ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΧΑΜΗΛΟΥ ΚΟΣΤΟΥΣ ΜΙΚΡΟ-ΡΕΥΣΤΟΝΙΚΩΝ ΔΙΑΤΑΞΕΩΝ ΧΑΡΤΟΥ ΓΙΑ ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Χρήστος Κόκκινος[1], Αναστάσιος Οικονόμου[1] και Δημοσθένης Γκιόκας[2]
[1]Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Αθηνών
[2] Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
e-mail: xkokkinos@gmail.com

Περίληψη

Στην εργασία αυτή περιγράφεται η κατασκευή, η αξιολόγηση και οι αναλυτικές εφαρμογές καινοτόμων, φορητών και χαμηλού κόστους ηλεκτροχημικών μικρο-ρευστονικών αισθητήρων χάρτου. Οι αισθητήρες κατασκευάστηκαν πάνω σε υπόστρωμα χάρτου με ενσωματωμένα μικρο-ρευστονικά κανάλια (microfluidic channels) και αποτελούνταν από τρία ηλεκτρόδια λεπτών υμενίων (πάχους ≈ 400nm) κασσιτέρου, αργύρου και λευκοχρύσου, τα οποία εναποτέθηκαν με καθοδική ιοντοβολή (sputtering). Τα μικρο-ρευστονικά κανάλια κατασκευάστηκαν με εκτύπωση υδρόφοβου κηρού στην επιφάνεια του υδρόφιλου χάρτου, με ειδικό εκτυπωτή. Οι μικροδιατάξεις χάρτου χρησιμοποιήθηκαν ως βολταμμετρικοί αισθητήρες για την επιτόπια (in-situ) ανίχνευση και ποσοτικό προσδιορισμό ιχνοποσοτήτων καδμίου και ψευδαργύρου καθώς επίσης, και για τον ποσοτικό προσδιορισμό βιοτινιλυομένης αλβουμίνης ορού βοοειδούς (BSA) με χρήση κβαντικών κουκκίδων ως ιχνηθέτες. Οι αισθητήρες χαρακτηριστήκαν με οπτικές και ηλεκτροχημικές μεθόδους και βελτιστοποιήθηκε η απόδοσή τους με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν πολύ χαμηλά όρια ανίχνευσης (0.94 μg L^{-1} BSA, 0.90 μg L^{-1} Cd(II), 1.10 μg L^{-1} Zn(II)), πολύ καλή γραμμική περιοχή (με R^2 >0.99 για όλους τους αναλύτες) και επαναληψιμότητα (RSD < 8% (*n*=5) για όλους τους αναλύτες). Οι αισθητήρας έχουν κόστος κατασκευής μόλις 0.11$/αισθητήρα (σε εργαστηριακή κλίμακα) και παρουσιάζουν σημαντικά πλεονεκτήματα τόσο στην κατασκευή όσο και στη λειτουργία που τους καθιστούν κατάλληλους για απλές και ευαίσθητες αναλύσεις στο πεδίο ανάγκης.

Λέξεις-Κλειδιά: αισθητήρες χάρτου, μικρο-ρευστονικές διατάξεις, ηλεκτροχημική ανάλυση, βαρέα μέταλλα, βιομόρια

Abstract

This work reports a microfabricated electrochemical paper-based analytical device (ePAD) for the voltammetric determination of biotinylated bovine serum albumin (BSA) and of Cd(II) and Zn(II) at trace levels. The device is patterned by wax-printing on paper and features a circular assay zone connected to an inlet zone and a sink. An electrochemical cell with integrated electrodes is formed on the reverse side of the paper by sputtering of thin metal films (Sn, Pt and Ag as the working, counter and reference electrode, respectively). Proof-of-principle of the ePAD for biosensing is demonstrated for biotinylated BSA assay involving labeling with CdSe/ZnS quantum dots (QDs). After the acidic dissolution of the QDs, the released Cd(II) is quantified by anodic stripping voltammetry (ASV) at the 400 nm-thick Sn-film working electrode. In the case of determination of Cd(II) and Zn(II), a drop of sample is placed in the circular assay zone; Cd(II) and Zn(II) are quantified by ASV. Under the selected conditions, the limits of detection were 0.94 μg L^{-1} BSA, 0.90 μg L^{-1} Cd(II) and 1.10 μg L^{-1} Zn(II) and the

between-sensor reproducibility was lower than 8% for all analytes. The developed microfluidic ePAD costs only 0.11$ (at lab scale) and presents favorable fabrication and operational features that make it an excellent sensor for simple and ultrasensitive point-of-need testing.

Keywords: paper-based analytical devices, microfluidics, electrochemisrty, trace metals, biomolecules

1. Εισαγωγή

Τα τελευταία χρόνια, υπάρχει έντονο ενδιαφέρον για την αντικατάσταση του θεμελιώδους αναλυτικού μοντέλου που παραδοσιακά βασίζεται στην πραγματοποίηση δειγματοληψίας, μεταφορά του δείγματος στο εργαστήριο, ανάλυση και έκδοση του αποτελέσματος. Η μεθοδολογία που αναμένεται να έχει ραγδαία ανάπτυξη τα επόμενα χρόνια βασίζεται στην πραγματοποίηση διάφορων αναλύσεων στο πεδίο (on site) ή στο σημείο φροντίδας των ασθενών (point of care). Για να πραγματοποιηθεί αυτή η μετάβαση, η επιστημονική κοινότητα θα κληθεί να αναπτύξει κατάλληλες καινοτόμες αναλυτικές μεθοδολογίες και εργαλεία για να επιτύχει τους επιδιωκόμενους στόχους. Σε αυτή την κατεύθυνση, υπάρχει έντονη ερευνητική δραστηριότητα στο χώρο των ηλεκτροχημικών αισθητήρων και βιοαισθητήρων (Kokkinos et al. 2016). Σε σύγκριση με τις συμβατικές μεθόδους (π.χ. φασματοσκοπικές) οι οποίες είναι ακριβές, περίπλοκες και δεν μπορούν να εφαρμοστούν σε μετρήσεις πεδίου, οι ηλεκτροχημικές τεχνικές προσφέρουν γρήγορες, υπερευαισθητές και επιτόπιες αναλύσεις με αμελητέα κατανάλωση ενέργειας. Ειδικότερα, η ανοδική αναδιαλυτική βολταμμετρία θεωρείται η πιο ιδανική ηλεκτροχημική τεχνική για την ανάλυση ιχνοποσοτήτων βαρέων μετάλλων και βιομορίων ιχνηθετημένων με κβαντικές κουκκίδες, χάρη στην εξαιρετική της ευαισθησία που προέρχεται από το στάδιο της προσυγκέντρωσης, σε συνδυασμό με τα διάφορα υλικά επιλογής για την κατασκευή ηλεκτροδίων (Economou et al. 2016).

Για πολλά χρόνια, τα ηλεκτρόδια υδραργύρου ήταν οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενοι μεταλλάκτες στην αναδιαλυτική βολταμμετρία, αλλά εξαιτίας της τοξικότητά τους, τα τελευταία χρόνια άρχισαν να αναπτύσσονται λιγότερο τοξικά ηλεκτρόδιά όπως βισμουθίου, αντιμονίου και κασσιτέρου προσφέροντας ελκυστικά ηλεκτροαναλυτικά χαρακτηριστικά. Συνήθως, τα ηλεκτρόδια αυτά κατασκευάζονται με ηλεκτροαπόθεση πάνω σε άκαμπτες και "μεγάλες" επιφάνειες άνθρακα και οι αναλύσεις διεξάγονται σε συμβατικές ηλεκτροχημικές κυψελίδες απαιτώντας σημαντικούς όγκους αντιδραστηρίων (Economou et al. 2003, Kokkinos et al. 2008, Serrano et al. 2016). Ακόμη, τα ηλεκτροαποτιθέμενα ηλεκτρόδια παρουσιάζουν σημαντικά μειονεκτήματα όπως: α) έχουν μεγάλο μέγεθος, β) απαιτείται η χρήση διαλυμάτων και αγώγιμων υποστρωμάτων για την κατασκευή τους, γ) η απόδοσή τους εξαρτάται από πολλές παραμέτρους (pH διαλύματος, τύπο αγώγιμης επιφάνειας), δ) δεν παρέχουν δυνατότητα κατασκευής σε μαζική κλίμακα και ε) δεν είναι κατάλληλα για την ενσωμάτωσή τους σε μικροδιατάξεις.

Αντίθετα, η κατασκευή αισθητήρων με τεχνικές μικροηλεκτρονικής (όπως η καθοδική ιοντοβολή) ξεπερνά τα παραπάνω μειονεκτήματα και παράλληλα παρέχει τη δυνατότητα κατασκευής ολοκληρωμένων ηλεκτροχημικών διατάξεων, οι οποίες μπορούν να περιλαμβάνουν περισσότερα του ενός ηλεκτρόδια (π.χ. τρία ηλεκτρόδια: εργασίας, αναφοράς και βοηθητικό) και να αποτελούν τμήμα μιας διάταξης μικρο-ρευστονικής (microfluidic lab-on-a-chip device) (Kokkinos et al. 2014). Η χρήση υποστρώματος χάρτου σε συνδυασμό με μικρο-ρευστονικά κανάλια παρέχει τη δυνατότητα μαζικής

παραγωγής χαμηλού κόστους και απορριπτόμενων ολοκληρωμένων μικροδιατάξεων, κατάλληλων για αναλύσεις δειγμάτων πολύ μικρού όγκου (Rattanarat et al. 2014, Nantaphol et al. 2017).

Στην εργασία αυτή παρουσιάζονται ολοκληρωμένοι ηλεκτροχημικοί μικρο-ρευστονικοί αισθητήρες χάρτου κατασκευασμένοι με καθοδική ιοντοβολή και εκτύπωση υδρόφοβου κηρού. Οι αισθητήρες αποτελούνται από τρία ηλεκτρόδια λεπτών υμενίων κασσιτέρου, αργύρου και λευκοχρύσου (πάχους ≈ 400nm) και χρησιμοποιήθηκαν για το βολταμμετρικό προσδιορισμό ιχνοποσοτήτων καδμίου και ψευδαργύρου (Cd(II), Zn(II)) καθώς επίσης, και για τον ποσοτικό προσδιορισμό βιοτινιλυομένης αλβουμίνης ορού βοοειδούς (BSA) με χρήση κβαντικών κουκκίδων ως ιχνηθέτες. Οι αισθητήρες παρουσιάζουν σημαντικά πλεονεκτήματα τόσο στο κόστος κατασκευής όσο και στην λειτουργία τους έναντι των συμβατικών ηλεκτροχημικών αισθητήρων, και είναι κατάλληλοι για επιτόπιες ευαίσθητες αναλύσεις απαιτώντας ελάχιστο όγκο δειγμάτων της τάξης των μικρολίτρων.

2. Μεθοδολογία

2.1 Κατασκευή αισθητήρων χάρτου

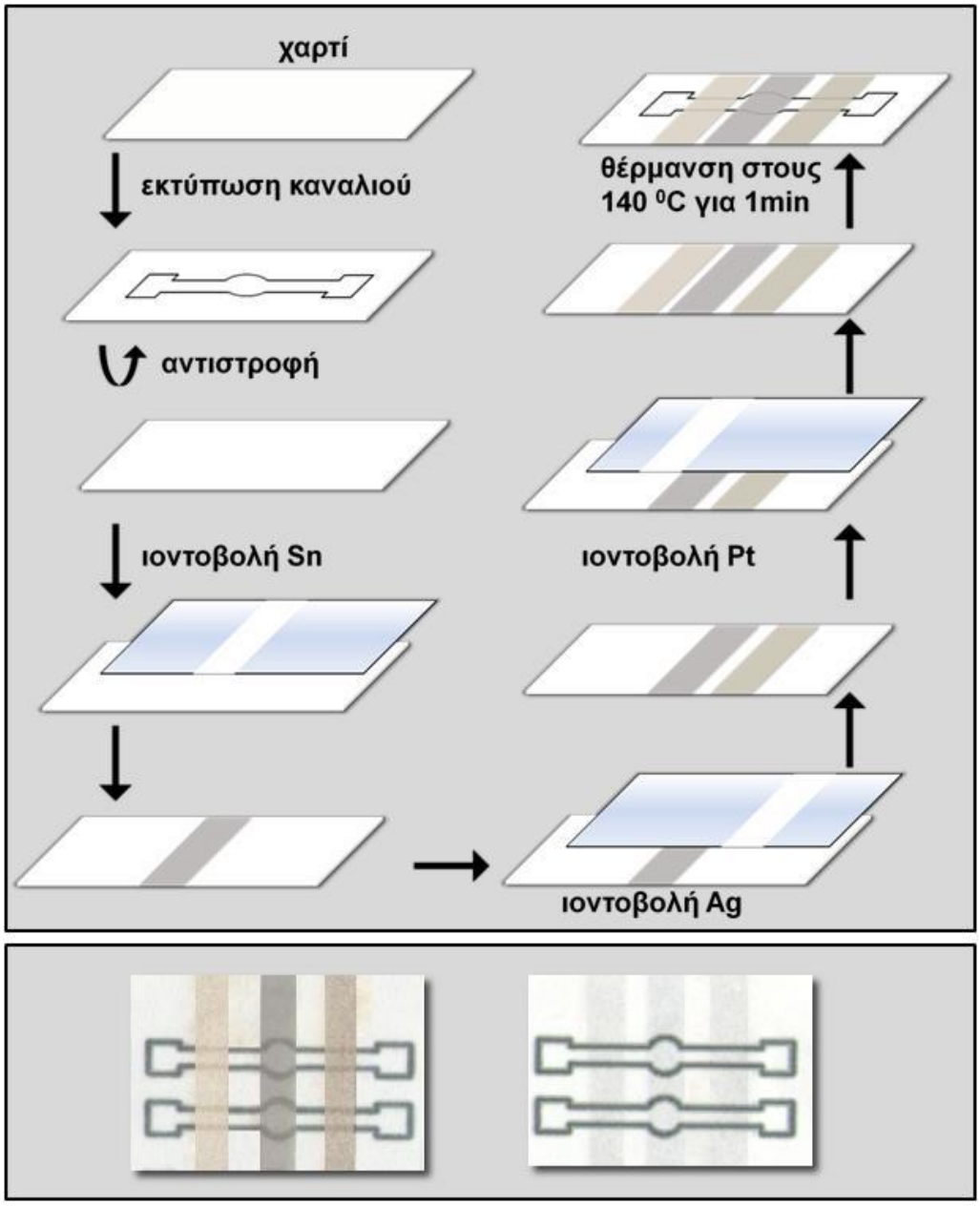
Σχηματικό διάγραμμα της κατασκευής των μικρο-ρευστονικών ηλεκτροχημικών διατάξεων χάρτου και φωτογραφία τους παρουσιάζονται στο Σχήμα 1. Αρχικά, στη μια πλευρά του υποστρώματος χάρτου (Whatman Chr 1) έγινε εκτύπωση των καναλιών χρησιμοποιώντας κατάλληλο εκτυπωτή και συνθετικό μελάνι κηρού (Xerox 8570DN). Στη συνέχεια, έγινε συριακή εναπόθεση των τριών ηλεκτροδίων (Sn, Ag, Pt), πάχους 400 nm, χρησιμοποιώντας κατάλληλες πλαστικές μάσκες και την τεχνική της καθοδικής ιοντοβολής (Cooke Vacuum Products). Οι στόχοι και των τριών μετάλλων ήταν καθαρότητας 99,9% (Williams Advanced Materials). Στη συνέχεια ο αισθητήρας θερμάνθηκε, σε φούρνο στους 140 ^{o}C για 1 min, ώστε το κερί να διαπεράσει το χαρτί και να σχηματιστεί το μικρο-ρευστονικό κανάλι. Από κάθε κύκλο κατασκευής προέκυπταν 72 ηλεκτροχημικές διατάξεις και το κόστος του κάθε αισθητήρα υπολογίστηκε στα 0.11$ (0.009$ για το χάρτινο υπόστρωμα και την εκτύπωση κηρού, 0.102$ για την καθοδική ιοντοβολή των τριών μετάλλων) (Kokkinos et al. 2018).

2.2 Βολταμμετρικός προσδιορισμός Cd(II), Zn(II) και BSA

Για την περίπτωση ταυτόχρονου βολταμμετρικού προσδιορισμού Cd(II) και Zn(II), 10 μL από το διάλυμα εργασίας (ρυθμιστικού διαλύματος οξικών 0.1 mol L^{-1}, pH 4.5), που περιείχε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις Cd(II) και Zn(II) τοποθετούνταν στην κυκλική περιοχή του μικρο-ρευστονικού καναλιού του αισθητήρα, από την πλευρά που δεν ήταν εναποτεθειμένα τα τρία ηλεκτρόδια, και η προσυγκέντρωση των Cd(II) και Zn(II) λάμβανε χώρα στο ηλεκτρόδιο εργασίας κασσιτέρου με εφαρμογή δυναμικού -1.50 V για 120 s. Στη συνέχεια, η προσυγκέντρωση διακοπτόταν και το δυναμικό του ηλεκτροδίου εργασίας σαρωνόταν από -1.30 έως -0.65 V και γινόταν καταγραφή του βολταμμογραφήματος. Οι συνθήκες τετραγωνικού παλμού ήταν: συχνότητα 50 Hz, ύψος παλμού 40 mV, βήμα δυναμικού 4 mV.

Για τον προσδιορισμό της βιοτινιλυομένης BSA, αρχικά γινόταν προσθήκη 10 μL βιοτινιλυομένης BSA διαφόρων συγκεντρώσεων σε 50 mmol L^{-1} ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) (pH 7.4), στην κυκλική περιοχή του αισθητήρα, από την πλευρά που δεν ήταν εναποτεθειμένα τα τρία ηλεκτρόδια. Ο αισθητήρας αφηνόταν να στεγνώσει σε

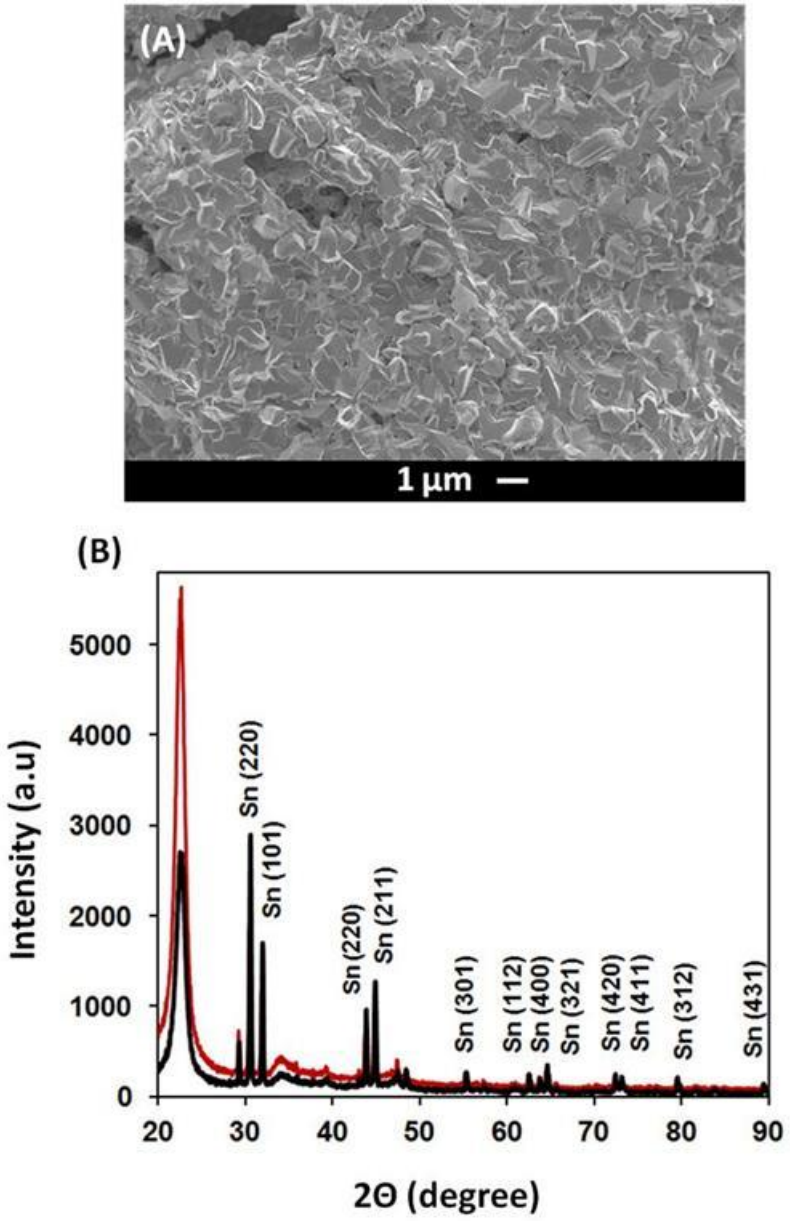
θερμοκρασία δωματίου και ακολουθούσε προσθήκη 20 μL BSA (3% (w/v) BSA σε 20 mmol L^{-1} PBS, pH 7.0) για την κάλυψη των κενών θέσεων. Μετά το στέγνωμα του αισθητήρα σε θερμοκρασία δωματίου γινόταν προσθήκη 20 μL διαλύματος κβαντικών κουκκίδων τροποποιημένων με στρεπταβιδίνη (CdSe/ZnS 10 nmol L^{-1} σε 50 mM PBS, pH 7.4). Ακολουθούσε πλύση δύο φορές με 20 μL PBS (50 mmol L^{-1}, pH 7.4) και στη συνέχεια, οι δύο τετράγωνες περιοχές του μικρο-ρευστονικού καναλιού κόβονταν με ψαλίδι. Μετά, 10 μL υδατικού διαλύματος HCl 0.01M εναποθέτονταν στην κυκλική περιοχή του αισθητήρα και μετά από 10 min γινόταν προσθήκη 10 μL ρυθμιστικού διαλύματος οξικών (0.1 mol L^{-1}, pH 4.5) και ακολουθούσε ο βολταμμετρικός προσδιορισμός των απελευθερωμένων από τις κβαντικές κουκίδες ιόντων καδμίου, εφαρμόζοντας δυναμικό προσυγκέντρωσης -1.20 V για 120s.



Σχήμα 1: Στάδια κατασκευής των μικρο-ρευστονικών διατάξεων, με χρήση καθοδικής ιοντοβολής και φωτογραφίες των δύο όψεων των αισθητήρων.

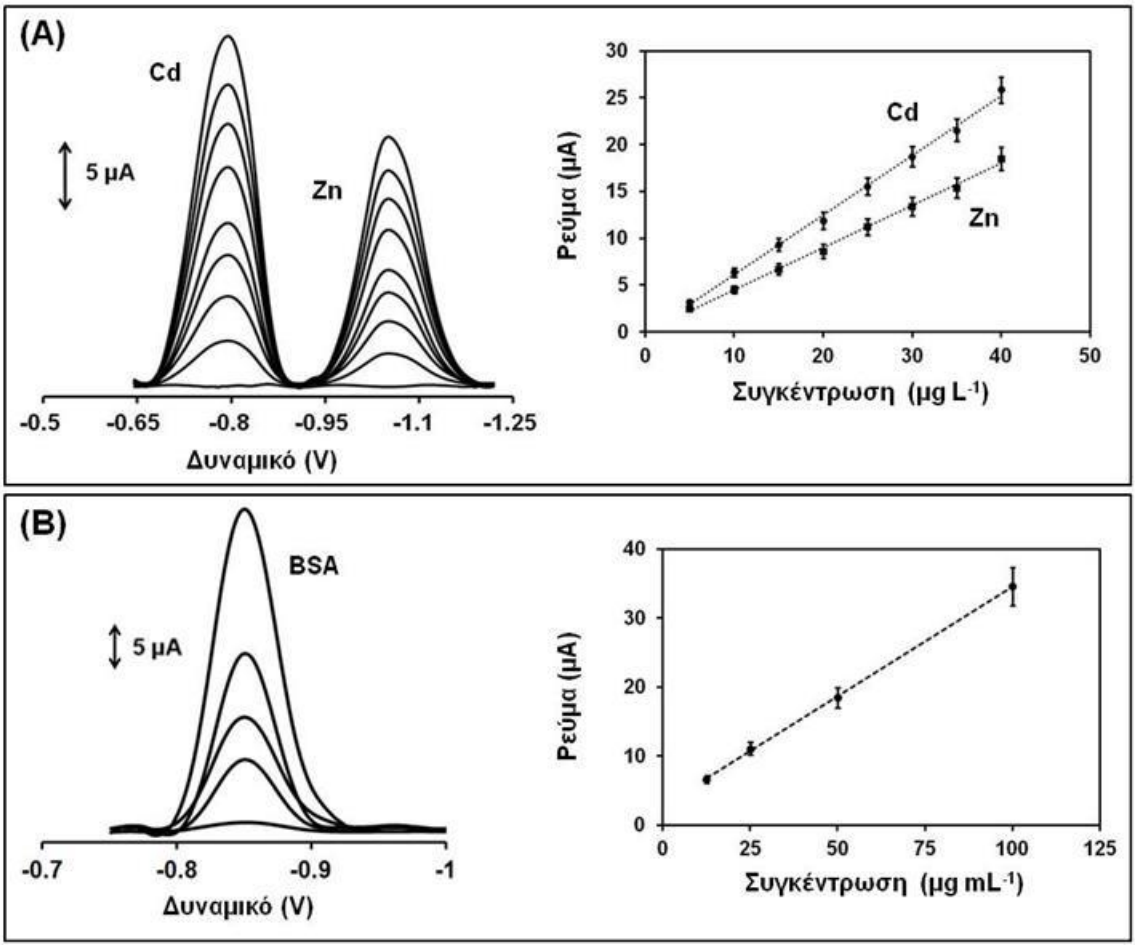
3. Αποτελέσματα

Τα ηλεκτροαναλυτικά χαρακτηριστικά των αισθητήρων χάρτου μελετήθηκαν μέσω του ταυτόχρονου βολταμμετρικού προσδιορισμού Cd(II) και Zn(II) και μέσω του προσδιορισμού βιοτινιλυομένης BSA με χρήση κβαντικών κουκίδων CdSe/ZnS ως ιχνηθέτες. Αρχικά έγινε οπτικός έλεγχος του ηλεκτροδίου εργασίας κασσιτέρου με μικροσκοπία ηλεκτρονικής σάρωσης (FESEM, JEOL JSM-7401f) και με φασματοσκοπία ακτίνων Χ ((XRD, Siemens D500, Bruker GmbH). Όπως προκύπτει από την απεικόνιση FESEM (Εικόνα 1Α) ολόκληρη η επιφάνεια του χάρτου είχε επικαλυφθεί ομοιόμορφα με το υμένιο κασσιτέρου. Ακόμη, από το φάσμα του XRD της επιφάνειας του ηλεκτροδίου εργασίας, προέκυψε ότι η εναπόθεση του υμενίου κασσιτέρου ήταν πολυκρυσταλλική (Εικόνα 1Β).



Εικόνα 1: (Α) FESEM απεικόνιση του ηλεκτροδίου εργασίας κασσιτέρου σε υπόστρωμα χάρτου. (Β) Φάσμα XRD του ηλεκτροδίου εργασίας κασσιτέρου σε υπόστρωμα χάρτου (μαύρη γραμμή) και σκέτου χάρτου (κόκκινη γραμμή).

Ακολούθησε, μελέτη της επίδραση του δυναμικού προσυγκέντρωσης, του χρόνου προσυγκέντρωσης και των παραμέτρων τετραγωνικού παλμού χρησιμοποιώντας διάλυμα 30 μg L^{-1} Cd(II) και Zn(II) και διάλυμα 25 μg L^{-1} βιοτινιλυομένης BSA. Στην περίπτωση προσδιορισμού Cd(II) και Zn(II) το δυναμικό προσυγκέντρωσης που επιλέχθηκε ήταν -1.50 V για 120 s, ενώ για τον προσδιορισμό βιοτινιλυομένης BSA -1.20 V για 120 s. Και στις δύο περιπτώσεις προσδιορισμού επιλέχθηκαν οι παρακάτω σύνηθες τετραγωνικού παλμού: συχνότητα 50 Hz, ύψος παλμού 40 mV, βήμα δυναμικού 4 mV. Οι αισθητήρες παρουσίασαν πολύ καλή γραμμική περιοχή (με R^2 >0.99 για όλους τους αναλύτες) (Εικόνα 2) και επαναληψιμότητα (RSD: 5.7% για Cd(II) και 7.5% για Zn(II) σε επίπεδο συγκέντρωσης 30 μg L^{-1} και 7.8 % για BSA σε επίπεδο συγκέντρωσης 25 μg mL^{-1} (*n*=5)). Τα όρια ανίχνευση ήταν 0.90 μg L^{-1} για Cd(II), 1.10 μg L^{-1} για Zn(II) και 0.94 μg L^{-1} BSA. Τα όρια ανίχνευσης ήταν συγκρίσιμα με αυτά που προκύπτουν από αναλύσεις που χρησιμοποιούν μεγάλες ηλεκτροχημικές κυψελίδες και συμβατικά ηλεκτρόδια κασσιτέρου (Zhu et al. 2007, Tian et al. 2009, Czop et al. 2011, Li et al. 2012, Tian et al. 2012, Wang et al. 2012). Τέλος, έγινε μελέτη επίδρασης παρεμποδίσεων στον προσδιορισμό Cd(II) και Zn(II) χρησιμοποιώντας 20 μg L^{-1} Cd(II) και Zn(II) και 10-πλασια συγκέντρωση κατιόντων (Mn(II), Ni(II), Mg(II), Fe(III), Pb((II)), των οποίων η παρουσία δεν επηρέασαν τον προσδιορισμό Cd(II) και Zn(II).



Εικόνα 2: (A) Βολταμμογράφημα προσδιορισμού Cd(II) και Zn(II) με αισθητήρες χάρτου και η αντίστοιχη καμπύλη αναφοράς. (B) Βολταμμογράφημα προσδιορισμού βιοτινιλυομένης BSA με αισθητήρες χάρτου και η αντίστοιχη καμπύλη αναφοράς.

4. Βιβλιογραφία

Kokkinos C, Economou A., Prodromidis M. I., *"Electrochemical immunosensors: Critical survey of different architectures and transduction strategies"*, Trends in Analytical Chemistry, 79 p.p. 88–105, 2016.

Economou A., Kokkinos C., *"Advances in stripping analysis of metals"*, in: D.W.M. Arrigan (Ed.), RSC Detection Science Series No. 6, Electrochemical Strategies in Detection Science, p.p. 1–18, 2016.

Economou A., Fielden P.R., *"Mercury film electrodes: developments, trends and potentialities for electroanalysis"*, Analyst, 128, p.p. 205–212, 2003.

Kokkinos C., Economou A., *"Stripping analysis at bismuth-based electrodes"*, Current Analytical Chemistry, 4, p.p. 183–190, 2008.

Serrano N., Diaz-Cruz M., Arino C., Esteban M., *"Antimony- based electrodes for analytical determinations"*, Trends in Analytical Chemistry, 77, p.p. 203–213, 2016.

Kokkinos C., Economou A., Speliotis T., *"Tin-film mini-sensors fabricated by a thin-layer microelectronic approach for stripping voltammetric determination of trace metals"*, Electrochemistry Communications, 38, p.p. 96–99, 2014.

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

Nantaphol S., Channon R.B., Kondo T., Siangproh W., Chailapakul O., Henry C.S., *"Boron doped diamond paste electrodes for microfluidic paper-based analytical devices"*, Analytical Chemistry, 89, p.p. 4100–4107, 2017.

Kokkinos C., Giokas D., Economou A., Petrou P., Kakabakos S,. *"Paper-based microfluidic device with integrated sputtered electrodes for stripping voltammetric determination of DNA via quantum dot labeling"*, Analytical Chemistry, 90, 1092–1097, 2018.

Zhu W.W., Li N.B., Luo H.Q., *"Simultaneous determination of chromium(III) and cadmium(II) by differential pulse anodic stripping voltammetry on a stannum film electrode"*, Talanta. 72, p.p. 1733–1737, 2007.

Tian Y., Li N., Luo H., *"Simultaneous determination of trace zinc(II) and cadmium(II) by differential pulse anodic stripping voltammetry using a MWCNTs-NaDBS modified stannum film electrode"*, Electroanalysis. 21, p.p. 2584–2589, 2009.

Czop E., Economou A., Bobrowski A., *"A study of in situ plated tin-film electrodes for the determination of trace metals by means of square-wave anodic stripping voltammetry"*, Electrochimica Acta. 56, p.p. 2206–2212,2011.

Li B.L., Wu Z.L., Xiong C.H., Luo H.Q., Li N.B., *"Anodic stripping voltammetric measurement of trace cadmium at tin-coated carbon paste electrode"*, Talanta, 88, p.p. 707–710, 2012.

Tian Y.Q., Luo H.Q., Li N.B., *"Stannum film electrode for square wave voltammetric determination of trace copper(II)"*, Journal of Solid State Electrochemistry, 16, 529–533, 2012.

Wang J., Bian C., Tong J., Sun J., Xia S., *"Simultaneous detection of copper, lead and zinc on tin film/gold nanoparticles/gold microelectrode by square wave stripping voltammetry"*, Electroanalysis, 24, p.p. 1783–1790, 2012.

5. Ευχαριστίες

Η Μεταδιδακτορική Έρευνα υλοποιήθηκε με υποτροφία του ΙΚΥ η οποία χρηματοδοτήθηκε από την Πράξη «Ενίσχυση Μεταδιδακτόρων Ερευνητών/Ερευνητριών» από τους πόρους του ΕΠ «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση» με άξονες προτεραιότητας 6,8,9 και συγχρηματοδοτείται από το Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ και το ελληνικό δημόσιο.