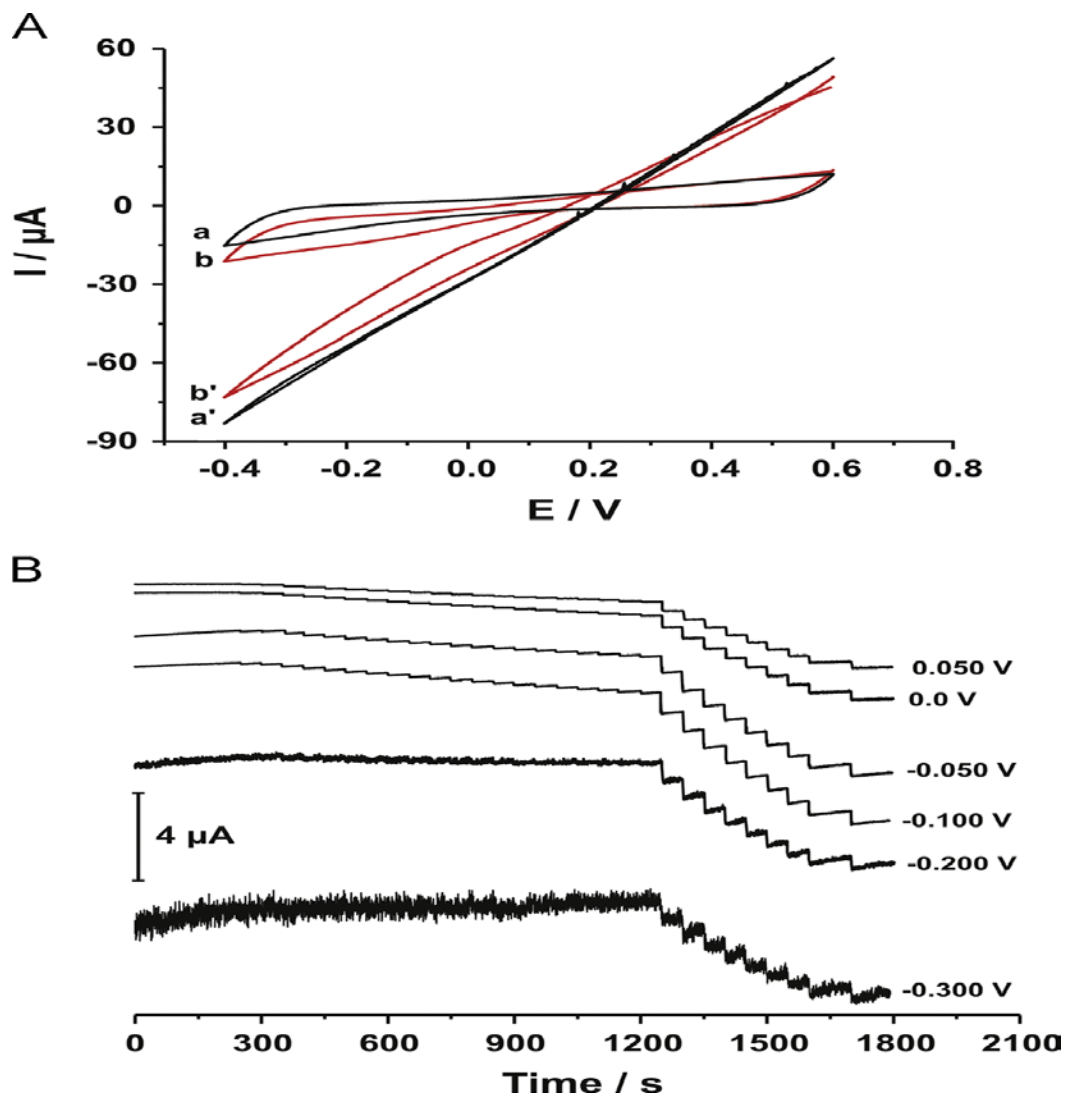
Από την άλλη πλευρά, ραβδώσεις εμφανίζονται στην ετερογενή επιφάνεια των "γυμνών" SPEs (**Εικόνα 1.5A**). Η κατώτερη τραχεία επιφάνεια στους αισθητήρες SPEs/PEI σε συνδυασμό με την αλληλεπίδραση που προκαλείται από τις θετικά φορτισμένες αμινομάδες της PEI διευκολύνουν τα RhNPs να διανεμηθούν ομοιόμορφα σε όλη την επιφάνεια των ηλεκτροδίων όπως αποδεικνύεται από τη στοιχειακή χαρτογράφηση EDX (τα άτομα Rh χρωματισμένα με κόκκινο) (**Εικόνα 1.5D και Εικόνα 1.6**).



Εικόνα 1.6. EDX στοιχειακή μικροανάλυση σε μεγεθυμένη κλίμακα σε SPEs/PEI(0,2%)/RhNPs.

1.3.3 Βελτιστοποίηση πειραματικών συνθηκών

Η επίδραση του διαλυμένου οξυγόνου στην ηλεκτροκαταλυτική απόδοση των SPEs/PEI(0,2%)/RhNPs μελετήθηκε αρχικά πραγματοποιώντας συγκριτικές μελέτες CV σε μη απαερωμένα (b, b') και απαερωμένα (a, a') διαλύματα PBS, πριν και μετά την προσθήκη H_2O_2 (Εικόνα 1.7).



Εικόνα 1.7. (A) Κυκλικά βολταμμογραφήματα (CVs) των SPEs/PEI(0,2%)/RhNPs σεαπαερωμένο (a και a') και μη απαερωμένο (b και b') διαλύμα $0,1 \text{ molL}^{-1}$ PBS pH 7 που περιέχει $0,1 \text{ molL}^{-1}$ KCl., Τα CVs (a και b) ελήφθησαν πριν την προσθήκη 5 mmolL^{-1} H_2O_2 ενώ τα CVs (a' και b') μετά την προσθήκη 5 mmolL^{-1} H_2O_2 . Ρυθμός σάρωσης, $0,1 \text{ Vs}^{-1}$.

(B) Χρονοαμπερομετρικά διαγράμματα των SPEs/PEI(0,2%)/RhNPs σε εύρος συγκεντρώσεων $5\text{--}1090 \text{ μmolL}^{-1}$ H_2O_2 στα (a) $0,050$, (b) $0,0$, (c) $-0,050$, (d) $-0,100$, (e) $-0,200$ και (f) $-0,300 \text{ V}$ σε $0,1 \text{ molL}^{-1}$ PBS pH 7 παρουσία $0,1 \text{ molL}^{-1}$ KCl και διαλυμένου οξυγόνου.

Συγκρίνοντας τις σαρώσεις (a, b) της **Εικόνας 1.7**, συμπεραίνουμε ότι τα RhNPs εμφανίζουν μέτρια ηλεκτροκαταλυτική συμπεριφορά προς το διαλυμένο οξυγόνο όπως

παρατηρήθηκε από το μέγεθος του καθοδικού καταλυτικού κύματος σάρωσης (b) και η οποία εξαφανίστηκε στη σάρωση (a) στο N₂-κορεσμένο διάλυμα ηλεκτρολύτη. Ο ανταγωνιστικός ρόλος του διαλυμένου οξυγόνου στην ηλεκτροαναγωγή του H₂O₂ μπορεί να φανεί με τη σύγκριση του μεγέθους των καταλυτικών κυμάτων [σαρώσεις (a'), (b')] που καταγράφηκαν μετά την προσθήκη 5 mmolL⁻¹ H₂O₂.

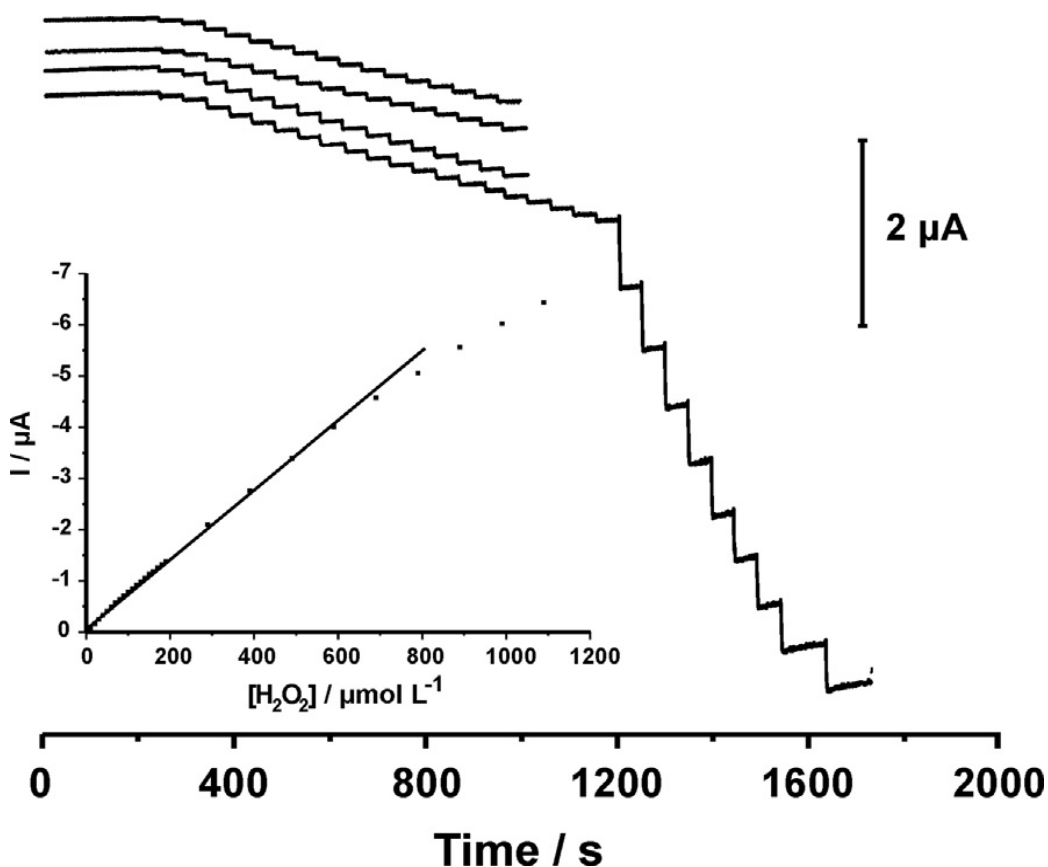
Για την καλύτερη αξιολόγηση της επίδρασης του διαλυμένου οξυγόνου στην ηλεκτροαναγωγή του H₂O₂ στα SPEs/PEI(0,2%)/RhNPs πραγματοποιήθηκαν χρονοαμπερομετρικές μετρήσεις σε διαφορετικές τιμές δυναμικού πόλωσης. Τα καταλυτικά ρεύματα που καταγράφηκαν στα 0,050, 0,0, -0,050, -0,100, -0,200 και -0,300 V επαληθεύουν την ικανότητα των SPEs/PEI(0,2%)/RhNPs αισθητήρων για τη μέτρηση H₂O₂ σε επίπεδα μM παρουσία διαλυμένου οξυγόνου σε τιμές δυναμικού πόλωσης λιγότερο καθοδικές από -0,200 V, όπου το φαινόμενο της παρεμπόδισης του διαλυμένου οξυγόνου αυξάνεται σημαντικά. Λαμβάνοντας ως κριτήρια την ευαισθησία της μεθόδου, την ένταση του ρεύματος υποβάθρου και του χρόνου που απαιτείται για την σταθεροποίηση του σήματος, πραγματοποιήθηκαν περαιτέρω πειράματα στα 0,0 V. Σημειώνεται πάντως ότι οι τιμές δυναμικού πόλωσης στα -0,050 και -0,100 V παρέχουν επίσης εξαιρετικές I-t καμπύλες που θα μπορούσαν εναλλακτικά να χρησιμοποιηθούν για εφαρμογές σε δείγματα πλούσια σε αναγωγικές ενώσεις.

Το pH του ρυθμιστικού διαλύματος εργασίας μελετήθηκε παρατηρώντας τις μεταβολές του σήματος των SPEs/PEI(0,2%)/RhNPs παρουσία 50 μmolL⁻¹ H₂O₂. Διεξήχθησαν πειράματα σε 0,1 molL⁻¹ PBS σε τιμές pH 5-8 και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι αισθητήρες παρουσιάζουν εξαιρετική απόδοση σε τιμές pH 6-8, ενώ υψηλότερη απόκριση παρατηρήθηκε σε pH 7, το οποίο χρησιμοποιήθηκε και ως βέλτιστο.

Ο βέλτιστος όγκος του κολλοειδούς αιωρήματος των RhNPs που εναποτίθεται πάνω στα ηλεκτρόδια μελετήθηκε με εναπόθεση 2, 5, 10, 15 και 20 μL RhNPs στην επιφάνεια των τροποποιημένων με PEI ηλεκτροδίων SPEs. Η ευαισθησία των τελικών αισθητήρων αυξάνονταν με την αύξηση του όγκου έως και τα 15 μL ενώ στη συνέχεια σταθεροποιείται ελαφρώς. Ως εκ τούτου, η εφαρμογή των 15 μL διαλύματος RhNPs επελέγη ως βέλτιστη.

1.3.4 Αναλυτική απόδοση

Υπό τις βέλτιστες πειραματικές συνθήκες καταγράφηκαν τα καταλυτικά ρεύματα σε διάφορες συγκεντρώσεις υπεροξειδίου του υδρογόνου (**Εικόνα 1.8**). Η εξίσωση $I(\text{ρεύμα}/\mu\text{A})=f([\text{H}_2\text{O}_2]/\mu\text{molL}^{-1})$ ήταν ευθύγραμμη στην περιοχή συγκεντρώσεων από 5 έως 600 μmolL^{-1} H_2O_2 με συντελεστή γραμμικότητας $R^2=0,9982$ (**Εικόνα 1.8, ένθετο γράφημα**). Το όριο ανίχνευσης, (ο λόγος του σήματος προς το θόρυβο ίσο με 3), ήταν 2 μmolL^{-1} H_2O_2 ενώ η σχετική τυπική απόκλιση (RSD) της μεθόδου ήταν μικρότερη από 3% ($n=10$, 10 μmolL^{-1} H_2O_2). Επίσης, μελετήθηκε η επαναληψιμότητα μεταξύ διαφορετικών αισθητήρων συγκρίνοντας την απόκριση τεσσάρων διαφορετικών αισθητήρων σε εύρος συγκεντρώσεων 5–150 μmolL^{-1} H_2O_2 . Από τα χρονοαμπερομετρικά διαγράμματα της **Εικόνας 1.8** προκύπτει ότι οι αισθητήρες παρουσιάζουν εξαιρετική επαναληψιμότητα. Τέλος, οι αισθητήρες εμφανίζουν εξαιρετική σταθερότητα αποθήκευσης και όταν αποθηκεύονται σε ξηρές συνθήκες περιβάλλοντος διατηρούν περισσότερο από το 95% της αρχικής τους δραστηριότητας για τουλάχιστον τέσσερις μήνες.

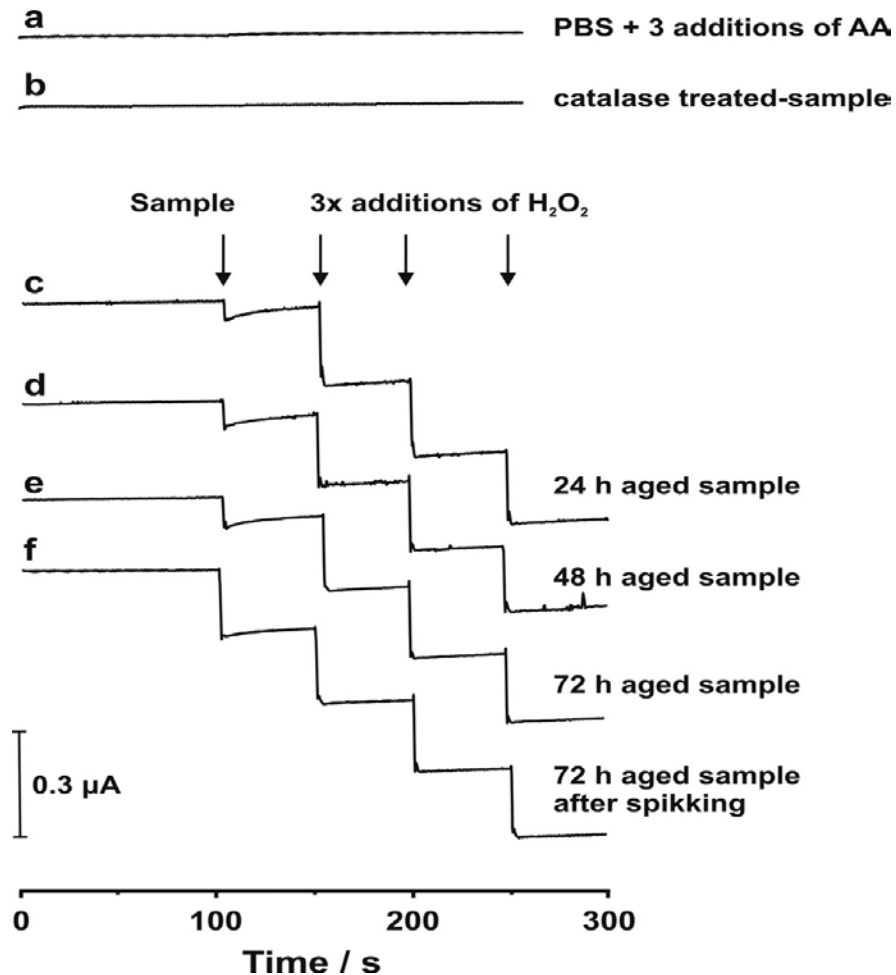


Εικόνα 1.8. Χρονοαμπερομετρικά διαγράμματα διαφορετικών SPEs/PEI(0,2%)/RhNPs σε εύρος συγκεντρώσεων 5–150 μmolL^{-1} (5–1090 μmolL^{-1} για το ηλεκτρόδιο που χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή της ένθετης καμπύλης αναφοράς) H_2O_2 στα 0,0 V σε 0,1 molL^{-1} PBS pH 7 περιέχοντας 0,1 molL^{-1} KCl παρουσία διαλυμένου οξυγόνου. Το ένθετο γράφημα απεικονίζει την καμπύλη $I=f[\text{H}_2\text{O}_2]$.

1.3.5 Εφαρμογή σε πραγματικά δείγματα

Οι αισθητήρες που αναπτύχθηκαν χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε εκχυλίσματα τσαγιού. Η εκλεκτικότητα των αισθητήρων μελετήθηκε αρχικά με τρεις διαδοχικές προσθήκες 25 μmolL^{-1} ασκορβικού οξέος, μία ισχυρά ηλεκτρενεργή ένωση, σε καθαρό διάλυμα ηλεκτρολύτη (Εικόνα 1.9, γράφημα a)

και με την προσθήκη στην κυψελίδα δειγμάτων με 1,0 mL καταλάση (**Εικόνα 1.9, γράφημα b**). Και στις δύο περιπτώσεις, καταγράφηκε μηδενικό ή σχεδόν μηδενικό σήμα αποδεικνύοντας πως οι αισθητήρες παρουσιάζουν υψηλή εκλεκτικότητα ως προς το υπεροξείδιο του υδρογόνου.



Εικόνα 1.9. Χρονοαμπερομετρικά διαγράμματα για τον προσδιορισμό H_2O_2 σε δείγμα πράσινου τσαγιού, δείγμα 1. Τα γραφήματα *a* και *b* δείχνουν την απόκριση του αισθητήρα μετά από τρεις διαδοχικές προσθήκες των $25 \mu\text{molL}^{-1}$ ασκορβικού οξέος σε διάλυμα καθαρού ηλεκτρολύτη, και στο δείγμα με καταλάση, αντίστοιχα. Μέθοδος σταθερής προσθήκης (δείγμα +3 διαδοχικές προσθήκες των $50 \mu\text{molL}^{-1} H_2O_2$) μετά από χρόνο παραμονής (διάγραμμα *c*) 24 h, (διάγραμμα *d*) 48 h και (διάγραμμα *e*) 72 h. Το διάγραμμα *f* αναφέρεται σε 72 h -παλαιωμένο δείγμα μετά από εμβολιασμό

με $22,0 \mu\text{molL}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$. Οι μετρήσεις διεξήχθησαν στα $0,0 \text{ V}$ σε $0,1 \text{ molL}^{-1} \text{PBS pH } 7$ περιέχοντας $0,1 \text{ molL}^{-1} \text{KCl}$ παρουσία διαλυμένου οξυγόνου.

Η ικανότητα παραγωγής H_2O_2 σε εκχυλίσματα πράσινου και μαύρου τσαγιού, που οφείλεται στην οξείδωση των πολυφαινολών, μελετήθηκε στη συνέχεια σε παλαιωμένα δείγματα τσαγιού (24, 48 και 72 h) χρησιμοποιώντας τη μέθοδο σταθερής προσθήκης (**Εικόνα 1.9, γραφήματα c, d, e**). Κάθε δείγμα αναλύθηκε μετά από αραιώση 65 φορές προκειμένου να μειωθεί η πιθανή παρεμποδιστική δράση διάφορων αναγωγικών ενώσεων που υπάρχουν στα δείγματα. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον **Πίνακα 1.1**.

Η ακρίβεια της μεθόδου επαληθεύτηκε με πειράματα ανάκτησης που πραγματοποιήθηκαν σε παλαιωμένα δείγματα τσαγιού των 72 h με προσθήκη $22 \mu\text{molL}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ (**Εικόνα 1.9, γράφημα f**). Οι ανακτήσεις κυμαίνονται μεταξύ 97 και 104% (**Πίνακας 1.1**) και αποδεικνύουν την ορθή λειτουργία των ανεπτυγμένων αισθητήρων για τον προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε πραγματικά δείγματα παρουσία οξυγόνου.

Πίνακας 1.1. Μελέτη προσδιορισμού και ανάκτησης H₂O₂ σε διάφορα δείγματα από εκχυλίσματα τσαγιού μετά από αραιώση 65 φορές σε 0,1 molL⁻¹ PBS pH 7 περιέχοντας 0,1 molL⁻¹ KCl. Οι συγκεντρώσεις αναφέρονται στη συγκέντρωση H₂O₂ στην κυψελίδα μέτρησης.

Δείγμα	[H ₂ O ₂]			Ανάκτηση %
	μετά την παλαίωση των δειγμάτων 24h / 48h / 72h	Προστέθηκαν [H ₂ O ₂ , μmolL ⁻¹]	[H ₂ O ₂] που βρέθηκε	
Πράσινο τσάι, δείγμα 1	15.0 / 26.7 / 35.0	22.0	55.6	97.5
Πράσινο τσάι, δείγμα 2	13.9 / 23.3 / 23.8	22.0	47.5	103.7
Μαύρο τσάι	44.4 / 69.0 / 66.2	22.0	86.8	98.4

1.4 Συμπεράσματα

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφηκε η ανάπτυξη αισθητήρων από εκτυπωμένα ηλεκτρόδια γραφίτη τροποποιημένα με πολυαιθυλενιμίνη/RhNPs, για τον προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου παρουσία οξυγόνου. Σε σύγκριση με προηγούμενες μελέτες, τα τροποποιημένα με RhNPs ηλεκτρόδια που αναπτύχθηκαν παρουσιάζουν πολύ καλύτερη αναλυτική απόδοση όσον αφορά την ευαισθησία και την σταθερότητά τους. Επιπλέον, αποτελούν το πρώτο παράδειγμα αισθητήρων με νανοσωματίδια ροδίου για τον προσδιορισμό υπεροξειδίου του υδρογόνου σε πραγματικά δείγματα. Η επιτυχής εφαρμογή των αισθητήρων σε πραγματικά δείγματα σε συνδυασμό με την ευκολία και το χαμηλό κόστος κατασκευής τους, αποδεικνύουν την καταλληλότητά τους για αναλύσεις ρουτίνας. Επιπλέον, η δυνατότητα χρήσης τους παρουσία διαλυμένου οξυγόνου υπόσχεται πολλά για αναλύσεις υπεροξειδίου του υδρογόνου στο πεδίο (επιτόπια ανάλυση) σε φορητές ηλεκτροαναλυτικές συσκευές.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ahammad A.J.S., Hydrogen Peroxide Biosensors Based on Horseradish Peroxidase and Hemoglobin, *J Biosens Bioelectron* (2013).
- Akagawa M., Shigemitsu T., Suyama K., Production of hydrogen peroxide by polyphenols and polyphenol-rich beverages under quasi-physiological conditions, *Biosci Biotechnol Biochem* 67 (2003) 2632–2640.
- Chandra S., LokeshK.S., Nicolai A., Lang H., Dendrimer-rhodium nanoparticle modified glassy carbon electrode for amperometric detection of hydrogen peroxide, *Anal Chim Acta* 632 (2009) 63–68.
- Chen S., Yuan R., Chai Y., Hu F., Electrochemical sensing of hydrogen peroxide using metal nanoparticles : A review, *Microchim Acta* 180 (2013) 5-32.
- Chen W., Cai S., Ren Q.-Q., Wen W., Zhao Y.-D., Recent advances in electrochemical sensing for hydrogen peroxide: A review, *Analyst* 137 (2012) 49-58.
- Devan S., Subramanian V.R., White R.E., Analytical Solution for the Impedance of a Porous Electrode, *J Electrochem Soc* 151 (2004) A905–A913.
- Doria G., Conde J., Veigas B., Giestas L., Almeida C., Assuncao, J. Rosa, Baptista P.V., Noble Metal Nanoparticles for Biosensing Applications, *Sensors* 12 (2012) 1657–1687.
- Giannoudi L., Piletska E.V., Piletsky S.A., Development of Biosensors for the Detection of Hydrogen Peroxide in Biotechnological Applications of Photosynthetic Proteins : Biochips, Biosensors and Biodevices, Eds. M.T. Giardi, E.V. Piletska, *Landes Bioscience* 16 (2006).

- Gu Y., Chen C.C., Eliminating the Interference of Oxygen for Sensing Hydrogen Peroxide with the Polyaniline Modified Electrode, *Sensors* **8** (2008) 8237–8247.
- Hu G., Zhou Z., Guo Y., Hou H., Shao S., Electrospun rhodium nanoparticle-loaded carbon nanofibers for highly selective amperometric sensing of hydrazine, *Electrochem Commun* **12** (2010) 422–426.
- Jin C., Xia W., Nagaiah T.C., Guo J., Chen X., Li N., Bron M., Schuhmann W., Muhler M., Rh-Rh_{Sx} nanoparticles grafted on functionalized carbon nanotubes as catalyst for the oxygen reduction reaction, *Chem Mater* **20** (2010) 736–742.
- Karyakin A.A., Prussian blue and its analogues: Electrochemistry and analytical applications, *Electroanalysis* **13** (2001) 813-819.
- Kuhlmeier D., Sandetskaya N., Allelein S., Application of nanotechnology in miniaturized systems and its use in medical and food analysis, *Recent Patents Food Nutr Agric* **4** (2012) 187–199.
- Muench F., Neetzl C., Kaserer S., Brötz J., Jaud J.-C., Karger Z.Z., Lauterbach S., Kleebe H.-J., Rothac C., Ensinger W., Fabrication of porous rhodium nanotube catalysts by electroless plating, *Mater Chem* **22** (2012) 12784–12791.
- Lezi N., Kokkinos C., Economou A., Prodromidis M.I., Voltammetric determination of trace Tl(I) at disposable screen-printed electrodes modified with bismuth precursor compounds, *Sens Actuators B* **182** (2013) 718–724.
- Li G., Wang Y., Xu H., A hydrogen peroxide sensor prepared by electropolymerization of pyrrole based on screen-printed carbon paste electrodes, *Sensors* **7** (2007) 239-250.

- Pingarron J.M., Yanez-Sedeno P., Gonzalez-Cortes A., Gold nanoparticle based electrochemical biosensors, *Electrochim Acta* **53** (2008) 5848-5866.
- Raffa D., Leung K.T., Battaglini F., A microelectrochemical enzyme transistor based on an N-alkylated poly(aniline) and its application to determine hydrogen peroxide at neutral pH, *Anal Chem* **75** (2003) 4983-4987.
- Ricci F., Palleschi G., Sensor and biosensor preparation, optimisation and applications of Prussian blue modified electrodes, *Biosens Bioelectron* **21** (2005) 389-407.
- Sathe B.R., Rhodium nanoparticle-carbon nanosphere hybrid material as an electrochemical hydrogen sensor, *RSC Adv* **3** (2013) 5361-5365.
- Siangproh W., Dungchai W., Rattanarat P., Chailapakul O., Nanoparticle based electrochemical detection in conventional and miniaturized systems and their bioanalytical applications : A review, *Anal Chim Acta* **690** (2011) 10-25.
- Song H., Ni Y., Kokot S., A novel electrochemical biosensor based on the hemin-graphenenano-sheets and gold nano-particles hybrid film for the analysis of hydrogen peroxide, *Anal Chim Acta* **788** (2013) 24-31.
- Sun N., Guan L., Shi Z., Li N., Gu Z., Zhu Z., Li M., Shao Y., Ferrocene Peapod Modified Electrodes: Preparation, Characterization, and Mediation of H₂O₂, *Anal Chem* **78** (2006) 6050-6057.
- Tabet-Aoul A., Mohamedi M., Rhodium thin film-carbon nanotube nanostructures: Synthesis, characterization and electron transfer properties, *Thin Solid Films* **534** (2013) 270-274.
- Wang T., Zhu H., Zhuo J., Zhu Z., Papakonstantinou P., Lubarsky G., Lin J., Li M., Biosensor Based on Ultrasmall MoS₂ Nanoparticles for Electrochemical Detection

of H₂O₂ Released by Cells at the Nanomolar Level, *Anal Chem* 85 (2013) 10289_10295.

Xu J., Wu X., Fu G., Liu X., Chen Y., Zhou Y., Tang Y., Lu T., Fabrication of phosphonate functionalized platinum nanoclusters and their application in hydrogen peroxide sensing in the presence of oxygen, *Electrochim Acta* 80 (2012) 233–239.

Xu Q., Linke U., Bujak R., Wandlowski T., Preparation and electrochemical characterization of low-index rhodium single crystal electrodes in sulfuric acid, *Electrochim Acta* 54 (2009) 5509–5521.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΕ ΦΥΤΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΤΙΣ ΦΑΣΜΑΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΧΡΩΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΤΩΝ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΤΟΥ ΡΟΔΙΟΥ

Περίληψη

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφεται μία νέα μέθοδος προσδιορισμού των φαινολικών ενώσεων, η οποία βασίζεται στην αλληλεπίδρασή τους με τα νανοσωματίδια ροδίου. Η μέθοδος βασίζεται στην παρατήρηση ότι οι φαινολικές ενώσεις (π.χ. κατεχίνες, γαλλικό οξύ, κινναμωμικό και διυδροβενζοϊκό οξύ) προκαλούν αλλαγές στο μέγεθος των νανοσωματιδίων ροδίου μεταβάλλοντας τον τοπικό συντονισμό επιφανειακών πλασμονίων, και ως εκ τούτου προκαλούν φασματικές και χρωματικές μεταβολές των εναιωρημάτων των νανοσωματιδίων του ροδίου. Πιο συγκεκριμένα, η αλληλεπίδραση των νανοσωματιδίων του ροδίου με παράγωγα του διυδροξυβενζοϊκού και τριυδροβενζοϊκού οξέος προκαλούν νέες κορυφές απορρόφησης στα 350 nm και 450 nm ενώ η αλληλεπίδραση των νανοσωματιδίων του ροδίου με τα παράγωγα του τριυδροξυβενζοϊκού οξέος έχουν σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση μιας νέας κορυφής απορρόφησης στα 580 nm. Και οι δύο κορυφές απορρόφησης (στα 450 nm και 580 nm) αυξάνονται γραμμικά με την αύξηση της συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων για περιοχή συγκεντρώσεων 0-500 μM . Τα όρια ανίχνευσης που επιτεύχθηκαν ήταν σε επίπεδα μM , ανάλογα με την φαινολική ένωση, και με ικανοποιητική επαναληψιμότητα

(<7,3%). Με βάση αυτά τα δεδομένα, αναπτύχθηκαν δύο μεθοδολογίες για τον προσδιορισμό της ολικής περιεκτικότητας φαινολικών ενώσεων και της ολικής περιεκτικότητας σε κατεχίνες και εφαρμόστηκαν σε δείγματα τσαγιού. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν συσχετίζονται με άλλες κοινές μεθόδους (π.χ. Folin-Ciocalteu και μέθοδος συμπλοκοποίησης αργιλίου). Η διαπίστωση ότι τα νανοσωματίδια ροδίου μπορούν να αντιδράσουν με αναλύτες και να παρουσιάσουν μοναδικά φάσματα συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων με απορρόφηση στο ορατό φάσμα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας γίνεται για πρώτη φορά και μπορεί να αποτελέσει την βάση για την περαιτέρω ανάπτυξη νέων οπτικών αναλυτικών εφαρμογών καθώς και εφαρμογών ανίχνευσης.

2.1 Εισαγωγή

Τα νανοσωματίδια των ευγενών μετάλλων έχουν βρει πολλές εφαρμογές, λόγω των μοναδικών οπτικών, καταλυτικών και μηχανικών ιδιοτήτων τους [Rycenga M., et al., 2011, Saha K., et al., 2012, Rosi N.L., et al., 2005]. Μία από τις πιο χαρακτηριστικές ιδιότητές τους είναι η αλληλεπίδρασή τους με το φως, προκαλώντας αρμονική ταλάντωση των ελεύθερων ηλεκτρονίων των μετάλλων τοπικά γύρω από κάθε νανοσωματίδιο με μία συχνότητα γνωστή ως τοπικό συντονισμό επιφανειακών πλασμονίων (LSPR) [Ghosh S.K., et al., 2007, Murray W.A., et al., 2007]. Το φαινόμενο LSPR εξαρτάται από τον τύπο, το μέγεθος, το σχήμα των νανοσωματιδίων και καθορίζει τα φάσματα απορρόφησης των διαλυμάτων των νανοσωματιδίων [Ghosh S.K., et al., 2007, Murray W.A., et al., 2007, Kelly K.L., et al., 2003]. Για παράδειγμα, διαλύματα νανοσωματιδίων χρυσού (AuNPs) με διάμετρο 13 nm εμφανίζουν μέγιστη τιμή απορρόφησης στα 520 nm (συντελεστής απόσβεσης $2,7 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [Jin R., et al., 2003], ενώ διαλύματα AuNPs με διάμετρο 40 nm εμφανίζουν μέγιστη τιμή απορρόφησης στα 528 nm (συντελεστής απόσβεσης $7,66 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [Jain P.K., et al., 2006]. Λόγω των υψηλών συντελεστών απόσβεσης [Jain P.K., et al., 2006], τα νανοσωματίδια των ευγενών μετάλλων προσφέρουν έντονα φασματοσκοπικά σήματα τόσο στην υπεριώδη όσο και στην ορατή περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος ακτινοβολίας. Επομένως, μόρια ή ιόντα που μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τα νανοσωματίδια και να προκαλέσουν αλλαγές στις διαστάσεις τους (συνήθως μέσω συσσωμάτωσης) προκαλούν έντονες φασματοσκοπικές μεταβολές στα εναιωρήματα των νανοσωματιδίων. Αυτές οι μεταβολές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την έμμεση ανίχνευση και τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης ενός αναλύτη.

Μεταξύ των διάφορων ειδών νανοσωματιδίων ευγενών μετάλλων, τα νανοσωματίδια του χρυσού και του αργύρου (AgNPs) είναι αυτά που χρησιμοποιούνται πιο συχνά για χημικές και βιοχημικές αναλύσεις. Για παράδειγμα, πολλοί έχουν χρησιμοποιήσει τις μεταβολές στις οπτικές ιδιότητες των AuNPs και AgNPs για την ανίχνευση κλινικών και βιοϊατρικών δεικτών [Saha K., et al., 2012, Rosi N.L., et al., 2005, Vilela D., et al., 2012], περιβαλλοντικών ρύπων [Karakoglou N.I., et al., 2009, Giannoulis K.M., et al., 2014, Kappi F.A., et al., 2014], εκρηκτικών [He Y., et al., 2015], κτλ. Πρόσφατα, πολλές δημοσιεύσεις επικεντρώνονται στην χρήση νανοσωματιδίων για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας φαινολικών ενώσεων και των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων των φυσικών προϊόντων με βάση την ισχυρή οξειδοαναγωγική δράση των φυσικών προϊόντων σε ευγενή μέταλλα και στα νανοσωματίδιά τους [Özyürek M., et al., 2012, Warriner K., et al., 2014, Vilela D., et al., Choleva T.G., et al., 2015, Vilela D., et al., 2012, Vilela D., et al., 2014].

Εκτός από τα νανοσωματίδια χρυσού και αργύρου, άλλα μεταλλικά νανοσωματίδια όπως του δημητρίου, του πυριτίου και της πλατίνας έχουν χρησιμοποιηθεί ως οπτικοί ανιχνευτές για τον προσδιορισμό αντιοξειδωτικών σε τρόφιμα [Sharpe E., et al., 2013], εκρηκτικών [Idros N., et al., 2015], και βιομακρομορίων [Gao Z., et al., 2013]. Τα νανοσωματίδια ροδίου (RhNPs) έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για αναλυτικούς σκοπούς αλλά μόνο ως ηλεκτροκαταλύτες για τον προσδιορισμό υπεροξειδίου του υδρογόνου [Chandra S., et al., 2009, Gatselou V.A., et al., 2015] και υδρογόνου [Sathe B.R., 2013]. Αντίθετα, μεταβολές στις LSPR ιδιότητες των RhNPs δεν έχουν χρησιμοποιηθεί για τον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό κάποιου αναλύτη.

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφονται οι αλληλεπιδράσεις των νανοσωματιδίων ροδίου με επικάλυψη κιτρικών ιόντων (RhNPs@CA) με τις φαινολικές ενώσεις (όπως κατεχίνη, γαλλικό οξύ, κινναμωμικό και διυδροξυβενζοϊκό οξύ) οι οποίες προκαλούν μεταβολές στο μέγεθος των RhNPs που έχουν σαν αποτέλεσμα φασματικές και χρωματικές μεταβολές στα εναιωρήματα των νανοσωματιδίων ροδίου. Ειδικότερα, δυο νέες κορυφές απορρόφησης στα 350 nm και 450 nm παρατηρήθηκαν όταν τα RhNPs αντιδρούν με τις φαινολικές ενώσεις όπως τα παράγωγα του διυδροξυβενζοϊκού και τριυδροξυβενζοϊκού οξέος. Με βάση την παρατήρηση αυτή αναπτύχθηκαν δύο φωτομετρικές μέθοδοι βασισμένες στα νανοσωματίδια ροδίου για τον προσδιορισμό της ολικής περιεκτικότητας φαινολικών ενώσεων όπως και των κατεχινών σε δείγματα τσαγιού. Το σύνολο των φαινολικών ενώσεων και των κατεχινών των φυσικών προϊόντων συχνά χρησιμοποιείται ως δείκτης ποιότητας σε διάφορα φυσικά δείγματα όπως κρασί, τσάι, βρώσιμα έλαια κλπ. [Frankel E.N., et al., 2000, Apak R., et al., 2007, Christodouleas D., et al., 2009, Giokas D.L., et al., 2007]. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν χρησιμοποιώντας φωτομετρικές μεθόδους με βάση τα RhNPs παρουσίασαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με αυτά που παρατηρήθηκαν από κοινές ανεπτυγμένες μεθόδους (π.χ., Folin-Ciocalteu και μέθοδος συμπλοκοποίησης αργιλίου). Αυτή η συσχέτιση δείχνει ότι οι φωτομετρικές μέθοδοι που βασίζονται στα RhNPs μπορεί να χρησιμοποιηθούν ανεξάρτητα ή σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους για την πληρέστερη αξιολόγηση της σύστασης και της ποιότητας των τροφίμων. Επίσης, η διαπίστωση ότι τα RhNPs μπορούν να παρουσιάζουν μοναδικές LSPR ζώνες στην ορατή περιοχή, προσφέρει νέες ευκαιρίες για την ανάπτυξη νέων οπτικών ανιχνευτών για αναλυτικούς σκοπούς.

2.2 Πειραματικό μέρος

2.2.1 Αντιδραστήρια

Όλα τα αντιδραστήρια ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας. Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu, το ασκορβικό οξύ, η φρουκτόζη, το $\text{RhCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ και το NaNO_2 ελήφθησαν από τη Merck-Millipore. Το κινναμωμικό οξύ (CA), το ο-κουμαρικό οξύ (CO), η (+)-κατεχίνη (CAT), το καφεϊκό οξύ (CAF), η επιγαλλοκατεχίνη (ECG), το ταννικό οξύ (TA), ο προπυλικός εστέρας γαλλικού οξέος (PG) και το τετρα-βουτυλ-κινναμωμικό οξύ (t-BC) αγοράστηκαν από τη Sigma-Aldrich. Μονοένυδρο γαλλικό οξύ (GA), βανιλλικό οξύ (VA) και κιτρικό νάτριο αγοράστηκαν από τη Fluka. Εμπορικά συσκευασμένα δείγματα τσαγιού και φυσικά αφεψήματα αγοράστηκαν από τοπικά καταστήματα. Ποσότητα 0,5 g εκχυλίστηκε σε θερμό απεσταγμένο νερό (20 mL) στους $90-95^\circ\text{C}$ για 10 λεπτά. Όλα τα δείγματα διηθήθηκαν μέσω απλού φίλτρου (0,45 μm μέγεθος πόρων) και αραιώθηκαν 10 φορές πριν από την ανάλυση.

2.2.2 Εξοπλισμός

Τα φάσματα UV-Vis καταγράφηκαν σε ένα φασματοφωτόμετρο Jenway 6405 UV/Vis χρησιμοποιώντας κυψελίδες χαλαζία με 1 cm μήκος οπτικής διαδρομής. Εικόνες μικροσκοπίας ατομικής δύναμης (AFM) ελήφθησαν με ένα νανοσκόπιο 3D χρησιμοποιώντας μικροδοκίδα πυριτίου Tap-300G με ακροφύσιο ακτίνας <10 nm και σταθερή δύναμη $\approx 20-75$ Nm^{-1} . Δείγματα των αραιωμένων υδατικών διαλυμάτων τοποθετήθηκαν πάνω σε λεπτούς κυκλικούς δίσκους πυριτίου (P/Boi, στιλβωτικός από την μία πλευρά) με εναπόθεση σταγόνας του δείγματος. Οι μετρήσεις δυναμικής

σκέδασης φωτός (DLS) διεξήχθησαν σε διάταξη Malvern Zetasizer Nano ZS, με κόκκινο λέιζερ στους 25°C. Πληροφορίες σχετικά με τη στοιχειακή σύνθεση καθώς και τη χημική κατάσταση της επιφάνειας των RhNPs ελήφθησαν με φωτοηλεκτρονιακή φασματομετρία ακτίνων-X (X-ray photoelectron spectroscopy, XPS). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας μονοχρωματική πηγή ακτίνων X ($h\nu=1486.6$ eV) Al-Mg, με ενέργεια 0,8 eV και πίεση κατά τη διάρκεια της μέτρησης 2×10^{-10} mbar. Τα δείγματα μετρήθηκαν με χρήση ενός λεπτού κυκλικού δίσκου υπερκάθαρου ημιαγωγού πυριτίου (silicon wafer), το οποίο χρησιμοποιείται σαν στοιχείο αναφοράς (Si 2p). Η μέτρηση των εμβαδών των κορυφών φωτοεκπομπής κάθε στοιχείου, που χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της ποσότητας του κάθε είδους στην επιφάνεια, πραγματοποιήθηκαν με κανονικοποίηση των παραγόντων ευαισθησίας του κάθε στοιχείου.

2.2.3 Σύνθεση νανοσωματιδίων ροδίου με επικάλυψη κιτρικών ιόντων (RhNPs@CA)

Συνθέσαμε νανοσωματίδια ροδίου με επικάλυψη κιτρικών ιόντων ως εξής [Papp S., et al., 2004] : Ισομοριακές ποσότητες $\text{RhCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ και κιτρικού τρινατρίου (0,5 mL, 10,0 mM) προστέθηκαν υπό ανάδευση σε 18,5 mL δις απεσταγμένο νερό και αναδεύτηκαν για 5 λεπτά. Στη συνέχεια προστέθηκαν 2,5 mM NaBH_4 (0,5 mL, 0,10 M). Η ανάδευση συνεχίστηκε για άλλα 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το εναιώρημα των νανοσωματιδίων ροδίου με επικάλυψη κιτρικών ιόντων είχε ένα σκούρο πράσινο-καφέ χρώμα και αποθηκεύτηκε σε συνθήκες περιβάλλοντος.

2.2.4 Σύνθεση νανοσωματιδίων ροδίου τροποποιημένα με γαλλικό οξύ

Συνθέσαμε νανοσωματίδια ροδίου τροποποιημένα με γαλλικό οξύ με ανάμιξη 1850 μL νανοσωματιδίων ροδίου με επικάλυψη κιτρικών ιόντων και 50 μL 18,5 mM υδατικού διαλύματος γαλλικού οξέος υπό ανάδευση για 10 λεπτά. Η τελική συγκέντρωση του γαλλικού οξέος στο διάλυμα ήταν ίση με 0,25 mM.

2.2.5 Ανάλυση της ολικής περιεκτικότητας φαινολικών ενώσεων σε δείγματα τσαγιού

Προσδιορίσαμε την ολική περιεκτικότητα φαινολικών ενώσεων (Total Phenolic Content, TPC) των δειγμάτων τσαγιού προσθέτοντας 100 μL ενός αραιού υδατικού εκχυλίσματος τσαγιού σε 1900 μL εναιωρήματος νανοσωματιδίων ροδίου με επικάλυψη κιτρικών ιόντων. Το μίγμα επώαστηκε για 25 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και η αύξηση της κορυφής απορρόφησης στα 450 nm μετρήθηκε και συσχετίστηκε με την ολική περιεκτικότητα φαινολικών ενώσεων στα δείγματα τσαγιού. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σαν συγκέντρωση ισοδύναμου γαλλικού οξέος (GAE).

2.2.6 Ανάλυση της ολικής περιεκτικότητας κατεχίνης σε δείγματα τσαγιού

Προσδιορίσαμε την ολική περιεκτικότητα σε κατεχίνες (Total Catechine Content, TCC) σε δείγματα τσαγιού προσθέτοντας 100 μL αραιού υδατικού εκχυλίσματος τσαγιού σε 1900 μL εναιωρήματος νανοσωματιδίων ροδίου τροποποιημένα με γαλλικό οξύ. Το μίγμα επώαστηκε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και η μείωση της κορυφής απορρόφησης στα 580 nm συσχετίστηκε με την ολική περιεκτικότητα κατεχίνης στα

δείγματα τσαγιού. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σαν ισοδύναμη συγκέντρωση κατεχίνης (CE).

2.2.7 Προσδιορισμός ολικών φαινολικών ενώσεων (Μέθοδος Folin-Ciocalteu)

Προσδιορίσαμε την ολική περιεκτικότητα φαινολικών ενώσεων (Total Phenolic Content, TPC) σε δείγματα τσαγιού με την μέθοδο Folin-Ciocalteu [Tsogas G.Z., et al., 2010]. Αναμίξαμε ένα αραιό υδατικό εκχύλισμα τσαγιού (όγκου 50-200 μL ανάλογα με τη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων στο δείγμα) με 0,8 mL Na_2CO_3 (7,5% w/v), και 1 mL 5% w/v από το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu. Το διάλυμα αραιώθηκε σε τελικό όγκο 5 mL και επώαστηκε στο σκοτάδι για 40 λεπτά. Η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων μετρήθηκε με βάση την αύξηση της κορυφής απορρόφησης στα 765 nm και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος (GAE).

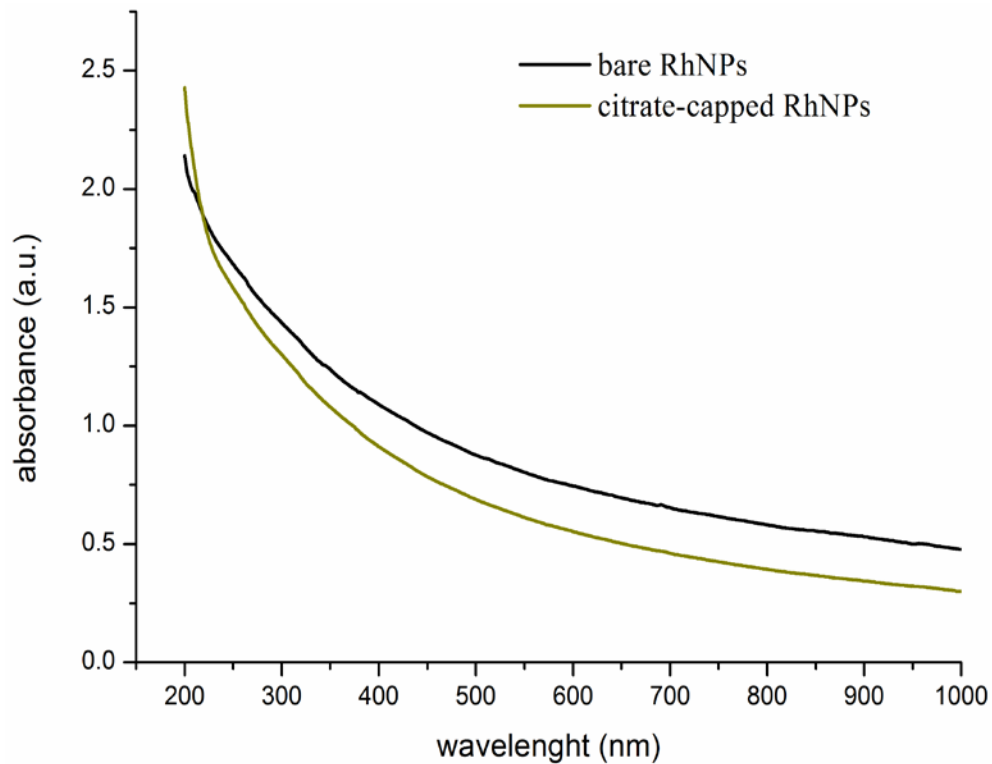
2.2.8 Μέθοδος συμπλοκοποίησης αργιλίου

Προσδιορίσαμε την ολική περιεκτικότητα σε κατεχίνες (TCC) στα δείγματα τσαγιού με την μέθοδο συμπλοκοποίησης του αργιλίου [Tsogas G.Z., et al., 2010]. Αραιώσαμε ένα υδατικό εκχύλισμα τσαγιού (όγκου 50-200 μL ανάλογα με τη συγκέντρωση των ολικών κατεχινών στο δείγμα) σε 1,775 mL απεσταγμένου νερού και προστέθηκαν 75 μL 5% NaNO_2 . Το διάλυμα επώαστηκε στο σκοτάδι για 6 λεπτά, και ύστερα προστέθηκαν 150 μL 10% w/v AlCl_3 . Αραιώσαμε το διάλυμα σε τελικό όγκο 5 mL και το μίγμα επώαστηκε στο σκοτάδι για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, προσθέσαμε 0,5 mL 1 M NaOH και αμέσως μετρήθηκε η κορυφή απορρόφησης στα 510 nm. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σαν ισοδύναμη συγκέντρωση κατεχίνης (CE).

2.3 Αποτελέσματα

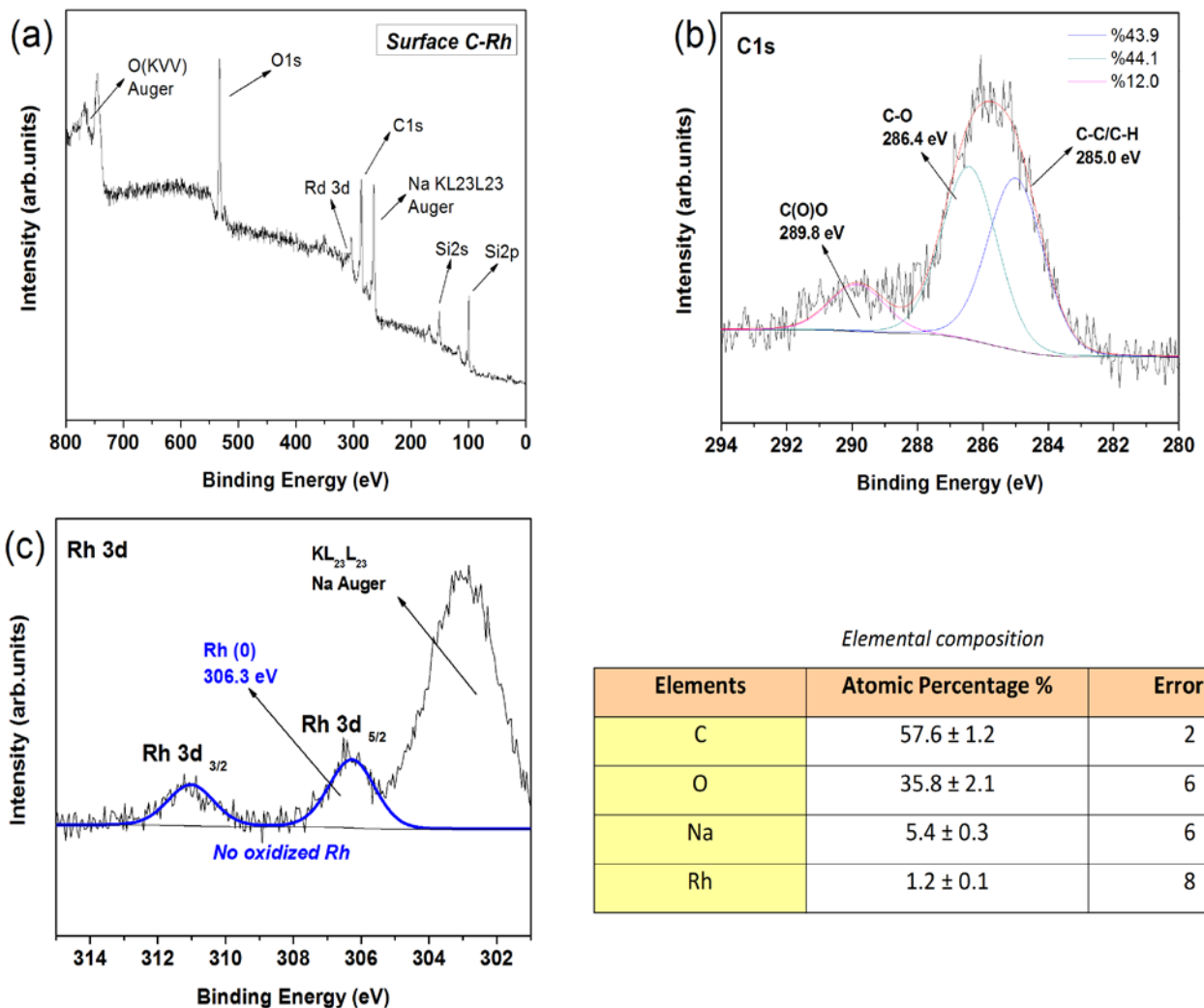
2.3.1 Χαρακτηρισμός RhNPs με επικάλυψη κιτρικών ιόντων (RhNPs@CA)

Το εναιώρημα των RhNPs χωρίς επικάλυψη κιτρικών ιόντων (που παρασκευάζονται μέσω αναγωγής του RhCl_3 με NaBH_4 χωρίς τη χρήση κιτρικών ιόντων) είχε ένα σκούρο καφέ-μαύρο χρώμα και παρουσίαζε αρκετά διευρυμένες ζώνες απορρόφησης στην υπεριώδη περιοχή κοντά στα 200 nm και ένα συνεχές μοτίβο απορρόφησης στην ορατή περιοχή (**Εικόνα 2.1**) [Papp S., et al., 1991].



Εικόνα 2.1. UV-Vis φάσματα των RhNPs χωρίς επικάλυψη κιτρικών ιόντων (μαύρη γραμμή) και των RhNPs@CA (πράσινη γραμμή) παρασκευάστηκαν κάτω από τις ίδιες πειραματικές συνθήκες και τα ίδια αντιδραστήρια.

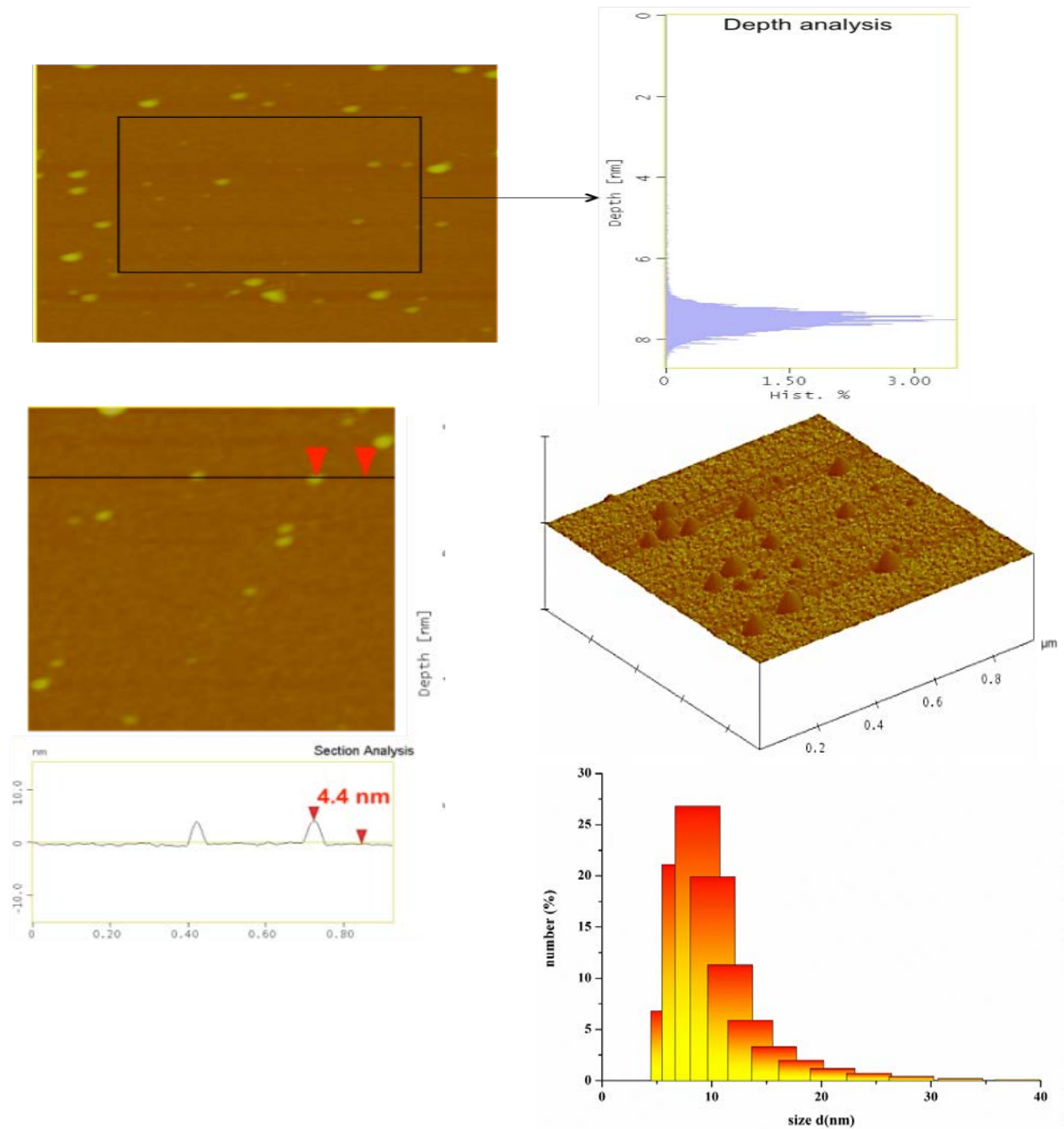
Όταν στο αρχικό διάλυμα προστέθηκαν τα κιτρικά ιόντα (πριν την προσθήκη του αναγωγικού αντιδραστηρίου) το χρώμα του εναιωρήματος των RhNPs μετατράπηκε σε σκούρο πράσινο-καφέ υποδεικνύοντας, σύμφωνα με την βιβλιογραφία, τον σχηματισμό RhNPs@CA με μικρότερες διαστάσεις σε σύγκριση με τα RhNPs χωρίς την επικάλυψη κιτρικών ιόντων [Hei H., et al., 2012]. Η προσρόφηση των κιτρικών ιόντων στην επιφάνεια των RhNPs επιβεβαιώθηκε και πειραματικά μέσω ανάλυσης XPS (Εικόνα 2.2).



Εικόνα 2.2. XPS ανάλυση και στοιχειακή σύνθεση των RhNPs@CA (a) φάσμα XPS (b) φάσμα φωτοηλεκτρονίων C1s (c) φάσμα φωτοηλεκτρονίων ροδίου 3d.

Τα αποτελέσματα της XPS ανάλυσης (**Εικόνα 2.2α**) αποδεικνύουν την παρουσία διαφόρων στοιχείων όπως άνθρακα, οξυγόνου, ροδίου και νατρίου. Το φάσμα φωτοηλεκτρονίων *C1s* (**Εικόνα 2.2β**) δείχνει ότι η *C1s* γραμμή παρουσιάζει συνεισφορά στα 285,0, 286,4 και 289,8 eV. Η κορυφή στα 285,0 eV προέρχεται από τους δεσμούς άνθρακα-άνθρακα και άνθρακα-υδρογόνου και αντιπροσωπεύει το 43,9% της ολικής έντασης άνθρακα. Η δεύτερη κορυφή στα 286,4 eV αποδίδεται σε δεσμούς C-O και κατέχει το 44,1% της συνολικής ποσότητας άνθρακα. Τέλος, το συστατικό στα 289,8 eV αποδίδεται σε καρβοξυλομάδες και αντιπροσωπεύει το 12,0% του συνόλου φασμάτων άνθρακα. Η παρουσία όλων αυτών των ομάδων οξυγόνου υποδηλώνει την συνύπαρξη καθαρού και οξειδωμένου άνθρακα. Από το φάσμα φωτοηλεκτρονίων ροδίου 3d (**Εικόνα 2.2ε**) παρατηρούμε σαφώς την παρουσία νανοσωματιδίων ροδίου ενώ δεν υπάρχουν καθόλου ιόντα Rh^{+3} ή Rh^{+} , υποδηλώνοντας την πλήρη αναγωγή του ροδίου.

Προηγούμενες μελέτες αποδίδουν τον σχηματισμό μικρότερων RhNPs στα κιτρικά ιόντα που μπορούν να σχηματίσουν ένα πυκνό στρώμα προσρόφησης σε ορισμένα σημεία των RhNPs εμποδίζοντας την πρόσβαση πρόσθετων ιόντων Rh^{3+} και εμποδίζοντας την περαιτέρω ανάπτυξη των RhNPs [Grass M.E., et al., 2009, Li Y., et al., 2012]. Η ανάλυση των RhNPs@CA χρησιμοποιώντας AFM επιβεβαίωσε τον σχηματισμό νανοσωματιδίων μικρού μεγέθους (<10 nm) ενώ έδειξε ότι τα νανοσωματίδια ήταν σχετικά ομοιόμορφα χωρίς να συσσωματώνονται (**Εικόνα 2.3**).



Εικόνα 2.3. AFM εικόνες (ανάλυση βάθους, προφίλ διατομής και 3D εικόνα) και DLS ανάλυση μεγέθους των RhNPs@CA (κάτω δεξιά). Με βάση την ανάλυση της διατομής το μέγεθος των σωματιδίων κυμαίνονταν μεταξύ 3,5 και 8,0 nm με μέσο μέγεθος τα 7,2 nm (προφίλ ανάλυσης βάθους), ενώ πειράματα DLS υπολόγισαν τη μέση υδροδυναμική διάμετρο των σωματιδίων ίση με 8,7 nm.

Πέρα από τον ρόλο τους ως ρυθμιστές της μορφολογίας και του μεγέθους των RhNPs, τα κιτρικά ιόντα μπορούν επίσης να σταθεροποιήσουν τα νανοσωματίδια και να αποτρέψουν τη συσσωμάτωσή τους κυρίως μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων άπωσης (coulombic interactions) [Jin C., et al., 2010, Yan N., et al., 2011]. Προηγούμενα πειραματικά στοιχεία δείχνουν ότι οι καρβοξυλικές ομάδες ασθενώς συντεταγμένες στην επιφάνεια των RhNPs σχηματίζουν μια ηλεκτρική διπλοστιβάδα που βοηθά στην πρόληψη της συσσωμάτωσης μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων άπωσης [Jin C., et al., 2010, Yan N., et al., 2011].

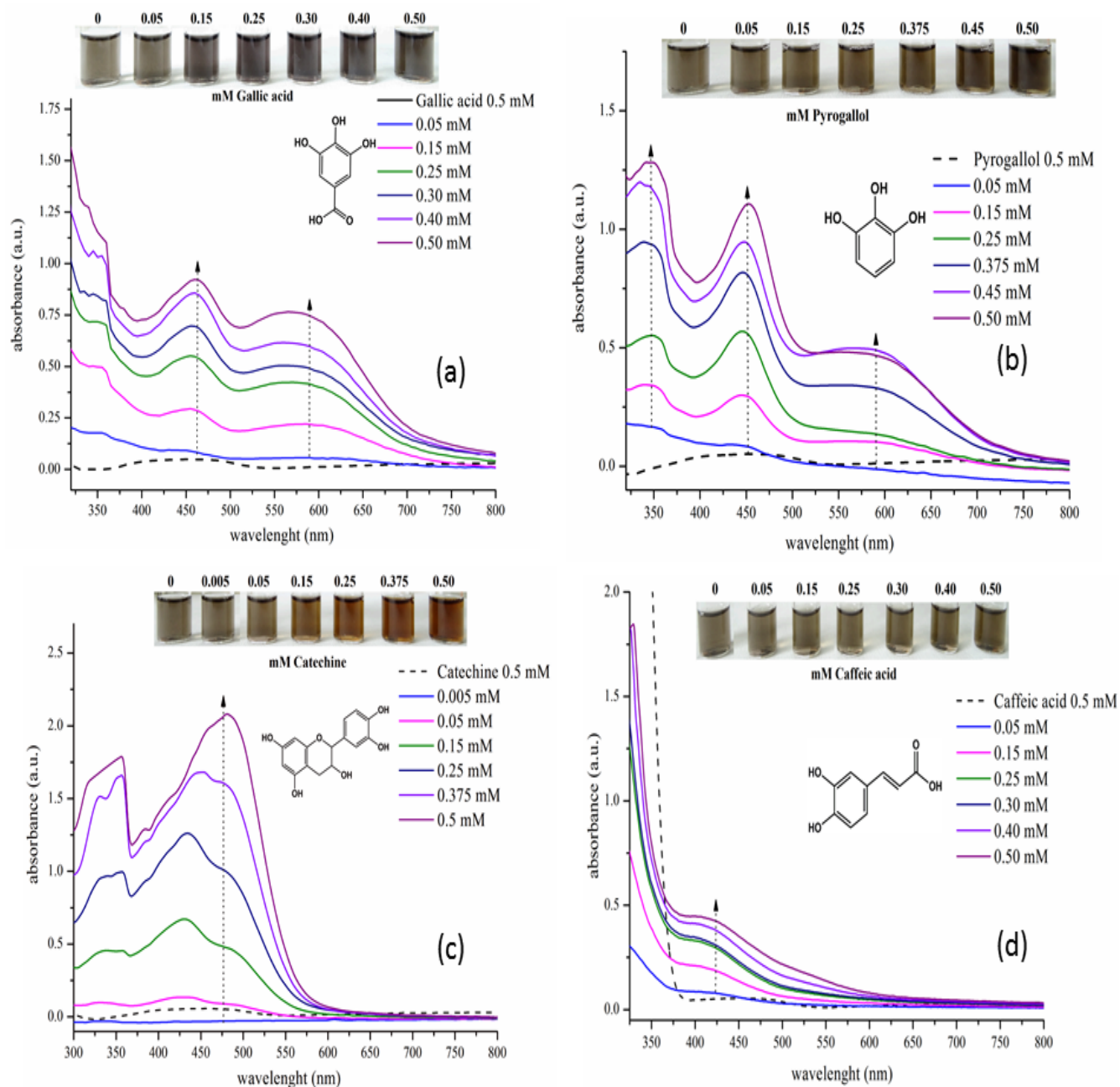
Για την επαλήθευση του ρόλου των κιτρικών ιόντων ως σταθεροποιητικό παράγοντα, συγκρίναμε τα φάσματα απορρόφησης των RhNPs@CA και των RhNPs χωρίς επικάλυψη κιτρικών ιόντων για χρονικό διάστημα 3 εβδομάδων. Το σήμα απορρόφησης των RhNPs@CA παρέμεινε ουσιαστικά αμετάβλητο. Από την άλλη πλευρά, τα RhNPs χωρίς επικάλυψη κιτρικών ιόντων σταδιακά συσσωματώθηκαν όπως αποδεικνύεται από τη μείωση της έντασης απορρόφησης σε όλο το UV-Vis φάσμα και την εμφάνιση σκούρου ιζήματος.

2.3.2 Αλληλεπιδράσεις των RhNPs με επικάλυψη κιτρικών ιόντων με φαινολικές ενώσεις

Τα RhNPs θεωρούνται γενικά αδρανή, επειδή το ρόδιο είναι ένα αδρανές μέταλλο. Σε αυτή τη μελέτη, όμως, παρατηρήσαμε ότι τα RhNPs@CA μπορούν να αντιδράσουν με διάφορες φαινολικές ενώσεις και να προκαλέσουν αλλαγές στα φάσματα απορρόφησης τους. Για να διευκρινιστεί ο μηχανισμός αυτών των αντιδράσεων, μελετήσαμε τα UV-Vis φάσματα απορρόφησης μιας σειράς από εναιωρήματα

RhNPs@CA παρουσία διαφόρων φαινολικών ενώσεων και άλλων αντιοξειδωτικών ουσιών (π.χ. θειόλες, ασκορβικό οξύ) με διαφορετικά δομικά χαρακτηριστικά και λειτουργικές ομάδες. Όλες οι ενώσεις μελετήθηκαν σε εύρος συγκεντρώσεων που καλύπτει μία τάξη μεγέθους (5×10^{-5} M – 5×10^{-4} M) για να εξασφαλιστεί ότι θα αναδειχθούν τόσο οι ασθενείς όσο και οι ισχυρές αλληλεπιδράσεις.

Τα παράγωγα του τριυδροξυβενζοϊκού οξέος όπως το γαλλικό οξύ και η πυρογαλλόλη παρατηρήθηκε ότι προκαλούν μία μοναδική οπτική χρωματική μεταβολή στα εναιωρήματα των RhNPs@CA από σκούρο πράσινο-καφέ σε μπλε ενώ εμφανίζονται ζώνες απορρόφησης στα 350, 450 και 575-580 nm (**Εικόνα 2.4a, b**).



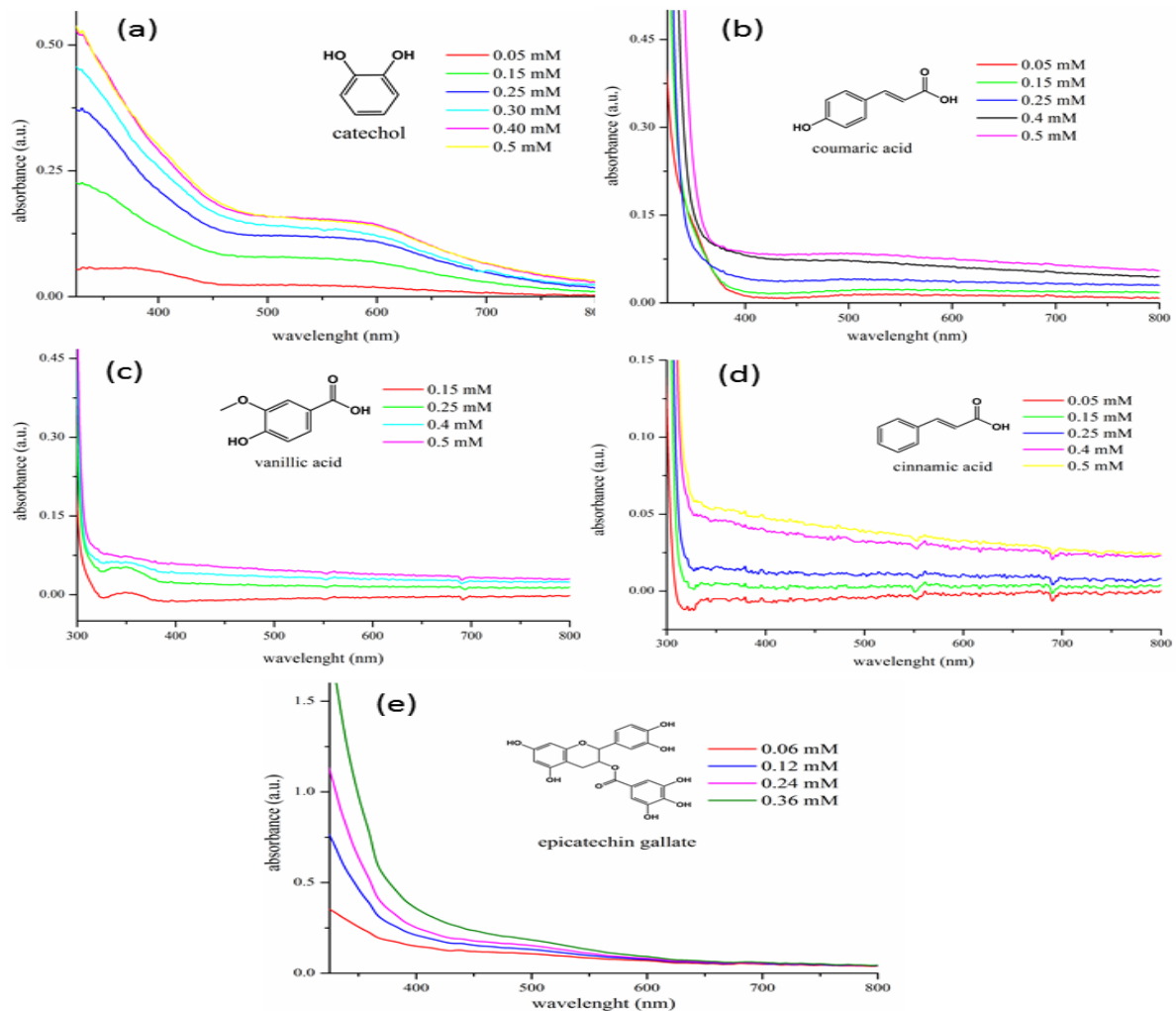
Εικόνα 2.4. Κανονικοποιημένα φάσματα UV-Vis και φωτογραφική απεικόνιση των χρωματικών μεταβολών των RhNPs@CA παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων (a) γαλλικού οξέος, (b) πυρογαλλόλης, (c) κατεχίνης και (d) καφεϊκού οξέος. Οι φασματικές γραμμές έχουν κανονικοποιηθεί με "τυφλό" (RhNPs@CA χωρίς φαινολικές ενώσεις). Οι διακεκομμένες γραμμές δείχνουν τα φάσματα απορρόφησης των φαινολικών ενώσεων σε υδατικό διάλυμα σε συγκέντρωση 0,5 mM.



Μεγέθυνση ένθετων της Εικόνας 2.4. Μεγεθυμένες φωτογραφίες εναιωρημάτων RhNPs που περιέχουν αυξανόμενες συγκεντρώσεις (0-0,5 mM) από διάφορες πολυφαινόλες.

Από την άλλη πλευρά τα παράγωγα του διυδροξυβενζοϊκού οξέος, όπως η κατεχίνη και το καφεϊκό οξύ, που φέρουν μία αρωματική γειτονική διόλη, προκάλεσαν την εμφάνιση ζωνών απορρόφησης στα 350 και 425-450 nm (**Εικόνα 2.4c, d**) που συνοδεύονται από την εμφάνιση πορτοκαλί χρωματισμού. Αυτός ο χρωματισμός είναι εμφανής δια γυμνού οφθαλμού ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις κατεχίνης (< 0.1 mM). Άλλες φαινολικές ενώσεις όπως το κουμαρικό οξύ, το βανιλλικό οξύ, το κινναμωμικό οξύ, η επιγαλλοκατεχίνη και η κατεχόλη προκάλεσαν ένα μικρό αλλά

μετρήσιμο σήμα απορρόφησης του εναιωρήματος των RhNPs@CA σε όλη την περιοχή του φάσματος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας χωρίς όμως να παρατηρηθεί κάποια μεταβολή στο χρώμα ή να παρουσιαστούν νέες ζώνες απορρόφησης (Εικόνα 2.5). Η κατεχόλη, ωστόσο, προκάλεσε μία πολύ ασθενή ζώνη απορρόφησης στα 580 nm.



Εικόνα 2.5. Κανονικοποιημένες UV-Vis φασματοσκοπικές και χρωματικές μεταβολές των RhNPs παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων διάφορων πολυφαινολών (a) κατεχόλη, (b) κουμαρικό οξύ, (c) βανιλλικό οξύ, (d) κινναμωμικό οξύ, (e) επιγαλλοκατεχίνη. Οι φασματικές γραμμές έχουν κανονικοποιηθεί με βάση το "τυφλό" (CA-RhNPs).

Το ασκορβικό οξύ, η φρουκτόζη, η ρεζορκινόλη, οι κοινές θειόλες, όπως η κυστεΐνη και η γλουταθειόνη καθώς και τα αμινοξέα (π.χ. γλουταμίνη, ασπαρτικό οξύ, γλυκίνη, ιστιδίνη, βαλίνη, ασπαραγίνη, γλουταμικό οξύ) δεν είχαν καμία επίδραση στην απορρόφηση των RhNPs@CA σε συγκεντρώσεις μέχρι 1,2 mM, που ήταν και το μέγιστο επίπεδο συγκέντρωσης που μελετήθηκε. Η έλλειψη επίδρασης των αμινοξέων και των αμινο-θειολών μπορεί να αποδοθεί στην ασθενή επίδραση μεταξύ των αμινο-ομάδων και των RhNPs [Zhu H., et al., 2014] και της διάσπασης των θειολών μέσω της καταλυτικής δράσης των RhNPs σε θερμοκρασία δωματίου [Gohda S., et al., 2008].

Για να μελετήσουμε την έκταση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των RhNPs@CA και των φαινολικών ενώσεων παρασκευάσαμε καμπύλες αναφοράς των τιμών απορρόφησης στα 450 nm και υπολογίστηκε η ισοδύναμη συγκέντρωση γαλλικού οξέος (GAE). Οι τιμές GAE υπολογίστηκαν διαιρώντας την κλίση της καμπύλης αναφοράς της κάθε ένωσης με εκείνη του γαλλικού οξέος [Özyürek M., et al., 2012, Choleva T.G., et al., 2015, Christodouleas D., et al., 2009, Giokas D.L., et al., 2007]. Οι ενώσεις που μελετήθηκαν κατατάχθηκαν ως εξής : κατεχίνη (GAE=2.1) > πυρογαλλόλη (GAE=1,11) > γαλλικό οξύ (GAE=1,00) > καφεϊκό οξύ (GAE=0.38) > επιγαλλοκατεχίνη (GAE=0.30) > κατεχόλη (GAE=0,24) > κουμαρικό οξύ (GAE=0.08) > βανιλλικό οξύ (GAE=0,053) > κινναμωμικό οξύ (GAE=0,052). Με εξαίρεση την επιγαλλοκατεχίνη, αυτή η κατάταξη φαίνεται να σχετίζεται με την παρουσία διαδοχικών ορθο-OH ομάδων στον φαινολικό δακτύλιο των ενώσεων. Πιστεύουμε ότι η επιγαλλοκατεχίνη (**Εικόνα 2.5**) είχε πολύ ασθενέστερη δράση από το γαλλικό οξύ, την πυρογαλλόλη και την κατεχίνη λόγω φαινομένων στερεοχημικής παρεμπόδισης στην επιφάνεια των πολύ μικρών σε μέγεθος RhNPs (<10 nm). Παρόμοιες παρατηρήσεις εξάλλου έχουν γίνει και για άλλα

νανοσωματίδια όπως του αργύρου [Özyürek M., et al., 2012]. Για να ελέγξουμε την εγκυρότητα αυτής της υπόθεσης, μελετήσαμε την απόκριση των RhNPs@CA με αυξανόμενες συγκεντρώσεις ταννικού οξέος. Το ταννικό οξύ είναι πολύ μεγαλύτερο από την επιγαλλοκατεχίνη και περιλαμβάνει πολλαπλές τρι-υδροξυβενζοϊκές ομάδες καθώς και ομάδες γειτονικών διολών στη δομή του. Η απορρόφηση του εναιωρήματος των RhNPs@CA που περιείχε ταννικό οξύ ήταν ασθενέστερη από την απορρόφηση του εναιωρήματος των RhNPs@CA που περιείχε επιγαλλοκατεχίνη, επιβεβαιώνοντας την επίδραση των χωρικών παρεμποδίσεων.

Από τα αποτελέσματα αυτά συμπεράναμε επίσης ότι η ύπαρξη των καρβοξυλικών ομάδων που είναι συνδεδεμένες στην επιφάνεια του φαινολικού δακτυλίου με δύο τουλάχιστον άτομα άνθρακα προκαλεί ισχυρότερη επίδραση στην απορρόφηση του εναιωρήματος των RhNPs@CA και προκαλεί περισσότερο εμφανείς φασματικές μεταβολές από παρόμοιες ενώσεις που στερούνται καρβοξυλικές ομάδες ή όταν τα καρβοξυλικά οξέα ήταν δεσμευμένα άμεσα στο φαινολικό δακτύλιο (π.χ. καφεϊκό οξύ GAE>κατεχόλη GAE, κουμαρικό οξύ GAE>βανιλικό οξύ GAE, πυρογαλλόλη GAE>γαλλικό οξύ GAE). Για να κατανοηθεί καλύτερα ο ρόλος των καρβοξυλικών ομάδων στις αλληλεπιδράσεις των φαινολικών ενώσεων με RhNPs@CA χρησιμοποιήσαμε προπυλικό εστέρα του γαλλικού οξέος, που έχει την ίδια δομή με το γαλλικό οξύ αλλά στερείται της καρβοξυλομάδας, και τετραβουτυλοκιναμωμικό οξύ, που αποτελεί ένα συνθετικό ανάλογο του κινναμωμικού οξέος και στερείται καρβοξυλικής ομάδας. Τόσο ο προπυλικός εστέρας του γαλλικού οξέος όσο και το τετραβουτυλοκιναμωμικό οξύ είχαν ασθενέστερες αλληλεπιδράσεις από το γαλλικό οξύ και το κινναμωμικό οξύ, αντίστοιχα, επιβεβαιώνοντας τον ρόλο της καρβοξυλο-ομάδας

στις φασματικές μεταβολές των εναιωρημάτων των RhNPs@CA. Δεδομένου ότι η αλληλεπίδραση με τα RhNPs@CA λαμβάνει χώρα κυρίως με τις αρωματικές υδροξυλικές ομάδες, τα καρβοξύλια μπορεί να παίζουν ένα διπλό ρόλο τόσο σαν θέση σύνδεσης για τα RhNPs όσο και ως σταθεροποιητικός παράγοντας.

Τέλος, μελετήσαμε την αντίδραση των ενώσεων με τα ιόντα Rh^{3+} και παρατηρήσαμε ότι δεν υπήρξαν ούτε φασματικές μεταβολές ούτε σχηματισμός νανοσωματιδίων. Αυτή η παρατήρηση υποδηλώνει ότι : α) οι εξεταζόμενες ενώσεις δεν σχηματίζουν σύμπλοκα με τα ιόντα Rh^{3+} με οπτικές ιδιότητες στην περιοχή UV-Vis, και β) οι εξεταζόμενες ενώσεις δεν ανάγουν τα ιόντα Rh^{3+} σε RhNPs. Ως εκ τούτου, καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι όλες οι φασματικές μεταβολές οφείλονται στην αλληλεπίδραση των RhNPs@CA με τις ενεργές ομάδες των φαινολικών ενώσεων (δηλαδή -OH και -COOH), ενώ οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις είναι ασήμαντες. Υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες, τα φασματικά σήματα που μετρούνται υποδηλώνουν την ικανότητα δέσμευσης των διάφορων φαινολικών ενώσεων στην επιφάνεια των RhNPs γεγονός που χρησιμοποιήσαμε για την ανάπτυξη μιας νέας μεθόδου που συσχετίζει την συγκέντρωση των δι- και τρι-υδροβενζοϊκών φαινολικών ενώσεων με τις φασματικές μεταβολές των εναιωρημάτων των RhNPs@CA. Μία τέτοια μέθοδος θα μπορούσε να λειτουργήσει συμπληρωματικά σε προηγούμενες μεθόδους που υπολογίζουν την ολική αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών στα πραγματικά δείγματα [Özyürek M., et al., 2012, Choleva T.G., et al., 2015, Vilela D., et al., 2012, Zhu H., et al., 2014, Gohda S., et al., 2008] ή επιλεγμένες κατηγορίες ενώσεων (π.χ. τριυδροξυβενζοϊκό) [Vilela D., et al., 2015] ή δραστικών ενώσεων [Apak R., et al., 2007].

2.3.3 Μικροσκοπικός και οπτικός χαρακτηρισμός της αλληλεπίδρασης των πολυφαινολών με RhNPs

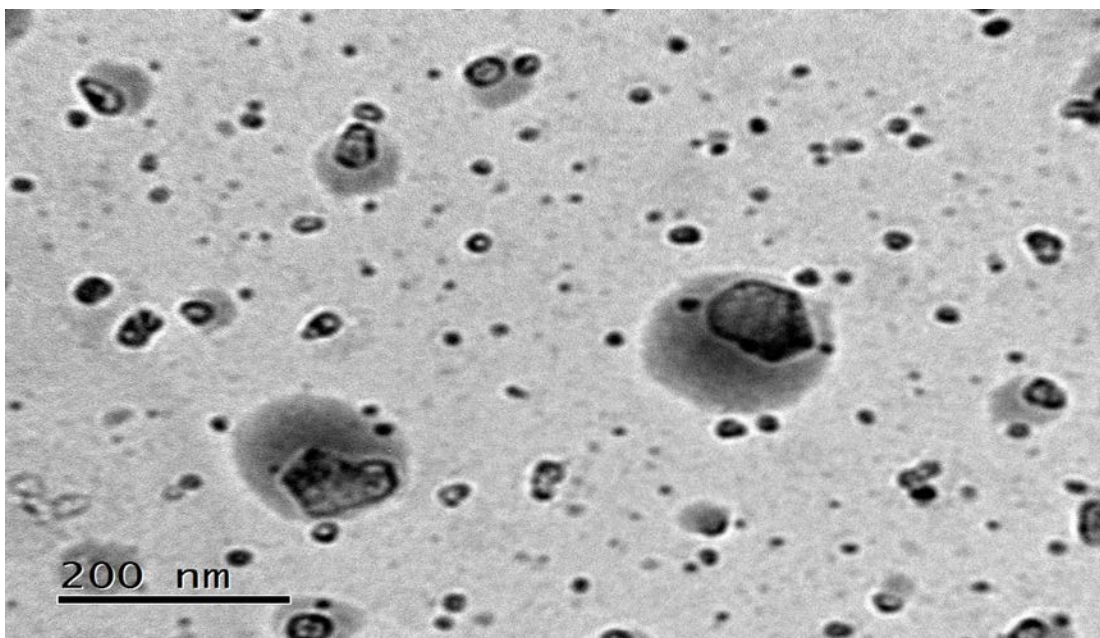
Χρησιμοποιώντας AFM και DLS, μετρήσαμε το μέγεθος των RhNPs@CA μετά από αντίδραση με διάφορες φαινολικές ενώσεις σε διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων. Παρατηρήσαμε ότι το μέγεθος των νανοσωματιδίων αυξήθηκε από 8,7 nm σε 18,2 nm με αύξηση της συγκέντρωσης γαλλικού οξέος και σε 24 nm με αύξηση της συγκέντρωσης κατεχίνης (Πίνακας 2.1).

Πίνακας 2.1. Η μέση υδροδυναμική διάμετρος και η κατανομή μεγέθους σωματιδίων των αντιοξειδωτικών-RhNPs@CA.*

Δείγμα	Υδροδυναμική διάμετρος (nm)	Κατανομή μεγέθους (nm)
RhNPs - Γαλλικό οξύ (0,05 mM)	8,7	6-10
RhNPs -Γαλλικό οξύ (0,5 mM)	18,2	15-24
RhNPs- Κατεχίνη (0,05 mM)	21,0	16,5-27
RhNPs- Κατεχίνη (0,5 mM)	24,0	19-35

* βασισμένα σε DLS παρατηρήσεις.

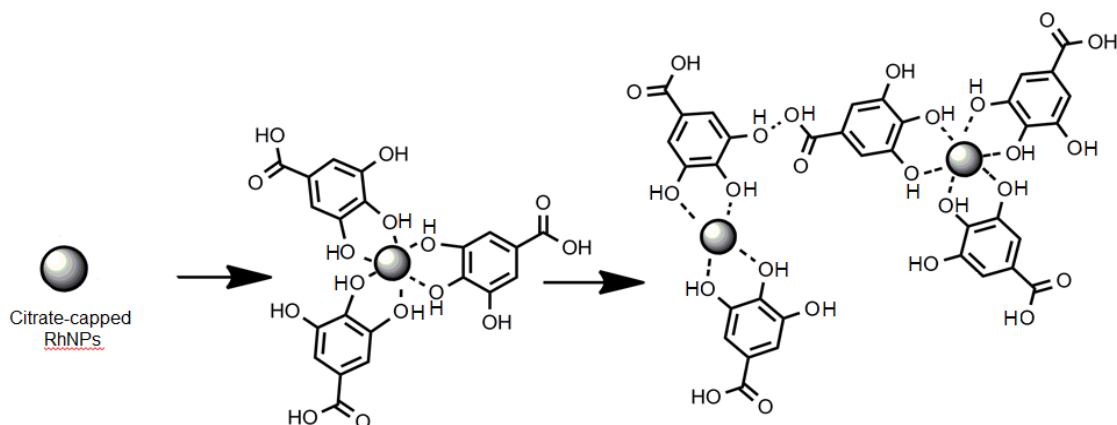
Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν επίσης με TEM (Εικόνα 2.6).



Εικόνα 2.6. Εικόνα TEM των RhNPs@CA περιέχοντας 0,5 mM γαλλικό οξύ.

Λαμβάνοντας υπόψη την ισχύ των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των φαινολικών ενώσεων με τα RhNPs@CA που περιγράφονται στην προηγούμενη ενότητα, ένας εύλογος μηχανισμός που εξηγεί τις μεταβολές στο παρατηρούμενο μέγεθος είναι ο εξής : Αρχικά, οι φαινολικές ενώσεις αλληλεπιδρούν με τα RhNPs@CA με τις υδροξυλικές τους (-OH) ομάδες. Οι ομάδες υδροξυλίου που υπάρχουν στις ομάδες της κατεχόλης (B-δακτύλιος) έχουν μεγαλύτερη τάση αλληλεπίδρασης με τα RhNPs@CA και ακολουθούν εκείνες που υπάρχουν στη ρεζορκινόλη (A-δακτύλιος) ή στις διυδρο-πυραν-ετεροκυκλικές (C-δακτύλιος) ομάδες. Στη συνέχεια, τα συσσωματώματα των RhNPs συνδέονται μέσω δεσμών υδρογόνου με τις υπόλοιπες υδροξυλικές ομάδες που υπάρχουν στις φαινολικές ενώσεις ενισχύοντας τη συσσωμάτωσή τους. Αυτή η θεωρία υποστηρίζεται από το γεγονός ότι υπό συνθήκες εργασίας (π.χ. σε ουδέτερες τιμές pH) οι φαινολικές υδροξυλικές ομάδες δεν ιονίζονται καθώς οι τιμές pK_a τους είναι μεγαλύτερες από 8,5 [Jovanovic S.V., et al., 1994, Ozkorucuklu S.P., et al., 2009]. Ός εκ

τούτου, ευνοείται ο σχηματισμός δεσμών υδρογόνου. Στην **Εικόνα 2.7** αναπαρίσταται σχηματικά ο πιθανός μηχανισμός αλληλεπίδρασης μεταξύ των RhNPs@CA και των φαινολικών ενώσεων.

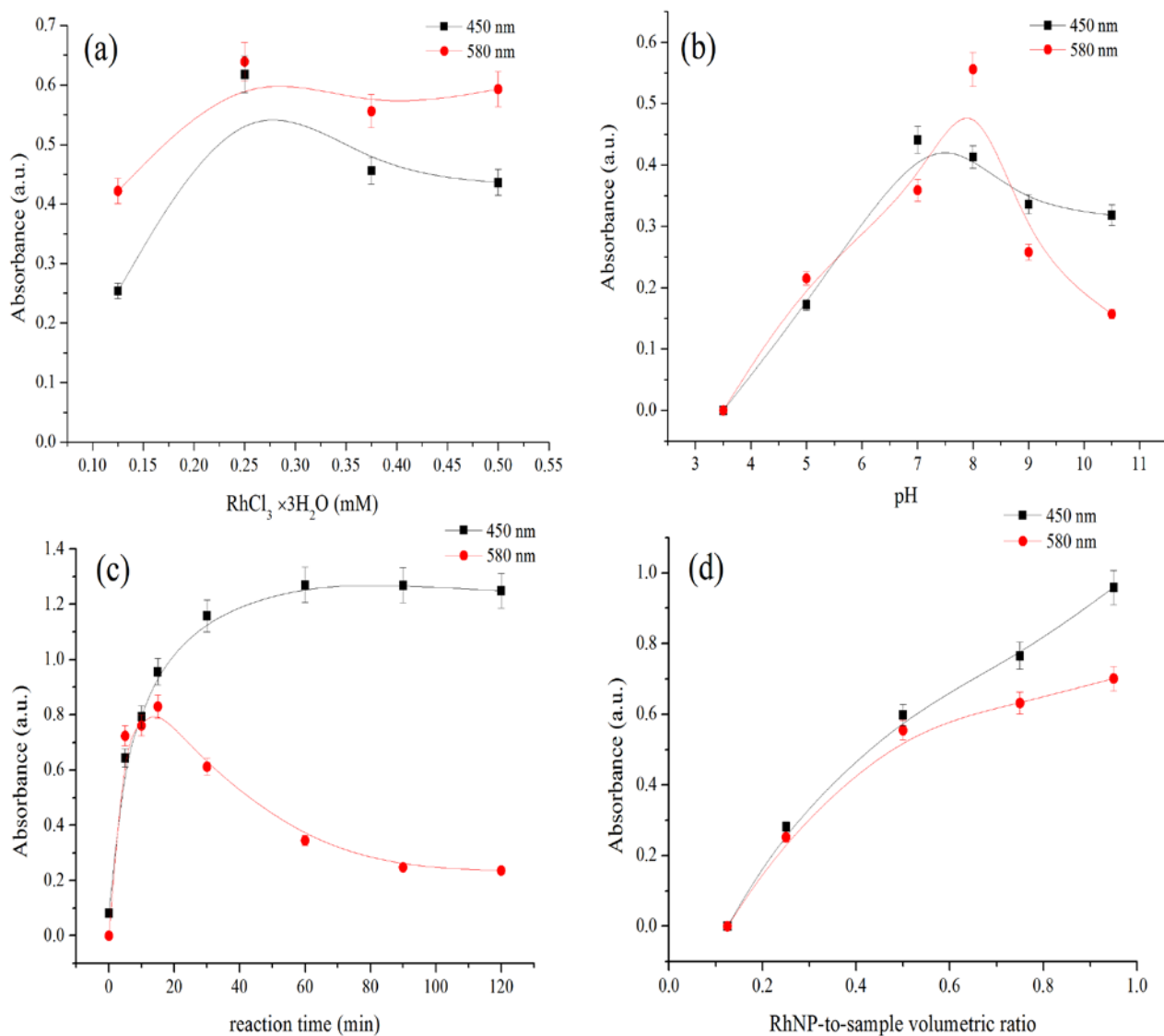


Εικόνα 2.7. Σχηματική απεικόνιση του πιθανού μηχανισμού αλληλεπίδρασης των φαινολικών οξέων (γαλλικό οξύ) με τα RhNPs@CA. Μόρια και νανοσωματίδια δεν είναι ισοσταθμισμένα και η αναπαράσταση δεν λαμβάνει υπόψη την σχετική αναλογία των συγκεντρώσεων μεταξύ φαινολικών ενώσεων και RhNPs@CA.

2.3.4 Πειραματική πορεία βασισμένη στα RhNPs για την ανάλυση της ολικής περιεκτικότητας φαινολικών ενώσεων (TPC) σε δείγματα τσαγιού.

Λαμβάνοντας υπόψη ότι τα δι- και τριυδροξυβενζοϊκά παράγωγα είναι οι πιο άφθονες φαινολικές ενώσεις στα φυσικά προϊόντα μελετήσαμε την αλληλεπίδρασή τους με τα RhNPs@CA για την ανάπτυξη ενός δείκτη φαινολικών ενώσεων. Το γαλλικό οξύ είναι μία από τις κύριες ενώσεις που βρίσκεται στα δείγματα τσαγιού, έτσι αποφασίσαμε να το χρησιμοποιήσουμε σαν πρότυπο για τη μελέτη των βέλτιστων συνθηκών που ευνοούν την αλληλεπίδραση των RhNPs@CA με τις φαινολικές ενώσεις. Μελετήσαμε την επίδραση διάφορων πειραματικών παραμέτρων (δηλαδή συγκέντρωση

αντιδραστηρίων, pH, θερμοκρασία αντίδρασης και χρόνο) χρησιμοποιώντας την μέγιστη κορυφή απορρόφησης των μιγμάτων των RhNPs@CA και γαλλικού οξέος στα 450 και 580 nm (Εικόνα 2.8).



Εικόνα 2.8. Επίδραση των πειραματικών συνθηκών στην απορρόφηση του γαλλικού οξέος-RhNPs. (a) Συγκέντρωση ροδίου (χρόνος αντίδρασης 10 λεπτά, δεν απαιτείται ρύθμιση pH), (b) pH διαλύματος (0,25 mM $RhCl_3 \times 3H_2O$, χρόνος αντίδρασης 10 λεπτά), (c) χρόνος αντίδρασης (pH = 8,0, 0,25 mM $RhCl_3 \times 3H_2O$), (d) αναλογία όγκου RhNPs-δείγματος (0,25 mM $RhCl_3 \times 3H_2O$, pH 8, χρόνος αντίδρασης 20 λεπτά).

Αρχικά μελετήσαμε την επίδραση των πειραματικών συνθηκών με παρακολούθηση της κορυφής απορρόφησης του μίγματος RhNPs@CA με γαλλικό οξύ στα 450 nm διότι ήταν η πιο έντονη. Ύστερα, παρατηρήσαμε ότι η κορυφή απορρόφησης στα 580 nm μειώνονταν με αύξηση του χρόνου επώασης και ο μπλε χρωματισμός εξασθενούσε. Ως εκ τούτου, μελετήσαμε τις πειραματικές συνθήκες που ευνοούν την αλληλεπίδραση του γαλλικού οξέος με τα RhNPs στα δύο μήκη κύματος και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με γραφήματα στην **Εικόνα 2.8**.

Η ένταση απορρόφησης έχει την μέγιστη τιμή όταν τα RhNPs παρασκευάζονται με αναγωγή 0,25 mM RhCl₃ με 2,5 mM NaBH₄ (**Εικόνα 2.8a**). Υπό αυτές τις συνθήκες επιτυγχάνεται μία αναλογία NaBH₄ : RhCl₃ 10 η οποία είναι αναγκαία για την διασφάλιση της ολικής αναγωγής των ιόντων Rh³⁺, όπως προτείνεται από Papp et al. [Papp S., et al., 2004]. Αυτό επίσης επαληθεύεται από φάσμα φωτοηλεκτρονίων ροδίου 3d (**Εικόνα 2.2c**), όπως αναφέρθηκε παραπάνω.

Το pH βρέθηκε επίσης να επηρεάζει τον σχηματισμό γαλλικού οξέος-RhNPs (**Εικόνα 2.8b**). Το αρχικό εναιώρημα των RhNPs@CA έχει τιμή pH ίση με 9,2-9,3 αλλά η μέγιστη τιμή απορρόφησης του εναιωρήματος γαλλικού οξέος-RhNPs στα 450 και 580 nm επιτυγχάνεται σε τιμή pH μεταξύ 7 και 8, αντίστοιχα.

Η συνολική διαδικασία εξαρτάται τόσο από το χρόνο (**Εικόνα 2.8c**) όσο κι από τη θερμοκρασία και η απόκριση στα 450 και 580 nm μεταβάλλεται με τον χρόνο ανάμιξης και με τη θερμοκρασία. Ειδικότερα, η κορυφή απορρόφησης στα 450 nm σχηματίζει ένα πλατώ μετά από 25 λεπτά αλλά η κορυφή απορρόφησης στα 580 nm μειώνεται για χρόνους επώασης μεγαλύτερους από 15 min. Την ίδια στιγμή το ίδιο προφίλ παρατηρήθηκε για άλλα τρι-υδροξυβενζοϊκά παράγωγα όπως η πυρογαλλόλη και

ο προπυλικός εστέρας του γαλλικού οξέος όχι όμως για τις κατεχίνες και άλλες φαινολικές ενώσεις όπως το καφεϊκό οξύ και το κουμαρικό οξύ, οι οποίες εμφάνισαν ένα σταθερό πρότυπο απορρόφησης για αρκετές ώρες. Από την άλλη πλευρά, η θερμοκρασία είχε αρνητική επίδραση στη σταθερότητα των μιγμάτων φαινολικών οξέων-RhNPs όπως αποδεικνύεται από το γεγονός ότι και οι δύο κορυφές (450 nm και 580 nm) έχουν μέγιστη τιμή απορρόφησης σε θερμοκρασία δωματίου (~25⁰C) και μειώνεται με αύξηση θερμοκρασίας πάνω από 40⁰C.

Βασιζόμενοι στα παραπάνω αποτελέσματα, αποφασίσαμε να χρησιμοποιήσουμε τις ακόλουθες πειραματικές συνθήκες : 0,25 mM RhCl₃, 20 λεπτά χρόνος αντίδρασης σε θερμοκρασία δωματίου, pH 8,0, αναλογία όγκου RhNPs προς δείγμα = 0,95. Χρησιμοποιώντας τις συνθήκες που περιγράφονται στο πειραματικό μέρος, παρασκευάσαμε καμπύλες απόκρισης των τιμών απορρόφησης έναντι της συγκέντρωσης της κάθε ένωσης (**Πίνακας 2.2**).

Πίνακας 2.2. Αναλυτικές καμπύλες απόκρισης της απορρόφησης (στα 450 και/ή 580 nm) σε σύγκριση με τη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων.

Φαινολική Ένωση	λ_{\max}	Γραμμικό εύρος (μM)	Καμπύλη αναφοράς	Συντελεστής συσχέτισης (r)	Όριο ανίχνευσης (μM)*	GAE
Κατεχίνη	450	0,0-500	$y = 4.2 \times 10^{-3} (\pm 2 \times 10^{-4}) \times C + 0.89 (\pm 5 \times 10^{-2})$	0,9937	39	2,1
Κατεχόλη	450	0,0-500	$y = 5 \times 10^{-4} (\pm 2 \times 10^{-5}) \times C + 0.79 (\pm 8 \times 10^{-3})$	0,9921	49	0,24
	580	0,0-500	$y = 4 \times 10^{-4} (\pm 2 \times 10^{-5}) \times C + 0.58 (\pm 1 \times 10^{-2})$	0,9820	77	
Γαλλικό οξύ	450	0,0-500	$y = 2 \times 10^{-3} (\pm 1 \times 10^{-4}) \times C + 0.84 (\pm 3 \times 10^{-2})$	0,9916	49	1,0
	580	0,0-500	$y = 1.6 \times 10^{-3} (\pm 4 \times 10^{-5}) \times C + 0.61 (\pm 1 \times 10^{-2})$	0,9970	29	
Καφεϊκό οξύ	450	0,0-500	$y = 7 \times 10^{-4} (\pm 3 \times 10^{-5}) \times C + 0.75 (\pm 1 \times 10^{-2})$	0,9931	46	0,38
Κουμαρικό οξύ	450	0,0-500	$y = 1.7 \times 10^{-4} (\pm 7 \times 10^{-6}) \times C + 0.78 (\pm 3 \times 10^{-3})$	0,9913	57	0,08
Βανιλλικό οξύ	450	150-500	$y = 1 \times 10^{-4} (\pm 3 \times 10^{-6}) \times C + 0.79 (\pm 3.4 \times 10^{-3})$	0,9845	103	0,053
Κιναμμομικό οξύ	450	150-500	$y = 1 \times 10^{-4} (\pm 8 \times 10^{-6}) \times C + 0.78 (\pm 3 \times 10^{-3})$	0,9863	91	0,052
Επιγαλλοκατεχίνη	450	50-400	$y = 6 \times 10^{-4} (\pm 4 \times 10^{-5}) \times C + 0.87 (\pm 1 \times 10^{-2})$	0,9615	98	0,30
Πυρογαλλόλη	450	0,0-500	$y = 2 \times 10^{-3} (\pm 5 \times 10^{-5}) \times C + 0.86 (\pm 1.4 \times 10^{-2})$	0,9987	30	1,11
	580	0,0-500	$y = 1.1 \times 10^{-3} (\pm 5 \times 10^{-5}) \times C + 0.64 (\pm 2 \times 10^{-2})$	0,9899	55	

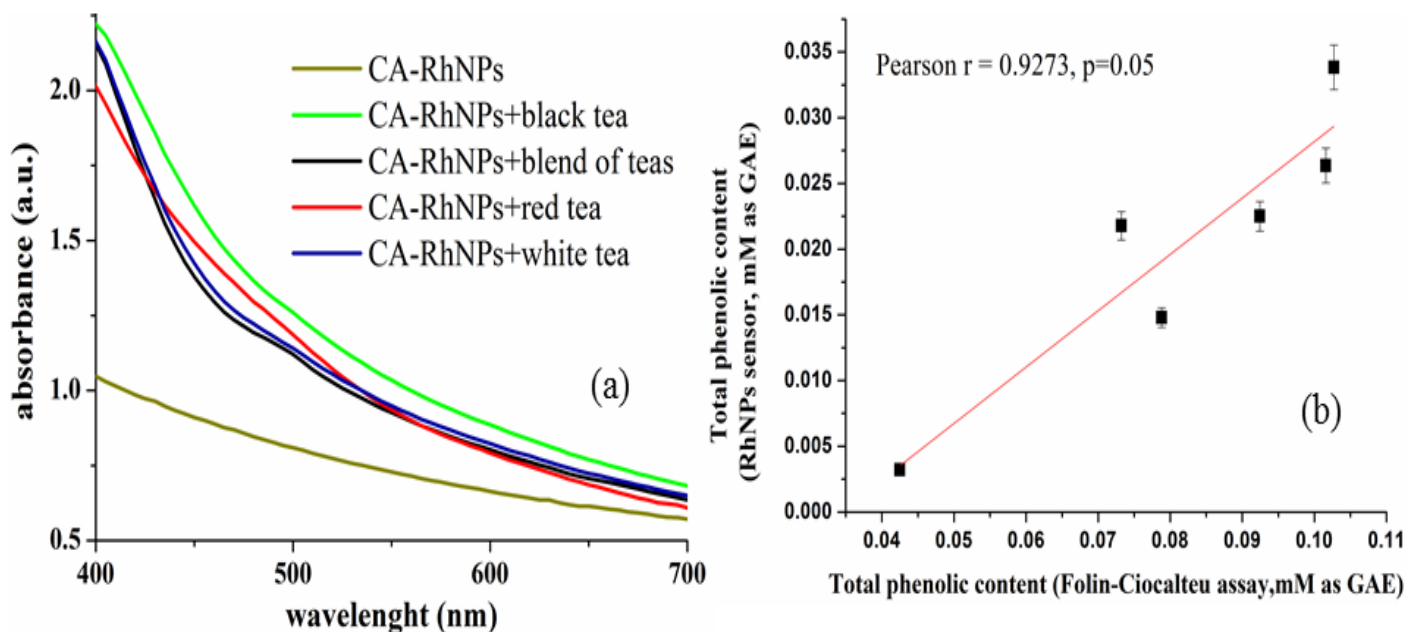
*Τρεις φορές ο λόγος σήματος προς θόρυβο. GAE= λόγος της κλίσης της καμπύλης αναφοράς των εξεταζόμενων ενώσεων προς την κλίση της καμπύλης αναφοράς του γαλλικού οξέος στα 450 nm. Η ένταση της απορρόφησης μετρήθηκε μετά από 25 λεπτά στα 450 nm και μετά από 15 λεπτά στα 580 nm.

Καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι υπάρχει μία γραμμική απόκριση της απορρόφησης των RhNPs@CA με τον λογάριθμο της συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων που επιτρέπουν την ανίχνευση ακόμα και σε επίπεδα μερικών μM. Η γραμμική περιοχή και η ευαισθησία της μεθόδου είναι υποδεέστερες από εκείνες που αναφέρονται για τα νανοσωματίδια χρυσού και αργύρου [Özyürek M., et al., 2012, Scampicchio M., et al.,

2006] αλλά εντός των επιπέδων συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων σε πραγματικά δείγματα.

Μελετήσαμε την επαναληψιμότητα και την αναπαραγωγιμότητα των φωτομετρικών μετρήσεων που εκφράζεται ως σχετική τυπική απόκλιση της ίδιας μέρας (intra-day) και διαφορετικών ημερών (inter-day) από πέντε επαναλήψεις, χρησιμοποιώντας ένα πρότυπο διάλυμα γαλλικού οξέος 0,5 mM. Η επαναληψιμότητα κυμάνθηκε μεταξύ 3,72 και 5,25% ενώ η αναπαραγωγιμότητα μεταξύ 5,1 και 7,3% αποδεικνύοντας την καλή ακρίβεια της μεθόδου. Επίσης, μελετήσαμε την προσθετικότητα της μεθόδου με εμβολιασμό αυξανόμενων συγκεντρώσεων γαλλικού οξέος και κατεχίνης σε υδατικό εκχύλισμα μαύρου τσαγιού. Οι τιμές απορρόφησης στα 450 και 580 nm (για γαλλικό οξύ) και 450 nm (για κατεχίνη) ήταν προσθετικές αποδίδοντας ευθύγραμμη απόκριση με την αύξηση της συγκέντρωσης.

Με βάση τις παραπάνω παρατηρήσεις, ο προσδιορισμός του TPC των υδατικών εκχυλισμάτων τσαγιού βασίστηκε στην επίδραση των αντιοξειδωτικών στην απορρόφηση του εναιωρήματος των RhNPs@CA στα 450 nm (**Εικόνα 2.9a**). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των έξι διαφορετικών ποικιλιών τσαγιού εμφανίζουν στατιστικά σημαντική γραμμική συσχέτιση με την ολική φαινολική περιεκτικότητα ($r=0,9273$, $p=0,05$) που προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu (**Εικόνα 2.9b**).

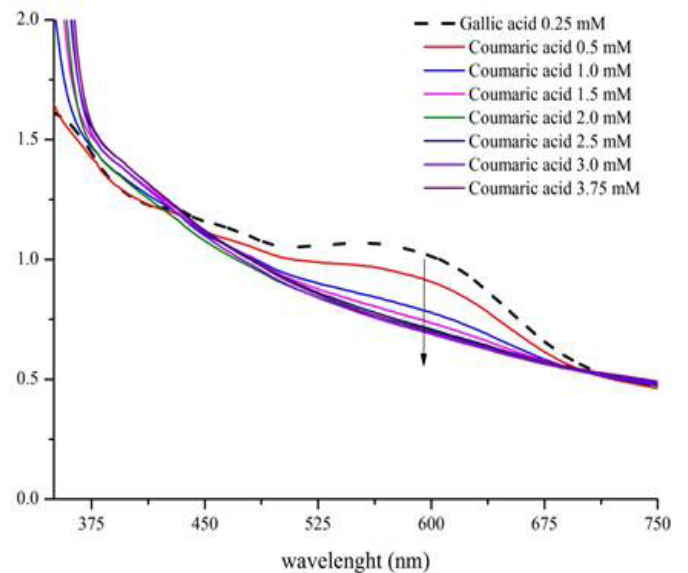
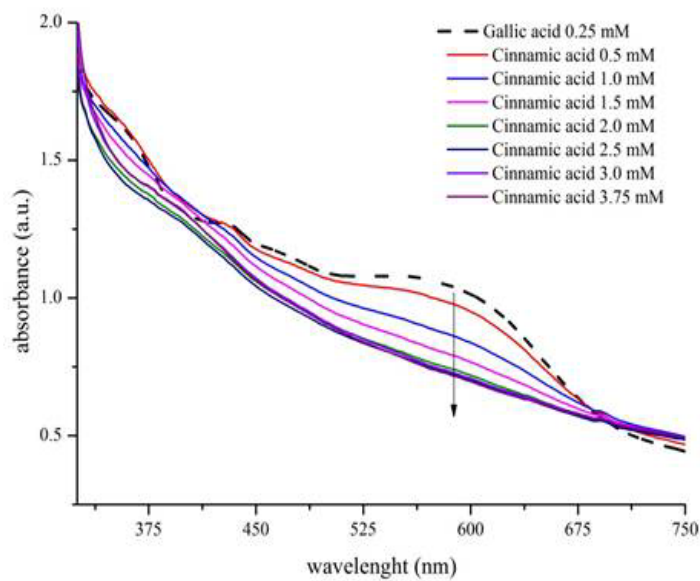
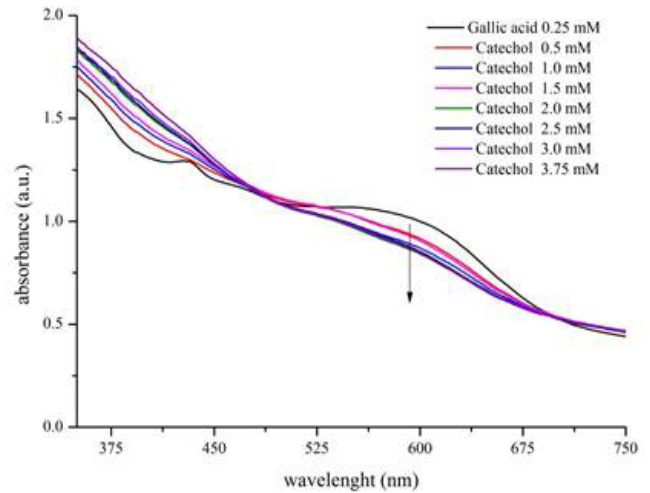
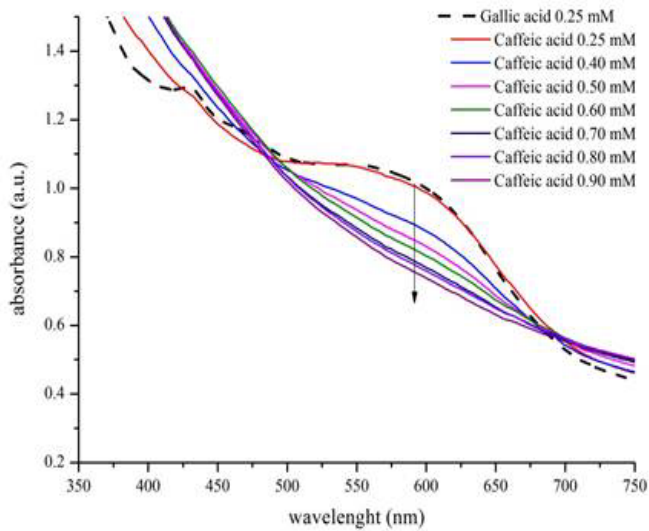


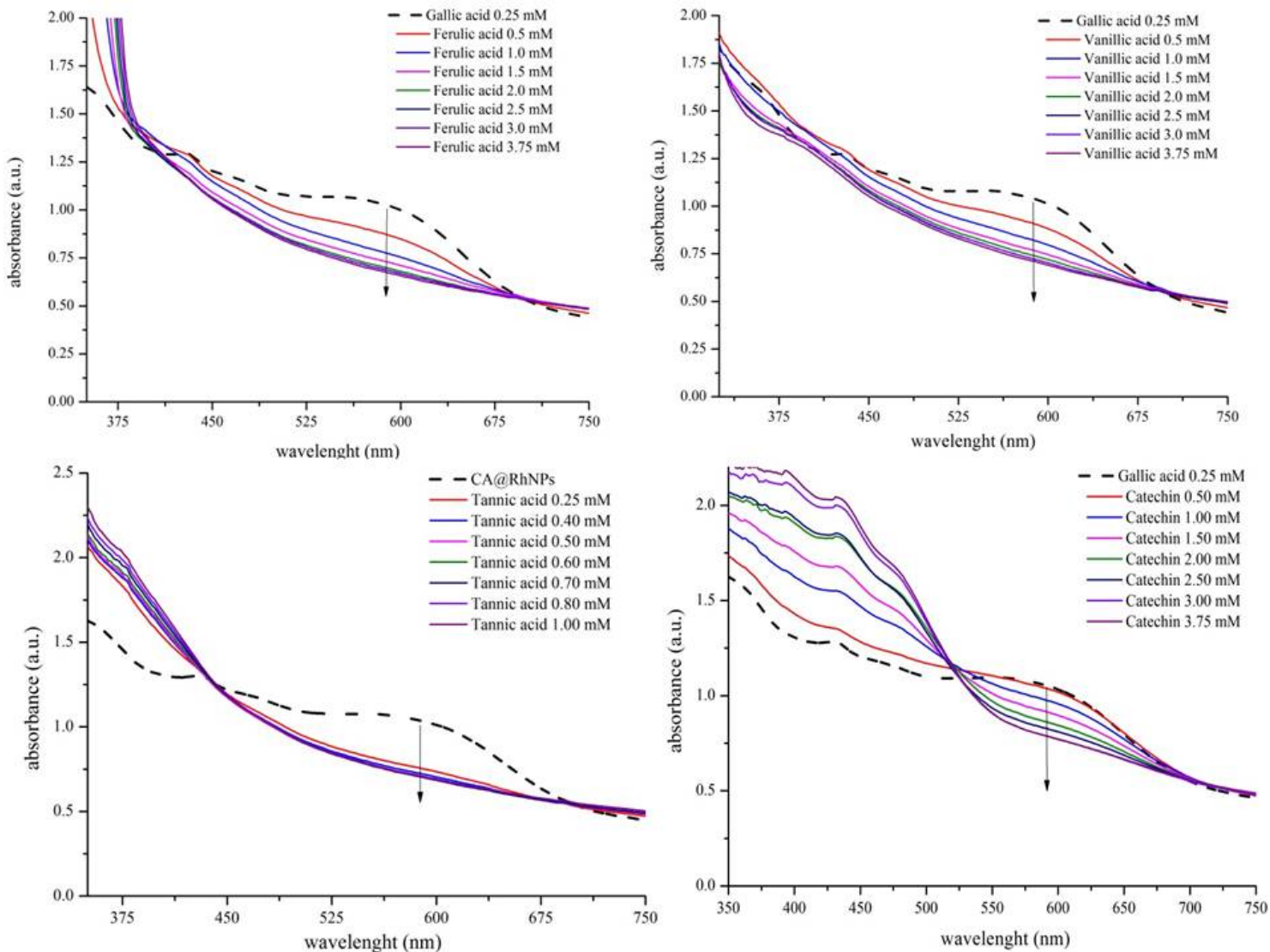
Εικόνα 2.9. (α) UV-Vis φάσματα των RhNPs@CA με εκχυλίσματα τσαγιού διαφόρων ποικιλιών (οι φασματικές γραμμές (τα φάσματα δεν έχουν κανονικοποιηθεί ως προς τη μάζα του δείγματος τσαγιού) (β) Συσχέτιση της συνολικής περιεκτικότητας φαινολικών ενώσεων που προσδιορίστηκε από την πορεία που βασίζεται στα RhNPs και της Folin-Ciocalteu (οι συγκεντρώσεις έχουν κανονικοποιηθεί ως προς τη μάζα του δείγματος τσαγιού).

2.3.5 Πειραματική πορεία βασισμένη στα RhNPs για την ανάλυση της ολικής περιεκτικότητας κατεχινών (TCC) σε δείγματα τσαγιού.

Παρατηρήσαμε ότι αρκετές φαινολικές ενώσεις, ανταγωνίζονται παράγωγα του τριυδροξυβενζοϊκού οξέος για τις διαθέσιμες θέσεις δέσμευσης στην επιφάνεια των RhNPs όταν βρίσκονται σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από τη συγκέντρωση των παραγώγων του τριυδροξυβενζοϊκού οξέος, προκαλώντας μείωση στην απορρόφηση RhNPs στα 580 nm ως συνάρτηση της συγκέντρωσης. Το φαινόμενο αυτό δεν παρατηρείται μεταξύ διαφορετικών παραγώγων του τριυδροξυβενζοϊκού οξέος (πχ. σε μίγματα γαλλικού οξέος και πυρογαλλόλης όπου η δράση είναι προσθετική). Στην

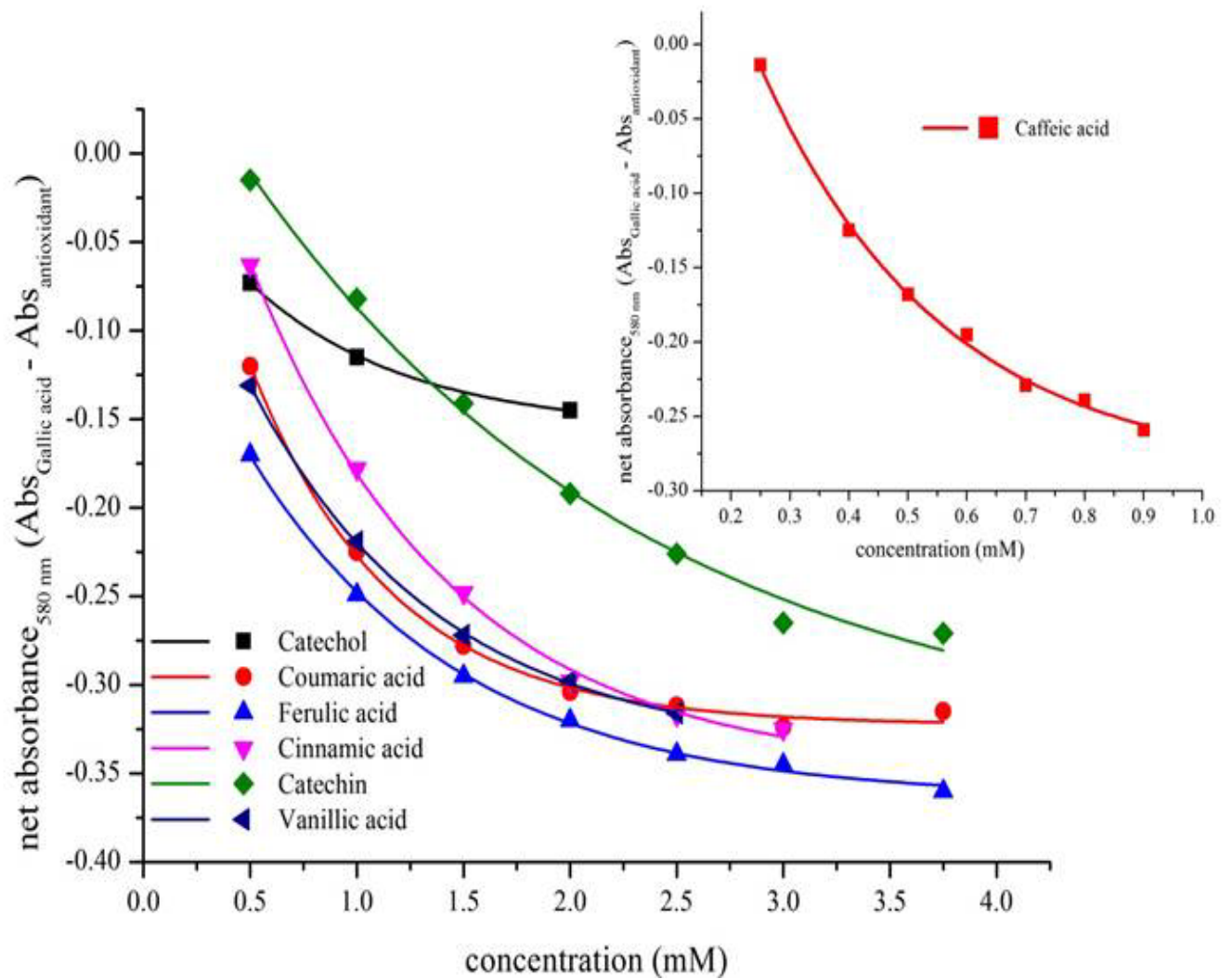
Εικόνα 2.10 παρουσιάζονται τα φάσματα απορρόφησης που καταγράφουν τη μείωση της κορυφής απορρόφησης των τροποποιημένων με γαλλικό οξύ-RhNPs στα 580 nm ως συνάρτηση της συγκέντρωσης διαφορετικών φαινολικών ενώσεων.





Εικόνα 2.10. Φάσματα απορρόφησης εναιωρήματος RhNPs τροποποιημένων με γαλλικό οξύ με αυξανόμενη συγκέντρωση διαφόρων φαινολικών ενώσεων: α) Καφεϊκό οξύ, β) Κατεχόλη, γ) Κιναμμοωμικό οξύ, δ) Κουμαρικό οξύ, ε) Φερουλικό οξύ, ς) Βανιλλικό οξύ, ζ) Ταννικό οξύ, η) Κατεχίνη. Τα τροποποιημένα με γαλλικό οξύ RhNPs παρασκευάζονται με αντίδραση RhNPs@CA με 0,25 mM γαλλικό οξύ.

Σε όλες τις περιπτώσεις η μείωση της απορρόφησης στα 580 nm παρουσιάζει λογαριθμική σχέση με την συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων. Οι καμπύλες απόκρισης των τιμών απορρόφησης έναντι της συγκέντρωσης της κάθε ένωσης παρουσιάζονται γραφικά στην **Εικόνα 2.11** και τον **Πίνακα 2.3**.



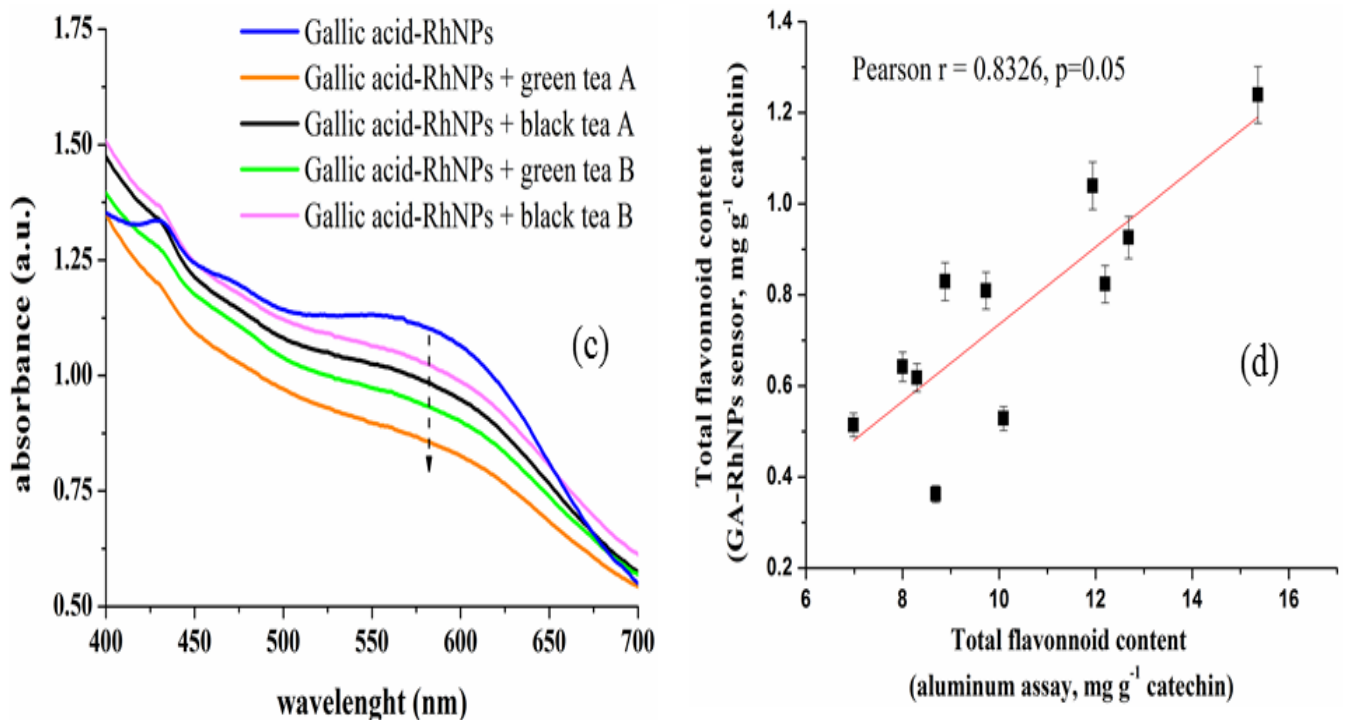
Εικόνα 2.11. Λογαριθμικές καμπύλες αναλυτικής απόκρισης του εναιωρήματος των RhNPs τροποποιημένων με γαλλικό οξύ με αυξανόμενη συγκέντρωση διαφόρων φαινολικών ενώσεων.

Πίνακας 2.3. Αναλυτικές καμπύλες απόκρισης της απορρόφησης (στα 450 και/ή 580 nm) για διαφορετικές συγκεντρώσεις φαινολικών ενώσεων.

Φαινολική ένωση	Γραμμικό εύρος (mM)	Καμπύλη αναφοράς	Συντελεστής συσχέτισης (r)	Όριο ανίχνευσης (mM)*
Κατεχίνη	0,50-3,75	$y = -0,315(\pm 0,02) \times \log C - 0,1(\pm 7 \times 10^{-3})$	0,9919	0,50
Κατεχόλη	0,5-2,0	$y = -0,12(\pm 0,01) \times \log C - 0,36(\pm 2 \times 10^{-3})$	0,9954	0,46
Ταννικό οξύ	0,25-0,70	$y = -0,12(\pm 0,02) \times \log C - 0,35(\pm 5 \times 10^{-3})$	0,9912	0,10
Καφεϊκό οξύ	0,25-1,0	$y = -0,42(\pm 0,02) \times \log C - 0,28(\pm 5 \times 10^{-3})$	0,9956	0,25
Κουμαρικό οξύ	0,5-3,0	$y = -0,26(\pm 0,02) \times \log C - 0,21(\pm 8 \times 10^{-3})$	0,9822	0,34
Βανιλικό οξύ	0,5-3,0	$y = -0,27(\pm 0,01) \times \log C - 0,22(\pm 3 \times 10^{-3})$	0,9966	0,22
Κιναμμοϊκό οξύ	0,5-3,0	$y = -0,35(\pm 0,02) \times \log C - 0,17(\pm 7 \times 10^{-3})$	0,9925	0,46
Φερούλικό οξύ	0,5-3,75	$y = -0,22(\pm 0,01) \times \log C - 0,24(\pm 4 \times 10^{-3})$	0,9910	0,15

Παρόλο που το φαινόμενο αυτό παρατηρήθηκε για διάφορες φαινολικές ενώσεις, σε πραγματικά δείγματα όπως αυτά των εκχυλισμάτων του τσαγιού, οι συγκεντρώσεις των περισσοτέρων φαινολικών ενώσεων είναι μικρότερη από αυτή των παραγώγων του τριυδροξυβενζοϊκού οξέος και συνήθως μικρότερη από 0,25 mM, με εξαίρεση τις κατεχίνες. Με βάση αυτή την παρατήρηση, και λαμβάνοντας υπόψη ότι οι κατεχίνες είναι οι πιο άφθονες πολυφαινόλες σε δείγματα τσαγιού [Cabrerá C., et al., 2003], προσδιορίσαμε την συνολική περιεκτικότητα κατεχινών σε δείγματα τσαγιού με βάση την ανασταλτική επίδραση των κατεχινών, στην κορυφή απορρόφησης των τροποποιημένων με γαλλικό οξύ-RhNPs στα 580 nm.

Χρησιμοποιήσαμε την καμπύλη της **Εικόνας 2.11** (όπως προέκυψε από το φάσμα απορρόφησης της **Εικόνας 2.10h**) για να αξιολογήσουμε τα TCC επίπεδα διαφόρων ποικιλιών τσαγιού (**Εικόνα 2.12a**) και συμπεράναμε ότι τα αποτελέσματα της μεθόδου μας συσχετίζονται γραμμικά με τη συνολική περιεκτικότητα κατεχινών που προσδιορίζεται με την πρότυπη πορεία συμπλοκοποίησης αργιλίου ($r=0,8326$, $p=0,05$) (**Εικόνα 2.12b**). Η ανταγωνιστική δράση των κατεχινών για το συσσωμάτωμα των τροποποιημένων με γαλλικό οξύ-RhNPs μπορεί ως εκ τούτου να παρέχει μία ικανοποιητική ποσοτική ένδειξη της ολικής περιεκτικότητας κατεχινών στα εκχυλίσματα τσαγιού.



Εικόνα 2.12. α) UV-Vis φάσματα των τροποποιημένων με γαλλικό οξύ RhNPs (0,25 mM γαλλικό οξύ) με εκχυλίσματα τσαγιού διαφόρων ποικιλιών (τα φάσματα δεν έχουν κανονικοποιηθεί ως προς τη μάζα του δείγματος τσαγιού), β) Διάγραμμα απόκρισης της ολικής περιεκτικότητας κατεχινών που καθορίστηκε από την πορεία που βασίζεται στα RhNPs και της μεθόδου συμπλοκοποίησης αργιλίου (οι συγκεντρώσεις έχουν κανονικοποιηθεί ως προς τη μάζα του δείγματος τσαγιού).

2.4 Συμπεράσματα

Στο κεφάλαιο αυτό, περιγράφηκε μία νέα μέθοδος προσδιορισμού φαινολικών ενώσεων βασισμένη στα RhNPs@CA. Οι φαινολικές ενώσεις βρέθηκε για πρώτη φορά να αντιδρούν με τα RhNPs@CA και να προκαλούν μεταβολές στο μέγεθος που μπορούν να παρατηρηθούν σαν μεταβολές στα φάσματα απορρόφησης των εναιωρημάτων των RhNPs@CA. Βάσει αυτών των ευρημάτων, αναπτύξαμε δύο πορείες με βάση τα RhNPs@CA για τον προσδιορισμό της συνολικής περιεκτικότητας των φαινολικών ενώσεων καθώς και των κατεχινών σε δείγματα τσαγιού. Τα αποτελέσματα συσχετίζονται ικανοποιητικά με τις πρότυπες μεθόδους (π.χ., Folin-Ciocalteu και μέθοδος συμπλοκοποίησης αργιλίου) που χρησιμοποιούνται συνήθως για να αξιολογηθεί η περιεκτικότητα φαινολών σε φυσικά προϊόντα παρά το γεγονός ότι οι πορείες που είναι βασισμένες στα RhNPs@CA αντανακλούν την ικανότητα δέσμευσης των φαινολικών ενώσεων στα RhNPs και δεν επηρεάζονται από αντιδράσεις οξειδοαναγωγής. Επιπλέον, οι μέθοδοι που αναπτύχθηκαν παρουσιάζουν ορισμένα πλεονεκτήματα που πηγάζουν από : i) την υψηλή σταθερότητα των RhNPs@CA, και ii) την απουσία αντιδράσεων οξειδοαναγωγής, οι οποίες παρατηρούνται συχνά σε αλληλεπίδραση των φαινολικών ενώσεων με άλλα νανοσωματίδια ευγενών μετάλλων. Τα χαρακτηριστικά αυτά επιτρέπουν να πραγματοποιηθεί η ανάλυση χωρίς αυστηρούς χρονικούς περιορισμούς, σε αντίθεση με άλλες δοκιμασίες που βασίζονται σε νανοσωματίδια και απαιτούν μεγαλύτερους χρόνους επώασης [Özyürek M., et al., 2012, Szydłowska-Czerniak A., et al., 2012] και αυστηρό έλεγχο του χρόνου αντίδρασης [Nezhad M.R.H., et al., 2008] ή χρησιμοποιούν αυξημένες θερμοκρασίες για να επιταχυνθεί η κινητική των οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων [Vilela D., et al., 2015].

BIBLIOΓΡΑΦΙΑ

- Apak R., Güçlü K., Demirata B., Özyürek M., Çelik S.E., Bektaşoğlu B., Berker K.I., Özyurt D., Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay, *Molecules* **12** (2007) **1496-1547**.
- Cabrera C., Gimenez R., Lopez M.C., Determination of Tea Components with Antioxidant Activity, *J Agric Food Chem* **51** (2003) **4427-4435**.
- Chandra S., Lokesh K.S., Nicolai A., Lang H., Dendrimer-rhodium nanoparticle modified glassy carbon electrode for amperometric detection of hydrogen peroxide, *Anal Chim Acta* **632** (2009) **63-68**.
- Choleva T.G., Kappi F.A., Giokas D.L., Vlessidis A.G., Paper-based assay of antioxidant activity using analyte-mediated on-paper nucleation of gold nanoparticles as colorimetric probes, *Anal Chim Acta* **860** (2015) **61-69**.
- Gao Z., Xu M., Hou L., Chen G., Dianping Tang, Irregular-shaped platinum nanoparticles as peroxidase mimics for highly efficient colorimetric immunoassay, *Anal Chim Acta* **776** (2013) **79-86**.
- Christodouleas D., Fotakis C., Papadopoulos K., Yannakopoulou E., Calokerinos A.C., Development and validation of a chemiluminogenic method for the evaluation of antioxidant activity of hydrophilic and hydrophobic antioxidants, *Anal Chim Acta* **652** (2009) **295-302**.
- Creighton J.A., Eadon D.G., Ultraviolet-Visible Absorption Spectra of the Colloidal Metallic Elements, *J Chem Soc Faraday Trans* **87**(1991) **3881-3891**.

- Frankel E.N., Meyer A.S., The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants, *J Sci Food Agric* **80** (2000) 1925-1941.
- Gatselou V.A., Giokas D.L., Vlessidis A.G., Prodromidis M.I., Rhodium nanoparticle-modified screen-printed graphite electrodes for the determination of hydrogen peroxide in tea extracts in the presence of oxygen, *Talanta* **134** (2015) 482-487.
- Ghosh S.K., Pal T., Interparticle Coupling Effect on the Surface Plasmon Resonance of Gold Nanoparticles: From Theory to Applications, *Chem Rev* **107** (2007) 4797-4862.
- Giannoulis K.M., Giokas D.L., Tsogas G.Z., Vlessidis A.G., Ligand-free gold nanoparticles as colorimetric probes for the non-destructive determination of total dithiocarbamate pesticides after solid phase extraction, *Talanta* **119** (2014) 276-283.
- Giokas D.L., Christodouleas D.C., Vlachou I., Vlessidis A.G., Calokerinos A.C., Development of a generic assay for the determination of total trihydroxybenzoate derivatives based on gold-luminol chemiluminescence, *Anal Chim Acta* **764** (2013) 70-77.
- Giokas D.L., Vlessidis A.G., Evmiridis N.P., On-line selective detection of antioxidants free-radical scavenging activity based on Co(II)/EDTA-induced luminolchemiluminescence by flow injection analysis, *Anal Chim Acta* **589** (2007) 59-65.
- Gohda S., Ashida T., Yagi S., Namatame H., Taniguchi M., Reaction of L-cysteine on Rh(PVP) nanoparticle surface by NEXAFS, *J Surf Anal* **14** (2008) 458-461.

- Grass M.E., Joo S.H., Zhang Y., Somorjai G.A., Colloidally Synthesized Monodisperse Rh Nanoparticles Supported on SBA-15 for Size- and Pretreatment-Dependent Studies of CO Oxidation, *J Phys Chem C* **113** (2009) 8616–8623.
- He Y., Liang Y., Wang D., The highly sensitive and facile colorimetric detection of the glycidylazide polymer based on propargylamine functionalized gold nanoparticles using click chemistry, *Chem Commun* **51** (2015) 12092-12094.
- Hei H., He H., Wang R., Liu X., Zhang G., Controlled Synthesis and Characterization of Noble Metal Nanoparticles, *Soft Nano Lett* **2** (2012) 34-40.
- Idros N., Ho M.Y., Pivnenko M., Qasim M.M., Xu H., Gu Z., Chu D., Colorimetric-based detection of TNT explosives using functionalized silica nanoparticles, *Sensors* **15** (2015) 12891-12905.
- Jain P.K., Lee K.S., El-Sayed I.H., El-Sayed M.A., Calculated Absorption and Scattering Properties of Gold Nanoparticles of Different Size, Shape, and Composition: Applications in Biological Imaging and Biomedicine, *J Phys Chem B* **110** (2006) 7238-7248.
- Jin C., Xia W., Nagaiah T.C., Guo J., Chen X., Li N., Bron M., Schuhmann W., Muhler M., Rh–Rh_{Sx} nanoparticles grafted on functionalized carbon nanotubes as catalyst for the oxygen reduction reaction, *J Mater Chem* **20** (2010) 736–742.
- Jin R., Wu G., Li Z., Mirkin C.A., Schatz G.C., What Controls the Melting Properties of DNA-Linked Gold Nanoparticle Assemblies?, *J Am Chem Soc* **125** (2003) 1643-1654.
- Jovanovic S.V., Steeden S., Tomic M., Marjanovic B., Simicg M.G., Flavonoids as antioxidants, *J Am Chem Soc* **116** (1994) 4846-4851.

- Kapakoglou N.I., Giokas D.L., Tsogas G.Z., Ladavos A.K., Vlessidis A.G., Development of a chromium speciation probe based on morphology-dependent aggregation of polymerized vesicle-functionalized gold nanoparticles, *Analyst* **134** (2009) 2475-2483.
- Kappi F.A., Tsogas G.Z., Giokas D.L., Christodouleas D.C., Vlessidis A.G., Colorimetric and visual read-out determination of cyanuric acid exploiting the interaction between melamine and silver nanoparticles, *Microchim Acta* **181** (2014) 623-629.
- Kelly K.L., Coronado E., Zhao L.L., Schatz G.C., The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape and Dielectric Environment, *J Phys Chem B* **107** (2003) 668-677.
- Li Y., Diao P., Jin T., Sun J., Xu D., Shape-controlled electrodeposition of standing Rh nanoplates on indium tin oxide substrates and their electrocatalytic activity toward formic acid oxidation, *Electrochim Acta* **83** (2012) 146-154.
- Murray W.A., Barnes W., Plasmonic Materials, *Adv Mater* **19** (2007) 3771-3782.
- Nezhad M.R.H., Alimohammadi M., Tashkhourian J., Mehdi Razavian S., Optical detection of phenolic compounds based on the surface plasmon resonance band of Au nanoparticles, *Spectrochim Acta Part A* **71** (2008) 199-203.
- Ozkorucuklu S.P., Beltran J.L., Fonrodona G., Barrón D., Alsancak G., Barbosa J., Determination of Dissociation Constants of Some Hydroxylated Benzoic and Cinnamic Acids in Water from Mobility and Spectroscopic Data Obtained by CE-DAD, *J Chem Eng Data* **54** (2009) 807-811.

- Özyürek M., Güngör N., Baki S., Güçlü K., Apak R., Development of a Silver Nanoparticle-Based Method for the Antioxidant Capacity Measurement of Polyphenols, *Anal Chem* **84** (2012) 8052–8059.
- Papp S., Szel J., Oszko A., Dekany I., Synthesis of Polymer-Stabilized Nanosized Rhodium Particles in the Interlayer Space of Layered Silicates, *Chem Mater* **16** (2004) 1674-1685.
- Rycenga M., Cobley C.M., Zeng J., Li W., Moran C.H., Zhang Q., Qin D., Xia Y., Controlling the Synthesis and Assembly of Silver Nanostructures for Plasmonic Applications, *Chem Rev* **111** (2011) 3669-3712.
- Saha K., Agasti S.S., Kim C., Li X., Rotello V.M., Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing, *Chem Rev* **112** (2012) 2739-2779.
- Rosi N.L., Mirkin C.A., Nanostructures in Biodiagnostics, *Chem Rev* **105** (2005) 1547-1562.
- Sathe B.R., Rhodium nanoparticle–carbon nanosphere hybrid material as an electrochemical hydrogen sensor, *RSC Adv* **3** (2013) 5361-5365.
- Scampicchio M., Wang J., Blasco A.J., Sanchez Arribas A., Mannino S., Escarpa A., Nanoparticle-Based Assays of Antioxidant Activity, *Anal Chem* **78** (2006) 2060-2063.
- Sharpe E., Frasco T., Andreescu D., Andreescu S., Portable ceria nanoparticle-based assay for rapid detection of food antioxidants (NanoCerac), *Analyst* **138** (2013) 249-262.

- Szydłowska-Czeriak A., Tułodzieckaa A., Szłyka E., A silver nanoparticle-based method for determination of antioxidant capacity of rapeseed and its products, *Analyst* **137** (2012) 3750-3759.
- Tsogas G.Z., Giokas D.L., Kapakoglou N.I., Efstathiou D.E., Vlessidis A.G., Dimitrellos G.N., Georgiadis T.D., Charchanti A.V., Land-Based Classification of Herb's Origin Based on Supervised and Unsupervised Pattern Recognition of Plant and Soil Chemical Profiling, *Anal Lett* **43** (2010) 2031–2048.
- Vilela D., Castañeda R., González M.C., Mendoza S., Escarpa A., Fast and reliable determination of antioxidant capacity based on the formation of gold nanoparticles, *Microchim Acta* **182** (2015) 105-111.
- Vilela D., González M.C., Escarpa A., (Bio)-synthesis of Au NPs from soy isoflavone extracts as a novel assessment tool of their antioxidant capacity, *RSC Adv* **4** (2014), pp. 3075–3081.
- Vilela D., González M.C., Escarpa A., Gold-nanosphere formation using food sample endogenous polyphenols for in-vitro assessment of antioxidant capacity, *Anal Bioanal Chem* **404** (2012) 341–349.
- Vilela D., González M.C., Escarpa A., Nanoparticles as analytical tools for in-vitro antioxidant-capacity assessment and beyond, *Trends Anal Chem* **64** (2015) 1–16.
- Vilela D., González M.C., Escarpa A., Sensing colorimetric approaches based on gold and silver nanoparticles aggregation: Chemical creativity behind the assay. A review, *Anal Chim Acta* **751** (2012) 24–43.

Warriner K., Reddy S.M., Namvar A., Neethirajan S., Developments in nanoparticles for use in biosensors to assess food safety and quality, *Trends in Food Science & Technology* **40** (2014) 183-199.

Yan N., Yuan Y., Dyson P.J., Rhodium nanoparticle catalysts stabilized with a polymer that enhances stability without compromising activity, *Chem Commun* **47** (2011) 2529–2531.

Zhu H., Zhang M., Cai S.Y., Ting Y., Wang C.P., Bao S.Y., Zou M.L., Du M.L., In situ growth of Rh nanoparticles with controlled sizes and dispersions on the cross-linked PVA–PEI nanofibers and their electrocatalytic properties towards H₂O₂, *RSC Adv* **4** (2014) 794-804.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

ΧΡΩΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ ΚΑΙ ΓΛΥΚΟΖΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΡΟΔΙΟΥ ΩΣ ΕΝΖΥΜΟΜΙΜΗΤΙΚΑ ΤΗΣ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗΣ.

Περίληψη

Στο κεφάλαιο αυτό, περιγράφεται για πρώτη φορά η ιδιότητα των νανοσωματιδίων ροδίου (RhNPs) να μιμούνται την δράση της υπεροξειδάσης. Συγκεκριμένα, τα RhNPs χρησιμοποιήθηκαν για να καταλύσουν την οξείδωση του υποστρώματος υπεροξειδάσης 3,3',5,5' τετραμεθυλβενζιδίνης (TMB) παρουσία H_2O_2 , παράγοντας ένα προϊόν κυανού χρώματος με μέγιστη απορρόφηση στα 652 nm. Κινητικές μελέτες της καταλυτικής δράσης των RhNPs έδειξαν ότι ο μηχανισμός καταλύσεως είναι σύμφωνος με την τυπική κινητική Michaelis-Menten και ακολούθησαν έναν μηχανισμό διπλής αντικατάστασης (γνωστός και ως μηχανισμός τύπου "πινγκ-πονγκ"). Οι υπολογισθείσες κινητικές παράμετροι έδειξαν ότι τα RhNPs εμφανίζουν ισχυρή συγγένεια τόσο για το υπόστρωμα υπεροξειδάσης TMB όσο και για το H_2O_2 , τα οποία ήταν καλύτερα από άλλα νανοϋλικά που έχουν χρησιμοποιηθεί ως μιμητικά της υπεροξειδάσης καθώς και από το φυσικό ένζυμο της υπεροξειδάσης των αγριοραφανίδων (Horseradish Oxidase-HRP). Επιπλέον, τα RhNPs δεν αντιδρούν με τα κύρια συστατικά της μήτρας των δειγμάτων όπως τα σάκχαρα, οι θειόλες, τα αμινοξέα και το ασκορβικό οξύ. Βάσει αυτών των δεδομένων, τα RhNPs χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη μιας ευαίσθητης και εκλεκτικής χρωματομετρικής μεθόδου για τον προσδιορισμό του H_2O_2

και της γλυκόζης στη γραμμική περιοχή από 1-100 μM και 5-125 μM , αντίστοιχα. Τα όρια ανίχνευσης υπολογίστηκαν κάτω από 0,75 μM . Η μέθοδος εφαρμόστηκε επιτυχώς στον προσδιορισμό του H_2O_2 σε φαρμακευτικά σκευάσματα και της γλυκόζης σε αναψυκτικά και πλάσμα αίματος με πολύ καλή ακρίβεια (σφάλμα <6%), υψηλές ανακτήσεις (96,5-103,7%) και ικανοποιητική επαναληψιμότητα (<6,3%).

3.1 Εισαγωγή

Τα φυσικά ένζυμα είναι εξαιρετικά αποτελεσματικά στην κατάλυση πολλών βιοχημικών αντιδράσεων με υψηλή εξειδίκευση και αποτελεσματικότητα [Wolfenden R., et al., 2001]. Ως αποτέλεσμα, τα ένζυμα έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως ως βιοκαταλυτικοί ιχνηθέτες σε ένα ευρύ φάσμα βιοαισθητήρων για βιοϊατρικές, φαρμακευτικές, γεωργικές και περιβαλλοντικές εφαρμογές [Wei H., et al., 2013]. Ωστόσο, η πρακτική εφαρμογή των φυσικών ενζύμων απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή λόγω της χαμηλής λειτουργικής τους σταθερότητας, της ευαισθησίας τους στις περιβαλλοντικές συνθήκες, των δυσκολιών στην ανάκτηση και του υψηλού κόστους καθαρισμού [Garg B., et al., 2015, Rauf S., et al., 2016].

Για να ξεπεραστούν αυτά τα μειονεκτήματα, εκτεταμένες ερευνητικές προσπάθειες έχουν αφιερωθεί στην ανάπτυξη βιοαισθητήρων που χρησιμοποιούν συνθετικά υλικά ως τεχνητά ένζυμα. Μεταξύ της ποικιλίας των υλικών που χρησιμοποιήθηκαν για να προσομοιώσουν τη λειτουργία των φυσικών ενζύμων, όπως για παράδειγμα τα τεχνητά ριβοσώματα [Fiammengo R., et al., 2005], τα νανοϋλικά έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον των ερευνητών. Έχει παρατηρηθεί ότι πολλά νανοϋλικά μπορούν να εμφανίζουν δραστηριότητα που προσομοιώνει την καταλυτική λειτουργία των φυσικών ενζύμων και προσφέρουν μια σειρά από πλεονεκτήματα έναντι των φυσικών ενζύμων, όπως το χαμηλότερο κόστος, την υψηλή σταθερότητα, την ευκολία σύνθεσης και την ευκολία καταλυτικής δράσης [Wei H., et al., 2013, Breslow R., 1995, Lin Y., et al., 2014].

Μεταξύ των νανοσωματιδίων που έχουν αναπτυχθεί ως μιμητικά της δράσης των ενζύμων είναι νανοσωματίδια οξειδίων των μετάλλων, νανοσωματίδια ευγενών

μετάλλων, νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα καθώς και υβριδικά νανοϋλικά. Κάθε ένα από αυτά τα νανοϋλικά έχει διαφορετικά πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα έναντι των παραδοσιακών βιολογικών καταλυτών. Εκτενή άρθρα ανασκόπησης έχουν δημοσιευθεί τα οποία παρουσιάζουν λεπτομερώς όλα τα τελευταία ευρήματα, τους μηχανισμούς δράσης καθώς και την αναλυτική χρησιμότητα των νανοϋλικών σε ένα ευρύ φάσμα βιοαναλυτικών εφαρμογών [Wolfenden R., et al., 2001, Wei H., et al., 2013, Garg B., et al., 2015, Rauf S., et al., 2016, Fiammengo R., et al., 2005, Breslow R., 1995, Lin Y., et al., 2014, Garg B., et al., 2016]. Από τις μελέτες αυτές έγινε επίσης σαφές ότι μία από τις προκλήσεις που συνδέονται με τη χρήση νανοϋλικών ως ενζυμομιμητικά είναι η εκλεκτικότητα και η εξειδίκευσή τους [Wei H., et al., 2013, Lin Y., et al., 2014, Nasir M., et al., 2017]. Έχει αποδειχθεί ότι πολλά νανοϋλικά, λόγω της μεγάλης ειδικής επιφάνειας, μπορούν να διευκολύνουν την προσρόφηση των συστατικών της μήτρας στην επιφάνεια των σωματιδίων προκαλώντας θετικά λανθασμένα (false-positive) ή αρνητικά λανθασμένα (false-negative) αποτελέσματα [Nasir M., et al., 2017, Wang C.I., et al., 2012]. Για παράδειγμα, η ενζυμική μιμητική δράση των νανοσωματιδίων (NPs) των ευγενών μετάλλων (όπως το νανοδομημένο κράμα Au/AgNPs, νανουβρίδια Au/Pt ή υβρίδια PtNPs / οξειδίου του γραφενίου) έχει αποδειχθεί ότι καταστέλλεται σημαντικά παρουσία κοινών βιομορίων, όπως οι αλβουμίνες [Wang C-I., et al., 2012], οι βιοθειόλες [Pan N., et al., 2017, Lin XQ., et al., 2015, He W., et al., 2017, Hsu K., et al., 2014] και τα σουλφίδια [Hsu K., et al., 2014, Liu J., et al., 2012], τα οποία μπορούν να δεσμευτούν στην επιφάνεια των σωματιδίων και να περιορίσουν την καταλυτική τους δράση. Επίσης, το ασκορβικό οξύ έχει αποδειχθεί ότι παρεμποδίζει τον προσδιορισμό της γλυκόζης σε βιολογικά δείγματα όταν χρησιμοποιούνται διμεταλλικά νανοσωματίδια μετάλλου-

άνθρακα ως μιμητικά της υπεροξειδάσης [Kotou NA., 2010]. Για να ξεπεραστεί η προσρόφηση των ουσιών που παρεμποδίζουν, πολλά νανοϋλικά απαιτούν πρόσθετα στρώματα επικάλυψης στην επιφάνειά τους, (π.χ. επικάλυψη πολυαιθυλενογλυκόλης, σιλάνια, η δεξτράνη κλπ.) [Lin Y., et al., 2014, Gao L., et al., 2007, Ponlakheth K., et al., 2016, Dominguez-Medina S., et al., 2012, Drozd M., et al., 2015]. Αυτές οι επικαλύψεις αποσκοπούν όχι μόνο στον περιορισμό της προσβασιμότητας των παρεμποδιζόντων ενώσεων αλλά και στη βελτίωση της σταθερότητας των NPs και στην αύξηση της συγγένειας για τον αναλύτη στόχο κατ' αναλογία με τα φυσικά ένζυμα τα οποία τυπικά αλληλεπιδρούν μέσω πολλαπλών θέσεων αντίδρασης [Lin Y., et al., 2014]. Ο σχηματισμός επιπρόσθετων στρώσεων επικάλυψης, ωστόσο, απαιτεί εξειδικευμένες συνθετικές διεργασίες και μερικές φορές καθιστά αυξημένο το κόστος για την επαναλήψιμη σύνθεση νανοϋλικών με σταθερά δομικά χαρακτηριστικά και ιδιότητες. Σε μερικές περιπτώσεις μάλιστα, ο σχηματισμός επικαλύψεων στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων έχει αποδειχθεί ότι περιορίζει την πρόσβαση στην καταλυτικά ενεργή επιφάνεια αντί να την ενισχύει [Zhang W., et al., 2012, Muench F., et al., 2012].

Στο κεφάλαιο αυτό μελετήθηκαν, για πρώτη φορά, τα νανοσωματίδια ροδίου (RhNPs) ως μιμητικά της υπεροξειδάσης για την ανίχνευση του H_2O_2 και της γλυκόζης. Το Rh είναι ένα αδρανές μέταλλο με εξαιρετική ανθεκτικότητα κάτω από δραστικές συνθήκες αντίδρασης και εξαιρετική καταλυτική δραστικότητα σε αντιδράσεις οξείδωσης [Yuan Y., et al., 2012, Gatselou VA., et al., 2015]. Στα προηγούμενα κεφάλαια διαπιστώθηκε ότι τα RhNPs εμφανίζουν εξαιρετική ηλεκτροκαταλυτική απόκριση στο H_2O_2 , δεν επηρεάζονται από οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, δεν εμφανίζουν δράση παρόμοια της καταλάσης και δεν αντιδρούν με κοινά βιομορία όπως

οι υδατάνθρακες, το ασκορβικό οξύ, οι βιοθειόλες και τα αμινοξέα σε φυσιολογικά επίπεδα συγκεντρώσεων [Gatselou V., et al., 2016, Jin L., et al., 2017]. Με βάση αυτά τα ευρήματα υποθέσαμε ότι τα RhNPs θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως ενζυμομιμητικά της υπεροξειδάσης με βελτιωμένη εκλεκτικότητα και ειδικότητα. Μελετήσαμε λοιπόν, την εγγενή δράση των RhNPs, για την κατάλυση της αντίδρασης του υποστρώματος υπεροξειδάσης 3,3',5,5'-τετραμεθυλβενζιδίνης (TMB) παρουσία H_2O_2 . Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που ελήφθησαν, τα RhNPs εμφανίζουν ενισχυμένη δράση παρόμοια με της υπεροξειδάσης με βάση την οποία αναπτύξαμε έναν ευαίσθητο χρωματομετρικό αισθητήρα για τον προσδιορισμό του H_2O_2 και της γλυκόζης. Σε σύγκριση με τους αισθητήρες γλυκόζης που χρησιμοποιούν υπεροξειδάση (HRP), η χρήση των RhNPs συνδυάζει τα πλεονεκτήματα της χρήσης νανοϋλικών ως μιμητικών της υπεροξειδάσης, με την μειωμένη δραστηριότητα των RhNPs έναντι άλλων συστατικών του δείγματος προσφέροντας έτσι βελτιωμένη εκλεκτικότητα. Τέλος, χρησιμοποιήσαμε αυτή την μέθοδο για τον προσδιορισμό του H_2O_2 σε προϊόντα υγιεινής καθώς και για τον προσδιορισμό της γλυκόζης σε ορό ανθρώπινου αίματος και σε αναψυκτικά με πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα όσον αφορά την εκλεκτικότητα, την ευαισθησία και την επαναληψιμότητα.

3.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.2.1 Εξοπλισμός

Χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο UV/Vis Jenway 6405 (Essex, UK) για την πραγματοποίηση μετρήσεων μοριακής απορρόφησης σε κυψελίδες χαλαζία μήκους οπτικής διαδρομής 1 cm. Ένα πεχάμετρο εφοδιασμένο με ηλεκτρόδιο υάλου (Mettler Toledo, F20) χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση του pH των διαλυμάτων.

3.2.2 Σύνθεση νανοσωματιδίων RhNPs

Συντέθηκαν RhNPs μεγέθους περίπου 7 nm σύμφωνα με την πειραματική διαδικασία που περιγράφηκε στο Κεφάλαιο 2. Πιο συγκεκριμένα, ισομοριακές ποσότητες $\text{RhCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ και κιτρικού τρινατρίου (0,5 mL, 10,0 mM) προστέθηκαν υπό ανάδευση σε 19,5 mL δις απεσταγμένου νερού και αναδεύτηκαν για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 2,5 mM NaBH_4 (0,5 mL, 0,10 M). Η ανάδευση συνεχίστηκε για άλλα 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το αιώρημα των νανοσωματιδίων του ρόδιου με επικάλυψη κιτρικών ιόντων είχε ένα σκούρο χρώμα πράσινο-καφέ και αποθηκεύτηκε σε συνθήκες περιβάλλοντος. Λεπτομερής χαρακτηρισμός των νανοσωματιδίων ροδίου παρουσιάζεται στο Κεφάλαιο 2.

3.2.3 Κινητική ανάλυση σταθερής κατάστασης

Οι κινητικές μελέτες διεξήχθησαν στους 35°C σε διαλύματα όγκου 2 mL που περιείχαν 10 mM ρυθμιστικού διαλύματος οξικού οξέος-οξικού νατρίου (pH 4,0) και διάφορες συγκεντρώσεις H_2O_2 (5 έως 500 μM) και TMB (0,1 έως 2 mM) παρουσία 175

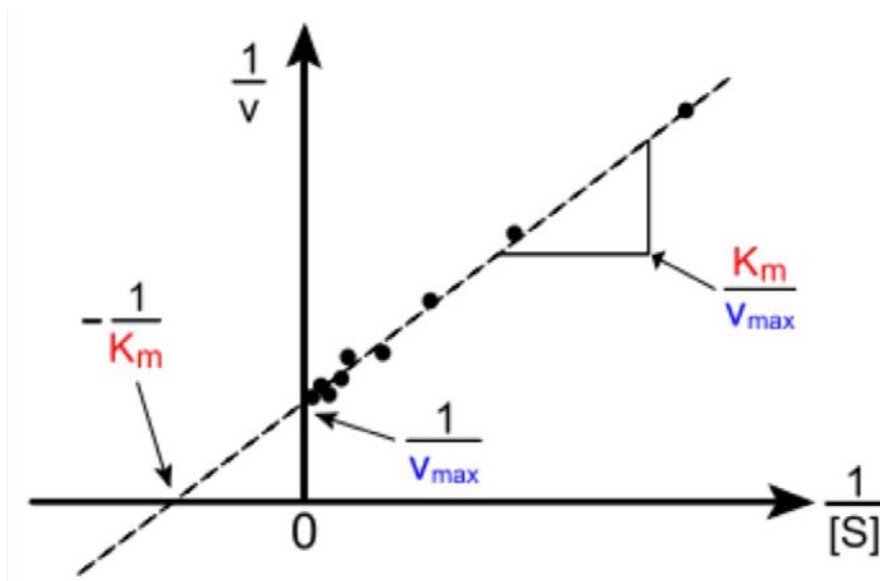
pM RhNPs. Οι κινητικές μετρήσεις έγιναν παρακολουθώντας την αλλαγή της απορρόφησης στα 652 nm ανά διάστημα 1 λεπτού. Τα δεδομένα προσαρμόστηκαν στην εξίσωση Michaelis-Menten:

$$V = (V_{\max} [S]) / (K_m + [S])$$

όπου V είναι η αρχική ταχύτητα, V_{\max} είναι ο μέγιστος ρυθμός αντίδρασης, $[S]$ είναι η συγκέντρωση του υποστρώματος και K_m είναι η σταθερά Michaelis-Menten. Οι ενζυμικές παράμετροι, V_{\max} και K_m προσδιορίστηκαν από τα γραφήματα Lineweaver-Burk, σύμφωνα με τους τύπους:

$$1 / V = K_m / (V_{\max} [S]) + 1 / V_{\max}$$

Στην **Εικόνα 3.1** παρουσιάζεται ένα τυπικό διάγραμμα Lineweaver-Burk της κινητικής μελέτης Michaelis-Menten.



Εικόνα 3.1. Τυπικό διάγραμμα Lineweaver-Burk της κινητικής μελέτης Michaelis-Menten.

3.2.4 Χρωματομετρική ανάλυση H_2O_2 χρησιμοποιώντας RhNPs

Σε 1,25 mL διαλύματος δείγματος που περιείχε διαφορετικές συγκεντρώσεις H_2O_2 (0-100 μM) προστέθηκαν 200 μL 0,1 M ρυθμιστικού διαλύματος οξικού

οξέος/οξικού νατρίου (pH = 4,0), 250 μ L 1,4 nM RhNPs (175 pM) και 300 μ L 10 mM TMB (1,5 mM). Το μείγμα επώαστηκε για 20 λεπτά στους 35°C και η απορρόφηση καταγράφηκε στα 652 nm. Η απόλυτη απορρόφηση υπολογίστηκε αφαιρώντας την απορρόφηση του τυφλού (δηλ. διάλυμα χωρίς H₂O₂).

3.2.5 Χρωματομετρική ανάλυση της γλυκόζης χρησιμοποιώντας RhNPs ως ενζυμομιμητικά της υπεροξειδάσης

Η ανίχνευση της γλυκόζης διεξήχθη σε δύο χωριστά στάδια. Αρχικά, χρησιμοποιήσαμε γλυκόζη οξειδάση (GOx) για την κατάλυση της οξείδωσης της γλυκόζης ώστε να παραχθεί γλυκονικό οξύ και H₂O₂. Στο δεύτερο στάδιο, το παραγόμενο H₂O₂ ανιχνεύθηκε χρησιμοποιώντας την αντίδραση χρωματισμού TMB που καταλύθηκε από τα RhNPs. Η πειραματική διαδικασία έχει ως εξής: 50 μ L GOx (5 mg/mL) προστέθηκαν σε 1,2 mL υδατικού διαλύματος δείγματος (pH = 6-7) που περιείχε διάφορες συγκεντρώσεις γλυκόζης και επώαστηκαν στους 35°C για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, προσθέσαμε 200 μ L ρυθμιστικού διαλύματος οξικού οξέος/οξικού νατρίου (pH = 4,0), 250 μ L 1,4 nM RhNPs (175 pM) και 300 μ L 10 mM TMB (1,5 mM). Το μίγμα επώαστηκε στους 35°C για 20 λεπτά και η απορρόφηση του διαλύματος καταγράφηκε στα 652 nm έναντι τυφλού δείγματος (δηλ. απουσία γλυκόζης).

3.2.6 Πραγματικά δείγματα

Δείγματα πλάσματος αίματος που συλλέχθηκαν από υγιείς εθελοντές φυγοκεντρήθηκαν (10.000 στροφές ανά λεπτό, 10 λεπτά) για να απομακρυνθούν πιθανά μεγάλα συσσωματώματα [Jin, et al., 2017] και αραιώθηκαν με απεσταγμένο νερό

(περίπου 100-250 φορές). Τα ενεργειακά ποτά (energy drinks) αγοράστηκαν από supermarket και διηθήθηκαν μέσω μεμβράνης κυτταρίνης με πόρους 0,25 μικρά. Στη συνέχεια, αραιώθηκαν με απιονισμένο νερό (τουλάχιστον 100 φορές). Παρασκευάστηκαν διαλύματα τεχνητού πλάσματος αίματος (ABP) ως ακολούθως [Wang N., et al., 2015] : 137,5 mM χλωριούχο νάτριο, 4,2 mM όξινο ανθρακικό νάτριο, 3,0 mM χλωριούχο κάλιο, 0,5 mM όξινο φωσφορικό νάτριο, 0,5 mM χλωριούχο μαγνήσιο, 2,64 mM χλωριούχο ασβέστιο και 0,5 θειικό νάτριο αναμίχθηκαν σε απεσταγμένο νερό και το pH ρυθμίστηκε στην τιμή 7,4. Έπειτα, προστέθηκε γλυκόζη (5 mM), ουρία (3,0 mM), ουρικό οξύ (220 μM), 1,0 mM BSA και μείγμα μερικών από τα συνηθέστερα αμινοξέα που υπάρχουν στο πλάσμα του αίματος (0,5 mM γλουταμίνης, γλυκίνης, βαλίνης, αργινίνης, λυσίνης και αλανίνης, συνολικής συγκέντρωσης 3,0 mM) και 250 μM κυστεΐνης, η οποία είναι η πλέον άφθονη βιοθειόλη στο πλάσμα αίματος. Πριν από την ανάλυση, το ABP αραιώθηκε 150 φορές με απεσταγμένο νερό.

3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

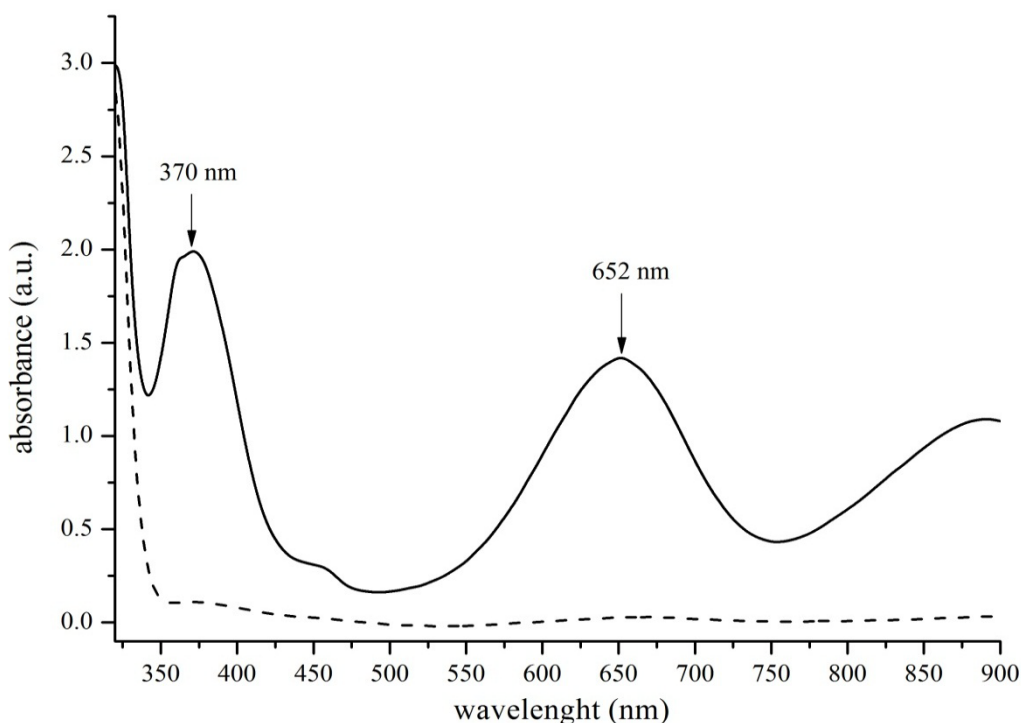
3.3.1 Επιλογή των RhNPs ως ενζυμομιμητικών της υπεροξειδάσης

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η ικανότητα πολλών μιμητικών νανοϋλικών της υπεροξειδάσης, ειδικά των νανοσωματιδίων των ευγενών μετάλλων, μπορεί να επηρεαστεί αρνητικά μέσω μη ειδικής προσρόφησης κοινών (βιο)μορίων όπως το ασκορβικό οξύ, οι θειόλες, τα σουλφίδια ή τα δισουλφίδια και οι πρωτεΐνες [Wang C-I., et al., 2012, Pan N., et al., 2017, Lin XQ., et al., 2015, He W., et al., 2017, Hsu K., et al.,

2014, Liu J., et al., 2012, Kotov NA., 2010]. Το Rh και τα RhNPs από την άλλη πλευρά, δεν αντιδρούν με αυτά τα βιομόρια, καθώς και άλλες ενώσεις όπως αμινοξέα και υδατάνθρακες, σε φυσιολογικά επίπεδα συγκεντρώσεων [Jin L., et al., 2017]. Επιπλέον, τα RhNPs παρουσιάζουν εξαιρετική ηλεκτροκαταλυτική απόκριση στο H_2O_2 και δεν εμπλέκονται σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις [Gatselou V., et al., 2016, Jin L., et al., 2017]. Τα RhNPs επιδεικνύουν επίσης μοναδικές καταλυτικές ιδιότητες σε σύγκριση με άλλα νανοσωματίδια, ιδιαίτερα σε υδρογόνωση, καρβονυλίωση, υδροφορμυλίωση και αντιδράσεις οξείδωσης [Yuan Y., et al., 2012, Gatselou V.A., et al., 2015]. Βάσει αυτών των χαρακτηριστικών θεωρήσαμε ότι τα RhNPs θα μπορούσαν να είναι ένα χρήσιμο υλικό ως μιμητικά της υπεροξειδάσης αξιοποιώντας τόσο την υψηλή καταλυτική δραστηριότητα όσο και τη χαμηλή αντίδραση με κοινά βιομόρια και άλλα συνυπάρχοντα είδη.

3.3.2 Δράση των RhNPs παρόμοια με της υπεροξειδάσης

Αρχικά, αξιολογήθηκε η δράση των RhNPs στην κατάλυση του TMB ως χρωμοφόρο υπόστρωμα υπεροξειδάσης, παρουσία H_2O_2 . Επαληθεύτηκε ότι το H_2O_2 οξειδώνει το TMB παρουσία των RhNPs από την εμφάνιση μπλε-κυανού χρώματος με μέγιστη απορρόφηση στα 652 nm (**Εικόνα 3.2** - συμπαγής γραμμή), η οποία αποδίδεται στο σχηματισμό του μπλε συμπλόκου 3, 3', 5, 5'-τετραμεθυλοβενζιδίνη διμίνη (TMBDI) [Garg B., et al., 2015, Liu Y., et al., 2014].



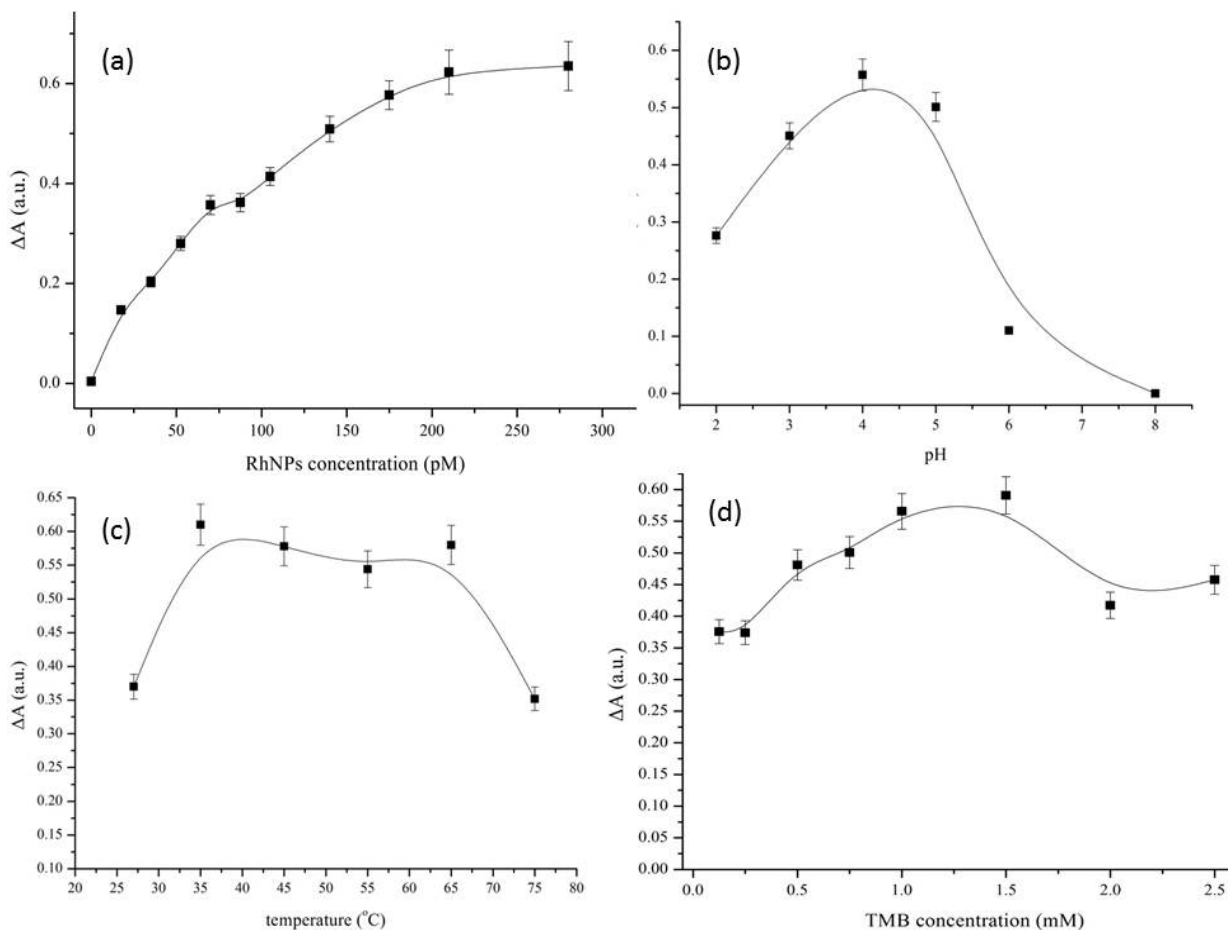
Εικόνα 3.2. Τυπικά φάσματα UV-Vis της οξείδωσης του TMB από το H_2O_2 που καταλύεται από RhNPs (συμπαγής γραμμή) και απουσία των RhNPs ως καταλύτης (διακεκομμένη γραμμή). Πειραματικές συνθήκες : TMB 1,5 mM, H_2O_2 100 μ M, RhNPs 140 pM, pH = 4.

Επιπλέον, η καταλυτική οξείδωση του TMB από το H_2O_2 επιβεβαιώθηκε από (α) την εμφάνιση μιας δεύτερης κορυφής απορρόφησης με μέγιστο μήκος κύματος στα 370 nm (**Εικόνα 3.2** - συμπαγής γραμμή) που είναι χαρακτηριστική της αντίδρασης οξείδωσης TMB [Liu Y., et al., 2014], β) την αλλαγή του χρώματος του διαλύματος από μπλε σε κίτρινο μετά την προσθήκη του H_2SO_4 , με μέγιστο μήκος κύματος στα 450 nm, το οποίο είναι χαρακτηριστικό του σχηματισμού μιας κίτρινης διμίνης [Liu Y., et al., 2014, Josephy PD., et al., 1982] και γ) αντιδράσεις απουσία RhNPs οι οποίες έδειξαν αμελητέες μεταβολές χρώματος ακόμη και σε μεγαλύτερους χρόνους επώασης (**Εικόνα 3.2-τελεία**), υποδηλώνοντας ότι τα RhNPs που δρουν παρόμοια με τη φυσική υπεροξείδωση, είναι υπεύθυνα για την οξείδωση του TMB.

3.3.3 Βελτιστοποίηση των πειραματικών συνθηκών

Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών με φυσική υπεροξειδάση καθώς και νανοϋλικών ως μιμητικών της υπεροξειδάσης, διαπιστώθηκε ότι η απόκριση της καταλυτικής δράσης των RhNPs ως μιμητών υπεροξειδάσης επηρεάζεται έντονα από τις συνθήκες αντίδρασης, όπως η συγκέντρωση του καταλύτη, το pH του διαλύματος, η θερμοκρασία, ο χρόνος επώασης και οι συγκεντρώσεις του H₂O₂ και TMB [Ponlakheth K., et al., 2016, Chang Q., et al., 2009, Ding C., et al., 2016, Ju Y., et al., 2013, Jiao X., et al., 2012, Drozd M., et al., 2016, Zhao K., 2015, Chau LY., et al., 2016]. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της **Εικόνας 3.3α**, η απορρόφηση αυξήθηκε με την αύξηση της συγκέντρωσης του καταλύτη και έφθασε σε ένα πλατώ μετά από 175 pM. Επιπλέον, τα RhNPs βρέθηκαν να εμφανίζουν πολύ ισχυρή ηλεκτροκαταλυτική δράση σε ασθενώς όξινα διαλύματα και υπόθερμες συνθήκες. Συγκεκριμένα, η βέλτιστη τιμή pH βρέθηκε να είναι 4,0 (**Εικόνα 3.3β**), η οποία είναι πολύ κοντά στις τιμές άλλων νανο-μιμητικών της υπεροξειδάσης καθώς και της φυσικής HRP [Dominguez-Medina S., et al., 2012, Liu Y., et al., 2014, Ju Y., et al., 2013, Jiao X., et al., 2012]. Σε αυτό το pH η μία αμινομάδα του μορίου TMB είναι πρωτονιωμένη γεγονός που ευνοεί την υδατοδιαλυτότητά του και ενισχύει την καταλυτική του δράση. Αντίθετα, σε χαμηλότερες τιμές pH και οι δύο αμινομάδες είναι πρωτονιωμένες, γεγονός που καθιστά το υπόστρωμα ανθεκτικό στην καταλυτική οξείδωση, ενώ σε υψηλότερες τιμές pH το TMB έχει περιορισμένη διαλυτότητα [Drozd M., et al., 2016]. Η απορρόφηση στα 652 nm αποδίδει τη μέγιστη ένταση στους 35°C (**Εικόνα 3.3ε**), η οποία είναι κοντά στη θερμοκρασία που αναφέρεται για την HRP και άλλα ενζυμομιμητικά νανοϋλικά της υπεροξειδάσης [Kotov NA., 2010, Kappi F.A., et al., 2017, Chang Q., et al., 2009, Zhao

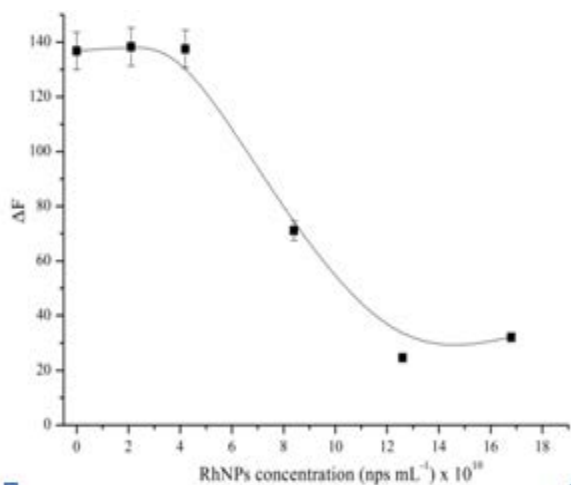
K., et al., 2015]. Για την συγκέντρωση του υποστρώματος, παρατηρήθηκε ότι η μεγαλύτερη δραστικότητα των RhNPs επιτυγχάνεται με την προσθήκη 1,5 mM TMB (**Εικόνα 3.3d**), ενώ υψηλότερες συγκεντρώσεις υποστρώματος ανέστειλαν την καταλυτική δράση. Παρόμοια συμπεριφορά του υποστρώματος παρατηρήθηκε και σε προηγούμενες μελέτες [He W., et al., 2017, Chau LY., et al., 2016, Dong Y-L., et al., 2012]. Η βέλτιστη συγκέντρωση του TMB είναι υψηλότερη από ότι σε προηγούμενες μελέτες [He W., et al., 2017, Kappi F.A., et al., 2017, Liu Y., et al., 2014, Ju Y., et al., 2013, Jiao X., et al., 2012, Drozd M., et al., 2016, Zhao K., et al., 2015, Chau LY., et al., 2016, Dong Y-L., et al., 2012], αλλά εξασφαλίζει ότι παραμένει στο διάλυμα μια επαρκώς υψηλή συγκέντρωση μη οξειδωμένου TMB. Υπό αυτές τις συνθήκες επιτυγχάνεται ισορροπία μεταξύ της κατιονικής ρίζας TMB και του μπλε συμπλόκου που εξασφαλίζει τη σταθερότητα του μπλε συμπλόκου. Αντίθετα, σε χαμηλές συγκεντρώσεις TMB έχει αναφερθεί ότι η ισορροπία μετατοπίζεται προς το σχηματισμό διαμίνης εις βάρος του μπλε συμπλόκου [Drozd M., et al., 2016].



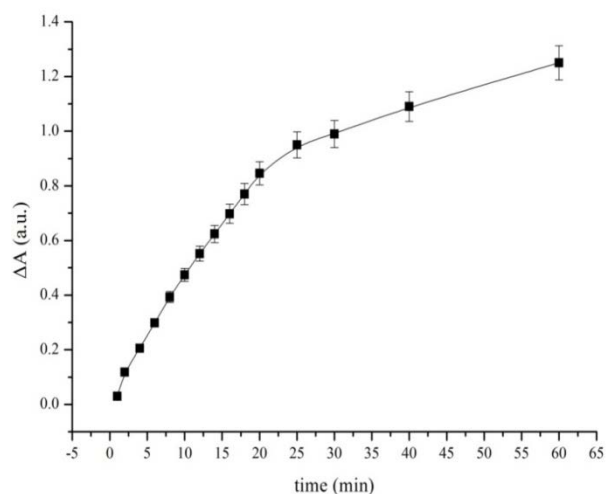
Εικόνα 3.3. Η επίδραση των πειραματικών παραμέτρων (α) συγκέντρωση των RhNPs (β) pH του διαλύματος (γ) θερμοκρασία και (δ) συγκέντρωση της TMB στην ενζυμομιμητική δράση των RhNPs. Οι απεικονιζόμενες ράβδοι αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα που προέρχεται από τρεις επαναλαμβανόμενες μετρήσεις.

Επίσης, μελετήθηκε ο χρόνος αντίδρασης του μίγματος στους 35°C. Από τα αποτελέσματα της **Εικόνας 3.4** παρατηρήθηκε ότι η απορρόφηση αυξάνεται γραμμικά με αύξηση του χρόνου αντίδρασης έως 20 λεπτά. Μετά από 20 λεπτά η κλίση της καμπύλης (απορρόφηση έναντι χρόνου) είναι μικρότερη, πράγμα που σημαίνει ότι σε μεγαλύτερους χρόνους επώασης η απορρόφηση αυξάνεται με μικρότερο ρυθμό. Ως εκ τούτου, χρησιμοποιήθηκε ως βέλτιστος χρόνος επώασης τα 20 λεπτά.

a)

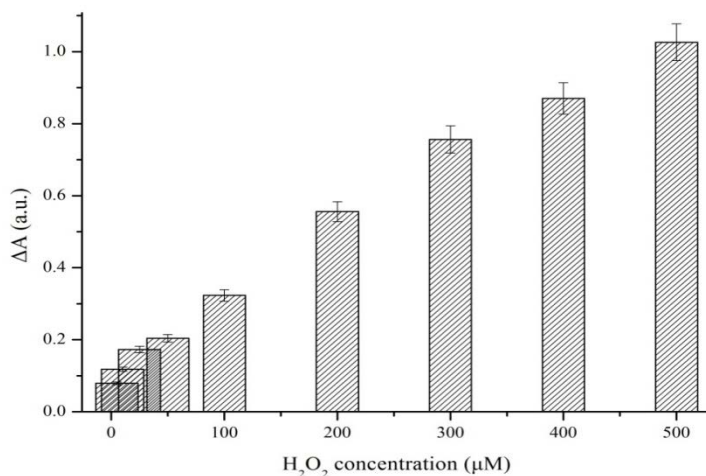


b)



Εικόνα 3.4. a) Η επίδραση των RhNPs στο σχηματισμό ρίζας υδροξυλίου με τερεφθαλικό οξύ ως ανιχνευτή φθορισμού. ΔF ορίζεται ως η διαφορά μεταξύ της ολικής έντασης φθορισμού του διαλύματος και της έντασης μόνο από τα RhNPs. b) Επίδραση του χρόνου αντίδρασης στην ενζυμομιμητική δράση των RhNPs.

Τέλος, δεν παρατηρήθηκε αναστολή της καταλυτικής δράσης των RhNPs σε συγκεντρώσεις H_2O_2 έως 500 μM , υποδηλώνοντας ότι τα RhNPs παρουσιάζουν σταθερή καταλυτική δράση ακόμα και σε υψηλές συγκεντρώσεις H_2O_2 (**Εικόνα 3.5**).

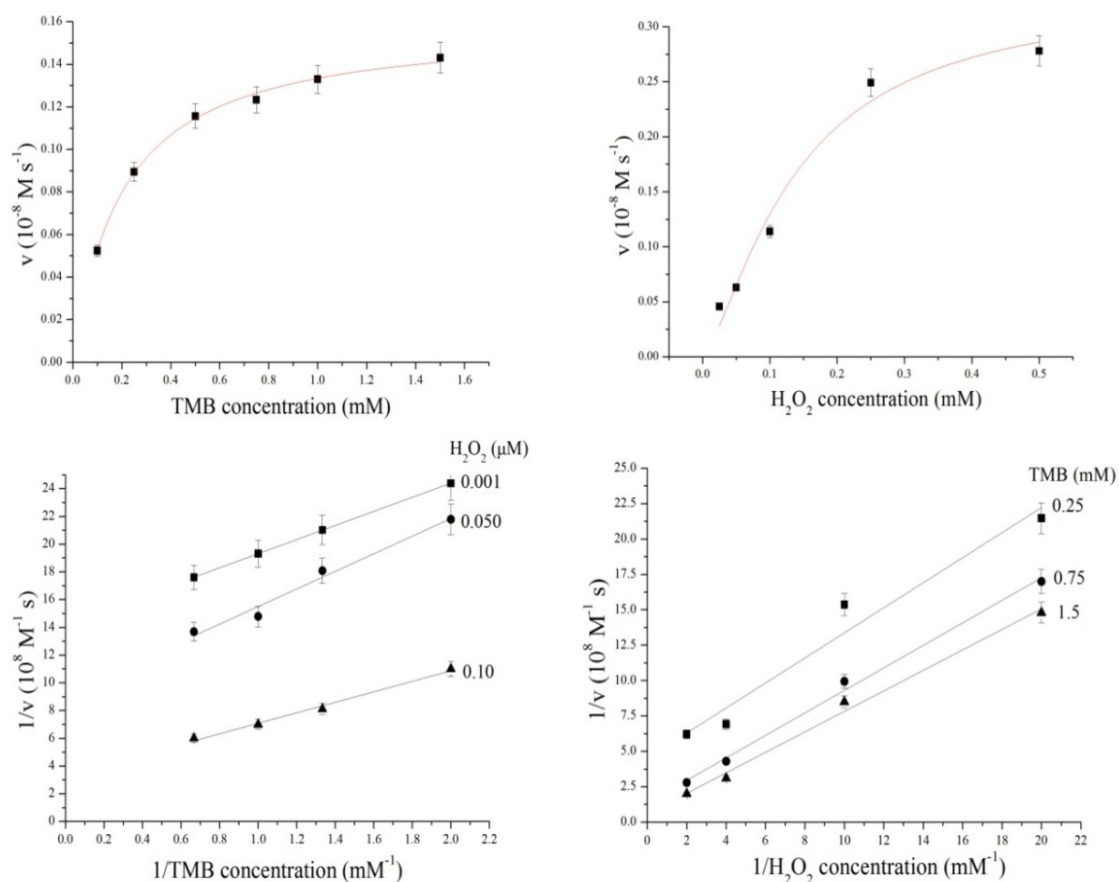


Εικόνα 3.5. Καταλυτική δράση των RhNPs με αυξανόμενες συγκεντρώσεις H_2O_2 σε σταθερό χρόνο αντίδρασης 10 λεπτών στους 35°C. Άλλες πειραματικές συνθήκες : 1,5 mM TMB, pH=4.

3.3.4 Κινητικές μελέτες και μηχανισμός αντίδρασης

Υπό τις βέλτιστες συνθήκες χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση Michaelis-Menten για την μελέτη των κινητικών παραμέτρων που σχετίζονται με την καταλυτική δράση των RhNPs μεταβάλλοντας τη συγκέντρωση του H_2O_2 (25-750 μM) και του υποστρώματος TMB (0,1-1,5 mM).

Χρησιμοποιήθηκε η ένταση απορρόφησης στα 652 nm για τον υπολογισμό εκ νέου της συγκέντρωσης του TMB από τα δεδομένα απορρόφησης χρησιμοποιώντας έναν γραμμομοριακό συντελεστή απορρόφησης $39000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ για το προϊόν οξείδωσης που προέρχεται από το TMB [Zhang W., et al., 2012, Liu Y., et al., 2014]. Ο ρυθμός αντίδρασης σε διάφορες συγκεντρώσεις υποστρώματος (δηλαδή H_2O_2 ή TMB) ελήφθη με υπολογισμό των κλίσεων των τιμών απορρόφησης έναντι του χρόνου. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.6**, παρατηρήθηκε μία τυπική καμπύλη Michaelis-Menten.



Εικόνα 3.6. Κινητική μελέτη καθαρής κατάστασης και καταλυτικός μηχανισμός των RhNPs. (α) Διάγραμμα αρχικής ταχύτητας έναντι συγκέντρωσης H_2O_2 σε σταθερή συγκέντρωση TMB 1,5 mM. (β) Διάγραμμα αρχικής ταχύτητας έναντι συγκέντρωσης TMB σε σταθερή συγκέντρωση H_2O_2 0,1 mM. (γ) Διπλά-αντίστροφο διάγραμμα αρχικής ταχύτητας έναντι συγκέντρωσης TMB σε 3 διαφορετικές σταθερές συγκεντρώσεις H_2O_2 (0,001, 0,05 και 0,1 mM). (δ) Διπλά-αντίστροφο διάγραμμα αρχικής ταχύτητας έναντι συγκέντρωσης H_2O_2 σε 3 διαφορετικές σταθερές συγκεντρώσεις TMB (0,25, 0,75 και 1,5 mM). Άλλες πειραματικές συνθήκες: 175 μM RhNPs σε 2 mL 0,01M NaAc, pH 4, στους 35°C.

Χρησιμοποιώντας τα διπλά-αντίστροφα γραφήματα Lineweaver-Burk υπολογίσαμε τις τιμές της σταθεράς Michaelis-Menten και την μέγιστη ταχύτητα αντίδρασης (V_{\max}). Το K_m υποδηλώνει τη συγγένεια του ενζύμου με το υπόστρωμα (δηλ. μια μικρότερη τιμή υποδηλώνει υψηλότερη συγγένεια) ενώ το V_{\max} είναι ένδειξη της

καταλυτικής δραστηριότητας (δηλ. αυξημένη V_{max} υποδηλώνει υψηλή καταλυτική δραστηριότητα). Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον **Πίνακα 3.1**.

Πίνακας 3.1. Κινητικές παράμετροι της αντίδρασης οξειδωσης TMB/H₂O₂ καταλυόμενης από RhNPs [Ponlakheth K., et al., 2016].

	Υπόστρωμα	[E] (pM) ^b	K _m (mM)	V _{max} (Ms ⁻¹)	K _{cat} (s ⁻¹) ^c
RhNPs	TMB	175	0.198	6.78×10 ⁻⁸	387
	H ₂ O ₂	175	0.099	1.15×10 ⁻⁷	657
HRP ^a	TMB	25	0.434	10×10 ⁻⁸	4000
	H ₂ O ₂	25	3.70	8.7×10 ⁻⁸	3480

^a[Gao L., et al., 2007], ^b[E] είναι η συγκέντρωση του καταλύτη, ^cK_{cat} = V_{max} / [E].

Η σύγκριση των τιμών K_m και V_{max} που αναφέρονται στη βιβλιογραφία με άλλα νανοϋλικά παρουσιάζεται στον **Πίνακα 3.2**. Η τιμή K_m των RhNPs με TMB ως υπόστρωμα είναι χαμηλότερη από εκείνη που αναφέρθηκε για την HRP (σχεδόν 2 φορές) υποδηλώνοντας ότι τα RhNPs έχουν υψηλότερη δραστηριότητα για το TMB από την HRP. Η τιμή του K_m με H₂O₂ ως υπόστρωμα είναι περίπου 25 φορές χαμηλότερη από εκείνη της HRP, πράγμα που υποδηλώνει ότι τα RhNPs εμφανίζουν ισχυρή δραστηριότητα ως προς το H₂O₂. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι τιμές K_m είναι από τις χαμηλότερες που αναφέρονται στη βιβλιογραφία τόσο για TMB όσο και για H₂O₂, πράγμα που υποδηλώνει ότι τα RhNPs εμφανίζουν υψηλή δραστηριότητα και για τα δύο υποστρώματα. Αντίθετα, οι τιμές K_m που λαμβάνονται συνήθως από ενζυμομιμητικά

νανοϋλικά παρέχουν βελτίωση (σε σύγκριση με τις τιμές K_m που λαμβάνονται από την HRP) σε ένα από τα δύο υποστρώματα (**Πίνακας 3.2**)

Πίνακας 3.2. Σύγκριση των κινητικών παραμέτρων των RhNPs με εκείνες των προηγούμενων αναφερθέντων μιμητικών νανοϋλικών υπεροξειδάσης.

Νανοϋλικά	Υπόστρωμα	K_m (mM)	V_{max} ($10^{-8} Ms^{-1}$)	Αναφορά
GO-Fe ₃ O ₄	TMB	0,43	13,08	Dong Y-L., et al., 2012
	H ₂ O ₂	0,71	5,31	
Fe ₃ S ₄	TMB	0,160	1,146	Ding C., et al., 2016
	H ₂ O ₂	1,158	2,168	
ZnFe ₂ O ₄	TMB	0,85	13,31	Su L. et al., 2012
	H ₂ O ₂	1,66	7,74	
Fe ₃ O ₄	TMB	0,098	3,44	Gao L., et al., 2007
	H ₂ O ₂	154	9,78	
PtNPs/rGO	TMB	0,0806	46,5	ChauLY., et al., 2016
	H ₂ O ₂	935	378	
PtNPs	TMB	0,120	126	Gao Z., et al., 2015
	H ₂ O ₂	769	185	
RuO ₂	TMB	0,236	19	Deng H., et al., 2012
	H ₂ O ₂	212	20,5	
Cu ₂ (OH) ₃ ClCeO ₂	TMB	12,36	10,62	Wang N., et al., 2015
	H ₂ O ₂	11,61	8,15	
PEG-MNPs	TMB	0,187	59	Shin HY., et al., 2017
	H ₂ O ₂	30	58000	
RhNPs	TMB	0,198	6,78	RhNPs
	H ₂ O ₂	0,099	11,5	(αυτήημελέτη)

GO: Οξειδιοτυγραφενίου, PEG: πολυαιθυλενογλυκόλη, MNP: Μαγνητικά νανοσωματίδια, rGO: ανηγμένο οξείδιο του γραφενίου.

Με βάση αυτά τα δεδομένα, υπολογίσθηκε ο καταλυτικός αριθμός μετατροπής (K_{cat}) ο οποίος εκφράζει τη μέγιστη απόδοση του καταλύτη (δηλ. μεγαλύτερο K_{cat} υποδεικνύει υψηλότερη καταλυτική δραστηριότητα). Οι τιμές K_{cat} των RhNPs με TMB και H_2O_2 ως υποστρώματα ήταν $4 \times 10^2 \text{ (s}^{-1}\text{)}$ και $6,57 \times 10^2 \text{ (s}^{-1}\text{)}$, αντίστοιχα, οι οποίες είναι χαμηλότερες από εκείνες που αναφέρθηκαν για την HRP ($4 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ και $3,48 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$, αντίστοιχα). Αυτό πιθανώς να οφείλεται στο μικρό μέγεθος των νανοσωματιδίων που χρησιμοποιήθηκαν τα οποία κατά κανόνα παρουσιάζουν χαμηλότερες τιμές K_{cat} σε αντίθεση με νανοσωματίδια μεγαλύτερων διαστάσεων που δίνουν πολύ υψηλές τιμές K_{cat} [He W., et al., 2001, Su L., et al., 2012, Deng H., et al., 2012, Song Y., et al., 2010].

Όπως δείξαμε και στο κεφάλαιο 1, τα RhNPs παρουσιάζουν υψηλή ηλεκτροκαταλυτική δραστηριότητα προς την ηλεκτροχημική αναγωγή του H_2O_2 [Gatselou V., et al., 2016]. Επομένως, η φύση της ηλεκτροκαταλυτικής δραστηριότητας των RhNPs αποδίδεται στην ικανότητά τους να διευκολύνουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ TMB και του H_2O_2 . Για να μελετηθεί αν οι ρίζες υδροξυλίου (OH^\bullet) εμπλέκονται στην αντίδραση αυτή χρησιμοποιήσαμε το σύστημα τερεφθαλικού οξέος/ H_2O_2 . Το τερεφθαλικό οξύ παράγει ένα έντονα φθορίζον προϊόν (2-ύδροξυ-τερεφθαλικό οξύ) κατά την αντίδραση με τις ρίζες OH^\bullet [Kappi F.A., et al., 2017, Su L., et al., 2012]. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν ότι το καθαρό σήμα φθορισμού (που ορίζεται ως η διαφορά μεταξύ της ολικής έντασης φθορισμού του διαλύματος και της έντασης μόνο από τα RhNPs) αυξήθηκε με την αύξηση της συγκέντρωσης των RhNPs έως και τα 200 μM , αλλά ακολούθως μειώθηκε. Αυτό υποδηλώνει ότι τα RhNPs σε συγκεντρώσεις μικρότερες από 200 μM διασπύουν το H_2O_2 για να παράγουν OH^\bullet ενισχύοντας την οξείδωση του TMB. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, τα RhNPs είτε καταναλώνουν OH^\bullet

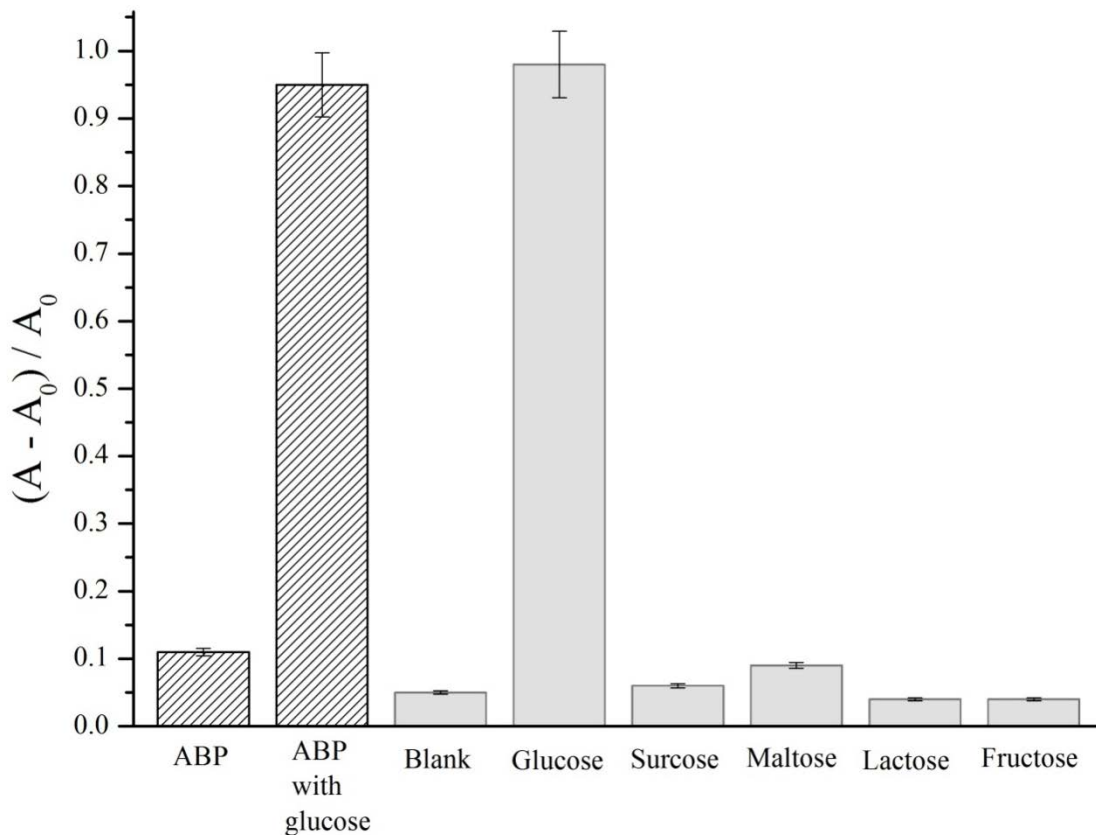
ρίζες ή η καταλυτική δραστηριότητά τους να φτάνει στη μέγιστη δυνατότητά της και ως εκ τούτου αύξηση της συγκέντρωσης των RhNPs δεν συνεισφέρει περαιτέρω στην διάσπαση του H_2O_2 σε OH^\bullet . Αυτή η παρατήρηση είναι σύμφωνη με την επίδραση της συγκέντρωσης του καταλύτη που συζητήθηκε προηγουμένως, όπου το σήμα απορρόφησης φτάνει σε ένα πλατώ μετά από συγκέντρωση 200 μM RhNPs.

Για να διερευνηθεί περαιτέρω ο μηχανισμός καταλύσεως των RhNPs μετρήθηκε η δραστηριότητα των RhNPs υπό τις βέλτιστες συνθήκες μεταβάλλοντας την συγκέντρωση του ενός υποστρώματος κρατώντας σταθερή τη συγκέντρωση του άλλου υποστρώματος. Οι ευθείες που ελήφθησαν από τα διπλά-αντίστροφα διαγράμματα ήταν παράλληλες, γεγονός που είναι ενδεικτικό μιας αντίδρασης διπλής αντικατάστασης (γνωστή και ως μηχανισμός "ring-pong") όπως παρατηρήθηκε και για την HRP [Su L., et al., 2012] καθώς και για άλλα είδη νανοϋλικών [Wei H., et al., 2013, Zhao K., et al., 2015, Chau LY., et al., 2016, Dong Y-L., et al., 2012]. Αυτό δείχνει ότι τα RhNPs αντιδρούν πρώτα με το πρώτο υπόστρωμα για να απελευθερώσουν ένα προϊόν και στη συνέχεια αντιδρούν με το δεύτερο υπόστρωμα. Με βάση την παραπάνω μελέτη, υποθέτουμε ότι τα RhNPs αρχικά διασπούν το H_2O_2 σε ρίζες OH^\bullet και στη συνέχεια διευκολύνουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ των ριζών OH^\bullet και του TMB.

3.3.5 Εκλεκτικότητα

Η εκλεκτικότητα της μεθόδου μελετήθηκε αρχικά σε διαλύματα που αποτελούνταν από τεχνητά βιολογικά υγρά που περιέχουν διάφορους ηλεκτρολύτες και βιομόρια σε φυσιολογικά επίπεδα συγκεντρώσεων (βλέπε πειραματικό μέρος του Κεφαλαίου 3) παρουσία 5,0 mM γλυκόζης και τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με αυτά

που ελήφθησαν από την ανάλυση πρότυπων υδατικών διαλυμάτων γλυκόζης της ίδιας συγκέντρωσης. Και στα δύο διαλύματα χρησιμοποιήσαμε την ίδια συγκέντρωση οξειδάσης της γλυκόζης (0,125 mg/mL) για την κατάλυση της οξείδωσης της γλυκόζης σε H₂O₂. Καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι η μήτρα του υποστρώματος των βιολογικών υγρών δεν παρεμποδίζει και η μέθοδος παρουσιάζει υψηλή εκλεκτικότητα για τη χρωματομετρική ανίχνευση του H₂O₂ και της γλυκόζης (**Εικόνα 3.7**).



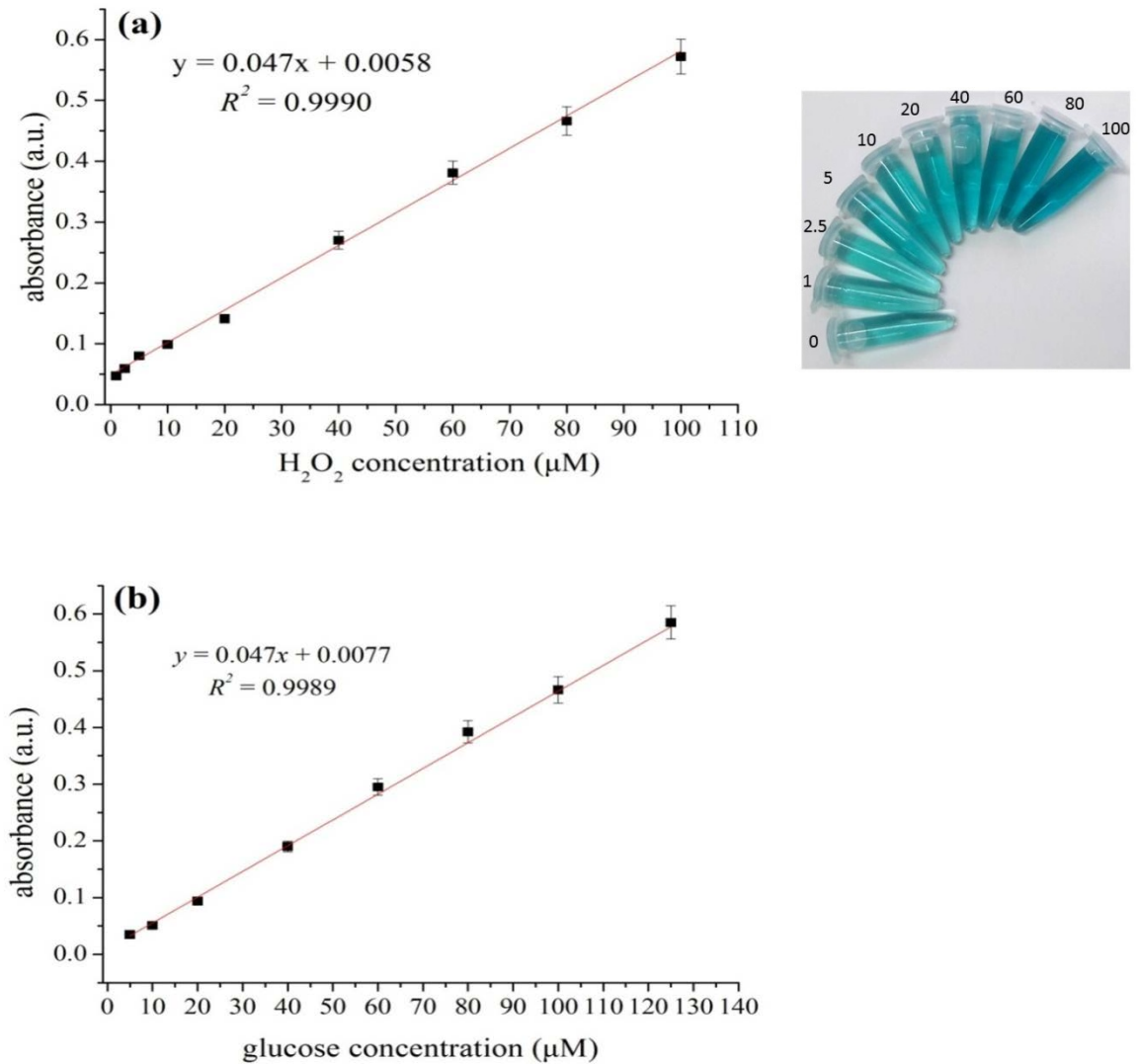
Εικόνα 3.7. Ανάλυση της εκλεκτικότητας για την ανίχνευση γλυκόζης με μελέτη της σχετικής απορρόφησης. Μπάρες σφαλμάτων αντιστοιχούν στο τυπικό σφάλμα τριών ανεξάρτητων μετρήσεων.

Η εκλεκτικότητα της μεθόδου μελετήθηκε επίσης έναντι κοινών υδατανθράκων, όπως η φρουκτόζη, η μαλτόζη, η λακτόζη και η σακχαρόζη σε επίπεδο συγκέντρωσης 5,0 mM χρησιμοποιώντας την οξειδάση της γλυκόζης (**Εικόνα 3.7**). Δεδομένου ότι η οξειδάση της γλυκόζης έχει υψηλή συγγένεια με τη γλυκόζη, η παρουσία αναλόγων της γλυκόζης επηρέασε ελάχιστα το αναλυτικό σήμα και η απορρόφηση παρέμεινε τόσο χαμηλή όσο το σήμα υποβάθρου. Ως εκ τούτου, καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι η προτεινόμενη μέθοδος είναι εκλεκτική έναντι άλλων ειδών υδατανθράκων.

3.3.6 Αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου

Με βάση τα ανωτέρω αποτελέσματα αναπτύξαμε δύο χρωματομετρικές μεθόδους για τον προσδιορισμό του H_2O_2 και της γλυκόζης. Η **Εικόνα 3.8** παρουσιάζει μία τυπική καμπύλη απόκρισης με αυξανόμενες συγκεντρώσεις H_2O_2 . Η καμπύλη είναι γραμμική στην περιοχή από 1,0 έως 100 μM δίνοντας ένα όριο ανίχνευσης ίσο με 0,2 μM . Η σχετική τυπική απόκλιση ήταν 5,47% για τον προσδιορισμό 20 μM H_2O_2 ($n=7$). Για τον προσδιορισμό της γλυκόζης ακολουθήθηκε μια πειραματική διαδικασία δύο σταδίων (όπως περιγράφεται στην πειραματική ενότητα). Στο πρώτο στάδιο χρησιμοποιείται οξειδάση της γλυκόζης για να καταλύσει την οξείδωση της γλυκόζης σε H_2O_2 (και γλυκονικό οξύ) και στο δεύτερο στάδιο ανιχνεύεται το παραγόμενο H_2O_2 χρησιμοποιώντας την καταλυτική οξείδωση της TMB με H_2O_2 . Η καμπύλη απόκρισης-συγκέντρωσης γλυκόζης είναι γραμμική στην κλίμακα από 5 έως 125 μM με όριο ανίχνευσης τα 0,5 μM . Λαμβάνοντας υπόψη ότι η συγκέντρωση γλυκόζης του αίματος σε υγιή και διαβητικά άτομα κυμαίνεται από 3-8 mM και 9-40 mM [Gao Z., et al., 2013], αντίστοιχα, καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι η ευαισθησία της μεθόδου είναι

περισσότερο από επαρκής για την ανάλυση της γλυκόζης σε πραγματικά δείγματα με απλή αραιώση. Τέλος, η επαναληψιμότητα των μετρήσεων, όπως εκφράζεται από τη σχετική τυπική απόκλιση των 7 επαναλήξιμων μετρήσεων σε συγκέντρωση γλυκόζης 20 μM , είναι 6,32% η οποία είναι πολύ ικανοποιητική.



Εικόνα 3.8. Καμπύλες βαθμονόμησης (α) του H_2O_2 και (β) της γλυκόζης. Οι μετρήσεις απορρόφησης πραγματοποιήθηκαν στα 652 nm.

Τα αναλυτικά χαρακτηριστικά της προτεινόμενης μεθόδου συγκρίθηκαν με εκείνες άλλων μεθόδων που αναφέρονται στη βιβλιογραφία και βασίζονται σε νανομμητικά της υπεροξειδάσης (**Πίνακας 3.3**). Με βάση τη σύγκριση συμπεράναμε ότι η προτεινόμενη μέθοδος παρουσιάζει καλή γραμμικότητα και υψηλή ευαισθησία που επιτρέπει τον προσδιορισμό του H₂O₂ και της γλυκόζης σε επίπεδα μΜ.

Πίνακας 3.3. Σύγκριση των μμητικών νανοϋλικών υπεροξειδάσης που χρησιμοποιούνται για τον χρωματομετρικό προσδιορισμό της γλυκόζης.

Νανοϋλικά	Γραμμική		Δείγματα	Αναφορά
	Περιοχή (μΜ)	LOD (μΜ)		
GO-Fe ₃ O ₄	2-200	0,74	Ούρα	Dong Y-L., et al., 2012
Fe ₃ S ₄	2-100	0,16	Ορός αίματος	Ding C., et al., 2016
ZnFe ₂ O ₄	1,25-18,75	0,3	Ούρα	Su L., et al., 2012
Cu ₂ (OH) ₃ Cl-CeO ₂	100-2000	50	PBS	Wang N., et al., 2015
PEG-MNPs	5-1000	3	Ορός αίματος	Shin HY., et al., 2017
Prussian blue-modified ferritin NPs	0,39-6,25	0,39	-	Muench F., et al., 2012
PtNCs	0-200	0,46	Ορός αίματος	Kappi F.A., et al., 2017
CeO ₂	6,6-130	3	Ορός αίματος	Jiao X., et al., 2012
Prussian blue NPs	0,1-50	0,03	Ορός αίματος	Zhang W., et al., 2014
SDS-MoS ₂ NPs	5-500	0,32	Ορός αίματος	Zhao K., et al., 2015
RhNPs	1-125	0,5	Ορός αίματος, Ενεργειακά /Αθλητικά ποτά, Προϊόντα Υγιεινής	Αυτή η μελέτη

GO: Οξείδιο του γραφενίου, PEG: πολυαιθυλενογλυκόλη, MNPs: Μαγνητικά νανοσωματίδια, PBS: αλατούχο διάλυμα φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος. SDS: δωδεκυλοθειικό νάτριο, PtNCs: νανοκλάστες πλατίνας

3.3.7 Εφαρμογή της μεθόδου

Η μέθοδος εφαρμόστηκε στην ανάλυση της περιεκτικότητας (α) του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε υγρό καθαρισμού φακών επαφής κατά την διαδικασία καθαρισμού του φακού, (β) της γλυκόζης σε ενεργειακά και αθλητικά ποτά και (γ) των επιπέδων γλυκόζης στο πλάσμα αίματος. Όλα τα δείγματα αραιώθηκαν με απιονισμένο νερό για να εξασφαλισθεί ότι οι συγκεντρώσεις γλυκόζης του δείγματος ήταν εντός του γραμμικού εύρους της καμπύλης βαθμονόμησης και για να μειωθούν πιθανές επιδράσεις της μήτρας του δείγματος. Οι ανακτήσεις προσδιορίστηκαν επίσης στα ίδια δείγματα με την προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων γλυκόζης στα αρχικά (μη αραιωμένα) δείγματα.. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.4** δείχνουν ότι το σχετικό σφάλμα της συγκέντρωσης γλυκόζης μεταξύ της προτεινόμενης μεθόδου και των πραγματικών συγκεντρώσεων (επισημασμένες τιμές για ενεργειακά ποτά και πρότυπη μέθοδος γλυκόζης για δείγματα αίματος) κυμαίνεται από 1 έως 3% και αποδεικνύει την καλή ακρίβεια της μεθόδου. Επιπλέον, οι ανακτήσεις κυμάνθηκαν από 96,5-103,7% υποδηλώνοντας την έλλειψη παρεμποδίσεων από τη μήτρα των πραγματικών δειγμάτων.

Πίνακας 3.4. Εφαρμογή της μεθόδου στην ανάλυση πραγματικών δειγμάτων και αποτελέσματα από την ανάλυση των εμβολιασμένων δειγμάτων. (α) Προσδιορισμός του H₂O₂ σε υγρό καθαρισμού φακών επαφής (β) Προσδιορισμός γλυκόζης σε ενεργειακά και αθλητικά ποτά και ορό ανθρώπινου αίματος.

(α)	Διάρκεια καθαρισμού (ώρες)	H ₂ O ₂ (προστέθηκε), M	H ₂ O ₂ (βρέθηκε), M	Ανάκτηση, %
Υγρό καθαρισμού φακών επαφής ^a	0	0	$91 \times 10^{-2} \pm 8 \times 10^{-2}$	-
	0,5	0	$50 \times 10^{-3} \pm 5.1 \times 10^{-3}$	-
	1	0	$21 \times 10^{-3} \pm 2.1 \times 10^{-3}$	-
	2	0	$2,9 \times 10^{-3} \pm 1.4 \times 10^{-4}$	-
	2	$0,25 \times 10^{-3}$	$3,2 \times 10^{-3} \pm 1.3 \times 10^{-4}$	102±4
	2	$0,50 \times 10^{-3}$	$3,5 \times 10^{-3} \pm 1.7 \times 10^{-4}$	103±5

* Η συγκέντρωση του H₂O₂ από τον κατασκευαστή είναι 3% (w/v) ή $88,0 \times 10^{-2}$ M. Επομένως, το σχετικό σφάλμα των αποτελεσμάτων μεταξύ των πραγματικών τιμών και εκείνων που λαμβάνονται με την αναπτυχθείσα μέθοδο ήταν 3,4%. Όλα τα αποτελέσματα είναι η μέση τιμή που λαμβάνεται από τρεις μετρήσεις.

(b)	Συγκέντρωση γλυκόζης (mM)	Μετρήθηκε (mM)	Σχετικό σφάλμα (%)	Προστέθηκε (mM)	Βρέθηκε (mM)	Ανάκτηση (%)
Ενεργειακό ποτό-1	233±17 ^a	226±15	3,0	10,0	235±12	96,5±5,1
Ενεργειακό ποτό-2	611±42 ^a	620±33	1,5	10,0	632±24	102,0±3,8
Αναψυκτικό 1	555±35 ^a	570±52	2,7	10,0	568±48	102,3±8,4
Αναψυκτικό 2	500±31 ^a	505±38	1,0	10,0	510±36	100,0±7,0
Πλάσμα αίματος 1	4,2±0.10 ^β	4.4±0.13	4,7	1,0	5,35±0.32	103,7±6,0
Πλάσμα αίματος 2	6,6±0.16 ^β	6.2±0.20	6,1	1,0	7,4±0.48	97,0±6,5

^a Υπολογίζεται με βάση τις τιμές που παρέχονται από τον κατασκευαστή στην ετικέτα του προϊόντος,

^β Μετρήθηκε με την πρότυπη μέθοδο προσδιορισμού της γλυκόζης. Όλα τα αποτελέσματα είναι η μέση τιμή που λαμβάνεται από τρεις μετρήσεις.

3.4 Συμπεράσματα

Στο κεφάλαιο 3 αναφέρθηκε για πρώτη φορά ότι τα RhNPs παρουσιάζουν ιδιότητες που μιμούνται την καταλυτική δράση της υπεροξειδάσης. Η δράση των RhNPs ακολουθούσε την τυπική κινητική Michaelis-Menten και παρουσίασε υψηλή καταλυτική απόδοση ακολουθώντας έναν μηχανισμό «πινγκ-πονγκ» που αποδίδεται σε αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων μεταξύ του χρωμογόνου υποστρώματος και των ριζών υδροξυλίου που παράγονται από την καταλυτική διάσπαση του H_2O_2 . Σε σύγκριση με άλλα νανοϋλικά με δραστηριότητα παρόμοια με την υπεροξειδάση, τα RhNPs παρουσιάζουν αρκετά πλεονεκτήματα, όπως α) πολύ υψηλή δραστηριότητα τόσο ως προς TMB όσο και ως προς το H_2O_2 , παρουσιάζοντας τιμές K_m οι οποίες ήταν αμφότερες μεταξύ των χαμηλότερων που αναφέρονται στη βιβλιογραφία. Αντίθετα, οι τιμές K_m των περισσότερων ενζυμομιμητικών νανοϋλικών εμφανίζουν μικρές τιμές K_m μόνο για ένα από τα δυο υποστρώματα (TMB ή H_2O_2), β) υψηλή εκλεκτικότητα ως προς τη γλυκόζη και το H_2O_2 και μειωμένη δραστηριότητα έναντι άλλων συστατικών της μήτρας του υποστρώματος των βιολογικών δειγμάτων, γ) σχετικά ευρεία γραμμική περιοχή με χαμηλά όρια ανίχνευσης και δ) μια πολύ απλή συνθετική διαδικασία. Τα πλεονεκτήματα αυτά είναι αρκετά για να υπερκεράσουν το μειονέκτημα που σχετίζεται με το σχετικά υψηλό κόστος του μεταλλικού Rh και να διευκολύνουν τη χρήση των RhNPs ως νανοένζυμα μιμητών υπεροξειδάσης (με τις κατάλληλες οξειδάσες που παράγουν H_2O_2) σε περιβαλλοντικές, βιοτεχνολογικές και ιατρικές εφαρμογές, ειδικά σε αραιά δείγματα ή σε συνθήκες ανεπάρκειας δείγματος (π.χ. στην ανάλυση εγκεφαλικών ή εγκεφαλονωτιαίων υγρών κ.λ.π.).

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Breslow R., Biomimetic chemistry and artificial enzymes: Catalysis by design, *Acc Chem Res* (1995) 28:146-153.
- Chang Q., Deng K., Zhu L., Jiang G., Yu C., Tang H., Determination of hydrogen peroxide with the aid of peroxidase-like Fe₃O₄ magnetic nanoparticles as the catalyst, *Microchim Acta* (2009) 165:299-305.
- Chau L.Y., He Q., Qin A., Yip SP., Lee T.M.H., Platinum nanoparticles on reduced grapheme oxide as peroxidase mimetics for the colorimetric detection of specific DNA sequence, *J Mater Chem B* (2016) 4:4076-4083.
- Deng H., Shen W., Peng Y., Chen X., Yi G., Gao Z., Nanoparticulate peroxidase/catalase mimetic and its application, *Chem Eur J* (2012) 18:8906-8911.
- Ding C., Yan Y., Xiang D., Zhang C., Xian Y., Magnetic Fe₃S₄ nanoparticles with peroxidase-like activity, and their use in a photometric enzymatic glucose assay, *Microchim Acta* (2016) 183:625-631.
- Dominguez-Medina S., McDonough S., Swanglap P., Landes C.F., Link S., *Langmuir* (2012) 28:9131-9139.
- Dong Y.L., Zhang H.G., Rahman ZU., Su L., Chen X.J., Hu J., Chen X.G., Graphene oxide-Fe₃O₄ magnetic nanocomposites with peroxidase-like activity for colorimetric detection of glucose, *Nanoscale* (2012) 4:3969-3976.
- Drozd M., Pietrzak M., Parzuchowski P.G., Malinowska E., Pitfalls and capabilities of various hydrogen donors in evaluation of peroxidase-like activity of gold nanoparticles, *Anal Bioanal Chem* (2016) 408:8505-8513.

- Drozd M., Pietrzak M., Parzuchowski P., Mazurkiewicz-Pawlicka M., Malinowska E., Peroxidase-like activity of gold nanoparticles stabilized by hyper branched polyglycidol derivatives over a wide pH range, *Nanotechnology* (2015) **26:495101**.
- Fiammengo R., Jaschke A., Nucleic acid enzymes, *Curr Opin Biotechnol* (2005) **16 (6):614–621**.
- Gao L., Zhuang J., Nie L., Zhang J., Zhang Y., Gu N., Wang T., Feng J., Yang D., Perrett S., Yan X., Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles, *Nat Nanotechnol* (2007) **2:577-583**.
- Gao Z., Xu M., Hou L., Chen G., Tang D., Irregular-shaped platinum nanoparticles as peroxidase mimics for highly efficient colorimetric immunoassay, *Anal Chim Acta* (2013) **776:79-86**.
- Garg B., Bisht T., Ling Y-C., Graphene-based nanomaterials as efficient peroxidase mimetic catalysts for biosensing applications: an overview, *Molecules* (2015) **20:14155-14190**.
- Garg B., Bisht T., Carbon nanodots as peroxidase nanozymes for biosensing, *Molecules* (2016) **21:1653-1669**.
- Gatselou VA., Giokas DL., Vlessidis AG., Prodromidis MI., Rhodium nanoparticle-modified screen-printed graphite electrodes for the determination of hydrogen peroxide in tea extracts in the presence of oxygen, *Talanta* (2015) **134:482-487**.

- Gatselou V., Christodouleas DC., Kouloumpis A., Gournis D., Giokas DL.,
Determination of phenolic compounds using spectral and color transitions of
rhodium nanoparticles, *Anal Chim Acta* (2016) 932:80-87.
- He W., Liu Y., Yuan J., Yin J-J., Wu X., Hu X., Zhang K., Liu J., Chen C., Ji Y., Guo
Y., Au@Pt nanostructures as oxidase and peroxidase mimetics for use in
immunoassays, *Biomaterials* (2011) 32:1139-1147.
- He W., Han X., Jia H., Cai J., Zhou Y., Zheng Z., AuPt alloy nanostructures with tunable
composition and enzymelike activities for colorimetric detection of bisulfide, *Sci
Rep* (2017) 7:40103.
- Hsu K., Lien C.W., Lin C.H., Chang H.T., Huang C.C., Immobilization of iron
hydroxide/oxide on reduced graphene oxide: Peroxidase-like activity and
selective detection of sulfide ions, *RSC Adv* (2014) 4:37705–37713.
- Jiao X., Song H., Zhao H., Bai W., Zhang L., Lv Y., Well-redispersed ceria
nanoparticles: Promising peroxidase mimetics for H₂O₂ and glucose detection,
Anal Methods (2012) 4:3261-3267.
- Jin L., Meng Z., Zhang Y., Cai S., Zhang Z., Li C., Shang L., Shen Y., Ultra small Pt
nanoclusters as robust peroxidase mimics for colorimetric detection of glucose
in human serum, *ACS Appl Mater Interfaces* 9 (2017) (11):10027-10033.
- Joseph P.D., Eling T.E., Mason R.P., The Horseradish peroxidase-catalyzed oxidation
of 3,5,39,59-Tetramethylbenzidine: Free radical and charge-transfer complex
intermediates, *J Biol Chem* (1982) 257:3669-3675.

- Ju Y., Kim J., Dendrimer-encapsulated Pt nanoparticles with peroxidase-mimetic activity as biocatalytic labels for sensitive colorimetric analyses, *Chem Commun* (2013) 51:13752-13755.
- Kappi F.A., Papadopoulos G.A., Tsogas G.Z., Giokas D.L., Low-cost colorimetric assay of biothiols based on the photochemical reduction of silver halides and consumer electronic imaging devices, *Talanta* (2017) 172 (1): 15-22.
- Kotov N.A., Inorganic nanoparticles as protein mimics, *Science* (2010) 330:188-189.
- Lin Y., Ren J., Qu X., Catalytically active nanomaterials: A promising candidate for artificial enzymes, *Acc Chem Res* (2014) 47:1097-1105.
- Lin X.Q., Deng H.H., Wu G.W., Peng H.P., Liu A.L., Lin X.H., Xia X.H., Chen W., Platinum nanoparticles/graphene-oxide hybrid with excellent peroxidase-like activity and its application for cysteine detection, *Analyst* (2015) 140:5251-5256.
- Liu J., Hu X., Hou S., Wen T., Liu W., Zhu X., Yin J.J., Wu X., Au@Pt core/shell nanorods with peroxidase- and ascorbate oxidase-like activities for improved detection of glucose, *Sens Actuators B* (2012) 166-167:708-714.
- Liu Y., Zhu G., Yang J., Yuan A., Shen X., Peroxidase-Like catalytic activity of Ag₃PO₄ nanocrystals prepared by a colloidal route, *PLoS ONE* (2014) 9(10):e109158.
- Muench F., Neetzal C., Kaserer S., Brötz J., Jaud J.C., Zhao-Karger Z., Lauterbach S., Kleebe H.J., Rotha C., Ensinger W., Fabrication of porous rhodium nanotube catalysts by electroless plating, *J Mater Chem* (2012) 22:12784-12791.

- Nasir M., Nawaz M.H., Latif U., Yaqub M., Hayat A., Rahim A., An overview on enzyme-mimicking nanomaterials for use in electrochemical and optical assays, *Microchim Acta* (2017) 184:323-342.
- Pan N., Li-Ying W., Wu L.L., Peng C.F., Xie Z.J., Colorimetric determination of cysteine by exploiting its inhibitory action on the peroxidase-like activity of Au@Pt core-shell nanohybrids, *Microchim Acta* (2017) 184:65-72.
- Ponlakhet K., Amatatongchai M., Sroysee W., Jarujamrus P., Chairam S., Development of sensitive and selective glucose colorimetric assay using glucose oxidase immobilized on magnetite-gold-folate nanoparticles, *Anal Methods* (2016) 8:8288-8298.
- Rauf S., Nawaz M.A.H., Badea M., Marty J.L., Hayat A., Nano-engineered biomimetic optical sensors for glucose monitoring in diabetes, *Sensors* (2016) 16:1931-1948.
- Shin H.Y., Kim B.G., Cho S., Lee J., Na H.B., Kim M.I., Visual determination of hydrogen peroxide and glucose by exploiting the peroxidase-like activity of magnetic nanoparticles functionalized with a poly(ethylene glycol) derivative, *Microchim Acta* (2017) 184:2115-2122.
- Song Y., Qu K., Zhao C., Ren J., Qu X., Graphene oxide: Intrinsic peroxidase catalytic activity and its application to glucose detection, *Adv Mater* (2010) 22:2206-2210.
- Su L., Feng J., Zhou X., Ren C., Li H., Chen X., Colorimetric detection of urine glucose based ZnFe₂O₄ magnetic nanoparticles, *Anal Chem* (2012) 84:5753-5758.

- Wang C.I., Chen W.T., Chang H.T., Enzyme mimics of Au/Ag nanoparticles for fluorescent detection of acetylcholine, *Anal Chem* (2012) 84:9706-9712.
- Wang N., Sun J., Chen L., Fan H., Ai S., $\text{ACu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}-\text{CeO}_2$ nanocomposite with peroxidase-like activity, and its application to the determination of hydrogen peroxide, glucose and cholesterol, *Microchim Acta* (2015) 182:1733-1738.
- Wei H., Wang E., Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): next-generation artificial enzymes, *Chem Soc Rev* (2013) 42:6060-6093.
- Wolfenden R., Snider M.J., The Depth of Chemical Time and the Power of Enzymes as Catalysts, *Acc Chem Res* (2001) 34:938-945.
- Yuan Y., Yan N., Dyson P.J., Advances in the rational design of rhodium nanoparticle catalysts : Control via manipulation of the nanoparticle core and stabilizer, *ACS Catal* (2012) 2:1057-1069.
- Zhang W., Zhang Y., Chen Y., Li S., Gu N., Hu S., Sun Y., Chen X., Li Q., Prussian blue modified ferritin as peroxidase mimetics and its applications in biological detection, *J Nanosci Nanotechnol* (2012) 12:1-8.
- Zhang W., Ma D., Du J., Prussian blue nanoparticles as peroxidase mimetics for sensitive colorimetric detection of hydrogen peroxide and glucose, *Talanta* (2014) 120:362-367.
- Zhao K., Gu W., Zheng S., Zhang C., Xian Y., SDS- MoS_2 nanoparticles as highly-efficient peroxidase mimetics for colorimetric detection of H_2O_2 and glucose, *Talanta* (2015) 141:47-52.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στόχος της διδακτορικής διατριβής είναι η αξιοποίηση των νανοσωματιδίων ροδίου για την ανάπτυξη νέων αναλυτικών μεθόδων βασισμένων σε φασματοσκοπικές και ηλεκτροχημικές τεχνικές ανίχνευσης.

Η χρήση των νανοσωματιδίων ροδίου για την ανάπτυξη νέων ηλεκτροχημικών μεθόδων ανάλυσης επικεντρώθηκε στον ηλεκτροχημικό προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου χρησιμοποιώντας νανοδομημένες καταλυτικές επιφάνειες ροδίου ακινητοποιημένες σε εκτυπωμένα ηλεκτρόδια γραφίτη. Πιο συγκεκριμένα, τα νανοσωματίδια ακινητοποιήθηκαν πάνω σε ηλεκτρόδια γραφίτη μέσω ελκτικών ηλεκτροστατικών δυνάμεων με ένα λεπτό υμένιο θετικά φορτισμένης πολυαιθυλενιμίνης. Οι αισθητήρες χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου που παράγεται, με την πάροδο του χρόνου, σε εκχυλίσματα από λευκό, πράσινο και μαύρο τσάι, μέσω της αυτοοξειδωσης των πολυφαινολών. Οι αισθητήρες παρουσίασαν γραμμική απόκριση μεταξύ ρεύματος και συγκέντρωσης υπεροξειδίου του υδρογόνου για περιοχή συγκεντρώσεων από 5 έως 600 μmolL^{-1} , και όριο ανίχνευσης τα 2,0 μM σε 0,0 V vs. Ag/AgCl/3M KCl ενώ η επαναληψιμότητα της βρέθηκε μικρότερη από 3%. Τα ποσοστά ανάκτησης κυμαίνονταν μεταξύ 97 και 104%.

Στη συνέχεια τα νανοσωματίδια ροδίου χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη μιας νέας αναλυτικής μεθόδου για τον προσδιορισμό της ολικής περιεκτικότητας φαινολικών ενώσεων και της ολικής περιεκτικότητας σε κατεχίνες σε εκχυλίσματα τσαγιού. Η μέθοδος που αναπτύχθηκε βασίζεται στην παρατήρηση ότι οι φαινολικές ενώσεις (π.χ. κατεχίνες, γαλλικό οξύ, κινναμωμικό και διυδροβενζοϊκό οξύ) προκαλούν αλλαγές στο μέγεθος των νανοσωματιδίων ροδίου μεταβάλλοντας τον τοπικό συντονισμό επιφανειακών πλασμονίων, και ως εκ τούτου προκαλούν

φασματικές και χρωματικές μεταβολές των εναιωρημάτων των νανοσωματιδίων του ροδίου. Πιο συγκεκριμένα, η αλληλεπίδραση των νανοσωματιδίων του ροδίου με παράγωγα του διυδροξυβενζοϊκού και τριυδροβενζοϊκού οξέος προκαλούν νέες κορυφές απορρόφησης στα 350 nm και 450 nm ενώ η αλληλεπίδραση των νανοσωματιδίων του ροδίου με τα παράγωγα του τριυδροξυβενζοϊκού οξέος έχουν σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση μιας νέας κορυφής απορρόφησης στα 580 nm. Και οι δύο κορυφές απορρόφησης (στα 450 nm και 580 nm) αυξάνονται γραμμικά με την αύξηση της συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων για περιοχή συγκεντρώσεων 0-500 μM ενώ τα όρια ανίχνευσης κυμαίνονταν σε επίπεδα μερικών μM , ανάλογα με την φαινολική ένωση, και με ικανοποιητική επαναληψιμότητα ($<7,3\%$).

Τέλος, τα νανοσωματίδια ροδίου χρησιμοποιήθηκαν ως μιμητικά της υπεροξειδάσης για την ανάπτυξη μιας νέας αναλυτικής μεθόδου για τον προσδιορισμό υπεροξειδίου του υδρογόνου και της γλυκόζης σε φαρμακευτικά σκευάσματα, βιολογικά υγρά καθώς και αναψυκτικά. Η μέθοδος που αναπτύχθηκε βασίζεται στην ιδιότητα των νανοσωματιδίων ροδίου να καταλύουν την οξείδωση του υποστρώματος υπεροξειδάσης 3,3',5,5' τετραμεθυλβενζιδίνης (TMB) παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου, παράγοντας ένα προϊόν κυανού χρώματος με μέγιστη απορρόφηση στα 652 nm. Κινητικές μελέτες της καταλυτικής δράσης των νανοσωματιδίων ροδίου έδειξαν ότι ο μηχανισμός καταλύσεως είναι σύμφωνος με την τυπική κινητική Michaelis-Menten και ακολούθησαν έναν μηχανισμό διπλής αντικατάστασης. Οι υπολογισθείσες κινητικές παράμετροι έδειξαν ότι τα νανοσωματίδια ροδίου εμφανίζουν ισχυρή συγγένεια τόσο για το υπόστρωμα υπεροξειδάσης TMB όσο και για το υπεροξείδιο του υδρογόνου, τα οποία ήταν καλύτερα από άλλα νανοϋλικά που έχουν χρησιμοποιηθεί ως μιμητικά της υπεροξειδάσης καθώς και από το φυσικό ένζυμο της υπεροξειδάσης των

αγριοραφανίδων. Βάσει αυτών των δεδομένων, τα νανοσωματίδια ροδίου χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη μιας ευαίσθητης και εκλεκτικής χρωματομετρικής μεθόδου για τον προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου και της γλυκόζης στη γραμμική περιοχή από 1-100 μM και 5-125 μM , αντίστοιχα. Τα όρια ανίχνευσης ήταν μικρότερα από 0,75 μM , το σφάλμα των αποτελεσμάτων της μεθόδου <6%, οι ανακτήσεις από 96,5 έως 103,7% και η επαναληψιμότητα μικρότερη από 6,3%.

SUMMARY

The main goal of the doctoral thesis is the exploitation of Rhodium nanoparticles (RhNPs) for the development of new analytical methods based on molecular absorption spectrometry and electrochemical techniques.

RhNP nanoparticles were used for the first time for the development of an electrochemical sensor for the determination of H_2O_2 in complex samples in the presence of dissolved oxygen. The sensors were modified by a simple drop-casting deposition of RhNP on the surface of graphite screen printed electrodes. Immobilization was accomplished by electrostatic attraction between the negative surface charge of RhNP and positively charged polyethyleneimine (PEI) previously functionalized on the surface of the electrodes. A remarkable electrocatalytic response for the reduction of hydrogen peroxide was recorded, even in the presence of oxygen, thus alleviating the need for sample deaeration. The functionalized sensors, polarized at 0.0 V vs. Ag/AgCl/3 M KCl, exhibited a linear response to H_2O_2 over the concentration range from 5 to 600 $\mu\text{mol L}^{-1}$ H_2O_2 in the presence of oxygen. The 3σ limit of detection was 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ H_2O_2 , while the reproducibility of the method at the concentration level of 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ H_2O_2 ($n=10$) and between different sensors ($n=4$) was lower than 3 and 5%, respectively. Most importantly, the sensors showed an excellent working and storage stability at ambient conditions and they were successfully applied to the determination of H_2O_2 produced by autooxidation of polyphenols in tea extracts with ageing. Recovery rates ranged between 97 and 104%.

Rhodium nanoparticles were then used for the development of a new analytical method for the determination of total phenolic content and total catechin content in tea extracts. Phenolic compounds (i.e., catechins, gallates, cinnamates, and

dihydroxybenzoic acids) were found to cause changes in the size and localized surface plasmon resonance of rhodium nanoparticles, and therefore, give rise to analyte-specific spectral and color transitions in the rhodium nanoparticle suspensions. Upon reaction with phenolic compounds (mainly dihydroxybenzoate derivatives, and trihydroxybenzoate derivatives), new absorbance peaks at 350 nm and 450 nm were observed. Upon reaction with trihydroxybenzoate derivatives, however, an additional absorbance peak at 580 nm was observed facilitating the speciation of phenolic compounds in the sample. Both absorbance peaks at 450 nm and 580 nm increased with increasing concentration of phenolic compounds over a linear range of 0–500 μM . Detection limits at the mid-micromolar levels were achieved, depending on the phenolic compound involved, and with satisfactory reproducibility (<7.3%). On the basis of these findings, two rhodium nanoparticles-based assays for the determination of the total phenolic content and total catechin content were developed and applied in tea samples. The obtained results correlated favorably with commonly used methods (i.e., Folin-Ciocalteu and aluminum complexation assay).

Last but not least, Rhodium nanoparticles were used as peroxidase mimetics for the development of a new analytical method for the determination of hydrogen peroxide and glucose in pharmaceutical formulations, blood plasma and soft drinks. RhNPs catalyze the oxidation of the peroxidase substrate 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) in the presence of H_2O_2 to produce a blue reaction product with a maximum absorbance at 652 nm. Kinetic studies show catalysis to follow Michaelis-Menten kinetics and a "ping-pong" mechanism. The calculated kinetic parameters indicate high affinity of RhNPs for both the substrate TMB and H_2O_2 . In fact, they are better than other peroxidase mimicking nanomaterials and even the natural enzyme horseradish peroxidase. Based on these findings, a sensitive

and selective colorimetric method was worked out for the determination of H_2O_2 in real samples with a linear response in the 1 - 100 μM concentration range. By employing glucose oxidase, the glucose assay has a linear range that covers the 5 to 125 μM glucose concentration range. The detection limits are $<0.75 \mu\text{M}$ for both species. Figures of merit include (a) good accuracy (with errors of $<6\%$), (b) high recoveries (96.5-103.7%), and (c) satisfactory reproducibility ($<6.3\%$).