



Πανεπιστήμιο Κύπρου
Τμήμα Χημείας

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ
ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΤΗΣ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ ΣΤΑ
ΚΥΠΡΙΑΚΑ ΤΡΟΦΙΜΑ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΝΕΩΝ
ΒΕΛΤΙΩΜΕΝΩΝ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ**

ΧΡΙΣΤΙΑΝΑ Α. ΓΕΩΡΓΙΟΥ

ΜΑΪΟΣ 2015



Πανεπιστήμιο Κύπρου
Τμήμα Χημείας

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΧΡΙΣΤΙΑΝΑ Α. ΓΕΩΡΓΙΟΥ

Εξεταστική Επιτροπή:

1. **Επικ. Καθηγήτρια Ευτυχία Πινακουλάκη (Πρόεδρος)**
2. **Αναπλ. Καθηγητής Αναστάσιος Τασιόπουλος (Εσωτερικό Μέλος)**
3. **Επικ. Καθηγήτρια Κωνσταντίνα Καπνίση-Χριστοδούλου
(Ερευνητική Σύμβουλος)**
4. **Επικ. Καθηγήτρια Δέσπω Φάττα-Κάσινου (Εξωτερικό Μέλος)**
5. **Επικ. Καθηγητής Κωνσταντίνος Πίστος (Εξωτερικό Μέλος)**

ΜΑΪΟΣ 2015

*Στον πνευματικό μου πατέρα, πατήρ Θεόδωρο Στυλιανού,
και αγαπημένο μου φίλο, Μάριο*

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΔΗΛΩΣΗ

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή εκπονήθηκε από εμένα στο Ερευνητικό Εργαστήριο Ενόργανης Ανάλυσης του Τμήματος Χημείας και στο Διεθνές Ερευνητικό Κέντρο Νερού Νηρέας της Πολυτεχνικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κύπρου υπό την επίβλεψη της Δρ. Κωνσταντίνας Καπνίση-Χριστοδούλου (Σεπτέμβριος 2010 – Μάιος 2015).

Ημερομηνία

Υπογραφή

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή αποτελεί το επιστέγασμα μιας συνεχούς και επίπονης προσπάθειας που έλαβε χώρα τα τελευταία πέντε χρόνια. Η αγάπη, η παρουσία, και η υποστήριξη κάποιων ανθρώπων αποτέλεσαν την κινητήριο δύναμη για την υλοποίηση του συγκεκριμένου στόχου. Μέσα σε λίγες γραμμές μου δίνεται η ευκαιρία να απευθύνω τις ευχαριστίες μου σε συγκεκριμένους ανθρώπους.

Οι πρώτες ανήκουν στην ερευνητικό μου σύμβουλο Δρ. Κωνσταντίνα Καπνίση-Χριστοδούλου, για τη συνεχή καθοδήγηση, την αμέριστη υποστήριξη, τις ουσιώδεις συμβουλές, καθώς και την αδιάκοπη συμπαράσταση και ενθάρρυνση που μου παρείχε όλο αυτό το διάστημα. Την ευχαριστώ θερμά για την προθυμία της να συμμεριστεί οποιαδήποτε μεγάλη ή μικρή μου ανησυχία.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της εσωτερικής εξεταστικής μου επιτροπής, την Επίκουρη καθηγήτρια Δρ. Ευτυχία Πινακουλάκη και τον Αναπληρωτή καθηγητή Δρ. Αναστάσιο Τασιόπουλο για το χρόνο που αφιέρωσαν όλα αυτά τα χρόνια ως εξεταστές μου αλλά και για τις πολύτιμες συμβουλές και υποδείξεις τους. Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια Δρ. Δέσπω Φάττα-Κάσινου του Τμήματος Πολιτικών Μηχανικών και Μηχανικών Περιβάλλοντος και τον Επίκουρο Καθηγητή Δρ. Κωνσταντίνο Πίστο, της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών για την αποδοχή τους να συμμετάσχουν στην εξεταστική μου επιτροπή.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες και στην Δρ. Ευρούλα Χαπέση για την πολύτιμη βοήθεια της στην πραγματοποίηση των πειραμάτων στο σύστημα UPLC-MS/MS. Ο πιο ουσιαστικός άνθρωπος και το σημαντικότερο στήριγμα στη ζωή μου είναι και θα είναι ο πνευματικός μου πατέρας, πατήρ Θεόδωρος Στυλιανού. Με την αστείρευτη ψυχική του δύναμη μου προσέφερε λύση και ανακούφιση σε όλες τις δύσκολες στιγμές μου και τον ευχαριστώ από καρδιάς.

Θα ήταν παράληψη μου να μην ευχαριστήσω την ερευνητική ομάδα του Εργαστηρίου Ενόργανης Ανάλυσης, Μαρία Μαυρουδή, Μιχάλη Κωνσταντίνου και Γιάννη Σταύρου για την όμορφη συνεργασία και είμαι σίγουρη ότι δημιουργήθηκαν αληθινές φιλίες.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου, στον αδελφό μου και στους καλούς μου φίλους Μάριο, Άννα, Παναγιώτη και Σάββα για την

πολύπλευρη συμπαράσταση, την ανοχή που επέδειξαν αδιαμαρτύρητα στα άγχη και στις φοβίες μου και για όλα όσα μου πρόσφεραν αυτά τα χρόνια.

Χριστιάννα Α. Γεωργίου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα προϊόντα οξειδωσης της χοληστερόλης (Cholesterol Oxidation Products, COPs) αποτελούν το ερευνητικό αντικείμενο της παρούσας εργασίας. Αρχικό κίνητρο για τη διενέργεια της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής ήταν η διερεύνηση της ύπαρξης των εν λόγω ενώσεων στα κυπριακά τρόφιμα προκειμένου να αξιολογηθούν για *πρώτη φορά* ως πιθανές πηγές προέλευσης των COPs. Οι βασικές προκλήσεις που έπρεπε να αντιμετωπιστούν στην πορεία επίτευξης αυτού του στόχου ήταν η χαμηλή συγκέντρωσης τους στα υπό μελέτη δείγματα και η πολυπλοκότητα που χαρακτηρίζει τις μήτρες των τροφίμων. Η εφαρμογή αναλυτικών τεχνικών που διαθέτουν ακρίβεια, εξειδίκευση και ευαισθησία και η εύρεση ενός αξιόπιστου αναλυτικού πρωτοκόλλου, που επέτρεπε την εκλεκτική απομόνωση των επιθυμητών ενώσεων, αποτέλεσαν την απάντηση στις παρούσες προκλήσεις.

Για την αποπεράτωση του ερευνητικού έργου ακολουθήθηκε συγκεκριμένη πειραματική πορεία. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση του διαχωρισμού και της ποσοτικής αποτίμησης των COPs στηριζόμενη στις θεμελιώδεις αρχές της χρωματογραφικής θεωρίας. Ακολούθησε αξιολόγηση των χαρακτηριστικών ποιότητας της μεθόδου μέσω της διαδικασίας της επικύρωσης, μια μελέτη απαραίτητη για τη διασφάλιση της εγκυρότητας των πειραματικών δεδομένων. Μείζονος σημασίας στόχο αποτέλεσε και η βελτιστοποίηση των συνθηκών του σταδίου προκατεργασίας των δειγμάτων. Από το σύνολο των δοκιμών που πραγματοποιήθηκαν το πρωτόκολλο που παρουσίασε τις υψηλότερες ανακτήσεις και τη μικρότερη διακύμανση των αποτελεσμάτων, εφαρμόστηκε για την εκχύλιση του συνόλου των αναλυτών από τις εξεταζόμενες μήτρες. Η εφαρμογή της τελικής μεθόδου στην ανάλυση τροφίμων ήταν το τελευταίο και ίσως το μεγαλύτερης πρακτικής σημασίας στάδιο.

Έχοντας λοιπόν ως αφετηρία τις υπάρχουσες βιβλιογραφικές πληροφορίες και τις προτεινόμενες μεθόδους, στο πρώτο στάδιο της ερευνητικής εργασίας επιχειρήθηκε ανάλυση των COPs με τη χρήση της τεχνικής της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) με ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού (UV-Vis). Εφαρμόζοντας ένα ισοκρατικό σύστημα διαλυτών ACN:MeOH:H₂O:IPA σε αναλογία 67:27:5:1, ρυθμό ροής 0.8 mL/min και θερμοκρασία 10 °C επιτεύχθηκε πλήρης διαχωρισμός εντός 22 min. Στη συνέχεια η βέλτιστη μέθοδος εφαρμόστηκε για *πρώτη φορά* για τον προσδιορισμό των COPs σε

κυπριακά αλλαντικά. Οι αυξημένες ποσότητες που ανιχνεύτηκαν επιβεβαιώνουν την υποψία ότι η προετοιμασία των εν λόγω προϊόντων ευνοεί την οξείδωση της χοληστερόλης. Με την ολοκλήρωση της παρούσας πτυχής της εργασίας αναδείχθηκαν ορισμένες αδυναμίες, οι οποίες ωστόσο αξιοποιήθηκαν και αποτέλεσαν τη βάση για το σχεδιασμό μιας νέας ερευνητικής εργασίας.

Συγκεκριμένα, η τεχνική HPLC χρησιμοποιήθηκε ευρύτατα για την ανάλυση των COPs ενώ η χρήση ανιχνευτή UV-Vis δεν παρείχε την επιθυμητή ευαισθησία. Η ανάγκη για εύρεση εναλλακτικής λύσης προκειμένου να ξεπεραστούν οι πιο πάνω περιορισμοί, μας οδήγησαν στην εφαρμογή, για πρώτη φορά, της υγρής χρωματογραφίας υπερύψηλης απόδοσης (Ultra Performance Liquid Chromatography, UPLC) σε σύζευξη με διαδοχική φασματομετρία μαζών (Tandem mass spectrometry, MS/MS) στην ανάλυση των COPs. Η εφαρμογή της εν λόγω τεχνικής επέτρεψε τη χρωματογραφική ανάλυση εντός 4.2 λεπτών και παράλληλα την απόκτηση δύο μεταβάσεων MRM ανά ένωση με καλή ευαισθησία, παρέχοντας, με τη σειρά της, μια αξιόπιστη επιβεβαίωση των COPs που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα.

Τέλος, μετά τα θετικά αποτελέσματα από την ανάλυση των κυπριακών αλλαντικών, το ερευνητικό ενδιαφέρον εστιάστηκε στον προσδιορισμό των επιπέδων συγκέντρωσης των COPs σε ποικιλία τροφίμων κυπριακής προέλευσης ευρείας κατανάλωσης. Τα πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι η 7-κέτο και τα 7-υδρόξυ παράγωγα αποτελούν τα κυρίαρχα COPs, ενώ τα επιβλαβή 5,6 εποξειδία προσδιορίστηκαν σε μικρότερες συγκεντρώσεις.

ABSTRACT

The goal of the research reported in this dissertation is to investigate the presence of cholesterol oxidation products (COPs) in Cypriot food, in order to be evaluated, for the first time, as potential sources of COPs. The main challenges that had to be addressed in order to achieve the particular objective were their low concentrations in the samples under study and the complexity of food matrices. The use of advanced analytical techniques with excellent precision and sensitivity and the development of a reliable analytical protocol that allowed the selective isolation of the desired compounds, were the answers to the present challenges.

The above-mentioned objective was achieved by the use of a particular experimental procedure. Optimal separation conditions were initially established by using the fundamental principles of chromatographic theory. The developed methods were then validated through a procedure that is required to ensure the accuracy of experimental data. The most important step in an analytical protocol is the development of a reliable sample preparation procedure. The ideal procedure, which was determined based on recovery and precision, was applied for the selective isolation of COPs from food matrices.

The first part of this research involves the development of a fast high-performance liquid chromatography method with ultraviolet-visible (UV-Vis) detector for the analysis of COPs. Baseline separation was achieved within 22 min by applying an isocratic solvent system of ACN:MeOH:H₂O:IPA (67:27:5:1), a flow rate of 0.8 mL/min and a temperature of 10 °C. Then, COPs were detected and quantified, for the first time, in Cypriot meat products. Large amounts were detected, which confirm the suspicion that the preparation of the particular meat products favors the oxidation of cholesterol. Upon completion of this aspect of research work, a few weaknesses were highlighted, which, however, were utilized for the design of a new research project.

In particular, while HPLC was widely utilized for the analysis of COPs, the use of UV-Vis detection did not provide the required sensitivity. The need to find an alternative to overcome the above-mentioned limitations, led us to apply, for the first time, Ultra High Performance Liquid Chromatography (Ultra Performance Liquid Chromatography, UPLC) coupled to tandem mass spectrometry (MS/MS) for the analysis of COPs. The use of the particular system allowed us to analyze all COPs within 4.2 min, while two

MRM transitions per compound were obtained with high sensitivity, which, in turn, provided a reliable confirmation of the COPs detected in the samples.

Finally, since positive results were obtained from the analysis of Cypriot meat products, in this study, research interest was focused on the qualitative and quantitative determination of COPs in a variety of widely consumed, traditional Cypriot foodstuffs.. The experimental data obtained demonstrated that 7-keto and 7-hydroxy derivatives were the dominant COPs, while the harmful 5,6 epoxides were determined in lower concentrations.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Δήλωση αναφορικά με την πνευματική ιδιοκτησία του περιεχομένου της εργασίας και των πειραμάτων	i
Ευχαριστίες	ii
Περίληψη	iv
Abstract	vi
Περιεχόμενα	viii
Κατάλογος Σχημάτων	xi
Κατάλογος Πινάκων	xv
Κατάλογος Συντμήσεων	xvi
1. Εισαγωγή	1
1.1. Βιβλιογραφική ανασκόπηση	4
1.2. Βιολογική δράση των COPs	9
1.3. Μηχανισμοί οξειδωσης της χοληστερόλης	10
1.3.1. Αυτοοξειδωση της χοληστερόλης μέσω μηχανισμού ελευθέρων ριζών	11
1.3.1.1. Οξειδωση στον C-7	11
1.3.1.2. Εποξειδωση της χοληστερόλης	13
1.3.1.3. Οξειδωση της πλευρικής αλυσίδας της χοληστερόλης	14
1.3.2. Φωτοοξειδωση της χοληστερόλης	14
2. Θεωρητικό υπόβαθρο – Επεξεργασία του δείγματος	17
2.1. Γενικά	17
2.2. Εξαγωγή των λιπιδίων	17
2.3. Σαπωνοποίηση	19
2.4. Εκχύλιση στερεάς φάσης	22
3. Χρωματογραφικές τεχνικές	25
3.1. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης	25
3.1.1. Οργανολογία	26
3.2. Υγρή χρωματογραφία υπερύψηλης απόδοσης	30
3.3. Ανιχνευτές	32
3.3.1. Ανιχνευτής συστοιχίας φωτοδιόδων	32
3.3.2. Διαδοχική φασματομετρία μάζας	33
3.3.2.1. Τετραπολικός αναλυτής μαζών	34
3.3.2.2. Μηχανισμός ηλεκτροψεκασμού	36

4.	Αξιολόγηση μεθόδου	39
4.1.	Ακρίβεια (Precision)	39
4.2.	Γραμμικότητα (Linearity)	40
4.3.	Όριο ανίχνευσης και όριο ποσοτικοποίησης (Limit of detection, LOD and Limit of quantification, LOQ)	40
4.4.	Ανάκτηση (Recovery)	41
5.	Πειραματικό μέρος	42
5.1.	Προσδιορισμός των COPs με χρήση της τεχνικής HPLC-UV/Vis	42
5.1.1.	Οργανολογία	42
5.1.2.	Αναλύτες	42
5.1.3.	Διαλύτες και αντιδραστήρια	42
5.1.4.	Μεθόδοι προετοιμασίας του δείγματος	43
5.2.	Σύγκριση μεθόδων επεξεργασίας του δείγματος	43
5.2.1.	Οργανολογία	43
5.2.2.	Αναλύτες	44
5.2.3.	Πειραματικές διαδικασίες επεξεργασίας του δείγματος	44
5.2.3.1.	Απευθείας σαπωνοποίηση	44
5.2.3.2.	Εξαγωγή των λιπιδίων	46
5.3.	Προσδιορισμός των COPs με χρήση της τεχνικής UPLC-MS/MS	48
5.3.1.	Οργανολογία	48
5.3.2.	Αναλύτες	48
5.3.3.	Διαλύτες	49
5.3.4.	Προετοιμασία του δείγματος	49
6.	Αποτελέσματα και συζήτηση	51
6.1.	Προσδιορισμός των COPs σε κυπριακά αλλαντικά με εφαρμογή της τεχνικής HPLC-UV/Vis	51
6.1.1.	Ανάπτυξη μεθόδου	51
6.1.2.	Αξιολόγηση μεθόδου	56
6.1.3.	Βελτιστοποίηση μεθόδου επεξεργασίας του δείγματος	57
6.1.4.	Εφαρμογή σε κυπριακά αλλαντικά	60
6.2.	Σύγκριση μεθόδων επεξεργασίας του δείγματος	63
6.2.1.	Βελτιστοποίηση σαπωνοποίησης	64
6.2.1.1.	Μελέτη αποικοδόμησης της 7-keto σε αλκαλικές συνθήκες	68
6.2.2.	Βελτιστοποίηση συνθηκών εξαγωγής του λίπους	71

6.3	Προσδιορισμός των COPs με χρήση της τεχνικής UPLC-MS/MS	74
6.3.1.	Ανάπτυξη μεθόδου	74
6.3.2.	Αξιολόγηση μεθόδου	82
6.3.2.1.	Επίδραση μητρικού υλικού (Matrix Effect, ME)	85
6.3.2.2.	Αξιολόγηση της ανάκτησης	88
6.3.3.	Εφαρμογή της μεθόδου	89
7.	Συμπεράσματα και μελλοντική εργασία	98
8.	Βιβλιογραφία	100

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

	Σελ.
Σχήμα 1.1. Κυτταροτοξική δράση των COPs. Με κίτρινο η Chol και με πράσινο η 25-OH.	10
Σχήμα 1.2. Μονοπάτι αυτοξειδωσης της χοληστερόλης. (I) Chol, (II) 7-Chol•, (III) 7-OO•, (IV) 7α-OOH, (V) 7β-OOH, (VI) 7-O•, (VII) 7α-OH, (VIII) 7β-OH, (IX) 7-keto.	12
Σχήμα 1.3. Εποξειδωση της Chol. (I) Chol, (XIII) 5,6α-EP, (XIV) 5,6β-EP, (XV) triol.	13
Σχήμα 1.4. Οξειδωση της πλευρικής αλυσίδας της Chol. (I) Chol, (XVI) 20α-OH, (XVII) 25-OH.	14
Σχήμα 1.5. Πορεία φωτοξειδωσης της χοληστερόλης. (I) Chol, (V) 7β-OOH, (IV) 7α-OOH, (XVIII) 6β-OOH, (XIX) 6α-OOH, (XX) 5α-OOH, (XXI) 5α-OH.	15
Σχήμα 2.1. Σχηματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης και των πρωτεϊνών: (α) υδρόφοβες και υδρόφιλες αλληλεπιδράσεις μεταξύ της Chol ή των COPs με τα υπόλοιπα λιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης, (β) υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αλειφατικών τμημάτων των λιπιδίων με μη πολικές περιοχές μιας εσωτερικής πρωτεΐνης, (γ, δ) υδρόφιλες και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πολικών ομάδων των λιπιδίων και μιας περιφερειακής πρωτεΐνης και (ε) μια αμφιφιλική πρωτεΐνη η οποία διεισδύει μερικώς στη διπλοστοιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης.	18
Σχήμα 2.2. Αντίδραση σαπωνοποίησης των τρυγλυκεριδίων.	20
Σχήμα 2.3. Μετατροπή της 7-keto στη Cholesta-3,5-dien-7-one κάτω από αλκαλικές συνθήκες ή/και θέρμανση.	20
Σχήμα 2.4. Σχηματική απεικόνιση της πορείας της καθαρισμού των COPs με SPE.	23
Σχήμα 3.1. Περιγραφή υπολογισμού των παραμέτρων της διαχωριστικής ικανότητας μιας χρωματογραφικής μεθόδου.	28
Σχήμα 3.2. Σχηματική αναπαράσταση συστήματος HPLC. 1. Αντλία, 2. Σύστημα εισαγωγής του δείγματος, 3. Χρωματογραφική Στήλη, 4. Ανιχνευτής.	29
Σχήμα 3.3. Καμπύλες Van Deemter για διαφορετικά μεγέθη σωματιδίων (1.7, 3, 5, 10 μm).	31

	Σελ.
Σχήμα 3.4. Σχηματική παρουσίαση ανιχνευτής συστοιχίας φωτοδιόδων	33
Σχήμα 3.5. Σχηματική αναπαράσταση των τμημάτων ενός φασματομέτρου μάζας.	34
Σχήμα 3.6. Σχηματική απεικόνιση τετραπολικού αναλυτή μαζών.	35
Σχήμα 3.7. Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας του ηλεκτροψεκασμού.	37
Σχήμα 5.1. Απεικόνιση της πειραματικής πορείας της απευθείας σαπωνοποίησης.	45
Σχήμα 5.2. Η πειραματική διαδικασία της εξαγωγής των λιπιδίων σε εικόνες.	47
Σχήμα 6.1. Χημικές δομές των υπό μελέτη COPs με HPLC-UV/Vis 1. 22R-OH, 2. 20α-OH, 3. 25-OH, 4. 7β-OH, 5. 7-κέτο.	51
Σχήμα 6.2. Πορεία επιλογής της βέλτιστης σύστασης της κινητής φάσης.	52
Σχήμα 6.3. Χρωματογράφημα με τη βέλτιστη σύσταση κινητής φάσης ACN:MeOH:H ₂ O:IPA (67:27:5:1), ταχύτητα ροής 1mL/min, θερμοκρασία στήλης 10°C. (1. 22R-OH, 2. 20α-OH, 3.25-OH, 4. 7-OH, 5.7-κέτο).	53
Σχήμα 6.4. Επίδραση της θερμοκρασίας της στήλης στο διαχωρισμό των υπό μελέτη COPs. Συνθήκες: κινητή φάση ACN:MeOH:H ₂ O:IPA 67:27:5:1, όγκος έγχυσης 10 μL. (1. 22R-OH, 2. 20α-OH, 3.25-OH, 4. 7-OH, 5. 7-κέτο).	54
Σχήμα 6.5. Επίδραση της ταχύτητας ροής της κινητής φάσης στο διαχωρισμό των υπό μελέτη COPs. Συνθήκες: κινητή φάση ACN:MeOH:H ₂ O:IPA 67:27:5:1, όγκος έγχυσης 10 μL, θερμοκρασία στήλης 10°C. (1. 22R-OH, 2. 20α-OH, 3.25-OH, 4. 7-OH, 5. 7-κέτο).	55
Σχήμα 6.6. Χρωματογράφημα από δείγμα λούντζας με εφαρμογή της πρώτης μεθόδου επεξεργασίας (3. 25-OH).	58
Σχήμα 6.7. Χρωματογραφήματα από δείγματα λούντζας με εφαρμογή των Β και Γ μεθόδων επεξεργασίας (1.22R-OH, 3. 25-OH)	59
Σχήμα 6.8. Χρωματογράφημα εμβολιασμένης λούντζας, στα 206 nm, που επεξεργάστηκε με τη μέθοδο ‘Mariutti’	64
Σχήμα 6.9. Χρωματογράφημα τυφλού δείγματος λούντζας, στα 206 nm, που επεξεργάστηκε με τη μέθοδο ‘Mariutti’. Σε κύκλο, η	65

	πρόσμειξη που οδηγεί σε υπερεκτίμηση της συγκέντρωσης της 22S-OH.	
Σχήμα 6.10.	Χρωματογράφημα εμβολιασμένου δείγματος λούντζας, στα 206 nm, που επεξεργάστηκε με τη μέθοδο ‘Ubhayasekera’.	67
Σχήμα 6.11.	Χρωματογράφημα τυφλού δείγματος λούντζας, στα 206 nm, που επεξεργάστηκε με τη μέθοδο ‘Ubhayasekera’. Σε κύκλο, οι ακαθαρσίες που επηρέασαν την ποσοτικοποίηση.	68
Σχήμα 6.12.	Χρωματογραφήματα της επίδρασης του χρόνου της σαπωνοποίησης (με KOH 3.6 M), στην ανάκτηση της 20α-OH και 7-keto. Η συγκέντρωση της τελευταίας μειώνεται με αύξηση του χρόνου σαπωνοποίησης ενώ η 20α-OH παραμένει ανεπηρέαστη.	69
Σχήμα 6.13.	Επίδραση του χρόνου σαπωνοποίησης (με KOH 3.6 M) στην ανάκτηση της 7-keto.	69
Σχήμα 6.14.	Φάσματα UV που επιβεβαιώνουν την όλο και μεγαλύτερη μετατροπή της 7-keto (230 nm) στη cholesta-3,5-dien-7-one (275 nm) με αύξηση του χρόνου σαπωνοποίησης (με KOH 3.6 M).	70
Σχήμα 6.15.	Επίδραση της συγκέντρωσης του KOH στην ανάκτηση της 7-keto.	71
Σχήμα 6.16.	Εφαρμογή της μεθόδου ‘Folch-Saldanha’ (α) σε εμβολιασμένο δείγμα 5 g λούντζας με ανίχνευση στα 206 nm και (β) στα 230 nm. Σύσταση κινητής φάσης εξάνιο/2-προπανόλη/ακετόνη (97:1.5:1.5, v/v), ρυθμός ροής 1.5 mL/min και θερμοκρασία 25 °C. (1) 20α-OH, (2) 22R-OH, (3) 22S-OH, (4) 25-OH, (5) 7-keto, (6) 7β-OH, (7) 7α-OH.	73
Σχήμα 6.17.	Τα κύρια θυγατρικά θραύσματα των (Α) 7-OH, (Β) 5,6-EP και (Γ) 22R-OH.	76
Σχήμα 6.18.	Βελτιστοποίηση του δυναμικού και της ενέργειας σύγκρουσης. (Α. 7-κέτο, Β. 5,6-EP, Γ. 7-OH, Δ. 22R-OH).	78
Σχήμα 6.19.	Η επίδραση της ταχύτητας ροής του αερίου αποδιαλύτωσης στην ένταση του σήματος των υπο μελέτη ενώσεων (Α. 5,6-EP, Β. 7-OH, Γ. 22R-OH, Δ. 7-keto).	79
Σχήμα 6.20.	Εξάρτηση της έντασης του σήματος των COPs με τη θερμοκρασία της πηγής. (Α. 5,6-EP, Β. 7-OH, Γ. 22R-OH, Δ. 7-keto).	80
Σχήμα 6.21.	Χρωματογραφήματα συνολικών ιόντων (TIC) πρότυπου μείγματος των υπό μελέτη ενώσεων σε συγκέντρωση 0.5 μg/mL. (1.22R-OH, 2. 7-OH, 3. 5,6-EP, 4. 7-keto).	82
Σχήμα 6.22.	Αξιολόγηση της επίδρασης του μητρικού υλικού σύμφωνα με την εξίσωση 6.1.	87

Σχήμα 6.23.	Αξιολόγηση της επίδρασης του μητρικού υλικού σύμφωνα με το λόγο της κλίσης μήτρας/διαλύτη.	88
Σχήμα 6.24.	Ενδεικτικό χρωματογράφημα κατά τον ποσοτικό προσδιορισμό των (1) 7-OH (2) 7-κέτο και (3) 5,6-EP σε δείγμα μπέικον.	91
Σχήμα 6.25.	Επίδραση του κόκκινου κρασιού στα επίπεδα συγκέντρωσης των COPs σε ωμό χοιρινό κρέας.	93
Σχήμα 6.26.	Αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών ενάντια στην οξείδωση της Chol.	93
Σχήμα 6.27.	Επίδραση της διάρκειας αλατίσματος στη συγκέντρωση των υπό μελέτη COPs σε ωμό χοιρινό κρέας.	95

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

	Σελ.
Πίνακας 1.1. Επίδραση της προσθήκης κρεμμυδιού και σκόρδου. Οι συγκεντρώσεις της 7-keto και των 7-OH δίνονται σε ng/g χοιρινού (n=2).	6
Πίνακας 1.2. Περιεκτικότητα των COPs (μg/100 g μπιφτεκιού) στα R, CO και CC που παρασκευάστηκαν με εκχύλιση αβοκάντο (T) ή χωρίς (C) (n=6).	8
Πίνακας 2.1. Τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα πρωτόκολλα SPE με σχηματική απεικόνιση.	24
Πίνακας 6.1. Παράμετροι αξιολόγησης της βέλτιστης HPLC μεθόδου.	56
Πίνακας 6.2. Η περιεκτικότητα σε COPs στα δείγματα λούντζας και χοιρομέρι (μg/g).	61
Πίνακας 6.3. Πειραματικά και βιβλιογραφικά ποσοστά ανάκτησης της μεθόδου 'Mariutti'	65
Πίνακας 6.4. Συγκριτικά αποτελέσματα ανάκτησης των μεθόδων απευθείας σαπωνοποίησης.	66
Πίνακας 6.5. Σύγκριση ανάκτησης των μεθόδων εκχύλισης των λιπιδίων με τη βέλτιστη μέθοδο σαπωνοποίησης.	72
Πίνακας 6.6. MS/MS παράμετροι των υπό μελέτη αναλυτών.	78
Πίνακας 6.7. Αξιολόγηση της ακρίβειας της μεθόδου.	83
Πίνακας 6.8. Δεδομένα βαθμονόμησης των καμπύλων αναφοράς των υπο μελέτη ενώσεων σε καθαρό διαλύτη και σε κάθε εξεταζόμενη μήτρα.	84
Πίνακας 6.9. Τα επίπεδα COPs που ανιχνεύτηκαν στα κυπριακά τρόφιμα.	90
Πίνακας 6.10. Επίπεδα συγκέντρωσης των COPs σε δείγματα πράσινων και κανονικών αυγών.	96

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ

20α-OH	20α-hydroxycholesterol, 20α-υδροξυχοληστερόλη
22R-OH	22R-hydroxycholesterol, 22R-υδροξυχοληστερόλη
22S-OH	22S-hydroxycholesterol, 22S-υδροξυχοληστερόλη
25-OH	25-hydroxycholesterol, 25-υδροξυχοληστερόλη
5,6-EP	5,6-epoxides, 5,6 εποξειδία της χοληστερόλης
7-keto	7-ketocholesterol, 7-κέτοχοληστερόλη
7-OH	7-hydroxycholesterol, 7-υδρόξυχοληστερόλη
ACN	Acetonitrile, ακετονιτρίλιο
Chol	Cholesterol, χοληστερόλη
COPs	Cholesterol oxidation products, προϊόντα οξείδωσης της χοληστερόλης
ESI	Electrospray ionization, ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό
GC	Gas chromatography, αέρια χρωματογραφία
HPLC	High performance liquid chromatography, υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
LH	Fatty acid, λιπαρά οξέα
LOD	Limit of detection, όριο ανίχνευσης
LOOH	Fatty acid hydroperoxide, υδροϋπεροξειδία των λιπαρών οξέων
LOQ	Limit of quantification, όριο ποσοτικοποίησης
MeOH	Methanol, μεθανόλη
MS/MS	Tandem mass spectrometry, διαδοχική φασματομετρία μάζας
PDA	Photodiode-array detector, ανιχνευτής συστοιχίας φωτοδιόδων
PUFA	Polyunsaturated fatty acid, πολυακόρεστα λιπαρά οξέα
Rs	Resolution factor, διαχωριστική ικανότητα
RSD	Relative standard deviation, σχετική τυπική απόκλιση
SPE	Solid phase extraction, εκχύλιση στερεάς φάσης
tR	Retention time, χρόνος κατακράτησης
UPLC	Ultra performance liquid chromatography, υγρή χρωματογραφία υπερύψηλης απόδοσης
UV-Vis	Ultraviolet-visible, υπεριώδες-ορατό
ME	Matrix effect, επίδραση μητρικού υλικού

1. Εισαγωγή

Η χοληστερόλη είναι μια μονοακόρεστη αλκοόλη, η οποία μπορεί εύκολα να υποστεί οξείδωση προς το σχηματισμό ενός μεγάλου αριθμού οξειδωτικών προϊόντων, τα οποία αποκαλούνται COPs.¹⁻⁴ Η μελέτη των COPs, τα τελευταία χρόνια, έχει προσελκύσει ένα μεγάλο κομμάτι της ερευνητικής δραστηριότητας, γεγονός που επισφραγίζεται από την πληθώρα σχετικών μελετών που δημοσιεύτηκαν στο διεθνή επιστημονικό τύπο.^{5,6} Τα COPs επηρεάζουν δυσμενώς την ανθρώπινη υγεία, δεδομένου ότι εμφανίζουν κυτταροτοξική και καρκινογόνο δράση. Θεωρείται ότι συμβάλλουν σημαντικά στο σχηματισμό αθηροματικών πλακών και συνδέονται με αλλαγές στη λειτουργία και στη μορφολογία της κυτταρικής μεμβράνης.⁷⁻¹¹

Η κατανάλωση τροφίμων, πλούσιων σε περιεκτικότητα χοληστερόλης, όπως το κρέας, τα θαλασσινά και τα γαλακτοκομικά προϊόντα, αποτελούν τις κύριες πηγές πρόσληψης των COPs.^{12,13} Παρόλο που δεν υπάρχουν θεσμοθετημένα όρια παρουσίας των εν λόγω ενώσεων στα τρόφιμα, χρόνια έκθεση συνιστά απειλή για την ανθρώπινη υγεία. Το γεγονός αυτό εγείρει σοβαρά ερωτήματα σχετικά με την ασφάλεια των καταναλωτών και εδραιώνει την απαίτηση για τον εντοπισμό των εν λόγω ενώσεων στα τρόφιμα που υπάρχουν στην ελεύθερη αγορά.¹⁴

Στόχος και πρωτοτυπία

Στο πλαίσιο αυτό εντάσσεται και η εκπόνηση της παρούσας εργασίας, η πρόοδος της οποίας βασίζεται σε τρεις βασικούς άξονες. Στο πρώτο στάδιο εξετάζεται η ικανότητα δύο χρωματογραφικών τεχνικών (HPLC-UV/Vis και UPLC-MS/MS) στην ανάλυση των COPs σε δείγματα τροφίμων. Να σημειωθεί ότι το τελευταίο χρωματογραφικό σύστημα εφαρμόστηκε για πρώτη φορά για την ανάλυση των COPs, στοιχείο στο οποίο έγκειται και η πρωτοτυπία της παρούσας έρευνας. Η ανάπτυξη μιας τέτοιας μεθόδου εμφανίζει σαφή πλεονεκτήματα σε σχέση με τις υπάρχουσες μεθόδους της βιβλιογραφίας και υπογραμμίζει για ακόμα μια φορά την ανάγκη αντικατάστασης των συμβατικών τεχνικών χρωματογραφίας από πιο ισχυρά και εκλεκτικά αναλυτικά εργαλεία που θα εκπληρώνουν τις απαιτήσεις της σύγχρονης ανάλυσης τροφίμων. Είναι χρήσιμο να αναφέρουμε ότι η HPLC και η αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC) αποτελούν τις κύριες χρωματογραφικές τεχνικές για την ανάλυση των COPs στα τρόφιμα. Η τελευταία, παρόλο που είναι αποτελεσματική, λόγω των υψηλών θερμοκρασιών που χρησιμοποιούνται, απαιτείται μια χρονοβόρα

διαδικασία παραγωγοποίησης των αναλυτών προκειμένου να ενισχυθεί η πτητικότητα και η θερμική τους σταθερότητα.¹⁵ Ως συνέπεια αυτών των περιορισμών, η HPLC έχει γίνει η τεχνική της επιλογής επιτρέποντας την ανάλυση των COPs σε χαμηλές θερμοκρασίες.^{6,16}

Η δεύτερη πτυχή της εργασίας εστιάστηκε στη βελτιστοποίηση των συνθηκών του σταδίου προκατεργασίας των δειγμάτων. Οι διάφορες τεχνικές συγκρίθηκαν ως προς την αποτελεσματικότητά τους, προκειμένου να βρεθεί εκείνη που πλεονεκτεί ως προς την εκλεκτικότητα της και παρουσιάζει τις υψηλότερες ανακτήσεις. Η σπουδαιότητα του εν λόγω σταδίου είναι ιδιαίτερα μεγάλη, καθώς, σε περίπτωση που δεν εφαρμοστεί σωστά, τότε τα αποτελέσματα είναι αναξιόπιστα, άσχετα με το πόσο σύγχρονη είναι η αναλυτική συσκευή που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των δειγμάτων. Η εφαρμογή του συγκεκριμένου αναλυτικού σταδίου πραγματοποιείται πριν από τη χρωματογραφική ανάλυση, με σκοπό την εξάλειψη των παρεμβολών από άλλα συστατικά της μήτρας/υποστρώματος και την απομόνωση των COPs.^{1,2} Παρά το γεγονός ότι πολλά ερευνητικά άρθρα έχουν δημοσιευθεί σχετικά με την εκχύλιση και τον καθαρισμό των COPs από τα τρόφιμα, δεν υπάρχει διαθέσιμη μέχρι σήμερα μια πιστοποιημένη μέθοδος. Έτσι, η ανάπτυξη ενός αξιόπιστου πρωτοκόλλου είναι ένα επείγον ζήτημα που πρέπει να ξεπεραστεί.

Τέλος, το ενδιαφέρον επικεντρώθηκε στον προσδιορισμό των COPs σε ποικιλία κυπριακών προϊόντων. Παρόλο που πολλές έρευνες ασχολήθηκαν με τον προσδιορισμό των COPs σε διάφορα είδη τροφίμων, υπάρχει μια σημαντική έλλειψη γνώσεων σχετικά με το περιεχόμενο των COPs σε κυπριακά προϊόντα διατροφής. Το κενό αυτό επιχειρεί να καλύψει η παρούσα εργασία, στόχος της οποίας όπως προαναφέρθηκε είναι να προσδιορίσει για πρώτη φορά το προφίλ των κύριων COPs σε μια μεγάλη ποικιλία κυπριακών παραδοσιακών προϊόντων.

Εκτός από τον εντοπισμό των εν λόγω ενώσεων απαιτείται να προσδιοριστούν και οι παράγοντες που προωθούν ή αναστέλλουν το σχηματισμό τους. Με αυτό ως γνώμονα, ένα σημαντικό κομμάτι της εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης του κρασιού και του άλατος στα επίπεδα συγκέντρωσης των COPs. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν τα επίπεδα συγκέντρωσης των εν λόγω ενώσεων σε ωμό χοιρινό κρέας το οποίο μαριναρίστηκε σε διάφορα χρονικά διαστήματα (0, 2, 4, 8, 12, 24 και 48 ώρες).

Αντίστοιχη μελέτη, χρησιμοποιώντας την ίδια μήτρα αξιολόγησης πραγματοποιήθηκε και για τον προσδιορισμό της επίδρασης του αλατίσματος.

Χριστιάννα Α. Γεωργίου

1.1. Βιβλιογραφική ανασκόπηση

Ο προσδιορισμός των COPs σε διάφορα είδη τροφίμων αποτέλεσε το επίκεντρο μελέτης σε πολλές ερευνητικές εργασίες. Τρόφιμα ζωικής προέλευσης με πλούσια περιεκτικότητα σε χοληστερόλη, όπως το κρέας, το γάλα, τα αυγά και τα θαλασσινά αποτέλεσαν τις κύριες μήτρες αξιολόγησης.^{12,17} Αν και δε μπορούν να αναλυθούν τα αποτελέσματα δεκάδων βιβλιογραφικών αναφορών, κρίνεται σημαντικό να εξεταστούν οι πιο ενδιαφέρουσες μελέτες.

Αρχικά, σε ερευνητική εργασία της Clariana¹⁸ προσδιορίστηκαν τα επίπεδα των COPs σε ξηρό χοιρινό κρέας, (dry-cured shoulder) παραδοσιακό προϊόν της Ισπανίας. Η 7 keto και η 7β-OH αποτέλεσαν τα κυρίαρχα COPs με τις συγκεντρώσεις τους να είναι 0.591 και 0.446 μg/g δείγματος, αντίστοιχα. Υψηλά επίπεδα συγκέντρωσης προσδιορίστηκαν και για τα επιβλαβή ισομερή 5,6 εποξειδία (συνολικά 0.528 μg/g δείγματος) και την 25-OH (0.224 μg/g δείγματος). Η ύπαρξη των COPs στο εν λόγω προϊόν αποδίδεται στο προοξειδωτικό περιβάλλον προετοιμασίας του, το οποίο περιλαμβάνει εκτεταμένο αλάτισμα και ωρίμανση με έκθεση στον αέρα. Να σημειωθεί εδώ ότι αυτή είναι μια πορεία που ακολουθείται και στην προετοιμασία των κυπριακών αλλαντικών.

Αντίστοιχη μελέτη πραγματοποιήθηκε κι από την ερευνητική ομάδα του Soto-Rodríguez¹⁹ για τον προσδιορισμό των COPs σε αποξηραμένες γαρίδες (sun-dried shrimp), παραδοσιακό φαγητό του Μεξικού. Αρχικά, γίνεται βρασμός τους σε άλμη (5% NaCl) για 5-10 min και στη συνέχεια ξηραίνονται με την τοποθέτησή τους σε συγκεκριμένες πλάκες για 3-10 ημέρες κάτω από απευθείας ακτινοβολία. Με πολλούς παράγοντες να ευνοούν την οξείδωση της χοληστερόλης, η 7-κέτο και τα 7-υδροξύ παράγωγα ήταν τα κυρίαρχα COPs που προσδιορίστηκαν σε τρία διαφορετικά δείγματα γαρίδων. Συγκεκριμένα τα ποσοστά της 7-κέτο κυμάνθηκαν από 3.80 με 6.80 mg/100 g δείγματος, ενώ η 7-OH από 6.90 σε 10.3 mg/100 g δείγματος. Σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις ανιχνεύτηκαν τα COPs της πλευρικής αλυσίδας 25- και 20α-OH.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ερευνητική εργασία του Janoszka,²⁰ ο οποίος μελέτησε την επίδραση του κρεμμυδιού και του σκόρδου (λαχανικά πλούσια σε πολυφαινόλες, κυρίως φλαβονοειδή) στο σχηματισμό τριών COPs (7-keto, 7α-OH και

7β-OH) σε χοιρινό κρέας, που μαγειρεύτηκε με τρεις διαφορετικούς τρόπους. Για το σκοπό αυτό, σύγκρινε τις συγκεντρώσεις των COPs στα τρία πιάτα, τα οποία προετοιμάστηκαν στην παρουσία και απουσία του κάθε συστατικού ξεχωριστά. Η έρευνα αυτή αποτέλεσε μέρος μιας μελέτης, η οποία βασιζόταν σε διάφορες μεθόδους που μπορούν να μειώσουν τις συγκεντρώσεις αυτών των βλαβερών, για τον άνθρωπο, ουσιών, σε τρόφιμα με υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες.

Παρακάτω, περιγράφεται συνοπτικά η παρασκευή των τριών πιάτων που μελετήθηκαν, καθώς και ο τρόπος με τον οποίο μαγειρεύτηκαν. Κάθε ένα από τα τρία πιάτα, παρασκευάστηκε στην παρουσία κρεμμυδιού, στην παρουσία σκόρδου καθώς και στην απουσία των δύο συστατικών. Οι ποσότητες που προστέθηκαν και στα τρία πιάτα ήταν 30 g κρεμμυδιού ή 15 g σκόρδου ανά 100 g κρέατος.

1^ο πιάτο: φιλέτο χοιρινού, βάρους 100 g, τυλίχθηκε σε ρολό, στην παρουσία ή απουσία του κρεμμυδιού/σκόρδου. Ακολούθως, τηγανίστηκε για 20 min, σε τηγάνι που προθερμάνθηκε προηγουμένως στους 200 °C, χωρίς λάδι. Τέλος, αφού προστέθηκαν 200 ml νερού, το τηγάνι σφραγίστηκε, και το κρέας αφέθηκε να σιγοβράζει για 1 h στους 95-98 °C.

2^ο πιάτο: τα δύο συστατικά, απλώθηκαν πάνω στις δύο πλευρές του φιλέτου, το οποίο ακολούθως τυλίχθηκε σε αλουμινοχαρτο και αφέθηκε σε ηρεμία για 12 h. Με το πέρας των 12 h, τα συστατικά αφαιρέθηκαν και το φιλέτο ψήθηκε στις ίδιες ακριβώς συνθήκες με το 1^ο πιάτο, με τη μόνη διαφορά ότι το χοιρινό τηγανίστηκε για 6 min σε κάθε πλευρά.

3^ο πιάτο: το χοιρινό αλέστηκε σε κιμά και ακολούθως αφού αναμείχθηκε με την κατάλληλη ποσότητα κρεμμυδιού ή σκόρδου, παρασκευάστηκαν μπιφτέκια. Τα μπιφτέκια, ψήθηκαν για 17 min σε κάθε πλευρά, σε ηλεκτρικό φούρνο, στους 270 °C.

Η ποσότητα των COPs, στα πιάτα που προετοιμάστηκαν στην παρουσία κρεμμυδιού ή σκόρδου, ήταν χαμηλότερη, σε όλες τις περιπτώσεις, από αυτά που προετοιμάστηκαν απουσία των δύο συστατικών (**Πίνακας 1.1.**). Η πιο αισθητή μείωση σημειώθηκε στο 3^ο πιάτο. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μείωση, της τάξης του 79.3% και 87.6%, στη συνολική συγκέντρωση των COPs, όταν χρησιμοποιήθηκε κρεμμύδι ή σκόρδος, αντίστοιχα, σε σχέση με τη συνολική ποσότητα απουσία, των δύο συστατικών. Η

δραματική μείωση που επέφεραν τα δύο συστατικά μπορεί να οφείλεται στη συνεχή επαφή των δύο συστατικών με τον κιμά.

Επιπλέον, στα πιάτα, όπου η επαφή των δύο συστατικών με το κρέας κατά τη διάρκεια της θερμικής επεξεργασίας ήταν μόνιμη (1^ο και 3^ο), ο σκόρδος φαίνεται να αναστέλλει πιο αποτελεσματικά (75 και 91.5 % αντίστοιχα) το σχηματισμό των δύο COPs, παρά το γεγονός ότι προστέθηκε σε μικρότερη ποσότητα απ' ό,τι το κρεμμύδι (15 έναντι 30 g).

Αισθητή μείωση (ιδιαίτερα στην περίπτωση χρήσης του κρεμμυδιού) παρατηρήθηκε και στο 2^ο πιάτο, όπου τα δύο συστατικά βρίσκονταν σε επαφή με το κρέας για 12 h πριν το τηγάνισμα. Πιθανότατα, οι αντιοξειδωτικές ενώσεις του κρεμμυδιού και του σκόρδου, έχουν την ικανότητα να διεισδύουν μέσα στο κρέας, παρέχοντας προστασία κατά της οξείδωσης της χοληστερόλης. Σύμφωνα με το Janoszka, η σημαντική μείωση των επιπέδων των COPs, στις περιπτώσεις που χρησιμοποιήθηκε το κρεμμύδι ή ο σκόρδος, μπορεί να αποδίδεται στην αναστολή του ρυθμού σχηματισμού των 7-OOH, από τα οποία σχηματίζονται η 7-keto και τα 7-OH.

Πίνακας 1.1. Επίδραση της προσθήκης κρεμμυδιού και σκόρδου. Οι συγκεντρώσεις της 7-keto και των 7-OH δίνονται σε ng/g χοιρινού (n=2).

Sample	7-keto	7-OH	Total
<i>Collar</i>			
<i>Without additives</i>	584.8	339.4	924.2
<i>With onion</i>	510.2 (12.7%)	326.2 (3.9%)	836.8 (9.4%)
<i>With garlic</i>	146.2 (75.0%)	320.7 (5.5%)	466.9 (49.5%)
<i>Chop</i>			
<i>Without additives</i>	223.5	219.1	442.5
<i>With onion</i>	129.6 (42.0%)	101.3 (53.8%)	230.9 (47.8%)
<i>With garlic</i>	172.8 (22.6%)	196.1 (10.5%)	368.9 (16.6%)
<i>Minced chop</i>			
<i>Without additives</i>	1331.5	881.8	2213.3
<i>With onion</i>	345.0 (74.1%)	113.7 (87.1%)	458.7 (79.3%)
<i>With garlic</i>	113.0 (91.5%)	160.5 (81.8%)	273.5 (87.6%)

Σε μια αντίστοιχη μελέτη ο Carpena²¹ και οι συνεργάτες του μελέτησαν την επίδραση εκχυλίσματος από αβοκάντο στο σχηματισμό των COPs σε χοιρινά μπιφτέκια. Για το σκοπό αυτό, παρασκεύασαν 18 μπιφτέκια (C) συνολικού βάρους 1 Kg, χρησιμοποιώντας 700 g μυϊκού ιστού, 100 g χοιρινού λίπους, 180 g αποσταγμένου νερού και 20 g γλωριούχου νατρίου, καθώς και 18 μπιφτέκια (T), αντικαθιστώντας 50 g νερού με 50 g εκχυλίσματος από αβοκάντο.

Τα C και T διαχωρίστηκαν στις τρεις παρακάτω κατηγορίες, αναλόγως με την επεξεργασία που υπέστησαν:

(α) ωμά (R, raw), τα οποία πακεταρίστηκαν υπό κενό, αμέσως μετά την παρασκευή τους, στους -80 °C μέχρι την ποσοτική τους ανάλυση,

(β) ψημένα (CO, cooked) και

(γ) αυτά που υποβλήθηκαν σε ψήσιμο και απλή ψύξη (CC, cooked & chilled).

Τα CO και CC ψήθηκαν στους 170 °C για 18 min σε ηλεκτρικό φούρνο. Τα CO πακεταρίστηκαν υπό κενό, στους -80 °C. Αντίθετα μετά το ψήσιμο, τα CC, συσκευάστηκαν σε πλαστικά δοχεία πολυπροπυλενίου τα οποία σφραγίστηκαν με PVC (διαπερατότητας 17 cm³/m² day σε οξυγόνο) και αποθηκεύτηκαν στους 5 °C για 15 ημέρες, κάτω από άσπρο λαμπτήρα, αντιπροσωπεύοντας ουσιαστικά τις εμπορικές συνθήκες φύλαξης. Ακολούθως, όπως και στην περίπτωση των R και CO, αποθηκεύτηκαν υπό κενό στους -80 °C μέχρι την ποσοτική τους ανάλυση. Στον **Πίνακα 1.2.** παραθέτονται τα αποτελέσματα από τον ποσοτικό προσδιορισμό των C και T στα R, CO και CC.

Στα R δείγματα, η συγκέντρωση των COPs, ήταν κάτω από τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου. Αντίθετα, παρατηρήθηκε προοδευτική αύξηση των επιπέδων τους κατά το ψήσιμο και την επακόλουθη διατήρηση με απλή ψύξη. Η 7-keto, ήταν το κυρίαρχο COP, σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις, ενώ η 25-OH και 20α-OH δεν ανιχνεύτηκαν σε κανένα δείγμα. Αυτό αποδίδεται στο γεγονός ότι η πλευρική αλυσίδα της χοληστερόλης, είναι λιγότερο ευπαθής στην οξείδωση.

Η θερμική επεξεργασία, προκάλεσε το σχηματισμό πέντε COPs. Όπως ήταν αναμενόμενο, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις βρέθηκαν στα CC. Η συγκέντρωση των COPs στα C, τα οποία παρασκευάστηκαν χωρίς εκχύλισμα αβοκάντο, αυξήθηκε κατά

3 με 7 φορές μετά από 15 ημέρες ψύξης, σε σχέση με τα αντίστοιχα C στα CO, τα οποία αποθηκεύτηκαν αμέσως υπό κενό. Και στις δύο περιπτώσεις, CO και CC, η μεγαλύτερη αύξηση στα C, παρατηρήθηκε στην περίπτωση της 7-keto. Τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας, δείχνουν ότι η οξείδωση της χοληστερόλης, στο μαγειρεμένο κρέας δεν αναστέλλεται κατά τη διατήρηση του μαγειρεμένου τροφίμου σε χαμηλές θερμοκρασίες (5 °C), αλλά ουσιαστικά προωθείται από τις φυσικοχημικές αλλαγές που προκύπτουν στα μπιφτέκια κατά τη θερμική τους επεξεργασία. Συγκεκριμένα, η θερμική επεξεργασία, εκτός του ότι προωθεί την παραγωγή των COPs, δημιουργεί και ένα έντονο προ-οξειδωτικό περιβάλλον, το οποίο ευνοεί την περαιτέρω οξείδωση της χοληστερόλης κατά την περίοδο διατήρησης στο ψυγείο και ως εκ τούτου, η τεχνική CC πρέπει να αποτρέπεται.

Πίνακας 1.2. Περιεκτικότητα των COPs (μg/100 g μπιφτεκιού) στα R, CO και CC που παρασκευάστηκαν με εκχύλισμα αβοκάντο (T) ή χωρίς (C) (n=6).

	R		CO		CC	
	C	T	C	T	C	T
7α-OH	LOD	LOD	38.6 ± 3.1	37.8 ± 5.2	281.6 ± 17.3	41.1 ± 6.6
7β-OH	LOD	LOD	48.7 ± 2.4	26.4 ± 3.2	353.4 ± 29.3	60.1 ± 5.3
7-keto	LOD	LOD	83.4 ± 16.8	25.9 ± 10.3	584.8 ± 18.8	82.8 ± 13.1
20α-OH	LOD	LOD	LOD	LOD	LOD	LOD
25-OH	LOD	LOD	LOD	LOD	<LOQ	LOD
Triol	LOD	LOD	LOD	LOD	LOD	LOD
5,6β-EP	LOD	LOD	29.6 ± 4.9	LOD	106.3 ± 25.6	33.5 ± 5.4
5,6α-EP	LOD	LOD	7.2 ± 1.6	LOD	25.5 ± 5.6	8.0 ± 0.3

Αντίθετα στα T, τα οποία παρασκευάστηκαν με εκχύλισμα αβοκάντο, η ποσότητα των COPs βρέθηκε αισθητά μειωμένη σε σχέση με τα αντίστοιχα C. Η προσθήκη του εκχυλίσματος στα μπιφτέκια, ανέστειλε σημαντικά το σχηματισμό των COPs, τόσο κατά τη θερμική επεξεργασία όσο και κατά την επακόλουθη ψύξη τους. Συγκεκριμένα, επέφερε δραματική μείωση στην 7-keto και απέτρεψε το σχηματισμό των επιβλαβή

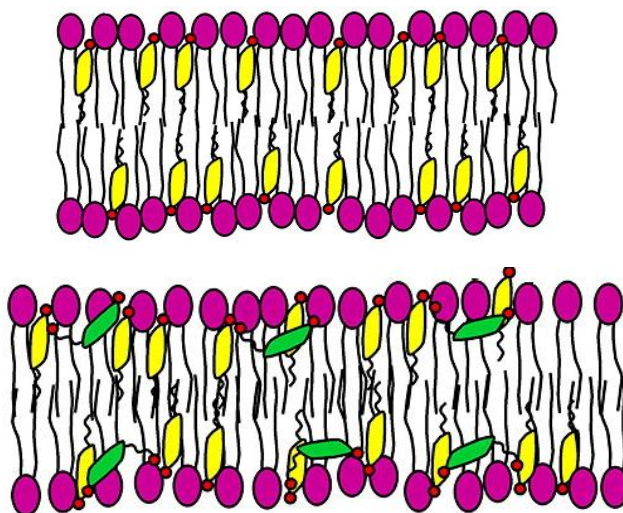
εποξειδίων κατά το ψήσιμο. Το μεγαλύτερο κέρδος από τη χρήση του εκχυλίσματος αβοκάντο, σημειώθηκε κατά τη διατήρηση στο ψυγείο. Τα δείγματα T στα CC, περιείχαν 3 με 7 φορές χαμηλότερη περιεκτικότητα σε COPs, απ' ό,τι τα αντίστοιχα C. Από τα αποτελέσματα του **Πίνακα 1.2.**, γίνεται επίσης αντιληπτό, ότι τα τελικά επίπεδα των COPs στα CC που παρασκευάστηκαν με εκχύλισμα αβοκάντο, ήταν σχεδόν ίσα με αυτά που βρέθηκαν στα φρεσκοψημένα C στα CO. Η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος αβοκάντο, μπορεί να αποδοθεί στην υψηλή του περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες (κατεχίνες, υδροξυκιναμικά οξέα και προκυανίδες).

1.2. Βιολογική δράση των COPs

Αν και η βιολογική δράση των COPs δεν αποτελεί βασική πτυχή της παρούσας εργασίας, θεωρείται ενδιαφέρον να εξηγηθούν επισταμένως κάποιες βασικές τους επιπτώσεις, με αρχή την κυτταροτοξική τους δράση. Στη λιπιδική διπλοστοιβάδα των κυτταρικών μεμβρανών, η χοληστερόλη (Chol), ευθυγραμμίζεται με τα μόρια των φωσφολιπιδίων προκειμένου ο στεροειδής πυρήνας της να κείται παράλληλα προς τις αλυσίδες των λιπαρών οξέων και η OH- ομάδα της να αλληλεπιδρά με τις πολικές κεφαλές τους. Η παρουσία της Chol περιορίζει την κίνηση των παρακείμενων φωσφολιπιδίων, λειτουργώντας ουσιαστικά ως «ρυθμιστής ρευστότητας» στην κυτταρική μεμβράνη, και συμβάλλει σημαντικά στην αύξηση της σταθερότητας της.²²

Η εισαγωγή μιας επιπλέον πολικής ομάδας στην υδρόφοβη περιοχή της Chol, π.χ. στον C-25 της πλευρικής της αλυσίδας, ή με άλλα λόγια η παρουσία ενός δισαμφιφιλικού COP αντί ενός αμφιφιλικού μορίου Chol μέσα στη λιπιδική διπλοστοιβάδα, διαταράσσει τη διαμόρφωση που επιτρέπει τη μέγιστη αλληλεπίδραση μεταξύ της Chol και των φωσφολιπιδίων (**Σχήμα 1.1.**).

Η στερόλη υιοθετεί συγκεκριμένο προσανατολισμό προκειμένου η νέα πολική ομάδα να βρίσκεται όσο το δυνατόν προς την υδρόφιλη περιοχή. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του εμβαδού και τη διαταραχή της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης. Η αλλαγή αυτή μάλιστα φαίνεται να διευκολύνει την εκρόφηση των COPs από τις μεμβράνες και τη μεταφορά τους στις λιποπρωτεΐνες του αίματος.²³



Σχήμα 1.1. Κυτταροτοξική δράση των COPs. Με κίτρινο η Chol και με πράσινο η 25-OH.²³

Στα πρώτα βήματα της αθηρογένεσης, όπως απέδειξαν πολυάριθμες μελέτες, εμπλέκεται η οξειδωμένη LDL. Ανάμεσα στις ενώσεις που ανιχνεύθηκαν στην εν λόγω οξειδωμένη μορφή είναι και ορισμένα COPs τα οποία πιθανόν να προωθούν την έναρξη της αθηροσκλήρωσης. Μερικές μάλιστα επιδημιολογικές έρευνες έχουν δείξει ότι υπάρχει θετική συσχέτιση ανάμεσα στη συγκέντρωση της 7-κέτο και 7β-OH στην οξειδωμένη LDL και στον κίνδυνο θανάτου από καρδιαγγειακές παθήσεις. Τα συγκεκριμένα COPs ανιχνεύθηκαν σε αφρώδη κύτταρα που απομονώθηκαν από ανθρώπινη αθηρωματική πλάκα, σε συγκέντρωση δύο τάξεις μεγέθους μεγαλύτερη απ' ό,τι στο πλάσμα.²⁴⁻²⁷ Παρόλ' αυτά, οι μηχανισμοί έναρξης της αθηροσκλήρωσης εξακολουθούν να αποτελούν αντικείμενο συνεχούς έρευνας.

Θα ήταν παράληψη να μην αναφερθούμε στην εμπλοκή των εν λόγω ενώσεων στην αναστολή της βιοσύνθεσης της χοληστερόλης. Πιστεύεται ότι τα COPs δρουν ως αναστολείς του ενζύμου hydroxymethyl-glutaryl CoA (HMG-CoA) που εμπλέκεται στη σύνθεση των στεροειδών. Η αναστολή της αναγωγής αποτρέπει τα κύτταρα να συνθέσουν χοληστερόλη, με αποτέλεσμα να διαταράσσεται η λειτουργικότητά τους προκαλώντας ουσιαστικά τη νέκρωσή τους.^{25,28,29}

1.3. Μηχανισμοί οξείδωσης της χοληστερόλης

Η ευαισθησία της χοληστερόλης στην οξείδωση έχει αναγνωρισθεί και μελετηθεί για περισσότερο από μερικές δεκαετίες. Ωστόσο, οι πορείες σχηματισμού ορισμένων

COPs δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως. Η χοληστερόλη, παρόμοια με τα λιπίδια, οξειδώνεται με τη μέθοδο της αυτοοξειδωσης και της φωτοοξειδωσης, παράγοντας τα σχετικά υδροϋπεροξειδία.³⁰

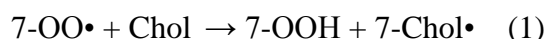
1.3.1. Αυτοοξείδωση της χοληστερόλης μέσω μηχανισμού ελευθέρων ριζών

Ανάμεσα στους πιθανούς εκκινητές της οξείδωσης της Chol είναι τα υδροϋπεροξειδία των λιπαρών οξέων (LOOH), τα μέταλλα μετάπτωσης, οι ενεργές μορφές οξυγόνου και η ακτινοβολία. Σύμφωνα με τους επιστήμονες, τα LOOH των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs, polyunsaturated fatty acids), τα οποία είναι τα κύρια προϊόντα της οξείδωσης των λιπιδίων, ίσως να είναι απαραίτητα για την έναρξη της αυτοοξειδωσης της Chol.

1.3.1.1. Οξείδωση στον C-7

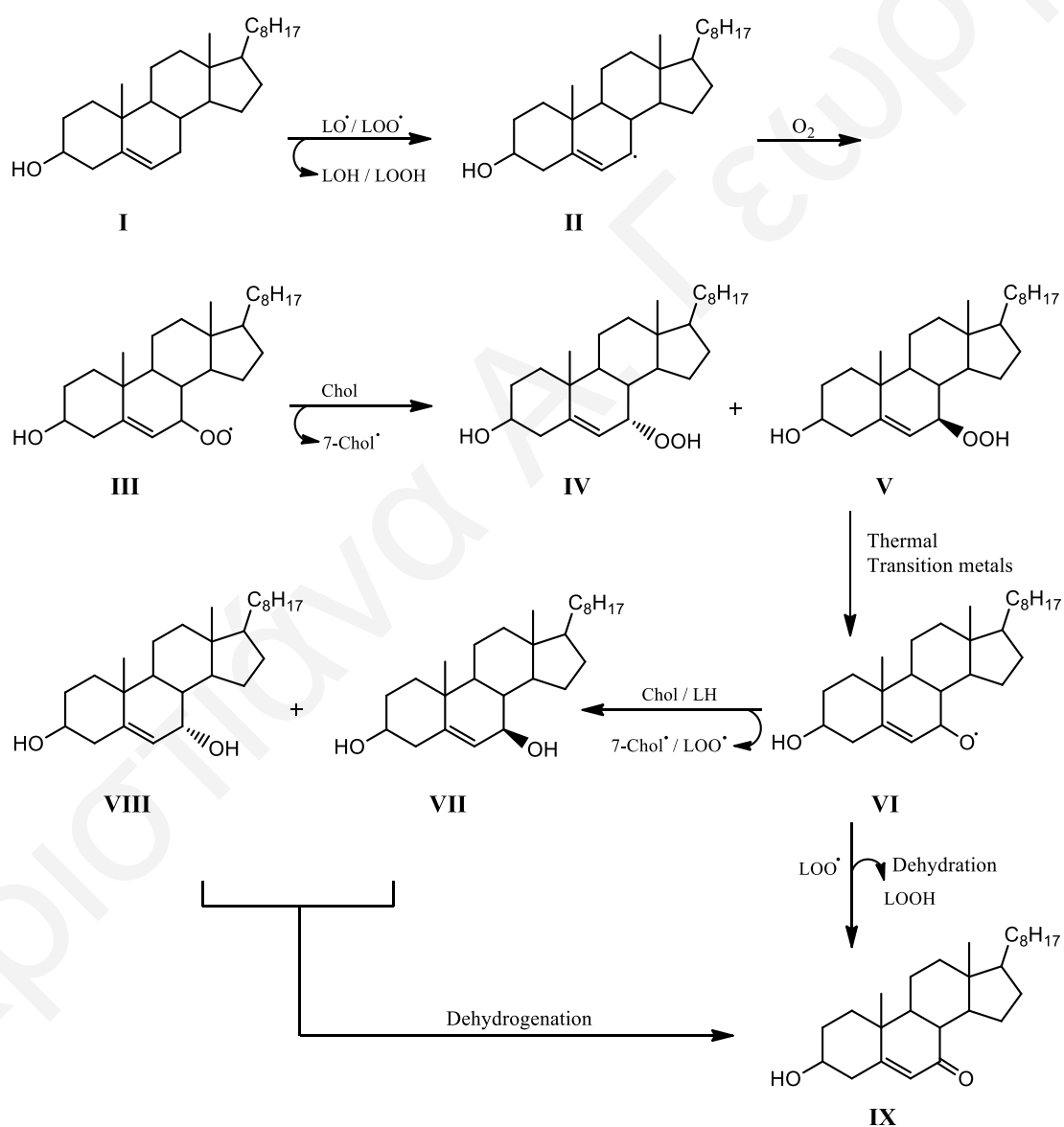
Η ομολυτική τους διάσπαση με τη δράση μετάλλων μετάπτωσης (π.χ. του Fe³⁺), οδηγεί στο σχηματισμό αλκόξυ-ριζών (LO•) και ριζών υπεροξειδίου (LOO•) των λιπαρών οξέων (LH). Η οξείδωση της Chol, εκκινεί (ένωση I), όταν ένα αλλυλικό υδρογόνο αποσπάται από τη θέση C7 από τις εν λόγω ρίζες καθιστώντας τη Chol ριζικό μεταφορέα [7-Chol•, ένωση II] (**Σχήμα 1.2.**). Η ευνοούμενη θέση για την οξείδωση της Chol είναι ο άνθρακας 7, όπου ο δεσμός άνθρακα-υδρογόνου είναι σχετικά ασθενής, με την ενέργεια διάσπασης του να είναι 88 kcal/mol.

Έχει αποδειχθεί μάλιστα, ότι η ρίζα 7-Chol• είναι θερμοδυναμικά σταθερή και κατέχει αρκετά μεγάλο χρόνο ημιζωής, με αποτέλεσμα να μπορεί να αντιδρά με το διαθέσιμο μοριακό οξυγόνο της βασικής κατάστασης (³O₂, triplet). Από την προσθήκη του O₂ σχηματίζεται η ρίζα του υπεροξειδίου της Chol [7-OO•, ένωση III]. Με τη σειρά της, η 7-OO• είναι εξαιρετικά δραστική και ικανή να αποσπάσει ένα ασταθές υδρογόνο από ένα νέο μόριο Chol, με αποτέλεσμα το σχηματισμό του υδροϋπεροξειδίου της χοληστερόλης 7-OOH, [ένωση IV] μαζί με μια νέα ρίζα, 7-Chol•, η οποία επανεκκίνη την αλυσίδα των αντιδράσεων (αντίδραση 1).



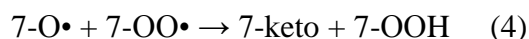
Τα 7-OOH, είναι ασταθή κάτω από συνθήκες θέρμανσης ή αποθήκευσης και μετατρέπονται προς τα αντίστοιχα υδρόξυ-παράγωγα της Chol (7-OH). Να σημειωθεί ότι ο δεσμός του υπεροξειδίου μπορεί να υποστεί θερμική ομολυτική διάσπαση

αποδίδοντας 7-O• και •OH (αντίδραση 2). Τα δύο νέα ριζικά είδη, ενισχύουν τη διαδικασία της οξείδωσης. Η 7-O• αποσπά ένα H από ένα νέο μόριο Chol ή LH, σχηματίζοντας τελικά τα κύρια προϊόντα αυτοοξειδωσης, δηλαδή τα δύο επιμερή 7-OH της Chol, ενώ παράλληλα αναγεννιέται η 7-Chol•, η οποία επανεκκινεί ένα νέο κύκλο αντιδράσεων (αντίδραση 3).



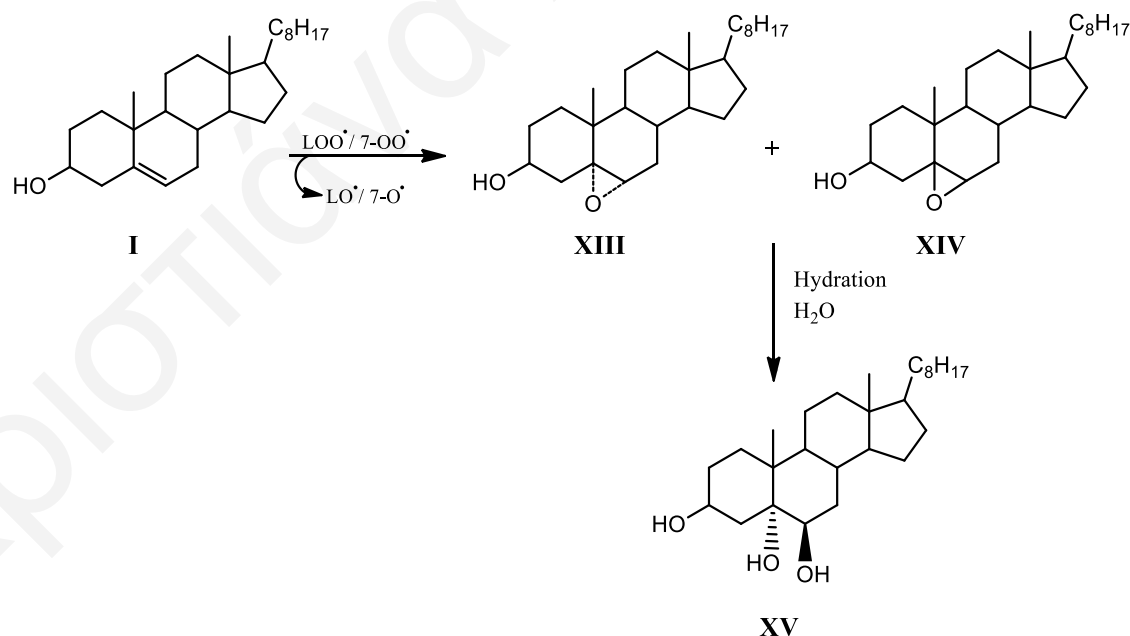
Σχήμα 1.2. Μονοπάτι αυτοοξειδωσης της χοληστερόλης. (I) Chol, (II) 7-Chol•, (III) 7-OO•, (IV) 7α-OOH, (V) 7β-OOH, (VI) 7-O•, (VII) 7α-OH, (VIII) 7β-OH, (IX) 7-keto.

Με αφυδάτωση των 7-OOH, μέσω της ενδιάμεσης 7-O•, σχηματίζεται η 7-keto, [ένωση IX], η οποία αποτελεί το πιο διαδεδομένο προϊόν αυτοξειδωσης της χοληστερόλης στα τρόφιμα μαζί με τα 7-OH. Η 7-keto, σχηματίζεται κατά την αντίδραση της 7-O• με μία ρίζα 7-OO• (αντίδραση 4). Εναλλακτικά, ο σχηματισμός της 7-keto μπορεί να προκύψει με αφυδρογόνωση των 7-OH στην παρουσία ριζών.⁹



1.3.1.2. Εποξειδωση της χοληστερόλης

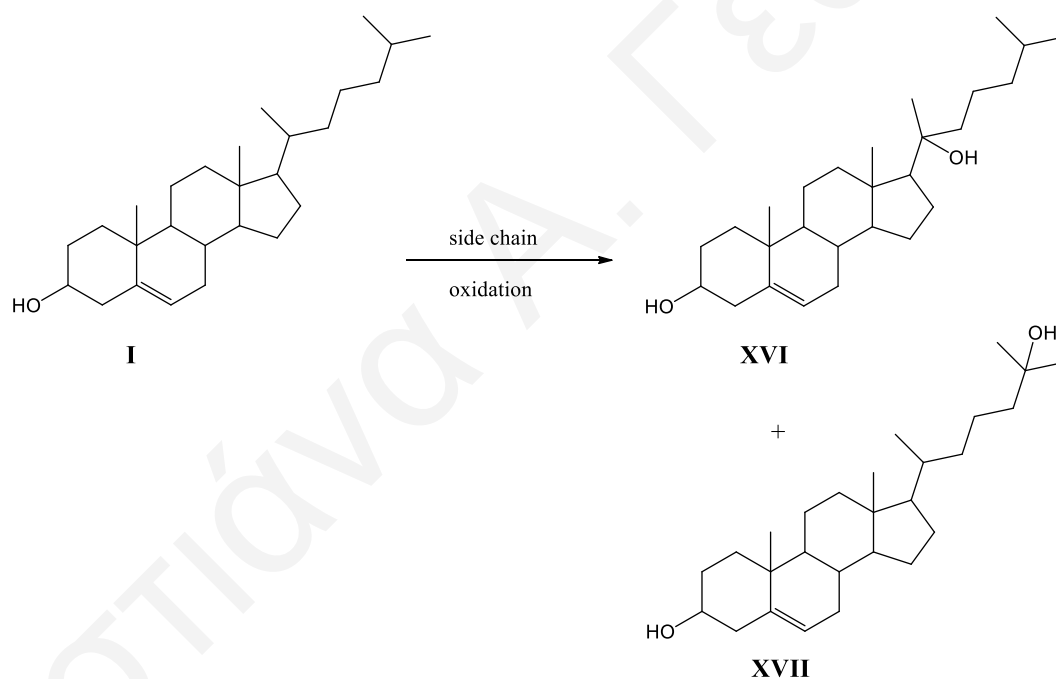
Οι ρίζες LOO• και 7-OO•, μπορούν να δημιουργήσουν επιπλέον COPs μέσω ενός μηχανισμού, ο οποίος δεν περιλαμβάνει απόσπαση H και ενδιάμεσες ρίζες. Κατά την αντίδραση αυτή, οι ρίζες προστίθενται στο διπλό δεσμό ($\Delta_{5,6}$) της Chol, με αποτέλεσμα την ετερολυτική του διάσπαση και το σχηματισμό των ισομερών εποξειδίων (5,6-EP), δηλαδή του 5,6 α -epoxy-5 α -cholestan-3 β -ol [5,6 α -EP ένωση XIII] και του 5,6 β -epoxy-5 β cholestan-3 β -ol [5,6 β -EP, ένωση XIV] (Σχήμα 1.3.) και την ταυτόχρονη απελευθέρωση μιας αλκόξυ-ρίζας. Με ενυδάτωση των δύο 5,6-EP, σε όξινο περιβάλλον, προκύπτει μια τριόλη, 5 α -cholestane-3 β -5,6 β -triol [triol, ένωση XV].



Σχήμα 1.3. Εποξειδωση της Chol. (I) Chol, (XIII) 5,6 α -EP, (XIV) 5,6 β -EP, (XV) triol.

1.3.1.3. Οξείδωση της πλευρικής αλυσίδας της χοληστερόλης

Η οξείδωση της Chol μπορεί να λάβει χώρα και στην πλευρική αλυσίδα με απόσπαση του H των τριτοταγών ανθράκων C₂₀ και C₂₅, είτε από ενεργά είδη που εμπλέκονται στην εκκίνηση της οξείδωσης της Chol είτε από δευτερογενής ρίζες που δημιουργούνται κατά τις αντιδράσεις διάδοσης. Κατά την αντίδραση αυτή, σχηματίζονται αρχικά οι ρίζες υπεροξειδίου της Chol, 25-OO• και 20-OO•, οι οποίες κατά την αντίδραση τους με το οξυγόνο αποδίδουν τα αντίστοιχα υπεροξειδία, 20-OOH και 25-OOH, τα οποία με τη σειρά τους μετατρέπονται προς τα αντίστοιχα υδρόξυ-παράγωγά τους [20-OH και 25-OH, ένωση XVI & XVII] (Σχήμα 1.4.). Η οξείδωση μπορεί να λάβει χώρα και στους υπόλοιπους άνθρακες της πλευρικής αλυσίδας, αλλά σε πολύ μικρότερο βαθμό.¹⁰



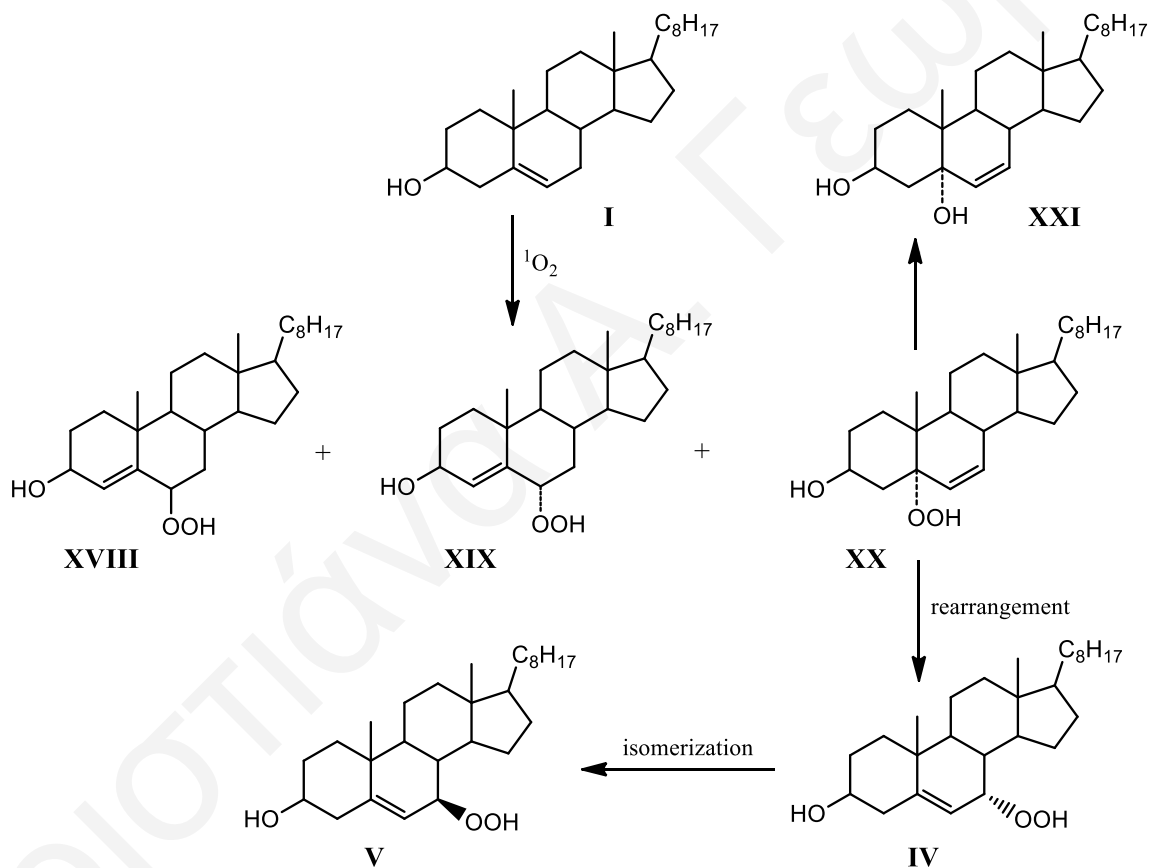
Σχήμα 1.4. Οξείδωση της πλευρικής αλυσίδας της Chol. (I) Chol, (XVI) 20α-OH, (XVII) 25-OH.

1.3.2. Φωτοξείδωση της χοληστερόλης

Ένα δεύτερο μονοπάτι αυτοξείδωσης της Chol είναι η φωτοξείδωση. Η φωτοξείδωση, συμβαίνει στην παρουσία φωτοευαισθητοποιητών, όπως οι φυσικές χρωστικές χλωροφύλλη και μυογλοβίνη (Mb, myoglobin). Τα μόρια αυτά μπορούν να

απορροφήσουν εξωτερική ενέργεια υπό μορφή ακτινοβολίας και να τη μεταφέρουν στο $^3\text{O}_2$. Έτσι, το $^3\text{O}_2$ διεγείρεται προς την ενεργή του μορφή, αυτή της απλής κατάστασης ($^1\text{O}_2$, singlet) και αντιδρά με τη Chol μέσω ενός μηχανισμού που δεν περιλαμβάνει τη συμμετοχή ριζών.

Συγκεκριμένα, το $^1\text{O}_2$ αντιδρά με το διπλό δεσμό του δακτυλίου B της Chol, με αποτέλεσμα τη μετακίνηση του στη θέση $\Delta_{6,7}$ ή $\Delta_{4,5}$. Κατά την αντίδραση αυτή, σχηματίζονται μόνο τρία υπεροξειδία: το 5 α -cholesterol hydroperoxide [5 α -OOH, ένωση XVIII] και τα ισομερή 6 α -cholesterol-hydroperoxide [6 α -OOH, ένωση XIX] και 6 β -cholesterol-hydroperoxide [6 β -OOH, ένωση XX] (Σχήμα 1.5).



Σχήμα 1.5. Πορεία φωτοξειδωσης της χοληστερόλης. (I) Chol, (V) 7 β -OOH, (IV) 7 α -OOH, (XVIII) 6 β -OOH, (XIX) 6 α -OOH, (XX) 5 α -OOH, (XXI) 5 α -OH.

Στην πραγματικότητα ο σχηματισμός του 5α-OOH ευνοείται έναντι των 6-OOH ισομερών. Το 5α-OOH μετατρέπεται περαιτέρω προς τα πιο σταθερά 7-OOH, μέσω αλληλικής αναδιάταξης. Τα 7-OOH, με τη σειρά τους μπορούν να μετατραπούν με θέρμανση, τόσο προς τα 7-OH παραγωγά τους, όσο και προς την 7-keto με αφυδάτωση.³¹

2. Θεωρητικό υπόβαθρο – Επεξεργασία του δείγματος

2.1. Γενικά

Η προετοιμασία του δείγματος αποτελεί το πιο κρίσιμο αναλυτικό στάδιο στον προσδιορισμό των COPs. Ο αναλυτής καλείται να εφαρμόσει, πριν από τη χρωματογραφική ανάλυση, το κατάλληλο πρωτόκολλο που θα επιτρέπει την εκλεκτική απομόνωση του συνόλου των αναλυτών από τις εξεταζόμενες μήτρες. Αν και τα τελευταία χρόνια, έχουν δημοσιευθεί πολλές διαφορετικές τεχνικές απομόνωσης και καθαρισμού των COPs από τα τρόφιμα, μέχρι στιγμής δεν έχει καθιερωθεί μια τυποποιημένη μέθοδος.^{15,20} Εκείνο πάντως που προκύπτει ως γενικό συμπέρασμα είναι ότι μικρές αλλαγές κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας μπορεί να επηρεάσουν σημαντικά την τελική ποσοτικοποίησή τους.

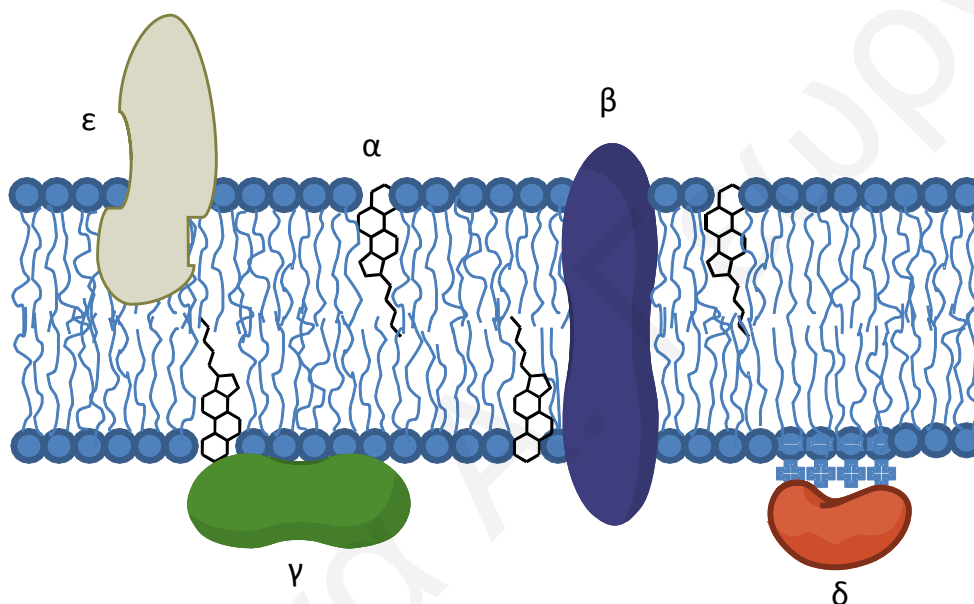
Το γεγονός ότι τα COPs είναι μέρος ενός σύνθετου μίγματος λιπιδίων και απαντώνται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις υποδεικνύουν το υψηλό επίπεδο δυσκολίας διεκπεραίωσης του συγκεκριμένου βήματος.³² Η παραγωγή τεχνητών COPs, των λεγόμενων artifacts, αποτελεί μια επιπλέον παράμετρο, η οποία, αν δεν προσεχθεί, δύναται να οδηγήσει σε αναληθή αποτελέσματα. Με τον όρο αυτό αναφερόμαστε σε COPs τα οποία σχηματίζονται κατά την επεξεργασία του δείγματος είτε λόγω της οξείδωσης της χοληστερόλης ή λόγω της μετατροπής των προϋπάρχοντων COPs σε άλλα.³³⁻³⁵

Η γενική πορεία που συνήθως ακολουθείται για την ανάλυση των COPs περιλαμβάνει: εκχύλιση των λιπιδίων από τη μήτρα των τροφίμων, υδρόλυση των εστεροποιημένων στερολών με σαπωνοποίηση και εν συνεχεία, εμπλουτισμό των COPs με εκχύλιση στερεάς φάσης. Ωστόσο, υπάρχουν πολλές ερευνητικές εργασίες στις οποίες η προετοιμασία του δείγματος διαφοροποιείται από την καθιερωμένη πορεία.³⁶ Με βάση τα ανωτέρω, κρίνεται σκόπιμο στο παρόν στάδιο της διατριβής να παρατεθούν εν συντομία γενικά στοιχεία για το κάθε βήμα του αναλυτικού πρωτοκόλλου ώστε να αποσαφηνιστεί ο ρολός τους στην προετοιμασία του δείγματος.

2.2. Εξαγωγή των λιπιδίων

Σε μια βιολογική μήτρα τα λιπίδια αποτελούν συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών ενώ συναντώνται και ως συσσωματώματα στο λιπώδη ιστό.³⁷⁻⁴⁰ Σε κάθε περίπτωση, εκτός του ότι συγκρατούνται ισχυρά μεταξύ τους, αλληλεπιδρούν και με μη-λιπιδικό

υλικό, όπως πρωτεΐνες, μέσω υδρόφοβων και υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων.^{37,41} Ως εκ τούτου, ο ιδανικός διαλύτης που θα επιτρέψει την ποσοτική εκχύλιση των λιπιδίων (συμπεριλαμβανομένου και των COPs) από τα τρόφιμα, πρέπει να διαλυτοποιεί τα λιπίδια και ταυτόχρονα να διασπά τις πολικές και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των λιπιδίων και των υπόλοιπων συστατικών της μήτρας (**Σχήμα 2.1**).^{39,42} Η χρήση μίγματος πολικού και μη πολικού διαλύτη φαίνεται να ανταποκρίνεται στην εν λόγω απαίτηση ενώ είναι φανερό, ότι η χρήση ενός απολικού οργανικού διαλύτη, όπως εξάνιο, κρίνεται ακατάλληλη.^{37,42}



Σχήμα 2.1. Σχηματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης και των πρωτεϊνών: **(α)** υδρόφοβες και υδρόφιλες αλληλεπιδράσεις μεταξύ της Chol ή των COPs με τα υπόλοιπα λιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης, **(β)** υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αλειφατικών τμημάτων των λιπιδίων με μη πολικές περιοχές μιας εσωτερικής πρωτεΐνης, **(γ, δ)** υδρόφιλες και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πολικών ομάδων των λιπιδίων και μιας περιφερειακής πρωτεΐνης και **(ε)** μια αμφιφιλική πρωτεΐνη η οποία διεισδύει μερικώς στη διπλοστοιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης.

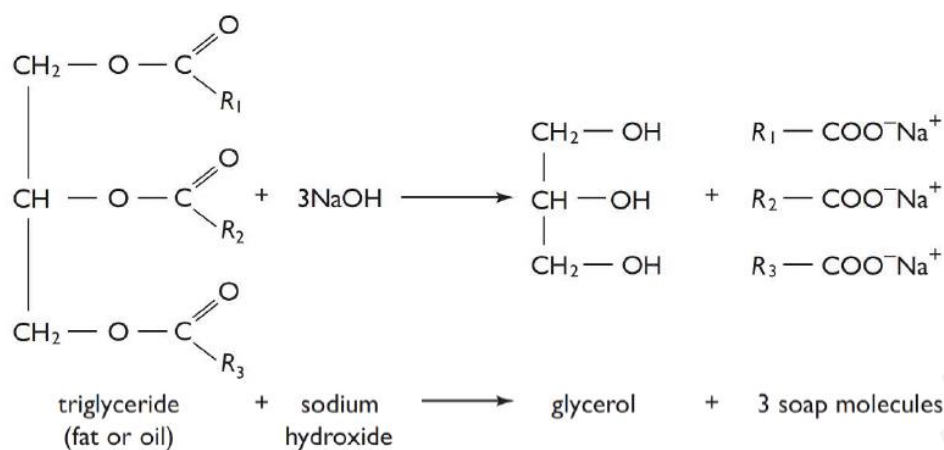
Ο Folch και οι συνεργάτες του (1957) ήταν οι πρώτοι που αναγνώρισαν αυτή την πτυχή, και πρότειναν μία μέθοδο εκχύλισης των λιπιδίων χρησιμοποιώντας μίγμα χλωροφορμίου/μεθανόλης σε αναλογία 2:1,v/v. Αναπόφευκτα όμως, η χρήση πολικού διαλύτη οδηγεί σε συνεκχύλιση και μη-λιπιδικών συστατικών. Για αυτό το λόγο, μετά

την ομογενοποίηση του δείγματος με το μίγμα χλωροφορμίου μεθανόλης και την απομάκρυνση των στερεών υπολειμμάτων με διήθηση, απαιτείται ένα στάδιο έκπλυσης του κλάσματος των λιπιδίων με υδατικό διάλυμα άλατος για απομάκρυνση των πολικών προσμίξεων. Μάλιστα, η προτεινόμενη αναλογία όγκου χλωροφορμίου /μεθανόλης/νερού απαιτείται να είναι ακριβώς 8:4:3. Αποκλίσεις από τη συγκεκριμένη αναλογία ενδέχεται να επηρεάσουν την ποσοτική ανάκτηση των πιο πολικών λιπιδίων όπως είναι τα COPs.⁴³ Αν και κατά καιρούς αναπτύχθηκαν εναλλακτικά συστήματα με κυριότερο παράδειγμα το μίγμα εξανίου/2-προπανόλης (3:2, v/v), η μέθοδος Folch είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέχρι σήμερα αφού θεωρείται η πιο αποτελεσματική για την πλήρη απομόνωση των λιπιδίων από διάφορους ιστούς.⁴⁴

Το επόμενο, και ταυτόχρονα το πιο δύσκολο βήμα της αναλυτικής διαδικασίας, αποτελεί η εκλεκτική απομόνωση των COPs από το κλάσμα των λιπιδίων. Τα COPs αποτελούν ένα μικρό μόνο μέρος ενός πολύπλοκου μίγματος λιπιδίων που αποτελείται κατά 95% από τριγλυκερίδια, ενώ το υπόλοιπο τμήμα από φωσφολιπίδια, εστεροποιημένη και ελεύθερη χοληστερόλη, ελεύθερα λιπαρά οξέα και λιποδιαλυτές βιταμίνες.³² Στόχος λοιπόν είναι η εφαρμογή μιας αποτελεσματικής μεθόδου καθαρισμού ικανής να απομακρύνει τα COPs από το μεγαλύτερο μέρος των λιπιδίων. Συνήθως για το σκοπό αυτό εφαρμόζεται είτε σαπωνοποίηση του εκχυλίσματος των λιπιδίων είτε εκχύλιση στερεάς φάσης είτε συνδυασμός των δυο μεθόδων.

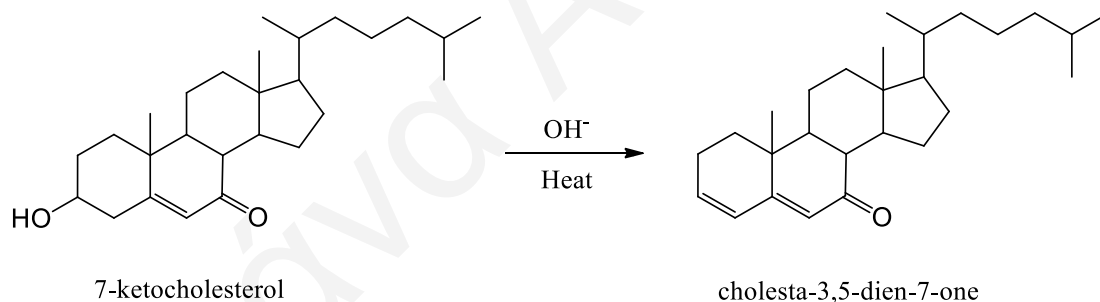
2.3. Σαπωνοποίηση

Για την ανάλυση των COPs, η σαπωνοποίηση, ή αλλιώς αλκαλική υδρόλυση, εξυπηρετεί δύο βασικούς σκοπούς. Πρώτον, απομακρύνει τις ακυλογλυκερόλες από το ακατέργαστο εκχύλισμα των λιπιδίων μετατρέποντας τις σε υδατοδιαλυτά άλατα των λιπαρών οξέων και γλυκερόλη, και δεύτερον, υδρολύει τους εστέρες της χοληστερόλης. Η διαδικασία της σαπωνοποίησης, περιλαμβάνει ουσιαστικά επώαση του λιπιδικού εκχυλίσματος σε μεθανολικό ή αιθανολικό διάλυμα NaOH ή KOH για ορισμένο χρονικό διάστημα (**Σχήμα 2.2.**). Το ασαπωνοποίητο κλάσμα, μέσα στο οποίο περιέχονται τα COPs, διαχωρίζεται με εκχύλιση με τη χρήση κατάλληλου διαλύτη (π.χ. εξάνιο). Με τη διεξαγωγή αυτού του βήματος τα COPs, εμπλουτίζονται τουλάχιστον εκατό φορές σε σύγκριση με την περιεκτικότητά τους στο ακατέργαστο εκχύλισμα λιπιδίων.³⁹



Σχήμα 2.2. Αντίδραση σαπωνοποίησης των τρυγλυκεριδίων.

Ένα μεγάλο μέρος της έρευνας σχετικά με τη σαπωνοποίηση έχει επικεντρωθεί στο σχηματισμό τεχνητών COPs. Η θερμοκρασία και η συγκέντρωση του αλκαλικού διαλύματος αναγνωρίστηκαν ως δύο κρίσιμες παράμετροι, οι οποίοι οδηγούν στην αποικοδόμηση ασταθών COPs, όπως η 7-κετοχοληστερόλη (**Σχήμα 2.3.**).



Σχήμα 2.3. Μετατροπή της 7-keto στη Cholesta-3,5-dien-7-one κάτω από αλκαλικές συνθήκες ή/και θέρμανση.

Σε μια πρόσφατη μελέτη της ερευνητικής ομάδας της Busch διερευνήθηκε η σταθερότητα της 7-κετοχοληστερόλης κατά τη διάρκεια της σαπωνοποίησης σε διάφορες θερμοκρασίες. Συγκεκριμένα, η 7-κέτο υποβλήθηκε σε σαπωνοποίηση στους 37 °C για 18 h και 45 °C για 3 h, και τα αποτελέσματα ανάκτησης της συγκρίθηκαν με εκείνα που λαμβάνονται υπό συνθήκες ελέγχου στους 24 °C για 18 h. Σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από 24 °C, η ανάκτηση της 7-κέτο ήταν μόνο 53% (37 °C) και 49% (45 °C) αντίστοιχα, γεγονός που υποδηλώνει την ευαισθησία της σε υψηλές θερμοκρασίες.

Από τα αποτελέσματα, προκύπτει επίσης ότι η θερμοκρασία της σαπωνοποίησης επηρεάζει σε μεγαλύτερο βαθμό την αποικοδόμηση της σε σχέση με τον χρόνο επώασης.

Η ίδια ερευνητική ομάδα πραγματοποίησε περαιτέρω εργασίες σχετικά με τη σταθερότητα της συγκεκριμένης ένωσης σε διαφορετικές αλκαλικές συνθήκες (3.6 M KOH για 3h και 1M KOH για 18h στους 24 °C). Όταν το δείγμα υποβλήθηκε σε επεξεργασία με το ισχυρότερο αλκαλικό διάλυμα, η ανάκτηση έπεσε στο 71%, αποκαλύπτοντας την ευαισθησία της 7-κέτο σε ισχυρές αλκαλικές συνθήκες.⁴⁵ Αυτές οι παρατηρήσεις ήταν σε συμφωνία με μια αντίστοιχη μελέτη που εκπονήθηκε από τον Park και τους συνεργάτες του, οι οποίοι ανέφεραν απώλεια 10% μετά από σαπωνοποίηση με 3.6 M KOH για 3h.⁴⁶

Ωστόσο, πρέπει να επισημανθεί ότι η χρήση της σαπωνοποίησης δεν είναι απαγορευτική. Όπως προτείνεται από πολλούς ερευνητές, αν η σαπωνοποίηση διεξάγεται σε θερμοκρασία δωματίου υπό ήπιες αλκαλικές συνθήκες (1 M KOH), μπορεί να θεωρηθεί ασφαλής με ελάχιστη παραγωγή τεχνητών COPs.⁴⁷ Για παράδειγμα, ο Park et al. (1996) ανέφεραν ότι σαπωνοποίηση κάτω από αυτές τις συνθήκες οδήγησε σε 97% ανάκτηση της 7-κέτο, και ως εκ τούτου, η αποικοδόμηση της ήταν πρακτικά αμελητέα.⁴⁶ Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, πολλά πρωτόκολλα σαπωνοποίησης έχουν δημιουργηθεί σε αυτές τις συνθήκες.^{19,48-50}

Η απευθείας σαπωνοποίηση χωρίς προηγούμενη εξαγωγή των λιπιδίων είναι ακόμη μια πιθανή επιλογή που χρησιμοποιείται στην ανάλυση των COPs.^{51,52} Μια ενδιαφέρουσα μελέτη βελτιστοποίησης των συνθηκών της απευθείας σαπωνοποίησης πραγματοποιήθηκε από την Saldanha και τους συνεργάτες της (2006).¹ Συγκεκριμένα, μελέτησαν όλες τις παραμέτρους της σαπωνοποίησης συμπεριλαμβανομένου του διαλύτη εκχύλισης για την απομόνωση των COPs (εξάνιο, διαιθυλαιθέρας), του αριθμού των εκχυλίσεων (3-5) και της ποσότητας νερού που προστίθεται με το πέρας της σαπωνοποίησης.

Η πλήρης διαλυτοποίηση του δείγματος και η αποφυγή σχηματισμού γαλακτώματος επιτεύχθηκαν με τη χρήση 10 mL διαλύματος KOH 3.6 M σε 60% υδατική αιθανόλη. Ως βέλτιστος διαλύτης εκχύλισης επιλέχθηκε το εξάνιο, αφού προσέφερε μεγαλύτερα ποσοστά ανάκτησης σε σχέση με το διαιθυλαιθέρα.

Σε μια πανομοιότυπη μελέτη, η ερευνητική ομάδα της Mariutti⁵³ υποστήριξε επίσης ότι το εξάνιο είναι ο καταλληλότερος διαλύτης εκχύλισης, αφού η χρήση του οδήγησε στην παρουσία ελάχιστων παρεμποδίσεων από προσμίξεις στο χρωματογράφημα UV. Αντίθετα, οι βέλτιστες τους συνθήκες διέφεραν από αυτές της Saldanha κυρίως ως προς τη σύσταση του διαλύτη σαπωνοποίησης (90 % υδατική αιθανόλη) και την ποσότητα του νερού που προστίθεται μετά το πέρας της σαπωνοποίησης (15 mL αντί 5 mL). Παρά τη χρήση μεγάλης συγκέντρωσης KOH (3.6 M), οι δύο αυτές μελέτες αναφέρουν ανακτήσεις από 84-104 % για όλα τα COPs συμπεριλαμβανομένου και της 7-keto. Τα ευρήματα αυτά έρχονται σε σύγκρουση με την πλειοψηφία των δημοσιευμένων μελετών που υποστηρίζουν ότι η χρήση υψηλής συγκέντρωσης KOH επιδρά δραματικά στην αποικοδόμηση της 7-keto.

Το γεγονός αυτό καταδεικνύει για πολλοστή φορά ότι πριν την εφαρμογή μιας αναλυτικής μεθόδου σε συγκεκριμένη μήτρα, θα πρέπει πρώτα αυτή να αξιολογείται ως προς το σχηματισμό τεχνητών COPs, την ανάκτηση των αναλυτών και την ικανότητα της να απομακρύνει τις προσμίξεις ούτως ώστε να διασφαλίζει αληθή αποτελέσματα. Στην περίπτωση που η επεξεργασία εμπλέκει τη σαπωνοποίηση, απαιτείται η μελέτη όλων των πιο πάνω πειραματικών παραμέτρων (συγκέντρωση KOH, δ/μα σαπωνοποίησης, διαλύτης εκχύλισης κλπ.), ώστε να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες που να ικανοποιούν τα τρία κριτήρια αξιολόγησης.

Παρά τη χρησιμότητα της σαπωνοποίησης για απομάκρυνση της μεγαλύτερης μάζας των λιπιδίων, πολλοί ερευνητές, για να παρακάμψουν το πρόβλημα της δημιουργίας τεχνητών COPs, αντικατέστησαν εντελώς το βήμα της σαπωνοποίησης με SPE. Η SPE είναι μια ταχύτερη και πιο ήπια τεχνική σε σχέση με τη σαπωνοποίηση.³² Παρ' όλα αυτά, πιο σύνηθες φαινόμενο είναι η εφαρμογή και των δύο σταδίων για την απομόνωση και τον καθαρισμό των COPs.

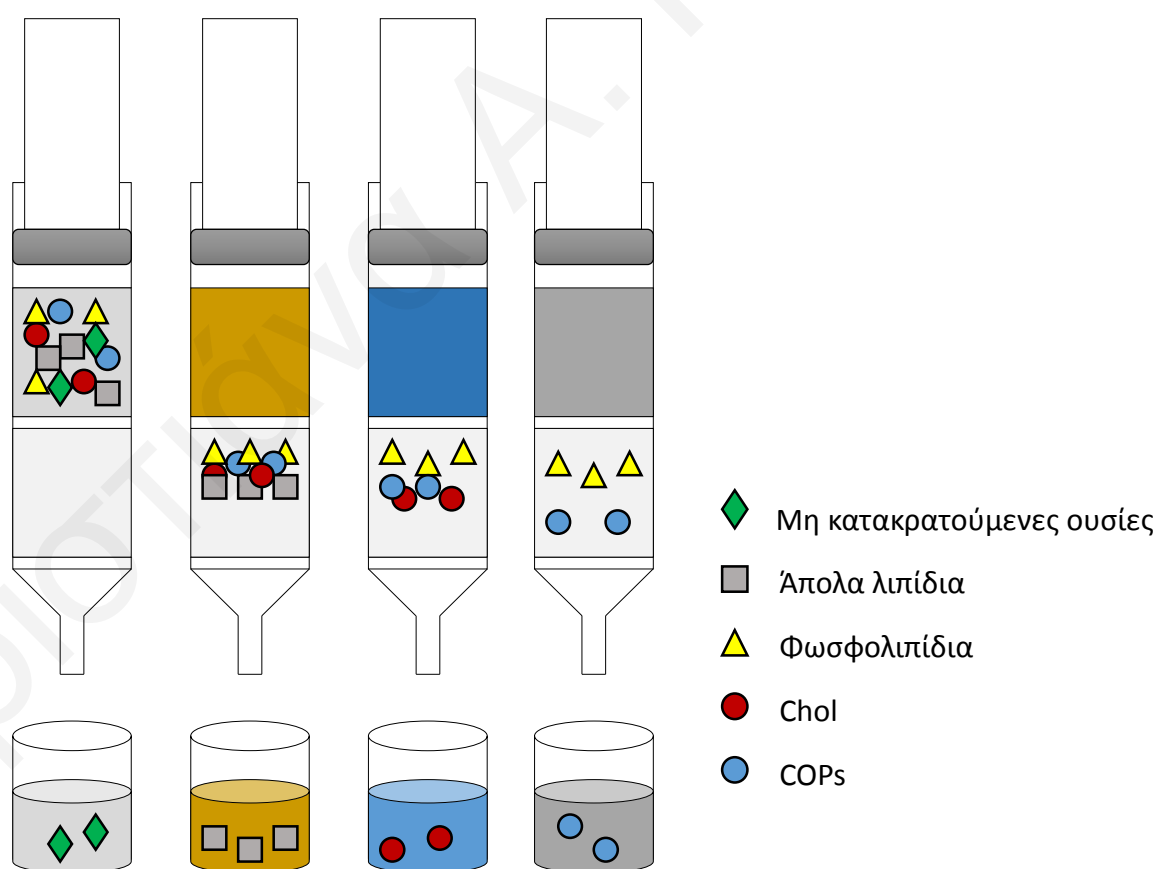
2.4. Εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid phase extraction, SPE)

Το τελευταίο στάδιο πριν από τη χρωματογραφική ανάλυση περιλαμβάνει την επιλεκτική απομόνωση των COPs με SPE.³⁹ Η εν λόγω τεχνική μπορεί να εφαρμοστεί είτε κατευθείαν στο ακατέργαστο εκχύλισμα λιπιδίων ή στο ασαπωνοποίητο κλάσμα για περαιτέρω καθαρισμό. Η SPE ουσιαστικά εκμεταλλεύεται διαφορές στην πολικότητα μεταξύ των παρεμβαλλόμενων ενώσεων και των αναλυτών-στόχων. Έτσι

και στην προκειμένη περίπτωση ο εμπλουτισμός των COPs επιτυγχάνεται λόγω της διαφορετικής τους πολικότητας από τα υπόλοιπα λιπίδια της μήτρας.³²

Σε πρώτο στάδιο, οι εστέρες της χοληστερόλης και τα τριγλυκερίδια ως τα πιο άπολα λιπίδια απομακρύνονται με έκπλυση της στήλης με ένα σύστημα μη πολικών διαλυτών. Η έκλυση των COPs επιτυγχάνεται με διαλύτη μεσαίας πολικότητας ενώ, τα φωσφολιπίδια, ως οι πιο πολικές ενώσεις, κατακρατούνται ισχυρά από την πολική στατική φάση καθ' όλη τη διάρκεια της ανάλυσης με SPE (Σχήμα 2.4).⁵⁴

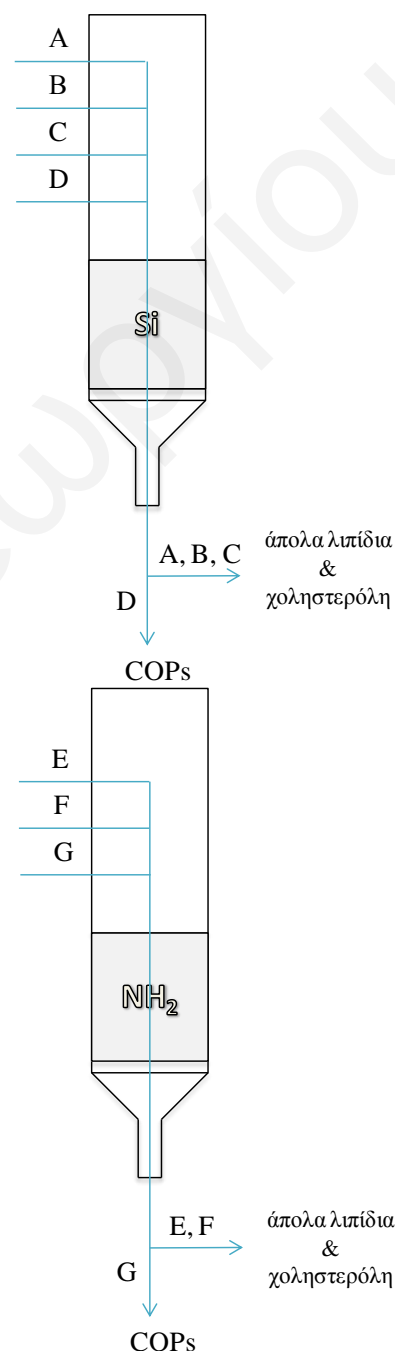
Να σημειώσουμε ότι, μέχρι στιγμής, έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι SPE για την εκλεκτική απομόνωση των COPs πριν τη χρωματογραφική τους ανάλυση. Οι περισσότερες είναι βασισμένες σε κανονικής φάσης στήλες με τις -SiOH και -NH₂ να αποτελούν τις δυο κυρίαρχες επιλογές.^{32,55} Στον Πίνακα 2.1. παρουσιάζονται οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες τεχνικές SPE μέχρι σήμερα.



Σχήμα 2.4. Σχηματική απεικόνιση της πορείας της καθαρισμού των COPs με SPE.

Πίνακας 2.1. Τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα πρωτόκολλα SPE με σχηματική απεικόνιση.

Morgan et al. 1989/ Lai et al. 1995	
	Ενεργοποίηση της Si-SPE με εξάνιο Εισαγωγή του δείγματος σε 5 ml δ/ματος (A) Έκπλυση με:
A.	10 mL εξάνιο/διαιθυλαιθέρας (95:5)
B.	25 mL εξάνιο/διαιθυλαιθέρας (90:10)
C.	15 mL εξάνιο/διαιθυλαιθέρας (80:20)
	Έκλυση με των COPs με:
D.	10 mL ή 5 mL ακετόνη
Rose-Sallin et al. 1995	
	Ενεργοποίηση της NH ₂ -SPE με εξάνιο Εισαγωγή του δείγματος σε 1 mL δ/ματος (E) Έκπλυση με:
E.	6 mL εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας (95:5)
F.	10 mL εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας (90:10)
	Έκλυση των COPs με:
G.	10 mL ακετόνη
Ulberth et al. 1998	
	Ενεργοποίηση της Si-SPE με εξάνιο Εισαγωγή του δείγματος σε 5 ml δ/ματος (A) Έκπλυση με:
A.	10 mL εξάνιο/διαιθυλαιθέρας (95:5)
B.	25 mL εξάνιο/διαιθυλαιθέρας (90:10)
C.	10 mL εξάνιο/διαιθυλαιθέρας (80:20)
	Έκλυση με:
D.	10 mL μεθανόλη/ακετόνη (60:20)
	Ενεργοποίηση της NH ₂ -SPE με εξάνιο Εισαγωγή του κλάσματος COPs σε 1 ml δ/ματος (F) Έκπλυση με:
F.	15 mL εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας (90:10)
	Έκλυση των COPs με
G.	10 mL ακετόνη



3. Χρωματογραφικές τεχνικές

Γενικά

Η χρωματογραφική ανάλυση αποτελεί το επόμενο στάδιο στην πειραματική πορεία για την ανάλυση των COPs. Η HPLC και η GC είναι οι πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενες τεχνικές για την ανάλυση των εν λόγω ενώσεων. Η τελευταία, αν και παρέχει καλύτερη διαχωριστική ικανότητα, απαιτεί μια χρονοβόρα διαδικασία παραγωγοποίησης των αναλυτών, προκειμένου να ενισχυθεί η πτητικότητα και η θερμική τους σταθερότητα. Επιπλέον, οι υψηλές θερμοκρασίες που χρησιμοποιεί μπορεί να λειτουργήσουν καταλυτικά στην παραγωγή ή/και αποικοδόμηση ορισμένων COPs προκαλώντας εσφαλμένες εκτιμήσεις στον ποιοτικό και ποσοτικό τους προσδιορισμό.⁵⁶

Ως συνέπεια αυτών των περιορισμών, η HPLC έχει γίνει η τεχνική της επιλογής, επιτρέποντας την ανάλυση των COPs σε χαμηλές θερμοκρασίες. Όσον αφορά την ανίχνευση των εν λόγω ουσιών, τα πιο συνηθισμένα συστήματα ανίχνευσης που χρησιμοποιούνται είναι ο δείκτης διάθλασης (RI), ιονισμού φλόγας (FI) και φασματομετρίας μάζας (MS). Η χρήση ανιχνευτή UV δεν ενδείκνυται για δυο βασικούς λόγους. Από τη μια, δεν επιτρέπει τον προσδιορισμό ορισμένων COPs με μεγάλη βιολογική σημασία, όπως τα ισομερή 5,6 εποξειδία τα οποία δεν απορροφούν στο υπεριώδες ενώ παράλληλα παρουσιάζει χαμηλή ευαισθησία σε λ μεταξύ 200-210 nm (απορροφούν τα COPs) εξαιτίας του ότι όλες οι οργανικές ενώσεις εμφανίζουν κάποια UV απορρόφηση στη συγκεκριμένη περιοχή.⁵⁶ Η εφαρμογή MS ανοίγει το δρόμο για μια πιο επιλεκτική και ευαίσθητη ανίχνευση των COPs.¹⁸

3.1. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

Είναι γνωστό, ότι η χρωματογραφία αποτελεί μια από τις πιο σημαντικές αναλυτικές τεχνικές διαχωρισμού με απήχηση σε κάθε επιστημονικό κλάδο. Τα 12 βραβεία Nobel που δόθηκαν από το 1937 έως το 1972 σε επιστήμονες, των οποίων η έρευνα βασίστηκε σε σημαντικό βαθμό σε χρωματογραφικές μεθόδους, έρχονται να επισφραγίσουν τη σημαντικότητα της εν λόγω τεχνικής.

Ο Ρώσος βοτανολόγος Mikhail Tswett, στις αρχές του εικοστού αιώνα, χρησιμοποίησε για πρώτη φορά τον όρο χρωματογραφία για να περιγράψει το διαχωρισμό των φυτικών χρωστικών που επιτεύχθηκε με διαβίβαση διαλύματός τους μέσω υάλινου σωλήνα, ο οποίος ήταν γεμάτος με εξαιρετικά λεπτό ανθρακικό ασβέστιο. Οι διαχωριζόμενες

ουσίες εμφανίζονταν ως χρωματιστές ζώνες στη στήλη και αυτός ήταν ο λόγος για τον οποίο ο Tswett επέλεξε (από την Ελληνική γλώσσα) το χαρακτηριστικό αυτό όνομα για την τεχνική.

Η HPLC εύστοχα χαρακτηρίζεται η ‘ναυαρχίδα’ των χρωματογραφικών τεχνικών.⁵⁷ Είναι κατάλληλη για τον ακριβή και επαναλήψιμο προσδιορισμό ενός μεγάλου φάσματος χημικών ενώσεων με βιολογικό ενδιαφέρον. Αποτελεί παραλλαγή της κλασικής χρωματογραφίας στήλης και η ταχύτατη εδραίωση της στο χώρο της ενόργανης ανάλυσης βασίστηκε κατά κύριο λόγο στην εξέλιξη των υλικών πλήρωσης της στήλης. Το κύριο πεδίο εφαρμογών της HPLC είναι η ανάλυση φαρμάκων, τροφίμων και περιβαλλοντικών δειγμάτων.⁵⁸

Ο διαχωρισμός των συστατικών στο συγκεκριμένο χρωματογραφικό σύστημα είναι αποτέλεσμα της συνδυαστικής δράσης μιας κινητής και μιας στατικής φάσης. Σε πρώτο στάδιο, το προς ανάλυση δείγμα εισάγεται στη χρωματογραφική στήλη όπου βρίσκεται η στατική φάση. Τα συστατικά του δείγματος συμπαρασύρονται από την κινητή φάση, η οποία προωθείται στη στήλη με τη βοήθεια μιας αντλίας υψηλής πίεσης και κάτω από σωστά επιλεγμένες πειραματικές συνθήκες μετακινούνται διαμέσου της φάσης με διαφορετικές ταχύτητες και διαχωρίζονται.

Τα συστατικά, τα οποία εκλούνται από το άκρο της χρωματογραφικής στήλης, εισέρχονται στον κατάλληλο ανιχνευτή και τα σήματα καταγράφονται ως συνάρτηση του χρόνου, δίνοντας ένα διάγραμμα με μια σειρά κορυφών, το λεγόμενο χρωματογράφημα. Οι θέσεις των κορυφών ως προς τον άξονα του χρόνου εξυπηρετούν την ταυτοποίηση των συστατικών του δείγματος και το εμβαδόν κάθε κορυφής αποτελεί το ποσοτικό τους μέτρο.^{57,59}

3.1.1. Οργανολογία

Η οργανολογία ενός σύγχρονου συστήματος HPLC παρουσιάζεται στο **Σχήμα 3.2.** Αποτελείται κυρίως από το σύστημα εισαγωγής του δείγματος, την αντλία, τη χρωματογραφική στήλη, τον ανιχνευτή και το σύστημα συλλογής και καταγραφής αποτελεσμάτων.

Αντλία: Αποτελεί το βασικό τμήμα του χρωματογραφικού συστήματος και είναι υπεύθυνη για τη διέλευση του διαλύτη μέσα από την στήλη. Η αντλία απαιτείται να παρέχει με σταθερή ροή την κινητή φάση ώστε να διασφαλιστεί η αναπαραγωγιμότητα

και η ακρίβεια της μεθόδου. Οι δυο εφαρμοζόμενες τεχνικές ανάλυσης είναι η ισοκρατική έκλυση (isocratic elution), στην οποία η κινητή φάση έχει σταθερή σύσταση καθόλη την ανάλυση, και η βαθμιδωτή έκλυση (gradient elution), στην οποία η κινητή φάση μεταβάλλεται βαθμιαία, ή κατά τακτά χρονικά διαστήματα με βάση προγραμματισμό. Η βαθμιδωτή έκλυση εφαρμόζεται συνήθως σε πολύπλοκα δείγματα που περιέχουν πολλά συστατικά, με σκοπό την επίτευξη καλύτερου και γρηγορότερου διαχωρισμού.

Σύστημα εισαγωγής του δείγματος: Είναι υπεύθυνο για την εισαγωγή του δείγματος στο 'ρεύμα ροής' της κινητής φάσης προτού αυτή εισέλθει στη στήλη. Τα σύγχρονα συστήματα HPLC είναι εξοπλισμένα με αυτόματους δειγματολήπτες που διαθέτουν ειδικά διαμορφωμένο δισκίο, χωρητικότητας μέχρι και 100 δειγμάτων, επιτρέποντας προγραμματισμένες εγχύσεις σε διάφορους όγκους.

Στήλη: Η στήλη αποτελεί τον πυρήνα κάθε χρωματογραφικού συστήματος. Πολλές στήλες είναι εμπορικώς διαθέσιμες σε διαφορετικά μήκη, μεγέθη και υλικά πλήρωσης. Η χρήση του σωστού συνδυασμού του μήκους και του υλικού πλήρωσης σε συσχέτιση με την κατάλληλη κινητή φάση μπορεί να βοηθήσει στον πιο αποτελεσματικό διαχωρισμό των ενώσεων του μείγματος. Σε γενικές γραμμές, οι στήλες LC είναι αρκετά ανθεκτικές, με μεγάλο χρόνο ζωής, εκτός εάν χρησιμοποιούνται με κάποιο τρόπο που είναι εγγενώς καταστρεπτικός, όπως για παράδειγμα, με πολύ όξινα ή βασικά εκλύσματα ή με συνεχείς ενέσεις "βρώμικων" βιολογικών ή ακατέργαστων δειγμάτων.^{60,61}

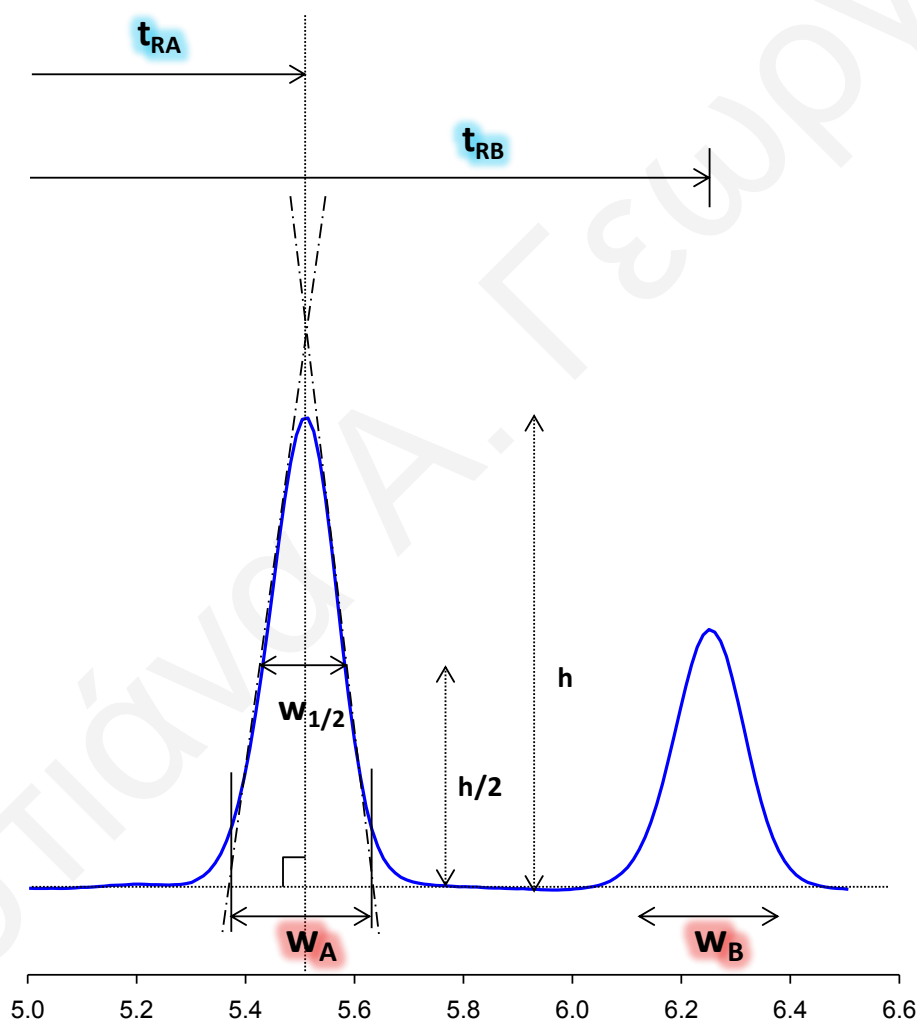
Στο σημείο αυτό, πριν περιγραφούν τα υπόλοιπα τμήματα ενός HPLC συστήματος, είναι χρήσιμο να παρουσιαστεί μια εξίσωση για ένα χαρακτηριστικό απόδοσης της στήλης. Πρόκειται για τη διαχωριστική ικανότητα, η οποία αποτελεί ουσιαστικά ποσοτικό μέτρο της ικανότητας μιας στήλης να διαχωρίσει δυο αναλύτες. Για ένα μίγμα με δυο ενώσεις A και B, η διαχωριστική ικανότητα μπορεί να οριστεί από την εξίσωση:

$$R_s = \frac{2(t_{RB} - t_{RA})}{W_A + W_B} \quad \text{Εξ. (3.1)}$$

όπου $(t_R)_A$ και $(t_R)_B$ οι χρόνοι κατακράτησης των κορυφών A και B, αντίστοιχα και W_A και W_B , το εύρος της βάσης των κορυφών.

Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 3.1.**, για να υπολογίσουμε το W , φέρνουμε τις δύο εφαπτόμενες στα σημεία καμπής της κορυφής και τις προεκτείνουμε, έτσι ώστε, αυτές να τέμνονται ακριβώς στο t_R . Οι δύο εφαπτόμενες με τη γραμμή βάσης (baseline) σχηματίζουν ένα τρίγωνο, το οποίο αποτελεί το εύρος της βάσης, W .

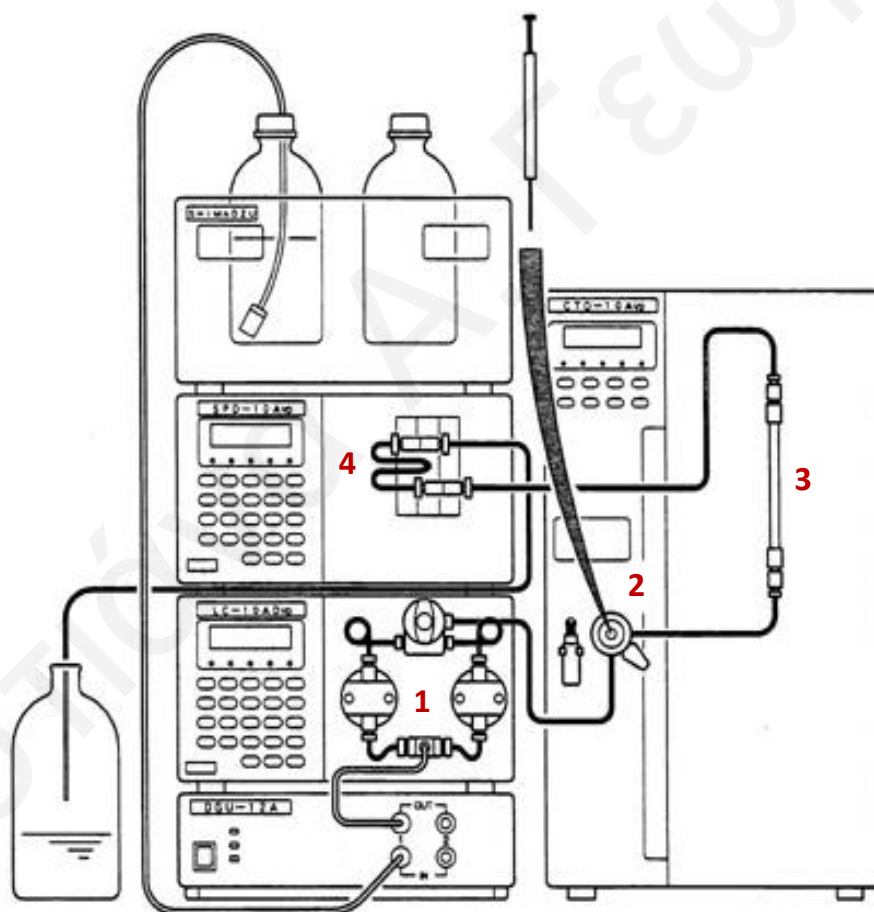
Διαχωριστική ικανότητα μεγαλύτερη από 1.5 αντιστοιχεί ουσιαστικά σε πλήρη διαχωρισμό των δύο συστατικών, ενώ σε μικρότερες τιμές παρατηρείται αλληλεπικάλυψη των κορυφών.^{62,63}



Σχήμα 3.1. Περιγραφή υπολογισμού των παραμέτρων της διαχωριστικής ικανότητας μιας χρωματογραφικής μεθόδου.

Ανιχνευτής: Ο ανιχνευτής χρησιμοποιείται για να ανιχνεύει την παρουσία μιας ένωσης που διέρχεται και παρέχει ένα ηλεκτρονικό σήμα σε μια συσκευή απόκτησης δεδομένων. Λεπτομέρειες για τους τύπους των ανιχνευτών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα ερευνητική εργασία δίνονται στο υποκεφάλαιο 3.3.

Μονάδα ελέγχου και επεξεργασίας δεδομένων: Στον Η/Υ είναι εγκατεστημένο κατάλληλο λογισμικό, μέσω του οποίου ρυθμίζονται όλοι οι παράμετροι των επιμέρους τμημάτων του συστήματος HPLC, όπως η θερμοκρασία της στήλης, η σύσταση και η ροή της κινητής φάσης και ο όγκος έγχυσης. Το λογισμικό είναι υπεύθυνο να συλλέγει και να επεξεργάζεται τα αποτελέσματα από τον ανιχνευτή.^{60,61}



Σχήμα 3.2. Σχηματική αναπαράσταση συστήματος HPLC. 1. Αντλία, 2. Σύστημα εισαγωγής του δείγματος, 3. Χρωματογραφική Στήλη, 4. Ανιχνευτής.

3.2. Υγρή χρωματογραφία υπερύψηλης απόδοσης

Η UPLC αντιπροσωπεύει μια βελτιωμένη και εκσυγχρονισμένη εκδοχή της HPLC με σημαντικές καινοτομίες στην οργανολογία και στην τεχνολογία των σωματιδίων. Με τη χρήση στηλών νέας γενιάς πακεταρισμένες με σωματίδια μεγέθους 1.7 μm και όργανα σχεδιασμένα με εξειδικευμένες ικανότητες για να παρέχουν την κινητή φάση με πιέσεις έως και 15.000 psi, κατάφερε να επιτευχθεί σημαντική πρόοδος στην ανάλυση, στην ταχύτητα και στην ευαισθησία. Όλα αυτά τα πλεονεκτήματα έρχονται να αντισταθμίσουν το υψηλό κόστος αγοράς και συντήρησης των μηχανημάτων, τα οποία θεωρούνται ως τα μοναδικά μειονεκτήματα.

Οι βασικές αρχές αυτής της εξέλιξης διέπονται από την εξίσωση Van Deemter. Ο εμπειρικός αυτός τύπος περιγράφει τη σχέση μεταξύ της γραμμικής ταχύτητας (u) και του ύψους της πλάκας (HETP ή αποδοτικότητας της στήλης). Δεδομένου ότι το μέγεθος των σωματιδίων (dp) είναι μια από τις μεταβλητές, η εξίσωση Van Deemter μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διερεύνηση της χρωματογραφικής απόδοσης.

$$H = 2\lambda d_p + \frac{2\gamma D_m}{u} + f(k) \left(\frac{d_p^2}{D_m} \right) u = a + \frac{b}{u} + cu \quad (\text{Εξ. 3.2})$$

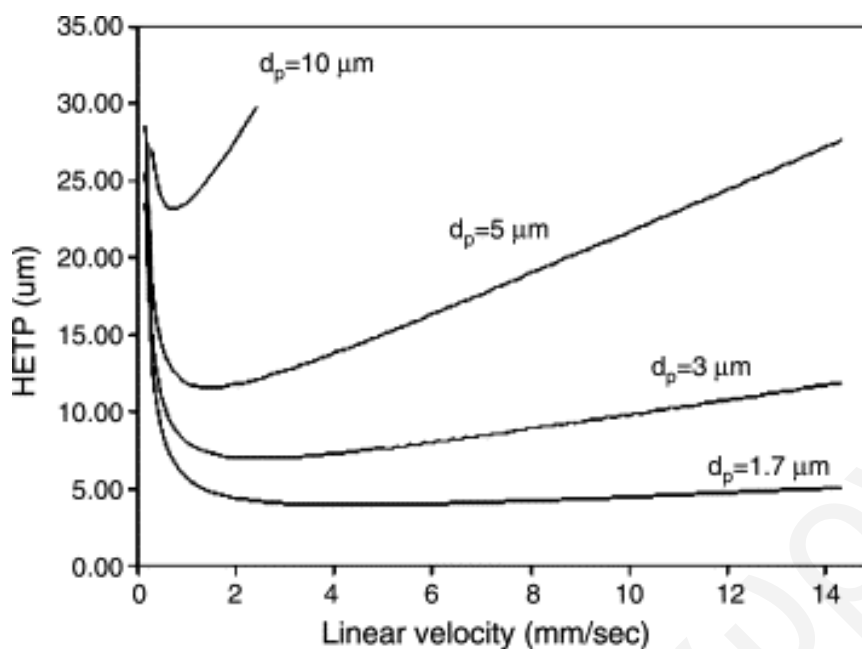
όπου

λ, γ: σταθερές που εξαρτώνται από την ποιότητα της πλήρωσης της στήλης,

D_m: συντελεστής διάχυσης στην κινητή φάση και

f(k): μια συνάρτηση του παράγοντα κατακράτησης (k).

Σύμφωνα με την εν λόγω εξίσωση, όταν το μέγεθος των σωματιδίων μειώνεται κάτω από 2.5 μm παρατηρείται σημαντική μείωση της HETP γεγονός που οδηγεί σε υψηλότερη αποδοτικότητα και σε ένα πιο επίπεδο προφίλ της καμπύλης Van Deemter (**Σχήμα 3.3**). Επομένως, η αύξηση του ρυθμού ροής της κινητής φάσης δεν έχει αρνητική επίδραση στην αποδοτικότητα, κάτι που παρατηρείται με τη χρήση σωματιδίων διαμέτρου 5 ή 10 μm. ⁶⁴⁻⁶⁶



Σχήμα 3.3. Καμπύλες Van Deemter για διαφορετικά μεγέθη σωματιδίων (1.7, 3, 5, 10 μm).

Ένα από τα πρώτα πράγματα που παρατηρεί ένας αναλυτής είναι τι συμβαίνει όταν η χρωματογραφική ταχύτητα ροής αλλάζει. Εάν η ταχύτητα ροής αυξάνεται, ο χρόνος ανάλυσης μειώνεται. Επιπρόσθετα, το πλάτος της κορυφής μειώνεται οδηγώντας σε ανάλογη αύξηση και του ύψους της. Στενότερες κορυφές οι οποίες είναι ψηλότερες, είναι εύκολο να ανιχνευθούν και να διαφοροποιηθούν από το θόρυβο του υποβάθρου, οδηγώντας έτσι σε υψηλότερη ευαισθησία.

Επιπλέον, με απλά χρωματογραφικά παραδείγματα και βασική αριθμητική, μπορεί εύκολα κανείς να κατανοήσει τις θεωρητικές αρχές που οδηγούν σε βελτίωση της ανάλυσης με εφαρμογή της τεχνολογίας UPLC. Όπως αναφέρεται στη θεμελιώδη εξίσωση της ανάλυσης, η εν λόγω παράμετρος είναι ευθέως ανάλογη με τη τετραγωνική ρίζα της αποδοτικότητας.

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \frac{(\alpha - 1)}{\alpha} \frac{k}{(k + 1)} \quad (\text{Εξ. 3.3})$$

Με δεδομένο ότι η αποδοτικότητα είναι αντιστρόφως ανάλογη με το μέγεθος των σωματιδίων, μείωση του μεγέθους των σωματιδίων του υλικού πλήρωσης οδηγεί σε αύξηση της αποδοτικότητας. Για παράδειγμα, όταν το μέγεθος μειώνεται κατά 3 φορές, από 5 μm (HPLC) σε 1.7 μm (UPLC), η θεωρία προβλέπει ότι η *N* πρέπει να αυξηθεί

κατά 3 φορές, οδηγώντας σε 1.7 αύξηση της διαχωριστικής ικανότητας (τετραγωνική ρίζα του 3).⁶⁷

3.3. Ανιχνευτές

3.3.1. Ανιχνευτής συστοιχίας φωτοδιόδων

Ένας εκ των πιο διαδεδομένων ανιχνευτών στην HPLC, είναι ο ανιχνευτής συστοιχίας φωτοδιόδων (Photodiode-Array Detector, PDA), με τον οποίο ολόκληρο το φάσμα μιας ουσίας καταγράφεται σε δευτερόλεπτα, καθώς εξέρχεται από τη χρωματογραφική στήλη. Ο ανιχνευτής αυτός συλλέγει τα δεδομένα της απορρόφησης της αναλυόμενης ένωσης σε όλο το φάσμα του ορατού ή του υπεριώδους σύμφωνα με την εξίσωση του Beer Lambert, που αποτελεί την καρδιά της φασματοφωτομετρίας:

$$A = \varepsilon * b * c \quad (\text{Εξ. 3.4})$$

όπου:

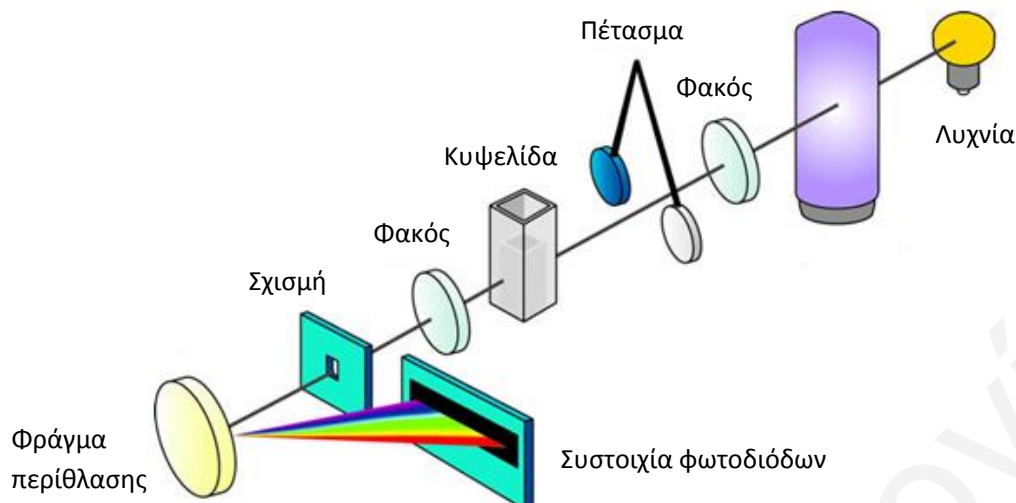
A: η απορρόφηση της ουσίας σε ορισμένο λ ,

ε : η γραμμομοριακή απορροφητικότητα της ουσίας στο λ ($L/ \text{mol} * \text{cm}$),

b: το μήκος της κυψελίδας (cm) και

c: η συγκέντρωση της ουσίας.

Η ουσιαστική διαφορά του με τον κλασσικό ανιχνευτή UV-Vis είναι η παρουσία του ολογραφικού φράγματος στη θέση του μονοχρωμάτορα. Μια απλοποιημένη σχηματική παράσταση ενός φασματομέτρου συστοιχίας φωτοδιόδων φαίνεται στο **Σχήμα 3.4**. Η ακτινοβολία από μια λυχνία διέρχεται διαμέσου του κελιού που περιέχει το δείγμα, με αποτέλεσμα μέρος της να απορροφάται από τα συστατικά του δείγματος. Στη συνέχεια, η δέσμη προσπίπτει σε ένα σταθερό μονοχρωμάτορα-φράγμα περίθλασης όπου και διασπείρεται στα επιμέρους μήκη κύματος (λ), τα οποία κατευθύνονται προς το μεταλλάκτη-παράταξη συστοιχίας φωτοδιόδων. Το σήμα εξόδου κάθε διόδου αντιστοιχεί στην ακτινοβολία διαφορετικού μήκους κύματος και το φάσμα λαμβάνεται με ανάγνωση των σημάτων εξόδου όλων των διόδων της συστοιχίας σε σειρά. Επειδή η ηλεκτρονική σάρωση είναι ταχύτατη, τα δεδομένα που συνιστούν το πλήρες φάσμα συλλέγονται σε χρόνους 1s ή και μικρότερους.⁵⁷

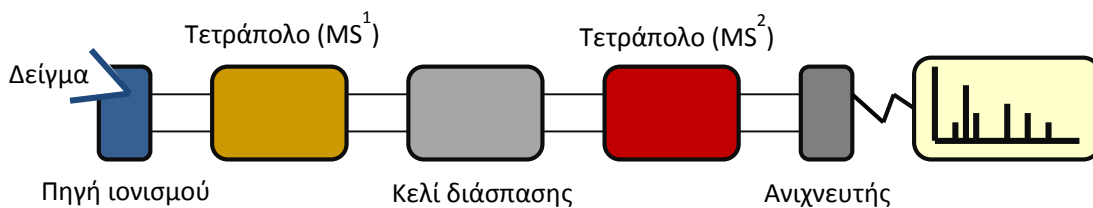


Σχήμα 3.4. Σχηματική παρουσίαση ανιχνευτής συστοιχίας φωτοδιόδων.

3.3.2. Διαδοχική φασματομετρία μάζας

Η εξαιρετική ευαισθησία αποτελεί το βασικό χαρακτηριστικό της διαδοχικής φασματομετρίας μάζας. Έχει καθιερωθεί ως ανιχνευτής σε συστήματα υγρής χρωματογραφίας σε μεγάλη σειρά αναλυτικών εργασιών. Πρόκειται ουσιαστικά για μια αναλυτική μέθοδο ανίχνευσης μορίων σε μορφή ιόντων με κριτήριο το λόγο της μάζας ως προς το φορτίο (m/z).

Το όργανο ανάλυσης αποτελείται από: α) την πηγή ιοντισμού, β) δύο τετραπολικούς αναλυτές μαζών (MS^1 , MS^2), γ) την κυψελίδα σύγκρουσης (collision cell), η οποία παρεμβάλλεται μεταξύ των δύο τετραπόλων και δ) τον ανιχνευτή (**Σχήμα 3.5.**). Τα μητρικά ιόντα δημιουργούνται με ηλεκτροψεκασμό (electrospray ionization) και επιλέγονται στο πρώτο τετράπολο (MS^1). Ακολούθως, οδηγούνται στην κυψελίδα σύγκρουσης, όπου συγκρούονται με μόρια αδρανούς αερίου (αργό), παράγοντας θυγατρικά ιόντα. Αυτά επιλέγονται στο δεύτερο τετραπολικό αναλυτή (MS^2) και φτάνουν στον ανιχνευτή. Εκεί παράγονται σήματα και καταγράφονται από ένα σύστημα υπολογιστή. Ο υπολογιστής εμφανίζει τα σήματα γραφικά ως ένα φάσμα μάζας που δείχνει τη σχετική αφθονία των σημάτων σύμφωνα με το λόγο τους m/z . Η ταυτότητα του κάθε μορίου καθορίζεται από το συνδυασμό των μαζών του μητρικού και των θυγατρικών ιόντων.



Σχήμα 3.5. Σχηματική αναπαράσταση των τμημάτων ενός φασματομέτρου μάζας.

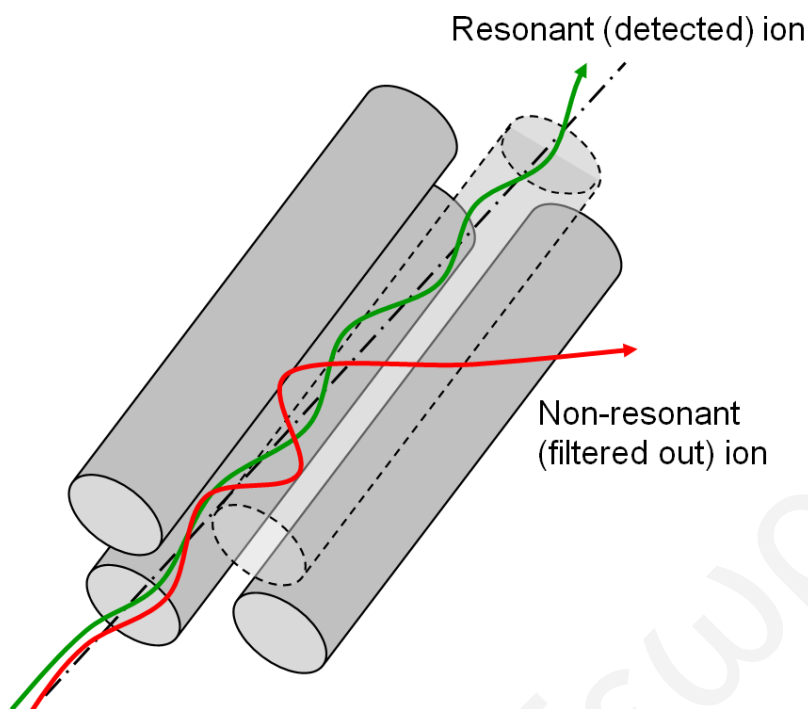
3.3.2.1. Τετραπολικός αναλυτής μαζών

Ο τετραπολικός αναλυτής μαζών αποτελείται από τέσσερις παράλληλες μεταλλικές ράβδους, οι οποίες είναι συμμετρικά τοποθετημένες ως προς τη δέσμη των ιόντων και συνδέονται διαγωνίως ηλεκτρικά μεταξύ τους (**Σχήμα 3.6.**). Κάθε ζεύγος ιόντων συνδέεται με τον πόλο πηγής τάσεως, που περιέχει μία συνεχή (direct current, DC) και μία εναλλασσόμενη υψίσυχη συνιστώσα, στην περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων (radio-frequency, RF). Ένα ηλεκτρικό πεδίο επιταχύνει τα ιόντα έξω από την περιοχή της πηγής ιονισμού και εντός του τετραπολικού αναλυτή. Για μια συγκεκριμένη τιμή των δυναμικών αυτών, ιόντα ενός συγκεκριμένου λόγου m/z ακολουθούν μια σταθερή τροχιά διαμέσου των ράβδων και φτάνουν στον ανιχνευτή.

Για συγκεκριμένα δυναμικά RF και DC προωθούνται επιλεγμένα ιόντα με συγκεκριμένο λόγο m/z και απορρίπτονται τα υπόλοιπα, τα οποία αποκτούν μεγαλύτερο ρυθμό επιτάχυνσης, με αποτέλεσμα να προσκρούουν στα ηλεκτρόδια και να αποφορτίζονται. Το δυναμικό DC, συνδυαζόμενο με το RF δυναμικό, δρουν ως φίλτρο για την απόρριψη των ιόντων με μεγάλο m/z . Το δυναμικό των δυο ζευγών ηλεκτροδίων δίνεται από την εξίσωση

$$V(t) = \pm (U + V\cos(\omega t)). \quad (\text{Εξ. 3.5})$$

όπου το U είναι το σταθερό δυναμικό DC και $V\cos(\omega t)$ είναι το εφαρμοζόμενο δυναμικό RF με ένταση V και συχνότητα ω .



Σχήμα 3.6. Σχηματική απεικόνιση τετραπολικού αναλυτή μαζών.

Οι τετραπολικοί αναλυτές μαζών εμφανίζουν σημαντικά πλεονεκτήματα. Είναι μικροί σε μέγεθος, έχουν μικρό κόστος και είναι μηχανικά ανθεκτικότεροι από τους περισσότερους τύπους φασματομέτρων μαζών. Επίσης, έχει το πλεονέκτημα των υψηλών ταχυτήτων σάρωσης, ώστε ολόκληρο το φάσμα μαζών να λαμβάνεται σε χρόνο μικρότερο των 100 ms.⁵⁷

Οι πιθανοί τρόποι λήψης δεδομένων σε ένα παράλληλο σύστημα τετραπόλων είναι:

Σάρωση θυγατρικού ιόντος (Product ion ή Daughter ion scan)

Στο πρώτο τετράπολο επιτρέπεται η διέλευση μόνο ενός ιόντος με συγκεκριμένο λόγο m/z , το οποίο στη συνέχεια θραυσματοποιείται εντός του θαλάμου διάσπασης. Τα παραγόμενα θυγατρικά ιόντα οδηγούνται στο δεύτερο αναλυτή, ο οποίος είναι ρυθμισμένος σε λειτουργία σάρωσης.

Σάρωση πρόδρομου ιόντος (Precursor ion scan ή Parent ion scan)

Ο πρώτος αναλυτής σαρώνει ένα επιλεγμένο εύρος μαζών των μητρικών ιόντων. Τα παραγόμενα ιόντα από το θάλαμο διάσπασης οδηγούνται στο δεύτερο αναλυτή,

ρυθμισμένο σε λειτουργία επιλογής συγκεκριμένου ιόντος. Εξέρχεται από αυτόν μόνο το ιόν με συγκεκριμένο λόγο m/z .

Παρακολούθηση προεπιλεγμένων ιόντων (Multiple reaction monitoring/MRM)

Και στα δύο τετράπολα εισέρχονται ιόντα με συγκεκριμένες τιμές λόγου m/z . Είναι προφανές ότι με τον συγκεκριμένο τρόπο λήψης φασμάτων αυξάνεται εντυπωσιακά η εκλεκτικότητα της τεχνικής, δεδομένου ότι το προεπιλεγμένο μητρικό ιόν επιβεβαιώνεται από την παρουσία κάποιου συγκεκριμένου θυγατρικού του. Επιπλέον, επιτυγχάνεται υψηλή ευαισθησία, αφού επιλέγεται ένα μόνο συγκεκριμένο ιόν, γεγονός που αυξάνει σημαντικά το παραγόμενο σήμα. Η σάρωση σε λειτουργία MRM αποτελεί πολύτιμο εργαλείο, ιδιαίτερα για διαδικασίες ποσοτικοποίησης.

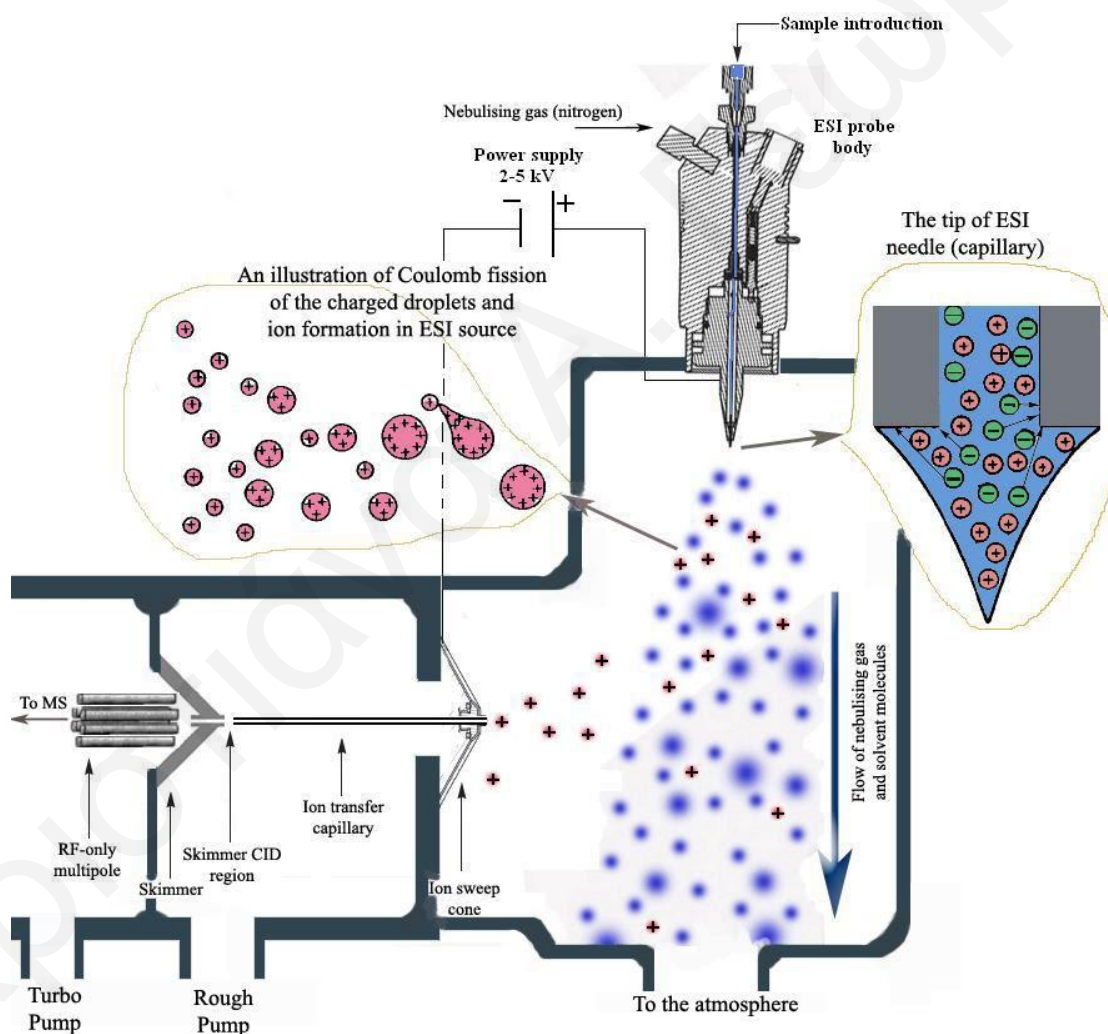
3.3.2.2. Μηχανισμός Ηλεκτροψεκασμού (Electrospray ionization, ESI)

Η μεταφορά των ιοντικών ειδών από το διάλυμα στην αέρια φάση με ESI περιλαμβάνει τρία επιμέρους βασικά στάδια: 1) δημιουργία εκνεφώματος με φορτισμένα σταγονίδια 2) εξάτμιση του διαλύτη και συρρίκνωση των σταγονιδίων και 3) εκπομπή των ιόντων στην αέρια φάση.

Μέσα σε μια πηγή ηλεκτροψεκασμού, μια συνεχής ροή του διαλύματος του δείγματος διέρχεται από ένα μεταλλικό τριχοειδή σωλήνα, στο άκρο του οποίου εφαρμόζεται υψηλή τάση (2.5-6 kV), η οποία μπορεί να έχει θετική ή αρνητική τιμή ανάλογα με τους αναλύτες που επιλέγονται προς ιοντισμό. Καθώς το διάλυμα διέρχεται από το ηλεκτρικό πεδίο που έχει δημιουργηθεί στο άκρο του τριχοειδούς, στην επιφάνεια του υγρού λαμβάνει χώρα διαχωρισμός φορτίου, καθώς ομόσημα με το ηλεκτρικό πεδίο ιόντα τείνουν να κινηθούν μακριά από αυτό, ενώ ετερόσημα με το ηλεκτρικό πεδίο ιόντα έλκονται από αυτό απομακρυνόμενα από το μέτωπο του διαλύματος.

Η ανάπτυξη απωστικών ηλεκτροστατικών δυνάμεων γνωστών και ως «κουλομβικών απώσεων» μεταξύ των συσσωρευμένων στο μέτωπο του διαλύματος ομόσημων ιόντων, ανταγωνίζεται τις συνεκτικές δυνάμεις της επιφανειακής τάσης του υγρού και η επιφάνεια του αρχίζει να εκτείνεται επιτρέποντας στα ομόσημα ιόντα να κινηθούν προς την έξοδο. Με τον τρόπο αυτό το υγρό εξέρχεται από το τριχοειδές με μια μορφή κωνικής διάταξης που ονομάζεται «κώνος Taylor». Όταν στο τμήμα του διαλύματος που συνιστά τον κώνο Taylor, επιτευχθεί το όριο Rayleigh, όπου η κουλομβική άπωση του επιφανειακού φορτίου γίνει ίση με την επιφανειακή τάση του διαλύματος,

αποδεδυμένα μικρά φορτισμένα σταγονίδια με τη μορφή εκνεφώματος, τα οποία κάτω από συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης, κινούνται προς την είσοδο του φασματομέτρου. Με τη βοήθεια αυξημένων θερμοκρασιών στην πηγή ESI ή ρεύμα N₂ ως αέριο ξήρανσης, τα φορτισμένα σταγονίδια συνεχώς μειώνονται σε μέγεθος από την εξάτμιση του διαλύτη, οδηγώντας σε αύξηση της πυκνότητας του επιφανειακού τους φορτίου. Όταν οι ηλεκτροστατικές απωστικές δυνάμεις μεταξύ των ομόσημων ιόντων του επιφανειακού φορτίου υπερβούν τις συνεκτικές δυνάμεις της επιφανειακής τάσης (όριο Rayleigh), τα σταγονίδια διαίρουνται σε μικρότερα με μια διάσπαση γνωστή ως «κουλομβική έκρηξη» (Σχήμα 3.7).^{68,69}



Σχήμα 3.7. Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας του ηλεκτροψεκασμού.

Οι δυο προτεινόμενοι μηχανισμοί που περιγράφουν το σχηματισμό ιόντων στην αέρια φάση κατά το στάδιο αυτό είναι της «εξάτμισης ιόντος» (Ion Evaporation) και «το μοντέλο φορτισμένων υπολοίπων» (Charged residue model).

Σύμφωνα με το πρώτο μοντέλο, το οποίο αποτελεί και το επικρατέστερο μέχρι σήμερα, τα φορτισμένα σταγονίδια υπό την επίδραση της αυξανόμενης πυκνότητας φορτίου στην επιφάνεια τους αναγκάζονται σε συνεχή διάσπαση. Όταν τα παραγόμενα μικροσταγονίδια φτάσουν σε μέγεθος των 10 nm, παύει η περαιτέρω διάσπαση και ιόντα σε αέρια φάση αρχίζουν να εγκαταλείπουν την επιφάνεια των σταγονιδίων. Στην περίπτωση του μοντέλου φορτισμένων υπολοίπων, επαναλαμβανόμενες εκρήξεις Coulomb λαμβάνουν χώρα μέχρι να σχηματιστεί ένα εξαιρετικά μικρό φορτισμένο σταγονίδιο ($R \approx 1$ nm) που περιέχει μόνο ένα μόριο αναλύτη.

4. Αξιολόγηση μεθόδου

Στις μέρες μας, μαζί με την ταχεία ανάπτυξη των αναλυτικών μεθόδων, μεγάλη σημασία αποδίδεται και για την ποιότητα των δεδομένων μέτρησης η οποία εξασφαλίζεται μέσω της διαδικασίας της επικύρωσης. Η αξιολόγηση της μεθόδου είναι το εργαλείο που χρησιμοποιείται για να τεκμηριώσουμε πειραματικά την καταλληλότητα της για το σκοπό που προορίζεται.

Πριν ξεκινήσει η διαδικασία της επικύρωσης, πρέπει να καθοριστεί ο σκοπός της. Για παράδειγμα, πρέπει να ληφθούν υπόψη ο τύπος και το εύρος συγκεντρώσεων του αναλύτη (-ες) που μετράται, ο τύπος του υλικού ή της μήτρας για την οποία εφαρμόζεται η μέθοδος. Πολύ εύστοχα αναφέρεται από τον Taverniers και τους συνεργάτες του, η βάση για μια σωστή αξιολόγηση στηρίζεται κυρίως στο σαφή προσδιορισμό των αναλυτικών απαιτήσεων.⁷⁰

Στη συνέχεια θα παρουσιαστούν με λεπτομέρεια τα κυριότερα μέτρα αξιολόγησης που εφαρμόστηκαν στη διαδικασία επικύρωσης των μεθόδων στην παρούσα ερευνητική εργασία.

4.1. Ακρίβεια (Precision)

Η εγγύτητα της συμφωνίας (βαθμός διασποράς) μεταξύ μιας σειράς μετρήσεων που λαμβάνονται σε συγκεκριμένες συνθήκες. Η ακρίβεια διακρίνεται σε τρεις κατηγορίες: την επαναληψιμότητα (repeatability or intraday precision), την ενδιάμεση ακρίβεια (intermediate or interday precision) και την αναπαραγωγιμότητα (reproducibility).

Επαναληψιμότητα: περιγράφει τη συμφωνία μεταξύ των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται κάτω από τις ίδιες συνθήκες λειτουργίας σε σύντομο χρονικό διάστημα. Η εν λόγω παράμετρος υπολογίζεται συνήθως μετά από διαδοχικές πειραματικές μετρήσεις την ίδια μέρα από τον ίδιο ερευνητή και το ίδιο όργανο.

Ενδιάμεση ακρίβεια: Σε αντίθεση με την επαναληψιμότητα, οι μετρήσεις πραγματοποιούνται στον ίδιο εργαστηριακό χώρο αλλά σε διαφορετικές ημέρες. Η ενδιάμεση ακρίβεια αποτελεί ουσιαστικά μέτρο της σταθερότητας μιας μεθόδου κατά τη διάρκεια μεγάλων χρονικών διαστημάτων μετά την ανάπτυξη της.

Αναπαραγωγιμότητα: Αναφέρεται στην πραγματοποίηση μετρήσεων με την ίδια μέθοδο αλλά σε διαφορετικούς εργαστηριακούς χώρους, σε διαφορετικό όργανο και με διαφορετικούς αναλυτές.

Κριτήριο αξιολόγησης της ακρίβειας είναι η απόλυτη τυπική απόκλιση (absolute standard deviation, s) και η εκατοστιαία σχετική τυπική απόκλιση (relative standard deviation, RSD):

$$\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}} \quad (\text{Εξ. 4.1})$$

$$RSD(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (\text{Εξ. 4.2})$$

όπου N , ο αριθμός των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων, \bar{x} η μέση τιμή των N μετρήσεων και x_i η κάθε επιμέρους μέτρηση.

4.2. Γραμμικότητα (Linearity)

Η γραμμικότητα μιας αναλυτικής διαδικασίας είναι η ικανότητά της (μέσα σε ένα δεδομένο εύρος) να δίνει μετρήσεις οι οποίες είναι ευθέως ανάλογες προς τη συγκέντρωση (ποσότητα) του αναλύτη στο δείγμα. Η γραμμικότητα συχνά αξιολογείται με οπτικό έλεγχο κατασκευάζοντας γράφημα του λαμβανόμενου σήματος του οργάνου ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της υπό ανάλυση ένωσης. Να σημειωθεί ότι η γραμμικότητα καθορίζεται από μια σειρά από πέντε έως έξι εγχύσεων των αναλυτών, που καλύπτει το εύρος της εξεταζόμενης περιοχής συγκεντρώσεων. Εάν υπάρχει μια γραμμική σχέση, τα αποτελέσματα θα πρέπει να αξιολογηθούν με κατάλληλες στατιστικές μεθόδους, για παράδειγμα, με υπολογισμό της γραμμής παλινδρόμησης με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων. Ο συντελεστής συσχέτισης, η τετμημένη, η κλίση της γραμμής παλινδρόμησης θα πρέπει να υποβάλλονται.

4.3. Όριο ανίχνευσης και όριο ποσοτικοποίησης (Limit of detection, LOD and Limit of quantification, LOQ)

Το LOD είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση του αναλύτη σε ένα δείγμα που μπορεί να ανιχνευθεί, αλλά όχι απαραίτητα να ποσοτικοποιηθεί. Το όριο ανίχνευσης συχνά συγγέεται με την ευαισθησία της μεθόδου. Η ευαισθησία μιας αναλυτικής μεθόδου είναι η ικανότητα της να διακρίνει μικρές διαφορές στη συγκέντρωση ή μάζα της

αναλυόμενης ουσίας. Με πρακτικούς όρους, η ευαισθησία είναι η κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης που λαμβάνεται με γραφική παράσταση της απόκρισης έναντι της συγκέντρωσης του αναλύτη. Το όριο ποσοτικοποίησης είναι το ελάχιστο ποσό ενίεται που παράγει ποσοτική μετρήση στη μήτρα-στόχο με αποδεκτή ακρίβεια.

Τα LOD και LOQ μπορούν να υπολογιστούν από την καμπύλη βαθμονόμησης σύμφωνα με τις παρακάτω εξισώσεις:

$$LOD = \frac{3.3 \times SD}{m} \quad (\text{Εξ. 4.3})$$

$$LOQ = \frac{10 \times SD}{m} \quad (\text{Εξ. 4.4})$$

όπου m , η κλίση και SD , η τυπική απόκλιση της καμπύλης βαθμονόμησης.⁷¹

4.4. Ανάκτηση (Recovery)

Η ανάκτηση εκφράζει την εγγύτητα της συμφωνίας μεταξύ μιας πραγματικής τιμής με την πειραματική. Η αξιολόγηση της εν λόγω παραμέτρου επιτυγχάνεται με τη μέθοδο spiking όπου γίνεται προσθήκη γνωστής συγκέντρωσης του αναλύτη στην εξεταζόμενη μήτρα. Ο βαθμός στον οποίο η ποσότητα του αναλύτη που εμβολιάστηκε στο δείγμα λαμβάνεται πίσω μετά την επεξεργασία και ανάλυση του δείγματος ορίζεται ως ανάκτηση. Η διαδικασία αυτή απαιτεί τη λήψη μετρήσεων σε κάθε τύπο μήτρας και σε διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων. Συγκεκριμένα, θα πρέπει να μελετάται μια συγκέντρωση κοντά στο όριο ποσοτικοποίησης, μια ενδιάμεση τιμή και μια υψηλή στο τέλος της καμπύλης βαθμονόμησης.^{70,72}

5. Πειραματικό μέρος

5.1. Προσδιορισμός των COPs με χρήση της τεχνικής HPLC-UV/Vis

5.1.1. Οργανολογία

Η διεξαγωγή όλων των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε σε σύστημα HPLC της εταιρείας Shimadzu (Kyoto, Japan) εφοδιασμένο με αντλία (LC-10AD), ανιχνευτή PDA (SPD-M20A), αυτόματο δειγματολήπτη (SIL-20AHT) και θερμοστατούμενο φούρνο (CTO-10ASVP). Ο χειρισμός του συστήματος, καθώς και η συλλογή και η ανάλυση των πειραματικών αποτελεσμάτων έγιναν με τη χρήση του λογισμικού 'LC Solution'. Η ανίχνευση των COPs έγινε στα 206 nm. Η αναλυτική στήλη που χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό των υπό μελέτη COPs ήταν Brava C18-ODS, 250 x 4.6 mm, 5 μm, εφοδιασμένη με προστήλη Brava C18-ODS, 7.5 x 4.6 mm, 5 μm.

5.1.2. Αναλύτες

Τα πρότυπα δείγματα των αναλυτών 20α-hydroxycholesterol (20α-OH), 22(R)-hydroxycholesterol (22R-OH), 25-hydroxycholesterol (25-OH), 7β-hydroxycholesterol (7β-OH) και 7-ketcholesterol (7-keto) αγοράστηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich. Τα πρότυπα διαλύματα προετοιμάστηκαν σε μεθανόλη σε συγκέντρωση 0.1 mg mL⁻¹ το καθένα, προκειμένου να δώσουν τελική συγκέντρωση 0.02 mg mL⁻¹ στο μείγμα. Για τον προσδιορισμό των βέλτιστων παραμέτρων διαχωρισμού, μελετήθηκαν η θερμοκρασία της στήλης (10 έως 25 °C) και η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης (0.8 έως 2.0 mL min⁻¹), αντίστοιχα. Ο όγκος έγχυσης ήταν 10 μL.

5.1.3. Διαλύτες και αντιδραστήρια

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στη χρωματογραφική ανάλυση ήταν καθαρότητας HPLC-grade και ελήφθησαν από την εταιρεία Merck (Hohenbrunn, Γερμανία). Πριν τη χρήση τους διηθήθηκαν υπό κενό με τη βοήθεια φίλτρου με μέγεθος πόρων 0.45 μm (Millipore) και απαερώθηκαν. Τα SPE cartridges, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την επεξεργασία του δείγματος ήταν Chromabond (500 mg SiOH-στατική φάση).

5.1.4. Μεθόδους προετοιμασίας του δείγματος

Για τα παραδοσιακά κυπριακά αλλαντικά δοκιμάστηκαν οι εξής μέθοδοι προετοιμασίας του δείγματος:

A. Σε 1 g αλεσμένου δείγματος προστίθενται 4 mL 50% υδατικού διαλύματος υδροξειδίου του καλίου και 6 mL αιθανόλη, προκειμένου να πραγματοποιηθεί σαπωνοποίηση σε θερμοκρασία δωματίου για 22 ώρες στο σκοτάδι. Με το πέρας της σαπωνοποίησης το δείγμα διηθείται με τη βοήθεια διηθητικού χαρτιού. Ακολούθως, 5 mL απεσταγμένο νερό και 10 mL εξάνιο προστίθενται στο δείγμα, αναδεύεται και το κλάσμα εξανίου διαχωρίζεται. Η εκχύλιση με 10 mL εξάνιο επαναλαμβάνεται τρεις φορές. Στη συνέχεια, γίνεται εξάτμιση υπό κενό, το υπόλειμμα διαλύεται σε 5 mL εξάνιο και διηθείται για απομάκρυνση των ακαθαρσιών. Το διήθημα τοποθετείται σε φυσίγγιο (cartridge) πυριτίου, το οποίο ενεργοποιείται με 10 mL εξάνιο. Ακολουθεί διαδοχικό ξέπλυμα της στήλης με 2 mL εξάνιο/διεθυλ αιθέρα σε αναλογία 8:2 και 2 mL εξάνιο/διεθυλ αιθέρα σε αναλογία 1:1. Τα COPs εκλύονται με 2 mL μεθανόλη.

B. 1 g αλεσμένου δείγματος κρέατος αναμειγνύονται με 10 mL χλωροφόρμιο-μεθανόλη (2:1, v/v) και αναδεύεται για 30 λεπτά. Το μείγμα διηθείται με τη βοήθεια διηθητικού χαρτιού και ακολούθως το διήθημα εξατμίζεται κάτω από κενό. Το υπόλειμμα διαλύεται σε 3 mL εξάνιο και διηθείται προκειμένου να απομακρυνθούν οι ακαθαρσίες. Το διήθημα τοποθετείται σε φυσίγγιο πυριτίου, το οποίο προηγουμένως ενεργοποιείται με 10 mL εξάνιο. Ακολουθεί ξέπλυμα της στήλης με 2 mL εξάνιο/διεθυλ αιθέρα σε αναλογία 8:2 και 2 mL εξάνιο/διεθυλ αιθέρα 1:1, αντίστοιχα. Τα COPs εκλούστηκαν με 2 mL μεθανόλη.

Γ. Η συγκεκριμένη διαδικασία διαφέρει από τη μέθοδο B μόνο στους οργανικούς διαλύτες που χρησιμοποιούνται για την εξαγωγή του λίπους. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται εξάνιο και 2-προπανόλη σε αναλογία 3:2 v/v.

5.2. Σύγκριση μεθόδων επεξεργασίας του δείγματος

5.2.1. Οργανολογία

Το δεύτερο μέρος της παρούσας διατριβής επικεντρώθηκε στη σύγκριση διαφορετικών μεθόδων επεξεργασίας του δείγματος. Παρόμοια με την προηγούμενη εργασία, για την πραγματοποίηση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε το σύστημα HPLC της εταιρείας

Shimadzu. Για το διαχωρισμό και την ανάλυση των COPs χρησιμοποιήθηκε στήλη κυανίου και συγκεκριμένα η Nova Pak CN από την εταιρεία Waters (Milford, MA), με διαστάσεις 300 mm x 3.9 mm (i.d.) x 4 μm. Η στήλη ήταν εφοδιασμένη με προστατευτική στήλη Hypersil BDS CN με διαστάσεις 7.5 mm x 4.6 mm (i.d.) x 5 μm. Η ανίχνευση των COPs έγινε στα 206 nm, εκτός από την 7-κέτο, η οποία παρουσίασε μέγιστη απορρόφηση στα 230 nm.

5.2.2. Αναλύτες

Τα COPs (20α-hydroxycholesterol (20α-OH), 22(R)-hydroxycholesterol (22R-OH), 25-hydroxycholesterol (25-OH), 7β-hydroxycholesterol (7β-OH) και 7α-hydroxycholesterol (7α-OH)) αγοράστηκαν από την εταιρεία Steraloids (Newport, RI) ενώ η 22(S)-hydroxycholesterol (22S-OH), η 7-ketocholesterol (7-keto) και η Cholesta-3,5-diene-7-one από την εταιρεία Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

5.2.3. Πειραματικές διαδικασίες επεξεργασίας του δείγματος

Καθ' όλη τη διάρκεια της βελτιστοποίησης της μεθόδου εξαγωγής, χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα δείγμα κυπριακής λούντζας. Για την αξιολόγηση της μεθόδου, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανάκτησης και για τα 7 COPs σε ποσότητα 20 μg. Η πειραματική διαδικασία επαναλήφθηκε συνολικά δύο φορές για κάθε μέθοδο.

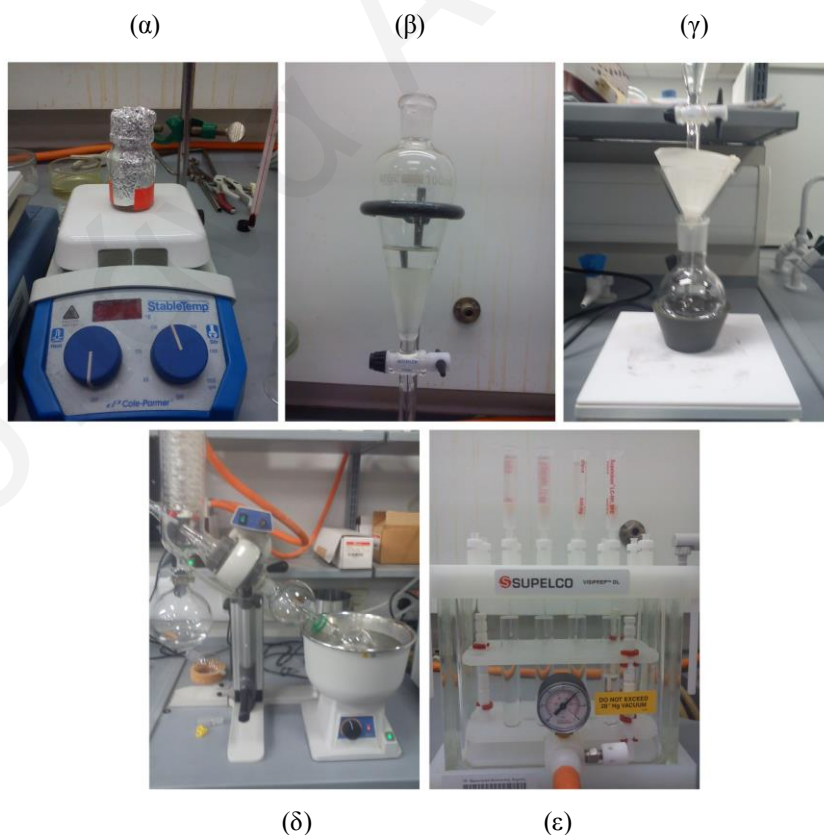
5.2.3.1. Απευθείας σαπωνοποίηση

Για την εύρεση της βέλτιστης μεθόδου σαπωνοποίησης συγκρίθηκαν μεταξύ τους τρεις βιβλιογραφικές μέθοδοι απευθείας σαπωνοποίησης, καθώς και μια τέταρτη μέθοδος που αποτέλεσε συνδυασμό δύο εξ αυτών. Οι μέθοδοι διέφεραν μεταξύ τους ως προς τη σύσταση του διαλύτη σαπωνοποίησης 'X' και την ποσότητα του προστιθέμενου νερού 'Y' μετά το τέλος της σαπωνοποίησης. Για τον περαιτέρω καθαρισμό των COPs από προσμίξεις της μήτρας πραγματοποιήθηκε NH₂-SPE, σύμφωνα με τη μέθοδο της Rose-Sallin, όπως αυτή περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 2.4.⁷³

1 g λούντζας τοποθετείται σε μπουκάλι των 25 mL εφοδιασμένο με πόμα, ώστε να μην έρχεται σε επαφή με τον ατμοσφαιρικό αέρα. Αφού το δείγμα εμβολιάζεται με 20 μg από κάθε COP, υφίσταται σαπωνοποίηση στους 25 °C με 10 mL διαλύματος KOH 3.5 M, σύστασης 'X', για 18 h υπό σκοτάδι και υπό συνεχή ανάδευση (Σχήμα 5.1.(α)). Ακολούθως προστίθενται 'Y' mL νερού και το διάλυμα μεταφέρεται σε εκχυλιστική

χοάνη. Το ασαπωνοποίητο κλάσμα, το οποίο περιλαμβάνει τα COPs, απομονώνεται με εκχύλιση με 10 mL εξανίου (**Σχήμα 5.1.(β)**). Η εκχύλιση πραγματοποιείται συνολικά 4 φορές για μεγιστοποίηση της ανάκτησης. Η οργανική φάση, αφού διηθείται με διηθητικό χαρτί, το οποίο περιέχει άνυδρο Na_2SO_4 για δέσμευση της υγρασίας (**Σχήμα 5.1.(γ)**), εξατμίζεται σε περιστροφικό εξατμιστήρα (rotary evaporator) στους 40 °C (**Σχήμα 5.1.(δ)**). Αξίζει να σημειωθεί ότι η έκπλυση της οργανικής φάσης με νερό αποφεύγεται, ούτως ώστε να μειωθεί ο κίνδυνος απώλειας των COPs σε επιπλέον στάδια καθαρισμού.

Το προκύπτον στερεό διαλύεται σε 2 mL διαλύματος εξανίου/οξικού-αιθυλεστέρα (95:5, v/v) και υποβάλλεται σε SPE (**Σχήμα 5.1.(ε)**). Η στήλη NH_2 ενεργοποιείται προηγουμένως με 3 mL εξανίου. Αφού το δείγμα φορτώνεται στη στήλη, ακολουθούν δύο στάδια έκπλυσης με 6 mL διαλύματος εξανίου/οξικού-αιθυλεστέρα (95:5, v/v) και 10 mL διαλύματος εξανίου/οξικού-αιθυλεστέρα (90:10, v/v), για απομάκρυνση των άπολων λιπιδίων και της Chol. Η έκλυση των COPs πραγματοποιείται με 10 mL ακετόνης. Τέλος, το κλάσμα των COPs εξατμίζεται κάτω από ροή N_2 και επαναδιαλύεται σε 1 mL διαλύματος εξανίου/2-προπανόλης (97:3, v/v).



Σχήμα 5.1. Απεικόνιση της πειραματικής πορείας της απευθείας σαπωνοποίησης.

5.2.3.2. Εξαγωγή των λιπιδίων

Για την εύρεση της βέλτιστης μεθόδου εξαγωγής των λιπιδίων συγκρίθηκαν μεταξύ τους τρεις βιβλιογραφικές μέθοδοι, οι οποίες περιγράφονται πιο κάτω. Οι μέθοδοι διέφεραν μεταξύ τους, κυρίως, ως προς το στάδιο καθαρισμού των λιπιδίων από πολικές προσμίξεις πριν τη διεξαγωγή της σαπωνοποίησης.

Μέθοδος ‘Lee’:

5 g λούντζας, τοποθετούνται σε ποτήρι ζέσεως των 250 mL και ομογενοποιούνται με 90 mL διαλύματος χλωροφορμίου/μεθανόλης (2:1, v/v) για 3 min με τη βοήθεια ενός mixer χειρός 750 W (**Σχήμα 5.2.(α)**). Το ‘mixer’ εκπλένεται περαιτέρω με 15 mL του διαλύματος ομογενοποίησης και το περιεχόμενο αναδεύεται για 30 min. Στη συνέχεια, το δείγμα διηθείται με διηθητικό χαρτί, το οποίο περιείχε άνυδρο Na_2SO_4 , για απομάκρυνση της υγρασίας και των στερεών υπολειμμάτων (**Σχήμα 5.2.(β)**) και εξατμίζεται σε περιστροφικό εξατμιστήρα. Το διηθητικό χαρτί εκπλένεται με 15 mL διαλύματος χλωροφορμίου/μεθανόλης (2:1, v/v). Το προκύπτον ελαιώδες υγρό διαλύεται με 10 mL εξάνιο και διηθείται διαμέσω φίλτρου μεμβράνης (0.45 μm), το οποίο ενεργοποιείται προηγουμένως με μεθανόλη (**Σχήμα 5.2.(γ)**). Το διάλυμα μεταφέρεται σε μπουκάλι των 25 mL και εξατμίζεται κάτω από ροή N_2 . Το προκύπτον στερεό υφιάταται σαπωνοποίηση για 18 h με διάλυμα KOH 1 M, σύμφωνα με τις βέλτιστες συνθήκες της μεθόδου ‘Saldanha’. Το δείγμα καθαρίζεται περαιτέρω με $\text{NH}_2\text{-SPE}$.

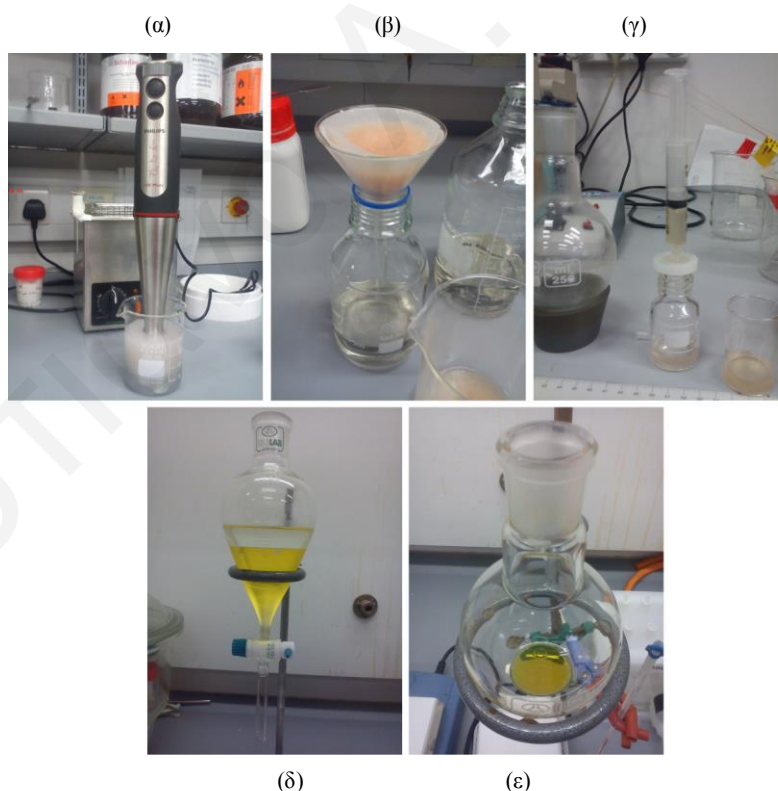
Μέθοδος ‘Folch’

5 g λούντζας, ομογενοποιούνται με 90 mL διαλύματος χλωροφορμίου/μεθανόλης (2:1, v/v) σε ποτήρι ζέσεως των 250 mL για 3 min. Το ‘mixer’ εκπλένεται περαιτέρω με 15 mL του διαλύματος ομογενοποίησης και το δείγμα διηθείται με διηθητικό χαρτί, το οποίο περιέχει άνυδρο Na_2SO_4 , για απομάκρυνση της υγρασίας και των στερεών υπολειμμάτων (κυρίως πρωτεϊνών). Το διηθητικό χαρτί εκπλένεται με 15 mL διαλύματος χλωροφορμίου/μεθανόλης (2:1, v/v). Ο όγκος του διηθήματος αναπροσαρμόζεται στα 120 mL με προσθήκη απαιτούμενης ποσότητας χλωροφορμίου/μεθανόλης (2:1, v/v) και μεταφέρεται σε μπουκάλι των 250 mL. Ακολούθως, προστίθενται 30 mL υδατικού διαλύματος NaCl (0.88 % w/w), ώστε να προκύψει αναλογία μεταξύ χλωροφορμίου/μεθανόλης/νερού 8:4:3. Το περιεχόμενο

ανακινείται και τοποθετείται στους 4 °C ολονύχτια, ώστε να προκύψει διαχωρισμός των δύο φάσεων (**Σχήμα 5.2.(δ)**). Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο Na₂SO₄, μεταφέρεται σε προζυγισμένη σφαιρική φιάλη των 250 mL και εξατμίζεται σε περιστροφικό εξατμιστήρα. Το λίπος (**Σχήμα 5.2.(ε)**) υποβάλλεται σε σαπωνοποίηση και NH₂-SPE.

Μέθοδος 'Boselli'

5 g λούντζας ομογενοποιούνται με 200 mL διαλύματος χλωροφορμίου/μεθανόλης (1:1, v/v) σε ποτήρι ζέσεως των 500 mL για 3 min. Το δείγμα στη συνέχεια τοποθετείται για 20 min σε υδρόλουτρο στους 60 °C για μεγιστοποίηση της εξαγωγής των λιπιδίων. Στη συνέχεια, αφού ομογενοποιείται περαιτέρω με 100 mL χλωροφορμίου για 3 min, διηθείται με διηθητικό χαρτί, το οποίο περιέχει άνυδρο Na₂SO₄, για απομάκρυνση της υγρασίας και των στερεών υπολειμμάτων. Το διήθημα μεταφέρεται σε μπουκάλι των 500 mL, στο οποίο προστίθενται 100 mL υδατικού διαλύματος NaCl (1 M). Το περιεχόμενο ανακινείται και τοποθετείται στους 4 °C ολονύχτια για διαχωρισμό των δύο φάσεων.



Σχήμα 5.2. Η πειραματική διαδικασία της εξαγωγής των λιπιδίων σε εικόνες

Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο Na_2SO_4 , μεταφέρεται σε προζυγισμένη σφαιρική φιάλη των 250 mL και εξατμίζεται σε περιστροφικό εξατμιστήρα. Το λίπος υποβάλλεται σε σαπωνοποίηση και $\text{NH}_2\text{-SPE}$.

5.3. Προσδιορισμός των COPs με χρήση της τεχνικής UPLC-MS/MS

5.3.1. Οργανολογία

Η διεξαγωγή των πειραμάτων της τελευταίας πτυχής της παρούσας διατριβής πραγματοποιήθηκε σε σύστημα ACQUITY TQD UPLC-MS/MS (Waters) χρησιμοποιώντας μία μέθοδο που αναπτύχθηκε ειδικά για την εφαρμογή αυτή. Για την ανίχνευση των αναλυόμενων ουσιών χρησιμοποιήθηκε τριπλό τετραπολικό φασματόμετρο μάζας TQD εξοπλισμένο με πηγή ηλεκτροψεκασμού ESI (+). Ο χειρισμός του συστήματος, καθώς επίσης η συλλογή και η αξιολόγηση όλων των πειραματικών δεδομένων, έγινε μέσω του λογισμικού MassLynx 4.1. Οι παράμετροι που εφαρμόστηκαν στην πηγή ιονισμού ήταν: δυναμικό τριχοειδούς, 3.5 kV; extractor voltage, 3V; θερμοκρασία της πηγής, 110 °C; θερμοκρασία αποδιαλύτωσης, 200 °C; cone gas flow, 50 L h⁻¹ ροή αερίου αποδιαλύτωσης, 850 L h⁻¹ (και τα δύο αέρια ήταν άζωτο).

Για τη χρωματογραφική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε στήλη τύπου BEH Shield RP18 (50 x 2.1 mm i.d, 1.7 μm) και κινητή φάση αποτελούμενη από δύο συστήματα διαλυτών, υδατικό διάλυμα φορμικού οξέος 0.1% (A) και μεθανόλη (B). Το εφαρμοζόμενο πρόγραμμα έκλουσης των διαλυτών ήταν: 0-1 min 15% B; 1-2 min 25% B; 2.1-3 min 80% B; 3-4.5 min B. Η βέλτιστη ταχύτητα ροής ήταν 0.4 mL min⁻¹, ενώ ο όγκος έγχυσης ήταν 10 μL. Η θερμοκρασία της στήλης και του αυτόματου δειγματολήπτη διατηρήθηκε στους 40 °C και 10 °C, αντίστοιχα.

5.3.2. Αναλύτες

Τα πρότυπα δείγματα 22R-υδροξυχοληστερόλη (22R-OH) και 7-υδροξυχοληστερόλη (7-OH) αγοράστηκαν από την εταιρία Steraloids (Newport, RI), ενώ τα 5,6-εποξειδία της χοληστερόλης (5,6-EP) και η 7-κετοχοληστερόλη (7-κετο) αποκτήθηκαν από την Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO). Τα μητρικά διαλύματα των προτύπων παρασκευάστηκαν σε μεθανόλη σε συγκεντρώσεις 1 mg mL⁻¹ και στη συνέχεια αραιώθηκαν σε συγκεντρώσεις εργασίας. Όταν ήταν απαραίτητο, εφαρμόστηκε

κατεργασία με υπερήχους για να εξασφαλιστεί η πλήρης διάλυση των ουσιών. Τα πρότυπα διαλύματα διατηρήθηκαν στο ψυγείο στους 4 °C.

5.3.3. Διαλύτες

Η μεθανόλη που χρησιμοποιήθηκε κατά την ανάλυση LC-MS/MS ήταν καθαρότητας LC-MS και λήφθηκε από την εταιρεία Merck. Ομοίως, χρησιμοποιήθηκε υψηλής καθαρότητας νερό για την παρασκευή της κινητής φάσης από ένα σύστημα καθαρισμού Millipore. (Milli-Q, Millipore, Bedford, USA)

5.3.4. Προετοιμασία του δείγματος

Η βέλτιστη μέθοδος από τη συγκριτική μελέτη της δεύτερης πτυχής της εργασίας εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό των COPs στα κυπριακά τρόφιμα με την τεχνική UPLC-MS/MS. Συγκεκριμένα, το πρώτο στάδιο της επεξεργασίας του δείγματος περιελάμβανε εξαγωγή των λιπιδίων χρησιμοποιώντας 120 mL διαλύματος χλωροφορμίου-μεθανόλης σε αναλογία 2:1 (v/v). Τα δείγματα (5 g) ομογενοποιήθηκαν με το εν λόγω σύστημα διαλυτών για 3 min και στη συνέχεια, το προκύπτον μίγμα διηθήθηκε προκειμένου να απομακρυνθούν τα στερεά υπολείμματα (κυρίως πρωτεΐνες). Το διήθημα αναμείχθηκε με 30 mL διαλύματος NaCl (0.88 %, w/w) ώστε η αναλογία μεταξύ χλωροφορμίου/μεθανόλης/νερού να είναι 8:4:3. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε στους 4 °C ολονύχτια ώστε να προκύψει διαχωρισμός των δύο φάσεων. Η κατώτερη φάση, που περιείχε τα λιπίδια, συλλέχθηκε και εξατμίστηκε κάτω από κενό.

Ακολούθως, κλάσμα λιπιδίων (250 mg) υποβλήθηκε σε σαπωνοποίηση με 10 mL διαλύματος 1M KOH σε αιθανόλη, σε θερμοκρασία δωματίου, για 18 ώρες υπό σκοτάδι και κάτω από συνεχή ανάδευση. Με την ολοκλήρωση της, προστέθηκαν 10 mL νερού και το διάλυμα μεταφέρθηκε σε διαχωριστική χοάνη. Το ασαπωνοποίητο κλάσμα, το οποίο περιελάμβανε τα COPs, απομονώθηκε με εκχύλιση με 10 mL εξάνιο. Για μεγιστοποίηση της ανάκτησης, η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε συνολικά 4 φορές. Τα εκχυλίσματα διηθήθηκαν με τη βοήθεια διηθητικού χαρτιού που περιείχε άνυδρο θειικό νάτριο για δέσμευση της υγρασίας, και το υλικό που συγκρατήθηκε μετά τη διήθηση πλήθηκε με επιπλέον 10 mL εξανίου. Στη συνέχεια, το διάλυμα εξατμίστηκε

κάτω από κενό και το στερεό υπόλειμμα διαλύθηκε σε 2 mL εξάνιο/οξικό αιθυλεστέρα (95:5, v/v).

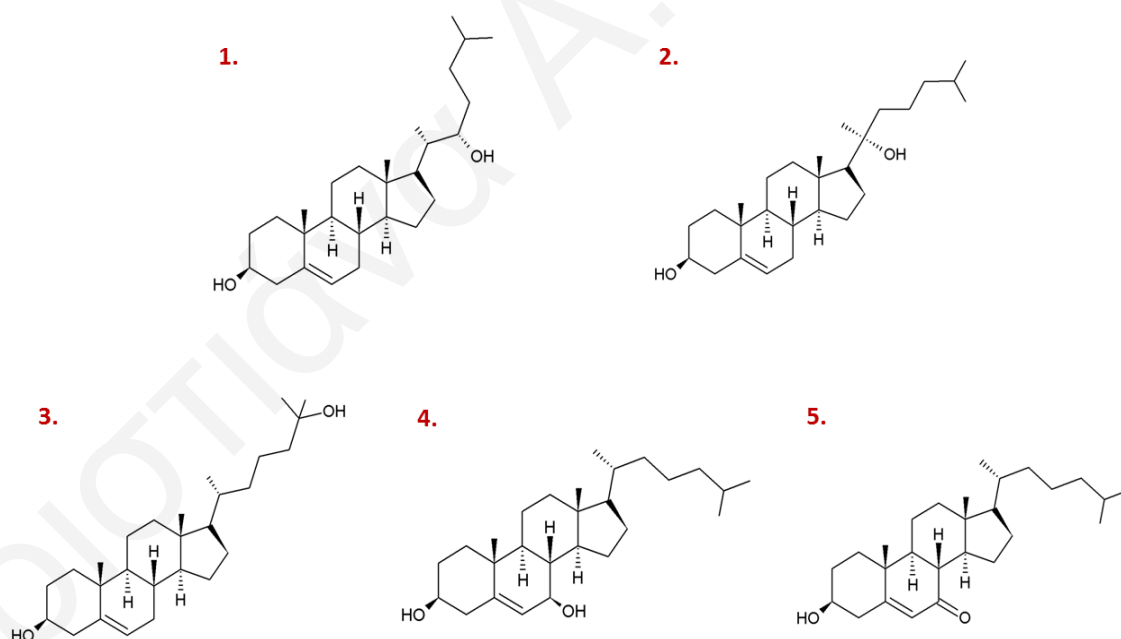
Ο εμπλουτισμός και ο καθαρισμός των υπό μελέτη ουσιών από άπολα λιπίδια και τη χοληστερόλη επιτεύχθηκε με SPE, χρησιμοποιώντας στήλη NH₂. Κάθε στήλη είχε ενεργοποιηθεί με 3 mL εξάνιου και, μετά από την τοποθέτηση του δείγματος, εκλούστηκε διαδοχικά με τρεις διαλύτες: 6 mL εξάνιο/οξικού αιθυλεστέρα (95:5, v/v), 10 mL εξάνιου/οξικού αιθυλεστέρα (90:10, v/v) και 10 mL ακετόνης. Τα δύο πρώτα κλάσματα απορρίφθηκαν, ενώ το τελευταίο κλάσμα που περιείχε τα COPs, εξατμίστηκε κάτω από ροή αζώτου και επαναδιαλύθηκε σε 1 mL μεθανόλης.

6. Αποτελέσματα και συζήτηση

6.1. Προσδιορισμός των COPs σε κυπριακά αλλαντικά με εφαρμογή της τεχνικής HPLC-UV/Vis

6.1.1. Ανάπτυξη μεθόδου

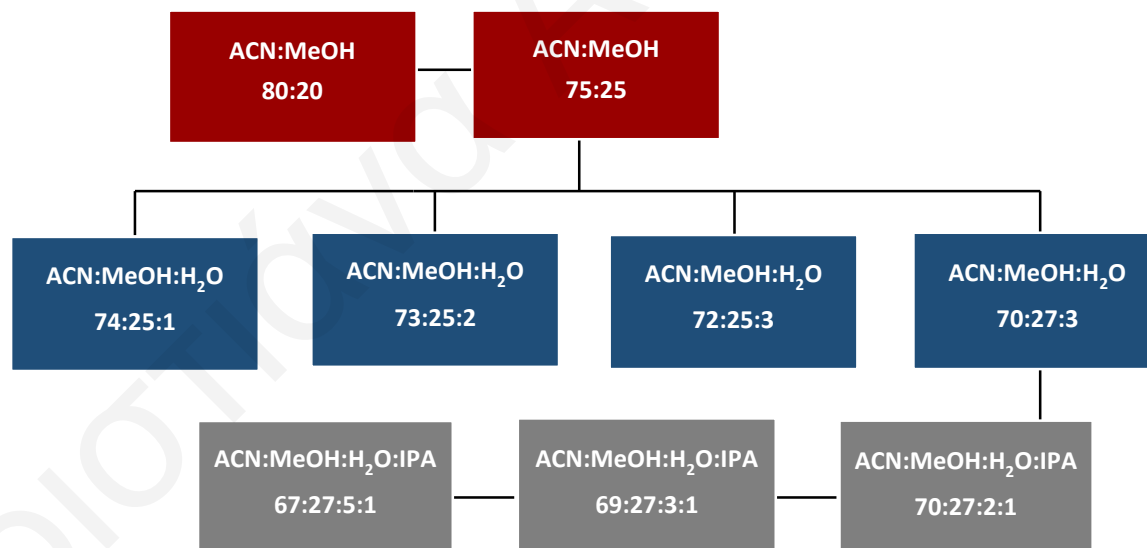
Ερευνητικός στόχος του πρώτου μέρους της παρούσας διατριβής, ήταν η ανάπτυξη μιας αναλυτικής μεθόδου με βάση την HPLC-UV/Vis που να επιτρέπει τον ταυτόχρονο διαχωρισμό των υπό μελέτη COPs.⁷¹ Οι βέλτιστες πειραματικές συνθήκες προσδιορίστηκαν από την αξιολόγηση διάφορων παραμέτρων, όπως η σύσταση της κινητής φάσης, η ταχύτητα ροής της και η θερμοκρασία της στήλης. Ακολούθως, αξιολογήθηκαν τρεις διαφορετικές επεξεργασίες του δείγματος, με την βέλτιστη να εφαρμόζεται στο τελικό στάδιο για τον ποσοτικό προσδιορισμό των COPs στα κυπριακά αλλαντικά. Στο **Σχήμα 6.1.** παρουσιάζονται οι χημικές δομές των πέντε αναλυτών που μελετήθηκαν με την αρίθμηση τους να αντιστοιχεί στη σειρά έκλουσής τους.



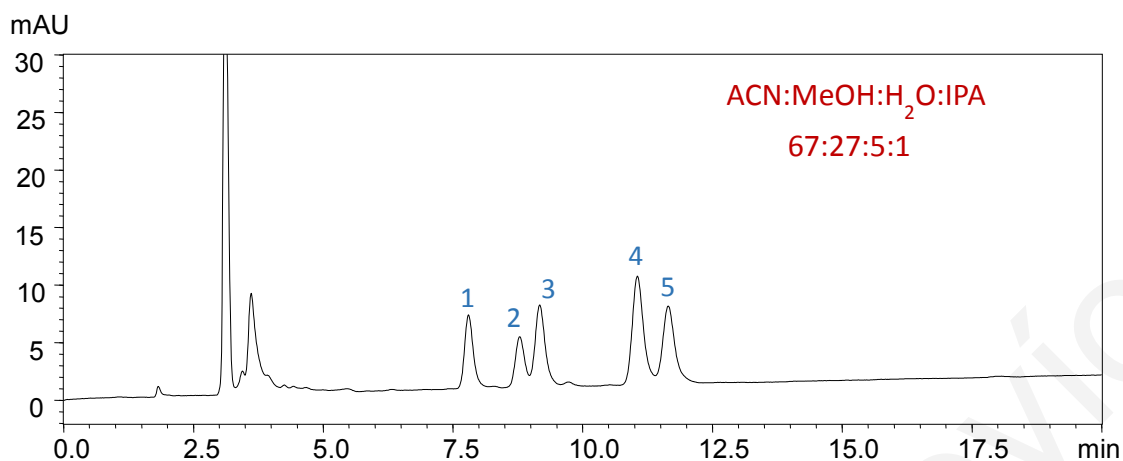
Σχήμα 6.1. Χημικές δομές των υπό μελέτη COPs με HPLC-UV/Vis 1. 22R-OH, 2. 20α-OH, 3. 25-OH, 4. 7β-OH, 5. 7-κέτο.

Σε προκαταρκτικά πειράματα, διερευνήθηκε η χρωματογραφική συμπεριφορά των COPs, μεταβάλλοντας τη σύσταση της κινητής φάσης και την εκατοστιαία ποσότητα των εν λόγω διαλυτών. Τροποποιήσεις στην κινητή φάση οδήγησαν σε διαφορετική εκλεκτικότητα και ανάλυση. Γενικά, παρατηρήθηκε ότι η σχετική υδρόφιλη φύση της έδωσε σημαντικά καλύτερο διαχωρισμό των COPs.

Βαθμιδωτή μείωση του ακετονιτριλίου από 74 σε 67 % (v/v), αύξηση του ποσοστού της μεθανόλης και του νερού από 25 σε 27% κι από 2 σε 5%, αντίστοιχα, παρείχε ένα εξαιρετικά καλύτερο διαχωρισμό μεταξύ των κορυφών 2-3 και 4-5, που αντιστοιχούν στους αναλύτες 20α-OH - 25-OH και 7-OH - 7-κέτο. Χαρακτηριστικά, οι τιμές διαχωρισμού αυξήθηκαν από 1.01 σε 1.17 κι από 0.68 σε 1.31, αντίστοιχα. Έτσι, μετά την εφαρμογή όλων των συνδυασμών που παρουσιάζονται στο **σχεδιάγραμμα 6.2.**, το ισοκρατικό σύστημα διαλυτών ACN:MeOH:H₂O:IPA (67:27:5:1) επιλέχθηκε ως η βέλτιστη σύσταση της κινητής φάσης (**Σχήμα 6.3.**).



Σχήμα 6.2. Πορεία επιλογής της βέλτιστης σύστασης της κινητής φάσης.



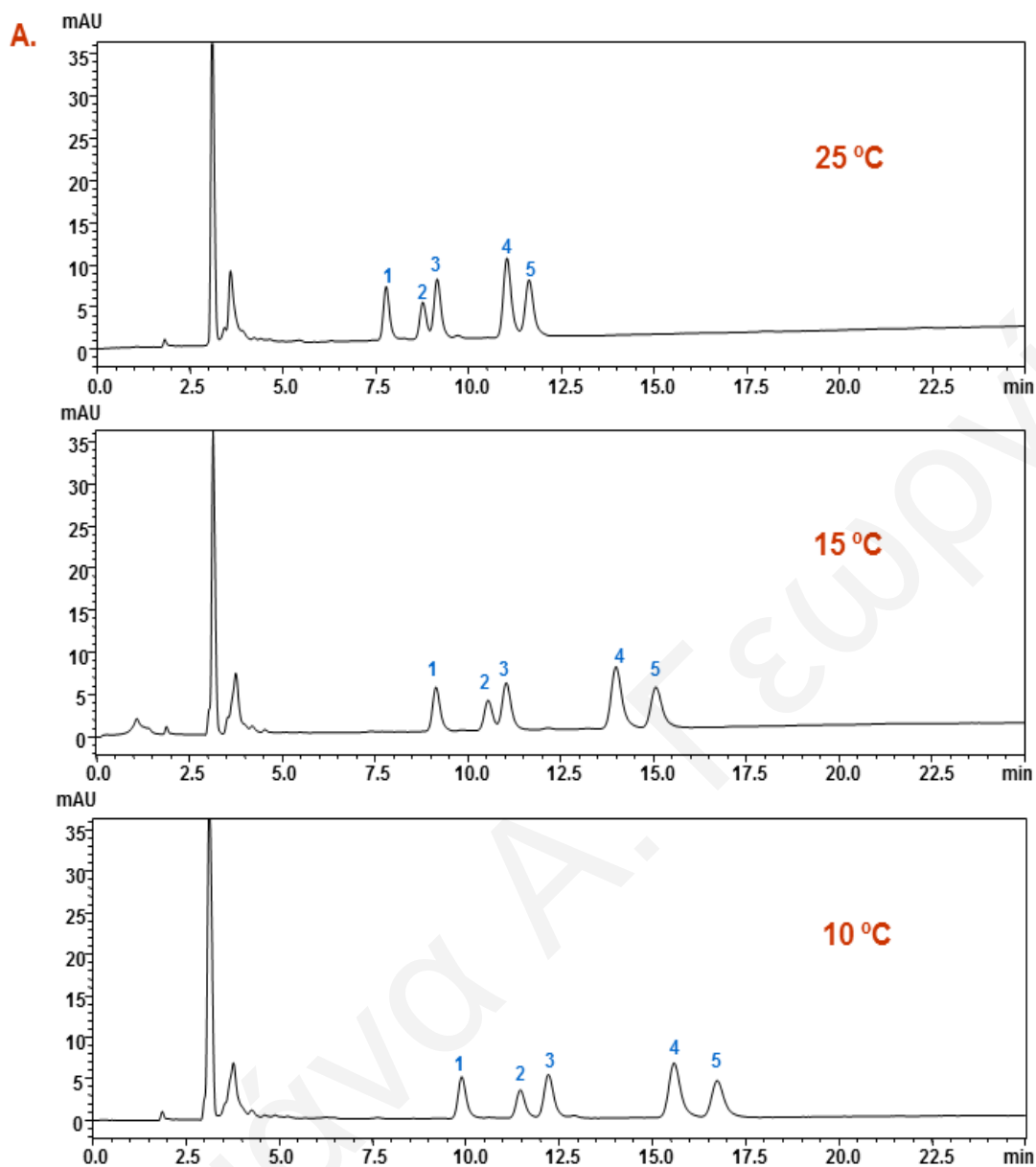
Σχήμα 6.3. Χρωματογράφημα με τη βέλτιστη σύσταση κινητής φάσης ACN:MeOH:H₂O:IPA (67:27:5:1), ταχύτητα ροής 1mL/min, θερμοκρασία στήλης 10°C. (1. 22R-OH, 2. 20α-OH, 3.25-OH, 4. 7-OH, 5. 7-κέτο)

Ακολουθώς, μελετήθηκε η θερμοκρασία της στήλης με σκοπό τη βελτιστοποίηση του διαχωρισμού (**Σχήμα 6.4.**). Η μεταβολή της θερμοκρασίας είναι μια σημαντική παράμετρος που μπορεί να συμβάλει στο διαχωρισμό αφού επιδρά αντιστρόφως ανάλογα στον παράγοντα κατακράτησης (k') ενός αναλύτη σύμφωνα με την εξίσωση του Van't Hoff, η οποία ορίζεται ως:

$$\log k' = A + B/T_K \quad (\text{Εξ. 6.1})$$

όπου A και B είναι σταθερές ανεξάρτητες της θερμοκρασίας και T_K η θερμοκρασία σε βαθμούς Kelvin.⁶³

Όπως ήταν αναμενόμενο με μείωση της θερμοκρασίας από 25 σε 10 °C αυξήθηκε ο χρόνος ανάλυσης από 12 σε 17 λεπτά λόγω της αύξησης του ιξώδους της κινητής φάσης. Ως συνέπεια της μεγαλύτερης κατακράτησης των αναλυτών στη στατική φάση επιτεύχθηκε καλύτερος διαχωρισμός μεταξύ του ζεύγους κορυφών 2-3 και 4-5. Η διαχωριστική ικανότητα αυξήθηκε από 1.17 σε 1.45 κι από 1.31 σε 1.54, αντίστοιχα. Λαμβάνοντας υπόψη τον επαρκή διαχωρισμό, η θερμοκρασία των 10 °C επιλέχθηκε ως η βέλτιστη.



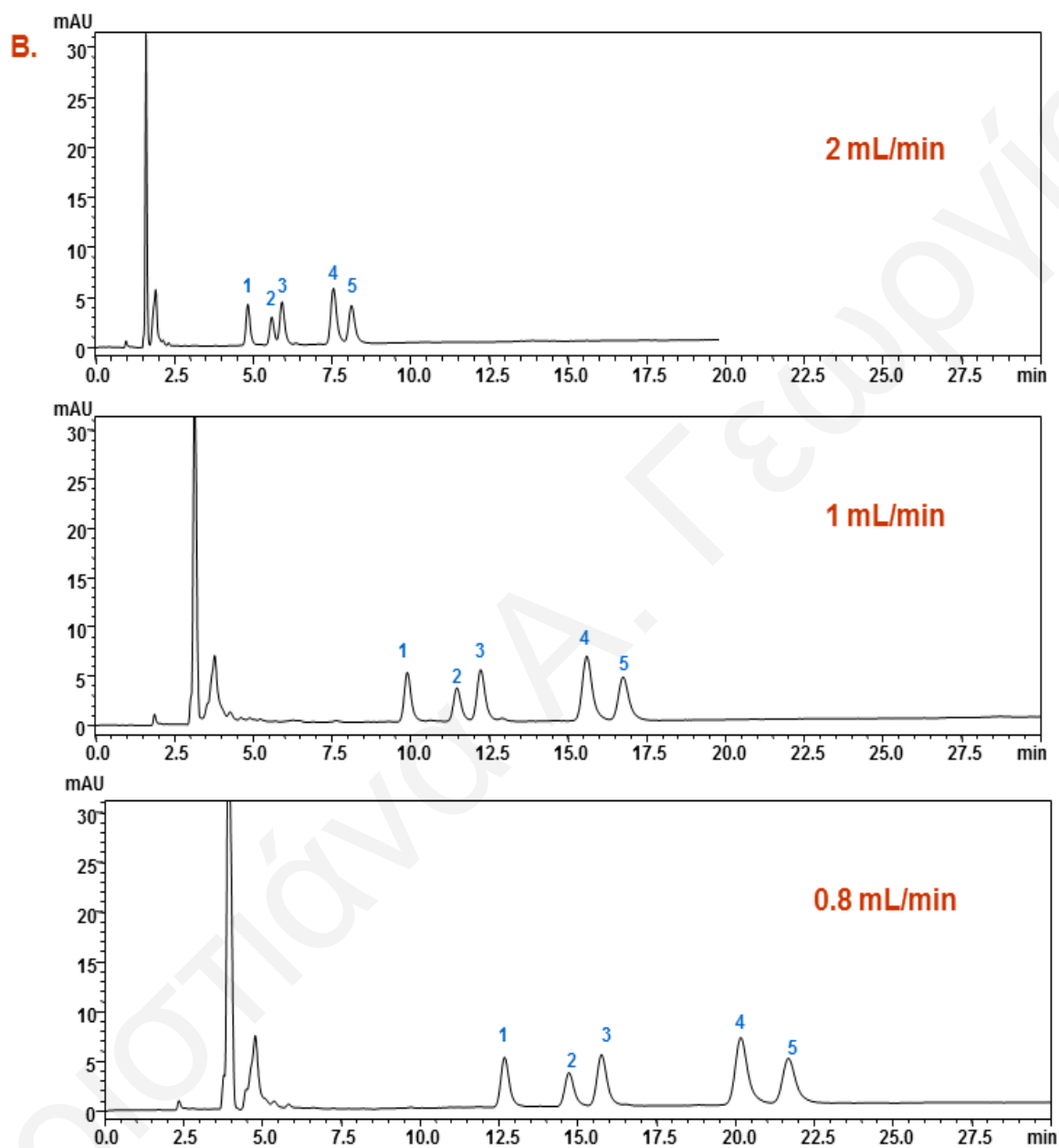
Σχήμα 6.4. Επίδραση της θερμοκρασίας της στήλης στο διαχωρισμό των υπό μελέτη COPs.

Συνθήκες: κινητή φάση ACN:MeOH:H₂O:IPA 67:27:5:1, όγκος έγχυσης 10 μ L.

(1. 22R-OH, 2. 20 α -OH, 3.25-OH, 4. 7-OH, 5. 7-κέτο)

Τέλος, εξετάστηκε η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης ως παράγοντας για την επίτευξη πλήρους διαχωρισμού. Όπως φαίνεται και στο **Σχήμα 6.5.**, η μείωση της ταχύτητας ροής από 2 σε 0.8 mL/min είχε ως αποτέλεσμα το μεγαλύτερο χρόνο κατακράτησης για όλους τους αναλύτες. Αυτό, με τη σειρά του, οδήγησε σε σημαντική βελτίωση της

ανάλυσης και επιτεύχθηκε πλήρης διαχωρισμός όλων των COPs σε διάστημα 22 min. Συνεπώς, ως βέλτιστη ταχύτητα ροής ορίστηκε η 0.8 mL/min.



Σχήμα 6.5. Επίδραση της ταχύτητας ροής της κινητής φάσης στο διαχωρισμό των υπό μελέτη COPs. Συνθήκες: κινητή φάση ACN:MeOH:H₂O:IPA 67:27:5:1, όγκος έγχυσης 10 μ L, θερμοκρασία στήλης 10°C. (1. 22R-OH, 2. 20 α -OH, 3.25-OH, 4. 7-OH, 5. 7-κέτο)

6.1.2. Αξιολόγηση μεθόδου

Η βέλτιστη HPLC μέθοδος που αναπτύχθηκε, αξιολογήθηκε στη συνέχεια με τους όρους της γραμμικότητας, της επαναληψιμότητας, η οποία δίνεται από το κριτήριο της RSD, των LOD και LOQ. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν φαίνονται στον **Πίνακα 6.1**. Οι καμπύλες βαθμονόμησης για τα πέντε COPs κατασκευάστηκαν με εξωτερική βαθμονόμηση, στην απουσία δηλαδή μήτρας (external calibration), με πέντε επαναλαμβανόμενες μετρήσεις του εμβαδού των κορυφών, σε επτά διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα των αναλυτών σε εύρος συγκεντρώσεων 1.5 με 50 $\mu\text{g/mL}$. Όπως παρατηρείται, λήφθηκαν πολύ καλές γραμμικότητες για όλους τους αναλύτες που μελετήθηκαν αφού σε όλες τις περιπτώσεις ο συντελεστής συσχέτισης ήταν μεγαλύτερος από 0.99.

Πίνακας 6.1. Παράμετροι αξιολόγησης της βέλτιστης HPLC μεθόδου.

Ένωση	Εξίσωση	r^2	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)	RSD _{IR} (%)
22R-OH	$y = 1.05e7 x - 5264.1$	0.9997	1.11	3.37	0.558
20 α -OH	$y = 8.57e6 x + 5562.4$	0.9996	1.28	3.89	0.840
25-OH	$y = 1.30e7 x - 1261.9$	0.9998	0.99	2.99	0.373
7 β -OH	$y = 1.26e7 x + 13573$	0.9997	1.09	3.31	0.127
7-κέτο	$y = 1.75e7 x - 1620.7$	0.9998	1.01	3.09	1.260

Επιπλέον, η επαναληψιμότητα των χρόνων κατακράτησης για πέντε επαναλαμβανόμενες μετρήσεις με χρήση προτύπου μίγματος των πέντε COPs σε συγκέντρωση 20 $\mu\text{g/mL}$, ήταν πολύ ικανοποιητική, με τις τιμές RSD να είναι μικρότερες ή πολύ κοντά στο 1%. Τέλος, οι τιμές των LODs και LOQs που υπολογίστηκαν κυμαίνονταν από 0.99 – 1.28 $\mu\text{g/mL}$ και 2.99 – 3.89 $\mu\text{g/mL}$, αντίστοιχα. Αυτά τα αποτελέσματα, όπως αποδείχθηκε, έδωσαν τη δυνατότητα προσδιορισμού των COPs στα υπό μελέτη δείγματα, κάτω από τις βέλτιστες πειραματικές συνθήκες.

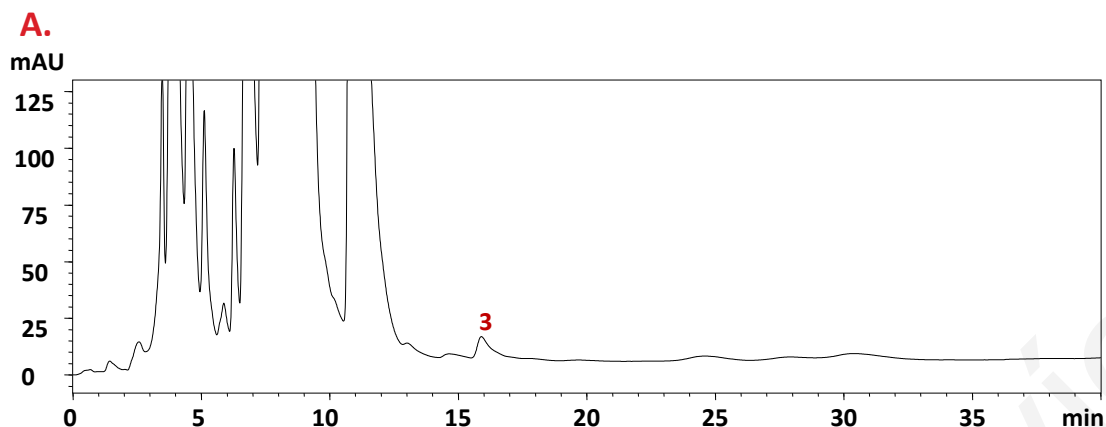
6.1.3. Βελτιστοποίηση μεθόδου επεξεργασίας του δείγματος

Το σημαντικότερο, και ταυτόχρονα πιο κρίσιμο στάδιο της αναλυτικής πορείας για τον προσδιορισμό των COPs είναι η προετοιμασία του δείγματος. Αυτό αποτελεί ένα βήμα, στο οποίο ο αναλυτής καλείται να επιτύχει την εκλεκτική απομόνωση των COPs από την εξεταζόμενη μήτρα απομακρύνοντας τις υπόλοιπες παρεμποδίζουσες ουσίες. Αυτό θα διασφαλίσει τη λήψη χρωματογραφημάτων υψηλής ευκρίνειας ως προς τα COPs, καθιστώντας εύκολη την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση τους.

Μέσα σε αυτό το γενικό πλαίσιο εντάσσεται και η παρούσα πτυχή της ερευνητικής εργασίας. Βασικός της στόχος είναι η ανάπτυξη διαφορετικών μεθόδων επεξεργασίας του δείγματος προκειμένου να καθοριστεί η πιο αποτελεσματική, η οποία θα επιτρέπει την αξιόπιστη ποσοτικοποίηση των COPs στα παραδοσιακά κυπριακά αλλαντικά. Η κάθε πορεία αξιολογήθηκε ως προς την εκλεκτικότητα, την ανάκτηση και την επαναληψιμότητα της.

Έχοντας λοιπόν τις υπάρχουσες βιβλιογραφικές μελέτες ως αφετηρία, σχεδιάστηκαν τρεις μέθοδοι επεξεργασίας οι οποίες περιγράφονται αναλυτικά στο πειραματικό μέρος. Αρχικά εφαρμόστηκε μια μέθοδος με απευθείας σαπωνοποίηση του δείγματος και εν συνεχεία εμπλουτισμός των COPs με SPE. Παρόλο που η διαδικασία της σαπωνοποίησης είναι χρονοβόρα, η εφαρμογή στο παρόν αναλυτικό πρωτόκολλο κρίθηκε απαραίτητη αφού σύμφωνα με την πλειονότητα των δημοσιευμένων ερευνητικών εργασιών αποτελεί τον αποτελεσματικότερο τρόπο καθαρισμού των COPs από την κύρια μάζα των λιπιδίων. Να σημειωθεί ότι, προκειμένου να αποφευχθεί ο κίνδυνος σχηματισμού τεχνητών COPs και αποικοδόμησης της 7-κέτο, εφαρμόστηκαν ήπιες αλκαλικές συνθήκες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Όπως φαίνεται χαρακτηριστικά στο **Σχήμα 6.6.**, στο χρωματογράφημα, το οποίο λήφθηκε χρησιμοποιώντας τη συγκεκριμένη μέθοδο, παρατηρήθηκε ασταθής γραμμή βάσης και πολλές παρεμβολικές κορυφές στο χρονικό εύρος όπου εκλούεται η 22R-OH. Συνεπώς, ο προσδιορισμός και η ποσοτικοποίηση αυτής της σημαντικής ένωσης ήταν αδύνατος με την εφαρμογή της εν λόγω διαδικασίας.



Σχήμα 6.6. Χρωματογράφημα από δείγμα λούντζας με εφαρμογή της πρώτης μεθόδου επεξεργασίας (3. 25-OH).

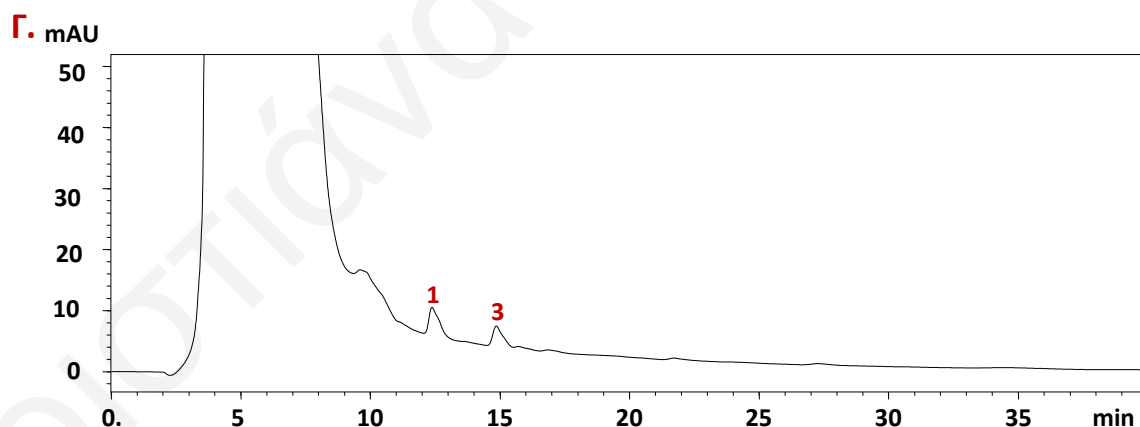
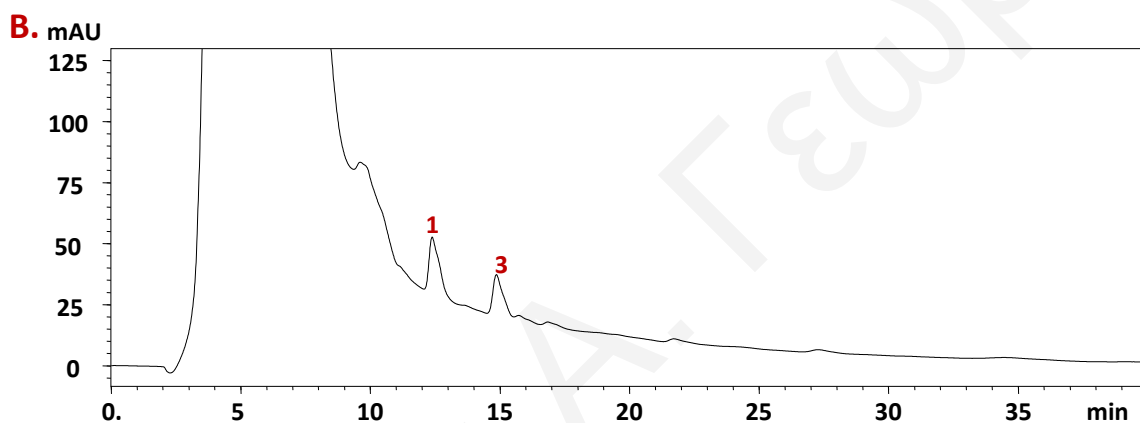
Είναι σημαντικό να σημειώσουμε ότι, πέραν από την αδυναμία της να απομακρύνει ικανοποιητικά τις προσμίξεις, κυριότερο πρόβλημα αποτέλεσε η δυσκολία στην πρακτική της εφαρμογή. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε σχηματισμός γαλακτωμάτων, των οποίων η διαχείριση ήταν πολύ δύσκολη στοιχείο που παρατηρήθηκε κι από την ερευνητική εργασία της Lozada - Castro (2011) η οποία εφάρμοσε απευθείας σαπωνοποίηση σε μαγειρεμένα ζαμπόν.³³

Σε μια προσπάθεια απλοποίησης της διαδικασίας, επιδιώκοντας όμως ταυτόχρονα και βελτίωση της αποδοτικότητας, αναπτύχθηκαν δυο εναλλακτικά πρωτόκολλα. Στις μεθόδους Β και Γ, πραγματοποιήθηκε αρχικά εξαγωγή του λίπους χρησιμοποιώντας μίγμα οργανικών διαλυτών, χλωροφόρμιο:μεθανόλη (2:1, v/v) στην πρώτη περίπτωση και εξάνιο/2-προπανόλη (3:2 v/v) στη δεύτερη. Ακολούθως, η απομόνωση των COPs από τα άλλα συστατικά που υπάρχουν στο κλάσμα του λίπους πραγματοποιήθηκε με χρήση SPE με υπόστρωμα πυριτίου.

Όταν εξετάστηκαν οι εν λόγω μέθοδοι, το υπόβαθρο βελτιώθηκε σημαντικά, καθιστώντας δυνατή την ποσοτικοποίηση όλων των υπό μελέτη ενώσεων. Να σημειωθεί ότι τα χρωματογραφήματα που λήφθηκαν ήταν πανομοιότυπα (**Σχήμα 6.7**). Παρόλα αυτά, με τη μέθοδο Γ, η ανάκτηση των COPs μειώθηκε δραματικά. Αν αναλογιστεί κανείς ότι τα λιπίδια και η χοληστερόλη αποτελούν συστατικά των μεμβρανών, και πέραν του ότι συγκρατούνται ισχυρά μεταξύ τους, αλληλεπιδρούν και με μη λιπιδικές ουσίες μέσω των πολικών τους ομάδων. Για την ποσοτική τους

εκχύλιση από τα τρόφιμα είναι απαραίτητη η χρήση διαλυτών που να διασπούν αυτές τις δυνάμεις αλληλεπίδρασης.^{31,33,35} Συνεπώς, η χρήση μη πολικών διαλυτών, όπως το εξάνιο στην προκειμένη περίπτωση, κρίνεται ακατάλληλη και οδηγεί σε μη ικανοποιητική εκχύλιση των αναλυτών.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η βέλτιστη μέθοδος προετοιμασίας (Μέθοδος Β) παρουσίασε πολύ καλή τιμή ανάκτησης με $106 \pm 8\%$. Ο χρόνος προετοιμασίας του δείγματος, ο οποίος ήταν σημαντικά μικρότερος συγκριτικά με την πρώτη μέθοδο, αποτέλεσε ένα επιπλέον στοιχείο που καθιστούσε τη μέθοδο Β ανώτερη από τις υπόλοιπες. Συγκεκριμένα, ο χρόνος ολοκλήρωσης της μεθόδου ήταν 40 λεπτά, ενώ στην μέθοδο Α μόνο το βήμα της σαπωνοποίησης του δείγματος απαιτούσε 22 ώρες.



Σχήμα 6.7. Χρωματογραφήματα από δείγματα λούντζας με εφαρμογή των Β και Γ μεθόδων επεξεργασίας (1. 22R-OH, 3. 25-OH).

Ο προσδιορισμός της επαναληψιμότητας, με υπολογισμό των τιμών RSD των χρόνων κατακράτησης και των εμβαδών των πέντε κορυφών των αναλυτών με εφαρμογή της βέλτιστης επεξεργασίας, ήταν το επόμενο πειραματικό βήμα. Τα αποτελέσματα που

λήφθηκαν έδειξαν ότι η προτεινόμενη μέθοδος παρουσιάζει ικανοποιητική επαναληψιμότητα με τις RSD τιμές των χρόνων κατακράτησης και των εμβαδών να είναι κάτω από 1 και 5%, αντίστοιχα. Με τα τρία λοιπόν κριτήρια αξιολόγησης που τέθηκαν, η μέθοδος B επιλέχθηκε ως η βέλτιστη για τον προσδιορισμό των COPs στα κυπριακά αλλαντικά, αφού ικανοποιούνται πλήρως με την εφαρμογή της.

6.1.4. Εφαρμογή σε κυπριακά αλλαντικά

Τα COPs απαντώνται σε σχετικά μικρές ποσότητες στα ωμά και φρέσκα τρόφιμα. Ωστόσο, η συγκέντρωσή τους αυξάνεται δραματικά κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας τους. Γενικά, οι υψηλές θερμοκρασίες, η έκθεση στο φως και η παρουσία οξυγόνου αναγνωρίζονται ως οι κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν το βαθμό οξείδωσης της χοληστερόλης.^{75,76} Μπορεί το κάπνισμα των τροφίμων να οδηγήσει στο σχηματισμό των COPs; Αυτό αποτέλεσε και ένα δικό μας ερώτημα. Για το λόγο αυτό και προχωρήσαμε στη διερεύνηση της παρουσίας των COPs στη λούντζα και στο χοιρομέρι. Τα εν λόγω προϊόντα, όπως είναι γνωστό, αποτελούν παραδοσιακά αλλαντικά της Κύπρου, τα οποία παρασκευάζονται με ένα ιδιότυπο τρόπο. Πρόκειται για χοιρινό κρέας, το οποίο καπνίζεται σε ειδικά σχεδιασμένα δωμάτια με την καύση κλαδιών. Η θερμοκρασία είναι περίπου 28 °C και το κρέας δεν έρχεται σε απευθείας επαφή με την φωτιά. Ακολουθώντας, τοποθετείται σε σκιερό και αεριζόμενο χώρο για περίοδο 1-2 μηνών προκειμένου να ωριμάσει.⁷² Έτσι, αναμφίβολα, τα εν λόγω προϊόντα προετοιμάζονται σε ένα περιβάλλον με πολλούς προοξειδωτικούς παράγοντες, οι οποίοι τα καθιστούν επιρρεπή στην οξείδωση. Με γνώμονα αυτά τα στοιχεία, θεωρήθηκε ενδιαφέρον να διερευνηθεί για πρώτη φορά η παρουσία των COPs στα παραδοσιακά κυπριακά αλλαντικά και να διαφανεί κατά πόσο το κάπνισμα μπορεί να θεωρηθεί ένας παράγοντας που ευνοεί την οξείδωση της χοληστερόλης.

Αξιολογήθηκαν συνολικά πέντε δείγματα, τρία εκ των οποίων ήταν δείγματα λούντζας και τα υπόλοιπα χοιρομέρι. Τα ποσά τους καθορίστηκαν από τις καμπύλες βαθμονόμησης και παρουσιάζονται στον **Πίνακα 6.2.** Όπως διαπιστώθηκε, στα υπό εξέταση δείγματα έγινε κατορθωτή η ανίχνευση και η ποσοτικοποίηση τεσσάρων COPs.

Πίνακας 6.2. Η περιεκτικότητα σε COPs στα δείγματα λούντζας και χοιρομέρι (μg/g).

Ένωση	Λούντζα 1	Λούντζα 2	Λούντζα 3	Χοιρομέρι 1	Χοιρομέρι 2
22R-OH	29.8	9.0	> LOQ	13.7	28.4
20α-OH	n.d.	n.d.	> LOQ	n.d.	n.d.
25-OH	17.4	5.3	n.d.	11.6	13.3
7-κετο	n.d.	3.6	n.d.	n.d.	n.d.

n.d. μη ανιχνεύσιμο.

Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις αντιστοιχούσαν κυρίως στις ουσίες 22R- και 25-OH, οι οποίες ανιχνεύτηκαν σε όλα σχεδόν τα δείγματα, ενώ η 7-κέτο και 20α-OH βρέθηκαν σε πολύ μικρές ποσότητες σε ένα μόνο δείγμα. Η ταυτοποίηση των κορυφών στα υπό εξέταση δείγματα έγινε με τη διαδικασία spiking. Ουσιαστικά, έγινε εμβολιασμός επιπλέον ποσότητας ενός από τους αναλύτες και η κορυφή της οποίας αυξήθηκε η ένταση αντιστοιχεί και στην ένωση που εμβολιάστηκε η επιπλέον ποσότητα.

Η ύπαρξη COPs δεν ήταν έκπληξη, δεδομένου ότι τα εν λόγω προϊόντα, κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας τους, όπως αναφέρθηκε, εκτίθενται για μεγάλο χρονικό διάστημα στο κάπνισμα, το οποίο πιθανόν ευνοεί την οξειδωση της χοληστερόλης. Το παράδοξο είναι ότι η πλειονότητα των COPs που προσδιορίστηκαν προέρχονται από την πλευρική αλυσίδα, ενώ στα τρόφιμα κυρίως ανιχνεύονται τα οξείδια του Β-δακτυλίου (7-κέτο, 7α- και 7β- OH).⁷⁸ Μια πιθανή εξήγηση εμπλέκει τη φυσική κατάσταση της χοληστερόλης, η οποία επηρεάζει σημαντικά τον τύπο των προϊόντων οξειδωσης που σχηματίζονται. Όταν η χοληστερόλη είναι στη στερεή φάση και είναι εκτεθειμένη στον αέρα, η αντίδραση οξειδωσης εξαρτάται κυρίως από τη διάταξη των μορίων στη στερεή φάση.

Στην περίπτωση αυτή, τα μόρια της χοληστερόλης είναι διευθετημένα σε διπλά στρώματα με τις 3-υδροξυλικές ομάδες να είναι σε αντιπαράθεση και οι πλευρικές αλυσίδες να είναι εκτεθειμένες. Έτσι, η τελευταία είναι πιο δραστική και περισσότερο εκτεθειμένη στην επίθεση των αντιδραστηρίων από τα άλλα άτομα.⁵²

Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία, η οποία αποτελεί το πρώτο μέρος της διδακτορικής διατριβής, αναπτύχθηκε μια απλή και γρήγορη HPLC μέθοδος για το διαχωρισμό των πέντε πιο σημαντικών COPs. Επιτεύχθηκε πλήρης διαχωρισμός εντός 22 λεπτών χρησιμοποιώντας ACN:MeOH:H₂O:IPA (67:27:5:1) ως κινητή φάση, 0.8 mL/min ταχύτητα ροής και 10 °C θερμοκρασία της στήλης. Το κύριο επίτευγμα αυτής της εργασίας ήταν η ανάπτυξη μιας μεθόδου προεπεξεργασίας, η οποία επιτρέπει τον ακριβή προσδιορισμό των COPs, για πρώτη φορά, σε δείγματα λούντζας και χοιρομέρι. Η παρουσία των εν λόγω ουσιών στα συγκεκριμένα προϊόντα υποδεικνύει ότι η διαδικασία της προετοιμασίας τους ενδεχομένως να ευνοεί την οξείδωση της χοληστερόλης. Μάλιστα αν συγκρίνουμε τα πειραματικά δεδομένα με αντίστοιχο προϊόν της Ισπανίας ξηρό χοιρινό κρέας (dry-cured shoulder), το οποίο παρασκευάζεται με πανομοιότυπο τρόπο (αλάτισμα και ωρίμανση με έκθεση στον αέρα) τα επίπεδα συγκέντρωσης ήταν κατά πολύ υψηλότερα. Στο συγκεκριμένο προϊόν τα επίπεδα κυμάνθηκαν από 0.035-0.591 μg/g δείγματος, ενώ στα κυπριακά αλλαντικά από 3.6–29.8 μg/g δείγματος. Επιπλέον, τα πειραματικά αποτελέσματα υπογραμμίζουν για άλλη μια φορά την ανάγκη ελέγχου των εμπορικά διαθέσιμων τροφίμων για εντοπισμό των COPs.

Με την ολοκλήρωση της συγκεκριμένης μελέτης, αναδείχθηκαν νέα ζητήματα και προοπτικές για το σχεδιασμό νέων ερευνητικών εργασιών. Το γεγονός ότι η τεχνική HPLC χρησιμοποιήθηκε ευρύτατα για την ανάλυση των COPs υπογράμμισε την αναγκαιότητα να αναζητηθεί μια νέα αναλυτική μέθοδος. Από την άλλη, η χρήση ανιχνευτή UV, δεν επέτρεπε τον προσδιορισμό ορισμένων COPs με μεγάλη βιολογική σημασία, όπως τα ισομερή 5,6 εποξειδία τα οποία δεν απορροφούν στο υπεριώδες. Επιπλέον, σημαντικό πρόβλημα αποτέλεσε η χαμηλή ευαισθησία που προσφέρει προς τα COPs, αφού σε χαμηλά λ (200-210 nm) γίνεται λιγότερο εκλεκτικός. Σε αυτήν την περιοχή όλες οι οργανικές ενώσεις εμφανίζουν κάποια UV απορρόφηση γεγονός που δυσχεραίνει ακόμη περισσότερο την ανίχνευση των μονοακόρεστων COPs.

Η ανάγκη λοιπόν για εύρεση εναλλακτικών λύσεων προκειμένου να ξεπεραστούν όλοι οι πιο πάνω περιορισμοί, μας οδήγησαν στην εφαρμογή, για πρώτη φορά, της UPLC σε σύζευξη με MS/MS στην ανάλυση των COPs. Ο εν λόγω συνδυασμός αποτελεί την ιδανική επιλογή αφού πληροί τις βασικές απαιτήσεις της σύγχρονης ανάλυσης

τροφίμων. Είναι γρήγορη, ώστε να επιτρέπει την ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων σε μικρό χρονικό διάστημα, ευαίσθητη, παρέχει δηλαδή τη δυνατότητα ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης σε επίπεδα συγκεντρώσεων ng, και επιλεκτική. Επιπλέον, με την εφαρμογή της συγκεκριμένης τεχνικής ικανοποιήθηκε και η απαίτηση μας για ανάπτυξη μιας καινοτόμας τεχνικής ανάλυσης των εν λόγω ενώσεων. Μέχρι σήμερα, δεν έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία η χρήση του συγκεκριμένου τύπου χρωματογραφίας στην ανάλυση των COPs.

Πέραν της χρωματογραφικής ανάλυσης, η προετοιμασία του δείγματος αποτέλεσε το δεύτερο ερευνητικό κομμάτι. Όπως προέκυψε από τα αποτελέσματα της προηγούμενης εργασίας, μεταβολή μιας και μόνο παραμέτρου στην εφαρμογή του πρωτοκόλλου μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την ανάκτηση και την εκλεκτικότητα της μεθόδου. Θέλοντας λοιπόν να αποκτήσουμε μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα σχετικά με την προετοιμασία του δείγματος, κρίθηκε ενδιαφέρον να πραγματοποιηθεί για πρώτη φορά σύγκριση των κύριων βιβλιογραφικών μεθόδων επεξεργασίας του δείγματος με σκοπό την εύρεση της βέλτιστης μεθόδου σαπωνοποίησης και εξαγωγής των λιπιδίων. Μέσα από αυτή την πειραματική πορεία θα αναδειχθούν ποιες παράμετροι του συγκεκριμένου αναλυτικού σταδίου διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάκτηση των αναλυτών-στόχων.

6.2. Σύγκριση μεθόδων επεξεργασίας του δείγματος

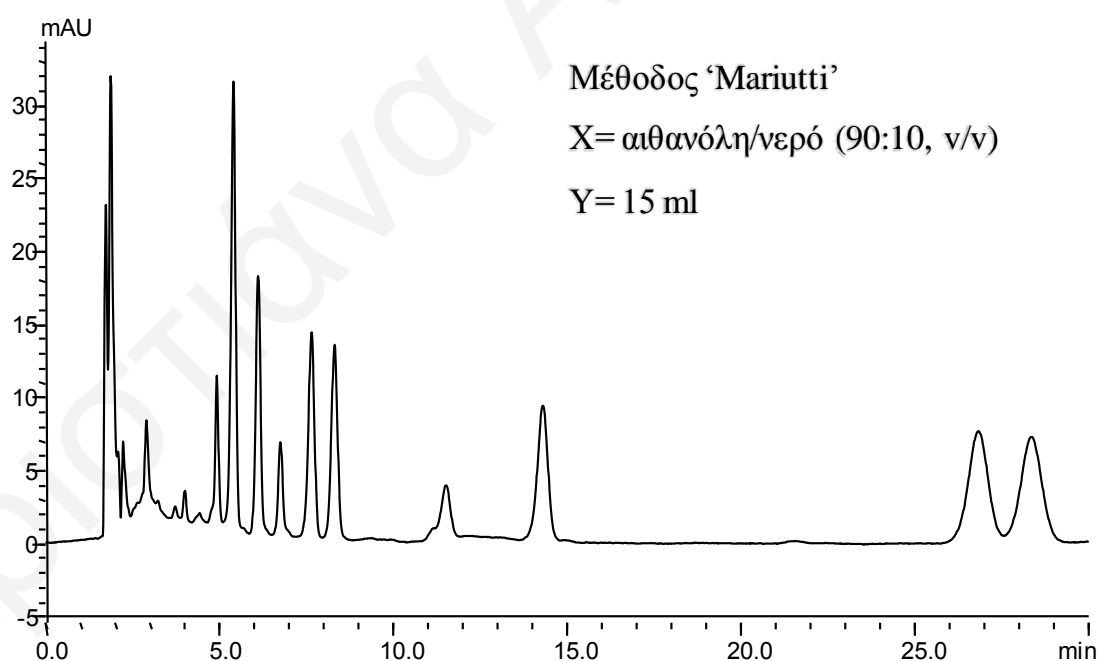
Στα πλαίσια λοιπόν πραγματοποίησης μιας πιο ολοκληρωμένης εργασίας σχετικά με την προετοιμασία του δείγματος, η δεύτερη πτυχή της παρούσας έρευνας επικεντρώνεται στο συγκεκριμένο αντικείμενο.⁷⁹ Πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά μια συγκριτική εργασία με τις ήδη υπάρχουσες βιβλιογραφικές μεθόδους επεξεργασίας προκειμένου να καθοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες αυτού του σημαντικού αναλυτικού σταδίου και να διαφανεί η σημαντικότητα κάποιων παραμέτρων στην ανάκτηση των αναλυτών-στόχων.

Τα κριτήρια αξιολόγησης, στα οποία βασίστηκε η μελέτη για την εύρεση του καταλληλότερου πρωτοκόλλου επεξεργασίας του δείγματος, ήταν η εκλεκτικότητα ως προς την απομάκρυνση των προσμίξεων της μήτρας, η αποτελεσματικότητα εκχύλισης των COPs από το μητρικό υλικό, η οποία προσδιορίστηκε μέσω πειραμάτων ανάκτησης και η αποκωδόμηση ή/και ο σχηματισμός τεχνητών COPs.

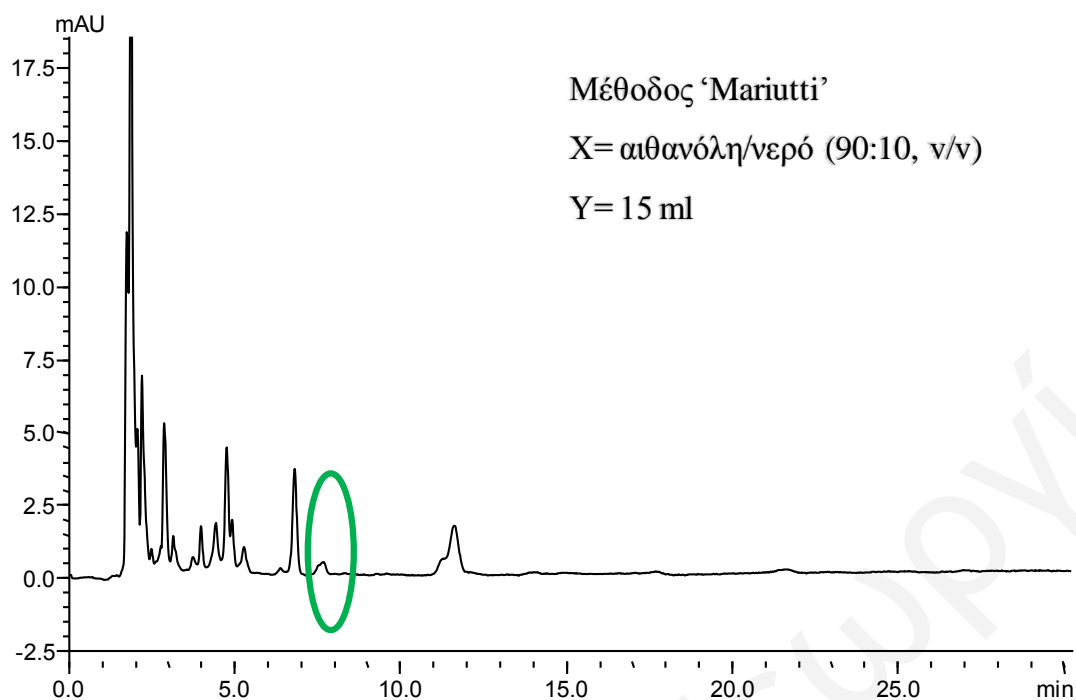
6.2.1. Βελτιστοποίηση σαπωνοποίησης

Αρχικά, για την εύρεση της βέλτιστης μεθόδου σαπωνοποίησης συγκρίθηκαν μεταξύ τους τρεις βιβλιογραφικές μέθοδοι απευθείας σαπωνοποίησης, καθώς και μια τέταρτη που αποτέλεσε συνδυασμό δύο εξ αυτών. Οι μέθοδοι διέφεραν μεταξύ τους ως προς τη σύσταση του διαλύτη σαπωνοποίησης 'X' και την ποσότητα του προστιθέμενου νερού 'Y' μετά το τέλος της σαπωνοποίησης.

Στην πρώτη μέθοδο εφαρμόστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες της ερευνητικής εργασίας της Mariutti, χρησιμοποιώντας αιθανόλη/νερό σε αναλογία 90:10, v/v και 15 mL νερό. Να σημειωθεί ότι η μέθοδος εφαρμόστηκε, τόσο σε εμβολιασμένο δείγμα, όσο και σε τυφλό δείγμα λούντζας (Σχήμα 6.8. και Σχήμα 6.9.). Στον Πίνακα 5.3. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ανάκτησης για κάθε COP με ταυτόχρονη αντιπαραβολή των αντίστοιχων ποσοστών που ανέφεραν η Mariutti και οι συνεργάτες της για αντίστοιχο εμβολιασμό με 25 μg . Η συμφωνία μεταξύ των αποτελεσμάτων είναι εξαιρετική για όλα σχεδόν τα COPs με εξαίρεση την 7-keto, η οποία ανακτήθηκε σε ποσοστό μόλις 52 % σε σχέση με 84 % που ανέφερε η συγκεκριμένη ερευνητική ομάδα.



Σχήμα 6.8. Χρωματογράφημα εμβολιασμένης λούντζας, στα 206 nm, που επεξεργάστηκε με τη μέθοδο 'Mariutti'



Σχήμα 6.9. Χρωματογράφημα τυφλού δείγματος λούντζας, στα 206 nm, που επεξεργάστηκε με τη μέθοδο 'Mariutti'. Σε κύκλο, η πρόσμειξη που οδηγεί σε υπερεκτίμηση της συγκέντρωσης της 22S-OH.

Πίνακας 6.3. Πειραματικά και βιβλιογραφικά ποσοστά ανάκτησης της μεθόδου 'Mariutti'

COPs	Πειραματική ανάκτηση	Βιβλιογραφική Ανάκτηση
20α-OH	89 %	89 %
22(R)-OH	92 %	93 %
22(S)-OH	106 %	101 %
25-OH	88 %	98 %
7-keto	52 %	84 %
7β-OH	91 %	92 %
7α-OH	85 %	87 %

Η κορυφή που εμφανίζεται στα 7,5 min στο τυφλό δείγμα συνεκλύεται με την 22S-OH. Παρ' όλα αυτά, δεν αντιστοιχεί στο συγκεκριμένο COP, αφού παρουσιάζει απορρόφηση και στα 230 nm. Η παρουσία της οδήγησε σε υπερεκτίμηση της

συγκέντρωσης της 22S-OH, γεγονός που δικαιολογεί την ανάκτηση της σε ποσοστό μεγαλύτερο του 100%. Παρομοίως, η πρόσμειξη στα 5.2 min ενδέχεται να συνεισέφερε θετικά στον υπολογισμό της ανάκτησης της 20α-OH. Αντίθετα, οι άγνωστες ουσίες που εκλύονται στα 7 min και 11.5 min δεν επηρεάζουν την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των υπόλοιπων COPs.

Όπως προκύπτει από τα πειραματικά αποτελέσματα, η εν λόγω μέθοδος ήταν ικανή να απομακρύνει τη μεγαλύτερη μάζα των προσμίξεων. Το πρόβλημα της, ωστόσο, έγκειτο στην πολύ χαμηλή ανάκτηση της 7-κέτο. Ως εκ τούτου, αποφασίστηκε η τροποποίηση της μεθόδου, εφαρμόζοντας τις βέλτιστες συνθήκες της Saldanha, η οποία έλαβε μέγιστες ανακτήσεις με αναλογία αιθανόλης/νερού 60:40 (v/v) και προσθήκη 5 mL νερού μετά το τέλος της σαπωνοποίησης.⁸⁰ Προκειμένου να προκύψουν συγκρίσιμα αποτελέσματα ο όγκος του νερού διατηρήθηκε σταθερός στα 15 mL. Η σύζευξη των δύο μεθόδων ('Mariutti-Saldanha') παρουσίασε πολύ μεγαλύτερη εκλεκτικότητα προς την 7-keto, με την ανάκτηση της να αυξάνεται κατά 15%. Παράλληλα όμως, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στην ανάκτηση των 7 υδρόξυ παραγώγων γεγονός που οδήγησε στην εφαρμογή της πρωτότυπης μεθόδου 'Saldanha' (Πίνακας 6.4.). Η τελευταία, προσέφερε συνολικά μεγαλύτερες ανακτήσεις με τα επίπεδα ωστόσο της 7-keto να παραμένουν πολύ χαμηλά.

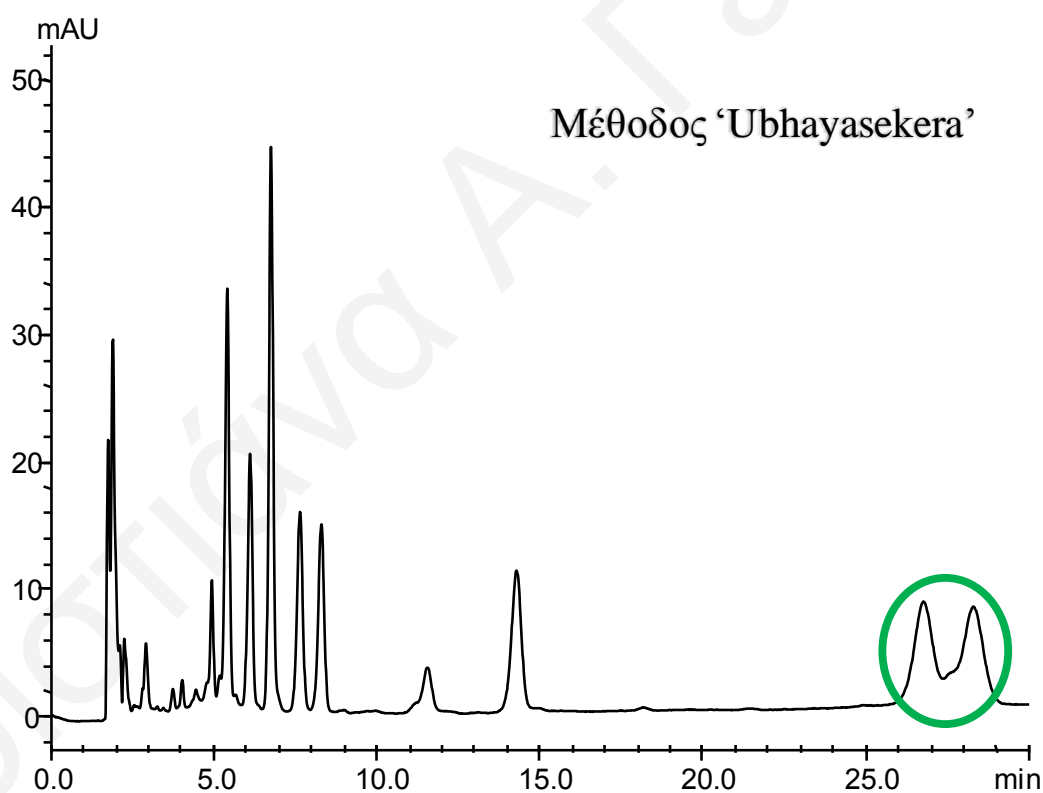
Πίνακας 6.4. Συγκριτικά αποτελέσματα ανάκτησης των μεθόδων απευθείας σαπωνοποίησης.

COPs	Ανάκτηση Mariutti	Ανάκτηση Saldanha	Ανάκτηση 'Mariutti-Saldanha'
20α-OH	89 %	85 %	93 %
22(R)-OH	92 %	94 %	93 %
22(S)-OH	106 %	88 %	105 %
25-OH	88 %	88 %	94 %
7-keto	52 %	63 %	67 %
7β-OH	91 %	95 %	75 %
7α-OH	85 %	95 %	74 %

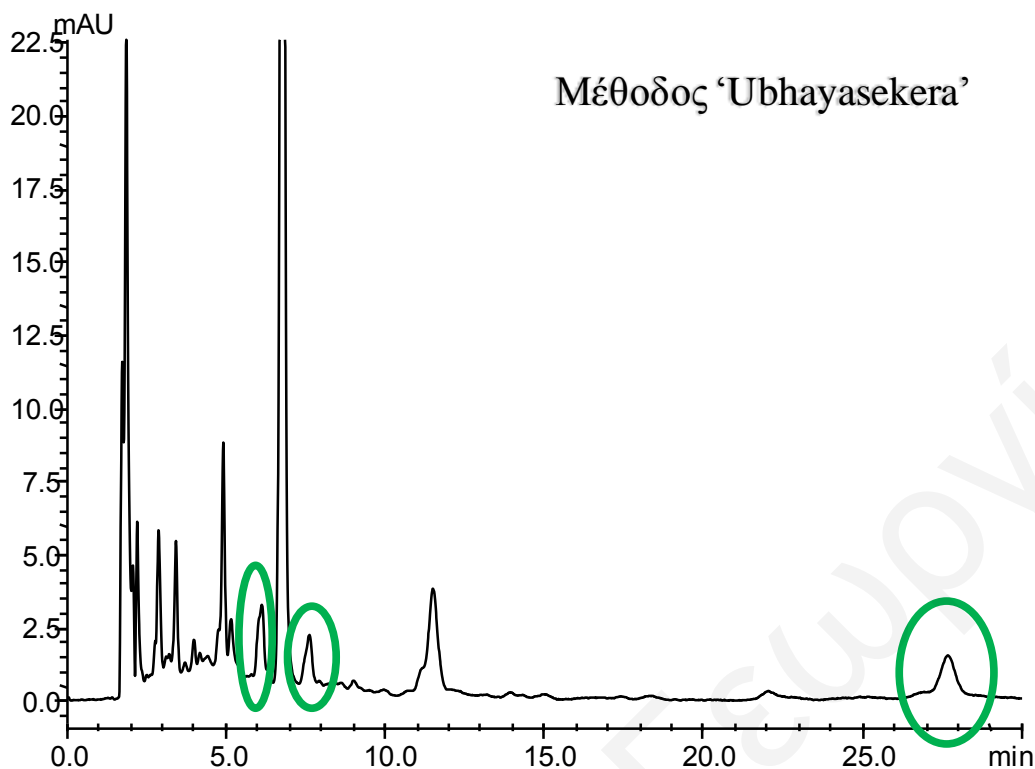
Σε μια προσπάθεια να αποκλειστεί η φύση του διαλύτη σαπωνοποίησης ως η αιτία για τη χαμηλή ανάκτηση της 7-keto, εφαρμόστηκε μια εντελώς διαφορετική μέθοδος σαπωνοποίησης, σύμφωνα με την ερευνητική εργασία της Ubhayasekera.⁸¹ Στην εν

λόγω περίπτωση, το διάλυμα σαπωνοποίησης αποτελείτο από 7 mL διαλύματος αιθανόλης/νερού (95:5, v/v) και 3 mL διχλωρομεθάνιο. Ο προστιθέμενος όγκος νερού ήταν 10 mL και η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε με 10 mL διχλωρομεθάνιο. Παρομοίως με τις προηγούμενες περιπτώσεις, η ανάκτηση της 7-keto κυμάνθηκε στο 59 %, γεγονός που ενίσχυσε την υποψία της αποικοδόμησης της εν λόγω ένωσης εξαιτίας των ισχυρών αλκαλικών συνθηκών της απευθείας σαπωνοποίησης (3.6 M KOH).

Επιπλέον, η μέθοδος 'Ubhayasekera' ήταν η πιο ακατάλληλη για την απομάκρυνση των ακαθαρσιών αφού όπως φαίνεται από το χρωματογράφημα του τυφλού δείγματος, πέραν των προσμίξεων στα αρχικά στάδια της ανάλυσης που συνεκλούνται με την 22R-OH και 22S-OH, εμφανίζεται και μια κορυφή στα 27.5 min, η οποία παρεμποδίζει τον ποσοτικό προσδιορισμό των 7-OH (Σχήμα 6.10. και Σχήμα 6.11.).



Σχήμα 6.10. Χρωματογράφημα εμβολιασμένου δείγματος λούντζας, στα 206 nm, που επεξεργάστηκε με τη μέθοδο 'Ubhayasekera'.



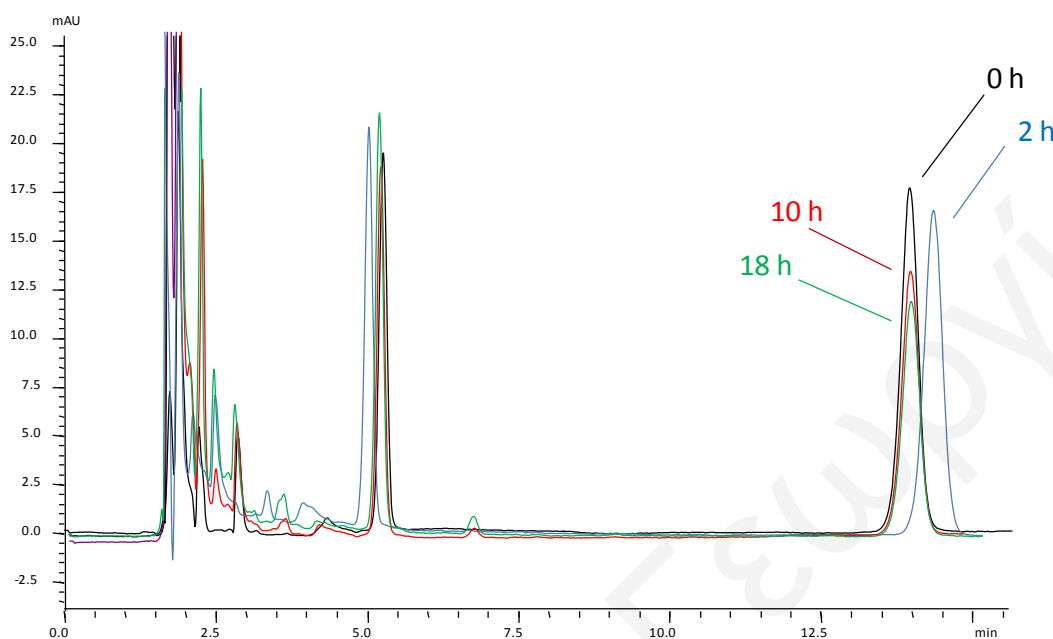
Σχήμα 6.11. Χρωματογράφημα τυφλού δείγματος λούντζας, στα 206 nm, που επεξεργάστηκε με τη μέθοδο 'Ubhayasekera'. Σε κύκλο, οι ακαθαρσίες που επηρέασαν την ποσοτικοποίηση.

6.2.1.1. Μελέτη αποικοδόμησης της 7-keto σε αλκαλικές συνθήκες

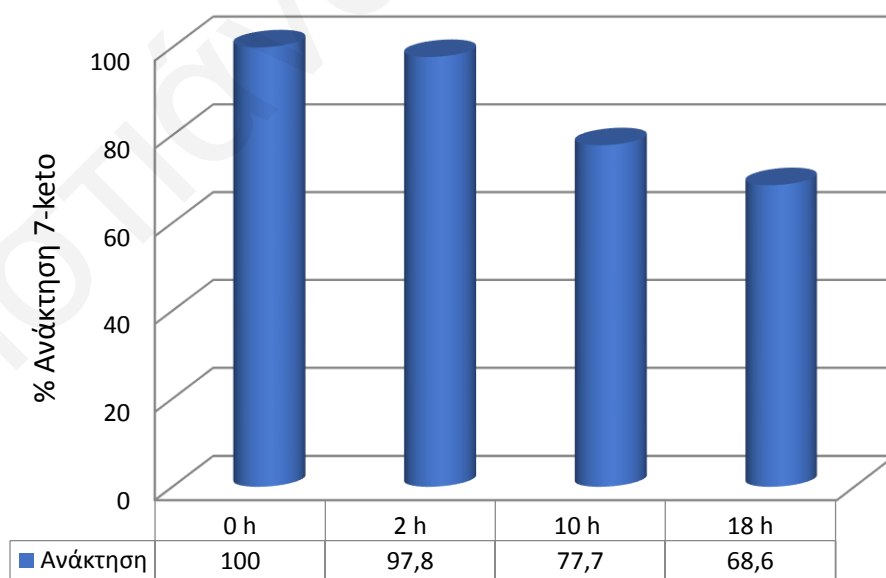
Για τη διαλεύκανση του κατά πόσον η συγκέντρωση του KOH επηρεάζει την αποικοδόμηση της 7-keto, σχεδιάστηκε ένα ενδιαφέρον πείραμα μελέτης της σταθερότητάς της. Στο πρώτο σκέλος του πειράματος μελετήθηκε η σταθερότητα της 7-keto κάτω από τις έντονα αλκαλικές συνθήκες της απευθείας σαπωνοποίησης, 3.6 M KOH, συναρτήσει του χρόνου επώασης, και συγκεκριμένα για 0 h, 2 h, 10 h και 18 h. Για το σκοπό αυτό, ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία, όπως περιγράφεται πιο πάνω, σύμφωνα με τις συνθήκες της βέλτιστης μεθόδου 'Saldanha'. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε διάλυμα, χωρίς την παρουσία μήτρας, γι' αυτό και παραλήφθηκε εντελώς το στάδιο του SPE. Για σκοπούς σύγκρισης, εκτός από την 7-keto (20 μg), το διάλυμα σαπωνοποίησης εμβολιάστηκε και με την 20α-OH (11.5 μg).

Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 6.12**, με αύξηση του χρόνου σαπωνοποίησης παρατηρήθηκε μείωση στην ανάκτηση της 7-keto. Αντιθέτως, η ανάκτηση της 20α-OH παρέμεινε ανεπηρέαστη (**Σχήμα 6.13**). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, σε αλκαλικό περιβάλλον η

7-keto μετατρέπεται προς τη cholesta-3,5-dien-7-one, ένα συζυγιακό τριένιο που απορροφά έντονα στα 270-280 nm.⁴⁵

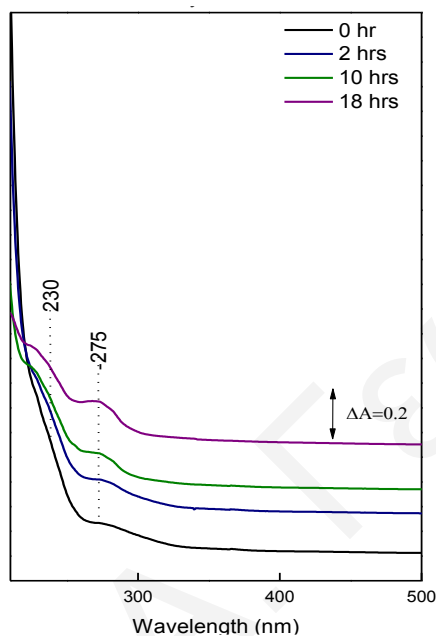


Σχήμα 6.12. Χρωματογραφήματα της επίδρασης του χρόνου της σαπωνοποίησης (με KOH 3.6 M), στην ανάκτηση της 20α-OH και 7-keto. Η συγκέντρωση της τελευταίας μειώνεται με αύξηση του χρόνου σαπωνοποίησης ενώ η 20α-OH παραμένει ανεπηρέαστη.



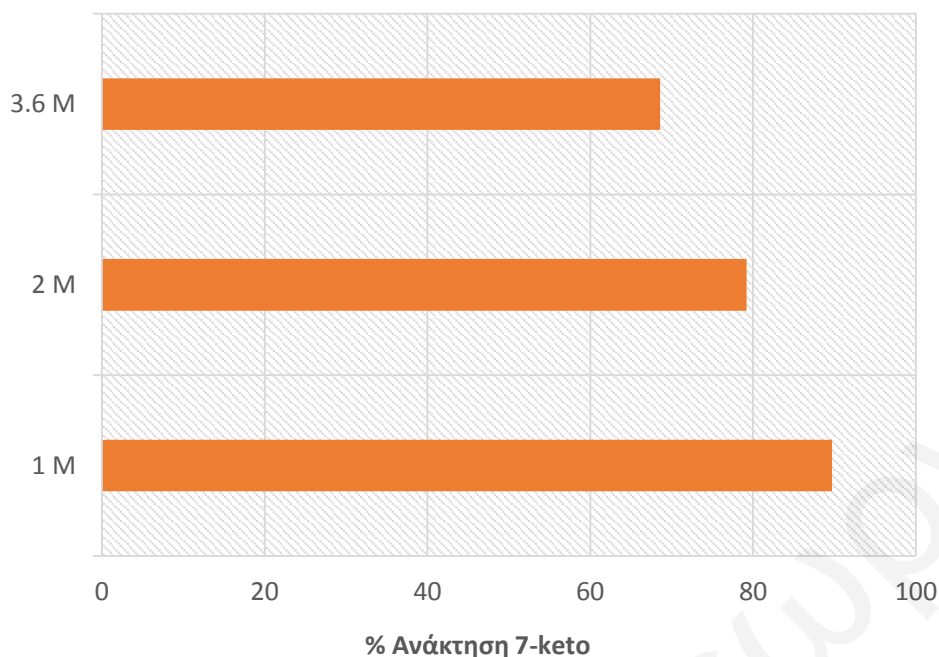
Σχήμα 6.13. Επίδραση του χρόνου σαπωνοποίησης (με KOH 3.6 M) στην ανάκτηση της 7-keto.

Για επιβεβαίωση του σχηματισμού της συγκεκριμένης ένωσης, τα δείγματα αναλύθηκαν και σε σύστημα UV-Vis (**Σχήμα 6.14.**). Στα φάσματα UV παρατηρείται αύξηση στην ένταση της κορυφής στα 275 nm με παράλληλη μείωση της έντασης της κορυφής στα 230 nm καθώς αυξάνεται ο χρόνος σαπωνοποίησης. Η μεταβολή αυτή υποδηλώνει τη μετατροπή της 7-keto στη cholesta-3,5-dien-7-one.



Σχήμα 6.14. Φάσματα UV που επιβεβαιώνουν την όλο και μεγαλύτερη μετατροπή της 7-keto (230 nm) στη cholesta-3,5-dien-7-one (275 nm) με αύξηση του χρόνου σαπωνοποίησης (με KOH 3.6 M).

Αφού λοιπόν επιβεβαιώθηκε η αποικοδόμηση της 7-κέτο στις συνθήκες της απευθείας σαπωνοποίησης κρίθηκε σκόπιμη η μελέτη της σταθερότητας της εν λόγω ένωσης για 18 h σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις KOH 1 M και 2 M, αντίστοιχα (**Σχήμα 6.15.**). Όπως ήταν αναμενόμενο τα επίπεδα ανάκτησης της 7-keto αυξήθηκαν με μείωση της συγκέντρωσης του KOH. Συγκεκριμένα, η χρήση διαλύματος KOH 1 M οδήγησε σε αύξηση του ποσοστού ανάκτησης κατά 21% και 11% σε σχέση με το ποσοστό που ανακτήθηκε όταν χρησιμοποιήθηκαν 3.6 M και 2 M, αντίστοιχα.



Σχήμα 6.15. Επίδραση της συγκέντρωσης του KOH στην ανάκτηση της 7-keto.

6.2.2. Βελτιστοποίηση συνθηκών εξαγωγής του λίπους

Αφού βρέθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες σαπωνοποίησης μετά από ολοκληρωμένη μελέτη όλων των παραμέτρων της, στη συνέχεια της πειραματικής πορείας αξιολογήθηκαν πρωτόκολλα εξαγωγής των λιπιδίων προκειμένου να εφαρμοστούν πριν το στάδιο της σαπωνοποίησης. Συγκεκριμένα, συγκρίθηκαν μεταξύ τους οι τρεις κύριες βιβλιογραφικές μέθοδοι εκχύλισης των λιπιδίων, όπως αυτές περιγράφονται εκτενέστερα στο πειραματικό μέρος. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η εφαρμογή της βέλτιστης μεθόδου σαπωνοποίησης δεν ήταν εφικτό να πραγματοποιηθεί απευθείας στη μήτρα του τροφίμου αφού μόνο με χρήση διαλύματος KOH συγκέντρωσης 3.6 M και άνω επιτυγχάνεται η πλήρης διαλυτοποίηση του δείγματος.

Σε πρώτο στάδιο εφαρμόστηκε η μέθοδος 'Lee' λόγω του μεγάλου πλεονεκτήματος της στο χρόνο ανάλυσης.⁸² Όπως προκύπτει κι από τα αποτελέσματα που λήφθηκαν, η ανάκτηση της 7-keto ήταν ικανοποιητική στα 78%. Παράλληλα, αξιοσημείωτη ήταν και η σταθερότητα στην ανάκτηση των περισσότερων COPs, ιδιαίτερα των 22S-OH, 25-OH και 7β-OH. Ωστόσο, το στάδιο καθαρισμού του κλάσματος των λιπιδίων με τη χρήση φίλτρου πραγματοποιείται με μεγάλη δυσκολία λόγω της παρουσίας πολικών προσμίξεων, ως συνέπεια της απουσίας ενός σταδίου καθαρισμού για την

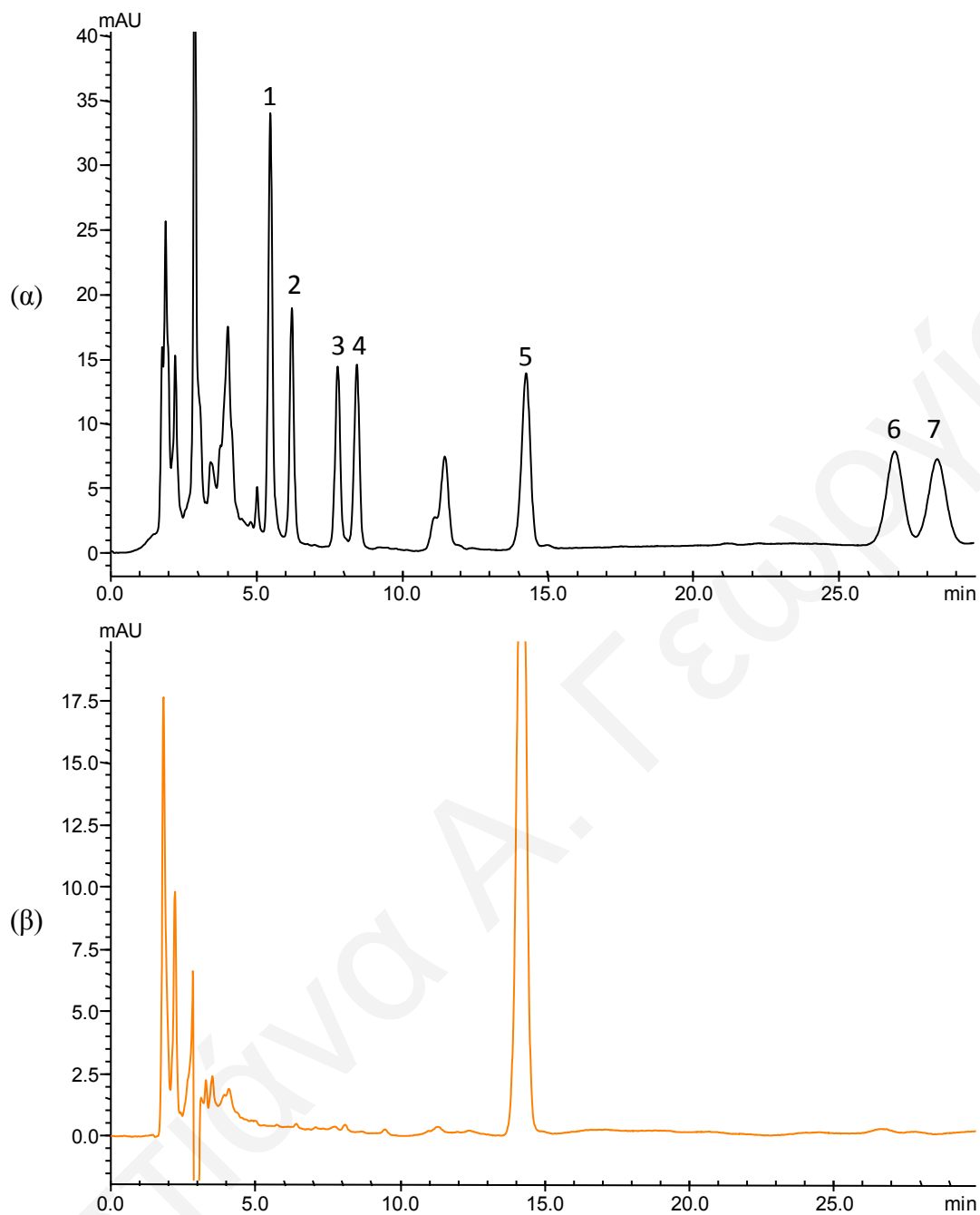
απομάκρυνσή τους. Το γεγονός αυτό οδήγησε στην απόρριψη της μεθόδου για εφαρμογές ρουτίνας, παρόλο που απαιτεί μικρότερους χρόνους επεξεργασίας του δείγματος.

Στη συνέχεια, η βέλτιστη μέθοδος σαπωνοποίησης, εφαρμόστηκε σε συνδυασμό με τις μεθόδους 'Folch' και 'Boselli'.^{43,76} Σύμφωνα με τον Folch, για να αποτραπεί η μεταφορά των πιο πολικών λιπιδίων στην υδατική φάση κατά το στάδιο καθαρισμού, η αναλογία χλωροφόρμιο/μεθανόλη/νερό θα πρέπει να είναι ακριβώς 8:4:3. Αντί αυτού, στη μέθοδο 'Boselli' η αναλογία είναι 8:4:4. Το γεγονός αυτό ίσως αποτελεί και την αιτία για τη χαμηλή ανάκτηση όλων των COPs που παρατηρήθηκε με την εφαρμογή αυτής της μεθόδου (Πίνακας 6.5.).

Πίνακας 6.5. Σύγκριση ανάκτησης των μεθόδων εκχύλισης των λιπιδίων με τη βέλτιστη μέθοδο σαπωνοποίησης.

COPs	Ανάκτηση	Ανάκτηση	Ανάκτηση
	'Lee-Saldanha'	'Folch-Saldanha'	'Boselli-Saldanha'
20α-OH	92 %	102 %	78 %
22(R)-OH	101 %	91 %	87 %
22(S)-OH	88 %	103 %	78 %
25-OH	88 %	98 %	65 %
7-keto	78 %	76 %	63 %
7β-OH	93 %	83 %	46 %
7α-OH	87 %	80 %	52 %

Αν και η ανάκτηση των πιο πολικών COPs, 7-keto και 7-OH, με τη μέθοδο 'Folch' ήταν χαμηλότερη σε σχέση με τη 'Lee', η πρώτη παρουσίασε μεγαλύτερη εκλεκτικότητα προς την απομάκρυνση των ακαθαρσιών (Σχήμα 6.16.). Λαμβάνοντας λοιπόν υπόψη όλα τα παραπάνω αποτελέσματα, η μέθοδος 'Folch-Saldanha' επιλέχθηκε ως η βέλτιστη για εφαρμογή σε διάφορα τρόφιμα.



Σχήμα 6.16. Εφαρμογή της μεθόδου ‘Folch-Saldanha’ (α) σε εμβολιασμένο δείγμα 5 g λούντζας με ανίχνευση στα 206 nm και (β) στα 230 nm. Σύσταση κινητής φάσης εξάνιο/2-προπανόλη/ακετόνη (97:1.5:1.5, v/v), ρυθμός ροής 1.5 ml/min και θερμοκρασία 25 °C. (1) 20α-OH, (2) 22R-OH, (3) 22S-OH, (4) 25-OH, (5) 7-keto, (6) 7β-OH, (7) 7α-OH.

Συμπεράσματα

Μετά από αξιολόγηση των κύριων αναλυτικών πρωτοκόλλων, η βέλτιστη αναλυτική πορεία περιελάμβανε την εξαγωγή των λιπιδίων με χρήση χλωροφορμίου/μεθανόλης (2:1, v/v), τη σαπωνοποίηση τους με διάλυμα ΚΟΗ 1 Μ σε 60% υδατική αιθανόλη και τον περαιτέρω καθαρισμό με εκχύλιση στερεάς φάσης σε στήλη ΝΗ₂. Με την εφαρμογή της συγκεκριμένης πειραματικής πορείας ικανοποιήθηκαν τα κριτήρια αξιολόγησης που τέθηκαν για την επιλογή της κατάλληλης μεθόδου. Απομάκρυνση όλων των προσμίξεων από τις εξεταζόμενες μήτρες, ικανοποιητικές τιμές ανάκτησεις για όλες τις υπό μελέτη ενώσεις (76-103%) και μη αποικοδόμηση των COPs προς σχηματισμό «artifacts».

Οι ισχυρές αλκαλικές συνθήκες που εφαρμόστηκαν με απευθείας σαπωνοποίηση του δείγματος οδήγησαν σε αποικοδόμηση της 7-κέτο επιβεβαιώνοντας την ευαισθησία της στις εν λόγω συνθήκες και υπογραμμίζοντας παράλληλα την ανάγκη ελέγχου της εν λόγω παραμέτρου κατά τη διάρκεια προετοιμασίας του δείγματος. Με την πραγματοποίηση της συγκεκριμένης εργασίας αναδείχθηκε η δυσκολία ανάπτυξης ενός αξιόπιστου πρωτοκόλλου και ταυτόχρονα η σημαντικότητα μελέτης όλων των παραμέτρων. Η μεταβολή ενός και μόνο παράγοντα επηρεάζει σημαντικά την τελική ποσοτικοποίηση των COPs.

6.3. Προσδιορισμός των COPs με χρήση της τεχνικής UPLC-MS/MS

6.3.1. Ανάπτυξη μεθόδου

Η ανάγκη για ανάπτυξη μιας νέας και βελτιωμένης χρωματογραφικής τεχνικής στην ανάλυση των COPs, αποτέλεσε το κίνητρο για τη διενέργεια της τελευταίας πτυχής της παρούσας διδακτορικής έρευνας. Για πρώτη φορά μελετήθηκε η ικανότητα της συζευγμένης τεχνικής UPLC-ESI-MS/MS στην ανάλυση των εν λόγω ενώσεων. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η βέλτιστη επεξεργασία του δείγματος, όπως προέκυψε από τη μελέτη στο δεύτερο μέρος της έρευνας, εφαρμόστηκε στο παρόν στάδιο για προσδιορισμό των COPs σε ποικιλία τροφίμων κυπριακής προέλευσης.

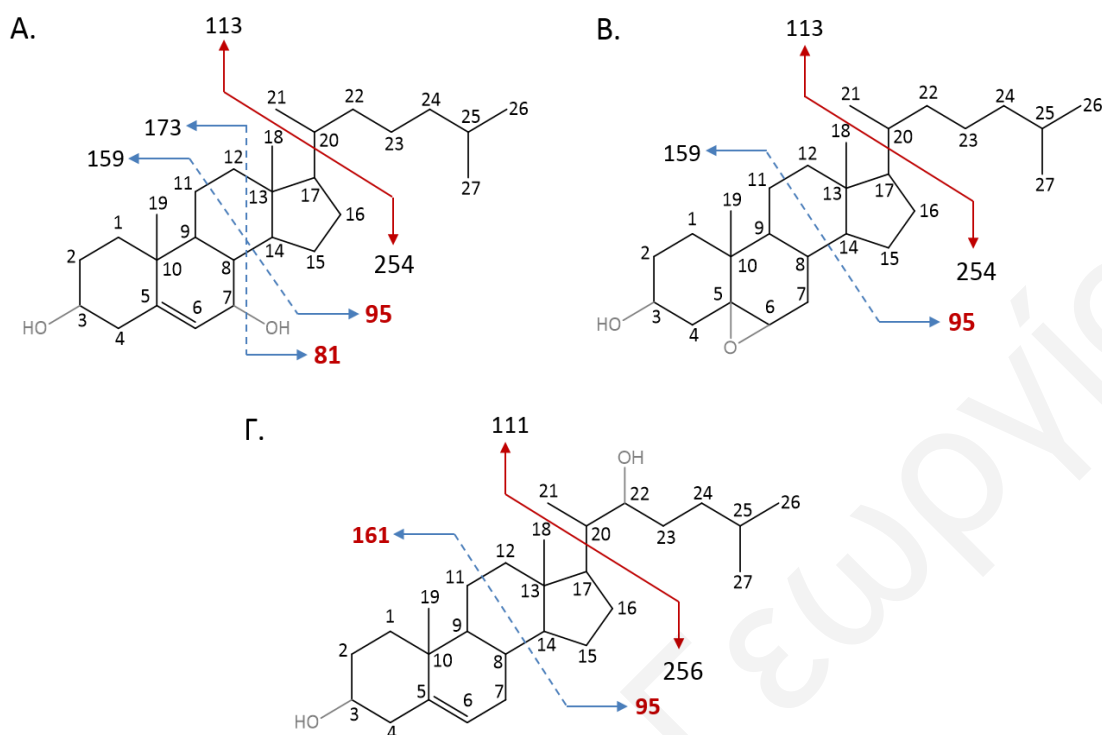
Κατά την έναρξη ανάπτυξης μιας τεχνικής LC-MS/MS, κρίνεται απαραίτητη πρώτα η ρύθμιση των παραμέτρων λειτουργίας του φασματογράφου μαζών, προκειμένου να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες για την ανίχνευση των υπό προσδιορισμό ουσιών. Για την υλοποίηση του εν λόγω στόχου απαιτήθηκε η εκτέλεση τριών σταδίων: i) εύρεση

των μητρικών ιόντων με λήψη φασμάτων πλήρους σάρωσης ii) προσδιορισμός των θυγατρικών ιόντων από τη θραυσματοποίηση των επιλεγμένων μητρικών ιόντων σε λειτουργία σάρωσης θυγατρικού ιόντος και iii) εισαγωγή στο λογισμικό των τιμών m/z των μητρικών και θυγατρικών ιόντων προς δημιουργία μεθόδου παρακολούθησης προεπιλεγμένων ιόντων.

Σε πρώτο στάδιο, για κάθε εξεταζόμενη ουσία, λήφθηκαν φάσματα πλήρους σάρωσης σε μια συγκεκριμένη περιοχή μαζών (50-1000 m/z). Το μοριακό ιόν ή ένα χαρακτηριστικό κύριο θραύσμα που είναι σε μεγαλύτερη αφθονία επιλέχθηκε ως μητρικό ιόν για την επακόλουθη θραυσματοποίηση του. Στα φάσματα παρατηρήθηκαν χαρακτηριστικά θραύσματα με τιμές m/z 385.6 και 367.6 που οφείλονταν στην απώλεια ενός $[M-H_2O+H]^+$ ή δύο $[M-2H_2O+H]^+$ μορίων νερού. Το πρωτονιωμένο μοριακό ιόν $[M+H]^+$ ήταν η κύρια κορυφή μόνο στην περίπτωση της 7-κέτο, ενώ σε μικρότερη αφθονία ήταν ανιχνεύσιμο και στο φάσμα των 5,6-EP, το οποίο είναι σύμφωνο με ερευνητική εργασία του Razzazi-Fazeli et al.²

Στη συνέχεια, με σάρωση θυγατρικού ιόντος λήφθηκαν σημαντικές πληροφορίες σχετικά με το μονοπάτι θραυσματοποίησης των επιλεγμένων μητρικών ιόντων. Αν και αναμέναμε, κατά το πρώτο στάδιο της διαδικασίας θραυσματοποίησης, να γίνει αποσύνδεση της αλειφατικής πλευρικής αλυσίδας από το στερολικό δακτύλιο δίδοντας 2 κύρια θραύσματα με τιμές m/z 113 και 254, κάτι τέτοιο δεν παρατηρήθηκε. Φαίνεται ότι οι συνθήκες στο κελί διάπασης είναι πολύ ισχυρές με αποτέλεσμα η πλευρική αλυσίδα να διασπάται περαιτέρω σε μικρά κομμάτια τα οποία είναι κάτω από το όριο ανίχνευσης των μαζών.

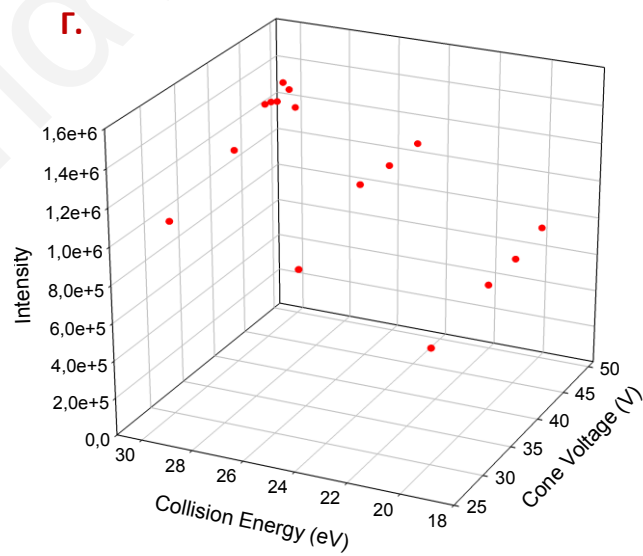
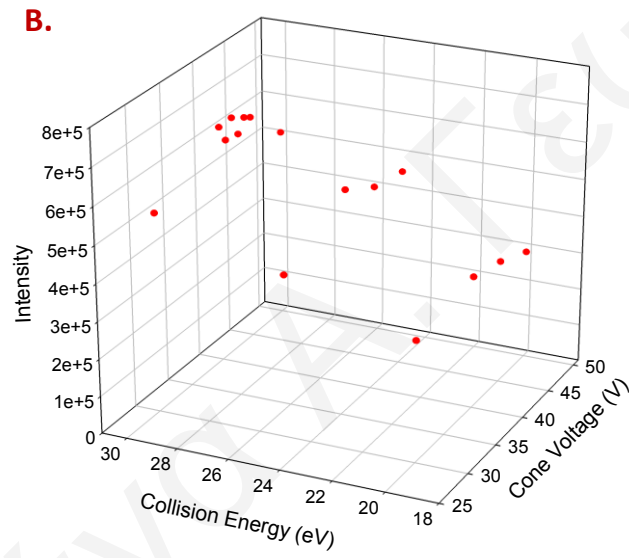
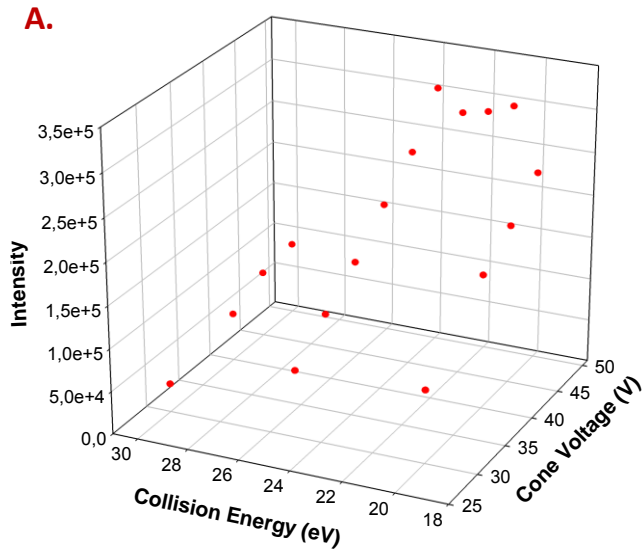
Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα, οι δεσπόζουσες θέσεις θραυσματοποίησης των COPs βρίσκονται στο σύστημα των στερολικών δακτυλίων και συγκεκριμένα μεταξύ των ατόμων άνθρακα 11-12 και 8-14 και η άλλη μεταξύ του 12-13 και 8-14 (**Σχήμα 6.17**). Η 7-κέτο ήταν ο μοναδικός αναλύτης, του οποίου τα θυγατρικά θραύσματα είχαν τιμές m/z 383.6 και 365.6, που αντιστοιχούν στην απώλεια ενός και δύο μορίων νερού, αντίστοιχα. Να σημειωθεί ότι τα συγκεκριμένα πειραματικά αποτελέσματα βρίσκονται σε πλήρη συμφωνία με την αναφορά της ερευνητικής ομάδας του Rossmann.⁸³

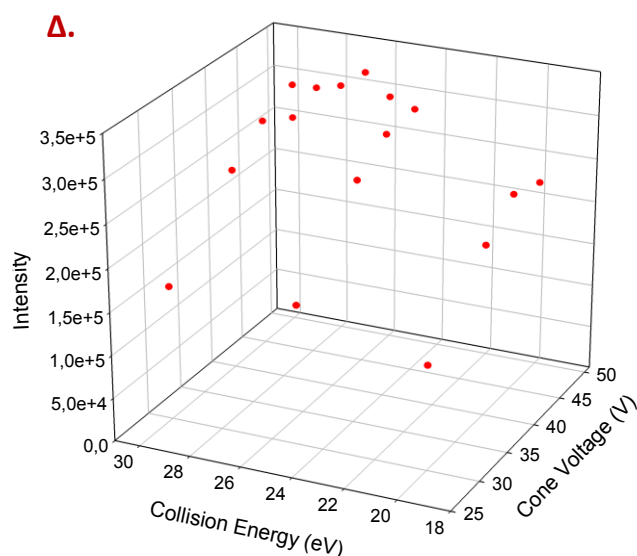


Σχήμα 6.17. Τα κύρια θυγατρικά θραύσματα των (Α) 7- OH, (Β) 5,6-EP και (Γ) 22R-OH.

Για όλες τις ενώσεις, τα δύο πιο άφθονα θυγατρικά ιόντα που παράγονται από κάθε μητρικό ιόν επελέγησαν ως μετάπτωση ιόντων (MRM). Αυτή η προσέγγιση παρέχει τέσσερα σημεία αναγνώρισης (identification points), τα οποία είναι επαρκή για την εκπλήρωση των κριτηρίων που απαιτούνται για ποιοτικές και ποσοτικές μεθόδους. Για σκοπούς ποσοτικοποίησης επιλέχθηκε η πιο ευαίσθητη μετάβαση MRM, ενώ η δεύτερη αποκτήθηκε για σκοπούς ταυτοποίησης, γεγονός που προσδίδει ιδιαίτερη αξιοπιστία στη μέθοδο. Να σημειωθεί ότι ο χρόνος κατακράτησης (t_R) λήφθηκε ως ένα επιπλέον στοιχείο επιβεβαίωσης των αναλυτών.

Ακολουθώντας, επικεντρωθήκαμε στη βελτιστοποίηση των παραμέτρων του MS, προκειμένου να εξασφαλίσουμε την μεγαλύτερη δυνατή ένταση του σήματος. Πρώτα στοιχεία μελέτης ήταν το δυναμικό του πρώτου τετραπόλου (Cone Voltage, CV), το οποίο καθορίζει το μητρικό ιόν και την ενέργεια σύγκρουσης (Collision Energy, CE) η οποία ελέγχει το βαθμό θραυσματοποίησης των μητρικών ιόντων στο θάλαμο σύγκρουσης (**Σχήμα 6.18.**)⁸⁴ Το δυναμικό μελετήθηκε από 30 μέχρι 50 V εφαρμόζοντας ταυτόχρονα και διαφορετικές ενέργειες σύγκρουσης από 20 μέχρι 30 eV.





Σχήμα 6.18. Βελτιστοποίηση του δυναμικού και της ενέργειας σύγκρουσης. (Α. 7-κέτο, Β. 5,6-EP, Γ. 7-OH, Δ. 22R-OH).

Στον **Πίνακα 6.6.** παρουσιάζονται οι τιμές m/z των μητρικών και θυγατρικών ιόντων για κάθε αναλύτη, καθώς επίσης οι βέλτιστες τιμές των MS παραμέτρων:

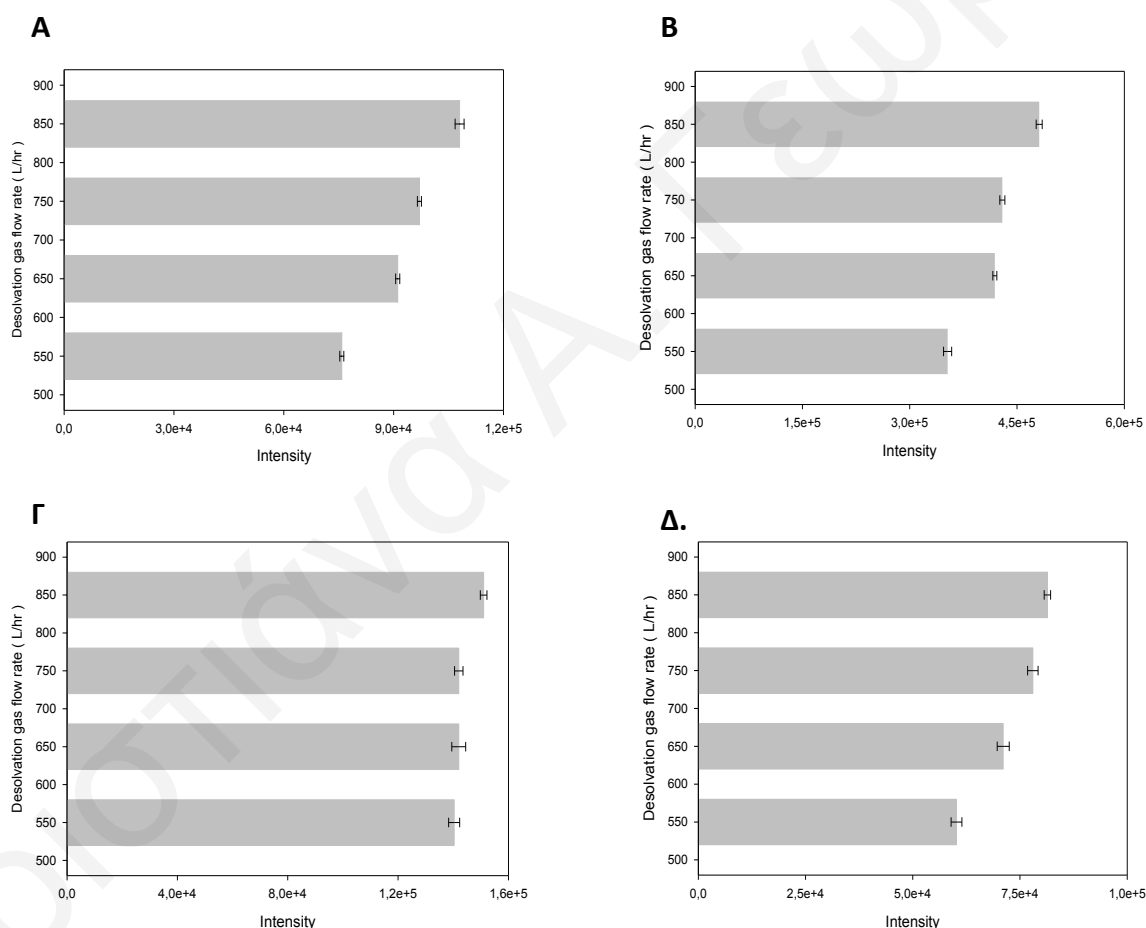
Πίνακας 6.6. MS/MS παράμετροι των υπό μελέτη αναλυτών.

Αναλύτες	Μετάπτωση Ποσοτικοποίησης	Μετάπτωση Ταυτοποίησης	CV (V)	CE (eV)
7-keto	401.6 > 383.3	401.6 > 365.2	50	24
5,6-EP	385.6 > 159.4	385.4 > 95.1	42	30
7-OH	367.6 > 81.2	367.6 > 95.2	48	30
22R-OH	367.7 > 161.1	367.6 > 95.2	50	27

Η σωστή ρύθμιση των παραμέτρων στην πηγή ιοντισμού, την «πύλη» ενός φασματομέτρου μάζας, η οποία μετατρέπει τα μόρια του δείγματος που περιέχονται στην υδατική φάση σε ιόντα στην αέρια φάση, είναι ιδιαίτερα σημαντική, δεδομένου ότι βελτιώνει αισθητά το σήμα του προσδιοριζόμενου συστατικού. Με βάση αυτό το δεδομένο, η θερμοκρασία της πηγής και η ταχύτητα ροής του αερίου αποδιαλύτωσης αποτέλεσαν παραμέτρους διερεύνησης.

Για να γίνει εύκολα αντιληπτή η σημασία των δύο αυτών παραμέτρων, θεωρείται σκόπιμο, στο σημείο αυτό, να σημειωθεί ότι ένα σημαντικό στάδιο του μηχανισμού ιοντισμού των δειγμάτων με ηλεκτροψεκασμό είναι η εξάτμιση του διαλύτη που οδηγεί στη συρρίκνωση των σταγονιδίων ηλεκτροψεκασμού και στον ιοντισμό των αναλυτών μας.⁸⁵ Με δεδομένο ότι οι δύο αυτοί παράμετροι ευνοούν τη διαδικασία εξάτμισης του διαλύτη και επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα του ιοντισμού, αποτελούν κρίσιμες μεταβλητές ενός MS συστήματος και απαιτούν αξιολόγηση.

Αρχικά, εξετάστηκε η επίδραση της ροής του αερίου αποδιαλύτωσης στο σήμα των COPs σε εύρος 650-850 L/h (3 εγχύσεις ανά ροή), κρατώντας τις υπόλοιπες παραμέτρους σταθερές (**Σχήμα 6.19**).

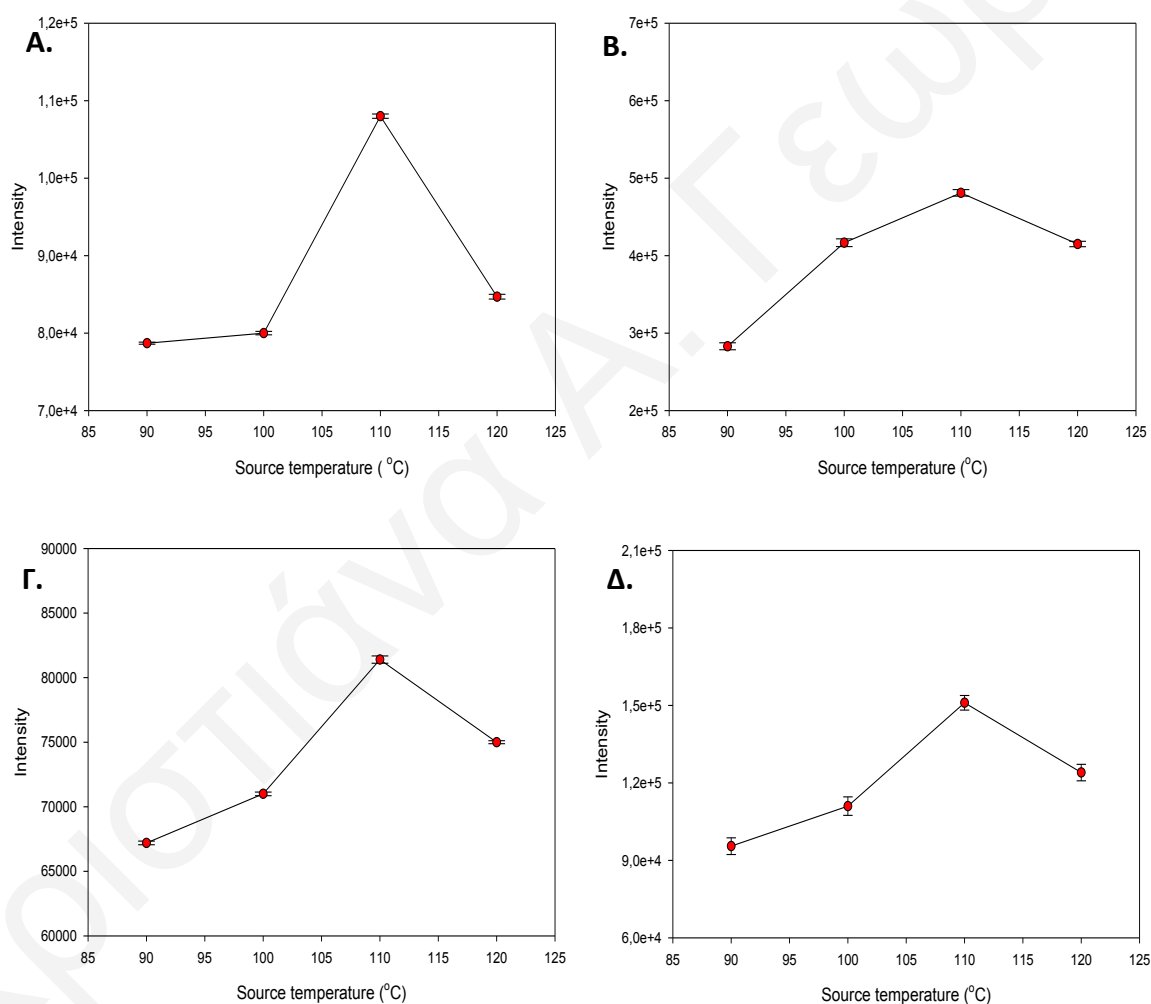


Σχήμα 6.19. Η επίδραση της ταχύτητας ροής του αερίου αποδιαλύτωσης στην ένταση του σήματος των υπο μελέτη ενώσεων (A. 5,6-EP, B. 7-OH, Γ. 22R-OH, Δ. 7-keto).

Όπως αναμενόταν, η αύξηση του ρυθμού ροής οδήγησε σε αξιοσημείωτη βελτίωση του σήματος για όλους τους αναλύτες, λόγω της καλύτερης αποδιαλύτωσης. Λαμβάνοντας

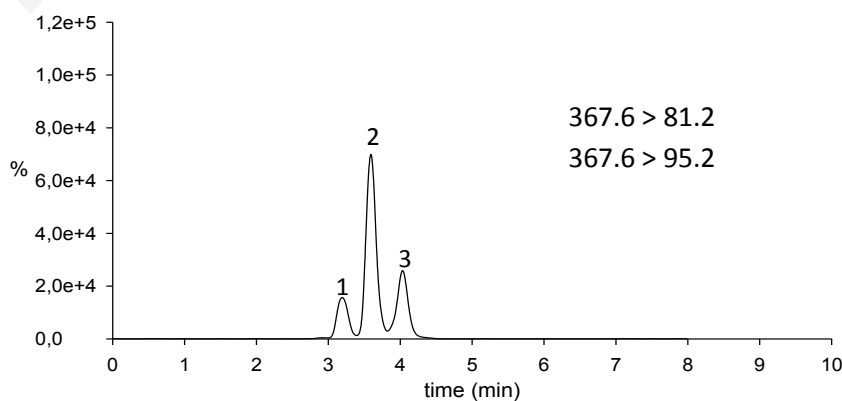
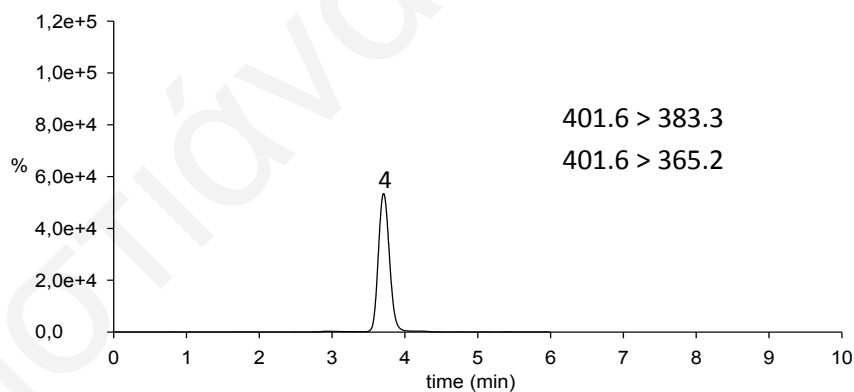
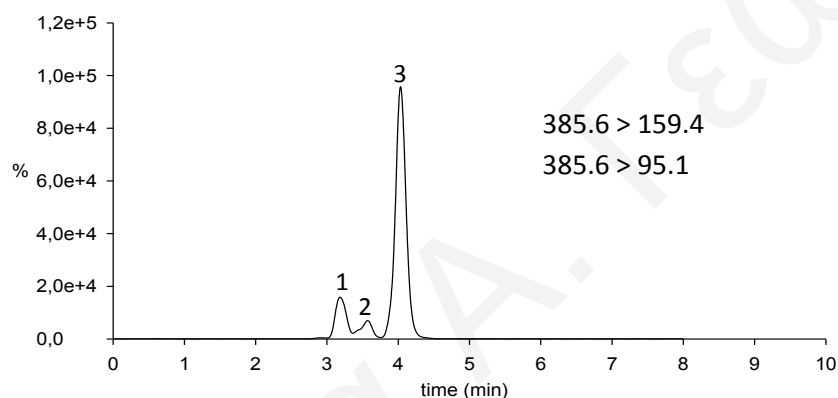
υπόψη τη μεγάλη ροή του διαλύτη και την υδατική φύση της κινητής φάσης, η εφαρμογή υψηλότερης ροής του αερίου ήταν επιβεβλημένη.

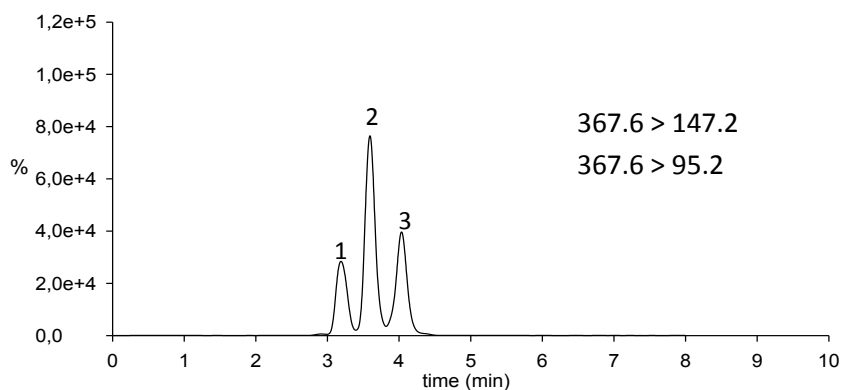
Η ρύθμιση της θερμοκρασίας αποτέλεσε την επόμενη παράμετρο μελέτης. Με αύξηση της θερμοκρασίας της πηγής από τους 90 °C στους 110 °C παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στην απόκριση του σήματος των αναλυτών, επιβεβαιώνοντας την προσδοκία ότι οι υψηλές θερμοκρασίες ευνοούν την εξάτμιση του διαλύτη και τη μετάβαση των αναλυτών στην αέρια φάση. Ωστόσο, περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας στους 120 °C οδήγησε σε ισχυρή μείωση του σήματος, γεγονός που αποδίδεται πιθανώς σε θερμική αστάθεια των υπό μελέτη ενώσεων (**Σχήμα 6.20.**).



Σχήμα 6.20. Εξάρτηση της έντασης του σήματος των COPs με τη θερμοκρασία της πηγής.
(A. 5,6-EP, B. 7-OH, Γ. 22R-OH, Δ. 7-keto).

Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός δεν απαιτείται, όταν για την ανίχνευση χρησιμοποιείται MS/MS, επειδή η δυνατότητα εύρεσης δύο ενώσεων με τον ίδιο χρόνο κατακράτησης και τις ίδιες MRM μεταβάσεις είναι πολύ περιορισμένη.⁸⁶ Ωστόσο, στην παρούσα εργασία τα υπο μελέτη μόρια, λόγω της δομικής τους ομοιότητας, παρουσιάζουν ένα κοινό μοτίβο θραυσματοποίησης.⁸³ Αυτό σαφώς υποδεικνύει ότι δεν ήταν δυνατόν να γίνει διάκριση μεταξύ των COPs αποκλειστικά από τα φάσματα μάζας τους κι ότι ο χρωματογραφικός διαχωρισμός αποτελούσε επιβεβλημένη ανάγκη. Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι η συνέκλωση πολλών αναλυτών, σε συγκεκριμένο χρονικό παράθυρο, επηρεάζει την ευαισθησία του ανιχνευτή με αποτέλεσμα να μην είναι εφικτή η ανίχνευση τους στα επιθυμητά επίπεδα συγκέντρωσης.





Σχήμα 6.21. Χρωματογραφήματα συνολικών ιόντων (TIC) πρότυπου μείγματος των υπό μελέτη ενώσεων σε συγκέντρωση 0.5 μg/mL. (1. 22R-OH, 2. 7-OH, 3. 5,6-EP, 4. 7-keto)

Κριτήρια χρωματογραφικής αξιολόγησης αποτέλεσαν η διαχωριστική ικανότητα, η μορφή των κορυφών (εύρος, συμμετρία και οξύτητα) και ο χρόνος ανάλυσης. Η εφαρμογή του προγράμματος βαθμιδωτής έκλυσης, που περιγράφεται στο πειραματικό μέρος 5.3.1., χρησιμοποιώντας δύο συστήματα διαλυτών, υδατικό διάλυμα φορμικού οξέος 0.1% και μεθανόλη ικανοποίησε πλήρως τα κριτήρια που τέθηκαν παρέχοντας γρήγορο χρόνο ανάλυσης, σε λιγότερο από 4.5 λεπτά με οξείες κορυφές και ικανοποιητική διαχωριστική ικανότητα (**Σχήμα 6.21.**).

6.3.2. Αξιολόγηση μεθόδου

Η εξασφάλιση της αξιοπιστίας και της καταλληλότητας της μεθόδου για το σκοπό που προορίζεται πραγματοποιήθηκε μέσω της διαδικασίας της επικύρωσης. Η πλήρης αξιολόγηση της αναπτυχθείσας μεθοδολογίας περιελάμβανε εκτίμηση της γραμμικότητας, της ακρίβειας, των LOD και LOQ.

Αρχικά, εκτιμήθηκε η ακρίβεια της μεθόδου εκτελώντας επαναλαμβανόμενες αναλύσεις ενός μίγματος των πρότυπων διαλυμάτων σε συγκέντρωση 0.5 μg mL⁻¹, την ίδια ημέρα και σε τρεις διαδοχικές ημέρες (**Πίνακας 6.7.**). Η εντός της ημέρας ακρίβεια, η οποία λήφθηκε από δέκα διαδοχικές μετρήσεις, ήταν χαμηλότερη από 1.9 % όσον αφορά το εμβαδόν των κορυφών, ενώ οι τιμές RSD για συνεχόμενες ημέρες, ήταν ελαφρά υψηλότερες σε εύρος μεταξύ 1.5 % και 4.1 %. Οι χρόνοι κατακράτησης παρουσίασαν εξαιρετική ακρίβεια και στις δυο περιπτώσεις, λαμβάνοντας τιμές RSD μικρότερες από 0.35%. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν έδειξαν ότι η προτεινόμενη μέθοδος παρουσιάζει την απαιτούμενη ακρίβεια.

Πίνακας 6.7. Αξιολόγηση της ακρίβειας της μεθόδου.

Αναλύτες	intra-day precision		inter-day precision	
	RSD _{tr} (%)	RSD _{area} (%)	RSD _{tr} (%)	RSD _{area} (%)
7-keto	0.14	1.9	0.26	4.1
5,6-EP	0.20	1.3	0.23	1.7
7-OH	0.08	1.9	0.35	2.5
22R-OH	0.17	1.1	0.18	1.5

Ακολούθως, αξιολογήθηκε η γραμμικότητα της μεθόδου με την κατασκευή καμπύλων βαθμονόμησης κάτω από τις βέλτιστες συνθήκες UPLC-MS/MS. Οι καμπύλες κατασκευάστηκαν τόσο με εξωτερική βαθμονόμηση στην απουσία δηλαδή μήτρας (external calibration) όσο και σε κάθε εξεταζόμενη μήτρα με 5 επαναλαμβανόμενες μετρήσεις του εμβαδού των κορυφών, σε 5 διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων (από 30 – 150 ng/mL).

Οι παράμετροι των γραμμικών εξισώσεων παλινδρόμησης: κλίση, τετμημένη και συντελεστής συσχέτισης (R^2) συνοψίζονται στον **Πίνακα 6.8.** Τα πειραματικά αποτελέσματα έδειξαν ότι το εμβαδόν των κορυφών σε σχέση με τη συγκέντρωση για όλους τους αναλύτες χαρακτηρίζεται από εξαιρετική γραμμικότητα αφού παρουσίασαν συντελεστές συσχέτισης μεγαλύτερους από 0.99.

Τα LODs και LOQs της μεθόδου προσδιορίστηκαν για κάθε εξεταζόμενη ουσία σε όλες τις υπό μελέτη μήτρες. Οι τιμές των LODs που λήφθηκαν κυμάνθηκαν από 0.03 μέχρι 0.16 μg/250 mg λίπους και οι τιμές των LOQs από 0.10 μέχρι 0.49 μg/250 mg λίπους (**Πίνακας 6.8.**). Τα εν λόγω αποτελέσματα κατέστησαν εφικτή την ανίχνευση των COPs στα επιθυμητά επίπεδα συγκέντρωσης (επίπεδα ng) σε δείγματα τροφίμων και υπογραμμίζουν την επίτευξη του βασικού μας στόχου να αναπτυχθεί μια πιο ευαίσθητη μέθοδος ανάλυσης των COPs.

Πίνακας 6.8. Δεδομένα βαθμονόμησης των καμπύλων αναφοράς των υπο μελέτη ενώσεων σε καθαρό διαλύτη και σε κάθε εξεταζόμενη μήτρα.

Αναλύτης	Μήτρα	Εξίσωση Παλινδρόμησης	R ²	LOD*	LOQ*
7-keto	Μεθανόλη ¹	y= 3.3378x + 46.101	0.9990	0.05	0.16
	Γιαούρτι	y= 3.3037x + 28.498	0.9973	0.09	0.28
	Τυρί Φέττα	y= 3.6518x + 9.7488	0.9958	0.11	0.35
	Χαλούμι	y= 2.6191x + 189.83	0.9975	0.09	0.27
	Αναρή	y= 5.235x + 147.73	0.9981	0.08	0.24
	Λουκάνικο	y= 3.7555x + 25.247	0.9989	0.06	0.18
	Σαλιγκάρια	y= 2.521x + 20.081	0.9978	0.08	0.25
	Χοιρομέρι	y = 1.909x + 26.463	0.9933	0.15	0.44
	Κουνέλι	y= 2.2477x + 43.689	0.9983	0.07	0.22
	Σαλάμι	y= 6.0744x + 246.3	0.9972	0.09	0.28
	Μπέικον	y= 1.8364x + 8.4147	0.9967	0.10	0.31
	Μπόλια	y= 2.4177x + 28.145	0.9947	0.13	0.39
7-OH	Μεθανόλη	y= 22.399x + 108.88	0.9980	0.08	0.24
	Γιαούρτι	y= 11.16x + 282.31	0.9948	0.12	0.39
	Τυρί Φέττα	y= 2.3124x + 130.18	0.9964	0.10	0.32
	Χαλούμι	y= 12.488x + 534.6	0.9951	0.12	0.38
	Αναρή	y= 26.907x + 5118	0.9975	0.09	0.27
	Λουκάνικο	y= 22.757x + 244.5	0.9976	0.09	0.26
	Σαλιγκάρια	y= 9.937x + 115.2	0.9962	0.11	0.33
	Χοιρομέρι	y = 5.0516x + 87.968	0.9977	0.09	0.26
	Κουνέλι	y= 5.5247x + 81.578	0.9942	0.13	0.41
	Σαλάμι	y= 28.72x + 819.74	0.9921	0.16	0.48
	Μπέικον	y= 1.3793x + 26.7	0.9916	0.16	0.49
	Μπόλια	y= 17.149x + 416.16	0.9950	0.12	0.38
5,6-EP	Μεθανόλη	y= 2.7988x + 6,9055	0.9986	0.07	0.20
	Γιαούρτι	y= 1.5412 x + 6.818	0.9969	0.10	0.30
	Τυρί Φέττα	y= 2.0834x - 5.2396	0.9978	0.08	0.25
	Χαλούμι	y= 1.2608x + 22.212	0.9949	0.13	0.38
	Αναρή	y= 3.7081x +139.34	0.9988	0.06	0.19
	Λουκάνικο	y= 1.3226x + 32.548	0.9964	0.11	0.32
	Σαλιγκάρια	y= 1.3212x + 1.862	0.9975	0.09	0.27
	Χοιρομέρι	y= 0.8228x + 23.329	0.9962	0.11	0.33

	Κουνέλι	$y = 1.1894x - 15.931$	0.9990	0.05	0.17
	Σαλάμι	$y = 1.4942x + 15.472$	0.9972	0.09	0.28
	Μπέικον	$y = 1.0859x + 2.3525$	0.9995	0.04	0.12
	Μπόλια	$y = 1.3924x - 6.7765$	0.9948	0.13	0.39
	Μεθανόλη	$y = 1.1431x + 23.067$	0.9990	0.05	0.17
	Γιαούρτι	$y = 1.1217x + 1.576$	0.9981	0.08	0.23
	Τυρί Φέττα	$y = 0.9062x - 1.9101$	0.9976	0.09	0.26
	Χαλούμι	$y = 0.8535x + 8.2166$	0.9985	0.07	0.21
	Αναρή	$y = 1.9894x + 120.07$	0.9991	0.05	0.16
22R-OH	Λουκάνικο	$y = 1.026x - 10.297$	0.9942	0.13	0.41
	Σαλιγκάρια	$y = 0.7857x + 8.571$	0.9960	0.11	0.34
	Χοιρομέρι	$y = 0.8832x + 9.9793$	0.9990	0.06	0.17
	Κουνέλι	$y = 0.9235x - 6.3272$	0.9997	0.03	0.10
	Σαλάμι	$y = 1.0594x - 3.4747$	0.9983	0.07	0.22
	Μπέικον	$y = 0.5221x + 1.9862$	0.9989	0.06	0.18
	Μπόλια	$y = 0.6419x + 10.161$	0.9983	0.07	0.22

†μονάδες μέτρησης σε καθαρή μεθανόλη µg/mL, *μονάδες μέτρησης: µg/250 mg λίπος

6.3.2.1. Επίδραση μητρικού υλικού (Matrix Effect, ME)

Η LC-MS/MS είναι ένα ισχυρό αναλυτικό εργαλείο για τον επιστήμονα με υψηλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα.⁷⁷ Ωστόσο, η επίδραση του μητρικού υλικού αποτελεί την «Αχίλλειο πτέρνα» της όπως εύστοχα χαρακτηρίζεται σε ερευνητική εργασία του Taylor.⁸⁷ Η επίδραση του μητρικού υλικού είναι ένας όρος που χρησιμοποιείται για να ορίσει την καταστολή ή την ενίσχυση στη μέτρηση του σήματος του αναλύτη που οφείλεται στην συνέκλωση συστατικών της μήτρας.

Το ανεπιθύμητο αυτό φαινόμενο είναι εξαιρετικά μεταβλητό μεταξύ των δειγμάτων γεγονός που καθιστά δύσκολο τον έλεγχο και την πρόβλεψη του. Λαμβάνοντας υπόψη τη μεγάλη επίδραση της συγκεκριμένης παραμέτρου στα ποιοτικά χαρακτηριστικά μιας μεθόδου (ακρίβεια, αξιοπιστία), πολλοί ερευνητές περιλαμβάνουν την αξιολόγηση της ως ένα ουσιαστικό μέρος της επικύρωσης της. Να σημειωθεί ότι σε μερικές μόνο ερευνητικές εργασίες έχουν γίνει προσπάθειες προκειμένου να μειώσουν ή να εξαλείψουν την επίδραση της μήτρας που παρατηρήθηκε, με τις προσπάθειες κυρίως να επικεντρώνονται στη βελτιστοποίηση της προετοιμασίας του δείγματος. Ωστόσο, η

προσέγγιση αυτή, είναι χρονοβόρα και, επιπλέον, αυξάνεται ο κίνδυνος της απώλειας των αναλυτών κατά τη διάρκεια πολλών διαδοχικών σταδίων καθαρισμού.

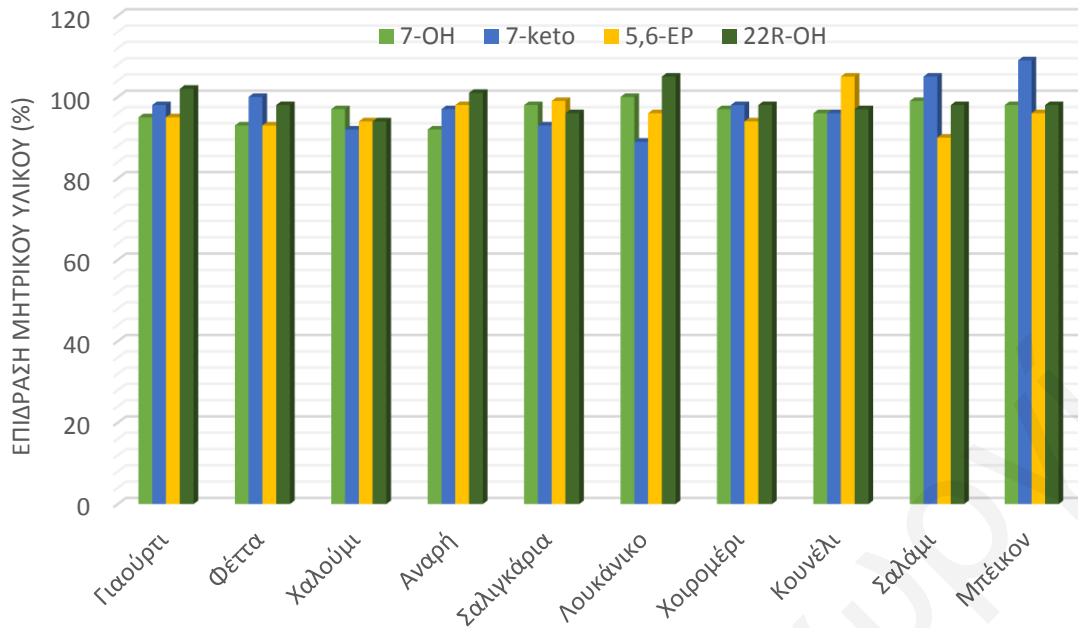
Ο ακριβής μηχανισμός είναι άγνωστος. Παρόλα αυτά είναι γενικά αποδεκτό ότι κύρια αιτία για το φαινόμενο της επίδρασης του μητρικού υλικού θεωρείται η μεταβολή στις ιδιότητες του διαλύματος σταγονιδίων ψεκασμού (spray droplet solution), η οποία προκαλείται από την παρουσία μη πτητικών ή λιγότερων πτητικών συστατικών. Τα συστατικά αυτά θεωρείται ότι επιδρούν στην αποτελεσματικότητα του σχηματισμού των σταγονιδίων και την εξάτμιση τους (τροποποίηση της επιφανειακής τάσης των σταγονιδίων). Έτσι, ο αριθμός των ιόντων που μεταφέρονται στην αέρια φάση και τελικά φτάνουν στον ανιχνευτή αλλοιώνεται.⁸⁸

Βιβλιογραφικά χρησιμοποιούνται διάφορες προσεγγίσεις για υπολογισμό της επίδρασης του μητρικού υλικού, εκ των οποίων οι δυο επικρατέστερες εφαρμόστηκαν στην παρούσα μελέτη. Αρχικά έγινε ποσοτική εκτίμηση της εν λόγω παραμέτρου σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση:

$$\%ME = (As - Ans)/Ass \times 100 \quad (\text{εξ. 6.1.})$$

όπου *As* και *Ans* είναι η απόκριση του αναλύτη σε εμβολιασμένο και μη-εμβολιασμένο δείγμα, αντίστοιχα, και *Ass* η απόκριση που λαμβάνεται από ένα πρότυπο διάλυμα με την ίδια συγκέντρωση.⁸⁹ Να σημειωθεί ότι η μελέτη έγινε σε ένα επίπεδο συγκέντρωσης 100 ng mL⁻¹. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν όπως φαίνεται και στο **Σχήμα 6.22**, από τη συγκεκριμένη μελέτη υπέδειξαν την ύπαρξη μικρής επίδρασης της μήτρας (μεταξύ 89-105%) για κάθε αξιολογούμενο δείγμα επισημαίνοντας τη δυνατότητα χρήσης των εξωτερικών καμπύλων βαθμονόμησης ως έγκυρη και απλή προσέγγιση για ποσοτικοποίηση.

Παράλληλα όμως, εφαρμόστηκε κι ένας εναλλακτικός τρόπος προσδιορισμού της συγκεκριμένης παραμέτρου. Κατασκευάστηκαν καμπύλες βαθμονόμησης σε κάθε εξεταζόμενη μήτρα και οι κλίσεις τους συγκρίθηκαν με τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από πρότυπα διαλύματα των COPs σε αντίστοιχο εύρος συγκεντρώσεων. Αμφότερες οι καμπύλες αποτελούνταν από πέντε σημεία βαθμονόμησης στην περιοχή από 30 μέχρι 150 ng mL⁻¹.



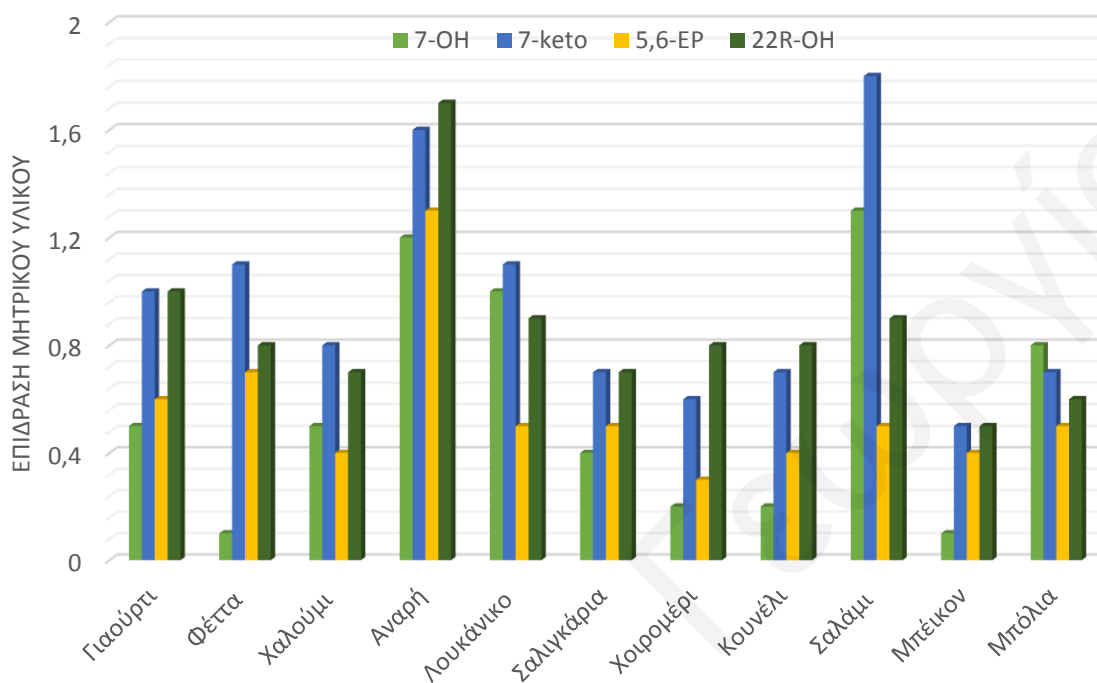
Σχήμα 6.22. Αξιολόγηση της επίδρασης του μητρικού υλικού σύμφωνα με την εξίσωση 6.1.

Στο **Σχήμα 6.23.** παρουσιάζονται οι αναλογίες της κλίσης μήτρας/διαλύτης θεωρώντας την ενίσχυση ή την καταστολή του σήματος, αντίστοιχα, ως αποδεκτή, εάν ο λόγος της κλίσης κυμαίνεται μεταξύ 0.8 και 1.2. Τιμές χαμηλότερες από 0.8 ή μεγαλύτερες από 1.2 υποδηλώνουν μια ισχυρή επίδραση της μήτρας.⁹⁰

Τα πειραματικά δεδομένα της συγκεκριμένης μελέτης, υπέδειξαν ότι η μήτρα επηρέασε σημαντικά την απόκριση των υπό μελέτη ενώσεων για κάθε αξιολογούμενο δείγμα με την επίδραση μάλιστα να είναι μεταβλητή, ανάλογα με το είδος της μήτρας και τη χημική ένωση. Ως εκ τούτου, ο ποσοτικός προσδιορισμός των αναλυτών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των matrix-matched calibration standards. Με αυτή την προσέγγιση, ουσιαστικά, γίνεται πλήρης αντιστάθμιση της επίδρασης του μητρικού υλικού που παρατηρείται κι έτσι αποφεύγεται η υπό ή υπερ εκτίμηση της συγκέντρωσης των αναλυτών στα πραγματικά δείγματα.⁸⁸

Είναι προφανές λοιπόν ότι με τις δυο μεθόδους υπολογισμού της επίδρασης του μητρικού υλικού προκύπτουν εντελώς διαφορετικά αποτελέσματα. Στην παρούσα εργασία η εφαρμογή της δεύτερης προσέγγισης κρίθηκε ορθότερη, αφού ο προσδιορισμός γίνεται σε εύρος συγκεντρώσεων έναντι ενός σημείου στην πρώτη περίπτωση. Να σημειώσουμε ότι για την ποσοτικοποίηση των COPs σε ορισμένα

πραγματικά δείγματα απαιτήθηκε η κατασκευή δύο καμπύλων βαθμονόμησης σε υψηλότερα επίπεδα συγκέντρωσης.



Σχήμα 6.23. Αξιολόγηση της επίδρασης του μητρικού υλικού σύμφωνα με το λόγο της κλίσης μήτρας/διαλύτη.

6.3.2.2. Αξιολόγηση της Ανάκτησης

Για να προσδιοριστούν πιθανές απώλειες των COPs κατά τη διάρκεια της διαδικασίας εκχύλισης τους, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανάκτησης σε τρία διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης (100, 500 και 1500 ng/mL). Οι τιμές ανάκτησης υπολογίστηκαν από τη διαφορά των εμβαδών των κορυφών κάθε αναλύτη σε εμβολιασμένο δείγμα (προσθήκη γνωστής συγκέντρωσης του αναλύτη πριν τη διαδικασία της προετοιμασίας) και μη προς το αντίστοιχο εμβαδόν δείγματος πρότυπου διαλύματος αντίστοιχης συγκέντρωσης. Να σημειωθεί ότι για την παρασκευή του διαλύματος αναφοράς ο εμβολιασμός των αναλυτών έγινε σε εκχυλισμένα δείγματα αντί καθαρού διαλύτη, έτσι ώστε να εμφανίζεται εξίσου και να μην επηρεάζει τους υπολογισμούς η επίδραση του μητρικού υλικού. Με αυτό το τρόπο καταφέρνουμε επιπλέον να εξασφαλίσουμε την αντίστοιχη χρωματογραφική συμπεριφορά των συγκρινόμενων δειγμάτων.

Όπως προέκυψε από την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων, η μέθοδος έδωσε ανακτήσεις μεταξύ 86.0-98.5%. Αυτά τα δεδομένα καταδεικνύουν την εφαρμοσιμότητα της μεθόδου που αναπτύχθηκε για την εκχύλιση των αναλυτών από το μητρικό υλικό. Οι τιμές ανάκτησης που λήφθηκαν και για τα τρία επίπεδα συγκέντρωσης ήταν συγκρίσιμες, γεγονός που υποδηλώνει ότι η εν λόγω παράμετρος δεν εξαρτάται από τη συγκέντρωση του αναλύτη.

6.3.3. Εφαρμογή της μεθόδου

Η έλλειψη δεδομένων, όπως έχει ήδη αναφερθεί, σχετικά με το περιεχόμενο των COPs στα κυπριακά προϊόντα, αποτέλεσε βασικό κίνητρο για την πραγματοποίηση της παρούσας πτυχής της εργασίας. Συγκεκριμένα, δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή στον προσδιορισμό του προφίλ των κύριων COPs σε μια μεγάλη ποικιλία κυπριακών προϊόντων που καταναλώνονται ευρέως, όπως το χαλούμι, η φέτα, το σαλάμι κ.ά.

Στον **Πίνακα 6.9.** συνοψίζονται οι ποσότητες των COPs που βρέθηκαν σε όλα τα υπό εξέταση δείγματα. Όπως φαίνεται, η 7-κέτο είναι το μοναδικό COP που ανιχνεύθηκε σε όλα τα αναλυθέντα δείγματα, στοιχείο που επιβεβαιώνει την καταλληλότητα χρήσης της εν λόγω ένωσης ως δείκτης της οξειδωσης της χοληστερόλης σε συστήματα τροφίμων. Επιπλέον, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι τα 7-υδρόξυ παράγωγα ανιχνεύθηκαν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, ενώ τα επιβλαβή 5,6-εποξειδία παρατηρήθηκαν σε μερικά μόνο δείγματα. Ένα ενδεικτικό χρωματογράφημα από δείγμα μπέικον παρουσιάζεται στο **Σχήμα 6.24.**

Πρώτη βασική παρατήρηση που προκύπτει από τα πειραματικά αποτελέσματα είναι τα διπλάσια επίπεδα συγκέντρωσης των COPs σε τηγανητό μπέικον σε σχέση με το αντίστοιχο ακατέργαστο προϊόν. Η θερμική επεξεργασία φαίνεται να προωθεί την παραγωγή των συγκεκριμένων οξειδίων. Επιπλέον, το περιεχόμενο των COPs σε κουνέλι που παρασκευάστηκε στο φούρνο για 16 λεπτά ήταν σημαντικά υψηλότερο από ό,τι στο τηγανητό κουνέλι με χρόνο ψησίματος 9 λεπτά. Ο σχηματισμός των χαμηλότερων επιπέδων COPs στο τελευταίο μπορεί να αποδοθεί στο μικρότερο χρονικό διάστημα που το δείγμα υποβλήθηκε σε θερμική διεργασία.

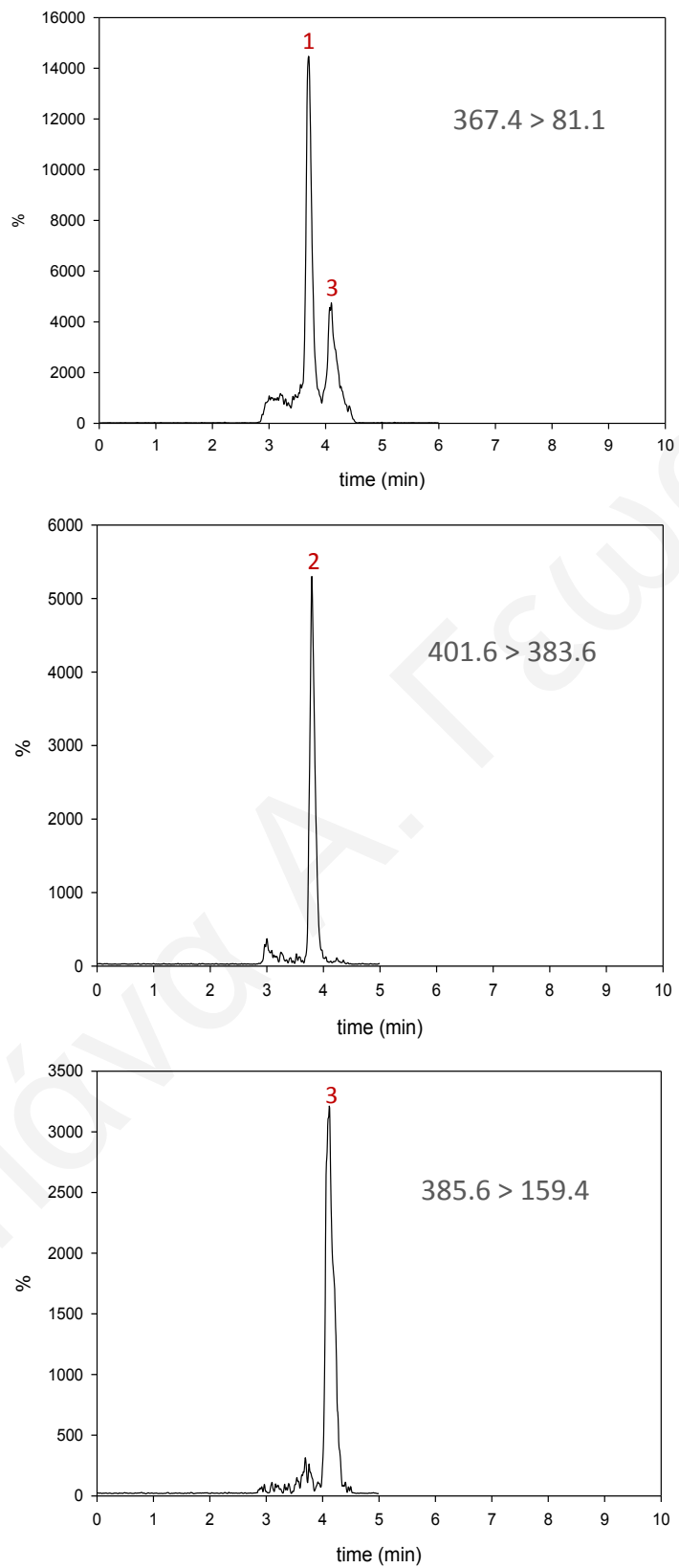
Πίνακας 6.9. Τα επίπεδα COPs που ανιχνεύτηκαν στα κυπριακά τρόφιμα

Δείγματα	7-OH	7-keto	5,6-EP	Συνολικά COPs
<u>Γαλακτοκομικά προϊόντα</u>				
Γιαούρτι	41 (1.7)	57 (5.2)	1314 (1.7)	1412
Τυρί Φέττα	1430 (1.8)	73 (2.8)	n.d	1503
Τυρί Χαλούμι	616 (1.1)	82 (3.0)	n.d	698
Αναρή	105 (2.4)	1099 (2.7)	n.d	1204
<u>Προϊόντα κρέατος</u>				
Σαλιγκάρια	1239 (4.7)	1424 (3.0)	n.d	2663
Χοιρομέρι	395 (2.2)	155 (2.8)	105 (2.7)	655
Λουκάνικο	444 (1.7)	490 (4.7)	n.d	934
Σαλάμι	972 (2.5)	141 (3.7)	442 (3.0)	1555
Μπόλια	122 (1.7)	331 (3.6)	1406 (2.3)	1859
Μπέικον (ωμό)	1104 (1.5)	158 (3.0)	n.d	1262
Μπέικον (τηγανητό)	2166 (1.5)	237 (1.6)	232 (2.8)	2635
Κουνέλι (τηγανητό)	843 (1.8)	681 (1.4)	202 (2.6)	1726
Κουνέλι (φούρνο)	2530 (0.3)	938 (1.8)	1594 (2.7)	5062

n.d., μη ανιχνεύσιμο, οι τιμές RSD δίνονται στη παρένθεση (n=4)

Όπως προκύπτει και από τα αποτελέσματα διαφόρων ερευνητικών εργασιών, η παραγωγή των COPs σχετίζεται άμεσα με τη θερμική επεξεργασία αλλά και το χρόνο θέρμανσης του τροφίμου.⁹ Τρόφιμα που υπόκεινται επεξεργασία για παρατεταμένο χρονικό διάστημα παρουσιάζουν μεγαλύτερα ποσοστά COPs.⁹¹

Αξίζει σε αυτό το σημείο να δούμε και τη χημική πτυχή πίσω από το σχηματισμό των εν λόγω ενώσεων υπό αυτές τις συνθήκες. Είναι γενικά αποδεκτό, ότι το μαγείρεμα προωθεί τη δημιουργία ενός προ-οξειδωτικού περιβάλλοντος. Συγκεκριμένα, παρατηρείται μετουσίωση των πρωτεϊνών, η οποία μπορεί να οδηγήσει στην απώλεια της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας ενζύμων ή την απελευθέρωση του σιδήρου από μεταλλοπρωτεΐνες (κυρίως τη μυοσφαιρίνη). Η παρουσία ιχθών μετάλλων καταλύει την οξείδωση των λιπιδίων και κατά συνέπεια της χοληστερόλης.⁷⁵



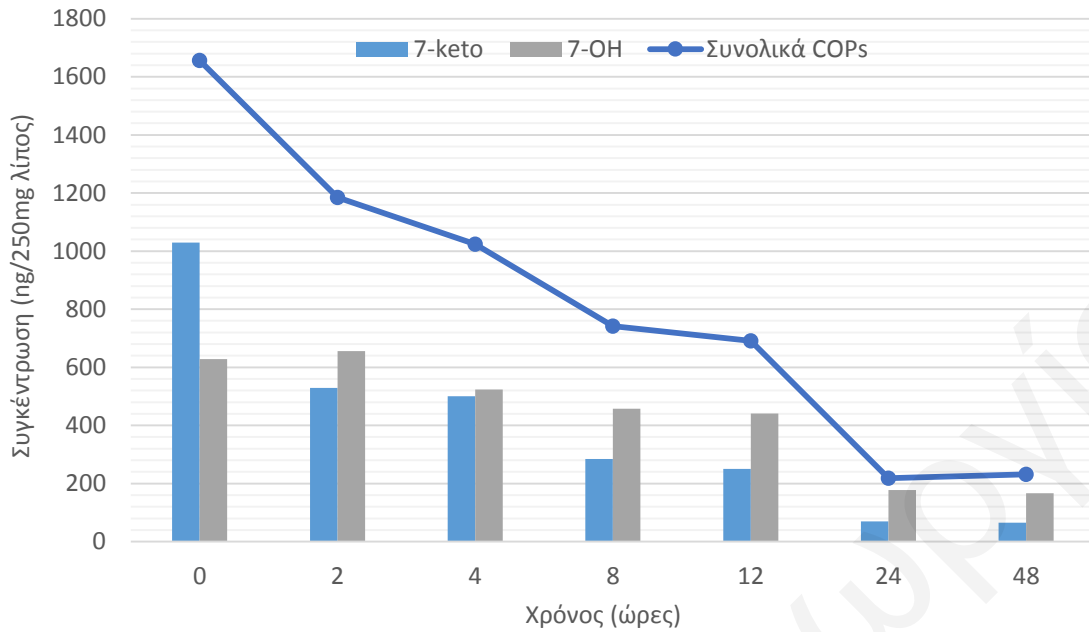
Σχήμα 6.24. Ενδεικτικό χρωματογράφημα κατά τον ποσοτικό προσδιορισμό των (1) 7-OH (2) 7-κέτο και (3) 5,6-EP σε δείγμα μπέικον.

Επιπλέον, οι υψηλές θερμοκρασίες που επικρατούν κατά το μαγείρεμα του τροφίμου επιταχύνουν την αυτοοξειδωση των PUFAs. Επειδή τα φωσφολιπίδια και η χοληστερόλη είναι δομικά συστατικά της λιπιδικής διπλοστοιβάδας της κυτταρικής μεμβράνης, πιστεύεται ότι τα LOOH, τα οποία προέρχονται από την οξείδωση των PUFAs των φωσφολιπιδίων, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην οξείδωση της χοληστερόλης.²¹ Φαίνεται ότι τα LOOH διασπώνται σε προ-οξειδωτικά είδη LOO• και LO•, αντίστοιχα, τα οποία εμπλέκονται στην έναρξη της οξείδωσης της.

Μετά από μια πιο προσεκτική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων που λήφθηκαν, αναδείχθηκαν νέα ζητήματα που απαιτούσαν την πραγματοποίηση περισσότερων ερευνητικών μελετών προκειμένου να δοθούν απαντήσεις. Αρχικά, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασαν τα πειραματικά αποτελέσματα από την ανάλυση χοιρομεριού μαριναρισμένο σε κόκκινο κρασί, το οποίο περιείχε σημαντικά χαμηλότερες συγκεντρώσεις COPs σε σύγκριση με τα υπόλοιπα αναλυθέντα δείγματα.

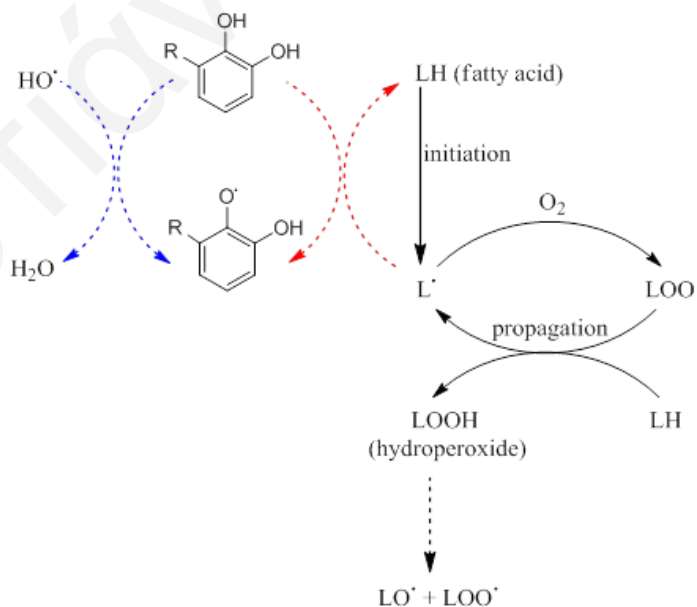
Το αποτέλεσμα αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στην αντιοξειδωτική δράση του κρασιού λόγω της υψηλής περιεκτικότητας του σε πολυφαινόλες.²¹ Λαμβάνοντας υπόψη τις περιορισμένες πληροφορίες σχετικά με τις προστατευτικές ιδιότητες των πολυφαινόλων από την οξείδωση της χοληστερόλης, θεωρήθηκε ενδιαφέρον να μελετηθούν τα επίπεδα συγκέντρωσης των COPs σε χοιρινό κρέας, το οποίο μαριναρίστηκε σε κόκκινο κρασί σε διάφορα χρονικά διαστήματα.

Η σημαντική μείωση των επιπέδων COPs με την πάροδο του χρόνου που παρατηρήθηκε επιβεβαιώνουν την προσδοκία ότι το κρασί δρα ανασταλτικά στην οξείδωση της χοληστερόλης. Συγκεκριμένα, η συγκέντρωση του συνόλου των COPs μειώθηκε σημαντικά μετά από 48 ώρες με τα επίπεδα τους να μειώνονται από 1657 σε 232 ng/250 mg λίπους. Μάλιστα, η 7-κέτο παρουσίασε περίπου 16 φορές μείωση ενώ τα 7 υδρόξυ παράγωγα μειώθηκαν κατά 4-φορές (**Σχήμα 6.25.**).



Σχήμα 6.25. Επίδραση του κόκκινου κρασιού στα επίπεδα συγκέντρωσης των COPs σε ωμό χοιρινό κρέας.

Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να αποδοθεί όπως προαναφέρθηκε στην αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολικών ενώσεων. Οι εν λόγω ουσίες θεωρείται ότι απομακρύνουν τις ενεργές μορφές οξυγόνου, που εμπλέκονται στην έναρξη της οξείδωσης των λιπιδίων (π.χ. $\text{HO}\bullet$), ή αντιδρούν με τις ρίζες των υπεροξειδίων των λιπαρών οξέων τερματίζοντας την αλυσιδωτή αντίδραση οξείδωσης (**Σχήμα 6.26**).



Σχήμα 6.26. Αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών ενάντια στην οξείδωση της Chol.

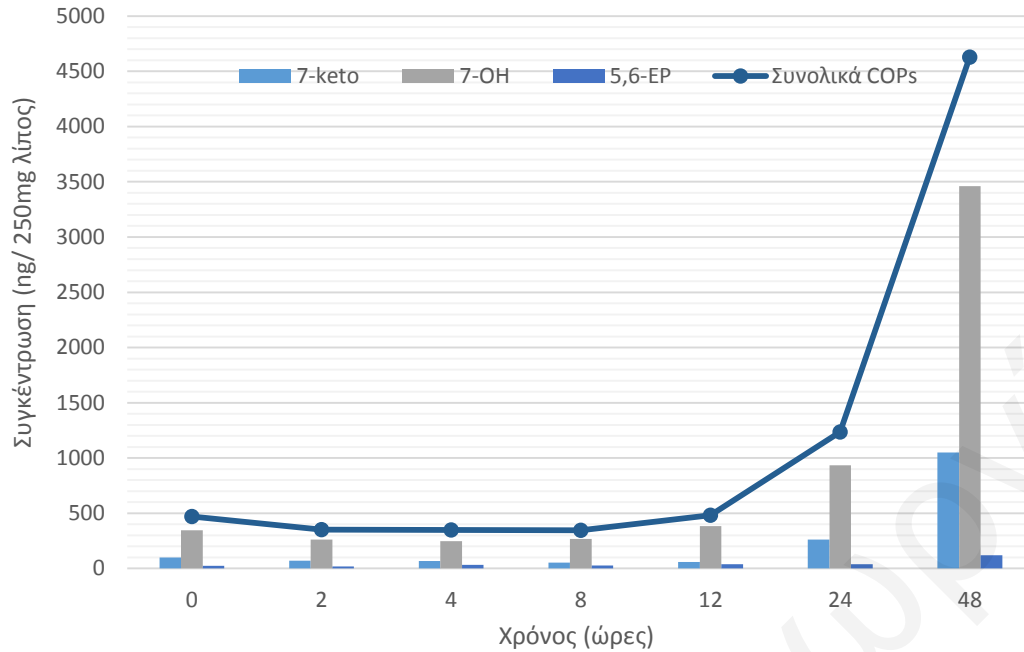
Επίσης, συγκεκριμένες πολυφαινολικές ενώσεις, όπως οι κατεχίνες, μπορούν να δεσμεύσουν χηλικά, μέταλλα μετάπτωσης, όπως το σίδηρο, αναστέλλοντας τον οξειδωαναγωγικό κύκλο του, που καταλύει την οξείδωση των λιπαρών οξέων και άρα της Chol.²¹

Βασικό στάδιο κατά τη διάρκεια παρασκευής των υπο εξέταση δειγμάτων (για παράδειγμα των παραδοσιακών αλλαντικών και τυριών) περιλαμβάνει την προσθήκη χλωριούχου νατρίου, δηλαδή άλατος. Λαμβάνοντας υπόψη ορισμένες ερευνητικές εργασίες, στις οποίες το NaCl έχει αναφερθεί ότι δρα ως προοξειδωτικό, κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί η επίδραση του στην οξείδωση της χοληστερόλης στα υπό μελέτη δείγματα.⁹²

Να σημειωθεί ότι τα αποτελέσματα στις διάφορες μελέτες είναι αντιφατικά λόγω του ότι στο άλας που χρησιμοποιείται περιέχονται διαφορετικά επίπεδα μεταλλικών ξένων προσμίξεων που μπορεί να δρουν ως καταλύτες στην οξείδωση των λιπιδίων.⁸⁵ Το άλας που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη δεν περιέχει μολυσματικά μικροστοιχεία, όπως Cu και Fe, στη σύνθεση του προκειμένου να αποδειχθεί ότι η προοξειδωτική επίδραση του συνέβη λόγω της παρουσίας των στοιχείων αυτών.

Ως εκ τούτου, για να διερευνηθεί περαιτέρω το αποτέλεσμα του αλατίσματος στην οξείδωση, μελετήθηκαν διαφορετικοί χρόνοι αλατίσματος (0, 2, 4, 8, 12, 24 και 48 ώρες) σε ωμό χοιρινό κρέας.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αύξηση της διάρκειας αλατίσματος επηρέασε σημαντικά την οξείδωση της χοληστερόλης. Τα επίπεδα των COPs παρουσίασαν μικρές αλλαγές μετά από περίοδο 12 ωρών ενώ παρατηρήθηκε απότομη αύξηση μετά από 24 και 48 ώρες, αντίστοιχα. Ειδικότερα, τα επίπεδα των COPs αυξήθηκαν περίπου 3 φορές μετά από 24 ώρες και 10 φορές μετά από 48 ώρες, με την 7-κέτο και 7-OH είναι τα κυρίαρχα COPs (**Σχήμα 6.27.**).



Σχήμα 6.27. Επίδραση της διάρκειας αλατίσματος στη συγκέντρωση των υπό μελέτη COPs σε ωμό χοιρινό κρέας.

Τέλος, θα ήταν παράληψη να μην αναφερθούμε σε μια ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα μελέτη που πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής αυτής διατριβής. Έχοντας ως γνώμονα τις αναφορές ότι τα πράσινα αυγά περιέχουν χαμηλά επίπεδα χοληστερόλης, επιχειρήθηκε για πρώτη φορά προσδιορισμός των COPs στα εν λόγω προϊόντα. Τα αποτελέσματα μάλιστα που λήφθηκαν συγκρίθηκαν με τα επίπεδα των COPs σε κανονικά αυγά. Τα πειραματικά δεδομένα παρουσίασαν ιδιαίτερο ενδιαφέρον (**Πίνακας 6.10.**). Τα πράσινα αυγά περιείχαν εξαιρετικά χαμηλά ποσά COPs σε σύγκριση με τα κανονικά. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα τους ήταν πέντε φορές ή και περισσότερο χαμηλότερα από τα κανονικά. Η 7-OH και 7-κέτο ήταν και στην προκειμένη περίπτωση τα δύο κυρίαρχα COPs. Είναι σημαντικό να τονίσουμε ότι τα στοιχεία αυτά είναι απλά μια ένδειξη, μια τάση και σίγουρα απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την εξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων.

Πίνακας 6.10. Επίπεδα συγκέντρωσης των COPs σε δείγματα πράσινων και κανονικών αυγών.

Συγκέντρωση COPs (ng/250mg λίπος)				
Δείγματα	7-OH	7-keto	5,6-EP	Συνολικά COPs
1. Αυγό	2546	155	n.d.	2701
2. Αυγό	2604	150	n.d.	2754
3. Αυγό	2146	126	n.d.	2272
4. Αυγό	1645	98	111	1854
5. Αυγό	1756	106	123	1985
1. Πράσινο αυγό	266	80	n.d.	346
2. Πράσινο αυγό	312	96	n.d.	408
3. Πράσινο αυγό	298	91	n.d.	389
4. Πράσινο αυγό	295	86	n.d.	381
5. Πράσινο αυγό	324	114	n.d.	438

n.d., μη ανιχνεύσιμο

Γενικά, η παρουσία υψηλών επιπέδων COPs στα υπό μελέτη δείγματα αποτελεί ένα σημαντικό τοξικολογικό κίνδυνο και θα πρέπει να εγείρει ανησυχίες. Λαμβάνοντας υπόψη την ημερήσια πρόσληψη αυτών των τροφίμων, ένα μεγάλο μέρος του κυπριακού πληθυσμού εκτίθεται σε COPs και αυτό θα μπορούσε να σχετίζεται με τη συχνότητα εμφάνισης της αθηροσκλήρωσης και άλλων προβλημάτων υγείας.

Συμπεράσματα

Το έργο αυτό αποτελεί την πρώτη εφαρμογή της τεχνικής UPLC-MS/MS στην ανάλυση των COPs στα τρόφιμα. Η καλή απόδοση της συγκεκριμένης αναλυτικής μεθοδολογίας μπορεί να στηριχθεί σε διάφορες πτυχές. Πρώτον, η χρήση του UPLC επέτρεψε τη χρωματογραφική ανάλυση σε 4.2 λεπτά ανά δείγμα, ενώ η χρήση της φασματομετρίας μάζας σε συνδυασμό με τριπλό τετραπολικό αναλυτή επέτρεψε την απόκτηση δύο μεταβάσεων MRM ανά ένωση με καλή ευαισθησία, παρέχοντας, με τη σειρά της, μια αξιόπιστη επιβεβαίωση των COPs που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα.

Η βελτιστοποιημένη μέθοδος κατέδειξε ικανοποιητικούς παραμέτρους επικύρωσης, συμπεριλαμβανομένου του εύρους γραμμικότητας, της ακρίβειας, των LOD και LOQ, και της ανάκτησης. Τέλος, η δυνατότητα εφαρμογής της μεθόδου επιβεβαιώθηκε με την ανάλυση διάφορων δειγμάτων τροφίμων. Ειδικότερα, η μελέτη αυτή

αντιπροσωπεύει την πρώτη αξιολόγηση της έκτασης της οξείδωσης της χοληστερόλης σε παραδοσιακά κυπριακά τρόφιμα. Σε όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν, προσδιορίστηκαν υψηλές συγκεντρώσεις COPs, με την 7-κέτο και 7-OH να βρίσκονται σε μεγαλύτερη αφθονία. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η συχνή κατανάλωση των προαναφερθέντων τροφίμων αποτελεί πηγή σημαντικών ποσοτήτων COPs στη διατροφή του τοπικού πληθυσμού της Κύπρου.

7. Συμπεράσματα και μελλοντική εργασία

Συμπεράσματα

Η εξέλιξη είναι μια λέξη που μπορεί εύστοχα να χαρακτηρίσει την παρούσα διδακτορική έρευνα. Η κάθε πτυχή της μελέτης έρχεται να συμπληρώσει την άλλη, παρέχοντας σε τελικό στάδιο μια ολοκληρωμένη εικόνα για την ανάλυση των COPs. Οι αδυναμίες του πρώτου μέρους έδωσαν την ευκαιρία για την πραγματοποίηση δυο νέων ερευνητικών εργασιών. Από τη μια επιτύχαμε τη βελτιστοποίηση της προετοιμασίας του δείγματος κι από την άλλη την ανάπτυξη μιας νέας και ταυτόχρονα βελτιωμένης χρωματογραφικής τεχνικής.

Μέσα από τη συγκριτική μελέτη των βιβλιογραφικών μεθόδων επεξεργασίας του δείγματος, επιτεύχθηκε η εύρεση του κατάλληλου πρωτοκόλλου που επέτρεπε την απομάκρυνση των προσμίξεων από τις εξεταζόμενες μήτρες και παρείχε ταυτόχρονα υψηλές τιμές ανάκτησης με τα ποσοστά να κυμαίνονται από 76-103 %. Συγκεκριμένα, η βέλτιστη μέθοδος περιελάμβανε την εξαγωγή των λιπιδίων με χρήση χλωροφορμίου/μεθανόλης (2:1, v/v), τη σαπωνοποίηση τους με διάλυμα KOH 1 M σε 60% υδατική αιθανόλη και τον περαιτέρω καθαρισμό με SPE σε στήλη NH₂.

Από χρωματογραφικής σκοπιάς, η εφαρμογή, για πρώτη φορά, της UPLC-MS/MS στην ανάλυση των COPs παρείχε τη δυνατότητα γρήγορης ανάλυσης και ανίχνευσης στα επιθυμητά επίπεδα συγκέντρωσης. Συγκεκριμένα, η εφαρμογή ενός προγράμματος βαθμιδωτής έκλουσης χρησιμοποιώντας υδατικό διάλυμα φορμικού οξέος 0.1% και μεθανόλης επέτρεψε το διαχωρισμό όλων των υπό μελέτη ενώσεων εντός 4.2 λεπτών. Η εξαιρετική ευαισθησία και εκλεκτικότητα που παρουσίασε η εφαρμογή του ανιχνευτή MS/MS (LOD σε πρότυπο δείγμα 0.05-0.08 μg/mL) έρχεται να επιβεβαιώσει την ανωτερότητα του έναντι στη χρήση ενός ανιχνευτή UV στην ανάλυση των COPs (LOD σε πρότυπο δείγμα 0.99-1.28 μg/mL).

Τέλος, η ύπαρξη των COPs στα κυπριακά τρόφιμα, έρχεται να επιβεβαιώσει την άποψη, ότι η πορεία προετοιμασίας των εν λόγω προϊόντων ευνοεί το σχηματισμό των εν λόγω ενώσεων. Με την 7-κέτο και τα 7-υδρόξυ παράγωγα να αποτελούν τα κυρίαρχα COPs σε υψηλές μάλιστα συγκεντρώσεις, υπογραμμίζεται ο κίνδυνος έκθεσης του κυπριακού πληθυσμού στις βλαβερές αυτές ουσίες. Το αλάτισμα, το οποίο αξιολογήθηκε ως πιθανός παράγοντας προώθησης της οξειδωσης, έδωσε θετικά

αποτελέσματα, ενώ η αντιοξειδωτική δράση του κρασιού εξαιτίας της παρουσίας των πολυφαινολικών ενώσεων, επιβεβαιώθηκε από τα χαμηλά επίπεδα συγκέντρωσης των COPs.

Μελλοντική εργασία

Η μελέτη των COPs αποτελεί αντικείμενο έρευνας τις τελευταίες δεκατίες, στοιχείο που δείχνει τη σημαντικότητά τους και την ανάγκη για ανάπτυξη νέων και καινοτόμων εργασιών είναι πολύ περιορισμένη. Ένα πλαίσιο, στο οποίο υπάρχουν προοπτικές μελέτης, είναι ο προσδιορισμός των επιπέδων των COPs στα τρόφιμα που υπόκεινται σε μαγείρεμα με διαφορετικούς τρόπους. Για παράδειγμα, ενδιαφέρουσα θα ήταν η διεξαγωγή μιας στατιστικής μελέτης σε σχέση με τα επίπεδα των COPs σε φαγητά που υπόκεινται σε ζέσταμα στο 'microwave' (recooked), μιας διαδικασίας που χρησιμοποιείται ευρέως και επί καθημερινής βάσεως στη χώρα μας.

Επιπλέον, η ύπαρξη COPs στα κυπριακά αλλαντικά δίνει την προοπτική για την πραγματοποίηση μιας μελέτης με βασικό στόχο τον προσδιορισμό των επιπέδων των COPs σε κάθε στάδιο της προετοιμασίας των αλλαντικών. Στο ωμό κρέας, μετά το αλάτισμά του, κατά τη διάρκεια του καπνίσματος και στο στάδιο της ωρίμανσης. Τα αποτελέσματα από μια τέτοια μελέτη θα δώσουν μια ξεκάθαρη κατεύθυνση για τους παράγοντες που ευνοούν το σχηματισμό των COPs στα εν λόγω προϊόντα.

Τέλος, από χρωματογραφικής πλευράς, οι δυνατότητες που διαθέτει η αναλυτική τεχνική UPLC-MS/MS επιτρέπουν την εφαρμογή της στην ανάλυση τροφίμων για προσδιορισμό οποιασδήποτε κατηγορίας ενώσεων. Ενδιαφέρον θα ήταν ο προσδιορισμός των πολυφαινολικών ενώσεων σε κυπριακά λάδια ή μέλι.

8. Βιβλιογραφία

- [1] Saldanha, T., Sawaya, F. H. C. A., Eberlin, N. M., Bragagnolo, N., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54, 4107-4113.
- [2] Razzazi-Fazeli, E., Kleineisen, S., Luf, W., *Journal of Chromatography A*, 2000, 896, 321-334.
- [3] Careri, M., Farretti, D., Manini, P., Musci, M., *Journal of Chromatography A*, 1998, 794, 253-262.
- [4] Schmarr, H. G., Gross, H. B., Shibamoto, T., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1996, 44, 512-517.
- [5] Georgiou C. A., Constantinou M. S., Kapnissi-Christodoulou C. P., *Food Chemistry*, 2014, 2013, 918-926.
- [6] Vicente S. J. V., Sampaio G. R., Ferrari C. K. B., Torres E. A. F. S., *Food Reviews International*, 2012, 28, 47-70.
- [7] Olkkonen V. M., Béaslas O., Nissilä E., *Biomolecules*, 2012, 2 76-103.
- [8] Lordan S., Mackrill J. J., O'Brien N. M., *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2009, 20, 321-336.
- [9] Otaegui-Arrazola A., Menendez-Carreño M., Ansorena D., Astiasarán I., *Food and Chemical Toxicology*, 2010, 48, 3289-3303.
- [10] Brown A. J., Jessup W., *Atherosclerosis*, 1999, 142, 1-28.
- [11] Leonarduzzi G., Sottero B., Poli G., *Journal of Nutritional Biochemistry* 2002, 13, 700-710.
- [12] Vicente S.J.V., Torres E.A.F.S., *Food Control*, 2007, 18, 63-68.
- [13] Sampaio G. R., Bastos D. H. M., Soares R. A. M., Queiroz Y. S., Torres E. A. F. S., *Food Chemistry*, 2006, 95, 344-351.
- [14] Yen T. Y., Inbaraj B. S., Chien J. T., Chen B. H., *Analytical Biochemistry*, 2010, 400, 130-138.
- [15] Chen, Y. C., Chien, J. T., Inbaraj, B. S., Chen, B. H., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60, 173-179.
- [16] Raith, K., Brenner, C., Farwanah, H., Müller, G., Eder, K., Neubert, R. H. H., *Journal of Chromatography A*, 2005, 1067, 207-211.
- [17] Sampaio, G. R., Bastos, D. H. M., Soares, R. A. M., Queiroz, Y. S., Torres, E. A. F. S. *Food Chemistry*, 2006, 95, 344-351.

- [18] Clariana, M., Díaz, I., Sárraga, C., García-Regueiro, J. *Food Analytical Methods*, 2011, 4, 465-474.
- [19] Soto-Rodriguez, I., Campillo-Velazquez, J. P., Ortega-Martinez, J., Rodriguez-Estrada, M. T., Lercker, G., Garcia, S.H. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2008, 21, 489-495.
- [20] Janoszka, B., *Meat Science*, 2010, 86, 976-984.
- [21] Rodriguez-Carpena J.-G., Morcuende D., Petróñ M. J., Estevez M., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60, 2224-2230.
- [22] Berne R. M., Levy M. N., *Αρχές Φυσιολογίας*, Τόμος 1, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 1-3.
- [23] Olsen, B. N., Schlesinger, P. H., Ory, D. S., Baker, N. A. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2012, 1818, 330-336.
- [24] Morrissey, P. A., Kiely, M.. Oxysterols: formation and biological function. In: Fox, P. F., & McSweeney, P. L. H. (Editors). *Advanced Dairy Chemistry Volume 2 Lipids*. Springer, 3rd Edition, 2006, 641-674.
- [25] Brown, A. J., Jessup, W. *Atherosclerosis*, 1999, 142, 1-28.
- [26] Lordan, S., Mackrill, J. J., O'Brien, N. M., *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2009, 20, 321-336.
- [27] Echarte, M., Ansorena, D., Astiasarán, I. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51, 5941-5945.
- [28] Calderón-Santiago, M., Peralbo-Molina, Á., Priego-Capote, F., Dolores Luque de Castro, M. *European Journal of Lipids Science and Technology*, 2012, 114, 687-694.
- [29] Gill, S., Chow, R., Brown, A. J., *Progress in Lipid Research*, 2008, 47, 391-404.
- [30] Tai C.Y., Chen Y.C., Chen B.H., *Journal of Food and Drug Analysis*, 1999, 7, 243-257.
- [31] Iuliano, L. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2011, 164, 457-468.
- [32] Ulberth, F., Rossler, D., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998, 46, 2634-2637.
- [33] Lozada-Castro, J. J., Gil-Diaz, M., Santos-Delgado, M. J., Rubio-Barroso, S., Polo-Diez, L.M., *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2011, 12, 519-525.
- [34] Manini, P., Andreoli, R., Careri, M., Elvirì, L., Musci, M., *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1998, 12, 883-889.

- [35] Cardenia, V., Rodriguez-Estrada, M. T., Baldacci, E., Savioli, S., Lercker, G., *Journal of Separation Science*, 2012, 35, 424-430.
- [36] Derewiaka, D., Obiedzinski, M., *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2010, 112, 1130-1137.
- [37] Christie, W. W., *Advances in Lipid Methodology*, 1993, 2, 195-213.
- [38] Reue, K., *Journal of Lipid Research*, 2011, 52, 1865-1868.
- [39] Guardiola, F., Dutta, P. C., Codony, R., Savage, G. P., 2002, *Cholesterol and Phytosterol Oxidation Products Analysis, Occurrence, and Biological Effects*. AOCS Press, (Chapter 3).
- [40] Farese, R. V., Walther, T. C., *Cell*, 2009, 139, 855-860.
- [41] Jensen, M. Ø., Mouritsen, O. G., *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004, 1666, 205-226.
- [42] Iverson, S. J., Lang, S. L. C., Cooper, M. H., *Lipids*, 2001, 36, 1283-1287.
- [43] Folch, J., Lees, M., Stanley, G.H.S., *Journal of Biological Chemistry*, 1957, 226, 497-509.
- [44] Hara, A., Radin, N.S., *Analytical Biochemistry*, 1978, 90, 420-426.
- [45] Busch, T. P., King A. J., *Journal of the American Oil Chemists Society*, 2010, 87, 955-962.
- [46] Park, W. T., Guardiola, F., Park, S. H., Addis, P. B., *Journal of the American Oil Chemists Society*, 1996, 73, 623-629.
- [47] Tai, C.-Y., Chen, Y. C., Chen, B. H., *Journal of Food and Drug Analysis*, 1999, 7, 243-257.
- [48] Ferioli, F., Caboni, M. F., Dutta P.C., *Meat Science*, 2008, 80, 681-685.
- [49] Baggio, S. R., Bragagnolo, N., *LWT*, 2006, 39, 513-520.
- [50] Baggio, S. R., Miguel, A. M. R., Bragagnolo, N., *Food Chemistry*, 2005, 89, 475-484.
- [51] Mazalli, M. R., Bragagnolo, N. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55, 2743-2748.
- [52] Saldanha, T., Benassi, M. T., Bragagnolo, N., *LWT*, 2008, 41, 1301-1309.
- [53] Mariutti L. R. B, Nogueira G. C., Bragagnolo N., *Journal of Food Science*, 2011, 76, 909-915.
- [54] Calderón-Santiago, M., Peralbo-Molina, Á., Priego-Capote, F., Dolores Luque de Castro, M. *European Journal of Lipids Science and Technology*, 2012, 114, 687-694.

- [55] Clariana, M., Díaz, I., Sárraga, C., García-Regueiro, J., *Food Analytical Methods*, 2011, 4, 465-474.
- [56] Vicente, S. J. V., Sampaio, G. R., Ferrari, C. K. B., Torres, E. A. F. S., *Food Reviews International*, 2012, 28, 47-70.
- [57] Skoog, D. A., *Fundamentals of analytical chemistry*, Thomson-Brooks/Cole 2004.
- [58] McMurry J., *Οργανική Χημεία. Τόμος Ι.*, 2005, 549-550.
- [59] Weston A., Brown P. R., *HPLC and CE Principles and Practice*
- [60] Kupiec T., *International Journal of Pharmaceutical Compounding*, 2004, 8, 223-227.
- [61] Kazakevich, Y., Lohratto, R. *HPLC for Pharmaceutical Scientists*, 2007, Wiley.
- [62] Ho W. F., Stuart B., Prichard R. E., *High Performance Liquid Chromatography*, 2003, Royal Society of Chemistry (Great Britain).
- [63] Snyder, L. R., Kiruland, J. J., Dolan, J.W., *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 2010, Wiley, 3rd Edition.
- [64] Novakova L., Matysova L., Solich P., *Talanta*, 2006, 68, 908–918.
- [65] Wren, A.C.S., Tchelitcheff, P., *Journal of Chromatography A*, 2006, 1119, 140-146.
- [66] Villiers A., Lestremau F., Szucs R., Gelebart S., David F., Sandra P., *Journal of Chromatography A*, 2006, 1127, 60–69
- [67] Grumbach E.S., Arsenault J. C., McCabe D. R., *Beginners Guide to UPLC*, 2009, Waters.
- [68] Banerjee S., Mazumdar S., *International Journal of Analytical Chemistry*, 2011, 2012, 1-40.
- [69] De Hoffmann E., *Journal of Mass Spectrometry*, 1996, 31,129-137.
- [70] Taverniers I., Loose M. D., Bockstaele E. V., *Trends in Analytical Chemistry*, 2004, 23, 535-552.
- [71] Guidance for Industry, Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology, 1996, ICH
- [72] Huber L., *Validation of analytical methods*, Agilent
- [73] Rose-Sallin, C., Huggett, A. C., Bosset, J. O. Tabacchi, R., Fay, L. B. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1995, 43, 935-941.
- [74] Georgiou, C. A., Kapnissi-Christodoulou, C. P., *Journal of Chromatographic Science*, 2013, 51, 286-291
- [75] Hur, S.J., Park, G.B., Joo, S.T., *Food Control*, 2007, 18, 939-947.

- [76] Boselli, E., Rodriguez-Estrada, M. T., Fedrizzi, G., Caboni, M. F., *Meat Science*, 2009, 81, 224-229.
- [77] [http://www.moa.gov.cy/moa/da/da.nsf/All/D48628FC3B414DA9C2257A21003A95B5/\\$file/PARADOSIAKA_ALLANTIKA.pdf?OpenElement](http://www.moa.gov.cy/moa/da/da.nsf/All/D48628FC3B414DA9C2257A21003A95B5/$file/PARADOSIAKA_ALLANTIKA.pdf?OpenElement)
- [78] Petron, J. M., Garcia-Regueiro, A. J., Martin, L., Muriel, E., Antequera, T., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51, 5786-5791.
- [79] Constantinou, M. S., Georgiou, C. A., Kapnissi-Christodoulou, C. P., *Food Analytical Methods*, 2014, 1-9.
- [80] Saldanha, T., Bragagnolo, N., *Lipids*, 2007, 42, 671-678.
- [81] Ubhayasekera, J. K. A. S., Jayasinghe, P., Ekanayake, S., Paresh, C. D. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2012, 114, 695-700.
- [82] Lee, H.-W., Chien, J.-T., Chen, B.-T., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006 54, 4873-4879.
- [83] Rossmann B., Thurner K., Luf W., *Monatsh. Chemistry.*, 2007, 138, 437-444.
- [84] Xu Y., Tian X., Ren C., Huang H., Zhang X., Gong X., Liu H., Yu Z., Zhang L., *Journal of Chromatography B*, 2012, 899, 14-20.
- [85] R. B. Cole (Ed.), 2nd ed., *Wiley and Sons*, Hoboken, US, 2010.
- [86] Chambers E., Wagrowski-Diehl D. M., Lu Z., Mazzeo J. R., *Journal of Chromatography B*, 2007, 852, 22-34.
- [87] Taylor P. J., *Clinical Biochemistry*, 2005, 38, 328-334.
- [88] Hajšlová J., Zrostlíková J., *Journal of Chromatography A*, 2003, 1000, 181-197.
- [89] Carpinteiro I., Ramil M., Rodríguez I., Cela R., *Journal of Chromatography A*, 2010, 1217, 7484-7492.
- [90] Flores M. I. A., Romero-González R., Frenich A. G., Vidal J. L. M., *Food Chemistry*, 2012, 134, 2465-2472.
- [91] Broncano, J. M., Petró, M. J., Parra, V. Timón, M. L., *Meat Science*, 2009, 83, 431-437.
- [92] Salih A. M., Price J. F., Smith D. M., Dawson L. E., *Journal of Food Quality*, 1989, 12, 71-83.