

AALTO YLIOPISTO  
SÄHKÖTEKNIIKAN KORKEAKOULU  
Elektroniikan laitos  
Bioinformaatioteknologian koulutusohjelma

Olli Kotiranta

# Amperometrisen välittäjäaineanturin karakterisointilaitteiston suunnittelu ja toteutus

Diplomityö, joka on jätetty opinnäytteenä tarkastettavaksi diplomi-insinöörin tutkintoa varten

Espoo, 30.1.2012

Työn valvoja: Prof. Mervi Paulasto-Kröckel  
Työn ohjaaja: DI Antti Ritvanen

AALTO-YLIOPISTO Sähkötekniikan korkeakoulu Bioinformaatioteknologian tutkinto-ohjelma		DIPLOMITYÖN TIIVISTELMÄ	
Tekijä	Olli Kotiranta	Päiväys	30.1.2012
		Sivumäärä	iv + 62
Työn nimi	Amperometrisen välittäjäaineanturin karakterisointilaitteiston suunnittelu ja toteutus		
Professori	Elektroniikan integrointi ja luotettavuus	Koodi	S-113
Työn valvoja	Prof. Mervi Paulasto-Kröckel		
Työn ohjaaja	DI Antti Ritvanen		
<p>Tässä diplomityössä rakennettiin laitteisto, jolla kyetään määrittämään ja mittaamaan amperometrisen välittäjäaineanturin suorituskykyä kuvaavia parametreja. Työ on osa Aalto-yliopiston Sähkötekniikan korkeakoulun Elektroniikan laitoksen tutkimusprojektia, jonka yksi osa-alue on valmistaa aivostimulaatiossa käytettäviä implantoitavia välittäjäaineantureita. Toteutettu laitteisto on tarkoitettu näiden antureiden testaamiseen.</p> <p>Työn kirjallisessa osiossa esitellään sähkökemiallisten mittausten teoreettinen perusta sekä erityisesti sähkökemiallisten välittäjäaineanturien toimintaperiaate keskittyen glutamaattia havainnoiviin antureihin. Lisäksi osioon kuuluu katsaus virtausdynamiikkaan sekä hydrodynaamisiin sähkökemiallisiin mittauksiin.</p> <p>Kokeellisessa osiossa esitellään kirjallisuuskatsauksen pohjalta suunniteltu mitauslaitteisto sekä sen toimintakykymittausten tulokset. Toimintakyvyn määrittämiseen käytettiin apuna kaupallisia Sarissa Biomedicalin glutamaattiantureita.</p> <p>Mittauksissa havaittiin ongelmia kaupallisten antureiden luotettavuuden kanssa, ja mittaukset onnistuttiin suorittamaan vain yhdelle anturille viidestä, mikä heikentää mittauksista tehtävien johtopäätösten luotettavuutta merkittävästi. Laitteistolla kyettiin kuitenkin määrittämään mitatun anturin keskeisiä suoritusparametreja kuten aikaresoluutio ja herkkyys. Lisäksi tulosten perusteella laitteisto kykeni nopeiden mittausten suorittamiseen.</p>			
Avainsanat	amperometria, välittäjäaine, glutamaatti, virtauskammio		

AALTO UNIVERSITY SCHOOL OF ELECTRICAL ENGINEERING Department of Electronics Degree Programme of Bioinformation Technology		ABSTRACT OF MASTER'S THESIS	
Author	Olli Kotiranta	Date	30th January 2012
		Pages	iv + 62
Title of thesis	Design and implementation of a system for characterising an amperometric neurotransmitter sensor		
Professorship	Electronics integration and reliability	Code	S-113
Supervisor	Prof. Mervi Paulasto-Kröckel		
Instructor	Antti Ritvanen, M.Sc.(Tech.)		
<p>A test bed for measuring different performance characteristics of amperometric neurotransmitter sensors was designed and implemented for this Master's thesis. This thesis is a part of a research project that's being undertaken in the Department of Electronics of Aalto university School of Electrical Engineering and which aims to develop implantable neurotransmitter sensors.</p> <p>The first part of the thesis consists of a literary survey that presents the necessary theoretical background for electrochemical measurements and specifically the operating principle of selective neurotransmitter sensors, focusing on the ones designed to detect glutamate. Also included is a treatment of fluid dynamics and hydrodynamic systems for electrochemical measurements.</p> <p>The experimental section presents the measurement system that was designed and manufactured based on the requirements set by the results obtained from the literary survey. Commercial glutamate sensors manufactured by Sarissa Biomedical were used to test the performance of the designed system.</p> <p>The reliability of the commercial biosensors proved to be an issue during the measurements and only one of the sensors provided useful information. This greatly limits the reliability of deductions made from the sensor measurements but nonetheless the system was able to measure central characteristics of the sensor including its time resolution and sensitivity. The results also indicate the system can be used to perform very fast measurements.</p>			
Keywords	amperometry, neurotransmitter, glutamate, flow chamber		

# Esipuhe

Haluan kiittää työni valvojaa professori Mervi Paulasto-Kröckeliä sekä mahdollisuudesta työskennellä mielenkiintoisen projektin parissa että kärsivällisyydestä työn ongelmien tuottamien viivästysten suhteen. Suuret kiitokset kuuluvat myös työni ohjajalle Antti Ritvaselle sekä Tomi Laurilalle, joiden ohjeistuksella työn sisältö hioutui lopulta järkevään muotoon.

Lisäksi haluaisin kiittää Kimmo Rajalaa sekä Heikki Ruotoistenmäkeä työssä käytetyn virtauskammion valmistamisesta, Betti Valmaria sekä Emilia Bergiä erittäin hyödyllisten kirjallisuusraporttien kirjoittamisesta ja Kyösti Jylhää valokuvauskalustoineen.

Erityiskiitoksen ansaitsee Teemu Turunen, jonka kanssa käydyt keskustelut olivat omiaan työssä kohdattujen ongelmien ratkaisemiseen. Lopuksi haluan kiittää Marjaa, jota ilman elämäni olisi kovin ikävää ja diplomityöni täynnä kirjoitusvirheitä.

Espoossa, 30.1.2012

Olli Kotiranta

# Sisältö

<b>1</b>	<b>Johdanto</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Sähkökemialliset elektrodireaktiot ja niiden mittaus</b>	<b>3</b>
2.1	Anodi- ja katodireaktiot . . . . .	3
2.2	Yleiset sähkökemiallisten reaktioiden mittaustavat . . . . .	5
2.2.1	Voltammetria . . . . .	5
2.2.2	Amperometria . . . . .	8
<b>3</b>	<b>Sähkökemialliset välittäjäaineanturit</b>	<b>13</b>
3.1	Välittäjäaineet . . . . .	13
3.1.1	Glutamaatti . . . . .	15
3.2	Anturien ominaisuudet . . . . .	16
3.3	Glutamaattia havainnoiva anturi . . . . .	17
3.3.1	Ensimmäisen ja toisen sukupolven glutamaattianturit . . . . .	19
3.3.2	Entsyymikerroksen immobilisointi ja stabiilius . . . . .	21
<b>4</b>	<b>Virtausdynamiikka ja virtausta käyttävät mittauslaitteistot</b>	<b>25</b>
4.1	Virtaus ja sen luonne . . . . .	25
4.1.1	Laminaarinen ja turbulenti virtaus . . . . .	26
4.2	Hydrodynaamiset sähkökemialliset mittaukset . . . . .	27
4.2.1	Pyörivät elektrodit . . . . .	28
4.2.2	Wall-jet -elektrodit . . . . .	29
4.2.3	Virtausinjektioanalyysi . . . . .	29
<b>5</b>	<b>Työn tarkoitus ja tutkimusmenetelmät</b>	<b>32</b>
<b>6</b>	<b>Mittauslaitteisto</b>	<b>33</b>
6.1	Kaupalliset glutamaattianturit ja niiden asettamat vaatimukset laitteistolle . . . . .	33
6.2	Suunniteltu laitteisto . . . . .	35

6.2.1	Potentiostaatti . . . . .	35
6.2.2	Buffer A -liuos . . . . .	36
6.2.3	Virtauskammio . . . . .	38
6.2.4	Aktiivinen anturipidike . . . . .	39
<b>7</b>	<b>Mittaukset ja tulokset</b>	<b>43</b>
7.1	Anturin liikkeen karakterisointi . . . . .	43
7.1.1	Anturin nopeus ja kulkema matka . . . . .	43
7.1.2	Anturin liikkeen poikkeamat . . . . .	44
7.2	Mittauslaitteiston virtausnopeus . . . . .	44
7.3	Anturien karakterisointi . . . . .	46
7.3.1	Glutamaattimittaukset . . . . .	47
7.3.2	Syklisen jännitevaihtelun vaikutus . . . . .	49
7.3.3	Vetyperoksidimittaukset . . . . .	50
7.4	Tulosten tarkastelu ja johtopäätökset . . . . .	51
7.4.1	Jatkotutkimuksen suunta . . . . .	55
<b>8</b>	<b>Yhteenveto</b>	<b>56</b>

# Luku 1

## Johdanto

Aivoissa tapahtuva kommunikaatio perustuu suurelta osin erilaisten molekyylien, välittäjäaineiden, erittämiseen hermosolujen välillä ja näiden havainnointiin, joka tapahtuu tehtävään erikoistuneilla kemiallisilla reseptoreilla. Erilaisten neurologisten sairauksien kuten Parkinsonin taudin tai epilepsian ilmenemistä voidaan tutkia seuraamalla tätä aivojen kommunikaatiota siinä käytettyjä välittäjäaineita ja niiden pitoisuuksien vaihtelua havainnoimalla.[1]

Välittäjäaineita voidaan havainnoida sähkökemiallisesti implantoitavilla elektrodeilla. Tällaisten elektrodien kehittäminen on haasteellinen tehtävä, johon kuuluu mm. elektrodin turvallisuuden, bioyhteesopivuuden ja toimintakyvyn varmistaminen *in vivo* -oloissa. Ensimmäiseksi on kuitenkin pystyttävä tuottamaan *in vitro* -oloissa toimiva riittävän suorituskykyinen anturi. Tämän todentamista varten on kehitettävä testausasetelma, jolla voidaan määrittää kehitettävän elektrodin tehokkuus erilaisin parametrein, joita ovat esimerkiksi elektrodin herkkyys ja spesifisyys halutulle välittäjäaineelle sekä vasteaika eli aika, joka anturin tuottamalla signaalilla kestää nousta maksimiarvoonsa.

Tämä diplomityö kuuluu Aalto-yliopiston Sähkötekniikan korkeakoulun Elektroniiikan laitoksen Elektroniikan integrointi ja luotettavuus -yksikön tutkimusprojektiin, jonka yksi osa-alue on kehittää välittäjäaineita havainnoiva, aivoihin implantoitava elektrodi. Työssä kehitettiin mittauslaitteisto, jolla voidaan tutkia tällaisen anturin suorituskykyä. Laitteiston vaatimusperusteena pidettiin kykyä karakterisoida toisen sukupolven entsyymipohjainen välittäjäaineanturi, jonka rakenne vaatii sen pitämisen koko ajan nestekontaktissa. Tällöin samaa laitteistoa voidaan käyttää useiden erilaisten elektrodien karakterisoinnissa.

Laitteiston suorituskykyä arvioitiin sekä kyvyllä karakterisoida yllä mainitun kauppal-

lisen välittäjäaineanturin parametreja sekä anturista riippumattomilla mittauksilla.

Työ jakaantuu lukujen 2-4 muodostamaan kirjalliseen ja lukujen 5-7 muodostamaan kokeelliseen osioon. Lisäksi luvussa 8 on työn yhteenveto. Luvussa 2 esitellään teoria-pohja sähkökemiallisille mittauksille sekä muutamia yleisiä sähkökemiallisia mittaamenetelmiä. Erityisesti painotetaan amperometriä mittaustapoja. Luvussa 3 käsitellään erilaisia anturiratkaisuja välittäjäainemittauksiin painottuen glutamaattia havainnoivien antureiden toteutukseen, sillä työssä testattava anturi on selektiivinen nimenomaan glutamaatille. Koska suunniteltu laitteisto perustuu nestevirtauksen hallittuun käyttöön, käydään luvussa 4 läpi virtausmekaniikan teoriaa sekä esitellään virtausta hyödyntäviä sähkökemiallisia mittausteitteistoja.

Luvussa 5 määritellään kokeellisen osion tavoite ja toteutustapa. Luvussa 6 esitellään määritellyn tavoitteen pohjalta suunniteltu laitteisto ja sen toimintaperiaate. Lukuun 7 on kerätty mittausteitteiston testeissä saadut tulokset sekä näistä tehdyt johtopäätökset kehitetyn laitteiston toimivuudesta. Lisäksi luvussa on esitetty jatkokehitystoimenpiteitä laitteiston toiminnan parantamiseksi.



# Luku 2

## Sähkökemialliset elektrodireaktiot ja niiden mittaus

Kaikki sähkökemialliset tavat mitata molekyylikonsentraatiota perustuvat vähintään kahden elektrodin muodostamaan kennoon, ja näillä elektordeilla tapahtuviin hapettumis- ja pelkistymisreaktioihin. Tässä luvussa esitellään sekä sähkökemiallisen kennon teoriaa että erilaisia mittaustekniikoita keskittyen erityisesti amperometriseen mittaukseen.

### 2.1 Anodi- ja katodireaktiot

Kun johtavasta materiaalista valmistettu elektrodi asetetaan elektrolyyttiliuokseen, elektrodin ja elektrolyyttiliuoksen välille muodostuu potentiaaliero, jota kutsutaan puolikennopotentiaaliksi (*engl. half-cell potential*). Tätä puolikennopotentiaalia on mahdoton mitata suoraan, sillä mittaukseen tarvitaan toinen elektrodi, ja tällöin mitattaisiin näiden kahden elektrodin puolikennopotentiaalien eroa. Eri materiaaleille onkin määritelty standardipotentiaali, joka saadaan vertaamalla elektrodin puolikennopotentiaalia vetyelektrodin potentiaaliin. Tätä standardipotentiaalia hyödyntämällä voidaan metallien potentiaalit laskea myös standardiolosuhteista poikkeavissa oloissa kaavan (2.1) eli Nernstin yhtälön mukaan

$$E = E^{\circ} - \frac{RT}{zF} \ln \frac{a_{Re}}{a_{Ox^{+}}}, \quad (2.1)$$

missä  $E^{\circ}$  on elektrodin standardipotentiaali,  $R$  kaasuvakio,  $T$  lämpötila Kelvineinä,  $F$  Faradayn vakio,  $z$  elektrodimateriaalin valenssi,  $a_{Re}$  materiaalin pelkistyneen muo-

don aktiivisuus ja  $a_{Ox^+}$  materiaalin hapettuneen muodon aktiivisuus [2]. Kun liuokseen asetetaan toinen, eri materiaalista tehty elektrodi, muodostuu kahden elektrodin välille potentiaaliero, jota kutsutaan kennopotentiaaliksi, ja elektrodit yhdessä elektrolyyttiliuoksen kanssa muodostavat sähkökemiallisen kennon. Elektrodien materiaalit ja elektrolyytti määräävät tasapainotilanteessa potentiaalieron suuruuden.

Sähkökemiallisen kennon anodi on positiivisesti varautunut elektrodi, jonka pinnalla hapettumisreaktiot tapahtuvat ja katodi vastaavasti negatiivisesti varautunut elektrodi, jonka pinnalla ionit pelkistyvät. Välittäjäaineiden sähkökemialliset mittaukset perustuvat havaittavan biologisen molekyylin hapettamiseen anodilla, ja vapautuvien elektronien muodostaman virran mittaukseen elektrodien välillä. Yleinen hapettumisreaktio esitellään kaavassa (2.2)



jossa  $Re$  on molekyylin pelkistynyt muoto,  $Ox^{+n}$  sen hapettunut muoto ja  $ne^{-}$  reaktiossa vapautuvat elektronit.

Elektrodien potentiaalien eroa voidaan kasvattaa ulkoisella jännitelähteellä. Kun anodin potentiaalia nostetaan, hapettumisreaktiot elektrodilla kiihtyvät. Jos hapettumisreaktio ei ole tarpeeksi nopea, elektrodi polarisoituu tasapainotilannetta korkeampaan potentiaaliin, ylipotentiaaliin.

Kaikilla molekyyleillä on tietty potentiaali, jossa reaktion saavutettua tasapainotilan molekyylin hapettuneen ja pelkistyneen olomuodon suhde on 1:1. Sähkökemiallisissa mittauksissa tilanne on kaukana tasapainosta, ja mitattavien virtojen suuruudet ilmentävät tasapainotilanteeseen pyrkivien reaktioiden kinetiikkaa. Tieto eri molekyylien tasapainopotentiaaleista sekä niiden hapettumis-pelkistymis-reaktioiden kinetiikasta antaa mahdollisuuden tunnistaa näitä molekyyliä ja niiden konsentraatioita, kun tutkitaan esimerkiksi tuntemattoman liuoksen virta-jännite -riippuvuutta. Tämä luo perustan voltammetrisille menetelmille, jotka esitellään osiossa 2.2.1. [3, 4]

Tärkeä parametri suunniteltaessa mittauskennoa on elektrodeissa käytettyjen materiaalien määräämä veden sähkökemiallinen ikkuna. Veden sähkökemiallinen ikkuna on potentiaaliväli, jossa elektrolyyttiliuoksen sisältämät vesimolekyylit pysyvät vakaina eivätkä osallistu huomattavissa määrin reaktioon. Ikkunan alarajalla veden pelkistymisreaktio kiihtyy ja katodilla muodostuu vetykaasua. Ylärajalla puolestaan veden hapettumisreaktio kiihtyy ja anodilla muodostuu happikaasua. Koska vettä on elektrodin läheisyydessä ylenmäärin ja reaktio on nopea, elektrodeja ei voida polarisoida enempää, ja ulkoisen jännitteen suurentaminen johtaa vain vety- tai happikaasun

muodostumisreaktion kiihtymiseen. [5]

Vesi-ikkuna ei ole absoluuttinen, vaan se kuvaa aluetta, jolla käytännössä on mahdollista suorittaa mielekkäitä mittauksia. Ikkunan suuruus riippuu käytetyistä elektrodimateriaaleista. Yleisesti käytettyjen elektrodimateriaalien, kuten platinan ja iridiumoksidin vesi-ikkuna ilmoitetaan olevan noin  $-0,6 - 0,8$  V, kun potentiaalia verrataan Ag|AgCl -elektrodiin. [6] Uusilla elektrodimateriaaleilla kuten boorilla seostetulla timantilla vesi-ikkuna saadaan laajennettua jopa  $-0,75 - 2,3$  V:iin [7]. Vesi-ikkuna määrittää suoraan sähköisesti havaittavien molekyylien joukon eli molekyylit, jotka haperuttuvat merkittävän nopeasti vesi-ikkunan ylärajaa matalammissa potentiaaleissa, ja ovat täten sähköisesti aktiivisia. Molekyylit, jotka eivät haperu suoraan vesi-ikkunan potentiaaleissa, voidaan havaita epäsuorasti esimerkiksi päällystämällä elektrodi entsyymillä, joka hajottaa molekyylin irrottaen siitä jonkin sähköisesti havaittavan osan, kuten vetyperoksidin.

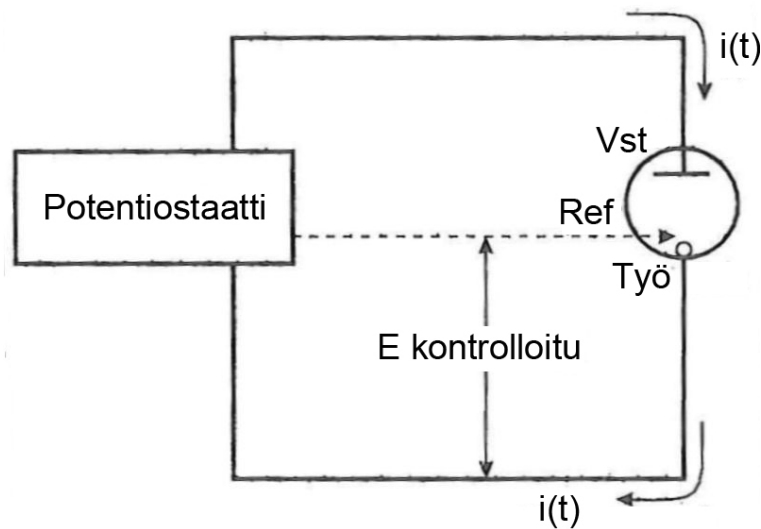
## 2.2 Yleiset sähkökemiallisten reaktioiden mittaus-tavat

Sähkökemiallisessa kennossa tapahtuvia reaktioita voidaan käyttää hyväksi välittäjäaineiden havainnoinnissa, sillä havainnoitavan molekyylin hapettumisesta syntyvä virta on tietyissä oloissa suoraan verrannollinen molekyylin konsentraatioon. Yleensä reaktioissa seurataan elektrodien jännitteen ja virran suhdetta muuttuvissa oloissa tai sähkövirran muutosta tietyllä potentiaalitasolla. Edellä mainittuja tekniikoita kutsutaan voltammetrisiksi menetelmiksi ja jälkimmäisiä amperometrisiksi. [2] Amperometriset mittaustulokset ilmaistaan amperogrammeilla, joilla kuvataan virran käyttäytymistä ajan funktiona. Voltammetriset mittaukset voidaan ilmaista voltammogrammeilla, joissa virta kuvataan jännitteen funktiona.

### 2.2.1 Voltammetria

Voltammetrisille menetelmille yhteistä on vaihteleva jännite ja tästä seuraavan virtaprofilin seuraaminen, mikä kertoo nopeudesta, jolla reaktio etenee tasapainotilaa kohti. Normaalisti mittausta suoritetaan kolmen elektrodin systeemissä, joka koostuu työelektrodista, vastaelektrodista ja referenssielektrodista. Jännite muodostetaan työelektrodin ja referenssielektrodin välille, ja anodilla tapahtuvasta havaittavan molekyylin hapettumisesta seuraava virta mitataan työelektrodin ja vastaelektrodin muo-

dostamasta piiristä. Kuvassa 2.1 esitellään kaaviokuva elektrodijärjestelmästä.



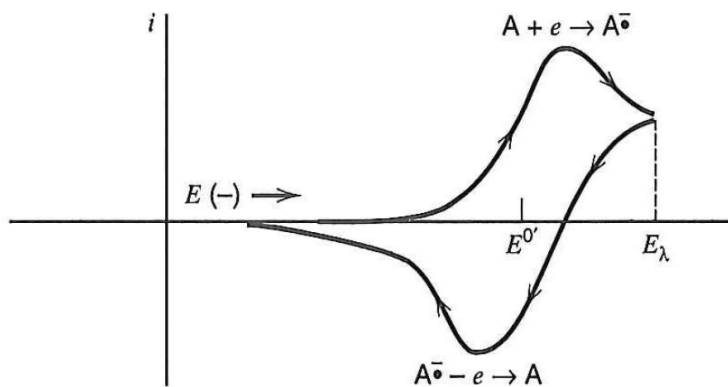
Kuva 2.1: Kolmen elektrodin muodostama sähkökemiallinen kenno. Jännite  $E$  pidetään vakiona työelektrodin (Työ) ja referenssielektrodin (Ref) välillä. Virta mitataan työelektrodin ja vastaelektrodin (Vst) muodostamasta piiristä. Jännitteen kontrollointi ja virran mittaaminen suoritetaan potentiostaatilla, jollainen esitellään tarkemmin osiossa 6.2.1. [8] (muokattu)

Mittaukset voidaan myös suorittaa kahden elektrodin systeemissä, jolloin jännite ja virta muodostuvat saman elektrodiparin välille. Tämä on mahdollista erityisesti silloin, kun syntyvä virta ja tästä seuraava jännitehäviö ovat molemmat pieniä, mikä toteutuu esimerkiksi mikrokokoisia elektrodeja käytettäessä. [9]

Yleisimmät voltammetriset menetelmät ovat differentiaalipulssivoltammetria (DPV, engl. *differential pulse voltammetry*) ja syklinen voltammetria (CV, engl. *cyclic voltammetry*). DPV-mittaus voidaan suorittaa kahdella tavalla: käytetty jännitemuoto voi muodostua lineaarisesti kasvavasta jännitteestä, jonka päälle summataan jaksottaisesti kanttiaaltopulssi tai kanttiaalto voidaan myös summata jaksottaisesti tasajännitteen päälle, mutta siten että jännite ei pulssin jälkeen laske entiselle tasolle, jolloin seuraava pulssi lähtee korkeammasta potentiaalista. Kummassakin menetelmässä virta mitataan ennen pulssia ja pulssin jälkeen, ja näistä arvoista mitataan erotus. Tästä differentiaalisesta virrasta ja käytetystä jännitteestä muodostetaan DPV-voltammogrammi. [2, 3, 4]

Differentiaalipulssivoltammetrialla voidaan mitata yhtäaikaaisesti monen eri analyytin pitoisuuksia, kunhan näiden hapettumispotentiaalit eroavat tarpeeksi toisistaan. Yksi DPV-mittaus voi vaatia kuitenkin jopa 30 sekuntia, joten se ei sovellu nopeiden ilmiöiden kuten välittäjäaine-erityksen seurantaan sellaisenaan. [3]

Syklisessä voltammetriassa työ- ja referenssielektrodin välinen jännite nostetaan aluksi alarajajännitteestä lineaarisesti tiettyyn ylärajajännitteeseen ja lasketaan tämän jälkeen takaisin alarajajännitteeseen. Käytetty jänniteväli valitaan havaittavan molekyylin sähkökemiallisen ikkunan mukaan. Tyypillinen CV-voltammogrammi on esitetty kuvassa 2.2.



Kuva 2.2: Tyypillinen voltammogrammi. Potentiaalia ajetaan alkujännitteestä ( $E_\lambda$ ) positiiviseen suuntaan. Jännitteen  $E^{0'}$  läheisyydessä hapettumisreaktio alkaa nopeutua. Reaktionopeus saavuttaa huippuarvonsa, jonka jälkeen reaktio muuttuu diffuusionrajoitetuksi. Virran saavutettua tasapainoarvonsa, jännitettä ajetaan negatiiviseen suuntaan, jolloin pelkistymisreaktio alkaa nopeutua. Jos reaktiotuotteet eivät ehdi diffusoitua syklin aikana elektrodin läheisyydestä, virtakäyrien välinen integraali on nolla. [10] (muokattu)

Eri molekyylien hapettumiskäyttäytyminen vaihtelee, vaikka niiden hapettumisjännitteet olisivatkin hyvin lähellä toisiaan. Nämä molekyylit voidaan erottaa toisistaan kuitenkin vertailemalla CV-voltammogrammin näkyvien virtapiikkien muotoja molekyylien tunnettuun käytökseen. [3]

Syklisen voltammetrian ajallinen resoluutio riippuu pyyhkäisyjännitteen nopeudesta. Erityisesti nykyään käytössä olevissa nopean pyyhkäisyn syklisissä voltammetreissa eli FSCV-mittauksissa (*Fast Scan Cyclic Voltammetry*) pyyhkäisy nopeus saadaan kasvatettua satoihin voltteihin sekunnissa, mikä mahdollistaa yhden CV-mittauksen millisekunneissa. FSCV-mittaukset ovatkin hyvän ajallisen resoluutionsa vuoksi yleisesti käytössä välittäjäaineiden havainnoinnissa. Mittauksissa on kuitenkin huomioitava nopeasta pyyhkäisy nopeudesta johtuva suuri kapasitiivinen virta, joka syntyy sähköisen kaksoiskerroksen varaamisesta. Vakionopeudella suoritettavassa pyyhkäisyssä tämä virta on vakio, joka voidaan vähentää havaitusta virrasta, jotta halutut ilmiöt saadaan esille. [3, 4]

## 2.2.2 Amperometria

Amperometrisissä välittäjäainemittauksissa elektrodisysteemin jännite pidetään vakiona ajan suhteen. Jännite asetetaan tasolle, joka riittää seurattavan analyytin hapettamiseen elektrodin pinnalla. Kun jännite pidetään vakiona, voidaan virtaprofilin aikaintegraalista suoraan laskea elektrodin pinnalla elektrolysoituneen analyytin määrä kaavan (2.3) eli Faradayn kaavan avulla.

$$\int I dt = nFm, \quad (2.3)$$

missä  $I$  on nollassa poikkeava virta,  $n$  yksittäiseen reaktioon osallistuvien elektronien määrä ja  $m$  reagoivien molekyylien määrä. [4]

Amperometrian etu moniin muihin tekniikoihin verrattuna on sen erinomainen ajallinen resoluutio. Pinnoittamattomilla elektrodeilla suoritettujen amperometrian resoluutio on käytännössä kiinni mittalaitteiston muista osista, sillä molekyylit hapettuvat elektrodin pinnalla välittömästi eivätkä muodosta siihen adsorptiokerrosta. [4] Pinnoittamattomien elektrodien käyttö amperometriassa johtaa kuitenkin heikkoon selektiivisyyteen, sillä elektrodireaktioihin osallistuvat kaikki käytetyllä jännitetasolla hapettuvat yhdisteet. Amperometrinen elektrodien selektiivisyyden parantamisesta pinnoituksella kerrotaan enemmän kappaleessa 3. Pinnoittamattomiakin elektrodeja voidaan käyttää välittäjäainemittauksissa, mutta tällöin on tiedettävä, että mittaus-tilanteessa syntyy vain kiinnostuksen kohteena olevaa analyyttiä. Tällainen tilanne syntyy esimerkiksi sähköstimulaation seurauksena vapautuvan dopamiinin mittauksessa mediaalisessa etuaivonipussa. [11]

Kaavan (2.3) mukaisesti amperometrisestä mittauksesta on helppoa selvittää reagoineen aineen määrä, kun reagoivien aineiden valenssit tiedetään, mutta tämän tiedon yleistäminen vastaamaan konsentraatioita ei ole kuitenkaan täysin suoraviivaista. Jotta elektrodin kalibroinnista saatava tieto virran ja konsentraation suhteesta pätyisi mittaustilanteeseen, täytyy elektrodin ympärille muodostuvan diffuusiokerroksen olla mahdollisimman samankaltainen molemmissa tilanteissa. [4] Sopivalla kalibroinnilla amperometriaa on kuitenkin pystytty käyttämään esimerkiksi dopamiinin konsentraatioiden mittaamisessa *in vitro* [12].

## Kronoamperometria

Kronoamperometria on amperometrinen tekniikka, jolla jännitettä pidetään aluksi tasolla, jossa tutkittavan analyytin hapettumista ei tapahdu. Tämän jälkeen jännite

nostetaan hetkellisesti hapettumisjännitteen yläpuolelle ja syntyvä virta mitataan tietyn ajan kuluttua pulssista. Kun kaiken elektrodin pinnalla olevan analyytin oletetaan hapettuvan välittömästi, pulssimuotoisen jännitteen synnyttämä hapettumisvirta tasomaisella elektrodilla voidaan ilmoittaa kaavan (2.4) eli Cottrellin yhtälön avulla:

$$i(t) = \frac{nFA\sqrt{DC}}{\sqrt{\pi t}}, \quad (2.4)$$

missä  $A$  on elektrodin pinta-ala,  $D$  analyytin diffuusiokerroin ja  $C$  analyytin konsentraatio. [3]

Kaavasta (2.4) nähdään virran vähenevän kääntäen verrannollisesti ajan neliöjuuren suhteen. Cottrellin yhtälö ei ole kuitenkaan riittävä kuvaamaan kronoamperisissa mitauksissa esiintyvää virtakäyttäytymistä, sillä se ei ota huomioon kaikkien nopeiden jännitepulssien yhteydessä esiintyvää kapasitiivista latausvirtaa. Tämän virran osuus kokonaisvirrasta on tyypillisesti suuri pienillä ajanhetkillä, mutta se vaimenee eksponentiaalisesti, joten ajan kuluessa hapettumisvirtaa alkaa dominoida signaalia. [3, 4]

Mikroelektrodien tapauksessa Cottrellin yhtälö ei enää päde elektrodin geometrian vuoksi sellaisenaan, vaan se muokkautuu kaavan (2.5) mukaiseen muotoon.

$$i(t) = nFADC\left(\frac{1}{\sqrt{D\pi t}} + \frac{1}{r_e}\right), \quad (2.5)$$

missä  $r_e$  on elektrodin säde. Kaavasta nähdään, että elektrodille syntyvä virta sisältää tasomaisesta elektrodista poiketen ajasta riippumattoman vakiovirtakomponentin. [9]

Hapettuminen kuluttaa analyyttiä ja täten muokkaa analyytin konsentraatioprofilia kaavan (2.6) eli Fickin toisen lain mukaisesti:

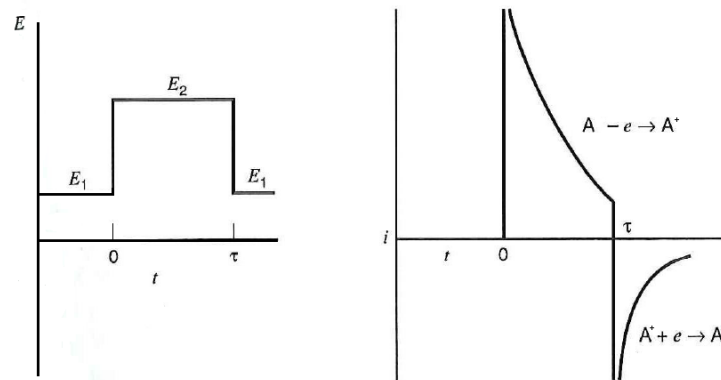
$$\frac{\delta C}{\delta t} = -\frac{\delta J}{\delta x} = D\frac{\delta^2 C}{\delta x^2}, \quad (2.6)$$

missä  $J$  on ionivuo.

Tämän muokkautumisen vuoksi virran mittausaianhetki pyritään asettamaan mahdollisimman lähelle ajanhetkeä, jolloin latausvirran osuus signaalista on merkityksellön. Mikroelektrodeilla tämä aika on tyypillisesti millisekuntien luokkaa. [3]

Kun kronoamperometriseen mittaukseen yhdistetään palautus korkeammasta potentiaalista pitojännitteeseen ja tulkitaan syntyvää virtaprofilia, saadaan tietoa hapetuspelkistys -reaktion kinetiikasta. Tämä parantaa kronoamperometriä selektiivisyyttä, ja kronoamperometriä voidaan käyttää esimerkiksi dopamiinin havaitsemiseen [13, 14]. Kuvassa 2.3 on tyypillinen kronoamperometrinen jänniteprofiili ja tyypillinen

syntyvä virtaprofili.[4]



Kuva 2.3: Kronoamperometriassa käytetty jänniteprofiili ja syntyvä virran käyttäytyminen. Jännite nostetaan ajanhetkellä  $t = 0$  arvosta  $E_1$  yli molekyylin A hapettumisjännitteen arvoon  $E_2$ . Virta saavuttaa huippunsa tänä ajanhetkenä ja lähtee laskemaan diffuusiorajoitettuna. Ajanhetkellä  $t = \tau$  potentiaali lasketaan takaisin arvoon  $E_1$ , jolloin pelkistymisvirta saavuttaa maksiminsa. Hapettumisvirran ja pelkistymisvirran suhteita tutkimalla saadaan tietoa havainnoidusta molekyytilajista. [4] [10](muokattu)

### Amperometrisen signaalin tulkinta välittäjäainemittauksissa

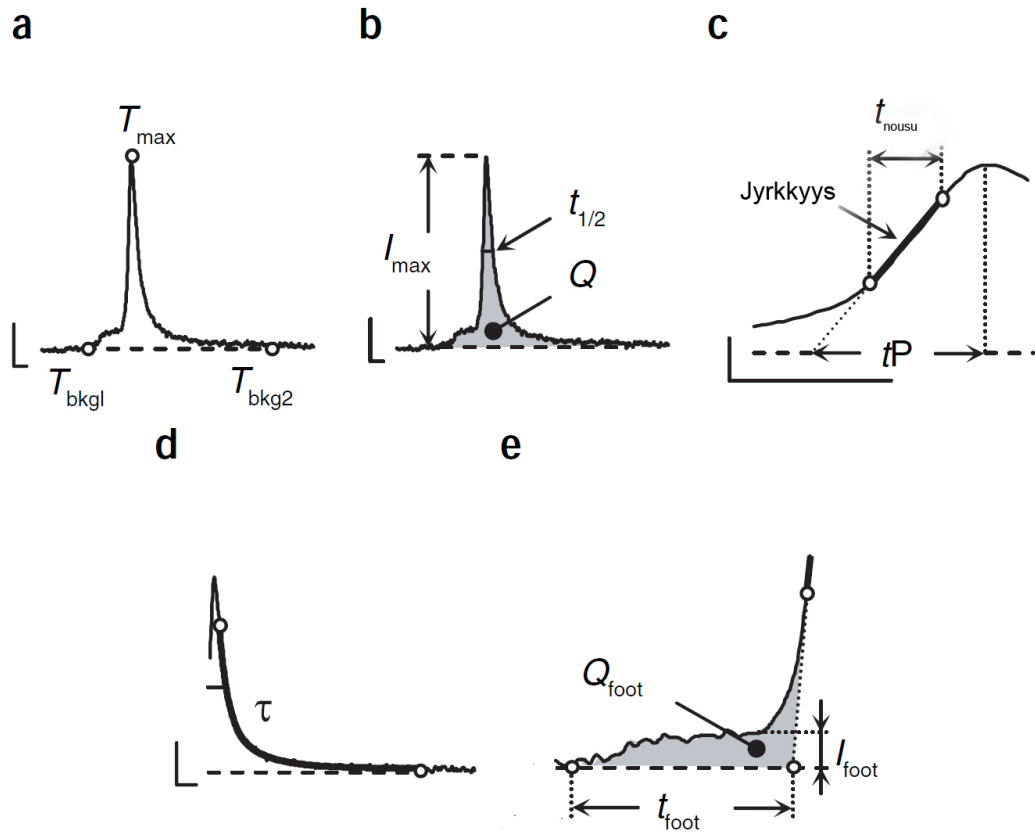
Amperometrinen mittauksien erinomainen ajallinen resoluutio mahdollistaa niiden käytön nopeiden välittäjäainesignaalointien mittauksissa. Tarpeeksi pienillä elektrodeilla amperometriä voidaan käyttää jopa yksittäisistä välittäjäainemolekyyleistä vapautuvien molekyylien mittaamiseen. [15, 16] Näissä mittauksissa kiinnostuksen kohteena on nimenomaan tunnettujen molekyylien kinetiikka, joten amperometrian heikko selektiivisyys ei ole este havainnoille.

Mittauksissa välittäjäaineiden vapautuminen vesikkeleistä nähdään elektrodilla virtapiikkeinä. Nämä piikit sisältävät informaatiota monista solun toiminnoista, esimerkiksi [17]:

- Vapautuva välittäjäainemäärä kertoo solunsisäisestä välittäjäaineiden tasapainosta
- Piikkien esiintymistiheys kertoo signaaloinnin tiheydestä
- Piikkien muodoista voidaan tehdä päätelmiä välittäjäaineita sisältävien vesikkelien ja solukalvon keskinäisdynamiikasta



Esimerkkinä viimeisestä kohdasta on amperometrisessä signaalissa havaittava ennen piikkiä syntyvä virran nousu (*engl. prespike foot, PSF*), joka kuvaa välittäjäaineiden vuotoa, joka syntyy välittäjäainerakkulan ja solukalvon fuusioitumisprosessissa. Fuusioprosessin mekanismeilla ja PSF:n muodolla on todettu olevan yhteys [18], joten sitä tutkimalla voidaan saada tietoa näistä mekanismeista.



Kuva 2.4: Amperometrisen mittauksen piikistä mitattavia parametrejä. Signaalin pohjataso määritellään olevan virran taso ennen ja jälkeen piikkiä eli kuvaajasta a ajanhetkillä  $T_{bkg1}$  ja  $T_{bkg2}$ . Piikin amplitudi  $I_{max}$  määritellään olevan virran erotus signaalin pohjatasosta ajanhetkellä  $T_{max}$ . Piikin leveys  $t_{1/2}$  määritellään aikana, joka kuluu virran nousussa arvosta  $0,5 \cdot I_{max}$  maksimiarvoon ja takaisin arvoon  $0,5 \cdot I_{max}$ . Reaktion aikana siirtyvä varausmäärä  $Q$  saadaan laskemalla pinta-ala pohjatason ja signaalin välillä. Käyrän nousuparametrit lasketaan kohdan c mukaisesti. Käyrään sovitetaan suora, josta lasketaan kulmakerroin, nousuaika  $t_{nousu}$  sekä time-to-peak -aika  $tP$ , joka saadaan laskemalla aika  $T_{max}$ :n ja ekstrapoloidun sovitussuoran ja signaalin nollatason leikkauskohdan välillä. Sovitussuoran päätepisteiden paikkoja ei ole standardoitu. Piikin laskevasta osasta lasketaan aikavakio  $\tau$  eksponentiaaliselle tai tuplaeksponentiaaliselle sovitukselle välille, jossa virta laskee arvosta  $0,75 \cdot I_{max}$  nollatasolle. Piikkiä edeltävästä ”jalasta”(PSF) lasketaan siirtynyt varaus  $Q_{foot}$ , PSF:n kesto  $t_{foot}$  ja amplitudi  $I_{foot}$ . [17] (muokattu)

Kuvassa 2.4 esitellään parametreja, joita yhdestä amperometrisestä piikistä voidaan

laskea. Parametrien laskeminen voi olla työlästä käsin, joten tehtävään on kehitetty algoritmeja. Erityisesti signaalin pohjatason määrittäminen automaattisesti on kuitenkin hankalaa. Pohjatason määrittäminen on toisaalta prosessin kriittisin vaihe, sillä se vaikuttaa kaikkiin muihin laskettaviin parametreihin. [17]

Signaalien parametrisaatiota ei ole vielä käytännössä standardoitu, ja eri julkaisut käyttävät omia menetelmiään esimerkiksi piikin lineaarisovitukselle. [17]

Varsinkin hyvin nopeita signaaleja mitattaessa on syytä huomioida rajoitukset laitteistossa, jolla mittaus suoritetaan. Erityistä huomiota täytyy kiinnittää käytettävän vahvistimen analogisen suodattimen rajataajuuteen sekä AD-muuntimen näytteistystaajuuteen. Signaalin vääristymisen välttämiseksi näytteistystaajuuden tulisi olla vähintään kaksinkertainen em. rajataajuuteen nähden ja vähintään kymmenen kertaa suurempi kuin suuritaajuuksisin mielenkiinnon kohteena oleva signaalikomponentti. Näistä jälkimmäistä vaatimusta voidaan pitää käytännön työssä toimivaksi havaittuna rajoituksena sillä perinteisen Nyqvistin näytteistysteoreeman mukaan kaksinkertainen näytteistystaajuus verrattuna suuritaajuuksimpaan signaalikomponenttiin on riittävä. Sopivan näytteistystaajuuden lisäksi signaalin oikean muodon säilyttämiseksi tulee välttää liiallista digitaalista alipäästösuodatusta, kun amperometrasta signaalia tulkitaan. [17]

# Luku 3

## Sähkökemialliset välittäjäaineanturit

Aivojen välittäjäaineita voidaan pääasiallisesti mitata kolmella eri menetelmätyypillä: mikrodialyysillä, spektroskooppisilla menetelmillä sekä sähkökemiallisesti. [4] Tässä diplomityössä rajaudutaan kuitenkin käsittelemään näistä vain sähkökemiallisia menetelmiä.

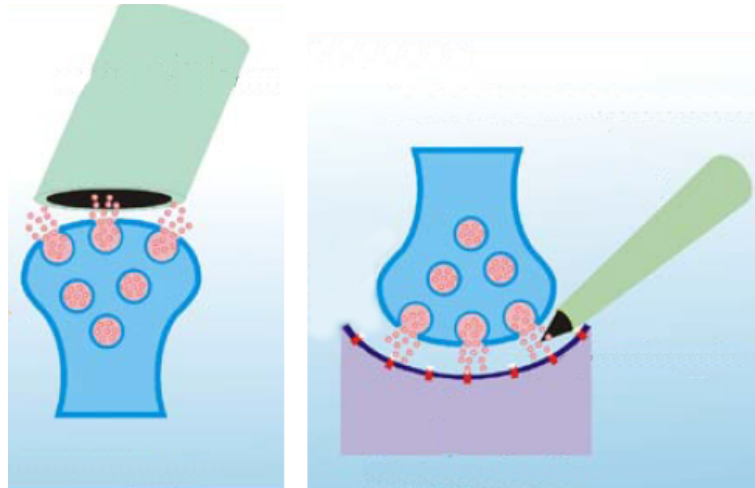
Tässä luvussa esitellään diplomityön kannalta tärkeä pohja välittäjäaineita havaitseville sähkökemialliselle antureilla. Erityisesti huomiota kiinnitetään glutamaattiin, sen ominaisuuksiin ja sen havainnointitekniikoihin.

### 3.1 Välittäjäaineet

Ihmisen hermosto koostuu arviolta 100 miljardin neuronin eli hermosolun muodostamasta verkostosta. Neuronit voivat joko suoraan ohjata tiettyä lihasta tai rauhasta tai olla yhteydessä toiseen neuroniin synapsin välityksellä. Nämä synapsit voivat olla sähköisiä tai kemiallisia. Kemiallisissa synapseissa signaali välittyy neuronilta toiselle välittäjäaineiksi kutsuttujen molekyylien avulla. [19, 20]

Suurin osa ihmisen hermoston synapseista on kemiallisia synapseja. Nämä synapsit muodostuvat presynaptisen neuronin synapsipäätteen ja postsynaptisen neuronin dendriittien tai soman välille. Neuronit eivät ole kosketuksissa toistensa kanssa, vaan niiden välille jää pieni, synapsiraoksi kutsuttu alue, joka on yhteydessä soluväliaineeseen. Presynaptisen neuronin päätteessä on välittäjäaineita sisältäviä rakkuloita eli vesikkeleitä, jotka aktiopotentiaalin seurauksena vapauttavat sisältämänsä välittäjäaineet synapsirakoon eksosytoosilla. Välittäjäaineet diffundoituvat synapsiraon yli

postsynaptisen neuronin solukalvolle, joka sisältää välittäjäaineherkkiä kanavaproteiineja. Välittäjäaineiden sitoutuessa näihin proteiineihin, muuttuu solukalvon läpäisevyys tietyille ioneille. Tällä toiminnalla postsynaptista neuronia voidaan eksitoida, inhiboida tai moduloida. [20] Välittäjäaineiden vapautumisia voidaan seurata sähkökemiallisesti hyvin pienillä elektrodeilla, jotka asetetaan synapsiraon läheisyyteen, tai korvaamalla postsynaptinen terminaali kokonaan elektrodilla. [21] Kuvassa 3.1 esitellään näiden kahden mittauksen periaate.



Kuva 3.1: Kaaviokuva kahdesta mittausasetelmasta, joilla voidaan tutkia synaptista välittäjäainevapautusta. (a) Postsynaptinen pääte korvataan kokonaan elektrodilla. (b) Elektrodi tuodaan synapsiraon läheisyyteen tai sen sisään. Synapsirakoon mahtuvaa elektrodia ei ole tällä hetkellä käytössä. [21] (muokattu)

Välittäjäaineita on useita kymmeniä, mutta asetyylikoliinia lukuunottamatta, ne voidaan pääasiallisesti jakaa kolmeen luokkaan: aminohapot, aminohappojohdannaiset amiinit sekä aminohapoista valmistetut suurikokoiset peptidit. Dalen periaatteen mukaan kukin neuronit vapauttaa vain tiettyä välittäjäainetta, mutta monet neuronit rikkovat tätä periaatetta vapauttamalla joko aminohappo- tai amiini-molekyylejä sekä jotain peptidiä. [22]

Välittäjäaineet voidaan jakaa kolmeen luokkaan myös niiden sähkökemiallisen havaittavuuden perusteella: [4]

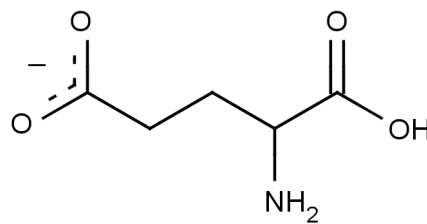
1. Sähkökemiallisesti aktiiviset aineet, jotka voidaan havaita suoraan. Esimerkiksi dopamiini, noradrenaliini ja adrenaliini. Lisäksi suorasti voidaan havaita muita sähköisesti aktiivisia aineita aivoissa kuten askorbaattia ja vetyperoksidia.
2. Epäsuorasti havaittavat aineet, jotka vaativat ne suoraan havaittavaan muotoon

muuntavan entsyymaattisen reaktion. Esimerkiksi glutamaatti, jonka havainnointia käsitellään osiossa 3.3

3. Molekyylit, joita ei voida tällä hetkellä havaita suoraan tai epäsuorasti. Esimerkiksi pienimolekyyliset neuropeptidit.

### 3.1.1 Glutamaatti

Glutamiinihappo on yksi elimistön 20 aminohaposta. Elimistön olosuhteissa glutamiinihappo esiintyy karboksyloituneessa anioni-muodossaan eli glutamaattina, jonka on esillä kuvassa 3.2.



Kuva 3.2: Glutamiinihapon karboksyloitunut muoto, glutamaatti. Aminohapon sivuketju on deprotonoitunut fysiologisen pH:n (7,35-7,45) alueella ja molekyyli on negatiivisesti varautunut. [23]

Glutamaatti on aivojen välittäjäaine, jolla on jo varhain todettu olevan neuroneja eksitoiva vaikutus. [24] Glutamaatin on arvioitu vaikuttavan jopa puolessa aivojen synapseista ja sillä on tutkitusti vaikutus mm. ihmisen muistiin ja liikkumiseen. [25] Toisaalta glutamaatin on todettu voivan toimia myös myrkkynä, ja glutamaatti onkin liitetty esimerkiksi skitsofreniaan, masennukseen ja kaksisuuntaiseen mielialahäiriöön. [26, 27]

Glutamaatti on sivutuote aivojen energiatuotannossa, joten sen pitoisuus koko aivojen alueella on suhteellisen suuri (raportoitu olevan välillä 4-350  $\mu\text{M}$  [28]) ja tasainen. Tämän vuoksi pelkkä glutamaatin havaitseminen neuronin läheisyydessä ei riitä luokittelemaan neuronin glutamatergiseksi eli glutamaattivälitteiseksi, vaan glutamaattia on löydettävä lisäksi neuronin välittäjäainerakkuloista. [29]

Glutamaatin suhteellisen tasainen konsentraatio aivoissa johtikin pitkään siihen, että sitä ei luokiteltu välittäjäaineeksi. Tutkimusmenetelmien kehittyttyä glutamaatin on kuitenkin todettu täyttävän välittäjäaineen neljä päävaatimusta [30]:

1. Aine on lokalisoitunut presynaptisesti eli löydettiin synapseja, joissa oli glutamaattirakkuloita

2. Sitä vapautuu fysiologisen stimuluksen seurauksena konsentraatioina, jotka aikaansaavat postsynaptisen reaktion
3. Keinotekoisesti lisätyllä aineella saadaan aikaan samat reaktiot kuin luonnollisesti esiintyvällä aineella
4. On olemassa mekanismeja, joilla aineen erityys saadaan lakkaamaan nopeasti

Välittäjäainetoiminnan ja energiametabolian lisäksi glutamaatti toimii esiasteena kahdelle muulle aminohapolle: gamma-aminovoihapolle (GABA) ja glutamiinille. Näistä myös GABA toimii välittäjäaineena aivoissa. Glutamaatin monipuolisen toiminnan johdosta sen pitoisuudet aivoissa ovatkin lokeroituneet eri alueille; glutamatergisiin neuroneihin välittäjäaineena ja glia-soluihin sekä GABA-välitteisiin neuroneihin glutamiinin ja GABA:n rakennusaineina. Lisäksi aiemmin mainitusti energiametabolian sivutuotteena glutamaattia löytyy tasaisesti kaikkialta aivoista. [29]

## 3.2 Anturien ominaisuudet

Välittäjäaineiden sähkökemiallinen havainnointi *in vivo* on invasiivinen toimenpide, jossa elektrodeja tuodaan kosketuksiin kudoksen kanssa, ja mahdollisesti implantoitetaan kehoon pitkäksi aikaa. Ihmisen elimistö on hyvin vihamielinen ympäristö implantoitaville materiaaleille, mikä täytyy huomioida elektrodien suunnittelussa. Anturien ominaisuuksia on käsitelty tarkemmin Saira Parmeksen diplomityössä [31], joten tässä niitä esitellään vain lyhyesti.

### Fysikaalinen koko

Pieni koko on varsinkin implantoitavien elektrodien kohdalla tärkeä parametri. Pieni elektrodi ei aiheuta implantoinnin aikana suurta kudovahinkoa, ja elektrodi on mahdollista sijoittaa tarkasti halutun alueen läheisyyteen. Lisäksi pieni koko vähentää elektrodin kapasitanssia ja laskee täten tämän aikavakiota, mikä mahdollistaa nopeiden mittausten suorittamisen. [4]

Ensimmäisten välittäjäaineita havainnoivien anturien halkaisijat olivat satojen mikrometrien luokkaa. Nykyisin metalliset anturit ovat halkaisijaltaan muutamia kymmeniä mikrometrejä ja hiilikuituelektrodit alle kymmenen mikrometrin paksuisia. Hiilinanoputkielektrodien halkaisija voi olla jopa sadan nanometrinen luokkaa. [4, 32]

## Bioyhteensopivuus

Bioyhteensopivuus aivoihin implantoitavien elektrodien tapauksessa koskee sekä implantin turvallisuutta sitä ympäröivän kudoksen suhteen että elektrodin toimintakyvyn säilymistä elimistössä. Elektrodin toimintakyky voi heiketä erityisesti pitkäaikaisissa implantoinneissa, joissa elimistön vierasesinereaktion seurauksena elektrodi kapseloituu gliasolukkoon. Tämä kapseloituminen eristää elektrodin muusta kudoksesta mekaanisesti ja sähköisesti, mikä pahimmillaan estää elektrodin halutun toiminnan. [33]

## Käytetyt materiaalit

Implantoitavien elektrodien materiaalien täytyy täyttää sekä siltä vaadittavat sähköiset että bioyhteensopivuuteen liittyvät ominaisuudet. Yleisiä käytettyjä materiaaleja ovat erilaiset metallit kuten platina, platina-iridium ja ruostumaton teräs. Lisäksi erityisesti pienikokoisten elektrodien tapauksessa käytetään hiilinanoputkia. [6]

## Pinnoitteet

Elektrodien ominaisuuksiin voidaan materiaalivalinnan lisäksi vaikuttaa erilaisilla pinnoitteilla. Sähköisiä ominaisuuksia parannetaan esimerkiksi pinnoittamalla elektrodi sähköä johtavalla polymeerilla kuten polypyrrolilla tai PEDOTilla (poly (etyleenidioksidiofeeni)). Pinnoitteena voidaan käyttää myös mm. iridiumoksidia. [6]

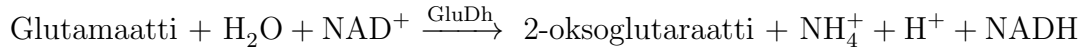
Välittäjäaineita havainnoivien elektrodien kannalta tärkeä ominaisuus on myös anturin selektiivisyys, jota voidaan parantaa erilaisilla pinnoitteilla kuten kationeja läpäisevällä Nafion-pinnoitteella. Erityisesti selektiivisyyttä voidaan parantaa tietyillä entsyymeillä, jotka reagoivat spesifisti vain haluttujen molekyylien kanssa.

## 3.3 Glutamaattia havainnoiva anturi

Glutamaatti ei ole sähköisesti aktiivinen aine, sillä sitä ei saada hapettumaan merkittävällä nopeudella nykyisin sähkökemiallisissa mittauksissa käytetyillä jänniteväleillä. Glutamaatin sähkökemiallinen havainnointi tapahtuukin epäsuorasti hajottamalla glutamaatti entsyymaattisesti tuotteisiin, joista jokin on sähköisesti aktiivinen.

Glutamaatin havainnoinnissa käytetään vaihtoehtoisesti kahta entsyymiä: glutamaattioksidiaasia (GluOx) tai glutamaattidehydrogenaasia (GluDh). Näistä oksidaasin käyt-

tö on yleisempää. Alla olevat reaktiot kuvaavat näiden oksidaasien toiminnan ja reaktioiden eroavaisuudet.



Glutamaattioksideasi irrottaa glutamaatista vetyperoksidi-molekyylin, joka voidaan havaita suoraan hapettamalla. Glutamaattidehydrogenaasi puolestaan pelkistää glutamaatin ja veden läsnäollessa kofaktorientsyymi  $\text{NAD}^+$ :n  $\text{NADH}$ :ksi, joka voidaan myös havaita sähkökemiallisesti suoraan. [28]

$\text{NADH}$ :n suora havainnointi pinnoittamattomalla elektrodilla on ongelmallista sen vaatiman suuren hapetuspotentiaalin ( $>1$  V vs  $\text{Ag}|\text{AgCl}$ ) ja elektrodille näissä potentiaaleissa helposti hapettumistuotteista muodostuvan adsorptiokerroksen takia. Hapetuspotentiaalia voidaan laskea ja adsorptiokerroksen muodostumista voidaan estää erilaisten hapetus-pelkistys -mediaattoreiden avulla. Nämä mediaattorit nopeuttavat  $\text{NADH}$ :n hapetusreaktioita. [34, 28, 35] Mediaattoreiden lisäksi hapetuspotentiaaliin voidaan vaikuttaa elektrodien materiaalivalinnoilla, ja esimerkiksi hiilinanoputkilla päällystettyjen elektrodien on havaittu laskevan  $\text{NADH}$ :n hapetuspotentiaal merkittävästi. [36]

Myös glutamaattioksideasin katalysoimassa reaktiossa syntyvän vetyperoksidin hapetuspotentiaali on suhteellisen suuri ( $\approx 0,6$  V vs  $\text{Ag}|\text{AgCl}$ ), joskin pysyen käytännöllisissä rajoissa, mikä mahdollistaa suoraan vetyperoksidin havainnoimiseen perustuvien anturien valmistuksen. [37]

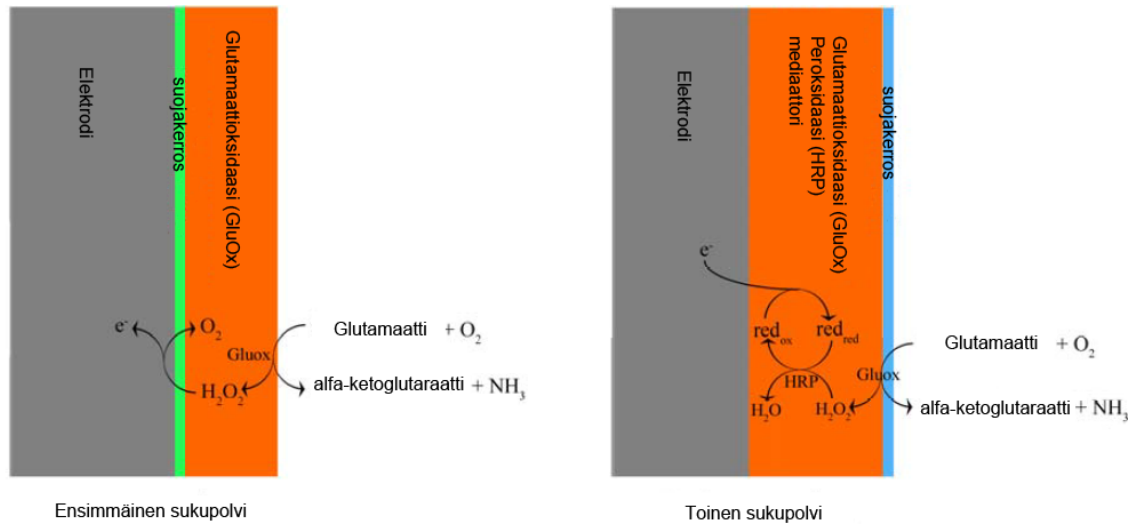
Vetyperoksidin hapetuspotentiaalia voidaan laskea samoilla keinoilla kuin  $\text{NADH}$ :nkin. Yleisesti käytettyjä vetyperoksidin hapetuspotentiaalia laskevia mediaattoreita ovat esimerkiksi piparjuuriperoksidaasia sisältävä osmium-polymeeriverkosto tai preussiniseksi kutsuttu rautaheksasyanoferraatti. [37, 38, 39]

### 3.3.1 Ensimmäisen ja toisen sukupolven glutamaattianturit

Kaikki glutamaattia havainnoivat amperometriset sensorit perustuvat entsyymaattiseen toimintaan, mutta ne voidaan jaotella ensimmäisen ja toisen sukupolven antureihin sen mukaan, miten ne yllä mainitusti eroavat niiden vetyperoksidin käsittelyssä. Ensimmäisen sukupolven anturit havainnoivat vetyperoksidin suoraan hapettamalla, kun taas toisen sukupolven anturit alentavat vetyperoksidin havaitsemispotentiaalia



lisävaiheen avulla. [37] Erot näiden kahden sukupolven antureiden välillä on havainnollistettu kuvassa 3.3.



Kuva 3.3: Havainnekuva glutamaattioksidasiin perustuvien ensimmäisen ja toisen sukupolven anturien toimintatavoista. Ensimmäisen sukupolven anturin elektrodi on päällystetty suojakerroksella, joka läpäisee vetyperoksidia ja ehkäisee häiritsevien aineiden pääsyn elektrodille. Suojakerroksen päälle on immobilisoitu glutamaattioksidasia, joka irrottaa glutamaatista havaittavan vetyperoksidin. Toisen sukupolven antureissa elektrodi päällystetään kerroksella, joka sisältää glutamaattioksidasin lisäksi vetyperoksidin hapetuspotentiaalia alentavaa mediaattoria. Tässä tapauksessa piparjuuriperoksidiaasia sisältävää osmium-polymeeria, jossa piparjuuriperoksidiaasi katalysoi vetyperoksidin pelkistymistä vedeksi ja osmium-ionin ( $\text{Os}^{2+}$ ) hapettumista muotoon ( $\text{Os}^{3+}$ ). Osmium pelkistyy elektrodilla takaisin muotoon ( $\text{Os}^{2+}$ ), aiheuttaen havaittavan virran. Lisäksi kuvaan on merkitty ulompi suojakerros, joka läpäisee anioneita kuten glutamaattia sekä estää anturin likaantumista. [37] (muokattu)

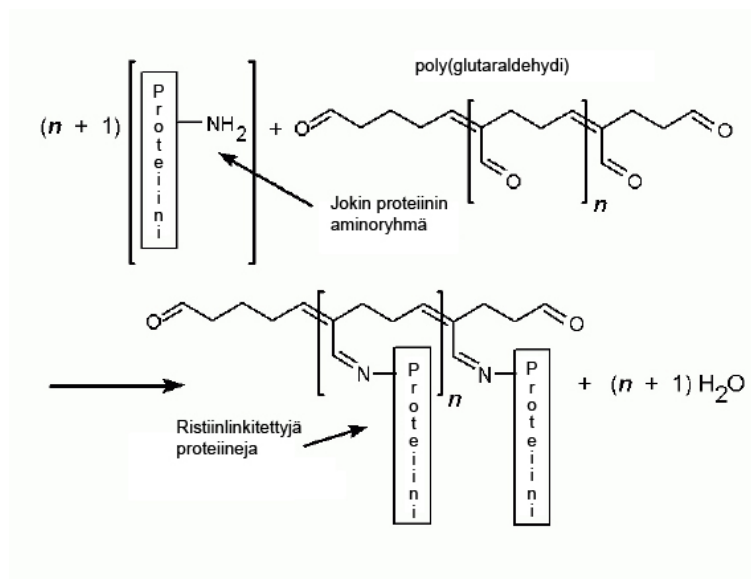
### Ensimmäisen sukupolven anturit

Kuvan 3.3 mukaisesti ensimmäisen sukupolven anturit ovat suhteellisen yksinkertaisia; niissä elektrodi on päällystetty suojakerroksella sekä entsyymikerroksella. Suojakerros lisää anturin spesifisyyttä ja voi sijaita suoraan elektrodin pinnalla tai entsyymikerroksen päällä. Itse elektrodi on normaalisti platinaa tai hiilikuitua platinan ollessa herkempi havainnoille (havaintorajat  $2,5 \mu\text{M}$  hiilikuituelektrodilla ja  $20 \text{ nM}$  platinalla [40, 41]). Tämän diplomityön kokeellisessa osiossa käytetyt glutamaattianturit kuuluvat ensimmäisen sukupolven antureiden luokkaan.

Entsyymikerros koostuu itse glutamaattioksidasista, ristiinlinkittäjästä sekä entsyymiproteiinien stabiloijasta. Tyypillisesti ristiinlinkittäjänä toimii glutaraldehydi ja sta-

biloijana albumiini. Huomattavaa on glutamaattioksideasin suhteellisen suuri määrä parhaiten suoriutuviissa antureissa verrattuna sen katalysointitehokkuuteen. Tämän ylenmääräisen oksidaasin on ajateltu toimivan ylimääräisenä suojakerroksena, joka estää häiriömolekyylien etenemistä elektrodille. [37]

Kuvassa 3.4 on esillä entsyymikerroksen muodostuminen ristiinlinkittäjän avulla. Koska reaktio on yksinkertainen, se on hyvin toistettava, mistä seuraa antureiden tasaiset suoritusarvot. Yksinkertainen ja ohut kalvorakenne johtaa myös toista sukupolvea nopeampiin vasteaikoihin. [37] Toisaalta toisen sukupolven antureiden alemmat käyttöpotentiaalit mahdollistavat ensimmäisen sukupolven antureita suuremman selektiivisyyden.



Kuva 3.4: Ristiinlinkittyminen. Entsyymiproteiini kiinnittyy poly-glutaraldehydin haaroihin amino-ryhmällään. [37] (muokattu)

### Toisen sukupolven anturit

Kuvasta 3.3 nähdään toisen sukupolven anturien rakenteen olevan ensimmäistä sukupolvea monimutkaisempi. Suurin ero on entsyymikerroksessa, joka koostuu glutamaattioksideasista, ristiinlinkittäjistä, peroksidaaseista, hapetus-pelkistys -reaktion mediaattorista sekä joskus selektiivisyyttä parantavasta askorbaattihappo-oksidaasista. Lisäksi anturi päällystetään suojakerroksella, joka sekä parantaa selektiivisyyttä että estää anturin biolikaantumista. [37]

Virran synnyttävä reaktio on ensimmäisen sukupolven antureita monivaiheisempi. Glutamaattioksideasin tuottama vetyperoksidi pelkistetään vedeksi peroksidaasin ka-

talysoimassa reaktiossa, jossa myös mediaattori hapettuu. Mediaattori pelkistyy uudestaan elektrodilla tuottaen havaittavan virran toimien täten elektroninsiirtäjänä. [37]

Erytystä huomiota anturin suunnittelussa kiinnitetään sopivan mediaattorin valintaan, ja sen tulisi täyttää seuraavat vaatimukset:

- Stabiilit pelkistyneet ja hapettuneet olomuodot [42]
- Nopea reagointi peroksidaasin kanssa [42]
- Mediaattorin pelkistymispotentiaalin tulee olla alhainen, ja pH:sta riippumaton [42]
- Tiukka ankkurointi anturin rakenteeseen [37]

Mediaattoreiden käyttö mahdollistaa anturin alhaisen käyttöpotentiaalin, mikä parantaa anturin selektiivisyyttä, koska potentiaali ei sovellu häiriömolekyylien hapettamiseen. Toisaalta reaktion useammat osavaiheet lisäävät vasteaika verrattuna ensimmäisen sukupolven antureihin. [37]

Koska entsyymikerros sisältää kahta eri entsyymiä, jotka kilpailevat samoista ristiinlinkittäjän sitoutumiskohdista, ja koska kerros valmistetaan yleensä yhdessä vaiheessa, entsyymikerrosten toistettavuus on heikompi kuin ensimmäisen sukupolven antureilla. Lisäksi useammasta osasta koostuva kerros voi olla hieman yksinkertaisempaa entsyymikerrosta paksumpi. Yhteenvedo ensimmäisen ja toisen sukupolven antureiden eroista on esitelty taulukossa 3.1, joka sisältää tutkimuksissa mitattuja suoritus- ja parametriarvoja. [37]

	1. Sukupolvi	2. Sukupolvi
Vetyperoksidin käsittely	Suora hapetus	Peroksidaasi+Mediaattori
Käyttöpotentiaali	400 - 700 mV	< 0 V
Glutamaattioksidaasin määrä	Suuri (100-200 U/ml)	Vähäinen ( $\approx 1$ U/ml)
Vasteaika	3-4 s	9 s
Havainnointiraja	0,5 $\mu$ M	5 $\mu$ M
Herkkyys	$\approx 12$ pA/ $\mu$ M	$\approx 2$ pA/ $\mu$ M
Entsyymikerroksen toistettavuus	Hyvä	Heikompi
Selektiivisyys	Hyvä	Erinomainen

Taulukko 3.1: Eri sukupolven glutamaattioksidaasiin perustuvien antureiden erot [37, 43, 44]

### 3.3.2 Entsyymikerroksen immobilisointi ja stabiilius

Yllä kuvatuissa anturiratkaisuissa entsyymikerrosten immobilisointi elektrodien pinnalle suoritettiin ristiinlinkittäjien avulla, mikä on yksinkertaisuutensa vuoksi ollut tekniikkana yleisessä käytössä. Linkityksen seurauksena entsyymi menettää kuitenkin osan aktiivisuudestaan, minkä vuoksi muita immobilisointimenetelmiä on kehitetty. [45, 46]

Immobilisaatiolla pyritään takaamaan entsyymikerroksen vakaus sekä stabiilina pysyvä vaste tietylle analyyttimäärälle. Tehokkaan entsyymikerroksen suunnittelussa voidaan käyttää apuna tiettyjä vaatimuksia [47]:

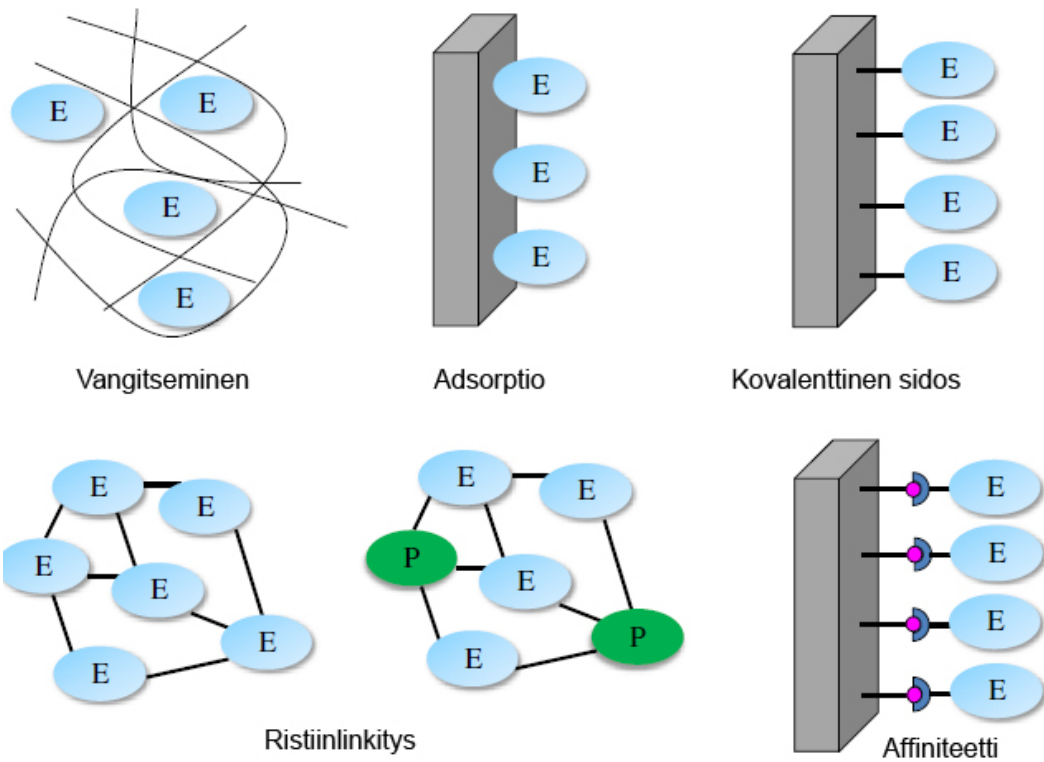
- Entsyymien toiminnan tulee tapahtua mahdollisimman lähellä elektrodin pintaa
- Immobilisaatiotekniikka ei saisi olla haitallinen entsyymien aktiivisuudelle
- Analyytin diffuusio entsyymikerrokseen tulisi olla rajoitettua

Listan viimeisen kohdan noudattaminen mahdollistaa entsyymikerroksen aktiivisuuden heikkenemisen ilman signaalitason muutosta, koska entsyymireaktion kinetiikka ei ole tällöin reaktiosarjan rajoittava askel. [47] Toisaalta tällöin myös rajoitetaan keinotekoisesti anturin vasteaikaa.

Kuvassa 3.5 esitellään eri keinoja entsyymikerroksen muodostamiseen. Näistä keskitytään vangitsemiseen (*engl. entrapment*), sillä tekniikka on käytössä tässä diplomityössä testatuissa glutamaattiantureissa.

Adsorptiossa entsyymit sitoutuvat elektrodin pintaan heikoin sidoksin. Tekniikka on helppo ja entsyymien aktiivisuus heikkenee vain vähän, mutta toisaalta entsyymit ovat mm. herkkiä desorptiolle olosuhteiden muuttuessa. Affiniteetti-sitoutumisen voidaan ajatella olevan hieman paranneltu versio adsorptiosta. Tässä elektrodin pintaan kiinnitetään sopivia molekyyliä, joiden kanssa entsyymi muodostaa suunnatun sidoksen. Tämä suuntaus mahdollistaa entsyymien aktiivisten alueiden paremman kontrollon, mutta toisaalta entsyymien täytyy sisältää sidoksen mahdollistava ryhmä. [46]

Ristiinlinkitys on esitelty aiemmin kuvassa 3.4, ja menetelmänä se on entsyymien aktiivisuutta heikentävä. Entsyymien aktiivisuus kärsii myös entsyymien kovalenttisessä sitomisessa elektrodin pinnalle, vaikka menetelmä tuottaakin vakaan ja nopeasti toimivan entsyymikerroksen. [46]



Kuva 3.5: Eri menetelmiä entsyymikerroksen immobilisoinnille. [46] (muokattu)

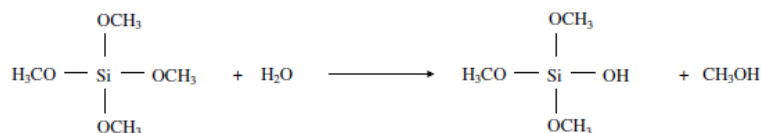
## Vangitseminen

Vangitsemistekniikassa entsyymi immobilisoidaan kolmiulotteiseen matriisiin, joka voi muodostua esimerkiksi sähköpolymerisoidusta kalvosta, amfifilisestä polydimetyylisiloksaani (PDMS) verkosta, silikaattigeelistä tai polysakkaridista. Tällaisessa immobilisaatiossa entsyymit eivät muodosta kemiallisia sidoksia matriisiin, joten ne eivät menetä biologista aktiivisuuttaan, ja menetelmä lisää entsyymikerroksen stabiiliutta. [46]

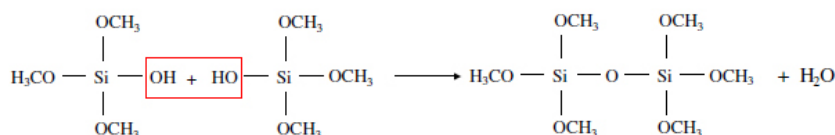
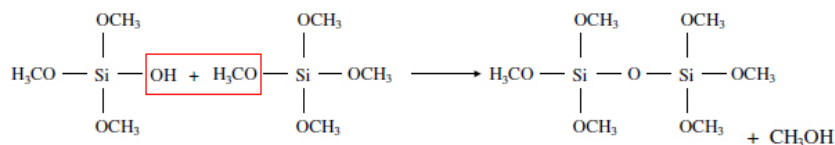
Koska diplomityössä käytettyjen anturien glutamaattioksidaasi on immobilisoitu silikaattigeeliin, esitellään tässä lyhyesti tämän sol-gel -prosessin periaate.

Sol-gel -prosessi perustuu metallien tai puolimetallien oksidien muodostamiseen liuospäristössä hydrolyysin avulla. Prosessin alussa halutun oksidin esiaste hydrolysoidaan sopivassa pH:ssa, jolloin molekyyliin muodostuu hydroksidi-ryhmiä. Näin muokkautuneet molekyylit voivat reagoida keskenään kondensaatioreaktiossa muodostaen happisilloitettuja polymeerejä. Kuvassa 3.6 on esitetty sol-gel -prosessi tetrametoksisilaanilla (TMOS). Lopputulos on huokoinen geeli, johon entsyymi voidaan kiinnittää, ja joka voidaan kuivattaa. [48, 46]

### 1. Esiasteen hydrolyysi



### 2. Kondensaatio



Kuva 3.6: Sol-gel -prosessi TMOS:illa. Aluksi TMOS:in hydrolyysi, jolloin muodostuu Si-OH -ryhmiä. Toisessa vaiheessa kondensaatioreaktion seurauksena molekyylit linkittyvät happisillattuina toisiinsa. [46] (muokattu)

Käytännössä entsyymi kiinnitetään valmistettuun silikaattigeeliin liuottamalla. Geeli voidaan edelleen liittää haluttuun elektrodiin sähköpäälystämällä. [45]

Ongelmia sol-gel -matriiseissa tuottaa entsyymien diffuusio ulos geelistä sen ollessa hydratoituneessa muodossaan, mikä heikentää tällaisen anturin käyttöikä. Kuivuneessa muodossaan entsyymikerros on hyvin stabiili (jopa 95 %:n suoritusasosta säilyy 5 kuukauden kuluttua [45]), mutta kontrolloimaton kuivuminen aiheuttaa entsyymikerroksen kutistumista ja halkeilua. [46] Kuivumista ja kutistumista voidaan kuitenkin hallita lisäämällä geeliin tiettyjä lisäaineita kuten glyserolia tai poly-eteeniglykolia. [49, 50]

# Luku 4

## Virtausdynamikka ja virtausta käyttävät mittauslaitteistot

Tässä diplomityössä suunniteltu laitteisto perustuu oleellisesti virtauskammion käyttöön mittauksissa. Tässä osiossa esitellään sekä virtausdynamikan teoriaa että muutamia yleisiä mittausasetelmia, joihin kuuluu hallitun virtauksen käyttö.

### 4.1 Virtaus ja sen luonne

Virtausdynamikka tutkii fluidien eli leikkausjännityksen alaisena jatkuvasti muokautuvien aineiden käyttäytymistä. Tällaisia aineita ovat nesteet, kaasut ja plasmata. [51]

Fluidin virtausta voidaan kuvata nopeuskenttänä kaavan (4.1) mukaisesti, jolloin virtauspartikkelin nopeus riippuu sen kolmiulotteisesta paikasta ja ajasta.

$$\vec{V} = \vec{V}(x, y, z, t) \quad (4.1)$$

Usein on kuitenkin hyödyllistä tutkia tasaista eli ajasta riippumatonta, yksiulotteista virtausta, jolloin esimerkiksi äärettömän pitkän tasapaksun putken nopeuskenttä voidaan ilmaista kaavan (4.2) avulla. Tällöin virtauksen nopeus on riippuvainen vain etäisyydestä putken seinämästä. [51]

$$v(r) = v_{max} \left(1 - \left(\frac{r}{R}\right)^2\right), \quad (4.2)$$

missä  $r$  on etäisyys putken seinämästä ja  $R$  putken säde.

Kaavasta (4.2) nähdään, että putken seinämän kohdalla, virtausnopeus on nolla. Tämä on virtauksen yleinen ominaisuus, joka tunnetaan termillä no-slip condition; kiinteään ja fluidin rajapinnan vahvojen molekyyllisidosten vuoksi rajapinnassa fluidi ei voi olla liikkeessä kiinteään pintaan nähden. [52]

Fluidien muokkautumisalttiutta leikkausjännityksen alaisena kuvataan viskositeetilla, joka kertoo kuinka suuren muutosnopeuden tai virtauksen tietty leikkausjännitys saa aikaan. Tässä työssä rajaudutaan Newtonilaisiin fluideihin, joiden viskositeetti on riippumaton leikkausjännityksestä kaavan (4.3) mukaisesti:

$$\tau_{yx} = \mu \frac{dv}{dy}, \quad (4.3)$$

missä  $\tau_{yx}$  on tangentialien leikkausjännitys,  $\frac{dv}{dy}$  fluidin muokkautumisnopeus ja  $\mu$  absoluuttinen viskositeetti. Mitä suurempi viskositeetti on, sitä hankalampaa fluidin virtausnopeutta on kasvattaa tangentialisella voimalla. Usein halutaan tarkastella absoluuttisen viskositeetin suhdetta fluidin tiheyteen ja tätä suuretta kutsutaan kinemaattiseksi viskositeetiksi,  $\nu$  [51]

### 4.1.1 Laminaarinen ja turbulenti virtaus

Virtaus voidaan sen käyttäytymisen mukaan jakaa turbulenttiseen ja laminaariseen virtaukseen. Turbulentti virtaus on kaoottista, ajasta ja paikasta monimutkaisella tavalla riippuvaista. Laminaarinen virtaus voidaan ajatella tapahtuvan tasaisesti ja toisiinsa sekoittumattomissa kerroksissa; laminaariseen virtaukseen ruiskutettava väriainepisara nähdään virtauksessa yhtenä viivana. Turbulentissa virtauksessa väriaine leviää nopeasti koko virtauksen alueelle. Turbulentin ja laminaarisen virtauksen nopeuskenttien erot havainnollistuvat kuvassa 4.1.

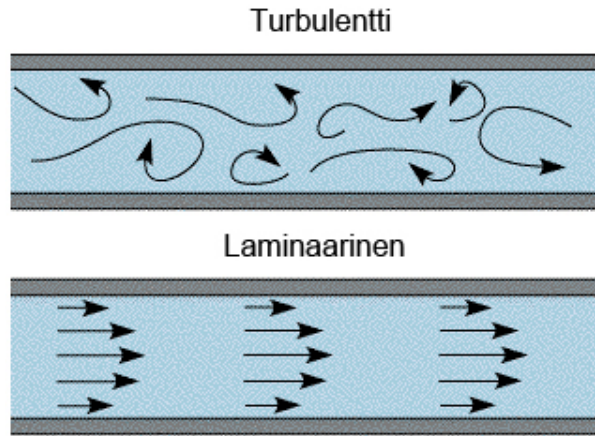
Virtauksen laminaarinen tai turbulenttinen luonne voidaan ennustaa yksiköttömän Reynoldsin luvun avulla, joka kuvaa neste-elementtiin vaikuttavien inertiaalisten ja viskoosien voimien suhdetta. Reynoldsin luku  $N_R$  sylinterimäisessä sileässä putkessa lasketaan kaavan ?? mukaan

$$N_R = \frac{vD\rho}{\mu}, \quad (4.4)$$

missä  $v$  on virtauksen keskinopeus,  $D$  putken halkaisija,  $\rho$  virtaavan nesteen tiheys ja  $\mu$  nesteen absoluuttinen viskositeetti. Laminaarisen virtauksen nopeuskenttä noudattaa yhtälöä (4.2) [54]

Kun  $N_R < 2000$ , virtaus putkessa on laminaarista. Suuremmilla arvoilla virtaus alkaa





Kuva 4.1: Laminaarinen ja turbulentti virtaus. Laminaarinen virtaus voidaan esittää yhdensuuntaisilla virtauslinjoilla toisin kuin turbulentti virtaus, jonka käyttäytyminen on kaottista.[53](muokattu)

saada turbulenteja piirteitä, ja kun  $N_R > 4000$ , virtauksen sanotaan olevan turbulenteista. [54]

Turbulenttia virtausta on hankala hallita toistettavasti, joten virtausta hyödyntävissä mittauksissa pyritään saamaan aikaan laminaarinen virtaus, jonka käyttäytyminen voidaan ennustaa analyttisesti. Seuraavaksi esitellään lyhyesti tällaisia, hydrodynaamisia mittaustekniikoita.

## 4.2 Hydrodynaamiset sähkökemialliset mittaukset

Aiemmin esitellyissä sähkökemiallisissa mittauksissa aineensiirto elektrodille tapahtuu diffuusion avulla. Hydrodynaamisissa systeemeissä aineensiirtoa edistetään pakotetulla konvektiolla eli käytännössä jollain menetelmällä luodulla virtauksella. Konvektio suunnitellaan dominoimaan systeemin aineensiirtoa kaikkialla muualla paitsi äärimmäisen lähellä elektrodin pintaa, jossa diffuusio dominoi aina. Tällaisella järjestelyllä analyytin konsentraatio pysyy vakiona elektrodin läheisyydessä, joten syntyvä vaste saavuttaa vakioarvon poiketen aikariippuvaisista virtavasteista, joita tähän asti on käsitelty. [9]

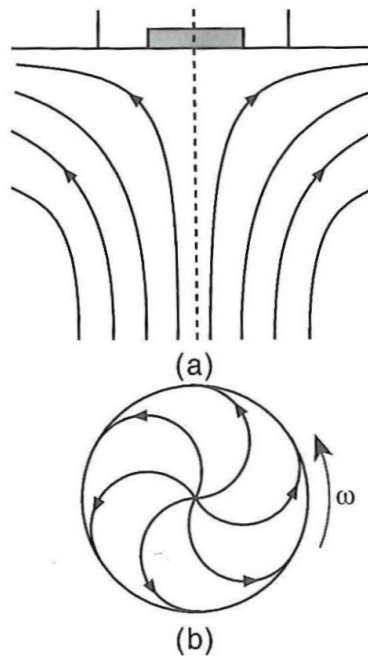
Fickin toista lakia (2.6) voidaan muokata huomioimaan konvektion vaikutus, jolloin yksiulotteisessa tapauksessa saadaan kaavan 4.4 muoto.

$$\frac{\delta C}{\delta t} = D \frac{\delta^2 C}{\delta x^2} - v(x) \frac{\delta C}{\delta x}, \quad (4.5)$$

missä  $v(x)$  on virtaavan fluidin nopeus. Yksinkertaisissa tapauksissa tätä muokattua Fickin toista lakia voidaan käyttää elektrodilla tapahtuvien reaktioiden määrittämiseen, jos  $v(x)$  on tunnettu. [9]

### 4.2.1 Pyörivät elektrodit

Eräs yleinen menetelmä aineensiirron hallintaan elektrodin läheisyydessä on käyttää pyörivää työelektroodia. Tarpeeksi suuressa nestetilavuudessa tapahtuva elektrodin rotaatio aiheuttaa nesteeseen hyvin määritellyn virtauksen. Tämä virtaus syntyy, kun nesteeseen asetettu pyörivä elektrodi samanaikaisesti imee itseensä päin nestettä sekä linkoaa sitä reunoiltaan. Yksinkertaisin tätä periaatetta hyödyntävä mittausasetelmä on pyörivä levyelektrodi (RDE, *engl. Rotating Disk Electrode*), jonka toimintaperiaate on esitetty kuvassa 4.2. [55, 9]



Kuva 4.2: Pyörivä levyelektrodi. (a) Sivukuva pyörivän elektrodin aiheuttamasta virtausprofiilista fluidissa. Nähtävillä imu- ja linkoamisefektit. (b) Fluidin virtaus lähellä kulmanopeudella  $\omega$  pyörivän elektrodin pintaa alasuunnasta katsottuna. [10] (muokattu)

Syntyvä virtauksen Reynoldsin luku määritellään kaavan (4.5) mukaisesti.

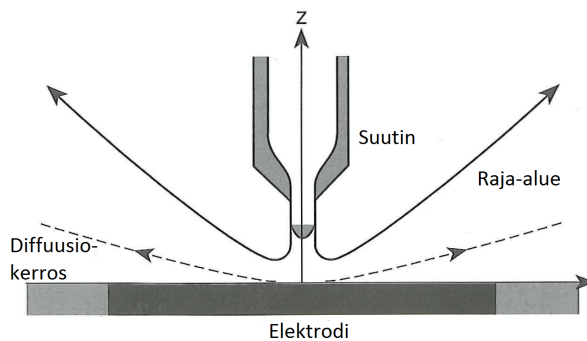
$$N_R = \frac{\omega r^2}{\nu}, \quad (4.6)$$

missä  $\omega$  on elektrodin kulmataajuus,  $r$  elektrodin säde ja  $\nu$  käytetyn nesteen kinemaattinen viskositeetti. [9]

Koska elektrodin pinnalla syntyvät hapettumistuotteet poistuvat virtauksen mukana, RDE-menetelmää ei voida käyttää reversiibelin reaktiokinetiikan tutkimiseen sellaiseenaan. Mittausasetelmaa voidaan kuitenkin muokata ympäröimällä pyörivä levyelektrodi kehäelektrodilla, jota voidaan käyttää virtauksen mukana kulkevien hapettumistuotteiden pelkistämiseen ja tämän pelkistyskinetiikan tutkimiseen. Tätä elektrodiparia kutsutaan pyöriväksi kehä-levy -elektrodiksi (RRDE, *engl. Rotating Ring-Disk Electrode*) [10, 55]

#### 4.2.2 Wall-jet -elektrodit

Wall-jet (WJ)-elektrodit perustuvat myös levymäiseen elektrodiin, mutta WJ-elektrodien tapauksessa konvektio saadaan aikaan kontrolloidulla liuossuihkulla. Menetelmän kaaviokuva on esitetty kuvassa 4.3. [9]

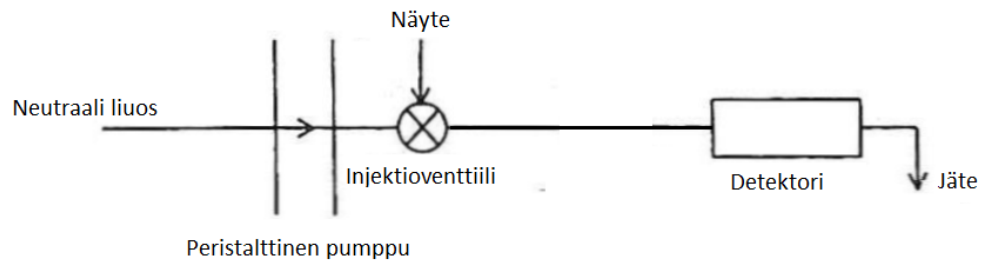


Kuva 4.3: Kaaviokuva WJ-elektrodin toiminnasta. Liuos suihkutetaan kohtisuoraan levyelektrodiin, minkä seurauksena syntyy kuvatuunlainen symmetrinen virtausprofiili. Systeemin aineensiiro on konvektion dominoimaa raja-alueella, jota elektrodin läheisyydessä rajoittaa diffuusiokerros. Koska virtaus on halkaisijaltaan elektrodia huomattavasti pienempi, virtaus ei saavuta elektrodin pintaa tasaisesti, mikä hankaloittaa analyysiä. [9] (muokattu)

WJ-elektrodeja käyttämällä virtausnopeutta voidaan kasvattaa huomattavasti pyörivien elektrodien systeemejä nopeammiksi. Ongelmaksi nousee kuvassa 4.3 näkyvä ilmiö, jossa levyelektrodin halkaisija on käytetyn suihkun halkaisijaa huomattavasti suurempi, ja suihku ei saavuta elektrodin pintaa tasaisesti. Tämä hankaloittaa mittauksen hydrodynaamisen luonteen tarkkaa selvittämistä. [9] Tilannetta ollaan pyritty kuitenkin yksinkertaistamaan suunnittelemalla mikroluokan levyelektrodeja, joilla tätä ongelmaa ei ole, ja suihku saavuttaa elektrodin pinnan tasaisesti. [56]

### 4.2.3 Virtausinjektioanalyysi

Virtausinjektioanalyysi (*engl. flow injection analysis, FIA*) on yleinen analyysimenetelmä, jota käytetään mm. fluoresenssi-, mikrodialyysi- ja sähkökemiallisissa mittaauksissa. FIA:ssa virtausliuokseen injektoidaan hallittu määrä mitattavaa analyyttiä, joka havainnoidaan sopivalla detektorilla, joka sähkökemiallisten mittausten tapauksessa on esimerkiksi jokin edellä esitelty elektrodisysteemi. Kuvassa 4.4 esitellään kaaviokuva yleisestä FIA-systeemistä. [57]

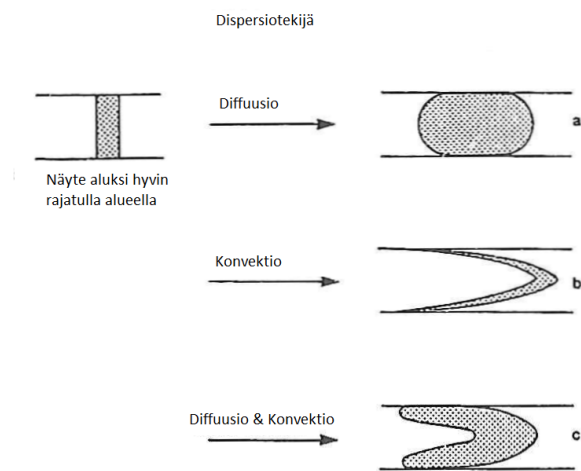


Kuva 4.4: Kaaviokuva virtausinjektio-analyysiin soveltuvasta mittauslaitteistosta. Liuos saadaan virtaamaan peristalttisen pumpun avulla. Analysoitava näyte voidaan injektoida virtaukseen erityisen venttiilin avulla. [57] (muokattu)

FIA-systeemin virtaus saadaan aikaan yleisimmin painovoiman tai peristalttisen pumpun avulla. Painovoiman avulla aikaansaatavaa virtausta voidaan säätää lähdeastian korkeutta muuttamalla tai erilaisilla kuristimilla. Peristalttisen pumpun käyttö mahdollistaa kuitenkin nopeuden tarkemman säätämisen, joskin pitkäaikainen käyttö johtaa käytettyjen letkujen mekaaniseen kulumiseen. [57]

Kun analyytti injektoidaan liuosvirtaukseen, on analyytti aluksi rajautunut tiukasti tietylle alueelle. Konvektion ja diffuusion vaikutuksesta analyytti alkaa kuitenkin nopeasti sekoittua liuokseen. Prosessin periaate on esitelty kuvassa 4.5.

Analyytin dispersio virtausliuoksessa on FIA-tekniikan analyyttinen ongelma. Dispersioon vaikuttaa mm. liuoksen virtausprofiili, käytetyn letkun geometria, lämpötila ja nesteen viskositeetti, joten systeemin käyttäytymisen ennustaminen ei ole yksinkertaista. [57] Vaikka FIA-laitteistoja on käytetty välittäjäaineantureiden karakterisoinnissa [58], tässä työssä päädyttiin erilaisella periaatteella toimivaan laitteistoon, joka esitellään luvussa 6. Tällöin vältetään monimutkaisemman virtauslaitteiston rakentamiselta sekä analyytin dispersion tuomilta ongelmilta.



Kuva 4.5: Periaatekuva injektoitavan analyytin dispersiosta diffuusion ja konvektion vaikutuksesta. Diffuusion vaikutus on isotrooppinen, mutta konvektiolla on selkeästi suuntautunut vaikutus. [57] (muokattu)

# Luku 5

## Työn tarkoitus ja tutkimusmenetelmät

Tämän diplomityön tarkoituksena oli saada aikaan koejärjestely, jolla voidaan selvittää sähkökemiallisen välittäjäaineanturin tärkeimmät suorituskykyyn liittyvät ominaisuudet kuten aikaresoluutio, herkkyys ja stabiilius. Laitteistoa on tarkoitus käyttää tulevaisuudessa ei-kaupallisten, itse valmistettujen välittäjäaineantureiden testialustana.

Työn ensimmäisessä vaiheessa tutustuttiin tieteelliseen kirjallisuuteen sähkökemiallisista välittäjäaineantureista ja niiden toimintamekanismeista. Tämän tiedon perusteella luotiin vaatimusmäärittely, joka kehitettävän laitteiston tulisi täyttää. Tämän jälkeen suunniteltiin määrittelyä täyttävä laitteisto, jolla pystyttiin määrittämään mitattavien antureiden suoritusarvot sekä pitämään anturit toimintakykyisinä mitausten aikana.

Tässä työssä esitellyn laitteiston lisäksi tutkimusprosessin aikana suunniteltiin ja toteutettiin kaksi vaihtoehtoista mittausjärjestelyä sähkökemiallisille antureille, mutta nämä laitteistot todettiin riittämättömiksi määriteltäviin tarpeisiin nähden.

Viimeisessä vaiheessa lopullista laitteistoa testattiin sekä kaupallisilla glutamaattiantureilla että antureista riippumattomilla kokeilla. Näiden mitausten tulosten perusteella arvioitiin laitteiston suorituskykyä sekä määritettiin laitteiston kehityskohteet.

# Luku 6

## Mittauslaitteisto

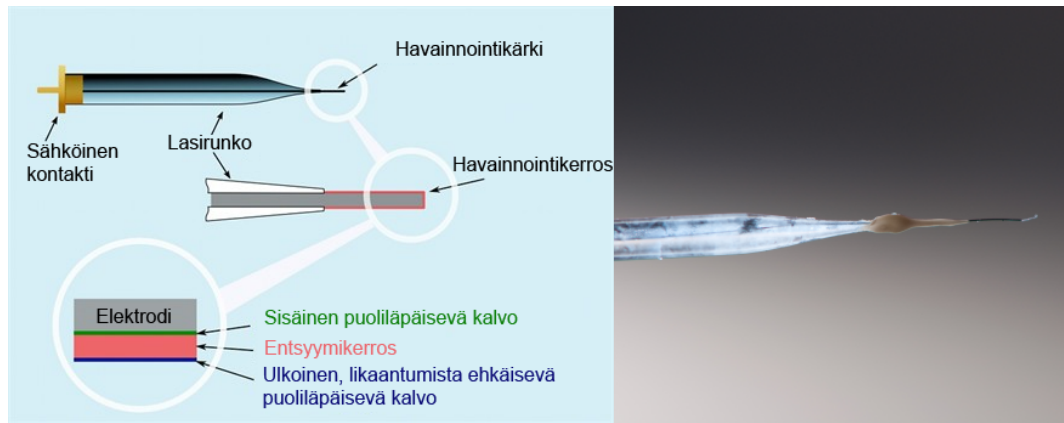
Toteutettu mittauslaitteisto suunniteltiin toimimaan erityisesti Sarissa Biomedicalin (Sarissa) valmistamien glutamaattiantureiden kanssa, koska testialustan rakentamisen lisäksi haluttiin saada tietoa kaupallisten glutamaattiantureiden suorituskyvystä. Tämä mahdollistaa vertailun itse kehitettyjen ja kaupallisten antureiden välillä.

### 6.1 Kaupalliset glutamaattianturit ja niiden asettamat vaatimukset laitteistolle

Sarissan anturit vaativat huolellista käsittelyä ja niiden käyttöolosuhteiden täytyy olla hyvin kontrolloidut. Erityisvaatimukset käsittelyssä johtuvat suurelta osin anturin toiminnan mahdollistavasta glutamaattioksideaasi-pinnoituksesta. Koska kaikki sähkökemialliset glutamaattianturit perustuvat entsyymipinnoitukseen, laitteiston toimivuus Sarissan antureiden kanssa yleistyy toimivuudeksi antureille, joilla on samankaltainen geometria Sarissan antureiden kanssa.

Sarissan antureiden havainnoiva osa koostuu platinalangasta, glutamaattioksideaasi-pinnoituksesta sekä puoliläpäisevästä kalvosta, joka estää esimerkiksi askorbaatin pääsyn elektrodille. Kaaviokuva anturin rakenteesta sekä valokuva anturin havainnoivasta osasta esitellään kuvassa 6.1.

Kun anturit toimitetaan, entsyymipinnoitus on dehydratoituneessa tilassa. Anturien käyttöönotossa entsyymit hydratoidaan mittauksissa käytettävässä suolaliuoksessa, joka esitellään osiossa 6.2.2. Käyttöönoton jälkeen entsyymipinnoitus on herkkä reagoimaan ilman kanssa, ja nestekontaktin häviämistä yli 30 sekunniksi ei suositella anturin toiminnan säilyttämiseksi.



Kuva 6.1: Kaaviokuva Sarissan glutamaattianturin rakenteesta, sekä valokuva yhdestä käytetyistä antureista. [59] (muokattu)

Nestekontaktin säilyttäminen erityisesti aikaresoluution mittauksissa oli päähaaste laitteiston suunnittelussa. Näissä mittauksissa anturi halutaan joko siirtää neutraalista verrokkiliuoksesta analyyttiä sisältävään liuokseen tai muutoin saada anturia ympäröivä verrokkiliuos vaihdettua mielenkiinnon kohteena olevaan liuokseen. Käytännössä jälkimmäinen tapa olisi toteutettavissa esimerkiksi virtaussysteemillä, joka koostuu kahdesta pienestä putkesta, joista toisen läpi virtaa jatkuvasti verrokkiliuosta ja toisen mittausliuosta, ja tätä systeemiä voidaan siirtää nopeasti. Mittauksessa anturi sijaitisi koko ajan paikallaan, mutta sen ympäröivää virtausta voitaisiin vaihtaa virtaussysteemiä siirtämällä. Toinen vaihtoehto liuoksen vaihdon toteuttamiseen olisi käyttää aiemmassa osiossa esiteltyä FIA-tekniikkaa. Käytännön haasteiden vuoksi tässä diplomityössä keskityttiin kehittämään mittausjärjestelyä, jossa itse anturia siirretään verrokkiliuoksesta mitattavaan liuokseen.

Sarissan antureille luvataan viiden päivän toiminta-aika ensimmäisestä käyttöönotosta alkaen. Nestekontaktin säilymisen lisäksi anturit pitää säilyttää mittauksen välissä 2-8 °C:ta, minkä takia joko koko mittausjärjestelmä on pystyttävä siirtämään viileään säilytykseen tai anturin kiinnitys on suunniteltava siten, että anturi voidaan kiinnittää ja irrottaa nopeasti. Tällöin minimoidaan aika, jonka anturi on kosketuksissa ilman kanssa.

Kontrolloitujen säilytysolosuhteiden lisäksi Sarissan anturi vaatii hallittua käsittelyä; fyysiset kosketukset anturin aktiiviseen osaan tuhoavat anturin havainnointikyvyn. Tämä asettaa vaatimuksia laitteiston helppokäyttöisyydelle ja erityisesti anturin liikkumismekanismien tarkkuudelle ja toistettavuudelle. Anturin aktiivisen osan pituus on 2 mm ja halkaisija 50  $\mu\text{m}$ , mikä tulee ottaa huomioon laitteiston mittausalueiden suunnittelussa.



Sarissan glutamaattianturin toimintajännite on 500 mV ja sen tuottama signaali tyyppillisille glutamaattipitoisuuksille nanoampeerien suuruusluokkaa. Mittauslaitteiston täytyy siis pystyä sekä tuottamaan sopiva jännite että mittaamaan syntyvä virta tarpeeksi herkästi. Koska anturista halutaan selvittää sen aikaresoluutio, tarvitaan tieto ajanhetkestä, jolloin anturi siirtyy verrokkiliuoksesta mittausliuokseen ja tämän suhde aikaan, jolloin anturi reagoi mittausliuokseen.

Anturin herkkyuden määrittelyssä ja kalibroinnissa on tärkeää tietää mittausliuoksen sisältämän analyytin tarkka pitoisuus. Käytännössä tämä nousee ongelmaksi, kun verrokkiliuos ja mitattava liuos ovat kontaktissa toistensa kanssa, ja niiden väliset konsentraatioerot tasoittuvat diffuusion myötä.

Yleinen tapa suorittaa sähkökemiallisia mittauksia on käyttää virtauskammiota. Tällöin on kuitenkin huomioitava virtauksen luonne; virtauksen tulisi olla mahdollisimman laminaarinen. Tätä vaatimusta käsitellään tarkemmin osiossa 6.2.3. Virtauksen luonteen lisäksi on huomioitava virtausputkiston tiiveys, sillä esimerkiksi virtauksessa mahdollisesti syntyvät ilmakuplat voivat kiinnittyä anturiin, mikä heikentää mittaus tulosta, ja voi jopa johtaa anturin kuivumiseen.

## 6.2 Suunniteltu laitteisto

Tässä osiossa esitellään diplomityössä kehitetty laitteisto, joka koottiin edellisessä kappaleessa esiteltyjen vaatimusten perusteella. Laitteisto koostuu virtauskammiosta ja siihen kytketystä virtaussysteemistä, aktiivisesta anturipidikkeestä, potentiostaatista sekä mittaustulosten tallentavasta tietokoneesta.

### 6.2.1 Potentiostaatti

Potentiostaatti on laite, jolla voidaan kontrolloida kolmen elektrodin systeemiä eli samanaikaisesti pitää yllä määrättyä jännitettä työelektrodin ja referenssielektrodin välillä samalla mitaten työelektrodin ja vastaelektrodin välillä kulkevaa virtaa. Tätä laitetta voidaan myös hyödyntää amperometrisissä mittauksissa käyttämällä samaa elektrodia sekä vasta- että referenssielektrodina.

Tässä työssä signaalien tuottamiseen ja mittaamiseen käytettiin eDAQin nelikanavaista QuadStat-potentiostaattia sekä kahdeksan kanavan e-corder 821 -datakerääjää, joiden toimintaa säädeltiin tietokoneelta eDAQin Chart- ohjelmiston avulla. Laitteisto mahdollistaa virtojen mittaamisen jopa pikoampeerien luokassa 16-bittisellä tarkkuudella,

joten se kykenee mittaamaan tyypilliset nanoampeerien suuruiset signaalit, joita käytetyt anturit tuottavat. Laitteiston tärkeimmät ominaisuudet on listattu taulukkoon 6.2.1.

Taulukko 6.1: Käytetyn laitteiston sähköiset ominaisuudet [60][61]  
e-corder-821

Sisääntulojen määrä	8
Sisääntuloimpedanssi	$\approx 1 \text{ M}\Omega$
CMMR	96 dB @ 50 Hz
Näytteistystaajuus	100 kHz (kaksi kanavaa käytössä)
Näytteistysresoluutio	16 bittiä (esim. 100 nA virtatasolla mittauspisteiden väli $\approx 3 \text{ pA}$ )
Alipäästösuodatuksen rajataajuudet	1,2,5,10,50,100,200,500,1000,2000 Hz

QuadStat

Mittauskanavien määrä	4
Sisääntuloimpedanssi	$100 \text{ T}\Omega \parallel 1 \text{ pF}$
Sisääntulon bias-virta	$< 1 \text{ pA @ } 25 \text{ }^\circ\text{C}$
Maksimi kontrollijännite	$\pm 2.5 \text{ V } (\pm 10 \text{ V ulkoisella kontrollilla)}$
Antovirta	Maks. $\pm 1 \text{ mA}$

Koska käytetty potentiostaatti ja datakerääjä ovat monikanavaisia, voitiin yhtä näistä kanavista käyttää kontrolloimaan aktiivista anturipidikettä, joka esitellään myöhemmin. Tämän järjestelyn seurauksena anturin liikkeen ajankohta ja anturin tuottaman signaalin syntyhetki voidaan tallentaa tarkasti samalla laitteistolla ja samaan mittausdataan, mikä mahdollistaa anturin aikaresoluution määrittämisen.

Monikanavaisen potentiostaatin valinta mahdollistaa myös tulevaisuudessa mittauksen signaali-kohina -suhteen parantamisen differentiaalisella mittauksella. Tällöin lopullinen signaali muodostettaisiin tietylle molekyylille selektiivisen anturin ja muutoin identtisen, mutta ei-selektiivisen anturin signaalien erotuksesta. Tällä mittaustavalla signaalin taustakohinaa saataisiin vähennettyä. Toisaalta tällainen mittaus asettaa esimerkiksi anturien väliselle etäisyydelle vaatimuksia, joita tähän diplomityöhön suunnitellulla laitteistolla ei voida toteuttaa, koska osiossa 6.2.3 esiteltävän virtauskammion yhdysputken halkaisija on tähän tarkoitukseen liian pieni.

## 6.2.2 Buffer A -liuos

Mittauksissa käytettiin Sarissan ohjeiden mukaista, antureille sopivaa puskuroitua suolaliuosta. Liuoksen pohjan muodosti 10 mM natriumvetyfosfaatti ( $Na_2HPO_4$ )-liuos ( $NaPi$ ), jonka pH säädettiin laimennetulla fosforihapolla ( $H_3PO_4$ ) arvoon 7,4. Tämän jälkeen siihen liuotettiin taulukon 6.2.2 mukaiset pitoisuudet natriumkloridia ( $NaCl$ ), magnesiumkloridia ( $MgCl_2$ ) sekä glyserolia. Sopivat mittausliuokset valmistettiin liuottamalla perusliuokseen glutamaatin natriumsuolaa.

Taulukko 6.2: Buffer A:n koostumus

<i>NaPi</i>	10 mM
<i>NaCl</i>	100 mM
<i>MgCl<sub>2</sub></i>	1 mM
<i>Glyseroli</i>	2 mM

Liuoksen virtauttaminen virtauskammion läpi toteutettiin painovoiman avulla. Mittausliuosta sisältävä dekantteri-lasi kiinnitettiin statiivilla n. 25 cm:n korkeudelle, josta se yhdistettiin 1 mm:n sisähalkaisijan silikoniletkulla byrettiin. Byretti toimi laitteistossa nestepuskurina estäen mahdollisten ilmakuplien pääsyn virtauskammioon. Byretti yhdistettiin virtauskammioon 3 mm:n sisähalkaisijan muoviputkella virtauskammion sisääntuloholkkiin. Virtauksen käynnistäminen tapahtui imemällä mittaruiskulla alipaine 1 mm:n letkuun, jonka toinen pää oli upoksissa mittausliuoksessa, ja kiinnittämällä letkun pää byrettiin. Kuvassa 6.2 nähdään virtausjärjestely.

## 6.2.3 Virtauskammio

### Virtauskammion suunnittelu ja valmistus

Virtauskammio on systeemi, jossa hallitulla virtauksella pyritään saamaan aikaan halutulle mittaukselle otolliset olosuhteet. Usein virtauskammioita käytetään solubiologisissa mittauksissa, joissa mittauksen kohteena olevat solut pidetään elossa virtaavan elatusaineen avulla. Tässä työssä virtauksella luotiin olosuhteet, jossa kaksi nestettä pystyivät olemaan nestekontaktissa ilman mainittavaa keskinäisdiffuusiota.

Työn mittausjärjestely haluttiin rakentaa sellaiseksi, että käytettyä anturia oli mahdollista siirtää verrokkiliuoksesta mittausliuokseen ilman, että anturi menettäisi nestekontaktia. Käytännössä tämä toteutettiin virtauskammiolla, joka koostuu altaasta, läpivirtausputkesta ja näitä yhdistävästä yhdysputkesta. Tällainen kammioiden suunniteltiin Autodesk Inventor -ohjelmistolla ja valmistettiin akryylista Aalto yliopiston



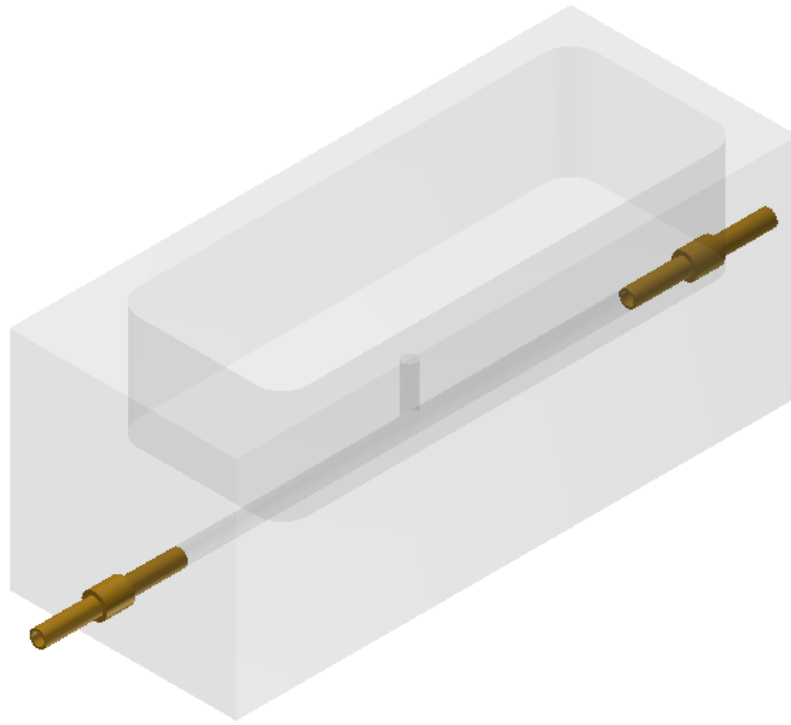
Kuva 6.2: Virtausjärjestely, jossa nähtävillä liuosvarastona toimiva dekantterilasi, byretti, näitä yhdistävä 1 mm:n muoviletku sekä byretistä lähtevä 3 mm:n muoviletku

Elektroniikan laitoksen verstaalla. Virtauskammion CAD-malli on esitelty kuvassa 6.3.

### Laminaarisuus

Tärkeä päämäärä virtauskammion suunnittelussa oli taata kammion läpi kulkevan virtauksen laminaarinen luonne. Turbulenttia virtausta haluttiin välttää erityisesti yhdysputken ja läpivirtausputken yhdyskohdassa, sillä vaihteleva nopeusprofiili aiheuttaa signaaliin kohinaa. Lisäksi pyörteet mittauskohdan läheisyydessä voivat aiheuttaa paikallisia konsentraatiomuutoksia analyytissä, mikä heikentää mittaustuloksen luotettavuutta. Turbulenssi voi myös lisätä diffuusiota läpivirtausputken ja virtauskammion altaan välillä, mikä johtaa mittauksen nollatason vääristymiseen.

Kun mittauksissa käytetyn suolaliuoksen tiheys ja viskositeetti approksimoidaan samoiksi kuin veden vastaavat arvot, saadaan osiossa 4.1.1 esitellyn Reynoldsin luvun (kaava (??)) avulla 3 mm:n halkaisijaltaan olevan kammion läpivirtausputken virtauksen olevan laminaarista vielä  $\approx 6$  m/s nopeuksilla. Koejärjestelystä mitatut virtausnopeudet esitellään tulososiossa, mutta jo suunnitteluvaiheessa 6 m/s nopeuden todettiin



Kuva 6.3: CAD-mallinnus virtauskammioista, jossa näkyvillä allas, virtausputki, yhdysputki sekä holkit, joihin virtausletkut yhdistetään

olevan epätodennäköisen suuri. Käytännössä virtauksen Reynoldsin luku on teoreettisesti laskettua arvoa suurempi, sillä läpivirtausputki on valmistettu poraamalla, mikä jättää putken sisäpintaan turbulenssia lisäävää karheutta. Lisäksi laskuissa jätetään huomioimatta yhdysputken mahdollisesti aiheuttama muutos virtauksen luonteeseen. Nämä vaikutukset on kuitenkin arvioitu tarpeeksi pieniksi, jotta laminaarisuusvaatimus ei vaaraannu.

### **Virtauskammio mittaustilanteessa**

Mittauksissa kammion allas täytettiin Buffer A -liuoksella, ja läpivirtausputken läpi johdettiin mitattavaa analyyttiä sisältävää Buffer A -liuosta. Koska allas ja läpivirtausputki ovat kontaktissa yhdysputken kautta, anturi voidaan siirtää liuoksesta toiseen ilman nestekontaktin häviämistä.

Ongelmaksi kyseisessä järjestelyssä nousee verrokkiliuoksen sekoittuminen mittausti-  
liuoksen kanssa, mitä tapahtuu, jos nestealtaan ja läpivirtausputken välillä vallitsee  
paine-ero. Tasapainotilanteessa, jossa sekoittumista ei tapahdu, altaassa sijaitsevan  
liuoksen aiheuttama hydrostaattinen paine on vakio yhtälön (6.1) mukaan

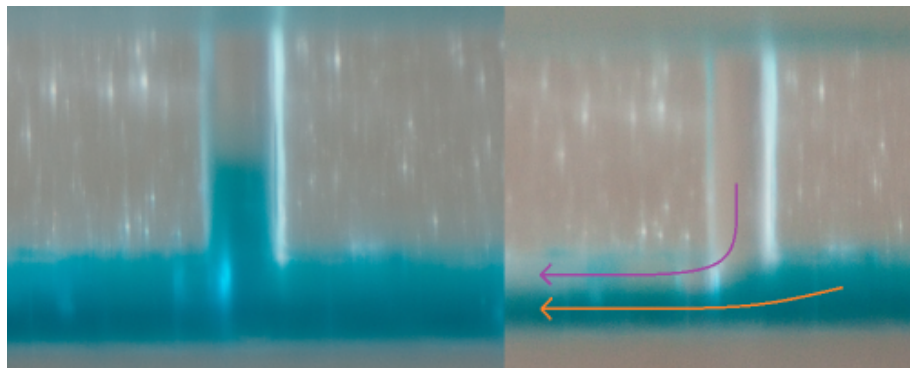
$$p = \rho gh, \tag{6.1}$$

missä  $p$  on paine,  $\rho$  liuksen tiheys,  $g$  putoamiskiihtyvyyys ja  $h$  nestepinnan korkeus.

Bernoullin kaavasta ??

$$p + \rho gh + \rho v^2 / 2 = C, \quad (6.2)$$

missä  $C$  on vakio, nähdään, että samalla korkeudella virtaavan nesteen virtausnopeuden laskiessa, kasvaa nesteen paine. Tällöin mitattavan liuksen virtausnopeutta säättämällä on mahdollista saavuttaa tasapainotilanne, jossa altaan hydrostaattinen paine vastaa virtaavan liuksen sisäistä painetta. Tässä työssä tasapainotilanteen syntyminen varmistettiin värjäämällä virtaava liuos elintarvikeväriä, joka ei häirinnyt mitattavaa signaalia. Tasapainotilanteessa yhdysputkeen muodostui selkeä kirkkaan ja värjätyn nesteen rajapinta. Virtausnopeuden säätö suoritettiin virtauskammion ulostuloputkeen asennetulla ruuvikuristimella. Käytännössä nesteen lähtöaltaan pinnanlaskun aiheuttama hydrostaattisen paineen väheneminen mittauksen edetessä poikkeuttaa systeemiä tasapainotilasta, minkä takia virtausnopeutta säädettiin tasaisin väliajoin tasapainotilan säilyttämiseksi. Tyypillinen poikkeama tasapainotilasta on esillä kuvassa 6.4, jossa altaasta virtaava suolaliuos on selkeästi erillään virtaavasta mittaustiuksesta.



Kuva 6.4: Yhdyskäytävä tasapainotilassa ja epätasapainotilassa. Kuvaan piirretyt nuolet kuvaavat virtauksen suuntaa. Nähtävissä myös virtauksen selkeä kerrostuminen, joka viittaa virtauksen laminaariseen luonteeseen.

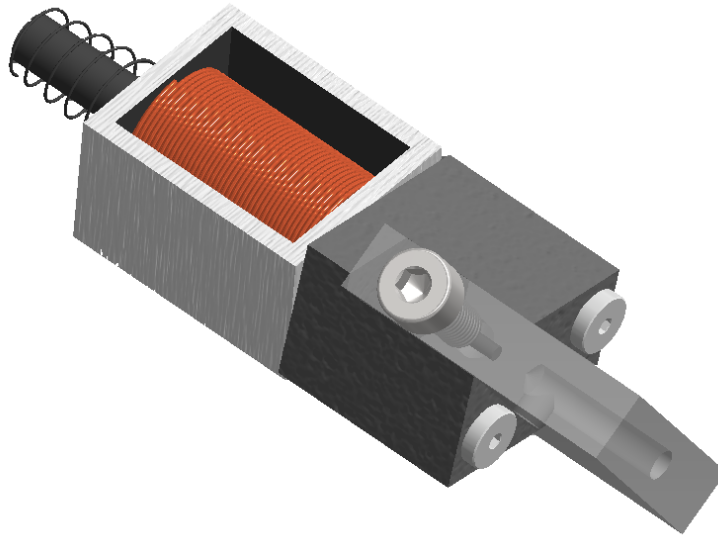
#### 6.2.4 Aktiivinen anturipidike

Anturipidikkeelle asetettiin tässä työssä neljä vaatimusta:

1. Pidikkeen on kyettävä nopeaan, noin 1 cm:n laajuiseen edestakaiseen liikkeeseen
2. Ohjaussignaalin ajanhetki täytyy olla tallennettavissa

3. Anturiin täytyy pystyä muodostamaan sähköinen kontakti
4. Anturin irrotus ja kiinnitys pidikkeeseen on oltava nopeaa anturin dehydraation välttämiseksi

Nämä vaatimukset täyttävä aktiivinen anturipidike suunniteltiin Autodesk Inventor -ohjelmistolla. Tarvittavat osat solenoidia lukuunottamatta työstettiin osiossa 6.2.3 mainitulla verstaalla. Kuvassa 6.5 nähdään anturipidikkeen rakenne.



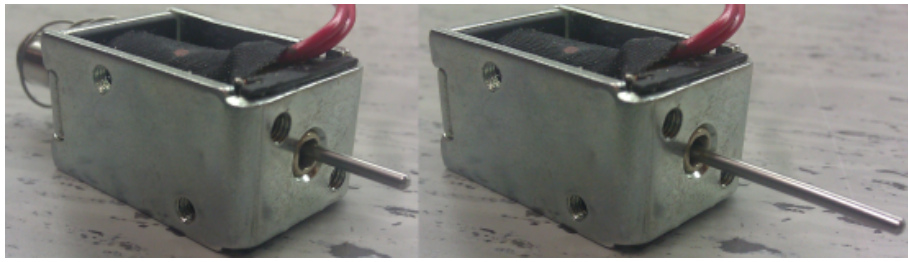
Kuva 6.5: Koottu anturipidike

Anturin liikkeen toteuttavaksi osaksi valittiin solenoidi. Solenoidi on tiukasti kääritty käämi, jonka sisätilaan muodostuu homogeeninen magneettikenttä virran kulkiessa käämin läpi. Solenoidia voidaan käyttää siis sähkömagneettina, jolla saadaan aikaan nopeaa liikettä. Solenoidien haittapuoli on niiden vaatima suuri virran määrä.

Työssä käytetyksi solenoidiksi valittiin PED:n valmistama 12 voltin käyttöjännitteellä toimiva työntötyyppinen solenoidi palautusjousella (PED - 44A-220-621-620). Kuvassa 6.6 nähdään käytetty solenoidi lepo- ja toimintatilassa.

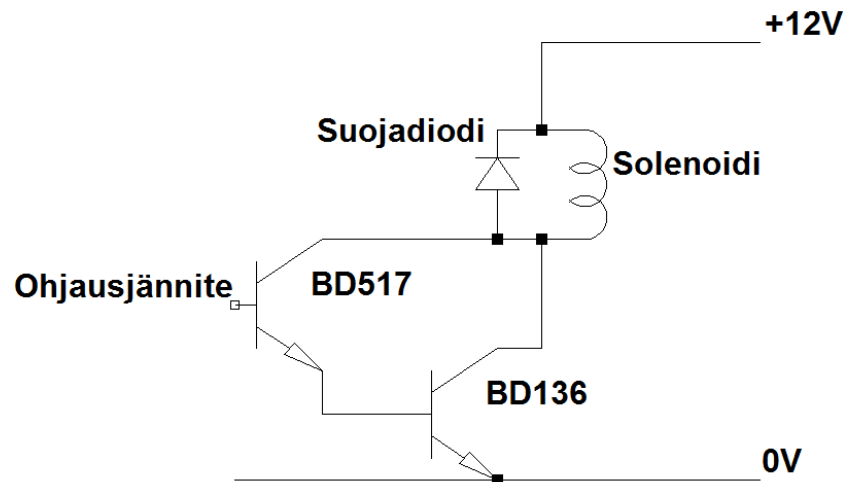
12 voltin käyttöjännitteellään solenoidin mitattiin tarvitsevan  $\approx 240$  mA virtaa. Työssä käytetty QuadStat -potentiostaatti kykenee taulukon 6.2.1 mukaisesti vain 10 V jännitteeseen ja 1 mA virtaan, joten sitä ei voitu suoraan käyttää solenoidin ohjaukseen.

Solenoidin ohjaukseen tarvittava virta otettiin verkkovirralla toimivasta 12 voltin tasavirtamuuntajasta. Muuntajan kytkimenä toimi kahden transistorin muodostama Darlingtonin transistori, ja tätä kytkintä ohjataan yhdellä potentiostaatin kanavista. Kak-



Kuva 6.6: Solenoidin männän liike lepotilasta ääriasentoon.

si transistoria tarvitaan, koska vaadittu virtavahvistus ylittää tyypillisen transistorin vahvistuksen arvon ( $\approx 100$ ). Piirikaavio kytkennästä on esillä kuvassa ??.

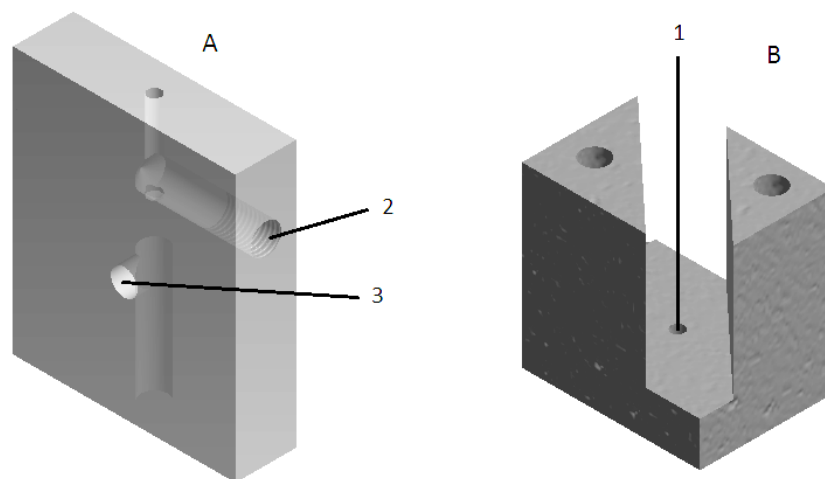


Kuva 6.7: Piirikaavio solenoidin ohjauskytkennästä. Npn-transistorit BD517 ja BD135 muodostavat Darlingtonin transistorin, joka mahdollistaa suuren virtavahvistuksen. Kun ohjausjännite nostetaan kynnyksjännitteen ( $\approx 1,4 \text{ V}$ ) yli, kytketty solenoidi päälle. Suojadiodi suojaa transistoreita vastakkaissuuntaiselta pulssivirralla, joka syntyy, kun ohjausjännite lasketaan kynnyksjännitteen alle ja solenoidivirta purkautuu.

Anturi kiinnitettiin solenoidin mäntään ruuvilla kuvassa 6.7A mallinnetun liitinpalan avulla. Lisäksi solenoidiin kiinnitettiin mallinnuksen 6.7B mukainen ohjauspala, joka estää männän sivuttais- ja rotaatioliikettä. Näistä varsinkin sivuttaisliike on merkittävää, sillä kuten kuvasta 6.6 nähdään, solenoidin männän ulostuloaukko on merkittävästi suurempi kuin männän halkaisija. Koska mäntä liikkuu vapaasti solenoidin sisällä, suunniteltiin kuvan 6.7 kappaleet A ja B myös estämään männän hyppääminen ulos käämin sisältä palautusjousen voimasta, kun piiri kytketään pois päältä.

Itse anturi kiinnitettiin ohjauspalaan anturin ja liitinkappaleen geometriaan sopivalta sähköliittimellä, johon juotettiin sähköjohto kuvassa 6.7A näkyvän reiän 3 kautta. Liitinkappale valmistettiin tässä työssä toimimaan yhdessä Sarissan anturin kanssa,

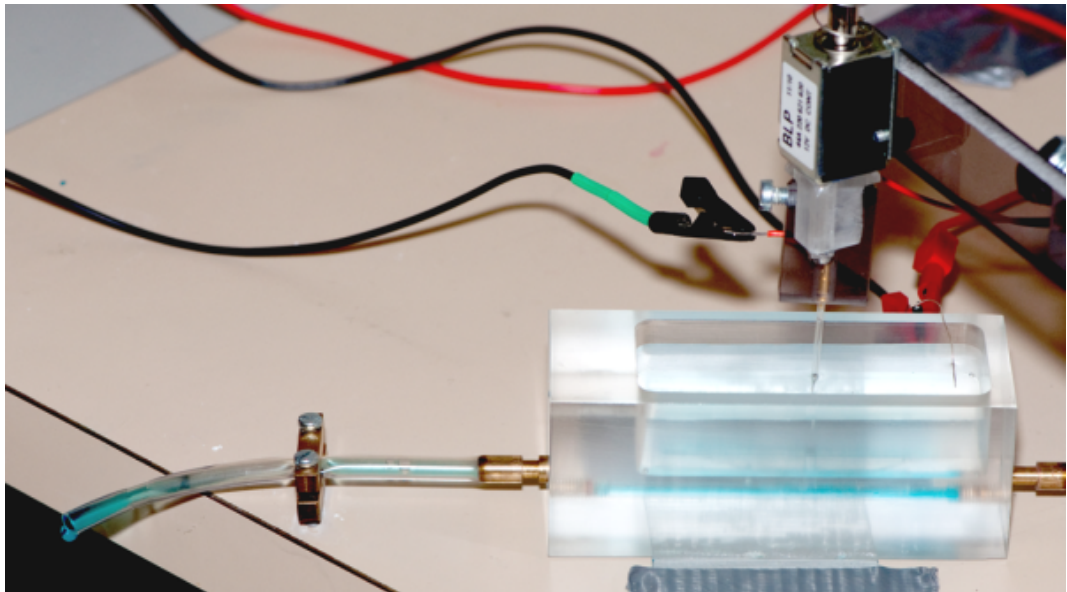




Kuva 6.8: Anturipidikkeen liitin- (A) ja ohjauspala (B). Ohjauspala kiinnitetään ruuveilla siten, että aukko 1 asettuu keskelle männän ulostuloaukkoa. Liitinpala kiinnitetään mäntään ruuvilla aukon 2 kautta. Liitännät ovat nähtävillä kuvassa 6.5

mutta helpon työstettävyytensä ansiosta sopiva liitinkappale on yksinkertaista valmistaa muidenkin geometrioiden antureille.

Mittaustilanteessa anturipidike kiinnitetään mikrometriruuvitasoon, jolla anturi voidaan asetella virtauskammioon siten, että anturi sijaitsee suoraan yhdysputken päällä. Anturin korkeus säädetään sopivaksi kytkemällä aktiivinen anturipidike päälle, jolloin se asettuu alimpaan tasoonsa. Tämän jälkeen anturin aktiivinen osa asetetaan mikrometriruuvitason avulla virtausputken korkeudelle. Kuvassa 6.8 on esitelty pidikkeeseen kiinnitetty anturi aseteltuna virtauskammioon.



Kuva 6.9: Mittausasetelma, jossa nähtävillä virtauskammio, anturi kiinnitettynä anturipidikkeeseen, virtausnopeuden säätöön käytetty kuristin sekä poistoletku.

# Luku 7

## Mittaukset ja tulokset

### 7.1 Anturin liikkeen karakterisointi

Mittauslaitteiston toimintaan kuuluu olennaisesti siihen kiinnitetyn anturin liike virtauskammion altaan ja mittauspisteen välillä. Tulosten ajallisen tulkinnan kannalta on tärkeää tuntea aika, joka anturilla kuluu näiden kahden pisteen väliseen siirtymiseen. Tämän viiveen tunteminen on myös tärkeää, kun laitteistolla halutaan tuottaa lyhyitä mittausjaksoja, joissa viiveen osuus ohjausjännitepulsstin kestossa on huomattava.

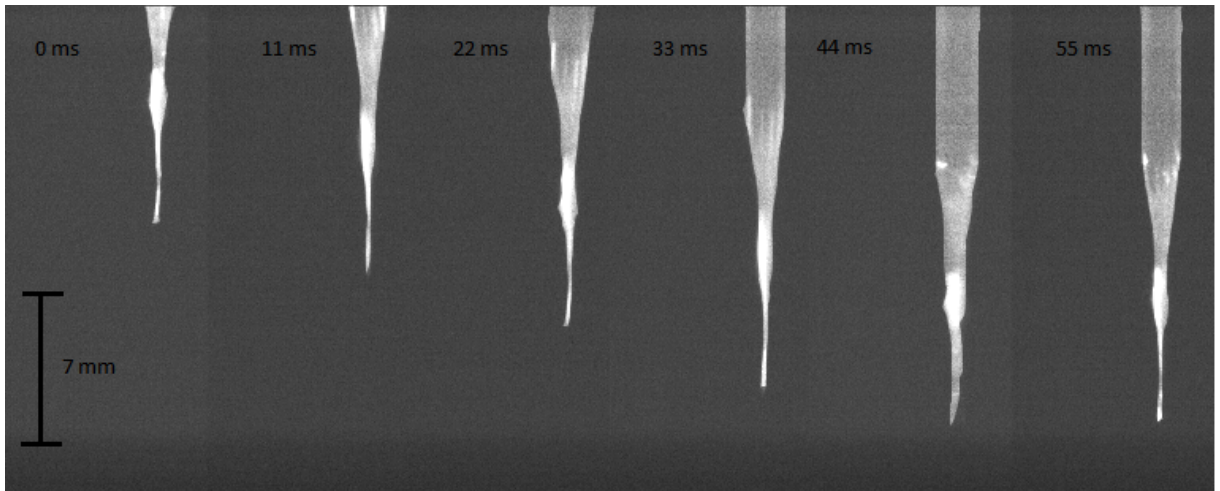
Lisäksi on syytä olettaa, että anturin liike ei ole puhtaasti vertikaalista, koska solenoidin tuottaman heikon voiman vuoksi anturipidike suunniteltiin hieman väljäksi. Virtauskammion yhdyskäytävän pieni halkaisija ei kuitenkaan salli kovin suurta poikkeamaa liikkeen horisontaalisessa suunnassa, joten anturin liikkeen sivuttais-komponentti on hyödyllistä tuntea.

Anturin nopeuden ja liikkeen poikkeamien karakterisoimiseksi anturin liikettä kuvattiin Basler 602f -suurnopeuskameralla, kun se oli kiinnitetty anturipidikkeeseen, jota ohjattiin eripituisilla jännitepulsseilla. Kameran kuvausnopeus oli noin 90 kuvaa sekunnissa eli kahden kuvan välinen aika oli noin 11 millisekuntia. Kuvien analysointi suoritettiin VirtualDub -ohjelmistolla.

#### 7.1.1 Anturin nopeus ja kulkema matka

Kuvassa 7.1 on esillä kuvasarja yksittäisestä anturin liikkeestä ääriasennosta toiseen. Liike kuvattiin jännitepulsstin ollessa 100 ms mittainen. Siirtymisaika ja anturin liikuma matka pysyivät vakioina käytetyistä pulssinpituuksista riippumatta, ja toisto-

kertojen välillä. Anturin nopean liikkeen ja käytetyn kameran rajoitetun kaappausnopeuden seurauksena siirtymäaika ei voitu määrittää täysin tarkasti, mutta sen arvioitiin olevan  $40 \pm 5$  ms. Kuvista voitiin myös laskea anturin kulkema matka käyttäen anturin tunnettuja dimensioita mittakaavana.



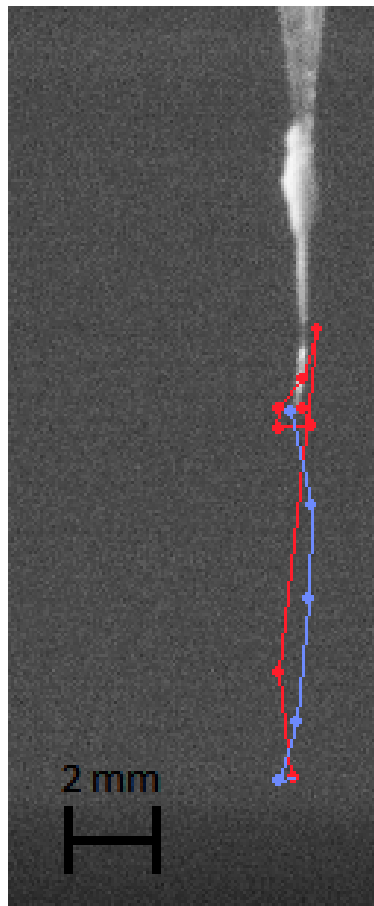
Kuva 7.1: Kuvasarja anturin liikkeestä. Mittakaava saatiin mittaamalla osa näkyvästä anturista. Anturilla liike levosta mittaussyvyyteen kesti noin 40 millisekuntia ja anturin kulkema matka oli noin 8,6 millimetriä.

Myös anturin siirtymäaika jännityneestä tilasta lepotilaan pystyttiin arvioimaan vastaavalla menetelmällä. Anturin poistuminen mitta-alueelta oli nopeaa ja kesti alle 20 millisekuntia. Palautusmekanismina toimiva mekaaninen jousi aiheutti liikkeeseen kuitenkin pientä värähtelyä ennen anturin asettumista lepotilaan. Tämän mekaanisen värähtelyn ominaisuuksia käsitellään seuraavassa osiossa.

### 7.1.2 Anturin liikkeen poikkeamat

Anturin liikerata yksittäisessä mittauksessa on esillä kuvassa 7.2, johon on merkitty anturin pään paikka liikkeen aikana. Vaikka liikeradassa esiintyy hieman stokastisuutta toistojen välillä, pysyy liikerata hyvin samankaltaisena.

Anturin liikerata poikkeaa ideaalisen vertikaalisesta liikkeestä hieman. Poikkeava sivuttaisliike on kokonaisuudessaan noin millimetrin luokkaa. Kuvasta 7.2 nähdään myös ero anturin liikkeessä mittaussyvyyteen verrattuna paluussa lepotilaan; solenoidin magneettikentällä aikaansaatu liike loppuu nopeasti ja anturi saavuttaa vaakan tasapainotilan, mutta mekaaninen jousi aiheuttaa yllä mainitusti värähtelyä ja viivettä anturin lepotilaan paluuseen.



Kuva 7.2: Yksittäinen anturin suorittama liike. Siniset pisteet kuvaavat anturin pään paikkoja anturin liikkuesssa mittaussyvyyteen. Punaiset pisteet kuvaavat vastaavasti anturin paluuta lepotilaan. Samanväristen pisteiden välinen aika on noin 11 millisekuntia.

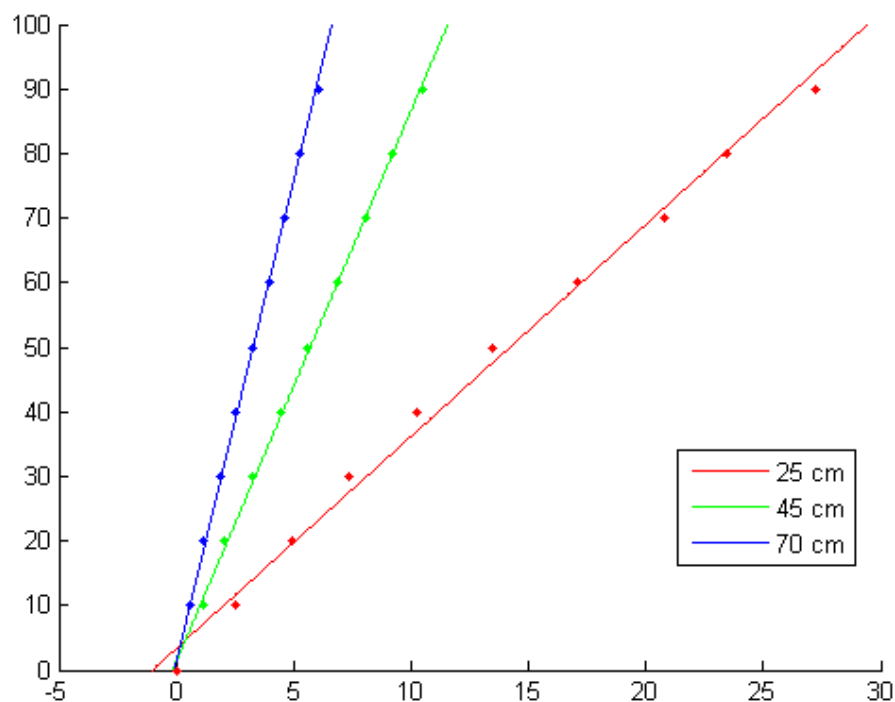
## 7.2 Mittauslaitteiston virtausnopeus

Nesteen virtausnopeutta kootussa mittauslaitteistossa voidaan muokata säätämällä lappoamisastian korkeutta. Virtausnopeuden säätö voi olla tarpeen testattavalle anturille optimaalisen virtausnopeuden määrittämisessä. Lisäksi liuoksen virtausnopeuden perusteella voidaan virtaukselle laskea Reynoldsin luku ja varmentaa virtauksen laminaarinen luonne.

Osion 6.2.2 mukaisesti lappoamisastiana toimiva dekantterilasi asetettiin tietylle korkeudelle statiivin avulla. Liuoksen virtauskäyttäytymistä tutkittiin kolmella eri tasolla: 25 cm, 45 cm ja 70 cm. Jokaisella korkeudella dekantterilasiin mitattiin 100 ml värjättyä vettä, joka lapottiin virtauskammion läpi. Virtausnopeutta rajoitettiin laitteistoon kuuluvalla kiristysruuvilla kuten oikeassa mittaustilanteessakin siten, että virtauksen aiheuttama paine oli tasapainossa virtauskammion altaan sisältämän

nesteen aiheuttaman paineen kanssa.

Virtausnopeus määritettiin mittaamalla kullakin nestekorkeudella aika, joka dekantterilasin tyhjenemiseen kului. Aika mitattiin 10 ml välein 90 millilitraan asti. Mittaustulokset on esitelty kuvassa 7.3. Mittaustuloksille on kuvaan piirretty myös lineaarisovituksia, joiden kulmakertoimista saadaan virtausnopeus, jos tämä nopeus oletetaan vakioksi. Koska nestepinnan korkeus dekantterilasissa laskee virtauksen seurauksena, myös virtausnopeus laskee. Kuvasta 7.3 nähdään kuitenkin, että nopeuden vakiooletus pätee suhteellisen hyvin käytetyillä tilavuuksilla. Epälineaarisuuksien nähdään myös vähenevän dekantterilasin korkeuden kasvaessa, koska tällöin nestepinnan laskulla on suhteellisesti pienempi vaikutus virtausnopeuteen.

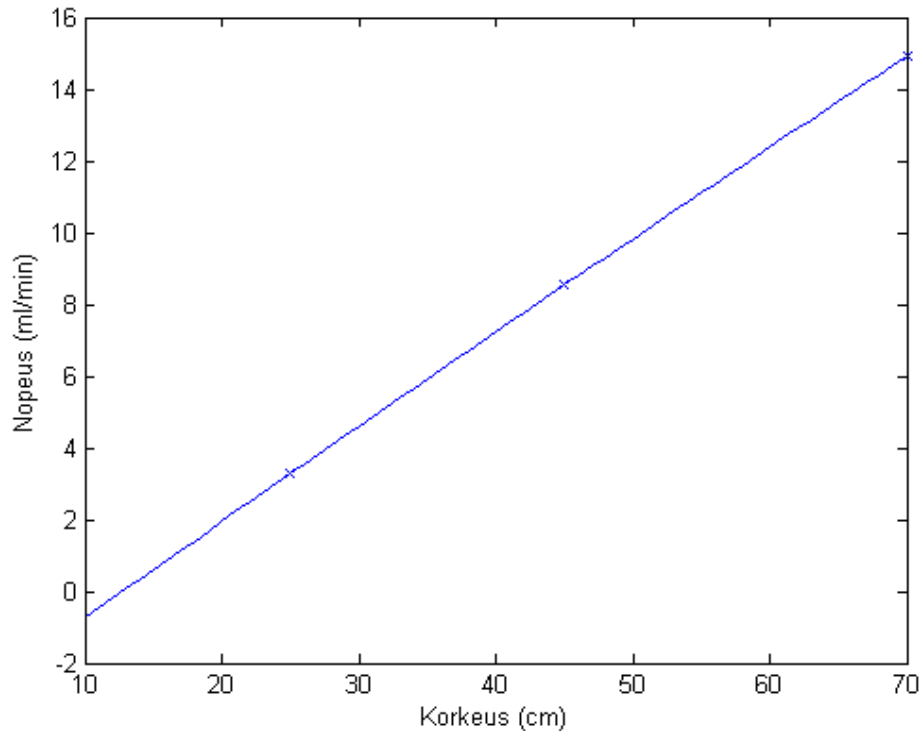


Kuva 7.3: Liuosvarastona toimivan dekantterilasin tyhjeneminen eri korkeuksilla ajan funktiona. Mitä korkeammalle dekantterilasi on sijoitettu, sitä selkeämmin tyhjeneminen tapahtuu vakionopeudella.

Kuvaan 7.4 on merkitty kuvan 7.3 sovitussuorien kulmakertoimet eli liuoksen virtausnopeudet eri korkeuksille. Kuvaajasta nähdään virtausnopeuden ja lappoastian korkeuden välillä olevan mittausvälillä lineaarinen riippuvuus.

Koska virtauskammion läpivirtausputken halkaisija on 3 mm, saadaan mittauskohdassa virtausnopeuksien vaihteluväliksi näillä korkeuksilla 5,9 - 38,8 mm/s. Kun lasketaan virtauksen Reynoldsin luku näillä arvoilla kaavan (??) mukaisesti, saadaan sen vaih-

teluväliksi vastaavasti 17,7 - 116,2. Koska virtaus alkaa saada turbulenteja piirteitä Reynoldsin luvun noustessa suuremmaksi kuin 2000, virtauksen voidaan olettaa olevan laminaarista varsinkin alemmilla korkeuksilla. Aiemmin mainitusti laminaarisuus voidaan havaita myös kuvasta 6.4, jossa virtaus on kerrostunut.



Kuva 7.4: Liuoksen virtausnopeus lappoastian korkeuden funktiona

### 7.3 Anturien karakterisointi

Laitteiston käyttökelpoisuutta anturien karakterisoinnissa arvioitiin mittaamalla Sarissan glutamaattiantureiden herkkyyttä, lineaarisuutta ja aikaresoluutiota glutamaattia sisältävillä liuksilla. Lisäksi tutkittiin, miten antureiden käyttöohjeisiin kirjattu havaitsemisherkkyyttä parantava käyttöjännitteen syklaaminen -0,5 - 0,5 V välillä vaikuttaa antureihin.

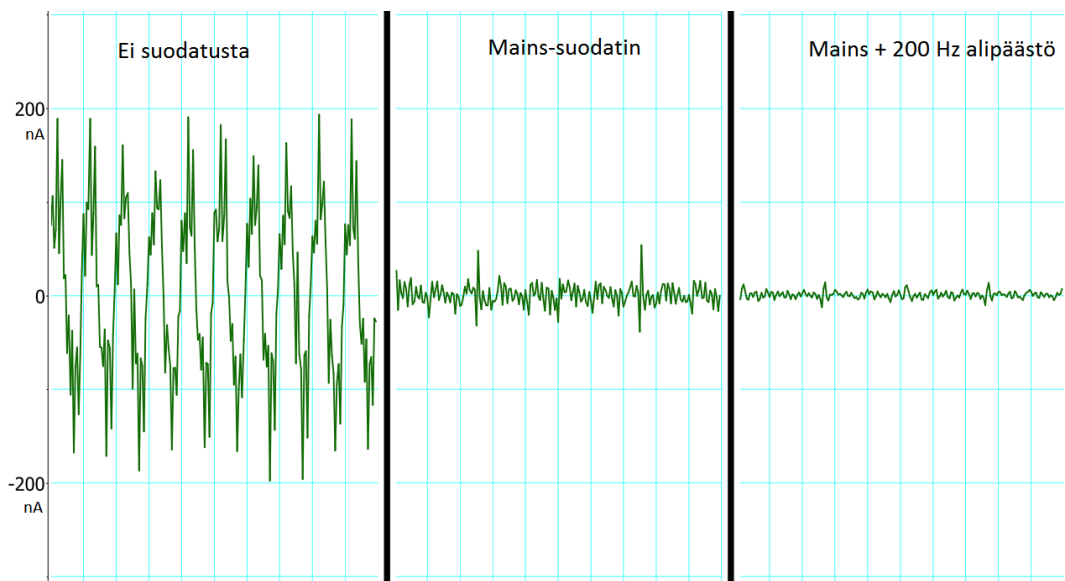
Antureiden käyttöönoton eli pinnoitehydrogeelin hydraation jälkeen antureiden entsyymipinnoite alkaa liueta pois elektrodin läheisyydestä. Antureiden toimintakyky on taattu viideksi päiväksi, ja tätä toimintakyvyn säilymistä oli tarkoitus myös testata seuraamalla herkkyuden muutosta ajan kanssa. Viidestä anturista kuitenkin vain yhdellä saatiin mitattua vasteita glutamaatille ja tälläkin anturilla mittaukset onnistut-

tiin suorittamaan vain kerran, joten antureiden pidemmän aikavälin käyttäytymisen arviointi ei tässä työssä ollut mahdollista. Antureiden epävakautta käsitellään osiossa 7.4.

Laitteiston ajallista suorituskykyä testattiin antureiden vetyperoksidivasteella, sillä vetyperoksidin havaitseminen ohittaa glutamaatin entsymaattisen hapetusvaiheen ja on täten nopeampaa.

Kaikki mittaukset suoritettiin aiemmin luvussa 6 esitellyllä laitteistolla ja mittausjärjestelyllä. Virtauksen ajavana voimana toimiva dekantterilasi oli asetettu 25 cm:n korkeudelle, jolloin virtausnopeus oli edellisen osion mukaisesti noin 5,9 mm/s.

Kaikissa mittauksissa mitattua signaalia suodatettiin ohjelmallisesti sähköverkosta kytkeytyviä häiriöitä poistavalla adaptiivisella Mains-suodattimella. Lisäksi mittauksissa käytettiin alipäästösuodatinta. Glutamaattimittauksissa alipäästösuodattimen rajataajuus oli 20 Hz, ja koska vetyperoksidimittauksissa haluttiin tarkastella nopeampia signaalimuutoksia, käytettiin niissä 200 Hz:n rajataajuutta. Erot suodattamattoman signaalin, Mains-suodatetun ja sekä Mains-suodattimella että 200 Hz:n alipäästösuodattimella käsitellyn signaalin välillä on esitelty kuvassa 7.5. Signaali näytettiin 1 kHz:n taajuudella.

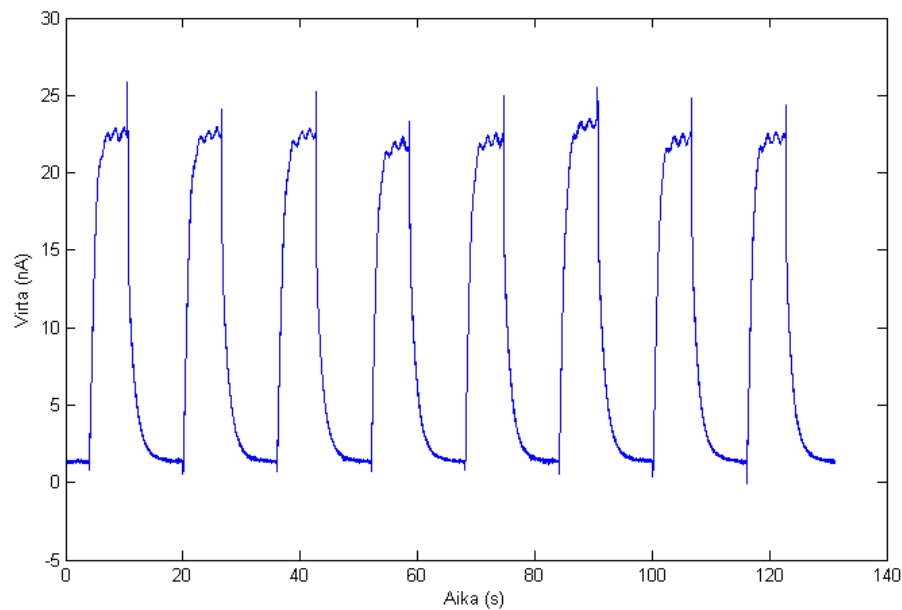


Kuva 7.5: Suodatuksen vaikutus signaaliin. Esillä 0,2 sekunnin otos signaalista ilman suodatusta sekä kahdella eri suodatustavalla.



### 7.3.1 Glutamaattimittaukset

Glutamaattimittauksia varten valmistettiin 7 Buffer A -liuosta eri glutamaattipitoisuuksilla: 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  ja 200  $\mu\text{M}$ . Mittaukset suoritettiin kaikilla näillä pitoisuuksilla 8 kertaa peräkkäisinä toistoina siten että anturin signaali ehti sekä nousta maksimitasolleen mitta-alueella että laskea nollatasolle, kun anturi siirretään pois virtauksesta. Käytännössä anturipidikkeen jännite nostettiin 10 sekunnin välein kuudeksi sekunniksi pidikkeen käyttöjännitteeseen eli 1,4 volttiin. Tyypillinen mittausvastejoukko on esitelty kuvassa 7.6, jossa nähdään anturin vaste 50  $\mu\text{M}$  glutamaattiliuokseen.



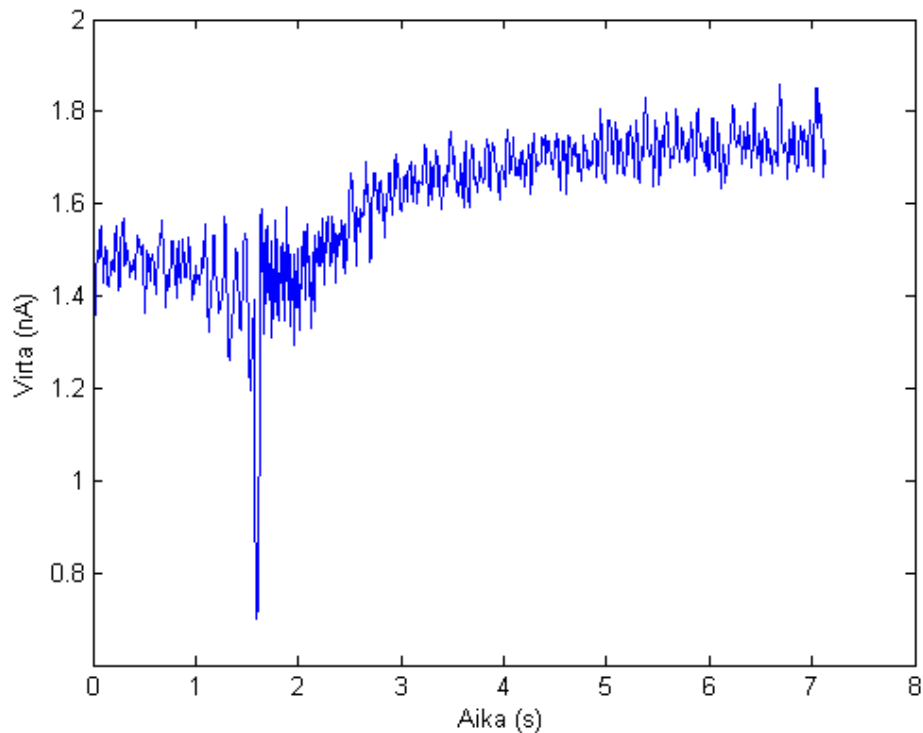
Kuva 7.6: Esimerkki tyypillisestä vastejoukosta. Mitattavan liuoksen glutamaattipitoisuus oli 50  $\mu\text{M}$ . Signaalien lopuissa havaittavat piikit ovat seurausta anturin liikkeestä.

#### Vasteen nousunopeus

Vasteen nousunopeus voidaan määritellä ajaksi, joka signaalilla kuluu nousta väli 10-90 % vasteen maksimiarvosta. Sarissan antureille täksi arvoksi on ilmoitettu <10 sekuntia. Kaikilla glutamaattipitoisuuksilla tämän nousunopeuden mitattiin olevan <3 sekuntia.

## Havaitsemisherkyys

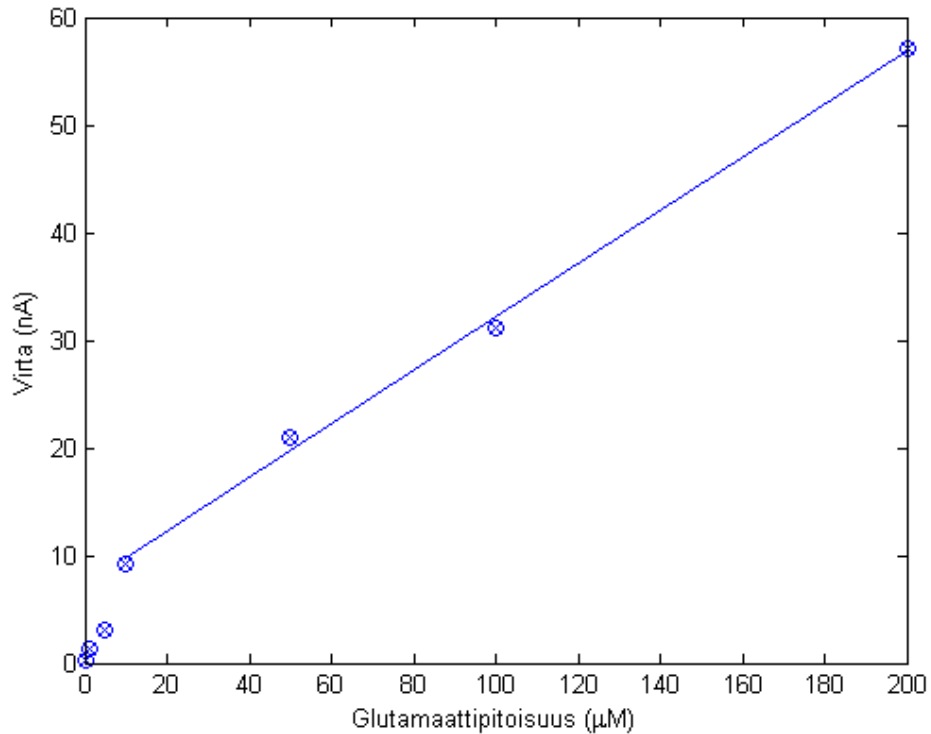
Suunnittelun laitteiston kykyä mitata pieniä signaaleja testattiin mittaamalla anturin vastetta  $0,1 \mu\text{M}$  pitoisuuteen glutamaattia, mikä on valmistajan ilmoituksen mukaan pienin havaittava pitoisuus. Tämä vaste on esillä kuvassa 7.7. Havaittu vaste tälle pitoisuudelle on noin  $0,2 \text{ nA}$ . Signaalissa esiintyvä kohina on melkein samaa luokkaa tämän vasteen kanssa, joten laitteiston käyttäminen tätä pienempien signaalien mittaamiseen ei ole mielekästä ilman häiriösuojauksen parantamista.



Kuva 7.7: Anturin tuottama vaste  $0,1 \mu\text{M}$  glutamaattipitoisuudelle. Vaste on noin  $0,2 \text{ nA}$

## Lineaarisuus

Sähkökemiallisen anturin tärkeä ominaisuus on kyky tuottaa helposti tulkittava lineaarinen vaste mitattavalle analytyille. Sarissan antureilla tämä lineaarisuus toteutuu valmistajan ilmoituksen mukaan glutamaatin pitoisuusvälillä  $0,1\text{-}100 \mu\text{M}$ . Lineaarisuusvälin määrittämiseksi aiemmin esitellystä mittausarjasta laskettiin jokaiselle pitoisuudelle keskiarvoistettu vaste. Nämä vasteet on merkitty kuvaan 7.8, josta selkeästi nähdään lineaarisuusvälin poikkeavan valmistajan ilmoittamasta; hyvin sovittuva lineaarinen vaste havaitaan pitoisuusvälillä  $10\text{-}200 \mu\text{M}$ .



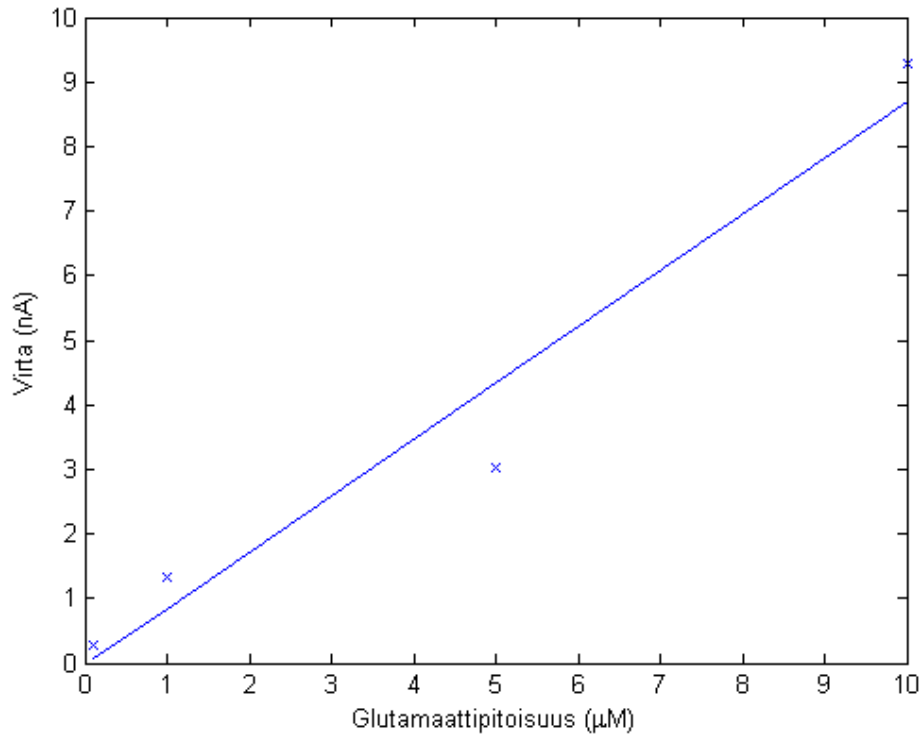
Kuva 7.8: Keskiarvoistetut virtavasteet eri glutamaattipitoisuuksille. Vasteilla ja pitoisuudella havaitaan olevan lineaarinen yhteys pitoisuusvälillä 10-200  $\mu\text{M}$ .

Kuvasta 7.8 voidaan laskea sovitussuoran kulmakerroin eli vasteen muutos pitoisuuden suhteen. Mitatuista arvoista kulmakertoimeksi saadaan noin  $0,25 \text{ nA}/\mu\text{M}$ . Tämä poikkeaa suuresti valmistajan ilmoittamasta arvosta  $4 \text{ nA}/\mu\text{M}$  kyseiselle anturityypille. Linearisovituksen hyvyttä voidaan mitata  $R^2$ -arvolla, jolla arvioidaan mitattujen arvojen poikkeamaa lineaarimallista. Mitä lähempänä tämä arvo on yhtä, sitä parempi sovitus on kyseessä. Pitoisuusvälillä 10-200  $\mu\text{M}$   $R^2$  arvo on 0,998, joten signaalin lineaarisuus on vahva.

Toisaalta huomataan, että suhteellisen lineaarinen vaste ilmenee myös pienillä pitoisuuksilla, välillä 0,1-10  $\mu\text{M}$ . Nämä mittauspisteet ja niille laskettu sovitussuora on esitetty kuvassa 7.9. Kuvaajan kulmakerroin on tällä välillä  $0,87 \text{ nA}/\mu\text{M}$ , joka edelleen on huomattavasti valmistajan ilmoittamaa arvoa pienempi. Sovitussuoran  $R^2$  -arvo on 0,95, joten pienillä pitoisuuksilla signaalin lineaarinen luonne on heikompi.

### 7.3.2 Syklisen jännitevaihtelun vaikutus

Käytön aikana välittäjäaineanturin suorituskyky voi heiketä esimerkiksi anturin pintaan adsorpoituvien proteiinien tai hapetustuotteiden seurauksena. Tätä menetet-



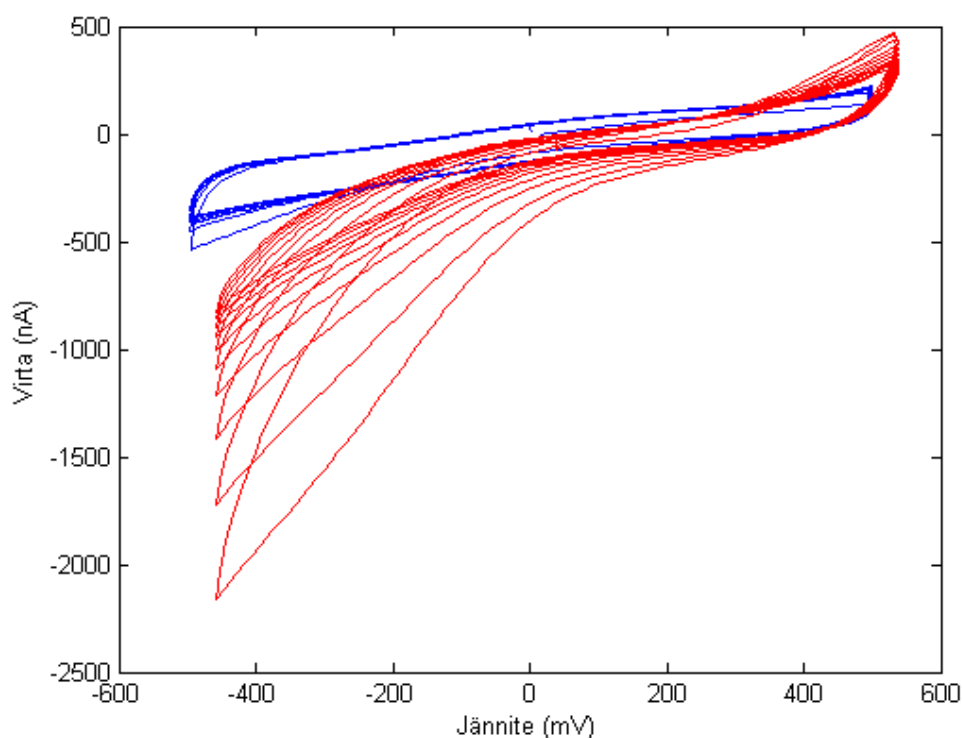
Kuva 7.9: Glutamaan vasteet pitoisuusvälillä 0,1-10 µM ja lineaarinen sovitussuora.

tyä herkkyyttä voidaan palauttaa syklisellä jännitevaihtelulla. Sarissan antureiden tapauksessa käyttöjännitettä neuvotaan vaihdeltavan -500 mV - 500 mV väliä 10 kertaa 100 mV/s nopeudella.

Mittauksissa oli tarkoitus arvioida tämän syklisen jännitevaihtelun vaikutusta anturin herkkyyteen mittaamalla anturin vaste jollekin glutamaattipitoisuudelle tietyn käyttöajan jälkeen, suorittamalla em. syklaus ja vertaamalla tämän jälkeen saatavaa vastetta samalle glutamaattipitoisuudelle. Suoritetun mittaussarjan ja syklauksen jälkeen käytetty anturi menetti kuitenkin glutamaan havainnointikykyänsä, eikä tätä mittausta voitu suorittaa.

Mittauslaitteistolla on teknisesti kuitenkin mahdollista suorittaa tällainen syklaus. Kuvassa 7.10 on esillä voltammogrammit sekä mittausten alussa että aiemmin esitellyn mittaussarjan jälkeen suoritetusta syklauksesta. Kuvasta voidaan nähdä jälkimmäisen syklauksen vaikutuksen ero alussa suoritettuun erityisesti negatiivisten jännitteiden tapauksessa, jolloin elektrodilla ilmeni selkeä pelkistymisvirta. Tämä pelkistysvirta pieneni jokaisella syklillä. Mittausten alussa suoritettu syklaus aiheuttaa syklien välillä vakiona pysyvän vasteen.

Negatiivisen virran pieneneminen syklien välillä voidaan selittää anturin suoritusky-



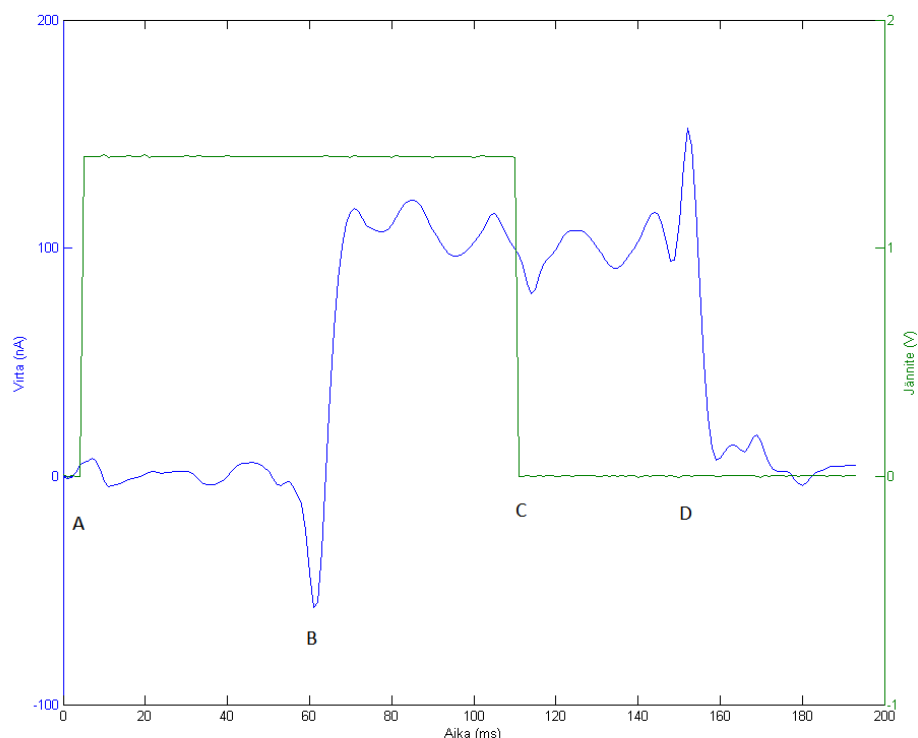
Kuva 7.10: Syklisen jännitevaihtelun aiheuttama virta anturilla mittausten alussa (sininen) ja suoritettujen mittausten jälkeen (punainen). Mittausten jälkeen havaittavissa huomattava pelkistymisvirta, joka pienenee jokaisen syklin jälkeen.

kyä heikentävien hapetustuotteiden vähentymisellä pelkistymisen seurauksena. On kuitenkin epäselvää, miksi näitä hapetustuotteita kertyy anturin pinnalle, ja kuinka suuri vaikutus näillä tuotteilla on anturin suorituskykyyn.

### 7.3.3 Vetyperoksidimittaukset

Laitteiston kykyä tuottaa lyhyitä mittauspulsseja, joilla voidaan rajatusti simuloida välittäjäainepulssien havainnointia, testattiin mittaamalla nopeasti havaittavaa vetyperoksidia. Mittaukset suoritettiin 100  $\mu\text{M}$  vetyperoksidilla Buffer A -liuoksessa.

Mittauksissa pyrittiin ottamaan selvää, millaisia viiveitä ja todellisia pulssinkestoja anturipidikkeen ohjauspulssin pituudesta seuraa. Kuvaan 7.11 on merkitty 100 millisekunnin ohjausjännitepulssi sekä anturin vaste vetyperoksidille. Kuvassa on selkeästi nähtävillä viiveet ohjausjännitteen ja anturin tuottaman pulssin välillä. Ajanhetkillä B ja D nähtävät noin 5 ms:n transientit häiriöpiikit pysyivät mittauksissa ajallisesti samansuuruisina, mutta amplitudiltaan vaihtelevina. Vasteessa on lisäksi nähtävissä 50 Hz:n häiriötä, mikä johtuu korkeasta 200 Hz:n alipäästösuodatuksesta.



Kuva 7.11: Vetyperoksidin aiheuttama vaste 100 ms:n jännitepulsilla. Kuvaajassa esillä anturipidikkeen ohjausjännite ja anturilla syntyvä virta. Ohjausjännite nousee maksimiarvoonsa ajanhetkellä A. Ajanhetki B määrittellään virtapiikin alkupisteeksi. C on vastaavasti ajanhetki, jolloin ohjausjännite pudotetaan lepoarvoonsa ja virtapiikki määrittellään loppuvan ajanhetkellä D.

Laitteiston ajallisen suorituskyvyn määrittämiseksi suoritettujen vetyperoksidivasteiden mittauksissa käytettiin 500 ms - 50 ms ohjausjännitepulsseja. 40 ms:n pulssi ei enää tuottanut havaittavaa virtapiikkiä. Käytetystä pulssipituudesta huolimatta kuvassa 7.11 nähtävien karakterististen ajanhetkien A & B ja C & D väliset ajat pysyivät vakioina, noin 60 ms ja noin 45 ms. Tällöin laitteistolla tuotettu mittauspulssin pituus voidaan laskea vähentämällä ohjausjännitteen pulssinpituudesta 15 ms, ja lyhyin aikaansaattava pulssi oli 35 ms pitkä.

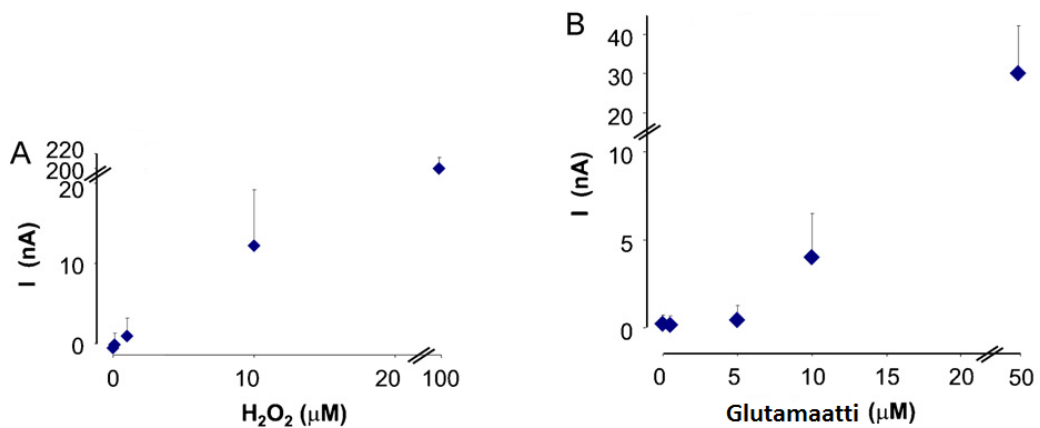
## 7.4 Tulosten tarkastelu ja johtopäätökset

Edellä mainitusti Sarissan anturit osoittautuivat epäluotettaviksi käytännön kokeissa. Tässä työssä esitellyllä laitteistolla testatuista viidestä anturista vain yhdellä onnistuttiin suorittamaan mittauksia ja nämäkin mittaukset vain osittain. Lisäksi aiemmin

kehitettyllä laitteistolla on testattu myös viisi samanlaista Sarissan anturia, ja nämäkään anturit eivät havainneet glutamaattia joko ollenkaan tai havainnointikyky katosi nopeasti mittausten aikana.

Antureiden hajoaminen käytössä aiheutti hankaluuksia mittauslaitteiston suorituskyvyn määrittämisessä. Antureita pyrittiin käsittelemään täysin valmistajan ohjeiden mukaisesti, ja erityisesti pyrittiin välttämään antureiden ilmakontaktia, joka aiemmin mainitusti voi tuhota antureiden suorituskyvyn. Anturin kiinnittäminen mittauslaitteistoon ja sen asettaminen virtauskammioon suoritettiin myös huolellisesti. On kuitenkin mahdollista, että mekaanisesti herkkä anturi on osunut esimerkiksi virtauskammion seinämään anturin asettelun aikana. Kuvasta 7.2 nähdään anturin liikkeesä olevan hieman sivuttaiskomponenttia. Tämä liike on suuruudeltaan noin puolet virtauskammion yhdysputken halkaisijasta, mikä edellyttää anturin asettelulta tarkkuutta, jota ei ehkä mittauksissa saavutettu.

Ongelmista huolimatta laitteistolla saatiin mitattua anturin vasteita useille glutamaattipitoisuuksille, ja vasteista oli havaittavissa lineaarinen riippuvuus tietyllä pitoisuusvälillä. Saatuja tuloksia voidaan verrata arvoihin, joita Mazzone et al. mittasivat tutkimuksessaan, jossa käytettiin myös Sarissan glutamaattiantureita. [62] Nämä tulokset ovat esillä kuvassa 7.12



Kuva 7.12: Sarissan antureiden tuottamat vasteet eri pitoisuuksille vetyperoksidia (A) ja glutamaattia (B). [62] (muokattu)

Mittaukset on raportoitu suoritettuna anturilla, jonka halkaisija on 50 μm, pituus 1 mm, ja jonka ilmoitettu herkkyys on 0,5 nA/μM. Huomioitavaa on, että Sarissan yleisestä valikoimasta ei löydy näitä spesifikaatioita täyttäviä antureita. Vastaavan herkkyyden anturin halkaisija ja pituus ovat Sarissan ilmoituksen mukaan 25 μm ja 0,5 mm. Tästä epäselvyydestä huolimatta anturin vasteilla on tutkimuksessa todettu olevan selkeä lineaarinen riippuvuus sekä vetyperoksidin että glutamaatin suhteen. Tuloksista

voidaan myös nähdä vetyperoksidin tuottavan noin kaksinkertaisen vasteen verrattuna glutamaatin vasteeseen samalla pitoisuudella. Tämä mittaustulos poikkeaa tässä diplomityössä mitatuista arvoista, joissa vetyperoksidin vaste on noin nelinkertainen glutamaattiin nähden.

Vetyperoksidimittauksien ja anturin liikkeen kuvaamisen avulla pystyttiin selvittämään mittauslaitteiston kykyä tuottaa lyhyitä mittauspulseja. Pulssien pituutta voidaan mittausten mukaisesti säätää tarkasti muuttamalla anturipidikkeen ohjausjännitteen kestoa. Ongelmia lyhyiden pulssien hallinnassa tuottavat kuitenkin virtapulssien alussa ja lopussa esiintyvät, alkuperältään tuntemattomat transienttihäiriöt.

Laitteistolla on mahdollista säätää tarpeen mukaan liuksen virtausnopeutta dekantterilasin korkeutta muuttamalla noin yhden kertaluokan verran. Suuret virtausnopeudet aiheuttavat kuitenkin käytännön ongelmia virtaavan liuksen nopean loppumisen vuoksi sekä hankalan hallittavuuden kannalta. Tarvittaessa virtausnopeutta voidaan alentaa edelleen lisäämällä laitteistoon kuuluvan 1 mm:n muoviletkun pituutta, jolloin koko virtaussysteemin virtausvastus suurenee.

Mittauksissa havaittiin tarve suodattaa signaalia vahvasti. Vasteisiin kytkeytyi herkästi 50 Hz:n verkkovirtahäiriö, jota pyrittiin poistamaan tarkoissa glutamaattimitauksissa 20 Hz:n alipäästösuodatuksella. Suodatus voi kuitenkin hävittää myös mielenkiintoisia signaalikomponentteja, joten suodatuksen tarvetta on mielekästä vähentää. Tämä voidaan saada aikaan sijoittamalla mittauslaitteisto Faradayn häkkiin, joka estää tehokkaasti signaalitielle kytkeytyviä häiriöitä.

Mittauslaitteistoon kuuluvan byretin on tarkoitus toimia nestepuskurina, joka estää ilmakuplien siirtymisen virtausletkuihin. Käytännössä letkuissa ja virtauskammiossa havaittiin ajoittain hankalasti poistettavia ilmakuplia. Nämä kuplat saattoivat muuttaa virtauskäyttäytymistä ja täten myös mitattavaa signaalia huomattavasti. Tätä ilmakuplien ilmentymistä voitaisiin tarvittaessa vähentää johtamalla mittausliukseen typpikaasua ennen mittauksia.

Välittäjäaineantureiden suorituskykyä voidaan testata osiossa 4.2.3 esitellyllä virtausinjektioanalyysillä. Tämän tekniikan heikkoutena voidaan pitää tarvetta tuntea injektoidun analyytin dispersiökäyttäytyminen virtaussysteemissä. Tässä työssä haluttiin luoda FIA-tekniikasta poikkeava mittausjärjestely, jossa anturin karakterisoinniseksi mitataan tarkasti hallittua analyyttipitoisuutta. Järjestely on lisäksi mekaanisesti yksinkertaisempi, koska siinä vältetään analyytin hallittuun syöttämiseen tarvittavalta venttiilisysteemiltä. Toisaalta työssä kehitetty laitteisto voidaan tarvittaessa muuntaa virtausinjektioanalyysia suorittavaksi lisäämällä laitteistoon tällainen venttiilisysteemi.



Kehitetty laitteisto osoittaa lupausta amperometrinen välittäjäaineantureiden suorituskyvyn määrittelyssä. Laitteistolla on mahdollista sekä tuottaa lyhyitä mittauspulsseja että mitata vasteita nanoampeerien kokoluokassa. Mittauslaitteisto on lisäksi yksinkertainen käyttää, ja tulosten tulkinta on helppoa.

#### **7.4.1 Jatkotutkimuksen suunta**

Jotta voidaan varmistua kehitetyn mittauslaitteiston käyttökelpoisuudesta, olisi suotavaa selvittää, miksi Sarissan antureiden suorituskyky oli selkeästi ilmoitettua heikompi. Erityisesti olisi selvitettävä oliko tämä heikko suorituskyky seurausta jostakin prosessista tai menetelmästä, joka kuuluu kiinteänä osana suunniteltuun mittausasetelmaan.

Todennäköisimmin anturien suorituskyvyn häviäminen johtui joko anturien sol-gel-pinnoitteen kuivumisesta ja tätä seuraavasta halkeamisesta tai anturien muusta fyysisestä vaurioitumisesta. Anturien käsittely pyrittiin kuitenkin suorittamaan hyvin hellävaraisesti ja varoen pinnoitteen kuivumista, joten voidaan todeta Sarissan antureiden olevan hyvin herkkiä vaurioitumiselle. Laitteiston suorituskykyä voisi tulevaisuudessa olla hyödyllistä selvittää muilla saatavilla olevilla välittäjäaineantureilla.

Jos osoittautuu, että ongelmat mittauksissa olivat antureista lähtöisin, voidaan laitteistoa jatkokehittää esimerkiksi häiriösuojausta parantamalla ja aktiivisen anturipidikkeen osien tarkemmalla sovituksella, jolloin mittauksissa havaittu pieni horisontaalinen virheliike saadaan poistettua.

Kuvattujen selvitysten ja parannusten jälkeen laitteistoa voidaan käyttää sen tarkoitussa roolissa eli itse kehitettyjen välittäjäaineanturien testialustana.

# Luku 8

## Yhteenveto

Tässä diplomityössä suunniteltiin ja toteutettiin mittauslaitteisto, jolla voitiin mitata amperometrisen, entsyymipinnoitetun välittäjäaineanturin suorituskykyä. Kehitettyä laitteistoa voidaan käyttää myös muiden kaltaisten anturin karakterisoimiseen.

Mittauslaitteisto koostui kaupallisesta potentiostaatista sekä itse kehitetyistä virtauskammiosta ja aktiivisesta anturipidikkeestä. Laitteistoa testattiin suorittamalla mittauksia kaupallisella Sarissa Biomedicalin glutamaattianturilla sekä mittaamalla laitteiston mahdollistamia virtausnopeuksia. Lisäksi anturin liikettä kuvattiin mittaustilanteessa suurnopeuskameralla sekä analysoitiin sen nopeutta ja liikerataa.

Mittauksissa huomattiin ongelmia käytettyjen Sarissan antureiden stabiilisuuden kanssa, ja suunnitellut mittaukset pystyttiinkin suorittamaan vain yhdellä anturilla viidestä. Tällöinkin anturin selektiivisyys katosi ensimmäisen mittaussarjan jälkeen, joten suorituskyvyn säilymisen selvittäminen ei ollut mahdollista. Näistä ongelmista johtuen glutamaattimittauksien tuloksista on vaikea tehdä pitäviä johtopäätöksiä toteutetun laitteiston suorituskyvystä, vaikkakin glutamaattipitoisuuksia pystyttiin mittaamaan välillä 0,1 - 200  $\mu\text{M}$  lineaarisen vasteen ollessa välillä 10 - 200  $\mu\text{M}$ . Anturin herkkyys tällä välillä oli 0,25 nA/ $\mu\text{M}$ , mikä on yksi kuudestoistaosa valmistajan ilmoittamasta arvosta. Anturin vasteaika glutamaatille mitattiin olevan  $< 3\text{s}$ .

Ongelmista huolimatta laitteiston suorituskykyä pystyttiin mittaamaan muilla testeillä, joista erityisesti nähtiin, että laitteistolla voidaan tuottaa hyvin lyhyitä, muutamien kymmenien millisekuntien, mittauspulsseja. Tämä mahdollistaa esimerkiksi glutamaattiantureita merkittävästi nopeampien antureiden vastenopeuksien määrittämisen. Lisäksi todettiin laitteiston toimintaan kuuluvan virtauksen olevan laminaarista, mikä on edellytys hallittujen hydrodynaamisten mittausten suorittamiselle.

Laitteistossa on useita kehityskohteita, joista yksi selkeimmistä on laitteiston häiriö-

suojauksen parantaminen. Yksinkertaisin tapa tähän olisi sijoittaa laitteisto Faradayn häkkiin, joka vaimentaisi mittaussignaaliin kytkeyviä sähköisiä häiriötä. Lisäksi olisi suotavaa suorittaa lisämittauksia tässä työssä käytettyjä Sarissan glutamaattiantureita vastaavilla antureilla, jotta voidaan selvittää johtuivatko havaitut stabiilisuuskonngelmat itse antureista vai mittausjärjestelyyn liittyvistä ilmiöistä tai suunnitteluvirheistä.

# Kirjallisuutta

- [1] Alan Cassell Jessica Koehne Meyya Meyyappan Barbara Nguyen-Vu Neng Huang Li Chen Russell Andrews, Jun Li. The nasa nanoelectrode array for deep brain stimulation: Monitoring neurotransmitters and electrical activity plus precise stimulation. *Minimally Invasive Neurosurgery and Multidisciplinary Neurotraumatology*, pages 212–215, 2006.
- [2] Daniel C. Harris. *Quantitative Chemical Analysis*. W.H Freeman and Company, 1999.
- [3] Laura M. Borland Adrian C. Michael. *Electrochemical Methods for Neuroscience*. Taylor & Francis Group, 2007.
- [4] Andrew T. Seipel R. Mark Wightman Donita L. Robinson, Andre Hermans. Monitoring rapid chemical communication in the brain. *Chemical Reviews*, 108(7):2554–2584, 2008.
- [5] John G.R. Jefferys Daniel R. Merrill, Marom Bikson. Electrical stimulation of excitable tissue: design of efficacious and safe protocols. *Journal of Neuroscience Methods*, 141:171–198, 2005.
- [6] Stuart F. Cogan. Neural stimulation and recording electrodes. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 10:275–309, 2008.
- [7] Keith B. Male John H. T. Luong and Jeremy D. Glennon. Boron-doped diamond electrode: synthesis, characterization, functionalization and analytical applications. *Analyst*, 134:1965–1979, 2009.
- [8] M. Otto M. Valcarcel H. M. Widmer R. Kellner, J.-M. Mermet. *Analytical Chemistry - A Modern Approach to Analytical Science*.
- [9] Craig E. Banks Richard G. Compton. *Understanding Voltammetry*. Imperial College Press, 2011.

- [10] Larry R. Faulkner Allen J. Bard. *Electrochemical Methods - Fundamentals and Applications*. John Wiley & Sons, Inc, 2001.
- [11] Joseph J. Mitala Jr Bridget M. Willoughby Christina M. Motzko Adrian C. Michael, Laura M. Borland. Theory for the impact of basal turnover on dopamine clearance kinetics in the rat striatum after medial forebrain bundle stimulation and pressure ejection. *Journal of Neurochemistry*, 94:1202–1211, 2005.
- [12] R. Mark Wightman B. Jill Venton, Kevin P. Troyer. Response times of carbon fiber microelectrodes to dynamic changes in catecholamine concentration. *Anal. Chem*, 74:539–546, 2002.
- [13] J.S. Yeomans C.D. Blaha A.D. Miller, G.L. Foster. Midbrain muscarinic receptors modulate morphine-induced accumbal and striatal dopamine efflux in the rat. *Neuroscience*, 136:531–538, 2005.
- [14] T. Miwa D. A. Tryk A. Fujishima E. Popa, H. Notsu. Selective electrochemical detection of dopamine in the presence of ascorbic acid at anodized diamond thin film electrodes. *Electrochemical and Solid-state Letters*, 2:49–51, 1998.
- [15] R.T. Kennedy K.T. Kawagoe T.J. Schroeder D.J. Leszczysyn J.A. Near E.J. Diliberto Jr O. H. Viveros R.M Wightman, J.A. Jankowski. Temporally resolved catecholamine spikes correspond to single vesicle release from individual chromaffin cells. *Neurobiology*, 88:10754–10758, 1991.
- [16] O. H. Viveros E.J. Diliberto Jr J.A. Near R.M Wightman D.J. Leszczysyn, J.A. Jankowski. Nicotinic receptor-mediated catecholamine secretion from individual chromaffin cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 265:14736–14737, 1990.
- [17] David Sulzer Eugene V Mosharov. Analysis of exocytotic events recorded by amperometry. *Nature Methods*, 2, 2005.
- [18] Guillermo Alvarez de Toledo Manfred Lindau. Fusion pore. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1641:167–173, 2003.
- [19] H. Bradford Hawley Laurence M. M.D. Katz Nancy A. Piotrowski Connie M.D. Rizzo Anne Lynn S., M.D. Chang. *Magill's Medical Guide*. Salem Press, 2007.
- [20] Lauralee Sherwood. *Human physiology: from cells to systems*. Brooks Cole, 2003.

- [21] Lin-Mei Li Zong-Li Wang Jie-Ke Cheng Wei-Hua Huang Wei Wang, Shu-hui Zhang. Monitoring of vesicular exocytosis from single cells using micrometer and nanometer-sized electrochemical sensors. *Anal Bioanal Chem*, 394:17–32, 2009.
- [22] Michael A. Paradiso Mark F. Bear, Barry W. Connors. *Neuroscience - Exploring the Brain*. Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
- [23] Harry Svensson. Isoelectric fractionation, analysis, and characterization of ampholytes in natural pH gradients. i. the differential equation of solute concentrations at a steady state and its solution for simple cases. *Acta Chemica Scandinavica*, 15:325–341, 1961.
- [24] J.C. Watkins D. R. Curtis. The excitation and depression of spinal neurones by structurally related amino acids. *Journal of Neurochemistry*, 6:117–141, 1960.
- [25] M. Weller Johannes Kornhuber. Psychogenicity and n-methyl-d-aspartate receptor antagonism: Implications for neuroprotective pharmacotherapy. *Society of Biological Psychiatry*, 1997.
- [26] Brendan Belsham. Glutamate and its role in psychiatric illness. *Human Psychopharmacology*, 16:139–146, 2001.
- [27] J. P. Newhouse D. R. Lucas. The toxic effect of sodium l-glutamate on the inner layers of the retina. *Arch Ophthalmol*, 58:193–201, 1957.
- [28] C. Retna Raj Sudip Chakraborty. Amperometric biosensing of glutamate using carbon nanotube based electrode. *Electrochemistry Communications*, 9:1323–1330.
- [29] Jon Storm-Mathisen Ole P. Ottersen. *Handbook of Chemical Neuroanatomy - Glutamate*. Elsevier, 2000.
- [30] Frode Fonnum. Glutamate: A neurotransmitter in mammalian brain. *Journal of Neurochemistry*, 42(1), 1984.
- [31] Saila Parmes. Hermoston välittäjäaineepitoisuuksien sähkökemialliseen mittaamiseen käytettävät elektrodit. Aalto Yliopiston Sähkötekniikan Korkeakoulu, Diplomityö, 2011.
- [32] Karel Holub Vladimir Marecek Wlodzimierz Kutner Karel Stulik, Christian Amatore. Microelectrodes. definitions, characterization, and applications. *Pure Appl. Chem*, 72(8):1483–1492, 2000.

- [33] S. Retterer A.J. Spence M. Isaacson H.G. Craighead-J.N. Turner W. Shain D.H. Szarowski, M.D. Andersen. Brain responses to micro-machined silicon devices. *Brain Research*, 983:23–35, 2003.
- [34] Philip J. Elving Jacques Moiroux. Effects of adsorption, electrode material, and operational variables on the oxidation of dihydronicotinamide adenine dinucleotide at carbon electrodes. *Anal. Chem*, 50(8), 1978.
- [35] F. Tobalina H. D. Abruiia F. Pariente, E. Lorenzo. Aldehyde biosensor based on the determination of nadh enzymatically generated by aldehyde dehydrogenase. *Anal. Chem.*, 67:3936–3944.
- [36] Joseph Wang. Carbon-nanotube based electrochemical biosensors: A review. *Electroanalysis*, 17, 2004.
- [37] Weite H. Oldenzil Thomas I.F.H. Cremers-Ben H.C. Westerink Si Qin, Miranda van der Zeyden. Microsensors for in vivo measurement of glutamate in brain tissue. *Sensors*, 8, 2008.
- [38] Ben H. C. Westerink Weite H. Oldenzil. Improving glutamate microsensors by optimizing the composition of the redox hydrogel. *Anal. Chem.*, 77:5520–5528, 2005.
- [39] Vernon D. Neff Ben H.C. Westerink Kingo Itaya, Isamu Uchida. Electrochemistry of polynuclear transition metal cyanides: Prussian blue and its analogues. *Acc. Che. Res*, 19:162–168, 1986.
- [40] A. Lefebvre R. Cespuglio A.P. Soldatkin O.M. Schuvailo, O.O. Soldatkin. Highly selective microbiosensors for in vivo measurement of glucose, lactate and glutamate. *Analytica Chimica Acta*, 573-574:110–116, 2006.
- [41] Sarah M. Kirwan Sarah J. Killoran Pier A. Serra John P. Lowry Robert D. O’Neill Colm P. McMahon, Gaia Rocchitta. Oxygen tolerance of an implantable polymer/enzyme composite glutamate biosensor displaying polycation-enhanced substrate sensitivity. *Biosensors and Bioelectronics*, 22:1466–1473, 2007.
- [42] B.D. Malhotra Asha Chaubey. Mediated biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 17:441–456, 2002.
- [43] B.H.C. Westerink W.H. Oldenzil, W. Beukema. Improving the reproducibility of hydrogel-coated glutamate microsensors by using an automated dipcoater. *Journal of Neuroscience Methods*, 140:117–126, 2004.

- [44] Thomas I. F. H. Cremers Ben H. C. Westerink Weite H. Oldenziel, Gerrit Dijkstra. Evaluation of hydrogel-coated glutamate microsensors. *Anal. Chem.*, 78:3366–3378, 2006.
- [45] Robert T.R. Huckstepp Nicholas Dale Faming Tian, Alexander V. Gourine. A microelectrode biosensor for real time monitoring of l-glutamate release. *Analytica Chimica Acta*, 645:86–91, 2009.
- [46] Béatrice D. Leca-Bouvier Audrey Sassolas, Loïc J. Blum. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances*, In Press.
- [47] Birgit Schulz-Theodor Bergann Alexander Schwock Peter Ulrich Abel, Thomas von Woedtke. Stability of immobilized enzymes as biosensors for continuous application in vitro and in vivo. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 7:93–100, 1999.
- [48] Antonio Ballesteros Iqbal Gill. Bioencapsulation within synthetic polymers (part 1): sol–gel encapsulated biologicals. *Trends in Biotechnology*, 18:282–296, 2000.
- [49] María del Pilar Buera Luis Eduardo Díaz Martín Federico Desimone, Silvia Beatriz Matiacevich. Effects of relative humidity on enzyme activity immobilized in sol–gel-derived silica nanocomposites. *Enzyme and Microbial Technology*, 42:583–588, 2008.
- [50] Won-Yong Lee Han Nim Choi, Min Ah Kim. Amperometric glucose biosensor based on sol–gel-derived metal oxide/nafion composite films. *Analytica Chimica Acta*, 537:179–187, 2005.
- [51] Alan T. McDonald Robert W. Fox. *Introduction to fluid mechanics*. John Wiley & Sons, Inc, 1994.
- [52] W.P. Graebel. *Engineering fluid mechanics*. Taylor & Francis Group.
- [53] <http://www.ceb.cam.ac.uk/data/images/groups/CREST/Teaching/laminar.gif>. Viitattu 12.11.2011.
- [54] Robert L. Mott. *Applied Fluid Mechanics*. Prentice Hall, Inc, 2000.
- [55] William R. Heineman Peter T. Kissinger. *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*. Marcel Dekker, Inc, 1996.



- [56] Patrick R. Unwin Julie V. Macpherson, Scott Marcar. Microjet electrode: A hydrodynamic ultramicroelectrode with high mass-transfer rater. *Anal. Chem.*, 66:2175–2179, 1994.
- [57] Galen Wood Ewing. *Analytical Instrumentation Handbook*. Marcel Dekker Inc, 1997.
- [58] Hirohito Nishino Toshio Yao, Takayuki Yano. Simultaneous in vivo monitoring of glucose, l-lactate and pyruvate concentrations in rat brain by a flow-injection biosensor system with an on-line microdialysis sampling. *Analytica Chimica Acta*, 510:53–59, 2004.
- [59] <http://www.sarissa-biomedical.com/products.aspx>. viitattu 12.11.2011.
- [60] eDAQ. *e-corder User Manual, Models 210, 410, 821 & 1621*.
- [61] eDAQ. *eDAQ Potentiostats, User Manual*.
- [62] Andrea Nistri Graciela L. Mazzone. Electrochemical detection of endogenous glutamate release from rat spinal cord organotypic slices as a real-time method to monitor excitotoxicity. *Journal of Neuroscience Methods*, 197:128–132, 2011.