



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών
ΜΠΣ Βιοϊατρικές μέθοδοι και τεχνολογία στη διάγνωση



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ανάπτυξη μιας εναλλακτικής φωτομετρικής μεθόδου με κύριο ενδιαφέρον στο πεδίο της περιβαλλοντικής ανάλυσης

POST GRADUATE THESIS

Development of an alternative photometric method with primary applications in the field of environmental analysis



ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ(ΤΩΝ)/NAME OF STUDENTS

Μαζαράκης Αναστάσιος Φοίβος
Mazarakis Anastasios Foivos

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

Γεωργία Ελένη Τσότσου
Georgia Eleni Tsotsou

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2022



Faculty of Health and Caring Professions

Department of Biomedical Sciences

Postgraduate program:

Biomedical methods and technology in diagnosis



POST GRADUATE THESIS

Development of an alternative photometric method of analysts with primary applications in the field of environmental analysis

MAZARAKIS ANASTASIOS FOIVOS

DmL20014

DmL20014@uniwa.gr

FIRST SUPERVISOR

GEORGIA ELENI TSOTSOU

SECOND SUPERVISOR

MARIA TRAPALI

AIGALEO 2022

Επιτροπή εξέτασης

Ημερομηνία εξέτασης: 3η Οκτωβρίου 2022

Ονόματα εξεταστών

Υπογραφή

1^{ος} Εξεταστής Γεωργία Ελένη Τσότσου

2^{ος} Εξεταστής Μαρία Τράπαλη

Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας

Ο κάτωθι υπογεγραμμένος Μαζαράκης Αναστάσιος Φοίβος του Μιχαήλ, με αριθμό μητρώου 20014 φοιτητής του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Βοϊατρικές μέθοδοι και Τεχνολογία στη Διάγνωση του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της, είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Ο Δηλών,

Ευχαριστίες

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την υπεύθυνη καθηγήτρια, Κ. Γεωργία Ελένη Τσότσου, για τις ανεκτίμητες συμβουλές της, τη συνεχή υποστήριξη και την υπομονή της κατά τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μου διατριβής. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον φίλο και φωτογράφο Αντώνη Ποντίκη για τις πολύτιμες συμβουλές του στην τέχνη της φωτογραφίας, που οδήγησαν στην καθιέρωση του φωτογραφικού πρωτοκόλλου που αναπτύχθηκε κατά την εκπόνηση της εργασίας αυτής.

Αφιερώσεις

Η εργασία αυτή είναι αφιερωμένη στην οικογένεια και τους φίλους μου που με στηρίζουν με κάθε τρόπο όλα αυτά τα χρόνια και υπομένουν τα ενθουσιώδη παραληρήματά μου χωρίς παράπονα. Επίσης σε οποιονδήποτε την διαβάσει ή επωφεληθεί με οποιοδήποτε τρόπο από αυτή, καθώς το σημαντικότερο μέρος του γραπτού λόγου, είναι οι αναγνώστες του.

“Doesn’t matter how good your bullets are if you don’t aim carefully.”

-Brandon Sanderson, The Alloy of Law

-

Περιεχόμενα

Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας.....	iv
Ευχαριστίες	v
Αφιερώσεις	vi
Πίνακας περιεχομένων εικόνων.....	ix
Περίληψη	x
1. Πρόλογος.....	1
2. Σκοπός	2
3. Εισαγωγή.....	4
3.1 Πρόβλημα προς επίλυση.	4
3.2 ImageJ- Το λογισμικό επεξεργασίας εικόνων	6
3.3 Περιγραφή ενώσεων και μορίων που εξετάστηκαν.	8
3.3.1 Montmorillonite clay	8
3.3.2 Κυτταροτοξικά φάρμακα που εξετάστηκαν.	11
3.3.3 Βαρέα μέταλλα	13
3.3.4 Απορρυπαντικά και λοιπές ενώσεις.....	16
3.4 Προηγούμενη χρήση μοντμοριλονίτη και φωτογραφικών μεθόδων στην βιολογική ανάλυση.....	18
3.4.1 Εξέλιξη της χρήσης φωτογραφίας στον τομέα βιολογικής ανάλυσης.....	18
3.4.2 Χρήση μοντμοριλονίτη στον τομέα της βιολογικής ανάλυσης.....	19
4. Υλικά και Μέθοδοι	19
4.1 Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν	19
4.2 Πειραματικές τεχνικές και πρωτόκολλα.....	19
4.2.1 Βασικά πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν.	19
4.2.2 Μέθοδοι προσδιορισμού και ποσοτικοποίησης ενώσεων.....	22
5. Αποτελέσματα και συζήτηση	25
5.1 Δοκιμή φωτομετρικού προσδιορισμού σιδήρου (Fe ⁺⁺) μετά από συμπύκνωση. ...	25
5.2 Δοκιμή φωτομετρικού προσδιορισμού μολύβδου (Pb ⁺⁺) μετά από συμπύκνωση. 27	
5.2.1 Μέθοδος προσδιορισμού με χρήση χρωστικής Arsenazo.....	27
5.2.2 Μέθοδος προσδιορισμού με χρήση χλωρίνης.	29
5.3 Δοκιμή φωτομετρικού προσδιορισμού αργύρου (Ag) μετά από συμπύκνωση.	32
5.4 Δοκιμή προσδιορισμού Χαλκού (Cu) και ανάπτυξη φωτογραφικού πρωτοκόλλου.35	

5.4.1 Φωτομετρικός προσδιορισμός χαλκού με τη μέθοδο συμπύκνωσης σε bentone LT.....	35
5.4.2 Μέθοδος προσδιορισμού με φωτογραφική ανάλυση.	38
5.5 Δοκιμή προσδιορισμού ερυθρού του μεθυλίου.	45
5.5.1 Φωτομετρικός προσδιορισμός MT red.....	45
5.5.2 Προσδιορισμός MT red με ανάλυση φωτογραφίας.	48
5.6 Δοκιμή προσδιορισμού κοβαλτίου (Co) μετά από συμπύκνωση.....	55
5.6.1 Φωτομετρικός προσδιορισμός κοβαλτίου.....	55
5.6.2 Φωτομετρικός προσδιορισμός κοβαλτίου σε μείγμα.	58
5.6.3 Φωτογραφικός προσδιορισμός κοβαλτίου.	60
5.7 Δοκιμή προσδιορισμού ιρινοτεκάνης μετά από συμπύκνωση.	62
5.8 Δοκιμή φωτομετρικού και φωτογραφικού προσδιορισμού τοποτεκάνης μετά από συμπύκνωση.	65
5.8.1 Δοκιμή προσδιορισμού τοποτεκάνης σε μείγμα διαφορετικών μορίων.....	65
5.8.2 Δοκιμή ανίχνευσης και προσδιορισμού τοποτεκάνης με φωτογραφική μέθοδο.	68
5.8.3 Δοκιμή προσδιορισμού τοποτεκάνης σε μείγμα με φωτογραφική μέθοδο.....	70
5.9 Δοκιμή προσδιορισμού ουρικού οξέος με βάση το φωτογραφικό πρωτόκολλο. ...	72
5.10 Συζήτηση.....	76
Αναφορές.....	79

Πίνακας περιεχομένων εικόνων

ΕΙΚΟΝΑ 1 PANASONIC LUMIX DMC-FZ200- Η ΜΗΧΑΝΗ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΕ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΗΝ ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ.	4
ΕΙΚΟΝΑ 2. ΛΥΜΑΤΑ ΠΕΤΑΓΟΝΤΑΙ ΣΕ ΣΤΑΣΙΜΑ ΝΕΡΑ – ΠΗΓΗ: HTTPS://WWW.AFRIK21.AFRICA/WP-CONTENT/UPLOADS/2019/09/SHUTTERSTOCK_753258850-1-800X400.JPG	5
ΕΙΚΟΝΑ 3 IMAGEJ LOGO - IMAGEJ.NET	7
ΕΙΚΟΝΑ 4 ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΙΣΤΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΣΤΟ ΛΟΓΙΣΜΙΚΟ IMAGEJ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΕΝΤΑΣΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΣ – ΠΗΓΗ: ΠΡΟΣΩΠΙΚΟ ΑΡΧΕΙΟ.	7
ΕΙΚΟΝΑ 5 ΔΟΜΗ ΜΟΝΤΜΟΡΙΛΛΟΝΙΤΗ ΠΗΓΗ: VENKATESHA, 2015	8
ΕΙΚΟΝΑ 6 ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ CU ΣΕ ΒΕΝΤΟΝΕ LT ΕΝΑΝ ΠΗΛΟ ΜΟΝΤΜΟΡΙΛΟΝΙΤΗ. ΠΗΓΗ: ΣΥΓΓΡΑΦΕΑΣ	10
ΕΙΚΟΝΑ 7 ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΣΗ ΤΟΡΟΤΕΚΑΝ ΠΡΟΣΡΟΦΗΜΕΝΟΥ ΣΕ ΒΕΝΤΟΝΕ LT ΣΕ ΠΗΓΑΔΙΑ ELISA- ΠΗΓΗ: ΠΡΟΣΩΠΙΚΟ ΑΡΧΕΙΟ.	12
ΕΙΚΟΝΑ 8 ΟΝΙΒΥΔΕ- ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΟ ΣΚΕΥΑΣΜΑ ΕΝΔΟΦΛΕΒΙΑΣ ΧΡΗΣΗΣ ΜΕ ΕΝΕΡΓΟ ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ ΤΗΝ ΙΡΙΝΟΤΕΚΑΝΗ. – ΠΗΓΗ: HTTPS://WWW.INDIAMART.COM/PRODDetail/ONIVYDE-IRINOTECAN-LIPOSOME-INJECTION-43-MG-10-ML-24923457891.HTML	13
ΕΙΚΟΝΑ 9 POTENTIALLY TOXIC ELEMENTS – ΠΗΓΗ: HTTPS://WWW.MDPI.COM/1660-4601/16/22/4446	16
ΕΙΚΟΝΑ 10 ΑΛΛΑΓΗ ΧΡΩΜΑΤΟΣ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ METHYL RED ΥΠΟ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΡΗ.– ΠΗΓΗ: HTTPS://EN.WIKIPEDIA.ORG/WIKI/FILE:COLOR_TRANSITION_OF_METHYL_RED_SOLUTION_UNDER_DIFFERENT_ACID-BASE_CONDITIONS.JPG	18
ΕΙΚΟΝΑ 11 ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΣΗ ΔΙΑΒΑΘΜΙΣΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΧΑΛΚΟΥ ΣΕ ERPENDORF – ΠΗΓΗ: ΣΥΓΓΡΑΦΕΑΣ	39
ΕΙΚΟΝΑ 12 ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΑ ΔΙΑΒΑΘΜΙΣΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΧΑΛΚΟΥ ΣΕ ΔΟΚΙΜΑΣΤΙΚΟΥΣ ΣΩΛΗΝΕΣ. Ο 1ΟΣ ΠΕΡΙΕΧΕΙ ΜΟΝΟ ΜΠΕΝΤΟΝΙΤΗ ΚΑΙ ΔΕΝ ΑΠΕΙΚΟΝΙΖΕΤΑΙ ΣΤΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ. –ΠΗΓΗ: ΣΥΓΓΡΑΦΕΑΣ	41
ΕΙΚΟΝΑ 13 COLOR WHEEL – ΠΗΓΗ: HTTP://DECOART.COM/BLOG/UPLOADS/COLOR-THEORY-GRAPHICS-WHEEL34.JPG	42
ΕΙΚΟΝΑ 14 ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΟ ΚΟΚΚΙΝΟ ΚΑΝΑΛΙ- ΛΥΧΝΙΕΣ LC-MS. ΠΗΓΗ: ΣΥΓΓΡΑΦΕΑΣ	43
ΕΙΚΟΝΑ 15 ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΟ ΚΟΚΚΙΝΟ ΚΑΝΑΛΙ- ΠΗΓΑΔΙΑ ΜΙΚΡΟΤΙΤΛΟΔΟΤΗΣΗΣ- ΠΗΓΗ: ΣΥΓΓΡΑΦΕΑΣ	44
ΕΙΚΟΝΑ 16 ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΣΗ MT RED ΣΕ ΡΗ=2,75 (ΑΡΙΣΤΕΡΑ) ΚΑΙ ΡΗ>7 (ΔΕΞΙΑ) -ΠΗΓΗ: ΣΥΓΓΡΑΦΕΑΣ	50
ΕΙΚΟΝΑ 17. ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΟ ΚΑΝΑΛΙ ΦΩΤΕΙΝΟΤΗΤΑΣ- ΠΗΓΗ: ΣΥΓΓΡΑΦΕΑΣ.	54
ΕΙΚΟΝΑ 18 ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΟ ΚΑΝΑΛΙ ΧΡΟΙΑΣ (ΑΡΙΣΤΕΡΑ). ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΟ ΚΑΝΑΛΙ ΚΟΡΕΣΜΟΥ (ΔΕΞΙΑ)– ΠΗΓΗ: ΣΥΓΓΡΑΦΕΑΣ	54
ΕΙΚΟΝΑ 19 ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΕΣ CO ΣΕ ELISA WELLS. ΑΡΙΣΤΕΡΑ- ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΑ ΓΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗ INTENSITY. ΔΕΞΙΑ- ΚΑΝΑΛΙ RGB-BLUE ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟ ΠΡΟΣ ΑΝΑΛΥΣΗ - ΠΗΓΗ: ΣΥΓΓΡΑΦΕΑΣ	61
ΕΙΚΟΝΑ 20 ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΣΗ ΤΟΠΟΤΕΚΑΝΗΣ ΣΕ ΠΗΓΑΔΙΑ ΜΙΚΡΟΤΙΤΛΟΔΟΤΗΣΗΣ. ΑΡΙΣΤΕΡΑ: ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΟ ΜΑΖΙ ΜΕ ΙΖΗΜΑ. ΔΕΞΙΑ: ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΟ ΙΖΗΜΑ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ,	70
ΕΙΚΟΝΑ 21 ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΑ ΙΖΗΜΑΤΟΣ ΤΟΠΟΤΕΚΑΝΗΣ ΣΕ ΜΕΙΓΜΑ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΧΡΩΜΟΓΟΝΟ. - ΠΗΓΗ: ΣΥΓΓΡΑΦΕΑΣ	72
ΕΙΚΟΝΑ 22 ΠΗΓΑΔΙΑ ΜΙΚΡΟΤΙΤΛΟΔΟΤΗΣΗΣ ΜΕ ΟΥΡΙΚΟ ΟΞΥ ΠΡΙΝ ΤΗΝ ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΤΟΥ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΟΥ.-ΠΗΓΗ- ΣΥΓΓΡΑΦΕΑΣ	75

Περίληψη

Εισαγωγή: Ζούμε σε ένα διαρκώς βιομηχανοποιούμενο κόσμο, όπου όλο και περισσότεροι άνθρωποι αναγκάζονται να ζήσουν σε περιοχές όπου η ποιότητα του περιβάλλοντος επηρεάζει αρνητικά την υγεία. Οι αναπτυσσόμενες χώρες ιδιαίτερα υπολείπονται στην αποτελεσματική επεξεργασία των λυμάτων. Υπάρχουν έτσι μόρια που βρίσκονται στα αστικά νερά και λύματα σε συγκεντρώσεις αρκετά χαμηλές ώστε να μην είναι δυνατή η ανίχνευση και ποσοτικοποίησή τους με συμβατικές μεθόδους και τεχνικές που ακολουθούνται γενικά στα εργαστήρια ανάλυσης που δεν διαθέτουν εξειδικευμένο εξοπλισμό. Λαμβάνοντας υπόψη τις συνθήκες αυτές, η ανάπτυξη έγκυρων και γρήγορων μεθόδων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης ρυπαντών είναι ιδιαίτερως σημαντική.

Σκοπός: Η εργασία αυτή στοχεύει στην ανάπτυξη ενός πρωτοκόλλου βασισμένου στην ικανότητα προσρόφησης του πηλού εκτορίτη, με σκοπό τη συμπύκνωση/προσυγκέντρωση δειγμάτων που θα διευκολύνει την έγκυρη και γρήγορη ανάλυση ρύπων σε λύματα και αποθέσεις ύδατος και στην ανάπτυξη μιας μεθόδου φωτογράφισης και ποσοτικοποίησης των δειγμάτων αυτών χωρίς τη χρήση φωτομέτρου.

Μέθοδος: Η πειραματική διαδικασία βασίστηκε σε 2 τεχνικές-πυλώνες, που χρησιμοποιήθηκαν για να υποστηρίξουν τον στόχο αυτό. Αυτές είναι η μέθοδος προσρόφησης μορίων σε bentone LT (υβρίδιο εκτορίτη) και μέτρησης της απορρόφησης των μορίων με τη χρήση φωτόμετρου μετά από συμπύκνωση και προσθήκη κατάλληλου χρωμογόνου ή εναλλακτικά τη φωτογράφιση των προσροφημένων αυτών μορίων στο στερεό υλικό μετά την αντίδραση με το χρωμογόνο και την ανάλυση έντασης των καναλιών RGB στο λογισμικό επεξεργασίας εικόνων ImageJ και την συσχέτιση αυτών με την συγκέντρωση των εξεταζόμενων δειγμάτων.

Αποτελέσματα: Πραγματοποιήθηκε με επιτυχία η ανάπτυξη των πρωτοκόλλων συμπύκνωσης σε bentone και ανάλυσης φωτογραφιών των εξεταζόμενων μορίων. Παρατηρήθηκε επιτυχή προσρόφηση τους σε bentone LT και ικανοποιητική ποσοτικοποίηση όπως προκύπτει από το R^2 και το εύρος των περιοχών γραμμικότητας που επιτεύχθηκαν. Συγκεκριμένα μέσω των πρωτοκόλλων βρέθηκε φωτομετρικά περιοχή γραμμικότητας σε επίπεδα κοντινά των περιβαλλοντικών, μορίων Fe(III), Ag(I), Cu(II), Mt red, Co(II) (σε προσομοίωση λυμάτων), irinotecan, topotecan (σε προσομοίωση λυμάτων) και ουρικού οξέος.

Φωτογραφικά έγινε ποσοτικός προσδιορισμός και εύρεση περιοχής γραμμικότητας για Cu, Mt red, Co, τοποτεκάνη και ουρικό οξύ. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα αποτελέσματα του ουρικού οξέος (0,43 - 17,7 µg/mL) και της τοποτεκάνης (100-240 ng/ml) καθώς τα πρωτόκολλα παρουσιάζουν πολύ μεγάλη ευαισθησία και όριο ποσοτικοποίησης μικρότερο ήδη επικυρωμένων μεθόδων.*

Συμπεράσματα: Με βάση τα αποτελέσματα των πειραματικών διαδικασιών φαίνεται πως και το πρωτόκολλο προσρόφησης μορίων και μέσω της χρήσης bentone LT και συμπύκνωσης τους σε αυτό, και το πρωτόκολλο φωτογράφισης και ανάλυσής τους είναι ικανά να χρησιμοποιηθούν εκτεταμένα για τον προσδιορισμό συγκεντρώσεων πλήθους μορίων σε συγκεντρώσεις σε κάποιες περιπτώσεις ακόμα και μικρότερες από τις αντίστοιχες ήδη επικυρωμένων μεθόδων. Περαιτέρω βελτίωση των πρωτοκόλλων και εξέταση μικρότερων συγκεντρώσεων φωτογραφικά μπορεί να οδηγήσει σε καλύτερα αποτελέσματα.

Λέξεις κλειδιά: Bentone, φωτογραφία, προσδιορισμός, συμπύκνωση

*Αριθμητικά οι περιοχές γραμμικότητας παρουσιάζονται συγκεντρωμένες στην ενότητα 5.10 (Πίνακας 26).

Abstract

Introduction: We live in a constantly industrializing world, where more and more people are forced to live in areas where the quality of the environment negatively affects health. Developing countries are particularly lagging behind in effective wastewater treatment. There are thus molecules found in urban water and wastewater, in concentrations low enough that it is not possible to detect and quantify them with conventional methods and techniques that are generally followed in common analysis laboratories that do not have specialized equipment. Considering these conditions, the development of valid and rapid methods for the detection and quantification of pollutants is particularly important.

Purpose: This work aims to develop a protocol based on the adsorption capacity of hectorite clay, finding use in the preconcentration of samples that will facilitate the valid and fast analysis of pollutants in wastewater and water deposits and to develop a method for photographing and quantifying these samples without using a photometer.

Method: The experimental procedure was based on 2 pillars-techniques, which were used in order to realise this objective. These techniques are the adsorption of molecules on bentone LT (hectorite hybrid) and measurement of their absorption using a photometer after condensation and addition of a suitable chromogen or alternatively the photography of these adsorbed molecules on the solid material after the reaction with the chromogen and the intensity analysis of the RGB channels in ImageJ image processing software and their correlation with the concentration of the examined samples.

Results: The development of bentone concentration and photo analysis protocols of the examined molecules was successfully carried out. Their successful adsorption on bentone LT was observed and satisfactory quantification as shown by R^2 and the range of linearity ranges achieved. Specifically, through the protocols, the linearity range was photometrically found at levels close to environmental, Fe(III), Ag(I), Cu(II), Mt red, Co(II) (in simulated wastewater), irinotecan, topotecan (in simulated wastewater) and uric acid molecules. Quantification and linearity range determination were conducted photographically for Cu, Mt red, Co, topotecan and uric acid. The results of uric acid (0,43 - 17,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and topotecan (100-240 ng/ml) are of particular interest as the protocols show very high sensitivity and a quantification limit lower than those of already validated methods.**

Discussion: Based on the results of the experimental procedures, it appears that both the molecule adsorption protocol and through the use of bentone LT and their concentration in it, and the photography and analysis protocol are capable of being used extensively for the determination of concentrations of a number of molecules in aggregates in some cases even smaller than the corresponding already validated methods.

Key words: Bentone, photography, determination, condensation

**The linearity ranges are presented numerically in section 5.10 (Table 26).

1. Πρόλογος

Η διπλωματική «Ανάπτυξη εναλλακτικής φωτομετρικής μεθόδου αναλυτών με ενδιαφέρον κυρίως στον χώρο της περιβαλλοντικής ανάλυσης» έχει διττό σκοπό. Η πρώτη του έκφανση είναι η διερεύνηση και η καθιέρωση πρωτόκολλων φωτομετρικού προσδιορισμού διαφόρων μορίων ενδιαφέροντος μετά από εκχύλιση σε στερεή φάση, βασισμένων σε ήδη δημοσιευμένες μεθόδους ώστε να καταστεί δυνατός ο προσδιορισμός τέτοιων μορίων σε συγκεντρώσεις αντίστοιχες των περιβαλλοντικών επιπέδων. Οι τεχνικές που θα εφαρμοστούν σκοπεύουν στη συμπύκνωση των μορίων αυτών ώστε η ευαισθησία του πρωτοκόλλου που θα αναπτυχθεί να επιτρέπει τον φωτομετρικό προσδιορισμό των μορίων ενδιαφέροντος σε συγκεντρώσεις πολύ χαμηλότερες των δημοσιευμένων φωτομετρικών πρωτοκόλλων.

Η δεύτερη έκφανση του σκοπού αυτού είναι η ανάπτυξη και καθιέρωση φωτογραφικής μεθόδου, βάσει της οποίας μόρια σε στερεή φάση, μετά από επεξεργασία και προσρόφηση σε κατάλληλο στερεό υλικό, θα μπορούν να προσδιορίζονται εύκολα και γρήγορα, χωρίς τη χρήση φωτομέτρου ή αντίστοιχων ενόργανων εργαστηριακών τεχνικών. Η φωτογραφία και η ανάλυσή της είναι ένα μέσο οικονομικό, γρήγορο και έχουν εντοπιστεί στη βιβλιογραφία περιπτώσεις αποτελεσματικής εφαρμογής της για παρόμοιο σκοπό.

Για την εκπόνηση της διπλωματικής αυτής θα χρησιμοποιηθούν διάφορες μέθοδοι προσδιορισμού επιλεγμένες συγκεκριμένα για κάθε μόριο που θα δοκιμαστεί και στις οποίες θα γίνουν κατάλληλες τροποποιήσεις, όπου και όποτε χρειάζεται, για να προσαρμοστούν σε μεθόδους συμπύκνωσης, κατά βάση με χρήση μπεντονίτη. Ο μπεντονίτης είναι ένας τύπος απορροφητικού διογκούμενου πηλού που αποτελείται κυρίως από το αργλικό ορυκτό μοντμοριλλονίτη. Η ιδιότητά του αυτή τον κάνει ιδιαίτερα χρήσιμο για τη βελτιστοποίηση διαφόρων προϊόντων και διαδικασιών όπως κατά τον αποχρωματισμό ελαίων, στην μεταφορά φαρμάκων και στην δική μας περίπτωση, στην συμπύκνωση μορίων από περιβαλλοντικά διαλύματα.

Ο μπεντονίτης θα χρησιμοποιηθεί και στις 2 φάσεις της εργασίας αυτής. Στον φωτογραφικό τομέα, μετά την απορρόφηση του εκάστοτε μορίου σε μπεντονίτη θα φωτογραφηθούν τα στερεά δείγματα σε lightbox με διπλή σειρά led lights (30/σειρα) και θα προσδιοριστούν με τη βοήθεια του λογισμικού επεξεργασίας φωτογραφιών ImageJ, παίρ-

νοντας τις τιμές χρωματικής έντασης κάθε δείγματος μετά από διαχωρισμό των χρωματικών καναλιών. Στις δοκιμές συμπύκνωσης, κάθε μόριο θα ελεγχθεί για την ικανότητα προσρόφησής του σε μπεντονίτη και κάθε μεθοδολογία ποσοτικού φωτομετρικού προσδιορισμού για το εκάστοτε μόριο θα δοκιμαστεί πρώτα χωρίς και έπειτα παρουσία μπεντονίτη για να ελεγχθεί αν η αποτελεσματικότητά της διατηρείται. Μετά από την προσρόφηση και συμπύκνωσή των εξεταζόμενων μορίων, θα γίνει αποπροσρόφηση και φωτομετρικός προσδιορισμός αυτών.

Τα προσδοκόμενα αποτελέσματα της διπλωματικής αυτής είναι η κατοχύρωση πρωτοκόλλων για τον εναλλακτικό προσδιορισμό κάποιων εκ των μορίων που θα χρησιμοποιηθούν κατά την πειραματική διαδικασία. Είναι πολύ πιθανόν κάποιες από τις μεθόδους οι οποίες θα ελεγχθούν να είναι μερικώς ή πλήρως μη συμβατές με τους τρόπους συμπύκνωσης που θα χρησιμοποιήσουμε, συνεπώς αναμένονται τόσο θετικά όσο και αρνητικά αποτελέσματα. Στον τομέα της φωτογραφίας ιδανικά αναμένεται να αναπτυχθεί ένας αποτελεσματικός τρόπος φωτογραφικής μέτρησης συγκεντρώσεων στερεών δειγμάτων ει δυνατόν με τρόπο αποτελεσματικό, ευαίσθητο και εύκολα προσβάσιμο, ακόμα και χωρίς ιδιαίτερο επαγγελματικό εξοπλισμό που θα μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά από κάθε εργαστήριο αντί του κλασικού εργαστηριακού ενόργανου εξοπλισμού.

2. Σκοπός

Ο σκοπός αυτής της διπλωματικής εργασίας είναι η ανάπτυξη ενός πρωτοκόλλου για την σωστή, εύκολη και γρήγορη ανάλυση ρύπων σε λύματα και αποθέσεις νερού. Η ανάπτυξη του πρωτοκόλλου θα γίνει βάσει επικυρωμένων μεθόδων προσδιορισμού για κάθε μόριο ενδιαφέροντος ξεχωριστά, με προτίμηση στις μεθόδους μεγάλης εξειδίκευσης ώστε να μην υπάρχουν ψευδή σήματα από αντιδράσεις μεταξύ διαφορετικών μορίων με τα αντιδραστήρια της κάθε μεθόδου και να επιτευχθεί καλύτερη και ευκολότερη ποσοτικοποίησή τους, με μείωση στο ελάχιστο των λαθών.

Η βασική μέθοδος που θα χρησιμοποιηθεί αρχικά θα είναι η συμπύκνωση του κάθε μορίου μέσω προσαρμογής ενός δημοσιευμένου γενικού πρωτοκόλλου του κάθε μορίου βασιζόμενο στην προσρόφηση του από υδατικό διάλυμα σε bentone LT, Θα ακολουθήσει φωτομετρικός προσδιορισμός του μορίου στο συμπύκνωμα με χρήση συμβατικού

φωτόμετρου, μετά από αντίδραση με κατάλληλο χρωμογόνο. Έπειτα, έχοντας επιβεβαιώσει την επιτυχία της προαναφερθείσας τεχνικής συμπύκνωσης, θα γίνει επανάληψη αυτής σε ορισμένα από αυτά τα μόρια με σκοπό τον σχεδιασμό ενός νέου πρωτοκόλλου ανίχνευσης και ημι-ποσοτικοποίησής τους με τη χρήση φωτογραφικής μηχανής. Φωτογραφίζοντάς το στερεό υλικό συμπύκνωσης, καταγράφοντας τις τιμές χρωματικής έντασης μετά από αντίδραση με χρωμογόνο και συγκρίνοντάς τες με καμπύλη αναφοράς, θα υπολογιστεί απευθείας η συγκέντρωσή των εξεταζόμενων μορίων και παραλείποντας τελείως τη χρήση του φωτόμετρου.

Ένας δευτερεύων σκοπός των πειραματικών διεργασιών που εκπονήθηκαν στο πλαίσιο της διπλωματικής είναι επίσης η εξακρίβωση κάποιων λεπτομερειών στην διαδικασία δέσμευσης των μορίων ανάμεσα στα φύλλα bentone LT το οποίο, ως αρνητικά φορτισμένο υλικό, δεσμεύει πιο αποτελεσματικά θετικά φορτισμένα μόρια και συζεύγματα. Το συγκεκριμένο πείραμα θα γίνει με την εξέταση της χρωστικής Methyl Red, η οποία έχει μηδενικό συνολικό φορτίο και χρώμα κόκκινο σε χαμηλό pH (<3,8) ενώ είναι αρνητικά φορτισμένη με κίτρινο χρώμα σε υψηλότερο pH (>5,8) (Mohammadi et al., 2017). Χρησιμοποιώντας την ιδιότητα αυτή θα εξετάσουμε τα δείγματα και στις δύο τιμές pH με τη μέθοδο φωτογράφισης ελέγχοντας εάν η καμπύλη τιμών χρωματικής έντασης σε χαμηλό pH θα παρουσιάζει παρόμοια μορφή με αυτή της καμπύλης του Methyl red σε υψηλότερα pH όταν φωτογραφίζεται μόνο το ίζημα του στερεού υλικού προσρόφησης που προκύπτει μετά τη διαδικασία της συμπύκνωσης.

Προσδοκούμε τα αποτελέσματά της διπλωματικής αυτής να προσφέρουν μια πρακτική βάση για την διαχείριση της ανίχνευσης μικρών συγκεντρώσεων επιβλαβών μορίων στο νερό και τα λύματα και την διευκόλυνση της παρακολούθησης μολύνσεων του υδάτινου ορίζοντα από μη κατάλληλα εξοπλισμένα εργαστήρια. Η παρακολούθηση της ρύπανσης μπορεί να προσφέρει σημαντική βοήθεια στην επιλογή της στρατηγικής για τον έλεγχο του επιπέδου ορισμένων επικίνδυνων στοιχείων, είτε στο νερό είτε στο έδαφος.



Εικόνα 1 Panasonic Lumix DMC-FZ200- η μηχανή που χρησιμοποιήθηκε κατά την ανάπτυξη την φωτογραφικής μεθόδου ποσοτικοποίησης.

3. Εισαγωγή

3.1 Πρόβλημα προς επίλυση

Η διπλωματική αυτή έχει γίνει με σκοπό να προσφέρει μια πρακτική βάση για την διαχείριση ενός σημαντικού ζητήματος και να βοηθήσει άμεσα στην επίλυση αυτού. Πρόκειται για την παρακολούθηση της ρύπανσης, η οποία μπορεί να προσφέρει σημαντική βοήθεια στην επιλογή της στρατηγικής για τον έλεγχο των επιπέδων ορισμένων επικίνδυνων στοιχείων, είτε στο νερό είτε στον αέρα. Οι δυσκολίες ανίχνευσης ρυπογόνων πηγών από πειραματικά δεδομένα σχετίζονται όχι μόνο με την υιοθέτηση συστηματικής και κατάλληλης διαδικασίας μέτρησης, αλλά και με τη σωστή διαχείριση των διαθέσιμων πληροφοριών (De Marchi et al., 1991). Τα λύματα αποτελούν πηγή πληροφοριών για την ανθρώπινη υγεία και συνήθειες και μπορούν να μετατραπούν σε παρατηρητήριο δημόσιας υγείας και να χρησιμοποιηθούν ως όργανο για τη βελτίωση της δημόσιας υγείας (Michael-Kordatou Karaolia and Fatta-Kassinou, 2020).

Οι αναπτυσσόμενες χώρες γενικά υπολείπονται στην αποτελεσματική επεξεργασία των λυμάτων και της ιλύος κοπράνων και σε πολλές περιπτώσεις, τα λύματα απορρίπτονται σε επιφανειακά ύδατα χωρίς καμία επεξεργασία (Pandey et al., 2020). Υπάρχουν έτσι μόρια που βρίσκονται στα αστικά νερά και λύματα σε συγκεντρώσεις αρκετά χαμηλές ώστε να μην είναι δυνατή η ανίχνευση και ποσοτικοποίησή τους με συμβατικές μεθόδους

και τεχνικές που ακολουθούνται γενικά στα κοινά εργαστήρια ανάλυσης που δεν διαθέτουν εξειδικευμένο εξοπλισμό, οι οποίες μπορεί να επιφέρουν διάφορα και σοβαρά προβλήματα σε άτομα που εκτίθενται στις αποθέσεις αυτές μακροχρόνια (Kordas et al., 2018). Η ανάπτυξη μιας μεθόδου που θα χρησιμοποιεί μη εξειδικευμένο εξοπλισμό και θα επιτρέψει την γρήγορη και έγκυρη ανίχνευση και ποσοτικοποίηση αγνώστων συγκεντρώσεων μορίων ενδιαφέροντος σε νερό και λύματα, είναι λοιπόν ιδιαίτερα χρήσιμη.

Στην διπλωματική αυτή προσπαθήσαμε να αναπτύξουμε μια τέτοια μέθοδο βασισμένοι στην ικανότητα προσρόφησης που έχει ένας τύπος πηλού που ονομάζεται εκτορίτης με σκοπό την συμπύκνωση των μορίων αυτών σε τελικές συγκεντρώσεις αρκετά υψηλές ώστε να μετρηθούν με συμβατικές φωτομετρικές μεθόδους μετά την αποπροσρόφησή τους με τη χρήση μείγματος νερού- ακετονιτριλίου. Επίσης έγινε μια προσπάθεια για την καθιέρωση μεθόδου φωτογράφησης των μορίων ενώ είναι ακόμα προσροφημένα σε μπεντονίτη και μέτρησης της χρωματικής τους εντάσεως μέσω κατάλληλου λογισμικού (στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό ImageJ, το οποίο όμως μπορεί να αντικατασταθεί από πιο γνωστά προγράμματα όπως τα photoshop, illustrator etc.). Με την επεξεργασία με την προτεινόμενη τεχνική πρότυπα διαλύματα του μορίου που θέλουμε να μετρήσουμε παράλληλα με άγνωστα δείγματα, φιλοδοξούμε να ελέγξουμε κατά πόσο μπορεί να γίνει ποσοτικοποίηση του μορίου χωρίς καμία χρήση συμβατικού φωτόμετρου.



Εικόνα 2. Λύματα πετάγονται σε στάσιμα νερά

Πηγή: https://www.afrik21.africa/wp-content/uploads/2019/09/shutterstock_753258850-1-800x400.jpg

3.2 ImageJ. Το λογισμικό επεξεργασίας εικόνων

Το ImageJ είναι λογισμικό δημόσιου τομέα (public domain) και ανοιχτού κώδικα (open source) για την επεξεργασία και ανάλυση επιστημονικών εικόνων, με πολλά παράγωγα και παραλλαγές, συμπεριλαμβανομένων των ImageJ2, Fiji και άλλων. Δημιουργήθηκε το 1997 από τον Wayne Rasband (Rueden et al., 2017). Το συγκεκριμένο λογισμικό έχει ως σκοπό να διευκολύνει τους χρήστες στην εφαρμογή τεχνικών ανάλυσης εικόνας, συμπεριλαμβανομένων της επεξεργασίας εικόνας, της εντοπισμού, της αποσυνέλιξης, της εγγραφής, της τμηματοποίησης, της παρακολούθησης, της οπτικοποίησης εικόνων και πολλές άλλες.

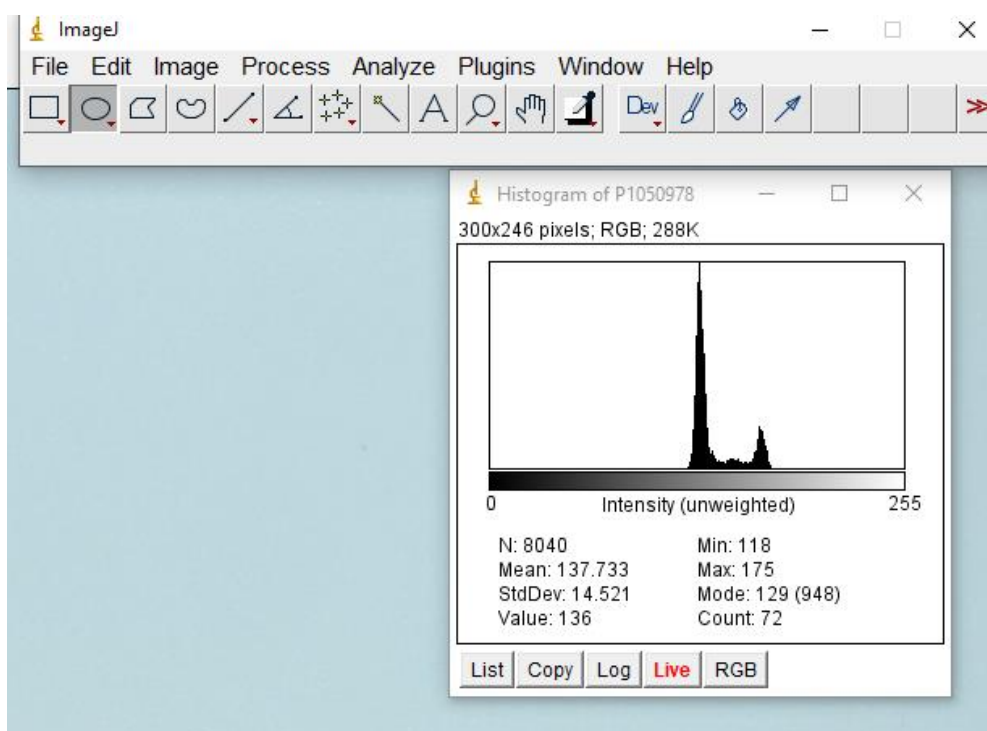
Το ImageJ αναπτύχθηκε σταδιακά με την πάροδο του χρόνου καθώς ο αρχικός δημιουργός του όπως και πολλοί άλλοι απλοί χρήστες συνέχισαν να προσθέτουν λειτουργίες σύμφωνα με τα αιτήματα των χρηστών (Schneider, Rasband and Eliceiri., 2012) αυξάνοντας τον αριθμό των προσθέτων (plugins) στις εκατοντάδες τουλάχιστον, καλύπτοντας εφαρμογές όπως τα Multiple image editor, προσφέροντας ταυτόχρονη επεξεργασία πολλών εικόνων, το Neuron detector που περιλαμβάνει απλές μακροεντολές για την ανάλυση εικόνων και βίντεο από ενεργοποιήσεις νευρώνων κλπ.

Τεχνικές που χρησιμοποιούν ανάλυση ψηφιακών εικόνων όλο και περισσότερο χρησιμοποιούνται στη βιολογία, την ιατρική, τη φυσική και άλλους ερευνητικούς τομείς (Minamisawa et al., 2008). Το λογισμικό ImageJ έχει ήδη χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά σε συνδυασμό με στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων για διάφορες αναλύσεις που διαφορετικά θα ήταν πολύ πιο δύσκολο να γίνουν (Safarik et al., 2019; Minamisawa et al., 2007) . Παραδείγματα αυτών είναι η σύγκριση αποτελεσματικότητας τεχνικών αποχρωματισμού των ούλων (Sikka et al., 2021) και η ποσοτική ανάλυση αφλατοξίνης B1 σε ξηρούς καρπούς με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Hoeltz et al., 2010) .



Εικόνα 3 ImageJ logo - imageJ.net

Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία το λογισμικό αυτό έχει πολύ σημαντικό ρόλο καθώς μέσω αυτού γίνονται οι αναλύσεις των εικόνων που έχουν ληφθεί από τα προσροφημμένα σε εκτορίτη μόρια. Πιο συγκεκριμένα το ImageJ προσφέρει τη δυνατότητα διαχωρισμού των χρωματικών καναλιών και της «live» μέτρησης της έντασης των χρωμάτων, τόσο ως εικόνα μείξης καναλιών όσο και στα διαχωρισμένα κανάλια. Η δυνατότητα αυτή, καθώς και η ευρεία χρήση του λογισμικού για επιστημονικούς σκοπούς οδήγησαν στην επιλογή του απέναντι σε άλλες επιλογές παρόμοιων εφαρμογών όπως τα photoshop, illustrator κλπ.

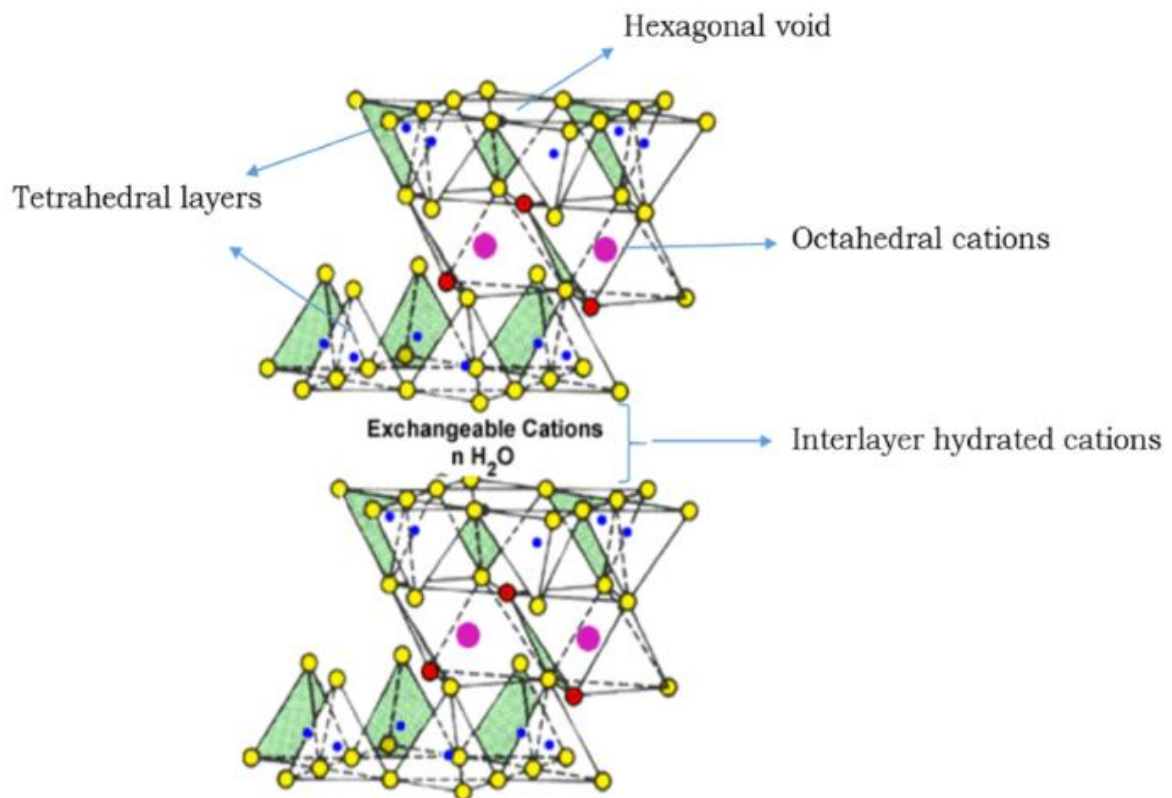


Εικόνα 4 Παράδειγμα ιστογράμματος στο λογισμικό ImageJ για την καταγραφή της έντασης χρώματος – Πηγή: Προσωπικό αρχείο.

3.3 Περιγραφή ενώσεων και μορίων που εξετάστηκαν

3.3.1 Montmorillonite clay

Στην διπλωματική αυτή χρησιμοποιήθηκε ως σώμα προσρόφησης των διαφόρων φαρμάκων και μετάλλων που βρέθηκε ότι μπορεί να αποτελούν επικίνδυνους παράγοντες για τον άνθρωπο ο πηλός μοντμοριλλονίτη και συγκεκριμένα υβριδικός πηλός bentone LT που αποτελείται από 1:1 εκτορίτη και υδροξυκυτταρίνη. Ο εκτορίτης είναι μια πολύ μαλακή φυλλοπυριτική ομάδα ορυκτών που σχηματίζονται όταν αυτά καθιζάνουν από υδατικό διάλυμα ως μικροσκοπικοί κρύσταλλοι δηλαδή ως πηλός. Είναι ένας πηλός 2:1, που σημαίνει ότι έχει ένα κεντρικό οκταεδρικό φύλλο alumina ανάμεσα σε δύο τετραεδρικά φύλλα πυριτίου και συγκεκριμένα ένα οκταεδρικό Mg-O-Li σεντόνι ανάμεσα σε δύο τετραεδρικά φύλλα Si-O-Si (Warr, 2021; Anthony et al, 1995; Ismadji, Soetaredjo and Agucitra, 2015). Είναι μέλος της ομάδας ορυκτών σμηκτίτη ενός ορυκτού μείγματος από διάφορα διογκώσιμα φύλλα πυριτικών αλάτων, τα οποία έχουν δομή τριών στρωμάτων και ανήκουν στα ορυκτά αργίλου.

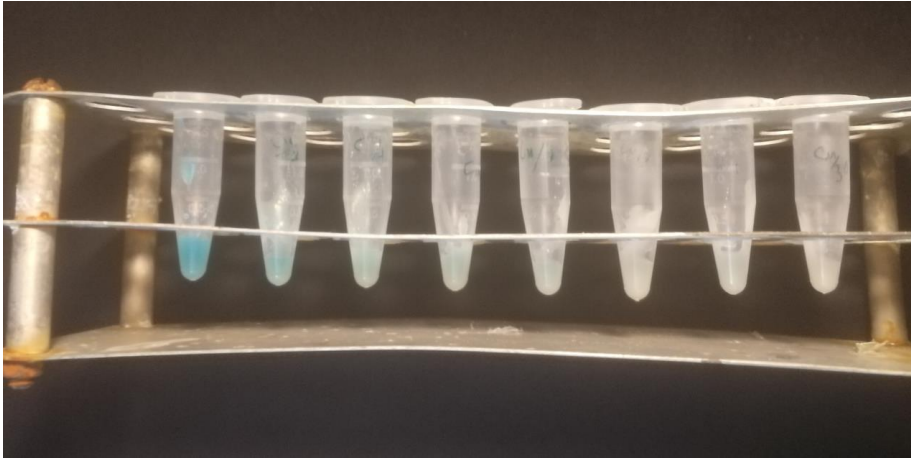


Εικόνα 5 Δομή Μοντμοριλλονίτη Πηγή: Venkatesha, 2015

Οι σμηκτίτες αποτελούνται κυρίως από μοντμοριλλονίτη, αλλά περιέχουν επίσης σκόνη χαλαζία και ασβεσίτη. Η δομή τους, όπως φυσικά και του μοντμοριλλονίτη αποτελείται από τρία στρώματα. Δύο τετραεδρικά στρώματα τα οποία συνδέονται ηλεκτροστατικά μέσω των κατιόντων ενός ενδιάμεσου στρώματος οκταέδρου. Τα στρώματα δεν συνδέονται άκαμπτα μεταξύ τους, αλλά μπορεί να διογκωθούν λόγω της αναστρέψιμης ενσωμάτωσης νερού και άλλων ουσιών (Friedrich, 1978). Σε αυτήν ακριβώς την ιδιότητα της δομής οφείλεται η μεγάλη ικανότητα των πηλών αυτών για προσρόφηση την οποία έχουμε εκμεταλλευτεί για την προσρόφηση των μορίων ενδιαφέροντος και τον ποσοτικό προσδιορισμό τους.

Επιστρέφοντας στον εκτορίτη, η χημική του δομή είναι $\text{Na}_{0.3}(\text{Mg},\text{Li})_3\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2$. Έχει πολλές χρήσεις σε διάφορους τομείς. Προσροφά εξαιρετικά βαρέα μέταλλα όταν υπάρχει φυσική επαφή, όμως δεν είναι κατάλληλος για χρήση σε ανθρώπινο οργανισμό καθώς οι επιδράσεις του δεν είναι γνωστές (Bhattacharyya and Gupta., 2008) και εξωτερικά του δέρματος χρησιμοποιείται για την θεραπεία δερματίτιδας εξ επαφής (Saary et al., 2005). Ο εκτορίτης προσροφά με μεγάλη απόδοση μια μεγάλη ποικιλία κατιονικών, υδρόφιλων ενώσεων, αυξάνοντας ακόμα περισσότερο τον αριθμό των ενώσεων αυτών μετά από διαδικασίες κατάλληλης τροποποίησης φορτίου και υδροφοβικότητας και το πόσο σταθερή θα είναι η προσκόλληση εξαρτάται και από τις φυσικοχημικές ιδιότητες του προσροφούμενου υλικού, όσο και από τις επιφανειακές ιδιότητες του προσροφητικού (Ismadji, Soetaredjo and Ayucitra, 2015; Zhang et al., 2019; Lagaly, Ogawa and Dékány, 2006).

Στην Εικόνα 1.2 φαίνεται ξεκάθαρα η οπτική διαφορά που παρουσιάζουν διάφορες συγκεντρώσεις Χαλκού (Cu) μετά από προσρόφηση σε μοντμοριλλονίτη. Αυτή η διαφορά είναι που οδήγησε στην επιπλέον διερεύνηση της μεθοδολογίας που ακολουθήθηκε για τον προσδιορισμό των μετάλλων.



Εικόνα 6 Προσρόφηση Cu σε bentone LT έναν πηλό μοντμοριλονίτη. Πηγή: συγγραφέας

Το δεύτερο μέρος του υβριδίου που χρησιμοποιήθηκε είναι η κυτταρίνη. Η κυτταρίνη είναι ένα δομικό βιοπολυμερές των φυτών και των ωομυκήτων, με τον τύπο $(C_6H_{10}O_5)_n$, είναι δηλαδή ένας πολυσακχαρίτης και αποτελείται από μια γραμμική αλυσίδα εκατοντάδων έως χιλιάδων $\beta(1 \rightarrow 4)$ συνδεδεμένων μονάδων D-γλυκόζης (Crawford, R. L., 1981, Updegraff D. M. 1969) και έχει μελετηθεί εκτενώς για την αφαίρεση διαφόρων τύπων ρύπων από λύματα και μόνη της αλλά και σε συνθετικά υλικά κυτταρίνης και ορυκτών σμηκτίτη (Islam et al., 2017; Santoso et al., 2019; Kumar et al., 2012) όπως το bentone LT που έχει χρησιμοποιηθεί εδώ. Μετά την προσρόφηση στις περιπτώσεις όπου οι μετρήσεις απορρόφησης πραγματοποιήθηκαν με την χρήση φωτόμετρου για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς πριν την επανάληψη διαδικασιών για φωτογραφική εξέταση, χρειάζεται να γίνει αποπροσρόφηση του μορίου από τον πηλό ώστε οι κατάλληλες μέθοδοι για την αντίδραση που θα οδηγήσει στην εξειδικευμένη ανίχνευσή του να εφαρμοστούν. Η αποκόλληση των μορίων από το εσωτερικό του πηλού γίνεται γενικά με χρήση ακετονιτριλίου σε συγκεκριμένο φάσμα συγκέντρωσης (ιδανικά 25% ακετονιτρίλιο – 75% νερό), με μετακίνηση εκτός του φάσματος να μειώνει την αποτελεσματικότητα της διαδικασίας (Kunz et al., 2020; Magni and Kyrali, 2020; Tsotsou, Mavroeidis and Georgiou, 2022).

Η τεχνική συμπύκνωσης που αναφέρθηκε προηγουμένως (βλ. ενότητα 1.1) και θα αναλυθεί εκτενώς στην ενότητα υλικά και μέθοδοι έχει εφαρμοστεί στην εργασία αυτή σε διάφορα μόρια. Ο πηλός αυτός είναι φορτισμένος αρνητικά οπότε υποθέτουμε πως καλύτερη δέσμευση θα παρατηρηθεί σε θετικά φορτισμένα μόρια και συμπλέγματα. Στην επόμενη υπο-ενότητα, θα γίνει μια αναφορά στα μόρια αυτά, στη σημασία τους ως ρύποι και την επικινδυνότητά τους για τον άνθρωπο, και θα παρουσιαστούν μερικά βασικά στοιχεία.

3.3.2 Κυτταροτοξικά φάρμακα που εξετάστηκαν

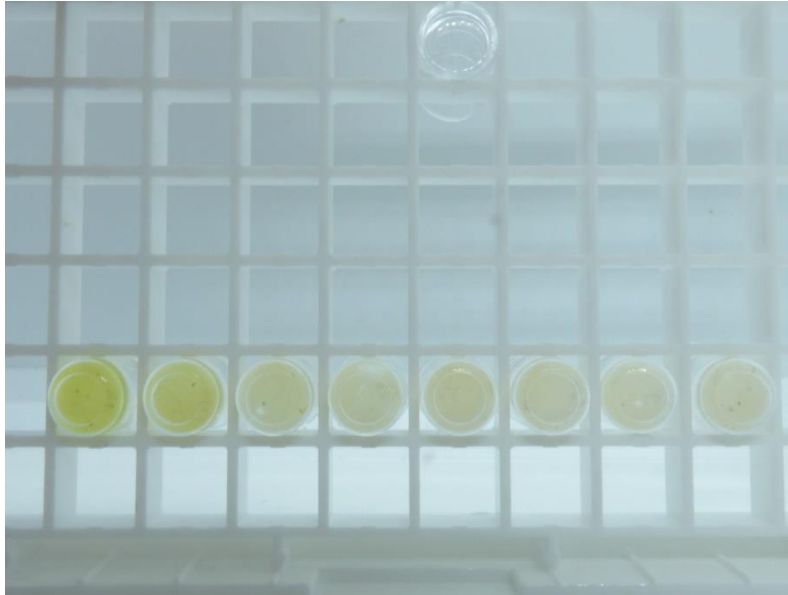
Οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες (επίσης κυτταροτοξικοί ή αντινεοπλασματικοί παράγοντες) είναι μια ομάδα ενώσεων που χρησιμοποιούνται για την πρόληψη ή τη διακοπή της κυτταρικής διαίρεσης (Allwood, Stanley and Wright, 2002). Η κατανάλωση τέτοιων χημειοθεραπευτικών φαρμάκων έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια. Αυτό, σε συνδυασμό με την υψηλή τοξικότητα και συχνά την καρκινογένειά τους, οδήγησε στην αναγνώριση αυτών των ουσιών ως μολυντών που προκαλούν ανησυχία και ως εκ τούτου, η εμφάνισή τους στο υδάτινο περιβάλλον πρέπει να αξιολογηθεί σωστά (Daughton and Ternes, 1999; Rabii et al., 2014).

Η υψηλή πολικότητα και η υδατοδιαλυτότητα της πλειονότητας αυτών των ενώσεων τις καθιστά λιγότερο πιθανό να αποικοδομηθούν ή να αφαιρεθούν κατά τη διάρκεια των διεργασιών σε μονάδες επεξεργασίας λυμάτων και επομένως πιο πιθανό να φτάσουν στο υδάτινο περιβάλλον. Ως εκ τούτου, η παρουσία τους στο υδάτινο περιβάλλον θα μπορούσε να έχει σημαντικό αντίκτυπο στην ανθρώπινη και οικολογική υγεία. Είναι επομένως σημαντικό να αναπτυχθούν αναλυτικές μέθοδοι που επιτρέπουν την ανίχνευσή τους σε χαμηλές συγκεντρώσεις νανογραμμαρίου ανά λίτρο (Aronson, 2016; Rabii et al., 2014). Τα φάρμακα που εξετάστηκαν για τις ανάγκες της διπλωματικής είναι η ιρινοτεκάνη και η τοποτεκάνη.

Topotecan

Η τοποτεκάνη ή topotecan είναι ένας αναστολέας της τοποϊσομεράσης I του DNA, ενός ενζύμου που επιτρέπει τη χαλάρωση της στρεπτικής καταπόνησης του DNA λόγω της δημιουργίας supercoils κατά την αντιγραφή και μεταγραφή του με «κόψιμο» και στη συνέχεια επανασφράγιση του μορίου DNA. Είναι ένα συνθετικό, υδατοδιαλυτό ανάλογο της φυσικής χημικής ένωσης καμπτοθεκίνη. Χρησιμοποιείται με τη μορφή του υδροχλωρικού του άλατος για τη θεραπεία του καρκίνου των ωοθηκών, του καρκίνου του πνεύμονα και άλλων τύπων καρκίνου. Προκαλεί κατά τη θεραπεία διάφορες παρενέργειες όπως αναιμία, θρομβοπενία, διάρροια, ναυτία, έμετο, στοματίτιδα, δυσκοιλιότητα κλπ. Λόγω της αιματολογικής του τοξικότητας, σπάνια χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλους αντικαρκινικούς παράγοντες (Scholar, 2007; Cordell, 2003). Το topotecan συναντάται σε μορφή σκόνης κίτρινου ως πρασινωπού χρώματος και έχει σημείο τήξης 100,5°C με 103,3 °C. Η

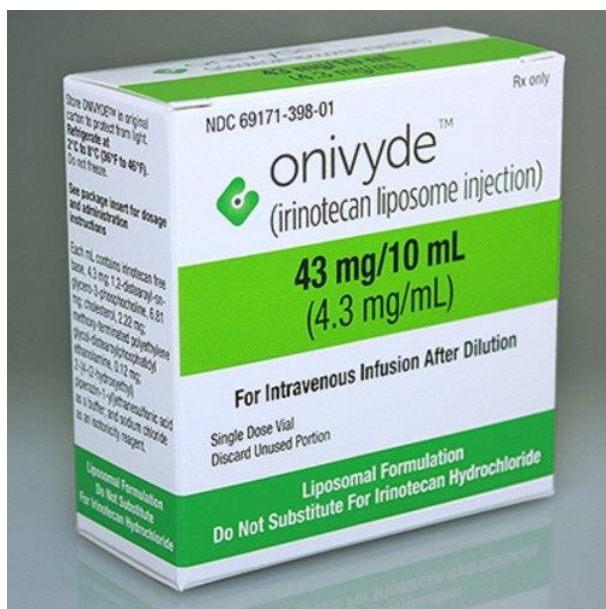
χημική του φόρμουλα είναι $C_{23}H_{23}N_3O_5$, με μοριακό βάρος 421.451. Μπορεί να χορηγηθεί και στοματικά αλλά κυρίως ενδοφλέβια στους ασθενείς και περίπου το 49% της ενδοφλέβιας δόσης ανακτάται στα ούρα και το 18% στα κόπρανα (Aronson, 2016).



Εικόνα 7 Φωτογράφιση toprecan προσροφημένου σε Bentone LT σε πηγάδια ELISA- Πηγή: προσωπικό αρχείο.

Irinotecan

Η ιρινοτεκάνη (irinotecan) όπως και η τοποτεκάνη είναι ένα ημι-συνθετικό παράγωγο της καμπτοθεσίνης. Έχει μοριακή μάζα 586,7 g/mol και χημικό τύπο $C_{33}H_{38}N_4O_6$. Είναι ένας αντινεοπλασματικός παράγοντας, ο οποίος δρα ως ειδικός αναστολέας της DNA τοποϊσομεράσης I λειτουργώντας με το να αποτρέπει την επανασύνδεση των κλώνων του DNA δεσμεύοντας το σύμπλεγμα τοποϊσομεράσης I-DNA και προκαλώντας θραύση της διπλής έλικας και κυτταρικό θάνατο. Το Irinotecan ενδείκνυται για τη θεραπεία του καρκίνου του παχέος εντέρου και του ορθού προχωρημένου σταδίου σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα, όπως και του παγκρεατικού καρκίνου. Χορηγείται μόνο ενδοφλέβια και οι ανεπιθύμητες παρενέργειες της ιρινοτεκάνης περιλαμβάνουν διάρροια, ναυτία και έμετο, ουδετεροπενία και πυρετό, λοιμώξεις του αίματος ή των πνευμόνων σοκ, αφυδάτωση, νεφρική ανεπάρκεια και θρομβοπενία (NCBI, 2022b ; Pomier, 2013; Lokiec, du Sobrier and Sanderink, 1996). Η μέση 24ωρη απέκκριση ιρινοτεκάνης στα ούρα αντιπροσωπεύει το 17-25% της χορηγούμενης δόσης (Chabot et al., 1998; Chabot, 1997)



Εικόνα 8 Onivyde- Αντικαρκινικό σκεύασμα ενδοφλέβιας χρήσης με ενεργό συστατικό την ιρινοτεκάνη. – Πηγή: <https://www.indiamart.com/proddetail/onivyde-irinotecan-liposome-injection-43-mg-10-mL-24923457891.html>

3.3.3 Βαρέα μέταλλα

Ένα σημαντικό πρόβλημα που προκαλεί όλο και μεγαλύτερη ανησυχία λόγω των δυσμενών επιπτώσεων που επιφέρει τόσο στο περιβάλλον, όσο και στην ανθρώπινη υγεία είναι η περιβαλλοντική ρύπανση από βαρέα μέταλλα. Οι ανόργανοι αυτοί παράγοντες ρύπανσης απορρίπτονται στα νερά, τα εδάφη και στην ατμόσφαιρα λόγω της ταχέως αναπτυσσόμενης γεωργίας και μεταλλουργίας, της ακατάλληλης απόρριψης απορριμμάτων, των λιπασμάτων και των φυτοφαρμάκων. Ορισμένα μέταλλα επηρεάζουν τις βιολογικές λειτουργίες και την ανάπτυξη, ενώ άλλα μέταλλα συσσωρεύονται σε ένα ή περισσότερα διαφορετικά όργανα προκαλώντας πολλές σοβαρές ασθένειες όπως ο καρκίνος (Briffa et al., 2020). Τα μεταλλοειδή τείνουν να σχηματίζουν ομοιοπολικούς δεσμούς με οργανικές ομάδες σχηματίζοντας λιπόφιλα ιόντα και ενώσεις που μπορούν να προκαλέσουν τοξικές επιδράσεις όταν συνδέονται με μη μεταλλικά στοιχεία των κυτταρικών μακρομορίων (Walker et al., 2005).

Κατά το πειραματικό μέρος της διπλωματικής εξετάστηκαν διάφορα μέταλλα ως προς την ικανότητα του bentone LT για την προσρόφηση και συμπύκνωσή τους και ακολούθως την διατήρηση της λειτουργίας των μεθόδων ποσοτικοποίησης τους. Μέταλλα που εξετάστηκαν περιλαμβάνουν τον άργυρο, τον χαλκό, τον σίδηρο, τον μόλυβδο και το κοβάλτιο.

Κοβάλτιο (Co)

Το κοβάλτιο είναι ένα λαμπερό μέταλλο με ασημί μπλε χρώμα. Είναι το 32^ο πιο άφθονο μέταλλο και βρίσκεται σε ορυκτά γνωστά ως κοβαλίτη τα οποία αποτελούνται από θείο, κοβάλτιο και αρσενικό, ερυθρίτη, γνωστό και ως κόκκινο κοβάλτιο, και σκουτερουδίτη (skutterudite) που αποτελείται από κοβάλτιο, αρσενικό, νικέλιο και μερικές φορές σίδηρο. Έχει πυκνότητα 8,86g/cm³ και χρησιμοποιείται σε μαγνήτες ως κράμα, σε τουρμπίνες εκτόξευσης, σε ηλεκτρολυτική επιμετάλλωση, ως μπλε βαφή και στη ραδιενεργή μορφή του (⁶⁰Co) ως θεραπεία καρκίνου.

Μπορεί να προκαλέσει πληθώρα δυσμενών επιπτώσεων στον άνθρωπο με πιο ήπιες τις δερματικές και αναπνευστικές παθήσεις ενώ οι πιο σοβαρές περιλαμβάνουν οίδημα, αιμορραγία στους πνεύμονες κατά την εισπνοή και συμφόρηση μεταξύ άλλων με επιπλέον επιπτώσεις μετά από χρόνια έκθεση. Τα περιβαλλοντικά επίπεδα είναι 0,3-10 μg/mL και δεν έχει τεθεί όριο στα επίπεδα μέχρι τα οποία πρέπει να βρίσκεται στο πόσιμο νερό. Μετά από πρόσληψη με οποιοδήποτε τρόπο, το κοβάλτιο απεκκρίνεται από το σώμα κυρίως μέσω των ούρων και σε μικρότερο βαθμό με τα κόπρανα και τη χολή (Lauwerys and Lison, 1994; Leyssens et al., 2017; Simonsen, Harbak and Bennekou, 2012; Stevens and Batlokwa, 2017).

Άργυρος (Ag)

Ο άργυρος (ασήμι) είναι ένα ορυκτό σχεδόν λευκό, λαμπερό, μαλακό, πολύ όλκιμο και εύπλαστο. Είναι το 65^ο πιο άφθονο μέταλλο και βρίσκεται σε ορυκτά όπως ο αργεντίτης που βρίσκεται σε υψηλές θερμοκρασίες και είναι κατασκευασμένος από κυβικό θειούχο ασήμι, ο ακανθίτης που αποτελείται από μονοκλινικό θειούχο άργυρο, και ο χλωραργυρίτης που αποτελείται από χλωριούχο άργυρο. Έχει πυκνότητα 10,5 g/cm³ και αποτελεί καλό αγωγό θερμότητας και ηλεκτρισμού και χρησιμοποιείται στην κατασκευή κοσμημάτων, στην φωτογραφία ως βρωμιούχος και ιωδιούχος άργυρος, σε καθρέφτες, ασημικά, μπαταρίες κλπ. Οι επιπτώσεις σε ανθρώπους μέσω επαφής μπορεί να περιλαμβάνουν αλλεργική δερματίτιδα, ερεθισμό του δέρματος και αργυρία, μέσω εισπνοής προβλήματα στο αναπνευστικό όπως φλεγμονή και προβλήματα αναπνοής, ζάλη και αστάθεια, λιποθυμία και στις έσχατες περιπτώσεις κόμα και θάνατο, και τέλος μέσω κατάποσης σε ποσότητες μεγαλύτερες από τις εξεταζόμενες στα πειράματα, ναυτία και έμμεση διάρροια, καρδιακές ανωμαλίες και εγκεφαλικά προβλήματα. Τα περιβαλλοντικά επίπεδα είναι

0,044 mg/mL και τα όρια στο πόσιμο νερό 0,05mg/L. Μετά από πρόσληψη από οποιοδήποτε τρόπο το περισσότερο ασήμι εκκρίνεται από τη χολή και σε μικρότερο βαθμό από τα ούρα (WHO, 2002; Briffa, Sinagra and Blundell, 2020; Martin and Griswold, 2009).

Μόλυβδος (Pb)

Ο μόλυβδος είναι ένα μαλακό, εύπλαστο μέταλλο με μουντό ασημένιο χρώμα. Είναι το 37^ο πιο άφθονο μέταλλο και βρίσκεται στο ορυκτό γνωστό ως galena, το οποίο αποτελείται από θειούχο μόλυβδο μαζί με ασήμι, ψευδάργυρο ή χαλκό. Έχει πυκνότητα 11,3 g/cm³ και χρησιμοποιείται στην κατασκευή μπαταριών αμαξιών, φύλλα οθονών υπολογιστών, εξοπλισμό αθλημάτων, σωλήνες, περιέκτες για διαβρωτικά υγρά κλπ. Σε ανθρώπους προκαλεί υπέρταση, αποβολές και προβλήματα στις γέννες, εγκεφαλικά προβλήματα (σοβαρότερα σε παιδιά) και διαταραχές στη σύνθεση αιμοσφαιρίνης μεταξύ άλλων. Τα όρια στο πόσιμο νερό 0,015mg/L. Τα ούρα και η οδός των κοπράνων είναι οι κύριες οδοί απέκκρισης του ανόργανου μόλυβδου (Briffa et al., 2020, ATSDR 2020).

Χαλκός (Cu)

Ο χαλκός είναι ένα εύπλαστο, κοκκινόχρυσο μέταλλο. Είναι το 26^ο πιο άφθονο μέταλλο και βρίσκεται στο χαλκοπυρίτιο ένα ορυκτό που αποτελείται από χαλκό, σίδηρο και θείο. Στη διπλωματική ασχοληθήκαμε με Cu(II). Έχει πυκνότητα 8,96 g/cm³, είναι καλός αγωγός θερμότητας και ηλεκτρισμού και χρησιμοποιείται στην κατασκευή κραμάτων όπως ο μπρούτζος, καλωδίων, σωλήνων, για την διατήρηση ξύλου και υφασμάτων και ως λίπασμα ή και σε θεραπευτικά σκευάσματα για αρρώστιες των φυτών. Αρνητικές επιδράσεις περιλαμβάνουν διάρροια, έμεση, ασθένεια Wilson, αϋπνίες, εγκεφαλικά προβλήματα, προβλήματα κατάποσης και πολλά ακόμα προβλήματα με υπερβολική έκθεση να μπορεί να οδηγήσει σε νέκρωση και θάνατο. Τα όρια στο πόσιμο νερό 1,3 mg/L. Τα ούρα και η οδός των κοπράνων είναι οι κύριες οδοί απέκκρισης του ανόργανου μόλυβδου (Briffa et al., 2020; Jafrir, 2017; ATSDR, 2022).

Σίδηρος (Fe)

Ο σίδηρος είναι ένα γυαλιστερό, όλκιμο, εύπλαστο, ασημί-γκρι μέταλλο. Ο σίδηρος πιστεύεται ότι είναι το 10^ο πιο άφθονο στοιχείο. Βρίσκεται σε διάφορα οξειδία του σιδήρου, όπως τα ορυκτά αιματίτης, μαγνητίτης και τακονίτης. Η πυκνότητά του είναι 7,8 g/cm³,

είναι χημικά ενεργός και σχηματίζει ενώσεις δισθενούς (II) και τρισθενούς (III) σιδήρου. Ο σίδηρος είναι το πιο χρησιμοποιούμενο από όλα τα μέταλλα και το ατσάλι είναι το πιο γνωστό κράμα σιδήρου. Οι εφαρμογές του περιλαμβάνουν αμέτρητα πράγματα από τα δοχεία τροφίμων μέχρι τα οικογενειακά αυτοκίνητα.

Ο αρσενίτης σιδήρου (Iron(III)-O-arsenite) μπορεί να είναι επικίνδυνος για το περιβάλλον ενώ στον άνθρωπο, ο σίδηρος μπορεί να προκαλέσει επιτεφυκίτιδα, χοριοειδίτιδα και αμφιβληστροειδίτιδα εάν έρθει σε επαφή και παραμείνει στους ιστούς. Η χρόνια εισπνοή υπερβολικών συγκεντρώσεων αναθυμιάσεων ή σκόνης οξειδίου του σιδήρου μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη σιδήρωσης. Τα επίπεδα στα λύματα είναι 0,4-2,0 mg/L και στο πόσιμο νερό προτείνεται η συγκέντρωση να μένει κάτω από 0,3 mg/L για λόγους αισθητικούς όμως και όχι υγείας (<https://www.lenntech.com/periodic/elements/fe.htm>).

Εικόνα 9 Potentially toxic elements – Πηγή: <https://www.mdpi.com/1660-4601/16/22/4446>

3.3.4 Απορρυπαντικά και λοιπές ενώσεις

Η αυξημένη εκβιομηχάνιση μαζί με την αύξηση του πληθυσμού έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση ανθεκτικών ρύπων όπως επιφανειοδραστικά φαρμακευτικά προϊόντα, προϊόντα προσωπικής φροντίδας και χρωστικές ουσίες στα λύματα, προκαλώντας σημαντικά παγκόσμια περιβαλλοντικά και δημόσιας υγείας προβλήματα. Πολλά από αυτά είναι δύσκολο ή αδύνατο να εξαλειφθούν χρησιμοποιώντας συμβατικές διαδικασίες επεξεργασίας. Τέτοια είναι και οι επιφανειοδραστικοί παράγοντες, που χρησιμοποιούνται συνήθως σε βιομηχανικές και οικιακές δραστηριότητες για τα αμφίφιλα χαρακτηριστικά τους έχουν αναδειχθεί σε μείζονα περιβαλλοντική ανησυχία καθώς είναι δυνητικά επικίνδυνα για την

ανθρώπινη υγεία, καθώς και για το χερσαίο και υδάτινο οικοσύστημα (Mondal, Adak and Datta, 2018). Η παρουσία τους στο νερό ακόμα και κάτω από τα τοξικά επίπεδα σχετίζεται επίσης με πολλά παθολογικά, φυσιολογικά και βιοχημικά προβλήματα στην υδρόβια ζωή καθώς λόγω των ιδιοτήτων τους προκαλούν διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών, οδηγώντας σε καθυστέρηση στο μεταβολισμό, μείωση του ρυθμού ανάπτυξης ή και κυτταρικό θάνατο σε υδρόβια φυτά (Clarke, 2009). Οι ιοντικές επιφανειοδραστικές ουσίες αποτελούν περίπου το 75 % του συνολικού όγκου, με τις κατιονικές να αποτελούν το 10% αυτών. Αυτές, αν και χρησιμοποιούνται λιγότερο σε σύγκριση με τις ανιονικές επιφανειοδραστικές ουσίες κατ' όγκο, είναι πιο τοξικές και πρέπει να παρακολουθούνται πιο εντατικά τα επίπεδά τους (Mondal et al., 2018).

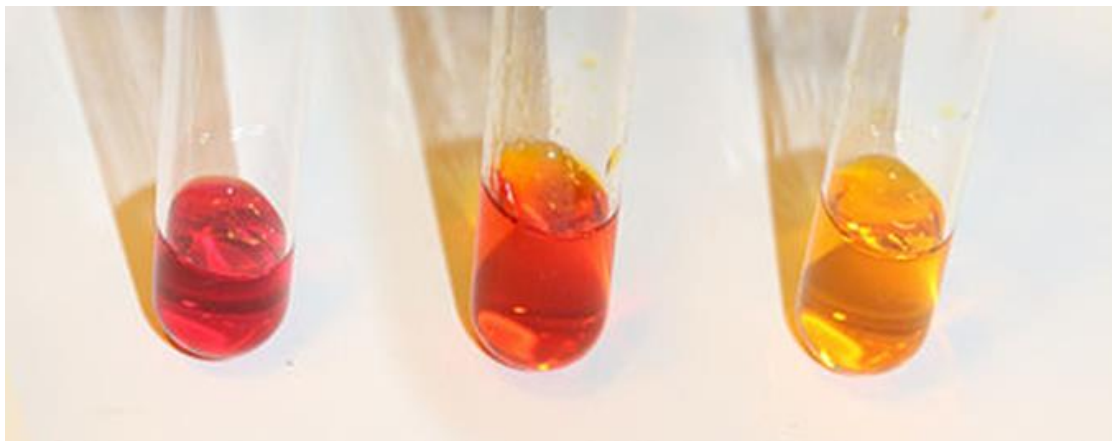
CTAB

Το CTAB ή βρωμιούχο κετυλοτριμεθυλαμμώνιο είναι ένα κατιονικό επιφανειοδραστικό. Είναι ένας αποτελεσματικός αντισηπτικός παράγοντας κατά των βακτηρίων και των μυκήτων και το κύριο συστατικό ορισμένων ρυθμιστικών διαλυμάτων για την εξαγωγή του DNA. Έχει δυσμενείς επιπτώσεις στο περιβάλλον καθώς το Ctab είναι τοξικό για την υδρόβια ζωή ακόμη και σε σχετικά μικρές συγκεντρώσεις όπως φαίνεται σε μια μελέτη από το UTSA έδειξε ότι τα ψάρια Zebra παρουσίασαν τοξικότητα CTAB όταν εκτέθηκαν σε 0,3 mg/L για 96 ώρες και οι ψύλλοι του νερού παρουσίασαν ενδείξεις CTAB τοξικότητας υπό έκθεση σε 0,03 mg/L για 48 ώρες. Τα συνηθισμένα επίπεδα του στα βιομηχανικά λύματα είναι 2,0 mg/mL ή χαμηλότερα (Maki, Sagara and Kawai 1991; Mondal, Adak and Datta, 2018; Clarke, 2009). Χρησιμοποιήθηκε στην διπλωματική ως περιβαλλοντικός ρυπαντής κατά τον προσδιορισμό τοποτεκάνης και κοβαλτίου σε μείγμα ρυπαντών.

Methyl red (ερυθρό του μεθυλίου)

Το Methyl red είναι μια αζωχρωστική και έχει μορφή σκούρας κόκκινης κρυσταλλικής σκόνης. Οι αζωχρωστικές είναι οργανικές ενώσεις που φέρουν τη λειτουργική ομάδα $R-N=N-R'$, στην οποία τα R και R' είναι συνήθως αρύλιο και χρησιμοποιούνται ευρέως για την επεξεργασία υφασμάτων, δερμάτινων ειδών και ορισμένων τροφίμων. Είναι μια βαφή δείκτης pH που γίνεται κόκκινη σε όξινα διαλύματα κάτω από pH 4,4, κίτρινη σε pH πάνω από 6,2 και πορτοκαλί ενδιάμεσα, με pKa 5,1 (βλ.Εικόνα 1.8). Στη μικροβιολογία, το ερυθρό του μεθυλίου χρησιμοποιείται στη δοκιμή Methyl red, που χρησιμοποιείται για τον

εντοπισμό βακτηρίων που παράγουν σταθερά οξέα με μηχανισμούς μικτής όξινης ζύμωσης της γλυκόζης (NCBI, 2022a ; Sigmaaldrich, 2022).



Εικόνα 10 Αλλαγή χρώματος διαλύματος Methyl red υπό διαφορετικές συνθήκες pH.– Πηγή:https://en.wikipedia.org/wiki/File:Color_transition_of_Methyl_red_solution_under_different_acid-base_conditions.jpg

3.4 Προηγούμενη χρήση μονιμοριλονίτη και φωτογραφικών μεθόδων στην βιολογική ανάλυση

3.4.1 Εξέλιξη της χρήσης φωτογραφίας στον τομέα βιολογικής ανάλυσης

Η προσπάθεια ενσωμάτωσης της φωτογραφίας στον τομέα της περιβαλλοντικής διαχείρισης έχει ξεκινήσει εδώ και δεκαετίες, όπου αρχικά δοκιμάστηκε με ψηφιακή κάμερα να γίνει ποσοτικοποίηση της ποιότητας νερού σε ζώνες ανάμιξης (Lillesand, Scarpace and Clapp, 1974) με την εξέλιξη της τεχνολογίας να κατευθύνει περισσότερες προσπάθειες προς το πεδίο αυτό. Στην πορεία της εξέλιξης των μεθόδων αυτών, έχουν χρησιμοποιηθεί τόσο επαγγελματικές κάμερες, όσο και μη επαγγελματικά μοντέλα ή ακόμα και smartphones (Coleman, Coarsey, and Asghar, 2019, Koohkan et al., 2020). Τα smartphones έχουν αναφερθεί κυρίως ως φορητές συσκευές για οπτική ανίχνευση χρωματομετρική, φθορισμός, χημειοφωταύγεια, βιοφωταύγεια. Ωστόσο, έχουν επίσης συνδεθεί λειτουργικά με ηλεκτροχημικούς ανιχνευτές για χημικές μετρήσεις με βάση την αντίσταση, την αμπερομετρία, και άλλους παράγοντες (Rezazadeh et al., 2019). Έχει γίνει προσδιορισμός H_2O_2 με τη φωτογράφιση χημειοαισθητήρα με βάση χαρτί (Zhang et al., 2018), έλεγχος χημικής ανοσοαπόκρισης αυτοαντισώματος (Adeniyi & Mashazi, 2022), και ακόμα για την παρακολούθηση της εξέλιξης βλαβών δρεπανοκυτταρικής αμφιβληστροειδοπάθειας (Malbin, Barbosa and Lin, 2018). Δεν έχει ακόμα χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό και

την δημιουργία γενικού πρωτοκόλλου έγκυρης και γρήγορης ποσοτικοποίησης ουσιών όπως είναι ο στόχος της εργασίας αυτής.

3.4.2 Χρήση μοντιμοριλονίτη στον τομέα της βιολογικής ανάλυσης

Άργιλοι σμηκτίτη έχουν χρησιμοποιηθεί για διαφόρων τύπων διεργασίες κάποιες εκ των οποίων έχουν αναφερθεί σε προηγούμενη ενότητα, λόγω την ικανότητας προσρόφησης ουσιών που παρουσιάζουν, έχοντας περαιτέρω βρει περιορισμένη χρήση σε διαδικασίες εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE), μιας τεχνικής η χρήση της βρίσκεται στην απομόνωση αναλυτών από μεγάλο εύρος προέλευσης, όπως η χρήση ως προσροφητικού υλικού για την απομόνωση ιόντων χαλκού από δείγματα φαγητού (Soleimani, Rafiei and Siahroosh, 2015) ή για τον καθαρισμό και εμπλουτισμό χλωροφαινόλης σε μαγνητική SPE. Λόγω όμως της σχετικά αργής και μικρής αποδοτικότητας απελευθέρωση των προσροφημένων μορίων, τα ορυκτά αυτά όπως και υβρίδιά τους δεν έχουν αξιοποιηθεί ευρέως με στόχο την ποσοτικοποίηση των μορίων αυτών (Tsotsou et al., 2022).

4. Υλικά και Μέθοδοι

4.1 Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν

Bentone LT 2,6%, Irinotecan hydrochloride, trihydrate 40 mg/2 mL topotecan 4mg/mL, HPLC Grade Acetonitrile, acetone and methanol, CTAB 200μg/mL, Fe(Cl₃), Copper(II)acetate monohydrate 5% w/v, εξαυδρικό Co(NO₃)₂ 10,6mg/mL και 7,4 mg/mL, diclofenac, ferrozine biosis kit for Co and Fe, Pb and Arsenazo III (WR) kit for Pb and Ag, AgNO₃ 16,3 mg/mL και 17,6mg/mL, Meloxicam, HCl, MT red, ουρικό οξύ 500 μg/mL, χλωρίνη εμπορίου για προσδιορισμό Pb. Πρότυπα υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα από τη Fisher Scientific χρησιμοποιήθηκαν για τη βαθμονόμηση του πεχαμέτρου.

4.2 Πειραματικές τεχνικές και πρωτόκολλα

4.2.1 Βασικά πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν

Για τις ανάγκες της διπλωματικής πραγματοποιήθηκαν πολλά πειράματα και δοκιμές σε διάφορα μόρια και ουσίες. Η πειραματική διαδικασία βασίστηκε σε 2 τεχνικές-πυλώνες, που χρησιμοποιήθηκαν για να υποστηρίξουν τον στόχο της επιτυχούς προσρόφησης και μέτρησης της απορρόφησης των μορίων με τη χρήση φωτόμετρου μετά από συμπύκνωση

και προσθήκη κατάλληλου χρωμογόνου ή, εναλλακτικά τη φωτογράφιση των προσροφημένων αυτών μορίων στο στερεό υλικό μετά την αντίδραση με το χρωμογόνο.

Προσρόφηση και αποδέσμευση ουσιών στο Bentone LT

Για την προσρόφηση των ενώσεων σε Bentone LT ακολουθήθηκε η παρακάτω πειραματική διαδικασία (Tsotsou et al.,2022): προστίθεται σε falcon tubes χωρητικότητας 50 mL, μικρός όγκος (150μL) υδατικού διαλύματος Bentone LT 2,6% και 42-45 mL υδατικού διαλύματος της ένωσης ή μείγματος διαφόρων ενώσεων στην περίπτωση εξέτασης ικανότητας προσδιορισμού της ένωσης σε μείγμα. Σε συγκεκριμένες περιπτώσεις ιονιζόμενων ενώσεων, είναι δυνατόν να γίνει προηγουμένως ρύθμιση του pH με σκοπό η ένωση να μην είναι αρνητικά φορτισμένη κατά την προσρόφηση. Η διαδικασία εφαρμόζεται σε πρότυπα δείγματα παράλληλα με τα άγνωστα. Μετά την προσθήκη ακολουθεί επώαση των δειγμάτων με έντονη ανάδευση ώστε να γίνει όσο το δυνατόν μεγαλύτερη προσρόφηση της ένωσης από τον μοντμοριλλονίτη για χρονική περίοδο 40-90 λεπτών ανάλογα την ένωση. Μετά την ανάδευση, λόγω περιορισμών του εξοπλισμού ακολουθεί μεταφορά των δειγμάτων σε falcon tubes 15mL φυγοκέντρωση στις 3.500 rpm για 5 λεπτά και διαχωρισμό του ιζήματος από το υπερκείμενο με προσεκτική απόρριψη του υπερκειμένου.

Η διαδικασία επαναλαμβάνεται ώσπου το σύνολο του αρχικού υδατικού διαλύματος να έχει φυγοκεντρωθεί και το συνολικό ίζημα συγκεντρωθεί στον πάτο των falcon tubes. Αφού απορρίπτεται το υπερκείμενο, το Bentone LT επαναιωρείται πλήρως σε μικρή ποσότητα (200-500 μL) διαλύτη εκρόφησης ο οποίος ήταν είτε υδατικό διάλυμα ακετονιτριλίου (25 ACN: 75 νερό (v/v)) είτε (σπάνια) υδατικό διάλυμα ακετόνης (25 ακετόνη: 75 νερό (v/v)) και επωάζονται εκεί για 20-30 λεπτά χωρίς ανάμειξη (Magni and Király, 2020). Γίνεται και πάλι μια φυγοκέντρωση για 5 λεπτά σε 3.500 rpm και η αποπροσροφημένη ένωση ποσοτικοποιείται φωτομετρικά μέσω του υπερκειμένου μετά από κατάλληλη μέθοδο επεξεργασίας με χρωμογόνο για κάθε ένωση.

Μεθοδολογία φωτογράφισης των ουσιών και ανάλυσής τους σε λογισμικό ImageJ

Κατά την ανάπτυξη φωτογραφικής μεθόδου ποσοτικοποίησης αρχικά έγιναν διάφορες δοκιμές. Αρχικά δοκιμάστηκε η προσρόφηση χαλκού σε bentone LT μέσα σε erpendorfs και γυάλινους ή πλαστικούς διάφανους σωλήνες. Μετά την προσθήκη των ενώσεων έγινε

προσρόφηση με επώαση και έντονη ανάδευση και ακολούθησε φωτογράφησή τους με κάμερα Panasonic Lumix DMC-FZ200 και 2 τεχνητές πηγές διάχυσης φωτός. Η ανάλυση των φωτογραφιών έγινε με το λογισμικό επεξεργασίας φωτογραφιών ImageJ και μετρήθηκε η χρωματική ένταση του κάθε δείγματος. Αφού τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά αποφασίστηκε η χρήση lightbox ώστε να υπάρχει ένα πιο ομοιόμορφο παρασκήνιο και να πέφτει το φως εξίσου σε κάθε δείγμα με τον πιο αποτελεσματικό τρόπο.

Αφού καταφέραμε να πάρουμε ενθαρρυντικά αποτελέσματα, η τεχνική που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: Για την φωτογράφησή των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν μια κάμερα Panasonic Lumix DMC-FZ200 και ένα lightbox εξοπλισμένο με διπλή σειρά led (Dias and Reis, 2012). Η βασική μέθοδος που ακολουθήθηκε είναι παρόμοια με αυτήν που περιγράφεται παραπάνω, με την βασική διαφορά ότι μετά την συγκέντρωση του ιζήματος, αυτό μεταφέρεται μετά από εναιώρηση σε νερό, σε διάφανο αποδέκτη και ακολουθείται φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 3.500 rpm, απόρριψη του υπερκειμένου και επεξεργασία με την εκάστοτε μέθοδο προσδιορισμού κάθε ένωσης που ακολουθείται και για τον φωτομετρικό προσδιορισμό της. Έπειτα στις θετικά φορτισμένες ενώσεις (οι οποίες προσροφούνται πολύ καλά στο bentone LT) γίνεται και πάλι φυγοκέντρηση και απόρριψη του υπερκειμένου και φωτογράφιση, ενώ στις αρνητικά φορτισμένες απευθείας φωτογράφιση μετά από κατάλληλη αλλαγή του pH, ώστε να ανακτήσουν το αρνητικό φορτίο τους. Κατά την φωτογράφιση τα δείγματα στήνονται στο κέντρο του lightbox, και φωτογραφίζονται σταθεροποιώντας την κάμερα και ρυθμίζοντάς ώστε οι φωτογραφίες να βγαίνουν με πολύ υψηλό φωτισμό, καταλήγοντας σε ελαφρύ «κάψιμο» τους και έτσι να προκύπτουν πιο ομοιόμορφα χρώματα στην έκταση κάθε δείγματος. Οι φωτογραφίες μετά ανεβαίνουν σε υπολογιστή, χωρίζονται σε χρωματικά κανάλια RGB, επιλέγεται η περιοχή εξέτασης για κάθε δείγμα ξεχωριστά και λαμβάνεται το ιστόγραμμα τους. Από αυτό δημιουργείται σε υπολογιστικό φύλλο αντιστοιχία συγκέντρωσης κάθε δείγματος με τις τιμές χρωματικής του έντασης στο επιλεγμένο κανάλι και διάγραμμα. Δείγματα μετρήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες γυάλινους και πλαστικούς, μικρότερα πλαστικά σωληνάκια, LC-MS tubes και πηγάδια μικροτιτλοδότησης, με σκοπό να μειωθεί όσο γίνεται ο απαραίτητος όγκος bentone LT ώστε να αυξηθεί ο παράγοντας συμπύκνωσης των ενώσεων. Καταλήξαμε σε μικρότερο ασφαλή (με ομοιόμορφη κάλυψη) όγκο bentone τα 250 μL με χρήση

των πηγαδιών μικροτιτλοδότησης. Οι ποσότητες και οι λεπτομέρειες κάθε δοκιμής θα παρουσιαστούν λεπτομερώς κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων στην επόμενη ενότητα (Αποτελέσματα).

4.2.2 Μέθοδοι προσδιορισμού και ποσοτικοποίησης ενώσεων

Σε περίπτωση που χρειάζεται η οποιαδήποτε αντίδραση pH σε συγκεκριμένο εύρος ή τιμή για να πραγματοποιηθεί, η ρύθμιση αυτή του pH γίνεται με το εργαστηριακό πεχάμετρο. Η βαθμονόμηση του πεχαμέτρου γίνεται με τη χρήση πρότυπων υδατικών ρυθμιστικών διαλυμάτων από τη Fisher Scientific βυθίζοντας το ηλεκτρόδιο του σε ρυθμιστικό διάλυμα με pH 4.0 εφόσον έχει επιλέγει βαθμονόμηση στο μηχάνημα και μετά τη σταθεροποίηση της ένδειξης ξεπλένεται και το βυθίζεται σε διάλυμα με pH 7.0, περιμένοντας πάλι τη σταθεροποίηση της ένδειξης. Μόλις γίνει σωστά η βαθμονόμηση ξεπλένεται και πάλι καλά το ηλεκτρόδιο και το βυθίζεται στο διάλυμα προς ρύθμιση.

Ιρινοτεκάνη: Σύμφωνα με το πρωτόκολλο για την ποσοτικοποίηση της ιρινοτεκάνης (Tsotsou et al., 2021), τα δείγματα οξινίστηκαν με πυκνό HCl (12,1 M) σε τελική συγκέντρωση 1,45 M. Στη συνέχεια, η ιρινοτεκάνη προσδιορίστηκε μετρώντας την απορρόφησή της με διχρωματική ανάλυση σε 405 nm και 500 nm για την ελαχιστοποίηση των παρεμβολών background μετά την αποπροσρόφησή της από το bentone LT.

Τοποτεκάνη: Για ποσοτικοποίηση τοποτεκάνης, τα δείγματα και πάλι οξινίστηκαν με πυκνό HCl το οποίο πρέπει να είναι 12% της ποσότητας τοποτεκάνης. Ο προσδιορισμός έγινε μετρώντας την απορρόφησή της με διχρωματική ανάλυση σε 425 και 465 για ελαχιστοποίηση παρεμβολών background μετά την αποπροσρόφησή της από τον πηλό. Η μέθοδος ποσοτικοποίησης αυτή βασίστηκε στη μέθοδο της ιρινοτεκάνης λόγω της δομικής τους ομοιότητας και φαίνεται πως λειτουργεί εξίσου καλά. Τα μήκη απορρόφησης επιλέχθηκαν με βάση τη μορφή της καμπύλης απορρόφησης μετά από wavelength scan. Κατά την ποσοτικοποίησή του με ψηφιακή ανάλυση φωτογραφίας μετά την συγκέντρωση και απομόνωση του ιζήματος μπεντονίτη, αυτό μεταφέρεται σε περιέκτη και προστίθεται 12% του όγκου του δείγματος που μεταφέρθηκε σε μL HCl για οξίνιση πριν γίνει φυγοκέντρηση, απομάκρυνση του υπερκειμένου και φωτογράφιση.

Fe(III): Για την ποσοτικοποίηση του σιδήρου χρησιμοποιήθηκε το Ferrozine biosis kit. Προστίθεται το διάλυμα R1 (1,0mL) και το δείγμα (0,2mL) ή το standard. Γίνεται ανάδευση και επώαση για 5 λεπτά σε υδρόλουτρο σε θερμοκρασία 37 °C ακολουθούμενη από μέτρηση

(A1) απορρόφησης στα 565 nm. Έπειτα προστίθεται στα δείγματα διάλυμα R2 (0,25mL), γίνεται και πάλι ανάδευση και 5 λεπτά επώαση στους 37 °C και η απορρόφηση καταγράφεται και πάλι στα 565 nm (A2).

Υπολογίζεται το ΔΑ ως $A2-0,8256 \cdot A1$

R1: Διάλυμα Γουανιδίνης

R2: Διάλυμα Φερροζίνης

Co(II): Το κοβάλτιο κατά τη διαδικασία συμπύκνωσης και «απελευθέρωσης» από τον πηλό, ποσοτικοποιείται με βάση τροποποιημένα δημοσιευμένα πρωτόκολλα (Kundra, Katyal και Singh, 1974 ; Khan and Syer, 1979, Raza et al., 2019) με τη χρήση του διαλύματος R2 από το Ferrozine biosis kit. Μετά την αποκόλληση από το bentone LT προστίθενται σε κυψελίδα R2 (250μL), νερό (650 μL) και το δείγμα Co (100 μL). Το δείγμα παίρνει ένα κοκκινωπό χρώμα και μετράται η απορρόφηση σε 363 και 700 nm. Κατά τη μέτρησή του σε μείγμα πολλών ενώσεων μετράται και η απορρόφηση στα 393 nm όπου και μετατοπίζεται η κορυφή στις περισσότερες συγκεντρώσεις. Κατά τον ποσοτικό προσδιορισμό με την φωτογραφική μέθοδο γίνεται μεταφορά του ιζήματος σε ELISA wells και προσθήκη 200μL αραιωμένου διαλύματος R2 (1 R2: 0,5 H2O). Το διάλυμα παίρνει κοκκινωπή χροιά ανάλογη της συγκέντρωσης του κοβαλτίου και φωτογραφίζεται χωρίς επιπλέον φυγοκέντρηση, καθώς το προϊόν της αντίδρασης φέρει αρνητικό φορτίο και άρα πιο δύσκολα θα δεσμευτεί στον μπεντονίτη, και επεξεργασία από το πρόγραμμα ImageJ.

Pb(II): Για τον προσδιορισμό του μολύβδου δοκιμάστηκε μια μέθοδος όπου θεωρητικά το ιόν του μολύβδου(II) αντιδρά με 2ClO^- για να δώσει ένα λευκό ίζημα υποχλωριώδους μολύβδου(II): $\text{Pb}^{+2} + 2\text{ClO}^- \rightarrow \text{Pb}(\text{ClO})_2$. Ο υποχλωριώδης μόλυβδος (II) στη συνέχεια οξειδώνεται σε οξείδιο του μόλυβδου τοποθετώντας το σε υδατόλουτρο κοντά σε θερμοκρασία βρασμού ώστε να επιταχυνθεί η αντίδραση. $\text{Pb}^{+2}(\text{aq})+2\text{H}_2\text{O} (\text{l})\rightarrow\text{PbO}_2 (\text{s})+4\text{H}^+(\text{aq})+2\text{e}^-$
 $\text{ClO}^- (\text{aq})+2\text{H}^+(\text{aq})+2\text{e}^-\rightarrow\text{Cl}^- (\text{aq})+\text{H}_2\text{O}(\text{l})$

Η μέθοδος αυτή δοκιμάστηκε χρησιμοποιώντας χλωρίνη εμπορίου.

Η δεύτερη μέθοδος που δοκιμάστηκε είναι ο προσδιορισμός με την χρήση του Ca Arsenazo biosis kit, προσθέτοντας μετά την απελευθέρωση από τον μπεντονίτη διάλυμα WR (250 μL) του arsenazo biosis kit, απιονισμένο νερό (250 μL) και τα δείγματα (100 μL), αφήνοντάς τα για επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά και τέλος διαβάζοντάς τα με διχρωματική ανάλυση 655 nm και 520 nm.

Ag(I): Για τον προσδιορισμό του Ag χρησιμοποιήθηκαν 0,1 mL meloxicam 1mM στο οποίο προστέθηκαν 0,7 mL AgNO₃ δείγματος (αρχικό stock 17,6 mg/mL) 0,1 mL H₂O και 0,1 mL οξικού ρυθμιστικού διαλύματος 100 mM με pH 5,0 και μετά από μικρή επώαση μέτρηση της απορρόφησης στα 412 και διόρθωση background μετρώντας απορρόφηση στα 360 και τα 700 nm (Shah, 2016). Σε πρώτη δοκιμή είχε γίνει προσθήκη 0,1 mL Tween20 για να βοηθήσει στην διαλύτοποίηση του διαλύματος χωρίς όμως να βρεθούν χρήσιμα αποτελέσματα κατά την μέτρηση απορρόφησης.

Cu(II): Φωτογραφικά ο χαλκός αναλύθηκε χωρίς περαιτέρω αντιδράσεις, αρχικά για δοκιμή της μεθόδου σε πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις χαλκού με απευθείας προσθήκη διαλύματος μπεντονίτη σε πυκνό διάλυμα χαλκού και μετά από ανάδευση και επώαση, μια φυγοκέντρηση και φωτογράφιση.

Για προσδιορισμό του χαλκού σε αραιά διαλύματα αυτού, χρησιμοποιήθηκε μια τροποποιημένη μορφή ενός δημοσιευμένου πρωτοκόλλου (Souza and Tubino, 2005). Μετά από απελευθέρωση από τον μπεντονίτη γίνεται προσθήκη MeCN και νερού σε διάλυμα όπου έχει αναμειχθεί diclofenac με το δείγμα χαλκού (25% diclofenac + 75% χαλκός) και επωαστεί για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και μέτρηση της απορρόφησης στα 446 nm με διόρθωση background την απορρόφηση στα 600 nm.

Χρησιμοποιήθηκε επίσης ως διαφορετικός τρόπος το διάλυμα R2 του Ferrozine biosis kit με τρόπο αντίστοιχο του σιδήρου από το βήμα προσθήκης R2 και μετά καταλήγοντας σε πρασινωπό χρώμα και τέλος διχρωματική ανάλυση σε A453 και A600.

Methyl red: Το methyl red, απορροφά στο ορατό με μετρήσιμη απορρόφηση ακόμα και σε μικρές συγκεντρώσεις και δεν απαιτεί κάποια επιπλέον αντίδραση για τον χρωματομετρικό προσδιορισμό του (Mohammadi et al. 2022). Χρειάζεται χρήση του πεχαμέτρου και προσθήκη λίγων mL HCl ώστε το pH να πέσει κάτω από 4,4 (στόχος το 2,8 στα πειράματα). Κατά την φωτογραφική μέτρηση μετά την απομόνωση του pellet σε falcon γίνεται επαναιώρηση και μεταφορά σε ELISA well, φυγοκέντρηση και φωτογράφιση του pellet στο lightbox. Έπειτα ανεβάζουμε το pH >5,8 με προσθήκη NaOH με στόχο το pH 8,0 και γίνεται απευθείας φωτογράφιση, λόγω του φορτίου του ερυθρού του μεθυλίου που ενισχύει την αποπροσρόφηση και αποδέσμευση των μορίων του ανάμεσα στα φύλλα μπεντονίτη.

Uric acid: Ο προσδιορισμός του φωτογραφικά έγινε χρησιμοποιώντας το αντίστοιχο kit του από την biosis και φωτογραφήθηκε σε lightbox.

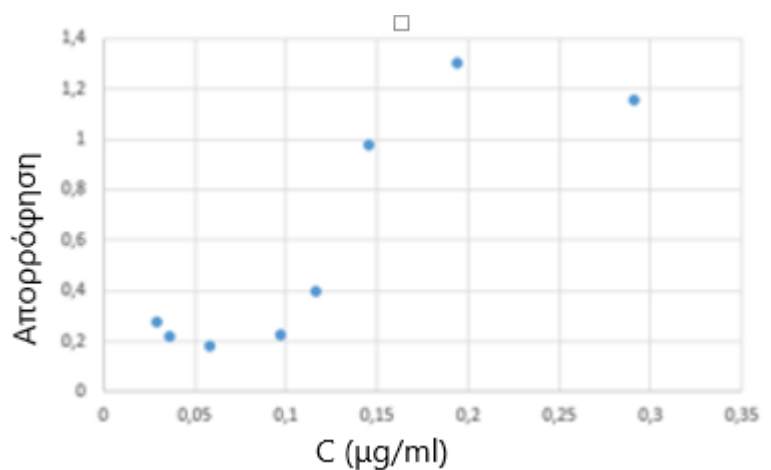
5. Αποτελέσματα και συζήτηση

5.1 Δοκιμή φωτομετρικού προσδιορισμού σιδήρου (Fe(III)) μετά από συμπύκνωση

Ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο συμπύκνωσης προσθέτοντας 42mL H₂O σε falcon tube μαζί με 150μL bentone LT 2,6% και διαδοχικών αραιώσεων έτοιμου διαλύματος Fe⁺⁺. Επώαση με ανακίνηση για 120 λεπτά για καλύτερη προσρόφηση του μορίου στο bentonite Μεταφορά του κάθε διαλύματος σε falcon tube 15 mL. Φυγοκέντρηση 5-10 min σε 3.500 rpm και απομάκρυνση του υπερκειμένου. Επανάληψη μέχρι να φυγοκεντρηθεί όλο το περιεχόμενο. Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 300 μL ACN 25% για αποπροσρόφηση του δείγματος από το bentone LT και επώαση 60 λεπτά ακολουθούμενη από φυγοκέντρηση. Ακολουθεί προσθήκη σε κυψελίδα 1mL αντιδραστηρίου R1 του κιτ προσδιορισμού Fe(III) της Biosis και 0,2 mL κάθε δείγματος μαζί με επανάληψη διαδικασίας με τυφλό και standard και επώαση 5 λεπτά σε 37°C. Η μέτρηση γίνεται στα 323 nm (A1). Τέλος, γίνεται προσθήκη 250μL R2 αντιδραστηρίου, ανάδευση και μετά από επώαση 5 λεπτά μέτρηση απορρόφησης (A2). Αφαιρείται για το αποτέλεσμα το A1 από το A2 και από κάθε δείγμα τα αποτελέσματα του σωλήνα χωρίς σίδηρο (μόνο bentone LT) και δημιουργείται διάγραμμα μετά από μηδενισμό με τυφλό. Στα διαγράμματα παρατηρείται σιγμοειδής καμπύλη ικανοποιητικής συσχέτισης. Οι αραιώσεις του προτύπου διαλύματος παρουσιάζονται παρακάτω.

Πίνακας 1. Συγκεντρώσεις σιδήρου που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό

(Αρχικό διάλυμα 2,904 g/dl)
0,0002904
0,000191664
0,0001452
0,00011616
0,000095832
0,00005808
0,0000363
0,00002904



Διάγραμμα 1. Διάγραμμα συσχέτισης απορρόφησης- συγκέντρωσης σιδήρου

Σε επόμενη δοκιμή όπου το ίδιο πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε με διαφορές όμως στον χρόνο ανάδευσης και στον χρόνο επώασης σε ACN 25% (70 λεπτά και 30 λεπτά αντίστοιχα), μέσω της χρήσης πρότυπου γνωστού διαλύματος υπολογίστηκε και ο συντελεστής συμπύκνωσης κάθε αραίωσης.

Πίνακας 2. Πίνακας συγκεντρώσεων και συντελεστή συμπύκνωσης του σιδήρου.

sample	iron initial C, mg/dL	dilution of supernatant after lysis for running ferrozine assay	iron levels after lysis in supernatant, mg/dL	concentration factor
1/10K	0,2904	1:10	2,706977	9,321545262
1/20K	0,1452	1:10	1,916279	13,19751425
1/50K	0,05808	NO	0,325581	5,605740278
1/80K	0,0363	NO	0,223256	6,150297905
1/100K	0,02904	NO	0,192558	6,630789929
MTM blank (no Fe added)	0	no		
blank no MTM	0	no		
standard	200ug/dL	no		

Πιθανών βλέποντας τα αποτελέσματα να έγινε λάθος αραίωση κατά τη μέτρηση του δείγματος αραίωσης 1/20000 όπου είχε σημειωθεί επιπλέον ½ αραίωση για φωτομετρική μέτρηση. Τα επιτρεπόμενα επίπεδα σιδήρου στο νερό έχουν καθοριστεί ως >1mg/L (Adebayo et al., 2011) και σε πόσιμο νερό >0,3 mg/L (Islam et al. 2013) με τα εξεταζόμενα δείγματα να βρίσκονται σε επίπεδα κοντά στα επίπεδα αυτά.

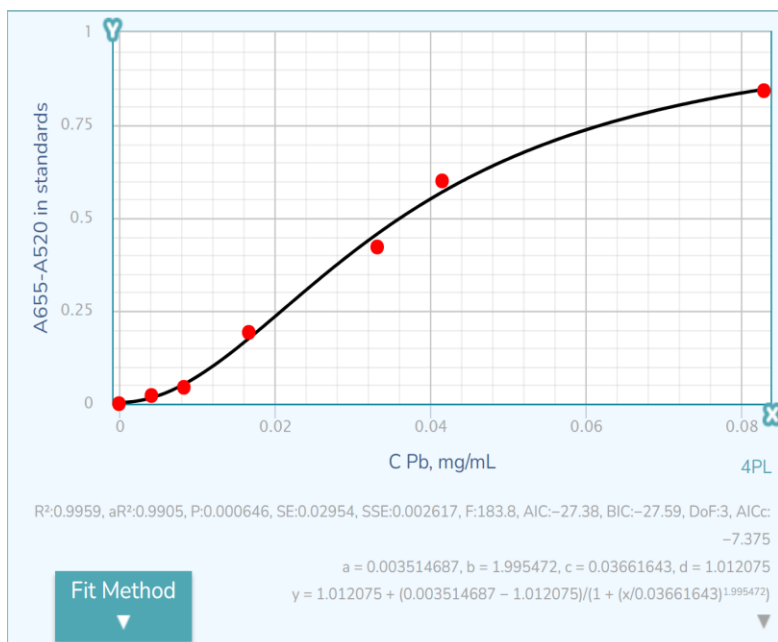
5.2 Δοκιμή φωτομετρικού προσδιορισμού μολύβδου (Pb(II)) μετά από συμπύκνωση

5.2.1 Μέθοδος προσδιορισμού με χρήση χρωστικής Arsenazo

Για τον φωτομετρικό προσδιορισμό μολύβδου αρχικά εξετάστηκε μια μέθοδος προσδιορισμού βασισμένη στη χρωστική arsenazo με τροποποίηση μιας ήδη δημοσιευμένης μεθόδου (Zhai, Li and Zhang., 2013). Κατά την μέθοδο αυτή προστέθηκαν 100 μL δείγματος, 250 WR-arsenazo (calcium kit, biosis) και 250 μL H₂O. Μετά από επώαση 10 λεπτών (RT), μετράται η απορρόφηση στα 655 nm και 520 nm AgNO₃.

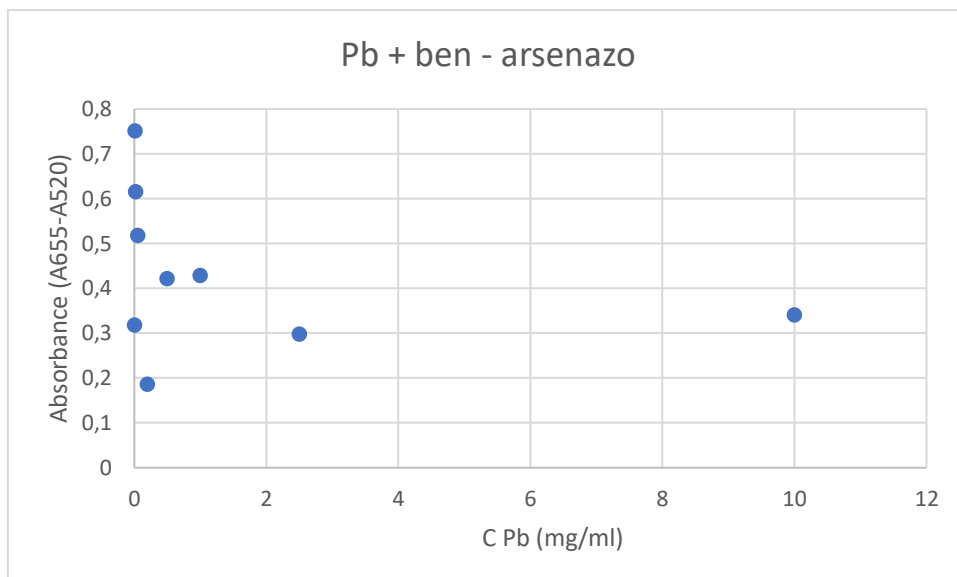
Πίνακας 3. Συγκεντρώσεις μολύβδου που χρησιμοποιήθηκαν για την δοκιμή μεθόδου arsenazo.

Final C Pb(NO ₃) ₂ (mM)	C Pb, mg/dL
0,4	8,288
0,08	1,6576
0,04	0,8288
0,02	0,4144
0,2	4,144
0,0001	0,002072
0,16	3,3152



Διάγραμμα 2. Καμπύλη αναφοράς συσχέτισης απορρόφησης και συγκεντρώσεων μόλυβδου.

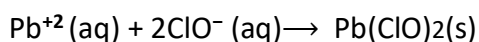
Παρατηρήθηκε καλή γραμμική συσχέτιση με την τροποποιημένη μέθοδο οπότε δοκιμάστηκε προσδιορισμός μετά από συμπύκνωση. Η συμπύκνωση έγινε με προσθήκη ίδιων συγκεντρώσεων μόλυβδου σε falcon tube με 42 mL H₂O και 150 μL bentone LT 2,6%. Μετά από ανάδευση 60 λεπτών έγινε φυγοκέντρηση σε 3500 rpm για 10 λεπτά και απόρριψη του υπερκειμένου με επανάληψη του τελευταίου βήματος μέχρι συγκέντρωσης όλου σου ιζήματος. Τότε ακολούθησε διαστρωματικός διαχωρισμός των φύλλων bentone LT απελευθερώνοντας τον μόλυβδο με επώαση σε 300 μL ACN 25%. Έπειτα από επόμενη φυγοκέντρηση, ο μόλυβδος προσδιορίστηκε με την μέθοδο που περιεγράφηκε προηγουμένως. Όπως θα φανεί στο επόμενο διάγραμμα δεν υπήρχε καμία συσχέτιση κατά την δοκιμή αυτή. Αυτό το αποτέλεσμα πιθανώς οφείλεται στην ικανότητα της μεθόδου χρωστικής arsenazo να δίνει θετικά αποτελέσματα με πλήθος μετάλλων, αριθμός των οποίων βρίσκονται ήδη στον μπεντονίτη, με μέρος των δειγμάτων να παρουσιάζουν έντονη μπλε και μωβ χρώση αποτρέποντας την αποτελεσματική μέτρηση της απορρόφησής τους στο φωτόμετρο.



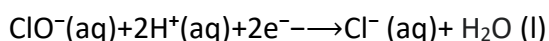
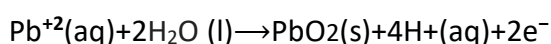
Διάγραμμα 3. Διάγραμμα συσχέτισης απορρόφησης και συγκεντρώσεων μόλυβδου μεθόδου *arsenazo* μετά από συμύκνωση σε *bentone LT*.

5.2.2 Μέθοδος προσδιορισμού με χρήση χλωρίνης.

Ένας δεύτερος τρόπος προσδιορισμού που δοκιμάστηκε στο εργαστήριο ήταν η χρήση χλωρίνης με μόλυβδο. Χρησιμοποιήθηκε μόλυβδος 4 mM και χλωρίνη εμπορίου (Klinex Ultra Χλωρίνη Λεμόνι). Κατά τη μέθοδο αυτή δισθενής χαλκός αντιδρά με υποχλωριώδη ιόντα με αποτέλεσμα αρχικά λευκό ίζημα με την παρακάτω αντίδραση.



Ο υποχλωριώδης μόλυβδος έπειτα οξειδώνεται σε οξείδιο του μολύβδου μετά από ολιγόλεπτη επώαση σε υδατόλουτρο (100 C) δίνοντας ένα ροζέ χρώμα.

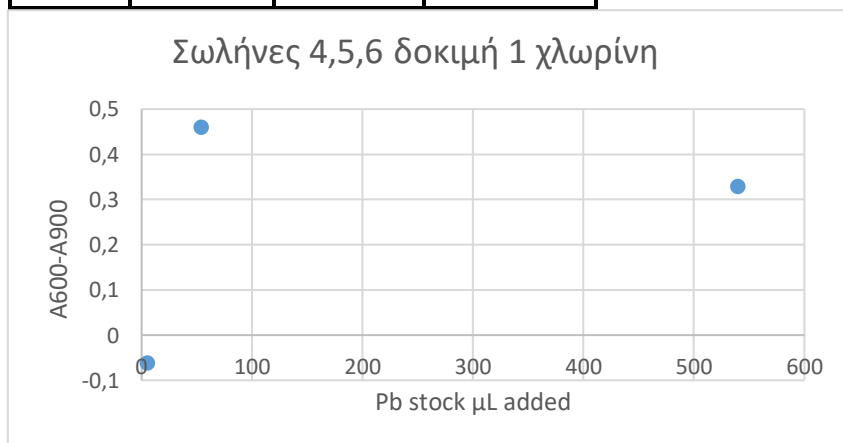


Για το πείραμα διαφορετικές ποσότητες χλωρίνης προστέθηκαν σε erpendorfs όπου είχαν προστεθεί σε διαφορετικές συγκεντρώσεις μολύβδου όπως παρουσιάζεται στο παρακάτω διάγραμμα. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με αποτέλεσμα πολύ ελαφριά ροζέ απόχρωση η οποία με επώαση σε θερμοκρασία δωματίου μετά το υδατόλουτρο συνέχισε να σκουραίνει. Οι σωλήνες με λιγότερη ποσότητα χλωρίνης (4,5,6 / 10,11,12) παρουσίασαν οπτική διαφορά στο χρώμα και στο επόμενο βήμα εξετάστηκαν τα δείγματα 4,5,6. Το ίζημα σε όλους τους σωλήνες δεν διαλύθηκε ενώ περιμέναμε προϊόντα σε υγρή

φάση οπότε για να γίνει μέτρηση στο φωτόμετρο. Δοκιμάστηκε για τη διάλυση του ιζήματος προσθήκη ACN, MeOI, EtOI, HCl και glacial acetic acid. Καλύτερη διαλυτότητα παρουσιάστηκε στο ίζημα με προσθήκη HCl μαζί όμως με αποχρωματισμό του προϊόντος, ενώ με το παγόμορφο οξικό οξύ το χρώμα παρέμεινε και έγινε πιο διαυγές, χωρίς όμως πλήρη διάλυση του ιζήματος. Μετρήθηκε η απορρόφηση σε A600- A900 σε κυψελίδα με 300 μl δείγματος και 700 μL glacial acetic.

Πίνακας 4 Πίνακας προστιθέμενων ποσοτήτων ανά δείγμα κατά την διαδικασία βελτιστοποίησης της μεθόδου προσδιορισμού μολύβδου με αντίδραση με χλωρίνη.

Δείγμα	Χλωρίνη	Pb ⁺⁺ (μl)	H ₂ O (μl)
1	300	300	0
2	300	30	270
3	300	3	297
4	60	540	0
5	60	54	485
6	60	5,5	535
7	360	240	0
8	360	25	215
9	360	2,5	237
10	120	480	0
11	120	48	430
12	120	5	475

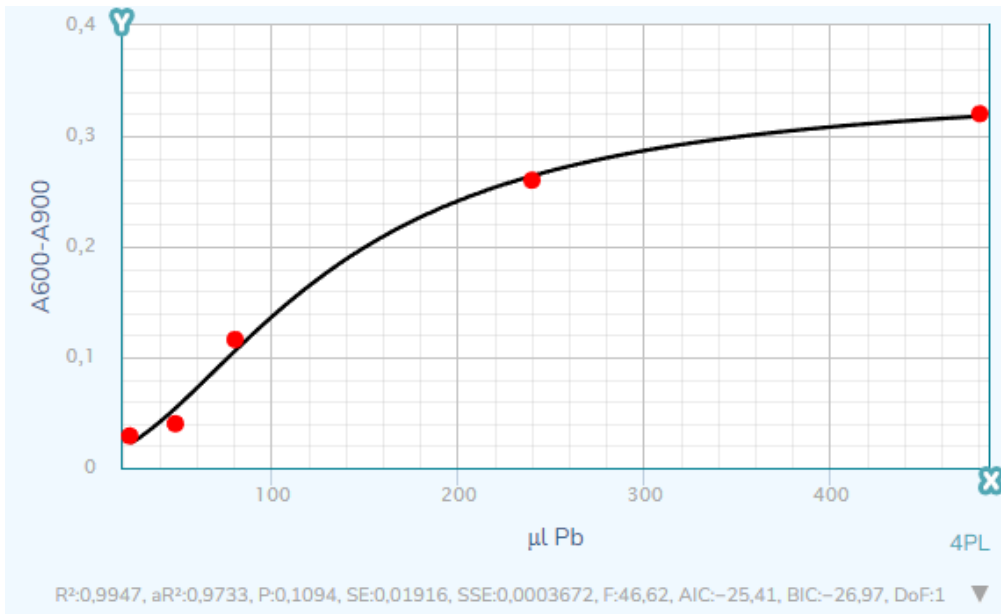


Διάγραμμα 4. Αποτελέσματα μέτρησης απορρόφησης των σωλήνων 4,5,6 κατά την δοκιμή προσδιορισμού μολύβδου με προσθήκη χλωρίνης.

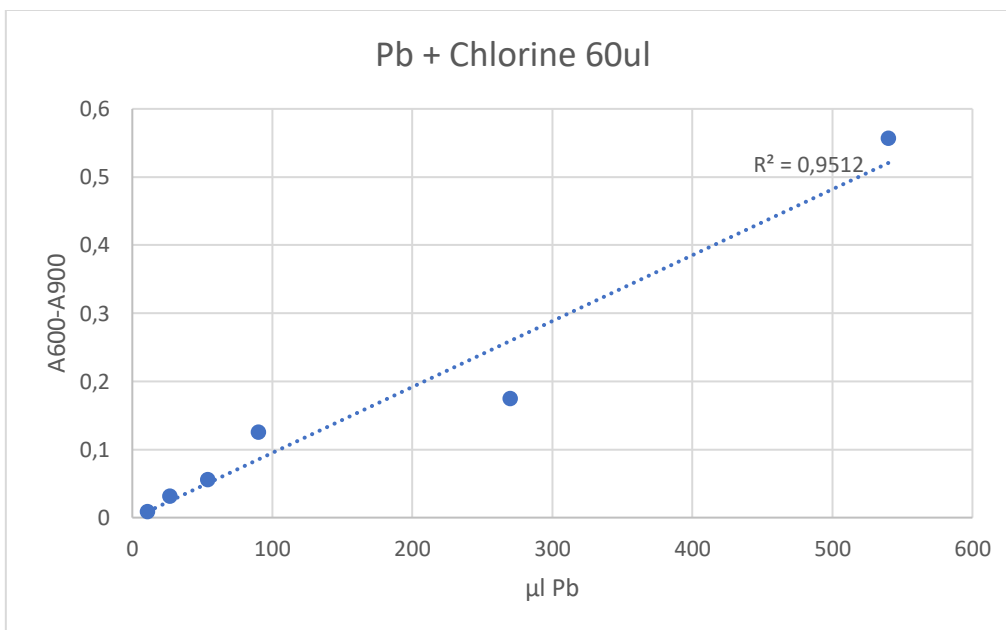
Στο παραπάνω διάγραμμα φαίνεται πως δεν υπάρχει καμία συσχέτιση, έγινε επανάληψη παρόλα αυτά του πειράματος με δύο σειρές δειγμάτων που παρουσιάζονται παρακάτω, μία με προσθήκη 120 μl χλωρίνης και μία με προσθήκη 60. Στην κυψελίδα προστέθηκαν επίσης 20 μl HCl το οποίο βρέθηκε να ομαλοποιεί την εικόνα του φάσματος απορρόφησης. Στα διαγράμματα βλέπουμε καλό συσχετισμό μεταξύ των δειγμάτων, ιδιαίτερα με προσθήκη μικρότερης ποσότητας χλωρίνης, αποφασίστηκε όμως να μην προχωρήσουν οι δοκιμές με συμπύκνωση σε bentone LT λόγω της ατελούς διάλυσης του ιζήματος που πιθανών να δημιουργούσε πρόβλημα σε διάφορα σημεία της διαδικασίας προσρόφησης και διαστρωματικού διαχωρισμού.

Πίνακας 5. Πίνακας προστιθέμενων ποσοτήτων χλωρίνης, μόλυβδου και νερού κατά την επανάληψη δοκιμασίας προσδιορισμού με χλωρίνη

Δείγμα	μl Pb	H ₂ O	Chlorine
1	480	0	120
2	240	240	120
3	80	400	120
4	48	432	120
5	24	456	120
6	96 (stock 1:10)	384	120
1	540	0	60
2	270	270	60
3	90	450	60
4	54	485	60
5	27	513	60
6	108 (stock 1:10)	432	60



Διάγραμμα 5. Γράφημα συσχέτισης ποσότητας και απορροφήσεων μόλυβδου με προσθήκη 120 μl χλωρίνης.



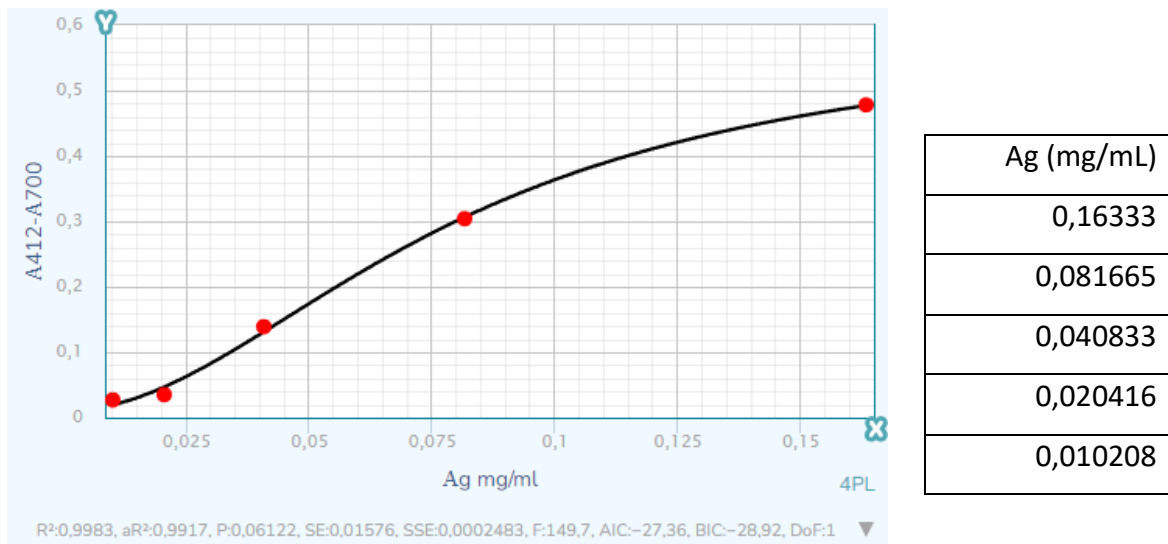
Διάγραμμα 6. Γράφημα συσχέτισης ποσότητας μόλυβδου και απορρόφησής με προσθήκη 60μl χλωρίνης.

5.3 Δοκιμή φωτομετρικού προσδιορισμού αργύρου (Ag) μετά από συμπύκνωση.

Για τον προσδιορισμό του αργύρου οι λεπτομέρειες της μεθόδου συμπύκνωσης είναι οι ακόλουθες. Αρχικά σε falcon tube προστίθενται 42 mL H₂O, μαζί με 150 μL bentone LT 2,6%. Στους δέκτες προστίθενται γνωστές συγκεντρώσεις αργύρου (stock 17,6 mg/mL) και το μείγμα αναμειγνύεται για 120 λεπτά. Ακολουθεί μεταφορά του κάθε δείγματος σε fal-

con tube 15 mL και φυγοκέντρωση για συγκέντρωση του ιζήματος με επανάληψη του τελευταίου βήματος μέχρι εξάντλησης των δειγμάτων. Τα δείγματα έπειτα επωάζονται για 50 λεπτά σε 300μl 25% ACN με τελική συγκέντρωση bentone LT 1,3%, για να γίνει αποδέσμευση του μορίου από τα στρώματα μπεντονίτη. Η μέθοδος προσδιορισμού του αργύρου περιλαμβάνει την αντίδρασή του με το φαρμακευτικό σκεύασμα meloxicam. Το stock meloxicam που χρησιμοποιήθηκε είχε αρχική συγκέντρωση 28,46 mM και αραιώθηκε σε τελική συγκέντρωση 1 mM και άργυρος προστέθηκε από stock $\text{AgNO}_3 = 16,3 \text{ mg/mL}$ κατά την κατασκευή καμπύλης αναφοράς και από stock $\text{AgNO}_3 = 17,6 \text{ mg/mL}$ κατά την δοκιμή προσρόφησης σε μπεντονίτη. Αρχικά η μέθοδος που δοκιμάστηκε ήταν η προσθήκη σε κυψελίδα 0,1 mL meloxicam 1 mM (0,1 ml), acetate buffer pH 5,0 (0,1 ml), AgNO_3 (700 μl) και Tween 20 0,2%w/v (100 μl) και μέτρηση απορρόφηση σε A360-A700. Καθώς δεν παρουσιάστηκε κορυφή στο φάσμα παρουσία Tween 20 αποφασίστηκε το Tween 20 να απομακρυνθεί από τη διαδικασία και να αντικατασταθεί από νερό. Το φωτόμετρο μηδενίστηκε με τυφλό που περιείχε 0,1 mL meloxicam, 0,1 mL acetate buffer και H_2O . Κατά τα πειράματα παρατηρήθηκε πως οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις παρουσιάζουν ίζημα που δεν διαλύεται εντελώς διατηρώντας μέρος του προσδιοριζόμενου αργύρου δεσμευμένο στα στρώματα πηλού λόγω έντονης πάκτωσής τους. Σε μικρότερες συγκεντρώσεις παραμένει μια μικρή κουκίδα που δηλώνει επιτυχής αποδέσμευση των μορίων. Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα.

Δοκιμάζοντας τη μέθοδο απουσία μπεντονίτη για δημιουργία καμπύλης αναφοράς σε προσδιορισμού αργύρου σε νερό, μετρήθηκε η απορρόφηση σε 360 nm, 412 nm και 700 nm. Απουσία μπεντονίτη η κορυφή παρουσιάζεται στα 412 nm αφαιρώντας ως υπόβαθρο την μέτρηση των 700 nm. Παρουσία μπεντονίτη αντίθετα η κορυφή απορρόφησης μετακινείται στα 360 nm οπότε η απορρόφηση που μετράται στα 700 nm αφαιρείται από την απορρόφηση που μετράται στα 360.

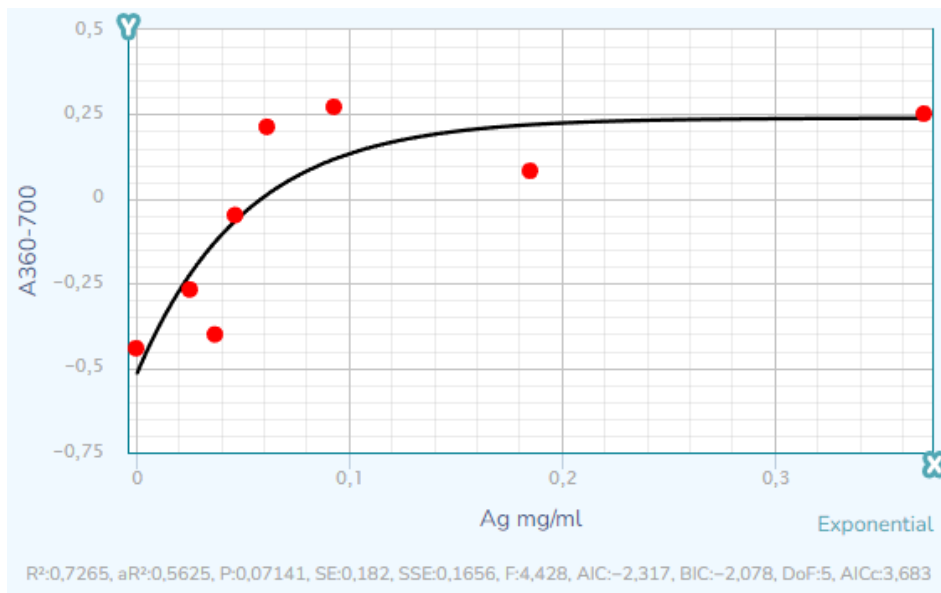


Διάγραμμα 7. Καμπύλη αναφοράς Ag. A412 nm-A700 nm /Πίνακας 6. Συγκεντρώσεις αργύρου που χρησιμοποιήθηκαν για την καμπύλη αναφοράς.

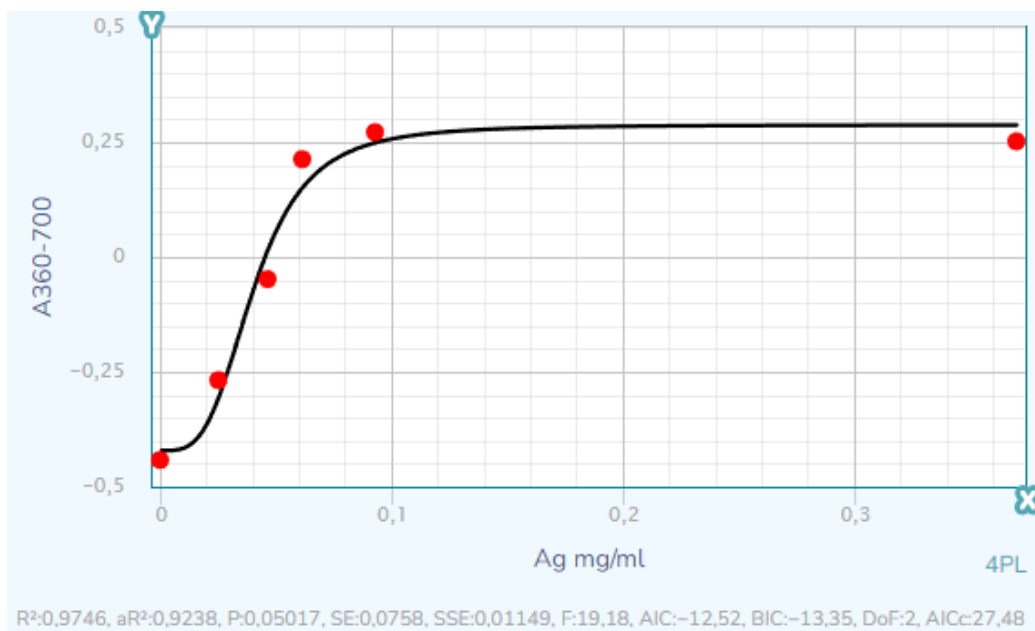
Όπως φαίνεται στα παρακάτω γραφήματα, υπάρχει μια τάση προς εκθετική προσαρμογή των αποτελεσμάτων σε καμπύλη, με καθόλου ικανοποιητικό όμως αποτέλεσμα. Αφαιρώντας στο δεύτερο γράφημα όμως τα δείγματα 3 και 7 όπου οι απορροφήσεις τους είναι πολύ χαμηλότερες των αναμενόμενων φαίνεται ένα πολύ διαφορετικό αποτέλεσμα με πιο ευδιάκριτη τάση. Τα δείγματα 2 ως 4, όντας το πυκνότερο φαίνεται να παρουσιάζουν κορεσμό, πιθανώς λόγω περιορισμένης λύσης του ιζήματος, αποτρέποντας ποσοτικοποίηση συγκεντρώσεων μεγαλύτερων του δείγματος 4. Η περιοχή γραμμικότητας των αποτελεσμάτων (0,025-0,09 mg/ml) βρίσκεται σε συμφωνία με την καμπύλη αναφοράς.

Πίνακας 7. Πίνακας συγκεντρώσεων και αντίστοιχων ποσοτήτων αργύρου που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό αργύρου μετά από συμπύκνωση σε bentone LT.

Δείγμα	AgNO ₃ mg/mL	μl AgNO ₃
1	0	0
2	0,3696	21
3	0,1848	10,5
4	0,0924	5,25
5	0,0616	3,5
6	0,0462	2,625
7	0,03696	2,1
8	0,02464	1,4



Διάγραμμα 8. Γράφημα συσχέτισης συγκέντρωσης-απορρόφησης αργύρου μετά από συμπύκνωση (δείγματα 1-8)



Διάγραμμα 9. Γράφημα συσχέτισης συγκέντρωσης- απορρόφησης αργύρου μετά από συμπύκνωση (αφαίρεση δειγμάτων 3,7)

5.4 Δοκιμή προσδιορισμού Χαλκού (Cu (I)) και ανάπτυξη φωτογραφικού πρωτοκόλλου.

5.4.1 Φωτομετρικός προσδιορισμός χαλκού με τη μέθοδο συμπύκνωσης σε bentone LT.

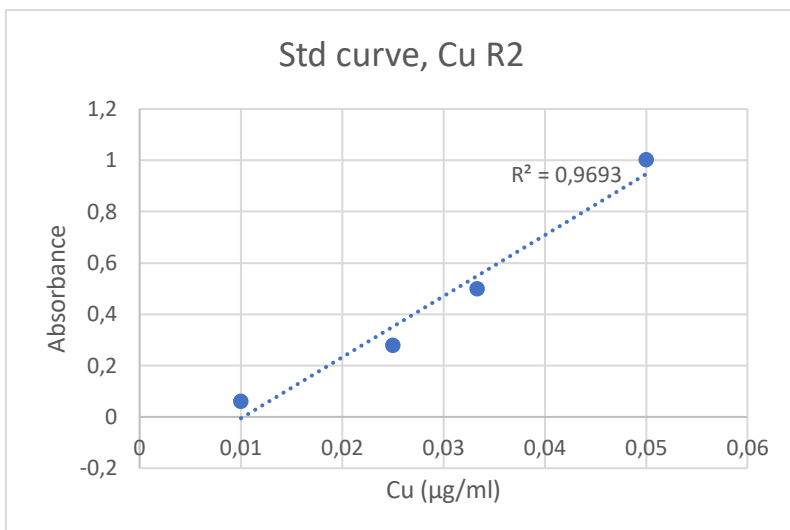
Για τον φωτομετρικό προσδιορισμό χαλκού μετά από την μέθοδο συμπύκνωσης σε μπεντονίτη δοκιμάστηκαν δύο διαφορετικές μέθοδοι προσδιορισμού. Χρησιμοποιήθηκε υδα-

τικό διάλυμα περιεκτικότητας 5 g/100mL χαλκού και στις δύο δοκιμασίες. Η μέθοδος συμπύκνωσης που χρησιμοποιήθηκε ακολουθεί το πρωτόκολλο που έχει περιγραφεί σε προηγούμενη ενότητα και συγκεκριμένα προστέθηκαν σε falcon tube 42 mL H₂O 150 mL Bentone LT 2,6% χαλκός στις συγκεντρώσεις που ακολουθούν. Μετά την προσθήκη, οι σωλίνες αναδεύονται για 60 λεπτά ώστε να γίνει δέσμευση του μετάλλου στον πηλό. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 3.500 rpm για 10 λεπτά και απόρριψη του υπερκειμένου με επανάληψη του τελευταίου βήματος μέχρι εξάντλησης του περιεχομένου των falcon tubes. Έπειτα πραγματοποιήθηκε λύση του ιζήματος σε 25% ACN για 20 λεπτά και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 3.600 στροφές. Σε επιτυχημένη διαδικασία το ίζημα που παραμένει μετά τη φυγοκέντρηση πρέπει να είναι πολύ μικρό σε σχέση με το αρχικό καθώς το ACN προκαλεί απελευθέρωση των μορίων από τις στρώσεις του bentone LT.

Η πρώτη μέθοδος προσδιορισμού που χρησιμοποιήθηκε (τροποποίηση μεθόδου Kundra et al., 1974) περιλάμβανε αντίδραση του χαλκού του διαλύματος με το αντιδραστήριο R2-φερριτίνη (iron kit, biosis). Προστίθενται σε κάθε κυβέτα 433 μL H₂O, 77μL δείγμα, και 167μL αντιδραστηρίου R2 και δημιουργείται έγχρωμο πρασινωπό προϊόν. Αρχικά δημιουργήθηκε καμπύλη αναφοράς χωρίς την προσθήκη bentone και στη συνέχεια έγινε επανάληψη του πειράματος μετά από συμπύκνωση σε bentone LT.

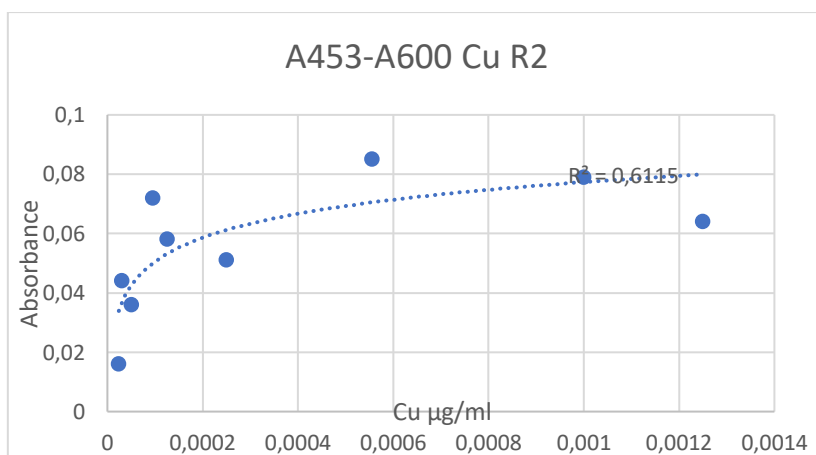
Πίνακας 8. Συγκεντρώσεις χαλκού, καμπύλη αναφοράς.

Cu, μg/mL
2500
1666,667
1250
500



Διάγραμμα 10. Διάγραμμα διασποράς καμπύλης αναφοράς.

Πίνακας 9. Συγκεντρώσεις χαλκού κατά την μέθοδο φερριτίνης,



Cu, µg/mL
62,5
50
27,77778
12,5
6,25
4,75
2,5
1,5
1,2
0

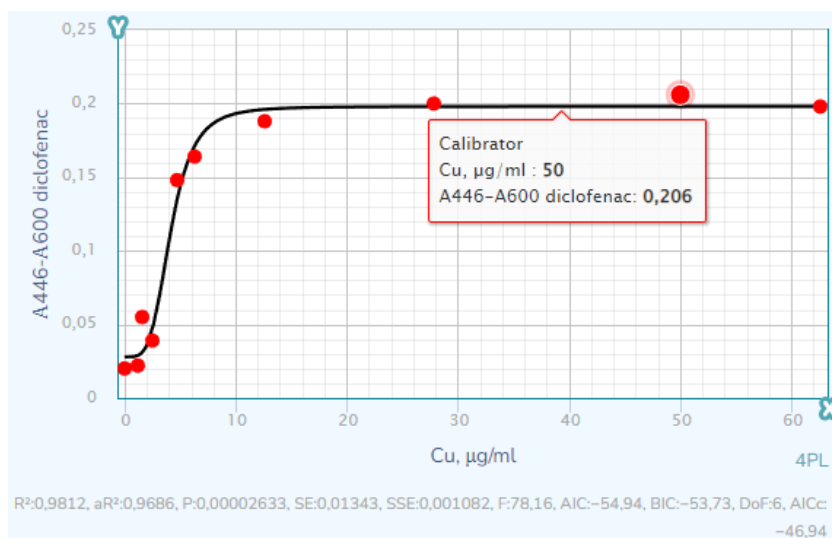
Διάγραμμα 11. Διάγραμμα συσχέτισης απορρόφησης- συγκέντρωσης χαλκού με τη μέθοδο φερριτίνης.

Όπως βλέπουμε από τα διαγράμματα η μέθοδος αυτή παρουσιάζει οπτικά συσχέτιση απορρόφησης με ποσότητας χαλκού, χωρίς όμως η συσχέτιση αυτή να είναι αρκετά ικανοποιητική ώστε η μέθοδος να χρησιμοποιηθεί για έγκυρο προσδιορισμό χαλκού ποσοτικά. Για τη δεύτερη μέθοδο προσδιορισμού, όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο, έγινε τροποποίηση δημοσιευμένων πρωτοκόλλων (Souza and Tubino, 2005) όπου προστέθηκαν σε κάθε κυψελίδα 50 µL diclofenac και 150 µL δείγμα, έγινε επώαση για 10

λεπτά και έπειτα προστέθηκαν 200 μL H_2O και 250 μL ACN. Έγινε μέτρηση σε A446-A600 μετά από 10 λεπτά.

Πίνακας 10. Συγκεντρώσεις χαλκού κατά τη μέθοδο diclofenac.

Cu, $\mu\text{g}/\text{mL}$
62,5
50
27,77778
12,5
6,25
4,75
2,5
1,5
1,2
0



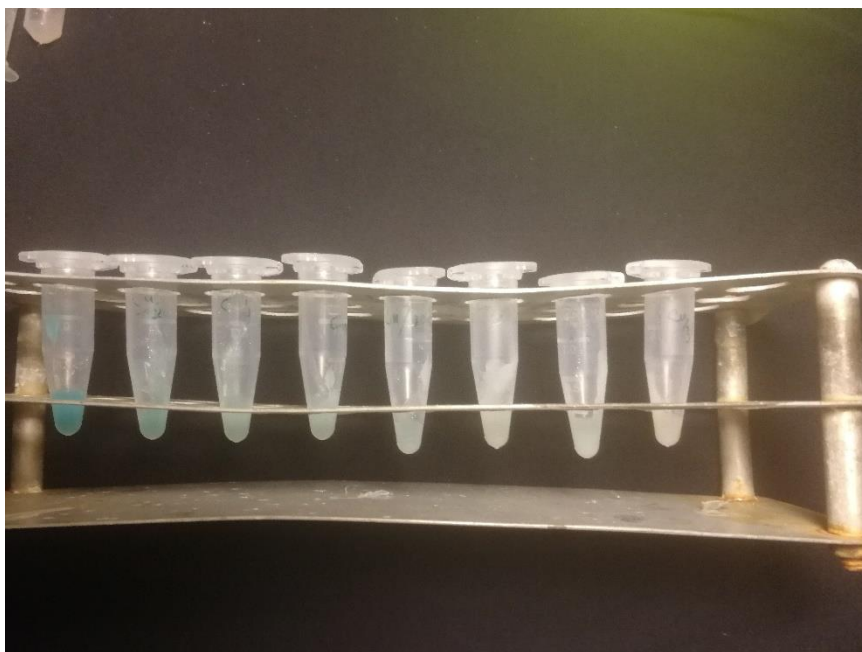
Διάγραμμα 12. Διάγραμμα συσχέτισης απορρόφησης- συγκέντρωσης χαλκού με προσθήκη diclofenac.

Όπως φαίνεται από το διάγραμμα, η μέθοδος αντίδρασης χαλκού με diclofenac παρουσιάζει πολύ πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα με καλή γραμμικότητα στα 1,2-6,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Η συγκεκριμένη μέθοδος συνεπώς είναι κατάλληλη για χρήση μαζί με το πρωτόκολλο συμπύκνωσης για τον προσδιορισμό μικρών συγκεντρώσεων χαλκού σε λύματα και νερό.

5.4.2 Μέθοδος προσδιορισμού με φωτογραφική ανάλυση.

Ο χαλκός ήταν το πρώτο μόριο στο οποίο δοκιμάστηκε και αναπτύχθηκε το πρωτόκολλο προσδιορισμού. Έγιναν διαδοχικές αραιώσεις διαλύματος χαλκού 5 $\text{g}/100\text{mL}$ και προσθήκη μπεντονίτη σε Eppendorf δύο τύπων και έπειτα σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Η φωτογράφιση των δειγμάτων έγινε με φωτογραφική μηχανή Panasonic Lumix DMC-FZ200 σε μαύρο φόντο με αυτοσχέδια lightboxes κατασκευασμένα από λάμπες γραφείου, διηθητικό χαρτί και αλουμινόχαρτο για τον πιο ομοιόμορφο φωτισμό των δειγμάτων και συνεπώς την καλύτερη αποτύπωση των πραγματικών χρωμάτων τους. Το συγκεκριμένο στήσιμο έδειξε περιορισμένη αποτελεσματικότητα και αποφασίστηκε η χρήση lightbox διπλής

σειράς led για την φωτογράφιση. Λόγω της θολερότητας του υλικού κατασκευής των Eppendorf τα αποτελέσματα δεν ήταν ενθαρρυντικά, ή διάφανη κατασκευή των δοκιμαστικών σωλήνων όμως εξασφάλισε καλύτερη ανίχνευση χρώματος από το λογισμικό.



Εικόνα 11 Φωτογράφιση διαβάθμισης συγκεντρώσεων χαλκού σε Eppendorf – Πηγή: συγγραφέας

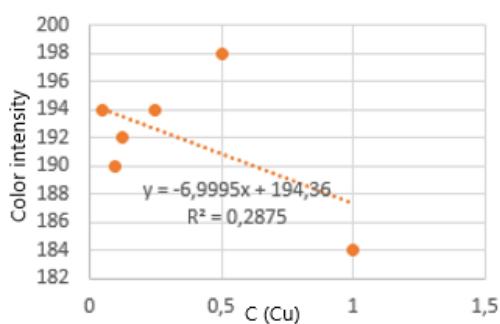
Η μέθοδος που ακολουθήθηκε συγκεκριμένα ήταν μια απλοποιημένη μορφή του πρωτοκόλλου συμπύκνωσης, που περιλάμβανε την προσθήκη στην περίπτωση των Eppendorf 500μL bentone LT 2,6% και 1,5mL υδατικού διαλύματος χαλκού σε αραιώσεις που θα παρατεθούν παρακάτω, ακολουθούμενα από 60 λεπτά επώαση με ανάδευση για την δέσμευση του μορίου στον μπεντονίτη. Τέλος γίνεται φυγοκέντρηση απόρριψη του υπερκειμένου και φωτογράφιση. Για την ανάλυση των φωτογραφιών μελετήθηκε σχετική βιβλιογραφία (Schincariol, Herderick and Schwartz, 1993; Adeniyi and Mashazi, 2022; Alizadeh, Salimi and Hallaj, 2019) και αποφασίστηκε η ανάλυση μέσω μέτρησης της χρωματικής έντασης της εκάστοτε φωτογραφίας όπως και της έντασης των χρωματικών καναλιών. Εξετάστηκε η φωτογράφιση μέσω κινητού (Zhang et al., 2018) επιλέχθηκε όμως τελικά η χρήση κάμερας για καλύτερο έλεγχο των συνθηκών. Για το σκοπό αυτό, μέσω του λογισμικού ImageJ παράγονται ιστογράμματα όπου απομονώθηκαν οι τιμές RGB κάθε φωτογραφίας ακολουθώντας τα βήματα Analyse->Histogram->live, και επιλογή οβάλ περιγράμματος ανάλυσης σε κάθε δείγμα και επιλογή συγκεκριμένου χρωματικού καναλιού για ανάλυση από το ιστόγραμμα ή διαχωρισμό καναλιών από την επιλογή Split channels και ανάλυση κάθε φωτογραφίας καναλιού ξεχωριστά. Κάθε μόριο ανταποκρίνεται καλύτερα σε

διαφορετικό κανάλι ανάλυσης ανάλογα τη σύσταση και τη χρωματική χροιά του. Για τους δοκιμαστικούς σωλήνες η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν ίδια αλλά οι ποσότητες των αντιδρώντων ήταν αντίστοιχα 2mL bentone LT και 6 mL υδατικού διαλύματος χαλκού. Προστέθηκαν οι εξής αραιώσεις του αρχικού στοκ. Παρακάτω παρατίθενται διαγράμματα ανάλυσης κόκκινου και πράσινου καναλιού όπως και οι φωτογραφίες από τις οποίες ήλθαν.

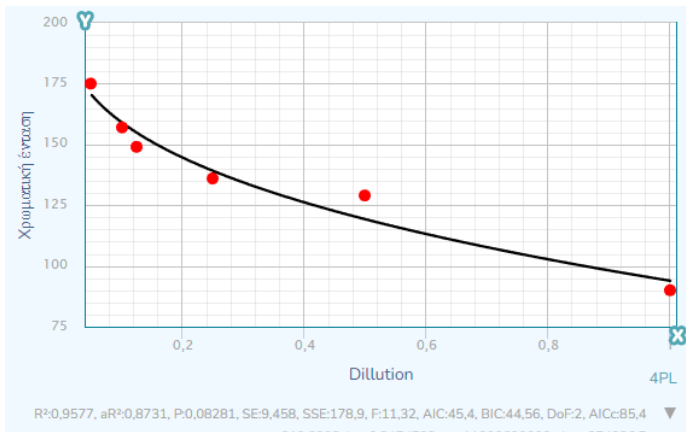
Πίνακας 11. Πίνακας αραιώσεων του αρχικού stock χαλκού που χρησιμοποιήθηκαν κατά το αρχικό στάδιο ανάπτυξης την φωτογραφικής μεθόδου προσδιορισμού

Αραιώσεις: (Αρχικό stock 5g/100mL)
No dilution
1/2
1/4
1/8
1/10
1/20

RGB green



Διάγραμμα 13. Συσχέτιση χρωματικής έντασης και συγκέντρωσης κατά την ανάλυση του πράσινου καναλιού της φωτογραφίας χαλκού.

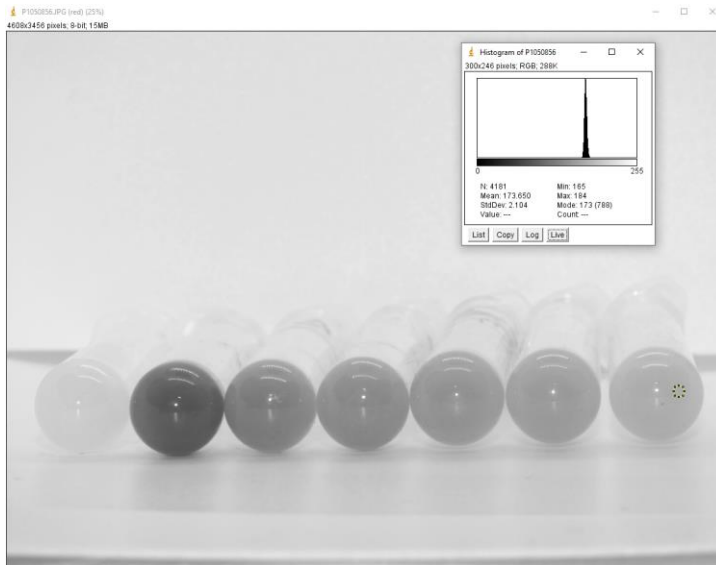


Διάγραμμα 14. Συσχέτισης χρωματικής έντασης και συγκέντρωσης κατά την ανάλυση του κόκκινου καναλιού της φωτογραφίας χαλκού.



Εικόνα 12 Φωτογραφία διαβάθμισης συγκεντρώσεων χαλκού σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Ο 1ος περιέχει μόνο μπεντονίτη και δεν απεικονίζεται στο διάγραμμα. –Πηγή: συγγραφέας

Φαίνεται από τα διαγράμματα ότι δημιουργώντας ιστόγραμμα για κάθε κανάλι ξεχωριστά, μπορεί να εντοπιστεί αποτελεσματικότερα το κανάλι στο οποίο οι συγκεντρώσεις ανταποκρίνονται καλύτερα στην χρωματική ένταση. Από τις δοκιμές που έγιναν σε διάφορα μόρια προτείνεται να γίνεται πρώτα ανάλυση στη συνολική ένταση του χρώματος και σε περίπτωση μη ικανοποιητικών αποτελεσμάτων τον διαχωρισμό των καναλιών και την εξέταση του καναλιού που είναι συμπληρωματικό χρωματικά στις χροιές που παρουσιάζει το δείγμα με τη βοήθεια ενός τροχού χρώματος.



Εικόνα 13 Ανάλυση φωτογραφίας χαλκού με ιστόγραμμα μετά από διαχωρισμό καναλιών. – Πηγή: συγγραφέας.



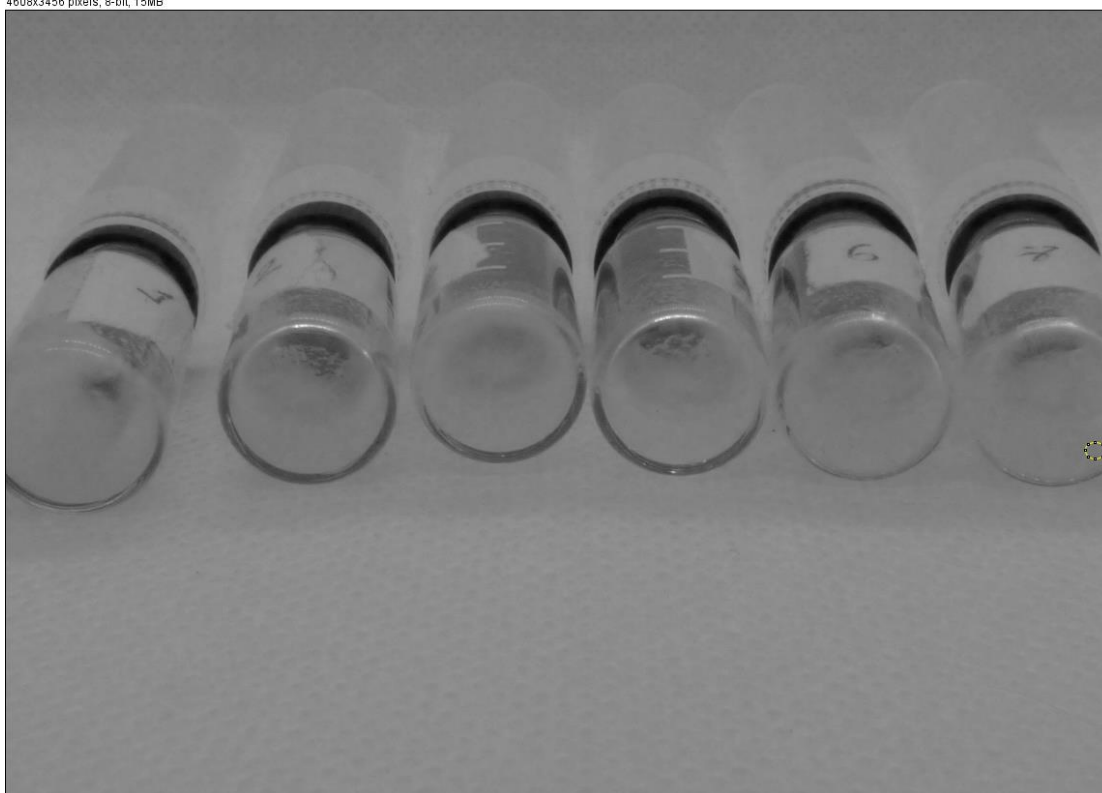
Εικόνα 13 Color wheel – Πηγή: <http://decoart.com/blog/uploads/Color-Theory-Graphics-WHEEL34.jpg>

Αφού έγινε επιτυχημένα η δοκιμή σε δοκιμαστικούς σωλήνες, αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθούν μικρότεροι φορείς ώστε να μπορεί να γίνει μεγαλύτερη συμπύκνωση και συνεπώς ανίχνευση μικρότερων συγκεντρώσεων των μορίων ενδιαφέροντος. Η επόμενη δοκιμή έγινε σε δέκτες LC- MS και σε πηγάδια ELISA στα οποία ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο συμπύκνωσης σε μεντονίτη που χρησιμοποιήθηκε και κατά τον φωτογραφικό του προσδιορισμό. Μετά τη συγκέντρωση του ιζήματος έγινε επαναϊώρησή του και μεταφορά του στους αντίστοιχους δέκτες, φυγοκέντρωση στις 3.600 στροφές για 10 λεπτά και απόρριψη του υπερκειμένου. Ακολούθησε φωτογράφιση σε συνθήκες lightbox και ανάλυση με διαχωρισμό καναλιών και εξέταση του κόκκινου καναλιού.

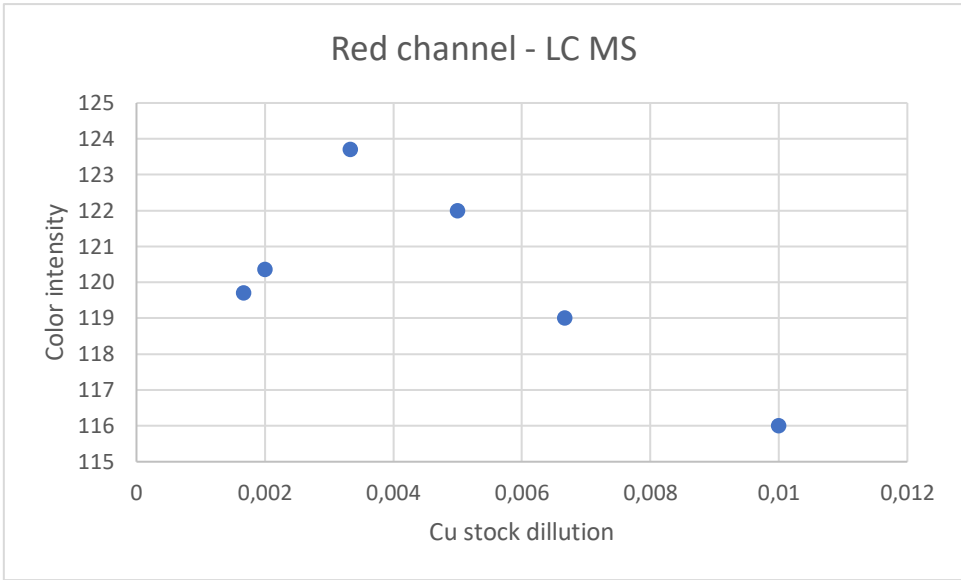
Πίνακας 12. Συγκεντρώσεις χαλκού στα φωτογραφούμενα δείγματα

Cu $\mu\text{g/mL}$
500
333,3333
250
166,6667
100
83,33333- πειρα- ματικό σφάλμα

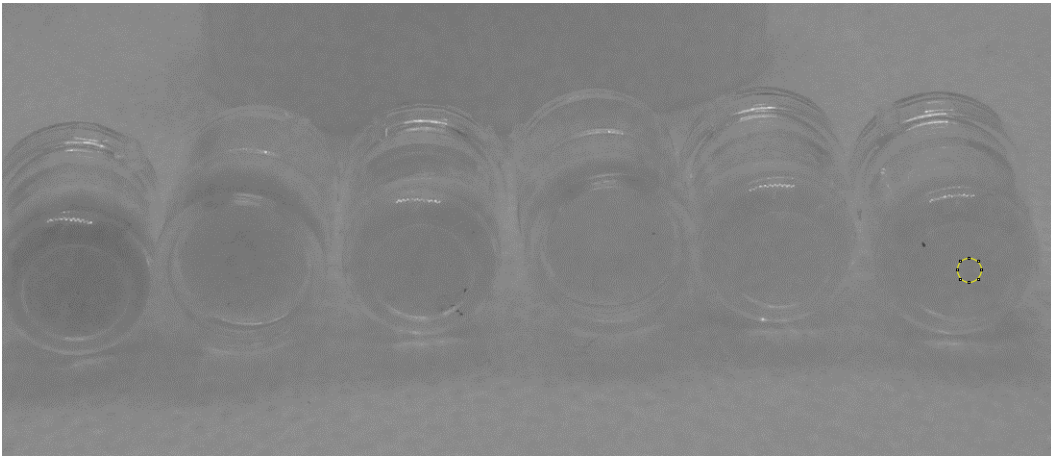
P1050881.JPG (red) (25%)
4608x3456 pixels; 8-bit; 15MB



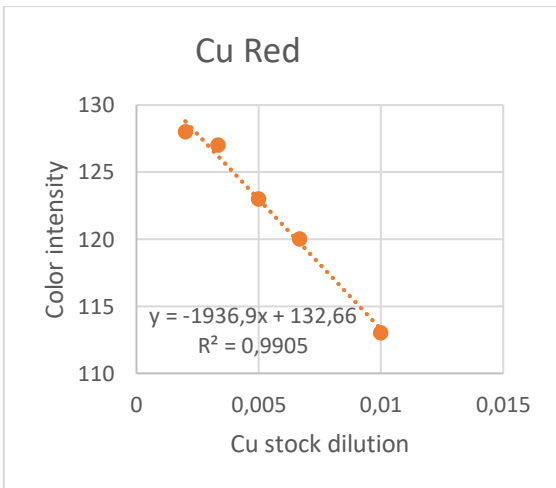
Εικόνα 14 Απομονωμένο κόκκινο κανάλι- λυχνίες LC-MS. Πηγή: συγγραφέας



Διάγραμμα 15. Διάγραμμα χρωματικής έντασης- συγκέντρωσης κόκκινου καναλιού κατά την δοκιμασία προσδιορισμού χαλκού-λυχνίες LC-MS.



Εικόνα 15 Απομονωμένο κόκκινο κανάλι- πηγάδια μικροτιλοδότησης- Πηγή: συγγραφέας



Διάγραμμα 16. Διάγραμμα χρωματικής έντασης- απορρόφησης κόκκινου καναλιού κατά την δοκιμασία προσδιορισμού χαλκού- πηγάδια μικροτιλοδότησης.

Στο διάγραμμα που προέρχεται από τους δέκτες LC-MS δεν βλέπουμε καθόλου ικανοποιητική εικόνα, γεγονός που δικαιολογείται από την ποσότητα μπεντονίτη που προστέθηκε για την συμπύκνωση. Τα 150 μl αν και θα επέτρεπαν την μεγαλύτερη συμπύκνωση και ανίχνευση μικρότερων ποσοτήτων οποιασδήποτε εξεταζόμενης ουσίας δεν είναι αρκετά για να καλύψουν τον πάτο των δεκτών LC-MS και δύσκολα καλύπτουν τα πηγάδια ELISA τα οποία παρουσιάζουν εξαιρετική ταύτιση με τα αναμενόμενα αποτελέσματα. Ο επίπεδος πάτος των πηγαδιών σε συνδυασμό με το μικρό εμβαδόν τους επιτρέπουν την χρήση μικρότερων ποσοτήτων πηλού και συνεπώς την ανίχνευση μικρότερων συγκεντρώσεων των μορίων, μιας και σε μικρότερη επιφάνεια, η ίδια ποσότητα μορίου ή ουσίας παρουσιάζει πιο έντονο χρωματισμό. Μειονέκτημά τους όμως αποτελεί επίσης το μέγεθός τους και η έλλειψη φυγοκέντρου προσαρμοσμένη για την φυγοκέντρωση τόσο μικρών μεγεθών, καθώς τα πειραματικά σφάλματα και οι απώλειες είναι μεγαλύτερα. Παρόλα αυτά βλέπουμε με ίδια ποσότητα μπεντονίτη ξεκάθαρα καλύτερα αποτελέσματα στα πηγάδια μικροτιλοδότησης. Μετά τις δοκιμές αυτές αποφασίστηκε στα πειράματα με φωτογραφικό κομμάτι να χρησιμοποιηθούν τα πηγάδια ELISA για τις αναλύσεις.

5.5 Δοκιμή προσδιορισμού ερυθρού του μεθυλίου.

5.5.1 Φωτομετρικός προσδιορισμός MT red

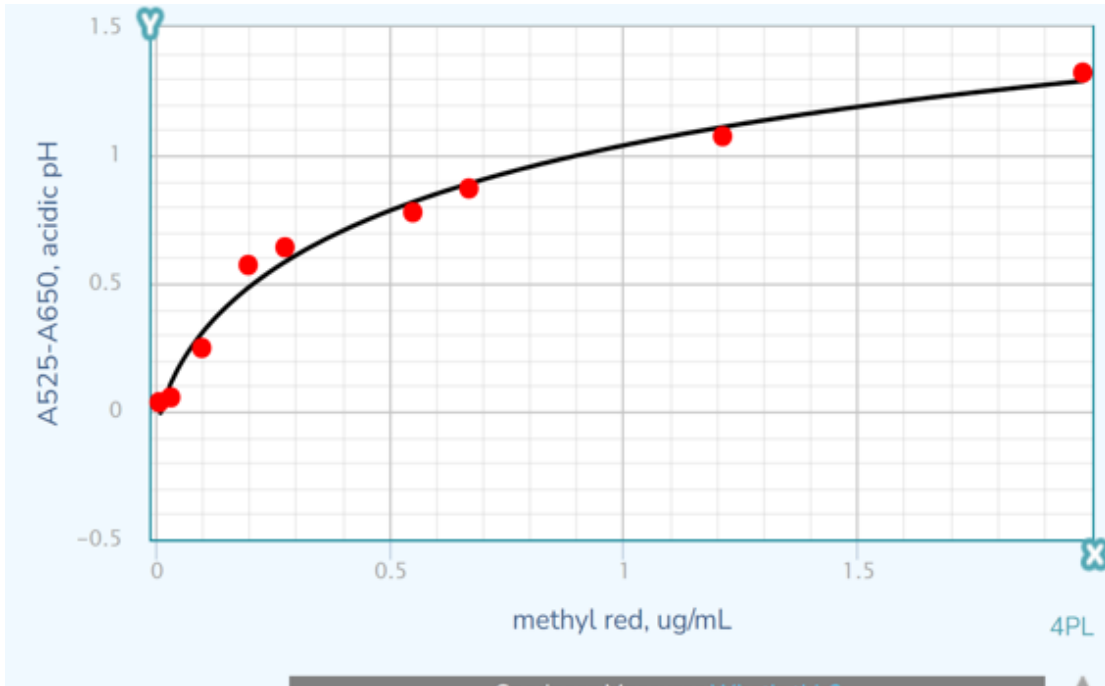
Για τον φωτομετρικό προσδιορισμό της χρώσης MT red προστέθηκαν σε falcon tube 45 mL H₂O 200 μl Bentone LT 2,6% 8 μl HCl και ερυθρό του μεθυλίου σε συγκεντρώσεις που θα παρατεθούν στον παρακάτω πίνακα. Η αντίδραση έγινε σε pH 2,75 το οποίο επιτεύχθηκε με την προσθήκη του HCl μετά τον έλεγχο του με το πεχάμετρο του εργαστηρίου. Μετά την προσθήκη, οι σωλήνες αναδεύονται για 40 λεπτά ώστε να γίνει ει δυνατόν καλύτερη δέσμευση της χρωστικής στον πηλό. Ακολουθεί φυγοκέντρωση και απόρριψη του υπερκειμένου με επανάληψη του τελευταίου βήματος μέχρι εξάντλησης του περιεχομένου των falcon tubes.

Ακολουθεί διαστρωματικός διαχωρισμός των των φύλλων μπεντονίτη με την προσθήκη 500 μL 25% ACN σε νερό και επώαση για 30 λεπτά, χωρίς έλεγχο του pH και φυγοκέντρωση. Παρατηρείται μικρής αποτελεσματικότητας καταστροφής της διαστρωματικής διάταξης του Bentone LT λόγω κορεσμού του bentone LT με H⁺. Γίνεται μέτρηση απορρόφησης σε A₅₂₅ –A₆₅₀ nm με μεταφορά όλου του υπερκειμένου στην κυβέτα. Ακολουθεί

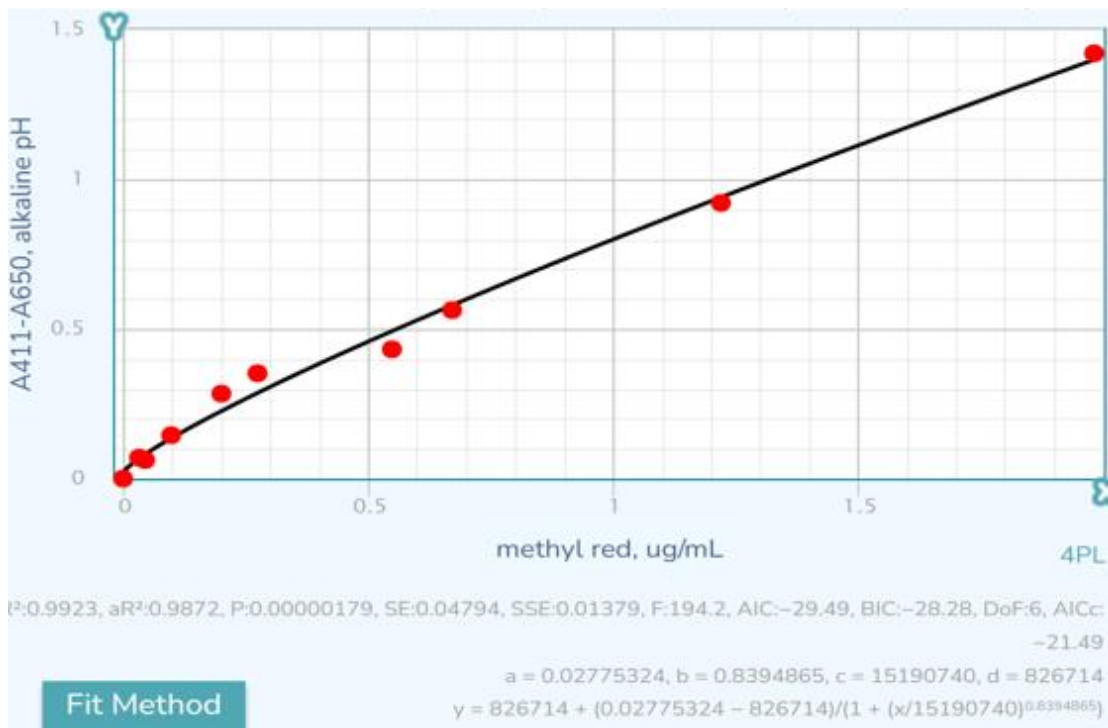
μεταβολή pH σε αλκαλικό (κίτρινο χρώμα) με προσθήκη 90 μL NaOH και μέτρηση σε A411-A650. Ο προσδιορισμός αυτός έγινε από το εργαστήριο και όχι από τον φοιτητή.

Πίνακας 13. Πίνακας συγκεντρώσεων και απορροφήσεων

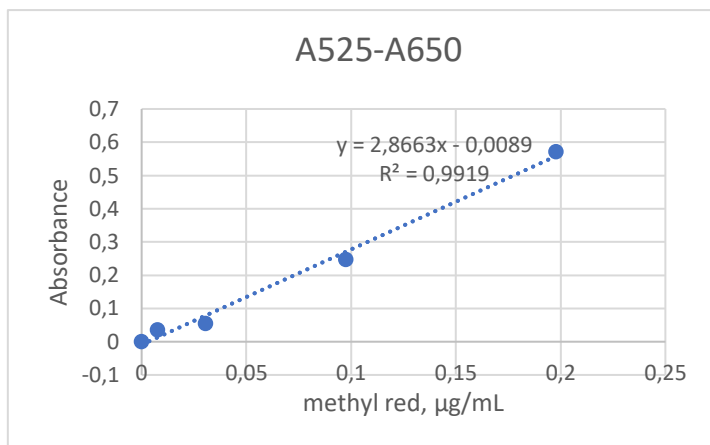
sample No	dilution of stock	ul added	methyl red, μg/mL
1		0	0
2	1:10	10	0,030444444
3	1:10	15	0,045666667
4	1:10	32	0,097422222
5	1:10	2,5	0,076111111
6	1:10	48 (sample lost)	
7	1:10	65	0,197888889
8	1:10	90	0,274
9	1:10	105	0,319666667
10	1:10	140 (sample lost)	
11	1:10	180	0,548
12	1:10	220	0,669777778
13	non diluted	40	1,217777778
14	non diluted	65	1,978888889



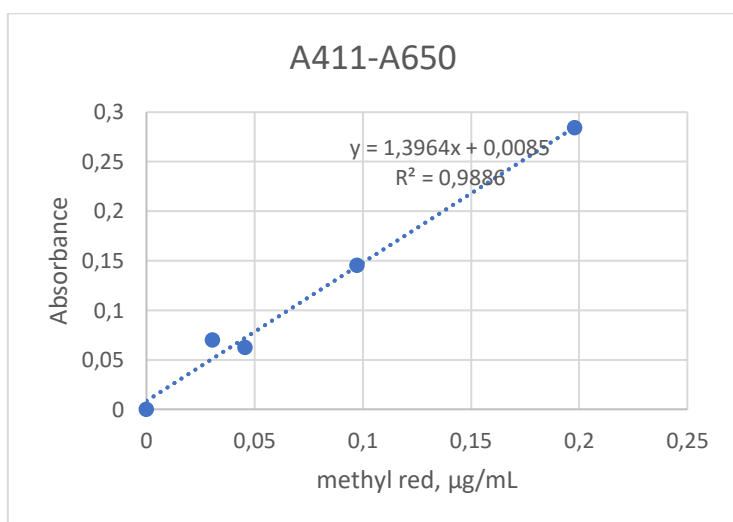
Διάγραμμα 17. Συσχέτιση απορρόφησης- συγκέντρωσης methyl red σε όξινο pH



Διάγραμμα 18. Συσχέτιση απορρόφησης- συγκέντρωσης methyl red σε αλκαλικό pH



Διάγραμμα 19. Γραμμική περιοχή φωτομετρικού προσδιορισμού MT red σε όξινο pH.



Διάγραμμα 20. Γραμμική περιοχή φωτομετρικού προσδιορισμού MT red σε αλκαλικό pH (γραμμική περιοχή μικρότερων συγκεντρώσεων.).

Όπως φαίνεται από τα διαγράμματα το πρωτόκολλο συμπύκνωσης λειτουργεί πολύ αποτελεσματικά. Οι αποκλίσεις από την γραμμή τάσης είναι μικρές χωρίς να επηρεάζουν την φύση του διαγράμματος και φαίνεται ότι μπορεί να ανιχνευθεί και να ποσοτικοποιηθεί σε πολύ χαμηλές πυκνότητες. Συνεπώς μπορεί να αποφανθεί πως για το συγκεκριμένο μόριο η μεθοδολογία είναι άκρως επιτυχημένη, προσφέροντας γρήγορη και ευαίσθητη ανίχνευση του μορίου.

5.5.2 Προσδιορισμός MT red με ανάλυση φωτογραφίας

Το κόκκινο του μεθυλενίου παίρνει σε $pH < 4,4$ (ιδανικά $pH=2$) κόκκινο χρώμα και είναι θετικά φορτισμένο, με αποτέλεσμα να δεσμεύεται καλά στον πηλό, ο οποίος είναι αρνη-

τικά φορτισμένος. Συνεπώς για το πρώτο μέρος της φωτογράφισης προστέθηκε νερό μπεντονίτης και MT red dye το pH ελέγχθηκε με το πεχάμετρο του εργαστηρίου και προστέθηκαν 8μL πυκνού HCL να μειωθεί το pH σε 2,75. Στο 2^ο μέρος προστέθηκε καυστικό νάτριο, τα δείγματα έγιναν κίτρινα και αρνητικά φορτισμένα, με αποτέλεσμα και η φωτογραφία βγήκε χωρίς φυγοκέντρηση του pellet καθώς υποθέτουμε πως όντας αρνητικά, μικρότερο μέρος της χρώσης θα μείνει προσδεμένο στον μπεντονίτη.

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε είναι παρόμοιο με το προηγούμενο μέχρι και πριν τον διαχωρισμό, με προσθήκη όμως 250 μL Bentone LT 2,6%, και ανάδευση των falcon tubes για 30 λεπτά. Φτιάχτηκε stock methyl red 1,37 mg/mL και από αυτό ποσότητα αραιώθηκε 1/10 και προστέθηκαν:

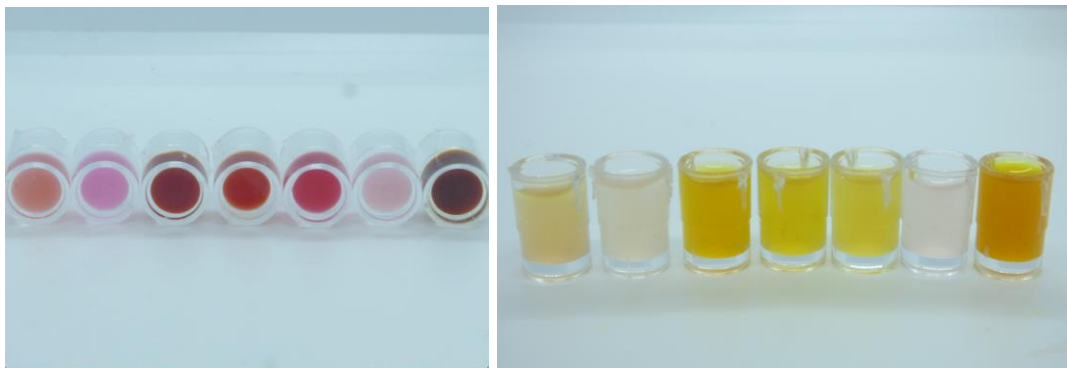
Πίνακας 14. Πίνακας προετοιμασίας δειγμάτων MT red.

Δείγμα	Προσθήκη μL	μg/mL
1	6,56	0,2
2	3,28 από 1/10 stock	0,1
3	65,6	2
4	32,8	1
5	16,4	0,5
6	1,64 από 1/10 stock	0,05
7	164	5

Πίνακας 13 Πίνακας προετοιμασίας δειγμάτων MT red.

Αποφασίστηκε να δοκιμαστεί ένα μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων ώστε να καλυφθεί η ικανότητα ανίχνευσης και διαχωρισμού τόσο στο μικρότερο ικανό άκρο όσο και σε συγκέντρωση αρκετά μεγάλη ώστε να πλησιάσει στον κορεσμό του pellet. Όπως έχει αναφερθεί, δεν γίνεται αποπροσρόφηση με διαστρωματικό διαχωρισμό κατά το φωτογραφικό πρωτόκολλο που αναπτύχθηκε, συνεπώς, μετά την συγκέντρωση όλου του μπεντονίτη σε ίζημα, γίνεται επαναιώρησή αυτού σε μικρή ποσότητα απιονισμένου νερού και μεταφορά του σε ELISA wells. Τα πηγάδια έχουν μικρή χωρητικότητα μέχρι 400 μL και η μεταφορά πρέπει να γίνει πολύ προσεκτικά. Μετά τη μεταφορά τα πηγάδια τοποθετού-

νται προσεκτικά σε περιέκτες και αυτοί με τη σειρά τους σε φυγόκεντρο, όπου φυγοκεντρούνται για 5 λεπτά σε 3.500 rpm. Έπειτα αφαιρείται το υπερκείμενο, τα δείγματα τοποθετούνται κάτω από lightbox διπλής σειράς LED και φωτογραφίζονται. Μετά την φωτογράφιση γίνεται προσθήκη μικρής ποσότητας NaOH (10 μL) σε 45 μL νερό και επαναϊώρηση, φωτογράφιση με τον ίδιο τρόπο.

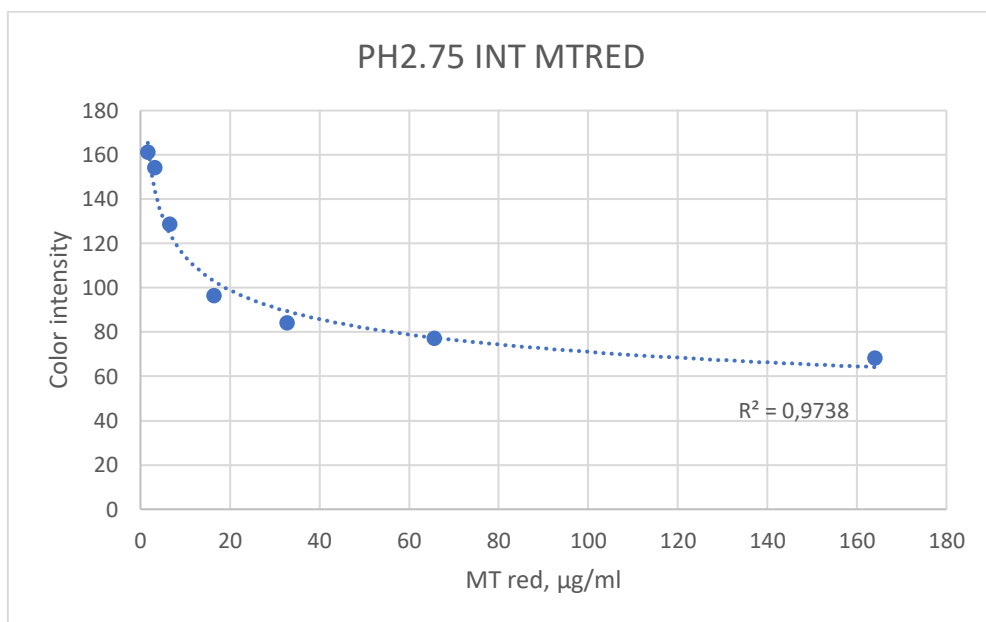


Εικόνα 16 Φωτογράφιση MT red σε $pH=2,75$ (αριστερά) και $pH>7$ (δεξιά) -Πηγή: συγγραφέας

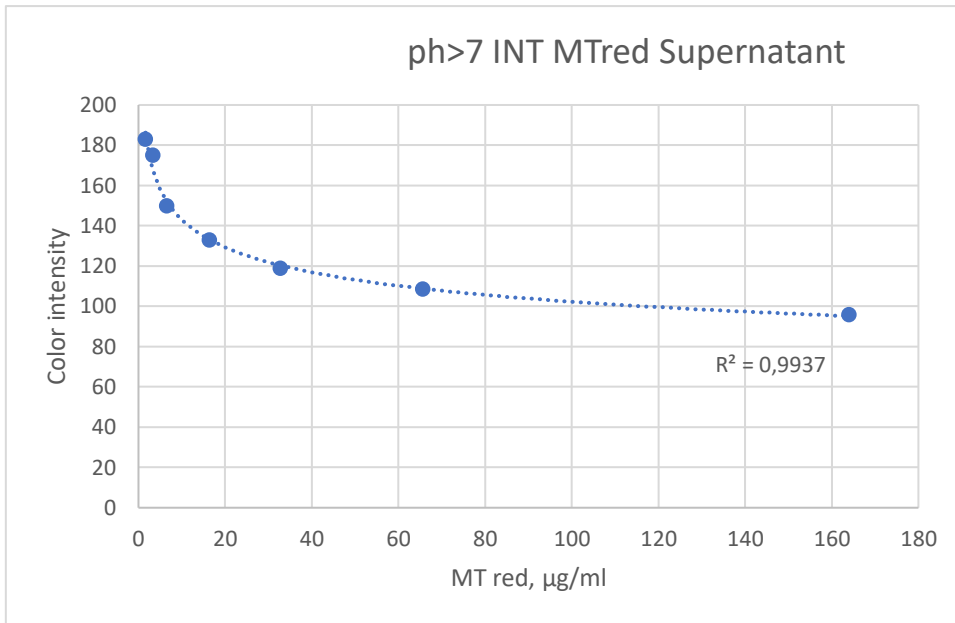
Η ανάλυση έγινε με το λογισμικό επεξεργασίας εικόνων ImageJ. Έγινε επιλογή της περιοχής εξέτασης κάθε δείγματος και η δημιουργία ιστογράμματος της χρωματικής έντασης. Αρχικά ελέγχθηκαν οι τιμές έντασης και χρωματικών καναλιών RGB και βρέθηκε μεγάλη ομοιότητα της τάσης των αποτελεσμάτων αυτών με αυτής του φωτομετρικού προσδιορισμού. Ο λόγος που τα διαγράμματα φαίνονται ανάποδα σε σχέση με αυτά του φωτομετρικού προσδιορισμού είναι απλός. Η ένταση στο λογισμικό αυτό μετράται με τιμές από 0 ως 255 για κάθε κανάλι χρώματος με τιμές κοντά στο 0 να υποδηλώνουν μεγάλη ένταση φωτός συνεπώς τα διαγράμματα έχουν τάση ανάποδη αλλά ίδιας μορφής με το προηγούμενο πρωτόκολλο. Φαίνεται ακόμα, πως φωτογραφίζονται σε $pH>7$ μόνο του το πελετ, τα αποτελέσματα είναι χειρότερα από τις αναλύσεις και του $pH 2,75$ και της φωτογραφίας σε $pH>7$ μαζί με το υπερκείμενο, τα διαγράμματα των οποίων είναι εξαιρετικά όμοια μεταξύ τους. Φαίνεται λοιπόν πως όντως το φορτίο του μορίου σε σχέση με το bentone LT επηρεάζει την ποιότητα των αναλύσεων, επιβεβαιώνοντας πως ακόμα και ήδη προσδεδεμένα μόρια με αλλαγή του pH τείνουν να διαχωριστούν από το bentone LT. Αυτό παρουσιάζει ευκαιρίες ανάλυσης ακόμα και μορίων που χωρίς επεξεργασία δεν μπορούν να δεσμευτούν και να μετρηθούν με την μεθοδολογία αυτή, με τον συνεχή έλεγχο και ρύθμιση του pH .

Πίνακας 15. Μετρήσεις χρωματικής έντασης MT red σε διαφορετικά pH

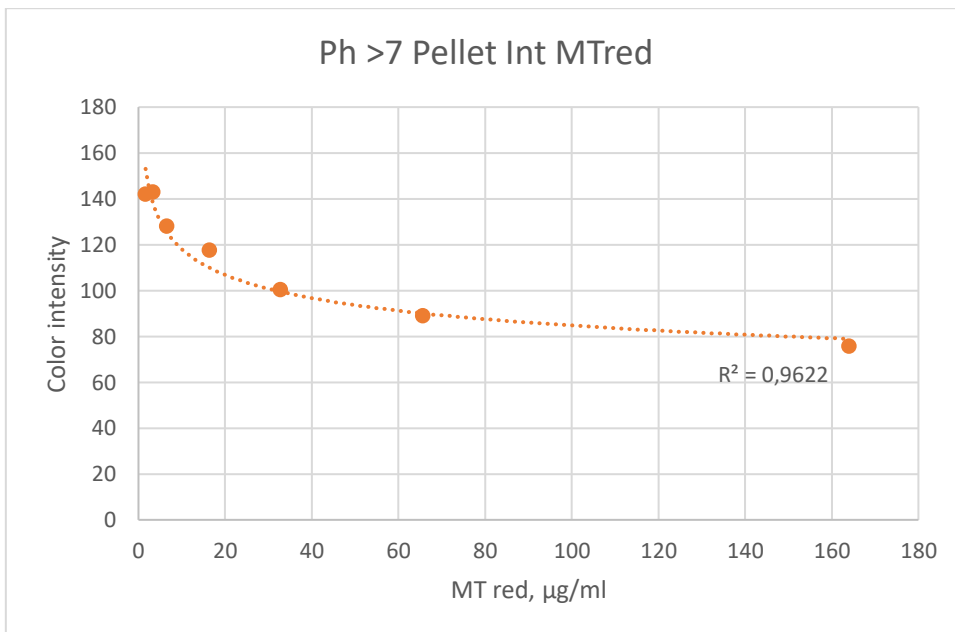
	ph2,75	ph>7	
µg/ml	PELLET INT	Supernatant INT	Pellet INT
6,56	168	150	128
3,28	174	175	143
65,6	109	108,5	89
32,8	136,6	119	100,3
16,4	154,4	133	117,5
1,64	171	183	142
164	78	96	75,8



Διάγραμμα 21. Διάγραμμα συσχέτισης χρωματικής έντασης και συγκέντρωσης MT red σε όξινο pH.



Διάγραμμα 22. Διάγραμμα συσχέτισης χρωματικής έντασης και συγκέντρωσης MT red σε αλκαλικό pH (ίζημα μαζί με υπερκείμενο)..



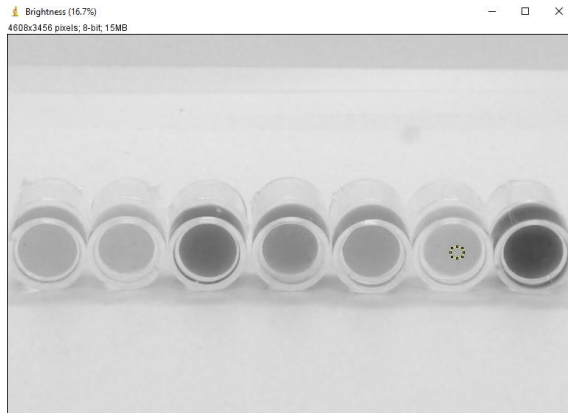
Διάγραμμα 23. Διάγραμμα συσχέτισης χρωματικής έντασης και συγκέντρωσης MT red σε αλκαλικό pH (ίζημα).

Κάθε μόριο που εξετάζεται έχει διαφορετικό χρώμα και μπορεί να παρουσιάζει καλύτερα αποτελέσματα είτε με διαχωρισμό των καναλιών και έλεγχο κάθε χρωματικού καναλιού RGB ξεχωριστά (ο χαλκός για παράδειγμα δεν δίνει καλά αποτελέσματα αν δεν

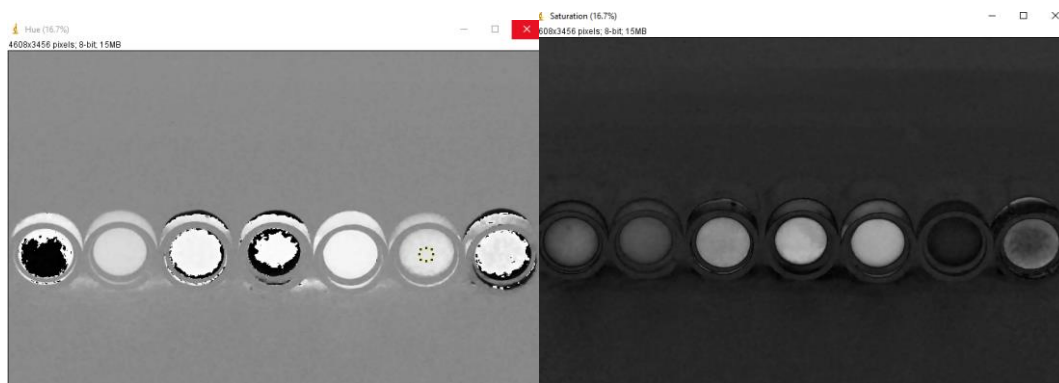
εξεταστεί ξεχωριστά το κόκκινο χρωματικό κανάλι) είτε όπως εδώ εξετάζοντας τη συνολική ένταση του χρώματος. Για τον λόγο αυτό, δοκιμάστηκε η εξέταση χρωματικού μοντέλου HSV/HSB το οποίο έχει βρεθεί στη βιβλιογραφία να δίνει αξιόπιστα αποτελέσματα (Safaric et al., 2019). Τα HSV/HSB όπως και HSL αποτελούν εναλλακτικές αναπαραστάσεις του χρωματικού μοντέλου RGB και σε αντίθεση με αυτό, το οποίο χρησιμοποιεί βασικά χρώματα, σχεδιάστηκαν για να ευθυγραμμιστούν πιο στενά με τον τρόπο που η ανθρώπινη όραση αντιλαμβάνεται τα χαρακτηριστικά που δημιουργούν τα χρώματα δίνοντας τιμές κορεσμού, χροιάς και φωτεινότητας. Μέσω της καρτέλας Image->Type->HSB Stack η εικόνα παίρνει τη μορφή αυτή και μετά μέσω της διαδικασίας Image- stacks- Stack to Images γίνεται ο διαχωρισμός με την ανάλυση να είναι ίδια με την διαδικασία RGB. Όπως βλέπουμε από τα διαγράμματα, το διάγραμμα φωτεινότητας, αν και ακολουθεί διαφορετική τάση, φαίνεται να παρουσιάζει εξαιρετική ταύτιση με την αναμενόμενη σε κάθε σημείο και παρουσιάζει ενδιαφέρον για τη χρήση του ως γενική επιλογή για τη φωτογραφική ανάλυση των μορίων. Τα υπόλοιπα κανάλια του μοντέλου αυτού δεν είναι κατάλληλα για περαιτέρω αξιολόγηση.

Πίνακας 16. HSV/HSB values- MT red.

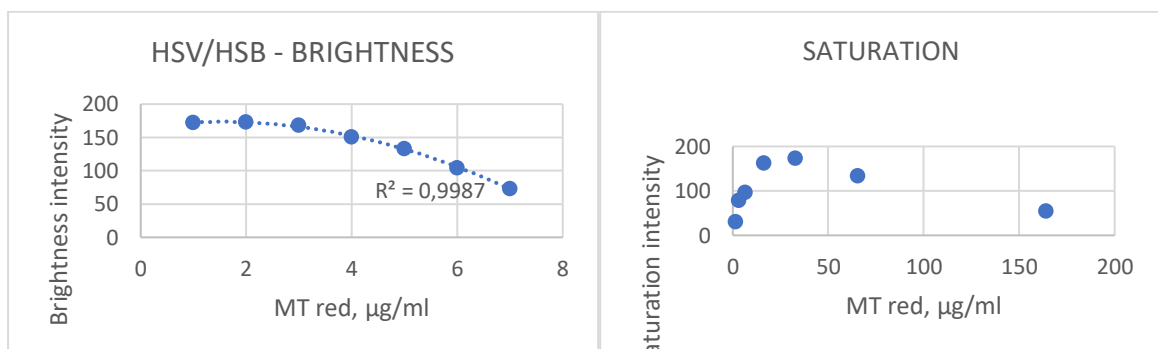
HSB values MT red			
C	B-Brightness	H-Hue	S-Saturation
1,64	172	227	31
3,28	173	218	78
6,56	168	222	96
16,4	151	245	163
32,8	133	250	173
65,6	104	243	134
164	73,3	142	54



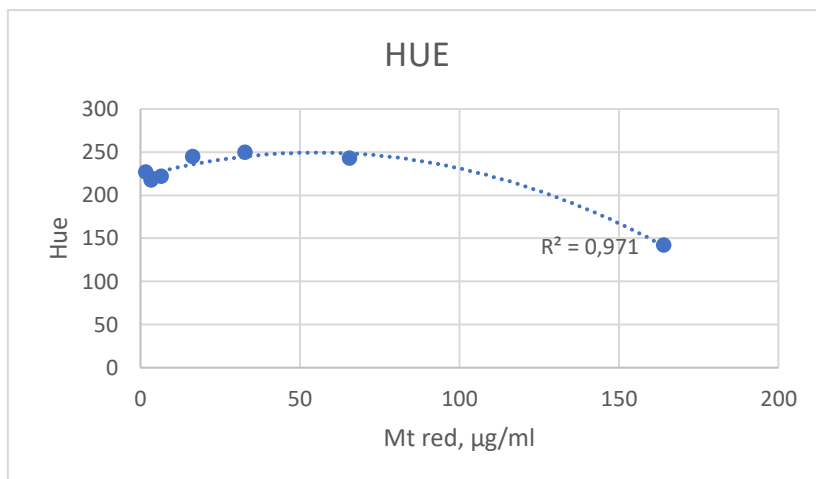
Εικόνα 17. Απομονωμένο κανάλι φωτεινότητας- Πηγή: συγγραφέας.



Εικόνα 18 Απομονωμένο κανάλι χρωιάς (αριστερά). Απομονωμένο κανάλι κορεσμού (δεξιά)- Πηγή: συγγραφέας



(Αριστερά) Διάγραμμα 24. Διάγραμμα συσχέτισης φωτεινότητας- συγκέντρωσης MT red. (Δεξιά) Διάγραμμα συσχέτισης κορεσμού- συγκέντρωσης MT red



Διάγραμμα 26. Διάγραμμα συσχέτισης χροιάς- συγκέντρωσης MT red

5.6 Δοκιμή προσδιορισμού κοβαλτίου (Co) μετά από συμπύκνωση

5.6.1 Φωτομετρικός προσδιορισμός κοβαλτίου

Η δοκιμή μεθόδου του φωτομετρικού προσδιορισμού του κοβαλτίου με τη μέθοδο συμπύκνωσης μέσω προσρόφησης σε bentone LT δεν έγινε από τον φοιτητή και παρατίθεται για την καλύτερη επεξήγηση των αποτελεσμάτων της διπλωματικής εργασίας (Πηγή: δεδομένα εργαστηρίου – υποβεβλημένο άρθρο στο περιοδικό Applied Clay Science).

Για τον φωτομετρικό προσδιορισμό του κοβαλτίου προστέθηκαν σε falcon tube 42ml H₂O 150 µL Bentone LT 2,6% και κοβάλτιο σε συγκεντρώσεις που θα παρατεθούν στον παρακάτω πίνακα. Μετά την προσθήκη, οι σωλήνες αναδεύονται για 60 λεπτά ώστε να γίνει ει δυνατόν καλύτερη δέσμευση του μετάλλου στον πηλό. Ακολουθεί φυγοκέντριση και απόρριψη του υπερκειμένου με επανάληψη του τελευταίου βήματος μέχρι εξάντλησης του περιεχομένου των falcon tubes.

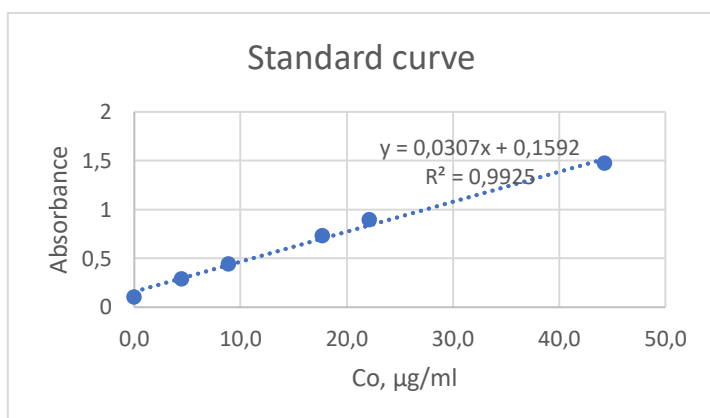
Ακολουθεί διαστρωματικός διαχωρισμός των φύλλων μπεντονίτη απελευθερώνοντας τα μόρια, με την προσθήκη 300 µl 25% ACN (ακετονιτριλίου) σε νερό και επώαση για 20 λεπτά. Για την μέθοδο φωτομέτρησης μετά την συμπύκνωση και την έκλυση προστίθενται σε κυβέτα 250 µl R2-φεροζίνη (iron kit, biosis) + 650 µl H₂O + 100 µl δείγμα (μέθοδος τροποποιημένη από Kundra, Katyal και Singh, 1974). Γίνεται μέτρηση απορρόφησης σε A363 –A700 nm. Με τη συγκεκριμένη μέθοδο φωτομέτρησης κατασκευάστηκε και καμπύλη αναφοράς, μέσω της οποίας υπολογίστηκε ο παράγοντας συμπύκνωσης του εξεταζόμενου μορίου.

Πίνακας 17. Δεδομένα προσδιορισμού Co για πείραμα συμπύκνωσης σε bentone LT.

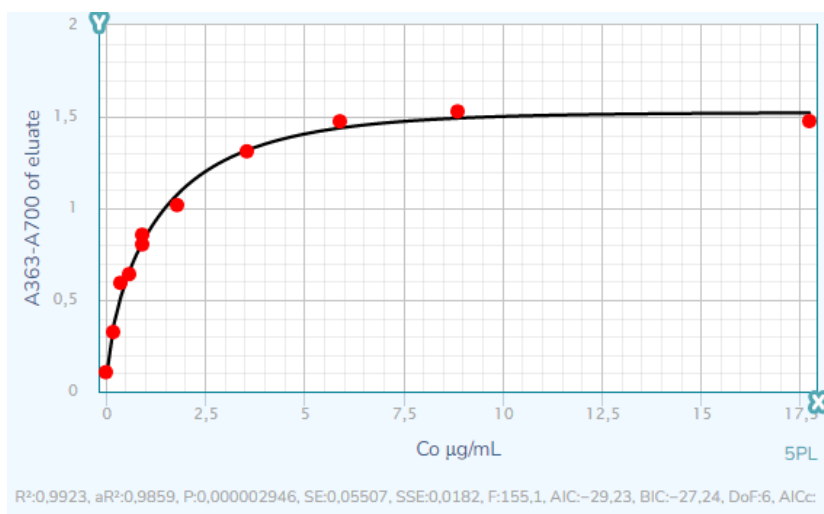
Dilution	A363-A700 of eluate	Co µg/mL, nominal into 42 mL= C0	Co µg/mL, into 300 ul eluate calculated from std curve	concentration factor x
0,01000	1,47600	17,71038	3,52280	1,98911
0,00500	1,52900	8,85519	3,65856	4,13154
0,00333	1,47500	5,90346	3,52024	5,96300
0,00200	1,31100	3,54208	3,10015	8,75236
0,00100	1,01800	1,77104	2,34964	13,26703
0,00050	0,85600	0,88552	1,93468	21,84800
0,00033	0,64100	0,59035	1,38397	23,44329
0,00020	0,59300	0,35421	1,26101	35,60099
0,00010	0,32500	0,17710	0,57454	32,44080
0,00050	0,80300	0,88552	1,79892	20,31491
0,00000	0,10600	0,00000	0,01358	

Πίνακας 18. Δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς.

Co µg/mL, stock	Co µg/mL, final	A363-A700	(A363-A700)+bkgr of MTM
8,85519	22,137977	0,791	0,897
3,54208	8,8551906	0,338	0,444
7,08415	17,710381	0,625	0,731
1,77104	4,4275953	0,185	0,291
0,00000	0	0	0,106
17,71038	44,275953	1,369	1,475



Διάγραμμα 27. Καμπύλη αναφοράς Co σε νερό.



Διάγραμμα 28. Διάγραμμα διασποράς συγκέντρωσης- απορρόφησης κοβαλτίου. A363-A750 $R^2= 0,9923$

Όπως φαίνεται από τα διαγράμματα η μέθοδος συμπύκνωσης παρουσιάζει διαφορετικούς παράγοντες συμπύκνωσης για κάθε συγκέντρωση κοβαλτίου με τις μικρότερες συγκεντρώσεις να παρουσιάζουν συμπύκνωση ως και 36 φορές, επιτρέποντας μεγάλο εύρος ανίχνευσης του μετάλλου. Αυτό ταυτόχρονα σημαίνει πως ενώ η καμπύλη αναφοράς της φωτομετρικής μεθόδου είναι γραμμικής μορφής, αυτό δεν ισχύει για την καμπύλη του πρωτοκόλλου συμπύκνωσης, η οποία παρουσιάζεται παραπάνω και η οποία όμως μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αποτελεσματική ανίχνευση και ποσοτικοποίηση μικρότερων συγκεντρώσεων.

5.6.2 Φωτομετρικός προσδιορισμός κοβαλτίου σε μείγμα.

Ένα βασικό βήμα για την εξέταση του καινούριου αυτού πρωτοκόλλου είναι η ικανότητα χρήσης του για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό κοβαλτίου και λοιπών μορίων σε μείγμα διαφορετικών μορίων. Έτσι σε αυτό το βήμα προστέθηκαν στα falcon tubes διαφορετικές ουσίες σε συγκεντρώσεις παραπλήσιες σε αυτές των λυμάτων και δοκιμάστηκε ο προσδιορισμός με την μέθοδο που περιεγράφηκε παραπάνω. Για την δοκιμή αυτή προστέθηκαν σε falcon tube 45mL H₂O και 250 μαζί με χαλκό, ουρικό οξύ, CTAB και τοποτεκάνη στις ποσότητες του παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 19. Πίνακας συνθηκών προσθήκης των επιπλέον ουσιών του μείγματος

Substance	stock	dilution	μL	C
Cu(CH ₃ COOH) ₂	5g/100mL	1/100	120	1,3 mg/L
Uric Acid	0,5mg/mL	1/1	112,5	1,25 μg/mL
CTAB	200/μg/mL	1/100	450	2 ng/mL
topotecan	4mg/mL	1/1000	45	4 ng/mL

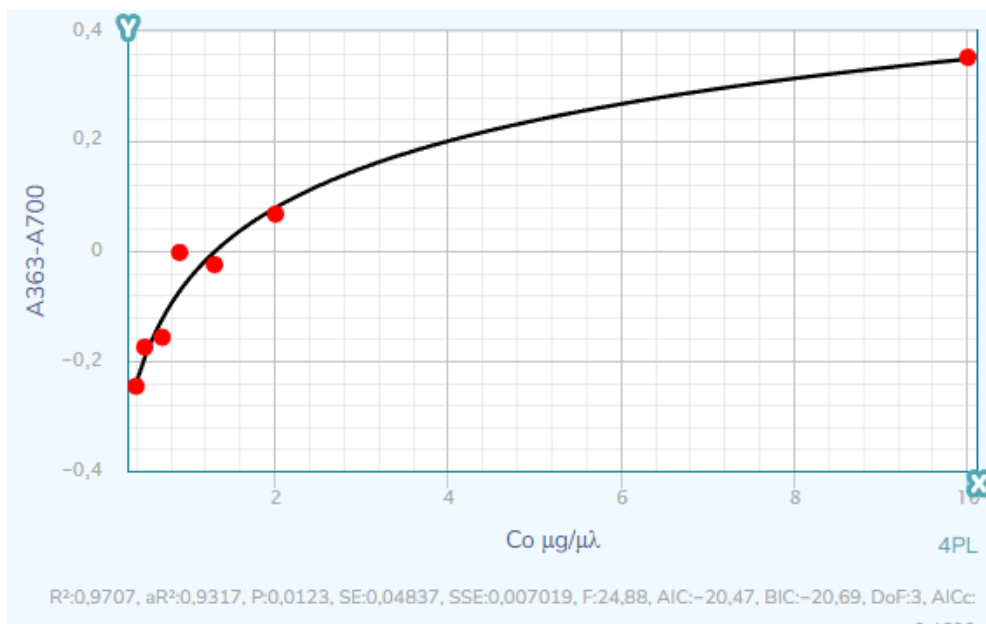
Προστέθηκε έπειτα Co σε μορφή Co(NO₃)₂ + 6 H₂O σε συγκεντρώσεις μέσα στην περιοχή ανίχνευσης του κοβαλτίου, με τις περισσότερες από αυτές στην περιοχή γραμμικότητας της καμπύλης (0,2-0,9 μg/mL). Ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο συμπύκνωσης με την προηγούμενη δοκιμή και ο προσδιορισμός όπως και παραπάνω έγινε προσθέτοντας σε κυψελίδα 250 μL R2, 650 μL H₂O και 100μL δείγμα Co και μέτρηση A363-A700 nm. Τα αποτελέσματα μαζί με τις συγκεντρώσεις που προστέθηκαν παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα, Co(NO₃)₂.

Πίνακας 20. Διαβάθμιση συγκεντρώσεων Co που προστέθηκαν στα δείγματα.

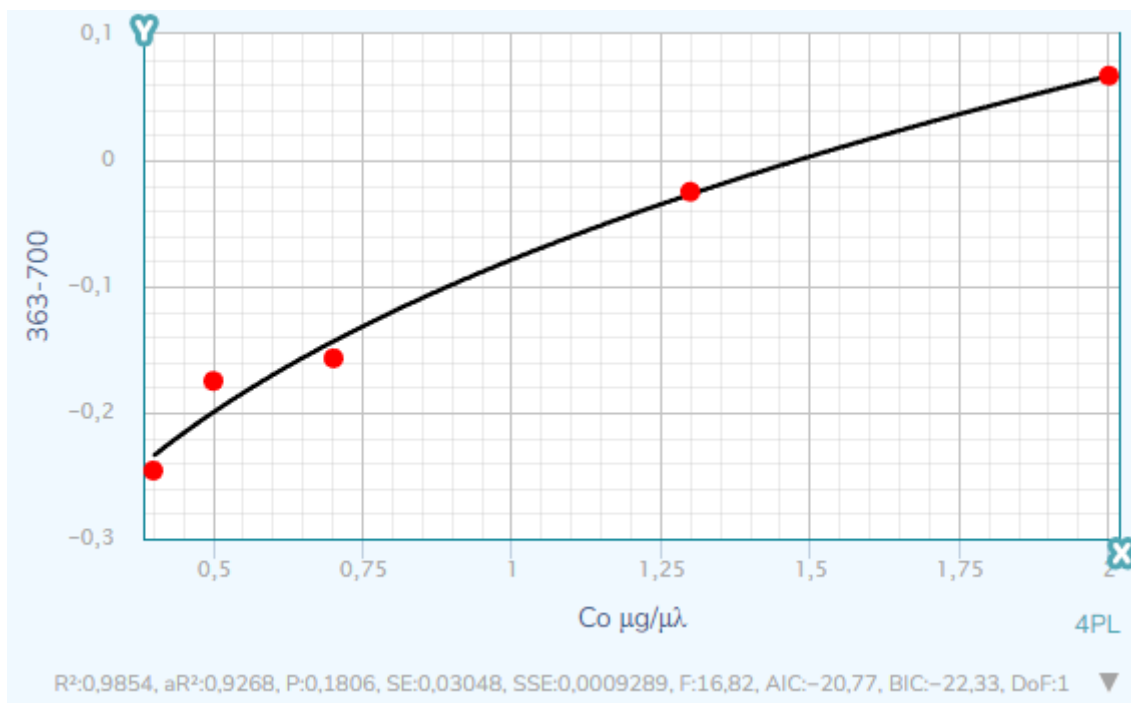
μg/mL	363	700
0,4	-0,254	-0,008
0,5	-0,181	-0,006
0,7	-0,169	-0,012

0,9	-0,0089	-0,006
1,3	-0,027	-0,002
2	0,064	-0,003
10	0,343	-0,009

Ενδιαφέρον είναι να τονιστεί πως μέχρι την συγκέντρωση 2μg/mL υπάρχει κοιλάδα αντί κορυφής στα 363 η οποία μετακινείται στα 350 μέχρι την συγκέντρωση 10 μg/mL. Παρά το συγκεκριμένο θέμα φαίνεται πως παρατηρείται ακόμα ίδια τάση στο παρακάτω διάγραμμα. Καθώς η τάση του διαγράμματος κατά την μέτρηση σε μείγμα ακολουθεί το ίδιο μοτίβο με την τάση κατά την μέτρηση μόνο του κοβαλτίου φαίνεται ότι ο πηλός είναι ικανός να προσροφήσει περισσότερα υλικά ταυτόχρονα, ελευθερώνοντας μετά τον διαστρωματικό διαχωρισμό των φύλλων του ποσότητες αντίστοιχες της αρχικής προσθήκης για κάθε συγκέντρωση. Είναι ασφαλές να συμπεράνει κανείς ότι μελλοντικά θα μπορούσε η παρούσα μέθοδος να χρησιμοποιηθεί σε λύματα αγνώστων συγκεντρώσεων με την προσθήκη φυσικά επιπλέον προτύπων διαλυμάτων για κατασκευή νέας καμπύλης ανά ομάδα δειγμάτων.



Διάγραμμα 29. Συσχέτιση απορρόφησης- συγκέντρωσης C_o σε μείγμα.



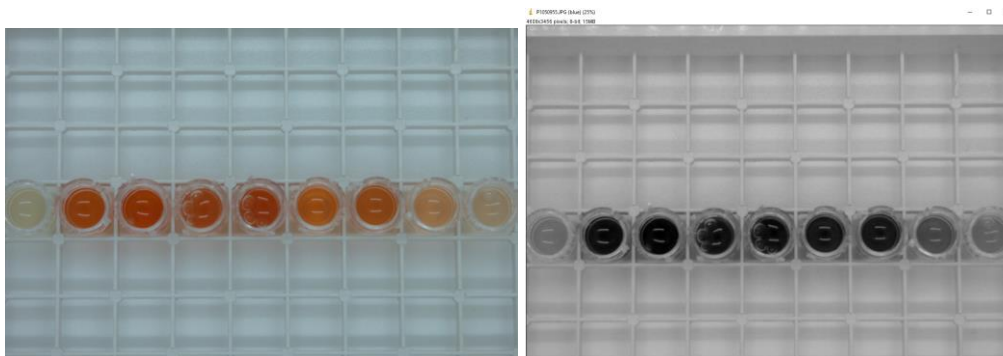
Διάγραμμα 30. Διάγραμμα δειγμάτων 1-6 (με αφαίρεση του δείγματος 5). Γραμμική περιοχή- 0,5-2μg/mL

5.6.3 Φωτογραφικός προσδιορισμός κοβαλτίου

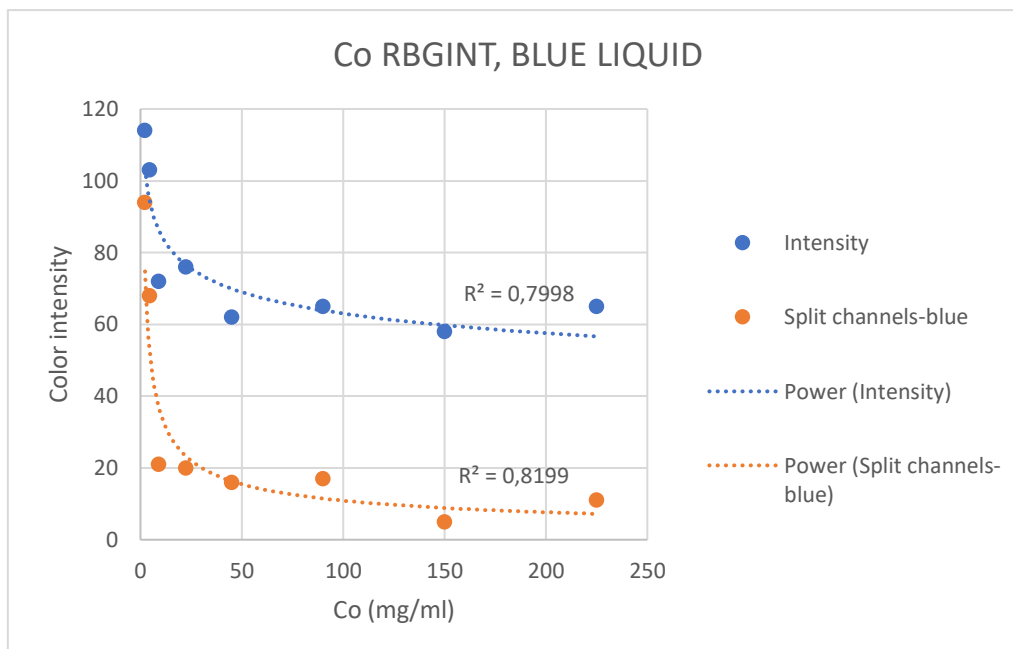
Για τον φωτογραφικό προσδιορισμό του κοβαλτίου προστέθηκαν σε falcon tube 45mL H₂O 200 μl Bentone LT 2,6% και κοβάλτιο σε μορφή $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 + 6 \text{H}_2\text{O}$ σε συγκεντρώσεις που θα παρατεθούν στον παρακάτω πίνακα. Μετά την προσθήκη, οι σωλήνες αναδεύτηκαν για 45 λεπτά ώστε να γίνει ει δυνατόν καλύτερη δέσμευση του μετάλλου στον πηλό. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 3.500 rpm για 10 λεπτά και απόρριψη του υπερκειμένου με επανάληψη του τελευταίου βήματος μέχρι εξάντλησης του περιεχομένου των falcon tubes. Μετά την συλλογή του ιζήματος γίνεται επαναιώρηση του σε 250 μL νερό και μεταφορά του σε πηγάδια ELISA. Τα πηγάδια ακολούθως φυγοκεντρώνονται και απορρίπτεται το υπερκείμενο. Σε αυτά προστίθενται 200 μl αντιδραστηρίου R2 (iron kit, biosis) αραιωμένο 1 (R2): 0,5 (H₂O) και γίνεται επαναιώρηση των ιζημάτων. Το χρώμα μετά από αναμονή μερικών δευτερολέπτων παίρνει διάφορες αποχρώσεις του κόκκινου. Λόγω της δυσκολίας χειρισμού μονών πηγαδιών υπήρξαν κάποιες πειραματικές απώλειες και αποφασίστηκε η ποσότητα bentone σε επόμενα παρόμοια πειράματα να αυξηθεί σε 250 μl. Μέσω ImageJ εξετάστηκε η φωτογραφία σαν σύνολο και το μπλε κανάλι απομονωμένο.

Πίνακας 21. Δεδομένα προσθήκης Co στα δείγματα και αποτελέσματα μέτρησης χρωματικής έντασης.

Stock Co: 10,6 mg/mL			
Dilution	μL	RGBint	blue
1/200	2,25	114	94
1/300	4,5	103	68
1/500	9	72	21
1/1000	22,5	76	20
1/2000	45	62	16
1/5000	90	65	17
1/10000	150	58	5
1/20000	225	65	11



Εικόνα 19 Φωτογραφίες Co σε ELISA wells. Αριστερά- Φωτογραφία για ανάλυση intensity. Δεξιά- Κανάλι RGB-blue μετά από διαχωρισμό προς ανάλυση - Πηγή: Συγγραφέας



Διάγραμμα 30. Συσχέτιση χρωματικής έντασης- απορρόφησης κοβαλτίου μετά από φωτογράφιση δειγμάτων.

Όπως φαίνεται στο παραπάνω διάγραμμα παρόλο που τα δείγματα δεν συμπίπτουν με τα αναμενόμενα αποτελέσματα στη γραμμή τάσης εξίσου καλά με τα προηγούμενα πειράματα, υπάρχει σαφή προσαρμογή πάνω σε αυτή δείχνοντας ικανοποιητικά αποτελέσματα, τα οποία σε επαναλήψεις με μικρότερο πειραματικό σφάλμα αναμένονται καλύτερα.

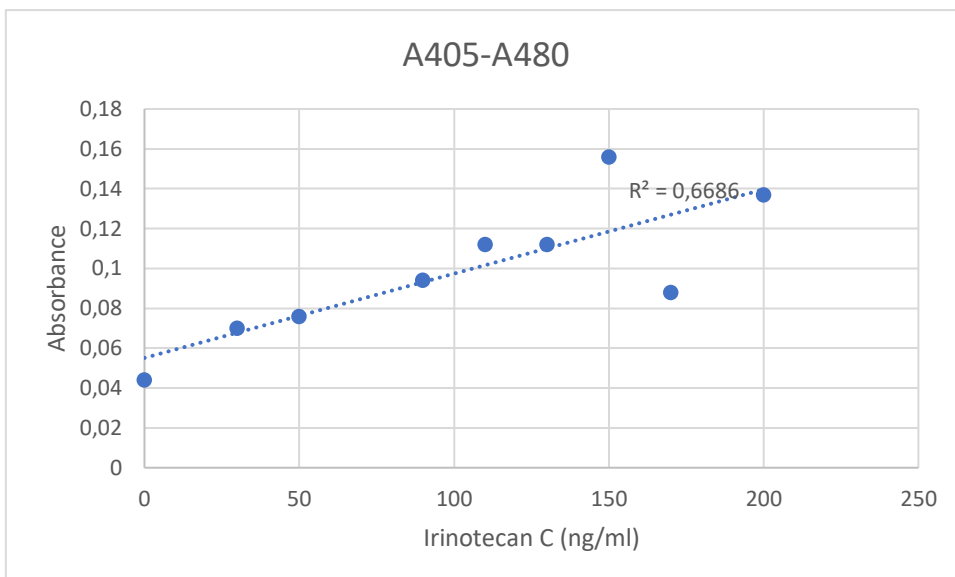
5.7 Δοκιμή προσδιορισμού ιρινοτεκάνης μετά από συμπύκνωση

Το συγκεκριμένο πείραμα έχει πραγματοποιηθεί με επιτυχία από το εργαστήριο και τα αποτελέσματά είναι υποβεβλημένα προς δημοσίευση σε άρθρο στο περιοδικό Applied Clay science. Η διαδικασία επαναλήφθηκε για του σκοπούς της διπλωματικής καθώς το πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται είναι το ίδιο με το πρωτόκολλο συμπύκνωσης που εξετάζεται για τα υπόλοιπα μόρια. (Η μέθοδος προσδιορισμού που ακολουθήθηκε μετά την συμπύκνωση βασίστηκε σε δημοσίευση Tsotsou et al. 2021) Προστίθενται 42mL H₂O σε falcon tube μαζί με 150μL bentone LT 2,6% και διαδοχικών αραιώσεων έτοιμου διαλύματος irinotecan. Επώαση με ανακίνηση για 50 λεπτά για καλύτερη προσρόφηση του μορίου στο bentonite. Μεταφορά του κάθε διαλύματος σε falcon tube 15mL. Φυγοκέντρηση 10 min σε 3.500 στροφές και απομάκρυνση του υπερκειμένου. Επανάληψη μέχρι να φυγοκε-

ντηθεί όλο το περιεχόμενο. Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 300μL ACN 25% για αποπροσρόφηση του δείγματος και επώαση 30 λεπτά ακολουθούμενη από φυγοκέντρηση. Η μέθοδος προσδιορισμού περιλαμβάνει έπειτα προσθήκη HCl (120μL / 1mL δείγματος) και όλο το υπερκείμενο σε κυψελίδες, αραιώση 1:2 με απιονισμένο νερό και μέτρηση A405-A480. Ο μηδενισμός γίνεται με τυφλό με απιονισμένο νερό.

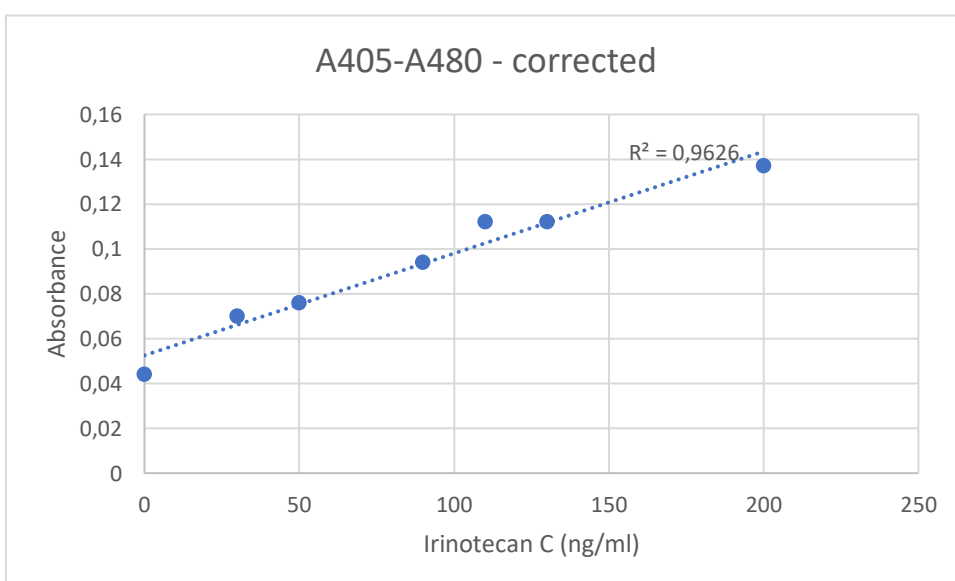
Πίνακας 22. Συγκεντρώσεις ιρινοπεκάνης στα δείγματα.

Δείγμα	C (ng/mL)	
1	0	
2	30	
3	50	
4	90	
5	110	
6	130	
7	150	χάθηκε περιεχόμενο
8	170	χάθηκε περιεχόμενο
9	200	



Διάγραμμα 31. Σύγκριση απορρόφησης- συγκέντρωσης ιρινοτεκάνης.

Το διάγραμμα οπτικά φαίνεται να παρουσιάζει καλή γραμμικότητα που επιβεβαιώνεται από τη βιβλιογραφία, με εξαίρεση τα 2 δείγματα όπου λόγω σφάλματος χάθηκε περιεχόμενο. Αντίθετα ο συντελεστής προσδιορισμού R^2 φαίνεται να δείχνει μικρή συσχέτιση των απορρόφησης συγκέντρωσης. Αφαιρώντας τα 2 αυτά δείγματα από τα αποτελέσματα όμως ο δείκτης φαίνεται να δείχνει πως τα δεδομένα ταιριάζουν πολύ καλύτερα στο μοντέλο παλινδρόμησης.



Διάγραμμα 31- Σύγκριση απορρόφησης- συγκέντρωσης ιρινοτεκάνης (διόρθωση).-

5.8 Δοκιμή φωτομετρικού και φωτογραφικού προσδιορισμού τοποτεκάνης μετά από συμπύκνωση

5.8.1 Δοκιμή προσδιορισμού τοποτεκάνης σε μείγμα διαφορετικών μορίων.

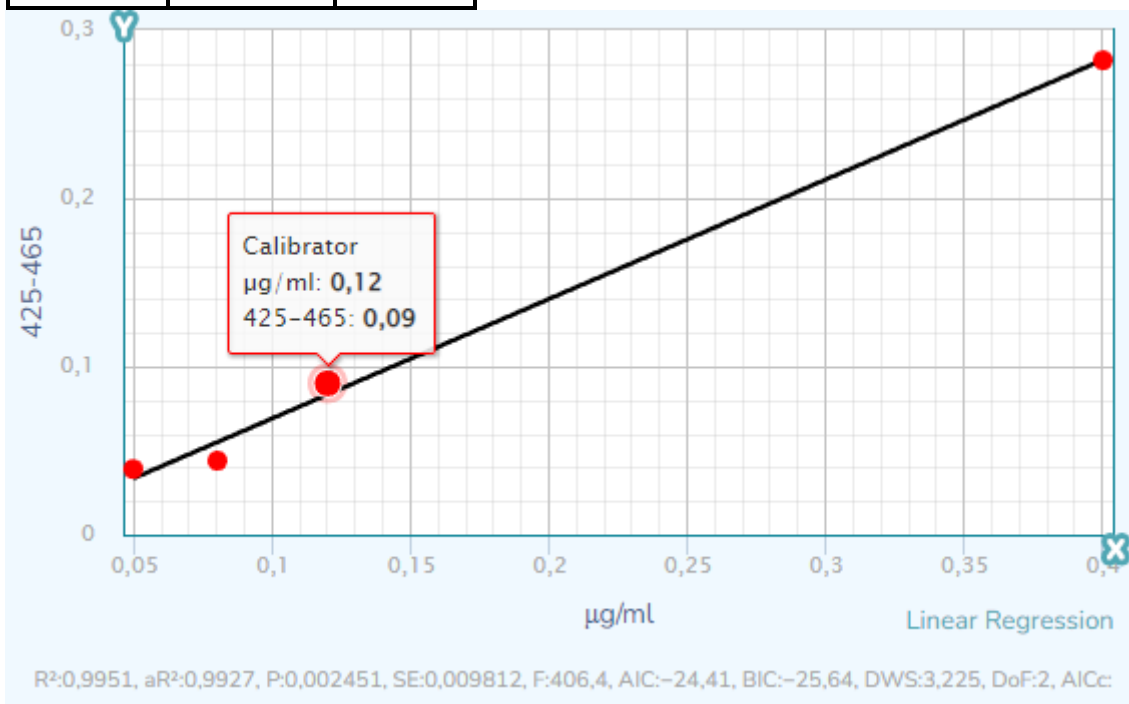
Στο συγκεκριμένο πείραμα προστέθηκαν σε σωλήνα falcon 45 mL H₂O, 150 μL bentone LT 2,6% και μια σειρά από διαφορετικές ουσίες σε συγκεντρώσεις κοντινές αυτών που παρουσιάζονται σε λύματα οι οποίες παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα. Μετά την προσθήκη, οι σωλήνες αναδεύονται για 50 λεπτά και ακολουθεί φυγοκέντρηση 5 λεπτών στις 3.600 στροφές και απόρριψη του υπερκειμένου με επανάληψη του τελευταίου βήματος μέχρι εξάντλησης του περιεχομένου των falcon tubes. Μετά την συγκέντρωση του ιζήματος γίνεται διαστρωματικός διαχωρισμός προσθέτοντας 400 μL ACN 25% και επώζοντας για μισή ώρα. Έπειτα γίνεται και πάλι φυγοκέντρηση σε ίδιες συνθήκες και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε κυβέττες όπου προστίθεται σε κάθε δείγμα 48μL HCl (μέθοδος βασισμένη σε Tsotsou et al., 2021). Μετράται η απορρόφηση σε A425-A605 μετά από μηδενισμό με τυφλό χωρίς τοποτεκάνη.

Πίνακας 23. Πίνακας συνθηκών προσθήκης των ουσιών του μείγματος

Substance	stock	dilution	μL	C
Cu(CH ₃ COOH) ₂	5g/100mL	1/100	120	1,3 mg/L
Uric Acid	0,5 mg/mL	1/1	112,5	1,25 μg/mL
CTAB	200 μg/mL	1/100	450	2 ng/mL
Co(nitrate) hexahydrate	10,61 mg/mL	1/1	21,22	5μg/mL

Πίνακας 24. Διαβάθμιση συγκεντρώσεων τοποτεκάνης στα δείγματα.

	Topotecan	λ
Δείγμα	μg/mL (4mg/mL stock)	425-465
1	0	0
2	0,05	0,039
3	0,08	0,044
4	0,12	0,09
5	0,25	lost sample
6	0,4	0,282



Διάγραμμα 32. Διάγραμμα απορρόφησης- συγκέντρωσης τοποτεκάνης σε μείγμα.

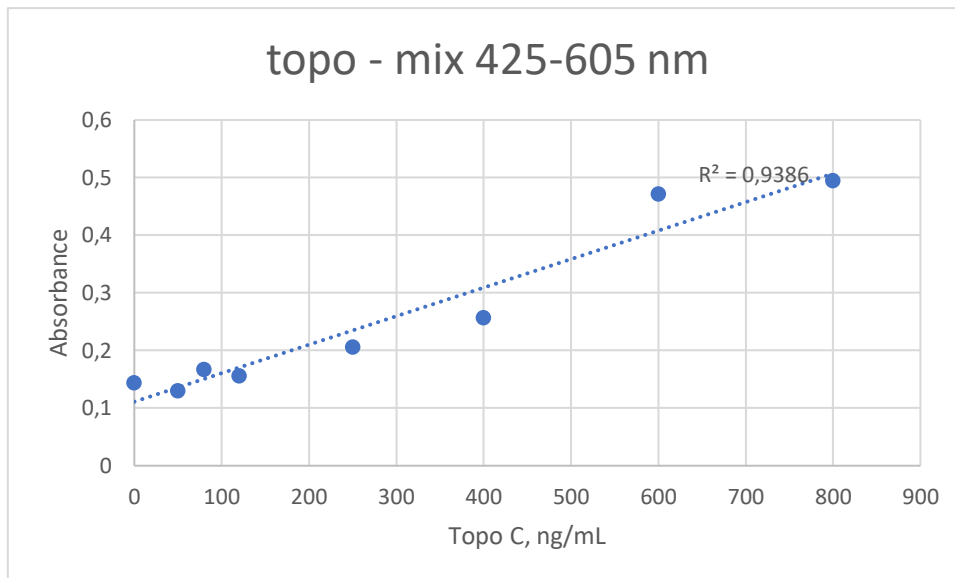
Φαίνεται από το παραπάνω διάγραμμα πως σε μείγμα πως υπάρχει γραμμική συσχέτιση η οποία μπορεί να ανιχνευθεί ικανοποιητικά με το πρωτόκολλο συμπύκνωσης σε μπεντονίτη ακόμα και σε μείγμα.

Έγινε μια δεύτερη επανάληψη του πειράματος για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων. Οι πειραματικές συνθήκες ήταν ίδιες με τη διαφορά ότι ο διαχωρισμός έγινε με 400 μL ACN 25% και 48 μL HCl. Επίσης ως τυφλό χρησιμοποιήθηκε H_2O προσθέτοντας ένα ακόμα σημείο στο διάγραμμα.

Πίνακας 25.. Συγκεντρώσεις τοποτεκάνης στα δείγματα.

Δείγμα	ng/mL
1	50
2	80
3	120
4	250
5	400
6	600
7	800
8	0

Όπως φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα υπάρχει ξεκάθαρη γραμμική συσχέτιση απέναντι στην απορρόφηση τοποτεκάνης και την συγκέντρωσή της στο μείγμα. Σημαντικό είναι να σημειωθεί πως το φάσμα απορρόφησης δεν παρουσίασε κορυφή μέχρι τα 250ng/mL συνεπώς δεν μπορούν να ληφθούν υπόψη οι συγκεντρώσεις από 120 ng/mL και κάτω.



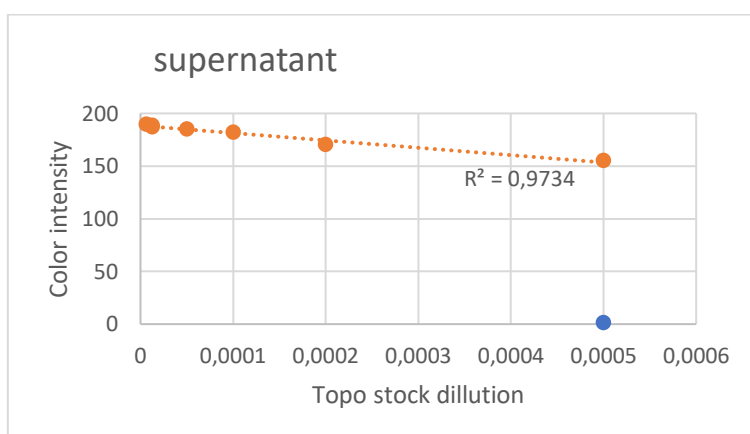
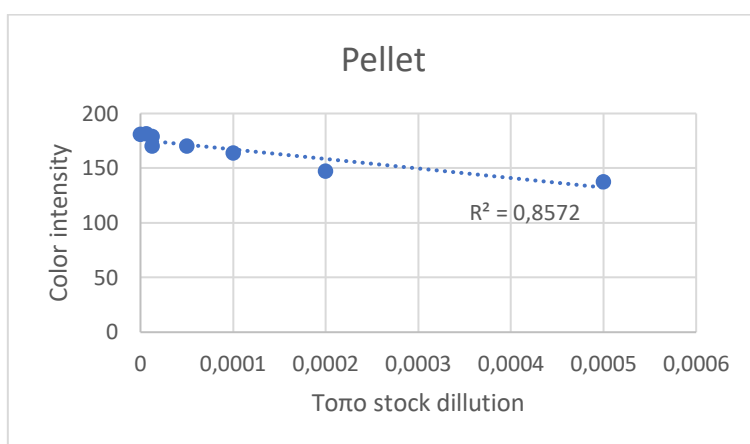
Διάγραμμα 33. Επανάληψη πειράματος προσδιορισμού τοποτεκάνης σε μείγμα – Διάγραμμα απορρόφησης- συγκέντρωσης.

5.8.2 Δοκιμή ανίχνευσης και προσδιορισμού τοποτεκάνης με φωτογραφική μέθοδο.

Η τοποτεκάνη έχει μεγάλη δομική συγγένεια με την ιρινοτεκάνη, παρουσιάζοντας γραμμική συσχέτιση συγκέντρωσης απορρόφησης. Για το συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε stock τοποτεκάνης 4 mg/mL από το οποίο διαβάθμιση συγκεντρώσεων προστέθηκε σε falcon tube με 45 mL H₂O και 200 μL bentone LT 2,6%. Μετά την προσθήκη, οι σωλήνες αναδεύονται για 50 λεπτά και ακολουθεί φυγοκέντριση 5 λεπτών στις 3.600 στροφές και απόρριψη του υπερκειμένου με επανάληψη του τελευταίου βήματος μέχρι εξάντλησης του περιεχομένου των falcon tubes. Μετά την συλλογή του ιζήματος γίνεται επαναιώρηση του σε 250 μL νερό και μεταφορά του σε πηγάδια ELISA. Τα πηγάδια ακολούθως φυγοκεντρώνονται και απορρίπτεται το υπερκείμενο. Έπειτα σε κάθε δείγμα προστίθενται 150μL HCl αραιωμένο 1:2. Φωτογραφήθηκαν τα δείγματα μαζί με υπερκείμενο και χωρίς (μετά από φυγοκέντριση. Το δείγμα 0 δεν εξετάστηκε.

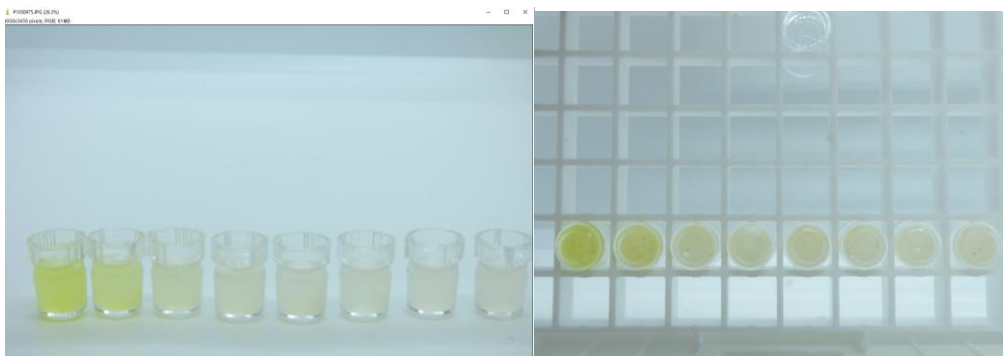
Πίνακας 26. Συγκεντρώσεις τοποτεκάνης σε δείγματα προς φωτογράφιση.

Δείγμα	Αραίωση stock	C (ng/mL)
1	1/2000	2000
2	1/5000	800
3	1/10000	400
4	1/20000	200
5	1/80000	50
6	1/80000	50
7	1/160000	25
0	0	0



(Πάνω) Διάγραμμα 34. Συσχετισμός χρωματικής έντασης- αραίωσης στο ίζημα. (Κάτω) Διάγραμμα 35. Συσχετισμός χρωματικής έντασης- συγκέντρωσης στο υπερκείμενο.

Όπως φαίνεται από τα διαγράμματα ο προσδιορισμός μέσω φωτογραφίας μπορεί να δώσει πολύ θετικά αποτελέσματα, εμφανίζοντας ξεκάθαρη γραμμικότητα ιδιαίτερα κατά την ανάλυση μαζί με το υπερκείμενο. Εξετάζοντας το γράφημα διασποράς φαίνεται πως μπορεί να ανιχνευθεί καθαρά η τοποτεκάνη μέχρι τα 200 ng/mL και με περισσότερη δυσκολία μέχρι τα 50 ng/mL. Συμπύκνωση από μεγαλύτερο αρχικό όγκο ίσως να δώσει πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα συγκεντρώνοντας μεγαλύτερη ποσότητα τοποτεκάνης με μεγαλύτερο δείκτη συμπύκνωσης.



Εικόνα 20 Φωτογράφιση τοποτεκάνης σε πηγάδια μικροτιτλοδότησης. Αριστερά: υπερκείμενο μαζί με ιζήμα. Δεξιά: απομονωμένο ιζήμα μετά από φυγοκέντρηση,

5.8.3 Δοκιμή προσδιορισμού τοποτεκάνης σε μείγμα με φωτογραφική μέθοδο

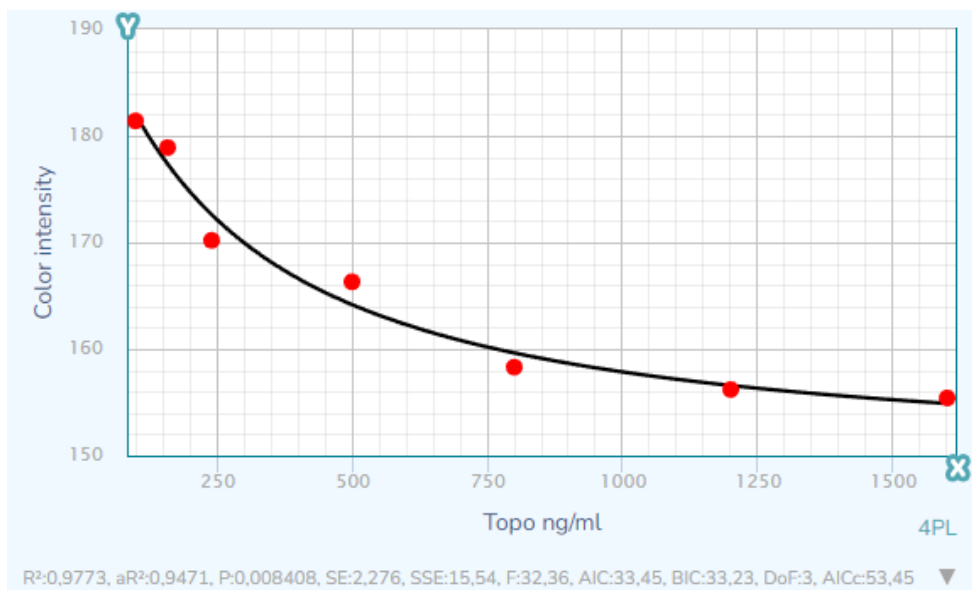
Παρόμοια με την προηγούμενη δοκιμή σε μείγμα, προστέθηκαν σε σωλήνα falcon 45 mL H₂O, 250 μL bentone LT 2,6% και μια σειρά από διαφορετικές ουσίες σε συγκεντρώσεις κοντινές αυτών που παρουσιάζονται σε λύματα ίδιες με αυτές της δοκιμασίας ανίχνευσης τοποτεκάνης σε μείγμα. Μετά την προσθήκη, οι σωλήνες αναδεύονται για 50 λεπτά και ακολουθεί φυγοκέντρηση 5 λεπτών στις 3.600 στροφές και απόρριψη του υπερκειμένου με επανάληψη του τελευταίου βήματος μέχρι εξάντλησης του περιεχομένου των falcon tubes.

Μετά την συλλογή του ιζήματος γίνεται επαναιώρηση του σε 250 μL νερό και μεταφορά του σε πηγάδια ELISA. Τα πηγάδια ακολούθως φυγοκεντρούνται και απορρίπτεται το υπερκείμενο. Έπειτα σε κάθε δείγμα προστίθενται 150 μL HCl αραιωμένο 1:2 και ακολουθεί φωτογράφιση κάτω από lightbox διπλής σειράς led μετά από φυγοκέντρηση και απόρριψη του υπερκειμένου. Η ανάλυση με το λογισμικό ImageJ έγινε σε μπλε απομονωμένο μπλε κανάλι και για συνολική χρωματική ένταση με παρόμοια αποτελέσματα. Τα

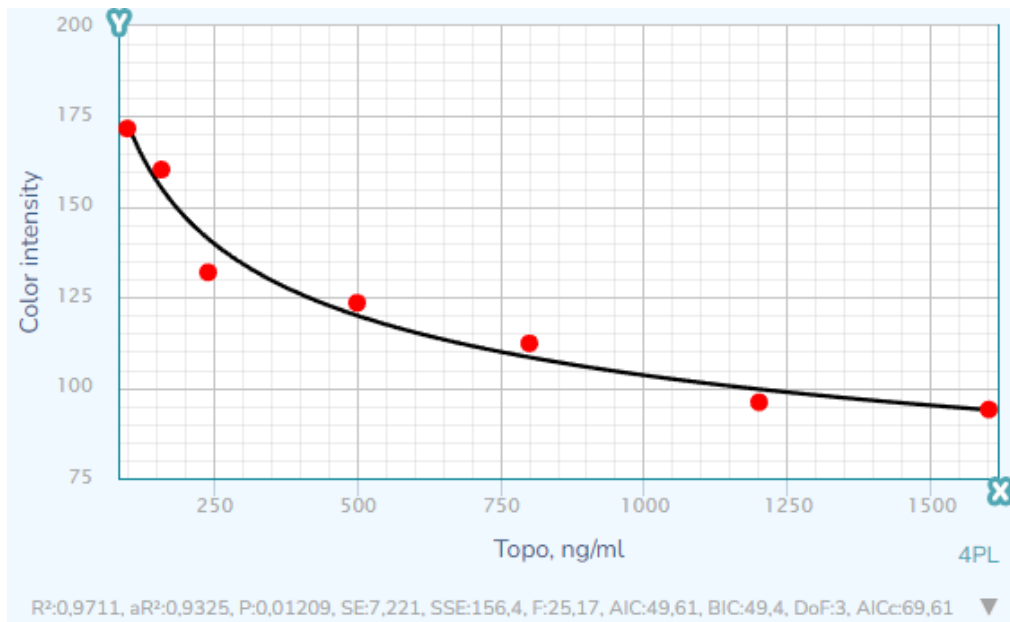
διαγράμματα δείχνουν συσχέτιση απορρόφησης και συγκέντρωσης τοποτεκάνης, διαφορετικής όμως μορφής από των προηγούμενων πειραμάτων με τάση κορεσμού στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Παρόλα αυτά η καμπύλη που κατασκευάστηκε μπορεί αποτελεσματικά να χρησιμοποιηθεί για ποσοτικό προσδιορισμό δειγμάτων. Από το διάγραμμα παρατηρούμε περιοχή γραμμικότητας 100-240 ng/ml. Η περιοχή αυτή περιλαμβάνει συγκεντρώσεις μικρότερες από τα όρια ανίχνευσης (published LOD = 0,2353 µg/ml) και ποσοτικοποίησης (published LOQ= 0,7131 µg/ml) επικυρωμένων μεθόδων (Saini et al., 2010).

Πίνακας 27. C torotecan σε μείγμα ουσιών για φωτογράφιση και προσδιορισμό.

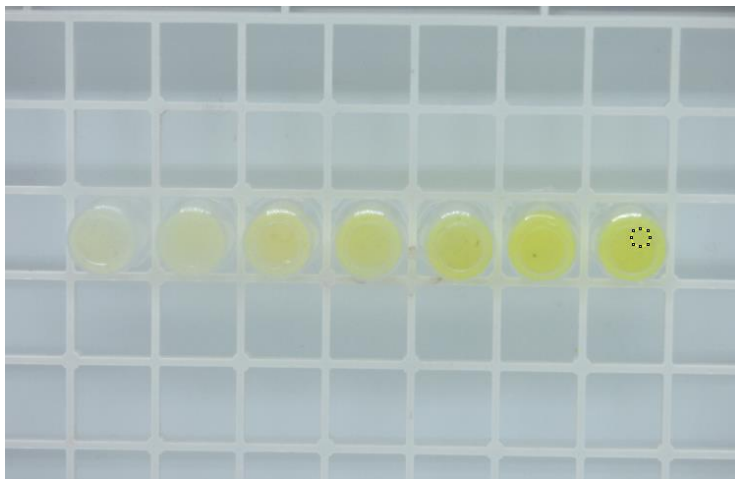
Σωλήνας	C (ng/mL)
1	100
2	160
3	240
4	500
5	800
6	1200
7	1600



Διάγραμμα 35. Γράφημα διασποράς χρωματικής έντασης



Διάγραμμα 36. Γράφημα διασποράς έντασης μπλέ καναλιού.



Εικόνα 21 Φωτογραφία ιζήματος τοποτεκάνης σε μείγμα διαφορετικών ουσιών μετά από επεξεργασία με χρωμογόνο. - Πηγή: συγγραφέας

5.9 Δοκιμή προσδιορισμού ουρικού οξέος με βάση το φωτογραφικό πρωτόκολλο

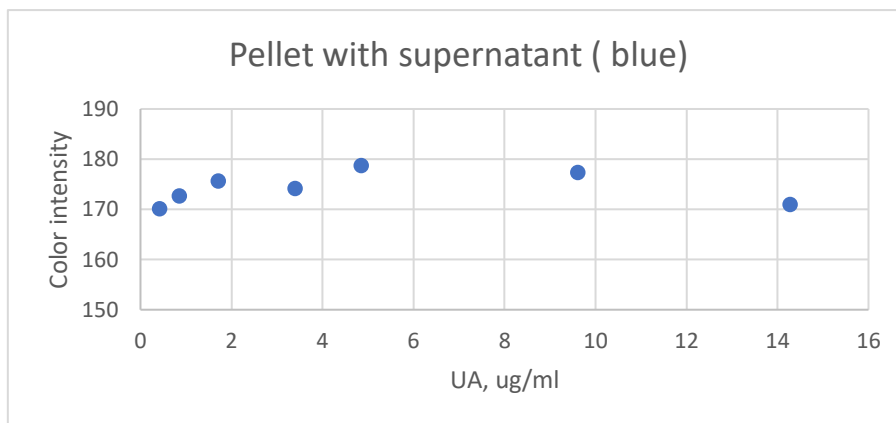
Για τον προσδιορισμό ουρικού οξέος προστέθηκαν 250 μL bentone LT 2,6% σε 15mL νερό με pH 2,7-2,75 ρυθμισμένο με HCl, μαζί με διαφορετικές συγκεντρώσεις. Γίνεται επώαση για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με έντονη ανάδευση. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά σε 3.500 rpm και απόρριψη του υπερκειμένου. Το ίζημα επαναιωρείται και μεταφέρεται σε αποσπασμένα πηγάδια από πλάκες μικροτιτλοδότησης, με μια ακόμα φυγοκέντρηση και απόρριψη του υπερκειμένου. Στα πηγάδια προστίθεται 250 μL Biosis WR

και επαναϊώρηση με πιπέτα, φωτογράφιση σε lightbox μετά από 5 λεπτά επώαση και φυγοκέντρηση. Ακολουθεί μεταφορά 150μL του υπερκειμένου σε διαφορετικά πηγάδια μικροτιτλοδότησης και απόρριψη του υπολοίπου και φωτογράφιση του ιζήματος που απομένει. Το υπερκείμενο που απομακρύνθηκε σε καινούρια πηγάδια διαβάζεται στα 492 nm (ιδανικό μήκος κύματος – 510 nm).

Πίνακας 28. Πίνακας συγκεντρώσεων ουρικού οξέος

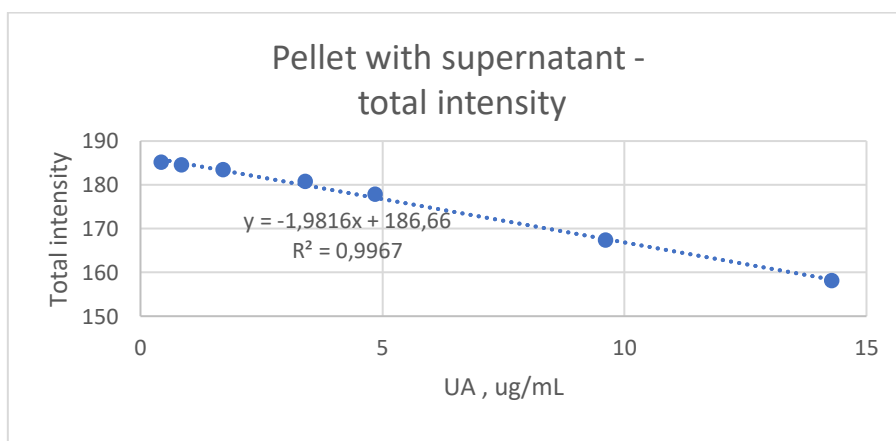
μL UA added	CUA, μg/mL
556,00	17,72896368
417,00	14,28062785
278,00	9,611194951
139,00	4,851859547
97,20	3,402661629
48,61	1,707443439
24,30	0,854994659
12,15	0,427860245
10	0,334602886
5	0,176162181

Για το υπερκείμενο μαζί με τον πηλό μετρήθηκε τόσο η ένταση του μπλε χρωματικού καναλιού όσο και η ολική ένταση. Δεν εντοπίστηκε καμία συσχέτιση κατά την ανάλυση του μπλε καναλιού οπότε απορρίφθηκε από επόμενες αναλύσεις ουρικού.

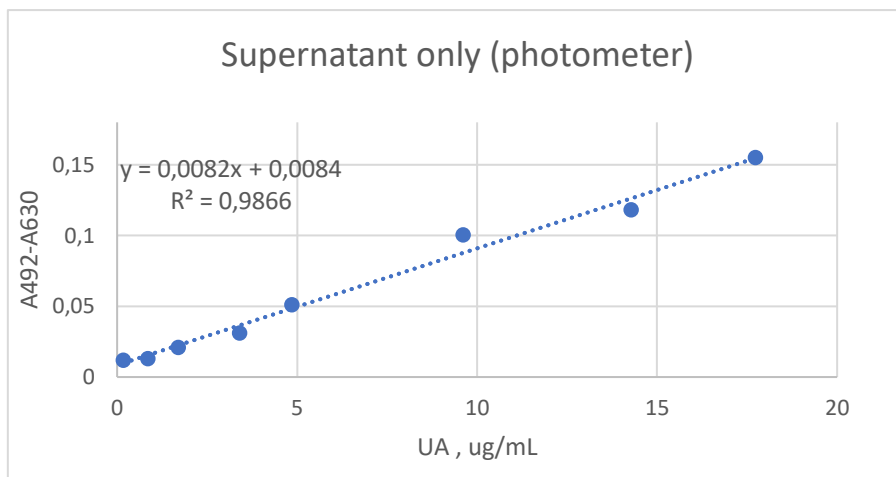


Διάγραμμα 36. Γράφημα διασποράς χρωματικής έντασης μπλε καναλιού και συγκέντρωσης ουρικού οξέος-ίζημα μαζί με υπερκείμενο.

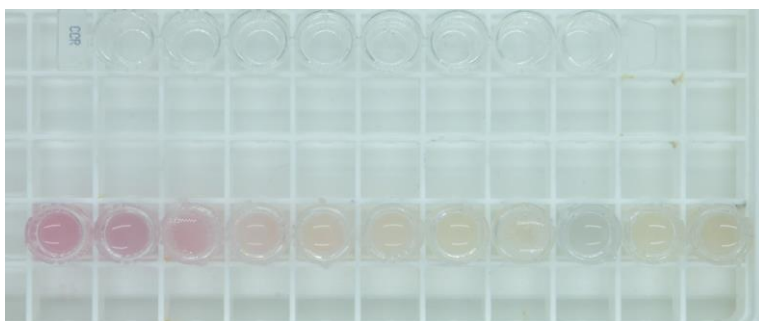
Από τη βιβλιογραφία έχει εντοπιστεί γραμμική συσχέτιση συγκέντρωσης ουρικού οξέος σε ορό με διαφορετική βέβαια μέθοδο (Matsubara et al., 1994) όπως και στη φωτομετρική μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε εδώ. Χρήσιμο είναι να επαναληφθεί πως η τιμή της χρωματικής έντασης μειώνεται όσο πιο σκούρα είναι η χροιά και συνεπώς τα διαγράμματα είναι της ίδιας μορφής με τα αντίστοιχα φωτομετρικών μεθόδων με αντίθετη όμως κλίση. Μετρώντας την συνολική ένταση φαίνεται πως υπάρχει πολύ ξεκάθαρη συσχέτιση μεταξύ έντασης και συγκέντρωσης ουρικού οξέος. Μετρώντας την ένταση του υπερκειμένου στο φωτόμετρο βλέπουμε μια αντίστοιχα καλή εικόνα. Στα διαγράμματα περιλαμβάνονται οι συγκεντρώσεις μέχρι 0,427 μg/mL καθώς η μέθοδος δεν μπόρεσε να διακρίνει χαμηλότερα αποτελεσματικά.



Διάγραμμα 37. Γράφημα διασποράς χρωματικής έντασης και συγκέντρωσης ουρικού οξέος-ίζημα μαζί με υπερκείμενο.



Διάγραμμα 38. Συσχετισμός απορρόφησης και συγκέντρωσης ουρικού οξέος με την εξεταζόμενη μέθοδο- μέτρηση σε πηγάδια μικροτιτλοδότησης.



Εικόνα 22 Πηγάδια μικροτιτλοδότησης με ουρικό οξύ πριν την απομάκρυνση του υπερκευμένου.-Πηγή- συγγραφέας

Η ανάλυση της φωτογραφίας με απομονωμένο ίζημα bentone παρουσιάζει επίσης μια πολύ ικανοποιητική εικόνα ως προς την συσχέτιση έντασης- συγκέντρωσης, ελαφρώς χειρότερη από την προηγούμενη πιθανώς λόγω της ίδιας της φωτογραφίας. Η γραμμικότητα είναι βέβαια αρκετά ικανοποιητική ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί με ασφάλεια για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ένωσης. Σύμφωνα με την Biosis, το όριο ανίχνευσης του προσδιορισμού υπολογίστηκε ότι αντιστοιχεί με 0,2 mg/dl ή 2 μg/mL. Η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε εδώ έχει όριο ανίχνευσης τουλάχιστον 0,43 μg/mL το οποίο είναι 4,65 φορές μικρότερο από την μεθοδολογία την Biosis.

5.10 Συζήτηση

Η ανάπτυξη έγκυρων και γρήγορων μεθόδων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης ρυπαντών όπως είχε ως στόχο η διπλωματική αυτή, είναι ιδιαίτερως σημαντική σε ένα διαρκώς βιομηχανοποιούμενο περιβάλλον, όπου όλο και περισσότεροι άνθρωποι αναγκάζονται να ζήσουν σε περιοχές όπου η ποιότητα του περιβάλλοντος επηρεάζει αρνητικά την υγεία. Σε πρόσφατη δημοσίευση (2017) του πανεπιστημίου Princeton, βρέθηκε σχέση μεταξύ της ζωής σε μη αναβαθμισμένες γειτονιές, όπου οι κώδικες υγιεινής δεν επιβάλλονται και δεν ελέγχονται επαρκώς τα επίπεδα ρύπων σε ατμόσφαιρα και υδάτινο ορίζοντα, και της ανάπτυξης άσθματος στους κατοίκους τους, και ιδιαίτερα στα παιδιά. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν παρουσιαστεί σε δημοσιεύσεις αναφερόμενες σε περιοχές μικρού και μεσαίου επιπέδου εισοδήματος, τονίζοντας τα προβλήματα υγείας που μπορεί να προκύψουν λόγω ρυπαντών στο περιβάλλον (Kordas et al., 2018; Briffa, Sinagra and Blundell, 2020, Zou et al., 2017).

Με βάση τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν, φαίνεται ξεκάθαρα πως το μελετώμενο πρωτόκολλο προσρόφησης μορίων και μέσω της χρήσης bentone LT και συμπύκνωσής τους σε αυτό, είναι ικανό να χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα για τον προσδιορισμό συγκεντρώσεων πλήθους μορίων σε συγκεντρώσεις σε κάποιες περιπτώσεις ακόμα και μικρότερες από τις αντίστοιχες ήδη επικυρωμένων μεθόδων. Αποδείξαμε μέσω των δοκιμών που πραγματοποιήθηκαν κατά την εκπόνηση της διπλωματικής αυτής εργασίας πως με το συγκεκριμένο πρωτόκολλο (Tsotsou, Mavroeidis and Georgiou, 2022) τα εξεταζόμενα μόρια μπορούν να προσροφηθούν από το bentone LT από υδατικά διαλύματά τους καθώς και πως μετά τον διαχωρισμό των μορίων από το υβρίδιο εκτορίτη στο οποίο προσροφήθηκαν, τα μόρια αυτά βρίσκονται σε κατάλληλη διαμόρφωση ώστε να συμμετέχουν στις αντιδράσεις προσδιορισμού που επιλέχθηκαν από τη βιβλιογραφία. Συνοψίζοντας στον πίνακα 28, η μέθοδος συμπύκνωσης που ακολουθήθηκε φαίνεται να λειτουργεί αποτελεσματικά στην πλειονότητα των εξεταζόμενων μορίων με ικανοποιητική προσρόφηση των μορίων και έπειτα απελευθέρωσή τους με διαστρωματικό διαχωρισμό των φύλλων bentone LT. Η περιοχές γραμμικότητας που βρέθηκαν κατά την ποσοτικοποίησή περιλαμβάνουν σε ορισμένες περιπτώσεις συγκεντρώσεις μικρότερες από τις αντίστοιχες δημοσιευμένων μεθόδων και σε κάθε περίπτωση είναι αρκετά χαμηλές ώστε να χρησιμοποιηθούν

ευρέως για προσδιορισμό των συγκεκριμένων μορίων. Η συγκεκριμένη διπλωματική επικεντρώθηκε στην εξέταση της αποτελεσματικότητας των πρωτοκόλλων σε κάθε μόριο και όχι στην καθολική βελτιστοποίηση της διαδικασίας. Επιπλέον δοκιμές όπως πειράματα με στόχο τη βελτιστοποίηση των χρόνων επώασης για κάθε μόριο ή η χρήση μεγαλύτερης αρχικής ποσότητας αγνώστου διαλύματος μπορεί να οδηγήσουν σε ακόμα μεγαλύτερο εύρος ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης αυτών. Η γραμμική περιοχή που βλέπουμε να αποδίδει το φωτογραφικό πρωτόκολλο περιλαμβάνει, στην πλειονότητα των περιπτώσεων, μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από αυτές που ανιχνεύονται φωτομετρικά. Στα πλαίσια ανάπτυξης του πρωτοκόλλου αυτού επικεντρωθήκαμε στην επιτυχή ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των μορίων περισσότερο από την εύρεση των ελάχιστων συγκεντρώσεων που μπορούν να ανιχνευτούν, συνεπώς δεν έχουν εξεταστεί αρκετά χαμηλές συγκεντρώσεις ώστε να γίνει σύγκριση μεταξύ των δύο τεχνικών. Στις περιπτώσεις όπου έχουν εξεταστεί συγκεντρώσεις εξίσου μικρές, η μέθοδος αυτή παρουσιάζει πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα, όπως στην περίπτωση του ουρικού οξέος.

Πίνακας 26. Παρουσίαση περιοχής γραμμικότητας κάθε εξεταζόμενης ουσίας.

Ουσία	Περιοχή γραμμικότητας	
	Φωτομετρική μέθοδος	Φωτογραφική μέθοδος
Fe(III)	0,095832 -0,1452μg/mL	δεν πραγματοποιήθηκε
Pb(II)	ανεπαρκής διάλυση ιζήματος	δεν πραγματοποιήθηκε
Ag(I)	0,025 -0,09mg/mL	δεν πραγματοποιήθηκε
Cu(II)	1,5- 6,25 μg/mL	100-500 μg/mL
Μτ red (όξινο pH)	0,197-1,21 μg/mL	1,64- 16,4 μg/mL
Μτ red (αλκαλικό pH)	0,03-0,197 μg/mL / 0,197-1,97μg/mL	1,64-16,4 μg/mL
Co(II)	0,17-0,885 μg/ml	0,53- 10μg/mL
Co(II) (μείγμα)	0,5-2 μg/mL	δεν πραγματοποιήθηκε
ιρινοτεκάνη	30-200 ng/mL	δεν πραγματοποιήθηκε
Τοποτεκάνη	δεν πραγματοποιήθηκε	50-2000 ng/mL
Τοποτεκάνη (μείγμα)	250-800 ng/mL	100-240 ng/mL
ουρικό οξύ	0,43 - 17,7 μg/mL	0,43 - 17,7 μg/mL

Είναι χρήσιμο να σημειωθεί ότι η χρήση καταλληλότερου εξοπλισμού, πιθανή επανάληψη των πρωτοκόλλων που εφαρμόστηκαν στη συγκεκριμένη εργασία να δώσει καλύτερα αποτελέσματα, καθώς οι απώλειες θα είναι μικρότερες και συνεπώς τα αποτελέσματα πιθανόν να αντικατοπτρίζουν την πραγματικότητα με μεγαλύτερη πιστότητα.

Το πρωτόκολλο ανίχνευσης και προσδιορισμού μέσω ανάλυσης φωτογραφιών των δειγμάτων και ανάλυσής τους, κατά το οποίο άγνωστα δείγματα ουσιών φωτογραφίζονται μαζί με δείγματα γνωστών συγκεντρώσεων και οι φωτογραφίες αυτές αναλύονται με χρήση λογισμικού επεξεργασίας φωτογραφιών, παρουσιάζει πολύ ενθαρρυντικά αποτελέσματα, με έγκυρη ανίχνευση συγκεντρώσεων διαφόρων ουσιών και μεθοδολογία τυποποιημένη με μόνες διαφορές κατά την επιλογή χρωματικού καναλιού προς επεξεργασία. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά το πρωτόκολλο φαίνεται έτοιμο να περάσει σε επόμενη φάση προσδιορισμού μορίων άμεσα σε λύματα.

Αναφορές

- Bhattacharyya, K. and Gupta, S., 2008. Adsorption of a few heavy metals on natural and modified kaolinite and montmorillonite: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 140(2), pp.114-131.
- Chabot, G., 1997. Clinical Pharmacokinetics of Irinotecan. *Clinical Pharmacokinetics*, 33(4), pp.245-259.
- Chabot, G., Robert, J., Lokiec, F. and Canal, P., 1998. *Pharmacocinétique De L'irinotecan..* [online] Lissa.fr. Available at: <https://www.lissa.fr/rep/articles/9932079> [Accessed 12 August 2022].
- Crawford, R., 1981. *Lignin biodegradation and transformation*. New York: John Wiley and Sons, pp.19-21.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2022. *Toxicological Profile for Copper (Draft for Public Comment)*. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2020. *Toxicological profile for Lead*. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.
- Cordell, G., 2003. *The Alkaloids: Chemistry And Biology*. California: Academic Press, pp.1-50.
- Islam, M., Khan, M., Biswas, S., Rabia Choudhury, T., Haque, P., U Rashid, T. and Mizanur Rahman, M., 2017. *Preparation and characterization of bijoypur clay-crystalline cellulose composite for application as an adsorbent*. *Advanced Material Science*, [online] 2(3). Available at: <https://www.oatext.com/preparation-and-characterization-of-bijoypur-clay-crystalline-cellulose-composite-for-application-as-an-adsorbent.php> [Accessed 12 August 2022].
- Lenntech, No date. Iron (Fe) - Chemical properties, health and environmental effects. Available at: <https://www.lenntech.com/periodic/elements/fe.htm> [Accessed 15 July 2022].
- Klockmann, F., 1978. *Klockmanns Lehrbuch Der Mineralogie*. 16th ed. Ramdohr P., Strunz H. Stuttgart: Enke, p.753.
- Kundra, S., Katyal, M. and Singh, R., 1974. Spectrophotometric determination of copper(I) and cobalt(II) with ferrozine. *Analytical Chemistry*, [online] 46(11), pp.1605-1606. Available at: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac60347a022> [Accessed 14 July 2022].
- Magni V. and Király Á., 2020. Delamination. *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.09515-4>
- Maki, K., Sagara, J., and Kawai, A., 1991. A cationic detergent, cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), selectively dissociates the intermediate filament of the fibroblast. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 175(3), pp.768–774. 10.1016/0006-291x(91)91632-m
- Malbin, B., Barbosa, J. and Lin, X., 2018. A Novel Approach Using ImageJ Analysis to Quantitatively Define Sickle Cell Retinopathy Lesions Pre-to-Post Treatment. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, [online] 59(1703). Available at: <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2690056> [Accessed 6 July 2022].
- Matsubara, C., Yokoi, Y., Nakamichi, N. and Takamura, K., 1994. Spectrophotometric Determination of Uric Acid in Serum Using a Titanium (IV)-Porphyrin Complex. *Yakugaku*

- zasshi*, [online] 114(1), pp.48-53. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8133459/> [Accessed 5 June 2022].
- Pommier Y., 2013. Drugging topoisomerases: lessons and challenges. *ACS Chem. Biol.* 8 (1): pp.82–95. 10.1021/cb300648v
- Saary, J., Qureshi, R., Palda, V., DeKoven, J., Pratt, M., Skotnicki-Grant, S. and Holness, L., 2005. A systematic review of contact dermatitis treatment and prevention. *Journal of the American Academy of Dermatology*, [online] 53(5), pp.845-845.. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16243136/> [Accessed 2 April 2022].
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., and Eliceiri, K. W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), pp. 671–675. 10.1038/nmeth.2089
- Soleimani, M., Rafiei, B. and Siahpoosh, Z., 2015. Ghezeljeh montmorillonite nanoclay as a natural adsorbent for solid phase extraction of copper ions from food samples. *Journal of Analytical Chemistry*, 70(7), pp.794-803. 10.1134/S1061934815070084.
- Tsotsou, G. E., Mavroeidis, P., & Georgiou, J. S., 2022. Adsorption onto hybrid hectorite-hydroxyethyl cellulose composite as a pre-concentration method for the spectrophotometric quantification of a cationic organic molecule, irinotecan. *Applied Clay Science*, 230, 106694. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2022.106694>
- Tsotsou, G.E., Gkotzamani, P., Petro, V., Argyropoulou, A., Karkalousos, P., 2021. A simple, rapid and low-cost spectrophotometric method for irinotecan quantification in human plasma and in pharmaceutical dosage forms. *Anal. Methods* 13, pp.258–266. <https://doi.org/10.1039/D0AY02201B>
- Updegraff D. M., 1969. Semimicro determination of cellulose in biological materials. *Analytical Biochemistry*. 32 (3) pp.420–424. 10.1016/S0003-2697(69)80009-6.
- Zhang, J., Zhou, C.H., Petit, S. and Zhang, H., 2019. Hectorite: Synthesis, modification, assembly and applications. *Applied Clay Science* 177, 114–138. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2019.05.001>
- Kunz, R., Amschler, S., Edenharter, A., Mayr, L., Herlitz, S., Rosenfeldt, S. and Breu, J., 2020. Giant multistep crystalline vs. osmotic swelling of synthetic hectorite in aqueous acetonitrile. *Clays and clay minerals*. 67, 481–487 [online] SpringerLink. Available at: <https://link.springer.com/article/10.1007/s42860-019-00046-9> [Accessed 14 May 2022].
- Adebayo, B. K. Ayejuyo S., Okoro H.K. and Ximba B.J., 2011. *Spectrophotometric determination of iron (III) in tap water using 8-hydroxyquinoline as a chromogenic reagent* | African Journal of Biotechnology. 10 , 71, Available at: <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/97600> [Accessed 8 September 2022].
- Adeniyi, O., and Mashazi, P., 2022. Kirigami paper-based colorimetric immunosensor integrating smartphone readout for determination of humoral autoantibody immune response. *Microchemical Journal*, 178, 107427. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107427>
- Alizadeh, N., Salimi, A., and Hallaj, R., 2019. Mimicking peroxidase-like activity of Co₃O₄-CeO₂ nanosheets integrated paper-based analytical devices for detection of glucose with smartphone. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 288, pp.44–52. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.01.068>
- Allwood M, Stanley A and Wright P., 2002. *The Cytotoxics Handbook*. Abingdon: Radcliffe Medical Press; 2002.

- Briffa, J., Sinagra, E., and Blundell, R., 2020. Heavy metal pollution in the environment and their toxicological effects on humans. *Heliyon*, 6(9), e04691. 10.1016/j.heliyon.2020.e04691 10.1016/j.heliyon.2020.e04691
- Clarke, J.D., 2009. Cetyltrimethyl Ammonium Bromide (CTAB) DNA Miniprep for Plant DNA Isolation. *Cold Spring Harbor Protocols*. (3). 10.1101/pdb.prot5177. ISSN 1940-3402.
- Coleman, B., Coarsey, C., and Asghar, W., 2019. Cell Phone based Colorimetric Analysis for Point-of-Care Settings. *The Analyst*. 6. 10.1039/c8an02521e
- Daughton C.G. and Ternes T.A., 1999. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environmental Health Perspect* 107
- De Marchi, G., Canepa, B., Braggio, F. and Randi, G., 1991. Analysis of Pollution Monitoring by expert systems. *Environmental Monitoring and Assessment*, 19(1-3), pp.539–547.
- Dias, T.R. and Reis, B.F., 2012. A led based photometer for solid phase photometry: Zinc determination in pharmaceutical preparation employing a multicommuted flow analysis approach. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23(8), pp.1515–1522.
- Scholar, E., 2007. Topotecan. *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, [online] pp.1–6. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080552323627850> [Accessed 5 Sep. 2022].
- National Center for Biotechnology Information (NCBI), 2022a. *PubChem Compound Summary for CID 10303, Methyl red*. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methyl-red> . Accessed Sept. 14, 2022.
- Sigmaaldrich, 2022. *Methyl red ACS reagent, crystals 493-52-7*. [online] ACS reagent, crystals 493-52-7. Available at: <https://www.sigmaaldrich.com/GR/en/product/sial/250198> [Accessed 15 July 2022].
- WHO, 2002. Concise International Chemical Assessment Document 44. Silver and silver compounds: environmental aspects. *International Programme on Chemical Safety (IPCS)*.. Available at: https://www.researchgate.net/publication/287386982_Concise_International_Chemical_Assessment_Document_44_Silver_and_silver_compounds_Environmental_aspects [Accessed 20 Aug. 2022].
- Islam, M.M., Khan, M.N., Biswas, S., Rabia Choudhury, T., Haque, P., U Rashid, T. and Mizanur Rahman, M., 2017. Preparation and characterization of Bijoypur clay-crystalline cellulose composite for application as an adsorbent. *Advanced Material Science*, 2(3). 10.15761/ams.1000126.
- Islam, M.Z., Noori, A., Islam, R., Azim, M.A. and Quraishi, S.B., 2012. Assessment of the contamination of trace metal in Balu River water, Bangladesh. *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, [online] 4(14), pp.242–249. Available at: <http://www.academicjournals.org/JECE> [Accessed 3 Jul. 2022].
- Ismadji, S., Soetaredjo, F.E. and Ayucitra, A., 2015. Modification of clay minerals for adsorption purpose. *SpringerBriefs in Molecular Science*, pp.39–56. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16712-1_3
- Aronson, J.K. ed., 2016. Cytotoxic and Immunosuppressant Drugs. *Meyler's Side Effects of Drugs 16th edition.*, pp.800–808.
- Khan, M. and Syer, K., 1979. Spectrophotometric Determination of Cobalt (II). *Chemical Society of Pakistan*, [online] 1, pp.73–74. Available at: https://www.academia.edu/21246063/Spectrophotometric_Determination_of_Cobalt_II [Accessed 23 Jun. 2022].

- Koohkan, R., Kaykhaii, M., Sasani, M. and Paull, B., 2020. Fabrication of a smartphone-based spectrophotometer and its application in monitoring concentrations of organic dyes. *ACS Omega*, 5(48), pp.31450–31455. 10.1021/acsomega.0c05123
- Kordas, K., Ravenscroft, J., Cao, Y., and McLean, E. V., 2018. Lead Exposure in Low and Middle-Income Countries: Perspectives and Lessons on Patterns, Injustices, Economics, and Politics. *International journal of environmental research and public health*, 15(11). 10.3390/ijerph15112351
- Kumar, A.S.K., Kalidhasan, S., Rajesh, V. and Rajesh, N., 2012. Application of Cellulose-Clay Composite Biosorbent toward the Effective Adsorption and Removal of Chromium from Industrial Wastewater. *Ind. Eng. Chem. Res.* 51, 58–69. <https://doi.org/10.1021/ie201349h>
- Lagaly G., Ogawa M. and Dékány I., 2006. Clay Mineral Organic Interactions, In: Bergaya F., Theng B., Lagaly G. , *Developments in Clay Science*, 1, Ch.7.3 pp. 309-377, [https://doi.org/10.1016/S1572-4352\(05\)01010-X](https://doi.org/10.1016/S1572-4352(05)01010-X)
- Lauwerys, R., and Lison, D., 1994. Health risks associated with cobalt exposure — an overview. *Science of The Total Environment*, 150(1-3), pp. 1-6. 10.1016/0048-9697(94)901252
- Leyssens, L., Vinck, B., Van Der Straeten, C., Wuyts, F., and Maes, L., 2017. Cobalt toxicity in humans—A review of the potential sources and systemic health effects. *Toxicology*, 387, pp.43–56. 10.1016/j.tox.2017.05.015
- Lillesand, T.M., Scarpace, F. and Clapp, J.L., 1974. Photographic quantification of water quality in mixing zones. *Annual Meeting of the American Society of Photogrammetry*. [online] Available at: https://www.researchgate.net/publication/23586709_Photographic_quantification_of_water_quality_in_mixing_zones [Accessed 1 Sep. 2022].
- Lokiec, F., du Sorbier, B. M., and Sanderink, G. J., 1996. Irinotecan (CPT-11) metabolites in human bile and urine. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2(12), pp. 1943–1949. [online] Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9816153/> [Accessed 1 Sep. 2022]
- Martin S. and Griswold W., 2009. Human Health Effects of Heavy Metals. *Environmental Science and Technology Briefs for Citizens*, 15, 1-6. [pdf] Available at: <https://www.engg.ksu.edu/chsr/files/chsr/outreach-resources/15HumanHealthEffectsOfHeavyMetals.pdf> [Accessed 1 Sep. 2022]
- Michael-Kordatou, I., Karaolia, P. and Fatta-Kassinos, D., 2020. Sewage analysis as a tool for the COVID-19 pandemic response and management: The urgent need for optimised protocols for SARS-COV-2 detection and quantification. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8(5). 10.1016/j.jece.2020.104306.
- Hoeltz, M., Welke, J.E., Noll, I.B. and Dottori, H.A., 2010. Photometric procedure for quantitative analysis of aflatoxin B1 in peanuts by thin-layer chromatography using charge coupled device detector. *Química Nova*, 33(1), pp.43–47. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000100009>
- Minamisawa, R.A., Santos, L.E., Parada, M.A., Daghasanli, K.R., Ciancaglini, P. and De Almeida, A., 2007. Digital Image Analysis to standardize a photometric method in colorimetric quantification. *Instrumentation Science & Technology*, 36(1), pp.97–104. 10.1080/10739140701750086.
- Mohammadi, M.J., Khaniabadi, Y.O., Basiri, H., Amrani, A., Nourmoradi, H., Momtazan, M., Sadeghi, S., Gholami-borujeni, F., Charkhloo, E., Jorfi, S., Takdastan, A., Yari, A.,

- Olfati, D., Keishams, F. and Shegerd, M., 2022. Montmorillonite as adsorbent for the removal of methyl red from aqueous solution. *Fresenius Environmental Bulletin* [online] Research Gate. Available at: <https://www.researchgate.net/publication/316609729_MONTMORILLONITE_AS_ADSORBENT_FOR_THE_REMOVAL_OF_METHYL_RED_FROM_AQUEOUS_SOLUTION> [Accessed 1 Sep. 2022].
- Mondal, B., Adak, A. and Datta, P., 2018. Effect of operating conditions and interfering substances on photochemical degradation of a cationic surfactant. *Environmental Technology*, 39(21), pp.2771–2780. <https://doi.org/10.1080/09593330.2017.1365943>
- National Center for Biotechnology Information (NCBI), 2022. PubChem Compound Summary for CID 60838, Irinotecan. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Irinotecan>. [Accessed 14 July 2022]
- Pandey, D., Verma, S., Verma, P., Mahanty, B., Dutta, K., Daverey, A. and Arunachalam, K., 2021. SARS-COV-2 in wastewater: Challenges for developing countries. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 231, p.113634. 10.1016/j.ijheh.2020.113634.
- Princeton University, Woodrow Wilson School of Public and International Affairs., 2017. Study links unhealthy segregated neighborhoods to childhood asthma. *Science-Daily*. [online] Available at www.sciencedaily.com/releases/2017/08/170807111454.htm [Accessed 1 Sep. 2022]
- Rabii, F.W., Segura, P.A., Fayad, P.B. and Sauv e, S., 2014. Determination of six chemotherapeutic agents in municipal wastewater using online solid-phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Science of The Total Environment*, 487, pp.792–800. 10.1016/j.scitotenv.2013.12.050
- Raza, A. , Khan, H. , Alom, N.and Haq, M., 2019. To Determine the Concentration Of Cobalt (II) In The Cobalt (II) Nitrate Hexahydrate Solution by UV-Visible Spectroscopy. *IOSR Journal of Applied Chemistry*. 12. pp. 22-27. 10.9790/5736-1212012227
- Rezazadeh, M., Seidi, S., Lid, M., Pedersen-Bjergaard, S. and Yamini, Y., 2019. The modern role of smartphones in Analytical Chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 118, pp.548–555. 10.1016/j.trac.2019.06.019
- Rueden, C. T., Schindelin, J., Hiner, M. C., DeZonia, B. E., Walter, A. E., Arena, E. T., and Eliceiri, K. W., 2017. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics*, 18(1). 10.1186/s12859-017-1934-z 10.1186/s12859-017-1934-z
- Safarik, I., Baldikova, E., Prochazkova, J., and Pospiskova, K., 2019. Smartphone-based image analysis for evaluation of magnetic textile solid phase extraction of colored compounds. *Heliyon*, 5(12). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02995>
- Saini, P. K., Jain, C. L., Singh, R. M., Mathur, S. C., and Singh, G. N., 2010. Development and Validation of a RP-Ultra performance liquid chromatographic Method for Quantification of Topotecan Hydrochloride in Bulk and Injection Dosage Form. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 72(4), pp.494–497. <https://doi.org/10.4103/0250-474X.73925>
- Santoso, S., Kurniawan, A., Edi-Soetaredjo, F., Cheng, kuan-C., Putro, J., Ismadji, S., and Ju, Y.H., 2019. Eco-friendly cellulose–bentonite porous composite hydrogels for adsorptive removal of azo dye and soilless culture. *Cellulose* 26. <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02314-2>

- Schincariol, R. A., Herderick, E. E., and Schwartz, F. W., 1993. On the application of image analysis to determine concentration distributions in laboratory experiments. *Journal of Contaminant Hydrology*, 12(3), 197–215. [https://doi.org/10.1016/0169-7722\(93\)90007-f](https://doi.org/10.1016/0169-7722(93)90007-f)
- Shah, R., 2016. Spectrophotometric Micro determination of Silver(I) using Meloxicam as a New Analytical Reagent. *Oriental Journal of Chemistry*, 32(1), 499–507. 10.13005/ojc/320157
- Sikka, S., Gopalkrishna, P., Bhat, G.S. et al. (2021). Correction to: Photometry and image analysis software 'ImageJ' to compare three methods of gingival depigmentation. *Laser Dent Sci* 5, 135. <https://doi.org/10.1007/s41547-021-00123-0>
- Simonsen, L. O., Harbak, H., and Bennekou, P., 2012. Cobalt metabolism and toxicology—A brief update. *Science of The Total Environment*, 432, pp. 210–215. 10.1016/j.scitotenv.2012.06.009
- Souza, R. L., and Tubino, M., 2005. Spectrophotometric determination of diclofenac in pharmaceutical preparations. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 16(5), pp.1068–1073. 10.1590/s0103-50532005000600026
- Stevens, M. and Batlokwa, B., 2017. Removal of Nickel (II) and Cobalt (II) from Wastewater Using Vinegar-Treated Eggshell Waste Biomass. *Journal of Water Resource and Protection*. 9. pp.931-944. 10.4236/jwarp.2017.98062.
- Walker, C.H., Sibly, R.M., Sibly, R.M., & Peakall, D.B., 2005. *Principles of ecotoxicology*. 3rd ed. Boca Raton, FL: CRC Press. Ch.8. <https://doi.org/10.1201/9781439894224>
- Warr, L.N., 2021. IMA–C NMNC approved mineral symbols. *Mineralogical Magazine*. 85 pp. 291–320.
- Zhai, Q.-Z., Li, J.-M. and Zhang, J.-P., 2013. Spectrophotometric determination of lead in tea leaf sample with Dibromo-p-chloro-Arsenazo. *Asian Journal of Chemistry*, 25(1), pp.538–540. 10.14233/ajchem.2013.13577
- Zhang, W., Niu, X., Li, X., He, Y., Song, H., Peng, Y., Pan, J., Qiu, F., Zhao, H. and Lan, M., 2018. A smartphone-integrated ready-to-use paper-based sensor with mesoporous carbon-dispersed pd nanoparticles as a highly active peroxidase mimic for H₂O₂ detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 265, pp.412–420. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.03.082>
- Zou, L., Mi, C., Yu, H., Gu, W. and Teng, Y., 2017. Characterization of the interaction between triclosan and catalase. *RSC Advances*, 7(15), pp.9031–9036. 10.1039/C6RA26431J