



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΙΚΡΟ-ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΜΕ
ΧΡΗΣΗ ΕΝΤΥΠΩΜΕΝΩΝ ΜΙΚΡΟΡΕΥΣΤΟΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ
ΔΙΑΤΑΞΕΩΝ ΧΑΡΤΙΟΥ ΚΑΙ ΝΑΝΟΥΛΙΚΩΝ

ΦΩΤΕΙΝΗ Α. ΚΑΠΠΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ M.Sc.

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2019



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΙΚΡΟ-ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΜΕ
ΧΡΗΣΗ ΕΝΤΥΠΩΜΕΝΩΝ ΜΙΚΡΟΡΕΥΣΤΟΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ
ΔΙΑΤΑΞΕΩΝ ΧΑΡΤΙΟΥ ΚΑΙ ΝΑΝΟΥΛΙΚΩΝ

ΦΩΤΕΙΝΗ Α. ΚΑΠΠΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ M.Sc.

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2019

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2»

- Ημερομηνία **έγκρισης της αίτησης** της κ. Φωτεινής Κάππη : **Συνέλευση Τμήματος**

Χημείας 901/13-02-2015

- Ορισμός **Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής** από τη Συνέλευση Τμήματος Χημείας :902/ 27-02-2015

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

Γκιώκας Δημοσθένης, Επίκ. Καθηγητής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Τμήματος Χημείας

Μέλη:

Βλεσσίδης Αθανάσιος, Καθηγητής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Τμήματος Χημείας

Γεράσιμος Μαλανδρίνος, Αν. Καθηγητής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Τμήματος Χημείας

- Ημερομηνία **ορισμού θέματος:** Συνέλευση Τμήματος Χημείας 903/13-3-2015

Θέμα: «ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΙΚΡΟ-ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΕΝΤΥΠΩΜΕΝΩΝ ΜΙΚΡΟΡΕΥΣΤΟΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΔΙΑΤΑΞΕΩΝ ΧΑΡΤΙΟΥ ΚΑΙ ΝΑΝΟΥΛΙΚΩΝ»

- **ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ** από τη Συνέλευση του Τμήματος Χημείας (Συνεδρίαση 997/12-04-19):

- 1) Γκιώκας Δημοσθένης, Επίκουρος Καθηγητής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Τμήματος Χημείας, Επιβλέπων.
- 2) Βλεσσίδης Αθανάσιος, Καθηγητής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Τμήματος Χημείας, Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής.
- 3) Γεράσιμος Μαλανδρίνος, Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Τμήματος Χημείας, Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής.
- 4) Σταλίκας Κωνσταντίνος, Καθηγητής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Τμήματος Χημείας, Μέλος.
- 5) Γαρούφης Αχιλλέας, Καθηγητής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Τμήματος Χημείας, Μέλος.
- 6) Κουρκουμέλης Νικόλαος, Επίκουρος Καθηγητής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Τμήματος Ιατρικής, Μέλος
- 7) Dionysios Christodouleas, Assistant Professor, University of Massachusetts (Lowell), Department of Chemistry, USA, Μέλος.

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό **«ΑΡΙΣΤΑ»** στις 03-07-2019

Η Πρόεδρος του Τμήματος Χημείας

Η Γραμματέας του Τμήματος

Μαρία Λουλούδη, Καθηγήτρια

Ξανθή Τουτουνζόγλου

**Αφιερώνεται
στην οικογένειά μου**

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	i
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ ΚΑΙ ΣΧΗΜΑΤΩΝ.....	vi
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	xiii
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	xv

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.

1.1 Εισαγωγή.....	2
1.2 Κυστεΐνη.....	5
1.3 Ομοκυστεΐνη.....	9
1.4 Γλουταθειόνη.....	14
1.5 Βιοθειόλες και σχετικές ασθένειες.....	19
1.6 Προσδιορισμός των βιοθειολών.....	27
1.6.1 Αποθήκευση δείγματος και καταστολή της ανταλλαγής θειολών-δισουλφιδίων.....	27
1.6.2 Προκατεργασία δείγματος και αναγωγή των δισουλφιδίων.....	28
1.6.3 Απομάκρυνση πρωτεϊνών.....	29
1.7 Φασματοφωτομετρικός και Φθορισμομετρικός προσδιορισμός Βιοθειολών.....	30
1.7.1 Αντιδραστήρια παραγωγοποίησης.....	30
1.7.2 Προσδιορισμός βιοθειολών με τεχνικές διαχωρισμού.....	36

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΟΠΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΕΝΥΣΗΣ ΒΙΟΘΕΙΟΛΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΝΑΝΟΪΛΙΚΩΝ

2.1 Εισαγωγή.....	42
2.2 Προσδιορισμός των θειολών με νανοσωματίδια χρυσού.....	42
2.3 Φωτομετρικοί προσδιορισμοί με τα νανοσωματίδια χρυσού.....	46
2.3.1 Φωτομετρικοί προσδιορισμοί που βασίζονται στη συσσωμάτωση νανοσωματιδίων χρυσού.....	46
2.3.2 Φωτομετρικοί προσδιορισμοί βασισμένοι στην παρεμποδισμένη ή αντίστροφη της συσσωμάτωσης των νανοσωματιδίων χρυσού.....	49

2.3.3 Εκχύλιση βιοθειολών μέσω νανοσωματιδίων χρυσού.....	51
2.4 Μέθοδοι Φωταύγειας με τα νανοσωματίδια χρυσού.....	53
2.5 Μέθοδοι χημειοφωταύγειας με βάση τα νανοσωματίδια χρυσού.....	56
2.6 Προσδιορισμός βιοθειολών με τα νανοσωματίδια αργύρου.....	57
2.7 Φωτομετρικές μέθοδοι με βάση τα νανοσωματίδια αργύρου.....	60
2.8 Μέθοδοι φθορισμού με βάση τα νανοσωματίδια αργύρου.....	63
2.9 Προσδιορισμός των θειολών με άλλα νανοσωματίδια.....	64

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΧΑΜΗΛΟΥ ΚΟΣΤΟΥΣ ΧΡΩΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΒΙΟΘΕΙΟΛΩΝ ΜΕ ΚΟΙΝΕΣ ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗΣ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗΣ ΠΟΥ ΒΑΣΙΖΕΤΑΙ ΣΤΗ ΦΩΤΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΓΩΓΗ ΑΛΟΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΡΓΥΡΟΥ.

Περίληψη.....	72
1.1 Εισαγωγή.....	73
1.2 Υλικά και μέθοδοι	
1.2.1 Αντιδραστήρια.....	74
1.2.2 Εξοπλισμός.....	75
1.2.3 Πειραματική Πορεία.....	76
1.2.4 Δείγματα.....	77
1.3 Αποτελέσματα και συζήτηση	
1.3.1 Φωτοαναγωγή αλογονιδίων αργύρου.....	78
1.3.2 Επιλογή των κατάλληλων κρυστάλλων αλογονιδίων του αργύρου.....	79
1.3.3 Βελτιστοποίηση της ανάλυσης βιοθειολών.....	80
1.3.4 Βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης ιόντων Ag^+	82
1.3.5 Βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης NaCl	83
1.3.6 Βελτιστοποίηση του pH.....	86
1.3.7 Βελτιστοποίηση του χρόνου επώασης και της θερμοκρασίας.....	88
1.3.8 Εκλεκτικότητα.....	91
1.3.9 Βελτιστοποίηση αναγωγής του διθειοϋλφιδικού δεσμού.....	94
1.3.10 Αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου.....	94
1.3.11 Εφαρμογή της μεθόδου.....	97
1.4. Συμπεράσματα	100

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΜΙΚΡΟΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ ΧΑΡΤΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΒΙΟΘΕΙΟΛΩΝ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΤΗ ΦΩΤΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΓΩΓΗ ΤΩΝ ΑΛΟΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΟΥ ΑΡΓΥΡΟΥ

Περίληψη.....	102
2.1. Εισαγωγή.....	103
2.2 Υλικά και μέθοδοι.....	104
2.2.1 Χημικές ουσίες και υλικά	104
2.2.2 Εξοπλισμός.....	104
2.3 Πειραματικές Πορείες	105
2.3.1 Κατασκευή διατάξεων χαρτιού.....	105
2.3.2 Δείγματα.....	106
2.3.3 Ανίχνευση βιοθειολών σε αναλυτικές διατάξεις χαρτού.....	107
2.3.4 Δοκιμές σταθερότητας	108
2.4 Αποτελέσματα και συζήτηση	109
2.4.1 Ανάπτυξη της μεθόδου με βάση το χαρτί.....	109
2.4.2 Βελτιστοποίηση της μεθόδου.....	110
2.4.3 Μηχανισμός ανίχνευσης βιοθειολών.....	116
2.4.4 Εκλεκτικότητα της μεθόδου – Μελέτη παρεμποδίσεων.....	120
2.4.5 Σταθερότητα των διατάξεων.....	123
2.4.6 Προσδιορισμός βιοθειολών σε βιολογικά υγρά.....	125
2.5 Συμπεράσματα.....	127

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ ΧΑΡΤΟΥ ΜΕ ΕΝΣΩΜΑΤΩΜΕΝΕΣ ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΕΣ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΟΣΟΤΙΚΩΝ ΑΝΑΛΥΣΕΩΝ ΒΙΟΘΕΙΟΛΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ΣΤΑΘΕΡΗΣ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ

Περίληψη.....	128
3.1 Εισαγωγή.....	130
3.2 Υλικά και μέθοδοι.....	138
3.2.1 Αντιδραστήρια και υλικά.....	138
3.2.2 Κατασκευή διατάξεων χάρτου	139
3.2.3 Προετοιμασία και χρήση διατάξεων με βαθμονόμηση.....	140
3.2.4 Βελτιστοποίηση πειραματικών συνθηκών.....	143
3.2.5 Βελτιστοποίηση διατάξεων για ομοιόμορφη κατανομή των χρωματομετρικών αντιδραστηρίων εντός της ζώνης ανίχνευσης.....	147
3.3 Αποτελέσματα και συζήτηση.....	149
3.3.1 Βαθμονομημένες διατάξεις χάρτου και μέθοδος σταθερής προσθήκης.....	149
3.3.2 Μαθηματικά μοντέλα για ανάλυση με την μέθοδο της σταθερής προσθήκης.....	150
3.3.3 Βαθμονομημένες διατάξεις με γραμμικές καμπύλες σταθερής προσθήκης.....	152
3.3.4 Βαθμονομημένες διατάξεις με μη γραμμικές καμπύλες σταθερής προσθήκης.....	155
3.3.5 Σύγκριση με άλλες μεθόδους βαθμονόμησης.....	166
3.3.6 Επαναληψιμότητα ακρίβεια και της μεθόδου σταθερής προσθήκης σε διαφορετικές βαθμονομημένες διατάξεις χάρτου.....	169
3.3.7 Σταθερότητα των βαθμονομημένων διατάξεων και επίδραση περιβαλλοντικών συνθηκών.....	170
3.4. Συμπεράσματα.....	173
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	175
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	205
SUMMARY.....	209

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ ΚΑΙ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Εικόνα 1.1. Γενικός τύπος θειόλης. Με μπλε παρουσιάζεται η υδροθειομάδα. Όπου R είναι γενικά οργανική ρίζα και όχι αποκλειστικά και μόνο αλκύλιο.....	2
Εικόνα 1.2. Χημικές δομές βιοθειολών. Cys, κυστεΐνη; Hcy, ομοκυστεΐνη; CA, κυστεαμίνη. -GluCys, γλουταμυλοκυστεΐνη. CysGly, κυστεΐνυλγλυκίνη. GSH, γλουταθειόνη. NAC, N-ακετυλοκυστεΐνη. CoA, συνένζυμο A.....	4
Εικόνα 1.3. Συντακτικός τύπος κυστεΐνης. $M(C_3H_7NO_2S)=121.16g/mol$	6
Εικόνα 1.4. Οξείδωση της κυστεΐνης προς σχηματισμό κυστίνης.....	7
Εικόνα 1.5. Συντακτικός τύπος ομοκυστεΐνης. $M(C_4H_9NO_2S)=135,18g/mol$	10
Εικόνα 1.6. Μεταβολικές οδοί της ομοκυστεΐνης.....	12
Εικόνα 1.7. Συντακτικός τύπος γλουταθειόνης. $M(C_{10}H_{17}N_3O_6S)=307.32g/mol$	15
Εικόνα 1.8. Συντακτικός τύπος οξειδωμένης γλουταθειόνης.....	17
Εικόνα 1.9. Ανίχνευση θειολών χρησιμοποιώντας αντιδραστήριο Ellman (DTNB). Λόγω του χαμηλού pKa του TNB σχηματίζεται μια εξαιρετικά αποτελεσματική αποχωρούσα ομάδα.....	30
Εικόνα 1.10. Υδρόλυση του DTNB. Τα ιόντα υδροξυλίου θα εισχωρήσουν στον δεσμό δισουλφιδίου του DTNB σχηματίζοντας ένα σουλφενικό οξύ και ένα θειολικό άλας...31	31
Εικόνα 1.11. Δομή 4-DPS και αντίδραση με θειόλες. Για κάθε θειόλη που οξειδώνεται σχηματίζεται ένα μόριο θειοπυριδόνης. Το τελευταίο είναι ένα ταυτομερές της θειόλης, το οποίο απορροφά ισχυρά στα 324nm.....	32
Εικόνα 1.12. Αντίδραση παραγωγοποίησης θειολών με τα μπιμάνια.....	33
Εικόνα 1.13. Αντίδραση βενζοφουρανίων με θειόλες. Τα προϊόντα της αντίδρασης είναι εξαιρετικά φθορίζοντα.....	34
Εικόνα 1.14. Αντίδραση παραγωγοποίησης θειολών με το τετραφθόροβορικό άλας της 2- χλώρο-1-μέθυλο κινολίνης.....	35

Εικόνα 1.15. Αντίδραση παραγωγοποίησης θειολών με το αντιδραστήριο ο-φθαλαλδεΰδη.....	36
Εικόνα 2.1. Σχηματική ανίχνευση βιοθειόλης βασισμένη στις αρχές (α) της συσσωμάτωσης νανοσωματιδίων χρυσού (ανατυπωμένη από τον Chen et al., 2009 με άδεια από την Springer Science) και (β) της παρεμποδισμένης συσσωμάτωσης νανοσωματιδίων χρυσού (ανατυπωμένη από τους Li et al. με άδεια από την Elsevier). Σημείωση: ssDNA, μονόκλωνο DNA. SAM, S-αδενοσυλ-L-μεθειονίνη.....	48
Εικόνα 2.2. Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διαδικασίας για την εκχύλιση των αμινοθειολών με νανοσωματίδια χρυσού επικαλυμμένα με Tween-20 πριν από τον προσδιορισμό τους με τριχοειδή ηλεκτροφόρηση- φθορισμό επαγόμενου από λέιζερ ως παράγωγα της ο-φθαλκικής αλδεΰδης. Σημείωση: Επανεκτύπωση από Shen, Tseng and Hsieh 2009 με την άδεια του Elsevier. AuNPs, νανοσωματίδια χρυσού. TGA, θειογλυκολικό οξύ, OPA, ο-φθαλαλδεΰδη. CE-LIF, τριχοειδής ηλεκτροφόρηση-φθορισμός που προκαλείται από λέιζερ.....	52
Εικόνα 2.3. Σχηματική ανίχνευση βιοθειολών με βάση (α) την αποκατάσταση της έντασης φθορισμού που είναι αποσβένεται από τα νανοσωματίδια χρυσού μέσω σε μηχανισμών μεταφοράς ενέργειας φθορισμού (Επανεκτύπωση από Lo et al., 2015 με την άδεια του Elsevier) και (β) το φαινόμενο του εσωτερικού φίλτρου μεταξύ της εκπομπής των κβαντικών κουκίδων CdTe και της απορρόφησης των νανοσωματιδίων χρυσού (Επανεκτύπωση από Xu et al., 2011 με την άδεια του Elsevier). Σημείωση: Το PyBDP, το διπυρρομεθένιο του βορίου και τα QDs οι κβαντικές κουκίδες.....	56
Εικόνα 2.4. Σχηματική ανίχνευση βιοθειολών με τη χρήση συντονισμού και συσσωμάτωσης ιόντων μετάλλων-βιοθειολών-νανοσωματιδίων αργύρου. Σημείωση: Επανεκτύπωση από Han et al. (2014) με την άδεια του Elsevier. AgNPs, νανοσωματίδια αργύρου.....	63
Σχήμα 2.5. Σχηματική παράσταση ανίχνευσης των βιοθειολών με βάση τη συσσωμάτωση διμεταλλικών νανοσωματιδίων Ag/Pd με τη μεσολάβηση του NaCl. Σημειώσεις: Επανεκτύπωση από Farhadi et al., (2014) με άδεια από την Elsevier. AgNPs, νανοσωματίδια αργύρου. PdNPs, νανοσωματίδια παλλαδίου.....	67

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Εικόνα 1.1. (α) Εναιώρημα AgCl μετά από έκθεση σε ακτινοβολία UV (β) Εναιώρημα AgCl παρουσία 100,0μM κυστεΐνης μετά από έκθεση σε ακτινοβολία UV. Το αιώρημα AgCl παρασκευάστηκε με ανάμιξη 1,5mM AgNO₃ με 5.0% (β/ο) NaCl. Η ακτινοβολήση των διαλυμάτων πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο έκθεσης υπεριώδους ακτινοβολίας (4 w cm⁻²) για 25 δευτερόλεπτα. Οι εικόνες ελήφθησαν με επίπεδο σαρωτή και παρουσιάζουν τα αιωρήματα AgCl σε μικροπλακίδια 96 φρεατίων. Πειραματικές λεπτομέρειες στο κείμενο. Και οι δύο εικόνες περικόπηκαν και μεγεθύνθηκαν για να διευκολύνουν την προβολή όψης.....81

Εικόνα 1.2. Επίδραση της συγκέντρωσης AgNO₃ στην απόκριση του καθαρού αναλυτικού σήματος της κυστεΐνης. (κυστεΐνη = 135μM, NaCl 5.0% (β/ο), χρόνος επώασης=2 λεπτά, ακτινοβολήση στα 4w cm⁻² για 30 δευτερόλεπτα) Οι ενσωματωμένες φωτογραφίες παρουσιάζουν ένα τυπικό πείραμα (n = 3).....82

Εικόνα 1.3. Απόκριση σήματος που λαμβάνεται από τα τυφλά δείγματα (τετράγωνα σύμβολα) και το πρότυπο διάλυμα θειόλης (δηλαδή κυστεΐνη) (κυκλικά σύμβολα) με αυξανόμενες συγκεντρώσεις AgNO₃ και NaCl.....83

Εικόνα 1.4. Επίδραση της συγκέντρωσης NaCl στην απόκριση καθαρού αναλυτικού σήματος (κυστεΐνη=135μM, AgNO₃ 1,25mM, χρόνος επώασης=2 λεπτά, ακτινοβολήση στα 4w cm⁻² για 30 δευτερόλεπτα). Οι ενσωματωμένες φωτογραφίες παρουσιάζουν ένα τυπικό πείραμα (n = 3).....85

Εικόνα 1.5. Επίδραση της συγκέντρωσης δεξτρίνης στην απόκριση του καθαρού αναλυτικού σήματος της κυστεΐνης στη μέθοδο που βασίζεται σε διάλυμα.....86

Εικόνα 1.6. (α) Επίδραση του pH στην απόκριση του καθαρού αναλυτικού σήματος της κυστεΐνης στη μέθοδο που βασίζεται σε διάλυμα. (β) Απόκριση σήματος που λαμβάνεται από το τυφλό δείγμα (τετράγωνο σήμα) και το πρότυπο διάλυμα θειόλης (δηλ. κυστεΐνη) (σήμα κύκλου) σε διαφορετικές τιμές pH. Οι ενσωματωμένες φωτογραφίες δείχνουν τις χρωματομετρικές μεταπτώσεις του τυφλού και των προτύπων διαλυμάτων θειόλης σε διαφορετικές τιμές pH.....87

Εικόνα 1.7. Απόκριση καθαρού αναλυτικού σήματος του εναιωρήματος AgCl παρουσία κυστεΐνης με αυξανόμενη θερμοκρασία (η ρύθμιση της θερμοκρασίας έγινε κατά τη διάρκεια του χρόνου επώασης και πριν από τη φωτο-αναγωγή).....88

Εικόνα 1.8. Επίδραση του χρόνου επώασης (πριν από τη φωτο-ακτινοβόληση) στην απόκριση αναλυτικού σήματος του εναιωρήματος AgCl παρουσία κυστεΐνης. Πειραματικές συνθήκες: Κυστεΐνη = 135μM, AgNO ₃ = 1,25mM, NaCl = 4% (β/ο), ακτινοβολία στα 4w cm ⁻² για 30 δευτερόλεπτα.....	89
Εικόνα 1.9. Κινητική του αναλυτικού σήματος της κυστεΐνης χρησιμοποιώντας διαφορετικές πηγές ακτινοβολίας.....	91
Εικόνα 1.10. α) Ανάκτηση κυστεΐνης (100,0μM) παρουσία σημαντικών ανόργανων αλάτων και βιομορίων σε συγκεντρώσεις ίσες ή υψηλότερες από τα φυσιολογικά επίπεδα στο πλάσμα αίματος και στα ούρα. Η μελέτη της παρεμπόδισης διεξήχθη με τη χρήση μιγμάτων 2 ουσιών (κυστεΐνης και παρεμβλλόμενης ουσίας) που αραιώθηκαν 2 φορές πριν από την ανάλυση, η οποία είναι η ελάχιστη αραιώση που απαιτείται για να βρίσκονται οι συγκεντρώσεις της βιοθειόλης μέσα στο γραμμικό εύρος της μεθόδου. (β) Ανάκτηση κυστεΐνης (100,0μM) παρουσία 0,5mM διαφόρων κύριων αμινοξέων.....	93
Εικόνα 2.1. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας κατασκευής των διατάξεων χαρτιού και φωτογραφίες των διατάξεων χαρτιού.....	106
Εικόνα 2.2. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας παρασκευής και χρήσης των διατάξεων χαρτιού για τον προσδιορισμό των βιοθειολών.....	108
Εικόνα 2.3. Επίδραση των συγκεντρώσεων των AgNO ₃ , NaCl και του οξέος στην απόκριση σήματος των τυφλών δειγμάτων (σύμβολα ανοιχτού τριγώνου) και στα πρότυπα διαλύματα κυστεΐνης (σύμβολα ανοικτού τετραγώνου). Τα σύμβολα μαύρου κύκλου δείχνουν την απόκριση καθαρού αναλυτικού σήματος του προτύπου διαλύματος κυστεΐνης.....	112
Εικόνα 2.4. Επίδραση των συνθηκών ακτινοβόλησης (μήκος κύματος φωτός, απόσταση από την πηγή ακτινοβολίας και χρόνου έκθεσης) στην απόκριση του αναλυτικού σήματος ενός πρότυπου διαλύματος κυστεΐνης (Πειραματικές συνθήκες: 2μL κυστεΐνης 272μM, 50mM AgNO ₃ , 80mM NaCl και οξικού οξέος 0,1M).....	113

Εικόνα 2.5. Φωτογραφίες και στερεοσκοπικές εικόνες (μεγεθυμένη όψη) των διατάξεων χαρτιού μετά από ακτινοβολία UV (α) απουσία βιοθειολών και (β) παρουσία βιοθειολών (κυστεΐνη 275μM).....	114
Εικόνα 2.6. Γραμμικά διαγράμματα βαθμονόμησης κυστεΐνης, γλουταθειόνης και ομοκυστεΐνης σε 150mM NaNO ₃	115
Εικόνα 2.7. Εικόνες SEM των διατάξεων χαρτιού που περιέχουν (Α) σωματίδια AgCl (Β) σωματίδια AgCl μετά την προσθήκη βιοθειολών και πριν από την ακτινοβολία UV (C) σωματίδια AgCl μετά την ακτινοβολία UV (χωρίς την προσθήκη βιοθειολών) και (D) σωματίδια AgCl μετά την προσθήκη βιοθειολών και μετά από την ακτινοβολία UV.....	117
Εικόνα 2.8. Μικρογραφία SEM που δείχνει την διασπορά των σωματιδίων AgCl στα άκρα της διάταξης χαρτιού μετά την προσθήκη του δείγματος (coffee ring effect)..	118
Εικόνα 2.9. Ανάκτηση της κυστεΐνης (272,0 μM) παρουσία (α) διαφόρων αμινοξέων και βιομορίων (β) ανόργανων αλάτων. Οι συγκεντρώσεις κάθε είδους ήταν ως ακολούθως: αμινοξέα 0,5mM (συνολική συγκέντρωση όλων των αμινοξέων: 3mM), γλυκόζη 5mM, ουρία 140mM, ουρικό οξύ 360μM, ασκορβικό οξύ 100μM, κρεατινίνη 120μM, KNO ₃ 6mM , Na ₂ SO ₄ 14mM, K ₂ HPO ₄ 18mM, NaHCO ₃ 30mM, κιτρικό 3mM, Ca(NO ₃) ₂ 4mM και Mg(NO ₃) ₂ 2mM. Η μελέτη διεξήχθη χρησιμοποιώντας μίγματα δύο ουσιών (κυστεΐνη και παρεμποδιστής) τα οποία αραιώθηκαν 3 φορές πριν την ανάλυση με σκοπό η συγκέντρωση της κυστεΐνης να βρίσκεται εντός της γραμμικής περιοχής της μεθόδου. Στη μελέτη παρεμπόδισης των κιτρικών, φωσφορικών και ανθρακικών ιόντων, το pH των διαλυμάτων ρυθμίστηκε στην τιμή 7,0 για να ταιριάζει με το φυσιολογικό pH των βιολογικών υγρών.....	121
Εικόνα 2.10. Αναλυτική απόκριση σήματος κυστεΐνης, γλουταθειόνης και ομοκυστεΐνης σε διαλύματα τεχνητών ούρων (AUS), τεχνητού πλάσματος αίματος (ABP) και 150mM NaNO ₃	123
Εικόνα 3.1. Αυτό-βαθμονομούμενες αναλυτικές διατάξεις χάρτου α) δεντροειδής (αριστερή εικόνα) και β) αστεροειδής (δεξιά εικόνα). Οι αριθμοί 1-5 υποδηλώνουν τα πρότυπα διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης και ενώ χ είναι το άγνωστο δείγμα....	133
Εικόνα 3.2. Προ-βαθμονομημένες αναλυτικές διατάξεις χάρτου (α) μέτρηση αριθμού έγχρωμων ράβδων (β) μέτρηση χρόνου και (γ) μέτρηση απόστασης.....	134

Εικόνα 3.3. Συσκευές χάρτου για την πραγματοποίηση αναλύσεων σταθερής προσθήκης ενός σημείου.....	135
Εικόνα 3.4. Σχεδιασμός και προετοιμασία των διατάξεων.....	139
Εικόνα 3.5. Διαδικασία και πειραματική πορεία ανάλυσης δείγματος σε βαθμονομημένες διατάξεις χάρτου: α) οι διατάξεις εκτυπώνονται και θερμαίνονται ώστε να διαμορφωθούν οι περιοχές ανίχνευσης, β) τα χρωματομετρικά αντιδραστήρια και οι δείκτες εναποτίθενται στην επιφάνεια των ζωνών ανίχνευσης και αφήνονται να στεγνώσουν, γ) προστίθενται τα διαλύματα βαθμονόμησης, οι διατάξεις ξηραίνονται και αποθηκεύονται, δ) σε κάθε περιοχή ανίχνευσης εναποτίθεται ένας συγκεκριμένος όγκος δείγματος και αποκτάται το σήμα, ε) τα σήματα του τυφλού από κάθε περιοχή ανίχνευσης αφαιρούνται από το συνολικό σήμα και σχηματίζεται η καμπύλη σταθερής προσθήκης για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του αναλύτη.....	141
Εικόνα 3.6. Εικόνες οπτικού μικροσκοπίου μιας βαθμονομημένης διάταξης για τον προσδιορισμό σιδήρου (III) -θειοκυανιούχων. Η επάνω δεξιά πλευρά της εικόνας δείχνει το υδρόφοβο φράγμα με βάση το κερί.....	142
Εικόνα 3.7. Γραμμικές συναρτήσεις μέθοδο σταθερής προσθήκης που εκτελούνται σε βαθμονομημένες διατάξεις με βάση το χαρτί: (α) προσδιορισμός σιδήρου (III) – θειοκυανιούχων (β) προσδιορισμός πρωτεϊνών-μπλε βρωμοφαινόλης, (γ) και (δ) προσδιορισμός βιοθειολών (κυστεΐνης και γλουταθειόνης) με φωτοχημική αναγωγή αλογονιδίων του αργύρου. Οι πολωνυμικές εξισώσεις πρώτης τάξης των καμπύλων σταθερής προσθήκης δίνονται στον Πίνακα 3.1.....	152
Εικόνα 3.8. Εξωτερικές καμπύλες βαθμονόμησης (που λαμβάνονται κατά την προετοιμασία των βαθμονομημένων διατάξεων) για (α) τον προσδιορισμό σιδήρου (III)–θειοκυανιούχων και (β) τον προσδιορισμό πρωτεϊνών-μπλε βρωμοφαινόλης. Οι ενσωματωμένες φωτογραφίες δείχνουν τις χρωματομετρικές μεταπτώσεις στην επιφάνεια του χάρτου μετά την προσθήκη των πρότυπων διαλυμάτων. Οι φωτογραφίες περικόπτονται και μεγεθύνονται για να διευκολύνεται η προβολή όψεων.....	154
Εικόνα 3.9. Πολωνυμικές καμπύλες για τη βαθμονόμηση πολλαπλής σταθερής προσθήκης που εκτελούνται σε βαθμονομημένες διατάξεις χάρτου για (α) τον προσδιορισμό H_2O_2 -ιωδιούχων, (β) τον ογκομετρικό προσδιορισμό οξικού οξέος/ OH^- -φαινολοφθαλεΐνης και (γ) τον ογκομετρικό προσδιορισμό ανθρακικών/ H^+ -	

φαινοφθαλεΐνης. Οι πολωνυμικές συναρτήσεις δίνονται στον Πίνακα 3.2. Οι ανοικτοί κύκλοι στο αρνητικό τμήμα του άξονα x δείχνουν την πραγματική τιμή...157

Εικόνα 3.10. Καμπύλες εξωτερικής βαθμονόμησης (που λαμβάνονται κατά την προετοιμασία των βαθμονομημένων διατάξεων) για (α) τον προσδιορισμό H_2O_2 -ιωδιούχων, (β) τον ογκομετρικό προσδιορισμό οξικού οξέος/ OH^- -φαινολοφθαλεΐνης και (γ) τον ογκομετρικό προσδιορισμό ανθρακικών/ H^+ -φαινοφθαλεΐνης. Οι ενσωματωμένες φωτογραφίες δείχνουν τις χρωματομετρικές μεταπτώσεις στην επιφάνεια του χάρτου μετά την προσθήκη των πρότυπων διαλυμάτων.....158

Εικόνα 3.11. Αξιολόγηση πολωνυμικών συναρτήσεων σε μη γραμμικές καμπύλες αναφοράς σταθερής προσθήκης με χρήση τριών ανεξάρτητων συνόλων δεδομένων που ανακτώνται από τη βιβλιογραφία. (α) Δεδομένα που ανακτώνται από την Αναφ. Schonhorn et al., 2014 (βλ. Σχήμα 3 στην αρχική δημοσίευση). Τα αρχικά δεδομένα δείχνουν τα αποτελέσματα ενός ανοσοπροσδιορισμού με βάση το χαρτί για την ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη. Η αναμενόμενη τιμή είναι 10,0. (β) Δεδομένα που ανακτώνται από την Αναφ. Wu et al., 2015 (βλ. Σχήμα 7 στην αρχική δημοσίευση). Τα αρχικά δεδομένα δείχνουν την απόκριση της αιθανόλης σε μια μικρο-ηλεκτροχημική διάταξη χάρτου. Η αναμενόμενη τιμή είναι 0,9. (γ) Δεδομένα που ανακτώνται από την Αναφ. Carrilho et al., 2009 (βλ. Σχήμα 6β στην αρχική δημοσίευση). Τα αρχικά δεδομένα δείχνουν τη σχέση μεταξύ των ποσοτήτων βαφής Coomassie που προσροφούνται στις ζώνες χάρτου σε μια πλάκα χάρτου 96 ζωνών σε σχέση με την ένταση της γκρίζας κλίμακας που μετρήθηκε από την ψηφιακή εικόνα της βαφής. Η αναμενόμενη τιμή είναι 0,1. (δ) Ανάλυση ανθρακικών ιόντων σε ένα αραιωμένο δείγμα μαλακού ποτού. Η αναμενόμενη τιμή είναι 0,04M.....165

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Πίνακας 1.1. Βιοθειόλες και η συσχέτιση τους με διάφορες ασθένειες.....	20
Πίνακας 1.2. Πρόσφατες αναλυτικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό των θειολών.....	37
Πίνακας 2.1. Μέθοδοι για τον προσδιορισμό βιοθειολών βασισμένοι σε νανοσωματίδια χρυσού.....	44
Πίνακας 2.2. Μέθοδοι που βασίζονται σε νανοσωματίδια αργύρου για τον προσδιορισμό των βιοθειολών.....	58
Πίνακας 2.3. Μέθοδοι για τον προσδιορισμό των βιοθειολών με τη χρήση διαφόρων νανοϋλικών.....	66

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Πίνακας 1.1. Τεχνικές προδιαγραφές (ιδιότητες, μήκος κύματος και ένταση) των πηγών ακτινοβολίας που χρησιμοποιήθηκαν σε όλη τη διάρκεια της μελέτης υπό βέλτιστες συνθήκες εργασίας.....	75
Πίνακας 1.2. Αναλυτικά στοιχεία για την αξία της ανάλυσης ^a	96
Πίνακας 1.3. Προσδιορισμός και ανάκτηση βιοθειολών σε πραγματικά και ενισχυμένα δείγματα.....	98
Πίνακας 1.4. Προσδιορισμός αναλογίας ανηγμένων/οξειδωμένων βιοθειολών σε τεχνητό πλάσμα αίματος.....	99
Πίνακας 2.1. Αναλυτικά στοιχεία για την αξιολόγηση των μεθόδων.....	116
Πίνακας 2.2. Σταθερότητα των διατάξεων μετά από αποθήκευση για 1 μήνα υπό διαφορετικές συνθήκες.....	125
Πίνακας 2.3. Προσδιορισμός των ολικών βιοθειολών στο πλάσμα του αίματος και ανακτήσεις από τα εμβολιασμένα δείγματα.....	126
Πίνακας 2.4. Προσδιορισμός ανηγμένων/οξειδωμένων βιοθειολών σε τεχνητό πλάσμα αίματος.....	127

Πίνακας 3.1. Γραμμικές καμπύλες σταθερής προσθήκης για τον προσδιορισμό του σιδήρου, των πρωτεϊνών και βιοθειολών σε διατάξεις χάρτου με βαθμονόμηση.....	155
Πίνακας 3.2. Πολυωνυμικές συναρτήσεις, κριτήρια προσαρμογής και παραμέτροι ποιοτικής προσαρμογής για καμπύλες βαθμονόμησης σταθερής προσθήκης για τον προσδιορισμό βιοθειολών, υπεροξειδίου του υδρογόνου, οξικού οξέος και ανθρακικού άλατος σε διατάξεις χάρτου.....	163
Πίνακας 3.3. Αποτελέσματα από την εφαρμογή διαφορετικών μεθόδων βαθμονόμησης σε χαρτί για τον προσδιορισμό του σιδήρου, των πρωτεϊνών, του υπεροξειδίου του υδρογόνου, του οξικού οξέος και του ανθρακικού άλατος. Μέσος όρος τριών μετρήσεων $\pm$ RSD (%).....	168
Πίνακας 3.4. Ακρίβεια και επαναληψιμότητα των ποσοτικών προσδιορισμών που έγιναν σε βαθμονομημένες διατάξεις χάρτου.....	170
Πίνακας 3.5. Ανακτήσεις (αποτελέσματα που λαμβάνονται από την αποθηκευμένη διάταξη σε σύγκριση με εκείνα που λαμβάνονται από τη νέα διάταξη) μετά από αποθήκευση για 1 μήνα υπό διαφορετικές συνθήκες. Μέσος όρος πέντε μετρήσεων $\pm$ RSD (%).....	171

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων στο πλαίσιο του Προγράμματος χρηματοδότησης «ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ ΑΡΙΣΤΕΙΑΣ IKY/SIEMENS». Με την ολοκλήρωση της διατριβής μου θα ήθελα να ευχαριστήσω όσους στάθηκαν δίπλα μου σε αυτή την προσπάθεια με την πολύτιμη συνεργασία τους και με βοήθησαν να την φέρω εις πέρας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος τον επιβλέποντα μου Επίκουρο Καθηγητή κ. Δημοσθένη Γκιώκα, για την ανάθεση του θέματος, την εμπιστοσύνη, την καθοδήγηση, τις πολύτιμες συμβουλές και την ποικιλόμορφη στήριξή του καθ' όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών. Όλα αυτά τα χρόνια μου έμαθε πολλά πράγματα, από ερευνητικά θέματα, όπως το πως να προσεγγίζω και να πραγματοποιώ το πείραμά μου, πως να αναλύω τα αποτελέσματά μου, πως να λειτουργώ μέσα στο εργαστήριο κ.α.

Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, τον Καθηγητή Αναλυτικής Χημείας κ. Βλεσσίδη Αθανάσιο και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Ανόργανης Χημείας κ. Γεράσιμο Μαλανδρίνο για τις σημαντικές συμβουλές, τις εύστοχες υποδείξεις και διορθώσεις και για την εποικοδομητική κριτική τους.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω και στα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής μου επιτροπής: τον Καθηγητή Ανόργανης Χημείας κ. Γαρούφη Αχιλλέα, τον Επίκουρο Καθηγητή Ιατρικής Φυσικής κ. Κουρκουμέλη Νικόλαο, τον Καθηγητή Αναλυτικής Χημείας κ. Σταλικά Κωνσταντίνο και τον Επίκουρο Καθηγητή Αναλυτικής Χημείας κ. Διονύσιο Χριστοδουλέα (UMASS, Lowell, USA) για τις εύστοχες παρατηρήσεις τους.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Αναλυτικής χημείας. Πρώτα απ' όλα τον Δρ. κ Τσόγκα Γεώργιο για την ουσιαστική βοήθειά του στην ολοκλήρωση της διατριβής, όπως και τις μεταπτυχιακές φοιτήτριες Γατσέλου Βασιλική, Χολέβα Τατιάνα, Βούλγαρη Ασημίνα και Μανδύλα Σπυριδούλα για την αμέριστη βοήθεια και άριστη συνεργασία που μου προσέφεραν.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την πολύπλευρη συμπαράσταση κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής αυτής.

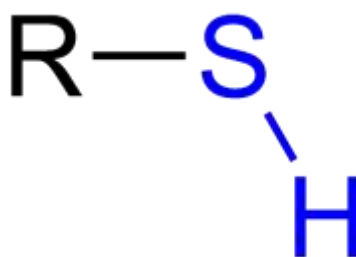
Κάππη Α. Φωτεινή
Ιωάννινα, Ιούλιος 2019

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

1.1 Εισαγωγή

Οι θειόλες (thiols-SH) είναι ενώσεις των οποίων η λειτουργική ομάδα αποτελείται από ένα άτομο θείου ενωμένο με ένα άτομο υδρογόνου (Εικόνα 1.1). Η λειτουργική αυτή ομάδα συνήθως αναφέρεται ως θειολική ομάδα ή ως σουλφυδρυλομάδα. Είναι αντίστοιχες ενώσεις με τις αλκοόλες με τη διαφορά ότι στη θέση του ατόμου του οξυγόνου υπάρχει το άτομο του θείου.



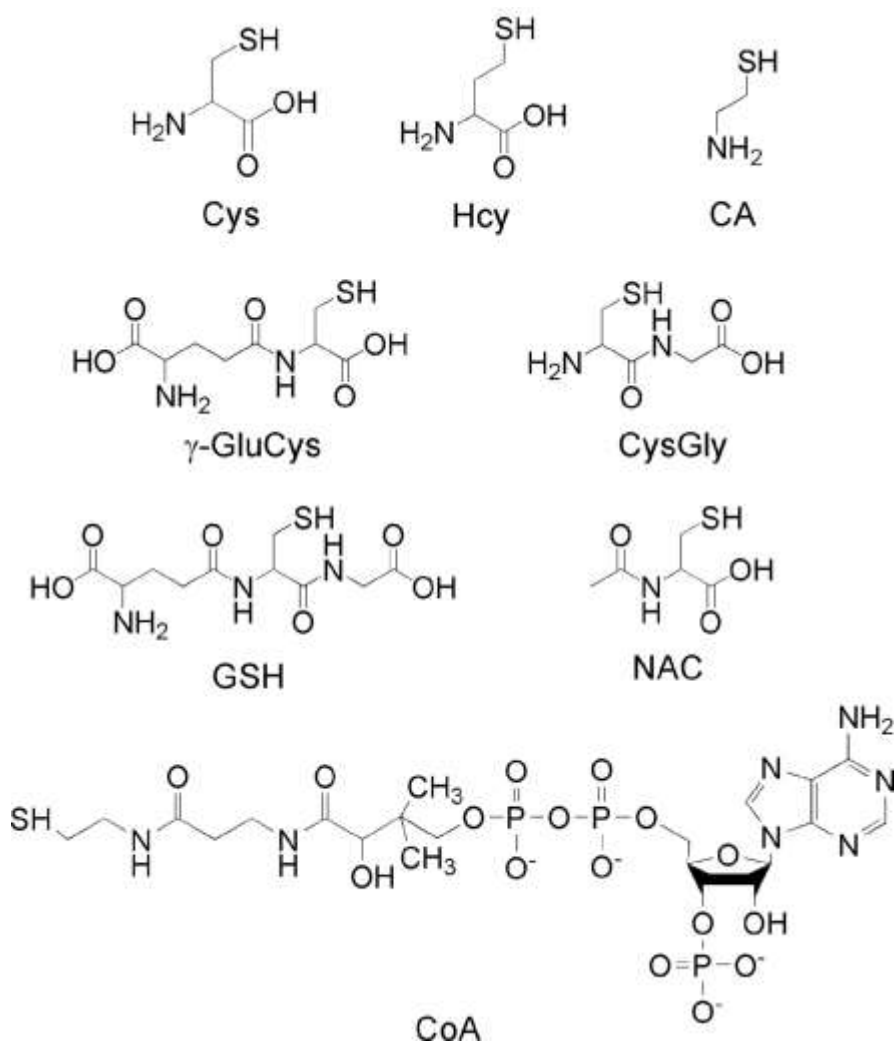
Εικόνα 1.1. Γενικός τύπος θειόλης. Με μπλε παρουσιάζεται η υδροθειομάδα. Όπου R είναι γενικά οργανική ρίζα και όχι αποκλειστικά και μόνο αλκύλιο.

Ένα από τα χαρακτηριστικότερα γνωρίσματα των θειολών είναι η περίεργη οσμή τους. Πολλές θειόλες έχουν έντονες οσμές που θυμίζουν αυτή του σκόρδου. Οι θειόλες (συνήθως η μεθανοθειόλη) χρησιμοποιούνται ως οσμοθετικές ενώσεις, δηλαδή ενώσεις που προστίθενται σε άοσμες ενώσεις ή μίγματα, όπως το υγραέριο, το φυσικό αέριο ή το φωταέριο, ώστε η χαρακτηριστική οσμή να προειδοποιεί για τυχόν υπάρχουσα διαρροή, και να αποφεύγονται έτσι, κατά το δυνατό, τα σχετικά ατυχήματα (Karakosta et al., 2013).

Ιδιαίτερης σημασίας αποτελούν οι θειολικές ενώσεις που απαντώνται σε βιολογικούς ιστούς ή όπως αλλιώς λέγονται οι **βιοθειόλες** όπως η γλουταθειόνη (GSH), η κυστεΐνη (Cys), η ομοκυστεΐνη (Hcy), η N-ακετυλοκυστεΐνη (NAC), η κυστεΐνυλγλυκίνη (CysGly), η γ-γλουταμυλοκυστεΐνη (γ-GluCys), η κυστεαμίνη (CA) και το συνένζυμο A (CoA), διότι παίζουν ουσιαστικό ρόλο στους ζωντανούς οργανισμούς και εμπλέκονται σε έναν αριθμό βιολογικών διαδικασιών (Moriarty-Craige et al., 2004, Stipanuk et al., 2004, Kemp et al., 2008) (Εικόνα 1.2) όπως η ρύθμιση του οξειδωτικού στρες. Ως οξειδωτικό stress (oxidative stress) ορίζεται η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των προοξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών ουσιών του κυττάρου και

οφείλεται είτε σε αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου είτε σε ανεπάρκεια των κυτταρικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Το οξειδωτικό stress ενοχοποιείται στην παθοφυσιολογία πολλών νοσημάτων, με αποτέλεσμα να παρουσιάζει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον η προσπάθεια φαρμακολογικής τροποποίησης της απόκρισης των οργανισμών στο οξειδωτικό stress. Ο ρόλος του έχει καταστεί πλέον αποδεκτός στην παθοφυσιολογία πολλών ασθενειών, όπως της αθηροσκλήρυνσης, της στεφανιαίας νόσου, της καρδιακής ανεπάρκειας, του σακχαρώδους διαβήτη και άλλων (Arrigo et al., 1999, Kodjoda et al., 1999, Touz et al., 2005, Reiter et al., 2004, Butterfield et al., 2005, Gawreih et al., 2004, Hecht et al., 1999, Rosenfeld et al., 1998, Ashok et al., 1999). Καρδιαγγειακοί παράγοντες κινδύνου, όπως το κάπνισμα, η υπερχοληστερολαιμία και η υπεργλυκαιμία, έχει αποδειχθεί ότι σχετίζονται άμεσα με το οξειδωτικό stress (Kodjoda et al., 1999), ενώ, τέλος, σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες ορισμένων φαρμάκων έχουν αποδοθεί και αυτές με τη σειρά τους στο οξειδωτικό stress (Arrigo et al., 1999, Kovacic et al., 2001, Subrahmanyam et al., 1987, Galati et al., 2002).

Οι αλλαγές στην οξειδοαναγωγική (redox) κατάσταση των βιοθειολών, λαμβάνει χώρα μέσω της οξειδοαναγωγής μεταξύ των ζευγών των θειολικών και δισουλφιδικών δεσμών και επηρεάζει την διαμόρφωση των πρωτεϊνών, την ενζυμική δραστηριότητα, την πρόσδεση του προσδέτη (υποκαταστάτη) στον αποδέκτη, την αλληλεπίδραση πρωτεϊνών-πρωτεϊνών, και τις αλληλεπιδράσεις DNA-πρωτεϊνών. Ο όρος δισουλφίδιο, disulfide – SS ,αναφέρεται σε χημικές ενώσεις που φέρουν δύο άτομα θείου ενωμένα με απλό δεσμό. Ο δεσμός αυτός αναφέρεται ως δισουλφιδικός δεσμός (disulfide bond) ή ως δισουλφιδική γέφυρα (disulfide bridge). Όταν ο δισουλφιδικός δεσμός αποτελεί και επίπεδο συμμετρίας της ένωσης, τότε το δισουλφίδιο ονομάζεται συμμετρικό. Δύο παραδείγματα συμμετρικών δισουλφιδικών μορίων είναι το δισουλφίδιο της γλουταθειόνης (αναφέρεται συχνά στη βιβλιογραφία και ως οξειδωμένη γλουταθειόνη) και το δισουλφίδιο της κυστεΐνης, που ονομάζεται κυστίνη. Μεικτά δισουλφίδια (mixed disulfides) ονομάζονται εκείνα που δεν είναι συμμετρικά εκατέρωθεν του δισουλφιδικού δεσμού.



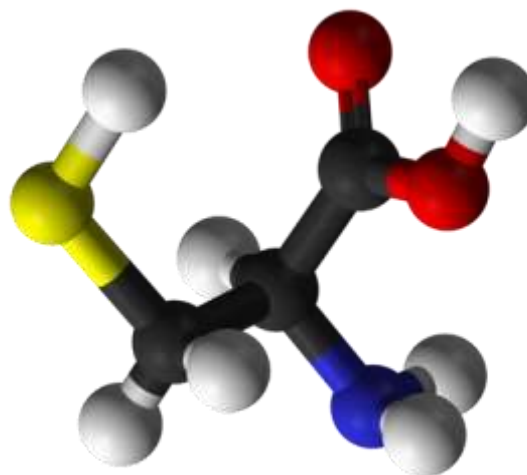
Εικόνα 1.2. Χημικές δομές βιοθειολών. Cys, κυστεΐνη; Hcy, ομοκυστεΐνη; CA, κυστεαμίνη. -GluCys, γλουταμυλοκυστεΐνη. CysGly, κυστεΐνυλγλυκίνη. GSH, γλουταθειόνη. NAC, N-ακετυλοκυστεΐνη. CoA, συνένζυμο A.

Περισσότερες από εκατό βιοθειόλες έχουν ταυτοποιηθεί σε βιολογικά υγρά, ωστόσο, η κυστεΐνη (Cys), η ομοκυστεΐνη (Hcy) και η γλουταθειόνη (GSH) είναι οι περισσότερο άφθονες (Turell et al., 2013). Σε ασθενείς που έχουν διαγνωσθεί με διάφορες κλινικές διαταραχές και ασθένειες έχουν ανιχνευθεί μη φυσιολογικά επίπεδα αυτών των βιοθειολών. Συνεπώς, λόγω της σύνδεσής τους με ένα ευρύ φάσμα κλινικών διαταραχών και ασθενειών πιο έντονη ερευνητική δραστηριότητα έχει επικεντρωθεί στην κυστεΐνη, την ομοκυστεΐνη και τη γλουταθειόνη (Turell et al., 2013, Andersson et al., 1999, Liu et al., 2016, Isokawa et al., 2014). Για παράδειγμα, στα κύτταρα του αίματος (και συνεπώς σε όλο το αίμα) η κυρίαρχη βιοθειόλη είναι η γλουταθειόνη και τα επίπεδα συγκέντρωσής της κυμαίνονται από 1 έως 10mM

(Richie et al., 1996). Στο πλάσμα αίματος, η κυρίαρχη βιοθειόλη είναι η ολική κυστεΐνη (τόσο η ανηγμένη όσο και η οξειδωμένη μορφή της) και η συγκέντρωσή της κυμαίνεται μεταξύ 150 και 300μM, ενώ οι συγκεντρώσεις της ομοκυστεΐνης και της γλουταθειόνης είναι σημαντικά χαμηλότερες (1-6 μM γλουταθειόνης και 5-15 μM ομοκυστεΐνης) (Turell et al., 2013, Andersson et al., 1999, Hakuna et al., 2014, Seiwert et al., 2007, Brattstrom et al., 1994, Estrada et al., 2001). Στα ούρα, η διαθεσιμότητα των βιοθειολών ακολουθεί παρόμοιο προφίλ με εκείνο στο πλάσμα του αίματος αλλά οι συγκεντρώσεις είναι χαμηλότερες (κυστεΐνη 20-80μM, ομοκυστεΐνη <12μM και γλουταθειόνη < 1μM) (Persichilli et al., 2011, Wei et al., 2010, Zhang et al., 2014, Zhang, Lu et al., 2014).

1.2 Κυστεΐνη

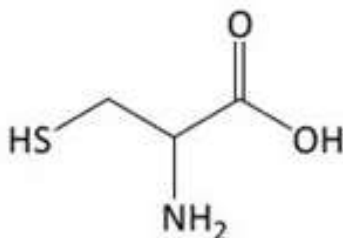
Το α- αμινοξύ κυστεΐνη (cysteine, CYS) αντιπροσωπεύει μόλις το 2% των αμινοξέων που απαντώνται σε πρωτεΐνες ευκαρυωτικών κυττάρων και το 1% των πρωτεϊνών που συναντώνται σε βακτήρια και αρχαιοβακτήρια. Παρόλα αυτά κατέχει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της ζωής, λόγω του εξέχοντος ρόλου της στον πρωτογενή και δευτερογενή μεταβολισμό.



Το μόριο της κυστεΐνης

Η κυστεΐνη όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 1.3, όπως όλα τα αμινοξέα, απαντάται σε δύο ισομερείς μορφές την R- και την S- μορφή, στις οποίες εντοπίζεται η παρουσία ενός θετικού φορτίου στην αμινομάδα και ενός αρνητικού φορτίου στην καρβοξυλομάδα του μορίου. Είναι ένα πρωτεϊνικό αμινοξύ το οποίο κωδικοποιείται

στο DNA με τις τριπλέτες βάσεων UGU και UGC. Η πλευρική αλυσίδα της κυστεΐνης χαρακτηρίζεται από την παρουσία της χαρακτηριστικής ομάδας του σουλφυδρυλίου ή αλλιώς υδροθειομάδας (-SH) γεγονός που κατατάσσει το αμινοξύ στις θειόλες (Berg et al., 2005, Whitford et al., 2005).



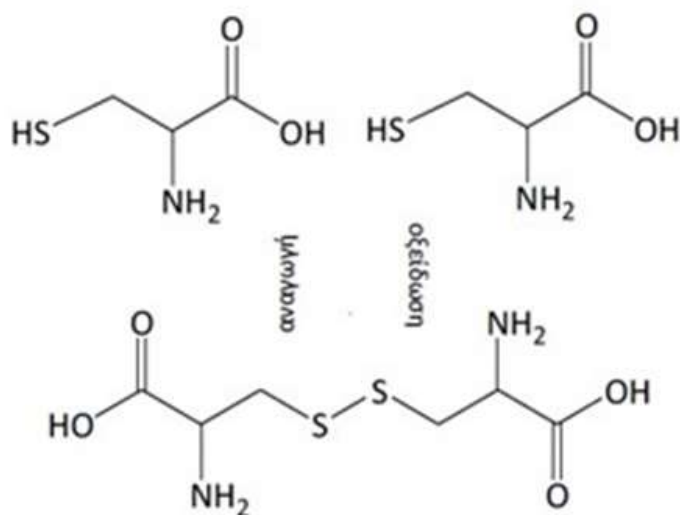
Εικόνα 1.3. Συντακτικός τύπος κυστεΐνης. $M(C_3H_7NO_2S)=121.16g/mol$.

Η σύνθεση της κυστεΐνης στα ανθρώπινα κύτταρα είναι αποτέλεσμα μιας σειράς ενδοκυττάρων αντιδράσεων, στις οποίες συμμετέχουν πολλά ένζυμα και βασίζεται στη μετατροπή του αμινοξέος μεθειονίνη σε ομοκυστεΐνη, πρόδρομη ένωση της κυστεΐνης (Lampert et al., 1989, Alpert et al., 1994, Zhu et al., 1991, Alpert et al., 1991, Majors et al., 1980). Επίσης, σύνθεση της κυστεΐνης μπορεί να πραγματοποιηθεί ταυτόχρονα σε διάφορα μέρη του φυτικού κυττάρου, όπως στα πλαστίδια, στο κυτταρόπλασμα και στα μιτοχόνδρια (Havlicek et al., 1975, Karatapanis et al., 2010, McCalley et al., 2010).

Τα φυτά, τα βακτήρια και οι μύκητες έχουν την ικανότητα να αφομοιώνουν το θείο με τη μορφή ανόργανων θεικών αλάτων, να το ανάγουν σε θειούχα και τελικά να το χρησιμοποιούν για το σχηματισμό αμινοξέων (Orth et al., 1982, Hemstrom et al., 2006). Αν και ο ανθρώπινος οργανισμός είναι ικανός να συνθέτει το θειούχο αμινοξύ σε περιορισμένες ποσότητες, η κύρια πηγή θειούχων αμινοξέων φθάνει στα ζώα και στους ανθρώπους μέσω της τροφής με τη μορφή κυστεΐνης (Boumahraz et al., 1982, Alpert et al., 1990). Πλούσιες πηγές κυστεΐνης είναι τα τρόφιμα υψηλής πρωτεϊνικής αξίας, όπως το χοιρινό κρέας, το κοτόπουλο, η γαλοπούλα, η πάπια, τα αυγά, το γάλα, η πρωτεΐνη του ορού του γάλακτος, το ανθότυρο, το τυρί cottage και το γιαούρτι, αλλά και οι κόκκινες πιπεριές, το σκόρδο, τα κρεμμύδια, το μπρόκολο, τα λάχανα Βρυξελλών, η βρώμη, το φύτρο σταριού και οι φακές. Ως συμπλήρωμα διατροφής ή ως πρόσθετο σε διάφορα τρόφιμα, η κυστεΐνη συμβολίζεται με τον αριθμό E 920 (Karakosta et al., 2013).

Η ελεύθερη κυστεΐνη παρουσιάζει χαμηλή δραστικότητα και δεν συμμετέχει εύκολα σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις *in vivo* (Lu et al., 2010). Η αναδίπλωση ωστόσο της αλληλουχίας των αμινοξέων κατά την πρωτεϊνική σύνθεση δημιουργεί κατάλληλες συνθήκες, στις οποίες τα ελεύθερα υπολείμματα κυστεΐνης εμφανίζουν υψηλή δραστικότητα (Neue et al., 1997). Έτσι, οι πρωτεϊνικές κυστεΐνες διατηρούν την υψηλή δραστικότητά τους μέσα από δομικές αλληλεπιδράσεις με άλλα αμινοξέα, όπως είναι η λυσίνη ή η αργινίνη και μπορεί να υιοθετήσουν οποιαδήποτε οξειδοαναγωγική κατάσταση μεταξύ +6 και -2 (Jandera et al., 2008, Li et al., 2009). Η ικανότητα αυτή του ατόμου του θείου της κυστεΐνης να απαντάται έως και δέκα διαφορετικές οξειδωτικές καταστάσεις στους έμβιους οργανισμούς, δίνει τη δυνατότητα στο αμινοξύ να αλληλεπιδρά ποικιλοτρόπως με πεπτίδια και πρωτεΐνες.

Η κυστεΐνη μπορεί να οξειδωθεί, οπότε λαμβάνεται το δισουλφίδιο της κυστεΐνης (cysteine disulfide) ή αλλιώς κυστίνη (cystine) (Εικόνα 1.4). Επειδή το ζεύγος κυστεΐνης/κυστίνης συναντάται σε υψηλά ποσοστά στο ανθρώπινο πλάσμα, η οξειδωτική κατάσταση του πλάσματος καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από τον λόγο των συγκεντρώσεων κυστεΐνης/κυστίνης. Κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι παράγοντες και ανθρώπινες συνήθειες, όπως είναι η ηλικία (Ozawa et al., 2009), το κάπνισμα (Zhou et al., 2010) και η υπερκατανάλωση αλκοολούχων ποτών, διαταράσσουν την οξειδοαναγωγική ισορροπία υπέρ της κυστίνης και αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισης καρδιαγγειακών και άλλων νοσημάτων.



Εικόνα 1.4. Οξείδωση της κυστεΐνης προς σχηματισμό κυστίνης.

Εξαιτίας της ικανότητάς της να σχηματίζει δισουλφιδικές γέφυρες με άλλα μόρια κυστεΐνης (Εικόνα 1.4), αλλά και με άλλα αμινοξέα, η κυστεΐνη συμμετέχει πρωτίστως και σε μεγάλο βαθμό στη σταθεροποίηση της τριτοταγούς και τεταρτοταγούς δομής των πρωτεϊνών (Dinh et al., 2011, Guo et al., 2011), ενώ διαμέσου του ατόμου του θείου δρα ως καταλύτης σε πολλές κυτταρικές αντιδράσεις (Giles et al., 2003).

Επιπλέον, εξαιτίας της υψηλής χημικής συγγένειας της θειολικής ομάδας με τα βαρέα μέταλλα, οι ελεύθερες πρωτεϊνικές κυστεΐνες μπορούν να δημιουργούν ισχυρούς δεσμούς με βαρέα μέταλλα, όπως ο υδράργυρος, ο μόλυβδος και το κάδμιο, προστατεύοντας τους οργανισμούς από τοξική δηλητηρίαση (Alpert et al., 2008, Zhou et al., 2008).

Η σημαντικότερη βιολογική δράση της κυστεΐνης είναι η μεταγωγή του οξειδωτικού σήματος (redox signaling) (Go et al., 2011, Lin et al., 2009, Persson et al., 2008) διαμέσου των πρωτεϊνών. Εκτός από το σημαντικό βιολογικό της ρόλο στην πρωτεϊνική σύνθεση, η κυστεΐνη συμμετέχει επίσης στη σύνθεση βιομορίων, όπως αντιοξειδωτικά, βιταμίνες και συνένζυμα (Alpert et al., 2008, Zhou et al., 2008). Η καταλυτική δράση των μορίων αυτών (όπως είναι η θειαμίνη, το λιποϊκό οξύ, η βιοτίνη και το συνένζυμο Α) βασίζεται και πάλι στη δραστηριότητα της θειολικής ομάδας, που στις περιπτώσεις αυτές είναι αποτέλεσμα του ασταθούς δεσμού ανάμεσα στο άτομο του άνθρακα και του θείου.

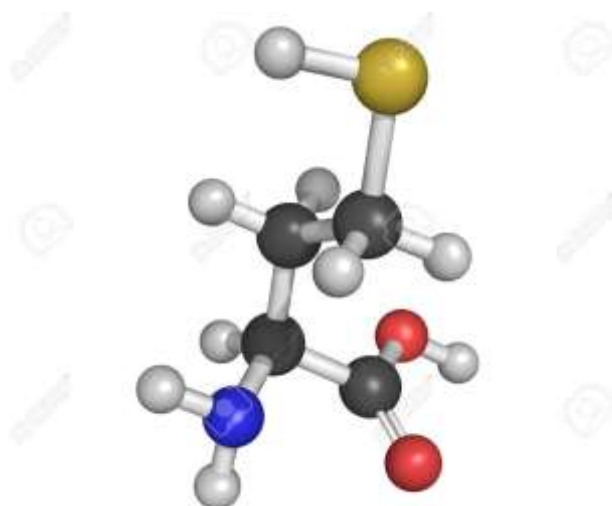
Η κυστεΐνη είναι η πιο άφθονη θειόλη χαμηλού μοριακού βάρους στο πλάσμα του αίματος και παίζει σημαντικό ρόλο στη σύνθεση πρωτεϊνών, τον μεταβολισμό των κυττάρων και την αποτοξίνωση (Mansoor et al., 1992). Τα φυσιολογικά επίπεδα κυστεΐνης στο πλάσμα αίματος κυμαίνονται από 135 έως 300 μM (Hakuma et al., 2014). Η έλλειψή της έχει συνδεθεί με αποχρωματισμό των μαλλιών, ηπατική βλάβη, οίδημα και αλλοιώσεις του δέρματος, ενώ αυξημένα επίπεδα κυστεΐνης σχετίζονται με τη νευροτοξικότητα (Shahrokhian et al., 2001, Yang et al., 2011).

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι η κυστεΐνη και κυρίως το *L*- εναντιομερές της είναι σημαντική πρόδρομη ένωση που χρησιμοποιείται κατά κόρον στη φαρμακοβιομηχανία, στη βιομηχανία τροφίμων και στη βιομηχανία παρασκευής ειδών προσωπικής υγιεινής. Η μεγαλύτερη εφαρμογή της βασίζεται στην παρασκευή και διατήρηση των αρωμάτων διάφορων τροφίμων (Jandera et al., 2011, Heftmann et al., 1992). Χρησιμοποιείται επίσης ως πρόσθετο στον καπνό του τσιγάρου λόγω της βλεννολυτικής της δράσης, αλλά και για να συμβάλλει στην αύξηση των επιπέδων

γλουταθειόνης στο αίμα των καπνιστών, τα οποία είναι αρκετά μειωμένα (Gama et al., 2012).

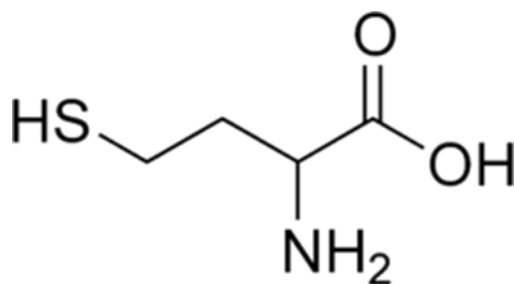
1.3 Ομοκυστεΐνη

Η ομοκυστεΐνη είναι ένα μη πρωτεϊνικό αμινοξύ. Είναι ομόλογη της κυστεΐνης, με τη διαφορά ότι διαθέτει έναν επιπλέον άνθρακα στην πλευρική ομάδα (Εικόνα 1.5). Η ομοκυστεΐνη που προέρχεται από τη διάσπαση των πρωτεϊνών της διατροφής, αποτελώντας ένα κατάλοιπο του μεταβολισμού, το οποίο παράγεται ανάλογα με την ποιότητα και την ποσότητα των πρωτεϊνών που καταναλώνει ο άνθρωπος.



Το μόριο της ομοκυστεΐνης

Η ομοκυστεΐνη παράγεται επίσης ως ένα μεταβολικό ενδιάμεσο που προέρχεται από το βασικό αμινοξύ μεθειονίνη στην βιοσύνθεση της Cys και διοχετεύεται στην κυκλοφορία μέσω του πλάσματος, κυρίως σε οξειδωμένη μορφή, δεσμευμένη σε πρωτεΐνες (Selhub et al., 1999, Lubert et al., 2012). Υπάρχει σε διάφορες μορφές στο πλάσμα, με την πιο κυρίαρχη να είναι η δεσμευμένη σε πρωτεΐνες που αντιπροσωπεύει το 70-80% της συνολικής Hcy, ακολουθούμενη από την ελεύθερη οξειδωμένη μορφή (μη συνδεδεμένα σε πρωτεΐνες δισουλφίδια) που αποτελούν το 20% και τελικά την ελεύθερη, ανηγμένη Hcy που αποτελεί λιγότερο από 1% της συνολικής της συγκέντρωσης (Ueland et al., 1995).



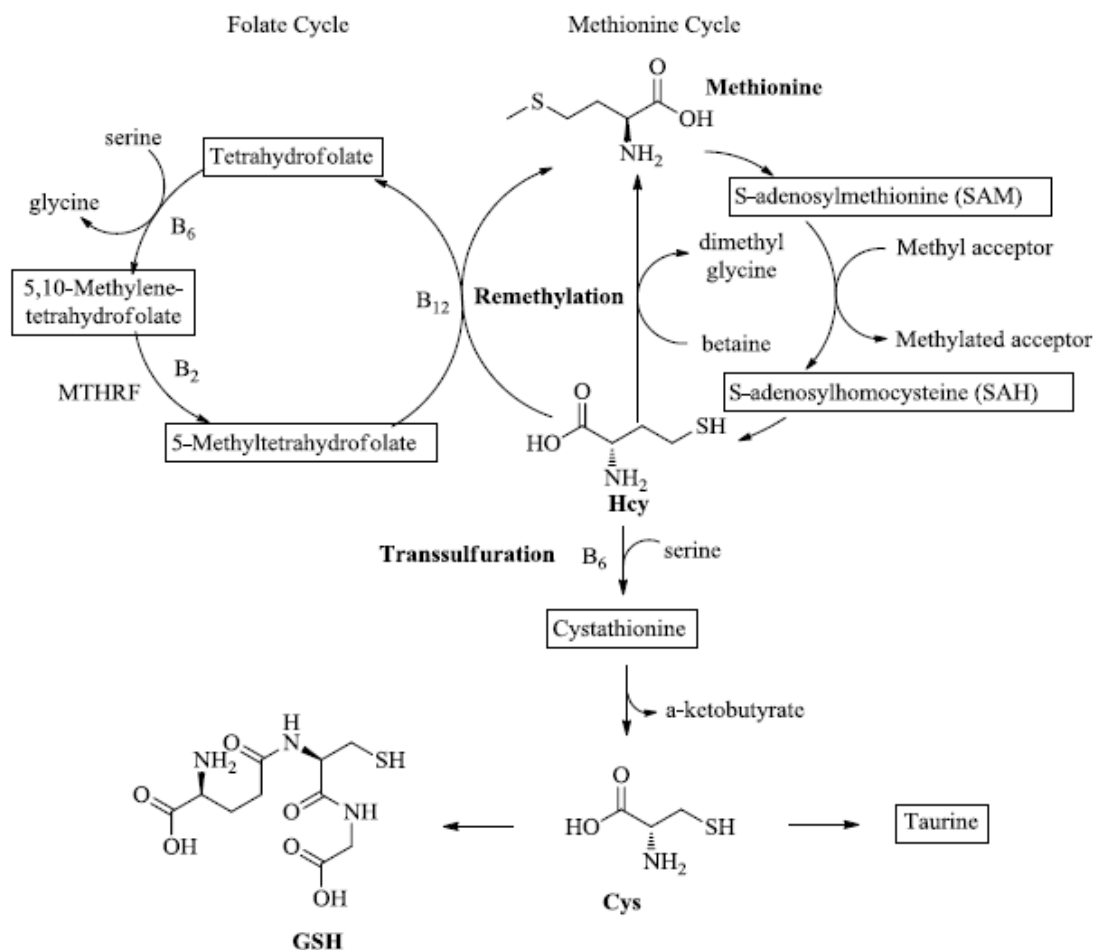
Εικόνα 1.5. Συντακτικός τύπος ομοκυστεΐνης. $M(C_4H_9NO_2S)=135,18g/mol$.

Η ομοκυστεΐνη επηρεάζει τη μεθυλίωση δηλαδή τη διαδικασία κατά την οποία χιλιάδες νευροδιαβιβαστές, ορμόνες και άλλα βασικά βιοχημικά συστατικά βρίσκονται σε ισορροπία. Η μεθυλίωση μας βοηθά επίσης να φτιάξουμε τα φιλικά λιπαρά για τον εγκέφαλο (φωσφολιπίδια) και ακόμα ελέγχει την έκφραση των γονιδίων. Αυτό σημαίνει πως μια πληροφορία ενός γονιδίου ενεργεί για να αλλάξει τη λειτουργία ενός κυττάρου. Με χαμηλή ομοκυστεΐνη έχουμε ισορροπία στο σώμα, αν όμως έχουμε αυξημένα επίπεδα ομοκυστεΐνης διαταράσσεται η μεθυλίωση, προκαλείται ερεθισμός και φλεγμονή στα εσωτερικά τοιχώματα των αιμοφόρων αγγείων και αυξάνεται ο κίνδυνος του εμφράγματος γιατί οι βλάβες στα τοιχώματα των αρτηριών προκαλούν την εναπόθεση πλακών που οδηγούν στη στένωση και τελικώς στο έμφραγμα. Αν και θεωρείται ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου, υποστηρίζεται ότι λειτουργεί συνεργικά με άλλους συμβατικούς παράγοντες καρδιαγγειακών νοσημάτων (π.χ. χοληστερίνης, υπέρτασης) ενισχύοντας τη δράση τους. Μάλιστα από πολλούς χαρακτηρίζεται ως η "νέα" χοληστερίνη!

Υπάρχουν διάφοροι παράγοντες που οδηγούν στην αύξηση της ομοκυστεΐνης. Οι κυριότεροι από αυτούς είναι η κληρονομικότητα, η έλλειψη βιταμινών, η ηλικία και το φύλλο. Μια διατροφή φτωχή σε βιταμίνες του συμπλέγματος Β (Β6, Β12, φυλλικό οξύ κλπ) οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της ομοκυστεΐνης. Ένας άλλος παράγοντας που επηρεάζει είναι η ηλικία, καθώς όπως ισχύει και για άλλους επιβαρυντικούς παράγοντες για την υγεία μας, έτσι και η ομοκυστεΐνη αυξάνεται όσο μεγαλώνουμε. Τέλος, η συγκέντρωση της επηρεάζεται και από το φύλλο, καθώς οι γυναίκες πριν την εμμηνόπαυση έχουν χαμηλότερα επίπεδα ομοκυστεΐνης, με την

κατάσταση να εξισώνεται σε μεγαλύτερες ηλικίες (De Bree et al., 2002, Brachet et al., 2004).

Η ομοκυστεΐνη αποτελεί μία από τις πιο σημαντικές βιοθειόλες, εξαιτίας της σύζευξης του μεταβολισμού τους με βιολογικά σημαντικούς μεταβολίτες όπως η S-αδενοσυλμεθειονίνη (SAM), το φυλλικό οξύ και η βιταμίνη B (Εικόνα 1.6). Αλλαγές σε αυτές τις ενώσεις και σε συσχετιζόμενα ένζυμα μπορεί να επηρεάσουν την κατάσταση της Hcy (Williams et al., 2010). Η Hcy παίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό της μεθειονίνης και του φυλλικού οξέος, καθώς είναι μεταβολικό ενδιάμεσο που συμμετέχει σε δύο οδούς, την επαναμεθυλίωση (κύκλος μεθειονίνης) και την σουλφουρυλίωση (κύκλος φυλλικού) (Εικόνα 1.6) (Robinson et al., 2000, Morgenstern et al., 2003). Στην οδό επαναμεθυλίωσης, η Hcy λαμβάνει μία ομάδα μεθυλίου από το 5-μεθυλοτετραϋδροφολικό άλας (συνηθέστερο στα κύτταρα και στους ιστούς) ή βεταΐνη και μετατρέπεται σε μεθειονίνη, η οποία είναι θεμελιώδης για τις βιοχημικές διεργασίες όπως η σύνθεση πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων. Στο μονοπάτι της σουλφουρυλίωσης, η Hcy μετατρέπεται σε Cys μέσω κυσταθειονίνης σε μια αντίδραση που περιλαμβάνει σερίνη και καταλύεται από ένα εξαρτώμενο από τη βιταμίνη B6 ένζυμο, τη συνθετάση της κυσταθειονίνης-β. Αυτή η πορεία είναι μη αναστρέψιμη υποδεικνύοντας την αδυναμία της Cys να χρησιμεύσει ως πρόδρομη ένωση για τη μεθειονίνη. Η περισσότερη Cys που σχηματίζεται μετατρέπεται στη συνέχεια στο τριπεπτίδιο GSH.



Εικόνα 1.6. Μεταβολικές οδοί της ομοκυστεΐνης.

Η Hcy έχει προσελκύσει μεγαλύτερη προσοχή ως βιοδείκτης (Folsom et al., 2013). Οι φυσιολογικές συνολικές συγκεντρώσεις της ομοκυστεΐνης στο πλάσμα του αίματος (π.χ., δεσμευμένες σε πρωτεΐνες, ελεύθερα οξειδωμένες και ανηγμένες) κυμαίνονται από 5 έως 15μM. Η συγκέντρωση της Hcy στο πλάσμα του αίματος, επίσης είναι αυξημένη σε ασθενείς που πάσχουν από την νόσο του Αλτσχάιμερ (AD) (Nilsson et al., 2012), τη νόσο του Πάρκινσον (PD) (Rodriguez-Oroz et al., 2009, Zoccolella et al., 2009), καρκίνο (Kędzierska et al., 2013, Miller et al., 2013, Mohammad et al., 2011, Pathak et al., 2012, Stabler et al., 2011), σακχαρώδη διαβήτη (DM) (Al-Maskari et al., 2012, Noce et al., 2014, Tsai et al., 2012), κατάγματα (Kuroda et al., 2013, LeBoff et al., 2009), την νόσο του Πάτζετ (Polyzos et al., 2010), χρόνια νεφρική νόσο (CKD) (Zinellu et al., 2012), αρθρίτιδα (Slot et al., 2013), ψυχιατρικές διαταραχές (Kinoshita et al., 2013), σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (POCS) (Kaya et al., 2010), και σύνδρομο αποφρακτικής υπνικής άπνοιας (OSAS)

(Sariman et al., 2010). Η μόλυνση με τον ανθρώπινο ιό της ανοσοανεπάρκειας (HIV) μειώνει τα επίπεδα της Hcy στο πλάσμα του αίματος (Borges-Santos et al., 2012). Επιπλέον, μία αύξηση 5μM στα επίπεδα της Hcy αποδείχθηκε ότι αυξάνει τον κίνδυνο στεφανιαίων καρδιακών νοσημάτων περίπου στο 20% (Humphrey et al., 2008). Επίσης, πρόσφατες κλινικές δοκιμές έχουν αποδείξει, ότι οι συγκεντρώσεις της Hcy είναι αυξημένες σε ασθενείς με καρδιαγγειακά νοσήματα (CVD) (Redeen et al., 2010, Page et al., 2010), με στεφανιαία νόσο (CAD) (Aydin et al., 2009, Baños-González et al., 2012, Vinukonda et al., 2009), και εγκεφαλικά (Dhamija et al., 2009, Hultdin et al., 2011, Kim et al., 2011, Rueda-Clausen et al., 2012, Sawula et al., 2009).

Όταν η συγκέντρωση της ομοκυστεΐνης υπερβεί τα 15μM, δημιουργείται μια κατάσταση γνωστή ως υπερομοκυστεϊναιμία (Mansoor et al., 1992), η οποία ταξινομείται ως μέτρια (15-30μM ομοκυστεΐνης), ενδιάμεση (30-100μM ομοκυστεΐνης) ή σοβαρή (>100μM ομοκυστεΐνης). Η υπερομοκυστεϊναιμία θεωρείται ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για κύριες παθολογίες μεταξύ των οποίων η άνοια (Seshadri et al., 2002), η νόσος του Alzheimer (Seshadri et al., 2002), η οστεοπόρωση (Van Meurs et al., 2004) και η καρδιαγγειακή θνησιμότητα (CVD) (Jacobsen et al., 1998).

Λόγω της σχέσης μεταξύ της υπερομοκυστεϊναιμίας και της κατώτερης δραστηριότητας της συνθέτασης της μεθειονίνης και της ανεπάρκειας φυλλικού οξέος, έχει προταθεί ότι η θεραπεία με φυλλικό οξύ μπορεί να είναι χρήσιμη για διαταραχές που σχετίζονται με την υπερομοκυστεϊναιμία (Rusin et al., 2004).

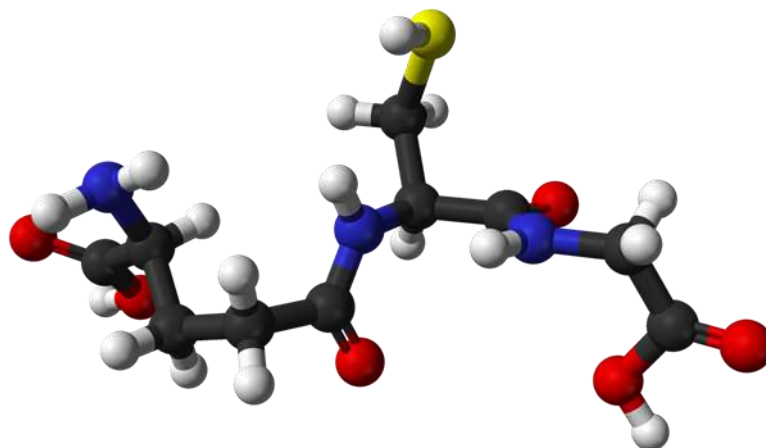
Τα αυξημένα επίπεδα της Hcy στο πλάσμα του αίματος (Refsum et al., 1998, Seshadri et al., 2001) μπορούν να προκληθούν από μεταβολικά ελαττώματα στις δύο οδούς (επαναμεθυλίωση-σουλφουρυλίωση) ή από ανεπάρκειες των ενζύμων και συμπαραγόντων που απαιτούνται σε αυτές τις οδούς. Η υπερομοκυστεϊναιμία μπορεί να προκληθεί από την παρεμποδισμένη σύνθεση του 5-μεθυλοτετραϋδροφυλλικού άλατος λόγω της ανεπάρκειας του φυλλικού οξέος ή ενός ελαττώματος στη ρεδοκτάση του 5-μεθυλοτετραϋδροφυλλικού άλατος (MTHFR) (Selhub et al., 1999). Σε αυτές τις περιπτώσεις, η Hcy που προοριζόταν για την επαναμεθυλίωση διοχετεύεται στην οδό της σουλφουρυλίωσης, μειώνοντας έτσι την τη συγκέντρωση της ενδοκυτταρικής s-αδενοσυλομεθειονίνης (SAM) και την επιβαρύνοντας του σύστημα της σουλφουρυλίωσης με περίσσεια Hcy. Η επιπλέον Hcy που συζεύγεται με χαμηλότερες συγκεντρώσεις της SAM (που δεν επαρκούν για την ενεργοποίηση

της σύνθεσης της κυσταθειονίνης) βλάπτει την οδό της σουλφουρυλίωσης. Τελικά, η Hcy που συσσωρεύεται στα κύτταρα και κατά συνέπεια που εξάγεται στο αίμα προκαλεί την υπερομοκυστεϊναιμία (Selhub et al., 1999, Morgenstern et al., 2003, Strain et al., 2004).

Μια άλλη αιτία της υπερομοκυστεϊναιμίας είναι ένα ελάττωμα στη συνθετάση της κυσταθειονίνης-β που παρεμποδίζει την οδό της σουλφουρυλίωσης μέσω της εκτροπής της Hcy προς το οδό της επαναμεθυλίωσης. Αυτό αυξάνει τον ρυθμό με τον οποίο συντίθεται η μεθειονίνη οδηγώντας σε αύξηση των επιπέδων της ενδοκυτταρικής s-αδενοσυλομεθειονίνης (SAM). Το επίπεδο της SAM μπορεί να φτάσει σε ένα σημείο όπου προκαλεί αναστολή της επανατροφοδότησης του MTHFR, εμποδίζοντας έτσι τη διαδικασία επαναμεθυλίωσης. Αυτό οδηγεί σε σοβαρή υπερομοκυστεϊναιμία διότι και οι δύο οδοί θα ήταν παρεμποδισμένες (Selhub et al., 1999, Strain et al., 2004). Οι ανωμαλίες στο ένζυμο συνθετάση της κυσταθειονίνης-β προκαλούν επίσης την ομοκυστενουρία η οποία είναι αυτοσωματική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από μετατόπιση του οφθαλμικού φακού, νοητική καθυστέρηση και επιθετική αγγειακή νόσο, ιδιαίτερα στη θρόμβωση των φλεβών (Robinson et al., 2000). Άλλοι παράγοντες που έχουν αναφερθεί ότι προκαλούν η υπερομοκυστεϊναιμία αποτελούν οι περιβαλλοντικές τοξίνες καθώς και η κακή διατροφή και ο κακός τρόπος ζωής. Για παράδειγμα, το κάπνισμα τσιγάρων, η υψηλή πρόσληψη αλκοόλ και η καφεΐνη σχετίζονται με τα αυξημένα επίπεδα της Hcy (Bleich et al., 2005). Οι συγκεντρώσεις της Hcy αυξάνονται σε ασθένειες όπως ο καρκίνος, ο υποθυρεοειδισμός, το φλεγμονώδες έντερο και νεφρική νόσος τελικού σταδίου (Refsum et al., 1998, Gao et al., 2014, Peyrin-Biroulet et al., 2007).

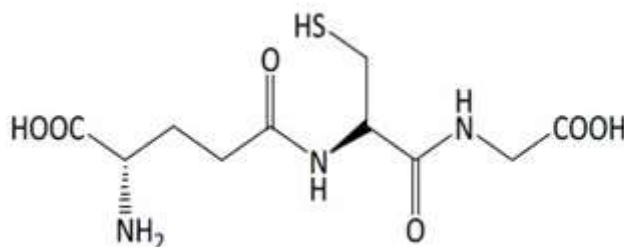
1.4 Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη (glutathione, GSH), γνωστή (ιδίως παλαιότερα) και ως γλουταθείο, είναι οργανική-χημική ένωση με σημαντική αντιοξειδωτική δράση στους ζωντανούς οργανισμούς. Απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1921 από τον Χόπκινς στη ζυθοζύμη και το ήπαρ των θηλαστικών και βρίσκεται σε αφθονία στους ζωικούς ιστούς και στις ζύμες, και λιγότερο στους ιστούς των φυτών.



Το μόριο της γλουταθειόνης.

Από βιοχημικής πλευράς, η γλουταθειόνη είναι ένα τριπεπτίδιο αποτελούμενο από τα αμινοξέα L-κυστεΐνη, L-γ-γλουταμικό οξύ και γλυκίνη με την εξής σειρά L-γ-γλουτάμυλο-L-κυστεΐνυλο-γλυκίνη και το ενεργό της κέντρο είναι η θειολική ομάδα (-SH) στο κατάλοιπο της κυστεΐνης (Εικόνα 1.7). Από γενικότερης χημικής άποψης, η γλουταθειόνη είναι μία θειόλη και ταυτόχρονα δικαρβονικό οργανικό οξύ.



Εικόνα 1.7. Συντακτικός τύπος γλουταθειόνης. $M(C_{10}H_{17}N_3O_6S)=307.32g/mol$.

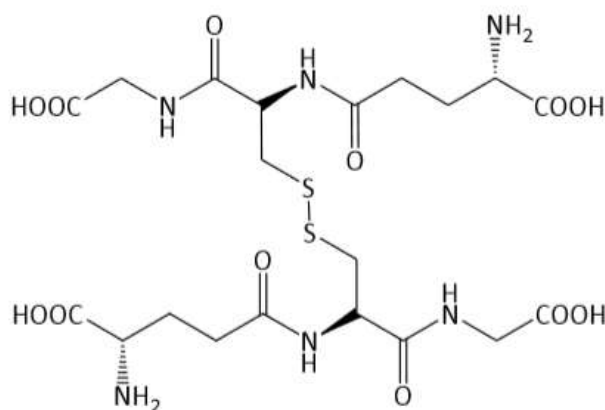
Η γλουταθειόνη είναι η σπουδαιότερη μικρομοριακή θειόλη που έχει βρεθεί σε φυτικά και ζωικά κύτταρα, αερόβια βακτήρια (π.χ. στο *E. coli*), καθώς επίσης σπανιότερα και σε αναερόβια βακτήρια (Copley et al., 2002, Grill et al., 2001). Αντιπροσωπεύει περίπου το 95% των μη πρωτεϊνικών θειολών, είναι ο βασικός θειολικός ρυθμιστής της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας του κυττάρου και εμπλέκεται στην αντιοξειδωτική κυτταρική άμυνα. Παρουσία γλουταθειόνης δεν παρατηρούνται φαινόμενα τοξικότητας που προκαλεί το αμινοξύ κυστεΐνη (Puka-Sundvall et al., 1995). Η παρουσία γ-πεπτιδικού δεσμού στο μόριο το καθιστά ανθεκτικό στην αποικοδόμηση παρουσία αμινοπεπτιδασών. Η γλουταθειόνη δεν είναι απαραίτητο να

λαμβάνεται μέσω της τροφής, καθόσον ο ανθρώπινος οργανισμός έχει την ικανότητα να συνθέτει μόρια γλουταθειόνης από τα αμινοξέα L-κυστεΐνη, L-γλουταμικό οξύ και γλυκίνη. Άλλωστε η λαμβανόμενη από του στόματος γλουταθειόνη δεν απορροφάται ικανοποιητικά από την γαστρεντερική οδό (Weston et al., 1997).

Η σύνθεση της γλουταθειόνης *in vivo* πραγματοποιείται σε δύο στάδια. Κατά το πρώτο στάδιο γίνεται αρχικά η σύνθεση της πρόδρομης ένωσης γ-γλουταμυλοκυστεΐνης (γ-glutamyl cysteine) από το L-γλουταμικό οξύ και την L-κυστεΐνη με τη βοήθεια του ενζύμου συνθετάση της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης. Το στάδιο αυτό είναι καθοριστικό για το ρυθμό σύνθεσης και τα τελικά επίπεδα γλουταθειόνης, καθώς το αμινοξύ κυστεΐνη δεν συντίθεται στον ανθρώπινο οργανισμό και πρέπει να λαμβάνεται μέσω συμπληρωμάτων διατροφής και κυστεϊνικά πλούσιων τροφών (Ahuja et al., 2005). Κατά το δεύτερο στάδιο σύνθεσης της γλουταθειόνης πραγματοποιείται προσθήκη της γλυκίνης στο τελικό άτομο άνθρακα της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης παρουσία του ενζύμου συνθετάση της γλουταθειόνης (glutathione synthetase).

Η φυσιολογική περιεκτικότητα του ανθρώπινου αίματος σε γλουταθειόνη είναι 0,35 ως 0,45 gr ανά λίτρο. Μέσα στους οργανισμούς η ουσία υπάρχει σε δύο μορφές: ανηγμένη και οξειδωμένη. Αυτό της επιτρέπει να παίρνει μέρος στα φαινόμενα οξειδοαναγωγής των ιστών, να διαδραματίζει τον ρόλο μεταφορέα του υδρογόνου και να αποτελεί έναν από τους κύριους παράγοντες σταθερότητας του δυναμικού οξειδοαναγωγής του κυττάρου. Η μεταβολή του ποσοστού της ανηγμένης γλουταθειόνης στο αίμα και της σχέσεως του με το ποσοστό της οξειδωμένης συνιστά ένδειξη μυϊκής κοπώσεως ή διάφορων νοσηρών καταστάσεων, όπως ο διαβήτης και η αβιταμίνωση.

Η γλουταθειόνη απαντάται ελεύθερη ή προσδεδεμένη στις πρωτεΐνες. Η ελεύθερη γλουταθειόνη υπάρχει στα κύτταρα, κυρίως στην ανηγμένη της μορφή, και δρα ως δότης ηλεκτρονίων απέναντι σε οποιοδήποτε οξειδωτικό μέσο. Με τη διαδικασία αυτή οξειδώνεται και δίνει το συμμετρικό δισουλφίδιο της γλουταθειόνης (glutathione disulfide - GSSG) (Εικόνα 1.8), το οποίο με τη βοήθεια του ενζύμου αναγωγάση της γλουταθειόνης (glutathione reductase) μετατρέπεται αμέσως ξανά σε ανηγμένη γλουταθειόνη. Εκτός όμως από την οξείδωση και τη δημιουργία γέφυρας ανάμεσα σε δύο άτομα γλουταθειόνης, το μόριο της γλουταθειόνης μπορεί να σχηματίσει δισουλφιδική γέφυρα και με άλλα, μικρού μοριακού βάρους μόρια, όπως είναι η ελεύθερη κυστεΐνη και το συνένζυμο A (Sies et al., 1999).



Εικόνα 1.8. Συντακτικός τύπος οξειδωμένης γλουταθειόνης.

Η GSH, η πιο άφθονη βιοθειόλη μέσα στα κύτταρα, διατηρεί την ενδοκυτταρική οξειδοαναγωγική κατάσταση και απομακρύνει τις τοξικές ενώσεις (Wu et al., 2004). Συγκεκριμένα, η GSH παίζει σημαντικό ρόλο στα νευρικά κύτταρα, και η δυσλειτουργία της GSH στην ομοιόσταση θεωρείται ότι συμβάλλει στην έναρξη και στην εξέλιξη των νευροεκφυλιστικών ασθενειών (Johnson et al., 2012). Οι συγκεντρώσεις της GSH σε κύτταρα κυμαίνονται από 1 έως 10 mM, με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση ποσότητας να εμφανίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, που είναι και η κύρια θέση της βιοσύνθεσής της. Καθόσον στο κυτταρόπλασμα η συγκέντρωση ποσότητας της γλουταθειόνης είναι πολύ μεγαλύτερη από οποιουδήποτε άλλου οξειδοαναγωγικού ρυθμιστή, η μέτρηση των συγκεντρώσεων ποσότητας της ανηγμένης και της οξειδωμένης μορφής παρέχει μέτρο της συνολικής οξειδοαναγωγικής κατάστασης του κυττάρου. Σε φυσιολογικά κύτταρα ο λόγος αυτός υπερβαίνει το 100, ενώ σε καταστάσεις stress η τιμή του κυμαίνεται από 10 έως 1 (Pasternak, et al., 2008, Takahashi et al., 2011).

Τα επίπεδα της GSH στο πλάσμα του αίματος είναι σημαντικά χαμηλότερα και συνήθως κυμαίνονται από 1 έως 6 μ M (Mansoor et al., 1992). Λόγω της ιδιαίτερης και πολύπλευρης σημασίας της για τη διατήρηση της ομοιόστασης στον ανθρώπινο οργανισμό, η απουσία ή τα χαμηλά επίπεδα γλουταθειόνης έχουν ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση πολλών παθήσεων, όπως η διπολική διαταραχή, η βαριάς μορφής κατάθλιψη, η σχιζοφρένεια, η καταστολή των λειτουργιών του ανοσοποιητικού συστήματος και η επιτάχυνση της γήρανσης (Staal et al., 1992, Samiec et al., 1998), Έχει επίσης αναφερθεί ότι τα επίπεδα της GSH μειώνονται σε

ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη (DM) (Al-Maskari et al., 2012, Tsai et al., 2012, Calabrese et al., 2012), άσθμα (Al-Afaleg et al., 2011), ασθένειες στα μάτια (Selvi et al., 2011), νόσο του Αλτσχάιμερ (AD) (Puertas et al., 2012), HIV (Borges-Santos et al., 2012), χρόνια νεφρική νόσο (CKD) (Zinellu et al., 2012). Τέλος, στην αλκοολική ηπατική νόσο (ALD), η αναλογία ανηγμένης GSH / οξειδωμένης GSH μειώνεται (Chen et al., 2011).

Αντίθετα αυξημένα επίπεδα γλουταθειόνης έχουν συσχετιστεί με την αυξημένη αντίσταση των καρκινικών κυττάρων στη χημειοθεραπεία (Ballatori et al., 2009) ενώ ασθενείς με αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση (ALS) και τη νόσο του Πάρκινσον (PD) παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα οξειδωμένης GSH στο πλάσμα του αίματος (Baillet et al., 2010).

Αναπλήρωση των επιπέδων της γλουταθειόνης με λήψη *N*-ακετυλοκυστεΐνης έχει αποδειχθεί ότι μειώνει την εμφάνιση συμπτωμάτων των περισσότερων διαταραχών (Dean, et al., 2011). Επιπλέον, φαίνεται ότι διαδραματίζει τον πιο σημαντικό ρόλο στην εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών που εντοπίζονται στον ανθρώπινο εγκέφαλο (Gawryluk et al., 2011). Η ικανότητα της γλουταθειόνης να ελέγχει και να μεταβάλλει τα επίπεδα ελευθέρων ριζών σε μεμονωμένα ανθρώπινα κύτταρα που έχουν καλλιεργηθεί σε εργαστηριακό περιβάλλον (Park et al., 2009), δίνει ελπίδες ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δραστική ουσία για την παρασκευή αντικαρκινικών φαρμάκων με στόχο την αποτροπή σχηματισμού νέων καρκινικών κυττάρων (Karakosta et al., 2013). Στις περιπτώσεις, ωστόσο, όπου τα καρκινικά κύτταρα έχουν ήδη αναπτυχθεί, παρουσιάζοντας ανθεκτικότητα στα σκευάσματα της χημειοθεραπείας, τα αυξημένα επίπεδα γλουταθειόνης προστατεύουν τα καρκινικά κύτταρα αντί να τα περιορίζουν (Balendiran et al., 2004). Η GSH επίσης, αποτοξινώνει αντινευροπλαστικούς παράγοντες, οι οποίοι προκαλούν οξειδωτικό στρες και αλλάζουν τις κυτταρικές οξειδοαναγωγικές καταστάσεις, επομένως η ενδοκυτταρική GSH επηρεάζει την ανάπτυξη την διάγνωση και την θεραπεία του καρκίνου. Εξάλλου για την σχέση μεταξύ των επιπέδων της GSH και του καρκίνου έχει αναφερθεί ότι: η ολική μείωση ή ο περιορισμός της GSH στο πλάσμα και τον ορό του αίματος συχνά παρατηρείται σε ασθενείς με καρκίνο (Kędzierska et al., 2013, Mohammad et al., 2011, Kontakiotis et al., 2011, Vidyasagar et al., 2010), ενώ η αύξηση της ανηγμένης GSH στο πλάσμα του αίματος έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς με λευχαιμία (Sarmiento-Ribeiro et al., 2012).

Εκτός από τον ρόλο της γλουταθειόνης στους έμβιους οργανισμούς, πολλές είναι οι εφαρμογές της στην οινοποιία (για την παρασκευή κυρίως λευκού κρασιού) και τη βιομηχανία τροφίμων (για τη διατήρηση των φρέσκων φρούτων και λαχανικών για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα). Αυτό οφείλεται στην ικανότητά της είτε να αντιδρά με κινόνες, ενώσεις που σχηματίζονται κατά τα πρώτα στάδια της ενζυμικής αμαύρωσης και να σχηματίζουν άχρωμα προϊόντα, είτε να δρα ως αναγωγικό αντιδραστήριο και να συμμετέχει στην αντίδραση αναγωγής της ο-κινόνης προς ο-διφαινόλη (Rigaud et al., 1991).

1.5 Βιοθειόλες και σχετικές ασθένειες

Όπως ήδη αναφέρθηκε, οι ανισορροπίες σε βιοθειόλες και στον ενδοκυτταρικό και στον εξωκυτταρικό χώρο συσχετίζονται με καρδιαγγειακά νοσήματα (CVD), νευροεκφυλιστικά νοσήματα, καρκίνο, νεφρική δυσλειτουργία, σακχαρώδη διαβήτη (DM) και άλλες ασθένειες. Οι συγκεντρώσεις των βιοθειολών στο πλάσμα και το αίμα ασθενών με αυτές τις ασθένειες, όπως αναφέρθηκε σε άρθρα που δημοσιεύτηκαν από το 2009 μέχρι σήμερα συνοψίζονται στον Πίνακα 1.1 (Isokawa et al., 2013).

Πέρα από τη διαγνωστική σημασία των μεμονωμένων βιοθειολών, αρκετές μελέτες έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι η συνολική συγκέντρωση βιοθειολών μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης για διαγνωστικούς σκοπούς. Για παράδειγμα, η συνολική συγκέντρωση των βιοθειολών στο πλάσμα έχει χρησιμοποιηθεί: i) για την πρόβλεψη της επιβίωσης σε ασθενείς πλακώδες καρκίνωμα του στόματος (Patel et al., 2007), ii) για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας της μη αλκοολικής στεατοηπατίτιδας (NASH) (Baskol et al., 2014), iii) για την πρόβλεψη υποτροπιασμού σε ασθενείς με πολλαπλά νοσήματα σκλήρυνσης (Vural et al., 2016) και iv) ως δείκτης της αθηροσκληρωτικής νόσου (Ozkan et al., 2002). Η συνολική συγκέντρωση των βιοθειολών στα ούρα έχει χρησιμοποιηθεί ως δείκτης νευρογενών νεοπλασιών της ουροδόχου κύστης (Korzeniecka et al., 2014), φλεγμονών επαγόμενων από ιογενείς και βακτηριακές λοιμώξεις, ρευματοειδούς αρθρίτιδας, οξείας παγκρεατίτιδας ή εμφράγματος του μυοκαρδίου (Rojkovich et al., 1999).

Πίνακας 1.1. Βιοθειόλες και η συσχέτιση τους με διάφορες ασθένειες.

Ασθένεια		Βιοθειόλη				Δείγμα	Αναλυτική Μέθοδος	Αναφορά
		Hcy	GSH	Cys	CysGly γ-GluCys			
CVD, CAD, και εγκεφαλικά								
CVD	Έμφραγμα του μυοκαρδίου	15.1μM				Ορός	Ανοσοπροσδιορισμός	Redéen et al., 2010
	Ισχαιμική καρδιακή νόσος	13,0μM						
	Ανεύρυσμα της αορτής	21,0μM						
	TIA ή εγκεφαλικό επεισόδιο	11,7μM						
	Καρδιακή ανεπάρκεια και / ή αρρυθμία	13.2μM						
CAD	Control	12,1μM				Πλάσμα	HPLC-FLD (SBD-F)	Aydin et al., 2009
	Ασθενείς	(t) 15,89μM						
CAD	Υγιείς	(t) 9,82μM				Πλάσμα	Ανοσοπροσδιορισμός	Banos-González et al., 2012
	Ασθενείς	(t) 11.4μM						
	Control	(t) 10,1μM						
CAD	Ασθενείς (άντρες)	(t) 17.4μM				Πλάσμα	HPLC-FLD (SBD-F)	Vinukonda et al., 2009
	Υγιείς (άντρες)	(t) 10.7μM						
	Ασθενείς (γυναίκες)	(t) 12.0 μM						
	Υγιείς (γυναίκες)	(t) 8.8μM						
	Ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο	(t) 12,8μM				Πλάσμα	HPLC-ECD	Hultdin et al., 2011
Εγκεφαλικό	Αιμορραγικό εγκεφαλικό	(t) 13.4μM					FPIA	

Εγκεφαλικό	επεισόδιο Control	(t) 12,7μM		Πλάσμα	FPIA	Kim et al., 2011
	Ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο	(t) 11,24μM				
Ισχαιμικό εγκεφαλικό	Εγκεφαλικό έμφραγμα Control	(t) 11,42μM		Πλάσμα	ELISA	Dhamija et al., 2009
	Ασθενείς	(t) 10,08μM (t) 28,40μM				
Ισχαιμικό εγκεφαλικό	Υγιείς Ασθενείς	(t) 11,16μM (t) 10,01μM		Πλάσμα	FPIA	Rueda-Clausen et al., 2012
	Υγιείς Ασθενείς	(t) 8,48μM (t) 16,8μM				
Μυοκαρδιακό έμφραγμα	Control	(t) 10,4μM		Πλάσμα	HPLC-FLD (SBD-F)	Sawula et al., 2009
	Ασθενείς	(t) 11,0μM	(t) 254.3μM			
	Control	(t) 9.9μM	(t) 249.5μM			
Νευροεκφυλιστική ασθένεια και άνοια						
AD, MCI	ηλικία <75 ετών / ηλικία > 75 ετών			Πλάσμα	HPLC - Χρωματομετρική ανίχνευση (4-PDS)	Nilsson et al., 2012
	AD φυσιολογική κατάσταση	(t) 12,9/16,6μM				
	AD παθολογική κατάσταση	(t) 13,3/17,1μM				
	MCI φυσιολογική κατάσταση	(t) 12,5/13,9μM				
	MCI παθολογική κατάσταση	(t) 11,6/16,0μM				
AD	Υγιείς AD	(t) 12,1/13,4μM	(t) 3,2μM	Πλάσμα	Προσδιορισμός ενζυματικής ανακύκλωσης	Puertas et al., 2012

PD-MCI	Control		(t) 4,9μM			Πλάσμα	Ανοσοπροσδιορισμός	Rodriguez-Oroz et al., 2009
	PD-φυσιολογική	14.9μM						
	PD-MCI	15,1μM						
	PD-άνοια	15,4μM						
PD-άνοια	Control	8,55μM				Πλάσμα	HPLC-FLD (SBD-F)	Zoccolella et al., 2009
	PD με άνοια	(f) 20,7μM						
	PD χωρίς άνοια	(f) 15,8μM						
PD, ALS	PD		(t) 976,52μM, (ox) 14,21μM, (r) 946,74μM			Πλάσμα	Δοκιμή Ellman (DTNB)	Baillet et al., 2010
	ALS		(t) 985,17μM, (ox) 15,08μM, (r) 951,03μM					
	Control		(t) 974,67μM, (ox) 11,88μM, (r) 949,00μM					
Καρκίνος και λευχαιμία								
Καρκίνος του μαστού	Ασθενείς	(t) 16.0μM	(t) 379.6μM			Πλάσμα	Hcy: HPLC-FLD (SBD-F) GSH: Μέθοδος Ellman (DTNB)	Mohammad et al., 2011
	Υγιείς	(t) 12.45μM	(t) 500.6μM					
Επιθετικός καρκίνος του μαστού	Ασθενείς	(t) 8,94μM	(t) 2,82μM	(t) 103,4μM	(t) 12,42μM	Πλάσμα	HPLC-UV (CMQT)	Kedzierska et al., 2013
	Οι ασθενείς μετά από Χειρουργική επέμβαση και 4 ^η CT	(t) 9.0μM	(t) 1.03μM	(t) 54.0μM	(t) 16.60μM			
	Υγιείς	(t) 5,59μM	(t) 5,35μM	(t) 185,3μM	(t) 36,30μM			
Πρωκτικός καρκίνος	Ασθενείς	(t) 9.42μM		(t) 283.9μM		Πλάσμα	HPLC-FLD (SBD-F)	Miller et al., 2013
	Control	(t) 9.12μM		(t) 284.0μM				

Καρκίνος του τραχήλου της μήτρας	SIL	12.8μM			Ορός	Ανοσοπροσδιορισμός	Pathak et al., 2012
	Καρκίνος του τραχήλου της μήτρας	13,46μM					
	Control	9.67μM					
Καρκίνος του τραχήλου της μήτρας	Ασθενείς		(r) 152g/mL		Ορός	Μέθοδος Beutle (DTNB)	Vidyasagar et al., 2010
	Ασθενείς μετά την 5 ^η RT		(r) 112g/mL				
	Control		(r) 196g/mL				
Μεταστατικός καρκίνος του προστάτη	Επαναλαμβανόμενος	11,7μM		419μM	Ορός	Αέρια-υγρή Χρωματογραφία-MS	Stabler et al., 2011
	Μη επαναλαμβανόμενος	9,0μM		346μM			
Καρκίνος του πνεύμονα	Ασθενείς		(r) 87.10μM		Ορός	Χρωματομετρικός προσδιορισμός	Kontakiotis et al., 2011
	Υγιείς		(r) 88.46μM				
Λευχαιμία	ALL		(r) 2.9mol/g πρωτεΐνης		Πλάσμα	Χρωματομετρικός προσδιορισμός	Sarmento-Ribeiro et al., 2012
	ALL υποτροπή		(r) 5,5mol/g πρωτεΐνης				
	Υγιείς		(r) 1,9mol/g πρωτεΐνης				
	CLL		(r) 1,9mol/g πρωτεΐνης				
	CLL ανθεκτικό στο CT		(r) 0,96mol/g πρωτεΐνης				
	Υγιείς		(r) 3.2mol/g πρωτεΐνης				
DM							

DM (τύπος 2)	Ασθενείς	(t) 33,42μM			Πλάσμα	HPLC-FLD (mBBr)	Noce et al., 2014
	Υγιείς	(t) 13,60μM					
DM (τύπος 2)	Ασθενείς	(t) 14,9μM	(t) 3,7μM		Πλάσμα	HPLC-FLD (SBD-F)	Tsai et al., 2012
	Υγιείς	(t) 18,9μM	(t) 4,7μM				
DM (τύπος 2)	Ασθενείς	25,30μM	7,93μM		Ορός	GSH: φθοριομετρικός προσδιορισμός	Al-Maskari et al., 2012
	Υγιείς	10.26μM	18.13μM			Hcy: ανοσοπροσδιορισμός	
DM (τύπος 2)	Ασθενείς		(ox) 0,23μM, (r) 9,3μM		Πλάσμα	Προσδιορισμός ενζυματικής ανακύκλωσης (DTNB)	Calabrese et al., 2012
	Υγιείς		(ox) 0,11μM, (r) 14,8μM				
Κάταγμα και ασθένεια του Paget							
Κάταγμα ισχίου	Ασθενείς (γυναίκες)	(t) 11,7μM			Ορός	HPLC	LeBoff et al., 2009
	Control (γυναίκες)	(t) 10,7μM					
Σπονδυλικό κάταγμα	Βαθμός 0 (γυναίκες)	8,9μM			Πλάσμα	HPLC-FLD (SBD-F)	Kuroda et al., 2013
	Βαθμός 1 (γυναίκες)	9.2μM					
	Βαθμός 2 (γυναίκες)	9,8μM					
	Βαθμός 3 (γυναίκες)	11,3μM					
Η νόσος του Paget στα οστά	Ασθενείς	16.3μM			Ορός	Ανοσοπροσδιορισμός	Polyzos et al., 2010
	Υγιείς	12,6μM					
Άλλες ασθένειες							
Άσθμα	Ασθενείς		(r) 12,33g/mL		Πλάσμα	Μέθοδος Beutle (DTNB)	Al-Afaleg et al., 2011
HIV	Υγιείς Μολυσμένοι	(t) 9,8μM	(r) 20,22g/mL (r) 4,9μM, (ox)	(t) 158μM	Πλάσμα	HPLC-FLD	Borges-Santos

	από HIV		1,44μM					(Hcy και Cys, SBD-F; GSH, OPA)	et al., 2012
	Υγιείς	(t) 13,9μM	(r) 9,2μM, (ox) 0,77μM (r/ox) 18.3	(t) 413μM					
ALD	Ηπατίτιδα ALD						Ερυθροκύτταρα	Προσδιορισμός ενζυματικής ανακύκλωσης (DTNB)	Chen et al., 2011
	Κίρρωση ALD		(r/ox) 14,2						
CKD	Υγιείς CKD	(t) 18,4μM	(r/ox) 38.1 (t) 6,5μM	(t) 299μM	(t) 35,6μM	(t) 4,3μM	Πλάσμα	ELISA CE-LIF (5-IAF)	Zinellu et al., 2012
	Control	(t) 10,7μM	(t) 4,9μM	(t) 222μM	(t) 34,8μM	(t) 3,2μM			
Οφθαλμική νόσος	ED (ενεργή αγγειίτιδα)		3,4mM				Πλάσμα	Φθοριομετρία (OPA)	Selvi et al., 2011
	ED (θεραπευμένη αγγειίτιδα)		3,3mM						
	Uveitis		3,6mM						
	Καταρράκτης		3,3mM						
Ουρική αρθρίτιδα	Υγιείς		5.2mM						
	Αποδεδειγμένη με κρυστάλλους ουρική αρθρίτιδα	18,3μM					Πλάσμα	Δεν έχει αναφερθεί	Slot et al., 2013
Σχιζοφρένεια	Άλλες ρευματικές διαταραχές	13,9μM							
	Ασθενείς	(t) 19,5μM					Πλάσμα	HPLC-FLD (ABD-F)	Kinoshita et al., 2013
PCOS	Control	(t) 12,4μM							
	Ασθενείς (γυναίκες)	(t) 12.4μM					Πλάσμα	HPLC-FLD	Kaya et al., 2010
	Υγιείς (γυναίκες)	(t) 8.6μM							
OSAS	Ήπια OSAS	17.12μM					Ορός	FPIA	Sarıman et al.,

Στήλη "Ασθένειες": Συντομογραφίες: AD, ασθένεια Alzheimer,; ALD, αλκοολική ηπατική νόσος, ALS, αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση, CAD, ασθένεια στεφανιαίας αρτηρίας, CKD, χρόνια νεφρική νόσος, CVD, καρδιαγγειακές παθήσεις, DM, σακχαρώδης διαβήτης, HIV, ιός ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας, MCI, ήπια γνωστική εξασθένηση, OSAS, σύνδρομο αποφρακτικής υπνικής άπνοιας, PCOS, σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, PD, ασθένεια Parkinson.

Στήλη "Υποκείμενα": Σημείωση: Ως "control" νοούνται τα άτομα που είναι ελεύθερα από την αντίστοιχη ασθένεια. Συντομογραφίες: ALL, οξεία λεμφοκυτταρική λευχαιμία, CLL, χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία, CT, χημειοθεραπεία, ED, νόσος Eales, RT, θεραπεία με ακτινοβολία, SIL, πλακώδεις ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις, TIA, παροδική ισχαιμική επίθεση.

Στήλη "Βιοθειόλη": Σημείωση: (t), (f), (ox) και (r) σημαίνουν ολικές, ελεύθερες, οξειδωμένες και ανηγμένες θειόλες, αντίστοιχα. (r / ox) ο λόγος των (r) προς τις (ox) θειόλες. Οι μη επισημασμένες τιμές των συγκεντρώσεων των θειολών δεν έχουν καμία δήλωση για την κατάσταση οξειδοαναγωγής στις αναφορές.

Στήλη "Αναλυτικές μέθοδοι": Συντμήσεις: 4-PDS, 4,4-διθειοδιπυριδίνη; 5-IAF, 5-ιωδοακεταμιδοφθορεσκεΐνη, ABD-P, 4-αμινοσουλφονυλ-7-φθορο-2,1,3-βενζοξαδιαζόλη, CE-LIF, ανίχνευση τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης με επαγόμενο από λέιζερ φθορισμό, CMQT, τετραφθοροβορικό 2-χλωρο-1 μεθυλοκινολινίου, DTNB, 5,5-διθειοδισ (2-νιτροβενζοϊκό οξύ), αντιδραστήριο Ellman, ECD, ηλεκτροχημική ανίχνευση, ELISA, ανοσοπροσροφητική ανίχνευση συνδεδεμένη με ένζυμο, FLD, ανίχνευση φθορισμού. FPIA, ανοσοροσδιορισμός πόλωσης φθορισμού. mBBr, βρωμοβιμάνιο. MS, ανίχνευση φασματομετρίας μάζας. OPA, ο-φθαλδιαλδεΐδη, SBD-F, 7-φθορο-2,1,3-βενζοξαδιαζολο-4-σουλφονικό αμμώνιο.

1.6 Προσδιορισμός των βιοθειολών

Ο προσδιορισμός των βιοθειολών συνήθως δεν γίνεται άμεσα στα βιολογικά ρευστά αλλά απαιτεί μια σειρά πειραματικών σταδίων προκατεργασίας του δείγματος. Τα στάδια αυτά μπορεί να εφαρμοστούν επιλεκτικά ή και όλα μαζί ανάλογα με την επιθυμητή ανάλυση και μπορεί να περιλαμβάνουν την απομάκρυνση των πρωτεϊνών, την αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών για την αναγωγή των οξειδωμένων θειολών στις ανηγμένες μορφές τους (π.χ. κυστίνη σε κυστεΐνη), την ελαχιστοποίηση της ανταλλαγής μεταξύ θειολών και δισουλφιδίων και την λύση των κυττάρων (όταν είναι επιθυμητός ο προσδιορισμός της συνολικής συγκέντρωσης των βιοθειολών στο αίμα ή σε κύτταρα αίματος). Τα στάδια αυτά περιγράφονται λεπτομερώς παρακάτω.

1.6.1 Αποθήκευση δείγματος και καταστολή της ανταλλαγής θειολών-δισουλφιδίων

Μετά τη συλλογή του ολικού αίματος, το πλάσμα πρέπει να διαχωρίζεται αμέσως από τα κύτταρα του αίματος και στη συνέχεια να καταψύχεται για αποθήκευση. Κατά τη διάρκεια κατεργασίας του δείγματος, είναι απαραίτητη η καταστολή της ανταλλαγής θειολών-δισουλφιδίων, ειδικά όταν επίκειται ξεχωριστή μέτρηση των ανηγμένων και οξειδωμένων θειολών, καθώς μπορεί να συμβεί ενζυματική μετατροπή και μη ενζυματική οξείδωση των θειολών, αλλάζοντας έτσι την αναλογία θειολών-δισουλφιδίων (Camera et al., 2002). Η ελαχιστοποίηση της ανταλλαγής θειολών-δισουλφιδίων γίνεται είτε με προσθήκη χηλικού αντιδραστηρίου ή με την οξίνιση των δειγμάτων ή την αλκυλίωση των ανηγμένων θειολικών ομάδων. Η προσθήκη χηλικών αντιδραστηρίων στα δείγματα αίματος αποσβένει την οξείδωση (Lambeth et al., 1982) που προκαλείται από μεταλλικά ιόντα όπως Cu^{2+} και Fe^{3+} τα οποία μπορούν να καταλύσουν τη μη ενζυματική οξείδωση της θειολικής ομάδας (Bagiyan et al., 2003). Το αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA) είναι ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος χηλικός υποκαταστάτης ενώ λειτουργεί και ως αντιπηκτικό του αίματος.

Η οξίνιση του βιολογικού δείγματος είναι μια άλλη μέθοδος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διακοπή της ανταλλαγής θειολών-δισουλφιδίων (Rossi et al.,

2002). Σε όξινες συνθήκες, τόσο η ενζυματική μετατροπή όσο και η μη ενζυματική οξείδωση καταστέλλονται. Αυτό συμβαίνει καθώς η ενζυματική μετατροπή των θειολών γίνεται σε ουδέτερο pH, ενώ σε pH μεγαλύτερο από 7, οι θειολικές ομάδες μπορούν να μετατραπούν σε αποπρωτονιωμένες χημικά ενεργές μορφές, που είναι μη ενζυματικά οξειδωμένες (Camera et al., 2002). Αν και η οξίνιση καταστέλλει την ανταλλαγή, οι όξινες συνθήκες του δείγματος συχνά δεν είναι κατάλληλες για άλλα στάδια προ-επεξεργασίας όπως της αναγωγής και της παραγωγοποίησης με οργανικούς (χρωματομετρικούς ή φθορισμομετρικούς) ιχνηθέτες.

Η απόσβεση των ανηγμένων θειολικών ομάδων με αντιδραστήρια αλκυλίωσης όπως το N-αιθυλομηλεϊνιμίδιο (Kand'ár et al., 2007) χρησιμοποιείται για τη μέτρηση των δισουλφιδίων, καθώς οι θειολικές ομάδες που έχουν αποσβεσθεί, δεν μπορούν να οξειδωθούν για να σχηματίσουν δεσμούς δισουλφιδίου. Ωστόσο, η απομάκρυνση της περίσσειας των αντιδραστηρίων αλκυλίωσης είναι απαραίτητη, διότι αυτά αντιδρούν ταχύτατα με νέες θειολικές ομάδες που εκτείθονται κατά τη διάρκεια του σταδίου αναγωγής.

1.6.2 Προκατεργασία δείγματος και αναγωγή των δισουλφιδίων

Η ολικές θειόλες, περιλαμβάνουν τόσο τις ανηγμένες μορφές (R-SH) όσο και δισουλφίδια (RS-SR). Ο προσδιορισμός του δισουλφιδίου, το οποίο αποτελείται από μία θειόλη χαμηλού μοριακού βάρους (LMW) δεσμευμένη σε άλλη χαμηλού μοριακού βάρους θειόλη ή από μία θειολική πρωτεΐνη, πραγματοποιείται με αλκυλίωση των ανηγμένων θειολών πριν από την αναγωγή των δισουλφιδίων. Μετά την αναγωγή των δισουλφιδίων μπορούν να προσδιοριστούν οι ολικές θειόλες ενώ χωρίς την αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών, ο αναλυτικός προσδιορισμός των βιοθειολών είναι εφικτός μόνο για τις ανηγμένες μορφές.

Τα αντιδραστήρια που περιέχουν θειόλες και οι φωσφίνες είναι αντιπροσωπευτικά αντιδραστήρια αναγωγής των δισουλφιδικών δεσμών. Τα πιο διαδεδομένα είναι η διθειοθρεϊτόλη (DTT), η διθειοερυθριτόλη (DTE, ένα επιμερές του DTT), το διμερκαπτοπροπανο σουλφονικό οξύ (DMPS), το 2-μερκαπτοαιθανοσουλφονικό οξύ (MESNA) και η 2-μερκαπτοαιθανόλη (ME). Οι ενώσεις αυτές περιέχουν θειολικές ομάδες, συνεπώς αντιδρούν επίσης με τα αντιδραστήρια ιχνηθέτησης περιπλέκοντας την ανάλυση. Οι φωσφίνες αντιδρούν μη

αντιστρεπτά με δισουλφιδικούς δεσμούς και οι πιο διαδεδομένες είναι η τριβουτυλοφωσφίνη (TBP), η τριφαινυλοφωσφίνη, η τρις (2-καρβοξυαιθυλο) φωσφίνη (TCEP), και η τρις (3-υδροξυπροπυλ) φωσφίνη (THP). Μεταξύ αυτών των αναγωγικών αντιδραστηρίων, τα DTT και TCEP χρησιμοποιούνται πιο συχνά όπως φαίνεται στον Πίνακα 1.2 (Isokawa et al., 2013) αν και τα αποτελέσματα των διαφόρων μελετών δεν συμφωνούν ως προς την δραστικότητα και αποτελεσματικότητα των διάφορων αντιδραστηρίων. Πρόσφατες μελέτες συγκρίνανε τα αναγωγικά αντιδραστήρια DTT, DMPS, MESNA και THP, καταλήγοντας στο συμπέρασμα στις κατάλληλες (βέλτιστες) συγκεντρώσεις έχουν ισοδύναμες ικανότητες να ανάγουν τους δισουλφιδικούς δεσμούς (Svagera et al., 2012). Ωστόσο, σε άλλες μελέτες, η δραστικότητα των παραγώγων TCEP και DTT ήταν ανόμοια. Οι φωσφίνες ήταν πιο δραστικές στα δισουλφίδια χαμηλού μοριακού βάρους από το DTT, ενώ παρατηρήθηκε η αντίστροφη σχέση για δισουλφίδια πρωτεϊνών (Cline et al., 2004). Συνεπώς, το TCEP ή άλλες φωσφίνες θεωρούνται κατάλληλη πρώτη επιλογή ως αναγωγικοί παράγοντες για δισουλφίδια χαμηλού μοριακού βάρους. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι περισσότεροι αναγωγικοί παράγοντες δεν αντιδρούν με δισουλφίδια σε όξινες συνθήκες. Αντίθετα, τα παράγωγα THP και TCEP ανάγουν τα δισουλφίδια σε σχετικά χαμηλότερο pH (Svagera et al., 2012, Cline et al., 2004).

1.6.3 Απομάκρυνση πρωτεϊνών

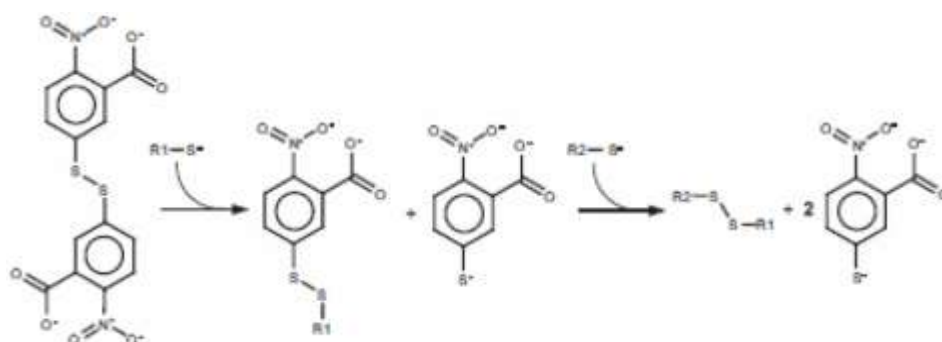
Η απομάκρυνση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται με οξίνιση, προσθήκη οργανικού διαλύτη, υπερδιήθηση ή εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE). Για την οξίνιση, έχουν χρησιμοποιηθεί 5-σουλφοσαλικυλικό οξύ, τριχλωροξικό οξύ (TCA), και υπερχλωρικό οξύ. Αυτά τα οξέα έχουν επαρκή ικανότητα για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών (Stempak et al., 2001), και μεταξύ αυτών, το TCA καταστέλλει στο μέγιστο βαθμό την οξειδωση της GSH σε δείγματα ολικού αίματος (Rossi et al., 2002). Το ακετονιτρίλιο, η ακετόνη και η μεθανόλη έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για την καταβύθιση των πρωτεϊνών. Αυτές οι οργανικοί διαλύτες αποπρωτονίωσης προτιμώνται κατά την ανίχνευση με φασματομετρία μάζας (MS) για τη βελτίωση της ευαισθησίας καθώς επίσης και στη χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης (HILIC), όπου το δείγμα έγχυσης περιέχει οργανικό διαλύτη. Για γενικές ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους, η εκχύλιση ακετονιτρίλιου συνιστάται αντί της υπερδιήθησης, της SPE ή της οξίνισης (Daykin et al., 2002, Tulipani et al., 2013).

1.7 Φασματοφωτομετρικός και Φθορισμομετρικός προσδιορισμός Βιοθειολών

Ο προσδιορισμός των βιοθειολών είναι εφικτός τόσο με ενόργανες τεχνικές ανάλυσης όπως η υγρή χρωματογραφία, η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση, η ηλεκτροχημεία και η φασματομετρία μάζας (Isokawa et al., 2014, Winther et al., 2014, White et al., 2002, Chang et al., 2010, Seiwert et al., 2007), αλλά και με χημειοαισθητήρες που βασίζονται σε χρωματομετρικούς και φθορισμομετρικούς ιχνηθέτες (αντιδραστήρια παραγωγοποίησης), όπως οι πολυθειοφαινικές βαφές ξανθίνης, τα παράγωγα χρωμενίου (βενζοπυρενίου), κ.ά. (Chen et al., 2010, Peng et al., 2012).

1.7.1 Αντιδραστήρια παραγωγοποίησης

Το πιο γνωστό χρωμογονικό αντιδραστήριο για την ανίχνευση των θειολών είναι το 5,5'-διθειοδις-(2-νιτροβενζοϊκό) οξύ (**DTNB**, ή αλλιώς γνωστό ως **αντιδραστήριο Ellman**) (Ellman et al., 1959). Η ένωση αυτή έχει έναν δισουλφιδικό δεσμό με υψηλή οξειδωτική δράση, ο οποίος ανάγεται στοιχειομετρικά από ελεύθερες θειόλες σε μία αντίδραση ανταλλαγής, σχηματίζοντας ένα μεικτό δισουλφίδιο και απελευθερώνοντας ένα μόριο 5-θειο-2-νιτροβενζοϊκού οξέος (TNB, Εικόνα 1.9). Το TNB αποτελεί μια εξαιρετική αποχωρούσα ομάδα με τιμή $pK_a = 4,5$ (Riddles et al., 1983).



DTNB

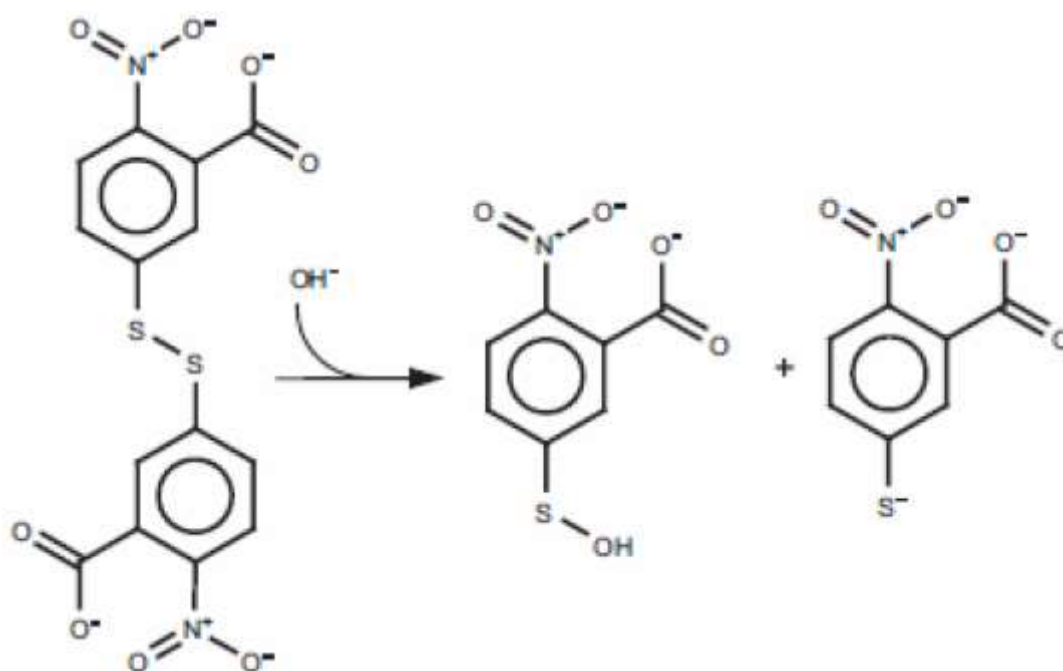
TNB μικτού δισουλφιδίου

δισουλφίδιο

Εικόνα 1.9. Ανίχνευση θειολών χρησιμοποιώντας αντιδραστήριο Ellman (DTNB). Λόγω του χαμηλού pK_a του TNB σχηματίζεται μια εξαιρετικά αποτελεσματική αποχωρούσα ομάδα.

Ενώ το DTNB έχει ασθενή απορρόφηση στα 412nm, ο συντελεστής απόσβεσης για το TNB είναι $14.100\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ σε pH 7.3 (Riddles et al., 1983), αλλά πέφτει απότομα σε χαμηλότερο pH ανακλώντας την πρωτονίωση των θειολικών σωματιδίων.

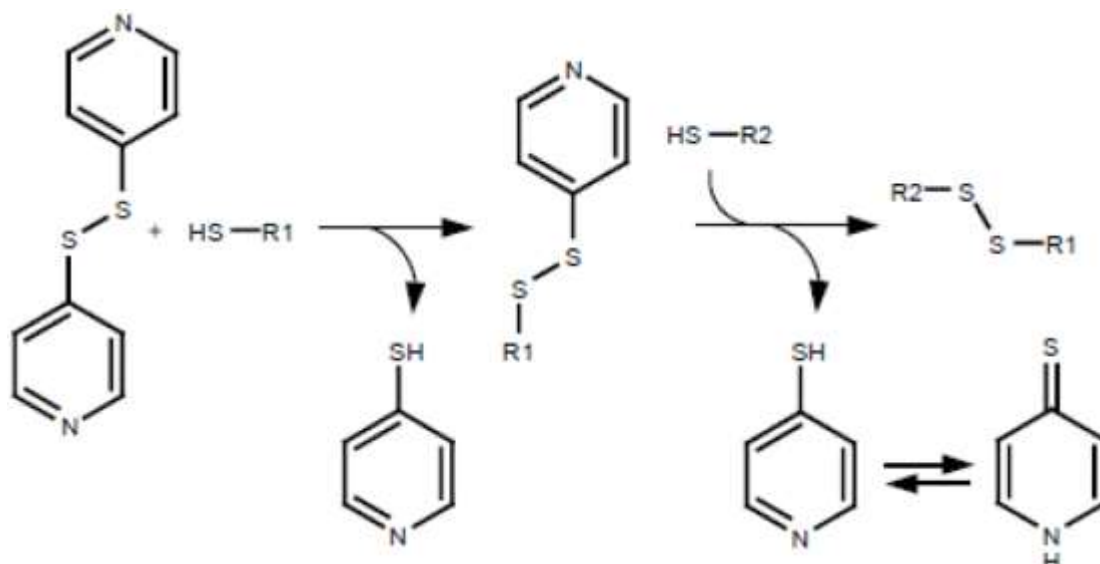
Θα πρέπει επίσης να γνωρίζουμε ότι το DTNB είναι αρκετά ευαίσθητο στην υδρόλυση σε υψηλές θερμοκρασίες και, ειδικότερα, σε τιμές pH>7. Η αποσύνθεση αρχίζει μέσω υδρολυτικής διάσπασης του ενεργοποιημένου δισουλφιδίου του DTNB για να αποδώσει τα σουλφενικά σωματίδια όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.10. Για την αντιμετώπιση αυτής της αστάθειας έχει αναπτυχθεί ένα υδρολυτικά σταθερότερο παράγωγο του DTNB (Zhu et al., 2004).



Εικόνα 1.10. Υδρόλυση του DTNB. Τα ιόντα υδροξυλίου θα εισχωρήσουν στον δεσμό δισουλφιδίου του DTNB σχηματίζοντας ένα σουλφενικό οξύ και ένα θειολικό άλας.

Ένα εναλλακτικό αντιδραστήριο παραγωγοποίησης είναι η **4,4'-διθειοδιπυριδίνη (4-DPS)**. Ενώ η αναγωγή του DTNB παράγει το θειολικό TNB, η αναγωγή του 4-DPS οδηγεί στον σχηματισμό του ταυτομερούς 4-θειοπυριδίνη (Εικόνα 1.11). Η ανεξάρτητη από το pH απορρόφηση της πυριδόνης (συντελεστής απόσβεσης $21.000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ στα 324nm) επιτρέπει την ποσοτικοποίηση των θειολών σε σχετικά μεγάλο εύρος τιμών pH (pH=3-7). Κάτω από αυτές τις συνθήκες, ο αριθμός των ανεπιθύμητων παρεμποδίσεων μειώνεται και η υδρολυτική διάσπαση

του δισουλφιδίου είναι ασήμαντη. Παρά το γεγονός ότι αυτό αποτελεί ένα εμφανές πλεονέκτημα του 4-DPS, το μέγιστο μήκος κύματος για το TNB στην περιοχή του ορατού, σε σχέση με το προϊόν πυριδόνης του 4-DPS που απορροφά στην περιοχή του υπεριώδους, κάνει το DTNB καταλληλότερο για τον ποσοτικό προσδιορισμό των θειολών σε διαλύματα που απορροφούν ισχυρά στο εγγύς UV. Ένας άλλος παράγοντας που πρέπει να ληφθεί υπόψη είναι η πολύ μικρότερη διαλυτότητα του ηλεκτρικά ουδέτερου 4-DPS (~ 3mM σε νερό) σε σύγκριση με το διανιόν του DTNB σε pH 7. Συνεπώς, το DTNB θεωρείται αδιαπέραστο από τις μεμβράνες σε ουδέτερες τιμές pH (Cline et al., 2004), ενώ το 4-DPS μπορεί να προσεγγίσει και να διαπερνά τις βιολογικές μεμβράνες.

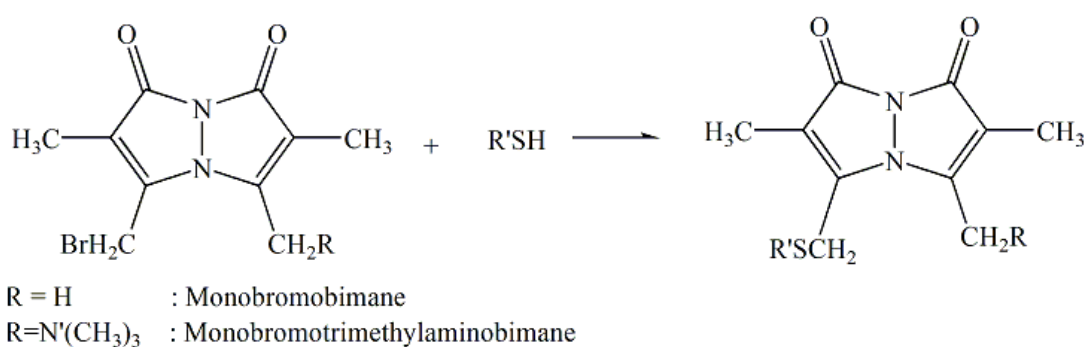


Εικόνα 1.11. Δομή 4-DPS και αντίδραση με θειόλες. Για κάθε θειόλη που οξειδώνεται σχηματίζεται ένα μόριο θειοπυριδόνης. Το τελευταίο είναι ένα ταυτομέρες της θειόλης, το οποίο απορροφά ισχυρά στα 324nm.

Ενώ αυτά τα ενεργοποιημένα χρωμογόνα αντιδραστήρια έχουν αποδειχθεί εξαιρετικά χρήσιμα στην ποσοτικοποίηση των θειολών, πρέπει να χρησιμοποιούνται λαμβάνοντας υπ' όψιν τους περιορισμούς τους. Ένα παράδειγμα είναι οι πιθανές παρεμποδίσεις στον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων των θειολών που συνδέονται με την παρουσία θειωδών σε βιολογικά δείγματα. Τα θειώδη άλατα προσβάλλουν τους δισουλφιδικούς δεσμούς προκαλώντας τη διάσπασή τους με απελευθέρωση των λειτουργικών ομάδων -SH και $-S-SO_3^{2-}$. Ενώ γενικά τα δισουλφίδια δεν είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στη σουλφιτόλυση, τα εξαιρετικά ενεργά δισουλφίδια του DTNB

και του DPS οδηγούν σε μία στοιχειομετρική αντίδραση με τα θειώδη άλατα και στην επακόλουθη υπερεκτίμηση της συγκέντρωσης των θειολών παρουσία θειωδών (Humphrey et al., 1970).

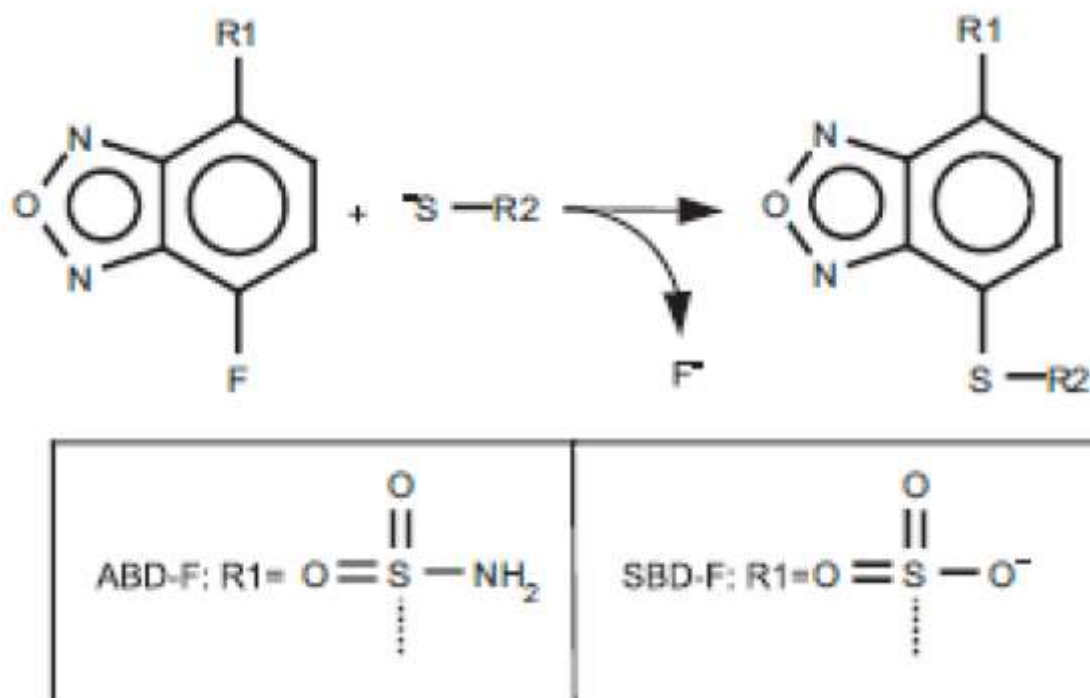
Σε ό,τι αφορά την φθορισμομετρική ανίχνευση των θειολών έχουν αναπτυχθεί πολλά αντιδραστήρια και τα οποία έχουν γίνει αντικείμενο εκτεταμένων ανασκοπήσεων (Tyagarajan et al., 2003, Chen et al., 2010). Το **μονοβρωμομπιμάνιο (mBBr)** και τα βενζοφουράνια αποκτούν φθορισμό όταν αντιδρούν με θειόλες. Έτσι, το mBBr εμφανίζει έναν μπλε φθορισμό μόνο μετά τον σχηματισμό θειοαιθέρα (διέγερση στα 380nm και εκπομπή στα 480nm.) Το αντιδραστήριο έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα τόσο για την ανίχνευση θειολών χαμηλού μοριακού βάρους όσο και τροποποιημένων πρωτεϊνών. Το μονοβρωμομπιμάνιο (monobromobimane-mBBr), το μονοχλώρομπιμάνιο (monochlorobimane-MCB) και το μονοβρωμοτριμεθυλαμινομπιμάνιο (monobromotrimethylaminobimane) αντιδρούν επίσης με τις θειόλες όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.12. Το μειονέκτημα των αντιδράσεων αυτών είναι η ισχυρή και παρατεταμένη θέρμανση που απαιτείται ($T > 60^{\circ}\text{C}$) για την ολοκλήρωση της αντίδρασης σε ισχυρά αλκαλικές συνθήκες ($\text{pH} > 10,0$). και για το λόγο αυτό δεν μπορούν να υιοθετηθούν εύκολα σε συστήματα συνεχούς ροής μπορούν όμως να χρησιμοποιηθούν για αντιδράσεις παραγωγοποίησης πριν το χρωματογραφικό ή ηλεκτροφορικό διαχωρισμό τους (Karakosta et al., 2013).



Εικόνα 1.12. Αντίδραση παραγωγοποίησης θειολών με τα μπιμάνια.

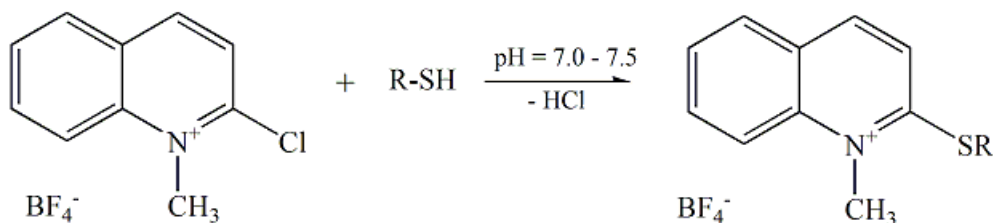
Εκτός από την εφαρμογή τους για παραγωγοποίηση και φθορισμομετρική ανίχνευση θειολών, τα μπιμάνια και τα αλογονωμένα σουλφοφαινυλο-βενζοφουράνια έχουν χρησιμοποιηθεί σε μεθόδους προσδιορισμού θειολών με ανιχνευτή μάζας για αναλύσεις βιολογικών δειγμάτων και φαρμακευτικών σκευασμάτων (Medvedovici et al., 2009, Zhu et al., 2008, Toriumi et al., 2003).

Μια άλλη κατηγορία ιχνηθετών για θειόλες είναι τα **βενζοφουράνια** και συγκεκριμένα το 7-φθοροβενζο-2-οξα-1,3-διαζολ-4-σουλφονικό οξύ (**SBD-F**) και το 4-(αμινοσουλφονυλ)-7-φθορο-2,1,3-βενζοξιαδιαζόλιο (**ABD-F**) (Εικόνα 1.13) (Imai et al., 1983, Toyooka et al., 1985). Και τα δύο αντιδραστήρια είναι μη φθορίζοντα, αλλά επιτυγχάνουν ισχυρό φθορισμό γύρω στα 500nm κατά τη σύζευξη με θειόλες. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση ότι αυτά τα αντιδραστήρια δεν αντιδρούν σε μεγάλο βαθμό με τις φωσφίνες. Ενώ το SBD-F απαιτεί μάλλον ειδικές συνθήκες (60°C σε pH 8,5 για 1 ώρα), η τροποποίηση με ABD-F είναι πλήρως σε θερμοκρασία περιβάλλοντος σε 10 λεπτά και σε pH 8. Για το λόγο αυτό η χρήση του ABD-F είναι προτιμότερη, αν και για ορισμένες εφαρμογές η έλλειψη εξειδίκευσης μπορεί να αποτελέσει πρόβλημα (Husted et al., 2003). Επιπλέον, το ABD-F είναι αρκετά ασταθές παρουσία περίσσειας θειολών (Treueheit et al., 1993). Μία ιδιαιτέρως χρήσιμη εφαρμογή των βενζοφουρανίων είναι ότι αρκετές ενώσεις προσθήκης θειολών χαμηλού μοριακού βάρους μπορούν να ανιχνευθούν ταυτόχρονα με διαχωρισμό HPLC και με ανίχνευση φθορισμού (Abukhalaf et al., 2002). Πρόσφατα έχει περιγραφεί μια νέα κατηγορία βενζοφουρανίων που είναι περισσότερο δραστικές και έχουν πιθανή εφαρμογή στη μικροσκοπία φθορισμού (Li et al., 2012).



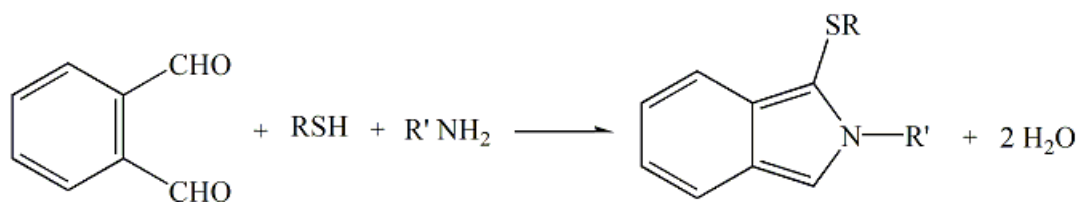
Εικόνα 1.13. Αντίδραση βενζοφουρανίων με θειόλες. Τα προϊόντα της αντίδρασης είναι εξαιρετικά φθορίζοντα.

Η αντίδραση των θειολών με το **τετραφθοροβορικό άλας της 2-χλώρο-1-μέθυλο κινολίνης** (*2-chloro-1-methylquinolinium tetrafluoroborate*, **CMQT**) είναι, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.14, μια αντίδραση υποκατάστασης του ατόμου του χλωρίου του άλατος από τη θειολική ομάδα. Πραγματοποιείται γρήγορα υπό ήπιες συνθήκες και τα σχηματιζόμενα παράγωγα ανιχνεύονται φασματοσκοπικά σε μήκος κύματος περίπου 355nm (Kuśmierek et al., 2006, Bald et al., 2001, Kuśmierek et al., 2008, Bald et al., 2004, Kuśmierek, Chwatko et al., 2008, Kuśmierek et al., 2007, Alwaela et al., 2010, Głowacki et al., 2009, Kuśmierek et al., 2008 II, Głowacki et al., 2009 II, Bald et al., 2005). Το μειονέκτημα του αντιδραστήριου αυτού είναι ότι δεν είναι εμπορικά διαθέσιμο και η εργαστηριακή του παρασκευή είναι μια αρκετά χρονοβόρα και επίπονη διαδικασία.



Εικόνα 1.14. Αντίδραση παραγωγοποίησης θειολών με το τετραφθόροβορικό άλας της 2- χλώρο-1-μέθυλο κινολίνης.

Η **ο-φθαλαλδεΐδη** (*o*-Phthaldialdehyde-**OPA**), χρησιμοποιείται συχνά ως αντιδραστήριο παραγωγοποίησης ενώσεων που φέρουν στο μόριό τους πρωτοταγή αμινομάδα και μπορεί να χρησιμοποιηθεί έμμεσα για τη φθορισμομετρική ανίχνευση των θειολών. Η αντίδραση ακολουθεί το μηχανισμό που φαίνεται στην Εικόνα 1.15. Πραγματοποιείται γρήγορα σε αλκαλικές συνθήκες ($\text{pH} > 9.0$) και οι σχηματιζόμενες ισοϊνδόλες ανιχνεύονται φθορισμομετρικά με μήκος κύματος διέγερσης περίπου στα 350nm και εκπομπής περίπου στα 405-450nm. Το σημαντικότερο μειονέκτημα του αντιδραστήριου είναι ότι τα ισοϊνδολικά παράγωγα που προκύπτουν είναι ασταθή. Για το λόγο αυτό η ο- φθαλαλδεΐδη βρίσκει περισσότερες εφαρμογές στην παραγωγοποίηση θειολών σε συστήματα συνεχούς ροής (Karakosta et al., 2011) ή μετά τον χρωματογραφικό διαχωρισμό τους (Nakamura et al., 1981, Nakamura et al., 1982, Nakamura et al., 1988, Leroy et al., 1993, Kok et al., 1997, Sakhi et al., 2007) αντί για παραγωγοποίηση πριν τη χρωματογραφική στήλη (Mopper et al., 1984, Kand'ar et al., 2007).



Εικόνα 1.15. Αντίδραση παραγωγοποίησης θειολών με το αντιδραστήριο ο-φθαλαλδεΰδη.

1.7.2 Προσδιορισμός βιοθειολών με τεχνικές διαχωρισμού

Πληθώρα αναλυτικών μεθόδων έχουν αναπτυχθεί για τον προσδιορισμό βιοθειολών με χρήση τεχνικών διαχωρισμού όπως η υγρή χρωματογραφία (HPLC) και η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (CE). Μια ανασκόπηση των μεθόδων πριν το 2009 παρουσιάζεται από τον Toyo'oka 2009 (Toyo'oka et al., 2009). Στον Πίνακα 1.2 συνοψίζονται οι πιο πρόσφατες μέθοδοι για τον προσδιορισμό βιοθειολών σε σύζευξη με τεχνικές διαχωρισμού με ανιχνευτές (Isokawa et al., 2014):

- υπεριώδους (UV) (Kus'imierek et al., 2009, Glowacki et al., 2009, Glowacki et al., 2009 II, Zhang et al., 2014), φθορισμού (Ichinose et al., 2009, Valente et al., 2012, Ferin et al., 2012, Isokawa et al., 2013, Cevasco et al., 2010, Wada et al., 2013, Huang et al., 2011, Michaelsen et al., 2009, Pozdeev et al., 2010, Guo et al., 2009, Huang et al., 2010, Huang et al., 2011, Guo et al., 2012, Guo et al., 2013, Zinellu et al., 2009, Wang et al., 2012),
- χημειοφωταύγειας (CL) (Bai et al., 2013, McDermott et al., 2011, Shang et al., 2011, Zhao et al., 2012),
- ηλεκτροχημική ανίχνευση (Khan et al., 2011, Khan, Iqbal et al., 2011),
- και φασματομετρία μάζας (MS) (Norris et al., 2012, Jiang et al., 2009, Persichilli et al., 2010, Squellerio et al., 2012, D'Agostino et al., 2011, Moore et al., 2013).

Πίνακας 1.2. Πρόσφατες αναλυτικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό των θειολών.

Δείγμα	Αντίδραση αναγωγής	Παραγωγο- ποίηση	Μέθοδος διαχωρισμού	Κινητή φάση	Τρόπος διαχωρισμού & έκλουσης	Ανίχνευση	Χρόνος ανάλυσης (min)	Όριο ανίχνευσης (LOD) (nm)				
								Αναφορά				
								Cys	Hcy	GSH	CysGly	
Πλάσμα	TCEP	BCPB	RPLC	Ρυθμιστικό διάλυμα ακετονιτριλίου/ τριχλωροοξικού οξέος	Βαθμωτός	UV	7	200	200	200	200	(Kusimierek et al., 2009)
Πλάσμα	TCEP	CMQT	RPLC	Ακετονιτρίλιο/υδα- τικό διάλυμα τριχλωροοξικού οξέος/ υδροξείδιο του λιθίου	Βαθμωτός	UV	12	100	200	200	150	(Glowacki et al., 2009)
Πλάσμα	TCEP	CMQT	RPLC	Ακετονιτρίλιο/ υδατικό διάλυμα τριχλωροοξικού οξέος / υδροξείδιο του λιθίου	Βαθμωτός	UV	13	250	250	250	250	(Glowacki et al., 2009 II)
Πλάσμα	TCEP	AuNPs	RPLC	Υδατικό τριφθοροοξικό οξύ	Ισοκρατικός	UV	6	310	490			(Zhang et al., 2014)
Πλάσμα	Βοροϋδρικό νάτριο	SBD-F	RPLC	Ρυθμιστικό διάλυμα ακετονιτριλίου/ οξικού οξέος	Ισοκρατικός	FL	12	470	160			(Ichinose et al., 2009)
Πλάσμα	TCEP	SBD-F	RPLC (UHPLC)	Ρυθμιστικό διάλυμα ακετονιτριλίου/ φωσφορικού οξέος	Ισοκρατικός	FL	9	240	50			(Valente et al., 2012)

Πλάσμα	TBP	SBD-F	RPLC	Ρυθμιστικό διάλυμα ακετονιτριλίου/ φωσφορικού οξέος	Ισοκρατικός	FL	6	90	50	30	10	(Ferin et al., 2012)
Πλάσμα	TCEP	SBD-F	HILIC	Ρυθμιστικό διάλυμα ακετονιτριλίου/ μυρμηκικού αμμωνίου	Ισοκρατικός	FL	10	1.5	0.8	0.8	0.3	(Isokawa et al., 2013)
Πλάσμα	TCEP	SBD-BF	RPLC	Τετραϋδροφουράνι ο σε μεθανόλη/ υδατικό διάλυμα τριφθοροοξικού οξέος	Βαθμωτός	FL	12	100	10	20	10	(Cevasco et al., 2010)
Πλάσμα	DTE	DBD-F	RPLC	Ρυθμιστικό διάλυμα ακετονιτριλίου/ φωσφορικού οξέος	Ισοκρατικός	FL	12	110	130			(Wada et al., 2013)
Πλάσμα	-	ABD-F	RPLC	Ρυθμιστικό διάλυμα μεθανόλης/ οξικού οξέος	Ισοκρατικός	FL	12	5		20		(Huang et al., 2011)
Ερυθροκ ύτταρα	-	OPA	RPLC	Ρυθμιστικό διάλυμα μεθανόλης/ οξικού οξέος	Ισοκρατικός	FL	20					(Michaelsen et al., 2009)
Πλάσμα	DTT	OPA	RPLC	Ρυθμιστικό διάλυμα ακετονιτριλίου/ φωσφορικού οξέος/ δωδέκυλο θειικό νάτριο	Βαθμωτός	FL	45	410	370	160		(Pozdeev et al., 2010)

Πλάσμα	DTT και βοροϋδρικό νάτριο	TMPAB-I	RPLC	Ρυθμιστικό διάλυμα μεθανόλης/ τετραϋδροφουρανί ου/ κιτρικού οξέος	Ισοκρατικός	FL	20	0,3	0,7	0,3	(Guo et al., 2009)
Αίμα	-	BODIPY Fl-C1-IA	RPLC	Ρυθμιστικό διάλυμα μεθανόλης/ οξικού οξέος	Ισοκρατικός	FL	10	0,2		0,2	(Huang et al., 2010)
Πλάσμα	-	BODIPY Fl-C1-IA	RPLC	Ρυθμιστικό διάλυμα μεθανόλης/ οξικού οξέος	Ισοκρατικός	FL	8	0.004		0.02	(Huang et al., 2011)
Πλάσμα	DTT και βοροϋδρικό νάτριο	TMPAB-I	MEKC	Ρυθμιστικό διάλυμα ακετονιτριλίου/ φωσφορικού οξέος/ δωδεκυλο θειικού νατρίου	-	FL	20	0.004	0.05	0.004	(Guo et al., 2012)
Πλάσμα	DTT και βοροϋδρικό νάτριο	TMMB-Br	RPLC	Ρυθμιστικό διάλυμα μεθανόλης/ κιτρικού οξέος- NaOH	Ισοκρατικός	FL	26	0.8	0,3	0,2	(Guo et al., 2013)
Πλάσμα	TBP	5-IAF	CE	Φωσφορικό νάτριο, βορικό νάτριο, N-μεθυλο-D-	-	FL	10				(Zinellu et al., 2009)

Πλάσμα	-	NBD-F	RPLC	γλυκαμίνη Ρυθμιστικό διάλυμα	Ισοκρατικός	FL	25			30		(Wang et al., 2012)
Αίμα	-	Μαγγάνιο (IV) (στήλη)	RPLC	ακετονιτριλίου/ φωσφορικού οξέος Μεθανόλη/ υδατικό διάλυμα τριφθοροοξικού οξέος	Ισοκρατικός	CL	20	50	50	70		(McDermott et al., 2011)
Πλάσμα	TCEP	Λουμινόλη	RPLC	Υδατικό διάλυμα τριφθοροοξικού οξέος	Ισοκρατικός	CL	12	0.8	4	5	2	(Shang et al., 2011)
Πλάσμα	TCEP	Λουμινόλη	RPLC	Υδατικό διάλυμα τριφθοροοξικού οξέος	Ισοκρατικός	CL	10	14.6	19.7	22.5	9.4	(Bai et al., 2013)
Πλάσμα	Βοροϋδρικό νάτριο	ABEI	CE	Ρυθμιστικό διάλυμα βορικού/ δωδεκυλοθειικού νατρίου	-	CL	10		7.6			(Mu et al., 2012)
Πλάσμα και ερυθροκ ύτταρα	-	Καμία	RPLC	Μεθανόλη/ υδατικό διάλυμα τριφθοροοξικού οξέος	Ισοκρατικός	Ηλεκτροχημ ική	26	5	3	30		(Khan et al., 2011)
Πλάσμα και ερυθροκ ύτταρα	TCEP	Καμία	RPLC	Μεθανόλη/ υδατικό διάλυμα τριφθοροοξικού οξέος που περιέχει αντιδραστήριο ζεύξης ιόντων	Ισοκρατικός	Ηλεκτροχημ ική	20	0,45	0,37	0,26		(Khan, Iqbal et al., 2011)
Αίμα	-	Καμία	RPLC	Μεθανόλη/ ακετονιτρίλιο/ υδατικό διάλυμα μυρμηκικού οξέος	Βαθμωτός	MS/MS	6			1800		(Norris et al., 2012)

Πλάσμα	DTT	Καμία	RPLC	Ρυθμιστικό διάλυμα ακετονιτριλίου/ μυρμηκικού αμμωνίου	Βαθμωτός	MS/MS	20	0.8	7.4	3.3	2.8	(Jiang et al., 2009)
Πλάσμα	DTT	Καμία	IC	Μεθανόλη/ νερό	Ισοκρατικός	MS/MS	4		10			(Persichilli et al., 2010)
Αίμα	-	Καμία	RPLC	Ρυθμιστικό διάλυμα μεθανόλης/ μυρμηκικού αμμωνίου	Ισοκρατικός	MS/MS	10			3		(Squellerio et al., 2012)
Πλάσμα	-	Μηλεϊνιμίδιο	CE	Υδατικό διάλυμα μυρμηκικού οξέος	-	MS	13	8	10	6	10	(D'Agostino et al., 2011)
Αίμα	-	Καμία	RPLC	Ακετονιτρίλιο/ φορμικό οξύ	Βαθμωτός	MS/MS	5			400		(Moore et al., 2013)

BCPB, βρωμιούχο 1-βενζυλο-2-χλωροπυριδίνιο, *CMQT*, τετραφθοροβορικό 2-χλωρο-1-μεθυλοκινολίνιο, *SBD-F*, 7-φθορο-2,1,3-βενζοξαδιαζολο-4-σουλφονικό αμμώνιο. *SBD-BF*, 5-βρωμο-7-φθοροβενζο-2-οξα- 1,3-διαζολ-4-σουλφονικό; *DBD-F*, 4- (N, N-διμεθυλαμινοσουλφονυλ) -7-φθορο-2,1,3-βενζοξαδιαζόλη, *ABD-F*, 4- (αμινοσουλφονυλ) -7-φθορο-2,1,3-βενζοξαδιαζόλη. *OPA*, ο-φθαλδιαλδεΐδη. *TMPAB-I*, 1,3,5,7-τετραμεθυλ-8-φαινυλ- (4- ιωδοακεταμίδιο) διφθορο-βορα-διαζα-s-ινδακένιο. *BODIPY Fl-C1-IA*, N- (4,4-διφθορο-5,7-διμεθυλ-4-βορα-3α, 4α-διαζα-s-ινδακεν-3-υλ) μεθυλ- ιωδοακεταμίδιο. *TMMB-Br*, 1,3,5,7-τετραμεθυλο-8-βρωμομεθυλο- διφθορο-βορα-διαζα-s-ινδακένιο, *NBD-F*, 4-φθορο-7-νιτρο-2,1,3-βενζοξαδιαζόλη. *IC*: ιοντική χρωματογραφία, *CE*: τριχοειδής ηλεκτροφόρηση, *ABEI*: N- (4-αμινοβουτυλ) -N-αιθυλοισολουμινόλη, *5-IAF*: 5-Ιωδοακεταμιδοφθορεσκεΐνη, *RPLC*: υγρή χρωματογραφία αντιστρόφου φάσης, *FL*: φθορισμός, *CL*: χημειοφωταύγεια.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

ΟΠΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΕΝΥΣΗΣ ΒΙΟΘΕΙΟΛΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΝΑΝΟΪΛΙΚΩΝ

2.1 Εισαγωγή

Όπως προαναφέρθηκε ο προσδιορισμός των βιολογικών αμινοθειολών (κυρίως κυστεΐνης, ομοκυστεΐνης και γλουταθειόνης) είναι ένα σημαντικό εργαλείο στην κλινική διάγνωση πολλών διαταραχών και ασθενειών. Για τον λόγο αυτό η ανάπτυξη νέων χημικών αισθητήρων και ανιχνευτών που βασίζονται στα νανοϊλικά έχει προσελκύσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον δεδομένου ότι τα νανοϊλικά προσφέρουν αρκετά πλεονεκτήματα, όπως χαμηλότερο κόστος, ταχύτερους χρόνους ανάλυσης και ευκολία λειτουργίας σε σύγκριση με τις κλασικές ενόργανες τεχνικές ανάλυσης όπως η υγρή χρωματογραφία και η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση. Λόγω της ισχυρής χημικής πρόσδεσης της σουλφυδρυλο-ομάδας με τα νανοσωματίδια ευγενών μετάλλων και τις μοναδικές οπτικές ιδιότητες των νανο-κολλοειδών των ευγενών μετάλλων (π.χ. οπτικές ιδιότητες που εξαρτώνται από το μέγεθος των νανοσωματιδίων, μεγάλη ειδική επιφάνεια, υψηλοί συντελεστές απόσβεσης, κλπ), έχουν αναπτυχθεί αρκετές οπτικές μέθοδοι που συνδυάζουν ανίχνευση με φασματοφωτομετρία, φθορισμό, χημειοφωταύγεια και σκέδαση φωτός και βασίζονται σε διαφορετικούς μηχανισμούς αντίδρασης

Στο κεφάλαιο αυτό, περιγράφεται ο οπτικός προσδιορισμός βιοθειολών με τη χρήση νανοϊλικών, συνοψίζονται οι σημαντικότεροι μηχανισμοί αντίδρασης και μέθοδοι ανίχνευσης και συγκρίνονται ως προς την ευαισθησία και την εκλεκτικότητα τους έναντι διαφόρων ειδών βιοθειολών.

2.2 Προσδιορισμός των θειολών με νανοσωματίδια χρυσού

Η υψηλή χημική συγγένεια του θείου με τον χρυσό και τα νανοσωματίδια του χρυσού αποτέλεσε εφαλτήριο για την ανάπτυξη πολλών αναλυτικών μεθόδων και στρατηγικών ανίχνευσης (Zhang et al., 2002, Sudeep et al., 2005, Aryal et al. Mocanu et al., 2009, Du et al., 2012, Giannoulis et al., 2014, Zhao et al., 2014, Zhang et al.,

2016). Οι βιοθειόλες δεν αποτελούν εξαίρεση και ως εκ τούτου τα νανοσωματίδια χρυσού είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο νανοϋλικό για την ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των βιοθειολών. Εντούτοις, έχει χρησιμοποιηθεί μια πληθώρα από διαφορετικές πορείες αντίδρασης και στρατηγικές ανίχνευσης. Μια σύνοψη των πρόσφατων αναλυτικών μεθόδων παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.1.

Πίνακας 2.1. Μέθοδοι για τον προσδιορισμό βιοθειολών βασισμένοι σε νανοσωματίδια χρυσού

Αναλύτης	Ανίχνευση	Γραμμική Περιοχή	Όριο Ανίχνευσης	Επαναληψιμότητα (Σχετική τυπική απόκλιση %)	Συντελεστής γραμμικότητας	Δείγμα	Αναφορά
Κυστεΐνη	Φωτομετρική	0.1-5.0 μM	100 nM				Chen et al. (2009)
Κυστεΐνη	Συντονισμός σκεδασμού φωτός	0,2-3,0 μM	0.15 μM		0,992	Ανθρώπινα ούρα και πλάσμα	Xiao et al. (2011)
Ομοκυστεΐνη							
Κυστεΐνη	Φωτομετρική	10-100 μM		3.1-6.7	0.997	Ούρα	Wei et al. (2010)
Κυστεΐνη	Φωτομετρική	0.4-1.2 μM	21.7 nM			Ανθρώπινος ορός	Li et al. (2015)
Γλουταθειόνη		0,2-0,9 μM	35.8 nM				
Ομοκυστεΐνη		0.6-3.0 μM	62.4 nM				
Γλουταθειόνη	Φωτομετρική	0,1-1,0 μM	12 nM		0.998	Ανθρώπινος ορός και ούρα ppzdtc ligands	Li, Huang, and Wu (2017)
Γλουταθειόνη	Φωτομετρική	8-250 nM	8 nM		0.989		Li, Wu, et al. (2011)
Κυστεΐνη	Φωτομετρική	0.02-2.0 μM	8 nM	3.01-6.63	0.978	Ανθρώπινος ορός	Deng et al. (2015)
	Φωτοφωταύγεια						
	Μετασχηματισμός φωτοφωταύγειας	0,01-2,0 μM 0.01-2.0 μM	4 nM		0.991		
			5 nM		0.992		

Κυστεΐνη	Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση με ανίχνευση UV	2,5-25 μ M	0.554 μ M	3.07	0.991	Δείγματα ούρων	Li et al. (2009)
Γλουταθειόνη		0.25-10 μ M	0.028 μ M	2.04	0.994		
Ομοκυστεΐνη		2.5-25 μ M	0.456 μ M	4.95	0.990		
Ομοκυστεΐνη	Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση με φθορισμό επαγόμενο μέσω λείζερ	25-500 nM	4013.2 pM	4.20	0.999	Ούρα	Shen, Tseng, and Hsieh (2009)
Γλουταθειόνη		1-250 nM	79.8 pM	2.53	0.999		
γ -γλουταμικυστεΐνη		5-250 nM	382.8 pM	4.85	0.996		
Κυστεΐνη	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης	3.0-10 μ M	2 μ M	2.6		Ανθρώπινα ούρα	Lu et al. (2007)
Κυστεΐνυλογλυκίνη			40 pmol	1.7			
Ομοκυστεΐνη			40 pmol	2.1			
Γλουταμυλοκυστεΐνη			60 pmol	2.9			
Γλουταθειόνη			80 pmol	1.9			

2.3 Φωτομετρικοί προσδιορισμοί με τα νανοσωματίδια χρυσού

2.3.1 Φωτομετρικοί προσδιορισμοί που βασίζονται στη συσσωμάτωση νανοσωματιδίων χρυσού

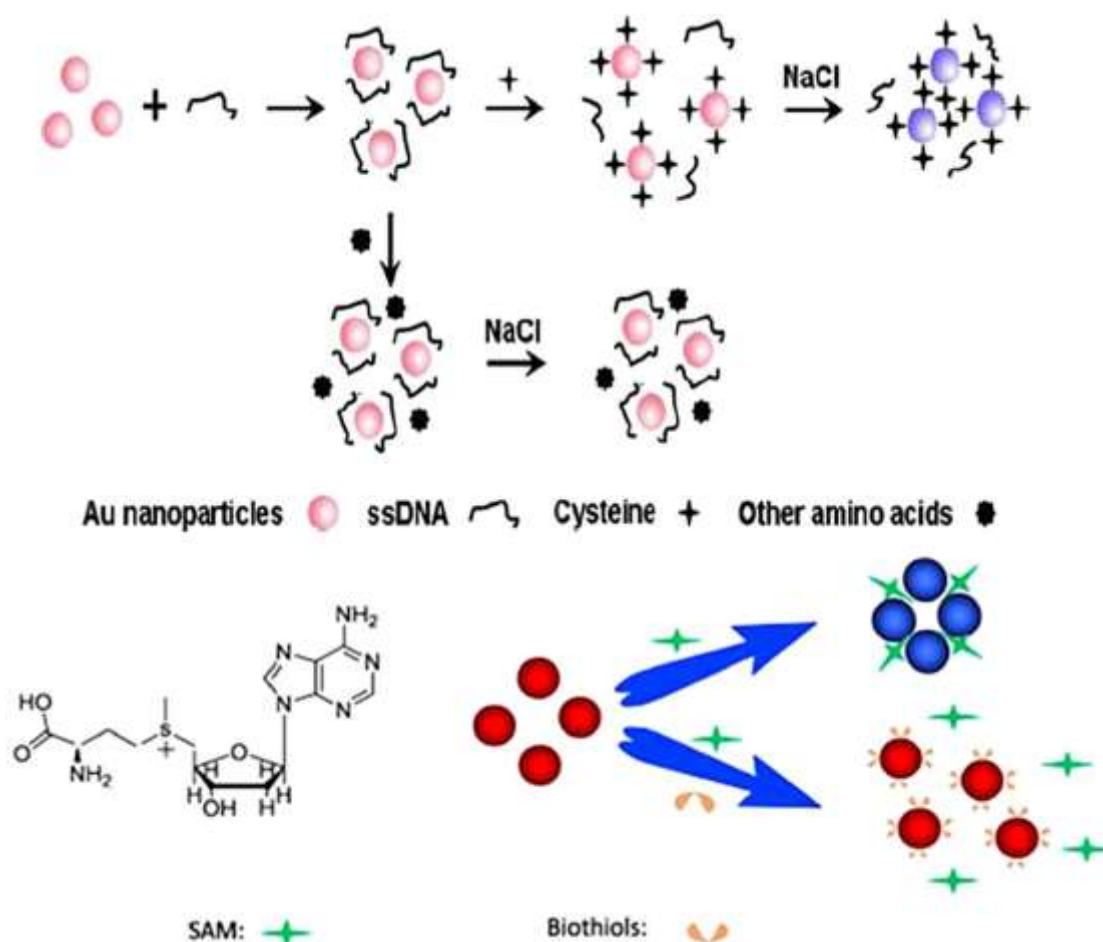
Η συσσωμάτωση νανοσωματιδίων χρυσού είναι μία από τις πιο δημοφιλείς και εύκολες προσεγγίσεις για την ανίχνευση βιοθειολών. Όταν προστίθενται θειόλες σε ένα υδατικό αιώρημα νανοσωματιδίων χρυσού, συνδέονται γρήγορα στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων προκαλώντας μια βαθοχρωμική μετατόπιση στη ζώνη απορρόφησης υπεριώδους-ορατού του διαλύματος νανοσωματιδίων χρυσού (redshift) (Mocanu et al., 2009). Με βάση τα φάσματα υπέρυθρων και Raman, προηγούμενες μελέτες έχουν επιβεβαιώσει ότι οι βιοθειόλες συνδέονται με τα νανοσωματίδια χρυσού μέσω ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων Au-S (Zhang et al., 2002, Sudeep et al., 2005, Aryal et al., 2006). Στη συνέχεια, η συσσωμάτωση γίνεται μέσω της σύνδεσης γειτονικών νανοσωματιδίων χρυσού μέσω διαφορετικών μηχανισμών που εξαρτώνται από τα είδη των βιοθειολών. Στην περίπτωση της κυστεΐνης, ο κύριος μηχανισμός συσσωμάτωσης έχει αποδοθεί στις διϊοντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των σωματιδίων ανάμεσα στη θετικά φορτισμένη αμινομάδα και στην αρνητικά φορτισμένη καρβοξυλ-ομάδα γειτονικών μορίων κυστεΐνης που συνδέονται στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων χρυσού (Sudeep et al., 2005, Acres et al., 2014). Από την άλλη πλευρά, η συσσωμάτωση των νανοσωματιδίων χρυσού από τη γλουταθειόνη αποδίδεται κυρίως στους διαμοριακούς δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των μορίων της γλουταθειόνης που είναι συνδεδεμένα στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων χρυσού (Kreibig et al., 1985, Acres et al., 2014). Σε κάθε περίπτωση, το pH και η ιοντική ισχύς διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο, καθώς επηρεάζουν την κατάσταση ιονισμού των βιοθειολών, τη σταθερότητα των νανοσωματιδίων χρυσού και τον σχηματισμό δεσμών υδρογόνου (Kreibig et al., 1985, Zhang et al., 2002, Acres et al., 2014).

Η ιοντική ισχύς είναι ένας κρίσιμος παράγοντας στις μεθόδους που βασίζονται στη συσσωμάτωση νανοσωματιδίων χρυσού επειδή οι ανόργανοι ηλεκτρολύτες μπορούν να μειώσουν τις απωστικές ηλεκτροστατικές δυνάμεις μεταξύ γειτονικών νανοσωματιδίων χρυσού και να προκαλέσουν τη συσσωμάτωσή τους. Προκειμένου να αποτραπεί αυτή η παρεμπόδιση, τα περισσότερα νανοσωματίδια χρυσού επικαλύπτονται με ένα κατάλληλο σταθεροποιητή που εμποδίζει τη συσσωμάτωσή

τους. Όταν οι βιοθειόλες προστίθενται στο διάλυμα, συνδέονται στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων χρυσού, απομακρύνοντας αυθόρμητα την επίστρωση των σταθεροποιητών από την επιφάνειά τους, πράγμα που μειώνει την αντίστασή τους στην συσσωμάτωση. Βάσει αυτής της αρχής, οι Chen et al. περιέγραψαν τον προσδιορισμό της κυστεΐνης χρησιμοποιώντας νανοσωματίδια χρυσού που έχουν ως σταθεροποιητή μονόκλωνα DNA (Εικόνα 2.1α), ενώ οι Ghasemi et al. περιγράφουν μια σειρά ανιχνευτών για τον προσδιορισμό και τη στατιστική διάκριση των βιοθειολών με χρήση νανοσωματιδίων χρυσού επικαλυμμένων με βρωμιούχο δεκαεξα-τριμεθυλαμμώνιο (Ghasemi et al., 2015). Χρησιμοποιώντας το συντονισμό του σκεδασμού φωτός πλασμονίων των νανοσωματιδίων χρυσού, που συμβαίνει όταν τα ηλεκτρόνια στα νανοσωματίδια κινούνται με την ίδια συχνότητα όπως το προσπίπτον κύμα ακτινοβολίας (Aslan et al., 2005), οι Wang et al. ανέπτυξαν ένα σύνολο μεθόδων για τον προσδιορισμό της κυστεΐνης χρησιμοποιώντας νανοσωματίδια χρυσού επικαλυμμένα με βρωμιούχο κετυλ-τριμεθυλαμμώνιο (Wang et al., 2008).

Οι Xiao et al. ανέφεραν την εκλεκτική ανίχνευση της κυστεΐνης και της ομοκυστεΐνης με νανοσωματίδια χρυσού επικαλυμμένων με φθορο-επιφανειοδραστικές ουσίες (Xiao et al., 2011) μέσω ρύθμισης τόσο του pH όσο και της ιοντικής ισχύος του διαλύματος. Συγκεκριμένα, παρατήρησαν ότι όταν το pH του νανοκολλοειδούς διαλύματος ήταν σχεδόν ουδέτερο (δηλ., pH 6,5), η κινητική της συσσωμάτωσης των νανοσωματιδίων χρυσού, επικαλυμμένων με φθορο-επιφανειοδραστικά τόσο από την κυστεΐνη όσο και από την ομοκυστεΐνη, ήταν σχεδόν πανομοιότυπες. Όταν η τιμή του pH του νανοκολλοειδούς διαλύματος αυξήθηκε σε 12,0, η κινητική της συσσωμάτωσης από την κυστεΐνη ήταν πολύ ταχύτερη από εκείνη που προκαλείται από την ομοκυστεΐνη. Για τον προσδιορισμό της ολικής κυστεΐνης και ομοκυστεΐνης, δεν απαιτούνταν η ρύθμιση της ιοντικής ισχύος αλλά για να καταστεί δυνατός ο προσδιορισμός της κυστεΐνης, η ιοντική ισχύς ρυθμίστηκε με 100mM NaCl. Με βάση αυτά, η μέθοδος εφαρμόστηκε σε δείγματα ανθρώπινων ούρων και πλάσματος για τον εκλεκτικό προσδιορισμό της κυστεΐνης και της ομοκυστεΐνης (Xiao et al., 2011). Ο άμεσος προσδιορισμός της κυστεΐνης έχει επίσης αναφερθεί χωρίς τροποποίηση της ιοντικής ισχύος του διαλύματος. Συγκεκριμένα, οι Wei et al. πρότειναν ότι η καρβοξυμεθυλο-κυτταρίνη, η οποία ενεργεί τόσο ως υλικό επικάλυψης όσο και ως αναγωγικός παράγοντας των

νανοσωματιδίων χρυσού, μπορεί να προστατεύσει αποτελεσματικά τα νανοσωματίδια χρυσού από τη συσσωμάτωση και επιτρέπει τον προσδιορισμό της κυστεΐνης χωρίς ρύθμιση της ιοντικής ισχύος (Wei et al., 2010). Στην προσέγγιση αυτή, η συσσωμάτωση επιτυγχάνεται μόνο με την αλληλεπίδραση της κυστεΐνης με τα νανοσωματίδια χρυσού.



Εικόνα 2.1. Σχηματική ανίχνευση βιοθειόλης βασισμένη στις αρχές (α) της συσσωμάτωσης νανοσωματιδίων χρυσού και (β) της παρεμποδισμένης συσσωμάτωσης νανοσωματιδίων χρυσού. Σημείωση: ssDNA, μονόκλωνο DNA. SAM, S-αδενοσυλ-L-μεθειονίνη.

2.3.2 Φωτομετρικοί προσδιορισμοί βασισμένοι στην παρεμποδισμένη ή αντίστροφη της συσσωμάτωσης των νανοσωματιδίων χρυσού

Λόγω της ισχυρής συγγένειάς τους με τα νανοσωματίδια χρυσού, οι βιοθειόλες έχουν αποδειχθεί ότι αναστέλλουν ή αναστρέφουν αποτελεσματικά τη συσσωμάτωση των νανοσωματιδίων χρυσού που προκαλείται από κατάλληλα μόρια τα οποία χρησιμοποιούνται ως σταθεροποιητές των νανοσωματιδίων. Με τον τρόπο αυτό, το χρώμα του διαλύματος νανοσωματιδίων χρυσού μετατοπίζεται προς μικρότερα μήκη κύματος (επίσης αναφέρεται ως αντισυσσωμάτωση). Η προκαλούμενη φασματική μετατόπιση (από μεγαλύτερα προς μικρότερα μήκη κύματος) σχετίζεται με τη συγκέντρωση των βιοθειολών στο δείγμα.

Με βάση αυτή την αρχή, έχουν αναπτυχθεί αρκετές μέθοδοι που χρησιμοποιούν όμως διαφορετικούς παράγοντες συσσωμάτωσης. Οι Li et al. χρησιμοποίησαν S-αδενοσυλ-L-μεθειονίνη ως παράγοντα συσσωμάτωσης για τα νανοσωματίδια χρυσού (Εικόνα 2.1β) και έδειξαν ότι οι βιοθειόλες μπορούν να αποδεσμεύσουν την S-αδενοσυλ-L-μεθειονίνη προκαλώντας την αποσυσσωμάτωση των νανοσωματιδίων. Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό των βιοθειολών (κυστεΐνη, γλουταθειόνη και ομοκυστεΐνη) σε ορό αίματος σε νανομοριακό επίπεδο (Li et al., 2015). Πάνω στην ίδια γενική αρχή έχει αναπτυχθεί μία μέθοδος για τον εκλεκτικό προσδιορισμό της γλουταθειόνης (έναντι άλλων σημαντικών βιοθειολών, όπως η κυστεΐνη και η ομοκυστεΐνη) σε ανθρώπινο πλάσμα και ούρα χρησιμοποιώντας το 2-μερκαπτο-1-μεθυλιμιδαζόλιο ως παράγοντα κάλυψης και συσσωμάτωσης των νανοσωματιδίων χρυσού και με κατάλληλο έλεγχο του pH του διαλύματος (Li et al., 2017).

Οι Li, Wu, et al., 2011 ανέπτυξαν μία εκλεκτική μέθοδος για τον προσδιορισμό της γλουταθειόνης που βασίζεται στον ανταγωνισμό μεταξύ της γλουταθειόνης και του πιπεραζινο-δισ-διθειοκαρβαμικού νατρίου ως παράγοντα συσσωμάτωσης. Απουσία γλουταθειόνης, το πιπεραζινο-δισ-διθειοκαρβαμικό άλας προκαλεί τη συσώρευση των νανοσωματιδίων χρυσού. Όταν υπάρχει η γλουταθειόνη στο διάλυμα, αποτρέπει αποτελεσματικά τη δέσμευση των πιπεραζινο-δισ-διθειοκαρβαμικών στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων χρυσού, εμποδίζοντας έτσι τη συσσωμάτωσή τους. Η διαφορά της φωτομετρικής απόκρισης μεταξύ

συσσωματωμένων και μη συσσωματωμένων διαλυμάτων νανοσωματιδίων χρυσού χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση των βιοθειολών σε πραγματικά δείγματα σε συγκεντρώσεις τόσο χαμηλές όσο 8nM.

Με τον ίδιο τρόπο σκέψης, αναπτύχθηκε μια μέθοδος για τον προσδιορισμό των βιοθειολών που βασίστηκε στη συσσωμάτωση νανοσωματιδίων χρυσού με Hg^{2+} (Xu et al., 2012). Συγκεκριμένα, η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα των ιόντων υδραργύρου Hg^{2+} να προκαλούν τη συσσωμάτωση των νανοσωματιδίων χρυσού επικαλυμμένων με ναφθαλιμίδιο λόγω των αλληλεπιδράσεων σταυρωτής σύνδεσης με τη μορφή θυμίνη- Hg^{2+} -θυμίνη (T- Hg^{2+} -T). Αρχικά, τα ιόντα υδραργύρου Hg^{2+} κατεργάζονται με βιοθειόλες και αναμιγνύονται με ένα εναιώρημα επικαλυμμένων με ναφθαλιμίδιο νανοσωματιδίων χρυσού. Η συσσωμάτωση των νανοσωματιδίων χρυσού παρεμποδίζεται ανάλογα με τη συγκέντρωση των βιοθειολών. Η παρεμποδισμένη συσσωμάτωση των νανοσωματιδίων χρυσού οφείλεται στην υψηλότερη συγγένεια του Hg^{2+} με τις βιοθειόλες σε σχέση με το ναφθαλιμίδιο. Αυτή η φωτομετρική ανάλυση παρουσίασε υψηλή εκλεκτικότητα και ευαισθησία και χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία για τον προσδιορισμό της συνολικής περιεκτικότητας βιοθειολών σε δείγματα ανθρώπινων ούρων (Xu et al., 2012). Ωστόσο, η χρήση των ιόντων Hg^{2+} απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή.

Μια πιο περίπλοκη προσέγγιση περιγράφηκε πρόσφατα από τους Deng et al. (2015) που εκμεταλλεύτηκαν την ικανότητα των βιοθειολών να αντιστρέφουν τη συσσωμάτωση των νανοσωματιδίων χρυσού που είναι επικαλυμμένα με άζωτούχες κβαντικές κουκίδες άνθρακα. Οι βιοθειόλες μπορούν να διεισδύσουν στο κέλυφος των εμποτισμένων με άζωτο κβαντικών κουκίδων άνθρακα και να διασκορπίζουν τα συσσωματώματα κουκίδων άνθρακα/νανοσωματιδίων χρυσού, οδηγώντας τόσο σε φωτομετρικές αλλαγές από βιολετί σε κόκκινο όσο και στην ανάκτηση της φωτοφωταύγειας των κβαντικών κουκίδων άνθρακα. Αυτή η μέθοδος εφαρμόστηκε με επιτυχία για την ανίχνευση της κυστεΐνης στον ανθρώπινο ορό με όριο ανίχνευσης 4 nM.

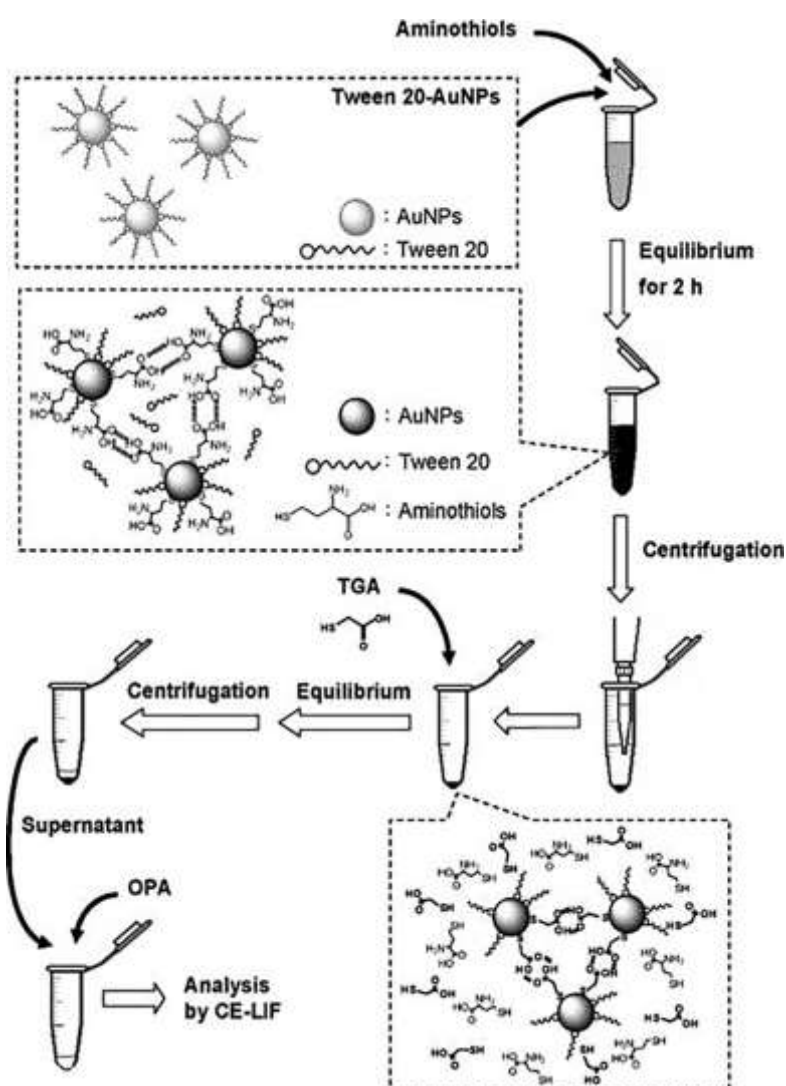
2.3.3 Εκχύλιση βιοθειολών μέσω νανοσωματιδίων χρυσού

Εκτός από τη χρήση τους ως χημικούς αισθητήρες, τα νανοσωματίδια χρυσού έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί ως μέσο εκχύλισης των βιοθειολών. Πιο συγκεκριμένα, τα νανοσωματίδια χρυσού με κατάλληλη επικάλυψη (συνήθως μια μη ιοντική επιφανειοδραστική ουσία), η οποία σταθεροποιεί τα νανοσωματίδια χρυσού, χρησιμοποιήθηκαν για την εκχύλιση βιοθειολών αξιοποιώντας την υψηλή συγγένεια της σουλφυδρυλο-ομάδας με την επιφάνεια των νανοσωματιδίων χρυσού. Στη συνέχεια οι βιοθειόλες προσδιορίστηκαν με ενόργανες τεχνικές ανάλυσης. Αυτή η προσέγγιση προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα, δεδομένου ότι επιτρέπει την εκλεκτική εκχύλιση των βιοθειολών.

Ανάμεσα σε μία πληθώρα εμπορικά διαθέσιμων μη ιοντικών επιφανειοδραστικών, το Tween-20 (ένα πολυσορβικού-τύπου μη ιοντικού επιφανειοδραστικού που σχηματίζεται από την αιθοξυλίωση της σορβιτάνης πριν από την προσθήκη του λαουρικού οξέος), έχει αποδειχθεί ότι παρέχει το καλύτερο μέσο για την εκχύλιση βιοθειολών. Και αυτό διότι η επικάλυψη των νανοσωματιδίων χρυσού με το Tween-20 δεν επηρεάζει την ικανότητα των βιοθειολών να συνδέονται ισχυρά με τα νανοσωματίδια χρυσού ενώ είναι συμβατό με την τεχνική της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης με ανιχνευτή UV ή φθορισμού (Li et al., 2009, Shen et al., 2009, Chang et al., 2010). Η διαδικασία της εκχύλισης γίνεται σε τρία βήματα: σχηματισμός συσσωματωμάτων βιοθειολών-νανοσωματιδίων, διαχωρισμός μέσω υπερφυγοκέντρωσης, και πλύση και απελευθέρωση βιοθειολών μέσω ανταλλαγής υποκαταστατών (για παράδειγμα, χρησιμοποιώντας διθειοτρεϊτόλη ή θειογλυκολικό οξύ) (Εικόνα 2.2). Ανάλογα με την τεχνική ανίχνευσης μπορεί να απαιτηθεί ένα πρόσθετο βήμα που περιλαμβάνει την παραγωγοποίηση των βιοθειολών (Shen et al., 2009). Χρησιμοποιώντας αυτή την προσέγγιση, παρατηρήθηκε σημαντική βελτίωση της ευαισθησίας για τον προσδιορισμό της γλουταθειόνης και της ομοκυστεΐνης σε δείγματα ούρων (Li et al., 2009, Shen et al., 2009, Chang et al., 2010).

Νανοσωματίδια χρυσού που είναι επικαλυμμένα με επιφανειοδραστικά έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί ως αντιδραστήριο παραγωγοποίησης για τη φασματοφωτομετρική ανίχνευση βιοθειολών μετά από διαχωρισμό υγρής χρωματογραφίας. Σε αυτή την εφαρμογή, αρχικά οι βιοθειόλες διαχωρίζονται στη χρωματογραφική στήλη. Καθώς οι βιοθειόλες εκκλύονται, αλληλεπιδρούν με ένα

ρεύμα νανοσωματιδίων χρυσού επικαλυμμένων με επιφανειοδραστικές ουσίες προκαλώντας τη συσσωμάτωσή τους, η οποία με τη σειρά της έχει ως αποτέλεσμα μια φωτομετρική απόκριση (red-shift). Αντικαθιστώντας το Tween-20 με άλλα μη ιοντικά επιφανειοδραστικά όπως το Brij-35 παρατηρήθηκε κάποια βελτίωση στην εκλεκτικότητα, για βιοθειόλες χαμηλού μοριακού βάρους όπως η κυστεΐνη και η ομοκυστεΐνη (Lu et al., 2007).



Εικόνα 2.2. Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διαδικασίας για την εκχύλιση των αμινοθειολών με νανοσωματίδια χρυσού επικαλυμμένα με Tween-20 πριν από τον προσδιορισμό τους με τριχοειδή ηλεκτροφόρηση- φθορισμό επαγόμενου από λέιζερ ως παράγωγα της ο-φθαλικής αλδεΐδης. Σημείωση: AuNPs, νανοσωματίδια χρυσού. TGA, θειογλυκολικό οξύ, OPA, ο-φθαλαλδεΐδη. CE-LIF, τριχοειδής ηλεκτροφόρηση-φθορισμός που προκαλείται από λέιζερ.

2.4 Μέθοδοι φωταύγειας με τα νανοσωματίδια χρυσού

Φθορίζουσες ουσίες όπως η 4-αμινο-6-υδροξυ-2-μερκαπτοπυριμιδίνη έχουν χρησιμοποιηθεί ως παράγοντες κάλυψης των νανοσωματιδίων χρυσού για τον εκλεκτικό προσδιορισμό της κυστεΐνης παρουσία άλλων αμινοξέων. Σε αυτή τη μέθοδο, χαμηλές συγκεντρώσεις κυστεΐνης (pM έως nM) δεσμεύονται σε νανοσωματίδια χρυσού επικαλυμμένα με 4-αμινο-6-υδροξυ-2-μερκαπτοπυριμιδίνη, αλλά δεν μπορούν να προκαλέσουν συσσωμάτωση. Αντίθετα, παρατηρήθηκε σημαντική αλλαγή στην ένταση φθορισμού του συμπλόκου 4-αμινο-6-υδροξυ-2-μερκαπτοπυριμιδίνη-νανοσωματίδια χρυσού-κυστεΐνη, η οποία σχετίζεται με τη συγκέντρωση κυστεΐνης στο δείγμα. Αυτή η προσέγγιση επέδειξε εξαιρετική εκλεκτικότητα στον προσδιορισμό νανομοριακών συγκεντρώσεων κυστεΐνης ακόμη και παρουσία 10.000-φορές άλλων αμινοξέων (Shankar et al., 2015).

Μια πολύ δημοφιλής προσέγγιση φθορισμού για ανίχνευση βιοθειολών βασίζεται στην αποκατάσταση της έντασης φθορισμού κατάλληλων ανιχνευτών φθορισμού οι οποίοι προσροφούνται στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων χρυσού. Όταν οι ανιχνευτές φθορισμού βρίσκονται στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων χρυσού εμφανίζουν πολύ ασθενή φθορισμό λόγω της ικανότητας των νανοσωματιδίων χρυσού να αποσβένουν την εκπομπή φθορισμού τους μέσω μηχανισμών μεταφοράς ενέργειας (δηλαδή το φθορίζον μόριο συμπεριφέρεται ως δότης ενέργειας και τα νανοσωματίδια χρυσού ως αποδέκτες ενέργειας). Οι βιοθειόλες εκτοπίζουν τα φθορίζοντα μόρια και τα απελευθερώνουν στο διάλυμα. Έτσι, ο φθορισμός τους αποκαθίσταται.

Ο εντοπισμός βιοθειολών με βάση την μεταφορά ενέργειας φθορισμού διαμέσου των νανοσωματιδίων χρυσού αναπτύχθηκε από τους Chen and Chang (2004) χρησιμοποιώντας νανοσωματίδια χρυσού επικαλυμμένα με Κόκκινο του Νείλου (Nile Red), μια λιπόφιλη χρωστική. Τα Nile Red-νανοσωματίδια χρυσού παράγουν ασθενές φθορισμό εξαιτίας της ικανότητας των νανοσωματιδίων χρυσού να αποσβένουν το φθορισμό η οποία ενισχύεται κατά την προσθήκη βιοθειολών εξαιτίας της εκρόφησης των μορίων Nile Red από την επιφάνεια των νανοσωματιδίων χρυσού. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι αρνητικά, ουδέτερα και θετικά φορτισμένες βιοθειόλες βρέθηκαν να επηρεάζουν με διαφορετικό τρόπο την αποκατάσταση φθορισμού των μορίων Nile Red και το χρώμα του διαλύματος των

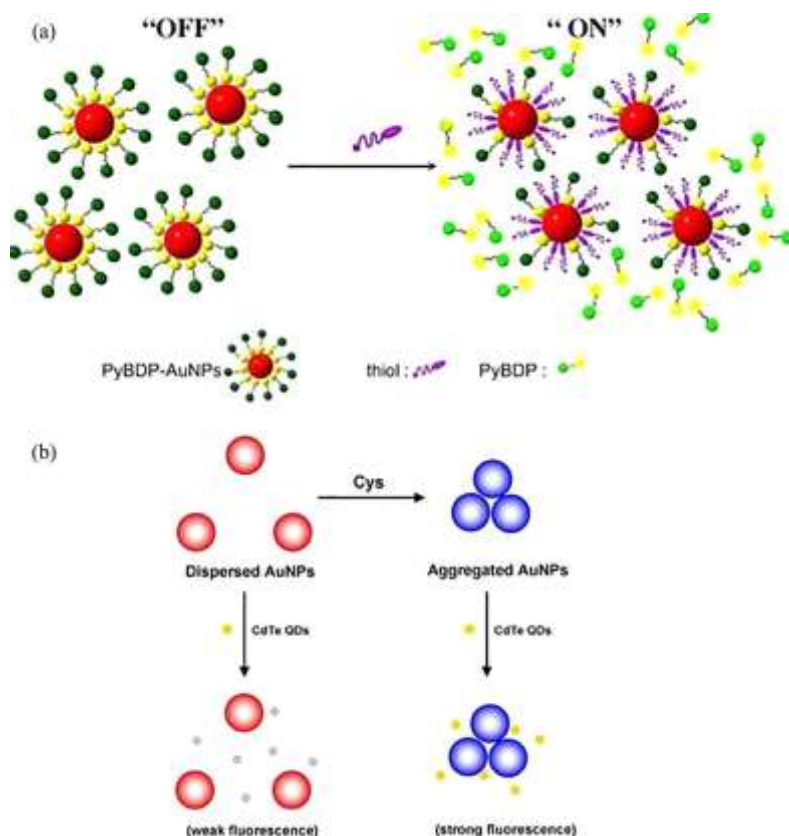
νανοσωματιδίων χρυσού. Ως εκ τούτου, χρησιμοποιήθηκαν Nile Red-νανοσωματίδια χρυσού για τον προσδιορισμό διαφόρων βιοθειολών ξεχωριστά, χρησιμοποιώντας τόσο μετρήσεις φθορισμού όσο και υπεριώδους ορατού με κατάλληλη ρύθμιση της κατάσταση ιονισμού των βιοθειολών μέσω ελέγχου του pH (Chen et al., 2004). Επιπλέον, ανάλογα με το ρυθμό με τον οποίο μεταβαλλόταν το χρώμα του διαλύματος Nile Red-νανοσωματιδίων χρυσού, η ανηγμένη γλουταθειόνη (αργός ρυθμός) ήταν εύκολα διακριτή από την οξειδωμένη γλουταθειόνη (χωρίς συσσωμάτωση και χωρίς μετατόπιση φάσματος) και από την κυστεΐνη και την ομοκυστεΐνη (γρήγορος ρυθμός).

Με βάση την ίδια αρχή, η οποία περιλαμβάνει την αποκατάσταση της έντασης φθορισμού, ο φθορισμός κοντά στο υπέρυθρο έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση βιοθειολών σε πλάσμα αίματος (Shang et al., 2009). Η φθορισμοφόρος χρωστική FR730 παρουσίασε ασθενή εκπομπή στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων χρυσού. Παρουσία βιοθειολών, η φθορισμοφόρος χρωστική εκροφήθηκε από την επιφάνεια των νανοσωματιδίων χρυσού και αποκαταστάθηκε η ένταση φθορισμού επιτρέποντας τον προσδιορισμό των βιοθειολών σε συγκεντρώσεις τόσο χαμηλές όσο 10 nM στο πλάσμα αίματος (Shang et al., 2009). Παρομοίως, οι Lo et al. (2015) χρησιμοποίησαν για την ανίχνευση της κυστεΐνης νανοσωματίδια χρυσού επικαλυμμένα με διπυρομεθένιο του βορίου (Εικόνα 2.3α). Τα επικαλυμμένα με διπυρομεθένιο του βορίου νανοσωματίδια χρυσού παρουσίασαν ασθενές φθορισμό, αλλά μετά την προσθήκη κυστεΐνης, τα φθορισμοφόρα μόρια εκτοπίστηκαν από την επιφάνεια των νανοσωματιδίων χρυσού μέσω αντιδράσεων ανταλλαγής υποκαταστάτη αποκαθιστώντας τον πράσινο φθορισμό του διπυρομεθενίου του βορίου. Αυτή η μέθοδος παρουσίασε υψηλή εκλεκτικότητα, έναντι άλλων αμινοξέων συμπεριλαμβανομένης της ομοκυστεΐνης και της γλουταθειόνης, και καλή ευαισθησία (δηλ. 1,2 μ M). Πάνω στην ίδια αρχή στηρίζεται και η ανίχνευση της κυστεΐνης χρησιμοποιώντας νανοσωματίδια χρυσού ενεργοποιημένα με φθοριοσκεΐνη (Bouri et al., 2016).

Εκτός από τη μεταφορά ενέργειας φθορισμού, το φαινόμενο του εσωτερικού φίλτρου έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση βιοθειολών με χρήση κβαντικών κουκίδων. Η χρήση του φαινομένου εσωτερικού φίλτρου βασίζεται στην παράπλευρη επικάλυψη μεταξύ του φάσματος εκπομπής των κβαντικών κουκίδων και του φάσματος απορρόφησης των νανοσωματιδίων χρυσού (δηλ. τα νανοσωματίδια χρυσού απορροφούν την ακτινοβολία που εκπέμπεται από τις κβαντικές κουκίδες, οι

οποίες είναι κατάλληλα σχεδιασμένες να εκπέμπουν στην κορυφή απορρόφησης των νανοσωματιδίων χρυσού). Έτσι, ο φθορισμός των κβαντικών κουκίδων είναι πολύ αδύναμος παρουσία νανοσωματιδίων χρυσού λόγω της έντονης απορρόφησης της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας από τα νανοσωματίδια χρυσού. Παρουσία βιοθειολών, το συσσωμάτωμα των νανοσωματιδίων χρυσού οδηγεί στη μειωμένη απορρόφηση των νανοσωματιδίων χρυσού στο αρχικό μήκος κύματος (τυπικά στα 520-530nm). Στην περίπτωση αυτή, οι κβαντικές κουκίδες εμφανίζουν έντονο φθορισμό. Επομένως, το σήμα απορρόφησης μετατράπηκε εύκολα σε σήμα φθορισμού, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των βιοθειολών. Η γενική αρχή της ανίχνευσης που βασίζεται στο φαινόμενο του εσωτερικού φίλτρου απεικονίζεται στην Εικόνα 2.3β όπως περιγράφεται στη μελέτη των Xu, Li, and Jin (2011) με κβαντικές κουκίδες CdTe. Αυτή η στρατηγική φθορισμού του φαινομένου εσωτερικού φίλτρου χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση κυστεΐνης, γλουταθειόνης και ομοκυστεΐνης σε δείγματα ανθρώπινου πλάσματος (Xu et al., 2011).

Τα νανοσωματίδια $\text{CePO}_4: \text{Tb}^{3+}$ αποτελούν επίσης έναν χρήσιμο ανιχνευτή φθορισμού για τον προσδιορισμό βιοθειολών με βάση το φαινόμενο του εσωτερικού φίλτρου που προκαλείται από την επικάλυψη των φασμάτων μεταξύ της απορρόφησης των νανοσωματιδίων χρυσού και της εκπομπής των νανοσωματιδίων $\text{CePO}_4: \text{Tb}^{3+}$. Χρησιμοποιώντας αυτή τη μέθοδο, ανιχνεύθηκαν βιοθειόλες χαμηλής μοριακής μάζας όπως η κυστεΐνη, η ομοκυστεΐνη και η γλουταθειόνη σε συνθετικά δείγματα σε χαμηλά μικρομοριακά επίπεδα (Chen et al., 2013).



Εικόνα 2.3. Σχηματική ανίχνευση βιοθρεωλών με βάση (α) την αποκατάσταση της έντασης φθορισμού που είναι αποσβένεται από τα νανοσωματίδια χρυσού μέσω σε μηχανισμών μεταφοράς ενέργειας φθορισμού και (β) το φαινόμενο του εσωτερικού φίλτρου μεταξύ της εκπομπής των κβαντικών κουκίδων CdTe και της απορρόφησης των νανοσωματιδίων χρυσού. Σημείωση: Το PyBDP, το διπυρρομεθένιο του βορίου και τα QDs οι κβαντικές κουκίδες.

2.5 Μέθοδοι χημειοφωταύγειας με βάση τα νανοσωματίδια χρυσού

Τα τρις(2,2'-διπυριδίνη) σύμπλοκα ρουθηνίου (II) έχουν μελετηθεί εκτενώς λόγω των ευνοϊκών φωτοχημικών και φωτο-φυσικών ιδιοτήτων τους, συμπεριλαμβανομένης της έντονης φωταύγειας του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος στην περιοχή του ορατού (Damrauer et al., 1997). Για τον εκλεκτικό προσδιορισμό της κυστεΐνης αναπτύχθηκε ένας καινούριος ανιχνευτής φωταύγειας που βασίζεται σε νανοσωματίδια χρυσού τροποποιημένα από ένα τρις(2,2'-διπυριδίνη) σύμπλοκο ρουθηνίου (II). Η σύνθεση των νανοσωματιδίων χρυσού και η τροποποίηση της φθορισμοφόρου ουσίας έγινε με μια διαδικασία ενός σταδίου, απλοποιώντας την

προετοιμασία των ανιχνευτών φωταύγειας (Li, Zhan et al., 2011). Η χρησιμότητα αυτής της μεθόδου αποδείχθηκε με τον προσδιορισμό μεσαίων έως υψηλών μικρομοριακών επιπέδων της ολικής κυστεΐνης σε δείγματα ανθρώπινων ούρων.

Για την ανίχνευση των βιοθειολών έχουν συζευχθεί τριγωνικά νανοσωματίδια χρυσού με μέσες διαμέτρους 32nm με ένα σύστημα χημειοφωταύγειας (Li, Liu et al., 2011). Η ανίχνευση βασίστηκε στην ικανότητα των βιοθειολών να μειώνουν την ένταση της χημειοφωταύγειας που εκπέμπεται κατά τη διάρκεια της καταλυτικής οξείδωσης της λουμινόλης από νανοσωματίδια χρυσού. Αυτό έγινε διακόπτοντας το σχηματισμό ενδιάμεσων ενεργού οξυγόνου μέσω σχηματισμού ομοιοπολικών δεσμών Au-S στην επιφάνεια των τριγωνικών νανοσωματιδίων χρυσού. Η ίδια ερευνητική ομάδα συνέθεσε επίσης τριγωνικά νανοσωματίδια χρυσού με αναγωγή του HAuCl_4 από το κιτρικό νάτριο παρουσία ενός μη ιοντικού φθορο-τασιενεργού (φθορο-επιφανειοδραστικό). Τα τροποποιημένα με φθορο-τασιενεργά τριγωνικά νανοσωματίδια χρυσού επέδειξαν μεγαλύτερη καταλυτική ενεργότητα ως προς τη χημειοφωταύγεια που παράγεται από τη λουμινόλη, από τα σφαιρικά νανοσωματίδια χρυσού, ενώ οι βιοθειόλες αποσβένουν το σήμα χημειοφωταύγειας. Αυτή η προσέγγιση χρησιμοποιήθηκε ως στρατηγική ανίχνευσης για τον προσδιορισμό της κυστεΐνης, της ομοκυστεΐνης, της γλουταθειόνης, της κυστεΐνης-Gly και της Glu-κυστεΐνης σε βιολογικά δείγματα μετά από διαχωρισμό υγρής χρωματογραφίας με υψηλή ευαισθησία, ακρίβεια και εκλεκτικότητα (Li, Liu, et al., 2011).

2.6 Προσδιορισμός βιοθειολών με τα νανοσωματίδια αργύρου

Τα νανοσωματίδια και νανοϋλικά αργύρου έχουν χρησιμοποιηθεί λιγότερο για τον προσδιορισμό των βιοθειολών σε σύγκριση με τα νανοϋλικά που βασίζονται στον χρυσό. Ωστόσο, προσφέρουν μια σειρά πλεονεκτημάτων όπως χαμηλότερο κόστος, υψηλούς συντελεστές απόσβεσης, και μια στενή ζώνη συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων στην περιοχή του ορατού (Li et al., 2009, Liang et al., 2012). Μια σύνοψη των πιο πρόσφατων μεθόδων παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.2.

Πίνακας 2.2. Μέθοδοι που βασίζονται σε νανοσωματίδια αργύρου για τον προσδιορισμό των βιοθειολών.

Αναλύτης	Ανίχνευση	Γραμμική Περιοχή	Όριο Ανίχνευσης	Ακρίβεια (Σχετική τυπική απόκλιση %)	Συντελεστής γραμμικότητας	Πραγματικό Δείγμα	Αναφορά
Κυστεΐνη	Φωτομετρική	1.5–6.0 μM	0.05 μM		0.993	Ανθρώπινα ούρα και πλάσμα	Chen et al. (2014)
Κυστεΐνη	Φωτομετρική	2.5–30 nM	1.5 nM	3.1	0.997	Ανθρώπινο πλάσμα	Shen et al. (2014)
Ομοκυστεΐνη		5–40 nM	2.6 nM	3.1			
Γλουταθειόνη		2.5–30 nM	1.2 nM	2.4			
Κυστεΐνη	Φωτομετρική	0.025–0.1 μM		2.29	0.990	Εισαγωγή αμινοξέος	Hou et al. (2014)
Ομοκυστεΐνη	Φωτομετρική	2–12 μM	0.5 μM		0.994	Ανθρώπινο πλάσμα	Leesutthiphonchai et al. (2011)
Κυστεΐνη	Φωτομετρική	1–1000 nM	1.0 nM			Υδατικά διαλύματα	Ravindran et al. (2011)
Κυστεΐνη	Φωτομετρική	3.2–8.2 μM	2.8 μM	3.3	0.994	Πλάσμα αίματος	Bamdad et al. (2016)
Κυστεΐνη	Φωτομετρική	0.1–1000 μM	0.1 μM		0.997	Ανθρώπινος ορός, Τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό	Han et al. (2014)
Κυστεΐνη	Φωτομετρική	10–100 μM	8.1 μM	6.7	0.989	Πλάσμα αίματος, Τεχνητό πλάσμα αίματος και ούρα	Kappi et al. (2017)
Γλουταθειόνη		10–100 μM	9.8 μM	8.8	0.988		
Ομοκυστεΐνη		10–100 μM	9.0 μM	7.4	0.991		
Κυστεΐνη	Φθορισμού	0–5.0 μM	0.134 μM		0.991		Li and Wei (2017)
Γλουταθειόνη		0.5–4.5 μM	0.172 μM		0.983		

Κυστεΐνη	Φθορισμού	8–100 nM	4 nM	3.74–5.83	0.984	Ανθρώπινο πλάσμα	Han et al. (2011)
Γλουταθειόνη		8–100 mM	4 nM		0.983		
Ομοκυστεΐνη		0.6–2 μM	0.2 μM		0.999		
Κυστεΐνη	Φθορισμού	0.025–6 μM	20 nM	2.2	0.991	Συγκροτήματα Ag	Shang et al. (2009)
Κυστεΐνη	Φθορισμού	6–300 nM	4 nM	1.2–4.0	0.998	Ανθρώπινο πλάσμα και ούρα	Amjadi et al. (2015)

2.7 Φωτομετρικές μέθοδοι με βάση τα νανοσωματίδια αργύρου

Η αλληλεπίδραση των βιοθειολών με τα νανοσωματίδια αργύρου είναι παρόμοια με εκείνη των νανοσωματιδίων χρυσού (Ravindran et al., 2012). Επομένως, έχουν επίσης αναπτυχθεί αρκετές φωτομετρικές μέθοδοι ανίχνευσης που χρησιμοποιούν τα νανοσωματίδια αργύρου. Κάποιες από αυτές τις μεθόδους εκμεταλλεύονται μηχανισμούς αντίδρασης και στρατηγικές ανίχνευσης παρόμοιες με αυτές που χρησιμοποιούνται στις μεθόδους με τα νανοσωματίδια χρυσού, ενώ άλλες χρησιμοποιούν νέες οδούς αντίδρασης εκμεταλλευόμενοι τις διαφορετικές χημικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων αργύρου και των ιόντων αργύρου.

Με βάση τις αρχές της παρεμποδισμένης συσσωμάτωσης, αναπτύχθηκε μια πειραματική διαδικασία για τον εκλεκτικό προσδιορισμό της κυστεΐνης με χρήση νανοσωματιδίων αργύρου (Chen et al., 2014). Η μέθοδος βασίζεται στις ίδιες αρχές με εκείνες που χρησιμοποιούν νανοσωματίδια χρυσού με επικάλυψη φθορο-επιφανειοδραστικών ουσιών (Xiao et al., 2011) και περιλαμβάνει την αρχική επίστρωση των νανοσωματιδίων αργύρου με ένα μη ιονικό φθορο-επιφανειοδραστικό το οποίο λειτουργεί ως σταθεροποιητής και αποτρέπει τη συσσωμάτωσή τους. Η κυστεΐνη εκροφά και αντικαθιστά την επικάλυψη με φθορο-επιφανειοδραστικά των νανοσωματιδίων αργύρου, με αποτέλεσμα να μειώνεται η ανοχή των νανοσωματιδίων αργύρου στην επαγόμενη από το άλας συσσωμάτωση. Ως εκ τούτου, κατά την προσθήκη NaCl, τα νανοσωματίδια αργύρου συσσωματώνονται γρήγορα υποδηλώνοντας την παρουσία κυστεΐνης, ενώ απουσία κυστεΐνης, δεν παρατηρείται συσσωμάτωση. Αν και δεν πραγματοποιήθηκαν μελέτες εκλεκτικότητας, οι συγγραφείς ανέφεραν πολύ ικανοποιητικές ανακτήσεις από δείγματα ανθρώπινου πλάσματος και ούρων, υποδηλώνοντας την απουσία παρεμποδίσεων από άλλα αμινοξέα και βιολογικά σχετικές θειόλες (π.χ. ομοκυστεΐνη ή γλουταθειόνη).

Οι Shen et al., (2014) πρότειναν μια άλλη προσέγγιση κατά την οποία οι κβαντικές κουκίδες άνθρακα επιτρέπουν την άμεση αναγωγή των ιόντων αργύρου (Ag^+) σε στοιχειακό άργυρο (Ag^0) και ο στοιχειακός άργυρος σχηματίζει αυθόρμητα νανοσωματίδια αργύρου. Η περίσσεια κβαντικών κουκίδων άνθρακα συμπλοκοποιεί τα ελεύθερα κατιόντα αργύρου Ag^+ στο διάλυμα αναστέλλοντας έτσι την αύξηση των νανοσωματιδίων αργύρου. Οι βιοθειόλες μπορούν να δεσμεύσουν με τα κατιόντα αργύρου Ag^+ μέσω των ομάδων της θειόλης, και στη συνέχεια το σύμπλοκο Ag^+ -βιοθειόλης σταδιακά ελευθερώνει τα ιόντα Ag^+ τα οποία ανάγονται από τις κβαντικές

κουκίδες άνθρακα διευκολύνοντας έτσι την αύξηση των νανοσωματιδίων αργύρου στην επιφάνεια των κουκίδων άνθρακα. Βάσει αυτής της οδού αντίδρασης, αναπτύχθηκε μια φωτομετρική μέθοδος για την ταχεία ανίχνευση βιοθειολών στο ανθρώπινο πλάσμα σε νανογραμμομοριακά επίπεδα συγκεντρώσεων.

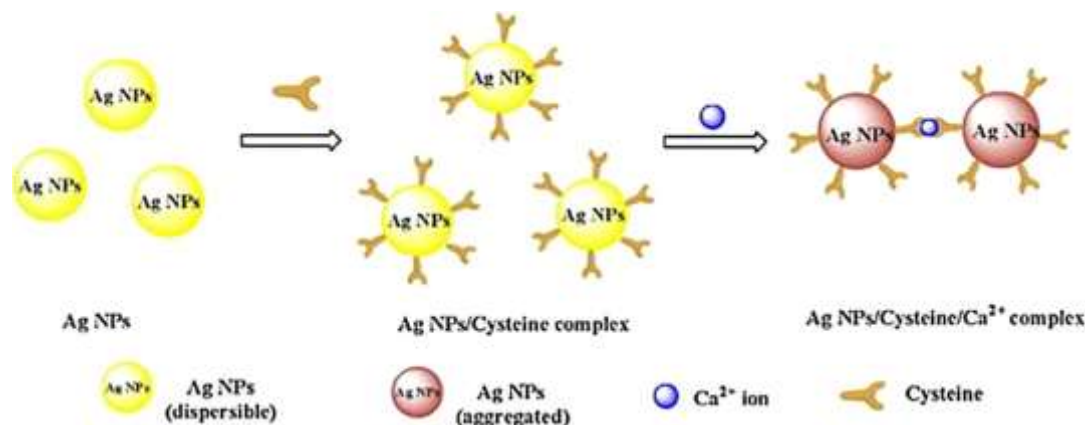
Αξιοποιώντας την εύκολη οξειδωση των νανοσωματιδίων αργύρου, οι Hou et al., (2014) ανέπτυξαν μία νέα φασματοφωτομετρική μέθοδο για την ανίχνευση βιοθειολών. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τριγωνικές νανοπλάκες αργύρου για την ανίχνευση ιχνοστοιχείων κυστεΐνης παρουσία θειοθειϊκού νατρίου ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$). Παρουσία $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, παρατηρήθηκε διάβρωση των τριγωνικών νανοσωματιδίων αργύρου από την κυστεΐνη, προκαλώντας έτσι μια αλλαγή στην μέγιστη κορυφή απορρόφησης των νανοσωματιδίων. Η κυστεΐνη μπορεί να αναστείλει τη διαδικασία διάβρωσης ωστόσο, δεν είναι εύκολη η οπτική αναγνώριση με γυμνό μάτι επειδή όλα τα διαλύματα (απουσία και παρουσία κυστεΐνης) έχουν μια μπλε απόχρωση. Επομένως, οι διαφορές στην ένταση του χρώματος μπορούν να παρακολουθούνται μόνο με φασματοφωτόμετρο. Επιπλέον, δεν έχουν αναφερθεί παρεμποδίσεις από άλλα είδη βιοθειολών όπως η γλουταθειόνη και η ομοκυστεΐνη. Αυτή η μέθοδος εφαρμόστηκε στον προσδιορισμό της κυστεΐνης που είχε προηγουμένως προστεθεί σε ένα υδατικό δείγμα εγχύσεως αμινοξέων σε χιλιοστογραμμομοριακά επίπεδα συγκεντρώσεων.

Οι διαφορετικές κινητικές στην συσσωμάτωση νανοσωματιδίων αργύρου που προκαλείται από την κυστεΐνη και την ομοκυστεΐνη χρησιμοποιήθηκαν επίσης ως βάση για τον προσδιορισμό της ομοκυστεΐνης. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι ο ρυθμός συσσωμάτωσης μεταξύ ομοκυστεΐνης και κυστεΐνης διαφέρει σημαντικά στα 525nm. Μόνο η ομοκυστεΐνη μπορούσε να προκαλέσει μια μετατόπιση προς υψηλότερα μήκη κύματος (redshift) στη ζώνη απορρόφησης των νανοσωματιδίων αργύρου, επιτρέποντας τον εκλεκτικό προσδιορισμό της σε δείγματα ανθρώπινου πλάσματος (Leesutthiphonchai et al., 2011).

Η συναρμογή των ιόντων μετάλλων με τις βιοθειόλες και τα νανοσωματίδια αργύρου έχει επίσης προσελκύσει μεγάλη προσοχή ως στρατηγική ανίχνευσης με νανοσωματίδια αργύρου. Με βάση τα παραπάνω, μεταλλικά ιόντα όπως τα ιόντα χρωμίου (Cr^{3+}) βρέθηκαν να αλληλεπιδρούν με τα μόρια κυστεΐνης-νανοσωματιδίων αργύρου μέσω συνεργηστικών αντιδράσεων μετάλλου-υποκαταστάτη, προκαλώντας τη συσσωμάτωση των νανοσωματιδίων αργύρου, με αποτέλεσμα την αλλαγή χρώματος του διαλύματος νανοσωματιδίων αργύρου από κίτρινο σε μωβ. Έτσι,

αναπτύχθηκε μια γρήγορη (< 5 λεπτά), εκλεκτική και ευαίσθητη μέθοδος ανίχνευσης της κυστεΐνης (Ravindran et al., 2011). Πάνω στην ίδια αρχή, αναπτύχθηκε μια νέα φωτομετρική μέθοδος για τον προσδιορισμό της κυστεΐνης με βάση την μετατόπιση του μήκους κύματος προς τη μέγιστη ζώνη συντονισμού πλασμονίων των νανοσωματιδίων αργύρου που έχουν σταθεροποιηθεί με πολυβινυλοπυρρολιδόνη. Ειδικότερα, τα σταθεροποιημένα με πολυβινυλοπυρρολιδόνη νανοσωματίδια αργύρου αλληλεπιδρούν με την κυστεΐνη και ακολούθως συσσωματώνονται παρουσία Ba^{2+} ως συνδετικού παράγοντα (Bamdad et al., 2016). Οι συγγραφείς επέλεξαν το Ba^{2+} ως επαγωγέα συσσωμάτωσης επειδή το χρώμα του αιωρήματος των νανοσωματιδίων αργύρου αλλάζει γρήγορα από κίτρινο σε ροζ ακόμη και σε μικρές συγκεντρώσεις κυστεΐνης. Η πειραματική διαδικασία διήρκεσε 15 λεπτά και επέτρεψε τον προσδιορισμό του κυστεΐνης σε δείγματα ανθρώπινου πλάσματος τόσο με γυμνό μάτι όσο και με φωτομετρία.

Ένα άλλο φωτομετρικό σύστημα βασισμένο στη χημεία συναρμογής μεταξύ κυστεΐνης και ιόντων μετάλλων βασίζεται στη συμπλοκοποίηση των ιόντων Ca^{2+} από τα μόρια κυστεΐνης που προηγουμένως ήταν συνδεδεμένα στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων αργύρου σε αναλογία 2:1 (Ho et al., 2007, Han et al., 2014). Το σύμπλοκο Ca-cysteine προκάλεσε τη συσσωμάτωση των νανοσωματιδίων μέσω σταυροειδούς σύνδεσης των νανοσωματιδίων αργύρου με τα μόρια κυστεΐνης, οδηγώντας σε φωτομετρικές αλλαγές και αλλαγές απορρόφησης. Μία γενική περίληψη αυτής της μεθόδου απεικονίζεται στην Εικόνα 2.4. Με βάση αυτόν τον μηχανισμό, έχει αναπτυχθεί μια νέα φωτομετρική μέθοδος που χρησιμοποιεί ως δείκτες χρώματος νανοσωματίδια αργύρου και ως διασταυρωτή σύνδεσης το Ca^{2+} για τον προσδιορισμό της κυστεΐνης σε ορό και τεχνητό εγκεφαλονωτιαίο υγρό (Han et al., 2014).



Εικόνα 2.4. Σχηματική ανίχνευση βιοθειολών με τη χρήση του συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων των νανοσωματιδίων αργύρου που προκαλείται από τη συσσωμάτωση των ιόντων-βιοθειολών-νανοσωματιδίων αργύρου.

2.8 Μέθοδοι φθορισμού με βάση τα νανοσωματίδια αργύρου

Πέρα από τη χρήση τους σε φωτομετρικές μεθόδους, τα νανοσωματίδια αργύρου έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη φθορισμομετρικών μεθόδων ανίχνευσης βιοθειολών. Τα φθορίζοντα νανοσυμπλέγματα αργύρου αποτελούν μία τάξη νανοϋλικών τα οποία συντίθενται από λίγα έως εκατοντάδες άτομα και παρουσιάζουν ιδιότητες παρόμοιες αυτές των μορίων συμπεριλαμβανομένων των διακριτών ηλεκτρονικών καταστάσεων και του φθορισμού που εξαρτάται από το μέγεθος (Shang et al., 2011).

Τα νανοσυμπλέγματα αργύρου με μονόκλωνο DNA χρησιμοποιήθηκαν ως φθορίζοντες ανιχνευτές για τον αναλυτικό προσδιορισμό της κυστεΐνης, της ομοκυστεΐνης και της γλουταθειόνης παρουσία δεκαπλάσιας περίσσειας άλλων αμινοξέων. Η ένταση της φωτοφωταύγειας των νανοσυμπλεγμάτων αργύρου με μονόκλωνο DNA αποσβέστηκαν έντονα με την αύξηση της συγκέντρωσης των βιοθειολών λόγω σχηματισμού ενός μη φθορίζοντος συμπλόκου μεταξύ των νανοσυμπλεγμάτων αργύρου με μονόκλωνο DNA και των βιοθειολών (Han et al., 2011).

Εκτός από τα βιομακρομόρια, έχουν επίσης εξεταστεί φθορίζοντα νανοσυμπλέγματα αργύρου τα οποία έχουν σταθεροποιηθεί με πολυ-(μεθακρυλικό

οξύ) ως πιθανοί ανιχνευτές για τον προσδιορισμό βιοθειολών που βασίζεται την απόσβεση φθορισμού (Shang et al., 2009). Παρουσία κυστεΐνης, η εκπομπή των νανοσυμπλεγμάτων αργύρου με πολυ-(μεθακρυλικό οξύ) αποσβέστηκε ακολουθούμενη από εμφανή μετατόπιση του μέγιστου μήκους κύματος εκπομπής προς μεγαλύτερα μήκη κύματος (redshift). Ο μηχανισμός απόσβεσης του φθορισμού αποδόθηκε σε μια διαδικασία δύο σταδίων: πρώτον, η κυστεΐνη απομάκρυνε το πολύ-μεθακρυλικό οξύ από την επιφάνεια των νανοσυμπλεγμάτων αργύρου και δεύτερον, τα νανοσυμπλέγματα αργύρου οξειδώθηκαν από το οξυγόνο και σταδιακά διαλύθηκαν σε μη φθορίζουσα μορφή. Ωστόσο, δεν έχει περιγραφεί μια ρεαλιστική εφαρμογή αυτών των νανοσυμπλεγμάτων.

Τέλος, οι κβαντικές κουκίδες άνθρακα έχουν χρησιμοποιηθεί ως φθορίζοντες ανιχνευτές με τα νανοσωματίδια αργύρου για τον προσδιορισμό των βιοθειολών. Συγκεκριμένα, οι Amjadi et al., (2015) παρατήρησαν ότι η κυστεΐνη, ακόμη και σε νανομοριακά επίπεδα, θα μπορούσε να ανακτήσει τον φθορισμό των κουκίδων άνθρακα ο οποίος είχε αποσβεστεί σημαντικά από τα νανοσωματίδια αργύρου, ως αποτέλεσμα μηχανισμών μεταφοράς ενέργειας φθορισμού. Έτσι, αναπτύχθηκε ένα σύστημα μεταφοράς ενέργειας φθορισμού μεταξύ των κβαντικών κουκίδων άνθρακα (ως δοτών) και των νανοσωματιδίων αργύρου (ως δεκτών) για τον σχεδιασμό μιας απλής και εκλεκτικής μεθόδου για τον προσδιορισμό της κυστεΐνης σε νανομοριακά επίπεδα συγκεντρώσεων. Η χρησιμότητα της μεθόδου αποδείχθηκε με τον προσδιορισμό της κυστεΐνης σε δείγματα ανθρώπινου πλάσματος και ούρων με ικανοποιητικά αποτελέσματα.

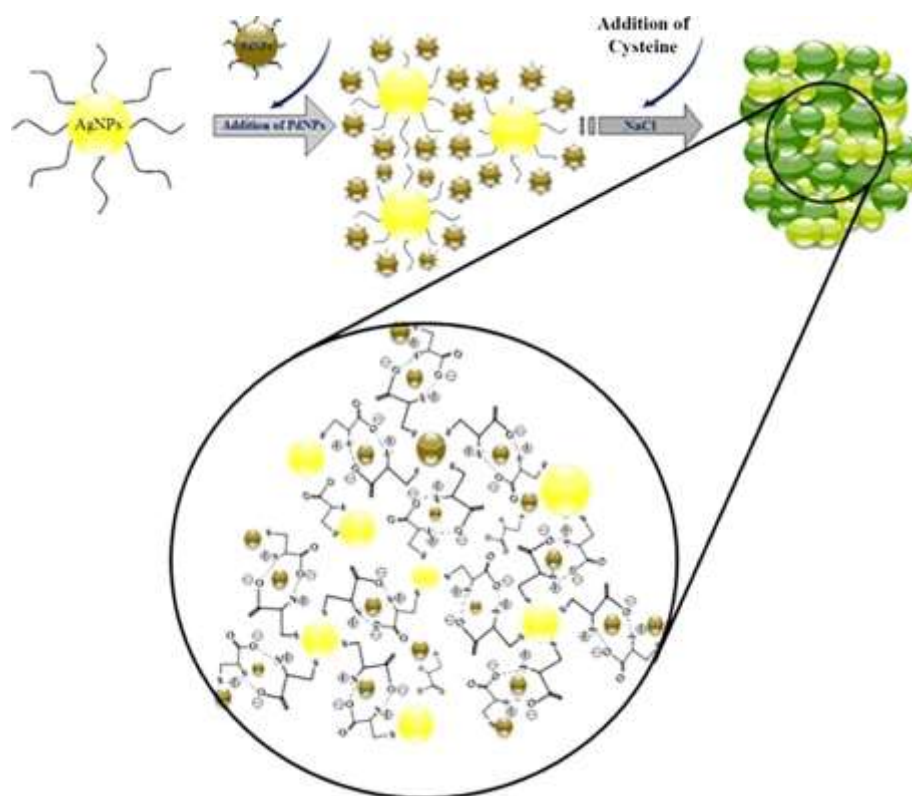
2.9 Προσδιορισμός των θειολών με άλλα νανοσωματίδια

Αν και τα νανοσωματίδια χρυσού και αργύρου είναι τα πιο δημοφιλή νανοϋλικά για τον προσδιορισμό των βιοθειολών, έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί διάφορα άλλα νανοσωματίδια και νανοϋλικά (Πίνακας 2.3). Ορισμένα από αυτά τα νανοϋλικά είναι επικαλυμμένα με χρυσό ή άργυρο με αποτέλεσμα οι μηχανισμοί ανίχνευσης να εμφανίζουν πολλά κοινά με τα νανοσωματίδια χρυσού ή αργύρου. Για παράδειγμα, ο προσδιορισμός φθορισμού των βιοθειολών χρησιμοποιώντας κβαντικές κουκίδες άνθρακα βασίζεται στην ικανότητα των βιοθειολών να απομακρύνουν την επικάλυψη των νανοϋλικών αποκαθιστώντας την εκπομπή

φθορισμού τους (Chao et al., 2014). Ένα άλλο παράδειγμα είναι η συσσωμάτωση διμεταλλικών νανοσωματιδίων Ag/Pd που προκαλείται από την κυστεΐνη η οποία προσδένεται στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων Ag/Pd μέσω δεσμών Ag (πυρήνα)-S και Pd (κελύφους)-S. Αυτός ο δεσμός σχηματίζεται από αλληλεπιδράσεις ανταλλαγής υποκαταστατών μεταξύ της κυστεΐνης και των ομάδων κιτρικού άλατος στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων Ag/Pd. Η μετατόπιση της ομάδας κιτρικών που βρίσκονται στο κέλυφος των διμεταλλικών νανοσωματιδίων Ag/Pd από την κυστεΐνη προάγει τη συσσωμάτωση των νανοσωματιδίων, λόγω δεσμών υδρογόνου ή ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μορίων της κυστεΐνης. Επιπλέον, η συσσωμάτωση επιταχύνεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις NaCl (δηλ. 6,6 mM) (Εικόνα 2.5) (Farhadi et al., 2014). Το αποτέλεσμα είναι μια δραματική αλλαγή χρώματος από κιτρινωπό σε πράσινο, που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της κυστεΐνης σε φαρμακευτικά δείγματα (ενέσιμο διάλυμα αμινοξέων).

Πίνακας 2.3. Μέθοδοι για τον προσδιορισμό των βιοθειολών με τη χρήση διαφόρων νανοϋλικών.

Αναλύτης	Ανίχνευση	Γραμμική Περιοχή	Όριο Ανίχνευσης	Ακρίβεια (Σχετική τυπική απόκλιση %)	Συντελεστής γραμμικότητας	Πραγματικό Δείγμα	Αναφορά
Κυστεΐνη	Χρωματομετρική	10–172 nM	3.3 nM		0.991	Φαρμακευτικά σκευάσματα	Farhadi et al. (2014)
Κυστεΐνη	Ηλεκτροκατάλυση με νανοσωματίδια Ni(OH) ₂	10–1000 μM	1.2 μM	6.5	0.997	Ανθρώπινα ούρα	Jia et al. (2011)
Κυστεΐνη	Φωτοφωταύγεια με κβαντικές κουκκίδες CdTe	5–200 μM	3.4 μM	3.0	0.999	Ανθρώπινα ούρα	Wang et al. (2009)
Κυστεΐνη	Φθορισμός μέσω κβαντικών κουκκίδων CdSe/ZnS	10–800 nM	3.8 nM	1.1	0.997		Huang et al. (2009)
Γλουταθειόνη	Φθορισμός χρησιμοποιώντας κουκκίδες άνθρακα-MnO ₂	1–10 μM	300 nM	2.9-3.7	0.997	Ανθρώπινος ορός	Cai et al. (2015)



Σχήμα 2.5. Σχηματική παράσταση ανίχνευσης των βιοθειολών με βάση τη συσσωμάτωση διμεταλλικών νανοσωματιδίων Ag/Pd με τη μεσολάβηση του NaCl.

Κβαντικές νανοκουκίδες και νανοκουκίδες άνθρακα έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για την φθορισμομετρική ανίχνευση βιοθειολών. Παρουσία κυστεΐνης οι νανοκρύσταλλοι CdTe, επικαλυμμένοι με θειογλυκολικό οξύ, υποβάλλονται σε μεταβολές φθορισμού (Wang et al., 2009) ενώ οι κβαντικές κουκκίδες CdSe/ZnS που καλύπτονται με μερκαπτο-οξικό οξύ (Huang et al., 2009) παρουσίασαν αυξημένη εκπομπή φθορισμού παρουσία κυστεΐνης. Σε μια άλλη μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν νανοφύλλα MnO_2 για την επικάλυψη των κουκίδων άνθρακα και τη μείωση της εκπομπής φθορισμού λόγω της μικρής απόστασης μεταξύ των κουκκίδων άνθρακα και των νανοφύλλων MnO_2 . Με την προσθήκη γλουταθειόνης, τα νανοφύλλα MnO_2 ανάχθηκαν σε Mn^{2+} απελευθερώνοντας τις

κουκίδες άνθρακα ενισχύοντας την ένταση φθορισμού με τρόπο ανάλογο με τη συγκέντρωση της γλουταθειόνης (Cai et al., 2015).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Παρά την σημαντική αξία των βιοθειολών στην διάγνωση σοβαρών ασθενειών, ο προσδιορισμός των ελεύθερων βιοθειολών είναι ιδιαίτερα απαιτητικός και δύσκολος για διάφορους λόγους (όπως η μεγάλη χημική συγγένεια με τα αμινοξέα, η αναγωγική τους δράση, η απουσία χρωμοφόρων ή φθοριζόντων ομάδων στο μόριο τους, κλπ) με αποτέλεσμα η ανάλυση τους να μην συμπεριλαμβάνεται στις συνήθεις βιοχημικές αναλύσεις. Όπως προαναφέρθηκε για τον προσδιορισμό των ελεύθερων βιοθειολών απαιτείται είτε η χρήση κατάλληλων

χρωμοφόρων ή φθοροφόρων οργανικών ιχνηθετών σε συνδυασμό με εξειδικευμένες ενόργανες τεχνικές διαχωρισμού και ανάλυσης (όπως η υγρή χρωματογραφία, η φασματομετρία μάζας, η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση), είτε ενζυματικές μέθοδοι με φθορισμομετρική ανίχνευση. Αν και η χρήση ενζυματικών φθορισμομετρικών μεθόδων είναι πιο κοινή σε σχέση με την χρήση τεχνικών διαχωρισμού, η εφαρμογή τους απαιτεί ακριβό εξοπλισμό (φθορισμόμετρα μικροπλακιδίων), εξειδικευμένους χειρισμούς και αυστηρή τήρηση των πρωτοκόλλων ανάλυσης. Και αυτό διότι η ανίχνευση βασίζεται σε συγκεκριμένες και χρονικά εξαρτώμενες αλληλουχίες αντιδράσεων προκειμένου να αντιμετωπιστούν προβλήματα σταθερότητας των ενζύμων και συν-δραστικότητας των φθορισμομετρικών ή χρωματομετρικών ιχνηθετών με άλλα συστατικά των βιολογικών ρευστών. Για τους λόγους αυτούς η ανάπτυξη μεθόδων για την ανάλυση ελεύθερων βιοθειολών αποτελεί ένα αναπτυσσόμενο πεδίο έρευνας καθώς υπάρχει ζήτηση για την ανάπτυξη απλών και εύχρηστων μεθόδων ανάλυσης που να λειτουργούν ανεξάρτητα ή/και συμπληρωματικά των υφιστάμενων μεθόδων ανάλυσης συνδυάζοντας υψηλή εκλεκτικότητα και ευαισθησία.

Με βάση τα ανωτέρω, σκοπός της διδακτορικής διατριβής είναι η ανάπτυξη καινοτόμων μεθόδων ανίχνευσης και ανάγνωσης σήματος ως εργαλεία για τον ποσοτικό προσδιορισμό βιοθειολών σε βιολογικά ρευστά που να συνδυάζουν απλότητα στην χρήση (ώστε να είναι εφαρμόσιμες ακόμα και από μη εξειδικευμένο προσωπικό), χωρίς ενόργανες τεχνικές ανάλυσης (ώστε να

είναι ρεαλιστική η εφαρμογή τους εκτός εργαστηριακών υποδομών όπως πχ. στον νοσηλευτικό πάγκο) και να χρησιμοποιούν σταθερά και εμπορικά διαθέσιμα αντιδραστήρια που δεν απαιτούν ειδικές διαδικασίες παρασκευής και προετοιμασίας (όπως στην περίπτωση των ενζυματικών ή ανοσοχημικών μεθόδων). Τέτοιες μέθοδοι αναμένεται να συνδράμουν στις προσπάθειες για έγκαιρη διάγνωση και παρακολούθηση ασθενειών που σχετίζονται με τα επίπεδα των ελεύθερων βιοθειολών στον ανθρώπινο οργανισμό (καρδιοαγγειακές παθήσεις, νευρολογικές διαταραχές, διαβήτης, κύρωση του ήπατος, κ.α.).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1^ο

ΧΑΜΗΛΟΥ ΚΟΣΤΟΥΣ ΧΡΩΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΒΙΟΘΕΙΟΛΩΝ ΜΕ ΚΟΙΝΕΣ ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗΣ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗΣ ΠΟΥ ΒΑΣΙΖΕΤΑΙ ΣΤΗ ΦΩΤΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΓΩΓΗ ΑΛΟΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΡΓΥΡΟΥ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφεται μια νέα μέθοδος για τον προσδιορισμό των ελεύθερων βιοθειολών σε βιολογικά υγρά εκμεταλλευόμενη μερικές από τις βασικές αρχές της χημείας της πρώιμης φωτογραφίας— που βασίζονταν σε φωτογραφικά υλικά από αλογονίδια του αργύρου - και χρησιμοποιεί ευρέως διαθέσιμες συσκευές απεικόνισης (επίπεδους σαρωτές), ως ανιχνευτές. Συγκεκριμένα, η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα των βιοθειολών να δεσμεύουν τα ιόντα αργύρου και να διασπών τους κρυστάλλους αλογονιδίων αργύρου αλλάζοντας έτσι την φωτοευαισθησία του κρυσταλλικού αιωρήματος των αλογονιδίων αργύρου. Οι μεταβολές που προκαλούνται από τις βιοθειόλες, στην ένταση του φωτός που απορροφάται από το εναιώρημα των αλογονιδίων αργύρου μετά από τη φωτοχημική αναγωγή, καταγράφονται με μια απλοποιημένη φωτομετρική προσέγγιση χρησιμοποιώντας έναν επίπεδο σαρωτή. Η συνολική διαδικασία ανάλυσης για τον προσδιορισμό των βιοθειολών ήταν εύκολα εκτελέσιμη, γρήγορη και μπορεί να εφαρμοστεί με φθηνά υλικά και εμπορικά διαθέσιμα αντιδραστήρια χωρίς την ανάγκη σύνθεσης νέων υλικών. Επιπλέον, επιτρέπει την διάκριση μεταξύ φυσιολογικών και μη φυσιολογικών επίπεδων βιοθειολών ακόμη και με γυμνό μάτι. Η μέθοδος που αναπτύξαμε εφαρμόστηκε με επιτυχία στον προσδιορισμό βιοθειολών σε δείγματα ούρων και πλάσματος αίματος με όρια ανίχνευσης 10μM, ικανοποιητικές ανακτήσεις (92-97%), καλή επαναληψιμότητα (6.7-8.8%) και υψηλή εκλεκτικότητα έναντι άλλων

συστατικών των βιολογικών υγρών. Αποδείχθηκε επίσης η χρησιμότητα της μεθόδου για τον προσδιορισμό της αναλογίας ανηγμένων/οξειδωμένων βιοθειολών καθώς και η εφαρμογή της υπό φυσικό φωτισμό, χωρίς εξωτερικές πηγές ενέργειας. Αποδεικνύεται έτσι η δυνατότητα χρήσης της μεθόδου για εφαρμογές στο σημείο χρήσης ή σε εγκαταστάσεις με περιορισμένες δυνατότητες πραγματοποίησης βιοχημικών αναλύσεων (π.χ. αγροτικά ιατρεία).

1.1 Εισαγωγή

Την τελευταία δεκαετία, υπάρχει συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη απλών αναλυτικών μεθόδων χαμηλού κόστους που είναι εύκολο να εφαρμοστούν με βασική εκπαίδευση, μπορούν να χρησιμοποιηθούν με ελάχιστους πόρους ή περιορισμένες υποδομές και προσφέρουν γρήγορα, ακριβή και αξιόπιστα αποτελέσματα (Petryayeva et al., 2015). Ιδανικά, οι μέθοδοι αυτές θα πρέπει να μπορούν να εφαρμοστούν οπουδήποτε ή να είναι εύκολα μεταφερόμενες και να εγκαθίστανται στο σημείο ενδιαφέροντος χωρίς απώλεια της λειτουργικότητας τους (Grudpan et al., 2015). Για να ικανοποιηθούν αυτές οι ανάγκες, πολλές αναλυτικές μέθοδοι έχουν ενσωματωθεί σε μικρο-διατάξεις (όπως συσκευές χαρτιού, συσκευές πλευρικής ροής, κ.λπ.) (Petryayeva et al., 2015, Parolo et al., 2013, Sharma et al., 2015) και χρησιμοποιούν ως ανιχνευτές ευρέως διαδομένες (και μη εξειδικευμένες) συσκευές καταγραφής σήματος (π.χ. σαρωτές γραφείου, smartphones κ.λπ.) ή ακόμη και το γυμνό μάτι του παρατηρητή. Με βάση αυτές τις αρχές, έχουν αναπτυχθεί πολλές πλήρως λειτουργικές συσκευές και αναλυτικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό αναλυτών περιβαλλοντικού, διατροφικού και βιολογικού ενδιαφέροντος (Grudpan et al., 2015, Parolo et al., 2013, Sharma et al., 2015, Walker et al., 2014, Choleva et al., 2015, Nayak et al., 2017). Ωστόσο, παρά την πρόοδο που έχει σημειωθεί, δεν έχουν αναφερθεί ακόμη χαμηλού κόστους μέθοδοι για τον γρήγορο και εύκολο προσδιορισμό των βιοθειολών.

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφεται μια απλή και χαμηλού κόστους μέθοδος για την ανίχνευση βιοθειολών που βασίζεται στις αρχές της πρώιμης φωτογραφίας και χρησιμοποιεί την επίδραση των βιοθειολών στη φωτοχημική αναγωγή των κρυστάλλων αλογονιδίων του αργύρου. Ειδικότερα, η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα των βιοθειολών να διασπούν τους κρυστάλλους αλογονιδίων του αργύρου

μειώνοντας έτσι τη φωτοευαισθησία του εναιωρήματος αλογονιδίων του αργύρου. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των βιοθειολών επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας έναν επίπεδο σαρωτή ο οποίος μετρά την διαπερατότητα του φωτός που διαπερνά μέσω του εναιωρήματος αλογονιδίων του αργύρου ενώ τα φυσιολογικά επίπεδα βιοθειολών στα βιολογικά υγρά μπορούν να ανιχνευθούν ακόμα και δια γυμνού οφθαλμού παρακολουθώντας τις φασματικές-χρωματικές μεταπτώσεις του εναιωρήματος αλογονιδίων του αργύρου. Η μέθοδος εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό βιοθειολών σε βιολογικά δείγματα, όπως τα ούρα και το πλάσμα αίματος, με ικανοποιητικά αναλυτικά χαρακτηριστικά από άποψη ευαισθησίας, εκλεκτικότητας και επαναληψιμότητας χρησιμοποιώντας ένα εύχρηστο αναλυτικό πρωτόκολλο και φθηνά υλικά και αντιδραστήρια. Αυτά τα χαρακτηριστικά μπορούν να διευκολύνουν την πραγματοποίηση γρήγορων αναλύσεων ρουτίνας για βιοθειόλες.

1.2 Υλικά και μέθοδοι

1.2.1 Αντιδραστήρια

Όλα τα αντιδραστήρια ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας (εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά) και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω κατεργασία. Τα αντιδραστήρια L-γλουταθειόνη (ανηγμένη), AgNO_3 (> 99%) και τρις (2-καρβοξυαιθυλ) φωσφιν-υδροχλωρίδιο (TCEP, 95%, 0,5M) αγοράστηκαν από την Alfa Aesar (Karlsruhe, Γερμανία). Τα αντιδραστήρια L-κυστεΐνη, DL-ομοκυστεΐνη, γλουταμίνη (Gln), γλουταμικό οξύ (Glu), κυστίνη (Cys-Cys), ασπαραγίνη (Asn), ασπαρτικό οξύ (Asp), γαλακτικό οξύ, δισόξινο φωσφορικό κάλιο, όξινο ανθρακικό νάτριο, χλωριούχο αμμώνιο, γλυκερίνη, βρωμιούχο νάτριο, ιωδιούχο νάτριο, οξικό νάτριο, κρεατινίνη, ουρικό οξύ, D(+) - γλυκόζη και παγόμορφο οξικό οξύ αγοράστηκαν από την Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Η γλυκίνη (Gly), η ιστιδίνη (His), η λυσίνη (Lys) και η βαλίνη (Val) αγοράστηκαν από την Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Germany). Τα αντιδραστήρια κιτρικό οξύ, εξαένυδρο χλωριούχο μαγνήσιο, χλωριούχο κάλιο και διένυδρο χλωριούχο ασβέστιο αποκτήθηκαν από την Mallinckrodt (Δουβλίνο, Ιρλανδία). Τα αντιδραστήρια Αργινίνη (Arg), θειικό μαγνήσιο, χλωριούχο νάτριο, θειικό νάτριο και όξινο φωσφορικό κάλιο ελήφθησαν από την Merck (Darmstadt, Germany). Τέλος, η ουρία

(> 99,5%) αγοράστηκε από την Pharmacia Biotech AB (Uppsala, Σουηδία) και το ακετονιτρίλιο HPLC από την Fischer Scientific (Loughborough, UK).

1.2.2 Εξοπλισμός

Για την ακτινοβολήση των δειγμάτων χρησιμοποιήσαμε διαφορετικές πηγές υπεριώδους και ορατού φωτός που παρείχαν διαφορετικές εντάσεις έκθεσης και σε διαφορετικά μήκη κύματος. Λεπτομερείς πληροφορίες παρέχονται στον Πίνακα 1.1.

***Πίνακας 1.1.** Τεχνικές προδιαγραφές (ιδιότητες, μήκος κύματος και ένταση) των πηγών ακτινοβολίας που χρησιμοποιήθηκαν σε όλη τη διάρκεια της μελέτης υπό βέλτιστες συνθήκες εργασίας.*

Πηγή ακτινοβολίας	Μήκος κύματος (nm)	Ένταση στα 15 cm ($\mu\text{W cm}^{-2}$)	Χρόνος έκθεσης στην ακτινοβολία (min)	Βέλτιστος χρόνος έκθεσης στην ακτινοβολία (min)	Μέγιστο καθαρό αναλυτικό σήμα (a.u. $\pm$ sd)
Λάμπα UV (4 W) ¹	254	265	1.0-30.0	1.0	54 $\pm$ 3
Λάμπα UV (4 W) ¹	365	350	0.25-5.0	0.25	65 $\pm$ 5
Θάλαμος UV (5 $\times$ 8 W) ²	254	4000	0.5-3.0	0.5	68 $\pm$ 5
Φως δωματίου	300-800	Δεν προσδιορίστηκε	2.0-30.0	5.0	59 $\pm$ 3
Ηλιακό φως ³	300-800	25000	0.2-3.0	1.0	11 $\pm$ 2

¹ VilberLourmat 4LC, ²VilberLourmatBLX-254Crosslinker, ³Atlas Suntest XLS+.

Χρησιμοποιήσαμε ένα θάλαμο έκθεσης υπεριώδους ακτινοβολίας (Vilber Lourmat Bio-Link® BLX Crosslinker) (4W cm⁻²) για ακτινοβολήση των διαλυμάτων με υπεριώδη ακτινοβολία (254, 312 και 365nm) επειδή δεν επηρεάζεται από τις

εξωτερικές συνθήκες φωτισμού και εξασφαλίζει την επαναλήψιμη έκθεση των δειγμάτων σε σταθερή ένταση ακτινοβολίας.

Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε επίπεδο σαρωτή (PerfectionV550 Photo, Epson) σε λειτουργία σάρωσης διέλευσης φωτός (transmission scanning). Αυτός ο τρόπος λειτουργίας είναι σχεδιασμένος για την απεικόνιση φωτογραφικών ταινιών και χρησιμοποιεί μια ενσωματωμένη μονάδα διαφάνειας που χρησιμοποιεί λευκή ευρεία επίπεδη φωτεινή πηγή LED σε μία λωρίδα. Κατά τη διάρκεια της σάρωσης, η φωτεινή πηγή LED στη μονάδα διαφάνειας φωτίζει την φωτογραφική μεμβράνη με λευκό φως από την κορυφή και ο αισθητήρας ταινίας CCD (Charged Coupled Device) ανιχνεύει το φως που μεταδίδεται μέσω της μεμβράνης στο κάτω μέρος και ψηφιοποιεί την ένταση του φωτός σε τρία κανάλια: Κόκκινο (R), Πράσινο (G) και Μπλε (B) (Christodouleas et al., 2015).

1.2.3 Πειραματική πορεία

Σε ένα βαθμονομημένο δοκιμαστικό σωλήνα αναμίχθηκαν 0,75mL πρότυπου διαλύματος θειόλης (ή αραιωμένου δείγματος), 0,4mL NaCl (20%, w/v) και 0,1mL ρυθμιστικού διαλύματος οξικού οξέος / οξικού νατρίου (pH 5,6). Στη συνέχεια προστέθηκαν διαδοχικά 0.25mL AgNO_3 (10mM) και 0.5mL δεξτρίνης (14.4%, w/v) και αναμίχθηκαν. Μετά από επώαση 5 λεπτών σε συνθήκες περιβάλλοντος (δηλ. θερμοκρασία δωματίου και φωτισμός δωματίου) αφαιρέθηκε ένα κλάσμα 250μL και τοποθετήθηκε σε μικροπλακίδιο τιτλοδότησης (Nunc, Thermo Scientific) 96 υποδοχών (96-well plate) χωρητικότητας 400μL έκαστο. Το μικροπλακίδιο ακτινοβολήθηκε για 25 δευτερόλεπτα στα 254nm σε θάλαμο έκθεσης υπεριώδους ακτινοβολίας (4 W cm^{-2}) σε απόσταση 15cm από την πηγή UV.

Για τη μέτρηση της έντασης χρώματος των υδατικών αιωρημάτων αλογονιδίων του αργύρου χρησιμοποιήσαμε επίπεδο σαρωτή σε λειτουργία σάρωσης διέλευσης φωτός. Τοποθετήσαμε το μικροπλακίδιο που περιείχε τα ακτινοβολημένα διαλύματα μεταξύ της επιφάνειας απεικόνισης και της μονάδας διαφάνειας του σαρωτή, προκειμένου να ευθυγραμμιστεί η φωτεινή πηγή (λευκή λυχνία LED) και ο ανιχνευτής (αισθητήρας ταινίας CCD). Με αυτόν τον τρόπο δημιουργήθηκε μια οπτική διαδρομή που επέτρεψε την εκτέλεση (φωτομετρικών) μετρήσεων διαπερατότητας με χωρικά ομοιόμορφη ένταση κατά μήκος του οπτικού παραθύρου

(δηλ. του μικροπλακιδίου) (Christodouleas et al., 2015). Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν απενεργοποιώντας όλες τις λειτουργίες αυτόματης διόρθωσης που είναι ενσωματωμένες στο λογισμικό του σαρωτή (Easy Photo Scan, v.1.00.08, Epson) για να διασφαλιστεί ότι τα φωτομετρικά δεδομένα δεν θα επηρεαστούν από άλλες παραμέτρους. Όλες οι εικόνες αποθηκεύτηκαν ως αρχεία JPEG (Joint Photographic Experts Group) σε ανάλυση 300 dpi και μετρήθηκε η ένταση του χρώματος ως μέση γκριζα περιοχή που μεταδίδεται μέσω των φρεατίων του μικροπλακιδίου χρησιμοποιώντας το λογισμικό Image J (US National Institutes of Health).

1.2.4 Δείγματα

Τεχνητό διάλυμα ούρων (artificial urine sample-AUS) παρασκευάστηκε με ανάμιξη 1,1mM γαλακτικού οξέος, 2,0mM κιτρικού οξέος, 25,0mM διττανθρακικού νατρίου, 170,0mM ουρίας, 2,5mM χλωριούχου ασβεστίου, 90, mM χλωριούχου νατρίου, 2,0mM θεικού μαγνησίου, 10,0mM θεικού νατρίου, 7,0mM φωσφορικού καλίου, 7,0mM όξινου φωσφορικού καλίου και 25,0mM χλωριούχου αμμωνίου σε απεσταγμένο νερό και ρυθμίζοντας το pH στην τιμή 6,0 (Brooks et al., 1997). Προστέθηκαν κατάλληλες ποσότητες προτύπου διαλύματος βιοθειολών και αναμίχθηκαν υπό ανάδευση για 10 λεπτά.

Τεχνητό πλάσμα αίματος (artificial blood plasma-ABP) παρασκευάστηκε με ανάμιξη 137,5mM χλωριούχου νατρίου, 4,2mM όξινου ανθρακικού νατρίου, 3,0mM χλωριούχου καλίου, 0,5mM όξινου φωσφορικού δινατρίου, 0,5mM χλωριούχου μαγνησίου, 2,64mM χλωριούχου ασβεστίου και 0,5mM θεικού νατρίου σε απεσταγμένο νερό ρυθμίζοντας το pH σε τιμή 7.4 (Liu et al., 2006). Προστέθηκαν κατάλληλες ποσότητες πρότυπου διαλύματος βιοθειολών και αναμίχθηκαν υπό ανάδευση για 10 λεπτά.

Δείγματα αίματος συλλέχθηκαν από υγιείς εθελοντές. Το πλάσμα αίματος συλλέχθηκε μετά από φυγοκέντρηση και κατεργάστηκε σύμφωνα με την πειραματική πορεία που περιγράφουν οι Tsang και Cheng (Seiwert et al., 2007) με μερικές τροποποιήσεις. Πρώτον, καταβυθίστηκαν οι πρωτεΐνες από το πλάσμα με ακετονιτρίλιο (αναλογία δείγματος ACN 2:1) (Blanchard et al., 1981) με φυγοκέντρηση στις 8000 rpm για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, 500μL του πλάσματος

(ελεύθερου πρωτεϊνών) αναμίχθηκαν με 10μL 0.05M TCEP και αναδεύτηκαν για 15 δευτερόλεπτα. Μετά από 30 λεπτά επώασης (με ενδιάμεση ανάμιξη) ένα κλάσμα του διαλύματος αραιώθηκε (3 έως 4 φορές) και χρησιμοποιήθηκε για ανάλυση. Για μελέτες ανάκτησης, προστέθηκαν θειόλες μετά την καταβύθιση των πρωτεϊνών και τα αιωρούμενα δείγματα αραιώθηκαν καταλλήλως.

1.3 Αποτελέσματα και συζήτηση

1.3.1 Φωτοαναγωγή αλογονιδίων αργύρου

Η φωτοχημική αναγωγή των αλογονιδίων του αργύρου (δηλ. AgCl, AgBr, AgI) σε μεταλλικό άργυρο είναι ένα πολύ γνωστό φαινόμενο που έχει χρησιμοποιηθεί σε εμπορικά φωτογραφικά υλικά για περισσότερο από έναν αιώνα. Οι κρύσταλλοι αργύρου-αλογονιδίου τυπικά έχουν κυβικό σχήμα και σε κάθε κρύσταλλο ένα ιόν αργύρου (Ag^+) περιβάλλεται από έξι ιόντα αλογονιδίων (Bjelhagen et al., 1995, Marchetti et al., 1992). Όταν ένα φωτόνιο φωτός χτυπά έναν κρύσταλλο αλογονιδίου του αργύρου, η ενέργεια του φωτονίου απορροφάται από το αλογονίδιο, το οποίο απελευθερώνεται από τον κρύσταλλο, ελευθερώνοντας ένα ηλεκτρόνιο. Το φωτο-παραγόμενο ελεύθερο ηλεκτρόνιο αντιδρά με το κατιόν αργύρου Ag^+ , για να σχηματίσει το αντίστοιχο άτομο μετάλλου Ag^0 (Marchetti et al., 1992). Όταν σχηματίζονται αρκετά άτομα Ag^0 , δημιουργούν ένα συγκρότημα Ag^0 εντός του πλέγματος του αλογονιδίου του αργύρου. Αυτά τα συγκροτήματα αυξάνονται σε αριθμό και μέγεθος με την αύξηση του χρόνου ακτινοβολίας (Bjelhagen et al., 1995). Για σχετικά βραχείς χρόνους ακτινοβολίας σχηματίζονται μικρές ποσότητες συγκροτημάτων Ag^0 οι οποίες δεν είναι αντιληπτές με γυμνό μάτι. Στην θεωρία της φωτογραφίας αυτά τα αόρατα με γυμνό μάτι συγκροτήματα ονομάζονται "speks" (λανθάνουσα εικόνα) και χρησιμοποιούνται ως καταλυτικά κέντρα για την για την υποβοήθηση της αναγωγής των ιόντων Ag^+ που βρίσκονται κοντά στα "speks" σε αντίθεση με τα ιόντα Ag^+ που βρίσκονται μακριά από αυτά (Bjelhagen et al., 1995). Η αναγωγή των ιόντων Ag^+ κοντά στα κέντρα της λανθάνουσας εικόνας εμφανίζεται ως φωτογραφία (θετικό είδωλο). Για να βελτιωθεί η διαδικασία αναγωγής των ιόντων Ag^+ (και συνεπώς η ποιότητα της φωτογραφίας) χρησιμοποιούνταν συνήθως ανόργανα και οργανικά πρόσθετα, μεταξύ των οποίων διάφορες μερκαπτάνες και σουλφίδια (Bjelhagen et al., 1995, Fischer et al., 2004, Tani et al., 1995, Fujita et al.,

2004). Τα περισσότερα από αυτά τα πρόσθετα δεσμεύονταν από τα ιόντα Ag^+ και παρείχαν βελτιώσεις στη διαδικασία ανάπτυξης της φωτογραφίας (π.χ. ελαχιστοποιούν της αναγωγή των μη εκτεθειμένων κρυστάλλων αλογονιδίων του αργύρου, βελτιώνουν την αντίθεση, ενισχύουν τη φωτοευαισθησία των συγκροτημάτων Ag^0 κλπ) (Bjelkhagen et al., 1995, Fischer et al., 2004, Tani et al., 1995, Fujita et al., 2004).

Εμπνευσμένοι από τους μηχανισμούς που χρησιμοποιήθηκαν στη χημεία της πρώιμης φωτογραφίας, θεωρήσαμε ότι οι θειόλες χαμηλού μοριακού βάρους θα μπορούσαν επίσης να επηρεάσουν την φωτο-αναγωγή των κρυστάλλων αλογονιδίων του αργύρου λόγω της υψηλής συγγένειάς τους με τα ιόντα αργύρου. Για να επιβεβαιώσουμε την υπόθεση αυτή πραγματοποιήσαμε μια σειρά προκαταρκτικών πειραματικών δοκιμών χρησιμοποιώντας ένα υδατικό αιώρημα κρυστάλλων AgCl . Όπως είδαμε, η προσθήκη βιοθειολών (κυστεΐνη, γλουταθειόνη και ομοκυστεΐνη) επηρέασε την αναγωγή των κρυστάλλων AgCl όταν εκτέθηκαν σε ακτινοβολία υπεριώδους φωτός και πιο συγκεκριμένα παρεμπόδιζε την φωτο-αναγωγή των κρυστάλλων AgCl . Βασιζόμενοι στην παρατήρηση αυτή, αναπτύξαμε μια νέα μέθοδο για τον προσδιορισμό βιοθειολών σε βιολογικά υγρά.

1.3.2 Επιλογή των κατάλληλων κρυστάλλων αλογονιδίων του αργύρου

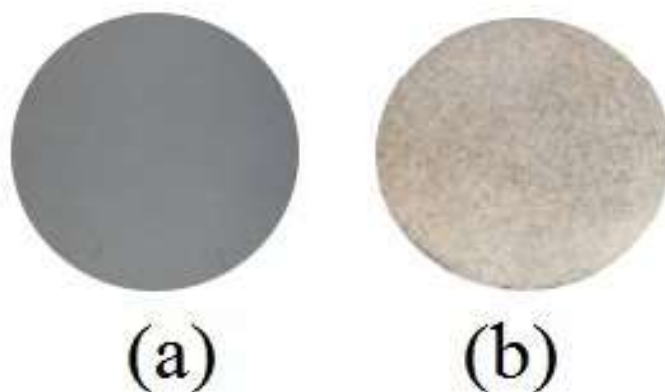
Αρχικά εξετάσαμε διαφορετικά αλογονίδια αργύρου ως προς την φωτο-ευαισθησία τους στην ακτινοβολία υπεριώδους φωτός (UV) παρουσία και απουσία κυστεΐνης. Με βάση τις πληροφορίες που παρέχονται από τη θεωρία της πρώιμης φωτογραφίας σχετικά με τη φωτοευαισθησία των κρυστάλλων αλογονιδίων του αργύρου (Sahyun et al., 1974) ελέγχθηκαν τα άλατα χλωριούχου, βρωμιούχου και ιωδιούχου νατρίου που παράγουν αδιάλυτα άλατα με τον άργυρο. Η επιλογή του πιο κατάλληλου αλογονιδίου για ανίχνευση βιοθειολών βασίστηκε στην ένταση του καθαρού αναλυτικού σήματος η οποία ορίζεται ως η διαφορά μεταξύ της έντασης σήματος που λαμβάνεται από την φωτο-αναγωγή ενός εναιωρήματος αλογονιδίου του αργύρου παρουσία και απουσία βιοθειολών. Από τις δοκιμές αυτές καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι το καθαρό αναλυτικό σήμα που προέκυψε από τα τρία αλογονίδια του αργύρου μειωνόταν σύμφωνα με τη σειρά: AgCl (66.0) > AgBr (47.7) > AgI (-5.0) (οι αριθμοί στην παρένθεση είναι το μέσο καθαρό αναλυτικό σήμα, σε αυθαίρετες

μονάδες, που λαμβάνεται από πέντε ανεξάρτητες μετρήσεις). Αυτή η κατάταξη (η οποία είναι αντιστρόφως ανάλογη της διαλυτότητάς των αλογονιδίων του αργύρου στο νερό) (Fujita et al., 2004) συνάδει με την αναφερθείσα ευαισθησία των αλογονιδίων του αργύρου στην υπεριώδη ακτινοβολία (Bjelkhagen et al., 1995, Allen et al., 2011) και την ταχύτητα ανάπτυξης των φωτογραφικών εικόνων (James et al., 1942).

1.3.3 Βελτιστοποίηση της ανάλυσης βιοθειολών

Ο προσδιορισμός των βιοθειολών χρησιμοποιώντας υδατικά αιωρήματα AgCl βασίζεται στην ικανότητα των βιοθειολών να συμπλέκουν ισχυρά τα ιόντα Ag^+ (James et al., 1942) και επομένως να παρεμποδίζουν το σχηματισμό κρυστάλλων AgCl. Όταν τα ιόντα Ag^+ αναμειγνύονται με ιόντα χλωρίου, σχηματίζεται ένα λευκό εναιώρημα κρυστάλλων AgCl ($K_{sp} = 1,77 \times 10^{-10}$). Όταν το εναιώρημα αυτό εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία, οι κρύσταλλοι AgCl φωτο-ανάγονται για να σχηματίσουν Ag^0 , παράγοντας ένα σκούρο γκριζωπό-καφέ χρώμα (Εικόνα 1.1.α). Παρουσία βιοθειολών, παρατηρήσαμε ότι ο σχηματισμός του στερεού AgCl αναστέλλεται και παράγεται μικρότερη ποσότητα ιζήματος AgCl (Εικόνα 1.1.β). Η παρατήρηση αυτή δικαιολογείται από τις σταθερές ισορροπίας των ιόντων Ag^+ που είναι πολύ υψηλότερες για την κυστεΐνη ($\log K = 22.67-36.74$) (Liu et al., 2012) από ότι για τα ιόντα χλωρίου ($\log K = 3.31-6.10$) (Adams et al., 1999). Υπό τις συνθήκες αυτές η ποσότητα κρυστάλλων AgCl είναι διαθέσιμη για φωτο-αναγωγή μικρότερη παρουσία βιοθειολών με αποτέλεσμα το διάλυμα να εμφανίζεται πιο φωτεινό μετά από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (σε σχέση με διάλυμα ίδιας σύστασης και υπό τις ίδιες συνθήκες που δεν περιέχει βιοθειόλες) (Εικόνα 1.1). Η διαφορά στην ακτινοβολία που απορροφάται από το φωτο-ανηγμένο αιώρημα AgCl παρουσία και απουσία βιοθειολών σχετίζεται με τη συγκέντρωση βιοθειολών στο διάλυμα.

Οι ίδιες παρατηρήσεις έγιναν επίσης όταν προστέθηκαν βιοθειόλες σε ένα εναιώρημα που περιέχει προ-σχηματισμένους κρυστάλλους AgCl αν και το καθαρό αναλυτικό σήμα (δηλαδή η διαφορά μεταξύ της έντασης των χρωματομετρικών μεταπτώσεων παρουσία και απουσία βιοθειολών) ήταν μικρότερη. Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις, επιλέχθηκε ο επιτόπιος (in-situ) σχηματισμός κρυστάλλων AgCl στο δείγμα αντί για την προσθήκη (στο δείγμα) προ-σχηματισμένων κρυστάλλων AgCl.

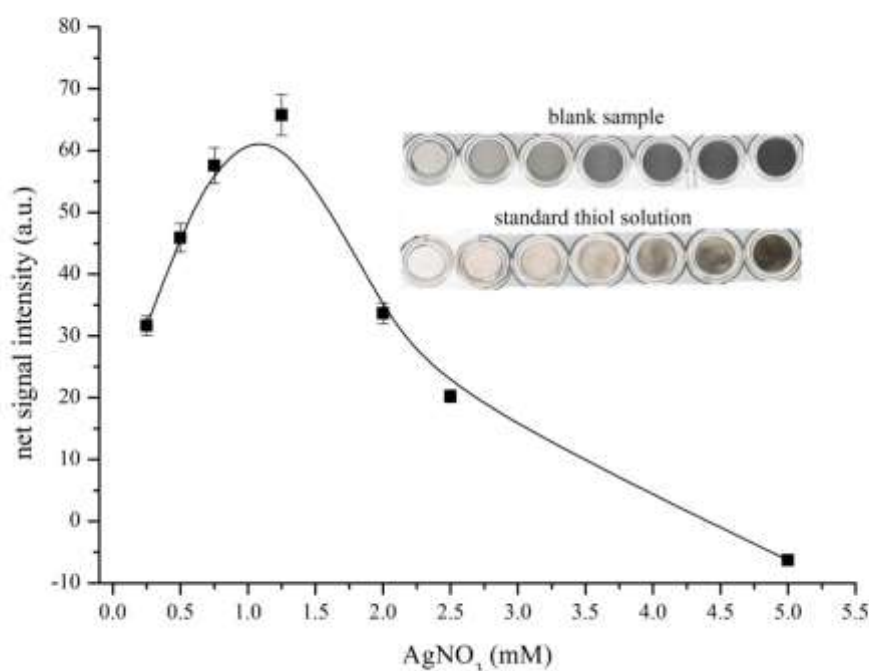


Εικόνα 1.1. (α) Εναιώρημα AgCl μετά από έκθεση σε ακτινοβολία UV (β) Εναιώρημα AgCl παρουσία 100,0μM κυστεΐνης μετά από έκθεση σε ακτινοβολία UV. Το αιώρημα AgCl παρασκευάστηκε με ανάμιξη 1,5mM AgNO₃ με 5.0% (β/ο) NaCl. Η ακτινοβολήση των διαλυμάτων πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο έκθεσης υπερϊώδους ακτινοβολίας (4 w cm⁻²) για 25 δευτερόλεπτα. Οι εικόνες ελήφθησαν με επίπεδο σαρωτή και παρουσιάζουν τα αιωρήματα AgCl σε μικροπλακίδια 96 φρεατίων. Πειραματικές λεπτομέρειες στο κείμενο. Και οι δύο εικόνες περικόπηκαν και μεγεθύνθηκαν για να διευκολύνουν την προβολή όψης.

Για να βελτιστοποιηθεί η φωτο-αναγωγή του εναιωρήματος AgCl (παρουσία και απουσία βιοθειολών) ερευνήσαμε την επίδραση των συγκεντρώσεων του AgNO₃, των αλάτων, του pH, του χρόνου επώασης, της θερμοκρασίας καθώς και των παραμέτρων που σχετίζονται με τον χρόνο έκθεσης σε υπερϊώδη ακτινοβολία και την ένταση της υπερϊώδους ακτινοβολίας. Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν παρουσία 135,0 μM κυστεΐνης το οποίο είναι το πιο αντιπροσωπευτικό είδος αμινο-θειόλης σε βιολογικά υγρά. Επιπλέον, τα φυσιολογικά επίπεδα κυστεΐνης στο πλάσμα του αίματος κυμαίνονται από 135-300μM (Hakuma et al., 2014), συνεπώς, η συγκέντρωση εργασίας βρίσκεται εντός των φυσιολογικών επιπέδων.

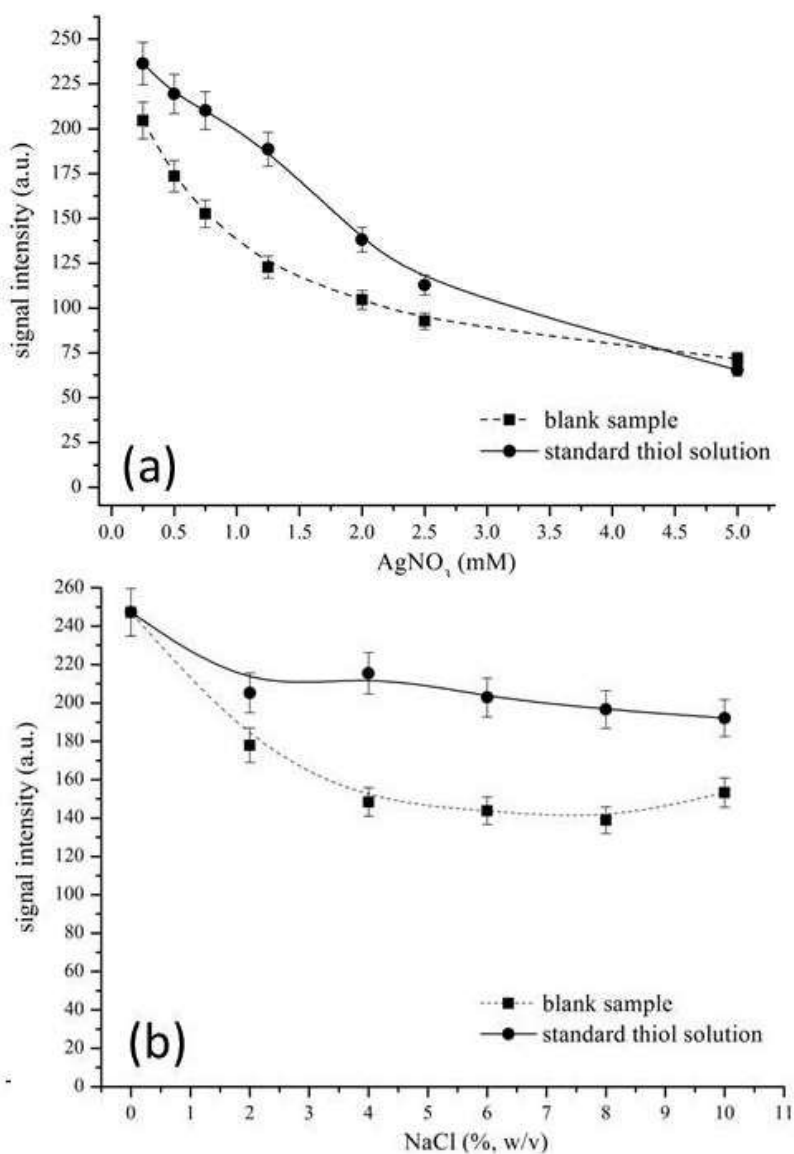
1.3.4 Βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης ιόντων Ag^+

Η ποσότητα των ιόντων Ag^+ και ιόντων χλωρίου που προστίθενται στο διάλυμα είναι ένας κρίσιμος παράγοντας που ελέγχει την αφθονία και τη μορφολογία των κρυστάλλων AgCl . Παρατηρήσαμε ότι το μέγιστο καθαρό αναλυτικό σήμα λαμβάνεται στα 1,25mM AgNO_3 και σταδιακά μειώνεται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (Εικόνα 1.2).



Εικόνα 1.2. Επίδραση της συγκέντρωσης AgNO_3 στην απόκριση του καθαρού αναλυτικού σήματος της κυστεΐνης. (κυστεΐνη = 135 μM , NaCl 5.0% (β/ο), χρόνος επώασης = 2 λεπτά, ακτινοβολήση στα 4 W cm^{-2} για 30 δευτερόλεπτα) Οι ενσωματωμένες φωτογραφίες παρουσιάζουν ένα τυπικό πείραμα ($n = 3$).

Αυτή η συμπεριφορά εξηγείται από το γεγονός ότι υψηλές συγκεντρώσεις ιόντων Ag^+ οδηγούν στο σχηματισμό υψηλότερων ποσοτήτων κρυστάλλων AgCl . Συνεπώς, η προσθήκη βιοθειολών έχει μικρή επίδραση στη φωτοευαισθησία του συνολικού εναιωρήματος AgCl και τα αναλυτικά σήματα που λαμβάνονται από τα διαλύματα του τυφλού και του δείγματος σταδιακά συγκλίνουν (Εικόνα 1.3.α).

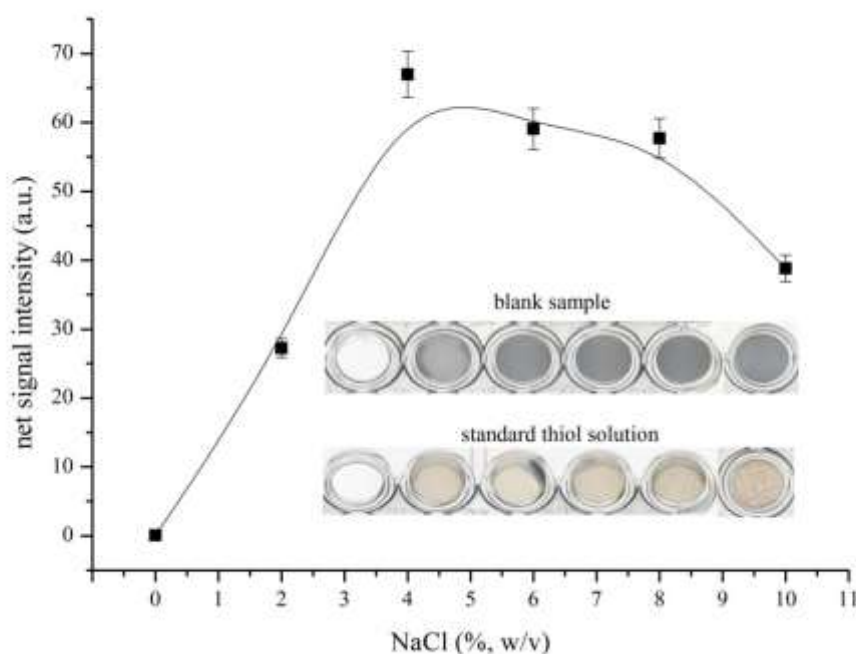


Εικόνα 1.3. Απόκριση σήματος που λαμβάνεται από τα τυφλά δείγματα (τετράγωνα σύμβολα) και το πρότυπο διάλυμα θειόλης (δηλαδή κυστεΐνη) (κυκλικά σύμβολα) με αυξανόμενες συγκεντρώσεις AgNO_3 και NaCl .

1.3.5 Βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης NaCl

Η επίδραση της συγκέντρωσης NaCl διερευνήθηκε σε συγκεντρώσεις αρκετά πάνω από τη συγκέντρωση των ιόντων Ag^+ επειδή, σύμφωνα με τη θεωρία που αφορά την παρασκευή φωτογραφικών γαλακτωμάτων, για να ληφθούν κρύσταλλοι αλογονιδίων του αργύρου μεγάλου μεγέθους που είναι περισσότερο φωτοευαίσθητοι, απαιτείται μεγάλη ποσότητα αλογονιδίων (Carrol et al., 1931, Diamond et al., 2002,

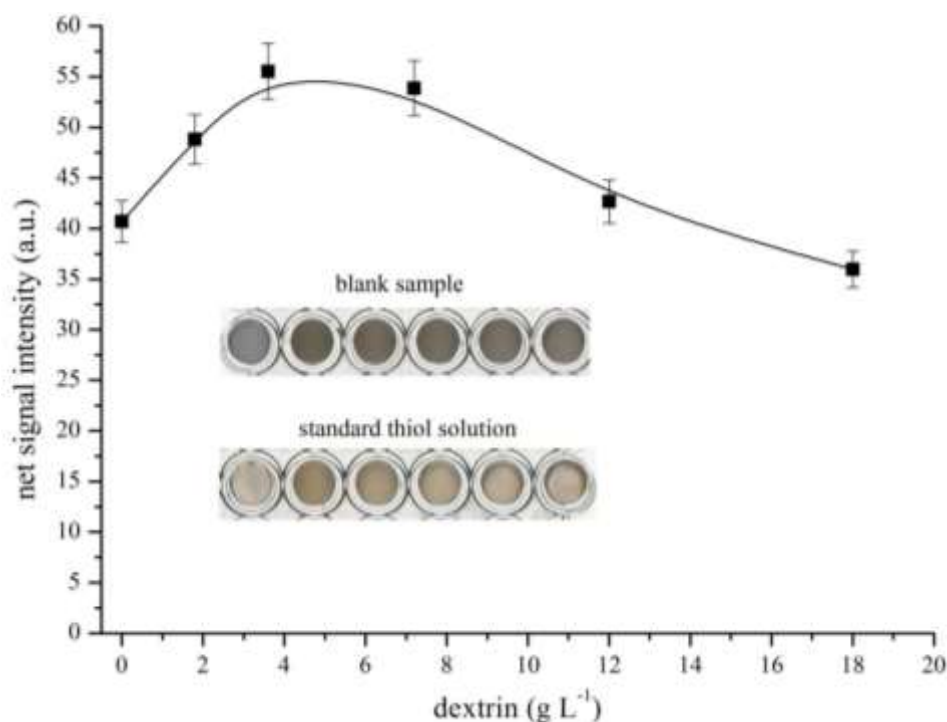
Mess et al., 1966). Υπό την παρουσία μεγάλης περίσσειας ιόντων αλογονιδίων, οι κρύσταλλοι αλογονιδίων του αργύρου μεγαλώνουν σε μέγεθος λόγω της ωρίμανσης κατά Ostwald (Ostwald ripening) και της ωρίμανσης συνένωσης (coalescence ripening) (Fujita et al., 2004, Carrol et al., 1931, Mess et al., 1966). Η ωρίμανση κατά Ostwald συμβαίνει επειδή η περίσσεια ιόντων αλογονιδίων αυξάνει τη διαλυτότητα μικρών κρυστάλλων AgCl διαλυτοποιώντας τους προς τον σχηματισμό φορτισμένων ειδών όπως AgCl^+ , AgCl_2^{-2} (Fujita et al., 2004). Αυτά τα σύμπλοκα στη συνέχεια διαχέονται σε μεγαλύτερους κρυστάλλους AgCl και εναποτίθενται ξανά στην επιφάνειά τους προκαλώντας την περαιτέρω αύξηση του μεγέθους των ήδη μεγάλων κρυστάλλων (Bjerkhagen et al., 1995, Fujita et al., 2004). Ταυτόχρονα, η ωρίμανση συνένωσης λαμβάνει χώρα από την ταχεία κατακρήμνιση στερεών AgCl (που μπορεί να συμβεί, για παράδειγμα, από την ταχεία προσθήκη AgNO_3) προκαλώντας ζεύγη ή μεγάλα συσσωματώματα κρυστάλλων μεγεθύνοντας ακόμα περισσότερο το μέγεθος των κρυστάλλων AgCl (Bjerkhagen et al., 1995, Carrol et al., 1931, Diamond et al., 2002, Mess et al., 1966). Οι μεγάλοι κρύσταλλοι AgCl είναι κατά κανόνα πιο ευαίσθητοι στην ακτινοβολία και φωτο-ανάγονται πολύ ταχύτερα από τους μικρότερους κρυστάλλους, επειδή σε μεγάλα μεγέθη κρυστάλλων μεγαλύτερη ποσότητα Ag^+ φωτο-ανάγεται σε Ag^0 (James et al., 1942, Carrol et al., 1931). Λόγω αυτών των μηχανισμών, ερευνήσαμε την επίδραση της συγκέντρωσης NaCl στην περιοχή 0,3-10% (β/ο) (δηλ. 0,05-1,7M) προκειμένου να διασφαλίσουμε ότι τα ιόντα αλογονιδίων βρίσκονται σε περίσσεια από τα ιόντα Ag^+ (1,25mM AgNO_3). Η γραφική αναπαράσταση των εντάσεων του σήματος που απεικονίζονται στην Εικόνα 1.4 (και στην Εικόνα 1.3.β) δείχνουν ότι το σήμα αυξάνεται μέχρι 4% (w/v) (~ 0,7M) NaCl και στη συνέχεια σταδιακά μειώνεται. Αυτό το προφίλ μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι σε υπερβολικά χαμηλές συγκεντρώσεις NaCl οι κρύσταλλοι έχουν σταθερές όψεις και είναι κυβικοί, προσφέροντας χαμηλότερο εμβαδόν επιφανείας για φωτο-αναγωγή σε σύγκριση με τις επιφάνειες και το οκταεδρικό κρυσταλλικό σχήμα που λαμβάνεται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις NaCl (Diamond et al., 2002).



Εικόνα 1.4. Επίδραση της συγκέντρωσης NaCl στην απόκριση καθαρού αναλυτικού σήματος (κυστεΐνη = $135\mu\text{M}$, AgNO_3 $1,25\text{mM}$, χρόνος επώασης=2 λεπτά, ακτινοβολήση στα 4 w cm^{-2} για 30 δευτερόλεπτα). Οι ενσωματωμένες φωτογραφίες παρουσιάζουν ένα τυπικό πείραμα ($n = 3$).

Αν και οι μεγάλοι κρύσταλλοι AgCl εμφανίζουν μεγαλύτερη φωτοευαισθησία και υφίστανται ταχύτερη φωτο-αναγωγή, έχουν επίσης υψηλή κοκκιότητα (granularity) (Bjelhagen et al., 1995). Μετά την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, παρατηρήσαμε ότι οι μεγαλύτεροι (κοκκώδεις) κρύσταλλοι μετασχηματίστηκαν σε χοντρά συσσωματώματα, ορατά ακόμη και δια γυμνού οφθαλμού. Παρατηρήσαμε επίσης ότι οι εν λόγω χονδροειδείς κόκκοι αυξάνονται σε μέγεθος με αύξηση της συγκέντρωσης των βιοθειολών, περιπλέκοντας τη μέτρηση της μέσης γκρίζας έντασης του διαλύματος με αποτέλεσμα να μειώνουν την επαναληψιμότητα των μετρήσεων. Για να ξεπεραστεί η κροκίδωση των κρυστάλλων AgCl και ο επακόλουθος σχηματισμός χονδροειδών συσσωματωμάτων (μετά από φωτο-αναγωγή) προστέθηκε δεξτρίνη. Στην αργυρομετρία η δεξτρίνη χρησιμοποιείται συνήθως ως προστατευτικό κολλοειδές για την πρόληψη της κροκίδωσης του AgCl. Στη μελέτη μας, η δεξτρίνη μας επέτρεψε να αποκτήσουμε ένα ομοιογενές εναιώρημα χωρίς μεγάλα κολλοειδή συσσωματώματα (βλέπε ένθετες φωτογραφίες στην Εικόνα 1.5). Υπό τις πειραματικές συνθήκες εργασίας, βρέθηκε ότι

η βέλτιστη συγκέντρωση της δεξτρίνης ήταν 0,36% (β/ο) (βλέπε Εικόνα 1.5) ενώ υψηλότερες συγκεντρώσεις βρέθηκαν να έχουν αρνητική επίδραση στο καθαρό αναλυτικό σήμα πιθανώς παρεμποδίζοντας την πρόσβαση της υπεριώδους ακτινοβολίας στα φωτο-δραστικά κέντρα του κρυστάλλου AgCl.

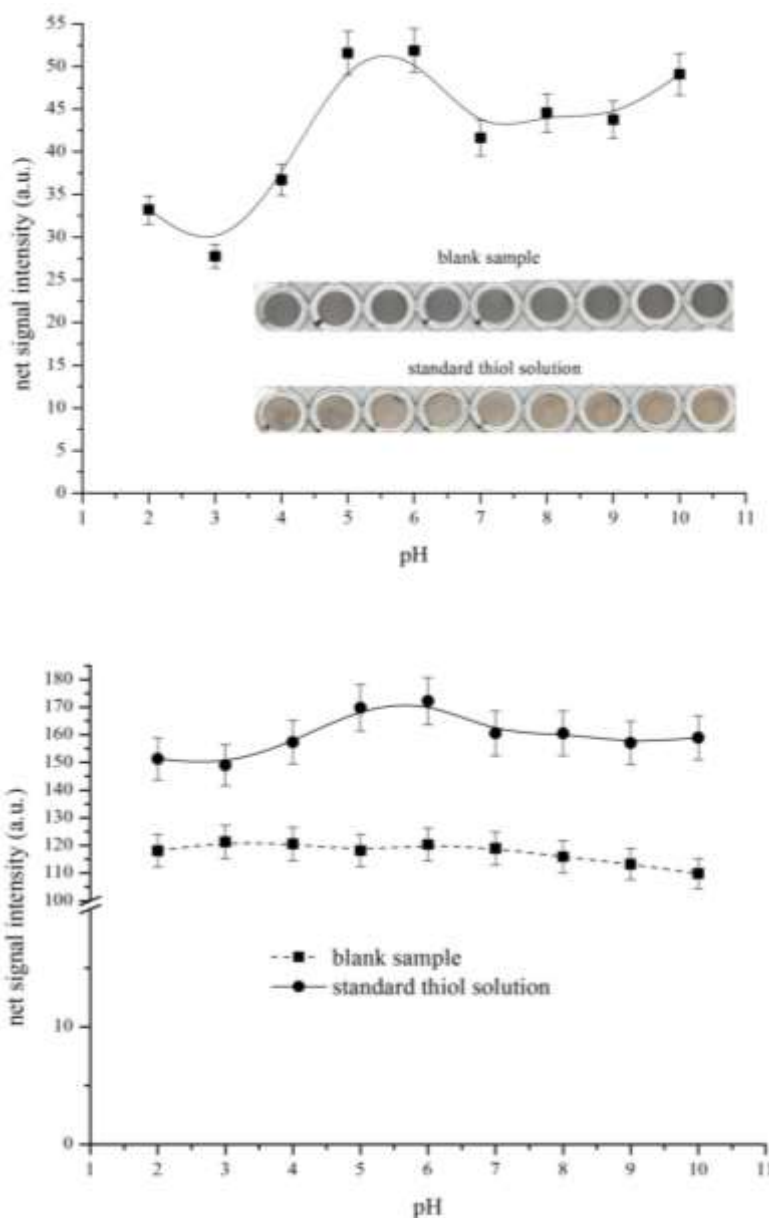


Εικόνα 1.5. Επίδραση της συγκέντρωσης δεξτρίνης στην απόκριση του καθαρού αναλυτικού σήματος της κυστεΐνης στη μέθοδο που βασίζεται σε διάλυμα.

1.3.6 Βελτιστοποίηση του pH

Δεδομένου ότι ο σχηματισμός του συμπλόκου Ag-κυστεΐνης είναι ευαίσθητος στο pH (Shen et al., 2011), ερευνήσαμε την επίδραση του pH στη φωτο-αναγωγή των αιωρημάτων AgCl παρουσία και απουσία κυστεΐνης σε περιοχή pH από 2-10 χρησιμοποιώντας ως ρυθμιστές pH αραιό οξικό οξύ και NaOH (βλέπε Εικόνα 1.6.α). Συγκρίνοντας την απόκριση σήματος του τυφλού και του δείγματος αποκαλύφθηκε ότι το σήμα που δημιουργήθηκε από το τυφλό δείγμα δεν επηρεάστηκε από το pH (βλέπε Εικόνα 1.6.β). Αυτό συμβαίνει επειδή η μεταβολή του pH δεν επηρεάζει τη διαλυτότητα του AgCl επειδή το Cl⁻ είναι το ανιόν ενός ισχυρού οξέος και ως εκ τούτου έχει αμελητέα βασικότητα. Από την άλλη πλευρά, το σήμα που ανακτάται από το δείγμα ενισχύεται σε τιμές pH μεταξύ 5-6 (βλ. Εικόνα 1.6.β)

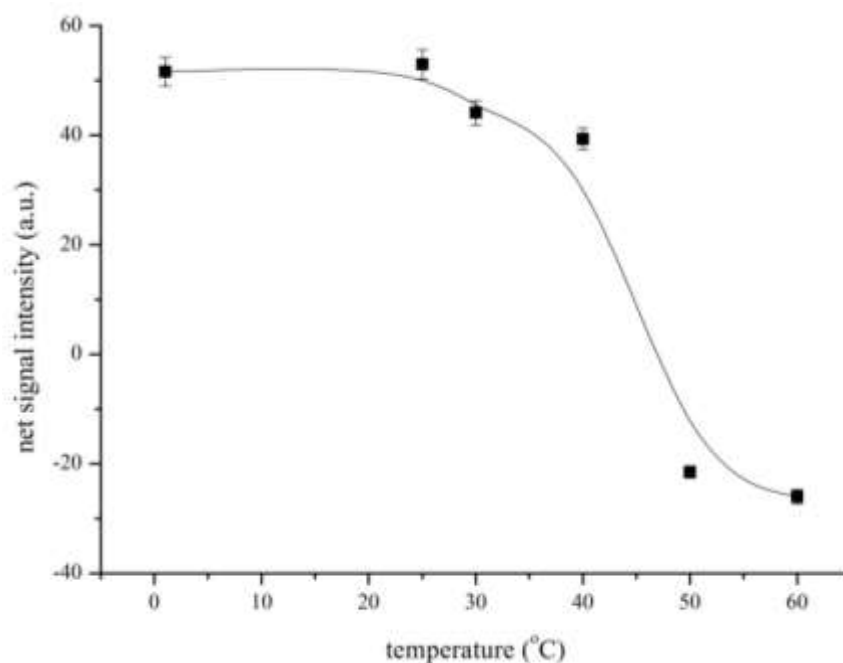
που είναι κοντά στο ισοηλεκτρικό σημείο της κυστεΐνης ($\text{pH} = 5,02$). Έχει επίσης αναφερθεί ξανά η ταχεία συμπλοκοποίηση της κυστεΐνης στα ιόντα Ag σε αυτή την περιοχή pH (Shen et al., 2011). Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις, το pH του τελικού μίγματος (μετά την προσθήκη AgNO_3) ρυθμίστηκε στην τιμή 5,6 με ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος/οξικού.



Εικόνα 1.6. (α) Επίδραση του pH στην απόκριση του καθαρού αναλυτικού σήματος της κυστεΐνης στη μέθοδο που βασίζεται σε διάλυμα. **(β)** Απόκριση σήματος που λαμβάνεται από το τυφλό δείγμα (τετράγωνο σήμα) και το πρότυπο διάλυμα θειόλης (δηλ. κυστεΐνη) (σήμα κύκλου) σε διαφορετικές τιμές pH. Οι ενσωματωμένες φωτογραφίες δείχνουν τις χρωματομετρικές μεταπτώσεις του τυφλού και των προτύπων διαλυμάτων θειόλης σε διαφορετικές τιμές pH.

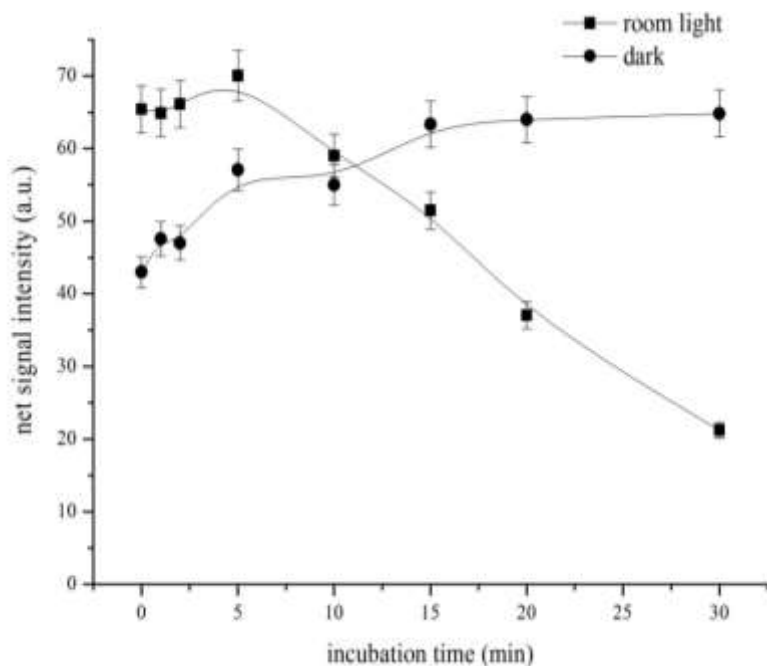
1.3.7 Βελτιστοποίηση του χρόνου επώασης και της θερμοκρασίας

Η επώαση των εναιωρημάτων AgCl και AgCl-κυστεΐνης σε διάφορες θερμοκρασίες επηρέασε σημαντικά την φωτο-αναγωγή των κρυστάλλων AgCl. Η ένταση του σήματος έφθασε στη μέγιστη τιμή του και διατηρήθηκε σταθερή σε θερμοκρασίες μεταξύ 1-25°C, ενώ στη συνέχεια μειώνονταν (βλ. Εικόνα 1.7). Ο πιθανός λόγος είναι ότι οι αυξανόμενες θερμοκρασίες ενισχύουν τόσο την ωρίμανση κατά Ostwald όσο και την ωρίμανση συνένωσης (Bjelkhagen et al., 1995, Mess et al., 1966), προωθώντας τη μεγέθυνση των κρυστάλλων AgCl. Ως εκ τούτου, η φωτοευαισθησία του τυφλού διαλύματος αυξάνεται οπότε μειώνεται το καθαρό αναλυτικό σήμα. Το φαινόμενο αυτό καθίσταται όλο και πιο σημαντικό σε υψηλότερες θερμοκρασίες ($> 50^{\circ}\text{C}$) με αποτέλεσμα τη δραματική μείωση του καθαρού αναλυτικού σήματος. Ως εκ τούτου, η μέθοδος έλαβε χώρα σε θερμοκρασία δωματίου ($20 \pm 2^{\circ}\text{C}$) η οποία είναι κατάλληλη για τη διατήρηση της ευαισθησίας της μεθόδου ενώ ταυτόχρονα συνδράμει στην απλότητα της συνολικής αναλυτικής πειραματικής πορείας.



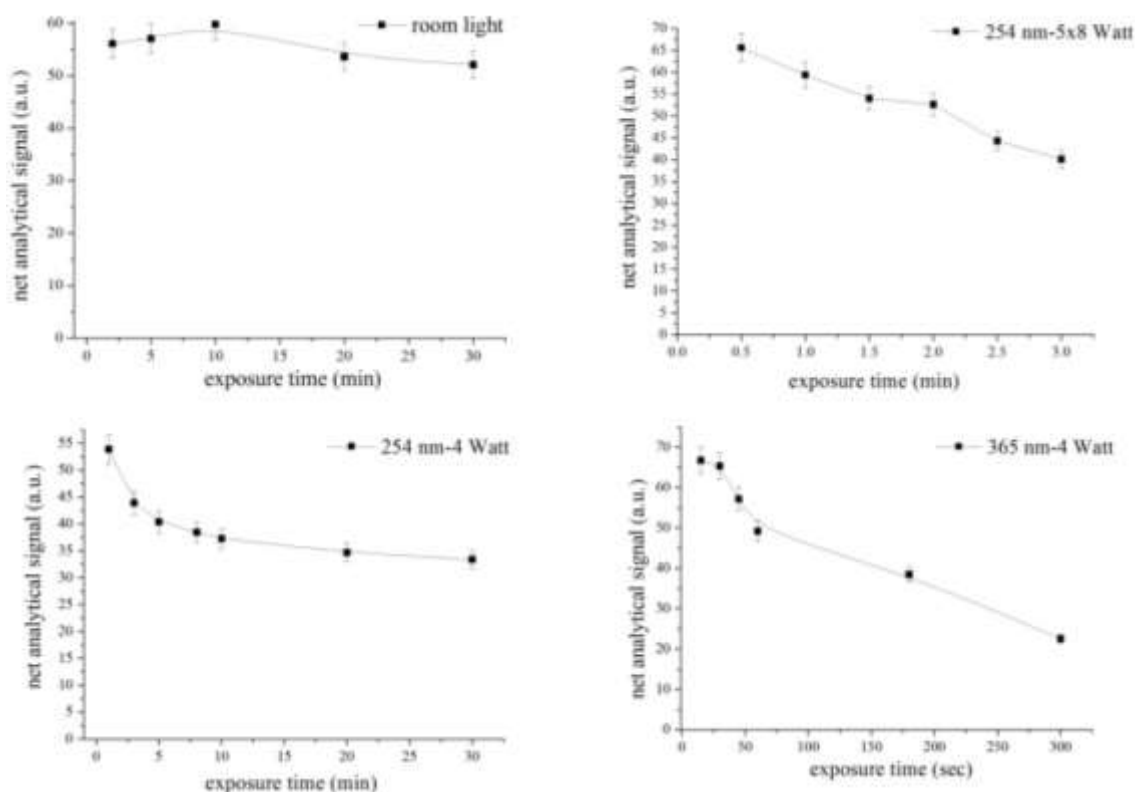
Εικόνα 1.7. Απόκριση καθαρού αναλυτικού σήματος του εναιωρήματος AgCl παρουσία κυστεΐνης με αυξανόμενη θερμοκρασία (η ρύθμιση της θερμοκρασίας έγινε κατά τη διάρκεια του χρόνου επώασης και πριν από τη φωτο-αναγωγή).

Παρατηρήσαμε επίσης ότι η ένταση του σήματος αλλάζει με τον χρόνο αντίδρασης (επώασης) πριν από την έκθεση του σε υπεριώδη ακτινοβολία. Κάτω από φως περιβάλλοντος, το σήμα παραμένει σταθερό για 5 λεπτά, αλλά μειώνεται σταδιακά σε μεγαλύτερους χρόνους επώασης (Εικόνα 1.8-τετράγωνα σύμβολα). Αυτή η μείωση αποδίδεται στην λογαριθμική αύξηση του σήματος του τυφλού, το οποίο είναι περισσότερο φωτοευαίσθητο επειδή περιέχει μεγαλύτερη ποσότητα κρυστάλλων AgCl (για τους λόγους που εξηγήθηκαν προηγουμένως). Όταν πραγματοποιήσαμε το ίδιο πείραμα στο σκοτάδι, τα σήματα του τυφλού και του δείγματος επίσης αυξήθηκαν με την πάροδο του χρόνου, πιθανώς λόγω της μεγέθυνσης των κρυστάλλων AgCl. Μετά από 20 λεπτά επώασης στο σκοτάδι, το σήμα φθάνει σε ένα πλατό υποδηλώνοντας ότι δεν λαμβάνει χώρα περαιτέρω αύξηση του μεγέθους των κρυστάλλων AgCl. Μετά από 20 λεπτά επώασης στο σκοτάδι, το σήμα φθάνει σε ένα πλατό υποδηλώνοντας ότι δεν λαμβάνει χώρα περαιτέρω αύξηση του μεγέθους των κρυστάλλων AgCl. Και τα δύο αυτά αποτελέσματα επιτρέπουν την εύκολη διαχείριση των δειγμάτων πριν την ανάλυση ανάλογα με τις ανάγκες. Αν η ανάλυση πρέπει να διεξαχθεί σε σύντομο χρονικό διάστημα (περίπου 5 λεπτά) τότε δεν απαιτούνται ειδικές προφυλάξεις. Όταν απαιτούνται μεγαλύτερες χρονικές περίοδοι, συνιστάται η αποθήκευση στο σκοτάδι για τουλάχιστον 20 λεπτά πριν από την έκθεση σε μια πηγή υπεριώδους ακτινοβολίας.



Εικόνα 1.8. Επίδραση του χρόνου επώασης (πριν από τη φωτο-ακτινοβόληση) στην απόκριση αναλυτικού σήματος του εναιωρήματος AgCl παρουσία κυστεΐνης. Πειραματικές συνθήκες: Κυστεΐνη = 135μM, AgNO₃ = 1,25mM, NaCl = 4% (β/ο), ακτινοβολία στα 4 w cm⁻² για 30 δευτερόλεπτα.

Έχοντας βελτιστοποιήσει τις πειραματικές συνθήκες, μελετήσαμε την επίδραση του χρόνου, της έντασης και του μήκους κύματος της ακτινοβολίας UV στην απόκριση του σήματος. Όπως παρατηρούμε στην Εικόνα 1.9, η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί εξίσου καλά υπό διαφορετικές συνθήκες έντασης φωτός και μήκους κύματος. Από την απόκριση του καθαρού σήματος έναντι του χρόνου έκθεσης για διαφορετικά μήκη κύματος και εντάσεις φωτός (βλ. Εικόνα 1.9) καταλήξαμε στα ακόλουθα συμπεράσματα: α) το καθαρό αναλυτικό σήμα που λαμβάνεται μετά την έκθεση του αιωρήματος AgCl σε φως δωματίου λαμβάνει τη μέγιστη έντασή εντός 10 λεπτών, ενώ στη συνέχεια μειώνεται κατά περίπου 10%, β) το καθαρό αναλυτικό σήμα που μετράται μετά την έκθεση του αιωρήματος AgCl σε οποιαδήποτε άλλη πηγή φωτός (ένταση 4W και 40W υπεριώδους ακτινοβολίας στα 254nm, ένταση 4W υπεριώδους ακτινοβολίας στα 365nm και ηλιακό φως) μειώνεται με την πάροδο του χρόνου εξαιτίας της αύξησης του τυφλού. Με βάση τα ευρήματα αυτά καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι η μέθοδος είναι επίσης εφαρμόσιμη υπό φως περιβάλλοντος (με το μειονέκτημα της απώλειας ευαισθησίας περίπου κατά 10%), χωρίς όμως την ανάγκη για εξωτερικές πηγές ενέργειας, πράγμα που είναι επωφελές για εφαρμογές στο σημείο ανάγκης, ειδικά όταν υπάρχουν ελλείψεις υποδομών και περιορισμένοι πόροι. Για τους σκοπούς αυτής της εργασίας, χρησιμοποιήσαμε θάλαμο υπεριώδους ακτινοβολίας (254nm, 40W) λόγω της σταθερής και συνεχούς εστίασης των διαλυμάτων κάτω από το υπεριώδες φως και λόγω του ταχύτερου χρόνου ανάλυσης. Ωστόσο, μερικά από τα πειράματα για την ανάλυση πραγματικών δειγμάτων διεξήχθησαν υπό φως δωματίου για σύγκριση όπως περιγράφεται παρακάτω (τμήμα 1.3.11 Εφαρμογή των μεθόδων).



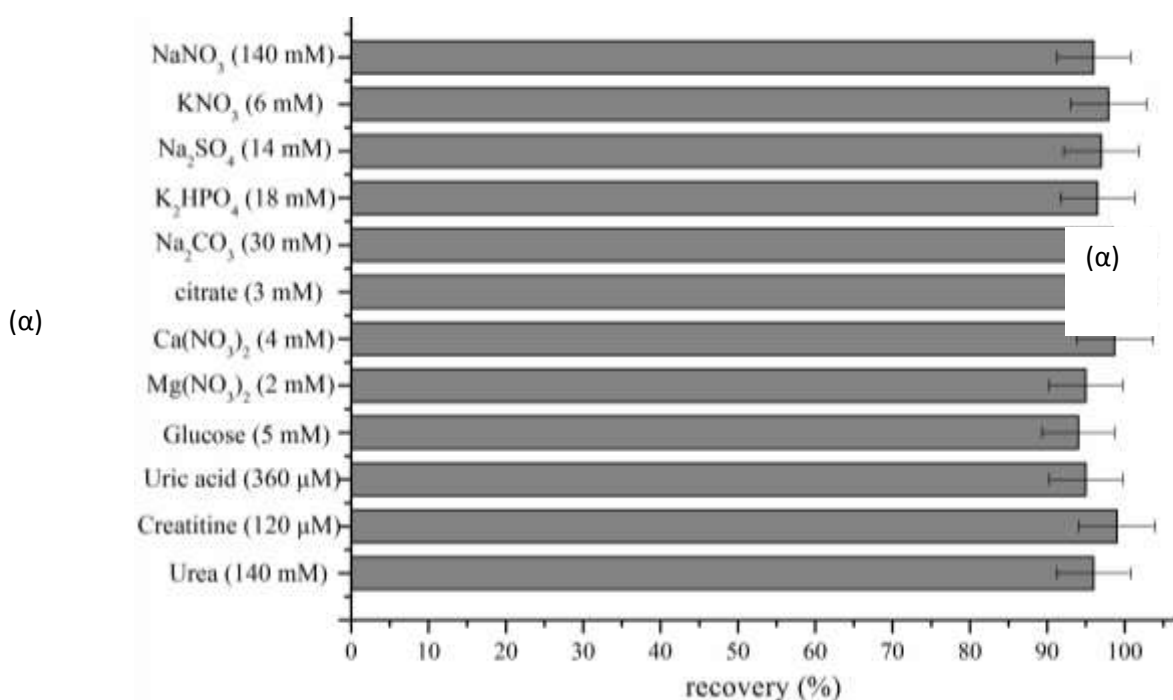
Εικόνα 1.9. Κινητική του αναλυτικού σήματος της κυστεΐνης χρησιμοποιώντας διαφορετικές πηγές ακτινοβολίας.

1.3.8 Εκλεκτικότητα

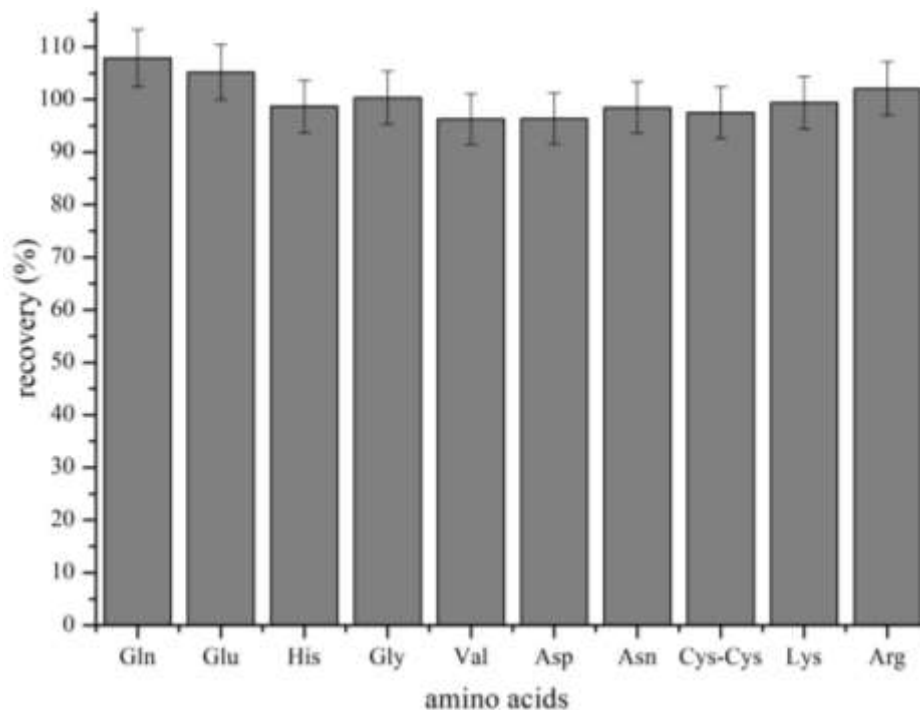
Για να προσδιοριστεί η εκλεκτικότητα των μεθόδων συγκρίναμε την αναλυτική απόκριση των βιοθειολών παρουσία και απουσία βασικών αμινοξέων, διάφορων ηλεκτρολυτών και κοινών βιομορίων υπό τις βέλτιστες πειραματικές συνθήκες. Η παρουσία ανόργανων ιόντων, όπως το κάλιο, το νάτριο, το ασβέστιο, το μαγνήσιο, τα νιτρικά, τα θειικά, τα φωσφορικά, τα ανθρακικά και τα κιτρικά καθώς και βιομόρια όπως η γλυκόζη, το ουρικό οξύ, η κρεατινίνη και η ουρία δεν επηρέασαν την ανίχνευση βιοθειολών (βλ. Εικόνα 1.10.α). Εν τούτοις, όταν αυτές οι ενώσεις υπήρχαν ως μείγματα (δηλ. σε τεχνητά ούρα και τεχνητά δείγματα πλάσματος αίματος), οι ανακτήσεις των βιοθειολών ήταν υψηλότερες από αυτές που ελήφθησαν σε απεσταγμένο νερό. Αυτή η παρεμπόδιση αποδόθηκε στην επίδραση μη κοινού ιόντος που επηρεάζει τη διαλυτότητα των κρυστάλλων AgCl καθώς και στον ανταγωνισμό άλλων ανιόντων, όπως φωσφορικών ή ανθρακικών, για το σχηματισμό αδιάλυτων αλάτων αργύρου (πχ. Ag_3PO_4 , Ag_2CO_3). Επομένως, για να μετριάσουμε

αυτή την παρεμπόδιση, εφαρμόσαμε τη μέθοδο σταθερής προσθήκης. Η μέθοδος αυτή προτιμήθηκε έναντι άλλων μεθόδων όπως η αφαλάτωση του δείγματος με εξειδικευμένες ρητίνες, διότι α) είναι η "πρότυπη" μέθοδος για την αντιμετώπιση παρεμποδίσεων από ενδογενή συστατικά του δείγματος, β) είναι εύκολα εφαρμόσιμη σε βασικές εργαστηριακές εγκαταστάσεις και γ) δεν αυξάνει το χρόνο ή το κόστος της ανάλυσης.

Οι ανακτήσεις της κυστεΐνης παρουσία άλλων αμινοξέων φαίνεται στην Εικόνα 1.10.β. Από αυτά τα αποτελέσματα γίνεται φανερό ότι τα αμινοξέα δεν παρεμποδίζουν τον προσδιορισμό της κυστεΐνης πιθανώς επειδή οι σταθερές σχηματισμού των συμπλόκων τους με ιόντα αργύρου είναι χαμηλότερες από εκείνες των ιόντων χλωρίου (Berthon et al., 1995). Έτσι, σε αντίθεση με τις βιοθειόλες, δεν μπορούν να διασπάσουν τους κρυστάλλους AgCl και να επηρεάσουν την φωτοευαισθησία του εναιωρήματος AgCl. Η γλουταμίνη ήταν το μόνο αμινοξύ που προκάλεσε ελαφρώς θετική παρεμπόδιση κατά την ανίχνευση της κυστεΐνης. Ωστόσο, η εφαρμογή της αραίωσης, προκειμένου να βρίσκονται τα επίπεδα βιοθειολών εντός της γραμμικής περιοχής της μεθόδου σε συνδυασμό με την εφαρμογή της μέθοδο σταθερής προσθήκης μπορούν να άρουν αυτή την παρεμπόδιση.



(β)



Εικόνα 1.10. α) Ανάκτηση κυστεΐνης (100,0μM) παρουσία σημαντικών ανόργανων αλάτων και βιομορίων σε συγκεντρώσεις ίσες ή υψηλότερες από τα φυσιολογικά επίπεδα στο πλάσμα αίματος και στα ούρα. Η μελέτη της παρεμπόδισης διεξήχθη με τη χρήση μιγμάτων 2 ουσιών (κυστεΐνης και παρεμβαλλόμενης ουσίας) που αραιώθηκαν 2 φορές πριν από την ανάλυση, η οποία είναι η ελάχιστη αραιώση που απαιτείται για να βρίσκονται οι συγκεντρώσεις της βιοθειόλης μέσα στο γραμμικό εύρος της μεθόδου. **(β)** Ανάκτηση κυστεΐνης (100,0μM) παρουσία 0,5mM διαφόρων κύριων αμινοξέων.

1.3.9 Βελτιστοποίηση αναγωγής του δισουλφιδικού δεσμού

Οι βιοθειόλες υπάρχουν σε βιολογικά υγρά ως ελεύθερες ανηγμένες, ελεύθερες οξειδωμένες καθώς και σε μορφές που είναι συνδεδεμένες με πρωτεΐνες. Συνεπώς, ένα κρίσιμο βήμα στον προσδιορισμό των ελεύθερων βιοθειολών είναι η αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών, προκειμένου να μετασχηματιστούν στην ελεύθερη ανηγμένη μορφή. Για τον σκοπό αυτό επιλέχθηκε το TCEP, επειδή είναι ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος αναγωγικός παράγοντας. Αυτό συμβαίνει επειδή προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα: είναι άοσμο, έχει καλή υδατοδιαλυτότητα, είναι σταθερό σε υδατικά διαλύματα, είναι πολύ αποτελεσματικό στην αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών ακόμα και σε χαμηλό pH και δεν περιέχει τμήματα θειόλης που θα μπορούσαν να αλληλεπιδράσουν με ιόντα Ag (Seiwert et al., 2007). Παρατηρήσαμε ότι το TCEP μπορεί να γίνει ανεκτό χωρίς αναγωγή των κρυστάλλων AgCl σε συγκεντρώσεις ίσες ή χαμηλότερες από 0,3mM. Ως εκ τούτου, ρυθμίσαμε τη συγκέντρωση του TCEP με αραιώση. Συγκεκριμένα, τα δείγματα (μετά την καθίζηση πρωτεΐνης) αρχικά αναμείχθηκαν με TCEP. Πριν από την προσθήκη ιόντων Ag⁺, τα δείγματα αραιώθηκαν όπως είναι κατάλληλο προκειμένου η συγκέντρωση του TCEP να γίνει χαμηλότερη ή ίση με 0,3mM στο τελικό διάλυμα. Με τον τρόπο αυτό, οι συγκεντρώσεις των βιοθειολών αραιώθηκαν επίσης εντός της γραμμικής περιοχής των μεθόδων. Όταν πρέπει να χρησιμοποιηθούν μη αραιωμένα δείγματα, προτείνουμε την επώαση των δειγμάτων με την βέλτιστη συγκέντρωση TCEP για μεγαλύτερους χρόνους.

1.3.10 Αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου

Στον Πίνακα 1.2 συνοψίζονται οι συναρτήσεις βαθμονόμησης, η γραμμικότητα, η ακρίβεια και τα όρια ανίχνευσης (DLs) για την ανίχνευση Cys, Hcy και GSH. Όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε, οι καμπύλες αναφοράς έχουν γραμμικό και μη γραμμικό εύρος. Συγκεκριμένα, τα διαγράμματα βαθμονόμησης (ΔS έναντι C) κυστεΐνης και γλουταθειόνης ήταν λογαριθμικά σε μια περιοχή συγκεντρώσεων από 10 έως 325μM και γραμμικά σε ένα εύρος μεταξύ συγκεντρώσεων 10-100μM. Για την ομοκυστεΐνη η καμπύλη αναφοράς ήταν λογαριθμική σε ένα εύρος συγκεντρώσεων από 5 έως 200μM και γραμμική σε

συγκεντρώσεις μεταξύ 5-100μM. Η μη γραμμική περιοχή των καμπυλών αναφοράς μπορεί να οφείλεται στον κορεσμό χρώματος της ανάλυσης, στη χαμηλή αναλυτική ικανότητα του ανιχνευτή (δηλ. στον αισθητήρα CCD) σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, στη μη γραμμικότητα του ανιχνευτή ή σε συνδυασμό όλων αυτών των παραγόντων (Christodouleas et al., 2015). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα δείγματα που βρίσκονται είτε στο μη γραμμικό είτε στο γραμμικό εύρος της ανάλυσης, καλύπτουν το εύρος των φυσιολογικών επιπέδων των βιοθειολών σε βιολογικά ρευστά (Hakuma et al., 2014). Είναι επίσης σημαντικό ότι οι χρωματομετρικές μεταπτώσεις που προκαλούνται από τις βιοθειόλες είναι εύκολα αντιληπτές ακόμη και δια γυμνού οφθαλμού (Πίνακας 1.2 – ενσωματωμένες φωτογραφίες).

Πίνακας 1.2. Αναλυτικά στοιχεία για την αξία της ανάλυσης^α.

Μέθοδος	Κυστεΐνη			Γλουταθειόνη			Ομοκυστεΐνη		
	Περιοχή βαθμονόμησης (μΜ)	Συνάρτηση βαθμονόμησης	RSD (%) n=9	Περιοχή βαθμονόμησης (μΜ)	Συνάρτηση βαθμονόμησης	RSD (%) n=9	Περιοχή βαθμονόμησης (μΜ)	Συνάρτηση βαθμονόμησης	RSD (%) n=9
	Μη-γραμμική: 10-325	$y=16.37x^{0.275}$ R ² =0.9788	6.7	Μη-γραμμική: 10-325	$y=13.73x^{0.248}$ R ² =0.9836	8.8	Μη-γραμμική: 10-200	$y=3.342x^{0.642}$ R ² =0.9900	7.4
	Γραμμική: 10-100	$y=0.28x+30.0$ R ² =0.9894		Γραμμική: 10-100	$y=0.17x+26.2$ R ² =0.9880		Γραμμική: 10-100	$y=0.62x+9.61$ R ² =0.9911	
	LOD=8.1 μΜ			LOD=9.8 μΜ			LOD=9.0 μΜ		
									

^αLOD ορίζεται ως τριπλάσιος λόγος σήματος προς θόρυβο (3S/N). Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των καμπυλών αναφοράς ήταν 0,10,20,30,40,65,80,100,150,250,325μM για Cys και GSH και 0,10, 20,30,40,60,80,100,150,200μM για Hcy. Η σχετική τυπική απόκλιση (RSD,%) υπολογίστηκε από εννέα αντίγραφα στα 50.0μM για κάθε είδος θειόλης.

Η επαναληψιμότητα (ως σχετική τυπική απόκλιση) για εννέα μετρήσεις σε συγκέντρωση 50μM κυστεΐνης, γλουταθειόνης ή ομοκυστεΐνης κυμαίνεται από 6,7% έως 8,8%. Τα όρια ανίχνευσης για Cys, Hcy και GSH, υπολογιζόμενα από τη γραμμική συνάρτηση βαθμονόμησης ως το τριπλάσιο του λόγου σήματος προς θόρυβο (3S/N), ήταν κοντά στα 10μM για όλα τα είδη βιοθειολών. Αυτά τα όρια ανίχνευσης είναι συγκρίσιμα ή υψηλότερα από άλλες μεθόδους που χρησιμοποιούν χρωματομετρικούς αισθητήρες με βάση νανοσωματίδια ή χρωμοφόρους οργανικούς υποκαταστάτες (Peng et al., 2012, Huang et al., 2010, Durocher et al., 2009, Xiao et al., 2011, Wang et al., 2008, Chen et al., 2004, Chen et al., 2012, Wang et al., 2010, Xiao et al., 2012). Ωστόσο, είναι πολύ κάτω από τη συγκέντρωση των συνολικών βιοθειολών σε βιολογικά υγρά (Hakuma et al., 2014, Peng et al., 2012), ενώ η συνολική αναλυτική διαδικασία είναι εύκολο να εκτελεστεί, δεν απαιτεί νέα υλικά ή αντιδραστήρια και χρησιμοποιεί ως ανιχνευτή ένα απλό σαρωτή γραφείου.

1.3.11 Εφαρμογή της μεθόδου

Η δυνατότητα εφαρμογής της μεθόδου αξιολογήθηκε σε δείγματα τεχνητών ούρων και τεχνητών πλασμάτων αίματος, εμπλουτισμένα με δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις κυστεΐνης, καθώς και σε πραγματικά δείγματα πλάσματος αίματος. Τα αποτελέσματα από την ανάλυση των εμβολιασμένων δειγμάτων παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.3 και δείχνουν ότι έχουν επιτευχθεί ανακτήσεις από 91,5 έως 97,2%, με ακτινοβολία UV αποδεικνύοντας την ακρίβεια της μεθόδου και την καταλληλότητά της για ανάλυσεις ρουτίνας. Εξετάσαμε επίσης την αποτελεσματικότητα της μεθόδου υπό φως δωματίου και συγκρίναμε τα αποτελέσματα με αυτά που ελήφθησαν υπό υπεριώδες φως. Σύμφωνα με το κριτήριο t, δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται με τις δύο μεθόδους φωτισμού σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95%. Συνεπώς, καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι η ανάλυση μπορεί να γίνει χωρίς τεχνητές πηγές ακτινοβολίας. Επιπλέον, δεδομένου ότι η ανάλυση πραγματοποιείται με βαθμονόμηση σταθερής προσθήκης, οποιαδήποτε μεταβολή στις συνθήκες φωτισμού του περιβάλλοντος δεν επηρεάζει την ακρίβεια των αποτελεσμάτων, επειδή οι συνθήκες φωτισμού των εμβολιασμένων διαλυμάτων ταιριάζουν με τις συνθήκες φωτισμού του δείγματος.

Πίνακας 1.3. Προσδιορισμός και ανάκτηση βιοθειολών σε πραγματικά και ενισχυμένα δείγματα.

	Προσδιορίστηκε (μM) ^a	Εμβολιάστηκε (μM)	Βρέθηκε (μM)	Ανακτήσεις (%)
Τεχνητά ούρα	-	20.0	18.3 $\pm$ 1.8	91.5 $\pm$ 8.7
		50.0	46.9 $\pm$ 2.9 (47.6 $\pm$ 3.5) ^b	93.8 $\pm$ 5.8 (95.2 $\pm$ 7.0)
Τεχνητό πλάσμα αίματος	-	20.0	19.4 $\pm$ 2.0	97.2 $\pm$ 10
		50.0	95.7 $\pm$ 5.8 (92.6 $\pm$ 5.8) ^b	95.7 $\pm$ 5.8 (92.6 $\pm$ 5.8)
Πλάσμα αίματος ^b	44.2 $\pm$ 3.6	12.5	56.2 $\pm$ 4.2	96.0 $\pm$ 7.2
		25.0	67.9 $\pm$ 5.6 (67.5 $\pm$ 6.2) ^b	94.8 $\pm$ 7.8 (93.2 $\pm$ 8.5)

^a Συνολική συγκέντρωση των βιοθειολών σε 4 φορές αραιωμένο δείγμα

^b Οι τιμές σε αγκύλες ανακτήθηκαν υπό φως περιβάλλοντος

Πέραν της διαγνωστικής σημασίας των συνολικών επιπέδων βιοθειολών σε βιολογικά υγρά, οι αναλογίες ανηγμένων/οξειδωμένων βιοθειολών θεωρούνται ως δείκτης κυτταρικής υγείας και συχνά χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των θεραπευτικών αγωγών (Jung et al., 2016). Όπως παρουσιάστηκε προηγουμένως, η κυστίνη (η οξειδωμένη μορφή της κυστεΐνης) δεν δείχνει καμία παρεμπόδιση στον προσδιορισμό των βιοθειολών. Ως εκ τούτου, εκτιμήσαμε τη χρησιμότητα της μεθόδου για τον προσδιορισμό της αναλογίας μεταξύ ανηγμένων και οξειδωμένων βιοθειολών με επιφόρτιση τεχνητού πλάσματος αίματος με κυστεΐνη και κυστίνη σε προκαθορισμένες αναλογίες (100% κυστεΐνη, 50% κυστεΐνη και 50% κυστίνη και 100% κυστίνη). Ένα τμήμα του δείγματος αναλύθηκε

απευθείας ενώ ένα δεύτερο τμήμα κατεργάστηκε με TCEP για να ανάγει την κυστίνη σε κυστεΐνη. Τα αποτελέσματα που δείχνονται στον Πίνακα 1.4 καταδεικνύουν τη χρησιμότητα της μεθόδου για τον προσδιορισμό της αναλογίας μεταξύ ανηγμένων/οξειδωμένων βιοθειολών σε βιολογικά υγρά, διευρύνοντας έτσι περαιτέρω το πεδίο της προτεινόμενης μεθόδου σε διάφορες κλινικές αναλύσεις.

Πίνακας 1.4. Προσδιορισμός αναλογίας ανηγμένων/οξειδωμένων βιοθειολών σε τεχνητό πλάσμα αίματος.

	Προστέθηκε (μM)	Βρέθηκε (μM)	Βρέθηκε μετά από αναγωγή του TCEP (μM)	Ανακτήσεις (%) ^a
Κυστεΐνη /	50 / 0	48.5 $\pm$ 3.2	51.2 $\pm$ 4.2	97.0 (102.4)
Κυστίνη	50 / 50	48.0 $\pm$ 3.2	97.5 $\pm$ 7.0	96.0 (97.5)
	0 / 50	< D.L.	47.8 $\pm$ 4.0	n.d. (95.6)

^a Οι τιμές σε παρένθεση δείχνουν τις ανακτήσεις μετά την αναγωγή από το TCEP.

1.4 Συμπεράσματα

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράψαμε μια απλή και χαμηλού κόστους μέθοδο για την ανάλυση βιοθειολών σε δείγματα ούρων και πλάσμα αίματος που βασίζονται στην ικανότητα των βιοθειολών να τροποποιούν τη φωτοχημική αναγωγή των κρυστάλλων του χλωριούχου αργύρου. Αυτή η προσέγγιση έχει πολλά πλεονεκτήματα. i) είναι γρήγορη και όλα τα βήματα ανάλυσης μπορούν να εκτελεστούν εύκολα, χρησιμοποιώντας ένα απλό πρωτόκολλο ανάλυσης, ii) όλα τα αντιδραστήρια είναι εμπορικά διαθέσιμα και δεν απαιτούνται νέα υλικά, iii) δεν απαιτεί επιστημονικό εξοπλισμό. Ένας επίπεδος σαρωτής γραφείου και απλό λογισμικό επεξεργασίας εικόνας είναι οι μόνες απαιτήσεις για την λήψη του αναλυτικού αποτελέσματος διευρύνοντας έτσι τις πιθανές εφαρμογές της ανάλυσης βιοθειολών από εξιδεικευμένα εργαστήρια που χρησιμοποιούν εξειδικευμένο εξοπλισμό, σε εφαρμογές στο σημείο ανάγκης και σε εγκαταστάσεις με περιορισμένους πόρους iv) η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό τόσο της συνολικής συγκέντρωσης των βιοθειολών καθώς και της σχετικής αναλογίας των βιοθειολών (αναλογία ανηγμένων/οξειδωμένων βιοθειολών), διευρύνοντας έτσι τη χρησιμότητά της ως διαγνωστικού εργαλείου (π.χ. για την αξιολόγηση της κατάστασης της κυτταρικής υγείας). Επιπλέον, η μέθοδος θα μπορούσε να διεξαχθεί υπό το φως περιβάλλοντος χωρίς την ανάγκη εξωτερικών ή σταθερών πηγών ακτινοβολίας. Επίσης, οι χρωματομετρικές μεταπτώσεις που προκαλούνται από βιοθειόλες είναι έντονες επιτρέποντας στον τελικό χρήστη να εκτελεί ποιοτική ή ημι-ποσοτική ερμηνεία των δεδομένων δια γυμνού οφθαλμού και χωρίς ηλεκτρονικά μέσα. Επίσης, αποδείξαμε ότι η αναπτυχθείσα μέθοδος προσφέρει επαρκή ευαισθησία για τον προσδιορισμό της ολικής συγκέντρωσης ελεύθερων ανηγμένων βιοθειολών σε βιολογικά υγρά με ικανοποιητικές ανακτήσεις, επαναληψιμότητα και καλή εκλεκτικότητα.

Η μέθοδος που περιγράφηκε σε αυτή την εργασία αναπτύχθηκε χρησιμοποιώντας κρυστάλλους χλωριούχου αργύρου αφού παρήγαγαν την υψηλότερη απόκριση καθαρού αναλυτικού σήματος. Η χρήση μειγμάτων αλογονιδίων αργύρου (π.χ. AgBr / AgCl) ή η προσθήκη μη θειολικών προσθέτων, όπως χρησιμοποιούνται σε φωτογραφικά γαλακτώματα αλογονιδίων αργύρου για τη βελτίωση της ποιότητας των τυπωμένων φωτογραφιών, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τη ρύθμιση του χρόνου απόκρισης, της ευαισθησίας ή ακόμη και την ένταση χρώματος των φωτο-ανηγμένων κρυστάλλων.

Κεφάλαιο 2^ο

ΜΙΚΡΟΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ ΧΑΡΤΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΒΙΟΘΕΙΟΛΩΝ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΤΗ ΦΩΤΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΓΩΓΗ ΤΩΝ ΑΛΟΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΟΥ ΑΡΓΥΡΟΥ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφεται η ανάπτυξη μικροανλυτικών διατάξεων χάρτου για τον προσδιορισμό βιοθειολών. Οι διατάξεις που κατασκευάστηκαν είναι φθηνές (καθώς αποτελούνται μόνο από χαρτί και δυσδιάλυτα άλατα αλογονιδίων αργύρου) και η αναλυτική πορεία είναι εύκολα εκτελέσιμη με ελάχιστη τεχνική εμπειρογνωμοσύνη και χωρίς την ανάγκη εξειδικευμένου εξοπλισμού. Ο χρήστης προσθέτει το εξεταζόμενο δείγμα στην διάταξη, ακτινοβολεί την περιοχή ανίχνευσης με ακτινοβολία UV και καταγράφει την αλλαγή χρώματος της περιοχής ανίχνευσης χρησιμοποιώντας μια απλή διάταξη απεικόνισης (όπως κάμερα κινητού τηλεφώνου) ή δια γυμνού οφθαλμού. Ο μηχανισμός ανίχνευσης των βιοθειολών βασίζεται στην φωτοδιέγερση που προκαλούν οι βιοθειόλες στους νανοκρυστάλλους χλωριούχου αργύρου που έχουν εναποτεθεί στην επιφάνεια του χαρτιού. Τα φωτοανηγμένα σωματίδια χλωριούχου αργύρου έχουν γκριζωπό χρώμα η έντασης του οποίου που εξαρτάται από τη συγκέντρωση των βιοθειολών στο εξεταζόμενο διάλυμα. Οι διατάξεις δοκιμάστηκαν για την ανίχνευση της συνολικής συγκέντρωσης των βιοθειολών σε δείγματα τεχνητών βιολογικών υγρών καθώς και πλάσματος ανθρώπινου αίματος και τα αποτελέσματα ήταν ικανοποιητικά όσον αφορά την ευαισθησία, την εκλεκτικότητα, τις ανακτήσεις και την επαναληψιμότητα.

2.1 Εισαγωγή

Οι αναλυτικές διατάξεις χάρτου αποτελούν μια ιδιαίτερα ελκυστική πλατφόρμα ανάλυσης για φορητές αναλύσεις χαμηλού κόστους που μπορούν να πραγματοποιηθούν με ελάχιστους πόρους και παρέχουν γρήγορα αποτελέσματα. Από την πρώτη περιγραφή της χρήσης τους το 2007 από τον καθηγητή Γ. Whitesides και τους συνεργάτες του (Martinez et al., 2007), αρκετές ερευνητικές ομάδες έχουν δοκιμάσει πολλές αναλυτικές μεθόδους σε χαρτί και ανέπτυξαν αρκετές πλήρως λειτουργικές διατάξεις χαρτιού για τον προσδιορισμό μιας ευρείας ποικιλίας αναλυτών περιβαλλοντικού, βιοχημικού και διατροφικού ενδιαφέροντος (Ornatska et al., 2011, Vella et al., 2012, Renault et al., 2013, Schonhorn et al., 2014, Rattanarat et al., 2014, Giokas et al., 2014, Hamedi et al., 2016, Badu-Tawiah et al., 2015, Choleva et al., 2015, Kappi et al., 2017, Verma et al., 2018). Σε όλες σχεδόν τις μεθόδους που βασίζονται στο χαρτί, τα απαραίτητα αντιδραστήρια αποθηκεύονται στεγνά στην επιφάνεια του χαρτιού και ενυδατώνονται από τον διαλύτη του δείγματος (δηλ. νερό) κατά τη διάρκεια της ανάλυσης. Επομένως, οι περισσότεροι μηχανισμοί ανίχνευσης στις διατάξεις χαρτιού είναι ομοιογενείς χημικές αντιδράσεις μεταξύ του αναλύτη-στόχου και των χρωμοφόρων μορίων (ιχνηθετών) (Morbioli et al., 2017, Yetisen et al., 2013).

Σε αυτή την εργασία, αναφέρουμε μία μέθοδο που βασίζεται σε χαρτί, για τον προσδιορισμό των συνολικών βιοθειολών η οποία βασίζεται σε μια ετερογενή χημική αντίδραση μεταξύ των βιοθειολών και ακινητοποιημένων στην επιφάνεια του χαρτιού νανοκρυστάλλων αλογονιδίων του αργύρου. Παρατηρήσαμε ότι οι βιοθειόλες ενισχύουν, μετά από ακτινοβολία UV, τη φωτοαναγωγή των κρυστάλλων των αλογονιδίων του αργύρου οδηγώντας στην εμφάνιση ενός γκριζωπού χρώματος στην επιφάνεια του χαρτιού. Με βάση αυτή την παρατήρηση, εκμεταλλευτήκαμε για πρώτη φορά την φωτοδιέγερση που προκαλούν οι βιοθειόλες στα αλογονίδια του αργύρου για αναλυτικούς σκοπούς κατασκευάζοντας αναλυτικές διατάξεις από χαρτί. Οι διατάξεις αυτές είναι φθηνές (αποτελούνται από χαρτί και αλογονίδια του αργύρου) και η αναλυτική πορεία είναι εύκολα εκτελέσιμη με ελάχιστη τεχνική εμπειρογνωμοσύνη και χωρίς την ανάγκη εξειδικευμένου εξοπλισμού.

2.2 Υλικά και μέθοδοι

2.2.1 Χημικές ουσίες και υλικά

Τα αντιδραστήρια αργινίνη, ασπαραγίνη, ασπαρτικό οξύ, L-κυστεΐνη, κυστίνη, DL-ομοκυστεΐνη, γλουταμίνη, γλουταμικό οξύ, χλωριούχο αμμώνιο, γαλακτικό οξύ, θειϊκό μαγνήσιο, εξάενδρο χλωριούχο μαγνήσιο, χλωριούχο νάτριο, θειϊκό νάτριο, διττανθρακικό νάτριο, βρωμιούχο νάτριο, ιωδιούχο νάτριο, οξικό νάτριο, όξινο φωσφορικό κάλιο, δισόξινο φωσφορικό κάλιο, κιτρικό οξύ, χλωριούχο κάλιο, χλωριούχο ασβέστιο αφυδατωμένο, ουρικό οξύ, D(+)-γλυκόζη, κρεατινίνη και παγόμορφο οξικό οξύ ελήφθησαν από τη Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Τα αντιδραστήρια L-γλουταθειόνη (ανηγμένη μορφή), AgNO_3 (>99%) και τρις(2-καρβοξυαιθυλ) υδροχλωρική φωσφίνη (TCEP, 95%, 0.5M) ελήφθησαν από την Alpha Aesar (Karlsruhe, Γερμανία). Τα αμινοξέα γλυκίνη (Gly), ιστιδίνη (His), λυσίνη (Lys) και Valine (Val) ελήφθησαν από την Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Germany). Τέλος, η ουρία (> 99,5%) αγοράστηκε από την Pharmacia Biotech AB (Uppsala, Sweden) και το ακετονιτρίλιο βαθμού HPLC από την Fischer Scientific (Loughborough, UK). Όλα τα αντιδραστήρια ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας. Οι διατάξεις χαρτιού παρασκευάστηκαν σε χαρτί χρωματογραφίας Whatman No. 1.

2.2.2 Εξοπλισμός

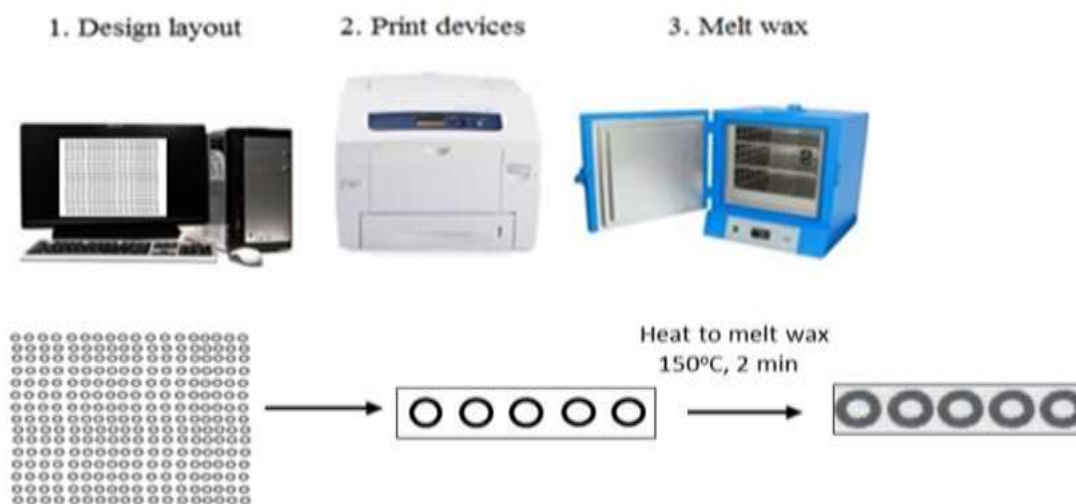
Χρησιμοποιήσαμε ένα θάλαμο ακτινοβολήσης UV (Vilber Lourmat Bio-Link® BLX Crosslinker) (4W cm^{-2}) για την ακτινοβολήση με υπεριώδη ακτινοβολία (254 nm) των περιοχών ανίχνευσης των διατάξεων χαρτιού. Ο θάλαμος εξασφαλίζει σταθερή και ελεγχόμενη έκθεση των περιοχών ανίχνευσης των διατάξεων στο υπεριώδες φως σε όλα τα πειράματα. Χρησιμοποιήσαμε σαρωτή επίπεδης επιφάνειας (PerfectionV550 Photo, Epson) σε κατάσταση ανάκλασης για τη λήψη εικόνων των διατάξεων πριν και μετά την ανάλυση.

2.3 Πειραματικές πορείες

2.3.1 Κατασκευή διατάξεων χαρτιού

Ο όρος διάταξη χρησιμοποιείται εδώ για να περιγράψει μια σειρά ξεχωριστών, κυκλικών ζωνών ανίχνευσης που εκτυπώνονται διαδοχικά. Σχεδιάσαμε τις διατάξεις σε κυκλικό σχήμα και λευκό φόντο στο Adobe Illustrator και τις εκτυπώσαμε σε χαρτί (Whatman No.1 Χρωματογραφικό χαρτί) χρησιμοποιώντας εκτυπωτή στερεάς μελάνης (ColorQube 8580DN, Xerox). Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας εκτύπωσης, το μελάνι με βάση το κερί αποτίθεται στην επιφάνεια του χαρτιού. Για να λιώσει το μελάνι και να σχηματιστεί η περιοχή ανίχνευσης, θερμάναμε τις διατάξεις σε ένα φούρνο στους 150 ± 5 °C για 120 δευτερόλεπτα (Εικόνα 2.1). Έτσι, το μελάνι κερνού λιώνει και διεισδύει στο χαρτί απομονώνοντας με αυτό τον τρόπο την περιοχή ανίχνευσης (Carrilho et al., 2009). Μετά την θέρμανση οι διατάξεις είχαν διάμετρο 0,80 cm και αποτελούνταν από μία εσωτερική περιοχή (δηλ. τη ζώνη ανίχνευσης) με διάμετρο 0,40 cm, η οποία είναι απομονωμένη με ένα φράγμα κεριού πάχους 0,20 cm στον άξονα y και ένα φράγμα από κερί πάχους 0.18 mm (δηλ. το πάχος του χαρτιού) στο άξονα z.

Στο κέντρο της ζώνης ανίχνευσης, προσθέσαμε πρώτα 2μL AgNO_3 συγκέντρωσης 50mM τα οποία ξηράθηκαν υπό ρεύμα θερμού αέρα. Στη συνέχεια, προσθέσαμε 2μL οξικού οξέος συγκέντρωσης 0,1 M και 2μL NaCl συγκέντρωσης 80mM. Μεταξύ κάθε προσθήκης αντιδραστηρίου, οι διατάξεις ξηράθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου προστατευμένες από την έκθεση στο φως (για περίπου 5-6 λεπτά). Αποθηκεύσαμε τις διατάξεις αεροστεγώς στο ψυγείο (4 °C) μέσα σε πλαστικές σακούλες, καλυμμένες με αλουμινόχαρτο και πακέτα silica gel για την απορρόφηση της υγρασίας. Οι διατάξεις πριν τη χρήση, επώστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (προστατευμένες από έκθεση σε φως) για 10 λεπτά.



Εικόνα 2.1. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας κατασκευής των διατάξεων χαρτιού και φωτογραφίες των διατάξεων χαρτιού.

2.3.2 Δείγματα

Δείγμα τεχνητών ούρων (artificial urine sample-AUS) παρασκευάστηκε ως εξής (Brooks et al., 1997): Αναμείξαμε 1,1mM γαλακτικό οξύ, 2,0mM κιτρικό οξύ, 25,0mM διττανθρακικό νάτριο, 170,0mM ουρία, 2,5mM χλωριούχο ασβέστιο, 90,0mM χλωριούχο νάτριο, 2,0mM θεικό μαγνήσιο, 10,0mM θεικό νάτριο, 7,0mM δισόξινο φωσφορικό κάλιο, 7,0mM δι-υδροξυ φωσφορικό κάλιο και 25,0mM χλωριούχο αμμώνιο σε απεσταγμένο νερό και ρυθμίσαμε το pH στην τιμή 6.0. Στη συνέχεια προσθέσαμε ένα μείγμα μερικών από τα πιο κοινά αμινοξέα που βρίσκονται στα ούρα (0,5mM από γλουταμίνη, γλουταμικό οξύ, γλυκίνη, βαλίνη, αργινίνη και αλανίνη, συνολικής συγκέντρωσης 3,0mM) και εμβολιάσαμε το τεχνητό διάλυμα ούρων με πρότυπα διαλύματα βιοθειολών.

Διαλύματα τεχνητού πλάσματος αίματος (ABP) παρασκευάστηκε ως εξής (Liu et al., 2006): Αναμείξαμε 137,5mM χλωριούχο νάτριο, 4,2mM όξινο ανθρακικό νάτριο, 3,0mM χλωριούχο κάλιο, 0,5mM δισόξινο φωσφορικό νάτριο, 0,5mM χλωριούχο μαγνήσιο, 2,64mM χλωριούχο ασβέστιο και 0,5mM θεικό νάτριο σε απεσταγμένο νερό και ρυθμίσαμε το pH στην τιμή 7.4. Στη συνέχεια προσθέσαμε γλυκόζη (5mM), ουρία (3.0mM), ουρικό οξύ (220μM) και ένα μείγμα από τα πιο κοινά αμινοξέα που βρίσκονται στο πλάσμα αίματος (0,5mM γλουταμίνης, γλυκίνης,

βαλίνης, αργινίνης, λυσίνης και αλανίνης, συνολικής συγκέντρωσης 3,0mM) και εμβολιάσαμε το διάλυμα τεχνητού πλάσματος αίματος με πρότυπα διαλύματα βιοθειολών.

Δείγματα πλάσματος αίματος ελήφθησαν διαχωρίζοντας το πλάσμα αίματος από το αίμα υγριών εθελοντών δοτών. Το πλάσμα αίματος κατεργάστηκε σύμφωνα με προηγούμενη αναφορά (Chang et al., 2010) με μερικές τροποποιήσεις. Αρχικά, κατεργάστηκαν 500μL πλάσματος αίματος με 25μL TCEP 0.05M και αναδεύτηκαν για 15 δευτερόλεπτα. Μετά από επώαση 30 λεπτών (με ενδιάμεση ανάμιξη) οι πρωτεΐνες καταβυθίστηκαν από το πλάσμα με ακετονιτρίλιο (Blanchard et al., 1981) με φυγοκέντρηση στα 12000rpm (10000g) για 10 λεπτά. Για μελέτες ανάκτησης, οι βιοθειόλες προστέθηκαν μετά την καθίζηση των πρωτεϊνών.

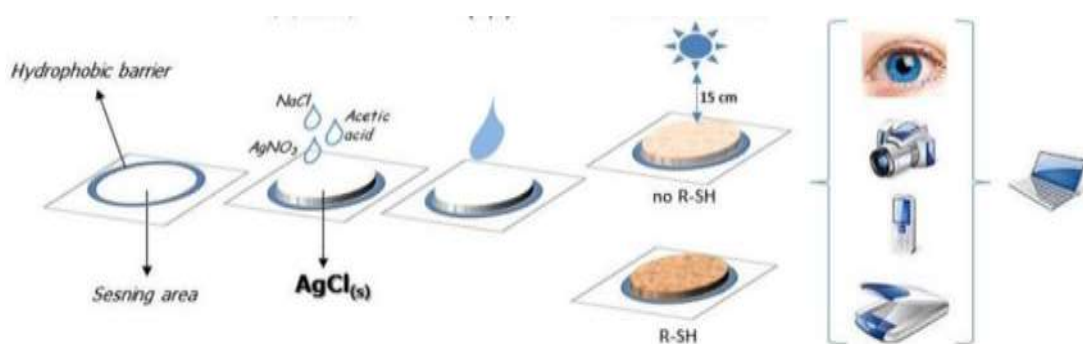
Για την ανάλυση πραγματικών δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκε όγκος δείγματος 500μL και αραιώθηκε με 150mM NaNO₃. Ένα κλάσμα 2μL από αυτό το διάλυμα χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση.

2.3.3 Ανίχνευση βιοθειολών σε αναλυτικές διατάξεις χάρτου

Η διαδικασία προετοιμασίας των διατάξεων και η χρήση τους αναπαρίστανται στην Εικόνα 2.2. Για την ανάλυση, τοποθετήσαμε στην περιοχή ανίχνευσης των διατάξεων 2,0μL του δείγματος (δηλ. πρότυπο διάλυμα βιοθειολών εμποτισμένο ή τεχνητά ούρα, ή τεχνητό πλάσμα αίματος, ή πλάσμα αίματος). Οι διατάξεις στη συνέχεια ξηράθηκαν σε συνθήκες περιβάλλοντος στο σκοτάδι και ακτινοβολήθηκαν στα 254nm για 25 δευτερόλεπτα μέσα σε θάλαμο έκθεσης υπεριώδους ακτινοβολίας σε απόσταση 15cm από την πηγή UV. Η περιοχή ανίχνευσης εμφάνισε ένα γκρι χρωματισμό ενδεικτικό της παρουσίας βιοθειολών στο εξεταζόμενο δείγμα. Εικόνες των διατάξεων ελήφθησαν χρησιμοποιώντας έναν επίπεδο σαρωτή σε λειτουργία ανακλαστικής σάρωσης (reflectance scanning) αφού πρώτα είχαμε απενεργοποιήσει όλες τις λειτουργίες αυτόματης διόρθωσης της ποιότητας της εικόνας του λογισμικού του σαρωτή (Easy Photo Scan, v.1.00.08, Epson). Αποθηκεύσαμε όλες οι εικόνες ως αρχεία Joint JPEG Group (JPEG) στο ανάλυση 300dpi.

Για τον υπολογισμό του αναλυτικού σήματος (μέση τιμή της έντασης του γκριζού χρώματος της περιοχής ανίχνευσης), χρησιμοποιήσαμε το λογισμικό Image J (US National Institutes of Health). Για να αποφύγουμε προβλήματα

επαναληψιμότητας λόγω πιθανής επίδρασης φαινομένων διασποράς των αντιδραστηρίων (coffee ring effect), μετρήσαμε τη μέση ένταση του γκρι χρώματος σε μια σταθερή κυκλική περιοχή διαμέτρου 0,32cm. Αυτή η περιοχή αντιπροσωπεύει το 80% της συνολικής επιφάνειας (δηλ. 0,4cm) της ζώνης ανίχνευσης. Η μέτρηση της έντασης του χρώματος στις ζώνες ανίχνευσης έγινε στις αρχικές εικόνες χωρίς καμία επεξεργασία εικόνας.



Προετοιμασία

Χρήση

Ανάγνωση μετρήσεων

Εικόνα 2.2. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας παρασκευής και χρήσης των διατάξεων χαρτιού για τον προσδιορισμό των βιοθειολών.

2.3.4 Δοκιμές σταθερότητας

Προετοιμάσαμε διατάξεις σύμφωνα με την μεθοδολογία που αναφέρθηκε ανωτέρω και τις σφραγίσαμε αεροστεγώς σε πλαστικές σακούλες υπό διαφορετικές συνθήκες: σε θερμοκρασία δωματίου, στους 4°C, σε συνθήκες υγρασίας περιβάλλοντος, σε συνθήκες σχεδόν μηδενικής υγρασίας (χρησιμοποιώντας πακέτα silica gel που απορροφούν την υγρασία), σε ατμοσφαιρικό αέρα και σε υψηλής καθαρότητας άζωτο. Όλες οι διατάξεις ήταν προστατευμένες από το φως για να αποφευχθεί η φωτοαναγωγή ή η φωτοευαισθητοποίηση των κρυστάλλων AgCl. Μετά από περίοδο αποθήκευσης ενός μήνα, επώασαμε τις διατάξεις σε συνθήκες περιβάλλοντος (προστατευμένες από το φως) για 10 λεπτά και στη συνέχεια προσθέσαμε ένα πρότυπο διάλυμα 100μM κυστεΐνης. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν

με εκείνα που λήφθηκαν από πρόσφατα προετοιμασμένες διατάξεις που προετοιμάστηκαν την ίδια ημέρα.

Για να εξετάσουμε εάν τα αποτελέσματα της ανάλυσης επηρεάζονται από περιβαλλοντικές συνθήκες, μελετήσαμε την απόδοση των διατάξεων υπό διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας (8, 25 και 35 °C) και υγρασίας (25%, 50%, 80%). Τα επίπεδα θερμοκρασίας και υγρασίας ρυθμίστηκαν με έλεγχο των συνθηκών εξαερισμού και μετρήθηκαν με ψηφιακούς αισθητήρες.

2.4 Αποτελέσματα και συζήτηση

2.4.1 Ανάπτυξη της μεθόδου με βάση το χαρτί

Αρχικά, εξετάσαμε την επίδραση των βιοθειολών στην φωτοαναγωγή διαφόρων κρυστάλλων αλογονιδίων του αργύρου AgX (X: Cl, Br, I) που παρασκευάζονται επί τόπου στην επιφάνεια του χαρτιού αποθέτοντας διαδοχικά ιόντα αργύρου και το κατάλληλο άλας αλογονιδίου του νατρίου. Καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι το AgCl ήταν το πιο αποτελεσματικό αλογονίδιο αργύρου για την ανίχνευση βιοθειολών παρουσία κυστεΐνης εμφάνισαν την υψηλότερη ενίσχυση σήματος στην φωτοαναγωγή του AgCl σε σύγκριση με την φωτοαναγωγή του AgBr ή του AgI. Επίσης διερευνήσαμε την επίδραση των ακόλουθων πειραματικών παραμέτρων στο αναλυτικό σήμα ενός πρότυπου διαλύματος κυστεΐνης συγκέντρωσης 272μM: α) τις συγκεντρώσεις των AgNO₃ και NaCl (και τα δύο απαιτούνται για το σχηματισμό των κρυστάλλων AgCl), β) τη συγκέντρωση του CH₃COOH (προκειμένου να ρυθμιστεί το pH του μείγματος αντίδρασης έτσι ώστε να διευκολύνει την αντίδραση των βιοθειολών με τους κρυστάλλους AgCl), και γ) τις συνθήκες ακτινοβολίας. Καταλήξαμε ότι το βέλτιστο σήμα ελήφθη όταν α) 2μL διαλύματος AgNO₃ 50mM, 2μL CH₃COOH συγκέντρωσης 0,1M, 2μL διαλύματος NaCl συγκέντρωσης 80mM και 2μL δείγματος προστέθηκαν διαδοχικά στην περιοχή ανίχνευσης (κάθε αντιδραστήριο αφέθηκε να στεγνώσει πριν από την προσθήκη του επόμενου αντιδραστήριου) και οι διατάξεις ακτινοβολήθηκαν στα 254nm για 2 δευτερόλεπτα σε απόσταση 15cm από πηγή υπεριώδους ακτινοβολίας έντασης 40W. Παρατηρήσαμε ότι η ακτινοβολία των δειγμάτων με λάμπες υπεριώδους ακτινοβολίας ισχύος μικρότερης από 40W ή μήκη κύματος μεγαλύτερα από 254nm,

συμπεριλαμβανομένου και του ηλιακού φωτός, μπορούν να χρησιμοποιηθούν αλλά απαιτείται περισσότερος χρόνος ακτινοβολίας ενώ και τα αναλυτικά σήματα ήταν χαμηλότερα (Εικόνα 2.4). Για παράδειγμα, χρησιμοποιώντας μία λάμπα UV 4W στα 365nm χρειάστηκαν 90 δευτερόλεπτα για την απόκτηση αναλυτικού σήματος της μισής έντασης από εκείνο που αποκτήθηκε μετά από 25 δευτερόλεπτα μετά από ακτινοβολία στα 254nm με πηγή υπεριώδους ακτινοβολίας έντασης 40W.

2.4.2 Βελτιστοποίηση της μεθόδου

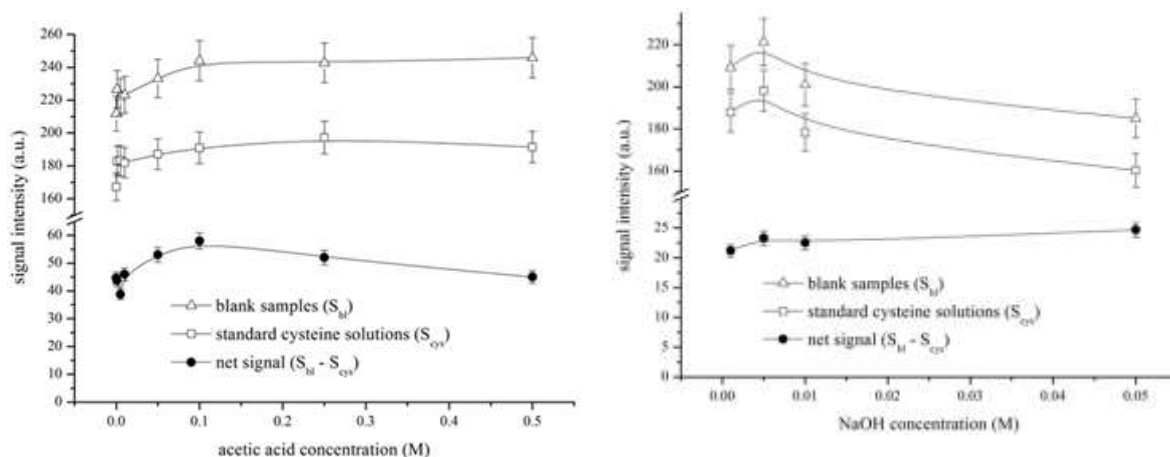
Για την βελτιστοποίηση της μεθόδου αρχικά μελετήσαμε ποια αλογονίδια του αργύρου παρουσιάζουν την υψηλότερη φωτοευαισθησία στην ακτινοβολία UV παρουσία και απουσία ενός πρότυπου διαλύματος 272μM κυστεΐνης. Τα άλατα αργύρου του χλωρίου, του βρωμίου και του ιωδίου, τα οποία παραδοσιακά χρησιμοποιούνται σε φωτογραφικά γαλακτώματα λόγω της υψηλής φωτοευαισθησίας τους (Sahvun et al., 1974), δοκιμάστηκαν με διαδοχική απόθεση και ξήρανση ενός διαλύματος AgNO_3 και του αντίστοιχου διαλύματος άλατος νατρίου (NaCl , NaBr ή NaI) στην επιφάνεια χαρτιού Whatman No.1. Οι διατάξεις στη συνέχεια ακτινοβολήθηκαν για 15 δευτερόλεπτα υπό υπεριώδες φως (254nm) και το μέγιστο καθαρό αναλυτικό σήμα χρησιμοποιήθηκε ως κριτήριο για να αποφασιστεί το καλύτερο αλογονίδιο του αργύρου. Το καθαρό αναλυτικό σήμα υπολογίστηκε αφαιρώντας την ένταση σήματος του τυφλού (απεσταγμένο νερό) από την ένταση σήματος του δείγματος (πρότυπο διάλυμα της κυστεΐνης).

Από αυτό το πείραμα παρατηρήσαμε ότι η καθαρή ένταση σήματος υπό ακτινοβολία με υπεριώδη ακτινοβολία ελαττώνονταν σύμφωνα με τη σειρά: $\text{AgCl} > \text{AgBr} > \text{AgI}$, πράγμα που σημαίνει ότι το AgCl ήταν το πιο αποτελεσματικό αλογονίδιο αργύρου για την ανίχνευση βιοθειολών με τη συγκεκριμένο μέθοδο. Η σειρά αυτή συμφωνεί με την αναφερόμενη ταχύτητα ανάπτυξης των φωτογραφικών εικόνων (James et al., 1942) και την ευαισθησία των αλογονιδίων του αργύρου στην ακτινοβολία UV (Bjelkhagen et al., 1995, Triantaphillidou et al., 2011, Marchetti et al., 1992). Συγκεκριμένα, ο χλωριούχος άργυρος φωτοανάγεται από ακτινοβολία μικρού μήκους κύματος και σχετικά υψηλή ενέργεια όπως το ορατό φως και υπεριώδες, ο βρωμιούχος άργυρος φωτοανάγεται από ακτινοβολία με σχετικά χαμηλότερη ενέργεια όπως το ορατό μπλε και ο ιωδιούχος άργυρος φωτοανάγεται από ακτινοβολία χαμηλής ενέργειας όπως το ορατό πράσινο.

Για τη βελτιστοποίηση της φωτοαναγωγής του AgCl στην επιφάνεια του χαρτιού μελετήσαμε την επίδραση της συγκέντρωσης του AgNO₃ στο καθαρό αναλυτικό σήμα με απόθεση 2,0μL ενός υδατικού διαλύματος AgNO₃ σε εύρος συγκεντρώσεων από 10 έως 200mM. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που απεικονίζονται στο Σχήμα 3, το σήμα του τυφλού (δηλαδή απουσία κυστεΐνης) παρέμεινε σχεδόν σταθερό έως 50mM AgNO₃ και ελαττώνονταν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις ενώ το σήμα που ελήφθη από το πρότυπο διάλυμα κυστεΐνης ελαττωνόταν σχεδόν γραμμικά με την αύξηση της συγκέντρωσης του AgNO₃. Το μέγιστο καθαρό αναλυτικό σήμα (η διαφορά μεταξύ του σήματος του τυφλού και του δείγματος) ελήφθη στα 50mM και επομένως χρησιμοποιήθηκε ως βέλτιστο.

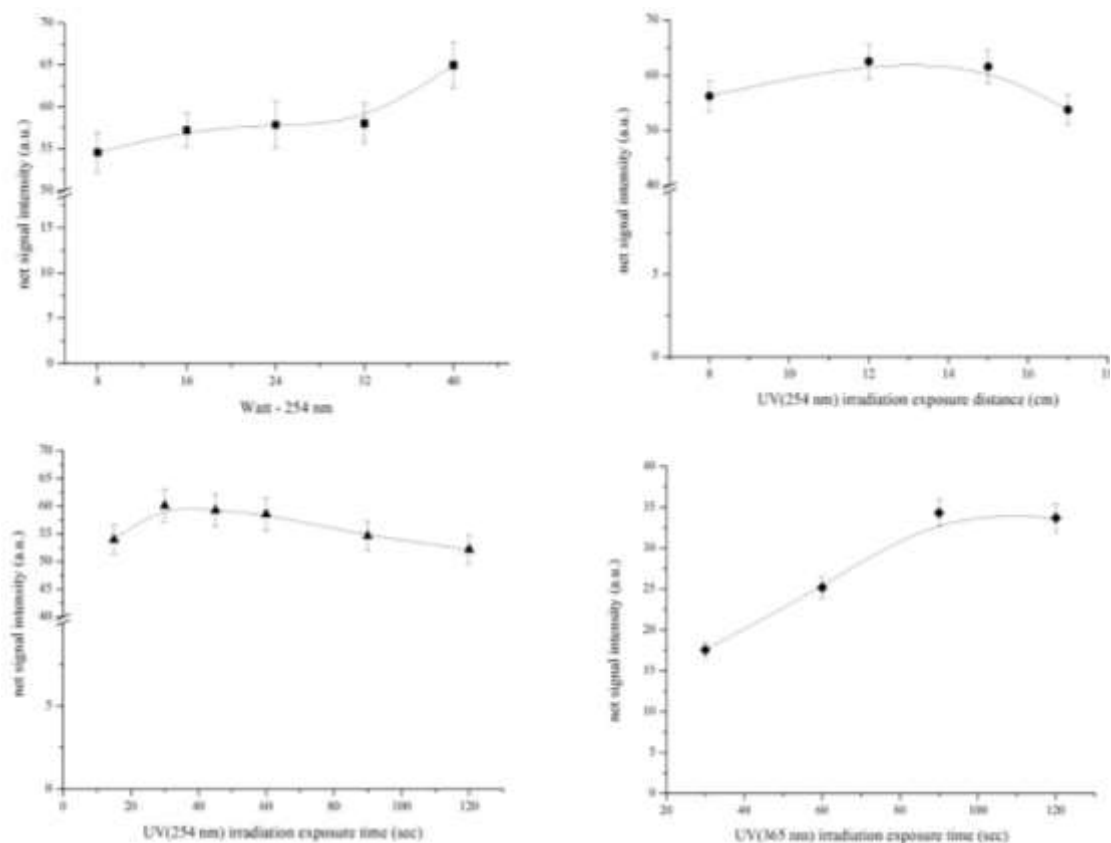
Η συγκέντρωση των ιόντων χλωρίου που προστίθενται στην επιφάνεια του χαρτιού είναι ένας σημαντικός παράγοντας στην εκτέλεση της μεθόδου καθώς ελέγχει την αφθονία και τη μορφολογία των κρυστάλλων AgCl (Mess et al., 1966, Fujita et al., 2004, Carrol et al., 1931). Μελετήθηκαν οι συγκεντρώσεις του NaCl σε ένα εύρος συγκεντρώσεων μεταξύ 10-200mM και τα υψηλότερα αναλυτικά σήματα ανακτήθηκαν όταν η συγκέντρωση του NaCl ήταν υψηλότερη από αυτή του AgNO₃. Η βέλτιστη συγκέντρωση NaCl στην επιφάνεια του χαρτιού βρέθηκε στα 80mM ενώ σε υψηλότερη συγκέντρωση το καθαρό αναλυτικό σήμα μειωνόταν κατά 15% περίπου (Εικόνα 2.3).

Καθώς ο σχηματισμός του συμπλόκου Ag- κυστεΐνης επηρεάζεται από το pH (Shen et al., 2011), μελετήσαμε την επίδραση του pH στην αντίδραση συμπλοκοποίησης μεταξύ των κρυστάλλων AgCl και των βιοθειολών, με απόθεση 2.0μL διαλυμάτων αραιού οξικού οξέος (1×10^{-4} - 0.5M) ή αραιού NaOH (1×10^{-5} - 5×10^{-2} M) πριν από την προσθήκη του δείγματος. Οι όξιμες τιμές του pH έδωσαν υψηλότερα αναλυτικά σήματα σε σύγκριση με τις αλκαλικές τιμές pH (Εικόνα 2.3). Συγκεκριμένα, το υψηλότερο αναλυτικό σήμα παρατηρήθηκε παρουσία οξικού οξέος 0,1M ενώ για συγκεντρώσεις του NaOH πάνω από 1×10^{-5} M, το αναλυτικό σήμα μειώθηκε σημαντικά (σχεδόν 50% σε σύγκριση με αυτό που αποκτήθηκε παρουσία 0,1M οξικού οξέος) (Εικόνα 2.3). Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις, για τη ρύθμιση του pH χρησιμοποιήθηκε 0,1M CH₃COOH.

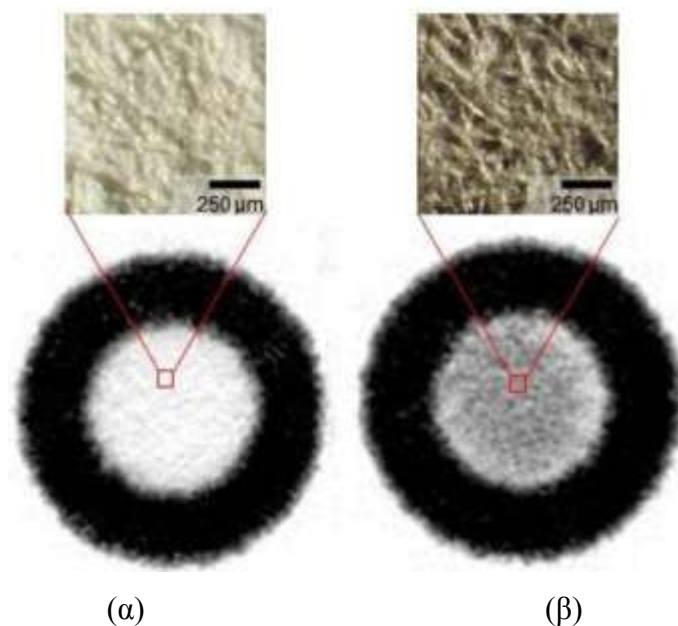


Εικόνα 2.3. Επίδραση των συγκεντρώσεων των $AgNO_3$, $NaCl$ και του οξέος στην απόκριση σήματος των τυφλών δειγμάτων (σύμβολα ανοιχτού τριγώνου) και στα πρότυπα διαλύματα κυστεΐνης (σύμβολα ανοικτού τετραγώνου). Τα σύμβολα μαύρου κύκλου δείχνουν την απόκριση καθαρού αναλυτικού σήματος του προτύπου διαλύματος κυστεΐνης.

Στη συνέχεια μελετήσαμε την επίδραση του χρόνου, της έντασης και του μήκους κύματος της ακτινοβολίας UV στην απόκριση σήματος για διαφορετικά μήκη κύματος, εντάσεις φωτός και χρόνους έκθεσης. Όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε στην Εικόνα 2.4, η υπεριώδη ακτινοβολία στα 254nm, έντασης από 8 έως 40W για 25 δευτερόλεπτα παράγει τα πιο υψηλά σήματα τα οποία αυξάνονται με την αύξηση της έντασης της ακτινοβολίας. Το σήμα φθάνει τη μέγιστη τιμή του μετά την έκθεση σε 40W (254nm) για 25-30 δευτερόλεπτα και μειώνεται για μεγαλύτερους χρόνους ακτινοβολίας, ενώ η απόσταση της διάταξης χαρτιού από την πηγή της ακτινοβολίας πρέπει να διατηρείται μεταξύ 12-15cm για να ληφθεί το μέγιστο σήμα. Τέλος, όταν οι διατάξεις ακτινοβολούνται σε μεγαλύτερα μήκη κύματος, το σήμα μειώνεται σημαντικά ακόμα και για μεγαλύτερους χρόνους έκθεσης (Εικόνα 2.4).

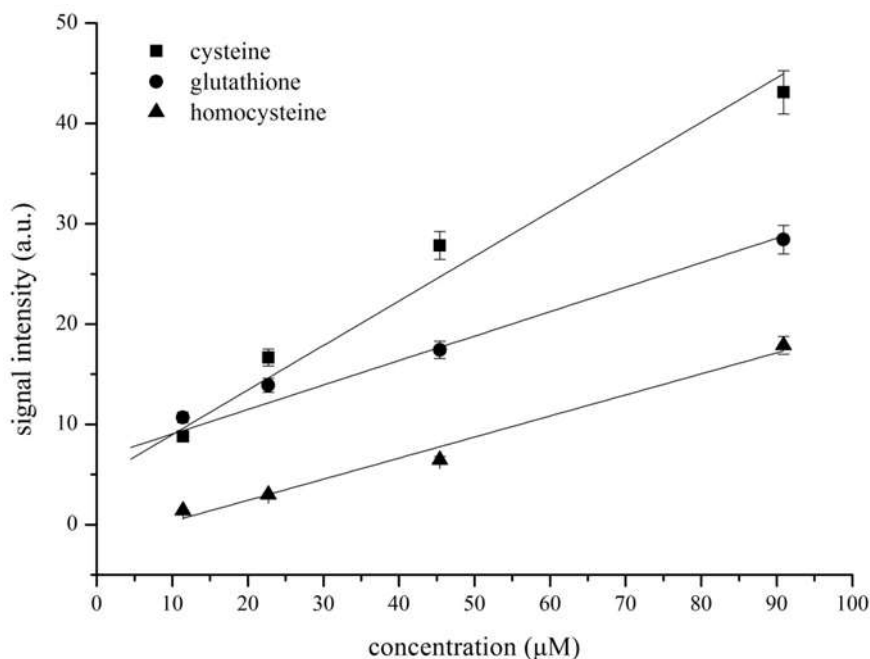


Εικόνα 2.4. Επίδραση των συνθηκών ακτινοβολήσης (μήκος κύματος φωτός, απόσταση από την πηγή ακτινοβολίας και χρόνου έκθεσης) στην απόκριση του αναλυτικού σήματος ενός πρότυπου διαλύματος κυστεΐνης (Πειραματικές συνθήκες: 2μL κυστεΐνης 272μM, 50mM AgNO₃, 80mM NaCl και οξικού οξέος 0,1M).



Εικόνα 2.5. Φωτογραφίες και στερεοσκοπικές εικόνες (μεγεθυμένη όψη) των διατάξεων χαρτιού μετά από ακτινοβολία UV (α) απουσία βιοθειολών και (β) παρουσία βιοθειολών (κυστεΐνη 275μM).

Για να ελέγξουμε την απόδοση της μεθόδου για την ανίχνευση διαφορετικών βιοθειολών, προετοιμάσαμε πρότυπα διαλύματα κυστεΐνης (Cys), ομοκυστεΐνης (Hcy) και γλουταθειόνης (GSH) σε διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων (μεταξύ 5 και 500μM) και κατασκευάσαμε καμπύλες χρησιμοποιώντας την μέση ένταση του γκρίζου χρώματος στην περιοχή ανίχνευσης έναντι της συγκέντρωσης των Cys, Hcy ή GSH. Για όλες τις βιοθειόλες που εξετάστηκαν, οι καμπύλες βαθμονόμησης ήταν γραμμικές για τη συγκεντρώσεις μεταξύ 10 και 100μM (Εικόνα 2.6).



Εικόνα 2.6. Γραμμικά διαγράμματα βαθμονόμησης κυστεΐνης, γλουταθειόνης και ομοκυστεΐνης σε 150mM NaNO₃.

Ευρύτερες περιοχές βαθμονόμησης (5-150μM για την κυστεΐνη και 20-225μM για τη γλουταθειόνη και την ομοκυστεΐνη), μπορούν να χρησιμοποιηθούν με λογαριθμικές καμπύλες βαθμονόμησης. Η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων (υπολογισμένη ως η σχετική τυπική απόκλιση εννέα μετρήσεων) κυμαίνονταν στο 10% (για διαλύματα που περιείχαν 50μM κυστεΐνης, γλουταθειόνης ή ομοκυστεΐνης ήταν 8,8%, 11,5% και 5,2% αντίστοιχα). Το όριο ανίχνευσης (3σ) των μεθόδων για τον προσδιορισμό των Cys, Hcy και GSH ήταν ίσο ή μικρότερο από 10μM. Οι εξισώσεις των καμπυλών βαθμονόμησης, η γραμμικότητα, η επαναληψιμότητα και τα όρια ανίχνευσης (DLs) των ποσοτικών προσδιορισμών συνοψίζονται στον Πίνακα 2.1. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα όρια ανίχνευσης των μεθόδων είναι συγκρίσιμα με εκείνα που λήφθηκαν με οργανικούς χρωμοφόρους ιχνηθέτες (π.χ. αντιδραστήριο Ellman) (Moser et al., 2016) και επίσης πολύ χαμηλότερα από τη συγκέντρωση των συνολικών βιοθειολών στα βιολογικά υγρά (Deneke et al., 2001). Ωστόσο, άλλες μέθοδοι που χρησιμοποιούν πιο εξελιγμένες μεθόδους (π.χ., φασματοφωτομετρικές μέθοδοι ή μέθοδοι φθορισμού που βασίζονται σε νανοσωματίδια) (Tsogas et al., 2018, Chen et al., 2010, Shen et al., 2014), έχουν επιτύχει ακόμη χαμηλότερα όρια ανίχνευσης.

Πίνακας 2.1. Αναλυτικά στοιχεία για την αξιολόγηση των μεθόδων^a.

Κυστεΐνη (Cys)	Γλουταθειόνη (GSH)	Ομοκυστεΐνη (Hcy)
Γραμμική περιοχή: 10-100μM ($y=0,43x+6,2$, $R^2=0,99$)	Γραμμική περιοχή: 10-100μM ($y=0,19x+9,1$, $R^2 = 0,99$)	Γραμμική περιοχή: 20-100 μM ($y=0.16x+0.71$, $R^2 = 0.99$)
LOD=10.0μM, %RSD=8.8	LOD=10.0μM, %RSD=11.5	LOD=7.5μM, %RSD=5.2
Εκτεταμένη γραμμική περιοχή: 5-150μM ($y=45.3\log x - 43.1$, $R^2=0.98$)	Εκτεταμένη γραμμική περιοχή: 20-225μM ($y=27.5\log x - 24.8$, $R^2=0.99$)	Εκτεταμένη γραμμική περιοχή: 20-225μM $y=28.9\log x - 38.5$, $R^2=0.97$)
		

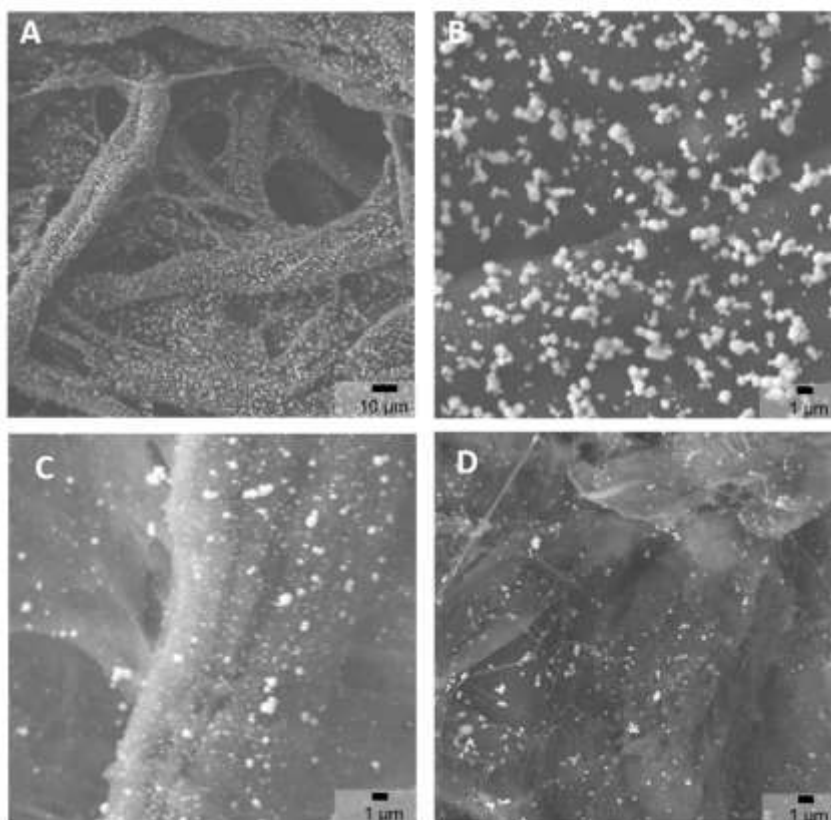
^a LOD ορίζεται ως τριπλάσιος λόγος σήματος προς θόρυβο (3S/N). Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των καμπυλών βαθμονόμησης ήταν 0, 10, 25, 50, 100, 150, 225 μM για κάθε βιοθειόλη. Η σχετική τυπική απόκλιση (RSD,%) υπολογίστηκε από την ανάλυση εννέα δειγμάτων (n=9) στα 50.0μM για κάθε είδος βιοθειόλης. Τα ένθετα διαγράμματα δείχνουν την κυκλική περιοχή που χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση του αναλυτικού σήματος. Αυτή η περιοχή καταλαμβάνει το 80% της συνολικής επιφάνειας της ζώνης ανίχνευσης

2.4.3 Μηχανισμός ανίχνευσης βιοθειολών

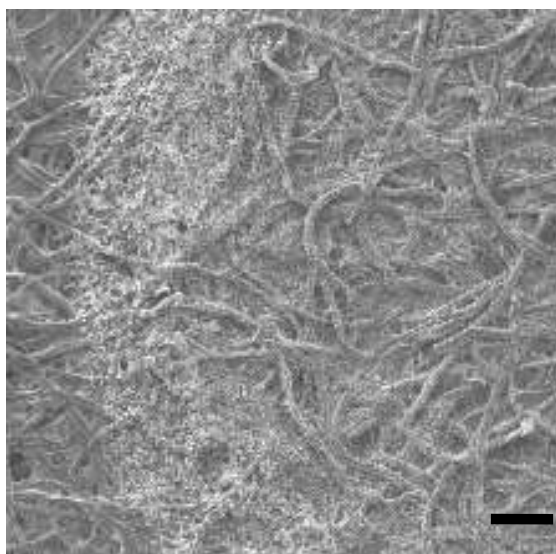
Η μέθοδος που περιγράφεται στο κεφάλαιο αυτό βασίζεται στην ικανότητα των βιοθειολών να ενισχύουν τη φωτοχημική αναγωγή των κρυστάλλων χλωριούχου αργύρου που είναι ακινητοποιημένοι στην επιφάνεια του χαρτιού. Για να κατανοήσουμε καλύτερα το μηχανισμό της ευαισθητοποίησης των νανοκρυστάλλων AgCl, βασιστήκαμε σε μικρογραφίες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM) σε συνδυασμό με βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με τις φυσικοχημικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα κατά την εμφάνιση φωτογραφικών φιλμ που περιέχουν αλογονίδια του αργύρου.

Η προσθήκη χλωριούχων ανιόντων σε μια διάταξη χαρτιού που περιέχει ιόντα Ag⁺ (σε αυτή την μέθοδο 160nmol Cl⁻ και 100nmol Ag⁺) είχε ως αποτέλεσμα το

σχηματισμό σωματιδίων AgCl τα οποία εναποτέθηκαν στις ίνες του χαρτιού. Τα σωματίδια χλωριούχου αργύρου, τα οποία είναι δυσδιάλυτα σε υδατικά διαλύματα ($K_{sp}=1,8 \times 10^{-10}$) είναι λευκά, συνεπώς, δεν αποχρωματίζουν την περιοχή ανίχνευσης του χαρτιού που είναι επίσης λευκή (Εικόνα 2.5.α). Οι εικόνες SEM δείχνουν ότι τα σωματίδια απλώνονται ομοιόμορφα στην επιφάνεια της περιοχής ανίχνευσης (Εικόνα 2.7) και η διάμετρος τους κυμαίνεται μεταξύ 500 και 1000nm. Επίσης παρατηρήσαμε ότι τα σωματίδια τείνουν να συσσωματώνονται στα άκρα της περιοχής ανίχνευσης λόγω της επίδρασης του φαινομένου φαινομένων διασποράς των αντιδραστηρίων (coffee ring effect) (βλ. Εικόνα 2.8). Το φαινόμενο αυτό διασποράς ήταν και ο βασικός λόγος για τον οποίο αποφασίσαμε να καταγράψουμε τις χρωματικές μεταβολές στο 80% της περιοχής ανίχνευσης.



Εικόνα 2.7. Εικόνες SEM των διατάξεων χαρτιού που περιέχουν (A) σωματίδια AgCl (B) σωματίδια AgCl μετά την προσθήκη βιοθειολών και πριν από την ακτινοβολία UV (C) σωματίδια AgCl μετά την ακτινοβολία UV (χωρίς την προσθήκη βιοθειολών) και (D) σωματίδια AgCl μετά την προσθήκη βιοθειολών και μετά από την ακτινοβολία UV.



Εικόνα 2.8. Μικρογραφία SEM που δείχνει την διασπορά των σωματιδίων AgCl στα άκρα της διάταξης χαρτιού μετά την προσθήκη του δείγματος (coffee ring effect).

Η προσθήκη δείγματος που περιέχει βιοθειόλες προκαλεί τη μερική διαλυτοποίηση των νανοσωματιδίων AgCl (Εικόνα 2.7B), η οποία μπορεί να αποδοθεί στην ισχυρή συγγένεια του Ag^+ για τις θειόλες ($\log K_{\text{σχηματισμού}}=11,9$ για Ag^+ -κυστεΐνη και 12,3 για Ag^+ -γλουταθειόνη) (Liu et al., 2012, Adams et al., 1999). Η διαλυτοποίηση των σωματιδίων AgCl από τις βιοθειόλες έχει αναφερθεί και στην βιβλιογραφία, αλλά μόνο σε υδατικά αιωρήματα (Liu et al., 2012, Kappi et al., 2017) και μετά από μεγαλύτερους χρόνους επώασης (Liu et al., 2012). Μετά την ακτινοβόληση με υπεριώδη ακτινοβολία, το χρώμα της περιοχής ανίχνευσης των διατάξεων που περιείχαν βιοθειόλες άλλαξε από λευκό σε γκρι-μωβ (Εικόνα 2.5β), που είναι ενδεικτικό της παρουσίας σωματιδίων Ag:AgCl στις περιοχές ανίχνευσης (το χρώμα των σωματιδίων Ag:AgCl είναι γκρι- μωβ) (Dong et al., 2013). Οι μικρογραφίες SEM έδειξαν επίσης ότι η ακτινοβόληση των τυφλών δειγμάτων (δηλ. δείγματα χωρίς βιοθειόλες) προκαλούν τη θραυσματοποίηση των σωματιδίων AgCl σε μικρότερα σωματίδια (Εικόνα 2.7C), κάτι που, από όσο γνωρίζουμε, δεν έχει αναφερθεί στην βιβλιογραφία. Ως αποτέλεσμα, το μέγεθος των σωματιδίων Ag:AgCl στα τυφλά δείγματα μετά από ακτινοβόληση με υπεριώδη ακτινοβολία (Εικόνα 2.7C) είχαν συγκρίσιμο μέγεθος με τα σωματίδια Ag:AgCl μετά από διαλυτοποίηση από τις βιοθειόλες (πριν από ακτινοβόληση με υπεριώδη ακτινοβολία) (Εικόνα 2.7C). Μετά

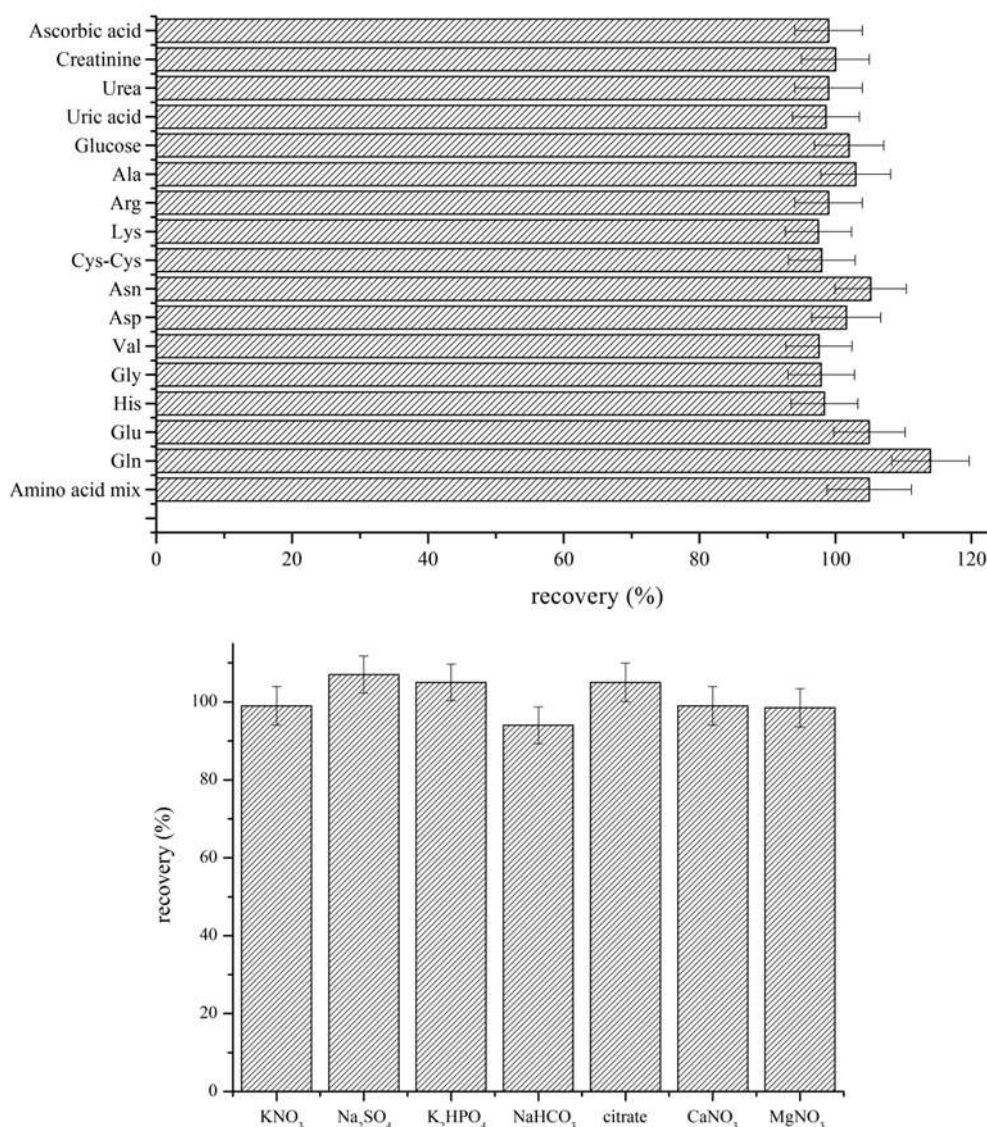
από την ακτινοβολία με υπεριώδη ακτινοβολία παρουσία βιοθειολών παρατηρήσαμε περαιτέρω μείωση στο μέγεθος των σωματιδίων (Εικόνα 2.7D).

Αν και οι μικρογραφίες που ελήφθησαν από την τεχνική SEM αποκάλυψαν ότι η διαλυτοποίηση των σωματιδίων AgCl από τις βιοθειόλες είναι επίσης εφικτή στην επιφάνεια του χαρτιού, ωστόσο, δεν παρέχουν επαρκείς πληροφορίες για την εξήγηση της ενίσχυσης του σήματος αφού διαλυτοποίηση των νανοκρυστάλλων AgCl θα οδηγούσε σε μειωμένη φωτοευαισθησία. Με αυτά ως δεδομένα η ευαισθητοποίηση θα πρέπει να αποδοθεί κυρίως στην αλλαγή των ηλεκτρονικών ιδιοτήτων των σωματιδίων AgCl, λόγω της συναρμογής των βιοθειολών στην επιφάνειά τους, παρά στην μεταβολή του μεγέθους τους. Αν και κρύσταλλοι αλογονιδίων αργύρου έχουν χρησιμοποιηθεί για την προετοιμασία φωτογραφικών φιλμ για σχεδόν 150 χρόνια, ο ακριβής μηχανισμός της φωτοαναγωγής τους, ειδικά όταν αλληλεπιδρούν με άλλες ενώσεις στην επιφάνειά τους, δεν έχει κατανοηθεί πλήρως. Αυτό που είναι γνωστό είναι ότι ο AgCl έχει δομή παρόμοια με εκείνη της δομής του NaCl και έχει δύο μετατοπισμένα ενδοκεντρωμένα κυβικά πλέγματα: ένα πλέγμα αποτελείται από ιόντα αργύρου και το άλλο περιέχει ιόντα χλωρίου (Bjelkhagen et al., 1995, Marchetti et al., 1992). Τα ιόντα χλωρίου παραμένουν ακίνητα στις θέσεις τους, αλλά ένα μικρό κλάσμα κατιόντων αργύρου δεν βρέθηκαν στις θέσεις πλέγματός τους αλλά σε διάμεσες θέσεις δημιουργώντας ασυνέχειες πλέγματος (αποκαλούμενες ζεύγη Frenkel) (Funke et al., 2013, Wilson et al., 2004). Αυτές οι ασυνέχειες είναι απαραίτητες στη διαδικασία φωτοαναγωγής. Τα ενδιάμεσα ιόντα αργύρου εντοπίζονται κυρίως στο εσωτερικό του κύριου όγκου του κρυστάλλου, έτσι η επιφάνεια του κρυστάλλου είναι αρνητικά φορτισμένη (Hudson et al., 1987). Όταν οι κρύσταλλοι χλωριούχου αργύρου απορροφούν φως στην περιοχή υπεριώδους ακτινοβολίας (καθώς έχουν ένα άμεσο χάσμα μεταξύ ζωνών 5.15eV (241nm) και ένα έμμεσο χάσμα μεταξύ ζωνών 3.25eV (382nm) (Glaus et al., 2003), σχηματίζονται ζεύγη ηλεκτρονίου-οπής (excitons) και τα ηλεκτρόνια πηδούν από τη ζώνη αγωγιμότητας στη ζώνη σθένους του κρυστάλλου, αφήνοντας οπές στις ζώνες σθένους. Η κομβική άκρη μιας επίπεδης επιφάνειας (θέση "κόμβος" με θετικό τοπικό φορτίο) θεωρείται ότι είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική εγγενής θέση για την παγίδευση των ηλεκτρονίων (Marchetti et al., 1992). Στη συνέχεια, τα διάμεσα ιόντα αργύρου ανακλώνται στην επιφάνεια των κρυστάλλων για να συνδυαστούν μαζί τους και να σχηματίσουν συγκροτήματα ατομικού αργύρου (Wilson et al., 2004).

Όταν στο δείγμα υπάρχουν βιοθειόλες, σχηματίζουν σύμπλοκα με ιόντα αργύρου σε στοιχειομετρία 1:1 (Leung et al., 2013) με αποτέλεσμα τη μερική διαλυτοποίηση των σωματιδίων AgCl. Οι βιοθειόλες επίσης συντονίζονται στην επιφάνεια των υπολοίπων σωματιδίων AgCl. Η ζώνη αγωγιμότητας των ενώσεων Ag-S έχει χαμηλότερη ενέργεια από εκείνη του AgCl (Gurney et al., 1938), επομένως, τα ηλεκτρόνια μπορούν ευκολότερα να παγιδευτούν στην επιφάνεια των σωματιδίων που είναι επικαλυμμένα με σύμπλοκα αργύρου-θειολών. Αυτοί οι μηχανισμοί μπορεί να είναι υπεύθυνοι για το γεγονός ότι τα σωματίδια AgCl-SH φωτοανάγονται πιο έντονα από τους κρυστάλλους AgCl προκαλώντας το σχηματισμό ενός γκρι-μωβ χρώματος στην επιφάνεια του χαρτιού. Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι η ευαισθησία για κάθε βιοθειόλη (HCy> GSH> Cys, Πίνακας 2.1), ίσως και λόγω σύμπτωσης, είναι ανάλογη της πυρηνοφιλίας των θειολικών ομάδων των HCy, GSH και Cys, η οποία σχετίζεται με τις pKa τιμές τους (~ 10, ~ 9,6 και ~ 8,3, αντίστοιχα) (Hubmacher et al., 2011).

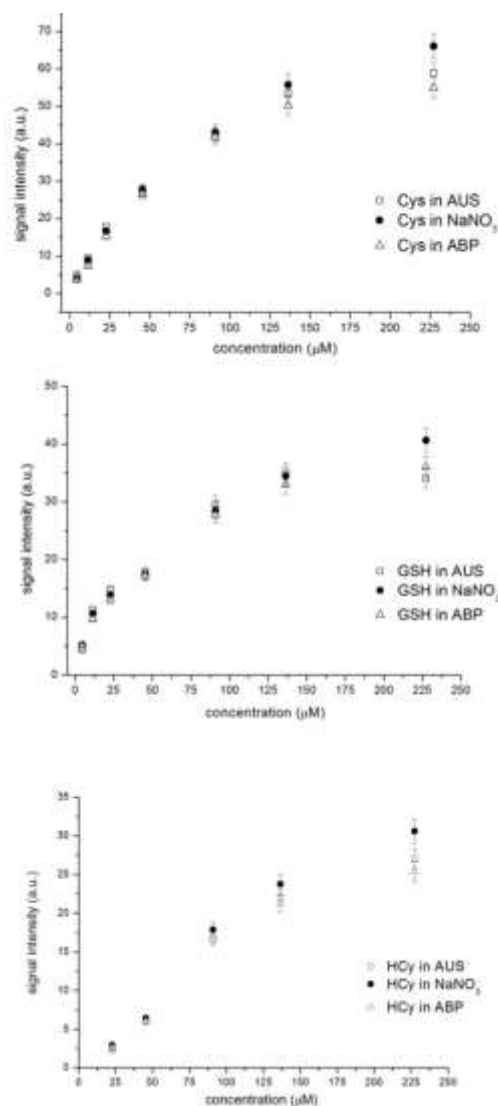
2.4.4 Εκλεκτικότητα της μεθόδου – Μελέτη παρεμποδίσεων

Μελετήσαμε την εκλεκτικότητα της μεθόδου: i) εξετάζοντας την παρεμπόδιση κοινών συστατικών της μήτρας του υποστρώματος των βιολογικών υγρών (π.χ., αμινοξέα, ιόντα, σάκχαρα, αντιοξειδωτικά κλπ.) και ii) κατασκευάζοντας καμπύλες βαθμονόμησης σε τεχνητά ούρα και τεχνητό πλάσμα αίματος και συγκρίνοντάς τις με τις καμπύλες βαθμονόμησης που λαμβάνονται χρησιμοποιώντας πρότυπα διαλύματα βιοθειολών. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι η παρουσία αμινοξέων (γλουταμίνη, γλουταμικό οξύ, κυστίνη, ασπαραγίνη, ασπαρτικό οξύ, γλυκίνη, ιστιδίνη, λυσίνη, βαλίνη, αλανίνη, και αργινίνη), ανόργανων ιόντων (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , NO_3^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , CO_3^{2-} , κιτρικά) και κοινών βιομορίων (γλυκόζη, ασκορβικό οξύ, ουρικό οξύ, ουρία και κρεατινίνη) σε φυσιολογικά επίπεδα συγκεντρώσεων δεν παρεμποδίζουν τον προσδιορισμό των βιοθειολών, καθώς η μετρηθείσα ανάκτηση της κυστεΐνης ήταν σε όλες τις περιπτώσεις ποσοτική (κοντά στο 100%) (Εικόνα 2.9).



Εικόνα 2.9. Ανάκτηση της κυστεΐνης (272,0 μM) παρουσία (α) διαφόρων αμινοξέων και βιομορίων (β) ανόργανων αλάτων. Οι συγκεντρώσεις κάθε είδους ήταν ως ακολούθως: αμινοξέα 0,5mM (συνολική συγκέντρωση όλων των αμινοξέων: 3mM), γλυκόζη 5mM, ουρία 140mM, ουρικό οξύ 360 μM , ασκορβικό οξύ 100 μM , κρεατινίνη 120 μM , KNO₃ 6mM, Na₂SO₄ 14mM, K₂HPO₄ 18mM, NaHCO₃ 30mM, κιτρικό 3mM, Ca(NO₃)₂ 4mM και Mg(NO₃)₂ 2mM. Η μελέτη διεξήχθη χρησιμοποιώντας μίγματα δύο ουσιών (κυστεΐνη και παρεμποδιστής) τα οποία αραιώθηκαν 3 φορές πριν την ανάλυση με σκοπό η συγκέντρωση της κυστεΐνης να βρίσκεται εντός της γραμμικής περιοχής της μεθόδου. Στη μελέτη παρεμπόδισης των κιτρικών, φωσφορικών και ανθρακικών ιόντων, το pH των διαλυμάτων ρυθμίστηκε στην τιμή 7,0 για να ταιριάζει με το φυσιολογικό pH των βιολογικών υγρών.

Αντιθέτως τα σήματα στα τεχνητά σωματικά υγρά ήταν χαμηλότερα από αυτά των υδατικών διαλυμάτων. Αφού δεν παρατηρήσαμε καμία παρεμπόδιση από την παρουσία μεμονωμένων συστατικών των βιολογικών υγρών (όπως ηλεκτρολύτες και άλλα βιομόρια), πιστεύουμε ότι αυτή η παρεμπόδιση προέρχεται από την υψηλή τιμή της ιοντικής ισχύος των διαλυμάτων των τεχνητών βιολογικών υγρών (περίπου 200mM). Για να ελέγξουμε την επίδραση της ιοντικής ισχύος βαθμονομήσαμε την μέθοδο χρησιμοποιώντας πρότυπα διαλύματα βιοθειολών που περιείχαν 150mM NaNO_3 . Χρησιμοποιήσαμε 150mM NaNO_3 γιατί α) η φυσιολογική συγκέντρωση του άλατος είναι ισοδύναμη με 150mM NaCl (Tebbe et al., 2015) και β) τα νιτρικά άλατα δεν σχηματίζουν αδιάλυτα ιζήματα με ιόντα Ag. Παρατηρήσαμε ότι οι καμπύλες βαθμονόμησης των βιοθειολών (δηλ. Cys, GSH και Hcy) που περιέχουν 150mM NaNO_3 ήταν παρόμοιες με τις καμπύλες βαθμονόμησης των βιοθειολών που παρασκευάζονται σε τεχνητά ούρα και τεχνητό αίμα (Εικόνα 2.10). Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις, η ανάλυση των πραγματικών δειγμάτων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας καμπύλες βαθμονόμησης σε 150mM NaNO_3 . Για τον ίδιο λόγο η αραίωση των πραγματικών δειγμάτων για την ανάλυση των βιοθειολών πραγματοποιήθηκε σε 150mM NaNO_3 έτσι ώστε να εξασφαλιστούν σταθερές συνθήκες ιοντικής ισχύος.



Εικόνα 2.10. Αναλυτική απόκριση σήματος κυστεΐνης, γλουταθειόνης και ομοκυστεΐνης σε διαλύματα τεχνητών ούρων (AUS), τεχνητού πλάσματος αίματος (ABP) και 150mM NaNO₃.

2.4.5 Σταθερότητα των διατάξεων

Για να αξιολογήσουμε τη σταθερότητα των διατάξεων, αποθηκεύσαμε τις διατάξεις για ένα μήνα υπό διαφορετικές συνθήκες (σε θερμοκρασία δωματίου και στους 4 °C, σε συνθήκες υγρασίας περιβάλλοντος και σε συνθήκες χωρίς υγρασία, σε αέρα και σε άζωτο υψηλής καθαρότητας) και μελετήσαμε η απόδοσή τους. Υποθέσαμε ότι οι αποθηκευμένες διατάξεις διατηρούν τη σταθερότητά τους όταν τα

αποτελέσματα (ένταση σήματος) δεν αποκλίνουν περισσότερο από 10% σε σύγκριση με τα αποτελέσματα που λαμβάνονται από πρόσφατα προετοιμασμένες διατάξεις. Καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι οι διατάξεις διατηρούν τη σταθερότητά τους μόνο όταν φυλάσσονται υπό συνθήκες χωρίς υγρασία σε θερμοκρασίες $\leq 20^{\circ}\text{C}$. Η αποθήκευση σε ατμοσφαιρικό αέρα ή αδρανή ατμόσφαιρα δεν επηρεάζουν την σταθερότητα των διατάξεων (Πίνακας 2.2). Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι οι διατάξεις μπορούν να αποθηκευτούν (για τουλάχιστον ένα μήνα) χωρίς απώλεια της λειτουργικότητάς τους. Για παρατεταμένη αποθήκευση όμως (δηλαδή αρκετούς μήνες) απαιτούνται πιο εκτεταμένες δοκιμές.

Για να εξετάσουμε εάν τα αποτελέσματα των αναλύσεων επηρεάζονται από την μεταβολή των περιβαλλοντικών συνθηκών κατά την διάρκεια της ανάλυσης, μελετήσαμε την απόδοση των διατάξεων υπό διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας. Υποθέσαμε ότι οι περιβαλλοντικές συνθήκες δεν επηρεάζουν την ανάλυση όταν τα αποτελέσματα δεν αποκλίνουν περισσότερο από 10% από τα αποτελέσματα αυτά που ελήφθησαν ακολουθώντας την πρότυπη πειραματική πορεία (αποθήκευση σε συνθήκες χωρίς υγρασία στο σκοτάδι σε θερμοκρασία $\leq 20^{\circ}\text{C}$ και επώαση διατάξεων για 10min πριν από τη χρήση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος προστατευμένες από το φως.). Παρατηρήσαμε ότι η λειτουργικότητα των διατάξεων δεν επηρεάζεται όταν οι διατάξεις χρησιμοποιήθηκαν λίγο μετά το άνοιγμά τους (δηλαδή ≤ 10 λεπτά). Όταν όμως οι διατάξεις α) παρέμειναν για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα β) εκτέθηκαν σε υψηλές θερμοκρασίες ($\geq 40^{\circ}\text{C}$) ακόμη και για σύντομο χρονικό διάστημα ή γ) εκτέθηκαν σε συνθήκες υψηλής υγρασίας ($\geq 80\%$) για παρατεταμένο χρονικό διάστημα (δηλ. >1 ώρα), τα αποτελέσματα απέκλιναν περισσότερο από 10% (Πίνακας 2.2). Συνεπώς, καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι οι συνήθεις συνθήκες περιβάλλοντος δεν επηρεάζουν αρνητικά την ποιότητα των αποτελεσμάτων των αναλύσεων όταν οι διατάξεις χρησιμοποιούνται με βάση την πρότυπη πειραματική πορεία.

Πίνακας 2.2. Σταθερότητα των διατάξεων μετά από αποθήκευση για 1 μήνα υπό διαφορετικές συνθήκες.

Συνθήκες αποθήκευσης	Σταθερότητα ¹
Θερμοκρασία Αποθήκευσης: T=40°C	-
Θερμοκρασία Αποθήκευσης: T=20°C	+
Θερμοκρασία Αποθήκευσης: T=4°C	+
Υγρασία Αποθήκευσης: RH=80 %	-
Υγρασία Αποθήκευσης: RH=60 %	+
Υγρασία Αποθήκευσης: RH=0 %	+
Ατμόσφαιρα Αποθήκευσης: Αέρας	++
Ατμόσφαιρα Αποθήκευσης: Άζωτο	+

¹Το θετικό σύμβολο (+) υποδεικνύει ότι το σήμα που αποκτήθηκε από την αποθηκευμένη διάταξη αποκλίνει λιγότερο από 10% σε σύγκριση με εκείνο που αποκτήθηκε από την πρόσφατα προετοιμασμένη διάταξη, ενώ το αρνητικό σύμβολο (-) υποδεικνύει ότι το σήμα που αποκτήθηκε από την αποθηκευμένη διάταξη αποκλίνει περισσότερο από 10% σε σύγκριση με εκείνο που αποκτήθηκε από την πρόσφατα προετοιμασμένη διάταξη.

* Σε συνθήκες χωρίς υγρασία

2.4.6 Προσδιορισμός βιοθειολών σε βιολογικά υγρά

Όπως προαναφέρθηκε ότι η συνολική συγκέντρωση των βιοθειολών στα βιολογικά υγρά εξαρτάται κυρίως από τη συγκέντρωση των κυρίαρχων βιοθειολών (γλουταθειόνη στο αίμα, κυστεΐνη στο πλάσμα και στα ούρα), συνεπώς οι αποκλίσεις από τα αναμενόμενα επίπεδα των συνολικών βιοθειολών, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες ανίχνευσης διαφόρων ασθενειών.

Η εφαρμογή της μεθόδου σε πραγματικά δείγματα πραγματοποιήθηκε με την ανάλυση δειγμάτων πλάσματος αίματος από υγιείς εθελοντές. Η καθίζηση των πρωτεϊνών του πλάσματος πριν από την ανάλυση ήταν απαραίτητη, επειδή ορισμένες πρωτεΐνες έχουν θειολικές ομάδες που μπορεί να επηρεάσουν αρνητικά τα αποτελέσματα. Η πρακτική αυτή εφαρμόζεται σε όλες τις μεθόδους ανάλυσης βιοθειολών.

Αρχικά προσδιορίσαμε τη συγκέντρωση των ολικών βιοθειολών σε δείγματα πλάσματος (μετά από καταβύθιση των πρωτεϊνών) χρησιμοποιώντας την καμπύλη

βαθμονόμησης της κυστεΐνης, καθώς η κυστεΐνη είναι η σημαντικότερη βιοθειόλη στο πλάσμα του αίματος. Στη συνέχεια, εμβολιάσαμε τα δείγματα με γνωστή ποσότητα κυστεΐνης με σκοπό τον υπολογισμό των ανακτήσεων (Πίνακας 2.3). Οι ανακτήσεις κυμαίνονται μεταξύ 86 και 102%, υποδεικνύοντας την ακρίβεια της μεθόδου και την καταλληλότητά της για βιοχημικές αναλύσεις ρουτίνας.

Πίνακας 2.3. Προσδιορισμός των ολικών βιοθειολών στο πλάσμα του αίματος και ανακτήσεις από τα εμβολιασμένα δείγματα.

	Μετρήθηκαν (μM) ^a	Εμβολιάστηκαν (μM) ^b	Βρέθηκαν(μM)	Ανάκτηση (%)
Πλάσμα αίματος 1	89.5	20.0	96.8 $\pm$ 6.1	85.9 $\pm$ 5.4
	89.5	40.0	131.4 $\pm$ 10.4	102 $\pm$ 8
Πλάσμα αίματος 2	39.4	17.7	52.3 $\pm$ 3.5	87.8 $\pm$ 5.8
Πλάσμα αίματος 3	38.6	17.7	51.4 $\pm$ 3.9	87.4 $\pm$ 6.6
	38.6	35.4	71.7 $\pm$ 8.0	94.0 $\pm$ 10.5

^aΟι τιμές αναφέρονται σε 4 φορές αραιωμένα δείγματα (σε 150mM NaNO₃).

^b Εμβολιασμός με κυστεΐνη

Εκτός από τα επίπεδα των ολικών βιοθειολών στα βιολογικά υγρά, η αναλογία ανηγμένων/οξειδωμένων βιοθειολών στο πλάσμα του αίματος χρησιμοποιείται συχνά ως δείκτης του οξειδωτικού στρες και της κατάστασης υγείας των κυττάρων (Ashfaq et al., 2006). Η μέθοδος που περιγράφηκε μπορεί να ανιχνεύει την αναλογία ανηγμένων/οξειδωμένων βιοθειολών αναλύοντας το βιολογικό δείγμα με και χωρίς αναγωγή της κυστίνης σε κυστεΐνη. Για την επίδειξη της εφαρμογής αυτής αναλύσαμε δείγματα τεχνητού πλάσματος αίματος που είχαν εμβολιαστεί με κυστεΐνη και κυστίνη, διαχωρίζοντάς τα σε δύο κλάσματα. Ένα κλάσμα των δειγμάτων αναλύθηκε χωρίς άλλη κατεργασία, ενώ το υπόλοιπο κλάσμα υποβλήθηκε σε επεξεργασία με TCEP (πριν από την ανάλυση των βιοθειολών), προκειμένου να αναχθεί η κυστίνη σε κυστεΐνη. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.4, αποδεικνύουν τη χρησιμότητα της μεθόδου για τον προσδιορισμό της αναλογίας μεταξύ ανηγμένων/οξειδωμένων θειολών σε βιολογικά υγρά, διευρύνοντας έτσι περαιτέρω την εφαρμογή της μεθόδου για διαφορετικούς κλινικούς προσδιορισμούς.

Πίνακας 2.4. Προσδιορισμός ανηγμένων/οξειδωμένων βιοθειολών σε τεχνητό πλάσμα αίματος.

	Προστέθηκαν (μM)	Βρέθηκαν (μM)	Βρέθηκαν μετά από αναγωγή με TCEP (μM)	Ανακτήσεις (%) ^a
Κυστεΐνη/ Κυστίνη	100 / 0	97.8	98.4	97.8 (98.4)
	100 / 100	103.0	190.0	103.0 (95.0)
	0 / 100	< D.L.	96.1	n.d. (96.1)

^aΟι τιμές σε παρένθεση δείχνουν τις ανακτήσεις μετά από αναγωγή με TCEP.

2.5 Συμπεράσματα

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφεται η πρώτη χρήση μικροαναλυτικών διατάξεων χάρτου που βασίζεται σε ετερογενείς χημικές αντιδράσεις για την παραγωγή χρωματικών μεταβολών και η εφαρμογή τους για την ανίχνευση βιοθειολών σε βιολογικά ρευστά. Οι διατάξεις είναι εξαιρετικά φτηνές, εύκολες στην κατασκευή, και όλη η διαδικασία της ανάλυσης απαιτεί ελάχιστο εξοπλισμό (είναι απαραίτητη μόνο πηγή ακτινοβολίας UV και μια κάμερα). Επίσης, η χρήση της είναι εύκολη (ο χρήστης προσθέτει μόνο το δείγμα στη διάταξη και ακτινοβολεί τη διάταξη με υπεριώδη ακτινοβολία) και γρήγορη (ο συνολικός χρόνος ανάλυσης είναι λιγότερος από 5 λεπτά). Ο μηχανισμός ανίχνευσης των βιοθειολών βασίζεται στην ευαισθητοποίηση της φωτοαναγωγής των κρυστάλλων AgCl προς γκρίζα σωματίδια Ag:AgCl εξαιτίας της παρουσίας των βιοθειολών. Αν και ο ακριβής μηχανισμός αυτής της ευαισθητοποίησης δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως, πιστεύουμε ότι οι βιοθειόλες συντονίζονται στην επιφάνεια των κρυστάλλων χλωριούχου αργύρου διευκολύνοντας την παγίδευση των ηλεκτρονίων λόγω της χαμηλότερης ενέργειας της ζώνης αγωγιμότητας των ενώσεων Ag-S (σε σύγκριση με εκείνη του AgCl), και έτσι προκύπτει η ενισχυμένη φωτοαναγωγή. Η προτεινόμενη μέθοδος είναι εκλεκτική σε βιοθειόλες (όπως κυστεΐνη, ομοκυστεΐνη, γλουταθειόνη), καθώς κοινά βιομόρια (όπως αμινοξέα, ανόργανα ιόντα, γλυκόζη, ασκορβικό οξύ, ουρικό οξύ, ουρία και κρεατινίνη) δεν παρεμποδίζουν την ανίχνευση. Ωστόσο, αρκετές πρωτεΐνες που περιέχουν ομάδες S-H πρέπει να αφαιρεθούν πριν από την ανάλυση.

Κεφάλαιο 3^ο

ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ ΧΑΡΤΟΥ ΜΕ ΕΝΣΩΜΑΤΩΜΕΝΕΣ ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΕΣ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΟΣΟΤΙΚΩΝ ΑΝΑΛΥΣΕΩΝ ΒΙΟΘΕΙΟΛΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ΣΤΑΘΕΡΗΣ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφεται μια νέα προσέγγιση για την υλοποίηση ποσοτικών αναλύσεων σε αναλυτικές διατάξεις χάρτου. Η καινοτομία της προσέγγισης βασίζεται στην ενσωμάτωση των αρχών της μεθόδου βαθμονόμησης σταθερής προσθήκης πολλαπλών σημείων σε διατάξεις χάρτου. Συγκεκριμένα, πριν την ανάλυση ενός αγνώστου δείγματος οι περιοχές ανίχνευσης τροποποιούνται με την προσθήκη των αναγκαίων χρωματομετρικών αντιδραστηρίων και γνωστές ποσότητες (πρότυπα διαλύματα) του αναλύτη. Με τον τρόπο αυτό σχηματίζεται ένα έγχρωμο προϊόν σε κάθε περιοχή ανίχνευσης. Μετά την προσθήκη του δείγματος, το αναλυτικό σήμα από κάθε περιοχή ανίχνευσης αντιστοιχεί στη συνολική συγκέντρωση του αναλύτη, η οποία είναι το άθροισμα της συγκέντρωσης του αναλύτη στο εξεταζόμενο δείγμα συν τη γνωστή ποσότητα του αναλύτη που έχει προστεθεί προηγουμένως στη διάταξη. Το συνολικό αναλυτικό σήμα που ανακτάται από κάθε ζώνη ανίχνευσης χρησιμοποιείται για την κατασκευή μιας καμπύλης βαθμονόμησης σταθερής προσθήκης από την οποία υπολογίζεται η συγκέντρωση του αναλύτη στο άγνωστο δείγμα χρησιμοποιώντας γραμμικά ή μη γραμμικά μοντέλα (δηλ., πολώνυμα πρώτης και υψηλότερης τάξης). Αυτή η νέα προσέγγιση απλοποιεί την ανάλυση καθώς δεν απαιτείται η επί τόπου βαθμονόμηση της μεθόδου, η οποία συνήθως πραγματοποιείται με την ανάλυση πρότυπων διαλυμάτων που πρέπει να προετοιμαστούν ή να μεταφερθούν επί τόπου. Παράλληλα, μειώνει την επίδραση παρεμποδίσεων από τη μήτρα του υποστρώματος του δείγματος, από την ανομοιογένεια του χάρτου και από τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε αρχικά με σκοπό την ανάλυση βιοθειολών όμως θεωρήθηκε σκόπιμη η περαιτέρω μελέτη και διερεύνηση των δυνατοτήτων αλλά και των περιορισμών της, χρησιμοποιώντας, μεθόδους που βασίζονται σε διαφορετικές αντιδράσεις και

μηχανισμούς. Για τον λόγο αυτό εξετάστηκε (πλέον της ανάλυσης βιοθειολών με χρήση της φωτοχημικής αναγωγής αλογονιδίων το αργύρου) και σε πέντε μεθόδους (για τον προσδιορισμό σιδήρου, πρωτεϊνών, υπεροξειδίου του υδρογόνου, οξικού οξέος και ανθρακικών) οι οποίες βασίζονται σε αντιδράσεις συμπλοκοποίησης, οξειδωσης και εξουδετέρωσης. Με τον τρόπο αυτό αναδείχθηκαν όλες οι πτυχές της μεθόδου η οποία αποτελεί την πρώτη εφαρμογή της μεθόδου πολλαπλής σταθερής προσθήκης ειδικά σχεδιασμένης για αναλυτικές διατάξεις χάρτου και αναδεικνύει τη χρήση της για εφαρμογές στο σημείο χρήσης.

3.1 Εισαγωγή

Τις τελευταίες δυο δεκαετίες, οι φορητές διαγνωστικές διατάξεις (διατάξεις παρακλίνιας ανάλυσης ή διαγνωστικές διατάξεις στο σημείο φροντίδας - Point Of Care devices ή συντομογραφικά POC) γίνονται όλο και πιο δημοφιλείς καθώς διευκολύνουν την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση των αναλυτών με χαμηλό κόστος στο σημείο ανάγκης (Gervais et al., 2011). Τα πιο χαρακτηριστικά παραδείγματα διατάξεων POC είναι τα γλυκοζόμετρα και τα γρήγορα τεστ ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης (τεστ εγκυμοσύνης) τα οποία έχουν φέρει επανάσταση στον τρόπο με τον οποίο οι άνθρωποι παρακολουθούν τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα τους ή διενεργούν τεστ εγκυμοσύνης, αντίστοιχα.

Συνήθως, οι διατάξεις POC κατασκευάζονται από πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο, γυαλί, πλαστικό ή νιτροκυτταρίνη (Gervais et al., 2011, Petryayeva et al., 2015, Ballerini et al., 2012). Το 2007, η ερευνητική ομάδα του καθηγητή George Whitesides εισήγαγε το χαρτί ως δομικό υλικό για διατάξεις POC. Τις διατάξεις αυτές τις ονόμασαν "μικρορευστονικές αναλυτικές διατάξεις χάρτου (microfluidic paper-based analytical devices ή συντομογραφικά μPADs)" (Martinez et al., 2007). Έκτοτε ένας μεγάλος αριθμός αναλυτικών μεθόδων έχουν δοκιμαστεί σε χαρτί (Martinez et al., 2011, Fridley et al., 2014, Glavan et al., 2014, Cate et al., 2015, Ballerini et al., 2012, Liana et al., 2012) και έχουν αναπτυχθεί πλήρως λειτουργικές διατάξεις χάρτου (τόσο δυσδιάστατες 2D όσο και τρισδιάστατες 3D) (Fridley et al., 2014, Glavan et al., 2014, Oyola-Reynoso et al., 2015, Martinez et al., 2008, Giokas et al., 2014, Renault et al., 2013, Schilling et al., 2012, Vella et al., 2012, Jayawardane et al., 2014, Lankelma et al., 2012). Η συντριπτική πλειοψηφία αυτών των διατάξεων χρησιμοποιεί για την ανίχνευση χρωματικές αντιδράσεις κυρίως επειδή τα χρωματικά σήματα δεν απαιτούν ακριβή εξοπλισμό για την λήψη και επεξεργασία τους. Φωτογραφικές κάμερες, σαρωτές γραφείου ή ακόμα και ο γυμνός οφθαλμός έχουν χρησιμοποιηθεί για την λήψη και καταγραφή του αναλυτικού σήματος (ως χρώμα).

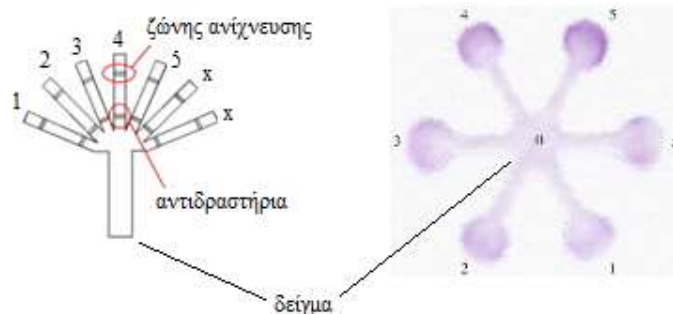
Οι αναλυτικές διατάξεις χάρτου μπορούν να παρέχουν είτε ποιοτικά είτε ποσοτικά αποτελέσματα, ανάλογα με το σχεδιασμό της διάταξης και το χρησιμοποιούμενο σύστημα ανίχνευσης. Οι προσδιορισμοί που παρέχουν ποιοτικά αποτελέσματα (για παράδειγμα η ανίχνευση της ελονοσίας και του δάγκειου πυρετού (Toley et al., 2013, Deraney et al., 2016), η εξακρίβωση του τύπου αίματος (Li et al., 2012) ή η ανίχνευση της φυματίωσης (Veigas et al., 2012)) βασίζονται συνήθως στην

ανάπτυξη ενός έγχρωμου προϊόντος που μπορεί εύκολα να παρατηρηθεί δια γυμνού οφθαλμού. Για την λήψη ποσοτικών αποτελεσμάτων οι μέθοδοι που εκτελούνται στις διατάξεις χάρτου βαθμονομούνται χρησιμοποιώντας την μέθοδο εξωτερικής βαθμονόμησης κατά την οποία διαλύματα που περιέχουν γνωστές συγκεντρώσεις του αναλύτη αναλύονται με σκοπό την κατασκευή καμπυλών βαθμονόμησης. Με βάση τις καμπύλες βαθμονόμησης υπολογίζεται στη συνέχεια η συγκέντρωση του αναλύτη σε ένα άγνωστο δείγμα από το μετρούμενο σήμα (Glavan et al., 2014, Vella et al., 2012, Jayawardane et al., 2014, Lankelma et al., 2012, Choleva et al., 2015, Rattanarat et al., 2014, Bhakta et al., 2014).

Η μέθοδος της εξωτερικής βαθμονόμησης είναι η πιο διαδεδομένη και παρέχει ακριβή και επαναλήψιμα αποτελέσματα όταν χρησιμοποιείται για την ανάλυση δειγμάτων που δεν έχουν παρεμποδίσεις και συνήθως με απλή μήτρα υποστρώματος. Σε αυτή την περίπτωση, θα πρέπει το δείγμα να είναι ελεύθερο παρεμποδίσεων και οι διαφορές μεταξύ της μήτρας των προτύπων διαλυμάτων (δηλαδή του διαλύτη εργασίας) και του δείγματος να είναι ασήμαντες ώστε να μην επηρεάζουν τα αποτελέσματα της ανάλυσης (Cuadros-Rodriguez et al., 2007). Εν τούτοις, όταν στο δείγμα υπάρχουν παρεμποδίσεις, το αναλυτικό σήμα μπορεί να επηρεάζεται απρόβλεπτα από προσθετικά ή/και αναλογικά συστηματικά σφάλματα. Αυτά τα σφάλματα μπορεί να είναι ανεξάρτητα από την παρουσία και την ποσότητα του αναλύτη (μεταφορικές επιδράσεις μήτρας- translational matrix effects) ή μπορεί να είναι ανάλογα με την ποσότητα του αναλύτη μεταβάλλοντας έτσι την ευαισθησία της μεθόδου (περιστροφικές επιδράσεις μήτρας- rotational matrix effects) (Ellison et al., 2008). Οι αναλύσεις που εκτελούνται σε διατάξεις με βάση το χαρτί είναι ευαίσθητες τόσο στις μεταφορικές όσο και στις περιστροφικές επιδράσεις της μήτρας, επειδή επηρεάζονται όχι μόνο από τη μήτρα και τη σύσταση του δείγματος αλλά και από τους πέντε ακόλουθους παράγοντες: i) Οι αναλύσεις που βασίζονται στο χαρτί χρησιμοποιούν μετρήσεις με βάση την ανάκλαση του φωτός από την επιφάνεια του χάρτου. Οι μετρήσεις αυτές έχουν μεγάλη μεταβλητότητα λόγω της πολυπλοκότητας του μήκους της οπτικής διαδρομής του ανακλώμενου φωτός μέσα στο χαρτί. ii) Τα τυφλά δείγματα εμφανίζουν ισχυρά και πολύ μεταβλητά σήματα υποβάθρου ακόμη και στην ίδια διάταξη χάρτου (Swanson et al., 2015). iii) Η απόκριση ανιχνευτών που χρησιμοποιούνται συνήθως (π.χ. σαρωτές, ψηφιακές κάμερες κ.λπ.) είναι μη γραμμική (Christodouleas et al., 2015, Morbioli et al., 2017). iv) Το αναλυτικό σήμα (δηλ. το χρώμα) δεν είναι ομοιόμορφα κατανομημένο εντός της ζώνης ανίχνευσης

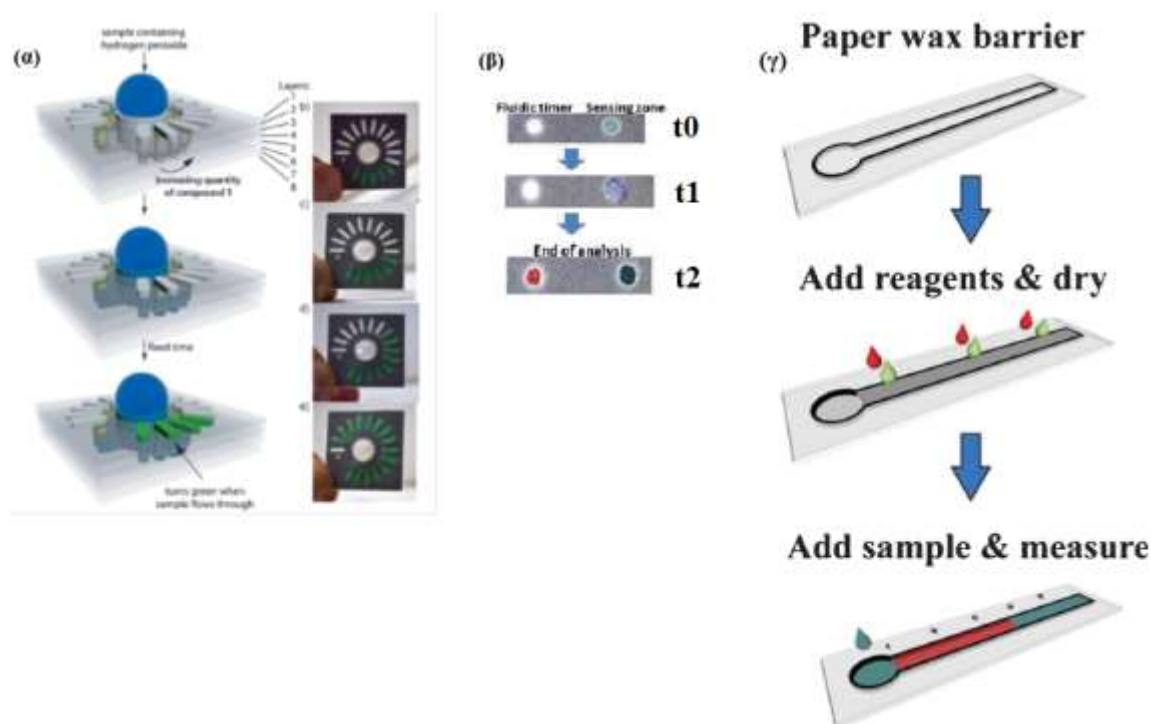
(ευρέως γνωστό ως φαινόμενο διασποράς αντιδραστηρίων-coffee ring effect) (Deegan et al., 1997). ν) Οι περιβαλλοντικές συνθήκες (όπως υγρασία, θερμοκρασία και η ένταση φωτός του περιβάλλοντος) επηρεάζουν τα αποτελέσματα της ανάλυσης (Yetisen et al., 2013). Εξαιτίας των παραπάνω παραγόντων, η εξωτερική βαθμονόμηση μπορεί να μην λαμβάνει επαρκώς υπόψη τις επιδράσεις της μήτρας του δείγματος ή τη μεταβλητότητα του σήματος που καταγράφεται σε διατάξεις χάρτου κατά την ανάλυση πραγματικών δειγμάτων.

Για να διευκολυνθεί η διαδικασία βαθμονόμησης και να ελαχιστοποιηθούν οι επιδράσεις που προκύπτουν από περιβαλλοντικές συνθήκες, αρκετές μελέτες πρότειναν τη χρήση αυτο-βαθμονομουμένων ή προ-βαθμονομημένων διατάξεων χάρτου. Συνήθως, οι αυτο-βαθμονομούμενες διατάξεις περιέχουν προ-αποθηκευμένα πρότυπα διαλύματα του αναλύτη που αναλύονται ταυτόχρονα με τα άγνωστα δείγματα στην ίδια διάταξη. Για παράδειγμα, οι Zhu κ.ά. (Zhu et al., 2014) και Li κ.ά. (Li et al., 2010 II) ανέπτυξαν αυτό-βαθμονομούμενες διατάξεις με διακλαδισμένο σχήμα (δενδροειδές ή αστεροειδές) έτσι ώστε τα πρότυπα διαλύματα του αναλύτη και του άγνωστου δείγματος να μπορούν να αναλυθούν σε (πολλαπλούς) ξεχωριστούς κλάδους μίας μόνο διάταξης (Εικόνα 3.1). Τοποθετούσαν τα πρότυπα διαλύματα του αναλύτη και του άγνωστου δείγματος στους ξεχωριστούς κλάδους της διάταξης και έπειτα άφηναν τα απαραίτητα χρωματομετρικά αντιδραστήρια να ρέουν σε κάθε κλάδο. Τα σήματα που δημιουργήθηκαν σε κάθε ξεχωριστό κλάδο από τα πρότυπα και το δείγμα καταγράφηκαν ταυτόχρονα στην ίδια διάταξη. Έτσι, τόσο η εξωτερική βαθμονόμηση όσο και η ανίχνευση εκτελέστηκαν ταυτόχρονα. Αυτή η προσέγγιση μπορεί να απλοποιήσει τη διαδικασία για την εκπόνηση μιας εξωτερικής καμπύλης βαθμονόμησης και να μειώσει την επίδραση των περιβαλλοντικών συνθηκών (π.χ. συνθήκες φωτισμού) στα αποτελέσματα της ανάλυσης, αλλά δεν λαμβάνει υπόψη τυχόν επιδράσεις της μήτρας των άγνωστων δειγμάτων, καθώς για την προετοιμασία της εξωτερικής καμπύλης βαθμονόμησης χρησιμοποιούνται πρότυπα διαλύματα του αναλύτη (Wang et al., 2010, Zhu et al., 2014, Li et al., 2010).



Εικόνα 3.1. Αυτό-βαθμονομούμενες αναλυτικές διατάξεις χάρτου α) δενδροειδής (αριστερή εικόνα) και β) αστεροειδής (δεξιά εικόνα). Οι αριθμοί 1-5 υποδηλώνουν τα πρότυπα διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης και ενώ χ είναι το άγνωστο δείγμα.

Οι προ-βαθμονομημένες διατάξεις, από την άλλη πλευρά, ενσωματώνουν ένα μηχανισμό μέτρησης σήματος όπως ο χρόνος (Noh et al., 2010, Lewis et al., 2014), η απόσταση (Cate et al., 2013) ή οι έγχρωμες ράβδοι (Lewis et al., 2012). Η τιμή κάθε παραμέτρου έχει προ-βαθμονομηθεί ώστε αντιστοιχεί σε μια συγκεκριμένη συγκέντρωση του αναλύτη (Εικόνα 3.2). Για παράδειγμα, ο Philips και οι συνεργάτες του ανέπτυξαν προ-βαθμονομημένες διατάξεις που συσχετίζουν τη συγκέντρωση του αναλύτη με το χρόνο που απαιτείται για την ανάπτυξη ενός χρώματος (Noh et al., 2010, Lewis et al., 2014) ή τον αριθμό των ράβδων που αλλάζουν χρώμα (Lewis et al., 2012). Άλλοι ερευνητές χρησιμοποίησαν την απόσταση ανάπτυξης χρώματος ως μέτρο της συγκέντρωσης του αναλύτη (Cate et al., 2013).

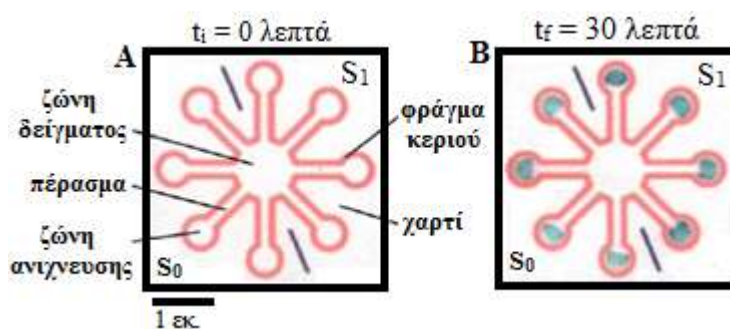


Εικόνα 3.2. Προ-βαθμονομημένες αναλυτικές διατάξεις χάρτου (α) μέτρηση αριθμού έγχρωμων ράβδων (β) μέτρηση χρόνου και (γ) μέτρηση απόστασης.

Οι παραπάνω προσεγγίσεις είναι εύκολο να χρησιμοποιηθούν, αλλά οι διατάξεις απαιτούν πολύπλοκο και σύνθετο σχεδιασμό (Lewis et al., 2012) ενώ μερικές από αυτές είναι κατάλληλες μόνο για συγκεκριμένες χημικές αναλύσεις (π.χ. αναλύσεις που χρησιμοποιούν αντιδράσεις καθίζησης ή νέα αντιδραστήρια) (Cate et al., 2013, Lewis et al., 2012). Σε όλες τις περιπτώσεις, τόσο οι αυτο-βαθμονομημένες όσο και οι προ-βαθμονομημένες διατάξεις δεν μπορούν να αντιμετωπίσουν τυχόν παρεμποδίσεις που πηγάζουν από την μήτρα του υποστρώματος του δείγματος καθώς η βαθμονόμηση του μηχανισμού μέτρησης πραγματοποιείται με τη χρήση προτύπων διαλυμάτων του αναλύτη.

Η βαθμονόμηση σταθερής προσθήκης (σταθερή προσθήκη ενός ή πολλαπλών σημείων) είναι η πλέον κατάλληλη μέθοδος για την άρση των παρεμποδίσεων που προκύπτουν από τις επιδράσεις της μήτρας του υποστρώματος. Πραγματοποιείται σε δυο στάδια που περιλαμβάνουν α) την ανάλυση του αγνώστου δείγματος και β) την ανάλυση του αγνώστου δείγματος στο οποίο έχει προστεθεί συγκέντρωση του αναλύτη (Cuadros-Rodriguez et al., 2007). Από τα αναλυτικά σήματα που λαμβάνονται, υπολογίζεται η συγκέντρωση του αγνώστου δείγματος με βάση τη

γραμμική σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης του αναλύτη και της έντασης του σήματος. Η μέθοδος αυτή όταν πραγματοποιείται υγροχημικά, είναι αρκετά χρονοβόρα (επειδή πρέπει να προετοιμαστεί και να εξεταστεί μεγάλος αριθμός διαλυμάτων για κάθε δείγμα ξεχωριστά (Harvey et al., 2008). Αντίθετα, η ανάλυση σταθερής προσθήκης σε συσκευές χάρτου, πραγματοποιείται ευκολότερα διότι τόσο τα αντιδραστήρια όσο και τα πρότυπα διαλύματα του αναλύτη προστίθενται στη συσκευή κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας τους και αποθηκεύονται σε ξηρή μορφή μέχρι την ανάλυση, η οποία πραγματοποιείται με απλή προσθήκη του δείγματος στη συσκευή. Πάνω σε αυτή τη λογική ο Martinez και οι συνεργάτες του εισήγαγαν τη χρήση της βαθμονόμησης σταθερής προσθήκης ενός σημείου (σταθερή προσθήκη ενός σημείου) σε διατάξεις με βάση το χαρτί και την χρησιμοποίησαν για τον προσδιορισμό της γλυκόζης χρησιμοποιώντας έναν ενζυματικό προσδιορισμό (Chaplan et al., 2014). Συγκεκριμένα, κατασκεύασαν μια διακλαδισμένη διάταξη χάρτου και αποθήκευσαν τα απαραίτητα χρωματομετρικά αντιδραστήρια στις περιοχές ανίχνευσης της διάταξης καθώς και ένα πρότυπο διάλυμα γλυκόζης σε μερικά από τα μικρορευστονικά κανάλια (Εικόνα 3.3). Καθώς το δείγμα ρέει στα μικρορευστονικά κανάλια που περιέχουν το πρότυπο διάλυμα γλυκόζης, γίνεται έκπλυση του διαλύματος γλυκόζης και μεταφορά του, μαζί με το δείγμα, στις περιοχές ανίχνευσης για να αντιδράσουν με τα αντιδραστήρια της ανάλυσης. Με αυτόν τον τρόπο, τόσο τα άγνωστα δείγματα όσο και τα δείγματα με ένα επίπεδο επικάλυψης της υπό προσδιορισμό ουσίας μετρούνται ταυτόχρονα, στην ίδια διάταξη.



Εικόνα 3.3. Συσκευές χάρτου για την πραγματοποίηση αναλύσεων σταθερής προσθήκης ενός σημείου.

Λόγω του γεγονότος ότι η καμπύλη αναφοράς του προσδιορισμού της γλυκόζης, δεν ήταν γραμμική, για να εκτελεστεί η μέθοδος σταθερής προσθήκης μονού σημείου, αποφάσισαν να προσαρμόσουν τα δεδομένα τους σε μία εμπειρική

συνάρτηση βαθμονόμησης και να υπολογίσουν τη συγκέντρωση άγνωστων δειγμάτων. Η προσέγγιση αυτή όμως έχει τρία πιθανά μειονεκτήματα. i) Εξ ορισμού, η σταθερή προσθήκη ενός σημείου απαιτεί σαφώς καθορισμένες, τυπικά, γραμμικές καμπύλες αναφοράς που πρέπει να υπολογιστούν πριν από την ανάλυση. Όπως αναφέρεται από τους ίδιους τους συγγραφείς (Chaplan et al., 2014) αυτό δεν είναι πάντα εφικτό, συνεπώς, χρησιμοποίησαν μια εμπειρική συνάρτηση για τον υπολογισμό του αποτελέσματος. Ωστόσο, οι εμπειρικές συναρτήσεις μπορεί να μην συνυπολογίζουν αλλαγές στη φύση ή το μέγεθος των επιδράσεων της μήτρας. Ως εκ τούτου, διαφορετικές επιδράσεις μήτρας μπορούν να αλλάξουν τις καμπύλες αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν για τους υπολογισμούς και να παραγάγουν λανθασμένα αποτελέσματα. ii) Τα πειραματικά σφάλματα στη μέτρηση του άγνωστου δείγματος ή του δείγματος με ένα σημείο σταθερής προσθήκης μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά το τελικό αποτέλεσμα, διότι το αποτέλεσμα προσδιορίζεται χρησιμοποιώντας μόνο δύο σημεία βαθμονόμησης (σε αντίθεση με πέντε ή περισσότερα σημεία δεδομένων τα οποία είναι χρησιμοποιούνται συνήθως όταν εκτελείται μια καμπύλη βαθμονόμησης) (Kóscielniak et al., 1999). iii) Απαιτείται εκτίμηση της συγκέντρωσης του αναλύτη στο δείγμα, διότι το επίπεδο της επικάλυψης επηρεάζει την ακρίβεια (Chaplan et al., 2014, Zhao et al., 2008).

Λαμβάνοντας υπόψη τους περιορισμούς των προηγούμενων μεθόδων, στο κεφάλαιο αυτό, περιγράφουμε μια νέα, γενική προσέγγιση για την πραγματοποίηση βαθμονόμησης σταθερής προσθήκης πολλαπλών σημείων σε διατάξεις χάρτου που βασίζονται στη χρήση βαθμονομημένων διατάξεων. Οι βαθμονομημένες διατάξεις σχηματίζονται με εναπόθεση μιας σειράς πρότυπων διαλυμάτων του αναλύτη στις ζώνες ανίχνευσης των διατάξεων μαζί με τα κατάλληλα αντιδραστήρια. Με αυτόν τον τρόπο, τα πρότυπα διαλύματα αντιδρούν με τα αντιδραστήρια και παράγονται έγχρωμα προϊόντα. Ως εκ τούτου, οι ζώνες ανίχνευσης περιέχουν μια ποσότητα των έγχρωμων προϊόντων της αντίδρασης (που είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση των πρότυπων διαλυμάτων) και την περίσσεια της ποσότητας των αντιδραστηρίων που παρέμειναν χωρίς να αντιδράσουν. Κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, η περίσσεια των αντιδραστηρίων στη ζώνη ανίχνευσης αντιδρά με τον αναλύτη που υπάρχει στο δείγμα παράγοντας ένα αθροιστικό αναλυτικό σήμα το οποίο αντιστοιχεί στη συνολική συγκέντρωση του αναλύτη στην περιοχή ανίχνευσης (αναλύτης στο δείγμα συν αναλύτης στο πρότυπο διάλυμα που προ-υπάρχει στη διάταξη). Τα αθροιστικά σήματα απεικονίζονται γραφικά σε σχέση με τη συγκέντρωση των προτύπων

διαλυμάτων για να παραχθεί μια καμπύλη σταθερής προσθήκης πολλαπλών σημείων. Η καμπύλη προσαρμόζεται σε ένα γραμμικό (ή μη γραμμικό) μοντέλο που επιλέγεται βάσει αυστηρών αλγεβρικών κριτηρίων και στη συνέχεια χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του αναλύτη με την προβολή της συγκέντρωσης που αντιστοιχεί στο μηδενικό σήμα.

Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε αρχικά για την πραγματοποίηση αναλύσεων βιοθειολών (με φωτοαναγωγή των αλογονιδίων του αργύρου σε αναλυτικές διατάξεις χάρτου), όπως περιεγράφηκε στο Κεφάλαιο 2. Σκοπός μας ήταν η περαιτέρω απλοποίηση της μεθόδου ανάλυσης των βιοθειολών αίροντας την ανάγκη για πραγματοποίηση εξωτερικής βαθμονόμησης πριν την ανάλυση. Με τον τρόπο αυτό η ανάλυση μπορεί να πραγματοποιηθεί άμεσα στο σημείο φροντίδας με απλότητα και ταχύτητα. Κατά την διάρκεια της μελέτης αυτής όμως διαπιστώσαμε ότι οι καμπύλες σταθερής προσθήκης απέκλιναν από τη γραμμικότητα όταν οι εικόνες των διατάξεων λαμβάνονταν με φωτογραφική κάμερα σε διάφορες συνθήκες φωτισμού (αντί για σαρωτή γραφείου). Ως αποτέλεσμα δεν μπορούσε να εφαρμοστεί η απλή γραμμική παλινδρόμηση για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων. Με αυτό ως έναυσμα μελετήσαμε την μέθοδο και σε άλλες αναλυτικές μεθόδους ώστε να διαπιστωθεί αν η μη γραμμικότητα είναι τυχαίο γεγονός στις συγκεκριμένη μέθοδο και υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες ανάλυσης (λήψη φωτογραφιών υπό μεταβαλλόμενες συνθήκες φωτισμού έναντι σταθερών συνθηκών φωτισμού στο σαρωτή) ή ένα γενικότερο φαινόμενο που μπορεί να εμφανιστεί και σε άλλες περιπτώσεις. Και αυτό διότι η μη γραμμικές καμπύλες εξωτερικής βαθμονόμησης είναι πιο απαιτητικές στην επίλυση τους ενώ οι περισσότεροι χρήστες δεν είναι εξοικειωμένοι με την χρήση τους γεγονός που θα μπορούσε να αποτελεί μειονέκτημα και περιορισμό για την γενική εφαρμογή της μεθόδου. Προς την κατεύθυνσή αυτή η μέθοδος αξιολογήθηκε σε πέντε επιπλέον μεθόδους που βασίζονται σε διάφορες χημικές διεργασίες (όπως, συμπλοκοποίηση, οξειδοαναγωγή και αντιδράσεις εξουδετέρωσης) για τον προσδιορισμό i) σιδήρου (χρησιμοποιώντας την αντίδραση συμπλοκοποίησης του σιδήρου με θειοκυανιούχα ιόντα) σε δισκία συμπληρωμάτων διατροφής, ii) πρωτεϊνών (με βάση την αντίδραση συμπλοκοποίησης των πρωτεϊνών με μπλε βρωμοφαινόλης) σε ανθρώπινα ούρα, iii) υπεροξειδίου του υδρογόνου (χρησιμοποιώντας την αντίδραση οξείδωσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου με ιωδιούχα σε διαλύματα για φακούς επαφής, iv) οξικού οξέος (χρησιμοποιώντας τιτλομετρικές δοκιμές με υδροξείδιο του νατρίου και φαινολοφθαλεΐνη) και v)

ανθρακικών ιόντων (χρησιμοποιώντας τιτλομετρικούς προσδιορισμούς με HCl και με φαινολοφθαλεΐνη) σε εμπορικά δείγματα ανθρακικού νατρίου. Βάσει των αποτελεσμάτων, αναπτύξαμε μια νέα γενικευμένη προσέγγιση για την ανάλυση πραγματικών δειγμάτων στο σημείο ανάγκης χωρίς την ανάγκη εξωτερικής βαθμονόμησης και επιδεικνύουμε την εφαρμοσιμότητα της τόσο στην ανάλυση βιοθειολών όσο και σε άλλες εφαρμογές.

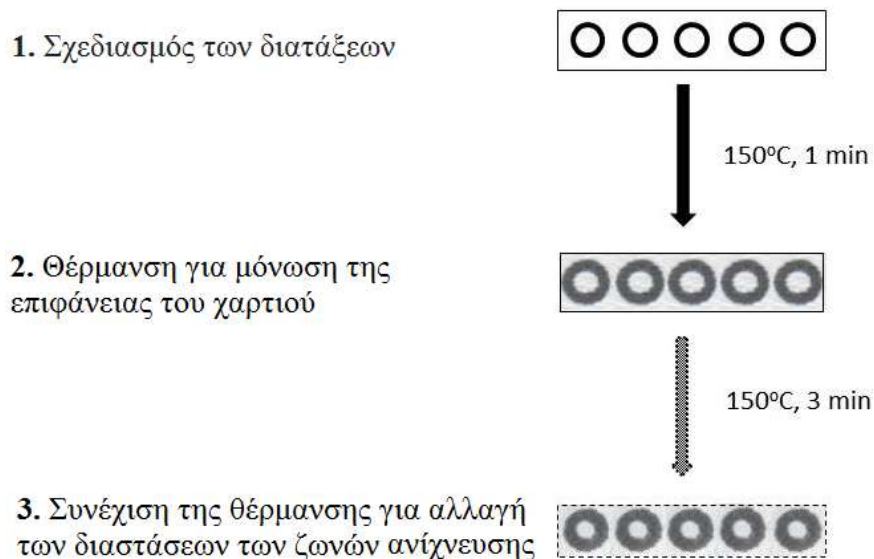
3.2 Υλικά και μέθοδοι

3.2.1 Αντιδραστήρια και υλικά

Όλα τα χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια ήταν αναλυτικής καθαρότητας. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου (30%, Perhydrol®), το θειοκυανιούχο αμμώνιο, το υδροξείδιο του νατρίου (Titripur®), η ουρία, το χλωριούχο αμμώνιο και ο δείκτης φαινολοφθαλεΐνης αγοράστηκαν από την Merck-Millipore (Darmstadt, Germany). Η αλβουμίνη από ορό βοοειδών (BSA), η L-κυστεΐνη, η DL-ομοκυστεΐνη, το άλας νατρίου της βρωμοφαινόλης (BPB), το γαλακτικό οξύ, το δισόξινο φωσφορικό κάλιο, το φωσφορικό κάλιο, το ιωδιούχο κάλιο, το παγόμορφο οξικό οξύ, το κιτρικό νάτριο, το διττανθρακικό νάτριο, το χλωριούχο ασβέστιο, το χλωριούχο νάτριο και το ανθρακικό νάτριο προμηθεύτηκαν από την Sigma-Aldrich. Η αιθανόλη HPLC ελήφθη από την Fisher Scientific (Loughborough, UK). Η L-γλουταθειόνη (ανηγμένη μορφή) και ο AgNO₃ (>99%) ελήφθησαν από την Alpha Aesar (Karlsruhe, Γερμανία). Οι διατάξεις χαρτιού παρασκευάστηκαν σε χαρτί χρωματογραφίας Whatman No. 1.

3.2.2 Κατασκευή διατάξεων χάρτου

Ο όρος «διάταξη» χρησιμοποιείται εδώ για να περιγράψει μια σειρά μεμονωμένων ζωνών ανίχνευσης στρογγυλού σχήματος όπως φαίνονται στην Εικόνα 3.4.

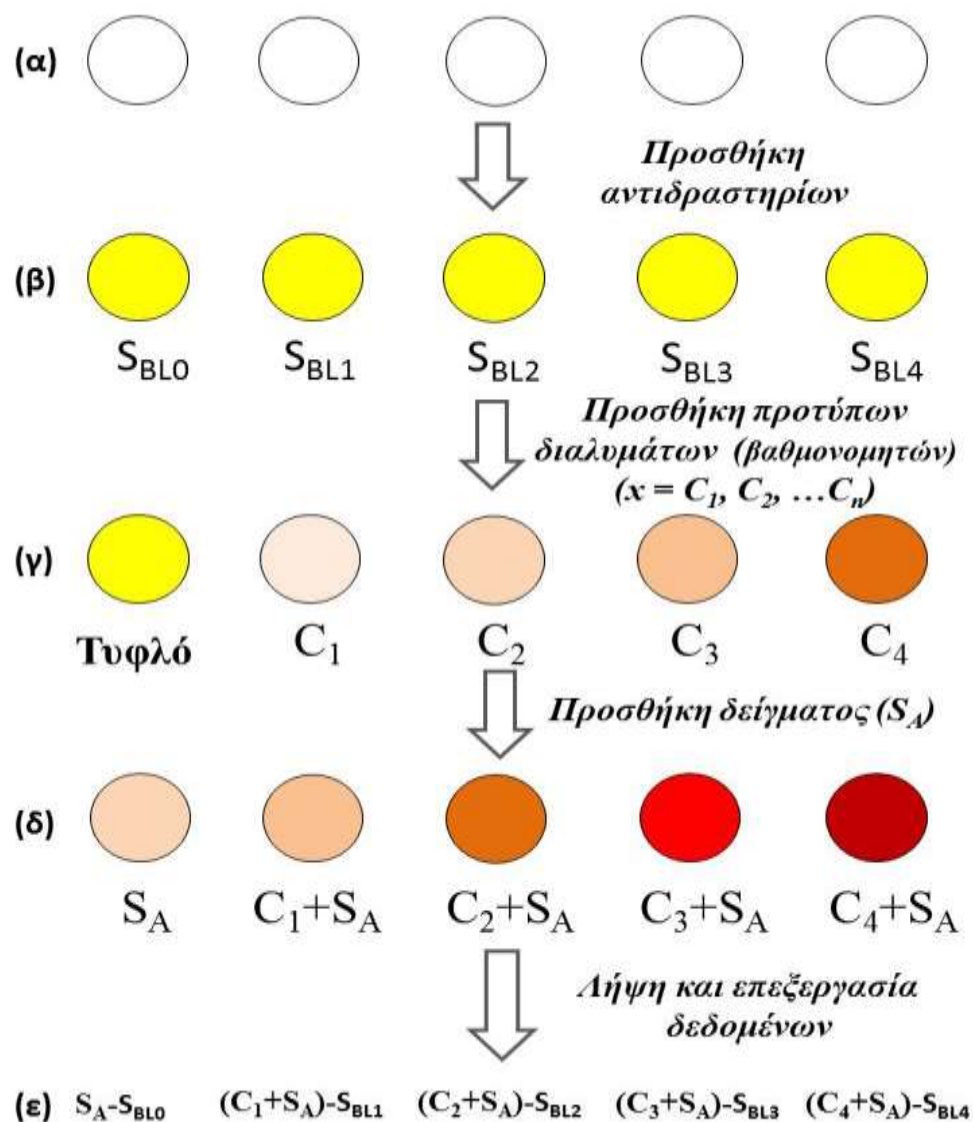


Εικόνα 3.4. Σχεδιασμός και προετοιμασία των διατάξεων.

Για την εκτύπωση των διατάξεων δοκιμάσαμε χαρτιά χαμηλού πάχους (όπως χαρτί διηθήσεως και χαρτί χρωματογραφίας) καθώς παρέχουν μεγαλύτερη μεταγωγή σήματος από την επιφάνεια αδιαφανούς χάρτου (Evans et al., 2014). Το διηθητικό χαρτί (Munktell, ποιοτικά φύλλα χάρτου, βαθμός 34/N, 0,18mm, 60g m⁻²) εξετάστηκε λόγω χαμηλού κόστους και χαμηλής επιφάνειας ανά βάρος, ενώ το χρωματογραφικό χαρτί (Whatman, Χρωματογραφικό χαρτί No.1 φύλλα, 0,18mm, 87g m⁻²) δοκιμάστηκε επειδή είναι ομοιογενές (ομοιόμορφο πάχος) και δεν περιέχει προσμίξεις. Το μοτίβο της διάταξης τυπώθηκε στο χαρτί χρησιμοποιώντας έναν εκτυπωτή στερεάς μελάνης (ColorQube 8580DN, Xerox, CT). Οι διατάξεις στη συνέχεια θερμάνθηκαν στους 150 ± 5°C για 2 λεπτά. Οι διατάξεις που παράχθηκαν με αυτή τη διαδικασία είχαν διάμετρο 0,8cm, εσωτερική διάμετρο 0,40cm (υδρόφιλη ζώνη ανίχνευσης) και πάχος φράγματος 0,20cm. Οι διατάξεις για την ανίχνευση υπεροξειδίου του υδρογόνου θερμάνθηκαν για 4 λεπτά και η εσωτερική τους διάμετρος ήταν 0,28cm.

3.2.3 Προετοιμασία και χρήση διατάξεων με βαθμονόμηση

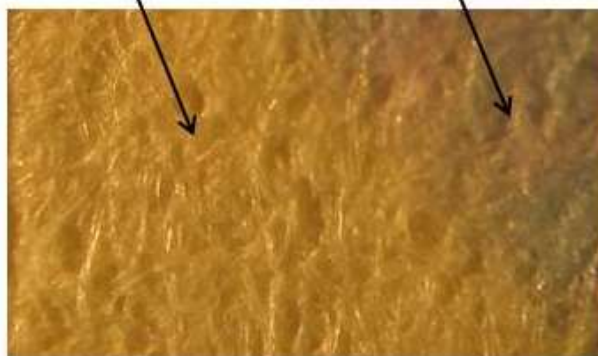
Για την προετοιμασία των βαθμονομημένων διατάξεων χάρτου, προσθέσαμε πρώτα τα χρωματομετρικά αντιδραστήρια στις ζώνες ανίχνευσης των διατάξεων, τα αφήσαμε να στεγνώσουν και στη συνέχεια ελήφθη μια ψηφιακή εικόνα των διατάξεων για να ανακτήσουμε τις τιμές του υποβάθρου (δηλαδή την ένταση του χρώματος από διατάξεις που δεν περιέχουν τον αναλύτη) (Εικόνα 3.5.β). Στη συνέχεια, εναποθέσαμε στη ζώνη ανίχνευσης των διατάξεων, πρότυπα διαλύματα του αναλύτη (βαθμονομητές) σε διάφορα επίπεδα συγκεντρώσεων, συμπεριλαμβανομένου ενός τυφλού δείγματος χωρίς αναλυτή (ένα διάλυμα βαθμονόμησης ανά ζώνη ανίχνευσης). Τα χρωματομετρικά αντιδραστήρια που εναποτέθηκαν στις ζώνες ανίχνευσης αντέδρασαν με τον αναλύτη που υπήρχε στα διαλύματα βαθμονόμησης σχηματίζοντας τα χρωματομετρικά προϊόντα των αντιδράσεων (Εικόνα 3.5.γ). Οι διατάξεις ξηράθηκαν και αποθηκεύτηκαν μέχρι να χρησιμοποιηθούν.



Εικόνα 3.5. Διαδικασία και πειραματική πορεία ανάλυσης δείγματος σε βαθμονομημένες διατάξεις χάρτου: α) οι διατάξεις εκτυπώνονται και θερμαίνονται ώστε να διαμορφωθούν οι περιοχές ανίχνευσης, β) τα χρωματομετρικά αντιδραστήρια και οι δείκτες εναποτίθενται στην επιφάνεια των ζωνών ανίχνευσης και αφήνονται να στεγνώσουν, γ) προστίθενται τα διαλύματα βαθμονόμησης, οι διατάξεις ξηραίνονται και αποθηκεύονται, δ) σε κάθε περιοχή ανίχνευσης εναποτίθεται ένας συγκεκριμένος όγκος δείγματος και αποκτάται το σήμα, ε) τα σήματα του τυφλού από κάθε περιοχή ανίχνευσης αφαιρούνται από το συνολικό σήμα και σχηματίζεται η καμπύλη σταθερής προσθήκης για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του αναλύτη.

Η Εικόνα 3.6 δείχνει μια εικόνα οπτικού μικροσκοπίου μιας βαθμονομημένης διάταξης για τον προσδιορισμό σιδήρου (III).

Περιοχή ανίχνευσης Στερεό μελάνι



Εικόνα 3.6. Εικόνες οπτικού μικροσκοπίου μιας βαθμονομημένης διάταξης για τον προσδιορισμό σιδήρου (III) -θειοκυανιούχων. Η επάνω δεξιά πλευρά της εικόνας δείχνει το υδρόφοβο φράγμα με βάση το κερί.

Για την ανάλυση των πραγματικών δειγμάτων, τοποθετήθηκε συγκεκριμένος όγκος δείγματος σε κάθε μία από τις ζώνες ανίχνευσης, συμπεριλαμβανομένης της ζώνης ανίχνευσης του τυφλού (προκειμένου να χρησιμεύσει ως το πρώτο σημείο της καμπύλης βαθμονόμησης σταθερής προσθήκης). Δεδομένου ότι η ανάλυση διεξάγεται χωρίς να ρέει το δείγμα ή τα αντιδραστήρια στην επιφάνεια του χάρτου (Rattanasarat et al., 2014, Zhao et al., 2008, Ornatska et al., 2011), οι απαιτήσεις όγκου δείγματος ελαχιστοποιούνται (<10μL ανά ανάλυση) και μειώνεται τυχόν ανομοιομορφία μεταφοράς του υγρού δείγματος λόγω ανομοιογένειας του χάρτου ή των περιβαλλοντικών συνθηκών (υγρασία και θερμοκρασία). Ο αναλύτης που υπήρχε στο δείγμα αντέδρασε με την περίσσεια των αντιδραστηρίων που παρέμειναν μετά την προσθήκη των πρότυπων διαλυμάτων και απέδωσε το χρωματομετρικό προϊόν της αντίδρασης. Το συνολικό πλέον χρώμα στην ζώνη ανίχνευσης αντιστοιχούσε στη συνολική συγκέντρωση του αναλύτη (προστιθέμενο δείγμα και πρότυπο διάλυμα) (Εικόνα 3.5.δ) . Μετά την ξήρανση καταγράφηκαν τα αναλυτικά σήματα από κάθε ζώνη ανίχνευσης (δηλ. η τιμή του χρώματος) και αφαιρέθηκαν οι τιμές των τυφλών (υπόβαθρο) (Εικόνα 3.5.ε). Η απόλυτη διαφορά (Δ) μεταξύ της έντασης αναλυτικού σήματος του τυφλού και του δείγματος χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό του καθαρού αναλυτικού σήματος. Για την προετοιμασία της καμπύλης πολλαπλής

σταθερής προσθήκης για κάθε προσδιορισμό, τα καθαρά αναλυτικά σήματα των διατάξεων απεικονίστηκαν σε γραφική παράσταση έναντι της συγκέντρωσης των διαλυμάτων βαθμονόμησης που είχαν προηγουμένως αποθηκευτεί στις διατάξεις. Η προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων σε γραμμικά ή μη γραμμικά πολυωνυμικά μοντέλα (π.χ. 1^{ης}, 2^{ης}, 3^{ης} ή 4^{ης} τάξης) ελέγχθηκε με τη χρήση δύο κριτηρίων επιλογής μαθηματικών μοντέλων: το κριτήριο Akaike (Akaike Information Criterion - AIC) και το κριτήριο Bayes (Bayes Information Criterion - BIC). Το πολυωνυμικό μοντέλο που ελαχιστοποιούσε τα κριτήρια AIC και BIC χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του αναλύτη στο δείγμα με προβολή του σήματος στην (αρνητική) προέκταση του άξονα των x για μηδενική απόκριση ($y = 0$).

3.2.4 Βελτιστοποίηση πειραματικών συνθηκών

Σε όλες τις μεθόδους που εξετάστηκαν, η ποσότητα των αντιδραστηρίων που είχαν προηγουμένως αποθηκευτεί στις διατάξεις επελέγη με βάση τα αποτελέσματα προκαταρκτικών μελετών βελτιστοποίησης. Η μελέτη βελτιστοποίησης για όλους τους προσδιορισμούς διεξήχθη μελετώντας τη βέλτιστη συγκέντρωση των χρωματομετρικών αντιδραστηρίων σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις αναλύτη (100,0 ng/mL σιδήρου (III), 50,0μM BSA, 100,0mM υπεροξειδίου του υδρογόνου, 0,1M CH₃COOH και 1,0M ανθρακικών ιόντων), προκειμένου να διασφαλιστεί ότι η ποσότητα των αντιδραστηρίων θα είναι επαρκής για την εφαρμογή της μεθόδου σταθερής προσθήκης και δεν θα περιορίσει το δυναμικό εύρος των συγκεντρώσεων βαθμονόμησης λόγω κορεσμού του σήματος. Η ανάλυση των βιοθειολών πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις βέλτιστες πειραματικές συνθήκες που προέκυψαν από την μελέτη βελτιστοποίησης όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.

Αρχικά δοκιμάστηκαν δύο τύποι χάρτου (διηθητικό και χρωματογραφίας Whatman No.1). Σε όλες τις αναλύσεις, καλύτερα αποτελέσματα ελήφθησαν με διηθητικό χαρτί, εκτός από τον προσδιορισμό ανθρακικών ιόντων, όπου καλύτερα αποτελέσματα ελήφθησαν από το χαρτί χρωματογραφίας Whatman No.1. Από τη μελέτη βελτιστοποίησης διαπιστώθηκε ότι η βέλτιστη μάζα των αντιδραστηρίων ήταν 3μmole SCN⁻ για την ανίχνευση του σιδήρου (III), 4nmole BPB για την ανίχνευση πρωτεϊνών, 1μmole I⁻ για την ανίχνευση του υπεροξειδίου του υδρογόνου και 10μg φαινολοφθαλεΐνης για την ανίχνευση ιόντων οξικού οξέος και ανθρακικών ιόντων. Αυτές οι τιμές είναι υψηλότερες από αυτές που χρησιμοποιήθηκαν σε προηγούμενες

μελέτες που χρησιμοποιούν εξωτερική βαθμονόμηση σε ζώνες ανίχνευσης χάρτου παρόμοιου μεγέθους, για τους ίδιους αναλύτες και για συγκρίσιμα επίπεδα συγκέντρωσης (Martinez et al., 2007, Giokas et al., 2014, Renault et al., 2013, Karita et al., 2014, Brooks et al., 1997). Συνεπώς, η ποσότητα των αντιδραστηρίων που αποθηκεύτηκαν στις διατάξεις ήταν αρκετή για να αντιδράσουν τόσο με τους βαθμονομητές που είχαν προ-αποθηκευτεί στις διατάξεις όσο και με τον αναλύτη στα προς δοκιμή δείγματα και δεν περιορίζει το δυναμικό εύρος της μεθόδου λόγω κορεσμού του σήματος.

Για να αποκτήσουμε τα αναλυτικά σήματα, καταγράψαμε εικόνες από την περιοχή ανίχνευσης των διατάξεων πριν και μετά την προσθήκη δείγματος με τη χρήση επίπεδου σαρωτή (Canon LIDE 20). Χρησιμοποιήσαμε επίπεδο σαρωτή επειδή όλες οι εικόνες των διατάξεων μπορούσαν να αποκτηθούν υπό σταθερές συνθήκες φωτισμού και με συνεχή εστίαση από τον ανιχνευτή. Αποθηκεύσαμε τα αρχεία σε μορφή JPEG (300dpi) και στη συνέχεια χρησιμοποιήσαμε το πρόγραμμα Image J για να μετρήσουμε τη μέση ένταση του χρώματος (σε κλίμακα γκρι ή σε λειτουργία RGB). Λόγω μη γραμμικότητας των δεδομένων της καμπύλης σταθερής προσθήκης σε ορισμένους από τους προσδιορισμούς, επιλέξαμε την απλούστερη προσέγγιση για την απόκτηση του αναλυτικού σήματος ώστε να ελαχιστοποιηθεί η παρέμβαση από τον χρήστη και τα βήματα επεξεργασίας.

Οι διαδικασίες για την προετοιμασία και την εφαρμογή των βαθμονομημένων διατάξεων για κάθε προσδιορισμό περιγράφονται λεπτομερώς ακολούθως:

Προσδιορισμός βιοθειολών. Ο προσδιορισμός των βιοθειολών σε δείγματα συνθετικού αίματος έγινε χρησιμοποιώντας την ίδια πειραματική πορεία που περιεγράφηκε στο Κεφάλαιο 2.

Προσδιορισμός σιδήρου (III). Σε αυτή την μέθοδο, ο σίδηρος (III) (που υπάρχει στο δείγμα) αντιδρά με τα θειοκυανιούχα ιόντα (που είναι αποθηκευμένα στη διάταξη) προς το σχηματισμό του αιματέρυθρου συμπλόκου $[\text{FeSCN}]^{2+}$. Προετοιμάσαμε τις διατάξεις με απόθεση 1.0μL διαλύματος 3.0M NH_4SCN σε κάθε διάταξη, αφήνοντάς το να στεγνώσει και έπειτα προσθέσαμε 1.0μL του βαθμονομητή (πρότυπα διαλύματα σιδήρου (III) σε εύρος συγκεντρώσεων 0-150ng/μL). Οι διατάξεις ξηράθηκαν στον αέρα και αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι τη χρήση.

Δοκιμάσαμε αυτές τις διατάξεις για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης σιδήρου (III) σε δισκία συμπληρωμάτων διατροφής. Αρχικά διαλύσαμε κάθε δισκίο σε 10mL διαλύματος 8,0M HNO₃ υπό θερμές συνθήκες (~ 50°C) για να ληφθεί ένα εκχύλισμα. Στη συνέχεια διηθήσαμε το εκχύλισμα, το εξουδετερώσαμε με NaOH και το διαλύσαμε σε τελικό όγκο 50mL με απεσταγμένο νερό. Δείγμα 1,0μL προστέθηκε σε κάθε ζώνη ανίχνευσης, αποξηράθηκε και ελήφθησαν έγχρωμες εικόνες των διατάξεων. Ως αναλυτικό σήμα χρησιμοποιήσαμε τη μέση γκρι ένταση των περιοχών ανίχνευσης.

Προσδιορισμός των πρωτεϊνών. Αυτή η μέθοδος βασίζεται στην αντίδραση των πρωτεϊνών με μπλε βρωμοφαινόλης (BPB) που αποθηκεύεται στη διάταξη, προς σχηματισμό ενός υδρόφοβου μπλε συμπλόκου. Για την προετοιμασία των διατάξεων, τοποθετήσαμε στο κέντρο της διάταξης 2,0μL διαλύματος κιτρικού οξέος 250mM (pH = 2,0) (2 φορές) και 1,0μL διαλύματος BPB (4,0mM). Μεταξύ κάθε προσθήκης ενός αντιδραστήριου, η διάταξη αφέθηκε να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστέθηκε ένα 1.0 μL του βαθμονομητή (πρότυπα διαλύματα BSA σε εύρος συγκεντρώσεων 0-60μM) και οι διατάξεις αφέθηκαν να στεγνώσουν σε συνθήκες περιβάλλοντος και αποθηκεύτηκαν στους 4°C χωρίς υγρασία, μέχρι τη χρήση.

Χρησιμοποιήσαμε αυτές τις διατάξεις για την ανάλυση πρωτεϊνών στα ούρα. Τεχνητό διάλυμα ούρων παρασκευάστηκε με ανάμιξη 1,1mM γαλακτικού οξέος, 2,0mM κιτρικού οξέος, 25,0mM διττανθρακικού νατρίου, 170,0mM ουρίας, 2,5mM χλωριούχου ασβεστίου, 90,0mM χλωριούχου νατρίου, 2,0mM θεικού μαγνησίου, 10,0mM θεικού νατρίου, 7,0mM δισόξινου φωσφορικού καλίου, 7,0mM όξινου φωσφορικού καλίου και 25,0mM χλωριούχου αμμωνίου σε απεσταγμένο νερό και ρύθμιση του pH στην τιμή 6,0 (Deegan et al., 1997). Στη συνέχεια προστέθηκε μια γνωστή ποσότητα πρωτεΐνης (δηλ. BSA) και το μίγμα χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα. Κλάσμα 1,5μL τεχνητού δείγματος ούρων προστέθηκε σε κάθε περιοχή ανίχνευσης, αποξηράθηκε και ελήφθησαν έγχρωμες εικόνες των διατάξεων. Για τη βαθμονόμηση των διατάξεων και την προετοιμασία των καμπυλών σταθερής προσθήκης χρησιμοποιήσαμε ως αναλυτική παράμετρο την ένταση τη απόχρωσης του κόκκινου των περιοχών ανίχνευσης.

Προσδιορισμός υπεροξειδίου του υδρογόνου. Σε αυτή την μέθοδο, το H_2O_2 αντιδρά με ιωδιούχα (I^-) και τα οξειδώνει σε ιώδιο (I_2), το οποίο στη συνέχεια αντιδρά και πάλι με τα ιωδιούχα, σχηματίζοντας τα κίτρινα-καφέ ιόντα τριϊωδίου (I_3^-). Οι διατάξεις για την ανάλυση του H_2O_2 προετοιμάστηκαν με εναπόθεση και ξήρανση 1.0μL 1.0M KI στη ζώνη ανίχνευσης, φροντίζοντας να προστατέψουμε τις διατάξεις από την έκθεση σε φως. Στη συνέχεια προσθέσαμε 1.0μL του βαθμονομητή (πρότυπα διαλύματα H_2O_2 σε εύρος συγκεντρώσεων 0-100mM). Οι διατάξεις αποθηκεύτηκαν για ξήρανση σε αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου (N_2) στους 4°C, υπό συνθήκες χωρίς υγρασία και προστατευμένες από την έκθεση σε φως.

Χρησιμοποιήσαμε αυτές τις διατάξεις για τον προσδιορισμό του H_2O_2 σε διαλύματα καθαρισμού για φακούς επαφής. Αγοράσαμε αυτά τα διαλύματα από τα τοπικά καταστήματα και τα αραιώσαμε 40 φορές με απεσταγμένο νερό. Δείγμα 1,0μL προστέθηκε στο κέντρο των ζωνών ανίχνευσης, ξηράθηκε και αποκτήθηκαν έγχρωμες εικόνες των διατάξεων. Επεξεργαστήκαμε αυτές τις εικόνες ρυθμίζοντας το εύρος ορίου απόχρωσης στην τιμή των 157.225, μετατρέποντας την εικόνα σε γκρι κλίμακα (8-bit) και ανεστραμμένη. Για τη βαθμονόμηση των διατάξεων και την προετοιμασία των καμπυλών σταθερής προσθήκης χρησιμοποιήσαμε ως αναλυτική παράμετρο τη μέση τιμή της γκρίζας περιοχής των ζωνών ανίχνευσης.

Προσδιορισμός οξικού οξέος. Αυτή η μέθοδος βασίζεται σε οξεο-βασική τιτλοδότηση. Το οξικό οξύ στο δείγμα εξουδετερώνει τα OH^- που έχουν αποθηκευτεί στην περιοχή ανίχνευσης της διάταξης χάρτου και η φαινολοφθαλεΐνη ανιχνεύει τις μεταβολές του pH στην περιοχή ανίχνευσης. Για την προετοιμασία αυτών των διατάξεων, αποθέσαμε 1.0μL NaOH 0.15M και 0.5μL διαλύματος δείκτη (φαινολοφθαλεΐνη 1.0% σε αιθανόλη) στη ζώνη ανίχνευσης. Σχηματίστηκε ένας μωβ χρωματισμός λόγω του σχηματισμού της αποπρωτονιωμένης φαινολικής μορφής της φαινολοφθαλεΐνης. Όταν προστέθηκε ο βαθμονομητής (1.0μL υδατικών προτύπων διαλυμάτων οξικού οξέος σε ένα εύρος συγκεντρώσεων 0-0.1M), μέρος του OH^- που ήταν αποθηκευμένο στη διάταξη εξουδετερώθηκε και η χρωματομετρική αντίδραση αντιστράφηκε αναλογικά με τη συγκέντρωση του οξέος. Αφού ξηράθηκαν, οι διατάξεις αποθηκεύτηκαν στους 4°C υπό συνθήκες χωρίς υγρασία και προστατεύθηκαν από την έκθεση σε φως.

Χρησιμοποιήσαμε αυτές τις διατάξεις για να μετρήσουμε την οξύτητα εμπορικών δειγμάτων ξιδιού. Το ξύδι αρχικά αραιώθηκε (1:100) με απεσταγμένο

νερό. Κλάσμα 1,0 μL του δείγματος εναποτέθηκε σε κάθε διάταξη και αποκτήθηκαν έγχρωμες εικόνες των ξηρών διατάξεων. Για τη βαθμονόμηση των διατάξεων και την προετοιμασία των καμπύλων σταθερής προσθήκης χρησιμοποιήσαμε ως αναλυτική παράμετρο τη μέση γκρίζα ένταση των περιοχών ανίχνευσης.

Προσδιορισμός ανθρακικών ιόντων. Η μέθοδος για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ανθρακικών ιόντων βασίζεται σε οξεο-βασική τιτλοδότηση. Συγκεκριμένα, η αλκαλικότητα ενός δείγματος που περιέχει ανθρακικά ιόντα επάγει χρωματομετρικές μεταπτώσεις στην περιοχή ανίχνευσης των διατάξεων που περιέχουν οξύ (HCl) και δείκτη (φαινολοφθαλεΐνη). Για την προετοιμασία των διατάξεων, αποθέσαμε 1.0 μL διαλύματος HCl 0.05M ακολουθούμενη από την προσθήκη δείκτη φαινολοφθαλεΐνης (0.5 μL , 1% σε αιθανόλη). Αρχικά οι διατάξεις δεν είχαν χρώμα (δηλαδή ήταν λευκές) λόγω της πρωτονίωσης της φαινολοφθαλεΐνης από τα H^+ . Όταν προστέθηκαν 1.0 μL του διαλύματος βαθμονόμησης (πρότυπα διαλύματα Na_2CO_3 σε εύρος συγκεντρώσεων 0-0.9M), τα H^+ εξουδετερώθηκαν καταλήγοντας στο χαρακτηριστικό μωβ χρώμα της αποπρωτονιωμένης φαινολικής μορφής της φαινολοφθαλεΐνης. Μετά την ξήρανση, οι διατάξεις αποθηκεύτηκαν στους 4°C υπό συνθήκες χωρίς υγρασία και προστατευμένες από την έκθεση σε φως.

Χρησιμοποιήσαμε αυτές τις διατάξεις για να καθορίσουμε το περιεχόμενο των ανθρακικών ιόντων σε εμπορικά δείγματα σόδας. Μαγειρική σόδα διαλύθηκε σε ελαφρώς αλκαλικό νερό ($\text{pH}=8,0$). Ένα (1,0) μL του διαλύματος εναποτέθηκε σε κάθε ζώνη ανίχνευσης της διάταξης και αφέθηκε να ξηραθεί. Αποκτήσαμε έγχρωμες εικόνες των διατάξεων και μετρήσαμε τη μέση γκρίζα ένταση των περιοχών ανίχνευσης για τη βαθμονόμηση των διατάξεων και την προετοιμασία των καμπύλων σταθερής προσθήκης.

3.2.5 Βελτιστοποίηση διατάξεων για ομοιόμορφη κατανομή των χρωματομετρικών αντιδραστηρίων εντός της ζώνης ανίχνευσης

Μία κοινή πηγή διακύμανσης στα αποτελέσματα των αναλύσεων που εκτελούνται σε διατάξεις χάρτου είναι η χωρική ανομοιογένεια του αναλυτικού σήματος (π.χ. χρώμα) στις ζώνες ανίχνευσης. Η ανομοιογένεια του χάρτου είναι ένας κύριος λόγος για την απόκτηση χωρικά ανομοιόμορφων σημάτων στις περιοχές

ανίχνευσης, αλλά μπορεί επίσης να παρατηρηθεί όταν τα χρωματομετρικά προϊόντα είναι είτε πολύ υδρόφιλα ή υδρόφοβα, ειδικά σε υψηλές συγκεντρώσεις αναλύτη.

Όταν τα χρωματομετρικά προϊόντα είναι πολύ υδρόφιλα, ξεπλένονται στα άκρα της ζώνης ανίχνευσης λόγω του φαινομένου διασποράς των αντιδραστηρίων "coffee ring effect". Ο όρος " coffee ring effect " αναφέρεται σε ένα φαινόμενο που παρατηρείται σε μια επιφάνεια όπου σταγόνες που περιέχουν διεσπαρμένα στερεά εξατμίζονται αφήνοντας μια δακτυλιοειδή απόθεση κατά μήκος της περιμέτρου της σταγόνας. Η κύρια αιτία αυτού του φαινομένου είναι η τριχοειδής ροή, η οποία εξασφαλίζει ότι το υγρό που εξατμίζεται από τα άκρα αναπληρώνεται από το υγρό στο εσωτερικό (Deegan et al., 1997). Κατά τη διάρκεια προκαταρκτικών πειραμάτων, παρατηρήσαμε το φαινόμενο αυτό στην ανάλυση για τον προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου μόνο μετά την προσθήκη του δείγματος στις βαθμονομημένες διατάξεις και όχι κατά την προσθήκη του πρότυπου διαλύματος. Επομένως, το φαινόμενο παρατηρήθηκε λόγω υπερβολικής έκπλυσης των υδρόφιλων προϊόντων της αντίδρασης λόγω της διαδοχικής προσθήκης υδατικών διαλυμάτων. Για την αντιμετώπιση του φαινομένου αυτού μειώσαμε τις διαστάσεις της περιοχής ανίχνευσης της διάταξης κατά περίπου 30% (δηλ. από 0,40 cm σε 0,28 cm) (Εικόνα 3.1). Άλλες μέθοδοι για την αντιμετώπιση αυτού του περιορισμού μπορεί να περιλαμβάνουν τη χρήση επιβραδυντών ροής (π.χ. πολυακρυλικό οξύ) (Wu et al., 2015) ή τη χρήση μικρότερων όγκων δειγμάτων (εάν είναι εφικτό).

Όταν τα χρωματομετρικά προϊόντα της αντίδρασης είναι υδρόφοβα, η επιφάνεια χάρτου γίνεται επίσης υδρόφοβη. Ο ρυθμός τριχοειδούς ροής ενός υδατικού διαλύματος που έρχεται σε επαφή με μία υδρόφοβη επιφάνεια εξασθενεί λόγω της αύξησης της γωνίας επαφής του νερού με την επιφάνεια (Schonhorn et al., 2014). Στην μελέτη μας, αντιμετωπίσαμε αυτό το φαινόμενο στην ανάλυση για τον προσδιορισμό πρωτεϊνών. Κατά τη διάρκεια της παρασκευής των βαθμονομημένων διατάξεων, σχηματίστηκε μία μεγάλη ποσότητα του υδρόφοβου συμπλόκου BSA-μπλε βρωμοφαινόλης στη διάταξη, ιδιαίτερα σε υψηλές συγκεντρώσεις BSA (άνω των 80,0 μM). Όταν προστέθηκε το δείγμα, το υδρόφοβο σύμπλοκο που είχε προηγουμένως αποθηκευτεί στη διάταξη περιορίσε τη διάχυση του υδατικού δείγματος σε ολόκληρη την επιφάνεια της περιοχής ανίχνευσης. Ως αποτέλεσμα, το έγχρωμο προϊόν της αντίδρασης συγκεντρώθηκε χωρικά στην περιοχή όπου προστέθηκαν τα αντιδραστήρια, προκαλώντας μια ανομοιογενή κατανομή του χρώματος στη ζώνη ανίχνευσης (δηλαδή το έγχρωμο προϊόν συγκεντρώθηκε κυρίως

στο κέντρο της ζώνης ανίχνευσης). Για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος, χρησιμοποιήσαμε συγκεντρώσεις BSA για βαθμονόμηση μεταξύ 0-60μM με σκοπό να μειώσουμε την ποσότητα του υδρόφοβου συμπλόκου BSA-μπλε βρωμοφαινόλης, το οποίο είχε προ-αποθηκευτεί στην περιοχή ανίχνευσης. Σε αυτό το εύρος συγκέντρωσης, η ποσότητα του υδρόφοβου συμπλόκου είχε μικρότερη επίδραση στη διοχέτευση του υδατικού δείγματος, επιτρέποντάς του να εξαπλωθεί ευκολότερα σε ολόκληρη την περιοχή ανίχνευσης ελαχιστοποιώντας έτσι την ανομοιογένεια του σήματος. Άλλες μέθοδοι, όπως η προσθήκη επιφανειοδραστικών ή πολυαιθυλενογλυκόλης, θα μπορούσαν ενδεχομένως να αυξήσουν τη διαλυτότητα του συμπλόκου και να διευκολύνουν τη διάδοση του δείγματος και του χρώματος σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (Bhakta et al., 2014, Wu et al., 2015).

3.3 Αποτελέσματα και συζήτηση

3.3.1 Βαθμονομημένες διατάξεις χάρτου και μέθοδος σταθερής προσθήκης

Οι προσδιορισμοί που εκτελούνται σε διατάξεις χάρτου μπορεί να αντιμετωπίσουν τόσο περιστροφικές όσο και μεταφορικές επιδράσεις μήτρας που αποδίδονται όχι μόνο στο δείγμα αλλά και στη διάταξη χάρτου και στον ανιχνευτή. Για παράδειγμα, οι περιστροφικές επιδράσεις μήτρας μπορεί να προκληθούν από: α) κορεσμό της έντασης χρώματος στην περιοχή ανίχνευσης της διάταξης, β) μη γραμμικότητα του ανιχνευτή και από γ) αλλοίωση των αντιδραστηρίων λόγω αλλαγών των περιβαλλοντικών συνθηκών. Από την άλλη πλευρά, η ανομοιογένεια και το υψηλό υπόβαθρο της επιφάνειας του χάρτου ή οι διαφορές στις συνθήκες απόκτησης σήματος (π.χ. συνθήκες φωτισμού) μπορεί να προκαλέσουν μεταφορικές επιδράσεις μήτρας.

Η προσέγγιση που περιγράψαμε σε αυτή την μελέτη χρησιμοποιεί βαθμονομημένες διατάξεις και καμπύλες πολλαπλής σταθερής προσθήκης που μειώνουν την επίδραση και των δύο τύπων επιδράσεων μήτρας καθώς i) αφαιρούμε το υπόβαθρο από κάθε περιοχή ανίχνευσης ξεχωριστά (πριν προστεθεί το δείγμα), ii) χρησιμοποιούμε τη μέθοδο σταθερής προσθήκης πολλαπλών σημείων, η οποία μπορεί να άρει πολλαπλασιαστικές παρεμποδίσεις (Ellison et al., 2008), και iii) όλα τα σήματα ανακτώνται ταυτόχρονα υπό τις ίδιες συνθήκες εξαλείφοντας πιθανές

περιστροφικές και μεταφορικές επιδράσεις λόγω μεταβολών στις συνθήκες φωτισμού, την υγρασία, τη θερμοκρασία κλπ.

3.3.2 Μαθηματικά μοντέλα για ανάλυση με την μέθοδο της σταθερής προσθήκης

Κατά βάση η μέθοδος σταθερής προσθήκης χρησιμοποιεί πολυωνυμικές καμπύλες πρώτης τάξης (δηλαδή γραμμικές συναρτήσεις) για να περιγράψει τα πειραματικά δεδομένα. Η άγνωστη συγκέντρωση του αναλύτη-στόχου υπολογίζεται στη συνέχεια είτε ως η αναλογία μεταξύ της τομής επί την αρχή και της κλίσης της γραμμικής συνάρτησης, $x = -b / a$ (για γραμμικές καμπύλες με τη μορφή $y = a + bx$) ή ως το σημείο τομής της αντίστροφης παλινδρόμησης, $x = -b$ (για γραμμικές καμπύλες με τη μορφή $x = b + ay$) (Meija et al., 2014).

Όταν μια πολυωνυμική συνάρτηση πρώτης τάξης δεν μπορεί να προσαρμοστεί στα πειραματικά δεδομένα, πρέπει να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικές διαδικασίες. Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη προσέγγιση είναι να περιοριστεί το εύρος συγκεντρώσεων των προσθηκών (μέσω πειραματικών δοκιμών) μέχρι να επιτευχθεί ένα γραμμικό εύρος (Tellinghuisen et al., 2005). Η προσέγγιση αυτή μπορεί να αντιμετωπίσει τη μη γραμμικότητα που εξαρτάται από τις ιδιότητες του δείγματος (π.χ. συμπυκνωμένα διαλύματα, (Kóscielniak et al., 1999) μεγάλο εύρος βαθμονόμησης, (Tellinghuisen et al., 2005), επιδράσεις μήτρας (Danzer et al., 1998)). Ωστόσο, μερικές φορές η μη-γραμμικότητα συμβαίνει ακόμη και σε μικρές περιοχές συγκεντρώσεων, ειδικά κάτω από συνθήκες ισχυρών παρεμποδίσεων (Tellinghuisen et al., 2005). Επομένως η προσαρμογή μιας μη γραμμικής συνάρτησης στα πειραματικά δεδομένα μπορεί να είναι η μόνη επιλογή για να αντιπροσωπευθεί μαθηματικά η αλλαγή του αναλυτικού σήματος έναντι της συγκέντρωσης του αναλύτη (Kóscielniak et al., 1999). Αν και οι μη γραμμικές καμπύλες βαθμονόμησης σταθερής προσθήκης γενικά δεν έχουν φυσική σημασία, έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετές φορές για να περιγράψουν τα πειραματικά δεδομένα των καμπύλων σταθερής προσθήκης (Kóscielniak et al., 1999, Meija et al., 2014, Tellinghuisen et al., 2005, Kóscielniak et al., 1985, Kirkup et al., 2005). Ωστόσο, η μη γραμμική βαθμονόμηση σταθερής προσθήκης απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή, επειδή η ακρίβεια των αποτελεσμάτων της μπορεί να επιδεινωθεί σημαντικά εάν δεν επιλεγεί προσεκτικά ο αριθμός των προσθηκών, ο αριθμός των επαναλήψεων μέτρησης, η ευαισθησία, το μέγεθος προσάυξεσης και ο βαθμός καμπυλότητας (Kóscielniak et al., 1999). Με

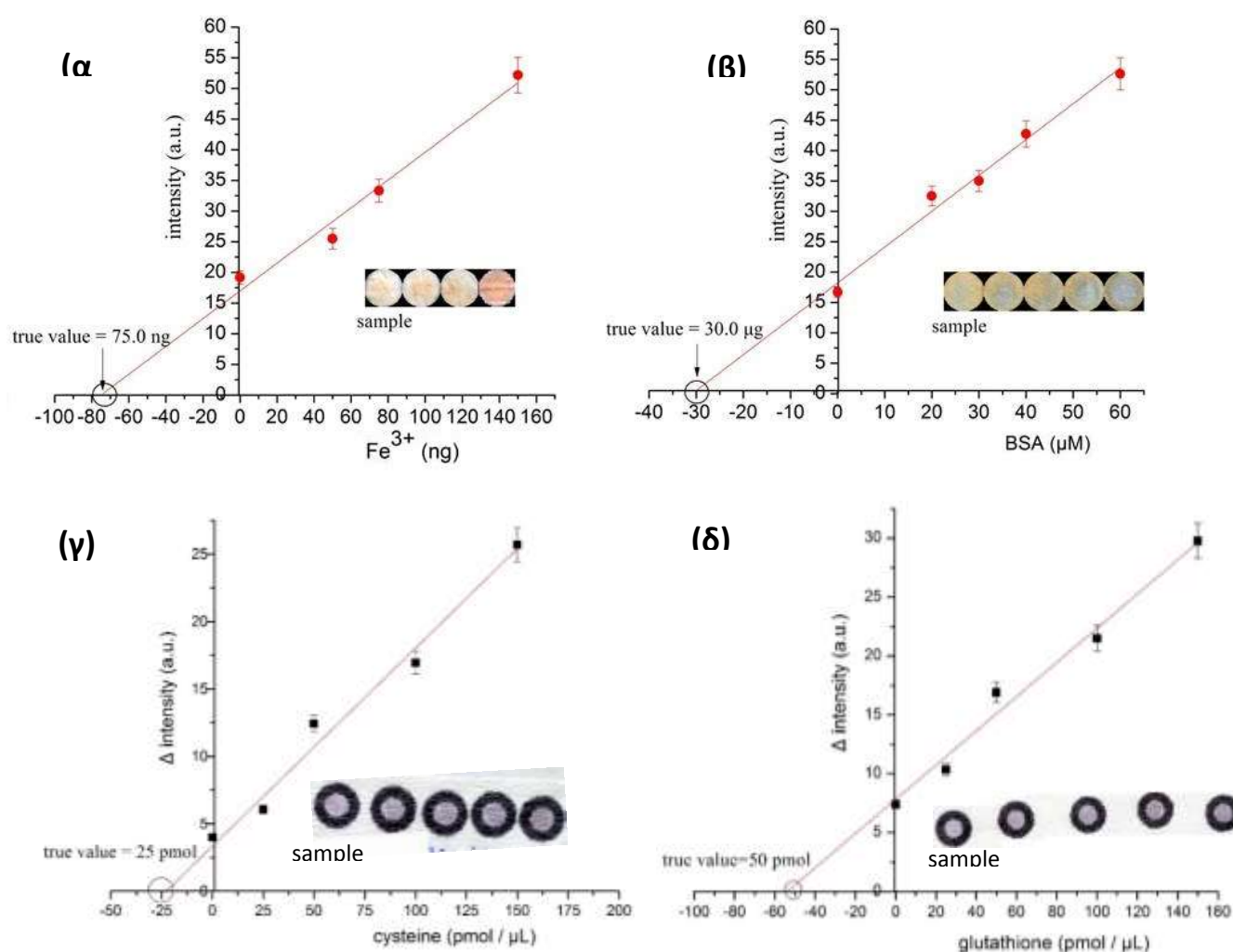
βάση εκτεταμένες θεωρητικές και πειραματικές δοκιμές, προηγούμενες εργασίες (Kóscielniak et al., 1999, Meija et al., 2014, Tellinghuisen et al., 2005, Kóscielniak et al., 1985, Kirkup et al., 2005) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι, προκειμένου να εφαρμοστούν μη γραμμικές συναρτήσεις στις καμπύλες σταθερής προσθήκης, τα πειραματικά δεδομένα πρέπει να πληρούν τα ακόλουθα κριτήρια: α) οι συγκεντρώσεις των προτύπων διαλυμάτων πρέπει να αυξάνονται με σχετικά ομοιογενή τρόπο, β) το εύρος των συγκεντρώσεων πρέπει κατά προτίμηση να μην αυξάνεται πέραν της μιας τάξης μεγέθους και γ) κάθε μέτρηση θα πρέπει να εκτελείται πολλές φορές (συνήθως πέντε ή περισσότερες) (Kóscielniak et al., 1999, Kirkup et al., 2004). Όταν πληρούνται αυτά τα κριτήρια, α) ελαχιστοποιείται η ευαισθησία των αποτελεσμάτων στις μεταβολές των σταθερών προσθηκών διατηρώντας μια σχετικά σταθερή αβεβαιότητα μέτρησης σε όλη την κλίμακα βαθμονόμησης, β) μετριάζεται το επίπεδο του υψηλότερου προτύπου που μπορεί να επηρεάσει έντονα τη συνάρτηση της βαθμονόμησης, και γ) ελαχιστοποιείται το συστηματικό σφάλμα προσδιορισμού (Cuadros-Rodriguez et al., 2007, Kóscielniak et al., 1999, Meija et al., 2014, Tellinghuisen et al., 2005, Danzer et al., 1998, Kóscielniak et al., 1985).

Σε αυτή την μελέτη, ελέγξαμε αρχικά την απόδοση βαθμονομημένων διατάξεων για την εφαρμογή καμπυλών πολλαπλής σταθερής προσθήκης, για τον προσδιορισμό βιοθειολών. Παρατηρήσαμε ότι όταν χρησιμοποιήθηκε σαρωτής γραφείου για την λήψη των αναλυτικών σημάτων η καμπύλες σταθερής προσθήκης ήταν γραμμικές όμως όταν χρησιμοποιήθηκε κάμερα (κινητού τηλεφώνου σε φυσικές συνθήκες φωτισμού) οι καμπύλες σταθερής προσθήκης ήταν μη γραμμικές. Με αυτό ως έναυσμα μελετήσαμε την μέθοδο σταθερής προσθήκης και σε άλλους αναλυτικούς προσδιορισμούς ώστε να διερευνηθεί κατά πόσον οι μη γραμμικότητα είναι τυχαίο γεγονός που οφείλεται στην μεταβλητότητα των συνθηκών φωτισμού κατά την συγκεκριμένη ανάλυση ή γενικότερο φαινόμενο. Για τον λόγο αυτό ελέγξαμε την απόδοση βαθμονομημένων διατάξεων για την εφαρμογή καμπυλών πολλαπλής σταθερής προσθήκης σε πέντε επιπλέον προσδιορισμούς (για τον προσδιορισμό σιδήρου (III), πρωτεϊνών, υπεροξειδίου του υδρογόνου, οξικού οξέος και ανθρακικών ιόντων). Με βάση τα προκαταρκτικά αποτελέσματα, καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι η γραμμική εξίσωση θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε για τον προσδιορισμό βιοθειολών με χρήση σαρωτή ως ανιχνευτή, για τον προσδιορισμό του σιδήρου (III) και για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών ενώ για τέσσερις αναλύσεις θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν μη γραμμικές εξισώσεις (δηλαδή για τον προσδιορισμό βιοθειολών

με χρήση κάμερας ως ανιχνευτή, για τον προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου, του οξικού οξέος και των ανθρακικών ιόντων).

3.3.3 Βαθμονομημένες διατάξεις με γραμμικές καμπύλες σταθερής προσθήκης

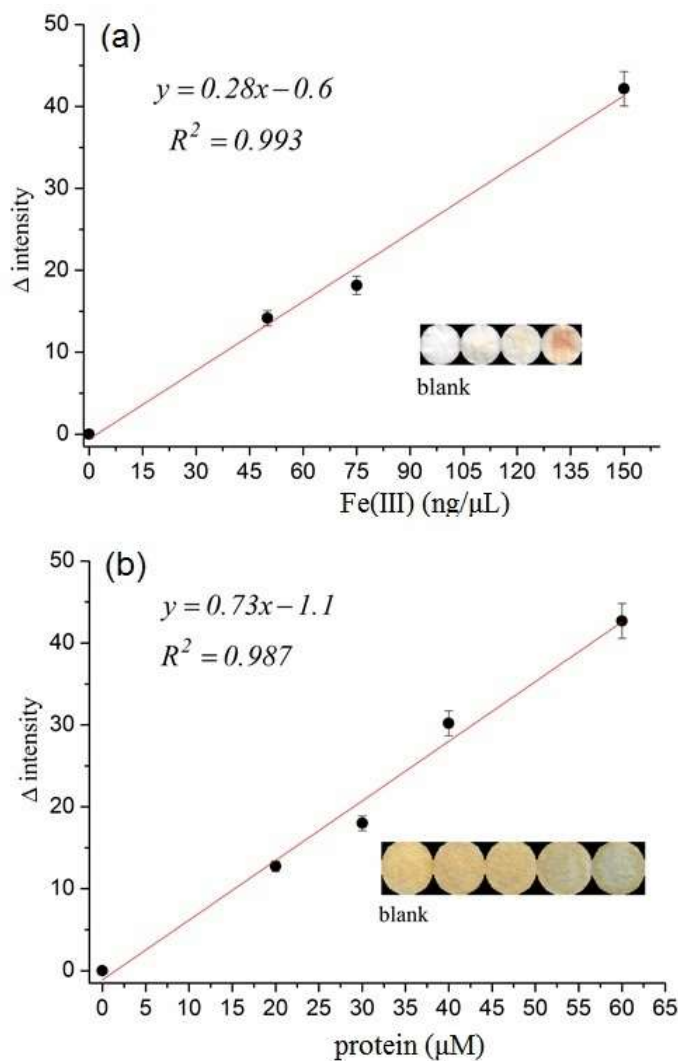
Στις αναλύσεις για τον προσδιορισμό των βιοθειολών με σαρωτή γραφείου, του σιδήρου (III) και των πρωτεϊνών, το αναλυτικό σήμα ακολούθησε ένα γραμμικό πρότυπο στις σταθερές προσθήκες (Εικόνα 3.7) και για την προσαρμογή των δεδομένων χρησιμοποιήθηκαν πολυωνυμικές συναρτήσεις πρώτης τάξης.



Εικόνα 3.7. Γραμμικές συναρτήσεις μέθοδο σταθερής προσθήκης που εκτελούνται σε βαθμονομημένες διατάξεις με βάση το χαρτί: (α) προσδιορισμός σιδήρου (III) –θειοκυανιούχων (β) προσδιορισμός πρωτεϊνών-μπλε βρωμοφαινόλης, (γ) και (δ) προσδιορισμός βιοθειολών (κυστεΐνης και γλουταθειόνης) με φωτοχημική αναγωγή αλογονιδίων του αργύρου. Οι πολυωνυμικές εξισώσεις πρώτης τάξης των καμπύλων σταθερής προσθήκης δίνονται στον Πίνακα 3.1.

Συγκρίνοντας την κλίση (slope) και την τομή επί την αρχή των καμπύλων βαθμονόμησης (σταθερός όρος, intercept) που προέκυψαν από τα πειράματα σταθερής προσθήκης (Εικόνα 3.7 και Πίνακας 3.1), με την κλίση και την τομή επί την αρχή των γραμμών βαθμονόμησης που ελήφθησαν από εξωτερικές καμπύλες βαθμονόμησης (κατά την προετοιμασία των βαθμονομημένων διατάξεων- Εικόνα 3.8), για την ανάλυση σιδήρου και πρωτεϊνών, παρατηρήσαμε ότι οι σταθεροί όροι των καμπύλων από τις βαθμονομήσεις σταθερής προσθήκης ήταν σημαντικά υψηλότεροι από τους σταθερούς όρους των καμπύλων που ελήφθησαν κατά την εξωτερική βαθμονόμηση. Αντίθετα, η κλίση των καμπύλων κατά τη διάρκεια των πειραμάτων σταθερής προσθήκης ήταν σχεδόν 20% χαμηλότερη από την κλίση των καμπύλων που ελήφθησαν από εξωτερικές καμπύλες βαθμονόμησης. Ως εκ τούτου, καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι σε αυτές τις αναλύσεις (σιδήρου και πρωτεϊνών) οι μεταφορικές επιδράσεις μήτρας επικρατούν έναντι των περιστροφικών επιδράσεων μήτρας και πιθανότατα προέρχονται από την ανομοιογενή διάταξη του χρώματος στις ζώνες ανίχνευσης (Εικόνα 3.7-ενσωματωμένες φωτογραφίες). Στον προσδιορισμό του σιδήρου (III), οι μεταφορικές επιδράσεις μήτρας μπορεί επίσης να σχετίζονται με τον ελαφρύ χρωματισμό των εκχυλισμάτων.

Σε ότι αφορά τις θειόλες παρατηρήσαμε ότι τόσο ο σταθερός όρος όσο και η κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης με την μέθοδο της σταθερής προσθήκης ήταν παρόμοιες με αυτές που ελήφθησαν κατά την εξωτερική βαθμονόμηση των διατάξεων (Πίνακας 2.1-Κεφάλαιο 2 και Πίνακας 3.1-Κεφάλαιο 3) παρατήρηση που υποδηλώνει την απουσία μεταφορικών και περιστροφικών επιδράσεων μήτρας κατά την ανάλυση σε διατάξεις χάρτου. Στην περίπτωση της κυστεΐνης παρατηρήθηκε μείωση της κλίσης της καμπύλης βαθμονόμησης με την μέθοδο της σταθερής προσθήκης (περίπου 30%) σε σχέση με την κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης με την μέθοδο της εξωτερικής βαθμονόμησης γεγονός που υποδηλώνει την επικράτηση περιστροφικών επιδράσεων μήτρας (π.χ. λόγω κορεσμού της έντασης χρώματος στην περιοχή ανίχνευσης της διάταξης).



Εικόνα 3.8. Εξωτερικές καμπύλες βαθμονόμησης (που λαμβάνονται κατά την προετοιμασία των βαθμονομημένων διατάξεων) για (α) τον προσδιορισμό σιδήρου (III)–θειοκυανιούχων και (β) τον προσδιορισμό πρωτεϊνών-μπλε βρωμοφαινόλης (γ) κυστεΐνης και (δ) γλουταθειόνης με φωτοαναγωγή ακινιτοποιημένων κρυστάλλων AgCl. Οι ενσωματωμένες φωτογραφίες δείχνουν τις χρωματομετρικές μεταπτώσεις στην επιφάνεια του χάρτου μετά την προσθήκη των πρότυπων διαλυμάτων. Οι φωτογραφίες περικόπτονται και μεγεθύνονται για να διευκολύνεται η προβολή όψεων.

Σε όλες τις περιπτώσεις, παρά την διαφορετική φύση των παρεμποδίσεων, η προσέγγισή μας κατάφερε να εκτιμήσει την πραγματική συγκέντρωση των αναλυτών στα δείγματα με σχετικό σφάλμα μικρότερο από 5,5% (Πίνακας 3.1) γεγονός που αναδεικνύει την αποτελεσματικότητα της.

Πίνακας 3.1. Γραμμικές καμπύλες σταθερής προσθήκης για τον προσδιορισμό του σιδήρου, των πρωτεϊνών και βιοθειολών σε διατάξεις χάρτου με βαθμονόμηση.

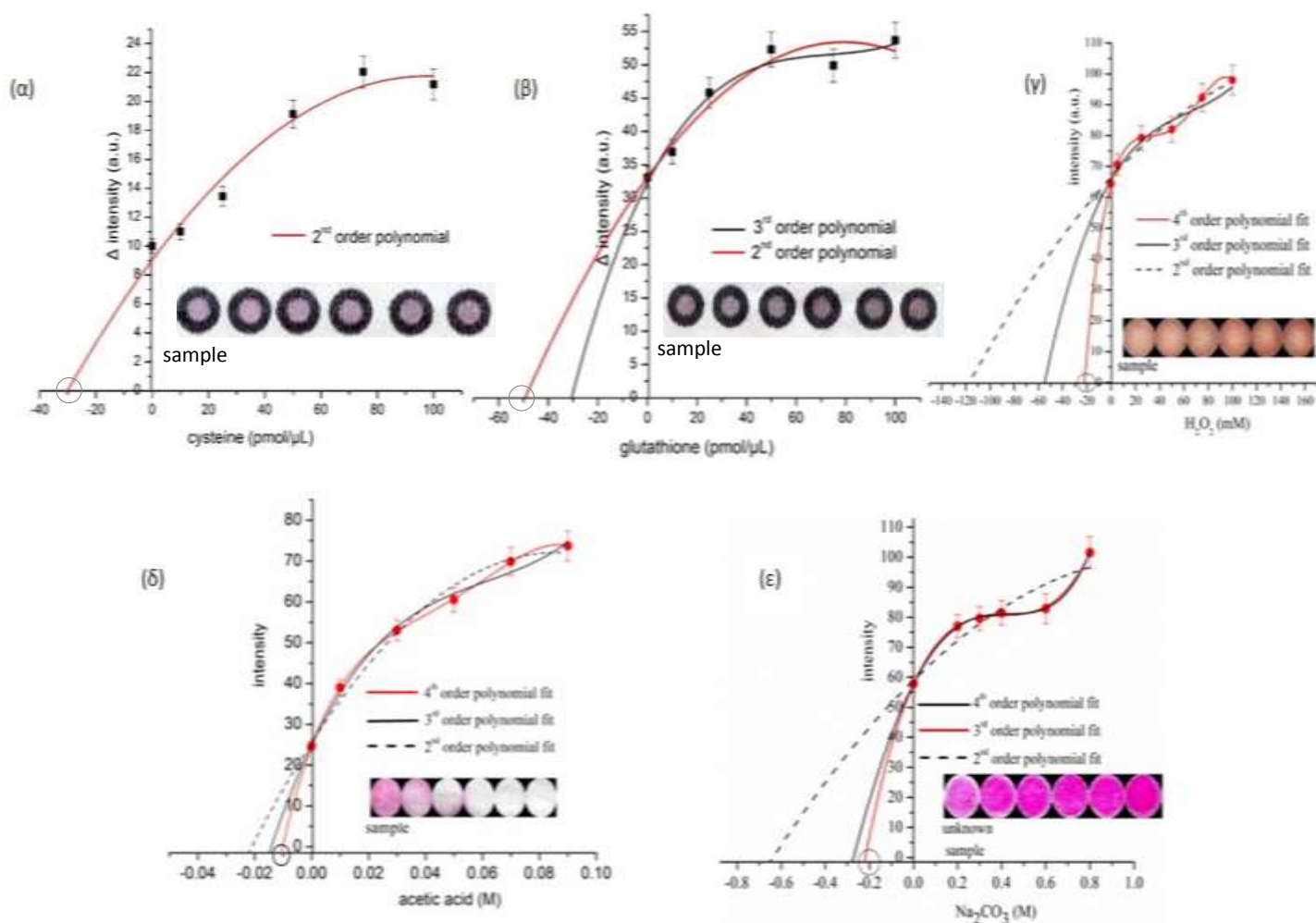
Ανάλυση (μονάδες)	Πολυωνυμική συνάρτηση	Συντελεστής παλινδρόμησης (R ²)	Συγκέντρωση που υπολογίστηκε	Πραγματική συγκέντρωση αναλύτη στο δείγμα	Σχετικό σφάλμα (%) ^b
Σίδηρος (III) (ng/μL)	$y = 0,23x + 17,0$	0,98	73,9	75,0	-1,5
Πρωτεΐνες (μM)	$y = 0,6x + 18,2$	0,99	30,3	30,0	1,0
Κυστεΐνη (pmol/μL)	$y = 0,14x + 3,33$	0,98	23,8	25,0	-4,8
Γλουταθειόνη (pmol/μL)	$y = 0,14x + 7,83$	0,98	52,7	50,0	5,4

^b Σχετικό σφάλμα (%) = [(Πραγματική τιμή-Μετρούμενη τιμή) / Πραγματική τιμή] x 100

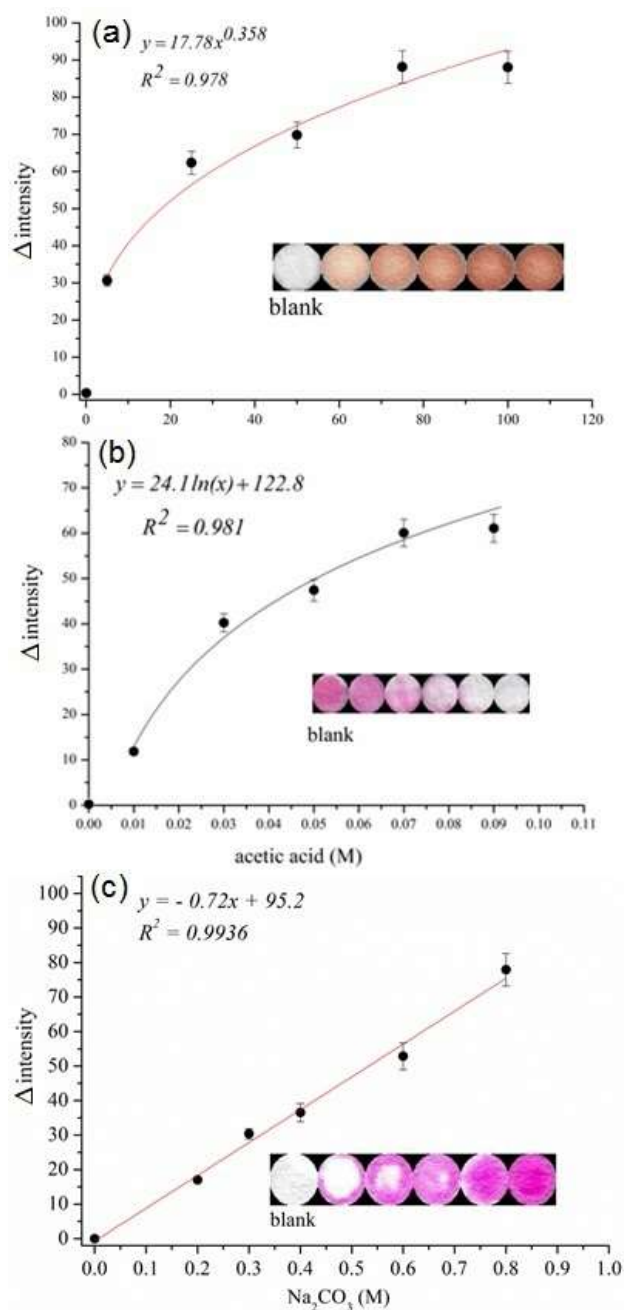
3.3.4 Βαθμονομημένες διατάξεις με μη γραμμικές καμπύλες σταθερής προσθήκης

Στις αναλύσεις για τον προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου και του οξικού οξέος (Εικόνα 3.9 και Εικόνα 3.10), παρατηρήθηκε μη γραμμική απόκριση τόσο στην εξωτερική βαθμονόμηση (δηλ. τη βαθμονόμηση που ελήφθη από βαθμονομημένες διατάξεις με πρότυπα διαλύματα του αναλύτη και χωρίς προσθήκη του δείγματος) όσο και στη βαθμονόμηση σταθερής προσθήκης. Για τον προσδιορισμό βιοθειολών και ανθρακικών ιόντων, αν και η εξωτερική βαθμονόμηση ήταν ευθύγραμμη (Εικόνα 2.6-Κεφάλαιο 2, Εικόνα 3.10-Κεφάλαιο 3) παρατηρήθηκε σημαντική μη γραμμικότητα στις καμπύλες σταθερής προσθήκης (Εικόνα 3.9). Οι μη γραμμικές καμπύλες έχουν επίσης παρατηρηθεί σε προηγούμενες έρευνες όπου γίνεται χρήση διατάξεων χάρτου (Martinez et al., 2008, Wu et al., 2015, Schonhorn et

al., 2014, Carrilho et al., 2009). Σε αυτές τις μελέτες έχουν χρησιμοποιηθεί παραβολικές και λογαριθμικές εξισώσεις για την περιγραφή των καμπύλων αναφοράς σε διατάξεις χάρτου (Martinez et al., 2008, Wu et al., 2015, Schonhorn et al., 2014, Carrilho et al., 2009).



Εικόνα 3.9. Πολυωνυμικές καμπύλες για τη βαθμονόμηση πολλαπλής σταθερής προσθήκης που εκτελούνται σε βαθμονομημένες διατάξεις χάρτου για (α) τον προσδιορισμό H_2O_2 -ιωδιούχων, (β) τον ογκομετρικό προσδιορισμό οξικού οξέος/ OH^- -φαινολοφθαλεΐνης και (γ) τον ογκομετρικό προσδιορισμό ανθρακικών/ H^+ -φαινοφθαλεΐνης. Οι πολυωνυμικές συναρτήσεις δίνονται στον Πίνακα 3.2. Οι ανοικτοί κύκλοι στο αρνητικό τμήμα του άξονα x δείχνουν την πραγματική τιμή.



Εικόνα 3.10. Καμπύλες εξωτερικής βαθμονόμησης (που λαμβάνονται κατά την προετοιμασία των βαθμονομημένων διατάξεων) για (α) τον προσδιορισμό H_2O_2 -ιωδιούχων, (β) τον ογκομετρικό προσδιορισμό οξικού οξέος/ OH^- -φαινολοφθαλεΐνης και (γ) τον ογκομετρικό προσδιορισμό ανθρακικών/ H^+ -φαινοφθαλεΐνης. Οι ενσωματωμένες φωτογραφίες δείχνουν τις χρωματομετρικές μεταπτώσεις στην επιφάνεια του χάρτου μετά την προσθήκη των πρότυπων διαλυμάτων.

Η μη γραμμικότητα των καμπύλων σταθερής προσθήκης μπορεί να αποδοθεί σε διάφορους λόγους οι οποίοι δεν απαντώνται συνήθως σε αναλύσεις σταθερής προσθήκης που εκτελούνται υγροχημικά σε κυψελίδες. Αυτοί οι λόγοι μπορεί να

σχετίζονται τόσο με τις μεταφορικές και τις περιστροφικές επιδράσεις μήτρας που προέρχονται από τις διατάξεις χάρτου όσο και με την έκθεση των ακινητοποιημένων (ξηρών) αντιδραστηρίων (ΚΙ και φαινολοφθαλεΐνης) στο φως. Άλλοι λόγοι μπορεί να σχετίζονται με το γεγονός ότι καθώς η συνολική συγκέντρωση του αναλύτη στην επιφάνεια του χάρτου αυξάνεται (δηλ. το άθροισμα του πρότυπου διαλύματος που έχει προηγουμένως αποθηκευτεί στη διάταξη συν τη συγκέντρωση του αναλύτη στο άγνωστο δείγμα), στην επιφάνεια του χάρτου δημιουργείται μια μεγάλη ποσότητα χρωματομετρικών προϊόντων. Αυτά τα προϊόντα ενδέχεται να επηρεαστούν από περιβαλλοντικές συνθήκες και από μη ομοιόμορφη κατανομή σήματος με διαφορετικό και απρόβλεπτο τρόπο που μπορεί να διαφέρει ακόμη και από το ένα σημείο βαθμονόμησης στο άλλο. Επιπλέον, στη μέθοδο σταθερής προσθήκης που περιγράφεται σε αυτή την εργασία, ο σχηματισμός μιας μεγάλης περίσσειας χρωματομετρικών προϊόντων μπορεί να μην είναι εντελώς ομοιογενής σε όλη την επιφάνεια του χάρτου λόγω ανομοιογένειας του χάρτου, προσμίξεων, διαφορετικής τοπικής συγκέντρωσης και της κινητικής της αντίδρασης. Επιπρόσθετα, καθώς ο ανιχνευτής φτάνει στον κορεσμό, παράγει κοντινά σήματα μεταξύ γειτονικών σημείων βαθμονόμησης. Αυτά τα σήματα, ωστόσο, μπορεί να έχουν διαφορετική απόχρωση, σκίαση, τόνο κ.α. που μπορεί να γίνουν όλο και πιο σημαντικές στην ανάγνωση σήματος. Στην περίπτωση των βιοθειολών η αποκλίσεις από την γραμμικότητα συνδέονται σαφώς με την μεταβλητότητα του φωτισμού και της εστίασης της χειροκίνητης κάμερας (εφόσον με τη χρήση σαρωτή οι καμπύλες σταθερής προσθήκης ήταν γραμμικές). Όλοι αυτοί οι παράγοντες μπορούν να εισάγουν μια σημαντική μη γραμμικότητα που μπορεί να εξηγηθεί μόνο σε μια φαινομενολογική και όχι σε φυσική βάση. Σε αυτές τις περιπτώσεις, τα γραμμικά μοντέλα δεν μπορούν να περιγράψουν την υψηλή καμπυλότητα των δεδομένων σταθερής προσθήκης προκαλώντας σημαντική υπερεκτίμηση της συγκέντρωσης του αναλύτη (βλ. Πίνακα 3.2).

Λόγω της μη γραμμικής απόκρισης στις αναλύσεις για τον προσδιορισμό των βιοθειολών, του υπεροξειδίου του υδρογόνου, του οξικού οξέος και των ανθρακικών ιόντων, προσπαθήσαμε πρώτα να περιορίσουμε το εύρος συγκεντρώσεων των καμπύλων σταθερής προσθήκης για να ελέγξουμε εάν τα πειραματικά δεδομένα ακολουθούν τις γραμμές γραμμικής προσαρμογής. Ωστόσο, ακόμη και σε στενό εύρος συγκεντρώσεων παρατηρήσαμε ότι τα πειραματικά δεδομένα δεν ακολούθησαν μια γραμμική συνάρτηση. Ως εκ τούτου, αποφασίσαμε να χρησιμοποιήσουμε

καμπύλες σταθερής προσθήκης χρησιμοποιώντας ολόκληρο το εύρος συγκεντρώσεων και να προσαρμόσουμε τα δεδομένα σε συναρτήσεις υψηλότερης τάξης.

Η αλγεβρική πορεία που ακολουθήσαμε για να σχηματίσουμε μια καμπύλη σταθερής προσθήκης με μη γραμμικά δεδομένα βαθμονόμησης ήταν η εξής:

A. Χρησιμοποιήσαμε συναρτήσεις που αποτελούνται από διάφορα πολυωνυμικά μοντέλα δευτέρου και μεγαλύτερου βαθμού της μορφής: $y = a_0 + a_1x + a_2x^2 + a_3x^3 + \dots a_nx^n$, όπου $a_0, a_1, a_2, a_3 \dots a_n$ είναι μοντέλα μεταβλητών, και προσδιορίσαμε τις αριθμητικές τιμές των μεταβλητών ($a_0, a_1, a_2, a_3 \dots a_n$) που ταιριάζουν στα δεδομένα. Η διαμόρφωση του πολυωνυμικού μοντέλου και ο προσδιορισμός των μεταβλητών γίνεται εύκολα χρησιμοποιώντας τις ενσωματωμένες συναρτήσεις που ενσωματώνονται στα περισσότερα λογισμικά υπολογιστικών φύλλων (π.χ. Microsoft Excel). Τα υπολογιστικά φύλλα είναι άμεσα διαθέσιμα στις περισσότερες φορητές διατάξεις (π.χ. tablet, smartphone κ.λπ.). Ως εκ τούτου, είναι ευρέως προσβάσιμα στο σημείο ενδιαφέροντος. Χρησιμοποιήσαμε την ενσωματωμένη συνάρτηση MS-Excel LINEST επειδή μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο για γραμμικές όσο και για μη γραμμικές εξισώσεις (Meija et al., 2014). Εισάγαμε τα δεδομένα σε πολυωνυμικά μοντέλα 2^{ου}, 3^{ου} και 4^{ου} βαθμού και ανακτήσαμε τις αριθμητικές τιμές των μεταβλητών όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.2.

B. Για να επιλέξουμε το πολυωνυμικό μοντέλο 2^{ου}, 3^{ου} ή 4^{ου} βαθμού που ταιριάζει καλύτερα στα πειραματικά δεδομένα χρησιμοποιήσαμε δυο αλγεβρικά κριτήρια επιλογής μοντέλων κατάλληλα για πολυωνυμικά μοντέλα και συγκεκριμένα τα κριτήρια πληροφοριών Akaike (AIC) και το κριτήριο πληροφοριών Bayes (BIC) (Kirkup et al., 2004, Zucchini et al., 2017). Και τα δύο κριτήρια επιλέγουν την τάξη του πολυωνυμικού μοντέλου που ελαχιστοποιεί τις τιμές των AIC και BIC (οι αρνητικές τιμές είναι επίσης δυνατές και αντιμετωπίζονται ως πραγματικοί αριθμοί). Άλλα κριτήρια επιλογής μοντέλων είναι επίσης διαθέσιμα στην βιβλιογραφία αλλά απαιτούν περισσότερους υπολογισμούς ή τείνουν να αποφεύγουν την πολυπλοκότητα (π.χ. κριτήριο Mallows) ή να επιλέγουν την υψηλότερη δυνατή τάξη (π.χ. προσαρμοσμένη R^2) (Zucchini et al., 2017).

Τα κριτήρια AIC και BIC για πολυωνυμικά μοντέλα υπολογίζονται από τις εξισώσεις 1 και 2:

$$AIC_{(p)} = \ln(SSE_{(p)}) + (p+1) \times (2/n)$$

$$BIC_{(p)} = \ln(SSE_{(p)}) + (p+1) \times (\ln(n)/n)$$

όπου το $SSE_{(p)}$ είναι το υπολειπόμενο άθροισμα τετραγώνων για το πολυωνυμικό μοντέλο βαθμού p , και n είναι ο αριθμός των σημείων αναφοράς της καμπύλης, που πρέπει να είναι μεγαλύτερος από $p+1$ (James et al., 2000). Επομένως, για πολώνυμα μέχρι 4^{ου} βαθμού, πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τουλάχιστον πέντε σημεία βαθμονόμησης. Για να επιλυθούν όλες οι πιθανές συναρτήσεις (2^{ου}, 3^{ου} και 4^{ου} βαθμού), βαθμονομήσαμε τους προσδιορισμούς χρησιμοποιώντας έξι σημεία βαθμονόμησης, έτσι η συνθήκη $p+1$ ίσχυε για όλες τις περιπτώσεις. Επιπλέον, με τη χρήση επιπρόσθετων σημείων βαθμονόμησης, θα μπορούσε να μειωθεί η επίδραση συστηματικής ή μη συστηματικής μεταβλητότητας σήματος (π.χ. μεταβολή στις συνθήκες μέτρησης, μικρή ή μεγάλη διακύμανση σήματος μεταξύ διαδοχικών συγκεντρώσεων κ.λπ.).

Γ. Στο τελευταίο βήμα, το επιλεγμένο πολυωνυμικό μοντέλο επιλύθηκε, είτε γραφικά είτε αλγεβρικά, ρυθμίζοντας το $y = 0$. Για τον υπολογισμό του αναλύτη στα άγνωστα δείγματα επιλύσαμε τα μοντέλα που παρείχαν την καλύτερη προσαρμογή αλγεβρικά ρυθμίζοντας το σήμα απόκρισης στο μηδέν ($y = 0$) και υπολογίσαμε τις ρίζες του πολωνύμου. Οι αρνητικές πραγματικές ρίζες των εξισώσεων είναι ίσες με τη συγκέντρωση του αναλύτη στα δοκιμασμένα δείγματα (οι συζευγμένες ρίζες αγνοήθηκαν). Για να ελαχιστοποιηθεί η προσπάθεια επίλυσης πολυωνυμικών εξισώσεων υψηλού βαθμού, οι οποίες συνήθως απαιτούν πολλές και πολύπλοκες μαθηματικές εξισώσεις, προτείνουμε δύο λύσεις. Η μία είναι να επιλυθεί το μοντέλο γραφικά, επεκτείνοντας την καμπύλη προς το σημείο όπου τέμνει τον άξονα x (η συγκέντρωση είναι η απόλυτη απόσταση μεταξύ του σημείου τομής επί την αρχή και του σημείου που αντιστοιχεί στη μηδενική συγκέντρωση του αναλύτη), ενώ η άλλη είναι να επιλύσουμε την πολυωνυμική εξίσωση με τη χρήση αριθμητικών υπολογιστικών εργαλείων που είναι ελεύθερα προσβάσιμα στο διαδίκτυο (<http://www.1728.org/indexalg.html>, <http://www.mathportal.org/calculators.php>, <http://www.freewebs.com/brianjs/>). Τέτοια διαδικτυακά εργαλεία μπορούν να παρέχουν μια γρήγορη λύση στις πολυωνυμικές εξισώσεις με απλή είσοδο των μεταβλητών του μοντέλου ακόμη και χωρίς προηγούμενη εξοικείωση με την

πολύπλοκους αλγεβρικούς υπολογισμούς. Επίσης σε μερικούς από αυτούς τους συνδέσμους παρέχονται οι εξισώσεις που χρησιμοποιούνται για την επίλυση αυτών των πολυώνυμων, επιτρέποντας έτσι την ενσωμάτωσή τους σε μορφή υπολογιστικών φύλλων σε περίπτωση που δεν είναι διαθέσιμη η σύνδεση στο διαδίκτυο. Η τελευταία αυτή προσέγγιση είναι ιδιαίτερος ελκυστική για εφαρμογές στο-σημείο, ειδικά σε περιβάλλοντα περιορισμένων πόρων.

Σε όλες τις μεθόδους εξετάστηκαν πολυωνυμικά μοντέλα μέχρι 4^{ου} βαθμού. Πολυώνυμα υψηλότερης τάξης (5^{ου} και 6^{ου} βαθμού) δεν εξετάστηκαν επειδή απαιτούν μεγάλο αριθμό σημείων της καμπύλης βαθμονόμησης (τα οποία αυξάνουν τις πειραματικές και υπολογιστικές απαιτήσεις), ενώ πολυώνυμα μεγαλύτερα του 4^{ου} βαθμού δεν καταστέλλουν επαρκώς τις ταλαντώσεις στις πολυωνιμικές καμπύλες που μπορεί να προκληθούν από ακραίες τιμές (Kragten et al., 1990). Τέτοιες αποκλίσεις μπορούν να προκληθούν από σφάλματα μέτρησης, μεγάλες τυχαίες μεταβολές στο μετρούμενο σήμα ή συστηματικά σφάλματα στη συγκέντρωση των προτύπων διαλυμάτων (Kragten et al., 1990).

Ο Πίνακας 3.2 δείχνει τις τιμές AIC και BIC των πολυώνυμων 2^{ου}, 3^{ου} και 4^{ου} βαθμού που ταιριάζουν με τα δεδομένα των αναλύσεων για τον προσδιορισμό βιοθειολών, υπεροξειδίου του υδρογόνου, ανθρακικού άλατος και οξικού οξέος. Το Σχήμα 8 δείχνει τις διαφορετικές καμπύλες για τον κάθε προσδιορισμό. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.2, στην ανάλυση των βιοθειολών το βέλτιστο μοντέλο ήταν 2^{ου} βαθμού, στην ογκομετρική ανάλυση για τον προσδιορισμό του ανθρακικού άλατος το βέλτιστο μοντέλο ήταν 3^{ης} τάξης, ενώ στις αναλύσεις για τον προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου και του οξικού οξέος, πολυώνυμα 4^{ης} τάξης έδωσαν τα καλύτερα αποτελέσματα. Τα αποτελέσματα της μεθόδου μας (που παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2, συγκρίθηκαν με τις πραγματικές συγκεντρώσεις των αναλυτών-στόχων και καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από τα επιλεγμένα πολυωνυμικά μοντέλα ήταν σύμφωνα με τη συγκέντρωση των αναλυτών στα προς δοκιμή δείγματα με σχετικό σφάλμα <10%.

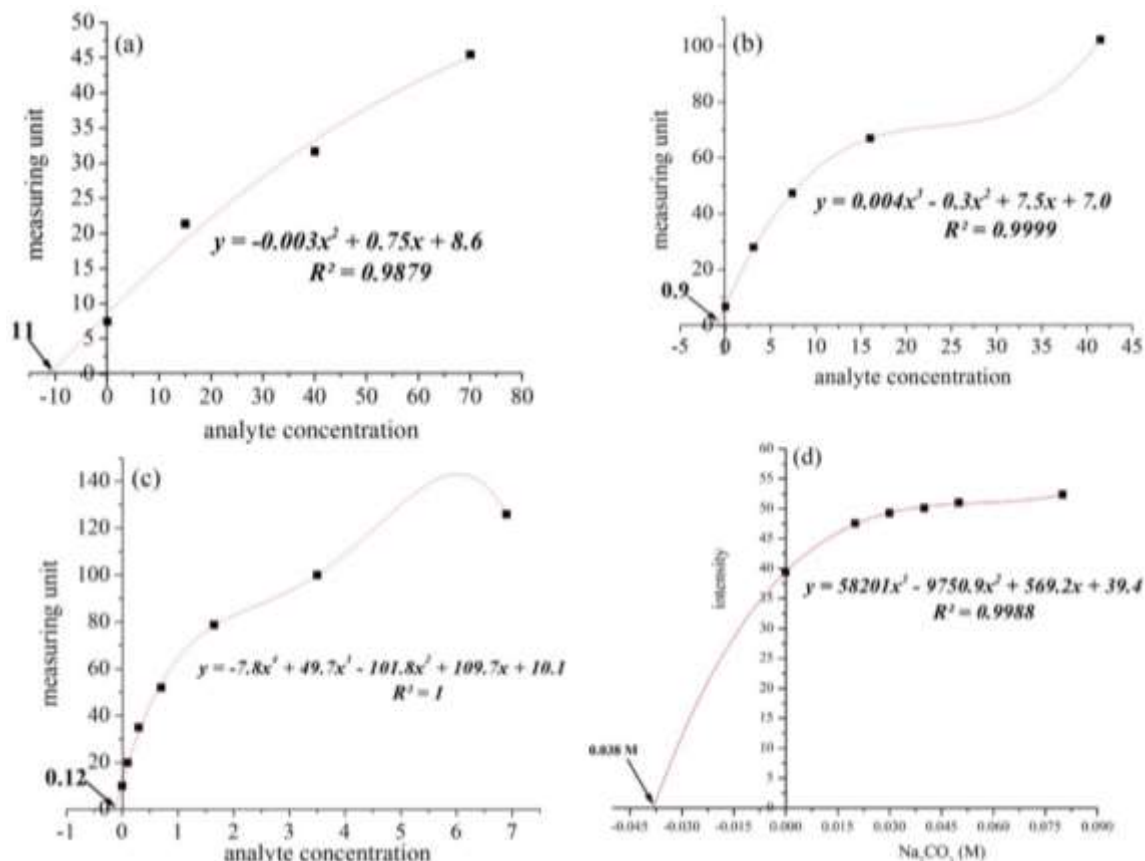
Πίνακας 3.2. Πολυωνυμικές συναρτήσεις, κριτήρια προσαρμογής και παράμετροι ποιοτικής προσαρμογής για καμπύλες βαθμονόμησης σταθερής προσθήκης για τον προσδιορισμό βιοθειολών, υπεροξειδίου του υδρογόνου, οξικού οξέος και ανθρακικού άλατος σε διατάξεις χάρτου.^a

Ανάλυση (μονάδες)	Πολυωνυμική συνάρτηση	AIC τιμή	BIC τιμή	C _{υπολ.}	C _{πραγμ.}	Σχετικό σφάλμα (%) ^b
Κυστεΐνη (μM)	$y = 0.13x + 10.5$	3.30	3.23	80.7		169
	$y = -1.3 \times 10^{-3}x^2 + 0.26x + 9.0$	2.43	2.32	30.1	30.0	0.3
	3 ^{ov} βαθμού δεν μπορούσε να υπολογιστεί					
	4 ^{ov} βαθμού δεν μπορούσε να υπολογιστεί					
Γλουταθειόνη (μM)	$y = 0.21x + 35.5$	3.30	3.24	169.0		238.0
	$y = -3.2 \times 10^{-3}x^2 + 0.51x + 33.1$	2.31	2.20	49.5	50.0	1.0
	$y = 4.3 \times 10^{-5}x^3 - 9.5 \times 10^{-3}x^2 + 0.72x + 32.3$	2.39	2.27	25.8		48.4
	4 ^{ov} βαθμού δεν μπορούσε να υπολογιστεί					
Υπεροξείδιο του υδρογόνου (mM)	$y = 0.29x + 67.6$	1.81	1.74	233.1		1165
	$y = -2 \times 10^{-3}x^2 + 0.45x + 66.4$	1.74	1.64	101.6		408.0
	$y = 3.6 \times 10^{-5}x^3 - 7 \times 10^{-3}x^2 + 0.63x + 65.8$	1.94	1.80	57.3		186.5
	$y = -3.2 \times 10^{-6}x^4 + 7.8 \times 10^{-4}x^3 - 5.2 \times 10^{-2}x^2 + 1.46x + 64.4$	-4.27	-4.44	21.5	20.0	7.5
Οξικό οξύ (M)	$y = 607x + 27.8$	4.51	4.44	0.046		460.0
	$y = -6319x^2 + 1084x + 25.6$	2.52	2.50	0.021		110.0
	$y = 106780x^3 - 19683x^2 + 1458x + 24.9$	1.66	1.63	0.014		40.0
	$y = -3.2 \times 10^{-6}x^4 + 0.65 \times 10^6x^3 - 47 \times 10^3x^2 + 1.8 \times 10^3x + 24.6$	0.23	0.19	0.010	0.01	1.0
Ανθρακικά ιόντα (M)	$y = 55.3x + 55.8$	3.33	3.32	1.0		500.0
	$y = -42.2x^2 + 90.1x + 53.3$	5.74	5.64	0.48		140.0
	$y = 323x^3 - 393x^2 + 162.6x + 57.8$	2.06	2.03	0.22	0.20	10.0
	$y = -583x^4 + 1308x^3 - 939x^2 + 271x + 51.2$	2.22	2.18	0.12		40.0

^a Δεδομένα του Σχήματος 8 και 9. ^b Σχετικό σφάλμα (%) = [(Πραγματική τιμή-Μετρούμενη τιμή) / Πραγματική τιμή] x 100

Για την περαιτέρω αξιολόγηση της χρησιμότητας των πολυωνυμικών συναρτήσεων για την προσαρμογή των μη γραμμικών δεδομένων των καμπυλών αναφοράς σταθερής προσθήκης σε διατάξεις χάρτου, χρησιμοποιήσαμε τρία σύνολα πειραματικών αποτελεσμάτων από διατάξεις χάρτου που ανακτήθηκαν από τη βιβλιογραφία (Wu et al., 2015, Schonhorn et al., 2014, Carrilho et al., 2009). Αυτά αποτελούνταν από i) αποτελέσματα από τη βαθμονόμηση μιας διάταξης χάρτου που χρησιμοποιεί μια ανοσολογική δοκιμή με τη μεσολάβηση νανοσωματιδίων χρυσού για την ανίχνευση της ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης (Schonhorn et al., 2014), ii) αποτελέσματα από τη βαθμονόμηση μιας διάταξης χάρτου για την ηλεκτροχημική ανίχνευση αιθανόλης (Wu et al., 2015) και iii) αποτελέσματα από τη βαθμονόμηση ενός μικροπλακιδίου χάρτου 96 ζωνών που χρησιμοποιεί μια έγχρωμη χρωστική ουσία ως μοντέλο αναλύτη (Carrilho et al., 2009). Χρησιμοποιήσαμε τα δεδομένα αυτά για να ελέγξουμε αν οι μη γραμμικές καμπύλες σταθερής προσθήκης θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την προσαρμογή των δεδομένων και τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του αναλύτη σε ένα άγνωστο δείγμα. Επιπλέον, αυτά τα ανεξάρτητα σύνολα πειραματικών δεδομένων επελέγησαν επειδή ήταν μη γραμμικά και ικανοποιούσαν τα προαναφερθέντα κριτήρια για την εφαρμογή πολυωνυμικών συναρτήσεων σε καμπύλες βαθμονόμησης (σημεία βαθμονόμησης που σχεδόν ισαπέχουν και δεν αποκλίνουν σημαντικά από μία τάξη μεγέθους). Σε κάθε ομάδα δεδομένων, υποθέσαμε ότι i) το διάλυμα με τη χαμηλότερη συγκέντρωση στην καμπύλη αναφοράς ήταν το "άγνωστο" δείγμα για την βαθμονόμηση σταθερής προσθήκης (και συνεπώς η πραγματική συγκέντρωση του εξεταζόμενου διαλύματος). Επομένως, το μετρούμενο αναλυτικό σήμα αυτού του διαλύματος χρησιμοποιήθηκε ως το αναλυτικό σήμα του "άγνωστου" δείγματος και ii) τα υπόλοιπα σημεία αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν ως τα αποτελέσματα των προστιθέμενων προτύπων διαλυμάτων για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης σταθερής προσθήκης. Αυτή η υπόθεση μπορεί να γίνει επειδή το αναλυτικό σήμα του πρώτου σημείου δεδομένων της καμπύλης, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως το "άγνωστο" δείγμα στην προσέγγισή μας, μπορεί να επηρεαστεί από όλες τις πιθανές επιδράσεις μήτρας (π.χ., που αποδίδονται στις διατάξεις χάρτου και στη χρήση ανιχνευτών ψηφιακής απεικόνισης όπως περιγράφεται λεπτομερώς παραπάνω) που μπορεί επίσης να επηρεάσουν το αναλυτικό σήμα των άλλων προτύπων διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς. Έτσι, η αύξηση των

αναλυτικών σημάτων των άλλων σημείων αναφοράς (σε σύγκριση με το πρώτο σημείο αναφοράς) μπορεί να αποδοθεί μόνο στην αυξημένη ποσότητα του αναλύτη. Στη συνέχεια, υπολογίσαμε το βέλτιστο πολωνυμικό μοντέλο που ταιριάζει καλύτερα στα δεδομένα με βάση τη διαδικασία που περιγράφεται παραπάνω. Τα



αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.11.

Εικόνα 3.11. Αξιολόγηση πολωνυμικών συναρτήσεων σε μη γραμμικές καμπύλες αναφοράς σταθερής προσθήκης με χρήση τριών ανεξάρτητων συνόλων δεδομένων που ανακτώνται από τη βιβλιογραφία. (α) Δεδομένα που ανακτώνται από την Αναφ. Schonhorn et al., 2014 (βλ. Σχήμα 3 στην αρχική δημοσίευση). Τα αρχικά δεδομένα δείχνουν τα αποτελέσματα ενός ανοσοπροσδιορισμού με βάση το χαρτί για την ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη. Η αναμενόμενη τιμή είναι 10,0. (β) Δεδομένα που ανακτώνται από την Αναφ. Wu et al., 2015 (βλ. Σχήμα 7 στην αρχική δημοσίευση). Τα αρχικά δεδομένα δείχνουν την απόκριση της αιθανόλης σε μια μικρο-ηλεκτροχημική διάταξη χάρτου. Η αναμενόμενη τιμή είναι 0,9. (γ) Δεδομένα που ανακτώνται από την Αναφ. Carrilho et al., 2009 (βλ. Σχήμα 6β στην αρχική δημοσίευση). Τα αρχικά δεδομένα δείχνουν τη σχέση μεταξύ των ποσοτήτων βαφής Coomassie που προσροφούνται στις ζώνες χάρτου σε μια πλάκα χάρτου 96 ζωνών σε σχέση με την

ένταση της γκρίζας κλίμακας που μετρήθηκε από την ψηφιακή εικόνα της βαφής. Η αναμενόμενη τιμή είναι 0,1. (δ) Ανάλυση ανθρακικών ιόντων σε ένα αραιωμένο δείγμα μαλακού ποτού. Η αναμενόμενη τιμή είναι 0,04M.

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.11 (α-γ) δείχνουν ότι οι πολωνυμικές συναρτήσεις μπορούν να υπολογίσουν αποτελεσματικά τη συγκέντρωση του "άγνωστου" δείγματος (δηλαδή τη συγκέντρωση του πρώτου σημείου βαθμονόμησης). Αυτό το εύρημα υποδηλώνει ότι η πολωνυμική προσαρμογή θα μπορούσε να περιγράψει αποτελεσματικά τα μη γραμμικά δεδομένα βαθμονόμησης και ότι δεν είναι απαραίτητη η χρήση συγκεκριμένων μαθηματικών εκφράσεων ή η ακριβής γνώση της τάξης του πολωνύμου προσαρμογής για κάθε προσδιορισμό καθώς η συνάρτηση προσαρμογής μπορεί να υπολογιστεί πειραματικά.

Η εφαρμοσιμότητα της πολωνυμικής βαθμονόμησης σταθερής προσθήκης αξιολογήθηκε επίσης με την εφαρμογή της ανάλυσης για τον προσδιορισμό ανθρακικών ιόντων σε ένα δείγμα αναψυκτικού που αραιώθηκε 3 φορές χρησιμοποιώντας την ίδια μέθοδο τιτλοδότησης που βασίστηκε στο χαρτί που αναπτύχθηκε παραπάνω. Η γραφική παράσταση στην Εικόνα 3.11-δ δείχνει ότι παρά τα χαμηλά επίπεδα συγκέντρωσης και το στενό εύρος βαθμονόμησης (που θεωρητικά θα μπορούσαν να ευνοήσουν μια γραμμική καμπύλη αναφοράς) η καμπύλη σταθερής προσθήκης περιγράφεται επίσης από πολώνυμο 3^{ης} τάξης και μπορεί αποτελεσματικά να υπολογίζει τη συγκέντρωση των ανθρακικών ιόντων στο δείγμα με σφάλμα 5% (η αναμενόμενη συγκέντρωση των ανθρακικών ιόντων ήταν 0,04M). Επομένως, παρά την εμφανή τους πολυπλοκότητα, τα πολώνυμα υψηλής τάξης μπορούν να χρησιμοποιηθούν ακόμη και για αραιωμένα δείγματα και μικρές συγκεντρώσεις. Αυτό είναι ιδιαίτερα πρακτικό όταν απαιτείται μια γρήγορη, ημι-ποσοτική εκτίμηση της περιεκτικότητας του δείγματος.

3.3.5 Σύγκριση με άλλες μεθόδους βαθμονόμησης

Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν με την μέθοδο πολλαπλής σταθερής προσθήκης σε βαθμονομημένες διατάξεις χάρτου συγκρίθηκαν με αυτά που λαμβάνονται με α) βαθμονόμηση με χρήση καμπύλης εξωτερικής βαθμονόμησης (με χρήση προτύπων διαλυμάτων του αναλύτη) καθώς β) με την μέθοδο σταθερής προσθήκης πραγματοποιώντας την σταθερή προσθήκη αρχικά σε διαλύματα των

δειγμάτων (υγροχημικά) και στη συνέχεια εναποθέτοντας τα διαλύματα σε διατάξεις χάρτου (Ornatska et al., 2011).

Για την εξωτερική καμπύλη βαθμονόμησης προσθέσαμε τα χρωματομετρικά αντιδραστήρια στις ζώνες ανίχνευσης των διατάξεων και τα αφήσαμε να στεγνώσουν. Στη συνέχεια, τοποθετήσαμε μια σειρά προτύπων διαλυμάτων του αναλύτη στις διατάξεις (ένα πρότυπο διάλυμα για κάθε ζώνη ανίχνευσης). Το εξεταζόμενο δείγμα εναποτέθηκε σε ξεχωριστή ζώνη ανίχνευσης. Μετά την ξήρανση τα σήματα καταγράφηκαν και απεικονίστηκαν σε γραφική παράσταση έναντι της συγκέντρωσης για να δημιουργηθεί μια εξωτερική καμπύλη αναφοράς. Η συγκέντρωση του αναλύτη στο υπό δοκιμή δείγμα προέκυψε από τη συνάρτηση βαθμονόμησης.

Για να εκτελέσουμε τη μέθοδο της σταθερής προσθήκης χρησιμοποιώντας διαλύματα δειγμάτων, προετοιμάσαμε πρώτα τις διατάξεις και τις αποθηκεύσαμε σε ξηρή κατάσταση υπό κατάλληλες συνθήκες. Για την εκτέλεση της ανάλυσης, το υγρό δείγμα διαιρέθηκε σε 4 τμήματα ίσων όγκων. Το πρώτο τμήμα δεν είχε προσθήκη. Τα υπόλοιπα τμήματα τροφοδοτήθηκαν με πρότυπο διάλυμα του αναλύτη, φροντίζοντας ώστε η διαφορά μεταξύ των διαδοχικών όγκων του προτύπου διαλύματος που προστέθηκε να διατηρείται σταθερή. Όλα τα διαλύματα στη συνέχεια συμπληρώθηκαν σε ίσους όγκους. Με τον τρόπο αυτό, οι συγκεντρώσεις του αναλύτη στο δείγμα ήταν σταθερές σε όλα τα διαλύματα ενώ η συγκέντρωση του προστιθέμενου αναλύτη αυξήθηκε αναλογικά. Τα διαλύματα στη συνέχεια εναποτέθηκαν στις διατάξεις χάρτου και αφέθηκαν να στεγνώσουν πριν αποκτήσουν το αναλυτικό σήμα. Τα μετρούμενα σήματα χρησιμοποιήθηκαν για την προετοιμασία μιας καμπύλης σταθερής προσθήκης (γραμμικής ή μη γραμμικής). Η συγκέντρωση του αναλύτη στο δείγμα υπολογίστηκε διασταυρώνοντας την καμπύλη σταθερής προσθήκης με τον άξονα x ή αλγεβρικά ρυθμίζοντας το $y = 0$.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την σύγκριση των τριών μεθόδων καθώς και λεπτομέρειες σχετικά με την εφαρμογή της εξωτερικής βαθμονόμησης και της καμπύλης σταθερής προσθήκης σε διατάξεις χάρτου, παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.3.

Πίνακας 3.3. Αποτελέσματα από την εφαρμογή διαφορετικών μεθόδων βαθμονόμησης σε χαρτί για τον προσδιορισμό του σιδήρου, των πρωτεϊνών, του υπεροξειδίου του υδρογόνου, του οξικού οξέος και του ανθρακικού άλατος. Μέσος όρος τριών μετρήσεων $\pm$ RSD (%).

Αναλύτης	Σταθερή προσθήκη (προτεινόμενη μέθοδος)	Εξωτερική βαθμονόμηση σε διατάξεις χάρτου	Υγροχημική καμπύλη σταθερής προσθήκης με εφαρμογή σε διατάξεις χάρτου	Πραγματική τιμή
Κυστεΐνη (μM) ¹	23,8 $\pm$ 2.0 (RE=4,8%)	26,0 $\pm$ 1.8 (RE=4,0%)	26,3 $\pm$ 3.0 (RE=5,2%)	25.0
Γλουταθειόνη (μM) ¹	52,7 $\pm$ 3,4 (RE=5,4%)	50,5 $\pm$ 1.8 (RE=1,0%)	51,4 $\pm$ 3.0 (RE=2,8%)	50.0
Σίδηρος (III) (ng/ μL) ¹	73.9 $\pm$ 3.0 (RE=1.6%)	72.5 $\pm$ 3.8 (RE=3.3%)	76.4 $\pm$ 3.9 (RE=-1.8%)	75.0
Πρωτεΐνες (μM) ¹	29.2 $\pm$ 5.8 (RE=2.7%)	28.4 $\pm$ 7.4 (RE=5.3%)	30.0 $\pm$ 9.3 (RE=0%)	30.0
Κυστεΐνη (μM) ²	30,1 $\pm$ 2.5 (RE=0,3%)	-	-	30.0
Γλουταθειόνη (μM) ²	48,4 $\pm$ 3.1 (RE=3,2%)	-	-	50.0
Υπεροξείδιο του υδρογόνου (mM) ²	20.7 $\pm$ 6.3 (RE=-3.5%)	19.4 $\pm$ 15 (RE=3.0%)	21.8 $\pm$ 7.3 (RE=9.0%)	20.0
Οξικό οξύ (M) ²	0.01 $\pm$ 20 (RE=0%)	0.011 $\pm$ 18 (RE=10.0%)	0.011 $\pm$ 8.2 (RE=10.0%)	0.01
Ανθρακικά ιόντα (M) ²	0.19 $\pm$ 7.9 (RE=5.0%)	0.20 $\pm$ 5.0 (RE=0%)	0.22 $\pm$ 8.2 (RE=10.0%)	0.20

¹ Με χρήση γραμμικών καμπυλών σταθερής προσθήκης

² Με χρήση πολωνυμικών καμπυλών σταθερής προσθήκης

RE (Σχετικό σφάλμα %) = [(Πραγματική τιμή-Μετρούμενη τιμή) / Πραγματική τιμή] x 100

Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 3.3, καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι η προτεινόμενη προσέγγιση προσφέρει ικανοποιητική ακρίβεια και επαναληψιμότητα στην ανάλυση πραγματικών δειγμάτων σε σχέση με τις κλασσικές μεθόδους βαθμονόμησης. Επιπλέον, η ευαισθησία των προσδιορισμών είναι συγκρίσιμη με εκείνες που αναφέρθηκαν σε προηγούμενες μελέτες που χρησιμοποιούν την εξωτερική βαθμονόμηση σε διατάξεις χάρτου για τους ίδιους αναλύτες (Martinez et

al., 2007, Giokas et al., 2014, Renault et al., 2013, Karita et al., 2014). Μπορούμε επίσης να παρατηρήσουμε ότι αν και τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την εξωτερική βαθμονόμηση ήταν σε καλή συμφωνία με τις αναμενόμενες τιμές, όλοι οι προσδιορισμοί σταθερής προσθήκης παρείχαν ελαφρώς καλύτερα αποτελέσματα (Πίνακας 3.3). Αυτό σημαίνει ότι α) η κύρια πηγή των επιδράσεων μήτρας στις αναλύσεις μας προέρχεται από τις διατάξεις χάρτου και σε μικρότερη έκταση από τη μήτρα δείγματος β) η μέθοδος σταθερής προσθήκης θα μπορούσε να μετριάσει αποτελεσματικά και τα δύο είδη επιδράσεων μήτρας.

3.3.6 Επαναληψιμότητα ακρίβεια και της μεθόδου σταθερής προσθήκης σε διαφορετικές βαθμονομημένες διατάξεις χάρτου

Τα προηγούμενα αποτελέσματα ελήφθησαν πραγματοποιώντας τις αναλύσεις στην ίδια διάταξη χάρτου. Για να εκτιμηθεί η επαναληψιμότητα των προσδιορισμών που εκτελούνται σε διαφορετικές βαθμονομημένες διατάξεις χάρτου, πραγματοποιήσαμε τις αναλύσεις πέντε φορές με διατάξεις χάρτου που παρασκευάστηκαν σε διαφορετικά φύλλα χάρτου και κάθε μέτρηση ήταν ο μέσος όρος τριών αναλύσεων. Η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα των προσδιορισμών από όλα τα πειράματα δίδονται στον Πίνακα 3.4 και δείχνουν ότι οι προσδιορισμοί που αναπτύχθηκαν παρέχουν ακριβή και επαναλήψιμη εκτίμηση των συγκεντρώσεων του αναλύτη στα πραγματικά δείγματα.

Πίνακας 3.4. Ακρίβεια και επαναληψιμότητα των ποσοτικών προσδιορισμών που έγιναν σε βαθμονομημένες διατάξεις χάρτου.

Αναλύτης	Καμπύλη σταθερής προσθήκης	C _{μετρούμενη} ± SD	RSD (% , n=5)	Πραγματική τιμή
Cysteine (pmol/μL)	1 ^{ης} τάξης	26,1±1.9	7.3	25.0
Glutathione (pmol/μL)	1 ^{ης} τάξης	47.7±3.8	7.9	50.0
Σίδηρος (III) (ng/μL)	1 ^{ης} τάξης	73.9±2.2	2.9	75.0
Πρωτεΐνες (μM)	1 ^{ης} τάξης	29.2±1.7	5.8	30.0
Υπεροξειδίου του υδρογόνου (mM)	4 ^{ης} τάξης	20.7±1.3	6.3	20.0
Οξικό οξύ (M)	4 ^{ης} τάξης	0.01±0.002	10.0	0.01
Ανθρακικά ιόντα (M)	3 ^{ης} τάξης	0.19±0.015	7.9	0.2

SD: Τυπική απόκλιση. RSD: Σχετική τυπική απόκλιση

3.3.7 Σταθερότητα των βαθμονομημένων διατάξεων και επίδραση περιβαλλοντικών συνθηκών

Η σταθερότητα των διατάξεων για την ανάλυση βιοθειολών μελετήθηκε στο Κεφάλαιο 2. Για την αξιολόγηση της διάρκειας ζωής των βαθμονομημένων διατάξεων για την ανάλυση των υπόλοιπων αναλυτών που εξετάστηκαν στο κεφάλαιο αυτό, ετοιμάσαμε διατάξεις για τους πέντε αναλύτες, τις αποθηκεύσαμε για 1 μήνα προστατευμένες από το φως και κάτω από διαφορετικές συνθήκες (σε θερμοκρασία δωματίου και στους 4°C, συνθήκες υγρασίας περιβάλλοντος και χωρίς υγρασία, σε αέρα και άζωτο υψηλής καθαρότητας) και έπειτα ελέγξαμε εάν τα αποτελέσματα ήταν διαφορετικά σε σύγκριση με τα αποτελέσματα που λήφθηκαν χρησιμοποιώντας νέες διατάξεις που κατασκευάστηκαν την ημέρα της ανάλυσης. Θεωρήσαμε ότι οι διατάξεις διατηρούν τη σταθερότητά τους όταν τα αποτελέσματα (δηλαδή η ένταση σήματος των βαθμονομημένων διατάξεων και η μετρούμενη συγκέντρωση του αναλύτη) δεν αποκλίνουν περισσότερο από 10% σε σύγκριση με εκείνα που λαμβάνονται από νέες διατάξεις. Να σημειωθεί ότι πριν από τη χρήση, οι αποθηκευμένες διατάξεις επώστηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (απουσία

φωτός) συνθήκες για 5 λεπτά ώστε οι συνθήκες ανάλυσης να είναι ίδιες μεταξύ των νέων και των αποθηκευμένων διατάξεων. Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών συνοψίζονται στον Πίνακα 3.5.

Πίνακας 3.5. Ανακτήσεις (αποτελέσματα που λαμβάνονται από την αποθηκευμένη διάταξη σε σύγκριση με εκείνα που λαμβάνονται από τη νέα διάταξη) μετά από αποθήκευση για 1 μήνα υπό διαφορετικές συνθήκες. Μέσος όρος πέντε μετρήσεων $\pm$ RSD (%).

Συνθήκες αποθήκευσης	Σίδηρος (III)	Πρωτεΐνες	H ₂ O ₂	Οξικό οξύ	Ανθρακικά ιόντα
Θερμοκρασία αποθήκευσης T=20°C	0.98 $\pm$ 4.8	0.9 $\pm$ 6.4	0.85 $\pm$ 9.7	0.88 $\pm$ 10.3	0.90 $\pm$ 8.2
Θερμοκρασία αποθήκευσης T=4°C	1.02 $\pm$ 5.5	0.96 $\pm$ 5.9	0.92 $\pm$ 9.1	0.94 $\pm$ 9.0	0.95 $\pm$ 6.5
Υγρασία αποθήκευσης: RH=60 %	1.04 $\pm$ 6.0	0.96 $\pm$ 6.8	0.92 $\pm$ 11.4	0.93 $\pm$ 8.3	0.94 $\pm$ 10.5
Υγρασία αποθήκευσης: RH=0 %	0.98 $\pm$ 3.7	1.03 $\pm$ 7.0	0.94 $\pm$ 7.7	0.95 $\pm$ 8.0	0.95 $\pm$ 5.9
Ατμόσφαιρα αποθήκευσης: Αέρας	1.09 $\pm$ 5.1	1.07 $\pm$ 5.5	0.88 $\pm$ 10.3	0.90 $\pm$ 12.3	0.88 $\pm$ 7.7
Ατμόσφαιρα αποθήκευσης: Άζωτο	1.07 $\pm$ 4.4	1.04 $\pm$ 5.6	1.04 $\pm$ 7.8	1.03 $\pm$ 6.4	0.97 $\pm$ 7.4

Για μια περίοδο αποθήκευσης ενός μήνα, καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι α) οι διατάξεις για τον προσδιορισμό του σιδήρου (III) ήταν σταθερές κάτω από οποιεσδήποτε συνθήκες αποθήκευσης, β) οι διατάξεις για τους άλλους προσδιορισμούς ήταν σταθερές μόνο στους 4°C, γ) σε όλους τους προσδιορισμούς οι διατάξεις που αποθηκεύτηκαν υπό συνθήκες χωρίς υγρασία παρουσίασαν καλύτερη επαναληψιμότητα και δ) οι διατάξεις για τον προσδιορισμό του υπεροξειδίου του υδρογόνου θα πρέπει κατά προτίμηση να αποθηκεύονται σε αδρανή ατμόσφαιρα.

Για να εξεταστεί εάν τα αποτελέσματα των αναλύσεων που πραγματοποιήθηκαν σε βαθμονομημένες διατάξεις μεταβάλλονται με την αλλαγή των περιβαλλοντικών συνθηκών, δοκιμάσαμε τις πέντε μεθόδους υπό διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας (10, 25 και 35°C) και υγρασίας (20%, 45% 80%). Τα επίπεδα θερμοκρασίας και υγρασίας ρυθμίστηκαν με έλεγχο των συνθηκών αερισμού και μετρήθηκαν με ψηφιακούς αισθητήρες. Πριν από τη χρήση, οι διατάξεις επωάστηκαν στις κατάλληλες συνθήκες για 5 λεπτά. Καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι η μέση σχετική τυπική απόκλιση μεταξύ των αποτελεσμάτων όλων των αναλύσεων από πέντε επαναληπτικές μετρήσεις κυμάνθηκε από 5,0-12,3% (7,0% κατά μέσο όρο) υποδηλώνοντας ότι οι περιβαλλοντικές συνθήκες επηρεάζουν ελάχιστα τα αποτελέσματα των αναλύσεων που πραγματοποιήθηκαν σε βαθμονομημένες διατάξεις.

3.4 Συμπεράσματα

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράψαμε μια νέα προσέγγιση για την πραγματοποίηση αναλύσεων στο πεδίο που βασίζεται σε βαθμονόμηση σταθερής προσθήκης πολλαπλών σημείων και χρησιμοποιεί βαθμονομημένες διατάξεις χάρτου. Αυτή η προσέγγιση έχει αρκετά πλεονεκτήματα:

- i) Εξαλείφει την ανάγκη διεξαγωγής καμπύλης εξωτερικής βαθμονόμησης που θα πρέπει να διεξάγεται επί τόπου. Αυτό είναι αρκετά πολύπλοκο όταν οι μέθοδοι πρέπει να εκτελούνται εκτός εργαστηριακών εγκαταστάσεων και ιδιαίτερα όταν χρησιμοποιούνται ως ανιχνευτές κάμερες χειρός. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα αποτελέσματα των χρωματομετρικών προσδιορισμών επηρεάζονται από τις συνθήκες φωτισμού όταν λαμβάνονται οι εικόνες των περιοχών ανίχνευσης (Morbioli et al., 2017, Yetisen et al., 2013).
- ii) Η διαδικασία είναι γρήγορη και όλα τα βήματα της ανάλυσης (δηλ., προετοιμασία καμπύλης αναφοράς σταθερής προσθήκης, ανάλυση πραγματικών δειγμάτων) μπορούν να πραγματοποιηθούν σε μία μόνο διάταξη. Ως εκ τούτου, μη εκπαιδευμένο προσωπικό θα μπορεί να προσθέσει μόνο ένα κλάσμα του δείγματος στις ζώνες ανίχνευσης και μετά από λίγα λεπτά να αποκτήσει μια εικόνα των ζωνών ανίχνευσης. Για να εξαχθεί η συγκέντρωση του αναλύτη στο δείγμα, ο χρήστης μπορεί είτε να αποστείλει τις εικόνες σε πιο εξειδικευμένο χρήστη για να εξαγάγει το αποτέλεσμα είτε να χρησιμοποιήσει προσαρμοσμένο λογισμικό υπολογιστικού φύλλου για να αναλύσει τις εικόνες επιτόπου.
- iii) Η μέθοδος μπορεί να μειώσει τις επιδράσεις μήτρας, συμπεριλαμβανομένων των επιδράσεων μήτρας που προκαλούνται από τα έγχρωμα δείγματα (π.χ. ορός αίματος) και την επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων, καθώς η βαθμονόμηση σταθερής προσθήκης πολλαπλών σημείων είναι η ενδεδειγμένη μέθοδος για την αντιμετώπιση αυτών των παρεμποδίσεων.
- iv) Η μέθοδος μειώνει τα τυχαία σφάλματα που σχετίζονται με την ανομοιογένεια του χάρτου καθώς το σήμα υποβάθρου από κάθε περιοχή ανίχνευσης αφαιρείται από το αναλυτικό σήμα.
- v) Η μέθοδος ελαχιστοποιεί τυχαία σφάλματα, καθώς η σταθερότητα και η κατάσταση λειτουργίας των διατάξεων μπορούν εύκολα να επαληθευθούν συγκρίνοντας την ένταση χρώματος στις ζώνες ανίχνευσης των διατάξεων λίγο μετά την παρασκευή και αμέσως πριν τη χρήση. Όταν παρατηρείται σημαντική

αλλοίωση των αντιδραστηρίων (που μπορεί να παρατηρηθεί από την αλλαγή χρώματος στις ζώνες αντίχρεωσης), οι διατάξεις πρέπει να απορρίπτονται. Εάν παρατηρηθούν μικρές μεταβολές, οι διατάξεις θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν αφού τα αποτελέσματα είναι κανονικοποιημένα, διότι οποιαδήποτε μεταβολή των προϊόντων της αντίδρασης ή των αντιδραστηρίων που δεν έχουν αντιδράσει θα επηρεάσει όλα τα σήματα με ανάλογο τρόπο.

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί πως η προτεινόμενη μέθοδος είναι ευπροσάρμοστη και μπορεί να χρησιμοποιηθεί όχι μόνο σε πολύ απλές δισδιάστατες διατάξεις χάρτου αλλά και σε πιο εξελιγμένες διατάξεις (π.χ. 3D, βαθμονομημένες διατάξεις με ενσωματωμένο μηχανισμό μέτρησης κ.λπ.)

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abraham J.M., Cho L., *Cleve Clin J Med* 77 (2010) 911–918.
- Abukhalaf I.K., Silvestrov N.A., Menter J.M., von Deutsch D.A., Bayorh M.A., Socci R.R., Ganafa A.A., *J Pharm Biomed Anal* (2002) 28:637–643.
- Acres R.G., Feyer V., Tsud N., Carlino E., Prince K.C., *The Journal of Physical Chemistry C* 118 (2014) 10481–87.
- Adams N.W.H., Kramer J.R., *Aquatic Geochem* 5 (1999) 1-11.
- Al-Afaleg N.O., Al-Senaidy A., El-Ansary A., *Clin Biochem* 44 (2011) 612–617.
- Al-Maskari M.Y., Waly M.I., Ali A., Al-Shuaibi Y.S., Ouhtit A., *Nutrition* 28(2012) 23–26.
- Allen E., Triantaphillidou S., *Taylor & Francis, Oxford, UK, 2011, 10th Ed.*
- Alwaela H., Connolly D., Barron L., Paull B., *J Chromatogr A* 1217 (2010) 3863.
- Amjadi M., Abolghasemi-Fakhri Z., Hallaj T., *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 309 (2015) 8–14.
- Andersson A., Lindgren A., Arnadottir M., Prytz H., Hultberg B., *Clin Chem* 45 (1999) 1084-1086.
- Arrigo A., *Free Rad Biol Med* 27 (1999) 936.
- Aryal, S., Remant B.K.C., Dharmaraj N., Bhattarai N., Kim C.H., Kim H.Y., *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 63 (2006) 160–63.
- Ashfaq S., Abramson J.L., Jones D.P., Rhodes S.D., Weintraub W.S., Hooper W.C., Vaccarino V., Harrison D.G., Quyyumi A.A., *J Am Coll Cardiol* 47 (2006) 1005–1011.
- Ashok B., Ali R., *Exp Geront* 34 (1999) 293.

Aslan, K., Holley P., Davies L., Lakowicz J.R., Geddes C.D., *Journal of the American Chemical Society* **127** (2005) 12115–21.

Aydin M., Gokkusu C., Ozkok E., Tulubas F., Unlucerci Y., Pamukcu B., Ozbek Z., Umman B., *Mol Cell Biochem* **325** (2009) 199–208.

Badu-Tawiah A.K., Lathwal S., Kaastrup K., Al-Sayah M., Christodouleas D., Smith B.S., Whitesides G.M., *Lab Chip* **15** (2015) 655–659.

Baghdady Y.Z., Schug K.A., *Journal of Separation Science* **39** (2016) 102–114.

Bagiyan G.A., Koroleva I.K., Soroka N.V., Ufimtsev A.V., *Russ Chem Bull* **52** (2003) 1135–1141.

Bai S., Chen Q., Lu C., Lin J.-M., *Anal Chim Acta* **768** (2013) 96–101.

Baillet A., Chanteperdrix V., Trocmé C., Casez P., Garrel C., Besson G., *Neurochem Res* **35** (2010) 1530–1537.

Bald E., Chwatko G., Głowacki R., Kusmierk K., *J Chromatogr A* **1032** (2004) 109.

Bald E., Glowacki R., *Amino Acids* **28** (2005) 431.

Bald E., Glowacki R., Drzewoski J., *J Chromatogr A* **913** (2001) 319.

Balendiran G.K., Dabur R., Fraser D., *Cell Biochem Func* **22** (2004) 343.

Ballatori N., Krance S.M., Notenboom S., Shi S., Tieu K., Hammond C.L., *Biological Chemistry* **390** (2009) 191–214.

Ballerini D.R., Li X., Shen W., *Microfluid Nanofluid* **13**(2012) 769–787.

Bamdad F., Khorram F., Samet M., Bamdad K., Sangi M.R., Allahbakhshi F., *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **161** (2016) 52–57.

Bañnos-González M.A., Anglés-Cano E., Cardoso-Saldana G., Peña-Duque M.A., Martínez-Ríos M.A., Valente-Acosta B., González-Pacheco H., de la Peña-Díaz A., *Circ J* **76** (2012) 1953–1957.

Baskol M., DolbunSeckin K., Baskol G., *Turk J Gastroenterol* **25** (2014) 32–37.

Bass R.B., Butler S.L., Chervitz S.A., Gloor S.L., Falke J.J., *Meth Enzymol* **423** (2007) 25.

Berg J.M., Stryer L., Tymoczko J.L., *Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης*, 2005.

Berthon G., *Pure App Chem* **67** (1995) 1117-1240.

Bhakta S.A., Borba R., Taba Jr M., Garcia C.D., Carrilho E., *Anal Chim Acta* **809** (2014) 117-122.

Bhamore J., Rawat K.A., Basu H., Singhal R.K., Kailasa S.K., *Sensors and Actuators B* **212** (2015) 526–535.

Birke H., Haas F.H., De Kok L.J., Balk J., Wirtz M., Hell R., *Biochem J* **445** (2012) 275.

Bjorkhagen H.I., *Springer, New York*, 1995, 2nd Ed.

Blanchard J., *J Chromatogr* **226** (1981) 455-460.

Bleich S., Carl M., Bayerlein K., Reulbach U., Biermann T., Hillemacher T., Bonsch D., Kornhuber J., *Alcoholism-Clinical and Experimental Research* (2005) **29**, 334-336.

Borges-Santos M.D., Moreto F., Pereira P.C.M., Ming-Yu Y., Burini R.C., *Nutri-tion* **28** (2012) 753–756.

Bouri M., Salghi R., Ríos A., Zougagh M., *Analytical Letters* **49** (2016) 1221–32.

Brachet P., Chanson A., Demigne C., Batifoulier F., Alexandre-Gouabau M.C., Tyssandier V., Rock E., *Nutr Res Rev* **2004**, *17*, 55-68.

Brattstrom L., Lindgren A., Israelsson B., Andersson A., Hultberg B., *J Intern Med* **236** (1994) 633–641.

Brooks T., Keevil C.W., *Lett Appl Microbiol* **24** (1997) 203-206.

Butterfield D., Boyd-Kmball D., *Biochim Biophys Acta* **1703** (2005) 149.

Cai Q.Y., Li J., Ge J., Zhang L., Hu Y.L., Li Z.H., Qu L.B., *Biosensors and Bioelectronics* **72** (2015) 31–36.

Calabrese V., Cornelius C., Leso V., Trovato-Salinaro A., Ventimiglia B., Cav-allaro M., Scuto M., Rizza S., Zanolì L., Neri S., Castellino P., *Biochim Biophys Acta* **1822** (2012) 729–736.

Camera E., Picardo M., *J Chromatogr B* **781** (2002) 181–206.

Cao H., Wei M., Chen Z., Huang Y., *Analyst* **138** (2013) 2420–26.

Carrilho E., Martinez A.W., Whitesides G.M., *Anal Chem* **81** (2009) 7091–7095.

Carrilho E., Phillips S.T., Vella S.J, Martinez A.W., Whitesides G.M., *Anal Chem* **81** (2009) 5990–5998.

Carrol B.H., *Journal of Chemical Education* **8** (1931) 2341-2367.

Cate D.M., Adkins J.A., Mettakoonpitak J., Henry C.S., *Anal Chem* **87** (2015) 19–41.

- Cate D.M., Dungchai W., Cunningham J.C., Volckens J., Henry C.S., Simple, distance-based measurement for paper analytical devices, *Lab Chip* **13** (2013) 2397–2404.
- Cevasco G., Piątek A.M., Scapolla C., Thea S., *J Chromatogr A* **1217** (2010) 2158–2162.
- Chang C.W., Tseng W.L., *Anal Chem* **82** (2010) 2696–2702.
- Chao M.R., Hu C.W., Chen J.L., *Microchimica Acta* **181** (2014) 1085–91.
- Chaplan C.A., Mitchell H.T., Martinez A.W., *Anal Methods* **6** (2014) 1296–1300.
- Chen H.Q., Wu Y., Yuan F., Xu J., Zhang Y.Y., Wang L., *Journal of Luminescence* **141** (2013) 33–37.
- Chen S.J., Chang H.T., *Anal Chem* **76** (2004) 3727–3734.
- Chen S., Gao H., Shen W., Lu C., Yuan Q., *Sensors and Actuators B: Chemical* **190** (2014) 673–78.
- Chen X., Zhou Y., Peng X., Yoon J., *Chem Soc Rev* **39** (2010) 2120–2135.
- Chen Y.L., Chen L.J., Bair M.J., Yao M.L., Peng H.C., Yang S.S., Yang S.C., *World J Gastroenterol* **17** (2011) 1063–1070.
- Chen Z., Luo S., Liu C., Cai Q., *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **395** (2009) 489–94.
- Chen Z., Wang Z., Chen J., Wang S., Wang X., *Analyst* **137** (2012) 3132–3137.
- Chin C.C., Wold F., *Anal Biochem* (1993) 214:128– 134.
- Choleva T.G., Kappi F.A., Giokas D.L., Vlessidis A.G., *Anal Chim Acta* **860** (2015) 61–69.
- Christodouleas D.C., Nemiroski A., Kumar A.A., Whitesides G.M., *Anal Chem* **87** (2015) 9170–9178.
- Clarke R., Halsey J., Bennett D., Lewington S., *J Inherit Metab Dis* **34** (2011) 83–91.

Cline D.J., Redding S.E., Brohawn S.G., Psathas J.N., Schneider J.P., Thorpe C., ***Biochemistry* 43 (2004) 15195–15203.**

Copley S., Dhillon J., ***Genome Biol* 3 (2002) 1.**

Cuadros-Rodriguez L., Bagur-Gonzalez M.G., Sanchez-Vinas M., Gonzalez-Casado A., Gomez-Saez A.M., ***J Chromatogr A* 1158 (2007) 33–46.**

D’Agostino L.A., Lam K.P., Lee R., Britz-McKibbin P., ***J Proteome Res* 10 (2011) 592–603.**

Damrauer N.H., Cerullo G., Yeh A., Boussie T.R., Shank C.V., Mccusker J.M., ***Science* 275 (1997) 54–57.**

Danzer K., Currie L.A., ***Pure Appl Chem* 70 (1998) 993-1014.**

Daykin C.A., Foxall P.J., Connor S.C., Lindon J.C., Nicholson J.K., ***Anal Biochem* 304 (2002) 220–230.**

De Bree A., Verschuren W.M.M., Kromhout D., Kluijtmans L.A.J., Blom H.J., ***Pharmacol Rev* 2002, 54, 599-618.**

De Ruijter W., Westendorp R.G., Assendelft W.J., den Elzen W.P., de Craen A.J., le Cessie S., Gussekloo J., ***BMJ* 338 (2009) 3083.**

Dean O., Giorlando F., Berk M., ***J Psychiatry Neurosci* 36 (2011) 78.**

Deegan R.D., Bakajin O., Dupont T.F., Huber G., Nagel S.R., Witten T.A., ***Nature* 389 (1997) 827–829.**

Deneke S.M., Thiols-based antioxidants, in: E.R. Stadtman, P.B. Chock (Eds.), ***Academic Press, San Diego CA, (2001), 151–180.***

Deng J.H., Lu Q.J., Hou Y.X., Liu M.L., Li H.T., Zhang Y.Y., Yao S.Z., ***Analytical Chemistry* 87 (2015) 2195–203.**

Deraney R.N., Mace C.R., Rolland J.P, Schonhorn J.E., ***Anal Chem* 88 (2016) 6161–6165.**

Dhamija R.K., Gaba P., Arora S., Kaintura A., Kumar M., Bhattacharjee J., *J Neurol Sci* **281** (2009) 64–68.

Diamond A.S., Weiss D.S., *Marcel Dekker, New York, 2002, 2nd Ed.*

Dong R., Tian B., Zeng C., Li T., Wang T., Zhang J., *J Phys Chem C* **117** (2013) 213–220.

Droux M., *Photosyn Res* **79** (2004) 331.

Du S., Wang X., Sun X., Li Q., *Analytical Letters* **45** (2012) 1230–41.

Durocher S., Rezaee A., Hamm C., Rangan C., Mittler S., Mutus B., *J Am Chem Soc* **131** (2009) 2475–2477.

Ellerbee A.K., Phillips S.T., Siegel A.C., Mirica K.A., Martinez A.W., Striehl P., Jain N., Prentiss M., Whitesides G.M., *Anal Chem* **81** (2009) 8447–8452.

Ellison S.L.R., Thompson M., *Analyst* **133** (2008) 992–997.

Ellman G.L., *Arch Biochem Biophys* (1959) 82:70–77.

Estrada D.A., Billett H.H., *Am J Hematol* **66** (2001) 252–256.

Evans E., Moreira Gabriel E.F., Tomazelli Coltro W.K., Garcia C.D., *Analyst* **139** (2014) 2127–2132.

Farhadi K., Forough M., Pourhossein A., Molaei R., *Sensors and Actuators B: Chemical* **202** (2014) 993–1001.

Feldman-Salit A., Wirtz M., Lenherr E.D., Throm C., Hothorn M., Scheffzek K., Hell R., Wade R.C., *Structure* **20** (2012) 292.

Ferin R., Pavão M.L., Baptista J., *J Chromatogr B* **911** (2012) 15–20.

Fermo I., Arcelloni C., Paroni R., *Anal Biochem* **307** (2002) 181.

Fischer G., *Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2004.*

Folsom A.R., *J Epidemiol* **23** (2013) 158–162.

Fridley G.E., Le H., Yager P., *Anal Chem* **86** (2014) 6447–6453.

Fujita S., *Springer-Verlag New York*, 2004, 1st Ed.

Funke K., *Sci Technol Adv Mater* 14 (2013) 043502.

Galati G., Tafazoli S., Sabzevari O., Chan T., O'Brein P., *Chem Biol Interact* 142 (2002) 25.

Gamcsik M.P., Kasibhatla M.S., Teeter S.D., Colvin O.M., *Biomarkers* 17 (2012) 671–691.

Gao X.H., Zhang G.Y., Wang Y., Zhang H.Y., *PLoS ONE* 2014, 9.

Gawreih S., Opara E., Koch T., *J Investig Med* 52 (2004) 506.

Gawryluk J.W., Wang J.F., Andreazza A.C., Shao L., Young L.T., *Int J Neuropsychopharm. (CINP)* 14 (2011) 123.

Gervais L., de Rooij N., Delamarche E., *Adv Mater* 23 (2011) H151–H176.

Ghasemi F., Hormozi-Nezhad M.R., Mahmoudi M., *Analytica Chimica Acta* 882 (2015) 58–67.

Giannoulis K.M., Giokas D.L., Tsogas G.Z., Vlessidis A.G., *Talanta* 119 (2014) 276–83.

Giles G.I., Jacob C., *Biol Chem* 383 (2002) 375.

Giles N.M., Giles G.I., Jacob C., *Biochem Biophys Res Comm* 300 (2003) 1.

Giokas D.L., Tsogas G.Z., Vlessidis A.G., *Anal Chem* 86 (2014) 6202–6207.

Glaus S., Calzaferri G., *Photochem Photobiol Sci* 2 (2003) 398–401.

Glavan A., Christodouleas D.C., Mosadegh B., Yu H., Smith B., Lessing J., Fernandez-Abedul M.T., Whitesides G.M., *Anal Chem* 86 (2014) 11999-12007.

Glowacki R., Bald E., *J Chromatogr B* 877 (2009) 3400–3404.

Glowacki R., Bald E., *J Liq Chromatogr Rel Technol* 32 (2009) 2530–2544.

Glushchenko A.V., Jacobsen D.W., *Antioxid Redox Signal* (2007) 9, 1883-1898.

Go Y.M., Jones D.P., *Free Rad Biol Med* 50 (2011) 495.

Grill D., Tausz T., De Kok L., ***Significance of glutathione in plant adaptation to the environment. Springer (2001)***

Grudpan K., Kolev S.D., Lapanantnopakhun S., McKelvie I.D., Wongwilai W., ***Talanta 136 (2015) 84–94.***

Güçlü K., Özyürek M., Güngör N., Baki S., Apak R., ***Anal Chim Acta 794 (2013) 90–98.***

Guo X.-F., Wang H., Guo Y.-H., Zhang Z.-X., Zhang H.-S., ***J Chromatogr A 1216(2009) 3874–3880.***

Guo X.F., Zhang H.X., Ma L.N., Wang H., Zhang H.S., Guo J., *J Sep Sci* 35 (2012)2756–2763.

Guo X.-F., Zhu H., Wang H., Zhang H.-S., ***J Sep Sci 36 (2013) 658–664.***

Gurney R.W., Mott N.F., ***Proc Royal Soc A 164 (1938) 151–167.***

Hakuma L., ***PhD Thesis, Portland State University, 2014, 137.***

Hamed M.M., Ainla A., Guder F., Christodouleas D., Fernandez-Abedul M.T., ***Adv Mater 28 (2016) 5054–5063.***

Han B., Wang E., ***Biosensors and Bioelectronics 26 (2011) 2585–89.***

Han C., Xu K., Liu Q., Liu X., Li J., ***Sensors and Actuators B: Chemical 202 (2014) 574–82.***

Harvey D., ***Analytical Chemistry 2.0, (2008), 161–167.***

He M., Johnson R.J., Escobedo J.O., Beck P.A., Kim K.K., St. Luce N.N., Davis C.J., Lewis P.T., Fronczek F.R., Melancon B.J., Mrse A.A., Treleaven W.D., Strongin R.M., ***J Am Chem Soc (2002) 124, 5000-5009.***

Hecht S., ***J Natl Cancer Inst 91 (1999) 1194.***

Hildebrandt W., Kinscherf R., Hauer K., Holm E., Droge W., ***Mech Ageing Dev 123 (2002) 1269.***

- Ho Y.P., Yang M.W., Chen L.T., Yang Y.C., ***Rapid Communications in Mass Spectrometry* 21 (2007) 1083–89.**
- Hou X.Y., Chen S., Tang J., Long Y.F., ***Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 125 (2014) 285–289.**
- Huang H., Liu X., Hu T., Chu P.K., ***Biosens Bioelectron* 25 (2010) 2078–2083.**
- Huang K.J., Han C.H., Han C.Q., Li J., Wu Z.W., Liu Y.M., ***Microchim Acta* 174 (2011) 421–427.**
- Huang K.J., Han C.H., Sun J.Y., Niu D.J., Wu Z.W., Xue Y.P., Zhang L.J., Xiong X.Q., ***Chromatographia* 72 (2010) 1049–1054.**
- Huang K.J. Huang, Han C.H., Li J., Wu Z.W., Liu Y.M., Wu Y.Y., ***Chromatographia* 74 (2011) 145–150.**
- Huang S., Wang L., Huang C., Hu B., Su W., Xiao Q., ***Microchim Acta* 183 (2016) 1855–1864.**
- Huang S., Xiao Q., Li R., Guan H.L., Liu J., Liu X.R., He Z.K., Liu Y., ***Analytica Chimica Acta* 645 (2009) 73–78.**
- Hubmacher D., Sabatier L., Annis D.S., Mosher D.F., Reinhardt D.P., ***Biochem* 50 (2011) 5322–5332.**
- Hudson R.A., Farlow G.C., Slifkin L.M., ***Phys Rev B Condens Matter* 36 (1987) 4651–4659.**
- Hultdin J., Van Guelpen B., Winkvist A., Hallmans G., Weinehall L., Stegmayr B., Nilsson T.K., ***Clin Chem Lab Med* 49 (2011) 1555–1562.**
- Humphrey L.L., Fu R., Rogers K., Freeman M., Helfand M., ***Mayo Clin Proc* 83(2008) 1203–1212.**
- Humphrey R.E., Ward M.H., Hinze W., ***Anal Chem.* (1970) 42:698–702.**
- Husted L.B., Sorensen E.S., Sottrup-Jensen L., ***Anal Biochem* (2003) 314:166–168.**

Ichinose S., Nakamura M., Maeda M., Ikeda R., Wada M., Nakazato M., Ohba Y., Takamura N., Maeda T., Aoyagi K., Nakashima K., *Biomed Chromatogr* **23**(2009) **935–939**.

Imai K., Toyooka T., Watanabe Y., *Anal Biochem* (1983) **128**:471–473.

Isokawa M., Funatsu T., Tsunoda M., *Analyst* **138** (2013) **3802–3808**.

Isokawa M., Kanamori T., Funatsu T., Tsunoda M., *J Chromatogr B* **964** (2014) **103–115**.

Jacob C., Giles G.I., Giles N.M., Sies H., *Angew Chem Int Ed.* **42** (2003) **4742**.

Jacobsen D.W., *Clin Chem* **44** (1998) **1833–1843**.

James K., *Newnes Publ Oxford (UK)*, 2000.

James T.H., Kornfeld G., *Chem Rev*, **30** (1942) **1–32**.

Jayawardane B.M., Wei S., McKelvie I.D., Kolev S.D., *Anal Chem* **86** (2014) **7274–7279**.

Jia D., Li F., Sheng L., Ren Q., Dong S., Xu S., Mu Y., Miao Y., *Electrochemistry Communications* **13** (2011) **1119–22**.

Jiang Z., Liang Q., Luo G., Hu P., Li P., Wang Y., *Talanta* **77** (2009) **1279–1284**.

Johnson D.C., Dean D.R., Smith A.D., Johnson M.K., *An Rev Biochem* **74** (2005) **247**.

Johnson W.M., Wilson-Delfosse A.L., Mieyal J.J., *Nutrients* **4** (2012) **1399–1440**.

Jung Y.L., Park J.H., Kim M.I., Park H.G., *Nanotechnology* **27** (2016) **055501**.

Kand'ár R., Záková P., Lotková, H., Kučera O., Červinková Z., *J Pharm Biomed Anal* **43** (2007) **1382–1387**.

Kang S.H., Kim J.W., Chung D.S., *J Pharm Biomed Anal* **15** (1997) **1435**.

Kappi F.A., Papadopoulos G.A., Tsogas G.Z., Giokas D.L., *Talanta* **172** (2017) 15–22.

Kappi F.A., Tsogas G.Z., Christodouleas D.C., Giokas D.L., *Sensor Actuator B Chem* **253** (2017) 860–867.

Karakosta T.D., Tzanavaras P.D., *Anal Let* **44** (2011) 2530.

Karakosta T.D., Tzanavaras P.D., *J Pharm Biomed Anal* **54** (2011) 882.

Karita S., Kaneta S.T., *Anal Chem* **86** (2014) 12108–12114.

Kaya C., Akgül E., Pabuccu R., *Fertil Steril* **94** (2010) 230–235.

Kędzierska M., Głowacki R., Czernek U., Szydłowska-Pazera K., Potemski P., Piekarski J., Jeziorski A., Olas B., *Mol Cell Biochem* **372** (2013) 47–55.

Kemp M., Go Y.M., Jones D.P., *Free Radic Biol Med* **44** (2008) 921–937.

Khan A., Khan M.I., Iqbal Z., Shah Y., Ahmad L., Nazir S., Watson D.G., Khan J.A., Nasir F., Khan A., Ismail, *Talanta* **84** (2011) 789–801.

Khan M.I., Iqbal Z., *J Chromatogr B* **879** (2011) 2567–2575.

Kim O.J., Hong S.H., Oh S.H., Kim T.G., Min K.T., Oh D., Kim N.K., *Stroke* **42**(2011) 2393–2402.

Kinoshita M., Numata S., Tajima A., Shimodera S., Imoto I., Ohmori T., *Epige-netics* **8** (2013) 584–590.

Kirkup L., Mulholland M., *J Chromatogr A* **1029** (2004) 1–11.

Kirley T.L., *Anal Biochem* **180** (1989) 231.

- Kodjoda G., Harrisson D., *Cardiovasc Res* **43** (1999) 562.
- Kok R.J., Visser J., Moolenaar F., de Zeeuw D., Meijer D.K.F., *J Chromatogr B* **693** (1997) 181.
- Kontakiotis T., Katsoulis K., Hagizisi O., Kougioulis M., Gerou S., Papakosta D., *Eur J Intern Med* **22** (2011) 522–526.
- Korzeniecka Kozerska A., Zawada B.O., Skutnik J.M., Wasilewska A., *Urol J* **11** (2014) 1400–1405.
- Kóscielniak P., *Chemom Intell Lab Syst* **47** (1999) 275–287.
- Kóscielniak P., Parczewski A., *Fresenius Z Anal Chem* **321** (1985) 572–574.
- Kosower N.S., Kosower E.M., Newton G.L., Ranney H.M., *Proc Nat Acad Sci U S A.* (1979) 76:3382– 3386.
- Kou X., Zhang S., Yang Z., Tsung C.K., Stucky G.D., Sun L., Wang J., Yan C., *J Am Chem Soc* **129** (2007) 6402–6404.
- Kovacic P., Jacintho J., *Curr Med Chem* **7** (2001) 863.
- Kragten J., *Anal Chim Acta* **241** (1990) 1–13.
- Kreibig U., Genzel L., *Surface Science Letters* **156** (1985) 678–700.
- Krijt J., Vackova M., Kozich V., *Clin Chem* **47** (2001) 1821–1828.
- Kuroda T., Tanaka S., Saito M., Shiraki Y., Shiraki M., *Calcif Tissue Int* **93** (2013) 269–275.
- Kuśmierek K., Bald E., *Biomed Chromatogr* **23** (2009) 770–775.
- Kuśmierek K., Bald E., *Chromatographia* **66** (2007) 71.
- Kuśmierek K., Bald E., *Chromatographia* **67** (2008) 23.

- Kuśmierek K., Bald E., *Food Chemistry* **106** (2008) 340.
- Kuśmierek K., Chwatko G., Bald E., *Chromatographia Supplement* **68** (2008) 91.
- Kuśmierek K., Chwatko G., Głowacki R., Kubalczyk P., Bald E., *Journal of Chromatography B* **879** (2011) 1290–307.
- Kuśmierek K., Głowacki R., Bald E., *Anal Bioanal Chem* **385** (2006) 855.
- Lambeth D.O., Ericson G.R., Yorek M.A., Ray P.D., *Biochim Biophys Acta* **719** (1982) 501–508.
- Lankelma J., Nie Z., Carrilho E., Whitesides G.M., *Anal Chem* **84** (2012) 4147–4152.
- LeBoff M.S., Narweker R., LaCroix A., Wu L., Jackson R., Lee J., Bauer D.C., Cauley J., Kooperberg C., Lewis C., Thomas A.M., Cummings S., *J Clin Endocrinol Metab* **94** (2009) 1207–1213.
- Leesutthiphonchai W., Dungchai W., Siangproh W., Ngamrojnvanich N., Chailapakul O., *Talanta* **85** (2011) 870–876.
- Leeuwen J.P.T.M., Breteler M.M.B., Lips P., Pols H.A.P., Uitterlinden A.G., *New Engl J Med* **350** (2004) 2033–2041.
- Leroy P., Nicolas A., Wellmann M., Michelet F., Oster T., Siest G., *Chromatographia* **36** (1993) 130.
- Leung B.O., Jalilehvand F., Mah V., Parvez M., Wu Q., *Inorg Chem* **52** (2013) 4593–4602.
- Lewis G.G., DiTucci M.J., Phillips S.T., *Angew Chem Int Ed* **51** (2012) 12707–12710.
- Lewis G.G., Robbins J.S., Phillips S.T., *Chem Commun* **50** (2014) 5352–5354.
- Li C., Wei C., *Sensors and Actuators B: Chemical* **240** (2017) 451–58.
- Li H., Cui Z., Han C., *Sensors Actuators B* **143** (2009) 87–92.

- Li J.F., Huang P.C., Wu F.Y., *Sensors and Actuators B* 240 (2017) 553–59.
- Li M.D., Cheng T.L., Tseng W.L., *Electrophoresis* 30 (2009) 388–95.
- Li M., Tian J., Al-Tamimi M., Shen W., *Angew Chem Int Ed* 51 (2012) 5497–5501.
- Li M.J., Zhan C.Q., Zheng Y.M., Chen G.N., Chen X., *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 11 (2011) 3578–85.
- Li Q., Liu F., Lu C., Lin J.M., *The Journal of Physical Chemistry C* 115 (2011) 10964–70.
- Li Q., Shang F., Lu C., Zheng Z., Lin J.-M., *J Chromatogr A* 1218 (2011) 9064–9070.
- Li X., Ballerini D.R., Shen W., *Biomicrofluidics* 6 (2012) 011301–011313.
- Li X., Tian J., Shen W., *Anal Bioanal Chem* 396 (2010) 495–501.
- Li Y., Wu P., Xu H., Zhang H., Zhong X., *Analyst* 136 (2011) 196–200.
- Li Y.H., Yang Y., Guan X.M., *Anal Chem* (2012) 84:6877–6883.
- Li Z.J., Zheng X.J., Zhang L., Liang R.P., Li Z.M., Qiu J.D., *Biosensors and Bioelectronics* 68 (2015) 668–74.
- Li Z.P., Duan X.R., Liu C.H., Du B.A., *Analytical Biochemistry* 351 (2006) 18–25.
- Liana D.D., Raguse B., Gooding J.J., Chow E., *Sensors* 12 (2012) 11505–11526.
- Liang A., Liu Q., Wen G., Jiang Z., *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 37 (2012) 32–47.
- Ling B.L., Baeyens W.R.G., Dewaele C., Del Castillo B., *J Pharm Biomed Anal* 10 (1992) 985.
- Ling B.L., Dewaele C., Baeyens W.R.G., *J Chromatogr* 514 (1990) 189.
- Liu J., Wang Z., Liu F.D., Kane A.B., Hurt R.H., *ACS Nano* 6 (2012) 9887–9899.
- Liu L., Qiu C.L., Chena Q., Zhang S.M., *J Alloys Comp* 425 (2006) 268–273.
- Liu P., Qi C.B., Zhu Q.F., Yuan B.F., Feng Y.Q., *Sci Rep* 6 (2016) 21433.

- Lo S.H., Wu M.C., Wu S.P., *Sensors and Actuators B* 221 (2015) 1366–1371.
- Lu C., Zu Y., Yam V.W.W., *Journal of Chromatography A* 1163 (2007) 328–32.
- Lubert S., Jeremy B., Tymoczki J., (2012) *Βιοχημεία. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης*, 761-3.
- Malinow M.R., Bostom A.G., Krauss R.M., *Circulation* (1999) 99, 178-182.
- Mansoor M.A., Svoldal A.M., Ueland P.M., *Analytical Biochemistry* 200 (1992) 218–29.
- Marchetti A.P., Eachus R.S., *Adv Photochem* 17 (1992) 145–216.
- Marciano D., Santana M., Nowicki C., *Mol Biochem Parasitol* 185 (2012) 114.
- Martinez A.W., *Bioanalysis* 23 (2011) 2589–2592.
- Martinez A.W., Phillips S.T., Butte M.J., Whitesides G.M., *Angew Chem Int Ed* 46 (2007) 1318–1320.
- Martinez A.W., Phillips S.T., Carrilho E., Thomas III S.W., Sindi H., Whitesides G.M., *Anal Chem* 80 (2008) 3699–3707.
- Martinez A.W., Phillips S.T., Whitesides G.M., *Proc Natl Acad Sci USA*, 105 (2008) 19606-19611.
- McDermott G.P., Terry J.M., Conlan X.A., Barnett N.W., Francis P.S., *Anal Chem* 83 (2011) 6034–6039.
- McPherson R.A., Hardy G., *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 14 (2011) 562.
- Medvedovici A., Albu F., Sora I.D., Udrescu S., Galaon T., Davi V., *Biomed Chromatogr* 23 (2009) 1092.
- Meija J., Pagliano E., Mester Z., *Anal Chem* 86 (2014) 8563-8567.
- Mentele M.M., Cunningham J., Koehler K., Volckens J., Henry C.S., *Anal Chem* 84 (2012) 4474–4480.
- Mess C.E.K., James T.H., *Collier Macmillan, New York, 1966, 3rd Ed.*

Michaelson J.T., Dehnert S., Giustarini D., Beckmann B., Tsikas D., *J Chromatogr B* 877 (2009) 3405–3417.

Mieyal J.J., Chock P.B., *Antiox Redox Signal* 16 (2012) 471.

Miller J.W., Beresford S.A., Neuhaus M.L., Cheng T.Y.D., Song X., Brown E.C., Zheng Y., Rodriguez B., Green R., Ulrich C.M., *Am J Clin Nutr* 97 (2013) 827–834.

Mohammad N.S., Yedluri R., Addepalli P., Gottumukkala S.R., Digumarti R.R., Kutala V.K., *Mol Cell Biochem* 349 (2011) 159–167.

Moore T., Le A., Niemi A.-K., Kwan T., Cusmano-Ozog K., Enns G.M., Cowan T.M., *J Chromatogr B* 929 (2013) 51–55.

Mopper K., Delmas D., *Anal Chem* 56 (1984) 2557.

Morbioli G.G., Mazzu-Nascimento T., Stockton A.M., Carrilho E., *Anal Chim Acta* 970 (2017) 1–22.

Morgenstern I., Raijmakers M.T.M., Peters W.H.M., Hoensch H., Kirch W., *Dig Dis Sci* 2003, 48, 2083-2090.

Moriarty-Craige S.E., Jones D.P., *Annu Rev Nutr* 24 (2004) 481–509.

Moriarty S.E., Shah J.H., Lynn M., Jiang S., Openo K., Jones D.P., Sternberg P., *Free Radic Biol Med* 35 (2003) 1582.

Moser M., Schneider R., Behnke T., Schneider T., Falkenhagen J., Resch-Genger U., *Anal Chem* 88 (2016) 8624–8631.

Mu X., Zhao S., Huang Y., Ye F., *J Sep Sci* 35 (2012) 280–285.

Nakamura H., Tamura Z., *Anal Chem* 53 (1981) 2190.

Nakamura H., Tamura Z., *Anal Chem* 54 (1982) 1951.

Nakamura H., Tamura Z., *Bunseki Kagaku* 37 (1988) 35.

Nayak S., Blumenfeld N.R., Laksanasopin T., Sia S.K., *Anal Chem* 89 (2017) 102-123.

- Nilsson K., Gustafson L., Hultberg B., *Dement Geriatr Cogn Disord* **34** (2012) 121–127.
- Nishiuchi H., Kohmura M., Wakabayashi H., *Food Sci Technol Res* **17** (2011) 341.
- Noce A., Fabrini R., Dessì M., Bocedi A., Santini S., Rovella V., Pastore A., Tesaro M., Bernardini S., Daniele N., Ricci G., *Acta Diabetol* (2014) (in press).
- Noh H., Phillips S.T., *Anal Chem* **82** (2010) 8071–8078.
- Nolin T.D., McMenamin M.E., Himmelfar J., *J Chromatogr B* **852** (2007) 554.
- Norris R.L.G., Paul M., George R., Moore A., Pinkerton R., Haywood A., Charles B., *J Chromatogr B* **898** (2012) 136–140.
- Oe T., Ohyagi T., Naganuma A., *J Chromatogr B* **708** (1998) 285.
- Ogasawara Y., Mukai Y., Togawa T., Suzuki T., Tanabe S., Ishii K., *J Chromatogr B* **845** (2007) 157.
- Oliveira H.C., Cosso R.G., Alberici L.C., Maciel E.N., Salerno A.G., Dorighello G.G., Velho J.A., de Faria E.C., Vercesi A.E., *ASEB J* **19** (2005) 278.
- Ornatska M., Sharpe E., Andreescu D., Andreescu S., *Anal Chem* **83** (2011) 4273–4280.
- Oyola-Reynoso S., Heim A.P., Halbertsma-Black J., Zhao C., Tevis I.D., Çınar S., Cademartiri R., Liu X., Bloch J-F., Thuo M.M., *Talanta* **144** (2015) 289–293.
- Ozkan Y., Ozkan E., Şimşek B., *Int J Cardiol* **82** (2002) 269–277.
- Page J.H., Ma J., Chiuve S.E., Stampfer M.J., Selhub J., Manson J.E., Rimm E.B., *Am Heart J* **159** (2010) 599–604.
- Park J., *Oncology Reports* (2009) 385.
- Parolo C., Merkoci A., *Chem Soc Rev* **42** (2013) 450–457.
- Pasternack R.F., Collings P.J., *Science* **269** (1995) 935–39.

Patel B.P., Rawal U.M., Dave T.K., Rawal R.M., Shukla S.N., Shah P.M., Patel P.S., ***Integr Canc Ther* 6 (2007) 365–372.**

Pathak S., Bhatla N., Singh N., ***Mol Cell Biochem* 369 (2012) 1–7.**

Paulsen C.E., Carroll K.S., ***Chem Biol* 5 (2010) 47.**

Peng H., Chen W., Cheng Y., Hakuna L., Strongin R., Wang B., ***Sensors* 12 (2012) 15907-15946.**

Persichilli S., Gervasoni J., Castagnola M., Zuppi C., Zappacosta B., ***Lab Med* 42 (2011) 657–662.**

Persichilli S., Gervasoni J., Iavarone F., Zuppi C., Zappacosta B., ***J Sep Sci* 33(2010) 3119–3124.**

Petryayeva E., Algar W. R., ***RSC Adv* 5 (2015) 22256-22282.**

Peyrin-Biroulet L., Rodriguez-Gueant R.M., Chamaillard M., Desreumaux P., Xia B., Bronowicki J.P., Bigard M.A., Gueant J.L., ***Am J Gastroenterol* (2007) 102, 1108-1115.**

Polyzos S.A., Anastasilakis A.D., Efstathiadou Z., Litsas I., Kita M., Pana-giotou A., Papatheodorou A., Arsos G., Moravidis E., Barmpalios G., Zafeiriadou E., Triantafillidou E., Makrigiannaki E., Terpos E., ***J Bone Miner Metab* 28 (2010)314–319.**

Pozdeev V.K., Pozdeyev N.V., ***Biochemistry (Mosc)* 4 (2010) 288–295.**

Puertas M.C., Martínez-Martos J.M., Cobo M.P., Carrera M.P., Mayas M.D., Ramírez-Expósito M.J., ***Exp Gerontol* 47 (2012) 625–630.**

Puka-Sundvall M., Eriksson P., Nilsson M., Sandberg M., Lehmann A., ***Brain Res* 705 (1995) 65.**

Rattanarat P., Dungchai W., Cate D., Volckens J., Chailapakul O., Henry C.S., ***Anal Chem* 86 (2014) 3555–3562.**

- Ravindran A., Chandrasekaran N., Mukherjee A., *Current Nanoscience* 8 (2012) 1–10.
- Ravindran A., Mani V., Chandrasekaran N., Mukherjee A., *Talanta* 85 (2011) 533–40.
- Redéen S., Ryberg A., Petersson F., Eriksson O., Nägga K., Borch K., *Dig Dis Sci* 55 (2010) 351–358.
- Refsum H., Ueland P.M., Nygard O., Vollset S.E., *Annu Rev Med Coggins C.H.*, (1998) Vol 49, 31-62.
- Reiter R., Tan D., Pappola M., *Ann NY Acad Sci* 1035 (2004) 179.
- Renault C., Li X., Fosdick S.E., Crooks R.M., *Anal Chem* 85 (2013) 7976–7979.
- Richie J.P., Skowronski Jr. L., Abraham P., Leutzinger Y., *Clin Chem* 42 (1996) 64–70.
- Riddles P.W., Blakeley R.L., Zerner B., *Methods Enzymol* (1983) 91:49–60.
- Riedijk M.A., van Beek H.R., Voortman G., de Bie H.M., Dassel A.C., van Goudoever J.B., *Am J Clin Nutr* 86 (2007) 1120.
- Riedijk M.A., Voortman G., van Beek R.H., Baartman M.G., Wafelman L.S., van Goudoever J.B., *Pediatrics* 121 (2008) 561.
- Rigaud J., Cheynier V., Souquet J.M., Moutounet M., *J Sci Food Agric* 57 (1991) 55.
- Robinson K., *Heart* (2000) 83, 127-130.
- Rodriguez-Oroz M.C., Lage P.M., Sanchez-Mut J., Lamet I., Pagonabarraga J., Toledo J.B., García-García D., Clavero P., Samaranch L., Irurzun C., Matsubara J.M., Irigoien J., Bescos E., Kulisevsky J., Pérez-Tur J., Obeso J.A., *Mov Disord* 24 (2009) 1437–1444.
- Rojkovich B., Nagy E., Prohle T., Poor G., Gergely P., *Clin Diagn Lab Immunol* 6 (1999) 683–685.

- Rosenfeld M., *Semin Reprod Endoc* 16 (1998) 249.
- Rossi R., Milzani A., Dalle-Donne I., Giustarini D., Lusini L., Colombo R., DiSimplicio P., *Clin Chem* 48 (2002) 742–753.
- Rueda-Clausen C.F., Córdoba-Porras A., Bedoya G., Silva F.A., Zarruk J.G., López-Jaramillo P., Villa L.A., *Eur J Neurol* 19 (2012) 417–425.
- Rusin O., Alpturk O., He M., Escobedo J.O., Jiang S., Dawan F., Lian K., McCarroll M.E., Warner I.M., Strongin R.M., *J Fluoresc* (2004) 14, 611-615.
- Sahvun M.R.V., *J Chem Edu* 51 (1974) 72-77.
- Sakhi A.K., Blomhoff R., Gundersen T.E., *J Chromatogr A* 1142 (2007) 178.
- Samiec P.S., Drews-Botsch C., Flagg E.W., Kurtz J.C., Sternberg P., Reed L.R., Jones D.P., *Free Radical Biol Med* 24 (1998) 699-704.
- Santa T., Aoyama C., Fukushima T., Imai K., Funatsu T., *Biomed Chromatogr* 20 (2006) 656.
- Sariman N., Levent E., Aksungar F.B., Soylu A.C., Bektas O., *Respiration* 79 (2010) 38–45.
- Sarmiento-Ribeiro A.B., Proenca M.T., Sousa I., Pereira A., Guedes F., Teixeira A., Oliveira C.R., *Leuk Res* 36 (2012) 1041–1048.
- Sawuła W., Banecka-Majkutewicz Z., Kadziński L., Jakóbkiewicz-Banecka J., Wegrzyn G., Nyka W., Banecki B., *Clin Biochem* 42 (2009) 442–447.
- Schilling K.M., Lepore A.L., Kurian J.A., Martinez A.W., *Anal Chem* 84 (2012) 1579–1585.
- Schönhorn J.E., Fernandes S.C., Rajaratnam A., Deraney R.N., Rollanda J.P., Mace C.R., *Lab Chip* 14 (2014) 4653–4658.
- Seiwert B., Karst U., *Anal Chem* 79 (2007) 7131-7138.
- Selhub J., *Annu Rev Nutr* 1999, 19, 217-246.

Selvi R., Angayarkanni N., Biswas J., Ramakrishnan S., *Indian J Med Res* 134 (2011) 83–90.

Seshadri S., Beiser A., Selhub J., Jacques P.F., Rosenberg I.H., D'Agostino R.B., Wilson P.W.F., Wolf P.A., *New Engl J Med* 346 (2002) 476–483.

Sevier C.S., Kaiser C.A., *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 (2002) 836.

Shahrokhian S., *Anal Chem* 73 (2001) 5972–5978.

Shang L., Dong S., *Biosensors and Bioelectronics* 24 (2009) 1569–73.

Shang L., Dong S., Nienhaus G.U., *Nano Today* 6 (2011) 401–18.

Shang L., Yin J., Li J., Jin L., Dong S., *Biosensors and Bioelectronics* 25 (2009) 269–74.

Shankar S., John S.A., *Sensors and Actuators B* 221 (2015) 1202–08.

Sharma S., Zapatero-Rodriguez J., Estrela P., O'Kennedy R., *Biosensors* 5 (2015) 577–601.

Shen C.C., Tseng W.L., Hsieh M.M., *Journal of Chromatography A* 1216 (2009) 288–93.

Shen J.S., Li D.H., Zhang M.B., Zhou J., Zhang H., Jiang Y.B., *Langmuir* 27 (2011) 481–486.

Shen L.M., Chen Q., Sun Z.Y., Chen X.W., Wang J.H., *Anal Chem* 86 (2014) 5002–5008.

Sies H., *Free Rad Biol Med* 9 (1999) 916.

Slot O., *Ann Rheum Dis* 72 (2013) 457–457.

Smulders Y.M., Blom H.J., *J Inherit Metab Dis* 34 (2011) 93–99.

Squellerio I., Caruso D., Porro B., Veglia F., Tremoli E., Cavalca V., *J Pharm Biomed Anal* 71 (2012) 111–118.

Staal F.J.T., Ela S.W., Roederer M., Anderson M.T., Herzenberg L.A., Herzenberg L.A., ***Lancet* 339 (1992) 909-912.**

Stabler S., Koyama T., Zhao Z., Martinez-Ferrer M., Allen R.H., Luka Z., Loukachevitch L.V., Clark P.E., Wagner C., Bhowmick N.A., ***PLoS ONE* 6 (2011) 22486.**

Starkenmann C., Troccaz M., Howell K., ***Flavour Fragr J* 23 (2008) 369.**

Stempak D., Dallas S., Klein J., Bendayan R., Koren G., Baruchel S., ***Ther DrugMonit* 23 (2001) 542-549.**

Stipanuk M.H., ***Annu Rev Nutr* 24 (2004) 539-577.**

Strain J.J., Dowey L., Ward M., Pentieva K., McNulty H., ***Proc Nutr Soc* (2004) 63, 597-603.**

Subrahmanyam V., McGirr L., O'Brein L., ***Pharmacol Ther* 33 (1987) 63.**

Sudeep P.K., Joseph S.T.S., Thomas K.G., ***Journal of the American Chemical Society* 127 (2005) 6516-17.**

Švagera Z., Hanzlíková D., Šimek P., Hušek P., ***Anal Bioanal Chem* 402 (2012) 2953-2963.**

Swanson C., Lee S., Aranyosi A.J., Tien B., Chan C., Wong M., Lowe J., Jain S., Ghaffari R., ***Sensing Bio-Sensing Research* 5 (2015) 55-61.**

Tani T., ***Oxford University Press, New York, 1995, 1st Ed.***

Tebbe M., Kuttner C., Mannel M., Fery A., Chanana M., ***ACS Appl Mater Interfaces* 7 (2015) 5984-5991.**

Tellinghuisen J., ***Analyst* 130 (2005) 370-378.**

Thibon C., Shinkaruk S., Jourdes M., Bennetau B., Dubourdieu D., Tominaga T., ***Anal Chim Acta* 660 (2010) 190.**

Tolani S., Mugweru A., Craig M., Wanekaya A.K., *J App Polymer Sc* 116 (2010) 308.

Toley B.J., McKenzie B., Liang T., Buser J.R., Yager P., Fu E., *Anal Chem* 85 (2013) 11545–11552.

Toriumi C., Imai K., *Anal Chem* 75 (2003) 3725.

Touz R., *Curr Opin Nephrol Hypertens* 14 (2005) 125.

Toyo'oka T., Furukawa F., Suzuki T., Saito Y., Takahashi M., Hayashi Y., Uzu S., Imai K., *Biomed Chromatogr* 3 (1989) 166.

ToyO'oka T., *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 39 (2016) 1397–411.

Toyo'oka T., Imai K., *Anal Chem* 56 (1984) 2461.

Toyo'oka T., Imai K., *Anal Chem* (1985) 57:1931–1937.

Toyo'oka T., Imai K., *J Chromatogr* 282 (1983) 495.

Toyo'oka T., Imai K., Kawahara Y., *J Pharm Biomed Anal* 2 (1984) 473.

Toyo'oka T., Tanabe J., Jinno H., *Biomed Chromatogr* 15 (2001) 240.

Toyo'oka T., Uchiyama S., Saito Y., Imai K., *Anal Chim Acta* 205 (1988) 29.

Treuheit M.J., Kirley T.L., *Anal Biochem* (1993) 212:138–142.

Tsai C.-J., Hsieh C.-J., Tung S.-C., Kuo M.-C., Shen F.-C., *Diabetes Res Clin Pract* 98 (2012) 257–263.

Tsogas G.Z., Kappi F.A., Vlessidis A.G., Giokas D.L., *Anal Lett* 51 (2018) 443–468.

Tulipani S., Llorach R., Urpi-Sarda M., Andres-Lacueva C., *Anal Chem* 85(2013) 341–348.

Turell L., Radic R., Alvarez B., *Free Radic Biol Med* 65 (2013) 244–253.

Tyagarajan K., Pretzer E., Wiktorowicz J.E., *Electrophoresis* (2003) 24:2348–2358.

Ueland P.M., *Clin Chem* (1995) 41, 340-342.

- Uzun L., Türkmen D., Yılmaz E., Bektaş S., Denizli A., ***Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng Aspects* 330 (2008) 161.**
- Valente A., Bronze M.R., Bicho M., Duarte R., Costa H.S., ***J Sep Sci* 35 (2012) 3427–3433.**
- Van Meurs J.B.J., Dhonukshe-Rutten R.A.M., Pluijm S.M.F., van der Klift M., de Jonge R., Lindemans J., de Groot L.C.P.G.M., Hofman A., Witteman J.C.M., van Leeuwen J.P.T.M., Breteler M.M.B., Lips P., Pols H.A.P., Uitterlinden A.G., ***New England Journal of Medicine* 350 (2004) 2033–41.**
- Van Meurs J.B.J., Dhonukshe-Rutten R.A.M., Pluijm S.M.F., van der Klift M., de Jonge R., Lindemans J., de Groot L.C.P.G.M., Hofman A., Witteman J.C.M., van Mocanu A., Cernica I., Tomoaia G., Bobos L.D., Horovitz O., Tomoaia-Cotisel M., ***Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 338 (2009) 93–101.**
- Veigas B., Jacob J.M., Costa M.N., Santos D.S., Viveiros M., Inácio J., Martins R., Barquinha P., Fortunato E., Baptista P.V., ***Lab Chip* 12 (2012) 4802–4808.**
- Vella S.J., Beattie P., Cademartiri R., Laromaine A., Martinez A.W., Phillips S.T., Mirica K.A., Whitesides G.M., ***Anal Chem* 84 (2012) 2883–2891.**
- Verma M.S., Tsaloglou M.-N., Sisley T., Christodouleas D.C., Chen A., Milette J., Whitesides G.M., ***Biosens Bioelectron* 99 (2018) 77–84.**
- Vidyasagar M.S., Kodali M., Prakash Saxena P., Upadhya D., Murali Krishna C., Vadhiraaja B.M., Fernandes D.J., Bola Sadashiva S.R., ***Int J Radiat Oncol Biol Phys* 78 (2010) 343–349.**
- Vinukonda G., Shaik Mohammad N., Md Nurul Jain J., Prasad Chintakindi K., Rama Devi Akella R., ***Clin Chim Acta* 405 (2009) 127–131.**

- Vural G., Gumusyayla S., Bektas H., Deniz O., Ergin M., Erel O., *World J Neurosci* **6** (2016) 6.
- Wada M., Hirose M., Kuroki M., Ikeda R., Sekitani Y., Takamura N., Kuroda N., Nakashima K., *Biomed Chromatogr* **27** (2013) 708–713.
- Walker F.M., Ahmad K.M., Eisenstein M., Soh H.T., *Anal Chem* **86** (2014) 9236–9241.
- Wang J., Li Y.F., Huang C.Z., Wu T., *Anal Chim Acta* **626** (2008) 37–43.
- Wang W., Wu W-Y., Zhu J-J., *J Chromatogr A* **1217** (2010) 3896–3899.
- Wang X., Chi D., Song D., Su G., Li L., Shao L., *J Chromatogr Sci* **50** (2012) 119–122.
- Wang Y., Wang J., Yang F., Yang X., *Anal Sci* **26** (2010) 545–549.
- Wang Y., Zheng J., Zhang Z., Yuan C., Fu D., *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **342** (2009) 102–06.
- Wei X., Qi L., Tan J., Liu R., Wang F., *Anal Chim Acta* **671** (2010) 80–84.
- Werder S.F., *Neuropsychiatr Dis Treat* (2010) **6**, 159–195.
- White C., Viernes H., Krejsa C., Botta D., Kavanagh T., *Anal Biochem* **318** (2003) 175.
- White P.C., Lawrence N.S., Davis J., Compton R.G., *Electroanalysis* **14** (2002) 89–98.
- Whitford D., *Proteins: structure and function*, Wiley, 2005.
- Williams K.T., Schalinske K.L., *Biofactors* **36** (2010) 19–24.
- Wilson D.J., Sokol A.A., French S.A., Catlow C.R.A., *J Phys Condens Matter* **16** (2004) S2827–S2838.
- Winther J.R., Thorpe C., *Biochim Biophys Acta* **1840** (2014) 838–846.

Wirtz M., Beard K., Lee C.P., Boltz A., Schwarzländer M., Fuchs C., Meyer A.J., Heeg C., Sweetlove L.J., Ratcliffe R.G., Hell R., *J Biol Chem* **287** (2012) 27941.

Witschi A., Reddy S., Stofer B., Lauterburg B.H., *Eur J Clin Pharmacol* **43** (1992) 667.

Wood W.J.L., Huang L., Ellman J.A., *J Comb Chem* **5** (2003) 869.

Wu G., Fang Y.-Z., Yang S., Lupton J.R., Turner N.D., *J Nutr* **134** (2004) 489–492.

Wu G., Zaman M.H., *Talanta* **134** (2015) 194–199.

Xiao Q., Gao H., Lu C., Yuan Q., *Trends Anal Chem* **40** (2012) 64–76.

Xiao Q., Shang F., Xu X., Li Q., Lu C., Lin J.M., *Biosens Bioelectron* **30** (2011) 211–215.

Xiao Q., Zhang L., Lu C., *Sensors and Actuators B* **166–67** (2012) 650–57.

Xu L., Li B., Jin Y., *Talanta* **84** (2011) 558–64.

Xu H., Wang Y., Huang X., Li Y., Zhang H., Zhong X., *Analyst* **137** (2012) 924–31.

Yaghmur A., Aserin A., Garti N., *J Agric Food Chem* **50** (2002) 2878.

Yang X.F., Guo Y.X., Strongin R.M., *Angew Chem Int Ed* **50** (2011) 10690–10693.

Yetisen A.K., Akram M.S., Lowe C.R., *Lab Chip* **13** (2013) 2210–2251.

Yguerabide J., Yguerabide E.E., *Analytical Biochemistry* **262** (1998a) 137–56.

Yguerabide J., Yguerabide E.E., *Analytical Biochemistry* **262** (1998b) 157–75.

Yguerabide J., Yguerabide E.E., *Journal of Cellular Biochemistry* **37** (2001) 71–81.

Zhang F.X., Han L.I., Israel L.B., Daras J.G., Maye M.M., Ly N.K., Zhong C.J., *Analyst* **127** (2002) 462–65.

Zhang H., Kang Y., Liu P., Tao X., Pei J., Li H., Du Y., *Analytical Letters* **49** (2016) 2268–78.

- Zhang H.Y., Qin T., Jiang Y.Y., Caetano-Anollés G., *J Biomol Struc Dynam* 30 (2012) 542.
- Zhang J., Xu X., Yuan Y., Yang C., Yang X., *ACS Appl Mater Interf* 3 (2011) 2928–2931.
- Zhang L., Lu B., Lu C., Lin J.M., *J Separ Sci* 37 (2014) 30–36.
- Zhang W., Li P., Geng Q., Duan Y., Guo M., Cao Y., *J Agric Food Chem* 62 (2014) 5845–5852.
- Zhang Y., Li Y., Yan X.P., *Anal Chem* 81 (2009) 5001–5007.
- Zhao J.H., Guan J.L., *Prog Molec Subcel Biol* 25 (2000) 37.
- Zhao Q., Chen S., Huang H., Liu F., Xie Y., *Analytical Letters* 47 (2014) 295–308.
- Zhao W., Ali M.M., Aguirre S.D., Brook M.A., Li Y., *Anal Chem* 80 (2008) 8431–8437.
- Zhu J.G., Dhimitruka I., Pei D., *Org Lett* (2004) 6:3809–3812.
- Zhu P., Oey T., Blair I.A., *Rapid Commun Mass Spectrom* 22 (2008) 432.
- Zhu W-J., Feng D-Q., Chen M., Chen Z-D., Zhu R., Fang H-L., Wang W., *Sensors Actuators B: Chemical* 190 (2014), 414– 418.
- Zinellu A., Sotgia S., Loriga G., Deiana L., Satta A.E., Carru C., *Amino Acids* 43 (2012) 1499–1507.
- Zinellu A., Sotgia S., Scanu B., Usai M.F., Fois A.G., Spada V., Deledda A., Deiana L., Pirina P., Carru C., *Amino Acids* 37 (2009) 395–400.
- Zoccolella S., dell’Aquila C., Abruzzese G., Antonini A., Bonuccelli U., Canesi M., Cristina S., Marchese R., Pacchetti C., Zagaglia R., Logroscino G., Defazio G., Lamberti P., Livrea P., *Mov Disord* 24 (2009) 1028–1033.
- Zucchini W., Claeskens G., Nguefack-Tsague G., Model selection (version 2.0), StatProb: The Encyclopedia Sponsored by Statistics and Probability Societies

(Available at https://www.encyclopediaofmath.org/index.php/Model_selection).

Accessed 01 March 2017.

<http://www.medicinenet.com/script/main/art.asp?articlekey=50746>.

<http://www.webmd.com/prostate-cancer/news/20030529/whey-protein-mayprevent-prostate-cancer>.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στόχος της διδακτορικής διατριβής είναι η ανάπτυξη καινοτόμων μεθόδων ανίχνευσης και ανάγνωσης σήματος ως εργαλεία για τον ποσοτικό προσδιορισμό βιοθειολών σε βιολογικά ρευστά που να συνδυάζουν απλότητα στην χρήση, χωρίς ενόργανες τεχνικές ανάλυσης και να χρησιμοποιούν σταθερά και εμπορικά διαθέσιμα αντιδραστήρια που δεν απαιτούν ειδικές διαδικασίες παρασκευής και προετοιμασίας (όπως στην περίπτωση των ενζυματικών ή ανοσοχημικών μεθόδων).

Αρχικά περιγράφεται μια νέα μέθοδος για τον προσδιορισμό των ελεύθερων βιοθειολών σε βιολογικά υγρά εκμεταλλευόμενη μερικές από τις βασικές αρχές της χημείας της πρώιμης φωτογραφίας— που βασίζονταν σε φωτογραφικά υλικά από αλογονίδια του αργύρου - και χρησιμοποιεί ευρέως διαθέσιμες συσκευές απεικόνισης (επίπεδους σαρωτές), ως ανιχνευτές. Συγκεκριμένα, η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα των βιοθειολών να δεσμεύουν τα ιόντα αργύρου και να διασπούν τους κρυστάλλους αλογονιδίων αργύρου αλλάζοντας έτσι την φωτοευαισθησία του κρυσταλλικού αιωρήματος των αλογονιδίων αργύρου. Οι μεταβολές που προκαλούνται από τις βιοθειόλες, στην ένταση του φωτός που απορροφάται από το εναιώρημα των αλογονιδίων αργύρου μετά από τη φωτοχημική αναγωγή, καταγράφονται με μια απλοποιημένη φωτομετρική προσέγγιση χρησιμοποιώντας έναν επίπεδο σαρωτή. Η συνολική διαδικασία ανάλυσης για τον προσδιορισμό των βιοθειολών ήταν εύκολα εκτελέσιμη, γρήγορη και μπορεί να εφαρμοστεί με φθηνά υλικά και εμπορικά διαθέσιμα αντιδραστήρια χωρίς την ανάγκη σύνθεσης νέων υλικών. Επιπλέον, επιτρέπει την διάκριση μεταξύ φυσιολογικών και μη φυσιολογικών επίπεδων βιοθειολών ακόμη και με γυμνό μάτι. Η μέθοδος που αναπτύξαμε εφαρμόστηκε με επιτυχία στον προσδιορισμό βιοθειολών σε δείγματα ούρων και πλάσματος αίματος με όρια ανίχνευσης 10μM, ικανοποιητικές ανακτήσεις (92-97%), καλή επαναληψιμότητα (6.7-8.8%) και υψηλή εκλεκτικότητα έναντι άλλων συστατικών των βιολογικών υγρών. Αποδείχθηκε επίσης η χρησιμότητα της μεθόδου για τον προσδιορισμό της αναλογίας ανηγμένων/οξειδωμένων βιοθειολών καθώς και η εφαρμογή της υπό φυσικό φωτισμό, χωρίς εξωτερικές πηγές ενέργειας. Αποδεικνύεται έτσι η δυνατότητα χρήσης της μεθόδου για εφαρμογές στο σημείο

χρήσης ή σε εγκαταστάσεις με περιορισμένες δυνατότητες πραγματοποίησης βιοχημικών αναλύσεων (π.χ. αγροτικά ιατρεία).

Στη συνέχεια περιγράφεται η ανάπτυξη μικροαναλυτικών διατάξεων χάρτου για τον προσδιορισμό βιοθειολών. Οι διατάξεις που κατασκευάστηκαν είναι φθηνές (καθώς αποτελούνται μόνο από χαρτί και δυσδιάλυτα άλατα αλογονιδίων αργύρου) και η αναλυτική πορεία είναι εύκολα εκτελέσιμη με ελάχιστη τεχνική εμπειρογνωμοσύνη και χωρίς την ανάγκη εξειδικευμένου εξοπλισμού. Ο χρήστης προσθέτει το εξεταζόμενο δείγμα στην διάταξη, ακτιβοβολεί την περιοχή ανίχνευσης με ακτινοβολία UV και καταγράφει την αλλαγή χρώματος της περιοχής ανίχνευσης χρησιμοποιώντας μια απλή διάταξη απεικόνισης (όπως κάμερα κινητού τηλεφώνου) ή δια γυμνού οφθαλμού. Ο μηχανισμός ανίχνευσης των βιοθειολών βασίζεται στην φωτοδιέγερση που προκαλούν οι βιοθειόλες στους νανοκρυτάλλους χλωριούχου αργύρου που έχουν εναποτεθεί στην επιφάνεια του χαρτιού. Τα φωτοανηγμένα σωματίδια χλωριούχου αργύρου έχουν γκριζωπό χρώμα η έντασης του οποίου που εξαρτάται από τη συγκέντρωση των βιοθειολών στο εξεταζόμενο διάλυμα. Οι διατάξεις δοκιμάστηκαν για την ανίχνευση της συνολικής συγκέντρωσης των βιοθειολών σε δείγματα τεχνητών βιολογικών υγρών καθώς και πλάσματος ανθρώπινου αίματος και τα αποτελέσματα ήταν ικανοποιητικά όσον αφορά την ευαισθησία, την εκλεκτικότητα, τις ανακτήσεις και την επαναληψιμότητα.

Τέλος, περιγράφεται μια νέα προσέγγιση για την υλοποίηση ποσοτικών αναλύσεων σε αναλυτικές διατάξεις χάρτου. Η καινοτομία της προσέγγισης βασίζεται στην ενσωμάτωση των αρχών της μεθόδου βαθμονόμησης σταθερής προσθήκης πολλαπλών σημείων σε διατάξεις χάρτου. Συγκεκριμένα, πριν την ανάλυση ενός αγνώστου δείγματος οι περιοχές ανίχνευσης τροποποιούνται με την προσθήκη των αναγκαίων χρωματομετρικών αντιδραστηρίων και γνωστές ποσότητες (πρότυπα διαλύματα) του αναλύτη. Με τον τρόπο αυτό σχηματίζεται ένα έγχρωμο προϊόν σε κάθε περιοχή ανίχνευσης. Μετά την προσθήκη του δείγματος, το αναλυτικό σήμα από κάθε περιοχή ανίχνευσης αντιστοιχεί στη συνολική συγκέντρωση του αναλύτη, η οποία είναι το άθροισμα της συγκέντρωσης του αναλύτη στο εξεταζόμενο δείγμα συν τη γνωστή ποσότητα του αναλύτη που έχει προστεθεί προηγουμένως στη διάταξη. Το συνολικό αναλυτικό σήμα που ανακτάται από κάθε ζώνη ανίχνευσης χρησιμοποιείται για την κατασκευή μιας καμπύλης βαθμονόμησης σταθερής προσθήκης από την οποία υπολογίζεται η συγκέντρωση του αναλύτη στο άγνωστο δείγμα χρησιμοποιώντας γραμμικά ή μη γραμμικά μοντέλα (δηλ., πολυώνυμα πρώτης και

υψηλότερης τάξης). Αυτή η νέα προσέγγιση απλοποιεί την ανάλυση καθώς δεν απαιτείται η επί τόπου βαθμονόμηση της μεθόδου, η οποία συνήθως πραγματοποιείται με την ανάλυση πρότυπων διαλυμάτων που πρέπει να προετοιμαστούν ή να μεταφερθούν επί τόπου. Παράλληλα, μειώνει την επίδραση παρεμποδίσεων από τη μήτρα του υποστρώματος του δείγματος, από την ανομοιογένεια του χάρτου και από τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε αρχικά με σκοπό την ανάλυση βιοθειολών όμως θεωρήθηκε σκόπιμη η περαιτέρω μελέτη και διερεύνηση των δυνατοτήτων αλλά και των περιορισμών της, χρησιμοποιώντας, μεθόδους που βασίζονται σε διαφορετικές αντιδράσεις και μηχανισμούς. Για τον λόγο αυτό εξετάστηκε (πλέον της ανάλυσης βιοθειολών με χρήση της φωτοχημικής αναγωγής αλογονιδίων το αργύρου) και σε πέντε μεθόδους (για τον προσδιορισμό σιδήρου, πρωτεϊνών, υπεροξειδίου του υδρογόνου, οξικού οξέος και ανθρακικών) οι οποίες βασίζονται σε αντιδράσεις συμπλοκοποίησης, οξείδωσης και εξουδετέρωσης. Με τον τρόπο αυτό αναδείχθηκαν όλες οι πτυχές της μεθόδου η οποία αποτελεί την πρώτη εφαρμογή της μεθόδου πολλαπλής σταθερής προσθήκης ειδικά σχεδιασμένης για αναλυτικές διατάξεις χάρτου και αναδεικνύει τη χρήση της για εφαρμογές στο σημείο χρήσης.

SUMMARY

The aim of the PhD thesis is the development of novel analytical methods and signal readout approaches for the quantitative determination of biothiols in biological fluids which are easy to use, do not require instrumental analytical techniques and use stable and commercially available reagents which do not require specialized handling and treatment (such as those used in immunoassays or enzymatic assays).

Firstly, the thesis describes a new approach for the determination of free biothiols in biological fluids that exploits some of the basic principles of early photographic chemistry — that was based on silver-halide recording materials — and uses broadly-available imaging devices (i.e. flatbed scanners) as detectors. Specifically, the proposed approach relies on the ability of biothiols to bind to silver ions and dissociate the silver halide crystals thus changing the photosensitivity of silver halide crystal suspension. The changes induced by biothiols on the light intensity transmitted through the silver halide suspension, after photochemical reduction, were measured with a simplified photometric approach that employs a flatbed scanner operating in transmittance mode. The overall analytical procedure for the determination of biothiols was easily executable, fast and could be applied with inexpensive and commercially available materials and reagents. What is more, physiologically relevant biothiol levels could be inspected even by the unattended eye. The developed assay was successfully applied to the determination of biothiols in urine and blood plasma samples with detection limits as low as 10 μM , satisfactory recoveries (92-97%), good reproducibility (6.7-8.8%) and high selectivity against other major components of biological fluids. The utility of the method to the determination of reduced/oxidized thiol ratio's as well as its application under natural

light illumination, without external energy sources, was also demonstrated and is discussed with regard to point-of need applications in facility-limited settings.

In the next chapter the thesis describes the development of paper-based devices for the determination of biothiols. The devices are inexpensive (composed of paper and silver halide particles), and the analytical protocol is easily executable with minimum technical expertise and without the need of specialized equipment; the user has to add a test sample, illuminate the device with a UV lamp, and read the color change of the sensing area using a simple imaging device (i.e., cell-phone camera) or a bare eye. The detection mechanism of the assay is based on the biothiols-mediated photoreduction of nanometer-sized silver chloride particles deposited on the surface of paper; photoreduced silver chloride particles have a grayish coloration that depends on the concentration of biothiols in the tested solution. This is the first time that the UV-mediated photoreduction of solid silver halides particles is used for analytical purposes. The performance of the devices has been tested on the detection of total biothiols content of artificial body fluids and protein-free human blood plasma samples, and the results were satisfactory in terms of sensitivity, selectivity, recoveries and reproducibility.

Finally, a new approach for performing analytical assays on paper-based analytical devices that relies on the principles of multiple standard additions calibration, and uses calibrant-loaded paper devices, is described. Calibrant-loaded devices have multiple sensing areas pre-loaded with an excess amount of the necessary colorimetric reagents and known amounts (standard solutions) of the tested analyte; thus, a colored product is developed before analysis in each sensing area. After sample addition, the analytical signal from each sensing area corresponds to the total concentration of the analyte, which is the sum of the concentration of the analyte

in the tested sample plus the known amount of the analyte pre-stored in the device. The combined signal retrieved from each sensing zone is plotted to form a standard addition calibration curve that is used to calculate the concentration of the analyte in the sample using linear or non-linear models (i.e., first or higher order polynomials). This new approach could reduce the influence of matrix effects, paper inhomogeneity and environmental conditions on the results, and it could simplify the analysis as it may eliminate the steps associated with on-spot calibration that should ideally be performed using standard solutions that are prepared or transported in-situ. The utility and applicability of this approach is demonstrated as proof-of-concept on five assays (i.e., for the determination of iron, protein, hydrogen peroxide, acetic acid and carbonate ions) that use different reactions (i.e. complexation, oxidation and neutralization). This work provides a demonstration of a multiple standard addition methodology applied on calibrant-loaded paper-based analytical devices and illustrate its use as a sample-in result-out tool for point-of-use applications.