



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**«Εκτυπωμένη ηλεκτροχημική κυψελίδα όγκου 1 μL για τον προσδιορισμό
του ουρικού οξέος στα ανθρώπινα δάκρυα και τη διάγνωση της ουρικής
αρθρίτιδας»**

Μαρία Τσιρογιάννη

Χημικός

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου

Ιωαννίνων

ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 2025



UNIVERSITY OF IOANNINA
FACULTY OF NATURAL SCIENCE
DEPARTMENT OF CHEMISTRY
LABORATORY OF ANALYTICAL CHEMISTRY

“A smart assembly of millimetre-sized screen-printed surfaces forms a one-microliter volume three electrode cell for the determination of uric acid in human tears toward the diagnosis of hyperuricemia”

Maria Tsirogianni

Chemist

Master Thesis submitted to the Department of Chemistry of the University of
Ioannina

IOANNINA, 2025

Αφιερώνεται στην οικογένειά μου

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, στο πλαίσιο του Μεταπτυχιακού Προγράμματος του Τμήματος Χημείας, με επιβλέποντα τον καθηγητή του Τμήματος Χημείας κ. Μάμαντο Προδρομίδη κατά το χρονικό διάστημα Οκτώβριος 2023 – Οκτώβριος 2025.

Η εργασία απαρτίζεται από δύο μέρη, το θεωρητικό και το πειραματικό μέρος. Στο θεωρητικό μέρος δίνονται πληροφορίες για τη σημασία και τις προοπτικές των δακρύων ως βιολογικό υγρό για τη διάγνωση διαφόρων ασθενειών και συγκεκριμένα για την υπερουριχαιμία και την ουρική αρθρίτιδα.

Στο πειραματικό μέρος παρουσιάζεται η ανάπτυξη μιας ηλεκτροχημικής κυψελίδας όγκου ενός μικρολίτρου, αποτελούμενης από (α) ένα τυπικό εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο γραφίτη, το οποίο τροποποιήθηκε με νανοσωματίδια σιδήρου παραγόμενα με ηλεκτρική εκκένωση και με γραφитικό νιτρίδιο του άνθρακα και (β) μία ειδικά σχεδιασμένη εκτυπωμένη επιφάνεια γραφίτη, η οποία μετά τη διάτρησή της λειτουργεί ταυτόχρονα ως ηλεκτρόδιο αναφοράς και αντισταθμιστικό ηλεκτρόδιο για τον προσδιορισμό του ουρικού οξέος στα ανθρώπινα δάκρυα και τη διάγνωση της ουρικής αρθρίτιδας.

Όλα τα παραπάνω, ωστόσο, δεν θα ήταν εφικτά χωρίς την πολύτιμη βοήθεια συγκεκριμένων ανθρώπων.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Μάμαντο Προδρομίδη για την ανάθεση του τόσο ενδιαφέροντος θέματος, την πολύτιμη καθοδήγησή του και την πολύ καλή συνεργασία καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, τον καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Σταλικά και τον καθηγητή κ. Βασίλειο Σακκά για τον χρόνο που διέθεσαν και τις πολύτιμες παρατηρήσεις τους. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Αγγελική Φλώρου, μέλος Ε.ΔΙ.Π του Εργαστηρίου Αναλυτικής Χημείας, για την πολύτιμη βοήθειά της όποτε ήταν απαραίτητη.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους διδακτορικούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές με τους οποίους μοιραστήκαμε το ίδιο εργαστήριο τα δύο αυτά χρόνια για την πολύτιμη βοήθεια και στήριξη που μου προσέφεραν. Έτσι, ένα μεγάλο ευχαριστώ στον

Θεοδόση, τη Θεοδώρα, τη Χριστίνα, τον Νίκο, τον Ηλία και την Καλλιρόη που, εκτός των άλλων, έκαναν την καθημερινότητα στο εργαστήριο πιο όμορφη και εύκολη.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τους φίλους μου εκτός εργαστηρίου που ήταν πάντα παρόν όποτε τους χρειαζόμουν και με στήριζαν σε κάθε στιγμή.

Τέλος, το πιο μεγάλο ευχαριστώ το οφείλω στους γονείς μου, Κώστα και Αγγελική, που χωρίς τη δική τους συμβολή όλα αυτά τα χρόνια και τη στήριξή τους δεν θα τα είχα καταφέρει.

Μαρία Τσιρογιάννη

Ιωάννινα 2025

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	i
ABSTRACT.....	iii
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	i
1. Εισαγωγή.....	1
1.1 Δάκρυα.....	1
1.1.1 Δάκρυα ως βιοδείκτες	3
1.1.2 Μέθοδοι δειγματοληψίας δακρύων.....	6
1.2 Ουρική Αρθρίτιδα (Gouty Arthritis)	8
1.2.1 Παθοφυσιολογία	9
1.2.2 Θεραπεία ουρικής αρθρίτιδας	12
1.3 Τεχνική εκτύπωσης ηλεκτροδίων μέσω πλέγματος	13
1.3.1 Διαδικασία εκτύπωσης.....	14
1.4 Παραγωγή νανοσωματιδίων με ηλεκτρική εκκένωση	17
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	21
2.1 Σκοπός της εργασίας.....	23
2.2 Εισαγωγή.....	23
2.3 Πειραματικό Μέρος	25
2.3.1 Αντιδραστήρια - Διαλύματα.....	25
2.3.2 Σύνθεση γραφιτικού νιτριδίου του άνθρακα ($g-C_3N_4$)	26
2.3.3 Οργανολογία	27
2.3.4 Εκτύπωση επιφανειών γραφίτη	27
2.3.5 Τροποποίηση των SPEs με ηλεκτρική εκκένωση.....	29
2.3.6 Τροποποίηση των SPEs με $g-C_3N_4$	30
2.3.7 Κατασκευή ηλεκτροχημικής κυψελίδας 3 ηλεκτροδίων	30
2.3.8 Δειγματοληψία και επεξεργασία δακρύων	31
2.3.9 Πειραματική Πορεία	34

3.	Αποτελέσματα – Συζήτηση.....	35
3.1	Ηλεκτροχημικός χαρακτηρισμός ηλεκτροχημικών κυψελίδων με διαφορετικό ηλεκτρόδιο αναφοράς.....	35
3.1.1	Σταθερά ταχύτητας ετερογενούς μεταφοράς ηλεκτρονίων k^o	37
3.1.2	Υπολογισμός ενεργούς επιφάνειας A ηλεκτροδίων	38
3.2	Τροποποίηση του ηλεκτροδίου εργασίας και βελτιστοποίηση των πειραματικών παραμέτρων	40
3.3	Εξέταση μορφολογίας των ηλεκτροδίων	45
3.4	Φασματοσκοπία ATR – FTIR	47
3.5	Ηλεκτροχημικός χαρακτηρισμών κυψελίδων	48
3.6	Κατασκευή καμπύλης αναφοράς σε πρότυπα διαλύματα και τεχνητά δάκρυα	50
3.7	Ανάλυση βιολογικών δειγμάτων δακρύων.....	54
4.	Συμπεράσματα	57
5.	Βιβλιογραφία	59

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ανάπτυξη αναλυτικών συσκευών για μη επεμβατικές ιατροδιαγνωστικές εφαρμογές είναι εξαιρετικά σημαντική τόσο στον ακαδημαϊκό όσο και στον βιομηχανικό τομέα. Πέρα από τα παραδοσιακά δείγματα, όπως το αίμα και τα ούρα, η τρέχουσα έρευνα επικεντρώνεται όλο και περισσότερο στην ανάλυση του ιδρώτα και των δακρύων, καθώς και στην ανάπτυξη χαμηλού κόστους διαγνωστικών συσκευών που μπορούν να παρέχουν αξιόπιστα αποτελέσματα σε χώρους εκτός εργαστηρίου και χωρίς να απαιτούν εξειδικευμένο προσωπικό.

Προς αυτήν την κατεύθυνση, η παρούσα εργασία παρουσιάζει την ανάπτυξη μιας (ημι)απορριπτόμενης ηλεκτροχημικής συσκευής, με χαμηλό κόστος και ευκολία στην κατασκευή, η οποία απαιτεί μόλις ένα μικρόλιτρο δείγματος για τον προσδιορισμό του ουρικού οξέος στα ανθρώπινα δάκρυα και τη διάγνωση της υπερουριχαιμίας. Λαμβάνοντας ως κριτήρια την απόκριση του ηλεκτροδίου εργασίας στην οξείδωση του ουρικού οξέος και το διαχωρισμό του ηλεκτροχημικού σήματός του από το αντίστοιχο σήμα του ασκορβικού οξέος σε συγκέντρωση τρεις φορές μεγαλύτερη, η επιφάνεια του ηλεκτροδίου τροποποιήθηκε με νανοσωματίδια σιδήρου παραγόμενα με ηλεκτρική εκκένωση και με γραφитικό νιτρίδιο του άνθρακα ($g-C_3N_4$). Ακολούθησε ο μορφολογικός και ηλεκτροχημικός χαρακτηρισμός της ηλεκτροχημικής διάταξης και κάτω από ορισμένες πειραματικές συνθήκες οι μετρήσεις διαφορικής παλμικής βολταμμετρίας έδειξαν ότι τα ρεύματα κορυφής στα 0.25 V περίπου (έναντι ηλεκτροδίου ψευδοαναφοράς γραφίτη) σχετίζονται γραμμικά με τη συγκέντρωση του ουρικού οξέος στο εύρος συγκεντρώσεων 1-50 μM σε 0.1 M PBS, pH 5 και στο εύρος συγκεντρώσεων 2-50 μM σε τεχνητά δάκρυα, που περιέχουν 30 μM ασκορβικό οξύ. Η καταλληλότητα της μεθόδου για τη διάγνωση της υπερουριχαιμίας, που αποτελεί πρόδρομο στάδιο της ουρικής αρθρίτιδας (gout), επαληθεύτηκε σε δείγματα ανθρώπινων δακρύων, τα οποία συλλέχθηκαν με οφθαλμολογικούς ράβδους (ocular sticks) από τρεις υγιείς νεαρούς εθελοντές. Η ανάκτηση της μεθόδου κυμάνθηκε από 99-109%.

ABSTRACT

The development of analytical devices for non-invasive medical diagnostics is immensely important in both academia and industry. Beyond traditional samples like blood and urine, current research is increasingly focused on the analysis of sweat and tears and the development of low-cost diagnostic devices capable of delivering reliable results in low-resource settings by non-expert users.

In response, we report on the development of an easy-constructed, low-cost, (semi)disposable electrochemical device requiring only one microliter of sample for the determination of uric acid in human tears and the diagnosis of hyperuricemia. Taking as criteria the response of the working electrode towards the oxidation of uric acid and the separation of its peak from that of a 3-fold concentration excess of ascorbic acid, electrode surface was modified with spark generated Fe_xO_y nanoparticles and graphitic carbon nitride (g- C_3N_4). Various experimental variables were examined. Under selected conditions, differential pulsed voltammetric measurements showed that the peak currents at ca. 0.25 V vs. graphite pseudo reference are linearly related to the concentration of uric acid over the range from 1 to 50 μM in 0.1 M PBS pH 5 and from 2 to 50 μM in artificial tears containing 30 μM ascorbic acid. The method's applicability for diagnosing hyperuricemia, a known predisposing factor for inflammatory arthritis (gout), was validated at human tear samples collected with ocular sticks from three healthy young volunteers. Recovery was 99-109%.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

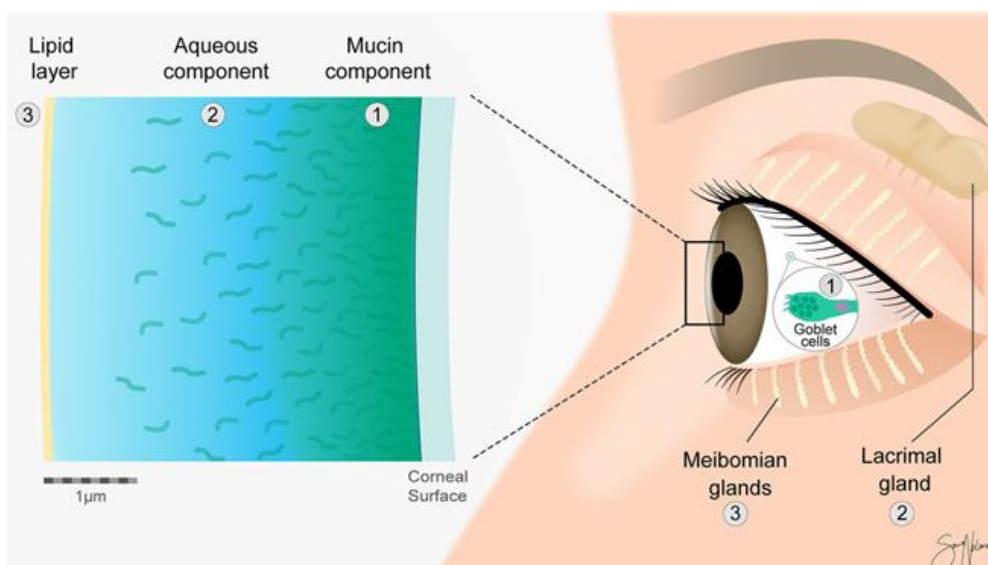
1. Εισαγωγή

1.1 Δάκρυα

Τα δάκρυα αποτελούν ένα πολύ σημαντικό βιολογικό υγρό και αποτελούνται κυρίως από νερό, πρωτεΐνες, ένζυμα, λιπίδια και ηλεκτρολύτες, όπως είναι το χλωριούχο νάτριο και το ανθρακικό κάλιο. Σύμφωνα με την Αμερικανική Ακαδημία Οφθαλμολογίας (American academy of ophthalmology), χωρίζονται σε τρεις βασικές κατηγορίες: τα **βασικά δάκρυα** (basal tears) που είναι αυτά που ενυδατώνουν και προστατεύουν τον κερατοειδή, τα **ανακλαστικά δάκρυα** (reflex tears) που προκαλούνται ακούσια εξαιτίας διάφορων ερεθισμάτων, όπως είναι ο καπνός, και τα **συναισθηματικά δάκρυα** (emotional tears) που προκαλούνται λόγω συναισθηματικής φόρτισης, χαράς, λύπης.¹ Πολλοί ερευνητές συγκαταλέγουν τα συναισθηματικά δάκρυα στην κατηγορία των ανακλαστικών δακρύων, καθώς και αυτά προκαλούνται ακούσια λόγω ερεθισμάτων που συνδέονται με εκείνα τα κέντρα του εγκεφάλου που είναι υπεύθυνα για τα συναισθήματα.

Τα βασικά δάκρυα βρίσκονται συνεχώς στην επιφάνεια του κερατοειδή και συνθέτουν μία μεμβράνη, τη δακρυϊκή μεμβράνη. Η δακρυϊκή μεμβράνη αποτελείται από τρία στρώματα, το εσωτερικό βλεννώδες στρώμα (mucin layer), το μεσαίο υδατικό στρώμα (aqueous layer) και το εξωτερικό λιπαρό στρώμα (lipid layer) και έχει πάχος 2-6 μm.² Το εσωτερικό στρώμα αποτελείται από βλεννίτες (γλυκοπρωτεΐνες υψηλού μοριακού βάρους), ηλεκτρολύτες και νερό και χρησιμεύει στη λίπανση της οφθαλμικής επιφάνειας, καθώς και στην προστασία του ματιού από παθογόνους μικροοργανισμούς και από διάφορους εξωτερικούς παράγοντες, όπως η σκόνη. Το μεσαίο υδατικό στρώμα αποτελείται από νερό, ηλεκτρολύτες και πρωτεΐνες που εκκρίνονται από τα επιθηλιακά κύτταρα του κερατοειδούς (cornea) και του επιπεφυκότα (conjunctiva), καθώς και από τους κύριους και βοηθητικούς δακρυϊκούς αδένες. Η ύπαρξη του συγκεκριμένου στρώματος είναι καθοριστική, καθώς συμβάλλει στην προστασία του κερατοειδούς από παθογόνα, στην απομάκρυνση των νεκρών κυττάρων, των τοξινών και των ξένων σωμάτων, στη διατήρηση του pH και της οσμωτικότητας των δακρύων και τέλος στη διατήρηση της οφθαλμικής επιφάνειας υγρής. Τέλος, το εξωτερικό στρώμα αποτελείται από πολικά και μη πολικά λιπίδια και φωσφολιπίδια, εκκρίνεται από τους μείβομιανούς αδένες (meibomian glands) και χρησιμεύει στην πρόληψη της μόλυνσης και στη μείωση του ρυθμού εξάτμισης της δακρυϊκής μεμβράνης.^{3,4,5} Πολλές φορές, ωστόσο,

το υδατικό και το βλεννιτικό στρώμα θεωρούνται ως ένα ενιαίο στρώμα που καλείται υδατικό στρώμα βλεννίνης (aqueous-mucin layer) και έχει υφή γέλης.²



Σχήμα 1: Δακρυϊκή μεμβράνη.⁶

Η παραγωγή δακρύων είναι μία ρυθμιζόμενη διαδικασία, που ελέγχεται από το νευρικό σύστημα. Οι δακρυϊκοί και οι μείβομιοι αδένες ελέγχονται τόσο μέσω του παρασυμπαθητικού όσο και μέσω του συμπαθητικού νευρικού συστήματος, ενώ τα λαγηνοειδή ή καλυκοειδή κύτταρα (goblet cells) ελέγχονται κυρίως μέσω του παρασυμπαθητικού νευρικού συστήματος. Συγκεκριμένα, το παρασυμπαθητικό νευρικό σύστημα διεγείρει τους δακρυϊκούς αδένες να εκκρίνουν το υδαρές υγρό και τους μείβομιονούς αδένες και τα λαγηνοειδή κύτταρα να παράγουν λιπίδια και βλεννίνη αντίστοιχα. Η οφθαλμική επιφάνεια παρουσιάζει υψηλή πυκνότητα νευρικών απολήξεων, κυρίως στον κερατοειδή και στα άκρα των βλεφάρων, για τις οποίες είναι υπεύθυνο το τρίδυμο νεύρο.^{5,7,8} Οι νευρικές αυτές εισροές και εκροές σχηματίζουν ένα ανακλαστικό τόξο, το οποίο προσαρμόζει την έκκριση των δακρύων στις ανάγκες του ματιού. Όταν, δηλαδή, αισθητηριακοί υποδοχείς στον οφθαλμό ανιχνεύσουν ερεθισμό, όπως ξηρότητα, σκόνη, καπνό, το τρίδυμο νεύρο μεταφέρει το σήμα αυτό στο κεντρικό νευρικό σύστημα και ενεργοποιείται μία ανακλαστική οδός που αυξάνει την παραγωγή δακρύων (ανακλαστικό τόξο). Οι μηνίσκοι που βρίσκονται στη συμβολή των βλεφάρων με τον βολβό (μάτι), επιτρέπουν την κίνηση των δακρύων προς τα δακρυϊκά κανάλια, μέσω των οποίων καταλήγουν στο ρινοδακρυϊκό σύστημα. Η ποσότητα των δακρύων που εξατμίζεται αντικαθίσταται από νέα δακρυϊκή έκκριση. Ο ρυθμός παραγωγής των

δακρύων είναι 1-3 $\mu\text{L}/\text{min}$, αλλά μπορεί να αυξηθεί σημαντικά λόγω εξωτερικών ερεθισμάτων, όπως σκόνη, καπνός, ή λόγω συναισθηματικής αντίδρασης.^{8,9}

1.1.1 Δάκρυα ως βιοδείκτες

Τα δάκρυα αποτελούν χρήσιμο βιολογικό υγρό, καθώς μπορούν να υποδηλώσουν την ύπαρξη διαφόρων ασθενειών τόσο στην οφθαλμική περιοχή όσο και γενικότερα στο ανθρώπινο σώμα, μέσω συγκεκριμένων βιοδεικτών. Τέτοιες ασθένειες που αφορούν την οφθαλμική περιοχή είναι το γλαύκωμα, η ξηροφθαλμία, η επιπεφυκίτιδα, η βλεφαρίτιδα, ο κερατοκώνος και η οφθαλμοπάθεια Graves. Στις γενικές ασθένειες που μπορούν να διαγνωστούν μέσω των δακρύων συγκαταλέγονται ο διαβήτης (διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια – diabetic retinopathy), το αλτσχάιμερ, το πάρκινσον, η κυστική ίνωση, η σκλήρυνση κατά πλάκας, ο καρκίνος, κυρίως του μαστού, η υπερουριχαιμία (hyperuricemia), που αποτελεί πρόδρομο στάδιο της ουρικής αρθρίτιδας και η ουρική αρθρίτιδα (gouty arthritis)¹⁰ (Πίνακας 1). Συγκεκριμένα, η υπερουριχαιμία και κατ' επέκταση η ουρική αρθρίτιδα μπορούν να διαγνωστούν μετρώντας τα επίπεδα ουρικού οξέος τόσο στον ορό του αίματος όσο και στα δάκρυα. Ωστόσο, για τη μέτρηση του ουρικού οξέος στον ορό του αίματος απαιτείται παρακέντηση της περιφερικής φλέβας, γεγονός που είναι πιο επώδυνο για τον ασθενή.¹¹ Για τον λόγο αυτό προτείνεται η μέτρηση του ουρικού οξέος μέσω των δακρύων, που είναι μία μη επεμβατική μέθοδος, πιο προσιτή, λιγότερο χρονοβόρα, λιγότερο πολύπλοκη συγκριτικά με τη δειγματοληψία αίματος και δεν προκαλεί δυσφορία στον ασθενή.¹⁰ Ένας ακόμη λόγος που προτιμώνται τα δάκρυα είναι ότι απαιτούν ελάχιστη έως καθόλου επεξεργασία πριν την ανάλυση. Μάλιστα, ύστερα από την έρευνα των Park et al.¹² που έδειξαν την γραμμική σχέση μεταξύ των επιπέδων ουρικού οξέος στο αίμα και τα δάκρυα, ολοένα και περισσότερο προτιμώνται τα δάκρυα ως το βιολογικό υγρό για τη διάγνωση της ουρικής αρθρίτιδας.

Οι Park et al.¹² μελέτησαν το ουρικό οξύ στα δάκρυα χρησιμοποιώντας την τεχνική SERS (Surface – enhanced Raman Scattering) στο εύρος συγκεντρώσεων 25 – 150 μM και έδειξαν τη γραμμική σχέση των επιπέδων του ουρικού οξέος στο αίμα και τα δάκρυα. Συγκεκριμένα, έλαβαν δείγματα από υγιείς ανθρώπους, από ανθρώπους με υψηλό ρίσκο ουρικής αρθρίτιδας και τέλος από ασθενή που λάμβανε αγωγή για να καταστείλει τα επίπεδα ουρικού οξέος. Πραγματοποίησαν τη δειγματοληψία των

δακρύων χρησιμοποιώντας την ταινία Schirmer ενισχυμένη με πλασμόνια (plasmonic Schirmer strip), δηλαδή ενσωμάτωσαν νανοσωματίδια χρυσού στην χαρτοταινία του Schirmer test, ώστε να μπορούν να μετρήσουν εκτός από την ποσότητα των δακρύων και τη συγκέντρωση μικρών βιομορίων, όπως το ουρικό οξύ. Οι Li et al.¹¹ μελέτησαν, επίσης, τη συγκέντρωση του ουρικού οξέος στα δάκρυα χρησιμοποιώντας την τεχνική SERS (Surface – enhanced Raman Scattering) σε εύρη συγκεντρώσεων 25 – 150 μM . Έδειξαν κι αυτοί τη γραμμική συσχέτιση των επιπέδων ουρικού οξέος στο αίμα και τα δάκρυα. Η δειγματοληψία στη συγκεκριμένη περίπτωση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση τριχοειδών σωλήνων και περιλάμβανε τόσο υγιείς ανθρώπους όσο και ασθενείς. Οι C. Xiong et al.¹³, με τη σειρά τους, ανέπτυξαν έναν αισθητήρα για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της γλυκόζης και του ουρικού οξέος. Ο αισθητήρας κατασκευάζεται με SGGTs (Solution-gated graphene transistors) και διαθέτει δύο πύλες ηλεκτροδίων. Η μία πύλη ηλεκτροδίου τροποποιείται με GOx-CHIT/ Co_3O_4 , και δίνει την συνολική απόκριση ρεύματος τόσο για τη γλυκόζη όσο και για το ουρικό οξύ, και η δεύτερη πύλη, που δίνει την απόκριση ρεύματος αποκλειστικά του ουρικού οξέος, τροποποιείται με BSA-CHIT/ Co_3O_4 . Η ανίχνευση του ουρικού οξέος επιτυγχάνεται μέσω της άμεσης οξειδωσής του στο ηλεκτρόδιο πύλης. Με τον συγκεκριμένο αισθητήρα μέτρησαν το ουρικό οξύ σε συγκέντρωση $98.5 \pm 16.3 \mu\text{M}$ και το όριο ανίχνευσης της μεθόδου ήταν 100 nM.¹³ Τέλος, οι Wu et. al.¹⁴ μέτρησαν τα επίπεδα του ουρικού οξέος και της ιντερλευκίνης (IL-1 β) στα δάκρυα με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας (chemiluminescence) και της ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) αντίστοιχα, τόσο σε υγιείς εθελοντές όσο και σε εθελοντές που νοσούν από υπερουριχαιμία και ουρική αρθρίτιδα. Έδειξαν, λοιπόν, ότι τα επίπεδα ουρικού οξέος στους ασθενείς που νοσούν με υπερουριχαιμία είναι σημαντικά υψηλότερα συγκριτικά με τους υγιείς εθελοντές ($98.2 \pm 51.5 \mu\text{M}$ και $42.7 \pm 24.0 \mu\text{M}$ αντίστοιχα) και διαπίστωσαν τη συσχέτιση της συγκέντρωσης του ουρικού οξέος με τη συγκέντρωση της ιντερλευκίνης (IL-1 β) στα δάκρυα. Συγκεκριμένα, όσο αυξάνεται το ουρικό οξύ στα δάκρυα τόσο αυξάνεται και η ιντερλευκίνη (IL-1 β).¹⁴

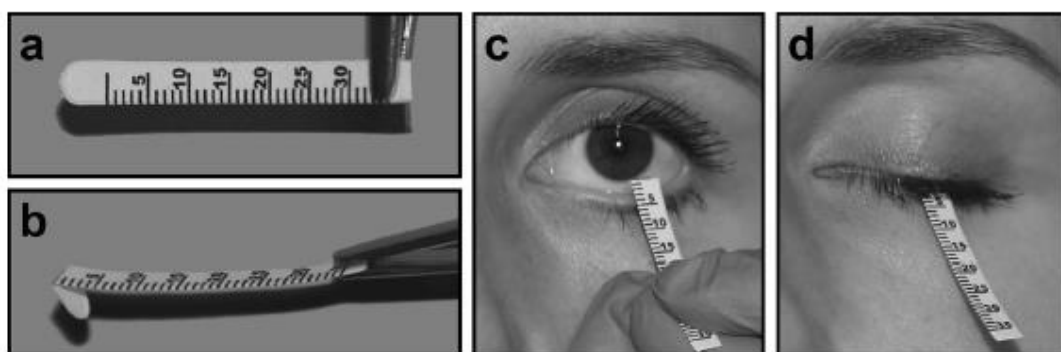
Πίνακας 1: Βιοδείκτες στα δάκρυα για τη διάγνωση διάφορων ασθενειών

Ασθένεια		Βιοδείκτης	Συγκέντρωση
Γλαύκωμα ¹⁵		Λυσοζύμη C, Προλακτίνη	Αύξηση
Θυροειδής ¹⁶		IL-1β, IL-6, IL-8	Αύξηση
Πάρκινσον ¹⁷		Peroxioredoxin-6, annexin-X5, TNF-α	Αύξηση
Κυστική ίνωση ¹⁸		IL-8, IFN-γ, MIP-1α	Αύξηση
Καρκίνος	Μαστού ¹⁹	Κυστατίνη SA, miR-21, miR-200c	Αύξηση
	Παχέος εντέρου ²⁰	Lacryglobin	Αύξηση
	Οφθαλμού ²¹	Κυστατίνες C, Λακτοφερρίνη	Αύξηση
Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια ²²		APOA1, APOB, S100 A8	Αύξηση
Ημικρανία ²³		Πεπτίδιο συσχετιζόμενο με το γονίδιο της καλσιτονίνης	Αύξηση
Διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια ^{24,25}		Λακτοτρανσφερίνη, Λυσοζύμη C, TNF-α	Αύξηση
Στρες	Καρδιαγγειακή νόσος ^{26,27}	Κορτιζόλη	Αύξηση
	Ψυχολογικό ²⁸	Κορτιζόλη, διυδροεπιανδροστερόνη	Αύξηση
Ουρική Αρθρίτιδα ¹²		Ουρικό οξύ	Αύξηση > 95 μM

1.1.2 Μέθοδοι δειγματοληψίας δακρύων

Η δειγματοληψία των δακρύων είναι μία απλή και εύκολη διαδικασία και δεν απαιτεί την ύπαρξη εξειδικευμένου προσωπικού. Πρέπει, ωστόσο, όπως είναι κατανοητό, η δειγματοληψία να γίνεται με πολύ προσοχή, ώστε να μην τραυματιστεί η οφθαλμική περιοχή του δότη. Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι δειγματοληψίας δακρύων, με τις πιο γνωστές να είναι η ταινία Schirmer, τα χειρουργικά σφουγγάρια (surgical sponge), οι οφθαλμολογικοί ράβδοι (ocular sticks), οι τριχοειδείς μικροπιπέτες/σωλήνες (capillary micropipettes/tubes).

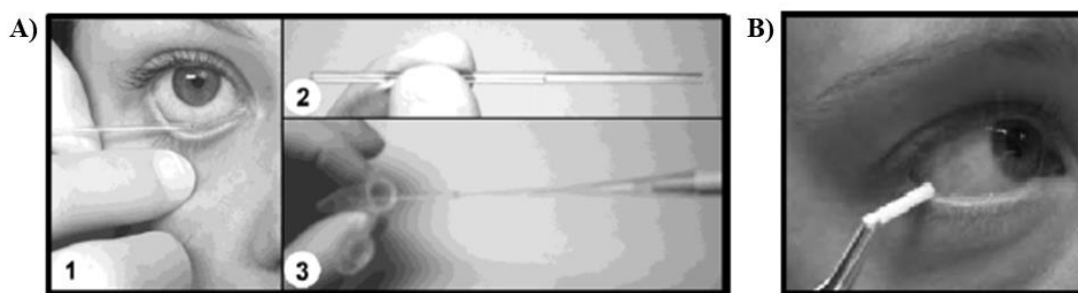
Το Schirmer τεστ αποτελεί ίσως την πιο χρησιμοποιημένη μέθοδο για τη δειγματοληψία των δακρύων. Πρόκειται για μία ταινία από χρωματογραφικό χαρτί Whatman (διαστάσεων 5×35 mm) με κλίμακα χιλιοστού που υποδεικνύει την ποσότητα των δακρύων που συλλέγονται και αναπτύχθηκε από τον Γερμανό οφθαλμίατρο Otto Schirmer.²⁹ Για τη δειγματοληψία, η ταινία Schirmer τοποθετείται στην οφθαλμική περιοχή με τέτοιο τρόπο, ώστε να βρίσκεται σε άμεση επαφή με τον επιπεφυκότα και τα μάτια διατηρούνται κλειστά.³⁰ Αναλόγως την ποσότητα των δακρύων που είναι επιθυμητή κάθε φορά, η ταινία μπορεί να μείνει σε αυτή τη θέση από λίγα δευτερόλεπτα έως μερικά λεπτά. Συνήθως, για να διαβραχεί πλήρως η ταινία απαιτούνται περίπου 5 min.^{12,10} Η μέθοδος αυτή, επίσης, χρησιμοποιείται για τη διάγνωση της ξηροφθαλμίας, καθώς αξιολογείται ο όγκος των δακρύων που συλλέγονται, δηλαδή το πόσο έχει διαβραχεί η ταινία Schirmer (σε mm).³¹



Σχήμα 2: Δειγματοληψία δακρύων με την ταινία Schirmer.³⁰

Ομοίως, την ίδια διαδικασία με την ταινία Schirmer για τη δειγματοληψία των δακρύων ακολουθούν οι οφθαλμολογικοί ράβδοι (ocular sticks), τα χειρουργικά σφουγγαράκια (surgical sponges) και γενικά όποια μέθοδος στηρίζεται στην προσρόφηση των δακρύων πάνω σε μία επιφάνεια. Συγκεκριμένα, οι οφθαλμολογικοί ράβδοι και τα χειρουργικά σφουγγαράκια τοποθετούνται είτε στο δεξιό είτε στο αριστερό άκρο του ματιού με τέτοιο τρόπο ώστε να βρίσκονται σε άμεση επαφή με τον επιπεφυκότα. Με τις μεθόδους αυτές είναι πιθανή η παραγωγή ανακλαστικών δακρύων, λόγω της επαφής με τον επιπεφυκότα, αναλόγως την ευαισθησία που παρουσιάζει ο δότης.¹⁰

Τέλος, μία αρκετά, επίσης, διαδεδομένη μέθοδος δειγματοληψίας είναι οι τριχοειδείς μικροπιπέτες (capillary micropipettes/microtubes). Κατά τη δειγματοληψία οι τριχοειδείς μικροπιπέτες τοποθετούνται στο άκρο του ματιού με τέτοιο τρόπο, ώστε να έρχονται σε επαφή με τον δακρυϊκό υμένα αλλά όχι με τον επιπεφυκότα και τον κερατοειδή.³² Με τη μέθοδο αυτή μειώνεται σημαντικά η παραγωγή ανακλαστικών δακρύων, καθώς δεν έρχονται σε επαφή με τον επιπεφυκότα. Η ποσότητα των δακρύων που συλλέγεται είναι μικρότερη συγκριτικά με τις άλλες μεθόδους.³³ Ωστόσο, η μέθοδος αυτή, σε αντίθεση με τις άλλες μεθόδους, πραγματοποιείται σε ανοιχτό μάτι, γεγονός που την καθιστά πιο χρονοβόρα, καθώς διακόπτεται με το ανοιγοκλείσιμο του ματιού, και έτσι είναι πιο κουραστική και ενοχλητική για τον δότη, ιδιαίτερα στην περίπτωση μικρών παιδιών.^{34,35,36}



Σχήμα 3: Δειγματοληψία δακρύων με τριχοειδείς μικροπιπέτες (A) και με χειρουργικά σφουγγαράκια (B).^{29,36}

Με το πέρας της δειγματοληψίας με την εκάστοτε μέθοδο, τα δείγματα, συνήθως, μεταφέρονται σε φιαλίδιο erpendorf, φυγοκεντρούνται και έπειτα αποθηκεύονται στην κατάψυξη μέχρι την μέτρησή τους. Επίσης, όπως φαίνεται και στα Σχήματα 2 και 3 τα απορροφητικά υλικά, όπως είναι η ταινία Schirmer, οι οφθαλμολογικοί ράβδοι και τα χειρουργικά σφουγγαράκια κρατούνται με λαβίδες, προκειμένου να αποφευχθεί η

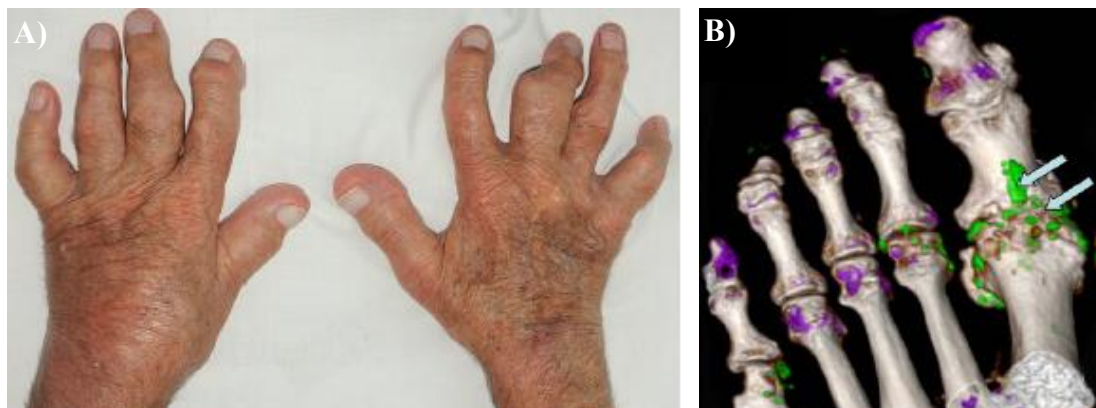
μεταφορά του ιδρώτα και του λίπους του χεριού του ατόμου που πραγματοποιεί τη δειγματοληψία στο απορροφητικό υλικό.

1.2 Ουρική Αρθρίτιδα (Gouty Arthritis)

Η ουρική αρθρίτιδα αποτελεί την πιο κοινή μορφή φλεγμονώδους αρθρίτιδας και αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά ως ασθένεια από τους Αιγύπτιους το 2640 π.Χ. και στη συνέχεια από τον Ιπποκράτη τον 5^ο αιώνα π.Χ.^{37,38} Αναφερόταν και ως «η ασθένεια των βασιλιάδων», διότι όταν πρωτοεμφανίστηκε συσχετίστηκε με το πλούσιο φαγητό και το αλκοόλ, ύλες που μόνο οι εύποροι της εποχής θα μπορούσαν να διαθέτουν.³⁹ Πλέον, αναφέρεται ως ουρική αρθρίτιδα και πρόκειται για μία ρευματολογική ασθένεια, που εμφανίζεται κυρίως σε άνδρες άνω των 40 ετών, είναι μία μεταβολική διαταραχή και επομένως επηρεάζεται από τις διατροφικές συνήθειες, όπως είναι η κατανάλωση αλκοόλ και από ασθένειες όπως η παχυσαρκία.⁴⁰

Η ουρική αρθρίτιδα συχνά συγχέεται λανθασμένα με την υπερουριχαιμία (hyperuricemia). Η υπερουριχαιμία αποτελεί πρόδρομο στάδιο της ουρικής αρθρίτιδας, χωρίς αυτό να σημαίνει ότι αν ο ασθενής διαγνωστεί με υπερουριχαιμία, νοσεί υποχρεωτικά και από την ουρική αρθρίτιδα. Συγκεκριμένα, υπάρχουν τέσσερα κλινικά στάδια της ουρικής αρθρίτιδας: η ασυμπτωματική υπερουριχαιμία, η οξεία ουρική αρθρίτιδα, η ενδιάμεση ουρική αρθρίτιδα, η οποία αναφέρεται ουσιαστικά στα διαστήματα μεταξύ των οξέων κρίσεων και τέλος η χρόνια τοφώδης ουρική αρθρίτιδα. Ουσιαστικά, η ασυμπτωματική υπερουριχαιμία προκαλείται λόγω των αυξημένων επιπέδων ουρικού οξέος στον οργανισμό, μπορεί να διαρκέσει και χρόνια και συνήθως η διάγνωσή της γίνεται κατά τον εργαστηριακό έλεγχο του ασθενούς για άλλη ασθένεια. Η οξεία ουρική αρθρίτιδα είναι μία κρίση, κατά την οποία προκαλείται ξαφνικά έντονη φλεγμονή σε μία ή περισσότερες αρθρώσεις, συνοδεύεται από πόνο, ερυθρότητα και οίδημα και συνήθως διαρκεί 3 έως 10 ημέρες και μπορεί να υποχωρήσει και χωρίς θεραπεία. Η ενδιάμεση ουρική αρθρίτιδα αναφέρεται στα διαστήματα μεταξύ των κρίσεων, κατά τα οποία ο ασθενής δεν εμφανίζει συμπτώματα. Αν δεν αντιμετωπιστεί με θεραπεία οι κρίσεις εμφανίζονται όλο και συχνότερα και είναι πιο έντονες. Τέλος, η χρόνια τοφώδης ουρική αρθρίτιδα ή πιο απλά ποδάγρα, εμφανίζεται ύστερα από χρόνια νόσο προηγούμενων σταδίων που δε θεραπεύτηκε, προκαλεί μόνιμη βλάβη στις αρθρώσεις και τους ιστούς και η φλεγμονή είναι επίπονη

και συνεχής. Ονομάζεται τοφώδης, διότι σε αυτό το στάδιο σχηματίζονται τόφοι, δηλαδή σκληρά οζίδια (εξογκώματα) λόγω εναποθέσεων κρυστάλλων ουρικού οξέος σε αρθρώσεις, όπως τα δάκτυλα χεριών και ποδιών και τα γόνατα.^{41,42,43}



Σχήμα 4: Α) Άκρα ασθενούς με χρόνια τοφώδης ουρική αρθρίτιδα και Β) κρύσταλλοι MSU σε πόδι ασθενούς.^{42,43}

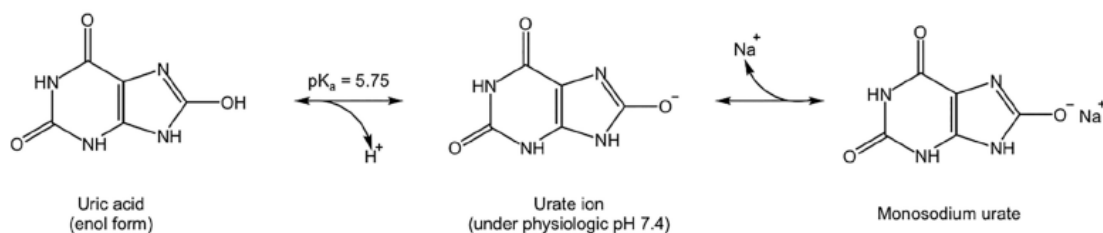
Η ουρική αρθρίτιδα προκαλείται λόγω υψηλών επιπέδων ουρικού οξέος στον οργανισμό. Τα φυσιολογικά επίπεδα ουρικού οξέος στον ορό του αίματος κυμαίνονται από 3.5 έως 7.2 mg/dL (210-430 $\mu\text{mol/L}$) για τους άνδρες και από 2.6 έως 6.0 mg/dL (155-360 $\mu\text{mol/L}$) για τις γυναίκες.⁴⁴ Αντίστοιχα, τα επίπεδα ουρικού οξέος στα δάκρυα για τους υγιείς ανθρώπους είναι μικρότερα από 95 μM και δεν παρουσιάζουν διαφοροποίηση μεταξύ ανδρών και γυναικών. Οποιαδήποτε τιμή μεγαλύτερη των παραπάνω ορίων υποδηλώνει την εμφάνιση υπερουριχαιμίας.¹²

1.2.1 Παθοφυσιολογία

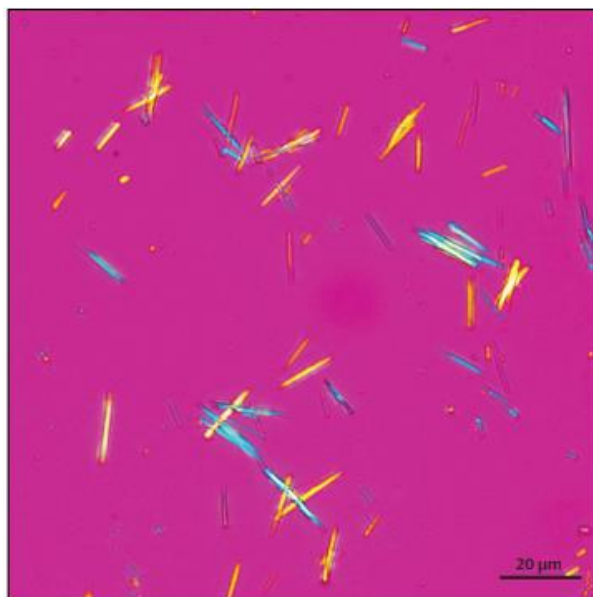
Η ουρική αρθρίτιδα οφείλεται είτε σε αυξημένη παραγωγή ουρικού οξέος είτε σε μειωμένη απέκκριση αυτού. Πιο αναλυτικά, το ουρικό οξύ (2,6,8 τριοξυπουρίνη, $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3$) είναι ένα ασθενές οξύ, που είναι υπεύθυνο για τη διατήρηση του αντιοξειδωτικού στρες και βοηθά στην πρόληψη της αρτηριακής πίεσης.⁴⁵ Αποβάλλεται κυρίως από τα νεφρά (65-75%) και το έντερο (25-35%) και είναι το τελικό προϊόν του καταβολισμού των πουρινών στους ανθρώπους.⁴⁶ Στα περισσότερα θηλαστικά το ουρικό οξύ, στη συνέχεια, οξειδώνεται, με την παρουσία του ενζύμου ουρικάση (ουρική οξειδάση), σε αλλαντοϊνη (allantoin), η οποία είναι υδατοδιαλυτή και απεκκρίνεται αμετάβλητη μέσω των ούρων.⁴⁷ Ωστόσο, στους ανθρώπους

παρατηρείται απώλεια λειτουργικότητας του γονιδίου που κωδικοποιεί το ένζυμο ουρικάση, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση ουρικού οξέος στον οργανισμό.⁴⁸ Αυτός είναι και ο κυριότερος λόγος εμφάνισης της υπερουριχαιμίας και κατ' επέκταση της ουρικής αρθρίτιδας. Ωστόσο, πρόσθετοι παράγοντες είναι απαραίτητοι για την εμφάνιση της ασθένειας αυτής, όπως είναι η κατανάλωση τροφών πλούσιων σε πουρίνες, όπως είναι το κόκκινο κρέας, τα θαλασσινά και το αλκοόλ.⁴⁹ Επίσης, η ουρική αρθρίτιδα συχνά προκαλείται λόγω νεφρικών παθήσεων, καθώς δεν πραγματοποιείται σωστά η απέκκριση του ουρικού οξέος, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση αυτού στον ανθρώπινο οργανισμό. Άλλες ασθένειες που σχετίζονται με την ουρική αρθρίτιδα είναι η υπέρταση, ο σακχαρώδης διαβήτης και οι καρδιαγγειακές παθήσεις, καθώς συχνά η φαρμακευτική αγωγή για την καταπολέμηση αυτών των ασθενειών οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων του ουρικού οξέος.^{44,50,51} Επιπλέον, άτομα που νοσούν από λευχαιμία είναι πολύ πιθανό να εμφανίσουν και ουρική αρθρίτιδα, καθώς κατά τη διάρκεια της νόσου αυτής παρατηρείται συνεχής παραγωγή και ταχεία αποδόμηση λευχαιμικών κυττάρων. Ο αυξημένος αυτός κυτταρικός πολλαπλασιασμός οδηγεί σε αυξημένη απελευθέρωση νουκλεϊκών οξέων, τα οποία μεταβολίζονται σε πουρίνες, οι οποίες, με τη σειρά τους μετατρέπονται σε ουρικό οξύ.⁵² Τέλος, διάφοροι γενετικοί παράγοντες μπορεί να οδηγήσουν σε υπερπαραγωγή του ουρικού οξέος.

Όπως προαναφέρθηκε, τα αυξημένα επίπεδα ουρικού οξέος στον ανθρώπινο οργανισμό για μεγάλα χρονικά διαστήματα οδηγούν στην εναπόθεση κρυστάλλων ουρικού μονονατρίου (monosodium urate, MSU). Συγκεκριμένα, το ουρικό οξύ, ένα ασθενές οξύ, υφίσταται αποπρωτονίωση και υπό φυσιολογικές συνθήκες συναντάται ως ουρικό ανιόν στο αίμα. Τα ουρικά ανιόντα συνδέονται μεταξύ τους μέσω δεσμών υδρογόνου και ευθυγραμμίζονται κατά μήκος των άκρων τους, σχηματίζοντας επίπεδα φύλλα δακτυλίων πουρίνης. Έπειτα, τα ουρικά ανιόντα συνδέονται με ιόντα νατρίου προς σχηματισμό των κρυστάλλων MSU. Οι κρύσταλλοι αυτοί έχουν τρίκλινη δομή (triclinic structure) με τρεις άνισους άξονες (κανένας κάθετος με τους υπόλοιπους), στην οποία στοιβαγμένα φύλλα δακτυλίων πουρίνης δίνουν το χαρακτηριστικό βελονοειδές σχήμα που παρατηρείται στο μικροσκόπιο.^{48,53}



Σχήμα 5: Σχηματισμός κρυστάλλων MSU.⁵³



Σχήμα 6: Κρύσταλλοι MSU υπό μικροσκοπία πολωμένου φωτός.⁵⁴

Με τον σχηματισμό των κρυστάλλων MSU ενεργοποιείται το ανοσοποιητικό σύστημα και συγκεκριμένα τα μακροφάγα του ιστού, τα οποία εκκρίνουν κυτταροκίνες, όπως η ιντερλευκίνη 1β (IL-1β), οι οποίες προκαλούν φλεγμονή. Οι ουσίες αυτές ενεργοποιούν τα ουδετερόφιλα, τα οποία είναι ένας τύπος λευκών αιμοσφαιρίων. Τα ουδετερόφιλα ενεργοποιούνται περαιτέρω όταν έρχονται σε επαφή με τους κρυστάλλους MSU, με αποτέλεσμα την παραγωγή φλεγμονωδών ουσιών, οι οποίες ενισχύουν τη φλεγμονή προκαλώντας έντονο πόνο και πρήξιμο, χαρακτηριστικά της οξείας ουρικής αρθρίτιδας.⁴⁸

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, με τον σχηματισμό κρυστάλλων MSU παράγονται κυτταροκίνες και συγκεκριμένα η IL-1β, η οποία προκαλεί τη φλεγμονή. Επομένως, η συγκέντρωση της ιντερλευκίνης συνδέεται άμεσα με τα επίπεδα ουρικού οξέος στον οργανισμό, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τη μελέτη των Wu et.al..⁵⁵

1.2.2 Θεραπεία ουρικής αρθρίτιδας

Η ουρική αρθρίτιδα, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, αποτελείται από τέσσερα στάδια, επομένως η αντιμετώπισή της περιλαμβάνει διαφορετικά βήματα αναλόγως τα συμπτώματα του ασθενούς. Συγκεκριμένα, τα στάδια αυτά περιλαμβάνουν την άμεση αντιμετώπιση ενός οξέος επεισοδίου, τη μείωση των αυξημένων επιπέδων ουρικού οξέος με σκοπό την πρόληψη νέων κρίσεων και την αποφυγή της εναπόθεσης κρυστάλλων ουρικού μονονατρίου στους ιστούς και τις αρθρώσεις και τέλος την προληπτική αντιμετώπιση ώστε να περιοριστεί ο κίνδυνος επανεμφάνισης οξέων επεισοδίων.⁴¹

Η θεραπεία της ουρικής αρθρίτιδας επικεντρώνεται, αρχικά, στον τρόπο ζωής του ασθενούς. Συγκεκριμένα, οι ασθενείς πρέπει να αποφεύγουν την κατανάλωση τροφών πλούσιων σε πουρίνες, όπως το κρέας και τα θαλασσινά, καθώς και την κατανάλωση αλκοόλ και κυριότερα τη μύρα. Επίσης, είναι αναγκαία η καλή ενυδάτωση των ατόμων που νοσούν από ουρική αρθρίτιδα (πρόληψη τουλάχιστον 2 λίτρων υγρών καθημερινά) προκειμένου να διευκολυνθεί η αποβολή του ουρικού οξέος μέσω των νεφρών.⁵¹

Σε περιπτώσεις, όμως, που η σωστή διατροφή δεν επαρκεί, χορηγείται στον ασθενή η κατάλληλη φαρμακευτική αγωγή. Η φαρμακευτική θεραπεία χωρίζεται σε δύο βασικούς άξονες: την αντιμετώπιση των οξέων κρίσεων και την πρόληψη και μείωση των επεισοδίων με τη μακροχρόνια θεραπεία μείωσης των επιπέδων του ουρικού οξέος (urate-lowering therapy, ULT).

Οι κυριότερες φαρμακευτικές αγωγές για την αντιμετώπιση της φλεγμονής και του έντονου πόνου είναι η χρήση της κολχικίνης (colchicine), των μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων (nonsteroidal anti-inflammatory, NSAIDs), των κορτικοστεροειδών (corticosteroids) και τέλος η χρήση της κορτικοτροπίνης (corticotropin). Συγκεκριμένα, η κολχικίνη έχει αντιφλεγμονώδη δράση, χορηγείται κυρίως από τη στοματική κοιλότητα και σε ορισμένες περιπτώσεις που είναι αναγκαίο χορηγείται ενδοφλέβια και είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική όταν χορηγείται εντός των πρώτων 24 ωρών από την έναρξη της κρίσης.^{41,51} Ωστόσο προκαλεί διάφορες παρενέργειες, όπως ναυτία, διάρροια. Λόγω αυτών των παρενεργειών προτιμώνται τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (NSAIDs), τα οποία προσφέρουν αποτελεσματική ανακούφιση, ακόμη και με μία μόλις δόση, αν η χορήγηση

πραγματοποιηθεί άμεσα. Τα κορτικοστεροειδή συνιστώνται, συνήθως, σε περιπτώσεις που η χορήγηση κολχικίνης ή NSAIDs δεν είναι εφικτή και χορηγούνται είτε συστηματικά είτε τοπικά με ένεση κατευθείαν στην άρθρωση που έχει προσβληθεί. Τέλος, η κορτικοτροπίνη αποτελεί τη λιγότερο χρησιμοποιούμενη φαρμακευτική μέθοδο και χρησιμοποιείται σε ασθενείς που δεν μπορούν να λάβουν άλλη θεραπεία, είτε λόγω παρενεργειών που προκαλούν αυτές είτε λόγω άλλων ασθενειών που φέρουν οι ασθενείς.⁵¹

Οι κυριότερες φαρμακευτικές αγωγές για τη μείωση του ουρικού οξέος (ULT) είναι οι αναστολείς της οξειδάσης της ξανθίνης, τα ουρικοσουρικά φάρμακα (uricosurics drugs) και τέλος η πεγλοτικάση (pegloticase). Συγκεκριμένα, οι αναστολείς της οξειδάσης της ξανθίνης, όπως η αλλοπουρινόλη (allopurinol) αναστέλλουν τη σύνθεση του ουρικού οξέος, αποτελούν την προτιμότερη θεραπεία για τους περισσότερους ασθενείς και συχνά συνοδεύονται από κολχικίνη ή NSAIDs το πρώτο διάστημα, προκειμένου να μειωθεί ο κίνδυνος οξείας έξαρσης. Τα ουρικοσουρικά φάρμακα (uricosurics drugs) αυξάνουν την απέκκριση του ουρικού οξέος από τα νεφρά και χρησιμοποιούνται σε ασθενείς που δεν πάσχουν από νεφρική δυσλειτουργία και σε περιπτώσεις που δεν είναι εφικτή η χρήση των αναστολέων της οξειδάσης της ξανθίνης. Τέλος, η πεγλοτικάση είναι μία ανασυνδυασμένη ουρικάση, που μετατρέπει το ουρικό οξύ σε αλλαντοΐνη, που είναι πιο υδατοδιαλυτή και χρησιμοποιείται σε πολύ σοβαρές και ανεκτικές περιπτώσεις ουρικής αρθρίτιδας.⁵⁶

1.3 Τεχνική εκτύπωσης ηλεκτροδίων μέσω πλέγματος

Τα τελευταία χρόνια η ανάπτυξη ηλεκτροδίων χαμηλού κόστους και σχετικά μικρού μεγέθους κρίνεται αναγκαία, λόγω της ταχύτατης εξέλιξης των ηλεκτροχημικών αισθητήρων. Τα ηλεκτρόδια αυτά, γνωστά ως ηλεκτρόδια επίστρωσης, αποτελούνται από αγωγίμες, ημιαγωγίμες ή μονωτικές επιστρώσεις και η παραγωγή τους βασίζεται σε δύο τεχνολογίες: την τεχνολογία λεπτής επίστρωσης και την τεχνολογία παχιάς επίστρωσης. Με την τεχνολογία λεπτής επίστρωσης προκύπτουν ηλεκτρόδια με επιστρώσεις πάχους <5 μm, ενώ με την τεχνολογία παχιάς επίστρωσης προκύπτουν ηλεκτρόδια πάχους >5 μm.

Η τεχνική εκτύπωσης μέσω πλέγματος βασίζεται στην τεχνολογία παχιάς επίστρωσης (thick film technology) και χρησιμοποιείται για τη μαζική παραγωγή ηλεκτροδίων τόσο

σε βιομηχανική όσο και σε εργαστηριακή κλίμακα. Εμφανίστηκε ταυτόχρονα στην Αγγλία και τη Γαλλία το 1850 στην υφαντουργική βιομηχανία. Πρόδρομο στάδιο, ωστόσο, της σύγχρονης τεχνικής εκτύπωσης μέσω πλέγματος θεωρείται η τεχνική που χρησιμοποιούταν στην αρχαία Κίνα για την κατασκευή υφασμάτων με αποτυπωμένα σχέδια, με τη χρήση πλεγμάτων από ανθρώπινες τρίχες.⁵⁷ Σήμερα, η τεχνική εκτύπωσης μέσω πλέγματος βρίσκει εφαρμογή τόσο στις γραφικές τέχνες όσο και στη μικροηλεκτρονική, όπως παραδείγματος χάριν στην εκτύπωση ηλεκτρονικών κυκλωμάτων.⁵⁸

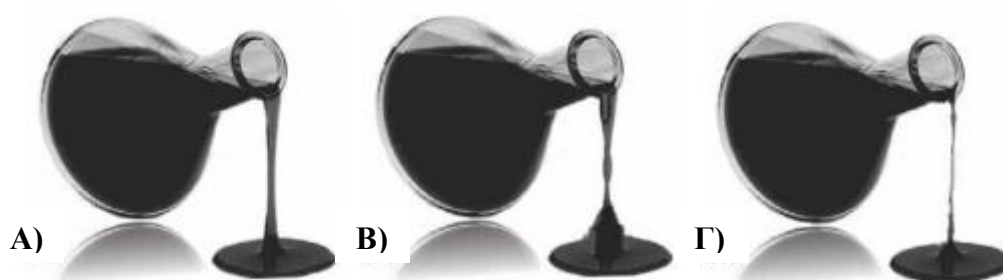
Το υλικό (μελάνι, ink) εκτύπωσης βρίσκεται σε μορφή παχύρευστου γαλακτώματος κατάλληλου ιξώδους. Χαρακτηρίζεται ως θιζοτροπικό υλικό, υλικό δηλαδή το οποίο έχει τη δυνατότητα να γίνεται ρευστό υπό πίεση και να επανέρχεται στην αρχική του φυσική κατάσταση μόλις παύσει η πίεση αυτή. Το μελάνι, κινούμενο υπό πίεση με τη βοήθεια ελαστικού σαρώθρου (squeegee) μέσω ενός πλέγματος – εκμαγείου (screen), εκτυπώνεται στο υλικό στήριξης (υπόστρωμα, substrate) και ακολούθως το εκτυπωμένο υλικό θερμαίνεται, σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας, προκειμένου να αποκτήσει τις επιθυμητές ιδιότητες.⁵⁸

Τα εκτυπωμένα ηλεκτρόδια είναι επίπεδα, διαφόρων σχημάτων (που καθορίζεται από το πλέγμα που χρησιμοποιείται κάθε φορά) και αποτελούνται από αγωγίμες και μονωτικές στρώσεις ελεγχόμενου πάχους πάνω στο επιθυμητό υπόστρωμα. Το πάχος των ηλεκτροδίων βρίσκεται συνήθως στο εύρος 80 – 120 μm .

1.3.1 Διαδικασία εκτύπωσης

Προκειμένου να ξεκινήσει η διαδικασία της εκτύπωσης πρέπει πρώτα να τοποθετηθεί το κατάλληλο πλέγμα πάνω από το υπόστρωμα, στο οποίο θα γίνει η εκτύπωση. Το πλέγμα είναι αυτό που καθορίζει το μέγεθος και το σχήμα των εκτυπωμένων ηλεκτροδίων.⁵⁹ Η περιοχή του πλέγματος που λειτουργεί ως εκμαγείο είναι πορώδης, ενώ η υπόλοιπη επιφάνεια είναι συμπαγής (τυφλή). Το μελάνι τοποθετείται στην επιφάνεια του πλέγματος και με τη βοήθεια του ελαστικού σαρώθρου κινείται υπό πίεση πάνω στην επιφάνεια του πλέγματος και εκτυπώνεται στο υπόστρωμα. Το μελάνι για να χρησιμοποιηθεί στην εκτύπωση θα πρέπει να έχει λεπτή και ρευστή υφή. Για το λόγο αυτό πριν την εκτύπωση προηγείται πάντα αργή ανάδευση του μελανιού μέχρι να επιτευχθεί η ροή που απεικονίζεται στο Σχήμα 7. Πρέπει, δηλαδή, το μελάνι να ρέει

εύκολα ως μία ομοιόμορφη και συνεχής μάζα, χωρίς να δημιουργούνται σβόλοι, και καθώς έρχεται σε επαφή με το κυρίως σώμα του μελανιού να δημιουργεί μία μικρή κορυφή, όπως στο Σχήμα 7 . Για να θεωρείται κατάλληλο το μελάνι για εκτύπωση πρέπει, επίσης, να διέρχεται εύκολα μέσω των οπών του πλέγματος, καθώς και να απομακρύνεται εύκολα από το πλέγμα όταν αυτό αποκολλάται από το υλικό εκτύπωσης, να ρέει εύκολα όταν απλώνεται από το σάρωθρο πάνω στο πλέγμα και τέλος να μη στεγνώνει μέσα στις οπές του πλέγματος κατά τη διάρκεια της εκτύπωσης.⁶⁰ Στο εμπόριο διατίθεται μεγάλη ποικιλία μελανιών, όπως μελάνι Ag, Au, Pt, Pd, Ag/AgCl και γραφίτη.⁵⁸

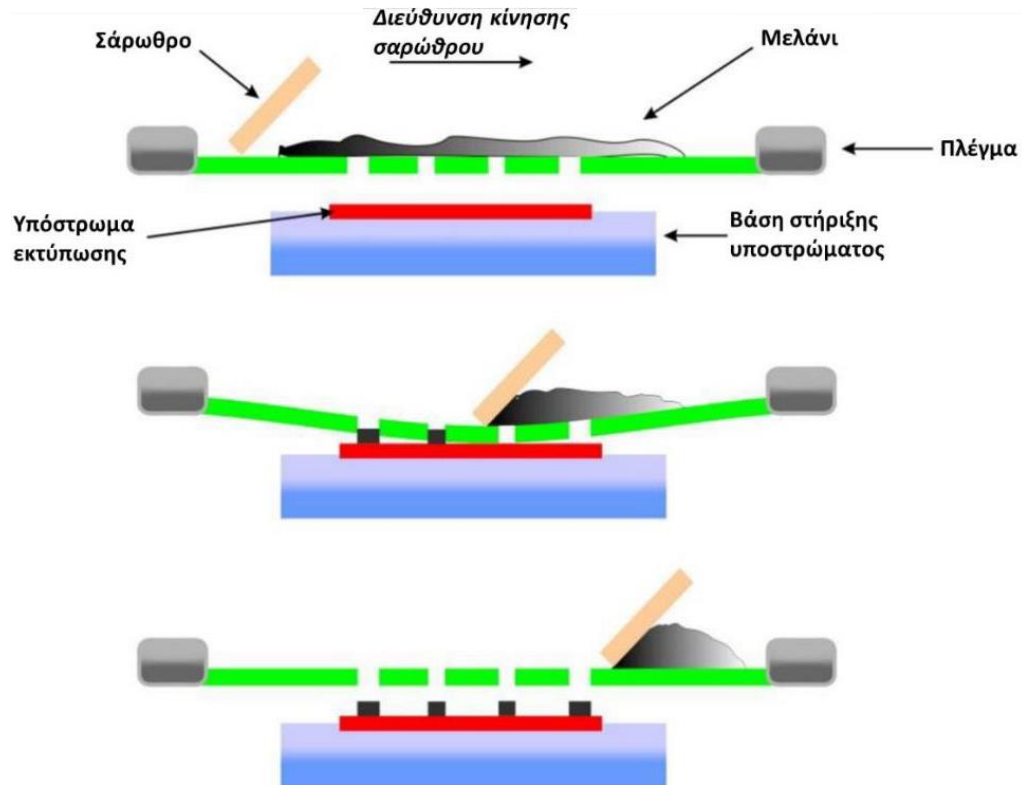


Σχήμα 7: Σωστή (A) και λάθος (B), (Γ) ροή μελανιού.⁵⁸

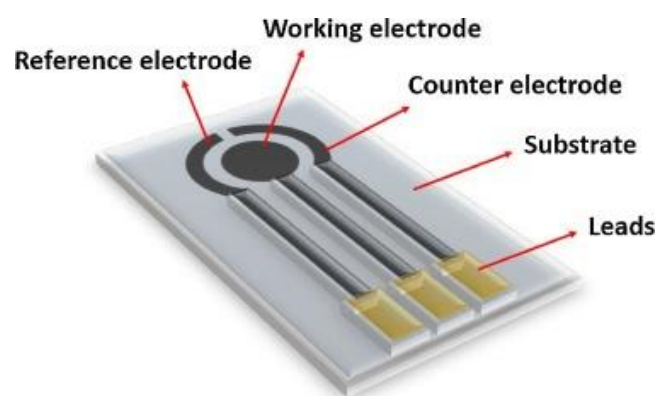
Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 8, καθώς το σάρωθρο περνά πάνω από την επιφάνεια του πλέγματος, το τελευταίο πιέζεται σταδιακά πάνω στο υπόστρωμα, χωρίς όμως να έρχεται σε άμεση επαφή με αυτό. Κατά τη διαδικασία αυτή, το μελάνι διεισδύει μέσα από τις οπές του πλέγματος, αφήνοντας έτσι το επιθυμητό αποτύπωμα πάνω στην επιφάνεια του υποστρώματος. Μετά το πέρας του σαρώθρου το πλέγμα επανέρχεται σταδιακά στην αρχική του θέση, διατηρώντας το αποτύπωμα του μελανιού στο υπόστρωμα άθικτο. Η σταθεροποίηση του υποστρώματος επάνω στην μετακινούμενη βάση του εκτυπωτή επιτυγχάνεται με τη βοήθεια κενού, που δημιουργείται στο κέντρο της βάσης.^{58,61}

Τα πλέγματα εκτύπωσης μπορούν να κατασκευαστούν χρησιμοποιώντας είτε μεταλλικά είτε ξύλινα πλέγματα στήριξης. Λόγω, όμως, της μεγαλύτερης μηχανικής αντοχής (όπως αντοχή στο σκέβρωμα) που εμφανίζουν τα μεταλλικά πλαίσια, καθώς και της μικρής διαφοράς των δύο υλικών στο κόστος, προτιμώνται σχεδόν εξ ολοκλήρου τα μεταλλικά πλαίσια. Ανάλογα με τον σχεδιασμό των πλεγμάτων καθίσταται εφικτή η εκτύπωση και κατασκευή τόσο μεμονωμένων ηλεκτροδίων όσο

και ολοκληρωμένων ηλεκτροχημικών στοιχείων, όπου δηλαδή γίνεται εκτύπωση του ηλεκτροδίου εργασίας, αναφοράς και βοηθητικού στο ίδιο υλικό στήριξης.^{58,62}



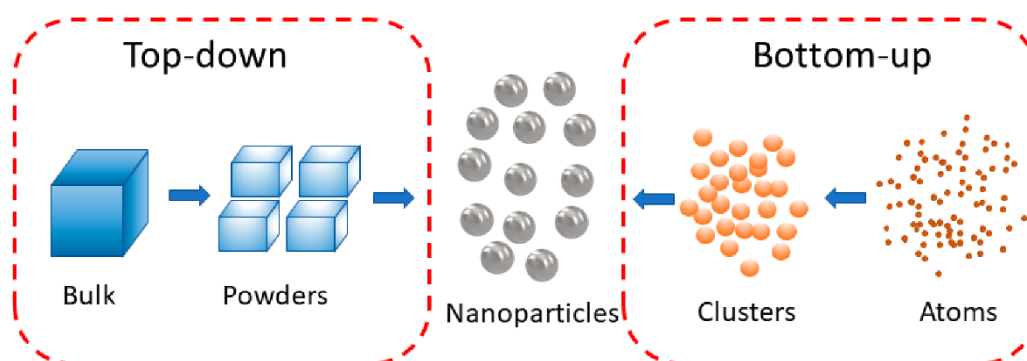
Σχήμα 8: Διαδικασία εκτύπωσης μέσω πλέγματος.⁵⁸



Σχήμα 9: Σχηματική απεικόνιση εκτυπωμένου ηλεκτροχημικού στοιχείου τριών ηλεκτροδίων.⁶²

1.4 Παραγωγή νανοσωματιδίων με ηλεκτρική εκκένωση

Τα νανοσωματίδια αποτελούν κλάδο με τεράστιο επιστημονικό και ερευνητικό ενδιαφέρον, λόγω των ιδιαίτερων ιδιοτήτων τους συγκριτικά με τα αντίστοιχα υλικά μεγάλου μεγέθους και της χρησιμότητάς τους σε διάφορους τομείς, όπως η κατάλυση, η ανάπτυξη αισθητήρων, η παραγωγή και αποθήκευση ενέργειας. Υπάρχουν δύο μέθοδοι σύνθεσης των νανοσωματιδίων: οι “top-down” και οι “bottom-up” μέθοδοι. Οι “top-down” μέθοδοι βασίζονται στη διάσπαση ενός υλικού μεγάλου μεγέθους για τη δημιουργία μικρότερων σωματιδίων. Η διάσπαση μπορεί να είναι μηχανική, φυσική ή χημική, όπως διάσπαση με θερμική αποσύνθεση, με υπερήχους και με άλεση του υλικού μεγάλου μεγέθους. Αντιθέτως, οι «bottom-up” μέθοδοι στηρίζονται στην πυρήνωση υλικών ατομικού μεγέθους στα τελικά νανοσωματίδια.^{63,64}



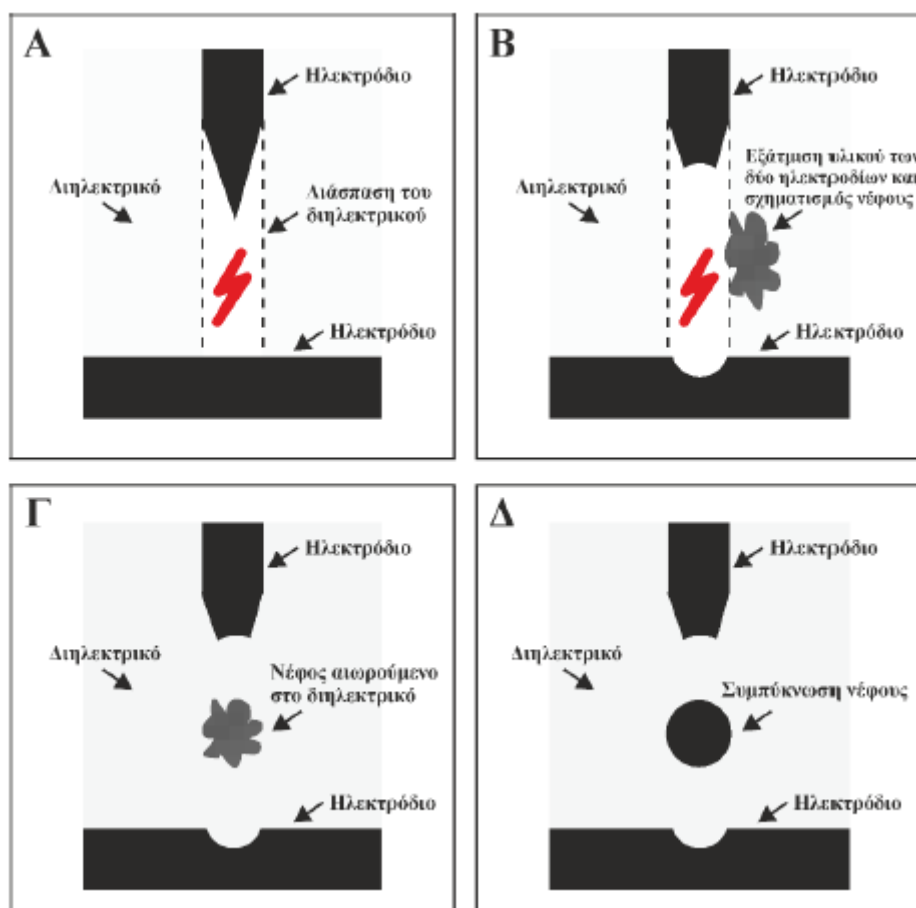
Σχήμα 10: Σχηματική απεικόνιση των μεθόδων “top-down” και “bottom-up” για την παραγωγή νανοσωματιδίων.⁶³

Η ηλεκτρική εκκένωση συγκαταλέγεται στις “top-down” μεθόδους και πρόκειται για μία θερμοηλεκτρική μέθοδο, καθώς πραγματοποιείται σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες, περίπου 5000-20000 °C. Οι θερμοκρασίες αυτές έχουν ως αποτέλεσμα τη θερμική απομάκρυνση του υλικού των ηλεκτροδίων. Συγκεκριμένα, η ηλεκτρική εκκένωση λαμβάνει χώρα μεταξύ δύο ηλεκτροδίων, που λειτουργούν ως αγωγοί, του ηλεκτροδίου που προκαλεί την τροποποίηση και του ηλεκτροδίου του οποίου τροποποιείται η επιφάνεια. Τα δύο αυτά ηλεκτρόδια συνδέονται με μία πηγή υψηλής τάσης και ανάμεσά τους βρίσκεται το διηλεκτρικό, που συνήθως είναι ο ατμοσφαιρικός αέρας. Με την εφαρμογή διαφοράς δυναμικού ανάμεσα στα ηλεκτρόδια, δημιουργείται ένα ηλεκτρικό πεδίο στο διηλεκτρικό και τα δύο ηλεκτρόδια έρχονται σε πολύ κοντινή απόσταση μεταξύ τους, χωρίς όμως να έρχονται σε επαφή. Στην πορεία, όσο εφαρμόζεται το ηλεκτρικό πεδίο, δημιουργούνται αγωγίμοι δίαυλοι στο διηλεκτρικό, που οδηγούν στη

διάσπαση του διηλεκτρικού και τελικά στην ηλεκτρική εκκένωση. Στο σημείο αυτό το διηλεκτρικό χάνει τις μονωτικές του ιδιότητες και επιτρέπει τη διέλευση του ηλεκτρικού ρεύματος. Όπως ήδη αναφέρθηκε, η θερμοκρασία στην περιοχή της εκκένωσης αυξάνεται πολύ και μπορεί να φτάσει τους 5000-20000 °C, προκαλώντας την εξάτμιση ή εξάχνωση του υλικού των δύο ηλεκτροδίων. Το αέριο μίγμα, που προκύπτει από τα υλικά των δύο ηλεκτροδίων, μεταφέρεται στην περιοχή μεταξύ των δύο ηλεκτροδίων με τη μορφή νέφους, όπου ψύχεται άμεσα από το διηλεκτρικό. Μετά το πέρας της ηλεκτρικής εκκένωσης, καθώς το νέφος ψύχεται, τα σωματίδια σταθεροποιούνται, οδηγώντας τελικά στον σχηματισμό νανοσωματιδίων. Το μέγεθος και το σχήμα των νανοσωματιδίων που σχηματίζονται εξαρτώνται από τις φυσικές ιδιότητες του υλικού του ηλεκτροδίου, τον ρυθμό ψύξης του νέφους και την ποσότητα της ενέργειας που απελευθερώνεται κατά την ηλεκτρική εκκένωση.^{65,66,67}

Όπως αναφέρεται παραπάνω, για τη διάσπαση του διηλεκτρικού είναι απαραίτητη η ύπαρξη ισχυρού ηλεκτρικού πεδίου, καθώς χωρίς αυτό το αέριο δρα ως μονωτής. Όταν εφαρμοστεί διαφορά δυναμικού μεταξύ των δύο ηλεκτροδίων, τα ελεύθερα ηλεκτρόνια που βρίσκονται στη μάζα του μονωτικού αερίου (ατμοσφαιρικός αέρας) επιταχύνονται από την αρνητικά φορτισμένη κάθοδο (-) προς τη θετικά φορτισμένη άνοδο (+), ακολουθώντας τη διεύθυνση του ηλεκτρικού πεδίου. Στη διαδρομή αυτή, τα ηλεκτρόνια συγκρούονται με άτομα ή μόρια του μονωτικού αερίου είτε ελαστικά είτε ανελαστικά. Στις ελαστικές συγκρούσεις, χάνεται μέρος της κινητικής τους ενέργειας και μεταβάλλεται η πορεία τους, ενώ στις ανελαστικές συγκρούσεις τα μόρια του αερίου διεγείρονται και μεταβαίνουν σε υψηλότερο ενεργειακό επίπεδο.⁶⁶

Όταν το ηλεκτρικό πεδίο που δημιουργείται είναι ομοιόμορφο, η διάρρηξη του διηλεκτρικού, λόγω της σταδιακής αύξησης της ηλεκτρικής τάσης μεταξύ των δύο ηλεκτροδίων, πραγματοποιείται με τη μορφή σπινθήρα, χωρίς να λαμβάνουν χώρα προκαταρκτικές εκκενώσεις. Αντίθετα, στις περιπτώσεις που το ηλεκτρικό πεδίο δεν είναι ομοιόμορφο, η αύξηση της εφαρμοζόμενης τάσης οδηγεί σε τοπικές εκκενώσεις του διηλεκτρικού, οι οποίες εμφανίζονται κυρίως σε περιοχές όπου η ένταση του πεδίου είναι μεγαλύτερη.⁶⁸



Σχήμα 11: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας παραγωγής νανοσωματιδίων με ηλεκτρική εκκένωση. (Α) Διάσπαση του διηλεκτρικού λόγω της εφαρμογής κατάλληλης τιμής ηλεκτρικής τάσης στα δύο ηλεκτρόδια, (Β,Γ) εξάτμιση του υλικού των δύο ηλεκτροδίων και σχηματισμός νέφους των αντίστοιχων σωματιδίων και (Δ) συμπύκνωση νέφους και σχηματισμός νανοσωματιδίων.⁶⁸

Η ηλεκτρική εκκένωση προτιμάται για την παραγωγή νανοσωματιδίων έναντι άλλων μεθόδων, καθώς πρόκειται για μία φιλική προς το περιβάλλον μέθοδο, μιας και δεν χρησιμοποιούνται διαλύτες και επομένως δεν παράγονται απόβλητα. Επιπλέον, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για διάφορα αγώγιμα υλικά, όπως ο άνθρακας, τα μέταλλα, τα ημιμέταλλα, οι ημιαγωγοί και διάφορα κράματα. Πρόκειται, επίσης, για μία απλή και φθηνή μέθοδο, καθώς απαιτείται οργανολογία χαμηλού κόστους και πολύ μικρές ποσότητες των διαφόρων υλικών. Με την μέθοδο αυτή παράγονται νανοσωματίδια υψηλής καθαρότητας και ελεγχόμενου μεγέθους. Τέλος, χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις παραγωγής μικτών υλικών, που η παραγωγή τους καθίσταται δύσκολη με άλλες μεθόδους.⁶⁹

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι (α) η ανάπτυξη μιας ηλεκτροχημικής διάταξης τριών ηλεκτροδίων χαμηλού κόστους, που απαιτεί μικρή ποσότητα δείγματος (< 2 μL) και (β) ο προσδιορισμός ουρικού οξέος στα ανθρώπινα δάκρυα για τη διάγνωση της ουρικής αρθρίτιδας.

2.2 Εισαγωγή

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, τα δάκρυα αποτελούν ένα πολύ σημαντικό βιολογικό υγρό, καθώς δρουν ως βιοδείκτες τόσο για ασθένειες που αφορούν την οφθαλμολογική περιοχή όσο και για ασθένειες που αφορούν γενικότερα το ανθρώπινο σώμα, όπως παραδείγματος χάριν ο διαβήτης. Επιπλέον, τα δάκρυα, όπως και ο ιδρώτας, συλλέγονται ανώδυνα και με μη επεμβατικό τρόπο (non invasive), δηλαδή χωρίς να απαιτείται διάτρηση του δέρματος ή άλλου ιστού, σε αντίθεση με το αίμα όπου η δειγματοληψία απαιτεί χρήση βελόνας και εξειδικευμένο προσωπικό.¹⁰ Παρά το γεγονός αυτό, ωστόσο, τα δάκρυα αποτελούν το λιγότερο μελετημένο βιολογικό υγρό για ασθένειες που δεν αφορούν την οφθαλμολογική περιοχή, όπως είναι η ουρική αρθρίτιδα, που μελετάται στην παρούσα εργασία. Μέχρι στιγμής δεν υπάρχει κλινικά αποδεκτή μέθοδος για τη διάγνωση της ουρικής αρθρίτιδας βασισμένης στην συγκέντρωση του ουρικού οξέος στα δάκρυα, όπως παραδείγματος χάριν η διάγνωση της κυστικής ίνωσης μέσω της συγκέντρωσης των χλωριούχων ιόντων στον ιδρώτα.

Η ουρική αρθρίτιδα (gouty arthritis) συγκαταλέγεται στις πιο συχνές ρευματολογικές παθήσεις, εμφανίζεται συχνότερα στους άνδρες άνω των 40 ετών και προκαλείται, συνήθως, λόγω χρόνιας υπερουριχαιμίας (hyperuricemia), η οποία με τη σειρά της οφείλεται στην ύπαρξη υψηλών επίπεδων ουρικού οξέος στον ανθρώπινο οργανισμό.⁴⁰ Συγκεκριμένα, όταν τα επίπεδα ουρικού οξέος είναι πολύ υψηλά, το ουρικό οξύ κρυσταλλώνεται και εναποτίθεται πάνω στις αρθρώσεις και τους ιστούς, προκαλώντας τοπική φλεγμονή, η οποία εκδηλώνεται με έντονο πόνο, ερυθρότητα και οίδημα της προσβεβλημένης περιοχής.⁷⁰ Η μέθοδος που είναι κλινικά αποδεδειγμένη και ευρέως αποδεκτή για τη διάγνωση της ουρικής αρθρίτιδας είναι η μέτρηση της συγκέντρωσης του ουρικού οξέος στο αίμα. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια έχουν δημοσιευτεί μελέτες πάνω στον προσδιορισμό της συγκέντρωσης ουρικού οξέος στα δάκρυα και πως αυτή συσχετίζεται με την ουρική αρθρίτιδα. Συγκεκριμένα, τόσο οι Park et al.¹² όσο και οι

Li et al.¹¹ μελέτησαν τη συγκέντρωση του ουρικού οξέος στα δάκρυα, στο εύρος συγκεντρώσεων 25-150 μM , χρησιμοποιώντας την τεχνική SERS (Surface – enhanced Raman Scattering) και έδειξαν τη γραμμική συσχέτιση των επιπέδων ουρικού οξέος στο αίμα και τα δάκρυα. Επίσης, οι C. Xiong et al.¹³ ανέπτυξαν έναν αισθητήρα για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της γλυκόζης και του ουρικού οξέος στα δάκρυα και μέτρησαν το ουρικό οξύ σε συγκέντρωση $98.5 \pm 16.3 \mu\text{M}$, ενώ το όριο ανίχνευσης της μεθόδου ήταν 100 nM. Οι Wu et.al.⁵⁵, επιπλέον, μελέτησαν τα επίπεδα του ουρικού οξέος και της ιντερλευκίνης 1- β στα δάκρυα, καθώς και τη συσχέτιση αυτών, με τη χρήση της χημειοφωταύγειας (chemiluminescence) και της ELISA (Enzyme -Linked Immunosorbent Assay) αντίστοιχα σε υγιείς εθελοντές και σε εθελοντές που νοσούν από ασυμπτωματική υπερουριχαιμία και ουρική αρθρίτιδα και έδειξαν ότι τα επίπεδα ουρικού οξέος είναι σημαντικά χαμηλότερα σε υγιείς εθελοντές ($42.7 \pm 24.0 \mu\text{M}$) από ότι σε εθελοντές που νοσούν είτε με υπερουριχαιμία είτε με ουρική αρθρίτιδα ($98.2 \pm 51.5 \mu\text{M}$).

Λαμβάνοντας υπόψη τη γραμμική συσχέτιση της συγκέντρωσης του ουρικού οξέος στο αίμα και τα δάκρυα, σε συνδυασμό με την ευκολία της δειγματοληψίας των δακρύων και την αποφυγή δυσφορίας του ασθενή κατά τη διάρκεια αυτής, τα δάκρυα θα μπορούσαν να αποτελέσουν ένα κατάλληλο βιολογικό υγρό για τη μη επεμβατική διάγνωση της ουρικής αρθρίτιδας. Προς αυτήν την κατεύθυνση, η παρούσα εργασία αφορά στη μέτρηση της συγκέντρωσης του ουρικού οξέος στα δάκρυα με τη βοήθεια ηλεκτροχημικών αισθητήρων. Η προτεινόμενη μέθοδος είναι απλή στη χρήση και μπορεί να εφαρμοστεί από μη εξειδικευμένο προσωπικό, χαμηλού κόστους ανά ανάλυση και απαιτεί απλή και χαμηλού κόστους οργανολογία. Η μέθοδος απαιτεί πολύ μικρό όγκο δείγματος ($< 2 \mu\text{L}$) και ελάχιστη επεξεργασία αυτού πριν τη μέτρηση. Επιπλέον, η κατασκευή της ηλεκτροχημικής κυψελίδας είναι απλή και αποτελείται από δύο εκτυπωμένες επιφάνειες γραφίτη μεγέθους μερικών χιλιοστών, ένα τυπικό – εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο με κυκλική ενεργό επιφάνεια 6 mm που λειτουργεί ως ηλεκτρόδιο εργασίας (WE) και μία κατάλληλα σχεδιασμένη επιφάνεια, η οποία μετά τη διάτρησή της με οπή διαμέτρου 1.6 mm, την αναστροφή της και την τοποθέτησή της αντικρυστά με τη βοήθεια μιας διάτρητης ταινίας διπλής κολλητικής όψης με οπή 3 mm, πάχους 0.18 mm, λειτουργεί ταυτόχρονα ως ηλεκτρόδιο αναφοράς και αντισταθμιστικό ηλεκτρόδιο (RE / CE). Η συναρμολόγηση των παραπάνω επιφανειών οδηγεί στην κατασκευή μιας ολοκληρωμένης ηλεκτροχημικής κυψελίδας τριών

ηλεκτροδίων με μία οπή εισόδου δείγματος (1.6 mm), με ενεργό επιφάνεια WE (3 mm) η οποία σε συνδυασμό με το πάχος της ενδιάμεσης ταινίας δημιουργεί μία ενσωματωμένη κυψελίδα όγκου μικρότερου των 2 μL . Η επιφάνεια του WE τροποποιήθηκε αρχικά με ηλεκτρική εκκένωση με σύρμα σιδήρου και στη συνέχεια με γραφιτικό νιτρίδιο του άνθρακα (Fe-sparked-g- C_3N_4 SPE). Ακολούθησε η επιλογή του υλικού του ηλεκτροδίου αναφοράς (γραφίτης ή Ag/AgCl), η διερεύνηση της ηλεκτροκαταλυτικής συμπεριφοράς του WE μετά την τροποποίησή του με τους παραπάνω ηλεκτροκαταλύτες, η βελτιστοποίηση διάφορων πειραματικών συνθηκών και η αποτίμηση της αναλυτικής συμπεριφοράς της μεθόδου σε πρότυπα διαλύματα ουρικού οξέος, σε δείγματα συνθετικών δακρύων και σε ανθρώπινα δάκρυα, που λήφθηκαν από υγιείς εθελοντές με μετρήσεις διαφορικής παλμικής βολταμμετρίας (Differential pulse voltammetry, DPV). Η ανάκτηση της μεθόδου ήταν 99-110%. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η προτεινόμενη αναλυτική συσκευή, η οποία συμμορφώνεται με τα περισσότερα κριτήρια του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (World Health Organization, WHO) για διαγνωστικές συσκευές στο σημείο φροντίδας (point of care, PoC)⁷¹ μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό του ουρικού οξέος σε βιολογικά δάκρυα για τη διάγνωση της υπερουριχαμίας και της ουρικής αρθρίτιδας.

2.3 Πειραματικό Μέρος

2.3.1 Αντιδραστήρια - Διαλύματα

Το χλωριούχο νάτριο, το ασκορβικό οξύ (AA), το οξικό οξύ και το οξικό νάτριο ήταν προϊόντα της εταιρίας Merck. Το ανθρακικό κάλιο, η ουρία, το κιτρικό οξύ, η γλυκόζη, το ουρικό οξύ (UA), η αλβουμίνη ορού βοοειδών (albumin bovine, Mr = 66430), το χλωριούχο κάλιο, το χλωριούχο εξααμμωνιορουθήνιο III (RuHex, hexaammineruthenium (III) chloride), το σιδηροκυανιούχο κάλιο και το σιδηρικούανιούχο κάλιο ήταν προϊόντα της εταιρίας Sigma-Aldrich. Τέλος, το μονοένυδρο δισόξινο φωσφορικό νάτριο ήταν προϊόν της εταιρίας Fluka. Για την παρασκευή όλων των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε δισαπασταγμένο νερό (DDW).

Το ισότονο διάλυμα φωσφορικών, PBS (phosphate buffered saline, 0.1 M, pH 5), περιείχε 0.1 M μονοένυδρο δισόξινο φωσφορικό νάτριο ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 0.137 M χλωριούχο νάτριο και 0.0027 M χλωριούχο κάλιο και φυλασσόταν στους 4 °C.

Το ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος - οξικού νατρίου (0.1 M, pH 4.5) περιείχε 0.87 mL οξικού οξέος (CH_3COOH), 1.39 g οξικού νατρίου (CH_3COONa) και 250 mL DDW.

Τα πρότυπα διαλύματα ουρικού οξέος παρασκευάζονταν καθημερινά είτε σε PBS είτε σε διάλυμα τεχνητών δακρύων.

Τα τεχνητά δάκρυα παρασκευάστηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται από τους Park et al.¹² και περιείχαν 125 mM χλωριούχο νάτριο, 26 mM ανθρακικό κάλιο, 5 mM ουρία, 31 μM κιτρικό οξύ, 0.3 mM γλυκόζη, 50 μM αλβουμίνη, 100 mM μονοένυδρο δισόξινο φωσφορικό νάτριο ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) και 30 μM ασκορβικό οξύ και αποθηκεύτηκε στους 4 °C για μία εβδομάδα. Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε στην τιμή 5 με 0.1 M HCl. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται αναλυτικά η σύσταση των τεχνητών δακρύων που χρησιμοποιήθηκε.

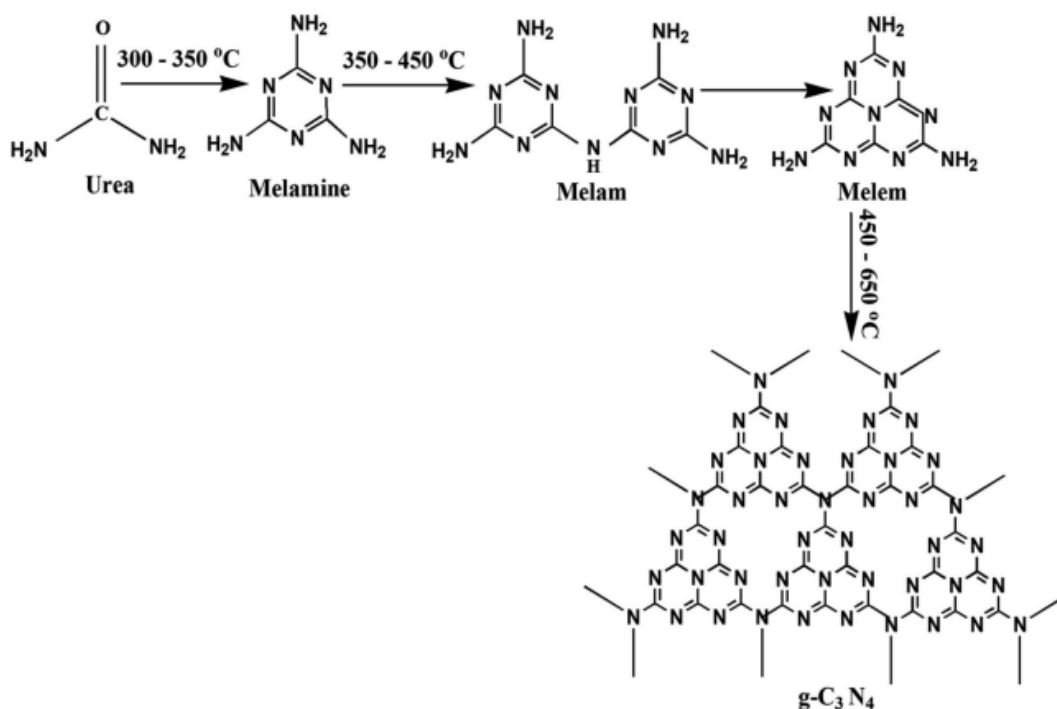
Πίνακας 2: Σύσταση διαλύματος τεχνητών δακρύων

Ουσία	Συγκέντρωση (mM)
NaCl	125
K_2CO_3	26
Ουρία	5
Κιτρικό οξύ	0.031
Γλυκόζη	0.3
Αλβουμίνη	0.050
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	100
Ασκορβικό οξύ	0.030

2.3.2 Σύνθεση γραφιτικού νιτριδίου του άνθρακα (g- C_3N_4)

Για την σύνθεση του g- C_3N_4 χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος θερμικής πολυσυμπύκνωσης. Συγκεκριμένα, ποσότητα περίπου 10 g ουρίας διαλυτοποιήθηκε σε DDW και έπειτα τοποθετήθηκε στο πυριαντήριο στους 80 °C για εξάτμιση μέχρι ξηρού. Η ποσότητα του στερεού που έμεινε, ομογενοποιήθηκε σε ιγδίο πορσελάνης, τοποθετήθηκε σε χωνευτήριο πορσελάνης, τυλίχθηκε προσεκτικά με αλουμινόχαρτο και θερμάνθηκε στους 550 °C για 4 h. Ο ρυθμός αύξησης της θερμοκρασίας ήταν 5 °C/min. Τέλος, το παραγόμενο g- C_3N_4 αποθηκεύτηκε σε φιαλίδιο και τοποθετήθηκε σε ξηραντήρα.

Εκτός από την ουρία, σαν πρόδρομες ουσίες για την σύνθεση του g- C_3N_4 μπορούν να χρησιμοποιηθούν η θειουρία, το κυαναμίδιο, το δικυανδιαμίδιο και η μελαμίνη.⁷² Παρακάτω παρουσιάζονται σχηματικά τα στάδια της σύνθεσης του g- C_3N_4 .⁷³



Σχήμα 12: Σχηματική απεικόνιση της σύνθεσης του g-C₃N₄ χρησιμοποιώντας ως πρόδρομη ένωση την ουρία.⁷³

2.3.3 Οργανολογία

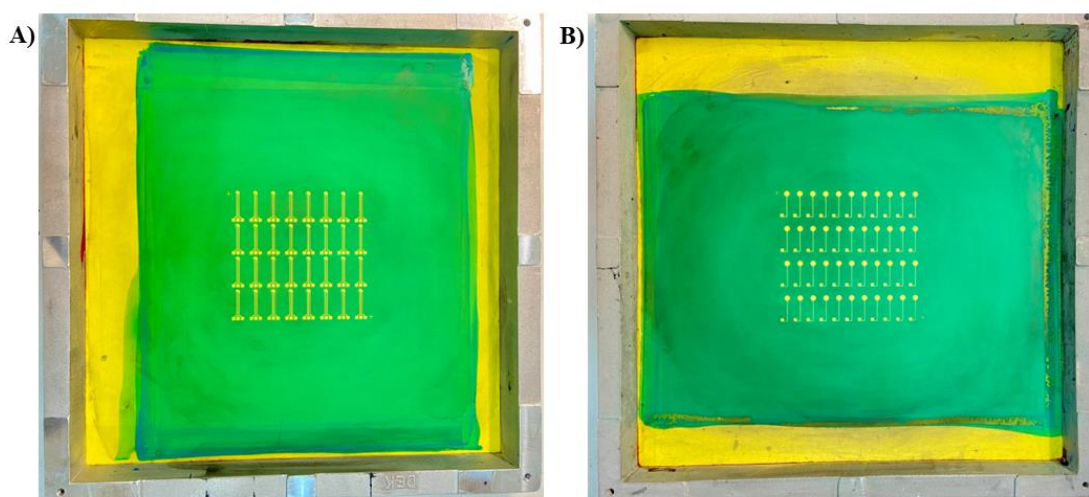
Οι ηλεκτροχημικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με τον ποτενσιοστάτη PGSTAT12 της εταιρείας Metrohm Autolab, ενός ηλεκτρονικού υπολογιστή και του λογισμικού GPES 4.6. Οι μετρήσεις DPV πραγματοποιήθηκαν σε 0.1 M PBS, pH 5, με τις εξής παραμέτρους: ύψος παλμού (modulation amplitude) 0.05 V, βήμα δυναμικού (step potential) 0.002 V και χρόνος εφαρμογής του παλμού (modulation time) 0.05 s.

2.3.4 Εκτύπωση επιφανειών γραφίτη

Το μελάνι γραφίτη που χρησιμοποιήθηκε για την εκτύπωση των επιφανειών είναι το LOCTITE EDAG PF-407C E&C. Αρχικά, πριν την εκτύπωση πραγματοποιείται αργή ανάδευση του μελανιού με ράβδο από teflon προκειμένου να επιτευχθεί η επιθυμητή ροή και υφή. Τα υποστρώματα στα οποία θα πραγματοποιηθεί η εκτύπωση είναι φύλλα πολυεστέρα πάχους 175 μm και καθαρίζονται με βαμβάκι εμποτισμένο με ισοπροπανόλη πριν τη χρήση.

Τα πλέγματα κατασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας μεταλλικά πλαίσια και γάζα μεταξοτυπίας από πολυεστέρα (195/48, SEFAR® PET 1500). Η γάζα μεταξοτυπίας

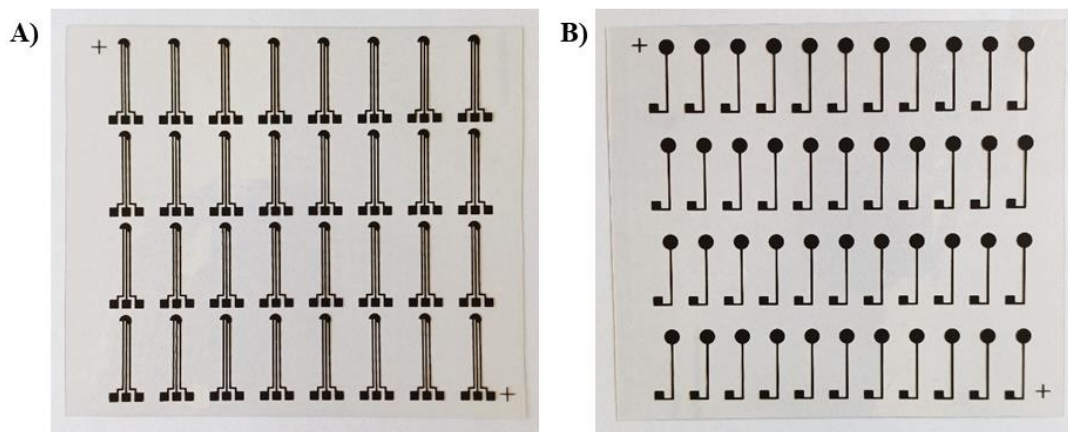
τοποθετείται πάνω από το πλαίσιο και τεντώνεται (τάση πλέγματος 28 N/cm περίπου). Έπειτα, το πλέγμα καθαρίζεται με το KIWO Mesh X-Gel και τοποθετείται σε θάλαμο στεγνώματος (Combinetuve Etabli 608/1, Tiflex) στους 40 °C για 1 h. Ακολούθως, το πλέγμα καλύπτεται με το φωτοευαίσθητο υλικό (POLYCOL S-HR) σε σκοτεινό θάλαμο και τοποθετείται στο θάλαμο στεγνώματος στους 40 °C για 2 h (με τη μεριά εκτύπωσης προς τα κάτω). Στη συνέχεια πραγματοποιείται η εμφάνιση του αποτυπώματος (τα ηλεκτρόδια σχεδιάστηκαν στο CorelDRAW X8) και το πλέγμα τοποθετείται, υπό κενό, σε φωτοτράπεζα UV ακτινοβολίας (Combinetuve Etabli 608/1, Tiflex) για κάποιο χρονικό διάστημα. Τέλος, το πλέγμα καθαρίζεται με ροή νερού υψηλής πίεσης έως ότου απομακρυνθεί το μη φωτοπολυμερισμένο τμήμα του φωτοευαίσθητου υλικού και αφήνεται σε φωτεινό μέρος για τουλάχιστον 1 ημέρα προτού χρησιμοποιηθεί. Τα πλέγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία φαίνονται στο Σχήμα 13.



Σχήμα 13: Πλέγματα εκτύπωσης Α) επιφάνειας ηλεκτροδίων αναφοράς και αντισταθμιστικού και Β) ηλεκτροδίων εργασίας.

Η εκτύπωση των επιφανειών πραγματοποιήθηκε με τον εκτυπωτή Screen and Stencil Printer E2 (EKRA) με σάρωτρο πολυουρεθάνης σκληρότητας 75 dm. Εκτυπώθηκαν δύο διαφορετικοί τύποι ηλεκτροδίων, όπως φαίνεται στο Σχήμα 14.

Μετά την εκτύπωση ακολούθησε θερμική κατεργασία των επιφανειών στο πυριαντήριο στους 90 °C για 60 min και έπειτα αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου καλυμμένα με διηθητικό χαρτί για περίπου 1 ημέρα. Τέλος, αποθηκεύτηκαν σε πλαστικό σακουλάκι zip και φυλάσσονταν σε σκοτεινό μέρος.



Σχήμα 14: Εκτύπωση συστοιχίας επιφανειών A) επιφάνειας ηλεκτροδίων αναφοράς και αντισταθμιστικού και B) ηλεκτροδίων εργασίας σε εύκαμπτο φύλλο πολυεστέρα.

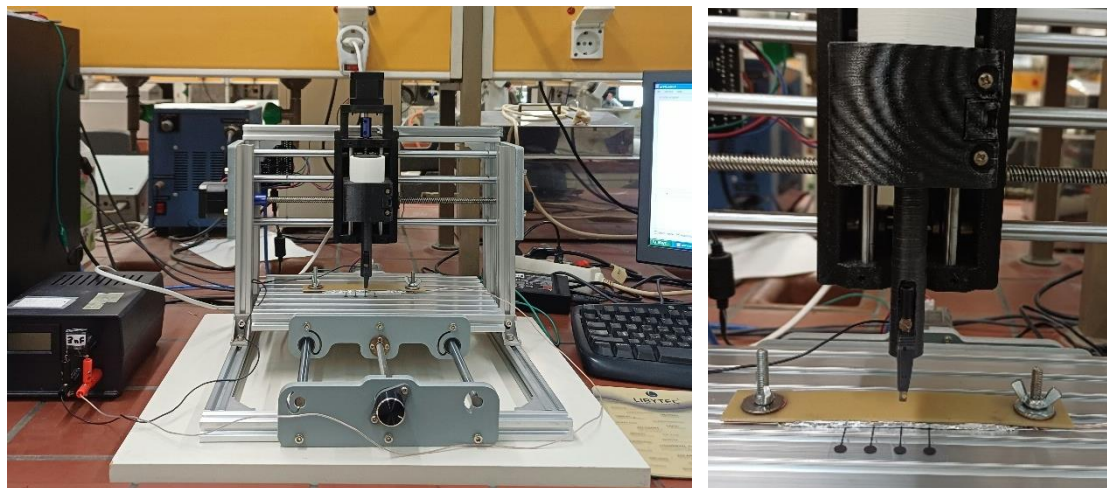
2.3.5 Τροποποίηση των SPEs με ηλεκτρική εκκένωση

Τόσο η τροποποίηση με ηλεκτρική εκκένωση όσο και η τροποποίηση με το γραφитικό νιτρίδιο του άνθρακα, που αναλύεται παρακάτω, αναφέρονται στο ηλεκτρόδιο εργασίας.

Για την τροποποίηση με ηλεκτρική εκκένωση κατασκευάστηκε μία διάταξη τρισδιάστατης τοποθέτησης, που ελέγχεται μέσω G-code και λειτουργεί με πλακέτα Arduino Uno, μέσω ενός ανοιχτού κώδικα λογισμικού GRBL, το οποίο μετατρέπει τις εντολές G-code σε κινήσεις της πλακέτας (Σχήμα 15). Αρχικά, κατά τη διαδικασία δημιουργείται πρώτα ένα ορθογώνιο από τα σημεία εκκένωσης και σε επόμενο βήμα αποκλείονται τα σημεία εκείνα που βρίσκονται εκτός της κυκλικής επιφάνειας του ηλεκτροδίου. Οι ταχύτητες κίνησης, βύθισης και ανύψωσης του ηλεκτροδίου της καθόδου ρυθμίζονται. Συνήθως, τα σημεία εκκένωσης τοποθετούνται τακτικά σε όλη την επιφάνεια του ηλεκτροδίου (διάμετρος 5 mm) και ο αριθμός των εκκενώσεων καθορίζεται από τη μεταξύ τους απόσταση.⁶⁶

Το σύρμα σιδήρου που χρησιμοποιείται για την τροποποίηση των ηλεκτροδίων, καθαρίζεται πριν από κάθε χρήση, σε λουτρό υπερήχων με ακετόνη για περίπου 5 min. Η τροποποίηση με ηλεκτρική εκκένωση πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες περιβάλλοντος, φέρνοντας σε κοντινή απόσταση τα δύο ηλεκτρόδια, μέσω της διάταξης τρισδιάστατης τοποθέτησης, που περιγράφεται παραπάνω, χρησιμοποιώντας ένα τροφοδοτικό υψηλής τάσης (εφαρμοζόμενη τάση 1.2 kV) και συνδέοντας το σύρμα

Fe στην κάθοδο (-) και το εκτυπωμένο ηλεκτρόδιο SPE στην άνοδο (+). Η ταχύτητα σάρωσης κατά την ηλεκτρική εκκένωση ορίστηκε στα 2000 mm / s και οι γραμμές σάρωσης ήταν 25.



Σχήμα 15: Διάταξη τρισδιάστατης τοποθέτησης και τροφοδοτικό υψηλής τάσης για την τροποποίηση των ηλεκτροδίων με ηλεκτρική εκκένωση.

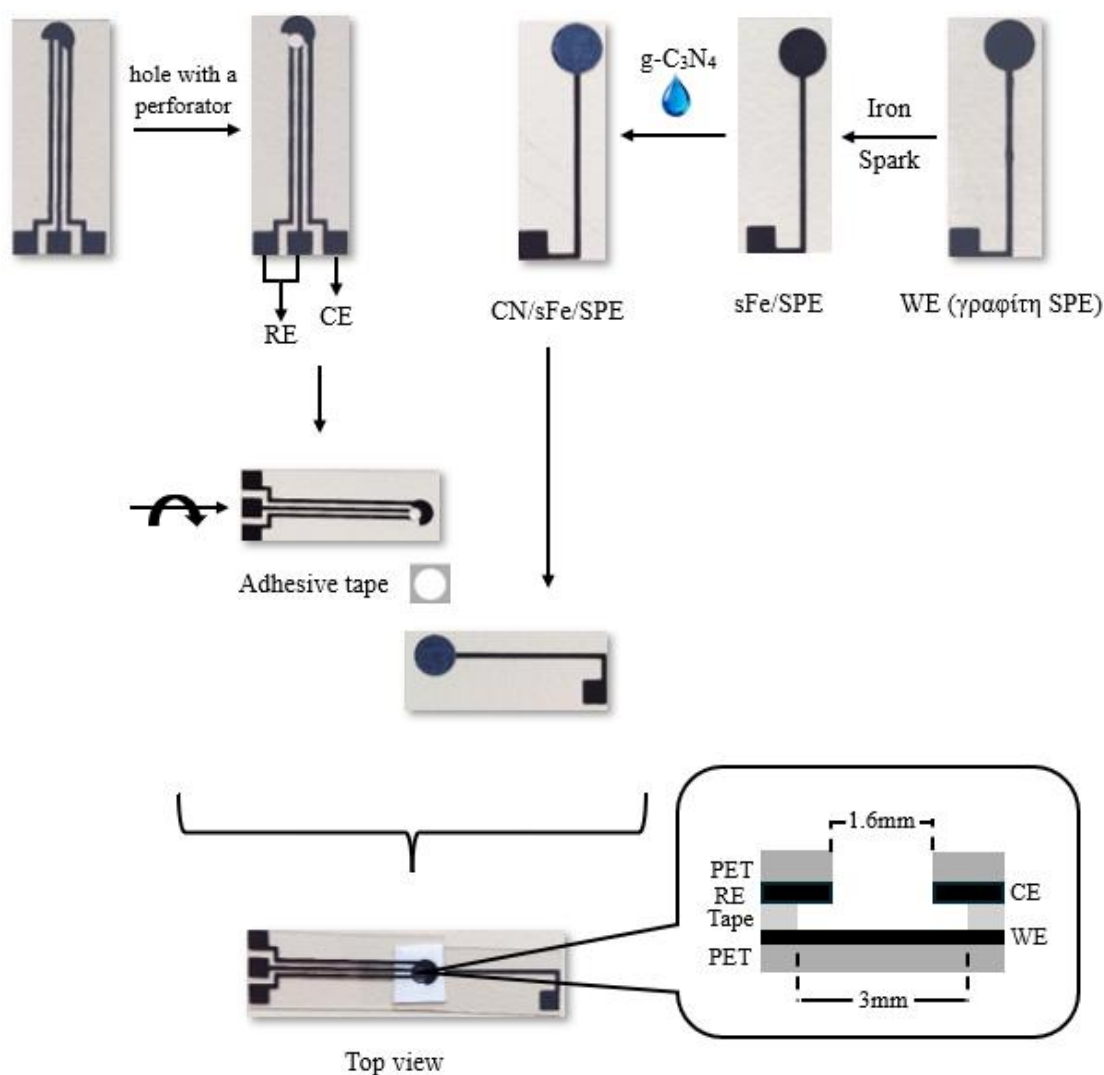
2.3.6 Τροποποίηση των SPEs με g-C₃N₄

Αρχικά, παρασκευάζεται διασπορά 0.5 mg/mL g-C₃N₄ σε DDW σε λουτρό υπερήχων για 60 min. Έπειτα, τοποθετούνται 5 μ L της διασποράς g-C₃N₄ στο ενεργό κέντρο των ηλεκτροδίων εργασίας, που έχουν ήδη τροποποιηθεί με ηλεκτρική εκκένωση και ακολουθεί εξάτμιση του διαλύτη τοποθετώντας τα ηλεκτρόδια στο πυριαντήριο στους 60 °C για 60 min.

2.3.7 Κατασκευή ηλεκτροχημικής κυψελίδας 3 ηλεκτροδίων

Η ηλεκτροχημική διάταξη αποτελείται από δύο εκτυπωμένα ηλεκτρόδια γραφίτη. Το ένα ηλεκτρόδιο (τριπλό) λειτουργεί ως αντισταθμιστικό ηλεκτρόδιο (CE) και ως ηλεκτρόδιο αναφοράς (RE) ταυτόχρονα (βλέπε Σχήμα 15) και το άλλο ηλεκτρόδιο (απλό) λειτουργεί ως ηλεκτρόδιο εργασίας (WE). Το ηλεκτρόδιο αναφοράς φέρει μικρή οπή διαμέτρου 1.6 mm στο κέντρο της ενεργούς του επιφάνειας και συνδέεται με το ηλεκτρόδιο εργασίας μέσω δύο ταινιών διπλής όψεως πάχους 180 μ m, που φέρουν κι αυτές με τη σειρά τους οπή διαμέτρου 3 mm. Το μέγεθος των οπών, καθώς και το πάχος της ταινίας διπλής όψεως καθορίζουν τον όγκο της κυψελίδας. Στο συγκεκριμένο πείραμα, ο όγκος της ηλεκτροχημικής κυψελίδας είναι 1.3 μ L. Μόλις τοποθετηθεί στην

οπή της κυψελίδας ο όγκος του προς μέτρηση διαλύματος, η κυψελίδα σκεπάζεται με ένα δοχείο στον πυθμένα του οποίου έχει τοποθετηθεί βαμβάκι εμποτισμένο με νερό. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται προκειμένου να δημιουργηθεί μία ατμόσφαιρα κορεσμένη σε υγρασία για αποφυγή εξατμίσεως του προς μέτρηση διαλύματος.



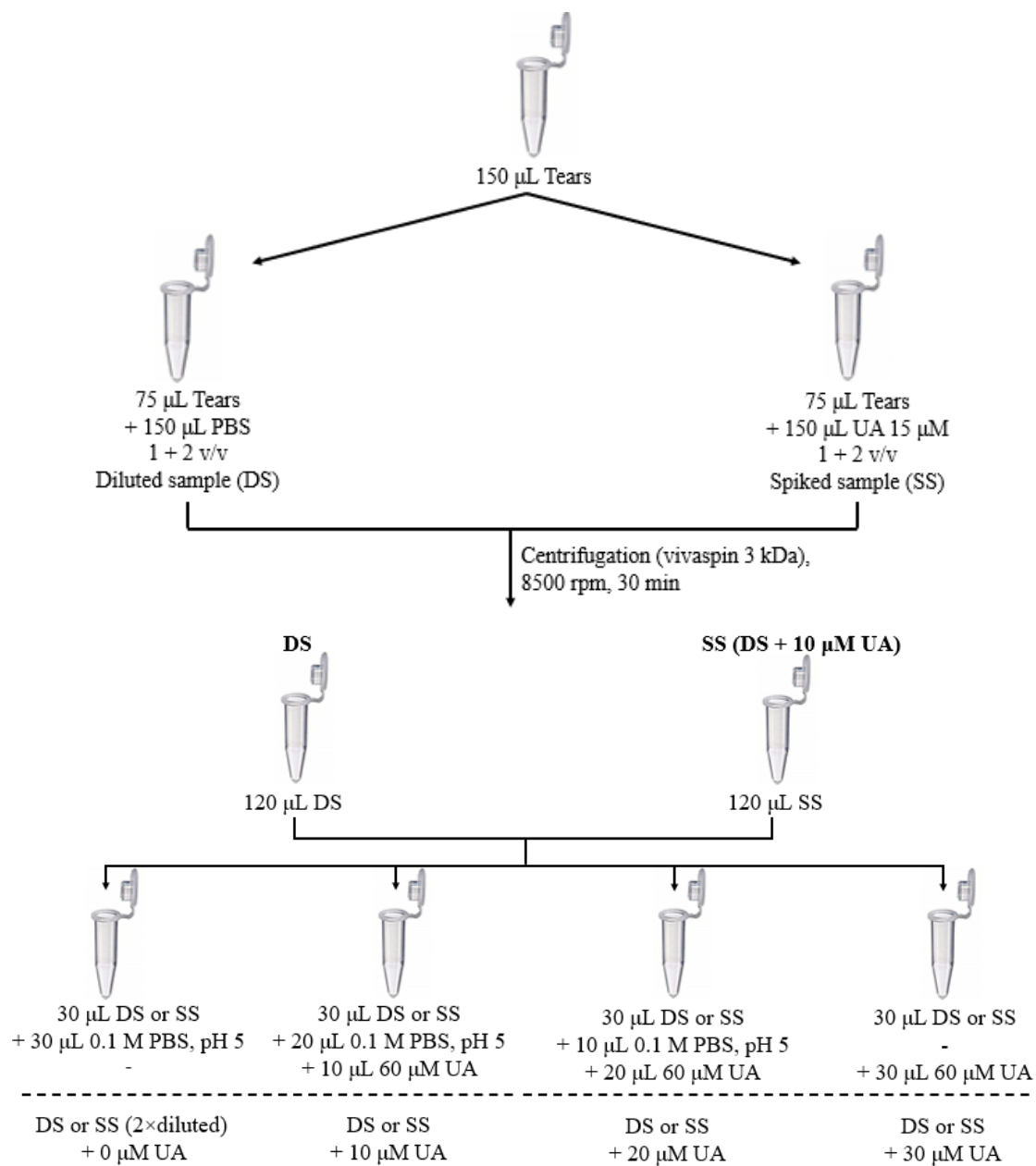
Σχήμα 16: Σχηματική απεικόνιση της κατασκευής της ηλεκτροχημικής κυψελίδας.

2.3.8 Δειγματοληψία και επεξεργασία δακρύων

Η δειγματοληψία δακρύων πραγματοποιήθηκε σε υγιείς εθελοντές με τη χρήση ειδικών οφθαλμολογικών ράβδων (Pro-Ophta®, Κωδικός 16515, ocular sticks), τα οποία τοποθετήθηκαν στην εσωτερική κόγχη του ματιού του δότη. Με το πέρας της δειγματοληψίας, οι οφθαλμολογικοί ράβδοι τοποθετήθηκαν στο εσωτερικό μιας σύριγγας και με τη βοήθεια του εμβόλου η ποσότητα των δακρύων που είχε προσροφηθεί μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο erpendorf. Έπειτα, η ποσότητα του δείγματος

που συλλέχθηκε χωρίστηκε σε δύο ίσα μέρη. Στο πρώτο eppendorf προστέθηκε διπλάσιος όγκος από το ισότονο διάλυμα φωσφορικών PBS 0.1 M, pH 5, προκειμένου το δείγμα να αραιωθεί τρεις φορές. Στο δεύτερο eppendorf προστέθηκε διπλάσιος όγκος από πρότυπο διάλυμα ουρικού οξέος σε PBS τέτοιας συγκέντρωσης προκειμένου η τελική συγκέντρωση του επιπλέον ουρικού οξέος στο δείγμα να είναι 10 μ M. Το δείγμα αυτό στο οποίο προστέθηκε επιπλέον ποσότητα ουρικού οξέος χαρακτηρίζεται ως spiked. Ακολουθεί φυγοκέντριση στις 8500 στροφές για 30 min, με φυγοκεντρικούς σωλήνες προσυγκέντρωσης (Viva spin, Amicon® Ultra Centrifugal Filter, MWCO, 3kDa, 2mL) για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών.

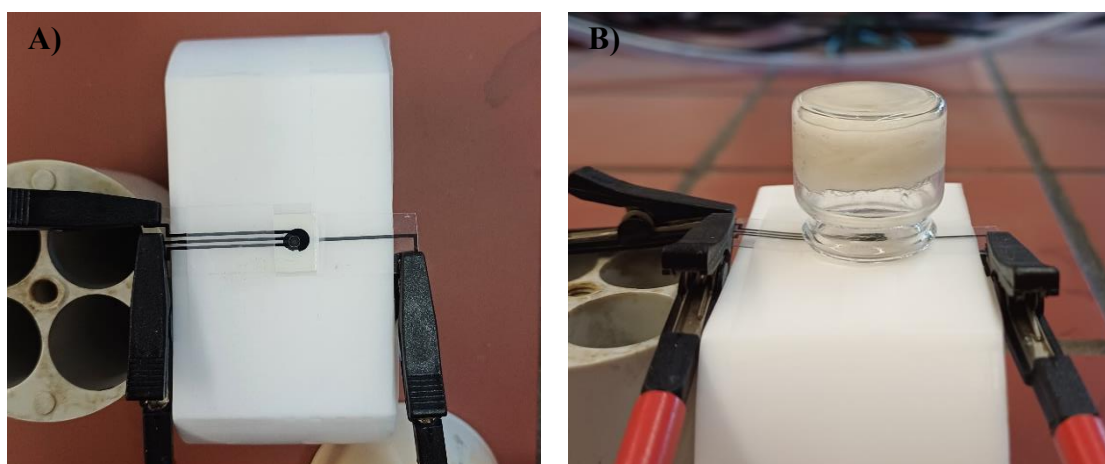
Τα δύο δείγματα (spiked και unspiked) χωρίστηκαν σε 4 ίσα μέρη το καθένα. Στο πρώτο προστέθηκε ίσος όγκος από διάλυμα 0.1 M PBS, pH 5, (αραίωση 1+1) και στα άλλα τρία κατάλληλος όγκος πρότυπου διαλύματος ουρικού οξέος, ώστε η επιπλέον τελική συγκέντρωση του ουρικού οξέος να είναι 10, 20 και 30 μ M αντίστοιχα. Ο όγκος που υπολείπεται στο καθένα προκειμένου να γίνει δύο φορές αραίωση συμπληρώνεται με 0.1 M PBS, pH 5. Τα 8 διαλύματα φυλάσσονται σε δοχείο με πάγο μέχρι το πέρας των μετρήσεων. Διαγραμματική απεικόνιση της επεξεργασίας των δειγμάτων δακρύων πριν τη μέτρηση φαίνεται στο Σχήμα 17.



Σχήμα 17: Διαγραμματική απεικόνιση της πειραματικής πορείας για την ανάλυση των δειγμάτων δακρύων με τη μέθοδο γνωστής προσθήκης.

2.3.9 Πειραματική Πορεία

Η ηλεκτροχημική κυψελίδα, που περιγράφεται στην Ενότητα 2.3.7, συνδέεται αρχικά με τον ποτενσιοστάτη και ενεργοποιείται το πρόγραμμα GPES 4.6. Έπειτα τοποθετούνται στην κυψελίδα πρώτα 2 μL 0.1 M PBS, pH 5, λαμβάνεται τρεις φορές το βολταμμογράφημα διαφορικού παλμού και στη συνέχεια λαμβάνονται τα βολταμμογραφήματα DP του προς μέτρηση διαλύματος. Μεταξύ των διαφορετικών μετρήσεων πραγματοποιείται καθαρισμός της κυψελίδας με δέκα διαδοχικές προσθήκες 4 μL DDW και απόρριψη αυτών με τη χρήση βαμβακερής μπατονέτας. Ακολούθως, πραγματοποιείται η προσθήκη και απόρριψη του νέου προς μέτρηση διαλύματος τρεις φορές και έπειτα πραγματοποιείται η μέτρηση.

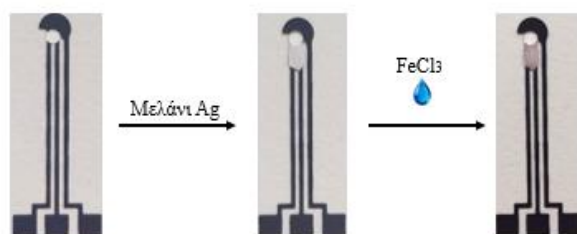


Σχήμα 18: A) Σύνδεση της ηλεκτροχημικής κυψελίδας με τον ποτενσιοστάτη και B) Τοποθέτηση δοχείου που περιέχει βαμβάκι εμποτισμένο με νερό για δημιουργία ατμόσφαιρας κορεσμένης σε υγρασία για την αποφυγή της εξάτμισης του δείγματος.

3. Αποτελέσματα – Συζήτηση

3.1 Ηλεκτροχημικός χαρακτηρισμός ηλεκτροχημικών κυψελίδων με διαφορετικό ηλεκτρόδιο αναφοράς

Αρχικά, κατασκευάστηκαν ηλεκτροχημικές κυψελίδες, όπως αναφέρεται αναλυτικά στην Ενότητα 2.3.7, όπου όλα τα ηλεκτρόδια εκτυπώθηκαν με μελάνι γραφίτη και στη συνέχεια κατασκευάστηκαν ηλεκτροχημικές κυψελίδες όπου το (διπλό) ηλεκτρόδιο αναφοράς τροποποιήθηκε με μελάνι αργύρου (Loctite EDAG 418SS E&C, Henkel), το οποίο στέγνωσε στους 100 °C σε φούρνο ιμάντα υπέρυθρης ακτινοβολίας (IR Little Red X2-30, Vastex) για 20 min και έπειτα τοποθετήθηκαν προσεκτικά πάνω στην επιφάνεια αργύρου 2 μ L 50 mM FeCl_3 , για τον σχηματισμό Ag/AgCl ⁷⁴ (Σχήμα 19).

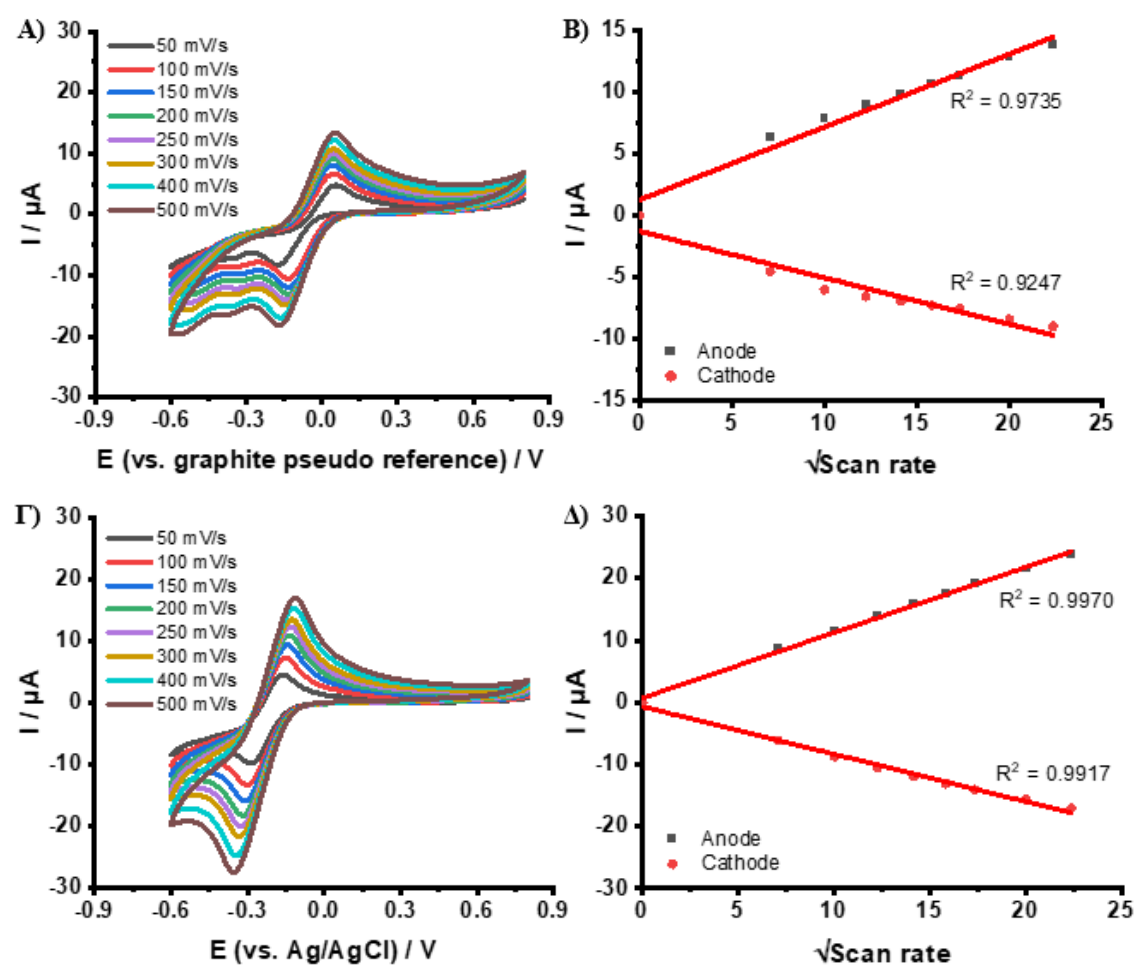


Σχήμα 19: Τροποποίηση του ηλεκτροδίου αναφοράς γραφίτη σε Ag/AgCl .

Ο ηλεκτροχημικός χαρακτηρισμός των παραπάνω κυψελίδων (με ηλεκτρόδιο αναφοράς γραφίτη ή Ag/AgCl) πραγματοποιήθηκε με μετρήσεις κυκλικής βολταμμετρίας, αρχικά σε διάλυμα 0.1 M KCl με ταχύτητα σάρωσης 100 mV/s για 10 σαρώσεις (εγκλιματισμός και καθαρισμός των ηλεκτροδίων) και μετά τον καθαρισμό των κυψελίδων με DDW (Ενότητα 2.3.9) σε διάλυμα 0.1 M KCl / 1 mM RuHeX σε διάφορες ταχύτητες σάρωσης (50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500 mV/s).

Παρακάτω παρουσιάζονται τα κυκλικά βολταμμογραφήματα σε 0.1 M KCl / 1 mM RuHeX , καθώς και τα αντίστοιχα διαγράμματα της έντασης του ρεύματος των κορυφών οξείδωσης και αναγωγής του RuHeX συναρτήσει της τετραγωνικής ρίζας της ταχύτητας σάρωσης για τους δύο τύπους ηλεκτροχημικής κυψελίδας που περιγράφονται παραπάνω. Παρατηρείται πως οι κορυφές οξείδωσης και αναγωγής του RuHeX είναι πιο οξείες και συμμετρικές στην περίπτωση του ηλεκτροδίου Ag/AgCl , καθώς επίσης και τα ρεύματα κορυφής είναι υψηλότερα, γεγονός που υποδηλώνει καλύτερη ηλεκτροχημική συμπεριφορά συγκριτικά με τις κυψελίδες όπου το ηλεκτρόδιο αναφοράς, ουσιαστικά ηλεκτρόδιο ψευδοαναφοράς, ήταν με γραφίτη.

Επίσης, η γραμμικότητα της έντασης του ρεύματος κορυφής ως προς την τετραγωνική ρίζα της ταχύτητας σάρωσης και στα δύο ηλεκτρόδια υποδηλώνει πως η διεργασία ελέγχεται από τη διάχυση.



Σχήμα 20: Κυκλικά βολταμμογραφήματα σε 0.1 M KCl/ 1mM RuHeX και τα αντίστοιχα διαγράμματα της έντασης του ρεύματος της κορυφής οξείδωσης και αναγωγής συναρτήσει της τετραγωνικής ρίζας της ταχύτητας σάρωσης των ηλεκτροχημικών κυψελίδων με: (Α, Β) WE και RE/CE γραφίτη και (Γ, Δ) WE/CE γραφίτη και RE Ag/AgCl.

3.1.1 Σταθερά ταχύτητας ετερογενούς μεταφοράς ηλεκτρονίων k^o

Σύμφωνα με τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα, υπολογίστηκε η σταθερά ταχύτητας ετερογενούς μεταφοράς ηλεκτρονίων k^o , η οποία συνδέεται με την κινητική της αντίδρασης μεταξύ μιας οξειδοαναγωγικής ένωσης και της ενεργής επιφάνειας του ηλεκτροδίου. Συγκεκριμένα, για ένα ηλεκτροχημικό σύστημα μεγάλη τιμή της σταθεράς k^o υποδηλώνει ότι το σύστημα φτάνει γρήγορα σε κατάσταση ισορροπίας.

Υπάρχουν πολλές μέθοδοι υπολογισμού της k^o (όπως οι μέθοδοι Nicholson, Klingler-Kochi, Gileadi), ωστόσο στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Nicholson. Πρόκειται για μία μέθοδο που βασίζεται στην κυκλική βολταμετρία και στην οποία η σταθερά k^o για ημι-αντιστρεπτές ηλεκτροχημικές αντιδράσεις συσχετίζεται με μία αδιάστατη κινητική παράμετρο, το Ψ . Η σταθερά k^o , λοιπόν, σύμφωνα με τη μέθοδο Nicholson δίνεται από την εξίσωση:

$$k^o = \Psi \sqrt{\frac{\pi D n \nu F}{RT}} \quad (1)$$

Όπου, D είναι ο συντελεστής διάχυσης σε cm^2/s (για το RuHeX είναι $9.1 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$), n είναι ο αριθμός ηλεκτρονίων που συμμετέχουν στην οξειδοαναγωγική αντίδραση, F είναι η σταθερά Faraday (96485 C/mol), R είναι η σταθερά των αερίων ($8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) και T είναι η θερμοκρασία (σε K). Η παράμετρος Ψ είναι μία πολυωνυμική συνάρτηση του γινομένου $n\Delta E$ (όπου ΔE_p η διαφορά δυναμικού κορυφής) εντός των τιμών $63 < n\Delta E_p < 212 \text{ mV}$. Τα εύρη τιμών της παραμέτρου Ψ είναι $7 > \Psi > 0.1$. Όταν η παράμετρος Ψ λαμβάνει την ανώτερη τιμή της (ή αντίστοιχα το γινόμενο $n\Delta E_p > 63 \text{ mV}$) υποδηλώνεται η μετάβαση του αντιστρεπτού συστήματος σε ημι-αντιστρεπτό. Αντίστοιχα, όταν η παράμετρος Ψ λαμβάνει την κατώτερη τιμή της (ή αντίστοιχα το γινόμενο $n\Delta E_p > 212 \text{ mV}$) υποδηλώνεται η μετάβαση του ημι-αντιστρεπτού συστήματος σε μη αντιστρεπτό.⁷⁵

Η παράμετρος Ψ υπολογίζεται σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση:

$$\Psi = \frac{-0.6288 + 0.0021(n\Delta E_p)}{1 - 0.017(n\Delta E_p)} \quad (2)$$

3.1.2 Υπολογισμός ενεργούς επιφάνειας A ηλεκτροδίων

Στα περισσότερα ηλεκτροχημικά συστήματα λαμβάνουν χώρα ημι-αντιστρεπτές ηλεκτροχημικές αντιδράσεις, δηλαδή ισχύει ο περιορισμός $63 < n\Delta E_p < 212$ mV. Στις περιπτώσεις αυτές, λοιπόν, η ενεργός επιφάνεια του ηλεκτροδίου υπολογίζεται με βάση την εξίσωση των Randles-Ševčík για τα ημι-αντιστρεπτά συστήματα:

$$I_p = (2.69 \times 10^5 n^{3/2} A \sqrt{DC} \sqrt{v}) K(\Lambda, \alpha) \quad (3)$$

Λύνοντας την παραπάνω εξίσωση ως προς το A προκύπτει η παρακάτω εξίσωση:

$$A = \frac{I_p}{(2.69 \times 10^5 n^{3/2} \sqrt{DC} \sqrt{v}) K(\Lambda, \alpha)} \quad (4)$$

Όπου, I_p είναι το ρεύμα κορυφής, C η συγκέντρωση της οξειδοαναγωγικής ουσίας (σε mol/cm³) και $K(\Lambda, \alpha)$ μία τροποποιημένη αδιάστατη παράμετρος για ημι-αντιστρεπτές αντιδράσεις. Προκειμένου να υπολογιστεί η παράμετρος $K(\Lambda, \alpha)$ πρέπει πρώτα να υπολογιστούν δύο άλλες παράμετροι, το $\Delta(\Lambda, \alpha)$ και το Λ . Η παράμετρος $\Delta(\Lambda, \alpha)$ υπολογίζεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$E_{p/2} - E_p = \Delta(\Lambda, \alpha) \left(\frac{RT}{F} \right) \quad (5)$$

Όπου, E_p είναι το δυναμικό κορυφής (σε mV) και $E_{p/2}$ είναι το δυναμικό κορυφής μισού κύματος (σε mV).

Η παραπάνω εξίσωση για θερμοκρασία $\theta = 25$ °C γίνεται:

$$E_{p/2} - E_p = 26 \Delta(\Lambda, \alpha) \quad (6)$$

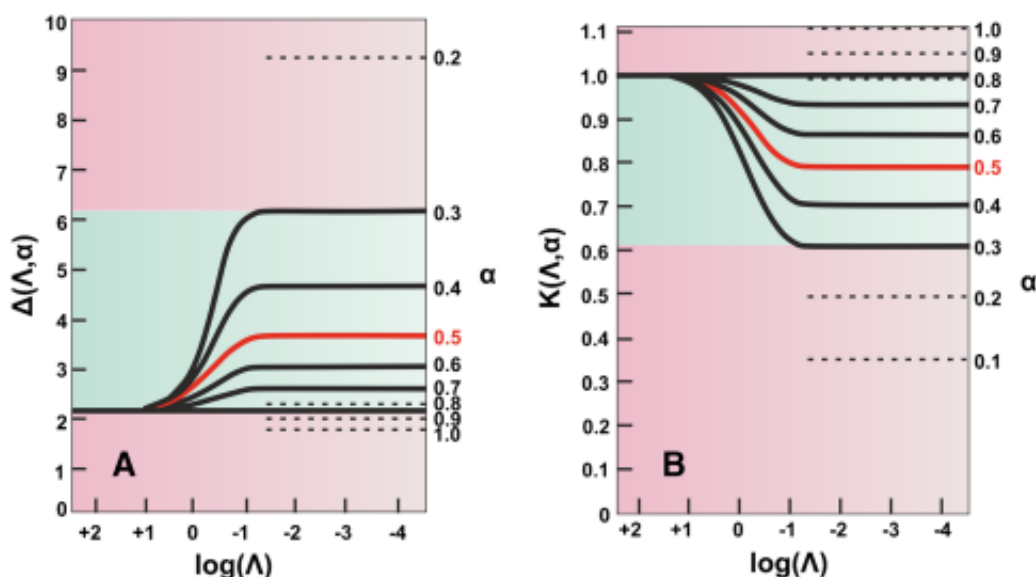
Η παράμετρος Λ δίνεται από την εξίσωση:

$$\Lambda = \Psi \sqrt{\pi} \quad (7)$$

Όπου, Ψ είναι μία κινητική παράμετρος, όπως αναφέρεται παραπάνω.

Αφού υπολογιστούν οι δύο αυτές παράμετροι ακολουθεί ο υπολογισμός του $\log \Lambda$. Έπειτα, από το διάγραμμα $\Delta(\Lambda, \alpha) = f(\log \Lambda)$ που φαίνεται στο Σχήμα 21, μπορεί να βρεθεί γραφικά ο συντελεστής μεταφοράς α , αφού οι παράμετροι $\Delta(\Lambda, \alpha)$ και $\log \Lambda$ είναι πλέον γνωστές. Ακολούθως, από το διάγραμμα $K(\Lambda, \alpha) = f(\log \Lambda)$ μπορεί να βρεθεί γραφικά η παράμετρος $K(\Lambda, \alpha)$ για την συγκεκριμένη τιμή του συντελεστή μεταφοράς α που υπολογίστηκε από το διάγραμμα $\Delta(\Lambda, \alpha) = f(\log \Lambda)$. Πλέον, όλες οι παράμετροι

είναι γνωστές, επομένως υπολογίζεται η ενεργός επιφάνεια σύμφωνα με την Εξίσωση 4.⁷⁵



Σχήμα 21: Α) Διάγραμμα $\Delta(\Lambda, \alpha) = f(\log \Lambda)$ και Β) Διάγραμμα $K(\Lambda, \alpha) = f(\log \Lambda)$.⁷⁵

Στην παρούσα εργασία υπολογίστηκε η σταθερά k° και η ενεργός επιφάνεια A του ηλεκτροδίου εργασίας για το διάλυμα 1 mM RuHeX σε 0.1 M KCl χρησιμοποιώντας τους δύο διαφορετικούς τύπους ηλεκτροχημικής κυψελίδας που αναφέρονται παραπάνω. Οι τιμές της σταθεράς k° και της ενεργούς επιφάνειας A του ηλεκτροδίου εργασίας υπολογίστηκαν για ταχύτητες σάρωσης 100, 150 και 200 mV/s. Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται οι τιμές της παραμέτρου Ψ και οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις της σταθεράς k° και της ενεργούς επιφάνειας A του ηλεκτροδίου εργασίας για τις τρεις τιμές της ταχύτητας σάρωσης.

Πίνακας 3: Μέσοι όροι της ενεργούς επιφάνειας και της σταθεράς ταχύτητας ετερογενούς μεταφοράς ηλεκτρονίων για τις ηλεκτροχημικές κυψελίδες WE/ RE/CE γραφίτη και WE/CE γραφίτη και RE Ag/AgCl.

Τύπος Κυψελίδας	Ταχύτητα σάρωσης (mV/s)	ΔE_p (mV)	Ψ	$k^\circ (\times 10^{-3})$ (cm/s)	A (cm ²)
WE/RE/CE γραφίτη	100	168	0.1487	2.035 ± 0.417	0.023 ± 0.002
	150	161	0.1674		
	200	164	0.1591		
WE/CE γραφίτη και RE Ag/AgCl	100	139	0.2472	2.331 ± 0.253	0.038 ± 0.001
	150	158	0.1762		
	200	171	0.1414		

Η θεωρητική τιμή της ενεργούς επιφάνειας του ηλεκτροδίου υπολογίστηκε από την εξίσωση: $A_{geo} = \pi r^2$ και βρέθηκε 0.071 cm^2 .

Έχοντας τις τιμές της θεωρητικής και της πειραματικής τιμής της ενεργούς επιφάνειας του ηλεκτροδίου υπολογίζεται το ποσοστό R%, για τους δύο τύπους κυψελίδων.

Έτσι, για την κυψελίδα με WE/RE/CE γραφίτη, η $R\% = 33\%$.

Και για την κυψελίδα με WE/CE γραφίτη και RE Ag/AgCl η $R\% = 54\%$.

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω αποτελέσματα, η φαινομενική απόδοση των ηλεκτροχημικών κυψελίδων παρουσία του ηλεκτροδίου αναφοράς Ag/AgCl είναι καλύτερη. Παρόλο αυτά, λαμβάνοντας υπόψη (α) την ευκολία και το κόστος κατασκευής των αντίστοιχων κυψελίδων και (β) την αναλυτική συμπεριφορά των κυψελίδων στην ηλεκτροχημική μέτρηση του ουρικού οξέος (δες παρακάτω), οι περαιτέρω μελέτες έγιναν με το ψευδοηλεκτρόδιο αναφοράς γραφίτη. Σε μια μελλοντική δουλειά με αυτές τις κυψελίδες θα ληφθεί υπόψη η κατασκευή ενός επιπλέον πλέγματος για την εκτύπωση της στρώσης Ag/AgCl στο ηλεκτρόδιο αναφοράς.

3.2 Τροποποίηση του ηλεκτροδίου εργασίας και βελτιστοποίηση των πειραματικών παραμέτρων

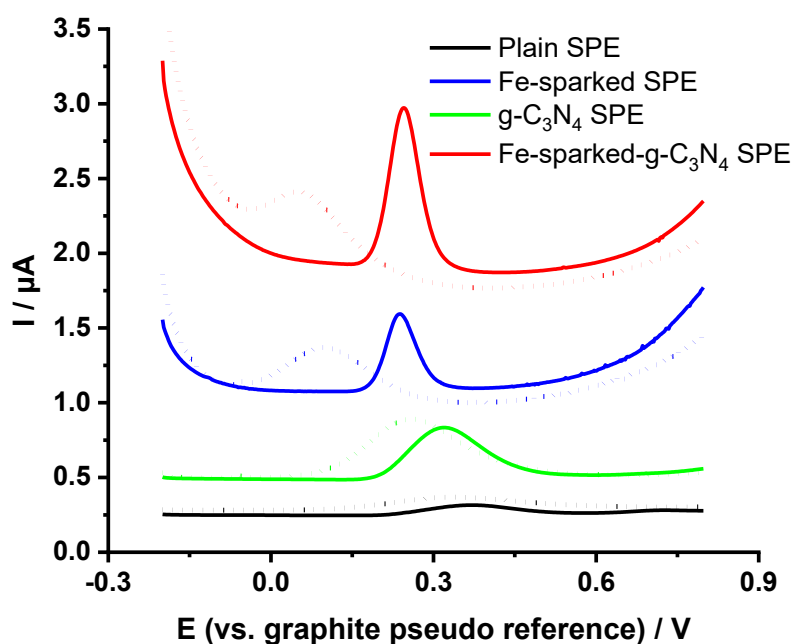
Η ηλεκτροκαταλυτική απόδοση των κυψελίδων στη μέτρηση του ουρικού οξέος μελετήθηκε με μετρήσεις διαφορικής παλμικής βολταμμετρίας σε 0.1 M PBS , $\text{pH } 5$ παρουσία $20 \text{ } \mu\text{M UA}$. Επιπλέον συνεκτιμήθηκε και η απόδοση των αντίστοιχων τροποποιημένων ηλεκτροδίων σε διάλυμα $60 \text{ } \mu\text{M AA}$. Το AA δοκιμάστηκε επειδή περιέχεται στα δάκρυα στο εύρος συγκεντρώσεων $0.61 \pm 0.59 \text{ mM}$ ⁷⁶ και είναι μια αναγωγική ουσία με τυπική παρεμποδιστική δράση στις ανοδικές ηλεκτροαναλυτικές μετρήσεις.

Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις με διαφορετικούς τύπους κυψελίδων. Συγκεκριμένα, σε όλες τις περιπτώσεις το ηλεκτρόδιο αναφοράς (RE) και το αντισταθμιστικό ηλεκτρόδιο (CE) ήταν από γραφίτη και διαφοροποιούνταν οι τροποποιήσεις στο ηλεκτρόδιο εργασίας. Αρχικά μελετήθηκε το μη τροποποιημένο ηλεκτρόδιο εργασίας (plain SPE), έπειτα το τροποποιημένο με ηλεκτρική εκκένωση ηλεκτρόδιο με σύρμα σιδήρου (Fe-sparked SPE), ακολούθως μελετήθηκε το τροποποιημένο με $\text{g-C}_3\text{N}_4$

ηλεκτρόδιο (g-C₃N₄ SPE) και τέλος μελετήθηκε το Fe-sparked SPE μετά την τροποποίησή του με το γραφитικό νιτρίδιο του άνθρακα (Fe-sparked-g-C₃N₄ SPE). Οι διαφορετικοί τύποι ηλεκτροδίου εργασίας που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και τα ρεύματα και τα δυναμικά των κορυφών οξείδωσης του ουρικού και του ασκορβικού οξέος παρουσιάζονται στον Πίνακα 4 και το Σχήμα 22.

Πίνακας 4: Πειραματικά δεδομένα για μετρήσεις διαφορικής παλμικής βολταμετρίας σε 0.1 M PBS, pH 5 παρουσία 20 μ M UA ή 60 μ M AA με τη χρήση διαφορετικών ηλεκτροδίων εργασίας.

Ηλεκτρόδια εργασίας (WE)	I_{pAA} (A)	E_{pAA} (V)	I_{pUA} (A)	E_{pUA} (V)	ΔE_{pp} (V)
Plain SPE	7.67×10^{-8}	0.333	6.13×10^{-8}	0.368	0.035
Fe-sparked SPE	2.99×10^{-7}	0.102	5.09×10^{-7}	0.237	0.135
g-C ₃ N ₄ -SPE	3.85×10^{-7}	0.260	3.36×10^{-7}	0.320	0.060
Fe-sparked g-C ₃ N ₄ -SPE	2.74×10^{-7}	0.068	1.07×10^{-6}	0.246	0.178



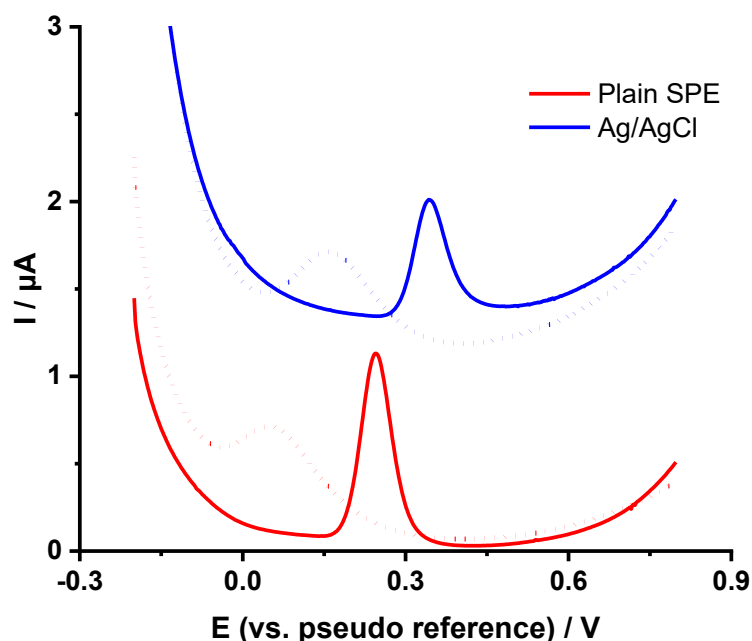
Σχήμα 22: Μετρήσεις διαφορικής παλμικής βολταμετρίας σε 0.1 M PBS, pH 5 παρουσία 20 μ M UA (συνεχείς γραμμές) ή 60 μ M AA (διακεκομμένες γραμμές) με τη χρήση των ηλεκτροδίων εργασίας: Plain SPE (μαύρη καμπύλη), g-C₃N₄ SPE (πράσινη καμπύλη), Fe-sparked SPE (μπλε καμπύλη) και Fe-sparked g-C₃N₄ SPE (κόκκινη καμπύλη).

Από τα παραπάνω δεδομένα προκύπτει πως η καλύτερη ηλεκτροχημική κυψελίδα για τον ηλεκτροχημικό προσδιορισμό του ουρικού οξέος παρουσία ασκορβικού οξέος είναι αυτή που χρησιμοποιεί ως ηλεκτρόδιο εργασίας το τροποποιημένο αρχικά με ηλεκτρική εκκένωση ηλεκτρόδιο με τη χρήση σιδήρου και έπειτα με το g-C₃N₄, καθώς με αυτή παρατηρείται ο μέγιστος διαχωρισμός ουρικού και ασκορβικού οξέος. Το γεγονός αυτό υποδηλώνεται και από το ΔΕ που είναι μεγαλύτερο από ότι στις υπόλοιπες περιπτώσεις. Επιπλέον, η κυψελίδα αυτή παρουσιάζει τη μεγαλύτερη κορυφή οξειδωσης του ουρικού οξέος. Παρατηρείται, επίσης, πως και οι τρεις διαφορετικές τροποποιήσεις στο ηλεκτρόδιο εργασίας παρουσίασαν πιο βελτιωμένες κορυφές συγκριτικά με το μη τροποποιημένο ηλεκτρόδιο. Η μετατόπιση των κορυφών προς καθοδικά δυναμικά οφείλεται στην ηλεκτροχημική απόκριση του κάθε ηλεκτροδίου εργασίας, η οποία διαφοροποιείται ανάλογα την τροποποίηση.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν πειράματα χρησιμοποιώντας ως ηλεκτρόδιο εργασίας το τροποποιημένο ηλεκτρόδιο που αναφέρεται παραπάνω (Fe-sparked-g-C₃N₄) και ηλεκτρόδιο αναφοράς Ag/AgCl.

Πίνακας 5: Πειραματικά δεδομένα για μετρήσεις διαφορικής παλμικής βολταμετρίας των ηλεκτροδίων Fe-sparked g-C₃N₄-SPE σε 0.1 M PBS, pH 5 παρουσία 20 μM UA ή 60 μM AA με ηλεκτρόδιο αναφοράς γραφίτη ή Ag/AgCl.

Τύπος Κυψελίδας	I _{pAA} (A)	E _{pAA} (V)	I _{pUA} (A)	E _{pUA} (V)	ΔE _{pp} (V)
WE: Fe-sparked g-C ₃ N ₄ -SPE RE: graphite	2.74×10 ⁻⁷	0.068	1.07×10 ⁻⁶	0.246	0.178
WE: Fe-sparked g-C ₃ N ₄ -SPE RE: Ag/AgCl	3.42×10 ⁻⁷	0.164	6.47×10 ⁻⁷	0.342	0.178

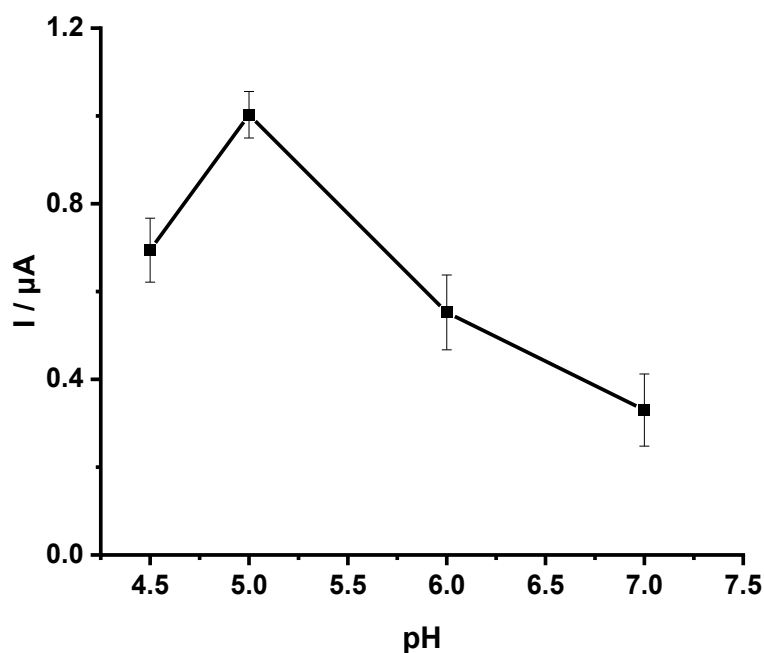


Σχήμα 23: Μετρήσεις διαφορικής παλμικής βολταμμετρίας σε 0.1 M PBS, pH 5 παρουσία 20 μM UA ή 60 μM AA με τη χρήση ηλεκτροδίων εργασίας Fe-sparked g-C₃N₄ (WE) και με ηλεκτρόδιο αναφοράς γραφίτη (κόκκινη γραμμή) ή Ag/AgCl (μπλε γραμμή).

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 23, οι διαφορετικοί τύποι κυψελίδων δεν παρουσιάζουν διαφοροποίηση ως προς τον διαχωρισμό των κορυφών του ουρικού και του ασκορβικού οξέος. Ωστόσο, στην περίπτωση του ηλεκτροδίου αναφοράς γραφίτη παρατηρείται μεγαλύτερη κορυφή οξείδωσης του ουρικού οξέος, γεγονός που την καθιστά καλύτερη.

Πραγματοποιήθηκαν, επίσης, πειράματα σε διαφορετικά pH προκειμένου να βρεθεί το pH εκείνο στο οποίο λαμβάνουμε την καλύτερη κορυφή οξείδωσης του ουρικού οξέος. Έτσι, χρησιμοποιώντας ηλεκτροχημική κυψελίδα με WE: Fe-sparked g-C₃N₄ SPE και RE/CE: γραφίτη λήφθηκαν βολταμμογραφήματα διαφορικής παλμικής βολταμμετρίας παρουσία 20 μM ουρικού οξέος σε 0.1 M PBS, pH 5, 6, και 7 και 20 μM ουρικού οξέος σε 0.1 M ρυθμιστικού οξικών, pH 4.5.

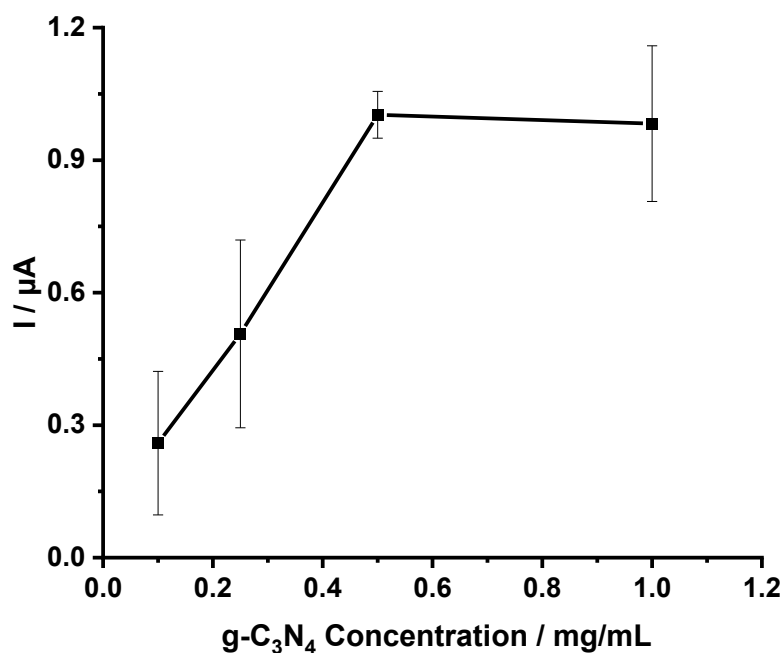
Όπως φαίνεται στο Σχήμα 24 το βέλτιστο pH είναι το 5, καθώς σε αυτό παρατηρείται η μέγιστη κορυφή οξείδωσης του ουρικού οξέος (μεγαλύτερη ένταση ρεύματος) και ταυτόχρονα είχε την καλύτερη επαναληψιμότητα μεταξύ των πολλών διαφορετικών μετρήσεων που λήφθηκαν στην ίδια κυψελίδα.



Σχήμα 24: Διάγραμμα της έντασης της κορυφής οξείδωσης 20 μM ουρικού οξέος συναρτήσει του pH. Οι τιμές της έντασης του ρεύματος των κορυφών (I) για κάθε τιμή pH προέκυψαν από τουλάχιστον τέσσερις μετρήσεις.

Επιπλέον, μελετήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις της διασποράς του $\text{g-C}_3\text{N}_4$, με τις οποίες έγινε η τροποποίηση του ηλεκτροδίου εργασίας. Έτσι, λοιπόν, λήφθηκαν βολταμμογραφήματα DP της έντασης της κορυφής οξείδωσης του ουρικού οξέος σε 0.1 M PBS, pH 5, χρησιμοποιώντας ηλεκτροχημική κυψελίδα με ηλεκτρόδιο αναφοράς γραφίτη και ηλεκτρόδιο εργασίας Fe-sparked $\text{g-C}_3\text{N}_4$ SPE, το οποίο τροποποιήθηκε με υδατικές διασπορές $\text{g-C}_3\text{N}_4$ συγκέντρωσης 0.1, 0.25, 0.5 και 1 mg/mL.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 25 η βέλτιστη συγκέντρωση του γραφιτικού νιτριδίου είναι 0.5 mg/mL, καθώς σε αυτή τη συγκέντρωση λαμβάνεται η μεγαλύτερη κορυφή οξείδωσης του ουρικού οξέος και ταυτόχρονα δίνει την καλύτερη επαναληψιμότητα μεταξύ των πολλών διαφορετικών μετρήσεων που λήφθηκαν στην ίδια κυψελίδα.



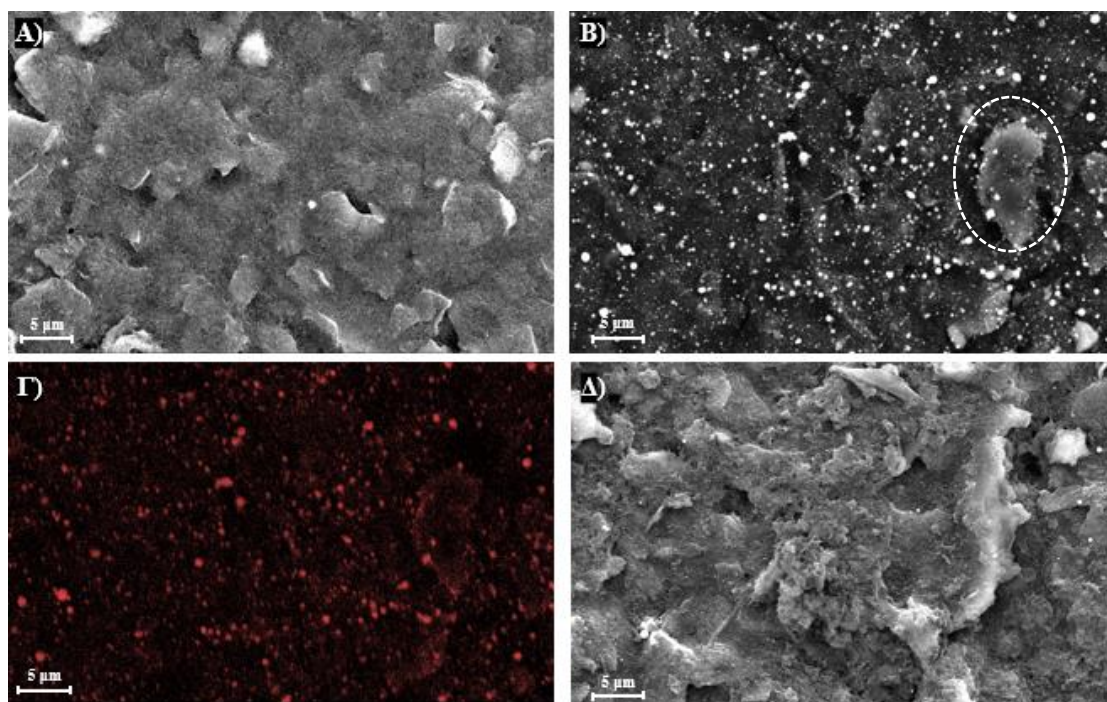
Σχήμα 25: Διάγραμμα της έντασης της κορυφής οξείδωσης 20 μM ουρικού οξέος σε 0.1 M PBS, pH 5 συναρτήσει της συγκέντρωσης του $\text{g-C}_3\text{N}_4$ με το οποίο έγινε η τροποποίηση του ηλεκτροδίου εργασίας. Οι τιμές της έντασης ρεύματος των κορυφών (I) για κάθε συγκέντρωση του γραφιτικού νιτρίδιου προέκυψαν από τουλάχιστον τέσσερις μετρήσεις.

Σύμφωνα με τις παραπάνω μελέτες προέκυψε πως η καλύτερη ηλεκτροχημική κυψελίδα είναι αυτή που έχει ηλεκτρόδιο αναφοράς γραφίτη και ηλεκτρόδιο εργασίας Fe-sparked $\text{g-C}_3\text{N}_4$ SPE (με $\text{C}_{\text{g-C}_3\text{N}_4} = 0.5 \text{ mg/mL}$) και το βέλτιστο pH είναι το 5.

3.3 Εξέταση μορφολογίας των ηλεκτροδίων

Ακολουθώς, λήφθηκαν εικόνες SEM για το ηλεκτρόδιο εργασίας πριν και μετά την τροποποίηση του με ηλεκτρική εκκένωση και το γραφιτικό νιτρίδιο του άνθρακα. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 26A παρατηρείται μία σχετικά ομοιόμορφη επιφάνεια του άνθρακα, ενώ στο Σχήμα 26B διακρίνονται τα νανοσωματίδια σιδήρου τα οποία κατανέμονται ομοιόμορφα στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου γραφίτη μετά την ηλεκτρική εκκένωση. Η ομοιόμορφη κατανομή των νανοσωματιδίων επιβεβαιώνεται και από τη στοιχειακή χαρτογράφηση της επιφάνειας όπου τα παραγόμενα με ηλεκτρική εκκένωση νανοσωματίδια απεικονίζονται με κόκκινες κουκίδες (Σχήμα 26 Γ). Τα σχηματιζόμενα νανοσωματίδια είναι κυρίως σφαιρικά με διάμετρο μικρότερη από 50 nm στην πλειονότητα τους και την παρουσία μικρών πληθυσμών μεγαλύτερων νανοσωματιδίων με διάμετρο 50-100 nm και σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες XPS κατά το σχηματισμό τους σε ανοικτή ατμόσφαιρα μετατρέπονται σε διάφορες μορφές

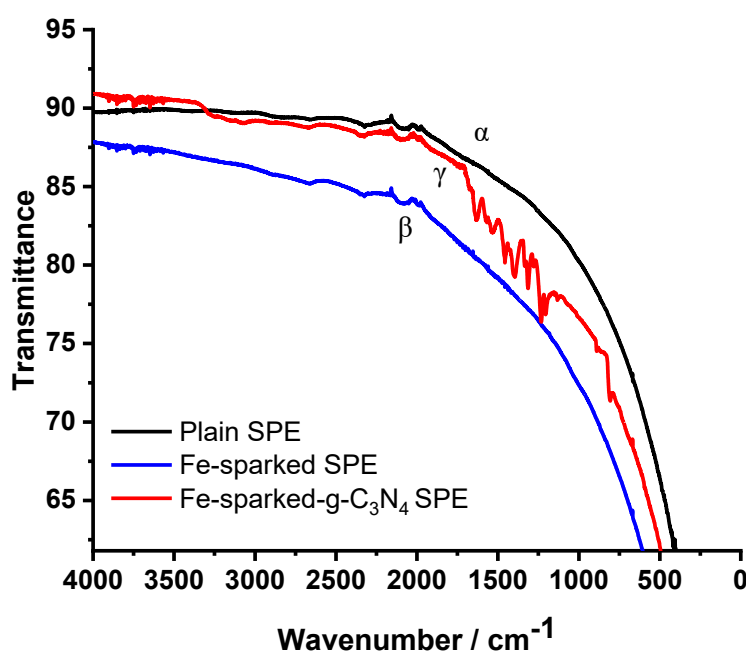
οξειδείων, όπως FeO , Fe_3O_4 και FeO_2 ⁷⁷. Στην ίδια εικόνα SEM είναι, επίσης, εμφανής η αλλαγή της μορφολογίας του εκτυπωμένου μελανιού γραφίτη και ο σχηματισμός, λόγω της ηλεκτρικής εκκένωσης, φυλλόμορφων μορφών γραφίτη (κυκλωμένες περιοχές) όπως έχουν ταυτοποιηθεί με μελέτες Raman σε προηγούμενες μελέτες⁷⁸. Τέλος, στο Σχήμα 26Δ φαίνεται η μορφολογία της επιφάνειας των ηλεκτροδίων μετά την επίστρωση του $\text{g-C}_3\text{N}_4$, η οποία επικαλύπτει τα νανοσωματίδια με τα φύλλα και τις πτυχωσεις που οφείλονται στο γραφιτικό νιτρίδιο του άνθρακα.



Σχήμα 26: Εικόνες SEM της ενεργής επιφάνειας των ηλεκτροδίων εργασίας (A) Plain SPE, (B) Fe-sparked SPE, (Δ) Fe-sparked $\text{g-C}_3\text{N}_4$ SPE. Στο Σχήμα 26Γ φαίνεται η στοιχειακή χαρτογράφηση της επιφάνειας όπου τα άτομα Fe απεικονίζονται με κόκκινες κουκίδες.

3.4 Φασματοσκοπία ATR – FTIR

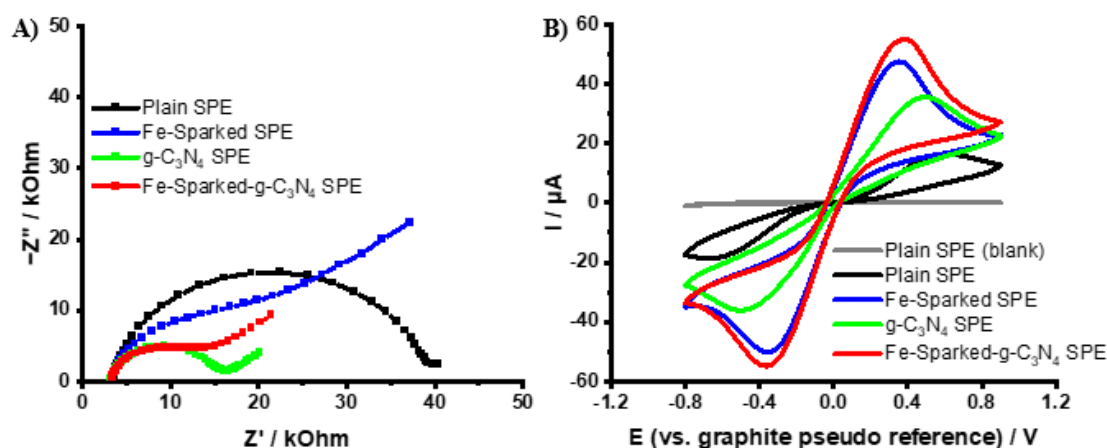
Η επιφανειακή χημική σύσταση των τριών ηλεκτροδίων εργασίας (Plain SPE, Fe-sparked SPE και Fe-sparked-g-C₃N₄ SPE) εξετάστηκε, επίσης, και με Φασματοσκοπία Υπέρυθρης Ακτινοβολίας με μετασχηματισμό Fourier, συνδυασμένη με εξασθενημένη ολική ανάκλαση (ATR-FTIR). Όπως φαίνεται στο Σχήμα 27 τόσο το μη τροποποιημένο ηλεκτρόδιο SPE όσο και το ηλεκτρόδιο Fe-sparked SPE δεν έδωσαν κάποια κορυφή. Στην περίπτωση, όμως, του ηλεκτροδίου Fe-sparked-g-C₃N₄ SPE παρατηρούνται έντονες κορυφές περίπου στα 1000 με 1500 cm⁻¹. Συγκεκριμένα, οι κορυφές περίπου στα 1240 cm⁻¹, 1320 cm⁻¹ και 1564 cm⁻¹ οφείλονται στις δονήσεις τάσης του δεσμού C-N που εμφανίζεται στον αρωματικό δακτύλιο της τριαζίνης στο g-C₃N₄. Η κορυφή που εμφανίζεται στα 1568 cm⁻¹ και 1650 cm⁻¹ περίπου οφείλεται στις δονήσεις τάσης του δεσμού C=N εντός του τριαζινικού δακτυλίου. Οι κορυφές στο εύρος 1200 – 1450 cm⁻¹ οφείλονται στις δονήσεις τάσης του δεσμού C-N του αρωματικού τριαζινικού δακτυλίου. Τέλος, η κορυφή στα 810 cm⁻¹ περίπου οφείλεται στη δόνηση κάμψης των τριαζινικών δακτυλίων και υποδηλώνει τον τρόπο αναπνοής του πυρήνα επταζίνης (breathing vibration mode).⁴⁵ Χαρακτηρίζεται με τον τρόπο αυτό (breathing mode), διότι τα άτομα C και N κινούνται συμμετρικά προς και από το κέντρο, δίνοντας την εντύπωση ότι το μόριο «αναπνέει».⁷⁹ Η κορυφή αυτή αποτελεί χαρακτηριστική κορυφή του g-C₃N₄ και επιβεβαιώνει την επιτυχή τροποποίηση του ηλεκτροδίου.^{80,81}



Σχήμα 27: Φάσματα ATR-FTIR των ηλεκτροδίων εργασίας: α) Plain SPE, β) Fe-sparked SPE και γ) Fe-sparked-g-C₃N₄ SPE.

3.5 Ηλεκτροχημικός χαρακτηρισμών κυψελίδων

Η ηλεκτροχημική συμπεριφορά των κυψελίδων πριν και μετά τις διάφορες τροποποιήσεις στο ηλεκτρόδιο εργασίας μελετήθηκε, επίσης, με μετρήσεις κυκλικής βολταμμετρίας και φασματοσκοπίας ηλεκτροχημικής εμπίδησης σε 0.1 M PBS, pH 7 που περιέχει 5 mM σιδηρικυανιούχα και 5 + 5 mM σιδηρο-/σιδηρικυανιούχα ιόντα (Σχήμα 28). Χρησιμοποιήθηκαν οι εξής κυψελίδες: α) WE: γραφίτη και RE/CE: γραφίτη, β) WE: Fe-sparked SPE και RE/CE: γραφίτη, γ) WE: g-C₃N₄ SPE και RE/CE: γραφίτη και δ) WE: Fe-sparked g-C₃N₄ SPE και RE/CE: γραφίτη. Λήφθηκε, επίσης, κυκλικό βολταμμογράφημα με scan rate 50 mV/s για το ισότονο διάλυμα φωσφορικών, PBS, 0.1 M, pH 7, το οποίο ήταν και ο ηλεκτρολύτης του οξειδοαναγωγικού ζεύγους.



Σχήμα 28: (A) Κυκλικά βολταμμογραφήματα και (B) διαγράμματα Nyquist των ηλεκτροχημικών κυψελίδων με τη χρήση των ηλεκτροδίων εργασίας Plain SPE, Fe-sparked SPE, g-C₃N₄ SPE και Fe-sparked-g-C₃N₄ σε 0.1 M PBS παρουσία 5+5 mM σιδηρο-/σιδηρικυανιούχων ιόντων.

Από τα κυκλικά βολταμμογραφήματα που παρουσιάζονται στο Σχήμα 28 παρατηρείται ότι και τα τρία τροποποιημένα ηλεκτρόδια εργασίας διαθέτουν καλύτερη κινητική μεταφοράς ηλεκτρονίων συγκριτικά με το μη τροποποιημένο ηλεκτρόδιο (Plain SPE), καθώς παρουσιάζουν πιο καλοσχηματισμένες και συμμετρικές κορυφές οξείδωσης και αναγωγής του οξειδοαναγωγικού ζεύγους και σημαντικά υψηλότερα ρεύματα κορυφής τόσο για την οξείδωση όσο και την αναγωγή του οξειδοαναγωγικού ζεύγους.

Επιπλέον, αναφορικά με τα διαγράμματα Nyquist είναι γνωστό πως η διάμετρος του ημικυκλίου αντιστοιχεί στη αντίσταση μεταφοράς φορτίου, R_{ct} στη διεπιφάνεια ηλεκτροδίου/ηλεκτρολύτη. Συγκεκριμένα, όσο μικρότερη είναι η ακτίνα του ημικυκλίου τόσο μικρότερη είναι και η αντίσταση μεταφοράς φορτίου, γεγονός που

υποδηλώνει αύξηση στην κινητική της ετερογενούς ηλεκτροδιακής αντίδρασης.^{80,82} Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα, λοιπόν, παρατηρείται πως το μη τροποποιημένο ηλεκτρόδιο Plain SPE παρουσιάζει το μεγαλύτερο ημικύκλιο, άρα και τη μεγαλύτερη αντίσταση μεταφοράς φορτίου. Η αντίσταση μεταφοράς φορτίου μειώνεται τόσο με την τροποποίηση με ηλεκτρική εκκένωση με τη χρήση σιδήρου (Fe-sparked SPE) όσο και με την τροποποίηση με το γραφιτικό νιτρίδιο του άνθρακα. Μειώνεται, όμως, ακόμα περισσότερο με τον συνδυασμό των παραπάνω τροποποιήσεων (Fe-sparked-g-C₃N₄ SPE). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η υψηλότερη ηλεκτροχημική απόδοση παρατηρείται με τη χρήση του ηλεκτροδίου Fe-sparked-g-C₃N₄ SPE.

Σύμφωνα με τις παραπάνω μετρήσεις κυκλικής βολταμμετρίας υπολογίστηκε η σταθερά ρυθμού ετερογενούς μεταφοράς ηλεκτρονίων k^o καθώς και η ενεργός επιφάνεια A των τεσσάρων ηλεκτροδίων εργασίας. Βάσει των τιμών ΔE_p στα κυκλικά βολταμμογραφήματα, ο υπολογισμός της ενεργούς επιφάνειας έγινε με την τροποποιημένη εξίσωση Randles-Ševčík (εξ. 8) για τις μη αντιστρεπτές αντιδράσεις, όπου $\Delta E_p > 200 \text{ mV}$.⁷⁵

$$A = \frac{I_p}{2.99 \times 10^5 \alpha^{1/2} \sqrt{DC} \sqrt{v}} \quad (8)$$

Όμοια, η σταθερά k^o δεν υπολογίστηκε με βάση τη μέθοδο Nicholson που περιγράφεται στην Ενότητα 3.1.1, διότι η διαφορά δυναμικού μεταξύ των κορυφών οξείδωσης και αναγωγής του οξειδοαναγωγικού ζεύγους Ferri/Ferro δεν βρίσκεται εντός των επιτρεπτών για τη μέθοδο αυτή ορίων ($63 < n\Delta E_p < 212 \text{ mV}$).

Χρησιμοποιήθηκε, λοιπόν, η μέθοδος Klinger-Kochi, η οποία αναφέρεται σε συστήματα όπου $n\Delta E_p > 150 \text{ mV}$. Η σταθερά ρυθμού ετερογενούς μεταφοράς ηλεκτρονίων υπολογίστηκε με βάση την παρακάτω εξίσωση:

$$k^o = 2.18 \sqrt{\frac{\alpha D n v F}{RT}} e^{-\left(\frac{\alpha^2 n F}{RT}\right) \Delta E_p} \quad (9)$$

Όπου, α ο συντελεστής μεταφοράς της εμπρόσθιας σάρωσης, ο οποίος υπολογίζεται με βάση την εξίσωση: $|E_p - E_{p/2}| = \frac{47.7}{\alpha}$. Οι υπόλοιποι όροι της εξίσωσης είναι ίδιοι με τους όρους που αναλύθηκαν στην Ενότητα 3.1.1.

Με βάση τις παραπάνω εξισώσεις, λοιπόν, υπολογίστηκε η σταθερά k^o και η ενεργός επιφάνεια A του ηλεκτροδίου εργασίας για διάλυμα 5+5 mM σιδηρο-

/σιδηρικού ανιόντων σε 0.1 M PBS, pH 7, χρησιμοποιώντας τους τέσσερις διαφορετικούς τύπους ηλεκτροχημικής κυψελίδας που αναφέρονται παραπάνω. Οι τιμές της σταθεράς k^0 και της ενεργούς επιφάνειας A του ηλεκτροδίου εργασίας υπολογίστηκαν για ταχύτητα σάρωσης 50 mV/s. Τα αποτελέσματα αυτά συνοψίζονται στον Πίνακα 6.

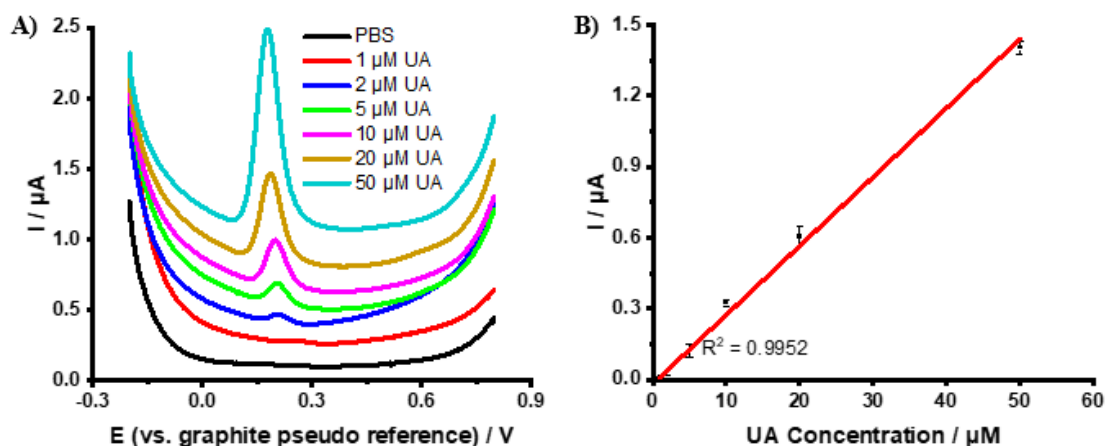
Πίνακας 6: Πειραματικές τιμές της ενεργούς επιφάνειας και της σταθεράς ταχύτητας ετερογενούς μεταφοράς ηλεκτρονίων για τις ηλεκτροχημικές κυψελίδες με RE/CE γραφίτη και WE: Plain SPE, Fe-sparked SPE, g-C₃N₄ SPE και Fe-sparked-g-C₃N₄ SPE.

Ηλεκτρόδια εργασίας	Ταχύτητα σάρωσης (mV/s)	ΔE_p (mV)	α	$k_0 (\times 10^{-3})$ (cm/s)	A (cm ²)
Plain SPE	50	1108	0.2484	0.297	0.012
g-C ₃ N ₄ SPE	50	945	0.3507	0.054	0.014
Fe-sparked SPE	50	637	0.2282	1.100	0.081
Fe-sparked-g-C ₃ N ₄ SPE	50	661	0.2111	1.224	0.099

Από τα παραπάνω αποτελέσματα, λοιπόν, προκύπτει πως η φαινομενική απόδοση της ηλεκτροχημικής κυψελίδας παρουσία του ηλεκτροδίου εργασίας Fe-sparked-g-C₃N₄ SPE είναι καλύτερη, συμπέρασμα που συμφωνεί τόσο με τα κυκλικά βολταμμογραφήματα όσο και με τα διαγράμματα Nyquist. Παρατηρείται, επίσης, πως οι τροποποιήσεις με ηλεκτρική εκκένωση με τη χρήση σιδήρου βελτιώνουν σημαντικά τη μεταφορά ηλεκτρονίων σε σύγκριση με την τροποποίηση μόνο με το γραφίτικό νιτρίδιο του άνθρακα.

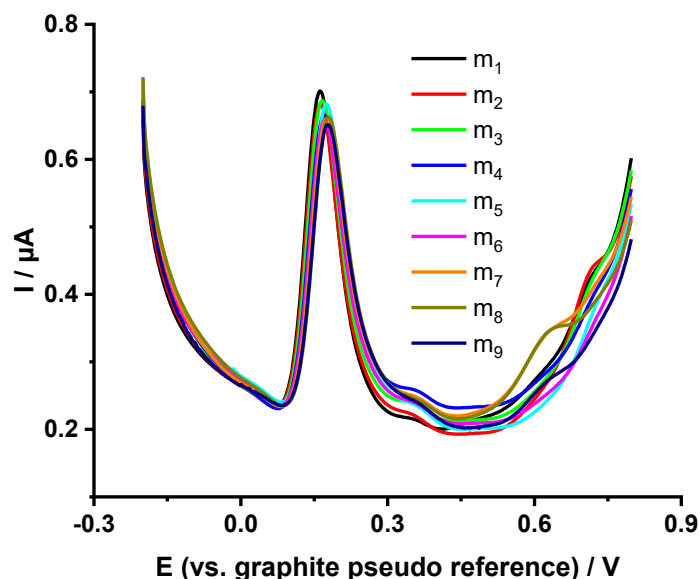
3.6 Κατασκευή καμπύλης αναφοράς σε πρότυπα διαλύματα και τεχνητά δάκρυα

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις διαφορικής παλμικής βολταμμετρίας και καταγραφή της έντασης του ρεύματος της κορυφής οξείδωσης του ουρικού οξέος σε 0.1 M PBS, pH 5, παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων προτύπων διαλυμάτων ουρικού οξέος (1, 2, 5, 10, 20, 50 μ M). Στο Σχήμα 29 παρουσιάζονται τα βολταμμογραφήματα διαφορικής παλμικής βολταμμετρίας και η αντίστοιχη καμπύλη αναφοράς για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις ουρικού οξέος.



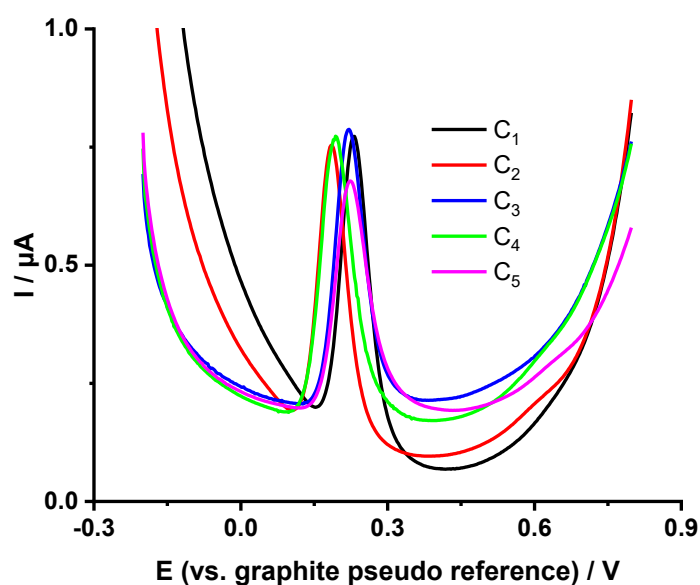
Σχήμα 29: (Α) Βολταμμογραφήματα διαφορικής παλμικής βολταμμετρίας ηλεκτροχημικών κυψελίδων με WE Fe-sparked-g-C₃N₄ SPE σε 0.1 M PBS, pH 5 παρουσία 0, 1, 2, 5, 10, 20 και 50 μM UA και (Β) η αντίστοιχη καμπύλη αναφοράς. Τα error bars που φαίνονται στην καμπύλη αναφοράς αναφέρονται στις τρεις διαδοχικές μετρήσεις στην ίδια κυψελίδα.

Μελετήθηκε, επίσης, η επαναληψιμότητα (repeatability) και η επαναληπτικότητα (reproducibility) της ηλεκτροχημικής κυψελίδας WE: Fe-sparked-g-C₃N₄ SPE / RE/CE: γραφίτη. Η επαναληψιμότητα της ηλεκτροχημικής κυψελίδας μελετήθηκε λαμβάνοντας 9 διαδοχικά βολταμμογραφήματα διαφορικής παλμικής βολταμμετρίας στην ίδια κυψελίδα για το πρότυπο διάλυμα ουρικού οξέος (20 μM) και βρέθηκε 4.3% (Σχήμα 30).



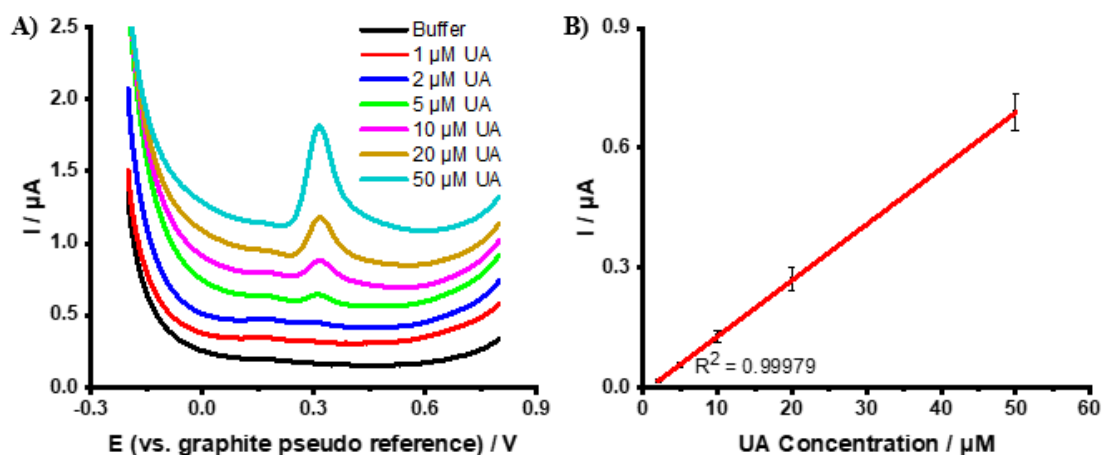
Σχήμα 30: Διαδοχικά βολταμμογραφήματα διαφορικής παλμικής βολταμμετρίας σε 0.1 M PBS, pH 5 παρουσία 20 μM ουρικού οξέος στην ίδια κυψελίδα.

Η επαναληπτικότητα της ηλεκτροχημικής κυψελίδας WE: Fe-sparked-g-C₃N₄ SPE / RE/CE: γραφίτη μελετήθηκε λαμβάνοντας βολταμμογράφημα διαφορικής παλμικής βολταμμετρίας για το πρότυπο διάλυμα ουρικού οξέος (20 μ M) σε 5 διαφορετικές κυψελίδες και βρέθηκε 9.1%. Η μικρή μετατόπιση που παρατηρείται στο δυναμικό που εμφανίζεται η κάθε κορυφή οξείδωσης οφείλεται στις μικρές διαφοροποιήσεις που συμβαίνουν κατά την κατασκευή της ηλεκτροχημικής κυψελίδας.



Σχήμα 31: Βολταμμογραφήματα διαφορικής παλμικής βολταμμετρίας σε 0.1 M PBS, pH 5 παρουσία 20 μ M ουρικού οξέος σε 5 διαφορετικές κυψελίδες.

Η παραπάνω σειρά μετρήσεων πραγματοποιήθηκε και σε διάλυμα τεχνητών δακρύων προκειμένου να εξετάσουμε την συμπεριφορά των ηλεκτροδίων παρουσία διαφόρων ενώσεων που υπάρχουν στα δάκρυα και κυρίως του ασκορβικού οξέος, ένα μόριο με πιθανή παρεμποδιστική δράση, και της αλβουμίνης. Στο Σχήμα 32 παρουσιάζονται τα βολταμμογραφήματα διαφορικής παλμικής βολταμμετρίας που λήφθηκαν, καθώς και η αντίστοιχη καμπύλη αναφοράς.



Σχήμα 32: (Α) Βολταμμογραφήματα διαφορικής παλμικής βολταμμετρίας ηλεκτροχημικών κυψελίδων με WE Fe-sparked-g-C₃N₄ SPE σε τεχνητά δάκρυα (pH 5) παρουσία 0, 1, 2, 5, 10, 20 και 50 μM UA και (Β) η αντίστοιχη καμπύλη αναφοράς. Τα error bars που φαίνονται στην καμπύλη αναφοράς αναφέρονται στις τρεις διαδοχικές μετρήσεις στην ίδια κυψελίδα.

Παρατηρούμε ότι το τυφλό δείγμα (τεχνητά δάκρυα) δεν παρουσίασε κάποια κορυφή, ενώ τα διαλύματα τεχνητών δακρύων στα οποία προστέθηκε ποσότητα ουρικού οξέος εμφάνισαν κορυφή στα 0.3 V περίπου, η ένταση της οποίας αυξανόταν, όπως αναμένεται, όσο αυξανόταν η συγκέντρωση του ουρικού οξέος. Ωστόσο, στην περίπτωση όπου προστέθηκε 1 μM ουρικού οξέος στο διάλυμα των τεχνητών δακρύων δεν παρατηρείται κορυφή οξείδωσης.

Η εξίσωση ευθείας και στις δυο παραπάνω μελέτες, είναι της μορφής:

$$I/\mu A = (a \pm S_a) + (b \pm S_b) \times [UA/\mu M]$$

Οι μεταβλητές των εξισώσεων και το όριο ανίχνευσης LOD, σύμφωνα με την εξίσωση

$$LOD = \frac{3S_a}{b}, \text{ δίνονται στο Πίνακα 7.}$$

Πίνακας 7: Μεταβλητές των εξισώσεων ευθείας για τις καμπύλες αναφοράς σε PBS και διάλυμα τεχνητών δακρύων και αναλυτική συμπεριφορά των ηλεκτροχημικών κυψελίδων με WE: Fe-sparked-g-C₃N₄ SPE.

Δείγμα	a	S _a	b	S _b	R ²	Linear range / μM	LOD
0.1 M PBS, pH 5	-0.01802	0.00451	0.02917	0.00101	0.9952	1-50	0.4638
Τεχνητά δάκρυα	-0.01188	0.00050	0.01402	0.00012	0.9997	2-50	0.1063

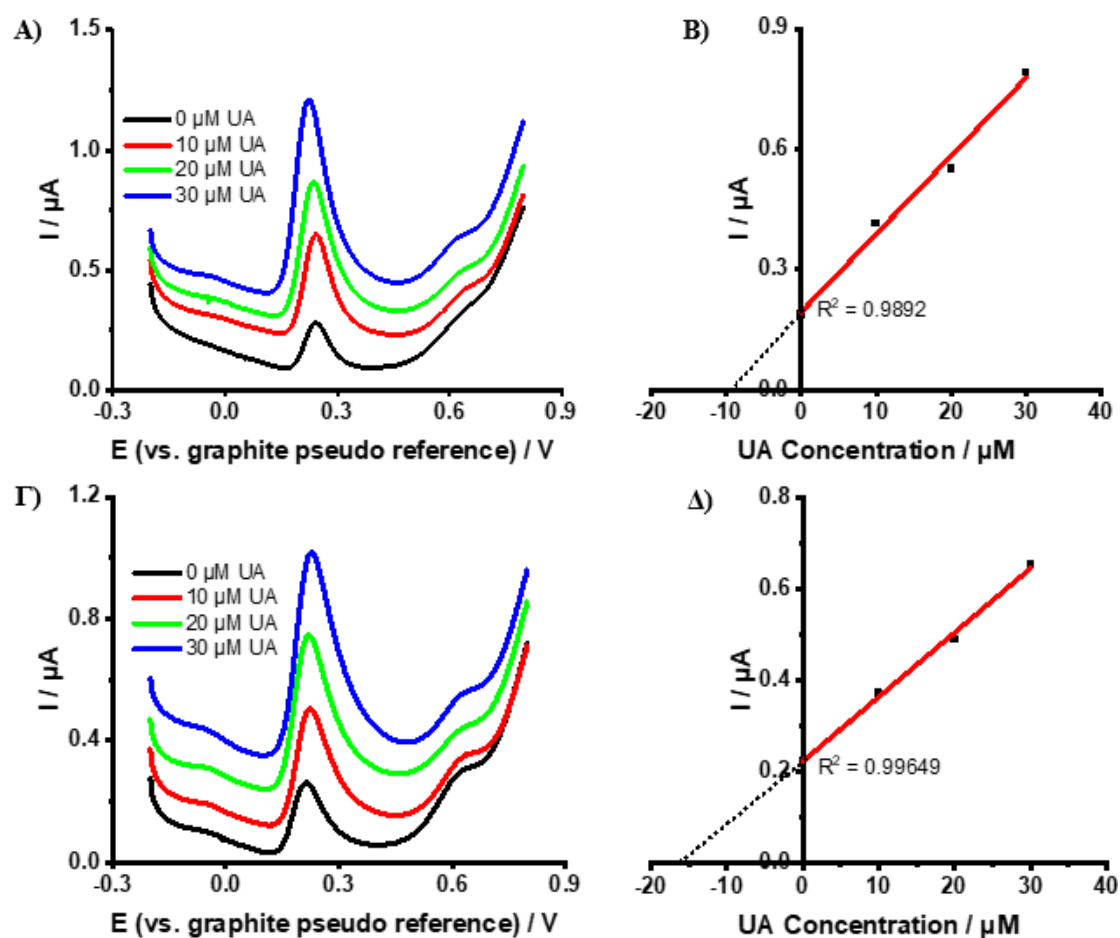
Το όριο ανίχνευσης (LOD) στα τεχνητά δάκρυα υπολογίστηκε αρκετά χαμηλότερο σε σύγκριση με τα πρότυπα διαλύματα. Αυτό οφείλεται στο ότι η καμπύλη αναφοράς των τεχνητών δακρύων παρουσιάζει καλύτερη γραμμικότητα από την αντίστοιχη των πρότυπων διαλυμάτων, γεγονός που επιβεβαιώνεται από τα αντίστοιχα R^2 . Αποτέλεσμα της καλύτερης γραμμικότητας είναι η σημαντικά χαμηλότερη τυπική απόκλιση S_a στην περίπτωση των τεχνητών δακρύων, με αποτέλεσμα και το χαμηλότερο όριο ανίχνευσης μιας και οι δύο αυτοί όροι είναι ανάλογοι μεταξύ τους.

3.7 Ανάλυση βιολογικών δειγμάτων δακρύων

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις σε πραγματικά βιολογικά δείγματα. Η δειγματοληψία των δακρύων πραγματοποιήθηκε σε υγιείς εθελοντές, με τον τρόπο που αναγράφεται στην Ενότητα 2.3.8. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις σε τρεις διαφορετικές κυψελίδες. Σε κάθε ηλεκτροχημική κυψελίδα ελήφθησαν αρχικά μια μέτρηση σε 0.1 M PBS, pH 5 (εγκλιματισμός της κυψελίδας) και ακολούθως μετρήσεις των 4 διαλυμάτων που παρασκευάστηκαν για την ανάλυση των μη εμβολιασμένων (unspiked) και των εμβολιασμένων (spiked) δειγμάτων (Σχήμα 33) με τη μέθοδο γνωστής προσθήκης. Τα αναλυτικά αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.

Πίνακας 8: Αναλυτικά δεδομένα και ανάκτηση της μεθόδου για τον προσδιορισμό ουρικού οξέος στα ανθρώπινα δάκρυα. Οι τιμές αναφέρονται στη μέση τιμή και την τυπική απόκλιση των μετρήσεων σε τρεις διαφορετικές κυψελίδες.

Δείγμα 2 × diluted DS or SS	Προστιθέμενη ποσότητα UA (μM)	Προσδιοριζόμενη ποσότητα UA (μM)	Ανάκτηση %
#1	0	15.5 ± 0.4	101.7 ± 10.2
	10	26.1 ± 2.6	
#2	0	14.3 ± 0.3	109.3 ± 6.1
	10	26.5 ± 1.5	
#3	0	19.5 ± 2.1	98.7 ± 8.7
	10	29.3 ± 4.4	



Σχήμα 33: Αντιπροσωπευτικά βολταμμογραφήματα διαφορετικής παλμικής βολταμμετρίας ηλεκτροχημικών κυψελίδων με WE Fe-sparked-g-C₃N₄ SPE για (Α,Β) τον προσδιορισμό ουρικού οξέος και (Γ,Δ) της ανάκτησης της μεθόδου με τη μέθοδο γνωστής προσθήκης σε βιολογικά δάκρυα (Δείγμα #3).

Στο Σχήμα 33 παρατηρείται η γραμμική αύξηση της έντασης της κορυφής οξείδωσης του ουρικού οξέος συναρτήσει της συγκέντρωσής του τόσο στο μη εμβολιασμένο (Σχήμα 33Α, 33Β) όσο και στο εμβολιασμένο δείγμα (Σχήμα 33Γ, 33Δ).

4. Συμπεράσματα

Η χαμηλού κόστους ηλεκτροχημική διάταξη 3 ηλεκτροδίων, με ενσωματωμένη κυψελίδα όγκου μικρολίτρων ($<2 \mu\text{L}$), που κατασκευάστηκε στην παρούσα εργασία, καθίσταται κατάλληλη για την ανάλυση βιολογικών υγρών με περιορισμένη διαθεσιμότητα, όπως τα δάκρυα. Η ηλεκτροχημική κυψελίδα με ηλεκτρόδια εργασίας Fe-sparked-g-C₃N₄ SPE και ηλεκτρόδια RE/CE γραφίτη χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία για τον προσδιορισμό του ουρικού οξέος στα δάκρυα. Η ανάκτηση της μεθόδου κυμάνθηκε στο εύρος 99-110%.

Περαιτέρω κλινικές μελέτες και βελτιστοποιήσεις στην κατασκευή της προτεινόμενης ηλεκτροχημικής διάταξης ενδεχομένως να οδηγήσουν στην ευρεία χρήση της προτεινόμενης διάταξης για τον προσδιορισμό του ουρικού οξέος στα δάκρυα για τη διάγνωση της ουρικής αρθρίτιδας, καθώς πρόκειται για μία μέθοδο χαμηλού κόστους, που δεν απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό και παρέχει αξιόπιστα αποτελέσματα στο επίπεδο συγκεντρώσεων με βιολογικό ενδιαφέρον.

Τέλος, η συγκεκριμένη ηλεκτροχημική διάταξη αναλόγως την τροποποίηση της ενεργούς επιφάνειας των ηλεκτροδίων και το υλικό κατασκευής αυτών, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό διαφόρων βιοδεικτών και τη διάγνωση ασθενειών.

5. Βιβλιογραφία

- (1) Nandi, S. K.; Singh, D.; Upadhay, J.; Gupta, N.; Dhiman, N.; Mittal, S. K.; Mahindroo, N. Identification of Tear-Based Protein and Non-Protein Biomarkers: Its Application in Diagnosis of Human Diseases Using Biosensors. *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *193*, 838–846. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.10.198>.
- (2) Sheppard, J. D.; Nichols, K. K. Dry Eye Disease Associated with Meibomian Gland Dysfunction: Focus on Tear Film Characteristics and the Therapeutic Landscape. *Ophthalmol. Ther.* **2023**, *12* (3), 1397–1418. <https://doi.org/10.1007/s40123-023-00669-1>.
- (3) Edman, M. C.; Janga, S. R.; Kakan, S. S.; Okamoto, C. T.; Freire, D.; Feigenbaum, D.; Lew, M.; Hamm-Alvarez, S. F. Tears – More to Them Than Meets the Eye: Why Tears Are A Good Source of Biomarkers in Parkinson’S Disease. *Biomark. Med.* **2020**, *14* (2), 151–163. <https://doi.org/10.2217/bmm-2019-0364>.
- (4) Vicnesh, J.; Oh, S. L.; Wei, J. K. E.; Ciaccio, E. J.; Chua, K. C.; Tong, L.; Rajendra Acharya, U. Thoughts Concerning the Application of Thermogram Images for Automated Diagnosis of Dry Eye – A Review. *Infrared Phys. Technol.* **2020**, *106*, 103271. <https://doi.org/10.1016/j.infrared.2020.103271>.
- (5) Fjærvoll, K.; Fjærvoll, H.; Magno, M.; Nøland, S. T.; Dartt, D. A.; Vehof, J.; Utheim, T. P. Review on the Possible Pathophysiological Mechanisms Underlying Visual Display Terminal-associated Dry Eye Disease. *Acta Ophthalmol. (Copenh.)* **2022**, *100* (8), 861–877. <https://doi.org/10.1111/aos.15150>.
- (6) Magno, M. S.; Olafsson, J.; Beining, M.; Moschowits, E.; Lagali, N.; Wolffsohn, J. S.; Craig, J. P.; Dartt, D. A.; Vehof, J.; Utheim, T. P. Chambered Warm Moist Air Eyelid Warming Devices – a Review. *Acta Ophthalmol. (Copenh.)* **2022**, *100* (5), 499–510. <https://doi.org/10.1111/aos.15052>.
- (7) Wu, Z.; Begley, C. G.; Port, N.; Bradley, A.; Braun, R.; King-Smith, E. The Effects of Increasing Ocular Surface Stimulation on Blinking and Tear Secretion. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* **2015**, *56* (8), 4211. <https://doi.org/10.1167/iovs.14-16313>.
- (8) Dartt, D. A.; Willcox, M. D. P. Complexity of the Tear Film: Importance in Homeostasis and Dysfunction during Disease. *Exp. Eye Res.* **2013**, *117*, 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2013.10.008>.
- (9) Labetoulle, M.; Baudouin, C.; Calonge, M.; Merayo-Llodes, J.; Boboridis, K. G.; Akova, Y. A.; Aragona, P.; Geerling, G.; Messmer, E. M.; Benítez-del-Castillo, J.

- Role of Corneal Nerves in Ocular Surface Homeostasis and Disease. *Acta Ophthalmol. (Copenh.)* **2019**, 97 (2), 137–145. <https://doi.org/10.1111/aos.13844>.
- (10) Ozdalğic, B.; Gul, M.; Uygun, Z. O.; Atçeken, N.; Tasoglu, S. Emerging Applications of Electrochemical Impedance Spectroscopy in Tear Film Analysis. *Biosensors* **2022**, 12 (10), 827. <https://doi.org/10.3390/bios12100827>.
- (11) Li, J.; Cui, X.; Yang, X.; Qiu, Y.; Li, Y.; Cao, H.; Wang, D.; He, W.; Feng, Y.; Yang, Z. Quantification of Uric Acid Concentration in Tears by Using PDMS Inverse Opal Structure Surface-Enhanced Raman Scattering Substrates: Application in Hyperuricemia. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **2022**, 278, 121326. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.121326>.
- (12) Park, M.; Jung, H.; Jeong, Y.; Jeong, K.-H. Plasmonic Schirmer Strip for Human Tear-Based Gouty Arthritis Diagnosis Using Surface-Enhanced Raman Scattering. *ACS Nano* **2017**, 11 (1), 438–443. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b06196>.
- (13) Xiong, C.; Zhang, T.; Kong, W.; Zhang, Z.; Qu, H.; Chen, W.; Wang, Y.; Luo, L.; Zheng, L. ZIF-67 Derived Porous Co₃O₄ Hollow Nanopolyhedron Functionalized Solution-Gated Graphene Transistors for Simultaneous Detection of Glucose and Uric Acid in Tears. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, 101, 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.10.004>.
- (14) Wu, M.; Hu, X.; Lu, T.; Liu, C.; Lu, H. Uric Acid Is Independently Associated with Interleukin-1 β Levels in Tear Fluid of Hyperuricemia and Gout Patients. *Immun. Inflamm. Dis.* **2023**, 11 (3), e805. <https://doi.org/10.1002/iid3.805>.
- (15) Pieragostino, D.; Agnifili, L.; Fasanella, V.; D'Aguanno, S.; Mastropasqua, R.; Di Ilio, C.; Sacchetta, P.; Urbani, A.; Del Boccio, P. Shotgun Proteomics Reveals Specific Modulated Protein Patterns in Tears of Patients with Primary Open Angle Glaucoma Naïve to Therapy. *Mol. Biosyst.* **2013**, 9 (6), 1108. <https://doi.org/10.1039/c3mb25463a>.
- (16) Huang, D.; Xu, N.; Song, Y.; Wang, P.; Yang, H. Inflammatory Cytokine Profiles in the Tears of Thyroid-Associated Ophthalmopathy. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **2012**, 250 (4), 619–625. <https://doi.org/10.1007/s00417-011-1863-x>.
- (17) Boerger, M.; Funke, S.; Leha, A.; Roser, A.-E.; Wuestemann, A.-K.; Maass, F.; Bähr, M.; Grus, F.; Lingor, P. Proteomic Analysis of Tear Fluid Reveals Disease-Specific Patterns in Patients with Parkinson's Disease – A Pilot Study. *Parkinsonism Relat. Disord.* **2019**, 63, 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2019.03.001>.

- (18) Mrugacz, M.; Kaczmariski, M.; Bakunowicz-Lazarczyk, A.; Zelazowska, B.; Wysocka, J.; Minarowska, A. IL-8 and IFN- γ in Tear Fluid of Patients with Cystic Fibrosis. *J. Interferon Cytokine Res.* **2006**, *26* (2), 71–75. <https://doi.org/10.1089/jir.2006.26.71>.
- (19) Inubushi, S.; Kawaguchi, H.; Mizumoto, S.; Kunihiisa, T.; Baba, M.; Kitayama, Y.; Takeuchi, T.; Hoffman, R. M.; Sasaki, R. Oncogenic miRNAs Identified in Tear Exosomes From Metastatic Breast Cancer Patients. *Anticancer Res.* **2020**, *40* (6), 3091–3096. <https://doi.org/10.21873/anticancer.14290>.
- (20) Evans, V.; Vockler, C.; Friedlander, M.; Walsh, B.; Willcox, M. D. Lacryglobin in Human Tears, a Potential Marker for Cancer. *Clin. Experiment. Ophthalmol.* **2001**, *29* (3), 161–163. <https://doi.org/10.1046/j.1442-9071.2001.00408.x>.
- (21) Dikovskaya, M. A.; Trunov, A. N.; Chernykh, V. V.; Korolenko, T. A. Cystatin C and Lactoferrin Concentrations in Biological Fluids as Possible Prognostic Factors in Eye Tumor Development. *Int. J. Circumpolar Health* **2013**, *72* (1), 21087. <https://doi.org/10.3402/ijch.v72i0.21087>.
- (22) Zong, R.; Zhu, F.-F.; Han, W.; Wang, Y.; Wang, G.; Wang, Y.; Mao, Y.; Guan, T.; Liu, Z.; Xue, Y.; Li, C. Tear Dynamics Testing and Quantitative Proteomics Analysis in Patients with Chronic Renal Failure. *J. Proteomics* **2021**, *248*, 104351. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2021.104351>.
- (23) Kamm, K.; Straube, A.; Ruscheweyh, R. Calcitonin Gene-Related Peptide Levels in Tear Fluid Are Elevated in Migraine Patients Compared to Healthy Controls. *Cephalalgia* **2019**, *39* (12), 1535–1543. <https://doi.org/10.1177/0333102419856640>.
- (24) Csősz, É.; Boross, P.; Csutak, A.; Berta, A.; Tóth, F.; Póliska, S.; Török, Z.; Tőzsér, J. Quantitative Analysis of Proteins in the Tear Fluid of Patients with Diabetic Retinopathy. *J. Proteomics* **2012**, *75* (7), 2196–2204. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.01.019>.
- (25) Amil-Bangsa, N. H.; Mohd-Ali, B.; Ishak, B.; Abdul-Aziz, C. N. N.; Ngah, N. F.; Hashim, H.; Ghazali, A. R. Total Protein Concentration and Tumor Necrosis Factor α in Tears of Nonproliferative Diabetic Retinopathy. *Optom. Vis. Sci.* **2019**, *96* (12), 934–939. <https://doi.org/10.1097/OPX.0000000000001456>.
- (26) Cardinell, B. A.; Spano, M. L.; La Belle, J. T. Toward a Label-Free Electrochemical Impedance Immunosensor Design for Quantifying Cortisol in

- Tears. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* **2019**, *47* (3), 207–215. <https://doi.org/10.1615/CritRevBiomedEng.2019026109>.
- (27) Iob, E.; Steptoe, A. Cardiovascular Disease and Hair Cortisol: A Novel Biomarker of Chronic Stress. *Curr. Cardiol. Rep.* **2019**, *21* (10), 116. <https://doi.org/10.1007/s11886-019-1208-7>.
- (28) Masoudi, S. Biochemistry of Human Tear Film: A Review. *Exp. Eye Res.* **2022**, *220*, 109101. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2022.109101>.
- (29) Posa, A.; Bräuer, L.; Schicht, M.; Garreis, F.; Beileke, S.; Paulsen, F. Schirmer Strip vs. Capillary Tube Method: Non-Invasive Methods of Obtaining Proteins from Tear Fluid. *Ann. Anat. - Anat. Anz.* **2013**, *195* (2), 137–142. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2012.10.001>.
- (30) Bachhuber, F.; Huss, A.; Senel, M.; Tumani, H. Diagnostic Biomarkers in Tear Fluid: From Sampling to Preanalytical Processing. *Sci. Rep.* **2021**, *11* (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89514-8>.
- (31) Rajan, A.; Vishnu, J.; Shankar, B. Tear-Based Ocular Wearable Biosensors for Human Health Monitoring. *Biosensors* **2024**, *14* (10), 483. <https://doi.org/10.3390/bios14100483>.
- (32) Krajčiková, K.; Glinská, G.; Tomečková, V. Effect of Tear Fluid Sampling and Processing on Total Protein Quantity and Electrophoretic Pattern. *Taiwan J. Ophthalmol.* **2022**, *12* (1), 88–92. https://doi.org/10.4103/tjo.tjo_14_21.
- (33) Nandi, S. K.; Singh, D.; Upadhyay, J.; Gupta, N.; Dhiman, N.; Mittal, S. K.; Mahindroo, N. Identification of Tear-Based Protein and Non-Protein Biomarkers: Its Application in Diagnosis of Human Diseases Using Biosensors. *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *193*, 838–846. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.10.198>.
- (34) Rentka, A.; Koroskenyi, K.; Harsfalvi, J.; Szekanecz, Z.; Szucs, G.; Szodoray, P.; Kemeny-Beke, A. Evaluation of Commonly Used Tear Sampling Methods and Their Relevance in Subsequent Biochemical Analysis. *Ann. Clin. Biochem. Int. J. Lab. Med.* **2017**, *54* (5), 521–529. <https://doi.org/10.1177/0004563217695843>.
- (35) Ma, J.; Sze, Y.; Bian, J.; Lam, T. Critical Role of Mass Spectrometry Proteomics in Tear Biomarker Discovery for Multifactorial Ocular Diseases (Review). *Int. J. Mol. Med.* **2021**, *47* (5). <https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.4916>.
- (36) Esmaelpour, M.; Cai, J.; Watts, P.; Boulton, M.; Murphy, P. J. Tear Sample Collection Using Cellulose Acetate Absorbent Filters. *Ophthalmic Physiol. Opt.* **2008**, *28* (6), 577–583. <https://doi.org/10.1111/j.1475-1313.2008.00603.x>.

- (37) Nuki, G.; Simkin, P. A. A Concise History of Gout and Hyperuricemia and Their Treatment. *Arthritis Res. Ther.* **2006**, *8* (Suppl 1), S1. <https://doi.org/10.1186/ar1906>.
- (38) Wali, L.; Rowbotham, E. Imaging of Gout: An Atlas. *Rheumatol. Adv. Pract.* **2025**, *9* (2), rkaf051. <https://doi.org/10.1093/rap/rkaf051>.
- (39) Wilson, L.; Saseen, J. J. Gouty Arthritis: A Review of Acute Management and Prevention. *Pharmacother. J. Hum. Pharmacol. Drug Ther.* **2016**, *36* (8), 906–922. <https://doi.org/10.1002/phar.1788>.
- (40) Schlesinger, N. Management of Acute and Chronic Gouty Arthritis: Present State-of-the-Art. *Drugs* **2004**, *64* (21), 2399–2416. <https://doi.org/10.2165/00003495-200464210-00003>.
- (41) Schlesinger, N. Management of Acute and Chronic Gouty Arthritis: Present State-of-the-Art. *Drugs* **2004**, *64* (21), 2399–2416. <https://doi.org/10.2165/00003495-200464210-00003>.
- (42) Abhishek, A. Managing Gout Flares in the Elderly: Practical Considerations. *Drugs Aging* **2017**, *34* (12), 873–880. <https://doi.org/10.1007/s40266-017-0512-4>.
- (43) Chowalloor, P. V.; Siew, T. K.; Keen, H. I. Imaging in Gout: A Review of the Recent Developments. *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.* **2014**, *6* (4), 131–143. <https://doi.org/10.1177/1759720X14542960>.
- (44) Du, L.; Zong, Y.; Li, H.; Wang, Q.; Xie, L.; Yang, B.; Pang, Y.; Zhang, C.; Zhong, Z.; Gao, J. Hyperuricemia and Its Related Diseases: Mechanisms and Advances in Therapy. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2024**, *9* (1), 212. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01916-y>.
- (45) Shahzad, N.; Afzal, A. Molecularly Imprinted Nanocomposites-Based Synthetic Antibodies for Uric Acid-Specific Non-Invasive Electrochemical Gout Sensors. *Microchim. Acta* **2025**, *192* (3), 163. <https://doi.org/10.1007/s00604-025-07008-0>.
- (46) De Oliveira, E. P.; Burini, R. C. High Plasma Uric Acid Concentration: Causes and Consequences. *Diabetol. Metab. Syndr.* **2012**, *4* (1), 12. <https://doi.org/10.1186/1758-5996-4-12>.
- (47) Gliozzi, M.; Malara, N.; Muscoli, S.; Mollace, V. The Treatment of Hyperuricemia. *Int. J. Cardiol.* **2016**, *213*, 23–27. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.08.087>.

- (48) Martillo, M. A.; Nazzal, L.; Crittenden, D. B. The Crystallization of Monosodium Urate. *Curr. Rheumatol. Rep.* **2014**, *16* (2), 400. <https://doi.org/10.1007/s11926-013-0400-9>.
- (49) Choi, H. K.; Liu, S.; Curhan, G. Intake of Purine-rich Foods, Protein, and Dairy Products and Relationship to Serum Levels of Uric Acid: The Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arthritis Rheum.* **2005**, *52* (1), 283–289. <https://doi.org/10.1002/art.20761>.
- (50) Bevis, M.; Blagojevic-Bucknall, M.; Mallen, C.; Hider, S.; Roddy, E. Comorbidity Clusters in People with Gout: An Observational Cohort Study with Linked Medical Record Review. *Rheumatology* **2018**, *57* (8), 1358–1363. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/key096>.
- (51) Jelley, M. J.; Wortmann, R. Practical Steps in the Diagnosis and Management of Gout: *BioDrugs* **2000**, *14* (2), 99–107. <https://doi.org/10.2165/00063030-200014020-00004>.
- (52) Lai, S.-W.; Lin, C.-L.; Liao, K.-F. Hyperuricemia Might Be an Early Manifestation of Undiagnosed Adult Leukemia in a Population-Based Cohort Study. *BioMedicine* **2020**, *10* (1). <https://doi.org/10.37796/2211-8039.1004>.
- (53) Qi, C. W.; Mohd Nordin, U. U.; Mahmood, S.; Karusan, N. R.; Khalid, R.; Nordin, N.; Fornaguera, C.; Ahmad, N. Gout Management Using Nanocarrier Systems: A Review. *ACS Appl. Nano Mater.* **2024**, *7* (9), 9816–9846. <https://doi.org/10.1021/acsanm.3c06079>.
- (54) Dalbeth, N.; Merriman, T. R.; Stamp, L. K. Gout. *The Lancet* **2016**, *388* (10055), 2039–2052. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00346-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00346-9).
- (55) Wu, M.; Hu, X.; Lu, T.; Liu, C.; Lu, H. Uric Acid Is Independently Associated with Interleukin-1 β Levels in Tear Fluid of Hyperuricemia and Gout Patients. *Immun. Inflamm. Dis.* **2023**, *11* (3), e805. <https://doi.org/10.1002/iid3.805>.
- (56) Kannuthurai, V.; Gaffo, A. Management of Patients with Gout and Kidney Disease: A Review of Available Therapies and Common Missteps. *Kidney360* **2023**, *4* (9), e1332–e1340. <https://doi.org/10.34067/KID.0000000000000221>.
- (57) Wu, G.; Wu, L.; Zhang, H.; Wang, X.; Xiang, M.; Teng, Y.; Xu, Z.; Lv, F.; Huang, Z.; Lin, Y.; Zhao, Y.; Zhao, H.; Xue, C.; Gao, L. Research Progress of Screen-Printed Flexible Pressure Sensor. *Sens. Actuators Phys.* **2024**, *374*, 115512. <https://doi.org/10.1016/j.sna.2024.115512>.

- (58) Προδρομίδης, Μ. *Ηλεκτροχημικοί αισθητήρες και βιοισθητήρες*; Εκδόσεις Κωσταιάκη, 2013.
- (59) Mohamed, H. M. Screen-Printed Disposable Electrodes: Pharmaceutical Applications and Recent Developments. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2016**, *82*, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.02.010>.
- (60) Bommineedi, L. K.; Upadhyay, N.; Minnes, R. Screen Printing: An Ease Thin Film Technique. In *Simple Chemical Methods for Thin Film Deposition*; Sankapal, B. R., Ennaoui, A., Gupta, R. B., Lokhande, C. D., Eds.; Springer Nature Singapore: Singapore, 2023; pp 449–507. https://doi.org/10.1007/978-981-99-0961-2_11.
- (61) Thick Films. In *Springer Handbook of Electronic and Photonic Materials*; Kasap, S., Capper, P., Eds.; Springer US: Boston, MA, 2007; pp 717–731. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-29185-7>.
- (62) Nesakumar, N.; Berchmans, S.; Alwarappan, S. Chemically Modified Carbon Based Electrodes for the Detection of Reduced Glutathione. *Sens. Actuators B Chem.* **2018**, *264*, 448–466. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.01.224>.
- (63) Lu, H.; Tang, S.-Y.; Yun, G.; Li, H.; Zhang, Y.; Qiao, R.; Li, W. Modular and Integrated Systems for Nanoparticle and Microparticle Synthesis—A Review. *Biosensors* **2020**, *10* (11), 165. <https://doi.org/10.3390/bios10110165>.
- (64) Shyam, A.; Chandran S., S.; George, B.; E., S. Plant Mediated Synthesis of AgNPs and Its Applications: An Overview. *Inorg. Nano-Met. Chem.* **2021**, *51* (12), 1646–1662. <https://doi.org/10.1080/24701556.2020.1852254>.
- (65) Meuller, B. O.; Messing, M. E.; Engberg, D. L. J.; Jansson, A. M.; Johansson, L. I. M.; Norlén, S. M.; Tureson, N.; Deppert, K. Review of Spark Discharge Generators for Production of Nanoparticle Aerosols. *Aerosol Sci. Technol.* **2012**, *46* (11), 1256–1270. <https://doi.org/10.1080/02786826.2012.705448>.
- (66) Trachioti, M. G.; Tzianni, E. I.; Riman, D.; Jurmanova, J.; Prodromidis, M. I.; Hrbac, J. Extended Coverage of Screen-Printed Graphite Electrodes by Spark Discharge Produced Gold Nanoparticles with a 3D Positioning Device. Assessment of Sparking Voltage-Time Characteristics to Develop Sensors with Advanced Electrocatalytic Properties. *Electrochimica Acta* **2019**, *304*, 292–300. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2019.03.004>.
- (67) Tabrizi, N. S.; Ullmann, M.; Vons, V. A.; Lafont, U.; Schmidt-Ott, A. Generation of Nanoparticles by Spark Discharge. *J. Nanoparticle Res.* **2009**, *11* (2), 315–332. <https://doi.org/10.1007/s11051-008-9407-y>.

- (68) Τραχιώτη, Μ. Παραγωγή Νανοσωματιδίων Αγώγιμων Υλικών Με Ηλεκτρική Εκκένωση Και Ανάπτυξη Εκτυπωμένων Ηλεκτροχημικών Αισθητήρων Για Χημική Ανάλυση, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 2022.
- (69) Meuller, B. O.; Messing, M. E.; Engberg, D. L. J.; Jansson, A. M.; Johansson, L. I. M.; Norlén, S. M.; Tureson, N.; Deppert, K. Review of Spark Discharge Generators for Production of Nanoparticle Aerosols. *Aerosol Sci. Technol.* **2012**, *46* (11), 1256–1270. <https://doi.org/10.1080/02786826.2012.705448>.
- (70) Gliozzi, M.; Malara, N.; Muscoli, S.; Mollace, V. The Treatment of Hyperuricemia. *Int. J. Cardiol.* **2016**, *213*, 23–27. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.08.087>.
- (71) Land, K. J.; Boeras, D. I.; Chen, X.-S.; Ramsay, A. R.; Peeling, R. W. REASSURED Diagnostics to Inform Disease Control Strategies, Strengthen Health Systems and Improve Patient Outcomes. *Nat. Microbiol.* **2018**, *4* (1), 46–54. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0295-3>.
- (72) Wang, C.-Y.; Maeda, K.; Chang, L.-L.; Tung, K.-L.; Hu, C. Synthesis and Applications of Carbon Nitride (CN) Family with Different Carbon to Nitrogen Ratio. *Carbon* **2022**, *188*, 482–491. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2021.12.027>.
- (73) Paul, D. R.; Sharma, R.; Nehra, S. P.; Sharma, A. Effect of Calcination Temperature, pH and Catalyst Loading on Photodegradation Efficiency of Urea Derived Graphitic Carbon Nitride towards Methylene Blue Dye Solution. *RSC Adv.* **2019**, *9* (27), 15381–15391. <https://doi.org/10.1039/C9RA02201E>.
- (74) Resnik, D.; Pečar, B.; Možek, M.; Lokar, N.; Vrtačnik, D. Formation of Thin Film Ag/AgCl Reference Electrode by Electrochemical and Chemical Method. In *2019 42nd International Convention on Information and Communication Technology, Electronics and Microelectronics (MIPRO)*; IEEE: Opatija, Croatia, 2019; pp 41–46. <https://doi.org/10.23919/MIPRO.2019.8756828>.
- (75) Trachioti, M. G.; Lazanas, A. Ch.; Prodromidis, M. I. Shedding Light on the Calculation of Electrode Electroactive Area and Heterogeneous Electron Transfer Rate Constants at Graphite Screen-Printed Electrodes. *Microchim. Acta* **2023**, *190* (7), 251. <https://doi.org/10.1007/s00604-023-05832-w>.
- (76) Xu, J.; Tao, X.; Liu, X.; Yang, L. Wearable Eye Patch Biosensor for Noninvasive and Simultaneous Detection of Multiple Biomarkers in Human Tears. *Anal. Chem.* **2022**, *94* (24), 8659–8667. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c00614>.

- (77) Tseliou, F.; Pappas, P.; Spyrou, K.; Hrbac, J.; Prodromidis, M. I. Lab-on-a-Screen-Printed Electrochemical Cell for Drop-Volume Voltammetric Screening of Flunitrazepam in Untreated, Undiluted Alcoholic and Soft Drinks. *Biosens. Bioelectron.* **2019**, *132*, 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.03.001>.
- (78) Trachioti, M. G.; Hemzal, D.; Hrbac, J.; Prodromidis, M. I. Generation of Graphite Nanomaterials from Pencil Leads with the Aid of a 3D Positioning Sparking Device: Application to the Voltammetric Determination of Nitroaromatic Explosives. *Sens. Actuators B Chem.* **2020**, *310*, 127871. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.127871>.
- (79) Bi, L.; Zhan, J.; Zhang, W.; Wu, Z.; Xu, W.; Liang, X.; Zhang, L.; Yan, B.; Xu, C. An Efficient Strategy to Boost Photoelectrochemical Water Oxidation of G-C₃N₄ Films Modified with NiO as Cocatalyst. *Sci. Rep.* **2025**, *15* (1), 4632. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-89031-y>.
- (80) Qiu, S.; Li, J. High-Efficiency Ag-Modified ZnO/g-C₃N₄ Photocatalyst with 1D-0D-2D Morphology for Methylene Blue Degradation. *Molecules* **2024**, *29* (10), 2182. <https://doi.org/10.3390/molecules29102182>.
- (81) Fahimirad, B.; Asghari, A.; Rajabi, M. Magnetic Graphitic Carbon Nitride Nanoparticles Covalently Modified with an Ethylenediamine for Dispersive Solid-Phase Extraction of Lead(II) and Cadmium(II) Prior to Their Quantitation by FAAS. *Microchim. Acta* **2017**, *184* (8), 3027–3035. <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2273-5>.
- (82) Wu, Z.; Chen, X.; Liu, X.; Yang, X.; Yang, Y. A Ternary Magnetic Recyclable ZnO/Fe₃O₄/g-C₃N₄ Composite Photocatalyst for Efficient Photodegradation of Monoazo Dye. *Nanoscale Res. Lett.* **2019**, *14* (1), 147. <https://doi.org/10.1186/s11671-019-2974-2>.