



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

**"ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΡΟ-ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΝΕΝΩΝ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ
ΔΙΑΤΑΞΕΩΝ ΧΑΡΤΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΟΣΟΤΙΚΩΝ
ΑΝΑΛΥΣΕΩΝ ΣΤΟ ΣΗΜΕΙΟ ΑΝΑΓΚΗΣ"**

**ΓΕΩΡΓΙΟΣ Θ. ΓΙΑΝΝΟΥΛΑΣ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

Μεταπτυχιακή Διατριβή

**Ιωάννινα
Ιούνιος, 2018**

© 2018 Γεώργιος Γιαννούλας

Η έγκριση της διπλωματικής εργασίας από το Τμήμα Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

Ημερομηνία αίτησης του κ. Γιαννούλα Γεώργιου: **01-06-2018**

Επιβλέπων μέλος ΔΕΠ: Επίκουρος Καθηγητής, Δημοσθένης Λ. Γκιώκας

Θέμα: «ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΡΟ-ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΝΕΝΩΝ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΔΙΑΤΑΞΕΩΝ ΧΑΡΤΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΟΣΟΤΙΚΩΝ ΑΝΑΛΥΣΕΩΝ ΣΤΟ ΣΗΜΕΙΟ ΑΝΑΓΚΗΣ»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από τη Γ.Σ.Ε.Σ.:

977/01-06-2018

1. Επίκουρος Καθηγητής, Δημοσθένης Λ. Γκιώκας
2. Καθηγητής, Αθανάσιος Γ. Βλεσσίδης
3. Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Δήμητρα Χελά

Έγκριση Μεταπτυχιακής Διατριβής στις

Η Πρόεδρος του Τμήματος Χημείας

Καθηγήτρια, Μαρία-Ελένη Λέκκα

Η Γραμματέας του Τμήματος

Ξανθή Τουτουτζόγλου

**Αφιερώνεται
στους γονείς μου**

ΠΡΟΛΟΓΟΣ – ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης (Μ.Δ.Ε.) στην εξειδίκευση: «ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ ΣΤΙΣ ΧΗΜΙΚΕΣ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΣΤΗΝ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ» εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας στα πλαίσια του αναμορφωμένου Π.Μ.Σ. του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Σκοπός της εργασίας ήταν η ανάπτυξη μιας απλοποιημένης, φτηνής και γρήγορης μεθόδου για πραγματοποίηση ποσοτικών, χρωματομετρικών αναλύσεων σε προβαθμονομημένες αναλυτικές συσκευές χάρτου, με σκοπό την πραγματοποίηση εξωτερικής βαθμονόμησης ενός σημείου ή βαθμονόμησης σταθερής προσθήκης. Η μέθοδος στηρίζεται στο αθροιστικό σήμα που παράγεται από τον αναλύτη που υπάρχει στο δείγμα και από το πρότυπο διάλυμα του αναλύτη, που έχει προαποθηκευτεί στη συσκευή. Η εφαρμογή αυτής της προσέγγισης, αξιολογήθηκε σε τρεις διαφορετικές μεθόδους (για τον προσδιορισμό του σιδήρου, του νικελίου, και των αμινοξέων), που βασίζονται σε διαφορετικές χημικές αντιδράσεις.

Στην εκπόνηση της εργασίας αυτής συνέβαλαν σε μεγάλο βαθμό τα μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, τους οποίους θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά. Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα μου, Επίκουρο Καθηγητή Δρ. Δημοσθένη Γκιώκα, για την ανάθεση του θέματος, την επίβλεψη και την καθοδήγηση του σε θεωρητικό και πειραματικό επίπεδο κατά τη διάρκεια εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου διατριβής καθώς επίσης και για την πολύτιμη βοήθεια και τις συμβουλές του στην επίλυση διάφορων προβλημάτων κατά την πειραματική διαδικασία.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Καθηγητή κ. Αθανάσιο Βλεσσίδα καθώς και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Δήμητρα Χελά για την πολύτιμη βοήθεια και

τις συμβουλές τους, καθώς και για τις εύστοχες παρατηρήσεις τους στο κείμενο της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω στον Δρ. Γεώργιο Τσόγκα, στους διδακτορικούς φοιτητές Χολέβα Τατιάνα, Κάππη Φωτεινή και στους μεταπτυχιακούς φοιτητές Κωσταρά Αναστασία, Βοτάνη Αλεξία και Τζόκα Στεφανία για την αμέριστη βοήθεια και συμπαράσταση καθώς και την άριστη συνεργασία που μου πρόσφεραν.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου Θωμά και Ευφροσύνη, που με υπομονή και κουράγιο πρόσφεραν την απαραίτητη ηθική συμπαράσταση για την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου εργασίας και τους φίλους μου Σωτήρη και Βασιλική, οι οποίοι στάθηκαν σημαντικοί αρωγοί στην προσπάθειά μου και με υποστήριξαν σε κάθε φάση της πορείας μου.

Γεώργιος Γιαννούλας

Ιωάννινα, 2018

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΟΣΟΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

1.1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	2
1.2	ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	2
1.2.1	Επιλογή αναλυτικής μεθόδου	2
1.2.2	Αναλυτική βαθμονόμηση	5
1.2.3	Μεθοδολογίες αναλυτικής βαθμονόμησης.....	6
1.3	ΑΡΧΕΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ.....	7
1.3.1	Πρότυπα διαλύματα.....	7
1.3.2	Βαθμονόμηση του σήματος (S_{total})	8
1.3.3	Προσδιορισμός της ευαισθησίας (k_A)	9
1.3.4	Βαθμονόμηση ενός σημείου έναντι πολλαπλών σημείων.....	9
1.4	ΜΕΘΟΔΟΙ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ.....	11
1.4.1	Μέθοδος εξωτερικών προτύπων	11
1.4.2	Μέθοδος εσωτερικών προτύπων	14
1.4.3	Μέθοδος σταθερής προσθήκης.....	16

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΑΣΜΕΝΕΣ ΑΠΟ ΧΑΡΤΙ

2.1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	24
2.2	ΚΟΙΝΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ ΓΙΑ ΤΗ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΠΟΛΥΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΩΝ μPADs	24
2.2.1	Κοπή και διάπλαση χαρτιού	27
2.2.2	Κερί.....	28
2.2.3.	Κατασκευή πλήρως κλειστών μPADs με χρήση γραφίτη	31
2.3.	ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΣΕ ΜΙΚΡΟΡΕΥΣΤΟΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ ΧΑΡΤΟΥ	32

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	38
3.2.	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ.....	41
3.3	ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ.....	42
3.3.1	Εξοπλισμός	42

3.3.2 Κατασκευή συσκευών χάρτου.....	43
3.3.3 Προετοιμασία και χρήση συσκευών με βαθμονόμηση	44
3.4. ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ	46
3.5 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	47

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	50
4.2 ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ	51
4.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΦΩΤΙΣΜΟΥ.....	59
4.4 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	60
4.5 ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΕΩΝ ΣΤΟ ΔΕΙΓΜΑ	61
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	64
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	66
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	75
ABSTRACT	77

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΟΣΟΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ



1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.2 ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Ο σκοπός μιας αναλυτικής μέτρησης μπορεί να είναι ποιοτικός, ποσοτικός ή ημιποσοτικός. Για παράδειγμα, η παρουσία φυτοφαρμάκων στα ψάρια αποτελεί θέμα ανησυχίας. Τα ερωτήματα μπορεί να είναι: Υπάρχουν φυτοφάρμακα στα ψάρια; Εάν ναι, ποια; Η ανάλυση που αποσκοπεί στην αντιμετώπιση αυτών των ζητημάτων είναι μια ποιοτική ανάλυση. Το επόμενο προφανές ερώτημα είναι: Σε τι ποσότητα βρίσκονται τα φυτοφάρμακα; Αυτός ο τύπος ανάλυσης είναι ποσοτικός και αποσκοπεί στον υπολογισμό της συγκέντρωσής των φυτοφαρμάκων. Η άλλη σημαντική κατηγορία είναι η ημιποσοτική ανάλυση. Εδώ η ανησυχία δεν είναι ακριβώς πόσο φυτοφάρμακο υπάρχει, αλλά αν είναι πάνω ή κάτω από ένα συγκεκριμένο όριο (*Winerordner J.D., 2003*).

1.2.1 Επιλογή αναλυτικής μεθόδου

Ως αναλυτική μέθοδος, ορίζεται η εφαρμογή μιας πειραματικής πορείας για την ανάλυση ενός αναλύτη σε συγκεκριμένη μήτρα υποστρώματος (δείγματος). Κατά την επιλογή μιας μεθόδου, λαμβάνονται υπόψη όλοι οι παράμετροι: ακρίβεια, πιστότητα, ευαισθησία, επιλεκτικότητα, αξιοπιστία, όριο ανίχνευσης, χρόνος ανάλυσης, και κόστος (*Harvey D., 2008*).

Ακρίβεια

Η ακρίβεια (*accuracy*) της μεθόδου καταδεικνύει την απόκλιση του πειραματικού αποτελέσματος από το θεωρητικό. Μπορούμε να εκφράσουμε την ακρίβεια ως απόλυτο σφάλμα (*Harvey D., 2008*). Στην περίπτωση που η πραγματική τιμή είναι άγνωστη, θεωρείται πραγματική η τιμή που έχει επικυρωθεί από μια αναγνωρισμένη και επικυρωμένη μέθοδο (*Winerordner J.D., 2003*). Όταν η μέση τιμή αποκλίνει $\leq 15\%$ από την πραγματική τιμή, το όριο απόκλισης θεωρείται αποδεκτό. Για συγκεντρώσεις, όμως, κοντά στο όριο ποσοτικής αποτίμησης (*LOQ*), θεωρείται αποδεκτή και η απόκλιση μέχρι 20%

Πιστότητα

Η πιστότητα (precision) μιας μεθόδου εκφράζεται με την επαναληψιμότητα (repeatability) και την αναπαραγωγιμότητα (reproducibility). Κατά την επαναλαμβανόμενη ανάλυση ενός δείγματος, τα μεμονωμένα αποτελέσματα κάθε ανάλυσης δεν είναι πάντα ίδια. Όσο περισσότερο πλησιάζουν τα μεμονωμένα αποτελέσματα μεταξύ τους τόσο καλύτερη είναι η πιστότητα της ανάλυσης. Η πιστότητα εκφράζει το μέτρο αυτής της μεταβλητότητας. (Harvey D., 2008). Καλή επαναληψιμότητα δηλώνει ότι η διασπορά των μετρήσεων είναι μικρή, δηλαδή τα αποτελέσματα βρίσκονται κοντά μεταξύ τους. Η πιστότητα επίσης, εκφράζει την αναπαραγωγιμότητα των αποτελεσμάτων και επηρεάζεται από το τυχαίο σφάλμα. Λαμβάνοντας υπόψη ότι όλες οι μετρήσεις περιέχουν τυχαίο σφάλμα, το αποτέλεσμα από μια μόνο μέτρηση δεν μπορεί να γίνει αποδεκτό ως πραγματική τιμή. Η εκτίμηση αυτού του σφάλματος είναι απαραίτητη για να προβλεφθεί σε ποιο εύρος τιμών εντοπίζεται η πραγματική τιμή (Schrader B., 1995). Η πιστότητα μπορεί να εκφραστεί με την τυπική απόκλιση s (standard deviation) ή με τη σχετική τυπική απόκλιση RSD (relative standard deviation). Όταν η σχετική τυπική απόκλιση $\leq 15\%$, τα όρια απόκλιση θεωρούνται αποδεκτά. Για συγκεντρώσεις κοντά στο LOQ θεωρείται ωστόσο αποδεκτή και τιμή απόκλισης μέχρι 20%. Μια αναλυτική μέθοδος πρέπει να χαρακτηρίζεται τόσο από εξαιρετική ακρίβεια, όσο και πιστότητα.

Ευαισθησία

Η ευαισθησία (sensitivity) μιας αναλυτικής μεθόδου εκφράζει την ικανότητα της μεθόδου να εντοπίζει τις μεταβολές του μετρούμενου μεγέθους. Μια αναλυτική μέθοδος παρουσιάζει τόσο μεγαλύτερη ευαισθησία, όσο μεγαλύτερη μεταβολή του μετρούμενου μεγέθους μπορεί να μετρήσει, σε πολύ μικρή μεταβολή της συγκέντρωσης του δείγματος. Η ευαισθησία συγγέεται συχνά με το όριο ανίχνευσης μιας μεθόδου, το οποίο εκφράζει την ελάχιστη ποσότητα αναλύτη που μπορούμε να προσδιορίσουμε με εμπιστοσύνη. Μια αναλυτική μέθοδος είναι ευαίσθητη εάν το σήμα της εξαρτάται μόνο από την αναλυόμενη ουσία. (Persson B-A., Vessman J., 2001).

Επιλεκτικότητα

Η επιλεκτικότητα (selectivity) είναι το μέτρο ελευθερίας της μεθόδου από τις παρεμβολές (Valcárcel M., et al, 2001). Η επιλεκτικότητα, εκφράζει την ικανότητα της μεθόδου να εντοπίζει με ακρίβεια ένα συστατικό μέσα από ένα μίγμα ουσιών και πιθανών παρεμποδιστών.

Αξιοπιστία

Η αξιοπιστία (reliability), εκφράζει την ποιότητα της ανάλυσης με βάση την ακρίβεια και την πιστότητα.

Όριο ανίχνευσης

Το όριο ανίχνευσης (detection limit), είναι η μικρότερη ποσότητα (συγκέντρωση) μιας ουσίας, που μπορεί να ανιχνευτεί με βεβαιότητα 99.6%.

Χρόνος ανάλυσης

Ο χρόνος ανάλυσης, είναι ο χρόνος που απαιτείται για την ολοκλήρωση μιας ανάλυσης από την αρχή της προετοιμασίας του δείγματος. Στις μέρες μας όμως, το ενδιαφέρον επικεντρώνεται στην ταχύτητα της μεθόδου, παρά στον χρόνο ανάλυσης. Η ταχύτητα της μεθόδου εκφράζει τον αριθμό των αναλύσεων ανά μονάδα χρόνου. Ο χρόνος ολοκλήρωσης της ανάλυσης ενός δείγματος είναι συχνά παρόμοιος στην κάθε μέθοδο. Αυτό όμως, είναι κάπως παραπλανητικό, καθώς μεγάλο μέρος αυτού του χρόνου δαπανάται για την προετοιμασία των διαλυμάτων και τη συγκέντρωση του εξοπλισμού ενώ η δειγματοληψία μπορεί να διαφέρει από μέθοδο σε μέθοδο. Επιπλέον, μερικές μέθοδοι αυτοματοποιούνται ευκολότερα. Αυτός είναι ένας σημαντικός παράγοντας στην επιλογή μιας μεθόδου σε ένα εργαστήριο που χειρίζεται μεγάλο αριθμό δειγμάτων (Harvey D., 2008).

Κόστος ανάλυσης

Το κόστος μιας ανάλυσης εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως το κόστος του εξοπλισμού και των αντιδραστηρίων, το κόστος των αναλυτών και του αριθμού των δειγμάτων που μπορούν να επεξεργαστούν ανά ώρα. Γενικά, οι μέθοδοι που βασίζονται σε όργανα κοστίζουν περισσότερο ανά δείγμα από άλλες μεθόδους (Harvey D., 2008).

Οι παράμετροι που αναφέρθηκαν παραπάνω δεν είναι ανεξάρτητες μεταξύ τους (Valcárcel M. and Ríos A., 1993). Σε αναλύσεις που χρησιμοποιούνται μικρότερα δείγματα ή όταν επιλέγεται να βελτιωθεί η επιλεκτικότητα της μεθόδου, μειώνεται η πιστότητα της μεθόδου. Επιπρόσθετα, η ελαχιστοποίηση του κόστους και του χρόνου μιας ανάλυσης μειώνει την ακρίβεια της. Η εφαρμογή μιας μεθόδου, απαιτεί προσεκτική επιλογή των παραπάνω παραμέτρων. Συνήθως, το πιο σημαντικό κριτήριο είναι η ακρίβεια και η καλύτερη μέθοδος είναι αυτή που δίνει το πιο ακριβές αποτέλεσμα. Όταν η ανάγκη για αποτελέσματα είναι επείγουσα, όπως συμβαίνει συχνά στα κλινικά εργαστήρια, ο χρόνος ανάλυσης μπορεί να αποτελέσει τον πιο κρίσιμο παράγοντα.

Σε ορισμένες περιπτώσεις, η καλύτερη αναλυτική μέθοδος καθορίζεται από τις ιδιότητες του δείγματος. Για παράδειγμα, ένα δείγμα με σύνθετη μήτρα, μπορεί να απαιτεί μια μέθοδο με εξαιρετική επιλεκτικότητα για την αποφυγή παρεμποδίσεων. Δείγματα στα οποία η αναλύσιμη ουσία βρίσκεται σε ιχνοποσότητες, απαιτούν συνήθως μέθοδο προσυγκέντρωσης. Εάν η ποσότητα του δείγματος είναι περιορισμένη, τότε η μέθοδος που εφαρμόζεται δεν πρέπει να απαιτεί μεγάλη ποσότητα δείγματος (Harvey D. 2008).

1.2.2 Αναλυτική βαθμονόμηση

Η βαθμονόμηση είναι η πιο συνηθισμένη και αξιόπιστη μέθοδος στην ποσοτική ανάλυση. (Cuadros Rodr'iguez L., et al, 2001). Βασίζεται, στη μέτρηση ενός συνόλου προτύπων βαθμονόμησης, συμπεριλαμβανομένου του τυφλού, τα οποία είναι ομοιόμορφα κατανεμημένα στην περιοχή εργασίας της αναλυτικής μεθόδου. Στη συνέχεια, εφαρμόζοντας στα δεδομένα τον κατάλληλο αλγόριθμο παλινδρόμησης (συνήθως γραμμική παλινδρόμηση), επιτυγχάνεται η βαθμονόμηση της μεθόδου. Ένας αλγόριθμος παλινδρόμησης περιλαμβάνει δύο βήματα:

- ❖ Επιλογή ενός μαθηματικού μοντέλου και προσαρμογή της μαθηματικής συνάρτησης στα πειραματικά δεδομένα.
- ❖ Επικύρωση του μοντέλου και έλεγχος αρχικών υποθέσεων.

Η συνέπεια των αποτελεσμάτων της παλινδρόμησης, εξαρτάται από τον βαθμό των τυχαίων πειραματικών σφαλμάτων.

Τα πρότυπα αναλυτών μέτρησης που χρησιμοποιούνται στις αναλυτικές επιστήμες ονομάζονται "βαθμονομητές" και είναι υλικά αναφοράς, τα οποία μπορούν ουσιαστικά να ταξινομηθούν σε δύο τύπους: (E.A.-04/14., 2003):

- ❖ Υλικά αναφοράς ουσιών, παρασκευασμένα από απλούς αναλυτές. Περιλαμβάνουν: (α) καθαρές ουσίες που χαρακτηρίζονται από χημική καθαρότητα και (β) πρότυπα διαλύματα, παρασκευασμένα από καθαρές ουσίες (μεμονωμένες ή μικτές).
- ❖ Υλικά αναφοράς που αναφέρονται στη μήτρα (RM), τα οποία χαρακτηρίζονται για την σύνθεση τους από συγκεκριμένα χημικά συστατικά σε μεγάλες ή μικρές ποσότητες, ακόμα και ιχνοποσότητες. Μπορούν να αναλυθούν στις μήτρες ή μέσω συνθετικών μιγμάτων. Ωστόσο, τα RM περιέχουν τους αναλύτες που μας ενδιαφέρουν συν τις κύριες χημικές ενώσεις που χαρακτηρίζουν τη μήτρα.

1.2.3 Μεθοδολογίες αναλυτικής βαθμονόμησης

Στα δείγματα, μπορούν να εφαρμοστούν διάφορες μεθοδολογίες βαθμονόμησης (*Cuadros Rodr'iguez L., et al, 2001*), λαμβάνοντας υπόψη παράγοντες όπως: ι) η ύπαρξη αντιπροσωπευτικών προτύπων, ιι) η φύση των αναλυτών, ιιι) η έλλειψη ακρίβειας ή απόκλισης του συστήματος μέτρησης και ιιιι) η πιθανότητα διατάραξης του αναλυτικού σήματος εξόδου από άλλα συστατικά συνακόλουθα του αναλύτη. Είναι προφανές ότι η πολλαπλή και η απλή πρότυπη βαθμονόμηση μπορούν να εφαρμοστούν σε όλες τις μεθοδολογίες.

1.3 ΑΡΧΕΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ

Η ποσοτική ανάλυση ενός δείγματος προϋποθέτει τη μέτρηση ενός χημικού ή φυσικού σήματος, το οποίο είναι ανάλογο της ποσότητας της αναλυόμενης ουσίας στο δείγμα. Η ποσότητα της αναλυόμενης ουσίας, μπορεί να εκφραστεί είτε ως μάζα ή γραμμομόρια, είτε ως συγκέντρωση.

Αν μια μέθοδος ανταποκρίνεται στην ποσότητα αναλυόμενης ουσίας στο δείγμα, τότε το σήμα που οφείλεται στον αναλύτη, S_A , είναι:

$$S_{\text{total}} = k_A n_A + S_{\text{reag}} \quad (1)$$

Όπου, S_{total} είναι το συνολικό σήμα, n_A τα γραμμομόρια ή γραμμάρια της αναλυόμενης ουσίας στο δείγμα, k_A είναι η σταθερά αναλογικότητας ή ευαισθησία της μεθόδου για τον αναλύτη και S_{reag} είναι η συνεισφορά στο S_{total} από άλλες πηγές εκτός του δείγματος.

Η δεύτερη κατηγορία αναλυτικών μεθόδων, ανταποκρίνεται στη συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας, C_A :

$$S_{\text{total}} = k_A C_A + S_{\text{reag}} \quad (2)$$

Για την πιστοποίηση μιας αναλυτικής μεθόδου, απαραίτητος είναι ο καθορισμός της τιμής k_A και S_{reag} .

1.3.1 Πρότυπα διαλύματα

Για την πιστοποίηση μιας αναλυτικής μεθόδου χρησιμοποιούμε πρότυπα βαθμονόμησης που περιέχουν γνωστές ποσότητες της αναλυόμενης ουσίας. Τα πρότυπα βαθμονόμησης περιέχουν τον αναλύτη ή ένα υποκατάστατο του αναλύτη, δηλαδή μια καθαρή ουσία (ένωση ή στοιχείο) παρόμοιας χημικής σύνθεσης με την αναλυόμενη ουσία που μας ενδιαφέρει. Τα πρότυπα βαθμονόμησης, μπορούν να μετρηθούν χωριστά από το δείγμα (εξωτερική βαθμονόμηση) καθώς και όταν συμπεριλαμβάνονται στο δείγμα (εσωτερική βαθμονόμηση). Στην εσωτερική βαθμονόμηση, χρησιμοποιείται ένα υποκατάστατο του

αναλύτη, το οποίο ονομάζεται ‘‘εσωτερικό πρότυπο’’. Το εσωτερικό πρότυπο είναι χημικά διαφορετικό από τους αναλύτες και δεν έχει τις ίδιες χημικές ιδιότητες. Ωστόσο, επιλέγεται με τέτοιο τρόπο ώστε να σχετίζεται στενά με τους αναλύτες του και να παρουσιάζει την ίδια ή σχεδόν ίδια χημική συμπεριφορά. Καλύτερο τρόπο εφαρμογής των εσωτερικών προτύπων, συνιστά η χρήση ισοτοπικών επισημασμένων αναλυτών, ώστε οι χημικές ιδιότητες του εσωτερικού προτύπου να είναι όμοιες με τον αναλύτη.

Τα αναλυτικά πρότυπα διακρίνονται σε πρωτεύοντα και δευτερεύοντα. Σε ένα πρωτεύον πρότυπο μπορούμε να προσθέσουμε με ακρίβεια, γνωστή ποσότητα αναλύτη. Ένα πρωτεύον πρότυπο πρέπει να έχει γνωστή στοιχειομετρία, να διακρίνεται για την καθαρότητά του και να παραμένει σταθερό για μεγάλο χρονικό διάστημα κατά την αποθήκευση. Λόγω της δυσκολίας προσδιορισμού του βαθμού ενυδάτωσης μιας ουσίας, ακόμη και μετά την ξήρανση, ένα ενυδατωμένο αντιδραστήριο συνήθως δεν αποτελεί πρωταρχικό πρότυπο. Υπάρχουν διαθέσιμες λίστες πρωτογενών προτύπων διαλυμάτων στη βιβλιογραφία (Moody J. R., et al, 1988). Τα αντιδραστήρια που δεν πληρούν τα παραπάνω κριτήρια συγκαταλέγονται στα δευτερεύοντα πρότυπα. Η συγκέντρωση ενός δευτερεύοντος προτύπου διαλύματος προσδιορίζεται σε σχέση με ένα πρωτεύον πρότυπο (Harvey D., 2008).

Η προετοιμασία ενός προτύπου συχνά απαιτεί πρόσθετα αντιδραστήρια που δεν ανήκουν στα πρωτεύοντα ή δευτερεύοντα πρότυπα. Η παρασκευή ενός προτύπου διαλύματος, για παράδειγμα, απαιτεί έναν κατάλληλο διαλύτη καθώς και τα πρόσθετα αντιδραστήρια για τη ρύθμιση της μήτρας του προτύπου. Αυτοί οι διαλύτες και τα αντιδραστήρια αν δεν ληφθούν υπόψη, παράγουν ένα καθορισμένο σφάλμα στην βαθμονόμηση, καθώς μπορεί να αυξήσουν τη συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας. Κατά προτίμηση πρέπει να χρησιμοποιούνται χημικά που ανταποκρίνονται στα πρότυπα που ορίζονται από την αμερικάνικη χημική κοινότητα. (Committee on Analytical Reagents, Reagent Chemicals, 1993).

1.3.2 Βαθμονόμηση του σήματος (S_{total})

Η ακρίβεια προσδιορισμού των k_A και S_{reag} εξαρτάται από την ακρίβεια στη μέτρηση του σήματος S_{total} . Η μέτρηση του σήματος πραγματοποιείται από συγκεκριμένο εξοπλισμό, όπως γυάλινα σκεύη, αναλυτικούς ζυγούς και από διάφορα όργανα, όπως

φασματοφωτόμετρα και πεχάμετρα. Η βαθμονόμηση του εξοπλισμού και των οργάνων, ελαχιστοποιεί τα σφάλματα που επηρεάζουν το σήμα. Η βαθμονόμηση πραγματοποιείται μετρώντας το S_{total} ενός προτύπου με γνωστή απόκριση S_{std} και ισχύει:

$$S_{\text{total}} = S_{\text{std}}$$

1.3.3 Προσδιορισμός της ευαισθησίας (k_A)

Ο προσδιορισμός της τιμής k_A , μέσω χημικών και φυσικών διεργασιών που παράγουν το σήμα είναι απαραίτητος. Δυστυχώς, τέτοιοι υπολογισμοί είναι ανέφικτοι σε περιπτώσεις απουσίας αναπτυγμένων θεωρητικών μοντέλων των φυσικών διεργασιών ή δεν είναι χρήσιμοι λόγω μη επαρκούς χαρακτηρισμού των χημικών φαινομένων. Σε τέτοιες περιπτώσεις, η τιμή του k_A προσδιορίζεται πειραματικά με την ανάλυση ενός ή περισσότερων προτύπων διαλυμάτων, καθένα από τα οποία περιέχει γνωστή ποσότητα αναλύτη. Θεωρώντας ότι η τιμή S_{reag} υπολογίστηκε από κατάλληλο τυφλό δείγμα, οι σχέσεις (1) και (2) μπορούν να ανικατασταθούν από το σήμα του αναλύτη, S_A ως εξής:

$$S_A = k_A n_A \quad (3)$$

$$S_A = k_A C_A \quad (4)$$

1.3.4 Βαθμονόμηση ενός σημείου έναντι πολλαπλών σημείων

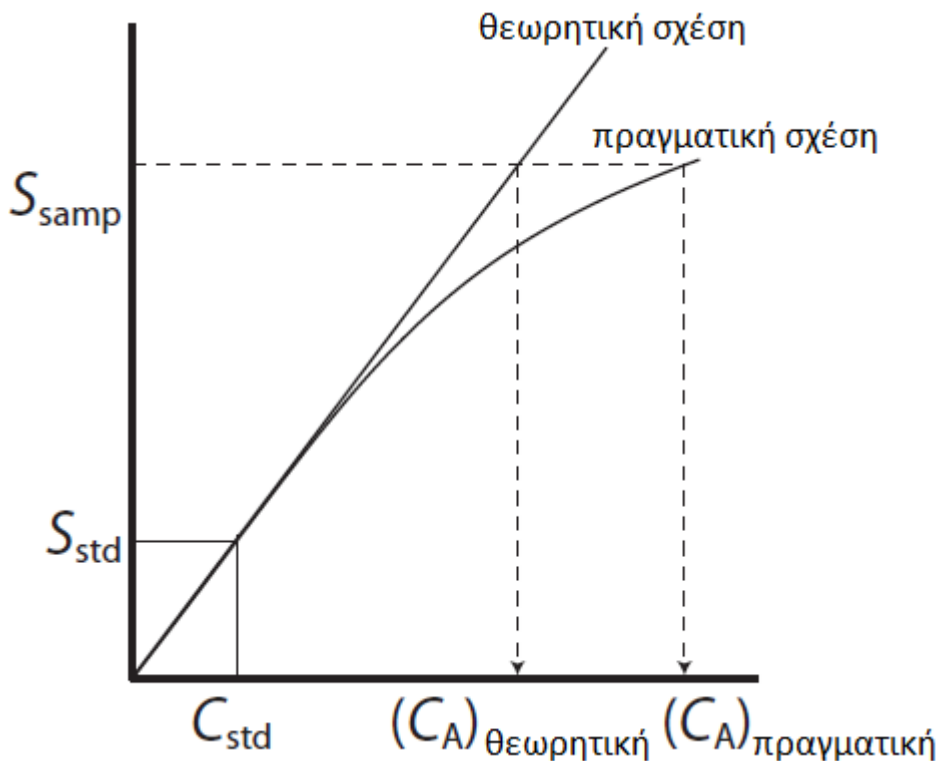
Στην βαθμονόμηση ενός σημείου ο υπολογισμός της τιμής k_A στην εξίσωση (4) πραγματοποιείται εύκολα, μετρώντας το σήμα S_{std} ενός προτύπου, γνωστής συγκέντρωσης αναλύτη C_{std} .

$$k_A = \frac{S_{\text{std}}}{C_{\text{std}}} \quad (5)$$

Με τον προσδιορισμό της τιμής k_A , μπορούμε να υπολογίσουμε τη συγκέντρωση της αναλύμενης ουσίας σε οποιοδήποτε δείγμα μετρώντας το σήμα της S_{samp} , μέσω της εξίσωσης 6.

$$C_A = \frac{S_{\text{samp}}}{k_A} \quad (6)$$

Η βαθμονόμηση ενός σημείου σε σχέση με την βαθμονόμηση πολλαπλών σημείων είναι λιγότερο αξιόπιστη. Υπάρχουν, τουλάχιστον δύο λόγοι για αυτό. Πρώτον, κάθε σφάλμα στον καθορισμό του k_A , μεταφέρεται και στον υπολογισμό της C_A . Δεύτερον, η πειραματική τιμή του k_A αναφέρεται σε μία συγκεκριμένη συγκέντρωση του αναλύτη. Η επέκταση της τιμής του k_A σε άλλες συγκεντρώσεις αναλύμενης ουσίας, απαιτεί σχέση γραμμικότητας μεταξύ σήματος και συγκέντρωσης αναλύτη, μια υπόθεση που συχνά δεν είναι αληθής (Cardone M. J., et al, 1980). Το σχήμα 1.1, δείχνει πώς η παραδοχή μιας σταθερής τιμής k_A , μπορεί να οδηγήσει σε ένα καθορισμένο σφάλμα στη συγκέντρωση του αναλύτη. Παρά τους περιορισμούς αυτούς, οι προτυποποιήσεις ενός σημείου χρησιμοποιούνται σε αναλύσεις ρουτίνας όταν το αναμενόμενο εύρος συγκεντρώσεων του αναλύτη είναι μικρό. Υπό αυτές τις συνθήκες είναι συχνά ασφαλές να υποθέσουμε ότι το k_A είναι σταθερό (αυτή η υπόθεση πρέπει να επαληθευτεί πειραματικά).



Σχήμα 1.1. Παράδειγμα που δείχνει πώς μια βαθμονόμηση ενός σημείου οδηγεί σε ένα καθορισμένο σφάλμα στην αναφερόμενη συγκέντρωση αναλυόμενης ουσίας, εάν υποθέσουμε λανθασμένα ότι η τιμή του k_A είναι σταθερή.

Η βαθμονόμηση πολλαπλών σημείων είναι προτιμότερη και πιο αξιόπιστη μέθοδος. Αρχικά, προετοιμάζεται μια σειρά προτύπων, καθένα από τα οποία περιέχει τον αναλύτη σε διαφορετική συγκέντρωση. Τα πρότυπα επιλέγονται με τέτοιο τρόπο ώστε να καλύπτουν σε εύρος τη συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας. Μια βαθμονόμηση πολλαπλών σημείων πρέπει να περιλαμβάνει τουλάχιστον τρία πρότυπα. Όσο αυξάνεται ο αριθμός των προτύπων, τόσο μεγαλώνει και η αξιοπιστία της μεθόδου. Ένα γράφημα S_{std} έναντι C_{std} είναι γνωστό και ως καμπύλη βαθμονόμησης.

Υπάρχουν τουλάχιστον δύο πλεονεκτήματα κατά τη βαθμονόμηση πολλαπλών σημείων. Πρώτον, αν και ένα καθορισμένο σφάλμα σε ένα πρότυπο εισάγει ένα προσδιορισμένο σφάλμα στην ανάλυση, το αποτέλεσμά του ελαχιστοποιείται από τα υπόλοιπα πρότυπα. Δεύτερον, με τη μέτρηση του σήματος για διάφορες συγκεντρώσεις αναλυόμενης ουσίας δεν χρειάζεται να υποθέσουμε ότι η τιμή του k_A είναι ανεξάρτητη από τη συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας.

1.4 ΜΕΘΟΔΟΙ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ

1.4.1 Μέθοδος εξωτερικών προτύπων

Η μέθοδος εξωτερικών προτύπων είναι η συνηθέστερη μέθοδος ποσοτικοποίησης. Στη μέθοδο αυτή, χρησιμοποιούνται ένα ή περισσότερα εξωτερικά πρότυπα βαθμονόμησης γνωστής συγκέντρωσης. Τα διαλύματα αυτά αποκαλούνται ‘‘εξωτερικά’’, γιατί η προετοιμασία και η ανάλυσή τους γίνεται χωριστά από τα δείγματα. Έτσι, τα πρότυπα και τα δείγματα, αποτελούν μέρος διαφορετικών αναλυτικών παρασκευασμάτων, τα οποία μετρώνται διαδοχικά. Στη βιβλιογραφία η μέθοδος εξωτερικών προτύπων ονομάζεται και «βαθμονόμηση διαλυτών», «τυπική βαθμονόμηση» ακόμα και «κανονική βαθμονόμηση»

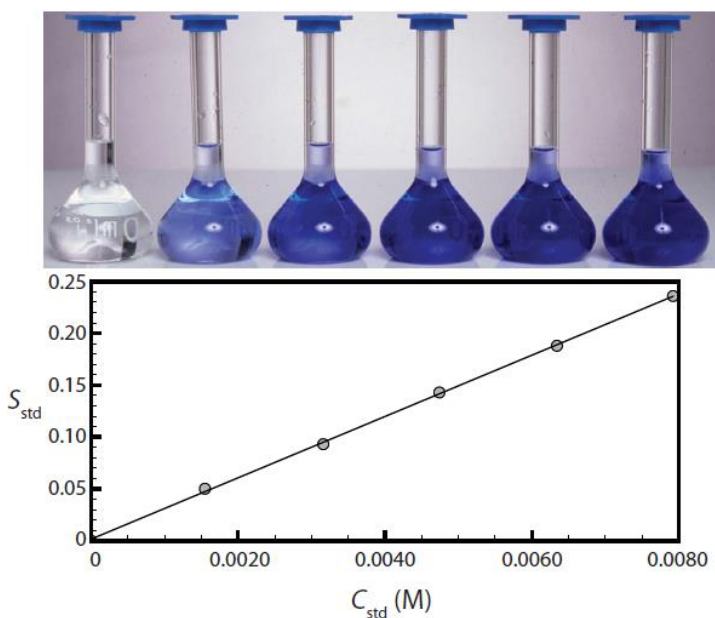
Ως εξωτερικό πρότυπο, χρησιμοποιείται ένα υλικό αναφοράς που περιέχεται στο διαλύτη εργασίας. Συνήθως, περιέχει τον αναλύτη, αν και δεν είναι απαραίτητο, καθώς η βαθμονόμηση μπορεί να πραγματοποιηθεί και από ένα υποκατάστατο του αναλύτη. Η εξωτερική βαθμονόμηση με υποκατάστατο πραγματοποιείται όταν δεν υπάρχει υλικό αναφοράς που περιέχει την αναλυόμενη ουσία. Για παράδειγμα, κατά τον προσδιορισμό των πολυφαινολών στο ελαιόλαδο, χρησιμοποιούνται υποκατάστατα του αναλύτη ως εξωτερικά πρότυπα (Gómez Caravaca A.M., et al, 2013).

1.4.1.1 Μέθοδος ενός εξωτερικού προτύπου

Ο ποσοτικός προσδιορισμός χρησιμοποιώντας ένα εξωτερικό πρότυπο, αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα. Αρχικά, προσδιορίζεται η τιμή του k_A μέσω της εξίσωσης (5) και ύστερα, από την εξίσωση (6) υπολογίζεται η συγκέντρωση του αναλύτη C_A .

1.4.1.2 Μέθοδος πολλαπλών εξωτερικών προτύπων

Στο σχήμα 1.2. παρουσιάζεται μια τυπική εξωτερική βαθμονόμηση πολλών σημείων. Η ογκομετρική φιάλη στα αριστερά χρησιμοποιείται ως τυφλό και οι υπόλοιπες ογκομετρικές φιάλες περιέχουν αυξανόμενες συγκεντρώσεις Cu^{2+} . Κάτω από τις ογκομετρικές φιάλες εμφανίζεται η προκύπτουσα καμπύλη βαθμονόμησης. Επειδή αυτή είναι η πιο κοινή μέθοδος βαθμονόμησης, η προκύπτουσα σχέση καλείται κανονική καμπύλη βαθμονόμησης.

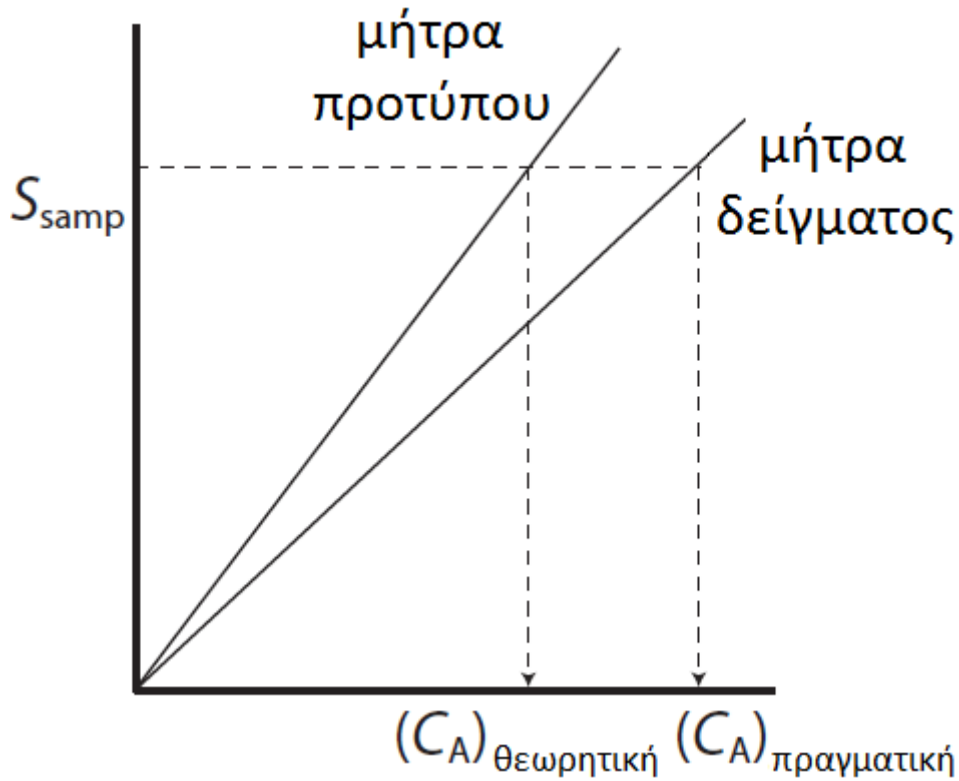


Σχήμα 1.2. Στο πάνω μέρος εμφανίζεται ένα τυφλό αντιδραστήριο (αριστερά) και ένα σύνολο πέντε εξωτερικών προτύπων Cu^{2+} με συγκεντρώσεις που αυξάνονται από αριστερά προς τα δεξιά. Κάτω από τα εξωτερικά πρότυπα εμφανίζεται η προκύπτουσα κανονική καμπύλη βαθμονόμησης.

Όταν η καμπύλη βαθμονόμησης είναι ευθεία, όπως φαίνεται στο Σχήμα 1.2, η κλίση της ευθείας δίνει την τιμή του k_A . Αυτή η περίπτωση θεωρείται ιδανική, καθώς η ευαισθησία της μεθόδου παραμένει σταθερή σε όλο το εύρος συγκεντρώσεων της αναλυόμενης ουσίας. Όταν η καμπύλη βαθμονόμησης δεν είναι ευθεία, η ευαισθησία της μεθόδου εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας. Στο Σχήμα 1.1, για παράδειγμα, η τιμή του k_A είναι μεγαλύτερη όταν η συγκέντρωση του αναλύτη είναι μικρή και μειώνεται συνεχώς σε υψηλότερες συγκεντρώσεις της αναλυόμενης ουσίας. Όπως φαίνεται στο σχήμα 1.1, η τιμή του k_A σε οποιοδήποτε σημείο κατά μήκος της καμπύλης βαθμονόμησης δίνεται από την κλίση στο σημείο αυτό.

Με τη μέθοδο εξωτερικής βαθμονόμησης, δίνεται η δυνατότητα ανάλυσης πολλαπλών δειγμάτων, χρησιμοποιώντας μία και μόνο καμπύλη βαθμονόμησης. Αυτό είναι ένα σημαντικό πλεονέκτημα όταν έχουμε πολλά δείγματα προς ανάλυση.

Ωστόσο, υπάρχει ένας σοβαρός περιορισμός στη μέθοδο εξωτερικής βαθμονόμησης. Όταν προσδιορίζουμε την τιμή του k_A χρησιμοποιώντας την εξίσωση 5, η αναλυόμενη ουσία υπάρχει στη μήτρα του εξωτερικού προτύπου, η οποία συνήθως είναι απλούστερη από αυτή των δειγμάτων μας. Όταν χρησιμοποιούμε μια εξωτερική βαθμονόμηση, υποθέτουμε ότι η μήτρα δεν επηρεάζει την τιμή του k_A . Εάν αυτή η υπόθεση είναι ψευδής, τότε εισάγουμε σφάλμα στην ανάλυση. Κατά συνέπεια, η επίδραση της μήτρας αυξάνει το επίπεδο των τυχαίων σφαλμάτων, μειώνοντας την αξιοπιστία της ανάλυσης, καθώς εισάγονται συστηματικά σφάλματα, τα οποία μπορεί να είναι σταθερά, αν το τυφλό επηρεάζεται, ή να είναι ανάλογα με τη συγκέντρωση του αναλύτη, αν η ευαισθησία της μεθόδου τροποποιηθεί (Fernández-Fígares I., et al, 2004). Ως αποτέλεσμα η ακρίβεια των αποτελεσμάτων μειώνεται από την επίδραση της μήτρας, καθώς επηρεάζεται η πιστότητα. Η ανίχνευση σταθερών και αναλογικών συστηματικών σφαλμάτων έχουν μελετηθεί εκτενώς από τον Cardone (Cardone M.J., 1983) και έχει προταθεί ένα στατιστικό πρωτόκολλο για τη διόρθωσή τους. Αυτό δεν συμβαίνει στο Σχήμα 1.3., για παράδειγμα, όπου παρουσιάζονται οι καμπύλες βαθμονόμησης της αναλυόμενης ουσίας στη μήτρα του δείγματος και στη μήτρα του προτύπου. Σε αυτό το παράδειγμα, μια καμπύλη βαθμονόμησης που προκύπτει από εξωτερικά πρότυπα οδηγεί σε προσδιορισμένο σφάλμα. Εάν αναμένουμε ότι η επίδραση της μήτρας είναι σημαντική, τότε προσπαθούμε να ταιριάξουμε τη μήτρα του προτύπου με εκείνη του δείγματος. Αυτό είναι γνωστό ως αντιστοίχιση μήτρας. Εάν η μήτρα του δείγματος παραμένει άγνωστη, τότε πρέπει να δείξουμε ότι η επίδραση της μήτρας είναι αμελητέα ή να χρησιμοποιήσουμε μια εναλλακτική μέθοδο βαθμονόμησης.



Σχήμα 1.3. Καμπύλες βαθμονόμησης ενός αναλύτη στη μήτρα του προτύπου και στη μήτρα του δείγματος. Εάν η μήτρα επηρεάζει την τιμή του k_A , όπως συμβαίνει εδώ, τότε εισάγουμε ένα προσδιορισμένο σφάλμα στην ανάλυσή μας.

1.4.2 Μέθοδος εσωτερικών προτύπων

Στην μέθοδο εξωτερικής βαθμονόμησης, τα δείγματα και τα πρότυπα αντιμετωπίζονται με τον ίδιο τρόπο. Όταν αυτό δεν είναι δυνατό, μειώνεται η ακρίβεια και η πιστότητα της βαθμονόμησης. Για παράδειγμα, αν ο αναλύτης περιέχεται σε πτητικό διαλύτη, τότε η συγκέντρωση του αυξάνεται, λόγω απώλειας του διαλύτη κατά την εξάτμιση. Υποθέτοντας ότι έχουμε ένα δείγμα και ένα πρότυπο με ίδιες συγκεντρώσεις αναλύτη και πανομοιότυπα σήματα, οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις της αναλυόμενης ουσίας και των σημάτων τους συνεχίζουν να είναι πανομοιότυπες, εάν και τα δύο έχουν την ίδια αναλογική απώλεια διαλύτη. Στην πραγματικότητα, μπορούμε να αγνοήσουμε την εξάτμιση αν τα δείγματα και τα πρότυπα αντιμετωπίζουν ισοδύναμη απώλεια διαλύτη. Εάν όμως το πρότυπο και το δείγμα χάνουν διαφορετικές ποσότητες διαλύτη, τότε οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις και τα σήματα τους δεν θα είναι πλέον ίσα. Σε αυτή την περίπτωση δεν είναι δυνατή η μέθοδος εξωτερικής βαθμονόμησης.

Μια βαθμονόμηση, πραγματοποιείται επίσης αν αντιστοιχίσουμε το σήμα του αναλύτη, με το σήμα ενός άλλου είδους που προστίθεται στα δείγματα και στα πρότυπα. Τα είδη που προστίθενται ονομάζονται εσωτερικά πρότυπα και είναι διαφορετικά από τον αναλύτη.

Επειδή ο αναλύτης και το εσωτερικό πρότυπο σε οποιοδήποτε δείγμα ή πρότυπο λαμβάνουν την ίδια επεξεργασία, ο λόγος των σημάτων τους δεν επηρεάζεται από οποιαδήποτε έλλειψη αναπαραγωγιμότητας στη διαδικασία. Εάν σε ένα διάλυμα περιέχεται ένας αναλύτης συγκέντρωσης C_A και ένα εσωτερικό πρότυπο συγκέντρωσης C_{IS} , τότε τα σήματα που οφείλονται στον αναλύτη S_A και στο εσωτερικό πρότυπο S_{IS} , είναι:

$$S_A = k_A C_A \quad (7)$$

$$S_{IS} = k_{IS} C_{IS} \quad (8)$$

,όπου k_A και k_{IS} είναι η ευαισθησία του αναλύτη και του εσωτερικού προτύπου αντίστοιχα. Ο λόγος των δύο σημάτων παρέχει τη θεμελιώδη εξίσωση για μια εσωτερική βαθμονόμηση.

$$\frac{S_A}{S_{IS}} = \frac{k_A C_A}{k_{IS} C_{IS}} = K \times \frac{C_A}{C_{IS}} \quad (9)$$

Το K είναι ο λόγος της ευαισθησίας του αναλύτη k_A και του εσωτερικού προτύπου k_{IS} και δεν είναι απαραίτητο να καθοριστούν ανεξάρτητα οι τιμές τους.

1.4.2.1 Μέθοδος ενός εσωτερικού προτύπου

Σε μια εσωτερική βαθμονόμηση ενός σημείου, προετοιμάζεται ένα πρότυπο που περιέχει τον αναλύτη και το εσωτερικό πρότυπο και χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό της τιμής του K στην εξίσωση (9).

$$K = \left(\frac{C_{IS}}{C_A} \right)_{std} \times \left(\frac{S_A}{S_{IS}} \right)_{std} \quad (10)$$

Με την βαθμονόμηση της μεθόδου, η συγκέντρωση του αναλύτη δίνεται από τη παρακάτω εξίσωση:

$$C_A = \frac{C_{IS}}{K} \times \left(\frac{S_A}{S_{IS}} \right)_{\text{samp}} \quad (11)$$

1.4.2.2 Μέθοδος πολλαπλών εσωτερικών σημείων

Η βαθμονόμηση ενός εσωτερικού σημείου έχει τους ίδιους περιορισμούς με την κανονική βαθμονόμηση ενός σημείου. Για να κατασκευαστεί μια καμπύλη βαθμονόμησης εσωτερικού προτύπου, ετοιμάζουμε μια σειρά προτύπων, που το καθένα περιέχει την ίδια συγκέντρωση εσωτερικού προτύπου και διαφορετικές συγκεντρώσεις αναλύμενης ουσίας. Υπό τις συνθήκες αυτές, η καμπύλη βαθμονόμησης $(S_A / S_{IS})_{\text{std}}$ συναρτήσει C_A είναι γραμμική με κλίση K / C_{IS} .

Σε ορισμένες περιπτώσεις δεν είναι δυνατή η προετοιμασία των προτύπων έτσι ώστε το καθένα να περιέχει την ίδια συγκέντρωση εσωτερικού προτύπου. Αυτό συμβαίνει, για παράδειγμα, κατά την προετοιμασία των δειγμάτων κατά μάζα αντί του όγκου. Ωστόσο, μπορούμε να σχεδιάσουμε μια καμπύλη βαθμονόμησης, $(S_A / S_{IS})_{\text{std}}$ συναρτήσει C_A / C_{IS} , δίνοντας γραμμική καμπύλη βαθμονόμησης με κλίση K .

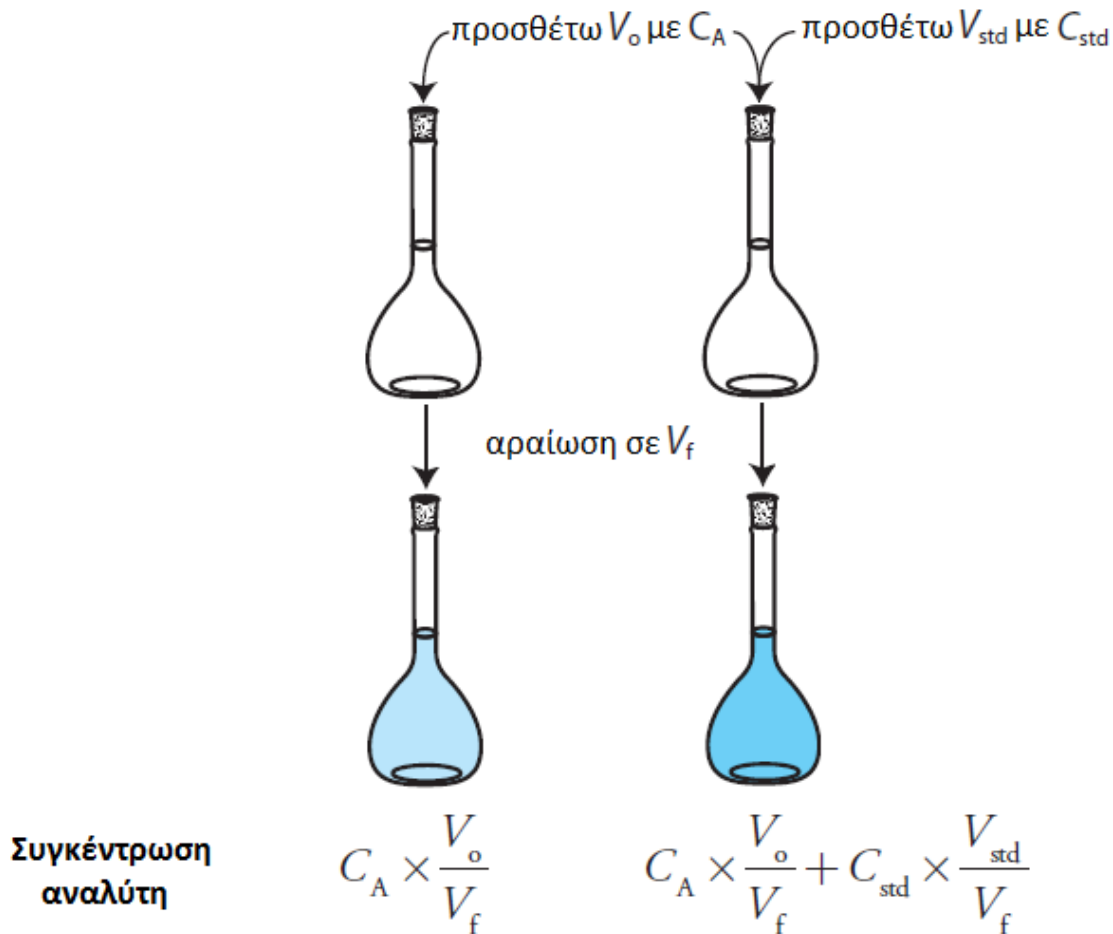
1.4.3 Μέθοδος σταθερής προσθήκης

Στη μέθοδο σταθερής προσθήκης παρακάμπτεται η επιπλοκή κατά την αντιστοίχιση της μήτρας των προτύπων με τη μήτρα του δείγματος.

1.4.3.1 Μέθοδος απλής προσθήκης

Η απλούστερη εκδοχή της μεθόδου σταθερής προσθήκης παρουσιάζεται στο Σχήμα 1.4. Αρχικά, προσθέτουμε ένα τμήμα του δείγματος, V_o σε ογκομετρική φιάλη, αραιώνουμε σε τελικό όγκο, V_f και καταγράφεται το σήμα του, S_{samp} . Στη συνέχεια, προστίθεται ένα

δεύτερο όμοιο τμήμα δείγματος σε ισοδύναμη ογκομετρική φιάλη, καθώς και πολυ μικρή ποσότητα, V_{std} , ενός εξωτερικού προτύπου η συγκέντρωση του οποίου είναι C_{std} . Αφού αραιωθεί το αιωρούμενο δείγμα στον ίδιο τελικό όγκο, μετράται το σήμα του, S_{spike} . Οι ακόλουθες δύο εξισώσεις αφορούν το S_{samp} και το S_{spike} στη συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας, C_A , στο αρχικό δείγμα.



Σχήμα 1.4. Η ογκομετρική φιάλη στα αριστερά περιέχει ένα τμήμα του δείγματος, V_o και η ογκομετρική φιάλη στα δεξιά περιέχει ένα πανομοιότυπο τμήμα του δείγματος και πολύ μικρή ποσότητα V_{std} πρότυπου διαλύματος της αναλυόμενης ουσίας. Και οι δύο φιάλες αραιώνονται στον ίδιο τελικό όγκο, V_f . Η συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας σε κάθε φιάλη παρουσιάζεται στο κάτω μέρος του σχήματος όπου η C_A είναι η συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας στο αρχικό δείγμα και C_{std} είναι η συγκέντρωση αναλυόμενης ουσίας στο εξωτερικό πρότυπο.

$$S_{\text{samp}} = k_A C_A \frac{V_o}{V_f} \quad (12)$$

$$S_{\text{spike}} = k_A \left(C_A \frac{V_o}{V_f} + C_{\text{std}} \frac{V_{\text{std}}}{V_f} \right) \quad (13)$$

Όταν ο όγκος, V_{std} είναι μικρός σε σχέση με τον όγκο, V_o , η επίδραση της μήτρας του προτύπου στη μήτρα του δείγματος είναι αμελητέα. Υπό αυτές τις συνθήκες η τιμή του k_A είναι ίδια στις εξισώσεις 12 και 13. Με αυτόν τον τρόπο, προκύπτει η παρακάτω εξίσωση:

$$\frac{S_{\text{samp}}}{C_A \frac{V_o}{V_f}} = \frac{S_{\text{spike}}}{C_A \frac{V_o}{V_f} + C_{\text{std}} \frac{V_{\text{std}}}{V_f}} \quad (14)$$

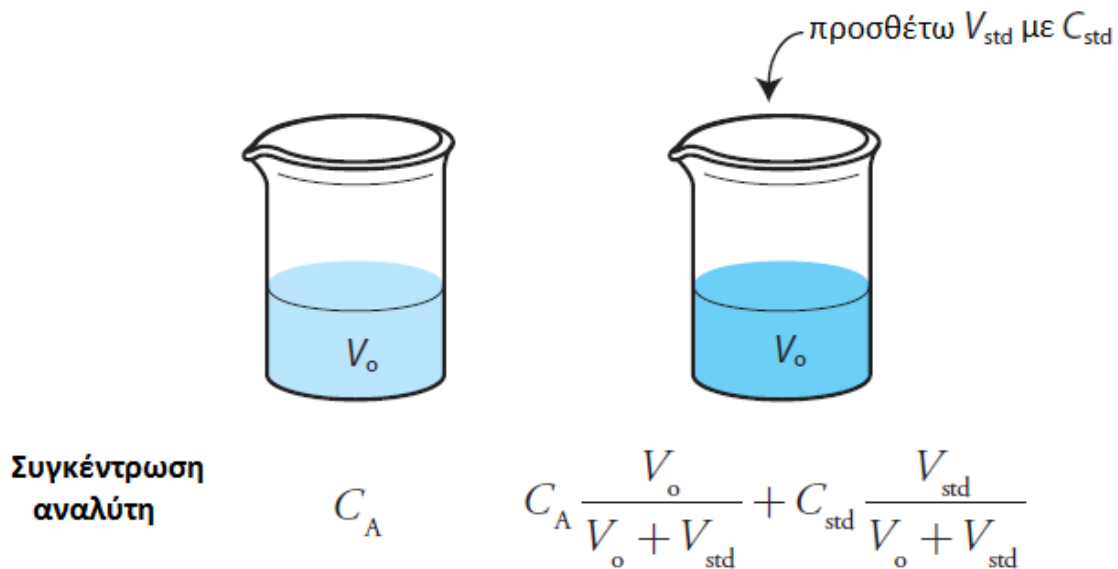
Από την παραπάνω εξίσωση, υπολογίζεται η συγκέντρωση C_A της αναλυόμενης ουσίας στο πρωτότυπο δείγμα.

Σε μια άλλη εκδοχή, πραγματοποιείται απευθείας προσθήκη στο δείγμα, μετρώντας το σήμα τόσο πριν όσο και μετά την προσθήκη της πολύ μικρής ποσότητας, όπως παρουσιάζεται στο σχήμα 1.5. Σε αυτή την περίπτωση, ο τελικός όγκος μετά την προσθήκη είναι $V_o + V_{\text{std}}$ και οι εξισώσεις 12, 13 και 14 μετατρέπονται ως εξής:

$$S_{\text{samp}} = k_A C_A$$

$$S_{\text{spike}} = k_A \left(C_A \frac{V_o}{V_o + V_{\text{std}}} + C_{\text{std}} \frac{V_{\text{std}}}{V_o + V_{\text{std}}} \right) \quad (15)$$

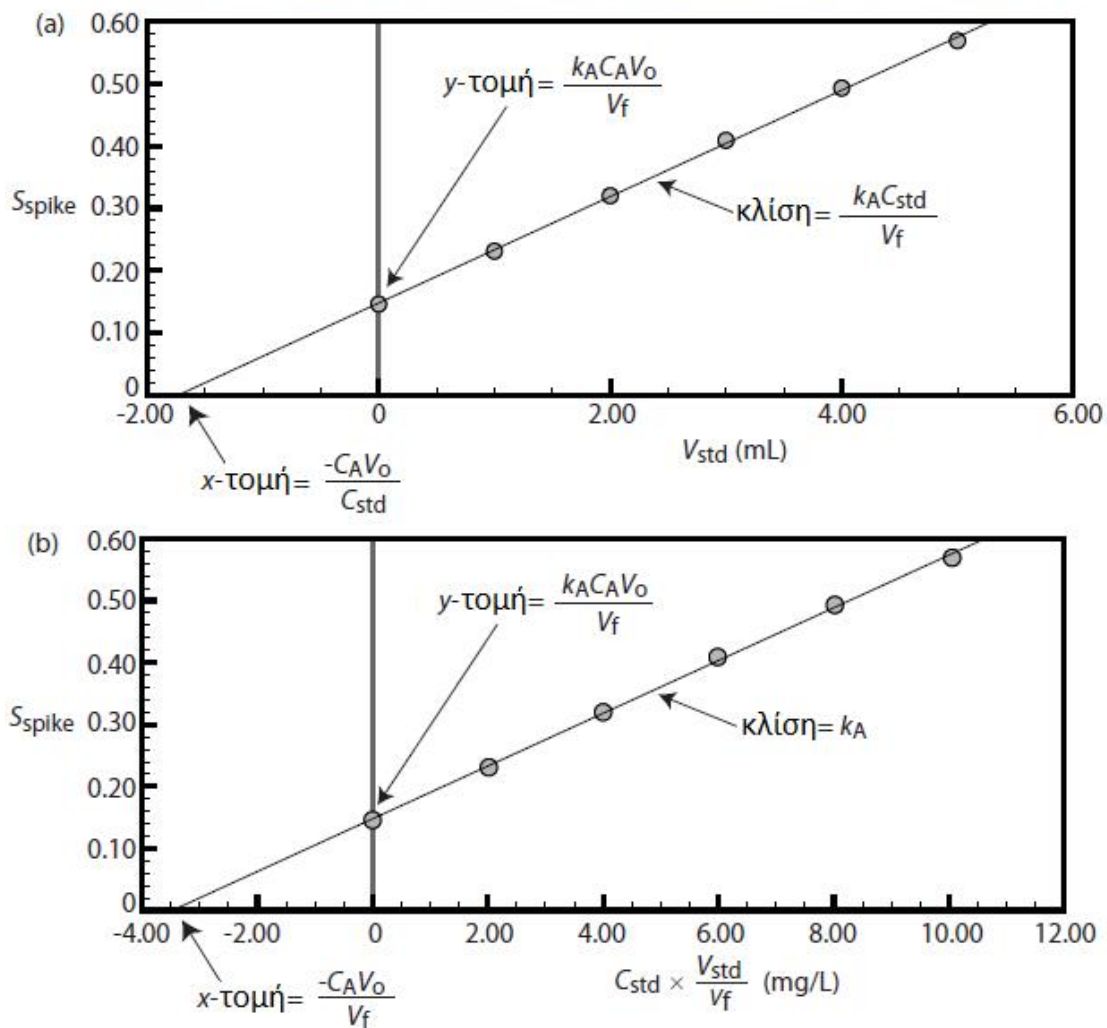
$$\frac{S_{\text{samp}}}{C_A} = \frac{S_{\text{spike}}}{C_A \frac{V_o}{V_o + V_{\text{std}}} + C_{\text{std}} \frac{V_{\text{std}}}{V_o + V_{\text{std}}}} \quad (16)$$



Σχήμα 1.5: Στο σχήμα παρουσιάζεται μια εναλλακτική μορφή της μεθόδου σταθερής προσθήκης. Σε αυτή την περίπτωση προσθίθεται πολύ μικρή ποσότητα του εξωτερικού προτύπου απευθείας στο δείγμα, χωρίς περαιτέρω ρύθμιση του όγκου.

1.4.3.2 Μέθοδος πολλαπλής προσθήκης

Στη μέθοδο σταθερής προσθήκης πολλαπλών σημείων, προετοιμάζεται μια σειρά δειγμάτων που περιέχουν αυξανόμενες ποσότητες του εξωτερικού προτύπου. Στο σχήμα 1.6. παρουσιάζονται δύο πιθανοί τρόποι σχεδίασης μιας τυπικής καμπύλης βαθμονόμησης, με βάση την εξίσωση (13). Στο σχήμα 1.6a, παρουσιάζεται η συνάρτηση S_{spike} , έναντι του πολύ μικρού όγκου που προστίθεται, V_{std} . Αν η k_A είναι σταθερή, τότε η καμπύλη βαθμονόμησης είναι ευθεία. Από την καμπύλη διαπιστώνεται ότι το σημείο τομής στον άξονα x είναι ίσο με $-C_A V_o / C_{std}$.



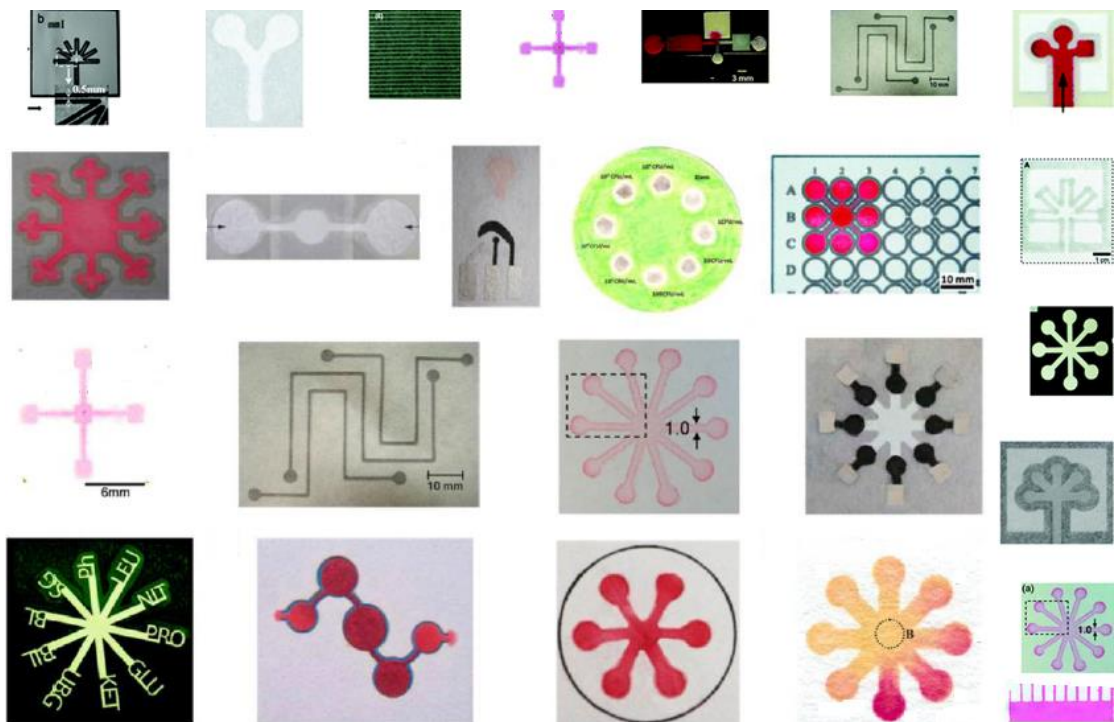
Σχήμα 1.6: Στο πάνω μέρος εμφανίζεται ένα σύνολο έξι προτύπων για τον προσδιορισμό του Mn^{2+} . Η φιάλη στα αριστερά είναι ένα δείγμα 25.00 mL αραιωμένο στα 50.00 mL. Οι υπόλοιπες φιάλες περιέχουν 25.00 mL δείγματος και, από αριστερά προς τα δεξιά, 1.00, 2.00, 3.00, 4.00 και 5.00 mL από ένα εξωτερικό πρότυπο 100.6 mg / L Mn^{2+} . Παρακάτω εμφανίζονται δύο τρόποι σχεδίασης της καμπύλης βαθμονόμησης στη μέθοδο προσθήκης. Στη μέθοδο πολλαπλής προσθήκης, οι συγκεντρώσεις του αναλύτη υπολογίζονται από την

τομή στον άξονα x , καθώς ο όγκος του αρχικού δείγματος, V_0 και η συγκέντρωση του εξωτερικού προτύπου, C_{std} είναι γνωστά.

Στη μέθοδο σταθερής προσθήκης κατασκευάζεται μία καμπύλη βαθμονόμησης στο δείγμα, επομένως η εξίσωση βαθμονόμησης δεν χρησιμοποιείται για άλλα δείγματα. Για κάθε δείγμα κατασκευάζεται ξεχωριστή καμπύλη βαθμονόμησης. Αυτό αποτελεί σοβαρό μειονέκτημα της μεθόδου κατά την ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΑΣΜΕΝΕΣ ΑΠΟ ΧΑΡΤΙ



2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

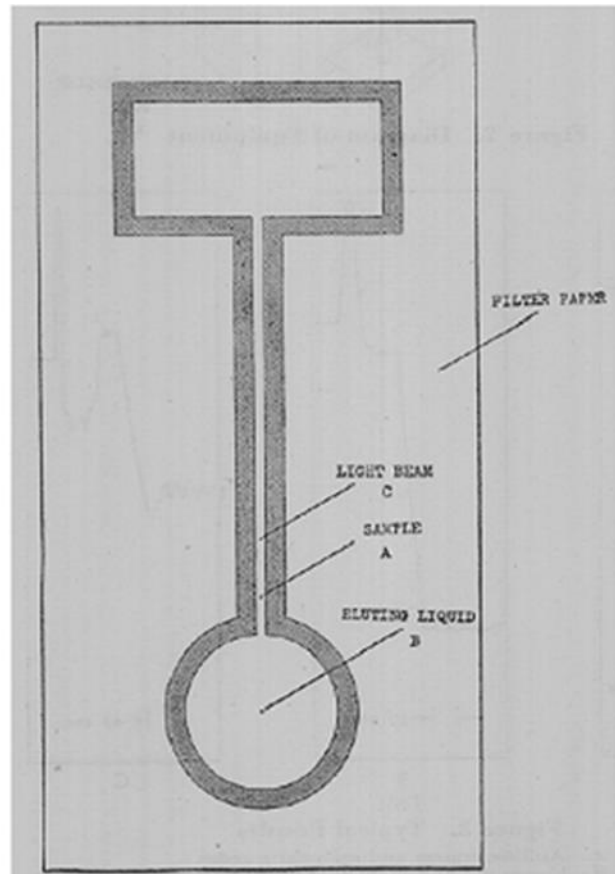
Οι αναλυτικές συσκευές μικρορευστομηχανικής που βασίζονται στο χαρτί (μPAD), έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας τα τελευταία χρόνια και βρίσκουν ποικίλες εφαρμογές όπως στην ποιοτική ανάλυση των τροφίμων και στους τομείς της υγείας και του περιβάλλοντος. Το χαρτί αποτελεί ιδανικό υπόστρωμα για διάφορα συστήματα ανάλυσης και συστήματα μικρορευστομηχανικής για τους ακόλουθους λόγους (Li X., *et al*, 2012):

- ❖ Αποτελεί φθηνό υλικό
- ❖ Είναι συμβατό με πολλές χημικές, βιοχημικές και ιατρικές εφαρμογές.
- ❖ Μπορεί να μεταφέρει υγρά χρησιμοποιώντας τριχοειδής δυνάμεις, χωρίς να δέχεται εξωτερικές δυνάμεις.
- ❖ Έχει μεγάλη ειδική επιφάνεια
- ❖ Μπορεί να αποθηκεύει αντιδραστήρια σε ενεργή μορφή στα δίκτυα των ινών κυτταρίνης

Οι μέθοδοι ανάλυσης που βασίζονται στο χαρτί, προσελκύουν το ερευνητικό ενδιαφέρον, λόγω του χαμηλού κόστους, της ευκολίας λειτουργίας τους και της ικανότητάς τους να λειτουργούν χωρίς εξωτερική ισχύ ή υποστηρικτικό εξοπλισμό (Jokerst J.C., *et al*, 2012).

2.2 ΚΟΙΝΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ ΓΙΑ ΤΗ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΔΙΑΤΑΞΕΩΝ ΧΑΡΤΟΥ

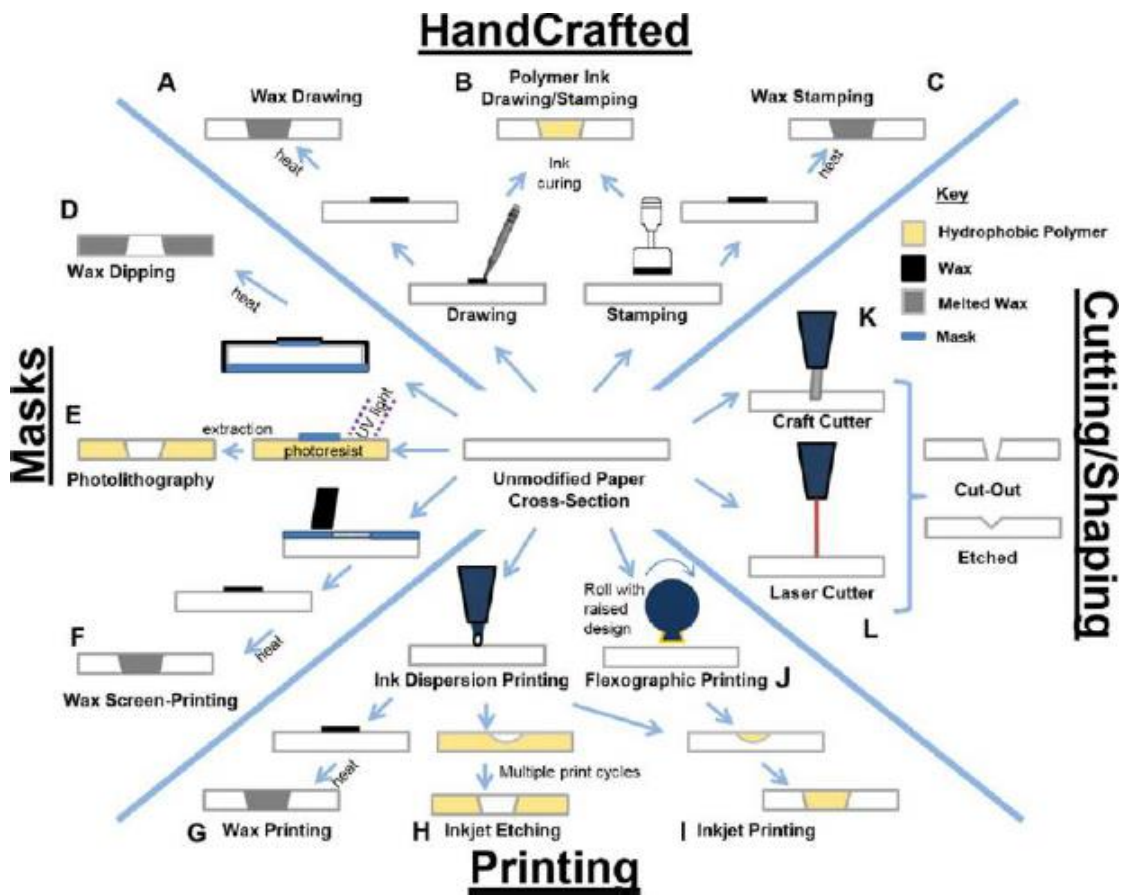
Η πρώτη μελέτη κατασκευής χαρτιού για χρήση σε αναλύσεις παρουσιάστηκε το 1949 από τον Muller και τους συνεργάτες του, οι οποίοι μελέτησαν την εκλεκτική έκλυση ενός μίγματος χρωστικών πάνω σε κανάλι ροής τοποθετημένο σε χαρτί. Δημιούργησαν χαρτί διήθησης εμποτίζοντάς το σε παραφίνη και παρατήρησαν ότι το σχηματιζόμενο κανάλι επισπεύδει τη διαδικασία διάχυσης του δείγματος και μειώνει την κατανάλωση του. Αυτό το χαρτί παραφίνης μπορεί να θεωρηθεί ως η βάση για την ανάπτυξη της περαιτέρω τεχνολογίας (Σχήμα 2.1).



Σχήμα 2.1: Μέθοδος παρασκευής εμποτισμού με παραφίνη (Muller, 1949)

Παρακάτω αναφέρονται κοινές μέθοδοι κατασκευής βασιζόμενες, είτε στη δημιουργία εμποδίων μέσα στο ίδιο το χαρτί είτε στην επιλεκτική κοπή ή και αφαίρεση του χαρτιού με σκοπό να δημιουργηθούν πολυλειτουργικά μPADs (microfluidic paper based analytical devices, αναλυτικές διατάξεις χάρτου) (σχήμα 2.2). Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στη μέθοδο στην οποία χρησιμοποιείται κερί, το οποίο είναι υδρόφοβο και αποτελεί σημαντικό εργαλείο στα μPADs. Οι πιο γνωστές μέθοδοι με σκοπό τη δημιουργία πολυλειτουργικών μPADs είναι οι εξής:

- ❖ Εκτύπωση με μελάνι
- ❖ Φωτολιθογραφία
- ❖ Χημική τροποποίηση του χαρτιού
- ❖ Τρισδιάστατες συσκευές
- ❖ Στεγανοποίηση και πακετάρισμα
- ❖ Κοπή και διάπλωση / διαμόρφωση χαρτιού
- ❖ Κερί απομίμησης



Σχήμα 2.2: Σχέδια κατασκευής για τη δημιουργία μPADs

Η βασική αρχή που διέπει όλες τις μεθόδους παρασκευής είναι η δημιουργία υδρόφοβων εμποδίων, με σκοπό τη δημιουργία μικρο-καναλιών ελεγχόμενης μεταφοράς υγρού στο χαρτί. Οι αρχές σχεδίασης των τεχνικών παρασκευής των χαρτιών βασίζονται: στο μπλοκάρισμα των πόρων του χαρτιού, στη φυσικοχημική απόθεση υδρόφοβων αντιδραστηρίων πάνω στην κυτταρίνη και στη χημική διαμόρφωση των ινώδων επιφανειών. Εξάιρεση αποτελεί η μέθοδος κοπής, στην οποία το χαρτί δημιουργείται με ηλεκτρονικά ελεγχόμενο κοπίδι και το κομμένο χαρτί περιβάλλεται περιμετρικά με ταινία, ώστε να μονωθεί και να αποκτήσει το τελικό του σχήμα.

2.2.1 Κοπή και διάπλαση χαρτιού

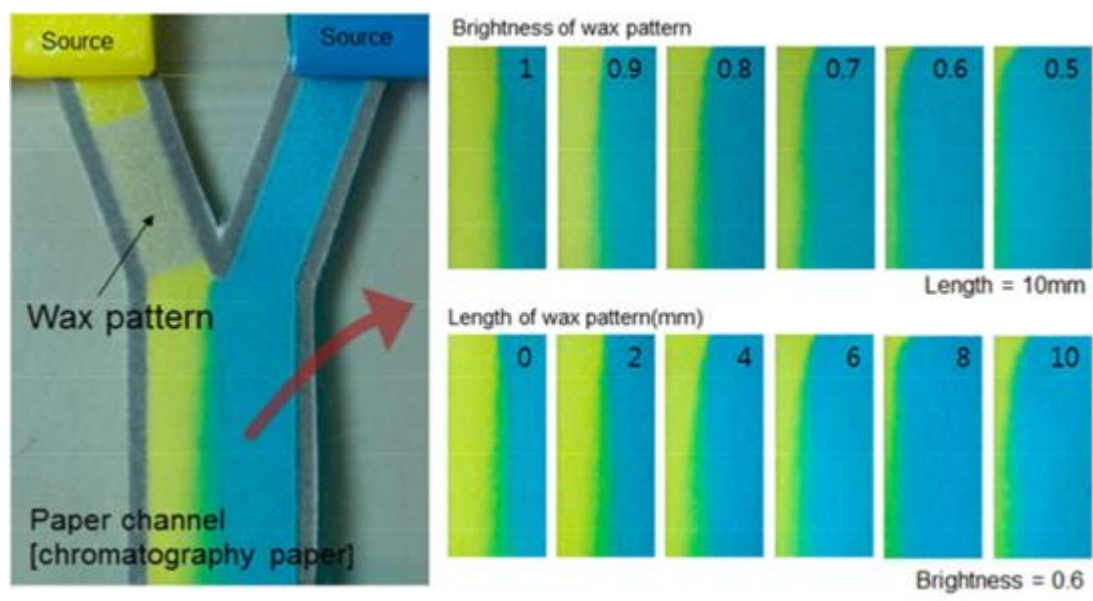
Η κοπή του χαρτιού για την κατασκευή μικρορευστονικών αναλυτικών διατάξεων χαρτιού αποτελεί την πιο απλή μέθοδο κατασκευής. Δύο πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι ότι δεν χρειάζονται χημικές ουσίες για τον καθορισμό των ορίων της συσκευής και ο εξοπλισμός είναι γενικά ευρέως διαθέσιμος και χαμηλού κόστους. Ωστόσο, αυτές οι συσκευές μειονεκτούν λόγω χαμηλής μηχανικής σταθερότητας, ενώ στηρίζονται σε στερεά υποστρώματα αυξάνοντας το κόστος (Cassano C.L., Fan Z.H., 2013). Εκτός από τη χρήση λεπίδων χειρός για τη δημιουργία συσκευών, (Renault C., et al., 2013) έχουν χρησιμοποιηθεί επίσης, κοπίδια (Fenton E.M., et al, 2008) και λέιζερ CO₂ (Fu E., et al, 2010), για τη βελτίωση της ακρίβειας, της ταχύτητας και του όγκου παραγωγής.

Η χρήση κοπιδίων βασίζεται στην χρήση λεπίδων, που κόβουν το χαρτί. Οι λεπίδες είναι ικανές να κόψουν σε διαφορετικές πιέσεις και γωνίες ανάλογα με την εφαρμογή (Fenton E.M., et al 2008). Ένα μειονέκτημα αυτής της μεθόδου προκύπτει από την ίδια τη δράση της κοπής που μπορεί να προκαλέσει στρέβλωση ή σχίσιμο. Ωστόσο, μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολλαπλά περάσματα σε χαμηλότερες δυνάμεις κοπής για μείωση της ζημιάς. Η προσθήκη ενός πιο ανθεκτικού υποστρώματος στο χαρτί μπορεί, επίσης, να μειώσει τη ζημιά. Ο Fenton δημιούργησε τα μPADs με κοπή νιτροκυτταρίνης, αλλά επειδή είναι πολύ λεπτή και σχίζεται εύκολα απαιτήθηκε υποστήριξη από πολυεστέρα (Fenton E.M., et al 2008).

Επιπλέον, στην κατασκευή μPADs έχουν χρησιμοποιηθεί μηχανές κοπής λέιζερ (Nie J., et al, 2013 : Evans E., et al, 2014 : Spicar-Mihalic P., et al, 2013). Αυτή η τεχνική είναι παρόμοια με τη χρήση λεπίδων, αλλά έχει το πλεονέκτημα ότι είναι σε θέση να κόψει κατευθείαν το υλικό με ένα πέρασμα χωρίς να χρειάζεται υποστήριξη για παροχή σταθερότητας. Το κύριο μειονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι το κόστος του κόπτη λέιζερ (450\$ - 8000\$) σε σχέση με το κοπίδι (65\$ - 400\$). Ένα πλεονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι ότι δεν απαιτείται το πρόσθετο βήμα απομάκρυνσης των αχρησιμοποίητων, περίσσειων υλικών.

2.2.2 Κερί

Τα πρώτα μPADs κατασκευάστηκαν, χρησιμοποιώντας φωτοευαίσθητα υλικά για τον καθορισμό των ορίων της ροής (Consdan R., et al, 1944). Ωστόσο, το κόστος του φωτοευαίσθητου υλικού αποτελεί αποτρεπτικό παράγοντα χρήσης της μεθόδου (Martinez A.W., et al, 2007 : Dungchai W., et al, 2011). Οι περιορισμοί των μεθόδων με φωτοευαίσθητα υλικά οδήγησαν στην ανάπτυξη χαμηλού κόστους μεθόδων κατασκευής, με αποτέλεσμα τη χρήση του κεριού και παρόμοιων υλικών αντί του φωτοευαίσθητου υλικού. Η δημιουργία εμποδίων αποτελούμενα από κερί, παρέχει μια εύκολα προσβάσιμη τεχνολογία κατασκευής χρησιμοποιώντας σχετικά αδρανή υλικά που διευκολύνουν τη ροή του ρευστού (Carrilho E., et al, 2009). Το κερί, ειδικότερα, μπορεί να εφαρμοστεί σε χαρτί χρησιμοποιώντας μια ποικιλία τεχνικών. Λιώνει εύκολα μέσα στο χάρτινο υπόστρωμα και δημιουργείται το τρισδιάστατο φράγμα (σχήμα 2.3).



Σχήμα 2.3: Μέθοδος εκτύπωσης με κερί για τον έλεγχο του ρυθμού ροής σε μια μικρορευστονική συσκευή που βασίζεται στο χαρτί μέσω της αλλαγής της διαπερατότητας του χαρτιού.

Μια χαμηλού κόστους εναλλακτική λύση χρησιμοποιώντας κερί για εμφάνιση αναφέρθηκε από τον Songjaroen (Songjaroen T., et al, 2011 : Noiphung J., et al, 2013). Σε αυτή τη μέθοδο, μια μεταλλική μάσκα κάλυψε τις ζώνες που έπρεπε να παραμείνουν

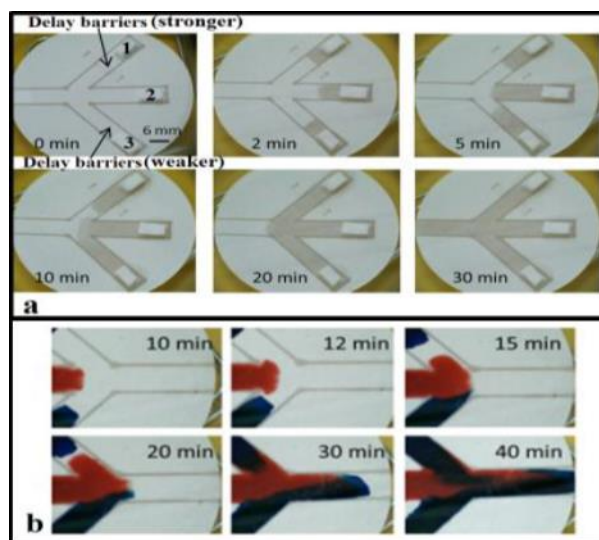
υδρόφιλες και το σύστημα εμβαπτίστηκε σε λιωμένο κερί. Οι μεταλλικές μάσκες κρατήθηκαν στη θέση τους με ένα μαγνήτη.

Ενώ οι προαναφερθείσες μέθοδοι είναι ελκυστικές, στην πιο κοινή μέθοδο κατασκευής, χρησιμοποιείται ένας εμπορικά διαθέσιμος εκτυπωτής γραφείου που περιέχει μελάνι με βάση το κερί (Carrilho E., et al, 2009 : Lu Y., et al, 2009). Ο χρήστης δεν περιορίζεται στο να δημιουργήσει μια νέα μάσκα για διαφορετικά σχέδια κατασκευής, αλλά έχει την ελευθερία να εφαρμόσει εύκολα αλλαγές στο σχεδιασμό και μπορεί να εκτυπώσει συσκευές μέσα σε λίγα δευτερόλεπτα. Μετά την εκτύπωση, οι σελίδες που έχουν εκτυπωθεί με κερί, θερμαίνονται ώστε να λιώσει το κερί μέσα στο χαρτί. Η επιτυχία εκτύπωσης με κερί έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη μεθόδων κατασκευής που επιτρέπουν τη δημιουργία των ημικαι πλήρως κλειστών καναλιών μέσα στο χαρτί (Renault C., et al, 2014 : Li X. and Liu X., 2014). Ανάλογα με τον τρόπο που επιλέγεται για εκτύπωση, μπορούν να δημιουργηθούν διαφορετικά μεγέθη καναλιών (Li X., Liu X., 2014). Η τρισδιάστατη εκτύπωση με κερί επέτρεψε τον καλύτερο έλεγχο της ροής μέσα στο χαρτί, καθώς και μια απλοποιημένη γενιά τρισδιάστατων συσκευών.

Οι τεχνικές εκτύπωσης διερευνήθηκαν περαιτέρω από τον Lu (2009), ο οποίος ανέπτυξε διάφορες τεχνικές για να κατασκευάσει μPADs χρησιμοποιώντας κερί. Η απλούστερη από τις τεχνικές είναι αυτή που περιλαμβάνει την άντληση ενός μοτίβου πάνω σε αμφότερες τις πλευρές ενός υποστρώματος διηθητικού χαρτιού χρησιμοποιώντας ένα κραγιόνι κεριού και θερμαίνοντας το χαρτί σε έναν κλίβανο, ώστε το κερί να λιώσει μέσα στο υπόστρωμα. Αυτή η μέθοδος είναι κατάλληλη για χρήση σε περιβάλλον με εξαιρετικά περιορισμένους πόρους, αλλά παράγει υδρόφοβα κανάλια χαμηλής ανάλυσης.

Η ομάδα του Prof.G. Whitesides, εισήγαγε έναν νέο τρόπο κατασκευής μPADs που επιτυγχάνεται με τον ορισμό των μικροδιαύλων πάνω σε υδρόφιλο χαρτί μέσω σχηματοποίησης με υδρόφοβα πολυμερή, φωτοευαίσθητο υλικό ή κερί. Σε αυτό το έργο έχει βελτιστοποιηθεί ο σχεδιασμός των μικρο-ρευστονικών δικτύων και οι αντίστοιχες διαδικασίες σχηματοποίησης χαρτιού χρησιμοποιώντας την τεχνολογία εκτύπωσης κεριού. Σε αυτή την προσέγγιση χρησιμοποιείται ένας στερεός εκτυπωτής μελάνης, στον οποίο η μελάνη παρέχεται ως στερεό κερί που τήκεται πριν εκτιναχθεί από την κεφαλή εκτύπωσης και στερεοποιείται αμέσως στην επιφάνεια του χαρτιού. Πρόκειται για μια καινοτόμο, βραβευμένη τεχνολογία έγχρωμης εκτύπωσης διαθέσιμη μόνο από τη Xerox. Η τεχνολογία αυτή δημιουργεί μέχρι και 90% λιγότερα απόβλητα εκτύπωσης από τους εκτυπωτές λείζερ,

επειδή δεν υπάρχουν φυσίγγια να διαθέσει και έχει λιγότερα υλικά συσκευασίας. Η στερεά μελάνη παρασκευάζεται από ένα μη τοξικό πολυμερές με βάση τη ρητίνη και είναι ασφαλής στο χειρισμό. Σύμφωνα με τα δελτία δεδομένων ασφαλείας προϊόντος (Safety Data Sheet), τα στερεά μελάνια αποτελούνται από μίγμα κεριών πολυαιθυλενίου και λιπαρών αμίδιων (50-70%), ρητίνες (10-20%) και χρωστικές (<5%) (Xerox, Solid Ink SDS, 2014). Τήκεται στους 80° C, όντας κατάλληλη για πιεζοηλεκτρική εκτύπωση. Το τυπωμένο χαρτί υποβάλλεται σε θερμική επεξεργασία (140°C, 2 λεπτά), επιτρέποντας το κερί να διαχυθεί κατακόρυφα διαμέσου του πορώδους χαρτιού, δημιουργώντας υδρόφοβα εμπόδια που καθορίζουν υδρόφιλα κανάλια και ζώνες αντίδρασης.

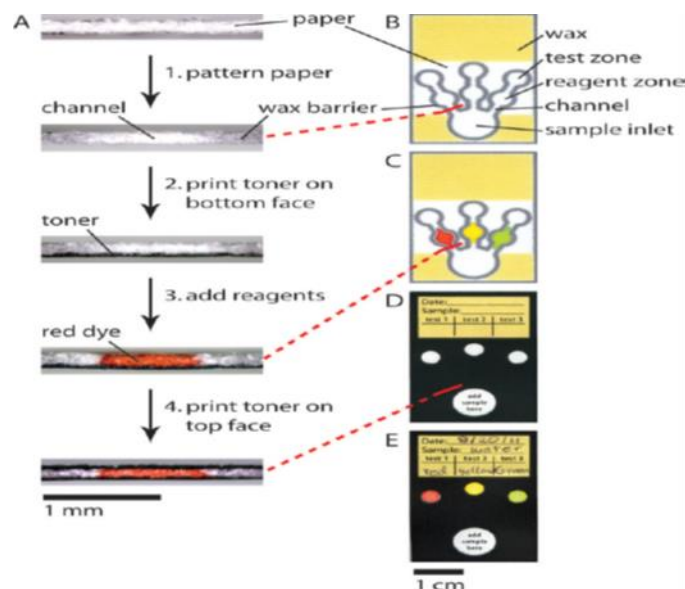


Σχήμα 2.4: Συσκευή 2D πολλαπλών καναλιών ρευστού που χρησιμοποιείται για την διαδοχική παράδοση τριών ρευστών.α) Άφιξη του BSA από κάθε κανάλι σε διαφορετικούς χρόνους.β) Άφιξη και ανάμειξη του μαύρου και του κόκκινου μελανιού από τρία ξεχωριστά κανάλια και η επακόλουθη ανάμειξή τους.

Στο παραπάνω σχήμα (2.4), υπάρχουν τρία πανομοιότυπα κανάλια (πλάτους 6 mm και μήκους 23 χιλιοστών), τροποποιημένα με διαφορετικά εμπόδια καθυστέρησης (1. Εμπόδια ισχυρής καθυστέρησης, 2. Χωρίς εμπόδια, 3. Εμπόδια ασθενέστερης καθυστέρησης).

2.2.3. Κατασκευή πλήρως κλειστών μPADs με χρήση γραφίτη

Πλήρως κλειστά microPADs κατασκευάστηκαν σε τέσσερα βήματα όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα (σχήμα 2.5) Το χαρτί χρωματογραφίας διαμορφώθηκε από εκτύπωση με κερί (Xiao J., et al, 2012). Στερεό μελάνι (κερί) τυπώθηκε σε χαρτί χρησιμοποιώντας έναν εκτυπωτή Xerox Phaser 8560 σε ποιότητα εκτύπωσης φωτογραφίας. Το χαρτί, στη συνέχεια, θερμάνθηκε για 15 λεπτά σε ένα φούρνο στους 138°C, για να λιώσει το στερεό μελάνι. Υπό αυτές τις συνθήκες, μια ευρεία τυπωμένη γραμμή 200μm είχε ως αποτέλεσμα ένα ευρύ εμπόδιο κεριού 1mm. Οι συσκευές ψύχθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και στη συνέχεια το πάνω μέρος των συσκευών επικαλύφθηκε με τέσσερα στρώματα γραφίτη χρησιμοποιώντας εκτυπωτή Samsung CLP-620ND που είχε ρυθμιστεί στην καλύτερη ποιότητα εκτύπωσης. Οι συσκευές αφέθηκαν να εξισορροπηθούν σε υγρασία περιβάλλοντος για τουλάχιστον 5 λεπτά ανάμεσα σε κάθε κύκλο εκτύπωσης. Τα αντιδραστήρια προστέθηκαν στις συσκευές και ξηράθηκαν σε συνθήκες περιβάλλοντος. Τελικά, τυπώθηκαν τέσσερα στρώματα γραφίτη στο πίσω μέρος των συσκευών.



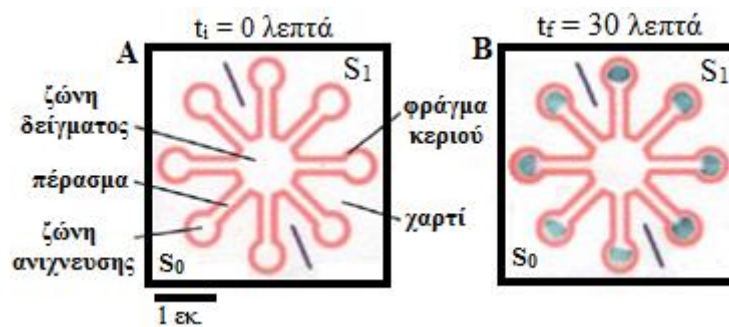
Σχήμα 2.5: Κατασκευή πλήρως κλειστών μPADs.

2.3. ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΣΕ ΜΙΚΡΟΡΕΥΣΤΟΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ ΧΑΡΤΟΥ

Οι συσκευές χαρτιού μπορούν να χρησιμοποιηθούν για προσδιορισμούς που παρέχουν είτε ποιοτικά είτε ποσοτικά αποτελέσματα, ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο σύστημα ανίχνευσης. Οι προσδιορισμοί που παρέχουν ποιοτικά αποτελέσματα (όπως για παράδειγμα αναλύσεις για την ανίχνευση βιολογικών δεικτών της ελονοσίας και του δάγκειου πυρετού (Toley B.J., et al, 2013 : Deraney R.N., et al, 2016), βασίζονται στην ανάπτυξη ενός έγχρωμου προϊόντος που μπορεί εύκολα να παρατηρηθεί ακόμα και δια γυμνού οφθαλμού. Για την λήψη ποσοτικών αποτελεσμάτων όμως απαιτείται βαθμονόμηση, χρησιμοποιώντας συνήθως την μέθοδο της εξωτερικής βαθμονόμησης (Glavan A., et al, 2014 : Vella S.J., et al, 2012 : Jayawardane B.M., et al, 2014 : Lankelma J., et al, 2012 : Choleva T.G., et al, 2015 : Rattanarat P., et al, 2014 : Bhakta S.A., et al, 2014).

Όπως προαναφέρθηκε η εξωτερική βαθμονόμηση παρέχει αποτελέσματα υψηλής ποιότητας όταν χρησιμοποιείται για την ανάλυση δειγμάτων που δεν έχουν επιδράσεις μήτρας. Εν τούτοις, όταν στο δείγμα υπάρχουν επιδράσεις μήτρας, το αναλυτικό σήμα μπορεί να επηρεάζεται απρόβλεπτα από συστηματικά ή/και μη- συστηματικά σφάλματα. Αυτά τα σφάλματα μπορεί να είναι ανεξάρτητα από την παρουσία και την ποσότητα του αναλύτη ή ανάλογα με την ποσότητα του αναλύτη μεταβάλλοντας έτσι την ευαισθησία της μεθόδου (Ellison S.L.R. and Thompson M., 2008). Οι αναλύσεις που εκτελούνται σε συσκευές με βάση το χαρτί επηρεάζονται και από τα δυο είδη παρεμποδίσεων, γιατί: i) Οι αναλύσεις που βασίζονται στο χαρτί χρησιμοποιούν μετρήσεις με βάση την ανάκλαση που έχουν υψηλή μεταβλητότητα λόγω της πολυπλοκότητας του μήκους οπτικής διαδρομής του ανακλώμενου φωτός μέσα στο χαρτί (Ellerbe A.K., et al, 2009 : Evans E., et al, 2014). ii) Τα τυφλά δείγματα εμφανίζουν μεταβλητά σήματα υποβάθρου ακόμη και στην ίδια συσκευή χαρτιού (Swanson C., et al, 2015). iii) Η απόκριση ανιχνευτών που χρησιμοποιούνται συνήθως (π.χ. σαρωτές, ψηφιακές κάμερες κ.λπ.) είναι μη γραμμική (Christodouleas D.C., et al, 2015 : Morbioli G.G., et al, 2017). iv) Το αναλυτικό σήμα (δηλ. το χρώμα) δεν είναι ομοιόμορφα κατανομημένο εντός της ζώνης ανίχνευσης (Deegan R.D., et al, 1997). v) Οι περιβαλλοντικές συνθήκες (όπως υγρασία, θερμοκρασία και η ένταση φωτός του περιβάλλοντος) επηρεάζουν τα αποτελέσματα της ανάλυσης (Yetisen A.K., et al, 2013). Εξαιτίας των παραπάνω λόγων, η εξωτερική βαθμονόμηση μπορεί να μην είναι πάντοτε ακριβής για την ανάλυση πραγματικών δειγμάτων.

Η βαθμονόμηση σταθερής προσθήκης (σταθερή προσθήκη μονού σημείου ή πολλαπλών σημείων) είναι η πλέον κατάλληλη προσέγγιση για τον υπολογισμό των επιδράσεων της μήτρας. Πρόσφατα προτάθηκε η χρήση της βαθμονόμησης σταθερής προσθήκης ενός σημείου (σταθερή προσθήκη ενός σημείου) σε συσκευές με βάση το χαρτί (Wang W., et al, 2010). Συγκεκριμένα, κατασκευάστηκαν διακλαδισμένες διάταξεις χαρτιού και τα απαραίτητα χρωματομετρικά αντιδραστήρια αποθηκεύτηκαν στις περιοχές ανίχνευσης της συσκευής. Ένα πρότυπο διάλυμα του αναλύτη εναποτέθηκε σε μερικά από τα μικρορευστονικά κανάλια. Καθώς το δείγμα ρέει στα μικρορευστονικά κανάλια που περιέχουν το πρότυπο διάλυμα, γίνεται έκπλυση του πρότυπου διαλύματος και μεταφέρεται 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 συσκευή.

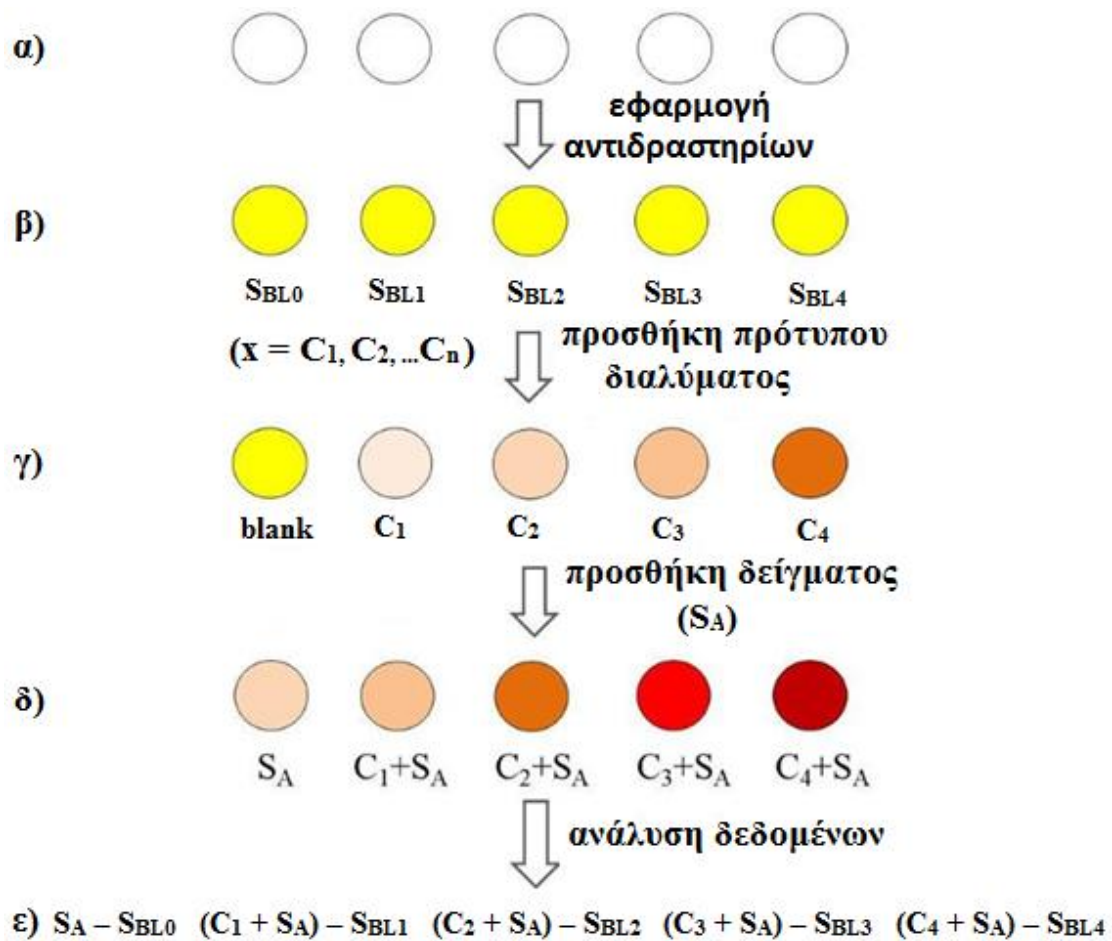


Σχήμα 2.6: Συσκευές σταθερής προσθήκης που βασίζονται στο χαρτί. Α) Συσκευή πριν την προσθήκη του δείγματος. Τα αντιδραστήρια για τον χρωματομετρικό προσδιορισμό της γλυκόζης, ξηραίνονται σε κάθε ζώνη ανίχνευσης. Το διάλυμα σταθερής προσθήκης της γλυκόζης, ξηραίνεται στα τέσσερα περάσματα της πλευράς S_1 . Β) Η όψη της συσκευής 30 λεπτά μετά την προσθήκη του δείγματος (2.5 mM γλυκόζης), στη ζώνη του δείγματος. Όταν, το δείγμα προστίθεται στη συσκευή, ρέει κατά μήκος των περασμάτων, διαλύει την ξερή γλυκόζη και τη μεταφέρει στη ζώνη ανίχνευσης. Η ένταση του χρώματος των ζωνών ανίχνευσης S_1 , είναι πάντα μεγαλύτερη από εκείνη των S_0 ζωνών, εξαιτίας της επιπλέον γλυκόζης από τα περάσματα.

Παρόλο που η μέθοδος εφαρμόστηκε με επιτυχία σε άγνωστα δείγματα, η προσέγγιση αυτή έχει τρία 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 φαίνεται από τους Chaplan κ.ά., (Chaplan C.A., et al, 2014)

αυτό δεν είναι πάντα εφικτό, συνεπώς, χρησιμοποιήσαν 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 επίπεδο επικάλυψης μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά το τελικό αποτέλεσμα, διότι το αποτέλεσμα προσδιορίζεται χρησιμοποιώντας μόνο δύο σημεία βαθμονόμησης (Kóscielniak P., et al, 1999). iii) Όπως και σε όλες τις μεθόδους σταθερής προσθήκης απαιτείται εκτίμηση της συγκέντρωσης του αναλύτη στο δείγμα, διότι το επίπεδο της επικάλυψης επηρεάζει την ακρίβεια (Charlan C.A., et al, 2014 : Zhao W., et al, 2008).

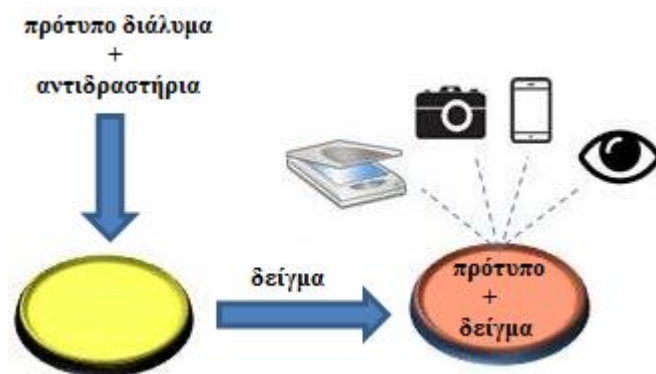
Πρόσφατα προτάθηκε μια νέα, γενική προσέγγιση για την πραγματοποίηση βαθμονόμησης σταθερής προσθήκης πολλαπλών σημείων σε συσκευές χαρτιού που βασίζονται στη χρήση βαθμονομημένων συσκευών. Οι βαθμονομημένες συσκευές σχηματίζονται με εναπόθεση μιας σειράς πρότυπων διαλυμάτων του αναλύτη στις ζώνες ανίχνευσης των συσκευών μαζί με τα αντιδραστήρια των προσδιορισμών. 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 περίσσεια ποσότητας 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 συνδυασμένο αναλυτικό σήμα (δηλαδή, έγχρωμα τελικά προϊόντα της αντίδρασης) το οποίο αντιστοιχεί στη συνολική συγκέντρωση του αναλύτη στην περιοχή ανίχνευσης. Τα συνδυασμένα σήματα χρησιμοποιούνται για να παραχθεί μια καμπύλη σταθερής προσθήκης πολλαπλών σημείων η οποία περιγράφεται από ένα γραμμικό ή μη γραμμικό μοντέλο. Η καμπύλη προσαρμόζεται σε ένα πολυωνυμικό μοντέλο πρώτης ή ανώτερης τάξης που επιλέγεται βάσει αυστηρών αλγεβρικών κριτηρίων κατάλληλων για πολυωνυμικές συναρτήσεις και στη συνέχεια χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του αναλύτη με την προβολή της συγκέντρωσης που αντιστοιχεί στο μηδενικό σήμα. Η γενική αναπαράσταση αυτής της μεθόδου παρουσιάζεται στο σχήμα 2.7.



Σχήμα 2.7: Διαδικασία προετημασίας και ανάλυσης δείγματος σε βαθμονομημένες συσκευές χαρτιού: α) οι συσκευές εκτυπώνονται και θερμαίνονται ώστε να διαμορφωθούν οι περιοχές ανίχνευσης, β) τα αντιδραστήρια εναποτίθενται στην επιφάνεια του χαρτιού και αφήνονται να στεγνώσουν, γ) προστίθενται μια σειρά διαλυμάτων βαθμονόμησης· οι συσκευές ξηραίνονται και αποθηκεύονται, δ) σε κάθε περιοχή ανίχνευσης εναποτίθεται ένας συγκεκριμένος όγκος δείγματος, ξηραίνονται και καταγράφεται το σήμα, ε) τα τυφλά σήματα από κάθε περιοχή ανίχνευσης αφαιρούνται από το συνολικό σήμα και σχηματίζεται μία καμπύλη σταθερής προσθήκης για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του αναλύτη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



3.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ανάπτυξη φορητών, φιλικών προς το χρήστη αναλυτικών συσκευών, συμβάλει στη βελτίωση του τομέα της ανάλυσης καθώς και στη μείωση του κόστους των αναλύσεων (Chin C. D., *et al.*, 2007). Τα τελευταία χρόνια, συσκευές όπως ειδικές ταινίες (dipsticks), τεστ πλευρικής ροής (lateral-flow tests) και συσκευές μικρορευστομηχανικής που βασίζονται στο χαρτί (paper-based microfluidic devices), χρησιμοποιούνται ολοένα και περισσότερο για αναλύσεις στο σημείο ανάγκης και υποστηρίζουν χρωματομετρικές αναλύσεις (Chin C. D., *et al.*, 2007 : von Lode P., 2005 : Martinez A. W., *et al.*, 2007 : Yetisen A. K., *et al.*, 2013). Στις περισσότερες περιπτώσεις ως ανιχνευτές χρησιμοποιούνται κάμερες, σαρωτές ή ακόμα και το γυμνό μάτι, επομένως δεν απαιτείται ακριβός ή εξειδικευμένος εξοπλισμός κατά την ανάλυση.

Οι χρωματομετρικές αναλύσεις, παρέχουν κατά κανόνα ποιοτικά αποτελέσματα (Charlan C. A., *et al.*, 2014) (π.χ. τεστ εγκυμοσύνης, προσδιορισμός του τύπου αίματος κ.λπ.), αλλά σε πολλές περιπτώσεις απαιτούνται ποσοτικά αποτελέσματα (για παράδειγμα όταν είναι απαραίτητο να γίνει διάκριση μεταξύ φυσιολογικών και μη φυσιολογικών επιπέδων ενός αναλύτη σε ένα δείγμα). Για τη λήψη ποσοτικών αποτελεσμάτων, η συγκέντρωση των αναλυτών προσδιορίζεται, λαμβάνοντας μια ψηφιακή εικόνα της χρωματομετρικής ανάλυσης, μετρώντας την ένταση του χρώματος από την εικόνα και στη συνέχεια συγκρίνοντας την ένταση με μία εξωτερική καμπύλη βαθμονόμησης που παρασκευάζεται υπό τις ίδιες συνθήκες (Martinez A. W., *et al.*, 2008). Αυτή η τεχνική, είναι η πιο διαδεδομένη για την ποσοτικοποίηση αναλυτών, αλλά ενέχει δύο βασικούς περιορισμούς: α) Στην εξωτερική βαθμονόμηση απαιτείται η ανάλυση των προτύπων διαλυμάτων, που πρέπει να μεταφέρονται στο πεδίο ή να παρασκευάζονται επί τόπου. Αν και αυτό μπορεί να είναι σχετικά εύκολο κατά την εργασία σε εργαστηριακό περιβάλλον, είναι ιδιαίτερα περίπλοκο στο εξωτερικό περιβάλλον, ελλείψει πόρων, β) Η επίδραση της μήτρας πρέπει να είναι αμελητέα πριν από την ανάλυση, καθώς επηρεάζει το αναλυτικό σήμα και εισάγει σφάλματα στο αποτέλεσμα. Η επίδραση της μήτρας μπορεί να είναι ανεξάρτητη από την παρουσία και την ποσότητα της αναλυόμενης ουσίας στο δείγμα (translational matrix effects) ή ανάλογη με την ποσότητα της αναλυόμενης ουσίας στο δείγμα, με αποτέλεσμα την μεταβολή της ευαισθησίας της μεθόδου (rotational matrix effects) (Ellison S.L.R. and Thompson M., 2008). Στις αναλύσεις που πραγματοποιούνται σε συσκευές που βασίζονται στο χαρτί, συνήθως συναντώνται και οι δύο τύποι επίδρασης της μήτρας, που μπορεί να

προέρχονται όχι μόνο από το δείγμα αλλά και από την πολυπλοκότητα του μήκους της οπτικής διαδρομής του ανακλώμενου φωτός μέσα στο χαρτί (Ellerbe A.K., *et al.*, 2009), τα έντονα σήματα υποβάθρου των τυφλών δειγμάτων (Swanson C., *et al.*, 2015), τη μη γραμμική απόκριση των ανιχνευτών που χρησιμοποιούνται (π.χ. σαρωτές, κάμερες) (Morbioli G.G., *et al.*, 2017), τη μη ομοιόμορφη κατανομή του αναλυτικού σήματος εντός της ζώνης ανίχνευσης (γνωστή ως "coffee ring" effect) (Deegan R.D., *et al.*, 1997) ή από τη μεταβλητότητα των περιβαλλοντικών συνθηκών, (π.χ. υγρασία, θερμοκρασία, φυσικός φωτισμός) κατά την ανάλυση (Morbioli G.G., *et al.*, 2017 : Yetisen A.K., *et al.*, 2013).

Η εξωτερική βαθμονόμηση στο πεδίο, μπορεί να ξεπεραστεί με τη χρήση μη ενόργανων ποσοτικών προσεγγίσεων ανάγνωσης (Fu E., 2014). Σε αυτές τις προσεγγίσεις ως μονάδα μέτρησης του σήματος χρησιμοποιείται ο χρόνος, (Noh H. and Phillips S.T., 2010 : Lewis G.G., *et al.*, 2014) η απόσταση (Cate D.M., *et al.*, 2013), ή οι έγχρωμες ράβδοι (Lewis G.G., *et al.*, 2012), όπου η τιμή της κάθε παραμέτρου έχει προβαθμονομηθεί, ώστε να αντιστοιχεί σε μία συγκεκριμένη συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας. Εναλλακτικά, προτείνονται συσκευές, που ενσωματώνουν μηχανισμούς αυτοβαθμονόμησης. Αυτές οι συσκευές περιέχουν προαποθηκευμένα πρότυπα διαλύματα του αναλύτη που δοκιμάζονται ταυτόχρονα με τα δείγματα (Wang W., *et al.*, 2010 : Zhu W-J., *et al.*, 2014 : Li X., *et al.*, 2010). Όμως, και οι αυτοβαθμονομημένες και οι προβαθμονομημένες συσκευές, δεν μπορούν να υπολογίσουν την επίδραση της μήτρας, επειδή χρησιμοποιούν (εξωτερικά) πρότυπα διαλύματα της αναλυόμενης ουσίας για τη βαθμονόμηση των συσκευών.

Η βαθμονόμηση σταθερής προσθήκης (δηλ. σταθερή προσθήκη ενός σημείου ή πολλαπλών σημείων), είναι η καταλληλότερη προσέγγιση για την άρση των παρεμποδίσεων που προκύπτουν από τις επιδράσεις της μήτρας του υποστρώματος. Σε μια κλασσική ανάλυση σταθερής προσθήκης, μετράται το σήμα που προέρχεται από το άγνωστο δείγμα και το σήμα του αγνώστου δείγματος, στο οποίο περιέχεται γνωστή συγκέντρωση αναλύτη (σταθερή προσθήκη-spike) (Cuadros-Rodríguez L.M., *et al.*, 2007). Από αυτά τα δεδομένα, υπολογίζεται η συγκέντρωση του αγνώστου δείγματος με βάση τη γραμμική σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης του αναλύτη και της έντασης του σήματος. Αν και η κλασσική ανάλυση σταθερής προσθήκης, που πραγματοποιείται υγροχημικά με τη χρήση κυψελίδων, είναι χρονοβόρα (επειδή πρέπει να προετοιμαστεί και να εξεταστεί μεγάλος αριθμός διαλυμάτων για κάθε δείγμα ξεχωριστά (Harvey D., 2008), η ανάλυση σταθερής προσθήκης σε συσκευές χάρτου, πραγματοποιείται ευκολότερα. Αυτό συμβαίνει, γιατί τα αντιδραστήρια και το πρότυπο διάλυμα του αναλύτη, μπορούν να προστεθούν στη συσκευή κατά τη διάρκεια της

προετοιμασίας τους και να αποθηκευτούν σε ξηρή μορφή μέχρι την ανάλυση, η οποία πραγματοποιείται με την προσθήκη του δείγματος στη συσκευή (Schilling K. C., *et al.*, 2013). Βάσει αυτής της αρχής, ο Charlan και οι συνεργάτες του, εισήγαγαν τη χρήση της βαθμονόμησης σταθερής προσθήκης ενός σημείου σε συσκευές χάρτου, με σκοπό τον προσδιορισμό της γλυκόζης (Charlan C.A., *et al.*, 2014). Στην προσέγγιση αυτή, τα κατάλληλα χρωματομετρικά αντιδραστήρια αποθηκεύτηκαν στις περιοχές ανίχνευσης της συσκευής και ένα πρότυπο διάλυμα του αναλύτη, εναποτέθηκε σε μερικά από τα μικρορευστομηχανικά κανάλια. Με αυτόν τον τρόπο, μετρούνται ταυτόχρονα τα άγνωστα δείγματα και τα δείγματα σταθερής προσθήκης ενός πρότυπου διαλύματος (single-level spiked samples), στην ίδια συσκευή. Το εργαστήριο μας, επέκτεινε την εφαρμογή της σταθερής προσθήκης σε συσκευές χάρτου, εφαρμόζοντας σταθερή προσθήκη πολλαπλών σημείων με τη χρήση προβαθμονομημένων συσκευών χάρτου (Kappi F. A., *et al.*, 2017). Οι προβαθμονομημένες συσκευές περιέχουν ένα έγχρωμο προϊόν, που παράγεται από την αντίδραση ενός πρότυπου διαλύματος του αναλύτη με τα κατάλληλα (χρωμοφόρα) αντιδραστήρια. Όταν προστίθεται ένα άγνωστο δείγμα στη συσκευή, η περίσσεια των αντιδραστηρίων στη ζώνη ανίχνευσης, αντιδρά με τον αναλύτη και παράγεται ένα συνολικό αναλυτικό σήμα, που αντιστοιχεί στη συνολική συγκέντρωση του αναλύτη στη ζώνη ανίχνευσης (αναλύτης στο δείγμα συν αναλύτης στο πρότυπο διάλυμα που είναι προαποθηκευμένο στη συσκευή). Τα συνδυασμένα σήματα χρησιμοποιούνται για την κατασκευή μιας καμπύλης πολλαπλής σταθερής προσθήκης, από την οποία και υπολογίζεται η συγκέντρωση του αναλύτη στο άγνωστο δείγμα.

Σε αυτή την μεταπτυχιακή εργασία παρουσιάζεται μια απλοποιημένη και φιλική προς το χρήστη προσέγγιση, για την πραγματοποίηση ποσοτικών αναλύσεων σε προβαθμονομημένες συσκευές χάρτου, εκτελώντας εξωτερική βαθμονόμηση ενός σημείου ή ανάλυση σταθερής προσθήκης ενός σημείου. Κατά την πρώτη προσέγγιση, το εξεταζόμενο δείγμα προστίθεται στη ζώνη ανίχνευσης της προβαθμονομημένης συσκευής, που περιέχει το χρωματομετρικό προϊόν της αντίδρασης μεταξύ των αντιδραστηρίων δείκτη και ενός πρότυπου διαλύματος της αναλυόμενης ουσίας. Ο αναλύτης που εμπεριέχεται στο δείγμα, αντιδρά με τα αντιδραστήρια του δείκτη και το συνολικό σήμα αντιστοιχεί στο άθροισμα της συγκέντρωσης του αναλύτη στο δείγμα και του πρότυπου διαλύματος. Στη δεύτερη προσέγγιση, εφαρμόζεται η ίδια διαδικασία, αλλά ένα ξεχωριστό κλάσμα του δείγματος προστίθεται στη ζώνη ανίχνευσης της συσκευής, που περιέχει μόνο τα χρωματομετρικά αντιδραστήρια, ώστε να ληφθεί το σήμα που αντιστοιχεί στη συγκέντρωση του αναλύτη στο

άγνωστο δείγμα. Και στις δύο προσεγγίσεις, η συγκέντρωση στο άγνωστο δείγμα, μπορεί να υπολογιστεί απευθείας, με βάση τις γενικές αρχές της γραμμικής βαθμονόμησης, χωρίς άλλες πειραματικές ή υπολογιστικές διαδικασίες.

Επιλέξαμε τρεις διαφορετικούς χρωματομετρικούς προσδιορισμούς για να αξιολογήσουμε, βελτιστοποιήσουμε και να επιδείξουμε αυτή τη νέα τεχνική βαθμονόμησης. Συγκεκριμένα την αντίδραση συμπλοκοποίησης του Fe^{3+} με θειοκυανιούχο άλας, την αντίδραση καταβύθισης του Ni^{2+} με διμεθυλογλυοξίμη και την αντίδραση της νινυδρίνης με α-αμιनिξέα. Οι παραπάνω αντιδράσεις είναι γνωστό ότι πραγματοποιούνται σε συσκευές χαρτιού και βασίζονται σε διαφορετικούς μηχανισμούς αντίδρασης (Giokas G.Z., *et al.*, 2014 : Cai Y., *et al.*, 2013 : Rattanarat W., *et al.*, 2014). Έτσι διερευνάται η δυνατότητα εφαρμογής της τεχνικής βαθμονόμησης σε διαφορετικές χημικές αντιδράσεις. Για την αξιολόγηση της ακρίβειας και της πιστότητας των αποτελεσμάτων, που αποκτήθηκαν από τις αναλύσεις βαθμονόμησης ενός σημείου (calibrant-loaded single-point calibration assays), χρησιμοποιήθηκε μια σειρά από πραγματικά δείγματα πριν και μετά την επιφόρτιση τους με γνωστή ποσότητα του αναλύτη (spiked samples). Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν, προτείνουμε τη χρήση της συγκεκριμένης μεθόδου ως εργαλείο ποσοτικής ή ημιποσοτικής ανάλυσης δειγμάτων, για αναλύσεις χωρίς βαθμονόμηση.

3.2. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Όλες οι χημικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω κατεργασία. Τα πρότυπα διαλύματα των μεταλλικών ιόντων (1000 mg L^{-1} , βάση μετάλλων), παρασκευάστηκαν διαλύοντας κατάλληλες ποσότητες άνυδρου νιτρικού σιδήρου (III) και εξαένυδρου θειικού νικελίου (II) (Sigma-Aldrich) σε δις απεσταγμένο νερό. Τα διαλύματα εργασίας παρασκευάστηκαν με κατάλληλες αραιώσεις. Το θειοκυανιούχο αμμώνιο, η διμεθυλογλυοξίμη, το υδροξείδιο του νατρίου (Titripur®), η νινυδρίνη, το γλουταμινικό οξύ, το γαλακτικό οξύ, το δισόξινο φωσφορικό κάλιο, το διττανθρακικό νάτριο και το χλωριούχο αμμώνιο αγοράστηκαν από την Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Το θειικό μαγνήσιο, το χλωριούχο νάτριο, το θειικό νάτριο και το όξινο φωσφορικό κάλιο, αποκτήθηκαν από τη Merck (Darmstadt, Germany). Το κιτρικό οξύ, το εξαένυδρο χλωριούχο μαγνήσιο, το χλωριούχο κάλιο και το διένυδρο

χλωριούχο ασβέστιο παραλήφθηκαν από την Mallinckrodt (Dublin, Ireland). Η ουρία (> 99.5%) αγοράστηκε από την Pharmacia Biotech AB (Uppsala, Sweden) και οι διαλύτες HPLC- βαθμού (μεθανόλη και ακετόνη), αποκτήθηκαν από την Fischer Scientific (Loughborough, UK).

3.3 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

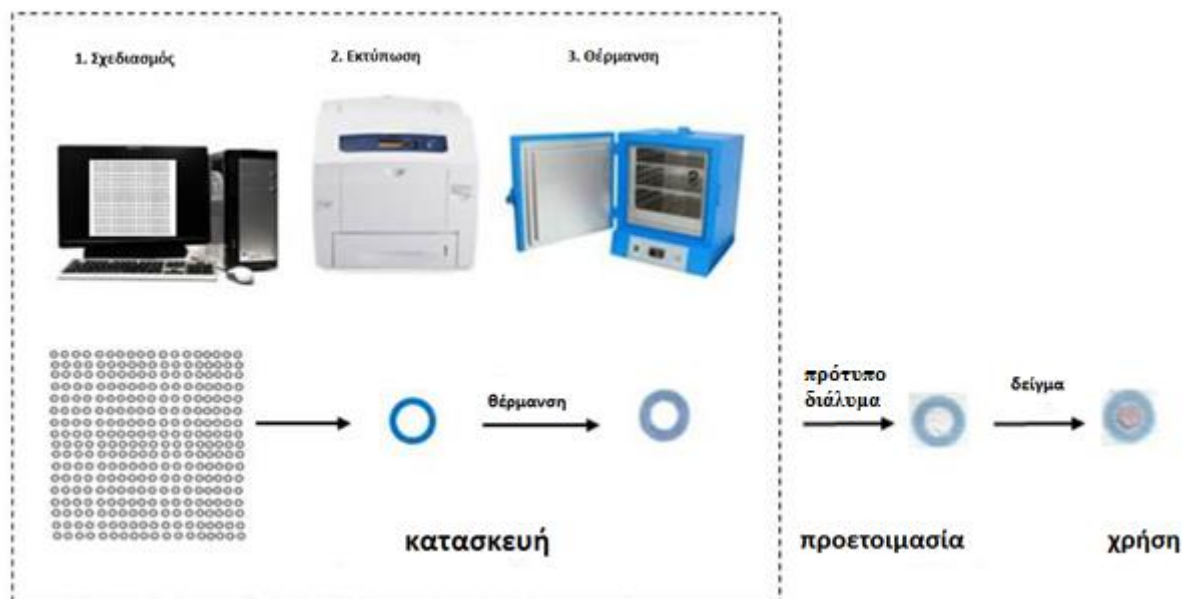
3.3.1 Εξοπλισμός

A) Για την εκτύπωση των συσκευών χρησιμοποιήθηκε εκτυπωτής Xerox Phaser 8560N, ο οποίος διανέμει το μελάνι (λιωμένο κερί) σε μορφή υγρών σταγονιδίων διαμέτρου 50-60nm. Το κερί αποτελείται από μίγμα υδρόφοβων καρβαμικών ενώσεων, υδρογονανθράκων και χρωστικών ουσιών, που όταν ψυχθούν, σταθεροποιούνται στιγμιαία, χωρίς περαιτέρω εξάπλωση. B) Για τη λήψη έγχρωμων εικόνων των συσκευών, χρησιμοποιήσαμε έναν επίπεδο σαρωτή (PerfectionV550 Photo, Epson), σε λειτουργία ανάκλασης. Γ) Μια κάμερα Nikon Coolpix W100 (13.2 Mpixel). Δ) Για την ανάδευση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε αναδευτήρας (Snijders, Ολλανδία) με ρυθμιζόμενη ταχύτητα περιστροφής. E) Για τη μέτρηση των τιμών pH των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε πεχάμετρο METTLER- TOLEDO.



3.3.2 Κατασκευή συσκευών χάρτου

Κάθε συσκευή αποτελείται από μεμονωμένες, κυκλικές ζώνες ανίχνευσης (εικόνα 1). Για την αποτύπωση των συσκευών, χρησιμοποιήσαμε διηθητικό χαρτί, μικρού πάχους (Munktell, ποιοτικά φύλλα χαρτιού, βαθμού 34/N, 0.18mm, 60 g m⁻²), επειδή προσφέρει υψηλότερη μεταγωγή σήματος από την αδιαφανή επιφάνεια του (Evans E., *et al.*, 2014 : Choleva T.G., *et al.*, 2015). Επιπλέον, το διηθητικό αυτό χαρτί έχει χαμηλό κόστος και μικρή επιφάνεια ανά βάρος. Το σχήμα κάθε συσκευής, εκτυπώθηκε με τη βοήθεια εκτυπωτή στερεού μελανιού (ColorQube 8580DN, Xerox, CT) και οι συσκευές θερμάνθηκαν στους 150±5 °C για 2 λεπτά, ώστε να λιώσει το κερί και να διαπεράσει όλη τη μάζα του χαρτιού. Οι παραγόμενες συσκευές είχαν διάμετρο 0.8 cm αποτελούμενη από την υδροφιλική ζώνη ανίχνευσης (εσωτερική διάμετρο) 0.40 cm και το υδρόφοβο φράγμα πάχους 0.20 cm.



Σχήμα 3.1. Σχεδιασμός και κατασκευή των συσκευών και απλοποιημένη μεθοδολογία της παρασκευής και χρήσης τους.

3.3.3 Προετοιμασία και χρήση συσκευών με βαθμονόμηση

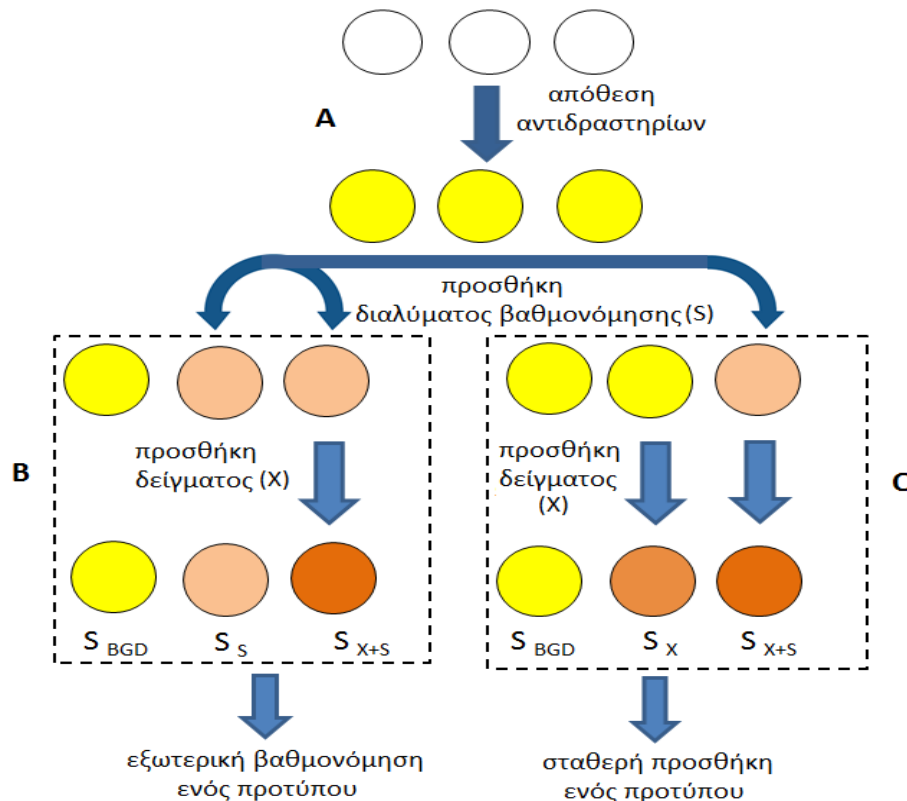
Για την προετοιμασία των προβαθμονομημένων συσκευών χαρτιού, ακολουθήσαμε την παρακάτω διαδικασία (Kappi F. A., *et al.*, 2017). Αρχικά, προσθέσαμε τα χρωματομετρικά αντιδραστήρια στις ζώνες ανίχνευσης η συσκευών (σχήμα 3.2.) ως εξής: Για τον προσδιορισμό του Fe^{3+} , προσθέσαμε 1μL διαλύματος NH_4SCN (3.0 M). Για τον προσδιορισμό του Ni^{2+} , αρχικά προσθέσαμε 1 μL ρυθμιστικού διαλύματος (boric acid/NaOH pH=9.1) και κατόπιν εναποθέσαμε 0.7 μL διμεθυλογλυοξίμης (DMG, 0.1 M σε μεθανόλη). Τέλος, για τον προσδιορισμό των α-αμινοξέων, προσθέσαμε 1 μL νινυδρίνης (8.0 g σε 100 mL ακετόνης), στις ζώνες ανίχνευσης των συσκευών. Μετά από κάθε προσθήκη αντιδραστηρίων, οι συσκευές αφήνονται να ξηραθούν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος στο σκοτάδι. Για την επίτευξη εξωτερικής βαθμονόμησης, απαιτούνται τουλάχιστον δύο προβαθμονομημένες ζώνες ανίχνευσης, ενώ στη σταθερή προσθήκη ενός σημείου, είναι απαραίτητη τουλάχιστον μία προβαθμονομημένη ζώνη ανίχνευσης. Έπειτα, προσθέσαμε μια συγκεκριμένη ποσότητα (1.0 μL) πρότυπου διαλύματος του αναλύτη (δηλ. διάλυμα βαθμονόμησης) στις ζώνες ανίχνευσης (σχήμα 3.2β) (σχήμα 3.2γ). Τα χρωματομετρικά αντιδραστήρια, που προσθέσαμε στις ζώνες ανίχνευσης, αντέδρασαν με τον αναλύτη του πρότυπου διαλύματος και παράχθηκαν τα χρωματομετρικά προϊόντα των αντιδράσεων. Οι συσκευές στεγνώθηκαν και αποθηκεύτηκαν μέχρι τη χρήση τους.

Για την ανάλυση πραγματικών δειγμάτων με εξωτερική βαθμονόμηση, προσθέσαμε 1 μL του υπό μελέτη δείγματος, σε μία από τις προβαθμονομημένες ζώνες ανίχνευσης. Αφού στέγνωσαν οι συσκευές, τραβήξαμε μια φωτογραφία των συσκευών για να μετρήσουμε ταυτόχρονα την ένταση του σήματος του υποβάθρου (δηλ. Το σήμα που αποκτήθηκε εξαιτίας της προσθήκης των αντιδραστηρίων), την ένταση του σήματος των προβαθμονομημένων συσκευών και τη συνδυασμένη ένταση σήματος που παράχθηκε μετά την προσθήκη του αγνώστου δείγματος στην προβαθμονομημένη συσκευή (σχήμα 3.2β).

Για την ανάλυση πραγματικών δειγμάτων με βαθμονόμηση σταθερής προσθήκης, προσθέσαμε αρχικά 1 μL του δείγματος σε μία ζώνη ανίχνευσης που περιείχε μόνο τα χρωματομετρικά αντιδραστήρια, προκειμένου να αποκτήσουμε την ένταση του σήματος του αγνώστου δείγματος. Στη συνέχεια, προσθέσαμε άλλο 1 μL του δείγματος στη ζώνη ανίχνευσης της προβαθμονομημένης συσκευής για να αποκτήσουμε τη συνδυασμένη ένταση σήματος που παράγεται μετά την προσθήκη του αγνώστου δείγματος στη προβαθμονομημένη

συσκευή. Μετά την ξήρανση της συσκευής, καταγράψαμε ταυτόχρονα όλα τα αναλυτικά σήματα από τις ζώνες ανίχνευσης (σχήμα 3.2γ).

Και στις δύο μεθόδους, η συγκέντρωση του αναλύτη του αγνώστου δείγματος, υπολογίστηκε με βάση τις γενικές αρχές της γραμμικής βαθμονόμησης προσθήκης, όπως περιγράφεται παρακάτω. Στο σχήμα 3.2. παρουσιάζεται η σχηματική απεικόνιση της συνολικής διαδικασίας.



Σχήμα 3.2. Προετοιμασία των προβαθμονομημένων συσκευών που βασίζονται στο χαρτί και εφαρμογή της εξωτερικής βαθμονόμησης ενός σημείου (αριστερή πλευρά) και της ανάλυσης σταθερής προσθήκης ενός σημείου (δεξιά πλευρά). Το S_{BGD} , είναι το σήμα του διαλύματος βαθμονόμησης και το S_{X+S} , είναι το συνδυασμένο σήμα του δείγματος και του διαλύματος βαθμονόμησης.

Η λήψη των αναλυτικών σημάτων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια ενός επίπεδου σαρωτή (Epson, PerfectionV550 Photo) και μιας κάμερας Nikon Coolpix W100 (13.2 Mpixel), για την καταγραφή έγχρωμων εικόνων της περιοχής ανίχνευσης των συσκευών. Χρησιμοποιήσαμε επίπεδο σαρωτή, ώστε όλες οι εικόνες να λαμβάνονται υπό συνεχείς συνθήκες φωτισμού και με συνεχή εστίαση. Η κάμερα χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της ακρίβειας και της πιστότητας των αναλύσεων, υπό διαφορετικές συνθήκες φωτισμού.

Αποθηκεύσαμε τα αρχεία σε μορφή JPEG (300 dpi) και στη συνέχεια χρησιμοποιήσαμε το πρόγραμμα Image J, για να μετρήσουμε τη μέση ένταση του χρώματος στη γκρι κλίμακα. Μετρήσαμε την ένταση σήματος σε κλίμακα γκριζου, επειδή ήταν η απλούστερη προσέγγιση για την απόκτηση του αναλυτικού σήματος και για την αποφυγή λάθους χειρισμού των δεδομένων καθώς και παρέμβασης του χρήστη.

3.4. ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Για τον προσδιορισμό του σιδήρου, ένα δισκίο συμπληρώματος διατροφής διαλυτοποιήθηκε σε 10 mL HNO₃ 8.0 M, υπό θερμές συνθήκες (~ 50 °C). Το εκχύλισμα, αφού διηθήθηκε και εξουδετερώθηκε με NaOH, αραιώθηκε με απεσταγμένο νερό, μέχρι τελικού όγκου 50 mL. Η αναμενόμενη συγκέντρωση Fe³⁺, ήταν 70 mg L⁻¹. Για τα πειράματα ανάκτησης, προστέθηκαν άλλα 70 mg L⁻¹ του Fe³⁺ σε ένα κλάσμα του εκχυλίσματος με (συνολική αναμενόμενη συγκέντρωση: 140 mg L⁻¹ Fe³⁺). Τα δείγματα αραιώθηκαν 5-10 φορές, πριν την ανάλυση. Για τον προσδιορισμό του νικελίου, συλλέχθηκε δείγμα χώματος, το οποίο ξηράνθηκε στον αέρα και κοσκινίστηκε μέσω κοσκίνων από ανοξειδωτο χάλυβα των 64 μm. Ύστερα, προστέθηκε ένα υδατικό διάλυμα Ni²⁺ στο χόμα, σε δύο διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων (2.5 mg g⁻¹ και 5 mg g⁻¹) και ξηράνθηκε σε συνθήκες περιβάλλοντος. Ένα τμήμα 1.0 g του χώματος εκχυλίστηκε με 15 mL HNO₃ 8.0M, υπό σταθερή ανάδευση για 1 ώρα και σε θερμές συνθήκες (80 °C). Το χρώμα του εκχυλίσματος ήταν υποκίτρινο, πιθανόν λόγω της ύπαρξης υπολειμμάτων οργανικής ύλης. Το εκχύλισμα διηθήθηκε, εξουδετερώθηκε με NaOH και αραιώθηκε σε τελικό όγκο 50 mL, με απεσταγμένο νερό. Μια ποσότητα NaF (0.5 M) και τρυγικού οξέος (10% w/v), προστέθηκαν σαν καλυπτικά αντιδραστήρια (masking agents), για τα μεταλλικά ιόντα και το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε στην τιμή 8, με τη χρήση αμμωνίας. Υπό αυτές τις συνθήκες, τα παρεμποδίζοντα μεταλλικά ιόντα συμπλοκοποιούνται από τα φθοριούχα (δηλ. Fe) και τα τρυγικά ιόντα (δηλ. Fe, Cr, Al, κ.α) ή μετατρέπονται σε διαλυτά αμμωνιακά σύμπλοκα (π.χ Co, Cu, Zn, κ.α). Τα εκχυλίσματα αραιώθηκαν 5-6 φορές πριν την ανάλυση. Για τον προσδιορισμό των αμινοξέων με τη χρήση νινυδρίνης, προστέθηκαν 220.7 mg L⁻¹ (1.5 mM) και 441.4 mg L⁻¹ (3.0 mM) γλουταμινικού οξέος σε τεχνητά ούρα με. Το διάλυμα τεχνητών ούρων, παρασκευάστηκε με ανάμιξη 1.1 mM γαλακτικού οξέος, 2.0 mM κιτρικού οξέος, 25 mM διττανθρακικού νατρίου, 170 mM ουρίας, 2.5 mM χλωριούχου ασβεστίου, 90 mM

χλωριούχου νατρίου, 2.0 mM θεικού μαγνησίου, 10 mM θεικού νατρίου, 7.0 mM δισόξινου φωσφορικού καλίου και 25 mM χλωριούχου αμμωνίου, σε απεσταγμένο νερό και το pH ρυθμίστηκε στην τιμή 6.0 (Brooks T. and Keevil C.W., 1997). Το τεχνητό διάλυμα ούρων, αραιώθηκε 4-6 φορές πριν την ανάλυση. Σε όλες αναλύσεις, χρησιμοποιήθηκε 1 μL του δείγματος. Ο προσδιορισμός του σιδήρου και του νικελίου πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ για την ανάλυση των αμινοξέων οι διατάξεις θερμάνθηκαν, (μετά την προσθήκη του δείγματος) στους 95 ± 5 °C για 15λεπτά.

3.5 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Τόσο η εξωτερική βαθμονόμηση ενός σημείου, όσο και σταθερή προσθήκη ενός σημείου σε προβαθμονομημένες αναλυτικές συσκευές, βασίζονται στο γεγονός ότι το δείγμα προστίθεται σε μια προβαθμονομημένη ζώνη ανίχνευσης. Αυτή η ζώνη ανίχνευσης, παρασκευάζεται με την προσθήκη πρότυπου διαλύματος του αναλύτη και των απαραίτητων χρωματομετρικών αντιδραστηρίων. Έτσι, παράγεται ένα έγχρωμο προϊόν και η ένταση του χρώματος, (S_s) αντιστοιχεί στη συγκέντρωση του πρότυπου διαλύματος (C_s). Όταν προστίθεται το άγνωστο δείγμα (1 μL) στην περιοχή ανίχνευσης των προβαθμονομημένων συσκευών, πραγματοποιείται αντίδραση μεταξύ του αναλύτη, που εμπεριέχεται στο άγνωστο δείγμα και των χρωματομετρικών αντιδραστηρίων, με αποτέλεσμα την αύξηση της έντασης του χρώματος στις περιοχές ανίχνευσης. Η ένταση του χρώματος σε κάθε περιοχή ανίχνευσης, αντιστοιχεί στη συνολική συγκέντρωση του αναλύτη στη ζώνη ανίχνευσης (πρότυπο διάλυμα και δείγμα). Κατόπιν, υπολογίζεται η καθαρή ένταση του σήματος, αφαιρώντας την ένταση του σήματος του υποβάθρου (S_{BGD}), το οποίο μετράται στις ζώνες ανίχνευσης που περιέχουν μόνο τα χρωματομετρικά αντιδραστήρια (απουσία του αναλύτη).

Στην σταθερή προσθήκη ενός σημείου, η συγκέντρωση του αναλύτη υπολογίζεται από τη γενική εξίσωση της σταθερής προσθήκης:

$$\frac{C_x}{C_{x+s}} = \frac{S_x}{S_{x+s}}$$

Για αναλύσεις σταθερής προσθήκης ενός σημείου, η παραπάνω εξίσωση διαμορφώνεται ως εξής:

$$\begin{aligned} \frac{C_X}{C_{X+S}} &= \frac{S_X}{S_{X+S}} \Rightarrow C_X = \frac{S_X}{S_{X+S}} \times C_{X+S} \Rightarrow C_X = \frac{S_X}{S_{X+S}} \times C_X + \frac{S_X}{S_{X+S}} \times C_S \Rightarrow \\ (1 - \frac{S_X}{S_{X+S}}) C_X &= \frac{S_X}{S_{X+S}} \times C_S \Rightarrow C_X = \frac{\frac{S_X}{S_{X+S}} \times C_S}{(1 - \frac{S_X}{S_{X+S}})} \Rightarrow C_X = \frac{\frac{S_X}{S_{X+S}} \times C_S}{(\frac{S_{X+S} - S_X}{S_{X+S}})} \Rightarrow \\ C_X &= \frac{S_X}{S_{X+S} - S_X} \times C_S \end{aligned} \quad (1)$$

Στην εξωτερική βαθμονόμηση ενός σημείου, η συγκέντρωση του αναλύτη υπολογίζεται με την προσαρμογή της παραπάνω εξίσωσης ως εξής:

$$\begin{aligned} \frac{C_X}{C_{X+S}} &= \frac{S_X}{S_{X+S}} \Rightarrow C_X \times S_X + C_X \times S_S = C_X \times S_X + C_S \times S_X \Rightarrow \\ C_X \times S_S &= C_S \times S_X \Rightarrow C_X = \frac{S_X}{S_S} \times C_S \Rightarrow C_X = \frac{S_{X+S} - S_S}{S_S} \times C_S \end{aligned}$$

Άρα,

$$C_X = \frac{S_{X+S} - S_S}{S_S} \times C_S \quad (2)$$

Όπου:

S_X , είναι η ένταση σήματος του διαλύματος του αγνώστου δείγματος, το οποίο περιέχει έναν αναλύτη συγκέντρωσης C_X

S_{X+S} , είναι η συνολική ένταση του σήματος, που προκύπτει από το διάλυμα του αγνώστου δείγματος (S_X) και από το διάλυμα βαθμονόμησης (πρότυπο) (S_S), στα οποία περιέχεται το σύνολο του αναλύτη με συνολική συγκέντρωση C_{X+S} . Ισχύει ότι, $S_{X+S} = S_X + S_S$. Σε όλα τα σήματα αφαιρείται η ένταση του υποβάθρου (S_{BGD}) πριν τους υπολογισμούς

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η εφαρμογή της εξωτερικής βαθμονόμησης ενός σημείου ή της μεθόδου σταθερής προσθήκης σε προβαθμονομημένες συσκευές βαθμονόμησης, προσφέρει διάφορα πλεονεκτήματα: i) αίρεται η ανάγκη παρασκευής προτύπων διαλυμάτων ή μεταφοράς τους στο πεδίο. Αντί αυτού τα πρότυπα διαλύματα αποθηκεύονται στις ζώνες ανίχνευσης ενώ η προετοιμασία τους γίνεται υπό ελεγχόμενες εργαστηριακές συνθήκες μειώνοντας τα σφάλματα του χειριστή ή άλλα μη συστηματικά σφάλματα, ii) τόσο η εξωτερική βαθμονόμηση όσο και η βαθμονόμηση σταθερής προσθήκης μπορούν να πραγματοποιηθούν στην ίδια διάταξη και σε μια πειραματική – αναλυτική πορεία. Συνεπώς, δεν υπάρχει ανάγκη χρήσης διαφορετικών διατάξεων μειώνοντας έτσι πιθανές παρεμποδίσεις από την ανομοιογένεια ή το έντονο υπόβαθρο του χαρτιού ή από τυχόν μεταβολές στις περιβαλλοντικές συνθήκες (φωτισμός, υγρασία, κλπ) κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, iii) πιθανή αλλοίωση των αντιδραστηρίων ή των χρωματομετρικών προϊόντων (για παράδειγμα λόγω ακατάλληλων συνθηκών αποθήκευσης ή χειρισμού), μπορεί να επαληθευτεί, συγκρίνοντας την ένταση του χρώματος στις ζώνες ανίχνευσης των προβαθμονομημένων συσκευών, μετά την παρασκευή τους και αμέσως πριν τη χρήση τους. Επιπλέον, η σταθερή προσθήκη είναι η ιδανικότερη μέθοδος για την ελαχιστοποίηση των παρεμποδίσεων από την μήτρα του υποστρώματος (Ellison S.L.R. and Thompson M., 2008). Όπως προαναφέρθηκε, σε συσκευές χάρτου, τα αποτελέσματα της μήτρας προέρχονται όχι μόνο από τα συστατικά του αγνώστου δείγματος αλλά και από τον κορεσμό της έντασης του χρώματος στην περιοχή ανίχνευσης της συσκευής, τη μη γραμμικότητα του ανιχνευτή και από την αλλοίωση των αντιδραστηρίων λόγω αλλαγών στις περιβαλλοντικές συνθήκες (Kappi F. A., *et al.*, 2017).

Παρά τα πλεονεκτήματα αυτά, στην εξωτερική βαθμονόμηση δεν λαμβάνονται υπόψη οι παρεμποδίσεις που μπορεί να υπάρχουν στο δείγμα. Ως εκ τούτου, τα παρεμποδίσεις που εισάγουν σφάλματα στην ανάλυση, πρέπει να εξαλείφονται στα στάδια προεπεξεργασίας των δειγμάτων στη συσκευή (Giokas D.L., *et al.*, 2014 : Rattanarat P., *et al.*, 2014) ή με πειραματικές διαδικασίες εκτός της λειτουργίας της συσκευής. Η σταθερή προσθήκη, ελαχιστοποιεί τέτοιες παρεμποδίσεις, αλλά έχει δύο περιορισμούς. Ο πρώτος περιορισμός αφορά το επίπεδο σταθερής προσθήκης (δηλ. τη συγκέντρωση σταθερής προσθήκης), καθώς επηρεάζει την ακρίβεια (Ellison S.L.R. and Thompson M., 2008 : Chaplan C. A., *et al.*, 2014). Κατά συνέπεια, απαιτείται εκτίμηση της συγκέντρωσης της αναλυόμενης ουσίας στο δείγμα. Ο άλλος περιορισμός απορρέει από τη χρήση δύο σημείων βαθμονόμησης (σε

αντίθεση με πολλά σημεία βαθμονόμησης που χρησιμοποιούνται όταν κατασκευάζεται μια εξωτερική καμπύλη βαθμονόμησης). Έτσι, λόγω των πιθανών πειραματικών λαθών κατά τη μέτρηση του άγνωστου δείγματος ή του δείγματος μετά από σταθερή προσθήκη μπορεί να επηρεαστεί η ακρίβεια του τελικού αποτελέσματος (Kóscielniak P., 1999). Με την προσέγγισή μας, αντιμετωπίζονται σε μεγάλο βαθμό αυτά τα μειονεκτήματα, καθώς προετοιμάζονται πολλαπλές περιοχές ανίχνευσης σε κάθε συσκευή. Με τον τρόπο αυτό α) είναι δυνατή η προκαταρκτική ανάλυση του δείγματος με τη χρήση εξωτερικής βαθμονόμησης ή βαθμονόμησης σταθερής προσθήκης, με σκοπό τη λήψη πρωταρχικών δεδομένων σχετικά με το επίπεδο συγκεντρώσεων του αναλύτη, ώστε να αποφασιστεί ο βέλτιστος συντελεστής αραίωσης, β) συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της εξωτερικής βαθμονόμησης και της βαθμονόμησης σταθερής προσθήκης, μπορεί να προβλεφθεί η παρουσία παρεμποδιστών, εφόσον παρατηρούνται σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο μεθόδων, γ) πολλά δείγματα μπορούν να αναλυθούν ταυτόχρονα στην ίδια συσκευή, ελαχιστοποιώντας έτσι τα σφάλματα που επηρεάζουν στην ακρίβεια των αποτελεσμάτων.

4.2 ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ

Η δυνατότητα εφαρμογής της προτεινόμενης μεθόδου, εξετάστηκε στον προσδιορισμό του σιδήρου, του νικελίου και των α-αμινοξέων. Οι αντιδράσεις προσδιορισμού βασίζονται σε διαφορετικές χρωματικές χημικές αντιδράσεις, όπως συμπλοκοποίηση, καθίζηση και οξειδοαναγωγική αντίδραση πολλαπλών σταδίων, αντίστοιχα. Οι χρωματομετρικές αναλύσεις του σιδήρου-θειοκυανιούχων και του νικελίου-διμεθυλογλυοξίμης, επελέγησαν ως χαρακτηριστικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα αμέσως μετά την ανάμιξη των διαλυμάτων του αναλύτη (βαθμονομητή ή δείγματος) με τα χρωματομετρικά αντιδραστήρια, ενώ η αντίδραση των α-αμινοξέων με τη νινυδρίνη, πραγματοποιείται κατόπιν θέρμανσης. Έτσι, κατά την ανάλυση των πραγματικών δειγμάτων του Fe^{3+} και του Ni^{2+} , τα δείγματα εναποτέθηκαν στις ζώνες ανίχνευσης, στις οποίες προϋπήρχε το χρωματομετρικό προϊόν της αντίδρασης, του διαλυματος βαθμονόμησης (προτύπου), ενώ στην περίπτωση των αμινοξέων, οι ζώνες ανίχνευσης εμπεριείχαν το πρότυπο διάλυμα και τα αντιδραστήρια, χωρίς όμως να σχηματιστεί το έγχρωμο προϊόν της αντίδρασης. Το χρωματομετρικό προϊόν της αντίδρασης

του διαλυματος βαθμονόμησης των αμινοξέων, σχηματίστηκε ταυτόχρονα με το δείγμα, μόνο μετά τη θέρμανση.

Οι πειραματικές συνθήκες βελτιστοποιήθηκαν, όσον αφορά τη συγκέντρωση των χρωματομετρικών αντιδραστηρίων και του όγκου του δείγματος σε διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων του βαθμονομητή (προτύπου). Σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης προτύπου, κατασκευάστηκε μια καμπύλη δόσης-απόκρισης (καμπύλη αναφοράς) με σταθερή προσθήκη 1 μL πρότυπου διαλύματος, που περιείχε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του αναλύτη. Ως βέλτιστος θεωρήθηκε ο συνδυασμός που οδηγεί σε ευρύτερο γραμμικό εύρος, με καλή ακρίβεια (σφάλμα $\leq 5\%$). Οποιαδήποτε συγκέντρωση εντός αυτού του εύρους, μπορεί να προσδιοριστεί με ασφάλεια, αφού υπάρχει γραμμική σχέση που συνδέει τη συγκέντρωση του αναλύτη και την ένταση του σήματος. Αυτό, αποτελεί θεμελιώδη προϋπόθεση για την ανάλυση σταθερής προσθήκης ενός σημείου. Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν μικρότερα γραμμικά εύρη, αλλά είναι λιγότερο πρακτικά, δεδομένου ότι οι διάφορες δοκομασίες, που περιλαμβάνουν διαδοχικές αραιώσεις του άγνωστου δείγματος, θα πρέπει να γίνουν προκειμένου να εξασφαλιστεί ότι οι συγκεντρώσεις του αναλύτη εμπίπτουν εντός της γραμμικής περιοχής.

Βάσει αυτής της μελέτης, εξετάστηκαν διάφορα εύρη συγκεντρώσεων για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης βαθμονόμησης, διαφορετικές συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων και όγκοι δειγμάτων (Πίνακα 4.1). Κάθε ανάλυση διεξήχθη εις τριπλούν (σε τρεις διαφορετικές συσκευές) και υπολογίστηκε ο μέσος όρος των μετρήσεων. Τα αποτελέσματα της μελέτης βελτιστοποίησης, έδειξαν ότι οι μικρές συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων δεν ήταν ευνοϊκές, λόγω της χαμηλής έντασης του σήματος καθώς και λόγω του κορεσμού της έντασης χρώματος στην επιφάνεια του χαρτιού με την αύξηση της συγκέντρωσης. Όταν τα αντιδραστήρια βρισκόταν σε περίσσεια, παρατηρήθηκαν μη επαναλήψιμα σήματα υποβάθρου, που οδηγούσαν σε αυξημένα σφάλματα. Είναι αξιοσημείωτο ότι σε όλα τα πειράματα βελτιστοποίησης ο βέλτιστος όγκος δείγματος ήταν 1 μL . Αυτός ο όγκος δείγματος ήταν επαρκής για να καλύψει ολόκληρη την επιφάνεια της ζώνης ανίχνευσης, ενώ όταν εναποτέθηκαν στη συσκευή μεγαλύτεροι όγκοι δείγματος: α) οι συσκευές χρειάστηκαν περισσότερο χρόνο για να στεγνώσουν, με αποτέλεσμα τη μείωση της ακρίβειας και της επαναληψιμότητας, λόγω της (ανεξέλεγκτης) εξάτμισης του δείγματος, β) η μεγάλη ποσότητα του δείγματος οδήγησε τα προϊόντα της χρωματομετρικής αντίδρασης στα άκρα της ζώνης ανίχνευσης (coffee ring effect), περιπλέκοντας την μέτρηση του αναλυτικού σήματος. Όσον αφορά τον χρόνο αντίδρασης, δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην ένταση του σήματος μετά την

ξήρανση του δείγματος (περίπου 5 λεπτά) και μέχρι τον μέγιστο χρόνο αντίδρασης των 20 λεπτών για τους προσδιορισμούς του Fe και Ni, ενώ για την ολοκλήρωση της χρωματομετρικής αντίδρασης των α-αμινοξέων με νινυδρίνη ήταν απαραίτητη η θέρμανση της συσκευής στους 95°C για 15 λεπτά. Με βάση τα αποτελέσματα που ελήφθησαν, οι βέλτιστες συνθήκες και η γραμμική περιοχή για κάθε προσδιορισμό συνοψίζονται στον Πίνακα 4.2.

Πίνακας 4.1. Βελτιστοποίηση πειραματικών συνθηκών για την πραγματοποίηση εξωτερικής βαθμονόμησης ενός σημείου και σταθερής προσθήκης σε προβαθμονομημένες συσκευές χάρτου. Όλες οι παράμετροι μελετήθηκαν ξεχωριστά για κάθε συγκέντρωση βαθμονόμησης.

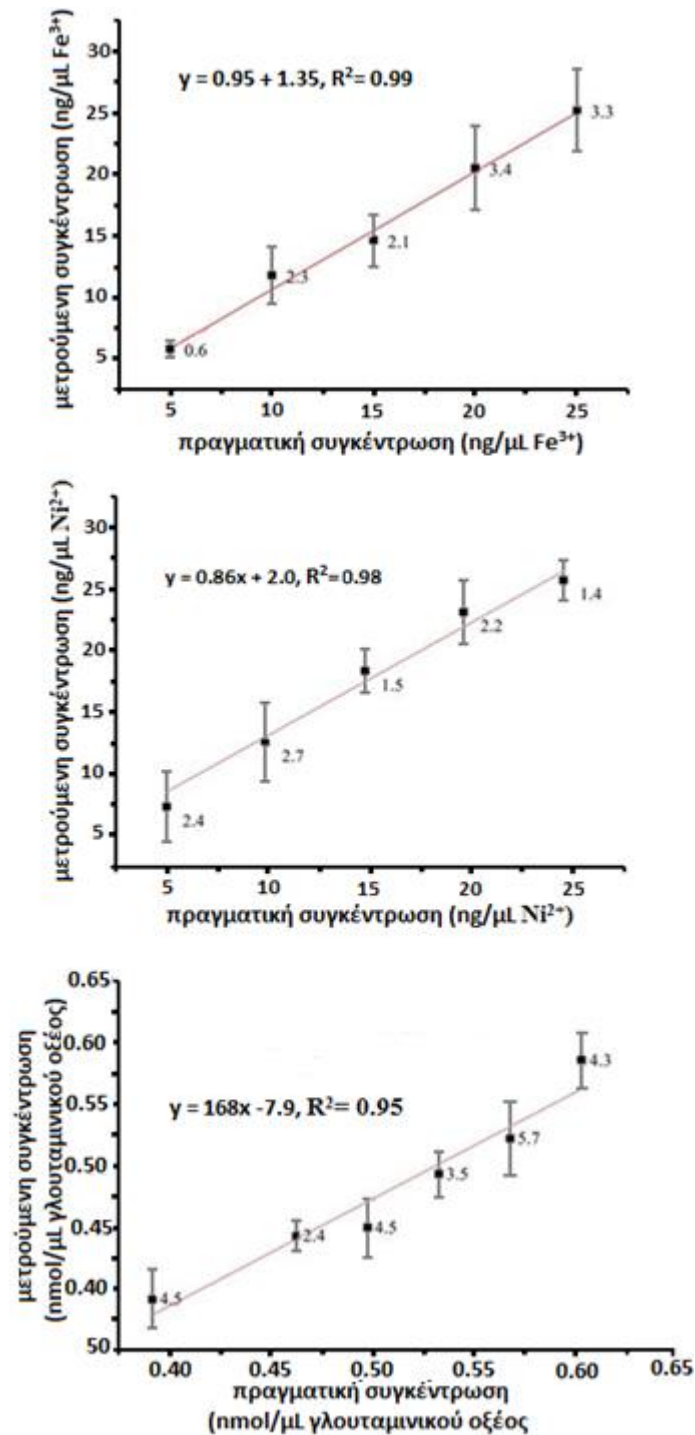
	Μάζα βαθμονομητή	Μάζα αντιδραστηρίων	Όγκος δείγματος	Άλλες συνθήκες	Εύρος γραμμικής απόκρισης (ng μL^{-1})
Fe³⁺	50 ng	1-4 μmol NH_4SCN	0.5-2.5 μL	χρόνος αντίδρασης ¹ : 5-20 λεπτά	5-50
	100 ng				15-100
	150 ng				15-150
	200 ng				15-200
	300 ng				15-300
Ni²⁺	25 ng	0.7 – 105 nmol DMG	0.5-2.5 μL	pH: 8-10 χρόνος αντίδρασης ¹ : 5-20 λεπτά	10-100
	50 ng				5-50
	100 ng				25-150
α-αμινοξέα (γλουταμινικό οξύ)	0.14 nmol	0.625-2.24 μmol νινυδρίνης	0.5-2.5 μL	θερμοκρασία: 70-100 °C, χρόνος αντίδρασης: 5-25 λεπτά	10-60
	0.20 nmol				30-70
	0.27 nmol				20-60
	0.41 nmol				20-80
	0.61 nmol				70-120

¹Οι συσκευές παρέμειναν ξηρές για περίπου 5 λεπτά, μετά την προσθήκη του δείγματος (1 μL), σε θερμοκρασία δωματίου.

Πίνακας 4.2. Βέλτιστες πειραματικές συνθήκες εργασίας και περιοχή γραμμικής απόκρισης των μεθόδων εξωτερικής βαθμονόμησης και σταθερής προσθήκης ενό σημείου σε προβαθμονομημένες αναλυτικές διατάξεις χάρτου.

	Μάζα αντιδραστηρίων	Συγκέντρωση βαθμονομητή	Όγκος δείγματος	Άλλες συνθήκες	Εύρος γραμμικής απόκρισης (ng μL^{-1})
Fe³⁺	3 μmol NH ₄ SCN	50 ng μL^{-1}	1 μL	-	5-25 ng μL^{-1}
Ni²⁺	70 nmol DMG	25 ng μL^{-1}	1 μL	pH=9	1-20 ng μL^{-1}
		50 ng μL^{-1}	1 μL	pH=9	5-25 ng μL^{-1}
α-αμινοξέα (γλουταμινικό οξύ)	0.45 μmol ninhydrin	0.60 nmol μL^{-1}	1 μL	Θέρμανση στους 95°C για 15 λεπτά	0.4-0.61 nmol μL^{-1}

Η ακρίβεια των αποτελεσμάτων και η τυπική απόκλιση για κάθε σημείο βαθμονόμησης απεικονίζεται γραφικά στο σχήμα 4.1.



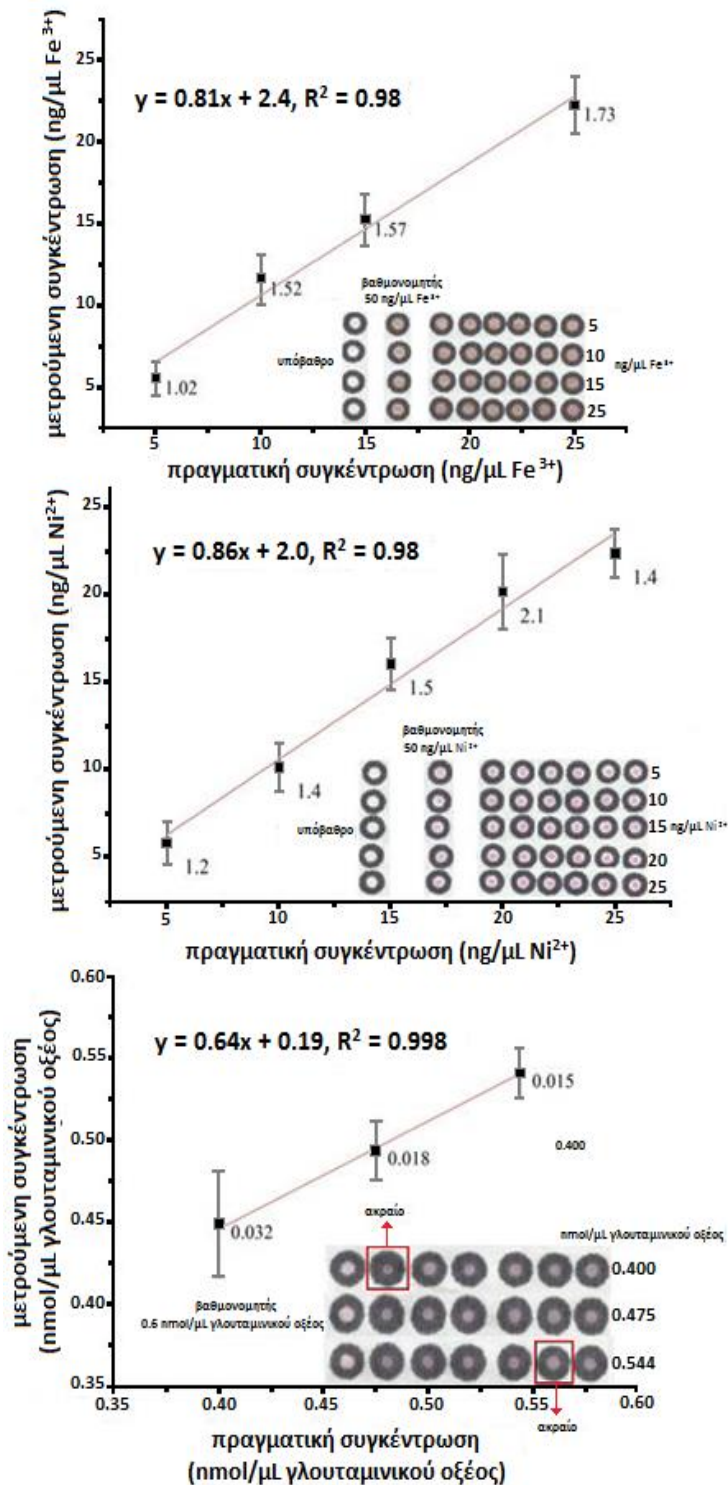
Σχήμα 4.1. Γραμμική απόκριση και ακρίβεια των αναλύσεων βαθμονόμησης ενός σημείου που πραγματοποιούνται σε προ-βαθμονομημένες αναλυτικές συσκευές χάρτου. Η τυπική απόκλιση για κάθε σημείο δεδομένων, υπολογίστηκε από έξι μετρήσεις (δύο μετρήσεις σε τρεις διαφορετικές συσκευές). Οι πειραματικές συνθήκες ορίζονται στον Πίνακα 4.1.

Παρατηρούμε ότι σε όλους τους προσδιορισμούς, παρουσιάζεται σχετικά μικρή γραμμική περιοχή, σε σύγκριση με την κλασική εξωτερική βαθμονόμηση (χρησιμοποιώντας πρότυπα διαλύματα του αναλύτη) (Giokas D.L., *et al.*, 2014 : Cai L., *et al.*, 2013 : Rattanarat P., *et al.*, 2014), λόγω κορεσμού της έντασης του χρώματος στις προβαθμονομημένες συσκευές. Εντούτοις, η γραμμική περιοχή εκτείνεται σε συγκεντρώσεις μικρότερες των συγκεντρώσεων του διαλύματος βαθμονόμησης. Αυτό σημαίνει ότι η συγκέντρωση του προτύπου διαλύματος είναι μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση του αναλύτη. Αυτή η συνθήκη, είναι αναγκαία προϋπόθεση στις δοκιμές σταθερής προσθήκης ενός σημείου, όπου το επίπεδο συγκέντρωσης της σταθερής προσθήκης πρέπει να είναι πολύ μεγαλύτερο από τη συγκέντρωση του αναλύτη στο άγνωστο δείγμα, για να εξασφαλιστεί καλή πιστότητα (Ellison S.L.R. and Thompson M., 2008 : Charlan C. A., *et al.*, 2014). Κατά την ανάλυση του Fe^{3+} και του Ni^{2+} , η παραπάνω συνθήκη ικανοποιείται καθώς το γραμμικό εύρος εκτείνεται σε συγκεντρώσεις 2 έως 10 φορές μικρότερες από του διαλύματος βαθμονόμησης. Όσον αφορά, την ανάλυση των αμινοξέων, το γραμμικό εύρος είναι μικρότερο και εκτείνεται σε συγκεντρώσεις 1 έως 1.5 φορές μικρότερες από του διαλύματος βαθμονόμησης. Αυτή η διαφορά, μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι η αντίδραση του διαλύματος βαθμονόμησης με τη νινυδρίνη, δεν πραγματοποιείται αμέσως μετά την προσθήκη του διαλύματος βαθμονόμησης, σε αντίθεση με τις δοκιμασίες του Fe^{3+} και του Ni^{2+} . Ως αποτέλεσμα, δεν σχηματίζεται το χρωματικό προϊόν της αντίδρασης στη ζώνη ανίχνευσης με την προσθήκη του προτύπου διαλύματος (βαθμονομητή). Μετά την προσθήκη του δείγματος και τη θέρμανση των συσκευών, ο βαθμονομητής και ο αναλύτης αντιδρούν ταυτόχρονα με τη νινυδρίνη και το συνδυασμένο αναλυτικό σήμα αντιστοιχεί στη συνολική συγκέντρωση των αμινοξέων στο διάλυμα βαθμονόμησης και το εξεταζόμενο δείγμα.

Από τα ίδια διαγράμματα βαθμονόμησης, διαφαίνεται ότι οι προσδιορισμοί που πραγματοποιήθηκαν, παρουσιάζουν σχετικά μεγάλο εύρος, (τυπική απόκλιση) μεταξύ των τιμών. Τέτοια αποτελέσματα, παρατηρούνται συχνά στις χρωματομετρικές αναλύσεις επί συσκευών χάρτου, οι οποίες συνήθως εμφανίζουν χαμηλή πιστότητα, αλλά σχετικά καλή ακρίβεια, όταν πραγματοποιούνται πολλές δοκιμές για να εξαχθεί ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων και έτσι ελαχιστοποιούνται οι επιπτώσεις των μη συστηματικών σφαλμάτων (Charlan C. A., *et al.*, 2014). Η πιστότητα των αναλύσεων που πραγματοποιούνται σε διαφορετικές συσκευές, μπορεί να βελτιωθεί με τη χρήση αυτοματοποιημένου συστήματος διανομής υγρού, για την εναπόθεση των αντιδραστηρίων στη συσκευή ή με αφαίρεση των τιμών του υποβάθρου από κάθε μεμονωμένη ζώνη ανίχνευσης (Kappi F. A., *et al.*, 2017). Η

τελευταία προσέγγιση, αξιολογείται και συζητείται εκτενέστερα παρακάτω, στην ανάλυση πραγματιών δειγμάτων.

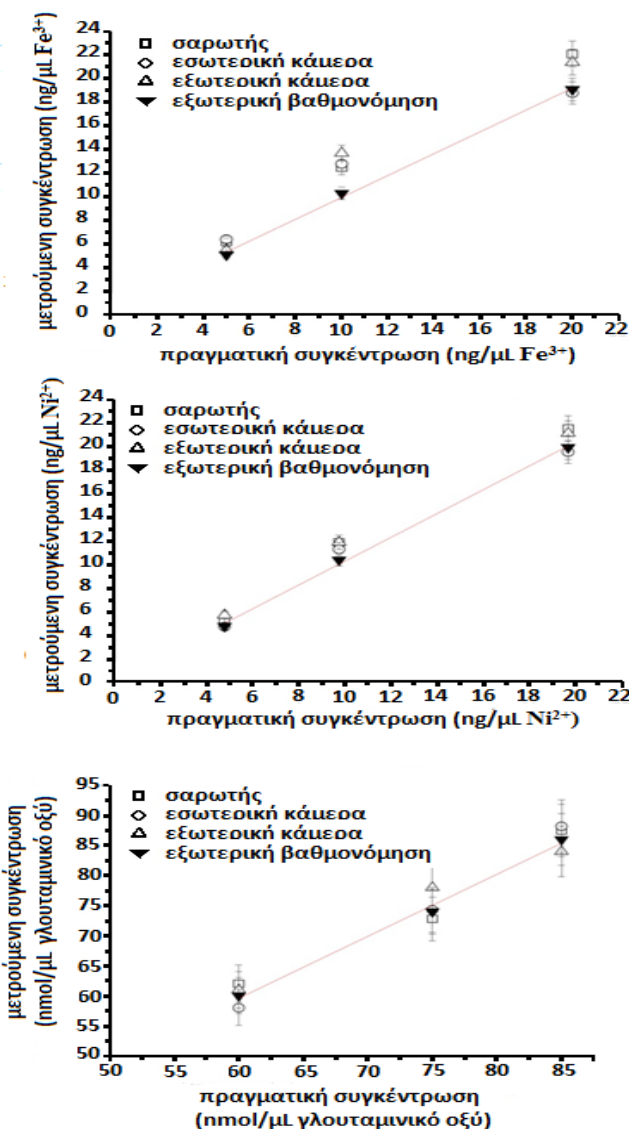
Επιπλέον, εξετάσαμε αν η πιστότητα και η ακρίβεια των αποτελεσμάτων, βελτιώνεται με την εκτέλεση όλων των αναλύσεων στην ίδια συσκευή. Έτσι, εκτελέσαμε μια σειρά πειραμάτων σε μία συσκευή αποτελούμενη από έξι ζώνες ανίχνευσης. Από τα διαγράμματα παλινδρόμησης του Σχήματος 4.2, φαίνεται ότι η πραγματοποίηση τουλάχιστον έξι μετρήσεων ταυτόχρονα ($n=6$) στην ίδια συσκευή, βελτιώνει την τυπική απόκλιση των αποτελεσμάτων (εντός του εύρους των υπό μελέτη συγκεντρώσεων), χωρίς να επηρεάζεται η ακρίβεια τους. Η παραπάνω παρατήρηση μπορεί να σχετίζεται με το γεγονός ότι το σήμα υποβάθρου και το σήμα του πρότυπου (βαθμονόμησης) διαλύματος, ανακτήθηκαν από την ίδια συσκευή και ήταν ίδια για όλες τις μετρήσεις σε κάθε επίπεδο συγκεντρώσεων. Με αυτόν τον τρόπο, ενδεχομένως να ελαχιστοποιούνται τα τυχαία σφάλματα μεταξύ διαφορετικών συσκευών (π.χ. λόγω ανομοιογένειας του χαρτιού, συνθηκών φωτισμού κ.λ.π.)



Σχήμα 4.2. Γραμμική απόκριση και ακρίβεια δοκιμών βαθμονόμησης ενός σημείου, που πραγματοποιήθηκε σε προ-βαθμονομημένες αναλυτικές συσκευές χάρτου. Η τυπική απόκλιση για κάθε σημείο υπολογίστηκε από έξι μετρήσεις, που εκτελέστηκαν στις ζώνες ανίχνευσης της ίδιας συσκευής. Οι ακραίες τιμές που παρατηρήθηκαν στις δοκιμές των αμινοξέων, σημειώνονται σε τετράγωνα. Οι τιμές που ανακτήθηκαν από αυτές τις ζώνες ανίχνευσης, απορρίφθηκαν ως ακραίες και δεν συμπεριλήφθηκαν στους υπολογισμούς.

4.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΦΩΤΙΣΜΟΥ

Εξετάσαμε τη δυνατότητα εφαρμογής της μεθόδου σε διαφορετικές συνθήκες φωτισμού (σαρωτής, εσωτερική και εξωτερική κάμερα) και συγκρίναμε τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από καμπύλη εξωτερικής βαθμονόμησης που ελήφθησε χρησιμοποιώντας σαρωτή για την απόκτηση του σήματος. Οι καμπύλες βαθμονόμησης για τις τρεις διαφορετικές συνθήκες φωτισμού παρουσιάζονται στο σχήμα 4.3. Γενικά, όλες οι καμπύλες είναι γραμμικές και τα αποτελέσματα διατηρούν το επίπεδο της ακρίβειας, υπό την προϋπόθεση ότι όλες οι μετρήσεις έχουν πραγματοποιηθεί υπό τις ίδιες συνθήκες φωτισμού. Το t-τεστ (σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95%), έδειξε ότι δεν υπάρχει σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την εξωτερική βαθμονόμηση και την σταθερή προσθήκη, χρησιμοποιώντας προβαθμονομημένες συσκευές ενός σημείου, υπό τις τρεις συνθήκες φωτισμού.



Σχήμα 4.3. Σύγκριση αποτελεσμάτων της σταθερής προσθήκης ενός σημείου σε διαφορετικές συνθήκες φωτισμού με τα αποτελέσματα της εξωτερικής βαθμονόμησης.

4.4 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των πραγματικών δειγμάτων, χρησιμοποιώντας προβαθμονομημένες συσκευές ενός σημείου (single-calibrant loaded devices), παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.3. Όλες οι τιμές προκύπτουν από το μέσον όρο των έξι μετρήσεων που πραγματοποιήθηκαν στην ίδια συσκευή. Με τον αποκλεισμό των ακραίων τιμών, τα αποτελέσματα ήταν σε σχετική συμφωνία με τις αναμενόμενες συγκεντρώσεις του αναλύτη, αλλά η αναπαραγωγικότητα (ως RSD) μειώθηκε σε σύγκριση με εκείνη που παρατηρήθηκε στα πρότυπα διαλύματα, στα ίδια επίπεδα συγκεντρώσεων (σχήμα 4.1). Η απώλεια της ακρίβειας και της πιστότητας αποδόθηκε στο γεγονός ότι χρησιμοποιείται μία ζώνη ανίχνευσης για την απόκτηση του σήματος του υποβάθρου και του διαλύματος βαθμονόμησης. Αυτή η προσέγγιση μπορεί να είναι φιλική προς το χρήστη, δεδομένου ότι αποκτάται μόνο μία εικόνα της συσκευής, αλλά βασίζεται στην (απλοποιημένη) παραδοχή ότι τα σήματα του υποβάθρου και του διαλύματος βαθμονόμησης είναι τα ίδια σε όλες τις ζώνες ανίχνευσης και δεν υπάρχει μεταβολή του σήματος από τη μία ζώνη ανίχνευσης στην άλλη. Συνεπώς, δεν λαμβάνονται υπόψη οι διαφορές μεταξύ των ζωνών ανίχνευσης.

Στην προσπάθεια για βελτίωση της ακρίβειας, πραγματοποιήσαμε ξανά τους προσδιορισμούς, αποκτώντας μία εικόνα των συσκευών με σκοπό την ανάκτηση της έντασης του χρώματος του υποβάθρου (δηλ. των χρωματικών τιμών) και των διαλυμάτων βαθμονόμησης για κάθε ζώνη ανίχνευσης, χωριστά. Ο προσδιορισμός του κάθε αναλύτη πραγματοποιήθηκε ξανά, αλλά αυτή τη φορά το μετρούμενο σήμα αφαιρέθηκε από το σήμα υποβάθρου της συγκεκριμένης ζώνης και η ένταση του σήματος των προβαθμονομημένων συσκευών, χρησιμοποιήθηκε χωριστά στους υπολογισμούς. Η συγκεκριμένη προσέγγιση απαιτεί περισσότερη υπολογιστική προσπάθεια καθώς απαιτούνται τρία στάδια απόκτησης και μέτρησης του σήματος. Το πρώτο μετά την προσθήκη των χρωματομετρικών αντιδραστηρίων, στο δεύτερο μετά την προσθήκη του διαλύματος βαθμονόμησης και στο τρίτο μετά την εισαγωγή του δείγματος. Σε κάθε στάδιο, πρέπει να μετράται χωριστά η ένταση του σήματος από όλες τις ζώνες ανίχνευσης στη συσκευή. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 4.3 (σε παρενθέσεις) και δείχνουν ότι η συγκεκριμένη προσέγγιση, προσφέρει βελτίωση τόσο στην ακρίβεια, όσο και στην πιστότητα όλων των προσδιορισμών. Μια τέτοια προσέγγιση συνεπώς, θα μπορούσε να είναι πιο κατάλληλη για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων μιας ανάλυσης ή όταν η επίδραση της μήτρας είναι σημαντική και υπάρχουν παρεμποδίσεις.

Παρόλη την βελτίωση στην ακρίβεια και πιστότητα των αποτελεσμάτων όμως στον προσδιορισμό του Ni, οι ανακτήσεις βρέθηκαν υψηλότερες από 110%, υποδηλώνοντας ότι οι παρεμποδίσεις δεν έχουν εξαλειφθεί πλήρως κατά την προεπεξεργασία του δείγματος, αν και τα αποτελέσματα θεωρούνται αποδεκτά.

Πίνακας 4.3. Εφαρμογή της μεθόδου εξωτερικής βαθμονόμησης ενός σημείου στην ανάλυση πραγματικών δειγμάτων

Αναλύτης	Μετρούμενη συγκέντρωση±RSD	Σφάλμα (%)	Ανάκτηση (%)	Πραγματική τιμή
Fe ³⁺ (ng/μL)	76.5±8.1	9.3	109	70.0
	[74.1±6.2]	[5.9]	[106]	
	151±14	7.8	108	140.0
	[145±11]	[3.5]	[103]	
Ni ²⁺ (ng/μL)	57.3±6.9	14.6	115	50.0
	[54.8±5.0]	[9.6]	[110]	
	110±12.3	10.0	110	100.0
	[112.2±9.5]	[12.2]	[112]	
Γλουταμινικό οξύ (mg/L)	203±18	7.9	92	220.5
	[212±15]	[3.8]	[96]	
	468±52	6.1	106	441.0
	[451±50]	[2.3]	[102]	

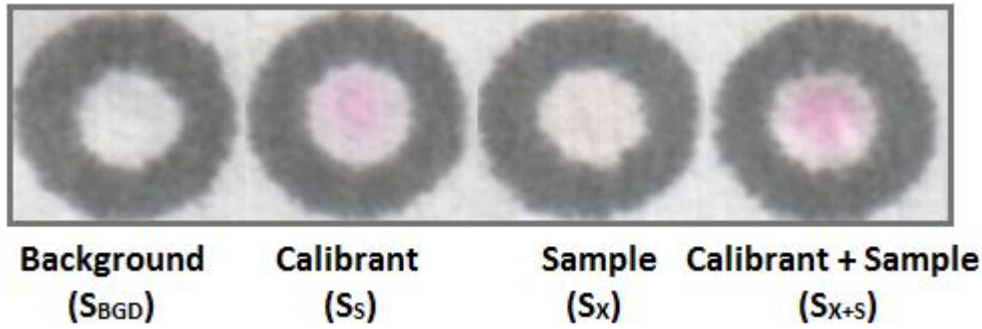
Σφάλμα(%) = (μετρούμενη συγκέντρωση– πραγματική τιμή) ×100 / πραγματική τιμή.

4.5 ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΕΩΝ ΣΤΟ ΔΕΙΓΜΑ

Η προσέγγισή μας, προσφέρει ένα απλό και χωρίς ιδιαίτερες απαιτήσεις πρωτόκολλο, που δίνει τη δυνατότητα ημιποσοτικής εκτίμησης της επίδρασης των παρεμποδίσεων στο αναλυτικό σήμα, κάνοντας χρήση και των δύο μεθόδων βαθμονόμησης. Αν τα αποτελέσματα της εξωτερικής βαθμονόμησης και της σταθερής προσθήκης ενός σημείου διαφέρουν

σημαντικά, τότε υπάρχει πιθανότητα παρουσίας παρεμποδίσεων στο δείγμα. Σε αυτή την περίπτωση, αποδεχόμαστε τα αποτελέσματα της σταθερής προσθήκης ενός σημείου, που είναι πιθανότερο να εμφανίζουν μεγαλύτερη ακρίβεια από τα αποτελέσματα της εξωτερικής βαθμονόμησης ή λαμβάνουμε τα κατάλληλα μέτρα για την εξάλειψη των παρεμποδίσεων στο δείγμα (ότι είναι πιο εύκολο και βολικό).

Για να αποδειχθεί η χρησιμότητα της μεθόδου στον εντοπισμό παρεμποδίσεων σε ένα άγνωστο δείγμα, πραγματοποιήσαμε ένα πείραμα, χρησιμοποιώντας ένα υδατικό διάλυμα που περιείχε $25 \text{ mg L}^{-1} \text{ Fe}^{3+}$, $25 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ και $25 \text{ mg L}^{-1} \text{ Co}$ (ως παρεμποδιστές) και $10 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ni}$ (ως αναλύτης-στόχος). Το χρώμα του διαλύματος ήταν υποκίτρινο, λόγω παρουσίας του Fe^{3+} . Στη συνέχεια, εφαρμόσαμε τις μεθόδους εξωτερικής βαθμονόμησης ενός σημείου και σταθερής προσθήκης ενός σημείου σε προβαθμονομημένες συσκευές. Η συγκέντρωση του βαθμονομητή ήταν $50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, προκειμένου να εξασφαλιστεί ότι η συγκέντρωση του Ni στο πρότυπο διάλυμα είναι πέντε φορές υψηλότερη από τη συγκέντρωση του Ni στο δείγμα (Ellison S.L.R. and Thompson M., 2008). Οι εικόνες των συσκευών και τα μετρούμενα σήματα παρουσιάζονται παρακάτω στο Σχήμα 4.4 και τον Πίνακα 4.4. Με βάση την καθαρή ένταση του σήματος και τις σχέσεις (1) και (2), η συγκέντρωση Ni με τη μέθοδο σταθερής προσθήκης βρέθηκε 9.3 mg L^{-1} ενώ με τη μέθοδο εξωτερικής βαθμονόμησης 55.9 mg L^{-1} . Προφανώς, υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων που αποκτήθηκαν από τις δύο μεθόδους, η οποία είναι παρατηρήσιμη και δια γυμνού οφθαλμού στις εικόνες των διατάξεων (εμφανίζεται υποκίτρινος - άσπρος χρωματισμός στη ζώνη ανίχνευσης του δείγματος - Sample: S_x - και όχι ασθενής ροζ που θα υποδεικνύε το σχηματισμό του συμπλόκου Ni-DMG). Συνεπώς, μια συνδυασμένη αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων, μπορεί να παρέχει στοιχεία για την παρουσία παρεμποδίσεων στο δείγμα. Έτσι ο χρήστης έχει τη δυνατότητα να επιλέξει την καταλληλότερη προσέγγιση (βαθμονόμηση σταθερής προσθήκης ή προεπεξεργασία του δείγματος).



Σχήμα 4.4. Φωτογραφίες των διατάξεων (από σαρωτή) που ελήφθησαν κατά την ανάλυση τεχνητού δείγματος Ni²⁺ παρουσία παρεμποδίσεων.

Πίνακας 4.4. Μετρούμενη ένταση του χρώματος στην επιφάνεια των διατάξεων και υπολογισμός συγκεντρώσεων με τις μεθόδους εξωτερικής βαθμονόμησης και σταθερής προσθήκης ενός σημείου.

Σήμα	Μετρούμενη ένταση	Καθαρή ένταση ¹	Συγκέντρωση σταθερής προσθήκης	Αποτέλεσμα της σταθερής προσθήκης (σχέση 1)	Αποτέλεσμα της εξωτερικής βαθμονόμησης (σχέση 2)
S _{BGD}	216.8				
S _X	220.5	-3.7	10 mg L ⁻¹	9.3 mg L ⁻¹	
S _{X+S}	200.7	16.1			55.9 mg L ⁻¹
S _S	209.2	7.6			

¹ Καθαρή ένταση: S_{BGD} – S_S or X or X+S

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σε αυτή την μεταπτυχιακή εργασία, παρουσιάσαμε μια απλοποιημένη προσέγγιση για την πραγματοποίηση χρωματομετρικών αναλύσεων σε αναλυτικές συσκευές που βασίζονται στο χαρτί και συγκεκριμένα σε προβαθμονομημένες συσκευές χάρτου. Η μέθοδος στηρίζεται στο αθροιστικό σήμα που παράγεται από τον αναλύτη που εμπεριέχεται στο δείγμα και από το πρότυπο διάλυμα του αναλύτη που έχει προαποθηκευτεί στη συσκευή. Η εκτέλεση του αναλυτικού πρωτοκόλλου είναι σχετικά εύκολη και δεν απαιτείται τεχνική εμπειρογνωμοσύνη ή εξειδικευμένος εξοπλισμός. Ο χρήστης προσθέτει ένα δείγμα στη συσκευή και διαβάσει την ένταση του χρώματος του υποβάθρου και των περιοχών ανίχνευσης, ταυτόχρονα, και σε ένα μόνο βήμα, χρησιμοποιώντας μια απλή συσκευή απεικόνισης, όπως κάμερα ή σαρωτή.

Αυτή η προσέγγιση βαθμονόμησης, λειτουργεί μέσα σε ένα σχετικά στενό γραμμικό εύρος συγκεντρώσεων: α) ελαχιστοποιώντας την επίδραση των επιπέδων συγκέντρωσης της σταθερής προσθήκης (spiking level) στην πιστότητα των αποτελεσμάτων, που είναι ένας εγγενής περιορισμός της μεθόδου σταθερής προσθήκης ενός σημείου, β) αποφεύγοντας τις μη γραμμικές καμπύλες σταθερής προσθήκης, που εμφανίζουν δυσκολίες κατά την μαθηματική επίλυση τους. Επιπλέον, ελαχιστοποιούνται οι απαιτήσεις, που αφορούν τον όγκο του δείγματος (μόλις 1 μL απαιτείται για την ανάλυση σε κάθε ζώνη ανίχνευσης) και η επίδραση της μη ομοιόμορφης μεταφοράς των ρευστών ενώ αποφεύγεται και η επίδραση της μεταβολής των περιβαλλοντικών συνθηκών κατά τη διάρκεια της βαθμονόμησης και της ανάλυσης. Με τη συγκεκριμένη μέθοδο, μειώνονται τα τυχαία σφάλματα που οφείλονται στην ανομοιογένεια του χαρτιού, καθώς αφαιρείται το σήμα υποβάθρου από το αναλυτικό σήμα. Επίσης, η σταθερότητα των συσκευών μπορεί να εξακριβωθεί εύκολα, συγκρίνοντας την ένταση του χρώματος των ζωνών ανίχνευσης των συσκευών, λίγο μετά την προετοιμασία τους και πριν από τη χρήση. Όταν παρατηρείται αλλοίωση των αντιδραστηρίων (συνήθως παρατηρείται από την αλλαγή της έντασης του χρώματος στις προβαθμονομημένες ζώνες ανίχνευσης), οι συσκευές θα πρέπει να απορρίπτονται.

Θα πρέπει τέλος να σημειωθεί ότι τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μεθόδου δεν είναι τόσο ακριβή, όσο αυτά που λαμβάνονται από την εξωτερική βαθμονόμηση ή από ενόργανες τεχνικές ανάλυσης, όμως μπορεί να είναι χρήσιμα σε καταστάσεις έκτακτης ανάγκης, όπου απαιτείται ταχύ αποτέλεσμα, για ημιποσοτικές ή ποιοτικές αξιολογήσεις

διαφόρων δειγμάτων (π.χ. νοθευμένα τρόφιμα) και σε επί τόπου περιβαλλοντικές έρευνες ή ελλείψει εργαστηριακών εγκαταστάσεων και περιορισμένων πόρων (π.χ. συνθήκες απώλειας ηλεκτρικού ρεύματος). Εξίσου σημαντικό είναι όμως και το γεγονός ότι η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση παρεμποδίσεων στο δείγμα δίνοντας έτσι τη δυνατότητα έγκαιρης αντιμετώπισης τους και αποφεύγοντας (ή ελαχιστοποιώντας) σφάλματα κατά την ανάλυση.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ballerini D.R., Li X., Shen W., Patterned paper and alternative materials as substrates for low-cost microfluidic diagnostics, *Microfluid. Nanofluid.* **13** (2012) 769–787.
- Bhakta S.A., Borba R., Taba Jr M., Garcia C.D., Carrilho E., Determination of nitrite in saliva using microfluidic paper-based analytical devices, *Anal. Chim. Acta* **809** (2014) 117-122.
- Brooks T., Keevil C.W., A simple artificial urine for the growth of urinary pathogens, *Lett. Appl. Microbiol.* **24** (1997) 203-206.
- Cai L., Wu Y., Xu C., Chen Z., A simple paper-based microfluidic device for the determination of the total amino acid content in a tea leaf extract, *J. Chem. Educ.* **90** (2013) 232–234.
- Cardone M.J., Detection and determination of error in analytical methodology, *J. Assoc Off Anal. Chem.* **66** (1983) 1257-1282.
- Cardone M.J., Palmero P.J., Sybrandt L.B., *Anal. Chem.* **52** (1980) 1187–1191.
- Carrilho E., Martinez A.W., Whitesides G.M., Understanding Wax Printing: A Simple Micropatterning Process for Paper-Based Microfluidics, *Anal. Chem.* **81** (2009) 7091-7095.
- Cassano C.L., Fan Z.H., Laminated paper-based analytical devices (LPAD): fabrication, characterization, and assays, *Microfluid Nanofluid.* **15** (2013) 173-181.
- Cate D.M., Adkins J.A., Mettakoonpitak J., Henry C.S., Recent developments in paper-based microfluidic devices, *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.
- Chaplan C. A., Mitchell H. T., Martinez A. W., Paper-based standard addition assays, *Anal. Methods.* **6** (2014) 1296–1300.
- Chin C. D., Linder V. and Sia S. K., Lab-on-a-chip devices for global health: Past studies and future opportunities, *Lab Chip.* **7** (2007), 41–57.

Choleva T.G., Kappi F.A., Giokas D.L., Vlessidis A.G., Paper-based assay of antioxidant activity using analyte-mediated on-paper nucleation of gold nanoparticles as colorimetric probes, *Anal. Chim. Acta* **860** (2015) 61-69.

Christodouleas D.C., Nemiroski A., Kumar A.A., Whitesides G.M., Broadly available imaging devices enable high-quality low-cost photometry, *Anal. Chem.* **87** (2015) 9170–9178.

Committee on Analytical Reagents, Reagent Chemicals, 8th ed., *American Chemical Society: Washington, D. C.*, (1993).

Consden R., Gordon A.H., Martin A.J.P., Qualitative analysis of proteins: a partition chromatographic method using paper, *Biochem. J.* **38** (1944) 224-232.

Cuadros Rodr'iguez L., G'amiz Gracia L., Almansa L'opez E., Bosque Sendra J.M., Principles of analytical calibration/quantification for the separation sciences, *Journal of Chromatography A.* **1158** (2007) 33–46.

Deegan R.D., Bakajin O., Dupont T.F., Huber G., Nagel S.R., Witten T.A., Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops, *Nature* **389** (1997) 827–829.

Deraney R.N., Mace C.R., Rolland J.P, Schonhorn J.E., Multiplexed, patterned-paper immunoassay for detection of malaria and dengue fever, *Anal. Chem.* **88** (2016) 6161–6165.

Dungchai W., Chailapakul O., Henry C.S., A low-cost, simple, and rapid fabrication method for paper-based microfluidics using wax screen-printing, *Analyst.* **136** (2011) 77-82.

E.A.-04/14., The Selection and Use of Reference Materials, *European Cooperation for Accreditation* (2003).

Ellerbee A.K., Phillips S.T., Siegel A.C., Mirica K.A., Martinez A.W., Striehl P., Jain N., Prentiss M., Whitesides G.M., Quantifying colorimetric assays in paper-based microfluidic devices by measuring the transmission of light through paper, *Anal. Chem.* **81** (2009) 8447–8452.

Ellison S.L.R., Thompson M., Standard additions: myth and reality, *Analyst.* **133** (2008) 992–997.

Evans E., Gabriel E.F.M., Coltro W.K.T., Garcia C.D., Modification of Microfluidic Paper-Based Devices with Silica Nanoparticles, *Analyst*. **139** (2014) 2127-2132.

Evans E., Moreira Gabriel E.F., Coltro W.K.T., Garcia C.D., Rational selection of substrates to improve color intensity and uniformity on microfluidic paper-based analytical devices, *Analyst*. **139** (2014) 2127-2132.

Evans E., Moreira Gabriel E.F., Tomazelli Coltro W.K., Garcia C.D., Rational selection of substrates to improve color intensity and uniformity on microfluidic paper-based analytical devices, *Analyst*. **139** (2014) 2127-2132.

Fenton E.M, Mascarevas N.R., Lopez G.P., Sibbett S.S., Multiplex lateral-flow test strips fabricated by two-dimensional shaping, *ACS Appl. Matter Interfaces*. **1** (2008) 124-129.

Fernández- Figares I., Cuadros Rodríguez L. , González-Casado A., Effect of different matrices on physiological amino acids analysis by liquid chromatography: evaluation and correction of the matrix effect, *J. Chromatogr. B*. **799** (2004) 73–79.

Fridley G.E., Le H., Yager P., Highly sensitive immunoassay based on controlled rehydration of patterned reagents in a 2-dimensional paper network, *Anal. Chem*. **86** (2014) 6447–6453.

Fu E., Enabling robust quantitative readout in an equipment-free model of device development, *Analyst*. **139** (2014) 4750-4757.

Fu E., Kauffman P., Lutz B., Yager P., Chemical signal amplification in two-dimensional paper networks, *Sens-Actuators, B: Chem* **149** (2010) 325-328.

Gómez Caravaca A.M., Carrasco Pancorbo A., Cañabate Díaz B., Segura Carretero A., Fernández Gutiérrez A., High-throughput determination of phenolic compounds in virgin olive oil using dispersive liquid-liquid microextraction-capillary zone electrophoresis, *Electrophoresis*. **34** (2013) 1836–1843.

Gervais L., de Rooij N., Delamarche E., Microfluidic chips for point-of-care immunodiagnosics, *Adv. Mater*. **23** (2011) H151–H176.

Giokas D.L., Tsogas G.Z., Vlessidis A.G., Programming fluid transport in paper-based microfluidic devices using razor-crafted open channels, *Anal Chem*. **86** (2014) 6202-6207.

Glavan A., Christodouleas D.C., Mosadegh B., Yu H., Smith B., Lessing J., Fernandez-Abedul M.T., Whitesides G.M., Folding analytical devices for electrochemical ELISA in hydrophobic RH paper, *Anal. Chem.* **86** (2014) 11999-12007.

Harvey D., in Analytical Chemistry 2.0, published online at <http://www.asdlib.org/onlineArticles/ecourseware/Welcome.html>, (2008), 161–167.

Jayawardane B.M., Wei S., McKelvie I.D., Kolev S.D., Microfluidic paper-based analytical device for the determination of nitrite and nitrate, *Anal. Chem.* **86** (2014) 7274–7279.

Kappi F. A., Tsogas G. Z., Christodouleas D. C., Giokas D. L., Calibrant-loaded paper-based analytical devices for standard addition quantitative assays, *Sensors and Actuators B: Chemical.* **253** (2017) 860-867.

Kóscielniak P., Nonlinear calibration by the standard addition method, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **47** (1999) 275–287.

Lankelma J., Nie Z., Carrilho E., Whitesides G.M., Paper-based analytical device for electrochemical flow-injection analysis of glucose in urine, *Anal. Chem.* **84** (2012) 4147–4152.

Lewis G.G., DiTucci M.J., Phillips S.T., Quantifying analytes in paper-based microfluidic devices without using external electronic readers, *Angew. Chem. Int. Ed.* **51** (2012) 12707–12710.

Lewis G.G., Robbins J.S., Phillips S.T., A prototype point-of-use assay for measuring heavy metal contamination in water using time as a quantitative readout, *Chem. Commun.* **50** (2014) 5352–5354.

Li M., Tian J., Al-Tamimi M., Shen W., Paper-based blood typing device that reports patient's blood type “in writing”, *Angew. Chem. Int. Ed.* **51** (2012) 5497-5501.

Li X., Ballerini D.R., Shen W., A perspective on paper-based microfluidics: Current status and future trends, *Biomicrofluidics* **6** (2012) 011301-011313.

Li X., Liu X., Fabrication of three-dimensional microfluidic channels in a single layer of cellulose paper, *Microfluid Nanofluid.* **16** (2014) 819-827.

Li X., Tian J., Shen W., Quantitative biomarker assay with microfluidic paper-based analytical devices, *Anal Bioanal Chem.* **396** (2010) 495-501.

Liana D.D., Raguse B., Gooding J.J., Chow E., Recent advances in paper-based sensors, *Sensors* **12** (2012) 11505-11526.

Lu Y., Shi W., Jiang L., Qin J., Lin B., Rapid prototyping of paper-based microfluidics with wax for low-cost, portable bioassay, *Electrophoresis.* **30** (2009) 1497-1500.

Martinez A. W. , Phillips S. T., Carrilho E., Thomas S. W., Sindi H. and Whitesides G. M., Simple telemedicine for developing regions: camera phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis., *Anal. Chem.* **80** (2008) 3699–3707.

Martinez A. W., Phillips S. T., Butte M. J. and Whitesides G. M., Patterned paper as a platform for inexpensive, low volume, portable bioassays., *Angew. Chem., Int. Ed.* **46** (2007) 1318–1320.

Martinez A.W., Microfluidic paper-based analytical devices: from POCKET to paper-based ELISA, *Bioanalysis* **23** (2011) 2589–2592.

Martinez A.W., Phillips S.T., Whitesides G.M., Three-dimensional microfluidic devices fabricated in layered paper and tape, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105** (2008) 19606-19611.

Moody J. R., Greenburg P. R., Pratt K. W., Rains T. C., The Two Sides of Analytical Chemistry, *Anal. Chem.* **60** (1988) 1203A–1218A.

Morbioli G.G., Mazzu-Nascimento T., Stockton A.M., Carrilho E., Technical aspects and challenges of colorimetric detection with microfluidic paper-based analytical devices (mPADs) - A review, *Anal. Chim. Acta.* **970** (2017) 1-22.

Nie J., Liang Y., Zhang Y., Le S., Li D., Zhang S., One-step patterning of hollow microstructures in paper by laser cutting to create microfluidic analytical devices, *Analyst.* **138** (2013) 671-676.

Noh H., Phillips S.T., Fluidic timers for time-dependent, point-of-care assays on paper, *Anal. Chem.* **82** (2010) 8071–8078.

Noiphung J., Songjaroen T., Dungchai W., Hentry C.S., Chailapakul O., Laiwattanapaisal W., Electrochemical detection of glucose from whole blood using paper-based microfluidic devices, *Anal. Chim. Acta.* **788** (2013) 39-45.

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., Draw your assay: Fabrication of low-cost paper-based diagnostic and multi-well test zones by drawing on a paper, *Talanta* **144** (2015) 289–293.

Persson B-A., Vessman J., Generating selectivity in analytical chemistry to reach the ultimate – specificity, *Trends Anal. Chem.* **17** (1998) 117–119.

Persson B-A., Vessman J., The use of selectivity in analytical chemistry - Some considerations, *Trends Anal. Chem.* **20** (2001) 526–532.

Petryayeva E., Algar W.R., Toward point-of-care diagnostics with consumer electronic devices: the expanding role of nanoparticles, *RSC Adv.* **5** (2015) 22256-22282.

Rattanarat P., Dungchai W., Cate D., Volckens J., Chailapakul O., Henry C.S., Multilayer paper-based device for colorimetric and electrochemical quantification of metals, *Anal. Chem.* **86** (2014) 3555–3562.

Renault C., Koehne J., Ricco A.J., Crooks R.M., Three-dimensional wax patterning of paper fluidic devices, *Langmuir.* **30** (2014) 7030-7036.

Renault C., Li X., Fosdick S.E., Crooks R.M., Hollow-Channel Paper Analytical Devices, *Anal. Chem.* **85** (2013) 7976-7979.

Schilling K. C., Jauregui D. and Martinez A. W., Paper and toner three dimensional fluidic devices: programming fluid flow to improve point-of-care diagnostics, *Lab Chip.* **13** (2013) 628–631.

Schilling K.M., Lepore A.L., Kurian J.A., Martinez A.W., Fully enclosed microfluidic paper-based analytical devices, *Anal. Chem.* **84** (2012) 1579–1585.

Schrader B., ed., Infrared and Raman Spectroscopy: Methods and Applications, (1995).

Songjaroen T., Dungchai W., Chailapakul O., Laiwattanapaisal W., Novel, simple and low-cost alternative method for fabrication of paper-based microfluidics by wax dipping, *Talanta* **85** (2011) 2587-2593.

Spicar-Mihalic P., Toley B., Houghtaling J., Liang T., Yager P., Fu E., CO₂ laser cutting and ablative etching for the fabrication of paper-based devices, *J. Micromech Microeng* **23** (2013) 067003.

Swanson C., Lee S., Aranyosi A.J., Tien B., Chan C., Wong M., Lowe J., Jain S., Ghaffari R., Rapid light transmittance measurements in paper-based microfluidic devices, *Sensing Bio-Sensing Research* **5** (2015) 55–61.

Toley B.J., McKenzie B., Liang T., Buser J.R., Yager P., Fu E., Tunable-delay shunts for paper microfluidic devices, *Anal. Chem.* **85** (2013) 11545–11552.

Valcárcel M., Gomez-Hens A., Rubio S., Selectivity in analytical chemistry revised, *Trends Anal. Chem.* **20** (2001) 386–393.

Valcárcel M., Ríos A., The hierarchy and relationships of analytical properties, *Anal. Chem.* **65** (1993) 781A–787A.

Veigas B., Jacob J.M., Costa M.N., Santos D.S., Viveiros M., Inácio J., Martins R., Barquinha P., Fortunato E., Baptista P.V., Gold on paper–paper platform for Au-nanoprobe TB detection, *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., Measuring markers of liver function using a micropatterned paper device designed for blood from a fingerstick, *Anal. Chem.* **84** (2012) 2883–2891.

von Lode P., Point-of-care immunotesting: approaching the analytical performance of central laboratory methods, *Clin Biochem.* **38** (2005) 591–606.

Wang W., Wu W.-Y., Zhu J.-J., Tree-shaped paper strip for semi-quantitative colorimetric detection of protein with self-calibration, *J Chromatogr A.* **1217** (2010) 3896-3899.

Winerordner J.D., A Series Of Monographs On Analytical Chemistry And It's Applications, *Chemical Analysis.* **162** (2003) by J. Wiley & Sons, Ink.

Xiao J., Stone H.A., Attinger D., Source-like solution for radial imbibition into a homogeneous semi-infinite porous medium, *Langmuir*. **28** (2012) 4208-4212.

Yetisen A. K., Akram M. S. and Lowe C. R., Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices, *Lab Chip*. **13** (2013) 2210–2251.

Zhao W., Ali M.M., Aguirre S.D., Brook M.A., Li Y., Paper-Based bioassays using gold nanoparticle colorimetric probes, *Anal. Chem.* **80** (2008) 8431–8437.

Zhu W-J., Feng D-Q., Chen M., Chen Z-D., Zhu R., Fang H-L., Wang W., Bioenzyme colorimetric detection of glucose with self-calibration based on tree-shaped paper strip, *Sensors Actuators B: Chemical* **190** (2014), 414– 418.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στη συγκεκριμένη εργασία περιγράφουμε μια νέα, απλοποιημένη προσέγγιση, για την πραγματοποίηση ποσοτικών, χρωματομετρικών αναλύσεων σε βαθμονομημένες αναλυτικές συσκευές χάρτου, με σκοπό την πραγματοποίηση εξωτερικής βαθμονόμησης ενός σημείου ή βαθμονόμησης σταθερής προσθήκης. Οι προβαθμονομημένες συσκευές, αποτελούνται από περιοχές ανίχνευσης, που ενσωματώνουν το προϊόν της χρωματομετρικής αντίδρασης, που προκύπτει από την αντίδραση των κατάλληλων αντιδραστηρίων με πρότυπο διάλυμα του αναλύτη. Το αναλυτικό σήμα (δηλαδή η ένταση του χρώματος), που παράγεται με την προσθήκη του αγνώστου δείγματος στη προβαθμονομημένη ζώνη ανίχνευσης, αυξάνεται αναλογικά με τη συγκέντρωση της αναλύμενης ουσίας στο υπό ανάλυση δείγμα. Επομένως, το συνολικό μετρούμενο σήμα, αντιστοιχεί στο άθροισμα της συγκέντρωσης του αναλύτη στο δείγμα και του πρότυπου διαλύματος που προαποθηκεύτηκε στη συσκευή. Το συνολικό σήμα, χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του αναλύτη στο δείγμα, με τη χρήση των αρχών της εξωτερικής βαθμονόμησης ή της βαθμονόμησης σταθερής προσθήκης. Η εφαρμογή αυτής της προσέγγισης, αξιολογήθηκε σε τρεις διαφορετικές μεθόδους (για τον προσδιορισμό του σιδήρου, του νικελίου, και των αμινοξέων), που βασίζονται σε διαφορετικές χημικές αντιδράσεις. Με βάση τα αποτελέσματα παρουσιάζεται μια απλοποιημένη προσέγγιση, χωρίς βαθμονόμηση για αναλύσεις που πραγματοποιούνται σε αναλυτικές συσκευές χάρτου. Η προτεινόμενη μέθοδος απαιτεί ελάχιστη πειραματική και υπολογιστική προσπάθεια και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για εξωτερική βαθμονόμηση ή/ και για βαθμονόμηση σταθερής προσθήκης, καθώς και για τον εντοπισμό πιθανών παρεμποδίσεων σε ένα δείγμα.

ABSTRACT

This article describes a new, simplified approach for performing quantitative colorimetric assays on paper-based analytical devices that uses calibrant loaded paper devices to perform one-point external calibration or standard addition calibration. Calibrant-loaded devices consist of sensing areas pre-loaded with the colorimetric reaction product of the appropriate reagents with a standard solution of the target analyte. When the sample is added into the calibrant-loaded sensing zone the analytical signal (i.e. color intensity) increases proportionally to the concentration of the analyte in the tested sample so that the total measured signal corresponds to the sum of the concentration of the analyte in the sample and the standard solution pre-stored in the device. The total (combined) signal is used to calculate the concentration of the analyte in the sample using the principles of external or standard addition calibration. The applicability of this approach was benchmarked in three assays (i.e., for the determination of iron, nickel, protein, and amino acids) that use different colorimetric reaction chemistries. This work demonstrates a simplified calibration-free approach for assays performed on paper-based analytical devices that requires minimum experimental and computational effort, it can be used for either external or standard addition calibration and can be used to identify the presence of interferences in a sample.