

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΟΤΕΝΣΙΟΜΕΤΡΙΚΩΝ ΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ ΓΙΑ
ΤΗ ΜΕΤΡΗΣΗ ΦΩΣΦΟΡΙΚΩΝ ΚΑΙ ΧΛΩΡΙΟΥΧΩΝ
ΙΟΝΤΩΝ**

ΚΑΡΑΜΕΤΣΗ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΧΑΝΙΩΤΑΚΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**

2003

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	1
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT	5
1. ΧΗΜΙΚΟΙ ΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ	6
2. ΠΟΤΕΝΣΙΟΜΕΤΡΙΑ	8
2.1. ΓΑΛΒΑΝΙΚΟ ΣΤΟΙΧΕΙΟ	8
2.2 ΤΑ ΗΜΙΣΤΟΙΧΕΙΑ ΚΛΑΣΣΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ	8
2.3 ΤΑ ΗΜΙΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ	9
2.3.1 Ημιστοιχείο αναφοράς αργύρου / χλωριούχου αργύρου ($Ag; AgCl / KCl$).....	9
2.4 ΤΟ ΔΥΝΑΜΙΚΟ ΓΕΦΥΡΑΣ Η ΔΥΝΑΜΙΚΟ ΥΓΡΟΥ ΣΥΝΔΕΣΜΟΥ	10
3. ΠΟΤΕΝΣΙΟΜΕΤΡΙΚΟΙ ΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ	11
3.1 ΕΠΙΛΕΚΤΙΚΑ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΑ ΙΟΝΤΩΝ (Ε.Η.Ι.).....	11
3.2 ΑΡΧΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ	12
3.3 ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ.	13
3.3.1 Ο ιονομεταφορέας	13
3.3.2 Ο πλαστικοποιητής	14
3.3.3 Το πολυμερές.....	15
3.3.4 Τα λιπόφιλα φορτισμένα πρόσθετα.....	16
3.4 ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	16
3.4.1 Η καμπύλη βαθμονόμησης.....	16
3.4.2 Εύρος Απόκρισης.....	17
3.4.3 Ευαισθησία Ε.Η.Ι.....	18
3.4.4 Όριο ανίχνευσης.....	18
3.4.5 Χρόνος απόκρισης	18
3.4.6 Ο χρόνος ζωής	18
3.4.7 Ποτενσιομετρικός Συντελεστής Επιλεκτικότητας	19
Προσδιορισμός των ποτενσιομετρικών συντελεστών επιλεκτικότητας.....	19
4.ΕΙΔΗ ΕΠΙΛΕΚΤΙΚΩΝ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΩΝ ΙΟΝΤΩΝ	21
4.1 ΣΥΜΒΑΤΙΚΑ ΕΠΙΛΕΚΤΙΚΑ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΑ ΙΟΝΤΩΝ (PHILIPS).....	21
4.4 ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΑ ΣΤΕΡΕΑΣ ΕΠΑΦΗΣ -ΥΓΡΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ (LMSC)	22
4.2 ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΑ ΣΤΕΡΕΑΣ ΕΠΑΦΗΣ.....	22
4.3 ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΟ ΕΠΙΚΑΛΥΜΜΕΝΟΥ ΜΕΤΑΛΛΟΥ (CWE).....	24
5. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	27
6. ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΟ ΦΩΣΦΟΡΙΚΩΝ ΙΟΝΤΩΝ	28
6.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ	28
6.2 ΤΡΟΠΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΦΩΣΦΟΡΙΚΩΝ	29
6.3 Ε.Η.Ι. ΦΩΣΦΟΡΙΚΩΝ-ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ	29
6.4.ΕΠΙΛΟΓΗ ΙΟΝΟΜΕΤΑΦΟΡΕΑ	30
6.5 ΣΥΜΒΑΤΙΚΟ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΟ ΦΩΣΦΟΡΙΚΩΝ	31

6.5.1 Επίδραση των λοπόφιλων πρόσθετων στη μεμβράνη - τετραβουτυλαμωνιακά φωσφορικά (TBAP).....	32
6.7 ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΟ ΣΤΕΡΕΑΣ ΕΠΑΦΗΣ ΦΩΣΦΟΡΙΚΩΝ	35
6.7.1 Μελέτη Χρόνου Ζωής και Επαναληψιμότητας.....	36
6.9 ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΟ ΦΩΣΦΟΡΙΚΩΝ ΣΤΕΡΕΑΣ ΕΠΑΦΗΣ-ΥΓΡΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ.....	37
6.10 ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΟ ΦΩΣΦΟΡΙΚΩΝ ΕΠΙΚΑΛΥΜΜΕΝΟΥ ΜΕΤΑΛΛΟΥ (C.W.E.)	39
6.11 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	42
7. ΙΟΝΤΑ ΧΛΩΡΙΟΥ	43
7.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ	43
7.2 ΤΡΟΠΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΙΟΝΤΩΝ ΧΛΩΡΙΟΥ	44
7.3 Ε.Η.Ι. ΙΟΝΤΩΝ ΧΛΩΡΙΟΥ.....	44
7.4.ΙΟΝΟΜΕΤΑΦΟΡΕΑΣ ΙΟΝΤΩΝ ΧΛΩΡΙΟΥ	45
7.5 ΜΕΛΕΤΗ ΧΡΟΝΟΥ ΖΩΗΣ ΚΑΙ ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑΣ	46
7.6 ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΣΕ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ	48
7.7 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	51
8. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ-ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	52
8.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	52
8.1.1 Παρασκευή μεμβρανών	52
8.1.2 Παρασκευή διαλυμάτων	52
8.2 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ	53
8.3 ΠΟΤΕΝΣΙΟΜΕΤΡΙΚΕΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ	53
9.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	54

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σε αυτή την εργασία σκοπός ήταν η ανάπτυξη επιλεκτικού ηλεκτροδίου φωσφορικών ιόντων. Η προσπάθεια ανάπτυξης βασίστηκε στη χρήση ποικίλων μεθόδων κατασκευής Ε.Η.Ι. Οι κατασκευές αυτές χρησιμοποιήθηκαν για την επίτευξη αναλυτικών χαρακτηριστικών τέτοιων που θα επέτρεπαν την άμεση μέτρηση φωσφορικών ιόντων σε πραγματικά δείγματα, όπως ορός αίματος και πόσιμο νερό.

Οι κατασκευές αυτές μελετήθηκαν ως προς την επιλεκτικότητα, την ακρίβεια, το χρόνο ζωής και την επαναληψιμότητα των μετρήσεων.

Η μεγάλη σταθερά σύμπλεξης όμως των φωσφορικών ιόντων με τον ιονομεταφορέα δεν επιτρέπει την αντιστρεπτή αλληλεπίδραση τους με αποτέλεσμα το επιλεκτικό ηλεκτρόδιο φωσφορικών ιόντων να μην μπορεί να πραγματοποιήσει παραπάνω από μία μέτρηση.

Παράλληλα μελετήθηκε επιλεκτικό ηλεκτρόδιο ιόντων χλωρίου ως προς την ικανότητα μέτρησης πρότυπων διαλυμάτων όπως ο τεχνητός ορός αίματος. Το ηλεκτρόδιο βασίστηκε σε προηγούμενες μελέτες ιονομεταφορέα που έχουν γίνει στο εργαστήριο μας. Τα αποτελέσματα από τις μελέτες του χρόνου ζωής, της επαναληψιμότητας και της ακρίβειας των μετρήσεων δίνουν την δυνατότητα χρήσης αυτού του ηλεκτροδίου στο μέλλον για την άμεση μέτρηση ιόντων χλωρίου σε πραγματικά δείγματα.

ABSTRACT

The development of an ISE for phosphate ions that based on the use of different construction methods is presented. Those constructions were used for the development of analytical characteristics that will allow the direct measurement of phosphate ions in real samples like blood serum and drinking water.

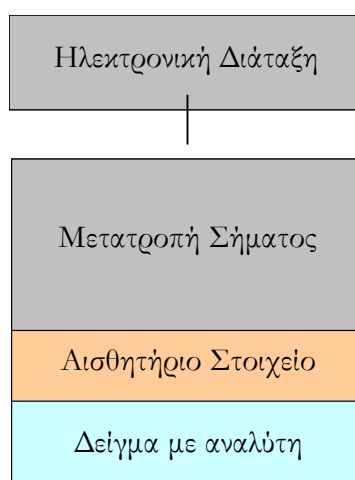
The constructions were tested for their selectivity toward phosphate ions, the accuracy of the measurements, the lifetime of the electrode and the reproducibility of the measurements.

The complex-formation constant of carrier with phosphate ion is very big. That fact does not allow the reversible interaction of the carrier with the phosphate ion. The result of these is that the electrode is not capable of doing more than one measurement.

Additionally an ISE for chloride ion was tested for its ability to measure standard samples like artificial blood serum. The electrode's construction was based on tests for carriers that were carried out in our laboratory. The results of those tests for the lifetime, the reproducibility and the accuracy of the measurements allow the electrode to be used in the future for the direct measurement of chloride ions in real samples.

1. ΧΗΜΙΚΟΙ ΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ

Σύμφωνα με την IUPAC(1) χημικοί αισθητήρες είναι οι συσκευές που μετατρέπουν μια χημική πληροφορία σε αναλυτικό σήμα. Κάθε χημικός αισθητήρας αποτελείται από δυο μέρη: το αισθητήριο στοιχείο και τον μεταλλάκτη σήματος. Η διαδικασία της χημικής αναγνώρισης βασίζεται στην κατανομή του αναλύτη από το δείγμα στο αισθητήριο στοιχείο. Για το μετασχηματισμό της χημικής πληροφορίας σε μετρούμενο σήμα χρησιμοποιείται ο μεταλλάκτης σήματος. Στο παρακάτω σχήμα φαίνεται μια σχηματική απεικόνιση ενός χημικού αισθητήρα.



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση χημικού αισθητήρα

Οι χημικοί αισθητήρες υποδιαιρούνται, ανάλογα με το μεταλλάκτη που χρησιμοποιούν σε τέσσερις κατηγορίες: τους οπτικούς, τους θερμικούς, της μάζας και τους ηλεκτροχημικούς.

Οι οπτικοί αισθητήρες βασίζονται στη μέτρηση της μεταβολής μιας οπτικής ιδιότητας της ενεργού ουσίας που προκαλείται κατά τη διαδικασία της χημικής αναγνώρισης του αναλύτη. Οι μεταβαλλόμενες οπτικές ιδιότητες που μετρώνται είναι συνήθως η απορρόφηση ή ο φθορισμός της ενεργού ουσίας. Σήμερα για την αποτελεσματική μεταφορά του φωτός από και προς μια μικρή επιφάνεια χρησιμοποιούνται κυρίως οι οπτικές ίνες(2).

Οι θερμικοί αισθητήρες(3) βασίζονται σε μια καταλυτική αντίδραση και χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση της θερμότητας που εκλύεται από μια φυσικοχημική διεργασία. Οι μεταβολές της θερμοκρασίας ανιχνεύονται από μια θερμοστήλη ή ένα θερμίστορ.

Οι αισθητήρες μάζας(3) βασίζονται στις αλλαγές μάζας που προκαλούν μεταβολές στη συχνότητα συντονισμού της επιφάνειας του αισθητήρα. Χωρίζονται σε δυο κατηγορίες: τους πιεζοηλεκτρικούς που μετρούν αλλαγές στη συχνότητα ταλάντωσης του κρυστάλλου και τους αιουστικούς που μετρούν αλλαγές στη συχνότητα συντονισμού ενός κύματος, το οποίο περνά διαμέσου της επιφάνειας του αισθητήρα.

Οι ηλεκτροχημικοί αισθητήρες μετατρέπουν τη χημική πληροφορία σε ηλεκτρικό σήμα. Χωρίζονται σε τρεις κύριες κατηγορίες: τους αμπερομετρικούς, τους αγωγιμομετρικούς και τους ποτενσιομετρικούς.

Οι αμπερομετρικοί αισθητήρες βασίζονται στις βολταμετρικές τεχνικές ανάλυσης, όπου εφαρμόζεται δυναμικό στο ηλεκτρόδιο εργασίας και το παραγόμενο ρεύμα δίνει πληροφορίες για τη σύσταση του προς ανάλυση δείγματος. Ο πρώτος και πιο δημοφιλής αμπερομετρικός αισθητήρας είναι το ηλεκτρόδιο Clark για τον προσδιορισμό O_2 (4).

Στους αγωγιμομετρικούς αισθητήρες το σήμα προέρχεται από τη μεταβολή της αγωγιμότητας του αισθητήριου στοιχείου στην επιφάνεια του αισθητήρα(5). Η αγωγιμότητα είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης των ιόντων που υπάρχουν στο διάλυμα και η αλγεβρική τιμή της εξαρτάται από το φορτίο, την κινητικότητα και τη σταθερά διάστασης των ιόντων. Έτσι όταν κατά την χημική αναγνώριση υπάρχει αλλαγή στον αριθμό των ιόντων, το φορτίο ή την κινητικότητά τους, τότε μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε αγωγιμομετρικούς αισθητήρες.

Οι ποτενσιομετρικοί αισθητήρες, που είναι και το αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας θα παρουσιαστούν παρακάτω.

2. ΠΟΤΕΝΣΙΟΜΕΤΡΙΑ

Η ποτενσιομετρία(6) ανήκει στην κατηγορία των ηλεκτροχημικών τεχνικών ανάλυσης και συνίσταται στη μέτρηση της ηλεκτρεγερτικής δύναμης (Η.Ε.Δ.) ενός ηλεκτροχημικού στοιχείου. Η μέτρηση της Η.Ε.Δ. του στοιχείου γίνεται με ειδικές ποτενσιομετρικές διατάξεις που ονομάζονται ποτενσιόμετρα.

Τα ποτενσιόμετρα είναι όργανα μέτρησης δυναμικού με πολύ μεγάλη εσωτερική ολική αντίσταση (εμπέδηση) συνήθως $>10^{12}\Omega$. Έτσι δίνουν την δυνατότητα μέτρησης δυναμικού σε συνθήκες μηδενικού ρεύματος, ώστε η σύσταση του διαλύματος που μετράται να παραμένει πρακτικά αμετάβλητη. Δυο είναι οι τύποι οργάνων που χρησιμοποιούνται στην ποτενσιομετρία: το απλό ποτενσιόμετρο του οποίου οι ενδείξεις λαμβάνονται με Volt και το ηλεκτρικό βολτόμετρο άμεσης ανάγνωσης της συγκέντρωσης.

Οι ποτενσιομετρικές τεχνικές ανάλυσης διακρίνονται στις άμεσες ποτενσιομετρικές τεχνικές και στις ποτενσιομετρικές ογκομετρήσεις.

2.1. Γαλβανικό στοιχείο

Ένα γαλβανικό στοιχείο αποτελείται από δυο ηλεκτροχημικά ημιστοιχεία, το ενδεικτικό και το αναφορικό. Το ενδεικτικό ημιστοιχείο περιλαμβάνει το αισθητήριο στοιχείο του συστήματος και το δυναμικό του $E_{ενδ}$ είναι ανάλογο με το λογάριθμο της ενεργότητας του αναλύτη. Το ημιστοιχείο αναφοράς έχει σταθερό δυναμικό $E_{αναφ}$ το οποίο πρέπει να είναι πρακτικά ανεξάρτητο της σύστασης του προς ανάλυση διαλύματος.

Το δυναμικό του στοιχείου E εκφράζεται από την ακόλουθη εξίσωση:

$$E = (E_{ενδ} - E_{αναφ}) + E_{γερφ}$$

όπου $E_{γερφ}$ το δυναμικό γέφυρας που παρουσιάζεται παρακάτω.

2.2 Τα ημιστοιχεία κλασσικού τύπου

Τύπου 0: Είναι αδρανή μέταλλα (π.χ. Pt, Au) σε επαφή με ένα διάλυμα οξειδοαναγωγικού ζεύγους π.χ. $Pt | Ce^{4+}, Ce^{3+}$.

Τύπου 1: Είναι αντιστρεπτά ηλεκτρόδια μετάλλου / άλατος μετάλλου π.χ. $Ag | Ag^+$.

Τύπου 2: Είναι αντιστρεπτά ηλεκτρόδια μετάλλου / κορεσμένου άλατος μετάλλου σε περίσσεια ανιόντος X^- π.χ. $Ag; AgX | X^-$.

Τύπου 3: Είναι αντιστρεπτά ηλεκτρόδια μετάλλου /άλατος μετάλλου ή ευδιάλυτου συμπλόκου / δευτέρου άλατος μετάλλου ή συμπλόκου και περίσσεια δευτέρου κατιόντος π.χ. $Zn | ZnC_2O_4 ; CaC_2O_4 ; Ca^{2+}$

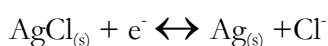
2.3 Τα ημιστοιχεία αναφοράς

Το ημιστοιχείο αναφοράς είναι ένα ημιστοιχείο τύπου 1 με γνωστό δυναμικό, το οποίο δεν επηρεάζεται από τη σύσταση του δείγματος. Το ημιστοιχείο αναφοράς πρέπει α) να βασίζεται σε αντιστρεπτές χημικές αντιδράσεις β) να έχει καλή επαναληψιμότητα και γ) να παρουσιάζει σταθερότητα δυναμικού, η οποία εκφράζεται με την διολίσθηση σήματος με το χρόνο. Τα αναφορικά στοιχεία που χρησιμοποιούνται στις χημικές αναλύσεις είναι το ημιστοιχείο αναφοράς αργύρου / χλωριούχου αργύρου και το ημιστοιχείο αναφοράς καλομέλανος.

2.3.1 Ημιστοιχείο αναφοράς αργύρου / χλωριούχου αργύρου ($Ag; AgCl / KCl$)

Το ημιστοιχείο αναφοράς αργύρου / χλωριούχου αργύρου παρασκευάζεται με ηλεκτρολυτική εναπόθεση χλωριούχου αργύρου σε σύρμα αργύρου και σε διάλυμα χλωριούχων 0,1M. Όταν το επικαλυμμένο σύρμα εμβαπτίζεται σε διάλυμα KCl σταθερής συγκέντρωσης, έχει σταθερό δυναμικό υπό ορισμένες συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας.

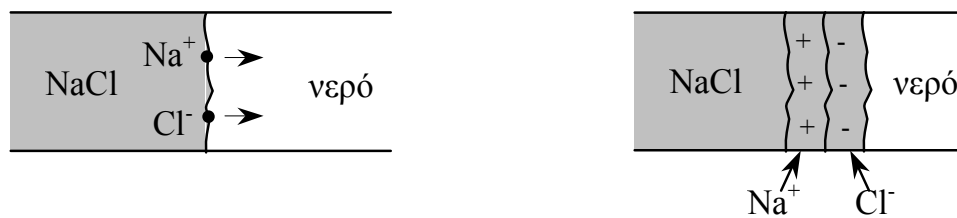
Η απόκριση του ημιστοιχείου αυτού βασίζεται στην ακόλουθη αντιστρεπτή αντίδραση:



Το ημιστοιχείο αργύρου / χλωριούχου αργύρου παρουσιάζει καλή ηλεκτρική και χημική σταθερότητα και έχει επαναλήψιμο δυναμικό. Το δυναμικό του είναι 0,222 V ως προς το SHE, στους 25°C, σε κορεσμένο εσωτερικό διάλυμα KCl και AgCl. Πρέπει να σημειωθεί ότι το ημιστοιχείο αυτό δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί άμεσα (ως ηλεκτρόδιο απλής γέφυρας) σε διαλύματα που περιέχουν πρωτεΐνες, βρωμιούχα, ιωδιούχα και θειούχα ιόντα τα οποία σχηματίζουν ιζήματα με τα ιόντα αργύρου. Επίσης προκαλούνται παρεμποδίσεις όταν χρησιμοποιείται σε διαλύματα που περιέχουν συμπλοκοποιητικούς παράγοντες όπως CN^- ή SCN^- και ισχυρά οξειδωτικά ή αναγωγικά μέσα.

2.4 Το δυναμικό γέφυρας ή δυναμικό υγρού συνδέσμου

Σε ένα ποτενσιομετρικό στοιχείο, το ημιστοιχείο αναφοράς συνδέεται με το προς ανάλυση δείγμα μέσω μια γέφυρας άλατος, η οποία δημιουργεί την ηλεκτρική επαφή μεταξύ των δυο ημιστοιχείων του στοιχείου και αποτελεί τον υγρό σύνδεσμο(7). Ως υγρός σύνδεσμος χαρακτηρίζεται η διεπιφάνεια μεταξύ δυο διαφορετικών ηλεκτρολυτών, συνήθως του ημιστοιχείου αναφοράς και του προς ανάλυση δείγματος. Στη διεπιφάνεια αυτή εμφανίζεται ένα δυναμικό υγρού συνδέσμου, ως αποτέλεσμα της διαφοράς στις ταχύτητες διάχυσης των κατιόντων και των ανιόντων διαμέσου της διεπιφάνειας. Η μια πλευρά της διεπιφάνειας τείνει να αποκτήσει το φορτίο του λιγότερο ευκίνητου ιόντος με αποτέλεσμα τη δημιουργία διαβάθμισης ηλεκτρικού πεδίου, (εικόνα 2).



Εικόνα 2: Δημιουργία δυναμικού γέφυρας που προκαλείται από τις διαφορετικές κινητικότητες των ιόντων Na^+ και Cl^- .

Το μέγεθος του δυναμικού συνδέσμου στην ισορροπία εξαρτάται από τις κινητικότητες, τις συγκεντρώσεις, τα φορτία, τους συντελεστές ενεργότητας όλων των ιόντων και από τις δυο πλευρές της διεπιφάνειας, καθώς και από τον τρόπο κατασκευής του συνδέσμου. Έτσι το δυναμικό υγρού συνδέσμου που δημιουργείται μεταξύ δυο ηλεκτρολυτών διαφορετικής σύστασης είναι πρακτικά αδύνατο να προσδιοριστεί ή να υπολογιστεί για κάθε αναλυτική μέτρηση ρουτίνας. Γι'αυτό το λόγο το δυναμικό υγρού συνδέσμου αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα στην ακρίβεια των ποτενσιομετρικών μετρήσεων. Ο στόχος είναι λοιπόν να ελαττωθεί το δυναμικό υγρού συνδέσμου σε τέτοιο βαθμό, ώστε να είναι επαναλήψιμο από τη μια μέτρηση στην άλλη.

3. ΠΟΤΕΝΣΙΟΜΕΤΡΙΚΟΙ ΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ

Οι ποτενσιομετρικές τεχνικές ανάλυσης βασίζονται σε μετρήσεις του δυναμικού ηλεκτροχημικών στοιχείων χωρίς αυτά να διαρρέονται από σημαντικό ρεύμα. Περισσότερο σύγχρονες είναι οι τεχνικές στις οποίες υπολογίζονται άμεσα οι συγκεντρώσεις ιόντων με μέτρηση του δυναμικού επιλεκτικών ηλεκτροδίων ιόντων. Αυτή είναι και η τεχνολογία που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή την εργασία και γι'αυτό τα επιλεκτικά ηλεκτρόδια ιόντων παρουσιάζονται αναλυτικά παρακάτω.

3.1 Επιλεκτικά Ηλεκτρόδια Ιόντων (Ε.Η.Ι.)

Τα επιλεκτικά ηλεκτρόδια ιόντων αποτελούν μια από τις πιο σημαντικές κατηγορίες των χημικών αισθητήρων και συγκεκριμένα των ποτενσιομετρικών αισθητήρων και αυτό φαίνεται από το μεγάλο αριθμό Ε.Η.Ι. που έχουν κατασκευαστεί για ανόργανα και οργανικά κατιόντα και ανιόντα. Για παράδειγμα το επιλεκτικό ηλεκτρόδια K^+ που βασίζεται στη βαλινομυκίνη, χρησιμοποιείται για εκατομμύρια κλινικές αναλύσεις κάθε χρόνο.

Το πρώτο Επιλεκτικό Ηλεκτρόδιο Ιόντων (Ε.Η.Ι.) ήταν το επιλεκτικό ηλεκτρόδιο ύαλου για το ιόν του υδρογόνου και ανακαλύφθηκε από τον Cremer το 1906(8).

Η καθιέρωση των άμεσων ποτενσιομετρικών μεθόδων ως αναλυτικές μέθοδοι ρουτίνας έγινε το 1966 με την ανακάλυψη του ηλεκτροδίου μεμβράνης φθοριούχου λανθανίου από τους Fant και Ross που αποκρινόταν στα φθοριούχα ιόντα(9).

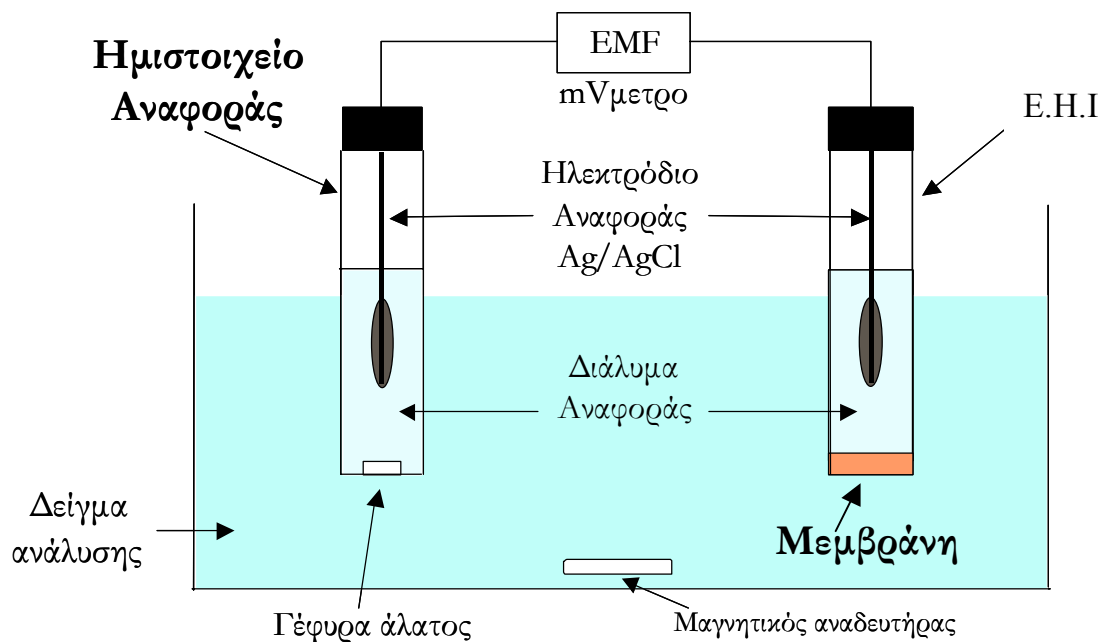
Μέσα σε μια δεκαετία είχαν αναπτυχθεί μεμβράνες για την κατασκευή ηλεκτροδίων για πλήθος ιόντων όπως π.χ. Na^+ , K^+ . Η έλλειψη κοινού μηχανισμού που να περιγράφει τον τρόπο απόκρισης των διαφόρων ουσιών σε συγκεκριμένους αναλύτες επέφερε μείωση στο ενδιαφέρον των ερευνητών για τα Ε.Η.Ι.

Το ενδιαφέρον για το πεδίο των Ε.Η.Ι. που είναι η κύρια κατηγορία των ποτενσιομετρικών αισθητήρων, έχει ανακάμψει τα τελευταία χρόνια και η επαναφορά των επιλεκτικών ηλεκτροδίων ιόντων ως μια ισχυρή κατεύθυνση της έρευνας στο πεδίο των χημικών αισθητήρων έγινε λόγω της κατανόησης πλέον σε μεγάλο βαθμό του μηχανισμού λειτουργίας τους(10). Αυτό επιτρέπει την ακριβή πρόβλεψη της συμπεριφοράς αυτών των αισθητήρων σε πραγματικά δείγματα, κατευθύνοντας έτσι την δημιουργία Ε.Η.Ι. ικανών να χρησιμοποιηθούν ως αναλυτικές συσκευές μεγάλης ακρίβειας για αναλύσεις ρουτίνας(11).

3.2 Αρχές λειτουργίας

Το Ε.Η.Ι. είναι ένα ηλεκτροχημικό ημιστοιχείο που χρησιμοποιεί επιλεκτικές μεμβράνες ως αισθητήριο στοιχείο. Διαφέρει από τα ημιστοιχεία κλασικού τύπου στο ότι η χημική αναγνώριση βασίζεται στην επιλεκτική κατανομή ιόντων, και όχι στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις. Για την ολοκλήρωση του στοιχείου χρησιμοποιείται δεύτερο αναφορικό ημιστοιχείο δεύτερου τύπου ως εσωτερικό ηλεκτρόδιο αναφοράς. Ένα Ε.Η.Ι. σε συνδυασμό με ένα εξωτερικό ημιστοιχείο αναφοράς αποτελεί το στοιχείο Ε.Η.Ι.

Η σχηματική αναπαράσταση ενός Ε.Η.Ι. φαίνεται στο παρακάτω σχήμα (σχήμα 3).



Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση Ε.Η.Ι.

Η χημική αναγνώριση του αναλύτη λαμβάνει χώρα στο αισθητήριο στοιχείο του αισθητήρα (μεμβράνη) που περιέχει την ενεργή ουσία η οποία αναφέρεται και ως ιονομεταφορέας και βρίσκεται σε επαφή με το προς ανάλυση δείγμα. Η αλληλεπίδραση του αναλύτη με την εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης μεταβάλλει το δυναμικό της σύμφωνα με την εξίσωση Nernst.

$$E = E^0 + \frac{RT}{zF} \ln \frac{a_i(\text{aq})}{a_i(\text{org})}$$

Όπου:

a_i (aq): η ενεργότητα του ιόντος στο δείγμα,

a_i (org): η ενεργότητα του ιόντος στη μεμβράνη,

z : το φορτίο του ιόντος,

R : η παγκόσμια σταθερά των αερίων,

T : η θερμοκρασία και

F : η σταθερά του Faraday.

Υπό την προϋπόθεση ότι η συγκέντρωση του ιόντος στην μεμβράνη $a_{i(\text{org})}$ είναι σταθερή, η παραπάνω εξίσωση μετατρέπεται στην γνωστή εξίσωση του Nernst:

$$E = E^0 + \frac{RT}{zF} \ln a_i(\text{aq})$$

Η μεταβολή αυτή του δυναμικού μετράται συναρτήσει του σταθερού δυναμικού της εσωτερικής επιφάνειας της μεμβράνης, το οποίο διατηρείται σταθερό γιατί βρίσκεται σε επαφή με διάλυμα σταθερής συγκέντρωσης (εσωτερικό διάλυμα).

Για λόγους ευκολίας η αναφορά, στη συνέχεια της εργασίας, σε Ε.Η.Ι. θα δηλώνει τα στοιχεία των Ε.Η.Ι. Παρακάτω θα εξεταστούν διεξοδικά τα Ε.Η.Ι. ως προς τα λειτουργικά και τα κατασκευαστικά τους χαρακτηριστικά.

3.3 Συστατικά της μεμβράνης.

Η υγρή πολυμερική μεμβράνη που χρησιμοποιείται στα επιλεκτικά ηλεκτρόδια ιόντων έχει ως βασικά συστατικά τον ιονομεταφορέα, τον πλαστικοποιητή, το πολυμερές και τα λιπόφιλα φορτισμένα πρόσθετα.

3.3.1 Ο ιονομεταφορέας

Ο ιονομεταφορέας αποτελεί το πιο σημαντικό συστατικό της υγρής πολυμερικής μεμβράνης μιας και η επιλεκτική απόκριση του Ε.Η.Ι. στον αναλύτη εξαρτάται από αυτόν. Οι ιονομεταφορείς είναι ευκίνητες υδρόφοβες ανόργανες ή οργανικές ενώσεις (συνήθως μεγάλου μοριακού βάρους) που αλληλεπιδρούν με τα προς ανίχνευση ιόντα και αυξάνουν το βαθμό κατανομής των ιόντων στη μεμβράνη. Οι πρώτες ενεργές ενώσεις που

χρησιμοποιήθηκαν ως ιονομεταφορείς ήταν φυσικά προϊόντα όπως τα αντιβιοτικά, ενώ στη συνέχεια παρασκευάστηκαν πολλοί συνθετικοί ιονομεταφορείς.

Η χρήση της κατάλληλης ενεργής ουσίας (ιονομεταφορέα) που θα αναγνωρίσει και θα δεσμεύσει τον αναλύτη στο δείγμα, αποτελεί το πρώτο και καθοριστικό στάδιο στην ανάπτυξη ενός νέου ηλεκτροχημικού αισθητήρα. Το στάδιο αυτό περιλαμβάνει τη σχεδίαση τη σύνθεση και την εφαρμογή της ενεργής ουσίας στον αισθητήρα.

Οι διάφορες βιολογικές διεργασίες που περιλαμβάνουν την αλληλεπίδραση μεταξύ υποδοχέα-υποστρώματος έδωσαν στους χημικούς το κίνητρο για τη σύνθεση ανόργανων υποδοχέων, οι οποίοι αναγνωρίζουν και δεσμεύουν επιλεκτικά διάφορα ιόντα.

Μια από τις εφαρμογές της χημικής αναγνώρισης είναι η ανάπτυξη των επιλεκτικών ηλεκτροδίων ιόντων υγρής πολυμερικής μεμβράνης.

Οι πιο σημαντικές προαπαιτήσεις για ένα ιονομεταφορέα είναι:

- Η αλληλεπίδραση του ιονομεταφορέα με το πρωτεύον ιόν να είναι ισχυρότερη σε σχέση με το δευτερεύον ιόν.
- Αντιστρεπτή αλληλεπίδραση του ιονομεταφορέα με το πρωτεύον και το δευτερεύον ιόν.
- Σταθερό σχήμα για να μην αλλάζει η επιλεκτικότητα του ιονομεταφορέα ως προς το πρωτεύον ιόν.
- Μεγάλη λιποφιλία για να συγκρατείται στην οργανική φάση της μεμβράνης.

Η επιλεκτικότητα των αισθητήρων ανιόντων που βασίζονται σε ιονανταλλάκτες εξαρτάται από τον συντελεστή κατανομής στην λιπόφιλη οργανική φάση της μεμβράνης. Στην περίπτωση των ανιόντων η σειρά επιλεκτικότητας που παρατηρείται είναι η επονομαζόμενη σειρά επιλεκτικότητας Hofmeister(12) και είναι: οργανικά ιόντα > ClO_4^- > SCN^- ~ I^- > Sal^- > NO_3^- > Br^- > NO_2^- ~ Cl^- > HCO_3^- > H_2PO_4^- ~ F^- ~ SO_4^{2-} . Στις επόμενες περιπτώσεις, λόγω της επιλεκτικής αλληλεπίδρασης του ιονομεταφορέα με το προς ανάλυση ιόν, η σειρά επιλεκτικότητας αποκλίνει από τη σειρά Hofmeister

3.3.2 Ο πλαστικοποιητής

Ο πλαστικοποιητής είναι ο οργανικός διαλύτης όλων των συστατικών της μεμβράνης και ειδικά του πολυμερούς το οποίο σε θερμοκρασία περιβάλλοντος βρίσκεται σε στερεή μορφή και είναι αδιάλυτο σε ανόργανους διαλύτες. Τα κύρια χαρακτηριστικά του πλαστικοποιητή είναι η διηλεκτρική σταθερά του (δηλαδή το μέτρο πολικότητάς του), η λιποφιλία του, και η δυνατότητα αλληλεπίδρασης με τον ιονομεταφορέα(13).

Έτσι λοιπόν, πρέπει να έχει μικρή διηλεκτρική σταθερά (ϵ) δηλαδή να έχει υψηλή λιποφιλία ώστε να μην κατανέμονται από τη φάση της μεμβράνης στο υδατικό διάλυμα τα συστατικά της μεμβράνης. Η χρήση πλαστικοποιητή με μεγάλη διηλεκτρική σταθερά αυξάνει την επιλεκτικότητα του αισθητήριου στοιχείου για τα υδροφιλα ιόντα λόγω της μεγαλύτερης κατανομής τους και αντίστροφα.

Η λιποφιλία του πλαστικοποιητή είναι σημαντική παράμετρος για το χρόνο ζωής του αισθητήρα. Όσο πιο λιπόφιλος είναι ο πλαστικοποιητής τόσο μικρότερη είναι η εκροή αυτού και των υπόλοιπων συστατικών της μεμβράνης στο υδατικό διάλυμα, άρα και τόσο μεγαλύτερος ο χρόνος ζωής του αισθητήρα.

Υπάρχουν και περιπτώσεις όπου ο πλαστικοποιητής ανταγωνίζεται τον ιονομεταφορέα ως προς την δέσμευση του αναλύτη στο διάλυμα. Γι'αυτό δεν θα πρέπει να περιέχει ενεργές ομάδες που μπορούν να δρουν ως ανταγωνιστικές θέσεις συναρμογής ως προς τον αναλύτη. Τέλος ο πλαστικοποιητής δεν πρέπει να κρυσταλλώνεται στη μεμβράνη(13).

3.3.3 Το πολυμερές

Το πολυμερές αποτελεί το υπόστρωμα της μεμβράνης. Η πιο σημαντική ιδιότητα του πολυμερούς είναι η θερμοκρασία υαλώδους μεταπτώσεως (T_g), η θερμοκρασία δηλαδή που το πολυμερές μεταβαίνει από στερεή σε υγρή κατάσταση. Σε θερμοκρασία χαμηλότερη της T_g τα πολυμερή είναι σκληρά και εύθραυστα, ενώ σε θερμοκρασία υψηλότερη της T_g είναι μαλακά και εύκαμπτα. Για τη χρήση των πολυμερών σε μεμβράνες Ε.Η.Ι. πρέπει η θερμοκρασία T_g να είναι μικρότερη της θερμοκρασίας δωματίου.

Το PVC αποτελεί το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο πολυμερές στην παρασκευή μεμβρανών Ε.Η.Ι(14). Η θερμοκρασία υαλώδους μεταπτώσεως του PVC είναι $T_g \approx 81$ °C. Για το λόγο αυτό απαιτείται ο πλαστικοποιητής για τη χρήση του PVC στην παρασκευή υγρών πολυμερικών μεμβρανών για τα Ε.Η.Ι.

Πολλές χημικά τροποποιημένες μορφές του PVC που περιέχουν υδροξύ-, άμινο ή καρβοξυλικές ομάδες έχουν συντεθεί με σκοπό την βελτιστοποίηση του πολυμερούς ως προς την ικανότητα προσκόλλησής του στην επιφάνεια των ηλεκτροδίων.

Εναλλακτικά με το PVC υπάρχουν πολυμερή όπως η πολυουρεθάνη(15) και το silicone rubber(16),(17, 18). Τέτοια πολυμερή χρησιμοποιούνται σε περιπτώσεις που χρειάζονται ειδικά λειτουργικά χαρακτηριστικά. Όπως σε in vivo εφαρμογές όπου η εκροή συστατικών από την μεμβράνη που έχουν φλεγμονώδεις ή τοξικές ιδιότητες πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψιν. Παρόμοια, το silicone rubber επιδεικνύει πολύ καλή προσκόλληση σε πυριτικά υποστρώματα, αντίθετα με το PVC δίνοντας ταυτόχρονα σχετικά μικρή

αντίσταση στη μεμβράνη, ενώ παράλληλα είναι συμβατό με διαδικασίες περιστροφικής επίστρωσης (screen printing) καθιστώντας το έτσι πολύ ελκυστικό υλικό για την ανάπτυξη αισθητήρων μαζικής παραγωγής.

3.3.4 Τα λιπόφιλα φορτισμένα πρόσθετα

Τα συνηθέστερα ιοντικά πρόσθετα που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή και τη μελέτη μεμβρανών E.H.I., είναι τα τετραάλκυλοαμμωνιακά άλατα TDMA^+X^- ($\text{X}=\text{Cl}^-, \text{NO}^-$) και τα τετραφαινυλοβορικά άλατα M^+TPB^- ($\text{M}=\text{Na}^+, \text{K}^+$)(19). Η συγκέντρωση των πρόσθετων στη μεμβράνη καθορίζεται από το φορτίο του ιόντος και τη στοιχειομετρία του συμπλόκου που σχηματίζεται με τον ιονομεταφορέα και δεν ξεπερνάει αυτή του ιονομεταφορέα στη μεμβράνη.

Τα φορτισμένα πρόσθετα εισάγονται στη μεμβράνη διότι:

- Μειώνουν τις παρεμποδίσεις από λιπόφιλα αντισταθμιστικά ιόντα.
- Μειώνουν την αντίσταση της μεμβράνης(20) και το χρόνο απόκρισης του αισθητήρα.
- Τροποποιούν την επιλεκτικότητα.

Ανάλογα με την επίδραση στην απόκριση του E.H.I. που έχουν τα φορτισμένα πρόσθετα, μπορεί να βρεθεί ο μηχανισμός απόκρισης του ιονομεταφορέα:

- Η βελτιστοποίηση της επιλεκτικότητας ενός ιονομεταφορέα ανιόντων με τη χρήση θετικά φορτισμένων πρόσθετων υποδεικνύει ότι ο ιονομεταφορέας είναι ουδέτερος φορτισμένος.
- Αντίθετα, η βελτιστοποίηση της επιλεκτικότητας ενός ιονομεταφορέα ανιόντων με τη χρήση αρνητικά φορτισμένων προσθέτων είναι ενδεικτική ότι ο ιονομεταφορέας είναι θετικά φορτισμένος.

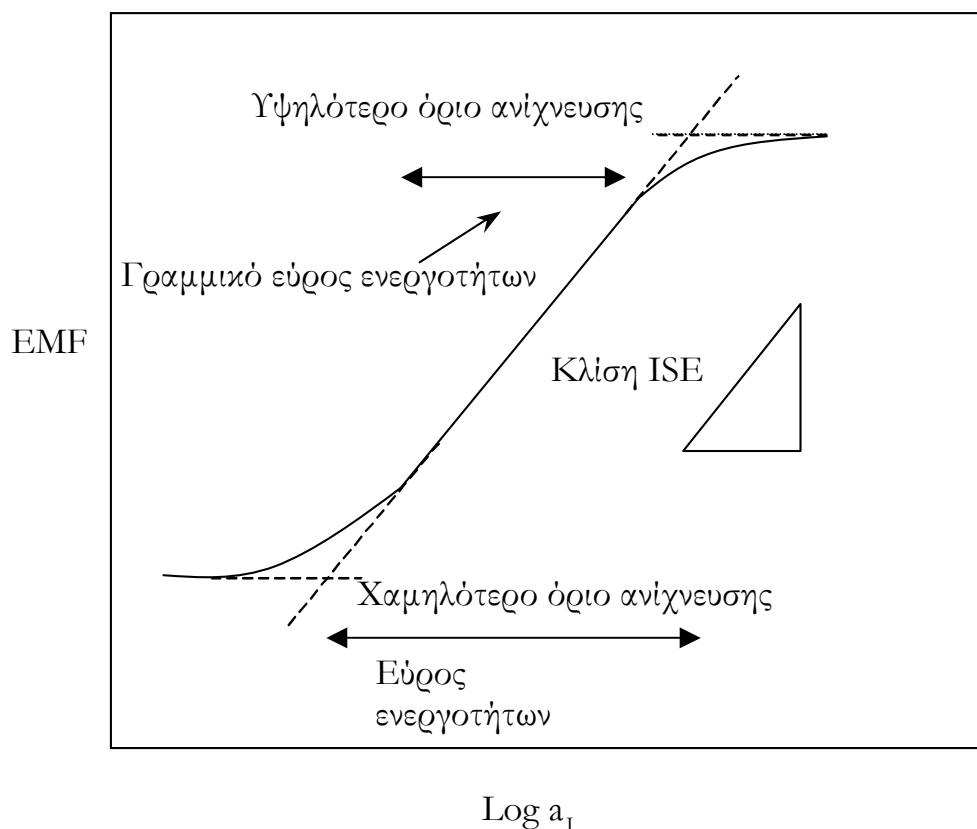
3.4 Αναλυτικά Χαρακτηριστικά

Τα αναλυτικά χαρακτηριστικά ενός E.H.I. παρουσιάζονται παρακάτω.

3.4.1 Η καμπύλη βαθμονόμησης

Καμπύλη βαθμονόμησης είναι η γραφική παράσταση του δυναμικού του E.H.I. συναρτήσει του λογαρίθμου της ενεργότητας ενός συγκεκριμένου ιόντος. Από την καμπύλη βαθμονόμησης εξάγονται επιμέρους λειτουργικά χαρακτηριστικά των E.H.I., όπως η

ευαισθησία, το όριο ανίχνευσης και το εύρος γραμμικής απόκρισης. Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται μια τυπική καμπύλη βαθμονόμησης.



Εικόνα 4: Τυπική καμπύλη βαθμονόμησης ενός Ε.Η.Ι.

3.4.2 Εύρος Απόκρισης

Η περιοχή συγκεντρώσεων ή ενεργοτήτων που ορίζεται από το χαμηλότερο και το υψηλότερο όριο ανίχνευσης του Ε.Η.Ι. ονομάζεται εύρος συγκεντρώσεων ή ενεργοτήτων απόκρισης του Ε.Η.Ι. και το γραμμικό τμήμα της καμπύλης βαθμονόμησης ονομάζεται γραμμικό εύρος συγκεντρώσεων. Τα Ε.Η.Ι. πολυμερικής μεμβράνης αποκρίνονται σε μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων. Τα Ε.Η.Ι. πολυμερικής μεμβράνης αποκρίνονται σε μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων. Τα ηλεκτρόδια pH αποκρίνονται σε 13-15 λογαριθμικές τάξεις συγκέντρωσης, ενώ έχει αναφερθεί ότι τα τυπικά εύρη συγκεντρώσεων Ε.Η.Ι. μονοσθενών ιόντων είναι 5 -7 τάξεις μεγέθους, ενώ Ε.Η.Ι. δισθενών ιόντων είναι 10-14 τάξεις μεγέθους(21).

3.4.3 Εναισθησία E.H.I.

Η κλίση του γραμμικού τμήματος της καμπύλης βαθμονόμησης, είναι το μέτρο της εναισθησίας του E.H.I.. Όταν η κλίση του E.H.I. συμφωνεί με τη θεωρητική τιμή που προβλέπεται από την εξίσωση του Nernst για E.H.I. και είναι $2,303RT/(Z_A F)$, (ή $59,16 / Z_A$ mV ανά μονάδα αλλαγής του $p_{A,}$ στους 298,15 K) τότε λέγεται ότι το E.H.I. αποκρίνεται κατά Nernst. Στην περίπτωση που το E.H.I. δεν ακολουθεί την εξίσωση Nernst, τότε στην κλίση του E.H.I. παρατηρούνται αποκλίσεις από τις θεωρητικές τιμές και τότε λέγεται ότι το E.H.I. παρουσιάζει υπερ- ή υπό- Nernstian απόκριση για μεγαλύτερη ή μικρότερη απόκριση από τη θεωρητική τιμή, αντίστοιχα.

3.4.4 Όριο ανίχνευσης

Ως όριο ανίχνευσης χαρακτηρίζεται η μικρότερη συγκέντρωση ή ποσότητα του μετρούμενου συστατικού, που μπορεί να προσδιορισθεί με αξιοπιστία. Ανάλογα με το είδος του αισθητήρα μπορεί να υπολογιστεί είτε από το σημείο τομής της προέκτασης των δυο γραμμικών τμημάτων της καμπύλης βαθμονόμησης. Ουσίες που παρεμποδίζουν την μέτρηση προκαλούν αύξηση στο όριο ανίχνευσης ενώ όλοι οι παράγοντες που ελαττώνουν το θόρυβο επιφέρουν μείωση στο όριο ανίχνευσης.

3.4.5 Χρόνος απόκρισης

Σύμφωνα με την IUPAC, ως χρόνος απόκρισης ορίζεται ο χρόνος που απαιτείται από τη στιγμή που το E.H.I. εμβαπτίζεται στο διάλυμα έως ότου το δυναμικό λάβει σταθερή τιμή στα όρια του $\pm 1\text{mV}$ ή εναλλακτικά όταν φθάσει στο 90% της τελικής του τιμής.

Ο χρόνος απόκρισης για τα ηλεκτρόδια έχει τιμές που κυμαίνονται από μερικά δευτερόλεπτα για τα ηλεκτρόδια στερεάς επαφής μέχρι αρκετών λεπτών για τα ηλεκτρόδια αερίων.

3.4.6 Ο χρόνος ζωής

Ο χρόνος ζωής ενός E.H.I. ορίζεται ως το χρονικό διάστημα από την αρχική κατασκευή του E.H.I. μέχρι τη στιγμή που τουλάχιστον ένα λειτουργικό χαρακτηριστικό του E.H.I. έχει μειωθεί σε τέτοιο βαθμό ώστε να μην μπορούν να ληφθούν αξιόπιστες μετρήσεις. Συνήθως η επιλεκτικότητα, η συνολική ποτενσιομετρική απόκριση σε μια

καθορισμένη συγκέντρωση και η κλίση του E.H.I. χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό του χρόνου ζωής.

Ο χρόνος ζωής των E.H.I. πολυμερικής μεμβράνης εξαρτάται από τους παρακάτω δυο παράγοντες.

1. από το ρυθμό διαρροής των ενεργών συστατικών (ιονομεταφορέα, προσθέτων, πλαστικοποιητή) της μεμβράνης προς το υδατικό διάλυμα.
2. από το ρυθμό επίδρασης του δείγματος στην ενεργή επιφάνεια της μεμβράνης (επιτάχηση πρωτεϊνών, συμπλόκων κλπ)

3.4.7 Ποτενσιομετρικός Συντελεστής Επιλεκτικότητας

Τα E.H.I. δεν παρουσιάζουν εξειδικευμένη απόκριση για ένα και μόνο ιόν. Άλλα ιόντα, που συνυπάρχουν με το μετρούμενο ιόν στο διάλυμα, είναι δυνατόν να συνεισφέρουν στο μετρούμενο δυναμικό. Ο βαθμός επιλεκτικότητας του ηλεκτροδίου έναντι του παρεμποδίζοντος ιόντος B, σε σχέση προς το πρωτεύον ιόν A, εκφράζεται με τον ποτενσιομετρικό συντελεστή επιλεκτικότητας, $K_{A,B}^{pot}$.

Έτσι η εξίσωση Nernst, για διάλυμα με περισσότερα από ένα ιόντα που συνεισφέρουν στο μετρούμενο δυναμικό, παίρνει την ακόλουθη μορφή: (Nikolskii Eisenman)

$$E = E^o + \frac{RT}{z_A F} \ln \left[a_A + K_{A,B}^{pot} a_B^{z_A/z_B} \right]$$

Όσο περισσότερο επιλεκτικό είναι ένα ηλεκτρόδιο ως προς το ιόν A σε σύγκριση με το ιόν B, τότε $K_{A,B}^{pot} < 1$. Αντίθετα όσο μεγαλύτερη είναι η παρεμποδιστική δράση του ιόντος B, τόσο μεγαλύτερη είναι η τιμή του $K_{A,B}^{pot}$.

Προσδιορισμός των ποτενσιομετρικών συντελεστών επιλεκτικότητας

Σύμφωνα με την IUPAC (1976) υπάρχουν δυο μέθοδοι για τον προσδιορισμό των ποτενσιομετρικών συντελεστών επιλεκτικότητας των E.H.I. Η μέθοδος των ξεχωριστών διαλυμάτων (Separate Solution Method, SSM) και η μέθοδος των σταθερών παρεμποδίσεων (Fixed Interference Method, FIM):

Η Μέθοδος των ξεχωριστών διαλυμάτων: το δυναμικό ενός E.H.I. μετράται σε δυο ξεχωριστά διαλύματα, από τα οποία το ένα περιέχει το ιόν A με ενεργότητα α_A (αλλά καθόλου το ιόν B) και το άλλο ιόν B με την ίδια ενεργότητα $\alpha_B = \alpha_A$ (αλλά καθόλου το ιόν

A). Αν οι μετρούμενες τιμές δυναμικού είναι E(A) και E(B) αντίστοιχα, τότε η τιμή του $K_{A,B}^{pot}$ λαμβάνεται από την εξίσωση:

$$K_{A,B}^{pot} = \frac{z_A F [E(B) - E(A)]}{2,303 RT} + \left(1 - \frac{z_A}{z_B}\right) \log a_A$$

Η Μέθοδος των σταθερών παρεμποδίσεων: το δυναμικό ενός Ε.Η.Ι. μετράται σε διαλύματα που περιέχουν σταθερή ενεργότητα παρεμποδίζοντος ιόντος α_B ενώ μεταβάλλεται η ενεργότητα του πρωτεύοντος ιόντος α_A . Γίνεται γραφική παράσταση των τιμών δυναμικού συναρτήσει της ενεργότητας του πρωτεύοντος ιόντος (**Εικόνα 4**) Το σημείο τομής των προεκτάσεων των γραμμικών τμημάτων της καμπύλης δίνει την τιμή της ενεργότητας α_A που μέσω της παρακάτω εξίσωσης μας δίνει την τιμή του $K_{A,B}^{pot}$.

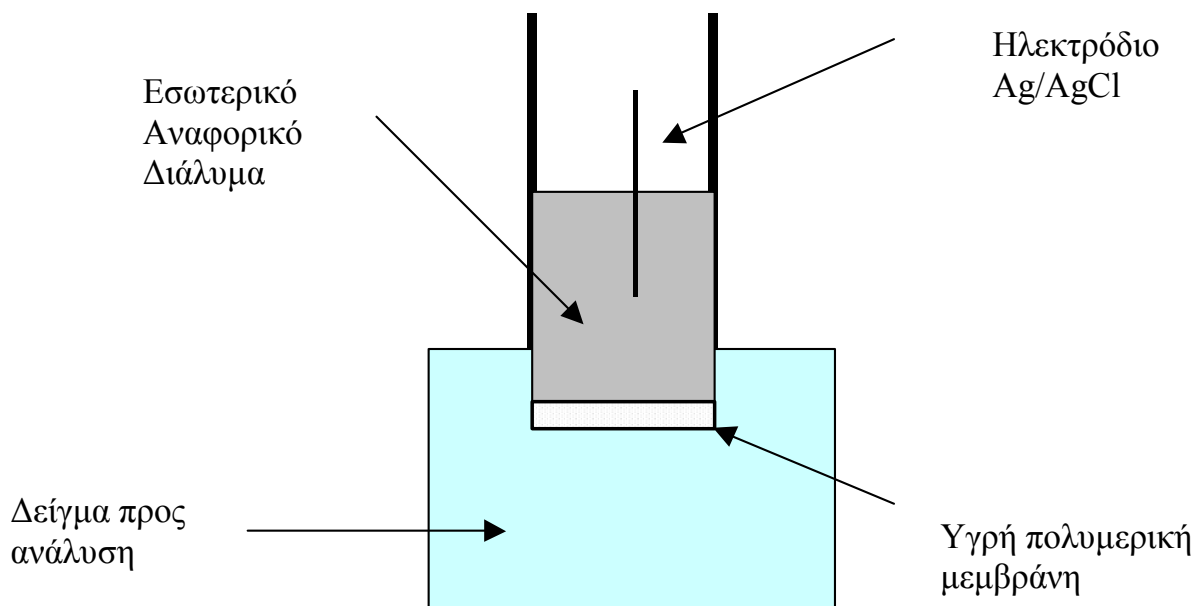
$$K_{A,B}^{pot} = \frac{a_A}{a_B^{z_A/z_B}}$$

4.ΕΙΔΗ ΕΠΙΛΕΚΤΙΚΩΝ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΩΝ ΙΟΝΤΩΝ

Τα Ε.Η.Ι. κατασκευαστικά χωρίζονται σε 3 κατηγορίες: τα συμβατικά ή Philips, τα στερεάς επαφής (SC) και τα επικαλυμμένου μετάλλου (CWE). Παρακάτω παρουσιάζονται τα κατασκευαστικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των τριών ειδών Ε.Η.Ι.

4.1 Συμβατικά Επιλεκτικά Ηλεκτρόδια Ιόντων (Philips)

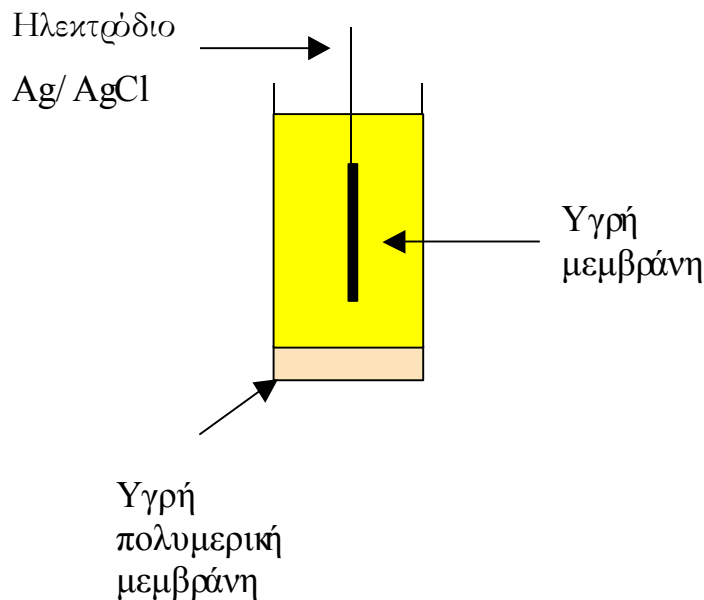
Τα ηλεκτρόδια Philips όπως και όλα τα Ε.Η.Ι. βασίζουν την λειτουργία του στη χημική αναγνώριση της προς ανάλυση ουσίας που γίνεται στη μεμβράνη και που παρουσιάστηκε αναλυτικά παραπάνω. Στο παρακάτω σχήμα (εικόνα 5) φαίνεται ένα ηλεκτρόδιο Philips και οι αρχές λειτουργίας του, όπως παρουσιάστηκαν σε παραπάνω παράγραφο, όπου φαίνονται το ηλεκτρόδιο Ag/AgCl, το εσωτερικό αναφορικό διάλυμα και η μεμβράνη που γίνεται η χημική αναγνώριση.



Εικόνα 5: Σχηματική Αναπαράσταση Ε.Η.Ι.

4.4 Ηλεκτρόδια Στερεάς επαφής -Υγρής μεμβράνης (LMSC)

Μια παραλλαγή των συμβατικών ηλεκτροδίων είναι τα ηλεκτρόδια στερεάς επαφής- υγρής μεμβράνης. Η αρχή λειτουργίας του είναι ίδια με αυτή του συμβατικού ηλεκτροδίου Philips. Η χημική αναγνώριση δηλαδή γίνεται στην μεμβράνη που περιέχει τον ιονομεταφορέα. Η μόνη διαφορά είναι ότι στη θέση του εσωτερικού αναφορικού διαλύματος έχει τοποθετηθεί μίγμα πλαστικοποιητή και ιονομεταφορέα. Με αυτό τον τρόπο η μεμβράνη εμπλουτίζεται με ιονομεταφορέα και έτσι παρατείνεται ο χρόνος ζωής του ηλεκτροδίου. Στο παρακάτω σχήμα (εικόνα 6) φαίνεται η σχηματική αναπαράσταση ενός τέτοιου ηλεκτροδίου.



Εικόνα 6: Σχηματική Αναπαράσταση ηλεκτροδίου Στερεάς επαφής- Υγρής μεμβράνης

4.2 Ηλεκτρόδια Στερεάς Επαφής

Η επιθυμία να μικρύνουν και παραχθούν μαζικά επιλεκτικά ηλεκτρόδια ιόντων, οδήγησε στην ανάπτυξη ποτενσιομετρικών αισθητήρων πολυμερικής μεμβράνης με στερεή εσωτερική επαφή(22).

Τα ηλεκτρόδια στερεάς επαφής αναφέρονται σε ένα τύπο Ε.Η.Ι. στα οποία το εσωτερικό αναφορικό στοιχείο είναι σε απευθείας επαφή με την μεμβράνη και έτσι δεν υπάρχει εσωτερικό αναφορικό διάλυμα.

Το πιο σύνηθες υπόστρωμα είναι αγώγιμος άνθρακας σε επαφή με ένα σύρμα Ag /AgCl(23). Ο άνθρακας είναι πορώδης αγώγιμο υλικό, φτηνό και εύχρηστο.

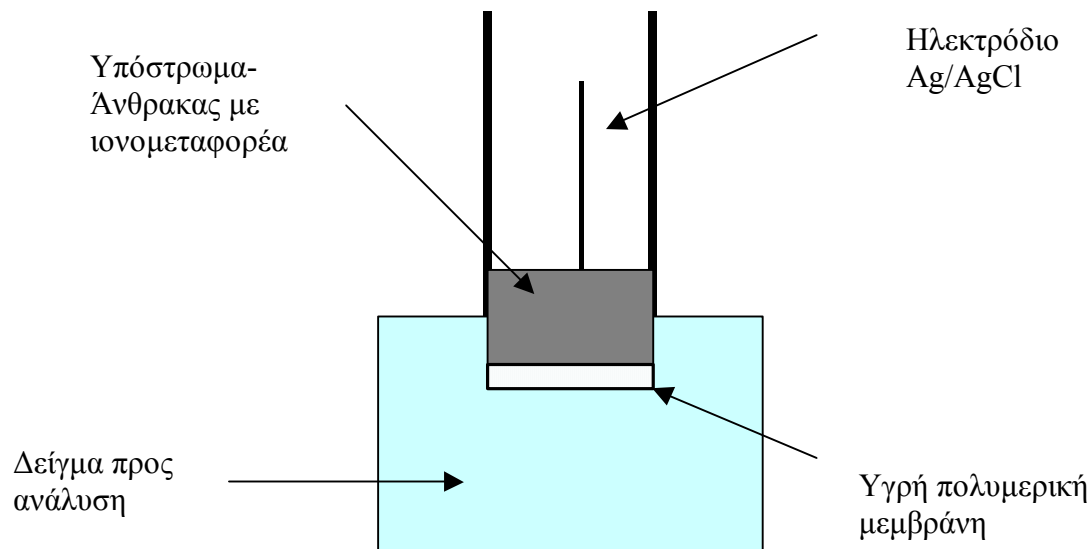
Κάποια άλλα υποστρώματα που έχουν χρησιμοποιηθεί για τέτοιου είδους αισθητήρες είναι τα πυριτικά υποστρώματα τα οποία όμως εμφανίζουν προβλήματα σχετικά με την επιλογή του κατάλληλου ηλεκτροενεργού πολυμερικού υλικού για τη μεμβράνη. Οι μεμβράνες που παρασκευάζονται με PVC δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε αυτά τα υποστρώματα λόγω των προβλημάτων προσκόλλησης στην επιφάνεια του πυριτίου. Έτσι διάφορα εναλλακτικά πολυμερικά υποστρώματα όπως το silicon rubber, χρησιμοποιούνται σε αυτού του τύπου τα ηλεκτρόδια(18).

Τέλος, ως υποστρώματα για ηλεκτρόδια στερεάς επαφής έχουν χρησιμοποιηθεί Silver-epoxy με πολυμερικό υπόστρωμα το silicon rubber(24), PVC με προσθήκη συμπλόκων του αργύρου(22), το DPP (1,3-διφαινυλοφωσφίνο προπάνιο) και το TDC (τριαιθερο παράγωγο της καλιξαρίνης)(22), η ακόμα και μίγμα πολυανιλίνης με πολυστυρένιο(25).

Τα ηλεκτρόδια στερεάς επαφής έχουν αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με τα αντίστοιχα κλασικά με εσωτερικό αναφορικό διάλυμα. Μπορούν να εκτεθούν σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες και πιέσεις, και είναι δυνατή η χρήση τους σε θέση διαφορετική από την κάθετη θέση. Το εσωτερικό διάλυμα δε χρειάζεται αναπλήρωση, μπορούν να παρασκευαστούν σε διάφορα σχήματα και μεγέθη και κοστίζουν λιγότερο από τα κλασικά E.H.I. Όλα τα ηλεκτρόδια στερεάς επαφής επιτρέπουν κατασκευές μικρο-πολυαισθητήρων που αποτελούνται από ένα αναφορικό ηλεκτρόδιο και πολλά επιλεκτικά ηλεκτρόδια. Οι κατασκευές αυτές είναι πολύ σημαντικές και χρήσιμες για την *in vivo* παρακολούθηση ουσιών που είναι από τους κυριότερους σκοπούς της έρευνας στο πεδίο των επιλεκτικών ηλεκτροδίων ιόντων(26). Το σημαντικότερο πρόβλημα που αντιμετωπίζουν αυτού του είδους τα ηλεκτρόδια είναι η αστάθεια στο δυναμικό τους, η κακή επαναληψιμότητα καθώς και η ολίσθηση σήματος που παρουσιάζουν(27). Η αστάθεια αυτή οφείλεται στην μη καλά ορισμένη διεπιφάνεια που σχηματίζεται ανάμεσα στο εσωτερικό στερεό υπόστρωμα και την μεμβράνη(22).

Είναι λοιπόν προφανές ότι το κλειδί στο σχεδιασμό αυτών των αισθητήρων είναι ο έλεγχος της διεπιφάνειας ανάμεσα στην οργανική ηλεκτροενεργή μεμβράνη και το εσωτερικό αναφορικό στοιχείο. Τέτοιο έλεγχος είναι απαραίτητος για να εξασφαλιστούν δυναμικά τα οποία θα είναι σταθερά και δε θα επηρεάζονται από το εξωτερικό διάλυμα(23).

Παραδείγματα ηλεκτροδίων στερεάς επαφής είναι τα επιλεκτικά ηλεκτρόδια επαγόμενου πεδίου και τα ηλεκτρόδια επικαλυπτόμενου μετάλλου (CWE). Τα τελευταία παρουσιάζονται πιο αναλυτικά παρακάτω(23).



Εικόνα 7: Σχηματική Αναπαράσταση Επιλεκτικού Ηλεκτροδίου Ιόντων Στερεάς Επαφής.

4.3 Ηλεκτρόδιο επικαλυμμένου μετάλλου (CWE)

Η επιθυμία να μικρύνουν, να απλοποιηθούν και να παραχθούν φθηνότερα και περισσότερο επιλεκτικά ηλεκτρόδια ιόντων μιας χρήσης, επικέντρωσε το ενδιαφέρον πολλών εργαστηρίων(27). Με τον όρο μιας χρήσης χαρακτηρίζονται τα ηλεκτρόδια με αναπαραγωγίμο αρχικό δυναμικό και ευαισθησία με σκοπό την μαζική κατασκευή ηλεκτροδίων. Έτσι παράχθηκε το πρώτο ηλεκτρόδιο επικαλυμμένου μετάλλου. Αν και ο όρος ηλεκτρόδιο επικαλυπτόμενου μετάλλου παρουσιάστηκε από τους Cattrall και Freiser το 1971(28), υπάρχουν αναφορές σχετιές πριν από αυτή την ημερομηνία.

Το κύριο χαρακτηριστικό των ηλεκτροδίων επικαλυμμένου μετάλλου είναι η εξάλειψη του συμβατικού υδατικού συστήματος αναφοράς που βρίσκουμε στα ηλεκτρόδια πολυμερικής μεμβράνης. Έτσι τα ηλεκτρόδια επικαλυμμένου μετάλλου είναι αυτά που ο ιονομεταφορέας ενσωματώνεται μέσα στο πολυμερικό φιλμ, συνήθως το PVC και επιστρώνεται πάνω σε ένα μεταλλικό υπόστρωμα.

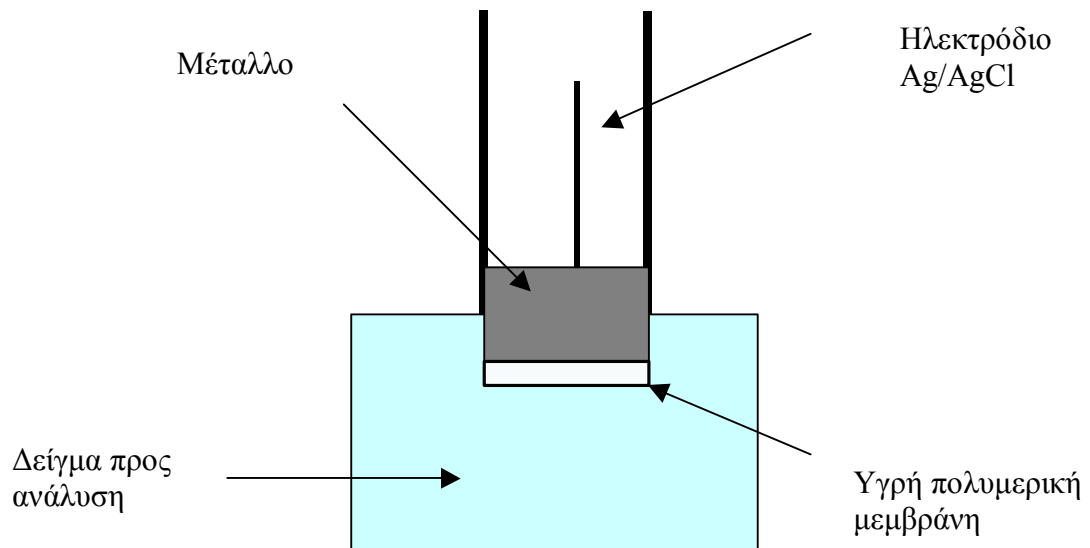
Αντίθετα με τα επιλεκτικά ηλεκτρόδια ιόντων που παρουσιάζονται, το ηλεκτροχημικό κελί σε ένα ηλεκτρόδιο επικαλυμμένου μετάλλου έχει την εξής διαμόρφωση.

Μέταλλο | μεμβράνη | διάλυμα δείγματος | εξωτερικό αναφορικό ηλεκτρόδιο

Ένα από τα μειονεκτήματα που παρουσιάζουν αυτά τα ηλεκτρόδια είναι η αστάθεια στο δυναμικό τους που αποδίδεται στο μη καλά καθορισμένο οξειδοαναγωγικό ζεύγος στην διεπιφάνεια μεμβράνης – μετάλλου(29). Η μεμβράνη είναι διαπερατή στο O_2 και στο νερό και σχηματίζει μια στοιβάδα που συμβάλει στην αστάθεια του δυναμικού. Αυτή η στοιβάδα δημιουργεί δυο δυναμικά διεπιφάνειας στην εσωτερική πλευρά της μεμβράνης (μεμβράνη/νερό και νερό /μέταλλο) αντί για ένα (μέταλλο/ μεμβράνη). Το δυναμικό της διεπιφάνεια ανάμεσα στην υδατική στοιβάδα και τη μεμβράνη εξαρτάται από τη σύσταση της στοιβάδας και της μεμβράνης. Όμως η μεμβράνη είναι διαπερατή και από ιόντα και έτσι είναι πιθανό ότι η σύσταση της στοιβάδας αυτής να εξαρτάται από το δείγμα. Η αργή αλλαγή στη σύσταση αυτή της στοιβάδας προκαλεί μεταβολή στο εσωτερικό δυναμικό της διεπιφάνειας μεμβράνη / νερό, που εμφανίζεται σαν διολίσθηση του σήματος του αισθητήρα(29).

Αυτό το πρόβλημα αντιμετωπίζεται με την τοποθέτηση ενός ενδιάμεσου στρώματος αγωγίμο πολυμερές. Έτσι η ανταλλαγή ηλεκτρονίων μπορεί να γίνει ανάμεσα στο αγωγίμο πολυμερές και την εσωτερική επιφάνεια της μεμβράνης και ανάμεσα στο αγωγίμο πολυμερές και το μέταλλο. Μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση σε αυτή την άποψη είναι η χρήση ηλεκτροενεργών πολυμερών (αγωγίμων ή οξειδοαναγωγικών) ως μεταλλάκτη σε συνδυασμό με πολυμερική μεμβράνη(30). Υπάρχουν πολλά αγωγίμα πολυμερή που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον σκοπό αυτό, όπως το πολυπυρρόλιο (PPy)(31), το poly(3,4-ethylenedioxythiophene)(30), DPP (1,3-διφαινυλοφωσφίνο προπάνιο) και το TDC (τριαιθερο παράγωγο της καλιξαρίνης)(22). Η εξάλειψη του προβλήματος του δυναμικού διεπιφάνειας μπορεί να βοηθήσει στην παραγωγή ηλεκτροδίου CWE με αναπαράγωγιμο και σταθερό δυναμικό ικανού να πραγματοποιεί μετρήσεις σε διάφορα δείγματα.

Το σύνηθες μέταλλο που χρησιμοποιείται ως βάση για τα ηλεκτρόδια επικαλυμμένου μετάλλου είναι η πλατίνα. Παράλληλα, ευρέως χρησιμοποιούμενο είναι το σύρμα Ag/AgCl. Προσπάθειες έχουν γίνει επίσης για την τοποθέτηση πολυμερικής μεμβράνης σε τυπωμένα ηλεκτρόδια γραφίτη (screen printing)(27). Η τεχνολογία αυτή δίνει τη δυνατότητα κατασκευής ηλεκτροδίων μιας χρήσης χαμηλού κόστους, με επαναλήψιμο αρχικό δυναμικό, και θεωρητική απόκριση(15).



Εικόνα 8: Σχηματική Αναπαράσταση Επιλεκτικού Ηλεκτροδίου Ιόντων Επικαλυμμένου Μετάλλου.

5. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η έλλειψη εύχρηστης, χαμηλού κόστους και αξιόπιστης μεθόδου προσδιορισμού τόσο φωσφορικών όσο και χλωριούχων ιόντων σε πραγματικά δείγματα κάνει επιτακτική την ανάγκη ανάπτυξης νέων αναλυτικών μεθόδων για τη συνεχή μέτρηση φωσφορικών και χλωριούχων ιόντων. Οι μέθοδοι αυτές πρέπει να παρέχουν τη δυνατότητα μέτρησης σε πραγματικά και πολύπλοκα δείγματα, όπως ο ορός αίματος και το πόσιμο νερό. Στόχος αυτής της εργασίας είναι η ανάπτυξη νέων επιλεκτικών ηλεκτροδίων φωσφορικών και χλωριούχων ιόντων με κατάλληλα αναλυτικά χαρακτηριστικά για τη χρήση τους σε νέες μεθόδους προσδιορισμού των ιόντων αυτών σε πραγματικά δείγματα.

Στο πρώτο τμήμα της εργασίας, η ανάπτυξη επιλεκτικού ηλεκτροδίου φωσφορικών ιόντων βασίζεται στη χρήση ποικίλων κατασκευαστικών μεθόδων E.H.I., προκειμένου να επιτευχθούν τα αναλυτικά χαρακτηριστικά που θα επιτρέψουν την άμεση μέτρηση φωσφορικών σε πραγματικά δείγματα, όπως ορός αίματος, και πόσιμο νερό. Εξετάζονται οι δυνατότητες που παρέχουν διάφορες μέθοδοι κατασκευής E.H.I., όπως τα συμβατικά ηλεκτρόδια Philips, τα E.H.I. στερεάς επαφής-υγρής μεμβράνης, τα E.H.I. στερεάς επαφής και τα E.H.I. επικαλυμμένου μετάλλου. Τα ηλεκτρόδια που κατασκευάζονται μελετώνται ως προς την επιλεκτικότητα, την ακρίβεια, το χρόνο ζωής και την επαναληψιμότητα των μετρήσεων.

Το δεύτερο τμήμα της εργασίας εστιάζεται στη βελτιστοποίηση των αναλυτικών χαρακτηριστικών επιλεκτικού ηλεκτροδίου χλωριούχων ιόντων. Η προσπάθεια αυτή βασίζεται σε προηγούμενες μελέτες που έχουν γίνει στο εργαστήριο για τη σχεδίαση και βελτιστοποίηση οργανομεταλλικών ιονομεταφορέων για τα ιόντα χλωρίου(32). Τα αποτελέσματα από τις μελέτες του χρόνου ζωής, της επαναληψιμότητας και της ακρίβειας των μετρήσεων τόσο σε πρότυπα δείγματα όπως και σε ορό αίματος καθορίζουν την επιτυχία και τη δυνατότητα εφαρμογής στο μέλλον των μελετών αυτών.

6. ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΟ ΦΩΣΦΟΡΙΚΩΝ ΙΟΝΤΩΝ

Η σημασία των φωσφορικών ιόντων και η παρουσία τους σε μια ποικιλία ανόργανων και βιολογικών δειγμάτων όπως το πόσιμο νερό και ο ορός αίματος, κάνει επιτακτική την ανάγκη ύπαρξης μιας γρήγορης, φτηνής και αξιόπιστης μεθόδου προσδιορισμού τους.

Η έλλειψη μιας τέτοιας μεθόδου οδηγεί την έρευνα στον τομέα των Ε.Η.Ι. να στραφεί προς τα φωσφορικά ιόντα.

6.1 Εισαγωγικά

Ο φώσφορος στις βιολογικές ενώσεις συναντάται ως επί το πλείστον στη μορφή των ορθοφωσφορικών (PO_4^{3-}). Τα φωσφορικά ιόντα είναι ένα σημαντικός διατροφικός και ενεργειακός μεταφορέας πολλών διαφορετικών επιπέδων της ζωής και επίσης ένα ιόν κλειδί για τη σύζευξη βιοτικών και αβιοτικών τμημάτων της βιόσφαιρας επειδή επιτρέπει την κατασκευή μακροπρόθεσμων και ανατροφοδοτικών μηχανισμών ανάμεσα στο κλίμα, το περιβάλλον και την οικολογία(33). Τα φωσφορικά ιόντα συμμετέχουν στις κυριότερες δομικές και λειτουργικές μονάδες των οργανισμών. Το RNA και το DNA είναι πολυμερή που βασίζονται σε μονομερή φωσφορικών εστέρων. Οι λιπιδικές μεμβρανικές διπλοστοιβάδες βασίζονται στα φωσφολιπίδια ενώ το κύριο συστατικό των οστών είναι το φωσφορικό ασβέστιο. Η κύρια μονάδα παραγωγής, μεταφοράς και αποθήκευσης ενέργειας στους οργανισμούς, το ATP, περιέχει φωσφορικές ομάδες. Στο πλάσμα του αίματος η μεγαλύτερη ποσότητα του φωσφόρου βρίσκεται με τη μορφή των ανόργανων φωσφορικών σε συγκέντρωση περίπου 0,9-1,3 mmol/l. Στο αίμα βρίσκονται στις μορφές H_2PO_4^- και HPO_4^{2-} σε αναλογία 1: 4 και συμμετέχουν στη ρύθμιση του pH σε 7,4. Τα φωσφορικά ιόντα είναι τα πιο υδρόφιλα σύμφωνα με την σειρά λιποφιλίας του Hofmeister και η μορφή στην οποία βρίσκονται στο διάλυμα εξαρτάται από το pH του διαλύματος ($\text{pK}_{a1}=2,148$, $\text{pK}_{a2}=7,199$ & $\text{pK}_{a3}=12,15$)(7) και είναι οι εξής: H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} και PO_4^{3-}

Ένα σύστημα με δυνατότητα να παρακολουθεί συνεχώς και επιλεκτικά τα επίπεδα φωσφορικών ιόντων σε υδατικά διαλύματα με καθορισμένο pH μπορεί, για τους παραπάνω λόγους, να βρει εφαρμογή σε μια πληθώρα πεδίων όπως η φαρμακολογία, η βιοϊατρική έρευνα και η κλινική χημεία(34).

Η ανάπτυξη μιας αναλυτικής μεθόδου για την ανίχνευση των φωσφορικών είναι επίσης σημαντική για την παρακολούθηση της περιβαλλοντικής ρύπανσης. Τα φωσφορικά χρησιμοποιούνται εκτεταμένα στα απορρυπαντικά και τα λιπάσματα γεγονός που σε

συνδυασμό με τον αργό βιολογικό τους κύκλο συμβάλλει σημαντικά στον ευτροφισμό των λιμνών και των ποταμών(35),(36). Ταυτόχρονα, είδη που περιέχουν φωσφορικά καταλήγουν στις δεξαμενές υπογείων υδάτων κάνοντάς τα ακατάλληλα για κατανάλωση από τον άνθρωπο.

6.2 Τρόποι προσδιορισμού φωσφορικών

Οι μέθοδοι που προτείνονται από το Standard Methods(37) για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των φωσφορικών είναι οι φασματοφωτομετρικές και οι χρωματογραφικές τεχνικές. Οι φασματοφωτομετρικές τεχνικές βασίζονται στο ότι τα φωσφορικά αντιδρούν σε όξινο περιβάλλον με το ιόν του μολυβδαινίου για την παραγωγή του ιόντος του φωσφομολυβδαινίου το οποίο ανάγεται σε μπλε του μολυβδαινίου. Αυτή η μέθοδος απαιτεί εξειδικευμένες συνθήκες, επικίνδυνα αντιδραστήρια και είναι πολύ χρονοβόρα(36). Οι χρωματογραφικές τεχνικές βασίζονται στο διαχωρισμό ιόντων κατά την έκλυση του δείγματος από μια ανιονανταλλακτική στήλη.

Οι παραπάνω μέθοδοι, ενώ παρέχουν μεγάλη ευαισθησία και ακρίβεια, είναι ακριβές και χρονοβόρες και ταυτόχρονα δεν επιτρέπουν συνεχείς μετρήσεις ή μετρήσεις στον τόπο συλλογής του δείγματος.

Για το λόγο αυτό η ανάπτυξη μεθόδων για τον προσδιορισμό των φωσφορικών βασισμένων σε επιλεκτικά ηλεκτρόδια ιόντων καθώς και βιοαισθητήρων προσφέρουν τη δυνατότητα συνεχούς μέτρησης και παρακολούθησης των φωσφορικών στην ανάλυση περιβαλλοντικών, φαρμακευτικών και κλινικών δειγμάτων(38).

6.3 Ε.Η.Ι. φωσφορικών-Ιστορική αναδρομή

Η ιστορία των ποτενσιομετρικών αισθητήρων για φωσφορικά ξεκίνησε το 1966 με τον Pungor(39). Το 1980 Ρώσοι επιστήμονες παρουσίασαν οργανομεταλλικά κατιοντικά άλατα που έδειξαν μεγάλη επιλεκτικότητα ως προς τα φωσφορικά ιόντα. Στα τέλη της ίδιας δεκαετίας οι Glazier και Arnold παρουσίασαν μια σειρά οργανοασπιτεριικών ενώσεων με πολύ καλή επιλεκτικότητα στα φωσφορικά. Το 1993 παρουσιάστηκαν πολυδοντικές οργανομεταλλικές ενώσεις ως ιονομεταφορείς φωσφορικών[Chaniotakis, 1993 #98]. Πρόσφατα και άλλες δημοσιεύσεις για οργανοασπιτεριικούς ιονομεταφορείς φωσφορικών έχουν παρουσιαστεί(40). Παρόλο τις καλές επιλεκτικότητες που παρουσίασαν οι παραπάνω ενώσεις, τα αντίστοιχα ηλεκτρόδια είχαν μικρό χρόνο ζωής και επαναληψιμότητα.

Εκτός από τις οργανομεταλλικές ενώσεις, έχουν παρουσιαστεί ως ιονομεταφορείς φωσφορικών zwitterionic bis-γουανιδίνες(41), uranyl salophenes(42),(43) και κυκλικές πολυαμίνες(44), που όμως και αυτοί παρουσιάζουν προβλήματα όσον αφορά το γραμμικό εύρος απόκρισης και το όριο ανίχνευσης.

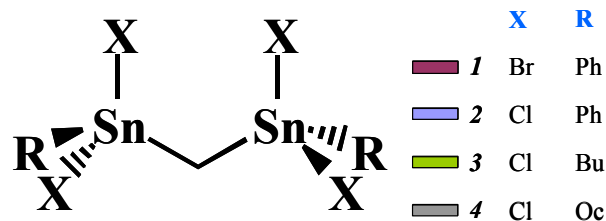
Πολλές δημοσιεύσεις υπάρχουν και για ηλεκτροδία φωσφορικών στερεάς επαφής. Το 1990 παρουσιάστηκε ένας ιονομεταφορέας cobalt phthalocyanine(45), ενώ το 1986 είχε δημοσιευθεί ο ιονομεταφορέας BiPO_4 για φωσφορικά. Το 1995 ο Χiao παρουσίασε ένα ηλεκτροδίο κοβαλτίου με πολύ καλή επιλεκτικότητα ως προς τα φωσφορικά ιόντα(46).

Παρόλο που υπάρχουν πολλές δημοσιεύσεις για διάφορους ιονομεταφορείς επιλεκτικούς στα φωσφορικά ιόντα, κανένας δεν είχε όλα τα απαραίτητα αναλυτικά χαρακτηριστικά για να χρησιμοποιηθεί για συνεχείς μετρήσεις σε πραγματικά δείγματα.

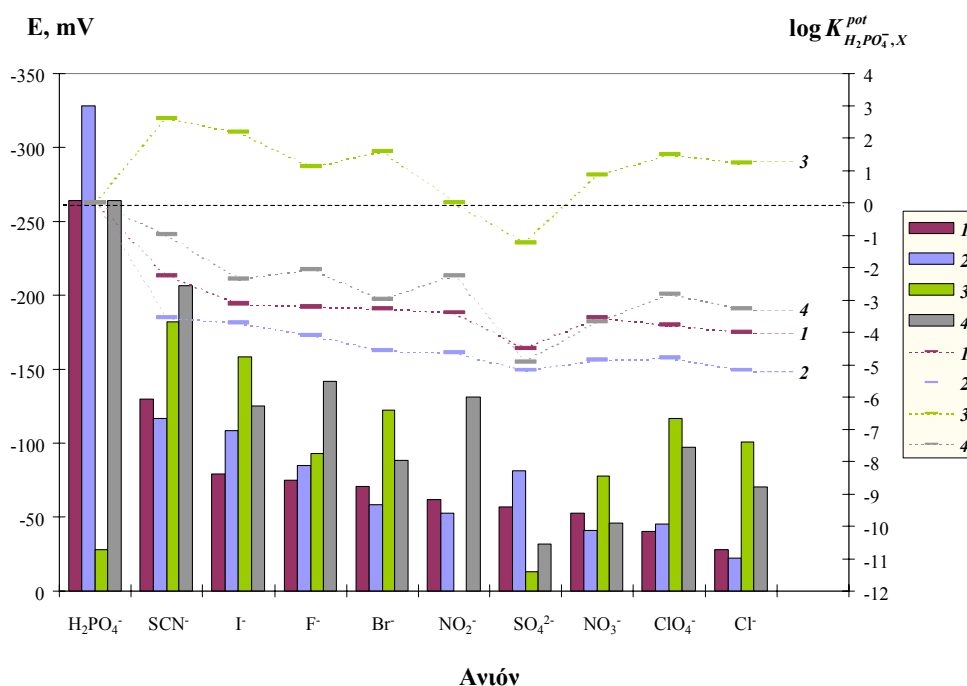
6.4.Επιλογή Ιονομεταφορέα

Η σχεδίαση οργανοκασσιτεριών ιονομεταφορέων φωσφορικών είναι ένας τομέας με τον οποίο έχει ασχοληθεί το Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας τα τελευταία δέκα περίπου χρόνια. Κατά τη διάρκεια των μελετών αυτών, έχουν συντεθεί και μελετηθεί ιονομεταφορείς, ορισμένοι εκ των οποίων θα μπορούσαν, με μια περαιτέρω βελτιστοποίηση να καλύψουν την ανάγκη για μετρήσεις φωσφορικών, όπως αυτές έχουν αναλυθεί προηγουμένως..

Οι καλύτεροι ιονομεταφορείς φωσφορικών βάσει των αναλυτικών τους χαρακτηριστικών παρουσιάζονται στην εικόνα 9(47). Μελετήθηκε η επίδραση των υποκαταστατών του κασσιτέρου στην επιλεκτικότητα του ηλεκτροδίου. Οι ιονομεταφορείς αυτοί είναι διδοντικές ενώσεις του κασσιτέρου στις οποίες η αλλαγή τόσο του υποκαταστάτη όσο και της απόστασης ανάμεσα στα κασσιτερικά κέντρα έχει δραματικές αλλαγές στην επιλεκτικότητα τους. Μετά από λεπτομερείς μελέτες για την επίδραση της απόστασης ανάμεσα στα κασσιτερικά κέντρα κατέληξαν ότι τα καλύτερα αποτελέσματα για τα φωσφορικά λαμβάνονται για απόσταση ένα άνθρακα ανάμεσα στα δυο κασσιτερικά κέντρα(47). Λεπτομερής ανάλυση της επιλεκτικότητας ως προς τα φωσφορικά ιόντα και της συνολικής ποτενσιομετρικής απόκρισης, των σημαντικότερων ποιοτικών χαρακτηριστικών των ιονομεταφορέων αυτών ως προς τους διαφορετικούς υποκαταστάτες φαίνεται στην εικόνα 10. Συγκρίνοντας τόσο την απόκριση (αριστερός άξονας X) όσο και τον συντελεστή επιλεκτικότητας (δεξιός άξονας X) επιλέγεται ως ο καλύτερος για περαιτέρω μελέτη, βελτιστοποίηση και εφαρμογή ο Ιονομεταφορέας 2.



Εικόνα 9: Ιονομεταφορείς φωσφορικών με δυο κασσιτερικά κέντρα.

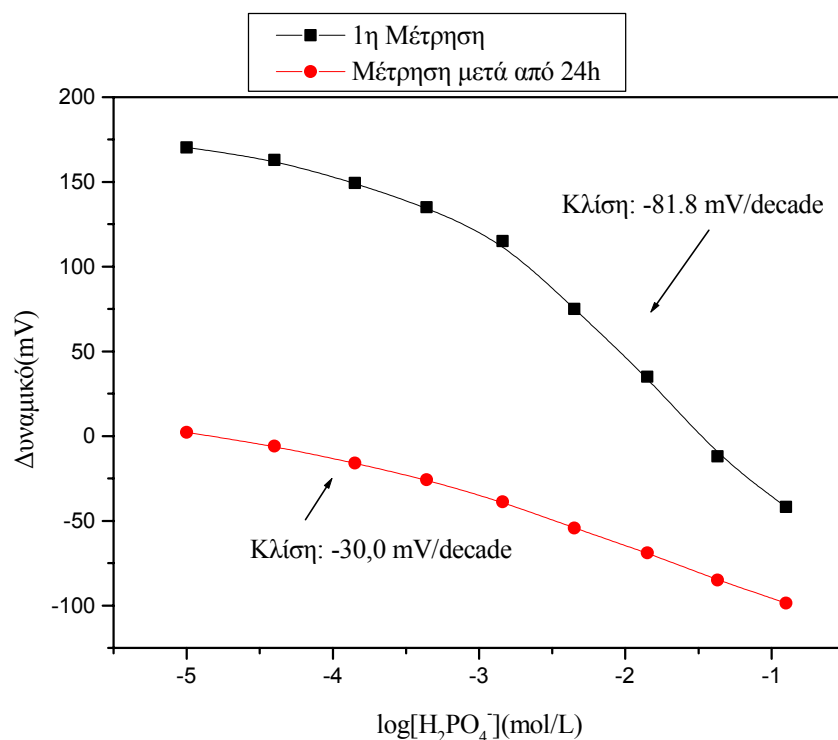


Εικόνα 10: Ποτενσιομετρικοί συντελεστές των παραπάνω ιονομεταφορέων.

6.5 Συμβατικό Ηλεκτρόδιο Φωσφορικών

Αρχικά έγιναν καμπύλες βαθμονόμησης με συμβατικό ηλεκτρόδιο Philips για να παρατηρηθεί η συμπεριφορά του ηλεκτροδίου σε συνεχόμενες μετρήσεις και ο χρόνος ζωής του. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 11 το ηλεκτρόδιο αρχικά δίνει υψηλή ευαισθησία (-81,8 mV/decade) αλλά σε διάστημα 24 ωρών παραμονής στον αέρα η ευαισθησία του μειώνεται κατά 60%, γεγονός που κάνει απαγορευτική τη χρήση του συγκεκριμένου ηλεκτροδίου για παραπάνω από μία μετρήσεις.

Με δεδομένο αυτό δοκιμάστηκε η χρήση λιπόφιλων προσθέτων στη μεμβράνη για τη βελτιστοποίηση των λειτουργικών χαρακτηριστικών του ηλεκτροδίου όπως φαίνεται στην παρακάτω παράγραφο.

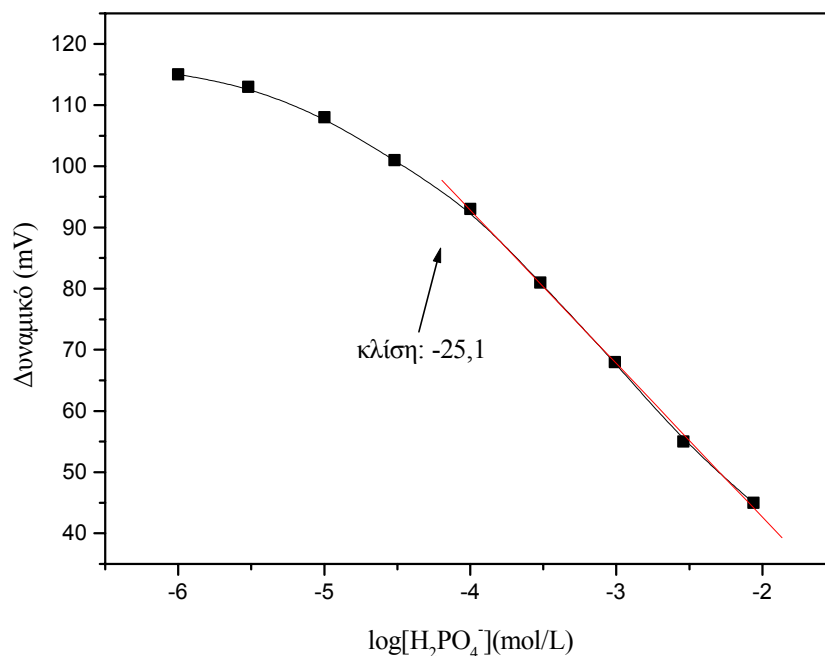


Εικόνα 11: Καμπύλη βαθμονόμησης ηλεκτροδίου φωσφορικών ιόντων με συμβατικό ηλεκτρόδιο philips.

6.5.1 Επίδραση των λοπόφιλων πρόσθετων στη μεμβράνη - τετραβουτυλαμμωνιακά φωσφορικά (TBAP).

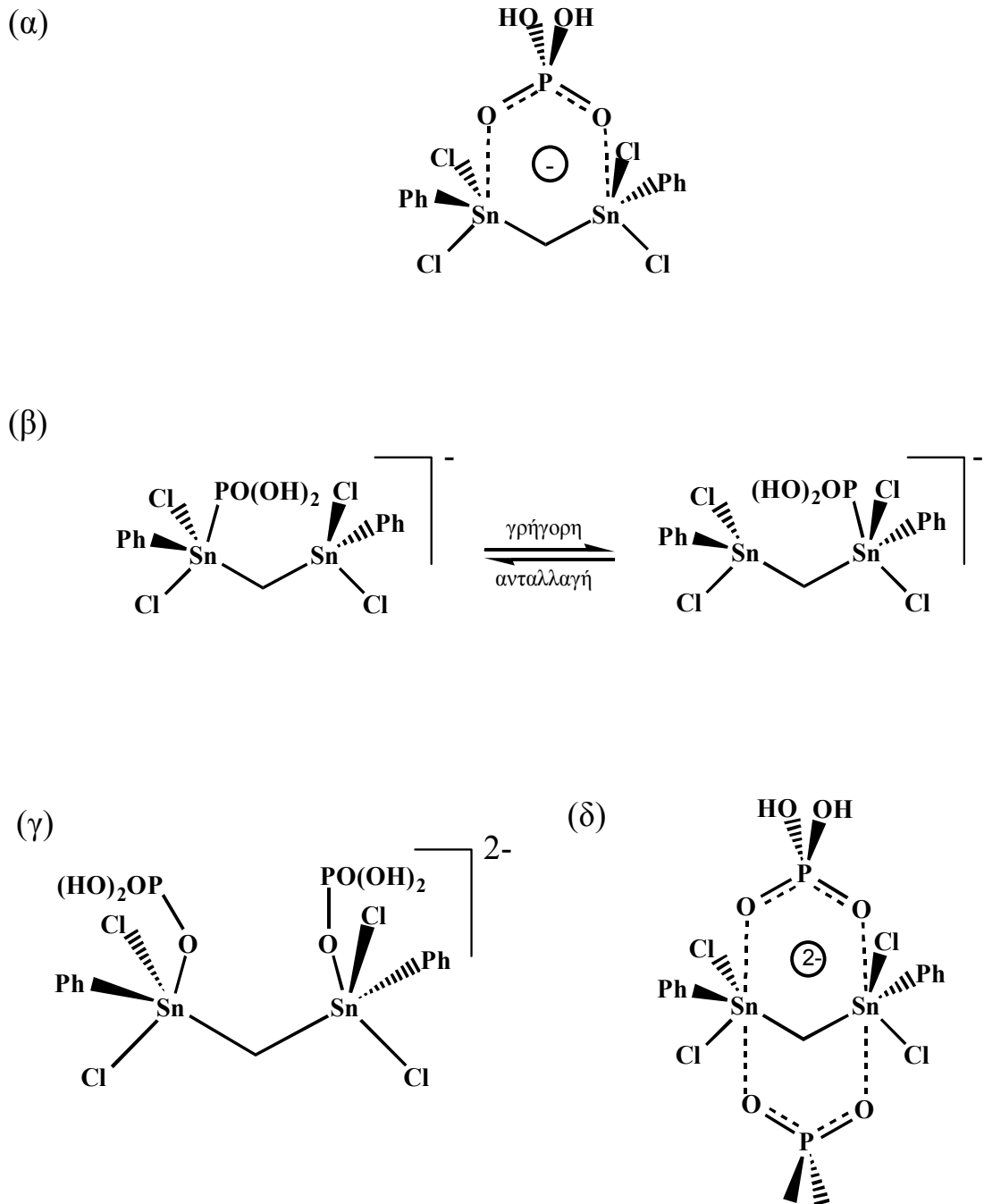
Έχει αναφερθεί ότι η χρήση TBAP μπορεί να βελτιώσει τα χαρακτηριστικά ποτενσιομετρικών αισθητήρων(19). Το αποτέλεσμα των πειραμάτων στα οποία έγιναν καμπύλες βαθμονόμησης σε ρυθμιστικό διάλυμα Γλουταμινικό οξύ - Γλουταμινικό Νάτριο pH=4 με προσθήκες διαλύματος KH₂PO₄ ήταν η ύπαρξη επαναλήψιμων αποτελεσμάτων, με πολύ μικρή κλίση (sub-Nernstian response) που κάνει απαγορευτική τη χρήση των ηλεκτροδίων σε χαμηλές συγκεντρώσεις (εικόνα 12). Η γραμμική απόκριση του ηλεκτροδίου ήταν για συγκεντρώσεις φωσφορικών ιόντων από 10⁻² έως 10⁻⁴M., και το όριο ανίχνευσης του ηλεκτροδίου υπολογίστηκε στα 5×10⁻⁵ M. Έχοντας ως δεδομένο ότι η

σύσταση των βιολογικών δειγμάτων σε φωσφορικά είναι της τάξης των μM η χρήση αυτών των ηλεκτροδίων σε πραγματικά δείγματα δεν είναι εφικτή.



Εικόνα 12: Καμπύλη βαθμονόμησης ηλεκτροδίου φωσφορικών με πρόσθετο τετραβουτυλαμμωνιακά φωσφορικά.

Όπως φαίνεται και από την παρακάτω σχηματική αναπαράσταση του τρόπου που συμπλέκεται το ιόν των φωσφορικών με τον ιονομεταφορέα και από τη σταθερά σύμπλεξης τους που υπολογίστηκε από τις μελέτες NMR και είναι $193 \pm 70 \text{ M}^{-1}$ (47), η πρόσδεση είναι πολύ ισχυρή. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μην υπάρχει η απαραίτητη για τις μετρήσεις στην ποτενσιομετρία αντιστρεπτή πρόσδεση των ιόντων των φωσφορικών με τον ιονομεταφορέα. Αυτός είναι πιθανόν και ο λόγος για τον οποίο οι αισθητήρες φωσφορικών δε λειτουργούν ικανοποιητικά. Η κακή επαναληψιμότητα των αρχικών δυναμικών και η ραγδαία μείωση της ευαισθησίας των ηλεκτροδίων από μέτρηση σε μέτρηση είναι αποτέλεσμα της μη αντιστρεπτής δέσμευσης των φωσφορικών, ή με άλλα λόγια της «δηλητηρίασης» του αισθητήριου στοιχείου. Η μέτρηση των φωσφορικών σε πραγματικά δείγματα με αυτούς τους αισθητήρες μπορεί να γίνει μόνο μία φορά.

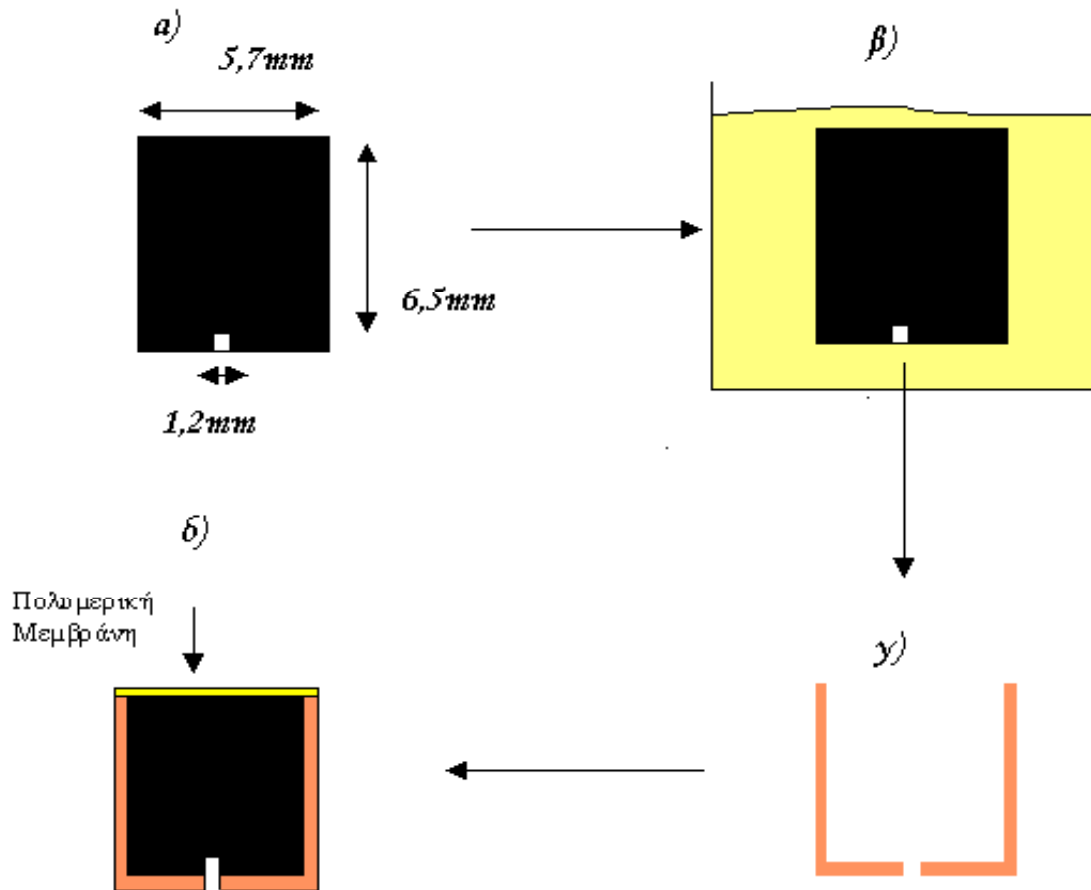


Εικόνα 13: Πιθανοί σχηματισμοί συμπλόκων της ένωσης 2 με τα φωσφορικά ιόντα. (α) σύμπλεξη 1: 1, με ένα ιόν φωσφορικού να συνδέεται ταυτόχρονα με τα δυο κασσιτερικά κέντρα (β) σύμπλεξη 1: 1, με ένα ιόν φωσφορικού να εναλλάσσεται πολύ γρήγορα μεταξύ των δυο κασσιτεριών κέντρων (γ) σύμπλεξη 1: 2, με ένα ιόν φωσφορικού να συνδέεται σε κάθε κασσιτερικό κέντρο και (δ) σύμπλεξη 1: 2, με τα δύο ιόντα φωσφορικών να συνδέονται ταυτόχρονα και με τα δυο κασσιτερικά κέντρα.

6.7 Ηλεκτρόδιο Στερεάς Επαφής Φωσφοριτών

Με δεδομένη από τα παραπάνω πειράματα, την αδυναμία χρήσης του ιονομεταφορέα σε συμβατικά ηλεκτρόδια με ή χωρίς την χρήση λιπόφιλων προσθέτων η έρευνα οδηγήθηκε στην κατασκευή Ε.Η.Ι. στερεάς επαφής. Για την κατασκευή των Ε.Η.Ι. στερεάς επαφής χρησιμοποιήθηκε αγώγιμος πορώδης άνθρακας. Η κατασκευή του ηλεκτροδίου ακολουθεί τα παρακάτω στάδια (εικόνα 14)

- α) Το ανθρακικό υπόστρωμα διαμορφώνεται στις κατάλληλες διαστάσεις.
- β) Το ανθρακικό υπόστρωμα ειπλένεται διαδοχικά σε νερό και αιθανόλη και ξηραίνεται στο φούρνο στους 150⁰C για 3 ώρες. Στη συνέχεια φέρεται σε φιαλίδιο παρασκευής μεμβρανών με υγρή μεμβράνη (όλα τα συστατικά της μεμβράνης εκτός από το πολυμερές) και τοποθετείται σε αντλία κενού (~1/2 h).
- γ) Το σώμα άνθρακα μετά την πλήρη εμπότιση του με την υγρή μεμβράνη, τοποθετείται σε ειδικά διαμορφωμένο σώμα ηλεκτροδίου .
- δ) Ακολουθεί η εναπόθεση του διαλύματος της πολυμερικής μεμβράνης στην εξωτερική επιφάνεια του σώματος άνθρακα και αφήνεται για περίπου 12 ώρες ώστε να εξατμιστεί τελείως ο διαλύτης (THF).



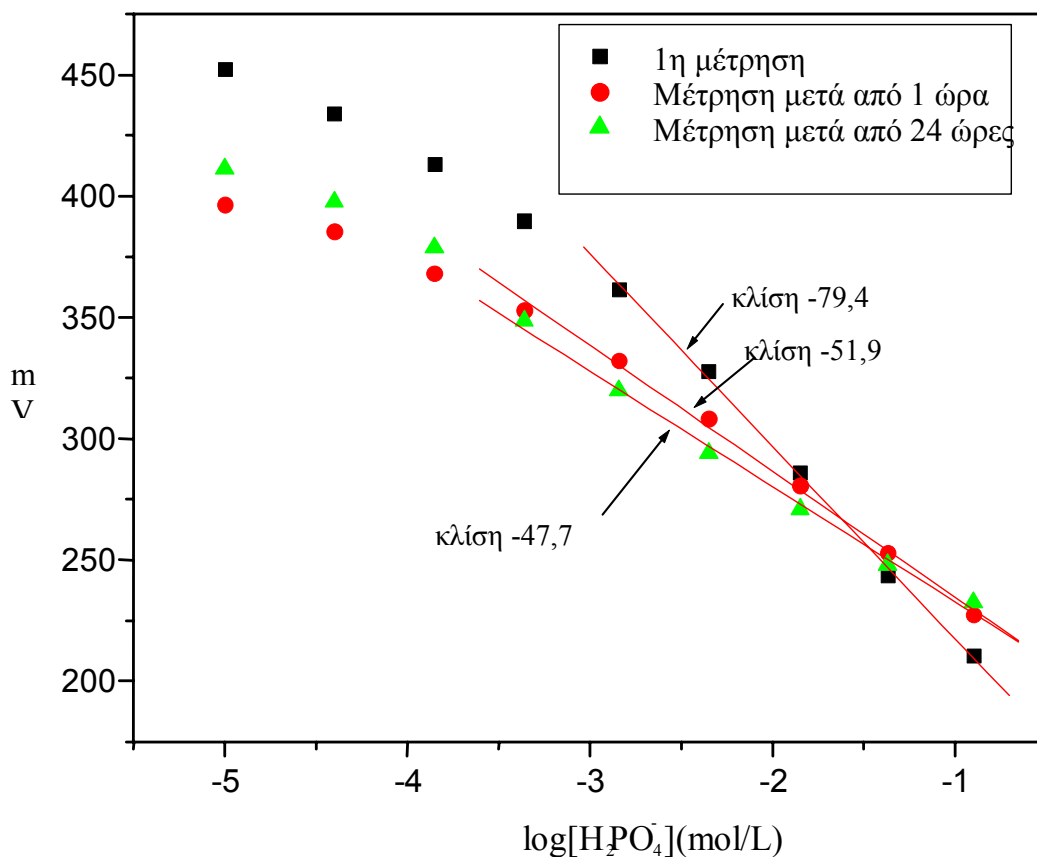
Εικόνα 14: Συναρμολόγηση προσαρτήματος ηλεκτροδίου για τα ηλεκτρόδια στερεάς επαφής. α) διαμόρφωση σώματος άνθρακα, β) εμπότιση άνθρακα με την υγρή μεμβράνη, γ) εισαγωγή σώματος άνθρακα σε ειδικό προσάρτημα ηλεκτροδίου και δ) εναπόθεση πολυμερικής μεμβράνης στο ηλεκτρόδιο.

6.7.1 Μελέτη Χρόνου Ζωής και Επαναληψιμότητας

Η πρώτη σειρά πειραμάτων συμπεριλαμβάνει την εξέταση του αισθητήρα ως προς το χρόνο ζωής καθώς και ως προς την επαναληψιμότητα των μετρήσεων.

Στο ηλεκτρόδιο έγιναν καμπύλες βαθμονόμησης σε ρυθμιστικό διάλυμα Γλουταμινικό οξύ - Γλουταμινικό Νάτριο pH=4,0 με προσθήκες διαλύματος KH_2PO_4 0,1 M. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 15 το ηλεκτρόδιο αρχικά παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία (-79,4 mV/decade). Η καμπύλη βαθμονόμησης επαναλήφθηκε για το ίδιο ηλεκτρόδιο μετά από μια ώρα και μετά από 24 ώρες όπου το ηλεκτρόδιο παρέμενε στον αέρα. Παρατηρούμε ότι η ευαισθησία μειώνεται κατά 34,5% μετά από μία ώρα και κατά 40% μετά από 24 ώρες από την αρχική ευαισθησία. Επίσης παρατηρούμε ότι το δυναμικό για τις διάφορες

συγκεντρώσεις φωσφορικών ιόντων δεν είναι επαναλήψιμο. Τα αποτελέσματα αυτά δεν επιτρέπουν τη χρήση του αισθητήρα φωσφορικών ιόντων σε πραγματικά δείγματα.

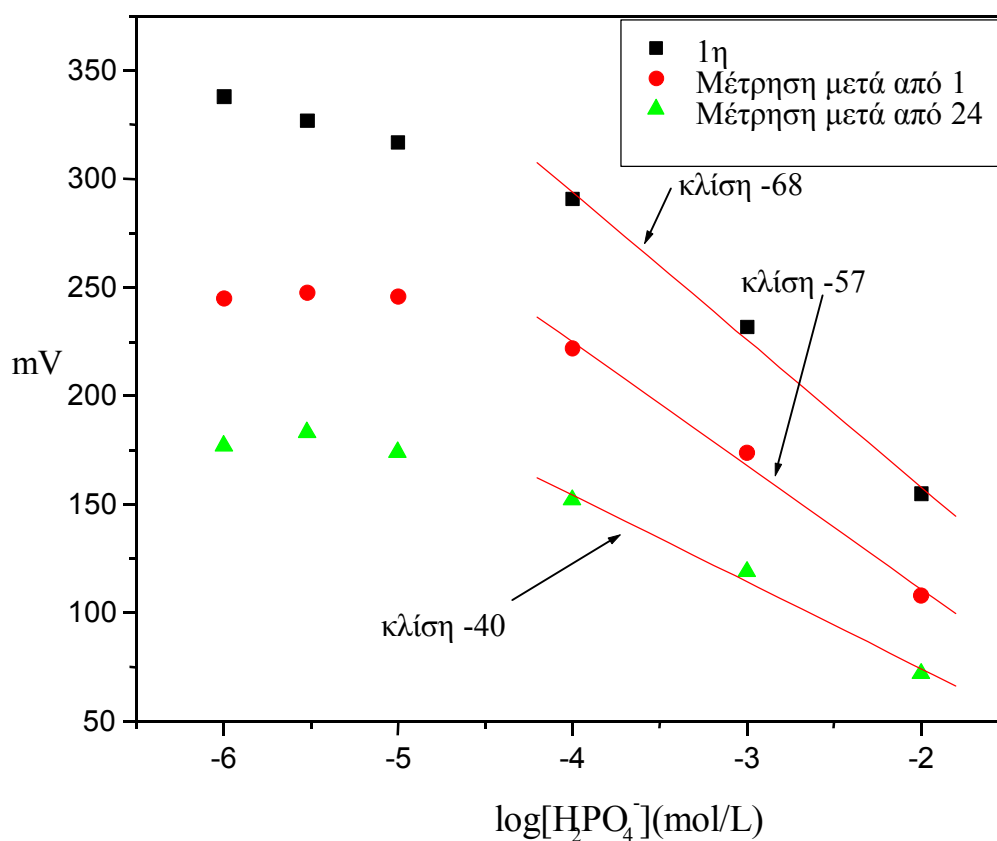


Εικόνα 15: Καμπύλες βαθμονόμησης ηλεκτροδίου στερεάς επαφής.

6.9 Ηλεκτρόδιο φωσφορικών Στερεάς επαφής-Υγρής μεμβράνης

Για την αντιμετώπιση του προβλήματος της αλλαγής της ευαισθησίας με το χρόνο, δοκιμάστηκε μια άλλη κατασκευή, τα επιλεκτικά ηλεκτρόδια στερεάς επαφής υγρής μεμβράνης. Ο εμπλουτισμός της μεμβράνης με ιονομεταφορέα θα μπορούσε να εξαλείψει το πρόβλημα που αντιμετωπίστηκε με τα παραπάνω ηλεκτρόδια. Σε αντιστοιχία με τα Ε.Η.Ι. στερεάς επαφής, στα Ε.Η.Ι. υγρής μεμβράνης ο αγώγιμος άνθρακας έχει αντικατασταθεί από διάλυμα ιονομεταφορέα σε πλαστικοποιητή σε αναλογία 1: 20. Αντίστοιχα με τα στερεάς επαφής, στα Ε.Η.Ι. υγρής μεμβράνης έγιναν καμπύλες

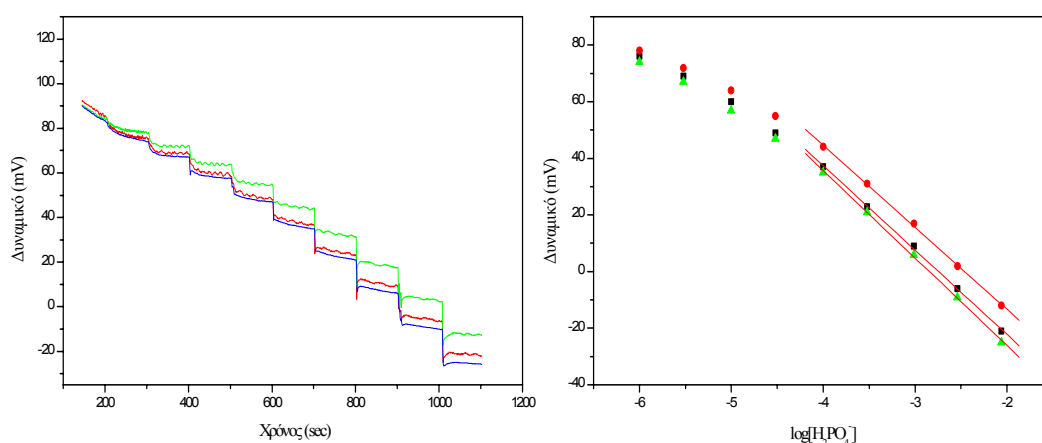
βαθμονόμησης σε ρυθμιστικό διάλυμα Γλουταμινικό οξύ - Γλουταμινικό Νάτριο pH=4,0 με προσθήκες διαλύματος KH_2PO_4 , και όπως φαίνεται και στο παρακάτω διάγραμμα είχαν υψηλή ευαισθησία αλλά καθόλου επαναληψιμότητα. Οι καμπύλες βαθμονόμησης έγιναν κατά σειρά αμέσως μετά την κατασκευή του ηλεκτροδίου, μετά από 1 ώρα και μετά από 24 ώρες, όπου στο ενδιάμεσο χρονικό διάστημα το ηλεκτρόδιο παρέμενε στον αέρα και η κλίση του ηλεκτροδίου μειώνεται με τέτοιο ρυθμό που δεν δίνει την δυνατότητα για δεύτερη μέτρηση. Η μείωση της ευαισθησίας σε 1 ώρα είναι 16%, (από -68 σε -57 mV/decade) ενώ μετά από 24 ώρες φτάνει το 41% (σε -40 mV/decade). Τα δεδομένα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ούτε αυτή η σχεδίαση ήταν ικανή για να αντιμετωπίσει το πρόβλημα της αλλαγής της ευαισθησίας με το χρόνο.



Εικόνα 16: Καμπύλες βαθμονόμησης ηλεκτροδίου στερεάς επαφής- υγρής μεμβράνης.

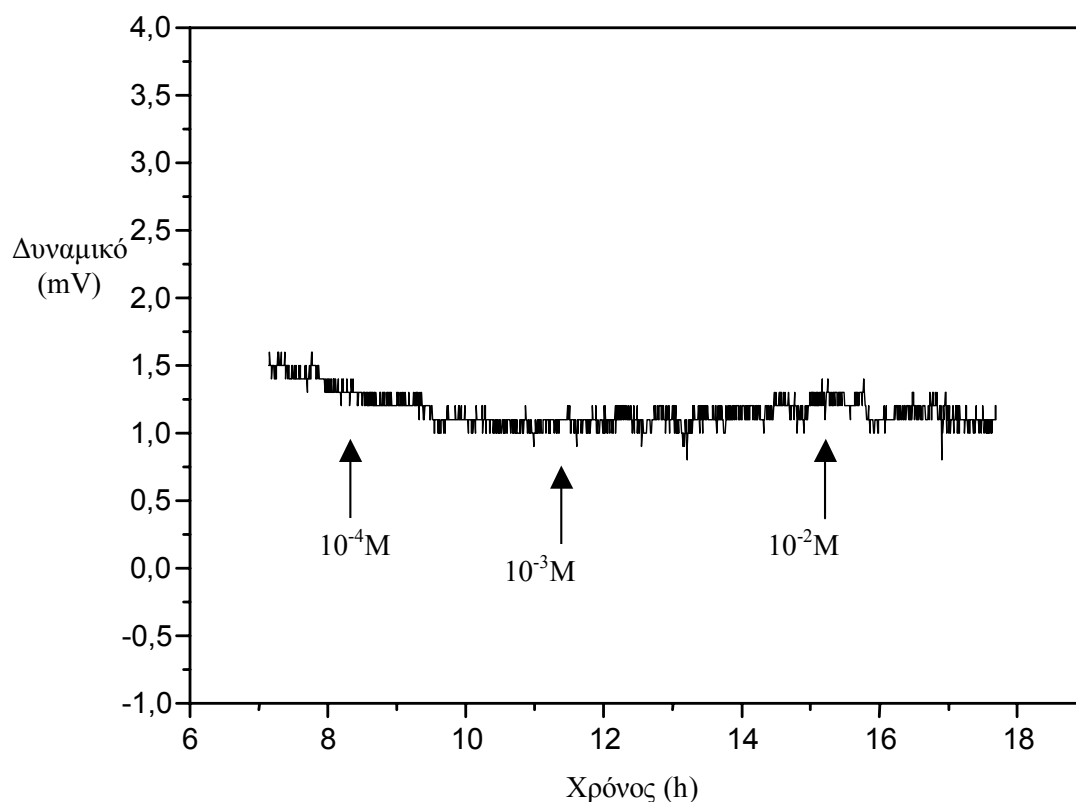
6.10 Ηλεκτρόδιο φωσφορικών Επικαλυμμένου Μετάλλου (C.W.E.)

Μετά από τα παραπάνω αποτελέσματα κρίθηκε απαραίτητη η κατασκευή ηλεκτροδίων επικαλυπτόμενου μετάλλου. Η κατασκευή αυτή δίνει την δυνατότητα δημιουργίας ηλεκτροδίων μιας χρήσης. Η λεκτροδίων δηλαδή που όπως αναφέρθηκε παραπάνω θα έχουν επαναλήψιμα αρχικά δυναμικά και ίδιες ευαισθησίες. Για την ύπαρξη σταθερού εσωτερικού αναφορικού δυναμικού χρησιμ7οποιείται ως εσωτερικό μέταλλο σύρμα Ag/AgCl. Μετά την προετοιμασία του μετάλλου έγινε εναπόθεση υγρής πολυμερικής μεμβράνης, όπως αναφέρεται στο πειραματικό μέρος. Σε κάθε ηλεκτρόδιο μέσω της μεθόδου περιστροφικής επικάλυψης (spin-coating) τοποθετήθηκαν 250 mg υγρής πολυμερικής μεμβράνης. Μετά την επικάλυψη το ηλεκτρόδιο παρέμεινε 12 ώρες σε χώρο χωρίς υγρασία για να εξατμιστεί τελείως ο διαλύτης (THF). Μετά την πλήρη εξάτμιση του διαλύτη το ηλεκτρόδιο ήταν έτοιμο για την πρώτη εξέταση, που είναι η καμπύλη βαθμονόμησης. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 18, τα 3 ηλεκτρόδια που εξετάστηκαν έχουν ίδια αναλυτικά χαρακτηριστικά. Τόσο το αρχικό δυναμικό, όσο και η κλίση τους είναι επαναλήψιμες με RSD που κυμαίνεται από 2,5 έως 7,0% κάτι που δίνει τη δυνατότητα χρήσης της συγκεκριμένης κατασκευής για τη δημιουργία ηλεκτροδίου φωσφορικών ιόντων μιας χρήσης.



Εικόνα 17: Καταγραφήματα δυναμικού και καμπύλες βαθμονόμησης ηλεκτροδίων φωσφορικών C.W.E.

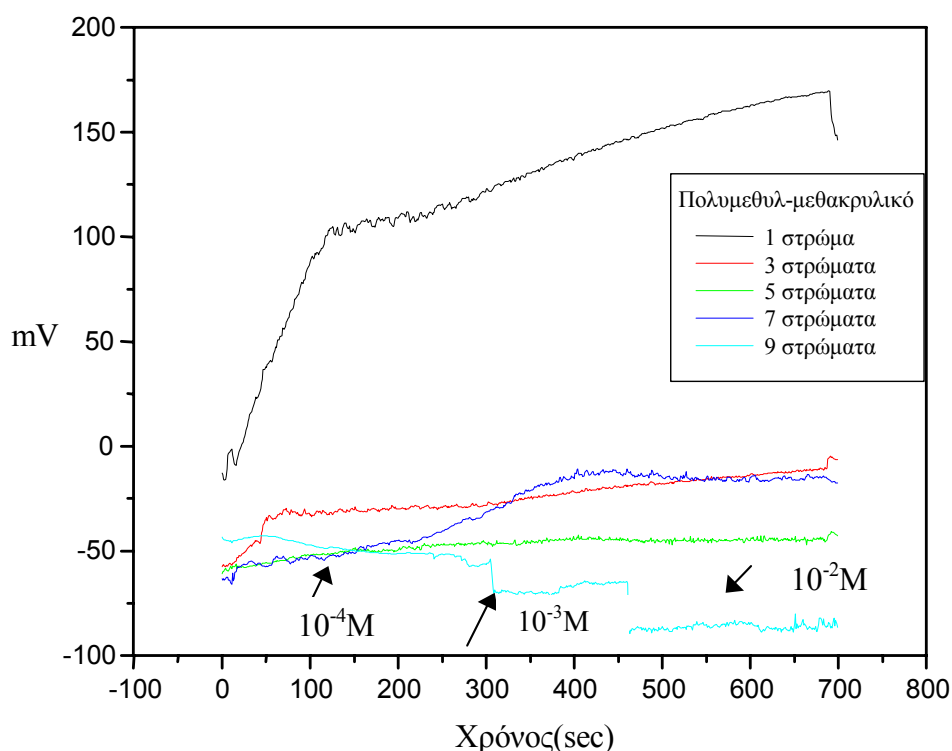
Για την ελαχιστοποίηση της διακύμανσης των αρχικών δυναμικών των ηλεκτροδίων επικαλυμμένου μετάλλου, προτείνεται η χρήση λεπτού στρώματος εσωτερικού αγωγίμου υλικού. Έχοντας ως δεδομένο την κατασκευή αναφορικού ηλεκτροδίου Ag/AgCl με επίστρωση μίγματος KCl-KNO₃-πολυμεθυλ-μεθακρυλικού και πειραματικά δεδομένα του εργαστηρίου μας (εικόνα 18) αποφασίστηκε η χρήση αυτού του υλικού ως το ηλεκτροενεργό πολυμερές που χρησιμοποιείται για την εξάλειψη του δυναμικού διεπιφανείας ανάμεσα στην πολυμερική μεμβράνη και το μεταλλικό υπόστρωμα, όπως έχει αναφερθεί στην εισαγωγή.



Εικόνα 18: Δυναμικό αναφορικού ηλεκτροδίου Ag/AgCl καλυμμένου με πολυμεθυλ-μεθακρυλικό.

Δοκιμάστηκε, με τη μέθοδο της περιστροφικής επίστρωσης η επίδραση του αριθμού στρώσεων στα χαρακτηριστικά του αναφορικού αυτού συστήματος. Τα ηλεκτρόδια εμβαπτίστηκαν σε υδατικό διάλυμα και έγιναν προσθήκες KCl 1M. Τα ηλεκτρόδια με στρώσεις από 1 έως 3, όπως φαίνεται και παρακάτω (εικόνα 19) αποκρίνονται στα ιόντα του διαλύματος κάτι που δείχνει ότι το στρώμα του πολυμεθυλ-μεθακρυλικού είναι πολύ λεπτό

και το σύρμα αργύρου έρχεται σε επαφή με το διάλυμα. Αντιθέτως μετά από 5 στρώσεις το στρώμα είναι πολύ παχύ. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το ηλεκτρόδιο να έχει μεγάλη ολική εμπέδηση, και δεν επιτρέπει τη μέτρηση. Βάσει των παραπάνω παρατηρήσεων, καταλήγουμε στη χρήση 5 στρώσεων, καθώς αυτές δίνουν ηλεκτρόδιο με σταθερό δυναμικό που δεν επιτρέπει στο διάλυμα να έρχεται σε επαφή με το σύρμα αργύρου, όπως φαίνεται και στο παρακάτω σχήμα (εικόνα 19).



Εικόνα 19: Επιλογή στρώσεων πολυμεθυλ-μεθακρυλικό για τον CWE.

Φτιάχτηκαν 5 ηλεκτρόδια με την παραπάνω μέθοδο. Τα ηλεκτρόδια αυτά τα οποία είναι επικαλυμμένα με 5 στρώματα πολυμεθυλ-μεθακρυλικό δίνουν αναπαραγωγίμο δυναμικό με θόρυβο $\pm 2mV$ ο οποίος μπορεί να οφείλεται τόσο στην οργανολογία μέτρησης, όσο και στο σύρμα Ag που χρησιμοποιήθηκε. Επομένως, στα επικαλυμμένα με πολυμεθυλ-μεθακρυλικό ηλεκτρόδια Ag/AgCl εξαλείφεται το δυναμικό διεπιφάνειας γεγονός που επιτρέπει την περαιτέρω χρήση τους στην ανάπτυξη E.H.I. φωσφοριών.

Παρά τα ικανοποιητικά αποτελέσματα που ελήφθησαν κατά το προηγούμενο πείραμα, τα E.H.I. φωσφοριών που κατασκευάστηκαν με επίστρωση μεμβράνης στο επικαλυμμένο

ηλεκτρόδιο Ag/AgCl δεν παρουσίαζαν την αναμενόμενη επαναληψιμότητα, και για το λόγο αυτό έγιναν προσπάθειες επανάληψης του πειράματος με τις ίδιες πειραματικές συνθήκες. Κατασκευάστηκαν 5 ηλεκτρόδια που όμως ούτε τα αρχικά τους δυναμικά αλλά ούτε και οι ευαισθησίες του είχαν την απαραίτητη επαναληψιμότητα για να συνεχιστούν οι μετρήσεις φωσφοριών. Τα αρχικά τους δυναμικά είχαν διαφορές της τάξης των 20-30 mV, ενώ οι ευαισθησίες της τάξης των 10mV/decade, δεδομένα που κάνουν απαγορευτική τη χρήση τους για την κατασκευή E.H.I. μιας χρήσης.

6.11 Συζήτηση

Η μελέτη των διαφορετικών κατασκευαστικών μεθόδων για την ανάπτυξη επιλεκτικού ηλεκτροδίου φωσφοριών ιόντων και τα αποτελέσματα αυτών των μελετών οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το πρόβλημα δεν είναι κατασκευαστικό αλλά είναι ο ιονομεταφορέας. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω η σταθερά σύμπλεξης του ιονομεταφορέα με το φωσφορικό ιόν είναι πολύ μεγάλη. Αυτό οδηγεί στην μη αντιστρεπτή αλληλεπίδραση τους γεγονός που φαίνεται από την αδυναμία του ηλεκτροδίου να κάνει παραπάνω από μια μετρήσεις. Με αυτά τα δεδομένα το ηλεκτρόδιο φωσφοριών θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως ηλεκτρόδιο μιας χρήσης. Γεγονός όμως που δεν επιτεύχθηκε λόγω έλλειψης των κατάλληλων μεθόδων.

Η έρευνα στον τομέα των επιλεκτικών ηλεκτροδίων φωσφοριών ιόντων πρέπει να εστιαστεί στον σχεδιασμό ιονομεταφορέα με αρκετά μεγάλη σύμπλεξη ώστε να δεσμεύει τα πολύ υδρόφιλα φωσφορικά ιόντα και ταυτόχρονα όχι τόσο ισχυρή ώστε να επιτρέπει την αντιστρεπτή αλληλεπίδραση του ιονομεταφορέα με το ιόν.

7. ΙΟΝΤΑ ΧΛΩΡΙΟΥ

Τα ιόντα χλωρίου είναι από τα πιο διαδεδομένα ιόντα στη φύση. Είναι παρόντα τόσο σε ανόργανα όσο και σε βιολογικά δείγματα και σε μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων. Το μεγάλο αυτό εύρος συγκεντρώσεων καθιστά πολύ δύσκολη τη χρήση μιας μεθόδου για το προσδιορισμό τους. Έτσι είναι απαραίτητη εφαρμογή μιας μεθόδου εύχρηστης, φτηνής, γρήγορης και αξιόπιστης για τον προσδιορισμό του και μάλιστα σε μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων όπως είναι τα E.H.I.

7.1 Εισαγωγικά

Τα χλωριούχα άλατα είναι ευρέως διαδεδομένα στο περιβάλλον. Κάποια από τα πιο κοινά χλωριούχα άλατα είναι το χλωριούχο νάτριο (NaCl) και το χλωριούχο μαγνήσιο (MgCl₂). Τα χλωριούχα ιόντα είναι από τα κυριότερα ιόντα στα βιολογικά υγρά και σε συνδυασμό με ένα μέταλλο όπως το νάτριο γίνονται απαραίτητα για τη ζωή. Μικρά ποσά χλωριούχων απαιτούνται για τη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων στα φυτά και στα ζώα. Το χλώριο ως αέριο (Cl₂) είναι πολύ τοξικό και συχνά χρησιμοποιείται ως απολυμαντικό.

Το χλωριούχο ιόν αποτελεί ένα από τα κυριότερα συστατικά των υδάτων. Είναι συνήθως παρόντα σε χαμηλές συγκεντρώσεις στα επιφανειακά ύδατα (λίμνες και ποτάμια). Τα υπόγεια ύδατα περιέχουν διάφορα ποσά ανάλογα με τη γεωλογία του περιβάλλοντος και την γειτνίαση ή επαφή με θαλασσίνο περιβάλλον.

Το χλώριο είναι ευρέως διανεμημένο στο περιβάλλον, ως χλωριούχο νάτριο (NaCl), χλωριούχο κάλιο (KCl), και χλωριούχο ασβέστιο (CaCl₂). Η διάβρωση των ιζηματογενών πετρωμάτων και η διαλυτοποίηση κοιτασμάτων αλάτων του εδάφους απελευθερώνουν χλώριο τόσο στα επιφανειακά όσο και στα υπόγεια ύδατα.

Το χλώριο χρησιμοποιείται σε πληθώρα βιομηχανικών και οικιακών διεργασιών. Στη μορφή του χλωριούχου νατρίου και του χλωριούχου ασβεστίου χρησιμοποιείται εκτενώς για την απομάκρυνση χιονιού και πάγου. Σε διάφορες άλλες μορφές χρησιμοποιείται στην επεξεργασία των αποβλήτων.

Τα χλωριούχα ιόντα στο πόσιμο νερό γενικά δεν είναι βλαβερά για τον άνθρωπο σε μικρές συγκεντρώσεις. Οι περιορισμοί στη συγκέντρωση των χλωριούχων ιόντων στο πόσιμο νερό βασίζεται περισσότερο σε γευστικές απαιτήσεις παρά σε λόγους υγείας, και καθορίζεται 10-50 mg/L. Στον ορό του αίματος η συγκέντρωση των χλωριούχων ιόντων είναι της τάξης του $1,5 \times 10^{-1}$ M.

7.2 Τρόποι προσδιορισμού ιόντων χλωρίου

Ο προσδιορισμός των χλωριούχων ιόντων σε διαλύματα γίνεται με διάφορες μεθόδους(37). Ο πιο συνηθισμένος είναι η τιτλοδότηση με AgNO_3 στην οποία το ισοδύναμο σημείο της τιτλοδότησης ανιχνεύεται με την αλλαγή χρώματος του δείκτη K_2CrO_4 σε κίτρινο.

Η Ιωδιομετρική μέθοδος είναι άλλη μια μέθοδος τιτλοδότησης της οποίας το ισοδύναμο σημείο ανιχνεύεται με την αλλαγή χρώματος από την ελευθέρωση του ελεύθερου ιωδίου από το KI μέσω του δείκτη $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

Οι τιτλοδοτήσεις ως μέθοδοι δεν έχουν μεγάλη ευαισθησία και ταυτόχρονα χρειάζονται εξειδικευμένο προσωπικό μιας και έχουμε τη χρήση επικίνδυνων χημικών αντιδραστηρίων.

Η πιο ευαίσθητη και επιλεκτική μέθοδος είναι η ιοντική χρωματογραφία, η οποία όμως είναι ακριβή, χρονοβόρα, χρειάζεται μεγάλη προκατεργασία τους προς ανάλυση δείγματος και χρειάζεται εξειδικευμένο προσωπικό. Η παραπάνω μέθοδος ενώ προσφέρει μεγάλη ακρίβεια και αξιοπιστία στις μετρήσεις, δε δίνει τη δυνατότητα συνεχών μετρήσεων ή μετρήσεων στο τόπο συλλογής των δειγμάτων, κάτι που μπορεί να προσφέρει ένα Ε.Η.Ι. για ιόντα χλωρίου με καλά αναλυτικά χαρακτηριστικά που είναι το αντικείμενο μελέτης αυτής της εργασίας.

7.3 Ε.Η.Ι. ιόντων χλωρίου

Οι οργανοκασσιτερικές ενώσεις, όπως ο τριφαινυλοχλωριούχος κασσίτερος ήταν από τις πρώτες ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ως ιονομεταφορείς ιόντων χλωρίου σε Ε.Η.Ι. (48). Γενικά, οι τριάλυλο-ενώσεις του κασσίτερου έχουν δείξει μια αναλυτικά ικανοποιητική επιλεκτικότητα στα χλωριούχα ιόντα(49). Ο τριοκτυλοχλωριούχος κασσίτερος είναι εμπορικά διαθέσιμος σήμερα για την κατασκευή αισθητήρων ιόντων χλωρίου.

Ως ιονομεταφορείς χλωριούχων ιόντων έχουν μελετηθεί πορφυρίνες (50),(51) με μαγγάνιο και ινδίο με πολύ καλή επιλεκτικότητα ως προς τα ιόντα χλωρίου, καθώς και η θειουρία ως ιονομεταφορέας που σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το ιόν του χλωρίου και παρουσιάζει σημαντικά μειωμένη παρεμπόδιση από τα θειοκυανιούχα, νιτρίδια, ιωδιούχα και σαλικυλικά ιόντα(52).

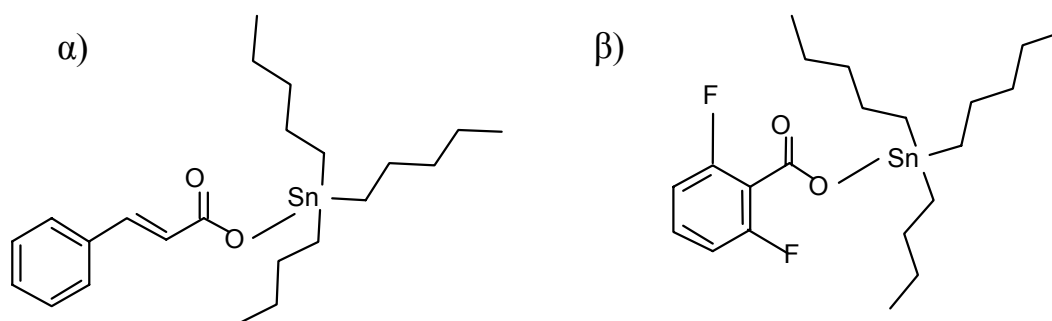
Πολύ καλή επιλεκτικότητα στο χλώριο έδωσαν οργανομεταταλλικές ενώσεις του υδραργύρου με προτίμηση στο χλώριο, έναντι των θειοκυανιούχων, των νιτρίων και των υπερχλωρικών ιόντων(53). Στην αγορά υπάρχει ηλεκτρόδιο ιόντων χλωρίου με αρκετά καλή

επιλεκτικότητα και ευαισθησία κατάλληλο για μετρήσεις σε πραγματικά δείγματα, που βασίζεται σε μίγμα χρυσού με άλατα χρυσού και υδραργύρου (Thermo-Orion).

Η έλλειψη όμως κάποιου ηλεκτροδίου μεμβράνης επιλεκτικού ως προς τα ιόντα χλωρίου και με τέτοια αναλυτικά χαρακτηριστικά που να επιτρέπει την χρήση του σε πραγματικά δείγματα, οδηγεί στη συνέχιση της έρευνας για την δημιουργία Ε.Η.Ι. για τα ιόντα χλωρίου.

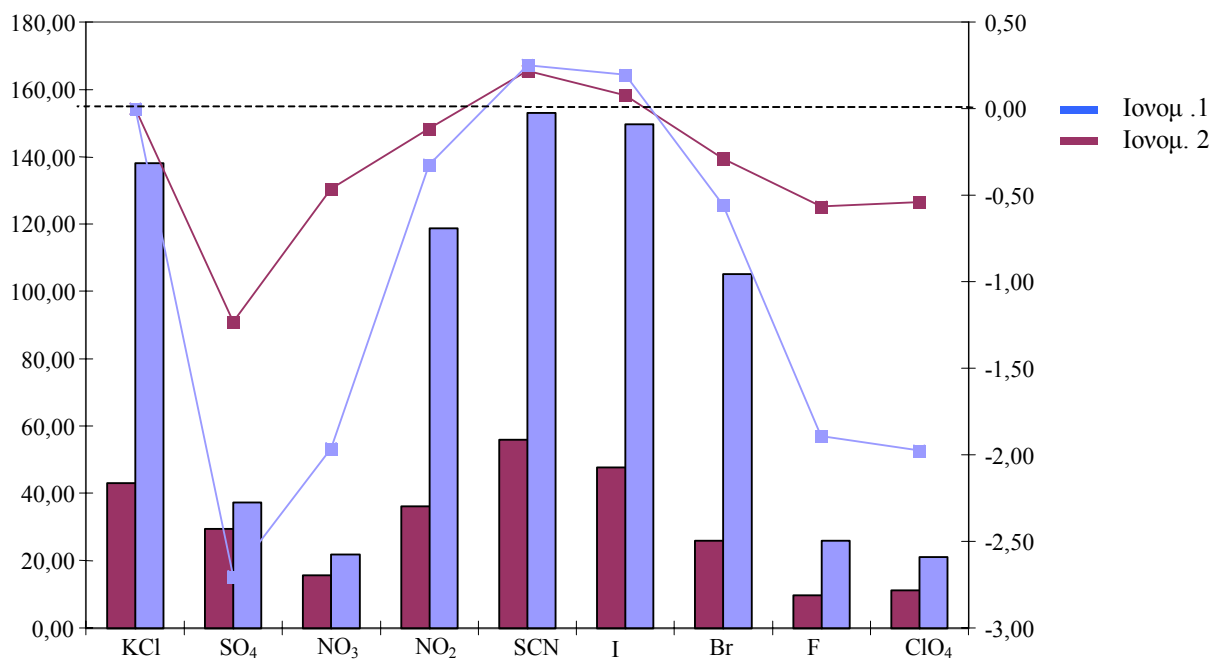
7.4.Ιονομεταφορέας Ιόντων Χλωρίου

Στο δεύτερο τμήμα αυτής της εργασίας, σκοπός ήταν η κατασκευή ηλεκτροδίου ιόντων χλωρίου για τη μέτρηση σε πραγματικά δείγματα. Μετά από έρευνες που έγιναν στο εργαστήριο και τη μελέτη διάφορων οργανοκασσιτεριικών ιονομεταφορέων, οι ιονομεταφορείς που παρουσίασαν τα καλύτερα αναλυτικά χαρακτηριστικά είναι αυτοί που παρουσιάζονται στην εικόνα 17.



Εικόνα 20: α)Ιονομεταφορέας 1 β)Ιονομεταφορέας 2

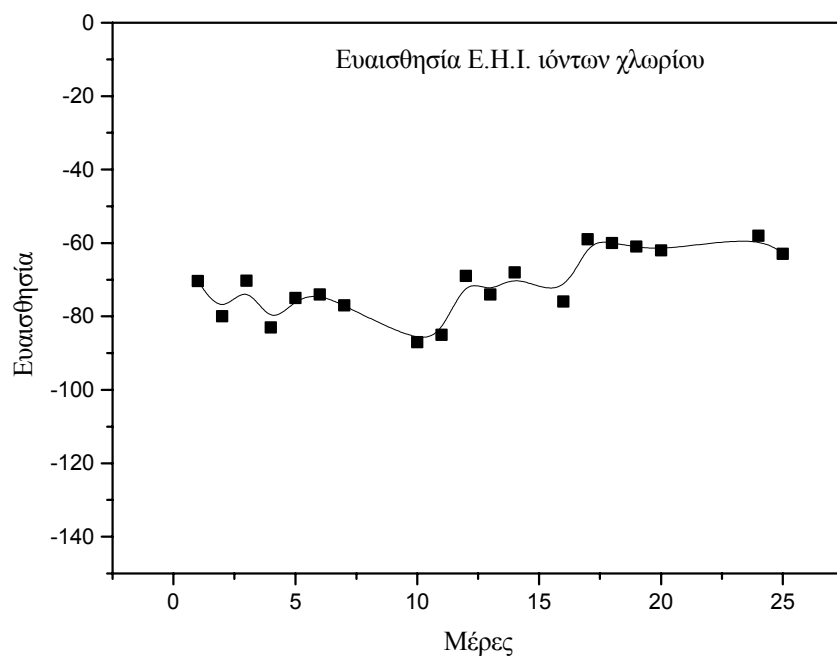
Χρησιμοποιήθηκε ο ιονομεταφορέας 1(32) ο οποίος παρουσιάζει πολύ καλή επιλεκτικότητα ως προς τα ιόντα χλωρίου σε σχέση με τα περισσότερα ανιόντα, ακόμα και αυτά που είναι πιο λιπόφιλα στη σειρά λιποφιλίας του Hoffmaister (εικόνα 23).



Εικόνα 21: Ποτενσιομετρικοί συντελεστές ιονομεταφορέων ιόντων χλωρίου.

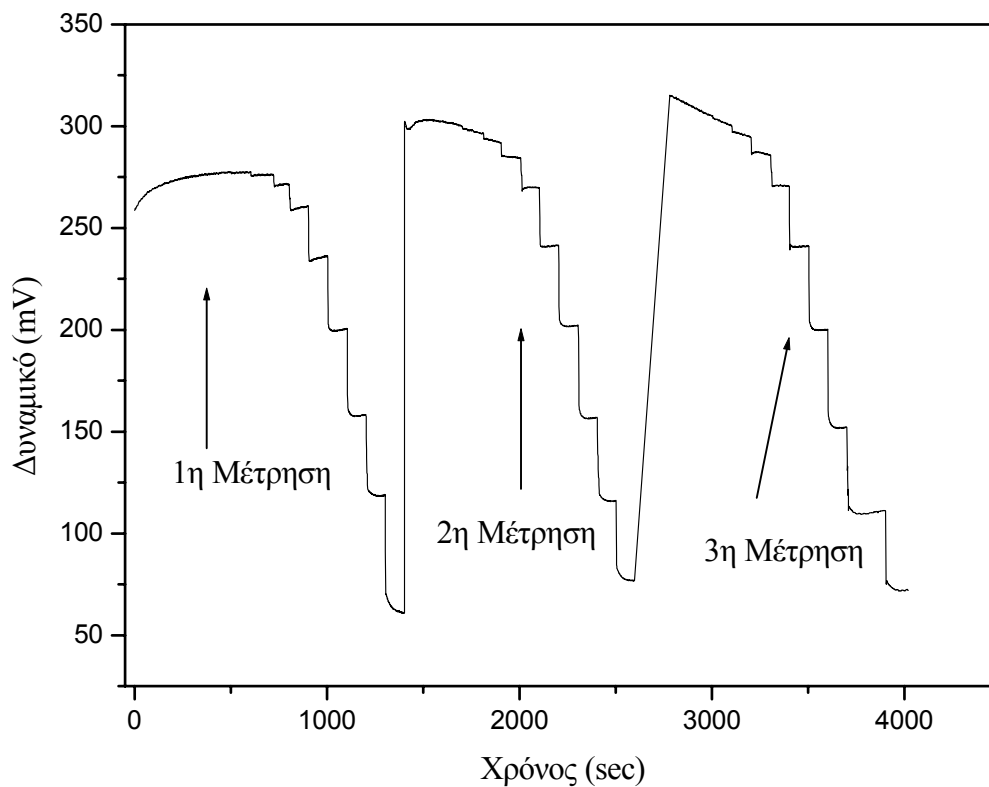
7.5 Μελέτη Χρόνου Ζωής και Επαναληψιμότητας

Τα ηλεκτρόδια που κατασκευάστηκαν με τον ιονομεταφορέα 1 όπως φαίνεται στην εικόνα 24 έχουν χρόνο ζωής ένα μήνα με ευαισθησία η οποία κυμαίνεται από -85 mV/decade έως -55 mV/decade . Αυτό μας επιτρέπει τη χρήση αυτών των αισθητήρων για περισσότερο από ένα μήνα μιας και η ευαισθησία τους παραμένει σε τιμές μεγαλύτερες από τις προβλεπόμενες από την εξίσωση του Nernst για μονοσθενή ιόντα που είναι $-59,2 \text{ mV/decade}$.



Εικόνα 22: Διάγραμμα των κλίσεων του ηλεκτροδίου ιόντων χλωρίου για ένα μήνα.

Στα πειράματα επαναληψιμότητας που έγιναν σε ρυθμιστικό διάλυμα MES pH=5,5 με προσθήκες KCl 1M, το ηλεκτρόδιο φαίνεται να επανέρχεται μετά την πρώτη μέτρηση στο αρχικό δυναμικό και να δίνει επαναλήψιμες μετρήσεις, με RSD που κυμαίνεται από 0,5 έως 4,5.



Εικόνα 23: Μετρήσεις επαναληψιμότητας ηλεκτροδίου ιόντων χλωρίου

7.6 Μετρήσεις σε πραγματικά δείγματα

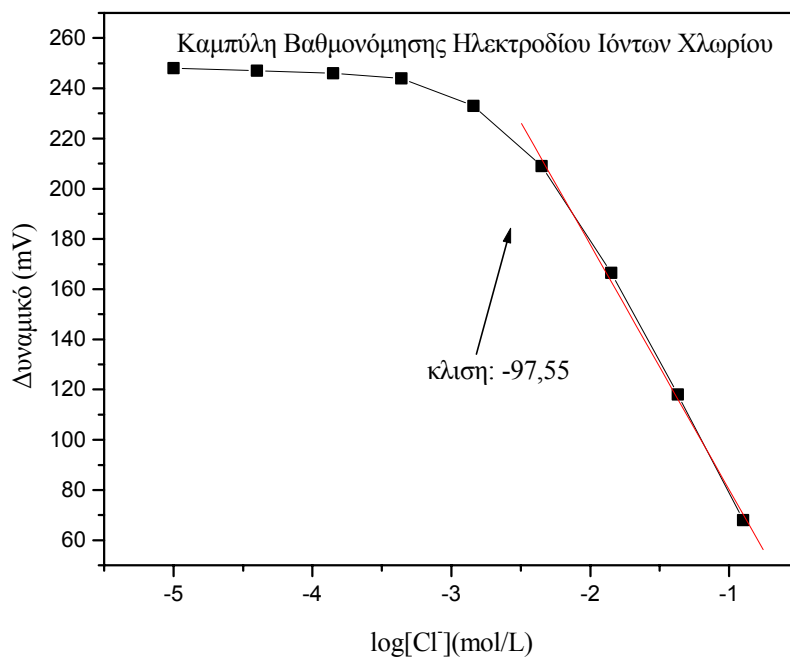
Η δυνατότητα εφαρμογής του ηλεκτροδίου σε μετρήσεις ιόντων χλωρίου σε πραγματικά δείγματα, αξιολογήθηκε με τον προσδιορισμό των επιπέδων ιόντων χλωρίου σε τεχνητό ορό αίματος(54). Παρασκευάστηκε τεχνητός ορός αίματος με σύσταση που φαίνεται στον παρακάτω πίνακα. Ο ορός αραιώθηκε κατά 1/5 και το διάλυμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή τόσο των πρότυπων όσο και των διαλυμάτων μέτρησης.

Ιόντα	MgSO ₄	CaSO ₄	NaHCO ₃	NaHPO ₄
Συγκεντρώσεις	2,5x10 ⁻⁴	2,5x10 ⁻⁴	3x10 ⁻²	9,5x10 ⁻⁴

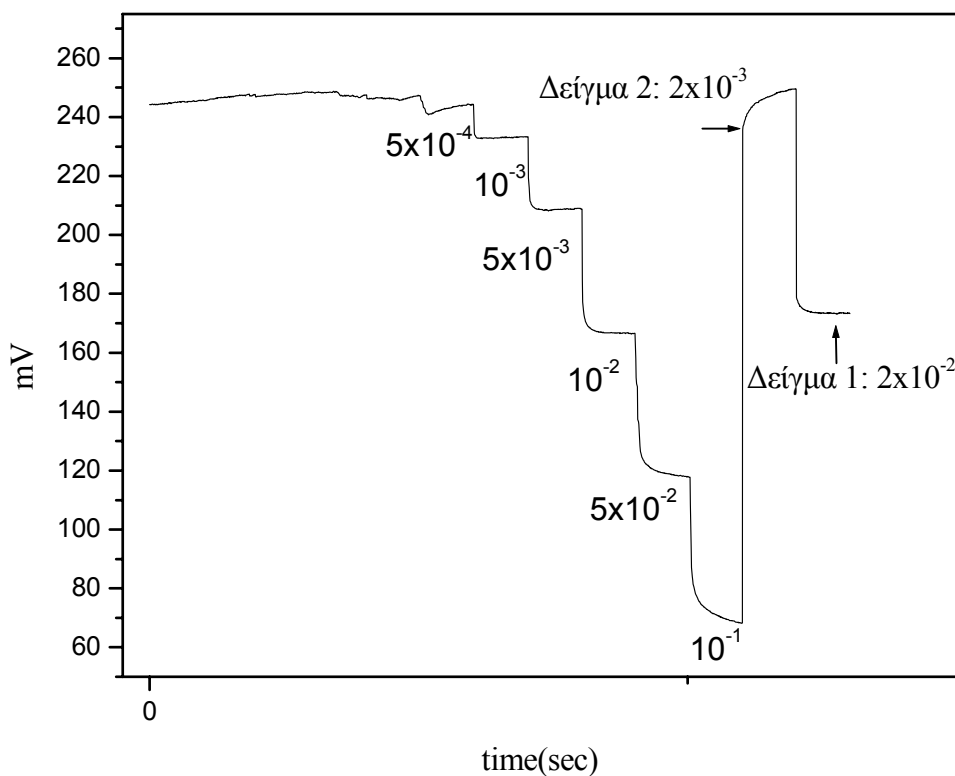
Πίνακας 1: Σύσταση τεχνητού ορού αίματος

Η καμπύλη βαθμονόμησης πραγματοποιήθηκε στον τεχνητό ορό με προσθήκες πρότυπου διαλύματος KCl 1M για εύρος συγκεντρώσεων ιόντων χλωρίου από 10⁻⁵ ως 10⁻² M.

Παρασκευάστηκαν δυο δείγματα με συγκεντρώσεις Cl⁻ 2x10⁻² M (δείγμα 1) και 2x10⁻³ M (δείγμα 2) σε τεχνητό ορό αίματος.



Εικόνα 24: Καμπύλη βαθμονόμησης ηλεκτροδίου ιόντων χλωρίου.



Εικόνα 25: Καταγράφημα δυναμικού του ηλεκτροδίου ιόντων χλωρίου.

Μετά την πραγματοποίηση της καμπύλης βαθμονόμησης, μετρήθηκε το δυναμικό του ηλεκτροδίου στα δείγματα 1 και 2 και προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις Cl^- για τα δυο αυτά δείγματα. Για το δείγμα 1 έχουμε ανάκτηση 115%, ενώ για το δείγμα 2 η ανάκτηση είναι 102% (πίνακας 1). Η περιεκτικότητα των πραγματικών δειγμάτων σε ιόντα χλωρίου είναι της τάξης του 10^{-2} M. Με αυτό το δεδομένο και το καλό ποσοστό ανάκτησης για αυτή την τάξη συγκέντρωσης Cl^- (δείγμα 2), το ηλεκτρόδιο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση ιόντων χλωρίου σε πραγματικά δείγματα.

	Θεωρητικό Δυναμικό (mV)*	Μετρούμενο Δυναμικό (mV)	Ανάκτηση
Δείγμα 1 (2×10^{-2} M Cl ⁻)	148,4	173,5	115%
Δείγμα 2 (2×10^{-3} M Cl ⁻)	246	249	102%

Πίνακας 2: Μέτρηση ιόντων χλωρίου σε ορό αίματος.

- από την καμπύλη βαθμονόμησης

7.7 Συζήτηση

Όπως φαίνεται και από τα παραπάνω αποτελέσματα κατασκευάστηκε επιλεκτικό ηλεκτρόδιο στερεάς επαφής με πολύ καλή επιλεκτικότητα ως προς τα ιόντα χλωρίου, μεγάλη ευαισθησία και μεγάλο χρόνο ζωής.

Όλα τα παραπάνω, σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα από την εξέταση πρότυπων διαλυμάτων όπως ο τεχνητός ορός αίματος, μας δίνουν την δυνατότητα ανάπτυξης συστήματος άμεσης μέτρησης ιόντων χλωρίων σε πραγματικά δείγματα.

8. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ-ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

8.1 Αντιδραστήρια

Ιονομεταφορείς: Η διδοντική οργανοκασσιτερική ένωση (ιονομεταφορέας 2) που χρησιμοποιήθηκε για τα φωσφορικά ελήφθη από την Prof. K. Jurkschat (University of Dortmund, Chair for Inorganic Chemistry II, Ott-Hahn Strasse 6 D-44227 Dortmund, Germany).

Η ένωση που χρησιμοποιήθηκε ως ιονομεταφορέας χλωριόντων (ιονομεταφορέας α) ελήφθη από τον Prof. R. Willem (High Resolution NMR Centre (HNMR), Free University of Brussels (VUB), Pleinlaan 2, B-1050 Brussel, Belgium).

8.1.1 Παρασκευή μεμβρανών

Χρησιμοποιήθηκαν:

Το πολυμερές PVC (poly vinyl chloride)(high molecular weight, Selectophore[®]; Fluka)

Οι πλαστικοποιητές DOS (Bis(2-ethylhexyl) sebacate) (Selectophore[®]; Fluka), TEHP (Tris(2-ethylhexyl) phosphate) (Selectophore[®]; Fluka) και FP-NPE (2-Fluorophenyl 2-nitrophenyl ether) (Selectophore[®]; Fluka)

Το φορτισμένο πρόσθετο TBAP (tetrabutyl ammonium phosphate) (Selectophore[®]; Fluka) και

Για την παρασκευή των κοιτέιλ μεμβρανών THF (Selectophore[®]; Fluka)

8.1.2 Παρασκευή διαλυμάτων

Χρησιμοποιήθηκαν:

Για τα διαλύματα ηλεκτρολυτών διαλύθηκαν σε νερό nanopure (18,3 MΩ), άλατα καλίου και νατρίου υψηλής καθαρότητας (p.a ; Fluka, p.a ; Merck)

Για τη ρύθμιση του pH το MES (2-[N-Morpholino]ethanesulfonic acid) (Merck) και τα HG, NAG (L-Glutamic acid, L-Glutamic acid –monosodium salt)(Biochimica; Fluka).

Το ηλεκτρόδιο του pH ρυθμιζόταν με τα πρότυπα ρυθμιστικά διαλύματα 4.01, 7.00, 10.00 (Merck).

8.2 Οργανολογία

Οι ποτενσιομετρικές μετρήσεις ελήφθησαν με ένα ηλεκτρόμετρο CI-317 8-καναλιών της XENON (Χαλάνδρι, Αθήνα) ως προς ηλεκτρόδιο αναφοράς διπλής γέφυρας 900200 της Orion Research (Beverly, MA, USA). Τα δεδομένα λαμβάνονταν από PC, με πρόγραμμα γραμμένο σε BASIC, αποθηκεύονταν και χρησιμοποιούνταν για περαιτέρω επεξεργασία.

8.3 Ποτενσιομετρικές μετρήσεις

Επιλεκτικότητα: Οι συνολικές ποτενσιομετρικές αποκρίσεις των Ε.Η.Ι. στα διάφορα ανιόντα λαμβάνονται με την διαδοχική εμφάνιση του Ε.Η.Ι. σε 50 ml ρυθμιστικού διαλύματος (MES 10mM pH=5.5 ή NaG-HG 1mM pH=4.5) και σε 50 ml διαλύματος ανιόντος 10mM και καταγραφή των δυναμικών. Οι διαφορές στα δυναμικά μεταξύ των δυο διαλυμάτων χρησιμοποιούνται για την εξαγωγή των ποτενσιομετρικών συντελεστών επιλεκτικότητας με βάση την εξίσωση

$$K_{A,B}^{pot} = \frac{z_A F [E(B) - E(A)]}{2,303 RT} + \left(1 - \frac{z_A}{z_B}\right) \log a_A$$

Βαθμονόμηση: Τα Ε.Η.Ι. εμφάνιζονται σε 50 ml διαλυμάτων ανιόντων καθορισμένων συγκεντρώσεων και ρυθμισμένων με ρυθμιστικό διάλυμα σε κατάλληλο pH και καταγράφονται οι μεταβολές του δυναμικού.

9.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) Hulanicki, A.; Glad, S.; Ingman, F. *Pure & Appl. Chem.* **1991**, *63*, 1247.
- (2) Seitz, W. *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 16A.
- (3) Cammann, K.; Lemke, U.; Rohen, A.; Sander, J.; Wilken, H.; Winter, B. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 516-539.
- (4) Clark, L. C. *Am. Soc. Artif. Intren. Organs. J.* **1956**, *2*, 41.
- (5) Janata, J.; Bezegh, A. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 62R.
- (6) Χατζηιωάννου, Θ.; Κουπάρης, Μ. *Ενόργανη Ανάλυση* **1990**, 79.
- (7) Harris, D., Fourth Edition ed.; W. H. Freeman and Company, 1995.
- (8) Cremer, M. *Z. Biol.* **1906**, *47*, 562.
- (9) Frant, M.; Ross, J. *Science* **1966**, *154*, 1553.
- (10) Bakker, E.; Telting-Diaz, M. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 2781-2800.
- (11) Bakker, E.; Pretsch, E.; Buhlmann, P. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 1127-1133.
- (12) Hofmeister, F. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol* **1888**, *14*, 274.
- (13) Eugster, R.; Rosatzin, T.; Rusterholz, B.; Aebersold, B.; Pedrazza, U.; Ruegg, D.; Schmid, A.; Spichiger, U. E.; Simon, W. *Anal. Chim. Acta* **1994**, *289*, 1-13.
- (14) Fiedler, U.; Ruzicka, J. *Anal. Chim. Acta* **1973**, *67*, 179.
- (15) Hower, R. W.; Shin, J. H.; Cha, G. S.; Meruva, R. K.; Meyerhoff, M. E.; Brown, R. B. *Sensors and Actuators B* **1996**, *33*, 168-172.
- (16) Poplawski, M. E.; Brown, R. B.; Rho, K. L.; Yun, S. Y.; Lee, H. J.; Cha, G. S.; Paeng, K.-J. *Anal. Chim. Acta* **1997**, *355*, 249-257.
- (17) Lotters, J. C.; Olthuis, W.; Veltink, P. H.; Bergveld, P. *J. Micromech. Microeng.* **1997**, *7*, 145-147.
- (18) Malinowska, E.; Oklejas, V.; Hower, R. W.; Brown, R. B.; Meyerhoff, M. E. *Sensors and Actuators B* **1996**, *33*, 161-167.
- (19) Schaller, U.; Bakker, E.; Spichiger, U. E.; Pretsch, E. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 391-398.
- (20) Thomas, R. C.; Simon, W.; Oehme, M. *Nature* **1975**, *300*, 881.
- (21) Schefer, U.; Ammann, D.; Pretsch, E.; Oesch, U.; Simon, W. *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 2282.
- (22) Liu, D.; Meruva, R. K.; Brown, R. B.; Meyerhoff, M. E. *Anal. Chim. Acta* **1996**, *321*, 173-183.
- (23) Vamvakaki, M.; Chaniotakis, N. A. *Anal. Chim. Acta* **1996**, *320*, 53-61.

- (24) Lutze, O.; Meruva, R. K.; Frielich, A.; Ramamurthy, N.; Brown, R. B.; Hower, R.; Meyerhoff, M. E. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1999**, *364*, 41-47.
- (25) Diniz, F. B.; Freitas, K. C. S. d.; Azevedo, W. M. d. *Electrochemistry Communications* **1999**, *1*, 271-273.
- (26) Eine, K.; Kjelstrup, S.; Nagy, K.; Syverud, k. *Sensors and Actuators B* **1997**, *44*, 381-388.
- (27) Zielinska, R.; Mulik, E.; Michalska, A.; Achmatowicz, S.; maj-Zurewska, M. *Anal. Chim. Acta* **2002**, *451*, 243-249.
- (28) Cattrall, R. W.; Freiser, H. *Anal. Chem.* **1971**, *43*, 1905-1906.
- (29) Fibbioli, M.; Bandyopadhyay, K.; Liu, S.-G.; Echegoyen, L.; Enger, O.; Diederich, F.; Gingery, D.; Buhlmann, P.; Persson, H.; Suter, U. W.; Pretsch, E. *Chem. Mater.* **2002**, *14*, 1721-1729.
- (30) Bobacka, J. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 4932-4937.
- (31) Blaz, T.; Migdalski, J.; Lewenstam, A. *Talanta* **2000**, *52*, 319-328.
- (32) Perdikaki, K.; Tsagatakis, J. K.; Chaniotakis, N. A. *Mikrochim. Acta* **2001**, *136*, 217-221.
- (33) Chen, Z.; Grierson, P.; Adams, M. A. *Anal. Chim. Acta* **1998**, *363*, 191-197.
- (34) Glazier, S. A.; Arnold, M. A. *Anal. Chem.* **1998**, *60*, 2540-2542.
- (35) Chen, Z.; Marco, R. D.; Alexander, P. W. *Anal. Commun.* **1997**, *34*, 93-95.
- (36) Haemmerli, S. D.; Suleiman, A. A.; Guilbault, G. G. *Anal. Biochem.* **1990**, *191*, 106-109.
- (37) Eaton, A. D.; Clesceri, L. S.; Greenberg, A. E., 19th ed.; American Public Health Association, 1995.
- (38) Yao, T.; Satomura, M.; Nakabara, T. *Talanta* **1994**, *41*, 2113-2119.
- (39) Engblom, S. O. *Biosensors & Bioelectronics* **1998**, *13*, 981-994.
- (40) Liu, D.; Chen, W.-C.; Yang, R.-H.; Shen, G.-L.; Yu, R.-Q. *Anal. Chim. Acta* **1997**, *338*, 209-214.
- (41) Fibbioli, M.; Berger, M.; Schmidtchen, F. P.; Pretsch, E. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 156-160.
- (42) Wroblewski, W.; Wojciechowski, K.; Dybko, A.; Brzozka, Z.; Egberink, R. J. M.; Snellink-Ruel, B. H. M.; Reinhoudt, D. N. *Sensors and Actuators B* **2000**, *68*, 313-318.
- (43) Wroblewski, W.; Wojciechowski, K.; Dybko, A.; Brzozka, Z.; Egberink, R. J. M.; Snellink-Ruel, B. H. M.; Reinhoudt, D. N. *Anal. Chim. Acta* **2001**, *432*, 79-88.

- (44) Carey, C.; Riggan, W. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 3587.
- (45) Liu, J.; Masuda, Y.; Sekido, E. J. *Electroanal. Chem.* **1990**, *291*, 67.
- (46) Xiao, D.; Yuan, H.-Y.; Li, J.; Yu, R.-Q. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 288-291.
- (47) Tsagatakis, I.; Chaniotakis, N. A.; Altmann, R.; Jurkschat, K.; Willem, R.; Martins, J. C.; Qin, Y.; Bakker, E. *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 1952-1961.
- (48) Frant, M. S.; Ross, W. J. *Chem. Abstr.* **1969**, *70*, 25474r.
- (49) Hauser, P. C. *Anal. Chim. Acta* **1993**, *278*, 227-232.
- (50) Kondo, Y.; Buhner, T.; Seiler, K.; Fromter, E.; Simon, W. *Pflügers Archive* **1989**, *414*, 663.
- (51) Zhang, W.; Rozniecka, E.; Malinowska, E.; Parzuchowski, P.; Meyerhoff, M. E. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 4548-4557.
- (52) Xiao, K. P.; Buhlmann, P.; Nishizawa, S.; Umezawa, S. A. Y. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 1038-1044.
- (53) Rothmaier, M.; Simon, W. *Anal. Chim. Acta* **1993**, *271*, 135-141.
- (54) Moschou, E. A.; Chaniotakis, N. A. *Anal. Chim. Acta* **2001**, *445*, 183-190.