



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ - ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**  
**ΤΟΜΕΑΣ ΑΝΟΡΓΑΝΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

70

**Δημήτριος Β. Στεργίου**  
Χημικός - MSc

**“ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ**  
**ΝΕΩΝ ΒΟΛΤΑΜΜΕΤΡΙΚΩΝ ΧΗΜΙΚΩΝ**  
**ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΩΝ ΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ ΟΖΟΝΤΟΣ”**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2007



*Αφιερωμένο στην οικογένειά μου*





νέου εμπεδησιομετρικού αισθητήρα για τον προσδιορισμό του όζοντος. Όπως και το Θεωρητικό έτσι και το Πειραματικό μέρος συμπληρώνεται από τις δικές του βιβλιογραφικές αναφορές.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς όλους όσους συνέβαλαν στην πραγματοποίηση της εργασίας αυτής. Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή και συγκεκριμένα τους κ.κ. Παναγιώτη Βελτισίτα (Επίκουρο Καθηγητή-επιβλέποντα), Νικόλαο Ευμοιρίδη (Καθηγητή) και Μάμαντο Προδρομίδα (Λέκτορα) για την αμέριστη συμπαράσταση και την καθοδήγησή τους σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής μέχρι και την ολοκλήρωσή της.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον κ. Δρ. Σπύρο Καρκαμπούνα, Λέκτορα στο Εργαστήριο Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και την εταιρία Nephrotech για την ευγενική παραχώρηση του οζονιστήρα, στον κ. Δρ. Μιχάλη Καρακασίδη, Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Υλικών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για τη βοήθειά του στη λήψη των φασμάτων HATR-FTIR, στον κ. Δρ. Κωνσταντίνο Σταλικά, Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και στο συναδέλφο μεταπτυχιακό φοιτητή κ. Ηλία Κάζο για την παραχώρηση της αντλίας με την οποία διεξήχθησαν οι δειγματοληψίες, στους συναδέλφους μεταπτυχιακούς φοιτητές κ. Άγγελο Σταμάτη και κ. Αλέξανδρο Κατσουλίδη για τη λήψη των φασμάτων IR και SEM, αντίστοιχα, και στον κ. Στέφανο Κρομούδα του Περιφερειακού Τμήματος του ΕΛΙΝΥΑΕ για τις πρότυπες μετρήσεις όζοντος. Επίσης, θερμές ευχαριστίες εκφράζω προς τους συναδέλφους μεταπτυχιακούς φοιτητές κ. Αικατερίνη Μαντζίλα, κ. Κωνσταντίνα Μαλάμου και κ. Αντώνη Πουρνάρα για την άριστη συνεργασία καθώς και προς όλα τα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου Αναλυτικής Χημείας για το καλό κλίμα συνεργασίας.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ θα ήθελα να το εκφράσω προς την οικογένειά μου για την αμέριστη ηθική συμπαράσταση και την πολύτιμη, με κάθε τρόπους, βοήθεια που μου παρείχαν καθ' όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών αλλά και των προπτυχιακών μου σπουδών.

Δημήτριος Β. Στεργίου  
Ιωάννινα, Ιανουάριος 2007





---

---

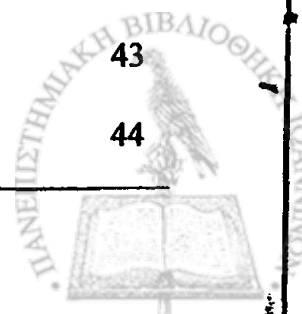
# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

---

|   |      |
|---|------|
| <b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ</b>   | iii  |
| <b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b>  | v    |
| <b>ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ - ABBREVIATIONS</b>  | xiii |
| <b>ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>  |      |
| <b>Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup> – Ηλεκτροχημεία και Ηλεκτροαναλυτικές Τεχνικές</b>            |      |
| 1.1. Βασικές Αρχές Ηλεκτροχημείας   | 1    |
| 1.1.1. Εισαγωγή   | 1    |
| 1.1.2. Η ηλεκτρική διπλοστιβάδα   | 2    |
| 1.1.3. Φαρανταϊκές και μη-Φαρανταϊκές διεργασίες  | 3    |
| 1.1.4. Ιδανικά πολωμένο και μη-πολωμένο ηλεκτρόδιο                                      | 4    |
| 1.1.5. Η έννοια του δυναμικού ενός ηλεκτροχημικού συστήματος                            | 5    |
| 1.1.6. Υπερδυναμικό ηλεκτροδίου και ωμική πτώση τάσης                                   | 7    |
| 1.1.7. Ηλεκτρόδια αναφοράς  | 8    |
| 1.1.8. Παράγοντες που επιδρούν στην κινητική συμπεριφορά των ηλεκτροχημικών αντιδράσεων | 11   |
| 1.1.9. Μηχανισμοί ηλεκτροχημικών αντιδράσεων  | 13   |
| 1.2. Ηλεκτροαναλυτικές Τεχνικές   | 16   |
| 1.2.1. Εισαγωγή   | 16   |



|  |                 |
|--|-----------------|
| 1.2.2. Κυκλική βολταμμετρία (Cyclic Voltammetry, CV)   | 17              |
| 1.2.2.1. Αρχή της μεθόδου  | 18 <sup>2</sup> |
| 1.2.2.2. Παράγοντες που επηρεάζουν τη μορφή ενός βολταμμογραφήματος                                    | 22              |
| 1.2.2.3. Ηλεκτροχημική συμπεριφορά ηλεκτρενεργού ουσίας προσροφημένης στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου   | 23              |
| 1.2.2.4. Κυκλοβολταμμετρική συμπεριφορά ηλεκτρενεργού ουσίας με πολλά ενεργά κέντρα                    | 26              |
| 1.2.3. Φασματοσκοπία Ηλεκτροχημικής Εμπέδησης (Φ.Η.Ε.) - (Electrochemical Impedance Spectroscopy, EIS) | 27              |
| 1.2.3.1. Αρχή της μεθόδου  | 28              |
| 1.2.3.2. Το κύκλωμα Randles  | 32              |
| 1.2.3.3. Διαγράμματα εμπέδησης   | 35              |
| 1.2.3.3.1. Διάγραμμα Nyquist ή Cole-Cole   | 35              |
| 1.2.3.3.2. Διάγραμμα Bode  | 36              |
| 1.2.3.4. Τεχνικές μέτρησης εμπέδησης   | 38              |
| <b>Κεφάλαιο 2<sup>ο</sup> – Αμπερομετρικοί και Εμπεδησιομετρικοί (βιο)αισθητήρες</b>                   |                 |
| 2.1. Χημικοί Αισθητήρες  | 39              |
| 2.1.1. Εισαγωγή  | 39              |
| 2.1.2. Κατηγορίες μεταλλακτών και χημικών αισθητήρων   | 40              |
| 2.2. Τύποι Αμπερομετρικών Βιοαισθητήρων  | 42              |
| 2.2.1. Ηλεκτρόδιο οξυγόνου ή τύπου Clark   | 43              |
| 2.2.2. Ηλεκτρόδιο H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>  | 44              |



|   |    |
|---|----|
| 2.2.3. Βιοαισθητήρες δεϋδρογενασών  | 45 |
| 2.2.4. Αμπερομετρικοί βιοαισθητήρες χημικά τροποποιημένοι με χρήση διαμεσολαβητών μεταφοράς φορτίου (mediators) | 46 |
| 2.2.5. Χημικά τροποποιημένα ηλεκτρόδια (Chemically Modified Electrodes, CMEs): Μέθοδοι και τεχνικές κατασκευής  | 49 |
| 2.3.*Εμπεδησιομετρικοί Βιοαισθητήρες  | 50 |
| 2.3.1. Κατηγορίες (βιο)αισθητήρων εμπέδησης   | 52 |
| 2.3.2. Τεχνικές κατασκευής (βιο)αισθητήρων εμπέδησης  | 53 |
| 2.4. Είδη Στερεών Ηλεκτροδίων Εργασίας  | 54 |

### **Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup> – Ανάλυση με Έγχυση Δείγματος σε Συνεχή Ροή (Flow Injection Analysis, FIA)**

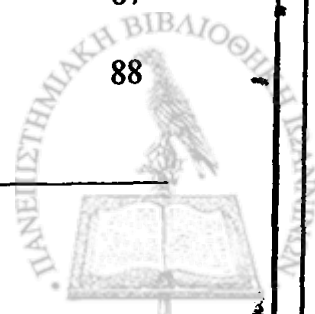
|  |    |
|--|----|
| 3.1. Ανάλυση Συνεχούς Ροής                                       | 59 |
| 3.1.1. Εισαγωγή  | 59 |
| 3.1.2. Κατάταξη τεχνικών ανάλυσης συνεχούς ροής                  | 60 |
| 3.2. Ανάλυση με Έγχυση Δείγματος σε Συνεχή Ροή (FIA)             | 61 |
| 3.2.1. Βασικά μέρη μίας διάταξης FIA                             | 61 |
| 3.2.2. Το φαινόμενο της διασποράς του δείγματος                  | 63 |
| 3.3. Πηγές, Διάγνωση και Αντιμετώπιση Σφαλμάτων σε Συστήματα FIA | 65 |
| 3.4. Άλλες Τεχνικές Ανάλυσης Συνεχούς Ροής                       | 69 |

### **Κεφάλαιο 4<sup>ο</sup> – Αρχές Ενζυμολογίας και Ακίνητοποίηση Ενζύμων**

|                          |    |
|--------------------------|----|
| 4.1. Εισαγωγή στα ένζυμα | 71 |
|--------------------------|----|



|   |    |
|---|----|
| 4.1.1. Γενικά   | 71 |
| 4.2. Ονοματολογία και Κατάταξη Ενζύμων                    | 72 |
| 4.3. Χαρακτηριστικές Ιδιότητες των Ενζύμων                | 73 |
| 4.3.1. Καταλυτική ισχύς                                   | 73 |
| 4.3.2. Εξειδίκευση  | 75 |
| 4.3.3. Ρύθμιση ενζυμικής δραστηριότητας                   | 75 |
| 4.4. Το Ενεργό Κέντρο                                     | 76 |
| 4.5. Κινητική Ενζυμικών Αντιδράσεων                       | 77 |
| 4.5.1. Η εξίσωση Lineweaver – Burk                        | 79 |
| 4.5.2. Η εξίσωση Eadie – Hofstee                          | 80 |
| 4.5.3. Η εξίσωση Hanes                                    | 81 |
| 4.6. Η Σπουδαιότητα των Τιμών $K_m$ και $V_{max}$         | 81 |
| 4.7. Παράγοντες που Επηρεάζουν την Ενζυμική Δραστηριότητα | 82 |
| 4.7.1. Επίδραση της θερμοκρασίας                          | 82 |
| 4.7.2. Επίδραση του pH                                    | 83 |
| 4.7.3. Επίδραση μεταλλικών και μη-μεταλλικών ιόντων       | 84 |
| 4.7.4. Επίδραση της συγκέντρωσης του υποστρώματος         | 84 |
| 4.8. Ακίνητοποίηση Ενζύμων                                | 84 |
| 4.8.1. Ιδιότητες ακινητοποιημένων ενζύμων                 | 84 |
| 4.8.2. Φυσικές μέθοδοι ακινητοποίησης                     | 86 |
| 4.8.2.1. Προσρόφηση (adsorption)                          | 86 |
| 4.8.2.2. Ενθυλάκωση (encapsulation)                       | 87 |
| 4.8.2.3. Παγίδευση (entrapment)                           | 88 |



---

|   |    |
|---|----|
| 4.8.3. Χημικές μέθοδοι ακινητοποίησης           | 89 |
| 4.8.3.1. Διασταυρούμενη σύνδεση (cross-linking) | 89 |
| 4.8.3.2. Ομοιοπολική σύνδεση (covalent bonding) | 91 |

## **Κεφάλαιο 5<sup>ο</sup> – Εισαγωγή στη Χημεία του Όζοντος (O<sub>3</sub>)**

|  |     |
|--|-----|
| 5.1. Εισαγωγή                          | 95  |
| 5.2. Ιδιότητες του Όζοντος             | 96  |
| 5.2.1. Φυσικές ιδιότητες               | 96  |
| 5.2.2. Ιδιότητες της δομής             | 98  |
| 5.2.3. Σταθερότητα του όζοντος         | 99  |
| 5.3. Ο Ρόλος του Όζοντος               | 102 |
| 5.3.1. Στρατοσφαιρικό όζον             | 103 |
| 5.3.2. Τροποσφαιρικό όζον              | 106 |
| 5.4. Αντιδράσεις του Όζοντος           | 107 |
| 5.5. Μέθοδοι Παραγωγής Όζοντος         | 110 |
| 5.6. Μέθοδοι Προσδιορισμού του Όζοντος | 111 |
| 5.7. Εφαρμογές                         | 112 |

|                                       |            |
|---------------------------------------|------------|
| <b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΘΕΩΡΗΤΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ</b> | <b>113</b> |
|---------------------------------------|------------|

## **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup> – Ανάπτυξη και Μελέτη ενός νέου Αμπερομετρικού Βιοαισθητήρα Φορμαλδεΰδης**

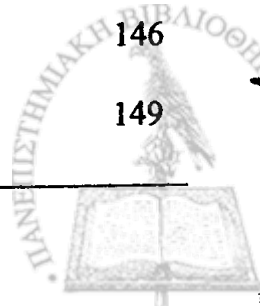
|               |     |
|---------------|-----|
| 1.1. Περίληψη | 125 |
|---------------|-----|



|   |     |
|---|-----|
| 1.2. Εισαγωγή   | 126 |
| 1.3. Πειραματικό Μέρος  | 128 |
| 1.3.1. Αντιδραστήρια  | 128 |
| 1.3.2. Πειραματική διάταξη  | 129 |
| 1.3.3. Παρασκευή και τιτλοδότηση του προτύπου διαλύματος<br>HCHO απαλλαγμένου μεθανόλης | 131 |
| 1.3.4. Παρασκευή του ενζυμικού διαλύματος παρακαταθήκης                                 | 132 |
| 1.3.5. Κατασκευή των μεμβρανών οξικής κυτταρίνης  | 133 |
| 1.3.6. Πολυμερικές μεμβράνες  | 134 |
| 1.3.7. Κατασκευή των βιοαισθητήρων  | 135 |
| 1.3.8. Πορεία εργασίας  | 136 |
| 1.4. Αποτελέσματα – Συζήτηση  | 137 |
| 1.4.1. Επιλογή ενζυμικού σχήματος   | 137 |
| 1.4.2. Επιλογή μεμβρανών  | 138 |
| 1.4.3. Επίδραση του pH  | 139 |
| 1.4.4. Αναλυτικά χαρακτηριστικά του βιοαισθητήρα  | 140 |
| 1.4.5. Μελέτη παρεμποδίσεων   | 142 |
| 1.5. Συμπεράσματα   | 142 |

## **Κεφάλαιο 2<sup>ο</sup> – Εφαρμογή του Βιοαισθητήρα Φορμαλδεΐδης στον Προσδιορισμό του Όζοντος**

|                        |     |
|------------------------|-----|
| 2.1. Περίληψη          | 145 |
| 2.2. Εισαγωγή          | 146 |
| 2.3. Πειραματικό Μέρος | 149 |



|  |     |
|--|-----|
| 2.3.1. Αντιδραστήρια   | 149 |
| 2.3.2. Κατασκευή των αντιδραστήρων Ευγενόλης                           | 150 |
| 2.3.3. Αρχή της μεθόδου  | 151 |
| 2.3.4. Πειραματική διάταξη   | 152 |
| 2.3.5. Πορεία εργασίας   | 152 |
| 2.4. Αποτελέσματα – Συζήτηση   | 154 |
| 2.4.1. Βελτιστοποίηση παραμέτρων                                       | 154 |
| 2.4.2. Επίδραση του οξυγόνου   | 158 |
| 2.4.3. Μελέτη απόκρισης άλλων αερίων                                   | 159 |
| 2.4.4. Αναλυτικά χαρακτηριστικά του βιοαισθητήρα                       | 160 |
| 2.4.5. Προσδιορισμός όζοντος σε συνθετικά αέρια δείγματα               | 164 |
| 2.5. Συμπεράσματα  | 166 |
| <br>   |     |
| <b>Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup> – Ηλεκτροχημική Μελέτη της Αποικοδόμησης</b> |     |
| <b>Υμενίων Λιγνίνης. Εφαρμογή στην Ανάπτυξη</b>                        |     |
| <b>ενός Εμπειρομετρικού Αισθητήρα Όζοντος</b>                          |     |
| 3.1. Περίληψη  | 167 |
| 3.2. Εισαγωγή  | 168 |
| 3.3. Πειραματικό Μέρος   | 171 |
| 3.3.1. Αντιδραστήρια   | 171 |
| 3.3.2. Αρχή της μεθόδου  | 172 |
| 3.3.3. Κατασκευή των αισθητήρων  | 172 |
| 3.3.4. Πειραματική διάταξη   | 174 |
| 3.3.5. Πορεία εργασίας   | 174 |



|   |     |
|---|-----|
| 3.4. Αποτελέσματα – Συζήτηση  | 175 |
| 3.4.1. Μελέτη της οζονόλυσης της LO με φασματοσκοπία<br>HATR-FTIR και SEM | 175 |
| 3.4.2. Επίδραση του μέσου διάλυσης της LO                                 | 180 |
| 3.4.3. Μελέτη διαφόρων τύπων ηλεκτροδίων                                  | 182 |
| 3.4.4. Μελέτη επίδρασης της ποσότητας της LO                              | 183 |
| 3.4.5. Επίδραση της συγκέντρωσης των διαλυμάτων της LO                    | 184 |
| 3.4.6. Επίδραση του μέσου διεξαγωγής της αντίδρασης με O <sub>3</sub>     | 185 |
| 3.4.7. Μελέτη του χρόνου αντίδρασης                                       | 187 |
| 3.4.8. Τυφλά πειράματα  | 188 |
| 3.4.9. Αναλυτικά χαρακτηριστικά του αισθητήρα LO                          | 189 |
| 3.4.10. Μελέτη παραγώγων της LA με TPP και PAP                            | 196 |
| 3.5. Συμπεράσματα   | 202 |
| <b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ</b>                                   | 203 |
| <b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α΄</b>   | 213 |
| <b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β΄</b>   | 215 |
| <b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ΄</b>   | 217 |
| <b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>   | 231 |
| <b>SUMMARY</b>  | 235 |





---

---

## ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ABBREVIATIONS

---

---

|                        |  |
|------------------------|--|
| <b>AOX</b>             | Αλκοολική οξειδάση                                     |
| <b>BIA</b>             | Ανάλυση με έγχυση μικροσφαιριδίων σε συνεχή ροή        |
| <b>CMEs</b>            | Χημικά τροποποιημένα ηλεκτρόδια                        |
| <b>CPE</b>             | Στοιχείο σταθερής φάσης                                |
| <b>CV</b>              | Κυκλική βολταμετρία                                    |
| <b>Da</b>              | - Dalton   |
| <b>EIS</b>             | Φασματοσκοπία ηλεκτροχημική εμπέδησης                  |
| <b>FDH</b>             | Δεϋδρογενάση της φορμαλδεϋδης                          |
| <b>FIA</b>             | Ανάλυση με έγχυση δείγματος σε συνεχή ροή              |
| <b>FRA</b>             | Αναλυτής απόκρισης συχνότητας                          |
| <b>FRIA</b>            | FIA ανάστροφης ροής                                    |
| <b>GC</b>              | Υαλώδης άνθρακας                                       |
| <b>HATR</b>            | Οριζοντίως ενισχυόμενη συνολική ανάκλαση               |
| <b>IDEs</b>            | Αλληλοεμπλεκόμενα κτενοειδή ηλεκτρόδια                 |
| <b>IHP</b>             | Εσωτερικό επίπεδο Helmholtz                            |
| <b>IUPAC</b>           | International Union of Pure and Applied Chemistry      |
| <b>LA</b>              | Lignin Alkali  |
| <b>LO</b>              | Lignin Organosolv                                      |
| <b>LoD</b>             | Όριο ανίχνευσης  |
| <b>MIP</b>             | Πολυμερή μοριακής αποτύπωσης                           |
| <b>MREs</b>            | Σωματίδια βιολογικής αναγνώρισης                       |
| <b>MWCNTs</b>          | Νανοςωλήνες άνθρακα πολλαπλού τοιχώματος               |
| <b>NAD<sup>+</sup></b> | Νικοτιναμίδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (οξειδωμένη μορφή) |
| <b>NADH</b>            | Νικοτιναμίδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (ανηγμένη μορφή) / |



|               |  |
|---------------|--|
| <b>NHE</b>    | Κανονικό ηλεκτρόδιο υδρογόνου                          |
| <b>OHP</b>    | Εξωτερικό επίπεδο Helmholtz                            |
| <b>Ox</b>     | Οξειδωμένη μορφή                                       |
| <b>PAP</b>    | Παπαβερίνη   |
| <b>PNA</b>    | Πεπτίδια νουκλεϊνικών οξέων                            |
| <b>PO</b>     | Υπεροξειδάση   |
| <b>Red</b>    | Ανηγμένη μορφή   |
| <b>rms</b>    | Ενεργός τιμή   |
| <b>RSD</b>    | Σχετική τυπική απόκλιση                                |
| <b>SAMs</b>   | Αυτοδιατασσόμενες μονοστιβάδες                         |
| <b>SCE</b>    | Κορεσμένο ηλεκτρόδιο καλομέλανος                       |
| <b>SEM</b>    | Μικροσκοπία σάρωσης ηλεκτρονίων                        |
| <b>SFA</b>    | Διακοπτόμενη συνεχής ανάλυση                           |
| <b>SFIA</b>   | FIA αναχαίτισης ροής                                   |
| <b>SIA</b>    | Ανάλυση με διαδοχικές εγχύσεις δείγματος σε συνεχή ροή |
| <b>SWCNTs</b> | Νανωσωλήνες άνθρακα μονού τοιχώματος                   |
| <b>TCNQ</b>   | Τετρακυανοκινοδιμεθάνιο                                |
| <b>TPP</b>    | Τετραφαινυλοφωσφόνιο                                   |
| <b>TTF</b>    | Τετραθειαφουβαλένιο                                    |
| <b>HEA</b>    | Ηλεκτρεγερτική δύναμη                                  |



## ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>



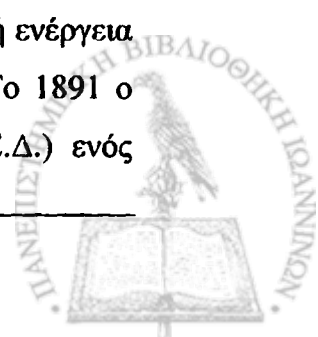
*Michael Faraday (1791 – 1867)*

## "ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΕΙΑ και ΗΛΕΚΤΡΟΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ"

### 1.1. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΕΙΑΣ

#### 1.1.1. Εισαγωγή

Θέλοντας κανείς να αναζητήσει τις ρίζες της Ηλεκτροχημείας φτάνει μέχρι τα τέλη του 18<sup>ου</sup> αιώνα και στα πειράματα που διεξήγαγε ο Galvani το 1791. Το 1800 ο Volta εφηύρε την περίφημη στήλη του αποδεικνύοντας ότι η παραγωγή ηλεκτρισμού στα πειράματα του Galvani, οφειλόταν στην επαφή των διαφορετικών μετάλλων μέσω αγωγίων υγρών. Το 1834 ο Faraday πρότεινε τους νόμους της ηλεκτρόλυσης. Το 1891 ο Stoney στηριζόμενος στους νόμους της ηλεκτρόλυσης πρότεινε ότι όπως η ύλη έτσι και ο ηλεκτρισμός έχει ατομική φύση και εισήγαγε το όνομα ηλεκτρόνιο για τη «μονάδα ηλεκτρικού φορτίου». Την ίδια χρονιά, ο Grove παρήγαγε ηλεκτρική ενέργεια από την ένωση υδρογόνου και οξυγόνου σε ένα ηλεκτροχημικό στοιχείο. Το 1891 ο Nernst συνέδεσε με μαθηματική σχέση την ηλεκτρεγερτική δύναμη (Η.Ε.Δ.) ενός



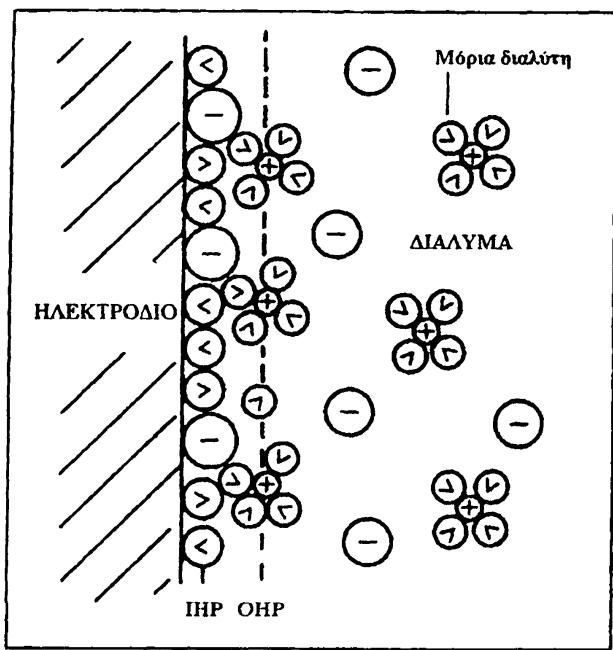
ηλεκτροχημικού στοιχείου με την ελεύθερη ενέργεια Gibbs ( $\Delta G$ ) από την οποία αργότερα προέκυψε η γνωστή εξίσωση Nernst. Ο Tafel το 1905 διετύπωσε τον εμπειρικό νόμο, ότι η διαφορά δυναμικού που αναπτύσσεται σε μία διεπιφάνεια στην οποία γίνεται μία ηλεκτροχημική αντίδραση, μεταβάλλεται γραμμικά συναρτήσει του λογαρίθμου της πυκνότητας ρεύματος. Εκείνο όμως που συνέβαλε στη ταχύτερη ανάπτυξη της ηλεκτροχημείας ήταν η επινόηση της τεχνικής της πολαρογραφίας το 1922 από τον Heyrovsky [Heyrovsky, 1922], για την οποία τιμήθηκε με το βραβείο Nobel το 1959.

Η Ηλεκτροχημεία σήμερα αποτελεί έναν σχεδόν ξεχωριστό κλάδο της χημείας. Η βελτίωση παλαιών και η ανάπτυξη νέων ηλεκτροαναλυτικών τεχνικών με εφαρμογή στο περιβάλλον, τη βιομηχανία και την ιατρική επιστήμη, σε συνδυασμό με τη ραγδαία ανάπτυξη της τεχνολογίας, έχουν προσδώσει μία εντυπωσιακή ώθηση και ένα ξεχωριστό κύρος στην Ηλεκτροχημεία. Γενικότερα η ηλεκτροχημεία ασχολείται με χημικά φαινόμενα τα οποία συνοδεύονται από μεταφορά φορτίου-αγωγή ηλεκτρικού ρεύματος. Αυτή η μεταφορά μπορεί να συμβαίνει ομοιογενώς εντός διαλυμάτων ή ετερογενώς στην επιφάνεια διαφόρων ηλεκτροδίων [Wang, 1994 – Brett, 1993 – Ευσταθίου, 1992].

### 1.1.2. Η ηλεκτρική διπλοστιβάδα

Όταν δύο διαφορετικές φάσεις έρθουν σε επαφή (π.χ. μεταλλικό φύλλο Cu σε νερό), τότε στη διεπιφάνεια λαμβάνει χώρα ανακατανομή ηλεκτρικού φορτίου. Αποτέλεσμα αυτής της ανακατανομής είναι ο σχηματισμός διπλοστιβάδας, η οποία αποτελείται από επιμέρους στιβάδες (Σχήμα 1.1). Σύμφωνα με τις πιο σύγχρονες θεωρίες [Wang, 1994 – Μουμτζής, 1997 – Brett, 1998] κοντά στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου υπάρχει μία μονοστιβάδα η οποία αποτελείται από μόρια του διαλύτη και από ιόντα του διαλύματος, που φέρουν αντίθετο φορτίο σε σχέση με αυτό που αναπτύσσεται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Η στιβάδα αυτή ονομάζεται «εσωτερικό επίπεδο Helmholtz» (Inner Helmholtz Plane, IHP). Η αμέσως επόμενη στιβάδα ονομάζεται «εξωτερικό επίπεδο Helmholtz» (Outer Helmholtz Plane, OHP) και αποτελείται από επιδιαλυτωμένα ιόντα, τα οποία συγκρατούνται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου με δυνάμεις Coulomb. Το εσωτερικό και το εξωτερικό επίπεδο Helmholtz

αποτελούν την λεγόμενη «ηλεκτρική διπλοστιβάδα Helmholtz» (Helmholtz electrical double layer).



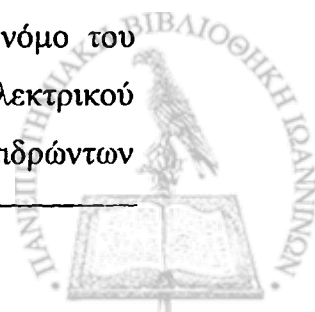
**Σχήμα 1.1:** Απεικόνιση της ηλεκτρικής διπλοστιβάδας Helmholtz, όπου φαίνονται το εσωτερικό (IHP) και το εξωτερικό (OHP) επίπεδο Helmholtz.

Πέρα από το εξωτερικό επίπεδο Helmholtz, και προς την κύρια μάζα του διαλύματος, εκτείνεται η «στιβάδα διάχυσης» (diffusion layer) ή «στιβάδα Gouy», αποτελούμενη από διάσπαρτα ιόντα. Η κατανομή αυτή των ιόντων αντιπροσωπεύει την ισορροπία ανάμεσα στις δυνάμεις του ηλεκτροστατικού πεδίου και την αταξία που προέρχεται από την τυχαία θερμική κίνηση. Το συνολικό φορτίο της διπλοστιβάδας Helmholtz και της στιβάδας διάχυσης είναι ίσο και αντίθετο προς το φορτίο που αναπτύσσεται στη επιφάνεια του ηλεκτροδίου, λόγω της εφαρμοζόμενης ηλεκτρικής τάσης (διαφοράς δυναμικού ή απλουστευμένα δυναμικού).

### 1.1.3. Φαρανταϊκές και μη-Φαρανταϊκές διεργασίες

Γενικά οι ηλεκτροδιακές διεργασίες διακρίνονται σε δύο κατηγορίες:

1) Φαρανταϊκές διεργασίες: ονομάζονται έτσι γιατί ακολουθούν το νόμο του Faraday, σύμφωνα με τον οποίο υπάρχει άμεση συσχέτιση του διερχόμενου ηλεκτρικού φορτίου (Q) και του συνολικού αριθμού των χημικών ισοδυνάμων (n) των αντιδρώντων



συστατικών που οξειδώνονται ή ανάγονται. Αποτέλεσμα αυτής της οξειδοαναγωγής είναι η εμφάνιση ηλεκτρικού ρεύματος (φαρανταϊκό ρεύμα, faradaic current). Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει διεργασίες, όπου έχουμε μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ της διεπιφάνειας ηλεκτροδίου-διαλύματος.

2) Μη-Φαρανταϊκές διεργασίες: χαρακτηρίζονται οι ηλεκτροχημικές διεργασίες, οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν την εμφάνιση ρεύματος (χωρητικό ρεύμα ή ρεύμα φόρτισης, capacitive ή charging current), χωρίς να πραγματοποιηθεί μεταφορά ηλεκτρικού φορτίου από το ηλεκτρόδιο προς το διάλυμα. Τέτοιες μπορούν να χαρακτηριστούν η προσρόφηση και η εκρόφηση ιόντων και μορίων στην επιφάνεια των ηλεκτροδίων και οφείλονται σε μεταβολές στη σύσταση του διαλύματος και του δυναμικού στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου [Bard, 1980].

#### 1.1.4. Ιδανικά πολωμένο και μη-πολωμένο ηλεκτρόδιο

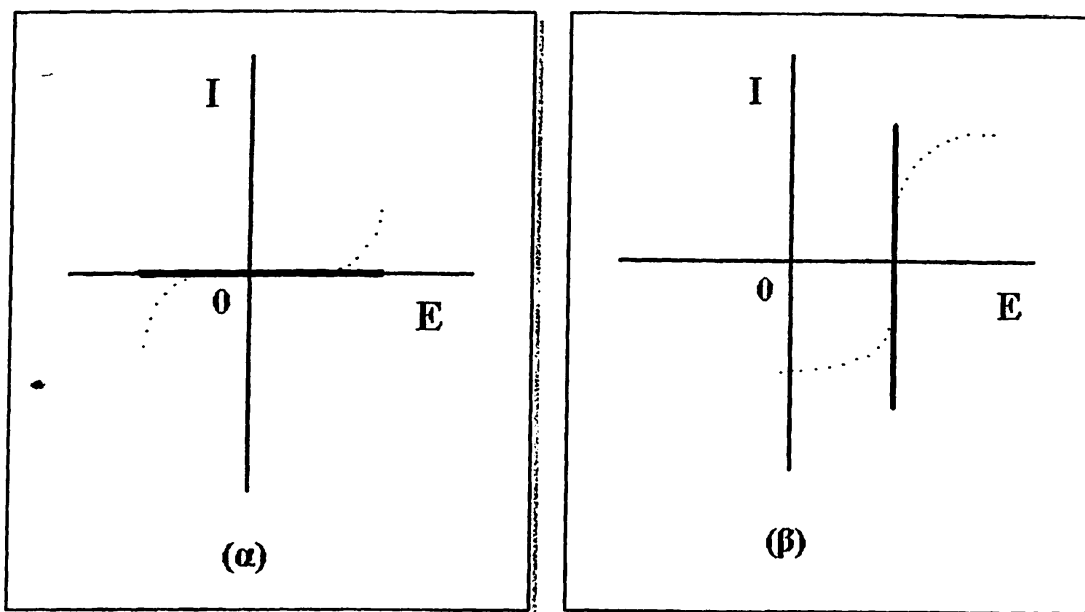
Η συμπεριφορά των διάφορων ηλεκτροδίων κυμαίνεται μεταξύ του ιδανικά πολωμένου και του ιδανικά μη-πολωμένου ηλεκτροδίου.

1) Ένα σύστημα ηλεκτροδίου – ηλεκτρολύτη στο οποίο δεν είναι δυνατή η διέλευση φορτίου από τη μία φάση στην άλλη ή λαμβάνει χώρα με σημαντικά μικρή ταχύτητα, ανεξάρτητα του εφαρμοζόμενου δυναμικού, ονομάζεται ιδανικά πολωμένο ηλεκτρόδιο (Σχήμα 1.2α). Σε αυτή την περίπτωση, το ηλεκτρόδιο συμπεριφέρεται σαν πυκνωτής χωρίς απώλειες και έχει τη δυνατότητα να αυξομειώνει τη χωρητικότητά του ανάλογα με το εφαρμοζόμενο δυναμικό.

2) Ιδανικά μη-πολωμένο ηλεκτρόδιο ονομάζεται ένα σύστημα ηλεκτροδίου – ηλεκτρολύτη, όπου το δυναμικό του παραμένει σταθερό ενώ ταυτόχρονα όταν διέλθει από αυτό ποσότητα ρεύματος, λαμβάνουν χώρα ταχύτατα φαινόμενα που αποκαθιστούν τη χημική ισορροπία (Σχήμα 1.2β) [Ευσταθίου, 1992 – Μουμτζής, 1997].

Στην πράξη δεν υφίστανται ιδανικά πολωμένα και μη-πολωμένα ηλεκτρόδια. Ορισμένα συστήματα μπορούν να προσεγγίσουν την συμπεριφορά των ιδανικά πολωμένων ηλεκτροδίων. Τα ηλεκτρόδια αναφοράς που επιτρέπουν τη διέλευση ρεύματος χωρίς να μεταβάλλεται το δυναμικό τους, προσεγγίζουν τη συμπεριφορά των ιδανικά μη-πολωμένων ηλεκτροδίων.





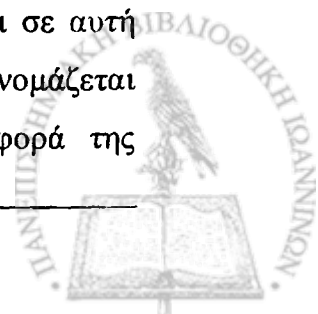
**Σχήμα 1.2:** Γράφημα ρεύματος – δυναμικού: α) ιδανικά πολωμένου και β) ιδανικά μη-πολωμένου ηλεκτροδίου. Η στικτή γραμμή αντιπροσωπεύει τις αποκλίσεις από την ιδανική συμπεριφορά.

### 1.1.5. Η έννοια του δυναμικού ενός ηλεκτροχημικού συστήματος

Όπως είναι γνωστό, ένα πλήρες ηλεκτροχημικό στοιχείο προκύπτει συνδυάζοντας δύο διαφορετικά ημιστοιχεία, δηλαδή δύο ηλεκτρόδια εμβαπτισμένα στο ίδιο διάλυμα ηλεκτρολύτη ή σε διαφορετικά, συνδεδεμένα μεταξύ τους με κάποιο ηλεκτρολυτικό σύνδεσμο ή γέφυρα. Ως αποτέλεσμα έχουμε την αυθόρμητη ροή ηλεκτρονίων και την εμφάνιση στο σύστημα διαφοράς δυναμικού. Ένα τέτοιο ηλεκτροχημικό σύστημα ονομάζεται «γαλβανικό στοιχείο» και η διαφορά δυναμικού που αναπτύσσεται «ηλεκτρεγερτική δύναμη» (Η.Ε.Δ). Εάν στο σύστημα εφαρμόσουμε εξωτερικά μία τάση αντίθετη και μεγαλύτερη της ΗΕΔ τότε έχουμε ένα «ηλεκτρολυτικό στοιχείο».

Η διαφορά μεταξύ ηλεκτρολυτικού και γαλβανικού στοιχείου είναι ότι στο πρώτο έχουμε παραγωγή χημικής δράσης με την κατανάλωση ηλεκτρικής ενέργειας ενώ στο δεύτερο έχουμε παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας που είναι αποτέλεσμα της αυθόρμητης χημικής δράσης.

Σε ένα γαλβανικό στοιχείο ο αρνητικός πόλος ονομάζεται άνοδος και σε αυτή λαμβάνουν χώρα πάντα αντιδράσεις οξειδωσης ενώ ο θετικός πόλος ονομάζεται κάθοδος και σε αυτή γίνονται πάντα αντιδράσεις αναγωγής. Εάν η φορά της



διεξαγόμενης αντίδρασης στο ηλεκτροχημικό στοιχείο μπορεί να αναστραφεί εφαρμόζοντας διαφορά δυναμικού λίγο μεγαλύτερη από την ηλεκτρεγερτική δύναμη του στοιχείου, τότε ονομάζεται «αντιστρεπτό γαλβανικό στοιχείο».

Το δυναμικό ενός ηλεκτροδίου οποιουδήποτε οξειδοαναγωγικού συστήματος εξαρτάται από τη θερμοκρασία και από τις ενεργότητες του οξειδωτικού και του αναγωγικού συστατικού. Επομένως θα εξαρτάται και από οποιονδήποτε παράγοντα επηρεάζει την ενεργότητα των συστατικών, όπως είναι η ιοντική ισχύς, το pH του διαλύματος, η φύση του διαλύτη και η παρουσία ή μη συμπλεκτικών μέσων.

Η εξίσωση Nernst παρέχει το δυναμικό του ηλεκτροδίου σε συνάρτηση με τις ενεργότητες:

$$E = E^{\circ} - \frac{RT}{nF} \ln \frac{\alpha_{Red}^{v_R}}{\alpha_{Ox}^{v_O}} \quad (1.1)$$

όπου:

$E^{\circ}$  = το κανονικό δυναμικό (V),

$R$  = η παγκόσμια σταθερά των αερίων ( $8,314 \text{ V C K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ),

$T$  = η απόλυτη θερμοκρασία (K),

$n$  = ο αριθμός των ηλεκτρονίων που συμμετέχουν στην αντίδραση ( $\text{eq mol}^{-1}$ ),

$F$  = η σταθερά Faraday ( $96485,38 \text{ C eq}^{-1}$ ),

$\alpha$  = η ενεργότητα των συστατικών και

$v$  = ο στοιχειομετρικός συντελεστής των συστατικών της αντίδρασης [θετικός για τα προϊόντα (οξειδωτικά) και αρνητικός για τα αντιδρώντα (αναγωγικά)].

Επειδή στην πράξη οι ενεργότητες δεν χρησιμοποιούνται, αντικαθίστανται από τις αντίστοιχες μοριακές συγκεντρώσεις, με τις οποίες συνδέονται μέσω της σχέσης:  $\alpha_i = \gamma_i C_i$ , όπου  $\gamma_i$  ο συντελεστής ενεργότητας του συστατικού  $i$ . Έτσι η παραπάνω σχέση (1.1) μετασχηματίζεται στην ακόλουθη:

$$E = E^{\circ} - \frac{RT}{nF} \ln \frac{\gamma_{Red}^{v_R} C_{Red}^{v_R}}{\gamma_{Ox}^{v_O} C_{Ox}^{v_O}} \quad (1.2)$$





η οποία τελικά μπορεί να γραφεί ως:

$$E = E^{\circ'} - \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_{Red}^{v_R}}{C_{Ox}^{v_O}} \quad (1.3)$$

Ο όρος  $E^{\circ'}$  ονομάζεται «τυπικό δυναμικό» (formal potential) του ηλεκτροδίου και είναι αυτό το οποίο πειραματικά μετρείται και υπολογίζεται από τη σχέση:

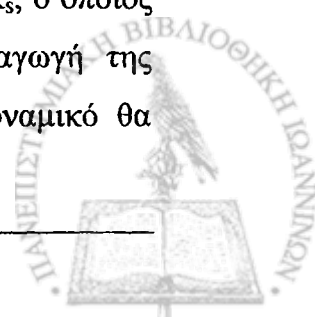
$$E^{\circ'} = E^{\circ} - \frac{RT}{nF} \ln \frac{\gamma_{Red}^{v_R}}{\gamma_{Ox}^{v_O}} \quad (1.4)$$

Από τη μαθηματική εξίσωση (1.3) είναι φανερό ότι το τυπικό δυναμικό  $E^{\circ'}$  ισούται με το δυναμικό  $E$  του ηλεκτροδίου, όταν οι μοριακές συγκεντρώσεις των συστατικών του οξειδοαναγωγικού ζεύγους είναι ίσες με τη μονάδα [Scholz, 2002].

#### 1.1.6. Υπερδυναμικό ηλεκτροδίου και ωμική πτώση τάσης

Σε αρκετές περιπτώσεις, για τη διεξαγωγή μιας ηλεκτροχημικής αντίδρασης με κάποια σημαντική ταχύτητα, είναι απαραίτητο να υπερνικήσουμε ενδιάμεσους ενεργειακούς φραγμούς. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να απαιτείται ένα επιπλέον δυναμικό, εκτός αυτού που θεωρητικά προβλέπεται από την εξίσωση Nernst. Το δυναμικό αυτό ονομάζεται «υπερδυναμικό» και είναι θετικό ή αρνητικό ανάλογα με το αν η αντίδραση διεξάγεται στην άνοδο ή την κάθοδο, αντίστοιχα.

Επίσης, όπως κάθε αγωγός του ηλεκτρικού ρεύματος, έτσι και τα διαλύματα των ηλεκτρολυτών εμφανίζουν μία εσωτερική αντίσταση  $R_s$ , η οποία εξαρτάται από τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά του ηλεκτροχημικού συστήματος, τη φύση των ηλεκτροδίων καθώς και του ηλεκτρολύτη. Όταν, λοιπόν, στο στοιχείο εφαρμοστεί εξωτερικά μία διαφορά δυναμικού, η τάση του ελαττώνεται κατά τον όρο  $iR_s$ , ο οποίος ονομάζεται «ωμική πτώση τάσης» ( $iR_s$  drop). Επομένως, για τη διεξαγωγή της συνολικής οξειδοαναγωγικής αντίδρασης το εξωτερικά εφαρμοζόμενο δυναμικό θα δίνεται από την ακόλουθη σχέση:



$$E = -[E_{(0,c)} - E_{(0,a)} + n_c + n_a + iR_s] \quad (1.5)$$

όπου  $E_{(0,c)}$  και  $E_{(0,a)}$  είναι το δυναμικό ισορροπίας του συστήματος ηλεκτροδίου-διαλύματος (σύμφωνα με την εξίσωση Nernst για μηδενική διέλευση ρεύματος) για την καθοδική και την ανοδική δράση αντίστοιχα,  $n_c$  και  $n_a$  το καθοδικό και η ανοδικό υπερδυναμικό και  $iR_s$  η ωμική πτώση τάσης.

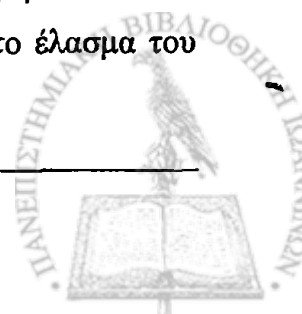
Τα υπερδυναμικά των ηλεκτροδίων δεν μπορούν να προβλεφθούν θεωρητικά αλλά η απόλυτη τιμή τους εξαρτάται από: 1) τη φύση της ηλεκτροδιακής ημιαντίδρασης, 2) την πυκνότητα ρεύματος, 3) το υλικό κατασκευής του ηλεκτροδίου, 4) την κατάσταση της επιφάνειας του ηλεκτροδίου και 5) τη φύση των προϊόντων των αντιδράσεων [Ευσταθίου, 1992 – Μουμτζής, 1997 – Scholz, 2002].

### 1.1.7. Ηλεκτρόδια αναφοράς

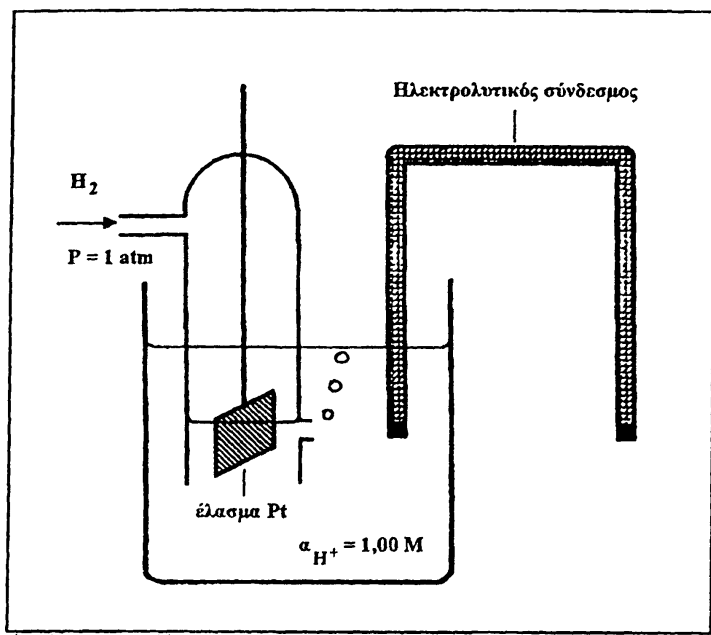
Εφόσον το δυναμικό ενός ηλεκτροχημικού στοιχείου υπολογίζεται πάντα ως η διαφορά των δυναμικών των δύο ηλεκτροδίων, είναι απαραίτητη η ύπαρξη και χρησιμοποίηση ενός ηλεκτροδίου, του οποίου το δυναμικό να παραμένει σταθερό με το χρόνο, τη θερμοκρασία, τη διέλευση ρεύματος και τη σύσταση του διαλύματος ενώ θα πρέπει να αναπαράγεται εύκολα. Ένα τέτοιο ηλεκτρόδιο ονομάζεται ηλεκτρόδιο αναφοράς και ως προς αυτό αναφέρεται κάθε φορά το δυναμικό του δεύτερου ηλεκτροδίου. Τα πιο γνωστά ηλεκτρόδια αναφοράς είναι: 1) το κανονικό ηλεκτρόδιο υδρογόνου, 2) το κορεσμένο ηλεκτρόδιο καλομέλανος και 3) το ηλεκτρόδιο αργύρου-χλωριούχου αργύρου.

1) Κανονικό Ηλεκτρόδιο Υδρογόνου (Normal Hydrogen Electrode, NHE): αποτελείται ουσιαστικά από ένα έλασμα λευκοχρύσου επικαλυμμένο με μέλανα λευκόχρυσου, το οποίο είναι εμβαπτισμένο εντός διαλύματος υδροχλωρικού οξέος.

Αέριο υδρογόνο υπό πίεση 1 atm διαβιβάζεται πάνω από το ηλεκτρόδιο και μέσα από το διάλυμα, έτσι ώστε το ηλεκτρόδιο και η περιοχή του διαλύματος γύρω από αυτό να είναι κεκορεσμένα με το αέριο. Το υδρογόνο προσροφάται πάνω στο έλασμα του



λευκοχρύσου και διασπάται σε άτομα που βρίσκονται σε ισορροπία με τα ιόντα  $H^+$  του διαλύματος.



Σχήμα 1.3: Σχηματική απεικόνιση του κανονικού ηλεκτροδίου υδρογόνου.

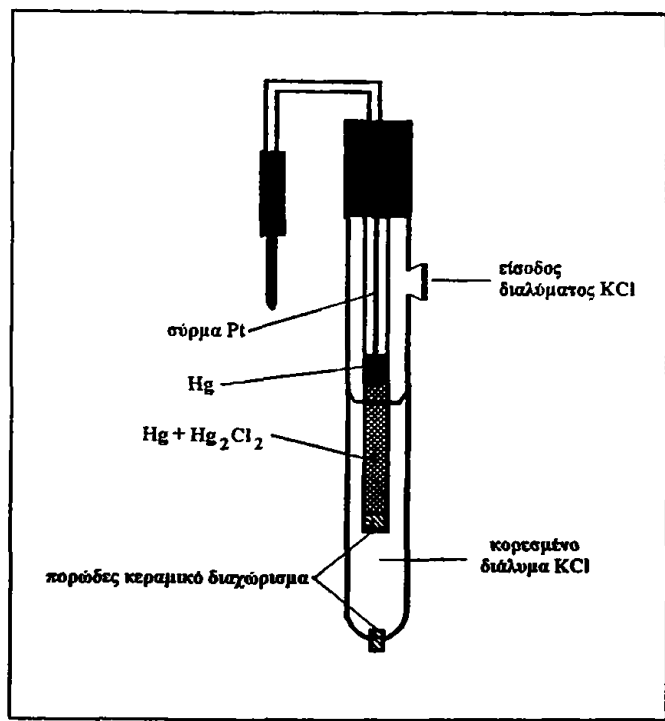
Όταν η ενεργότητα των ιόντων  $H^+$  στο διάλυμα ισούται με τη μονάδα, τότε έχουμε το κανονικό ηλεκτρόδιο υδρογόνου (Σχήμα 1.3) και το δυναμικό του λαμβάνεται κατά συνθήκη ίσο με το μηδέν.

Σήμερα δεν χρησιμοποιείται σε ευρεία κλίμακα, εξαιτίας των δυσκολιών που υπάρχουν στην κατασκευή, τη χρήση και συντήρησή του, χρησιμοποιείται όμως κυρίως για τη βαθμονόμηση άλλων ηλεκτροδίων σταθερού δυναμικού και πολύ πιο σπάνια για τη μέτρηση του pH.

2) Κορεσμένο Ηλεκτρόδιο Καλομέλανος (Saturated Calomel Electrode, SCE): είναι από τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα ηλεκτρόδια αναφοράς, λόγω της εύκολης κατασκευής του και της σταθερότητας του δυναμικού του.

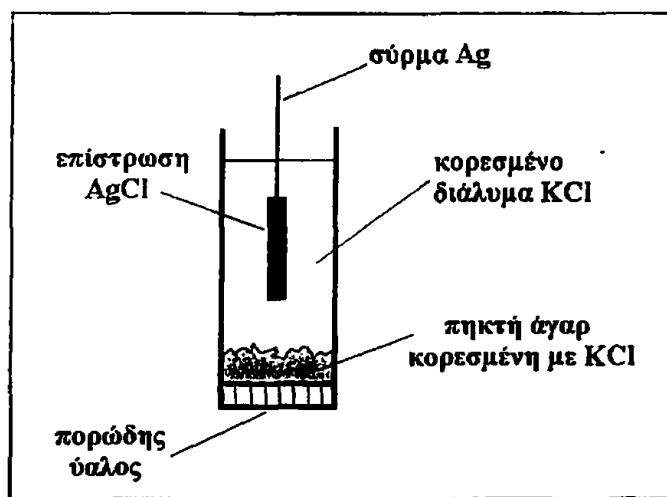
Είναι κατασκευασμένο από σύρμα λευκοχρύσου, που βρίσκεται σε επαφή διαδοχικά με στρώμα Hg,  $Hg_2Cl_2$  και κορεσμένο διάλυμα KCl του οποίου η συγκέντρωση είναι 4,1 M (Σχήμα 1.4). Σημαντικά μειονεκτήματα είναι η θερμική υστέρηση και ο μεγάλος θερμικός συντελεστής δυναμικού, λόγω της μεταβολής της διαλυτότητας του  $Hg_2Cl_2$  με τη θερμοκρασία.





Σχήμα 1.4: Απεικόνιση του κορεσμένου ηλεκτροδίου καλομέλανος.

3) Ηλεκτρόδιο αργύρου-χλωριούχου αργύρου (silver-silver chloride electrode): είναι κατασκευασμένο από σύρμα Ag, το οποίο είναι επικαλυμμένο με χλωριούχο άργυρο και εμβαπτισμένο σε κορεσμένο διάλυμα KCl (Σχήμα 1.5). Το πλεονέκτημα σε σχέση με το κορεσμένο ηλεκτρόδιο καλομέλανος, είναι ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε υψηλές θερμοκρασίες (μέχρι 275 °C). Χρησιμοποιείται ευρέως στα ηλεκτρόδια μεμβράνης ως εσωτερικό ηλεκτρόδιο αναφοράς, ενώ μικροηλεκτρόδια Ag/AgCl χρησιμοποιούνται για in vivo μελέτες [Μουμτζής, 1997 – Χατζηϊωάννου, 2000].



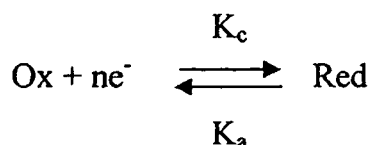
Σχήμα 1.5: Απεικόνιση του ηλεκτροδίου αναφοράς αργύρου-χλωριούχου αργύρου.

### 1.1.8. Παράγοντες που επιδρούν στην κινητική συμπεριφορά των ηλεκτροχημικών αντιδράσεων

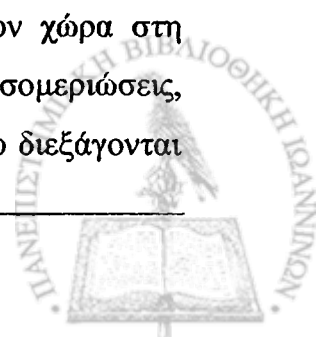
Σημαντικό ρόλο στην ηλεκτροχημική κινητική διαδραματίζουν κάποιοι παράγοντες που επηρεάζουν καθοριστικά την κινητική συμπεριφορά των ηλεκτροχημικών διεργασιών γενικότερα και ειδικότερα των αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα στη διαφασική περιοχή ηλεκτροδίου-διαλύματος. Οι παράγοντες αυτοί είναι οι ακόλουθοι:

- 1) εξωτερικοί παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, η πίεση και ο χρόνος,
- 2) παράγοντες μεταφοράς μάζας από και προς το ηλεκτρόδιο, όπως η ένταση του πεδίου, η διάχυση, η επιφανειακή συγκέντρωση των συστατικών και η προσρόφηση στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου,
- 3) παράγοντες του ηλεκτροδίου, όπως η φύση και το υλικό κατασκευής, γεωμετρικά και κατασκευαστικά χαρακτηριστικά καθώς και η κατάσταση της επιφανείας του,
- 4) παράγοντες του διαλύματος, όπως η συγκέντρωση της ηλεκτρενεργού ουσίας, η φύση και η συγκέντρωση του φέροντος ηλεκτρολύτη, η φύση του διαλύτη, η ιοντική ισχύς και το pH του διαλύματος,
- 5) ηλεκτρικοί παράγοντες, όπως η εφαρμοζόμενη διαφορά δυναμικού, το διερχόμενο ρεύμα και το φορτίο [Μουμτζής, 1997].

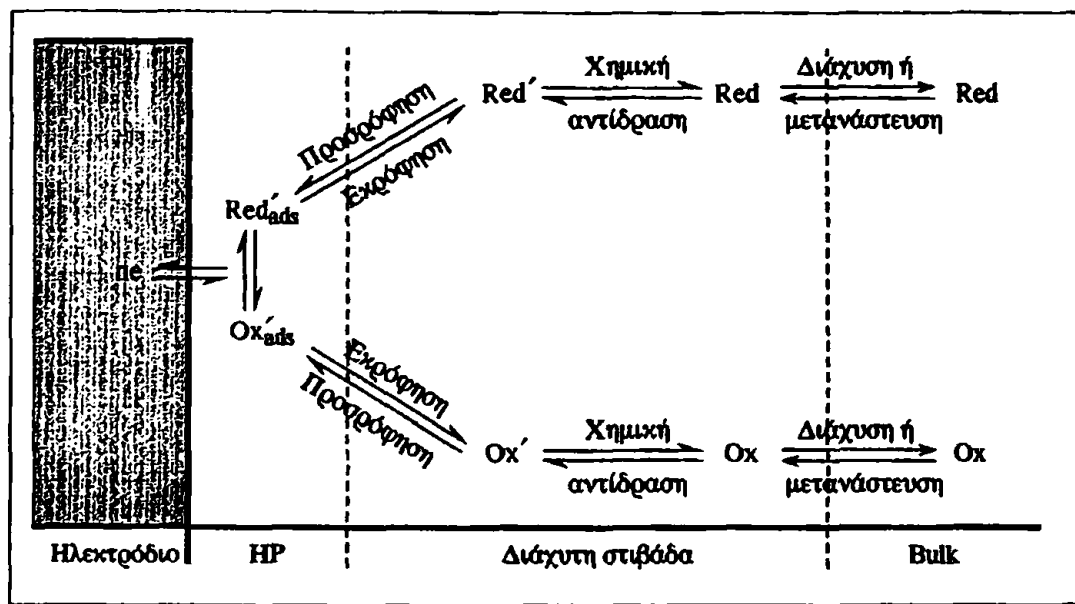
Στο Σχήμα 1.6 απεικονίζονται τα κύρια στάδια μίας γενικής ηλεκτροχημικής αντίδρασης που παριστάνεται με τη χημική εξίσωση:



Τα στάδια περιγράφονται ως εξής: 1) μεταφορά μάζας με διάχυση ή και μετακίνηση από την κύρια μάζα του διαλύματος (bulk) προς τη διαφασική περιοχή και αντίστροφα, 2) διάφορες ομογενείς χημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στη στιβάδα διάχυσης πριν ή μετά την ηλεκτροδιακή αντίδραση, όπως ισομεριώσεις, διμερισμοί και πρωτονιώσεις, 3) φυσικές ή φυσικοχημικές διεργασίες που διεξάγονται



στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου και εντός της περιοχής που καταλαμβάνει η στιβάδα Helmholtz (HP), όπως ηλεκτροδιάλυση και ηλεκτροαπόθεση του ηλεκτροδιακού υλικού, σχηματισμός και καταστροφή στρώσεων ή μεμβρανών αδιάλυτων συστατικών καθώς και προσρόφηση ή εκρόφηση των αντιδρώντων και προϊόντων.



Σχήμα 1.6: Διαγραμματική παράσταση της πορείας μίας ηλεκτροχημικής αντίδρασης.

Η ταχύτητα της ηλεκτροχημικής αντίδρασης καθορίζεται, όπως είναι φυσικό από το πιο αργό στάδιο, ενώ η παρεμπόδιση ενός ή και περισσοτέρων εκ των προαναφερθέντων σταδίων έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση υπέρτασης. Επομένως, στην περιοχή από τη διεπιφάνεια μέχρι την κύρια μάζα του διαλύματος (bulk) εντοπίζονται οι παράγοντες που επηρεάζουν την κινητική της οξειδοαναγωγικής αντίδρασης και είναι:

1) η επιφανειακή συγκέντρωση της ηλεκτρενεργού ουσίας, η οποία καθορίζεται κυρίως από τη διάχυση και τον τρόπο μεταφοράς της από και προς το ηλεκτρόδιο, όπως επίσης και από φαινόμενα προσροφήσεως της ουσίας,

2) η ενέργεια ενεργοποίησης της αντίδρασης μεταφοράς φορτίου, που εξαρτάται από τη φύση, τις καταλυτικές και προσροφητικές ιδιότητες του υλικού από το οποίο είναι κατασκευασμένο το ηλεκτρόδιο καθώς και από τη φύση των αντιδρώντων,

3) το δυναμικό του ηλεκτροδίου, που καθορίζει την ταχύτητα μεταφοράς φορτίου από και προς την επιφάνεια του ηλεκτροδίου,

4) η διεξαγωγή ή όχι ομογενών αντιδράσεων στη διφασική περιοχή πριν ή μετά την κύρια ηλεκτροχημική αντίδραση και η ταχύτητα με την οποία διεξάγονται,

5) η προσρόφηση τυχόν ενδιάμεσων ή τελικών προϊόντων της οξειδοαναγωγικής αντίδρασης, όπως και συνυπαρχόντων ουδετέρων μορίων που τυχόν παρεμποδίζουν ή καταλύουν την κύρια αντίδραση μεταφοράς φορτίου και

6) η θερμοκρασία, που επηρεάζει καθοριστικά την ταχύτητα διεξαγωγής όλων των φαινομένων που λαμβάνουν χώρα στη διφασική περιοχή.

\* Συνεπώς, το ρεύμα που αναπτύσσεται κατά τη διάρκεια διεξαγωγής της ηλεκτροχημικής αντίδρασης μπορεί να χαρακτηριστεί ως περιοριζόμενο από τη μεταφορά μάζας (mass transfer limited), τη μεταφορά φορτίου (charge transfer limited) και τη διάχυση (diffusion limited), ανάλογα με το ποιος παράγοντας καθορίζει την τιμή του [Bard,-1980].

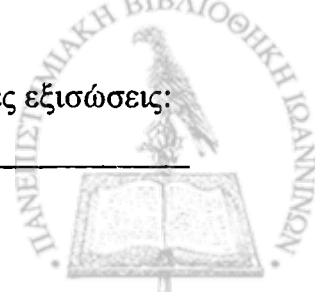
### 1.1.9. Μηχανισμοί ηλεκτροχημικών αντιδράσεων

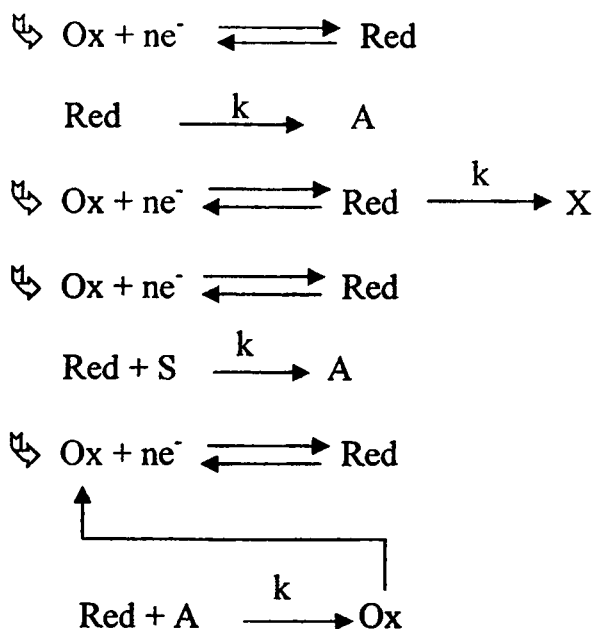
Ο μηχανισμός μίας ηλεκτροχημικής αντίδρασης είναι ένας συνδυασμός: α) από διάφορα ετερογενή ηλεκτροχημικά στάδια μεταφοράς φορτίου, που συμβολίζονται με E και λαμβάνουν χώρα στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου και β) από ομογενή χημικά στάδια που συμβολίζονται με C και διεξάγονται κατά κανόνα στην περιοχή της στοιβάδας διάχυσης.

Επομένως, μία αντίδραση μεταφοράς φορτίου μπορεί να συνοδεύεται ταυτόχρονα από μία ομογενή χημική αντίδραση ή αυτή να έπεται ή και να προηγείται. Επίσης, είναι δυνατόν τα προϊόντα της χημικής αντίδρασης να παρεμποδίζουν ή να καταλύουν την αντίδραση μεταφοράς φορτίου. Συνεπώς, λογικό είναι η κινητική της συνολικής ηλεκτροχημικής αντίδρασης να επηρεάζεται από τη σταθερά ταχύτητας των ομογενών χημικών αντιδράσεων. Οι πιο βασικοί τύποι μηχανισμών των ηλεκτροχημικών αντιδράσεων είναι:

1) EC – μηχανισμός (Electrochemical – Chemical mechanism): οι περισσότερες από τις ηλεκτροχημικές διεργασίες ακολουθούν αυτόν τον τύπο μηχανισμού, σύμφωνα με τον οποίο μία αντίδραση μεταφοράς φορτίου ακολουθείται από μία ομογενή χημική αντίδραση (συνήθως 1<sup>ης</sup> τάξης).

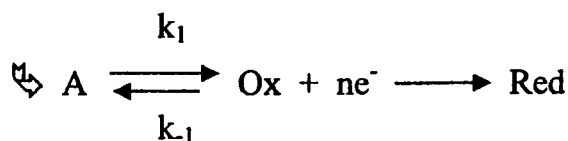
Ο EC μηχανισμός περιγράφεται με κάποιες από τις ακόλουθες χημικές εξισώσεις:



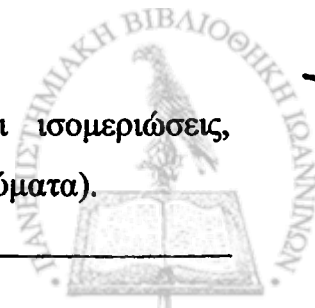


Οι ομογενείς χημικές αντιδράσεις μπορεί να καταλήγουν σε μη ηλεκτρενεργά προϊόντα και μπορεί να είναι διμερισμοί (οξείδωση τριτοταγών λιποαρωματικών αμινών σε DMF), ισομεριώσεις ή ταυτομεριώσεις (αναγωγή του διβενζολίου σε αλκαλικά διαλύματα) είτε και αντίδραση με μόρια διαλύτη ή τυχόν συνυπάρχοντα ανενεργά συστατικά που βρίσκονται στο διάλυμα σε περίσσεια. Η τελευταία αντίδραση αποτελεί ειδική περίπτωση και ο μηχανισμός ονομάζεται αυτοκαταλυτικός. Συγκεκριμένα, το προϊόν της ηλεκτροχημικής αντίδρασης αντιδρά με κάποιο άλλο συστατικό του διαλύματος και με αυτό τον τρόπο αναγεννάται η ηλεκτρενεργός ουσία.

2) CE – μηχανισμός (Chemical – Electrochemical mechanism): σε αυτή την περίπτωση μηχανισμού η ηλεκτρενεργός ουσία είναι το προϊόν της ομογενούς χημικής αντίδρασης, επομένως αυτή θα προηγείται της ηλεκτροχημικής αντίδρασης και αποδίδεται με την παρακάτω χημική εξίσωση:

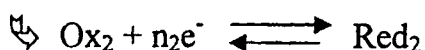
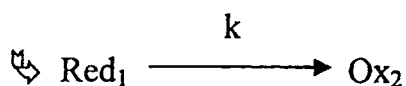
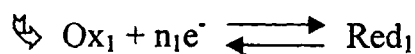


Και εδώ οι ομογενείς χημικές αντιδράσεις ενδέχεται να είναι ισομεριώσεις, μονομεριώσεις ή αφυδατώσεις (αναγωγή HCHO σε όξινα υδατικά διαλύματα).





3) ECE – μηχανισμός (Electrochemical – Chemical – Electrochemical mechanism): εδώ η ομογενής χημική αντίδραση διεξάγεται ανάμεσα σε δύο αντιδράσεις μεταφοράς φορτίου με βάση το ακόλουθο σχήμα:



Αρκετά συχνά, πολλές ηλεκτροχημικές αντιδράσεις ακολουθούν αυτόν το μηχανισμό, όπως π.χ. η ηλεκτροοξειδωση δευτεροταγών λιπαρωματικών αμινών σε DMF και CH<sub>3</sub>CN σε ηλεκτρόδιο Pt ή Au.

Τέλος θα πρέπει να επισημάνουμε ότι στους βασικούς μηχανισμούς που προαναφέραμε είναι δυνατόν να συμμετέχουν και ετερογενείς χημικές αντιδράσεις. Τα συστατικά που συμμετέχουν βρίσκονται προσροφημένα στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου ενώ παράλληλα δεν έχουμε ανταλλαγή φορτίων με το ηλεκτρόδιο.

Οι αντιδράσεις αυτού του τύπου διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο είτε παρεμποδίζοντας είτε ηλεκτροκαταλύοντας τις διάφορες ηλεκτροχημικές αντιδράσεις. Η παρεμπόδιση εμφανίζεται όταν το προσροφούμενο συστατικό δεν είναι ηλεκτροδραστικό. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να ελαχιστοποιείται η διαθεσιμότητα της ενεργής ηλεκτροδιακής επιφάνειας ή να αυξάνει το πάχος της διπλοστιβάδας, δυσχεραίνοντας την ανταλλαγή ηλεκτρονίων, μειώνοντας ταυτόχρονα τη ταχύτητα διεξαγωγής της ηλεκτροδιακής αντίδρασης.

Από την άλλη πλευρά, η ηλεκτροκατάλυση μπορεί να οδηγήσει και σε αύξηση αλλά και σε ελάττωση της ταχύτητας διεξαγωγής της αντίδρασης, αναλόγως με τον αν το προσροφούμενο συστατικό είναι κάποιο ενδιάμεσο ή τελικό προϊόν ή το ίδιο το ηλεκτρενεργό συστατικό αντίστοιχα [Μουμτζής, 1997].



## 1.2. ΗΛΕΚΤΡΟΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

### 1.2.1. Εισαγωγή

Καθεμία από τις ηλεκτροχημικές τεχνικές ανάλυσης βασίζεται σε ένα ιδιαίτερο φαινόμενο που πραγματοποιείται σε κάποιο ηλεκτροχημικό στοιχείο. Κατά τη διάρκεια ενός πειράματος μετρούνται διάφορα ηλεκτρικά μεγέθη, όπως το δυναμικό, η ένταση του ρεύματος, η αντίσταση ή η αγωγιμότητα.

Σε μία ηλεκτροχημική ανάλυση το μετρούμενο μέγεθος συνδυάζεται με κάποια φυσική ιδιότητα του συστήματος όπως η θερμοκρασία, η πίεση και η συγκέντρωση του υπό προσδιορισμού συστατικού.

Επίσης, η μέθοδος θα πρέπει να εξασφαλίζει τις απαραίτητες πληροφορίες για την ταχύτητα και το μηχανισμό διεξαγωγής της υπό μελέτη αντίδρασης και φυσικά να είναι ακριβής, να έχει επαναληψιμότητα, χαμηλό όριο ανίχνευσης και μικρό χρόνο απόκρισης του ηλεκτροδίου στις μεταβολές του μετρούμενου μεγέθους, το οποίο αλληλεπιδρά και συνδυάζεται με τις μεταβολές του δυναμικού.

Κάθε ηλεκτροχημική τεχνική χαρακτηρίζεται πάντα από τις επικρατούσες συνθήκες. Λαμβάνοντας υπόψη αυτό το κριτήριο αυτές χωρίζονται 1) στις τεχνικές ισορροπίας και 2) τις δυναμικές τεχνικές. Οι τεχνικές ισορροπίας περιλαμβάνουν κυρίως διάφορες ποτενσιομετρικές τεχνικές, ενώ οι δυναμικές τεχνικές υποδιαιρούνται σε τρεις επιμέρους κατηγορίες (Πίνακας 1.1):

1) Τεχνικές ελεγχόμενου δυναμικού (controlled potential techniques): στο σύστημα εφαρμόζεται σταθερό δυναμικό και καταγράφεται η καμπύλη μεταβολής του ρεύματος με το χρόνο ( $I-t$ ) ή του φορτίου με το χρόνο ( $Q-t$ ). Εναλλακτικά εφαρμόζεται ελεγχόμενα μεταβλητό δυναμικό και καταγράφονται οι μεταβολές ρεύματος συναρτήσει του δυναμικού ( $I-E$ ).

2) Τεχνικές ελεγχόμενου ρεύματος (controlled current techniques): στο σύστημα διατηρείται σταθερό το ρεύμα και καταγράφονται καμπύλες  $E-t$  ή μεταβάλλεται ελεγχόμενα το ρεύμα και καταγράφονται καμπύλες  $E-I$ .

3) Τεχνικές ελεγχόμενου φορτίου (controlled charge techniques): εδώ διατηρείται σταθερό το διερχόμενο φορτίο και καταγράφονται καμπύλες  $E-t$ . Ουσιαστικά είναι παρόμοιες με τις τεχνικές ελεγχόμενου ρεύματος, γι' αυτό και τις

περισσότερες φορές κατάσσονται μαζί στην ίδια κατηγορία [Ευσταθίου, 1992 – Μουμτζής, 1997 – Brett, 1998].

**Πίνακας 1.1:** Κατάταξη των σημαντικότερων ηλεκτροχημικών τεχνικών.

| ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ                                   |   |   |   |  |
|---|---|---|---|--|
| ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ                            |   |   | ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΟΥ ΡΕΥΜΑΤΟΣ (ή ΦΟΡΤΙΟΥ) |  |
| ΣΤΑΤΙΚΕΣ  | ΜΗ – ΣΤΑΤΙΚΕΣ   |   | ΣΤΑΤΙΚΕΣ                                  | ΜΗ ΣΤΑΤΙΚΕΣ                            |
|   | ΒΗΜΑΤΟΣ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ   | ΣΑΡΩΣΗΣ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ   |   |  |
| Αμπερομετρία  | Χρονοαμπερομετρία (απλού ή διπλού παλμού)                 | Βολταμμετρία απλής σάρωσης                                  | Χρονοποτενσιομετρία                       | Ποτενσιομετρία (απλού ή διπλού παλμού) |
| Αμπερομετρία λεπτής στιβάδας                              | Πολαρογραφία συνεχούς (dc) ή εναλλασσόμενου (ac) ρεύματος | Κυκλική βολταμμετρία (επαναλαμβανόμενη, αναδιαλυτική, απλή) | Ποτενσιομετρία λεπτής στιβάδας            | Κουλομετρία                            |
| Βολταμμετρία ηλεκτροδίου περιστρεφόμενου δίσκου           | Πολαρογραφία παλμών                                       |   | Μέθοδος διακοπής                          |  |
| Βολταμμετρία ηλεκτροδίου περιστρεφόμενου δίσκου/δακτυλίου | Χρονοκουλομετρία  |   |   |  |

Παρακάτω θα εξεταστούν διεξοδικά η Κυκλική Βολταμμετρία Γραμμικής Σάρωσης (Linear Sweep Cyclic Voltammetry, LSCV), η ηλεκτροχημική συμπεριφορά ηλεκτρενεργών ουσιών σε διαλυτή και ακινητοποιημένη μορφή με τη μέθοδο αυτή καθώς, επίσης, και η Φασματοσκοπία Ηλεκτροχημικής Εμπέδησης (Electrochemical Impedance Spectroscopy, EIS).

### 1.2.2. Κυκλική Βολταμμετρία (Cyclic Voltammetry, CV)

Η «κυκλική βολταμμετρία γραμμικής σάρωσης» (Linear Sweep Cyclic Voltammetry, LSCV) κατέχει εξέχουσα θέση ανάμεσα στις μη στατικές τεχνικές ελεγχόμενου δυναμικού και αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι είναι η καταλληλότερη μέθοδος για να πρωτοερευνηθεί μία ηλεκτροχημική αντίδραση σε ένα σταθερό ηλεκτρόδιο, τόσο από ποιοτική αλλά και από ημι-ποσοτική πλευρά. Είναι η κατεξοχήν

διαγνωστική μέθοδος για τη μελέτη του μηχανισμού ηλεκτροχημικών αντιδράσεων.

Έτσι μπορεί να διαπιστωθεί:

- 1) αν μία ηλεκτροχημική αντίδραση είναι αντιστρεπτή ή όχι,
- 2) αν διεξάγεται σε ένα ή περισσότερα στάδια,
- 3) αν στο ηλεκτρόδιο συμβαίνουν φαινόμενα προσρόφησης ή εκρόφησης,
- 4) αν παράγονται ενδιάμεσα προϊόντα,
- 5) αν συμβαίνουν φαινόμενα κατάλυσης ή παρεμπόδισης και
- 6) αν τυχόν η αντίδραση μεταφοράς φορτίου συνοδεύεται από κάποια ομογενή χημική αντίδραση.

Οι προαναφερθέντες λόγοι, σε συνδυασμό με την ευκολία των μετρήσεων συντελούν στην πολυδιάστατη εφαρμογή της μεθόδου στην ηλεκτροχημική ανάλυση, καθώς και σε άλλους κλάδους της χημείας, όπως η ανόργανη χημεία, η οργανική χημεία και η βιοχημεία.

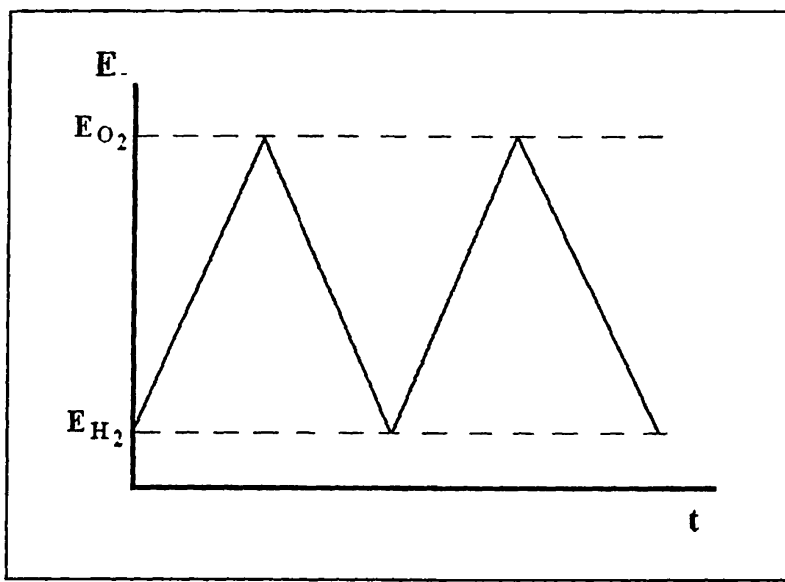
### 1.2.2.1. Αρχή της μεθόδου

Το κύριο χαρακτηριστικό της μεθόδου είναι η γραμμική μεταβολή του δυναμικού του ηλεκτροδίου εργασίας και η ταυτόχρονη καταγραφή της καμπύλης μεταβολής του εμφανιζόμενου ρεύματος συναρτήσει του εφαρμοζόμενου δυναμικού. Η σάρωση γίνεται μεταξύ δύο τιμών δυναμικού που τις περισσότερες φορές καθορίζονται από τα δυναμικά ανοδικής έκλυσης του οξυγόνου ( $E_{O_2}$ ) και καθοδικής έκλυσης του υδρογόνου ( $E_{H_2}$ ) (Σχήμα 1.7). Η σάρωση αλλάζει κατεύθυνση κάθε φορά που το δυναμικό φτάνει στις ακραίες αυτές τιμές δυναμικού. Κατά την καθοδική σάρωση λαμβάνουν χώρα αντιδράσεις αναγωγής ενώ κατά την ανοδική σάρωση αντιδράσεις οξειδωσης.

Επειδή η «ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού» (sweep rate) που δίνεται σαν η πρώτη παράγωγος του δυναμικού ως προς το χρόνο ( $dE/dt = v$  σε  $V s^{-1}$  ή  $mV s^{-1}$ ), πρέπει να είναι σταθερή, είναι φανερό ότι η ένταση του διερχόμενου ρεύματος από τη μονάδα επιφάνειας του ηλεκτροδίου είναι επίσης συνάρτηση της ταχύτητας ή του χρόνου σάρωσης. Η ταχύτητα σάρωσης μπορεί να λαμβάνει τιμές που κυμαίνονται από μερικά  $mV s^{-1}$  μέχρι και  $10^6 mV s^{-1}$ .

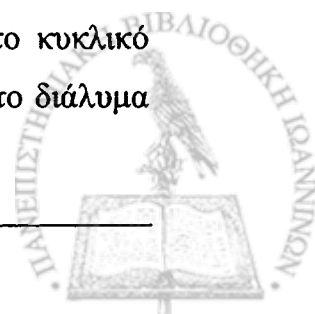
Οι καμπύλες ρεύματος-δυναμικού (I-E), που καταγράφονται με τη βοήθεια κατάλληλων πειραματικών διατάξεων ονομάζονται «κυκλικά βολταμογραφήματα». Η

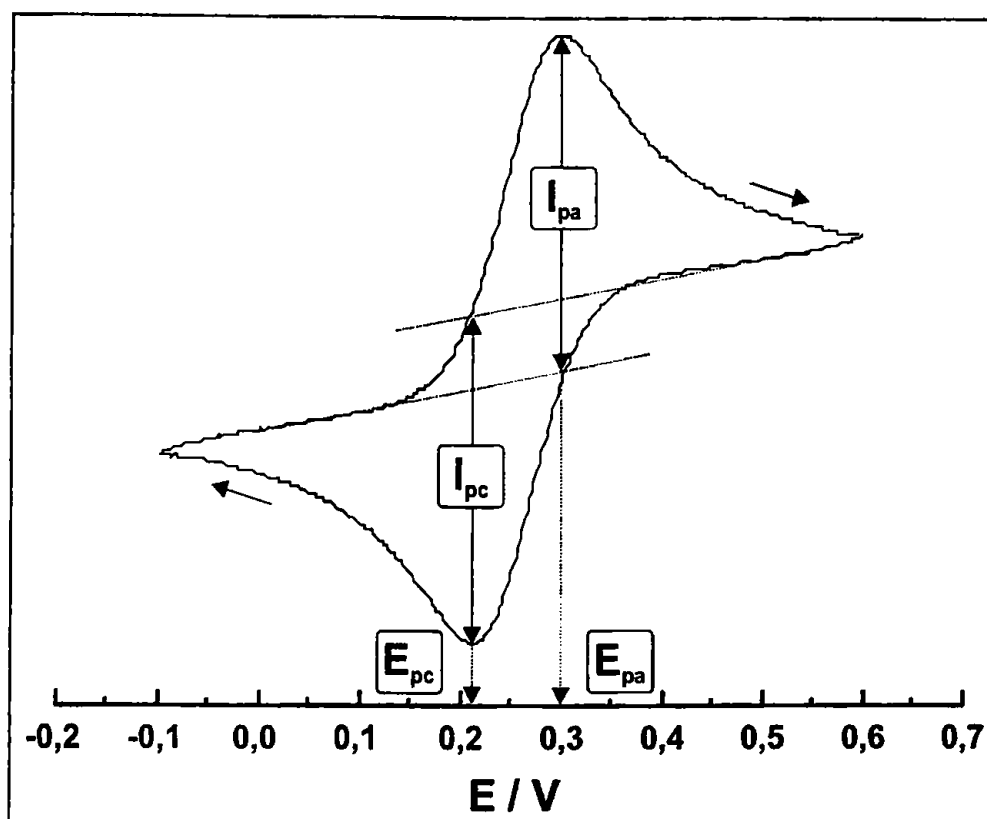
μορφή ενός βολταμμογραφήματος επηρεάζεται, όπως είναι αναμενόμενο, από την ταχύτητα μεταφοράς φορτίου και από την ταχύτητα μεταφοράς μάζας από και προς την επιφάνεια του ηλεκτροδίου.



Σχήμα 1.7: Διάγραμμα της τριγωνικής μεταβολής του δυναμικού του ηλεκτροδίου εργασίας σε συνάρτηση με το χρόνο στην κυκλική βολταμμετρία γραμμικής σάρωσης.

Καθώς τα πειράματα διεξάγονται σε μη αναδευόμενα διαλύματα, με την προσθήκη φέροντα ηλεκτρολύτη είναι επόμενο ότι ο μοναδικός τρόπος μεταφοράς μάζας των ηλεκτρενεργών ουσιών είναι η διάχυση. Στις «αντιστρεπτές αντιδράσεις» (reversible systems), η διαδικασία μεταφοράς του φορτίου είναι αντιστρεπτή, που σημαίνει ότι η τελευταία είναι πολύ ταχύτερη από το φαινόμενο της διάχυσης και έτσι η κινητική της αντίδρασης ελέγχεται από τη διάχυση [Mabbott, 1983 – Kissinger, 1983]. Στα «ημι-αντιστρεπτά» συστήματα (quasi-reversible systems), η ταχύτητα μεταφοράς φορτίου παίρνει ενδιάμεσες τιμές, οπότε η κινητική της αντίδρασης ελέγχεται, εκτός από τη διάχυση και από τη διαδικασία μεταφοράς φορτίου. Τέλος στα «μη-αντιστρεπτά συστήματα» (irreversible systems), η ταχύτητα μεταφοράς φορτίου είναι πολύ μικρή [van Benschoten, 1983 – Evans, 1983 – Nicholson, 1964, 1965]. Ας θεωρήσουμε την περίπτωση μίας ουσίας που οξειδοανάγεται αντιστρεπτά και της οποίας το κυκλικό βολταμμογράφημα απεικονίζεται στο Σχήμα 1.8. Υποθέτουμε ότι αρχικά στο διάλυμα υπάρχει η ηλεκτρενεργός ουσία μόνο στην ανηγμένη της μορφή (Red).<sup>1</sup>





Σχήμα 1.8: Κυκλικό βολταμμογράφημα αντιστρεπτής ηλεκτροχημικής αντίδρασης.

Η σάρωση στην ανοδική περιοχή ξεκινά από ένα δυναμικό αρκετά μικρότερο από το τυπικό δυναμικό  $E^{\circ}$  του αντιστρεπτού οξειδοαναγωγικού συστήματος. Εκείνο που παρατηρείται είναι η διέλευση ενός μικρού ρεύματος υποβάθρου. Καθώς η σάρωση προχωρεί σε πιο θετικά δυναμικά, η συγκέντρωση της ανηγμένης μορφής κοντά στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου αρχίζει να μειώνεται λόγω της οξείδωσης με αποτέλεσμα να εμφανίζεται το ρεύμα οξείδωσης  $I_{pa}$ . Έτσι, έχουμε διάχυση μορίων Red από την κύρια μάζα του διαλύματος προς την επιφάνεια του ηλεκτροδίου.

Όταν το δυναμικό λάβει την τιμή  $E_{pa}$ , τότε η συγκέντρωση των Red τείνει στο μηδέν, ενώ των μορίων που πλέον βρίσκονται στην οξειδωμένη μορφή (Ox) είναι μέγιστη και το ρεύμα κορυφής αποκτά μία μέγιστη τιμή. Παρόλο που το φαινόμενο εκείνη τη στιγμή καθορίζεται μόνο από τις συνθήκες της διάχυσης και όχι από την περαιτέρω αύξηση του δυναμικού, εντούτοις, η αύξηση του πάχους της διάχυτης στιβάδας έχει σαν αποτέλεσμα να ελαττώνεται η ταχύτητα διάχυσης του Red προς την επιφάνεια του ηλεκτροδίου και έτσι έχουμε την ελάττωση του ρεύματος κορυφής.

Κατά την αντίθετη φορά σάρωσης, έχουμε ακριβώς το αντίστροφο φαινόμενο της αναγωγής των Ox σε Red, που συνεπάγεται την εμφάνιση του καθοδικού ρεύματος κορυφής  $I_{pc}$ . Αυτό λαμβάνει την μέγιστη τιμή σε ένα δυναμικό  $E_{pc}$ . Το «ρεύμα κορυφής» (peak current) και το «δυναμικό κορυφής» (peak potential) αποτελούν χαρακτηριστικά μεγέθη ενός βολταμμογραφήματος. Η τιμή του δυναμικού, όπου έχουμε αλλαγή της φοράς σάρωσης, ονομάζεται «δυναμικό επιστροφής» (switching potential).

Σύμφωνα με τους Kissinger και Heineman [Kissinger, 1983] το τυπικό δυναμικό  $E^{\circ}$  μίας αντιστρεπτής ηλεκτροχημικής αντίδρασης, δίνεται από τη σχέση:

$$E^{\circ} = (E_{pa} + E_{pc}) / 2 \quad (1.6)$$

ενώ μεγάλη σημασία έχει και η διαφορά των δυναμικών κορυφής  $\Delta E_p$  που παρέχεται από τη σχέση:

$$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} = 0,059/n \quad (1.7)$$

Η μαθηματική εξίσωση (1.7) αποτελεί ένα από τα κριτήρια αντιστρεπτότητας και είναι φανερό ότι μπορεί κανείς να τη χρησιμοποιήσει για να υπολογίσει τον αριθμό  $n$  των ηλεκτρονίων που συμμετέχουν στην αντίδραση μεταφοράς φορτίου.

Αντίστοιχα το ρεύμα κορυφής  $I_p$  για ένα αντιστρεπτό ηλεκτροχημικό σύστημα, δίνεται από την εξίσωση Randles – Sevcik:

$$I_p = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} A D^{1/2} C v^{1/2} \quad (1.8)$$

όπου:

$I_p$  = το ρεύμα κορυφής (A),

$n$  = ο αριθμός των ηλεκτρονίων που συμμετέχουν στην αντίδραση,

$A$  = το εμβαδόν της επιφάνειας του ηλεκτροδίου ( $\text{cm}^2$ ),

$D$  = ο συντελεστής διάχυσης του ηλεκτρενεργού συστατικού ( $\text{cm}^2/\text{s}$ ),

$C$  = η μοριακή συγκέντρωση του ηλεκτρενεργού συστατικού ( $\text{mol}/\text{cm}^3$ ) και

$v$  = η ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού (V/s).



Από τη σχέση (1.8) είναι φανερό ότι στην περίπτωση που η συγκέντρωση της ηλεκτρενεργού ουσίας στην κύρια μάζα του διαλύματος είναι σταθερή, τότε η τιμή τού ρεύματος είναι ευθέως ανάλογη προς την τετραγωνική ρίζα της ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού.

Επίσης, για τα αντιστρεπτά ηλεκτροχημικά συστήματα ισχύει ότι ο λόγος των ρευμάτων κορυφής ισούται με τη μονάδα, δηλαδή:

$$I_{pa} / I_{pc} = 1 \quad (1.9)$$

Τα μεγέθη  $\Delta E_p$  και  $I_{pa}/I_{pc}$ , αποτελούν σημαντικά κριτήρια αντιστρεπτότητας και δίνουν πληροφορίες για την παραπέρα διερεύνηση των μηχανισμών των ηλεκτροχημικών αντιδράσεων [Mabbott, 1983].

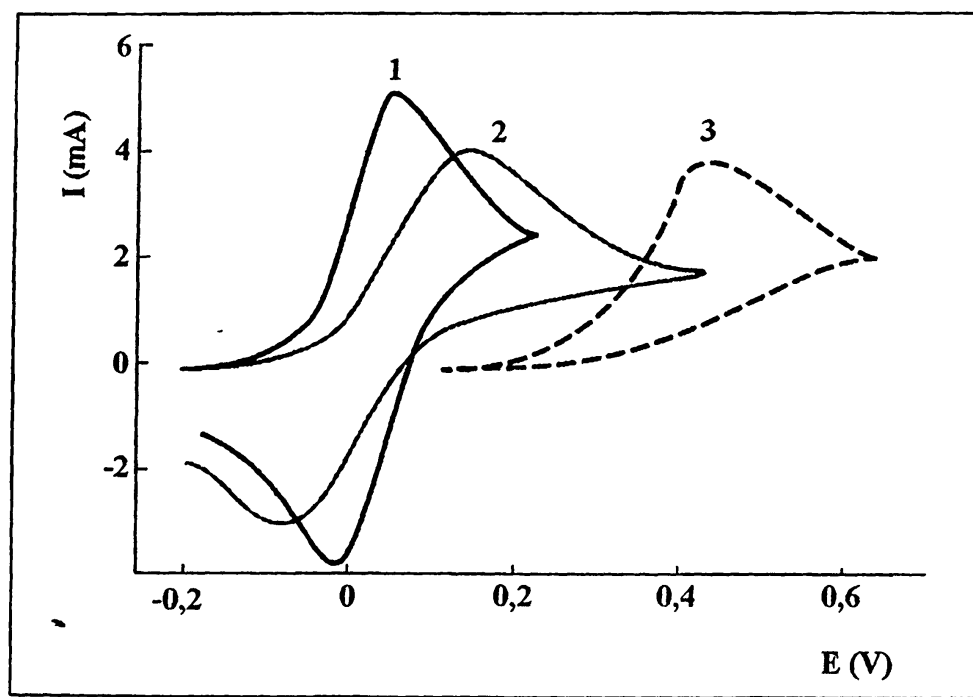
### 1.2.2.2. Παράγοντες που επηρεάζουν τη μορφή ενός βολταμμογραφήματος

Γενικά, η μορφή ενός βολταμμογραφήματος, επηρεάζεται σημαντικά: 1) από την ταχύτητα διεξαγωγής της ηλεκτροδιακής αντίδρασης ( $k^\circ$ ), 2) από την ταχύτητα σάρωσης ( $v$ ) του δυναμικού, 3) από τον παράγοντα διέλευσης ( $\alpha$ ) και 4) από το δυναμικό επιστροφής.

Η σταθερά ταχύτητας  $k^\circ$  καθορίζει αν η ηλεκτροχημική αντίδραση είναι αντιστρεπτή, ημι-αντιστρεπτή ή μη-αντιστρεπτή (Σχήμα 1.9). Οι ημι-αντιστρεπτές αντιδράσεις διεξάγονται σε τέτοιες ταχύτητες σάρωσης, ώστε το  $k^\circ$  να βρίσκεται μεταξύ των τιμών  $2 \times 10^{-5} v^{1/2}$  και  $0,3 v^{1/2}$ , ενώ για τις μη-αντιστρεπτές αντιδράσεις ισχύει ότι  $k^\circ \leq 2 \times 10^{-5} v^{1/2}$  [Mabbott, 1983].

Η αύξηση της ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού τείνει να αυξήσει τα ρεύματα κορυφής, ενώ όταν αυτή λαμβάνει πολύ μεγάλες τιμές έχει σαν αποτέλεσμα να παραμορφώνεται το βολταμμογράφημα. Στις αντιστρεπτές αντιδράσεις η διαφορά των δυναμικών κορυφής δεν επηρεάζεται από τη ταχύτητα σάρωσης, στις ημι-αντιστρεπτές όμως και μη-αντιστρεπτές αντιδράσεις η αύξησή της οδηγεί σε αντίστοιχη αύξηση του  $\Delta E_p$ . Στην περίπτωση των ημι-αντιστρεπτών αντιδράσεων η τιμή του  $\Delta E_p$  σχεδόν πλησιάζει εκείνη της αντίστοιχης αντιστρεπτής συμπεριφοράς για μικρές ταχύτητες σάρωσης, ενώ τείνει προς την μη-αντιστρεπτή συμπεριφορά για μεγάλες τιμές  $v$ .





**Σχήμα 1.9:** Βολταμμογραφήματα: (1) αντιστρεπτής ( $k^{\circ} = 1 \text{ s}^{-1}$ ), (2) ημι-αντιστρεπτής ( $k^{\circ} = 1,25 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ) και (3) μη-αντιστρεπτής ( $k^{\circ} = 6,25 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ ) ηλεκτροχημικής αντίδρασης (ταχύτητα σάρωσης  $\nu = 1000 \text{ mV s}^{-1}$ , παράγοντας διέλευσης  $\alpha = 0,5$ ).

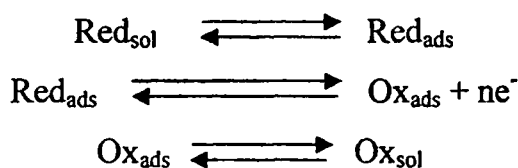
Ο «παράγοντας διέλευσης (φορτίου)  $\alpha$ » (charge transfer factor), λαμβάνει τιμές  $0 < \alpha < 1$  και η τιμή του εξαρτάται από τη συμμετρία του ανοδικού και καθοδικού ρεύματος, γι' αυτό και ονομάζεται και «παράγοντας συμμετρίας» (symmetry factor). Στις αντιστρεπτές αντιδράσεις και για ενδιάμεσες τιμές ταχύτητας σάρωσης, πρακτικά δεν επιδρά στη μορφή και τα χαρακτηριστικά του βολταμμογραφήματος. Αντιθέτως, έχει σημαντική επίδραση στις ημι-αντιστρεπτές και μη-αντιστρεπτές αντιδράσεις και ιδιαίτερα για πολύ υψηλές τιμές ταχύτητας σάρωσης [Μουμτζής, 1997]. Τέλος, το δυναμικό επιστροφής καθορίζει την τιμή του ρεύματος κορυφής της ηλεκτροδιακής δράσης που διεξάγεται μετά την αντιστροφή της φοράς σάρωσης. Όσο μεγαλύτερο είναι, σε απόλυτες τιμές, τόσο πιο συμμετρικό είναι το αντίστοιχο βολταμμογράφημα.

### 1.2.2.3. Ηλεκτροχημική συμπεριφορά ηλεκτρενεργού ουσίας, προσροφημένης στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου

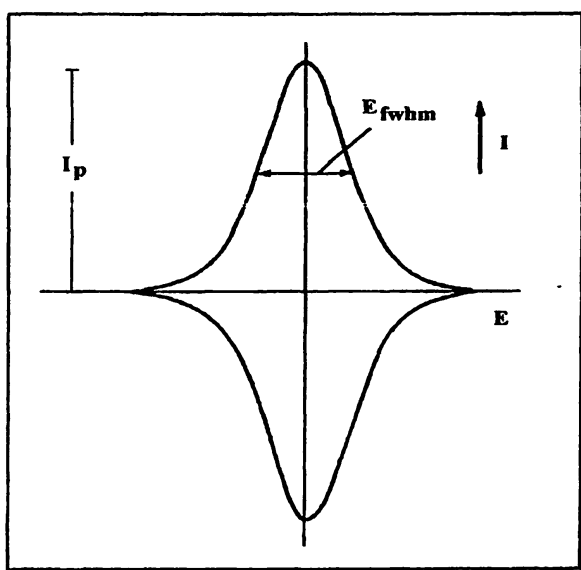
Η μελέτη της ηλεκτροχημικής συμπεριφοράς ηλεκτρενεργών ουσιών, οι οποίες είναι ισχυρά προσροφημένες πάνω στην επιφάνεια των ηλεκτροδίων σχηματίζοντας

μονομοριακές στιβάδες, χρήζει ιδιαίτερης αναφοράς, καθώς τα τελευταία 20 χρόνια το ενδιαφέρον για την κατασκευή τέτοιου είδους ηλεκτροχημικών αισθητήρων συνεχώς αυξάνεται με εκτεταμένες εφαρμογές τόσο στη Χημεία όσο και σε άλλους επιστημονικούς κλάδους όπως η Ιατρική [Wring, 1992].

Έστω ότι στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου υπάρχει ισχυρά προσροφημένη η ανηγμένη μορφή ( $\text{Red}_{\text{ads}}$ ) του ηλεκτροδραστικού συστατικού. Υπό την προϋπόθεση ότι η ουσία σχηματίζει στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου μονομοριακό στρώμα και ότι η προσρόφηση γίνεται με βάση την ισόθερμο Langmuir (απουσία αλληλεπιδράσεων μεταξύ των προσροφημένων σωματιδίων), ο γενικός μηχανισμός μελέτης αναφέρεται σε μία αντιστρεπτή οξειδοαναγωγική αντίδραση, όπου η προσροφημένη μορφή  $\text{Red}_{\text{ads}}$  βρίσκεται σε ισορροπία με την αντίστοιχη διαλυτή  $\text{Red}_{\text{sol}}$  μορφή:



Η ταχύτητα του φαινομένου προσρόφηση – εκρόφηση θεωρείται πολύ μεγάλη σε σχέση με την ταχύτητα μεταφοράς μάζας λόγω διάχυσης, ώστε η συνεισφορά της τελευταίας να είναι αμελητέα.



**Σχήμα 1.10:** Κυκλικό βολταμμογράφημα αντιστρεπτής οξείδωσης της Red-μορφής, ισχυρά προσροφημένης στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, με βάση την ισόθερμη Langmuir.

Σε αυτή την περίπτωση, λοιπόν, το κυκλικό βολταμμογράφημα ενός ισχυρά προσροφημένου ηλεκτροδραστικού συστατικού στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου παρουσιάζει σημαντικές διαφορές σε σχέση με εκείνο όπου δεν έχουμε προσρόφηση του συστατικού. Στο Σχήμα 1.10 είναι φανερό ότι η ανοδική με την καθοδική κορυφή ρεύματος έχουν σχέση ειδώλου – αντικειμένου. Το ρεύμα κορυφής δίνεται από την εξίσωση ροφητικού ρεύματος κορυφής:

$$I_p = (n^2 F^2 A \Gamma v) / 4 R T \quad (1.10)$$

όπου  $I_p$  = το ρεύμα κορυφής (A),  $n$  = ο αριθμός των ηλεκτρονίων που συμμετέχουν στην αντίδραση,  $F$  = η σταθερά Faraday ( $96485,38 \text{ C eq}^{-1}$ ),  $A$  = το εμβαδό της επιφάνειας του ηλεκτροδίου ( $\text{cm}^2$ ),  $\Gamma$  = η επιφανειακή συγκέντρωση του ηλεκτρενεργού συστατικού ( $\text{nmol cm}^{-2}$ ),  $v$  = η ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού ( $\text{V s}^{-1}$ ),  $R$  = η παγκόσμια σταθερά των αερίων ( $8,314 \text{ V C K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ) και  $T$  = η απόλυτη θερμοκρασία (K).

Από την μαθηματική εξίσωση (1.10) φαίνεται ότι το «ροφητικό ρεύμα κορυφής» (sorption peak – current), είναι ανάλογο προς την ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού ( $v$ ) σε αντίθεση με αυτό που ισχύει στην περίπτωση που δεν έχουμε προσρόφηση της ηλεκτρενεργού ουσίας.

Επίσης, για μικρές τιμές ταχύτητας σάρωσης ( $1-5 \text{ mV s}^{-1}$ ) το ανοδικό και το καθοδικό δυναμικό κορυφής συμπίπτουν, κατά απόλυτη τιμή, με το τυπικό δυναμικό  $E^0$  ( $\Delta E_p = 0$ ) ενώ το «πλάτος κορυφής στο μισό του ύψους» (full width half maximum-  $E_{fwhm}$ ,  $25^\circ\text{C}$ ) δίνεται από τη σχέση:

$$E_{fwhm} = (90,6 / n) \text{ mV} \quad (1.11)$$

Το διερχόμενο κατά την ανοδική ή την καθοδική σάρωση ηλεκτρικό φορτίο  $Q$  δίνεται από τη σχέση:

$$Q = n F A \Gamma \quad (1.12)$$



Το φορτίο υπολογίζεται από το εμβαδόν του τμήματος που περικλείεται από την ανοδική ή καθοδική καμπύλη και τον άξονα μηδενικού ρεύματος [Wang, 1994<sup>1</sup> – Μουμτζής, 1997 – Bard, 1980].

#### 1.2.2.4. Κυκλοβολταμετρική συμπεριφορά ηλεκτρενεργής ουσίας με πολλά ενεργά κέντρα

Εάν ανατρέξει κανείς στη διεθνή βιβλιογραφία θα συναντήσει ένα μεγάλο πλήθος εργασιών με ηλεκτρενεργές ουσίες που εμφανίζουν ένα μόνο ζεύγος κορυφών [Florou, 1998 – Prodromidis, 2000]. Αντίθετα, από τους ερευνητές έχει δοθεί πολύ λιγότερη προσοχή στη μελέτη ηλεκτροχημικών συστημάτων, όπου λαμβάνει χώρα μεταφορά φορτίου σε περισσότερα από ένα στάδια [Stergiou, 2004].

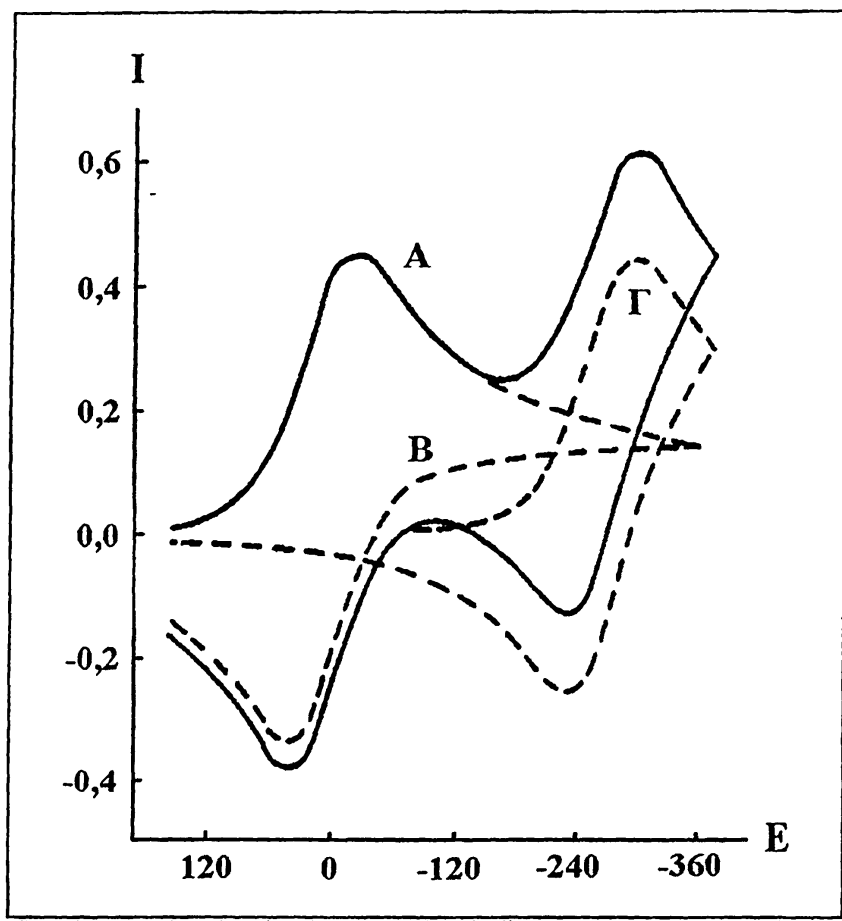
Ας θεωρήσουμε ένα τέτοιο σύστημα πολλών ενεργών κέντρων, το οποίο μπορεί να περιγραφεί ως ακολούθως:



όπου τα A και B είναι ηλεκτροδραστικά συστατικά και  $n_1$  και  $n_2$  είναι ο αριθμός των ηλεκτρονίων που συμμετέχουν στα διαδοχικά στάδια της ηλεκτροχημικής αντίδρασης. Εάν τα A και B αντιδρούν σε δυναμικά που έχουν σαφή διαφορά μεταξύ τους και παράλληλα το A είναι πιο ευανάγωγο σε σχέση με το B, τότε το κυκλικό βολταμμογράφημα έχει τη μορφή του Σχήματος 1.11 και αποτελείται από δύο διακριτά ζεύγη κορυφών, εκ των οποίων το πρώτο αντιπροσωπεύει την αναγωγή του A σε B. Το παραγόμενο συστατικό B διαχέεται στο διάλυμα και καθώς το εφαρμοζόμενο δυναμικό παίρνει όλο και πιο αρνητικές τιμές ανάγεται και αυτό με τη σειρά του, δίνοντας το συστατικό Γ. Οι διακεκομμένες γραμμές αντιπροσωπεύουν τις καμπύλες ρεύματος – δυναμικού που θα λαμβάνονταν, εάν είχαμε τα συστατικά B και Γ μεμονωμένα και σε καθαρή μορφή. Έτσι, είναι φανερό ότι το συνολικό βολταμμογράφημα προέρχεται από επικάλυψη των επιμέρους βολταμμογραφημάτων όλων των ηλεκτροδραστικών συστατικών. Θα πρέπει, επίσης, να τονίσουμε ότι η εμφάνιση ή όχι των διαδοχικών κορυφών εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από την ευκολία με την οποία διεξάγεται η



οξειδοαναγωγική αντίδραση καθώς και από την επιλογή των κατάλληλων συνθηκών του πειράματος, όπως το παράθυρο δυναμικού που θα σαρωθεί κ.α [Polcyn, 1966].



Σχήμα 1.11: Κυκλικό βολταμμογράφημα ενός ηλεκτρενεργού συστατικού πολλαπλών ενεργών κέντρων.

### 1.2.3 Φασματοσκοπία Ηλεκτροχημικής Εμπέδησης (Φ.Η.Ε.) - (Electrochemical Impedance Spectroscopy, EIS)

Η Φασματοσκοπία Ηλεκτροχημικής Εμπέδησης (Φ.Η.Ε.) αποτελεί μία τεχνική, η οποία είναι κατάλληλη για τη διερεύνηση των ηλεκτρικών ιδιοτήτων της κύριας μάζας και της διεπιφάνειας τόσο ενός στερεού όσο και ενός υγρού υλικού, το οποίο βρίσκεται σε επαφή με κάποιο ηλεκτροχημικό μεταλλάκτη [Bard, 1980]. Αποτελεί μία τεχνική, η οποία την τελευταία κυρίως δεκαετία έχει βρει αρκετές εφαρμογές, όπως η μελέτη της διάβρωσης μεταλλικών επιφανειών [Armstrong, 1995 – Domingues, 2002], η αποϊκόδομηση πολυμερών επικαλύψεων [McNeil, 1995], η ανάπτυξη εμπυεδησιομετρικών (βιο)αισθητήρων [Berggren, 2001 – Sánchez, 2005], η μελέτη

ημιαγωγίων υλικών [Gervasi, 2005], και τέλος η ανάπτυξη συσσωρευτών ενέργειας [Cha, 1997] και κελιών καύσης (fuel cells) [Easton, 2005 – Selman, 1993]. Είναι μη καταστρεπτική ηλεκτροαναλυτική τεχνική, η οποία δεν απαιτεί ιδιαίτερα πολύπλοκες και ακριβές μετρητικές διατάξεις, καθιστώντας την έτσι εύχρηστη και εύκολα εφαρμόσιμη τόσο σε εργαστηριακή ερευνητική κλίμακα όσο και βιομηχανική [McDonald, 1987].

### 1.2.3.1. Αρχή της μεθόδου

Η Φασματοσκοπία Εμπέδησης βασίζεται στη διαταραχή ενός συστήματος, που βρίσκεται σε ισορροπία ή στατική κατάσταση, με την εφαρμογή ενός ημιτονικού σήματος και την ταυτόχρονη καταγραφή της χρονικής ή συχνοτικής εξέλιξης του υπό μελέτη συστήματος, π.χ. η μέτρηση του εναλλασσομένου ρεύματος που διαρρέει ένα ηλεκτροχημικό σύστημα έπειτα από τη εφαρμογή μίας εναλλασσόμενης τάσης, ως συνάρτηση της συχνότητας.

Σύμφωνα με το νόμο του Ohm, όταν σε μία αντίσταση  $R$  (Ohm,  $\Omega$ ) εφαρμοστεί μία συνεχής τάση  $V$  (Volt, V) (συχνότητα διέγερσης 0 Hz), τότε ο αγωγός διαρρέεται από ένα συνεχές ρεύμα έντασης  $I$  (Ampere, A), το οποίο δίνεται από την ακόλουθη σχέση:

$$I = V / R \quad (1.13)$$

Ενώ, λοιπόν, σε ένα ηλεκτρικό κύκλωμα συνεχούς ρεύματος η μόνη αντίσταση που συναντούν τα κινούμενα ηλεκτρόνια οφείλεται στην ωμική αντίσταση του αγωγού, στην περίπτωση του εναλλασσομένου ρεύματος, η αντίσταση του κυκλώματος εκφράζεται από την εμπέδηση (impedance)  $Z$ .

Η εμπέδηση εκφράζει τη συνολική αντίσταση του ηλεκτρικού ρεύματος καθώς αυτό διαρρέει το κύκλωμα, το οποίο μπορεί να περιλαμβάνει εκτός από ωμικές αντιστάσεις ή/και πηνία ή/και πυκνωτές, δίνεται δε από σχέση ανάλογη με το νόμο του Ohm, ύστερα από τον κατάλληλο μετασχηματισμό:

$$Z = V_{(t)} / I_{(t)} \quad (1.14)$$



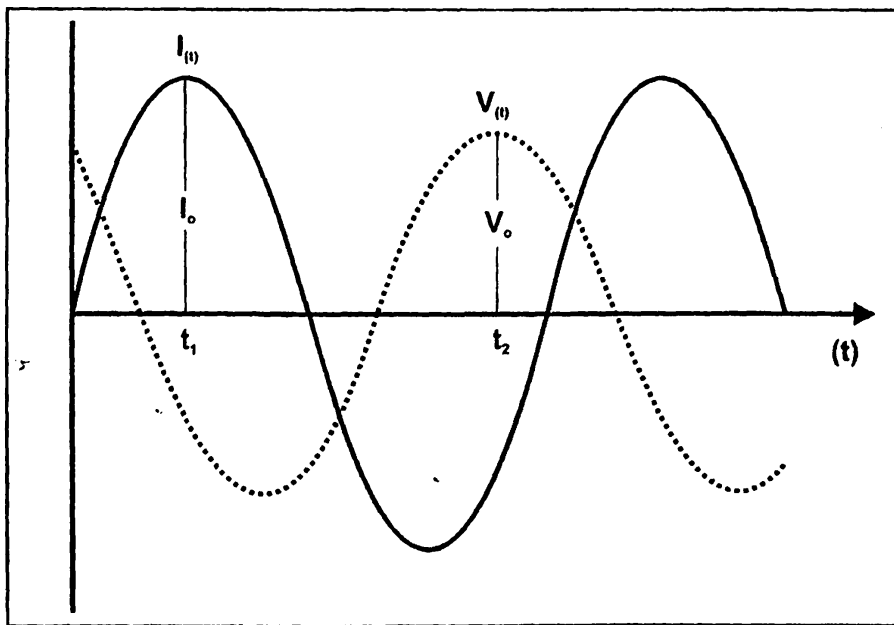
Η εμπέδηση  $Z$  μετρείται σε ohm ( $\Omega$ ) ενώ τα  $V_{(t)}$  (Volt, V) και  $I_{(t)}$  (Ampere, A) είναι οι στιγμιαίες τιμές της εναλλασσόμενης τάσης και του εναλλασσομένου ρεύματος αντίστοιχα, και δίνονται από τις ακόλουθες μαθηματικές σχέσεις:

$$V_{(t)} = V_0 \eta\mu(\omega t) \quad (1.15)$$

$$I_{(t)} = I_0 \eta\mu(\omega t + \theta) \quad (1.16)$$

όπου:  $V_0$  = η μέγιστη τιμή ή πλάτος της τάσης,  $I_0$  = η μέγιστη τιμή ή πλάτος του ρεύματος,  $\omega$  = η κυκλική συχνότητα και  $\theta$  = η μεταβολή στη γωνία φάσης ή διαφορά φάσης (rad). Η κυκλική συχνότητα  $\omega$  συνδέεται με τη συχνότητα  $f$  (Hz) μέσω της σχέσης  $\omega = 2\pi f$ .

Οι κυματομορφές διέγερσης τις περισσότερες φορές είναι μικρής σχετικά έντασης (συνήθως της τάξης των 5 – 10 mV), έτσι ώστε η απόκριση του συστήματος να θεωρείται γραμμική και ο ρυθμός αποκατάστασής (αποδιέγερσής) του να είναι ανάλογος της εφαρμοζόμενης εξωτερικά διαταραχής [Sánchez, 2005 – McDonald, 1987]. Λόγω της διαφοράς φάσης μεταξύ των δύο κυματομορφών αυτές εμφανίζουν μέγιστο ( $I_0$  και  $V_0$ ) σε διαφορετικές χρονικές στιγμές ( $t_1$  και  $t_2$ , αντίστοιχα) (Σχήμα 1.12).



Σχήμα 1.12: Γραφική απεικόνιση των στιγμιαίων τιμών εναλλασσομένου ρεύματος  $I_{(t)}$  και τάσης  $V_{(t)}$  σε συνάρτηση με το χρόνο.

Αυτό που έχει σημασία σε ένα κύκλωμα εναλλασσομένου ρεύματος είναι η μέση τιμή του ρεύματος, η οποία ονομάζεται τιμή rms (root mean square,  $I_{\text{rms}}$ ) της έντασης του ρεύματος ή ενεργός ένταση ρεύματος ( $I_{\text{εν}}$ ). Ο όρος rms σημαίνει απλά ότι παίρνουμε την τετραγωνική ρίζα της μέσης τιμής του τετραγώνου του ρεύματος και συνδέεται με τη μέγιστη τιμή  $I_0$  με τη σχέση 1.17:

$$I_{\text{rms}} = I_0 / \sqrt{2} = 0,707 I_0 \quad (1.17)$$

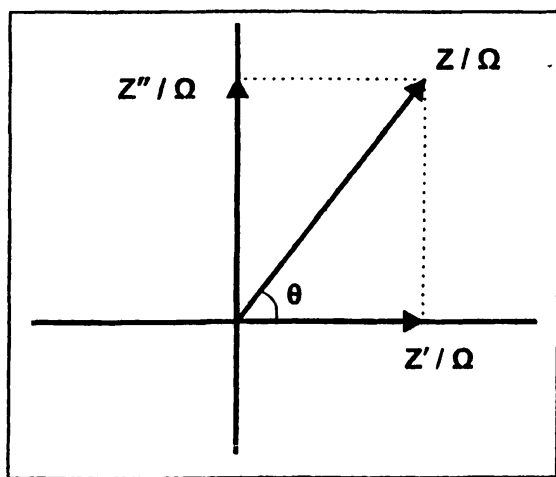
Παρόμοια σχέση (1.18) ισχύει και για τη εναλλασσόμενη τάση, όπου έχουμε την τάση rms ( $V_{\text{rms}}$ ) ή ενεργό τάση ( $V_{\text{εν}}$ ) [Serway, 1990]:

$$V_{\text{rms}} = V_0 / \sqrt{2} = 0,707 V_0 \quad (1.18)$$

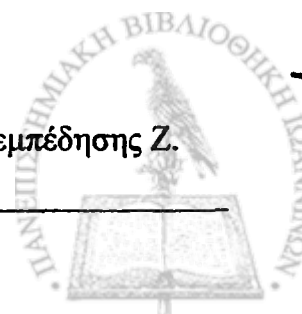
Πρέπει να αναφέρουμε ότι η εμπέδηση  $Z$  είναι διανυσματικό μέγεθος (Σχήμα 1.13) και εκφράζεται ως μιγαδική ποσότητα κατά την ανάλυση σύνθετων κυκλωμάτων εναλλασσομένου ρεύματος. Το πραγματικό μέρος ( $Z_r$  ή  $Z'$ -in phase) αντιπροσωπεύει την ωμική αντίσταση του κυκλώματος ενώ το φανταστικό μέρος ( $Z_i$  ή  $-Z''$ -out of phase) εκφράζει το συνδυασμό χωρητικής και επαγωγικής αντίστασης, δίνεται δε από τη σχέση 1.19 [Park, 2003]:

$$Z = Z' + j Z'' \quad (1.19)$$

όπου  $j$  = η φανταστική μονάδα, με την ιδιότητα  $j^2 = -1$ .



Σχήμα 1.13: Γραφική απεικόνιση της διανυσματικής ανάλυσης της εμπέδησης  $Z$ .





Το μέτρο του διανύσματος της εμπέδησης  $Z$  δίνεται από τη σχέση 1.20:

$$|Z| = \sqrt{Z'^2 + Z''^2} \quad (1.20)$$

και η γωνία  $\theta$  εκφράζει τη διαφορά φάσης μεταξύ ρεύματος και τάσης, ισχύει δε:  $\tan(\theta) = Z'' / Z'$ .

Όπως προαναφέρθηκε, η εμπέδηση εκφράζει τη συνολική αντίσταση του ηλεκτρικού ρεύματος καθώς αυτό διαρρέει το κύκλωμα, εξαιτίας των αντιστάσεων, των πυκνωτών και των πηνίων που τυχόν υπάρχουν στο ηλεκτρικό κύκλωμα. Η ύπαρξη πυκνωτών και πηνίων επηρεάζει τα χαρακτηριστικά και την ένταση του εναλλασσομένου ρεύματος, τα οποία εξαρτώνται από το χρόνο ή/και τη φάση. Όταν κυρίαρχη αντίσταση είναι η χωρητική τότε το ρεύμα προηγείται σε φάση του δυναμικού, ενώ όταν κυριαρχεί η επαγωγική αντίσταση το ρεύμα υστερεί σε φάση έναντι του δυναμικού. Στην περίπτωση της ωμική αντίστασης, το φανταστικό μέρος της εμπέδησης είναι μηδενικό, οπότε το ρεύμα και η φάση είναι συμφασικά ή λέμε ότι βρίσκονται σε συμφωνία φάσης ( $\theta = 0^\circ$ ) [Serway, 1990].


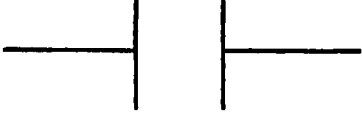
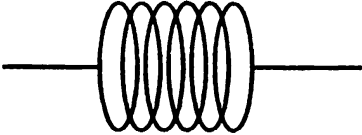
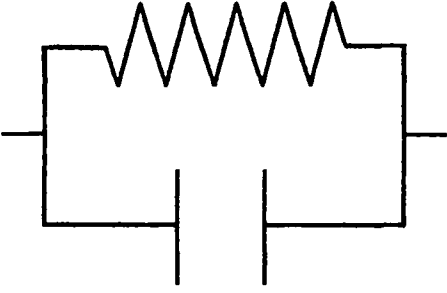
Στον πίνακα 1.2 συνοψίζονται τα χαρακτηριστικά απλά στοιχεία κυκλωμάτων με τις αντίστοιχες εξισώσεις εμπέδησης. Είναι φανερό και από τον πίνακα 1.2 ότι ο υπολογισμός της εμπέδησης σε ένα κύκλωμα προκύπτει από το συνδυασμό της εμπέδησης των επιμέρους στοιχείων του κυκλώματος. Έτσι, όταν δύο στοιχεία βρίσκονται συνδεδεμένα σε σειρά η ολική εμπέδηση θα ισούται με το άθροισμα των επιμέρους τιμών (σχέση 1.21) ενώ όταν η συνδεσμολογία τους είναι παράλληλη η ολική εμπέδηση ισούται με το άθροισμα των αντίστροφων των επιμέρους τιμών (σχέση 1.22) [Princeton, 1992].

$$Z_{O\Lambda} = Z_1 + Z_2 + \dots + Z_n \quad (1.21)$$

$$\frac{1}{Z_{O\Lambda}} = \frac{1}{Z_1} + \frac{1}{Z_2} + \dots + \frac{1}{Z_n} \quad (1.22)$$



Πίνακας 1.2: Στοιχεία κυκλωμάτων και εξισώσεις εμπέδησης.

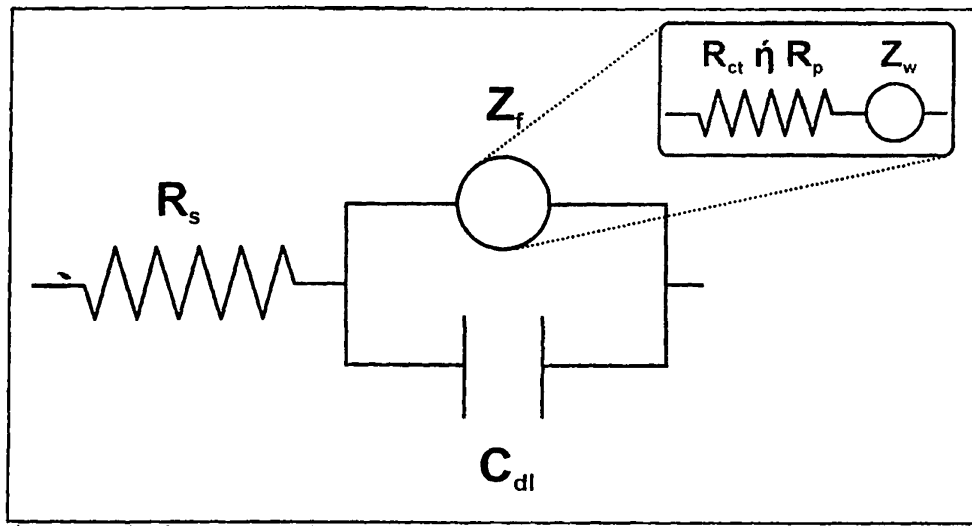
| ΣΤΟΙΧΕΙΟ ΚΥΚΛΩΜΑΤΟΣ  | ΕΞΙΣΩΣΗ ΕΜΠΕΔΗΣΗΣ   |                   |
|--|---|-------------------|
|   | $Z = R + 0j$  | $j = \sqrt{-1}$   |
|   | $Z = 0 - j / (\omega C)$  | $\omega = 2\pi f$ |
|   | $Z = 0 + j \omega L$  | $\omega = 2\pi f$ |
|  | $Z = \frac{R}{1 + \omega^2 C^2 R^2} - \frac{j\omega C R^2}{1 + \omega^2 C^2 R^2}$ |                   |

### 1.2.3.2. Το κύκλωμα Randles

Το κύκλωμα Randles (Randles circuit) αποτελεί το πιο διαδεδομένο μοντέλο ανάλυσης ηλεκτροχημικών διεργασιών, οι οποίες λαμβάνουν χώρα στη διεπιφάνεια ηλεκτροδίου-ηλεκτρολύτη, παρέχει δε τη δυνατότητα υπολογισμού των τιμών των επιμέρους στοιχείων του κυκλώματος κάνοντας προσεγγίσεις με πολύ γνωστές φυσικές διεργασίες, όπως η προσρόφηση ή απόθεση υμενίων.

Όπως απεικονίζεται και στο Σχήμα 1.14 αποτελείται από την ωμική αντίσταση ( $R_s$ ), που εκφράζει την ωμική αντίσταση του διαλύματος στο χώρο μεταξύ ηλεκτροδίου εργασίας και ηλεκτροδίου αναφοράς, και η οποία βρίσκεται συνδεδεμένη σε σειρά με ένα σύστημα παράλληλης σύνδεσης ενός πυκνωτή χωρητικότητας ( $C_{dl}$ ) και μίας αντίστασης εμπέδησης ( $Z_f$ ). Ο όρος  $Z_f$  εκφράζει τη φαρανταϊκή εμπέδηση, που οφείλεται στη διαδικασία μεταφοράς φορτίου στη διεπιφάνεια ηλεκτροδίου-ηλεκτρολύτη ( $R_{ct}$ , αντίσταση μεταφοράς φορτίου) ή στην περίπτωση που δεν υπάρχει

κάποιο οξειδοαναγωγικό ζεύγος στην ηλεκτροχημική κυψελίδα, στην αντίσταση πόλωσης του ηλεκτροδίου ( $R_p$ ) και την εμπέδηση Warburg ( $Z_w$ ), που εκφράζει την επίδραση της μεταφοράς μάζας (διάχυση) των ηλεκτρενεργών σωματιδίων επί της συνολικής εμπέδησης του κυκλώματος. Ακόμα,  $C_{dl}$  είναι η χωρητικότητα της ηλεκτρικής διπλοστιβάδας [Gamry, 1994 – EcoChemie, 1992 – Sánchez, 2005].



Σχήμα 1.14: Απεικόνιση του κυκλώματος Randles.

Οι τιμές των  $R_p$  ή  $R_{ct}$  εκφράζουν ηλεκτρικές ιδιότητες (αγωγός, ημιαγωγός, μονωτής) μίας επικάλυψης επί της επιφάνειας του ηλεκτροδίου ή την ποσότητα του φαρανταϊκού ρεύματος που αναπτύσσεται όταν στο διάλυμα του ηλεκτρολύτη προστεθεί κάποιο οξειδοαναγωγικό ζεύγος (π.χ. μίγμα σιδηρο- και σιδηρικυανιούχων). Επίσης, από τις τιμές της  $C_{dl}$  μπορούμε να εξαγάγουμε χρήσιμα συμπεράσματα όχι μόνο για το πάχος της ηλεκτρικής διπλοστοιβάδας αλλά και για τη διαδικασία σχηματισμού υμενίων επί της επιφάνειας των ηλεκτροδίων, την ποιότητα και την ομοιογένειά τους καθώς και το ποσοστό κάλυψης της ενεργής επιφάνειας. Επίσης, είναι φανερό ότι η εμπέδηση  $Z_w$  υπερισχύει για διαδικασίες που καθορίζονται από τη διάχυση, ενώ η  $Z_f$  λαμβάνει την τιμή  $R_{ct}$  στις διαδικασίες που καθορίζονται από την μεταφορά φορτίου [Sánchez, 2005].

Αυτό που πρέπει να τονιστεί είναι ότι η συμπεριφορά του κυκλώματος Randles ποικίλει ανάλογα με την περιοχή και το εύρος των εφαρμοζόμενων συχνοτήτων. Όπως είναι ήδη γνωστό η χωρητικότητα ενός πυκνωτή μειώνεται καθώς η συχνότητα αυξάνεται (πίνακας 1.2), ενώ η εμπέδηση μίας αντίστασης παραμένει σταθερή. Έτσι,

σε υψηλές τιμές συχνοτήτων ο πυκνωτής συμπεριφέρεται σαν βραχυκύκλωμα, αφού η εμπέδησή του είναι αμελητέα και πολύ μικρότερη από την  $R_p$ , με την οποία είναι συνδεδεμένος παράλληλα. Σε ακόμα υψηλότερες συχνότητες η εμπέδηση του πυκνωτή γίνεται ακόμα μικρότερη σε σχέση με την  $R_s$ , με αποτέλεσμα η συμπεριφορά του κυκλώματος Randles να εξαρτάται από την  $R_s$ . Αντίθετα, στην περιοχή χαμηλών συχνοτήτων ο πυκνωτής λειτουργεί σαν διακόπτης και είναι σαν να μην υπάρχει στο κύκλωμα, οπότε η εμπέδηση του κυκλώματος είναι αποτέλεσμα του συνδυασμού των αντιστάσεων  $R_s$  και  $R_p$ .

Σε ορισμένες περιπτώσεις, όπου το κύκλωμα Randles χρησιμοποιείται για να περιγράψει το υπό μελέτη ηλεκτροχημικό σύστημα, η χωρητικότητα της ηλεκτρικής διπλοστιβάδας  $C_{dl}$  αντικαθίσταται από το στοιχείο σταθερής φάσης (Constant phase Element, CPE), το οποίο περιγράφεται από την παρακάτω μαθηματική εξίσωση:

$$\text{CPE} = (1/Q)^{-1} (j\omega)^{-n} \quad (1.23)$$

όπου  $j=(-1)^{1/2}$ . Το CPE αποτελείται από διακλαδιζόμενες ομάδες πυκνωτών και αντιστάσεων συνδεδεμένων άλλοτε σε σειρά και άλλοτε παράλληλα. Η χρήση του στοιχείου CPE οφείλεται στο γεγονός ότι η χωρητική συμπεριφορά της στιβάδας παρουσιάζει αποκλίσεις από εκείνη του ιδανικού πυκνωτή. Μέτρο της απόκλισης από την ιδανική συμπεριφορά αποτελεί η παράμετρος ( $n$ ), η οποία στην ιδανική περίπτωση λαμβάνει την τιμή 1, στην πραγματικότητα όμως οι τιμές που λαμβάνει κυμαίνονται στην περιοχή  $0,5 \leq n \leq 1,0$ . Οι παρατηρούμενες αποκλίσεις αποδίδονται στην ετερογένεια, την ανομοιομορφία και το πορώδες των εκάστοτε συστημάτων [Brett, 1993 – McDonald, 1987].

Αυτό που βγαίνει σαν συμπέρασμα είναι ότι το κύκλωμα Randles τόσο στις χαμηλές όσο και στις υψηλές συχνότητες συμπεριφέρεται ως αντίσταση. Το φανταστικό μέρος της εμπέδησης είναι πολύ μικρό, η γωνία  $\theta$  είναι περίπου μηδέν και η εμπέδηση δεν μεταβάλλεται με τη συχνότητα. Για ενδιάμεσες τιμές συχνοτήτων η εμπέδηση του πυκνωτή ασκεί κάποια σημαντική επίδραση και το κύκλωμα έχει χωρητική συμπεριφορά. Σε αυτή την περίπτωση το φανταστικό μέρος της εμπέδησης έχει μία τιμή, η γωνία  $\theta$  πλησιάζει τις  $90^\circ$  και η εμπέδηση του κυκλώματος εξαρτάται από την συχνότητα [Princeton, 1992].

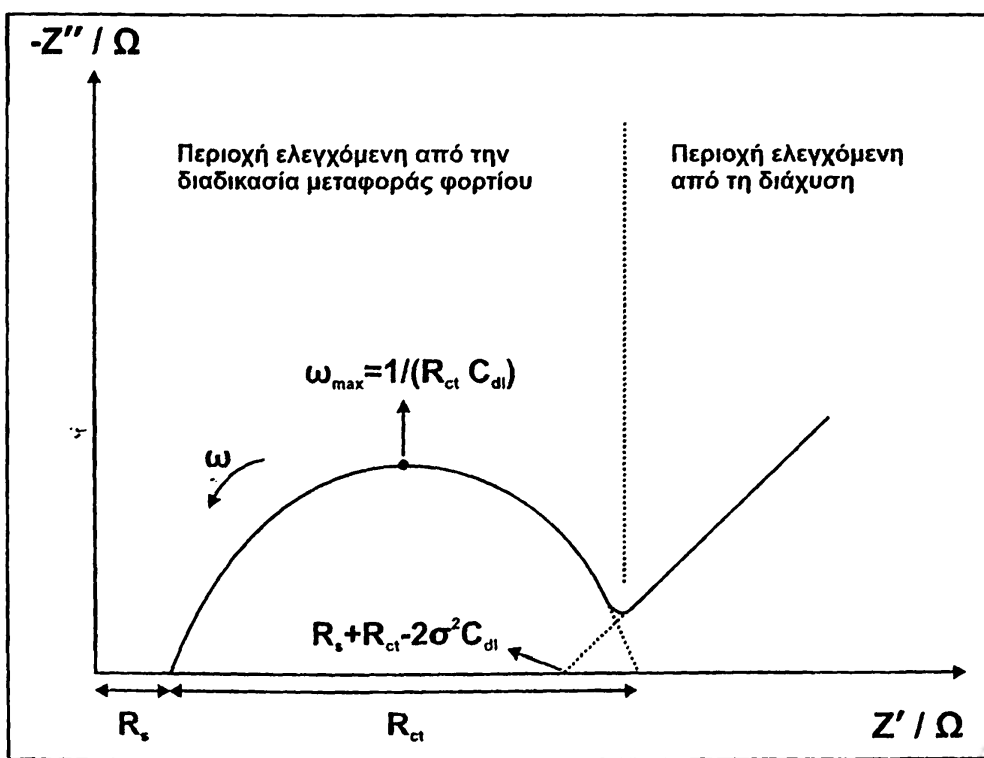
### 1.2.3.3. Διαγράμματα εμπέδησης

#### 1.2.3.3.1. Διάγραμμα Nyquist ή Cole-Cole

Το διάγραμμα Nyquist παριστάνει το πραγματικό μέρος ( $Z'$ ) της εμπέδησης ως προς το φανταστικό μέρος ( $-Z''$ ) για κάθε συχνότητα διέγερσης σε ένα εύρος, συνήθως, από 0,1 Hz μέχρι 100 kHz. Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 1.15, το διάγραμμα Nyquist για ένα κύκλωμα Randles αποτελείται από δύο περιοχές.

Η μία περιοχή, που περιέχει το ημικύκλιο περιλαμβάνει διαδικασίες που ελέγχονται από τη μεταφορά φορτίου. Το σημείο τομής του ημικυκλίου με το x-άξονα παρέχει την τιμή των  $R_s$  και  $R_s+R_{ct}$  ενώ από την τιμή της συχνότητας στο ανώτερο σημείο του ημικυκλίου, μπορεί να υπολογιστεί η σταθερά αποδιέγερσης ( $\tau$ ) του συστήματος.

Η δεύτερη περιοχή περιλαμβάνει διαδικασίες που ελέγχονται από τη διάχυση (ταχύτητα μεταφοράς μάζας) και αποτελείται από μία ευθεία γραμμή, που οφείλεται στην εμπέδηση Warburg ( $Z_w$ ) και η προέκταση της οποίας στον x-άξονα μας επιτρέπει να υπολογίσουμε το συντελεστή Warburg ( $\sigma$ ) και κατ' επέκταση το συντελεστή διάχυσης των σωματιδίων.



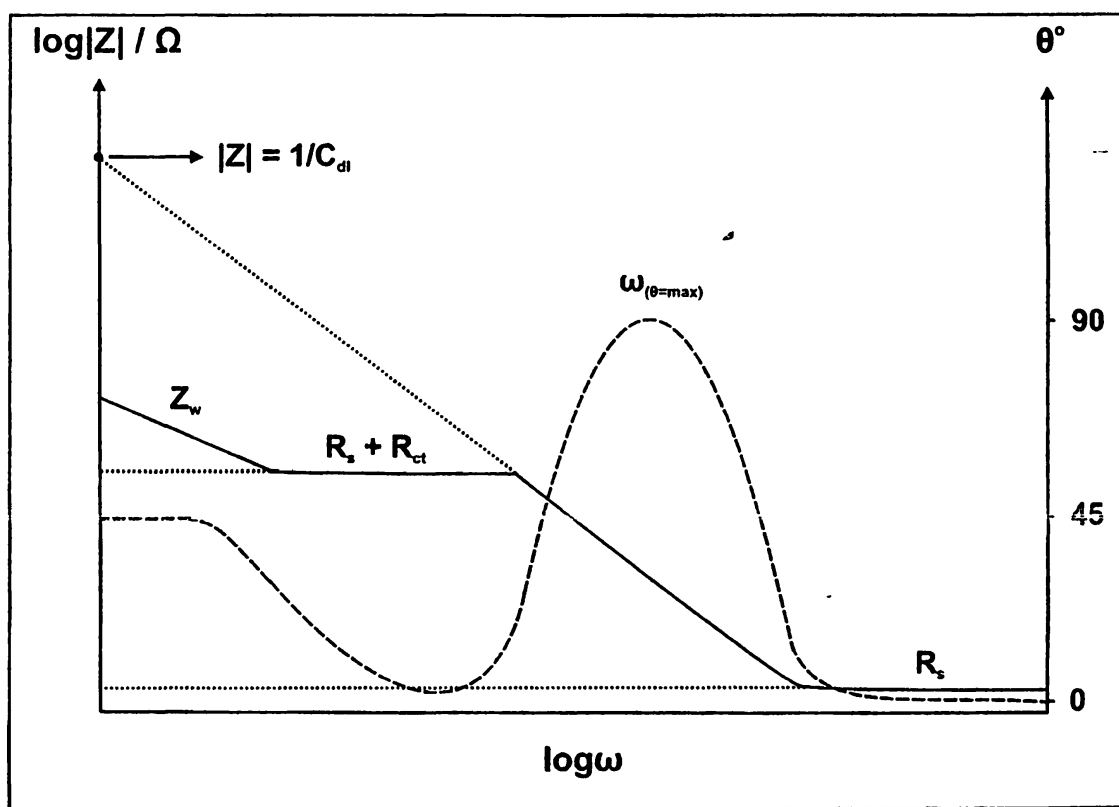
Σχήμα 1.15: Διάγραμμα Nyquist ενός κυκλώματος Randles.



Εκτός, όμως, από τα πλεονεκτήματα αυτά το διάγραμμα Nyquist έχει και κάποια σημαντικά μειονεκτήματα. Παρόλο που τα  $R_s$  και  $R_{ct}$  μπορούν εύκολα να υπολογιστούν, η χωρητικότητα του ηλεκτροδίου μπορεί να υπολογιστεί μόνο εφόσον είναι γνωστές οι συχνότητες. Ακόμα ένα άλλο μειονέκτημα είναι το γεγονός ότι στις υψηλές συχνότητες το διάγραμμα δεν παρέχει μεγάλη διακριτική ικανότητα εξαιτίας του ο γ-άξονας καθορίζεται από τις μεγάλες τιμές εμπέδησης στις χαμηλές συχνότητες [Sánchez, 2005 – McDonald, 1987].

### 1.2.3.3.2. Διάγραμμα Bode

Ένας άλλος τρόπος γραφικής απεικόνισης των δεδομένων της φασματοσκοπίας εμπέδησης είναι και το διάγραμμα Bode, στο οποίο παριστάνονται η φάση ( $\theta$ ) και ο λογάριθμος του μέτρου της εμπέδησης ( $\log|Z|$ ) ως συνάρτηση του λογαρίθμου των συχνοτήτων ( $\log\omega$ ).



Σχήμα 1.16: Διάγραμμα Bode ενός κυκλώματος Randles.

Τα διαγράμματα Bode έχουν κάποια πλεονεκτήματα σε σχέση με τα διαγράμματα Nyquist. Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 1.16 παρέχονται απευθείας πληροφορίες για τη

συχνότητα και τη φάση, οι οποίες βοηθούν στο να εξακριβωθούν οι διαφορετικές φάσεις των επιμέρους στοιχείων του κυκλώματος. Εξαιτίας της λογαριθμικής κλίμακας παρέχεται η δυνατότητα γραφικής απεικόνισης μεγάλους εύρους συχνοτήτων και η κάθε δεκάδα έχει την ίδια βαρύτητα στον x-άξονα. Το ίδιο ισχύει και για τον άξονα της εμπέδησης κάτι το οποίο είναι πολύ σημαντικό ειδικά στην περίπτωση που η εξάρτηση από τη συχνότητα είναι σημαντική, όπως συμβαίνει στην περίπτωση των πυκνωτών.

Στις πολύ υψηλές και πολύ χαμηλές συχνότητες, το κύκλωμα συμπεριφέρεται κυρίως σαν ωμική αντίσταση, γι' αυτό και η καμπύλη  $\log|Z| = f\{\log\omega\}$  έχει τη μορφή παράλληλης γραμμής ως προς τον άξονα  $\log\omega$ , ενώ η φάση  $\theta$  λαμβάνει τιμές περίπου μηδέν. Στις ενδιάμεσες συχνότητες το σύστημα έχει χωρητική συμπεριφορά και η καμπύλη είναι ευθεία γραμμή με κλίση  $-1$  και η φάση λαμβάνει τιμές που πλησιάζουν τις  $90^\circ$ . Το σημείο τομής της προέκτασης της ευθείας με τον άξονα  $\log|Z|$  για  $\log\omega = 0$  ( $f = 0,16$  Hz), μας δίνει τη δυνατότητα να υπολογίσουμε την  $C_{dl}$  από την ακόλουθη σχέση:

$$\boxed{|Z| = 1 / C_{dl}} \quad (1.24)$$

Φαινόμενα διάχυσης, που όπως προαναφέρθηκε εκφράζονται από την εμπέδηση Warburg ( $Z_w$ ), εμφανίζονται σαν ευθεία γραμμή με κλίση  $-1$  και  $\theta = 45^\circ$ . Από την καμπύλη  $\theta = f\{\log\omega\}$  στο σημείο που αυτή παρουσιάζει μέγιστο είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε την τιμή  $\omega_{(\theta=\max)}$ , δηλαδή τη συχνότητα εκείνη για την οποία η φάση  $\theta$  λαμβάνει τη μέγιστη τιμή της. Έτσι μπορούμε να υπολογίσουμε εναλλακτικά την τιμή της  $C_{dl}$  από τη σχέση 1.25, κάνοντας φυσικά τους κατάλληλους μαθηματικούς μετασχηματισμούς και γνωρίζοντας τα μεγέθη  $R_s$  και  $R_{ct}$ :

$$\boxed{\omega_{(\theta=\max)} = \sqrt{\left(\frac{1}{C_{dl}R_{ct}}\right)\left(1 + \frac{R_{ct}}{R_s}\right)}} \quad (1.25)$$

Προς αποφυγή παρανοήσεων πρέπει να τονιστεί ότι η τιμή της συχνότητας που αντιστοιχεί στο  $\omega_{(\theta=\max)}$  είναι εντελώς διαφορετική από εκείνη που αντιστοιχεί στο  $\omega_{\max}$  που εμφανίζεται στο διάγραμμα Nyquist.



Σαν γενικό συμπέρασμα μπορούμε να πούμε ότι τα διαγράμματα Bode παρέχουν μία πιο σαφή περιγραφή της συμπεριφοράς ενός συστήματος σε σχέση με τα διαγράμματα Nyquist ακόμα και στις περιπτώσεις όπου υπάρχει μεγάλη διασπορά τιμών [Sánchez, 2005 – Princeton, 1992].

#### 1.2.3.4. Τεχνικές μέτρησης εμπέδησης

Οι πιο διαδεδομένες τεχνικές μέτρησης εμπέδησης είναι εκείνες που βασίζονται στους ενισχυτές εγκλείδωσης (lock-in amplifiers) και στους αναλυτές απόκρισης συχνότητας (Frequency Response analyzers, FRA).

Ο ενισχυτής εγκλείδωσης είναι ένα ειδικό βολτόμετρο, το οποίο χρησιμοποιεί έναν ανιχνευτή φάσης (phase-sensitive detector) για τη μέτρηση σημάτων χαμηλής έντασης, διακρίνοντάς τα παράλληλα από το θόρυβο υποβάθρου (background noise). Η λειτουργία του ανιχνευτή φάσης στηρίζεται στο συγχρονισμό της συχνότητας και της φάσης τόσο του μετρούμενου σήματος όσο και του σήματος αναφοράς. Στα πλεονεκτήματα χρήσης τους συγκαταλέγονται η υψηλή ευαισθησία, η αποτελεσματική απομάκρυνση του θορύβου υποβάθρου και το χαμηλό κόστος ενώ στα μειονεκτήματα περιλαμβάνονται η περιορισμένη κλίμακα συχνοτήτων λειτουργίας, η μεγάλη διάρκεια των μετρήσεων και η δυσκολία αυτοματοποίησης.

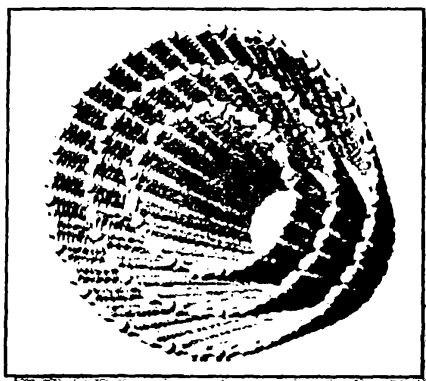
Ο FRA αποτελείται από έναν ψηφιακό αποδιαμορφωμένο (demodulated) μετρητή εμπέδησης με συχνότητα μεταβαλλόμενη κατά βήματα. Η καταγραφόμενη εμπέδηση του υπό μελέτη συστήματος συσχετίζεται ταυτόχρονα με δύο σήματα αναφοράς, φάσης  $0^\circ$  και  $90^\circ$ , αντίστοιχα πάντα σε σχέση με το ημιτονικό σήμα διέγερσης. Σημαντικά πλεονεκτήματα αποτελούν η γρήγορη ανάλυση, η ευρεία κλίμακα συχνοτήτων και οι σχετικά εύκολα αυτοματοποιημένες μετρήσεις, ενώ στα μειονεκτήματα συγκαταλέγεται το σχετικά υψηλό κόστος και η μη αποτελεσματική απομάκρυνση του θορύβου υποβάθρου [Princeton, 1992 – McDonald, 1987].





## ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>



*Multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs)*

## "ΑΜΠΕΡΟΜΕΤΡΙΚΟΙ και ΕΜΠΕΔΗΣΙΟΜΕΤΡΙΚΟΙ (ΒΙΟ)ΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ"

### 2.1. ΧΗΜΙΚΟΙ ΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ

#### 2.1.1. Εισαγωγή

Οι «χημικοί αισθητήρες» είναι συνήθως μικρές σε μέγεθος διατάξεις, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την άμεση μέτρηση ενός οποιουδήποτε αναλύτη στο υπό εξέταση δείγμα.

Σύμφωνα με τον ορισμό της IUPAC «ο χημικός αισθητήρας είναι μία συσκευή η οποία μετατρέπει τη χημική πληροφορία σε ένα αναλυτικά χρήσιμο σήμα» [Kellner, 2004].

Ένας πιο ειδικός ορισμός είναι ο ακόλουθος: «Ο χημικός αισθητήρας είναι ένα σύστημα, το οποίο φέρει ένα φυσικό μεταλλάκτη που βρίσκεται σε επαφή με κάποιο σωματίδιο χημικής ή βιολογικής αναγνώρισης. Η επιφάνεια αναγνώρισης αλληλεπιδρά με τον υπό προσδιορισμό αναλύτη και εν συνεχεία η μεταβολή της χημικής πληροφορίας



(π.χ. ενεργότητα, πίεση, θερμοκρασία, χωρητικότητα, εμπέδηση), μετατρέπεται με τη βοήθεια του μεταλλάκτη σε ηλεκτρικό σήμα» [Eggins, 2002].

Από τα τέλη του 19<sup>ου</sup> αιώνα η συνεχής μελέτη και ανάπτυξη πάνω στους χημικούς αισθητήρες οδήγησε και στην κατασκευή των «ηλεκτροχημικών αισθητήρων», οι οποίοι αποτελούν μία πολύ σημαντική υποκατηγορία, όπου στην περίπτωση αυτή το ηλεκτρόδιο διαδραματίζει το ρόλο του μεταλλάκτη.

### 2.1.2. Κατηγορίες μεταλλακτών και χημικών αισθητήρων

Με βάση τον ορισμό που δόθηκε για τους χημικούς αισθητήρες, είναι κατανοητό ότι η λειτουργία τους στηρίζεται στα χαρακτηριστικά του αναλύτη, που τον κάνουν αναγνωρίσιμο από τον αισθητήρα. Στα χαρακτηριστικά αυτά εμπεριέχονται η μάζα καθώς, επίσης, οι ηλεκτρικές, οι θερμικές και οι οπτικές ιδιότητες. Έτσι, με βάση τον εκάστοτε μεταλλάκτη (transducer) οι χημικοί αισθητήρες διακρίνονται στις ακόλουθες κατηγορίες:

1) Ηλεκτροχημικοί μεταλλάκτες (electrochemical transducers): μετατρέπουν το αποτέλεσμα μίας ηλεκτροχημικής διεργασίας σε ηλεκτρικό σήμα. Οι αισθητήρες που περιλαμβάνουν χωρίζονται σε:

1.α) Ποτενσιομετρικοί αισθητήρες (potentiometric sensors): η αρχή λειτουργίας τους βασίζεται στη μέτρηση του αναπτυσσόμενου δυναμικού μεταξύ του ηλεκτροδίου εργασίας και του ηλεκτροδίου αναφοράς σε συνθήκες μηδενικού ρεύματος. Τέτοιου είδους αισθητήρες αποτελούν τα εκλεκτικά ηλεκτρόδια ιόντων (ion selective electrodes – ISE) [Βελτσίστας, 1992 – Koryta, 1972 – Buck, 1972 – Midgley, 1983].

1.β) Αμπερομετρικοί αισθητήρες (amperometric sensors): η αρχή λειτουργίας τους στηρίζεται στη μέτρηση του ρεύματος, που εμφανίζεται εξαιτίας κάποιας οξειδοαναγωγικής αντίδρασης, που λαμβάνει χώρα στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας, όταν στο ηλεκτροχημικό στοιχείο εφαρμοστεί εξωτερικά μία διαφορά δυναμικού [Eggins, 2002].

1.γ) Αγωγιμομετρικοί αισθητήρες (conductimetric sensors): βασίζονται στη μεταβολή της ηλεκτρικής αγωγιμότητας των διαλυμάτων ή στις μεταβολές της αγωγιμότητας που προέρχονται από μεταφορά φορτίου ανάμεσα σε έναν προσροφημένο αναλύτη και μία ημιαγώγιμη επιφάνεια [Kellner, 2004].



1.δ) χωρητικοί ή εμπεδησιομετρικοί αισθητήρες (capacitance or impedimetric sensors): η προσρόφηση ενός αναλύτη επί της τροποποιημένης επιφάνειας ενός πυκνωτή με κάποιο πολυμερές υλικό ή βιολογικό σωματίδιο αναγνώρισης, προκαλεί μεταβολή στις διηλεκτρικές ιδιότητες του πυκνωτή, με αποτέλεσμα να αλλάζει η χωρητικότητά του [Janata, 2002 – Kellner, 2004 – Berggren, 2001 – Guan, 2004].

2) Οπτικοί μεταλλάκτες (optical transducers): μετατρέπουν τις μεταβολές ενός οπτικού φαινομένου, που προέρχονται από την επίδραση με τον αναλύτη, σε ηλεκτρικό σήμα. Ανάλογα με τη οπτική ιδιότητα που είναι δυνατόν να αναγνωρίζουν οι οπτικοί αισθητήρες διακρίνονται σε:

- 2.α) αισθητήρες απορρόφησης (absorbance sensors),
- 2.β) αισθητήρες ανάκλασης (reflectance sensors),
- 2.γ) αισθητήρες φωταύγειας (luminescence sensors),
- 2.δ) αισθητήρες σκέδασης φωτός (light scattering sensors) και
- 2.ε) αισθητήρες δείκτη διάθλασης (refractive index sensors).

3) Θερμικοί μεταλλάκτες (thermal transducers): η λειτουργία τους βασίζεται στη μετατροπή των μεταβολών των θερμικών ιδιοτήτων ενός συστήματος σε ηλεκτρικό σήμα. Οι θερμικοί αισθητήρες ανάλογα με το μεταλλάκτη διακρίνονται σε:

- 3.α) καταλυτικούς αισθητήρες (catalytic sensors) και
- 3.β) αισθητήρες θερμικής αγωγιμότητας (thermal conductivity sensors).

4) Μεταλλάκτες μάζας (mass transducers): μετατρέπουν τις μεταβολές της μάζας, οι οποίες προέρχονται από τη συσσώρευση του αναλύτη σε μία τροποποιημένη επιφάνεια, σε μεταβολή μίας ιδιότητας της επιφάνειας αυτής. Οι αισθητήρες που χρησιμοποιούν μεταλλάκτες μάζας διακρίνονται σε:

- 4.α) πιεζοηλεκτρικούς αισθητήρες (piezoelectric sensors) και
- 4.β) αισθητήρες ακουστικών κυμάτων επιφάνειας (surface acoustic wave sensors).

Αυξημένο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι αμπερομετρικοί και εμπεδησιομετρικοί (βιο)αισθητήρες, των οποίων οι αρχές λειτουργίας, τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα αναπτύσσονται παρακάτω [Janata, 1998 – Kellner, 2004].



**2.2. ΤΥΠΟΙ ΑΜΠΕΡΟΜΕΤΡΙΚΩΝ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ**

Οι βιοαισθητήρες αποτελούνται από ένα σωματίδιο βιολογικής αναγνώρισης, το οποίο βρίσκεται σε σύνδεση με έναν ηλεκτροχημικό μεταλλάκτη. Τα σωματίδια βιολογικής αναγνώρισης (molecular recognition elements, MREs) διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: 1) καταλυτικής δράσης (catalytic based MREs) και 2) συνάφειας (affinity based MREs), όπως φαίνεται και στον **πίνακα 2.1**. Το σωματίδιο βιολογικής αναγνώρισης μπορεί να είναι και τεχνητό (artificial) εκτός από φυσικό, όπως συμβαίνει στην περίπτωση των πεπτιδίων νουκλεϊνικών οξέων (peptide nucleic acid, PNA) και των πολυμερών μοριακής αποτύπωσης (molecular imprinting polymer, MIP) [Nakamura, 2003].

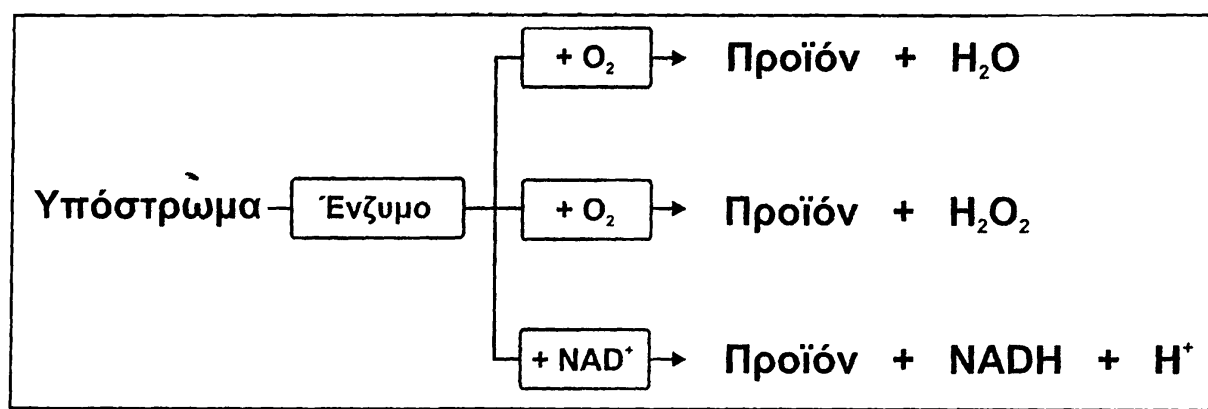
**Πίνακας 2.1:** Κατάταξη βιολογικών σωματιδίων αναγνώρισης στους βιοαισθητήρες.

| <b>ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΣΩΜΑΤΙΔΙΟ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗΣ</b>        |                                     |
|---|-------------------------------------|
| <b>ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ</b>                     | <b>ΣΥΝΑΦΕΙΑΣ</b>                    |
| Ένζυμα (enzymes)                              | Αντισώματα (antibodies)             |
| Μικρόβια (microbes)                           | Υποδοχείς (receptors)               |
| Όργανα (organelles)                           | Νουκλεϊνικά οξέα (nucleic acids)    |
| Φυτικά ή ζωικά κύτταρα (plant/animal cells)   | Απταμερή (aptamers)                 |
| Φυτικοί ή ζωικοί ιστοί (plant/animal tissues) | Πολυμερή μοριακής αποτύπωσης (MIPs) |

Οι Clark και Lyons [Clark, 1962] ήταν οι πρώτοι που δημοσίευσαν εργασία στην οποία παρουσίαζαν την παγίδευση διαλυτής οξειδάσης της γλυκόζης σε ένα ηλεκτρόδιο οξυγόνου. Ο πρώτος βιοαισθητήρας που χρησιμοποιούσε ακινητοποιημένο ένζυμο δημοσιεύτηκε το 1963 από τον Guilbault [Guilbault, 1963], και ο οποίος χρησιμοποιούνταν για την ανίχνευση νευροτοξικών ουσιών στην ατμόσφαιρα με τη βοήθεια του ενζύμου χολινεστεράση, παγιδευμένου σε δύο ηλεκτρόδια Pt. Από τότε μέχρι και σήμερα οι βιοαισθητήρες αποτελούν ένα ραγδαία αναπτυσσόμενο πεδίο έρευνας με πάρα πολλές δημοσιεύσεις και άρθρα ανασκοπήσεως [Guilbault, 2004 – Palmisano, 2000 – Wilson, 2000].



Οι αμπερομετρικοί βιοαισθητήρες στηρίζονται σε διάφορους τύπους ενζύμων και στην εξειδικευμένη δράση τους πάνω στο κατάλληλο υπόστρωμα. Τέτοια είναι οι οξειδάσες (χρησιμοποιούν  $O_2$  ή παράγουν  $H_2O_2$ ), οι υδρολάσες (χρησιμοποιούν  $O_2$ ) και οι δεϋδρογενάσες (ανάγουν  $NAD^+$  ή  $NADP^+$ ). Πολλές φορές όμως η εκλεκτικότητα των ενζύμων καθορίζεται από εκείνη του μεταλλάκτη. Οι παρακάτω χημικές εξισώσεις (Σχήμα 2.1) περιγράφουν το γενικό τύπο των αντιδράσεων που διεξάγονται κατά τη χρήση των αμπερομετρικών βιοαισθητήρων:

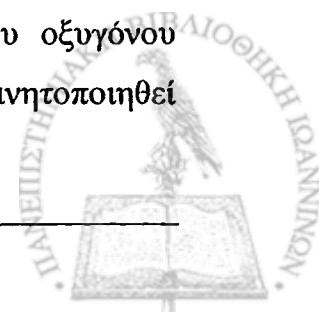


Σχήμα 2.1: Γενικοί τύποι αντιδράσεων, οι οποίες διεξάγονται στους αμπερομετρικούς βιοαισθητήρες.

Στη συνέχεια θα συζητηθούν οι κυριότεροι τύποι των αμπερομετρικών βιοαισθητήρων καθώς και τεχνικές ανάπτυξης αυτών.

### 2.2.1. Ηλεκτρόδιο οξυγόνου ή τύπου Clark

Όπως προαναφέρθηκε αποτελεί τον πρώτο βιοαισθητήρα. Το οξυγόνο μετρείται ηλεκτροχημικά με ένα ηλεκτρόδιο Pt χρησιμοποιώντας ως ηλεκτρόδιο αναφοράς ένα ηλεκτρόδιο Ag/AgCl σε (ημι)κορεσμένο διάλυμα KCl. Μία μικρού πορώδους πολυμερική μεμβράνη, από την οποία μπορούν να διέρχονται μόνο τα μόρια του οξυγόνου (ουσιαστικά εκμηδενίζοντας την παρεμποδιστική δράση άλλων ουσιών), χρησιμοποιείται έτσι ώστε το υπό ανάλυση διάλυμα να βρίσκεται σε επαφή με τον ηλεκτρολύτη. Στην κλασική μορφή του ηλεκτροδίου η μεμβράνη του οξυγόνου συνδυάζεται με μία άλλη πολυμερική μεμβράνη πάνω στην οποία έχει ακινητοποιηθεί



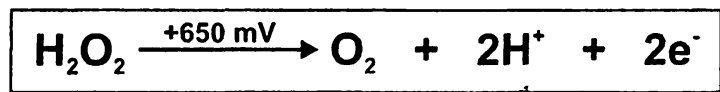
το ένζυμο και μία τρίτη μεμβράνη, που δρα προστατευτικά στην ενζυμική από μικροβιακή μόλυνση αποτρέποντας ταυτόχρονα τη διαρροή του ενζύμου.

Οι βιοαισθητήρες οξυγόνου εμφανίζουν υψηλή εκλεκτικότητα αλλά μειονεκτούν στο γεγονός της επαναπρόσληψης οξυγόνου από το δείγμα κατά τη διάρκεια των μετρήσεων. Το πρόβλημα αυτό είναι λιγότερο έντονο σε συστήματα συνεχούς ροής ενώ για μετρήσεις σε διαλύματα αντιμετωπίζεται είτε με συνεχή παροχή αέρα στο δείγμα είτε με παραγωγή του σήματος.

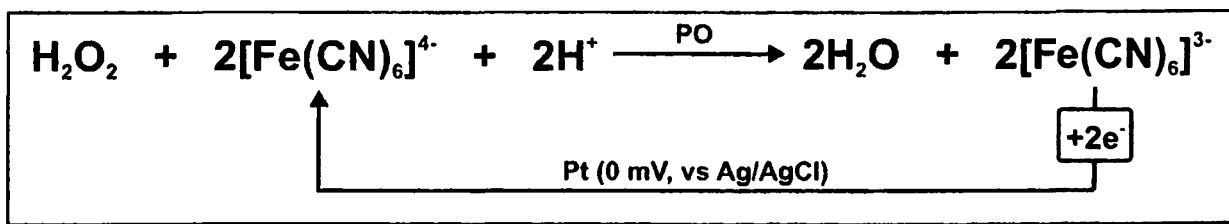
Το ηλεκτρόδιο οξυγόνου έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη του βιοαισθητήρα BOD (Biochemical Oxygen Demand), που στηρίζεται στην ακινητοποίηση του μικροοργανισμού *Trichosporon cutaneum* [Kulys, 1992]. Χρησιμοποιείται ευρύτατα στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας αποβλήτων και ενεργειακής διαχείρισης βιομάζας.

### 2.2.2. Ηλεκτρόδιο H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Η αρχή λειτουργίας του στηρίζεται στην ακόλουθη ηλεκτροχημική οξείδωση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, το οποίο παράγεται κατά την ενζυμική δράση των οξειδασών.



Η οξείδωση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> πραγματοποιείται στην άνοδο του ηλεκτροχημικού συστήματος σε δυναμικό +650 mV (ως προς ηλεκτρόδιο αναφοράς Ag/AgCl) και το ηλεκτρόδιο εργασίας είναι κατασκευασμένο από διάφορα υλικά (Pt, γραφίτης, υαλώδης άνθρακας). Υπάρχει, επίσης, η δυνατότητα αναγωγής, η οποία όμως παρεμποδίζεται από την ταυτόχρονη αναγωγή του οξυγόνου στο ίδιο δυναμικό.



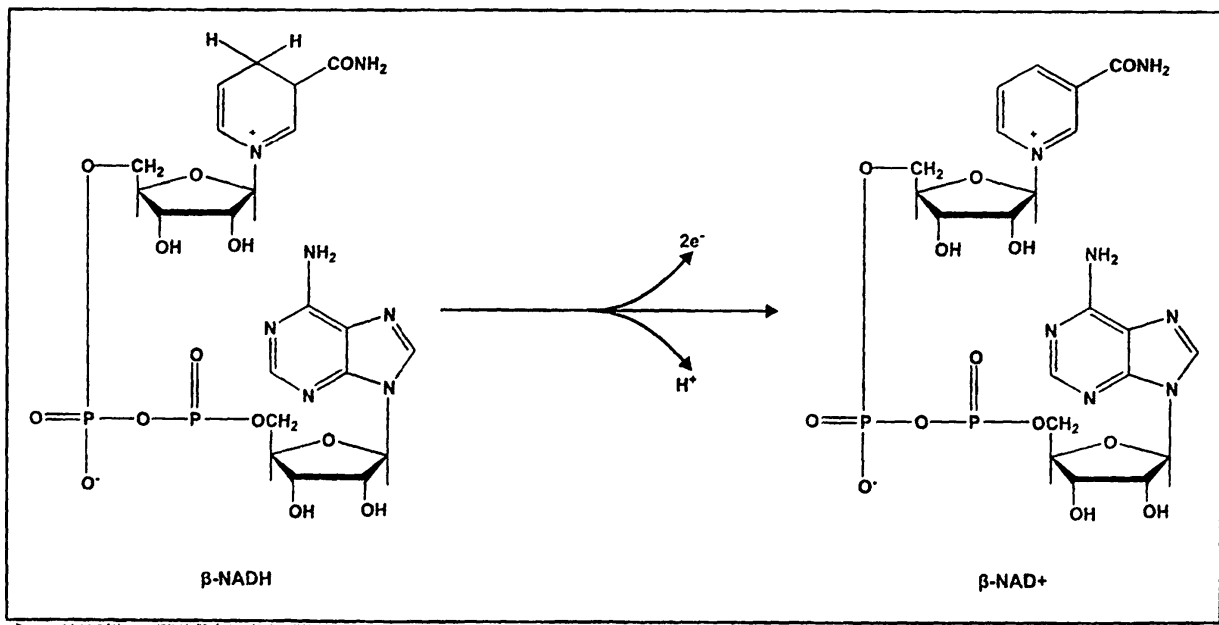
**Σχήμα 2.2:** Ηλεκτροχημική αναγωγή του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> παρουσία του ενζύμου υπεροξειδάση, με ταυτόχρονη χρήση διαμεσολαβητή μεταφοράς φορτίου.



Στην περίπτωση που στο σύστημα χρησιμοποιηθεί διαμεσολαβητής μεταφοράς φορτίου (mediator, βλέπε §2.2.4.), η αναγωγή διεξάγεται σε χαμηλότερες τιμές δυναμικών παρουσία του ενζύμου υπεροξειδάση (PO), αποφεύγοντας έτσι την παρεμποδιστική δράση του οξυγόνου (Σχήμα 2.2).

### 2.2.3. Βιοαισθητήρες δεϋδρογενασών

Η πιο διαδεδομένη κατηγορία αμπερομετρικών βιοαισθητήρων, είναι αυτή που βασίζεται στα ένζυμα γνωστά ως δεϋδρογενάσες. Για να λειτουργήσουν τα ένζυμα αυτά είναι απαραίτητη και η παρουσία  $\text{NAD}^+$  ή  $\text{NADP}^+$ , ως συμπαραγόντες. Η οξειδοαναγωγική αντίδραση που λαμβάνει χώρα κατά τη μετατροπή του  $\beta\text{-NADH}$  σε  $\beta\text{-NAD}^+$ , φαίνεται στο Σχήμα 2.3.

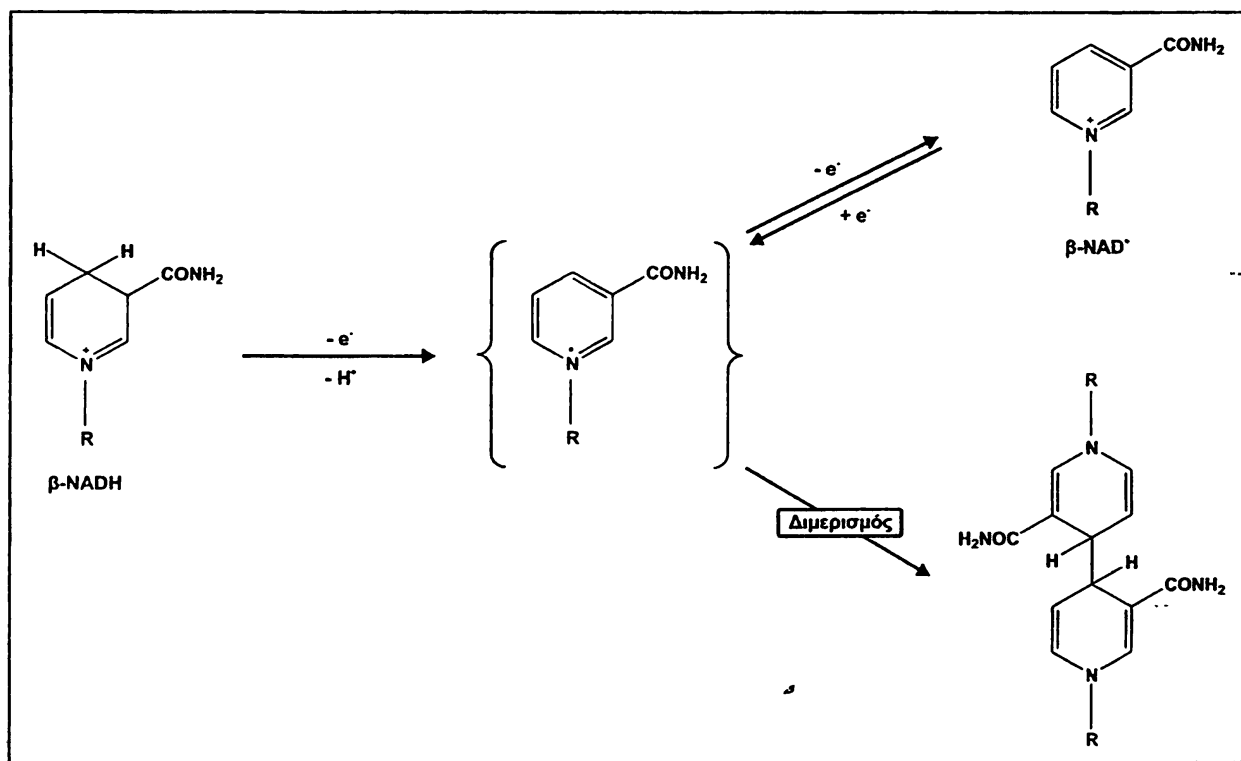


Σχήμα 2.3: Οξείδωση του  $\beta\text{-NADH}$  σε  $\beta\text{-NAD}^+$ .

Αν και ο μηχανισμός της οξείδωσης δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί πλήρως, πιστεύεται ότι αυτός διεξάγεται σε περισσότερα από ένα στάδια με τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου και τη δημιουργία ενδιάμεσων ριζών και πιθανόν προϊόντων διμερισμού (Σχήμα 2.4) [Eggins, 2002].

Κατά τη χρήση των βιοαισθητήρων δεϋδρογενασών και πιο συγκεκριμένα στον αμπερομετρικό προσδιορισμό του  $\beta\text{-NADH}$ , πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι

χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις έτσι ώστε να μην επέρχεται γρήγορα η παλαίωση (fouling) της επιφάνειας των ηλεκτροδίων και η οποία είναι εντονότερη όσο μεγαλύτερες είναι οι συγκεντρώσεις του  $\beta$ -NADH. Αποτέλεσμα της παλαίωσης των ηλεκτροδίων είναι η σταδιακή μείωση του παραγόμενου-καταγραφόμενου σήματος, η μείωση της διάρκειας ζωής του ηλεκτροδίου και η μη ποσοτική ανάκτηση του  $\text{NAD}^+$  [Chaubey, 2002].



Σχήμα 2.4: Προτεινόμενος μηχανισμός οξείδωσης του  $\beta$ -NADH.

Τα προβλήματα αυτά αντιμετωπίζονται με τη χρήση πολυμερικών μεμβρανών καθώς και διαμεσολαβητών μεταφοράς φορτίου οι οποίοι αναπτύσσονται παρακάτω.

#### 2.2.4. Αμπερομετρικοί βιοαισθητήρες χημικά τροποποιημένοι με χρήση διαμεσολαβητών μεταφοράς φορτίου (mediators)

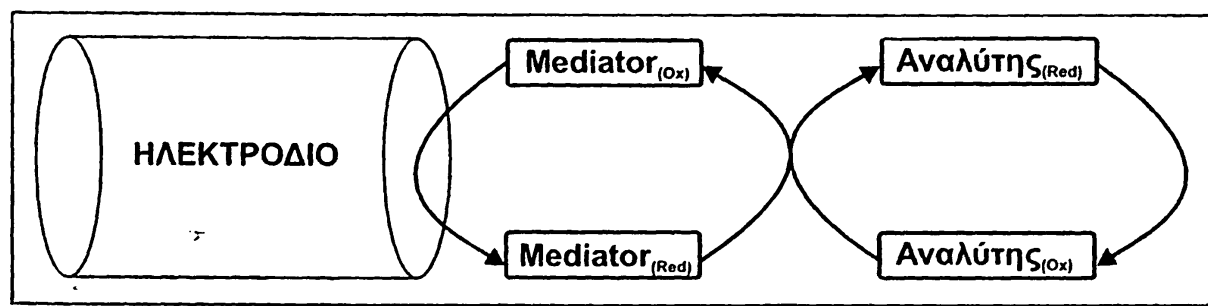
Παρά την ευρύτατη διάδοση των αμπερομετρικών βιοαισθητήρων, σε συνδυασμό με την απλότητα της τεχνικής της αμπερομετρίας και τα χαμηλά όρια ανιχνεύσεως που επιτυγχάνονται, εξακολουθούν να υφίστανται κάποια μειονεκτήματα σημαντικότερο από τα οποία είναι η μείωση της ευαισθησίας των ηλεκτροδίων λόγω παλαίωσης της



επιφάνειάς τους και η μικρή εκλεκτικότητα λόγω παρεμποδίσεων ιδιαίτερα σε υψηλά δυναμικά εργασίας. Η μόλυνση των ηλεκτροδίων προκαλείται κυρίως από ουσίες που προσροφώνται στην επιφάνειά τους, όπως ενδιάμεσα προϊόντα αντιδράσεων υψηλής δραστηριότητας (ελεύθερες ρίζες), μεγαλομόρια (πρωτεΐνες) και επιφανειοδραστικές ουσίες με αποτέλεσμα τη μείωση του μετρούμενου σήματος.

Τέτοιου είδους προβλήματα παρατηρούνται συνήθως κατά τον προσδιορισμό ουσιών που οξειδώνονται σε υψηλά δυναμικά ( $> +600$  mV) όπως το  $H_2O_2$ , το ασκορβικό οξύ, το  $\beta$ -NADH και το ουρικό οξύ. Για την αντιμετώπιση τέτοιων προβλημάτων, έχουν προταθεί διάφορες στρατηγικές, όπως η χρήση διαμεσολαβητών μεταφοράς φορτίου (αποσκοπεί στην ελάττωση του δυναμικού οξειδοαναγωγής οπότε ελαχιστοποιείται η προσρόφηση των «ρυπαντών» στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου) και πολυμερικών μεμβρανών που λειτουργούν σαν φράγματα προς τις ουσίες μεγάλου μοριακού βάρους. Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί αμπερομετρικοί αισθητήρες τροποποιημένοι α) με διαμεσολαβητές μεταφοράς φορτίου [Stergiou, 2004 – Prodromidis, 2000], β) με πολυμερικές επικαλύψεις αγωγίμες και μη-αγωγίμες [Emr, 1997 – Carrelli, 1996], γ) με ανόργανα υλικά (κυρίως ζεόλιθοι) [Walcaris, 1999] και δ) αισθητήρες πυριτικής γέλης (sol-gel) [Wang, 1997].

Οι «διαμεσολαβητές μεταφοράς φορτίου» αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία με τον όρο «mediators». Είναι οξειδοαναγωγικές ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους, οι οποίες συντελούν στη μεταφορά φορτίου ανάμεσα στο ηλεκτρόδιο εργασίας και τον αναλύτη, κατά τη διεξαγωγή των ηλεκτροδιακών δράσεων.



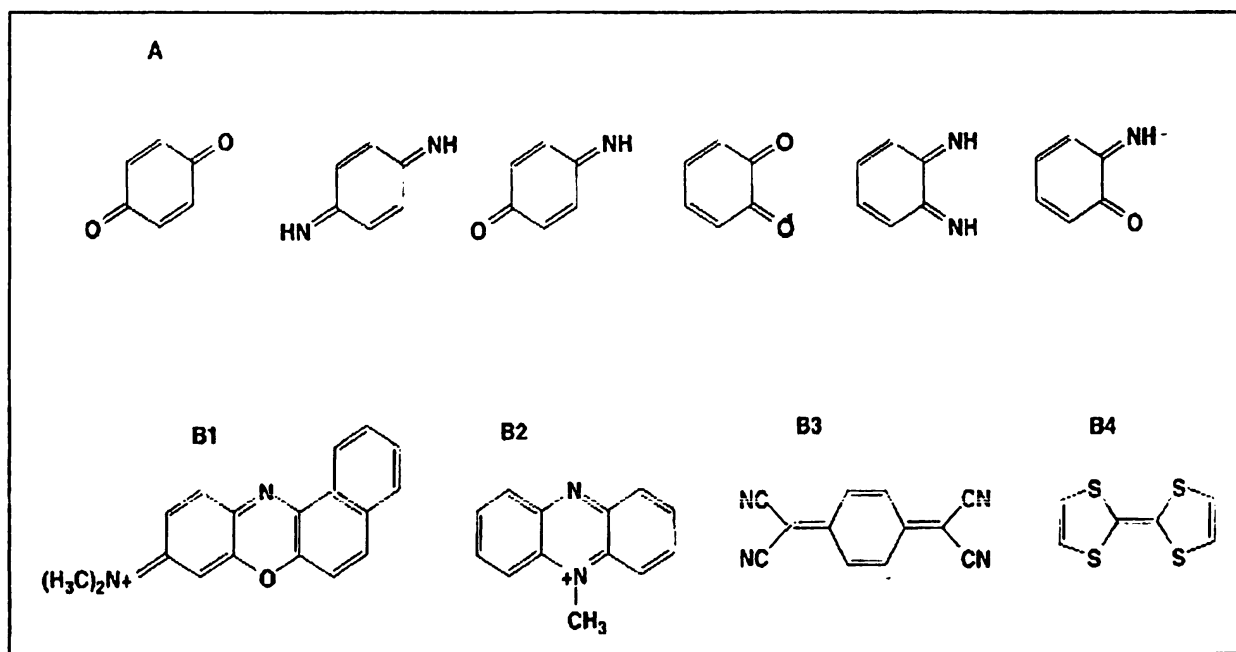
Σχήμα 2.5: Σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας ενός mediator.

Το δυναμικό εφαρμογής στο ηλεκτρόδιο εργασίας καθορίζεται από το τυπικό δυναμικό του mediator, που συνήθως είναι μικρότερο από εκείνο του αναλύτη. Έτσι, με αυτό τον τρόπο αποφεύγονται οποιεσδήποτε παρεμποδίσεις θα εμφανίζονταν στα υψηλά

δυναμικά κατά την άμεση οξειδοαναγωγή του προσδιοριζόμενου συστατικού πάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου.

Τα κριτήρια επιλογής ενός mediator είναι τα εξής: 1) να έχει χαμηλό δυναμικό οξειδοαναγωγής, 2) να αντιδρά γρήγορα με το χημικό σύστημα, 3) να είναι χημικά αδρανής ως προς τις παρεμποδίζουσες ουσίες που πιθανόν να συνυπάρχουν στο δείγμα, 4) να λειτουργεί σε ευρεία περιοχή pH ή στο βέλτιστο pH λειτουργίας του χημικού συστήματος που «αντικαθιστά», 5) να μην προκαλεί απενεργοποίηση του συστήματος, 6) να έχει περιορισμένη διαλυτότητα (όταν βρίσκεται σε ακινητοποιημένη μορφή), 7) να είναι χαμηλού κόστους και 8) να είναι χημικά σταθερός κατά τη χρήση και αποθήκευση [Chaubey, 2002 – Cass, 1990].

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την κατασκευή ενός αισθητήρα, είτε σε διαλυτή είτε σε ακινητοποιημένη μορφή πάνω στο ηλεκτρόδιο. Τα πλεονεκτήματα της ακινητοποίησης τους είναι η οικονομία αντιδραστηρίου, η απλοποίηση της τεχνικής και η δημιουργία αισθητήρων μεγαλύτερης εκλεκτικότητας και ευαισθησίας.



**Σχήμα 2.6:** (A) Μερικές βασικές δομικές μονάδες, που περιέχονται σε οργανικούς mediators και επιδρούν καταλυτικά στην οξείδωση του NADH. (B) Συντακτικοί τύποι των συνηθέστερα χρησιμοποιούμενων mediators: (B1) Meldola Blue, (B2) N-methylphenazinium, (B3) TCNQ (Tetracyanoquinodimethane), (B4) TTF (Tetrathiofulvalene).

Οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενοι mediators είναι οι κινόνες, τα σιδηρικούανιούχα άλατα, το φερροκένιο, οι φθαλοκυανίνες, οι φαινοθειαζίνες και οι φαιναζίνες και τα αγώγιμα άλατα τετραθειαφουλβαλένιο (TTF) και τετρακυανοκινοδιμεθάνιο (TCNQ) (Σχήμα 2.6)..

### 2.2.5. Χημικά τροποποιημένα ηλεκτρόδια (Chemically Modified Electrodes, CMEs): Μέθοδοι και τεχνικές κατασκευής

Η ακινητοποίηση ηλεκτρενεργών ουσιών γίνεται με τρεις βασικές μεθόδους:

1) με χημειορόφηση: βασίζεται στην προσρόφηση της ηλεκτρενεργής ουσίας πάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Τα μόρια της ουσίας συγκρατούνται πάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου με ηλεκτροστατικές δυνάμεις Van der Waals, ενώ στην περίπτωση των αρωματικών ενώσεων η ακινητοποίηση οφείλεται σε αλληλεπίδραση των π-ηλεκτρονίων του αρωματικού δακτυλίου με τα ηλεκτρόνια της επιφάνειας του ηλεκτροδίου [Whitten, 1996 – Minot, 1998].

2) με σχηματισμό ομοιοπολικών δεσμών: η πιο αντιπροσωπευτική περίπτωση είναι η «σιλανοποίηση», που πραγματοποιείται μεταξύ υδροξυ- ομάδων σε επιφάνειες οξειδίων μετάλλων και χλωρο- ή αλκοξυ- σιλανίων [Kellner, 2004].

3) με απόθεση πολυμερικών επικαλύψεων: η μέθοδος στηρίζεται στη δημιουργία μίας πολυμερικής μεμβράνης πάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Το σχηματιζόμενο φιλμ συγκρατείται λόγω της μικρής διαλυτότητας της ουσίας και λόγω φαινομένου χημειορόφησης [Kellner, 2004].

Οι σπουδαιότερες τεχνικές, που αφορούν την ακινητοποίηση των διαφόρων σωματιδίων με σκοπό τη χημική τροποποίηση των ηλεκτροδίων είναι:

1) δημιουργία επικάλυψης με εμβάπτιση (dip coating): το ηλεκτρόδιο εμβαπτίζεται εντός αναδευόμενου διαλύματος της ουσίας με την οποία επιθυμούμε να τροποποιήσουμε την επιφάνειά του και τέλος αφήνεται να εξατμιστεί ο διαλύτης.

2) εναπόθεση σταγόνας και εξάτμιση του διαλύτη (solvent evaporation): ένας μικρός όγκος διαλύματος του τροποποιητή αποτίθεται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου και αφήνεται ο διαλύτης προς εξάτμιση.



3) επικάλυψη με στροφοδίνη (spin coating): βασίζεται στην τεχνική εναπόθεσης σταγόνας με τη διαφορά ότι η εξάτμιση του διαλύτη γίνεται θέτοντας το ηλεκτρόδιο σε γρήγορη περιστροφή.

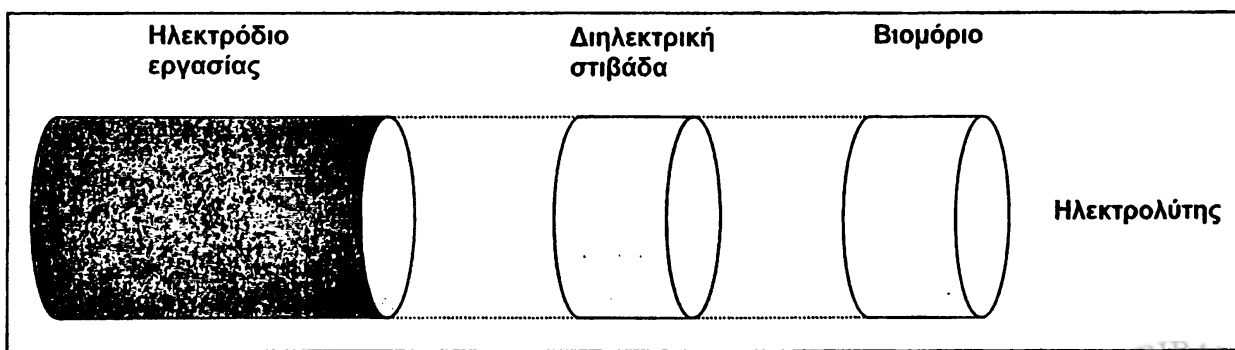
4) ηλεκτροπολυμερισμός (electropolymerization): σε αυτή την περίπτωση έχουμε τη δημιουργία μίας πολυμερικής επικάλυσης. Με την εφαρμογή μίας προεπιλεγμένης τιμής δυναμικού το μονομερές οξειώνεται/ανάγεται, με αποτέλεσμα να παράγονται ενδιάμεσα προϊόντα, τα οποία με τη σειρά τους πολυμερίζονται πάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου [Cosnier, 2003 – Palmisano, 2000].

5) πολυμερισμός πλάσματος (plasma polymerization): ατμοί του μονομερούς εκτίθενται σε ραδιοσυχνότητα εκφόρτισης πλάσματος με αποτέλεσμα τη δημιουργία πολυμερικής επικάλυσης.

### 2.3. ΕΜΠΕΔΗΣΙΟΜΕΤΡΙΚΟΙ (ΒΙΟ)ΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ

Οι πρώτοι εμπεδησιομετρικοί βιοαισθητήρες εμφανίστηκαν στα τέλη της δεκαετίας του 1980 [Newman, 1986 – Bataillard, 1988] και από τότε η ανάπτυξη και η χρήση τους γνώρισε μία ραγδαία εξέλιξη.

Η αρχή λειτουργίας τους (Σχήμα 2.7) βασίζεται στην καταγραφή και μέτρηση των μεταβολών των διηλεκτρικών ιδιοτήτων και της κατανομής φορτίου των αισθητήρων, οι οποίες οφείλονται στην αλληλεπίδραση των βιομορίων (αντιγόνο-αντίσωμα) ή το σχηματισμό ή την αποικοδόμηση κάποιας πολυμερικής επικάλυσης. Τα φαινόμενα αυτά λαμβάνουν χώρα επί της επιφάνειας των ηλεκτροδίων [Berggren, 2001].



Σχήμα 2.7: Απεικόνιση ενός τυπικού εμπεδησιομετρικού βιοαισθητήρα.

Όπως είναι ήδη γνωστό η χωρητικότητα (C) ενός πυκνωτή δίνεται από την ακόλουθη σχέση:

$$C = (\epsilon\epsilon_0 A) / d \quad (2.1)$$

όπου ( $\epsilon$ ) είναι η διηλεκτρική σταθερά του μέσου μεταξύ των οπλισμών του πυκνωτή, που είναι το ηλεκτρόδιο εργασίας και ο ηλεκτρολύτης, ( $\epsilon_0$ ) είναι η διηλεκτρική σταθερά ή διαπερατότητα του κενού με τιμή  $8,85419 \text{ pF m}^{-1}$ , (A) είναι το εμβαδό της επιφάνειας των οπλισμών του πυκνωτή και (d) η απόσταση μεταξύ των οπλισμών. Επομένως είναι κατανοητό ότι κάθε αλλαγή σε κάποιο από τα παραπάνω μεγέθη συνεπάγεται μεταβολή στη χωρητικότητα του ηλεκτροχημικού πυκνωτή.

Αυτό που πρέπει, επίσης, να τονιστεί είναι ότι σε έναν εμπεδησιομετρικό (βιο)αισθητήρα η μεταβολή της χωρητικότητας δεν μπορεί να αποδοθεί αποκλειστικά και μόνο στην αλλαγή ενός εκ των προαναφερθέντων μεγεθών, αλλά είναι το αποτέλεσμα ενός συνολικού φαινομένου, όπου ο κάθε όρος επιδρά με διαφορετική βαρύτητα.

Η διηλεκτρική στιβάδα που θα χρησιμοποιηθεί πρέπει να πληροί τους εξής όρους: 1) να είναι δυσδιάλυτη σε υδατικό περιβάλλον, 2) να έχει κατάλληλη διηλεκτρική σταθερά, 3) να είναι συμπαγής και χωρίς οπές οι οποίες βραχυκυκλώνουν το σύστημα, 4) να έχει υψηλή μηχανική αντοχή, 5) να φέρει κατάλληλες δραστικές ομάδες (π.χ. -NH<sub>2</sub>, -COOH, -OH), έτσι ώστε να είναι δυνατή η ακινητοποίηση του βιολογικού σωματιδίου αναγνώρισης με χημικό τρόπο ή να έχει κατάλληλη διαμόρφωση στο χώρο (π.χ. πολυμερές πλέγμα) για να μπορεί να δεσμευτεί το βιολογικό σωματίδιο αναγνώρισης με φυσικό τρόπο.

Σημαντικό, επίσης, ρόλο παίζει και η συμπεριφορά του ακινητοποιημένου βιομορίου. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία [Pethig, 1987], όταν τα πρωτεϊνικά μόρια βρίσκονται υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, αυτά συμπεριφέρονται σαν διηλεκτρικά υλικά με διηλεκτρική σταθερά περίπου 20. Παρόλα αυτά είναι γνωστό ότι δεν έχουν διηλεκτρικό χαρακτήρα, λόγω της υψηλής κινητικότητας ιόντων και μορίων νερού από το διάλυμα του ηλεκτρολύτη μέσα και γύρω από τα πρωτεϊνικά μόρια, τα οποία προκαλούν βραχυκύκλωση του συστήματος. Προβλήματα αυτού του είδους μπορούν να αντιμετωπιστούν καλύπτοντας τη στιβάδα του βιομορίου με άλλη στιβάδα

ενός μη αγώγιμου πολυμερούς, όπως είναι η πολυαιθυλενογλυκόλη. Εν τούτοις έχει αποδειχτεί ότι και αυτός ο τρόπος δεν είναι ο πιο ενδεδειγμένος καθώς καλύπτονται οι δραστικές ομάδες των βιομορίων [Berney, 1997].

### 2.3.1. Κατηγορίες (βιο)αισθητήρων εμπέδησης

Οι (βιο)αισθητήρες εμπέδησης, ανάλογα με τη φύση του μετρούμενου σήματος διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες:

1) χωρητικοί (βιο)αισθητήρες (capacitive (bio)sensors): η επιφάνεια του ηλεκτροδίου είναι πλήρως καλυμμένη από τη διηλεκτρική στιβάδα και ολόκληρη η συγκρότηση του αισθητήρα συμπεριφέρεται σαν μονωτής. Η μεταβολή του χωρητικού ρεύματος μετρείται υπό την επίδραση μίας τάσης ημιτονικής μορφής και μικρής έντασης σε χαμηλές συχνότητες της τάξης των 10-1000 Hz. Σε αυτού του τύπου τους αισθητήρες, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνικών μορίων αναμένεται να προκαλέσουν μείωση της μετρούμενης χωρητικότητας (αντίστοιχα αύξηση της εμπέδησης), καθώς τα λιγότερο πολικά μόρια των βιομορίων αντικαθιστούν τα πολικά μόρια του ηλεκτρολύτη από τη διεπιφάνεια ηλεκτροδίου-ηλεκτρολύτη. Άλλωστε, η αλληλεπίδραση αυτή έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση του πάχους της στιβάδας των βιομορίων με αντίστοιχη αύξηση της απόστασης μεταξύ των οπλισμών του πυκνωτή, οπότε όπως έχει προαναφερθεί σύμφωνα και με τη σχέση 2.1 η χωρητικότητα θα μειωθεί [Lasseter, 2004 – Berggren, 2001].

2) φαρανταϊκοί (βιο)αισθητήρες εμπέδησης (faradaic impedimetric biosensors): η επιφάνεια του ηλεκτροδίου είναι μερικώς ή πλήρως καλυμμένη με μία μη μονωτική στιβάδα ή μερικώς καλυμμένη με μία μονωτική στιβάδα. Έτσι, αν στο υπό ανάλυση διάλυμα υπάρχει κάποιο οξειδοαναγωγικό ζεύγος η επιφάνεια του ηλεκτροδίου έχει τη δυνατότητα να καταλύσει την οξείδωση ή την αναγωγή του. Σε αυτή την περίπτωση το μετρούμενο σήμα είναι το πραγματικό μέρος της εμπέδησης (η αντίσταση μεταφοράς φορτίου) σε περιοχή χαμηλών, συνήθως, συχνοτήτων της τάξης των 0,1-1,0 Hz. Τώρα οι αλληλεπιδράσεις των βιομορίων θα συνεπάγονται την αύξηση της αντίστασης μεταφοράς φορτίου καθώς η φαρανταϊκή αντίδραση εμποδίζεται όλο και περισσότερο από την στιβάδα των βιομορίων, τα οποία καλύπτουν την επιφάνεια του ηλεκτροδίου [Berggren, 2001].



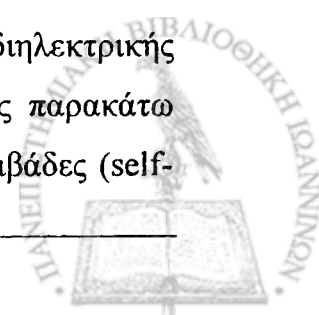
Η απόδοση των (βιο)αισθητήρων εμπέδησης επηρεάζεται από το εφαρμοζόμενο δυναμικό και από την περιοχή των συχνοτήτων στην οποία διεξάγεται η μέτρηση. Εξαιτίας του γεγονότος ότι τα πρωτεϊνικά μόρια είναι φορτισμένα, η επιλογή του εφαρμοζόμενου δυναμικού είναι κρίσιμης σημασίας αφού μπορεί να επηρεάζει τον προσανατολισμό αυτών επί της επιφάνειας του ηλεκτροδίου. Σε ότι αφορά την επίδραση της συχνότητας είναι γνωστό ότι σε πολύ χαμηλές συχνότητες ( $f < 1$  mHz) ο θόρυβος που προέρχεται από την αγωγιμότητα του ηλεκτρολυτικού διαλύματος είναι σημαντικός και οι μετρήσεις αρκετά χρονοβόρες. Ανίθετα σε υψηλές τιμές συχνότητας ( $f > 100$  kHz) η επαγωγή του ηλεκτροχημικού στοιχείου και των καλωδίων σύνδεσης συνεισφέρουν στο φάσμα της εμπέδησης. Επομένως η καταλληλότερη περιοχή συχνοτήτων για τη διεξαγωγή των μετρήσεων είναι από 10 mHz έως 100 kHz [Bard, 1980 – McDonald, 1987].

Γενικά οι φαρανταϊκοί αισθητήρες παρουσιάζουν υψηλότερη ευαισθησία σε σχέση με τους χωρητικούς εν τούτοις είναι δυνατόν τα σωματίδια του οξειδοαναγωγικού ζεύγους να μειώσουν τη σταθερότητα και τη δραστηριότητα της ενεργής επιφάνειας. Μειονέκτημα, επίσης, αποτελεί το γεγονός ότι καθίσταται δύσκολη η επαναχρησιμοποίηση των αισθητήρων ιδιαίτερα όταν απαιτείται καλή επαναληπτικότητα και διατήρηση της αρχικής δραστηριότητας. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η σύνδεση μεταξύ των βιομορίων είναι πολύ ισχυρή, με αποτέλεσμα οι διαδικασίες αναγέννησης της επιφάνειας να είναι λίγο δύσκολες και επίπονες, ενώ παράλληλα μειώνεται και η σταθερότητα της διηλεκτρικής στιβάδας.

Στα σημαντικά πλεονεκτήματα των εμπεδησιμετρικών (βιο)αισθητήρων συγκαταλέγονται τα χαμηλά όρια ανίχνευσης αν και υπάρχει σημαντική διαφορά για παρόμοιους τύπους αισθητήρων, η δυνατότητα κατασκευής μικρο- και νάνο-ηλεκτροδίων καθώς και συστοιχιών ηλεκτροδίων (multi-array sensors), η μαζική παραγωγή, το χαμηλό κόστος και η δυνατότητα για επιτόπιες μετρήσεις.

### 2.3.2. Τεχνικές κατασκευής (βιο)αισθητήρων εμπέδησης

Ανάλογα με το υλικό των ηλεκτροδίων εργασίας, τον τύπο της διηλεκτρικής στιβάδας και τον τρόπο ακινητοποίησης των βιομορίων διακρίνουμε τις παρακάτω κατηγορίες: 1) ηλεκτρόδια Au καλυμμένα με αυτο-διατασσόμενες μονοστιβάδες (self-



assembled monolayers, SAMs), π.χ. με θειόλες του τύπου  $X-(CH_2)_n-SH$ , όπου  $X = -NH_2$ ,  $-COOH$  και  $n=3-21$ , 2) ηλεκτρόδια οξειδίων In-Sn (Indium-Tin Oxide, ITO) τροποποιημένα με στιβάδες άμινο- ή επόξυ- σιλανίων, 3) ημιαγώγιμα ηλεκτρόδια Si/SiO<sub>2</sub> τροποποιημένα με στιβάδα σιλανίων, 4) ηλεκτρόδια οξειδίων μετάλλων ( $M/M_xO_y$ ), τροποποιημένα με στιβάδες σιλανίων, 5) ηλεκτρόδια επικαλυμμένα με αγώγιμα πολυμερή (π.χ. πολυπυρρόλιο, πολυθειφαίνιο), στα οποία δεσμεύονται με φυσικό ή χημικό τρόπο τα βιομόρια και 6) Ηλεκτρόδια επικαλυμμένα με ηλεκτροπολυμερισμένα μη-αγώγιμα πολυμερα (π.χ. πολυτυραμίνη), στα οποία τα βιομόρια δεσμεύονται ομοιολικά [Prodromidis, 2002 – Katz, 2003].

## 2.4. ΕΙΔΗ ΣΤΕΡΕΩΝ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΩΝ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες, το ενδιαφέρον για τα στερεά ηλεκτρόδια και η χρήση τους ως ηλεκτροδίων εργασίας έχει αυξηθεί σε πολύ σημαντικό βαθμό, εξαιτίας της μεγάλης ποικιλίας των υλικών κατασκευής των, της ευκολίας που παρέχουν στην τροποποίηση και αναγέννηση των επιφανειών και του ευρύτατου παραθύρου δυναμικού που μπορεί να επιτευχθεί. Τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα υλικά κατασκευής είναι ο άνθρακας, ο λευκόχρυσος, ο χρυσός και σε ειδικές περιπτώσεις το νικέλιο, ο χαλκός και ο άργυρος.

Μία σημαντική παράμετρος που πρέπει να ληφθεί υπόψη, είναι το γεγονός ότι η πλειοψηφία των στερεών ηλεκτροδίων εργασίας απαιτεί μία προκατεργασία της επιφάνειας πριν από κάθε χρήση. Οι προκατεργασίες αυτές περιλαμβάνουν λείανση με ειδικούς χάρτες ανθρακοπυριτίου ή σκόνη αλουμίνας πάνω σε κατάλληλο ύφασμα καθώς και σάρωση μίας προεπιλεγμένης περιοχής δυναμικού σε διάλυμα κάποιου ηλεκτρολύτη. Κατά καιρούς, έχουν εφαρμοστεί και άλλες χημικές, ηλεκτροχημικές και θερμικές κατεργασίες, με σκοπό την ενεργοποίηση της επιφάνειας των στερεών ηλεκτροδίων και κυρίως στις περιπτώσεις των ηλεκτροδίων άνθρακα.

Τα στερεά ηλεκτρόδια μπορεί να είναι στατικά ή περιστρεφόμενα και η ενεργή επιφάνειά τους έχει συνήθως τη μορφή επίπεδου δίσκου. Πιο συγκεκριμένα το ηλεκτρόδιο έχει το σχήμα κυλινδρικής ράβδου που τις περισσότερες φορές εγκλωβίζεται σε κάποιο αδρανές υλικό όπως είναι το Teflon και το Kel-F, έτσι ώστε να είναι διαθέσιμη μόνο η επίπεδη επιφάνεια και να αποφεύγεται η ηλεκτρική επαφή των



κυλινδρικών τοιχωμάτων με το διάλυμα. Άλλες μορφές στερεών ηλεκτροδίων είναι και διαψηφιοποιημένα ηλεκτρόδια (interdigitated electrodes), τα οποία έχουν τη μορφή διαπλεκόμενων «χτενιών» ή ομόκεντρων κύκλων [Wang, 1994 – Brett, 1993 – Adams, 1969 – Zhang, 2000 – Bakker, 2004].

Τα πιο αντιπροσωπευτικά είδη στερεών ηλεκτροδίων εργασίας είναι:

1) Ηλεκτρόδια μετάλλων: συνήθως κατασκευάζονται από χρυσό, λευκόχρυσο ή άργυρο που είναι αδρανή μέταλλα. Η αδράνεια, πάντως, αυτή είναι σχετική, καθόσον σε συγκεκριμένες τιμές δυναμικών σχηματίζονται δεσμοί ανάμεσα στο μέταλλο και ομάδες οξυγόνου ή υδρογόνου που υπάρχουν στα υδατικά και σε ορισμένα μη υδατικά διαλύματα. Επίσης, πρέπει να αναφερθεί ότι ο λευκόχρυσος έχει και καταλυτικές ιδιότητες.

Εξαιτίας της μεγάλης αγωγιμότητας που έχουν, παρουσιάζουν πολύ μικρό ρεύμα υποβάθρου, που είναι σημαντικό πλεονέκτημα για την ευαισθησία του ηλεκτροδίου. Πλεονέκτημα, επίσης, είναι και το γεγονός ότι είναι εύκολα στην κατασκευή, τη χρήση και τη λείανση.

2) Ηλεκτρόδια οξειδίων μετάλλων: η λειτουργία τους στηρίζεται στις ιδιότητες ημιαγωγού που παρουσιάζουν τα οξείδια πολλών μετάλλων. Αν ανατρέξει κανείς στη βιβλιογραφία θα συναντήσει πολλά άρθρα που αναφέρονται στην κατασκευή και χρήση τέτοιων ηλεκτροδίων. Τα οξείδια των μετάλλων που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή αισθητήρων είναι κυρίως τα  $\text{RuO}_2$ ,  $\text{IrO}_2$ ,  $\text{TiO}_2$  με εφαρμογές όπως η κατασκευή εμπεδησιομετρικών αισθητήρων, η μέτρηση του pH και η ανάλυση φαινολών στο ύδωρ [Ishihara, 1998 – Feng, 2003 – Wang, 2002].

3) Ηλεκτρόδια άνθρακα: είναι τα πιο διαδεδομένα στερεά ηλεκτρόδια που χρησιμοποιούνται στην ηλεκτροανάλυση, επειδή παρουσιάζουν ευρύ παράθυρο δυναμικού (από  $-1,3$  V μέχρι  $1,5$  V, ανάλογα με το διαλύτη), μικρό ρεύμα υποβάθρου, είναι χημικώς αδρανή, σχετικά φθηνά και πιο κατάλληλα για ορισμένα είδη εφαρμογών.

Ένα μειονέκτημα είναι ότι η ταχύτητα των ηλεκτροδιακών δράσεων είναι τις περισσότερες φορές μικρότερη σε σχέση με αυτή που παρατηρείται στα ηλεκτρόδια μετάλλων και αυτό οφείλεται στη δομική ιδιομορφία της επιφάνειας του άνθρακα. Οι διάφοροι τύποι άνθρακα που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή ηλεκτροδίων παρουσιάζουν υβριδισμό  $sp^2$  και είναι:



α) υαλώδης άνθρακας (glassy carbon, GC): ευρύτατα διαδεδομένος στην κατασκευή ηλεκτροδίων, εξαιτίας των άριστων φυσικών και χημικών του ιδιοτήτων. Παρουσιάζει χαμηλό βαθμό οξείδωσης και υψηλή χημική αδράνεια τα οποία συνδυάζονται με το μικρό μέγεθος των πόρων και τη μικρή διαπερατότητα σε αέρια και υγρά. Παρασκευάζεται με ελεγχόμενη θερμική κατεργασία πολυμερούς φαινόλης–φορμαλδεύδης σε μια περιοχή θερμοκρασιών 300–1200°C υπό αδρανή ατμόσφαιρα, που αποσκοπεί στην απομάκρυνση του οξυγόνου, του αζώτου και του υδρογόνου. Πρόσφατα έχει αναφερθεί και η κατασκευή ενός νέου τύπου ηλεκτροδίου από μικροκρυσταλλικά σωματίδια υαλώδους άνθρακα και ορυκτελαίου με την ονομασία «glassy carbon paste electrode», το οποίο συνδυάζει τα ηλεκτροχημικά χαρακτηριστικά του υαλώδους άνθρακα με τα πλεονεκτήματα των μεικτών ηλεκτροδίων (composite electrodes) [Wang, 2001].

Η κατεργασία της επιφάνειας των ηλεκτροδίων μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους. Συνήθως περιλαμβάνει λείανση σε ειδικό ύφασμα εμποτισμένο με αιώρημα αλουμίνας, βύθιση σε λουτρό υπερήχων και τέλος ξέπλυμα με απιονισμένο ύδωρ [Wang, 1994 – Stergiou, 2004]. Άλλες μέθοδοι περιλαμβάνουν ηλεκτροχημική κατεργασία [Dekanski, 2001], ακτινοβολήση με laser [Poon, 1986] ή με υπερήχους [Zhang, 1993] και άλλες ενεργοποίηση σε τόξο άνθρακα [Upadhyay, 1989].

β) πυρολυτικός γραφίτης (pyrolytic graphite, PyG): παρασκευάζεται με αποικοδόμηση αερίων υδρογονανθράκων σε πολύ υψηλή θερμοκρασία. Χαρακτηρίζεται από ανισοτροπία και έχει ελαφρά μεγαλύτερη πυκνότητα από το φυσικό γραφίτη [Brett, 1993].

γ) πυρολυτικός γραφίτης υψηλού βαθμού διάταξης (highly ordered pyrolytic graphite, HOPG): παρασκευάζεται από πυρολυτικό γραφίτη με ειδική τεχνική σε υψηλή θερμοκρασία και παρουσιάζει υψηλού βαθμού ανισοτροπία [Brett, 1993].

δ) πολυκρυσταλλικός γραφίτης (polycrystalline graphite, PG): είδος γραφίτη, όπου οι στοιβάδες των ατόμων άνθρακα διατάσσονται σε αυστηρά καθορισμένες θέσεις, οι δε κρύσταλλοι σε τυχαία θέση. Παρασκευάζεται από υδρογονάνθρακες υψηλού μοριακού βάρους με κατεργασία σε αρκετά υψηλές θερμοκρασίες. Υδρογονάνθρακες χαμηλού μοριακού βάρους χρησιμοποιούνται όταν απαιτείται η παρασκευή σκόνης γραφίτη [Brett, 1993].



ε) γραφίτης φασματοσκοπικής καθαρότητας (spectroscopic graphite, SG): είναι είδος πολυκρυσταλλικού γραφίτη και παρουσιάζει μεγάλο παράθυρο δυναμικού, χαμηλό ρεύμα υποβάθρου και υψηλές ταχύτητες ηλεκτροδιακών δράσεων μετά από κατάλληλη τροποποίηση της επιφάνειάς του [Tessema, 1995].

στ) πάστα γραφίτη (carbon paste, CP): παρασκευάζεται με ανάμιξη σκόνης γραφίτη και ενός οργανικού διαλύτη. Ο διαλύτης αυτός πρέπει να έχει χαμηλή πτητικότητα και μικρή αναμιξιμότητα με το νερό, να είναι υψηλής καθαρότητας, εύκολα εμπορικά διαθέσιμος και σχετικά φθηνός. Τέτοιοι διαλύτες είναι το Nujol, το παραφινέλαιο και το βρωμοναφθαλένιο.

Όσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό του διαλύτη στην πάστα τόσο περισσότερο μειώνονται οι ταχύτητες των ηλεκτροδιακών δράσεων με φανερή συνεισφορά στο ρεύμα υποβάθρου. Απουσία του διαλύτη ο καθαρός γραφίτης πλησιάζει σε όρους κινητικής συμπεριφοράς τα ηλεκτρόδια μετάλλων. Τα ηλεκτρόδια πάστας γραφίτη είναι αρκετά διαδεδομένα και προσφέρουν κατάλληλο υπόστρωμα για ακινητοποίηση διαφόρων mediator και ενζύμων, η δε τροποποίηση γίνεται αρκετά εύκολα [Munteanu, 2002]. Σημαντικό μειονέκτημα είναι η τάση του διαλύτη να διαρρέει σε διαλύματα που περιέχουν ένα αρκετά σημαντικό οργανικό κλάσμα [Wang, 1994].

ζ) μεικτά ηλεκτρόδια γραφίτη (composite ή solid graphite electrodes): αποτελούν παραλλαγή των ηλεκτροδίων πάστας γραφίτη. Εδώ αντί για τον οργανικό διαλύτη ως συνδετικό υλικό χρησιμοποιείται κάποια συγκολλητική ουσία όπως το Teflon και οι εποξειδικές ρητίνες. Σημαντικό πλεονέκτημα αποτελεί το γεγονός ότι στις περιπτώσεις όπου έχουμε τροποποιημένο ηλεκτρόδιο με κάποιο mediator αυτός δεν διαρρέει στο διάλυμα [Wang, 1994 – Céspedes, 2000].

η) ανθρακονήματα (carbon fibers): παρασκευάζονται με πυρόλυση πολυμερών σε υψηλή θερμοκρασία ή με καταλυτική απόθεση ατμών σε θερμή επιφάνεια. Το υλικό υπόκειται σε εφελκυσμό και λαμβάνει τη μορφή ίνας διαμέτρου 5-20 μm. Το μικρό τους μέγεθος τα καθιστά εύχρηστα στην κατασκευή μικροηλεκτροδίων και ιδιαίτερα εφαρμόσιμα σε in vivo μελέτες [Millar, 2001].

4) Μικροηλεκτρόδια: έτσι χαρακτηρίζονται τα ηλεκτρόδια των οποίων η μία τουλάχιστον διάσταση δεν ξεπερνά τα 25 μm. Εξαιτίας του μεγέθους τους παρουσιάζουν μεγάλη ευαισθησία σε μικρής έντασης ρεύματα και επομένως μπορούν να χρησιμοποιηθούν για μετρήσεις σε διαλύματα, όπου παρουσιάζουν μεγάλη ωμική

πτώση τάσης και δεν μπορούν να ανταποκριθούν τα κοινά ηλεκτρόδια. Επίσης, το χωρητικό ρεύμα ελαχιστοποιείται και αυξάνεται η ταχύτητα μεταφοράς μάζας των ηλεκτρενεργών συστατικών όσο πιο μικρό είναι το μέγεθος των ηλεκτροδίων. Αυτό οδηγεί σε υψηλό λόγο S/N. Οι εφαρμογές τους περιλαμβάνουν την παρακολούθηση και μέτρηση διαφόρων αναλυτών σε εγκεφαλικούς ιστούς και βιολογικά υγρά σε πραγματικό χρόνο [Burmeister, 2003 – Dressman, 2002].

5) Νανოსωλήνες άνθρακα (carbon nanotubes): η κατασκευή τους γίνεται με τρεις μεθόδους: 1) εκκένωση τόξου άνθρακα (arc-discharge), 2) θερμική διάβρωση με λέιζερ (laser ablation) και 3) απόθεση ατμών θερμικά εξατμιζόμενων υδρογονανθράκων (chemical-vapor deposition).

Διακρίνονται σε δύο κατηγορίες:

α) μονού τοιχώματος (single-walled carbon nanotubes, SWCNTs): η διάμετρός τους κυμαίνεται από 0,4 nm μέχρι 1,0 nm και αποτελούνται από ένα κυλινδρικό σωλήνα άνθρακα αποτελούμενο από επαναλαμβανόμενα εξάγωνα γραφίτη.

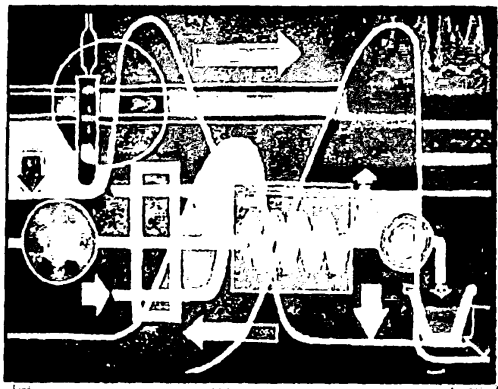
β) πολλαπλού τοιχώματος (multi-walled carbon nanotubes, MWCNTs): αποτελούνται από επάλληλους ομόκεντρους κυλινδρικούς νανοςωλήνες άνθρακα, οι οποίοι απέχουν μεταξύ τους 0,3-0,4 nm. Η συνολική διάμετρός τους κυμαίνεται από 2 nm μέχρι και 100 nm.

Από την ανακάλυψή τους το 1991 μέχρι και σήμερα έχουν βρει εκτεταμένες εφαρμογές και αποτελούν το δομικό λίθο της νανοτεχνολογίας. Οι εξαιρετικές τους ιδιότητες, όπως η αντοχή στον εφελκυσμό που είναι 100 φορές μεγαλύτερη από εκείνη του ατσάλιου, η καλή θερμική και ηλεκτρική αγωγιμότητα, που είναι παραπλήσια εκείνης του χαλκού και επιτρέπουν την διέλευση ρευμάτων πολύ μεγαλύτερης έντασης από τα συνηθισμένα, τους έχουν καταστήσει ιδιαίτερα ενδιαφέροντα σαν υλικά κατασκευής ηλεκτροδίων [Merkoçi, 2005 – Trojanowich, 2006 – Wildgoose, 2006].



## ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup>



## "ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΕΓΧΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΣΕ ΣΥΝΕΧΗ ΡΟΗ (FLOW INJECTION ANALYSIS, FIA)"

### 3.1. ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΥΝΕΧΟΥΣ ΡΟΗΣ

#### 3.1.1. Εισαγωγή

Ακόμη και σήμερα οποιαδήποτε διαδικασία μέτρησης, που περιλαμβάνει υγρά, μέσα σε ένα εργαστήριο περιλαμβάνει ξεχωριστούς χειρισμούς, όπως η προετοιμασία των διαλυμάτων, η ανίχνευση και ο προσδιορισμός του αναλύτη, συλλογή αποτελεσμάτων και επεξεργασία αυτών, τις περισσότερες φορές με τη βοήθεια ηλεκτρονικών υπολογιστών. Όπως είναι φανερό, η αναγκαιότητα για αύξηση του αριθμού των αναλύσεων μέσω κάποιας δυνατότητας αυτοματοποίησης της διαδικασίας, σε συνδυασμό με την ταχύρυθμη ανάπτυξη της τεχνολογίας είναι πλέον μεγαλύτερη όσο ποτέ άλλοτε, ιδιαίτερα στο πεδίο της ηλεκτροανάλυσης. Έτσι, οδηγηθήκαμε στην ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων με εφαρμογή αυτών σε συνεχή ροή. Ο όρος «ανάλυση σε συνεχή ροή», χρησιμοποιείται για να χαρακτηρίσει οποιαδήποτε διαδικασία κατά

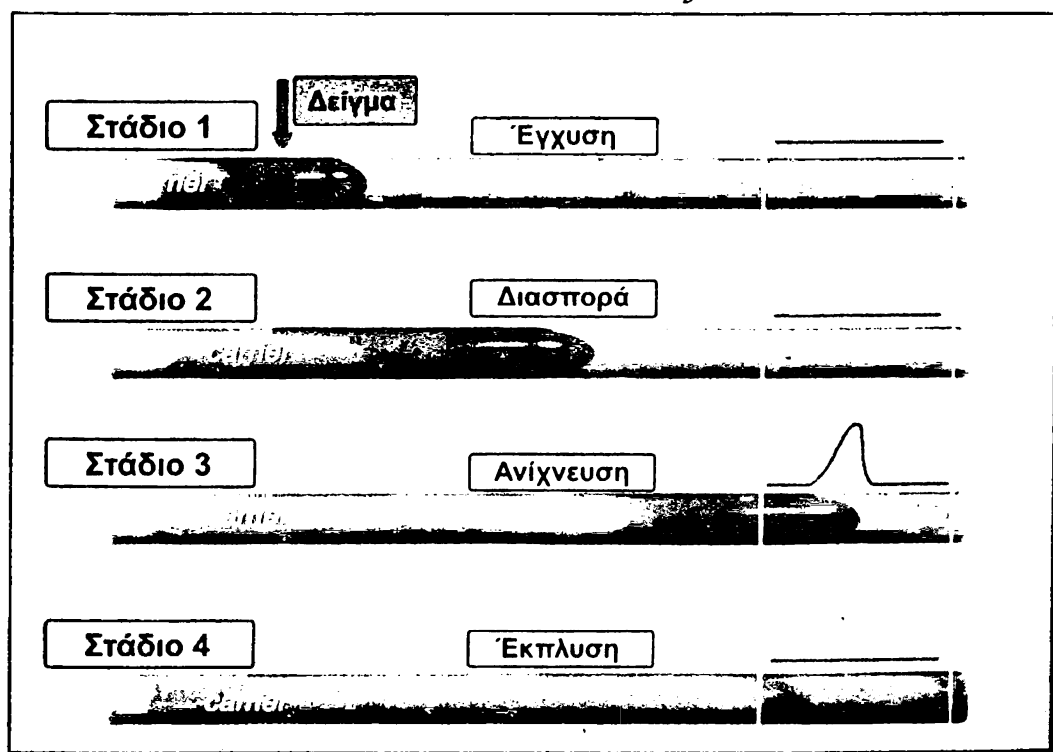
την οποία ο αναλύτης προσδιορίζεται χωρίς καμία διακοπή σε ένα συνεχές ρεύμα φέροντος υγρού ή αερίου [Růžicka, 1988].

### 3.1.2. Κατάταξη τεχνικών ανάλυσης συνεχούς ροής

Οι αναλυτικές τεχνικές συνεχούς ροής διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες:

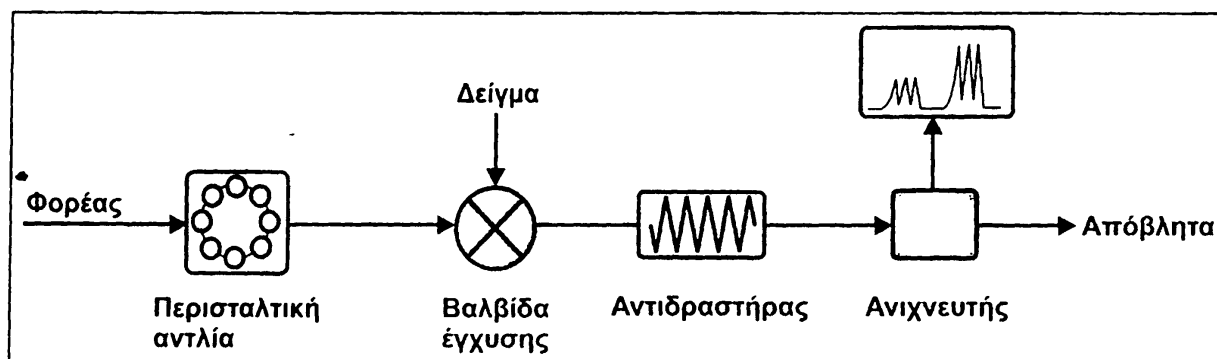
1) «διακοπτόμενη συνεχή ανάλυση» (Segment Flow Analysis, SFA): το προς ανάλυση δείγμα εισάγεται κατά συνεχή τρόπο στο ρεύμα του φορέα και η ροή του διακόπτεται από φυσαλίδες αέρος, χωρίζοντάς το σε διακριτά τμήματα. Το σήμα που καταγράφεται έχει τη μορφή σήματος σε κατάσταση ισορροπίας, καθώς επιτυγχάνεται πλήρης ανάμιξη με τα αντιδραστήρια, οι δε φυσαλίδες απομακρύνονται πριν φτάσουν στον ανιχνευτή.

2) «ανάλυση με έγχυση δείγματος σε συνεχή ροή» (Flow Injection Analysis, FIA): στην τεχνική αυτή τα δείγματα εισάγονται στο μη διακοπτόμενο ρεύμα του φορέα (carrier) μέσω μίας βαλβίδας έγχυσης ή ενός ελαστικού διαφράγματος (septum), υφίστανται διάφορες φυσικοχημικές διεργασίες (ανάμιξη, αραιώση) ή κάποια χημική αντίδραση και οδηγούνται στον ανιχνευτή συνεχούς ροής, ο οποίος καταγράφει το σήμα και τελικά αποβάλλεται (Σχήμα 3.1).



Σχήμα 3.1: Σχηματική απεικόνιση της αρχής λειτουργίας της FIA.

(Teflon, πολυαιθυλένιο). Παρουσιάζουν μεγάλη αντοχή στη θερμότητα και τους διαβρωτικούς διαλύτες (ισχυρά οξέα και βάσεις, οργανικοί διαλύτες) και κατασκευάζονται σε πολλές διαστάσεις και σχήματα.



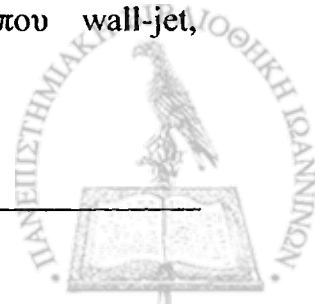
Σχήμα 3.2: Απεικόνιση μιας τυπικής διάταξης FIA.

2) το σύστημα προώθησης: συνήθως αποτελείται από μία περισταλτική αντλία. Τα πλεονεκτήματα αυτής είναι ότι μπορεί να φιλοξενήσει μεγάλο αριθμό καναλιών διαφορετικών διαστάσεων, εξασφαλίζει σταθερότητα στη ροή η οποία δεν επηρεάζεται από τη δημιουργούμενη υποπίεση και τις τυχόν αλλαγές στο ιξώδες. Το κυριότερο μειονέκτημά τους, είναι η δημιουργία παλμού στην κατεύθυνση της ροής, η επίδραση του οποίου μπορεί να ελαχιστοποιηθεί με τη χρήση εύκαμπτων σωλήνων.

3) το σύστημα έγχυσης του δείγματος: μπορεί να αποτελείται από μία απλή ένεση μέχρι και μία περιστροφική βαλβίδα έγχυσης πολλών κατευθύνσεων. Σήμερα οι πιο διαδεδομένες στη χρήση είναι οι περιστροφικές βαλβίδες πολλαπλών κατευθύνσεων ενώ για περισσότερο πολύπλοκες αναλύσεις χρησιμοποιούνται οι βαλβίδες επιλογής τριών θέσεων [Rosales, 2003].

4) οι αντιδραστήρες και οι θάλαμοι ανάμιξης: οι οποίοι χρησιμοποιούνται στην περίπτωση που θέλουμε να επιτύχουμε καλύτερη ανάμιξη του δείγματος ή αύξηση του χρόνου παραμονής στο σύστημα.

5) την κυψελίδα ροής: πρέπει να πληροί τους εξής όρους: να επιτυγχάνει χαμηλό λόγο σήματος/θορύβου (S/N) και μικρή ωμική πτώση τάσης, να έχει μικρό νεκρό όγκο, αυστηρά καθορισμένη υδροδυναμική και να συντηρείται εύκολα. Αυτές που συνήθως χρησιμοποιούνται είναι η λεπτής στοιβάδας (thin-layer) και τύπου wall-jet, κατασκευασμένες συνήθως από Teflon.



Τα σημαντικότερα μειονεκτήματα και πλεονεκτήματα που προκύπτουν από τη σύγκριση των δύο μεθόδων είναι τα ακόλουθα:

1) η FIA είναι ουσιαστικά πιο απλή και με λιγότερο απαιτητική οργανολογία,

2) ο ρυθμός ανάλυσης δειγμάτων στη FIA είναι τουλάχιστον διπλάσιος, ενώ παράλληλα η κατανάλωση σε όγκο δειγμάτων και αντιδραστηρίων είναι κατά πολύ μικρότερη απ' ό τι στην SFA.

3) με την SFA επιτυγχάνονται υψηλότερης ευαισθησίας προσδιορισμοί, γεγονός που οφείλεται στη μικρότερη αραίωση που υφίσταται το δείγμα μέσα στο φορέα και στο ότι η αντίδραση συμπληρώνεται σε μεγαλύτερο βαθμό πριν φτάσει το δείγμα στον ανιχνευτή. Αυτά τα μειονεκτήματα μπορούν να εξαλειφθούν και στη FIA με κατάλληλες τροποποιήσεις στην τεχνική.

4) η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων στην SFA είναι συνήθως καλύτερες και επηρεάζονται λιγότερο από διακυμάνσεις στο σήμα εξόδου, καθώς οι μετρήσεις γίνονται όταν το σύστημα έχει πλέον φτάσει σε κατάσταση ισορροπίας και μπορεί να εξαχθεί ένας μέσος όρος πολλών μετρήσεων.

5) η διασπορά του δείγματος στην SFA είναι σημαντικά μικρότερη λόγω του εγκλωβισμού του ανάμεσα στις φυσαλίδες. Από την άλλη πλευρά στη FIA- η εκτεταμένη διασπορά μπορεί να ελεγχθεί με κατάλληλη τροποποίηση και βελτιστοποίηση των πειραματικών συνθηκών, με σαφείς επιπτώσεις στην ευαισθησία και την εκλεκτικότητα της μεθόδου.

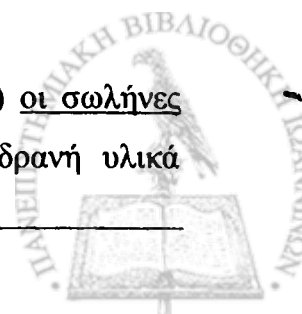
6) ένα πλεονέκτημα της FIA είναι ότι όλα τα απαραίτητα αντιδραστήρια μπορούν να εισαχθούν στο ρεύμα του φορέα. Αντίθετα στην SFA πρέπει να προστίθενται ξεχωριστά.

Αυτό που εξάγεται σαν γενικότερο συμπέρασμα είναι ότι η FIA είναι πιο διαδεδομένη σαν τεχνική και πιο απλή στην εφαρμογή της, σε αντίθεση με την SFA που εφαρμόζεται σε πιο πολύπλοκους προσδιορισμούς.

## 3.2. ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΕΓΧΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΣΕ ΣΥΝΕΧΗ ΡΟΗ (FIA)

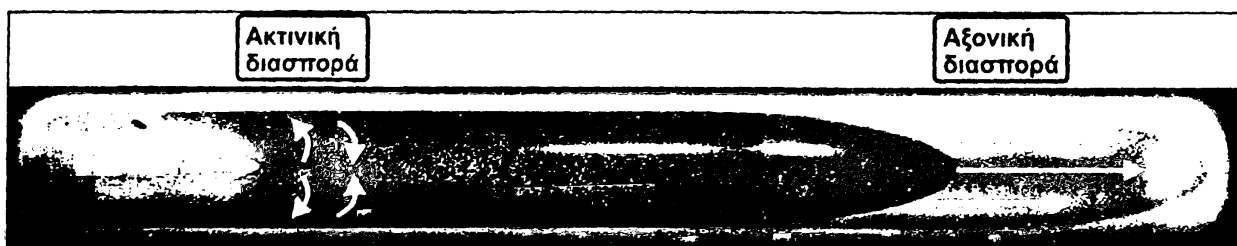
### 3.2.1. Βασικά μέρη μιας διάταξης FIA

Τα βασικότερα τμήματα μίας διάταξης FIA (Σχήμα 3.2) είναι: 1) οι σωλήνες μεταφοράς και οι σύνδεσμοι: είναι κατασκευασμένοι από χημικώς αδρανή υλικά



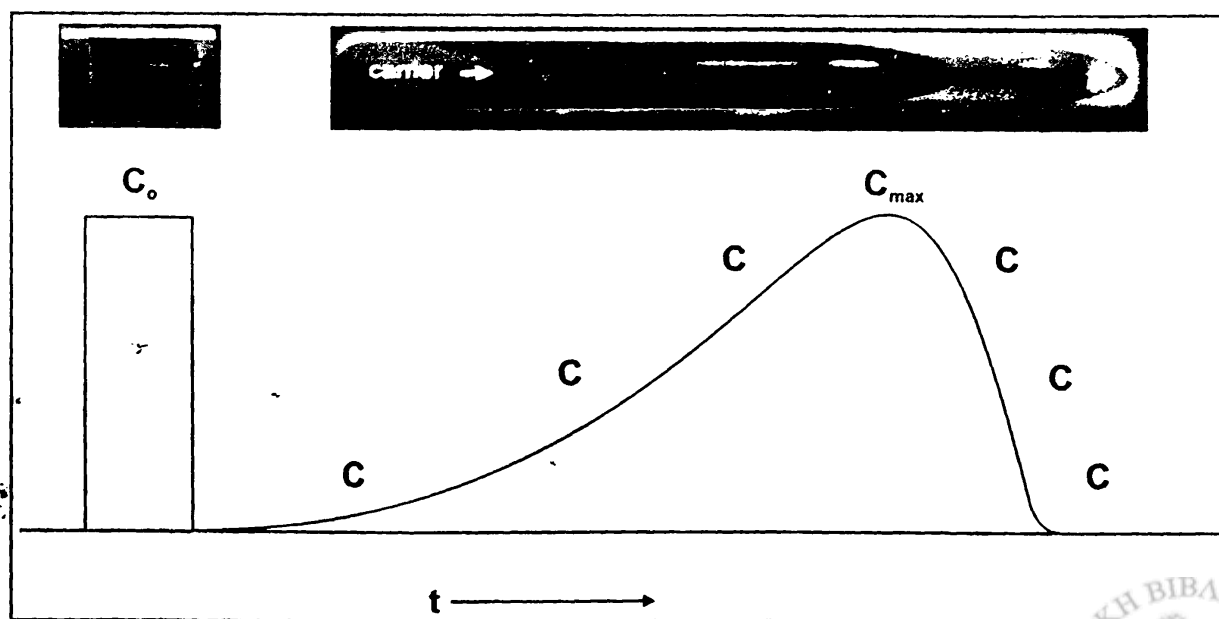


Όμως, και στις δύο περιπτώσεις η κορυφή έχει ένα μικρό εύρος εξαιτίας του φαινομένου της «διασποράς του δείγματος» μέσα στο φορέα. Το κέντρο της ζώνης δείγματος κινείται με ταχύτητα μεγαλύτερη απ' ό,τι στα άκρα εξαιτίας της επιβράδυνσης που υφίσταται το υγρό λόγω επαφής με τα τοιχώματα. Το φαινόμενο ονομάζεται «αξονική διασπορά». Τα μόρια που έρχονται σε επαφή με τα τοιχώματα κινούνται και προς το κέντρο του σωλήνα, ενώ αυτά που βρίσκονται στο κέντρο κινούνται με κατεύθυνση προς τα τοιχώματα. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται «ακτινική διασπορά» (Σχήμα 3.4).



Σχήμα 3.4: Απεικόνιση των φαινομένων της «αξονικής» και «ακτινικής» διασποράς.

Επειδή η συγκέντρωση του δείγματος είναι μεγαλύτερη στο κέντρο του φορέα, το καταγραφόμενο σήμα παρουσιάζει, όπως είναι φυσικό, ένα μέγιστο (Σχήμα 3.5). Η διασπορά είναι πρακτικά η αραιώση, που υφίσταται το δείγμα κατά τη διαδρομή του από τη στιγμή της έγχυσης μέχρι που αυτό φτάνει στον ανιχνευτή.

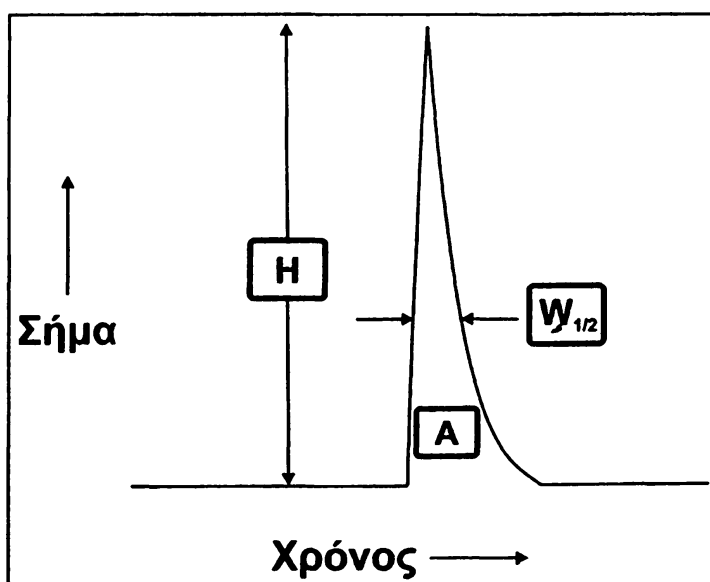


Σχήμα 3.5: Το φαινόμενο της διασποράς του δείγματος σε μία διάταξη FIA.

6) το σύστημα ανίχνευσης: στην αμπερομετρία αποτελείται από ένα ηλεκτρόδιο στερεάς κατάστασης συνδεδεμένο με το όργανο μέτρησης, τον ποτενσιοστάτη. Επειδή η ηλεκτροχημική διαδικασία λαμβάνει χώρα στην επιφάνεια του αισθητήρα και όχι στην κύρια μάζα του διαλύματος, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν για τις μετρήσεις μικροί όγκοι δειγμάτων.

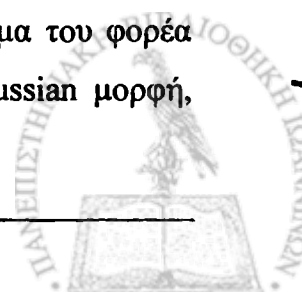
### 3.2.2. Το φαινόμενο της διασποράς του δείγματος

Όπως προαναφέραμε η τεχνική της FIA, στηρίζεται στη εισαγωγή ενός καθορισμένου όγκου δείγματος στο συνεχές ρεύμα του φορέα. Το δείγμα σχηματίζει μία ζώνη, η οποία μετακινούμενη προς τον ανιχνευτή διασπείρεται ή/και αντιδρά με το ρεύμα του φορέα. Το καταγραφόμενο σήμα έχει τη μορφή οξείας κορυφής (Σχήμα 3.3).



**Σχήμα 3.3:** Τυπική μορφή ενός σήματος FIA. H: το ύψος της κορυφής,  $W_{1/2}$ : το πλάτος της κορυφής στο μισό του ύψους, A: το εμβαδόν της κορυφής.

Το ύψος H, το πλάτος  $W_{1/2}$  στο μισό του ύψους και το εμβαδόν A είναι τα χαρακτηριστικά μεγέθη της κορυφής, τα οποία είναι ανάλογα της τιμής του μετρούμενου ρεύματος και σχετίζονται άμεσα με τη συγκέντρωση του προσδιοριζόμενου αναλύτη στο δείγμα. Στην περίπτωση, όπου στο ρεύμα του φορέα παρεμβάλλεται θάλαμος ανάμιξης, η καταγραφόμενη κορυφή έχει Gaussian μορφή, γιατί ο χρόνος παραμονής του δείγματος στο ρεύμα επιμηκώνεται.



Η διασπορά (D) του δείγματος δίνεται από την ακόλουθη μαθηματική εξίσωση:

$$D = C_o / C_{\max} = H_o / H_{\max} \quad (3.1)$$

όπου D = ο συντελεστής διασποράς του δείγματος, C<sub>o</sub> = η αρχική συγκέντρωση του δείγματος, C<sub>max</sub> = η συγκέντρωση του ίδιου δείγματος, που αντιστοιχεί στο μέγιστο της κορυφής, έπειτα από την έγχυση και διασπορά. Αν οι τιμές συγκεντρώσεων (C) του δείγματος βρίσκονται εντός της γραμμικής περιοχής του ανιχνευτή, τότε μπορούν να χρησιμοποιηθούν και τα αντίστοιχα ύψη των κορυφών H<sub>o</sub> και H<sub>max</sub>. Ο συντελεστής διασποράς (D) όπως είναι αναμενόμενο έχει πάντα τιμή μεγαλύτερη της μονάδας και όταν λαμβάνει την τιμή D = 2, τότε θεωρείται ότι το προς ανάλυση δείγμα έχει αραιωθεί στο φορέα με αναλογία αραιώσης 1:1.

**Πίνακας 3.1:** Διασπορά του δείγματος συναρτήσει του συντελεστή διασποράς (D).

| Συντελεστής διασποράς (D) | Μέγεθος διασποράς δείγματος |
|---------------------------|-----------------------------|
| 1 – 2                     | Περιορισμένη                |
| 2 – 10                    | Μέτρια                      |
| 10 – 10.000               | Υψηλή                       |

Στον πίνακα 3.1 μπορεί να δει κανείς πώς χαρακτηρίζεται η διασπορά ενός δείγματος σε συνάρτηση με την τιμή του συντελεστή διασποράς (D) [Růžička, 1988 – Štulík, 1987].

### 3.3. ΠΗΓΕΣ, ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΣΦΑΛΜΑΤΩΝ ΣΕ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ FIA

Σε πειράματα τα οποία περιλαμβάνουν τη χρήση συστημάτων FIA τρεις είναι οι συνηθέστερες πηγές σφαλμάτων:

- 1) η φύση του αναλυόμενου δείγματος,
- 2) δυσλειτουργία κάποιου από τα εξαρτήματα της FIA και
- 3) λάθος σχεδιασμός πειράματος και σφάλματα του χειριστή.



Πολλές φορές είναι απαραίτητη η προκατεργασία του δείγματος πριν αυτό χρησιμοποιηθεί για έγχυση σε ένα σύστημα FIA και μπορεί να περιλαμβάνει διαδικασίες όπως αραιώση, εξουδετέρωση και διήθηση, αν και στην περίπτωση δειγμάτων πυκνής συγκέντρωσης, ή πολύ όξινων (ή αλκαλικών), ή υψηλού ιξώδους είναι προτιμότερο να αραιώνονται απευθείας, εγχύοντας ποσότητες της τάξης των μικρολίτρων ( $\mu\text{L}$ ) σε δευτερεύοντα κανάλια.

Η διήθηση δεν μπορεί να αποφευχθεί στην περίπτωση που αρχικά στο δείγμα υπάρχουν αιωρούμενα στερεά, αν και πολλές φορές σχηματίζονται και κατά τη διάρκεια της ανάλυσης των δειγμάτων. Η μη απομάκρυνση των στερεών σωματιδίων από το δείγμα πριν από την ανάλυση μπορεί να οδηγήσει σε στόμωση των σωληνώσεων αλλά υπάρχουν και περιπτώσεις που αντιδρούν και με τους μεταλλάκτες άλλοτε καταστρέφοντάς τους και άλλοτε παρεμποδίζοντας την ανίχνευση του αναλύτη, ειδικά σε συστήματα με οπτικούς ανιχνευτές. Αν και το να απαλλάξει κάποιος το δείγμα από στερεά σωματίδια είναι πολύ εύκολο είτε με μία απλή διήθηση είτε με μία φυγοκέντρωση, δεν συμβαίνει και το ίδιο στην περίπτωση του σχηματισμού αυτών κατά τη διάρκεια της ανάλυσης. Ένας τρόπος αντιμετώπισης είναι η προσθήκη επιφανειοδραστικών ή απορρυπαντικών ουσιών (π.χ. γλυκερίνη), τα οποία αναστέλλουν το σχηματισμό στερεών σωματιδίων. Επίσης, η προσθήκη ουσιών που δεσμεύουν με χημικό τρόπο τα στερεά αιωρήματα (π.χ.  $\text{Fe(III)}$  στον προσδιορισμό του  $\text{SO}_2$  σε δείγμα κόκκινου κρασιού) είναι ένας ακόμα τρόπος αντιμετώπισης του προβλήματος [Růžička, 1988].

Προβλήματα που σχετίζονται με τη δυσλειτουργία κάποιων από τα εξαρτήματα του συστήματος FIA καθώς, επίσης, τα αίτια και πιθανοί τρόποι αντιμετώπισης αυτών αναφέρονται αμέσως παρακάτω:

1) κακή ή χαμηλή επαναληψιμότητα: πιθανή αιτία θεωρείται η συμπαράσυρση (carryover). Μπορεί πολύ εύκολα να ελεγχθεί εκτελώντας διαδοχικές εγχύσεις δειγμάτων εναλλάξ χαμηλών και υψηλών συγκεντρώσεων. Αντιμετωπίζεται είτε με ελάττωση της συχνότητας των εγχύσεων, είτε με αύξηση της ροής του φορέα και των αντιδραστηρίων ή και των δύο. Επίσης, σε αυτοματοποιημένα συστήματα είναι καλό να ελεγχθεί και η βαλβίδα για πιθανή διαρροή καθώς και η στάθμη των αντιδραστηρίων στους περιέκτες αποθήκευσης.



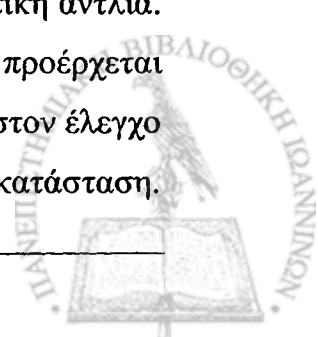
2) η αποδιέγερση της κορυφής είναι αργή: πολλές φορές μετά την έγχυση του δείγματος και την καταγραφή τη κορυφής η αποδιέγερση μέχρι που το σήμα να σταθεροποιηθεί ξανά στη γραμμή βάσης (baseline) είναι βραδεία. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην ύπαρξη νεκρού όγκου σε κάποιο σημείο της διαδρομής, που δρα σαν μικρός αντιδραστήρας ανάμιξης καθυστερώντας έτσι τη μεταφορά του δείγματος. Για το λόγο αυτό πρέπει να ελεγχθούν τα σημεία συνδέσεων των σωληνώσεων και η κυψελίδα ροής.

3) ολίσθηση (drift) της γραμμής βάσης: στην περίπτωση των οπτικών ανιχνευτών η ολίσθηση οφείλεται στην απόθεση υλικού στη διαπερατή επιφάνεια της κυψελίδας ροής και αντιμετωπίζεται με την προσθήκη κάποιου αντιδραστηρίου που δρα σαν καθαριστικό της επιφάνειας. Στην περίπτωση ηλεκτροχημικών ανιχνευτών μπορεί να οφείλεται στην παλαιώση της επιφάνειας του ηλεκτροδίου εργασίας, βλάβη του ηλεκτροδίου αναφοράς ή μεταβολή στο δυναμικό του ηλεκτρολυτικού συνδέσμου. Στην περίπτωση αυτή καθαρίζεται ή αντικαθίσταται το ηλεκτρόδιο εργασίας και ελέγχεται το ηλεκτρόδιο αναφοράς.

4) φουσαλίδες αέρα: η ύπαρξή τους μπορεί να οφείλεται σε μη απαέρωση του δείγματος, η δε δημιουργία τους μπορεί να οφείλεται σε κάποια χημική αντίδραση που λαμβάνει χώρα κατά μήκος της διαδρομής ή στην επίδραση Venturi στην κυψελίδα εξαιτίας της μεγαλύτερης εσωτερικής διαμέτρου της κυψελίδας ροής σε σχέση με εκείνη των συνδέσμων και των σωληνώσεων. Η αντιμετώπιση βασίζεται στον έλεγχο όλης της συνδεσμολογίας και ειδικότερα στα σημεία σύνδεσης με την κυψελίδα τόσο στην είσοδο όσο και στην έξοδο της προς τα απόβλητα.

5) ξαφνικός θόρυβος στις κορυφές: οφείλεται στην ύπαρξη μικροσκοπικών φουσαλίδων οι οποίες διέρχονται από τον ανιχνευτή. Ο λόγος ύπαρξης μπορεί να είναι είτε κάποιος από τους προαναφερθέντες είτε να οφείλονται σε ατελή πλήρωση του βρόχου του δείγματος.

6) θορυβώδες σήμα: ο έντονος θόρυβος στο καταγραφόμενο σήμα οφείλεται είτε σε συνεχείς παλμούς από την κίνηση της αντλίας είτε σε παλαιωμένα σωληνάκια. Επίσης, μπορεί τα σωληνάκια να μην πλέζονται σωστά πάνω στην περισταλτική αντλία. Εάν χρησιμοποιείται ποτενσιομετρική κυψελίδα ροής, ο θόρυβος μπορεί να προέρχεται και από στατικό ηλεκτρισμό. Η αντιμετώπιση του προβλήματος συνίσταται στον έλεγχο της αντλίας και των σωληνώσεων τα οποία πιθανώς να χρειάζονται αντικατάσταση.



Πρέπει να τονιστεί ότι όταν η αντλία δεν χρησιμοποιείται τα σωληνάκια πρέπει να είναι χαλαρωμένα και να μην πιέζονται σε αυτή. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να αυξάνεται ο χρόνος ζωής τους. Για την εξουδετέρωση του στατικού ηλεκτρισμού η γείωση του συστήματος ή η χρήση κλωβού Faraday είναι οι πιο ενδεδειγμένες λύσεις.

7) εμφάνιση διπλής κορυφής: οφείλεται στην όχι τόσο καλή ανάμιξη του δείγματος και αντιδραστηρίων. Αντιμετωπίζεται με αύξηση του χρόνου παραμονής του δείγματος στο σύστημα, με χρήση αντιδραστήρων ανάμιξης ή με μείωση του όγκου του δείγματος που εγχύεται κάθε φορά.

8) πρόβλημα επαναληψιμότητας για διαφορετικές συγκεντρώσεις: πολλές φορές η επαναληψιμότητα στην καταγραφή των κορυφών είναι καλή για δείγματα χαμηλών συγκεντρώσεων και κακή για δείγματα υψηλών συγκεντρώσεων. Οφείλεται σε ανεπάρκεια αντιδραστηρίων και επιλύεται είτε με αύξηση της συγκέντρωσης των αντιδραστηρίων είτε με αραίωση του αναλυόμενου δείγματος.

9) υψηλή τιμή ρεύματος υποβάθρου: οφείλεται είτε σε υψηλή τιμή του δυναμικού πόλωσης των ηλεκτροδίων είτε σε μόλυνση του φορέα. Η επίλυση επιτυγχάνεται πολύ εύκολα με έλεγχο και κατάλληλη ρύθμιση του εφαρμοζόμενου δυναμικού καθώς και με αντικατάσταση των μολυσμένων διαλυμάτων με άλλα πιο πρόσφατα από αντιδραστήρια υψηλής καθαρότητας.

10) ασταθής γραμμή βάσης: μπορεί να δημιουργείται από διάφορους λόγους όπως η κακή κατάσταση της αντλίας ή των σωληνώσεων μεταφοράς και τροφοδοσίας, στην ύπαρξη προβληματικών συνδέσμων αλλά και σε ελαττωματικό ηλεκτρόδιο αναφοράς. Απαιτείται λοιπόν έλεγχος της αντλίας και αντικατάσταση των φθαρμένων συνδέσμων και σωληνώσεων καθώς και επανατοποθέτηση ή αντικατάσταση του ηλεκτροδίου αναφοράς.

11) εμφάνιση αρνητικών κορυφών: μπορεί να προέρχεται από τη χρήση έγχρωμου φορέα και ανάλυση άχρωμου δείγματος, είτε επειδή το δείγμα είναι πολύ αραιό και προκαλεί στιγμιαία αραίωση και στο φορέα. Άλλοι λόγοι είναι η μεγάλη διαφορά στο ιξώδες ή τη χημική σύσταση φορέα και δείγματος. Η αντιμετώπιση βασίζεται στη χρήση συστημάτων με κοινή μήτρα, γι' αυτό το δείγμα πάντα παρασκευάζεται στο φορέα [Růžička, 1988].

Όσον αφορά τη συντήρηση ενός συστήματος FIA πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα εξής:



1) όταν το σύστημα πρόκειται να χρησιμοποιηθεί με κενά διαστήματα άνω της μίας ημέρας πρέπει μετά το πέρας των πειραμάτων να εκπλένεται σχολαστικά με απεσταγμένο ύδωρ. Εάν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων στα τοιχώματα των σωληνώσεων αποτίθενται στερεά ή έγχρωμα προϊόντα, τότε η έκπλυση πρέπει να γίνεται πρώτα με κάποιο αντιδραστήριο (οξύ, βάση, απορρυπαντικό) και έπειτα με απεσταγμένο ύδωρ, προς αποφυγή στόμωσης και καταστροφής των σωληνώσεων αλλά και της κυψελίδας ροής.

2) Μετά τη διαδικασία της έκπλυσης πρέπει οι σωληνώσεις να απελευθερώνονται από την αντλία ώστε να χαλαρώνουν. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση του χρόνου ζωής των.

3) Εάν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για διαδοχικές μετρήσεις με μικρές παύσεις δεν απαιτείται έκπλυση αλλά πάντα το σύστημα να είναι πλήρες με το διάλυμα του φορέα ή έστω με απεσταγμένο ύδωρ.

### 3.4. ΑΛΛΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΣΥΝΕΧΟΥΣ ΡΟΗΣ

Εκτός από τη FIA στη βιβλιογραφία αναφέρονται και άλλες τεχνικές ανάλυσης συνεχούς ροής οι οποίες είναι:

1) FIA ανάστροφης ροής (Flow Reversal Injection Analysis, FRIA): η κατεύθυνση της ροής αντιστρέφεται ανά τακτά χρονικά διαστήματα, έπειτα από την πρώτη διέλευση του δείγματος από τον ανιχνευτή. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να αυξάνεται ο χρόνος παραμονής του δείγματος στον αντιδραστήρα και επομένως και ο χρόνος επαφής των αντιδραστηρίων με το δείγμα. Η μορφή της κορυφής είναι τύπου Gaussian και το πλάτος της στη βάση αυξάνεται λόγω της αυξημένης διασποράς [Valcárcel, 1987].

2) FIA αναχαίτισης ροής (Stopped Flow Injection analysis, SFIA): η τεχνική βασίζεται στην «παγίδευση» εντός του ανιχνευτή, ενός κλάσματος της ζώνης του δείγματος, διακόπτοντας τη ροή. Τη στιγμή που το δείγμα βρίσκεται στην περιοχή του ανιχνευτή δεν έχει αποκατασταθεί ακόμα η ισορροπία και η αντίδραση βρίσκεται σε πλήρη εξέλιξη, οπότε καταγράφεται ουσιαστικά μία κινητική καμπύλη. Στη συνέχεια η ροή επανεκκινείται και ο ανιχνευτής επιστρέφει στη γραμμή βάσης [Růžička, 1988 – Hansen, 1992].



3) Ανάλυση με διαδοχικές εγχύσεις δείγματος σε συνεχή ροή (Sequential Injection Analysis, SIA): ανήκει στις τεχνικές συνεχούς ροής 2<sup>ης</sup> γενιάς και βασίζεται στη διαδοχική έγχυση του φορέα, του δείγματος και των αντιδραστηρίων μέσω μιας βαλβίδας πολλαπλών θέσεων, τα οποία σχηματίζουν ευδιάκριτες ζώνες. Η ανάμιξή τους γίνεται σε ένα αντιδραστήρα ανάμιξης και στη συνέχεια το υπό ανάλυση δείγμα οδηγείται με αντίστροφη ροή στον ανιχνευτή ο οποίος καταγράφει καμπύλες παρόμοιες με εκείνες της FIA. Η μέθοδος αυτή έχει το πλεονέκτημα ότι απαιτεί μικρή κατανάλωση αντιδραστηρίων αφού αυτά δεν εισάγονται κατά συνεχή τρόπο. Μειονεκτεί όμως στο γεγονός ότι ο αριθμός των δειγμάτων που μπορούν να αναλυθούν είναι μικρότερος και απαιτείται οπωσδήποτε αυτοματοποίηση για να εξασφαλιστεί υψηλή επαναληπτικότητα [Růžička, 1990 – Lenehan, 2002].

4) Ανάλυση με έγχυση μικροσφαιριδίων σε συνεχή ροή (Bead Injection Analysis, BIA): ανήκει στις τεχνικές συνεχούς ροής 3<sup>ης</sup> γενιάς και βασίζεται στην έγχυση μικροσφαιριδίων (beads) στο συνεχές ρεύμα του φορέα, τα οποία «παγιδεύονται» σε μία συγκεκριμένη θέση με καθορισμένη γεωμετρία. Στη συνέχεια εγχύεται το δείγμα, το οποίο μεταφέρεται μέσω του φορέα στην πακεταρισμένη κλίνη σωματιδίων. Εκεί λαμβάνει χώρα μία αντίδραση μεταξύ των μορίων του αναλύτη και των δραστικών ομάδων των σφαιριδίων, τα οποία δεσμεύονται και μετατρέπονται σε ανιχνεύσιμο υλικό, είτε in-situ είτε στο υγρό έκλουσης του αντιδραστήρα. Τέλος τα μικροσφαιρίδια είτε αναγεννιόνται μέσα στο σύστημα είτε οδηγούνται στα απόβλητα. Σημαντικά πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι η υψηλή ακρίβεια και επαναληψιμότητα, καθώς και η ταχύτητα αναγέννησης των σφαιριδίων του αντιδραστήρα [Růžička, 1993, 1994].





## ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup>



*Αλκοολική οξειδάση (Alcohol oxidase)*

## "ΑΡΧΕΣ ΕΝΖΥΜΟΛΟΓΙΑΣ και ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΝΖΥΜΩΝ"

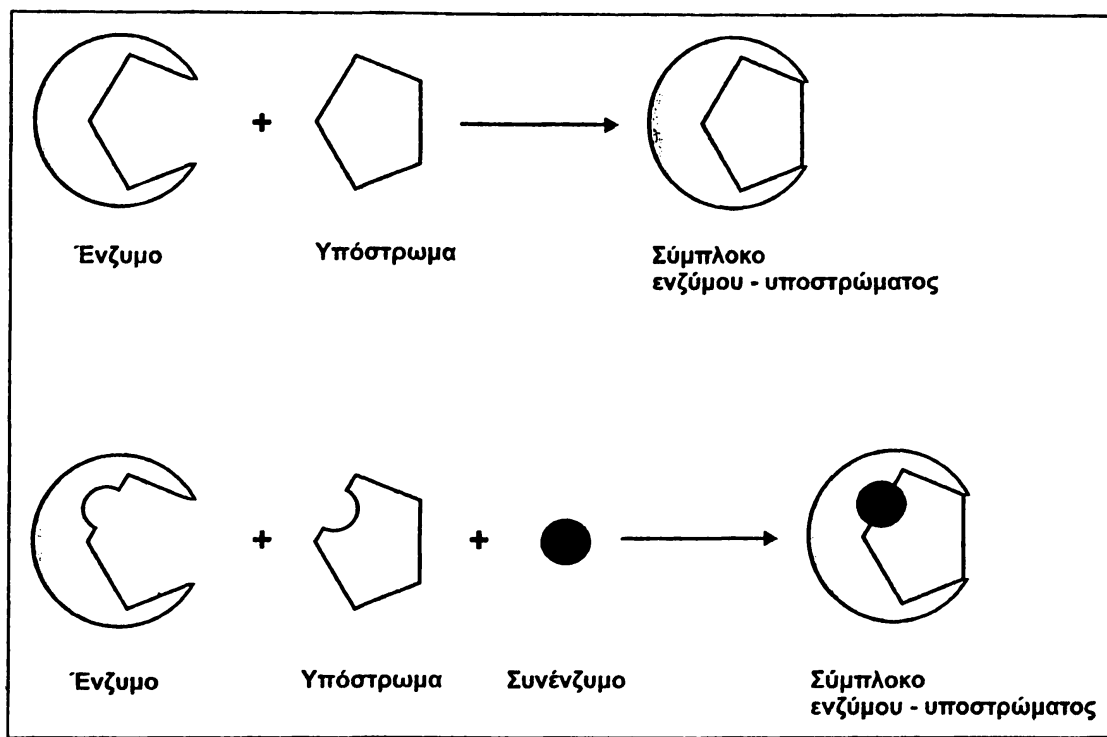
### 4.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΑ ΕΝΖΥΜΑ

#### 4.1.1. Γενικά

Τα «ένζυμα» ή αλλιώς «βιοκαταλύτες» είναι πρωτεϊνικά μόρια τα οποία επιταχύνουν τις αντιδράσεις που καταλύουν τουλάχιστον κατά ένα εκατομμύριο φορές και μεσολαβούν στο μετασχηματισμό των διαφόρων μορφών ενέργειας.

Ο μηχανισμός δράσης των ενζύμων επί του υποστρώματος (substrate), είναι του τύπου «κλειδαριάς-κλειδιού», όπως προτάθηκε το 1899 από τον Emil Fischer (**Σχήμα 4.1**). Πολλές φορές τα ένζυμα συνοδεύονται από άλλα μικρού μοριακού βάρους μόρια, τα οποία χαρακτηρίζονται σαν προσθετικές ομάδες και ονομάζονται συνένζυμα (co-enzyme). Όπως είναι αντιληπτό η ύπαρξη των συνενζύμων είναι κρίσιμης σημασίας, γιατί από αυτά εξαρτάται η καταλυτική δράση των ενζύμων.





Σχήμα 4.1: Μηχανισμός ενζυμικής δράσης του τύπου «κλειδαριάς-κλειδιού».

## 4.2. ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΤΩΝ ENZYMΩΝ

Ο πιο συνηθισμένος τρόπος ονομασίας και κατάταξης των ενζύμων γίνεται με βάση τη φύση του υποστρώματος πάνω στο οποίο δρουν. Έτσι, τα ένζυμα ανάλογα με το είδος της αντίδρασης που καταλύουν διακρίνονται στις παρακάτω κατηγορίες [Holme, 1998]:

- 1) Οξειδοοξειδοκτάσες: χρησιμοποιούνται για καταλυτικές οξειδώσεις και αναγωγές.
- 2) Τρανσφεράσες: καταλύουν τη μεταφορά χαρακτηριστικών ομάδων (π.χ. -NH<sub>2</sub>).
- 3) Υδρολάσες: χρησιμοποιούνται για την υδρολυτική διάσπαση των δεσμών C-O, C-N, C-C.
- 4) Λυάσες: Καταλύουν τη διάσπαση δεσμών C-C, C-O, C-N ή την αφαίρεση δεσμών από το υπόστρωμα με αποτέλεσμα τη δημιουργία διπλών δεσμών ή την προσθήκη ομάδων σε διπλούς δεσμούς.
- 5) Ισομεράσες: χρησιμοποιούνται για την κατάλυση γεωμετρικών ή δομικών ενδομοριακών ανακατατάξεων.

6) Συνθετάσες ή λιγάσες: καταλύουν την προσθήκη ενός μορίου σε ένα άλλο μόριο ή τη σύνθεση μορίων από απλούστερα μόρια και τριφωσφορικούς εστέρες νουκλεοζιτών.

Άλλος τρόπος κατάταξης και ονομασίας των ενζύμων είναι αυτός που έχει εισαχθεί από την EC (Enzyme Community) [International Union of Biochemistry, 1992], σύμφωνα με τον οποίο σε κάθε ένζυμο δίνεται ένας τετραψήφιος αριθμός. Τα τρία πρώτα ψηφία έχουν σχέση με το είδος της αντίδρασης που καταλύει το ένζυμο και ο τέταρτος απαιτείται μόνον όταν η ίδια αντίδραση καταλύεται από περισσότερα του ενός ένζυμα με διαφορετική πρωτεϊνική δομή (Πίνακας 4.1).

**Πίνακας 4.1:** Επεξήγηση ονοματολογίας ενζύμων με βάση το σύστημα EC.

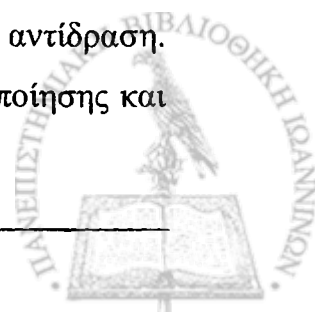
**Όνομα Ενζύμου (EC W.X.Y.Z)**

|    |   |
|----|---|
| EC | Αριθμός συστήματος EC                                   |
| W  | Δείχνει τον τύπο της καταλυόμενης αντίδρασης (1 – 6)    |
| X  | Δείχνει την γενική ομάδα στην οποία ανήκει το υπόστρωμα |
| Y  | Δείχνει το συγκεκριμένο τύπο υποστρώματος ή συνενζύμου  |
| Z  | Δείχνει τον αριθμό σειράς του ενζύμου                   |

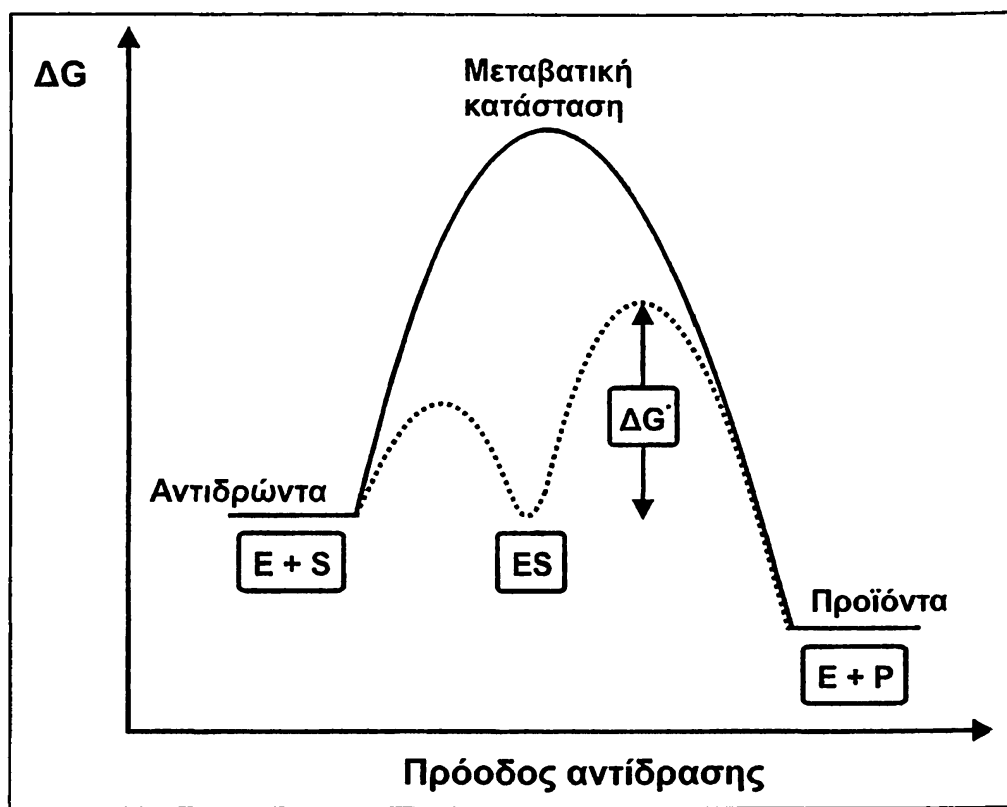
### 4.3. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ENZYMΩΝ

#### 4.3.1. Καταλυτική ισχύς

Όπως είναι ήδη γνωστό για να διεξαχθεί μία χημική αντίδραση πρέπει να υπερνικηθεί ένα ενεργειακό φράγμα, που ονομάζεται ενέργεια ενεργοποίησης ( $\Delta G^*$ ). Ακριβώς αυτός είναι και ο ρόλος των ενζύμων, τα οποία μειώνουν την  $\Delta G^*$  επιταχύνοντας έτσι την αντίδραση. Αυτό επιτυγχάνεται με την εξέλιξη της αντίδρασης διαμέσου μίας μεταβατική κατάσταση, κατά την οποία έχουμε το σχηματισμό ενός ενδιάμεσου συμπλόκου (ES) ανάμεσα στο ένζυμο (E) και το υπόστρωμα (S) (Σχήμα 4.2). Πρέπει να τονίσουμε ότι το ένζυμο, όπως άλλωστε και όλοι οι καταλύτες, παραμένει ποιοτικά και ποσοτικά αναλλοίωτο χωρίς να συμμετέχει στην αντίδραση. Επίσης πρέπει να τονιστεί ότι τα ένζυμα μεταβάλλουν την ενέργεια ενεργοποίησης και



όχι την ελεύθερη ενέργεια Gibbs ( $\Delta G$ ), άρα δεν μεταβάλλεται η θέση της χημικής ισορροπίας αλλά η ταχύτητα επίτευξης αυτής.



Σχήμα 4.2: Γραφική απεικόνιση εξέλιξης μία αντίδρασης απουσία (συνεχής γραμμή) και παρουσία ενζύμου (διακεκομμένη γραμμή).

Κατά την ενζυμική κατάλυση τα υποστρώματα δεσμεύονται σε συγκεκριμένες περιοχές επί των ενζύμων (ενεργά κέντρα, active site) με αποτέλεσμα να έρχονται πολύ κοντά. Το φαινόμενο αυτό προσομοιάζει με τη θεωρία των συγκρούσεων σε μία απλή χημική αντίδραση αλλά διεξάγεται με πολύ μεγαλύτερη ταχύτητα ακόμα και  $10^{12}$  φορές. Ένα ακόμα χαρακτηριστικό είναι η στρέψη και η παραμόρφωση των υποστρωμάτων κατά τη διαδικασία σύνδεσης με το ένζυμο, με αποτέλεσμα να μεταβάλλεται η γεωμετρία και η κατανομή φορτίου του υποστρώματος.

Επίσης, η καταλυτική ισχύς των ενζύμων οφείλεται στην ύπαρξη αλυσίδων αμινοξέων ή άλλων πρωτολυτικών ομάδων, που μπορούν να δράσουν σαν δότες ή δέκτες πρωτονίων (όξινη ή βασική κατάλυση) [Stryer, 1997]. Τέλος, στη περίπτωση του σχηματισμού των ενδιάμεσων προϊόντων (ομοιοπολική κατάλυση) λαμβάνει χώρα πυρηνόφιλη υποκατάσταση από το ένζυμο στο υπόστρωμα.

### 4.3.2. Εξειδίκευση

Τα ένζυμα παρουσιάζουν υψηλό βαθμό εξειδίκευσης, τόσο στην αντίδραση που καταλύουν όσο και στην επιλογή του υποστρώματος. Ένα ένζυμο καταλύει συνήθως μία χημική αντίδραση και για ένα συγκεκριμένο υπόστρωμα, οπότε ο βαθμός εξειδίκευσής του είναι απόλυτος (π.χ. DNA Πολυμεράση I). Στην περίπτωση που το ένζυμο καταλύει περισσότερες από μία συγγενικού τύπου αντιδράσεις τότε λέμε ότι δεν είναι εξειδικευμένο αλλά ότι παρουσιάζει υψηλή εκλεκτικότητα (π.χ. τα πρωτεολυτικά ένζυμα σαμπτυλυσίνη και θρυψίνη).

Υπάρχουν, επίσης, ένζυμα που παρουσιάζουν εξειδίκευση ως προς μία συγκεκριμένη ομάδα αλλά και ένζυμα η εξειδίκευση των οποίων βασίζεται στην στερεοχημική διαμόρφωση των υποστρωμάτων (π.χ. οι δεϋδρογενάσες τύπου A και B).

Το σημαντικότερο αποτέλεσμα της εξειδίκευσης όμως των ενζύμων είναι ότι στις ενζυμικές αντιδράσεις σπανίως συμβαίνουν παράπλευρες αντιδράσεις, που να οδηγούν στο σχηματισμό άχρηστων παραπροϊόντων, όπως συμβαίνει στις μη καταλυόμενες αντιδράσεις.

### 4.3.3. Ρύθμιση ενζυμικής δραστηριότητας

Σημαντική παράμετρο αποτελεί η δυνατότητα ελέγχου και ρύθμισης της ενζυμικής δραστηριότητας. Η ρύθμιση γίνεται από διάφορους παράγοντες:

1) επανατροφοδοτική αναστολή (feedback inhibition): πολλές φορές το ένζυμο που καταλύει μία χημική αντίδραση αναστέλλεται από το τελικό προϊόν. Ανάλογα με τη συγκέντρωση του προϊόντος το ένζυμο ενεργοποιείται και αναστέλλεται, εξαιτίας της αλλοστερικής αλληλεπίδρασης με το ένζυμο σε μία ρυθμιστική θέση διαφορετική από εκείνη του ενεργού κέντρου.

2) ρυθμιστικές πρωτεΐνες: μία τέτοια περίπτωση αποτελεί η ασβεστοτροποποιητίνη (καλμοδουλίνη, calmodulin), μία πρωτεΐνη βάρους 17 kd που χρησιμεύει σαν αισθητήρας ασβεστίου στα ευκαρυωτικά κύτταρα.

3) ομοιοπολική τροποποίηση: η πρόσδεση ή αφαίρεση χαρακτηριστικών ομάδων (π.χ. φώσφορικής) σε κατάλοιπα ενζυμικών αντιδράσεων ενεργοποιεί την καταλυτική δράση των ενζύμων.



4) πρωτεολυτική ενεργοποίηση: μερικά ένζυμα συντίθενται σε μία μορφή ανενεργού πρόδρομου μορίου (ζυμογόνα), το οποίο ενεργοποιείται στο φυσιολογικά κατάλληλο χρόνο και τόπο. Αυτό το είδος της ρύθμισης απαντάται στα ένζυμα της πέψης [Stryer, 1997].

#### 4.4. ΤΟ ΕΝΕΡΓΟ ΚΕΝΤΡΟ

Το ενεργό κέντρο του ενζύμου, όπως προαναφέρθηκε, είναι η περιοχή όπου προσδένονται τα υποστρώματα (και το συνένζυμο αν είναι απαραίτητο) και περιέχει τα κατάλοιπα που συμμετέχουν απευθείας στη σύνδεση ή τη διάσπαση των δεσμών. Αυτά τα κατάλοιπα ονομάζονται «καταλυτικές ομάδες» (catalytic groups). Αν και τα ένζυμα διαφέρουν ευρέως στη δομή, την εξειδίκευση και τον τρόπο της κατάλυσης, υπάρχουν κάποια γενικά χαρακτηριστικά που αφορούν το ενεργό κέντρο:

1) Καταλαμβάνει ένα σχετικά μικρό μέρος από το συνολικό όγκο του ενζύμου αποτελούμενο από περισσότερα των 100 καταλοίπων αμινοξέων με συνολική μάζα μεγαλύτερη από 10 kd και διάμετρο μεγαλύτερη από 25 Å [Fersht, 1985].

2) Το ενεργό κέντρο είναι μια τρισδιάστατη οντότητα, που έχει σχηματιστεί από ομάδες που προέρχονται από διαφορετικές περιοχές μίας γραμμικής αλληλουχίας αμινοξέων.

3) Τα υποστρώματα προσδένονται στα ένζυμα με πολλαπλές ασθενείς ελκτικές δυνάμεις. Τα σύμπλοκα ενζύμου-υποστρώματος (ES), συνήθως έχουν σταθερές σχηματισμού, που κυμαίνονται από  $10^{-2}$  μέχρι  $10^{-8}$  M, οι οποίες αντιστοιχούν σε τιμές ελεύθερης ενέργειας από -3 έως -12 kcal mol<sup>-1</sup>. Οι μη-ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις είναι πολύ ασθενέστερες από τους ομοιοπολικούς δεσμούς με τιμές ενέργειας που κυμαίνονται από -50 μέχρι -110 kcal mol<sup>-1</sup>.

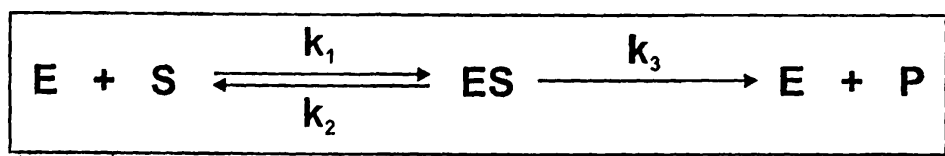
Οι αντιστρεπτές αλληλεπιδράσεις των βιομορίων οφείλονται σε δεσμούς ηλεκτροστατικής φύσεως, δεσμούς υδρογόνου, δυνάμεις van der Waals και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Στην πρόσδεση, οι δυνάμεις van der Waals γίνονται σημαντικές μόνο όταν αρκετά άτομα του υποστρώματος έλθουν ταυτόχρονα πολύ κοντά σε πολλά άτομα του ενζύμου. Άρα το ένζυμο και το υπόστρωμα θα έπρεπε να έχουν συμπληρωματικά σχήματα. Ο κατευθυντικός χαρακτήρας των δεσμών υδρογόνου μεταξύ του ενζύμου και του υποστρώματος επιβάλλει πολλές φορές τον υψηλό βαθμό της εξειδίκευσης.

4) Τα ενεργά κέντρα έχουν συνήθως τη μορφή εσοχής ή σχισμής. Το νερό τις περισσότερες φορές δεν δεσμεύεται σε αυτό εκτός αν είναι ένα από τα αντιδρώντα. Ο μη πολικός χαρακτήρας των εσοχών αυξάνει το βαθμό πρόσδεσης του υποστρώματος. Είναι δυνατόν να περιλαμβάνει και ορισμένα πολικά κατάλοιπα τα οποία δημιουργούν ένα περιβάλλον με ειδικές ιδιότητες που είναι ουσιώδεις για την καταλυτική δραστηριότητα.

5) Εκτός από τη σχέση «κλειδαριάς-κλειδιού» που είχε διατυπώσει ο Fischer, το 1958 ο Daniel Koshland υποστήριξε την άποψη ότι το σχήμα του ενεργού κέντρου τροποποιείται σημαντικά έτσι ώστε να μπορεί να προσδεθεί το υπόστρωμα. Το ενεργό κέντρο αυτών των ενζύμων έχει σχήμα που είναι συμπληρωματικό εκείνου του υποστρώματος μόνο μετά την πρόσδεσή του στο ενεργό κέντρο. Αυτή η πορεία ονομάζεται «επαγόμενη προσαρμογή» [Koshland, 1973].

#### 4.5. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ

Η κινητική μελέτη των ενζυμικών αντιδράσεων γίνεται συνήθως με την παραδοχή ενός μοντέλου, γνωστό και ως μοντέλο Michaelis-Menten, σύμφωνα με το οποίο η καταλυτική δράση μετασχηματισμού του υποστρώματος (S) σε προϊόν (P), λαμβάνει χώρα διαμέσου μίας μεταβατικής κατάστασης, όπου σχηματίζεται ένα σύμπλοκο (ES) ανάμεσα στο ένζυμο και το υπόστρωμα. Το μοντέλο περιγράφεται από τις ακόλουθες χημικές εξισώσεις:



Η συγκέντρωση του υποστρώματος θεωρείται κατά πολύ μεγαλύτερη από εκείνη του ενζύμου (E), ενώ  $k_1$ ,  $k_2$  και  $k_3$  είναι οι σταθερές ταχύτητας κάθε σταδίου της αντίδρασης.

Εάν υποθέσουμε ότι η συγκέντρωση του συμπλόκου (ES) παραμένει σταθερή, ότι δηλαδή ο ρυθμός παραγωγής είναι ίσος με το ρυθμό αποικοδόμησης τότε θα ισχύει:

$$k_1[E][S] = k_2[ES] + k_3[ES] \Rightarrow [ES] = \frac{k_1[E][S]}{k_2 + k_3} \quad (4.1)$$



Για οποιαδήποτε συγκέντρωση υποστρώματος μπορούμε να υπολογίσουμε το κλάσμα F του ενζύμου με τη μορφή του συμπλόκου (ES) βάσει της εξίσωσης 4.2:

$$F = \frac{[ES]}{[E] + [S]} \quad (4.2)$$

Αντικαθιστώντας στην εξίσωση (4.2) τη συγκέντρωση [ES] από την εξίσωση (4.1) θα έχουμε:

$$F = \frac{[ES]}{[E] + [S]} = \frac{[S]}{\left(\frac{k_2 + k_3}{k_1}\right) + [S]} \quad (4.3)$$

Αν υποτεθεί ότι η ολική συγκέντρωση του ενζύμου είναι  $[E]_0$ , τότε ισχύει  $[ES] = F[E]_0$  και από την εξίσωση (4.3) θα έχουμε:

$$[ES] = \frac{[E]_0 [S]}{\left(\frac{k_2 + k_3}{k_1}\right) + [S]} \quad (4.4)$$

Επίσης, η ταχύτητα σχηματισμού (V) του προϊόντος (P) δίνεται από τη σχέση  $V = k_3[ES]$ , οπότε η εξίσωση (4.4) μετασχηματίζεται στην (4.5):

$$V = \frac{k_3 [E]_0 [S]}{\left(\frac{k_2 + k_3}{k_1}\right) + [S]} \quad (4.5)$$

Αν στην αντίδραση (4.5) θέσουμε όπου (V) τη μέγιστη ταχύτητα  $V_{\max} = k_3[S]$  τότε έχουμε:

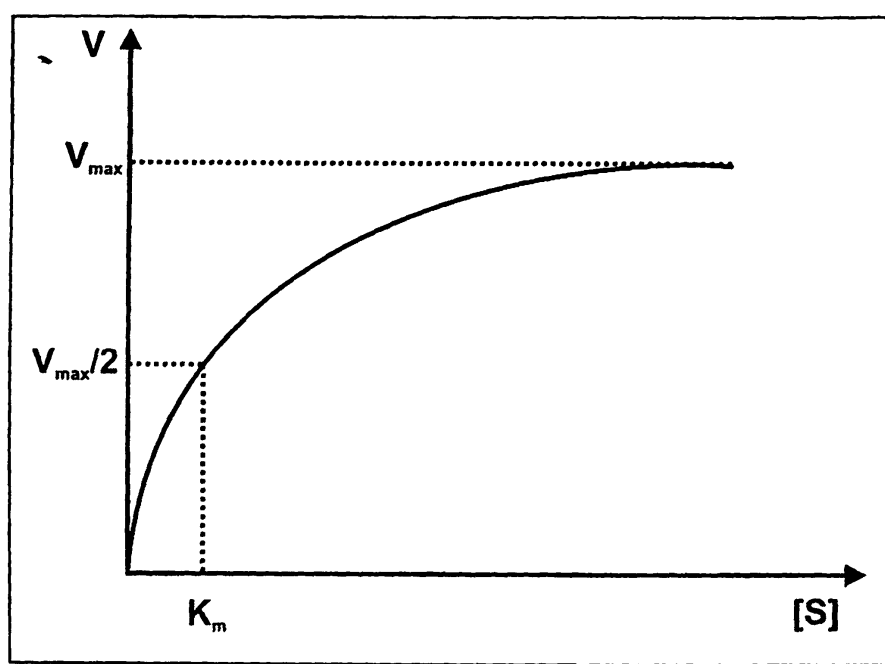
$$V = \frac{V_{\max} [S]}{\left(\frac{k_2 + k_3}{k_1}\right) + [S]} \quad (4.6)$$

Στην εξίσωση (4.6) ο όρος  $(k_2 + k_3)/k_1$  ονομάζεται σταθερά Michaelis, και συμβολίζεται με  $K_m$ , οπότε η εξίσωση (4.6), γνωστή και ως Michaelis-Menten, μπορεί να γραφτεί και ως:



$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad (4.7)$$

Όταν η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης είναι το μισό της μέγιστης, δηλαδή  $V=V_{\max}/2$ , τότε η συγκέντρωση του υποστρώματος  $[S]$  ισούται με τη σταθερά  $K_m$  (Σχήμα 4.3). Με κατάλληλους μετασχηματισμούς της εξίσωσης (4.7) μπορούμε να παραγάγουμε άλλες εξισώσεις, η γραφική απεικόνιση των οποίων μας βοηθάει στον υπολογισμό των  $K_m$  και  $V_{\max}$ .



Σχήμα 4.3: Γραφική απεικόνιση της εξίσωσης Michaelis-Menten.

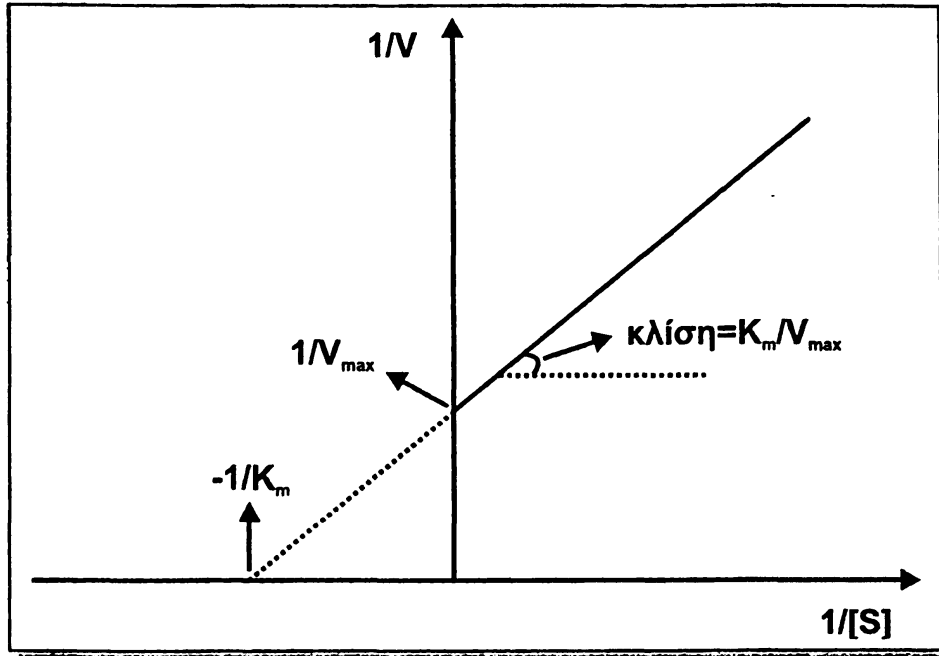
#### 4.5.1. Η εξίσωση Lineweaver-Burk

Αν επιλύσουμε την εξίσωση (4.7) ως προς  $(1/V)$ , τότε προκύπτει η εξίσωση (4.8), γνωστή και ως εξίσωση Lineweaver-Burk [Lineweaver, 1934]:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{[V_{\max}]} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (4.8)$$

Η γραφική παράσταση της παραπάνω εξίσωσης  $(1/V)=f(1/[S])$  είναι ευθεία γραμμή με κλίση  $K_m/V_{\max}$  (Σχήμα 4.4).

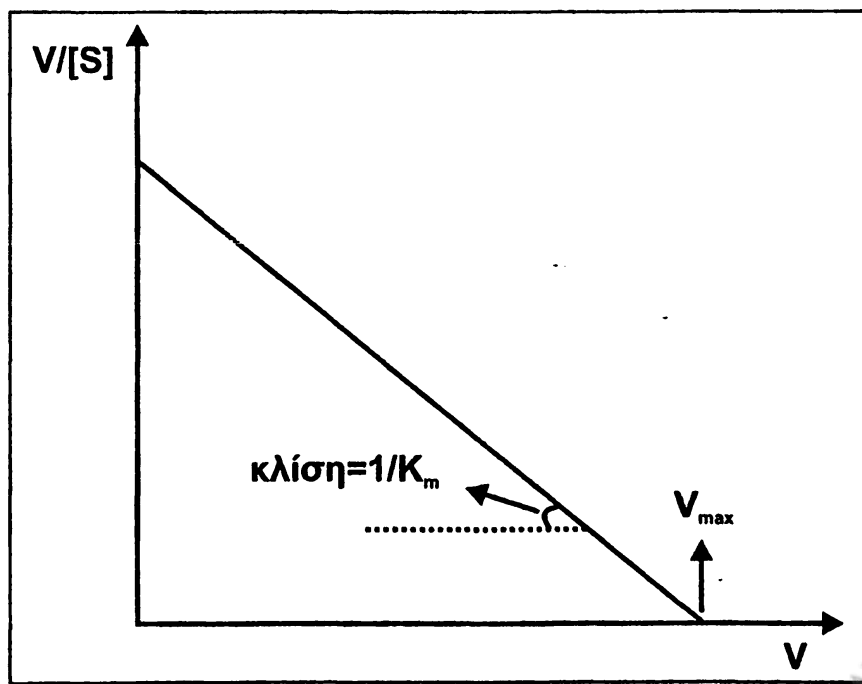




Σχήμα 4.4: Γραφική παράσταση της εξίσωσης Lineweaver-Burk.

#### 4.5.2. Η εξίσωση Eadie-Hofstee

Ο μετασχηματισμός της εξίσωσης Michaelis-Menten, μας δίνει την εξίσωση (4.9), γνωστή και ως εξίσωση Eadie-Hofstee [Hofstee, 1952].



Σχήμα 4.5: Γραφική παράσταση της εξίσωσης Eadie-Hofstee.

$$\frac{V}{[S]} = \frac{V_{\max}}{K_m} - \frac{V}{K_m} \quad (4.9)$$

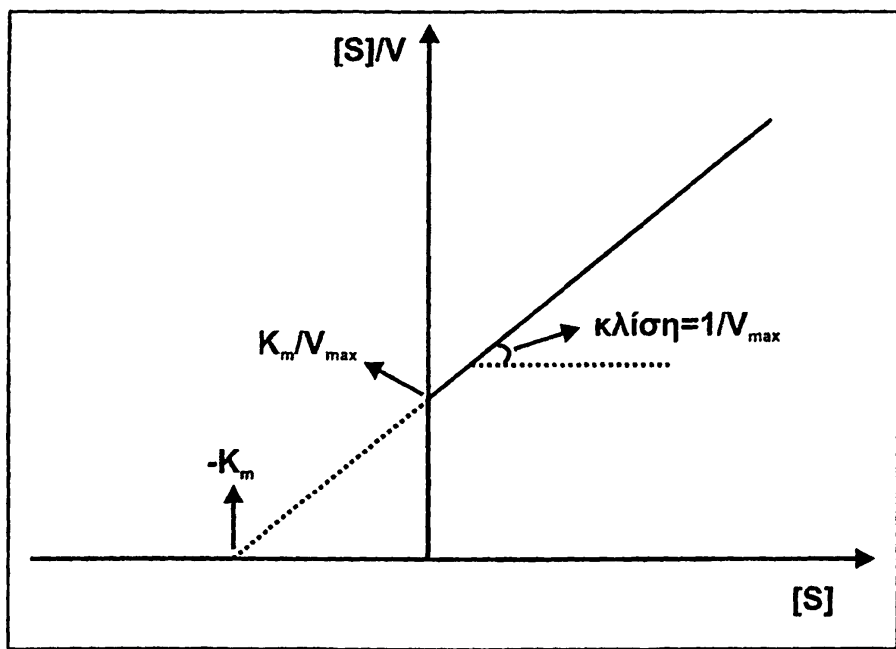
Η γραφική παράσταση  $(V/[S])=f(V)$  είναι ευθεία γραμμή με κλίση  $-1/K_m$  (Σχήμα 4.5).

### 4.5.3. Η εξίσωση Hanes

Μετασχηματίζοντας την εξίσωση (4.7) ως προς  $([S]/V)$ , τότε προκύπτει η εξίσωση Hanes (Σχήμα 4.6):

$$\frac{[S]}{V} = \frac{[S]}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \quad (4.10)$$

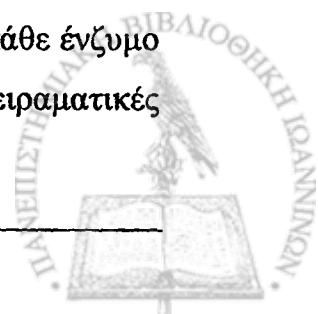
Η γραφική παράσταση  $([S]/V)=f([S])$  είναι ευθεία γραμμή κλίσης  $1/V_{\max}$  [Hanes, 1932].



Σχήμα 4.6: Γραφική παράσταση της εξίσωσης Hanes.

### 4.6. Η ΣΠΟΥΔΑΙΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΤΙΜΩΝ $K_m$ ΚΑΙ $V_{\max}$

Η τιμή  $K_m$  των ενζύμων ποικίλει με τιμές από  $10^{-1}$  μέχρι  $10^{-7}$  και για κάθε ένζυμο εξαρτάται από τη φύση του υποστρώματος καθώς, επίσης, και τις πειραματικές συνθήκες όπως το pH, η θερμοκρασία και η ιοντική ισχύς.



Η σημασία της σταθεράς Michaelis είναι διπλή: πρώτον εκφράζει τη συγκέντρωση του υποστρώματος, όπου τα μισά από τα ενεργά κέντρα του ενζύμου έχουν καταληφθεί και δεύτερον σχετίζεται με τις κινητικές σταθερές των επιμέρους σταδίων της καταλυτικής δράσης (βλέπε § 4.5.). με κατάλληλους μετασχηματισμούς αποδεικνύεται ότι η  $K_m$  ισούται με τη σταθερά διάσπασης του συμπλόκου (ES) εάν η σταθερά  $k_3$  είναι πολύ μικρότερη της  $k_2$ . Υπό αυτές τις συνθήκες η  $K_m$  αποτελεί μέτρο της σταθερότητας του συμπλόκου (ES). Η υψηλή τιμή φανερώνει χαμηλή πρόσδεση ενώ η χαμηλή τιμή δείχνει ισχυρή πρόσδεση.

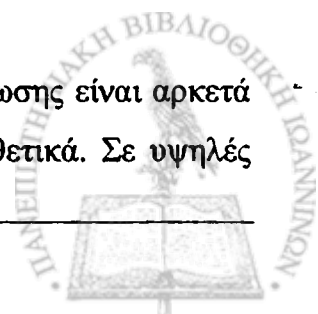
Η σπουδαιότητα της  $V_{max}$  έγκειται στο γεγονός ότι μπορούμε να υπολογίσουμε τον αριθμό μετατροπής (σταθεράς  $k_3$ ) ενός ενζύμου εφόσον είναι γνωστή η τιμή της συγκέντρωσης των ενεργών κέντρων  $[E_{TS}]$  από την εξίσωση  $V_{max}=k_3[E_{TS}]$ . Σαν αριθμός μετατροπής (turnover number) ενός ενζύμου, ορίζεται ο αριθμός των μορίων του υποστρώματος που μετατρέπονται σε προϊόν ανά μονάδα χρόνου από ένα μόριο ενζύμου, όταν το ένζυμο είναι πλήρως κορεσμένο με το υπόστρωμα. Ο αριθμός μετατροπής για τα περισσότερα ένζυμα με τα φυσιολογικά τους υποστρώματα κυμαίνεται από 1 μέχρι  $10^4 s^{-1}$ .

## 4.7. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ

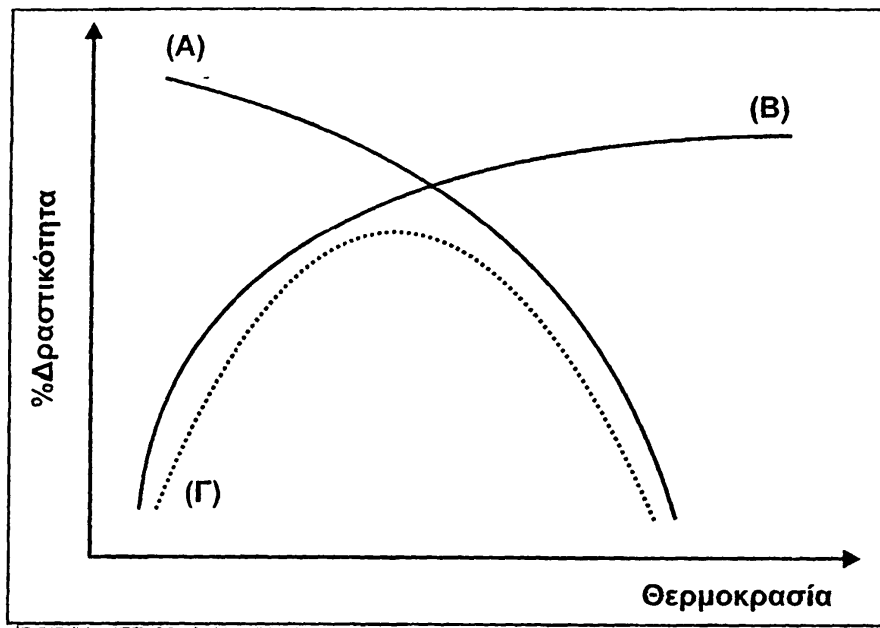
### 4.7.1. Επίδραση της θερμοκρασίας

Η αύξηση της θερμοκρασίας έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της ταχύτητας μίας αντίδρασης ακόμα και αυτών που καταλύονται από τα ένζυμα. Το γεγονός όμως είναι ότι η αυξημένη θερμοκρασία προκαλεί και αύξηση του ποσοστού μετουσίωσης (denaturation) των ενζύμων (Σχήμα 4.7). Τις περισσότερες φορές η ενζυμική δραστηριότητα παρουσιάζει ένα μέγιστο. Αυτή είναι η θερμοκρασία βέλτιστης λειτουργίας. Παρόλα αυτά είναι προτιμότερο να επιλέγεται η θερμοκρασία εκείνη στην οποία γίνεται ένας συμβιβασμός ανάμεσα στη μέγιστη ενζυμική δραστηριότητα για ένα σύντομο χρονικό διάστημα και μειωμένης μετουσίωσης των ενζύμων για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα.

Σε χαμηλές θερμοκρασίες (15-25 °C) το ποσοστό της μετουσίωσης είναι αρκετά μικρό με αποτέλεσμα η ταχύτητα της αντίδρασης να επηρεάζεται θετικά. Σε υψηλές



τιμές θερμοκρασίας (35-45 °C) η μετουσίωση των ενζύμων βρίσκεται σε υψηλά ποσοστά, οπότε μειώνεται η ταχύτητα της καταλυόμενης αντίδρασης. Σε ακόμα μεγαλύτερες θερμοκρασίες (60-70 °C) η καταστροφή της δομής των ενζύμων είναι πλέον ολοκληρωτική, με αποτέλεσμα την πλήρη απενεργοποίησή τους.



**Σχήμα 4.7:** Επίδραση της θερμοκρασίας στην ενζυμική δραστηριότητα. Η ταχύτητα της αντίδρασης αυξάνει με τη θερμοκρασία (Α) αλλά με ταυτόχρονη αύξηση του ποσοστού μετουσίωσης του ενζύμου (Β) (μείωση δραστηριότητας). Τελικά προκύπτει η καμπύλη (Γ), η οποία εμφανίζει ένα μέγιστο, ως συγκερασμός των δύο φαινομένων.

Γενικά δεν υπάρχει μία συγκεκριμένη θερμοκρασία αναφοράς στη βέλτιστη λειτουργία των ενζύμων. Η International Union of Biochemistry είχε ορίσει αρχικά τους 25 °C σαν θερμοκρασία αναφοράς αλλά πολύ σύντομα την ανέβασε στους 30 °C, εξαιτίας των δυσκολιών διατήρησής της σε περιοχές με πιο θερμά κλίματα [Holme, 1998].

#### 4.7.2. Επίδραση του pH

Τα ένζυμα είναι πολύ ευαίσθητα στις μεταβολές του pH και η λειτουργικότητά τους περιορίζεται σε πολύ στενά όρια τιμών pH, εντός του οποίου παρουσιάζουν ένα μέγιστο στη δραστηριότητά τους. Η επίδραση του pH στηρίζεται στη μεταβολή της ιοντικής φύσης των κατάλοιπων αμινοξέων των ενζύμων όσο και των υποστρωμάτων. Η μεταβολή αυτή στην κατανομή των φορτίων έχει σαν αποτέλεσμα να επηρεάζεται ο

βαθμός πρόσδεσης του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Επίσης, σε ισχυρά όξινο ή αλκαλικό περιβάλλον, η πρωτεϊνική δομή των ενζύμων καταστρέφεται με αποτέλεσμα την οριστική και μόνιμη μετουσίωσή τους. Η περιοχή λειτουργίας ενός ενζύμου επηρεάζεται και από τη φύση του υποστρώματος αλλά και από το είδος της καταλυόμενης από το ένζυμο αντίδρασης.

#### 4.7.3. Επίδραση μεταλλικών και μη-μεταλλικών ιόντων

Έχει βρεθεί ότι ορισμένα μεταλλικά ιόντα, όπως  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ , καθώς και μερικά αμέταλλα ιόντα, όπως  $\text{Cl}^-$  και  $\text{NH}_4^+$ , αυξάνουν τη δραστηριότητα ορισμένων ενζύμων, γι' αυτό ονομάζονται και «ενεργοποιητές» (activators). Βαρέα μέταλλα, όπως ο  $\text{Hg}^{2+}$ , ο  $\text{Pb}^{2+}$  και ο  $\text{Ag}^+$  δηλητηριάζουν τα ένζυμα μπλοκάροντας κάποιες κρίσιμες θέσεις στο ενεργό κέντρο των ενζύμων, μειώνοντας τη δραστηριότητά τους. Τέτοια μόρια ονομάζονται «αναστολείς» (inhibitors). Γενικά η δράση των ιόντων ποικίλει από ένζυμο σε ένζυμο, δηλαδή ένα ιόν που ενεργοποιεί ένα ένζυμο να αδρανοποιεί κάποιο άλλο.

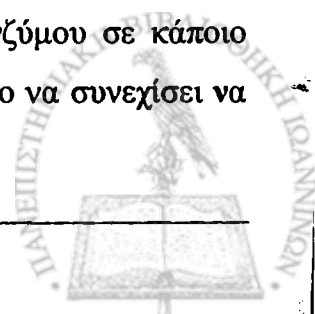
#### 4.7.4. Επίδραση της συγκέντρωσης του υποστρώματος

Μελέτες της επίδρασης του υποστρώματος επί της ενζυμικής δραστηριότητας έχουν αποκαλύψει ότι σε χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος η ταχύτητα της αντίδρασης αυξάνεται με αντίστοιχη αύξηση της συγκέντρωσης. Σε υψηλές τιμές συγκεντρώσεων η ταχύτητα της αντίδρασης πολύ γρήγορα σταθεροποιείται και δεν αυξάνει με περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος.

### 4.8. ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΝΖΥΜΩΝ

#### 4.8.1. Ιδιότητες ακινητοποιημένων ενζύμων

«Ακινητοποίηση» ονομάζεται η διαδικασία σύνδεσης ενός ενζύμου σε κάποιο αδιάλυτο υλικό-υπόστρωμα στήριξης, με τέτοιο τρόπο, που το ένζυμο να συνεχίσει να διατηρεί τις καταλυτικές του ιδιότητες.



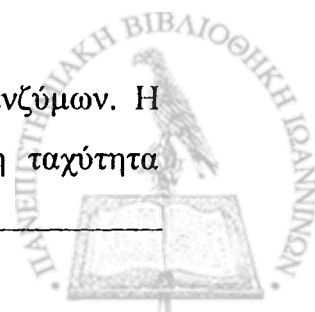
Η συμπεριφορά των ακινητοποιημένων ενζύμων διαφέρει αρκετά από εκείνη, που παρουσιάζουν όταν αυτά βρίσκονται σε διαλυτή μορφή. Οι διαφορές αυτές προέρχονται από την αλληλεπίδραση με το υλικό στήριξης καθώς, επίσης, και από αλλαγές που προκαλεί η ακινητοποίηση στη διαμόρφωση γενικότερα του ενζύμου και ειδικότερα των πρωτεϊνικών καταλοίπων του ενεργού κέντρου. Μετά το πέρας της διαδικασίας ακινητοποίησης ενδεχομένως να έχουν προκληθεί αλλαγές στη συμπεριφορά του ενζύμου όσον αφορά κινητικές παραμέτρους, τις βέλτιστες τιμές λειτουργίας pH και θερμοκρασίας, όπως και το βαθμό εξειδίκευσης.

Οι φυσικές μέθοδοι ακινητοποίησης ασκούν μικρότερη επίδραση στην καταλυτική συμπεριφορά του ενζύμου σε σχέση με τις χημικές. Ο λόγος είναι ότι με τη φυσική μέθοδο ακινητοποίησης το ένζυμο διατηρεί την αρχική του διαμόρφωση σε αρκετά μεγάλο βαθμό σε αντίθεση με τη χημική μέθοδο, όπου επέρχεται σημαντική τροποποίηση αυτού. Αυτό που παρατηρείται είναι μείωση του βαθμού συγγενείας (affinity) μεταξύ ενζύμου και υποστρώματος και σε αρκετές περιπτώσεις πλήρης απενεργοποίηση του μορίου. Το φαινόμενο αποδίδεται σε στερεοχημικές παρεμποδίσεις, που προκαλούνται από την ακινητοποίηση και το είδος του υλικού στήριξης, που έχει σαν αποτέλεσμα το ένζυμο να μην έχει κατάλληλο προσανατολισμό ώστε να μπορούν τα μόρια του υποστρώματος να εντοπίσουν το ενεργό κέντρο. Υπάρχουν περιπτώσεις που η ακινητοποίηση του ενζύμου γίνεται από το ενεργό κέντρο, οπότε το μόριο χάνει μέρος ή ολόκληρη την καταλυτική του ιδιότητα.

Κατά την ακινητοποίηση ενός ενζύμου γύρω από το μόριο σχηματίζεται μία στιβάδα διάχυσης. Είναι επομένως αναμενόμενο ότι φαινόμενα που επηρεάζουν τη διάχυση των μορίων του υποστρώματος προς και από το ένζυμο θα έχουν σαν αποτέλεσμα την αλλαγή των κινητικών παραμέτρων του βιομορίου. Παρόμοιες μεταβολές είναι δυνατόν να προκληθούν και από διαφόρων τύπων αλληλεπιδράσεις (ιοντικές, υδροφοβικές) μεταξύ υποστηρικτικού υλικού και ενζύμου.

Παράγοντες που έχουν να κάνουν με τη φύση του υλικού, τη μέθοδο ακινητοποίησης, το περιβάλλον στο οποίο διεξάγεται και το είδος του ενζύμου, μπορούν να επηρεάσουν το pH λειτουργίας μειώνοντας ή αυξάνοντας τη βέλτιστη τιμή ακόμα και κατά 3 μονάδες.

Οι ίδιοι παράγοντες επιδρούν και στη θερμική σταθερότητα των ενζύμων. Η ακινητοποίηση αυξάνει την ακαμψία του πρωτεϊνικού μορίου, οπότε η ταχύτητα



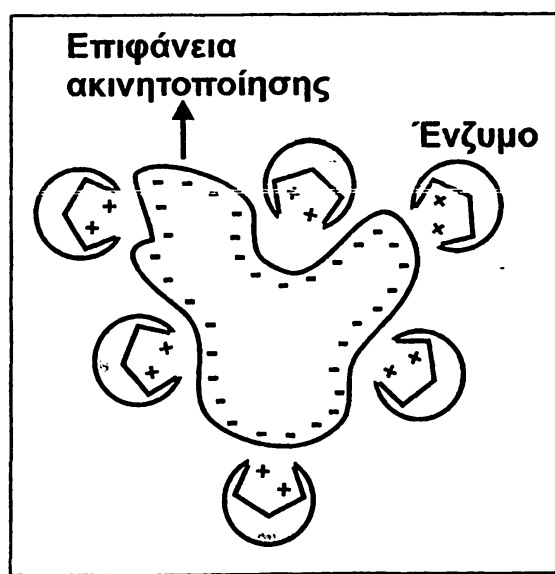
απενεργοποίησης ή μετουσίωσης των ενζύμων είναι μικρότερη καθιστώντας τα λιγότερο ευαίσθητα στις θερμοκρασιακές μεταβολές, εξαιτίας αλλαγών<sup>2</sup> στη διαμόρφωση της δευτεροταγούς και τεταρτοταγούς δομής των πρωτεϊνών [Mikkelsen, 2004].

#### 4.8.2. Φυσικές μέθοδοι ακινητοποίησης

Οι φυσικές μέθοδοι ακινητοποίησης περιλαμβάνουν την προσρόφηση (adsorption), την ενθυλάκωση (encapsulation) και την παγίδευση (entrapment). Παρακάτω αναπτύσσονται διεξοδικά και οι τρεις τεχνικές.

##### 4.8.2.1. Προσρόφηση (adsorption)

Η προσρόφηση αποτελεί την πιο εύκολη τεχνική ακινητοποίησης. Βασίζεται στην επώαση ενός διαλύματος ενζύμου μαζί με το υλικό στήριξης για κάποιο χρονικό διάστημα που μπορεί να κυμαίνεται από μερικά λεπτά μέχρι και ώρες. Μετά το στάδιο της επώασης το υλικό στήριξης που φέρει πλέον το ακινητοποιημένο βιομόριο εκκλίνεται με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα προς απομάκρυνση των μορίων του ενζύμου που δεν ακινητοποιήθηκαν.



Σχήμα 4.8: Σχηματική απεικόνιση της ακινητοποίησης ενζύμου μέσω προσρόφησης.

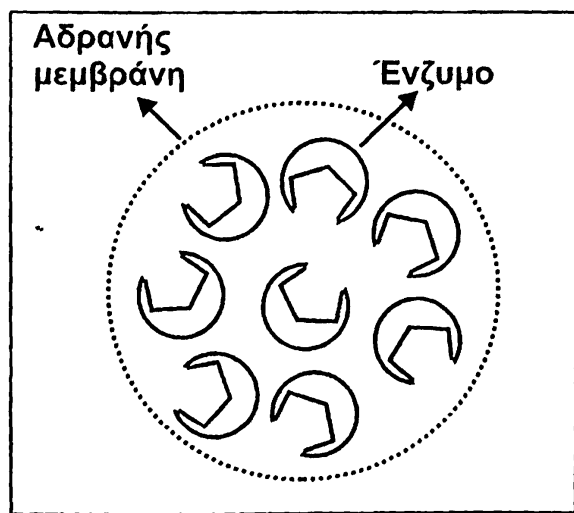


Η διαδικασία της προσρόφησης γίνεται μέσω αλληλεπιδράσεων ιονικής ή ηλεκτροστατικής φύσεως (Σχήμα 4.8). Επίσης μπορεί να οφείλεται στο σχηματισμό δικτύου δεσμών υδρογόνου, αλλά και σε υδροφοβικές ή αρωματικές αλληλεπιδράσεις. Η προσρόφηση των ενζύμων είναι συνήθως αντιστρεπτή διαδικασία αλλά με κατάλληλη επιλογή του υλικού και των συνθηκών ακινητοποίησης μπορεί να γίνει μόνιμη για μεγάλο χρονικό διάστημα, αποφεύγοντας με αυτό τον τρόπο φαινόμενα διαρροής ή ακόμα και εκρόφησης. Στις περιπτώσεις ακινητοποίησης με προσρόφηση το ποσοστό του ακινητοποιημένου μορίου δεν μπορεί να αντιστοιχιστεί σε πλήρη αναλογία με την ανακτηθείσα ενζυμική δραστηριότητα λόγω του ότι μέρος αυτής χάνεται εξαιτίας αλλαγών στη διαμόρφωση των πρωτεϊνικών μορίων.

Σαν υλικά στήριξης χρησιμοποιούνται η αλουμίνα, ο άνθρακας (σε διάφορες μορφές), ιονανταλλακτικές ρητίνες, κολλαγόνο, ζεόλιθοι, μέταλλα και γυαλί [Mikkelsen, 2004].

#### 4.8.2.2. Ενθυλάκωση (encapsulation)

Σε αυτή τη μέθοδο χρησιμοποιείται μία αδρανής μεμβράνη για την ακινητοποίηση του βιομορίου στην επιφάνεια του μεταλλάκτη. Το περιβάλλον του ενζύμου προσομοιάζει με διάλυμα μόνο που είναι περιορισμένο σε χώρο (Σχήμα 4.9). Αυτή ήταν και η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή του πρώτου βιοαισθητήρα γλυκόζης ακινητοποιώντας το ένζυμο της οξειδάσης της γλυκόζης επί ενός ηλεκτροδίου οξυγόνου [Eggins, 2002].



Σχήμα 4.9: Σχηματική απεικόνιση της ακινητοποίησης ενζύμου μέσω ενθυλάκωσης.

Τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι:

- 1) Επιτυγχάνεται στενή επαφή ανάμεσα στο ένζυμο και το μεταλλάκτη.
- 2) Είναι εύκολα εφαρμόσιμη και αξιόπιστη.
- 3) Μπορούν να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω αγώγιμα μόρια (π.χ. πολυπυρρόλιο) για την πρόσδεση και επαφή του ενζύμου με το μεταλλάκτη.
- 4) Η λειτουργικότητα του ενζύμου μπορεί να διατηρηθεί με αξιοπιστία εξαιτίας:
  - α) της υψηλής σταθερότητας σε μεταβολές του pH, της θερμοκρασίας και της ιοντικής ισχύος
  - β) της αποφυγής μολύνσεων και μετουσίωσης του βιομορίου.

Οι μεμβράνες που χρησιμοποιούνται συνήθως σε αυτή τη μέθοδο είναι:

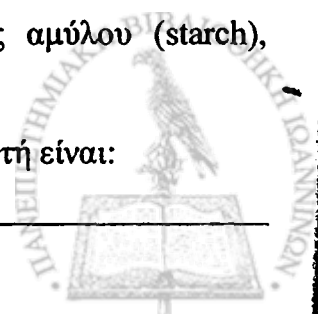
- 1) οξικής κυτταρίνης (cellulose acetate), οι οποίες λειτουργούν και σαν μοριακά φράγματα για μεγαλομόρια (π.χ. πρωτεΐνες, ασκορβικό οξύ) αίροντας τις παρεμποδίσεις.
- 2) πολυκαρβονικές (polycarbonate), ένα συνθετικό μη-περατοεκλεκτικό υλικό.
- 3) κολλαγόνο (collagen), ένα φυσικό υλικό.
- 4) Teflon (polytetrafluoroethylene, PTFE), υλικό το οποίο είναι περατοεκλεκτικό ειδικά για αέρια, όπως το οξυγόνο.
- 5) φορτισμένες μεμβράνες (π.χ. Nafion) καθώς και διάφορες άλλες πολουρεθανικής (polyurethane) φύσεως.

#### 4.8.2.3. Παγίδευση (entrapment)

Η τεχνική βασίζεται στην παγίδευση (inclusion, occlusion, lattice entrapment) του ενζύμου εντός μίας πηκτής πολυμερούς (polymeric gel) (Σχήμα 4.10), κατά τη διάρκεια της ωρίμασης αυτού. Το πολυμερές υλικό που χρησιμοποιείται συνήθως είναι το πολυακρυλαμίδιο (polyacrylamide) το οποίο προέρχεται από συμπολυμερισμό του ακρυλαμιδίου (acrylamide) με το N,N'-μεθυλενο-διακρυλαμίδιο (N,N'-methylenebisacrylamide). Ο πολυμερισμός γίνεται πιο αποτελεσματικός υπό την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας παρουσία βιταμίνης B<sub>1</sub>.

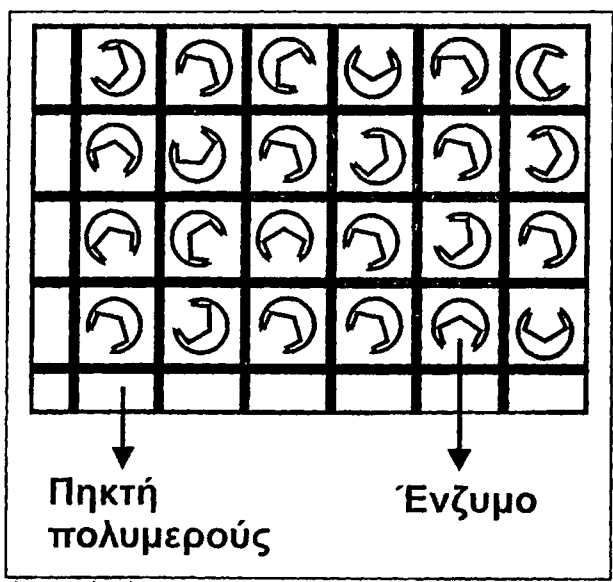
Άλλα υλικά που χρησιμοποιούνται περιλαμβάνουν πηκτές αμύλου (starch), νάυλον και αγώγιμα πολυμερή, όπως πολυπυρρόλιο.

Τα σημαντικότερα προβλήματα που παρουσιάζει η μέθοδος αυτή είναι:



1) πτώση της καταλυτικής δραστηριότητας εξαιτίας απώλειας-διαρροής του ενζύμου από του πόρους της πηκτής. Το πρόβλημα αυτό μπορεί να αντιμετωπιστεί ή με διασταυρούμενη σύνδεση (cross-linking) του ενζύμου με το πολυμερές ή με έλεγχο του πορώδους του πολυμερούς υποστρώματος κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης.

2) χαμηλές ταχύτητες αντίδρασης και μεγάλοι χρόνοι απόκρισης του αισθητήρα, λόγω του ότι το πολυμερές υλικό στήριξης μπορεί να δράσει και σαν φράγμα (ανάλογα με το πόρωδες) εμποδίζοντας τα μόρια του υποστρώματος να έρθουν σε επαφή με το ένζυμο.



Σχήμα 4.10: Σχηματική απεικόνιση της ακινητοποίησης ενζύμου με παγίδευση.

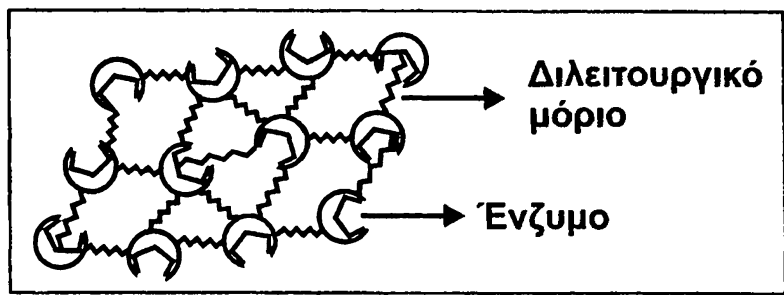
#### 4.8.3. Χημικές μέθοδοι ακινητοποίησης

Οι χημικές μέθοδοι ακινητοποίησης περιλαμβάνουν τη διασταυρούμενη σύνδεση (cross-linking) και την ομοιοπολική σύνδεση (covalent bonding).

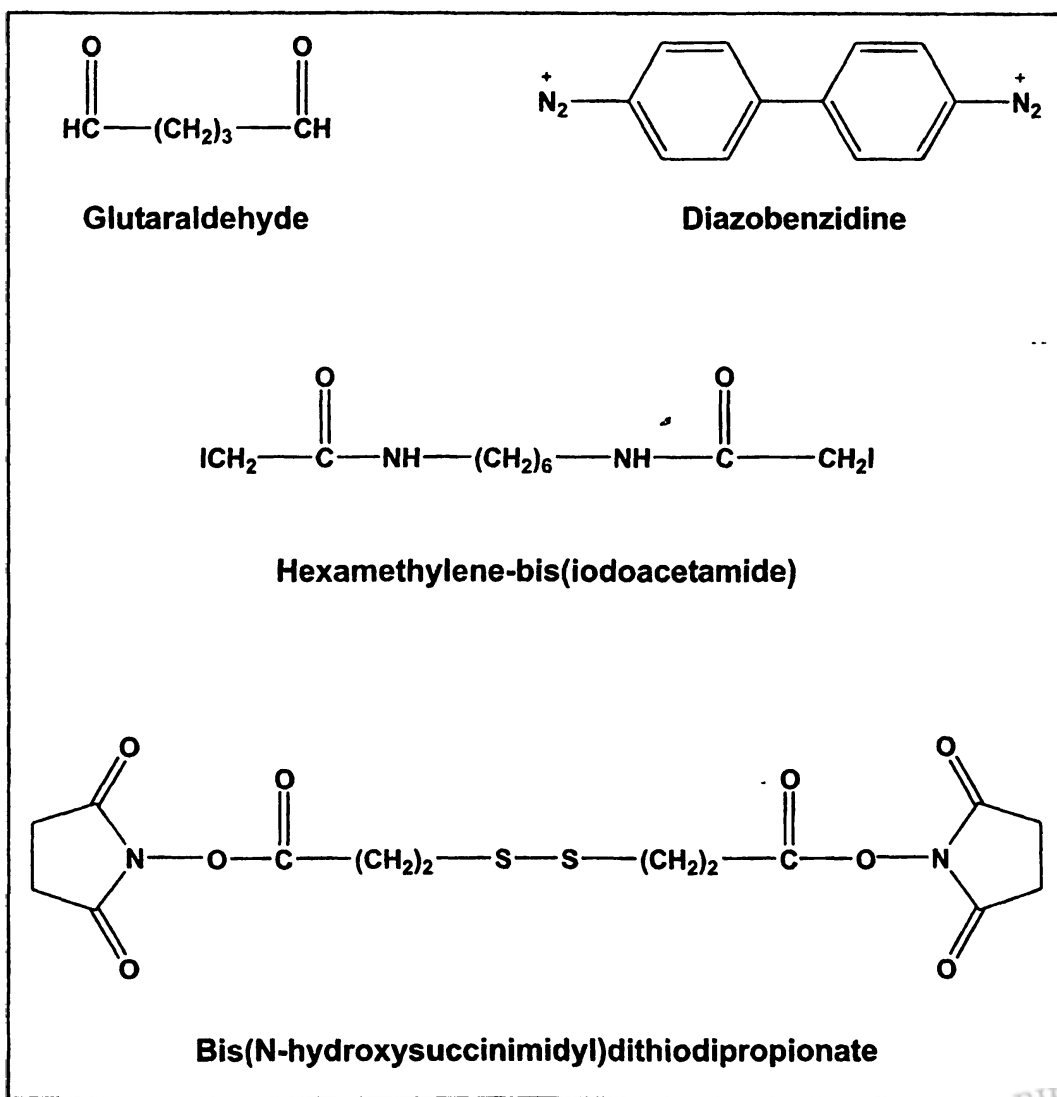
##### 4.8.3.1. Διασταυρούμενη σύνδεση (cross-linking)

Σε αυτή τη μέθοδο γίνεται χρήση διλειτουργικών μορίων ώστε να επιτευχθεί σύνδεση του ενζύμου με το υλικό στήριξης (Σχήμα 4.11). Τα «διλειτουργικά μόρια» φέρουν δύο δραστικές λειτουργικές ομάδες οι οποίες μπορεί να είναι του ιδίου αλλά και διαφορετικού τύπου. Έτσι τα διλειτουργικά μόρια διακρίνονται σε ομο-διλειτουργικά (Σχήμα 4.12) και ετερο-διλειτουργικά.

Τα ετερο-δिलειτουργικά μόρια χρησιμοποιούνται πολύ λιγότερο, παρόλα αυτά εμφανίζουν αυξημένη εκλεκτικότητα εξαιτίας του διαφορετικού χαρακτήρα των δύο λειτουργικών δραστικών ομάδων.



Σχήμα 4.11: Απεικόνιση της ακινητοποίησης ενζύμου με διασταυρούμενη σύνδεση.



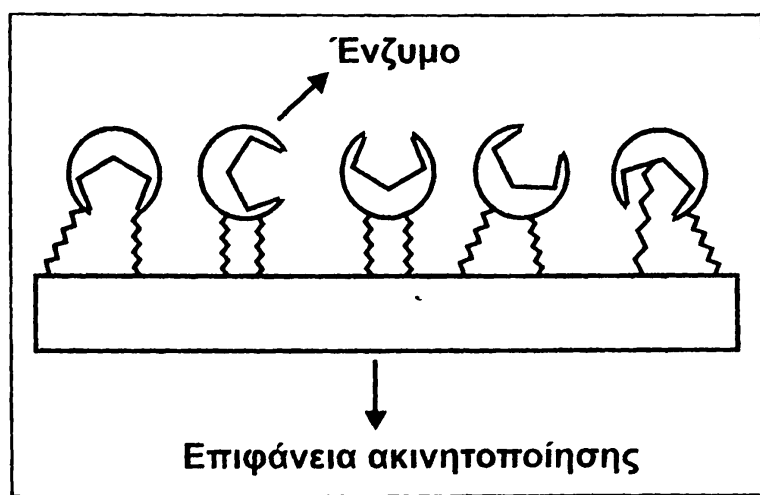
Σχήμα 4.12: Συντακτικοί τύποι των συνηθέστερα χρησιμοποιούμενων ομο-δिलειτουργικών μορίων.

Τα ευρύτερα χρησιμοποιούμενα ομο-δουλευργικά μόρια είναι η γλουταραλδεϋδη (glutaraldehyde, αντιδρά με τα κατάλοιπα λυσίνης του ενζύμου), η διαζωβενζιδίνη (diazobenzidine, αντιδρά με κατάλοιπα τυροσίνης, ιστιδίνης και λυσίνης), το εξαμεθυλενο-δι(ιωδοακεταμίδιο) (hexamethylene-bis(iodoacetamide), αντιδρά με κατάλοιπα λυσίνης μέσω πυρηνόφιλης προσθήκης του ιωδίου) και επίσης, το δις-(N-υδροξυσουκιννιμιδυλο)-διθειοδιπροπιοικό (bis-(N-hydroxysuccinimidyl)-dithiodipropionate, η ιδιότητα της διασταυρούμενης σύνδεσης είναι αντιστρεπτή καθώς ο δισουλφιδικός δεσμός μπορεί πολύ εύκολα να σπάσει από κοινά αναγωγικά αντιδραστήρια).

Παρά το πλεονέκτημα ότι η μέθοδος είναι αρκετά γρήγορη εν τούτοις έχει και σοβαρά μειονεκτήματα, στα οποία συγκαταλέγονται η μείωση της καταλυτικής δραστηριότητας εξαιτίας της παραμόρφωσης της τεταρτοταγούς δομής των ενζύμων αλλά και της μείωσης της διάχυσης των μορίων του υποστρώματος προς τα ενεργά κέντρα λόγω της πυκνότητας του πλέγματος καθώς, επίσης, και η μειωμένη μηχανική αντοχή του συστήματος.

#### 4.8.3.2. Ομοιοπολική σύνδεση (covalent bonding)

Η μέθοδος βασίζεται στη δημιουργία ομοιοπολικών δεσμών ανάμεσα στις λειτουργικές ομάδες των ενζύμων και των υλικών στήριξης (Σχήμα 4.13). Τα κατάλοιπα των αμινοξέων των ενζύμων φέρουν λειτουργικές ομάδες από τις οποίες μπορεί το ένζυμο να προσδεθεί μέσω ομοιοπολικής σύνδεσης με το υλικό.



Σχήμα 4.13: Απεικόνιση της ακινητοποίησης ενζύμου με ομοιοπολική σύνδεση.

Οι ενεργές αυτές θέσεις περιλαμβάνουν ομάδες, όπως πρωτοταγείς αμίνες (λυσίνη), υδροξύλια φαινολικού χαρακτήρα (τυροσίνη), καρβοξυλικά οξέα (ασπαραγινικό, γλουταμινικό), θειόλες (κυστεΐνη), υδροξύλια (σερίνη, θρεονίνη) και άζωτο μιδαζολικού χαρακτήρα (ιστιδίνη). Από αυτές οι πρωτοταγείς αμίνες, τα καρβοξυλικά οξέα και τα υδροξύλια είναι οι ομάδες που λαμβάνουν μέρος με μεγαλύτερη συχνότητα στη διαδικασία της ακινητοποίησης. Αυτό οφείλεται στον υδρόφιλο χαρακτήρα τους, που τις καθιστά περισσότερο διαθέσιμες στο υδατικό περιβάλλον της ακινητοποίησης.

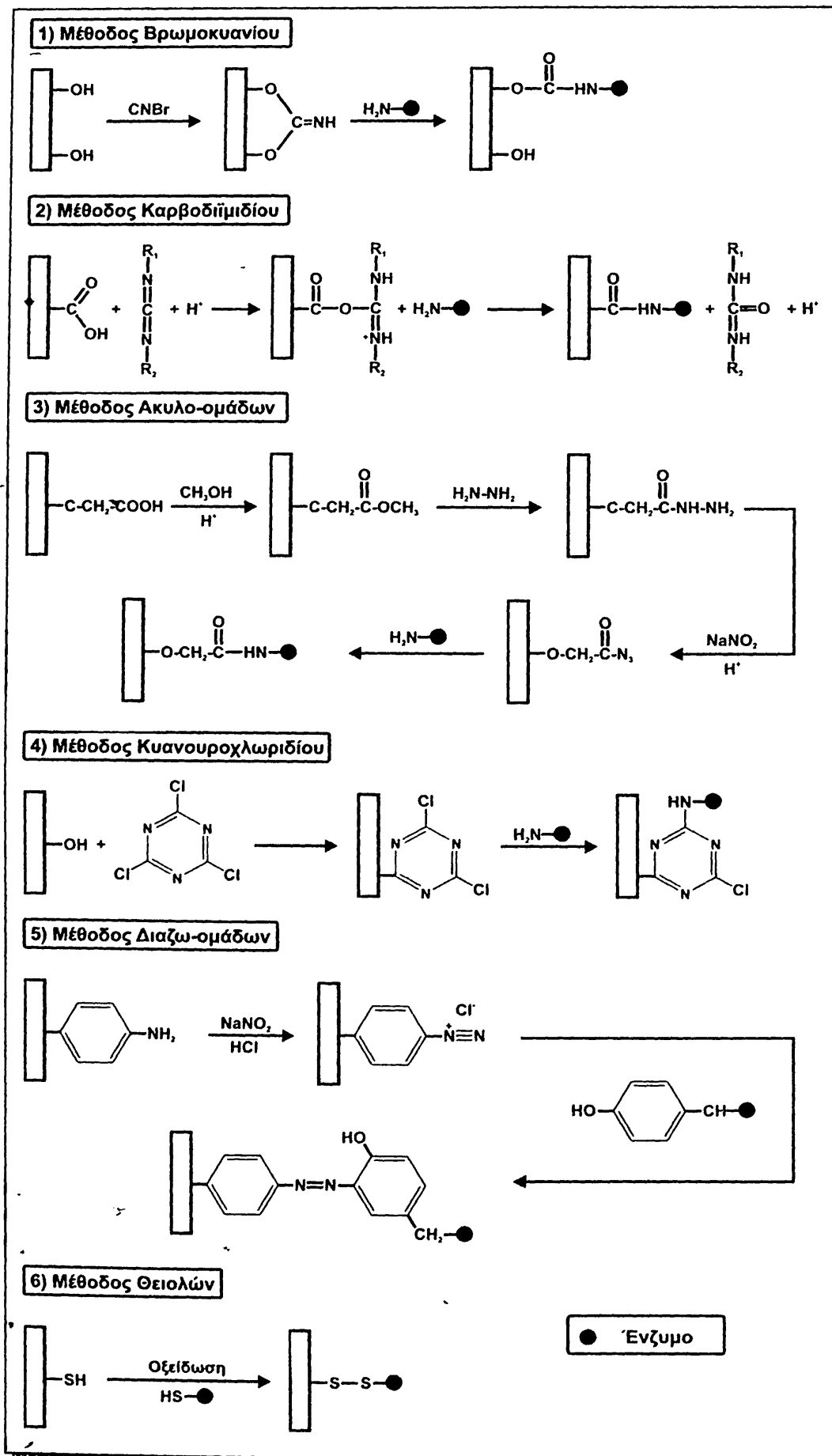
Όσον αφορά το υλικό στήριξης συνήθως δεν χρησιμοποιείται ως έχει αλλά προηγείται μία διαδικασία ενεργοποίησης των λειτουργικών ομάδων. Στον πίνακα 4.2 παρουσιάζονται μερικά από τα συνηθέστερα υλικά στήριξης και οι λειτουργικές ομάδες, που λαμβάνουν μέρος στην ομοιοπολική σύνδεση.

**Πίνακας 4.2:** Υλικά στήριξης και λειτουργικές ομάδες αυτών.

| Λειτουργική ομάδα                     | Υλικό στήριξης  |
|---------------------------------------|---|
| -Si(OH) <sub>3</sub>                  | Υαλος ελεγχόμενου πορώδους (controlled pore glass, CPG)                               |
| -CONH <sub>2</sub>                    | Πολυακρυλαμίδιο   |
| -COOH                                 | Πολυακρυλικό οξύ, Πολυασπαραγινικό οξύ, Πολυγλουταμινικό οξύ, Καρβοξυμέθυλο κυτταρίνη |
| R <sub>1</sub> -COO-CO-R <sub>2</sub> | Συμπολυμερές μαλεϊκού ανυδρίτη-αιθυλενίου   |
| -NH <sub>2</sub>                      | Πολυστυρόλιο (μετά από νίτρωση και αναγωγή<br>Nylon ( μετά από κατεργασία με HCl)     |
| -OH                                   | Κυτταρίνη, Sephadex, Αγαρόζη, Σεφαρόζη, Καρβοξυμέθυλο κύτταρίνη                       |

Η επιλογή των συνθηκών είναι επίσης κρίσιμης σημασίας παράγοντας. Ήπιες συνθήκες κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ακινητοποίησης έχει σαν αποτέλεσμα την αποφυγή δραστικών μεταβολών τόσο στα κατάλοιπα των αμινοξέων των ενζύμων, που συμμετέχουν στην ομοιοπολική σύνδεση όσο και σε αυτά του ενεργού κέντρου, όπως επίσης, και αλλαγές στη τεταρτοταγή δομή των ενζύμων.

Οι αντιδράσεις που χρησιμοποιούνται στην μέθοδο της ομοιοπολικής σύνδεσης για την ενεργοποίηση των επιφανειών ακινητοποίησης φαίνονται στο Σχήμα 4.14:



Σχήμα 4.14: Αντιδράσεις ενεργοποίησης υλικών στήριξης στην ομοιοπολική σύνδεση.



- 1) μέθοδος βρωμιούχου κυανίου ή βρωμοκυανίου (cyanogen bromide, CNBr).
- 2) μέθοδος καρβοδιϊμιδίου (carbodiimide).
- 3) μέθοδος διαμέσου ακυλο-ομάδων (acyl groups) με κατεργασία υδραζιδίων (hydrazides) με νιτρώδες οξύ (nitrous acid).
- 4) μέθοδος κυανουροχλωριδίου (cyanuric chloride).
- 5) μέθοδος διαζωνιακών ομάδων (diazonium groups) από αρωματικές αμινοομάδες.
- 6) μέθοδος θειολών.

Στον **πίνακα 4.3**, φαίνεται η εκλεκτικότητα διαφόρων μεθόδων ενεργοποίησης ως προς τις κατάλοιπες ομάδες των αμινοξέων.

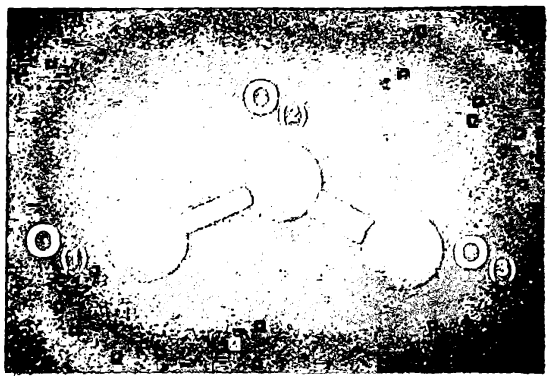
**Πίνακας 4.3:** Εκλεκτικότητα μεθόδων ενεργοποίησης.

| Μέθοδος                       | Κατάλοιπο πρωτεϊνικής ομάδας |
|-------------------------------|------------------------------|
| Διαζώτωσης (diazotization)    | Lys, His, Tyr, Arg, Cys      |
| Τριαζίνης (triazine)          | Lys                          |
| Βρωμοκυανίου (CNBr)           | Lys (-OH)                    |
| Ακυλο-αζιδίου (acyl azide)    | Lys, Tyr, Cys, Ser           |
| Καρβοδιϊμιδίου (carbodiimide) | Lys, Tyr, Cys, Ser, Met      |
| Ανυδρίτη (anhydride)          | Lys                          |
| Δισουλφιδίου (disulfide)      | Cys                          |

Είναι, λοιπόν, φανερό ότι η επιλογή του κατάλληλου τύπου αντίδρασης πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη και να ρυθμίζεται ανάλογα με τον τύπο του ενζύμου, που πρόκειται να ακινητοποιηθεί και το υλικό στήριξης [Eggins, 2002].





**ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ****ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5<sup>ο</sup>**

*Το μόριο του όζοντος (O<sub>3</sub>)*

**"ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΧΗΜΕΙΑ ΤΟΥ ΟΖΟΝΤΟΣ (O<sub>3</sub>)"****5.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Το όζον συναντάται για πρώτη φορά στα Ομηρικά έπη, την Ιλιάδα και την Οδύσσεια. Χωρίς να είναι φυσικά κατανοητή η φύση του αερίου γίνεται απλά η αναφορά στη χαρακτηριστική οσμή που αναδύεται στον αέρα μετά από τη ρίψη κεραυνών. Πολύ αργότερα το 1782 ο M. van Marum είχε επισημάνει το γεγονός ότι μία έντονη οσμή δημιουργούνταν όταν ηλεκτρικές εκκενώσεις διαπερνούσαν ένα θάλαμο οξυγόνου. Το 1801 ο Cruickshank παρατήρησε μία οσμή παρόμοια με εκείνη του χλωρίου, κατά τη διάρκεια της ηλεκτρόλυσης θεικού οξέος. Τελικά η ανακάλυψη του όζοντος έγινε πολλές δεκαετίες αργότερα από τον Schönbein το 1840. Υποστήριξε ότι η σχηματιζόμενη οσμή κατά τη διάρκεια της ηλεκτρόλυσης του νερού πρέπει να συνδέεται με την παραγωγή ενός ισχυρά ηλεκτραρνητικού αερίου, το οποίο ονόμασε «όζον» (από το ελληνικό ρήμα όζω, που σημαίνει μυρίζω) [Burns, 1997].

Η πραγματική φύση του όζοντος, ως μία εναλλακτική μορφή οξυγόνου, διευκρινίστηκε από τους Rive και de Marignac, κατά τη διάρκεια πειραμάτων σχηματισμού όζοντος από καθαρό οξυγόνο. Το 1857 κατασκευάστηκε ο πρώτος



οζονιστήρας από τον W. von Siemens και το 1865 ο J.L. Soret απέδειξε από έμμεσες μετρήσεις της πυκνότητας του όζοντος ότι αυτό αποτελείται από τρία άτομα οξυγόνου.

Το όζον άρχισε να χρησιμοποιείται από το 1890 όταν ο Ohlmüller ανακάλυψε ότι διαθέτει αντιμικροβιακές ιδιότητες. Έκτοτε χρησιμοποιείται για την απολύμανση του πόσιμου ύδατος συμπληρωματικά με τη διαδικασία της χλωρίωσης.

Για πρώτη φορά το 1922 οι E.H. Riesenfeld και G.M. Schwab κατάφεραν να παραγάγουν καθαρό όζον, γεγονός που οδήγησε στον προσδιορισμό των φυσικών ιδιοτήτων του. Μετά το δεύτερο παγκόσμιο πόλεμο το ενδιαφέρον για το όζον αρχίζει να γίνεται ακόμα πιο έντονο καθώς αρχίζει να εφαρμόζεται στις αγροτικές καλλιέργειες και τις βιομηχανίες τροφίμων με αποτέλεσμα τις τελευταίες δύο δεκαετίες το ενδιαφέρον για το όζον να έχει αυξηθεί σημαντικά, εξαιτίας των ολοένα και περισσότερων χρήσεων και εφαρμογών που βρίσκει. Τέλος πολλές από τις νέες τεχνολογίες που έχουν αναπτυχθεί έχουν να κάνουν με ένα άλλο σημαντικό πρόβλημα που ταλανίζει ολόκληρο τον πλανήτη από τα μέσα της δεκαετίας του 1970, και είναι φυσικά η γνωστή σε όλους «τρύπα του όζοντος».

## 5.2. ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ ΟΖΟΝΤΟΣ

### 5.2.1. Φυσικές ιδιότητες

Το όζον υπό κανονικές συνθήκες είναι ένα άχρωμο αέριο σε υψηλές όμως συγκεντρώσεις έχει μία κυανή χροιά. Η υγρή του μορφή έχει σκούρο μπλε χρώμα ενώ οι κρύσταλλοι του όζοντος έχουν χρώμα βιολετί και είναι σχεδόν αδιαφανείς. Έχει χαρακτηριστική διαπεραστική οσμή, που θυμίζει φωσφόρο και διοξείδιο του θείου και γι' αυτό το λόγο γίνεται εύκολα αντιληπτή η ύπαρξή του ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις της τάξης των 0,02 έως 0,05 ppm(v). Είναι μετρίως διαλυτό στο νερό. Η διαλυτότητα του καθαρού O<sub>3</sub> είναι 570 mg L<sup>-1</sup> (20 °C) [Kinman, 1975 – Channing, 1983 – Rischbieter, 2000 – Biń, 2006]. Είναι, επίσης, ο δεύτερος πιο ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας μετά τη ρίζα υδροξυλίου ενώ παράλληλα είναι ισχυρά διαβρωτικό και πολύ τοξικό αντιδραστήριο [Horváth, 1985 – EPA, 1999]. Στον πίνακα 5.1 φαίνονται οι χαρακτηριστικές φυσικές σταθερές του όζοντος σε σύγκριση με εκείνες του οξυγόνου.

Πίνακας 5.1: Φυσικές ιδιότητες του όζοντος και του οξυγόνου.

| Φυσική σταθερά                                    | Όζον (O <sub>3</sub> )     | Οξυγόνο (O <sub>2</sub> )  |
|---|----------------------------|----------------------------|
| Μοριακό βάρος                                     | 47,9982 g/mol              | 31,9988 g/mol              |
| Σημείο βρασμού (760 mm)                           | -111,9 ± 0,3 °C            | -182,97 °C                 |
| Σημείο τήξεως                                     | -192,7 ± 0,2 °C            | -218,4 °C                  |
| Κρίσιμη θερμοκρασία                               | -12,1 ± 0,1 °C             | -118,574 °C                |
| Κρίσιμη πίεση                                     | 54,6 atm                   | 49,77 atm                  |
| Κρίσιμη πυκνότητα                                 | 0,437 g/cm <sup>3</sup>    | 0,436 g/cm <sup>3</sup>    |
| Κρίσιμος όγκος                                    | 147,1 cm <sup>3</sup> /mol | 73,37 cm <sup>3</sup> /mol |
| Πυκνότητα αερίου (0 °C)<br>(760 mm)               | 2,144 g/L                  | 1,429 g/L                  |
| Πυκνότητα υγρού                                   |                            |                            |
| -112 °C   | 1,358 g/cm <sup>3</sup>    |                            |
| -183 °C   | 1,571 g/cm <sup>3</sup>    | 1,14 g/cm <sup>3</sup>     |
| -194,5 °C   | 1,614 g/cm <sup>3</sup>    | 1,201 g/cm <sup>3</sup>    |
| Επιφανειακή τάση                                  |                            |                            |
| -195 °C   | 43,8 ± 0,1 dyne/cm         |                            |
| -182,7 °C   | 38,1 ± 0,2 dyne/cm         |                            |
| -183,0 °C   | 38,4 ± 0,7 dyne/cm         | 13,2 dyne/cm               |
| Θερμοχωρητικότητα υγρού<br>από -183 μέχρι -145 °C | 0,45 cal/g °C              |                            |
| Θερμοχωρητικότητα αερίου                          |                            |                            |
| -173 °C   | 7,95 cal/g mol °C          |                            |
| 0 °C  | 9,10 cal/g mol °C          |                            |
| 25 °C   | 9,37 cal/g mol °C          |                            |
| 100 °C  |                            | 6,979 cal/g mol °C         |
| 127 °C  | 10,44 cal/g mol °C         |                            |
| Ιξώδες υγρού                                      |                            |                            |
| -195,6 °C   | 4,14 ± 0,05 cp             |                            |
| -183,0 °C   | 1,57 ± 0,02 cp             | 0,1958 cp                  |
| Θερμότητα εξάτμισης                               |                            |                            |
| -112 °C   | 75,6 cal/g                 |                            |
| -182,9 °C   |                            | 50,9 cal/g                 |
| Θερμότητα σχηματισμού                             |                            |                            |
| 25 °C   | -34,4 Kg cal/mol           |                            |
| Ελεύθερη ενέργεια 25 °C                           | 32,4 Kg cal/mol            |                            |

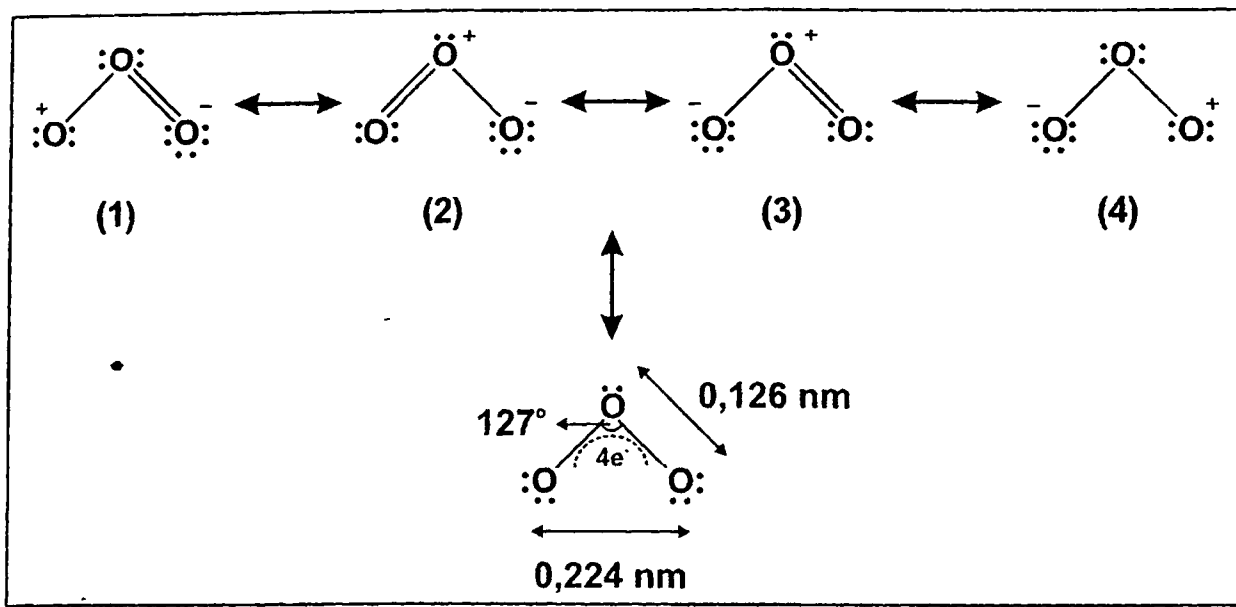


**Πίνακας 5.1:** Φυσικές ιδιότητες του όζοντος και του οξυγόνου (Συνέχεια).

| Φυσική σταθερά                                   | Όζον (O <sub>3</sub> )                     | Οξυγόνο (O <sub>2</sub> )                 |
|--|--|---|
| Σταθερά Van der Waals (a)                        | 3,545 atm L <sup>2</sup> /mol <sup>2</sup> | 1,36 atm L <sup>2</sup> /mol <sup>2</sup> |
| Σταθερά Van der Waals (b)                        | 0,04903 L/mol                              | 0,03803 L/mol                             |
| Μαγνητική επιδεκτικότητα                         |  |   |
| Αέριο (x 10 <sup>-6</sup> )                      | 0,002 cgs units                            | 10.6.2 cgs units                          |
| Υγρό (x 10 <sup>-6</sup> )                       | 0,150 cgs units                            | 260.0 cgs units                           |
| Θερμική αγωγιμότητα υγρού                        |  |   |
| -195,8 °C  | 5,21 cal/s cm °C x 10 <sup>4</sup>         |   |
| -183,0 °C  | 5,31 cal/s cm °C x 10 <sup>4</sup>         |   |
| -165,0 °C  | 5,42 cal/s cm °C x 10 <sup>4</sup>         |   |
| -128,0 °C  | 5,52 cal/s cm °C x 10 <sup>4</sup>         |   |
| Όρια φάσης του συστήματος όζοντος-οξυγόνου       |  |   |
| -183 °C  | : 29,8 και 72,4 wt % O <sub>3</sub>        |   |
| -195,4 °C  | : 9 και 90,8 wt % O <sub>3</sub>           |   |
| Θερμοκρασία συνδιάλυσης οξυγόνου-όζοντος         |  |   |
| -180 ± 0,5 °C                                    |  |   |
| Συντελεστής (α) θερμικής διαστολής υγρού όζοντος |  |   |
| -195,6 °C  | 1,62                                       |   |
| -183,0 °C  | 1,58                                       |   |
| -148,0 °C  | 1,47                                       |   |
| -123,0 °C  | 1,41                                       |   |
| -112,0 °C  | 1,35                                       |   |
| -98,8 °C   | 1,31                                       |   |

### 5.2.2. Ιδιότητες της δομής

Το όζον (O<sub>3</sub>) είναι μία αλλοτροπική μορφή του οξυγόνου, που αποτελείται από τρία άτομα οξυγόνου. Τα τρία άτομα δεν βρίσκονται σε ευθεία γραμμή αλλά σχηματίζουν μεταξύ τους ένα ισοσκελές τρίγωνο με γωνία κορυφής  $127 \pm 3^\circ$ , η δε δομή έχει άξονα συμμετρίας C<sub>2v</sub>. Οι αποστάσεις δεσμών των ατόμων είναι ίσες με τιμή  $0,126 \pm 0,002$  nm ενώ το μήκος της βάσης είναι 0,224 nm. Το γεγονός ότι τα μήκη δεσμών των ατόμων οξυγόνου του όζοντος, είναι πιο κοντά στις τιμές αυτών που έχουν τα άτομα στο μόριο του O<sub>2</sub> (0,121 nm) από ότι στο μόριο του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,149 nm), δείχνει πως οι δεσμοί είναι περίπου διπλού χαρακτήρα με τάξη δεσμού 1,7 (Πίνακας 5.2).



Σχήμα 5.1: Γεωμετρία της δομής του όζοντος και δομές συντονισμού.

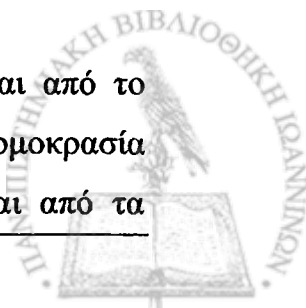
Πίνακας 5.2: Σύγκριση  $O_3$ ,  $O_2$  και  $H_2O_2$ .

| Ιδιότητες                      | $O_3$                 | $O_2$                 | $H_2O_2$               |
|--------------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|
| Μήκος δεσμού (nm)              | 0,126                 | 0,121                 | 0,149                  |
| Τάξη δεσμού                    | 1,7                   | 2                     | 1                      |
| Διπολική ροπή (D)              | 0,53                  | 0                     | 2,2                    |
| Μαγνητική επιδεκτικότητα (cgs) | $2,00 \times 10^{-9}$ | $3,45 \times 10^{-5}$ | $-1,77 \times 10^{-7}$ |

Από τις δομές συντονισμού (Σχήμα 5.1) εκείνες που εμφανίζουν αυξημένες ηλεκτρονιόφιλες ιδιότητες είναι οι (1) και (4), επειδή φέρουν το θετικό φορτίο στο τερματικό άτομο οξυγόνου. Οι μορφές αυτές είναι στενά συνδεδεμένες με το μηχανισμό της 1,3 κυκλοπροσθήκης στους διπλού δεσμούς. Οι δομές συντονισμού δεν έχουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια, επομένως το όζον είναι διαμαγνητικό μόριο με χαμηλή διπολική ροπή της τάξης των 0,53 D [Oyama, 2000].

### 5.2.3. Σταθερότητα του όζοντος

Το όζον είναι ένα ισχυρά οξειδωτικό αντιδραστήριο περισσότερο και από το μοριακό οξυγόνο αλλά και το υπεροξείδιο του υδρογόνου και σε θερμοκρασία δωματίου αντιδρά με τα περισσότερα υλικά, γεγονός που διαφαίνεται και από τα



δυναμικά αναγωγής (Πίνακας 5.3.). Σε όξινα διαλύματα την οξειδωτική δράση του όζοντος υπερβαίνουν μόνο το φθόριο, το υπερξενικό ιόν, το ατομικό οξυγόνο και οι ρίζες υδροξυλίου [Cotton, 1988].

**Πίνακας 5.3:** Κανονικά δυναμικά αναγωγής O<sub>3</sub>, O<sub>2</sub> και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [Weast, 1981].

| Αντίδραση  | E° (V) |
|--|--------|
| O <sub>3</sub> + 2H <sup>+</sup> + 2e <sup>-</sup> → O <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O | 2,07   |
| O <sub>2</sub> + 2H <sup>+</sup> + 2e <sup>-</sup> → H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>     | 0,68   |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 2H <sup>+</sup> + 2e <sup>-</sup> → 2H <sub>2</sub> O  | 1,78   |

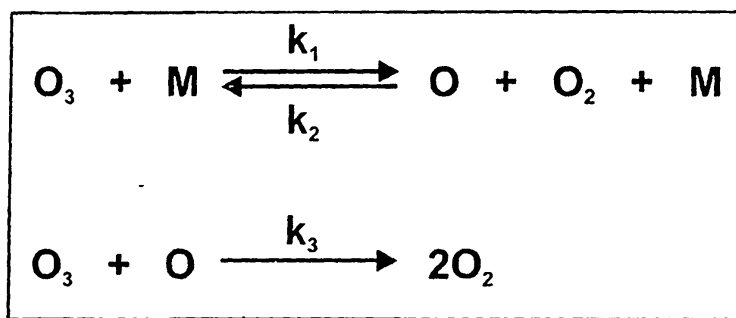
Αέρια φάση: στην αέρια φάση το όζον διασπάται αργά υπό την απουσία υπεριώδους (UV) ακτινοβολίας ή άλλων καταλυτών, σε θερμοκρασίες κάτω από 250 °C. Η θερμική διάσπαση του όζοντος περιγράφεται από έναν απλό μηχανισμό (Σχήμα 5.2), στον οποίο διαμεσολαβεί ένα τρίτο μόριο (M) που δέχεται την ενέργεια της αντίδρασης. Ο μηχανισμός της θερμικής διάσπασης του όζοντος μελετήθηκε για πρώτη φορά το 1906 από τον Jahn [Jahn, 1906], όπου πρότεινε ένα μηχανισμό διάσπασης δεύτερης τάξης (εξίσωση 5.1) και αναθεωρήθηκε (εξίσωση 5.2) το 1960 από τον Zaslowsky [Zaslowsky, 1960].

$$\boxed{-\frac{d[\text{O}_3]}{dt} = \frac{2k_1k_3[\text{O}_3]}{k_2[\text{O}]}} \quad (5.1)$$

$$\boxed{-\frac{d[\text{O}_3]}{dt} = \frac{2k_1k_3[\text{O}_3]^2}{k_2[\text{O}_2]\{1 + k_3[\text{O}_3]/k_2[\text{O}_2][\text{M}]\}}}} \quad (5.2)$$

Από την εξίσωση 5.2 με κατάλληλες προσεγγίσεις μπορεί να υπολογιστεί ο χρόνος ημίσειας ζωής (t<sub>1/2</sub>) του όζοντος σε μίγμα με οξυγόνο. Έτσι σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης και για θερμοκρασίες 25 °C, 100 °C και 250 °C οι χρόνοι ημίσειας ζωής για το όζον είναι 160 h, 210 s και 0,03 s, αντίστοιχα. Σαν συμπέρασμα προκύπτει ότι το όζον είναι σταθερό σε θερμοκρασία δωματίου. Αυτό όμως ισχύει στην ιδανική περίπτωση, διότι στην πραγματικότητα η ύπαρξη προσμίξεων και η δημιουργία παραπροϊόντων

(π.χ. οξειδίων του αζώτου) στον αέρα έχει σαν αποτέλεσμα τη διάσπαση του όζοντος με πολύ γρηγορότερους ρυθμούς.



Σχήμα 5.2: Προτεινόμενος μηχανισμός θερμικής διάσπασης του όζοντος.

Τέλος, στο άρθρο ανασκόπησης των Matsumi και Kawasaki [Matsumi, 2003], μπορεί να βρει κανείς εκτεταμένες πληροφορίες για την επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας στη φωτολυτική διάσπαση του όζοντος.

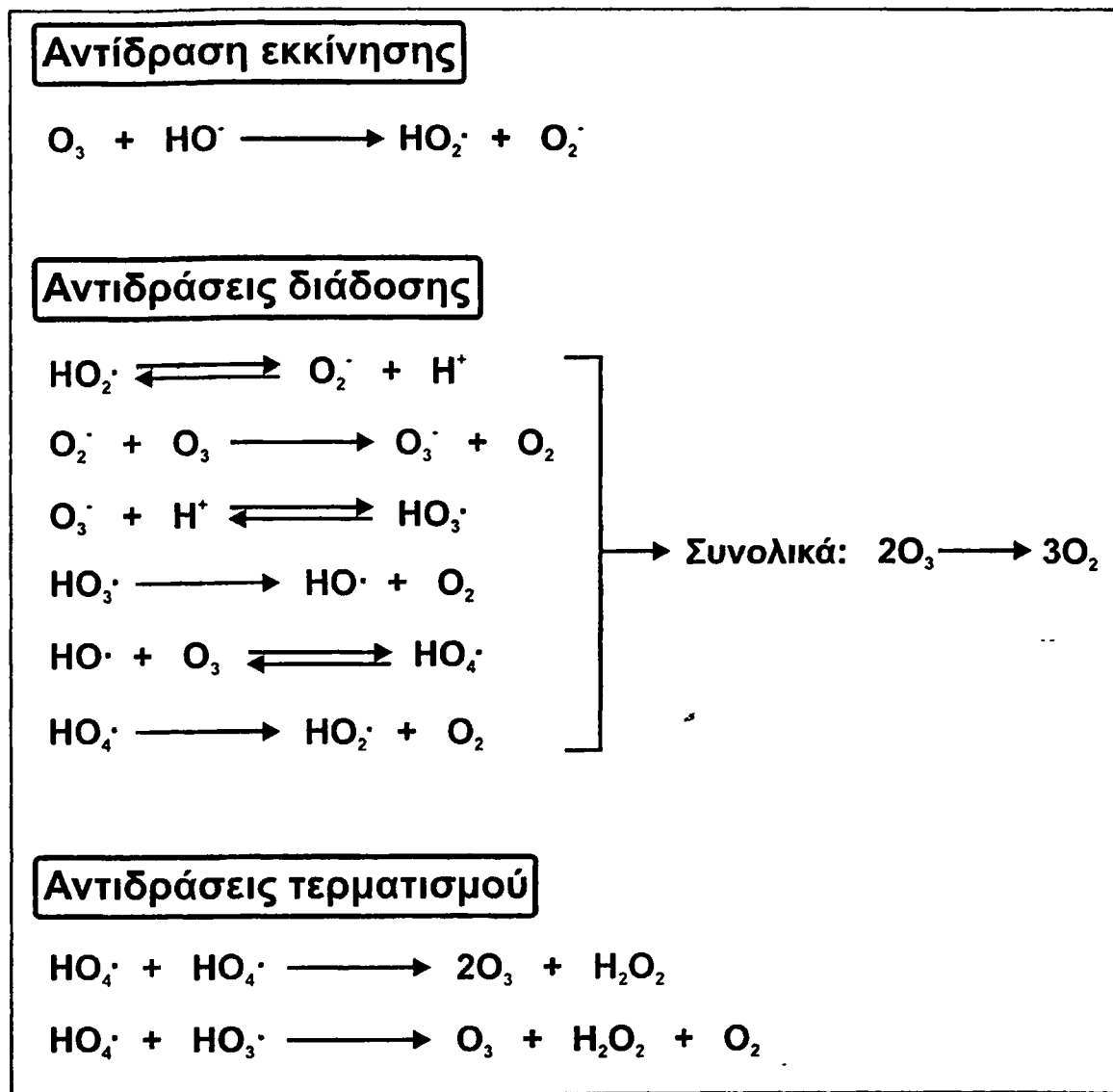
Υγρή φάση: η διάσπαση του όζοντος στο ύδωρ διεξάγεται μέσω ενός πολύπλοκου μηχανισμού ελευθέρων ριζών, που περιλαμβάνει αντιδράσεις εκκίνησης, διάδοσης και τερματισμού.

Αν και μέχρι σήμερα υπάρχει μία ασυμφωνία στην επιστημονική κοινότητα ως προς την τάξη και το είδος των αντιδράσεων, εν τούτοις όλοι αποδέχονται το γεγονός ότι οι ρίζες υδροξυλίου ( $\text{OH}\cdot$ ) διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε αυτό το μηχανισμό [Gurol, 1982a – Forni, 1982].

Ο μηχανισμός (Σχήμα 5.3) εκκινείται από την ύπαρξη των ιόντων υδροξυλίου ( $\text{OH}^-$ ), τα δε στάδια της διάδοσης συμπεριλαμβάνουν ιοντικές ρίζες του τύπου ( $\text{O}_2^-$ ) και ρίζες υδροξυλίου ( $\text{OH}\cdot$ ), όπου έχουμε και το σχηματισμό ενδιάμεσων ασταθών ιοντικών μορφών του όζοντος ( $\text{O}_3^-$ ). Αυτό που παρατηρεί κανείς είναι ότι κάθε φορά που ο μηχανισμός εκκινείται από την αρχή έχουμε την καταστροφή δύο μορίων όζοντος.

Ο χρόνος ημίσειας ζωής του όζοντος στο απεσταγμένο νερό είναι 7 min. Η ταχύτητα διάσπασης αυξάνει γρήγορα καθώς αυξάνεται το pH του διαλύματος [Gurol, 1982a,b] αλλά η αύξηση αυτή αναστέλλεται όταν στο διάλυμα υπάρχουν δεσμευτές (scavengers) των ριζών υδροξυλίου ( $\text{OH}\cdot$ ), όπως π.χ.  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ . Υπό την παρουσία τέτοιων δεσμευτών η σταθερά της ψευδο-πρώτης τάξεως αντίδρασης εκκίνησης μειώνεται και έτσι ο χρόνος ημίσειας ζωής του όζοντος μπορεί να ανέλθει μέχρι και τα 66 min σε pH=8. Η αποικοδόμηση μπορεί, επίσης, να εκκινήθει από την

ύπαρξη μεταλλικών ιόντων (π.χ.  $Fe^{2+}$ ) και επιταχύνεται από το  $H_2O_2$ , καθώς σχηματίζει ( $HO_2\cdot$ ) σε αλκαλικό περιβάλλον, το οποίο με τη σειρά του αντιδρά ταχύτατα με το όζον παράγοντας ( $O_2$ ). Την ίδια λειτουργία έχει αναφερθεί ότι έχουν και κάποια οργανικά μόρια (π.χ. οξικό οξύ, πρωτοταγείς και δευτεροταγείς αλκοόλες, γλυκοξυλικό οξύ), επιταχύνοντας τη διάσπαση του όζοντος [Staehelin, 1985].



Σχήμα 5.3: Προτεινόμενος μηχανισμός διάσπασης του όζοντος στο νερό.

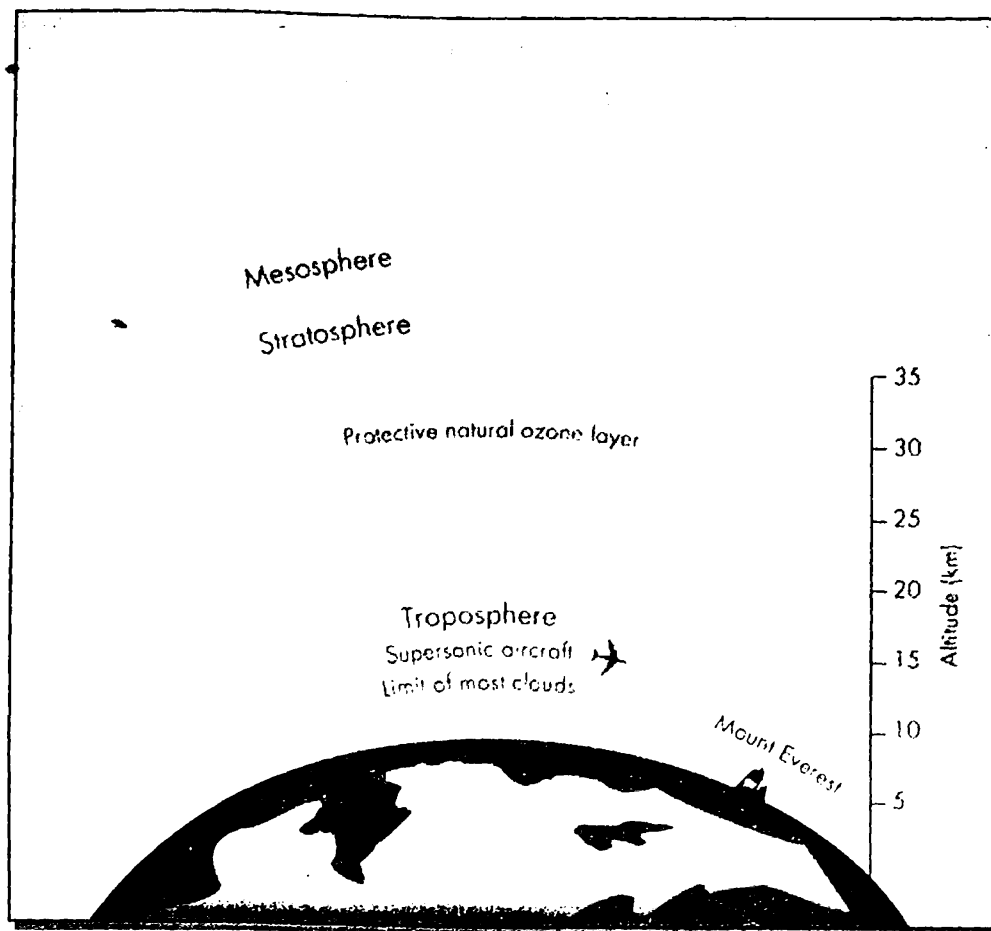
### 5.3 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΟΖΟΝΤΟΣ

Όπως προαναφέραμε το όζον αποτελεί ισχυρό οξειδωτικό παράγοντα και ταυτόχρονα είναι και ένα τοξικό αντιδραστήριο. Για το λόγο αυτό η παρουσία του στα



κατώτερα στρώματα της ατμόσφαιρας και συγκεκριμένα στην τροπόσφαιρα, σε υψηλές συγκεντρώσεις καθιστά το όζον έναν επικίνδυνο φωτοχημικό ρύπο.

Αντιθέτως η ύπαρξή του στην στρατόσφαιρα (μία ζώνη που εκτείνεται σε ύψος από 15-35 km) είναι κρίσιμης σημασίας καθώς αποτελεί την φυσική ασπίδα προστασίας από την επικίνδυνη υπεριώδη ηλιακή ακτινοβολία (Σχήμα 5.4).



Σχήμα 5.4: Απεικόνιση της διαστρωμάτωσης της γήινης ατμόσφαιρας.

Είναι λοιπόν φανερό ότι το όζον κατέχει ένα διπλό ρόλο κλειδί για τα έμβια όντα του πλανήτη, γι' αυτό παρακάτω αναλύεται πιο διεξοδικά ο ρόλος του τροποσφαιρικού και του στρατοσφαιρικού όζοντος.

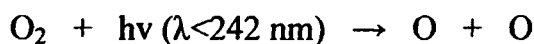
### 5.3.1. Στρατοσφαιρικό όζον

Στη στρατόσφαιρα η μέγιστη συγκέντρωση του όζοντος εντοπίζεται σε ύψος περίπου 25 km και μπορεί να φτάσει ακόμα και την τιμή των 10 ppm(v). Η δημιουργία της στιβάδας του όζοντος οφείλεται σε έναν αέναο κύκλο καταστροφής και αναγέννησης ανάμεσα στο οξυγόνο και το όζον, υπό την επίδραση της υπεριώδους

ηλιακής ακτινοβολίας, απελευθερώνοντας λιγότερο καταστρεπτικές μορφές ενέργειας. Το τελικό αποτέλεσμα είναι μία δυναμική ισορροπία ανάμεσα στο ρυθμό παραγωγής όζοντος από την ηλιακή ακτινοβολία και στο ρυθμό καταστροφής αυτού μέσω φωτοχημικών αντιδράσεων με άλλα αέρια [Μπιζάνη, 2003 – Βασιλικιώτης, 1989].

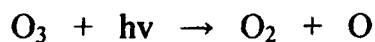
Ο μηχανισμός σχηματισμού του όζοντος είναι πιο ξεκαθαρισμένος και μονοσήμαντος. Σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η υπεριώδης ηλιακή ακτινοβολία, μέρος μόνο της οποίας (λιγότερο από 1%) φτάνει στην επιφάνεια της Γης. Η υπεριώδης ακτινοβολία έχει τρία είδη: τη UV-A (320-390 nm), τη UV-B (286-320 nm) και τη UV-C (<286 nm).

Η UV-C απορροφάται κυρίως από τα μόρια του οξυγόνου και μέσω μίας διαδικασίας που ονομάζεται φωτοδιάσπαση (photodegradation) προξενείται διάσπαση του μοριακού οξυγόνου σε δύο άτομα:



Όταν τα άτομα συνδυαστούν με άλλα μόρια οξυγόνου, τότε σχηματίζεται το μόριο του όζοντος. Το (M) είναι ένα τρίτο μόριο (π.χ. N<sub>2</sub> ή O<sub>2</sub>), το οποίο είναι απαραίτητο να προσλάβει την περίσσεια της ενέργειας, η οποία εάν δεν απομακρυνθεί θα προκαλέσει τη διάσπαση του όζοντος.

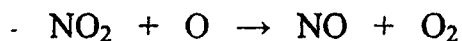
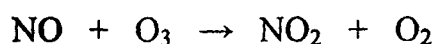
Αντίθετα με το σχηματισμό, ο μηχανισμός διάσπασης του όζοντος είναι περισσότερο πολύπλοκος. Το όζον απορροφώντας ενέργεια διασπάται:



αλλά τα άτομα του οξυγόνου αντιδρούν με μόρια οξυγόνου, παρουσία τρίτου μορίου, οπότε και αναγεννάται το όζον. Οι αλυσωτές αυτές αντιδράσεις διακόπτονται όταν το όζον αντιδράσει με άτομο ή άτομα οξυγόνου παρουσία τρίτου μορίου:

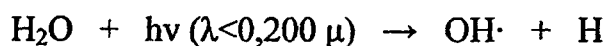


Το όζον καταστρέφεται και από το μονοξείδιο του αζώτου (NO), μέσα σε μία διαδικασία, που αναφέρεται ως καταλυτικός κύκλος:

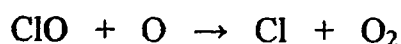
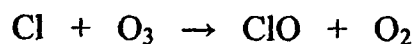


Το NO, που απαιτείται σε καταλυτικές ποσότητες προέρχεται από την τροπόσφαιρα, όπου εκπέμπεται σε αφθονία εξαιτίας της ανθρώπινης δραστηριότητας.

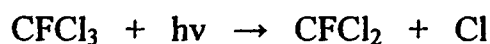
Οι ρίζες υδροξυλίου καταστρέφουν, επίσης, το όζον μέσα σε καταλυτικό κύκλο. Οι (OH·) δημιουργούνται από τη φωτοδιάσπαση των υδρατμών στην ατμόσφαιρα αλλά και από κρούσεις με άτομα O:

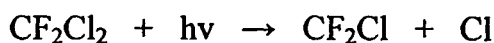


Με αυτό το μηχανισμό αποσυντίθεται περίπου το 11% του όζοντος ενώ κατά τον καταλυτικό κύκλο του αζώτου το 50-70%. Επιπλέον έρευνες έδειξαν ότι το όζον καταστρέφεται και από το χλώριο με τρόπο παρόμοιο με εκείνο του NO:



Αρχικά είχε πρόταθεί ότι τα άτομα του Cl στη στρατόσφαιρα προέρχονται από τη φωτολυτική διάσπαση του HCl αλλά τελικά σημαντικότερες πηγές είναι το Freon-11 (CFCl<sub>3</sub>) και το Freon-12 (CF<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), όπως και άλλοι πτητικοί οργανικοί υδρογονάνθρακες (volatile organic compounds, VOCs) [Oyama, 2000 – Horváth, 1985 – Russel, 1995]:





### 5.3.2. Τροποσφαιρικό όζον

Το όζον που υπάρχει στην τροπόσφαιρα δεν εκπέμπεται άμεσα αλλά αποτελεί ένα δευτερογενή ρυπαντή, που παράγεται από την αντίδραση ανάμεσα στο διοξείδιο του αζώτου (NO<sub>2</sub>), τους υδρογονάνθρακες (VOCs) και την ηλιακή ακτινοβολία (για μηχανισμούς βλέπε §5.3.1.).

Η ηλιακή ακτινοβολία παρέχει την απαραίτητη ενέργεια για την εκκίνηση της παραγωγής όζοντος διασπώντας σταθερά μόρια για να σχηματιστούν ελεύθερες ρίζες. Παρουσία οξειδίων του αζώτου, οι ελεύθερες ρίζες καταλύουν την οξείδωση των υδρογονανθράκων σε CO<sub>2</sub> και υδρατμούς. Αλδεύδες, κετόνες και CO είναι μερικά από τα ενδιάμεσα προϊόντα της μερικής οξείδωσης, ενώ το όζον σχηματίζεται ως παραπροϊόν.

Επίσης, καθώς το όζον φωτοδιασπάται, σχηματίζει ελεύθερες ρίζες με αποτέλεσμα να καταλύει το σχηματισμό του, πρόκειται δηλαδή για μία περίπτωση αυτοκατάλυσης.

Άρα τα αυξημένα επίπεδα του όζοντος γενικά παρατηρούνται κατά τη διάρκεια της καλοκαιρινής περιόδου, που επικρατεί ζέστη και ηλιοφάνεια και σε περιοχές όπου οι αέριες μάζες έχουν προηγουμένως εμπλουτιστεί από τους εκπεμπόμενους υδρογονάνθρακες και τα οξείδια του αζώτου (NO<sub>x</sub>).

Έτσι, για την αντιμετώπιση των συνεπειών του όζοντος στα κατώτερα στρώματα της ατμόσφαιρας έχουν θεσπιστεί διάφορα όρια έκθεσης και επικινδυνότητας για μακροχρόνια και μεσοπρόθεσμη έκθεση σε αυτό. Τα όρια αυτά κυμαίνονται από 50-200 ppb(v) τη στιγμή που η συγκέντρωση υποβάθρου είναι 30 ppb(v) [Horváth, 1985 – Vingarzan, 2004 – Weschler, 2004]. Στην Ελλάδα σαν «οριακή τιμή έκθεσης»<sup>1</sup> έχουν

<sup>1</sup> «Οριακή τιμή έκθεσης σε χημικό παράγοντα»: η τιμή την οποία δεν επιτρέπεται να ξεπερνά η μέση δωρη χρονικά σταθμισμένη έκθεση του εργαζομένου στο χημικό παράγοντα, μετρημένη στον αέρα της ζώνης αναπνοής του, κατά τη διάρκεια οποιασδήποτε δωρης ημερήσιας και 40ωρης εβδομαδιαίας εργασίας του.

οριστεί τα 100 ppb(v) ( $0,2 \text{ mg m}^{-3}$ ) και σαν «ανώτατη οριακή τιμή έκθεσης»<sup>2</sup> τα 300 ppb(v) ( $0,6 \text{ mg m}^{-3}$ ) [ΦΕΚ 94/Α/13-5-99, 2001].

#### 5.4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΟΖΟΝΤΟΣ

Το όζον συμμετέχει σε αντιδράσεις με τα περισσότερα από τα στοιχεία του περιοδικού πίνακα με εξαίρεση τα ευγενή μέταλλα, το φθόριο και τα ευγενή αέρια.

Πιο συγκεκριμένα στις αντιδράσεις ανόργανου τύπου το όζον μπορεί και οξειδώνει τα μέταλλα (εκτός από Au, Pt, Ir) σε οξειδία των μετάλλων, όπου αυτά βρίσκονται στις υψηλότερες οξειδωτικές βαθμίδες. Επίσης μετατρέπει οξειδία ενώσεων σε οξειδία μεγαλύτερων οξειδωτικών καταστάσεων ή υπεροξειδία, θειούχες ενώσεις σε θειικές, άνθρακα σε διοξείδιο του άνθρακα (ακόμα και σε κανονικές θερμοκρασίες) και την αμμωνία (είτε σε υγρή είτε σε αέρια φάση) σε νιτρικό αμμώνιο ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ). Αντιθέτως, το όζον δεν αντιδρά με τα αμμωνιακά άλατα [Oyama, 2000 – Horváth, 1985 – Hoigné, 1985].

Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι κάποια από τα υπερουράνια στοιχεία, όπως το ποσειδώνιο (Np, νεπτούνιο) και το πλουτόνιο (Pu), οξειδώνονται από το όζον στην οξειδωτική βαθμίδα +7, παρόλο που μέχρι τότε η οξειδωτική κατάσταση +6 θεωρούνταν η υψηλότερη [Komkov, 1968 – Shashukov, 1970].

Το όζον έχει, επίσης, συμμετοχή και στις κρυοχημικές αντιδράσεις [McGee, 1962]. Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται και οι αντιδράσεις σύνθεσης και απομόνωσης ανόργανων οζονιδίων, τα οποία όμως είναι σταθερά σε εξαιρετικά χαμηλές θερμοκρασίες ( $< -125 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Υπάρχουν, όμως και περιπτώσεις στις οποίες τα οζονίδια είναι σταθερά ακόμα σε θερμοκρασία δωματίου. Τέτοια είναι τα οζονίδια των αλκαλίων και κυρίως του καλίου (K) και του καισίου (Cs) [Vannerberg, 1962 – Klein, 2000].

Όσον αφορά τις αντιδράσεις του όζοντος με τα οργανικά μόρια αυτές έχουν μελετηθεί εκτεταμένα και μπορεί να βρει κανένας πληθώρα μονογραφιών και άρθρων ανασκόπησης, τόσο σχετικά με τους μηχανισμούς όσο και με κινητικές μελέτες

<sup>2</sup> «Ανώτατη οριακή τιμή έκθεσης σε χημικό παράγοντα»: η τιμή την οποία δεν επιτρέπεται να ξεπερνά η μέση χρονικά σταθμισμένη έκθεση του εργαζομένου στο χημικό παράγοντα, μετρημένη στον αέρα της ζώνης αναπνοής του, κατά τη διάρκεια οποιασδήποτε δεκαπεντάλεπτης περιόδου μέσα στο χρόνο εργασίας του, έστω και αν τηρείται η οριακή τιμή έκθεσης.

[Horváth, 1985 – Bailey, 1978, 1982 – Atkinson, 1984 – Criegee, 1975 – Hoigné, 1983a, 1983b].

Το όζον πρακτικά αντιδρά σχεδόν με όλες τις οργανικές και οργανομεταλλικές ομάδες, όπως, C-H, C-O, C-N, C-S και C-M. Η δράση του ως ηλεκτρονιόφιλου αντιδραστήριου ενισχύεται από την ύπαρξη ομάδων που δρουν ως δότες ηλεκτρονίων και αναστέλλεται από άλλες που έλκουν τα ηλεκτρόνια. Οι σταθερές ταχύτητας των αντιδράσεων σε υδατικό περιβάλλον είναι της τάξης των  $10^{-5}$  μέχρι  $10^9$  ενώ στην αέρια φάση τα όρια είναι από  $10^{-14}$  μέχρι  $10^{-24}$ .

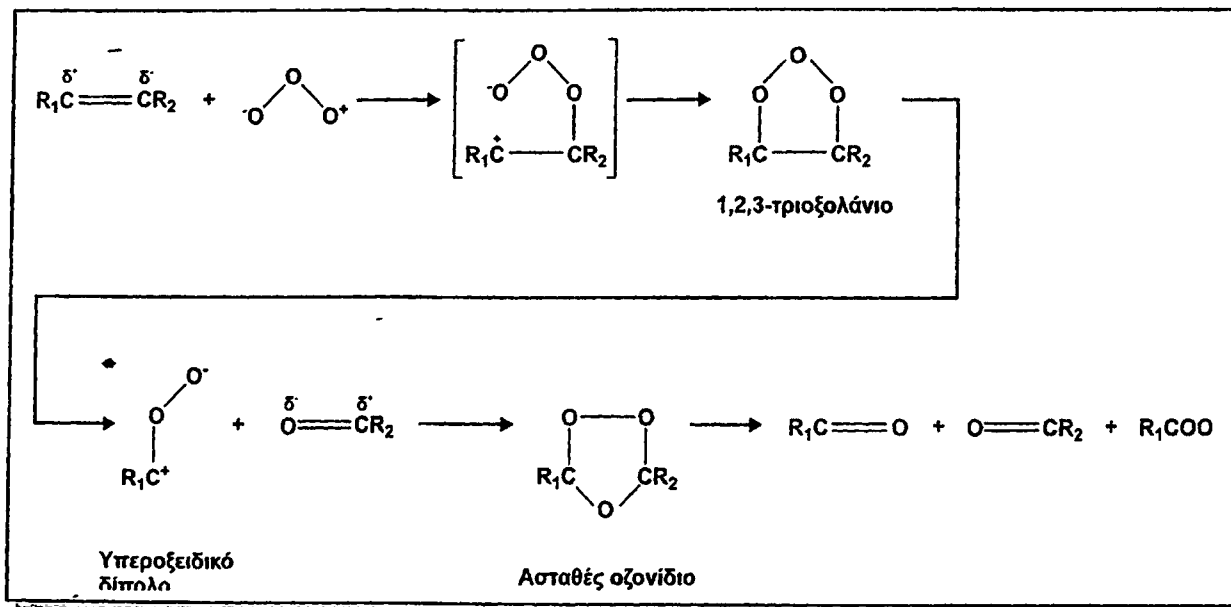
Η δράση του όζοντος επί των κορεσμένων υδρογονανθράκων είναι σχετικά περιορισμένη. Σε υδατικό περιβάλλον και υπό κανονικές συνθήκες όταν οι υδρογονάνθρακες φέρουν δευτεροταγή ή τριτοταγή άτομα υδρογόνου, τότε υπάρχει περίπτωση να λάβει χώρα οξείδωση (π.χ. το ισοβουτάνιο μετατρέπεται σε t-βουτυλική αλκοόλη) μέσω σχηματισμού ριζών ή κάποιον ενδιάμεσων φορτισμένων σωματιδίων. Το ίδιο περιορισμένη είναι και η δράση στην αέρια φάση, όπου οι όποιες αντιδράσεις (π.χ. αντίδραση με μεθάνιο) λαμβάνουν χώρα εξαιτίας της διάσπασης του όζοντος σε  $O_2$  και  $O$  [Toby, 1989].

Οι πιο διαδεδομένες αντιδράσεις είναι αυτές ανάμεσα στο όζον και τις ολεφίνες. Διεξάγονται μέσω του μηχανισμού Criegee [Criegee, 1975] και έχουν σαν αποτέλεσμα την παραγωγή διαφόρων καρβονυλικών ενώσεων (Σχήμα 5.5). Αρχικά το όζον δημιουργεί ένα π-σύμπλοκο με το αλκένιο και μέσω μίας αντίδρασης 1,3-κυκλοπροσθήκης [Huigsen, 1963], παράγεται το πρώτο οζονίδιο (1,2,3-τριοξολάνιο ή μολοζονίδιο).

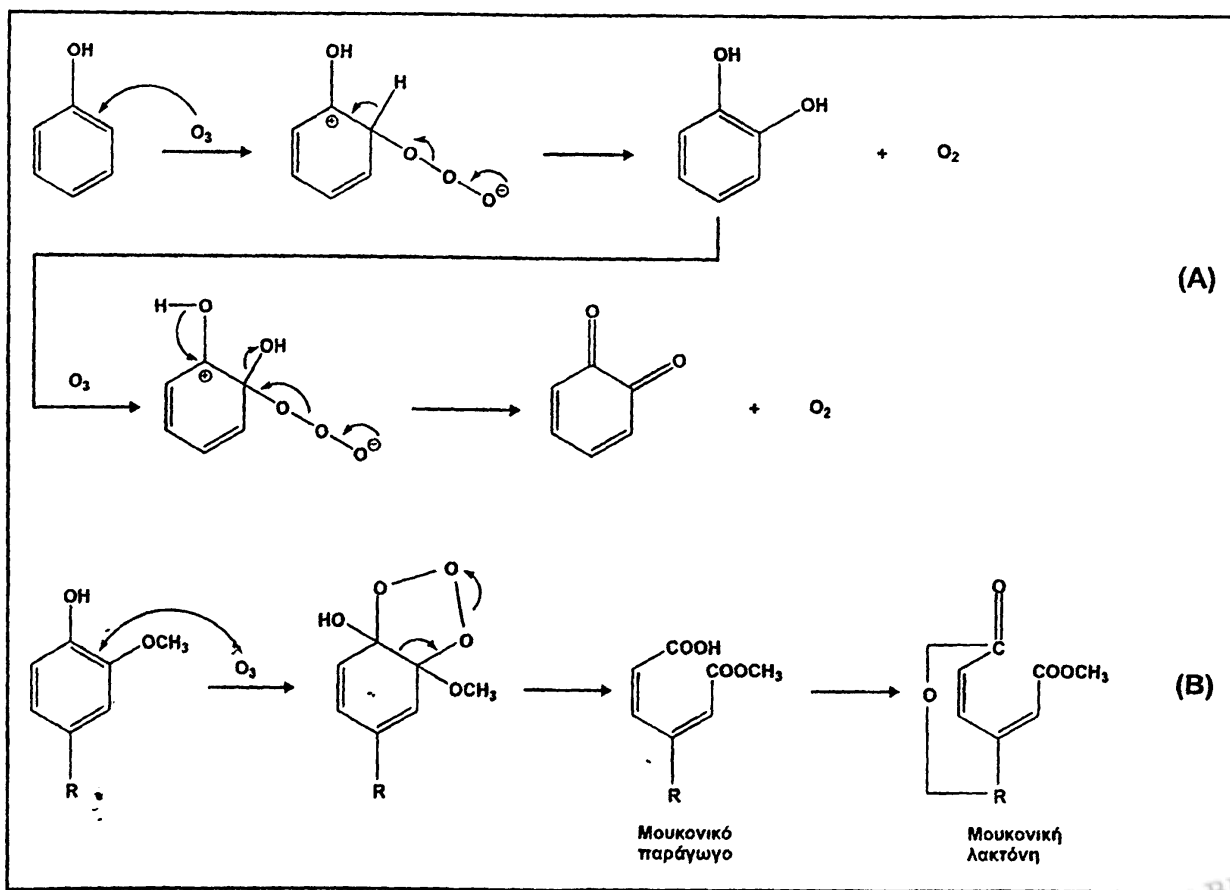
Η αντίδραση προσθήκης είναι στερεοειδική [Bauld, 1968] και καθώς το σχηματιζόμενο οζονίδιο είναι ασταθές, αυτό διασπάται παράγοντας ένα καρβονυλικό ιόν και ένα υπεροξειδικό δίπολο μόριο. Αυτά στη συνέχεια αναδιατάσσονται μεταξύ τους για να σχηματίσουν ένα δεύτερο οζονίδιο, που είναι εξίσου ασταθές, γι' αυτό διασπάται και παράγονται καρβονυλικές ενώσεις και καρβοξυλικά οξέα. Παρουσία  $H_2O$  είναι δυνατόν να παραχθεί και  $H_2O_2$  [Bailey, 1958 – Atkinson, 1984 – Feltham, 2000 – Lattimer, 1974].

Επίσης, υπάρχει αναφορά για μία μικρή τροποποίηση του μηχανισμού της οζονόλυσης, η οποία αφορά τις χλωρο-ολεφίνες [Griesbaum, 1975].





Σχήμα 5.5: Προτεινόμενος μηχανισμός οζονόλυσης των αλκενίων.



Σχήμα 5.6: Προτεινόμενοι μηχανισμοί οζονόλυσης αρωματικών δακτυλίων (A) φαινόλικου χαρακτήρα και (B) γουαΐακολικού (guaiacyl) χαρακτήρα.

Εξίσου σημαντικές είναι και οι αντιδράσεις του όζοντος με αρωματικούς υδρογονάνθρακες. Σε αυτές τις περιπτώσεις έχουμε προσθήκη του όζοντος στους διπλούς δεσμούς των αρωματικών δακτυλίων με ένα μηχανισμό παρόμοιο με εκείνο που αναφέρεται στις αντιδράσεις οζονόλυσης των αλκενίων (**Σχήμα 5.6**) καθώς επίσης και μέσω μηχανισμού ελευθέρων ριζών. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία παραγώγων του μουκονικού οξέος (muconic acid derivatives) και όσο προχωρά η οζονόλυση συνεχίζεται η διάσπαση του αρωματικού δακτυλίου, οπότε προκύπτουν καρβοξυλικά και καρβονυλικά παράγωγα [Gierer, 1985, 1986 – Lyse, 1979].

Τέλος ενδιαφέρον παρουσιάζουν και οι αντιδράσεις του όζοντος με το ακετυλένιο και γενικότερα με τους τριπλούς δεσμούς C-C [Oyama, 2000 – Horvath, 1985].

## 5.5. ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΟΖΟΝΤΟΣ

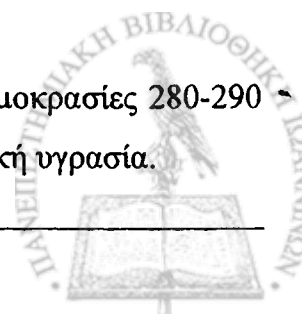
Η παραγωγή του όζοντος γίνεται με πολλαπλές μεθόδους. Ένας τρόπος είναι με τη βοήθεια ειδικών μηχανημάτων, που ονομάζονται γεννήτριες όζοντος (ozone generators) ή οζονιστήρες. Η λειτουργία τους βασίζεται σε διάφορες τεχνικές όπως:

1) εκκένωση ή εκφόρτιση τόξου: η παραγωγή του όζοντος με αυτή την τεχνική στηρίζεται στην εφαρμογή υψηλής τάσης μεταξύ δύο ηλεκτροδίων. Στο χώρο μεταξύ των ηλεκτροδίων διέρχεται ένα ρεύμα καθαρού οξυγόνου ή αέρα του οποίου συνεχώς εμπλουτίζεται σε ιόντα εξαιτίας του εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου. Τα ιόντα καθώς επιταχύνονται συγκρούονται ανελαστικά και παράγουν άλλα άτομα οξυγόνου με αποτέλεσμα να δημιουργούνται συνθήκες για την παραγωγή όζοντος. Η συνεχής συσσώρευση φορτίου κάποια στιγμή οδηγεί στη δημιουργία εκκένωσης και ένα συνεχές ρεύμα διαρρέει το χώρο μεταξύ των ηλεκτροδίων.

2) ακτινοβολήση: η τεχνική αυτή βασίζεται στην ακτινοβολήση ρεύματος ξηρού οξυγόνου με υπεριώδη ακτινοβολία, όπου σχηματίζονται άτομα οξυγόνου και ελεύθερες ρίζες. Για πιέσεις αερίου μεταξύ 1-60 bar, η χρησιμοποιούμενη ακτινοβολία είναι μήκους κύματος 220 nm ενώ για υψηλότερες πιέσεις 50-290 bar χρησιμοποιείται ακτινοβολία μήκους κύματος 253 nm.

Άλλες μέθοδοι παραγωγής όζοντος στηρίζονται:

1) σε χημικές αντιδράσεις, οι οποίες λαμβάνουν χώρα σε θερμοκρασίες 280-290 K και πάντα με τη χρήση καθαρού αέρα ή οξυγόνου με κάποια σχετική υγρασία.





2) σε θερμική διάσπαση του οξυγόνου σε ιόντα, άτομα και ελεύθερες ρίζες. Ο σχηματισμός διεξάγεται μέσω του μηχανισμού των συγκρούσεων.

3) σε ηλεκτρόλυση διαλυμάτων ηλεκτρολυτών (π.χ. θειικό οξύ). Ο σχηματισμός του όζοντος γίνεται στην άνοδο του ηλεκτρολυτικού συστήματος.

4) σε πυρηνικές αντιδράσεις ή με ραδιενεργή ακτινοβολήση οξυγόνου.

Όλες οι παραπάνω τεχνικές έχουν ξεχωριστά πλεονεκτήματα αλλά αυτό που πάντα υπάρχει σαν πρόβλημα είναι η ενεργειακή κατανάλωση που ορισμένες από αυτές τις καθιστά απαγορευτικές για εμπορική χρήση. Άλλωστε ο βαθμός μετατροπής του οξυγόνου σε όζον δεν ξεπερνά το 6-8% και σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να φτάσει και το 10% [Horváth, 1985].

## 5.6. ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΟΖΟΝΤΟΣ

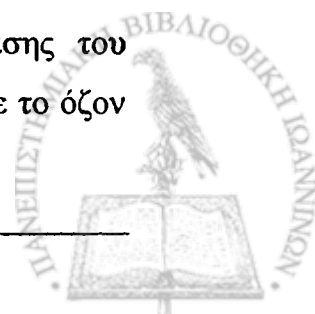
Εξαιτίας της σπουδαιότητας του όζοντος έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι για τον προσδιορισμό του και οι οποίες μπορούν να χωριστούν στις παρακάτω κατηγορίες:

1) μέθοδοι που βασίζονται σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις: ο κύριος εκπρόσωπος αυτής της κατηγορίας είναι οι ιωδομετρικές αντιδράσεις στις οποίες στηρίζονται οι περισσότερες εκ των ογκομετρικών μεθόδων υγρής και αέριας φάσης [Wadelin, 1957 – Boyd, 1970 – Dietz, 1973 – Bergshoeff, 1980 – Hodgenson, 1971 – Saltzman, 1959]. Εν τούτοις υπάρχουν αρκετές διαφωνίες ανάμεσα στους επιστήμονες για την αναλογία των mol όζοντος-ιωδίου που καταναλώνονται και παράγονται, αντίστοιχα σε συνδυασμό με την τιμή του pH του διαλύματος.

2) φασματοφωτομετρικές μέθοδοι: στηρίζονται στη μέτρηση της μεταβολής της απορρόφησης που προκαλείται από την αντίδραση του όζοντος με κάποια έγχρωμη ουσία [Bader, 1982 – Straka, 1985 – Mei, 1997 – Tomiyasu, 1984 – Hauser, 1967].

3) μέθοδοι που βασίζονται σε αντιδράσεις χημειοφωταύγειας: περιλαμβάνουν χημειοφωταυγείς αντιδράσεις του όζοντος με πλήθος χημικών ουσιών τόσο στην υγρή όσο και στην αέρια φάση [Bersis, 1966 – Hodgenson, 1970 – Ray, 1986 – Takeuchi, 1989 – McGowan, 1995 – Mikuška, 1998 – Mihalatos, 1995].

4) φθορισμομετρικές μέθοδοι: στηρίζονται στη μεταβολή της έντασης του φθορισμού μίας ουσίας (π.χ. 9,10-διυδροακριδίνη), εξαιτίας της αντίδρασης με το όζον [Wafanabe, 1966].



5) ηλεκτροχημικές μέθοδοι: οι τεχνικές στις οποίες βασίζονται είναι αρκετές. Ενδεικτικά αναφέρονται ότι έχουν χρησιμοποιηθεί ηλεκτρόδια Au σε συνδυασμό με μεμβράνες περατές από αέρια ή ιονανταλλακτικές (τύπου Nafion) [Stanley, 1979 – Knake, 2002 – Xie, 1998], παστίλιες AgI ανάμεσα από Ag και Pt [Suzuki, 1982], ενώ αρκετά διαδεδομένοι είναι και οι αισθητήρες όζοντος, που βασίζονται σε ημιαγωγούς οξειδίων μετάλλων [Kim, 2000 – Takada, 1993].

Περισσότερες πληροφορίες μπορεί κάποιος να βρει ανατρέχοντας στη μονογραφία περί όζοντος του Horváth [Horváth, 1985].

## 5.7. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Από αυτά που έχουν αναφερθεί μέχρι τώρα είναι φανερό ότι το όζον πέρα από τον επικίνδυνο για τα έμβια όντα χαρακτήρα του μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε καθημερινές εφαρμογές που ως στόχο έχουν να βελτιώσουν την ποιότητα ζωής.

Ορισμένες από τις εφαρμογές του όζοντος είναι:

1) στην απολύμανση, είτε ως κυρίαρχο αντιδραστήριο είτε συμπληρωματικά σε άλλες διαδικασίες απολύμανσης, π.χ. χλωρίωση [Rice, 1981].

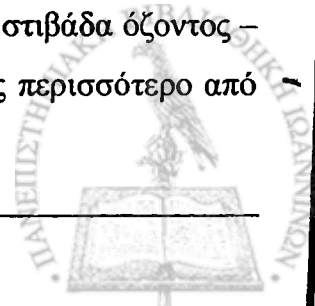
2) στη βιομηχανία τροφίμων, για την οξειδωτική καταστροφή ουσιών που προσδίδουν δυσάρεστη οσμή και γεύση στα τρόφιμα καθώς και στις διαδικασίες ωρίμανσης και συντήρησης τροφίμων [Guzel-Seydim, 2004].

3) στις αγροτικές καλλιέργειες, για την καταπολέμηση των ζιζανίων και την απολύμανση των αρδευτικών καναλιών [Horváth, 1985].

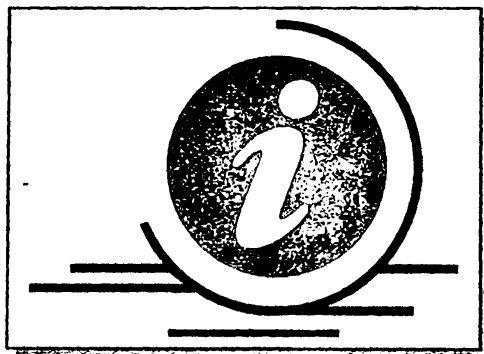
4) στις εγκαταστάσεις κλιματισμού, με σκοπό την αναβάθμιση της ποιότητας του εισπνεόμενου αέρα αν και υπάρχει διαφωνία στο γεγονός ότι η οξειδωτική δράση του όζοντος δημιουργεί περισσότερο τοξικές ουσίες παρά βελτιώνει την ποιότητα [Weschler, 1992 – Li, 2002 – Salisbury, 1997].

5) στην ιατρική επιστήμη για τη θεραπεία εγκαυμάτων, του οξειδωτικού στρες και διαφόρων δερματολογικών παθήσεων [Bocci, 2001, 2002].

Από τα προαναφερθέντα, λοιπόν, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η ευρύτητα των εφαρμογών του όζοντος και ο διπλός ρόλος του (προστατευτική στιβάδα όζοντος – τοξικός ρύπος στην τροπόσφαιρα) καθιστούν τη χημεία του όζοντος περισσότερο από ποτέ ως ένα ελκυστικό πεδίο έρευνας με συνεχή και ραγδαία εξέλιξη.



## ***ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΘΕΩΡΗΤΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ***



- Adams, R.N., *Electrochemistry at Solid Electrodes*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1969.
- Armstrong, R.D., Jenkins, A.T.A., Johnson, B.W., *Corros. Sci.*, 37, 1995, 1615.
- Atkinson, R., Carter, W.P.L., *Chem. Rev.*, 84, 1984, 437.
- Bader, H., Hoigné, J., *Ozone Sci. Eng.*, 4, 1982, 169.
- Bailey, P.S., *Chem. Rev.*, 58, 1958, 925.
- Bailey, P.S., *Ozonation in Chemistry*, Vol. 1, Academic Press, New York, 1978.
- Bailey, P.S., *Ozonation in Chemistry*, Vol. 2, Academic Press, New York, 1982.
- Bakker, E., *Anal. Chem.*, 76, 2004, 3285.
- Bard, A.J., , Faulkner, L.R., *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons, New York, 1980.
- Bataillard, P., Gardies, F., Renault, N.J., Martelet, C., Colin, B., Mandrand, B., *Anal. Chem.*, 60, 1988, 2374.
- Bauld, N.L., Thompson, J.A., Hudson, C.E., Bailey, P.S., *J. Am. Chem. Soc.*, 90, 1968, 1822.



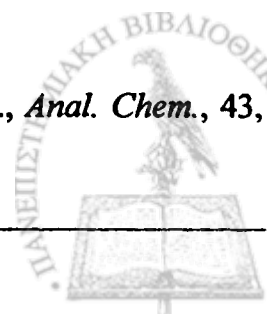
- Berggren, C., Bjarnason, B., Johansson, G., *Electroanalysis*, 13, 2001, 173.
- Bergshoeff, G., Lanting, R.W., Prop, J.M.G., Reynders, H.F.R., *Anal. Chem.*, 52, 1980, 541.
- Berney, H., Alderman, J., Lane, W., Collins, J.K., *Sens. Actuators B*, 44, 1997, 578.
- Bersis, D., Vassiliou, E., *Analyst*, 91, 1966, 499.
- Biń, A.K., *Ozone Sci. Eng.*, 28, 2006, 67.
- Bocci, V., Aldinucci, C., Borrelli, E., Corradeschi, F., Diadori, A., Fanetti, G., Valacchi, F., *Ozone Sci. Eng.*, 23, 2001, 207.
- Bocci, V., *Oxygen-Ozone Therapy, A Critical Evaluation*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 2002.
- Boyd, A.W., Willis, C., Cyr, R., *Anal. Chem.*, 42, 1970, 670.
- Brett, C.M.A., Oliveira-Brett, A.M., *Electroanalysis*, Oxford University Press, New York, 1998.
- Brett, C.M.A., Oliveira-Brett, A.M., *Electrochemistry. Principles, Methods and Applications*, Oxford University Press, Oxford, UK, 1993.
- Buck, R.P., *Anal. Chem.*, 44, 1972, 270.
- Burmeister, J.J., Palmer, M., Gerhardt, G.A., *Anal. Chim. Acta*, 481, 2003, 65.
- Burns, D.T., *Fresenius J. Anal. Chem.*, 357, 1997, 178.
- Carrelli, I., Chiarotto, I., Curulli, A., Palleschi, G., *Electrochim. Acta*, 41, 1996, 1793.
- Cass, A.E.G., *Biosensors, A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, 1990.
- Céspedes, F., Alegret, S., *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 19, 2000, 276.
- Cha, D.K., Park, S.M., *J. Electroanal. Chem.*, 459, 1998, 135.
- Channing, L.F.K., Helz, G.R., *Environ. Sci. Technol.*, 17, 1983, 145.



- Chaubey, A., Malhotra, B.D., *Biosens. Bioelectron.*, 17, 2002, 441.
- Clark, L.C., Lyons, C., *Ann. NY Acad. Sci.*, 102, 1962, 29.
- Cosnier, S., *Anal. Bioanal. Chem.*, 377, 2003, 507.
- Cotton, F.A., Wilkinson, G., *Advanced Inorganic Chemistry*, 5th edition, John Wiley & Sons, New York, 1988.
- Criegge, R., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 14, 1975, 745.
- Dekanski, A., Stevanović, J., Stevanović, R., Nikolić, B.Z., Jovanović, V.M., *Carbon*, 39, 2001, 1195.
- Dietz, R.N., Pruzansky, J., Smith, J.D., *Anal. Chem.*, 45, 1973, 402.
- Domingues, L., Oliveira, C., Fernandes, J.C.S., Ferreira, M.G.S., *Electrochim. Acta*, 47, 2002, 2253.
- Dressman, S.F., Peters, J.L., Michael, A.C., *J. Neurosci. Meth.*, 119, 2002, 75.
- Easton, E.B., Pickup, P.G., *Electrochim. Acta*, 50, 2005, 2469.
- EcoChemie B.V., *Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS): 3. Data Analysis, Autolab Application Note 013-1*, The Netherlands, 1992.
- Eiggins, B.R., *Chemical Sensors and Biosensors*, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, UK, 2002.
- Emr, S.A., Yacynych, A.M., *Electroanalysis*, 7, 1997, 913.
- EPA, *EPA Guidance Manual, Alternative Disinfectants and Oxidants*, NY, 1999.
- Evans, D.H., O'Connell, K.M., Petersen, R.A., Kelly, M.J., *J. Chem. Educ.*, 60, 1983, 290.
- Feltham, E.J., Almond, M.J., Marston, G., Ly, V.P., Wiltshire, K.S., *Spectrochim. Acta, Part A*, 56, 2000, 2605.
- Feng, Y.J., Li, X.Y., *Water Res.*, 37, 2003, 2399.



- Fersht, A.R., *Enzyme Structure and Mechanism*, 2<sup>nd</sup> Edition, W.H. Freeman, New York, 1985.
- Florou, A.B., Prodromidis, M.I., Karayannis, M.I., Tzouwara-Karayanni, S.M., *Electroanalysis*, 10, 1998, 1261.
- Forni, L., Bahnemann, D., Hart, E.J., *J. Phys. Chem.*, 86, 1982, 255.
- Gamry Instruments, *Electrochemical Impedance Spectroscopy Primer*, UK, 1994.
- Gervasi, C.A., Alvarez, P.E., *Corros. Sci.*, 47, 2005, 69.
- Gierer, J., *Wood Sci. Technol.*, 19, 1985, 289.
- Gierer, J., *Wood Sci. Technol.*, 20, 1986, 1.
- Griesbaum, K., Keul, H., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 14, 1975, 716.
- Guan, J.G., Miao, Y.Q., Zhang, Q.J., *J. Biosci. Bioeng.*, 97, 2004, 219.
- Guilbault, G.G., Kramer, D.N., Cannon, P.L., *Anal. Chem.*, 34, 1963, 1437.
- Guilbault, G.G., Pravda, M., Kreuzer, M., O'Sullivan, C.K., *Anal. Lett.*, 37, 2004, 1481.
- Gurol, M.D., *Environ. Sci. Technol.*, 16, 1982b, 337.
- Gurol, M.D., Singer, P.C., *Environ. Sci. Technol.*, 16, 1982a, 377.
- Guzel-Seydim, Z.B., Greene, A.K., Seydim, A.C., *Lebensm.-Wiss. u. Technol.*, 37, 2004, 453.
- Hanes, C.S., *Biochem. J.*, 26, 1932, 1406.
- Hansen, E.H., *Anal. Chim. Acta*, 261, 1992, 125.
- Hauser, T.R., Bradley, D.W., *Anal. Chem.*, 39, 1967, 1184.
- Heyrovsky, J., *Chem. Listy*, 16, 1922, 256.
- Hodgenson, J.A., Baumgardner, R.E., Martin, B.E., Rehme, K.A., *Anal. Chem.*, 43, 1971, 1123.



- Hodgenson, J.A., Krost, K.J., O'Keeffe, A.E., Stevens, R.K., *Anal. Chem.*, 42, 1970, 1795.
- Hofstee, B.H.J., *Science*, 116, 1952, 329.
- Hoigné, J., Bader, H., Haag, W.R., Staehelin, J., *Water, Res.*, 19, 1985, 993.
- Hoigné, J., Bader, H., *Water Res.*, 17, 1983a, 173.
- Hoigné, J., Bader, H., *Water Res.*, 17, 1983b, 185.
- Holme, D.J., Peck, H., *Analytical Biochemistry*, Third edition, Prentice Hall, UK, 1998.
- Horváth, M., Bilitzky, L., Hüttner, J., *Ozone*, Elsevier, Amsterdam, 1985.
- Huisgen, R., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2, 1963, 565.
- International Union of Biochemistry and Molecular Biology, *Enzyme Nomenclature 1992*, Academic Press, Orlando, FL, 1992.
- Ishihara, T., Matsubara, S., *J. Electroceram.*, 2, 1998, 215.
- Jahn, S., *Z. Anorg. Chem.*, 48, 1906, 260.
- Janata, J., *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 32, 2002, 109.
- Janata, J., Josowich, M., Vanysek, P., de Vaney, D.M., *Anal. Chem.*, 70, 1998, 179R.
- Katz, E., Willner, I., *Electroanalysis*, 15, 2003, 913.
- Kellner, R., Mermet, J.M., Otto, M., Valcárcel, M., Widmer, H.M., *Analytical Chemistry: A Modern Approach to Analytical Science*, Second Edition, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. Weinheim, 2004.
- Kim, S.R., Hong, H.K., Kwon, C.H., Yun, D.H., Lee, K., Sung, Y.K., *Sens. Actuators B*, 66, 2000, 59.
- Kinman, R.N., *Crit. Rev. Environ. Contr.*, 5, 1975, 141.
- Kissinger, P.T., Heineman, W.R., *J. Chem. Educ.*, 60, 1983, 702.



- Klein, W., Jansen, M., *Z. Anorg. Allg. Chem.*, 626, 2000, 136.
- Knake, R., Hauser, P.C., *Anal. Chim. Acta*, 459, 2002, 199.
- Komkov, Y.A., Krot, N.N., Gelman, A.D., *Radiokhimiya*, 10, 1968, 625.
- Koryta, J., *Anal. Chim. Acta*, 61, 1972, 329.
- Koshland, D.E., Jr., *Sci. Amer.*, 229, 1973, 52.
- Kulys, J., Higgins, I.J., Bannister, J.V., *Biosens. Bioelectron.*, 7, 1992, 187.
- Lasseter, T.L., Cai, W., Hamers, R.J., *Analyst*, 129, 2004, 3.
- Lattimer, R.P., Kuczkowski, R.L., Gillies, C.W., *J. Am. Chem. Soc.*, 96, 1974, 348.
- Lenahan, C.E., Barnett, N.W., Lewis, S.W., *Analyst*, 127, 2002, 997.
- Li, T.H., Turpin, B.J., Shields, H.C., Weschler, C.J., *Environ. Sci. Technol.*, 36, 2002, 3295.
- Lineweaver, H., Burk, D., *J. Am. Chem. Soc.*, 56, 1934, 658.
- Lyse, T.E., *PhD thesis*, The Institute of Paper Chemistry, Appleton, Wisconsin, 1979.
- Mabbott, G.A., *J. Chem. Educ.*, 60, 1983, 697.
- Matsumi, Y., Kawasaki, M., *Chem. Rev.*, 103, 2003, 4767.
- McDonald, J.R., *Impedance Spectroscopy: Emphasizing Solid Materials and Systems*, Wiley, New York, USA, 1987.
- McGee, H.A., Martin, W.J., *Cryogenics*, 2, 1962, 257.
- McGowan, K.A., Pacey, G.E., *Talanta*, 42, 1995, 1045.
- McNeil, C.J., Athey, D., Ball, M., Ho, W.O., Krause, S., Armstrong, R.D., Wright, J.D., Rawson, K., *Anal. Chem.*, 67, 1995, 3928.
- Mei, Y.H., Mendenhall, G.D., *Anal. Chem.*, 69, 1997, 1019.





- Merkoçi, A., Pumera, M., Llopis, X., Pérez, B., del Valle, M., Alegret, S., *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 24, **2005**, 826.
- Midgley, D., Mulcahy, D.E., *Ion-Selective Electrode Rev.*, 5, **1983**, 165.
- Mihalatos, A.M., Calokerinos, A.C., *Anal. Chim. Acta*, 303, **1995**, 127.
- Mikkelsen, S.R., Cortón, E., *Bioanalytical Chemistry*, John Wiley & Sons, NJ, USA, **2004**.
- Mikuška, P., Večeřa, Z., *Anal. Chim. Acta*, 374, **1998**, 297.
- Millar, J., Pelling, C.W.A., *J. Neurosci. Meth.*, 110, **2001**, 1.
- Minot, C., Markovits, A., *J. Mol. Struct.: THEOCHEM*, 424, **1998**, 119.
- Munteanu, F.D., Mano, N., Kuhn, A., Gorton, L., *Bioelectrochem.*, 56, **2002**, 67.
- Nakamura, H., Karube, I., *Anal. Bioanal. Chem.*, 377, **2003**, 446.
- Newman, A.L., Hunter, K.W., Stanbro, W.D., *Chemical Sensors: 2nd International Meeting, Proceedings*, **1986**.
- Nicholson, R.S., Shain, I., *Anal. Chem.*, 36, **1964**, 706.
- Nicholson, R.S., Shain, I., *Anal. Chem.*, 37, **1965**, 178.
- Oyama, S.T., *Catal. Rev. Sci. Eng.*, 42, **2000**, 279.
- Palmisano, F., Zambonin, P.G., Centonze, D., *Fresenius J. Anal. Chem.*, 366, **2000**, 586.
- Park, S.M., Yoo, J.S., *Anal. Chem.*, 75, **2003**, 455A.
- Pethig, R., Kell, D.B., *Phys. Med. Biol.*, 32, **1987**, 933.
- Polcyn, D.S., Shain, I., *Anal. Chem.*, 38, **1966**, 370.
- Poon, M., McCreery, R.L., *Anal. Chem.*, 58, **1986**, 2745.
- Princeton Applied Research, *Basics of electrochemical Impedance Spectroscopy, Application Note AC-1*, USA, **1992**.



- Prodromidis, M.I., Karayannis, M.I., *Electroanalysis*, 14, 2002, 241.
- Prodromidis, M.I., Veltsistas, P.G., Karayannis, M.I., *Anal. Chem.*, 72, 2000, 3995.
- Ray, J.D., Stedman, D.H., Wendel, G.J., *Anal. Chem.*, 58, 1986, 598.
- Rice, R.G., Robson, C.M., Miller, G.W., Hill, A.G., *J. Am. Water Works Assoc.*, 73, 1981, 44.
- Rischbieter, E., Stein, H., Schumpe, A., *J. Chem. Eng. Data*, 45, 2000, 338.
- Rosales, R.C.P., Garcia, J.L.L., de Castro, M.D.L., *Anal. Chim. Acta*, 480, 2003, 181.
- Russel, A., Milford, J., Bergin, M.S., McBride, S., McNair, L., Yang, Y., Stockwell, W.R., Coer, B., *Science*, 269, 1995, 491.
- Růžička, J., *Analyst*, 119, 1994, 1925.
- Růžička, J., Hansen, E.H., *Flow Injection Analysis*, Second edition, John Wiley & Sons, New York, 1988.
- Růžička, J., Marshall, G.D., *Anal. Chim. Acta*, 237, 1990, 329.
- Růžička, J., Pollema, C.H., Scudder, K.M., *Anal. Chem.*, 65, 1993, 3566.
- Salisbury, J., Ferrari, L., *Ozone, National Environmental Health Monographs, Air Series No1*, National Environmental Health Forum, NY, 1997.
- Saltzman, B.E., Gilbert, N., *Anal. Chem.*, 31, 1959, 1914.
- Sánchez, C.F., McNeil, C.J., Rawson, K., *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 24, 2005, 37.
- Scholz, F., *Electroanalytical Methods, Guide to Experiments and Applications*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2002.
- Selman, J., Lin, Y., *Electrochimica Acta*, 38, 1993, 2063.
- Serway, R.A., *Physics for Scientists & Engineers, Τόμος II, Ηλεκτρομαγνητισμός*, Third edition, Αθήνα, 1990.
- Shashukov, E.A., Kozlov, A.A., *Radiokhimiya*, 12, 1970, 237.



- Staehelin, J., Hoigne, J., *Environ. Sci. Technol.*, 19, 1985, 1206.
- Stanley, J.H., Johnson, J.D., *Anal. Chem.*, 51, 1979, 2144.
- Stergiou, D.V., Prodromidis, M.I., Veltsistas, P.G., Evmiridis, N.P., *Electroanalysis*, 16, 2004, 949.
- Straka, M.R., Gordon, G., Pacey, G.E., *Anal. Chem.*, 57, 1985, 1799.
- Stryer. L., *Βιοχημεία*, Τόμος Πρώτος, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 1997.
- Štulík, K., Pačáková, V., *Electroanalytical Measurements in Flowing Liquids*, Ellis Horwood Limited, Chichester, 1987.
- Suzuki, S., Nagashima, K., *Anal Chim. Acta*, 144, 1982, 261.
- Takada, T., Suzuki, K., Nakane, M., *Sens. Actuators B*, 13, 1993, 404.
- Takeuchi, K., Ibusuki, T., *Anal. Chem.*, 61, 1989, 619.
- Tessema, M., Ruzgas, T., Gorton, L., Ikeda, T., *Anal. Chim. Acta*, 310, 1995, 161.
- Toby, S., Toby, F.S., *J. Phys. Chem.*, 936, 1989, 2453.
- Tomiyasu, H., Gordon, G., *Anal. Chem.*, 56, 1984, 752.
- Trojanowich, M., *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 25, 2006, 480.
- Upadhyay, P.K., *J. Electroanal. Chem.*, 271, 1989, 339.
- Valcárcel, M., Hansen, E.H., *Flow Injection Analysis, Principles and Applications*, John Wiley & Sons, New York, 1987.
- van Benschoten, J.J., Lewis, J.Y., Heineman, W.R., Roston, D.A., Kissinger, P.T., *J. Chem. Educ.*, 60, 1983, 772.
- Vannerberg, N.G., *Progr. Inorg. Chem.*, 4, 1962, 125.
- Vingarzan, R., *Atmos. Environ.*, 38, 2004, 3431.
- Wadelin, C.W., *Anal. Chem.*, 29, 1957, 441.



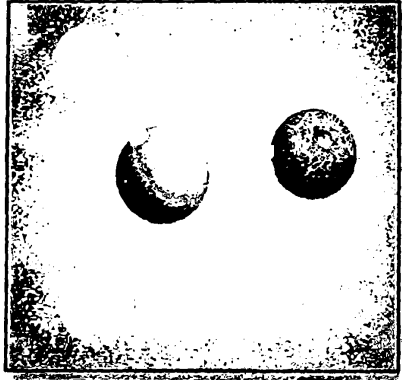
- Walcarius, A., *Anal. Chim. Acta*, 384, 1999, 1.
- Wang, J., Kirgöz, Ü.A., Mo, J.W., Lu, J., Kawde, A.N., Muck, A., *Electrochem. Commun.*, 3, 2001, 203.
- Wang, J., *Analytical Electrochemistry*, Wiley-VCH Inc., New York, 1994.
- Wang, J., Pamidi, P.V.A., Park, D.S., *Electroanalysis*, 9, 1997, 52.
- Wang, M., Yao, S., Madou, M., *Sens. Actuators B*, 81, 2002, 313.
- Watanabe, H. Nakadoi., T., *J. Air Pollut. Control Assoc.*, 16, 1966, 614.
- Weast, R.C., Astle, M.J., *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 62nd edition, CRC Press, Boca Raton, FL, 1981.
- Weschler, C.J., *Atmos. Environ.*, 38, 2004, 5715.
- Weschler, C.J., Hodgson, A.T., Wooley, J.D., *Environ. Sci. Technol.*, 26, 1992, 2371.
- Whitten, J.L., Yang, H., *Surf. Sci. Rep.*, 24, 1996, 55.
- Wildgoose, G.G., Banks, C.E., Leventis, H.C., Compton, R.G., *Microchim. Acta*, 152, 2006, 187.
- Wilson, G.S., Hu, Y., *Chem. Rev.*, 100, 2000, 2693.
- Wring, S.A., Hart, J.P., *Analyst*, 117, 1992, 1215.
- Xie, L., Lu, J., Yan, H., *Electroanalysis*, 10, 1998, 842.
- Zaslowsky, J.A., Urbach, H.B., Leighton, F., Wnuk, R.J., Wojtowicz, J.A., *J Am. Chem. Soc.*, 82, 1960, 2682.
- Zhang, H., Coury, L.A., *Anal. Chem.*, 65, 1993, 1552.
- Zhang, S., Wright, G., Yang, Y., *Biosens. Bioelectron.*, 15, 2000, 273.
- Βασιλικιώτης, Γ.Σ., *Χημεία Περιβάλλοντος*, Δεύτερη Έκδοση, University Studio Press, Θεσσαλονίκη, 1989.
- Βελτσίστας, Π.Γ., *Διδακτορική Διατριβή*, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα, 1992.

- Ευσταθίου, Κ.Η, Χατζηϊωάννου, Θ.Π., *Ενόργανες Τεχνικές Αναλύσεως – Τόμος Α*, Αθήνα, 1992.
- Μουμτζής, Ι.Α, Σαζού, Δ.Π., *Ηλεκτροχημεία*, Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη, 1997.
- Μπζάνη, Ε., Κουιμτζής, Θ., *Χημικά Χρονικά*, 3, 2003, 20.
- Στεργίου, Δ., *Μεταπτυχιακή Εργασία Ειδίκευσης*, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα, 2003.
- ΦΕΚ 94/Α/13-5-99, Υπουργείο Εργασίας και Κοινωνικών Ασφαλίσεων, *Νομοθετήματα εναρμόνισης του εθνικού μας δικαίου προς τις κοινοτικές οδηγίες για την υγιεινή και την ασφάλεια των εργαζομένων*, Γ Έκδοση Συμπληρωμένη, Αθήνα, 2001.
- Χατζηϊωάννου, Θ.Π., *Εργαστηριακά Ασκήσεις Ποσοτικής Αναλυτικής Χημείας*, 7<sup>η</sup> Έκδοση, Αθήνα, 1996.
- Χατζηϊωάννου, Θ.Π., Κουμπάρης, Μ.Α., *Ενόργανη Ανάλυση*, Αθήνα, 2000.



## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>

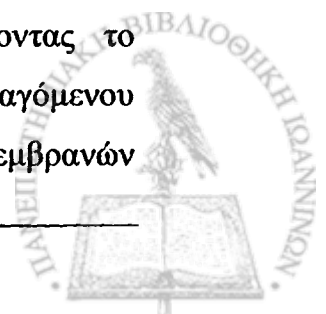


## "ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΕΝΟΣ ΝΕΟΥ ΑΜΠΕΡΟΜΕΤΡΙΚΟΥ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΦΟΡΜΑΛΔΕΪΔΗΣ"

### 1.1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφεται η ανάπτυξη και μελέτη ενός νέου αμπερομετρικού βιοαισθητήρα φορμαλδεΐδης. Η κατασκευή του αισθητήρα βασίζεται σε μία πολυμεμβρανική συστοιχία, η οποία αποτελείται από μία εξωτερική (προς το διάλυμα) πολυανθρακική μεμβράνη και μία εσωτερική (προς το ηλεκτρόδιο) μεμβράνη οξικής κυτταρίνης. Μεταξύ των παραπάνω μεμβρανών τοποθετείται μία μεμβράνη Nylon 66 επί της οποίας έχει ακινητοποιηθεί το ενζύμο της αλκοολικής οξειδάσης. Η όλη συστοιχία τοποθετείται πάνω στην επιφάνεια ενός ηλεκτροδίου Pt με τη βοήθεια ενός ελαστικού δακτυλίου (O-ring).

Ο βιοαισθητήρας συνδυάστηκε με μία διάταξη συνεχούς ροής (FIA) και μετρήθηκε αμπερομετρικά η συγκέντρωση της φορμαλδεΐδης σε δυναμικό +0,65 V (ως προς ηλεκτρόδιο αναφοράς Ag/AgCl/3M KCl) σε pH=7,0 καταγράφοντας το αναπτυσσόμενο ρεύμα, που προέρχεται από την οξείδωση του ενζυμικά παραγόμενου H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Η απόδοση του βιοαισθητήρα μελετήθηκε σε διάφορους τύπους μεμβρανών



ακινητοποίησης και για διαφορετικές τιμές pH. Μελετήθηκε, επίσης, η παρεμποδιστική δράση διαφόρων καρβονυλικών ενώσεων.

Ο προτεινόμενος βιοαισθητήρας παρουσίασε γραμμική απόκριση στην περιοχή συγκεντρώσεων 0,01-1,0 mM φορμαλδεΰδης. Η εξίσωση συµμεταβολής υπολογίστηκε  $y = (142,1 \pm 1,9) [\text{HCHO}, \text{mM}] + (1,9 \pm 0,9)$  και ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης είναι  $r^2=0,9996$  ( $n=5$ ). Το όριο ανίχνευσης υπολογίστηκε σε 0,02 mM HCHO (για λόγο σήματος προς θόρυβο 3,  $S/N=3$ ) η δε σχετική τυπική απόκλιση (RSD) της μεθόδου σε 2,3% ( $n=9$ , για 0,5 mM HCHO).

Τέλος τα λειτουργικά χαρακτηριστικά του βιοαισθητήρα κρίθηκαν πολύ ικανοποιητικά, καθώς παρουσίασε εξαιρετική σταθερότητα τόσο κατά τη διάρκεια των μετρήσεων για περισσότερα από 100 συνεχόμενα δείγματα φορμαλδεΰδης αλλά και κατά την παραμονή του σε θερμοκρασία +4 °C, διατηρώντας την αρχική του δραστηριότητα σχεδόν για 2 μήνες.

## 1.2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

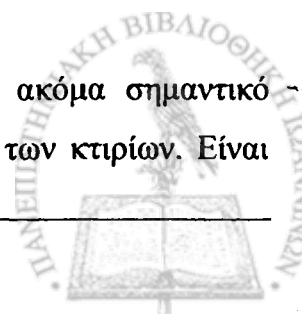
Ο προσδιορισμός των αλδεϋδών παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον σε διάφορα επιστημονικά πεδία, όπως η περιβαλλοντική χημεία και η χημεία τροφίμων, καθώς είναι πρόκειται για ουσίες ερεθιστικές και ύποπτες για καρκινογενέσεις [Eberlein, 1998 – Morgan, 1997 – IARC, 1995 – Luttrell, 2003].

Η φορμαλδεΰδη (HCHO) ανακαλύφθηκε το 1859 από τον Butleron στην προσπάθειά του να συνθέσει μεθυλενογλυκόλη, ενώ ο Hofmann το 1868 κατάφερε να παραγάγει φορμαλδεΰδη διαβιβάζοντας μίγμα ατμών μεθανόλης και αέρα πάνω από ένα θερμαινόμενο σύρμα λευκοχρύσου [Hofmann, 1868 – Walker, 1933].

Η φορμαλδεΰδη χρησιμοποιείται ευρύτατα σε διάφορες βιομηχανικές διεργασίες για την παραγωγή ρητινών, οδοντόπαστας, αποσμητικών χώρου και συγκολλητικών σκευασμάτων καθώς, επίσης, και για την ταρίχευση των πτωμάτων [Walker, 1944].

Η φορμαλδεΰδη χρησιμοποιείται, επίσης, στην παρασκευή απορρυπαντικών, σαπουνιών, σαμπουάν, καλλυντικών καθώς και ως απολυμαντικός παράγοντας σε ιατρικά και φαρμακευτικά σκευάσματα [Hines, 1993].

Η φορμαλδεΰδη έχει συνδέσει το όνομά της και με ένα ακόμα σημαντικό πρόβλημα, αυτό της ποιότητας του αέρα των εσωτερικών χώρων των κτιρίων. Είναι



γνωστό ότι η φορμαλδεΰδη περιέχεται στα έπιπλα και πολλά οικιακά είδη, καθώς και στα υλικά κατασκευής των κτιρίων όπως οι ρητίνες, οι συγκολλητικές ουσίες και η ξυλεία, όπως, επίσης, και στον καπνό των τσιγάρων [Hines, 1993], ενώ παράλληλα θεωρείται υπεύθυνη για την παραγωγή δευτερογενών ρύπων [Bufalini, 1972 – Weschler, 1992 – Carlier, 1986].

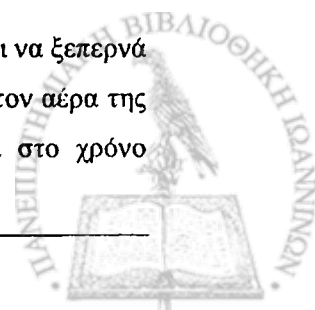
Σε κανονικές συνθήκες η φορμαλδεΰδη είναι ένα άχρωμο αέριο με διαπεραστική οσμή. Τα επίπεδα συγκεντρώσεων στην ατμόσφαιρα συνήθως δεν υπερβαίνουν τα 0,1 ppm(v) [Maroni, 1995] και οι κύριες πηγές της είναι τα καυσαέρια και η οξείδωση των υδρογονανθράκων. Αντιθέτως, στους εσωτερικούς χώρους, η μέση συγκέντρωση μπορεί να φτάσει ακόμα και τα 0,5 ppm(v) με ένα εύρος διακύμανσης 0,07-1,9 ppm(v) [Jones, 1999].

Έτσι, για την αντιμετώπιση των συνεπειών της φορμαλδεΰδης έχουν θεσπιστεί διάφορα όρια έκθεσης και επικινδυνότητας για μακροχρόνια και μεσοπρόθεσμη έκθεση σε αυτό. Τα όρια αυτά κυμαίνονται από 0,5 μέχρι 2,0 ppm(v) τη στιγμή που η συγκέντρωση υποβάθρου, όπως προαναφέρθηκε είναι 0,1 ppm(v). Στην Ελλάδα τα 2,0 ppm(v) ( $2,5 \text{ mg m}^{-3}$ ) έχουν οριστεί τόσο σαν «οριακή τιμή έκθεσης»<sup>1</sup> όσο και σαν «ανώτατη οριακή τιμή έκθεσης»<sup>2</sup> [ΦΕΚ 94/Α/13-5-99, 2001].

Λόγω της μεγάλης σπουδαιότητας της φορμαλδεΰδης, έχει αναπτυχθεί μία πληθώρα αναλυτικών μεθόδων για τον προσδιορισμό της τόσο στην αέρια όσο και στην υγρή φάση. Στις μεθόδους αυτές συμπεριλαμβάνονται μέθοδοι ογκομετρικές [Walker, 1944 – Tomčík, 2003], φασματοφωτομετρικές [Evmiridis, 1987, 1990 – Ho, 1988 – Barzana, 1989 – Teixeira, 2004], αέριας χρωματογραφίας (GC, GC-MS) με κατάλληλη παραγωγοποίηση [Cancilla, 1992 – Glaze, 1989 – Le Lacheur, 1993], χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) [Fung, 1981 – Levin, 1985] καθώς και ιοντικής χρωματογραφίας (ion-chromatography) [Shi, 1996 – Lorrain, 1981]. Άλλες

<sup>1</sup> «Οριακή τιμή έκθεσης σε χημικό παράγοντα»: η τιμή την οποία δεν επιτρέπεται να ξεπερνά η μέση 8ωρη χρονικά σταθμισμένη έκθεση του εργαζομένου στο χημικό παράγοντα, μετρημένη στον αέρα της ζώνης αναπνοής του, κατά τη διάρκεια οποιασδήποτε 8ωρης ημερήσιας και 40ωρης εβδομαδιαίας εργασίας του.

<sup>2</sup> «Ανώτατη οριακή τιμή έκθεσης σε χημικό παράγοντα»: η τιμή την οποία δεν επιτρέπεται να ξεπερνά η μέση χρονικά σταθμισμένη έκθεση του εργαζομένου στο χημικό παράγοντα, μετρημένη στον αέρα της ζώνης-αναπνοής του, κατά τη διάρκεια οποιασδήποτε δεκαπεντάλεπτης περιόδου μέσα στο χρόνο εργασίας του, έστω και αν τηρείται η οριακή τιμή έκθεσης.





μέθοδοι στηρίζονται στην αντίδραση της φορμαλδεΐδης με κάποιο κατάλληλο αντιδραστήριο προς το σχηματισμό μίας έγχρωμης ένωσης με ταυτόχρονη μέτρησή της απορρόφησης ή του φθορισμού [Altshuller, 1961 – Lazrus, 1988 – Girousi, 1997 – Motyka, 2004 – Li, 2001, 2005]. Εκτεταμένες είναι και οι ηλεκτροχημικές μέθοδοι [Knake, 2001], οι οποίες περιλαμβάνουν διαφορική παλμική πολαρογραφία (differential pulse polarography) [Turyan, 2000 – Chan, 1996], εκλεκτικά ηλεκτρόδια ιόντων (ion-selective electrodes) [Stergiou, 2006 – Chan, 1995 – Koupparis, 1979] καθώς και αγωγιμομετρικούς (conductometric) [Dzyadevych, 2001], ποτενσιομετρικούς (potentiometric) [Korpan, 2000], αμπερομετρικούς (amperometric) [Herschkovitz, 2000 – Yao, 2003 – Hämmerle, 1996 – Katakya, 2002] και φθορισμομετρικούς βιοαισθητήρες [Kiba, 1999].

Αν και οι προαναφερθείσες τεχνικές είναι αρκετά ακριβείς και σχετικά εκλεκτικές εν τούτοις παρουσιάζουν σημαντικά μειονεκτήματα, τα οποία σχετίζονται με εξαιρετικά πολύπλοκη και σε μερικές περιπτώσεις ακριβή οργανολογία, την κατανάλωση ακριβών αντιδραστηρίων, την έλλειψη λειτουργικής σταθερότητας λόγω παλαιώσης της επιφάνειας των ηλεκτροδίων καθώς και τη χρήση επικίνδυνων αντιδραστηρίων, όπως το KCN που ενέχει το κίνδυνο απελευθέρωσης HCN, το οποίο είναι εξαιρετικά πτητικό και ισχυρά τοξικός παράγοντας για τον ανθρώπινο οργανισμό.

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω αναπτύχθηκε ένας αμπερομετρικός βιοαισθητήρας για τον προσδιορισμό της φορμαλδεΐδης, ο οποίος βασίζεται σε ακινητοποιημένη Αλκοολική οξειδάση. Ο βιοαισθητήρας συνδυάστηκε με μία διάταξη συνεχούς ροής (FIA) και μετρήθηκε αμπερομετρικά η συγκέντρωση της φορμαλδεΐδης σε δυναμικό +0,65 V (ως προς ηλεκτρόδιο αναφοράς Ag/AgCl/3M KCl) σε pH=7.0 καταγράφοντας το αναπτυσσόμενο ρεύμα, που προέρχεται από την οξείδωση του ενζυμικά παραγόμενου H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 1.3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

#### 1.3.1. Αντιδραστήρια

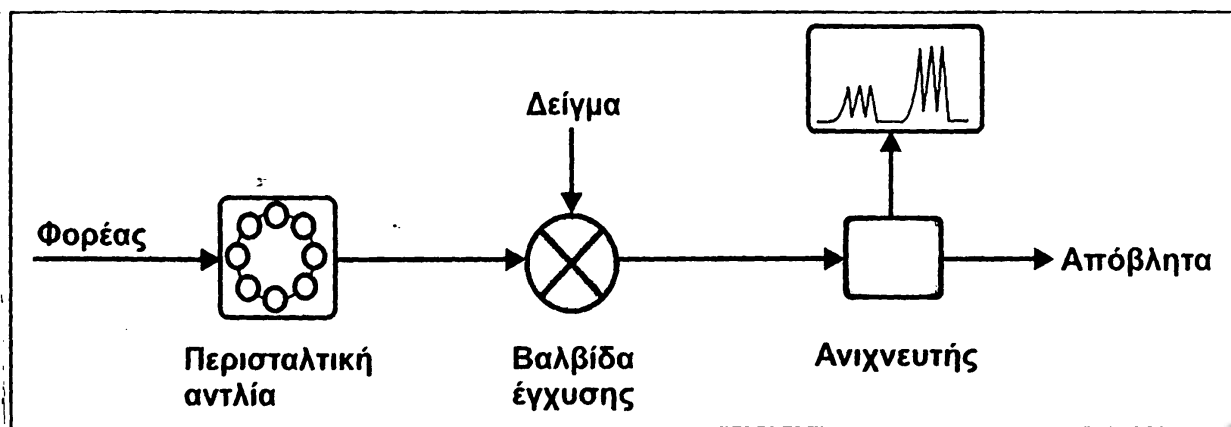
Η Αλκοολική οξειδάση (Alcohol oxidase, AOX, EC.1.1.3.13 from *Pichia pastoris* in 30% sucrose, 30 units mg<sup>-1</sup> of protein) και η κυκλοεξανόνη (cyclohexanone), ήταν

προϊόντα των εταιριών Sigma (St. Louis, USA) και Aldrich (Gillingham, UK), αντίστοιχα. Η οξική κυταρρίνη (cellulose acetate) και το άνυδρο δισόξινο φωσφορικό νάτριο ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  anhydrous) αγοράστηκαν από την εταιρία Fluka (Buchs, Switzerland). Τα δισκία παραφορμαλδεΐδης (paraformaldehyde) ήταν προϊόν της εταιρίας Mallinckrodt (USA). Κάθε άλλο αντιδραστήριο που χρησιμοποιήθηκε ήταν αναλυτικής καθαρότητας των εταιριών Merck (Darmstadt, Germany) και Riedel-de Hën (Sëlze, Germany). Όλα τα αντιδραστήρια χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε δις-απεσταγμένο ύδωρ.

### 1.3.2. Πειραματική διάταξη

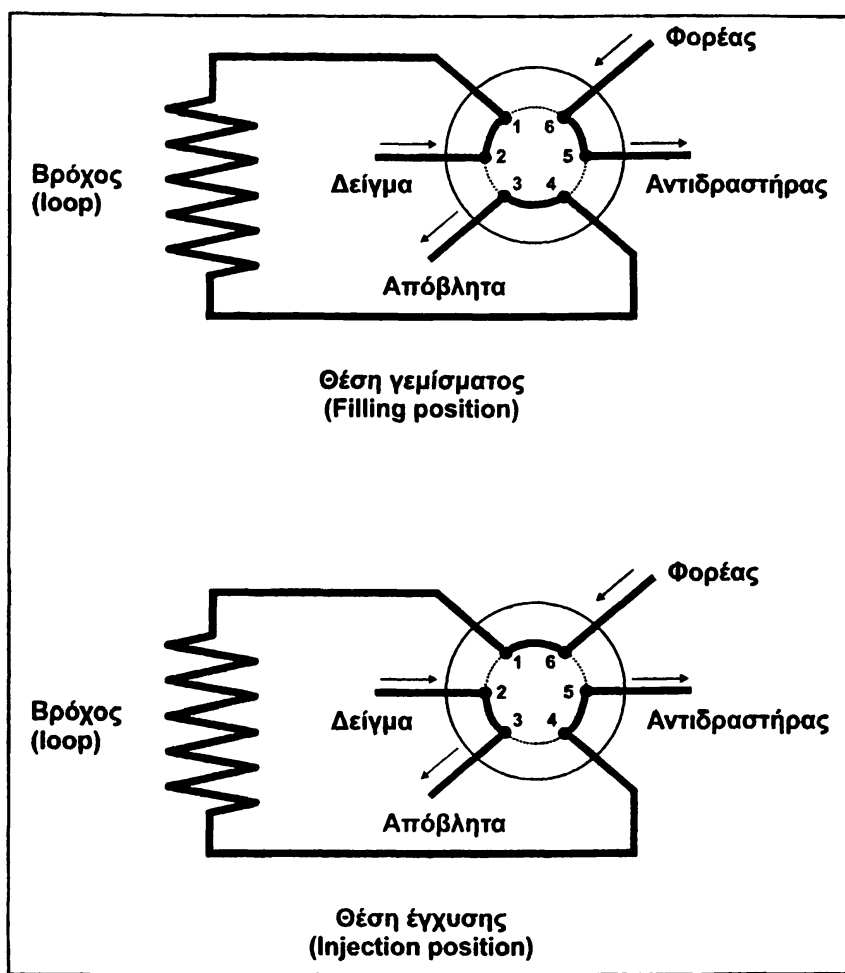
Η μετρητική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα, είναι το Autolab της εταιρίας Eco Chemie BV (Utrecht, The Netherlands), που αποτελείται από τον ποτενσιοστάτη PSTAT10. Το όλο σύστημα συνδέεται με ηλεκτρονικό υπολογιστή (IBM compatible) ενώ η συλλογή, καταγραφή και επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων γίνεται μέσω ειδικού λογισμικού της εταιρίας Eco Chemie με την ονομασία «General Purpose Electrochemical System 3» (GPES3).

Για τις αναλύσεις συνεχούς ροής με έγχυση δείγματος (FIA), χρησιμοποιήθηκαν μία περισταλτική αντλία τεσσάρων καναλιών Gilson Minipuls 3 (Middleton, USA) και μία περιστροφική βαλβίδα τεσσάρων κατευθύνσεων και δύο θέσεων Rheodyne 5701 (California, USA) (Σχήμα 1.1, 1.2).

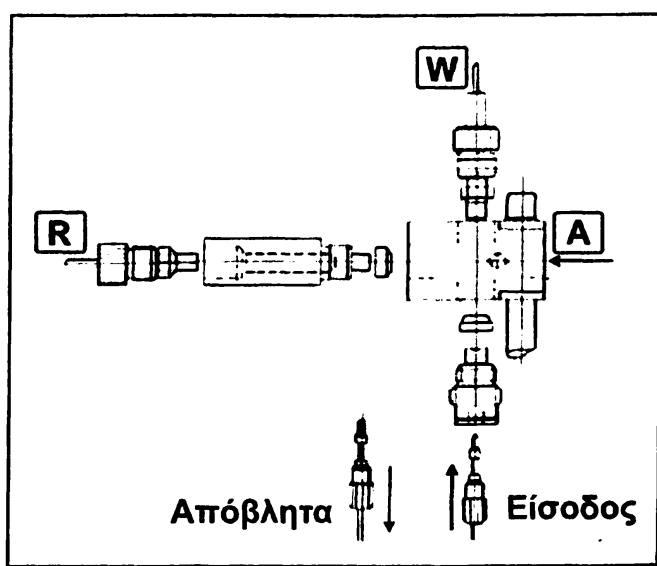


Σχήμα 1.1: Σχηματική απεικόνιση της διάταξης συνεχούς ροής.





Σχήμα 1.2: Αναπαράσταση του τρόπου λειτουργίας μίας περιστροφικής βαλβίδας τεσσάρων κατευθύνσεων – δύο θέσεων.



Σχήμα 1.3: Κάτοψη αμπερομετρικής κυψελίδας συνεχούς ροής τύπου wall-jet της εταιρίας Metrohm (Model 656), με δυνατότητα θερμοστάτησης (R: ηλεκτρόδιο αναφοράς, W: ηλεκτρόδιο εργασίας, A: βοηθητικό ηλεκτρόδιο).

Η αμπερομετρική κυψελίδα συνεχούς ροής (Σχήμα 1.3) ήταν τύπου wall-jet της εταιρίας Metrohm (Model 656, Herisau, Switzerland), με όγκο <1μl και δυνατότητα θερμοστάτησης. Ως ηλεκτρόδια εργασίας χρησιμοποιήθηκαν ηλεκτρόδια λευκοχρυσού (2 mm διάμετρος, IJ Cambria Scientific), ηλεκτρόδιο αναφοράς ένα Ag/AgCl/KCl 3M (Metrohm) και σύρμα Pt ως βοηθητικό ηλεκτρόδιο (Metrohm).

### 1.3.3. Παρασκευή και τιτλοδότηση του προτύπου διαλύματος HCHO απαλλαγμένου μεθανόλης

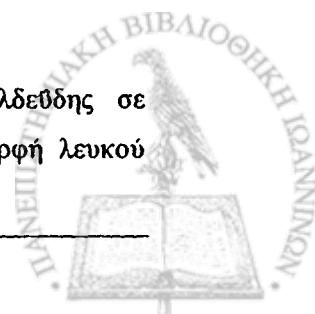
Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι η αλκοολική οξειδάση (AOX) καταλύει την οξείδωση πρωτίστως της μεθανόλης και της αιθανόλης και δευτερευόντως της φορμαλδεΐδης [van der Klei, 1990 – Patel, 1981]. Δεδομένου ότι τα εμπορικά διαθέσιμα σκευάσματα φορμαλδεΐδης (φορμαλίνη, περιεκτικότητα 30-50%) περιέχουν σαν συντηρητικό μεθανόλη<sup>3</sup> σε ποσοστό που κυμαίνεται από 0,5-15% έπρεπε να παρασκευαστεί ένα πρότυπο διάλυμα φορμαλδεΐδης που να είναι απαλλαγμένο από μεθανόλη.

Έτσι, εντός ογκομετρικής φιάλης του ενός λίτρου φέρονται 600 mL δις-απεσταγμένου ύδατος και 15,0 g παραφορμαλδεΐδης. Το μίγμα διαδοχικά θερμαίνεται και ψύχεται επί 3 ημέρες μέχρις ότου διαλυθεί πλήρως το στερεό [Lazrus, 1988]. Τελικά το μίγμα ψύχεται και η φιάλη συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή το δε διάλυμα που προκύπτει έχει τίτλο περίπου 0,5 M.

Το διάλυμα της φορμαλδεΐδης εν συνεχεία τιτλοδοτείται για να γνωρίζουμε επακριβώς τη συγκέντρωσή του. Η μέθοδος είναι αλκαλιμετρική και βασίζεται στην ογκομέτρηση του HCl που παράγεται από την αντίδραση της HCHO με την υδροχλωρική υδροξυλαμίνη, με πρότυπο διάλυμα NaOH:



<sup>3</sup> Η μεθανόλη (CH<sub>3</sub>OH) προστίθεται για την αποφυγή πολυμερισμού της φορμαλδεΐδης σε παραφορμαλδεΐδη (CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>, η οποία επικάθεται στον πυθμένα των φιαλών υπό τη μορφή λευκού τυρώδους ιζήματος.



Η διαδικασία της τιτλοδότησης είναι η ακόλουθη: εντός κωνικής φιάλης των 250 mL φέρονται 100 mL H<sub>2</sub>O (με ογκομετρικό κύλινδρο), 5,00 mL από το διάλυμα της HCHO (με σιφόνιο σταθερού όγκου) και 5,0 mL διαλύματος NH<sub>2</sub>OH·HCl 10% (με ογκομετρικό κύλινδρο). Το μίγμα αναδεύεται ισχυρά και αφήνεται σε ηρεμία για 20 min μέχρι να ολοκληρωθεί η αντίδραση. Στη συνέχεια προστίθενται 8 σταγόνες δείκτη Κυανούν της Βρωμοφαινόλης (Bromophenol blue) 0,04% σε δις-απεσταγμένο ύδωρ και το διάλυμα ογκομετρείται με πρότυπο διάλυμα 0,1000 M NaOH μέχρις αλλαγής χρώματος από κίτρινο σε μωβ στο τελικό σημείο. Στον πίνακα 1.1 φαίνονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων.

**Πίνακας 1.1:** Αποτελέσματα ογκομετρικού προσδιορισμού διαλύματος HCHO.

| a/a                         | V <sub>NaOH</sub> (mL) | M <sub>HCHO</sub>      |
|-----------------------------|------------------------|------------------------|
| 1                           | 23,95                  | 0,4790                 |
| 2                           | 23,85                  | 0,4770                 |
| 3                           | 23,90                  | 0,4780                 |
| 4                           | 23,85                  | 0,4770                 |
| 5                           | 23,80                  | 0,4760                 |
| <b>Μέσος όρος μετρήσεων</b> |                        | <b>0,4774 ± 0,0011</b> |

Το διάλυμα παρακαταθήκης φυλάσσεται σε θερμοκρασία +4 °C και παραμένει σταθερό για μεγάλο χρονικό διάστημα (τουλάχιστον 6 μήνες) χωρίς να απαιτούνται ενδιάμεσες επανατιτλοδοτήσεις. Από αυτό πλέον παρασκευάζονταν καθημερινά τα πρότυπα διαλύματα φορμαλδεΐδης στο ρυθμιστικό διάλυμα εργασίας.

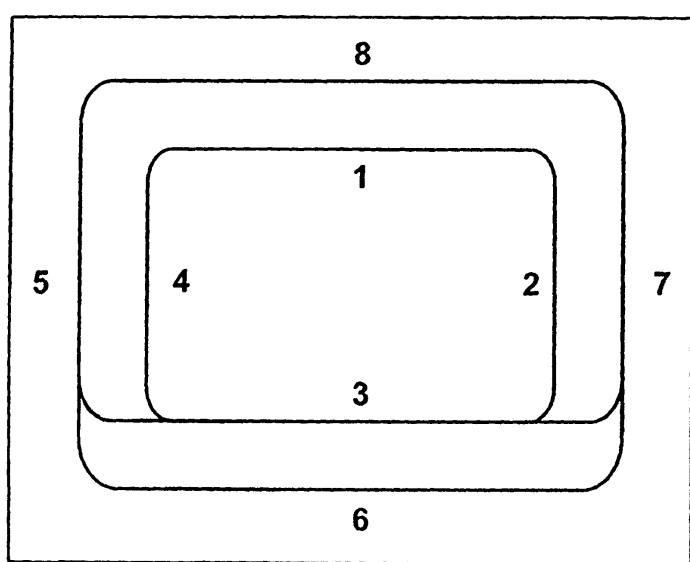
#### 1.3.4. Παρασκευή του ενζυμικού διαλύματος παρακαταθήκης

Από το εμπορικά διαθέσιμο πρωτεϊνικό παρασκεύασμα λαμβάνονται με πιπέττα ακριβείας 100 μL και τοποθετούνται σε ένα σωληνάκι Eppendorf του 1,0 mL. Στη συνέχεια προστίθενται 350 μL ρυθμιστικού διαλύματος 0,05 M φωσφορικών pH 7,0 και το μίγμα ομογενοποιείται με συνεχείς αναρροφήσεις και εκροφήσεις με τη βοήθεια

πιπέτας. Η ενεργότητα του διαλύματος παρακαταθήκης είναι 135 U. Το διάλυμα χωρίζεται σε τρία μέρη και φυλάσσεται στην κατάψυξη στους -30 °C.

### 1.3.5. Κατασκευή των μεμβρανών οξικής κυτταρίνης

Σε στεγνή και αεροστεγή φιάλη των 250 mL μεταφέρονται 60 mL ακετόνης και 40 mL κυκλοεξανόνης. Το μίγμα τίθεται υπό συνεχή και ισχυρή ανάδευση και προστίθενται 3,96 g οξικής κυτταρίνης.



**Σχήμα 1.4:** Απεικόνιση του οδηγού μορφοποίησης των μεμβρανών οξικής κυτταρίνης. Ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη πλευρά η υγρή μεμβράνη μπορεί να έχει πάχος (1) 25,4 – (2) 50,8 – (3) 76,2 – (4) 101,6 – (5) 127,0 – (6) 152,4 – (7) 177,8 – (8) 203,2 μm.

Η προσθήκη γίνεται πολύ αργά και σταδιακά προς αποφυγή συσσωματωμάτων τα οποία δε διαλύονται με την παρατεταμένη ανάδευση. Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση για 12 περίπου ώρες και τελικά προκύπτει ένα διάλυμα οξικής κυτταρίνης 4% w/v, διαυγές και με σχετικό ιξώδες το οποίο φυλάσσεται στους +4 °C για μεγάλο χρονικό διάστημα

Στη συνέχεια 2 mL του παραπάνω διαλύματος απλώνονται πάνω σε μία λεία, καθαρή και στεγνή γυάλινη επιφάνεια με τη πλευρά Νο 8 (πάχους 200 μm) του οδηγού της εταιρίας URAI (wet film applicator, 5 ιντσών, 1-8 mils, URAI s.p.a., Milano, Italy) (Σχήμα 1.4) και αφήνονται να στεγνώσουν για 24 ώρες, μέχρι την πλήρη εξάτμιση του

μίγματος των διαλυτών. Το λεπτό στρώμα των μεμβρανών, πάχους περίπου 20 μm, αποκολλάται κατά τη βύθιση της γυάλινης επιφάνειας σε λουτρό απεσταγμένου ύδατος, παραλαμβάνεται με φύλλο Teflon και αφήνεται να στεγνώσει για 12 ώρες καλυμμένο με διηθητικό χαρτί.

### 1.3.6. Πολυμερικές Μεμβράνες

Οι διάφοροι τύποι μεμβρανών που χρησιμοποιήθηκαν για την ακινητοποίηση είναι οι εξής:

1) HA (MF) membrane: μικροπορώδης μεμβράνη με διάμετρο πόρων 0,45 μm, η οποία συντίθεται από βιολογικά αδρανές μίγμα οξικής και νιτρικής κυτταρίνης της εταιρίας Millipore (MA, USA). Η ακινητοποίηση των πρωτεϊνικών μορίων επιτυγχάνεται με φυσική προσρόφηση.

2) Biodyne B: πρόκειται για θετικά φορτισμένη μεμβράνη nylon 66 πάχους 120 μm με διάμετρο πόρων 0,45 μm, προϊόν της εταιρίας Pall Filtration Corp. (Glen Gove, USA). Κατιονική μικροπορώδης μεμβράνη η επιφάνεια της οποίας φέρει υψηλό ποσοστό τεταρτοταγών αμμωνιακών ομάδων. Το θετικό της φορτίο διατηρείται για τιμές pH 3-10 και ευνοεί τη δέσμευση αρνητικά φορτισμένων πρωτεϊνών, μέσω ισχυρών δεσμών ιοντικής φύσεως [Pall, 2000].

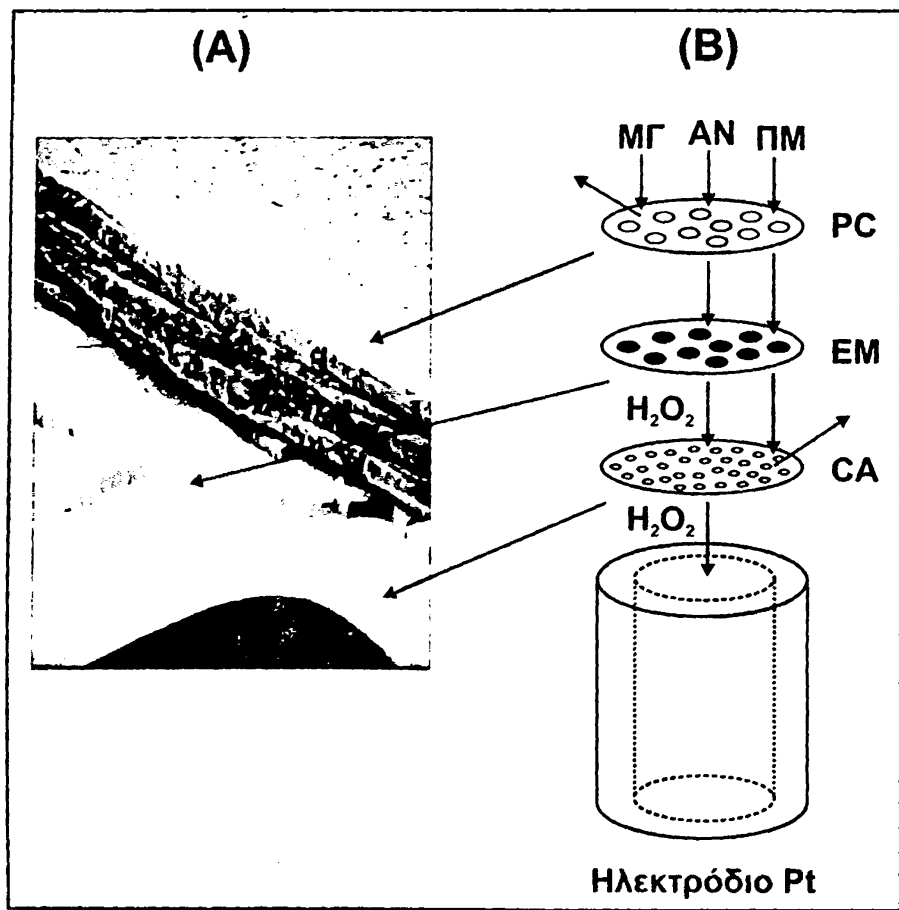
3) Immunodyne ABC: προενεργοποιημένη (pre-activated) μεμβράνη nylon 66 πάχους 120 μm με διάμετρο πόρων 0,45 μm, προϊόν της εταιρίας Pall Filtration Corp. (Glen Gove, USA). Μικροπορώδης μεμβράνη με υψηλή ικανότητα δέσμευσης βιομορίων, μέσω ομοιοπολικών δεσμών που αναπτύσσονται κυρίως μεταξύ των τελικών αμινο άκρων της λυσίνης και των ενεργών ομάδων (αλδεϋδικές) που υπάρχουν στην ενεργοποιημένη επιφάνεια της μεμβράνης. Όταν φυλάσσεται σε ξηραντήρα μπορεί να παραμείνει δραστική για διάστημα ενός έτους [Pall, 2001].

Ως προστατευτικές μεμβράνες στην κατασκευή των βιοαισθητήρων χρησιμοποιήθηκαν πολυανθρακικές μεμβράνες (polycarbonate membranes) πάχους 10 μm και μέγεθος πόρων 0,03 μm της εταιρίας Nucleopore (MA, USA).



### 1.3.7. Κατασκευή των βιοαισθητήρων

Για την κατασκευή των βιοαισθητήρων χρησιμοποιήθηκε η πολυμεμβρανική τεχνική. Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 1.5 μία συστοιχία τριών μεμβρανών τοποθετείται με την εξής σειρά με φορά από το ηλεκτρόδιο προς το διάλυμα:



Σχήμα 1.5: (Α) Εικόνα SEM της συστοιχίας των μεμβρανών και (Β) σχηματική απεικόνιση της μεθοδολογίας κατασκευής των βιοαισθητήρων ΑΟΧ: ΜΓ = μεγαλομόρια, ΑΝ = αναλύτης, ΠΜ = παρεμποδίζοντα μόρια, ΡC = πολυανθρακική μεμβράνη, ΕΜ = ενζυμική μεμβράνη, CΑ = μεμβράνη οξικής κυτταρίνης.

1) Μεμβράνη οξικής κυτταρίνης: έχει πάχος 20 μm και κατάλληλο μέγεθος πόρων και λειτουργεί ως φράγμα για μόρια με μέγεθος μεγαλύτερο από 100 Da. Έτσι, προστατεύεται η επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας από φαινόμενα παλαιώσης και άλλες ηλεκτρενεργές ουσίες που δρουν παρεμποδιστικά.

2) Ενζυμική μεμβράνη: η ακινητοποίηση του ενζύμου της ΑΟΧ γίνεται με επίσταξη ποσότητας 5 μL (6,75 U) από το ενζυμικό διάλυμα σε κάθε πλευρά της



μεμβράνης, η οποία αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου για 20 min. Στη συνέχεια εκπλένεται διαδοχικά υπό ανάδευση με το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,05 M και pH = 7,0 (3 φορές από 10 min), έτσι ώστε να απομακρυνθεί η ποσότητα του ενζύμου που δεν ακινητοποιήθηκε και τοποθετείται πάνω από τη μεμβράνη της οξικής κυτταρίνης.

3) Πολυανθρακική μεμβράνη: μικροπορώδης μεμβράνη με πάχος 10 μm και μέγεθος πόρων 0,03 μm. Ο ρόλος της είναι να προστατεύει την ενζυμική μεμβράνη από ενδεχόμενη μικροβιακή μόλυνση, από άλλα μεγαλομόρια (π.χ πρωτεϊνικής φύσεως) και τέλος εμποδίζει τη διαρροή (leaching) του ενζύμου από τη μεμβράνη ακινητοποίησης προς την κύρια μάζα του διαλύματος εργασίας. Τοποθετείται με συγκεκριμένο τρόπο έτσι ώστε η γυαλιστερή της πλευρά να έρχεται σε επαφή με το διάλυμα εργασίας.

Η συστοιχία των μεμβρανών τοποθετείται επί ενός ηλεκτροδίου λευκοχρυσού (ηλεκτρόδιο εργασίας) με τη βοήθεια ενός ελαστικού δακτυλίου (τύπου O-ring).

### 1.3.8. Πορεία εργασίας

Κατά τη διάρκεια των μετρήσεων συνεχούς ροής το δυναμικό που εφαρμόζεται στο ηλεκτρόδιο εργασίας είναι +0,65 V ως προς το ηλεκτρόδιο αναφοράς Ag/AgCl/KCl 3 M. Το ηλεκτρόδιο προσαρμόζεται στην αμπερομετρική κυψελίδα, εφαρμόζεται το δυναμικό εργασίας και αφήνεται σε συνεχή ροή, μέχρι να σταθεροποιηθεί το ρεύμα βάσης (background current-baseline).

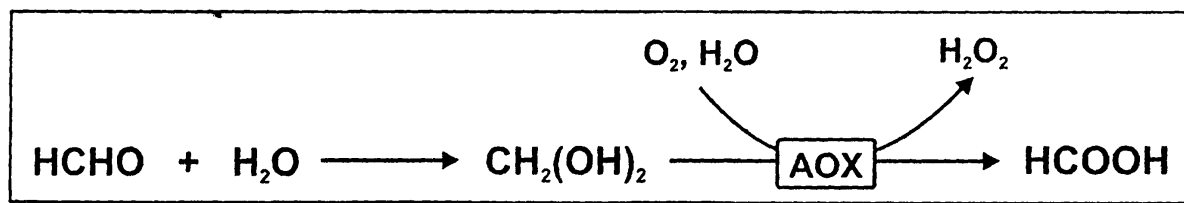
Ο φορέας είναι ρυθμιστικό διάλυμα 0,05 M φωσφορικών pH=7,0 και η προώθησή του γίνεται κατά συνεχή τρόπο με σταθερή ταχύτητα ροής 0,31 mL min<sup>-1</sup>. Τα δείγματα των προτύπων διαλυμάτων φορμαλδεΰδης παρασκευάζονται καθημερινά στο φορέα και η εισαγωγή τους στο σύστημα συνεχούς ροής γίνεται με τη βοήθεια της περιστρεφόμενης βαλβίδας και ενός βρόχου, που έχει όγκο 250 μL. Το ύψος των κορυφών του μετρούμενου ρεύματος επιλέχθηκε ως μέτρο της συγκέντρωσης της φορμαλδεΰδης.



## 1.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 1.4.1. Επιλογή ενζυμικού σχήματος

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η φορμαλδεΐδη, σε υδατικά διαλύματα, εφυδατώνεται σε ποσοστό 99,99% προς μεθυλενογλυκόλη ( $\text{CH}_2(\text{OH})_2$ ) [Los, 1977]. Με βάση αυτή την ιδιότητα ερμηνεύεται η καταλυτική δράση της AOX επί της φορμαλδεΐδης (Σχήμα 1.6), αφού είναι γνωστό ότι η AOX καταλύει την οξείδωση των πρώτων μελών της ομόλογης σειράς των πρωτοταγών αλκοολών ( $\text{C}_1\text{-C}_6$ ) [van der Klei, 1990 – Patel, 1981].



Σχήμα 1.6: Απεικόνιση του μηχανισμού εφυδάτωσης της φορμαλδεΐδης προς μεθυλενογλυκόλη και της καταλυτικής οξείδωσης αυτής από την AOX.

Εκτός από την AOX υπάρχει και η δεϋδρογενάση της φορμαλδεΐδης (Formaldehyde dehydrogenase, FDH), ένα ένζυμο πιο εξειδικευμένο, που χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα αποκλειστικά και μόνο τη φορμαλδεΐδη [Ando, 1979 – Ogushi, 1984 – Attwood, 1990]. Για την ανάπτυξη του βιοαισθητήρα δεν χρησιμοποιήθηκε η FDH διότι για να λειτουργήσει απαιτεί  $\text{NAD}^+$ . Το ενζυμικά παραγόμενο  $\text{NADH}$  απαιτεί τη χρήση διαμεσολαβητών μεταφοράς φορτίου, είτε σε διαλυτή είτε σε ακινητοποιημένη μορφή επί της επιφάνειας του ηλεκτροδίου εργασίας, έτσι ώστε να αντιμετωπιστούν προβλήματα που σχετίζονται με φαινόμενα ρύπανσης των αισθητήρων και τις υψηλές τιμές υπέρτασης που απαιτούνται για την οξείδωση του  $\text{NADH}$ . Σε αυτή την περίπτωση το σύστημα εμφανίζει σταδιακή μείωση της δραστηριότητάς του ενώ παράλληλα είναι πιο ευάλωτο στις παρεμποδίσεις από άλλες αναγωγικές ουσίες. Έτσι, η επιλογή της AOX έναντι της FDH έγινε με βάση το γεγονός ότι η AOX υπερέχει σε όρους που σχετίζονται με τη λειτουργική και αποθηκευτική σταθερότητα. Επιπλέον η AOX δεν απαιτεί την ύπαρξη συνενζύμου για να λειτουργήσει.



Σε γενικές γραμμές η κατασκευή βιοαισθητήρων, οι οποίοι βασίζονται σε οξειδάσες, παρέχει συστήματα με μεγαλύτερη αξιοπιστία [Badea, 2003 – Azevedo, 2004 – Gavalas, 2000 – Gibson, 1992], σε σύγκριση με εκείνα που στηρίζονται στη χρήση  $\text{NAD}^+$ -εξαρτώμενων δεϋδρογενασών [Prodromidis, 2002].

Πρέπει εν τούτοις να αναφερθεί πως η επιλογή της AOX έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη ευαισθησία. Οι βιοαισθητήρες, που χρησιμοποιούν την FDH παρουσιάζουν μεγάλη ευαισθησία τα δε όρια ανίχνευσης είναι αρκετά χαμηλά φτάνοντας ακόμα και το  $1,0 \mu\text{M}$  [Herschkovitz, 2000], ενώ παράλληλα οι μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί μέχρι τώρα και στηρίζονται σε βιοαισθητήρες AOX, προσδιορίζουν φορμαλδεϋδη σε επίπεδο mM [Barzana, 1989 – Korpan, 2000 – Dzyadevych, 2001].

Είναι, λοιπόν, φανερό ότι η επιλογή του ενζυμικού σχήματος ενέχει το συμβιβασμό ανάμεσα στη μειωμένη ευαισθησία και την απλότητα στην κατασκευή των βιοαισθητήρων, το χαμηλό κόστος, και την έλλειψη χρήσης άλλων αντιδραστηρίων, τα οποία προσφέρει η χρήση της AOX.

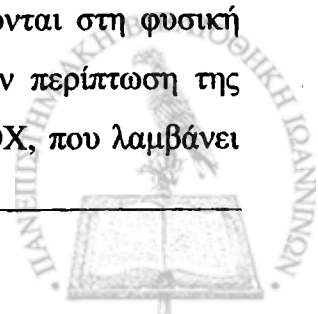
#### 1.4.2. Επιλογή μεμβρανών

Για την ακινητοποίηση της AOX χρησιμοποιήθηκαν διάφοροι τύποι μεμβρανών. Η διαφορά των μεμβρανών οφείλεται στον τύπο της ακινητοποίησης του ενζύμου λόγω:

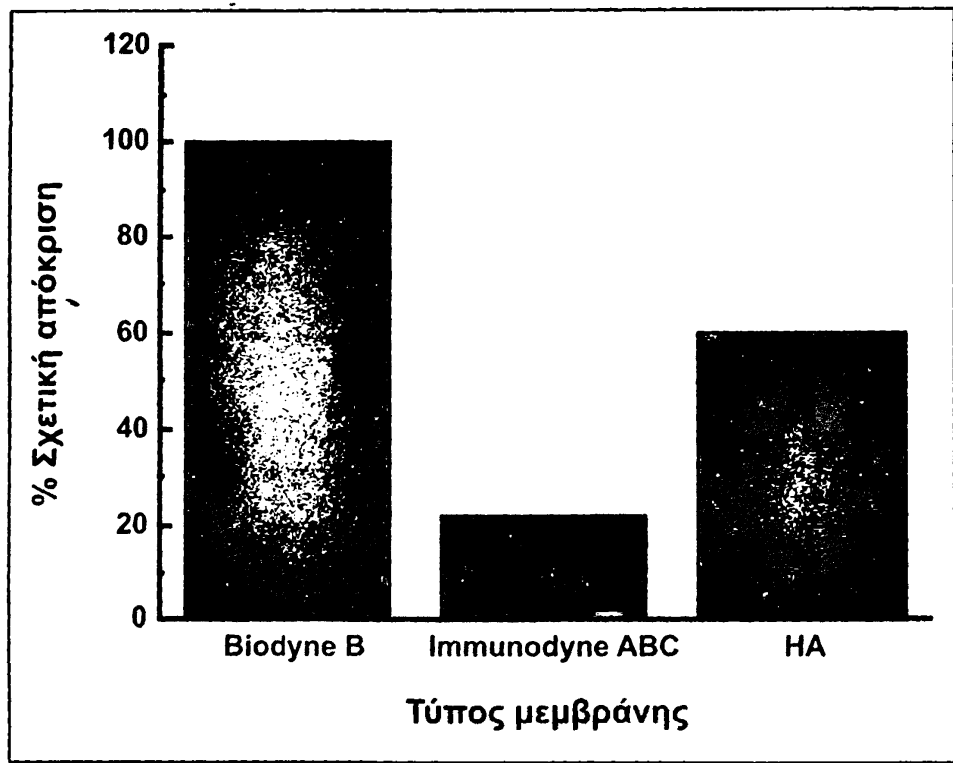
- 1) φυσικής προσρόφησης (μεμβράνη HA),
- 2) ιοντικής συνάφειας (μεμβράνη Biodyne B) και
- 3) χημικής δέσμευσης (μεμβράνη Immunodyne ABC).

Τα αποτελέσματα (Σχήμα 1.7) έδειξαν ότι η μεμβράνη Biodyne B είναι πιο κατάλληλη για την ακινητοποίηση του ενζύμου της AOX, ενώ οι μεμβράνες Immunodyne ABC και HA εμφανίζουν επί τοις εκατό σχετική απόκριση 22% και 60%, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως προς τη μεμβράνη Biodyne B, η απόδοση της οποίας λαμβάνεται ως 100% και η οποία χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή των βιοαισθητήρων.

Το μικρό ποσοστό για τη μεμβράνη HA είναι ως ένα βαθμό αναμενόμενο, αφού είναι γνωστό ότι πρωτόκολλα ακινητοποίησης ενζύμων, που βασίζονται στη φυσική προσρόφηση οδηγούν σε χαμηλά ποσοστά ακινητοποίησης. Για την περίπτωση της μεμβράνης Immunodyne ABC φαίνεται ότι η ακινητοποίηση της AOX, που λαμβάνει



χώρα μέσω χημικής δέσμευσης επηρεάζει τη διαμόρφωση του ενζύμου γύρω από την περιοχή του ενεργού κέντρου. Σε αντίθετη περίπτωση ο συγκεκριμένος τύπος μεμβράνης θα έπρεπε να δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα καθώς έχει τη μεγαλύτερη χωρητικότητα ακινητοποιημένου ενζύμου ( $135 \mu\text{g IgG cm}^{-2}$ ) μεταξύ των υπό δοκιμή μεμβρανών [Pall, 2001].

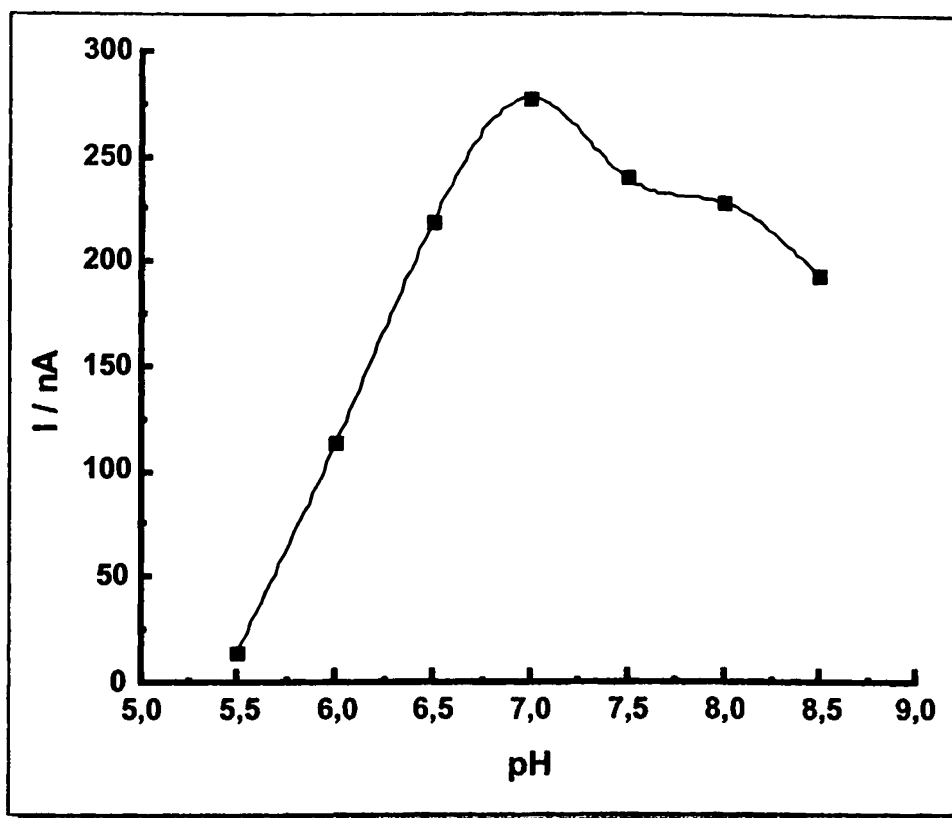


**Σχήμα 1.7:** Ραβδόγραμμα, με τις σχετικές ενεργότητες των μεμβρανών που χρησιμοποιήθηκαν για την ακινητοποίηση του ενζύμου της AOX, έναντι προτύπου διαλύματος 0,25 mM φορμαλδεΰδης.

### 1.4.3. Επίδραση του pH

Είναι γνωστό ότι η λειτουργικότητα των ενζύμων περιορίζεται σε πολύ στενά όρια των τιμών pH, εντός του οποίου παρουσιάζουν ένα μέγιστο στη δραστηκότητά τους. Η επίδραση του pH μελετήθηκε στην περιοχή τιμών από 5,5 μέχρι 8,5 χρησιμοποιώντας ένα ρυθμιστικό διάλυμα 0,05 M φωσφορικών και πρότυπο διάλυμα 0,5 mM φορμαλδεΰδης. Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 1.8** ο βιοαισθητήρας εμφανίζει το μέγιστο της απόδοσής του στην τιμή 7,0 και ως εκ τούτου οι περαιτέρω μελέτες πραγματοποιήθηκαν σε αυτή την τιμή pH.





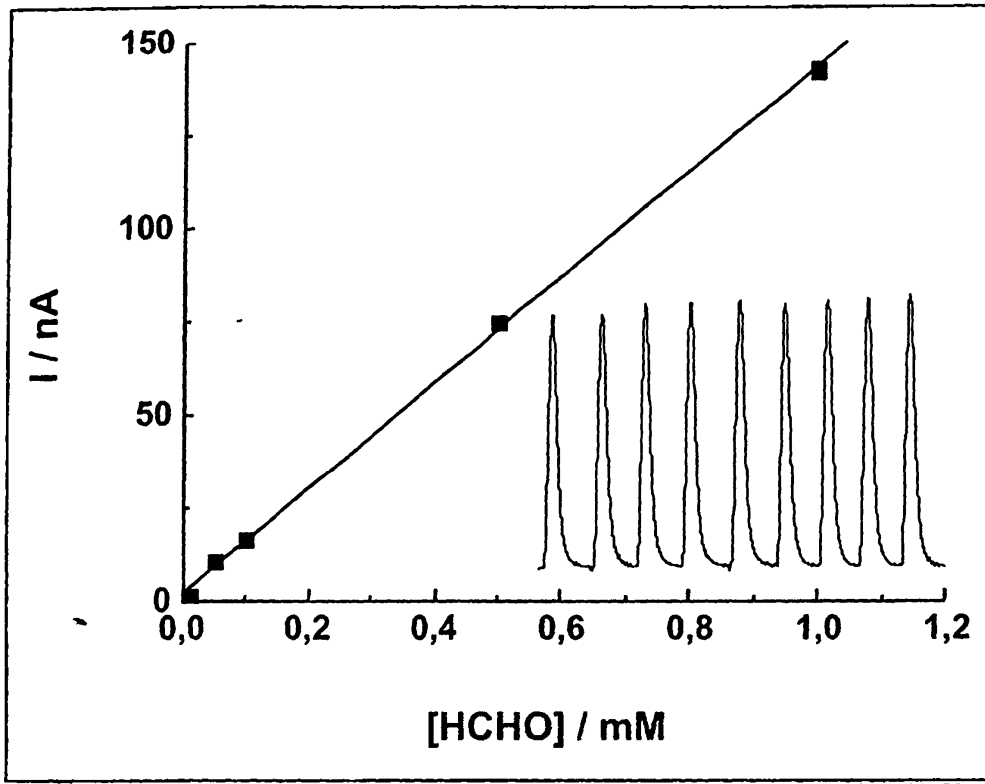
Σχήμα 1.8: Επίδραση του pH στην απόδοση του βιοαισθητήρα φορμαλδεύδης.

#### 1.4.4. Αναλυτικά χαρακτηριστικά του βιοαισθητήρα

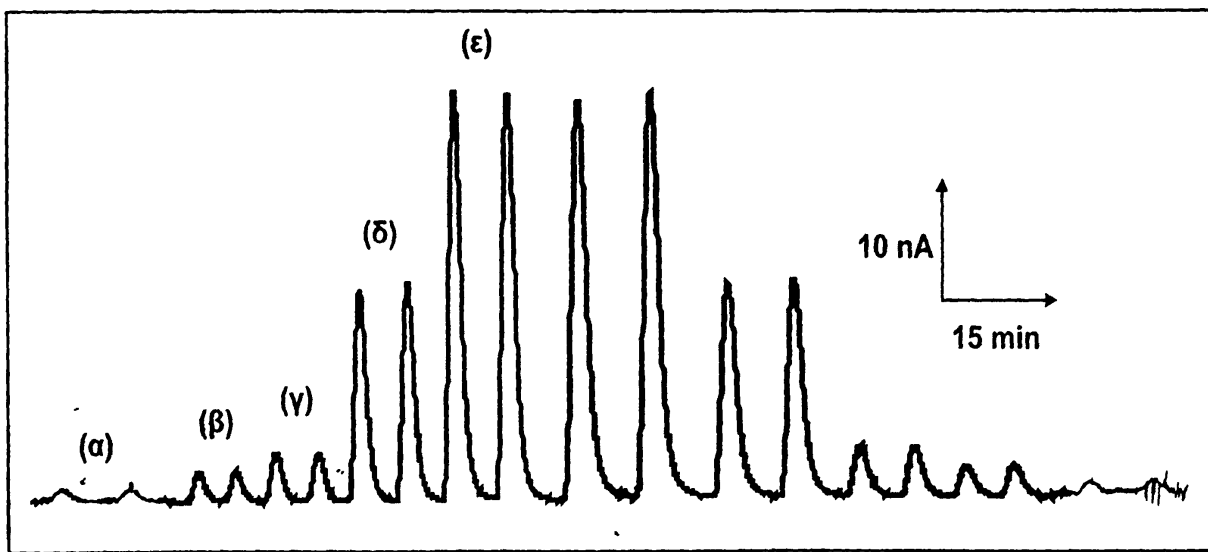
Υπό τις βέλτιστες πειραματικές συνθήκες κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς. Ο προτεινόμενος βιοαισθητήρας παρουσιάζει γραμμικότητα στην περιοχή συγκεντρώσεων φορμαλδεύδης από 0,01 mM μέχρι 1,0 mM (Σχήμα 1.9). Η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς υπολογιζόμενη με βάση τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων δίνεται από την ακόλουθη σχέση:

$$y = (142,1 \pm 1,9) [\text{HCHO}, \text{mM}] + (1,9 \pm 0,9)$$

όπου  $y$  = είναι η τιμή της έντασης του καταγραφόμενου ρεύματος  $I$  σε nA. Ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης υπολογίστηκε  $r^2 = 0,9996$  ( $n=5$ ). Η σχετική τυπική απόκλιση της μεθόδου για πρότυπο διάλυμα 0,5 mM φορμαλδεύδης υπολογίστηκε  $\text{RSD} = 2,3 \%$  ( $n = 9$ ), το δε όριο ανίχνευσης βρέθηκε  $\text{LOD} = 0,02 \text{ mM HCHO}$  ( $\text{S/N} = 3$ ). Στο Σχήμα 1.10 φαίνονται οι κορυφές FIA που καταγράφηκαν κατά την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς με τη χρήση προτύπων διαλυμάτων φορμαλδεύδης.



Σχήμα 1.9: Καμπύλη αναφοράς φορμαλδεΐδης. Ένθετο σχήμα: κορυφές FIA διαδοχικών εγχύσεων ( $n=9$ ) διαλύματος 0,5 mM HCHO. Ρυθμιστικό διάλυμα 0,05 M φωσφορικών pH = 7,0. Ταχύτητα ροής: 0,31 mL min<sup>-1</sup>. Δυναμικό: + 650 mV.



Σχήμα 1.10: Κορυφές FIA που καταγράφηκαν κατά την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς: (α) 0,01 – (β) 0,05 – (γ) 0,10 – (δ) 0,50 και (ε) 1,00 mM HCHO. Ρυθμιστικό διάλυμά φωσφορικών 0,05 M pH = 7,0. Ταχύτητα ροής: 0,31 ml min<sup>-1</sup>. Δυναμικό: + 650 mV.

Η σταθερότητα του προτεινόμενου βιοαισθητήρα κρίθηκε ικανοποιητική και το σύστημα μπορεί να χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για τη μέτρηση τουλάχιστον 100 δειγμάτων φορμαλδεΰδης χωρίς να απαιτούνται ενδιάμεσες βαθμονομήσεις. Επίσης, ο βιοαισθητήρας παρουσίασε εξαιρετική σταθερότητα κατά την αποθήκευση σε θερμοκρασία + 4 °C ενώ παράλληλα διατηρεί την αρχική του δραστηριότητα για τουλάχιστον 2 μήνες.

#### 1.4.5. Μελέτη παρεμποδίσεων

Η παρεμποδιστική δράση διαφόρων πρωτοταγών αλκοολών, όπως η μεθανόλη, η αιθανόλη και η προπανόλη καθώς και η ακεταλδεΰδη, μελετήθηκαν με τη μέθοδο των μικτών διαλυμάτων παρουσία 0,5 mM φορμαλδεΰδης.

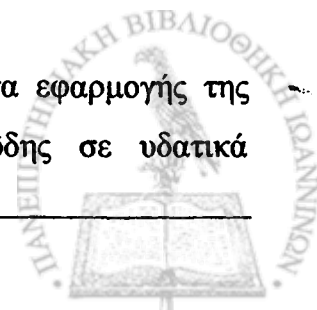
**Πίνακας 1.2:** Παρεμποδιστική δράση διαφόρων ουσιών και σχετικές αποκρίσεις αυτών. Εντός των παρενθέσεων δίνονται οι συγκεντρώσεις τους σε mM.

| Παρεμποδίζουσα ουσία | Σχετική απόκριση (%) |
|----------------------|----------------------|
| Μεθανόλη (1 mM)      | 210                  |
| Αιθανόλη (1 mM)      | 172                  |
| Προπανόλη (2 mM)     | 125                  |
| Ακεταλδεΰδη (2 mM)   | 99                   |

Στον πίνακα 1.2 φαίνονται οι ουσίες που μελετήθηκαν και οι σχετικές επί τους εκατό αποκρίσεις τους, συγκρινόμενες με ένα διάλυμα αναφοράς 0,5 mM φορμαλδεΰδης, του οποίου η απόκριση λαμβάνεται ως 100 %. Όπως δείχνουν τα αποτελέσματα τα πρώτα μέλη της ομόλογης σειράς των πρωτοταγών αλκοολών εμφανίζουν παρεμποδιστική δράση σε αντίθεση με την ακεταλδεΰδη, η οποία δεν προκαλεί καμία συνεισφορά στο καταγραφόμενο σήμα.

#### 1.5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τα παραπάνω αποτελέσματα είναι φανερή η δυνατότητα εφαρμογής της προτεινόμενης μεθόδου για τον προσδιορισμό της φορμαλδεΰδης σε υδατικά



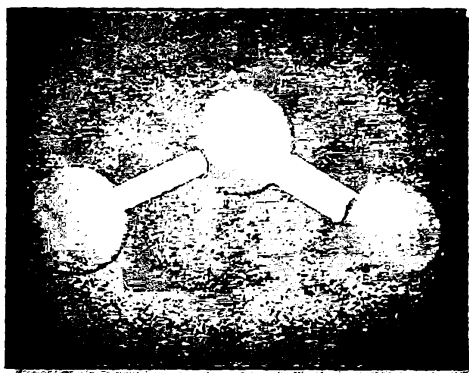
διαλύματα, απουσία κυρίως μεθανόλης και αιθανόλης. Η επαναληψιμότητα των μετρήσεων σε συνδυασμό με την απλότητα της κατασκευής καθιστούν τη μέθοδο κατάλληλη και περαιτέρω εφαρμόσιμη για τον προσδιορισμό του όζοντος, σύμφωνα με το αναλυτικό σχήμα που αναπτύσσεται διεξοδικά στο επόμενο πειραματικό κεφάλαιο της παρούσας διατριβής.





## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>

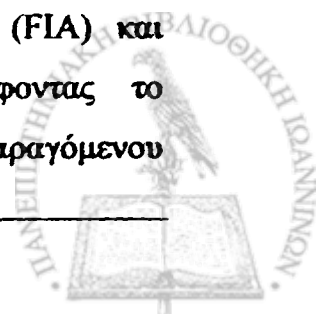


## "ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΟΥ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΦΟΡΜΑΛΔΕΪΔΗΣ ΣΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΟΥ ΟΖΟΝΤΟΣ"

### 2.1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Για πρώτη φορά παρουσιάζεται μία ηλεκτροχημική μέθοδος για τον προσδιορισμό του όζοντος, η οποία βασίζεται στη φιλοσοφία των αμπερομετρικών βιοαισθητήρων. Η προτεινόμενη μέθοδος περιλαμβάνει δύο σκέλη, ένα αντιδραστήριο – προσροφητή (sorber) για το όζον και ένα αμπερομετρικό βιοαισθητήρα φορμάλδεϋδης. Το όζον επιδρά μέσω μίας αντίδρασης 1,3-κυκλοπροσθήκης επί του διπλού δεσμού C=C της αλκινικής αλυσίδας της ευγενόλης, η οποία βρίσκεται ακινητοποιημένη σε ένα αντιδραστήρα με υδρόφοβο υπόστρωμα C-18. Η παραγόμενη φορμάλδεϋδη συλλέγεται εντός του ρυθμιστικού διαλύματος εργασίας, το οποίο με τη βοήθεια της ανύψιας προωθείται προς τον ανιχνευτή, όπου υπάρχει ο βιοαισθητήρας φορμάλδεϋδης.

Ο βιοαισθητήρας συνδυάστηκε με μία διάταξη συνεχούς ροής (FIA) και μετρήθηκε αμπερομετρικά η συγκέντρωση του όζοντος καταγράφοντας το αναπτυσσόμενο ρεύμα, που προέρχεται από την οξείδωση του ενζυμικά παραγόμενου



H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε δυναμικό +0,65 V (ως προς ηλεκτρόδιο αναφοράς Ag/AgCl/3 M KCl) σε pH=7,0.

Υπό τις βέλτιστες πειραματικές συνθήκες κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς όζοντος με γραμμική περιοχή συγκεντρώσεως 3-200 μg mL<sup>-1</sup>. Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου υπολογίστηκε 1,1 μg mL<sup>-1</sup> O<sub>3</sub> (S/N=3). Επίσης, μελετήθηκε η πιθανή σχετική απόκριση άλλων αερίων όπως O<sub>2</sub>, Ar, N<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O, NOCl, SO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub> και CO<sub>2</sub>, σε συγκεντρώσεις 200 φορές μεγαλύτερες από εκείνη των 100 μg mL<sup>-1</sup> O<sub>3</sub>, που χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι κανένα αέριο δεν παρεμποδίζει. Εκτός από την εκλεκτικότητα της μεθόδου ικανοποιητικές κρίθηκαν τόσο η λειτουργική σταθερότητα του βιοαισθητήρα όσο και η επαναληψιμότητα των μετρήσεων. Τέλος, γίνεται αναφορά στην εφαρμογή του βιοαισθητήρα για τον προσδιορισμό του όζοντος σε συνθετικά αέρια δείγματα.

## 2.2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το όζον είναι ένα ισχυρά οξειδωτικό αέριο και χρησιμοποιείται ευρύτατα για την αποστείρωση του πόσιμου ύδατος, ιατρικών εργαλείων και του αέρα εσωτερικών χώρων. Μία, επίσης, σημαντική εφαρμογή της χρήσης του όζοντος είναι η κατεργασία του εισπνεόμενου αέρα στις εγκαταστάσεις αερίσμου των κτιρίων καθώς και η βελτίωση της καθαρότητας διαφόρων εμπορικά διαθέσιμων αερίων. Ακόμα χρησιμοποιείται για τη βιοαποικοδόμηση διαφόρων οργανικών μορίων που θεωρούνται ρυπαντές, στην επεξεργασία τροφίμων και την τροποποίηση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών αυτών, όπως η οσμή και η γεύση και στην ιατρική επιστήμη [Oyama, 2000 – Bocci, 2001, 2002]. Εν τούτοις, παρά τη μεγάλη χρησιμότητά του το όζον λόγω της μεγάλης οξειδωτικής ισχύος του αποτελεί έναν ισχυρά τοξικό παράγοντα για κάθε ζωντανό οργανισμό.

Η ύπαρξη του όζοντος στα χαμηλότερα στρώματα της ατμόσφαιρας και πιο συγκεκριμένα στην τροπόσφαιρα οφείλεται τόσο σε φυσικούς όσο και σε ανθρωπογενείς παράγοντες. Τέτοιοι είναι: α) μεταφορά του όζοντος από τη στρατόσφαιρα στην τροπόσφαιρα και ακόμα χαμηλότερα προς το επίπεδο του εδάφους, β) in-situ παραγωγή του όζοντος από την αντίδραση των οξειδίων του αζώτου (NO<sub>x</sub>) με το μεθάνιο και τους πτητικούς υδρογονάνθρακες (Volatile Organic Compounds, VOCs)

και γ) μεταφορά του όζοντος μέσω μετακίνησης των αερίων μαζών από άλλες εν δυνάμει πηγές μόλυνσης [Vingarzan, 2004 – EPA, 1993].

Ο διπλός ρόλος του όζοντος άλλοτε ως χρήσιμου παράγοντα για τη ζωή και άλλοτε ως επικίνδυνου τοξικού ρύπου, έχει οδηγήσει στη θέσπιση νόμων μέσω των οποίων καθορίζονται ανώτατα επιτρεπτά όρια για βραχυχρόνια και μακροχρόνια έκθεση αλλά και λήψη μέτρων για τη μείωση της παραγωγής του. Τα όρια αυτά κυμαίνονται στην περιοχή συγκεντρώσεων 50-200 ppb(v) (98-392  $\mu\text{g m}^{-3}$ ), ενώ η φυσιολογική συγκέντρωση του όζοντος στο περιβάλλον κυμαίνεται γύρω στα 30 ppb(v) (59  $\mu\text{g m}^{-3}$ ) [Horváth, 1985].

Για τον προσδιορισμό του όζοντος έχουν αναπτυχθεί μέχρι σήμερα πολλές μέθοδοι. Η πλειοψηφία των χημικών μεθόδων στηρίζεται σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις όπως οι ιωδομετρικές [Wadelin, 1957 – Boyd, 1970 – Dietz, 1973 – Bergshoeff, 1980] και οι ογκομετρικές αέριας ή υγρής φάσης [Hodgenson, 1971 – Saltzman, 1959]. Για τον προσδιορισμό του όζοντος σε υδατικά διαλύματα έχουν αναπτυχθεί κατά καιρούς διάφορες φασματοφωτομετρικές μέθοδοι [Bader, 1982 – Straka, 1985 – Mei, 1997 – Tomiyasu, 1984 – Hauser, 1967], ενώ έχουν, επίσης, αναφερθεί φθορισμομετρικές [Watanabe, 1966] και χημειοφωταυγείς τεχνικές υγρής και αέριας φάσης [Bersis, 1966 – Hodgenson, 1970 – Ray, 1986 – Takeuchi, 1989 – McGowan, 1995 – Mikuška, 1998].

Οι ηλεκτροχημικές μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί βασίζονται στην άμεση αναγωγή του όζοντος επί της επιφάνειας ενός στερεού ηλεκτροδίου. Οι τεχνικές κατασκευής που έχουν χρησιμοποιηθεί στηρίζονται (α) στην τοποθέτηση ενός φίλτρου εμποτισμένου με τη χρωστική indigo μεταξύ δύο ηλεκτροδίων χρυσού [Penrose, 1995], (β) σε μεμβράνες ιονανταλλαγής (τύπου Nafion) [Knake, 2002 – Schiavon, 1990 – Xie, 1998] ή μεμβράνες διαπερατές από αέρια τοποθετημένες σε ηλεκτρόδιο χρυσού [Stanley, 1979 – Smart, 1979], (γ) σε παστίλια AgI η οποία φέρει σε κάθε της πλευρά σπογγώδη μεταλλικό Ag και Pt, αντίστοιχα [Suzuki, 1982] και (δ) σε ηλεκτρόδιο άνθρακα το οποίο φέρει μεμβράνη PTFE [Uchiyama, 1993]. Άλλες τεχνικές στις οποίες βασίζονται οι ηλεκτροχημικές μέθοδοι περιλαμβάνουν (ε) τη μέτρηση των μεταβολών του δυναμικού ανοικτού κυκλώματος (open circuit potential, ocp) του ενδεικτικού ηλεκτροδίου, ως αποτέλεσμα της αντίδρασης του όζοντος με τα ιόντα ιωδίου [Awad, 2004] και (στ) τη μέτρηση της εκλύομενης θερμότητας εξαιτίας

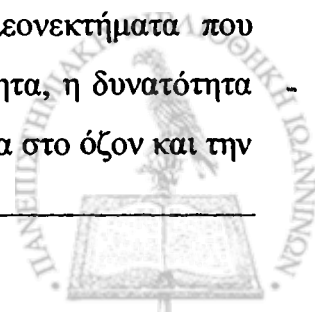
θερμικής διάσπασης μέσω θερμικών αισθητήρων [Nakagawa, 2001]. Τέλος εκτεταμένη έρευνα έχει γίνει και στην ανάπτυξη ηλεκτροχημικών αισθητήρων ημιαγωγών οξειδίων μετάλλων, οι οποίοι έχουν χρησιμοποιηθεί για τον άμεσο προσδιορισμό του όζοντος στην αέρια φάση [Kim, 2000 – Takada, 1993 – Doll, 1998 – Gurlo, 1998].

Όλες οι προαναφερθείσες μέθοδοι έχουν σαφή πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Οι ογκομετρικές και φασματοφωτομετρικές είναι σχετικά απλές, εν τούτοις σημαντικό μειονέκτημα στη χρήση τους είναι η συνεχής κατανάλωση αντιδραστηρίων και η έλλειψη δυνατότητας αυτοματοποίησης για καθημερινές αναλύσεις ρουτίνας. Οι μέθοδοι που στηρίζονται στη χημειοφωταύγεια, αν και είναι οι πιο δημοφιλείς για τον προσδιορισμό του όζοντος, μειονεκτούν στο γεγονός ότι χρησιμοποιούν σχετικά πολύπλοκη οργανολογία. Ειδικότερα, για το χημειοφωταυγή προσδιορισμό του όζοντος στην αέρια φάση είναι απαραίτητος ο ακριβής και ταυτόχρονος έλεγχος πολλών παραμέτρων, καθιστώντας περίπλοκη ακόμα και τη βαθμονόμηση του συστήματος.

Από την άλλη πλευρά οι ηλεκτροχημικές τεχνικές είναι πιο κατάλληλες για in-situ μελέτες, καθώς μπορούν εύκολα να αυτοματοποιηθούν και έχουν σχετικά χαμηλό κόστος. Σημαντικό μειονέκτημα στη χρήση αυτών είναι η έλλειψη υψηλής εκλεκτικότητας ως προς το όζον και η ανάγκη συνεχούς συντήρησης των ηλεκτροδίων. Τέλος, σημαντικό μειονέκτημα στη χρήση των αγωγιμετρικών αισθητήρων, που χρησιμοποιούν οξειδία μετάλλων ως ηλεκτρόδια εργασίας, είναι η υψηλή κατανάλωση ενέργειας καθώς η λειτουργία τους διεξάγεται σε υψηλές θερμοκρασίες.

Αυτό που προκύπτει ως γενικότερο συμπέρασμα είναι ότι η πλειονότητα των μεθόδων παρουσιάζει χαμηλή εκλεκτικότητα ως προς το όζον. Στις περισσότερες περιπτώσεις προσδιορίζονται συνολικά οι οξειδωτικές ουσίες, στην περίπτωση δε των αισθητήρων ημιαγωγών οξειδίων μετάλλων προσδιορίζεται μία ευρεία γκάμα αναλυτών στην αέρια φάση.

Στην παρούσα διατριβή προτείνεται μία ηλεκτροχημική μέθοδος για τον προσδιορισμό του όζοντος σε συνθετικά αέρια δείγματα. Η μέθοδος βασίζεται στη φιλοσοφία των βιοαισθητήρων συνδυάζοντας ταυτόχρονα τα πλεονεκτήματα που προσφέρουν αυτοί όπως η απλότητα της κατασκευής, η εκλεκτικότητα, η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης, με την εκλεκτικότητα της αντίδρασης ανάμεσα στο όζον και την



ευγενόλη (eugenol) [Sachdev, 1972]. Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην ανίχνευση της φ̄ορμαλδεϋδης, που παράγεται από την οζονόλυση του διπλού δεσμού της αλλυλικής ομάδας της ευγενόλης, με τη βοήθεια ενός βιοαισθητήρα ακινητοποιημένης αλκοολικής οξειδάσης. Ο βιοαισθητήρας συνδυάστηκε με μία διάταξη συνεχούς ροής (FIA) και μετρήθηκε αμπερομετρικά η συγκέντρωση του όζοντος καταγράφοντας το αναπτυσσόμενο ρεύμα, που προέρχεται από την οξείδωση του ενζυμικά παραγόμενου H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε δυναμικό +0,65 V (ως προς ηλεκτρόδιο αναφοράς Ag/AgCl/3 M KCl) σε pH=7,0. Λεπτομέρειες σχετικά με τη βελτιστοποίηση των πειραματικών συνθηκών, τη λειτουργικότητα του βιοαισθητήρα και την εφαρμογή του στον προσδιορισμό του όζοντος στην αέρια φάση διαπραγματεύονται παρακάτω.

## 2.3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

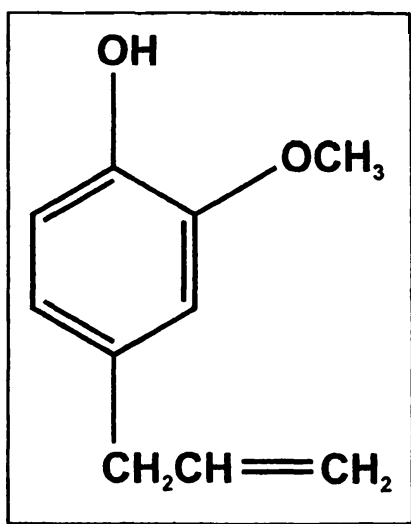
### 2.3.1. Αντιδραστήρια

Η ευγενόλη (GC grade) ήταν προϊόν της εταιρίας Aldrich (Gillingham, UK) (Σχήμα 2.1). Οι φιάλες των αερίων O<sub>2</sub> (99,99%), N<sub>2</sub> (99,999%), CO<sub>2</sub> (99,99%) και N<sub>2</sub>O (99,99%) προμηθεύτηκαν από την εταιρία Air Liquide Hellas. Οι φιάλες των αερίων Ar (99,998%), NOCl anhydrous (99,98%), SO<sub>2</sub> (99,98%) προμηθεύτηκαν από την εταιρία Matheson (USA) ενώ της NH<sub>3</sub> (99,8%) αγοράστηκε από την εταιρία Merck (Darmstadt, Germany).<sup>1</sup> Το άνυδρο δισόξινο φωσφορικό νάτριο (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> anhydrous) αγοράστηκε από την εταιρία Fluka (Buchs, Switzerland). Οι φύσιγγες με το υδρόφοβο υπόστρωμα Sep-Pak tC-18 ήταν προϊόν της εταιρίας Waters (USA).

Ως πρότυπες μέθοδοι για τον προσδιορισμό του όζοντος στην υγρή και αέρια φάση χρησιμοποιήθηκαν η ογκομετρική NBKI (neutral potassium iodide buffer solution) και το σύστημα ανίχνευσης της εταιρίας GASTEC (Italy), αντίστοιχα. Το σύστημα αποτελείται από βαθμονομημένους σωλήνες με πληρωτικό υλικό εμποτισμένο με τη χρωστική Indigo (Gastec detector tubes 18L) και από μία χειροκίνητη αντλία με έμβολο αναρρόφησης (Gastec stroke pump model GV-100S).

<sup>1</sup> ΠΡΟΣΟΧΗ !!! Η χρήση των αερίων NOCl, SO<sub>2</sub> και NH<sub>3</sub> πρέπει να γίνεται εντός απαγωγού φορώντας γάντια και μάσκα. Αποφύγετε την εισπνοή των ατμών !!!

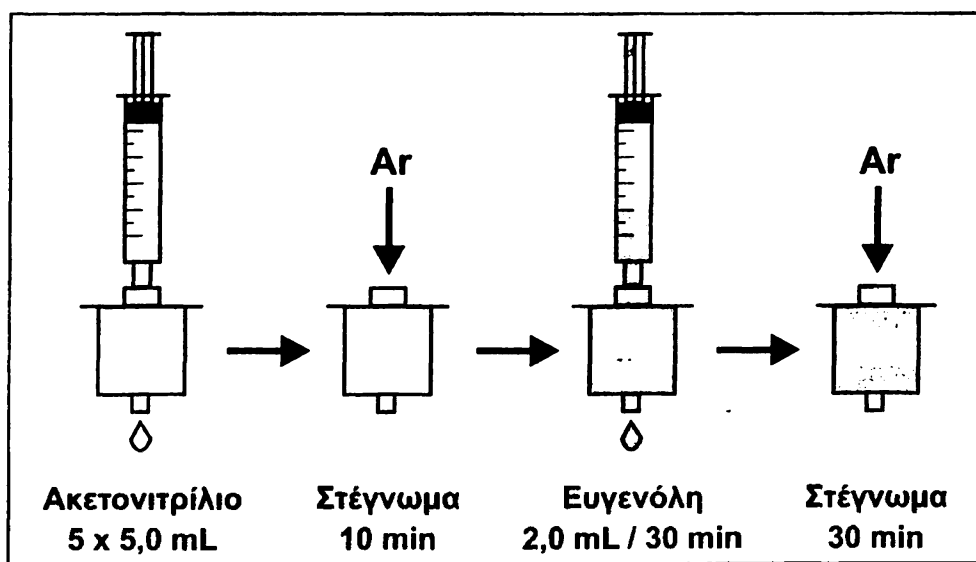




Σχήμα 2.1: Συντακτικός τύπος της ευγενόλης (4-αλλυλ-2-μεθοξυφαινόλη).

### 2.3.2. Κατασκευή των αντιδραστήρων Ευγενόλης.

Οι φύσιγγες με το υδρόφοβο υλικό C-18 εκπλένονται αρχικά με ακετονιτρίλιο (5 φορές από 5,0 mL) και στεγνώνονται σε ρεύμα Ar. Η ευγενόλη πριν από κάθε χρήση της κατεργάζεται με άνυδρο  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , ώστε να απομακρύνουμε τα ίχνη φορμαλδεΐδης<sup>2</sup> και την περιεχόμενη υγρασία.

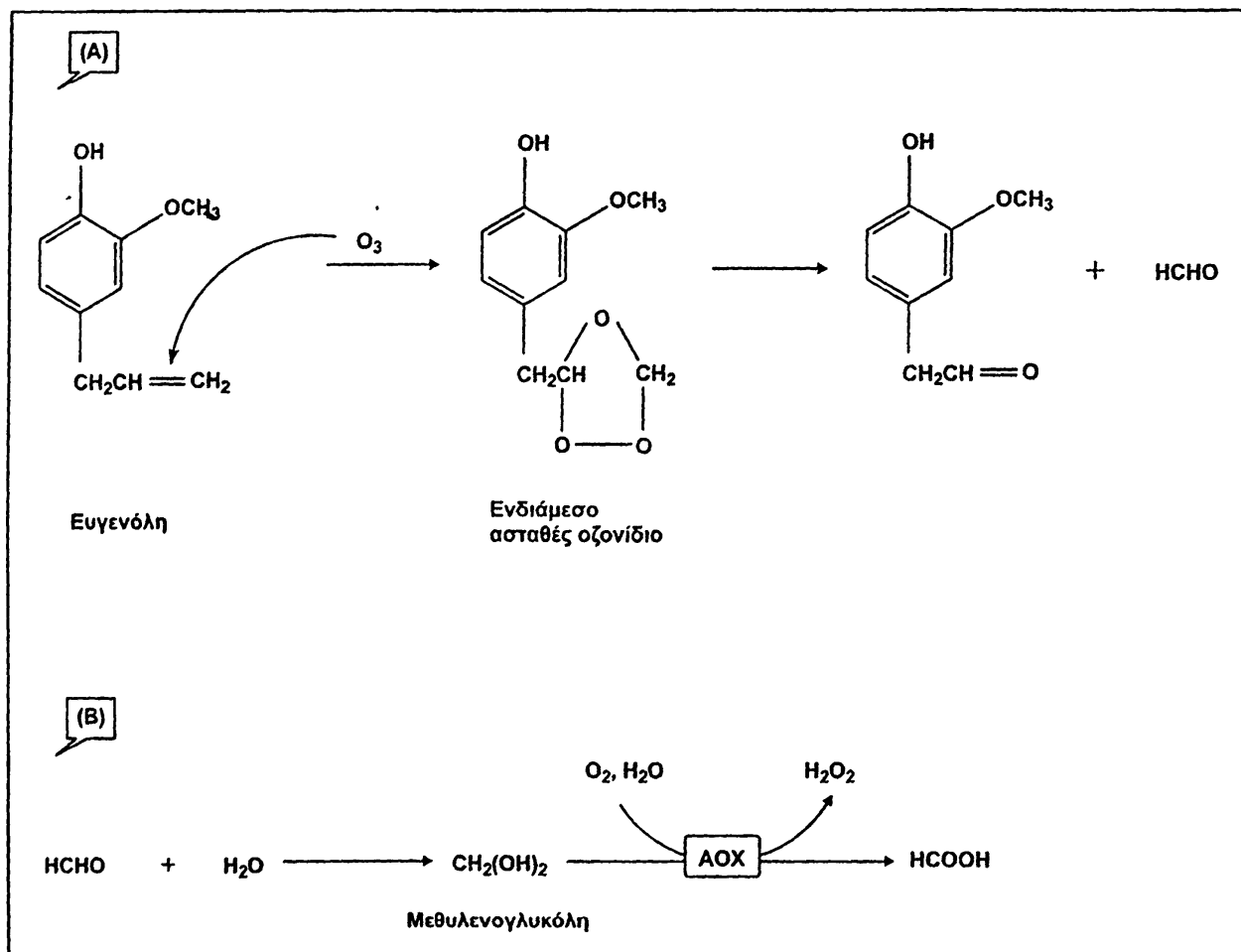


Σχήμα 2.2: Απεικόνιση της μεθόδου κατασκευής των αντιδραστήρων ευγενόλης.

Διηθείται με τη βοήθεια πτυχωτού ηθμού και χρησιμοποιείται αμέσως για την κατασκευή των αντιδραστήρων (Σχήμα 2.2). Με τη βοήθεια σύριγγας των 5,0 mL

<sup>2</sup> Η ευγενόλη περιέχει ίχνη φορμαλδεΐδης εξαιτίας της οξείδωσής της από το ατμοσφαιρικό όζον.

διαβιβάζουμε από τη φύσιγγα ποσότητα 2,0 mL από την προκατεργασμένη ευγενόλη για χρονικό διάστημα 30 min, έτσι ώστε να γίνει η τροποποίηση του πληρωτικού υλικού. Στη συνέχεια αφού αποστραγγιστεί το υπόλειμμα της ευγενόλης που δεν έχει ακινητοποιηθεί ο αντιδραστήρας στεγνώνεται σε ρεύμα Ar για 30 min. Οι αντιδραστήρες κατασκευάζονται στην αρχή κάθε εργαστηριακής ημέρας. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν μέχρι και για 70 συνεχείς μετρήσεις και φυλάσσονται σε θερμοκρασία +4 °C, αεροστεγώς κλεισμένοι και πληρωμένοι με Ar.



**Σχήμα 2.3:** Προτεινόμενος μηχανισμός (A) οζονόλυσης του διπλού δεσμού της αλλυλο-ομάδας της ευγενόλης και (B) εφυδάτωσης της φορμαλδεΐδης προς μεθυλενογλυκόλη και ενζυμικής οξείδωσης αυτής από την AOX.

### 2.3.3. Αρχή της μεθόδου

Η ανόρθωση του διπλού δεσμού C=C λαμβάνει χώρα μέσω ενός μηχανισμού που είναι γνωστός ως 1,3-κυκλοπροσθήκη και ο οποίος περιλαμβάνει τη δημιουργία ενός ενδιάμεσου ασταθούς οζονιδίου (Σχήμα 2.3A). Η αναδιάταξη του τελευταίου οδηγεί

στο σχηματισμό ενός καρβονυλικού παραγώγου και φορμαλδεΐδης. Η φορμαλδεΐδη συλλέγεται εντός του ρυθμιστικού διαλύματος εργασίας όπου εφυδατώνεται σε ποσοστό 99,99% και βρίσκεται υπό τη μορφή της μεθυλενογλυκόλης (Σχήμα 2.3B). Η τελευταία αποτελεί το υπόστρωμα για την Αλκοολική οξειδάση (AOX) με αποτέλεσμα από την ενζυμική αντίδραση να παράγεται  $H_2O_2$ , το οποίο ανάγεται επί του ηλεκτροδίου εργασίας (Pt) σε δυναμικό +0,65 V. Το αναπτυσσόμενο ρεύμα καταγράφεται και ακολούθως γίνεται συσχέτιση με την εκάστοτε συγκέντρωση του όζοντος.

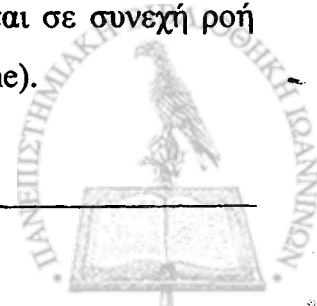
#### 2.3.4. Πειραματική διάταξη

Η μετρητική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα, είναι το Autolab της εταιρίας Eco Chemie BV (Utrecht, The Netherlands), που αποτελείται από τον ποτενσιοστάτη PSTAT10. Το όλο σύστημα συνδέεται με ηλεκτρονικό υπολογιστή (IBM compatible) ενώ η συλλογή, καταγραφή και επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων γίνεται μέσω ειδικού λογισμικού της εταιρίας Eco Chemie με την ονομασία «General Purpose Electrochemical System 3» (GPES3). Η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του όζοντος απεικονίζεται στο Σχήμα 2.4.

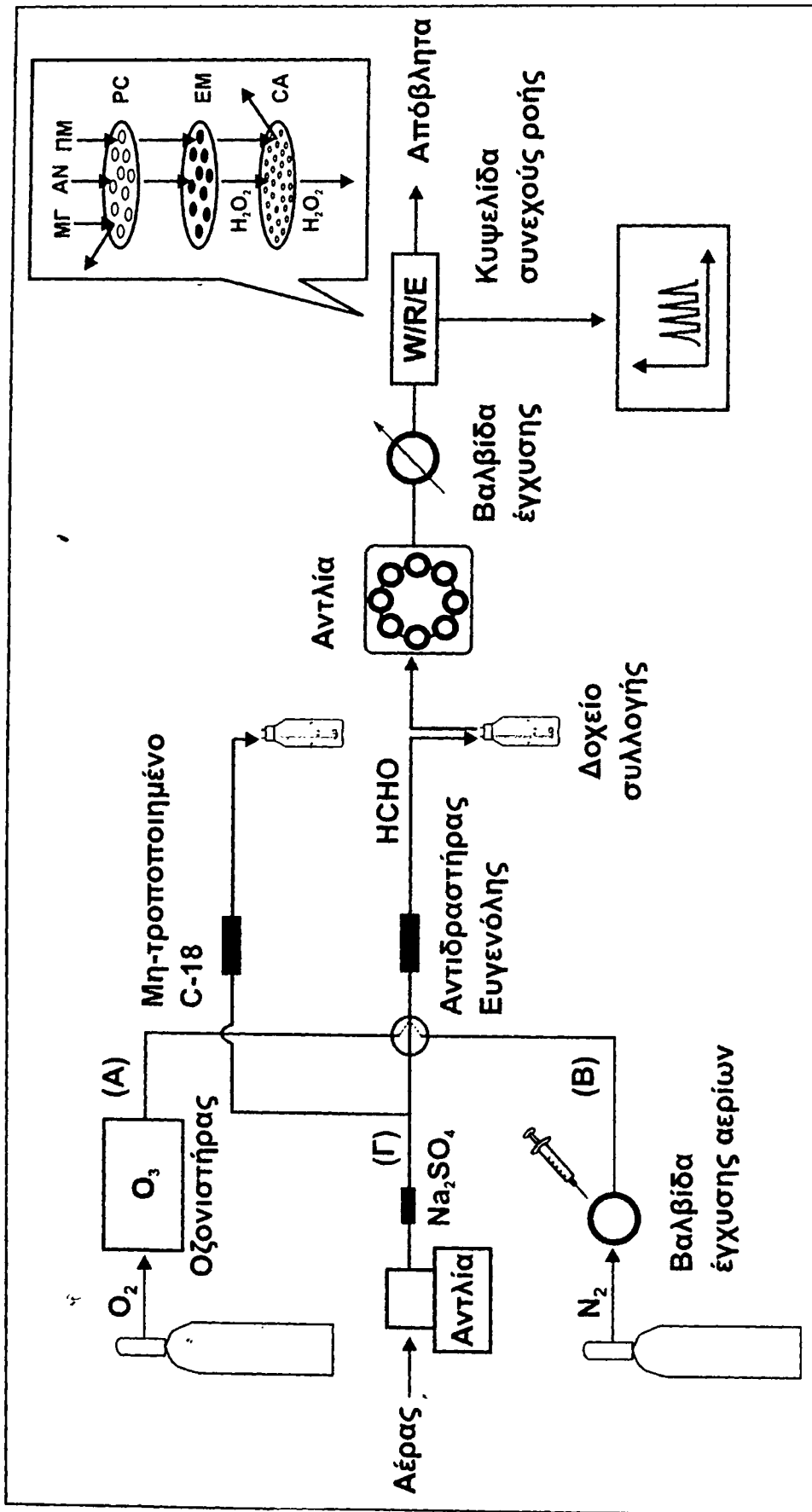
Η παραγωγή του  $O_3$  έγινε με τη βοήθεια του οζονιστήρα Medozons BM01 (Medozons Ltd., Russia), τροφοδοτώντας τον με καθαρό οξυγόνο 99,99%. Η συγκέντρωση και η ροή του  $O_3$  ρυθμίζονται στην επιθυμητή τιμή ηλεκτρονικά από το μηχάνημα.

#### 2.3.5. Πορεία εργασίας

Ένα ρυθμιστικό διάλυμα 0,05 M φωσφορικών με  $pH = 7,0$  χρησιμοποιήθηκε ως φορέας και συλλέκτης της παραγόμενης φορμαλδεΐδης. Η προώθηση του διαλύματος του φορέα γίνεται με τη βοήθεια περισταλτικής αντλίας κατά συνεχή τρόπο με ταχύτητα ροής  $0,31 \text{ mL min}^{-1}$ . Το ηλεκτρόδιο εργασίας τοποθετείται στην κυψελίδα ροής, εφαρμόζεται σε αυτό σταθερό δυναμικό +0,65 V και αφήνεται σε συνεχή ροή μέχρι να σταθεροποιηθεί το ρεύμα βάσης (background current-baseline).







Σχήμα 2.4: Σχηματική απεικόνιση της διάταξης συνεχούς ροής, η οποία χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του όζοντος.

Η βαθμονόμηση του συστήματος έγινε με τη διαβίβαση διαφορετικών συγκεντρώσεων αερίου όζοντος στην περιοχή 60 – 4000  $\mu\text{g L}^{-1}$   $\text{O}_3$  με ροή 0,25  $\text{L min}^{-1}$  για χρονική διάρκεια 1 min (πορεία Α), διαμέσου του αντιδραστήρα της ευγενόλης.

Εξετάστηκαν επίσης διάφοροι συνδυασμοί των παραμέτρων συγκέντρωση όζοντος εξόδου / ταχύτητα ροής αερίου / χρόνος παροχής. Η παραγόμενη φορμαλδεΐδη συλλέγεται σε ένα κλειστό δοχείο (δοχείο συλλογής) και προωθείται προς τον ανιχνευτή. Ως μέτρο της συγκέντρωσης του όζοντος χρησιμοποιήθηκαν τόσο το ρεύμα στάσιμης κατάστασης, όταν η φορμαλδεΐδη διοχετεύεται στον βιοαισθητήρα αντί του φορέα, είτε το ρεύμα κορυφής, στην περίπτωση που το δείγμα της φορμαλδεΐδης εισάγεται (όγκος δείγματος = 250  $\mu\text{L}$ ) μέσω της βαλβίδας έγχυσης στο ρεύμα του φορέα.

Η μελέτη των παρεμποδίσεων από διάφορα αέρια έγινε μέσω της πορείας Β κατὰ παρόμοιο τρόπο με τη βαθμονόμηση.

Τέλος η μελέτη για τον προσδιορισμό του όζοντος σε αέρια δείγματα έγινε μέσω της πορείας Γ. Η συλλογή των δειγμάτων έγινε με τη βοήθεια ηλεκτρικής αντλίας της εταιρίας SKC (model MCS10).

## 2.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 2.4.1. Βελτιστοποίηση παραμέτρων

Οι αντιδραστήρες αποδείχτηκαν εξαιρετικά αποτελεσματικοί στη αντίδραση ετερογενούς φάσεως, ανάμεσα στο αέριο όζον και την ακινητοποιημένη ευγενόλη. Η διερεύνηση της λειτουργικότητάς των, όσον αφορά το ποσοστό του όζοντος που αντιδρά διεξήχθη με διαβίβαση ρεύματος όζοντος συγκέντρωσης 4  $\text{mg L}^{-1}$ , με ταχύτητα ροής 0,25  $\text{L min}^{-1}$  για 10 min. Η έξοδος των αντιδραστήρων συλλέχθηκε σε μία παγίδα KI διαλυμένου σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,05 M φωσφορικών και  $\text{pH} = 7,0$ . Η ποσοτική αντίδραση του όζοντος σε ποσοστό 100% αποδεικνύεται από το γεγονός ότι δεν παρατηρήθηκε καμία χρωματική μεταβολή του διαλύματος KI παρουσία δείκτη αμύλου. Σε αντίθετη περίπτωση κυανή χρώση του διαλύματος θα σήμαινε απελευθέρωση ιωδίου άρα και μη ποσοτική αντίδραση του όζοντος στον αντιδραστήρα και διαφυγή του στη έξοδο αυτού. Υπό τις δεδομένες συνθήκες ο αντιδραστήρας μπορεί

να χρησιμοποιηθεί για 70 διαδοχικές μετρήσεις χωρίς να παρατηρηθεί μείωση της αρχικής του δραστηρότητας. Όταν δεν χρησιμοποιείται μπορεί να αποθηκευτεί στους +4 °C για περισσότερο από ένα μήνα. Στην αρχή κάθε εργαστηριακής περιόδου και πριν από τη χρήση του ο αντιδραστήρας πρέπει να καθαρίζεται από τυχόν παραμένοντα ίχνη φορμαλδεΐδης διαβιβάζοντας για λίγα λεπτά αέριο Ar.

Ο μηχανισμός της οξειδωτικής διάσπασης των διπλών δεσμών C=C από το όζον (οζονόλυση) δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί μέχρι σήμερα. Η πιο αποδεκτή θεωρία είναι ο μηχανισμός syn- και anti- zwitterion, βάσει του οποίου το όζον αντιδρά με το διπλό δεσμό μέσω μίας αντίδρασης 1,3-κυκλοπροσθήκης σε δύο στάδια προς το σχηματισμό ενός ενδιάμεσου ασταθούς οζονιδίου (Σχήμα 2.5, Πορεία A). Εξαιτίας της αστάθειάς του, τα οζονίδια μετατρέπονται σε άλλα προϊόντα διάσπασης όπως αλδεΐδες και κετόνες [Oyama, 2000 – Criegee, 1975 – Lattimer, 1974 – Bauld, 1968]. Παρουσία υγρασίας τα οζονίδια διασπώνται και το τρίτο άτομο οξυγόνου απελευθερώνεται άλλοτε υπό τη μορφή H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και άλλοτε υπό τη μορφή υπεροξειδικών παραγώγων των σχηματιζόμενων καρβονυλικών ενώσεων.

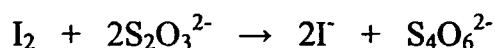
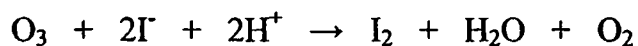
Έτσι, μία ακόμα παράμετρος που διερευνήθηκε είναι το ποσοστό μετατροπής του όζοντος σε φορμαλδεΐδη. Ο βαθμός μετατροπής υπολογίστηκε για τρεις διαφορετικές ποσότητες όζοντος 1, 2 και 4 mg. Στον πίνακα 2.1 φαίνονται οι συνθήκες με τις οποίες επιτεύχθηκαν αυτές οι συγκεντρώσεις.

**Πίνακας 2.1:** Συνδυασμοί πειραματικών συνθηκών που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του βαθμού μετατροπής του όζοντος σε φορμαλδεΐδη.

| Έξοδος οζονιστήρα<br>( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) | Ταχύτητα ροής<br>( $\text{L min}^{-1}$ ) | Χρόνος δειγματοληψίας<br>(min) |
|--|--|--------------------------------|
| 200  | 0,25                                     | 20                             |
| 400  | 0,5                                      | 10                             |
| 800  | 1,0                                      | 5                              |

Για κάθε συνδυασμό συνθηκών (έξοδος οζονιστήρα / ταχύτητα ροής / χρόνος δειγματοληψίας) διεξήχθησαν δύο πειράματα. Ένα για τον άμεσο προσδιορισμό του όζοντος και ένα για τον προσδιορισμό της φορμαλδεΐδης που παράγεται όταν οι ίδιες ποσότητες όζοντος διέρχονται μέσα από τους αντιδραστήρες. Το όζον συλλέγεται σε

μία παγίδα KI διαλυμένου σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,05 M φωσφορικών με pH = 7,0 και το παραγόμενο από την αντίδραση ιώδιο προσδιορίζεται ογκομετρικά με πρότυπο διάλυμα 0,0100 M θειοθειϊκού νατρίου, παρουσία δείκτη αμύλου σύμφωνα με τις παρακάτω αντιδράσεις:



Ο υπολογισμός της ποσότητας του όζοντος έγινε με βάση την εξίσωση:  $m = 0,24 \times V_{\theta}$ , όπου m είναι η μάζα του όζοντος σε mg και  $V_{\theta}$  είναι ο όγκος του διαλύματος θειοθειϊκού νατρίου που καταναλώθηκε σε mL.

Ο προσδιορισμός της φορμαλδεΐδης έγινε και αυτός με την ογκομετρική μέθοδο της υδροχλωρικής υδροξυλαμίνης (για λεπτομέρειες βλέπε Πειραματικό μέρος - Κεφάλαιο 1° - §1.3.3). Ο μέσος όρος των μετρήσεων (n=5) για κάθε συγκέντρωση όζοντος 1, 2 και 4 mg υπολογίστηκε  $81,5 \pm 3$ ,  $76,5 \pm 2$  και  $74,4 \pm 1$ , αντίστοιχα. Ο βαθμός μετατροπής για μικρότερες συγκεντρώσεις όζοντος (<1 mg) δεν υπολογίστηκε, καθώς τα αποτελέσματα των ογκομετρικών μεθόδων τόσο για το όζον όσο και για τη φορμαλδεΐδη παρουσιάζουν χαμηλή ακρίβεια και επαναληψιμότητα.

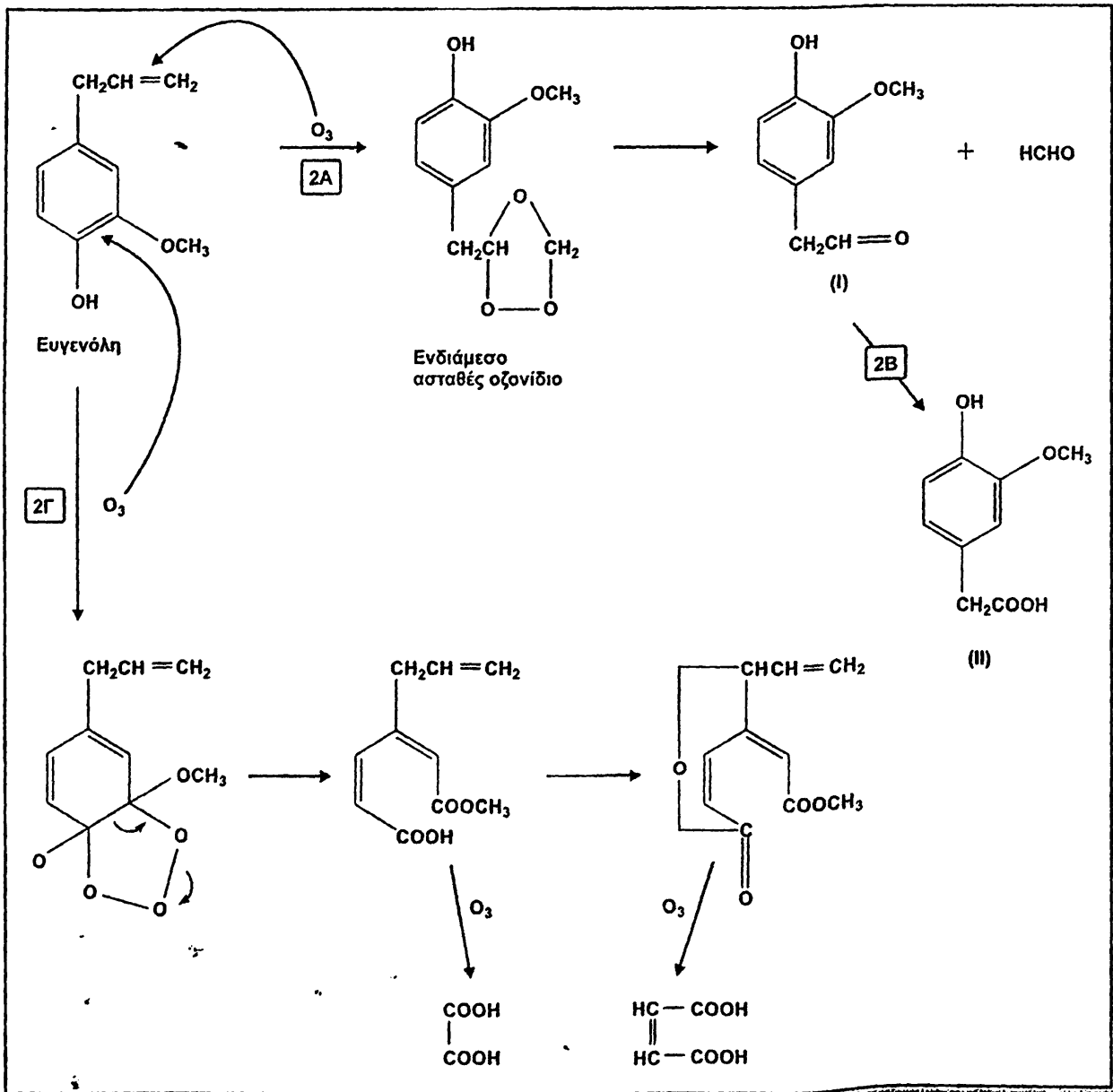
Η απόκλιση του βαθμού μετατροπής από τη θεωρητικά προβλεπόμενη τιμή που είναι 1,0 μπορεί να ερμηνευτεί με το να υποθέσουμε μία μη στοιχειομετρική αντίδραση ανάμεσα στο όζον και την ευγενόλη, όπως μπορεί να δει κανείς και στο **Σχήμα 2.5**.

Είναι φανερό ότι εκτός από τη διάσπαση του διπλού δεσμού C=C της αλλυλικής ομάδας της ευγενόλης (**Σχήμα 2.5, Πορεία Α**) ένα μέρος του όζοντος καταναλώνεται για την περαιτέρω οξείδωση του καρβονυλικού παραγώγου (I) στο προϊόν (II) (**Σχήμα 2.5, Πορεία Β**).

Επίσης, ένα ποσοστό του όζοντος καταναλώνεται και για τη διάσπαση του αρωματικού δακτυλίου της ευγενόλης (**Σχήμα 2.5, Πορεία Γ**). Σύμφωνα με τις προτεινόμενες αντιδράσεις το όζον μπορεί να διασπάσει του διπλούς δεσμούς C=C ενός αρωματικού δακτυλίου αλλά με πολύ μικρότερες ταχύτητες σε σχέση με εκείνες που παρατηρούνται στις αντιδράσεις διάσπασης των ολεφινικών διπλών δεσμών. Παρόλο

που και αυτός ο μηχανισμός δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί μέχρι σήμερα, πιστεύεται ότι διεξάγεται κατά παρόμοιο τρόπο με εκείνον των ολεφινών, μέσω της 1,3-κυκλοπροσθήκης [Atkinson, 1984].

Μελέτες έχουν δείξει ότι υποκαταστάτες που δρουν ως δότες ηλεκτρονίων ενισχύουν τη διάσπαση του αρωματικού δακτυλίου στα άτομα άνθρακα ανάμεσα στην υδροξυ- και τη μεθοξυ- ομάδα, πάλι μέσω του μηχανισμού της 1,3-κυκλοπροσθήκης [Pate, 1976].



Σχήμα 2.5: Προτεινόμενος μηχανισμός (A) οζονόλυσης, (B, Γ) παράπλευρων αντιδράσεων του όζοντος με το μόριο της ευγενόλης.

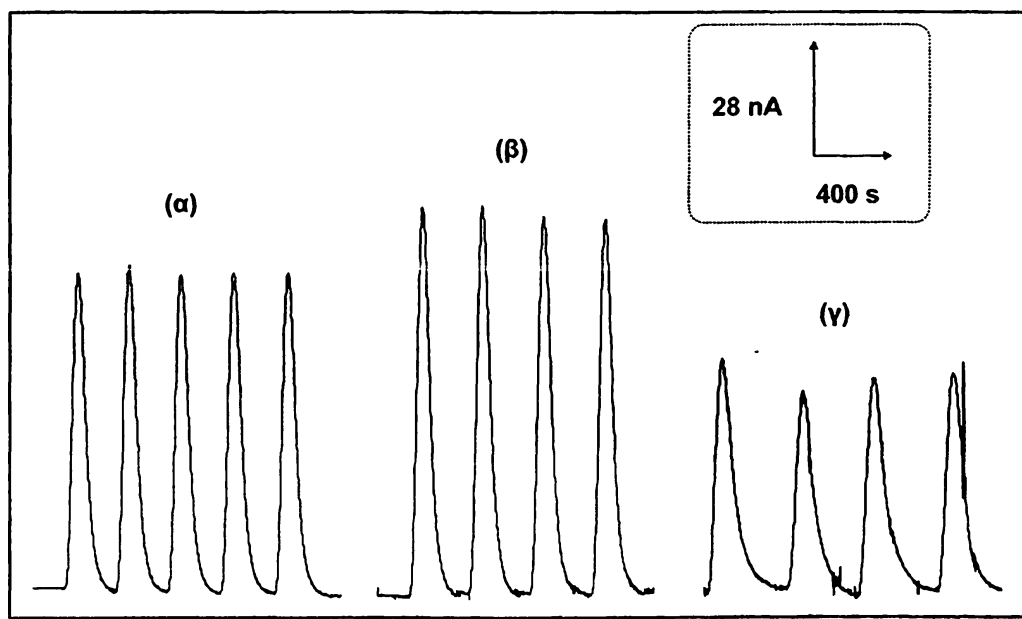


## 2.4.2. Επίδραση του οξυγόνου

Το παραγόμενο όζον, παρέχεται υπό τη μορφή μίγματος με οξυγόνο, το οποίο όπως φαίνεται στο **Σχήμα 1.6** (βλέπε Πειραματικό Μέρος, Κεφάλαιο 1°, §1.4.1) η ΑΟΧ το χρησιμοποιεί ως δότη ηλεκτρονίων στην ενζυμική μετατροπή της HCHO σε HCOOH. Δεδομένου αυτού του γεγονότος μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του O<sub>2</sub> στην απόδοση του βιοαισθητήρα.

Παρασκευάστηκαν τρεις σειρές προτύπων διαλυμάτων φορμαλδεΐδης συγκέντρωσης 0,5 mM (α) σε συνθήκες περιβάλλοντος, (β) εμπλουτισμένων με οξυγόνο και (γ) απαερωμένων με Ag. Ο εμπλουτισμός έγινε για 1 min με ροή αερίων 0,25 L min<sup>-1</sup> λίγο πριν την έγχυση των διαλυμάτων στο σύστημα FIA.

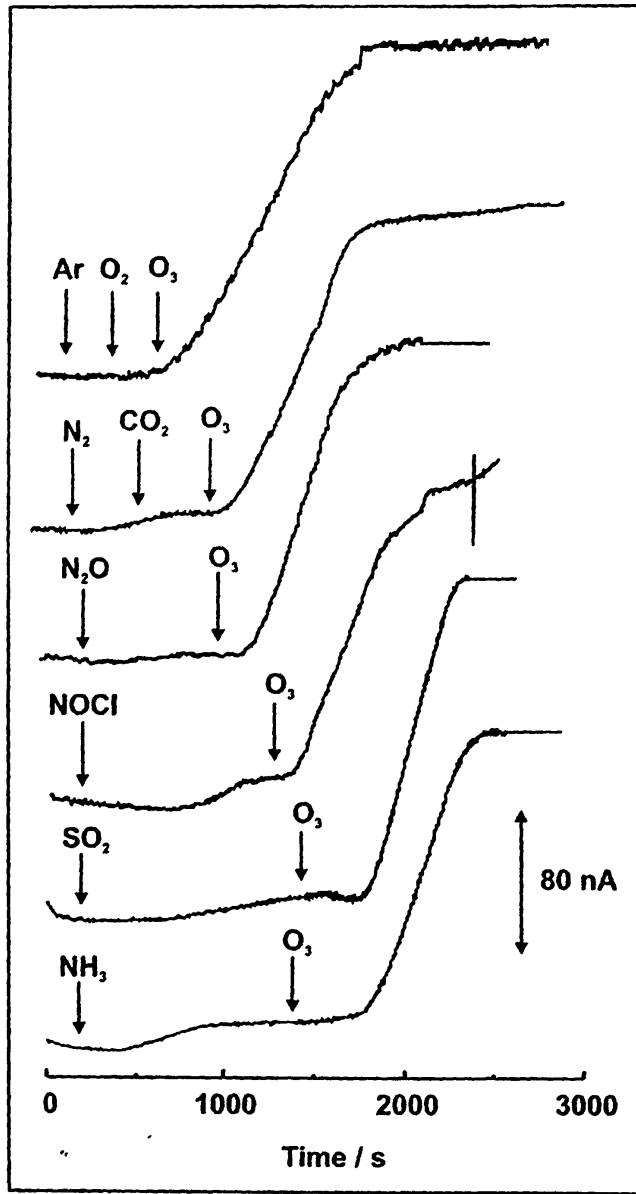
Από το **Σχήμα 2.6** αποκαλύπτεται μία μικρή αύξηση στο καταγραφόμενο σήμα στην περίπτωση των εμπλουτισμένων με οξυγόνο δειγμάτων (**Σχήμα 2.6β**) και μία αντίστοιχη μείωση στα απαερωμένα με Ag δείγματα (**Σχήμα 2.6γ**), σε σύγκριση με το καταγραφόμενο σήμα που αντιστοιχεί στα δείγματα που δεν έχουν υποστεί καμία κατεργασία. Είναι, λοιπόν, φανερό ότι η απόκριση του βιοαισθητήρα εξαρτάται άμεσα από τη συγκέντρωση του O<sub>2</sub>. Για να εξαλείψουμε την επίδραση αυτή όλα τα δείγματα πριν από τη μέτρησή τους εμπλουτίζονται με O<sub>2</sub> για 1 min με ροή 0,25 L min<sup>-1</sup>.



**Σχήμα 2.6:** Κορυφές FIA διαλυμάτων 0,5 mM φορμαλδεΐδης (α) μη εμπλουτισμένων, (β) εμπλουτισμένων με O<sub>2</sub> και (γ) εμπλουτισμένων με Ag. (διάρκεια εμπλουτισμού: 1 min, ροή: 0,25 L min<sup>-1</sup>, ρυθμιστικό διάλυμα 0,05 M φωσφορικών pH=7,0).

### 2.4.3. Μελέτη απόκρισης άλλων αερίων

Μελετήθηκε η σχετική απόκριση διαφόρων αερίων όπως οξυγόνο ( $O_2$ ), αργό (Ar), άζωτο ( $N_2$ ), διοξείδιο του θείου ( $SO_2$ ), διοξείδιο του άνθρακα ( $CO_2$ ), αμμωνία ( $NH_3$ ), υποξείδιο του αζώτου ( $N_2O$ ) και νιτρόξυλο χλωρίδιο (NOCl). Το κάθε αέριο εισάγεται με τη βοήθεια σύριγγας από μία βαλβίδα στο συνεχές ρεύμα αερίου αζώτου (Σχήμα 2.4, Πορεία Β).



Σχήμα 2.7: Καμπύλες απόκρισης του βιοαισθητήρα AOX έναντι διαφόρων παρεμποδιζόντων αερίων:  $SO_2$ ,  $50 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $NH_3$ ,  $20 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $N_2O$ ,  $180 \text{ mg mL}^{-1}$ , NOCl,  $180 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $CO_2$ ,  $120 \text{ mg mL}^{-1}$  Συνθήκες: ρυθμιστικό διάλυμα  $0,05 \text{ M}$  φωσφορικών  $pH = 7,0$ , ταχύτητα ροής φορέα:  $0,31 \text{ mL min}^{-1}$ , συγκέντρωση  $O_3$ :  $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ , ταχύτητα ροής  $N_2$ :  $0,50 \text{ L min}^{-1}$ , δυναμικό:  $+0,65 \text{ V}$ .

Οι συγκεντρώσεις των υπό μελέτη αερίων ήταν στην περιοχή 20-180 mg mL<sup>-1</sup>. Οι συγκεντρώσεις αυτές είναι 200 έως 1800 φορές μεγαλύτερες από εκείνη των 100 μg mL<sup>-1</sup> όζοντος που χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο αναφοράς. Η ποσότητα του κάθε αερίου υπολογίστηκε με απευθείας ζύγιση της σύριγγας προ και μετά την πλήρωσή της με το υπό μελέτη αέριο, σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας. Όπως φαίνεται από της καμπύλες ρεύματος σταθερής κατάστασης (Σχήμα 2.7) η παρεμποδιστική δράση των παραπάνω αερίων είναι μηδαμινή. Κάποιες μικρές μεταβολές που παρατηρούνται τόσο στη γραμμή βάσης όσο και στο καταγραφόμενο σήμα που προέρχεται από το πρότυπο δείγμα αερίου όζοντος, οφείλονται σε αλλαγές της τιμής του pH του φορέα.

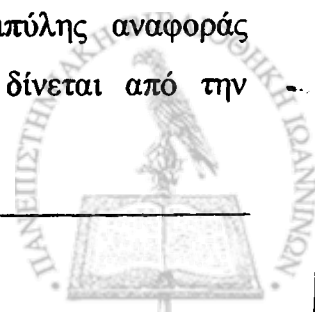
Από τα παραπάνω είναι φανερό ότι η προτεινόμενη μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό του όζοντος σε πραγματικά αέρια δείγματα. Η μόνη παρεμπόδιση εγείρεται από τη φορμαλδεΐδη που τυχόν μπορεί να υπάρχει σε ένα πραγματικό δείγμα [Jones, 1999]. Στη περίπτωση αυτή είναι απαραίτητη η ταυτόχρονη διεξαγωγή τυφλού πειράματος παρακάμπτοντας τον αντιδραστήρα της ευγενόλης.

Επίσης, παρουσία υγρασίας στο δείγμα ένα από τα προϊόντα της οζονόλυσης μπορεί να είναι το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [Horváth, 1985]. Προς αποφυγή σχηματισμού του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (που είναι το τελικά μετρούμενο συστατικό), τοποθετείται πριν από τον αντιδραστήρα της ευγενόλης ένα φίλτρο αέρα (Acro50, Pall), το οποίο περιέχει 1,0 g άνυδρου Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, για τη δέσμευση της υγρασίας (Σχήμα 2.4).

#### 2.4.4. Αναλυτικά χαρακτηριστικά του βιοαισθητήρα

Υπό τις βέλτιστες συνθήκες κατασκευάστηκαν δύο καμπύλες αναφοράς,  $I$  (nA) =  $f$  (O<sub>3</sub>, μg mL<sup>-1</sup>). Η κατασκευή της πρώτης καμπύλης αναφοράς έγινε ως προς την τιμή της έντασης του ρεύματος των κορυφών FIA, ενώ η δεύτερη καμπύλη αναφοράς κατασκευάστηκε ως προς την τιμή της έντασης του ρεύματος σταθερής κατάστασης, όπου το δείγμα εισέρχεται στον ανιχνευτή ως φορέας και όχι ως δείγμα ενιόμενο στο φορέα (Σχήμα 2.8).

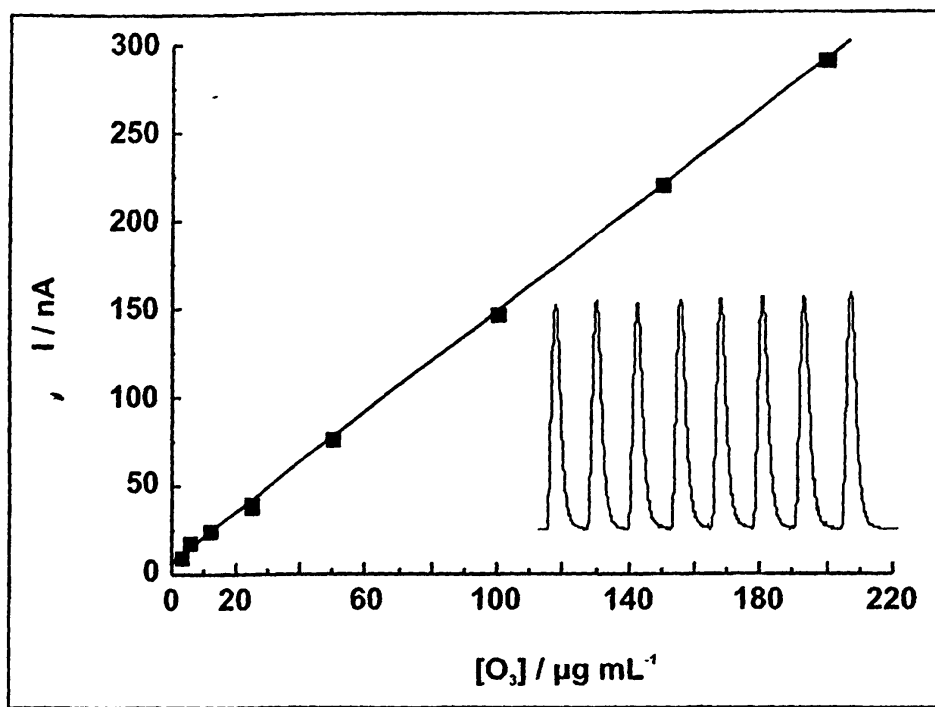
Στην πρώτη περίπτωση η καμπύλη παρουσιάζει γραμμικότητα στην περιοχή συγκεντρώσεων 3,0 – 200 μg mL<sup>-1</sup> O<sub>3</sub>. Η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς υπολογιζόμενη βάσει της μεθόδου των ελαχίστων τετραγώνων δίνεται από την ακόλουθη σχέση:



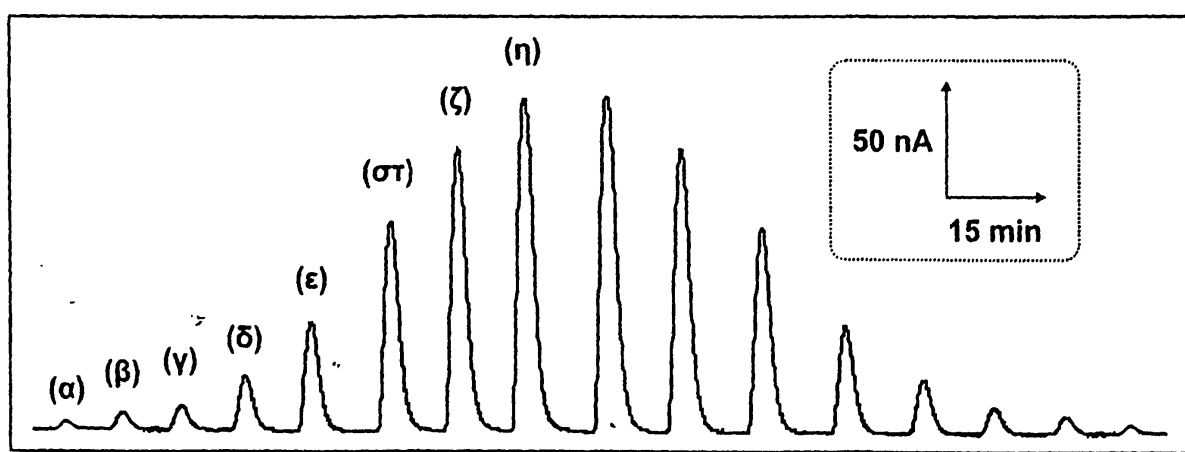


$$y = (1,42 \pm 0,01) O_3 + (5,66 \pm 0,99)$$

όπου  $y =$  είναι η τιμή της έντασης του καταγραφόμενου ρεύματος  $I$  σε nA και  $O_3$  είναι η συγκέντρωση του όζοντος σε  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .



**Σχήμα 2.8:** Καμπύλη αναφοράς όζοντος με τη μέθοδο των εγχύσεων. Ένθετο σχήμα: κορυφές FIA διαδοχικών εγχύσεων ( $n=8$ ) προτύπου  $100,0 \mu\text{g mL}^{-1} O_3$ . Ταχύτητα ροής  $O_3$ :  $0,25 \text{ L min}^{-1}$ , Χρόνος παροχής:  $4 \text{ min}$ , Ρυθμιστικό διάλυμα  $0,05 \text{ M}$  φωσφορικών  $\text{pH} = 7,0$ . Ταχύτητα ροής:  $0,31 \text{ mL min}^{-1}$ . Δυναμικό:  $+0,65 \text{ V}$ .



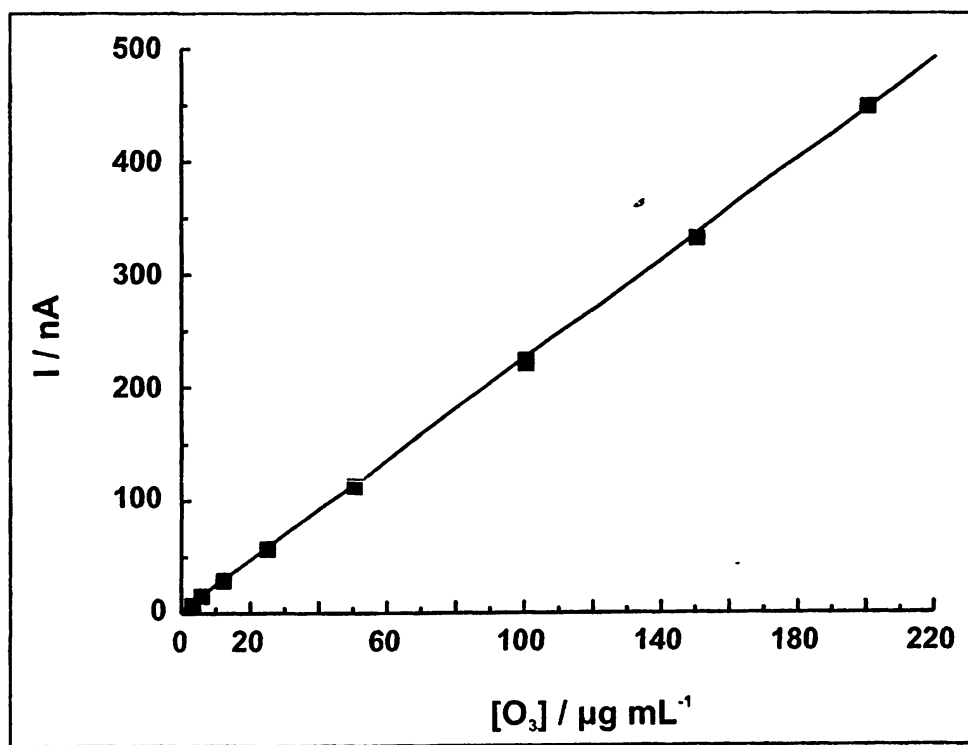
**Σχήμα 2.9:** Κορυφές FIA, καμπύλης αναφοράς όζοντος (α)  $3,0$  – (β)  $6,0$  – (γ)  $12,0$  – (δ)  $25,0$  – (ε)  $50,0$  – (στ)  $100,0$  – (ζ)  $150,0$  – (η)  $200,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Ταχύτητα ροής  $O_3$ :  $0,25 \text{ L min}^{-1}$ , Χρόνος παροχής:  $4 \text{ min}$ , Ρυθμιστικό διάλυμα  $0,05 \text{ M}$  φωσφορικών  $\text{pH} = 7,0$ . Ταχύτητα ροής:  $0,31 \text{ mL min}^{-1}$ . Δυναμικό:  $+0,65 \text{ V}$ .

Ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης υπολογίστηκε  $r^2 = 0,9998$  ( $n = 8$ ). Η σχετική τυπική απόκλιση της μεθόδου για πρότυπο δείγμα  $O_3$  συγκέντρωσης  $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  υπολογίστηκε  $RSD = 0,74 \%$  ( $n = 8$ ), το δε όριο ανίχνευσης είναι  $LOD = 2,1 \mu\text{g mL}^{-1} O_3$  ( $S/N = 3$ ). Στο Σχήμα 2.9 φαίνονται οι κορυφές FIA που καταγράφηκαν κατά την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς με τη χρήση προτύπων δειγμάτων όζοντος.

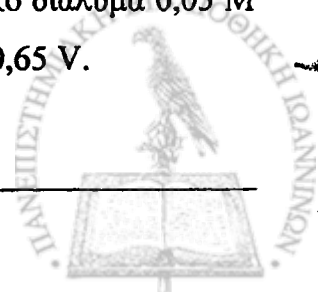
Η δεύτερη καμπύλη αναφοράς (Σχήμα 2.10) είναι γραμμική στην συγκεντρώσεων  $3,0 - 200 \mu\text{g mL}^{-1} O_3$ . Η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς υπολογιζόμενη βάσει της μεθόδου των ελαχίστων τετραγώνων δίνεται από την ακόλουθη σχέση:

$$y = (2,23 \pm 0,01) O_3 + (0,92 \pm 0,78)$$

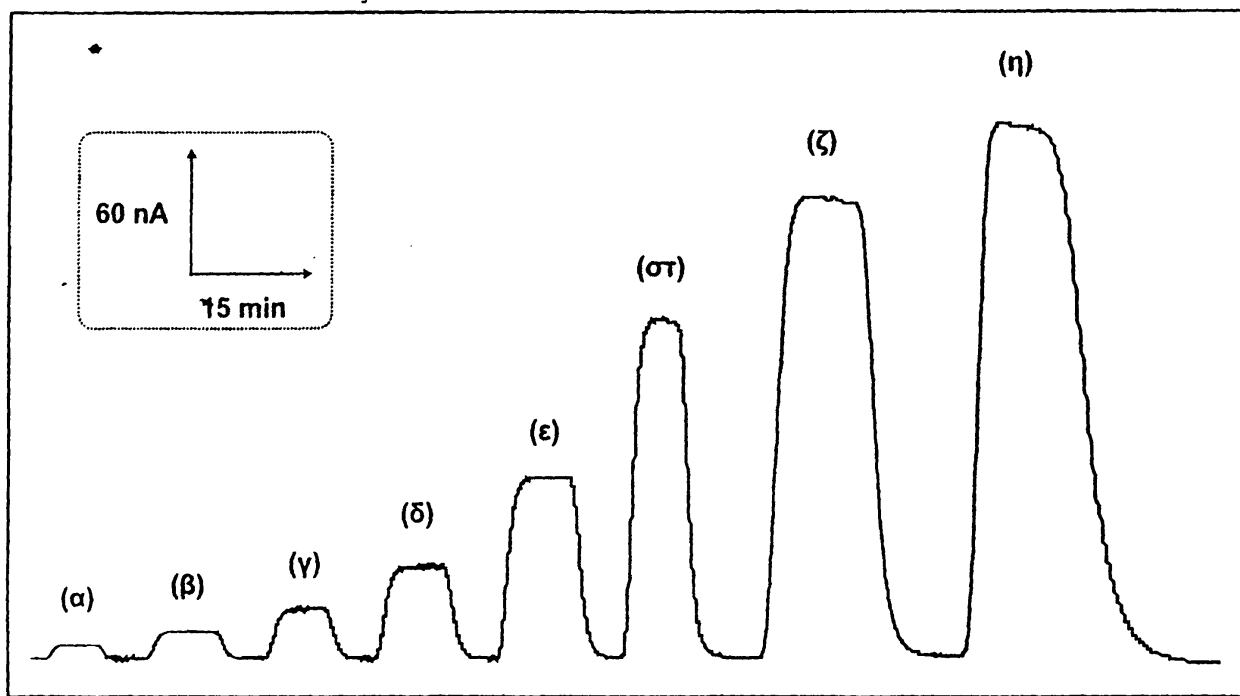
όπου  $y =$  είναι η τιμή της έντασης του ρεύματος σταθερής κατάστασης  $I$  σε  $\text{nA}$  και  $O_3$  είναι η συγκέντρωση του όζοντος σε  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .



Σχήμα 2.10: Καμπύλη αναφοράς όζοντος με τη μέθοδο της σταθερής κατάστασης. Ταχύτητα ροής  $O_3$ :  $0,25 \text{ L min}^{-1}$ , Χρόνος παροχής:  $4 \text{ min}$ , Ρυθμιστικό διάλυμα  $0,05 \text{ M}$  φωσφορικών  $\text{pH} = 7,0$ . Ταχύτητα ροής:  $0,31 \text{ mL min}^{-1}$ . Δυναμικό:  $+ 0,65 \text{ V}$ .



Ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης υπολογίστηκε  $r^2 = 0,9998$  ( $n = 8$ ). Η σχετική τυπική απόκλιση της μεθόδου για πρότυπο δείγμα όζοντος συγκέντρωσης  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  υπολογίστηκε  $\text{RSD} = 0,69 \%$  ( $n = 5$ ), το δε όριο ανίχνευσης βρέθηκε  $\text{LOD} = 1,1 \mu\text{g mL}^{-1} \text{O}_3$  ( $\text{S/N} = 3$ ). Στο Σχήμα 2.11 φαίνονται τα σήματα που καταγράφηκαν κατά την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς με τη χρήση προτύπων δειγμάτων  $\text{O}_3$ .



Σχήμα 2.11: Σήματα ρεύματος σταθερής κατάστασης για πρότυπα δείγματα (α)  $3,0$  – (β)  $6,0$  – (γ)  $12,0$  – (δ)  $25,0$  – (ε)  $50,0$  – (στ)  $100,0$  – (ζ)  $150,0$  – (η)  $200,0 \mu\text{g mL}^{-1} \text{O}_3$ , που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίστοιχη καμπύλη αναφοράς. Ταχύτητα ροής  $\text{O}_3$ :  $0,25 \text{ L min}^{-1}$ , Χρόνος δειγματοληψίας:  $4 \text{ min}$ , Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών  $0,05 \text{ M pH} = 7,0$ . Ταχύτητα ροής:  $0,31 \text{ mL min}^{-1}$ . Δυναμικό:  $+0,65 \text{ V}$ .

Πρέπει να τονιστεί ότι παρόμοιες καμπύλες αναφοράς λαμβάνονται και κατά τη χρήση προτύπων διαλυμάτων ίδιων συγκεντρώσεων, που έχουν όμως παρασκευαστεί με διαφορετικούς συνδυασμούς των συνθηκών έξοδος οζονιστήρα / ταχύτητα ροής / χρόνος δειγματοληψίας, γεγονός που αποδεικνύει ότι σε αυτή την περιοχή συγκεντρώσεων ο βαθμός μετατροπής του όζοντος παραμένει σταθερός. Αυτό ενισχύεται και από την υψηλή γραμμικότητα που επιτυγχάνεται και επίσης από την απουσία διαφόρων φαινομένων υστέρησης, ειδικότερα στο τμήμα της καμπύλης αναφοράς που περιλαμβάνει τις χαμηλές συγκεντρώσεις όζοντος.

**Πίνακας 2.2:** Συγκενρωτικά στατιστικά στοιχεία των καμπυλών αναφοράς που κατασκευάστηκαν για τον προσδιορισμό του όζοντος.

| Στοιχείο      | Τεχνική εγχύσεων                            | Τεχνική σταθερής κατάστασης                 |
|---------------|---|---|
| Εξίσωση       | $y = (1,42 \pm 0,01) O_3 + (5,66 \pm 0,99)$ | $y = (2,23 \pm 0,01) O_3 + (0,92 \pm 0,78)$ |
| $r^2$ (n = 8) | 0,9998                                      | 0,9998                                      |
| %RSD          | 0,74 <sup>[α]</sup>                         | 0,69 <sup>[β]</sup>                         |
| LOD (S/N=3)   | 2,1 $\mu\text{g mL}^{-1} O_3$               | 1,1 $\mu\text{g mL}^{-1} O_3$               |

<sup>[α]</sup> Υπολογίστηκε για n=8 διαδοχικές εγχύσεις δείγματος 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  όζοντος.

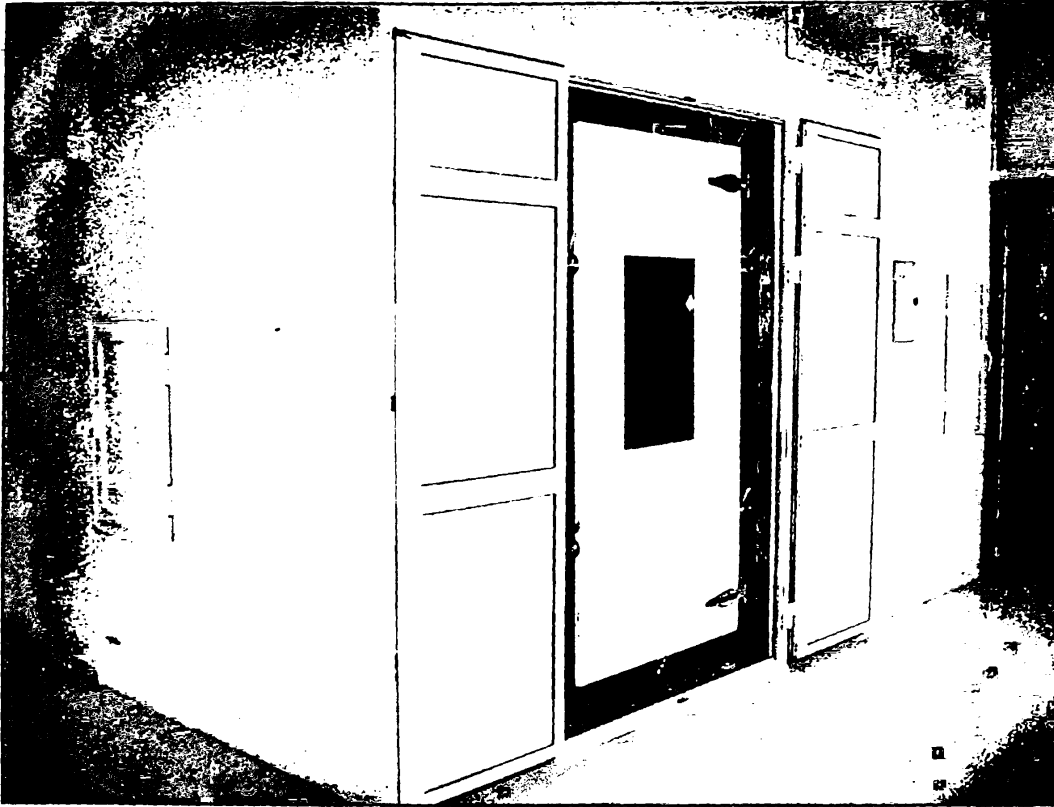
<sup>[β]</sup> Υπολογίστηκε για n=5 διαδοχικές εγχύσεις δείγματος 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  όζοντος.

Με τη βοήθεια των παραπάνω καμπυλών αναφοράς μετρήθηκαν πρότυπα διαλύματα όζοντος και φορμαλδεΰδης συγκεντρώσεων 20, 50 και 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , αντίστοιχα, και υπολογίστηκε από το μέσο όρο των μετρήσεων ότι ο βαθμός μετατροπής του όζοντος ανέρχεται σε ποσοστό  $33 \pm 1\%$ .

#### 2.4.5. Προσδιορισμός όζοντος σε συνθετικά δείγματα

Η προτεινόμενη μέθοδος δοκιμάστηκε για τον προσδιορισμό του όζοντος σε συνθετικά αέρια δείγματα εντός ειδικού θαλάμου όγκου 14,22 m<sup>3</sup> (Εικόνα 2.1). Ο θάλαμος είναι κατασκευασμένος από ανοξείδωτο ατσάλι και εξοπλισμένος με σύστημα εξαερισμού (Εικόνα 2.2A), εσωτερικό ανεμιστήρα με τον οποίο επιτυγχάνεται η καλύτερη ομογενοποίηση του εσωτερικού χώρου και διάφορες βαλβίδες εισόδου/εξόδου (Εικόνα 2.2B) μέσω των οποίων μπορεί να γίνει δειγματοληψία ή εμπλουτισμός στο εσωτερικό του θαλάμου. Η θερμοστάτηση του θαλάμου γίνεται εξωτερικά των τοιχωμάτων του και επιτυγχάνεται με τη βοήθεια μονάδας κλιματισμού.

Ο θάλαμος σφραγίζεται αεροστεγώς και αρχικά γίνεται εγκλιματισμός με διαβίβαση ατμοσφαιρικού αέρα για 2 h. Η παροχή του ατμοσφαιρικού αέρα διακόπτεται και γίνεται εμπλουτισμός του εσωτερικού χώρου με δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις αερίου όζοντος. Ο εσωτερικός αέρας ομογενοποιείται για 15 min και στη συνέχεια λαμβάνεται δείγμα όγκου 51 L το οποίο υποδιαιρείται κατά ίσα μέρη σε δύο κανάλια δειγματοληψίας, για χρόνο 30 min και με ροή 0,85 L min<sup>-1</sup>.



Εικόνα 2.1: Θάλαμος προσομοίωσης περιβαλλοντικών συνθηκών.



Εικόνα 2.2: (A) Σύστημα εξαερισμού, (B) Βαλβίδες δειγματοληψίας.

Το πρώτο κανάλι είναι εφοδιασμένο με τον αντιδραστήρα της ευγενόλης και δεύτερο κανάλι με μία μη-τροποποιημένη φύσιγγα με το υδρόφοβο υλικό C-18, οποίο θα χρησιμεύσει ως τυφλό δείγμα και θα αφαιρεθεί στους υπολογισμούς. δειγματοληψία διεξάγεται έπειτα από κάθε εμπλουτισμό και αμέσως μετά τη διαδικασία της ομογενοποίησης. Τα αέρια δείγματα συλλέγονται με τη βοήθεια μίας αντλίας αναρρόφησης της εταιρίας MCS (model MCS10) σε δύο ευρύλαιμα δοχεία τα οπο

περιέχουν 2,0 mL από το ρυθμιστικό διάλυμα εργασίας. Μετά το τέλος της δειγματοληψίας ο όγκος των συλλεχθέντων δειγμάτων συμπληρώνεται<sup>3</sup> στα 2,0 mL και όγκοι 250  $\mu\text{L}$  εισάγονται στο σύστημα FIA μέσω της βαλβίδας εγχύσεων. Η συγκέντρωση της φορμαλδεϋδης στο τυφλό δείγμα διορθώνεται με το συντελεστή 0,33 και η συγκέντρωση του όζοντος στα υπό ανάλυση δείγματα υπολογίζεται σε  $\mu\text{g m}^{-3}$ .

**Πίνακας 2.3:** Αποτελέσματα μέτρησης όζοντος σε πραγματικά αέρια δείγματα. Συνθήκες δειγματοληψίας: θερμοκρασία: 20 °C, ταχύτητα ροής: 0,85 L min<sup>-1</sup>, χρόνος: 30 min, όγκος συλλέκτη: 2,0 mL.

| Αριθμός δείγματος | Θεωρητικά προβλεπόμενη<br>[O <sub>3</sub> ] / $\mu\text{g m}^{-3}$ | Πειραματικά υπολογιζόμενη<br>[O <sub>3</sub> ] / $\mu\text{g m}^{-3}$ <sup>[α]</sup> $\pm$ SD |
|-------------------|--|---|
| 1                 | 788  | 349 $\pm$ 14  |
| 2                 | 1575   | 480 $\pm$ 12  |

<sup>[α]</sup> Υπολογίστηκε για n=3 διαδοχικές εγχύσεις αγνώστου δείγματος.

Τα αποτελέσματα (Πίνακας 2.3) είναι παρόμοια με εκείνα που ελήφθησαν με το σύστημα μέτρησης της εταιρίας GASTEC και φανερώνουν τη μείωση της συγκέντρωσης του όζοντος με την πάροδο του χρόνου εξαιτίας της διάσπασής του από άλλα σωματίδια που πιθανόν υπάρχουν εντός του θαλάμου.

## 2.5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

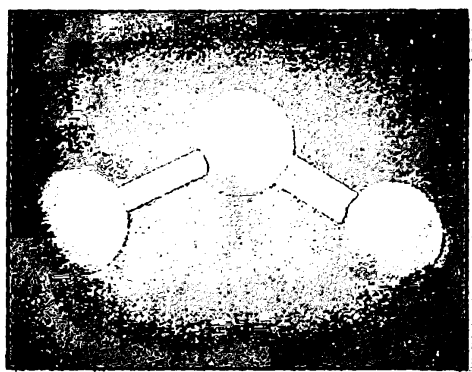
Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα είναι φανερή η δυνατότητα εφαρμογής της προτεινόμενης μεθόδου για τον προσδιορισμό του όζοντος σε συνθετικά αέρια δείγματα. Ο αμπερομετρικός βιοαισθητήρας AOX προσφέρει όλα τα πλεονεκτήματα των βιοαισθητήρων και πληροί όλες τις προϋποθέσεις για τον προσδιορισμό του όζοντος σε χώρους εργασίας και άλλες βιομηχανικές διεργασίες, όπου γίνεται χρήση αερίου όζοντος.

<sup>3</sup> Κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας ο όγκος του ρυθμιστικού διαλύματος συλλογής ελαττώνεται περίπου κατά 0,2 mL.



## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup>



## **"ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ ΥΜΕΝΙΩΝ ΛΙΓΝΙΝΗΣ. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΕΝΟΣ ΕΜΠΕΔΗΣΙΟΜΕΤΡΙΚΟΥ ΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΟΖΟΝΤΟΣ"**

### 3.1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σε αυτό το κεφάλαιο παρουσιάζεται η ανάπτυξη και μελέτη ενός νέου εμπειρομετρικού αισθητήρα για τον προσδιορισμό του όζοντος. Η λειτουργία του αισθητήρα στηρίζεται στη μεταβολή της εμπέδησης, τροποποιημένων με λιγνίνη ηλεκτροδίων υαλώδη άνθρακα, ως αποτέλεσμα της αποικοδόμησης του υμενίου λιγνίνης μετά την εμφύσηση των ηλεκτροδίων σε διάλυμα όζοντος.

Το ηλεκτρόδιο εργασίας αποτελείται από υαλώδη άνθρακα τροποποιημένο με ένα υμένιο λιγνίνης (Lignin Organosolv, LO). Η τροποποίηση των ηλεκτροδίων γίνεται με απόθεση επί της επιφάνειας του ηλεκτροδίου ποσότητας 10  $\mu\text{L}$  διαλύματος 0,3  $\text{mg mL}^{-1}$  LO σε ακετόνη και εξάτμιση του διαλύτη για 12 h. Διάφορες πειραματικές συνθήκες, όπως ο διαλύτης της απόθεσης, η συγκέντρωση της LO, ο όγκος του διαλύματος απόθεσής, το μέσο και ο χρόνος αντίδρασης βελτιστοποιήθηκαν με πειράματα κυκλικής βολταμμετρίας και φασματοσκοπίας ηλεκτροχημικής εμπέδησης. Επίσης, μελετήθηκε η

παρεμποδιστική δράση του οξυγόνου, το οποίο χρησιμοποιείται ως φέρον αέριο του όζοντος. Η αντίδραση διεξάγεται σε 2,5 mL διαλύματος 0,005 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και οι μετρήσεις εμπέδησης έγιναν σε διάλυμα 10 mM K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]/0,5 M KNO<sub>3</sub>, στην περιοχή συχνοτήτων 10<sup>-1</sup> – 10<sup>5</sup> Hz, χρησιμοποιώντας ένα απλό ημιτονικό σήμα τάσης, πλάτους 10 mV (rms) σε συνεχές δυναμικό +200 mV.

Υπό τις βέλτιστες πειραματικές συνθήκες κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς με χρήση προτύπων διαλυμάτων όζοντος, η οποία είναι γραμμική στην περιοχή 50 - 250 μg O<sub>3</sub> και ο αντίστοιχος συντελεστής γραμμικής συσχέτισης είναι  $r^2=0,9994$  (n=5). Η εξίσωση συμμεταβολής της καμπύλης αναφοράς είναι  $A = (0,36 \pm 0,01) B + (-14,15 \pm 1,36)$ , όπου  $A = (\Delta R_{ct}/R_{ct}) \times 100$  και B η ποσότητα του όζοντος σε μg. Η % σχετική τυπική απόκλιση της μεθόδου για πρότυπο δείγμα όζοντος ποσότητας 100,0 μg υπολογίστηκε RSD = 2,1 % (n = 5), το δε όριο ανίχνευσης υπολογίστηκε LOD = 11,3 μg O<sub>3</sub> για λόγο σήματος προς θόρυβο (S/N) 3.

Επίσης, μελετήθηκαν τα παράγωγα του διαλυτού σε αλκάλια κλάσματος της λιγνίνης (Lignin Alkali, LA) με τα οργανικά κατιόντα τετραφαινυλοφωσφόνιο (Tetraphenylphosphonium, TPP) και παπαβερίνη (Papaverine, PAP), ως εν δυνάμει υλικά τροποποίησης της επιφάνειας των ηλεκτροδίων για την ανάπτυξη αισθητήρων προσδιορισμού του όζοντος και κατασκευάστηκαν οι αντίστοιχες καμπύλες αναφοράς.

Τέλος, έγιναν μελέτες προσομοίωσης τού υπό μελέτη ηλεκτροχημικού συστήματος με ένα ισοδύναμο ηλεκτρικό κύκλωμα Randles, R(Q[RW]), χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο Boukamp.

### 3.2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η απαίτηση για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης διαφόρων αερίων στην ατμόσφαιρα καθώς και στα αέρια μίγματα εμφανίζεται πιο επιτακτική από ποτέ. Η ανάγκη αυτή προκύπτει ως αποτέλεσμα της μόλυνσης του περιβάλλοντος από διάφορα τοξικά αέρια αλλά και από την υποβάθμιση πολλές φορές της ποιότητας του αέρα των εσωτερικών χώρων εστίασης και εργασίας. Οι παραπάνω λόγοι σε συνδυασμό με το χαμηλό κόστος και την αυξημένη αξιοπιστία των ηλεκτροχημικών αισθητήρων οδήγησαν στην αλματώδη ανάπτυξη αυτών για τον προσδιορισμό αερίων τα τελευταία 30 χρόνια.





Ιδιαίτερο βάρος έχει δοθεί στην ανάπτυξη και μελέτη αισθητήρων στερεάς κατάστασης (solid state sensors) [Moseley, 1997], κυρίως για τον προσδιορισμό α) του οξυγόνου, π.χ. στις διαδικασίες ανάφλεξης των κινητήρων εσωτερικής καύσης, β) εύφλεκτων αερίων και γ) τοξικών αερίων στον αέρα, όπως π.χ. το όζον.

Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται οι αισθητήρες α) ημιαγωγών οξειδίων μετάλλων και κυρίως των  $\text{SnO}_2$  και  $\text{In}_2\text{O}_3$  [Kang, 1993], β) τύπου FET (Field Effect Transistors) [Eisele, 2001], γ) τύπου SAW (Surface Acoustic Wave) [Stone, 1993] και δ) στερεών ηλεκτρολυτών (solid electrolytes) [Kim, 2000 – Saito, 1984]. Οι παραπάνω αισθητήρες είναι ευρύτατα διαδεδομένοι κυρίως λόγω του χαμηλού κόστους κατασκευής και της σταθερότητας που εμφανίζουν. Σημαντικό μειονέκτημα στην περαιτέρω χρήση τους αποτελούν η μειωμένη εκλεκτικότητα και η υψηλή κατανάλωση ενέργειας που απαιτεί η λειτουργία τους.

Η Φασματοσκοπία Ηλεκτροχημικής Εμπέδησης (ΦΗΕ ή EIS) αποτελεί μία τεχνική για τη μελέτη ηλεκτροχημικών δράσεων, οι οποίες λαμβάνουν χώρα είτε στην κύρια μάζα του ηλεκτρολύτη είτε στη διεπιφάνεια ενός ηλεκτροδίου και του ηλεκτρολύτη, ο οποίος βρίσκεται σε επαφή με αυτό [McDonald, 1987]. Έχει, επίσης, χρησιμοποιηθεί ευρύτατα ως αναλυτική τεχνική για τη μέτρηση και συσχέτιση των μεταβολών ηλεκτρικών μεγεθών διαφόρων αισθητήρων, ως προς τη μεταβολή της συγκέντρωσης ενός αναλύτη. Θα πρέπει ακόμα να αναφερθεί ότι η EIS έχει βρει εκτεταμένη εφαρμογή στη ανάπτυξη και μελέτη βολταμμετρικών αισθητήρων, οι οποίοι σχετίζονται με φαινόμενα αποικοδόμησης πολυμερικών επικαλύψεων, οι οποίες έχουν αναπτυχθεί πάνω στην επιφάνεια στερεών ηλεκτροδίων. Οι εφαρμογές αυτού του είδους των αισθητήρων αφορούν στην ανίχνευση χημικών ουσιών, αερίων [Ishihara, 1998], βιομορίων ή στη μελέτη αλληλεπιδράσεων μεταξύ βιομορίων (π.χ. Αντιγόνο-Αντίσωμα, DNA) [Sánchez, 2005].

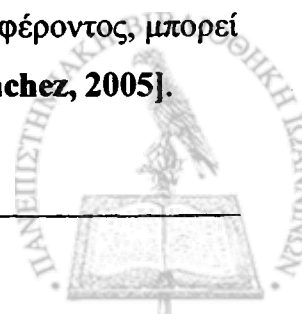
Για την κατασκευή εμπεδησιομετρικών αισθητήρων με σκοπό την ανίχνευση αερίων χρησιμοποιούνται διάφοροι τύποι ηλεκτροδίων, όπως άνθρακας, λευκόχρυσος (Pt), χρυσός (Au) είτε μεμονωμένα είτε σε πολυηλεκτροδιακές συστοιχίες (multiarray ή interdigitated electrodes) [White, 1997]. Οι τεχνικές κατασκευής διαφέρουν και περιλαμβάνουν την τροποποίηση της επιφάνειας των αισθητήρων με οξείδια μετάλλων [Martinielli, 1995 – Huusko, 1993 – Huyberegts, 1994 – Frantzen, 2004].

πολυμερικές επικαλύψεις [Adhikari, 2004 – Janata, 2003 – Amrani, 1995 – Polk, 1999 – Musio, 1995] και ζεόλιθους [Kurzweil, 1995].

Για την ανίχνευση του όζοντος η πλειοψηφία των αισθητήρων στερεάς κατάστασης βασίζεται στις ημιαγωγικές ιδιότητες των οξειδίων των μετάλλων και κυρίως του ινδίου (In) ή μιγμάτων αυτού με άλλα μέταλλα όπως ο ψευδάργυρος (Zn), το μολυβδαίνιο (Mo), το μαγνήσιο (Mg) και το βολφράμιο (W) [Kim, 2000 – Takada, 1993 – Doll, 1998 – Gurlo, 1998 – Miyata, 2000 – Ivanovskaya, 2001 – Gutman, 1995 – Labidi, 2005]. Άλλες προσεγγίσεις στηρίζονται στους αισθητήρες τύπου FET [Eisele, 2001] και στους ηλεκτρολύτες στερεάς κατάστασης [Xie, 1998 – Huang, 1997].

Όλες οι προαναφερθείσες μέθοδοι έχουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Στην περίπτωση των αισθητήρων ημιαγωγών οξειδίων μετάλλων και τύπου FET, σημαντικό μειονέκτημα είναι η κατανάλωση ενέργειας, λόγω των υψηλών θερμοκρασιών (άνω των 300 °C) που απαιτούνται για τη λειτουργία τους. Τέλος σημαντικό μειονέκτημα θεωρείται και η έλλειψη εκλεκτικότητας, καθώς στις περισσότερες περιπτώσεις γίνεται προσδιορισμός συνολικά των οξειδωτικών παραγόντων ή ο αισθητήρας αποκρίνεται και σε άλλα αέρια πέραν του όζοντος.

Από την άλλη πλευρά οι εμπεδησιομετρικοί αισθητήρες, η αρχή λειτουργίας των οποίων συνίσταται στην αποικοδόμηση πολυμερικών επικαλύψεων, έχει κερδίσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας τα τελευταία χρόνια. Πάνω σε αυτή τη φιλοσοφία έχουν αναπτυχθεί ανοσοαισθητήρες για την ανίχνευση καρκινικών δεικτών του προστάτη (PSA), που στηρίζονται στην υδρολυτική διάσπαση πολυμερούς νιτροκυτταρίνης λόγω αύξησης του pH που προκαλεί η υδρόλυση της ουρίας παρουσία του ενζύμου της ουρεάσης [Ho, 1999 – McNeil, 1995 – Sánchez, 2004] και αισθητήρες ανίχνευσης πρωτεολυτικών ενζύμων. Στις περιπτώσεις αυτές το ένζυμο αποικοδομεί το υμένιο (αμίδιο πολεστέρα ή δεξτράνη ή ζελατίνη) με το οποίο είναι επικαλυμμένο το ηλεκτρόδιο εργασίας, προκαλώντας μεταβολή στην εμπέδηση του συστήματος [Saum, 1998, 2000 – Sabot, 2002]. Περισσότερες πληροφορίες σχετικά με την ανάπτυξη αισθητήρων, που βασίζονται στην αποικοδόμηση πολυμερικών επικαλύψεων, για την ανίχνευση διαφόρων αναλυτών περιβαλλοντικού και βιολογικού ενδιαφέροντος, μπορεί κανείς να αντλήσει από το άρθρο ανασκόπησης των Sánchez et al [Sánchez, 2005].

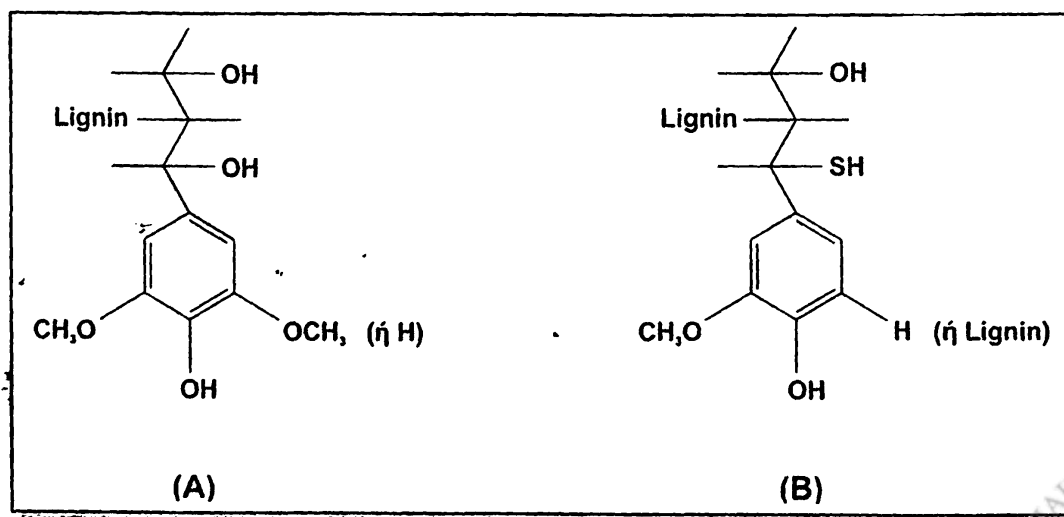


Πάνω σε αυτή τη φιλοσοφία αισθητήρων, παρουσιάζεται η ανάπτυξη και μελέτη ενός εμπέδησιμετρικού αισθητήρα όζοντος. Η λειτουργία του αισθητήρα στηρίζεται στη μεταβολή της εμπέδησης, τροποποιημένων με λιγνίνη ηλεκτροδίων υαλώδη άνθρακα, ως αποτέλεσμα της αποικοδόμησης του υμενίου λιγνίνης μετά την εμφάνιση των ηλεκτροδίων σε διάλυμα όζοντος. Η αντίδραση διεξάγεται σε 2,5 mL διαλύματος 0,005 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και οι μετρήσεις εμπέδησης γίνονται σε διάλυμα 10 mM K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]/0,5 M KNO<sub>3</sub>, στην περιοχή συχνοτήτων 10<sup>-1</sup> – 10<sup>5</sup> Hz, χρησιμοποιώντας ένα απλό ημιτονικό σήμα τάσης, πλάτους 10 mV (rms) σε συνεχές δυναμικό +200 mV. Λεπτομέρειες σχετικά με τη βελτιστοποίηση των πειραματικών συνθηκών, τη λειτουργικότητα του αισθητήρα και τις πιθανές παρεμποδίσεις πραγματεύονται παρακάτω.

### 3.3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

#### 3.3.1. Αντιδραστήρια

Η Lignin Organosolv (LO) (Σχήμα 3.1A) και η Lignin Alkali (LA) (Σχήμα 3.1B) ήταν προϊόντα της εταιρίας Aldrich (Gillingham, UK). Το χλωριούχο άλας του τετραφαινυλοφωσφονίου (tetraphenylphosphonium chloride) και η παπαβερίνη (papaverine) προμηθεύτηκαν από την εταιρία Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany), ενώ το σιδηρικούανιούχο κάλιο ήταν προϊόν της εταιρίας Merck (Darmstadt, Germany).



Σχήμα 3.1: Συντακτικοί τύποι των δομικών μονάδων (A) της LO και (B) της LA.

Όλα τα προϊόντα ήταν αναλυτικής καθαρότητας και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω επεξεργασία ή καθαρισμό. Τέλος σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε δις-απεσταγμένο ύδωρ.

### 3.3.2. Αρχή της μεθόδου

Η αρχή λειτουργίας του αισθητήρα βασίζεται στην αποικοδόμηση του υμενίου της λιγνίνης, με το οποίο είναι τροποποιημένη η επιφάνεια του ηλεκτροδίου, έπειτα από την αντίδραση με το όζον. Το μετρούμενο σήμα είναι η μεταβολή της αντίστασης μεταφοράς φορτίου  $R_{ct}$  (το πραγματικό μέρος της εμπέδησης) στην περιοχή χαμηλών συχνοτήτων, όπως αυτό προκύπτει από την αύξηση του συντελεστή διάχυσης του οξειδοαναγωγικού ζεύγους (σιδηρικού ανιούχο ιόν), που υπάρχει στην ηλεκτροχημική κυψελίδα, λόγω της αποικοδόμησης της λιγνίνης από το όζον.

### 3.3.3. Κατασκευή των αισθητήρων

**Ηλεκτρόδια υαλώδους άνθρακα (Glassy Carbon, GC):** Ο καθαρισμός της επιφάνειας των ηλεκτροδίων GC γίνεται με λειοτρίβησή τους σε έφυγρη πάστα αλουμίνας (μέγεθος κόκκων 0,01  $\mu\text{m}$ ) για 2 min με συνεχείς κυκλικές κινήσεις, εμβάπτιση σε λουτρό υπερήχων για 1 min, ξέπλυμα με άφθονο δις-απεσταγμένο ύδωρ και τελικά ξήρανση σε ρεύμα Ar. Η τροποποίηση γίνεται με τη μέθοδο εναπόθεσης σταγόνας (dropping evaporation) κατά την οποία ποσότητα 10  $\mu\text{L}$  ή 20  $\mu\text{L}$  ( $2 \times 10 \mu\text{L}$ ) από το διάλυμα απόθεσης LO ή LATPP ή LAPAP, αποτίθεται επί της επιφάνειας του ηλεκτροδίου και αφήνεται περίπου 12 h (overnight) σε ανοικτή ατμόσφαιρα, μέχρι την πλήρη εξάτμιση του διαλύτη. Τέλος, οι τροποποιημένες επιφάνειες εκπλένονται καλά με δις-απεσταγμένο ύδωρ, για να απομακρυνθούν μόρια ουσίας που δεν έχουν ακινητοποιηθεί στην επιφάνεια των ηλεκτροδίων.

**Ηλεκτρόδια χρυσού (Au):** Ο καθαρισμός της επιφάνειας των ηλεκτροδίων Au γίνεται με λειοτρίβησή τους σε έφυγρη πάστα αλουμίνας (μέγεθος κόκκων 0,01  $\mu\text{m}$ ) για 2 min, εμβάπτιση σε λουτρό υπερήχων για 1 min και τελικά ξέπλυμα με άφθονο δις-απεσταγμένο ύδωρ. Στη συνέχεια εμβαπτίζονται σε μίγμα  $\text{H}_2\text{O}/\pi. \text{H}_2\text{SO}_4/35\% \text{H}_2\text{O}_2 = 5:1:1$  για 5 min, εκπλένονται με άφθονο δις-απεσταγμένο ύδωρ, στεγνώνουν σε ρεύμα

Ag και φυλάσσονται εντός ξηραντήρα. Η τροποποίησή τους γίνεται με απόθεση ποσότητας 2x5 ή 3x5  $\mu\text{L}$  από διάλυμα LO σε ακετόνη, εξάτμιση του διαλύτη για 12 h και έκπλυση με άφθονο δις-απεσταγμένο ύδωρ.

**Ηλεκτρόδια γραφίτη φασματοσκοπικής καθαρότητας (Graphite, GR):** Προ της τροποποίησης, οι ράβδοι γραφίτη υποβάλλονται σε κατεργασία λείανσης της επιφάνειάς τους, που έχει ως στόχο τον καθαρισμό και την ανανέωση της. Τα ηλεκτρόδια εισάγονται σε θήκες από Teflon κατά τέτοιο τρόπο ώστε να μένει εκτεθειμένη μόνο η ενεργός επιφάνειά τους και λειαινούνται σε έφυγρα χαρτιά ανθρακοπυριτίου κοκκομετρικής διάστασης (grit) 1000 με συνεχείς κυκλικές κινήσεις. Στη συνέχεια, εκπλένονται με άφθονο δις-απεσταγμένο ύδωρ, έτσι ώστε να απομακρυνθούν διάφορα μικρά σωματίδια από την επιφάνεια και ακολουθεί ξήρανση σε πυριαντήριο σε θερμοκρασία 60 °C για 30 min. Τέλος εισάγονται σε φούρνο σε θερμοκρασία 700 °C για 90 s, προκειμένου να απομακρυνθούν διάφορες ουσίες από την επιφάνειά τους και φυλάσσονται εντός ξηραντήρα. Για να αποφύγουμε την ηλεκτρική επαφή των πλευρικών κυλινδρικών επιφανειών του ηλεκτροδίου με το διάλυμα του ηλεκτρολύτη και για να εξασφαλίσουμε σταθερή ενεργό επιφάνεια, οι πλευρές του ηλεκτροδίου καλύπτονται με παραφίλμ. Στη συνέχεια γίνεται απόθεση ποσότητας 1x10 ή 1x20  $\mu\text{L}$  από διάλυμα LO σε ακετόνη και αφήνονται στον αέρα για 1 h μέχρι την πλήρη εξάτμιση του διαλύτη.

**Αλληλοεμπλεκόμενα κτενοειδή ηλεκτρόδια χρυσού (Interdigitated Gold Electrodes, IDEs-Au):** Προ της τροποποίησης τα ηλεκτρόδια καθαρίζονται με εμβάπτιση σε μίγμα  $\text{H}_2\text{O}/\pi. \text{H}_2\text{SO}_4/35\% \text{H}_2\text{O}_2 = 5:1:1$  για 5 min. Στη συνέχεια εκπλένονται με άφθονο δις-απεσταγμένο ύδωρ, στεγνώνουν σε ρεύμα Ag και φυλάσσονται εντός ξηραντήρα. Τέλος, γίνεται απόθεση ποσότητας 1x10 ή 1x20  $\mu\text{L}$  από διάλυμα LO σε ακετόνη και αφήνονται στον αέρα για 1 h μέχρι την πλήρη εξάτμιση του διαλύτη.

**Γενική Παρατήρηση:** Τα ηλεκτρόδια πριν από τη χρήση τους, εμβαπτίζονται σε διάλυμα 0,005 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  για 30 min. Επίσης, καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων και όταν δε χρησιμοποιούνται βρίσκονται εμβαπτισμένα εντός του διαλύματος 0,005 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , έτσι ώστε να αποφευχθεί η συρρίκνωση των υμενίων, η οποία προκαλεί ολίσθηση στο καταγραφόμενο σήμα.



### 3.3.4. Πειραματική διάταξη

Η μετρητική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα φασματοσκοπίας ηλεκτροχημικής εμπέδησης και κυκλική βολταμμετρίας, είναι το Autolab της εταιρίας Eco Chemie BV (Utrecht, The Netherlands), που αποτελείται από τον ποτενσιοστάτη PGSTAT12 εξοπλισμένο με κάρτα αναλυτή απόκρισης συχνότητας FRA2 (Frequency Response Analyzer). Το όλο σύστημα συνδέεται με ηλεκτρονικό υπολογιστή (IBM compatible) ενώ η συλλογή, καταγραφή και επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων γίνεται μέσω ειδικού λογισμικού της εταιρίας Eco Chemie με την ονομασία «GPES - FRA version 4.9». Με το ίδιο λογισμικό έγινε και η προσομοίωση των δεδομένων του υπό μελέτη συστήματος, χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο Boukamp [Boukamp, 1986].

Οι μετρήσεις έγιναν εντός ηλεκτροχημικής κυψελίδας τριών ηλεκτροδίων (VC2, BAS, IN). Ως ηλεκτρόδια εργασίας χρησιμοποιήθηκαν οι διάφοροι τύποι ηλεκτροδίων που προαναφέρθηκαν, όπως GC (IJ Cambria), Au (EasyCon), GR (Ringsdorff-Werke) και IDEs-Au (GWENT). Ένα ηλεκτρόδιο Ag/AgCl/KCl 3 M (IJ Cambria) και ένα σύρμα Pt (BAS, IN), χρησιμοποιήθηκαν ως ηλεκτρόδιο αναφοράς και αντισταθμιστικό ηλεκτρόδιο, αντίστοιχα.

Η παραγωγή του όζοντος έγινε με τη βοήθεια του οζονιστήρα Medozons BM01 (Medozons Ltd., Russia), χρησιμοποιώντας ως τροφοδοσία καθαρό οξυγόνο 99,99%.

### 3.3.5. Πορεία εργασίας

Η αντίδραση των υμενίων λιγνίνης με το όζον έγινε σε διάλυμα 0,005 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Τα τροποποιημένα ηλεκτρόδια εμβαπτίζονται σε όγκο 2,5 mL από το παραπάνω διάλυμα εντός του οποίου διαβιβάζεται αέριο όζον διαφόρων συγκεντρώσεων (ρυθμίζοντας κατάλληλα την έξοδο του οζονιστήρα) με ροή 0,25 L min<sup>-1</sup>. Τα πειράματα κυκλικής βολταμμετρίας διεξήχθησαν στην περιοχή δυναμικών από -0,1 μέχρι +0,6 V με ταχύτητα σάρωσης 50 mV s<sup>-1</sup>. Οι μετρήσεις φασματοσκοπίας εμπέδησης πραγματοποιήθηκαν σε ένα εύρος συχνοτήτων 10<sup>-1</sup> – 10<sup>5</sup> Hz, χρησιμοποιώντας μία ημιτονική διατάραξη με τιμή τάσης (rms) 10 mV και εφαρμόζοντας μία συνεχή διαφορά δυναμικού +200 mV. Τόσο τα πειράματα κυκλικής βολταμμετρίας όσο και οι

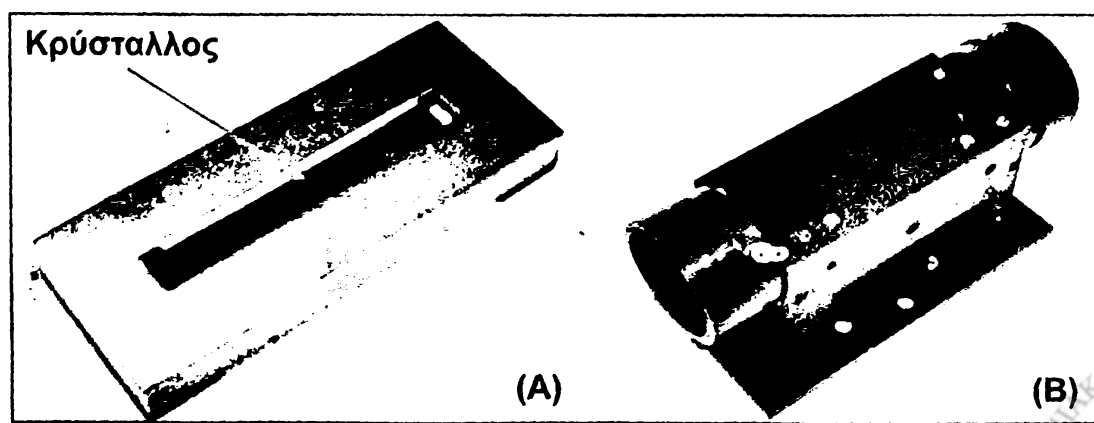
μετρήσεις ηλεκτροχημικής εμπέδησης έγιναν εντός διαλύματος 10 mM  $K_3[Fe(CN)_6]/0,5$  M  $KNO_3$ . Όλες οι τιμές δυναμικών αναφέρονται ως προς ηλεκτρόδιο αναφοράς  $Ag/AgCl/KCl$  3 M.

Οι εικόνες Ηλεκτρονιακής Μικροσκοπίας Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM) πάρθηκαν με ένα μικροσκόπιο σάρωσης ηλεκτρονίων JEOL JSM-5600. Τα φάσματα HATR-FTIR (Horizontal Attenuated Total Reflectance, οριζοντίως ενισχυόμενη συνολική ανάκλαση) καταγράφηκαν με τη βοήθεια ενός φασματοφωτομέτρου της εταιρίας Perkin Elmer.

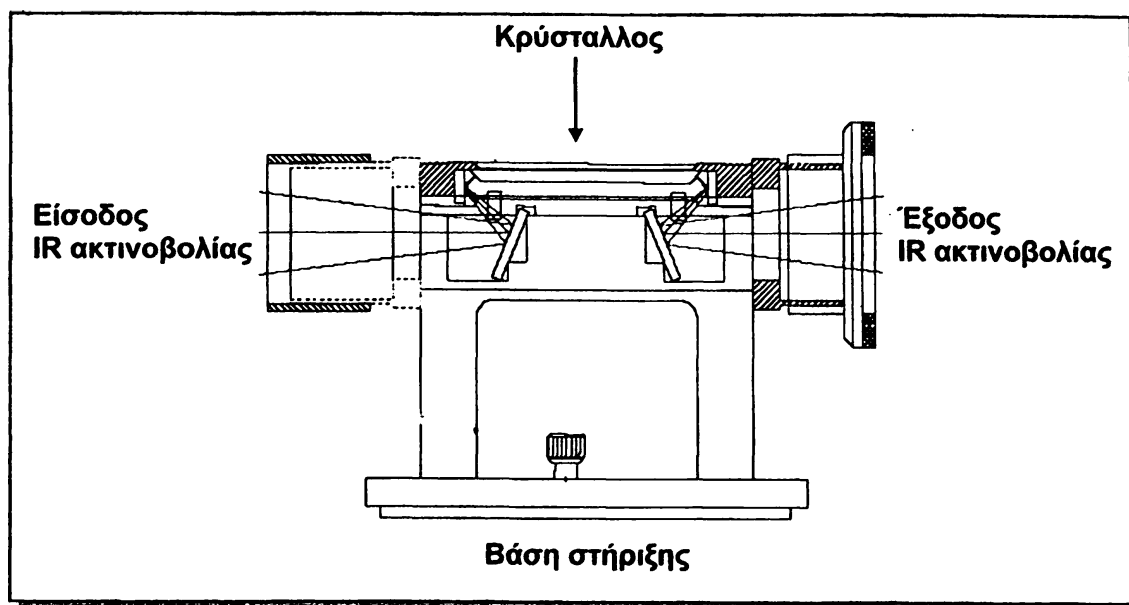
### 3.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

#### 3.4.1. Μελέτη της οξονόλυσης της LO με φασματοσκοπία HATR-FTIR και SEM

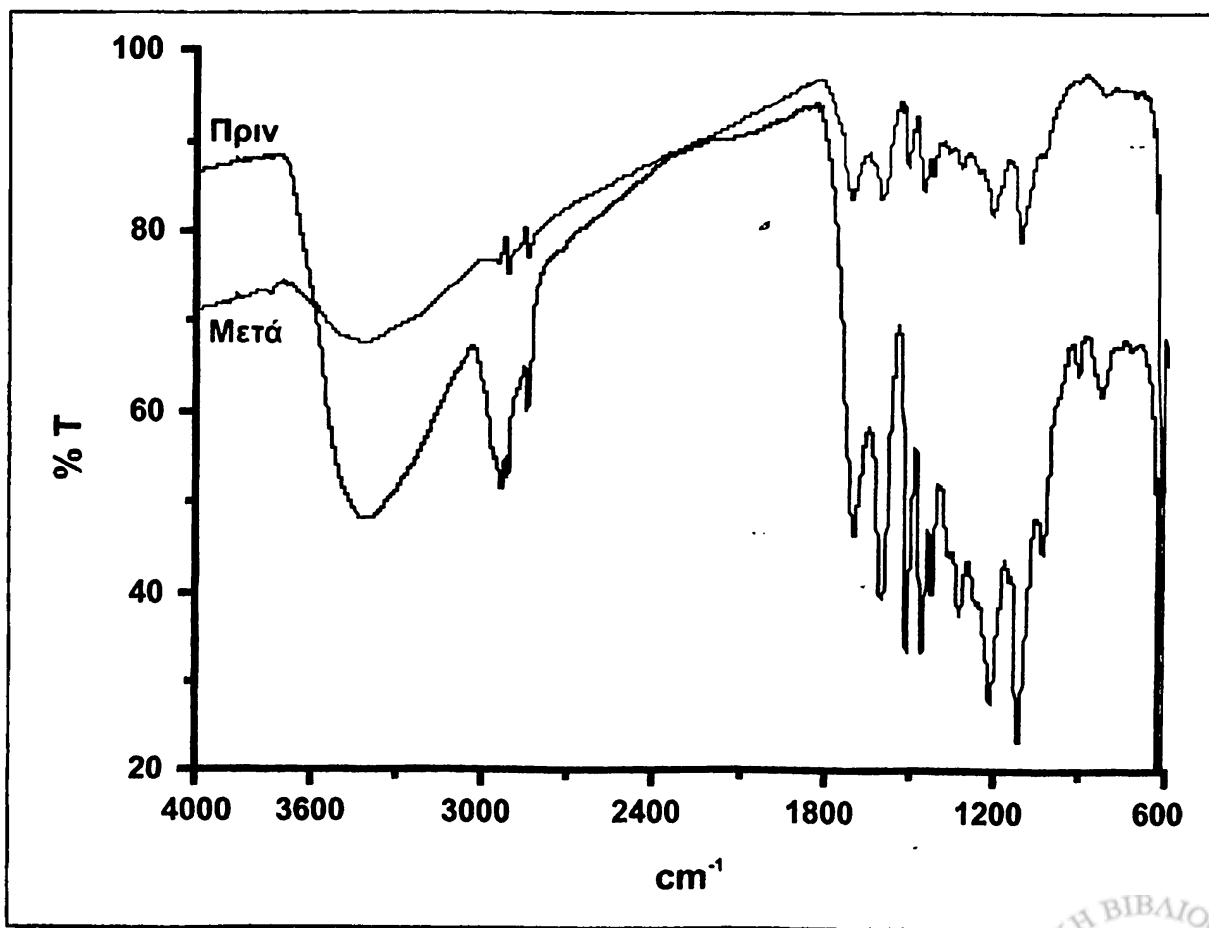
Η αντίδραση του όζοντος με την LO μελετήθηκε με φασματοσκοπία HATR-FTIR. Το δείγμα αποτίθεται υπό τη μορφή ακετονικού διαλύματος επί ενός ειδικού δειγματοφορέα που φέρει έναν κρύσταλλο φτιαγμένο από ZnSe ή Ge (**Εικόνα 3.1A**) και αφήνεται για 2 h έτσι ώστε να εξατμιστεί πλήρως ο διαλύτης, οπότε το δείγμα τελικά μετρείται υπό τη μορφή υμενίου. Στη συνέχεια ο δειγματοφορέας εμβαπτίζεται ανεστραμμένος εντός διαλύματος 0,005 M  $H_2SO_4$ , στο οποίο διαβιβάζεται 1 mg όζον με ροή  $0,25$  L  $min^{-1}$  για χρόνο 4 min. Μετά το πέρας της αντίδρασης, ο δειγματοφορέας ξηραίνεται με  $Ar$  και καταγράφεται εκ νέου το φάσμα του υμενίου. Κατά τη διάρκεια των μετρήσεων, ο δειγματοφορέας τοποθετείται πάνω σε μία ειδική βάση (**Εικόνα 3.1B**), η οποία τον ευθυγραμμίζει με την ακτίνα του φασματοφωτομέτρου.



**Εικόνα 3.1:** (A) Δειγματοφορέας και (B) βάση στήριξης φασματοφωτομέτρου.



Σχήμα 3.2: Μέθοδος λήψης φασμάτων με φασματοσκοπία HATR-FTIR.



Σχήμα 3.3: Φάσματα HATR-FTIR του υμενίου LO πριν και μετά την οζονόλυση.

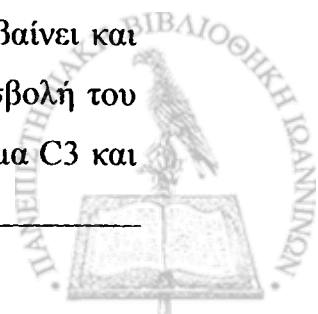


Η φασματοσκοπία NATR-FTIR στηρίζεται στη διαφορά των δεικτών διάθλασης ανάμεσα στον κρύσταλλο, ο οποίος έχει σχετικά υψηλό δείκτη διάθλασης, και στο δείγμα. Η υπέρυθη ακτινοβολία ανακλάται στην εσωτερική επιφάνεια του κρυστάλλου και προκαλεί την εμφάνιση ενός παροδικού κύματος (evanescent wave) κάθετα προς το δείγμα. Ένα μέρος της ενέργειας αυτού του κύματος απορροφάται από το δείγμα και το υπόλοιπο υπό συνεχείς ανακλάσεις πηγαίνει προς τον ανιχνευτή και καταγράφεται το φάσμα υπέρυθρου της ουσίας (Σχήμα 3.2).

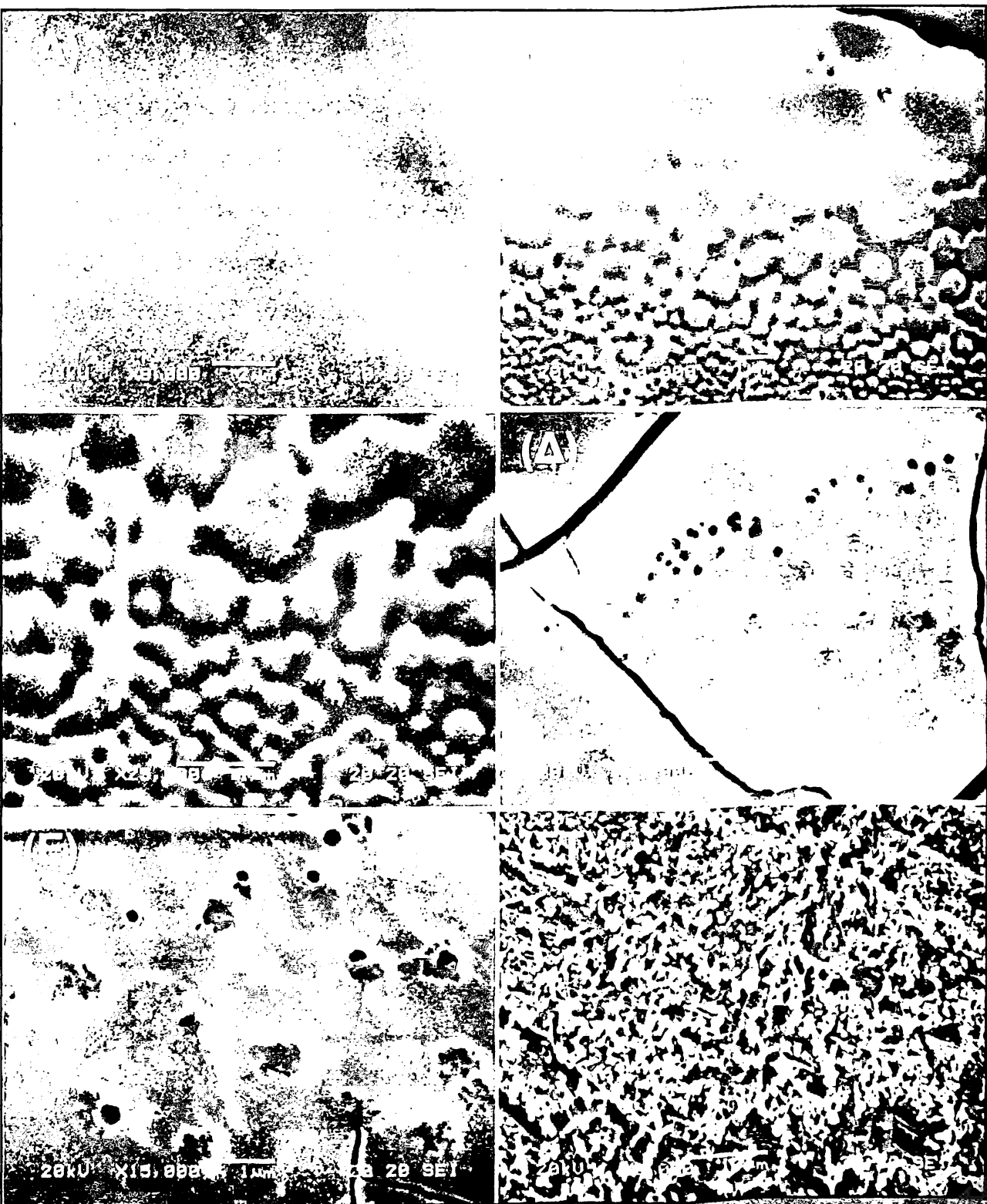
Σύμφωνα με την προαναφερθείσα μεθοδολογία ελήφθησαν τα φάσματα FTIR για το υμένιο της LO πριν και μετά την οζονόλυση (Σχήμα 3.3). Από τη σύγκριση των δύο φασμάτων προκύπτει ότι υπάρχει εξαφάνιση ή/και σημαντική μείωση στην ένταση των κορυφών, που αντιστοιχούν σε δονήσεις τάσεως δεσμών χαρακτηριστικών ομάδων της λιγνίνης, όπως C-H (2938, 2918, 2848  $\text{cm}^{-1}$ , μη αρωματικός), C=O (1701  $\text{cm}^{-1}$ ), C=C (2848, 1516  $\text{cm}^{-1}$ , αρωματικός), δεσμοί υδρογόνου ή O-H (3450 – 3420  $\text{cm}^{-1}$ ) και C-H (828  $\text{cm}^{-1}$ , αρωματικός) [Nada, 1998 – Hergert, 1953, 1960]. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει την αποικοδόμηση του υμενίου της λιγνίνης από το όζον, φαινόμενο στο οποίο στηρίζεται η λειτουργία του προτεινόμενου αισθητήρα.

Η αντίδραση της λιγνίνης με το όζον μελετήθηκε, επίσης, και με Ηλεκτρονιακή Μικροσκοπία Σάρωσης. Στην Εικόνα 3.2 φαίνονται διάφορα στάδια της αντίδρασης, όπου το αρχικά συμπαγές υμένιο (Εικόνα 3.2Α) αρχίζει να αποικοδομείται δημιουργώντας ρήγματα (Εικόνα 3.2Β, Γ) και οπές (Εικόνα 3.2Δ, Ε) μέχρι την τελική του καταστροφή (Εικόνα 3.2ΣΤ) από την επίδραση του όζοντος.

Οι μεταβολές που παρατηρούνται στη φύση του υμενίου μπορούν να περιγραφούν από έναν προτεινόμενο μηχανισμό (Σχήμα 3.4), σύμφωνα με τον οποίο το μόριο της λιγνίνης υφίσταται μία πλειάδα αντιδράσεων. Μία από τις αντιδράσεις αυτές περιλαμβάνει την προσβολή του αρωματικού δακτυλίου με αποτέλεσμα αυτός να διασπάται και να προκύπτουν διαλυτά παράγωγα του μουκονικού (βλεννικού οξέος) (Σχήμα 3.4, Πορεία Α). Αν και ο μηχανισμός της οζονόλυσης των αρωματικών υδρογονανθράκων δεν είναι πλήρως διευκρινισμένος πιστεύεται ότι η διάνοιξη του αρωματικού δακτυλίου λαμβάνει χώρα μέσω ενός μηχανισμού 1,3-κυκλοπροσθήκης και το σχηματισμό ενός ενδιάμεσου ασταθούς οξονιδίου, όπως ακριβώς συμβαίνει και με τις ολεφίνες [Huisgen, 1963 – Criegge, 1975 – Lattimer, 1974]. Η προσβολή του αρωματικού δακτυλίου από το όζον ευνοείται περισσότερο ανάμεσα στα άτομα C3 και



, τα οποία φέρουν υποκαταστάτες που δρουν ως δότες ηλεκτρονίων. Η συνεχής δράση του όζοντος έχει ως αποτέλεσμα την περαιτέρω διάσπαση των υπολειμμάτων νίνης και των μουκονικών παραγώγων. Ένας άλλος τύπος αντίδρασης (Σχήμα 3.4, Φορέα Β) περιλαμβάνει την αντικατάσταση μεθοξυ- και υδροξυ- ομάδων του οματικού δακτυλίου από κινονοειδή άτομα οξυγόνου.



Εικόνα 3.2: Εικόνες SEM όπου φαίνονται τα διάφορα στάδια αποικοδόμησης του ενίου της LO, έπειτα από την αντίδραση με το όζον.

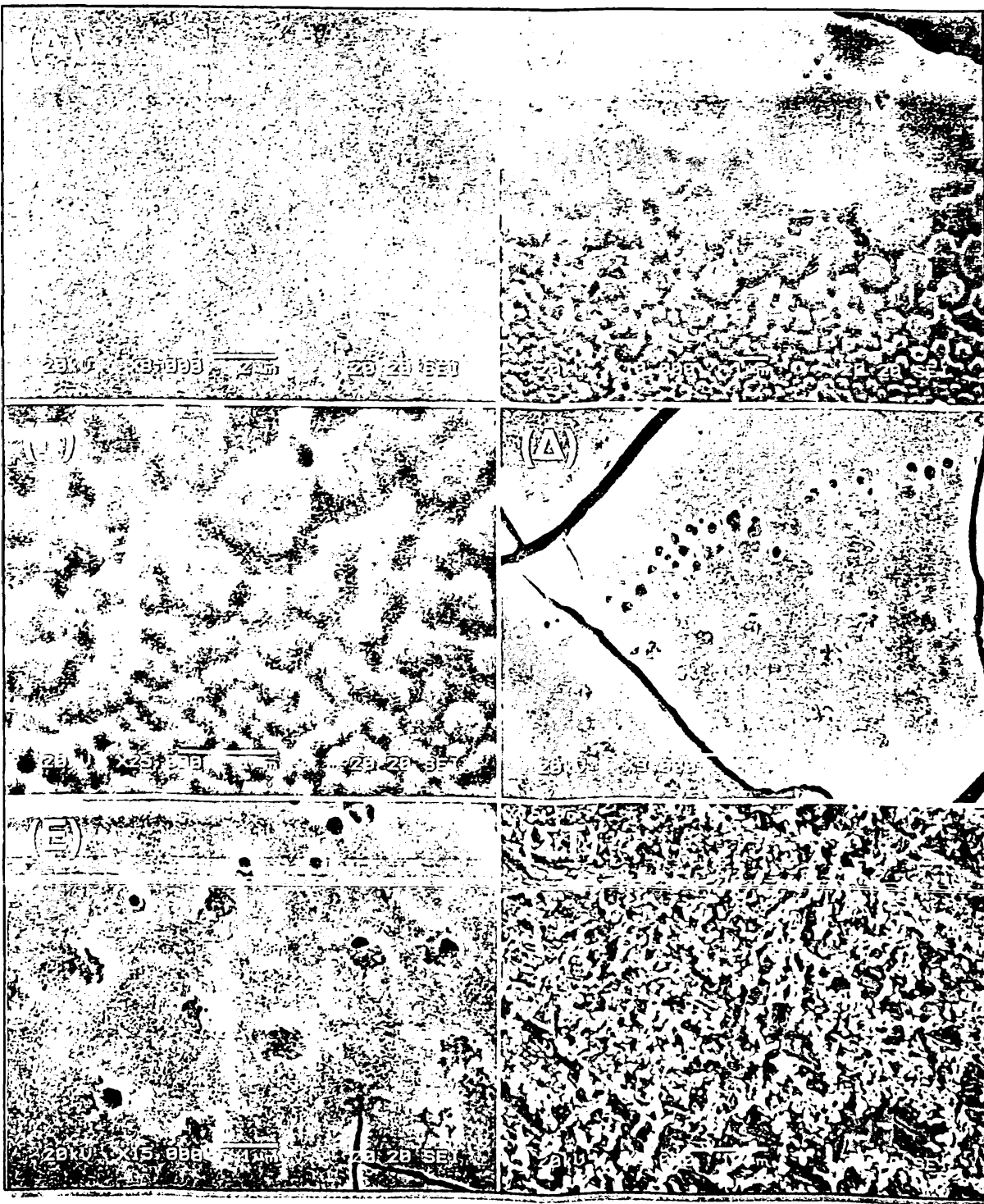
Η φασματοσκοπία HATR-FTIR στηρίζεται στη διαφορά των δεικτών διάθλασης ανάμεσα στον κρύσταλλο, ο οποίος έχει σχετικά υψηλό δείκτη διάθλασης, και στο δείγμα. Η υπέρυθρη ακτινοβολία ανακλάται στην εσωτερική επιφάνεια του κρυστάλλου και προκαλεί την εμφάνιση ενός παροδικού κύματος (evanescent wave) κάθετα προς το δείγμα. Ένα μέρος της ενέργειας αυτού του κύματος απορροφάται από το δείγμα και το υπόλοιπο υπό συνεχείς ανακλάσεις πηγαίνει προς τον ανιχνευτή και καταγράφεται το φάσμα υπέρυθρου της ουσίας (**Σχήμα 3.2**).

Σύμφωνα με την προαναφερθείσα μεθοδολογία ελήφθησαν τα φάσματα FTIR για το υμένιο της LO πριν και μετά την οζονόλυση (**Σχήμα 3.3**). Από τη σύγκριση των δύο φασμάτων προκύπτει ότι υπάρχει εξαφάνιση ή/και σημαντική μείωση στην ένταση των κορυφών, που αντιστοιχούν σε δονήσεις τάσεως δεσμών χαρακτηριστικών ομάδων της λιγνίνης, όπως C-H (2938, 2918, 2848  $\text{cm}^{-1}$ , μη αρωματικός), C=O (1701  $\text{cm}^{-1}$ ), C=C (2848, 1516  $\text{cm}^{-1}$ , αρωματικός), δεσμοί υδρογόνου ή O-H (3450 – 3420  $\text{cm}^{-1}$ ) και C-H (828  $\text{cm}^{-1}$ , αρωματικός) [Nada, 1998 – Hergert, 1953, 1960]. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει την αποικοδόμηση του υμενίου της λιγνίνης από το όζον, φαινόμενο στο οποίο στηρίζεται η λειτουργία του προτεινόμενου αισθητήρα.

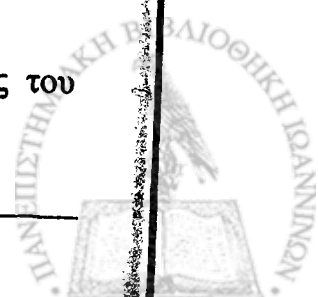
Η αντίδραση της λιγνίνης με το όζον μελετήθηκε, επίσης, και με Ηλεκτρονιακή Μικροσκοπία Σάρωσης. Στην **Εικόνα 3.2** φαίνονται διάφορα στάδια της αντίδρασης, όπου το αρχικά συμπαγές υμένιο (**Εικόνα 3.2A**) αρχίζει να αποικοδομείται δημιουργώντας ρήγματα (**Εικόνα 3.2B, Γ**) και οπές (**Εικόνα 3.2Δ, E**) μέχρι την τελική του καταστροφή (**Εικόνα 3.2ΣΤ**) από την επίδραση του όζοντος.

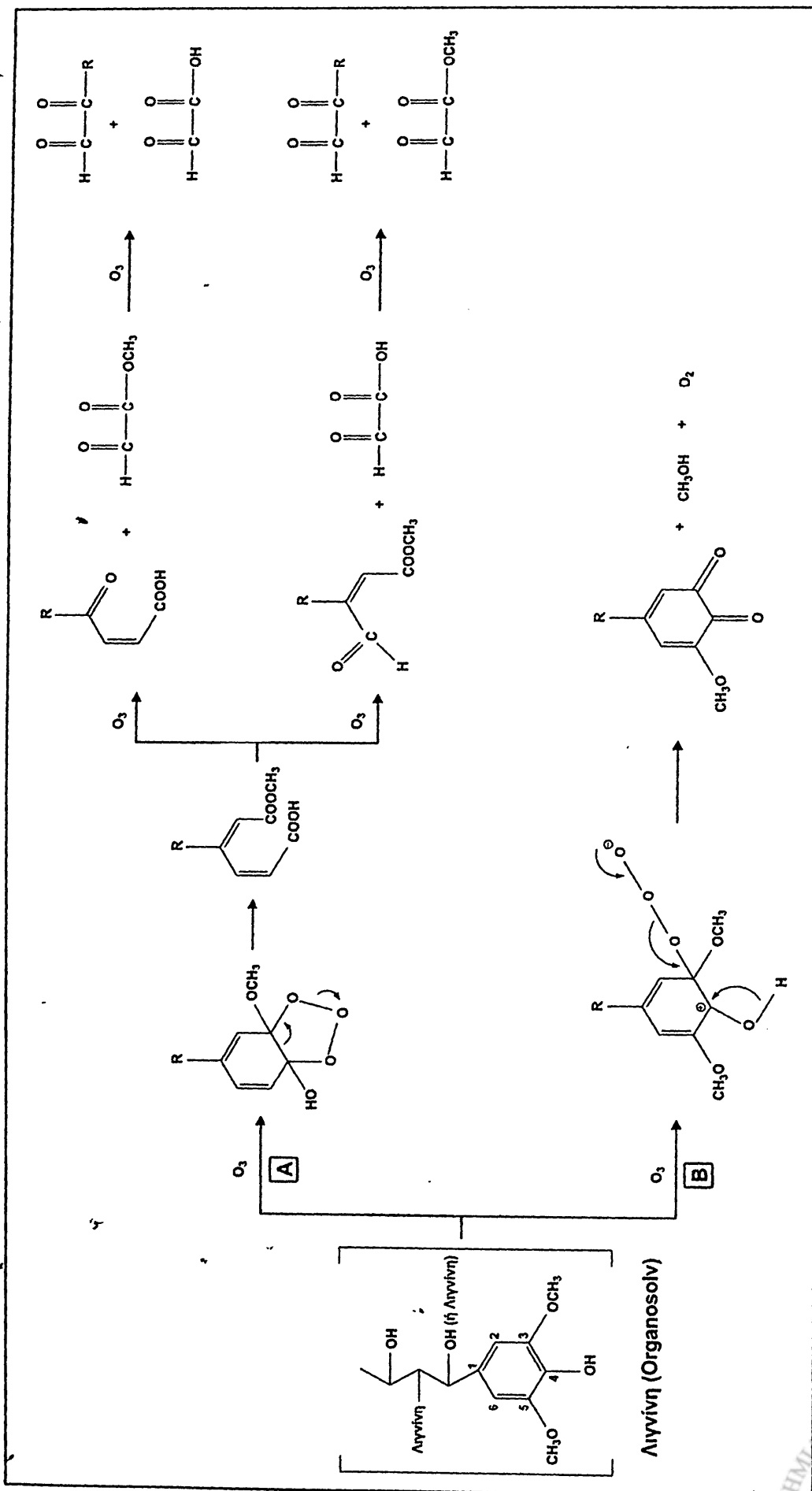
Οι μεταβολές που παρατηρούνται στη φύση του υμενίου μπορούν να περιγραφούν από έναν προτεινόμενο μηχανισμό (**Σχήμα 3.4**), σύμφωνα με τον οποίο το μόριο της λιγνίνης υφίσταται μία πλειάδα αντιδράσεων. Μία από τις αντιδράσεις αυτές περιλαμβάνει την προσβολή του αρωματικού δακτυλίου με αποτέλεσμα αυτός να διασπάται και να προκύπτουν διαλυτά παράγωγα του μουκονικού (βλεννικού οξέος) (**Σχήμα 3.4, Πορεία A**). Αν και ο μηχανισμός της οζονόλυσης των αρωματικών υδρογονανθράκων δεν είναι πλήρως διευκρινισμένος πιστεύεται ότι η διάνοιξη του αρωματικού δακτυλίου λαμβάνει χώρα μέσω ενός μηχανισμού 1,3-κυκλοπροσθήκης και το σχηματισμό ενός ενδιάμεσου ασταθούς οζονιδίου, όπως ακριβώς συμβαίνει και με τις ολεφίνες [Huisgen, 1963 – Criegge, 1975 – Lattimer, 1974]. Η προσβολή του αρωματικού δακτυλίου από το όζον ευνοείται περισσότερο ανάμεσα στα άτομα C3 και

, τα οποία φέρουν υποκαταστάτες που δρουν ως δότες ηλεκτρονίων. Η συνεχής δράση του όζοντος έχει ως αποτέλεσμα την περαιτέρω διάσπαση των υπολειμμάτων νίνης και των μουκονικών παραγώγων. Ένας άλλος τύπος αντίδρασης (Σχήμα 3.4, Φορεία Β) περιλαμβάνει την αντικατάσταση μεθοξυ- και υδροξυ- ομάδων του ωματικού δακτυλίου από κινονοειδή άτομα οξυγόνου.



Εικόνα 3.2: Εικόνες SEM όπου φαίνονται τα διάφορα στάδια αποικοδόμησης του ενίου της LO, έπειτα από την αντίδραση με το όζον.





Σχήμα 3.4: Προτεινόμενοι μηχανισμοί αποικοδόμησης της λιγνίνης από το όζον.



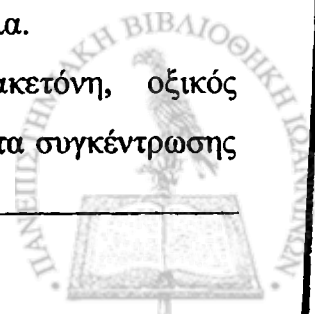
Επίσης, αναφέρονται και αντιδράσεις του όζοντος με την παράπλευρη αλυσίδα του μορίου της λιγνίνης (γνωστός ως «μηχανισμός εισαγωγής του όζοντος») καθώς και αντιδράσεις μέσω μηχανισμού ελευθέρων ριζών, που οδηγούν στη δημιουργία υδροξυ- και υπεροξειδικών ομάδων και καταστροφή ή/και πιθανό διμερισμό των μορίων της λιγνίνης, αντίστοιχα [Lyse, 1979 – Gierer, 1985, 1986].

### 3.4.2. Επίδραση του μέσου διάλυσης της LO

Όπως γίνεται αντιληπτό από την αρχή λειτουργίας της μεθόδου, κατά το σχεδιασμό ενός εμπεδησιομετρικού αισθητήρα αποικοδόμησης υμενίων, υπεισέρχεται ένας συμβιβασμός μεταξύ της δυναμικής περιοχής συγκεντρώσεων και της ευαισθησίας του αισθητήρα. Η δυναμική περιοχή συγκεντρώσεων (dynamic range) καθορίζεται από τη διαφορά της αντίστασης μεταφοράς φορτίου  $R_{ct}$  του ηλεκτροδίου πριν και μετά την τροποποίηση με το υμένιο. Σε αυτή την περίπτωση υμένια μεγάλου πάχους παρέχουν αισθητήρες με ευρεία δυναμική περιοχή αλλά μειωμένη ευαισθησία, αφού απαιτείται σχετικά μεγαλύτερη συγκέντρωση αναλύτη προκειμένου να επιτύχουμε μία σημαντική και επαναλήψιμη μεταβολή της εμπέδησης του συστήματος. Αντίστοιχα, υμένια μικρού πάχους παρέχουν αισθητήρες με υψηλή ευαισθησία, αφού μικρές συγκεντρώσεις του αναλύτη προκαλούν σημαντικές μεταβολές στη δομή του υμενίου και κατ' επέκταση μεγαλύτερο  $\Delta R_{ct}$ . Για το λόγο αυτό όλες οι πειραματικές συνθήκες που επηρεάζουν το πάχος και τις διηλεκτρικές ιδιότητες των υμενίων μελετήθηκαν λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω κριτήρια. Το πάχος των υμενίων επηρεάζεται κυρίως από τη συγκέντρωση της LO, τον όγκο του διαλύματος εναπόθεσης και τον αριθμό των επιστρώσεων. Ουσιαστικά οι τρεις αυτές παράμετροι είναι αλληλοεξαρτώμενες, όμως για λόγους πρακτικούς εξετάζονται χωριστά.

Έτσι, σημαντική παράμετρος είναι η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη εναπόθεσης. Ο διαλύτης εναπόθεσης επηρεάζει την ομοιογένεια, τις μηχανικές και φυσικές ιδιότητες του αποτιθέμενου υμενίου, καθώς επίσης την ικανότητα κάλυψης-ηλεκτρικής μόνωσης της ενεργού επιφάνειας των ηλεκτροδίων. Επίσης, ο διαλύτης πρέπει να είναι σχετικά πτητικός, ώστε να μπορεί να εξατμίζεται εύκολα.

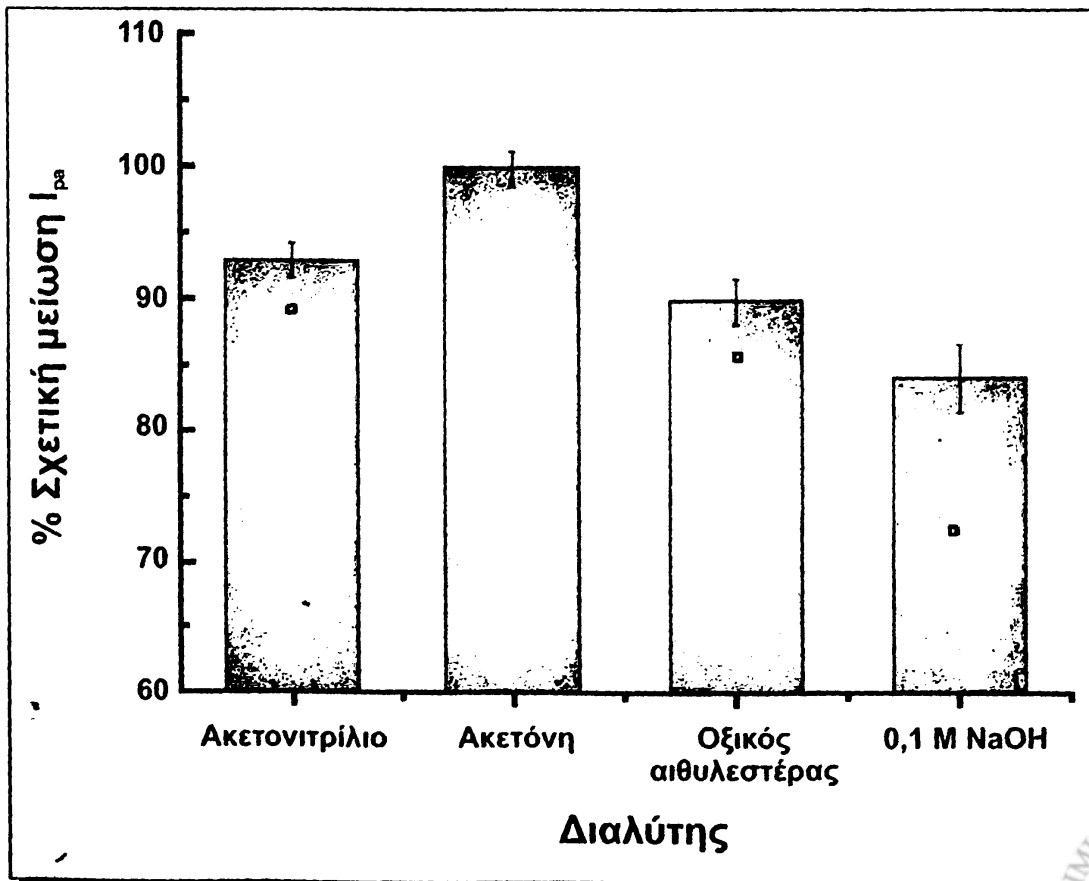
Μελετήθηκαν διάφοροι διαλύτες, όπως ακετονιτρίλιο, ακετόνη, οξικός αιθυλεστέρας και διάλυμα 0,1 M NaOH. Παρασκευάστηκαν διαλύματα συγκέντρωσης



0,5 mg mL<sup>-1</sup> LO σε κάθε διαλύτη και έγινε απόθεση ποσότητας 6 μL επί της επιφάνειας των ηλεκτροδίων GC. Διεξήχθησαν πειράματα κυκλικής βολταμμετρίας πριν και μετά την τροποποίηση των ηλεκτροδίων και ως κριτήριο για την καταλληλότητα των υπό μελέτη διαλυτών χρησιμοποιήθηκε η επί τοις εκατό σχετική μείωση της έντασης του ρεύματος ( $\Delta I_{pa} = [I_{pa, πριν} - I_{pa, μετά}] \times 100 / I_{pa, πριν}$ ) της ανοδικής κορυφής των σιδηρικούανιούχων  $I_{pa}$ , θεωρώντας ως 100% τη μέγιστη μείωση του φαρανταϊκού ρεύματος που παρατηρήθηκε μετά την επικάλυψη των ηλεκτροδίων με το ακετονικό διάλυμα.

Η ακετόνη διαλύει πλήρως τη λιγνίνη ενώ αντίθετα στα διαλύματα που προέρχονται από το ακετονιτρίλιο, τον οξικό αιθυλεστέρα και το NaOH μπορεί κανείς να διακρίνει μικρά συσσωματώματα αδιάλυτης λιγνίνης.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.5 τα καλύτερα αποτελέσματα ελήφθησαν όταν η χημική τροποποίηση των ηλεκτροδίων έγινε με το ακετονικό διάλυμα της LO. Στην περίπτωση του ακετονιτρίλιου και του οξικού αιθυλεστέρα η παρατηρούμενη μείωση του  $I_{pa}$  είναι μικρότερη, ενώ ακόμα μικρότερη είναι η μείωση που παρατηρήθηκε στην περίπτωση των διαλυμάτων LO σε 0,1 M NaOH.

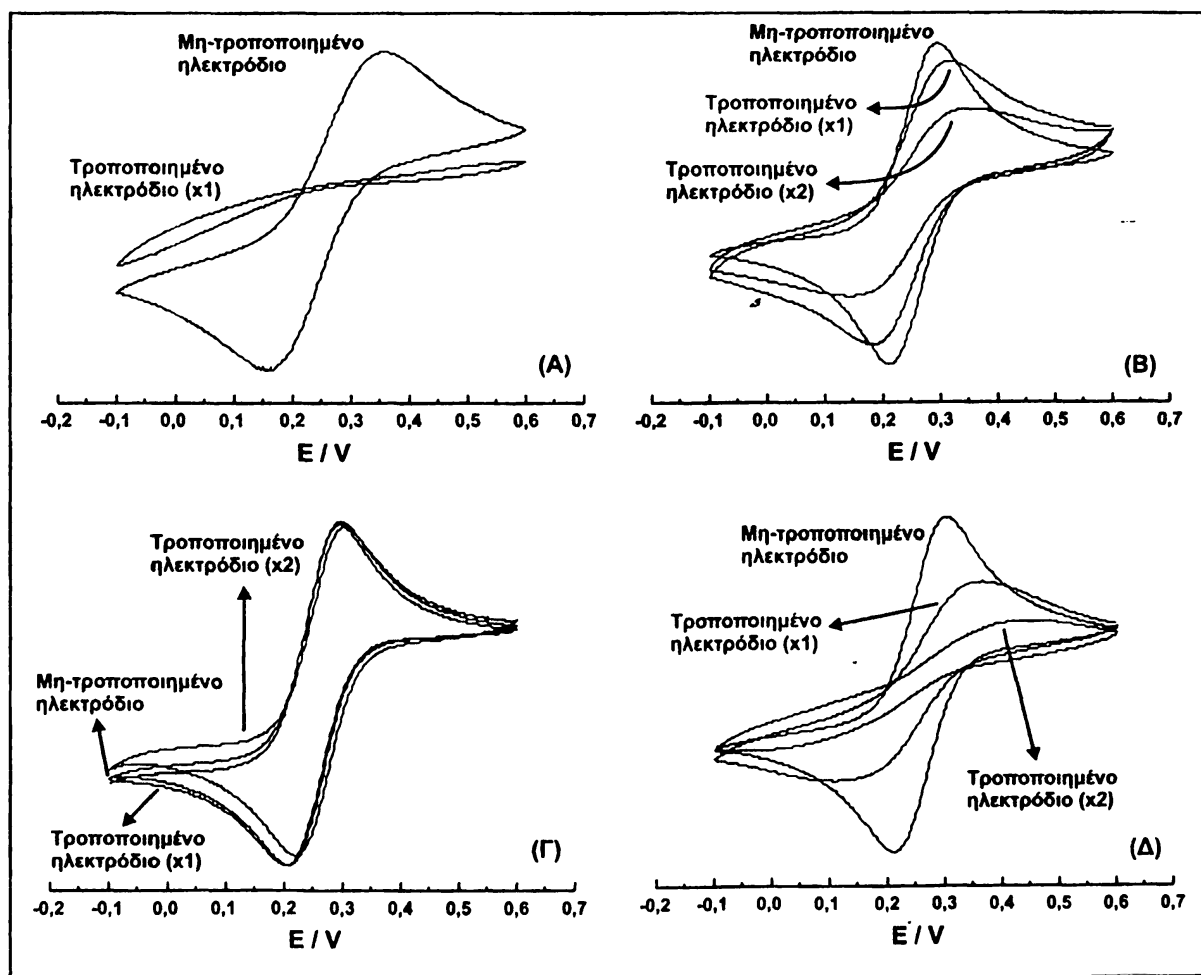


Σχήμα 3.5: Επί τοις εκατό σχετική απόκριση των ηλεκτροδίων για διάφορους διαλύτες.

Καταλήγουμε, λοιπόν, στο συμπέρασμα ότι ο πιο κατάλληλος διαλύτης για την LO, ο οποίος διαλύει τη λιγνίνη και τα παρεχόμενα υμένα πληρούν τις παραπάνω προϋποθέσεις είναι η ακετόνη. Αξιοσημείωτο είναι, επίσης, το γεγονός ότι η τροποποίηση των ηλεκτροδίων με τα υπόλοιπα διαλύματα πέραν του ακετονικού παρέχει αποτελέσματα με φτωχή επαναληψιμότητα.

### 3.4.3. Μελέτη διαφόρων τύπων ηλεκτροδίων

Μία ακόμα παράμετρος που μελετήθηκε ήταν το υλικό κατασκευής του ηλεκτροδίου εργασίας. Για το λόγο αυτό δοκιμάστηκαν ηλεκτρόδια GC, GR, Au και IDEs-Au. Η τροποποίηση των ηλεκτροδίων έγινε με απόθεση  $1 \times 10 \mu\text{L}$  ή/και  $2 \times 10 \mu\text{L}$  διαλύματος  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  LO σε ακετόνη. Ομοίως η μελέτη διεξήχθη με πειράματα κυκλικής βολταμμετρίας πριν και μετά την τροποποίηση.



Σχήμα 3.6: Κυκλικά βολταμμογραφήματα (Α) GC, (Β) GR, (Γ) IDEs-Au και (Δ) Au, τροποποιημένων με LO.



Με δεδομένο το διαλύτη και την αποθεθείσα ποσότητα της LO, ως κριτήριο επιλογής του καλύτερου υλικού χρησιμοποιήσαμε τη μείωση της έντασης του ανοδικού φαρανταϊκού ρεύματος  $I_{pa}$  των σιδηρικούανιούχων, το οποίο αποτελεί και μέτρο του βαθμού επικάλυψης της ενεργού επιφάνειας του ηλεκτροδίου εργασίας.

Από τα αντίστοιχα κυκλικά βολταμμογραφήματα του Σχήματος 3.6 φαίνεται ότι ο υαλώδης άνθρακας παρέχει τα καλύτερα αποτελέσματα με μία και μοναδική επικάλυψη LO (Σχήμα 3.6A). Αυτό μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι υπάρχει καλύτερη συνάφεια ανάμεσα στη λιγνίνη και το συγκεκριμένο υλικό που βοηθά στην καλύτερη προσρόφησή της μέσω των π-π αλληλεπιδράσεων των αρωματικών δακτυλίων. Αντίθετα στην περίπτωση του γραφίτη (Σχήμα 3.6B) το ποσοστό κάλυψης της επιφάνειας του ηλεκτροδίου εξακολουθεί να παραμένει χαμηλό πιθανόν λόγω του πορώδους της επιφάνειάς του.

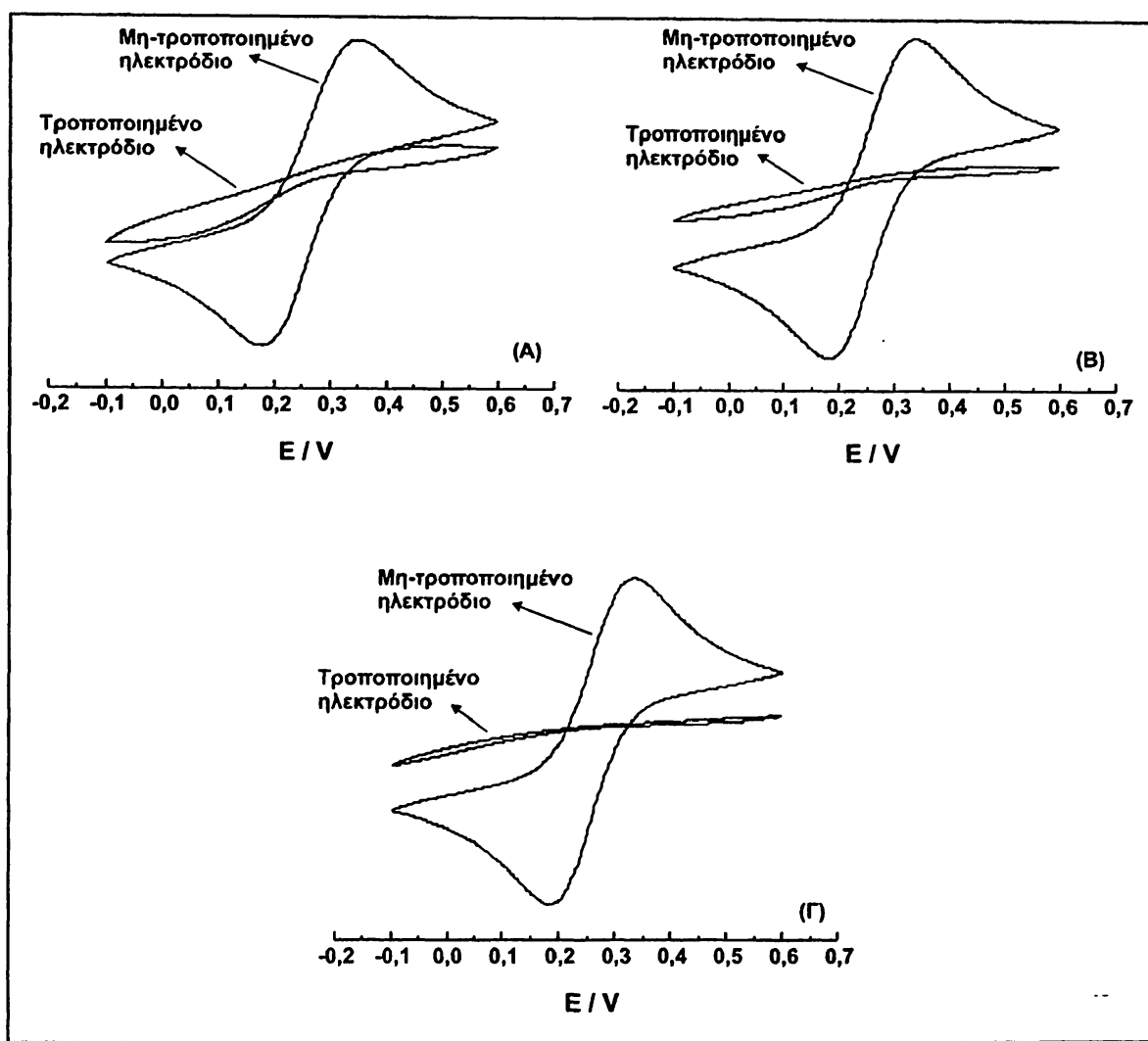
Επίσης, τα IDEs-Au κρίνονται ακατάλληλα για τη συγκεκριμένη εφαρμογή αφού το ποσοστό κάλυψης που επιτυγχάνεται είναι σχεδόν μηδενικό (Σχήμα 3.6Γ). Τέλος ικανοποιητικά αποτελέσματα ελήφθησαν και για τα ηλεκτρόδια Au, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικά ως υλικό κατασκευής ηλεκτροδίων εργασίας, αν και στην περίπτωση αυτή απαιτούνται δύο διαδοχικές αποθέσεις (Σχήμα 3.6Δ).

#### 3.4.4. Μελέτη επίδρασης της ποσότητας της LO

Μελετήθηκε ο όγκος του διαλύματος της LO που αποτίθεται επί της επιφάνειας των ηλεκτροδίων. Έτσι, επί των ηλεκτροδίων GC αποτέθηκαν ποσότητες 6, 8 και 10  $\mu\text{L}$  από διάλυμα  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  LO σε ακετόνη. Τα υμένια λιγνίνης που παράγονται έχουν πάχος 15  $\mu\text{m}$ . Μεγαλύτεροι όγκοι δε δοκιμάστηκαν, διότι έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία υμενίων μεγάλου πάχους ( $>25 \mu\text{m}$ ), μειώνοντας έτσι την ευαισθησία των αισθητήρων.

Από τα κυκλικά βολταμμογραφήματα του Σχήματος 3.7 φαίνεται ξεκάθαρα ότι η βέλτιστη ποσότητα είναι εκείνη των 10  $\mu\text{L}$  καθώς όπως γίνεται αντιληπτό επιθυμούμε την ανάπτυξη του λεπτότερου υμενίου, το οποίο θα εξασφαλίζει την καλύτερη μόνωση της ενεργού επιφάνειας του ηλεκτροδίου.



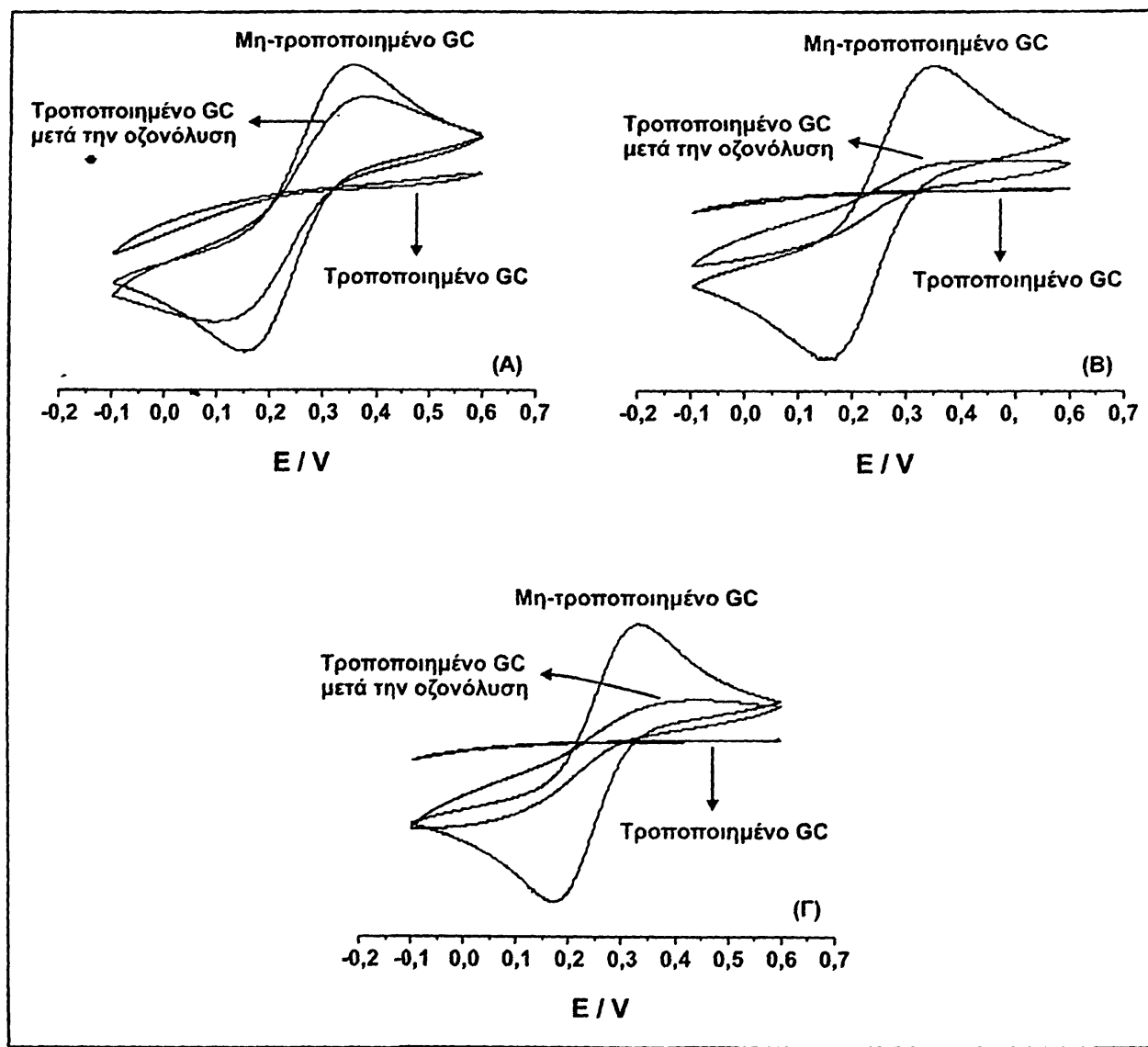


Σχήμα 3.7: Κυκλικά βολταμμογραφήματα ηλεκτροδίων GC τροποποιημένων με (Α) 6, (Β) 8 και (Γ) 10  $\mu\text{L}$  διαλύματος  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  LO σε ακετόνη.

### 3.4.5. Επίδραση της συγκέντρωσης των διαλυμάτων της LO

Διατηρώντας σταθερό τον όγκο απόθεσης ( $10 \mu\text{L}$ ) μελετήθηκε την επίδραση της συγκέντρωσης των διαλυμάτων της LO στην ικανότητα μόνωσης της επιφάνειας του ηλεκτροδίου και φυσικά στην ευαισθησία της αντίδρασης με το όζον, στην περιοχή συγκεντρώσεων  $0,1 - 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ . Όσον αφορά στα πιο αραιά διαλύματα ( $0,1$  και  $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ ) η μόνωση της επιφάνειας ήταν ανεπαρκής και ως εκ τούτου δεν μελετήθηκαν περαιτέρω. Επίσης, δεν μελετήθηκαν διαλύματα συγκέντρωσης μεγαλύτερης από  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ , διότι ένα μέρος της LO παραμένει αδιάλυτο. Η μελέτη επικεντρώθηκε στα διαλύματα συγκεντρώσεων  $0,3, 0,4$  και  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ . Πειράματα κυκλικής βολταμμετρίας στα ηλεκτρόδια πριν και μετά την τροποποίηση και μετά την εμβάπτιση

τους σε διάλυμα 250 µg όζοντος έδειξαν (Σχήμα 3.8) ότι τη μεγαλύτερη ευαισθησία ως προς την αντίδραση εμφανίζει το υμένιο που αναπτύχθηκε από το διάλυμα συγκέντρωσης 0,3 mg mL<sup>-1</sup>.



Σχήμα 3.8: Κυκλικά βολταμογραφήματα ηλεκτροδίων GC τροποποιημένων με διαλύματα LO διαφορετικών συγκεντρώσεων: (Α) 0,3 – (Β) 0,4 – (Γ) 0,5 mg mL<sup>-1</sup>, πριν και μετά την αντίδραση με 250 µg όζοντος.

### 3.4.6. Επίδραση του μέσου διεξαγωγής της αντίδρασης με O<sub>3</sub>

Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα η αποικοδόμηση του όζοντος υπό τη μορφή ύδατικού διαλύματος, λαμβάνει χώρα μέσω ενός πολύπλοκου μηχανισμού ελευθέρων ριζών, ο οποίος περιλαμβάνει αντιδράσεις εκκίνησης, διάδοσης και

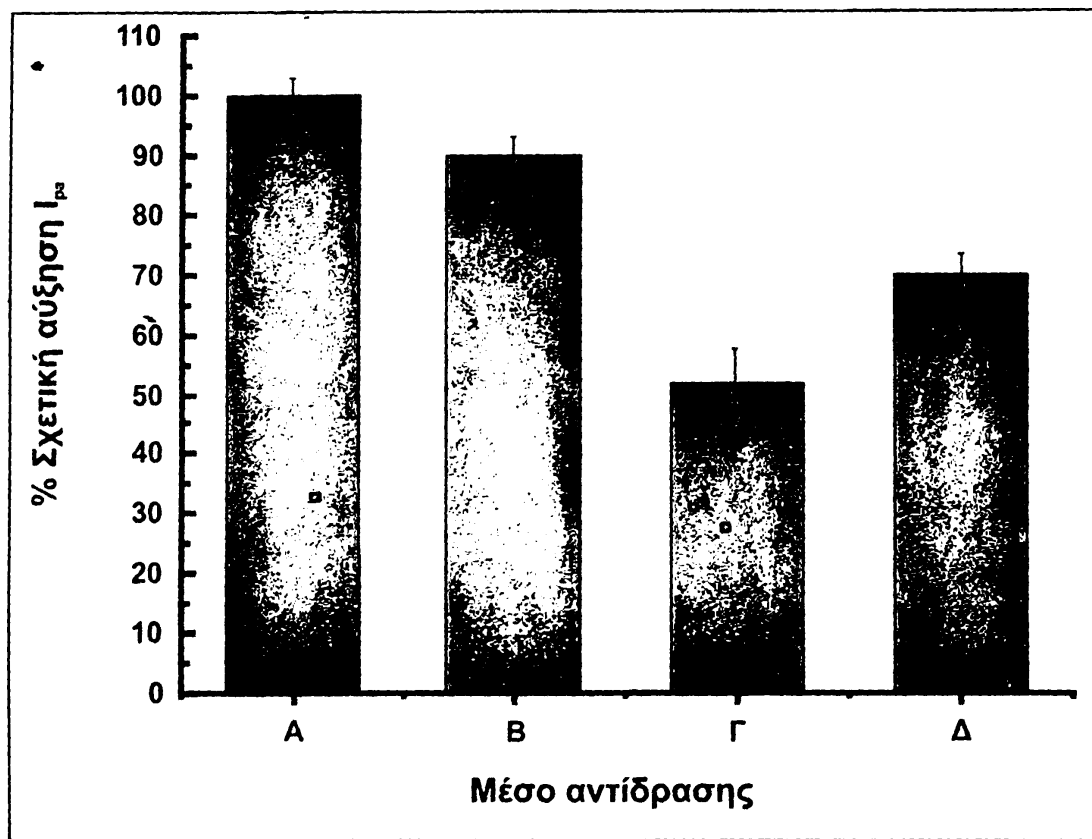
τερματισμού. Ο χρόνος ημίσειας ζωής του όζοντος δεν ξεπερνά τα 7 min [Gurol, 1982a,b] και η ταχύτητα καταστροφής του αυξάνει γρήγορα όσο το pH αυξάνεται. Εν τούτοις αν στο διάλυμα υπάρχουν ουσίες, όπως  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ , που δρουν ως παγίδες των ριζών  $\text{HO}^\cdot$ , τότε η καταστροφή του όζοντος αναστέλλεται σημαντικά και ο χρόνος ημίσειας ζωής σε pH 8 μπορεί να φτάσει ακόμα και τα 66 min. Επίσης, πρέπει να αναφερθεί, ότι τα μουκονικά παράγωγα, τα οποία προκύπτουν από την οζονόλυση της λιγνίνης είναι ευδιάλυτα σε αλκαλικό περιβάλλον. Τέλος, σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα η οζονόλυση της λιγνίνης διεξάγεται με μεγαλύτερη ταχύτητα και σε μεγαλύτερο ποσοστό σε όξινο περιβάλλον με pH 2 [Mbachu, 1981a,b – Roncero, 2003 – Lind, 1997].

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω δεδομένα, μελετήθηκε η επίδραση του μέσου στο οποίο γίνεται η οζονόλυση. Σκοπός ήταν να ευρεθεί το μέσο εκείνο, το οποίο θα συνδυάζει από τη μια το κατάλληλο pH ώστε η αντίδραση να διεξάγεται με τη μεγαλύτερη δυνατή ταχύτητα και από την άλλη θα παρέχει αυξημένη σταθερότητα στο όζον. Δοκιμάστηκαν, λοιπόν, τα παρακάτω συστήματα: α) 0,005 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , β) 0,01 M  $\text{HClO}_4$ , γ) ρυθμιστικό διάλυμα 0,05 M ανθρακικών, pH 10 και δ) ρυθμιστικό διάλυμα 0,05 M φωσφορικών, pH 7.

Η απόδοση των τροποποιημένων αισθητήρων εξετάστηκε με πειράματα κυκλικής βολταμμετρίας πριν και μετά την οζονόλυσή των υμενίων LO με 250 μg όζοντος. Ως κριτήριο επιλέχθηκε η επί τοις εκατό σχετική αύξηση της έντασης του ρεύματος της ανοδικής κορυφής  $\Delta I_{pa}$  των σιδηρικούανιούχων του τροποποιημένου ηλεκτροδίου πριν και μετά την οζονόλυση, λαμβάνοντας ως 100% εκείνη του διαλύματος 0,005 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (μέγιστη).

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.9 τα καλύτερα αποτελέσματα ελήφθησαν για το διάλυμα 0,005 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας που προαναφέρθηκαν, δείχνοντας ότι το χαμηλό pH ευνοεί ταυτόχρονα την αντίδραση και τη σταθερότητα του όζοντος. Για τον ίδιο λόγο εξίσου ικανοποιητικά αποτελέσματα ελήφθησαν και για το διάλυμα 0,01 M  $\text{HClO}_4$ . Αντίθετα η αυξημένη τιμή pH των δύο ρυθμιστικών διαλυμάτων φαίνεται ότι επιδρά αρνητικά στην ταχύτητα και την ευαισθησία της αντίδρασης, παρόλο που η σύστασή τους ευνοεί τη σταθεροποίηση του όζοντος και τη διαλυτοποίηση των προϊόντων αποικοδόμησης της λιγνίνης. Ειδικότερα στην περίπτωση του ρυθμιστικού διαλύματος των ανθρακικών θα

περίμενε κανείς καλύτερα αποτελέσματα δεδομένου ότι τα ανθρακικά ιόντα παίζουν το ρόλο των δεσμευτών ελευθέρων ριζών (scavengers), που παράγονται κατά τη διάρκεια της οζονόλυσης. Πιθανόν η εικόνα που παρατηρείται να είναι ένα συνολικό φαινόμενο της ανταγωνιστικής δράσης του pH και της σταθεροποίησης του όζοντος λόγω μείωσης της ποσότητας των παραγόμενων ελευθέρων ριζών.



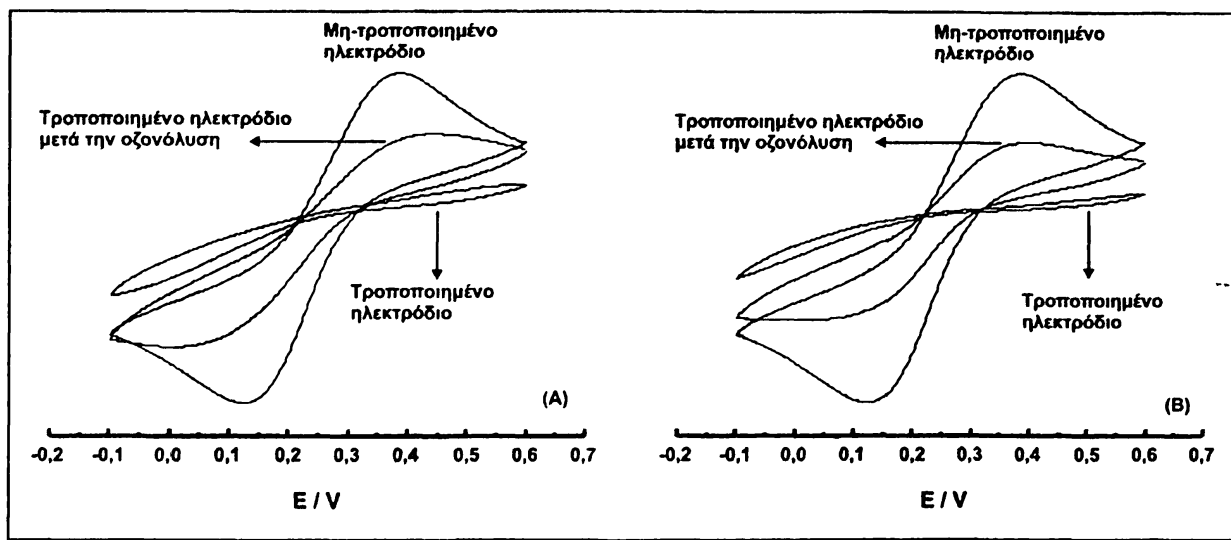
**Σχήμα 3.9:** Ραβδόγραμμα σύγκρισης διαφόρων συστημάτων διεξαγωγής της αντίδρασης οζονόλυσης των υμενίων LO, (A) 0,005 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, (B) 0,01 M HClO<sub>4</sub>, (Γ) ρυθμιστικό διάλυμα 0,05 M ανθρακικών, pH 10, (Δ) ρυθμιστικό διάλυμα 0,05 M φωσφορικών, pH 7.

#### 3.4.7. Μελέτη του χρόνου αντίδρασης

Σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης ήταν να διευκρινιστεί εάν η αντίδραση ανάμεσα στο όζον και τη λιγνίνη συνεχίζεται και μετά τη διακοπή της παροχής όζοντος. Για το λόγο αυτό, τα τροποποιημένα ηλεκτρόδια μετρήθηκαν αμέσως μετά τη διακοπή της παροχής του όζοντος από τον οζονιστήρα (200 μg O<sub>3</sub>) και έπειτα από παραμονή 20

min εντός του μίγματος της αντίδρασης, στο οποίο εξακολουθεί να υπάρχει κάποια ποσότητα όζοντος.

Τα αποτελέσματα (Σχήμα 3.10) έδειξαν ότι η αντίδραση αποικοδόμησης δε λαμβάνει χώρα μετά το πέρας της παροχής όζοντος. Πρέπει, επίσης, να σημειωθεί ότι αν η αντίδραση συνεχίζεται τότε για κινητικούς παράγοντες διεξάγεται με πολύ μικρή ταχύτητα, που όμως δεν επηρεάζει το τελικό αποτέλεσμα.



Σχήμα 3.10: Κυκλικά βολταμμογραφήματα από τα οποία φαίνεται η επίδραση του χρόνου επώασης έναντι του βαθμού αποικοδόμησης των υμενίων, για χρόνο (Α) 0 min και (Β) 20 min.

### 3.4.8. Τυφλά πειράματα

Κατά τη διάρκεια της μελέτης διεξήχθησαν τυφλά πειράματα με σκοπό να διευκρινιστεί η επίδραση: 1) του όζοντος επί της μη-τροποποιημένης επιφάνειας των ηλεκτροδίων, 2) του οξυγόνου (κύριος φορέας του ρεύματος όζοντος) επί των υμενίων της λιγνίνης και 3) του θειικού οξέος επί των μηχανικών και φυσικών ιδιοτήτων των υμενίων.

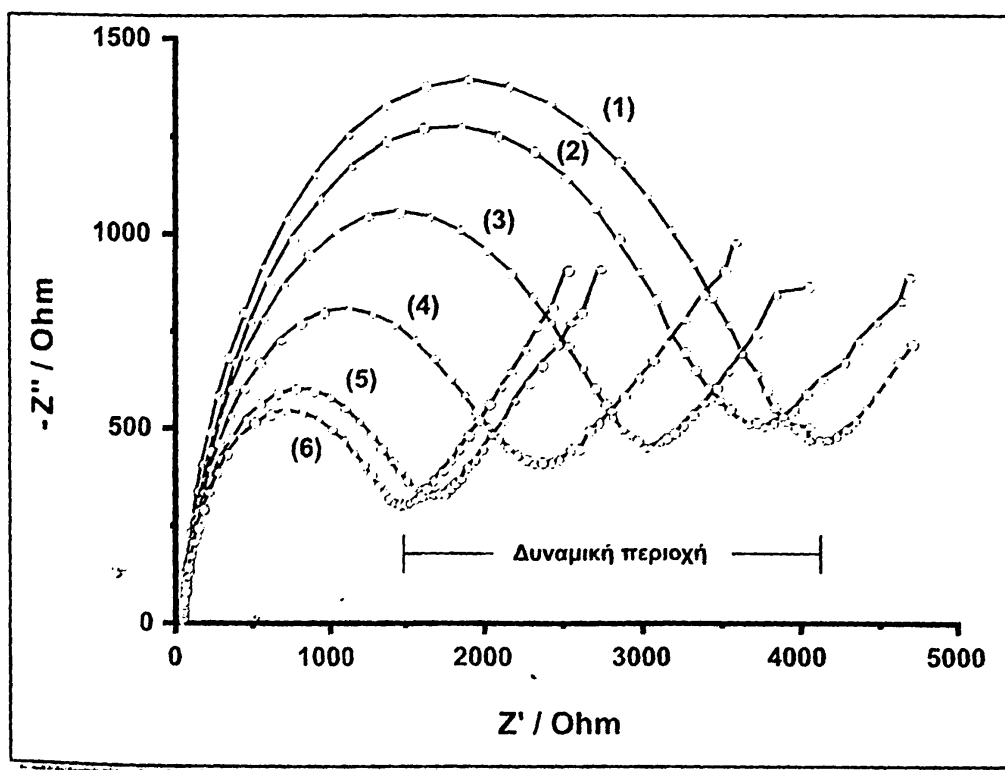
Από τα πειράματα κυκλικής βολταμμετρίας και φασματοσκοπίας εμπέδησης καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι το όζον δεν ασκεί καμία απολύτως επίδραση στην επιφάνεια των μη-τροποποιημένων ηλεκτροδίων, αφού δεν παρατηρείται καμία μεταβολή τόσο στο φαρανταϊκό ρεύμα όσο και στην εμπέδηση του συστήματος. Επίσης, το οξυγόνο δεν ασκεί καμία παρεμπόδιση αφού δεν δρα οξειδωτικά

αποικοδομώντας μέρος των υμενίων. Τέλος, το θεικό οξύ ασκεί μία μικρή επίδραση επί των υμενίων όχι αποικοδομώντας τα αλλά πιθανόν προκαλώντας ελαφρά διόγκωση (swelling) αυτών, με αποτέλεσμα να παρατηρείται μείωση του χωρητικού ρεύματος και αύξηση της αντίστασης μεταφοράς φορτίου  $R_{ct}$  κατά τα πρώτα 15 min, οπότε και σταθεροποιείται. Για το λόγο αυτό όλες οι μετρήσεις λαμβάνονται έπειτα από ένα στάδιο εγκλιματισμού διάρκειας 30 min εντός του διαλύματος 0,005 M  $H_2SO_4$ .

Αυτό, λοιπόν, που προκύπτει ως συμπέρασμα είναι ότι κανένας από τους παραπάνω παράγοντες δεν εγείρει παρεμποδιστική δράση και επομένως τα σήματα που καταγράφονται οφείλονται αποκλειστικά και μόνον στην οξειδωτική δράση του  $O_3$  επί των υμενίων της λιγνίνης.

### 3.4.9. Αναλυτικά χαρακτηριστικά του αισθητήρα LO

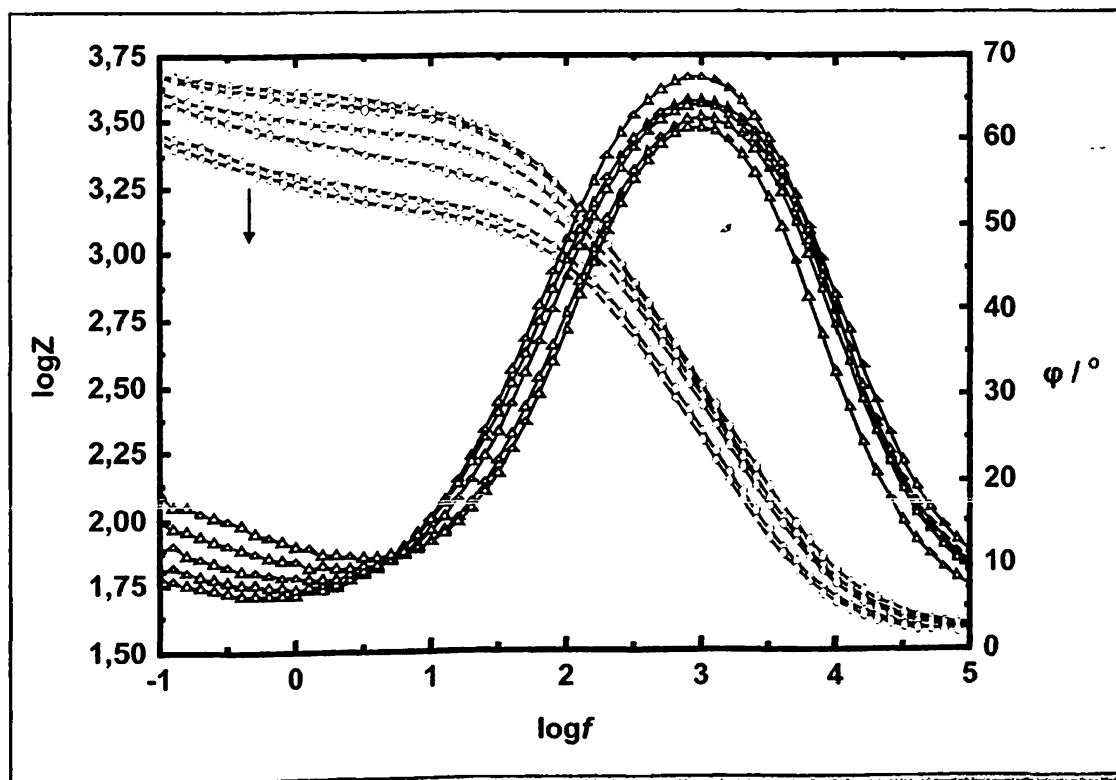
Υπό τις βέλτιστες συνθήκες έγινε προσπάθεια κατασκευής καμπύλης αναφοράς όζοντος. Η τροποποίηση των ηλεκτροδίων έγινε με απόθεση 10  $\mu L$  από διάλυμα 0,3 mg  $mL^{-1}$  LO σε ακετόνη.



**Σχήμα 3.11:** Διαγράμματα Nyquist τροποποιημένου ηλεκτροδίου LO (1x10  $\mu L$ ) (1) πριν από την αντίδραση και μετά από διαδοχικές εγχύσεις (2) 50  $\mu g O_3$ , (3) 100  $\mu g O_3$ , (4) 150  $\mu g O_3$ , (5) 200  $\mu g O_3$  και (6) μη-τροποποιημένου ηλεκτροδίου.

Στο Σχήμα 3.11 φαίνονται τα διαγράμματα Nyquist του τροποποιημένου ηλεκτροδίου πριν από την αντίδραση (φάση 1) και έπειτα από διαδοχικές εγχύσεις 50  $\mu\text{g}$  όζοντος (φάσεις 2-5) καθώς και του μη τροποποιημένου ηλεκτροδίου (φάση 6). Από τα διαγράμματα Nyquist είναι ξεκάθαρη η μεταβολή (μείωση) που υφίσταται το πραγματικό μέρος της εμπέδησης  $Z$ . Πιο συγκεκριμένα το μέγεθος που μεταβάλλεται είναι η αντίσταση μεταφοράς φορτίου  $R_{ct}$  του υμενίου της λιγνίνης, σε αντίθεση με την αντίσταση  $R_s$  του ηλεκτρολύτη (τιμή εμπέδησης σε συχνότητες μεγαλύτερες από 10 kHz) που παραμένει σταθερή.

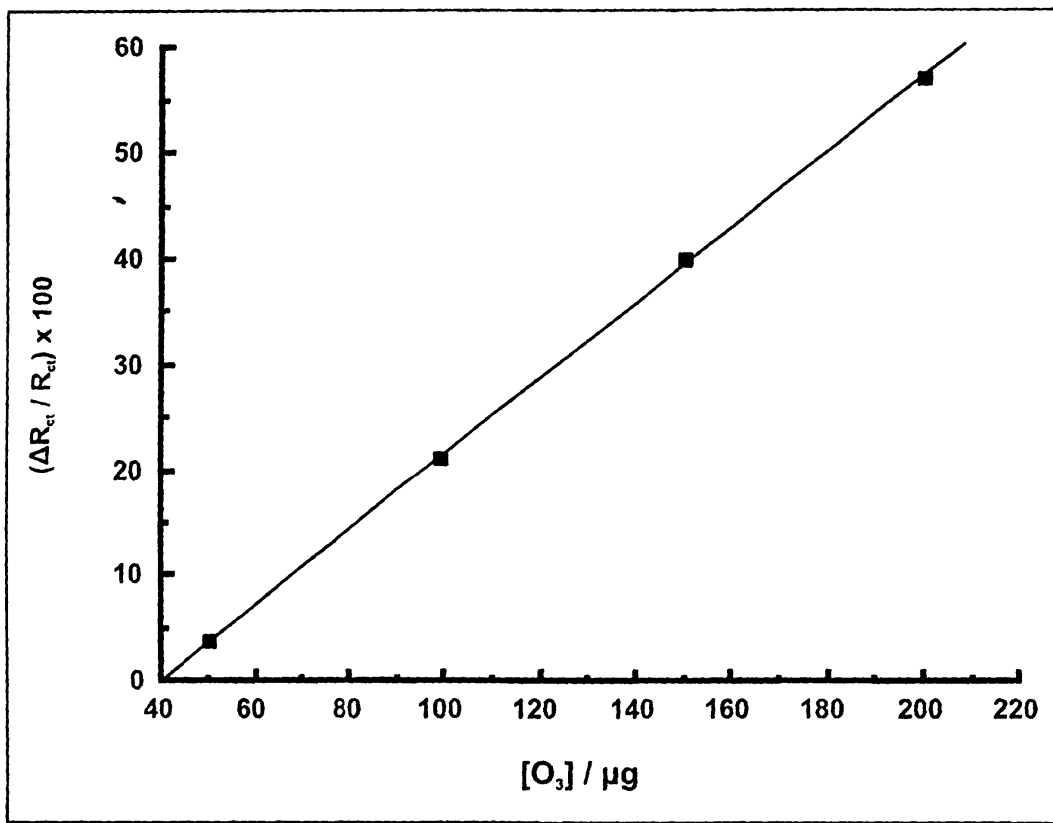
Το ίδιο συμπέρασμα προκύπτει και από τα αντίστοιχα διαγράμματα Bode (Σχήμα 3.12). Στην περιοχή των υψηλών συχνοτήτων φαίνεται ότι ο λογάριθμος της εμπέδησης παραμένει σταθερός ενώ όσο μεταβαίνουμε προς τις χαμηλές συχνότητες η μεταβολή γίνεται πιο αισθητή. Το γεγονός της αποικοδόμησης των υμενίων της λιγνίνης από το όζον φαίνεται, επίσης, και από τη σταδιακή μείωση της φάσης ( $\varphi$ ) όσο προχωρά η αντίδραση με το όζον κατά 10 περίπου μονάδες.



Σχήμα 3.12: Διαγράμματα Bode του τροποποιημένου ηλεκτροδίου LO (1x10  $\mu\text{L}$ ) πριν από την αντίδραση και μετά από διαδοχικές εγχύσεις 50  $\mu\text{g}$   $\text{O}_3$ .



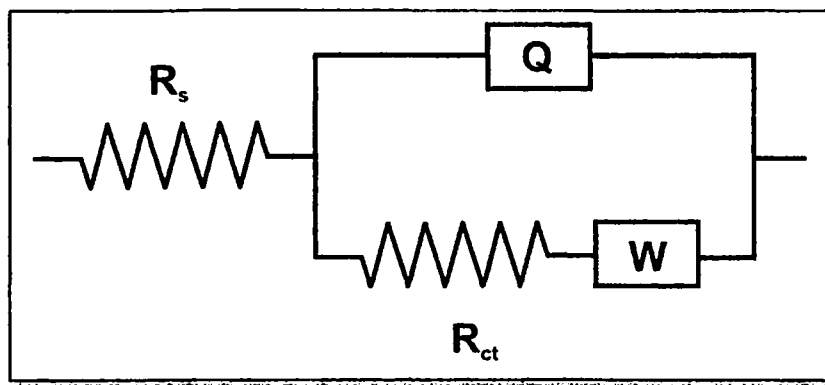
Για το μελετούμενο διάστημα ποσοτήτων (50-200  $\mu\text{g O}_3$ ) η μεταβολή της  $R_{ct}$  είναι γραμμική σε συνάρτηση με το όζον, όπως προκύπτει από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων η εξίσωση είναι  $A = (0,36 \pm 0,01) B + (-14,15 \pm 1,36)$ , όπου  $A = (\Delta R_{ct}/R_{ct}) \times 100$  και  $B$  η ποσότητα του όζοντος σε  $\mu\text{g}$  (Σχήμα 3.13). Ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης, η % σχετική τυπική απόκλιση και το όριο ανίχνευσης (για λόγο σήματος προς θόρυβο 3), υπολογίστηκαν  $r^2=0,9994$  ( $n=4$ ),  $RSD=2,1\%$  ( $n=5$ ) και  $11,3 \mu\text{g O}_3$ , αντίστοιχα.



Σχήμα 3.13: Καμπύλη αναφοράς όζοντος με βάση τον αισθητήρα LO (1x10  $\mu\text{L}$ ).

Οι τιμές που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς υπολογίστηκαν μετά την προσομοίωση των δεδομένων εμπέδησης με το ισοδύναμο ηλεκτρικό κύκλωμα Randles (Σχήμα 3.14) και τον αλγόριθμο Boukamp. Το κύκλωμα Randles αποτελείται από την αντίσταση  $R_s$ , που εκφράζει την ωμική αντίσταση του διαλύματος στο χώρο μεταξύ ηλεκτροδίου εργασίας και του ηλεκτροδίου αναφοράς, η οποία είναι συνδεδεμένη σε σειρά με ένα σύστημα παράλληλης σύνδεσης διαφόρων στοιχείων ηλεκτρικών κυκλωμάτων. Η αντίσταση  $R_{ct}$  και το στοιχείο  $W$  εκφράζουν την αντίσταση μεταφοράς φορτίου και την εμπέδηση Warburg (μέτρο της διάχυσης του οξειδοαναγωγικού ζεύγους προς την επιφάνεια του ηλεκτροδίου), αντίστοιχα. Το

στοιχείο σταθερής φάσης (constant phase element, CPE)  $Q$  εκφράζει τη μικτή συμπεριφορά (ωμική-χωρητική) της ηλεκτρικής διπλοστιβάδας, που δημιουργείται στα όρια της διεπιφάνειας υμενίου-ηλεκτρολύτη. Στην περίπτωση μας έχει αντικαταστήσει τη χωρητική αντίσταση ( $C_{dl}$ ) της ηλεκτρικής διπλοστιβάδας καθώς το φαινόμενο δεν έχει καθαρά χωρητική συμπεριφορά και είναι εξαρτώμενο από τη συχνότητα. Η απόκλιση αυτή από την ιδανική συμπεριφορά, οφείλεται στην ανομοιογένεια της επιφάνειας του ηλεκτροδίου εργασίας. Το στοιχείο CPE χρησιμοποιείται ευρύτατα καθώς αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για την καλύτερη προσομοίωση των πειραματικών δεδομένων σε ένα συγκεκριμένο ηλεκτροχημικό σύστημα.



**Σχήμα 3.14:** Ισοδύναμο ηλεκτρικό κύκλωμα Randle's,  $R(Q[RW])$ , το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την προσομοίωση των δεδομένων.

**Πίνακας 3.1:** Αποτελέσματα προσομοίωσης των πειραματικών δεδομένων του σχήματος 3.11 (αισθητήρας LO,  $1 \times 10 \mu\text{L}$ ) στο κύκλωμα Randles.

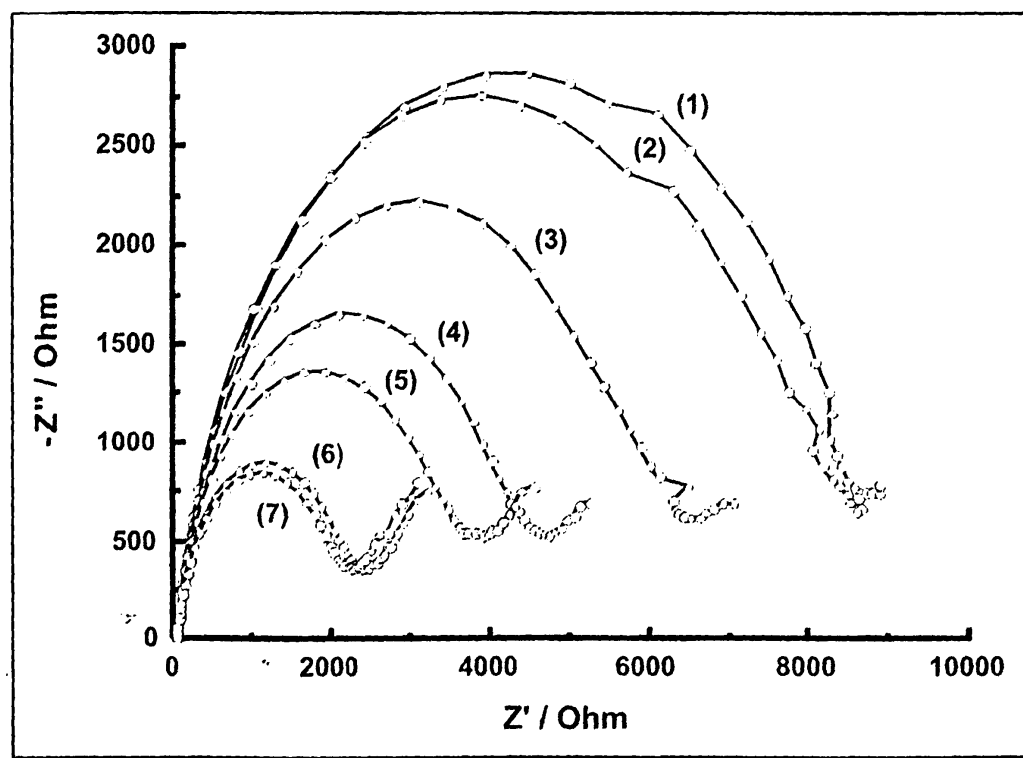
| Στάδιο αντίδρασης | $R_s$ ( $\Omega$ ) | $R_{ct}$ ( $k\Omega$ ) | $n$  |
|-------------------|--------------------|------------------------|------|
| (1)               | 37,0               | 3,35                   | 0,87 |
| (2)               | 36,8               | 3,22                   | 0,84 |
| (3)               | 36,3               | 2,65                   | 0,85 |
| (4)               | 36,1               | 2,01                   | 0,85 |
| (5)               | 36,0               | 1,44                   | 0,87 |
| (6)               | 36,0               | 1,29                   | 0,87 |



Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την προσομοίωση των δεδομένων του υπό μελέτη συστήματος φαίνονται στον πίνακα 3.1 και επιβεβαιώνουν το γεγονός ότι η τιμή του  $R_s$  παραμένει σταθερή ενώ το  $R_{ct}$  μειώνεται με τη σταδιακή προσθήκη όζοντος. Το μέγεθος  $n$  που εκφράζει το μέτρο της απόκλισης του CPE από την ιδανική χωρητική συμπεριφορά, λαμβάνει τιμές της τάξης του 0,86 (βλέπε Θεωρητικό Μέρος, Κεφάλαιο 1°, §1.2.3.2).

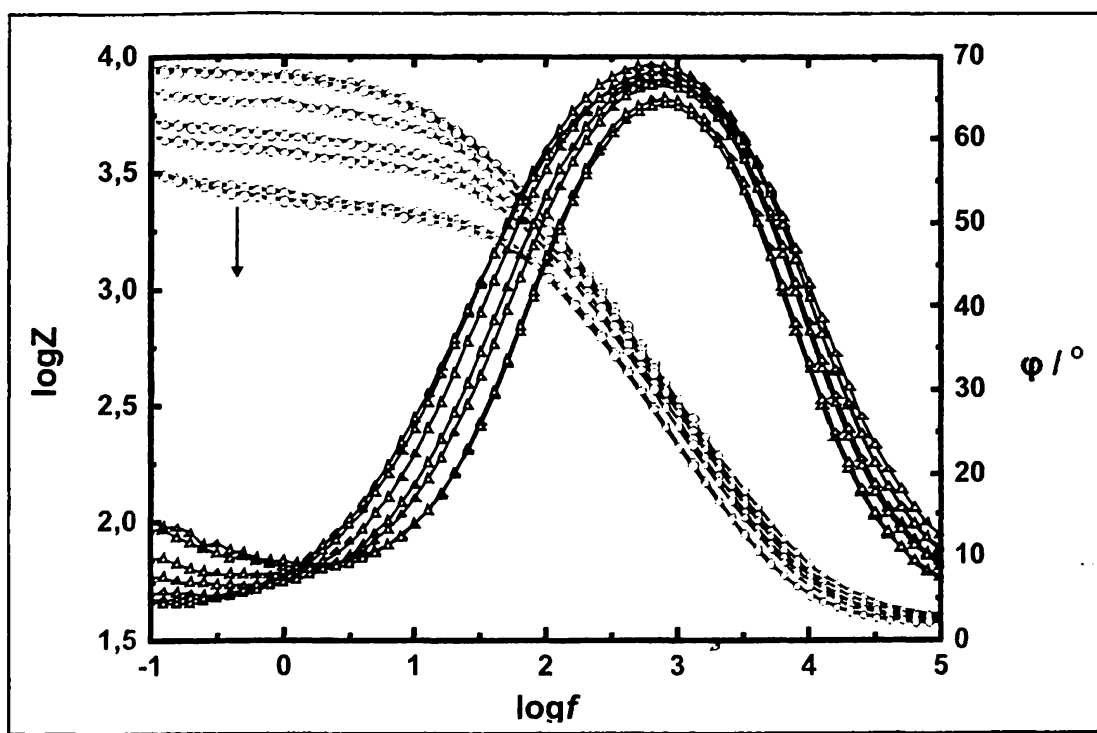
Τέλος, η τιμή του  $\chi^2$  που εκφράζει το βαθμό επιτυχίας της προσομοίωσης, είναι της τάξης του  $10^{-3}$ , γεγονός που σημαίνει πως το υπό μελέτη ηλεκτροχημικό σύστημα είναι δυνατόν να περιγραφεί με το προαναφερθέν ηλεκτρικό κύκλωμα.

Μία ακόμα προσέγγιση στην κατασκευή αισθητήρων έγινε με τροποποίηση των ηλεκτροδίων με ποσότητα  $2 \times 10 \mu\text{L}$  από διάλυμα  $0,3 \text{ mg mL}^{-1}$  LO σε ακετόνη. Από τα διαγράμματα Nyquist (Σχήμα 3.15) και Bode (Σχήμα 3.16) φαίνεται ότι ο διπλασιασμός της αποτιθέμενης ποσότητας οδηγεί σε αύξηση της τιμής του  $R_{ct}$ . Αυτό παρέχει μεγαλύτερη δυναμική περιοχή η οποία χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς (Σχήμα 3.17).



Σχήμα 3.15: Διαγράμματα Nyquist τροποποιημένου ηλεκτροδίου LO ( $2 \times 10 \mu\text{L}$ ) (1) πριν από την αντίδραση και μετά από διαδοχικές εγχύσεις (2)  $50 \mu\text{g O}_3$ , (3)  $100 \mu\text{g O}_3$ , (4)  $150 \mu\text{g O}_3$ , (5)  $200 \mu\text{g O}_3$  (6)  $250 \mu\text{g O}_3$  και (7) μη-τροποποιημένου ηλεκτροδίου.

Εν τούτοις, στα διαγράμματα Nyquist του τροποποιημένου ηλεκτροδίου, που αντιπροσωπεύουν τα στάδια (1) και (2) εμφανίζεται θόρυβος στην περιοχή των χαμηλών συχνοτήτων. Το γεγονός αυτό ενδεχομένως οφείλεται στο αυξημένο πάχος των υμενίων, το οποίο είναι δυνατόν να δημιουργεί περισσότερες ατέλειες στη μορφολογία τους. Η παρουσία θορύβου στις χαμηλές συχνότητες είναι αναμενόμενη καθώς η λήψη και η καταγραφή των δεδομένων διαρκεί περισσότερο σε σχέση με ότι συμβαίνει στις υψηλές συχνότητες.

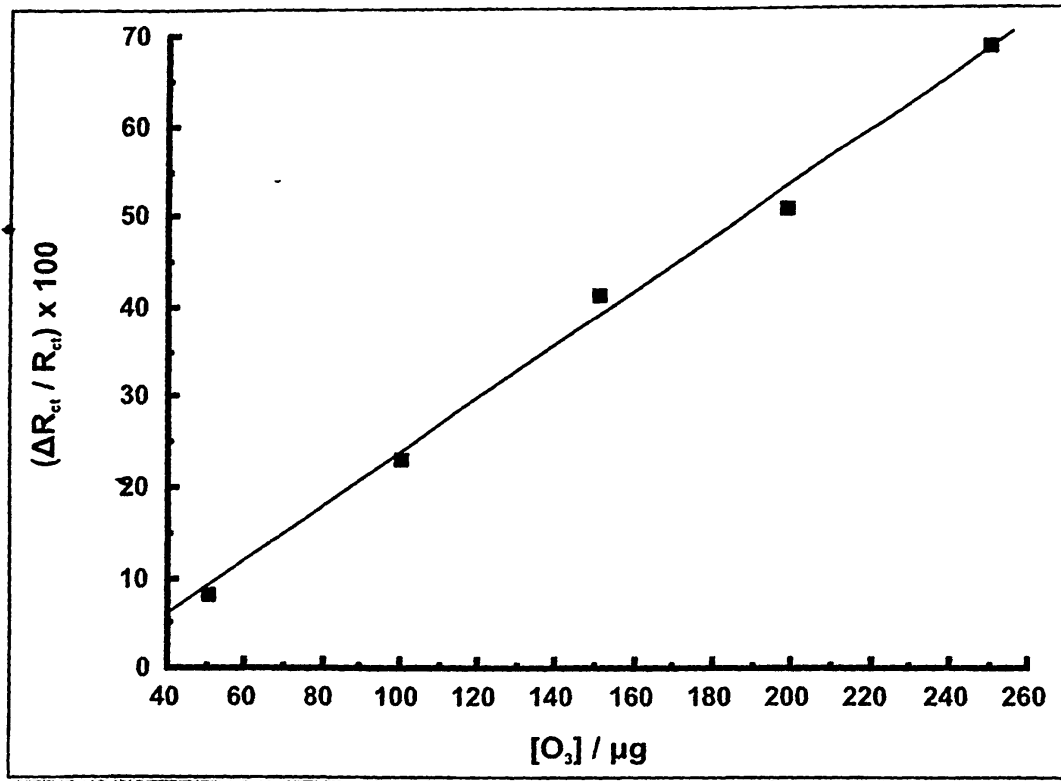


**Σχήμα 3.16:** Διαγράμματα Bode του τροποποιημένου ηλεκτροδίου LO (2x10 μL) πριν από την αντίδραση και μετά από διαδοχικές εγχύσεις 50 μg O<sub>3</sub>.

Επίσης, από τα διαγράμματα Bode βλέπουμε ότι και σε αυτή την περίπτωση η εμπέδηση του συστήματος παραμένει σταθερή στην περιοχή των υψηλών συχνοτήτων και σταδιακά μεταβάλλεται (μειώνεται) καθώς μετακινούμαστε κατά μήκος του λογαριθμικού άξονα προς τις χαμηλές συχνότητες.

Σύμφωνα με την εναλλακτική αυτή προσέγγιση η καμπύλη αναφοράς εμφανίζει γραμμικότητα στην περιοχή 50-250 μg O<sub>3</sub> και βάση των ελαχίστων τετραγώνων η εξίσωσή της είναι  $A = (0,30 \pm 0,02) B + (-5,84 \pm 3,14)$ , όπου  $A = (\Delta R_{ct}/R_{ct}) \times 100$  και B η ποσότητα του όζοντος σε μg. Ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης, η % σχετική

τυπική απόκλιση και το όριο ανίχνευσης (για λόγο σήματος προς θόρυβο 3), υπολογίστηκαν  $r^2=0,9990$  ( $n=5$ ),  $RSD=2,5\%$  ( $n=5$ ) και  $31,4 \mu\text{g O}_3$ , αντίστοιχα.



Σχήμα 3.17: Καμπύλη αναφοράς όζοντος με βάση τον αισθητήρα LO (2x10 μL).

Πίνακας 3.2: Αποτελέσματα προσομοίωσης των πειραματικών δεδομένων του σχήματος 3.15 (αισθητήρας LO, 2x10 μL) στο κύκλωμα Randles.

| Στάδιο αντίδρασης | R <sub>s</sub> (Ω) | R <sub>ct</sub> (kΩ) | n    |
|-------------------|--------------------|----------------------|------|
| (1)               | 37,4               | 6,73                 | 0,86 |
| (2)               | 37,1               | 6,17                 | 0,83 |
| (3)               | 36,8               | 5,17                 | 0,85 |
| (4)               | 37,2               | 3,86                 | 0,86 |
| (5)               | 36,0               | 3,34                 | 0,86 |
| (6)               | 36,0               | 2,09                 | 0,88 |
| (7)               | 36,3               | 1,97                 | 0,87 |

Παρατηρεί κανείς ότι η δεύτερη στρώση έχει ως αποτέλεσμα να αυξάνεται το LOD γεγονός που οφείλεται στην αύξηση του πάχους του υμενίου της LO με ταυτόχρονη μείωση της ευαισθησίας.

Το κύκλωμα Randles του **Σχήματος 3.14** χρησιμοποιήθηκε και σε αυτή την περίπτωση για την προσομοίωση των πειραματικών δεδομένων. Η τιμή του  $\chi^2$  που είναι της τάξης του  $10^{-3}$  αποκαλύπτει ότι το συγκεκριμένο ισοδύναμο ηλεκτρικό κύκλωμα είναι δυνατόν να προσομοιάσει το υπό μελέτη σύστημα. Ομοίως και σε αυτή την περίπτωση η τιμή της ωμικής αντίστασης  $R_s$  του ηλεκτρολύτη παραμένει σταθερή ενώ εκείνη που μειώνεται είναι η ωμική αντίσταση μεταφοράς φορτίου  $R_{ct}$  (**Πίνακας 3.2**).

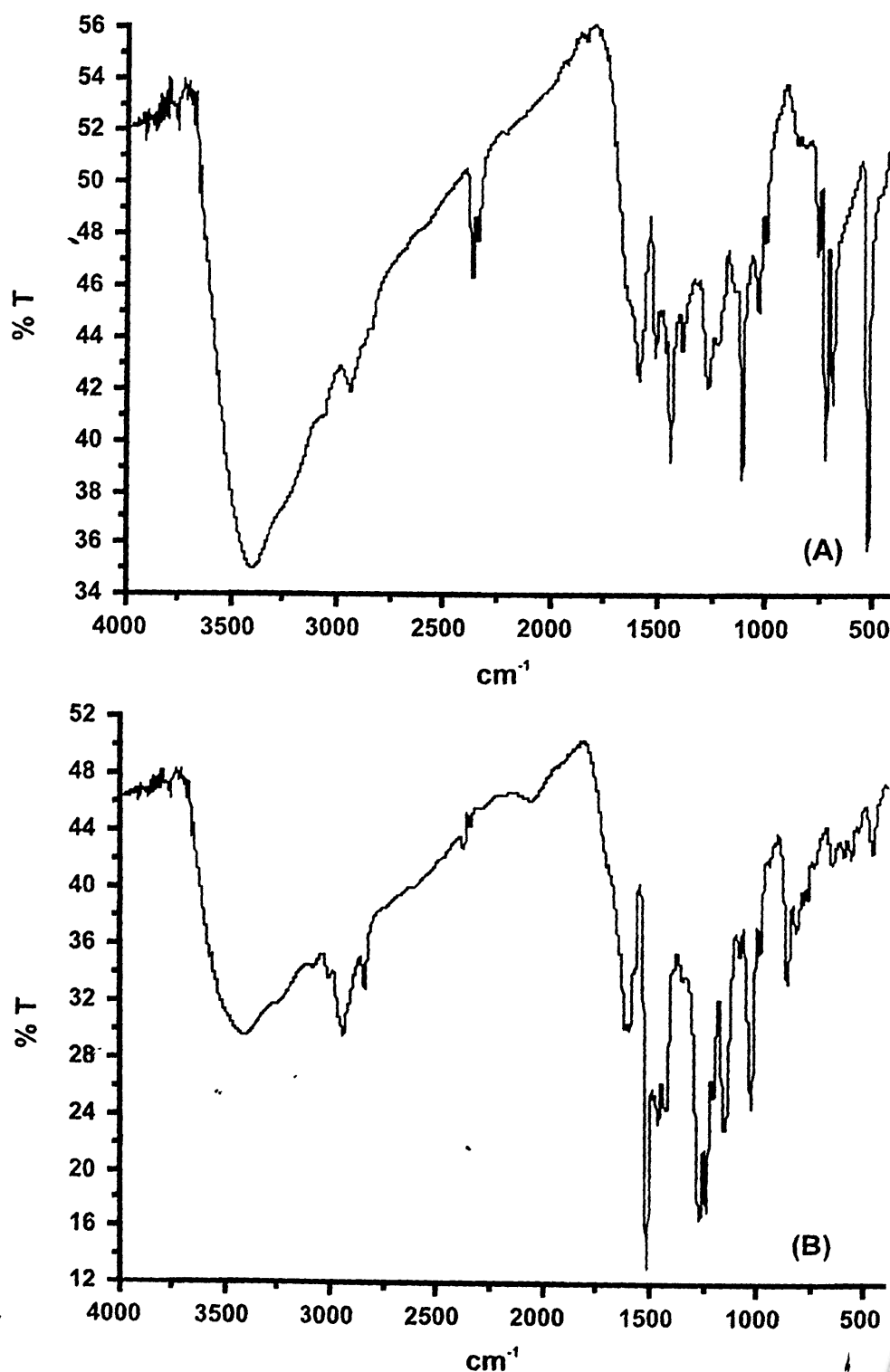
#### 3.4.10. Μελέτη παραγώγων της LA με TPP και PAP

Για την ανάπτυξη ενός εμπεδησιομετρικού αισθητήρα όζοντος απομονώθηκαν παράγωγα του διαλυτού σε αλκάλια κλάσματος της λιγνίνης (LA) με TPP και PAP (βλέπε **Παράρτημα Β**). Τα παράγωγα της λιγνίνης με τα οργανικά κατιόντα είναι στερεά χρώματος καφέ, δυσδιάλυτα στο ύδωρ και διαλυτά στους οργανικούς διαλύτες. Στο **Σχήμα 3.18** φαίνονται τα φάσματα FTIR των ενώσεων αυτών, τα οποία πάρθηκαν υπό μορφή παστίλιας KBr. Σε αυτά μπορεί να διακρίνει κανείς μερικές από τις χαρακτηριστικές κορυφές απορρόφησης της λιγνίνης, σε σύγκριση και με το φάσμα HATR-FTIR της LO (**Σχήμα 3.3**).

Με φασματοσκοπία εμπέδησης μελετήθηκαν ηλεκτρόδια GC τα οποία τροποποιήθηκαν με μία σειρά διαλύματων LATPP σε μεθανόλη και αντίστοιχα LAPAP σε μίγμα μεθανόλη:DMSO = 1:4. Η τροποποίηση των ηλεκτροδίων έγινε αποθέτοντας ποσότητα 10  $\mu\text{L}$  από το εκάστοτε διάλυμα με πορεία ανάλογη με εκείνη που ακολουθήθηκε για τους αισθητήρες της LO. Κατόπιν διεξήχθησαν πειράματα μέτρησης της εμπέδησης των τροποποιημένων ηλεκτροδίων πριν και μετά από την αντίδραση με 200  $\mu\text{g}$  όζοντος. Στους **πίνακες 3.3** και **3.4** φαίνονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων.

Από τον **πίνακα 3.3** φαίνεται ότι ο αισθητήρας που τροποποιήθηκε με το διάλυμα συγκέντρωσης 0,5  $\text{mg mL}^{-1}$  δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα. Εν τούτοις ως βέλτιστη συγκέντρωση επιλέχθηκε η 0,3  $\text{mg mL}^{-1}$  διότι τα άλλα δύο διαλύματα δεν παρέχουν επαναλήψιμα αποτελέσματα. Επίσης, για τα διαλύματα συγκεντρώσεων μεγαλύτερες από 0,5  $\text{mg mL}^{-1}$  δεν ήταν δυνατή η καταγραφή των φασμάτων Nyquist και Bode

εξαιτίας του σημαντικού θορύβου που παρατηρήθηκε στα φάσματα στην περιοχή των χαμηλών συχνοτήτων. Πιθανόν αυτό να οφείλεται σε ακατάλληλη μορφολογία των υμενίων λόγω των υψηλών συγκεντρώσεων και του εξαιρετικά μεγάλου πάχους αυτών. Ακόμα για τα διαλύματα συγκεντρώσεων 0,4 και 0,5 mg mL<sup>-1</sup> παρατηρείται ότι το R<sub>ct</sub> λαμβάνει μία οριακή τιμή πέρα από την οποία δεν παρατηρείται καμία αύξηση παρά την αύξηση της συγκεντρώσεως των διαλυμάτων.



Σχήμα 3.18: Φάσμα FTIR (A) LATPP και (B) LAPAP.

**Πίνακας 3.3:** Αποτελέσματα μετρήσεων φασματοσκοπίας εμπέδησης για τον αισθητήρα LATPP, πριν και μετά την οζονόλυση με 200 µg όζοντος.

| Συγκέντρωση<br>διαλυμάτων LATPP<br>(mg mL <sup>-1</sup> ) | R <sub>ct</sub> (kΩ), πριν | R <sub>ct</sub> (kΩ), μετά | (ΔR <sub>ct</sub> /R <sub>ct</sub> ) x 100<br>± SD (n=5) |
|---|----------------------------|----------------------------|--|
| 0,3   | 7,86                       | 5,14                       | -35 ± 3  |
| 0,4   | 12,33                      | 6,29                       | -49 ± 5  |
| 0,5   | 12,17                      | 5,27                       | -57 ± 8  |

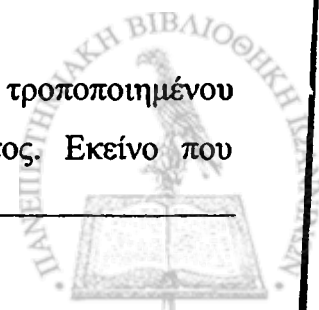
Αντίστοιχα αποτελέσματα (Πίνακας 3.4) προέκυψαν και για τους αισθητήρες που τροποποιήθηκαν με το παράγωγο LAPAP. Στην περίπτωση αυτή οι αισθητήρες παρουσιάζουν χαμηλή επαναληψιμότητα. Επίσης, για τα διαλύματα συγκεντρώσεων μεγαλύτερες από 0,5 mg mL<sup>-1</sup> παρατηρήθηκαν φαινόμενα ανάλογα με εκείνα των αισθητήρων LATPP, οπότε το παράγωγο αυτό δεν μελετήθηκε περαιτέρω. Πιθανές αιτίες μπορούν να θεωρηθούν η ακαταλληλότητα των υμενίων λόγω στερεοχημικών παρεμποδίσεων ανάμεσα στην LA και το οργανικό ιόν καθώς και μερική καταστροφή του πλέγματος της λιγνίνης από το DMSO.

**Πίνακας 3.4:** Αποτελέσματα μετρήσεων φασματοσκοπίας εμπέδησης για τον αισθητήρα LAPAP, πριν και μετά την οζονόλυση με 200 µg όζοντος.

| Συγκέντρωση<br>διαλυμάτων LAPAP<br>(mg mL <sup>-1</sup> ) | R <sub>ct</sub> (kΩ), πριν | R <sub>ct</sub> (kΩ), μετά | (ΔR <sub>ct</sub> /R <sub>ct</sub> ) x 100<br>± SD (n=5) |
|---|----------------------------|----------------------------|--|
| 0,3   | 2,91                       | 2,58                       | -11 ± 3  |
| 0,4   | 3,54                       | 2,68                       | -24 ± 8  |
| 0,5   | 6,04                       | 1,90                       | -69 ± 10   |

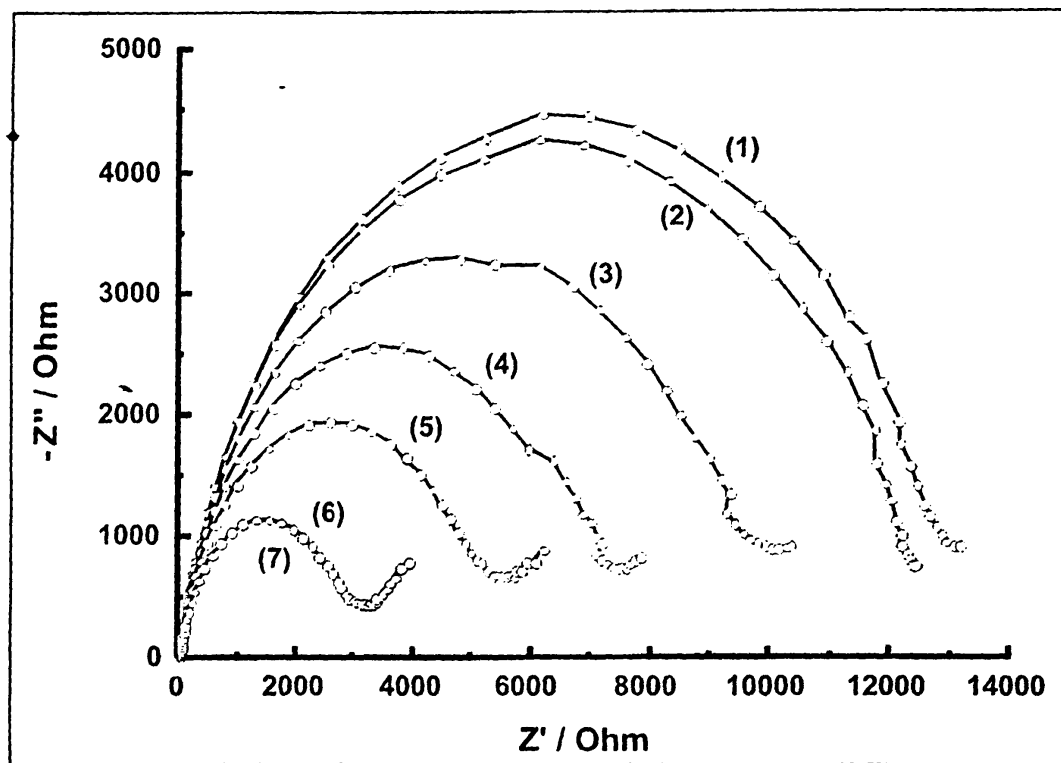
Προκειμένου να αυξηθεί η δυναμική περιοχή του αισθητήρα, τα ηλεκτρόδια GC τροποποιήθηκαν με 2x10 µL από το διάλυμα 0,3 mg mL<sup>-1</sup> LATPP.

Στο Σχήμα 3.19 φαίνονται τα διαγράμματα Nyquist του τροποποιημένου αισθητήρα πριν και μετά από διαδοχικές εγχύσεις 50 µg όζοντος. Εκείνο που





παρατηρούμε είναι η σημαντική αύξηση της δυναμικής περιοχής σε σχέση με τους αισθητήρες LO καθώς η τιμή του  $R_{ct}$  για το τροποποιημένο ηλεκτρόδιο είναι της τάξης των 13 kΩ. Επίσης, παρατηρήθηκαν φαινόμενα θορύβου στις χαμηλές συχνότητες όχι όμως σε σημαντικό βαθμό όπως στην περίπτωση των αισθητήρων LO ( $2 \times 10 \mu\text{L}$ ).

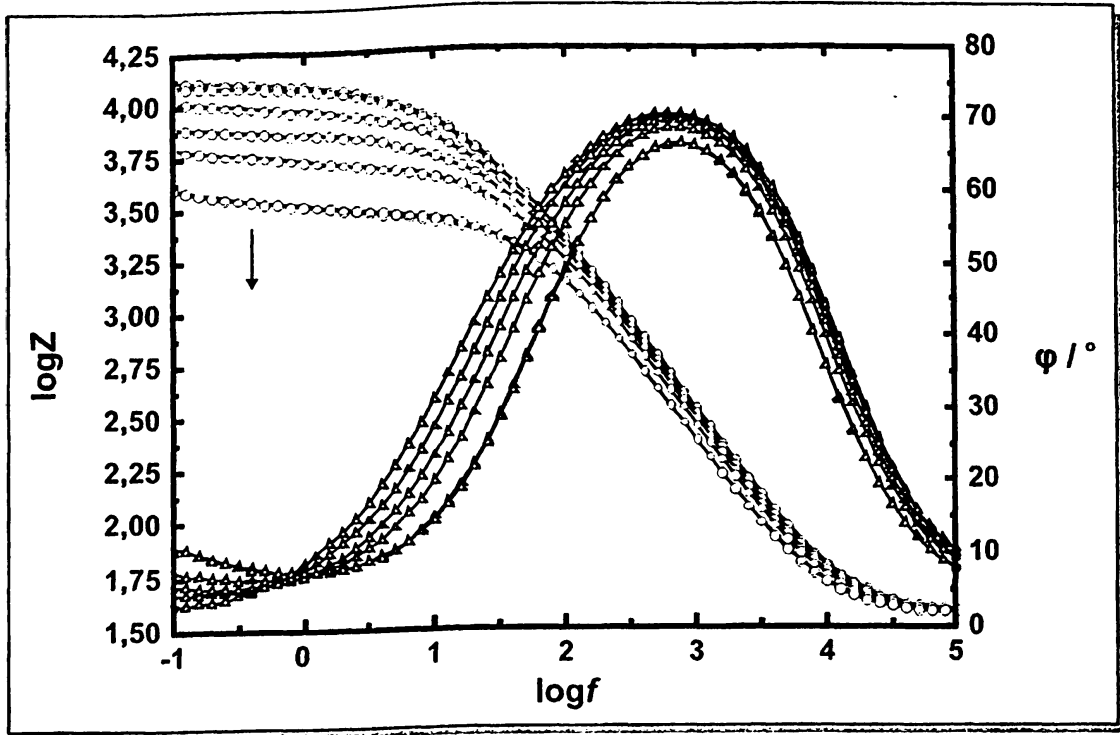


**Σχήμα 3.19:** Διαγράμματα Nyquist τροποποιημένου ηλεκτροδίου LATPP ( $2 \times 10 \mu\text{L}$ ) (1) πριν από την αντίδραση και μετά από διαδοχικές εγχύσεις (2)  $50 \mu\text{g O}_3$ , (3)  $100 \mu\text{g O}_3$ , (4)  $150 \mu\text{g O}_3$ , (5)  $200 \mu\text{g O}_3$  (6)  $250 \mu\text{g O}_3$  και (7) μη-τροποποιημένου ηλεκτροδίου.

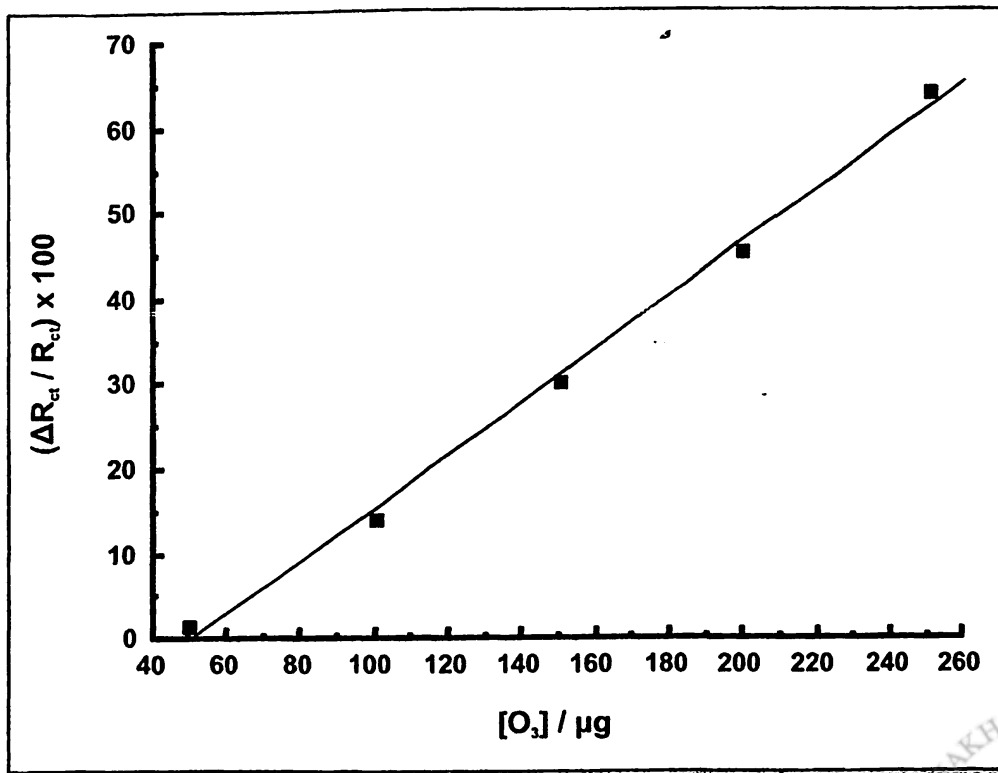
Όπως φαίνεται και στα αντίστοιχα διαγράμματα Bode (**Σχήμα 3.20**), η εμπέδηση παραμένει σταθερή στις υψηλές συχνότητες και μειώνεται σταδιακά στην περιοχή των χαμηλών συχνοτήτων. Αντίστοιχη μείωση παρατηρείται και στη φάση ( $\varphi$ ) κατά τη διάρκεια των διάφορων σταδίων της αντίδρασης.

Μελετήθηκε η περιοχή ποσοτήτων  $50\text{-}250 \mu\text{g O}_3$  για την οποία η αντίσταση μεταφοράς φορτίου  $R_{ct}$  έχει γραμμική εξάρτηση με το όζον. Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων η εξίσωση συµμεταβολής υπολογίστηκε  $A = (0,31 \pm 0,02) B + (-15,83 \pm 2,71)$ , όπου  $A = (\Delta R_{ct}/R_{ct}) \times 100$  και B η ποσότητα του όζοντος σε  $\mu\text{g}$  (**Σχήμα 3.21**). Ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης, η % σχετική τυπική απόκλιση

και το όριο ανίχνευσης (για λόγο σήματος προς θόρυβο 3), υπολογίστηκαν  $r^2=0,9991$  ( $n=5$ ),  $RSD=2,6\%$  ( $n=5$ ) και  $26,2 \mu\text{g O}_3$ , αντίστοιχα.



Σχήμα 3.20: Διαγράμματα Bode του τροποποιημένου ηλεκτροδίου LATPP ( $2 \times 10 \mu\text{L}$ ) πριν από την αντίδραση και μετά από διαδοχικές εγχύσεις  $50 \mu\text{g O}_3$ .



Σχήμα 3.21: Καμπύλη αναφοράς όζοντος με βάση τον αισθητήρα LATPP ( $2 \times 10 \mu\text{L}$ ).

Τέλος, χρησιμοποιώντας το ισοδύναμο κύκλωμα Randles του σχήματος 3.14 έγινε προσομοίωση των δεδομένων εμπέδησης του υπό μελέτη ηλεκτροχημικού συστήματος. Και σε αυτή την περίπτωση το  $R_s$  παραμένει σταθερό ενώ το  $R_{ct}$  μειώνεται με την αύξηση της ποσότητας του όζοντος (Πίνακας 3.5). Παράλληλα οι τιμές του  $n$  είναι ελαφρά μικρότερες της μονάδας ενώ η προσομοίωση του ηλεκτροχημικού συστήματος θεωρείται ικανοποιητική αφού η τιμή του  $\chi^2$  είναι της τάξης του  $10^{-3}$ .

**Πίνακας 3.5:** Αποτελέσματα προσομοίωσης των πειραματικών δεδομένων του σχήματος 3.19 (αισθητήρας LATPP, 2x10  $\mu$ L) στο κύκλωμα Randles.

| Στάδιο αντίδρασης | $R_s$ ( $\Omega$ ) | $R_{ct}$ (k $\Omega$ ) | $n$  |
|-------------------|--------------------|------------------------|------|
| (1)               | 36,0               | 7,62                   | 0,87 |
| (2)               | 35,9               | 7,47                   | 0,87 |
| (3)               | 35,5               | 6,57                   | 0,87 |
| (4)               | 35,4               | 5,33                   | 0,88 |
| (5)               | 35,6               | 4,25                   | 0,88 |
| (6)               | 35,8               | 2,69                   | 0,88 |
| (7)               | 35,5               | 2,62                   | 0,88 |

Στον πίνακα 3.6 συνοψίζονται τα χαρακτηριστικά των τριών αισθητήρων, που αναπτύχθηκαν για τον προσδιορισμό του όζοντος. Όπως είναι φανερό ο διπλασιασμός του όγκου του διαλύματος εναπόθεσης, στην περίπτωση της LO, οδηγεί σε αύξηση της δυναμικής περιοχής του αισθητήρα αλλά και σε αύξηση του αντίστοιχου LOD, εξαιτίας της αύξησης του πάχους των υμενίων.

Από την άλλη, στην περίπτωση της LATPP, έχουμε μία αρκετά μεγάλη αύξηση της δυναμικής περιοχής των αισθητήρων ενώ και το LOD είναι σχετικά υψηλό. Αυτό πιθανόν οφείλεται στο γεγονός ότι το μόριο της LATPP είναι περισσότερο ογκώδες γεγονός που επηρεάζει τη μορφολογία και το πάχος των αντίστοιχων υμενίων.



**Πίνακας 3.6:** Συγκεντρωτικά στατιστικά στοιχεία των καμπυλών αναφοράς που κατασκευάστηκαν για τον προσδιορισμό του όζοντος.

| Στοιχείο                                      | LO                                    | LO                                   | LATPP                                 |
|---|---------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| Όγκος απόθεσης (μL)                           | 1 x 10                                | 2 x 10                               | 2 x 10                                |
| Συγκέντρωση διαλύματος (mg mL <sup>-1</sup> ) | 0,3                                   | 0,3                                  | 0,3                                   |
| Δυναμική περιοχή (kΩ)                         | 1,5 – 4,0                             | 2,2 – 8,5                            | 3,0 – 13,0                            |
| Εξίσωση                                       | A = (0,36 ± 0,01) B + (-14,15 ± 1,36) | A = (0,30 ± 0,02) B + (-5,84 ± 3,14) | A = (0,31 ± 0,02) B + (-15,83 ± 2,71) |
| r <sup>2</sup>                                | 0,9994                                | 0,9990                               | 0,9991                                |
| %RSD <sup>[a]</sup>                           | 2,1                                   | 2,5                                  | 2,6                                   |
| LOD (S/N=3)                                   | 11,3 μg O <sub>3</sub>                | 31,4 μg O <sub>3</sub>               | 26,2 μg O <sub>3</sub>                |

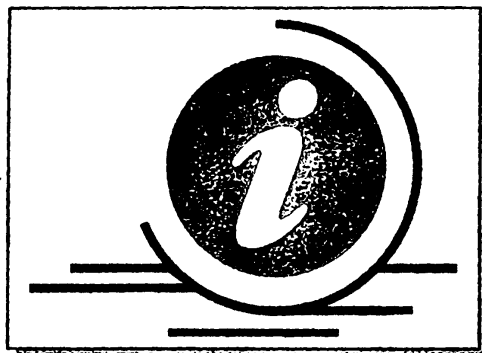
<sup>[a]</sup> Υπολογίστηκε για n=5 διαδοχικές εγχύσεις δείγματος 50 μg όζοντος.

### 3.5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

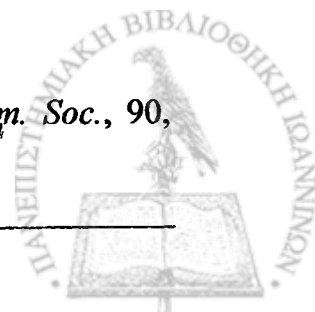
Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η αποικοδόμηση υμενίων λιγνίνης και παραγώγων αυτής παρουσία όζοντος με φασματοσκοπία εμπέδησης και κυκλική βολταμετρία.

Τα πειραματικά δεδομένα, όπως αυτά καταγράφονται στα διαγράμματα Nyquist και Bode καθώς και η προσομοίωση αυτών με το ισοδύναμο ηλεκτρικό κύκλωμα Randles, έδειξαν ότι η αντίσταση μεταφοράς φορτίου  $R_{ct}$  μεταβάλλεται γραμμικά σε συνάρτηση με την ποσότητα του όζοντος και ως εκ τούτου η παραπάνω μελέτη θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη αισθητήρων (τύπου προειδοποίησης) οι οποίοι θα χρησιμοποιούνται σε βιομηχανικούς χώρους και εγκαταστάσεις (όπου γίνεται χρήση όζοντος), σύμφωνα με την ισχύουσα νομοθεσία.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ



- Adhikari, B., Majumdar, S., *Prog. Polym. Sci.*, 29, 2004, 699.
- Altshuller, A.P., Miller, D.L., Sleva, S.F., *Anal. Chem.*, 33, 1961, 621.
- Amrani, M.E.H., Persaud, K.C., Payne, P.A., *Meas. Sci. Technol.*, 6, 1995, 1500.
- Ando, M., Yoshimoto, T., Ogushi, S., Rikitake, K., Shibata, S., Tsuru, D., *J. Biochem.*, 85, 1979, 1165.
- Atkinson, R., Carter, W.P.L., *Chem. Rev.*, 84, 1984, 437.
- Attwood, M.M., *Methods Enzymol.*, 188, 1990, 318.
- Awad, M.I., Ohsaka, T., *Electrochem. Commun.*, 6, 2004, 1135.
- Azevedo, A.M., Cabral, J.M.S., Gibson, T.D., Fonseca, L.P., *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 28, 2004, 45.
- Badea, M., Curulli, A., Palleschi, *Biosens. Bioelectron.*, 18, 2003, 689.
- Bader, H., Hoigné, J., *Ozone Sci. Eng.*, 4, 1982, 169.
- Barzana, E., Klibanov, A.M., Karel, M., *Anal. Biochem.*, 182, 1989, 109.
- Bauld, N.L., Thompson, J.A., Hudson, C.E., Bailey, P.S., *J. Am. Chem. Soc.*, 90, 1968, 1822.



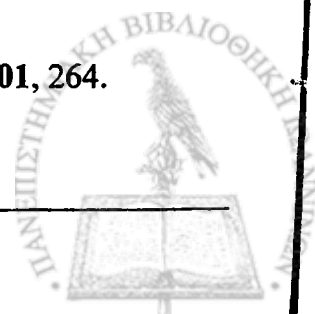
- Bergshoeff, G., Lanting, R.W., Prop, J.M.G., Reynders, H.F.R., *Anal. Chem.*, 52, 1980, 541.
- Bersis, D., Vassiliou, E., *Analyst*, 91, 1966, 499.
- Bocci, V., Aldinucci, C., Borrelli, E., Corradeschi, F., Diadori, A., Fanetti, G., Valacchi, F., *Ozone Sci. Eng.*, 23, 2001, 207.
- Bocci, V., *Oxygen-Ozone Therapy, A Critical Evaluation*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 2002.
- Boukamp, B.A., *Solid State Ionics*, 20, 1986, 31.
- Boyd, A.W., Willis, C., Cyr, R., *Anal. Chem.*, 42, 1970, 670.
- Bufalini, J.J., Gay, B.W.Jr., Brubaker, K.L., *Environ. Sci. Technol.*, 6, 1972, 816.
- Cancilla, D.A., Que-Hee, S.S., *J. Chromatogr.*, 627, 1992, 1.
- Carlier, P., Hannachi, H., Mouvier, G., *Atmos. Environ.*, 20, 1986, 2079.
- Chan, W.H., Huang, H., *Analyst*, 121, 1996, 1727.
- Chan, W.H., Yuan, R., *Analyst*, 120, 1995, 1055.
- Criegge, R., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 14, 1975, 745.
- Dietz, R.N., Pruzansky, J., Smith, J.D., *Anal. Chem.*, 45, 1973, 402.
- Doll, T., Fuchs, A., Eisele, I., Faglia, G., Gropelli, S., Sberveglieri, G., *Sens. Actuators B*, 49, 1998, 63.
- Dzyadevych, S.V., Arkhypova, V.N., Korpan, Y.I., El'Skaya, A.V., Soldatkin, A.P., Renault, N.J., Martelet, C., *Anal. Chim. Acta*, 445, 2001, 47.
- Eberlein, B.K., Przybilla, B., Kühnl, P., Pechak, J., Gebefügi, I., Klenschmidt, J., Ring, J., *J. Allerg. Clin. Immunol.*, 101, 1998, 141.
- Eisele, I., Doll, T., Burgmair, M., *Sens. Actuators B*, 78, 2001, 19.



- EPA, Environmental Protection Agency, *Air quality criteria or ozone and related photochemical oxidants*, EPA-6000/P-93-004aF-cF, **1993**, pp. 3-6.
- Evmiridis, N.P., Karayannis, M.I., *Analyst*, **112**, **1987**, 831.
- Evmiridis, N.P., Sadiris, N.C., Karayannis, M.I., *Analyst*, **115**, **1990**, 1103.
- Frantzen, A., Scheidtmann, J., Frenzer, G., Maier, W.F., Jockel, J., Brinz, T., Sanders, D., Simon, U., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **43**, **2004**, 752.
- Fung, K., Grosjean, D., *Anal. Chem.*, **53**, **1981**, 168.
- Gavalas, V.G., Chaniotakis, N.A., *Anal. Chim. Acta*, **404**, **2000**, 67.
- Gibson, T.D., Higgins, I.J., Woodward, J.R., *Analyst*, **117**, **1992**, 1293.
- Gierer, J., *Wood Sci. Technol.*, **19**, **1985**, 289.
- Gierer, J., *Wood Sci. Technol.*, **20**, **1986**, 1.
- Girousi, S.T., Golia, E.E., Voulgaropoulos, A.N., Maroulis, A.J., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **358**, **1997**, 667.
- Glaze, W.H., Koga, M., Cancilla, D., *Environ. Sci. Technol.*, **23**, **1989**, 838
- Gurlo, A., Barsan, N., Ivanovskaya, M., Weimar, U., Göpel, W., *Sens. Actuators B*, **47**, **1998**, 92.
- Gurol, M.D., *Environ. Sci. Technol.*, **16**, **1982b**, 337.
- Gurol, M.D., Singer, P.C., *Environ. Sci. Technol.*, **16**, **1982a**, 377.
- Gutman, E.E., *Sens. Actuators B*, **23**, **1995**, 209.
- Hämmerle, M., Hall, E.A.H., Cade, N., Hodgins, D., *Biosens. Bioelectron.*, **11**, **1996**, 239.
- Hauser, T.R., Bradley, D.W., *Anal. Chem.*, **39**, **1967**, 1184.
- Hergert, H.L., *J. Org. Chem.*, **25**, **1960**, 405.
- Hergert, H.L., Kurth, E.F., *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, **1953**, 1622.



- Herschkovitz, Y., Eshkenazi, I., Campbell, C.E., Rishpon, J., *J. Electroanal. Chem.*, 491, 2000, 182.
- Hines, A.L., Ghosh, T.K., Loyalka, S.K., Warder, R.C., *Indoor air – Quality and control*, Prentice Hall, Englewood, Cliffs, NJ, 1993.
- Ho, M.H., Samanifar, M., *Anal. Chim. Acta*, 215, 1988, 249.
- Ho, W.O, Krause, S., McNeil, C.J., Pritchard, J.A., Armstrong, R.D., Athey, D., Rawson, K., *Anal. Chem.*, 71, 1999, 1940.
- Hodgenson, J.A., Baumgardner, R.E., Martin, B.E., Rehme, K.A., *Anal. Chem.*, 43, 1971, 1123.
- Hodgenson, J.A., Krost, K.J., O’Keeffe, A.E., Stevens, R.K., *Anal. Chem.*, 42, 1970, 1795.
- Hofmann, A.W., *Ann.*, 145, 1868, 357.
- Horváth, M., Bilitzky, L., Hüttner, J., *Ozone*, Elsevier, Amsterdam, 1985.
- Huang, H., Dasgupta, P.K., *Electroanalysis*, 9, 1997, 585.
- Huisgen, R., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2, 1963, 565.
- Huusko, J., Lantto, V., Torvela, H., *Sens. Actuators B*, 16, 1993, 245.
- Huyberechts, G., van Muylder, M., Honore, M., Desmet, J., Roggen, J., *Sens. Actuators B*, 18, 1994, 296.
- IARC, International Agency for research on Cancer, *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans. Wood dust and formaldehyde*, Vol. 262, pp. 405, Lyon, France, 1995.
- Ishihara, T., Matsubara, S., *J. Electroceram.*, 2, 1998, 215.
- Ivanovskaya, M., Gurlo, A., Bogdanov, P., *Sens. Actuators B*, 77, 2001, 264.
- Janata, J., Josowicz, M., *Nat. Mater.*, 2, 2003, 19.





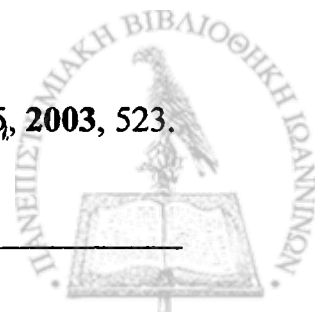
- Jones, A.P., *Atmos. Environ.*, 33, 1999, 4535.
- Kang, W.P., Kim, C.K., *J. Electrochem. Soc.*, 140, 1993, L125.
- Kataký, R., Bryce, M.R., Goldenberg, L., Hayes, S., Nowak, A., *Talanta*, 56, 2002, 451.
- Kiba, N., Sun, L., Yokose, S., Kazue, M.T., Suzuki, T.T., *Anal. Chim. Acta*, 378, 1999, 169.
- Kim, K.C., Cho, S.M., Choi, H.G., *Sens. Actuators B*, 67, 2000, 194.
- Kim, S.R., Hong, H.K., Kwon, C.H., Yun, D.H., Lee, K., Sung, Y.K., *Sens. Actuators B*, 66, 2000, 59.
- Knake, R., Hauser, P.C., *Anal. Chim. Acta*, 459, 2002, 199.
- Knake, R., Jacquinet, P., Hauser, P.C., *Electroanalysis*, 13, 2001, 631.
- Korpan, Y.I., Gonchar, M.V., Sibirny, A.A., Martelet, C., El'Skaya, A.V., Gibson, T.D., Soldatkin, A.P., *Biosens. Bioelectron.*, 15, 2000, 77.
- Koupparis, M.A., Efstathiou, C.E., Hadjiioannou, T.P., *Anal. Chim. Acta*, 107, 1979, 91.
- Kurzweil, P., Maunz, W., Plog, C., *Sens. Actuators B*, 24-25, 1995, 653.
- Labidi, A., Jacolin, C., Bendahan, M., Abdelghani, A., Guérin, J., Aguir, K., Maaref, B., *Sens. Actuators B*, 106, 2005, 713.
- Lattimer, R.P., Kuczkowski, R.L., Gillies, C.W., *J. Am. Chem. Soc.*, 96, 1974, 348.
- Lazrus, A.L., Fong, K.L., Lind, J.A., *Anal. Chem.*, 60, 1988, 1074.
- Le Lacheur, R.M., Sonnenberg, L.B., Singer, P.C., Christman, R.F., Charles, M.J., *Environ. Sci. Technol.*, 27, 1993, 2745.
- Levin, J.O., Andersson, K., Lindahl, R., Nilsson, C.A., *Anal. Chem.*, 57, 1985, 1032.



- Li, J., Dasgupta, P.K., Genfa, Z., Hutterli, M.A., *Field Anal. Chem. Technol.*, 5, 2001, 2.
- Li, J., Dasgupta, P.K., Luke, W., *Anal. Chim. Acta*, 531, 2005, 51.
- Lind, J., Merényi, G., *J. Wood Chem. Technol.*, 17, 1997, 297.
- Lorrain, J.M., Fortune, C.R., Dellinger, B., *Anal. Chem.*, 53, 1981, 1302.
- Los, J.M., Roeleveld, L.F., Wetsema, B.J.C., *J. Electroanal. Chem.*, 75, 1977, 819.
- Luttrell, W.E., *Chemical Health and Safety*, Division of Chemical Health and Safety of the American Chemical Society, 2003.
- Lyse, T.E., *PhD thesis*, The Institute of Paper Chemistry, Appleton, Wisconsin, 1979.
- Maroni, M., Seifert, B., Lindvall, T., *Indoor air quality – A Comprehensive reference book*, Elsevier, Amsterdam, 1995.
- Martinelli, G., Carotta, M.C., *Sens. Actuators B*, 23, 1995, 157.
- Mbachu, R.A.D., Manley, R.St.J., *J. Polym. Sci., Part A : Polym. Chem.*, 19, 1981a, 2053.
- Mbachu, R.A.D., Manley, R.St.J., *J. Polym. Sci., Part A : Polym. Chem.*, 19, 1981b, 2065.
- McDonald, J.R., *Impedance Spectroscopy: Emphasizing Solid Materials and Systems*, Wiley, New York, USA, 1987.
- McGowan, K.A., Pacey, G.E., *Talanta*, 42, 1995, 1045.
- McNeil, C.J., Athey, D., Ball, M., Ho, W.O., Krause, S., Armstrong, R.D., Wright, J.D., Rawson, K., *Anal. Chem.*, 67, 1995, 3928.
- Mei, Y.H., Mendenhall, G.D., *Anal. Chem.*, 69, 1997, 1019.
- Mikuška, P., Večeřa, Z., *Anal. Chim. Acta*, 374, 1998, 297.



- Miyata, T., Hikosaka, T., Minami, T., *Surf. Coat. Technol.*, 126, **2000**, 219.
- Morgan, K.T., *Toxicol. Pathol.*, 25, **1997**, 291.
- Moseley, P.T., *Meas. Sci. Technol.*, 8, **1997**, 223.
- Motyka, K., Mikuška, P., *Anal. Chim. Acta*, 518, **2004**, 51.
- Musio, F., Amrani, M.E.H., Persaud, K.C., *Sens. Actuators B*, 23, **1995**, 223.
- Nada, Abd-Alla M.A., El-Sakhawy, M., Kamel, S.M., *Polym. Degrad. Stab.*, 60, **1998**, 247.
- Nakagawa, H., Okazaki, S., Asakura, S., Himizu, H., Iwamoto, I., *Sens. Actuators B*, 77, **2001**, 543.
- Ogushi, S., Ando, M., Tsuru, D., *Agric. Biol. Chem.*, 48, **1984**, 597.
- Oyama, S.T., *Catal. Rev. Sci. Eng.*, 42, **2000**, 279.
- Pall Filtration Corporation, *Biodyne nylon 66 membranes protocol*, **2000**.
- Pall Filtration Corporation, *Immunodyne ABC membrane protocol*, **2001**.
- Pate, C.T., Atkinson, R., Pitts, J.N. Jr., *J. Environ. Sci. Health, Part A*, A11, **1976**, 1.
- Patel, R.N., Hou, C.T., Laskin, A.I., Derelanko, P., *Arch. Biochem. Biophys.*, 210, **1981**, 481.
- Penrose, W.R., Pan, L., Stetter, J.R., Ollison, W.M., *Anal. Chim. Acta*, 313, **1995**, 209.
- Polk, B.J., Smith, J.A., DeWeerth, S.P., Zhou, Z., Janata, J., Domansky, K., *Electroanalysis*, 11, **1999**, 707.
- Prodromidis, M.I., Karayannis, M.I., *Electroanalysis*, 14, **2002**, 241.
- Ray, J.D., Stedman, D.H., Wendel, G.J., *Anal. Chem.*, 58, **1986**, 598.
- Roncero, M.B., Qeral, M.A., Colom, J.F., Vidal, T., *Ozone Sci. Eng.*, 25, **2003**, 523.
- Sabot, A., Krause, S., *Anal. Chem.*, 74, **2002**, 3304.



- Sachdev, S.L., Lodge, J.P., West, P.W., *Anal. Chim. Acta*, 58, 1972, 141.
- Saito, Y., Maruyama, T., Matsumoto, Y., Kobayashi, K., Yano, Y., *Solid State Ionics*, 14, 1984, 273.
- Saltzman, B.E., Gilbert, N., *Anal. Chem.*, 31, 1959, 1914.
- Sánchez, C.F., McNeil, C.J., Rawson, K., *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 24, 2005, 37.
- Saum, A.G.E., Cumming, R.H., Rowell, F.J., *Biosens. Bioelectron.*, 15, 2000, 305.
- Saum, A.G.E., Cumming, R.H., Rowell, F.J., *Biosens. Bioelectron.*, 13, 1998, 511.
- Schiavon, G., Zotti, G., Bontempelli, G., Farnia, G., Sandona, G., *Anal. Chem.*, 62, 1990, 293.
- Shi, Y., Johnson, B.J., *Analyst*, 121, 1996, 1507.
- Smart, R.B., Dormond-Herrera, R., Mancy, K.H., *Anal. Chem.*, 51, 1979, 2315.
- Stanley, J.H., Johnson, J.D., *Anal. Chem.*, 51, 1979, 2144.
- Stergiou, D.V., Karkabounas, S.C., Veltsistas, P.G., Evmiridis, N.P., Vlessidis, A.G., *Microchim. Acta*, in press, 2006.
- Stone, D.C., Thompson, M., *Anal. Chem.*, 65, 1993, 352.
- Straka, M.R., Gordon, G., Pacey, G.E., *Anal. Chem.*, 57, 1985, 1799.
- Suzuki, S., Nagashima, K., *Anal. Chim. Acta*, 144, 1982, 261.
- Takada, T., Suzuki, K., Nakane, M., *Sens. Actuators B*, 13, 1993, 404.
- Takeuchi, K., Ibusuki, T., *Anal. Chem.*, 61, 1989, 619.
- Teixeira, L.S.G., Leão, E.S., Dantas, A.F., Pinheiro, H.L.C., Costa, A.C.S., de Andrade, J.P., *Talanta*, 64, 2004, 711.
- Tomčík, P., Mrafková, L., Bustin, D., *Microchim. Acta*, 141, 2003, 69.
- Tomiyasu, H., Gordon, G., *Anal. Chem.*, 56, 1984, 752.
- Turyan, Y.I., *Croat. Chem. Acta*, 73, 2000, 625.



- Uchiyama, S., Ikarugi, T., Mori, M., Kasama, K., Ishikawa, Y., Kaneko, M., Umezawa, A., *Electroanalysis*, 5, 1993, 121.
- van der Klei, I.J., Bystrykh, L.V., Harder, W., *Methods Enzymol.*, 188, 1990, 420.
- Vingarzan, R., *Atmos. Environ.*, 38, 2004, 3431.
- Wadelin, C.W., *Anal. Chem.*, 29, 1957, 441.
- Walker, J.F., *J. Chem. Educ.*, 10, 1933, 546.
- Walker, J.F., *Formaldehyde*, Reinhold Publishing Corporation, New York, 1944.
- Watanabe, H., Nakadoi., T., *J. Air. Pollut. Control Assoc.*, 16, 1966, 614.
- Weschler, C.J., Hodgson, A.T., Wooley, J.D., *Environ. Sci. Technol.*, 26, 1992, 2371.
- White, N.M., Turner, J.D., *Meas. Sci. Technol.*, 8, 1997, 1.
- Xie, L., Lu, J., Yan, H., *Electroanalysis*, 10, 1998, 842.
- Yao, T., Handa, S., *Anal. Sci.*, 19, 2003, 767.
- Yu, J., Jeffries, H.E., Le Lacheur, R.M., *Environ. Sci. Technol.*, 29, 1995, 1923.
- ΦΕΚ 94/Α/13-5-99, Υπουργείο Εργασίας και Κοινωνικών Ασφαλίσεων, *Νομοθετήματα εναρμόνισης του εθνικού μας δικαίου προς τις κοινοτικές οδηγίες για την υγιεινή και την ασφάλεια των εργαζομένων*, Γ Έκδοση Συμπληρωμένη, Αθήνα, 2001.



## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α΄

## ΜΟΝΑΔΕΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

**Α) Μονάδα ενζυμικής δράσης:** ορίζεται το ποσό του ενζύμου που μετατρέπει 1  $\mu\text{mol}$  του υποστρώματος σε χρόνο 1 min υπό καθορισμένες συνθήκες θερμοκρασίας και pH και σε κατάσταση κορεσμού υποστρώματος.

Σε περιπτώσεις που επηρεάζονται περισσότεροι από ένας δεσμοί σε κάθε μόριο υποστρώματος, η μονάδα ορίζεται ως το ποσό του ενζύμου που καταλύει τη μετατροπή 1 μικροϊσοδυνάμου της ομάδας που επηρεάζεται σε 1 min.

Αυτή η μονάδα είναι γνωστή ως Διεθνής Μονάδα (International Unit, IU ή Unit, U). Η μονάδα τείνει να αντικατασταθεί από το katal, που ορίζεται ως το ποσό της ενζυμικής δράσης που μετατρέπει 1 mol του υποστρώματος σε 1 s.

$$1 \text{ U} = 1 \mu\text{mol min}^{-1} = (1/60) \mu\text{mol s}^{-1} = (1/60) \mu\text{katal} = 16,67 \text{ nkatal}$$

$$1 \text{ katal} = 6 \times 10^7 \text{ U}$$

**Β) Ειδική δραστηριότητα:** ορίζεται ως ο αριθμός των μονάδων ενός ενζύμου ανά mg πρωτεΐνης ( $\text{U mg}^{-1}$ ) υπό καθορισμένες συνθήκες θερμοκρασίας και pH, ενώ παράλληλα αποτελεί μέτρο της καθαρότητας του ενζύμου.

**Γ) Μοριακή δραστηριότητα:** ορίζεται ως ο αριθμός των μονάδων σε κάθε mol υπό τις βέλτιστες συνθήκες συγκέντρωσης του υποστρώματος, δηλαδή ο αριθμός των μορίων του υποστρώματος που μετατρέπονται ανά λεπτό ανά μόριο ενζύμου.



**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β΄**

**ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ LATPP ΚΑΙ LAPAP**

---

**A) LATPP:** Σε 50 mL υδατικού διαλύματος που περιέχει 2,0 g LA προστίθεται αργά και υπό ανάδευση 50 mL διαλύματος που περιέχει 2,5 g χλωριούχου άλατος TPP. Το μίγμα αφήνεται υπό συνεχή έντονη ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου περίπου για 2 h, έτσι ώστε να ολοκληρωθεί ο σχηματισμός του παραγώγου. Στη συνέχεια το στερεό διηθείται με τη βοήθεια πτυχωτού ηθμού Watman No42, εκπλένεται με άφθονο κρύο δις-απεσταγμένο ύδωρ και αφήνεται προς ξήρανση αρχικά σε ανοικτή ατμόσφαιρα και τελικά εντός ξηραντήρα. Το στερεό χρώματος καφέ, παραλαμβάνεται με τη βοήθεια σπάτουλας και φυλάσσεται εντός πωματισμένου φιαλιδίου σε συνήθεις συνθήκες.

**B) LAPAP:** Σε 50 mL υδατικού διαλύματος που περιέχει 2,0 g LA προστίθεται αργά και υπό ανάδευση 50 mL διαλύματος που περιέχει 3,0 g παπαβερίνης. Το μίγμα αφήνεται υπό συνεχή έντονη ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου περίπου για 2 h, έτσι ώστε να ολοκληρωθεί ο σχηματισμός του παραγώγου. Στη συνέχεια το στερεό διηθείται με τη βοήθεια πτυχωτού ηθμού Watman No42, εκπλένεται με άφθονο κρύο δις-απεσταγμένο ύδωρ και αφήνεται προς ξήρανση αρχικά σε ανοικτή ατμόσφαιρα και τελικά εντός ξηραντήρα. Το στερεό χρώματος καφέ, παραλαμβάνεται με τη βοήθεια σπάτουλας και φυλάσσεται εντός πωματισμένου φιαλιδίου σε συνήθεις συνθήκες.



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ΄

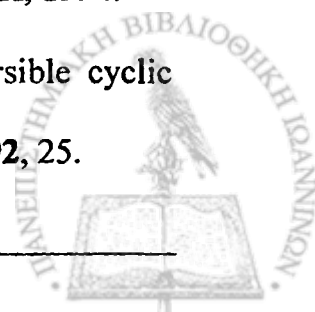
---

ΑΡΘΡΑ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗΣ, ΜΟΝΟΓΡΑΦΙΕΣ και ΒΙΒΛΙΑ  
ΑΝΑ ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΕΝΟΤΗΤΑ

---

1. ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΕΙΑ – ΗΛΕΚΤΡΟΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

- Adams, R.N., *Electrochemistry at Solid Electrodes*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1969.
- Bard, A.J., Faulkner, L.R., *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons, New York, 1980.
- Brett, C.M.A., Oliveira-Brett, A.M., *Electroanalysis*, Oxford University Press, New York, 1998.
- Brett, C.M.A., Oliveira-Brett, A.M., *Electrochemistry: Principles, Methods and Applications*, Oxford University Press, New York, 1993.
- Cass, A.E.G., *Biosensors, A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, 1990.
- EcoChemie B.V., *Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS): 3. Data Analysis, Autolab Application Note 013-1*, The Netherlands, 1992.
- Eggins, B.R., *Chemical Sensors and Biosensors*, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, UK, 2002.
- Evans, D.H., O'Connell, K.M., Petersen, R.A., Kelly, M.J., "Cyclic voltammetry", *J. Chem. Educ.*, 60, 1983, 290.
- Gamry Instruments, *Electrochemical Impedance Spectroscopy Primer*, UK, 1994.
- Keightley, A.M., Myland, J.C., Oldham, K.B., Symons, P.G., "Reversible cyclic voltammetry in the presence of product", *J. Electroanal. Chem.*, 322, 1992, 25.





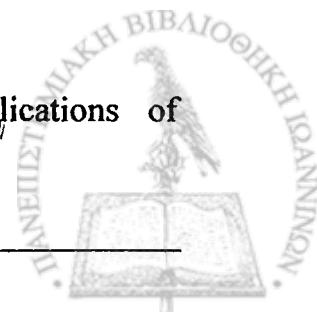
- Kellner, R., Mermet, J.M., Otto, M., Valcárcel, M., Widmer, H.M., *Analytical Chemistry: A Modern Approach to Analytical Science*, Second Edition, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. Weinheim, 2004.
- Kissinger, P.T., Heineman, W.R., "Cyclic voltammetry", *J. Chem. Educ.*, 60, 1983, 702.
- Kissinger, P.T., Heineman, W.R., *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*, 2<sup>nd</sup> Edition, Marcel Dekker, New York, 1996.
- Laviron, E. Roullier, L., "The square scheme with the electrochemical reactions at equilibrium. A study by diffusion or thin layer cyclic voltammetry and by scanning potential coulometry", *J. Electroanal. Chem.*, 186, 1985, 1.
- Laviron, E., "The EC1irr reaction with adsorption of the reactants", *J. Electroanal. Chem.*, 391, 1995, 187.
- Laviron, E., "Theoretical study of the kinetics of the homogeneous ee electrochemical reaction", *J. Electroanal. Chem.*, 148, 1983, 1.
- Mabbott, G.A., "An introduction to cyclic voltammetry", *J. Chem. Educ.*, 60, 1983, 697.
- Matsuda, H., Aoki, K., Tokuda, K., "Theory of electrode reactions of redox couples confined to electrode surfaces at monolayer levels. Part I. Expression of the current-potential relationship for simple redox reactions", *J. Electroanal. Chem.*, 217, 1987, 1.
- Matsuda, H., Aoki, K., Tokuda, K., "Theory of electrode reactions of redox couples confined to electrode surfaces at monolayer levels. Part II. Cyclic voltammetry and ac impedance measurements", *J. Electroanal. Chem.*, 217, 1987, 15.



- McDonald, J.R., *Impedance Spectroscopy: Emphasizing Solid Materials and Systems*, Wiley, New York, USA, 1987.
- Park, S.M., Yoo, J.S., "Electrochemical impedance spectroscopy for better electrochemical measurements", *Anal. Chem.*, 75, 2003, 455A.
- Princeton Applied Research, *Basics of electrochemical Impedance Spectroscopy, Application Note AC-1*, USA, 1992.
- Scholz, F., *Electroanalytical Methods, Guide to Experiments and Applications*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2002.
- Wang, J., *Analytical Electrochemistry*, Wiley-VCH Inc., New York, 1994.
- Μουμτζής, Ι.Α., Σαζού, Δ.Π., *Ηλεκτροχημεία*, Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη, 1997.

## 2. ΧΗΜΙΚΟΙ ΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ ΚΑΙ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ

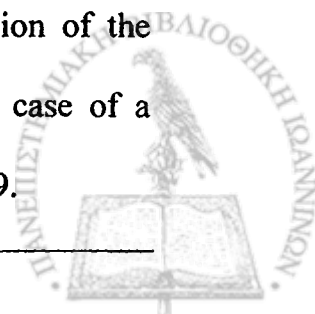
- Adhikari, B., Majumdar, S., "Polymers in sensor applications", *Prog. Polym. Sci.*, 29, 2004, 699.
- Alber, K.S., Cox, J.A., Kulesza, P.J., "Solid-state amperometric sensors for gas-phase analytes: A review of recent advances", *Electroanalysis*, 9, 1997, 97.
- Baeumner, A.J., "Biosensors for environmental pollutants and food contaminants", *Anal. Bioanal. Chem.*, 377, 2003, 434.
- Bakker, E., "Electrochemical sensors", *Anal. Chem.*, 76, 2004, 3285.
- Bakker, E., Diaz, M.T., "Electrochemical sensors", *Anal. Chem.*, 74, 2002, 2781.
- Berggren, C., Bjarnanson, B., Johansson, G., "Capacitive biosensors", *Electroanalysis*, 13, 2001, 173.
- Cao, Z., Buttner, W.J., Stetter, J.R., "The properties and applications of amperometric gas sensors", *Electroanalysis*, 4, 1992, 253.



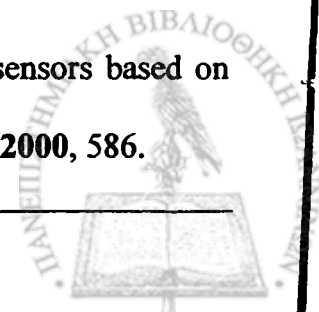
- Cass, A.E.G., *Biosensors, A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, 1990.
- Chaubey, A., Malhotra, B.D., "Mediated biosensors", *Biosens. Bioelectron.*, 17, 2002, 441.
- Cosnier, S., "Biosensors based on electropolymerized films: new trends", *Anal. Bioanal. Chem.*, 377, 2003, 507.
- Dekanski, A., Stevanović, J., Stevanović, R., Jovanović, V.M., "Glassy carbon electrodes I. Modification by immersion in  $\text{AgNO}_3$ ", *Carbon*, 39, 2001, 1207.
- Dekanski, A., Stevanović, J., Stevanović, R., Nikolić, B.Z., Jovanović, V.M., "Glassy carbon electrodes I. Characterization and electrochemical activation", *Carbon*, 39, 2001, 1195.
- Dong, S., Chen, X., "Some new aspects in biosensors", *Rev. Mol. Biotechnol.*, 82, 2002, 303.
- Eiggins, B.R., *Chemical Sensors and Biosensors*, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, UK, 2002.
- Frysz, C.A., Shui, X., Chung, D.D.L., "Electrochemical behavior of porous carbons", *Carbon*, 35, 1997, 893.
- Guan, J., G., Miao, Y.Q., Zhang, Q.J., "Impedimetric biosensors", *J. Biosci. Bioeng.*, 97, 2004, 219.
- Guilbault, G.G., Pravda, M., Kreuzer, M., O'Sullivan, C.K., "Biosensors - 42 years and counting", *Anal. Lett.*, 37, 2004, 1481.
- Habermüller, K., Mosbach, M., Schuhmann, W., "Electron-transfer mechanisms in amperometric biosensors", *Fresenius J. Anal. Chem.*, 366, 2000, 560.
- Hart, J.P., Pemberton, R.M., "A review of screen-printed electrochemical sensors", Princeton Applied Research, Application note #121.



- Hart, J.P., Wring, S.A., "Recent developments in the design and application of screen-printed electrochemical sensors for biomedical, environmental and industrial analyses", *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 16, 1997, 89.
- Homola, J., Yee, S.S., Gauglitz, G., "Surface plasmon resonance sensors: review", *Sens. Actuators B*, 54, 1999, 3.
- Ishihara, T., Matsubara, S., "Capacitive type gas sensors", *J. Electroceram.*, 2, 1998, 215.
- Janata, J., "Electrochemical sensors and their impedances: a tutorial", *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 32, 2002, 109.
- Janata, J., Josowicz, M., "Conducting polymers in electronic chemical sensors", *Nature Mater.*, 2, 2003, 19.
- Janata, J., Josowicz, M., Vanysek, P., de Vaney, D.M., "Chemical sensors", *Anal. Chem.*, 70, 1998, 179R.
- Karube, I., Nomura, Y., "Enzyme sensors for environmental analysis", *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 10, 2000, 177.
- Kissinger, P.T., "Biosensors - a perspective", *Biosens. Bioelectron.*, 20, 2005, 2512.
- Koncki, R., "Chemical sensors and biosensors based on Prussian Blues", *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 32, 2002, 79.
- Laviron, E., "The use of polarography and cyclic voltammetry for the study of redox systems with adsorption of the reactants. Heterogeneous vs surface path", *J. Electroanal. Chem.*, 382, 1995, 111.
- Laviron, E., "Theoretical study of a simple redox system with adsorption of the reactants on a rotating disk electrode. Part I. The reaction path in the case of a Langmuirian adsorption equilibrium", *J. Electroanal. Chem.*, 124, 1981, 19.



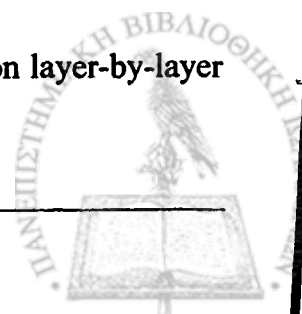
- Laviron, E., Roullier, L., "General expression of the linear potential sweep voltammogram for a surface redox reaction with interactions between the adsorbed molecules", *J. Electroanal. Chem.*, 115, 1980, 65.
- Lei, Y., Chen, W., Mulchandani, A., "Microbial biosensors", *Anal. Chim. Acta*, 568, 2006, 200.
- Mello, L.D., Kubota, L.T., "Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries", *Food Chem.*, 77, 2002, 237.
- Merkoçi, A., "Carbon nanotubes in analytical sciences", *Microchim. Acta*, 152, 2006, 157.
- Merkoçi, A., Pumera, M., Llopis, X., Pérez, B., del Valle, M., Alegret, S., "New materials for electrochemical sensing VI: Carbon nanotubes", *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 24, 2005, 826.
- Midgley, D., Mulcahy, D.E., "Carbon substrate ion-selective electrodes", *Ion-Selective Electrode Rev.*, 5, 1983, 165.
- Moseley, P.T., "Solid state gas sensors", *Meas. Sci. Technol.*, 8, 1997, 223.
- Nakamura, H., Karube, I., "Current research activity in biosensors", *Anal. Bioanal. Chem.*, 377, 2003, 446.
- O'Connell, K.M., Waldner, E., Roullier L., Laviron, E., "Experimental study of redox modified electrodes with simultaneous electron and proton exchange", *J. Electroanal. Chem.*, 162, 1984, 77.
- Opekar, F., Stulik, K., "Amperometric solid-state gas sensors: Materials for their active components", *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 32, 2002, 253.
- Palmisano, F., Zambonin, P.G., Centonze, D., "Amperometric biosensors based on electrosynthesized polymeric films", *Fresenius J. Anal. Chem.*, 366, 2000, 586.



- Patel, P.D., "(Bio)sensors for measurement of analytes implicated in food safety: a review", *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 21, 2002, 96.
- Prodromidis, M.I., Karayannis, M.I., "Enzyme based amperometric biosensors for food analysis", *Electroanalysis*, 14, 2002, 241.
- Rittersma, Z.M., "Recent achievements in miniaturized humidity sensors-a review of transduction techniques", *Sens. Actuators A*, 96, 2002, 196.
- Rogers, K.R., "Recent advances in biosensor techniques for environmental monitoring", *Anal. Chim. Acta*, 568, 2006, 222.
- Sánchez, C.F., McNeil, C.J., Rawson, K., "Electrochemical impedance spectroscopy studies of polymer degradation: application to biosensor development", *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 24, 2005, 37.
- Sherigara, B.S., Kutner, W., D'Souza, F., "Electrocatalytic properties and sensors applications of fullerenes and carbon nanotubes", *Electroanalysis*, 15, 2003, 753.
- Sirvent, M.A., Merkoçi, A., Alegret, S., "Configurations used in the design of screen-printed enzymatic biosensors. A review", *Sens. Actuators B*, 69, 2000, 153.
- Stradiotto, N.R., Yamanaka, H., Zanoni, M.V.B., "Electrochemical sensors: A powerful tool in analytical chemistry", *J. Braz. Chem. Soc.*, 14, 2003, 159.
- Švancara, I., Vytrás, K., Barek, J., Zima, J., "Carbon paste electrodes in modern electroanalysis", *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 31, 2001, 311.
- Trojanowicz, M., "Analytical applications of carbon nanotubes: a review", *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 25, 2006, 480.
- Volfkovich, Y.M., Serdyuk, T.M., "Electrochemical capacitors", *Russ. J. Electrochem.*, 38, 2002, 935.



- Walcarius, A., "Zeolite-modified electrodes in electroanalytical chemistry", *Anal. Chim. Acta*, 384, 1999, 1.
- Wang, J., "Carbon-nanotube based electrochemical biosensors: A review", *Electroanalysis*, 17, 2005, 7.
- Wang, P., Xu, G., Qin, L., Xu, Y., Li, Y., Li, R., "Cell-based biosensors and its application in biomedicine", *Sens. Actuators B*, 108, 2005, 576.
- White, N.M., Turner, J.D., "Thick-film sensors: past, present and future", *Meas. Sci. Technol.*, 8, 1997, 1.
- Wildgoose, G.G., Banks, C.E., Leventis, H.C., Compton, R.G., "Chemically modified carbon nanotubes for use in electroanalysis", *Microchim. Acta*, 152, 2006, 187.
- Wilson, G.S., Hu, Y., "Enzyme-based biosensors for in-vivo measurements", *Chem. Rev.*, 100, 2000, 2693.
- Wring, S.A., Hart, J.P., "Chemically modified, carbon-based electrodes and their application as electrochemical sensors for the analysis of biologically important compounds", *Analyst*, 117, 1992, 1215.
- Xu, Z., Chen, X., Dong, S., "Electrochemical biosensors based on advanced bioimmobilization matrices", *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 25, 2006, 899.
- Zen, J.M., Kumar, A.S., Tsai, D.M., "Recent updates of chemically modified electrodes in analytical chemistry", *Electroanalysis*, 15, 2003, 1073.
- Zhang, S., Wright, G., Yang, Y., "Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction", *Biosens. Bioelectron.*, 15, 2000, 273.
- Zhao, W., Xu, J.J., Chen, H.Y., "Electrochemical biosensors based on layer-by-layer assemblies", *Electroanalysis*, 18, 2006, 1737.



## 3. FLOW INJECTION ANALYSIS (FIA)

- Appelqvist, R., Beecher, G.R., et. al., "Flow Injection Analysis (FIA) – A personal view", *Anal. Chim. Acta*, 180, 1986, 1.
- Grudpan, K., "Some recent developments on cost-effective flow-based analysis", *Talanta*, 64, 2004, 1084.
- Hansen, E.H., "Exploiting kinetic-based flow-injection methods for quantitative chemical assays", *Anal. Chim. Acta*, 261, 1992, 125.
- Lenehan, C.E., Barnett, N.W., Lewis, S.W., "Sequential injection analysis", *Analyst*, 127, 2002, 997.
- Rosales, R.C.P., Garcia, J.L.L., de Castro, M.D.L., "Valves and flow injection manifolds: an excellent marriage with unlimited versatility", *Anal. Chim. Acta*, 480, 2003, 181.
- Růžička, J., "Tutorial review. Discovering flow injection: journey from sample to a live cell and from solution to suspension", *Analyst*, 119, 1994, 1925.
- Růžička, J., Hansen, E.H., *Flow Injection Analysis*, Second edition, John Wiley & Sons, New York, 1988.
- Růžička, J., Marshall, G.D., "Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays", *Anal. Chim. Acta*, 237, 1990, 329.
- Štulík, K., Pacáková, V., *Electroanalytical Measurements in Flowing Liquids*, Ellis Horwood Limited, Chichester, 1987.
- Trojanowicz, M., Szewczynska, M., Wcislo, M., "Electroanalytical flow measurements – Recent advances", *Electroanalysis*, 15, 2003, 347.
- Valcárcel, M., Hansen, E.H., *Flow Injection Analysis, Principles and Applications*, John Wiley & Sons, New York, 1987.





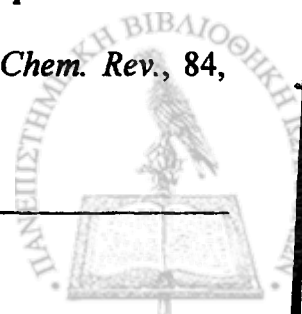
- van Staden, J.F., Stefan, R.I., "Chemical speciation by sequential injection analysis: an overview", *Talanta*, 64, 2004, 1109.

#### 4. ENZYMOΛΟΓΙΑ

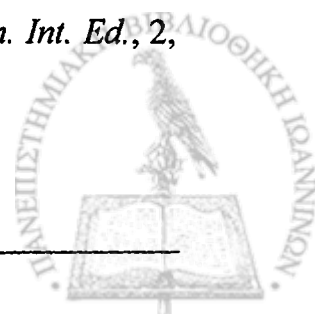
- Cass, T., Ligler, F.S., *Immobilized Biomolecules in Analysis, A Practical Approach*, Oxford University Press, New York, 1998.
- Chaniotakis, N.A., "Enzyme stabilization strategies based on electrolytes and polyelectrolytes for biosensor application", *Anal. Bioanal. Chem.*, 378, 2004, 89.
- Fersht, A.R., *Enzyme Structure and Mechanism*, 2<sup>nd</sup> Edition, W.H. Freeman, New York, 1985.
- Holme, D.J., Peck, H., *Analytical Biochemistry*, Third edition, Prentice Hall, UK, 1998.
- Mikkelsen, S.R., Cortón, E., *Bioanalytical Chemistry*, John Wiley & Sons, NJ, USA, 2004.
- Scheller, F.W., Wollenberger, U., Lei, C., Jin, W., Ge, B., Lehmann, C., Lisdat, F., Fridman, V., "Bioelectrocatalysis by redox enzymes at modified electrodes", *Rev. Mol. Biotechnol.*, 82, 2002, 411.
- Stryer. L., *Βιοχημεία*, Τόμος Πρώτος, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 1997.

#### 5. OZON

- Atkinson, R., Carter, W.P.L., "Kinetics and mechanisms of the gas-phase reactions of ozone with organic compounds under atmospheric conditions", *Chem. Rev.*, 84, 1984, 437.



- Bailey, P.S., "The reactions of ozone with organic compounds", *Chem. Rev.*, 58, 1958, 925.
- Bailey, P.S., *Ozonation in Chemistry*, Vol. 1, Academic Press, New York, 1978.
- Bailey, P.S., *Ozonation in Chemistry*, Vol. 2, Academic Press, New York, 1982.
- Bjń, A.K., "Ozone solubility in liquids", *Ozone Sci. Eng.*, 28, 2006, 67.
- Bocci, V., *Oxygen-Ozone Therapy, A Critical Evaluation*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 2002.
- Criegge, R., "Mechanism of ozonolysis", *Angew. Chem. Int. Ed.*, 14, 1975, 745.
- EPA, *EPA Guidance Manual, Alternative Disinfectants and Oxidants*, 1999.
- Gurol, M.D., Singer, P.C., "Kinetics of ozone decomposition: A dynamic approach", *Environ. Sci. Technol.*, 16, 1982, 377.
- Hoigné, J., Bader, H., "Rate constants of reactions of ozone with organic and inorganic compounds in water-II. Dissociating organic compounds", *Water Res.*, 1, 1983, 185.
- Hoigné, J., Bader, H., "Rate constants of reactions of ozone with organic and inorganic compounds in water-I. Non-dissociating organic compounds", *Water Res.*, 17, 1983, 173.
- Hoigné, J., Bader, H., "Rate constants of reactions of ozone with organic and inorganic compounds in water-III. Inorganic compounds and radicals", *Water Res.*, 19, 1985, 993.
- Horváth, M., Bilitzky, L., Hüttner, J., *Ozone*, Elsevier, Amsterdam, 1985.
- Huigsen, R., "1,3-Dipolar cycloadditions, past and future", *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2, 1963, 565.



- Lattimer, R.P., Kuczkowski, R.L., Gillies, C.W., "Mechanism of ozonolysis. (a) Microwave spectra, structures, and dipole moments of propylene and trans-2-butene ozonides. (b) Orbital symmetry analysis", *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, **1974**, 348.
- Matsumi, Y., Kawasaki, M., "Photolysis of atmospheric ozone in the ultraviolet region", *Chem. Rev.*, **103**, **2003**, 4767.
- Mbachu, R.A.D., Manley, R.S.J., "Degradation of lignin by ozone. I. The kinetics of lignin degradation of ozone", *J. Polym. Sci, Part A: Polym. Chem.*, **19**, **1981**, 2053.
- Mbachu, R.A.D., Manley, R.S.J., "Degradation of lignin by ozone. II. Molecular weights and molecular weight distributions of the alkali-soluble degradation products", *J. Polym. Sci, Part A: Polym. Chem.*, **19**, **1981**, 2065.
- Mihalatos, A.M., Calokerinos, A.C., "Ozone chemiluminescence in environmental analysis", *Anal. Chim. Acta*, **303**, **1995**, 127.
- Oyama, S.T., "Chemical and catalytic properties of ozone", *Catal. Rev. Sci. Eng.*, **42**, **2000**, 279.
- Salisbury, J., Ferrari, L., *Ozone, National Environmental Health Monographs, Air Series No1*, National Environmental Health Forum, **1997**.
- Stenke, A., Grewe, V., "Impact of ozone mini-holes on the heterogeneous destruction of stratospheric ozone", *Chemosphere*, **50**, **2003**, 177.
- Vingarzan, R., "A review of surface ozone background levels and trends", *Atmos. Environ.*, **38**, **2004**, 3431.
- Yan, X., "Detection by ozone-induced chemiluminescence in chromatography", *J. Chromatogr. A*, **842**, **1999**, 267.



## 6. ΦΟΡΜΑΛΔΕΪΔΗ

- Cancilla, D.A., Que-Hee, S.S., "O-(2,3,4,5,6-Pentafluorophenyl) methyl hydroxylamine hydrochloride: a versatile reagent for the determination of carbonyl-containing compounds", *J. Chromatogr.*, 627, 1992, 1.
- Carlier, P., Hannachi, H., Mouvier, G., "The chemistry of carbonyl compounds in the atmosphere – A review", *Atmos. Environ.*, 20, 1986, 2079.
- IARC, International Agency for research on Cancer, *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans. Wood dust and formaldehyde*, Vol. 262, pp. 405, Lyon, France, 1995.
- Jones, A.P., "Indoor air quality and health", *Atmos. Environ.*, 33, 1999, 4535.
- Knake, R., Jacquinet, P., Hauser, P.C., "Amperometric detection of formaldehyde in the ppb range", *Electroanalysis*, 13, 2001, 631.
- Morgan, K.T., "A brief review of formaldehyde carcinogenesis in relation to rat nasal pathology and human health risk assessment", *Toxicol. Pathol.*, 25, 1997, 291.
- Walker, F.J., *Formaldehyde*, Reinhold Publishing Corporation, New York, 1944.



1. The first part of the report deals with the general situation of the country and the progress of the work during the year.

2. The second part deals with the work done in the various departments and the results achieved.

3. The third part deals with the financial position of the organization and the budget for the next year.

4. The fourth part deals with the personnel and the training of staff.

5. The fifth part deals with the general conclusions and recommendations.

6. The sixth part deals with the appendixes and the statistical tables.

7. The seventh part deals with the references and the bibliography.

8. The eighth part deals with the index and the table of contents.

9. The ninth part deals with the cover and the title page.

10. The tenth part deals with the back cover and the binding.



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφεται η ανάπτυξη και μελέτη ενός νέου αμπερομετρικού βιοαισθητήρα φορμαλδεΰδης. Η κατασκευή του αισθητήρα βασίζεται σε μία πολυμεμβρανική συστοιχία, η οποία αποτελείται από μία εξωτερική (προς το διάλυμα) πολυανθρακική μεμβράνη και μία εσωτερική (προς το ηλεκτρόδιο) μεμβράνη οξικής κυτταρίνης. Μεταξύ των παραπάνω μεμβρανών τοποθετείται μία μεμβράνη Nylon 66 επί της οποίας έχει ακινητοποιηθεί το ενζύμο της αλκοολικής οξειδάσης. Η όλη συστοιχία τοποθετείται πάνω στην επιφάνεια ενός ηλεκτροδίου Pt με τη βοήθεια ενός ελαστικού δακτυλίου (O-ring).

Ο βιοαισθητήρας συνδυάστηκε με μία διάταξη συνεχούς ροής (FIA) και μετρήθηκε αμπερομετρικά η συγκέντρωση της φορμαλδεΰδης σε δυναμικό +0,65 V (ως προς ηλεκτρόδιο αναφοράς Ag/AgCl/3M KCl) σε pH=7,0 καταγράφοντας το αναπτυσσόμενο ρεύμα, που προέρχεται από την οξείδωση του ενζυμικά παραγόμενου H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Η απόδοση του βιοαισθητήρα μελετήθηκε σε διάφορους τύπους μεμβρανών ακινητοποίησης και για διαφορετικές τιμές pH. Μελετήθηκε, επίσης, η παρεμποδιστική δράση διαφόρων καρβονυλικών ενώσεων.

Ο προτεινόμενος βιοαισθητήρας παρουσίασε γραμμική απόκριση στην περιοχή συγκεντρώσεων 0,01-1,0 mM φορμαλδεΰδης. Η εξίσωση συμμεταβολής υπολογίστηκε  $y = (142,1 \pm 1,9) [\text{HCHO}, \text{mM}] + (1,9 \pm 0,9)$  και ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης είναι  $r^2=0,9996$  (n=5). Το όριο ανίχνευσης υπολογίστηκε σε 0,02 mM HCHO (για λόγο σήματος προς θόρυβο 3, S/N=3) η δε σχετική τυπική απόκλιση (RSD) της μεθόδου σε 2,3% (n=9, για 0,5 mM HCHO).

Τέλος τα λειτουργικά χαρακτηριστικά του βιοαισθητήρα κρίθηκαν πολύ ικανοποιητικά, καθώς παρουσίασε εξαιρετική σταθερότητα τόσο κατά τη διάρκεια των μετρήσεων για περισσότερα από 100 συνεχόμενα δείγματα φορμαλδεΰδης αλλά και κατά την παραμονή του σε θερμοκρασία +4 °C, διατηρώντας την αρχική του δραστηριότητα σχεδόν για 2 μήνες.



**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>**

Για πρώτη φορά παρουσιάζεται μία ηλεκτροχημική μέθοδος για τον προσδιορισμό τού όζοντος, η οποία βασίζεται στη φιλοσοφία των αμπερομετρικών βιοαισθητήρων. Η προτεινόμενη μέθοδος περιλαμβάνει δύο σκέλη, ένα αντιδραστήριο – προσροφητή (sorbent) για το όζον και ένα αμπερομετρικό βιοαισθητήρα φορμαλδεΰδης. Το όζον επιδρά μέσω μίας αντίδρασης 1,3-κυκλοπροσθήκης επί του διπλού δεσμού C=C της αλλυλικής αλυσίδας της ευγενόλης, η οποία βρίσκεται ακινητοποιημένη σε ένα αντιδραστήρα με υδρόφοβο υπόστρωμα C-18. Η παραγόμενη φορμαλδεΰδη συλλέγεται εντός του ρυθμιστικού διαλύματος εργασίας το οποίο με τη βοήθεια της αντλίας προωθείται προς τον ανιχνευτή, όπου υπάρχει ο βιοαισθητήρας φορμαλδεΰδης.

Ο βιοαισθητήρας συνδυάστηκε με μία διάταξη συνεχούς ροής (FIA) και μετρήθηκε αμπερομετρικά η συγκέντρωση του όζοντος καταγράφοντας το αναπτυσσόμενο ρεύμα, που προέρχεται από την οξείδωση του ενζυμικά παραγόμενου H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε δυναμικό +0,65 V (ως προς ηλεκτρόδιο αναφοράς Ag/AgCl/3 M KCl) σε pH=7,0.

Υπό τις βέλτιστες πειραματικές συνθήκες κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς όζοντος με γραμμική περιοχή συγκεντρώσεως 3-200 μg mL<sup>-1</sup>. Το όριο ανίχνευσής της μεθόδου υπολογίστηκε 1,1 μg mL<sup>-1</sup> O<sub>3</sub> (S/N=3). Επίσης, μελετήθηκε η πιθανή παρεμποδιστική δράση άλλων αερίων όπως O<sub>2</sub>, Ar, N<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O, NOCl, SO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub> και CO<sub>2</sub>, σε συγκεντρώσεις 200 φορές μεγαλύτερες από εκείνη των 100 μg mL<sup>-1</sup> O<sub>3</sub>, που χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι κανένα αέριο δεν παρεμποδίζει. Εκτός από την εκλεκτικότητα της μεθόδου ικανοποιητικές κρίθηκαν τόσο η λειτουργική σταθερότητα του βιοαισθητήρα όσο και η επαναληψιμότητα των μετρήσεων. Τέλος, γίνεται αναφορά στην εφαρμογή του βιοαισθητήρα για τον προσδιορισμό του όζοντος σε συνθετικά αέρια δείγματα.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup>

Σε αυτό το κεφάλαιο παρουσιάζεται η ανάπτυξη και μελέτη ενός νέου εμπεδησιομετρικού αισθητήρα για τον προσδιορισμό του όζοντος. Η λειτουργία του αισθητήρα στηρίζεται στη μεταβολή της εμπέδησης, τροποποιημένων με λιγνίνη ηλεκτροδίων υαλώδη άνθρακα, ως αποτέλεσμα της αποικοδόμησης του υμενίου λιγνίνης μετά την εμβάπτιση των ηλεκτροδίων σε διάλυμα όζοντος.

\* Το ηλεκτρόδιο εργασίας αποτελείται από υαλώδη άνθρακα τροποποιημένο με ένα υμένιο λιγνίνης (Lignin Organosolv, LO). Η τροποποίηση των ηλεκτροδίων γίνεται με απόθεση επί της επιφάνειας του ηλεκτροδίου ποσότητας 10  $\mu\text{L}$  διαλύματος 0,3  $\text{mg mL}^{-1}$  LO σε ακετόνη και εξάτμιση του διαλύτη για 12 h. Διάφορες πειραματικές συνθήκες, όπως ο διαλύτης της απόθεσης, η συγκέντρωση της LO, ο όγκος του διαλύματος απόθεσης, το μέσο και ο χρόνος αντίδρασης βελτιστοποιήθηκαν με πειράματα κυκλικής βολταμετρίας και φασματοσκοπίας ηλεκτροχημικής εμπέδησης. Επίσης, μελετήθηκε η παρεμποδιστική δράση του οξυγόνου, το οποίο χρησιμοποιείται ως φέρον αέριο του όζοντος.

Η αντίδραση διεξάγεται σε 2,5 mL διαλύματος 0,005 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  και οι μετρήσεις εμπέδησης έγιναν σε διάλυμα 10 mM  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/0,5$  M  $\text{KNO}_3$ , στην περιοχή συχνοτήτων  $10^{-1} - 10^5$  Hz, χρησιμοποιώντας ένα απλό ημιτονικό σήμα τάσης, πλάτους 10 mV (rms) σε συνεχές δυναμικό +200 mV.

Υπό τις βέλτιστες πειραματικές συνθήκες κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς με χρήση προτύπων διαλυμάτων όζοντος, η οποία είναι γραμμική στην περιοχή 50 - 250  $\mu\text{g O}_3$  και ο αντίστοιχος συντελεστής γραμμικής συσχέτισης είναι  $r^2=0,9994$  ( $n=5$ ). Η εξίσωση συμμεταβολής της καμπύλης αναφοράς είναι  $A = (0,36 \pm 0,01) B + (-14,15 \pm 1,36)$ , όπου  $A = (\Delta R_{ct}/R_{ct}) \times 100$  και B η ποσότητα του όζοντος σε  $\mu\text{g}$ . Η % σχετική τυπική απόκλιση της μεθόδου για πρότυπο δείγμα όζοντος ποσότητας 100,0  $\mu\text{g}$  υπολογίστηκε  $\text{RSD} = 2,1$  % ( $n = 5$ ), το δε όριο ανίχνευσης υπολογίστηκε  $\text{LOD} = 11,3$   $\mu\text{g O}_3$  για λόγο σήματος προς θόρυβο (S/N) 3.

Επίσης, μελετήθηκαν τα παράγωγα του διαλυτού σε αλκάλια κλάσματος της λιγνίνης (Lignin Alkali, LA) με τα οργανικά κατιόντα τετραφαινυλοφωσφόνιο (Tetraphenylphosphonium, TPP) και παπαβερίνη (Paraverine, PAP), ως εν δυνάμει υλικά τροποποίησης της επιφάνειας των ηλεκτροδίων για την ανάπτυξη, αισθητήρων προσδιορισμού του όζοντος και κατασκευάστηκαν οι αντίστοιχες καμπύλες αναφοράς.



Τέλος, έγιναν μελέτες προσομοίωσης του υπό μελέτη ηλεκτροχημικού συστήματος με ένα ισοδύναμο ηλεκτρικό κύκλωμα Randles,  $R(Q[RW])$ , χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο Boukamp.



---

**SUMMARY**

---

**CHAPTER 1**

In this chapter the development of a new amperometric biosensor for the determination of formaldehyde, is presented. The construction of the biosensor is based on the multi-membrane technique, which is consisted of an outer polycarbonate membrane and an inner cellulose acetate membrane. Alcohol oxidase has been immobilized onto a Nylon 66 membrane, which is placed between the two aforementioned membranes. The whole assembly is fitted onto the surface of a platinum working electrode with the aid of an elastic O-ring. The biosensor was mounted to a FI manifold and the enzymatically produced  $H_2O_2$  was monitored at +0.65 V (vs Ag/AgCl/KCl 3 M) at pH 7.0.

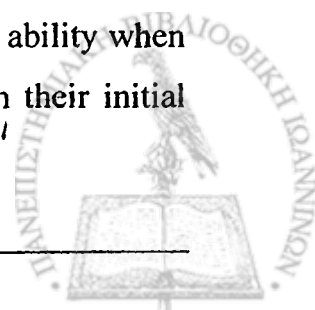
Several types of membranes, such as HA (physical adsorption), Biodyne B (ionic affinity) and Immunodyne ABC (chemical binding), has been tested for the immobilization of the enzyme. The best results were retrieved for Biodyne B membrane.

The response of the biosensor was tested against the pH, using a 0.05 M phosphate buffer solution in the pH range 5.5-8.5, revealing a maximum at pH 7.0.

Methanol, ethanol, propanol and acetaldehyde were investigated as potent interferants. The results showed that only methanol and ethanol interfere at the proposed method, while propanol and acetaldehyde have no serious interference action.

Under the optimum conditions, a linear calibration curve over the concentration range 0.01-1.0 mM HCHO, was constructed. Data fit the equation  $y = (142.1 \pm 1.9) [HCHO, mM] + (1.9 \pm 0.9)$  with a correlation coefficient  $r^2 = 0.9996$  ( $n=5$ ). The limit of detection (S/N 3) and the RSD of the method were calculated at 0.02 mM HCHO and 2.3% ( $n=9$  for 0.5 mM HCHO), respectively.

The stability of the biosensor is satisfactory and the system can be successfully used to measure more than 100 samples of 0.5 mM HCHO without need of intermediate recalibrations. The proposed biosensors, also, displayed very good storage ability when stored in the working buffer solution at +4 °C, if not in use. They retain their initial activity for more than 2 months.



## CHAPTER 2

An electrochemical method, based on the concept of a biosensor for the monitoring of ozone, is described for first time. The proposed method includes two parts: a selective sorbent for ozone, that is, eugenol and a formaldehyde amperometric biosensor, mounted to a flow-through cell.

Via a 1,3-dipolar cycloaddition reaction ozone adds rapidly to the double bond of the allyl group of eugenol, which has been immobilized onto a hydrophobic C-18 reactor and the so produced formaldehyde is collected into the working buffer solution (sampler) and pumped to the detector.

Ozone concentration was correlated with the peak current of the FI-curves, due to the enzymatically produced  $H_2O_2$ , which was monitored at +0.65 V (vs Ag/AgCl/KCl 3 M) at pH 7.0. Under the optimum conditions, two calibration curves  $I/nA = f(\mu g mL^{-1} O_3)$ , one based on peak current signals of the FI-grams and the other based on the steady-state current outputs, over the concentration range 3-200  $\mu g mL^{-1} O_3$ , were constructed, applying the least-squares method. The equation for the FI-grams based straight line is  $y = (1.42 \pm 0.01)(\mu g mL^{-1} O_3) + (5.66 \pm 0.99)$ , with a correlation coefficient  $r^2=0.9998$  ( $n=8$ ). The detection limit (S/N 3) and the RSD were calculated 2.1  $\mu g mL^{-1} O_3$  and 0.74% ( $n=8$  for 100  $\mu g mL^{-1} O_3$ ), respectively. Correspondingly, the equation for the steady-state-based straight line is  $(2.23 \pm 0.01) (\mu g mL^{-1} O_3) + (0.92 \pm 0.78)$  with a correlation coefficient  $r^2=0.9998$  ( $n=8$ ). The detection limit (S/N 3) and the RSD were calculated 1.1  $\mu g mL^{-1} O_3$  and 0.69% ( $n=5$  for 100  $\mu g mL^{-1} O_3$ ), respectively.

The proposed method is interference free from other gases such as  $O_2$ , Ar,  $N_2$ ,  $N_2O$ , NOCl,  $SO_2$ ,  $NH_3$  and  $CO_2$ , which were tested at concentrations >200-fold higher than that of 100  $\mu g mL^{-1} O_3$ , used for comparison.

The analytical applicability of the proposed method was evaluated by determining the ozone concentration in synthetic gaseous samples, by using a stainless steel thermo stated chamber, being equipped with a ventilation system, fan and proper in/out-puts for enrichment, sampling or probing purposes. The results were in good agreement with those obtained by the Gastec system.



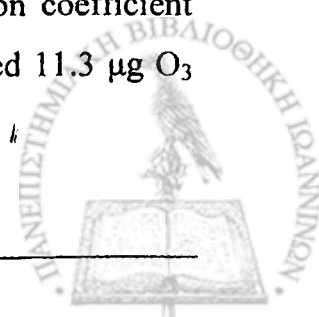
## CHAPTER 3

The first impedimetric sensor for ozone monitoring is described. The proposed method is based on the degradation of a lignin polymer film, due to the oxidative cleavage reaction of ozone, resulting in changes of the faradaic impedance.

Glassy carbon working electrodes were modified with Lignin Organosolv (LO), by spotting 10  $\mu\text{L}$  of a 0.3  $\text{mg mL}^{-1}$  LO solution in acetone and left 12 h the solvent to evaporate in open air. Experimental conditions such as the solvent of LO, the concentration of the LO solutions, the amount of the volume spotted onto the electrode surface, the reaction medium and the reaction time were optimized by performing cyclic voltammetry and EIS experiments. The effect of 1) ozone on the electrochemical properties of bare GC electrodes, 2) oxygen (main component in the ozone stream) on the degradation of the lignin coatings and 3) sulphuric acid on the mechanical properties of the lignin films, were also investigated. CV and EIS experiments gave evidence that the obtained signals shown above are solely attributed to the ozonolysis reaction. A slight change of the electrochemical behaviour (decrease of capacitive current, increase of  $R_{ct}$ ) of the LO modified-GC electrodes was observed during the first 15 min, after the immersion of the sensors in the electrolyte solution (swelling of the polymer). To ensure a constant baseline all measurements were performed after a conditioning period of 30 min.

All experiments regarding the ozonolysis reaction were carried out into 2.5 mL 0.001 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , with an  $\text{O}_3$  flow rate of 0.25  $\text{L min}^{-1}$ . The final concentration of ozone was achieved by adjusting the output of the ozone generator. Impedance spectra were recorded over a frequency range of  $10^{-1} - 10^5$  Hz, using a single sinusoidal excitation signal, superimposed on +200 mV. Excitation amplitude of 10 mV (rms) was used throughout. All measurements were carried out in a solution of 10 mM  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/0.5$  M  $\text{KNO}_3$ .

Under the optimum conditions, a linear calibration curve over the range 50-250  $\mu\text{g O}_3$ , was constructed. Data fit the equation  $A = (0.36 \pm 0.01) B + (-14.15 \pm 1.36)$ , where  $A = (\Delta R_{ct}/R_{ct}) \times 100$  and B the amount of ozone in  $\mu\text{g}$ , with a correlation coefficient  $r^2 = 0.9994$  ( $n=5$ ). The detection limit (S/N 3) and the RSD were calculated 11.3  $\mu\text{g O}_3$  and 2.1% ( $n=5$  for 100  $\mu\text{g O}_3$ ), respectively.



Lignin Alkali (LA) derivatives with tetraphenylphosphonium (TPP) and papaverine (PAP), were, also, tested as potent materials for the construction of impedimetric sensors for the monitoring of ozone.

In addition, EIS data, has been approximated by a Randles equivalent circuit  $R(Q[RW])$ , in which the  $C_{dl}$  has been replaced by a constant phase element (CPE), with satisfactory results. The proposed sensor can be potentially applied for the monitoring of ozone in industrial workplaces or as a process gas in various technical and industrial applications.

