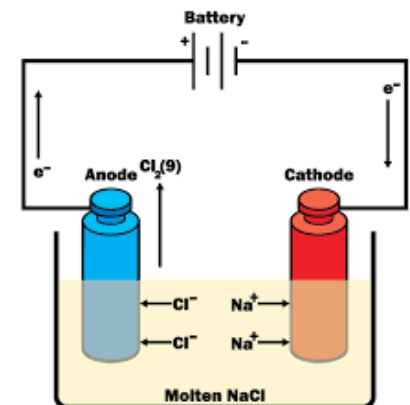


Електроаналитички методи

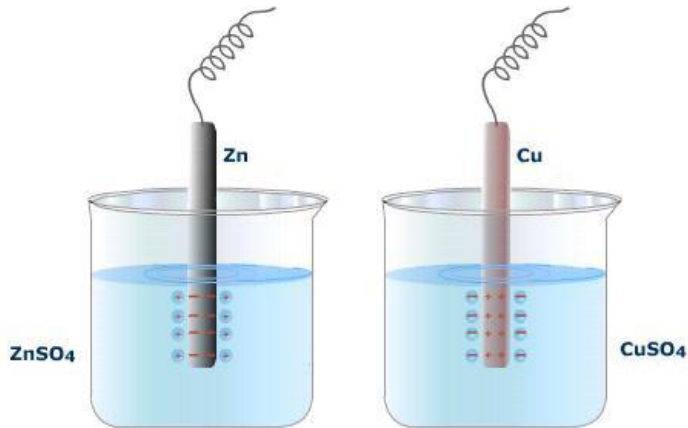
Техники кои го проучуваат анализот преку мерење на потенцијалот и/или струјата во електрохемиска ќелија во која се наоѓа анализот. Поделба на електроаналитичките методи:

- **Неспецифични електродни процеси (волуметриски)** – процеси карактеризирани со отсуство на електрохемиски реакции;
 - Кондуктометрија,
 - Осцилометрија,
 - Диелектрометрија
- **Специфични електродни процеси** – процеси кај кој протекуваат електрохемиски реакции- **доаѓа до хемиска реакција на електродите**
 - $I = 0$ Потенциометрија
 - $I \neq 0$ Волтаметрија
Кулометрија
Електрогравиметрија.
- Промени на својствата на двојниот електричен слој



Потенциометрија

Потенцијалот на електрохемиската ќелија се мери при статички услови. Бидејќи во текот на мерењето на **потенцијалот** на растворот низ ќелијата **не протекува струја**, или, пак, нејзиното протокување е занемарливо мало, **составот на растворот останува непроменет**. Од оваа причина, потенциометријата претставува корисна квантитативна аналитичка метода.



Електрохемиска ќелија е направа каде се добива електрична енергија како резултат на проток на хем. реакција или се овозможува проток на хемиска реакција под дејство на електрична струја.

Електрохемиски елемент се состои од **две фази** кои спроведуваат електричество:

- Спроводници (или полупроводници) и
- Течен електролит (раствор или растоп)

НЕРНСТОВА РАВЕНКА

Равенка која ги поврзува електрохемискиот потенцијал и концентрацијата на продуктите и реактантите

За равенката:



$$E = E^0 - \frac{RT}{zF} \ln \left(\frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b} \right)$$

R – универзална гасна константа; F – фарадеева константа

T – апсолутна температура; z – разменети електрони

$$E = E^0 - \frac{0,059V}{z} \log \left(\frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b} \right)$$

ПОТЕНЦИОМЕТРИЈА

Користи **електроди** на кои се мери потенцијал што овозможува добивање хемиска информација

Електроди (со различни конструкции) за добивање селективен одговор за специфичен аналит

1. Се користи **галванска ќелија**: непознатиот раствор е полуќелија
 2. Се приклучува **електрода** што **оддава/прима електрони од аналитот** што се определува
 3. Растворот со аналитот се поврзува со **електролитен мост** со втората полуќелија која е со познат состав и потенцијал
- **Индикаторска електрода** – **реагира со аналитот** и дава/прима електрони
 - **Референтна електрода** – втората полуќелија со **константен потенцијал**
 - **Потенцијалот на ќелијата е разликата во потенцијали на индикаторската и референтната ќелија**

Индикаторски електроди – две големи класи

- Создаваат потенцијал (E_{ind}) што зависи од концентрацијата на аналитот
- Селективни
- Брз и репродуцибилен одговор
- **Метални** - Директен контакт помеѓу цврстата и течната фаза
 - Електроди од прв тип, од втор тип, Редокс електродиелектроден потенцијал –резултат на редокс реакција на површината на електродата зависи од:
 - материјалот
 - од електролитот
 - температурата и др.
- **Мембрански** (јоноселективни електроди)
 - селективно сврзување на јонот на мембрана при што се развива електроден потенцијал

- **Метални**

Електроди од прв тип – метален спроводник потопен во раствор на соодветен метален јон.

- $\text{Zn}|\text{Zn}^{2+}$ (1,0 mol/L),
- $\text{Cu}|\text{Cu}^{2+}$ (0,1 mol/L),
- $\text{Pb}|\text{Pb}^{2+}$ (1,0 mol/L),
- $\text{Na(Hg)}|\text{Na}^+$ (1,0 mol/L),
- Гасни електроди.

$$E = E^0 - \frac{0,059\text{V}}{z} \log\left(\frac{1}{[\text{M}^{z+}]}\right)$$

— **Електроди од втор тип** – метален проводник прекриен со слој од слабо растворлива сол (или оксид)

- $\text{Ag} | \text{AgCl} | \text{Cl}^-$ (3,5 mol/L),
- $\text{Ag} | \text{AgI} | \text{I}^-$ (1,0 mol/L),
- $\text{Hg} | \text{Hg}_2\text{Cl}_2 | \text{Cl}^-$ (1,0 mol/L),
- $\text{Sb} | \text{Sb}_2\text{O}_3 | |\text{OH}^-$ (1,0 mol/L)

— **Редокс електроди** - металот од електродата не учествува во реакцијата:

- $\text{Pt} | \text{Fe}^{2+}$ (1 mol/L) $| \text{Fe}^{3+}$ (1 mol/L)

ЈОНОСЕЛЕКТИВНИ ЕЛЕКТРОДИ (МЕМБРАНСКИ)

Мембраната се врзува само со определен тип јони

Електроди со **индиректен** контакт помеѓу електродата – посредник – мембрана: полупроводник/стакло/органиски материјал.

Мембраната е **нерастворлива** – силициум диоксид, полимери

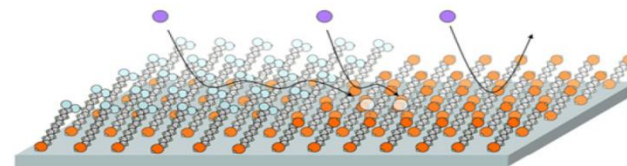
Мембраната поседува извесна спроводливост – **миграција на јони**

При тоа не доаѓа до редокс процес

• **Составот на растворот** од внатрешната страна е **константен**.

Примери:

- стаклена електрода
- ензимски електроди (биокаталитички мембрански)
- тврди електроди за определување на голем број метални јони.



Стаклена електрода – pH мерења

•Стаклена мембрана

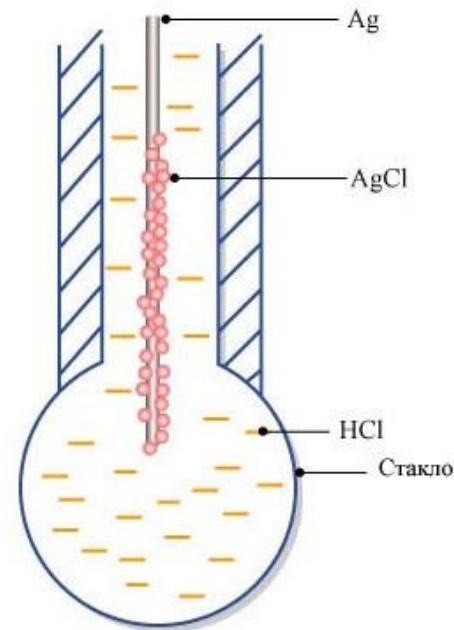
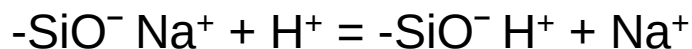
- Состав на стаклото: 22 % Na_2O ; 6,5 % CaO ; 72 % SiO_2 ;
- Раствор со позната концентрација;
- Внатрешна електрода
 - $\text{Ag} \mid \text{AgCl} \mid \text{Cl}^-$



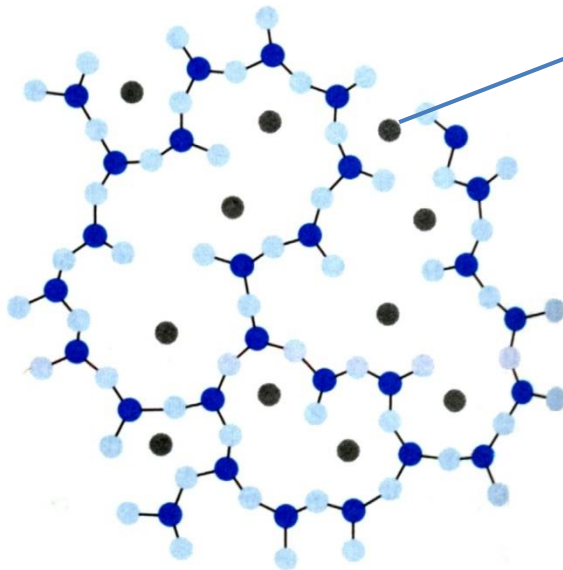
Електрохемискиот елемент:

$\text{Ag} \mid \text{AgCl} \mid \text{HCl} (c/\text{mol dm}^{-3}) \parallel \text{раствор} (c(\text{A})/\text{mol dm}^{-3})$

Јоноизменувачки карактер на мембраната:

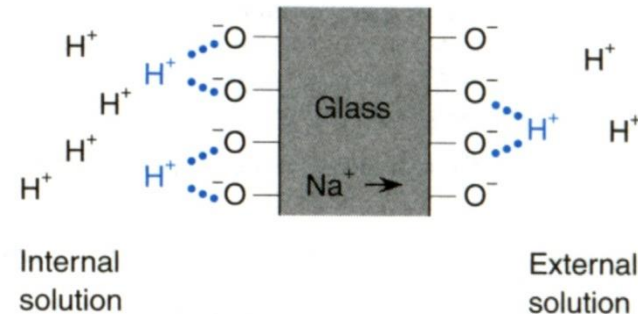
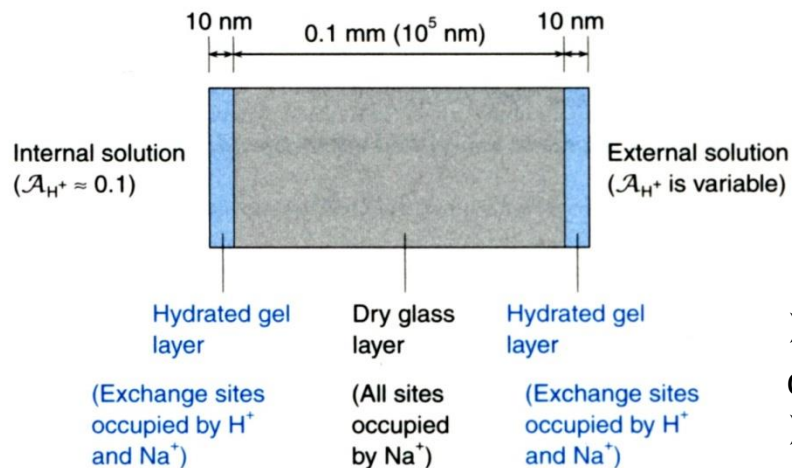


Стаклена мембрана

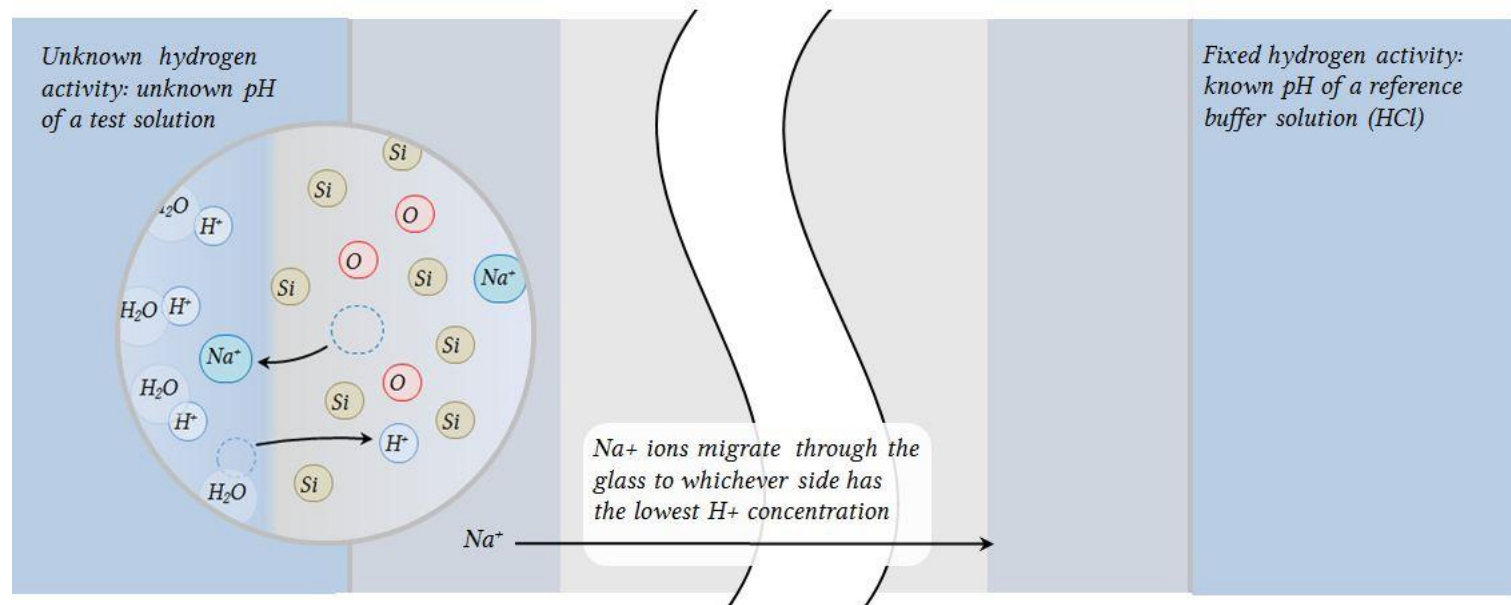
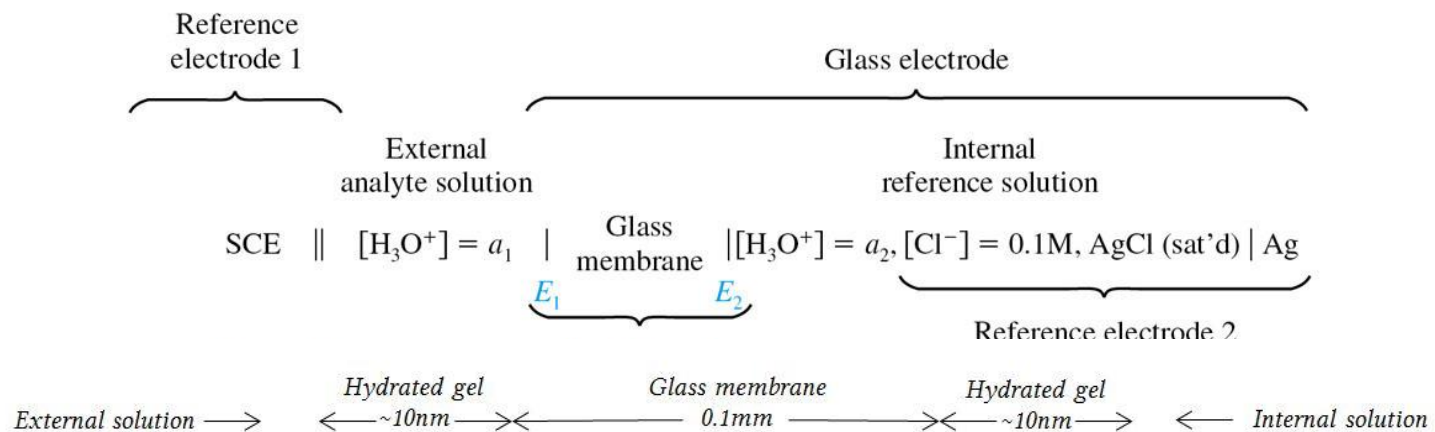


(Na⁺) катјони се сврзуваат со кислородот во SiO₄

- Двете површини на мембраната набубруваат кога се потопени во раствор
- Површините се во контакт со [H⁺] и се однесува како јонски изменувач
- [H⁺] навлегува во стаклената мембрана и го заменува Na⁺ во хидрираниот гел регион
- Осетливи само на [H⁺] бидејќи само тој се врзува за слојот во значителна мера



- Полнежот се менува со мигрирање на Na⁺ низ стаклената мембрана
- Потенцијалот е определен од надворешната [H⁺]



← Potential difference between the internal gel-solution interface and the external gel-solution interface: E_B , the boundary potential →

$$E = E' - \frac{RT}{F} \ln([H^+]) \quad E = E' - 0,059V \cdot \log([H^+]) \quad E = E' + 0,059V \cdot \text{pH}$$

Стаклена– комбинирана електрода

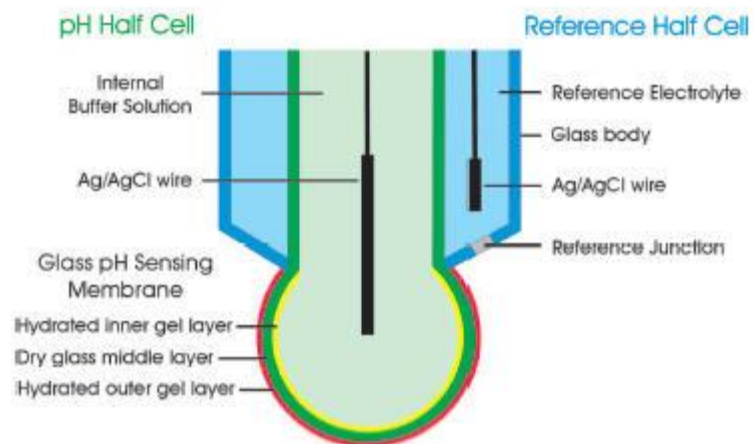
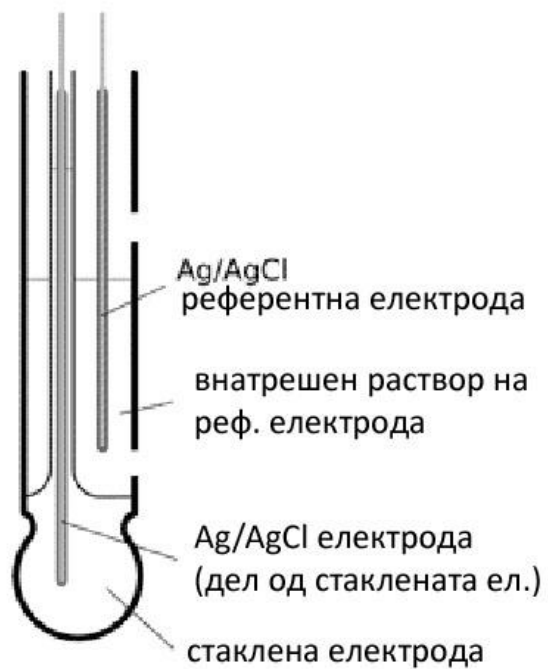


Figure 1 Typical combination pH electrode.

Грешки при pH мерења

Стандарди

- pH мерењата не може да се поточни од стандардите ($\pm 0,01$)

Потенцијал на електролитниот мост

- Ако јонската сила се разликува помеѓу анализот и пуферот, потенцијалот на мостот допринесува за грешка од $\pm 0,01$

Алкална грешка

- За високи pH вредности, електродниот одговор кон Na^+ и мерената pH е пониска од вистинската

Киселинска грешка

- За ниски pH вредности, мерената pH е поголема од вистинската pH, заради заситување на мембраната

Рамнотежно време

- Потребни се ~ 30 s за електродата да се урамнотежи со растворот

Хидрирање на стаклото

- Сува електрода нема да мери точно H^+

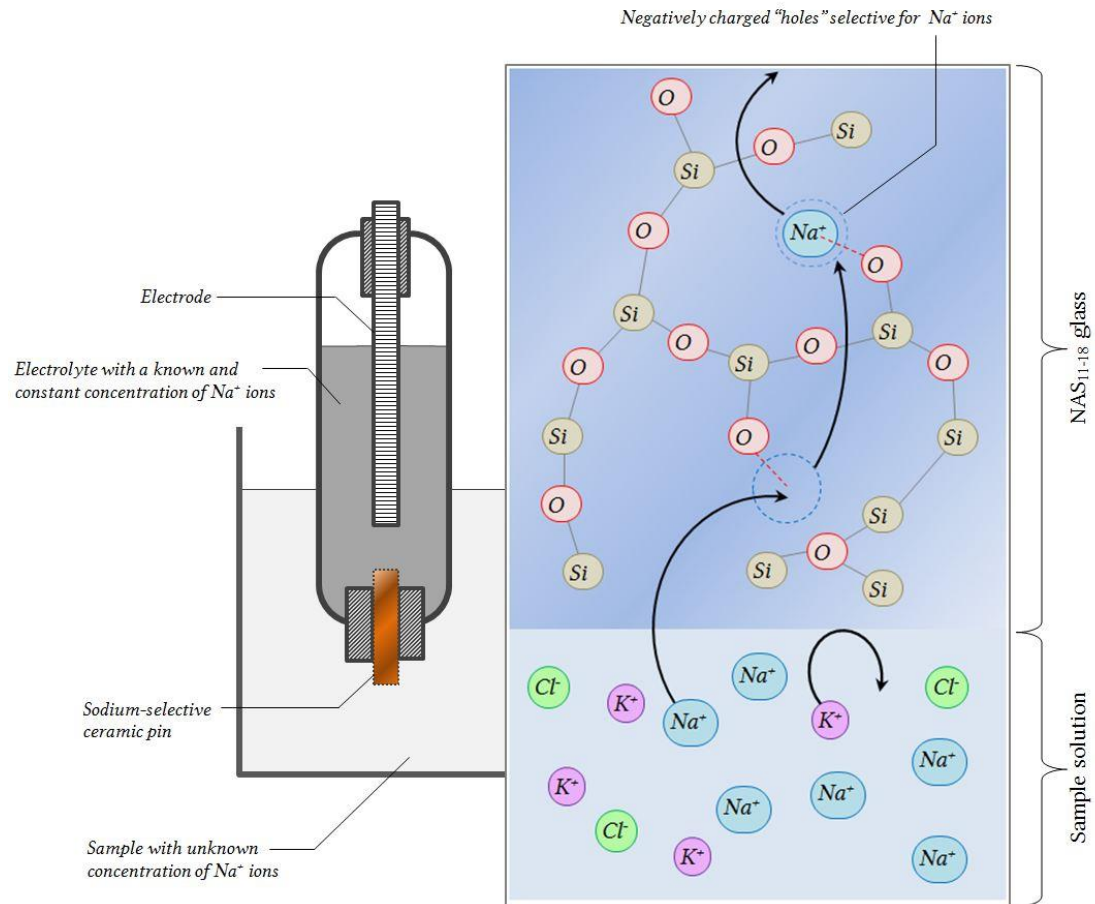
Температура

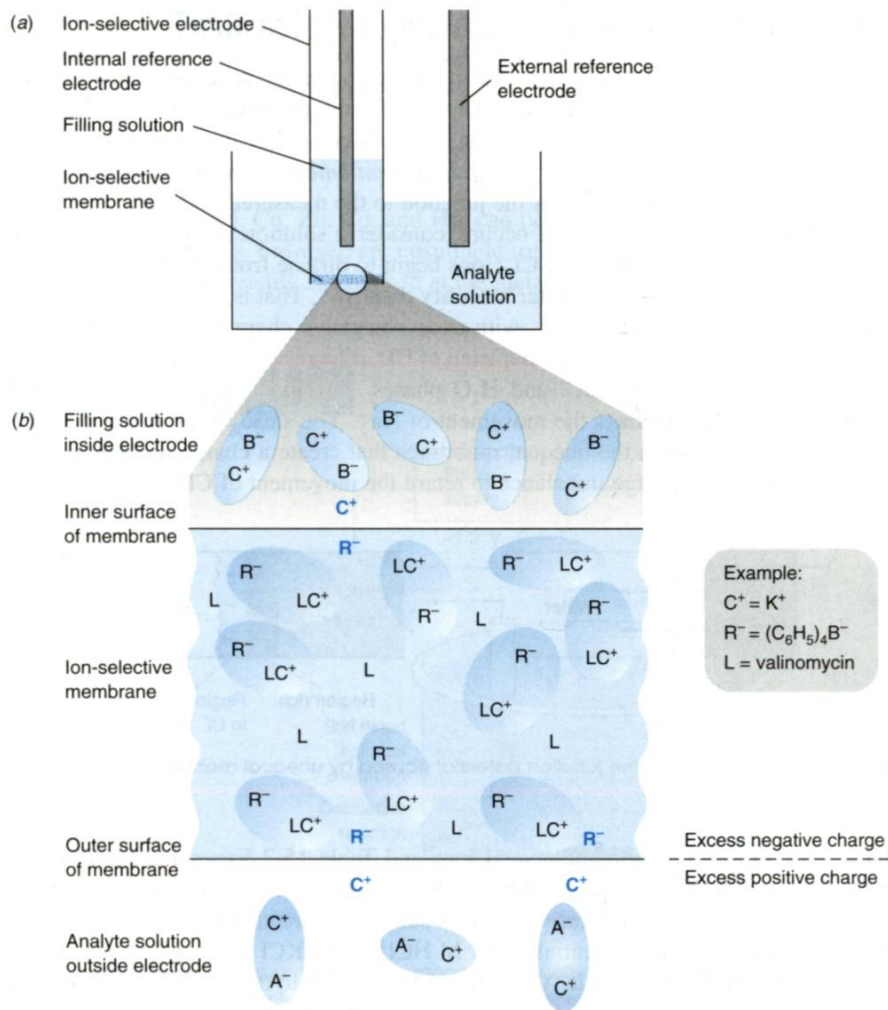
- Калибрацијата и мерењето треба да се вршат на иста температура

Чистење

- Загадување на мембраната води до погрешни мерења.

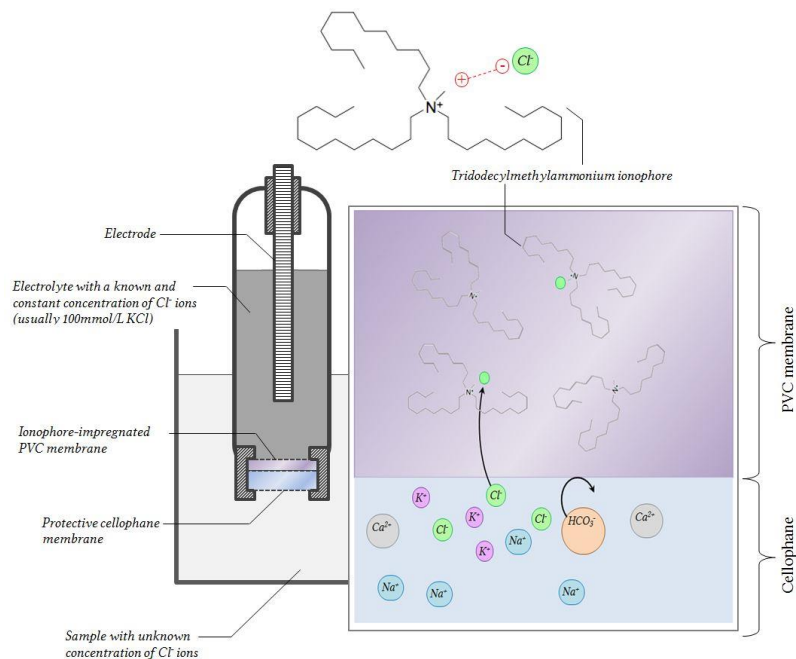
Ион-селективна стаклена електрода за натриум





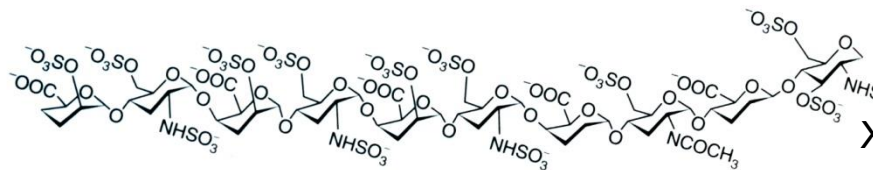
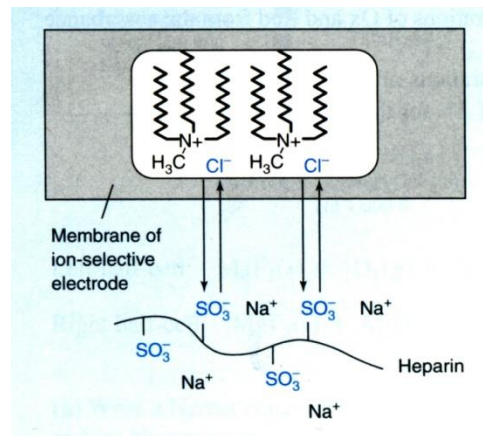
- Мембраната е направена од поливинил хлорид (PVC)
- Мембраната е импрегнирана со неполярна течност
- Мембраната содржи лиганд L (јон-селективен јонофор)
- Мембраната содржи LC^+
- Мембраната содржи хидрофобен анјон R^- (јонски изменувач)

Шематски приказ на типична мембранска електрода, за разни јони

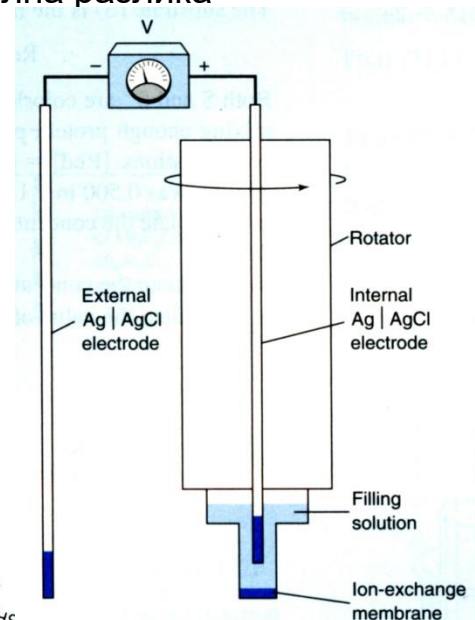


Ион-селективна електрода за хлор

Со сврзување на хепаринот се генерира потенцијална разлика

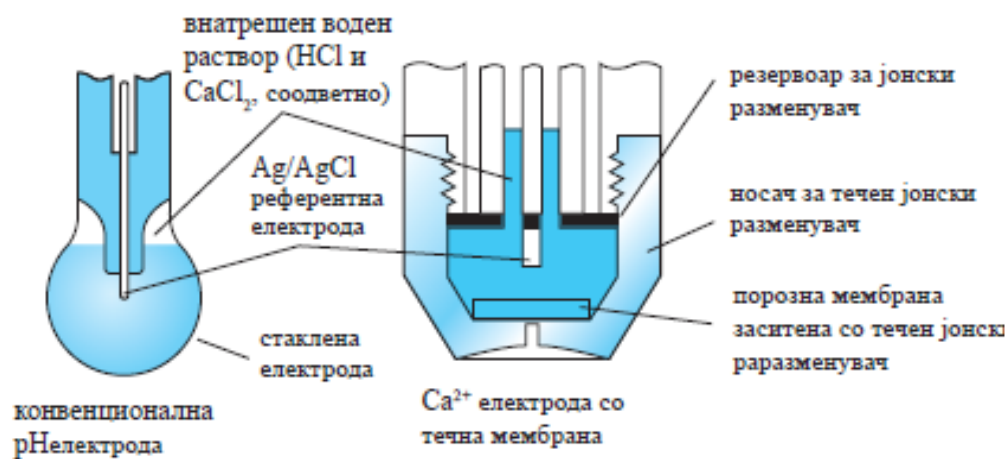
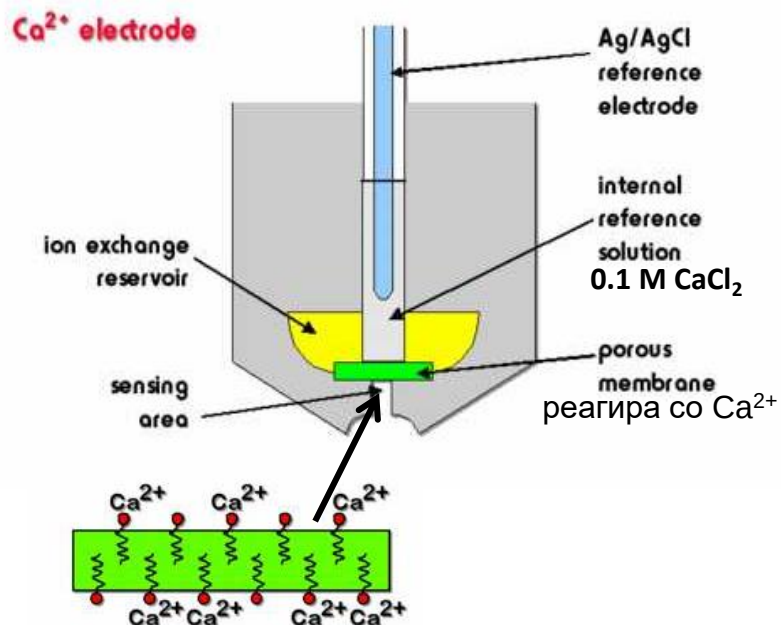


Хепарин

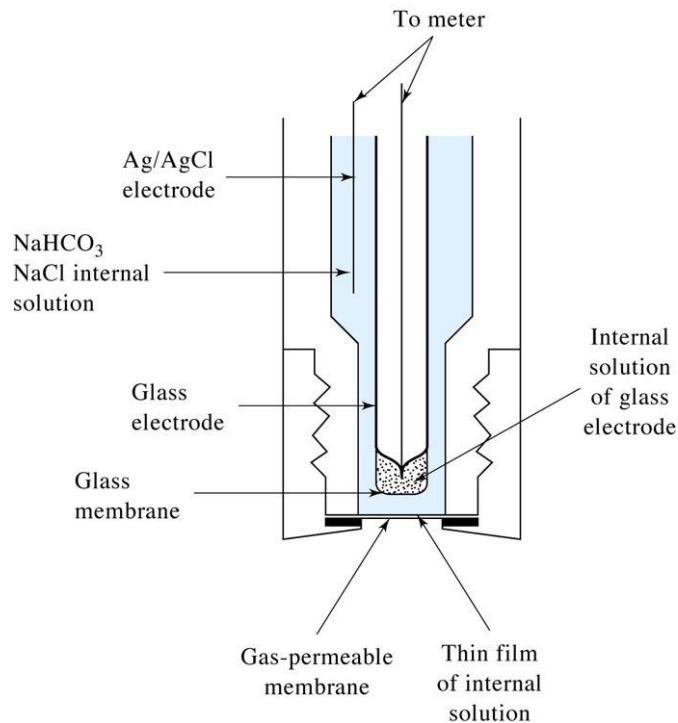


Потенцијалот е пропорционален на концентрацијата на хепарин во крвта

Мембранска електрода за калциум



Споредба на стаклена електрода со калциумова јон селективна електрода



Гасна електрода – конвенционална електрода обиколена со мембрана што изолира или генерира аналит на кои електродата реагира

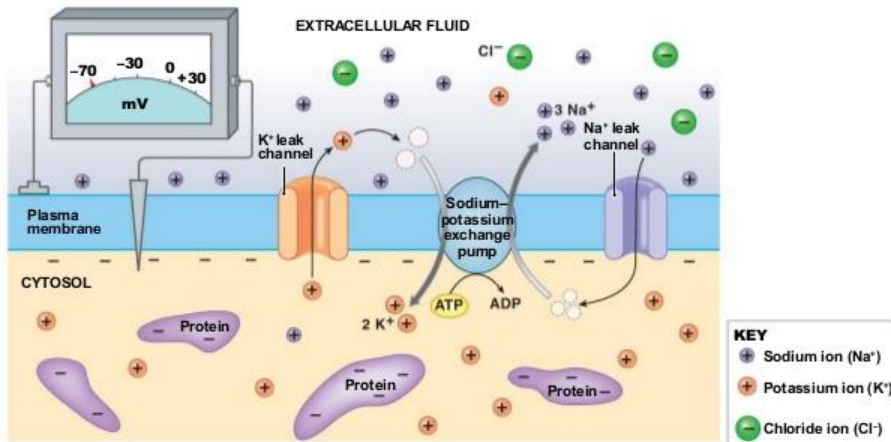
- активноста на јонот што се мери е под влијание на растворениот гас
- гасот навлегува во внатрешноста на растворот поминувајќи низ гас-пропуслива мембрана

КАКО ФУНКЦИОНИРА??!!

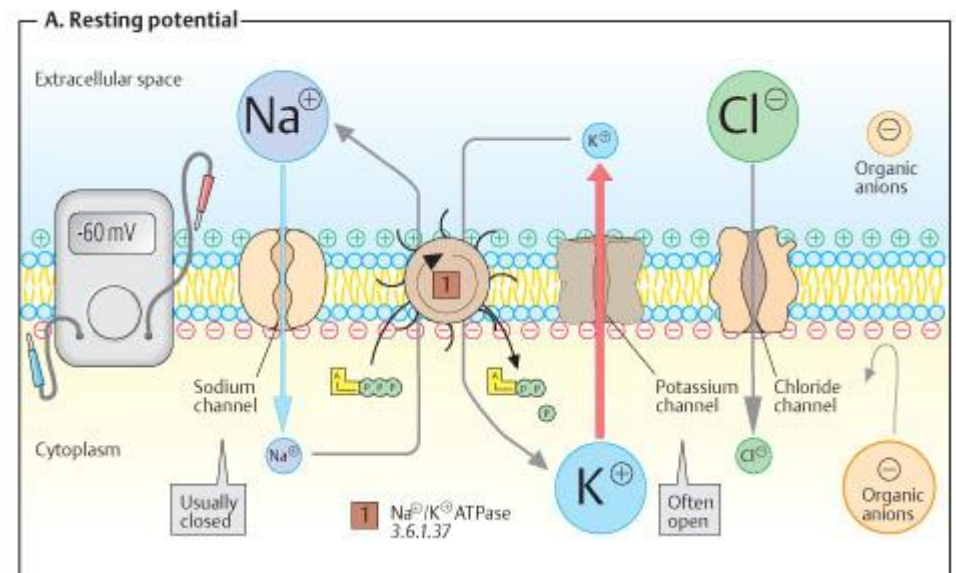
- pH електрода обвиткана со мембрана пропуслива за CO₂.
- CO₂ поминува низ мембраната, се раствора во растворот и pH се менува.
- pH промената е индиректна мера за концентрацијата на CO₂

Транспорт на јони низ клеточна мембрана

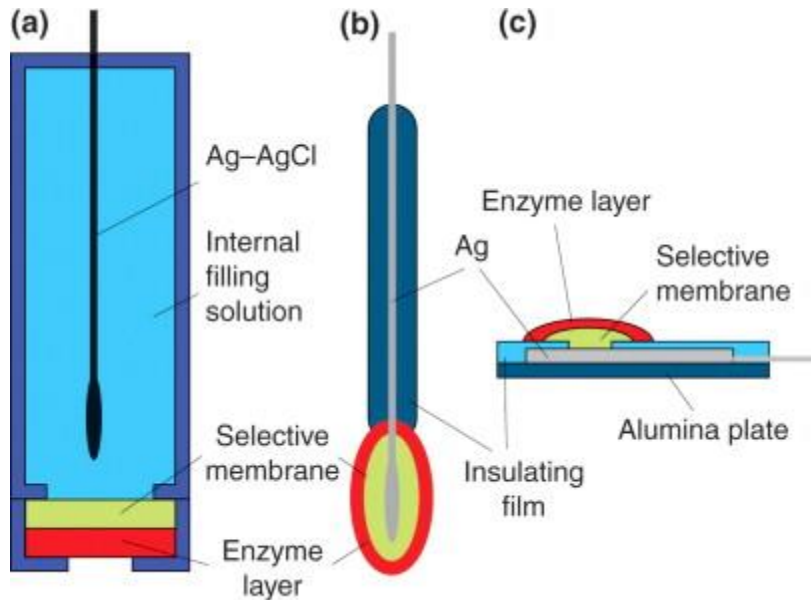
Figure 8-7 The Resting Potential Is the Membrane Potential of an Undisturbed Cell.



© 2013 Pearson Education. Inc.



Ензимски електроди

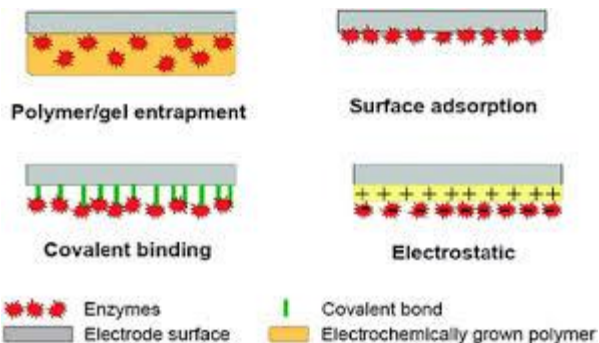


trends in Biotechnology

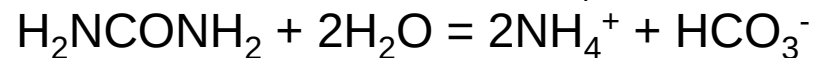
Внатрешната референтна електрода:

- Стаклена електрода
- Електрода со пропустлива течна мембрана

Рамнотежа 30 – 60 s



мембрана од **уреаза** – електродата ќе биде осетлива на NH_4^+ јони:



Потенциометриски мерења

Мерење на електромоторната сила на електрохемиски елемент:

• Електроди:

- Референтна и
- Индикаторска електрода.

При тоа

- Методи за определување (директна потенциометрија),
 - Бараната **концентрација** се определува **директно** од измерената ЕМС.
- Методи за индикација (потенциометриски титрации)
 - **Потенциометриските мерења** се користат за определување на **завршната точка**

Директна потенциометрија

За равенката која се одвива во десниот полуелемент:



$$E_{\text{kel}} = E_d - E_l = E_{\text{ind}} - E_{\text{ref}}$$

$$E_{\text{ind}} = E_{\text{kel}} + E_{\text{ref}}$$

$$E_{\text{ќелија}} = E_{\text{инд}} - E_{\text{реф}} + E_{ij}$$

За работа:

- Селективна електрода
- Не е неопходна подготовка на проба
- Потребен е стандарден раствор

При аналитички мерења користиме **концентрации**:

$$E_d = E^0 - \frac{RT}{zF} \ln \left(\frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b} \right)$$

Примена на директната потенциометрија:

- за определување на pH
- за определување на **константи на стабилност** на комплекси
- за определување на концентрации на јони во анализираните проби.

јоноселективните електроди ја наоѓаат својата најголема примена кај овој тип на анализи

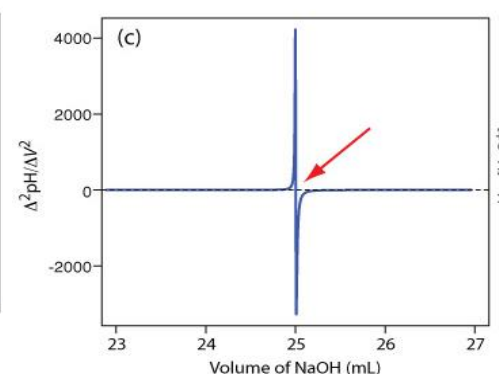
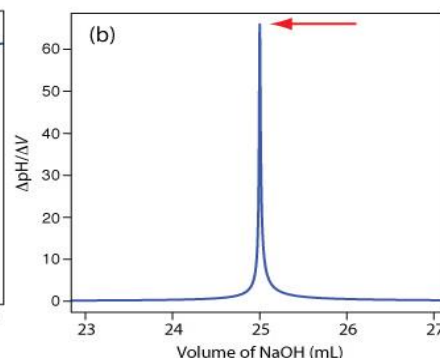
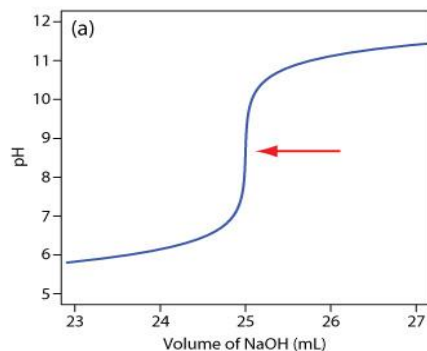
Потенциометриски титрации

Потенциометриски **титрации**:

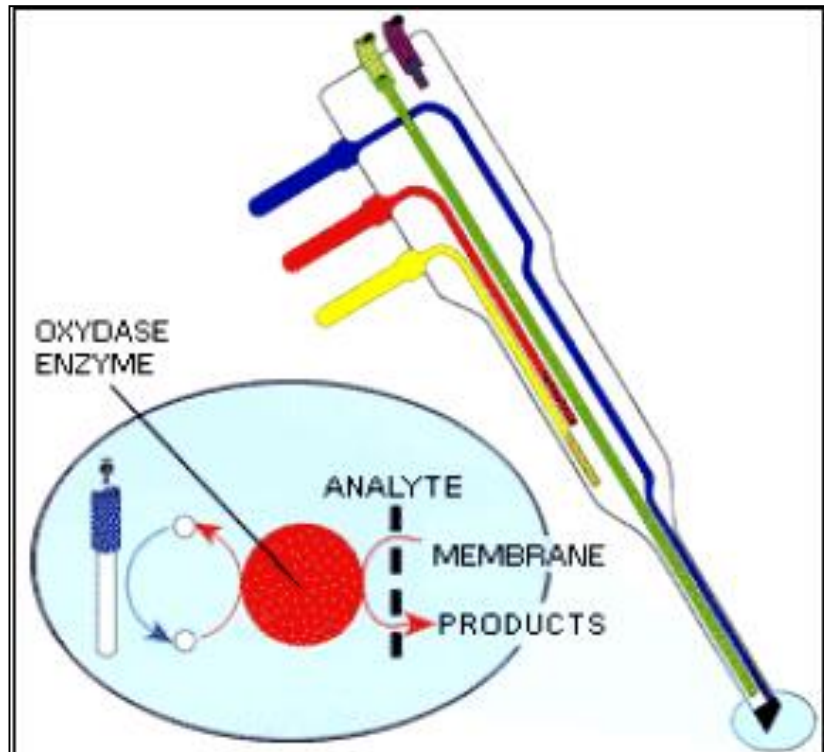
- Служат за определување на **завршната точка**.
- **Полуелементи**:
 - Аналитот + инд. електрода,
 - Референтна електрода.
 - Следење на промената на потенцијалот со додавање на титрант
- Завршната точка се определува од најстрмниот дел на кривата на E - V .

Титрациони криви:

- E како функција од V на титрационото средство (a);
- $\Delta E / \Delta V$ како функција од V (b);
- $\Delta^2 E / \Delta V^2$ како функција од V (c).



БИОСЕНЗОРИ



Биосензори се аналитички направи за анализа на био-материјали (сознанија за нивниот состав, структура и функција) при што биолошкиот одговор се конвертира во електричен сигнал. Биосензорот претставува направа што поврзува биолошки активна компонента во близок контакт со физичко-хемиски преносник и даваат однос помеѓу концентрацијата на аналитот и мерениот сигнал.

Зошто се важни?

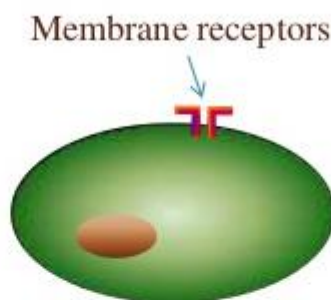
Детекција/препознавање



Antibody



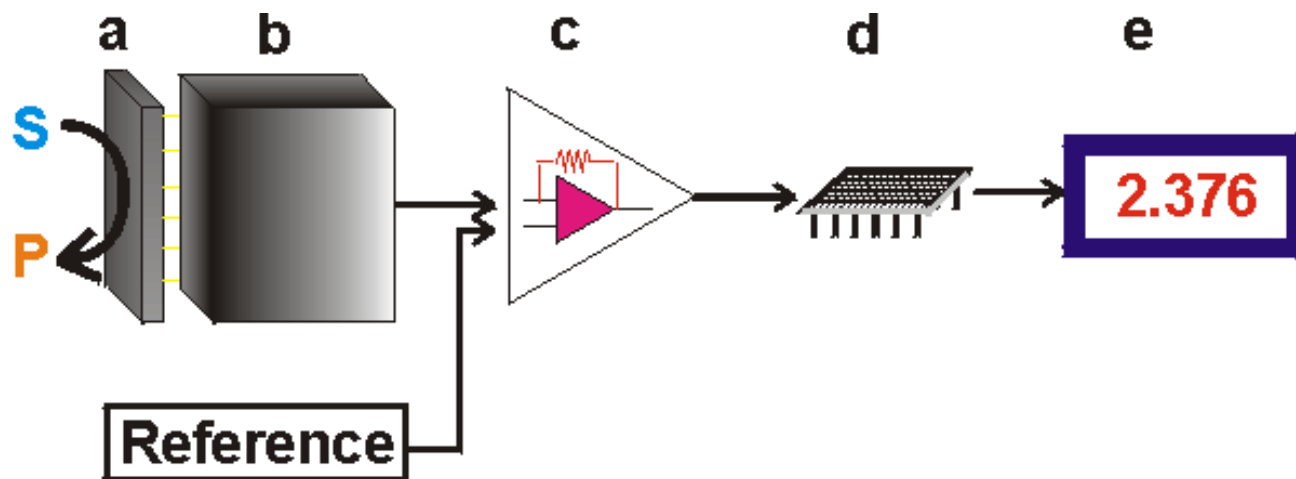
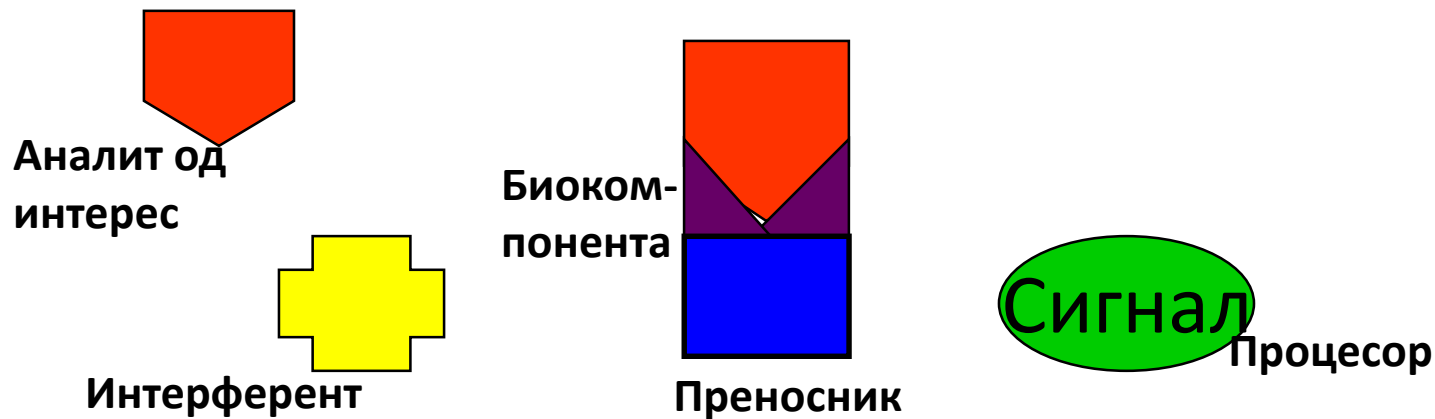
Enzyme



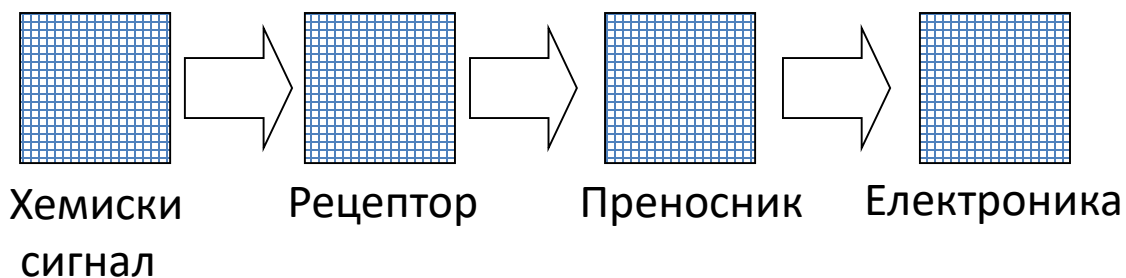
Cell



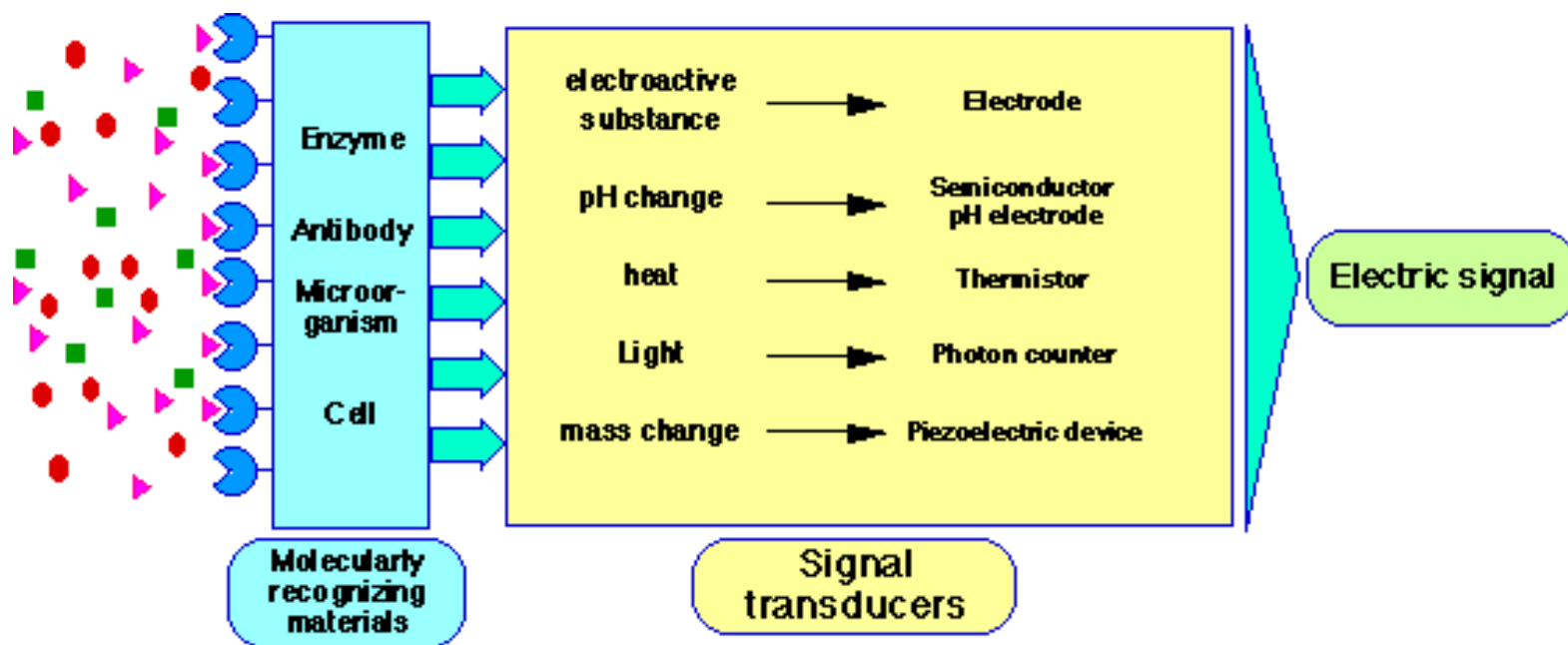
Polymer/Hydrogel



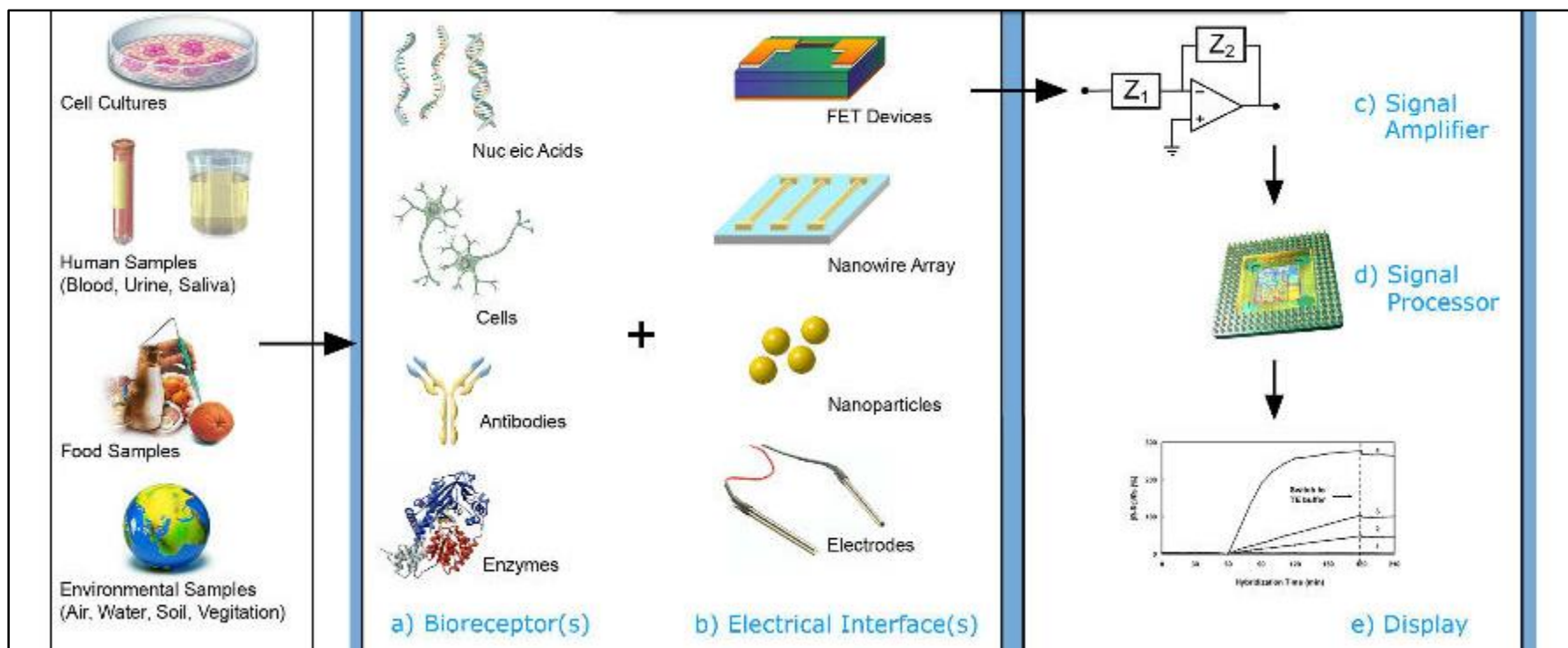
- (a) Биокатализаторот го конвертира супстратот во продукт.
 (b) Преносникот ја конвертира реакцијата во електричен сигнал
 (c) појачувач, (d) процесор(е) екран)



ШТО Е БИОСЕНЗОР?



ЕЛЕМЕНТИ НА БИОСЕНЗОРИ

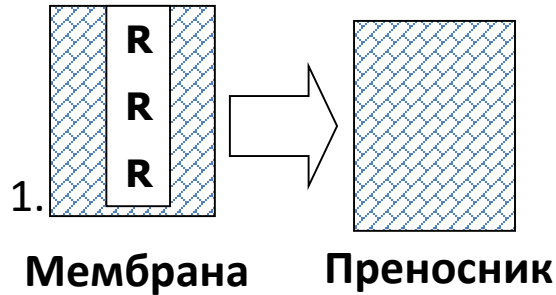


Примероци

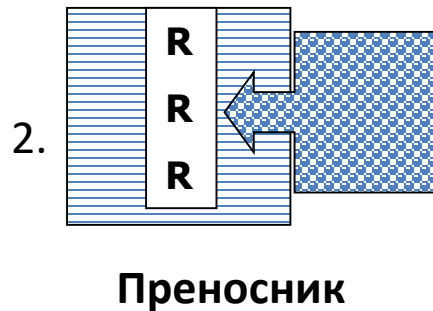
преносници

електронски систем

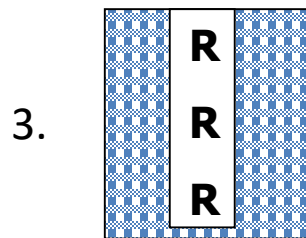
Биокомпоненти, еволуција во конструкцијата



Биокатализаторот е сместен помеѓу или на мембрана, која е поврзана со преносникот



Биокатализаторот е ковалентно врзан на површината на преносникот со што се елиминира потребата од полупропустлива мембрана



Директно врзување на биокатализаторот со електронска направа што го пренесува и појачува сигналот

Електронска направа - биочип

Типови на биосензори, по био материјал

Ензим-метаболички биосензори: ензимски и ќелиски електроди

Биоафинитетни сензори: антитела, нуклеински киселини, лектин

Преносници (што ја трансформират физичката промена што настанува при реакцијата)

Електрохемиски

Оптички

Пиезоелектрични

Калориметриски

Акустични

Ензим-метаболички сензори

- Ензимите се биолошки катализатори: оксидоредуктази, трансферази, хидролази, лиази, изомерази

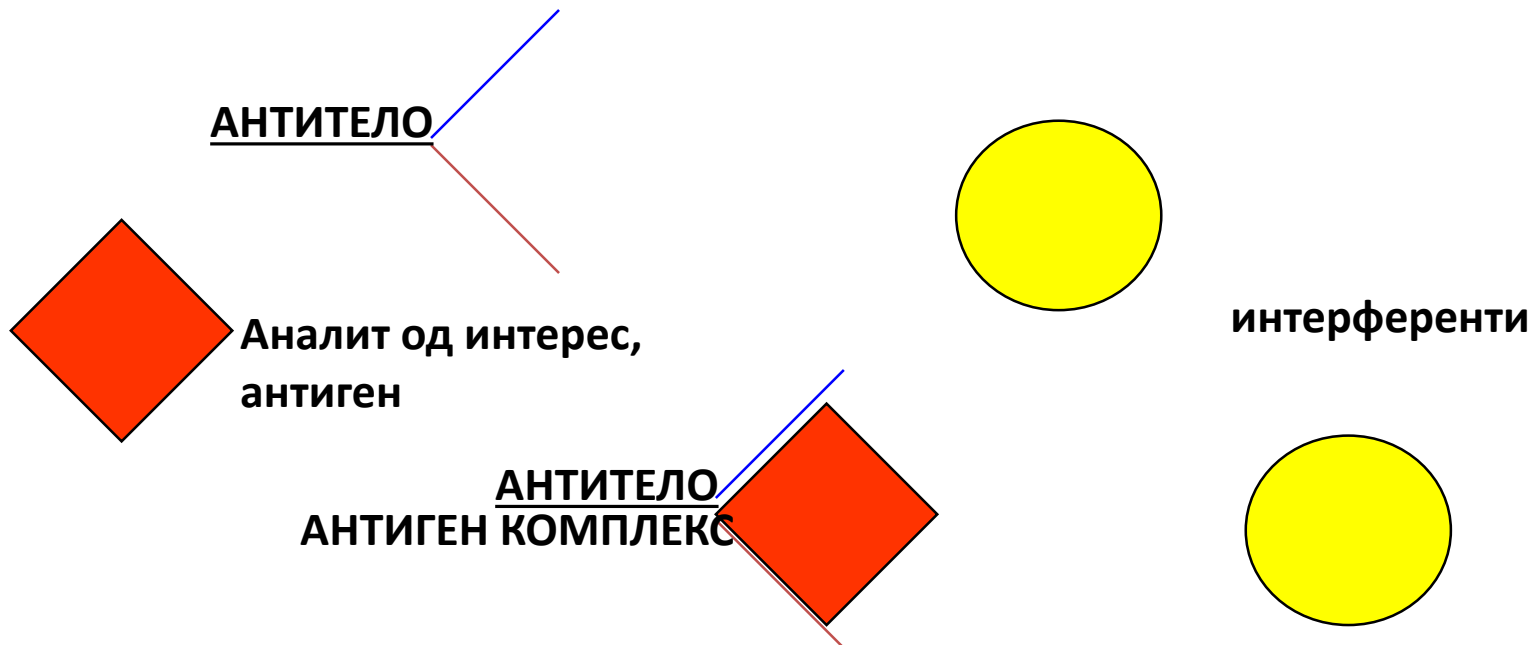


Потрошувачката на супстратот во однос на добивањето на продуктот се мери и се претвора во квантитативен сигнал

Биоафинитетни сензори

Се темелат на сврзувачки интеракции помеѓу имобилизирана молекула и анализот што не интересира. Овие интеракции се многу селективни.

Примери: антиген-антитело интеракции, нуклеински киселини за секвенционирање и лектин за шеќери.



ПРЕНОСНИЦИ/електрохемиски

- Потенциометриски сензори: потенцијалот, кога нема проток на струја (во однос на референтен потенцијал) што се развива на електроодната површина (или селективната мембрана) во контакт со растворот што го содржи анализот е директно зависен од концентрацијата на анализот. Главна примена, слична на мерење на pH.

$$E = E^{\circ} - \frac{RT}{zF} \ln[\text{analyte}]$$

- E° , константна за системот
- R универзална гасна константа
- T апсолутна температура
- z број на разменети електрони
- F фарадеева константа
- $\ln[\text{analyte}]$ природен логаритам од активитетот на анализот

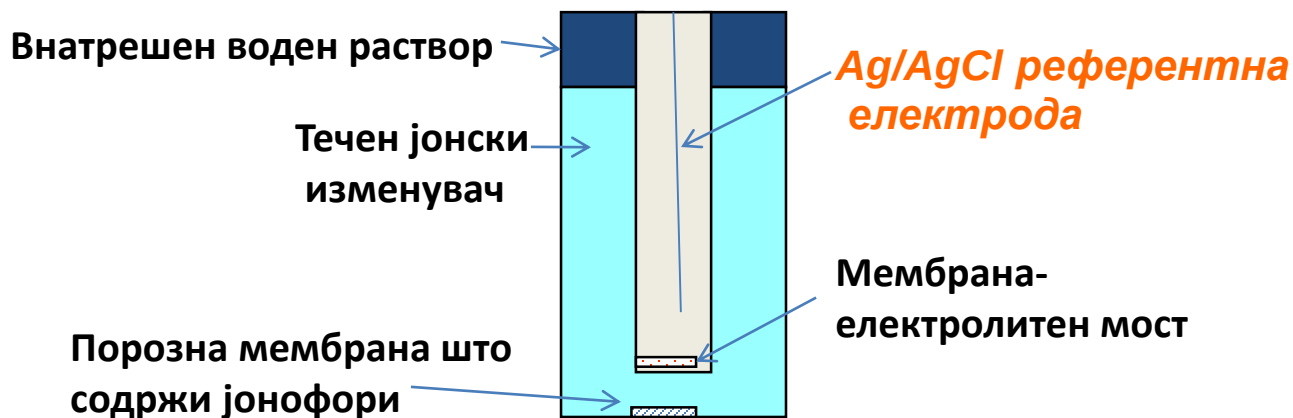
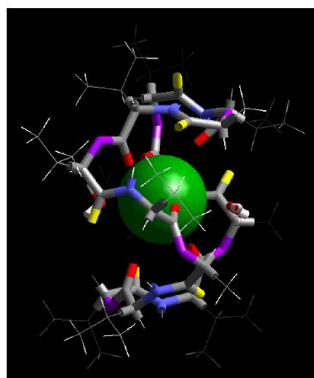
Потенциометриски биосензори

Три типа на јон селективни електроди, што се користат кај биосензорите:

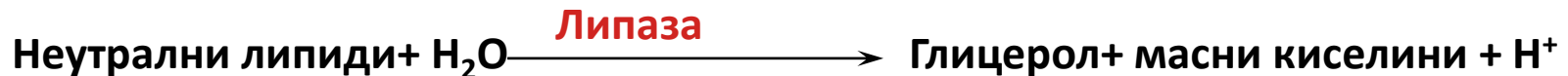
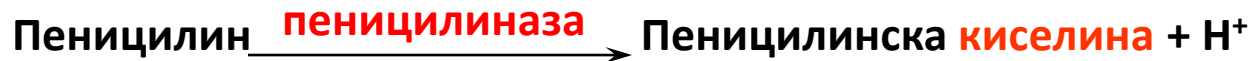
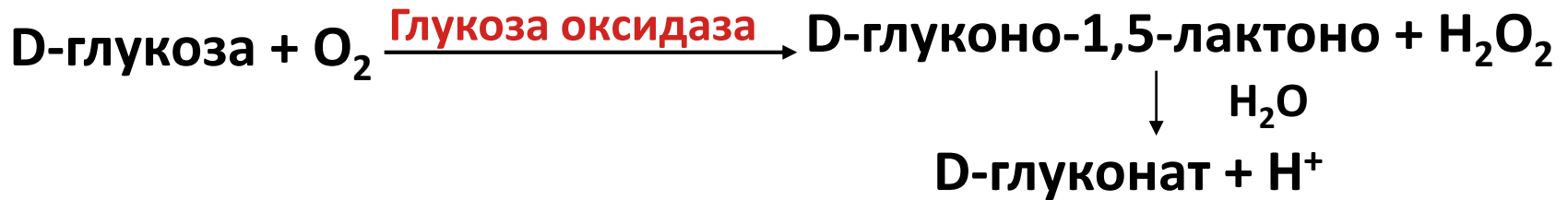
- Јон-селективна електрода за катјони
- Стаклена рН електрода превлечена со гас-пропуслива мембрана, селективна за CO_2 , NH_3 или H_2S .
- Јодидна електрода, погодна за определување на I^- во пероксидазни реакции

Потенциометриски биосензори

- При реакцијата се создаваат јони
- Биосензорот се состои од имобилизирана ензимска мембрана околу електрода. Инструмент - pH метар.
- Најпознат потенциометриски сензор - Јон-селективна електрода (ISE).
- Електроди со полимерни течни мембрани се комерцијални продукти и се употребуваат за определување на K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , NH_4^+ , H^+ , CO_3^{2-} во комплексни биолошки матрици.
- Антибиотиците нонактин и валиномицин се употребуваат како носачи за определување на NH_4^+ и K^+ , соодветно.



Реакции при кои се ослободува H⁺

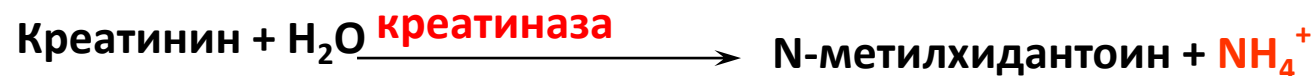


Реакции при кои се троши H⁺

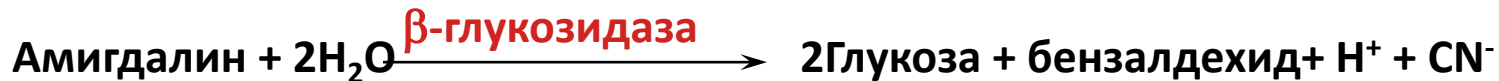


Во контакт со pH електрода

Реакции при кои се ослободува NH_4^+



Реакции при кои се ослободува анјон

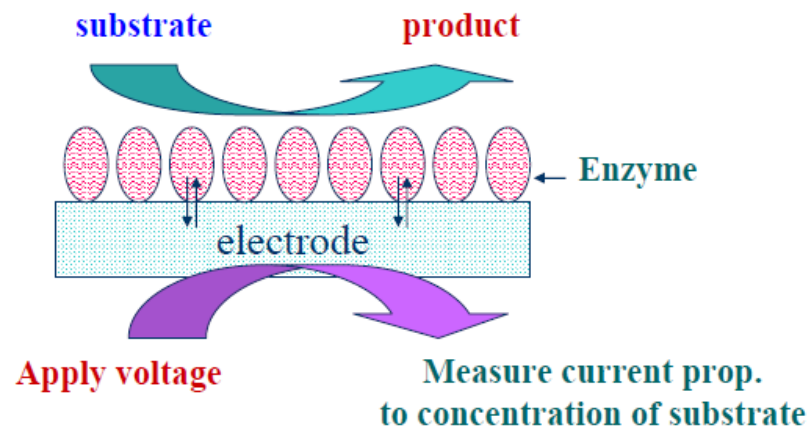


- За специфични ензимски супстрати се користат специјално конструирани јон-селективни електроди поврзани со имобилизирани ензими, селективни за специфичниот ензимски супстрат, најважни се оние за креатинин и уреа.
- Овие потенциометриски ензимски електроди се добиваат, задржувајќи го ензимот уреаза/креатиназа на површината на катјонска јон селективна (NH_4^+) електрода

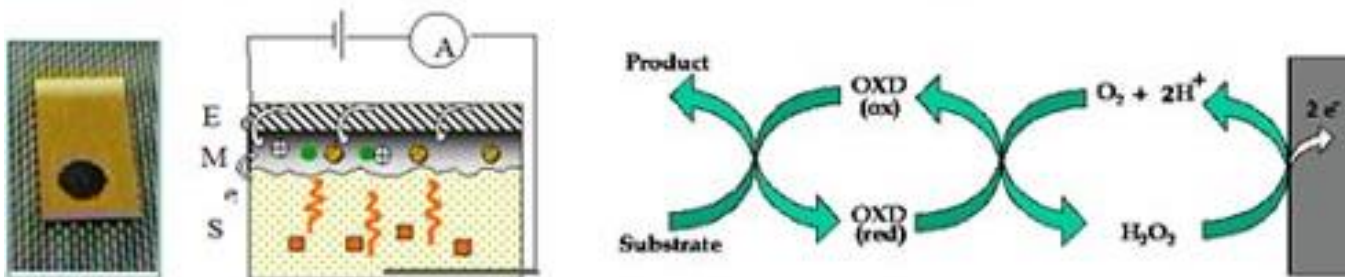
Амперометриски биосензори

- Кај амперометриските сензори, електродниот потенцијал се одржува на константно ниво, предизвикува оксидација или редукција на супстанците од интерес, односно реакцијата што протекува доведува до проток на струја
- Протокот на струјата е пропорционален на концентрацијата на аналитот

$$I_d = nFAD_s C/d$$



Амперометриски биосензор за лактат, глюкоза, холестерол



E = Electrode, M = Hydrogel Membrane, S = Solution, e = electron, ⊕: Charged cationic polymeric site, ○: Neutral polymeric site, ●: Counter-anion ●: Enzyme
■: Substrate, analyte or chemical trigger.

Основни карактеристики на биосензорите

1. **Линеарност:** Линеарноста на сензорот мора да е доволно голема да може да се определуваат високи вредности
2. **Осетливост:** Одговорот во врска со концентрацијата
3. **Селективност:** Интерференциите треба да се сведат на минимум
4. **Брзо време на одговор:** Време неопходно да се добие одговор од најмалку 96 % од вредноста.

Најчести определувања при поставување дијагноза на пациент

Јони	Гасови	Лекови	Супстанци	Ензими
Натриум	Кислород	Парацет-амол	Глукоза	Креатинин-киназа
Калиум	Амонијак	Салицилат	Холестерол	Амилаза
Калциум	CO ₂		Креатинин	Аспартат
pH				Аминотрансфераза