



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ ΜΕ ΧΡΗΣΗ
ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ ΤΡΙΧΟΕΙΔΟΥΣ ΚΑΙ
ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ
ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ**

ΕΙΡΗΝΗ Ν. ΝΙΚΟΛΑΟΥ

ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2011



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΕΙΡΗΝΗ Ν. ΝΙΚΟΛΑΟΥ

Εξεταστική Επιτροπή:

- 1) **Δρ. Ιωάννης Πασχαλίδης, Αναπληρωτής Καθηγητής (Πρόεδρος)**
- 2) **Δρ. Ευτυχία Πινακουλάκη, Λέκτορας (Εσωτερικό Μέλος)**
- 3) **Δρ. Κωνσταντίνα Καπνίση-Χριστοδούλου, Λέκτορας (Ερευνητική Σύμβουλος)**
- 4) **Δρ. Θεοδώρα Κρασιά-Χριστοφόρου, Επίκουρη Καθηγήτρια (Εξωτερικό Μέλος)**
- 5) **Δρ. Αδριανή Παππά Λουίζη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια (Εξωτερικό Μέλος)**

ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2011

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΔΗΛΩΣΗ

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή εκπονήθηκε από εμένα στο Ερευνητικό Εργαστήριο Ενόργανης Ανάλυσης του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κύπρου υπό την επίβλεψη της Δρ. Κωνσταντίνας Καπνίση-Χριστοδούλου (Σεπτέμβριος 2008-Δεκέμβριος 2011).

Η σύνθεση των πολυμερών τασιενεργών ουσιών έγινε από την ερευνητική ομάδα του Καθηγητή Isiah M. Warner στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου της Λουϊζιάνας.

Η χορήγηση των δειγμάτων αίματος έγινε από το Δρ. Σάββα Παπακώστα από το Ινστιτούτο Νευρολογίας και Γενετικής Κύπρου και επεξεργασία τους έγινε από εμένα.

Ημερομηνία

Υπογραφή

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής θα ήθελα να ευχαριστήσω κάποιους ανθρώπους που ήταν δίπλα μου, ο καθένας με το δικό του τρόπο, και με βοήθησαν στην πραγματοποίηση αυτού του μεγάλου στόχου.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου Δρ. Κωνσταντίνα Καπνίση-Χριστοδούλου, Λέκτορα του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κύπρου. Θα ήθελα να την ευχαριστήσω πρώτα απ' όλα γιατί πίστεψε σε μένα και μου προσέφερε τη δυνατότητα να πραγματοποιήσω τις μεταπτυχιακές μου σπουδές, αρχικά σε μεταπτυχιακό επίπεδο και στη συνέχεια με τη δική της ενθάρρυνση και υποστήριξη να συνεχίσω και σε διδακτορικό επίπεδο. Θέλω επίσης να την ευχαριστήσω για την καθοδήγηση της στην πραγματοποίηση της έρευνας αυτής, για τη συνεχή της ενθάρρυνση, την εμπιστοσύνη που έδειξε σε εμένα, αλλά και για την αμέριστη συμπαράσταση της σε ότι κι αν με απασχολούσε.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη της εσωτερικής εξεταστικής μου επιτροπής, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Δρ. Ιωάννη Πασχαλίδη και τη Λέκτορα Δρ. Ευτυχία Πινακουλάκη, του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κύπρου, για το χρόνο που αφιέρωσαν όλα τα αυτά τα χρόνια που συμμετείχαν στις επιτροπές αξιολόγησης της ερευνητικής μου διατριβής, αλλά και για τις πολύτιμες συμβουλές και υποδείξεις τους. Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια Δρ. Θεοδώρα Κρασιά-Χριστοφόρου του Τμήματος Μηχανικών Μηχανολογίας και Κατασκευαστικής του Πανεπιστημίου Κύπρου και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Δρ. Αδριανή Παππά Λουίζη, του Τμήματος Χημείας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης για την αποδοχή τους να συμμετάσχουν στην εξεταστική μου επιτροπή και για τις χρήσιμες υποδείξεις τους σχετικά με την επιμέλεια του τελικού κειμένου της διατριβής.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Πανεπιστήμιο Κύπρου και το Ίδρυμα Προώθησης Έρευνας για την οικονομική στήριξη που μου προσέφεραν κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους συμφοιτητές μου στο εργαστήριο Ενόργανης Ανάλυσης, τον Παύλο Αδάμου, την Άντια Πέτρου, το Χριστόφορο Χατζηστασή, τη Δέσπω Τσιουπή, το Γιάννη Σταύρου και τη Χριστιάνα Γεωργίου. Τους ευχαριστώ για την άψογη συνεργασία όλα αυτά τα χρόνια, για τη στήριξη τους και για όλες τις ωραίες στιγμές που μοιραστήκαμε.

Τις πιο πολλές ευχαριστίες χρωστάω στην οικογένεια μου. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στη μητέρα μου, Στάλω, για τις ηθικές αξίες που μου δίδαξε στη ζωή μου και που με έμαθε να χαμογελώ πάντα. Ευχαριστώ τον πατέρα μου, Νίκο, που πάντα πίστευε σε μένα και με στηρίζει σε ότι κι αν κάνω. Ευχαριστώ τα αδέλφια μου, Γιάννη και Κωνσταντίνο, που ξέρω ότι θα είναι για πάντα δίπλα μου σε ότι κι αν τους χρειαστώ. Ακόμα, ευχαριστώ τα ανιψάκια μου, Χρυσταλένη, Σταύρο, Όλγα και Κωνσταντίνο, για τις στιγμές χαράς και ανεμελιάς που ζω πάντα όταν είμαι μαζί τους.

Ευχαριστώ τις φίλες-αδελφές μου, Άννα, Μαρία και Έλενα, που είναι πάντα δίπλα μου, σε όλες τις φάσεις της ζωής μου και με στηρίζουν, με το δικό τους τρόπο, σε ότι κι αν κάνω.

Τελειώνοντας, ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στον αρραβωνιαστικό μου, Νίκο. Σε ευχαριστώ που είσαι πάντα δίπλα μου, κυριολεκτικά και μεταφορικά, όλα αυτά τα χρόνια, που με βοηθάς και με στηρίζεις πάντα.

Στους γονείς μου, Νίκο και Στάλω,
και στον αρραβωνιαστικό μου, Νίκο

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή διερευνάται η ικανότητα των ηλεκτροφορητικών τεχνικών να χρησιμοποιηθούν για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό συστατικών σε βιολογικά δείγματα και φυσικά προϊόντα. Τα πειράματα, στην κάθε περίπτωση, πραγματοποιήθηκαν σε τέσσερα στάδια. Αρχικά, μεταβλήθηκαν διάφορες πειραματικές συνθήκες για την εξαγωγή των βέλτιστων συνθηκών διαχωρισμού των υπό μελέτη ενώσεων σε πρότυπα διαλύματα και στη συνέχεια, έγινε αξιολόγηση της μεθόδου που αναπτύχθηκε. Ακολούθως, δοκιμάστηκαν διάφορες διαδικασίες για την απομόνωση των συστατικών από τα βιολογικά δείγματα ή τα φυσικά προϊόντα και προσδιορίστηκε η βέλτιστη διαδικασία. Τέλος, εφαρμόστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες και η βέλτιστη διαδικασία στα πραγματικά δείγματα για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των υπό μελέτη ενώσεων.

Η παρούσα εργασία χωρίζεται σε δύο βασικά μέρη. Το πρώτο μέρος αφορά τον προσδιορισμό των πολυφαινολικών ενώσεων με χρήση της τεχνικής ηλεκτροφόρησης τριχοειδούς (CE) με ανιχνευτή UV-Vis. Οι ουσίες αυτές συναντώνται σε ένα ευρύ φάσμα φυσικών προϊόντων και εμφανίζουν μεγάλο ενδιαφέρον λόγω των ευεργετικών τους επιπτώσεων στην ανθρώπινη υγεία. Σύμφωνα με τα πειραματικά δεδομένα, η πιο απλή μέθοδος CE, η ηλεκτροφόρηση ζώνης τριχοειδούς, αποδείχθηκε η καταλληλότερη μέθοδος για τον προσδιορισμό των πολυφαινολών. Επιπλέον, η μέθοδος που αναπτύχθηκε χαρακτηρίστηκε από πολύ καλή επαναληψιμότητα και γραμμικότητα, καθώς επίσης από χαμηλά όρια ανίχνευσης (LODs). Οι τιμές των LODs για τις οκτώ πολυφαινολικές ενώσεις κυμάνθηκαν μεταξύ 0.03 και 5.05 $\mu\text{g/mL}$.

Όταν η μέθοδος εφαρμόστηκε σε δείγματα κρασιού αποδείχθηκε ότι η πλειοψηφία των πολυφαινολών συναντάται στο κόκκινο κρασί παρά στο λευκό κρασί και ότι η συγκέντρωσή τους σε αυτά διαφέρει σημαντικά. Δοκιμάστηκαν και συγκρίθηκαν διάφορες διαδικασίες επεξεργασίας του κρασιού και βρέθηκε ότι η εκχύλιση υγρού με υγρό ήταν η βέλτιστη διαδικασία για την απομόνωση των πολυφαινολών από το κρασί, δίνοντας υψηλά ποσοστά ανάκτησης και πολύ καλή επαναληψιμότητα. Αξίζει εδώ να αναφερθεί ότι αυτή είναι η πρώτη φορά που πραγματοποιείται προσδιορισμός πολυφαινολικών ενώσεων σε κυπριακά κρασιά και ότι είναι η πρώτη φορά που γίνεται σύγκριση των διαδικασιών προετοιμασίας δείγματος με χρήση της τεχνικής CE.

Στο δεύτερο μέρος της μελέτης αυτής πραγματοποιήθηκε σύζευξη του συστήματος CE με φασματογράφο μάζας (MS) για τον προσδιορισμό της φαρμακευτικής ένωσης ριβαστιγμίνης. Η ριβαστιγμίνη αποτελεί μία από τις βασικότερες θεραπείες που χρησιμοποιούνται στην Κύπρο για τη νόσο του Alzheimer. Όπως φάνηκε από τα πειραματικά δεδομένα, ένας αριθμός παραμέτρων αποδείχθηκαν καθοριστικοί για τη λήψη υψηλής ευαισθησίας. Αυτοί οι παράμετροι περιλαμβάνουν τη σύσταση και το pH του ρυθμιστικού διαλύματος, τη σύσταση και το ρυθμό ροής του υγρού που χρησιμοποιείται στη σύζευξη CE-MS, γνωστό σαν sheath liquid, καθώς και μερικούς παράγοντες του θαλάμου ψεκασμού. Η μέθοδος που αναπτύχθηκε χαρακτηρίζεται από πολύ καλή επαναληψιμότητα, γραμμικότητα, σταθερότητα και πολύ ικανοποιητικά LODs. Το LOD για τη ριβαστιγμίνη ήταν 2.8 ng/mL και το όριο ποσοτικοποίησης 8.4 ng/mL.

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε εφαρμόστηκε στο πλάσμα για τον προσδιορισμό της ριβαστιγμίνης. Δοκιμάστηκαν διάφορες διαδικασίες επεξεργασίας σε δείγματα πλάσματος που είχαν αρχικά εμβολιαστεί με τη ριβαστιγμίνη και αποδείχθηκε, με βάση την ευαισθησία και τα ποσοστά ανάκτησης, ότι η εκχύλιση στερεάς φάσης με χρήση στήλης από C18 ήταν η βέλτιστη διαδικασία. Τέλος, έγινε κατορθωτός ο προσδιορισμός της ριβαστιγμίνης σε πλάσμα ασθενή, ο οποίος λαμβάνει θεραπεία με ριβαστιγμίνη μέσω διαδερμικού αυτοκόλλητου. Η συγκέντρωση της ριβαστιγμίνης που βρέθηκε στο πλάσμα δύο ώρες μετά την απελευθέρωση του φαρμάκου ήταν 14.6 ± 1.7 ng/mL. Να σημειωθεί ότι είναι η πρώτη φορά που γίνεται προσδιορισμός της ριβαστιγμίνης με την τεχνική CE-MS.

ABSTRACT

In the present PhD thesis, the ability of electrophoretic techniques to be used for the qualification and quantification of compounds in biological samples and natural products was investigated. The experiments, in each case, were performed in four steps. Several experimental conditions were initially varied in order to establish the optimum separation conditions of the analytes under study in standard solutions and then, the method that was developed was validated. After validation, several sample-preparation procedures for the extraction of the compounds from biological samples or natural products were investigated and the optimum procedure was determined. Finally, the optimum conditions and the optimum procedure were applied to real samples for the qualitative and quantitative determination of the analytes under study.

The present study is divided into two basic parts. The first part involves the determination of polyphenolic compounds using capillary electrophoresis (CE) with UV-Vis detector. These compounds exist in a variety of natural products and they attract a lot of interest due to their beneficial implication in human health. According to experimental data, the simplest CE method, capillary zone electrophoresis, proved to be the best method for the determination of polyphenolic compounds. In addition, the method that was developed was characterized by good precision and linearity and low limits of detection (LODs). The LOD values for the eight polyphenolic compounds ranged between 0.03 and 5.05 $\mu\text{g/mL}$.

When the method was applied to wine samples, it was established that red wines have higher levels of polyphenolic compounds than white wines and that the polyphenolic composition varies among different wines. Several sample preparation procedures were examined and compared, and it was found that liquid-liquid extraction was the optimum procedure for the isolation of polyphenols from wine, providing very good recovery values and excellent reproducibility. It should be mentioned that this is the first time that these components are identified in Cypriot wines and that this is the first time that different wine sample pre-treatment methods are compared using CE.

In the second part of this study, a direct coupling of the CE system with a mass spectrometer (MS) was performed for the determination of the pharmaceutical compound rivastigmine. Rivastigmine, is considered as one of the most important treatments that are clinically used for Alzheimer's disease. According to the experimental data, several electrophoretic and MS parameters proved to be essential for obtaining high sensitivity.

These parameters involved the composition and the pH of the buffer solution, the composition and the flow rate of the liquid used in the junction of CE and MS, known as sheath liquid, as well as some spray chamber parameters. Validation of the method demonstrated excellent precision, linearity, stability and very low LODs. The LOD for rivastigmine was found to be 2.8 ng/mL, while the limit of quantitation was 8.4 ng/mL.

The method that was developed was applied to human plasma for the determination of rivastigmine. Several sample preparation procedures were examined in blank plasma samples spiked with rivastigmine. SPE, using a C18-SPE, column proved to be the best procedure, in regard to sensitivity and recoveries. Finally, rivastigmine was determined in a plasma sample obtained from a patient following rivastigmine patch administration. The concentration of rivastigmine found in the plasma collected two hours post-application was 14.6 ± 1.7 ng/mL. To the best of our knowledge, this is the first time that rivastigmine is determined by use of CE-MS.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
Δήλωση αναφορικά με την πνευματική ιδιοκτησία του περιεχομένου της εργασίας και των πειραμάτων	<i>i</i>
Ευχαριστίες	<i>ii</i>
Περίληψη	<i>iv</i>
Abstract	<i>vi</i>
Περιεχόμενα	<i>viii</i>
Κατάλογος Σχημάτων	<i>xi</i>
Κατάλογος Πινάκων	<i>xvii</i>
Πίνακας Συντμήσεων και Συμβόλων	<i>xviii</i>
1. Εισαγωγή	1
2. Θεωρητικό υπόβαθρο-Βιβλιογραφική ανασκόπηση	5
2.1. Νόσος του Alzheimer	5
2.1.1. Παθολογία της νόσου AD	6
2.1.1.1. Αμυλοειδικές πλάκες	6
2.1.1.2. Νευροϊνιδικές αλλοιώσεις	8
2.1.1.3. Χολινεργική υπόθεση	8
2.1.1.4. Οξειδωτικό στρες	9
2.2. Παρεμποδιστές ακετυλοχολινεστεράσης	10
2.2.1. Θεραπευτικές στρατηγικές βασισμένες σε AChEIs	10
2.2.2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση μεθόδων προσδιορισμού AChEIs	12
2.3. Πολυφαινολικές ενώσεις	13
2.3.1. Πολυφαινόλες και κρασί	16
2.3.2. Πολυφαινόλες και Νόσος AD	18
2.3.3. Βιβλιογραφική ανασκόπηση μεθόδων προσδιορισμού πολυφαινολών	19
2.4. Οργανολογία Ηλεκτροφόρησης Τριχοειδούς	24
2.4.1. Ηλεκτροφόρηση	24
2.4.2. Αρχή του διαχωρισμού στη CE	25
2.4.3. Μέθοδοι CE	28
2.4.4. Οργανολογία	30
2.4.4.1. BGE	31
2.4.4.2. Τρόποι έγχυσης του δείγματος	31

2.4.4.3.	Μέθοδοι ανίχνευσης στη CE	32
2.4.4.3.1.	Ανιχνευτής UV-Vis	32
2.4.4.3.2.	Ανιχνευτής MS	34
2.4.4.3.2.1.	Διάταξη σύζευξης CE-MS	34
2.4.4.3.2.2.	Πηγή ιονισμού με ηλεκτροσπεκασμό	36
2.4.4.3.2.3.	Αναλυτής μάζας	38
3.	Πειραματικό μέρος	39
3.1.	Οργανολογία CE-UV και CE-MS	39
3.1.1.	Στήλη	40
3.1.2.	Ανιχνευτές	42
3.1.2.1.	Ανιχνευτής UV-Vis	42
3.1.2.2.	Ανιχνευτής MS	42
3.1.3.	Έγχυση του δείγματος	45
3.2.	Αντιδραστήρια	46
3.2.1.	Αντιδραστήρια για CE-UV ανάλυση των πολυφαινολικών ενώσεων	46
3.2.1.1.	Ρυθμιστικά διαλύματα	46
3.2.1.2.	Δείγματα αναλυτών	47
3.2.1.3.	Επεξεργασίες δειγμάτων κρασιού	48
3.2.2.	Αντιδραστήρια για CE-MS ανάλυση της ριβαστιγμίνης	49
3.2.2.1.	Ρυθμιστικά διαλύματα και sheath liquids	49
3.2.2.2.	Δείγματα αναλυτών	51
3.2.2.3.	Επεξεργασίες δειγμάτων πλάσματος	51
3.3.	Ανάλυση και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων	52
3.3.1.	Όρια ανίχνευσης	52
3.3.2.	Επαναληψιμότητα	54
3.3.3.	Διαχωριστική ικανότητα	55
4.	Αποτελέσματα και συζήτηση	56
4.1.	Προσδιορισμός πολυφαινολικών ενώσεων με χρήση της τεχνικής CE-UV	56
4.1.1.	Διαδικασία ταυτοποίησης των κορυφών	57
4.1.2.	Εύρεση της βέλτιστης μεθόδου CE	57
4.1.3.	Βελτιστοποίηση του CZE διαχωρισμού	64
4.1.3.1.	Επίδραση της θερμοκρασίας της στήλης	64
4.1.3.2.	Επίδραση της εφαρμοζόμενης τάσης	64

4.1.3.3.	Επίδραση του είδους και της συγκέντρωσης του BGE	67
4.1.3.4.	Επίδραση του pH του BGE	70
4.1.4.	Αξιολόγηση της μεθόδου CZE-UV	74
4.1.5.	Βελτιστοποίηση της διαδικασίας επεξεργασίας του κρασιού	76
4.2.	Προσδιορισμός του AChEI ριβαστιγμίνη με χρήση της τεχνικής CE-ESI-MS	85
4.2.1.	Εύρεση της βέλτιστης μεθόδου CE	85
4.2.2.	Μονοπάτι αποκωδόμησης της ριβαστιγμίνης	98
4.2.3.	Σύγκριση CZE-UV με CZE-ESI-MS	101
4.2.4.	Βελτιστοποίηση παραμέτρων του BGE	104
4.2.4.1.	Επίδραση της I.I. του BGE	104
4.2.4.2.	Επίδραση του pH του BGE	107
4.2.4.3.	Επίδραση της MeOH στο BGE	110
4.2.5.	Βελτιστοποίηση παραμέτρων του Sheath Liquid	112
4.2.5.1.	Σύσταση του sheath liquid	113
4.2.5.2.	Ποσοστό MeOH στο sheath liquid	115
4.2.5.3.	Ρυθμός ροής του sheath liquid	116
4.2.6.	Βελτιστοποίηση παραμέτρων του θαλάμου ψεκασμού	117
4.2.6.1.	Επίδραση του ρυθμού ροής του αερίου ξήρανσης	118
4.2.6.2.	Επίδραση της θερμοκρασίας του αερίου ξήρανσης	120
4.2.6.3.	Επίδραση της πίεσης του αερίου ψεκασμού	120
4.2.7.	Προσδιορισμός της ριβαστιγμίνης σε ανθρώπινο πλάσμα	122
4.2.8.	Αξιολόγηση της μεθόδου CE-MS	127
4.2.8.1.	Γραμμικότητα	127
4.2.8.2.	Επαναληψιμότητα	128
4.2.8.3.	Μελέτες σταθερότητας	129
4.2.8.4.	LOD και LOQ	129
5.	Συμπεράσματα	131
6.	Μελλοντική εργασία	135
7.	Βιβλιογραφία	136

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

	Σελ.
Σχήμα 2.1. Διεργασία του APP και συσσώρευση του Αβ.	7
Σχήμα 2.2. Σχηματικό διάγραμμα της ‘χολινεργικής υπόθεσης’.	9
Σχήμα 2.3. Μηχανισμός δράσης της ACh και της ριβαστιγμίνης στο ένζυμο της AChE.	11
Σχήμα 2.4. Μια απλοποιημένη κατηγοροποίηση των πολυφαινολικών ενώσεων και κάποιες αντιπροσωπευτικές δομές από κάθε κατηγορία.	14
Σχήμα 2.5. Βασική δομή των φλαβονοειδών.	15
Σχήμα 2.6. Η ολοκληρωμένη αναλυτική διαδικασία για τον προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων που βρίσκονται στα διάφορα τρόφιμα φυτικής προέλευσης.	21
Σχήμα 2.7. Αναπαράσταση της διπλοστιβάδας που σχηματίζεται στο τοίχωμα του τριχοειδή σωλήνα.	26
Σχήμα 2.8. Σχηματική αναπαράσταση της σειράς έκλουσης των αναλυτών λόγω της EOF.	28
Σχήμα 2.9. Προφίλ ροών (α) παρουσία της EOF, (β) σε ροές προκαλούμενες από αντλίες.	28
Σχήμα 2.10. Σχηματικό διάγραμμα του βασικού συστήματος CE.	31
Σχήμα 2.11. (α) Εμπορικά διαθέσιμη διάταξη τριπλού σωλήνα, (β) διάταξη τριπλού σωλήνα όπως προτάθηκε από τον Smith <i>et al.</i>	35
Σχήμα 2.12. Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας ηλεκτροψεκασμού.	38
Σχήμα 3.1. Σύστημα Agilent CE και τα βασικά μέρη από τα οποία αποτελείται.	39
Σχήμα 3.2. Κασέτα που χρησιμοποιείται (α) στο CE και στο (β) CE/MS.	40
Σχήμα 3.3. Σύστημα για το κόψιμο της στήλης.	41
Σχήμα 3.4. Σύστημα σύζευξης CE/MS.	41
Σχήμα 3.5. Τετραπολικό σύστημα Agilent MS.	43
Σχήμα 3.6. Δομές της ριβαστιγμίνης και της νεοστιγμίνης (I.S.).	44
Σχήμα 3.7. Δομές των μονομερών των τασιενεργών ουσιών που δοκιμάστηκαν: (α) SDS, (β) SUS, (γ) SUG και (δ) SUL.	47
Σχήμα 3.8. Δομές των μονομερών των ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν για την επικάλυψη της στήλης με τη μέθοδο OT-CEC: (α) PDADMAC και (β) PSS.	47
Σχήμα 3.9. Δομές των 8 πολυφαινολικών ενώσεων και ο αριθμός που	48

	αντιστοιχεί στην κάθε ένωση.	
Σχήμα 3.10.	SPE-στήλη Alltech Maxi-Clean Prevail.	50
Σχήμα 3.11.	Δομή του μονομερούς του διπεπτιδικού πολυμερούς τασιενεργών ουσιών poly-SULV.	51
Σχήμα 3.12.	Βασικές δομικές μονάδες του προσροφητικού υλικού της στήλης Oasis HLB.	52
Σχήμα 4.1.1.	Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν για το πρότυπο διάλυμα των 8 πολυφαινολών με χρήση των μεθόδων (α) CZE και (β) MEKC με χρήση 20 mM SDS. Συνθήκες: BGE 40 mM τετραβορικό νάτριο (pH 9), έγχυση με πίεση 30 mbar για 3 sec, εφαρμοσμένη τάση 25 kV, στήλη από τηγμένη πυριτία 64 cm, (αποτελεσματικό μήκος 55.5 cm) x 50 μm id, θερμοκρασία της στήλης 25 °C.	59
Σχήμα 4.1.2.	Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν για το πρότυπο διάλυμα των οκτώ πολυφαινολών με τη μέθοδο MEKC με χρήση των πολυμερών τασιενεργών ουσιών (α) 0.5 % poly-SUL και (β) 0.2 % w/v συμπολυμερές των poly-SUG και poly-SUS σε αναλογία 40:60. Υπόλοιπες συνθήκες: ίδιες με Σχήμα 4.1.1.	62
Σχήμα 4.1.3.	Ηλεκτροφερόγραμμα που λήφθηκαν για το πρότυπο διάλυμα των οκτώ πολυφαινολών με τη μέθοδο OT-CEC, με ένα στρώμα του κατιοντικού πολυμερούς PDADMAC και ένα στρώμα του ανιοντικού πολυμερούς PSS. Υπόλοιπες συνθήκες: ίδιες με Σχήμα 4.1.1.	63
Σχήμα 4.1.4.	Επίδραση της θερμοκρασίας της στήλης στο διαχωρισμό των οκτώ πολυφαινολών με τη μέθοδο CZE. Υπόλοιπες συνθήκες: ίδιες με Σχήμα 4.1.1.	66
Σχήμα 4.1.5.	Επίδραση της ιοντικής ισχύος του BGE στο διαχωρισμό των οκτώ πολυφαινολών με τη μέθοδο CZE. Συνθήκες διαχωρισμού: 10 mM φωσφορικό νάτριο, pH 9.6, υπόλοιπες συνθήκες: ίδιες με Σχήμα 4.1.1.	69
Σχήμα 4.1.6.	Επίδραση του pH του BGE στο διαχωρισμό των οκτώ πολυφαινολών με τη μέθοδο CZE. Συνθήκες διαχωρισμού: BGE: 50 mM τετραβορικού νάτριο, 10 mM φωσφορικό νάτριο, pH 9.6, υπόλοιπες συνθήκες: ίδιες με Σχήμα 4.1.1.	72
Σχήμα 4.1.7.	Ηλεκτροφερόγραμμα που λήφθηκε με χρήση της μεθόδου CZE κάτω από τις βέλτιστες συνθήκες για το διαχωρισμό των οκτώ πολυφαινολικών ενώσεων. BGE: 50 mM τετραβορικό νάτριο &	73

	10mM φωσφορικό νάτριο, pH 9.6, στήλη από τηγμένη πυρίτια 155.5 cm, 50 μm i.d, ανίχνευση στα 205 nm, θερμοκρασία 25 °C, εφαρμοζόμενη τάση 25 kV, έγχυση με πίεση 35 mbar για 5 sec.	
Σχήμα 4.1.8.	Καμπύλες βαθμονόμησης που κατασκευάστηκαν για τις οκτώ πολυφαινολικές ενώσεις κάτω από τις βέλτιστες συνθήκες.	75
Σχήμα 4.1.9.	Ηλεκτροφερόγραμμα που λήφθηκαν για τα δείγματα κρασιού με τις διαδικασίες Α και Β, οι οποίες δεν περιλάμβαναν εκχύλιση του κρασιού. Συνθήκες: ίδιες με Σχήμα 4.1.1.	79
Σχήμα 4.1.10.	Ηλεκτροφερόγραμμα που λήφθηκαν για τα δείγματα κρασιού με τις διαδικασίες Γ, Δ και Ε, στις οποίες δοκιμάστηκαν τρεις διαφορετικές διαδικασίες LLE. Συνθήκες: ίδιες με Σχήμα 4.1.1.	80
Σχήμα 4.1.11.	Ηλεκτροφερογράμμα που λήφθηκε για δείγμα κρασιού μετά από SPE. Συνθήκες: ίδιες με Σχήμα 4.1.1.	81
Σχήμα 4.1.12.	Ηλεκτροφερόγραμμα που λήφθηκε για λευκό κρασί μετά από την επεξεργασία Δ. Συνθήκες: ίδιες με Σχήμα 4.1.1.	82
Σχήμα 4.2.1.	Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν για τη νεοστιγμίνη με χρήση της μεθόδου MEKC με ανιχνευτή MS (α) στη SCAN-mode, (β) στη SIM-mode για m/z 223, με χρήση BGE 12.5 mM φωσφορικό νάτριο και 12.5 mM τετραβορικό νάτριο σε pH 10, παρουσία 20 mM SDS.	87
Σχήμα 4.2.2.	Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν για τη νεοστιγμίνη με χρήση της μεθόδου PF-MEKC με ανιχνευτή MS (α) στη SCAN-mode, (β) στη SIM-mode για m/z 223, με χρήση BGE: 12.5 mM φωσφορικό νάτριο και 12.5 mM τετραβορικό νάτριο σε pH 10, παρουσία 20 mM SDS μόνο κατά τη διαδικασία πλύσης της στήλης.	88
Σχήμα 4.2.3.	Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν για τη νεοστιγμίνη με χρήση της μεθόδου MEKC με ανιχνευτή MS (α) στη SCAN-mode, (β) στη SIM-mode για m/z 223, με χρήση BGE: φωσφορικό αμμώνιο 10 mM σε pH 7.5, παρουσία 20 mM SDS.	89
Σχήμα 4.2.4.	Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν για μείγμα ριβαστιγμίνης και νεοστιγμίνης με χρήση της μεθόδου MEKC με ανιχνευτή MS (α) στη SCAN-mode, (β) στη SIM-mode για m/z 223, (γ) στη SIM-mode για m/z 251 με χρήση σαν BGE οξικό αμμώνιο 10 mM σε pH 4, παρουσία συμπολυμερούς των poly-SUG και poly-SUS (20:80) συγκέντρωσης 0.25% w/v.	91
Σχήμα 4.2.5.	Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν για μείγμα ριβαστιγμίνης	92

- και νεοστιγμίνης με χρήση της μεθόδου MEKC με ανιχνευτή MS (α) στη SCAN-mode, (β) στη SIM-mode για m/z 223, (γ) στη SIM-mode για m/z 251 με χρήση BGE οξικό αμμώνιο 10 mM σε pH 9, παρουσία poly-SULV συγκέντρωσης 0.05% w/v.
- Σχήμα 4.2.6.** Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν για μείγμα ριβαστιγμίνης και νεοστιγμίνης με χρήση της μεθόδου MEKC με ανιχνευτή MS (α) στη SCAN-mode, (β) στη SIM-mode για m/z 223, (γ) στη SIM-mode για m/z 251 με χρήση BGE οξικό αμμώνιο 10 mM σε pH 9, παρουσία poly-SULV συγκέντρωσης 0.1% w/v. 93
- Σχήμα 4.2.7.** Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν για τη νεοστιγμίνη με χρήση της μεθόδου CZE με ανιχνευτή MS (α) στη SCAN-mode, (β) στη SIM-mode για m/z 223, με χρήση BGE: 12.5 mM φωσφορικό νάτριο και 12.5 mM βορικό νάτριο σε pH 10. 95
- Σχήμα 4.2.8.** Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν για μείγμα ριβαστιγμίνης και νεοστιγμίνης με χρήση της μεθόδου CZE με ανιχνευτή MS (α) στη SCAN-mode, (β) στη SIM-mode για m/z 223, (γ) στη SIM-mode για m/z 251 με χρήση BGE φωσφορικού αμμώνιο 10 mM σε pH 7.5. 96
- Σχήμα 4.2.9.** Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν για μείγμα ριβαστιγμίνης και νεοστιγμίνης με χρήση της μεθόδου CZE με ανιχνευτή MS (α) στη SCAN-mode, (β) στη SIM-mode για m/z 223, (γ) στη SIM-mode για m/z 251 με χρήση BGE οξικό αμμώνιο 10 mM σε pH 7.5. 97
- Σχήμα 4.2.10.** Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν για μείγμα ριβαστιγμίνης και νεοστιγμίνης με χρήση της μεθόδου OT-CEC με ανιχνευτή MS (α) στη SCAN-mode, (β) στη SIM-mode για m/z 223, (γ) στη SIM-mode για m/z 251 με χρήση BGE οξικό αμμώνιο 10 mM σε pH 7.5. Επικάλυψη της στήλης με ένα στρώμα PDADMAC (0.5% w/v) και ένα στρώμα poly-SUL (0.5% w/v). 99
- Σχήμα 4.2.11.** Προτεινόμενο μονοπάτι αποικοδόμησης του πρωτονιωμένου μορίου της ριβαστιγμίνης. 100
- Σχήμα 4.2.12.** Φάσμα ιόντων του πρωτονιωμένου ιόντος της ριβαστιγμίνης. 100
- Σχήμα 4.2.13.** Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν για το μείγμα της ριβαστιγμίνης (2) με το I.S. (1) (α) με ανιχνευτή UV, (β) με ανιχνευτή MS (SCAN-mode), (γ) SIM-mode για m/z 223 και (δ) για m/z 251. Συνθήκες: BGE 40 mM οξικό αμμώνιο (pH 9), έγχυση με πίεση 35 mbar για 5 sec, εφαρμοσμένη τάση 25 kV, 103

	στήλη από τηγμένη πυριτία 110 cm, (μήκος μέχρι τον ανιχνευτή UV 21.6 cm) x 50 m id, θερμοκρασία της στήλης 25 °C, sheath liquid 1 % οξικό αμμώνιο σε H ₂ O:MeOH (50:50 v/v) με ρυθμό ροής 10 µL/min, συγκέντρωση ριβαστιγμίνης και I.S. 0.3 mg/mL, αέριο ξήρανσης: 6 L/min, T= 200 °C, πίεση αερίου ψεκασμού 20 psi.	
Σχήμα 4.2.14.	Ηλεκτροφερογράμματα όπου φαίνεται η επίδραση της συγκέντρωσης του οξικού αμμωνίου στο BGE στο διαχωρισμό του I.S (1) και της ριβαστιγμίνης (2). Υπόλοιπες συνθήκες: ίδιες με Σχήμα 4.2.13.	106
Σχήμα 4.2.15.	Επίδραση της I.I. του BGE στο λόγο S/N για τη ριβαστιγμίνη.	107
Σχήμα 4.2.16.	Ηλεκτροφερογράμματα όπου φαίνεται η επίδραση του pH στο διαχωρισμό του I.S (1) και της ριβαστιγμίνης (2). Υπόλοιπες συνθήκες: ίδιες με Σχήμα 4.2.13.	108
Σχήμα 4.2.17.	Επίδραση του pH του BGE στο λόγο S/N για τη ριβαστιγμίνη.	110
Σχήμα 4.2.18.	Ηλεκτροφερογράμματα όπου φαίνεται η επίδραση του ποσοστού της MeOH στο BGE στο διαχωρισμό του I.S (1) και της ριβαστιγμίνης (2). Υπόλοιπες συνθήκες: ίδιες με Σχήμα 4.2.13.	111
Σχήμα 4.2.19.	Επίδραση του ποσοστού της MeOH στο BGE στο λόγο S/N για τη ριβαστιγμίνη.	112
Σχήμα 4.2.20.	Ηλεκτροφερογράμματα με χρήση (α) 1% οξικό οξύ, (β) 1% φορμικό οξύ και (γ) 5 mM οξικό αμμώνιο (H ₂ O:MeOH 50:50) σαν sheath liquid για το διαχωρισμό του I.S (1) και της ριβαστιγμίνης (2). Υπόλοιπες συνθήκες: ίδιες με Σχήμα 4.2.13.	114
Σχήμα 4.2.21.	Επίδραση της σύστασης του sheath liquid στο λόγο S/N για τη ριβαστιγμίνη.	115
Σχήμα 4.2.22.	Επίδραση του ποσοστού της MeOH στο sheath liquid (α) στην ένταση του σήματος και (β) στο λόγο S/N για τη ριβαστιγμίνη.	116
Σχήμα 4.2.23.	Επίδραση του ρυθμού ροής του sheath liquid (α) στο λόγο S/N και (β) στην ένταση του σήματος για τη ριβαστιγμίνη.	117
Σχήμα 4.2.24.	Επίδραση (α) του ρυθμού ροής, (β) της θερμοκρασίας του αερίου ξήρανσης και (γ) της πίεσης του αερίου ψεκασμού, στο λόγο S/N για τη ριβαστιγμίνη.	119
Σχήμα 4.2.25.	Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν για πλάσμα εμβολιασμένο με ριβαστιγμίνη και I.S. μετά από την εφαρμογή SPE με χρήση στήλης από C18 κάτω από τις βέλτιστες συνθήκες.	124
Σχήμα 4.2.26.	Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν για πλάσμα εμβολιασμένο	125

- με ριβαστιγμίνη και I.S. μετά από την εφαρμογή SPE με χρήση στήλης Oasis HLB κάτω από τις βέλτιστες συνθήκες.
- Σχήμα 4.2.27.** Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν για την ανάλυση πλάσματος ασθενή που λαμβάνει θεραπεία με ριβαστιγμίνη μέσω διαδερμικού αυτοκόλλητου, εμβολιασμένο I.S. μετά από την εφαρμογή SPE με χρήση στήλης από C18 κάτω από τις βέλτιστες συνθήκες. 126
- Σχήμα 4.2.28.** Καμπύλες βαθμονόμησης που κατασκευάστηκαν για τη ριβαστιγμίνη (**α**) με χρήση πρότυπων διαλυμάτων και (**β**) στο πλάσμα μετά από SPE με στήλη C18, κάτω από τις βέλτιστες συνθήκες. 128

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

	Σελ.
Πίνακας 2.1. Μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση πολυφαινολών στο κρασί.	23
Πίνακας 2.2. Βασικότερες μέθοδοι CE και η αρχή στην οποία βασίζεται ο διαχωρισμός.	29
Πίνακας 4.1.1. Μεταβολή της διαχωριστική ικανότητα και της αποδοτικότητας των κορυφών 2 και 3 στις διάφορες τιμές εφαρμοζόμενης τάσης. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Σχήμα 4.1.1.	65
Πίνακας 4.1.2. Βέλτιστες συνθήκες διαχωρισμού των οκτώ πολυφαινολικών ενώσεων.	73
Πίνακας 4.1.3. Εξισώσεις των καμπύλων βαθμονόμησης, οι συντελεστές συσχέτισης, οι τιμές RSD και τα LODs για τις οκτώ πολυφαινολικές ενώσεις.	74
Πίνακας 4.1.4. Ποσοτικός προσδιορισμός φλαβονοειδών σε τρία κόκκινα κυπριακά κρασιά (mg/L).	83
Πίνακας 4.2.1. Τιμές για τη διαχωριστική ικανότητα και την αποδοτικότητα των κορυφών της νεοστιγμίνης και της ριβαστιγμίνης στις διάφορες συγκεντρώσεις BGE.	105
Πίνακας 4.2.2. Αποδοτικότητα των κορυφών της ριβαστιγμίνης και του I.S. στις διάφορες τιμές pH.	109
Πίνακας 4.2.3. Επίδραση της πίεσης του αερίου ψεκασμού στην αποδοτικότητα των κορυφών της νεοστιγμίνης και της ριβαστιγμίνης.	121
Πίνακας 4.2.4. Τιμές της σχετικής τυπικής απόκλισης των χρόνων μετανάστευσης και των εμβαδών της κορυφής της ριβαστιγμίνης σε πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις, με και χωρίς τη χρήση I.S.	129

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ ΚΑΙ ΣΥΜΒΟΛΩΝ

Aβ	Beta Amyloid, βήτα αμυλοειδές
ACh	Acetylcholine, ακετυλοχολίνη
AChE	Acetylcholinesterase, ακετυλοχολινεστεράση
AChEI	Acetylcholinesterase Inhibitor, παρεμποδιστής ακετυλοχολινεστεράση
AD	Alzheimer's Disease, Νόσος του Alzheimer
ACN	ακετονιτρίλιο
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization, χημικός ιονισμός υπό ατμοσφαιρική πίεση
APP	Amyloid Precursor Protein, πρόδρομος πρωτεΐνη αμυλοειδούς
BGE	Background Electrolyte, ηλεκτρολύτης μέσου
CAD	Coronary Artery Disease, παθήσεις της στεφανιαίας αρτηρίας
CE	Capillary Electrophoresis, ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς
CGE	Capillary Gel Electrophoresis, ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς πηκτής
ChAT	Choline acetyltransferase, χολινική ακετυλοτρανσφεράση
CIEF	Capillary Isoelectric Focusing, ισοηλεκτρική εστίαση τριχοειδούς
CITP	Capillary Isotachopheresis, ισοταχυφόρηση τριχοειδούς
CMC	Critical Micelle Concentration, κρίσιμη μικυλλική συγκέντρωση
CZE	Capillary Zone Electrophoresis, ηλεκτροφόρηση ζώνης τριχοειδούς
EO-FAD	Early-Onset Familial Alzheimer Disease
EOF	Electroosmotic Flow, ηλεκτροωσμωτική ροή
ESI	Electrospray Ionization, ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό
EtOH	Ethanol, αιθανόλη
GC	Gas Chromatography, αέρια χρωματογραφία
HLB	Hydrophilic-Lipophilic-Balanced
HPLC	High Performance Liquid Chromatography, υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
I.D.	Internal Diameter, εσωτερική διάμετρος
I.I.	Ιοντική ισχύς
I.S.	Internal Standard, εσωτερικό πρότυπο
isoprOH	Isopropanol, ισοπροπανόλη
LLE	Liquid-Liquid Extraction, εκχύλιση υγρού με υγρό
LO-AD	Late-Onset AD
LOD	Limit of Detection, όριο ανίχνευσης

LOQ	Limit of Quantification, όριο ποσοτικοποίησης
PF	Partial Filling
MEKC	Micellar Electrokinetic Chromatography, μικυλλιακή ηλεκτροκινητική χρωματογραφία τριχοειδούς
MeOH	Methanol, Μεθανόλη
MS	Mass Spectrometer, φασματογράφος μάζας
NFTs	Neurofibrillary Tangles, νευροϊνιδικές αλλοιώσεις
OT-CEC	Open Tubular Capillary Electrochromatography, Ηλεκτροχρωματογραφία τριχοειδούς ανοικτού σωλήνα
PDADMAC	poly (diallyldimethylammonium chloride), πολυ (διαλλυλδιμεθυλ αμμωνιακό χλωρίδιο
PEM-coating	Polyelectrolyte Multilayer, επικάλυψη πολλαπλών στρωμάτων πολυηλεκτρολυτών
PF	Partial Filling, μερικό γέμισμα
PHF	Paired Helical Filaments, ζευγαρωμένα ελικοειδή ινίδια
poly-SUG	poly (sodium undecyl glycine), πολυ (ενδέκυλο γλυκινικό νάτριο)
poly-SUL	poly (sodium <i>N</i> -undecyl-leucine), πολυ (λευκινικός <i>N</i> -εντεκυλεστέρας νατρίου)
poly-SULV	poly (sodium <i>N</i> -undecyl valine - leucine), πολυ (λευκινικός - βαλινικός <i>N</i> -εντεκυλεστέρας νατρίου)
poly-SUS	poly (sodium 10-undecylenic sulfat), πόλυ (θεικό-10-εντεκυλικό νάτριο)
PS1	Presenilin 1, προσενιλίνης 1
PS2	Presenilin 2, προσενιλίνης 2
PSS	poly (styrene sulfonate), πολύ (σουλφονικό στυρένιο)
RSD	Relative Standard Deviation, σχετική τυπική απόκλιση
S/N	Signal to Noise, σήμα ως προς θόρυβο
SD	Standard Deviation, τυπική απόκλιση
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate, Δωδέκυλο-θεικό νάτριο
SIM-mode	Selected Ion Monitoring mode
SPE	Solid Phase Extraction, εκχύλιση στερεάς φάσης
SPs	Senile Plaques, σελινικές ή αμυλοειδικές πλάκες
UV-Vis	Ultraviolet-Visible, υπεριώδες-ορατό

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ανάπτυξη μεθόδων διαχωρισμού είναι ιδιαίτερα σημαντική τόσο στη φαρμακευτική βιομηχανία όσο και στην ανάλυση τροφίμων, ενώ υπάρχει μία συνεχώς αυξανόμενη ζήτηση από τους επιστήμονες για καλύτερες μεθόδους για το χαρακτηρισμό πολύπλοκων μιγμάτων. Η σημαντικότητα της ανάπτυξης μεθόδων διαχωρισμού αποδεικνύεται από τα 12 βραβεία Nobel που δόθηκαν από το 1937 έως το 1972 σε επιστήμονες, των οποίων η έρευνα βασίστηκε σε μεγάλο βαθμό σε χρωματογραφικές μεθόδους. Επίσης, βραβείο Nobel δόθηκε στο Σουηδό χημικό Arne Tiselius για την ανακάλυψη της τεχνικής της ηλεκτροφόρησης. Καθώς τα βιολογικά δείγματα και τα διάφορα φυτικά τρόφιμα αποτελούνται από πολλά συστατικά, ο διαχωρισμός των αναλυτών που μας ενδιαφέρουν από τα υπόλοιπα συστατικά του δείγματος είναι υψίστης σημασίας. Οι χρωματογραφικές και ηλεκτροφορητικές μέθοδοι είναι οι κύριες τεχνικές που χρησιμοποιούνται για ποιοτική και ποσοτική ανάλυση φαρμάκων και τροφίμων.

Οι νέες αναλυτικές τεχνικές που αναπτύσσονται πρέπει να επιλύουν έναν μεγάλο αριθμό προβλημάτων στην επιστήμη των τροφίμων παρέχοντας πληροφορίες για την επεξεργασία, τον έλεγχο ποιότητας και τη χημική σύσταση των τροφίμων αλλά και να εξασφαλίζουν τη συμμόρφωση με τους νόμους περί τροφίμων, τη νόθευση και τη μόλυνση των τροφίμων.^[1] Επιπλέον, το αυξανόμενο ενδιαφέρον του κοινού σχετικά με το τι υπάρχει στα τρόφιμα και την ασφάλεια των τροφίμων που καταναλώνει, έχει φέρει στο προσκήνιο την απαίτηση για ανάπτυξη νέων αναλυτικών τεχνικών ικανών να αντιμετωπίσουν τις νέες προκλήσεις. Καθώς τα τρόφιμα είναι πολύπλοκα μείγματα μεγάλης ποικιλίας μορίων, η ανάλυσή τους είναι ένα θέμα που απαιτεί την ανάπτυξη αποτελεσματικών, γρήγορων, ευαίσθητων και οικονομικών μεθοδολογιών.

Ένας μεγάλος αριθμός μελετών για την ανάλυση τροφίμων εστιάζεται στις πολυφαινολικές ενώσεις λόγω των ευεργετικών τους ιδιοτήτων στην ανθρώπινη υγεία, όπως οι αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, οι αντισταμινικές και οι αντικαρκινικές τους ιδιότητες, καθώς επίσης και η ικανότητα τους να απομακρύνουν τις ελεύθερες ρίζες από τον οργανισμό.^[1] Υπάρχουν πολλά στοιχεία που προτείνουν ότι πολλές ασθένειες, όπως καρδιακές παθήσεις, καρκίνος, εξασθένηση του ανοσοποιητικού συστήματος και δυσλειτουργίες του εγκεφάλου είναι αποτέλεσμα καταστροφής των κυττάρων από τις ελεύθερες ρίζες. Τα αντιοξειδωτικά αυτά στη διατροφή μας μπορεί να παίξουν σημαντικό ρόλο στην πρόληψη αυτών των ασθενειών. Το γεγονός αυτό έχει προκαλέσει το ενδιαφέρον του κοινού για τα φυσικά αντιοξειδωτικά και έχει οδηγήσει σε μία εκτεταμένη

έρευνα για αποτελεσματικά αντιοξειδωτικά στη φύση και ιδιαίτερα για αυτά που βρίσκονται σε αφθονία στην ανθρώπινη διατροφή. Οι μεθοδολογίες που αναπτύσσονται μπορούν να δώσουν πολύ σημαντικές πληροφορίες για τη σύσταση των υπό μελέτη δειγμάτων.^[2] Έχοντας λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τις πολυφαινολικές ενώσεις που βρίσκονται στα εκχυλίσματα που προέρχονται από φυτικά τρόφιμα προσδίδεται η ικανότητα καλύτερης κατανόησης των ιδιοτήτων του εκχυλίσματος αυτού. Αξιοπίστα δεδομένα για τη θρεπτική σύσταση των τροφίμων που καταναλώνονται από τους ανθρώπους είναι χρήσιμα σε πολλές περιοχές, όπως στην εκτίμηση της κατάστασης της υγείας, στη δημιουργία κατάλληλων θεραπευτικών διαιτών, στη διατροφική εκπαίδευση, σε επιδημιολογικές έρευνες για τη συσχέτιση μεταξύ διατροφής και ασθενειών και σε πολλά άλλα.

Ανάμεσα στις κλασικές αναλυτικές τεχνικές διαχωρισμού που έχουν χρησιμοποιηθεί στην ανάλυση τροφίμων, όπως για παράδειγμα η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) και η αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC), η ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς (Capillary Electrophoresis, CE) έχει εδραιωθεί σαν ένα χρήσιμο εργαλείο που παρέχει γρήγορους, αποτελεσματικούς και αυτοματοποιημένους διαχωρισμούς με μικρούς όγκους δείγματος και μικρή κατανάλωση διαλυτών.^[3]

Ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της CE είναι η ικανότητα σύζευξης της με διάφορους ανιχνευτές, μεταξύ των οποίων και ο φασματογράφος μάζας (Mass Spectrometer, MS). Ο ανιχνευτής MS έχει τη μοναδική ικανότητα να προσδιορίζει τους αναλύτες με βάση το μοριακό τους βάρος, γεγονός που οδηγεί σε σημαντική αύξηση της ευαισθησίας. Έτσι, η χρήση της συζευγμένης τεχνικής CE-MS αποτελεί ένα ισχυρό αναλυτικό εργαλείο, ιδιαίτερα για την ανάλυση φαρμάκων, αφού συνδυάζει την υψηλή αποδοτικότητα και ικανότητα διαχωρισμού της CE με την υψηλή ικανότητα ταυτοποίησης και την εκλεκτικότητα του MS. Ο προσδιορισμός φαρμάκων και των μεταβολιτών τους ή των προϊόντων αποικοδόμησης σε βιολογικά δείγματα για κλινική ανάλυση και για φαρμακοκινητικές και δικανικές μελέτες, απαιτεί τη χρήση μεθόδων διαχωρισμού και ανίχνευσης που είναι αποτελεσματικές, ευαίσθητες και εκλεκτικές.^[4] Επιπλέον, η τεχνική CE-MS υπερτερεί σε σχέση με την HPLC-MS, όταν είναι διαθέσιμες μόνο περιορισμένες ποσότητες βιολογικών δειγμάτων για την ανάλυση φαρμάκων και μεταβολιτών.

Οι παρεμποδιστές ακετυλοχολινεστεράσης (Acetyl Cholinesterase Inhibitors, AChEIs) αποτελούν τη βασικότερη κατηγορία φαρμάκων που χρησιμοποιούνται για την

επιβράδυνση της νόσου του Alzheimer (Alzheimer's Disease, AD). Οι επιπτώσεις της νόσου AD είναι καταστροφικές όχι μόνο για τους ασθενείς που πάσχουν από τη νόσο, αλλά και για ολόκληρη την κοινωνία. Για το λόγο αυτό, υπάρχει μία συνεχής έρευνα για την ανάπτυξη νέων τεχνικών διάγνωσης και νέων φαρμακευτικών ουσιών που να μπορούν να μειώσουν την εξέλιξη της νόσου. Η ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων για τον προσδιορισμό των ενώσεων αυτών μπορεί να αυξήσει τη γνώση γύρω από τις ουσίες αυτές, ενώ η εφαρμογή των μεθόδων αυτών σε βιολογικά δείγματα μπορεί να είναι χρήσιμη σε τοξικολογικές και κλινικές αναλύσεις.

Ο πρώτος στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής (ΔΔ) είναι ο διαχωρισμός οκτώ πολυφαινολικών ενώσεων με χρήση της μεθόδου CE με ανιχνευτή υπεριώδους ορατού (Ultraviolet-visible, UV-vis). Οι ουσίες αυτές είναι από τις πιο σημαντικές πολυφαινολικές ενώσεις που συναντούνται στο κρασί. Η μέθοδος που αναπτύσσεται αξιολογείται με τα κριτήρια της επαναληψιμότητας, της γραμμικότητας και ορίου ανίχνευσης. Στη συνέχεια, η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται σε διάφορα κυπριακά κρασιά για ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των συστατικών αυτών. Καθώς πριν από την εισαγωγή του κρασιού στο σύστημα CE απαιτείται μία διαδικασία επεξεργασίας του κρασιού, δοκιμάζονται και συγκρίνονται διάφορες διαδικασίες επεξεργασίας του κρασιού για εύρεση της βέλτιστης διαδικασίας.

Η πρωτοτυπία του πρώτου μέρους της παρούσας έρευνας έγκειται στο γεγονός ότι είναι η πρώτη φορά που γίνεται σύγκριση διαφόρων τεχνικών επεξεργασίας του κρασιού και στη συνέχεια ανάλυση του με χρήση της τεχνικής CE. Ακόμα, αν και στη βιβλιογραφία υπάρχουν πολλές μελέτες για τον προσδιορισμό πολυφαινολικών ενώσεων σε διάφορα φυσικά προϊόντα, είναι η πρώτη φορά που γίνεται προσδιορισμός των συγκεκριμένων ενώσεων σε κυπριακά κρασιά.

Ο δεύτερος στόχος της παρούσας ΔΔ είναι η ανάπτυξη μίας μεθόδου CE-MS για τον προσδιορισμό της φαρμακευτικής ένωσης ριβαστιγμίνης, η οποία αποτελεί έναν AChEI και χρησιμοποιείται κλινικά για τη θεραπεία της νόσου AD. Στα πλαίσια της έρευνας διατριβής μαστερ που ολοκληρώθηκε τον Ιούνιο του 2008, έχει ήδη αναπτυχθεί μία μέθοδος CE με ανιχνευτή UV-vis για τον προσδιορισμό της συγκεκριμένης ένωσης, ωστόσο τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου δεν ήταν ικανοποιητικά. Η σύζευξη του συστήματος CE με έναν πιο ευαίσθητο ανιχνευτή, όπως είναι ο ανιχνευτής MS, μπορεί να βελτιώσει τα όρια ανίχνευσης και να βοηθήσει ώστε η μέθοδος που αναπτύσσεται να μπορεί να εφαρμοστεί σε βιολογικά δείγματα για ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό της

ριβαστιγμίνης σε αυτά. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση της μεθόδου και ακολούθως η μέθοδος εφαρμόστηκε σε δείγμα πλάσματος, το οποίο λήφθηκε από ασθενή, ο οποίος λαμβάνει θεραπεία με το συγκεκριμένο φάρμακο. Πριν από την εισαγωγή του πλάσματος στο σύστημα CE-MS βρέθηκε η βέλτιστη διαδικασία επεξεργασίας του πλάσματος.

Η πρωτοτυπία της παρούσας έρευνας έγκειται στο γεγονός ότι μέχρι σήμερα, δεν αναφέρεται καθόλου στη βιβλιογραφία η χρήση της συζευγμένης τεχνικής CE-MS για τον προσδιορισμό της φαρμακευτικής ένωσης ριβαστιγμίνης. Η ανάπτυξη μίας τέτοιας μεθόδου εμφανίζει σαφή πλεονεκτήματα σε σχέση με τις υπάρχουσες μεθόδους της βιβλιογραφίας με βασικότερο πλεονέκτημα τη μικρή κατανάλωση δείγματος και διαλυτών. Ενδεικτικά θα πρέπει να αναφερθεί ότι ενώ στην περίπτωση της HPLC ένας συνηθισμένος ρυθμός ροής της κινητής φάσης είναι 1 mL/min, στην περίπτωση της CE, 1 mL κινητής φάσης είναι αρκετό για πολλές ώρες ανάλυσης. Ακόμα, ο όγκος έγχυσης του δείγματος στην HPLC είναι της τάξης των μL , ενώ στην περίπτωση της CE είναι τρεις τάξεις μεγέθους μικρότερος (nL). Έτσι, το κόστος της ανάλυσης στην περίπτωση της CE είναι σημαντικά πιο χαμηλό. Επίσης, η μέθοδος που αναπτύσσεται θα μειώσει στο ελάχιστο την απαιτούμενη ποσότητα πλάσματος για την ανάλυση. Το τελευταίο είναι πολύ σημαντικό αφού συνήθως η ποσότητα αίματος που μπορεί να ληφθεί από έναν ηλικιωμένο ασθενή, ο οποίος πάσχει από τη νόσο AD, είναι πολύ μικρή. Τέλος, γίνονται προσπάθειες ώστε η μέθοδος επεξεργασίας του πλάσματος που αναπτύσσεται να είναι απλή, γρήγορη και ευαίσθητη, και επιπλέον να μην απαιτείται η χρήση μεγάλων ποσοτήτων επιβλαβών, για τον άνθρωπο και το περιβάλλον, οργανικών διαλυτών.

2. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ-ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

2.1. Νόσος του Alzheimer

Στις αρχές του 1900, ο μέσος όρος ζωής του ανθρώπου ήταν γύρω στα 40 χρόνια.^[5] Όμως, η έλευση νέων τεχνολογιών και η ανάπτυξη της επιστήμης και των φαρμάκων έχουν οδηγήσει σε μεγάλη βελτίωση της ποιότητας ζωής, ιδιαίτερα στις ανεπτυγμένες χώρες, με αποτέλεσμα ο μέσος όρος ζωής σήμερα να έχει αυξηθεί στα 80 χρόνια. Ο Δρ. Grey από το πανεπιστήμιο του Cambridge σε μία ομιλία του σε ένα συνέδριο που πραγματοποιήθηκε στην Αγγλία το 2006 ανέφερε ότι ο μέσος όρος ζωής μέσα στα επόμενα 60 χρόνια αναμένεται να αυξηθεί στα 120 χρόνια, προκαλώντας δραματική αύξηση του ηλικιωμένου πληθυσμού στο μέλλον. Αυτό όμως θα έχει επίσης σαν αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού του πληθυσμού που πάσχει από γεροντικές παθήσεις, συμπεριλαμβανομένου νευροεκφυλιστικών παθήσεων. Ο όρος νευροεκφυλιστικές παθήσεις αναφέρεται σε μία ομάδα παθολογικών καταστάσεων που προκαλούνται από χρόνια κατάρρευση και προοδευτική, λειτουργική και δομική, απώλεια των νευρώνων, ιδιαίτερα στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Η συσσώρευση πρωτεϊνών στους νευρώνες έχει εμπλακεί σε αυτόν τον τύπο ασθενειών και η εξέλιξη τους προκαλείται από τον εκφυλισμό των νευρώνων. Η νόσος AD αποτελεί την πιο γνωστή νόσο που ακολουθεί τη διαδικασία αυτή και χαρακτηρίζεται από το θάνατο των νευρικών κυττάρων στον εγκεφαλικό φλοιό.

Η νόσος AD αποτελεί μία ανίατη, νευροεκφυλιστική νόσο, η οποία περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1906 από το Γερμανό ψυχίατρο και νευροπαθολόγο Alois Alzheimer.^[6] Σήμερα, η νόσος AD προσβάλλει έναν στους τρεις ανθρώπους άνω των 85 ετών. Το 2000 υπολογίστηκε ότι 25 εκατομμύρια άνθρωποι παγκοσμίως έπασχαν από τη νόσο, το 2006 ο αριθμός ανέβηκε στα 26.6 εκατομμύρια, ενώ όπως υπολογίζεται, μέχρι το 2050, 114 εκατομμύρια άνθρωποι θα πάσχουν από τη νόσο και αυτό θα αντιστοιχεί σε έναν στους 85 ανθρώπους.^[7] Στην Κύπρο υπολογίζεται ότι 5% των ατόμων ηλικίας 65 χρόνων και άνω έχουν άνοια τύπου Alzheimer. Αυτό σημαίνει ότι 5.000 ηλικιωμένοι συνάνθρωποί μας έχουν συμπτωματολογία της νόσου σε κάποιο μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό.

Από οικονομικής άποψης, η νόσος AD αποτελεί ένα βασικό πρόβλημα υγείας που αφορά όλον τον πληθυσμό. Χαρακτηριστικά, να αναφερθεί ότι το ετήσιο κόστος στις ΗΠΑ για τη φροντίδα των ασθενών με τη νόσο AD στις αρχές της δεκαετίας του 1990 ήταν \$110 δισεκατομμύρια και ο μέσος όρος για τον κάθε ασθενή ήταν περίπου \$45.000.^[8] Στην Κύπρο, το ετήσιο κόστος για την ιατρική κάλυψη των ασθενών που πάσχουν από τη νόσο AD είναι περίπου 700.000 ευρώ. Με την αναλογία των ηλικιωμένων ως προς το συνολικό

πληθυσμό να ανεβαίνει, η επιβάρυνση λόγω της ασθένειας, τόσο για τους ανθρώπους που φροντίζουν τους ασθενείς όσο και για τις εθνικές οικονομίες, αναμένεται να γίνει κατά πολύ μεγαλύτερη τις επόμενες δύο με τρεις δεκαετίες.^[9]

Στα πρώτα στάδια της νόσου παρατηρείται εξασθένηση στις γνωστικές λειτουργίες, ιδιαίτερα της βραχυπρόθεσμης μνήμης.^[5] Καθώς η ασθένεια προχωρά, οι ασθενείς παραπονιούνται για προβλήματα στο διάβασμα, στην ομιλία και στη λογική σκέψη, ενώ επηρεάζεται επίσης η μακροπρόθεσμη μνήμη. Στα τελικά στάδια της νόσου, παρατηρείται στους ασθενείς πρόβλημα στη γλώσσα, κατάθλιψη, επιθετικότητα, ταραχή και ψύχωση. Καθώς η νόσος προχωρά ακόμα περισσότερο, οι ασθενείς τελικά χρειάζονται πλήρη φροντίδα από τους άλλους. Η μέση διάρκεια μεταξύ της εμφάνισης των κλινικών συμπτωμάτων και του θανάτου του ασθενή είναι περίπου 8.5 χρόνια.^[9]

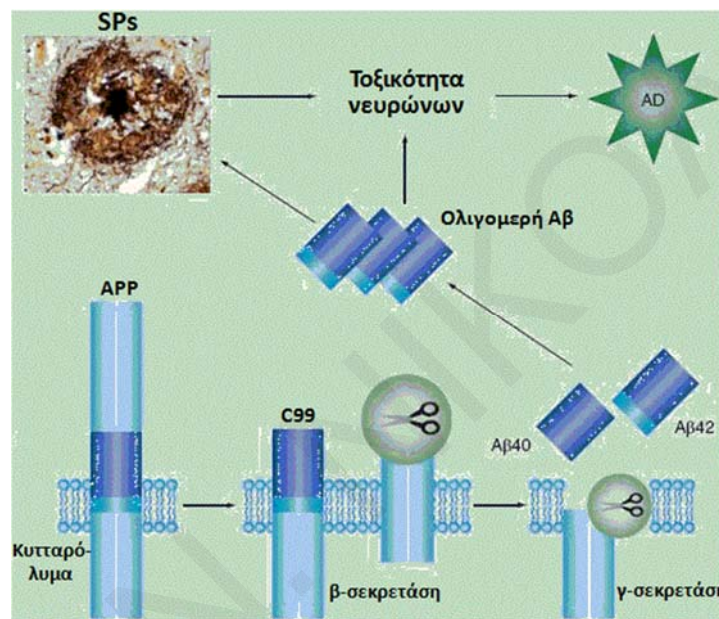
2.1.1. Παθολογία της νόσου AD

Τα κλινικά συμπτώματα που περιγράφηκαν πιο πάνω, οφείλονται σε κάποιες αλλαγές στα μέρη του εγκεφάλου που σχετίζονται με υψηλές νοητικές λειτουργίες, όπως είναι ο νεοφλοιός και ο ιππόκαμπος.^[9] Η νόσος AD έχει τρία βασικά παθολογικά χαρακτηριστικά: τις γεροντικές ή αμυλοειδικές πλάκες (Senile Plaques, SPs), τις νευροϊνιδικές αλλοιώσεις (Neurofibrillary Tangles, NFTs) και τρίτο, χαμηλά επίπεδα του νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη. Ακόμα, πιθανολογείται ότι το οξειδωτικό στρες παίζει σημαντικό ρόλο στην παθολογία της νόσου AD.

2.1.1.1. Αμυλοειδικές πλάκες

Οι SPs είναι μία εξωκυτταρική συσσώρευση του πεπτιδίου βήτα-αμυλοειδούς (beta-amyloid, Aβ) περιτριγυρισμένη από δυστροφικούς νευρίτες και μικρογλοία. Το Aβ είναι ένα πρωτεολυτικό προϊόν της αμυλοειδικής πρόδρομης πρωτεΐνης (Amyloid Precursor Protein, APP) που σχηματίζεται από τη β- και γ-σεκρετάση.^[10] Αν και η ακριβής λειτουργία της APP δεν είναι γνωστή, πιστεύεται ότι η APP αναμειγνύεται στην ανάπτυξη του κεντρικού νευρικού συστήματος και προκαλεί την αντίδραση σε περίπτωση στρες ή τραύματος. Επίσης, τα γονίδια της προσενιλίνης 1 και 2 (PS1 και PS2) λειτουργούν όπως η γ-σεκρετάση και είναι υπεύθυνα για την τελική πρωτεολυτική διάσπαση της APP.^[11] Η εκτεταμένη παραγωγή του Aβ ή η μειωμένη εκκαθάριση του Aβ οδηγεί σε συσσώρευση και συσσωμάτωση του Aβ, το οποίο είναι τοξικό. Αυτά τα υψηλά επίπεδα του Aβ πιστεύεται ότι αποτελούν τη βασική αιτία που προκαλεί τη νόσο AD και είναι γνωστή σαν αμυλοειδική υπόθεση. Τα διαλυτά, μονομερή του Aβ αυτοσυσσωματώνονται σε

πολλαπλές μορφές συμπεριλαμβανομένου ολιγομερών (2 έως 6 πεπτίδια), διαλυτά ινίδια και αδιάλυτα ινίδια, γνωστά σαν β-πτυχωτά ινίδια. Μεταξύ αυτών, τα ολιγομερή είναι τα πιο νευροτοξικά.^[12] Τα ολιγομερή αυτά αλληλεπιδρούν με τις νευρωνικές μεμβράνες και προκαλούν οξειδωτικό στρες και φλεγμονές, τα οποία οδηγούν σε βλάβη των νευρωνικών συνάψεων και των δενδριτών. Έτσι, ουσίες, οι οποίες μειώνουν τη δραστηριότητα της β- και γ-σεκρετάσης, καταστέλλουν τη διάσπαση της APP και κατά συνέπεια την έκκριση του Αβ και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σαν πιθανές θεραπείες κατά της νόσου AD.



Σχήμα 2.1. Διεργασία του APP και συσσώρευση του Αβ.

Η συσσώρευση του Αβ μπορεί να οφείλεται σε γενετική αλλοίωση της APP, όπως αρχικά παρατηρήθηκε σε μία σουηδική οικογένεια, όπου η νόσος εμφανιζόταν στα μέλη της στην ηλικία των 30 ετών.^[5] Η κληρονομική μορφή της νόσου AD εμφανίζεται σε μικρές ηλικίες σε κάποιες οικογένειες (Early-onset familial AD, EO-FAD) και αναφέρεται σε οικογένειες όπου εμφανίστηκαν πολλά περιστατικά της νόσου AD πριν από την ηλικία των 65 ετών, συνήθως σε ηλικία 40-50 ετών.^[11] Η EO-FAD προκαλείται από μεταλλάξεις σε γονίδια, τα οποία κληρονομούνται. Έχουν αναφερθεί 18 μεταλλάξεις που σχετίζονται με τη νόσο AD στο γονίδιο APP, 142 μεταλλάξεις στο γονίδιο PS1 και 10 μεταλλάξεις στο γονίδιο PS2. Η EO-FAD αφορά περίπου το 5-10 % όλων των περιπτώσεων της νόσου. Τα περισσότερα περιστατικά, το 90-95% των ασθενών, εμφανίζονται σποραδικά και σε ηλικία άνω των 65 χρόνων (Late-onset AD, LO-AD).^[8]

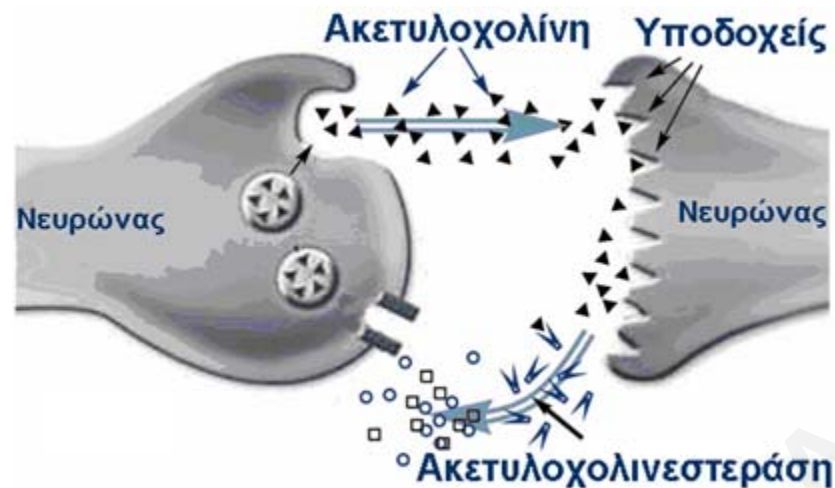
2.1.1.2. Νευροϊνιδικές αλλοιώσεις

Οι NFTs σχηματίζονται λόγω συσσώρευσης των ζευγαρωμένων ελικοειδών ινιδίων (Paired Helical Filaments, PHFs) μέσα στους νευρώνες με την υπερφωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη tau να αποτελεί την κύρια πρωτεϊνική υπομονάδα αυτών των PHFs.^[5] Σε κανονικές συνθήκες, η πρωτεΐνη tau βρίσκεται σε αφθονία μέσα στους νευρώνες του κεντρικού νευρικού συστήματος και είναι υπεύθυνη για να προάγει και να σταθεροποιεί τη διευθέτηση σε μικροσωληνίσκους. Η υπερφωσφορυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης tau, την μετατρέπει στην αδιάλυτη μορφή και μειώνει σημαντικά τη συγγένεια για τους μικροσωληνίσκους. Έτσι, αντί να προάγεται η διευθέτηση των μικροσωληνίσκων, η υπερφωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη tau συσσωματώνεται σε NFTs, οι οποίες οδηγούν στο θάνατο των νευρικών κυττάρων που προσβάλλονται.^[13]

Σε αντίθεση με το Αβ, δεν παρατηρήθηκε γενετική αλλοίωση της πρωτεΐνης tau στη νόσο AD, αλλά έχει βρεθεί ότι ο βαθμός της γνωστικής εξασθένησης στους ασθενείς σχετίζεται σημαντικά με τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης tau και της συνολικής πρωτεΐνης tau στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό.^[14]

2.1.1.3. Χολινεργική υπόθεση

Μελέτες που έγιναν στα μέσα της δεκαετίας του 70', έδειξαν σημαντική ανεπάρκεια στο νεοφλοιό στο ένζυμο, το οποίο είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση του νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη (ACh), της χολινικής ακετυλοτρανσφεράσης (Choline acetyltransferase, ChAT). Οι μελέτες αυτές, μαζί με την ανακάλυψη του ρόλου της ACh στη γνώση και στη μνήμη, οδήγησαν σε αυτό που αποκαλείται 'χολινεργική υπόθεση'. Έτσι, προτάθηκε ότι ο εκφυλισμός των χολινεργικών νευρώνων και η απώλεια των χολινεργικών νευροδιαβιβαστών στον εγκεφαλικό φλοιό και άλλες περιοχές του εγκεφάλου, συνεισφέρουν σημαντικά στη φθορά των γνωστικών λειτουργιών που παρατηρούνται σε ασθενείς με τη νόσο AD. Το ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση (Acetylcholinesterase, AChE) είναι υπεύθυνο για την αποικοδόμηση της ACh στα τερματικά νεύρα. Έτσι, ουσίες οι οποίες παρεμποδίζουν τη δράση του ενζύμου AChE, μπορεί να αυξήσουν τα επίπεδα του νευροδιαβιβαστή ACh στις συνάψεις. Οι ουσίες αυτές είναι γνωστές σαν AChEIs και αποτελούν τις πιο αποτελεσματικές θεραπείες που χρησιμοποιούνται στη νόσο AD.



Σχήμα 2.2. Σχηματικό διάγραμμα της 'χολινεργικής υπόθεσης'.

2.1.1.4. Οξειδωτικό στρες

Από στοιχεία που προέκυψαν από διάφορες μελέτες φαίνεται ο βασικός ρόλος των ελευθέρων ριζών και του οξειδωτικού στρες στην παθογένεση και παθολογία της νόσου AD.^[15] Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προσδιοριστεί σαν μία ανισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών, ευνοώντας τα οξειδωτικά. Οι ελεύθερες ρίζες είναι υψηλά ενεργά μόρια που μπορούν είτε να δώσουν ένα ηλεκτρόνιο είτε να αποσπάσουν ένα ηλεκτρόνιο από τα μόρια. Οι πιο σημαντικές ελεύθερες ρίζες είναι παράγωγα οξυγόνου, όπως υπεροξειδία και υπεροξειδία του υδρογόνου.^[16] Η παραγωγή ενεργών ειδών οξυγόνου, τα οποία οδηγούν σε οξειδωτικό στρες, μπορεί να εμφανίζονται πολύ νωρίς στους ασθενείς, πριν ακόμα εμφανιστούν τα συμπτώματα και οι αλλοιώσεις στον εγκέφαλο (SPs και NFTs), οδηγώντας σε καταστροφή των ιστών μέσω διαφόρων κυτταρικών μοριακών μονοπατιών.^[8,17] Οι νευρώνες φαίνεται να είναι ιδιαίτερα ευπαθείς στο οξειδωτικό στρες λόγω των σημαντικών ποσών κατανάλωσης οξυγόνου από τον εγκέφαλο, τη χαμηλή περιεκτικότητα σε γλουταθιόνη και την υψηλή αναλογία πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στους νευρώνες.^[15] Τα τμήματα του εγκεφάλου, στα οποία παρατηρείται η μεγαλύτερη οξειδωτική φθορά στη νόσο AD είναι ο ιππόκαμπος και ο φλοιός του εγκεφάλου. Τα ενεργά είδη οξυγόνου μπορεί να προκαλέσουν ζημιά σε βασικά κυτταρικά συστατικά, όπως λιπίδια, πρωτεΐνες και νουκλεϊνικά οξέα, οδηγώντας στο θάνατο των κυττάρων.^[8] Η καταστροφή αυτή μπορεί να επεκταθεί περαιτέρω λόγω του εξασθενημένου κυτταρικού αντιοξειδωτικού αμυντικού συστήματος. Τα αντιοξειδωτικά δρουν καταλύοντας την αποικοδόμηση των οξειδωτικών με σκοπό να αποτρέψουν τη φθορά σημαντικών μορίων, όπως των νουκλεϊνικών οξέων, των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και των σακχάρων.^[16] Έτσι, θεραπείες με αντιοξειδωτικά μπορούν θεωρητικά να δράσουν μειώνοντας το σχηματισμό των ελευθέρων ριζών καθώς και απομακρύνοντας τις

ελεύθερες ρίζες πριν πραγματοποιηθεί η καταστροφή των ιστών.^[8] Για το λόγο αυτό, έχουν πραγματοποιηθεί διάφορες μελέτες όπου εξετάζεται κατά πόσο η πρόσληψη αντιοξειδωτικών μέσω της διατροφής μπορεί να εμποδίσει ή να μειώσει την πρόοδο της νόσου AD. Αν και μερικά αντιοξειδωτικά έδειξαν κάποια αποτελεσματικότητα στις δοκιμές αυτές, δεν μπορεί να δοθεί ακόμα απάντηση αν τα αντιοξειδωτικά όντως προστατεύουν κατά της νόσου AD. Συνδυασμός αντιοξειδωτικών με άλλα φάρμακα μπορεί να έχουν πιο επιτυχή συνεργατική επίδραση.^[8]

2.2. Παρεμποδιστές ακετυλοχολινεστεράσης

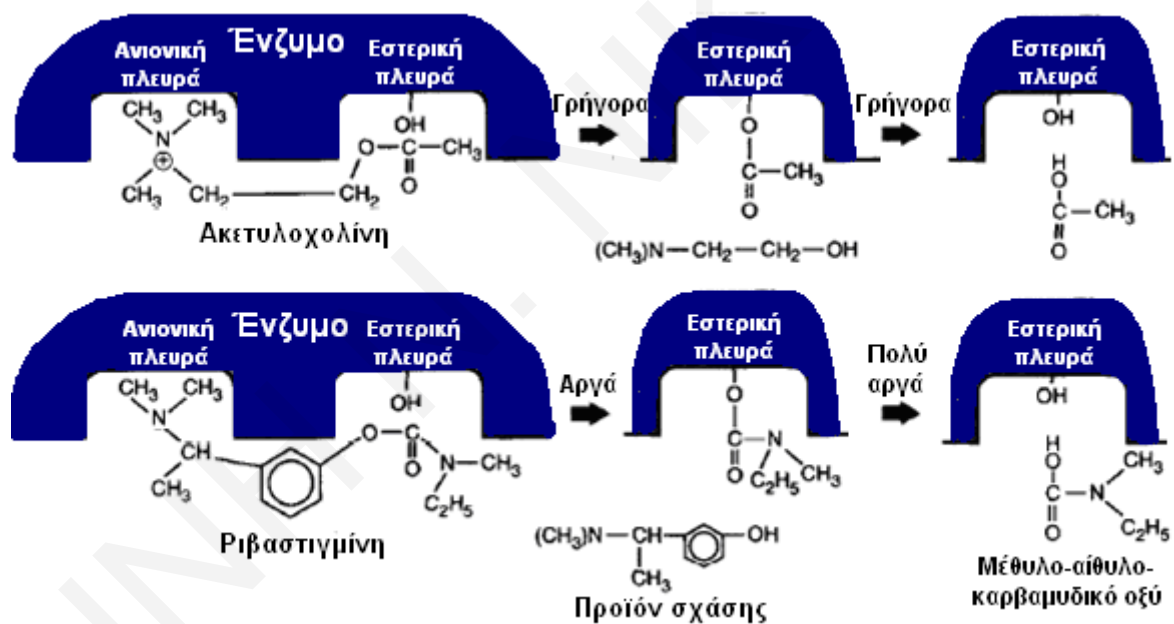
2.2.1. Θεραπευτικές στρατηγικές βασισμένες σε AChEIs

Οι βασικότερες θεραπευτικές στρατηγικές που χρησιμοποιούνται σήμερα για τη θεραπεία της νόσου AD βασίζονται στη 'χολινεργική υπόθεση'. Τα φάρμακα αυτά, γνωστά σαν AChEIs, παρεμποδίζουν τη δράση του ενζύμου AChE, έτσι αυξάνουν τα επίπεδα της διαθέσιμης ACh και με τον τρόπο αυτό βελτιώνονται οι λειτουργίες των νευρώνων.^[6] Οι AChEIs δρουν αποτρέποντας τη φυσιολογική αποικοδόμηση της ACh στις συνάψεις και επομένως, επιτρέπουν μεγαλύτερη διάχυση και χρόνο ημιζωής στην απελευθέρωση της ACh.^[18] Οι AChEIs έχουν δώσει θετικά αποτελέσματα όσον αφορά τη βελτίωση της γνωστικής δυσλειτουργίας που σχετίζεται με τη νόσο AD και έχει αποδειχτεί ότι μειώνουν τις διαταραχές στη συμπεριφορά που παρατηρούνται στη νόσο AD, όπως ο θυμός και το παραμιλητό. Εντούτοις, ένας από τους κύριους περιορισμούς στη ρύθμιση της δραστηριότητας της ACh μέσω παρεμπόδισης της AChE είναι ότι επαναλαμβανόμενες δόσεις AChEIs οδηγούν σε ανοχή, πιθανόν λόγω σύνθεσης νέας ACh στα άκρα των νευρών. Παρά τα μειονεκτήματα που εμφανίζουν, οι AChEIs παραμένουν μέχρι σήμερα, οι μόνες εγκεκριμένες θεραπείες για τη νόσο AD.

Η πρώτη γενιά AChEIs που δημιουργήθηκαν σαν πιθανές θεραπείες για τη νόσο AD περιλάμβαναν την τακρίνη και παράγωγα της φυσοστιγμίνης. Εντούτοις, τα συστατικά αυτά αποδείχτηκαν ακατάλληλα και η χρήση τους περιορίστηκε από ένα αριθμό μειονεκτημάτων που παρουσίασαν, όπως η ασταθής βιοδιαθεσιμότητα, ο πολύ μικρός χρόνος ημιζωής, η περιορισμένη τους επίδραση σε μη-γνωστικές λειτουργίες και ο κίνδυνος ηπατοτοξικότητας.^[19]

Η ανακάλυψη και η ανάπτυξη της ριβαστιγμίνης, προέκυψε από μια έρευνα για νέους AChEIs με αυξημένη κλινική δραστηριότητα και βελτιωμένες φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές ιδιότητες σε σχέση με τις προηγούμενες ενώσεις.^[20] Η ριβαστιγμίνη

είναι ένας AChEI δεύτερης γενιάς καρβαμιδικού τύπου, ο οποίος περιγράφεται σαν ψευδο-αντιστρεπτός παρεμποδιστής της AChE, αφού δημιουργεί μια επίδραση που διαρκεί πολύ περισσότερο απ' ό,τι το φάρμακο βρίσκεται στο πλάσμα. Η ριβαστιγμίνη δεσμεύεται τόσο στην ιονική όσο και στην εστερική πλευρά της AChE με τρόπο παρόμοιο με αυτόν του φυσικού υποστρώματος. Η ριβαστιγμίνη, όπως η ACh, υπόκειται σε υδρόλυση από το ένζυμο και παράγει ένα φαινολικό παράγωγο, ενώ αφήνει την εστερική πλευρά του ενζύμου καρβαμυλιωμένη. (Σχήμα 2.3) Ενώ η ακετυλομάδα της ACh αποσυνδέεται γρήγορα από την AChE, μέσα σε μικροδευτερόλεπτα, επιτρέποντας τη γρήγορη αναδημιουργία του ενεργού ενζύμου, το καρβαμυλικό τμήμα της ριβαστιγμίνης παραμένει δεσμευμένο πάνω από 24 ώρες πριν γίνει και πάλι ανενεργή. Μια δόση 3 mg ριβαστιγμίνης, προκαλεί παρεμπόδιση της AChE στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό που διαρκεί τουλάχιστον 10 ώρες.^[20] Η ριβαστιγμίνη είναι εκλεκτική για την AChE και εμφανίζει εκλεκτικότητα σε συγκεκριμένα τμήματα του εγκεφάλου, τον ιππόκαμπο και το νεοφλοιό.



Σχήμα 2.3. Μηχανισμός δράσης της ACh και της ριβαστιγμίνης στο ένζυμο της AChE.^[22]

Η ριβαστιγμίνη εμφανίζει σαφή πλεονεκτήματα σε σχέση με τα προηγούμενα φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν για τη θεραπεία της νόσου AD καθώς το φάρμακο αυτό απορροφάται ικανοποιητικά, είναι αποτελεσματικό και χωρίς πολλά συμπτώματα και παρενέργειες.^[20] Όπως έχει βρεθεί, με χορήγηση 6-12 mg ριβαστιγμίνης ανά ημέρα για 26 εβδομάδες, παρατηρήθηκε σημαντική βελτίωση της συμπεριφοράς στους ασθενείς.^[23] Ακόμα, λόγω του ότι το φάρμακο δε μεταβολίζεται στο συκώτι, ο κίνδυνος για ηπατοτοξικότητα είναι μειωμένος, ενώ έχει βρεθεί ότι υπάρχει μικρή πιθανότητα

αλληλεπίδρασης του φαρμάκου με άλλες ουσίες.^[20] Οι ελάχιστες δυσμενείς επιπτώσεις της ριβαστιγμίνης, όπως είναι η εμφάνιση κάποιων γαστρεντερικών ανωμαλιών και η καλή ανεκτικότητα στη θεραπεία, καθιστούν τη ριβαστιγμίνη ένα καλό φάρμακο για τη θεραπεία της νόσου AD.^[24]

2.2.2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση μεθόδων προσδιορισμού AChEIs

Η ανάπτυξη αξιόπιστων βιοαναλυτικών μεθόδων για την ανάλυση των AChEIs σε βιολογικά δείγματα είναι σημαντική για την αποτίμηση της βιοδιαθεσιμότητας και της φαρμακοκινητικής των φαρμάκων αυτών, καθώς επίσης και για την εξεύρεση νέων πιθανών φαρμάκων. Για τον προσδιορισμό του AChEI ριβαστιγμίνη σε βιολογικά δείγματα, έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι στιγμής οι τεχνικές HPLC-MS και GC-MS.

Οι Rommier και Frigola^[25] ανέπτυξαν μία μέθοδο HPLC αντίστροφης φάσης με ανιχνευτή MS με χημικό ιονισμό υπό ατμοσφαιρική πίεση (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI) για την ποσοτικοποίηση της ριβαστιγμίνης και του μεταβολίτη της NAP 226-90 σε ανθρώπινο πλάσμα. Οι ουσίες απομονώθηκαν από το πλάσμα με εκχύλιση υγρού με υγρό (Liquid-Liquid Extraction, LLE) με χρήση μέθυλο-tert-βουτυλαιθέρα σε βασικό pH με ταυτόχρονη παραγωγοποίηση του NAP 226-90 με προπιονικό ανυδρίτη. Η μέθοδος αυτή ήταν αρκετά χρονοβόρα και απαιτούσε μεγάλες ποσότητες οργανικών διαλυτών, οι οποίοι μπορούν να προκαλέσουν βλάβη στον άνθρωπο και στο περιβάλλον. Η ανάκτηση της ριβαστιγμίνης (115%) και το όριο ποσοτικοποίησης (Limit of Quantification, LOQ) (0.2 ng/mL) ήταν ικανοποιητικά, αλλά η απαιτούμενη ποσότητα πλάσματος για την κάθε ανάλυση ήταν 500 μ L.

Παρόμοια αποτελέσματα λήφθηκαν και από τον Enz *et al.*,^[26] οι οποίοι ανέπτυξαν μία μέθοδο HPLC-MS, στην οποία ο ιονισμός γινόταν με ηλεκτροψεκασμό. Στη μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της ριβαστιγμίνης και του μεταβολίτη NAP226-90 στο πλάσμα και στον εγκέφαλο ποντικών. Η απομόνωση των συστατικών έγινε και πάλι με LLE, με χρήση οξικού αιθυλίου, ενώ δεν κρίθηκε απαραίτητη η αντίδραση παραγωγοποίησης για τον προσδιορισμό του μεταβολίτη NAP226-90, όπως στην περίπτωση της προηγούμενης μελέτης.^[25] Η ανάκτηση της ριβαστιγμίνης με τη μέθοδο αυτή ήταν 92% και το LOQ 0.13 ng/mL. Για κάθε ανάλυση απαιτείτο 100 μ L πλάσματος.

Οι Sha *et al.*^[27] ανέπτυξαν μία μέθοδο capillary GC-MS με χρήση ιονισμού πρόσκρουσης ηλεκτρονίων για την ποσοτικοποίηση της ριβαστιγμίνης σε πλάσμα σκύλου. Ο στόχος τους ήταν η ανάπτυξη μίας γρήγορης και απλής μεθόδου για την απομόνωση της

ριβαστιγμίνης, χωρίς τη χρήση διαλυτών. Έτσι, αναπτύχθηκε μία μέθοδος μικροεκχύλισης στερεάς φάσης με ικανοποιητικά LOQs (0.2 ng/mL). Ωστόσο, η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν και πάλι αρκετά πολύπλοκη και χρονοβόρα (πάνω από 30 λεπτά ανά δείγμα), ενώ η απαιτούμενη ποσότητα αίματος για κάθε ανάλυση ήταν 500 μ L. Η ανάκτηση της μεθόδου δεν υπολογίστηκε.

Οι Bhatt *et al.*^[28] ανέπτυξαν μία μέθοδο GC-MS για τον προσδιορισμό της ριβαστιγμίνης σε ανθρώπινο πλάσμα με στόχο να βελτιώσουν τη διαδικασία προετοιμασίας του δείγματος. Έτσι, ανέπτυξαν μια μέθοδο εκχύλισης στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction, SPE), η οποία ήταν αρκετά απλή, αλλά απαιτούσε 800 μ L πλάσματος για κάθε ανάλυση. Η ανάκτηση της ριβαστιγμίνης ήταν 86% και το LOQ ήταν 0.2 ng/mL.

Οι Frankfort *et al.*^[29] ανέπτυξαν μία μέθοδο HPLC-MS-MS για τον προσδιορισμό της ριβαστιγμίνης και του μεταβολίτη NAP226-90 σε ανθρώπινο πλάσμα. Για την προετοιμασία του δείγματος χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος καθίζησης των πρωτεϊνών, η οποία ήταν αρκετά απλή αλλά σχετικά χρονοβόρα διαδικασία. Ο χρόνος προετοιμασίας κάθε δείγματος ήταν 25 λεπτά, ενώ η απαιτούμενη ποσότητα πλάσματος για κάθε ανάλυση ήταν 100 μ L. Το LOQ της μεθόδου ήταν 0.25 ng/mL, ενώ η ανάκτηση δεν υπολογίστηκε.

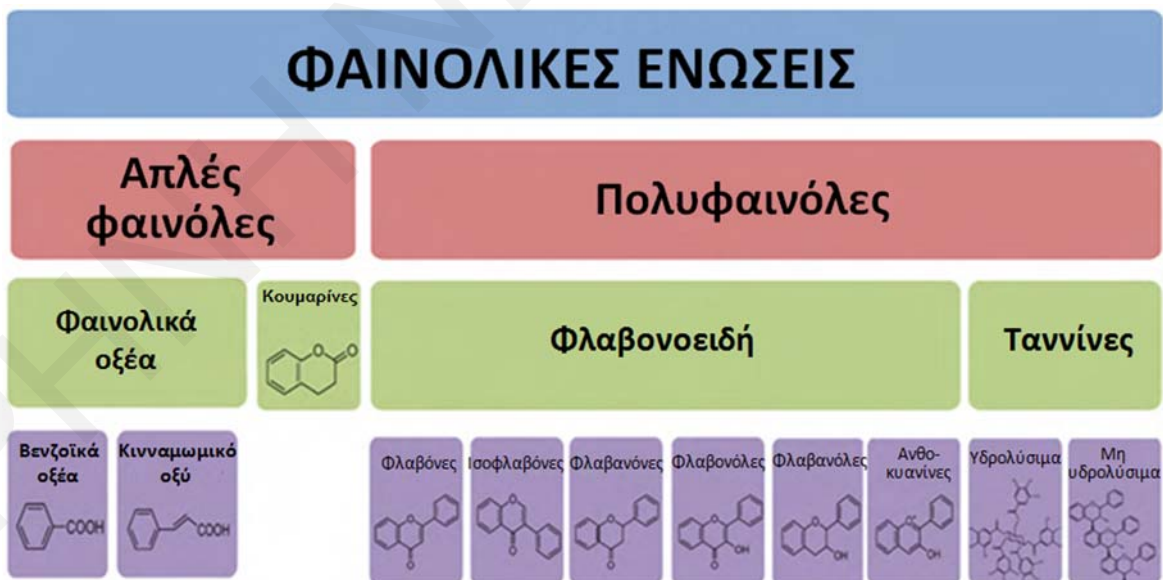
2.3. Πολυφαινολικές ενώσεις

Οι πολυφαινολικές ενώσεις ή πολυφαινόλες αποτελούν μία από τις πιο πολυάριθμες και πιο ευρέως διαδεδομένες ομάδες μεταβολιτών στα φυτά και λαμβάνουν όλο και περισσότερη προσοχή τα τελευταία χρόνια λόγω της βιοδραστικότητας τους.^[30,31] Οι ουσίες αυτές συντίθενται από τα φυτά κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης τους. Οι πολυφαινολικές ενώσεις παίζουν σημαντικό ρόλο στα φυτά, στα τρόφιμα και στον άνθρωπο.^[2]

Στα φυτά, τα συστατικά αυτά εκτελούν διάφορες λειτουργίες, όπως προστασία ενάντια στην υπεριώδη ακτινοβολία, δρουν σαν αντιοξειδωτικά, λαμβάνουν μέρος στην ανάπτυξη και στην αναπαραγωγή των φυτών, βοηθούν στην παραγωγή της γύρης, ενώ συνεισφέρουν στο χρώμα, στο άρωμα και στη γεύση.^[2,30,31] Οι βιοδραστικές τους ιδιότητες δίνουν στα συστατικά αυτά ένα σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη, στη μορφολογία και στην αναπαραγωγή των φυτών, παρέχοντας σημαντική προστασία κατά των παθογόνων οργανισμών και των καταστροφών. Στα τρόφιμα και στα ροφήματα, οι πολυφαινολικές ενώσεις συνεισφέρουν στην οξειδωτική σταθερότητα και στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, όπως η πικράδα, η γεύση και η στυπτικότητα.^[2] Η παρουσία τους στα

φρούτα, στα λαχανικά και σε άλλα φυτά αποτελεί μία σημαντική ένδειξη για τη διατροφική αξία των τροφίμων. Καθώς οι πολυφαινολικές ενώσεις είναι ευρέως διαδεδομένες σε όλα τα φυτά, αποτελούν κατά συνέπεια αναπόσπαστο κομμάτι της ανθρώπινης διατροφής.^[31] Οι φαινόλες δρουν στο ανθρώπινο σώμα παρέχοντας πολλές ευεργετικές ιδιότητες, όπως αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, προστατεύουν από διάφορες καρδιαγγειακές παθήσεις, ενώ πιθανολογείται ότι συνεισφέρουν στην πρόληψη και στη θεραπεία του καρκίνου.^[2,31] Από το 1980, διάφορες μελέτες έδειξαν ότι μία δίαιτα πλούσια σε φρούτα και λαχανικά σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης χρόνιων ασθενειών.

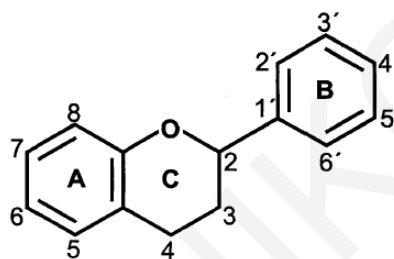
Όπως έχει αναφερθεί, οι πολυφαινολικές ενώσεις είναι μία από τις σημαντικότερες και πιο πολυάριθμες ομάδες ενώσεων στο φυτικό βασίλειο.^[2,30] Είναι γνωστές πάνω από 8000 ενώσεις και οι δομές τους εμφανίζουν ένα κοινό δομικό χαρακτηριστικό: αρωματικοί δακτύλιοι με έναν ή περισσότερους υδρόξυ-υποκαταστάτες. Οι δομές τους κυμαίνονται από απλά φαινολικά μόρια μέχρι πολύπλοκα, υψηλού μοριακού βάρους πολυμερή. Οι πολυφαινόλες διαιρούνται σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό των δομικών ατόμων άνθρακα σε συνδυασμό με τη δομή του βασικού φαινολικού σκελετού. Έτσι, μπορούν να χωριστούν στις απλές φαινόλες (φαινολικά οξέα και κουμαρίνες), στα φλαβονοειδή και στα στιλβένια (Σχήμα 2.4).



Σχήμα 2.4. Μια απλοποιημένη κατηγοροποίηση των πολυφαινολικών ενώσεων και κάποιες αντιπροσωπευτικές δομές από κάθε κατηγορία.

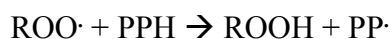
Ανάμεσα στις περίπου 8000 πολυφαινολικές ενώσεις που είναι γνωστές μέχρι σήμερα, περίπου 5000 από αυτές ανήκουν στην κατηγορία των φλαβονοειδών. Τα φλαβονοειδή μπορούν να κατηγοριοποιηθούν περαιτέρω στις φλαβόνες, ισοφλαβόνες, φλαβανόνες,

φλαβονόνες, φλαβανόλες και ανθοκυανίνες.^[2,30] Τα φλαβονοειδή είναι χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεις, τα οποία αποτελούνται από δεκαπέντε άτομα άνθρακα, διευθετημένα σε διαμόρφωση C6-C3-C6. Ουσιαστικά, η δομή τους αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους, A και B, οι οποίοι ενώνονται μέσω μίας C γέφυρας τριών ανθράκων, που έχει συνήθως τη μορφή ετεροκυκλικού δακτυλίου. Στο Σχήμα 2.5 φαίνεται η βασική δομή και το σύστημα αρίθμησης των φλαβονοειδών. Η μεταβολή της υποκατάστασης στο δακτύλιο C έχει σαν αποτέλεσμα τις βασικότερες κατηγορίες φλαβονοειδών, από τις οποίες οι φλαβόνες και οι φλαβονόλες είναι οι πιο ευρέως διαδεδομένες. Υποκατάσταση στους δακτυλίους A και B οδηγεί σε διαφορετικά συστατικά μέσα σε κάθε κατηγορία φλαβονοειδών.

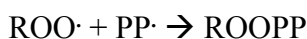


Σχήμα 2.5. Βασική δομή των φλαβονοειδών.

Τα τελευταία χρόνια, το ενδιαφέρον γύρω από τις πολυφαινολικές ενώσεις έχει αυξηθεί ιδιαίτερα, λόγω των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων και της ικανότητας των ενώσεων αυτών να απομακρύνουν τις ελεύθερες ρίζες από τον οργανισμό.^[31] Η σημαντική αντιοξειδωτική δραστηριότητα των πολυφαινολών οφείλεται στο μεγάλο αριθμό φαινολικών υδροξυλομάδων στους αρωματικούς τους δακτυλίους.^[31,32] Οι πολυφαινόλες παρεμβαίνουν στην οξείδωση των λιπιδίων και άλλων μορίων με γρήγορη δωρεά ενός ατόμου υδρογόνου στις ρίζες, η οποία έχει σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό μίας πολυφαινολικής φαινοξυλικής ρίζας (PP·) σύμφωνα με την πιο κάτω αντίδραση:



Οι φαινολικές ρίζες που σχηματίζονται μπορούν να σταθεροποιηθούν με περαιτέρω παραχώρηση ενός ατόμου υδρογόνου ή αντιδρώντας με άλλες ρίζες:



Επιπλέον, τα φλαβονοειδή έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν χηλικά μόρια με μεταλλοϊόντα, όπως ο σίδηρος και ο χαλκός. Ο σχηματισμός των χηλικών ενώσεων με τα

μέταλλα αυτά, αποτελεί έναν από τους τρόπους με τους οποίους οι πολυφαινόλες ασκούν την αντιοξειδωτική τους δράση.

Η αποτελεσματικότητα των πολυφαινολών σαν αντιοξειδωτικά εξαρτάται από τις χημικές τους δομές. Η φαινόλη από μόνη της είναι ανενεργή, αλλά τα όρθο- και πάρα- διφαινολικά έχουν αντιοξειδωτική ικανότητα. Τα φλαβονοειδή είναι μεταξύ των πιο δραστικών αντιοξειδωτικών στα φυτά αφού εμφανίζουν ένα ή περισσότερα από τα ακόλουθα δομικά στοιχεία: (1) μία ο-διφαινολική ομάδα στο δακτύλιο Β, (2) έναν 2-3 διπλό δεσμό συζυγιακό με την 4-όξο ομάδα, (3) υδροξυλομάδες στις θέσεις 3 και 5.^[33]

Οι πολυφαινόλες είναι ευρέως διαδεδομένες σε μία ποικιλία φρούτων, λαχανικών, ξηρών καρπών, δημητριακών, λουλουδιών και ροφημάτων.^[34] Το κακάο, τα μήλα, το τσάι, τα σαρκώδη φρούτα, ο καφές, το κρασί, οι μαρμελάδες, οι σοκολάτες και τα κρεμμύδια είναι οι πιο συνηθισμένες πηγές πολυφαινολών στην ανθρώπινη διατροφή.

Αν και οι πολυφαινόλες είναι ευρέως διαδεδομένες στα φυτικά τρόφιμα και ροφήματα, εντούτοις τα επίπεδα των πολυφαινολών ποικίλουν σημαντικά ακόμα και μεταξύ καλλιεργειών του ίδιου είδους.^[31] Για παράδειγμα, ο σχηματισμός των φλαβόνων και φλαβονολικών γλυκοζιδίων εξαρτάται σημαντικά από το φως. Ακόμα, μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αυτών των συστατικών βρίσκονται στα φύλλα και σε άλλα μέρη των φυτών, ενώ μόνο ίχνη ποσότητας συναντούνται στα υπόγεια μέρη των φυτών. Η παρουσία πολυφαινολών στα φυτικά τρόφιμα επηρεάζεται από γενετικούς παράγοντες και τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των συνολικών πολυφαινολών στα τρόφιμα δε μπορεί να γίνει με ακρίβεια, λόγω του ότι δε μπορούν να αναλυθούν οι αδιάλυτες πολυφαινόλες, οι οποίες ποσοτικά μπορεί να είναι πιο σημαντικές απ' ότι τα φλαβονοειδή. Χαρακτηριστικά θα πρέπει να αναφερθεί ότι σε δύο ανεξάρτητες έρευνες που έγιναν σε Ολλανδία και Δανία, η συνολική πρόσληψη φλαβονοειδών υπολογίστηκε να είναι 23 mg/ημέρα^[35] και 28 mg/ημέρα^[36], αντίστοιχα, ενώ σε μία παρόμοια έρευνα στις ΗΠΑ η ημερήσια πρόσληψη φλαβονοειδών βρέθηκε να είναι 1.1 g/ημέρα.^[37]

2.3.1. Πολυφαινόλες και κρασί

Όπως είναι ευρέως αποδεκτό από την επιστημονική κοινότητα, το κρασί είναι μία από τις σημαντικότερες πηγές πολυφαινολικών αντιοξειδωτικών που προέρχονται από τη διατροφή και περιλαμβάνει μεγάλη ποικιλία τόσο φλαβονοειδών (φλαβονολών, φλαβονολών και ανθοκυανίνων) όσο και μη-φλαβονοειδών συστατικών (φαινολικών οξέων, φαινολικών αλκοολών και στιλβενίων).^[38] Πριν από 30 χρόνια, ο St Legar και οι

συνεργάτες του ήταν οι πρώτοι που παρατήρησαν την αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ της κατανάλωσης κόκκινου κρασιού και της θνησιμότητας από ισχαιμικές καρδιακές παθήσεις σε 18 διαφορετικές ευρωπαϊκές και αμερικανικές χώρες.^[39] Η μελέτη αυτή βασίστηκε στις παρατηρήσεις προηγούμενων ανακαλύψεων που σχετίζουν την κατανάλωση αλκοόλ με χαμηλό ρυθμό ανάπτυξης παθήσεων της στεφανιαίας αρτηρίας (Coronary Artery Disease, CAD).^[40] Το 1995, οι Renaud *et al.* χρησιμοποίησαν για πρώτη φορά τον όρο ‘Γαλλικό παράδοξο’ για να υπογραμμίσουν το χαμηλό βαθμό θνησιμότητας από ισχαιμικές καρδιακές παθήσεις στο γαλλικό πληθυσμό παρά τα υψηλά ποσοστά κορεσμένων λιπαρών στη διατροφή τους, το οποίο συνήθως σχετίζεται με υψηλή θνησιμότητα από CAD.^[40] Στη νότια Γαλλία, όπου γίνεται μεγαλύτερη κατανάλωση κόκκινου κρασιού, η εμφάνιση CAD είναι η χαμηλότερη. Στη βόρεια Γαλλία, όπου καταναλώνουν λιγότερο κρασί και περισσότερο αλκοόλ, υπάρχει μεγαλύτερη συχνότητα CAD. Επιδημιολογικές μελέτες προτείνουν ότι η κατανάλωση κόκκινου κρασιού σε επίπεδα συγκρίσιμα με αυτά της Γαλλίας μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο για CAD, αποτρέποντας την αρτηριοσκλήρωση.

Τα επίπεδα των πολυφαινολών στα κρασιά είναι πολύ ευμετάβλητα λόγω διαφορών τόσο στην πηγή του σταφυλιού, όσο και στη διαδικασία παρασκευής του. Η κατανομή των πολυφαινολών στα κόκκινα κρασιά διαφέρει σημαντικά από αυτήν στα λευκά κρασιά λόγω της διαφοράς της σύστασης των κόκκινων και λευκών σταφυλιών, καθώς επίσης και λόγω της διαφορετικής τεχνολογίας οινοποίησης που χρησιμοποιείται.^[30] Τα κόκκινα κρασιά παράγονται με βράσιμο του χυμού σταφυλιού παρουσία των στερεών συστατικών του σταφυλιού, ενώ το λευκό κρασί παράγεται από βράσιμο του σταφυλιού αφού πρώτα αφαιρεθούν τα στερεά συστατικά του.^[42] Λόγω του ότι η πλειοψηφία των φλαβονοειδών στο κρασί προέρχεται από τη φλούδα και τα κουκούτσια κατά τη διαδικασία του βρασμού, στο κόκκινο κρασί περιέχονται πολύ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις πολυφαινολών απ’ ότι στο λευκό κρασί. Για το λόγο αυτό το κόκκινο κρασί εμφανίζει υψηλότερη αντιοξειδωτική δραστηριότητα.^[43] Επιπλέον, η διαδικασία βρασμού του κόκκινου κρασιού διαρκεί μέχρι και δύο εβδομάδες, παρέχοντας μεγαλύτερο χρόνο για την εκχύλιση των φλαβονοειδών. Η παρουσία αιθανόλης διευκολύνει επίσης τη διαδικασία, αφού οι αλκοόλες αποτελούν καλούς διαλύτες για εκχύλιση των πολυφαινολών. Η σύσταση των πολυφαινολών ποικίλει μεταξύ των διαφόρων κρασιών ανάλογα με το είδος του σταφυλιού που χρησιμοποιείται, τη διαδικασία που ακολουθείται κατά την παραγωγή του, τη διαδικασία της ζύμωσης και αν συμμετέχουν ή όχι τα στερεά συστατικά του κρασιού κατά τη διαδικασία του μουσκέματος. Ακόμα και όταν χρησιμοποιηθεί το ίδιο είδος σταφυλιού, η σύσταση των πολυφαινολών μπορεί να διαφέρει, αφού εξαρτάται και από την παρουσία ακαθαρσιών, τα

διάφορα καιρικά φαινόμενα, όπως τη θερμοκρασία, τη βροχή και την υγρασία, αλλά και από άλλες βιολογικές επιδράσεις όπως μύκητες και εντομοκτόνα.^[44]

2.3.2. Πολυφαινόλες και Νόσος AD

Αντιοξειδωτικά διαφόρων χημικών δομών έχουν διερευνηθεί σαν πιθανές θεραπείες για νευροεκφυλιστικές νόσους.^[8] Η οξειδωτική καταστροφή που παρατηρείται στη νόσο AD θα μπορούσε να αντιμετωπιστεί μειώνοντας το σχηματισμό των ελευθέρων ριζών καθώς και απομακρύνοντας τις ελεύθερες ρίζες πριν πραγματοποιηθεί η φθορά.^[45] Στη βιβλιογραφία υπάρχουν διάφορες μελέτες, στις οποίες εξετάζεται κατά πόσο η πρόσληψη αντιοξειδωτικών μέσω της διατροφής μπορεί να εμποδίσει ή να μειώσει την πρόοδο της νόσου AD.^[8] Έχει βρεθεί ότι παράγωγα της ρεσβερατρόλης μπορεί να μειώσουν τη δραστηριότητα της β-σεκρετάσης, παρεμποδίζοντας το αμυλοειδικό μονοπάτι.^[5] Η ρεσβερατρόλη, μία πολυφαινόλη τύπου στυλβενίου, η οποία προέρχεται από το κρασί και από πολλά φυτά, αποτελεί μία δημοφιλή φυσική ένωση με μεγάλο εύρος βιολογικών δραστηριοτήτων, όπως αντικαρκινική, αντιφλεγμονώδη και καρδιοαγγειακή δράση, ενώ πιθανολογείται ότι μπορεί να δράσει και κατά της νόσου AD. Η ευεργετική επίδραση της ρεσβερατρόλης στη νόσο AD πιστεύεται ότι πραγματοποιείται μέσω της μείωσης της συσσώρευσης του Αβ στον εγκέφαλο, αλλά και λόγω μείωσης του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από το Αβ. Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις, η ρεσβερατρόλη βρίσκεται στη Φάση III κλινικών μελετών για να προσδιοριστεί η επίδραση της χορήγησης ρεσβερατρόλης σε ήπια περιστατικά της νόσου AD.

Ακόμα, διάφορες ισοφλαβόνες έχουν αποδειχθεί ισχυροί παρεμποδιστές της β-σεκρετάσης. Οι κατεχίνες, οι οποίες ανήκουν στην κατηγορία των φλαβοειδών, εμφανίζουν μεγάλο εύρος φαρμακολογικής δραστηριότητας. Συγκεκριμένα, παρέχουν νευροπροστατευτικές επιδράσεις λόγω των ισχυρών αντιοξειδωτικών και αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων τους.^[46] Επιπλέον, παρατηρήθηκε βελτίωση στη μνήμη και στη γνώση μετά τη λήψη κατεχινών από το πράσινο τσάι, η οποία μπορεί στο μέλλον να δοκιμαστεί στη θεραπεία νευροεκφυλιστικών παθήσεων.^[47]

Οι πολυφαινόλες που περιέχονται στο κρασί έχουν αναφερθεί να μειώνουν τον κίνδυνο για ανάπτυξη της νόσου AD, λόγω της αντιοξειδωτικής και νευροπροστατευτικής δράσης που ασκούν.^[49,50,51] Σε μία μελέτη που έγινε στη Γαλλία και στην οποία έλαβαν μέρος 2273 άτομα, βρέθηκε ότι μέτρια κατανάλωση αλκοόλ μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο εμφάνισης άνοιας και της νόσου AD.^[49] Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι για τα άτομα που έπιναν 3 με 4

ποτήρια κρασί την ημέρα (250 - 500 mL), η πιθανότητα εμφάνισης της νόσου AD, μειώθηκε κατά 78%, ενώ σε μία έρευνα που έγινε στη Δανία παρατηρήθηκε ότι ο κίνδυνος ανάπτυξης άνοιας ήταν σημαντικά μικρότερος σε άτομα που κατανάλωναν κρασί περιστασιακά ή εβδομαδιαία, αλλά δε μειώθηκε σε άτομα που έπιναν καθημερινά.^[51] Αντίθετα, αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης άνοιας παρατηρήθηκε με κατανάλωση μπύρας ή άλλων αλκοολούχων ποτών. Επιπλέον, σε μία μελέτη που έγινε στον Καναδέζικο πληθυσμό για τους πιθανούς παράγοντες κινδύνου της νόσου AD έδειξε ότι η κατανάλωση κρασιού ήταν ο πιο σημαντικός προστατευτικός παράγοντας εναντίον της νόσου, μειώνοντας τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου AD κατά 50%.^[52] Πολύ ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι από τη μελέτη αυτή φάνηκε ότι η κατανάλωση κρασιού ήταν πιο αποτελεσματική στην πρόληψη της νόσου απ' ότι η χρήση μη-στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων. Σε μία μελέτη που έγινε από τους Commenges *et al.*^[53] για μία περίοδο πέντε χρόνων σε 1367 άτομα άνω των 65 ετών στη Γαλλία, τα οποία δεν έπασχαν από τη νόσο AD, βρέθηκε αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ της λήψης φλαβονοειδών και του κινδύνου εμφάνισης άνοιας. Κατέληξαν ότι υψηλή πρόσληψη φλαβονοειδών μπορεί να είναι ένας προστατευτικός παράγοντας κατά της νόσου AD. Από μία άλλη μελέτη στην οποία συμμετείχαν 5396 άτομα, βρέθηκε ότι η πρόσληψη βιταμινών C και E, β-καροτένης και φλαβονοειδών ασκούσε προστατευτική δράση κατά της νόσου AD.^[54]

2.3.3. Βιβλιογραφική ανασκόπηση μεθόδων προσδιορισμού πολυφαινόλων

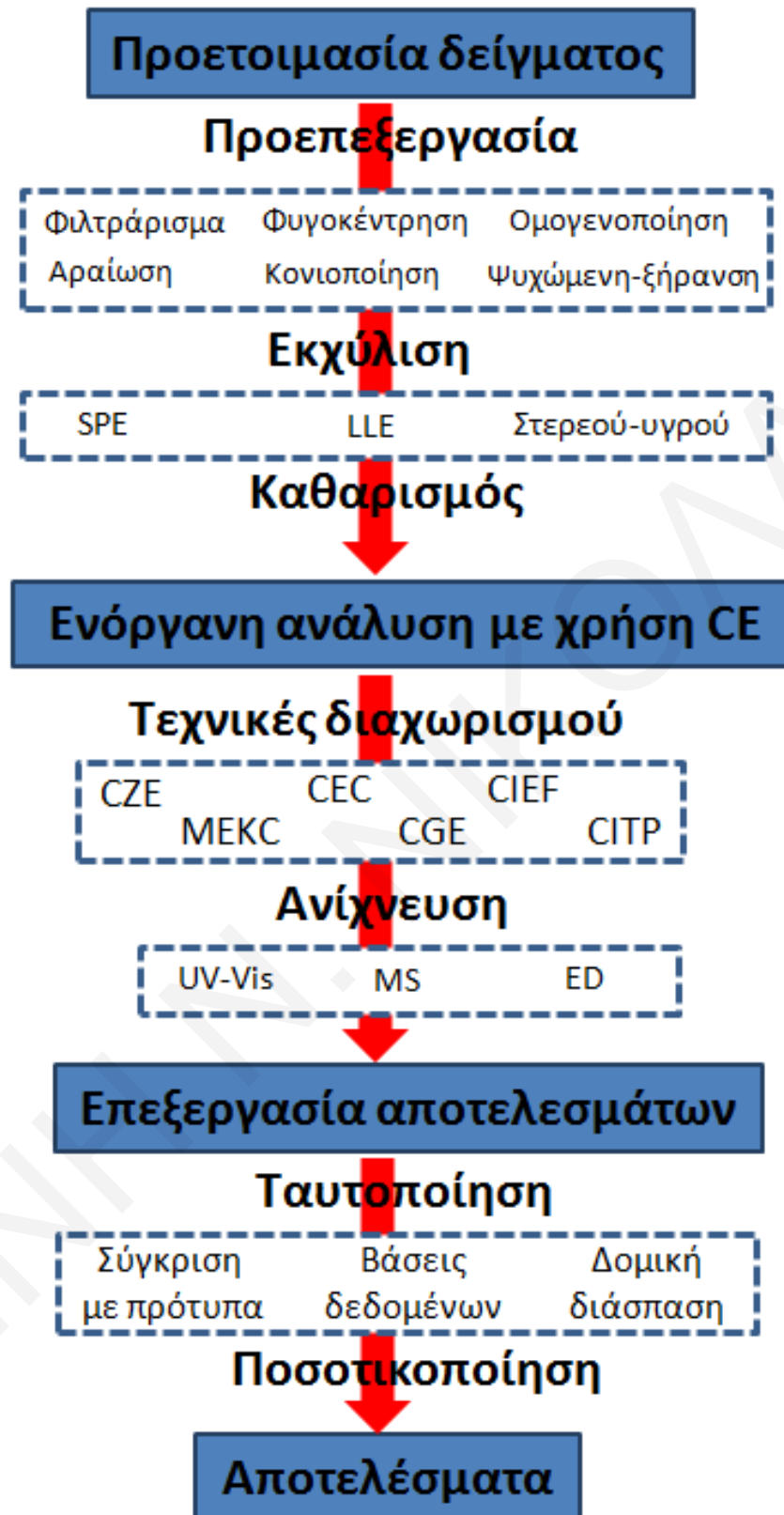
Στη βιβλιογραφία υπάρχει μεγάλος αριθμός δημοσιεύσεων όπου γίνεται προσδιορισμός πολυφαινόλικών ενώσεων σε διάφορα τρόφιμα φυτικής προέλευσης. Καθώς μόνο ένας μικρός αριθμός από τα φυτοχημικά που υπάρχουν στη φύση έχουν προσδιοριστεί μέχρι σήμερα, υπάρχει αυξημένο ενδιαφέρον στην ανάπτυξη νέων μεθόδων για το διαχωρισμό, την απομόνωση και το χαρακτηρισμό των δομών των πολυφαινόλων στα τρόφιμα.^[34] Ευρέως διαδεδομένες στο φυτικό βασίλειο και σε αφθονία στη διατροφή μας, οι πολυφαινόλες των φυτών είναι σήμερα μεταξύ των πιο συζητήσιμων κατηγοριών φυτοχημικών.^[2] Ο προσδιορισμός των πολυφαινόλων έχει ανθοφορήσει κατά τις τελευταίες δεκαετίες. Η ανάπτυξη νέων τεχνικών για την απομόνωση, το διαχωρισμό και την ταυτοποίηση τους, έχει εμπλουτίσει τη βάση δεδομένων των πολυφαινόλικών ενώσεων με νέες δομές και παρέχει καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού που ελέγχει τις επιδράσεις τους. Καθώς ο όρος 'πολυφαινόλες' περιλαμβάνει πολλές διαφορετικές οικογένειες με μεγάλο εύρος διαφορετικών δομών και ιδιοτήτων, δε μπορεί να

χρησιμοποιηθεί μία γενική μέθοδος για όλες τις πολυφαινόλες και πρέπει να γίνονται διαφορετικές προσεγγίσεις ανάλογα με τα συγκεκριμένα τρόφιμα και τις πολυφαινόλες που μας ενδιαφέρουν.

Ένα μεγάλο εύρος αναλυτικών μεθόδων έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των φυσικών αυτών συστατικών, αλλά είναι σημαντικό να ληφθεί υπόψη ότι η πολυπλοκότητα της μήτρας, η οποία περιέχει τα συστατικά αυτά, επιβάλλει τη χρήση τεχνικών διαχωρισμού με υψηλή διαχωριστική ικανότητα. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες τεχνικές είναι οι χρωματογραφικές τεχνικές (HPLC, GC), ηλεκτροφορητικές τεχνικές και φασματοσκοπικές μέθοδοι (MS, UV-Vis, φασματοσκοπία υπερύθρου). Γενικά, οποιαδήποτε αναλυτική διαδικασία για τον προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων περιλαμβάνει τέσσερα βασικά βήματα: εξαγωγή από το δείγμα, αναλυτικό διαχωρισμό, ποσοτικοποίηση και ερμηνεία των δεδομένων που λήφθηκαν. Στο Σχήμα 2.6 φαίνεται ένα σχεδιάγραμμα για την ανάπτυξη μίας μεθόδου για την απομόνωση και τον προσδιορισμό των πολυφαινολών από φυτικά προϊόντα με χρήση της CE σαν αναλυτικό εργαλείο.

Η HPLC αποτελεί την αναλυτική τεχνική που έχει χρησιμοποιηθεί σε μεγαλύτερο βαθμό για το διαχωρισμό και το χαρακτηρισμό των πολυφαινολικών ενώσεων.^[34] Οι στήλες που έχουν χρησιμοποιηθεί για το σκοπό αυτό είναι σχεδόν αποκλειστικά αντίστροφης φάσης, συνήθως από C18, ενώ τα συστήματα διαλυτών που χρησιμοποιούνται αποτελούνται από μία υδατική φάση και μία οργανική φάση, συνήθως ακετονιτρίλιο ή μεθανόλη. Συχνά ένα οξύ προστίθεται στους διαλύτες, με το οξικό οξύ και το φορμικό οξύ να χρησιμοποιούνται περισσότερο. Αυτός ο συνδυασμός στηλών και συστημάτων διαλυτών έχει εφαρμοστεί με επιτυχία σε ένα μεγάλο αριθμό πολυφαινολικών ενώσεων.

Τα τελευταία χρόνια η CE έχει εξελιχθεί σε μία ελκυστική εναλλακτική μέθοδο, κυρίως λόγω της υψηλής αποδοτικότητας του διαχωρισμού, της μικρής κατανάλωσης δείγματος και διαλυτών και της ταχύτητας της, καθώς ο χρόνος ανάλυσης μπορεί να μειωθεί σε μόλις μερικά λεπτά. Επιπλέον, ενώ οι στήλες που χρησιμοποιούνται στην HPLC έχουν μικρή διάρκεια ζωής λόγω της παρουσίας παρεμβολών, οι οποίες συνυπάρχουν μέσα στη στήλη, οι στήλες της CE είναι πιο εύκολο να καθαριστούν και να ανακτηθούν.



Σχήμα 2.6. Η ολοκληρωμένη αναλυτική διαδικασία για τον προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων που βρίσκονται στα διάφορα τρόφιμα φυτικής προέλευσης.

Για τον προσδιορισμό των πολυφαινολικών ενώσεων στο κρασί υπάρχει στη βιβλιογραφία ένας μεγάλος αριθμός δημοσιεύσεων, από τις οποίες μόνο περίπου το 10% από αυτές

κάνουν χρήση ηλεκτροφορητικών μεθόδων.^[2] Η μέθοδος CE που έχει χρησιμοποιηθεί περισσότερο για τον προσδιορισμό των πολυφαινολικών ενώσεων στο κρασί είναι η ηλεκτροφόρηση ζώνης τριχοειδούς (Capillary Zone Electrophoresis, CZE). Στον Πίνακα 2.1 συνοψίζονται κάποιες δημοσιεύσεις και συμπεριλαμβάνονται πληροφορίες σχετικά με τις διάφορες μεθοδολογίες CE που χρησιμοποιούνται σε κάθε περίπτωση. Η οξύτητα και η συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος παίζουν σημαντικό ρόλο στη CE. Ρυθμιστικό διάλυμα βορικού σε pH 8-11 και συγκέντρωση 25-200 mM χρησιμοποιείται συνήθως για τον προσδιορισμό πολυφαινολικών ενώσεων, καθώς το βορικό μπορεί να σχηματίσει σύμπλοκα με τις υδροξυλομάδες του πυρήνα του φλαβονοειδούς και με τον τρόπο αυτό ευνοείται ο διαχωρισμός.^[34]

Αν και η πρόοδος των αναλυτικών τεχνικών έχει οδηγήσει σε σημαντική βελτίωση της ποιότητας της ανάλυσης, η σημαντικότητα της προετοιμασίας του δείγματος δεν πρέπει να υποτιμάται.^[2] Η απομόνωση των πολυφαινολικών συστατικών από τη μήτρα του δείγματος είναι απαραίτητη σε κάθε ανάλυση. Οι βασικότερες μέθοδοι που έχουν χρησιμοποιηθεί για το σκοπό αυτό είναι η LLE,^[55-59] η SPE^[60,61] αλλά και άμεση έγχυση του δείγματος συνήθως μετά από αραίωση.^[62-66] Η ακριβής διαδικασία εξαρτάται από τη φύση τόσο του αναλύτη όσο και του δείγματος.

Πίνακας 2.1. Μέθοδοι CE που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση πολυφαινολών στο κρασί.

Δείγμα κρασιού	Σύστημα εξαγωγής	Αρχική ποσότητα → τελική ποσότητα διαλύτη στη διαδικασία εξαγωγής	Ρυθμιστικό διάλυμα	Αναφορά
Κόκκινο	LLE	5 mL εκχυλίζονται με διαιθυλαιθέρα → 0.5 mL MeOH	Βορικό νάτριο 100 mM, pH 9.5	Garcia-Viguera et al. ^[55]
Κόκκινο	LLE	5 mL → 1 mL MeOH	Βορικό νάτριο 100 mM, pH 9.5	Gil et al. ^[56]
Κόκκινο & Λευκό	LLE	1 mL → 2 mL MeOH	Μαλονικό οξύ 5 mM + TBAOH σε MeOH 9.6 mM, pH 13.5	Demianova et al. ^[57]
Ισπανικά-Δε διευκρινίζεται το είδος	LLE	5 mL → 0.5 mL MeOH	Βορικό οξύ 150 mM + SDS 50 mM + MeOH 5%, pH 8.5	Rodriguez-Delgado et al. ^[58]
Κόκκινο & Λευκό	LLE	1 mL → 1 mL EtOH (50 %)	Βορικό 10 mM + φωσφορικό 25 mM	Woraratphoka et al. ^[59]
Κόκκινο	SPE	2 mL → 0.2 mL MeOH	Βορικό 25 mM, pH 9.4	Pazourek et al. ^[60]
Κόκκινο & Λευκό	SPE	2 mL → 2 mL MeOH	Βορικό νάτριο 100 mM, pH 9.5	Arce et al. ^[61]
Κόκκινο	Άμεση έγχυση	Διαλύθηκε σε νερό	H ₂ O-MeOH (4:1) + MOSPO 25 mM + Tris 50 mM + Βορικό οξύ 15 mM + 2-HEC 0.2% + β-CD 5 mM, pH 8.5	Hamoudova et al. ^[62]
Κόκκινο	Άμεση έγχυση	-	Βορικό νάτριο 25 mM + φωσφορικό νάτριο 25 mM + SDS 75 mM, pH 9.0	Gu et al. ^[63]
Κόκκινο & Λευκό & Ροζέ	Άμεση έγχυση	Αραίωση 5 φορές σε νερό	Τετραβορικό νάτριο 25 mM, pH 9.5	Pazourel et al. ^[64]
Κόκκινο	-	Διαλύθηκαν 100 μL δείγματος σε 900 μL BGE	Δεοξυχολικό νάτριο 50 mM, διβασικό φωσφορικό νάτριο 10 mM, τετραβορικό νάτριο 6 mM, φωσφορικό οξύ 6 mM, pH 9.3	Prasongsidh et al. ^[65]
Κόκκινο	-	Φυγοκέντρηση → προσθήκη μεταδισουλφιδικού καλίου στο υπερκείμενο	Τετραβορικό νάτριο 50 mM + MeOH 15%, pH 8.4	Saenz-Lopez et al. ^[66]

2.4. Οργανολογία Ηλεκτροφόρησης Τριχοειδούς

2.4.1. Ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση, σαν τεχνική διαχωρισμού εισήχθη το 1937 από τον Σουηδό χημικό Arne Tiselius για τη μελέτη πρωτεϊνών του ορού. Για τη δουλειά του αυτή τιμήθηκε το 1948 με το βραβείο Nobel.^[67] Ο όρος ηλεκτροφόρηση σχετίζεται με όλες τις τεχνικές διαχωρισμού, οι οποίες βασίζονται στη διαφορετική ταχύτητα όδευσης των φορτισμένων σωματιδίων σε ρυθμιστικό διάλυμα, κατά μήκος του οποίου έχει εφαρμοστεί ένα ηλεκτρικό πεδίο.^[68] Αποτελεί τη βασική αρχή σε διάφορες αναλυτικές τεχνικές και τεχνικές προετοιμασίας, οι οποίες εφαρμόζονται ευρέως.^[69] Οι ηλεκτροφορητικοί διαχωρισμοί πραγματοποιούνται σήμερα με δύο διαφορετικούς τρόπους: την ηλεκτροφόρηση πλάκας και τη CE.^[68] Ο πρώτος τρόπος αποτελεί και την κλασική μέθοδο, η οποία έχει χρησιμοποιηθεί πολλά χρόνια για τον διαχωρισμό πολύπλοκων μιγμάτων ουσιών μεγάλου μοριακού βάρους, βιολογικού και βιοχημικού ενδιαφέροντος. Οι διαχωρισμοί πλάκας εκτελούνται σε ένα λεπτό επίπεδο στρώμα πορώδους ημιστερεάς πηκτής, που περιέχει υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα μέσα στους πόρους της.

Η CE αποτελεί την ενόργανη προσέγγιση της ηλεκτροφόρησης, η οποία επιτρέπει γρήγορους και αποτελεσματικούς διαχωρισμούς φορτισμένων συστατικών σε μικρούς όγκους δείγματος.^[70] Οι διαχωρισμοί βασίζονται στις διαφορές των ηλεκτροφορητικών ευκινησιών των ιόντων σε ηλεκτροφορητικό μέσο μέσα σε στενές τριχοειδείς στήλες. Η CE προσφέρει σαφή πλεονεκτήματα ως προς την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή όσον αφορά την ταχύτητα της ανάλυσης, την ευκολία που προσφέρει λόγω της αυτοματοποίησης και την ικανότητα ποσοτικοποίησης. Από τη δεκαετία του 1980, παρατηρείται ραγδαία ανάπτυξη της CE, το οποίο φανερώνεται από τον αυξανόμενο αριθμό δημοσιεύσεων, τις επιστημονικές συνεδριάσεις, τις πωλήσεις των εμπορικών συστημάτων και τις μεθόδους διαχωρισμού που σχετίζονται με την τεχνική αυτή.

Τα πρώτα ευρέως αποδεκτά αποτελέσματα που έδειχναν την ισχύ της CE λήφθηκαν από τους Jorgenson και Lukacs το 1981,^[71] όπου παρουσίασαν τη θεωρία της διασποράς στη CE και την υψηλή αποδοτικότητα του διαχωρισμού με χρήση υψηλού πεδίου σε τριχοειδείς στήλες με διάμετρο μικρότερη από 100 μm. Ένα άλλο σημαντικό βήμα στην ανάπτυξη της CE ήταν η ανακάλυψη της μικυλλιακής ηλεκτροκινητής χρωματογραφίας (Micellar Electrokinetic Chromatography, MEKC) το 1984 από τους Terabe et al.,^[72] η οποία περιλάμβανε την προσθήκη ενός τασιενεργού στο ηλεκτροφορητικό ρυθμιστικό

διάλυμα, το οποίο σχηματίζει μικύλλια με σκοπό να αυξηθεί ο διαχωρισμός των ουδέτερων ουσιών. Μέχρι το τέλος της δεκαετίας του 1980, συστήματα CE ήταν εμπορικά διαθέσιμα. Με τη γρήγορη πρόοδο που γίνεται, η CE αποτελεί ένα δημοφιλές εναλλακτικό εργαλείο σε αναλυτικές εφαρμογές ρουτίνας.

2.4.2. Αρχή του διαχωρισμού στην CE

Στην CE ο διαχωρισμός καθορίζεται από δύο παράγοντες.^[73] Ο πρώτος είναι η κίνηση των αναλυτών στην τριχοειδή στήλη λόγω του εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου, το οποίο ονομάζεται ταχύτητα όδευσης του ιόντος. Ο δεύτερος είναι η ροή της κύριας μάζας του διαλύματος λόγω του φορτίου της επιφάνειας στο τοίχωμα της στήλης, το οποίο ονομάζεται ηλεκτροωσμωτική ροή (Electroosmotic flow, EOF). Η ταχύτητα όδευσης είναι αποτέλεσμα της ισορροπίας των δυνάμεων τριβής και των ηλεκτροστατικών δυνάμεων. Με εφαρμογή ενός σταθερού ηλεκτρικού πεδίου, τα ιοντικά είδη υπόκεινται σε μια ηλεκτροστατική δύναμη, F_e , η οποία επιταχύνει τα ιόντα προς το ηλεκτρόδιο και είναι ανάλογη της ισχύς του ηλεκτρικού πεδίου (E) και του φορτίου του συγκεκριμένου ιόντος (q).^[74]

$$F_E = qE \text{ (Εξίσωση 2.1)}$$

Αντίθετα η επιβραδυντική δύναμη τριβής (F_f) επιβραδύνει την κινητικότητα των ιόντων και δίνεται από τη σχέση:

$$F_f = -6\pi\eta r v \text{ (Εξίσωση 2.2)}$$

όπου η = ιξώδες του διαλύματος, r = ιοντική ακτίνα, v = ταχύτητα όδευσης.

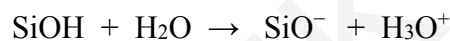
Στο σημείο ισορροπίας των δύο δυνάμεων, η ταχύτητα όδευσης δίνεται από τη σχέση:

$$v = \frac{q}{6\pi\eta r} E = \mu_e E \text{ (Εξίσωση 2.3)}$$

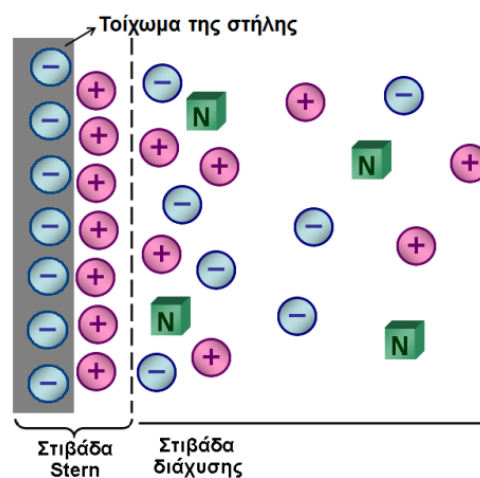
όπου μ_e είναι η ηλεκτροφορητική ευκινησία της ένωσης.

Όπως φαίνεται από την Εξίσωση 2.3, η ηλεκτροφορητική ευκινησία είναι ανάλογη του ιοντικού φορτίου του αναλύτη και αντιστρόφως ανάλογη των επιβραδυντικών παραγόντων τριβής.^[68] Η επιβραδυντική δύναμη τριβής στο ιόν του αναλύτη καθορίζεται από το μέγεθος και το σχήμα του ιόντος, καθώς επίσης και το ιξώδες του μέσου στο οποίο κινείται. Καθώς το ηλεκτρικό πεδίο επιδρά μόνο στα ιόντα, δύο ουσίες θα διαχωριστούν μεταξύ τους, εάν διαφέρουν είτε στο φορτίο, είτε στις δυνάμεις τριβής που υφίστανται κατά την κίνησή τους στο ρυθμιστικό διάλυμα. Συγκεκριμένα, όσο μεγαλύτερος είναι ο λόγος φορτίο-προς-μέγεθος ενός ιόντος τόσο γρηγορότερα κινείται ένα ιόν. Αντιθέτως, τα ουδέτερα σωματίδια δε διαχωρίζονται.

Η EOF είναι ένας δεύτερος παράγοντας που επηρεάζει την κίνηση των αναλυτών μέσω της τριχοειδούς στήλης.^[73] Η πρώτη παρατήρηση του φαινομένου αυτού έγινε το 1877 από τον Helmholtz,^[75] ο οποίος εφάρμοσε ηλεκτρικό πεδίο στα άκρα ενός γυάλινου τριχοειδούς σωλήνα που ήταν γεμάτος με υδατικό διάλυμα και περιείχε φορτισμένα σωματίδια. Όπως παρατήρησε, η εσωτερική επιφάνεια του τοιχώματος του σωλήνα απέκτησε ένα αρνητικό φορτίο και η στιβάδα του διαλύτη κοντά στο τοίχωμα και η επιφάνεια ενός φορτισμένου σωματιδίου απέκτησε το αντίθετο φορτίο. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα την κίνηση του υγρού κοντά στα τοιχώματα του σωλήνα προς το ένα από τα ηλεκτρόδια. Το φαινόμενο αυτό ονομάστηκε ηλεκτροόσμωση. Οι στήλες που χρησιμοποιούνται στην CE είναι κατασκευασμένες από τηγμένη πυριτία, η οποία περιέχει επιφανειακές ομάδες σιλανόλης.^[70] Αυτές οι ομάδες σιλανόλης ιονίζονται παρουσία ενός ηλεκτροφορητικού μέσου. Σε pH μεγαλύτερο από 2, οι επιφανειακές ομάδες σιλανόλης είναι αποπρωτονιωμένες.^[74]



Όταν η επιφάνεια της πυριτίας είναι αρνητικά φορτισμένη, αντισταθμιστικά ιόντα τείνουν να προσροφούνται σε αυτή με ηλεκτροστατικές έλξεις, το οποίο εξισορροπεί το αρνητικό φορτίο της επιφάνειας δημιουργώντας μια άκαμπτη στιβάδα, η οποία αποκαλείται στιβάδα Stern.^[76] Η στιβάδα Stern είναι σε ισορροπία με μια εξωτερική στιβάδα διάχυσης. Τα κατιόντα της στιβάδας διάχυσης είναι επιδιαλυτωμένα και τείνουν να μεταναστεύουν προς την κάθοδο.^[70] Αυτή η μετανάστευση των κατιόντων έχει σαν συνέπεια τη μετανάστευση όλου του υγρού μέσα στην τριχοειδή στήλη. Η ροή του υγρού μέσω της τριχοειδούς στήλης καλείται EOF. Στο Σχήμα 2.7 φαίνεται αναπαράσταση της διπλοστιβάδας στο τοίχωμα του τριχοειδούς σωλήνα.



Σχήμα 2.7. Αναπαράσταση της διπλοστιβάδας που σχηματίζεται στο τοίχωμα του τριχοειδούς σωλήνα.

Το δυναμικό στις στιβάδες αυτές καλείται ζήτα δυναμικό και δίνεται από την εξίσωση του Helmholtz:

$$\zeta = \frac{4\pi\eta\mu_{eo}}{\varepsilon} \quad (\text{Εξίσωση 2.4})$$

όπου μ_{eo} είναι η ηλεκτροοσμωτική ευκινησία.

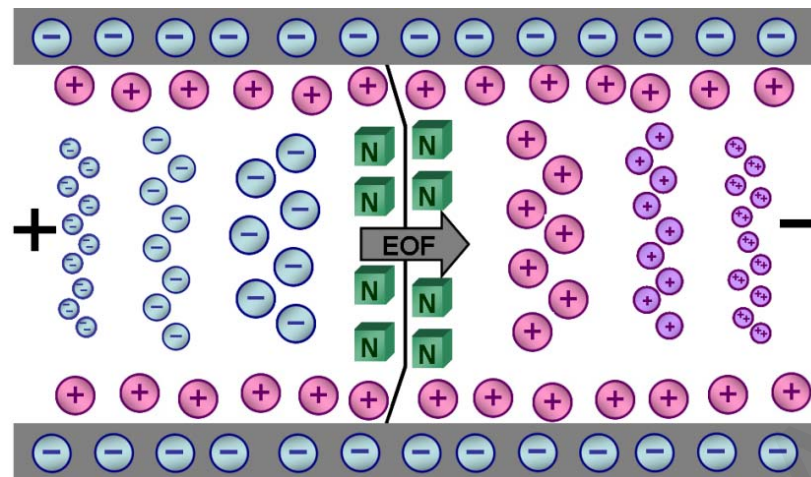
Η ταχύτητα της EOF δίνεται από τη σχέση:

$$v_{eo} = \left(\frac{\varepsilon\zeta}{\eta}\right) E \quad (\text{Εξίσωση 2.5})$$

Το μεγάλο πλεονέκτημα που προσφέρεται λόγω της δημιουργίας της EOF είναι ότι προκαλείται κίνηση όλων των ειδών, ανεξάρτητα από το φορτίο τους, προς την ίδια κατεύθυνση.^[67,73] Παρουσία της ηλεκτροόσμωσης η ταχύτητα ενός ιόντος είναι το άθροισμα της ταχύτητας όδευσης και της ταχύτητας της ηλεκτροοσμωτικής ροής.^[68,70] Επομένως:

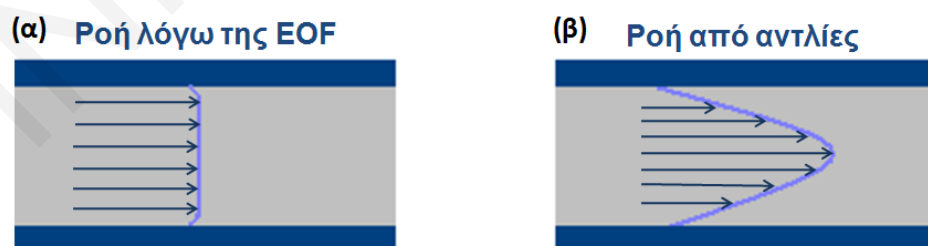
$$v = (\mu_e + \mu_{eo})E \quad (\text{Εξίσωση 2.6})$$

Σύμφωνα με τη Εξίσωση 2.6, όλα τα ιόντα μεταναστεύουν προς την ίδια κατεύθυνση όταν η EOF είναι μεγαλύτερη σε μέγεθος και αντίθετη σε κατεύθυνση από τα ανιόντα μέσα στο ρυθμιστικό διάλυμα. Τα κατιόντα έλκονται προς την κάθοδο και η ταχύτητά τους αυξάνεται από την EOF. Τα ανιόντα, αν και έλκονται ηλεκτροφορητικά προς την άνοδο, τελικά μεταναστεύουν προς την κάθοδο μαζί με την κύρια ροή του ηλεκτροφορητικού μέσου. Επιπλέον, μη-ιοντικά είδη θα μεταφερθούν με την EOF. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, τα κατιόντα με το μεγαλύτερο λόγο φορτίο ως προς μέγεθος μεταναστεύουν πρώτα, ακολουθούμενα από κατιόντα με μικρότερο λόγο. Στη συνέχεια εκκλύονται όλα τα ουδέτερα συστατικά χωρίς να διαχωριστούν μεταξύ τους καθώς ο λόγος φορτίο ως προς μέγεθος είναι μηδέν. Πιο αργά μεταναστεύουν τα ανιόντα, με αυτά με το χαμηλότερο λόγο φορτίο ως προς μέγεθος να μεταναστεύουν πρώτα. Στο Σχήμα 2.8 φαίνεται σχηματική αναπαράσταση της μετανάστευσης των ουσιών λόγω της EOF. Να αναφέρουμε επίσης ότι η πολικότητα μπορεί να αντιστραφεί και η σειρά έκλυσης να αλλάξει ανάλογα με το αν η EOF καταστέλλεται ή αντιστρέφεται.^[73]



Σχήμα 2.8. Σχηματική αναπαράσταση της σειράς έκλουσης των αναλυτών λόγω της EOF.

Ένα δεύτερο πλεονέκτημα που προσφέρεται από την EOF είναι ότι προκαλείται επίπεδη ροή, όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.9(α). Καθώς η κινητήρια δύναμη της ροής είναι ομοιόμορφα κατανεμημένη κατά μήκος του τριχοειδή σωλήνα, δεν παρατηρείται πτώση πίεσης και η ροή είναι σχεδόν ομοιόμορφη σε όλη τη στήλη.^[67,70] Αυτή η επίπεδη ροή αποτελεί ένα πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό της EOF, αφού σε άλλες τεχνικές, όπου οι ροές προκαλούνται από εφαρμογή εξωτερικής πίεσης, παρατηρείται παραβολική ή τυρβώδης ροή (Σχήμα 2.9(β)). Η επίπεδη ροή είναι ευεργετική καθώς δε συμβάλλει στη διεύρυνση των ζωνών των κορυφών του αναλύτη καθώς περνούν κατά μήκος της στήλης και κατά συνέπεια οδηγεί σε αύξηση του διαχωρισμού. Επίσης, στην CE παρατηρείται μείωση στο ελάχιστο της διεύρυνσης των ζωνών καθώς χρησιμοποιούνται τριχοειδείς στήλες με μικρή εσωτερική διάμετρο (Internal Diameter, I.D.) λόγω αντίστασης στη μεταφορά μάζας και λόγω απομάκρυνσης της θερμότητας.



Σχήμα 2.9. Προφίλ ροών (α) παρουσία της EOF, (β) σε ροές προκαλούμενες από αντλίες.

2.4.3. Μέθοδοι CE

Διάφορες μέθοδοι ηλεκτροφορητικού διαχωρισμού σε τριχοειδή μπορούν να εκτελεστούν στο σύστημα CE.^[70] Η προέλευση των διαφόρων μεθόδων για το διαχωρισμό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι η CE αναπτύχθηκε από το συνδυασμό διαφόρων

ηλεκτροφορητικών και χρωματογραφικών τεχνικών. Σε γενικές γραμμές, μπορεί να θεωρηθεί σαν ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός ενός αριθμού ουσιών μέσα σε στενό σωλήνα. Αν και οι περισσότεροι διαχωρισμοί πραγματοποιούνται με χρήση υγρού σαν μέσο για το διαχωρισμό, η CE περιλαμβάνει τεχνικές στις οποίες ο τριχοειδής περιέχει ηλεκτροφορητική πηκτή, χρωματογραφικό υλικό πλήρωσης ή επικάλυψη. Στον Πίνακα 2.2. συνοψίζονται οι βασικότερες μέθοδοι CE και η αρχή στην οποία βασίζεται ο διαχωρισμός σε κάθε περίπτωση.^[2]

Πίνακας 2.2. Βασικότερες μέθοδοι CE και η αρχή στην οποία βασίζεται ο διαχωρισμός.

Μέθοδος CE	Ακρωνύμιο	Βάση του διαχωρισμού
Ηλεκτροφόρηση ζώνης τριχοειδούς	CZE	Φορτίο ως προς μέγεθος
Μικυλλιακή ηλεκτροκινητική χρωματογραφία	MEKC	Υδροφοβικές/ιοντικές αλληλεπιδράσεις με τασιενεργές ουσίες
Ηλεκτροχρωματογραφία τριχοειδούς ανοικτού σωλήνα	OT-CEC	Υδροφοβικές/ιοντικές αλληλεπιδράσεις με επικάλυψη της στήλης
Ισοταχυφόρηση τριχοειδούς	CITP	Μετανάστευση σε όρια ανάλογα με την αναλογία φορτίο ως προς μάζα
Ισοηλεκτρική εστίαση τριχοειδούς	CIEF	Ισοηλεκτρικό σημείο
Ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς πηκτής	CGE	Μέγεθος του μορίου

Πολλές δημοσιεύσεις αναφέρουν τις τεχνικές CZE και MEKC σαν τις 'κλασικές' μεθόδους CE.^[2] Η CZE αποτελεί την πιο διαδεδομένη τεχνική στη CE λόγω της απλότητας της, αφού σε αυτήν ο τριχοειδής σωλήνας γεμίζεται μόνο με ρυθμιστικό διάλυμα, αλλά και λόγω του ότι πολλά συστατικά μπορούν να διαχωριστούν εύκολα και γρήγορα.^[70] Στην CZE, η ηλεκτροφορητική ευκινησία φορτισμένων αναλυτών προσδιορίζεται από το λόγο φορτίο ως προς μέγεθος. Ουδέτεροι αναλύτες, εκλούνται όλοι μαζί σε μία κορυφή αφού δεν έχουν φορτίο και κατά συνέπεια δεν έχουν δικές τους ηλεκτροφορητικές ευκινησίες και η μόνη κινητήρια δύναμη είναι η EOF, η οποία είναι η ίδια για όλα τα ουδέτερα συστατικά στο δείγμα.^[74]

Η μέθοδος MEKC αποτελεί μια από τις ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους CE λόγω της ικανότητας της να διαχωρίζει ταυτόχρονα ουδέτερες και φορτισμένες ουσίες. Ο διαχωρισμός των ουδέτερων ειδών επιτυγχάνεται με την προσθήκη τασιενεργών στο ρυθμιστικό διάλυμα σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από την κρίσιμη μικυλλιακή συγκέντρωση (Critical Micellar Concentration, CMC) ώστε να σχηματίζονται μικύλλια.^[67]

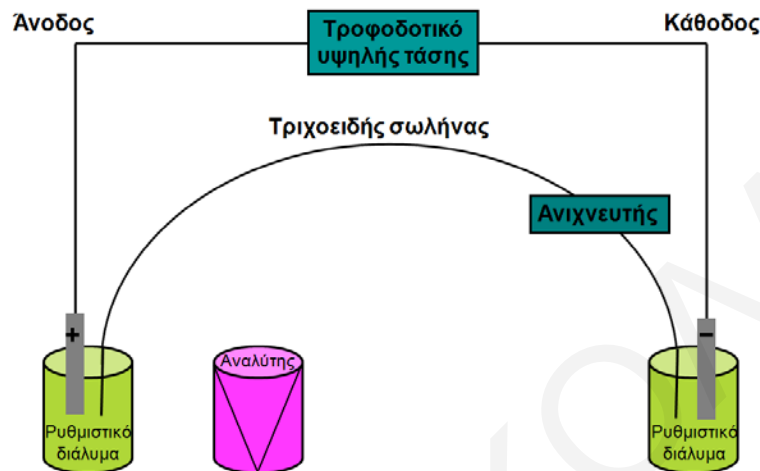
Τα τασιενεργά, και κατά συνέπεια τα μικύλλια, είναι φορτισμένα και μεταναστεύουν, ανάλογα με το φορτίο τους, είτε μαζί είτε αντίθετα από την EOF. Συνήθως χρησιμοποιούνται ανιοντικά τασιενεργά, όπως το δωδέκυλο-θεικό νάτριο (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS), τα οποία τείνουν να μεταναστεύουν προς την άνοδο, δηλαδή αντίθετα προς την EOF. Καθώς η EOF είναι πιο γρήγορη από την ταχύτητα μετανάστευσης των μικυλλίων, τα μικύλλια κινούνται επίσης στην ίδια κατεύθυνση με την EOF. Κατά τη διάρκεια της μετανάστευσης, τα μικύλλια μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τις ουσίες μέσω υδροφοβικών και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Ο διαχωρισμός των ουδέτερων ειδών βασίζεται στην κατανομή τους μέσα και έξω από τα μικύλλια. Όσο πιο υδρόφοβο είναι ένα συστατικό, τόσο περισσότερο αλληλεπιδρά με τα μικύλλια και κατά συνέπεια τόσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος μετανάστευσης, αφού συνήθως τα μικύλλια μεταφέρουν τις ουσίες ενάντια στην EOF. Οι ουσίες, οι οποίες δεν αλληλεπιδρούν με τα μικύλλια, απλά μεταφέρονται με την EOF.

Η τεχνική MEKC με ανιχνευτή UV-Vis έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως. Ωστόσο, η σύζευξη MEKC με τον ανιχνευτή MS χρησιμοποιώντας συνηθισμένα μικύλλια πάνω από την CMC είναι πολύ δύσκολη, αν όχι ακατόρθωτη.^[77] Αυτό οφείλεται στο ότι, καθώς η συγκέντρωση των χαμηλού μοριακού βάρους τασιενεργών αυξάνεται, γίνεται πιο δύσκολο να ληφθεί σταθερός ηλεκτροψευκασμός, το οποίο με τη σειρά του αυξάνει το θόρυβο του υποβάθρου στο MS. Στις συγκεντρώσεις του SDS που απαιτούνται για το διαχωρισμό, η πρόσδεση μορίων του SDS πάνω στον αναλύτη μειώνει την αποδοτικότητα του ιονισμού, προκαλώντας μείωση στην ευαισθησία για κατιοντικούς αναλύτες. Τα τελευταία χρόνια, έχει πραγματοποιηθεί ραγδαία αύξηση στην ανάπτυξη νέων τύπων πολυμερικών υλικών, τα οποία μπορούν να διαχωρίσουν ουδέτερα και φορτισμένα συστατικά με παρόμοιο τρόπο όπως και τα συνηθισμένα μικύλλια και τα οποία να είναι συμβατά με το MS.

2.4.4. Οργανολογία

Ένα από τα κύρια πλεονεκτήματα της CE είναι ότι απαιτεί πολύ απλή οργανολογία.^[67,68] Ένα σχηματικό διάγραμμα του βασικού συστήματος CE φαίνεται στο Σχήμα 2.10. Τα άκρα ενός τριχοειδή σωλήνα από τηγμένη πυριτία, ο οποίος είναι γεμάτος με έναν ηλεκτρολύτη μέσου (Background Electrolyte, BGE), εκτείνονται μεταξύ δύο δοχείων που περιέχουν το ίδιο BGE και στα οποία είναι επίσης βυθισμένα ηλεκτρόδια λευκοχρύσου, τα οποία χρησιμοποιούνται για να γίνει ηλεκτρική επαφή μεταξύ του τροφοδοτικού υψηλής τάσης και του τριχοειδή. Το δείγμα εισάγεται στη στήλη με αντικατάσταση ενός δοχείου που περιέχει το BGE με το δοχείο που περιέχει το δείγμα και πραγματοποιείται η έγχυση

του δείγματος. Όταν το δοχείο με το BGE πάρει και πάλι τη θέση του, εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο και πραγματοποιείται ο διαχωρισμός. Μετά από την επίτευξη του διαχωρισμού, οι ουσίες παρατηρούνται με χρήση ανιχνευτή, ο οποίος είναι τοποθετημένος στο τελικό άκρο της στήλης.



Σχήμα 2.10. Σχηματικό διάγραμμα του βασικού συστήματος CE.

2.4.4.1. BGE

Το BGE αποτελεί έναν παράγοντα μεγάλης σημασίας στην CE αφού η σύσταση του επηρεάζει τη μετανάστευση των αναλυτών.^[70] Ένα κατάλληλο σύστημα ηλεκτρολύτων πρέπει να εξασφαλίζει τη σωστή ηλεκτροφορητική συμπεριφορά όλων των ανεξάρτητων ουσιών, τη συνολική σταθερότητα του συστήματος και ικανοποιητικό διαχωρισμό των αναλυτών. Η επιλογή του κατάλληλου BGE στο διαχωρισμό στη CE περιλαμβάνει μελέτη πολλών παραγόντων, όπως η διαλυτότητα και η σταθερότητα των αναλυτών στον ηλεκτρολύτη, το βαθμό ιονισμού των αναλυτών, την επίδραση των ανιόντων και των κατιόντων του ηλεκτρολύτη στη μετανάστευση των ουσιών, την επίδραση του pH, οργανικών τροποποιητών και άλλων πρόσθετων και την απώλεια της θερμότητας που δημιουργείται στον ηλεκτρολύτη κατά τη διέλευση του ρεύματος.

2.4.4.2. Τρόποι έγχυσης του δείγματος

Για να εξασφαλιστεί η υψηλή αποδοτικότητα στην CE, πρέπει το σύστημα έγχυσης να μην προκαλεί σημαντική διεύρυνση των ζωνών.^[71] Η έγχυση του δείγματος στα συστήματα CE μπορεί να γίνει είτε υδροδυναμικά είτε ηλεκτροκινητικά.^[73] Στην υδροδυναμική έγχυση, το δοχείο που περιέχει το BGE αντικαθιστάται από το δοχείο που περιέχει το δείγμα και εφαρμόζεται πίεση ή κενό για να αναγκάσει ένα μικρό κλάσμα του δείγματος να εισέλθει στη στήλη. Στη συνέχεια, το δοχείο με το δείγμα αντικαθιστάται και πάλι με το δοχείο με

το BGE και ξεκινά ο διαχωρισμός. Στην ηλεκτροκινητική έγχυση, πραγματοποιείται η ίδια διαδικασία με τη διαφορά ότι για την εισαγωγή του δείγματος εφαρμόζεται τάση. Η τεχνική αυτή έγχυσης έχει το μειονέκτημα ότι κάνει κάποια διάκριση μεταξύ των ιόντων, αφού εισάγονται μεγαλύτερες ποσότητες ευκίνητων ιόντων, δηλαδή κατιόντων, στη συνέχεια εισάγονται στη στήλη τα ουδέτερα συστατικά και τελευταίες εγχέονται μικρότερες ποσότητες βραδύτερων ιόντων.^[68,73] Είναι σημαντικό να εξασφαλιστεί ότι η μέθοδος που χρησιμοποιείται για την έγχυση του δείγματος είναι ικανή να μεταφέρει μικρούς όγκους δείγματος μέσα στη στήλη αποτελεσματικά και επαναλήψιμα.^[71] Οι τυπικοί όγκοι δείγματος που εγχέονται υδροδυναμικά ή ηλεκτροκινητικά στο σύστημα CE είναι της τάξης των nL ή ακόμα και pL.^[73]

2.4.4.3. Μέθοδοι ανίχνευσης στη CE

Οι τέσσερις πιο συνηθισμένοι μέθοδοι ανίχνευσης στην CE είναι ο ανιχνευτής UV-Vis, ο ανιχνευτής φθορισμού, η ηλεκτροχημική ανίχνευση και ο ανιχνευτής MS. Δεδομένης της μικρής διαμέτρου της στήλης και του χαμηλού ρυθμού ροής του BGE μέσω της στήλης, κάθε τεχνική ανίχνευσης πρέπει να εφαρμόζεται κατάλληλα για να πραγματοποιηθεί με επιτυχία η ανίχνευση και η ποσοτικοποίηση. Οι ανιχνευτές UV-Vis και MS αποτελούν τους ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα Δ.Δ.

2.4.4.3.1. Ανιχνευτής UV-Vis

Τα φασματόμετρα UV-Vis (190-600 nm) χρησιμοποιούνται ευρύτατα ως ανιχνευτές στην CE.^[78] Η απορρόφηση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στην περιοχή UV-Vis αντιστοιχεί στη διέγερση χαμηλών ενεργειακά ηλεκτρονίων όπως σ ή π ηλεκτρονίων ή μη συζευγμένων ηλεκτρονίων ορισμένων ομάδων. Έτσι, τα κανονικά αλκάνια απορροφούν σε περιοχή UV κάτω από 180 nm καθώς τα σ ηλεκτρόνια απαιτούν υψηλότερης ενέργειας ακτινοβολίες για να διεγερθούν και να εμφανίσουν απορρόφηση, ενώ οι αρωματικές ενώσεις εμφανίζουν την απορρόφηση του βενζολικού δακτυλίου στα 205-225 nm και 245-265 nm λόγω της διέγερσης των συζευγμένων π ηλεκτρονίων του βενζολικού δακτυλίου.

Η πλειοψηφία των οργανικών ενώσεων μπορεί να αναλυθεί με ανιχνευτές UV-Vis. Για το λόγο αυτό αλλά και λόγω της μεγάλης συμβατότητας του με το CE, ο ανιχνευτής UV-Vis αποτελεί την πιο διαδεδομένη μέθοδο ανίχνευσης στη CE. Η ανίχνευση UV-Vis πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας την ίδια τη στήλη σαν κυψελίδα ανίχνευσης.^[73] Αυτό μπορεί να γίνει λόγω του ότι οι τριχοειδείς στήλες από τηγμένη πυριτία είναι οπτικά διαφανείς. Το παράθυρο ανίχνευσης δημιουργείται απομακρύνοντας με φλόγα περίπου 0.5

cm από την προστατευτική επίστρωση πολυιμιδίου. Με τη χρήση ενός παράθυρου ανίχνευσης πάνω στη στήλη, αποφεύγεται η μείωση της αποδοτικότητας του διαχωρισμού που παρατηρείται όταν χρησιμοποιείται ξεχωριστή κυψελίδα ανίχνευσης. Το μειονέκτημα ενός τέτοιου παράθυρου ανίχνευσης πάνω στη στήλη είναι ότι το μήκος της οπτικής διαδρομής περιορίζεται στην εσωτερική διάμετρο της στήλης, δηλαδή 50 με 100 μm, γεγονός που περιορίζει τα όρια ανίχνευσης, όταν αυτά εκφράζονται σε συγκέντρωση. Τα όρια ανίχνευσης της συγκέντρωσης είναι συνήθως 10^{-5} - 10^{-6} M, ανάλογα με τη μοριακή απορροφητικότητα της ένωσης.

Ο ανιχνευτής UV-Vis μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να παρακολουθείται η απορρόφηση σε ένα μήκος κύματος ή σε πολλά μήκη κύματος στην περίπτωση του ανιχνευτή συστοιχίας διόδων.^[73] Στην πρώτη περίπτωση, η ταυτοποίηση ενός συστατικού βασίζεται αποκλειστικά και μόνο στο χρόνο κατακράτησης του, γεγονός που οδηγεί συχνά σε λανθασμένα αποτελέσματα, αφού πολλές φορές μια κορυφή 'κρύβει' παρεμποδίζουσες ενώσεις που συνεκλούνται.^[78] Λύση στο πρόβλημα αυτό δόθηκε με χρήση του ανιχνευτή συστοιχίας διόδων, ο οποίος συλλέγει τα δεδομένα της απορρόφησης της αναλυόμενης ένωσης σε όλο το φάσμα του ορατού ή του υπεριώδους λόγω της παρουσίας ολογραφικού φράγματος στη θέση του μονοχρωμάτορα. Το δείγμα δέχεται ακτινοβολία ολόκληρου του φάσματος και η ακτινοβολία που βγαίνει από την κυψελίδα, αφού αναλυθεί στο ολογραφικό φάσμα, προσπίπτει σε παράταξη φωτοδιόδων, η οποία περιλαμβάνει από 35 μέχρι και 512 ή και περισσότερα φωτοευαίσθητα στοιχεία. Κάθε δίοδος δέχεται την ακτινοβολία ενός και μόνο nm και το σήμα αφού ενισχυθεί μετατρέπεται σε ψηφιακό και αποθηκεύεται στον υπολογιστή. Η συνεχής καταγραφή του ολικού φάσματος, δίνει τη δυνατότητα κατασκευής τρισδιάστατων χρωματογραφημάτων καθώς υπάρχει και η δυνατότητα ποσοτικής εκτίμησης της ανάλυσης σε περισσότερα του ενός μήκους κύματος, γεγονός που αυξάνει την εκλεκτικότητα του προσδιορισμού.

Καθώς τα περισσότερα εμπορικά διαθέσιμα συστήματα CE είναι εφοδιασμένα με ανιχνευτές UV-Vis, στη βιβλιογραφία υπάρχουν πολλές εφαρμογές με το συγκεκριμένο ανιχνευτή. Ωστόσο, υπάρχουν κάποιοι περιορισμοί στη χρήση του ανιχνευτή UV-Vis.^[2,34,77] Συχνά, τα ηλεκτροφερογράμματα που λαμβάνονται από την ανάλυση άγνωστων δειγμάτων μπορεί να περιέχουν πολλές κορυφές και οι πληροφορίες που λαμβάνονται από τα φάσματα UV-Vis είναι περιορισμένες. Ένα άλλο μειονέκτημα του ανιχνευτή UV-Vis στην CE είναι η δυσκολία στον προσδιορισμό φαρμακευτικών ουσιών, οι οποίες βρίσκονται σε μικρές συγκεντρώσεις, καθώς επίσης και μεταβολιτών κατά τη διάρκεια

φαρμακοκινητικών μελετών. Η μη ικανοποιητική ευαισθησία που πολλές φορές λαμβάνεται με τον ανιχνευτή UV-Vis καθώς και η χαμηλή ικανότητα ταυτοποίησης αποτελούν δύο άλλα βασικά μειονεκτήματα του συγκεκριμένου ανιχνευτή. Έτσι, συχνά είναι επιθυμητοί πιο ευαίσθητοι ανιχνευτές. Ο MS αποτελεί έναν τέτοιο ανιχνευτή, ο οποίος μπορεί να λύσει τα προβλήματα που σχετίζονται με την ταυτοποίηση άγνωστων ενώσεων, αφού παρέχει σημαντικές πληροφορίες για το μοριακό βάρος και τη δομή των διαχωριζόμενων συστατικών.

2.4.4.3.2. Ανιχνευτής MS

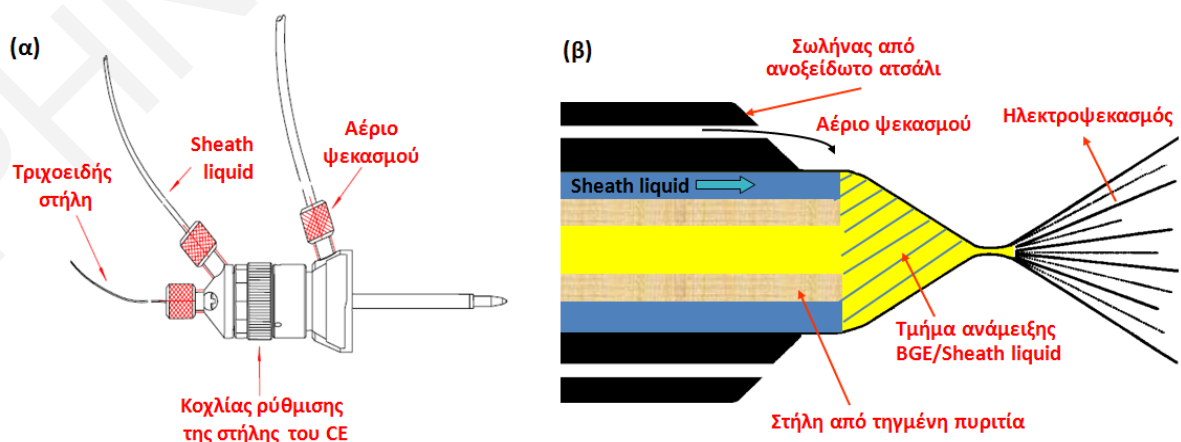
Ο ανιχνευτής MS αποτελεί ένα όργανο, το οποίο διαχωρίζει ταχέως κινούμενα ιόντα με βάση το λόγο μάζας-προς-φορτίο, m/z .^[68] Τα περισσότερα ιόντα είναι μονοφορτισμένα και επομένως ο λόγος αυτός ισούται με τη μάζα του ιόντος. Σήμερα διατίθενται από διάφορους κατασκευαστές ποικιλία τύπων φασματομέτρων μαζών. Τα βασικά μέρη από τα οποία αποτελείται ένα τυπικό σύστημα MS είναι:^[68,79] (α) το στόμιο εισαγωγής του δείγματος, (β) η πηγή ιόντων, (γ) ο αναλυτής μάζας και (δ) ο ανιχνευτής ιόντων. Ο ανιχνευτής ιόντων παράγει στην έξοδο του ηλεκτρικό σήμα, συνήθως ηλεκτρικό ρεύμα, ανάλογο του αριθμού ιόντων και του φορτίου τους, που δέχεται στην είσοδο του στη χρονική μονάδα.^[79] Στην περίπτωση του CE-MS, το στόμιο εισαγωγής του δείγματος δεν υπάρχει και γίνεται απ' ευθείας εισαγωγή του εκλούσματος από την τριχοειδή στήλη, δηλαδή του δείγματος με το διαλύτη, στην πηγή ιόντων. Στην παρούσα Δ.Δ., ο ιονισμός πραγματοποιείται με ηλεκτροψεκασμό, ενώ η ανάλυση των μαζών γίνεται σε τετραπολικό αναλυτή μάζας.

2.4.4.3.2.1. Διάταξη σύζευξης CE-MS

Για να επιτευχθεί η σύζευξη του CE με το MS απαιτείται η παρουσία μίας διάταξης σύζευξης.^[69] Οι περισσότερες διατάξεις που εφαρμόστηκαν στο CE-MS είναι προσαρμογές αυτών που κατασκευάστηκαν για τα συστήματα HPLC-MS. Κατά τη σύζευξη του συστήματος CE με τον ανιχνευτή MS, υπάρχουν τρεις παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψη και να επιλυθούν. Ο πρώτος αφορά την ασυμβατότητα των ροών. Τυπικά, η ροή που έρχεται από το σύστημα CE είναι μικρότερη από 100 nL/min, ενώ η ελάχιστη ροή που απαιτείται για τη λειτουργία της διάταξης σύζευξης LC-MS είναι 1-50 $\mu\text{L}/\text{min}$. Δεύτερο, σε αντίθεση με τη συνηθισμένη οργανολογία της CE, στα συστήματα CE-MS το τελικό άκρο της στήλης του CE δε μπορεί να είναι τοποθετημένο σε ένα δοχείο με BGE αλλά πρέπει να είναι τοποθετημένο στη διάταξη σύζευξης του CE-MS. Έτσι,

απαιτείται κατάλληλη διάταξη ώστε να πραγματοποιείται η ηλεκτρική επαφή για την επίτευξη του διαχωρισμού. Το τρίτο θέμα που πρέπει να επιλυθεί σχετίζεται με τη σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος στην CE. Αν και η ροή που έρχεται από το σύστημα CE είναι πολύ μικρή, η παρουσία μη πτητικών συστατικών στο ρυθμιστικό διάλυμα μπορεί να είναι επιβλαβής για τη μακροπρόθεσμη απόδοση του ανιχνευτή MS, λόγω μόλυνσης της πηγής. Η παρουσία ενός υγρού, γνωστό σαν sheath liquid, στη σύζευξη λύνει το πρόβλημα ασυμβατότητας των ροών, παρέχει την ηλεκτρική επαφή στην κάθοδο της στήλης του συστήματος CE και εξασφαλίζει κατάλληλες συνθήκες διαλυτών για τον ηλεκτροψεκασμό, ανεξάρτητα από το ρυθμιστικό διάλυμα της CE.

Η πιο δημοφιλής μέθοδος για τη σύζευξη του συστήματος CE-ESI-MS είναι με χρήση του συστήματος τριπλού σωλήνα με ροή ενός sheath liquid, το οποίο προτάθηκε από τον Smith *et al.*^[80] Ένα σχηματικό διάγραμμα της εμπορικά διαθέσιμης διάταξης τριπλού σωλήνα και αυτής που προτάθηκε από τον Smith *et al.* φαίνονται στο Σχήμα 2.11(α) και (β), αντίστοιχα. Στη διάταξη αυτή, η στήλη του συστήματος CE εισέρχεται στο ατμοσφαιρικό τμήμα της πηγής ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization, ESI) μέσω ενός στενού σωλήνα από ανοξείδωτο ατσάλι.^[69,77,81] Αυτός ο κεντρικός σωλήνας περιβάλλεται από ένα δεύτερο σωλήνα από ανοξείδωτο ατσάλι, ο οποίος, όχι μόνο συμπληρώνει το ηλεκτρικό κύκλωμα για τη στήλη του CE αλλά επιπλέον μεταφέρει το sheath liquid από την αντλία στην έξοδο της στήλης του συστήματος CE. Επιπλέον, ένας τρίτος ομοαξονικός σωλήνας μεταφέρει με μεγάλη ταχύτητα ένα αέριο, γνωστό σαν αέριο ψεκασμού, το οποίο βοηθά στη δημιουργία μικρών σταγονιδίων που απαιτούνται για την πηγή ESI και για τον καθαρισμό των ελεύθερων ηλεκτρονίων για να αποφευχθεί η εκφόρτιση της κολώνας.



Σχήμα 2.11. (α) Εμπορικά διαθέσιμη διάταξη τριπλού σωλήνα, (β) διάταξη τριπλού σωλήνα όπως προτάθηκε από τον Smith *et al.*

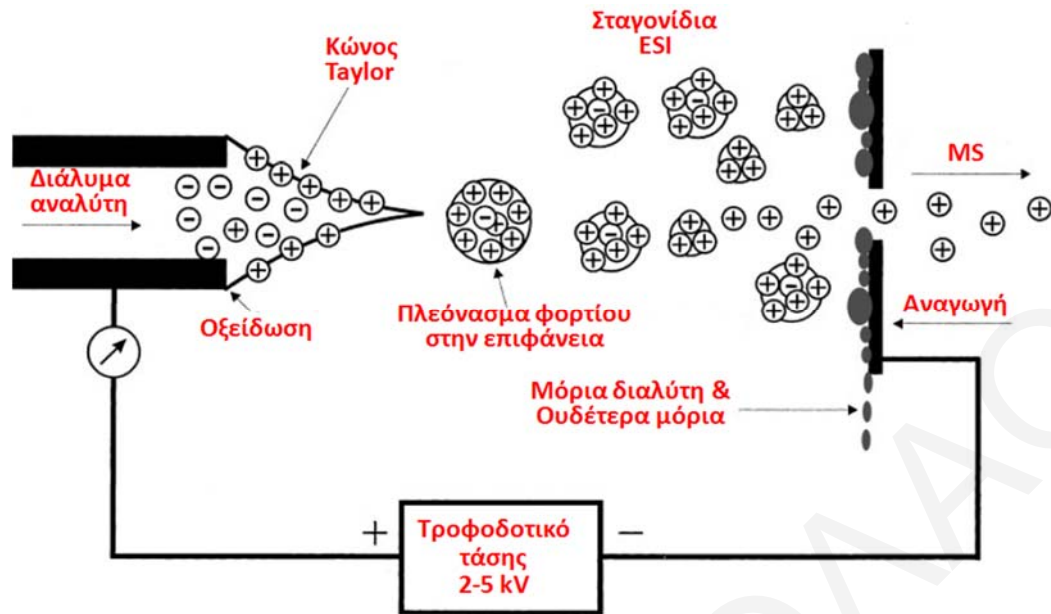
Καθώς το sheath liquid εισάγεται με μία ροή μερικών $\mu\text{L}/\text{min}$, ενώ η ροή που έρχεται από το σύστημα CE συνεισφέρει μόνο μερικές εκατοντάδες nL/min , η διαδικασία του ESI καθορίζεται κυρίως από το sheath liquid, ενώ οι περιορισμοί λόγω της σύστασης του ρυθμιστικού διαλύματος δεν είναι πλέον τόσο σημαντικοί.^[81] Λόγω του ότι ο σωλήνας που μεταφέρει το sheath liquid είναι μεταλλικός, συμπληρώνεται ταυτόχρονα το ηλεκτρικό μονοπάτι για τη στήλη της CE και για τον ESI. Τα πλεονεκτήματα της συγκεκριμένης διάταξης σύζευξης είναι ότι επιτρέπει τη χρήση στηλών του συστήματος CE χωρίς επικάλυψη, καθώς επίσης επιτρέπονται αλλαγές στο διάλυμα μετά την έξοδο του από τη στήλη έτσι ώστε να βελτιώνονται τα χαρακτηριστικά του ηλεκτροψεκασμού και η αποδοτικότητα του ιονισμού. Η φυσική περιοχή όπου ενώνονται και αναμειγνύονται το σύστημα CE με το sheath liquid έχει μικρό αλλά μετρήσιμο όγκο και έτσι η διεύρυνση των ζωνών λόγω διάχυσης είναι περιορισμένη. Πρέπει να σημειωθεί ότι η απόσταση που προεξέχει η στήλη της CE από το σωλήνα του sheath liquid μπορεί να έχει σοβαρές συνέπειες στην απόδοση και έτσι έχουν σχεδιαστεί διατάξεις που επιτρέπουν ευκολότερη ρύθμιση και βελτιστοποίηση αυτής της παραμέτρου. Ακόμα, πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή ώστε να μη χαθεί η αποδοτικότητα και η διαχωριστική ικανότητα της CE λόγω εξωτερικής διεύρυνσης των ζωνών στο σύστημα σύζευξης.

2.4.4.3.2.2. Πηγή ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό

Οι δύο βασικοί τύποι πηγών ιονισμού στα εμπορικά διαθέσιμα συστήματα CE-MS είναι ο ESI και ο APCI, οι οποίοι προσαρμόστηκαν με κάποιες μικρές τροποποιήσεις από τα συστήματα HPLC-MS για να χρησιμοποιηθούν στο σύστημα CE-MS.^[4] Αν και το APCI μπορεί να δώσει καλύτερη ευαισθησία απ' ό,τι το ESI για συστατικά με μέτρια ή χαμηλή πολικότητα, δεν υπάρχουν πολλές δημοσιεύσεις με τη συγκεκριμένη πηγή ιονισμού. Αυτό οφείλεται στο ότι τα περισσότερα interfaces για APCI που σχεδιάστηκαν για HPLC-MS μπορούν να λειτουργήσουν μόνο κάτω από συνθήκες υψηλής ροής. Κατά συνέπεια, παρατηρείται μικρός λόγος S/N όταν χρησιμοποιούνται υψηλές ροές sheath liquid στο σύστημα CE-MS. Μετά το 1984, όπου η ερευνητική ομάδα του Fenn εισήγαγε την τεχνική ESI-MS, η χρήση της μεθόδου αυτής για την ανάλυση φαρμάκων και των μεταβολιτών τους αυξάνεται ραγδαία.^[82] Για την ανακάλυψη του αυτή, ο Fenn τιμήθηκε το 2002 με το βραβείο Νόμπελ Χημείας.

Στο ESI-MS, ένα αραιό διάλυμα του αναλύτη αντλείται μέσω μίας τριχοειδούς βελόνας με ρυθμό ροής μερικών $\mu\text{L}/\text{min}$.^[83] Υψηλή τάση, συνήθως 2-5 kV, εφαρμόζεται στην τριχοειδή βελόνα, η οποία μπορεί να είναι είτε θετική είτε αρνητική, ανάλογα με τους

επιθυμητούς αναλύτες. Το δυναμικό βοηθά τόσο στη δημιουργία των σταγονιδίων μέσω της διαδικασίας ηλεκτροψεκασμού, όσο και στη φόρτιση των σταγονιδίων αυτών, έτσι ώστε να σχηματιστούν μικρά σταγονίδια και τελικά φορτισμένα ιόντα στην αέρια φάση.^[81] Για τη δημιουργία του ηλεκτροψεκασμού, το ρέων υγρό πρέπει να εμφανίζει συγκεκριμένες ιδιότητες, όπως είναι η χαμηλή επιφανειακή τάση και η χαμηλή αγωγιμότητα. Σε συνδυασμό με την υψηλή τάση, διοχετεύεται επίσης στο ρέων υγρό, με υψηλή ταχύτητα, ένα αέριο, γνωστό σαν αέριο ψεκασμού, το οποίο βοηθά στο σχηματισμό των μικρών σταγονιδίων. Σαν αποτέλεσμα της τάσης που εφαρμόζεται, το υγρό που βγαίνει από την άκρη της βελόνας έχει τη μορφή 'κώνου Taylor'. Όταν το διάλυμα που αποτελεί τον κώνο Taylor φτάσει στο όριο Rayleigh, δηλαδή στο σημείο όπου η κουλομβικές απώσεις του φορτίου της επιφάνειας εξισωθούν με την επιφανειακή τάση του διαλύματος, σταγονίδια που περιέχουν περίσσεια θετικών ή αρνητικών φορτίων αποσπώνται από το άκρο της βελόνας.^[84] (Σχήμα 2.12) Τα σωματίδια αυτά κινούνται μέσω της ατμόσφαιρας προς την είσοδο του MS και δημιουργούνται φορτισμένα μόρια του αναλύτη μέσω ενός από τους προτεινόμενους μηχανισμούς. Ο μηχανισμός κουλομβικής διάσπασης υποθέτει ότι η αυξημένη πυκνότητα φορτίου λόγω της εξάτμισης του διαλύτη αναγκάζει τα μεγάλα σταγονίδια να διαιρεθούν σε όλο και μικρότερα σταγονίδια, τα οποία τελικά αποτελούνται από ένα μόνο ιόν.^[85] Ένας δεύτερος μηχανισμός, γνωστός σαν εξάτμιση ιόντος, υποστηρίζει ότι η αυξημένη πυκνότητα φορτίου που προκαλείται από την εξάτμιση του διαλύτη οδηγεί στην υπερίσχυση της επιφανειακής τάση του υγρού από τις κουλομβικές απώσεις, οδηγώντας στην απελευθέρωση των ιόντων από την επιφάνεια του σταγονιδίου.^[86] Ανεξάρτητα από το μηχανισμό από τον οποίο δημιουργούνται, η διαδικασία ESI δημιουργεί ιόντα στην αέρια φάση, τα οποία μπορούν να αναλυθούν από το λόγο m/z μέσα στο MS. Όπως έχει αναφερθεί, στη συγκεκριμένη διάταξη σύζευξης, η βελόνα ψεκασμού βρίσκεται σε γειωμένο δυναμικό, ενώ το αντίθετο ηλεκτρόδιο βρίσκεται σε ένα δυναμικό μερικών kV. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, το τελικό άκρο της στήλης του συστήματος CE να μη μπορεί να βρίσκεται σε μηδενικό δυναμικό, όπως συμβαίνει στη συνηθισμένη CE, αλλά πρέπει να βρίσκεται σε δυναμικό μερικών kV.^[69]



Σχήμα 2.12. Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας ηλεκτροψεκασμού.^[83]

2.4.4.3.2.3. Αναλυτής μάζας

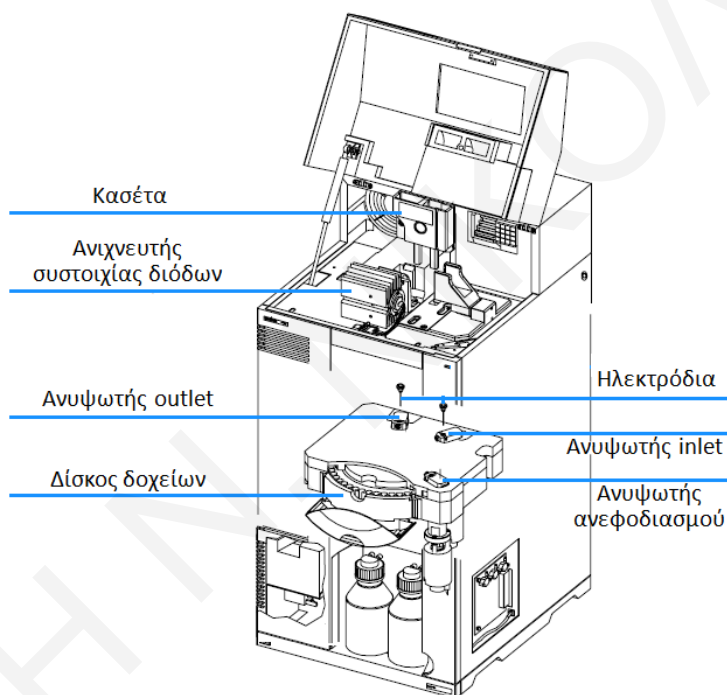
Η βασική λειτουργία του αναλυτή μάζας στο MS είναι να διαχωρίζει τα ιόντα που παράγονται στην πηγή ιόντων ανάλογα με τις διαφορετικές τιμές m/z .^[79] Ο διαχωρισμός είναι απαραίτητος έτσι ώστε το μετρούμενο ιοντικό ρεύμα στον ανιχνευτή ιόντων που ακολουθεί τον αναλυτή μαζών, να αντιστοιχεί σε ιόντα με συγκεκριμένο λόγο m/z . Ο τετραπολικός αναλυτής μάζας αποτελεί το συνηθέστερο τύπο που χρησιμοποιείται. Το εμπορικά διαθέσιμο σύστημα τετραπολικού αναλυτή μάζας προσφέρει πλεονεκτήματα όπως είναι το χαμηλό κόστος, το μικρό μέγεθος, η ανθεκτικότητα, η εύκολη λειτουργία του, καθώς και η υψηλή ταχύτητα σάρωσης.^[4,68]

Ο συγκεκριμένος 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. Κάθε ζεύγος ιόντων συνδέεται με τον πόλο πηγής τάσεως, που περιέχει μία συνεχή και μία εναλλασσόμενη υψίσυχη συνιστώσα, στην περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων. Για να ληφθεί το φάσμα μαζών με αυτή τη συσκευή, τα ιόντα επιταχύνονται στο χώρο ανάμεσα στις ράβδους με ένα δυναμικό 5 έως 10 V.^[68] Τα εναλλασσόμενα και συνεχή δυναμικά των ράβδων αυξάνουν συγχρόνως, διατηρώντας όμως το λόγο τους σταθερό. Σε κάποια χρονική στιγμή όλα τα ιόντα, εκτός από αυτά που έχουν μια συγκεκριμένη τιμή λόγου m/z , φθάνουν στις ράβδους και μετατρέπονται σε ουδέτερα μόρια. Έτσι, φθάνουν στο μεταλλάκτη μόνον τα ιόντα, των οποίων οι τιμές m/z βρίσκονται σε μια στενή περιοχή τιμών του λόγου m/z .

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1. Οργανολογία CE-UV και CE-MS

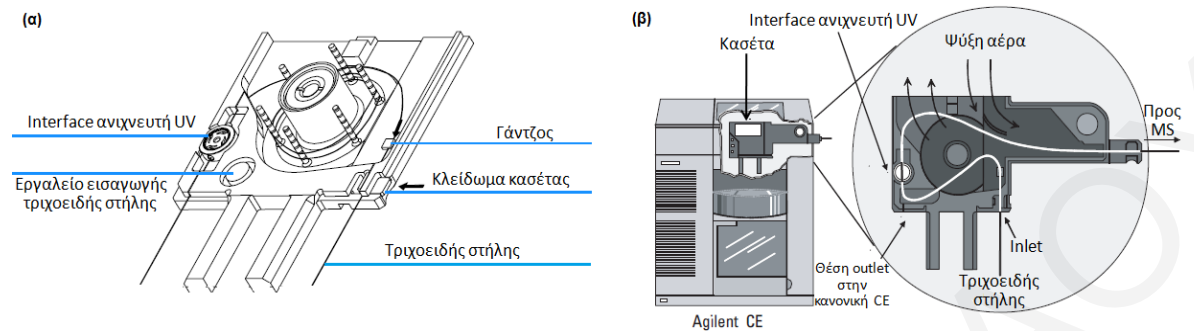
Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε σύστημα Agilent CE (Σχήμα 3.1.). Τα βασικά μέρη, από τα οποία αποτελείται το σύστημα CE, είναι το τροφοδοτικό υψηλής τάσης, τα δύο δοχεία που περιέχουν το BGE, ένα κωνικό δοχείο με τον αναλύτη, την τριχοειδή στήλη και τον ανιχνευτή συστοιχίας διόδων UV-Vis. Επιπλέον, στο σύστημα υπάρχει ένας αυτόματος δειγματολήπτης, ο οποίος είναι συνδεδεμένος με ηλεκτρονικό υπολογιστή. Ο χειρισμός του συστήματος καθώς και η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε μέσω του λογισμικού Agilent ChemStation.



Σχήμα 3.1. Σύστημα Agilent CE και τα βασικά μέρη από τα οποία αποτελείται.

Η τάση για την επίτευξη του διαχωρισμού ορίστηκε στα 25 kV, εκτός από τις περιπτώσεις που αναφέρεται διαφορετικά. Η τριχοειδής στήλη τοποθετείται μέσα σε κασέτα που περιέχει ένα παράθυρο, το οποίο επιτρέπει την ανίχνευση στο UV-Vis (Σχήμα 3.2(α)). Για την ανάλυση με CE/MS, στο σύστημα CE προσαρμόστηκε το CE-MS adapter kit Agilent G1603A, το οποίο προετοιμάζει το σύστημα CE για τη σύζευξη με το MS. Αυτό περιλαμβάνει μία κασέτα, η οποία έχει τροποποιηθεί σε σχέση με την απλή κασέτα του συστήματος CE για να επιτρέπει στην τριχοειδή στήλη που βγαίνει από το σύστημα CE να ενώνεται με το MS (Σχήμα 3.2(β)). Πριν φτάσει στον ανιχνευτή MS, η τριχοειδής στήλη περνά μέσω του interface, όπου και γίνεται η ανίχνευση με UV. Με τον τρόπο αυτό

επιτρέπεται ταυτόχρονη ανίχνευση στο UV και στο MS. Το εκτεθειμένο κομμάτι της τριχοειδούς στήλης μεταξύ των δύο οργάνων προστατεύεται με ένα σωλήνα από τεφλόν.



Σχήμα 3.2. Κασέτα που χρησιμοποιείται (α) στο CE και στο (β) CE/MS.

3.1.1. Στήλη

Σε όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε τριχοειδής στήλη από τηγμένη πυριτία, η οποία είναι επικαλυμμένη με μία προστατευτική επίστρωση πολυιμιδίου, στην οποία οφείλεται η ευελιξία της.^[67] Η τηγμένη πυριτία είναι χημικά και ηλεκτρικά αδρανής, διαπερατή στο UV-Vis, ευέλικτη και ανθεκτική, ενώ επιπλέον αποτελεί ένα φθινό υλικό. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε είχε εσωτερική διάμετρο (Internal Diameter, I.D) 50 μm και εξωτερική διάμετρο 360 μm . Στην περίπτωση της ανάλυσης των πολυφαινολικών ενώσεων με CE-UV, το αποτελεσματικό μήκος της στήλης, δηλαδή το μήκος από την είσοδο της στήλης μέχρι τον ανιχνευτή UV, ήταν 55.5 cm, ενώ το συνολικό μήκος της στήλης ήταν 64 cm. Στην ανάλυση με CE/MS, το μήκος της στήλης μέχρι τον ανιχνευτή MS ήταν 110 cm, ενώ μέχρι τον ανιχνευτή UV ήταν 21.6 cm.

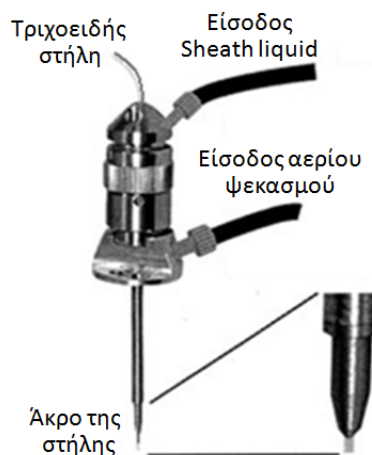
Το πλύσιμο της στήλης αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς παράγοντες για την επίτευξη καλής επαναληψιμότητας.^[67] Κάθε νέα στήλη πλενόταν αρχικά με H_2O (5 min), 1 M NaOH (60 min), H_2O (10 min) και τέλος με το BGE (40 min). Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η αποπρωτονίωση των επιφανειακών ομάδων σιλανόλης και γεμίζεται η στήλη με το BGE. Στην περίπτωση της CE/MS ανάλυσης, η τοποθέτηση της στήλης στον ανιχνευτή MS γινόταν μετά από το αρχικό πλύσιμο, για να αποφευχθεί η μόλυνση της πηγής με ιόντα νατρίου.^[87] Ενδιάμεσα των πειραμάτων, η στήλη πλενόταν για 5 min με BGE στην περίπτωση της ανάλυσης CE/MS, ενώ για την ανάλυση των πολυφαινολών η στήλη πλενόταν ενδιάμεσα των πειραμάτων με H_2O (2 min), 0.1 M NaOH (2 min) και BGE (8 min) για να αυξηθεί η επαναληψιμότητα των χρόνων μετανάστευσης. Η θερμοκρασία της στήλης διατηρήθηκε σταθερή στους 25 $^{\circ}\text{C}$, εκτός από τις περιπτώσεις που αναφέρεται διαφορετικά.

Το κόψιμο της τριχοειδούς στήλης αποτελεί έναν πολύ σημαντικό παράγοντα, ιδιαίτερα στην ανάλυση με CE-MS, για τη λήψη επαναλήψιμων αποτελεσμάτων και για κορυφές με καλό σχήμα αλλά και για επίτευξη υψηλού αριθμού πλακών. Ανώμαλα κομμένες άκρες παρεμποδίζουν το σχηματισμό ενός σταθερού ψεκασμού και δρουν σαν κέντρα προσρόφησης για συστατικά του δείγματος. Επίσης, τυχόν θραύσματα πολυιμιδίου και σωματίδια τηγμένης πυριτίας μπορεί να εμποδίσουν τη ροή μέσω της στήλης. Για το κόψιμο της στήλης χρησιμοποιήθηκε ένα Shortix Capillary Column Cutter, το οποίο περιέχει μία λεπίδα από διαμάντι (Σχήμα 3.3).



Σχήμα 3.3. Σύστημα για το κόψιμο της στήλης.

Κατά την τοποθέτηση της στήλης μέσα στο σύστημα σύζευξης του MS, το τελικό άκρο της στήλης πρέπει να προεξέχει περίπου 0.1 mm έξω από το σύστημα εκνέφωσης έτσι ώστε να επιτυγχάνεται η μέγιστη ευαισθησία.^[77] Στο σύστημα σύζευξης που χρησιμοποιείται περιέχεται ένας κοχλίας, ο οποίος με κατάλληλη ρύθμιση προσαρμόζει τη στήλη ώστε να προεξέχει ακριβώς 0.1 mm (Σχήμα 3.4).



Σχήμα 3.4. Σύστημα σύζευξης CE/MS.

3.1.2. Ανιχνευτές

3.1.2.1. Ανιχνευτής UV-Vis

Το σύστημα Agilent CE περιέχει ενσωματωμένο ανιχνευτή συστοιχίας διόδων UV-Vis. Το παράθυρο για την ανίχνευση με UV δημιουργείται αφαιρώντας 3-5 mm από την προστατευτική επίστρωση πολυμιδίου με φλόγα. Η στήλη τοποθετείται μέσα στο interface του UV και στη συνέχεια μέσα στην κασέτα έτσι ώστε το οπτικό παράθυρο που δημιουργήθηκε να εφαρμόζει στο παράθυρο της κασέτας. Η ανίχνευση των πολυφαινολικών ενώσεων έγινε στα 205 nm, ενώ η ανίχνευση της ριβαστιγμίνης και του I.S. στο UV έγινε στα 214 nm.

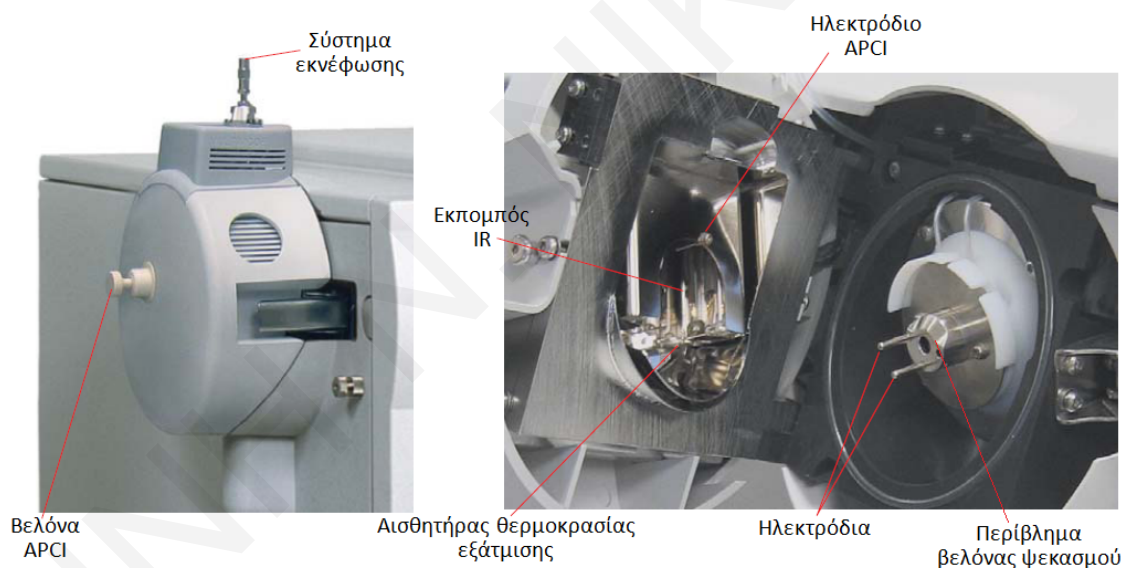
3.1.2.2. Ανιχνευτής MS

Στην περίπτωση της ανίχνευσης με MS, χρησιμοποιήθηκε ένα τετραπολικό σύστημα Agilent 6100 MS (Σχήμα 3.5), το οποίο περιέχει δύο διαφορετικές πηγές ιονισμού, μία πηγή ESI και μία πηγή APCI. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στην πηγή ESI. Για τη σύζευξη του συστήματος CE με το MS, χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα εκνέφωσης τριπλού σωλήνα, Agilent G1607A, το οποίο φαίνεται πιο πάνω, στο Σχήμα 3.4. Το σύστημα αυτό σχεδιάστηκε ώστε να προσαρμόζεται η τριχοειδής στήλη, στην οποία πραγματοποιείται ο διαχωρισμός, ένας σωλήνας που χρησιμεύει για τη μεταφορά του sheath liquid και ένας εξωτερικός σωλήνας για τη μεταφορά του αερίου ψεκασμού. Το σύστημα εκνέφωσης είναι διευθετημένο ορθογώνια στην είσοδο της τριχοειδούς βελόνας του MS στην πηγή ιονισμού. Το sheath liquid μεταφέρεται από μία ισοκρατική αντλία HPLC Agilent 1200. Η αντλία αυτή, η οποία είναι εφοδιασμένη με *splitter* 1:100, επιτρέπει στο sheath liquid να μεταφέρεται σε τιμές της τάξης των $\mu\text{L}/\text{min}$. Η χρήση της συγκεκριμένης αντλίας προσφέρει στρωτή μεταφορά του sheath liquid γεγονός που βελτιώνει το θόρυβο στο υπόβαθρο. Σαν αέριο ψεκασμού και σαν αέριο ξήρανσης χρησιμοποιήθηκε αέριο άζωτο, το οποίο μεταφέρεται μέσω γεννήτριας αζώτου.

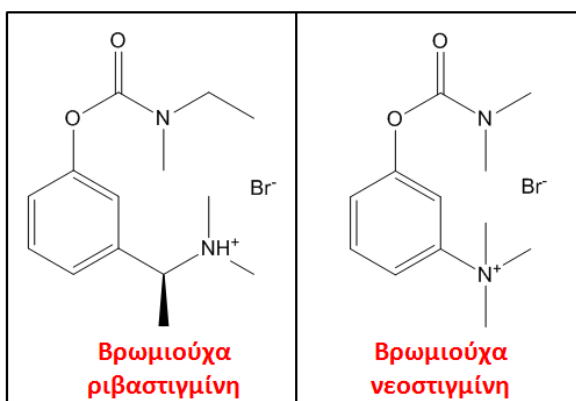
Στο MS υπάρχει η δυνατότητα εργασίας σε δύο διαφορετικές μεθόδους. Στην πρώτη μέθοδο, γνωστή σαν Scan-mode, γίνεται σάρωση των μαζών σε ένα συγκεκριμένο εύρος μαζών, το οποίο έχει οριστεί και παρακολουθείται η αφθονία των ιόντων. Όταν ολοκληρωθεί μία σάρωση, το σύστημα ξεκινά αμέσως και πάλι τη σάρωση στο εύρος αυτό. Όσο μικρότερο είναι το εύρος που έχει οριστεί, τόσο πιο γρήγορα γίνεται η σάρωση των μαζών. Κατά συνέπεια, για την απόκτηση όσο το δυνατό πιο ποιοτικών δεδομένων πρέπει να γίνεται σάρωση μόνο του απαραίτητου εύρους μαζών. Ο χρόνος μεταξύ δύο

σαρώσεων είναι 20 ms και η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται συνεχώς κατά τη διάρκεια της ανάλυσης. Η μέθοδος αυτή επιλέγεται σε περίπτωση ποιοτικής ανάλυσης, όπως για παράδειγμα για τον προσδιορισμό άγνωστων συστατικών. Η δεύτερη μέθοδος, γνωστή σαν SIM-mode (Selected Ion Monitoring mode), παρακολουθεί συγκεκριμένα ιόντα. Με χρήση της μεθόδου αυτής μεγιστοποιείται η ευαισθησία και έτσι επιλέγεται για την ποσοτική ανάλυση γνωστών ενώσεων.

Στο MS πραγματοποιήθηκε σάρωση των θετικών ιόντων αφού τόσο η ριβαστιγμίνη όσο και η νεοστιγμίνη, η οποία χρησιμοποιήθηκε σαν εσωτερικό πρότυπο (Internal Standard, I.S.), εμφανίζονται σαν πρωτονιωμένα μοριακά ιόντα $[M+H]^+$. Συγκεκριμένα, στη μέθοδο Scan-mode έγινε σάρωση των μαζών με λόγο m/z από 150 έως 350. Στη SIM-mode, επιλέχθηκαν να παρακολουθούνται οι λόγοι m/z 251 και 223, οι οποίοι αντιστοιχούν στα πρωτονιωμένα μοριακά ιόντα της ριβαστιγμίνης και της νεοστιγμίνης, αντίστοιχα. Οι δομές των δύο ενώσεων φαίνονται στο Σχήμα 3.6.



Σχήμα 3.5. Τετραπολικό σύστημα Agilent MS.



Σχήμα 3.6. Δομές της ριβαστιγμίνης και της νεοστιγμίνης (I.S.).

Αξίζει εδώ να σημειωθεί ότι μία φορά το μήνα γινόταν η διαδικασία ‘tuning’. Η διαδικασία αυτή είναι απαραίτητη όταν χρησιμοποιείται το τετραπολικό σύστημα MS σαν ανιχνευτής στην CE, καθώς κατά τη διάρκεια της ανάλυσης ένα φάσμα μάζας συσχετίζεται με κάθε σημείο στο ηλεκτροφερόγραμμα του συστήματος CE. Η διαδικασία αυτή γίνεται για τη ρύθμιση των παραμέτρων του τετραπολικού συστήματος CE/MS ώστε:

- να μεγιστοποιείται η ευαισθησία,
- να διατηρείται αποδεκτή διαχωριστική ικανότητα,
- να εξασφαλίζεται προσδιορισμός της μάζας με ακρίβεια.

Η διαδικασία ‘tuning’ γινόταν με αντικατάσταση του σωλήνα που διοχετεύει το sheath liquid με ένα σωλήνα, ο οποίος μεταφέρει ένα πρότυπο διάλυμα βαθμονόμησης και στη συνέχεια γίνεται ξέπλυμα του συστήματος με το διάλυμα αυτό για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, το σύστημα επιβεβαιώνει ότι τα ιόντα του διαλύματος, τα οποία έχουν γνωστές τιμές m/z , βρίσκονται στη σωστή θέση. Μετά από τη βελτιστοποίηση των παραμέτρων αυτών, οι τιμές που λαμβάνονται σώζονται σε ένα αρχείο. Το αρχείο αυτό καθορίζεται στη συνέχεια στη μέθοδο και χρησιμοποιείται για να ληφθούν τα δεδομένα από το δείγμα. Η διαδικασία ‘tuning’ συνήθως δεν πραγματοποιείται πέραν της μίας φορές μηνιαίως καθώς το MS παραμένει σταθερό για αρκετές εβδομάδες, αλλά και για να αποφευχθούν παρεμβολές από τα ιόντα του διαλύματος βαθμονόμησης.

Ο καθαρισμός του συστήματος ESI/MS αποτελεί έναν πολύ σημαντικό παράγοντα για τη λήψη υψηλής ευαισθησίας. Καθημερινά πραγματοποιούνταν καθαρισμός του προστατευτικού περιβλήματος της βελόνας ψεκασμού (spray shield) με χρήση διαλύματος H_2O :ισοπροπανόλη (50:50). Μία φορά την εβδομάδα γινόταν καθαρισμός του θαλάμου ψεκασμού με απομάκρυνση του από το σύστημα ESI/MS και πλύσιμο του και πάλι με διάλυμα H_2O :ισοπροπανόλη (50:50). Και στις δύο περιπτώσεις, πριν από τον καθαρισμό, δινόταν αρκετός χρόνος στο σύστημα για ψύξη του σε θερμοκρασία δωματίου, αφού η θερμοκρασία του θαλάμου ψεκασμού στην οποία διεξάγονταν τα πειράματα ήταν μεταξύ 150 και 350°C.

Κατά τη βελτιστοποίηση της μεθόδου μεταβλήθηκαν διάφοροι παράμετροι του MS. Οι εξής παράμετροι διατηρήθηκαν σταθεροί σε όλες τις περιπτώσεις:

- Τάση τριχοειδούς βελόνας/Capillary Voltage: είναι η τάση που εφαρμόζεται στην είσοδο της τριχοειδούς βελόνας. Η τάση αυτή είναι συγκριτικά με το σύστημα εκνέφωσης και το θάλαμο ψεκασμού, τα οποία βρίσκονται σε γειωμένο δυναμικό.

Η πολικότητα της ρυθμίζεται αυτόματα αντίθετα της πολικότητας των ιόντων που θα αναλυθούν. Η τάση της τριχοειδούς βελόνας ορίστηκε στα 4 kV.

- Τάση θρυμματισμού/Fragmental voltage: είναι η τάση που εφαρμόζεται στο τελικό άκρο της τριχοειδούς βελόνας. Η τάση αυτή επηρεάζει τη μεταφορά και το θρυμματισμό των ιόντων και δίνει την ώθηση στα ιόντα για να διασχίσουν το τμήμα υψηλής πίεσης μεταξύ του τελικού άκρου της τριχοειδούς βελόνας και του αποκορυφωτή. Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή αυτή τόσο υψηλότερος είναι ο θρυμματισμός των ιόντων και η τιμή της εξαρτάται από τα συστατικά που αναλύονται. Η τάση θρυμματισμού ορίστηκε στα 110 V.
- Θερμοκρασία Εξατμιστήρα/Vaporizer Temperature: καθορίζει τη θερμοκρασία για την εξάτμιση. Εξαρτάται από το διαλύτη και την ταχύτητα ροής. Για υδατικά διαλύματα ή για υψηλές ροές απαιτούνται υψηλότερες θερμοκρασίες. Η θερμοκρασία του εξατμιστήρα ορίστηκε στους 200 °C.
- Ενίσχυση/Gain: παράγοντας ενίσχυσης του σήματος στο MS. Αποτελεί μία συσχέτιση της αφθονίας σήματος ως προς την τάση του πολλαπλασιαστή ηλεκτρονίων. Η ενίσχυση του σήματος ορίστηκε στο 3.
- Όριο/Threshold: αποτελεί μία τιμή για την αφθονία. Λαμβάνονται υπόψη μόνο τα δεδομένα που έχουν τιμή στο φάσμα μαζών σε κάθε σάρωση ίση ή μεγαλύτερη από την τιμή αυτή. Το όριο ορίστηκε στο 50.
- Μέγεθος βημάτων/Stepsize: καθορίζει το μέγεθος των βημάτων μεταξύ των σημείων της σάρωσης και κατά συνέπεια επηρεάζει την ταχύτητα της σάρωσης. Η τιμή αυτή ορίστηκε στο 0.1 scan/sec.
- Εύρος κορυφής/Peakwidth: καθορίζει το αναμενόμενο χρωματογραφικό εύρος της κορυφής σε λεπτά. Κορυφές με εύρος μικρότερο από την τιμή αυτή δε λαμβάνονται υπόψη. Το εύρος της κορυφής ορίστηκε στα 0.120 min.

3.1.3. Έγχυση του δείγματος

Σε όλες τις περιπτώσεις, τόσο κατά την ανάλυση των πολυφαινολικών ενώσεων με CE-UV, όσο και κατά την CE-MS ανάλυση, η έγχυση του δείγματος πραγματοποιήθηκε υδροδυναμικά. Επιλέχθηκε ο συγκεκριμένος τρόπος έγχυσης αφού στην ηλεκτροκινητική έγχυση γίνεται διάκριση των ιόντων με αποτέλεσμα να εισάγονται μεγαλύτερες ποσότητες ευκίνητων ιόντων. Επίσης, η υδροδυναμική έγχυση είναι πιο επαναλήψιμη απ' ότι η ηλεκτροκινητική έγχυση.^[27] Στην περίπτωση των πολυφαινολικών ενώσεων, η έγχυση του δείγματος έγινε με εφαρμογή πίεσης 30 mbar για 3 s, ενώ κατά την CE-MS ανάλυση, η

έγχυση του μείγματος της ριβαστιγμίνης με το I.S. έγινε με εφαρμογή πίεσης 35 mbar για 5 sec.

3.2. Αντιδραστήρια

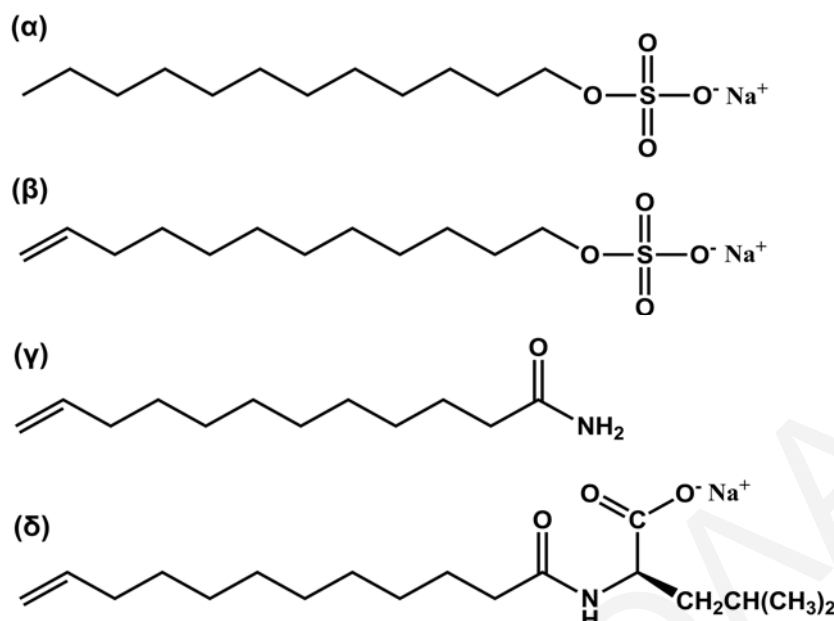
Οι οργανικοί διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν, όπως αιθανόλη (ethanol, EtOH), μεθανόλη (methanol, MeOH), ισοπροπανόλη (isopropanol, isoprOH), ακετονιτρίλιο (acetonitrile, ACN) και οξικός αιθυλεστέρας, ήταν υψηλής αναλυτικής καθαρότητας (HPLC grade) ή LC-MS grade, όπου ήταν διαθέσιμοι. Ακόμα, τα υπόλοιπα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν, όπως ρυθμιστικά διαλύματα και αναλύτες, επιλέχθηκαν να έχουν την υψηλότερη δυνατή καθαρότητα. Μετά από την παρασκευή τους, τα BGEs φιλτράρονταν με χρήση σύριγγας με φίλτρο διαμέτρου πόρων 0.45-μm και τοποθετούνταν σε σύστημα υπερήχων για 5 min. Όλα τα δείγματα των αναλυτών και τα BGEs, φυλάγονταν αμέσως μετά την παρασκευή τους στους 4 °C.

3.2.1. Αντιδραστήρια για CE-UV ανάλυση των πολυφαινολικών ενώσεων

3.2.1.1. Ρυθμιστικά διαλύματα

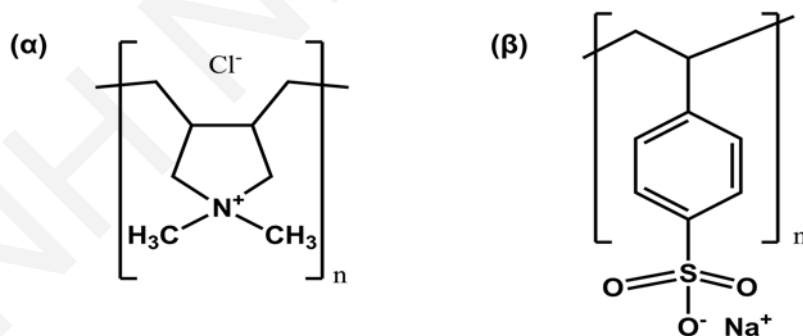
Τα ρυθμιστικά διαλύματα που δοκιμάστηκαν σαν BGEs στα πειράματα CZE και MEKC για το διαχωρισμό των οκτώ πολυφαινολικών ενώσεων ήταν το διβασικό φωσφορικό νάτριο (Na_2HPO_4) και το δεκαένυδρο τετραβορικό νάτριο ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$). Η ρύθμιση του pH έγινε με διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) ή φωσφορικού οξέος (H_3PO_4), ανάλογα με την επιθυμητή τιμή pH. Η μέτρηση του pH έγινε σε pH-μετρο 'Hanna Instruments pH 211, Microprocessor pH'.

Στην περίπτωση της MEKC, οι τασιενεργές ουσίες προστέθηκαν στο ρυθμιστικό διάλυμα μετά από την παρασκευή του. Σαν τασιενεργές ουσίες χρησιμοποιήθηκαν το SDS, καθώς επίσης το πολυμερές τασιενεργών ουσιών poly-SUL [πολύ (βαλινικός N-ενδεκυλεστέρας νατρίου)] και μίγμα συμπολυμερών των τασιενεργών ουσιών poly-SUG [πολυ (ενδέκυλο γλυκινικό νάτριο)] και poly-SUS [πολυ (θειικό-10-ενδέκυλο νάτριο)] (40:60) (Σχήμα 3.7). Τα πολυμερή τασιενεργών ουσιών παραχωρήθηκαν ευγενικά από την ερευνητική ομάδα του καθηγητή Warner από το Louisiana State University (Baton Rouge, LA, USA).



Σχήμα 3.7. Δομές των μονομερών των τασιενεργών ουσιών που δοκιμάστηκαν: (α) SDS, (β) SUS, (γ) SUG και (δ) SUL.

Στην περίπτωση της μεθόδου OT-CEC, για την επικάλυψη της στήλης χρησιμοποιήθηκαν το κατιοντικό πολυμερές πολυ (διαλλυλδιμεθυλ αμμωνιακό χλωρίδιο), [poly (diallyldimethylammonium chloride), PDADMAC], και το ανιοντικό πολυμερές πολυ (σουλφονικό στυρένιο), [poly (styrene sulfonate), PSS], οι δομές των οποίων φαίνονται στο Σχήμα 3.8.



Σχήμα 3.8. Δομές των πολυμερών που χρησιμοποιήθηκαν για την επικάλυψη της στήλης με τη μέθοδο OT-CEC: (α) PDADMAC και (β) PSS.

3.2.1.2. Δείγματα αναλυτών

Όλα τα δείγματα των πολυφαινολικών ενώσεων (trans-ρεσβερατρόλη, επικατεχίνη, κατεχίνη, ναρινγενίνη, καϊμφερόλη, απιγενίνη, μυρικετίνη, κερκετίνη) αγοράστηκαν από την εταιρία Sigma-Aldrich. Οι δομές των οκτώ πολυφαινολικών ενώσεων που αναλύθηκαν και ο αριθμός που αντιστοιχεί στην κάθε ένωση φαίνονται στο Σχήμα 3.9. Για τον κάθε αναλύτη παρασκευάστηκε διάλυμα συγκέντρωσης 0.2 mg/mL σε διαλύτη H₂O:EtOH σε αναλογία 1:1, με εξαίρεση τη μυρικετίνη, για την οποία παρασκευάστηκε διάλυμα

συγκέντρωσης 0.5 mg/mL και για τη ναρινγενίνη, για την οποία χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση 0.1 mg/mL.

Σχήμα 3.9. Δομές των 8 πολυφαινολικών ενώσεων και ο αριθμός που αντιστοιχεί στην κάθε ένωση.

3.2.1.3. Επεξεργασίες δειγμάτων κρασιού

Για να επιτευχθεί ο προσδιορισμός των πολυφαινολών στο κρασί, απαιτείται κάποια διαδικασία για την απομόνωση των συστατικών αυτών από το κρασί πριν από την εισαγωγή του στο σύστημα CE. Αν και στη βιβλιογραφία υπάρχουν πολλές μελέτες όπου γίνεται προσδιορισμός των συγκεκριμένων ενώσεων σε διάφορα φυσικά προϊόντα, εντούτοις δεν υπάρχει μία πρότυπη μέθοδος εξαγωγής των ενώσεων, αλλά απαιτείται η εξεύρεση της βέλτιστης διαδικασίας για την απομόνωση τους σε κάθε περίπτωση. Στην παρούσα Δ.Δ. δοκιμάστηκαν έξι διαφορετικές διαδικασίες για την εύρεση της πιο κατάλληλης διαδικασίας για την απομόνωση των πολυφαινολικών ενώσεων από το κρασί:

[Α] Έγινε αραίωση του κρασιού στο BGE σε αναλογία 1:9 και φιλτράρισμα με φίλτρο με διάμετρο πόρων 0.45 μm .^[65]

[B] 3 mL κρασιού εξατμίστηκαν κάτω από συνεχή ροή αζώτου στους 50 °C. Το στερεό διαλύθηκε σε 3 mL EtOH και ακολούθησε διήθηση για απομάκρυνση του εναπομείναντος στερεού.^[57]

[Γ] Πραγματοποιήθηκε εκχύλιση 15 mL κρασιού με 45 mL διαιθυλαιθέρα με ανάδευση για 30 min. Η οργανική φάση συλλέχθηκε και η υδατική φάση επαναεκχυλίστηκε με 45 mL οξικό αιθύλιο. Η δεύτερη οργανική φάση συλλέχθηκε, αναμειχθηκε με την πρώτη και ξηράθηκαν με 5 g άνυδρου θειικού νατρίου. Ακολούθησε εξάτμιση σε συσκευή περιστροφικού συμπυκνωτή και ξήρανση υπό κενό. Το στερεό διαλύθηκε σε 2 mL EtOH και ακολούθησε φιλτράρισμα με φίλτρο με διάμετρο πόρων 0.45 μm.^[88]

[Δ] Έγινε εκχύλιση 15 mL κρασιού με 15 mL διαιθυλαιθέρα με ανάδευση για 30 min. Η οργανική φάση συλλέχθηκε και εξατμίστηκε κάτω από συνεχή ροή αζώτου. Το στερεό διαλύθηκε σε 1.5 mL EtOH.^[58]

[E] Το pH του κρασιού ρυθμίστηκε αρχικά στην τιμή 2 με χρήση 1 M HCl. Έγινε δύο φορές εκχύλιση 15 mL κρασιού με 15 mL διαιθυλαιθέρα για 30 min. Η οργανική φάση συλλέχθηκε και εξατμίστηκε κάτω από συνεχή ροή αζώτου και τέλος το στερεό διαλύθηκε σε 1.5 mL EtOH.^[89]

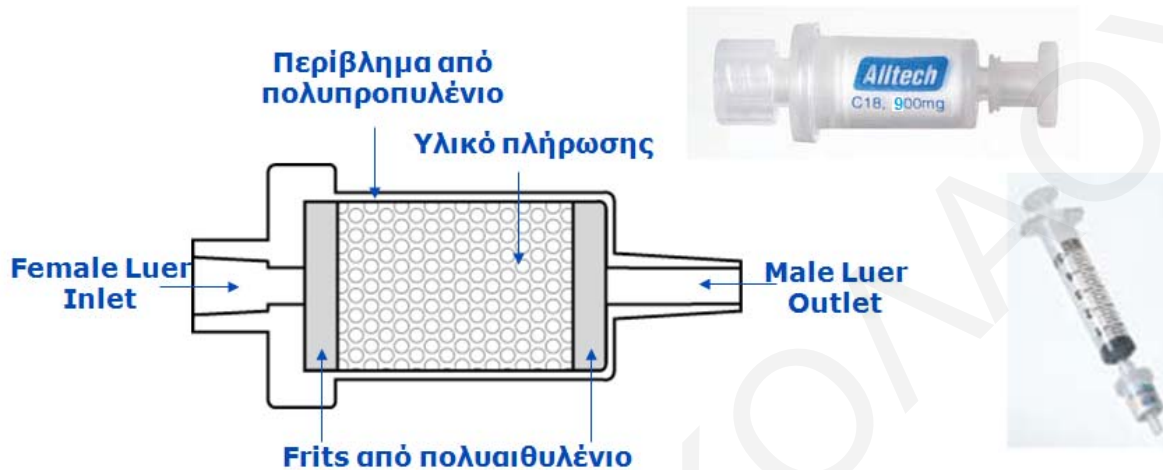
[Στ] Η τελευταία διαδικασία που δοκιμάστηκε ήταν SPE με χρήση μίας Alltech Maxi-Clean Prevail Cartridge, όπου το προσροφητικό υλικό ήταν C18 με μάζα υποστρώματος (bed weight) 900 mg (Σχήμα 3.10). Αποτελεί μία στήλη αντίστροφης φάσης με κάλυμμα από πολυπροπυλένιο, ενώ το υλικό πλήρωσης συγκρατείται με frits από πολυαιθυλένιο. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε με χρήση σύριγγας. Η SPE-στήλη πλύθηκε πριν από τη χρήση της με 4 mL MeOH και 4 mL νερού. Ακολούθως, 5 mL κρασιού τοποθετήθηκαν στο SPE-στρώμα με ρυθμό ροής 1 mL/min. Για την έκλουση των πολυφαινολικών ενώσεων δοκιμάστηκαν τρεις διαφορετικοί οργανικοί διαλύτες: MeOH, EtOH και ACN (2 mL).

3.2.2. Αντιδραστήρια για CE-MS ανάλυση της ριβαστιγμίνης

3.2.2.1. Ρυθμιστικά διαλύματα και sheath liquids

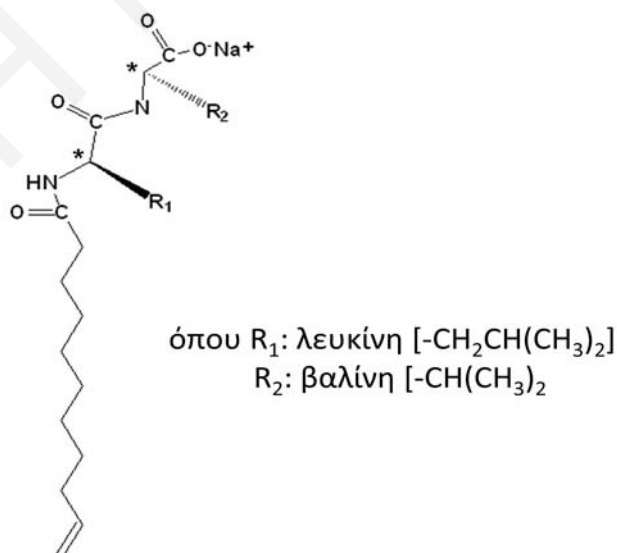
Σαν BGE για τον προσδιορισμό της ριβαστιγμίνης δοκιμάστηκαν το διβασικό φωσφορικό νάτριο (Na_2HPO_4), το δεκαένυδρο τετραβορικό νάτριο ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), το μονόξινο φωσφορικό αμμώνιο $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4]$ και το οξικό αμμώνιο ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$). Το pH του BGE ρυθμίστηκε είτε με χρήση αμμωνίας (NH_3) είτε με χρήση οξικού οξέος (CH_3COOH)

και μετρήθηκε με χρήση ενός pH-μετρου 'Seven Easy, Mettler Toledo AG'. Σαν sheath liquids δοκιμάστηκαν το οξικό οξύ, το φορμικό οξύ (HCOOH) και το οξικό αμμώνιο. Για την παρασκευή όλων των διαλυμάτων για τη CE-MS ανάλυση, χρησιμοποιήθηκε νερό που λήφθηκε από σύστημα καθαρισμού νερού 'Arium 611, Santorius A.G.'



Σχήμα 3.10. SPE-στήλη Alltech Maxi-Clean Prevail.

Στην περίπτωση της MEKC, σαν τασιενεργές ουσίες χρησιμοποιήθηκαν το SDS, μίγμα συμπολυμερών των τασιενεργών ουσιών poly-SUG [πολυ (ενδέκυλο γλυκινικό νάτριο)] και poly-SUS [πολυ (θειικό-10-ενδέκυλο νάτριο)] (20:80) (βλέπε Σχήμα 3.7) καθώς επίσης και το διπεπτιδικό πολυμερές τασιενεργών ουσιών poly-SULV [poly-(L-L)-SULV: πολυ ((L-L) λευκινικός-βαλινικός N-ενδεκυλεστέρας νατρίου)] (Σχήμα 3.11).



Σχήμα 3.11. Δομή του μονομερούς του διπεπτιδικού πολυμερούς τασιενεργών ουσιών poly-SULV.

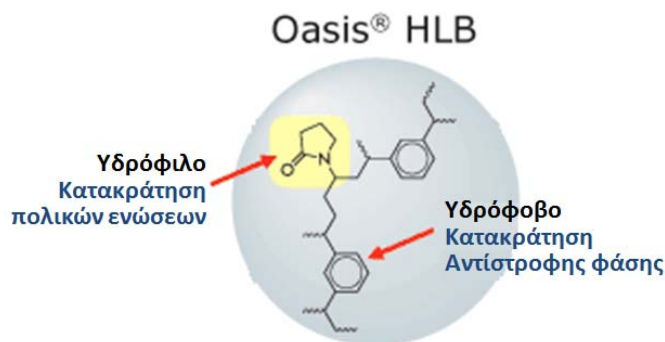
Στην περίπτωση της μεθόδου OT-CEC, για την επικάλυψη της στήλης χρησιμοποιήθηκαν το κατιοντικό PDADMAC (βλέπε Σχήμα 3.8), και το ανιοντικό πολυμερές τασιενεργών ουσιών poly-SUL (βλέπε Σχήμα 3.7).

3.2.2.2. Δείγματα αναλυτών

Το πρότυπο διάλυμα της βρωμιούχας νεοστιγμίνης, η οποία χρησιμοποιήθηκε σαν I.S., παρασκευάστηκε σε συγκέντρωση 1.2 mg/mL διαλύοντας κατάλληλη ποσότητα του στερεού σε νερό. Η ριβαστιγμίνη εκχυλίστηκε από το φαρμακευτικό σκεύασμα Exelon ως εξής:^[90] Το περιεχόμενο δέκα κάψουλων τοποθετήθηκε σε ποτήρι ζέσεως και ομογενοποιήθηκε. Το στερεό αναμείχθηκε με 60 mL MeOH και τοποθετήθηκε σε σύστημα υπερήχων για 10 min. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε στους 1300 x g για 15 min και απομονώθηκε το υπερκείμενο διάλυμα. Η συγκέντρωση του διαλύματος της ριβαστιγμίνης υπολογίστηκε να είναι 0.6 mg/mL. Με ανάμειξη του διαλύματος του I.S. συγκέντρωσης 1.2 mg/mL με το διάλυμα της ριβαστιγμίνης και προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας MeOH, παρασκευάστηκε το μείγμα που χρησιμοποιήθηκε κατά τη βελτιστοποίηση της μεθόδου, όπου η συγκέντρωση τόσο της ριβαστιγμίνης όσο και του I.S. ήταν 0.3 mg/mL, σε διαλύτη H₂O:MeOH (25:75).

3.2.2.3. Επεξεργασίες δειγμάτων πλάσματος

Για την απομόνωση της ριβαστιγμίνης από το πλάσμα δοκιμάστηκαν διάφορες προαναλυτικές τεχνικές επεξεργασίας του πλάσματος για την εύρεση της πιο κατάλληλης διαδικασίας. Στην περίπτωση της ανάλυσης δειγμάτων αίματος, δε χρησιμοποιείται συνήθως αραίωση και φιλτράρισμα, αφού οι μήτρες αυτές περιέχουν πολλά ανεπιθύμητα συστατικά, τα οποία πρέπει να απομακρυνθούν. Επίσης, δε μπορεί να γίνει απλή αραίωση και φιλτράρισμα όταν ο αναλύτης βρίσκεται σε πολύ μικρή συγκέντρωση στο δείγμα. Έτσι, πριν την εισαγωγή του πλάσματος στο σύστημα CE/MS είναι απαραίτητη κάποια διαδικασία για την εξαγωγή της ριβαστιγμίνης από αυτό. Για το λόγο αυτό οι διαδικασίες που δοκιμάστηκαν ήταν η LLE καθώς και η SPE με δύο διαφορετικά προσροφητικά υλικά. Συγκεκριμένα, δοκιμάστηκε μία Oasis Hydrophilic-Lipophilic-Balanced (HLB) στήλη και μία Alltech Maxi-Clean Prevail (900 mg, στατική φάση C18). Η Oasis HLB στήλη είναι μία στήλη αντίστροφης φάσης, η οποία αποτελείται από συγκεκριμένες αναλογίες δύο μονομερών, του υδρόφιλου N-vinylpyrrolidone και του υδρόφοβου divinylbenzene (1 cm³/30 mg) (Σχήμα 3.12).



Σχήμα 3.12. Βασικές δομικές μονάδες του προσροφητικού υλικού της στήλης Oasis HLB.

Σε όλες τις περιπτώσεις, τα δείγματα πλάσματος, τα οποία προέρχονταν από ασθενείς με τη νόσο του Alzheimer που δε λάμβαναν κάποια θεραπευτική αγωγή, εμβολιάζονταν αρχικά με ριβαστιγμίνη (0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) και νεοστιγμίνη (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) πριν εφαρμοστούν σε αυτά οι διάφορες διαδικασίες.

LLE: 20 μL αμμωνίας (25 %) προστέθηκαν σε 100 μL πλάσματος και στη συνέχεια το δείγμα εμβολιάστηκε με 10 μL I.S. και 1.0 μL ριβαστιγμίνη. Το μείγμα εκχυλίστηκε τρεις φορές με 500 μL οξικού αιθυλεστέρα. Οι τρεις οργανικές φάσεις απομονώθηκαν και αναμείχθηκαν. Στη συνέχεια, ακολούθησε εξάτμιση των οργανικών φάσεων κάτω από συνεχή ροή αζώτου. Το στερεό υπόλειμμα διαλύθηκε σε 100 μL MeOH ή ACN.

SPE: 160 μL πλάσματος αναμείχθηκαν με 5 μL I.S. και 1.6 μL ριβαστιγμίνης. Οι SPE-στήλες πλύθηκαν αρχικά πριν από τη χρήση τους με 1 mL MeOH και 2 mL νερό. Το μείγμα του πλάσματος τοποθετήθηκε πάνω στην εκχυλιστική στήλη και στη συνέχεια η στήλη πλύθηκε με 3 mL νερό. Τέλος, έγινε έκλουση της ριβαστιγμίνης και της νεοστιγμίνης με 100 μL MeOH.

3.3. Ανάλυση και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων

Ο χειρισμός του συστήματος καθώς και η ανάλυση των αποτελεσμάτων γινόταν μέσω του λογισμικού Agilent ChemStation. Ο λόγος σήμα προς θόρυβο (Signal-to-Noise, S/N), δίνεται από το ύψος της κορυφής της ριβαστιγμίνης ως προς τα επίπεδα του θορύβου. Ο θόρυβος προσδιορίζεται από το σύστημα με χρήση της μεθόδου κορυφή-προς-κορυφή για εύρος χρόνου 1 min, το οποίο καθορίζεται από το χρήστη.

3.3.1. Όρια ανίχνευσης

Το όριο ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD) ορίζεται σαν η μικρότερη συγκέντρωση ή ποσότητα του αναλύτη που μπορεί να ανιχνευτεί με ακρίβεια για μία δεδομένη αναλυτική

διαδικασία ή σαν η μικρότερη ποσότητα που μπορεί με σαφήνεια να διακριθεί από το υπόβαθρο.^[91,92] Το LOQ είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση στην οποία ποσοτικά αποτελέσματα μπορούν να ληφθούν με βεβαιότητα και κατά συνέπεια είναι μία υψηλότερη συγκέντρωση απ' ό τι το LOD. Αν και αποτελούν τα σημαντικότερα κριτήρια στην ποσοτική ανάλυση, εντούτοις επικρατεί μία σύγχυση ως προς τον τρόπο υπολογισμού τους και είναι κάτι που απασχολεί εδώ και πολλά χρόνια την επιστημονική κοινότητα. Οι τιμές που υπολογίζονται για τα όρια ανίχνευσης πολλές φορές διαφέρουν μέχρι και τάξεις μεγέθους για πολύ παρόμοια, ακόμα και ακριβώς τα ίδια, χρωματογραφικά συστήματα.^[92]

Οι βασικότερες προσεγγίσεις που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό του LOD είναι η στατιστική προσέγγιση και η εμπειρική προσέγγιση.^[91] Η στατιστική προσέγγιση βασίζεται στην επαναλαμβανόμενη μέτρηση τυφλών δειγμάτων, δηλαδή δειγμάτων τα οποία δεν περιέχουν αναλύτη αλλά με μήτρα όμοια με αυτή του μέσου δείγματος που αναλύεται και υπολογίζονται η μέση τιμή του τυφλού σήματος (\bar{S}_{bl}) και η τυπική απόκλιση του τυφλού σήματος (s_{bl}). Ως ελάχιστο αναλυτικό σήμα S_m που μπορεί να γίνει αντιληπτό, θεωρείται το άθροισμα του μέσου τυφλού σήματος \bar{S}_{bl} και του πολλαπλάσιου (k) της τυπικής απόκλισης του τυφλού s_{bl} , δηλαδή είναι:^[68]

$$S_m = \bar{S}_{bl} + k s_{bl} \text{ (Εξίσωση 3.1)}$$

Τελικά, η κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης (m) χρησιμοποιείται για τη μετατροπή του S_m σε συγκέντρωση, τα οποία αντιστοιχούν στα LOD και LOQ για k ίσο με 3 και k ίσο με 10, αντίστοιχα:

$$C_m = \frac{S_m - \bar{S}_{bl}}{m} \text{ (Εξίσωση 3.2)}$$

Καθώς η τεχνική αυτή απαιτεί 20 ή και περισσότερες εγχύσεις του τυφλού δείγματος είναι σε πολλές περιπτώσεις δύσκολη ή και μη εφικτή.^[92] Επιπλέον, εκτός του ότι αποτελεί μία πολύ χρονοβόρα διαδικασία, είναι πολύ δύσκολο να παρασκευαστεί ένα πραγματικά τυφλό δείγμα.

Στην εμπειρική μέθοδο, γίνεται ανάλυση μίας σειράς δειγμάτων που περιέχουν όλο και χαμηλότερες συγκεντρώσεις του αναλύτη. Συγκεκριμένα, παρασκευάζονται διάφορες συγκεντρώσεις του δείγματος με προσθήκη καθορισμένη ποσότητάς του σε τυφλό δείγμα. Το LOD και το LOQ υπολογίζονται ως εξής:^[93,94]

$$LOD = \frac{3 * SD}{m} \text{ (Εξίσωση 3.3)}$$

$$LOQ = \frac{10 * SD}{m} \text{ (Εξίσωση 3.4)}$$

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

Η SD υπολογίζεται από τη σχέση:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(Y - Y_i)^2}{n - 2}} \text{ (Εξίσωση 3.5)}$$

Μια τρίτη μέθοδος που έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για τον υπολογισμό του LOD και του LOQ βασίζεται στο λόγο S/N .^[88,90,95-101] Συγκεκριμένα, τα LOD και LOQ υπολογίζονται σαν οι συγκεντρώσεις που αντιστοιχούν σε λόγο S/N ίσο με 3 και 10, αντίστοιχα.

Στην παρούσα Δ.Δ. επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό του LOD και του LOQ η εμπειρική μέθοδος.

3.3.2. Επαναληψιμότητα

Η επαναληψιμότητα αποτελεί μέτρο του τυχαίου ή απροσδιόριστου σφάλματος της ανάλυσης. Συγκεκριμένα, η επαναληψιμότητα περιγράφει τη συμφωνία μεταξύ των αναλυτικών δεδομένων για μία σειρά επαναλαμβανόμενων μετρήσεων ή για μετρήσεις που έχουν ληφθεί υπό τις ίδιες ακριβώς συνθήκες.^[68] Η εκτίμηση της επαναληψιμότητας της μεθόδου έγινε με το κριτήριο της σχετικής τυπικής απόκλισης (Relative Standard Deviation, RSD), το οποίο δίνεται από την Εξίσωση 3.6, ενώ η SD δίνεται από την Εξίσωση 3.7:

$$RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \text{ (Εξίσωση 3.6)}$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{N - 1}} \text{ (Εξίσωση 3.7)}$$

όπου x_i : η μέση τιμή της i μέτρησης και \bar{x} : η μέση τιμή N μετρήσεων.

3.3.3. Διαχωριστική ικανότητα

Τα αποτελέσματα σε μια CE ανάλυση μπορούν να χαρακτηριστούν από τη διαχωριστική ικανότητα.^[74] Η διαχωριστική ικανότητα περιγράφει την ικανότητα μιας στήλης να διαχωρίζει δύο αναλύτες.^[67] Ο βασικός στόχος είναι η επίτευξη της μέγιστης δυνατής διαχωριστικής ικανότητας στο μικρότερο δυνατό χρόνο.^[74] Η διαχωριστική ικανότητα μπορεί να υπολογιστεί από ένα ηλεκτροφερόγραμμα από τη σχέση:

$$R = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{w_A + w_B} \quad (\text{Εξίσωση 3.8})$$

όπου $(t_R)_A$ και $(t_R)_B$ οι χρόνοι κατακράτησης των κορυφών Α και Β, αντίστοιχα, και w_A και w_B , το εύρος της βάσης των κορυφών Α και Β, αντίστοιχα.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζονται και συζητούνται τα αποτελέσματα που προέκυψαν κατά την ανάπτυξη των μεθόδων CE και την εφαρμογή τους σε φυσικά προϊόντα και βιολογικά δείγματα. Το συγκεκριμένο κεφάλαιο χωρίζεται σε δύο κύρια μέρη. Το πρώτο μέρος αφορά την ανάπτυξη της μεθόδου CE με ανιχνευτή UV για το διαχωρισμό των οκτώ πολυφαινολικών ενώσεων και τον προσδιορισμό τους σε κυπριακά κρασιά. Το δεύτερο μέρος αφορά την ανάπτυξη της μεθόδου CE-MS για τον προσδιορισμό της ριβαστιγμίνης και στη συνέχεια την εφαρμογή της μεθόδου που αναπτύσσεται στο πλάσμα. Και στις δύο περιπτώσεις, περιγράφεται αρχικά η διαδικασία βελτιστοποίησης της μεθόδου, ακολούθως γίνεται αξιολόγηση της μεθόδου που αναπτύχθηκε, στη συνέχεια συζητείται η εύρεση της βέλτιστης διαδικασίας επεξεργασίας του κρασιού και του πλάσματος για την εξαγωγή των ουσιών που μας ενδιαφέρουν και τέλος γίνεται προσδιορισμός των υπό μελέτη ενώσεων στα δείγματα αυτά.

4.1. Προσδιορισμός πολυφαινολικών ενώσεων με χρήση της τεχνικής CE-UV

Στα πρώτα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των οκτώ πολυφαινολικών ενώσεων δοκιμάστηκαν διάφοροι οργανικοί διαλύτες και σε διάφορες αναλογίες, για την παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων των αναλυτών. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε σαν διαλύτης η MeOH, η οποία αποτελεί έναν από τους πιο διαδεδομένους διαλύτες που χρησιμοποιούνται για τις πολυφαινολικές ενώσεις.^[57,58,61,65] Δοκιμάστηκαν διάφορες αναλογίες H₂O:MeOH, όπως 20:80, 50:50 αλλά και 100 % MeOH. Ωστόσο, και στις τρεις περιπτώσεις, οι κορυφές που λήφθηκαν ήταν αρκετά διευρυμένες (χαμηλή αποδοτικότητα) και η διαχωριστική ικανότητα μειώθηκε. Ακόμα, στα πρότυπα διαλύματα ορισμένων αναλυτών, όπως η καεμφερόλη, η μυρικετίνη και η απιγενίνη, παρατηρήθηκε καθίζηση στερεού μετά από την παραμονή τους για κάποιες ημέρες στο ψυγείο σε θερμοκρασία 4 °C. Δοκιμάστηκε επίσης σαν διαλύτης η prOH-1 σε αναλογία H₂O:prOH (80:20),^[88] αλλά και πάλι παρατηρήθηκε καταβύθιση στερεού. Η EtOH αποδείχτηκε σαν ο καταλληλότερος διαλύτης για τη διαλυτοποίηση των πολυφαινολικών, σε αναλογία H₂O:EtOH (50:50) για όλους τους αναλύτες. Η EtOH έχει χρησιμοποιηθεί επίσης αρκετά κατά την ανάλυση των πολυφαινολικών.^[64,93,95] Για να ληφθεί όσον το δυνατό πιο ομοιόμορφο σχήμα των κορυφών των οκτώ αναλυτών, για τη μυρικετίνη χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση 0.5 mg/mL, για τη ναρινγενίνη 0.1 mg/mL και για τους υπόλοιπους έξι αναλύτες χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις 0.2 mg/mL.

4.1.1. Διαδικασία ταυτοποίησης των κορυφών

Η ταυτοποίηση των κορυφών στα πρότυπα δείγματα κατά τη βελτιστοποίηση της μεθόδου έγινε με τη διαδικασία 'spiking'. Στη διαδικασία αυτή, γίνεται εμβολιασμός επιπλέον ποσότητας ενός από τους αναλύτες κάθε φορά. Η κορυφή, της οποίας αυξάνει η ένταση, αντιστοιχεί στην ένωση που εμβολιάστηκε η επιπλέον ποσότητα. Κατά την ανάλυση των δειγμάτων κρασιού, παρατηρήθηκε πρόβλημα κατά την ταυτοποίηση των κορυφών που μας ενδιαφέρουν με τη μέθοδο 'spiking' λόγω της παρουσίας πολλών κορυφών χαμηλής έντασης, οι οποίες παρατηρήθηκαν στα δείγματα κρασιού. Για το λόγο αυτό, η ταυτοποίηση των κορυφών έγινε με συνδυασμό της μεθόδου 'spiking' και με σύγκριση των φασμάτων UV. Η μέθοδος αυτή έχει χρησιμοποιηθεί σε μερικές περιπτώσεις για την ταυτοποίηση των πολυφαινολικών ενώσεων στο κρασί.^[58,61,97,102] Συγκεκριμένα, δημιουργήθηκε αρχικά ένα αρχείο με τα φάσματα UV για τις πρότυπες ουσίες κάτω από τις ίδιες συνθήκες και στη συνέχεια το λογισμικό σύγκρινε τα φάσματα αυτά με το φάσμα UV των κορυφών στο κρασί και υπολόγιζε ένα συντελεστή, ο οποίος αντιπροσωπεύει το βαθμό ομοιότητας των φασμάτων (0-1000). Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός αυτός, τόσο καλύτερα ταιριάζουν τα δύο φάσματα. Όταν ο αριθμός αυτός ήταν μεγαλύτερος από 950 (95 %), θεωρείτο ότι η κορυφή αντιστοιχούσε στη συγκεκριμένη ένωση και με τον τρόπο αυτό γινόταν η ταυτοποίηση της κορυφής.^[102]

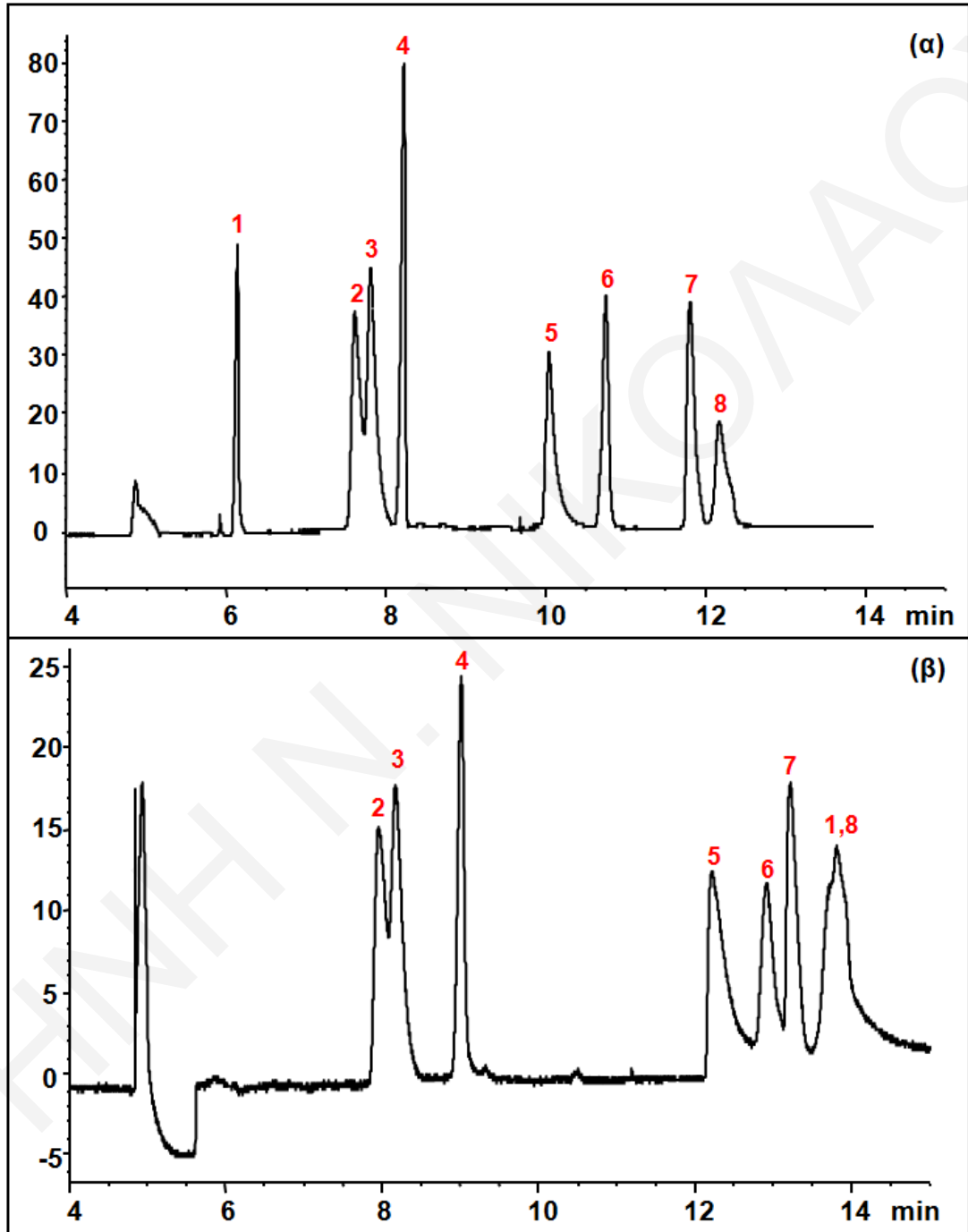
4.1.2. Εύρεση της βέλτιστης μεθόδου CE

Το πρώτο θέμα που διερευνήθηκε ήταν η εύρεση της καταλληλότερης μεθόδου CE για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των οκτώ πολυφαινολικών ενώσεων. Όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως, οι μέθοδοι CE που έχουν χρησιμοποιηθεί σε μεγαλύτερο βαθμό για τον προσδιορισμό των πολυφαινολικών ενώσεων σε διάφορα φυσικά προϊόντα είναι η CZE και η MEKC. Η CZE αποτελεί την πιο απλή μέθοδο CE αφού σε αυτήν ο τριχοειδής σωλήνας, ο οποίος δεν περιέχει κάποια επικάλυψη, γεμίζεται μόνο με ρυθμιστικό διάλυμα, ενώ στη MEKC, γίνεται προσθήκη τασιενεργών μέσα στο ρυθμιστικό διάλυμα σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από την CMC, έτσι ώστε να σχηματίζονται μικύλλια. Τα μικύλλια που σχηματίζονται δρουν σαν ψευδοστατική φάση και έτσι οι αναλύτες κατανέμονται μεταξύ της μικυλλιακής (υδρόφοβης) και της υδατικής (υδρόφιλης) φάσης. Ο διαχωρισμός των ουδέτερων αναλυτών επηρεάζεται κυρίως από την υδροφοβικότητα τους, ενώ στους φορτισμένους αναλύτες ο διαχωρισμός επηρεάζεται από το βαθμό ιονισμού και την υδροφοβικότητα τους. Έτσι, η MEKC εμφανίζει το μεγάλο πλεονέκτημα ότι μπορεί να διαχωρίσει ταυτόχρονα ουδέτερους και φορτισμένους αναλύτες.

Στο Σχήμα 4.1.1(α) και (β) φαίνονται τα ηλεκτροφερόγραμμα που λήφθηκαν με χρήση των μεθόδων CZE και MEKC, αντίστοιχα. Και στις δύο περιπτώσεις σαν BGE χρησιμοποιήθηκε 40 mM τετραβορικό νάτριο σε pH 9, ενώ στην περίπτωση της MEKC έγινε προσθήκη 20 mM SDS μέσα στο BGE. Η θερμοκρασία της στήλης ήταν σταθερή στους 25 °C, ενώ η τάση για την επίτευξη του διαχωρισμού ορίστηκε στα 25 kV. Οι υπόλοιπες συνθήκες ήταν σταθερές όπως αναφέρονται στο Πειραματικό μέρος. Όπως παρατηρείται, καλύτερος διαχωρισμός και μικρότεροι χρόνοι ανάλυσης λήφθηκαν με χρήση της μεθόδου CZE. Στην περίπτωση της CZE, παρατηρήθηκε πλήρης διαχωρισμός των οκτώ αναλυτών με εξαίρεση τις κορυφές 2 και 3, που αντιστοιχούν στην επικατεχίνη και κατεχίνη. Με την προσθήκη SDS στο BGE, παρόλο που ο χρόνος ανάλυσης ήταν αυξημένος, όχι μόνο δεν παρατηρήθηκε διαχωρισμός των κορυφών 2 και 3, αλλά επιπλέον η ρεσβερατρόλη (1), εκλούεται μαζί με την κερκετίνη (8), ενώ επίσης οι κορυφές που αντιστοιχούν στις ενώσεις 5,6,7 και 8 δε διαχωρίστηκαν πλήρως μεταξύ τους.

Αν και γενικά πιστεύεται ότι η MEKC εμφανίζει υψηλότερες εκλεκτικότητες και αποδοτικότητες απ' ότι η CZE, στην περίπτωση των πολυφαινολών, η CZE χρησιμοποιήθηκε περισσότερο από ότι η MEKC.^[103] Αυτό οφείλεται στην ικανότητα των ιόντων βορικού να σχηματίζει αρνητικά φορτισμένα σύμπλοκα με τις γειτονικές υδροξυλομάδες των αρωματικών δακτυλίων των φλαβονοειδών με αποτέλεσμα να ευνοείται ο διαχωρισμός. Οι πολυφαινολικές ενώσεις που μελετήθηκαν περιέχουν τουλάχιστον μία φαινολική υδροξυλομάδα.^[104] Οι τιμές pKa για τις πολυφαινολικές ενώσεις κυμαίνονται μεταξύ 7 και 12, ανάλογα με τη θέση των υδροξυλομάδων.^[103] Σε μία μελέτη που έγινε από τους Wolfbeis *et al.* προσδιορίστηκαν οι εξής τιμές pKa για τις φαινολικές υδροξυλομάδες: 7.39 για το 7-OH, 8.28 για το 4'-OH, 9.6 για το 3-OH, 9.75 για το 3'-OH και 11.56 για το 5-OH.^[105] Για τις τρεις υδροξυλομάδες της ρεσβερατρόλης υπολογίστηκαν σε υδατικό διάλυμα οι τιμές pKa 9.22, 10.55 και 11.16.^[57] Ο ιονισμός αυτής της ομάδας είναι ο βασικός παράγοντας που καθορίζει την ηλεκτροφορητική τους ευκινησία. Με τη χρήση βορικού σαν ρυθμιστικό διάλυμα κάτω από αλκαλικές συνθήκες, όπου οι πολυφαινόλες είναι αρνητικά φορτισμένες, ευνοείται ο διαχωρισμός για τους εξής δύο λόγους:^[106] Από τη μία μεταβάλλεται ο λόγος φορτίο-προς-μέγεθος και από την άλλη έχουμε την αλληλεπίδραση βορικού-φαινολών. Κατά συνέπεια, η σειρά έκλουσης των πολυφαινολών στην CZE είναι ανάλογη της πολικότητας τους, με τα πολικότερα συστατικά να εκλούνται στους μεγαλύτερους χρόνους. Αυτό οφείλεται στο ότι τα πολικότερα συστατικά εμφανίζουν μεγαλύτερο αρνητικό φορτίο με αποτέλεσμα να

μεταναστεύουν πιο αργά προς την κάθοδο, ενώ επίσης αλληλεπιδρούν περισσότερο με το βορικό και κατακρατούνται περισσότερο.



Σχήμα 4.1.1. Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν για το πρότυπο διάλυμα των 8 πολυφαινολών με χρήση των μεθόδων (α) CZE και (β) MEKC με χρήση 20 mM SDS. Συνθήκες: BGE 40 mM τετραβορικό νάτριο (pH 9), έγχυση με πίεση 30 mbar για 3 sec, εφαρμοσμένη τάση 25 kV, στήλη από τηγμένη πυριτία 64 cm, (αποτελεσματικό μήκος 55.5 cm) x 50 μm id, θερμοκρασία της στήλης 25 °C.

Ακόμα, έχει βρεθεί ότι η σειρά έκλουσης των πολυφαινολών επηρεάζεται από το βαθμό ακορεστότητας τους. Συγκεκριμένα, όσο πιο κορεσμένες είναι οι ουσίες, τόσο μικρότερος είναι ο χρόνος μετανάστευσης τους.^[104] Πρώτη εκλύεται η ρεσβερατρόλη, η οποία έχει διαφορετική δομή σε σχέση με τις άλλες ενώσεις αφού είναι το μοναδικό μη-φλαβονοειδές με τη μεγαλύτερη υδροφοβικότητα και στη συνέχεια εκλούνται τα διάφορα φλαβονοειδή. Η σειρά έκλουσης των φλαβονοειδών είναι φλαβανόλες (2,3), φλαβανόνες (4) και τελευταίες οι φλαβόνες και οι φλαβονόλες (5,6,7,8). Μεταξύ των τελευταίων τεσσάρων ενώσεων, η μυρικετίνη και η κερκετίνη, οι οποίες περιέχουν στο δακτύλιο B δύο ή περισσότερα υδροξύλια, εμφανίζουν το μεγαλύτερο χρόνο μετανάστευσης λόγω του ότι σχηματίζουν αρνητικά φορτισμένα σύμπλοκα με το βορικό.^[107] Επίσης, συγκρίνοντας τις ενώσεις ναρινγενίνη (4) και απιγενίνη (6), οι οποίες διαφέρουν μόνο ως προς ένα διπλό δεσμό, παρατηρούμε ότι η απιγενίνη, η οποία περιέχει τον επιπλέον διπλό δεσμό εκλύεται στο μεγαλύτερο χρόνο. Αυτό αποδεικνύει ότι η ιονισμένη μορφή της υδροξυλομάδας στον άνθρακα 4 ευνοείται στην περίπτωση της απιγενίνης λόγω της συζυγίας στον δακτύλιο C, οδηγώντας σε μεγαλύτερο χρόνο μετανάστευσης.^[94]

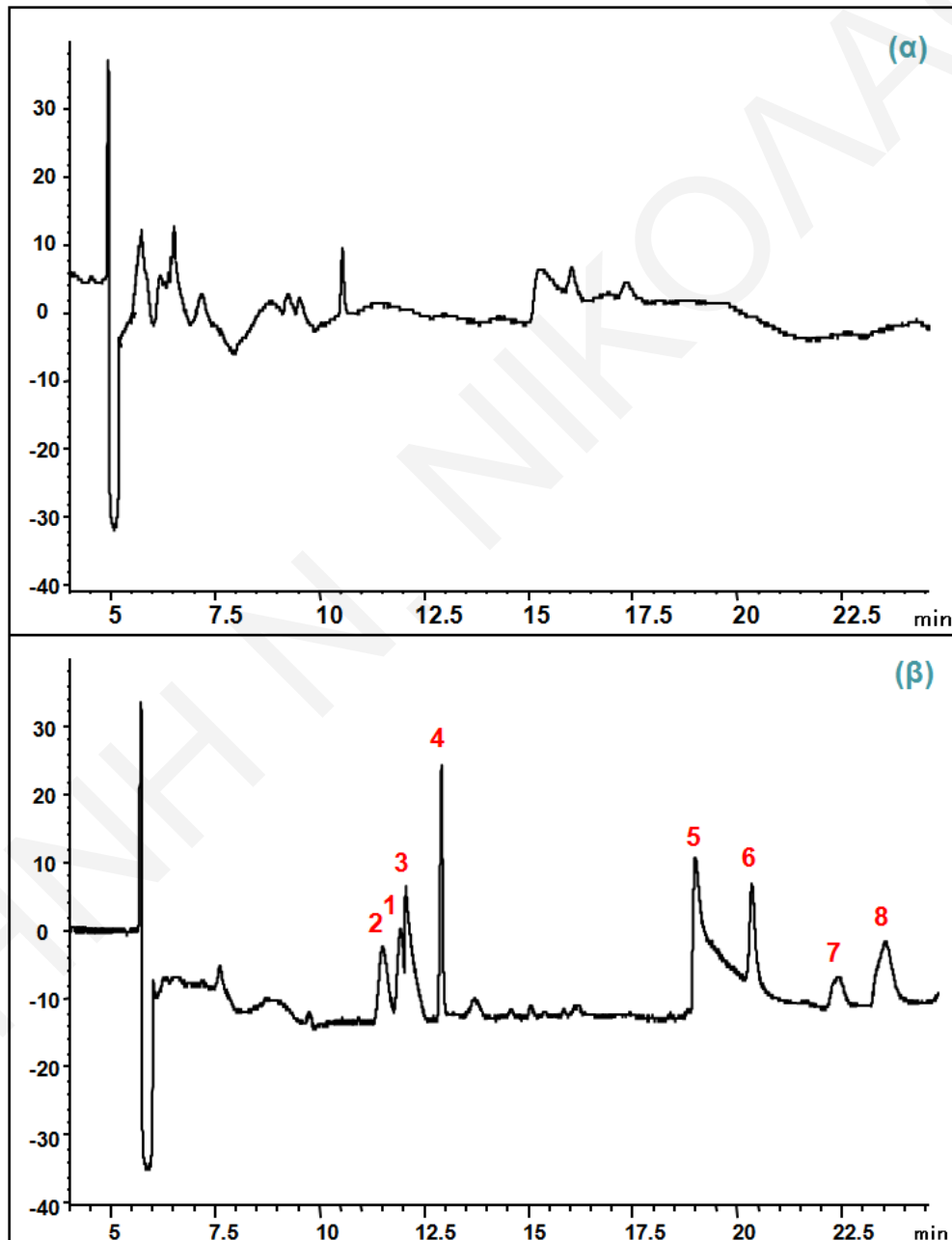
Στην περίπτωση της MEKC οι χρόνοι μετανάστευσης ήταν αυξημένοι για όλα τα συστατικά σε σχέση με την CZE. Αυτό οφείλεται στη σημαντική μείωση της ηλεκτροφορητικής ευκινησίας των αναλυτών.^[58] Όπως έχουμε αναφέρει, πραγματοποιείται σχηματισμός αρνητικά φορτισμένων συμπλόκων μεταξύ των υδροξυλίων των πολυφαινολών με το βορικό. Αν και το μεγάλο μέγεθος των συμπλόκων αυτών θα μπορούσε να διευκολύνει την κατανομή τους στη μικυλλιακή φάση, εντούτοις, οι ισχυρές ηλεκτροστατικές απώσεις που δημιουργούνται μεταξύ των συμπλόκων αυτών και των μικυλλίων του SDS έχουν σαν αποτέλεσμα μεγάλους χρόνους μετανάστευσης. Πρώτες εκλούνται οι φλαβανόλες (2 και 3), στις οποίες ο C-δακτύλιος δεν είναι επίπεδος, και συνεπώς μειώνεται η μοριακή τους αλληλεπίδραση και αυξάνει τη διαλυτότητα τους στο νερό.^[104] Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.1.1(β), μεγαλύτερη μετατόπιση παρατηρείται για τις ενώσεις 4, 5 και 6. Οι ενώσεις αυτές, περιέχουν στο δακτύλιο B μόνο ένα υδροξύλιο σε σχέση με τις υπόλοιπες ενώσεις που περιέχουν 2 ή 3 υδροξύλια.^[107] Έτσι, παρουσία SDS, οι ενώσεις 4, 5 και 6 αλληλεπιδρούν περισσότερο με τα μικύλλια και λιγότερο με τα ιόντα βορικού και αυτό οδηγεί σε μεγαλύτερη αύξηση του χρόνου μετανάστευσης τους σε σχέση με τις άλλες ουσίες. Αυτό έχει σαν συνέπεια τη μείωση της διαχωριστικής ικανότητας αφού οι ενώσεις 5 και 6 εκλούνται τελικά πιο κοντά στην ένωση 7.

Ακόμα, στην περίπτωση της MEKC αξιοσημείωτη είναι η μετατόπιση της κορυφής της ρεσβερατρόλης (1), η οποία, ενώ κατά την CZE-ανάλυση εκλύεται πρώτη, στη MEKC εκλύεται τελευταία. Όπως έχει αναφερθεί, η ένωση αυτή εμφανίζει τη μεγαλύτερη υδροφοβικότητα και κατά συνέπεια, παρουσία SDS μέσα στο ρυθμιστικό διάλυμα, αλληλεπιδρά περισσότερο με τα μικύλλια σε σχέση με τις υπόλοιπες ενώσεις λόγω υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της ταχύτητας μετανάστευσης της και κατά συνέπεια την αύξηση του χρόνου μετανάστευσής της.

Αφού στην περίπτωση της MEKC με χρήση συνηθισμένων μικυλλίων του SDS δεν επιτεύχθηκε ικανοποιητικός διαχωρισμός, δοκιμάστηκε στη συνέχεια η ικανότητα ορισμένων πολυμερών τασιενεργών ουσιών να διαχωρίσουν τις συγκεκριμένες ενώσεις. Στα πολυμερή τασιενεργών ουσιών, οι υδροφοβικές μονάδες ενώνονται μέσω ομοιοπολικών δεσμών, σε αντίθεση με τα συνηθισμένα μικύλλια όπου τα μονομερή αυτοδιοργανώνονται μέσω υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων.^[108] Οι ουσίες αυτές έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως τόσο στη χειρόμορφη όσο και στη μη χειρόμορφη ανάλυση αφού έχει βρεθεί ότι η ομοιοπολική σταθεροποίηση που εμφανίζουν μπορεί να οδηγήσει σε μία καλύτερα δομημένη φάση σε σχέση με τη μικυλλιακή φάση και κατά συνέπεια σε βελτιωμένες εκλεκτικότητες.

Τα πολυμερή τασιενεργών ουσιών που δοκιμάστηκαν ήταν 0.5 % poly-SUL καθώς επίσης και 0.2 % w/v συμπολυμερές των poly-SUG και poly-SUS σε αναλογία 40:60, μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα τετραβορικού νατρίου 40 mM σε pH 9. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.1.2(α) και (β), σε καμία από τις δύο περιπτώσεις δεν επιτεύχθηκε ικανοποιητικός διαχωρισμός. Στην περίπτωση του poly-SUL παρατηρήθηκε ασταθής γραμμή βάσης, η οποία καθιστούσε αδύνατη ακόμα και την ταυτοποίηση των κορυφών. Με χρήση του συμπολυμερούς των poly-SUG και poly-SUS, το ηλεκτροφερόγραμμα που λήφθηκε ήταν ικανοποιητικό, ωστόσο ο διαχωρισμός ήταν χειρότερος σε σχέση με την περίπτωση της CZE ανάλυσης και οι χρόνοι ανάλυσης ήταν αυξημένοι. Η αύξηση των χρόνων κατακράτησης οφείλεται στην ανάπτυξη υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων των αναλυτών με το συμπολυμερές των poly-SUG και poly-SUS. Ωστόσο, οι αλληλεπιδράσεις αυτές δεν οδήγησαν σε βελτίωση του διαχωρισμού. Είναι πιθανόν, η δομική ακαμψία που παρατηρείται στην περίπτωση των πολυμερών τασιενεργών ουσιών να ελαττώνει την ικανότητα του πολυμερούς να δημιουργεί κατάλληλες υδροφοβικές περιοχές. Αυτό έχει σαν συνέπεια να περιορίζονται συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις λόγω στερικής παρεμπόδισης με αποτέλεσμα να μην ευνοείται ο διαχωρισμός.^[108] Μία άλλη υπόθεση που

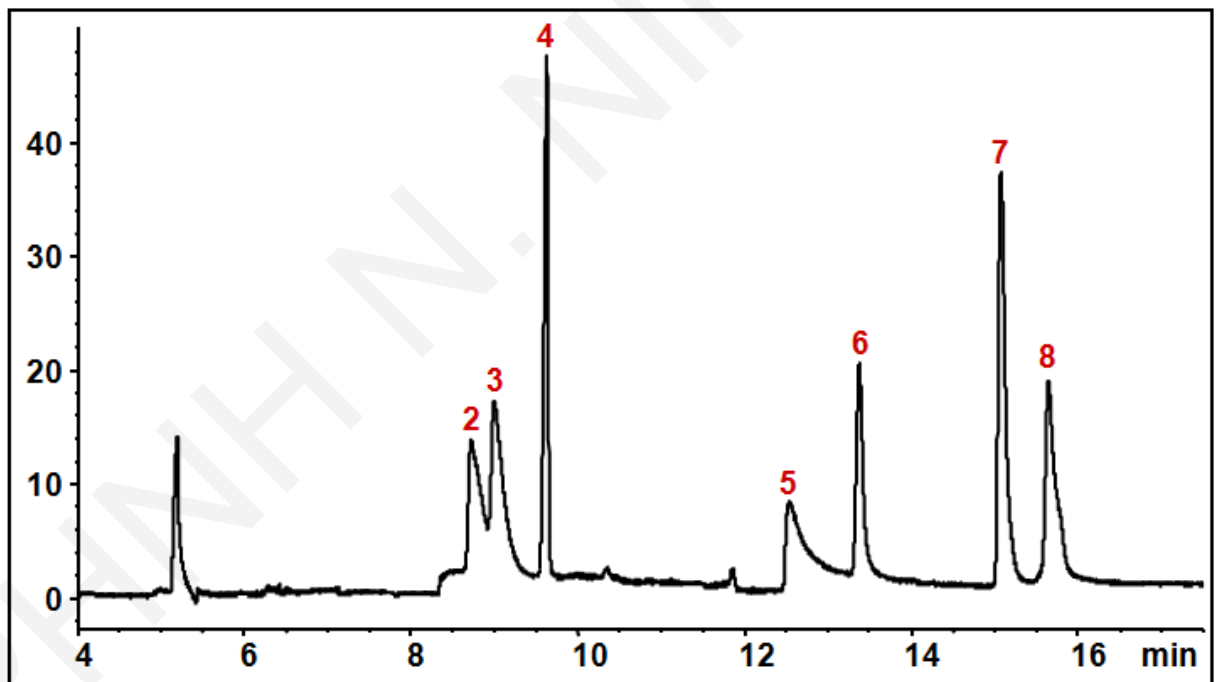
μπορεί να εξηγήσει τον μη ικανοποιητικό διαχωρισμό με χρήση των πολυμερών τασιενεργών ουσιών είναι η πιο χαλαρή διαμόρφωση του πολυμερούς λόγω της υψηλής τιμής pH που χρησιμοποιήθηκε. Έχει βρεθεί ότι σε υψηλά pH, τα πολυμερή τασιενεργών ουσιών σε μερικές περιπτώσεις, εμφανίζουν μία πιο χαλαρή διαμόρφωση λόγω ηλεκτροστατικών απώσεων που αναπτύσσονται μεταξύ των υψηλά αρνητικά φορτισμένων πολυμερών, με αποτέλεσμα να μην αλληλεπιδρούν ικανοποιητικά με τους αναλύτες και κατά συνέπεια να μην ευνοείται ο διαχωρισμός.^[109]



Σχήμα 4.1.2. Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν για το πρότυπο διάλυμα των οκτώ πολυφαινολών με τη μέθοδο MEKC με χρήση των πολυμερών τασιενεργών ουσιών (α) 0.5 % poly-SUL και (β) 0.2 % w/v συμπολυμερές των poly-SUG και poly-SUS σε αναλογία 40:60.

Υπόλοιπες συνθήκες: ίδιες με Σχήμα 4.1.1.

Επιπλέον, εξετάστηκε η μέθοδος OT-CEC, στην οποία η στατική φάση εναποτίθεται στα εσωτερικά τοιχώματα της στήλης. Στη μέθοδο αυτή, η επικάλυψη της στήλης από τηγμένη πυρίτια έγινε με τη μέθοδο επικάλυψης πολλαπλών στρωμάτων πολυηλεκτρολυτών (polyelectrolyte multilayer, PEM, coating) με εναλλασσόμενες εκπλύσεις θετικά και αρνητικά φορτισμένων πολυμερών. Συγκεκριμένα, έγινε επικάλυψη της στήλης με ένα στρώμα του κατιοντικού πολυμερούς PDADMAC και ένα στρώμα του ανιοντικού PSS. Η επικάλυψη αυτή πραγματοποιήθηκε με την εναπόθεση του πολυμερικού διαλύματος χρησιμοποιώντας τη λειτουργία 'πλύσης' στο σύστημα CE. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.1.3., στο ηλεκτροφερόγραμμα που λήφθηκε οι χρόνοι ανάλυσης ήταν αυξημένοι, ενώ δεν εμφανίζεται η κορυφή της ρεσβερατρόλης. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται σε ισχυρή κατακράτηση της ρεσβερατρόλης από την επικάλυψη της στήλης. Η κορυφή της ρεσβερατρόλης δεν εμφανίστηκε ακόμα και όταν έγινε έγχυση μόνο της ρεσβερατρόλης με μεγάλο μέγεθος έγχυσης (50 mbar για 7 sec). Για το λόγο αυτό, η συγκεκριμένη μέθοδος δε δοκιμάστηκε περαιτέρω.



Σχήμα 4.1.3. Ηλεκτροφερόγραμμα που λήφθηκαν για το πρότυπο διάλυμα των οκτώ πολυφαινολών με τη μέθοδο OT-CEC, με ένα στρώμα του κατιοντικού πολυμερούς PDADMAC και ένα στρώμα του ανιοντικού πολυμερούς PSS. Υπόλοιπες συνθήκες: ίδιες με Σχήμα 4.1.1.

4.1.3. Βελτιστοποίηση του CZE διαχωρισμού

Αφού, όπως αποδείχτηκε, η καταλληλότερη μέθοδος για το διαχωρισμό των πολυφαινολών είναι η CZE, μεταβλήθηκαν στη συνέχεια διάφορες πειραματικές

παράμετροι για τη βελτίωση του διαχωρισμού. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η θερμοκρασία της στήλης, η εφαρμοζόμενη τάση καθώς επίσης η σύσταση και το pH του BGE.

4.1.3.1. Επίδραση της θερμοκρασίας της στήλης

Σε μία προσπάθεια επίτευξης πλήρους διαχωρισμού των κορυφών 2 και 3, μεταβλήθηκε η θερμοκρασία της στήλης. Ο θερμοστατικός έλεγχος της στήλης είναι απαραίτητος για τη διατήρηση σταθερής θερμοκρασίας μέσα στη στήλη. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί και σαν μία παράμετρος για βελτιστοποίηση του διαχωρισμού. Με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος τετραβορικού νατρίου 40 mM σε pH 9, μειώθηκε η θερμοκρασία της στήλης από τους 25 στους 10 °C. Όπως ήταν αναμενόμενο, με μείωση της θερμοκρασίας, παρατηρήθηκε αύξηση των χρόνων μετανάστευσης των συστατικών, από τα 13 λεπτά στους 25 °C, στα 19 λεπτά στους 10 °C, λόγω μείωσης της ταχύτητας της EOF που προκαλείται από την αύξηση του ιξώδους του ρυθμιστικού διαλύματος (Σχήμα 4.1.4). Η αύξηση του ιξώδους μειώνει τόσο την ηλεκτροφορητική ευκινησία των αναλυτών όσο και την EOF, αυξάνοντας τους χρόνους μετανάστευσης των αναλυτών.^[34] Σαν συνέπεια του μεγαλύτερου παράθρου μετανάστευσης, παρατηρήθηκε βελτίωση της διαχωριστικής ικανότητας του ζεύγους των κορυφών 2 και 3, που αντιστοιχούν στα επιμερή επικατεχίνη και κατεχίνη, χωρίς ωστόσο να επιτευχθεί πλήρης διαχωρισμός ακόμα και στους 10 °C. Καθώς η μείωση της θερμοκρασίας της στήλης δεν οδήγησε σε σημαντική βελτίωση του διαχωρισμού, διατηρήθηκε σταθερή στους 25 °C, όπου οι κορυφές εκκλύονται στους μικρότερους χρόνους.

4.1.3.2. Επίδραση της εφαρμοζόμενης τάσης

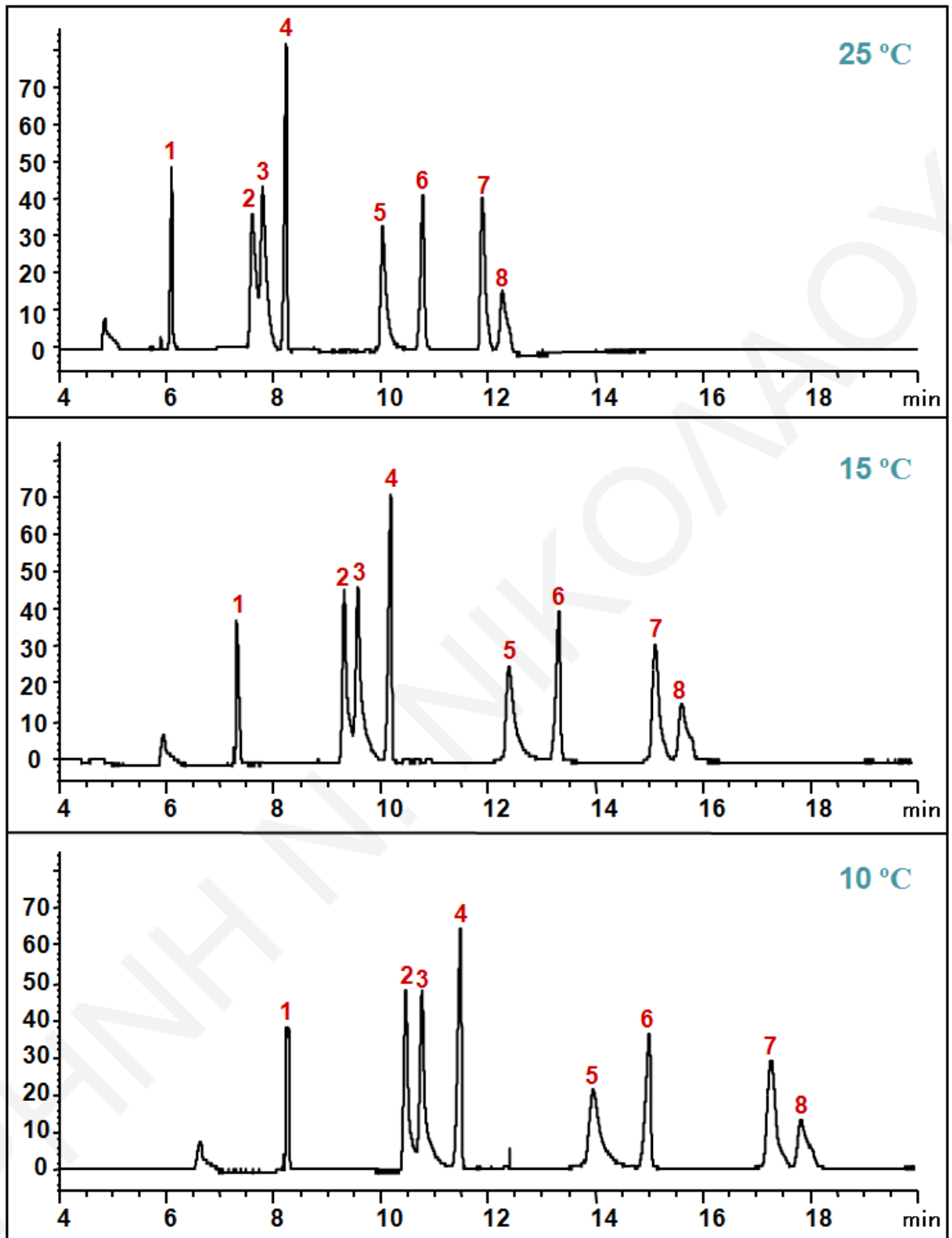
Μία άλλη παράμετρος που εξετάστηκε για την επίτευξη διαχωρισμού των κορυφών 2 και 3 ήταν η εφαρμοζόμενη τάση. Η εφαρμοζόμενη τάση επηρεάζει την ισχύ του ηλεκτρικού πεδίου, το οποίο με τη σειρά του επηρεάζει την EOF και την ταχύτητα μετανάστευσης των φορτισμένων σωματιδίων.^[34,94] Αυξάνοντας την τάση, οι χρόνοι μετανάστευσης μικραίνουν. Ωστόσο, μπορεί να παραχθεί θερμότητα Joule, να αυξηθεί ο θόρυβος του υποβάθρου και να προκληθεί φθορά στη στήλη.^[96] Μειώνοντας την τάση μπορεί να βελτιωθεί η διαχωριστική ικανότητα, αλλά μπορεί επίσης να αυξηθεί σημαντικά ο χρόνος της ανάλυσης, το οποίο με τη σειρά του μπορεί να οδηγήσει σε διεύρυνση των κορυφών λόγω διάχυσης, με αποτέλεσμα τη μείωση της αποδοτικότητας και της διαχωριστικής ικανότητας. Η βέλτιστη τάση προσδιορίζεται πειραματικά πραγματοποιώντας διαδοχικές αναλύσεις μεταβάλλοντας την τάση μέχρι να βρεθεί η βέλτιστη τιμή που να συνδυάζει

ικανοποιητικό διαχωρισμό και μικρούς χρόνους ανάλυσης. Έτσι, σε μία προσπάθεια βελτίωσης της διαχωριστικής ικανότητας των κορυφών 2 και 3, έγινε μεταβολή της εφαρμοζόμενης τάσης από τα 25 kV στα 10 kV με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος τετραβορικού νατρίου 40 mM σε pH 9. Με τη μείωση της τάσης, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των χρόνων μετανάστευσης, από τα 13 λεπτά για τάση 25 kV στα 33 λεπτά για τάση 10 kV, λόγω μείωσης της ταχύτητας της EOF (τα δεδομένα δε φαίνονται). Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε βελτίωση της διαχωριστικής ικανότητας του ζεύγους κορυφών 2 και 3, λόγω του ότι με ελάττωση της τάσης παρατηρήθηκε διεύρυνση των κορυφών και μείωση της αποδοτικότητας σαν συνέπεια των μεγαλύτερων χρόνων κατακράτησης. Στον Πίνακα 4.1.1 φαίνονται οι τιμές που λήφθηκαν για τη διαχωριστική ικανότητα (R_s) των κορυφών 2 και 3 στις διάφορες τιμές εφαρμοζόμενης τάσης καθώς και ο χρόνος ανάλυσης σε κάθε περίπτωση.

Πίνακας 4.1.1. Μεταβολή της διαχωριστική ικανότητα και της αποδοτικότητας των κορυφών 2 και 3 στις διάφορες τιμές εφαρμοζόμενης τάσης. Υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με Σχήμα 4.1.1.

	$R_{s(2,3)}$	$t_{\text{ανάλυσης}}(\text{min})$
25 kV	1.24	13
20 kV	1.27	17
15 kV	1.33	22
10 kV	1.22	33

Λαμβάνοντας υπόψη τους μικρότερους χρόνους μετανάστευσης και την ικανοποιητική διαχωριστική ικανότητα και αποδοτικότητα, τα 25 kV ορίστηκαν σαν η βέλτιστη εφαρμοζόμενη τάση. Να σημειωθεί, επίσης, ότι σε αυτή την υψηλή τάση δεν παρατηρήθηκε δημιουργία θερμότητας Joule. Έτσι, αφού ούτε η μείωση της εφαρμοζόμενης τάσης με το συγκεκριμένο BGE δεν οδήγησε σε σημαντική βελτίωση του διαχωρισμού, έγινε στη συνέχεια μεταβολή του BGE.

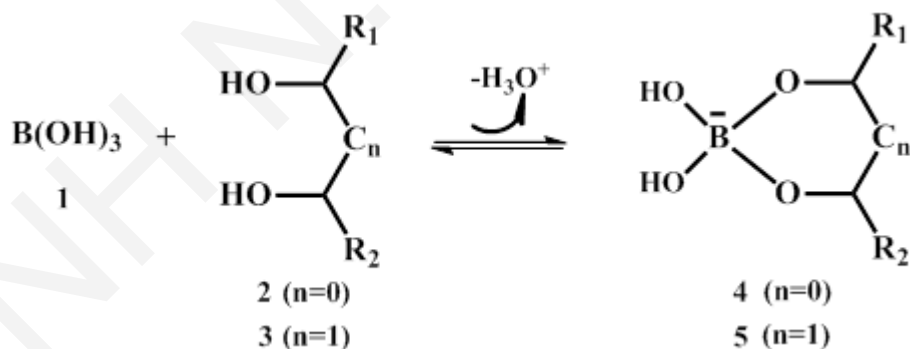


Σχήμα 4.1.4. Επίδραση της θερμοκρασίας της στήλης στο διαχωρισμό των οκτώ πολυφαινόλων με τη μέθοδο CZE. Υπόλοιπες συνθήκες: ίδιες με Σχήμα 4.1.1.

4.1.3.3. Επίδραση του είδους και της συγκέντρωσης του BGE

Στην περίπτωση της CZE, η επιλογή του κατάλληλου BGE αποτελεί τον πιο σημαντικό παράγοντα στη βελτιστοποίηση της μεθόδου. Κατά την επιλογή του ρυθμιστικού διαλύματος πρέπει να ληφθούν υπόψη πολλοί παράγοντες, όπως είναι η ιοντική ισχύς (αγωγιμότητα) και η απορροφητικότητα του BGE στο UV σε χαμηλά μήκη κύματος (190-220 nm).^[110] Ο βασικός σκοπός του ρυθμιστικού διαλύματος είναι να παρέχει τη μεταφορά του ηλεκτρικού ρεύματος και το διαχωρισμό των αναλυτών, τα οποία διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην ηλεκτροφορητική διαδικασία. Έτσι, το είδος και η συγκέντρωση του BGE στη CZE πρέπει να βελτιστοποιούνται για να ληφθεί καλή διαχωριστική ικανότητα των υπό εξέταση συστατικών σε ικανοποιητικό χρόνο. Όπως έχει αναφερθεί, ρυθμιστικά διαλύματα βασισμένα στο βορικό αποτελούν τα πιο συνηθισμένα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των πολυφαινολικών ενώσεων.

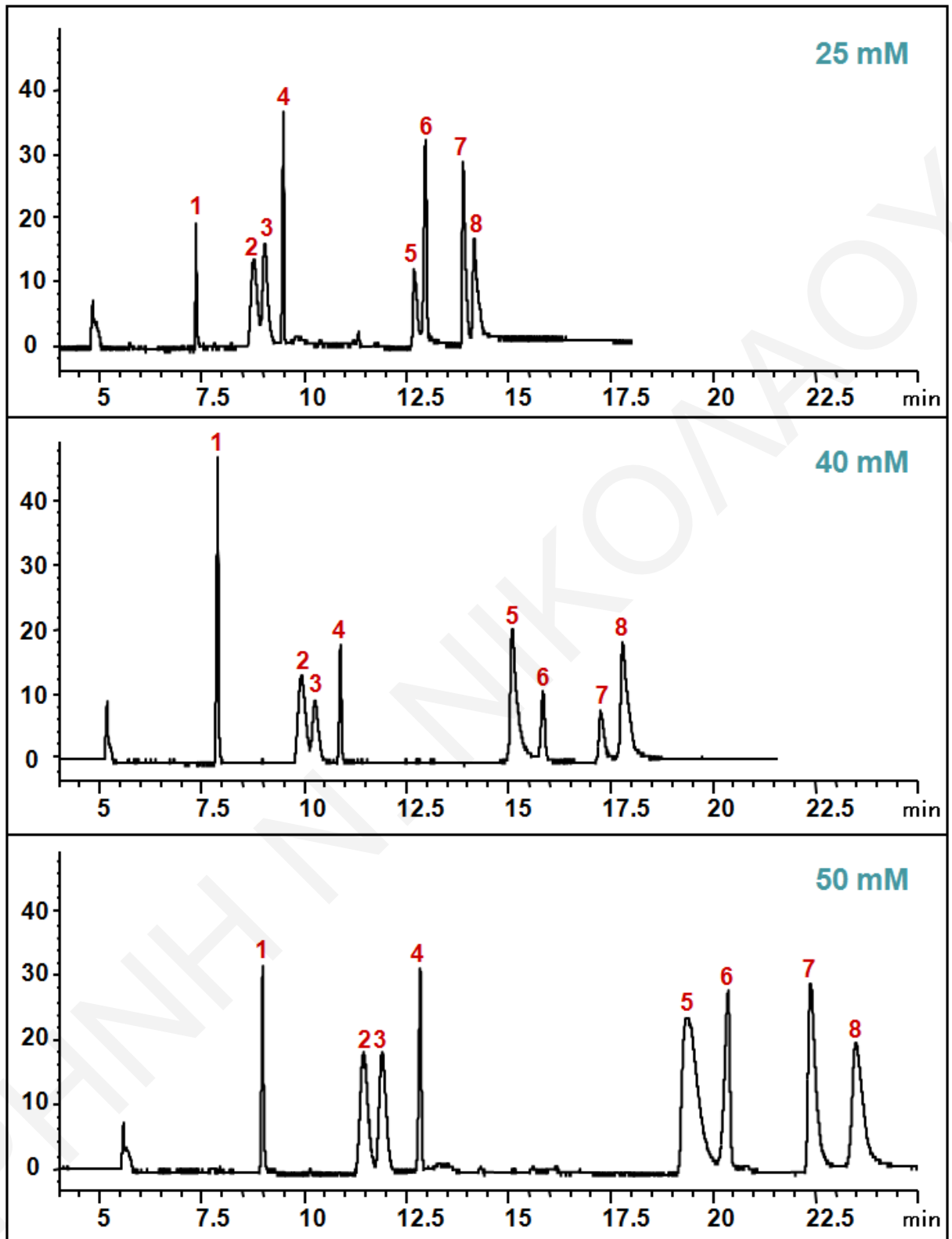
Όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία, το βορικό οξύ ($B(OH)_3$, **1**) μπορεί να συμπλοκοποιηθεί με ομάδες διολών, οι οποίες έχουν την κατάλληλη γεωμετρία, σε κυκλικές ή μη κυκλικές πολυυδροξύ ενώσεις.^[111] Έτσι, οι 1,2-διόλες ($n=0$, **2**) σχηματίζουν σύμπλοκα πενταμελών δακτυλίων με το βορικό (**4**), ενώ οι 1,3-διόλες ($n=1$, **3**) σχηματίζουν σύμπλοκα εξαμελών δακτυλίων (**5**) σύμφωνα με την πιο κάτω εξίσωση:



Έχει επιβεβαιωθεί η ύπαρξη αλληλεπιδράσεων ιόντος-διπόλου μεταξύ φλαβονοειδών και βορικού, ενώ έχουν επίσης προσδιοριστεί οι σταθερές διάστασης και η αλλαγή στην ελεύθερη ενέργεια Gibbs της αλληλεπίδρασης.^[96] Η συμπλοκοποίηση του βορικού με τις πολυφαινολικές ενώσεις προσδίδει φορτίο στους ουδέτερους υδρογονάνθρακες και προκαλεί αλλαγές στους λόγους φορτίο-προς-μέγεθος των ενώσεων με αποτέλεσμα να μεταναστεύουν πιο αργά μέσα στο ηλεκτρικό πεδίο, ευνοώντας με τον τρόπο αυτό το διαχωρισμό στην CZE.^[34,110,110] Το μέγεθος του αρνητικού φορτίου επηρεάζεται κυρίως από τη θέση και τον αριθμό των φαινολικών ομάδων.^[104] Επίσης, το μέγεθος του αρνητικού φορτίου επηρεάζεται από τα ιόντα βορικού στο BGE, τα οποία μπορούν να

σχηματίζουν αρνητικά φορτισμένα σύμπλοκα με τις γειτονικές υδροξυλομάδες των φλαβονοειδών, όπως για παράδειγμα με την κατεχίνη, την επικατεχίνη, την μυρικετίνη και την κερκετίνη.

Έτσι, διερευνήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του τετραβορικού νατρίου σε εύρος συγκεντρώσεων από 25 έως 50 mM σε pH 9.6, ενώ επιπλέον έγινε προσθήκη 10 mM φωσφορικού νατρίου στο BGE. Όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία, προσθήκη φωσφορικού μέσα στο ρυθμιστικό διάλυμα βελτιώνει την αποτελεσματικότητα του διαχωρισμού.^[93,98,104] Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η προσθήκη φωσφορικού στο BGE μπορεί να αυξήσει την ευαισθησία της ανίχνευσης.^[112] Με προσθήκη 10 mM φωσφορικού νατρίου στο ρυθμιστικό διάλυμα, παρατηρήθηκε βελτίωση στο σχήμα των κορυφών, υψηλότερη ευαισθησία και πιο επαναλήψιμα αποτελέσματα. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.1.5, με αύξηση της συγκέντρωσης του βορικού, παρατηρήθηκε αύξηση των χρόνων μετανάστευσης των αναλυτών γεγονός που οφείλεται στην ισχυρότερη αλληλεπίδραση του βορικού με τις πολυφαινολικές ενώσεις στις υψηλότερες συγκεντρώσεις βορικού καθώς επίσης και στη μείωση της ταχύτητας της EOF, λόγω αύξησης στο ιξώδες του ρυθμιστικού διαλύματος. Επίσης, η αύξηση της συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος ήταν ευεργετική, καθώς οδήγησε σε δημιουργία ζευγών ιόντος μεταξύ των κατιόντων του ρυθμιστικού διαλύματος και των μορίων του δείγματος, με αποτέλεσμα να μειώνεται η προσρόφηση του δείγματος πάνω στο τοίχωμα της στήλης.^[110] Η αύξηση των χρόνων μετανάστευσης οδήγησε σε βελτίωση της R_s από την τιμή 1.04 για συγκέντρωση βορικού νατρίου 25 mM σε 1.39 για 50 mM. Όπως παρατηρήθηκε, όλες οι πολυφαινόλες επηρεάστηκαν το ίδιο με τη μεταβολή της ιοντικής ισχύος του BGE, αφού η σειρά έκλουσης των αναλυτών παρέμεινε η ίδια. Η σειρά έκλουσης των αναλυτών είναι ανάλογη της πολικότητας τους με τα πολικότερα συστατικά να εκκλύονται στους μεγαλύτερους χρόνους.



Σχήμα 4.1.5. Επίδραση της ιοντικής ισχύος του BGE στο διαχωρισμό των οκτώ πολυφαινολών με τη μέθοδο CZE. Συνθήκες διαχωρισμού: 10 mM φωσφορικό νάτριο, pH 9.6, υπόλοιπες συνθήκες: ίδιες με Σχήμα 4.1.1.

Επίσης, το εμβαδόν των κορυφών αυξήθηκε με αύξηση της συγκέντρωσης του βορικού, καθώς η αλληλεπίδραση των ιόντων του βορικού με τα φλαβονοειδή αυξάνει σημαντικά την απορρόφηση των αναλυτών στο UV.^[96] Δε δοκιμάστηκαν υψηλότερες συγκεντρώσεις βορικού αφού όταν η ιοντική ισχύς του BGE ξεπεράσει μία συγκεκριμένη τιμή προκαλείται διασπορά του δείγματος και μείωση της αποδοτικότητας. Αυτό οφείλεται στη βαθμίδωση της θερμοκρασίας κατά μήκος της διαμέτρου της στήλης, φαινόμενο το οποίο είναι γνωστό σαν θερμότητα Joule που αυξάνει το θόρυβο στο υπόβαθρο.^[34,70,110] Έτσι, το BGE που περιείχε 50 mM τετραβορικού νατρίου και 10 mM φωσφορικού νατρίου επιλέχθηκε σαν το βέλτιστο BGE.

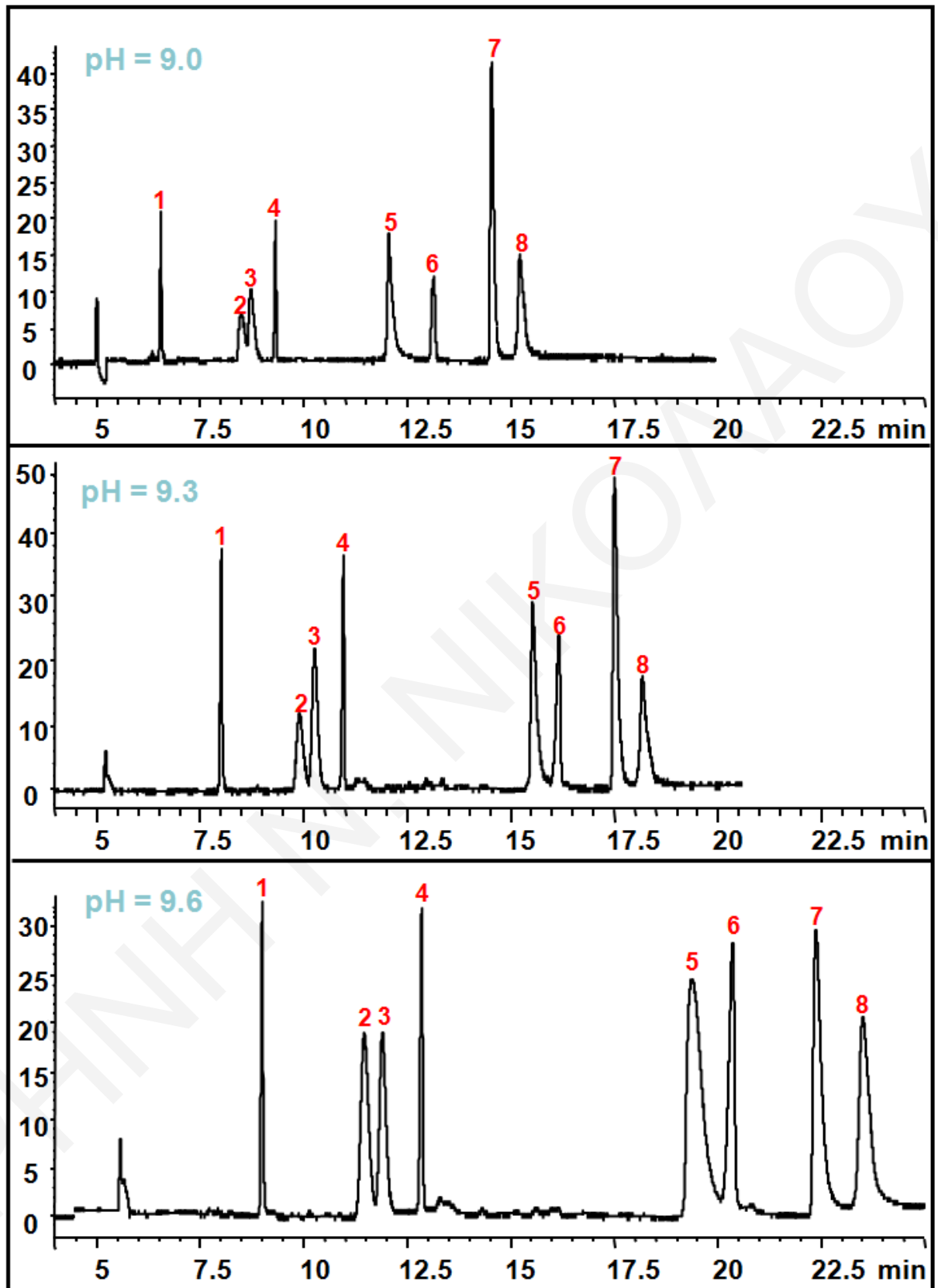
4.1.3.4. Επίδραση του pH του BGE

Στην περίπτωση της CZE το pH αποτελεί έναν παράγοντα κλειδί για το διαχωρισμό αφού καθορίζει το ποσοστό των φορτισμένων ειδών.^[94] Καθώς στην CZE η τριχοειδής στήλη γεμίζεται μόνο με ρυθμιστικό διάλυμα, ο διαχωρισμός βασίζεται αποκλειστικά στο λόγο φορτίο-προς-μέγεθος. Ο λόγος αυτός μεταβάλλεται με αλλαγή του pH του ρυθμιστικού διαλύματος καθώς αλλάζει ο βαθμός διάστασης των πολυφαινολών και κατά συνέπεια η ηλεκτροφορητική τους ευκινησία.^[70] Ακόμα, σε κάποιες περιπτώσεις, το pH μπορεί να επηρεάσει την ταχύτητα της EOF, αφού σε υψηλότερες τιμές pH ιονίζονται περισσότερες ομάδες σιλανόλης με αποτέλεσμα να αυξάνεται επίσης το ζήτα δυναμικό και η ταχύτητα ροής. Έτσι, η βελτιστοποίηση του pH είναι απαραίτητη κατά τη CZE ανάλυση.

Η ηλεκτροφορητική ευκινησία των ενώσεων εξαρτάται ισχυρά από τις τιμές του pka τους σε σχέση με το pH του ρυθμιστικού διαλύματος. Οι τιμές pH των ρυθμιστικών διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται συνήθως για τον προσδιορισμό των πολυφαινολών είναι μεταξύ 9 και 10, έτσι ώστε οι ουσίες να έχουν ιονισμένη τουλάχιστον μια φαινολική υδροξυλομάδα.^[104] Έτσι, διατηρώντας σταθερή τη σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος (50 mM βορικό & 10 mM φωσφορικό) μεταβλήθηκε το pH του μεταξύ των τιμών 9 και 10. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.1.6, με αύξηση του pH προκαλείται αύξηση των χρόνων μετανάστευσης λόγω αύξησης του αρνητικού φορτίου. Με αύξηση του αρνητικού φορτίου, μειώνεται η ηλεκτροφορητική ευκινησία των αναλυτών προς την κάθοδο, ενώ, επίσης, λόγω του υψηλότερου αρνητικού φορτίου οι πολυφαινόλες εμφανίζουν μεγαλύτερη συγγένεια για συμπλοκοποίηση με τα ιόντα βορικού.^[107] Παρόλο που με την αύξηση του pH προκαλείται αύξηση της ταχύτητας της EOF, ο σχηματισμός των αρνητικά φορτισμένων συμπλόκων μείωσε σημαντικά την ηλεκτροφορητική ευκινησία των αναλυτών προς την κάθοδο, οδηγώντας σε αύξηση των χρόνων μετανάστευσης των

αναλυτών. Σαν συνέπεια των μεγαλύτερων χρόνων μετανάστευσης παρατηρήθηκε σημαντική βελτίωση της διαχωριστικής ικανότητας του ζεύγους κορυφών 2 και 3. Συγκεκριμένα, οι τιμές της R_s για pH 9.0, 9.3 και 9.6 ήταν 0.87, 1.23 και 1.39, αντίστοιχα. Για pH 10, ενώ επιτεύχθηκε πλήρης διαχωρισμός ($R_s = 2.25$), το παράθυρο μετανάστευσης ήταν πολύ αυξημένο (~50 min). Επίσης, παρατηρήθηκε δημιουργία θερμότητας Joule, δηλαδή διεύρυνση των κορυφών, και δημιουργία ρεύματος, η οποία περιόρισε την ανάλυση (τα δεδομένα δε φαίνονται).

Ακόμα, με αύξηση του pH από 9.0 σε 9.6 παρατηρήθηκε βελτίωση στο σχήμα των κορυφών και αύξηση της έντασης των κορυφών λόγω καλύτερης διαλυτότητας των αναλυτών.^[98] Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι ενώσεις που περιέχουν μεγαλύτερο αριθμό υδροξυλομάδων, όπως είναι η μυρικετίνη και η κερκετίνη, ο βαθμός ιονισμού τους είναι μεγαλύτερος και έτσι η ηλεκτροφορητική τους ευκινησία προς την άνοδο είναι μεγαλύτερη. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να εκλούνται στους μεγαλύτερους χρόνους. Η σειρά έκλουσης των αναλυτών δεν αλλάζει με την αύξηση του pH, γεγονός που υποδηλώνει ότι δεν επηρεάζεται κάποια ένωση περισσότερο με τη μεταβολή του pH. Λαμβάνοντας υπόψη τους μικρούς χρόνους ανάλυσης και την υψηλή αποδοτικότητα των κορυφών σε συνδυασμό με τον ικανοποιητικό διαχωρισμό, σαν βέλτιστη τιμή pH ορίστηκε το 9.6.

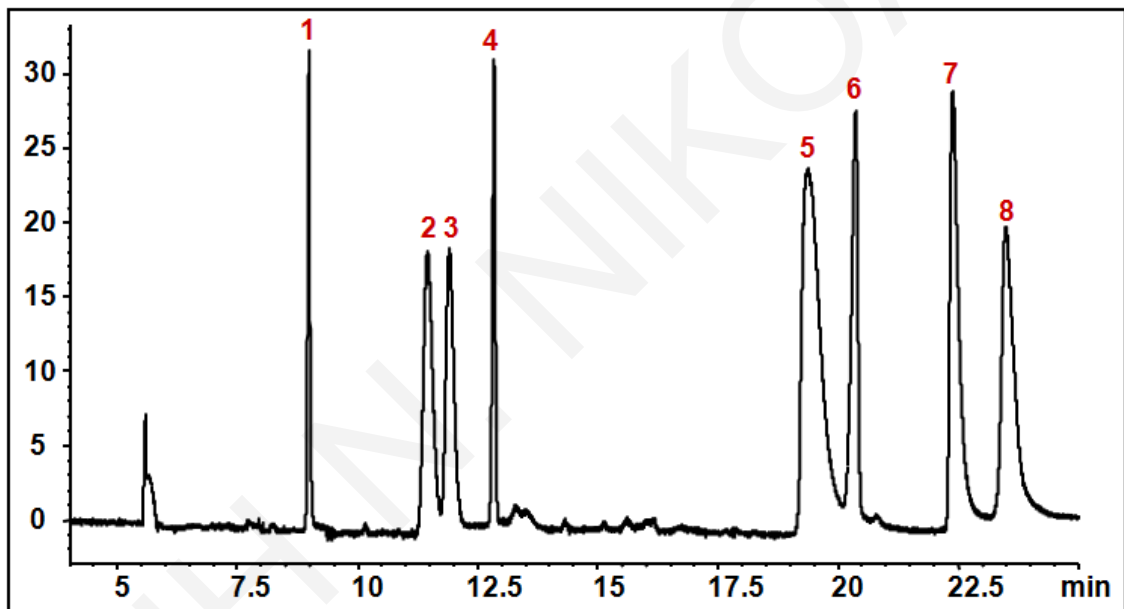


Σχήμα 4.1.6. Επίδραση του pH του BGE στο διαχωρισμό των οκτώ πολυφαινόλων με τη μέθοδο CZE. Συνθήκες διαχωρισμού: BGE: 50 mM τετραβορικού νάτριο, 10 mM φωσφορικό νάτριο, pH 9.6, υπόλοιπες συνθήκες: ίδιες με Σχήμα 4.1.1.

Έτσι, τελικά οι βέλτιστες συνθήκες για το διαχωρισμό του πρότυπου μείγματος των οκτώ πολυφαινολικών ενώσεων συνοψίζονται στον Πίνακα 4.1.2. Το ηλεκτροφερόγραμμα που λήφθηκε κάτω από αυτές τις συνθήκες φαίνεται στο Σχήμα 4.1.7.

Πίνακας 4.1.2. Βέλτιστες συνθήκες διαχωρισμού των οκτώ πολυφαινολικών ενώσεων.

BGE	50 mM τετραβορικό νάτριο & 10 mM φωσφορικό νάτριο (pH 9.6)
Στήλη	Τηγμένη πυριτία, L = 64 cm, l = 55.5 cm
Θερμοκρασία	25 °C
Τάση	25 kV
Έγχυση	35 mbar για 5 sec



Σχήμα 4.1.7. Ηλεκτροφερόγραμμα που λήφθηκε με χρήση της μεθόδου CZE κάτω από τις βέλτιστες συνθήκες για το διαχωρισμό των οκτώ πολυφαινολικών ενώσεων. BGE: 50 mM τετραβορικό νάτριο & 10mM φωσφορικό νάτριο, pH 9.6, στήλη από τηγμένη πυριτία l 55.5 cm, 50 μm i.d, ανίχνευση στα 205 nm, θερμοκρασία 25 °C, εφαρμοζόμενη τάση 25 kV, έγχυση με πίεση 35 mbar για 5 sec.

4.1.4. Αξιολόγηση της μεθόδου CZE

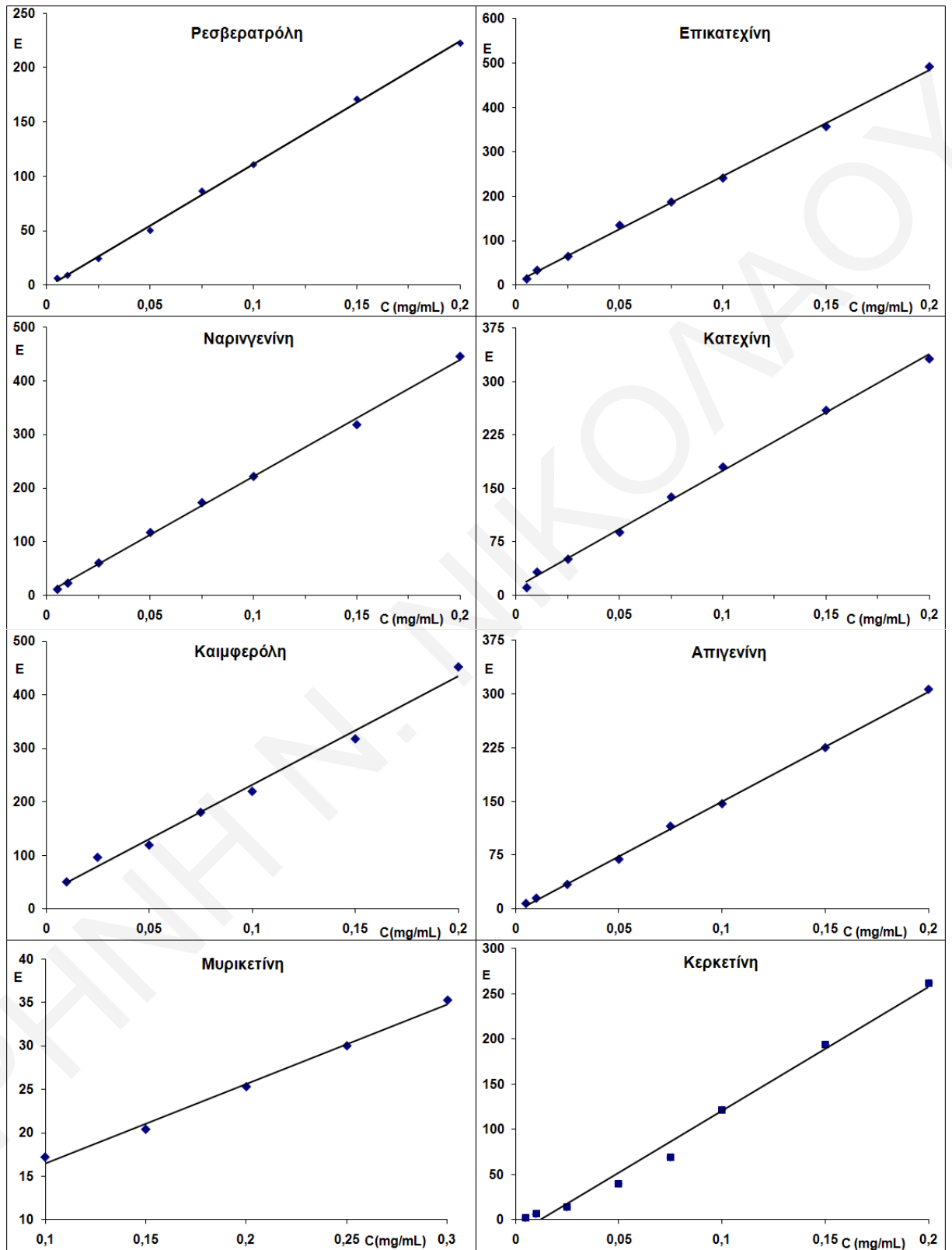
Η βέλτιστη μέθοδος CZE που αναπτύχθηκε, αξιολογήθηκε στη συνέχεια ως προς τη γραμμικότητα, την επαναληψιμότητα και το LOD. Ο υπολογισμός του LOD και της επαναληψιμότητας, η οποία δίνεται από τη RSD, έγινε όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 3.3. Οι εξισώσεις των καμπύλων βαθμονόμησης που λήφθηκαν για τις οκτώ πολυφαινολικές ενώσεις, οι αντίστοιχοι συντελεστές συσχέτισης καθώς και οι τιμές που υπολογίστηκαν για το LOD και τη RSD φαίνονται στον Πίνακα 4.1.3.

Πίνακας 4.1.3. Εξισώσεις των καμπύλων βαθμονόμησης, οι συντελεστές συσχέτισης, οι τιμές RSD και τα LODs για τις οκτώ πολυφαινολικές ενώσεις.

Συστατικό	Εξίσωση	r^2	RSD _(time) (%)	LOD (mg/L)
Ρεσβερατρόλη	$y = 1130.1 x - 1.8363$	0.9987	0.937	0.20
(-)-Επικατεχίνη	$y = 2392.9 x + 6.2133$	0.9987	0.189	0.08
(±)-Κατεχίνη	$y = 1638.7 x + 10.859$	0.9976	0.210	0.03
(±)-Ναρινγενίνη	$y = 2176 x + 4.0777$	0.9983	0.148	0.18
Καϊμπερόλη	$y = 2030.8 x + 28.7130$	0.9907	0.320	0.13
Απιγενίνη	$y = 1531.6 x - 3.1535$	0.9991	0.550	0.11
Μυρικετίνη	$y = 91.971 x + 7,2929$	0.9932	0.838	5.05
Κερκετίνη	$y = 1369.9 x - 16.5700$	0.9889	1.077	0.24

Οι καμπύλες βαθμονόμησης για τις οκτώ πολυφαινολικές ενώσεις κατασκευάστηκαν για τα πρότυπα διαλύματα των οκτώ πολυφαινολικών ενώσεων παραθέτοντας το εμβαδόν της κορυφής του αναλύτη ως προς την αντίστοιχη συγκέντρωση. Για τη ρεσβερατρόλη, την επικατεχίνη, την κατεχίνη, τη ναρινγενίνη, την απιγενίνη και την κερκετίνη, οι καμπύλες βαθμονόμησης κατασκευάστηκαν σε εύρος συγκεντρώσεων 5-200 $\mu\text{g/mL}$, ενώ για τις υπόλοιπες ενώσεις κατασκευάστηκαν σε εύρος συγκεντρώσεων 10-200 $\mu\text{g/mL}$. Οι διάφορες συγκεντρώσεις των αναλυτών παρασκευάστηκαν με διαδοχικές αραιώσεις των πρότυπων διαλυμάτων σε διαλύτη $\text{H}_2\text{O}:\text{EtOH}$ (50:50). Οι καμπύλες βαθμονόμησης που κατασκευάστηκαν για τις οκτώ πολυφαινολικές ενώσεις φαίνονται στο Σχήμα 4.1.8. Κάθε σημείο στη γραφική παράσταση ανταποκρινόταν στη μέση τιμή που λήφθηκε για δύο ανεξάρτητες μετρήσεις του εμβαδού. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 4.1.3, λήφθηκαν πολύ καλές γραμμικότητες για τους οκτώ αναλύτες αφού σε όλες τις περιπτώσεις, ο

συντελεστής συσχέτισης που βρέθηκε από τις καμπύλες βαθμονόμησης ήταν μεγαλύτερος από 0.99.



Σχήμα 4.1.8. Καμπύλες βαθμονόμησης που κατασκευάστηκαν για τις οκτώ πολυφαινολικές ενώσεις κάτω από τις βέλτιστες συνθήκες.

Επίσης, όπως φαίνεται στον Πίνακα 4.1.3, η επαναληψιμότητα των χρόνων κατακράτησης, όπως υπολογίστηκε για πέντε επαναλαμβανόμενες μετρήσεις που έγιναν μέσα στην ίδια μέρα, ήταν πολύ ικανοποιητική. Οι τιμές RSD που λήφθηκαν για τις οκτώ πολυφαινολικές ενώσεις ήταν μικρότερες ή πολύ κοντά στο 1%. Τέλος, οι τιμές για τα LODs που υπολογίστηκαν για τις οκτώ πολυφαινολικές ενώσεις ήταν μεταξύ 0.03 και 5.05 $\mu\text{g/mL}$. Οι τιμές αυτές είναι παρόμοιες με τις τιμές για τα LODs που αναφέρονται στη βιβλιογραφία για τις συγκεκριμένες ενώσεις.^[88,89,94,98] Η αξιολόγηση της μεθόδου απέδειξε ότι η μέθοδος που αναπτύχθηκε χαρακτηρίζεται από πολύ καλή επαναληψιμότητα, γραμμικότητα και όρια ανίχνευσης και κατά συνέπεια είναι κατάλληλη για εφαρμογή σε δείγματα κρασιού για την ανάλυση των πολυφαινολικών ενώσεων.

4.1.5. Βελτιστοποίηση της διαδικασίας επεξεργασίας του κρασιού

Η μέθοδος CZE που αναπτύχθηκε εφαρμόστηκε, στη συνέχεια, σε κυπριακά κρασιά για τον προσδιορισμό των πολυφαινολικών ενώσεων. Πριν όμως από την εισαγωγή του δείγματος στο σύστημα CE είναι απαραίτητη κάποια διαδικασία για την απομόνωση των πολυφαινολών από τα δείγματα κρασιού. Η προετοιμασία του δείγματος είναι υψίστης σημασίας για την εξασφάλιση μίας αξιόπιστης ανάλυσης.^[113] Ενδογενή συστατικά από τη μήτρα του δείγματος μπορεί να φράξουν τη στήλη και να οδηγήσουν σε μείωση του διαχωρισμού, αλλοίωση στην απόκριση του αναλύτη και φτωχή επαναληψιμότητα.^[73] Αν και τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει αρκετές μελέτες για τον προσδιορισμό πολυφαινολικών ενώσεων σε διάφορα προϊόντα φυτικής προέλευσης, εντούτοις δεν υπάρχει μία πρότυπη διαδικασία που να είναι κατάλληλη για την εξαγωγή όλων των πολυφαινολών από τα δείγματα αυτά.^[2,30] Το γεγονός αυτό οφείλεται στη μεγάλη ποικιλία των πολυφαινολών όσον αφορά την πολικότητα, την οξύτητα, τον αριθμό των υδροξυλομάδων και των αρωματικών δακτυλίων, τα επίπεδα συγκέντρωσης τους στα διάφορα προϊόντα φυτικής προέλευσης αλλά και την πολυπλοκότητα της μήτρας του δείγματος.^[113] Έτσι, σε κάθε περίπτωση είναι απαραίτητη η εύρεση της πιο κατάλληλης διαδικασίας για την απομόνωση των επιθυμητών συστατικών από τη συγκεκριμένα μήτρα ανάλογα με τη χημική δομή και τις ιδιότητες των υπό ανάλυση ενώσεων.

Οι διαδικασίες για την ανάλυση των πολυφαινολών ποικίλουν σε μεγάλο βαθμό ανάμεσα στις διάφορες μελέτες. Έχουν χρησιμοποιηθεί διαδικασίες από απλή αραίωση του δείγματος μέχρι και αρκετά πολύπλοκες διαδικασίες, όπως υδρόλυση του δείγματος και πολλαπλές εκχυλίσεις. Η εκχύλιση αποτελεί ένα πολύ σημαντικό βήμα στην απομόνωση και στον προσδιορισμό των πολυφαινολικών ενώσεων. Η LLE και η SPE αποτελούν τις

πιο συχνά χρησιμοποιούμενες τεχνικές για την απομόνωση των πολυφαινολικών ενώσεων, κυρίως λόγω της εύκολης χρήσης τους, της υψηλής τους αποδοτικότητας αλλά και της μεγάλης εφαρμοσιμότητας τους. Σε κάποιες περιπτώσεις έχει επίσης χρησιμοποιηθεί άμεση έγχυση του δείγματος, χωρίς να προηγηθεί εκχύλιση. Ανάλογα με το μείγμα των πολυφαινολικών ενώσεων που αναλύονται είναι απαραίτητη η βελτιστοποίηση της διαδικασίας. Έτσι, δοκιμάστηκαν έξι διαφορετικές προαναλυτικές διεργασίες επεξεργασίας του κρασιού ώστε να βρεθεί η πιο αποτελεσματική διαδικασία όσον αφορά την ανάκτηση των αναλυτών, το χρόνο που απαιτείται για τη διαδικασία, το βαθμό δυσκολίας και την επαναληψιμότητα.

Σε μία προσπάθεια απλοποίησης της διαδικασίας και αποφυγής πιθανής απώλειας αναλυτών, δοκιμάστηκαν αρχικά δύο διαδικασίες, οι οποίες δεν περιλάμβαναν εκχύλιση του κρασιού. Άμεση έγχυση του δείγματος στο σύστημα CE είναι ιδιαίτερα επιθυμητή σε περιπτώσεις όπου η ανάκτηση της εκχύλισης είναι μικρή ή δεν υπάρχει χρόνος για προετοιμασία του δείγματος.^[73] Η άμεση έγχυση μπορεί να δώσει πιο ακριβή αποτελέσματα με καλύτερη επαναληψιμότητα καθώς οι ανακτήσεις των τεχνικών που περιλαμβάνουν εκχύλιση προσθέτουν μία πηγή μεταβλητότητας. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.1.9, στα ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν μετά από τις επεξεργασίες A και B (βλέπε Πειραματικό μέρος 3.2.1.3), στις οποίες πραγματοποιήθηκε απλή αραιώση του κρασιού ή εξάτμιση και επαναδιάλυση του κρασιού, αντίστοιχα, οδήγησε σε πολύ πολύπλοκα ηλεκτροφερογράμματα με πολύ χαμηλή ευαισθησία. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ασταθής βασική γραμμή και παρουσιάστηκαν πολλές παρεμβολικές, χαμηλής έντασης, κορυφές με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατός ο προσδιορισμός και η ποσοτικοποίηση των κορυφών των πολυφαινολικών ενώσεων. Έτσι, απαιτείται μία διαδικασία εκχύλισης πριν την εισαγωγή του δείγματος κρασιού στο σύστημα CE ώστε να γίνει κατορθωτός ο προσδιορισμός των επιθυμητών ουσιών.

Στη συνέχεια, δοκιμάστηκαν τρεις διαφορετικές διαδικασίες LLE. Η LLE είναι μία διαδικασία μεταφοράς μάζας στην οποία ένα υγρό διάλυμα που περιέχει έναν ή περισσότερους αναλύτες αναμειγνύεται με έναν μη-αναμίξιμο ή σχεδόν μη-αναμίξιμο διαλύτη. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό δύο φάσεων: το εκχύλισμα, το οποίο περιέχει το διαλύτη εμπλουτισμένο με τα επιθυμητά συστατικά και το υπόλειμμα, το οποίο περιέχει μικρή ποσότητα του διαλύτη. Η εκχύλιση μπορεί να γίνει ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο αν επιλεγθεί το κατάλληλο σύστημα διαλυτών. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.1.10, με τις διαδικασίες Γ, Δ και Ε (βλέπε Πειραματικό μέρος 3.2.1.3), οι οποίες περιλάμβαναν εκχύλιση του κρασιού, απομακρύνθηκαν διάφορα ανεπιθύμητα συστατικά με αποτέλεσμα

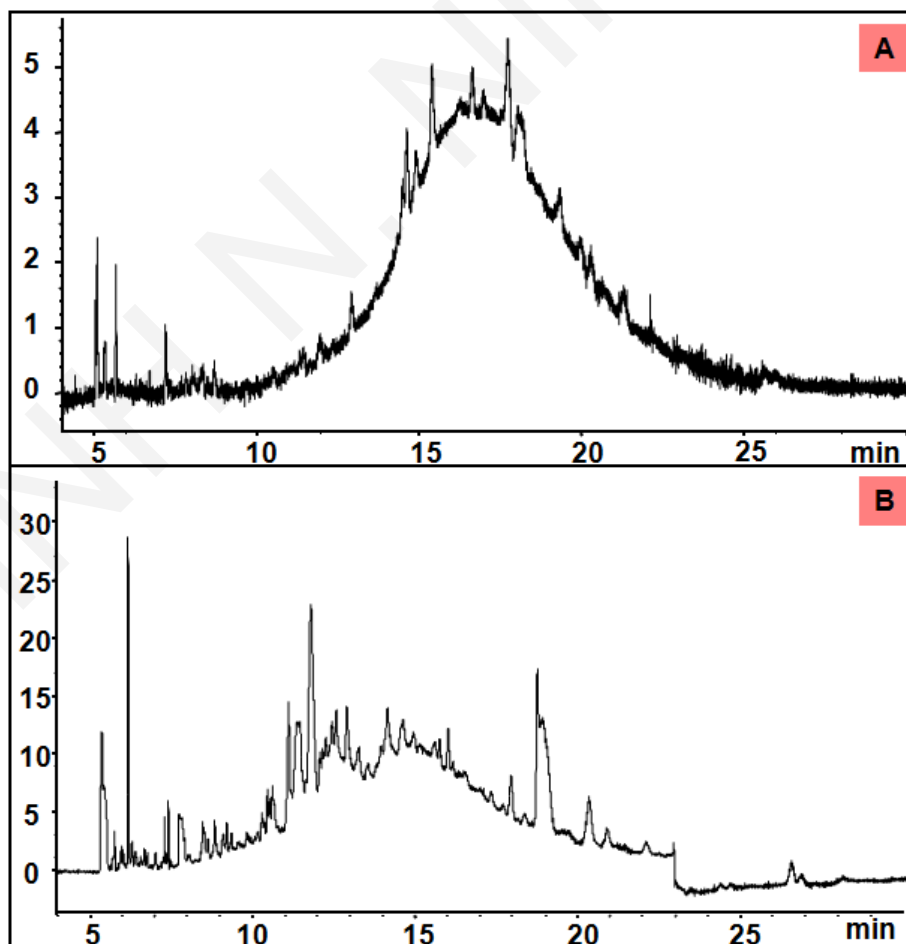
στα ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν, η βασική γραμμή να έχει βελτιωθεί αισθητά σε σχέση με τις δύο πρώτες διαδικασίες που δεν περιλάμβαναν εκχύλιση. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα υψηλότερες αποδοτικότητες, εκλεκτικότητες και ευαισθησίες και έγινε επιτρεπτή η ταυτοποίηση των υπό μελέτη ενώσεων.

Με την επεξεργασία Γ, η οποία ήταν αρκετά πολύπλοκη, αφού περιλάμβανε εκχύλιση με δύο διαφορετικούς οργανικούς διαλύτες, διαιθυλαιθέρα και οξικό αιθυλεστέρα, ξήρανση της οργανικής φάσης και εξάτμιση του ξηραμένου διαλύματος, ταυτοποιήθηκαν τέσσερα φλαβονοειδή, η επικατεχίνη (2), η κατεχίνη (3), η μυρικετίνη (7) και η κερκετίνη (8). Η ταυτοποίηση των κορυφών έγινε όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 4.1.3. Οι φλαβανόλες, κατεχίνη και επικατεχίνη, αποτελούν τη σημαντικότερη κατηγορία φλαβονοειδών που συναντάται στις μεγαλύτερες ποσότητες στο κρασί.^[2] Ωστόσο, με τη διαδικασία Γ, το υπόβαθρο εξακολουθούσε να είναι κάπως ασταθές, ιδιαίτερα στους χρόνους όπου εκλούεται η επικατεχίνη και η κατεχίνη. Αυτό είναι δυνατό να προκαλέσει πρόβλημα κατά την ποσοτικοποίηση των ενώσεων αυτών.

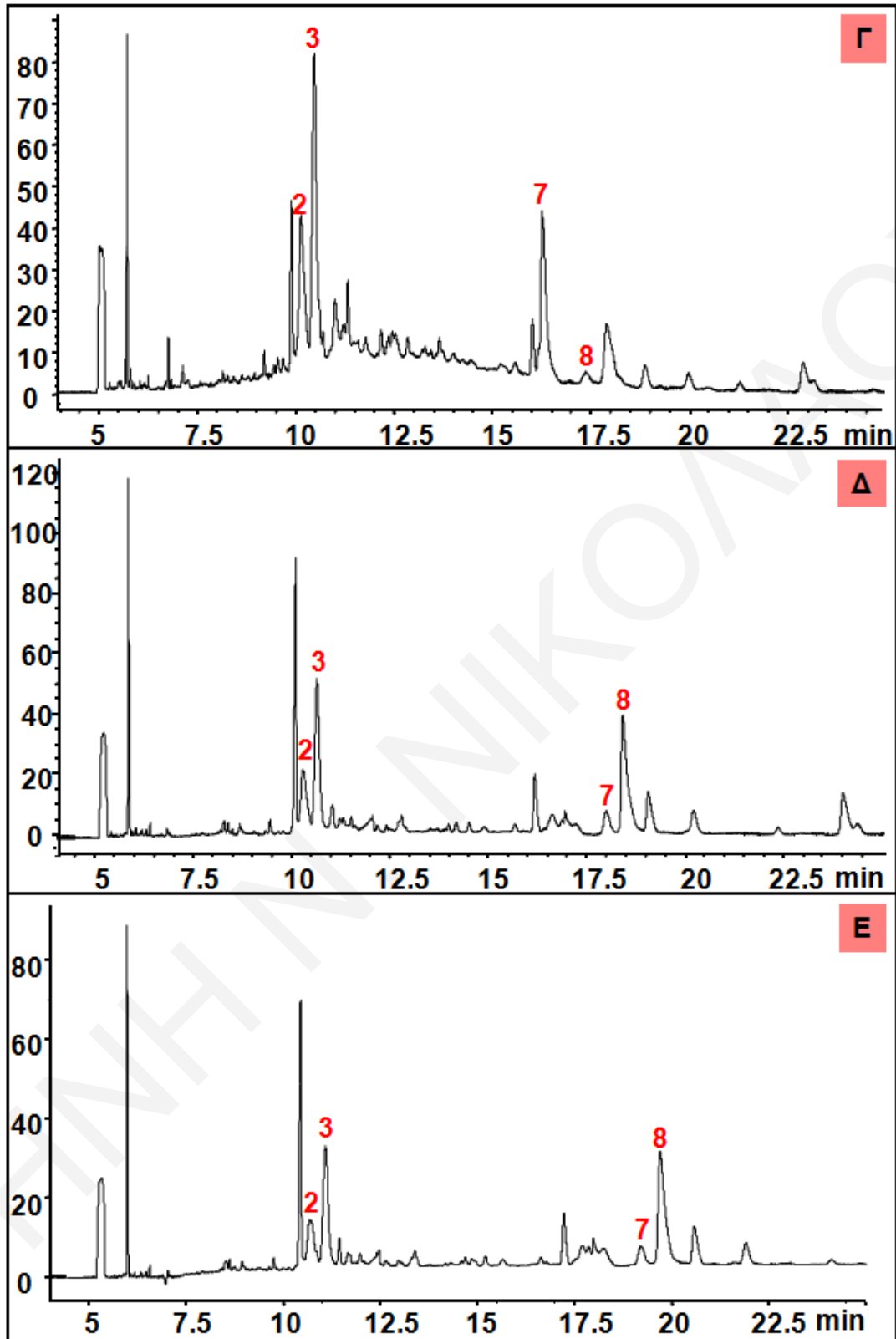
Για τα δείγματα κρασιού που επεξεργάστηκαν με τις διαδικασίες Δ και Ε, τα ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν ήταν πανομοιότυπα. Να σημειωθεί εδώ ότι οι δύο διαδικασίες ήταν σχεδόν οι ίδιες, με τη μόνη διαφορά ότι στη διαδικασία Ε έγινε αρχικά ρύθμιση του pH του κρασιού στην τιμή 2. Η μείωση του pH του κρασιού έγινε σε μία προσπάθεια να βελτιωθεί η αποδοτικότητα της μεθόδου αφού, όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία, με όξυνση του διαλύματος του δείγματος αποφεύγεται ο ιονισμός των φαινολών, ο οποίος μπορεί να μειώσει ισχυρά την κατακράτηση τους.^[113] Στην περίπτωση μας, δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή με την όξυνση του pH. Τόσο με τη διαδικασία Δ όσο και με τη διαδικασία Ε, η βασική γραμμή ήταν σταθερή, καθιστώντας δυνατό τον ποσοτικό προσδιορισμό των πολυφαινολικών ενώσεων, ενώ και στις δύο περιπτώσεις, ταυτοποιήθηκαν και πάλι τα τέσσερα φλαβονοειδή που ανιχνεύτηκαν και με τη διαδικασία Γ.

Σε μία προσπάθεια προσδιορισμού κι άλλων πολυφαινολικών ενώσεων στο κρασί, εάν αυτές υπάρχουν, δοκιμάστηκε στη συνέχεια μία διαδικασία SPE. Η SPE αποτελεί μία γρήγορη και επαναλήψιμη μέθοδο όπου λαμβάνονται συνήθως αρκετά καθαρά εκχυλίσματα με υψηλές ανακτήσεις.^[113] Η SPE είναι μία μορφή 'χρωματογραφίας', στην οποία οι αναλύτες που μας ενδιαφέρουν κατακρατούνται εκλεκτικά στο χρωματογραφικό υλικό και μετά εκλούνται.^[73] Ο αναλύτης δεσμεύεται στη στερεά φάση της στήλης SPE και στη συνέχεια παραλαμβάνεται με μικρό όγκο διαλύτη. Η SPE με προσροφητικό υλικό

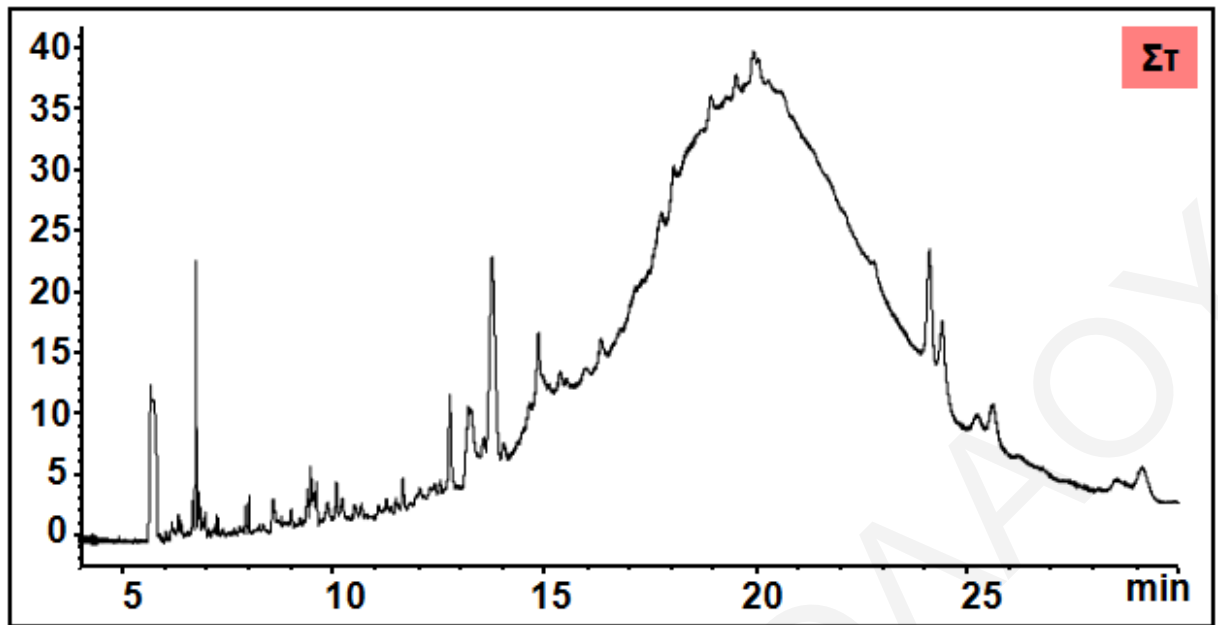
C18 που χρησιμοποιήθηκε στην περίπτωση μας, αποτελεί μία SPE αντίστροφης φάσης και χρησιμοποιείται για την απομόνωση μη πολικών ουσιών από πολική μήτρα πάνω σε μία μη-πολική στατική φάση. Η κατακράτηση των ουσιών πάνω στο υπόστρωμα γίνεται με ασθενείς δυνάμεις Van der Waals, ενώ για την έκλυση χρησιμοποιείται μη πολικός διαλύτης, ο οποίος ανταγωνίζεται την προσροφητική ουσία και λόγω της μεγάλης περισσειας του τη διώχνει από το υπόστρωμα. Η μέθοδος SPE αποδείχτηκε μη ικανοποιητική στην προκειμένη περίπτωση αφού όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.1.11, στο ηλεκτροφερόγραμμα που λήφθηκε για το εκχύλισμα του κρασιού μετά την SPE, περιέχεται ένας μεγάλος αριθμός άγνωστων συστατικών, τα οποία κάνουν δύσκολο τον προσδιορισμό των υπό μελέτη συστατικών. Τα ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν με τρεις διαφορετικούς διαλύτες έκλυσης, MeOH, EtOH και ACN, ήταν πανομοιότυπα (τα δεδομένα δε φαίνονται). Με τη χρήση τριών διαφορετικών διαλυτών έκλυσης αποδείχθηκε ότι η απουσία των πολυφαινολικών ενώσεων που δεν ταυτοποιήθηκαν δεν οφείλεται σε μη διαλυτότητα τους στον οργανικό διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε για την έκλυση.



Σχήμα 4.1.9. Ηλεκτροφερόγραμματα που λήφθηκαν για τα δείγματα κρασιού με τις διαδικασίες A και B, οι οποίες δεν περιλάμβαναν εκχύλιση του κρασιού. Συνθήκες: ίδιες με Σχήμα 4.1.1.



Σχήμα 4.1.10. Ηλεκτροφερόγραμματα που λήφθηκαν για τα δείγματα κρασιού με τις διαδικασίες Γ, Δ και Ε, στις οποίες δοκιμάστηκαν τρεις διαφορετικές διαδικασίες LLE. Συνθήκες: ίδιες με Σχήμα 4.1.1.

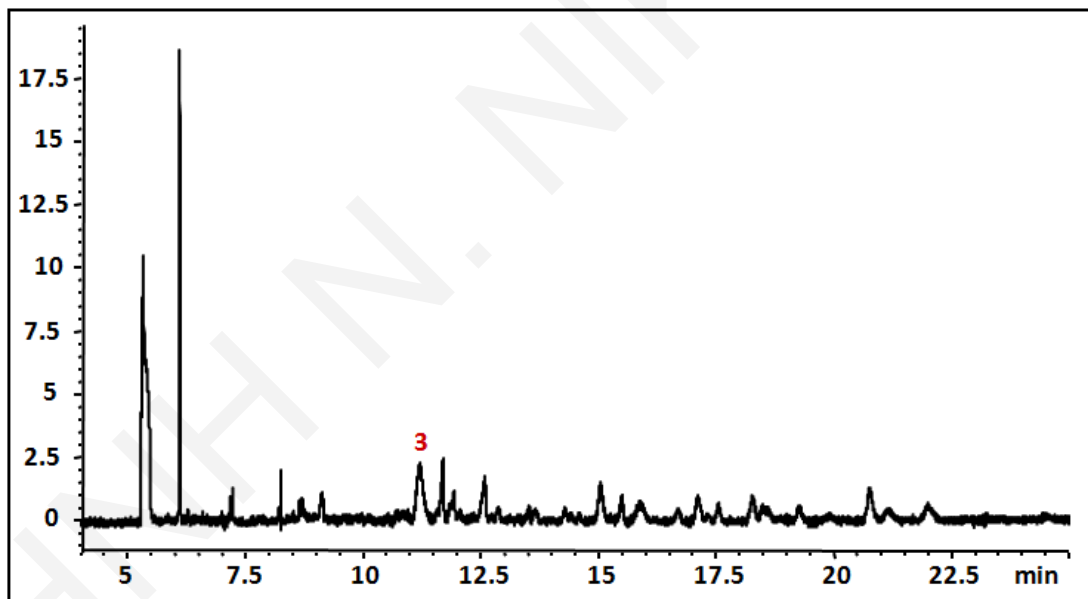


Σχήμα 4.1.11. Ηλεκτροφερογράμμα που λήφθηκε για δείγμα κρασιού μετά από SPE. Συνθήκες: ίδιες με Σχήμα 4.1.1.

Συγκρίνοντας τις έξι διαδικασίες επεξεργασίας του κρασιού που δοκιμάστηκαν, οι διαδικασίες Δ και Ε ήταν οι πιο αποτελεσματικές. Αν και με τη διαδικασία Γ έγινε κατορθωτός ο προσδιορισμός των τεσσάρων πολυφαινολικών ενώσεων, εντούτοις, όπως έχουμε αναφέρει, στην περίπτωση αυτή, το υπόβαθρο ήταν πιο ασταθές σε σχέση με τα ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν μετά από τις διαδικασίες Δ και Ε, δυσχεραίνοντας την ποσοτική ανάλυση. Επίσης, η διαδικασία Γ ήταν αρκετά πιο πολύπλοκη σε σχέση με τις διαδικασίες Δ και Ε. Συγκρίνοντας τώρα τις διαδικασίες Δ και Ε, η πρώτη διαδικασία ήταν πιο απλή σε σχέση με τη δεύτερη. Επιπλέον, αν και τα ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν και στις δύο περιπτώσεις ήταν σχεδόν τα ίδια, ο χρόνος ανάλυσης ήταν λίγο μικρότερος με τη διαδικασία Δ απ' ό,τι με τη διαδικασία Ε. Έτσι, η διαδικασία Δ επιλέχθηκε σαν η βέλτιστη διαδικασία επεξεργασίας του κρασιού, αφού αποτελεί μία απλή και επαναλήψιμη διαδικασία που μπορεί εκλεκτικά και αποτελεσματικά να απομονώσει τα επιθυμητά συστατικά από τα δείγματα κρασιού.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν μελέτες επαναληψιμότητας χρησιμοποιώντας τη διαδικασία Δ. Συγκεκριμένα, εκτιμήθηκε η επαναληψιμότητα των χρόνων μετανάστευσης και των εμβαδών των κορυφών των τεσσάρων πολυφαινολικών ενώσεων που ανιχνεύτηκαν στο κρασί κάτω από τις βέλτιστες συνθήκες με το κριτήριο της RSD. Οι τιμές RSD υπολογίστηκαν για πέντε διαδοχικές ηλεκτροφορητικές αναλύσεις. Οι τιμές RSD που λήφθηκαν για τους χρόνους μετανάστευσης και τα εμβαδά ήταν μικρότερα από 2 και 5%, αντίστοιχα, υποδηλώνοντας πολύ καλές επαναληψιμότητες.

Καθώς η διαδικασία Δ αποδείχτηκε η βέλτιστη διαδικασία επεξεργασίας του κρασιού, η διαδικασία αυτή εφαρμόστηκε στη συνέχεια σε άλλα δύο δείγματα κόκκινου κρασιού και σε ένα λευκό κρασί. Το ηλεκτροφερόγραμμα που λήφθηκε για το δείγμα λευκού κρασιού μετά από την επεξεργασία Δ φαίνεται στο Σχήμα 4.1.12. Στο λευκό κρασί, το μοναδικό φλαβονοειδές που ανιχνεύτηκε σε συγκεντρώσεις, στις οποίες μπορούσε να γίνει ποσοτική ανάλυση, ήταν η κατεχίνη σε συγκέντρωση 7.3 mg/L. Η απουσία των πλείστων πολυφαινολικών ενώσεων από το λευκό κρασί ήταν αναμενόμενη αφού οι περισσότερες πολυφαινόλες προέρχονται από τα στερεά συστατικά του σταφυλιού, δηλαδή τα κουκούτσια και τη φλούδα, κατά τη διαδικασία του βρασμού.^[42] Το λευκό κρασί παράγεται από βράσιμο του σταφυλιού αφού πρώτα αφαιρεθούν τα στερεά αυτά συστατικά. Αυτό έχει σαν συνέπεια να περιέχονται στο κόκκινο κρασί πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις πολυφαινολών απ' ότι στο λευκό κρασί. Επιπλέον, η διαδικασία βρασμού του κόκκινου κρασιού διαρκεί μέχρι και δύο εβδομάδες, παρέχοντας μεγαλύτερο χρόνο για εκχύλιση περισσότερων φλαβονοειδών.



Σχήμα 4.1.12. Ηλεκτροφερόγραμμα που λήφθηκε για λευκό κρασί μετά από την επεξεργασία Δ. Συνθήκες: ίδιες με Σχήμα 4.1.1.

Στον Πίνακα 4.1.4 συνοψίζονται οι συγκεντρώσεις των πολυφαινολών που βρέθηκαν στα τρία δείγματα κόκκινου κρασιού που αναλύθηκαν, όπως αυτά υπολογίστηκαν με βάση τις καμπύλες βαθμονόμησης που κατασκευάστηκαν (Πίνακας 4.1.3). Παρατηρήθηκε ότι η επικατεχίνη και η κατεχίνη βρέθηκαν σε όλα τα δείγματα κρασιού σε παρόμοιες συγκεντρώσεις, ενώ η μυρικετίνη και η κερκετίνη βρέθηκαν σε δύο από τα τρία κόκκινα κρασιά. Η σύσταση των πολυφαινολών ποικίλει ανάμεσα στα διάφορα κρασιά αφού

εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως το είδος του σταφυλιού που χρησιμοποιήθηκε και τη διαδικασία που ακολουθήθηκε κατά την παραγωγή και τη ζύμωσή του.^[114] Ακόμα και όταν χρησιμοποιηθεί το ίδιο είδος σταφυλιού, η σύσταση των πολυφαινόλων μπορεί να διαφέρει, αφού εξαρτάται επίσης και τα καιρικά φαινόμενα και άλλες βιολογικές επιδράσεις, όπως μύκητες και εντομοκτόνα.^[44,115] Επίσης, έχει βρεθεί ότι η περιεκτικότητα σε φλαβονόλες, όπως είναι η μυρικετίνη και η κερκετίνη, μειώνεται όσο το κρασί γίνεται πιο παλιό.^[99]

Τα επίπεδα των βασικότερων φλαβονοειδών στο κόκκινο κρασί που αναφέρονται στη βιβλιογραφία είναι για τις φλαβονόλες 40-120 mg/L, με βασικότερη ένωση την κατεχίνη, και για τις φλαβονόλες 50-200 mg/L.^[116] Οι ποσότητες που βρέθηκαν για την επικατεχίνη και την κατεχίνη είναι αρκετά κοντά με αυτές που αναφέρονται στη βιβλιογραφία και παρόμοιες και στα τρία κρασιά που αναλύθηκαν.^[89,117] Όσον αφορά τη μυρικετίνη και την κερκετίνη, οι ποσότητες που βρέθηκαν είναι λίγο μεγαλύτερες από αυτές της βιβλιογραφίας.^[88,89,117] Αυτή η διαφορά στις συγκεντρώσεις, καθώς επίσης και το γεγονός ότι δεν ανιχνεύτηκαν όλες οι πολυφαινόλες, δεν αποτελεί μειονέκτημα της μεθόδου που αναπτύχθηκε αφού, όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, η σύσταση των πολυφαινόλων στα κρασιά επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες. Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι σε μελέτες της βιβλιογραφίας στις οποίες γίνεται ανάλυση πολλών πολυφαινολικών ενώσεων, δεν ανιχνεύονται όλες οι ενώσεις σε όλα τα δείγματα κρασιού.^[88,89,97]

Πίνακας 4.1.4. Ποσοτικός προσδιορισμός φλαβονοειδών σε τρία κόκκινα κυπριακά κρασιά (mg/L).

	Επικατεχίνη	Κατεχίνη	Μυρικετίνη	Κερκετίνη
Κρασί 1	47.1	117.7	119,8	159.1
Κρασί 2	44.8	114.7	138,6	196.6
Κρασί 3	53.1	129.4	–	–

Τέλος, αξιοσημείωτη είναι η απουσία της πολυφαινολικής ένωσης, ρεσβερατρόλης από όλα τα δείγματα κρασιού που αναλύθηκαν. Η ρεσβερατρόλη, η οποία είναι το μοναδικό μη-φλαβονοειδές συστατικό που αναλύεται, αποτελεί μία από τις συνηθέστερες πολυφαινόλες που ανιχνεύονται στο κρασί και έχει προσδιοριστεί σε αυτό σε πολλές μελέτες στη βιβλιογραφία.^[57,62,65,89,99] Τα αρχικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν έδειξαν ότι η ρεσβερατρόλη δεν εξάγεται από τα δείγματα κρασιού με καμία από τις διαδικασίες που δοκιμάστηκαν. Για να επιβεβαιωθεί ότι η απουσία της ένωσης αυτής από

τα δείγματα κρασιού δεν οφείλεται σε ανικανότητα της μεθόδου να την προσδιορίσει, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανάκτησης. Έτσι, έγινε προσθήκη γνωστής συγκέντρωσης ρεσβερατρόλης σε δείγματα κρασιού και στη συνέχεια εφαρμόστηκαν οι διάφορες διαδικασίες προετοιμασίας του δείγματος. Από το εμβαδόν της κορυφής που λήφθηκε για την ρεσβερατρόλη σε κάθε περίπτωση και με βάση την καμπύλη βαθμονόμησης που κατασκευάστηκε για τη ρεσβερατρόλη υπολογίστηκε η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στη ρεσβερατρόλη. Η ανάκτηση της μεθόδου εκφράζεται σαν η εκατοστιαία αναλογία της συγκέντρωσης της ρεσβερατρόλης που υπολογίστηκε ως προς τη συγκέντρωση της ένωσης που προστέθηκε στο δείγμα. Όπως παρατηρήθηκε, το αρχικό ποσό της ρεσβερατρόλης που προστέθηκε σε κάθε περίπτωση στο δείγμα κρασιού μπορεί να ανιχνευτεί και να διαχωριστεί από τα άλλα συστατικά που βρίσκονται στο δείγμα κρασιού. Η βέλτιστη διαδικασία προετοιμασίας του δείγματος βρέθηκε ότι παρέχει πολύ καλή ανάκτηση και εξαιρετική επαναληψιμότητα. Όπως φάνηκε, το ποσό της ρεσβερατρόλης που προστέθηκε σε κάθε περίπτωση μπορεί να ανιχνευτεί με ποσοστά ανάκτησης $101 \pm 12\%$. Έτσι, τα πειράματα αυτά απέδειξαν ότι η διαδικασία επεξεργασίας του κρασιού που αναπτύχθηκε μπορεί να εξάγει την ρεσβερατρόλη με πολύ ικανοποιητικά ποσοστά ανάκτησης και επιβεβαίωσε ότι το συστατικό αυτό δεν υπάρχει στα δείγματα κρασιού που αναλύθηκαν. Αν και όπως έχει αναφερθεί η ρεσβερατρόλη συναντάται στα περισσότερα δείγματα κρασιού, εντούτοις στη βιβλιογραφία υπάρχουν κι άλλες μελέτες στις οποίες η ένωση αυτή δεν ανιχνεύτηκε.^[61,118]

4.2. Προσδιορισμός του AChEI ριβαστιγμίνη με χρήση της τεχνικής CE-ESI-MS

Ο δεύτερος στόχος της παρούσας Δ.Δ. ήταν η ανάπτυξη μίας μεθόδου CE με ανιχνευτή ESI-MS για τον προσδιορισμό του AChEI ριβαστιγμίνη, με χρήση της νεοστιγμίνης σαν I.S. Η χρήση του I.S. συνιστάται για να αποφευχθούν προβλήματα που σχετίζονται με την έγχυση του δείγματος.^[119] Η νεοστιγμίνη είναι μία τεταρτοταγής αμίνη και πιστεύεται ότι δεν επηρεάζεται από τη διαδικασία ιονισμού.^[120] Επιπλέον, η συγκεκριμένη ένωση έχει παρόμοιες δομικές και φυσικοχημικές ιδιότητες με τη ριβαστιγμίνη. Για τους λόγους αυτούς, επιλέχθηκε για να χρησιμοποιηθεί σαν I.S. Στα πλαίσια της έρευνας διατριβής μάστερ που ολοκληρώθηκε τον Ιούνιο του 2008, αναπτύχθηκε μία μέθοδος MEKC με ανιχνευτή UV, με την οποία επιτεύχθηκε πλήρης διαχωρισμός εννέα AChEIs, ανάμεσα στους οποίους ήταν και η ριβαστιγμίνη. Ωστόσο, τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου αυτής δεν ήταν ικανοποιητικά με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατός ο προσδιορισμός της ριβαστιγμίνης σε βιολογικά δείγματα. Για το λόγο αυτό, κρίθηκε απαραίτητη η σύζευξη του συστήματος CE με έναν πιο ευαίσθητο ανιχνευτή, όπως είναι ο ανιχνευτής MS. Στην περίπτωση της μεθόδου MEKC-UV, σαν BGE είχε χρησιμοποιηθεί μείγμα 12.5 mM δεκαένυδρου τετραβορικού νατρίου και 12.5 mM διβασικού φωσφορικού νατρίου σε pH 10, παρουσία 20 mM SDS.

4.2.1. Εύρεση της βέλτιστης μεθόδου CE

Καθώς η μέθοδος MEKC είχε αποδειχθεί σαν η καταλληλότερη μέθοδος για τον προσδιορισμό της συγκεκριμένης κατηγορίας ενώσεων με χρήση του ανιχνευτή UV, αρχικά δοκιμάστηκε η ικανότητα της μεθόδου αυτής να προσδιορίσει τη νεοστιγμίνη, η οποία χρησιμοποιείται σαν I.S., με χρήση του ανιχνευτή MS. Χρησιμοποιώντας το BGE που βρέθηκε σαν το βέλτιστο στην περίπτωση του ανιχνευτή UV (12.5 mM τετραβορικό νάτριο, 12.5 mM φωσφορικό νάτριο, 20 mM SDS, pH 10) η κορυφή της νεοστιγμίνης εκλύεται σε χρόνο 40 λεπτών.(Σχήμα 4.2.1) Επίσης, το σχήμα της κορυφής δεν ήταν καθόλου ικανοποιητικό, ενώ εμφανίστηκε έντονος θόρυβος στο υπόβαθρο. Αυτά τα μη ικανοποιητικά αποτελέσματα οφείλονται σε τρεις βασικούς λόγους. Ο πρώτος λόγος είναι ότι το συγκεκριμένο BGE αποτελείται από μη πτητικά άλατα, τα οποία μειώνουν την αποδοτικότητα του ιονισμού, ενώ επίσης υπάρχει ο κίνδυνος τα μη πτητικά άλατα να προκαλέσουν μόλυνση της πηγής του MS.^[69,119,121,122] Ακόμα, με χρήση τέτοιου είδους BGEs, παρατηρήθηκε καταβύθιση λευκού στερεού στην πηγή, η οποία μπορεί να εμποδίζει το στόμιο του αναλύτη μάζας και κατά συνέπεια να προκαλέσει μείωση της ευαισθησίας. Η δεύτερη αιτία, στην οποία πιθανόν να οφείλονται τα μη ικανοποιητικά

αποτελέσματα είναι η παρουσία ιόντων νατρίου στο BGE. Τα ιόντα νατρίου μπορούν επίσης να οδηγήσουν σε σημαντική μείωση της ευαισθησίας αφού προκαλείται δέσμευση ιόντων νατρίου πάνω στον αναλύτη. Ο τρίτος λόγος είναι η παρουσία τασιενεργών του SDS. Η απευθείας σύζευξη της μεθόδου MEKC με τον ανιχνευτή MS είναι προβληματική στις πλείστες περιπτώσεις λόγω της παρουσίας των μη πτητικών τασιενεργών αλλά και λόγω της μεγάλης επιφανειοδραστικότητας των μη-πολυμερισμένων μικυλλίων.^[4] Επιπλέον, η παρουσία χαμηλού μοριακού βάρους μονομερών των τασιενεργών αυτών προκαλεί πολύ ασταθή ηλεκτροψευκασμό λόγω μεγάλου σήματος στο υπόβαθρο, το οποίο οδηγεί τελικά σε μόλυνση της πηγής ιονισμού και μείωση της ευαισθησίας του ESI-MS. Ακόμα, η πρόσδεση μορίων του SDS πάνω στον αναλύτη μειώνει την αποδοτικότητα του ιονισμού ιδιαίτερα για κατιοντικούς αναλύτες και κατά συνέπεια την ευαισθησία.^[77] Από τα πιο πάνω γίνεται σαφές ότι είναι απαραίτητη η ανάπτυξη μίας νέας μεθόδου για να πραγματοποιηθεί με επιτυχία η σύζευξη του συστήματος CE με τον ανιχνευτή MS.

Οι περισσότερες εφαρμογές που κάνουν χρήση της τεχνικής MEKC-MS είτε χρησιμοποιούν χαμηλού μοριακού βάρους τασιενεργά σε πολύ χαμηλή μοριακή συγκέντρωση είτε χρησιμοποιούν την τεχνική μερικού γεμίσματος της στήλης (partial-filling, PF), στην οποία μόνο ένα μέρος της τριχοειδούς στήλης γεμίζεται με το μικυλλιακό ρυθμιστικό διάλυμα. Συγκεκριμένα, η στήλη αρχικά γεμίζεται με το BGE που περιέχει μικύλλια, ενώ κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, η κινητή φάση που περνά μέσα από τη στήλη αποτελείται από το ρυθμιστικό διάλυμα, απουσία μικυλλίων. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.2.2, με την τεχνική PF-MEKC, με χρήση και πάλι 12.5 mM τετραβορικό νάτριο, 12.5 mM φωσφορικό νάτριο σε pH 10, με 20 mM SDS, τα αποτελέσματα που λήφθηκαν ήταν παρόμοια με την περίπτωση της συνηθισμένης MEKC. Παρόλο που κατά τη διάρκεια της ανάλυσης δεν εισέρχονταν στο MS μόρια SDS, εντούτοις η χρήση ενός μη πτητικού ρυθμιστικού διαλύματος σε συνδυασμό με την ποσότητα των μικυλλίων που υπήρχαν μέσα στη στήλη οδήγησαν και πάλι σε μη ικανοποιητικό ηλεκτροψευκασμό.

Για να διερευνηθεί κατά πόσο τα μη ικανοποιητικά αποτελέσματα οφείλονται στην παρουσία ιόντων νατρίου και σε μικρότερο βαθμό στη μη πτητικότητα του συγκεκριμένου BGE, δοκιμάστηκε στη συνέχεια σαν BGE φωσφορικό αμμώνιο 10 mM σε pH 7.5, παρουσία 20 mM SDS. Το συγκεκριμένο BGE χρησιμοποιείται στη βιβλιογραφία για τον προσδιορισμό της ένωσης γαλανθαμίνης, η οποία αποτελεί επίσης έναν AChEI.^[123] Αν και στις περισσότερες δημοσιευμένες μελέτες, στις οποίες γίνεται χρήση της μεθόδου CE-MS, χρησιμοποιούνται πτητικά ρυθμιστικά διαλύματα, εντούτοις σε μερικές περιπτώσεις αναφέρεται και η χρήση μη-πτητικών BGEs, όπως είναι το φωσφορικό.^[69] Όπως φαίνεται

στο Σχήμα 4.2.3, ο χρόνος ανάλυσης ήταν μικρότερος σε σχέση με την πρώτη περίπτωση χρήσης της μεθόδου MEKC, αλλά και πάλι το σχήμα της κορυφής δεν ήταν ικανοποιητικό. Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν ότι η μέθοδος MEKC με χρήση μικυλλίων του SDS δε δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα όταν γίνεται σύζευξη με τον ανιχνευτή ESI-MS, ενώ είναι απαραίτητη η χρήση πτητικών ρυθμιστικών διαλυμάτων, τα οποία να μην περιέχουν ιόντα νατρίου.

Σχήμα 4.2.1. Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν για τη νεοστιγμίνη με χρήση της μεθόδου MEKC με ανιχνευτή MS (**α**) στη SCAN-mode, (**β**) στη SIM-mode για m/z 223, με χρήση BGE 12.5 mM φωσφορικό νάτριο και 12.5 mM τετραβορικό νάτριο σε pH 10, παρουσία 20 mM SDS.

Σχήμα 4.2.2. Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν για τη νεοστιγμίνη με χρήση της μεθόδου PF-MEKC με ανιχνευτή MS (**α**) στη SCAN-mode, (**β**) στη SIM-mode για m/z 223, με χρήση BGE: 12.5 mM φωσφορικό νάτριο και 12.5 mM τετραβορικό νάτριο σε pH 10, παρουσία 20 mM SDS μόνο κατά τη διαδικασία πλύσης της στήλης.

Σχήμα 4.2.3. Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν για τη νεοστιγμίνη με χρήση της μεθόδου MEKC με ανιχνευτή MS (**α**) στη SCAN-mode, (**β**) στη SIM-mode για m/z 223, με χρήση BGE: φωσφορικό αμμώνιο 10 mM σε pH 7.5, παρουσία 20 mM SDS.

Η μέθοδος MEKC θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στη σύζευξη με το MS με εύρεση χαμηλού μοριακού βάρους τασιενεργών, τα οποία να είναι συμβατά με το MS. Σε μία τελευταία προσπάθεια χρήσης της μεθόδου MEKC, δοκιμάστηκε η ικανότητα της μεθόδου να προσδιορίσει τη ριβαστιγμίνη και τη νεοστιγμίνη με χρήση πολυμερών

τασιενεργών ουσιών σαν ψευδοστατική φάση μέσα στο BGE, αντί για συνηθισμένα μικύλλια. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε BGE αποτελούμενο από οξικό αμμώνιο 10 mM σε pH 4, παρουσία συμπολυμερούς των poly-SUG και poly-SUS (20:80) συγκέντρωσης 0.25% w/v. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.2.4, το σχήμα των κορυφών ήταν σημαντικά βελτιωμένο σε σχέση με τις προηγούμενες μεθόδους MEKC, ωστόσο παρατηρήθηκε και πάλι σπάσιμο των κορυφών. Η χρήση των πολυμερών τασιενεργών ουσιών αντί για τα συνηθισμένα μικύλλια εμφανίζει πολλά πλεονεκτήματα.^[124] Σε αντίθεση με τα συνηθισμένα μικύλλια, τα οποία πρέπει να χρησιμοποιηθούν σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από τη CMC, τα πολυμερή τασιενεργών ουσιών μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε χαμηλές συγκεντρώσεις και για το λόγο αυτό μειώνεται το σήμα στο MS που οφείλεται στα τασιενεργά. Επιπλέον, λόγω της χαμηλότερης συγκέντρωσης που χρησιμοποιείται, δεν είναι τόσο έντονη η πρόσδεση αναλύτη-τασιενεργού, γεγονός που αυξάνει την αποτελεσματικότητα του ιονισμού. Ακόμα, η χαμηλή επιφανειοδραστικότητα των πολυμερών μπορεί να είναι ένας ακόμα λόγος για τη βελτίωση του σήματος στο MS. Αν και παρατηρήθηκε σημαντική βελτίωση στο σχήμα των κορυφών σε σχέση με την περίπτωση της MEKC όπου γίνεται χρήση συνηθισμένων μικυλλίων, εντούτοις παρατηρήθηκε και πάλι σπάσιμο των κορυφών, ενώ ο χρόνος ανάλυσης ήταν και πάλι αρκετά εκτεταμένος (~35 min).

Σε μία προσπάθεια να μειωθεί ο χρόνος της ανάλυσης και να βελτιωθεί το σχήμα των κορυφών, αυξήθηκε η τιμή του pH του ρυθμιστικού διαλύματος οξικού αμμωνίου στην τιμή 9, ενώ σαν τασιενεργό χρησιμοποιήθηκε το poly-SULV σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις: 0.05% και 0.1% w/v. Όπως φαίνεται στα Σχήματα 4.2.5 και 4.2.6, ο χρόνος της ανάλυσης μειώθηκε στα 10 περίπου λεπτά στη χαμηλότερη συγκέντρωση πολυμερούς και στα 12 λεπτά στην υψηλότερη συγκέντρωση. Ο μεγαλύτερος χρόνος κατακράτησης στη μεγαλύτερη συγκέντρωση πολυμερούς οφείλεται στην ισχυρότερη αλληλεπίδραση του αναλύτη με την ψευδοστατική φάση που σχηματίζει το πολυμερές, το οποίο οδηγεί σε μείωση της ηλεκτροφορητικής ευκινησίας του αναλύτη. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι το σχήμα των κορυφών είναι σημαντικά βελτιωμένο σε σχέση με τις προηγούμενες μεθόδους MEKC, με εξαίρεση το σπάσιμο της κορυφής της ριβαστιγμίνης που παρατηρήθηκε στη χαμηλότερη συγκέντρωση πολυμερούς. Ακόμα, η κορυφή της νεοστιγμίνης εμφανίζει ουρά, γεγονός το οποίο μπορεί να δημιουργήσει πρόβλημα στην ποσοτική ανάλυση.

Σχήμα 4.2.4. Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν για μείγμα ριβαστιγμίνης και νεοστιγμίνης με χρήση της μεθόδου MEKC με ανιχνευτή MS **(α)** στη SCAN-mode, **(β)** στη SIM-mode για m/z 223, **(γ)** στη SIM-mode για m/z 251 με χρήση σαν BGE οξικό αμμώνιο 10 mM σε pH 4, παρουσία συμπολυμερούς των poly-SUG και poly-SUS (20:80) συγκέντρωσης 0.25% w/v.

Σχήμα 4.2.5. Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν για μείγμα ριβαστιγμίνης και νεοστιγμίνης με χρήση της μεθόδου MEKC με ανιχνευτή MS **(α)** στη SCAN-mode, **(β)** στη SIM-mode για m/z 223, **(γ)** στη SIM-mode για m/z 251 με χρήση BGE οξικό αμμώνιο 10 mM σε pH 9, παρουσία poly-SULV συγκέντρωσης 0.05% w/v.

Σχήμα 4.2.6. Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν για μείγμα ριβαστιγμίνης και νεοστιγμίνης με χρήση της μεθόδου MEKC με ανιχνευτή MS **(α)** στη SCAN-mode, **(β)** στη SIM-mode για m/z 223, **(γ)** στη SIM-mode για m/z 251 με χρήση BGE οξικό αμμώνιο 10 mM σε pH 9, παρουσία poly-SULV συγκέντρωσης 0.1% w/v.

Αφού η μέθοδος MEKC δεν έδωσε αρκετά ικανοποιητικά αποτελέσματα για τον προσδιορισμό των υπό μελέτη ενώσεων, δοκιμάστηκε, στη συνέχεια, η ικανότητα της πιο απλής μεθόδου CE, της CZE, να προσδιορίσει τις ενώσεις αυτές. Αρχικά, δοκιμάστηκε σαν BGE αυτό που είχε χρησιμοποιηθεί στην περίπτωση της MEKC, δηλαδή 12.5 mM τετραβορικό νάτριο και 12.5 mM φωσφορικό νάτριο σε pH 10, χωρίς τη χρήση SDS.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.2.7, ο χρόνος της ανάλυσης μειώθηκε σημαντικά, περίπου στα 15 λεπτά, σε σχέση με την περίπτωση της MEKC (Σχήμα 4.2.1). Στην περίπτωση της MEKC, οι υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις των μικυλλίων με τον αναλύτη, οδηγούν σε μείωση της ταχύτητας μετανάστευσης της ένωσης κατά συνέπεια σε μεγαλύτερους χρόνους ανάλυσης. Ωστόσο, και στην περίπτωση της CZE παρατηρήθηκε σημαντικός θόρυβος στο υπόβαθρο και το σχήμα της κορυφής δεν ήταν ικανοποιητικό. Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν ότι μπορεί να προκληθεί μη ικανοποιητικός ιονισμός, όχι μόνο λόγω της παρουσίας των τασιενεργών, αλλά και λόγω της χρήσης μη πτητικών BGEs, τα οποία δεν είναι συμβατά με το MS.

Στη συνέχεια, δοκιμάστηκε σαν BGE φωσφορικό αμμώνιο 10 mM σε pH 7.5, έτσι ώστε να αποφευχθεί η είσοδος ιόντων νατρίου μέσα στο MS. Στο Σχήμα 4.2.8 φαίνονται τα ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν για μείγμα της νεοστιγμίνης και της ριβαστιγμίνης στη Scan-mode (Σχήμα 4.2.8(α)) και στη SIM-mode για τα πρωτονιωμένα μοριακά ιόντα της νεοστιγμίνης (Σχήμα 4.2.8(β)) και της ριβαστιγμίνης (Σχήμα 4.2.8(γ)). Όπως παρατηρήθηκε, και στις τρεις περιπτώσεις το σχήμα των κορυφών ήταν σημαντικά βελτιωμένο, ενώ επίσης παρατηρήθηκε μείωση των χρόνων μετανάστευσης των αναλυτών. Ο λόγος S/N, όπως υπολογίστηκε για την κορυφή της ριβαστιγμίνης στη SIM-mode για λόγο m/z 251 κάτω από τις συνθήκες αυτές, ήταν 335.

Το τελευταίο BGE που δοκιμάστηκε στην CZE ήταν το οξικό αμμώνιο σε συγκέντρωση 10 mM και σε pH 7.5. Το οξικό αμμώνιο αποτελεί το συνηθέστερο ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται στην τεχνική CE-MS.^[69] Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.2.9, το σχήμα των κορυφών ήταν βελτιωμένο, τόσο στη Scan-mode όσο και στη SIM-mode, ακόμη και όταν συγκριθεί με την περίπτωση στην οποία έγινε χρήση ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού αμμωνίου. Η ένταση των κορυφών αυξήθηκε σημαντικά, μέχρι και μία τάξη μεγέθους στην περίπτωση της SIM-mode για το πρωτονιωμένο ιόν της ριβαστιγμίνης σε λόγο m/z 251. Ο λόγος S/N, όπως υπολογίστηκε για την κορυφή της ριβαστιγμίνης, ήταν 575. Επίσης, ο χρόνος της ανάλυσης ήταν μόλις 10 λεπτά.

Σχήμα 4.2.7. Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν για τη νεοστιγμίνη με χρήση της μεθόδου CZE με ανιχνευτή MS **(α)** στη SCAN-mode, **(β)** στη SIM-mode για m/z 223, με χρήση BGE: 12.5 mM φωσφορικό νάτριο και 12.5 mM βορικό νάτριο σε pH 10.

Σχήμα 4.2.8. Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν για μείγμα ριβαστιγμίνης και νεοστιγμίνης με χρήση της μεθόδου CZE με ανιχνευτή MS (**α**) στη SCAN-mode, (**β**) στη SIM-mode για m/z 223, (**γ**) στη SIM-mode για m/z 251 με χρήση BGE φωσφορικού αμμώνιο 10 mM σε pH 7.5.

Σχήμα 4.2.9. Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν για μείγμα ριβαστιγμίνης και νεοστιγμίνης με χρήση της μεθόδου CZE με ανιχνευτή MS **(α)** στη SCAN-mode, **(β)** στη SIM-mode για m/z 223, **(γ)** στη SIM-mode για m/z 251 με χρήση BGE οξικό αμμώνιο 10 mM σε pH 7.5.

Τέλος, σε μία προσπάθεια περαιτέρω βελτίωσης του λόγου S/N, δοκιμάστηκε η ικανότητα της μεθόδου OT-CEC να προσδιορίσει τις υπό μελέτη ουσίες με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος οξικού αμμωνίου 10 mM σε pH 7.5. Συγκεκριμένα, έγινε επικάλυψη της στήλης με ένα στρώμα του κατιοντικού πολυμερούς PDADMAC (0.5% w/v) και ένα στρώμα του ανιοντικού πολυμερούς poly-SUL (0.5% w/v). Όπως φαίνεται στο Σχήμα

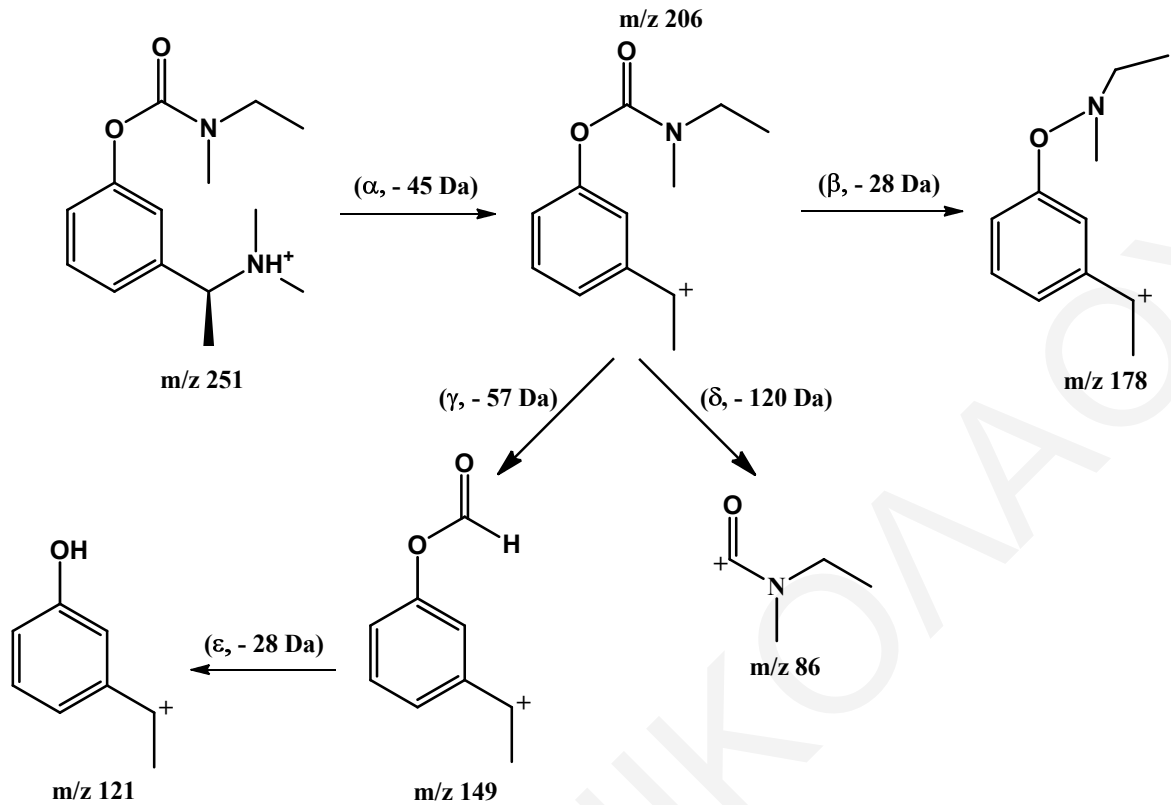
4.2.10, με επικάλυψη της στήλης παρατηρήθηκε φθορά στο σχήμα των κορυφών σε σχέση με την περίπτωση της CZE, καθώς επίσης και αύξηση των χρόνων μετανάστευσης. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην αλληλεπίδραση των αναλυτών με την επικάλυψη της στήλης. Επίσης, καθώς η εναπόθεση των πολυμερών πάνω στη στήλη γίνεται μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, είναι πιθανόν μία ποσότητα του πολυμερούς να παρασύρεται προς το MS, με αποτέλεσμα να μειώνεται η αποδοτικότητα του ιονισμού. Ο λόγος S/N που υπολογίστηκε για το πρωτονιωμένο ιόν της ριβαστιγμίνης για λόγο m/z 251 είναι 270. Η τιμή αυτή είναι μικρότερη από την τιμή που υπολογίστηκε στην περίπτωση της ανάλυσης με χρήση της μεθόδου CZE.

Έτσι, σαν βέλτιστη μέθοδος για τον προσδιορισμό της ριβαστιγμίνης και του I.S., αποδείχθηκε να είναι η CZE, στην οποία ο τριχοειδής σωλήνας γεμίζεται μόνο με ρυθμιστικό διάλυμα. Σαν βέλτιστο BGE, όσον αφορά το σχήμα των κορυφών, τους χρόνους ανάλυσης και το λόγο S/N, βρέθηκε να είναι το οξικό αμμώνιο. Η επίδραση της I.I. και του pH του ρυθμιστικού διαλύματος περιγράφονται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 4.2.4.

4.2.2. Μονοπάτι αποικοδόμησης της ριβαστιγμίνης

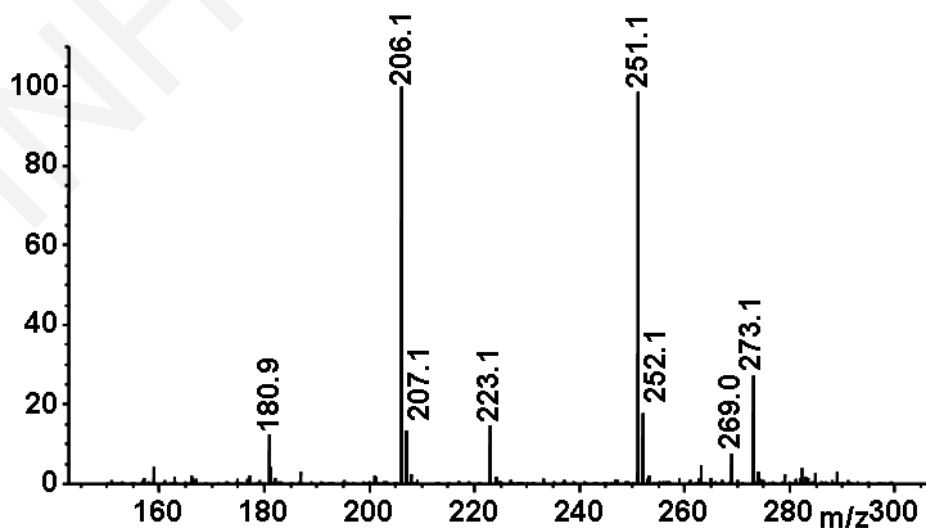
Με χρήση υψηλής ακρίβειας φασματόμετρο μάζας και πειράματα MSⁿ, προσδιορίστηκε ότι το πρωτονιωμένο μόριο της ριβαστιγμίνης, [M+H]⁺ με λόγο m/z 251, αποικοδομείται σε θετικό-ESI, όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.2.11.^[125] Το μεγαλύτερο σε αφθονία ιόν της ριβαστιγμίνης λαμβάνεται σε λόγο m/z 206 σαν αποτέλεσμα της απώλειας μίας διμεθυλαμίνης (διαδρομή α, 45 Da). Το ιόν αυτό στη συνέχεια αποικοδομείται διαδοχικά σε έναν αριθμό άλλων ιόντων. Η απώλεια ενός CO (διαδρομή β, 28 Da) δίνει το ιόν με m/z 178, πιθανώς συνοδευόμενο από μία αναδιάταξη λόγω μετατόπισης της αμινικής ομάδας στο φαινολικό οξυγόνο. Η απώλεια μίας αιθυλο-μεθυλαμίνης (διαδρομή γ, 57 Da) οδηγεί στο ιόν με m/z 149, το οποίο, όπως φάνηκε από πειράματα MS³, στη συνέχεια χάνει ένα CO (διαδρομή ε) και δίνει το ιόν με m/z 121. Ακόμα, μέσω της διαδρομής δ (120 Da) από το ιόν με m/z 206 σχηματίζεται το N-αιθυλο-N-μεθυλοφορμαμίδιο (m/z 86).

Σχήμα 4.2.10. Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν για μείγμα ριβαστιγμίνης και νεοστιγμίνης με χρήση της μεθόδου OT-CEC με ανιχνευτή **MS (α)** στη SCAN-mode, **(β)** στη SIM-mode για m/z 223, **(γ)** στη SIM-mode για m/z 251 με χρήση BGE οξικό αμμώνιο 10 mM σε pH 7.5. Επικάλυψη της στήλης με ένα στρώμα PDADMAC (0.5% w/v) και ένα στρώμα poly-SUL (0.5% w/v).



Σχήμα 4.2.11. Προτεινόμενο μονοπάτι αποικοδόμησης του πρωτονιωμένου μορίου της ριβαστιγμίνης.^[125]

Στο Σχήμα 4.2.12. φαίνεται το φάσμα ιόντων πρώτης τάξης που λήφθηκε για τη ριβαστιγμίνη. Τα μεγαλύτερα σε αφθονία ιόντα που λαμβάνονται είναι για λόγο m/z 251 και 206, τα οποία οφείλονται στο πρωτονιωμένο μόριο $[M+H]^+$ της ριβαστιγμίνης και στο μόριο που λαμβάνεται από την απώλεια μίας διμεθυλαμίνης, αντίστοιχα.



Σχήμα 4.2.12. Φάσμα ιόντων του πρωτονιωμένου ιόντος της ριβαστιγμίνης.

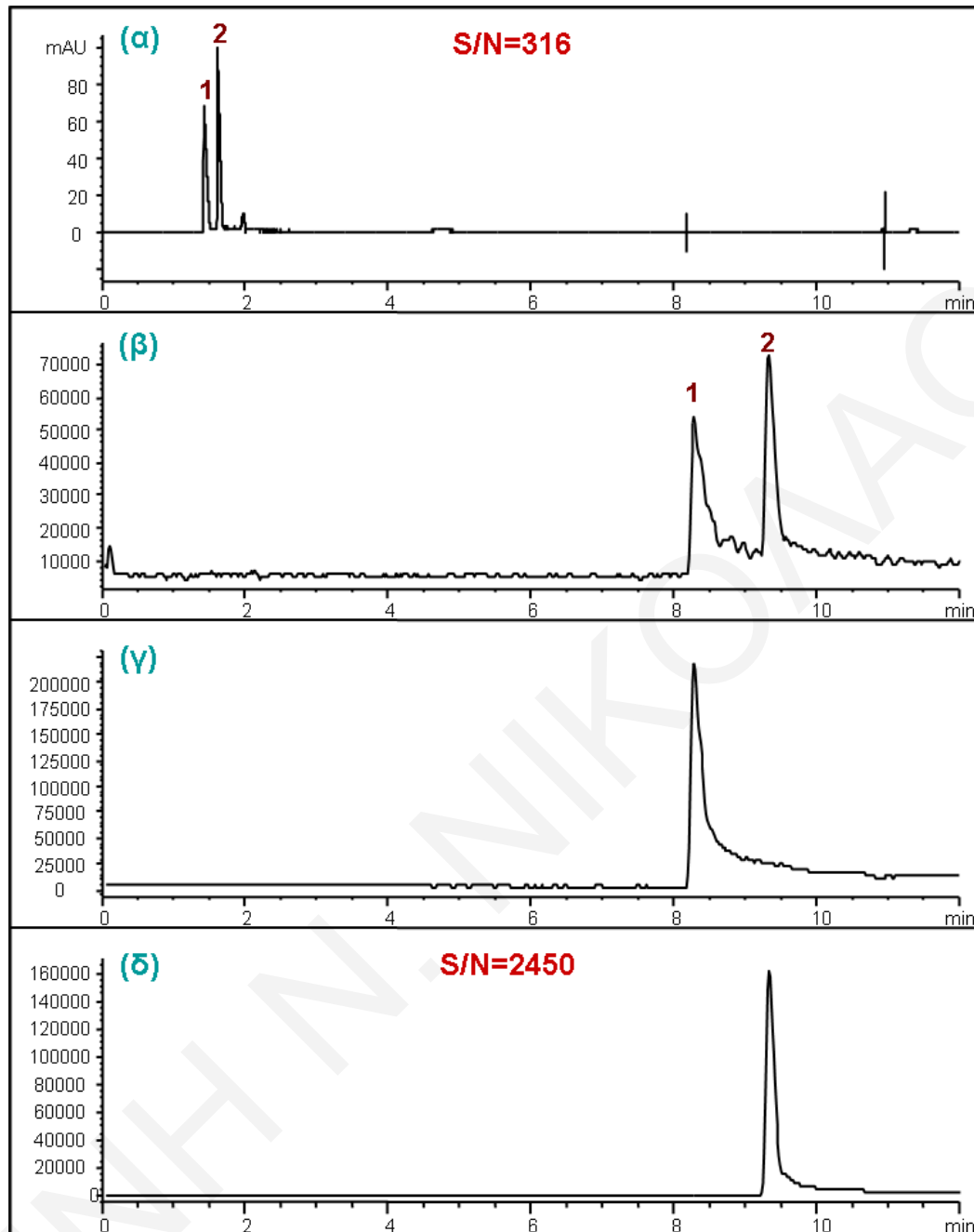
4.2.3. Σύγκριση CZE-UV με CZE-ESI-MS

Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, η μέθοδος MEKC δεν είναι κατάλληλη για σύζευξη με το MS λόγω της παρουσίας μη πτητικών τασιενεργών. Με τη χρήση του ανιχνευτή MS, δεν είναι απαραίτητη η επίτευξη διαχωρισμού των συστατικών για να γίνει ταυτοποίηση των κορυφών. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι όλα τα συστατικά μπορούν εύκολα να ανιχνευτούν λόγω της υψηλής εκλεκτικότητας και ευαισθησίας του MS, όπου μπορούν να διακριθούν ακόμα και συστατικά που εκκλύονται στον ίδιο χρόνο, αρκεί αυτά να διαφέρουν ως προς το μοριακό τους βάρος.^[2,4,100,120] Έτσι, για τον προσδιορισμό της ριβαστιγμίνης με τη μέθοδο CE-MS, έγινε χρήση της πιο απλής μεθόδου CE, της CZE. Το γεγονός ότι δεν απαιτείται επίτευξη πλήρη διαχωρισμού της κορυφής της ριβαστιγμίνης με την κορυφή του I.S., μας επιτρέπει να επικεντρωθούμε κατά την ανάπτυξη της μεθόδου, στην εύρεση των συνθηκών εκείνων που οδηγούν στα βέλτιστα LODs.

Στην CZE-ESI-MS ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το οξικό αμμώνιο ως BGE, το οποίο, όπως αποδείχθηκε, δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα, όσον αφορά το σχήμα των κορυφών, καθώς επίσης και τον υψηλότερο λόγο S/N. Το συγκεκριμένο BGE χρησιμοποιήθηκε αρχικά για να συγκριθεί η απόδοση των δύο ανιχνευτών στην CE, και συγκεκριμένα του ανιχνευτή UV και του ανιχνευτή ESI-MS. Καθώς στο σύστημα CE υπάρχει ενσωματωμένος ανιχνευτής UV, ταυτόχρονα με την ανάλυση στο MS γινόταν ανίχνευση και στο UV στα 214 nm. Η ταυτόχρονη ανίχνευση με UV και με MS στο σύστημα CE παρέχει πολλές συμπληρωματικές πληροφορίες που μπορεί να είναι ευεργετικές σε πολλές κλινικές μελέτες. Υπάρχουν περιπτώσεις στις οποίες ένας κύριος μεταβολίτης ή ένα προϊόν αποικοδόμησης έχει πολύ παρόμοια δομή με την υπό μελέτη ένωση και ο διαχωρισμός τους είναι πολύ δύσκολος με ανιχνευτή UV. Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις στις οποίες κάποιες ακαθαρσίες έχουν την ίδια μάζα με την ένωση και έτσι δεν μπορούν να προσδιοριστούν με ανιχνευτή MS. Έτσι, η ταυτόχρονη ανάλυση και με τους δύο ανιχνευτές μπορεί είναι πολύ χρήσιμη. Το παράθυρο για την ανίχνευση στο UV δημιουργήθηκε στη μικρότερη δυνατή απόσταση από την αρχή της στήλης, στα 21.6 cm, έτσι ώστε να μειωθεί στο ελάχιστο. Το συνολικό μήκος της στήλης μέχρι τον ανιχνευτή MS ήταν 110 cm. Στο Σχήμα 4.2.13 συγκρίνονται τα ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν με τον ανιχνευτή UV (Σχήμα 4.2.13(α)) και τον ανιχνευτή ESI-MS στη Scan-mode (Σχήμα 4.2.13(β)) και στη SIM-mode για λόγο m/z 223 που αντιστοιχεί στο πρωτονιωμένο μοριακό ιόν της νεοστιγμίνης (Σχήμα 4.2.13(γ)) και για λόγο m/z 251 που αντιστοιχεί στο πρωτονιωμένο μοριακό ιόν της ριβαστιγμίνης (Σχήμα 4.2.13(δ)).

Με χρήση της μεθόδου CZE-UV, ο χρόνος ανάλυσης ήταν μικρότερος από 2 min λόγω του μικρότερου αποτελεσματικού μήκους της στήλης σε σχέση με τον ανιχνευτή ESI-MS. Στην τελευταία περίπτωση, ο χρόνος της ανάλυσης αυξήθηκε στα 10 min. Παρά τον πολύ μικρό χρόνο ανάλυσης στην περίπτωση της ανάλυσης με CE-UV, ο διαχωρισμός των δύο κορυφών ήταν πλήρης. Αυτό οφείλεται στο ότι, όταν η ανίχνευση γίνεται πάνω στη στήλη, τα φαινόμενα διεύρυνσης των κορυφών μειώνονται και η διαχωριστική ικανότητα γίνεται καλύτερη. Η διαχωριστική ικανότητα στην περίπτωση της CE-MS ανάλυσης στη Scan-mode ήταν μειωμένη σε σχέση με την ανάλυση με CE-UV, λόγω της εφαρμογής επιπρόσθετης πίεσης για την ανάλυση στο MS.^[126] Αυτό δεν αποτελεί όμως πρόβλημα για τον προσδιορισμό των ενώσεων με τον ανιχνευτή MS αφού, όπως έχει αναφερθεί, όλες οι ουσίες μπορούν εύκολα να προσδιοριστούν στο MS με σάρωση του πρωτονιωμένου μοριακού ιόντος στη SIM-mode. Ωστόσο, ο λόγος S/N για τη ριβαστιγμίνη ήταν περίπου οκτώ φορές μεγαλύτερος με την ανάλυση με CZE-ESI-MS στη SIM-mode (S/N=2450) σε σχέση με την ανάλυση με CZE-UV (S/N=316). Η ανάλυση με ανιχνευτή UV μειονεκτεί λόγω παρεμβολών από τη μήτρα του δείγματος, ενώ τέτοιες παρεμποδίσεις έχουν πολύ λιγότερη επίδραση στο ESI-MS λόγω της υψηλής εκλεκτικότητας που παρέχεται στη SIM-mode. Η παρουσία τέτοιων παρεμβολών είναι ακόμα πιο έντονη κατά την ανάλυση βιολογικών δειγμάτων, όπως είναι το πλάσμα. Να σημειωθεί επίσης ότι η ευαισθησία που λήφθηκε στη SIM-mode ήταν πολύ μεγαλύτερη από την ευαισθησία που παρατηρήθηκε με σάρωση όλων των μαζών, αφού στη SCAN-mode λήφθηκε λόγος S/N μόλις 35.

Με στόχο την εύρεση του μέγιστου λόγου S/N, το οποίο οδηγεί σε χαμηλότερες τιμές LOD, αλλά και την επίτευξη σταθερών συνθηκών και κατά συνέπεια καλών ποσοτικών αποτελεσμάτων, μεταβλήθηκαν στην ανάλυση με CZE-ESI-MS διάφοροι παράγοντες σε τρία βήματα. Αρχικά, μελετήθηκαν παράγοντες που σχετίζονται με το BGE, όπως η ιοντική ισχύς (I.I.), το pH και η προσθήκη MeOH στο BGE. Στη συνέχεια, μελετήθηκαν παράγοντες που σχετίζονται με το sheath liquid, όπως η σύσταση, το ποσοστό της MeOH και ο ρυθμός ροής του sheath liquid και τέλος, παράγοντες του θαλάμου ψεκασμού, όπως η ροή και η θερμοκρασία του αερίου ξήρανσης καθώς και η πίεση για τη δημιουργία του ψεκασμού.



Σχήμα 4.2.13. Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν για το μείγμα της ριβαστιγμίνης (2) με το I.S. (1) **(α)** με ανιχνευτή UV, **(β)** με ανιχνευτή MS (SCAN-mode), **(γ)** SIM-mode για m/z 223 και **(δ)** για m/z 251. Συνθήκες: BGE 40 mM οξικό αμμώνιο (pH 9), έγχυση με πίεση 35 mbar για 5 sec, εφαρμοσμένη τάση 25 kV, στήλη από τηγμένη πυριτία 110 cm, (μήκος μέχρι τον ανιχνευτή UV 21.6 cm) x 50 μm id, θερμοκρασία της στήλης 25 °C, sheath liquid 1 % οξικό αμμώνιο σε H₂O:MeOH (50:50 v/v) με ρυθμό ροής 10 μL/min, συγκέντρωση ριβαστιγμίνης και I.S. 0.3 mg/mL, αέριο ξήρανσης: 6 L/min, T= 200 °C, πίεση αέριου ψεκασμού 20 psi.

Στη βιβλιογραφία, υπάρχουν μελέτες που διερευνούν κι άλλους παράγοντες, όπως είναι η θέση της στήλης μέσα στο σύστημα σύζευξης.^[87,101,119,121] Η τριχοειδής στήλη πρέπει να προεξέχει από τη βελόνα ψεκασμού έτσι ώστε να επιτρέπεται ανάμειξη του sheath liquid με το BGE, αλλά και για να κλείνει το ηλεκτρικό κύκλωμα.^[101] Εντούτοις, αν η απόσταση

αυτή είναι πολύ μεγάλη, δεν πραγματοποιείται επαρκής ανάμειξη και παρατηρείται ασταθής ψεκασμός και χαμηλή απόκριση. Ωστόσο, καθώς ο παράγοντας αυτός εξαρτάται αποκλειστικά από το εμπορικά διαθέσιμο σύστημα CE-MS που χρησιμοποιείται, η επίδραση του δε διερευνήθηκε. Σε όλες τις περιπτώσεις όμως η στήλη τοποθετήθηκε στο σύστημα σύζευξης ώστε να προεξέχει 0.1 mm, σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας.

4.2.4. Βελτιστοποίηση παραμέτρων του BGE

Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται ρυθμίζει κατάλληλα την τιμή του pH του διαλύματος για να ευνοήσει το σχηματισμό των ιόντων, εξασφαλίζει το σχηματισμό των επιθυμητών ιόντων προσθήκης, παρεμποδίζει το σχηματισμό των ανεπιθύμητων ιόντων προσθήκης και βοηθά στη βελτιστοποίηση του ηλεκτροφορητικού διαχωρισμού. Η χρήση πτητικών και χαμηλής ιοντικής ισχύος BGEs είναι βασική όχι μόνο για τη δημιουργία γρήγορης EOF, αλλά επίσης για να παρέχει υψηλή ευαισθησία και σταθερότητα για το MS.^[4] Σε όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε σαν sheath liquid οξικό οξύ 1% σε διαλύτη H₂O:MeOH 50:50, ο ρυθμός ροής του αερίου ξήρανσης ήταν 10 L/min σε θερμοκρασία 200 °C και η πίεση του αερίου ψεκασμού ορίστηκε στα 20 psi.

4.2.4.1. Επίδραση της I.I. του BGE

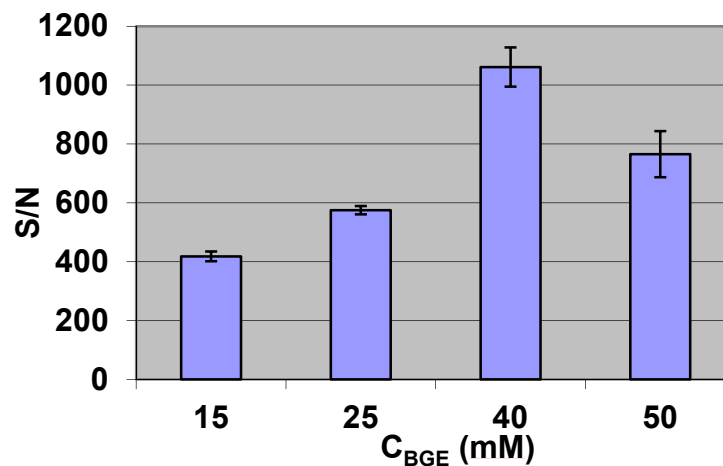
Όπως έχει αναφερθεί, σαν BGE χρησιμοποιήθηκε διάλυμα οξικού αμμωνίου. Έχει βρεθεί ότι BGEs βασισμένα σε οξικά συμβάλλουν στην επίτευξη υψηλής εκλεκτικότητας λόγω της ικανότητας τους να σχηματίζουν ζεύγη ιόντων και να δίνουν επαναλήψιμα αποτελέσματα όσον αφορά τους χρόνους ανάλυσης.^[87,100] Επιπλέον, το συγκεκριμένο άλας δημιουργεί πολύ χαμηλό ηλεκτρικό ρεύμα λόγω της χαμηλής αγωγιμότητας του και συνιστάται για την ανάλυση με CE-MS, αφού το ρεύμα στο σύστημα CE πρέπει να διατηρείται όσο το δυνατό σε χαμηλά επίπεδα ώστε να λαμβάνεται καλύτερη σταθερότητα.^[119] Η επίδραση της I.I. του BGE διερευνήθηκε μεταβάλλοντας τη συγκέντρωση του οξικού αμμωνίου από 15 έως 50 mM, σε pH 9.0 (Σχήμα 4.2.14). Όπως παρατηρήθηκε, η αύξηση της συγκέντρωσης είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση των χρόνων κατακράτησης λόγω της μείωσης της ταχύτητας της EOF. Καθώς η διπλοστιβάδα αποτελείται από τη συμπαγή στιβάδα, ή αλλιώς στιβάδα Stern, και τη στιβάδα διάχυσης, η αύξηση της I.I. οδηγεί σε αύξηση του πάχους της συμπαγούς στιβάδας και σε μείωση του πάχους της στιβάδας διάχυσης. Καθώς το ζ-δυναμικό καθορίζεται κυρίως από το πάχος της στιβάδας διάχυσης, η αύξηση της I.I. μειώνει το ζ-δυναμικό, το οποίο με τη

σειρά οδηγεί στη μείωση της ταχύτητας της EOF.^[127] Ακόμα, η αύξηση των χρόνων κατακράτησης με την αύξηση της I.I. του BGE οφείλεται στην αύξηση του ιξώδους της κινητής φάσης, που οδηγεί επίσης σε μείωση της ταχύτητας της EOF.^[128] Επίσης, παρατηρήθηκε ότι η σειρά έκλουσης των δύο αναλυτών ήταν η ίδια στις διάφορες συγκεντρώσεις οξικού αμμωνίου, γεγονός που υποδηλώνει ότι η εκλεκτικότητα του διαχωρισμού δεν επηρεάζεται σημαντικά από την αύξηση της συγκέντρωσης.^[129] Ωστόσο, ο λόγος S/N αυξήθηκε με αύξηση της συγκέντρωσης από τα 15 στα 40 mM, ενώ μειώνεται με περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης στα 50 mM (Σχήμα 4.2.15). Αυτό πιθανόν να οφείλεται στη δημιουργία θερμότητας Joule στις υψηλότερες συγκεντρώσεις BGE, η οποία συνεισφέρει σε υψηλότερες τιμές θορύβου. Έτσι, ο χαμηλότερος λόγος S/N παρατηρήθηκε στα 50 mM.^[127] Επίσης, όπως φαίνεται στον Πίνακα 4.2.1, η I.I. του BGE επηρεάζει την αποδοτικότητα των κορυφών. Συγκεκριμένα, με αύξηση της I.I. παρατηρήθηκε αύξηση της διαχωριστικής ικανότητας σαν συνέπεια της αύξησης της αποδοτικότητας. Έτσι, τα 40 mM επιλέχθηκαν σαν η βέλτιστη συγκέντρωση του BGE όπου συνδυάζεται υψηλή ευαισθησία και ικανοποιητικοί χρόνοι ανάλυσης.

Πίνακας 4.2.1. Τιμές για τη διαχωριστική ικανότητα και την αποδοτικότητα των κορυφών της νεοστιγμίνης και της ριβαστιγμίνης στις διάφορες συγκεντρώσεις BGE.

C_{BGE} (mM)	R_s	$N_{\text{Νεοστιγμίνης}}$	$N_{\text{Ριβαστιγμίνης}}$
50	5.73	52161	72263
40	4.37	54103	69857
25	3.33	36941	52341
15	2.78	55177	37996

Σχήμα 4.2.14. Ηλεκτροφερογράμματα όπου φαίνεται η επίδραση της συγκέντρωσης του οξικού αμμωνιού στο BGE στο διαχωρισμό του I.S (1) και της ριβαστιγμίνης (2). Υπόλοιπες συνθήκες: ίδιες με Σχήμα 4.2.13.



Σχήμα 4.2.15. Επίδραση της I.I. του BGE στο λόγο S/N για τη ριβαστιγμίνη.

4.2.4.2. Επίδραση του pH του BGE

Το pH αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες για βελτίωση της εκλεκτικότητας και της ευαισθησίας στην CE. Μικρές αλλαγές στο pH μπορεί να οδηγήσουν σε σημαντικές αλλαγές στην εκλεκτικότητα του διαχωρισμού και στη μετανάστευση των αναλυτών, και κατά συνέπεια στο διαχωρισμό. Χρησιμοποιώντας σαν BGE οξικό αμμώνιο 40 mM, δοκιμάστηκαν τιμές pH 6, 7, 8 και 9. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.2.16, η νεοστιγμίνη (I.S.) εκλούεται πρώτη σε όλο το εύρος pH που εξετάστηκε, λόγω του ότι η βασικότητα της ($pK_a=12.0$) είναι υψηλότερη από αυτήν της ριβαστιγμίνης ($pK_a=8.6$). Σε όλες τις τιμές pH που δοκιμάστηκαν, η νεοστιγμίνη είναι στην κατιοντική μορφή, με αποτέλεσμα η αποτελεσματική ηλεκτροφορητική της ευκινησία να παραμένει η ίδια και κατά συνέπεια ο χρόνος μετανάστευσης της να μην επηρεάζεται σημαντικά από την αλλαγή του pH.^[127] Για pH 6-8, οι χρόνοι ανάλυσης και για τις δύο ενώσεις είναι παρόμοιοι, ενώ σε pH 9, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση του χρόνου μετανάστευσης της ριβαστιγμίνης. Στο pH αυτό, η ριβαστιγμίνη αρχίζει να εμφανίζει αρνητικό φορτίο με αποτέλεσμα να μειώνεται η ηλεκτροφορητική της ευκινησία προς την κάθοδο.^[128] Αν και με την αύξηση του pH αυξάνει η ταχύτητα της EOF, η αύξηση αυτή ήταν λιγότερο σημαντική από τον ιονισμό των μορίων. Επιπλέον, η αύξηση του pH του BGE προκαλεί αύξηση της I.I. λόγω προσθήκης μεγαλύτερης ποσότητας αμμωνίας για τη ρύθμιση του pH. Αυτό με τη σειρά του προκαλεί μείωση της ταχύτητας της EOF και αύξηση του χρόνου ανάλυσης.^[127] Ακόμα, όπως φαίνεται στον Πίνακα 4.2.2 με αύξηση του pH του BGE παρατηρήθηκε αύξηση της αποδοτικότητας των κορυφών τόσο της ριβαστιγμίνης όσο και του I.S. Η αύξηση των χρόνων μετανάστευσης και της αποδοτικότητας των

κορυφών οδήγησαν στην αύξηση της διαχωριστικής ικανότητας από 0.99 στο pH 6 σε 2.87 στο pH 9.

Σχήμα 4.2.16. Ηλεκτροφερογράμματα όπου φαίνεται η επίδραση του pH στο διαχωρισμό του I.S (1) και της ριβαστιγμίνης (2). Υπόλοιπες συνθήκες: ίδιες με Σχήμα 4.2.13.

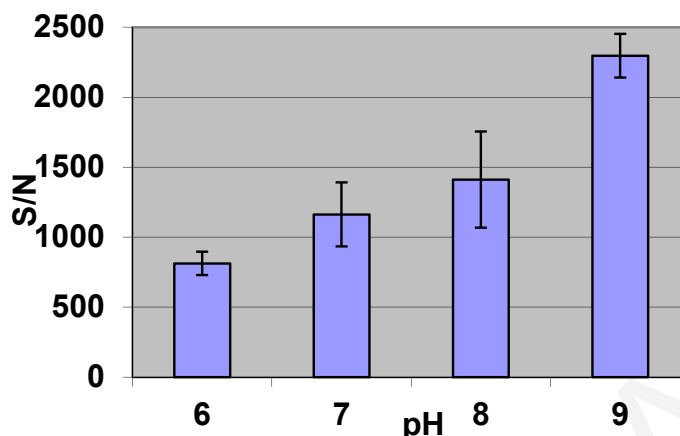
Πίνακας 4.2.2. Αποδοτικότητα κορυφών της ριβαστιγμίνης και του I.S. στις διάφορες τιμές pH.

	$N_{\text{Νεοστιγμίνη}}$	$N_{\text{ριβαστιγμίνη}}$
pH 6	14045	3948
pH 7	15464	7066
pH 8	14048	7653
pH 9	16215	20510

Καθώς ο ιονισμός στο ESI γίνεται μέσω πρωτονίωσης των αναλυτών, αναμένεται ότι οι τιμές pKa των αναλυτών θα παίζουν σημαντικό ρόλο στην απόκριση στο ESI. Εντούτοις, αυτό δεν ισχύει σε όλες τις περιπτώσεις.^[83] Συγκεκριμένα, για να έρθει ο αναλύτης στην πρωτονιωμένη μορφή στο ESI, πρέπει να είναι στη βασική μορφή στο διάλυμα ή στην αέρια φάση, ενώ η ανάλυση στο ESI για βασικούς αναλύτες γενικά δουλεύει καλύτερα σε χαμηλές τιμές pH. Εντούτοις, είναι γνωστό ότι πρωτονιωμένα ιόντα βασικών αναλυτών μπορούν να παρατηρηθούν όταν η ανάλυση στο ESI-MS πραγματοποιείται με βασικά διαλύματα, όπου το pH είναι υψηλότερο από την τιμή pKa του αναλύτη. Σε πολλές περιπτώσεις ανιχνεύονται πρωτονιωμένα ιόντα σε υψηλές τιμές pH. Στην περίπτωση του positive ion ESI σε πρωτικούς διαλύτες, η περίσσεια φορτίου είναι σε μορφή πρωτονίων και η συγκέντρωσή τους εξαρτάται όχι από το pH του διαλύματος αλλά από τη ροή και την εφαρμοζόμενη τάση. Τα πρωτόνια αυτά πρέπει να παραμείνουν είτε στον αναλύτη είτε στο διαλύτη. Εφόσον ο αναλύτης βρίσκεται στην επιφάνεια του σταγονιδίου και έχει τιμή pKa πιο χαμηλή από αυτήν του διαλύτη, θα πρωτονιωθεί ακόμα και αν το pKa του είναι κάτω από το pH του διαλύματος.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.2.17, το pH επηρεάζει επίσης σημαντικά την ευαισθησία στο MS αφού με αύξηση του pH, ιδιαίτερα από 8 σε 9, έχουμε υψηλότερες τιμές S/N λόγω χαμηλότερου θορύβου στα υψηλότερα pH, παρόλο που το ύψος της κορυφής δεν επηρεάζεται σημαντικά από την αύξηση του pH. Είναι πιθανόν για τιμές pH χαμηλότερες από 8, δηλαδή κάτω από την τιμή pKa της ριβαστιγμίνης, να παρατηρούνται υψηλότερα επίπεδα θορύβου καθώς τα πρωτόνια που δεν παραχωρούνται στον αναλύτη παραχωρούνται στο διαλύτη, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό πρωτονιωμένων μορίων διαλύτη ή συμπλέγματα. Ακόμα, η μεγαλύτερη ταχύτητα της EOF στις υψηλότερες τιμές μπορεί να βελτιώσει τη σταθερότητα του ψεκασμού λόγω του ότι ένα μεγαλύτερο ποσοστό ρυθμιστικού διαλύματος εξέρχεται από το άκρο της βελόνας

ψεκασμού.^[87] Έτσι, σαν βέλτιστο pH επιλέχθηκε η τιμή 9, στην οποία λήφθηκαν οι υψηλότερες τιμές S/N, χωρίς να παρατηρηθεί σημαντική αύξηση του χρόνου ανάλυσης.



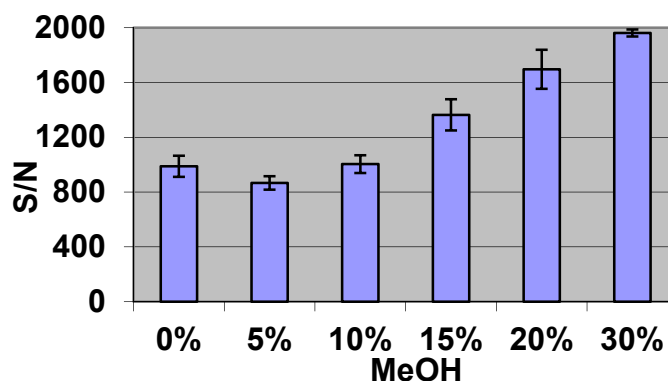
Σχήμα 4.2.17. Επίδραση του pH του BGE στο λόγο S/N για τη ριβαστιγμίνη.

4.2.4.3. Επίδραση της MeOH στο BGE

Η επόμενη παράμετρος που εξετάστηκε ήταν η προσθήκη MeOH μέσα σε BGE αποτελούμενο από οξικό αμμώνιο 40 mM σε pH 9, σε ποσοστά 5, 10, 15, 20 και 30 %. Στο ESI-MS, η χρήση οργανικών διαλυτών σαν πρόσθετα στο BGE μπορεί να επιταχύνει τη διαδικασία σχηματισμού ιόντων στην αέρια φάση μειώνοντας την επιφανειακή τάση και κατά συνέπεια την πτητικότητα του BGE.^[87] Όπως παρατηρήθηκε, με αύξηση του ποσοστού της MeOH από 0% σε 30% προκαλείται διπλασιασμός στο χρόνο ανάλυσης, από τα 10 στα 20 min (Σχήμα 4.2.18). Αυτό οφείλεται σε αύξηση του ιξώδους του ρυθμιστικού διαλύματος που προκαλεί μείωση στην ταχύτητα της EOF και κατά συνέπεια μεγαλύτερους χρόνους ανάλυσης.^[130] Για ποσοστά MeOH από 0 μέχρι 10%, ο λόγος S/N ήταν περίπου σταθερός, ενώ με αύξηση της MeOH στο BGE σε ποσοστά μεγαλύτερα από 15%, παρατηρήθηκε αύξηση στο λόγο S/N (Σχήμα 4.2.19). Αυτό οφείλεται στη μείωση του θορύβου στα υψηλότερα ποσοστά MeOH, ενώ το ύψος της κορυφής δε μεταβλήθηκε σημαντικά. Επιπλέον, η χρήση οργανικών διαλυτών συχνά οδήγησε σε μείωση της επαναληψιμότητας της μεθόδου, όσον αφορά τους χρόνους ανάλυσης και τα εμβαδά των κορυφών, αφού προκαλείται αλλαγή στη σύσταση της κινητής φάσης λόγω της αυξημένης πτητικότητας των οργανικών διαλυτών.^[87] Όπως παρατηρήθηκε, οι τιμές που λήφθηκαν για τη RSD για τους χρόνους ανάλυσης και τα εμβαδά απουσία MeOH στο BGE ήταν 0.10 και 5.35, αντίστοιχα, ενώ παρουσία 30% MeOH, οι τιμές για τη RSD αυξήθηκαν στο 5.35% και 16.91%, αντίστοιχα. Όπως παρατηρήθηκε, η προσθήκη MeOH μέσα στο BGE μειώνει σημαντικά την επαναληψιμότητα της μεθόδου. Έτσι, δεν έγινε προσθήκη MeOH μέσα στο BGE, αφού αυτό θα οδηγούσε σε εκτεταμένους χρόνους ανάλυσης και μείωση

της επαναληψιμότητας. Επιπλέον, όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία, αν και η χρήση μη υδατικών συστημάτων μπορεί να παρέχει κάποια πλεονεκτήματα, εντούτοις, ένα απλό υδατικό σύστημα μπορεί να είναι πιο κατάλληλο για την ανάλυση βιολογικών δειγμάτων, καθώς η εκλεκτικότητα ευνοείται περισσότερο.^[126]

Σχήμα 4.2.18. Ηλεκτροφερογράμματα όπου φαίνεται η επίδραση του ποσοστού της MeOH στο BGE στο διαχωρισμό του I.S (1) και της ριβαστιγμίνης (2). Υπόλοιπες συνθήκες: ίδιες με Σχήμα 4.2.13.



Σχήμα 4.2.19. Επίδραση του ποσοστού της MeOH στο BGE στο λόγο S/N για τη ριβαστιγμίνη.

4.2.4. Βελτιστοποίηση παραμέτρων του sheath liquid

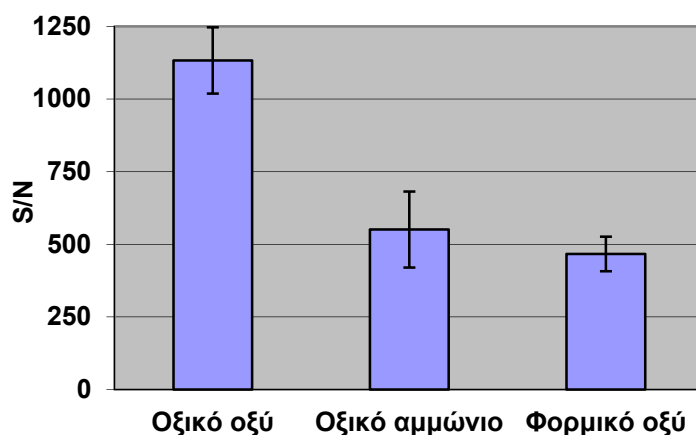
Στη σύζευξη του συστήματος CE με τον ανιχνευτή ESI-MS είναι απαραίτητη η χρήση ενός υγρού, γνωστό σαν sheath liquid, έτσι ώστε να λυθεί το πρόβλημα ασυμβατότητας της ροής που έρχεται από το CE με αυτή που απαιτείται για τη λειτουργία του MS. Ακόμα, χρησιμοποιείται για να εξασφαλιστεί η ηλεκτρική επαφή στην κάθοδο της στήλης του CE και για να δημιουργηθούν οι κατάλληλες συνθήκες διαλυτών για τον ηλεκτροψεκασμό, ανεξάρτητα από τη σύσταση του BGE της CE.^[69,81] Το sheath liquid καθορίζει το τελικό pH και τη σύσταση του διαλύματος που φτάνει στο ESI-MS και επηρεάζει τη μεταφορά του αναλύτη από την υγρή στην αέρια φάση. Για το λόγο αυτό αποτελεί έναν πολύ σημαντικό παράγοντα για τη σύζευξη CE-MS και για τη λήψη υψηλής ευαισθησίας.^[131] Επιπλέον, πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή ώστε να μη χαθεί η αποδοτικότητα και η διαχωριστική ικανότητα του συστήματος CE λόγω διεύρυνσης των κορυφών κατά τη σύζευξη. Από τα πιο πάνω γίνεται σαφές ότι το sheath liquid αποτελεί έναν ακόμα παράγοντα που πρέπει να βελτιστοποιηθεί κατά την ανάπτυξη της μεθόδου, αφού επηρεάζει τη σταθερότητα και την ευαισθησία του διαχωρισμού.^[121] Έτσι, διερευνήθηκε η σύσταση του sheath liquid, το ποσοστό του οργανικού διαλύτη σε αυτό και ο ρυθμός ροής του, διατηρώντας κάθε φορά τις υπόλοιπες συνθήκες σταθερές. Σε όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε σαν BGE οξικό αμμώνιο 40 mM σε pH 9, ο ρυθμός ροής του αερίου ξήρανσης ήταν 10 L/min σε θερμοκρασίας 200 °C και η πίεση του αερίου ψεκασμού ορίστηκε στα 20 psi.

Το σημείο ανάμειξης του sheath liquid με το BGE είναι πολύ σημαντικό για την επίτευξη υψηλής ευαισθησίας και για το λόγο αυτό σε όλες τις περιπτώσεις η τριχοειδής στήλη ήταν τοποθετημένη μέσα στο σύστημα σύζευξης έτσι ώστε να προεξέχει μόλις 0.1 mm.

4.2.4.1. Σύσταση του sheath liquid

Για να κλείσει το ηλεκτρικό κύκλωμα, απαιτείται ένα sheath liquid με χαμηλή ειδική αντίσταση. Έτσι, δοκιμάστηκαν τα εξής sheath liquids: οξικό οξύ 1%, φορμικό οξύ 1% και οξικό αμμώνιο 5 mM (σε διαλύτη H₂O:Μεθανόλη 50:50). Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.2.20, σε όλες τις περιπτώσεις οι χρόνοι κατακράτησης ήταν περίπου οι ίδιοι. Σε αντίθεση με τους χρόνους κατακράτησης παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή στην ευαισθησία και με τη χρήση οξικού οξέος λήφθηκε ο μεγαλύτερος λόγος S/N (Σχήμα 4.2.21). Αν και στις τρεις περιπτώσεις η ένταση του σήματος ήταν περίπου η ίδια, εντούτοις ο θόρυβος ήταν σημαντικά μικρότερος στην περίπτωση του οξικού οξέος, και κατά συνέπεια ο λόγος S/N ήταν μεγαλύτερος. Καθώς το οξικό οξύ χαρακτηρίζεται από χαμηλή ειδική αντίσταση, αποτελεί ένα πολύ καλό sheath liquid. Αποδείχθηκε ότι το καταλληλότερο sheath liquid ήταν αυτό που βασίζεται σε οξικά, όπως δηλαδή και το BGE, λόγω αποφυγής παρεμβολών.^[87,101] Το οξικό αμμώνιο, το οποίο χρησιμοποιήθηκε σαν BGE, δεν αποδείχθηκε αποτελεσματικό σαν sheath liquid αφού έδωσε πολύ χαμηλές τιμές S/N. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το οξικό αμμώνιο δεν ήταν ικανό να υποστηρίξει ένα σταθερό ηλεκτροψεκασμό, ενώ η χρήση διαλυμάτων οξέων σαν sheath liquids ευνοεί το σχηματισμό των θετικά φορτισμένων ιόντων, οδηγώντας σε υψηλότερες ευαισθησίες.^[132] Έτσι, σαν sheath liquid επιλέχθηκε διάλυμα οξικού οξέος 1%, αφού με αυτό επιτεύχθηκε η βέλτιστη ευαισθησία και σταθερότητα. ♦

Σχήμα 4.2.20. Ηλεκτροφερογράμματα με χρήση (α) 1% οξικό οξύ, (β) 1% φορμικό οξύ και (γ) 5 mM οξικό αμμώνιο (H₂O:MeOH 50:50) σαν sheath liquid για το διαχωρισμό του I.S (1) και της ριβαστιγμίνης (2). Υπόλοιπες συνθήκες: ίδιες με Σχήμα 4.2.13.

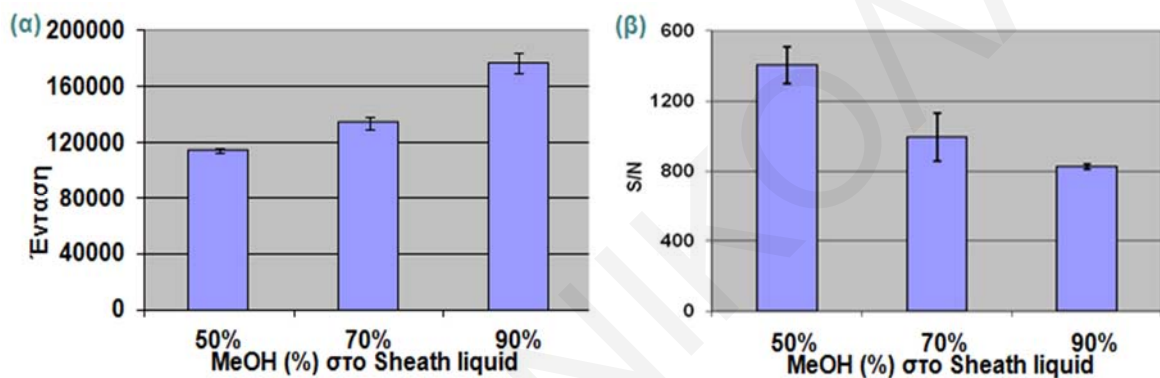


Σχήμα 4.2.21. Επίδραση της σύστασης του sheath liquid στο λόγο S/N για τη ριβαστιγμίνη.

4.2.4.2. Ποσοστό MeOH στο sheath liquid

Στη συνέχεια, με χρήση οξικού οξέος 1% σαν sheath liquid, διερευνήθηκε η επίδραση του ποσοστού της MeOH μέσα σε αυτό, όσον αφορά την ευαισθησία και τη σταθερότητα. Δοκιμάστηκαν ποσοστά MeOH 50, 70 και 90%. Η MeOH, ως πρωτικός διαλύτης, επιτρέπει ευκολότερη πρωτονίωση των αναλυτών βοηθώντας στο σχηματισμό των ιόντων. Αυτό με τη σειρά του μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της έντασης του σήματος.^[122] Σε μελέτες που δοκιμάστηκαν διάφοροι οργανικοί διαλύτες, όπως MeOH, ACN και isoprOH, φάνηκε ότι η MeOH παρέχει υψηλή ευαισθησία, ενώ το ACN, το οποίο δε διαθέτει διαθέσιμα πρωτόνια, δίνει το χαμηλότερο λόγο S/N.^[101,122,133] Όπως παρατηρήθηκε, η ένταση της κορυφής της ριβαστιγμίνης αυξήθηκε κατά το 1/3 με αύξηση του ποσοστού της MeOH από 50% σε 90% (Σχήμα 4.2.22(α)). Μία πιθανή ερμηνεία για αυτό είναι ότι διαλύματα που περιέχουν μεγαλύτερο ποσοστό MeOH, μειώνουν το μέγεθος του σταγονιδίου, το οποίο έχει σαν συνέπεια την αποδοτικότερη απομάκρυνση του διαλύτη.^[128] Σε αντίθεση με την ένταση του σήματος, παρατηρήθηκε μείωση στο λόγο S/N με αύξηση του ποσοστού της MeOH (Σχήμα 4.2.22(β)). Αυτό οφείλεται στα υψηλά επίπεδα θορύβου που προκαλούνται από την πολύ χαμηλή επιφανειακή τάση του υγρού, η οποία οδηγεί τελικά σε ασταθή ηλεκτροψεκασμό.^[128] Όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία, συνήθως παρατηρείται μεγαλύτερη απόκριση στο ESI για υψηλότερα ποσοστά μεθανόλης όπου υπάρχει μικρότερη επιφανειακή τάση, λόγω της πιο αποτελεσματικής απομάκρυνσης του διαλύτη.^[83] Ωστόσο, σε μερικές περιπτώσεις, μεγάλα ποσοστά MeOH μπορεί να μειώσουν την απόκριση λόγω του ότι η επιφανειακή τάση του υγρού μειώνεται κάτω από την ιδανική για να μεγιστοποιηθεί η σταθερότητα του ηλεκτροψεκασμού. Ακόμα, για ποσοστό MeOH 50% παρατηρήθηκαν οι πιο σταθερές συνθήκες όσον αφορά το ρεύμα που δημιουργείται στο σύστημα CE και στο ESI. Δε δοκιμάστηκαν ποσοστά MeOH μικρότερα

από 50%, αφού κάτι τέτοιο θα οδηγούσε σε μη-αποτελεσματική εξάτμιση λόγω της μικρότερης πτητικότητας του νερού από τη MeOH και κατά συνέπεια σε σημαντική μείωση της ευαισθησίας.^[100,101] Ακόμη, αξίζει να αναφερθεί ότι με τη μεταβολή του ποσοστού της μεθανόλης στο sheath liquid δεν παρατηρήθηκε μεταβολή των χρόνων κατακράτησης. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το sheath liquid προκαλεί αλλαγές στη σύσταση μετά την έξοδο του αναλύτη από τη στήλη του συστήματος CE, ενώ οι χρόνοι έκλουσης των κορυφών οφείλονται αποκλειστικά στην ηλεκτροφορητική ευκινησία των αναλυτών. Έτσι, σαν sheath liquid επιλέχθηκε το οξικό οξύ 1% σε διαλύτη H₂O: MeOH 50:50.

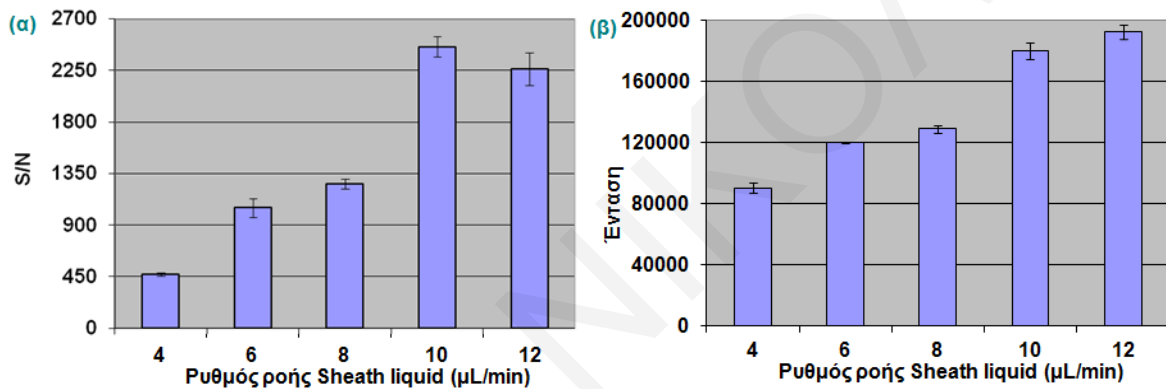


Σχήμα 4.2.22. Επίδραση του ποσοστού της MeOH στο sheath liquid **(α)** στην ένταση του σήματος και **(β)** στο λόγο S/N για τη ριβαστιγμίνη.

4.2.4.3. Ρυθμός ροής του sheath liquid

Ένα πολύ βασικό χαρακτηριστικό του sheath liquid είναι να συμπληρώνει τη ροή στο CZE σε επίπεδα κατάλληλα για τη λειτουργία του ηλεκτροψεκασμού.^[121] Κατά συνέπεια, ο ρυθμός ροής του sheath liquid επηρεάζει τη σταθερότητα του ηλεκτροψεκασμού. Με χρήση του βέλτιστου sheath liquid, διάλυμα οξικού οξέος 1% σε διαλύτη H₂O:MeOH 50:50, δοκιμάστηκε στη συνέχεια η επίδραση του ρυθμού ροής του από 4 μέχρι 12 $\mu\text{L}/\text{min}$. Δε δοκιμάστηκαν ροές χαμηλότερες από 4 $\mu\text{L}/\text{min}$, αφού τέτοιες ροές είναι πολύ χαμηλές για να εξασφαλιστεί η ηλεκτρική επαφή που απαιτείται για το διαχωρισμό στην CE και οδηγούν σε πτώση του ηλεκτρικού ρεύματος.^[128] Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.2.23(α), με αύξηση του ρυθμού ροής παρατηρήθηκε αύξηση στο λόγο S/N με μέγιστο λόγο να λαμβάνεται για ρυθμό ροής 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. Ακόμα, με την αύξηση της ροής του sheath liquid παρατηρήθηκε αύξηση της έντασης της κορυφής της ριβαστιγμίνης, η οποία οδήγησε στην αύξηση του λόγου S/N (Σχήμα 4.2.23(β)). Με περαιτέρω αύξηση της ροής στα 12 $\mu\text{L}/\text{min}$, παρατηρήθηκε μείωση του λόγου S/N λόγω αύξησης στο θόρυβο που

προκαλείται είτε λόγω αραίωσης του δείγματος είτε λόγω μη-ικανοποιητικής απομάκρυνσης του διαλύτη, τα οποία έχουν σαν συνέπεια μη-ικανοποιητικό ηλεκτροψεκασμό.^[129] Ροές χαμηλότερες από 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ οδήγησαν και πάλι σε μικρότερες τιμές S/N, πιθανόν λόγω μη ικανότητας των ροών αυτών να υποστηρίξουν ένα σταθερό ηλεκτροψεκασμό.^[100,127,129] Καθώς το sheath liquid περιέχει κατά 50% οργανικό διαλύτη, χρειάζεται μία αρκετά υψηλή ροή για να αποφευχθεί εκτεταμένη εξάτμιση του sheath liquid μέσα στη στήλη. Να σημειωθεί ακόμη ότι η μεταβολή του ρυθμού ροής του sheath liquid δεν επηρέασε τους χρόνους κατακράτησης των αναλυτών. Έτσι, η βέλτιστη ροή για το sheath liquid βρέθηκε να είναι τα 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, όπου λήφθηκε ο μέγιστος λόγος S/N λόγω συμβιβασμού μεταξύ σταθερότητας του ψεκασμού και αραίωσης του δείγματος.



Σχήμα 4.2.23. Επίδραση του ρυθμού ροής του sheath liquid (α) στο λόγο S/N και (β) στην ένταση του σήματος για τη ριβαστιγμίνη.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι η αποδοτικότητα των κορυφών της ριβαστιγμίνης και της νεοστιγμίνης ήταν πολύ ικανοποιητική. Αυτό αποδεικνύει ότι δεν προκαλείται σοβαρή διεύρυνση των ζωνών λόγω του συστήματος σύζευξης όπου γίνεται χρήση sheath liquid. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι το μειονέκτημα του συγκεκριμένου συστήματος σύζευξης είναι ότι μπορεί να προκαλέσει μείωση της αποδοτικότητας των κορυφών λόγω της μεγάλης ροής του sheath liquid. Ωστόσο, κάτι τέτοιο δεν παρατηρήθηκε στην περίπτωση μας.

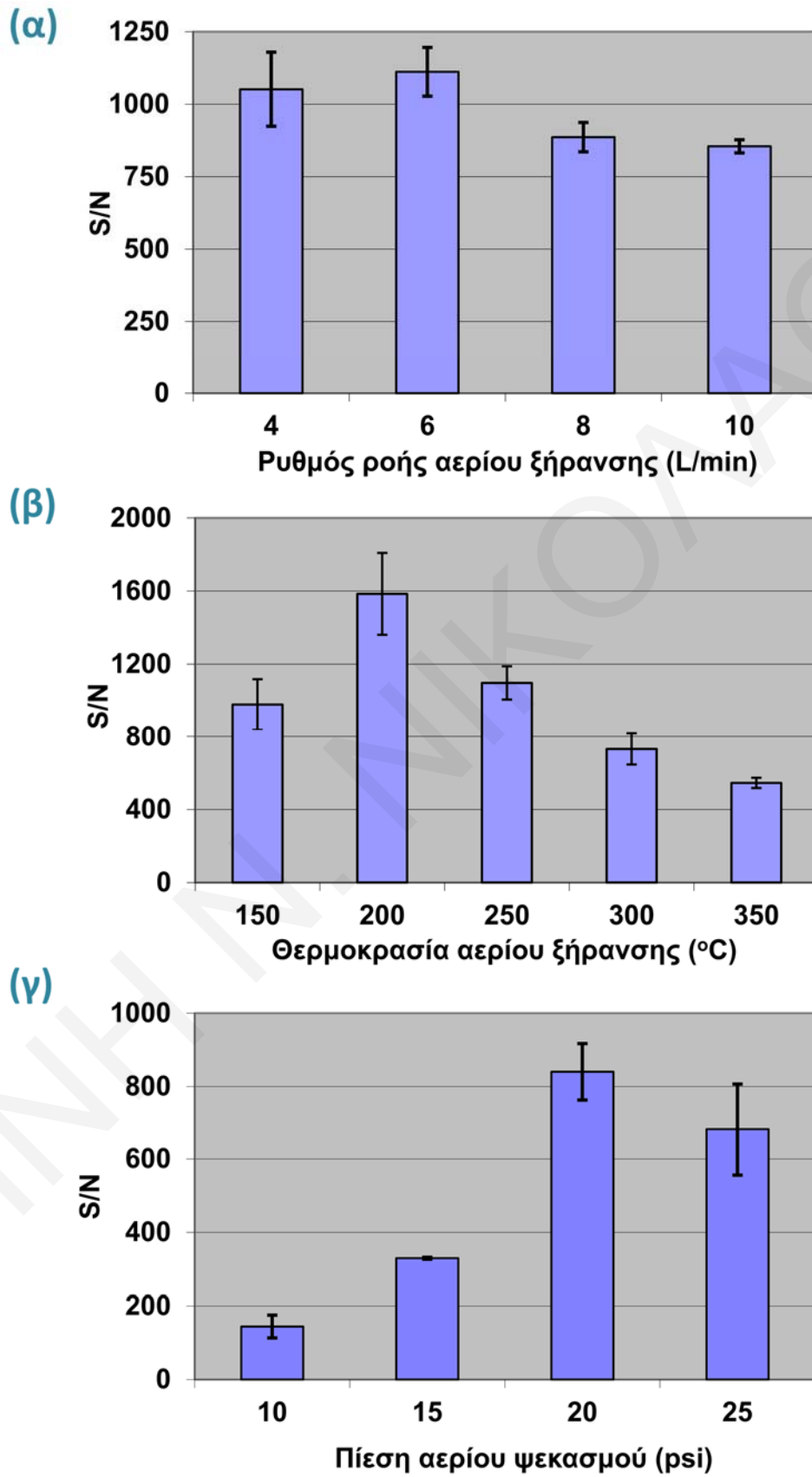
4.2.5. Βελτιστοποίηση παραμέτρων του θαλάμου ψεκασμού

Η τελευταία κατηγορία παραμέτρων που εξετάστηκε αφορούσε το θάλαμο ψεκασμού. Οι παράγοντες αυτοί επηρεάζουν τη δημιουργία του ηλεκτροψεκασμού και συνεισφέρουν στην επίτευξη σταθερών συνθηκών και στην απόκριση του ανιχνευτή MS. Οι παράγοντες που μελετήθηκαν ήταν η ροή και η θερμοκρασία του αερίου ξήρανσης καθώς και η πίεση του αερίου ψεκασμού, διατηρώντας κάθε φορά τις υπόλοιπες συνθήκες σταθερές. Άλλοι

παράγοντες του θαλάμου ψεκασμού, όπως είναι η τάση της τριχοειδούς βελόνας και η τάση θρυμματισμού, δε φάνηκαν να επηρεάζουν την ευαισθησία της μεθόδου και για το λόγο αυτό η βελτιστοποίηση τους δεν αναφέρεται αναλυτικά. Οι τάσεις αυτές διατηρήθηκαν σταθερές στα 4000 V και 110 V, αντίστοιχα. Η βελτιστοποίηση των παραμέτρων αυτών αναφέρεται μόνο σε ελάχιστες περιπτώσεις στη βιβλιογραφία.^[128] Σαν BGE χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις οξικό αμμώνιο 40 mM σε pH 9 και σαν sheath liquid χρησιμοποιήθηκε οξικό οξύ 1% σε διαλύτη H₂O:MeOH 50:50.

4.2.5.1. Επίδραση του ρυθμού ροής του αερίου ξήρανσης

Το αέριο ξήρανσης γενικά χρησιμοποιείται για να επιταχύνει την απομάκρυνση του διαλύτη, να αυξήσει την ευαισθησία στο MS και να αποφευχθεί η είσοδος ανεπιθύμητων ιόντων μέσα στο σύστημα MS.^[100,129] Σαν αέριο ξήρανσης χρησιμοποιήθηκε το άζωτο και διερευνήθηκε αρχικά η επίδραση της μεταβολής του ρυθμού ροής του από 4 σε 10 L/min. Ροές του αερίου ξήρανσης μικρότερες από 4 L/min, οδηγούν σε ασταθή ψεκασμό, καθώς απαιτείται μία ελάχιστη ροή για να διατηρηθεί θετική πίεση μέσα στο θάλαμο ψεκασμού και να αποφευχθεί η είσοδος μη-φιλτραρισμένου αέρα στο θάλαμο ψεκασμού και στο τμήμα του MS που βρίσκεται υπό κενό.^[100] Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.2.24(α), αρχικά, με αύξηση της ροής από 4 σε 6 L/min, παρατηρήθηκε αύξηση του λόγου S/N λόγω μείωσης των επιπέδων θορύβου στην υψηλότερη ροή. Σε χαμηλές ροές παρατηρήθηκε αύξηση του θορύβου λόγω του ότι μεγάλα φορτισμένα σταγονίδια περνούν μέσα στον αναλυτή μάζας.^[133] Αντίθετα, με χρήση υψηλότερων ρυθμών ροής, ένας μεγαλύτερος αριθμός ιόντων από την κύρια μάζα του διαλύματος έρχονται πιο κοντά στη διεπιφάνεια υγρού-αερίου και έτσι αυξάνεται η ταχύτητα απομάκρυνσης του διαλύτη.^[128] Για ροές μεγαλύτερες από 6 L/min, παρατηρήθηκε μείωση της ευαισθησίας, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στην επίδραση της διασποράς και στη μείωση του χρόνου παραμονής του σταγονιδίου του δείγματος. Από τα πιο πάνω γίνεται σαφές ότι ο ρυθμός ροής του αερίου ξήρανσης επηρεάζει τη σταθερότητα του ηλεκτροψεκασμού και αυτή, με τη σειρά της, μπορεί να επηρεάσει τα επίπεδα του θορύβου.^[127] Ο χρόνος ανάλυσης δεν επηρεάστηκε από τη μεταβολή του ρυθμού ροής του αερίου ξήρανσης. Λαμβάνοντας υπόψη τα πιο πάνω, σαν βέλτιστος ρυθμός ροής του αερίου ξήρανσης επιλέχθηκαν τα 6 L/min.



Σχήμα 4.2.24. Επίδραση (α) του ρυθμού ροής, (β) της θερμοκρασίας του αερίου ξήρανσης και (γ) της πίεσης του αερίου ψεκασμού, στο λόγο S/N για τη ριβαστιγμίνη.

4.2.5.2. Επίδραση της θερμοκρασίας του αερίου ξήρανσης

Η επίδραση της θερμοκρασίας του αερίου ξήρανσης μελετήθηκε μεταβάλλοντας τη θερμοκρασία από 150 έως 350 °C, για ρυθμό ροής του αερίου 6 L/min. Όπως παρατηρήθηκε, μέγιστος λόγος S/N λήφθηκε στους 200 °C (Σχήμα 4.2.24(β)). Με αύξηση της θερμοκρασίας από τους 150 στους 200 °C, παρατηρήθηκε αύξηση του λόγου S/N λόγω πιο αποτελεσματικής απομάκρυνσης του διαλύτη στην υψηλότερη θερμοκρασία. Για θερμοκρασίες μεγαλύτερες από 200 °C, παρατηρήθηκε μείωση στο λόγο S/N, λόγω υψηλότερου θορύβου στις θερμοκρασίες αυτές. Ακόμα, με την αύξηση της θερμοκρασίας παρατηρήθηκε μία συνεχής μείωση της έντασης της κορυφής. Μία πιθανή εξήγηση για αυτό είναι ότι η θερμοκρασία του αερίου ξήρανσης σχετίζεται αντίστροφα με το χρόνο παραμονής του σταγονιδίου του δείγματος.^[128] Κατά συνέπεια, αυτή η μείωση στο μέγεθος του σταγονιδίου στις υψηλότερες θερμοκρασίες αυξάνει την κινητικότητα και μειώνει το χρόνο παραμονής του σταγονιδίου. Έτσι, σαν βέλτιστη θερμοκρασία του αερίου ξήρανσης επιλέχθηκαν οι 200 °C.

4.2.5.3. Επίδραση της πίεσης του αερίου ψεκασμού

Ο τελευταίος παράγοντας που εξετάστηκε για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών του MS ήταν η πίεση του αερίου ψεκασμού. Στα συστήματα ESI, ο σχηματισμός των φορτισμένων σωματιδίων πραγματοποιείται με τη χρήση συστήματος υψηλής τάσης σε συνδυασμό με ένα αέριο ψεκασμού. Η πίεση του αερίου είναι πολύ σημαντική αφού βοηθά τη διαδικασία απομάκρυνσης του διαλύτη και βοηθά στο σχηματισμό του σταγονιδίου και στη συμύκνωση του κατά τη διάρκεια του ηλεκτροψεκασμού για την επίτευξη καλής ευαισθησίας στο MS.^[131] Επίσης, επηρεάζει την ποιότητα του διαχωρισμού, αφού η ροή που προκαλεί δημιουργεί μία αναρροφητική επίδραση μέσα στη στήλη με αποτέλεσμα να επηρεάζονται οι χρόνοι μετανάστευσης, και κατά συνέπεια ο διαχωρισμός.^[100,119,129,131] Έτσι, η πίεση αυτή αποτελεί έναν πολύ σημαντικό παράγοντα για βελτίωση του διαχωρισμού, ιδιαίτερα στη χειρόμορφη ανάλυση. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 4.2.3, η πίεση του αερίου ψεκασμού επηρεάζει την αποδοτικότητα των κορυφών. Συγκεκριμένα, όπως παρατηρήθηκε, με αύξηση της πίεσης του αερίου ψεκασμού μέχρι τα 20 psi, η αποδοτικότητα αυξάνεται, ενώ με περαιτέρω αύξηση της πίεσης στα 25 psi, η αποδοτικότητα των κορυφών μειώνεται.

Η πίεση του αερίου ψεκασμού προκάλεσε επίσης αλλαγές στην ευαισθησία της ανίχνευσης. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.2.24(γ), η αύξηση της πίεσης του αερίου ψεκασμού από τα 10 στα 20 psi ήταν ευεργετική για τη διαδικασία του ηλεκτροψεκασμού,

αφού αυξήθηκε η ευαισθησία της μεθόδου. Το φαινόμενο αυτό είναι πιθανόν να προκαλείται από μία βελτιωμένη διαδικασία εξάτμισης των ιόντων, αφού μικρότερα φορτισμένα σωματίδια παρατηρούνται σε υψηλότερες πιέσεις.^[100,119,131] Ωστόσο, με περαιτέρω αύξηση της πίεσης στα 25 psi, παρατηρήθηκε μείωση του λόγου S/N λόγω υψηλότερων επιπέδων θορύβου. Αυτό αποδεικνύει ότι υψηλές πιέσεις του αερίου ψεκασμού επηρεάζουν τη σταθερότητα του ηλεκτροψεκασμού. Επίσης, επιβεβαιώνει προηγούμενες μελέτες που υποστηρίζουν ότι ο ρυθμός ροής του αερίου ψεκασμού έχει πολλαπλές επιδράσεις στην απόκριση του οργάνου.^[128] Στην περίπτωση μας, οι χρόνοι ανάλυσης δεν επηρεάστηκαν σημαντικά από τη μεταβολή της πίεσης. Έτσι, σαν βέλτιστη πίεση του αερίου ψεκασμού επιλέχθηκαν τα 20 psi, αφού στην τιμή αυτή παρατηρήθηκε η υψηλότερη ευαισθησία, η υψηλότερη αποδοτικότητα των κορυφών, ενώ οι χρόνοι ανάλυσης δεν επηρεάστηκαν σημαντικά.

Πίνακας 4.2.3. Επίδραση της πίεσης του αερίου ψεκασμού στην αποδοτικότητα των κορυφών της νεοστιγμίνης και της ριβαστιγμίνης.

Πίεση αερίου ψεκασμού	$N_{\text{Νεοστιγμίνη}}$	$N_{\text{Ριβαστιγμίνη}}$
10 psi	24967	21067
15 psi	25712	35182
20 psi	27721	43504
25 psi	20560	31580

Συνοψίζοντας, οι βέλτιστες συνθήκες για τον προσδιορισμό της ριβαστιγμίνης με χρήση της νεοστιγμίνης σαν I.S. όσον αφορά τη λήψη μέγιστης ευαισθησίας, υψηλής αποδοτικότητας και ικανοποιητικούς χρόνους ανάλυσης ήταν: BGE: οξικό αμμώνιο 40 mM σε pH 9, sheath liquid: οξικό οξύ 1% σε διαλύτη H₂O:MeOH 50:50, ο ρυθμός ροής του αερίου ξήρανσης ήταν 10 L/min και η θερμοκρασία του αερίου ξήρανσης 200 °C, ενώ η πίεση του αερίου ψεκασμού ορίστηκε στα 20 psi.

4.2.7. Προσδιορισμός της ριβαστιγμίνης σε ανθρώπινο πλάσμα

Με στόχο να διερευνηθεί η ικανότητα εφαρμογής της μεθόδου που αναπτύχθηκε σε βιολογικά δείγματα για σκοπούς κλινικών και τοξικολογικών αναλύσεων, έγινε προσπάθεια προσδιορισμού της ριβαστιγμίνης στο πλάσμα. Καθώς το πλάσμα αποτελεί μία πολύπλοκη μήτρα που περιέχει διάφορες πρωτεΐνες και άλατα, είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί μία διαδικασία προετοιμασίας του δείγματος πριν από την έγχυση του στο σύστημα CE-MS. Για το σκοπό αυτό, αρχικά δοκιμάστηκαν διάφορες διαδικασίες επεξεργασίας του πλάσματος για εύρεση της βέλτιστης διαδικασίας για τον καθαρισμό και την προσυγκέντρωση του δείγματος. Τα δείγματα πλάσματος που δοκιμάστηκαν αρχικά, λήφθηκαν από ασθενείς, οι οποίοι πάσχουν από τη νόσο του Alzheimer αλλά δε λαμβάνουν κάποια θεραπευτική αγωγή. Τα δείγματα πλάσματος που δεν περιείχαν φάρμακο, εμβολιάστηκαν με ριβαστιγμίνη (0.6 µg/mL) και νεοστιγμίνη (0.1 µg/mL) και στη συνέχεια δοκιμάστηκαν μία διαδικασία LLE και δύο διαδικασίες SPE χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικές στήλες. Οι διαδικασίες επεξεργασίας του δείγματος περιγράφονται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 3.2.2.3. Μετά από την πραγματοποίηση της εκχύλισης, πραγματοποιήθηκε έγχυση του εκχυλίσματος στο σύστημα CE-MS κάτω από τις βέλτιστες συνθήκες.

Η LLE αποδείχτηκε μη αποτελεσματική για τον προσδιορισμό της ριβαστιγμίνης. Η μέθοδος αυτή ήταν αρκετά χρονοβόρα αφού το στάδιο της εκχύλισης ακολουθούσε εξάτμιση και επαναδιάλυση του εναπομείναντα στερεού σε οργανικό διαλύτη. Δοκιμάστηκαν δύο διαφορετικοί οργανικοί διαλύτες: MeOH και ACN. Ωστόσο, και στις δύο περιπτώσεις το στερεό δεν ήταν πλήρως διαλυτό, προκαλώντας έτσι ασταθές ρεύμα και ασταθή γραμμή βάση κατά την ανάλυση. Τα προβλήματα αυτά έκαναν αδύνατο τον προσδιορισμό των κορυφών που μας ενδιαφέρουν.

Στην περίπτωση της SPE, δοκιμάστηκαν δύο διαφορετικές SPE στήλες, μία με προσροφητικό υλικό C18 και μία Oasis HLB στήλη. Σε αντίθεση με την LLE, και οι δύο SPE διαδικασίες αποδείχθηκαν ικανές να προσδιορίσουν τη ριβαστιγμίνη στο πλάσμα. Τα ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν μετά από την επεξεργασία του πλάσματος με τις δύο SPE στήλες φαίνονται στα Σχήματα 4.2.25 και 4.2.26. Όπως παρατηρείται, και στις δύο περιπτώσεις στη Scan-mode, εμφανίζονται μόνο δύο κορυφές, οι οποίες όπως ταυτοποιήθηκε από το μοριακό τους βάρος, ανήκουν στα πρωτονιωμένα μοριακά ιόντα της νεοστιγμίνης και της ριβαστιγμίνης. Οι χρόνοι μετανάστευσης των δύο κορυφών ήταν οι ίδιοι με τους χρόνους στους οποίους εκλύονται οι αναλύτες στα πρότυπα διαλύματα.

Σε καμία από τις δύο περιπτώσεις δεν υπήρξαν παρεμβολές από ενδογενή συστατικά του δείγματος κατά την ανάλυση της ριβαστιγμίνης στους χρόνους μετανάστευσης των υπό μελέτη ενώσεων, οι οποίες να περιορίζουν την ανάλυση. Εντούτοις, στην περίπτωση όπου έγινε χρήση της SPE από C18, ο λόγος S/N ήταν τρεις φορές μεγαλύτερος (S/N=154) σε σχέση με την περίπτωση όπου χρησιμοποιήθηκε η Oasis HLB στήλη (S/N=52). Αυτό οφείλεται στις διαφορετικές αλληλεπιδράσεις των αναλυτών με τα δύο διαφορετικά προσροφητικά υλικά, οι οποίες οφείλονται στη φύση του προσροφητικού υλικού και στο φορτίο των ιονισμένων ειδών που βρίσκονται στα δείγματα. Επιπλέον, παρατηρήθηκε μία μικρή κορυφή, η οποία σημειώνεται με αστερίσκο στα Σχήματα 4.2.25 και 4.2.26, και εκλούεται πριν από τις δύο κορυφές. Η κορυφή αυτή είναι ανεξάρτητη από το λόγο m/z αφού εμφανίζεται τόσο στο Scan-mode όσο και στα δύο SIM που εξετάστηκαν. Επομένως, η κορυφή αυτή πιθανόν να οφείλεται σε μετατόπιση του διαλύτη (solvent displacement), δηλαδή της MeOH.^[127]

Ακόμα, έγινε εκτίμηση της ανάκτησης της ριβαστιγμίνης για τις δύο διαφορετικές SPE στήλες. Η ανάκτηση εκφράζεται σαν η μέση τιμή της συγκέντρωσης που μετριέται ως προς την πραγματική συγκέντρωση επί της εκατόν. Η ανάκτηση της εκχύλισης της ριβαστιγμίνης από το πλάσμα εκτιμήθηκε σε τρία διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης, μία χαμηλή, μία μεσαία και μία υψηλή συγκέντρωση: 0.5, 10 και 60 ng/mL. Ο υπολογισμός της ανάκτησης έγινε χρησιμοποιώντας την εξίσωση της καμπύλης βαθμονόμησης που κατασκευάστηκε με χρήση πρότυπων διαλυμάτων ριβαστιγμίνης. Οι ανακτήσεις που λήφθηκαν χρησιμοποιώντας τη στήλη C18 στα τρία επίπεδα συγκέντρωσης ήταν 114%, 80% και 93%, αντίστοιχα. Όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία, οι αποδεκτές τιμές για την ανάκτηση πρέπει να είναι μεταξύ 80-120%.^[25] Η SPE στήλη Oasis HLB έδωσε χαμηλές τιμές ανάκτησης στις τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις, οι οποίες υπολογίστηκαν να είναι 45%, 36% και 37%, αντίστοιχα. Έτσι, η απλή και γρήγορη SPE διαδικασία, στην οποία γίνεται χρήση στήλης από C18, επιλέχθηκε σαν η βέλτιστη διαδικασία επεξεργασίας του πλάσματος, αφού με χρήση της συγκεκριμένης στήλης λήφθηκαν ο υψηλότερος λόγος S/N και τα υψηλότερα ποσοστά ανάκτησης.

Συγκρίνοντας τη μέθοδο που αναπτύχθηκε με αντίστοιχες μελέτες της βιβλιογραφίας, όπου γίνεται ανάλυση της ριβαστιγμίνης με τις τεχνικές HPLC-MS και GC-MS, ο απαιτούμενος όγκος πλάσματος για την πραγματοποίηση μίας ανάλυσης μειώθηκε από την τάξη των μικρόλιτρων σε μερικά νανόλιτρα.^[25-27] Αυτό είναι πολύ σημαντικό αφού συχνά η διαθέσιμη ποσότητα βιολογικών δειγμάτων για την ανάλυση είναι περιορισμένη.

Επιπλέον, για την απομόνωση της ριβαστιγμίνης από το πλάσμα, αναπτύχθηκε μία απλή, γρήγορη και απαλλαγμένη από τη χρήση οργανικών διαλυτών διαδικασία εκχύλισης σε αντίθεση με άλλες μελέτες όπου χρησιμοποιείται η τεχνική LLE, στην οποία γίνεται απόρριψη οργανικών διαλυτών.^[25,26] Τέλος, να σημειωθεί ότι είναι διαθέσιμες στο εμπόριο αυτοματοποιημένες διαδικασίες SPE με τις οποίες εξασφαλίζεται η επαναληψιμότητα της μεθόδου και καθιστούν την CE-MS ανάλυση της ριβαστιγμίνης κατάλληλη για χρήση σε αναλύσεις ρουτίνας.

Σχήμα 4.2.25. Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν για πλάσμα εμβολιασμένο με ριβαστιγμίνη και I.S. μετά από την εφαρμογή SPE με χρήση στήλης από C18 κάτω από τις βέλτιστες συνθήκες.

Σχήμα 4.2.26. Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν για πλάσμα εμβολιασμένο με ριβασιγμίνη και I.S. μετά από την εφαρμογή SPE με χρήση στήλης Oasis HLB κάτω από τις βέλτιστες συνθήκες.

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε, εφαρμόστηκε στη συνέχεια για τον προσδιορισμό της ριβασιγμίνης σε πλάσμα, το οποίο λήφθηκε από ασθενή που λαμβάνει θεραπεία με ριβασιγμίνη μέσω διαδερμικού αυτοκόλλητου. Τα διαδερμικά αυτοκόλλητα προσφέρουν πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις συνηθισμένες θεραπείες που λαμβάνονται από το στόμα, όπως είναι η ομαλή και συνεχής μεταφορά του φαρμάκου, η μειωμένη μέγιστη συγκέντρωση στο αίμα και τα πιο σταθερά, συστηματικά επίπεδα του φαρμάκου.^[134] Τα χαρακτηριστικά αυτά μπορεί να βελτιώσουν το προφίλ ανεκτικότητας, φτάνοντας

ευκολότερα τις βέλτιστες θεραπευτικές δόσεις. Το διαδερμικό αυτοκόλλητο, απελευθερώνει μία δόση 9.5 mg ριβασιγμίνης κάθε 24 ώρες. Σε 160 μL δείγματος πλάσματος, το οποίο συλλέχθηκε 2 ώρες μετά την απελευθέρωση του φαρμάκου, εμβολιάστηκαν 5 μL I.S. συγκέντρωσης 100 ng/mL και ακολούθως εφαρμόστηκε σε αυτό η βέλτιστη SPE διαδικασία. Στο Σχήμα 4.2.27 φαίνονται τα SIM ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν για λόγο m/z 223 και 251, τα οποία αντιστοιχούν στα πρωτονιωμένα μοριακά ιόντα του I.S. και της ριβασιγμίνης. Η μέση τιμή της συγκέντρωσης (\pm S.D.) για τη ριβασιγμίνη υπολογίστηκε με βάση την καμπύλη βαθμονόμησης που κατασκευάστηκε στο πλάσμα και βρέθηκε να είναι 14.6 (\pm 1.7) ng/mL.

Σχήμα 4.2.27. Ηλεκτροφερογράμματα που λήφθηκαν για την ανάλυση πλάσματος ασθενή που λαμβάνει θεραπεία με ριβασιγμίνη μέσω διαδερμικού αυτοκόλλητου, εμβολιασμένο I.S. μετά από την εφαρμογή SPE με χρήση στήλης από C18 κάτω από τις βέλτιστες συνθήκες.

Ακόμα, διερευνήθηκε η παρουσία του βασικότερου μεταβολίτη της ριβασιγμίνης στο πλάσμα. Όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία, η ριβασιγμίνη μεταβολίζεται μέσω εστερικής υδρόλυσης της καρβαμιδικής ομάδας για να δώσει τον αποκαρβαμιδικό

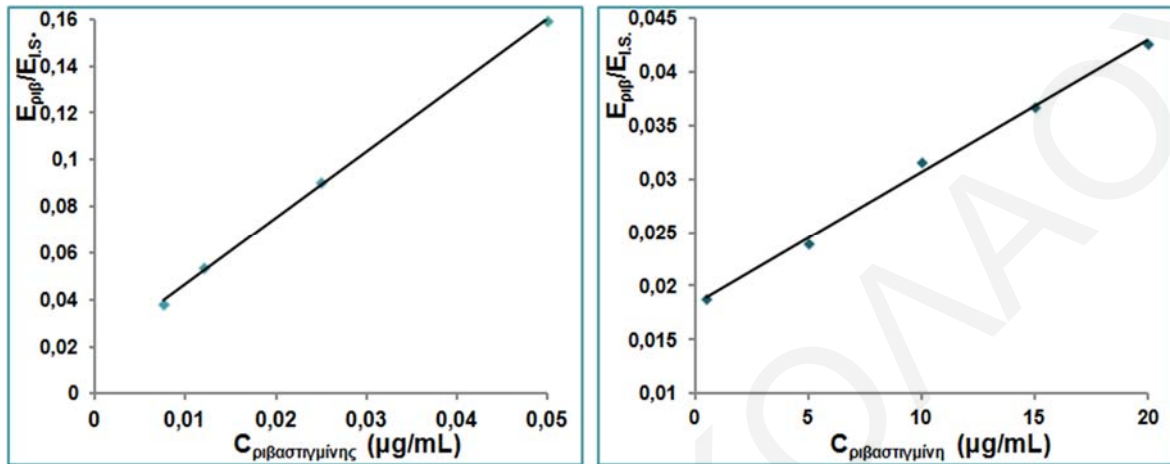
μεταβολίτη (S)-3-(1-διμεθυλαμινοαιθυλ)-φαινόλη, γνωστό σαν NAP 226-90.^[25] Για το σκοπό αυτό, έγινε σάρωση στο SIM-mode για λόγο m/z 166, το οποίο αντιστοιχεί στο πρωτιωμένο μοριακό ιόν του NAP-226. Ωστόσο, στο ηλεκτροφερόγραμμα που λήφθηκε δεν εμφανίστηκε κάποια κορυφή. Η απουσία του μεταβολίτη της ριβαστιγμίνης από το πλάσμα του ασθενή, ο οποίος λαμβάνει θεραπεία με το συγκεκριμένο φάρμακο, πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι το δείγμα λήφθηκε μόλις 2 ώρες μετά την απελευθέρωση του φαρμάκου από το διαδερμικό αυτοκόλλητο. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι η μέγιστη συγκέντρωση του NAP-226 στο πλάσμα είναι 2.87 ± 1.42 ng/mL και λαμβάνεται μεταξύ οκτώ και εικοσιοκτώ ωρών μετά την απελευθέρωση του φαρμάκου από το διαδερμικό αυτοκόλλητο.^[134] Το δείγμα πλάσματος που αναλύθηκε λήφθηκε, όπως έχει αναφερθεί, δύο ώρες μετά την απελευθέρωση του φαρμάκου. Στο χρόνο αυτό, ο μεταβολίτης της ριβαστιγμίνης δεν έχει ακόμα εμφανιστεί στο πλάσμα σε συγκεντρώσεις που να μπορεί να ανιχνευτεί. Να σημειωθεί επίσης ότι στις πλείστες μελέτες στις οποίες γίνεται προσδιορισμός του NAP-226 στο πλάσμα, η χορήγηση του φαρμάκου γίνεται από το στόμα.^[25,29] Στην περίπτωση αυτή, η συγκέντρωση του μεταβολίτη της ριβαστιγμίνης στο πλάσμα φτάνει σε μία υψηλή συγκέντρωση, η οποία είναι 6.59 ± 1.96 ng/mL, λίγα λεπτά μετά τη χορήγηση του φαρμάκου.^[134]

4.2.8. Αξιολόγηση της μεθόδου CE-MS

4.2.8.1. Γραμμικότητα

Κάτω από τις βέλτιστες συνθήκες που αναπτύχθηκαν στο σύστημα CE-MS κατασκευάστηκαν δύο καμπύλες βαθμονόμησης για τη ριβαστιγμίνη. Η πρώτη, κατασκευάστηκε με χρήση πρότυπων διαλυμάτων ριβαστιγμίνης σε διαλύτη H₂O:MeOH 50:50 (Σχήμα 4.2.28(α)), ενώ η δεύτερη κατασκευάστηκε με εμβολιασμό γνωστών ποσοτήτων ριβαστιγμίνης σε ανθρώπινο πλάσμα και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε εκχύλιση του πλάσματος με χρήση της SPE στήλης με προσροφητικό υλικό C18 (Σχήμα 4.2.28(β)). Σε όλες τις περιπτώσεις, γινόταν επίσης εμβολιασμός των διαλυμάτων με I.S. συγκέντρωσης 0.1 μg/mL και η καμπύλη βαθμονόμησης κατασκευάστηκε παραθέτοντας το λόγο του εμβαδού της κορυφής της ριβαστιγμίνης ως προς το εμβαδόν της κορυφής του I.S. σε σχέση με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις. Κάθε σημείο στις γραφικές παραστάσεις αποτελούσε τη μέση τιμή που λήφθηκε για τρεις ανεξάρτητες μετρήσεις. Η εξίσωση της γραμμικής παλινδρόμησης που λήφθηκε με χρήση πρότυπων διαλυμάτων ήταν $y = 0.0028x + 0.0178$ με συντελεστή συσχέτισης 0.9999, ενώ η εξίσωση της καμπύλης βαθμονόμησης στο πλάσμα ήταν $y = 0.0012x + 0.0186$ με συντελεστή συσχέτισης 0.9970.

Η ελάχιστη αποδεκτή τιμή για το συντελεστή συσχέτισης είναι 0.995.^[26] Στην πρώτη περίπτωση, το εύρος γραμμικότητας ήταν για συγκέντρωση 0.0075-0.1 $\mu\text{g/mL}$, ενώ στη δεύτερη περίπτωση ήταν από 0.5 έως 20 $\mu\text{g/mL}$. Όπως φαίνεται από τους συντελεστές συσχέτισης, και στις δύο περιπτώσεις λήφθηκε πολύ καλή γραμμικότητα.



Σχήμα 4.2.28. Καμπύλες βαθμονόμησης που κατασκευάστηκαν για τη ριβαστιγμίνη (α) με χρήση πρότυπων διαλυμάτων και (β) στο πλάσμα μετά από SPE με στήλη C18, κάτω από τις βέλτιστες συνθήκες.

4.2.8.2. Επαναληψιμότητα

Η επαναληψιμότητα της μεθόδου εκτιμήθηκε με το κριτήριο της RSD, όσον αφορά τους χρόνους μετανάστευσης και το εμβαδόν των κορυφών, με και χωρίς τη χρήση I.S. Πραγματοποιήθηκαν πέντε επαναλαμβανόμενες μετρήσεις μέσα στην ίδια μέρα για τις πέντε συγκεντρώσεις της καμπύλης βαθμονόμησης με εμβολιασμό πλάσματος, το οποίο δεν περιείχε φάρμακο, με γνωστή ποσότητα πρότυπου διαλύματος. Ακολούθως, στο πλάσμα εφαρμόστηκε SPE με προσροφητικό υλικό C18. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 4.2.4, οι τιμές της RSD για τους χρόνους μετανάστευσης και τα εμβαδά της κορυφής χωρίς τη χρήση I.S., κυμαίνονταν μεταξύ 0.13% έως 0.46% και 12.33% έως 3.62%, αντίστοιχα. Με προσθήκη I.S., οι τιμές RSD, τόσο για τους χρόνους μετανάστευσης όσο και για τα εμβαδά, βελτιώθηκαν σημαντικά. Συγκεκριμένα, οι τιμές που λήφθηκαν για το λόγο των χρόνων μετανάστευσης κυμαίνονταν από 0.10% έως 0.16%, ενώ οι τιμές RSD για το λόγο των εμβαδών των κορυφών ήταν μεταξύ 0.62% και 9.04%. Η χρήση I.S. οδήγησε σε βελτίωση της επαναληψιμότητας. Το I.S. μειώνει τα προβλήματα που προκαλούν χαμηλή επαναληψιμότητα λόγω της υδροδυναμικής έγχυσης.^[10]

Πίνακας 4.2.4. Τιμές της σχετικής τυπικής απόκλισης των χρόνων μετανάστευσης και των εμβαδών της κορυφής της ριβασιγμίνης σε πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις, με και χωρίς τη χρήση I.S.

C _{ριβασιγμίνης} (ng/mL)	RSD _{ριβασιγμίνη} (%) (n=5)			
	Χωρίς I.S.		Με I.S.	
	Χρόνοι μετανάστευσης	Εμβαδόν	Χρόνοι μετανάστευσης	Εμβαδόν
20	0.13	12	0.10	9.0
15	0.46	3.6	0.16	1.4
10	0.20	4.4	0.14	0.6
5	0.16	8.7	0.10	3.7
0.5	0.31	5.7	0.10	1.5

4.2.8.3. Μελέτες σταθερότητας

Η σταθερότητα του δείγματος εκτιμήθηκε συγκρίνοντας τη συγκέντρωση που βρέθηκε στο πλάσμα αμέσως μετά την εκχύλιση του, με αυτή που βρέθηκε όταν πραγματοποιήθηκε και πάλι έγχυση του δείγματος μετά από κάποιο χρονικό διάστημα. Οι μελέτες σταθερότητας για τη ριβασιγμίνη στο πλάσμα πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας δείγμα πλάσματος, το οποίο ήταν εμβολιασμένο με ριβασιγμίνη σε συγκέντρωση 0.5 ng/ml. Αρχικά, εκτιμήθηκε η σταθερότητα δείγματος, το οποίο αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για τρεις ώρες και στη συνέχεια έγιναν τέσσερις επαναλαμβανόμενες μετρήσεις της συγκέντρωσης. Το δείγμα αυτό βρέθηκε να είναι σταθερό, αφού η υπολογιζόμενη συγκέντρωση της ριβασιγμίνης σε αυτό ήταν 0.582 ± 0.081 ng/ml. Στη συνέχεια, το ίδιο δείγμα αναλύθηκε αφού αφέθηκε στους 4 °C για 24 ώρες. Η σταθερότητα της ριβασιγμίνης στο δείγμα πλάσματος ήταν και πάλι πολύ ικανοποιητική, αφού η συγκέντρωση βρέθηκε να είναι 0.575 ± 0.056 ng/ml.

4.2.8.4. LOD και LOQ

Ο προσδιορισμός των LOD και LOQ έγινε με χρήση της εμπειρικής μεθόδου, από το λόγο της SD του εμβαδού της κορυφής ως προς την κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης, όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 3.3.1. Στο πλάσμα, οι τιμές που υπολογίστηκαν για το LOD και το LOQ ήταν 2.8 ng/mL και 8.4 ng/mL, αντίστοιχα, ενώ οι τιμές που λήφθηκαν σε πρότυπα διαλύματα ήταν 1.6 ng/mL και 5.0 ng/mL, αντίστοιχα. Οι τιμές αυτές είναι ελαφρά χαμηλότερες από αυτές που βρέθηκαν στο πλάσμα. Αυτό πιθανόν να οφείλεται

στην αναπόφευκτη τροποποίηση του τοιχώματος της στήλης του CE όταν αναλύονται δείγματα πλάσματος.^[127]

Κλινικές μελέτες που έγιναν σε ασθενείς, οι οποίοι λαμβάνουν θεραπεία με ριβαστιγμίνη από το στόμα, έδειξαν ότι η μέγιστη συγκέντρωση ριβαστιγμίνης στο αίμα τους λαμβάνεται μισή ώρα μετά τη χορήγηση του φαρμάκου. Σε ασθενείς που λαμβάνουν δύο δόσεις των 3 mg καθημερινά, η μέγιστη αυτή συγκέντρωση βρέθηκε να είναι 18.4 ng/mL.^[29] Η μέγιστη συγκέντρωση της ριβαστιγμίνης σε ασθενείς, στους οποίους χορηγούνται δύο δόσεις των 6 mg καθημερινά, βρέθηκε να είναι 36.3 ng/mL. Σε μία άλλη μελέτη αναφέρεται ότι μετά από χορήγηση μίας μόνο δόσης 3 mg ριβαστιγμίνης, λαμβάνεται μέγιστη συγκέντρωση 7.63 ng/mL, μία ώρα μετά από τη χορήγηση του φαρμάκου.^[134] Οι τιμές που υπολογίστηκαν για το LOQ με τη μέθοδο που αναπτύχθηκε στα πλαίσια της διδακτορικής αυτής διατριβής ήταν χαμηλότερες από τις συγκεντρώσεις που έχουν βρεθεί στο πλάσμα ασθενών, οι οποίοι λαμβάνουν θεραπεία με ριβαστιγμίνη. Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν ότι η προτεινόμενη μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί με ακρίβεια για ποσοτικοποίηση της ριβαστιγμίνης σε αίμα ασθενών, οι οποίοι λαμβάνουν θεραπεία με ριβαστιγμίνη είτε από το στόμα είτε με χρήση διαδερμικού αυτοκόλλητου. Πολλοί ερευνητές έχουν υποθέσει ότι η βελτίωση της γνωστικής λειτουργίας των ασθενών είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του AChEI στο πλάσμα. Σε μία εξατομικευμένη αποτελεσματική θεραπευτική αγωγή, η οποία, για την ασφάλεια του ασθενή, θα περιορίζει την τοξικότητα, η ρύθμιση της δόσης του φαρμάκου στους ασθενείς με τη νόσο AD, μπορεί να οδηγήσει σε μεγαλύτερη δραστικότητα του φαρμάκου, βασιζόμενοι στις διάφορες φαρμακοκινητικές παραμέτρους. Έτσι, οι γιατροί μπορούν να λάβουν υπόψη τη συγκέντρωση του φαρμάκου όταν θα λάβουν μία απόφαση όσον αφορά την απόκριση στη θεραπεία ή για να μεταβούν από μία θεραπεία σε άλλη.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα κυριότερα συμπεράσματα που έχουν εξαχθεί από την παρούσα Δ.Δ. συνοψίζονται πιο κάτω και διαχωρίζονται σε αυτά που αφορούν (i) το διαχωρισμό των πολυφαινολικών ενώσεων με χρήση της τεχνικής CE με χρήση ανιχνευτή UV και (ii) τον προσδιορισμό του AChEI, ριβαστιγμίνη, με χρήση της συζευγμένης τεχνικής CE-MS.

Όσον αφορά το διαχωρισμό των οκτώ πολυφαινολικών ενώσεων, η CZE αποδείχτηκε σαν η καταλληλότερη μέθοδος, λόγω της ικανότητας των υδροξυλομάδων των ενώσεων αυτών να σχηματίζουν αρνητικά φορτισμένα σύμπλοκα με το βορικό που οδηγεί τελικά σε ικανοποιητικό διαχωρισμό.^[103] Η μέθοδος MEKC, τόσο με χρήση συνηθισμένων μικυλλίων του SDS όσο και με χρήση του συμπολυμερούς των τασιενεργών ουσιών poly-SUG και poly-SUS, οδήγησε σε αύξηση των χρόνων μετανάστευσης, χωρίς ωστόσο να παρατηρηθεί βελτίωση του διαχωρισμού. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι δεν αναπτύχθηκαν οι κατάλληλες υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις που να οδηγήσουν σε βελτίωση του διαχωρισμού. Στην περίπτωση της MEKC με χρήση μικυλλίων του SDS, μεγαλύτερη αύξηση των χρόνων κατακράτησης παρατηρήθηκε για τις λιγότερο πολικές ενώσεις 4, 5 και 6. Με χρήση της μεθόδου OT-CEC, όπου έγινε επικάλυψη της στήλης με ένα ζεύγος των πολυμερών PDADMAC και PSS, οι χρόνοι ανάλυσης ήταν αυξημένοι, ενώ επιπλέον παρατηρήθηκε ισχυρή κατακράτηση της ρεσβερατρόλης από την επικάλυψη της στήλης με αποτέλεσμα η κορυφή που αντιστοιχεί στην ένωση αυτή να μην εμφανίζεται.

Καθώς ο ιονισμός των ενώσεων αυτών επηρεάζει τόσο την ηλεκτροφορητική τους ευκινησία όσο και το βαθμό αλληλεπίδρασης τους με το βορικό, το pH αποδείχτηκε ένας καθοριστικός παράγοντας όσον αφορά το διαχωρισμό. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι το pH πρέπει να είναι μεγαλύτερο από 9 έτσι ώστε οι ουσίες να βρίσκονται στην ιονισμένη μορφή. Βέλτιστο BGE βρέθηκε να είναι 50 mM βορικό και 10 mM φωσφορικό σε pH 9.6. Η προσθήκη φωσφορικού μέσα στο BGE αποδείχτηκε ότι αυξάνει την αποτελεσματικότητα του διαχωρισμού και την ευαισθησία της ανίχνευσης. Με αύξηση της συγκέντρωσης του βορικού μέσα στο BGE παρατηρήθηκε σημαντική βελτίωση του διαχωρισμού, λόγω ισχυρότερου βαθμού αλληλεπίδρασης βορικού και αναλυτών. Μείωση της θερμοκρασίας της στήλης ή της εφαρμοζόμενης τάσης, είχαν σαν συνέπεια την αύξηση των χρόνων κατακράτησης, χωρίς ωστόσο να οδηγήσουν σε σημαντική βελτίωση του διαχωρισμού. Η σειρά έκλουσης των πολυφαινολών στην CZE ήταν ανάλογη της ακορεστότητας της κάθε ένωσης και της πολικότητας της, με τα πιο ακόρεστα και πιο πολικά συστατικά να εκλούνται στους μεγαλύτερους χρόνους.

Η μέθοδος CZE που αναπτύχθηκε αξιολογήθηκε με τους όρους της επαναληψιμότητας, της γραμμικότητας και του LOD. Παρατηρήθηκε πολύ καλή επαναληψιμότητα των χρόνων κατακράτησης, αφού όλες οι τιμές της RSD ήταν μικρότερες ή πολύ κοντά στο 1 %, ενώ ο συντελεστής συσχέτισης ήταν σε όλες τις περιπτώσεις μεγαλύτερος από 0.99. Τα LOD που υπολογίστηκαν για τους οκτώ αναλύτες ήταν μεταξύ 0.03 και 5.05 mg/L.

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε ήταν κατάλληλη για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των πολυφαινολικών ενώσεων σε δείγματα κρασιού. Αρχικά δοκιμάστηκαν έξι διαδικασίες επεξεργασίας του κρασιού. Η SPE αποδείχθηκε αναποτελεσματική για τον προσδιορισμό των πολυφαινολών λόγω της παρουσίας μεγάλου αριθμού άγνωστων συστατικών. Σαν η πιο κατάλληλη μέθοδος για απομόνωση των συστατικών αυτών από το κρασί αποδείχθηκε η LLE όπου πραγματοποιήθηκε εκχύλιση με διαιθυλαιθέρα, ακολουθούμενη από εξάτμιση του οργανικού διαλύτη και επαναδιάλυση σε EtOH. Με χρήση της συγκεκριμένης διαδικασίας επεξεργασίας του κρασιού, παρατηρήθηκαν υψηλά ποσοστά ανάκτησης, $101 \pm 12\%$, για τη ρεσβατραρόλη, η οποία δεν ανιχνεύτηκε σε κανένα από τα δείγματα κρασιού που αναλύθηκαν. Στο κόκκινο κρασί ανιχνεύτηκαν τα φλαβονοειδή κατεχίνη και επικατεχίνη σε συγκεντρώσεις παρόμοιες με αυτές της βιβλιογραφίας, καθώς επίσης και η μυρικετίνη και κερκετίνη σε συγκεντρώσεις λίγο μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες της βιβλιογραφίας. Στο λευκό κρασί, το μοναδικό φλαβονοειδές που προσδιορίστηκε ήταν η κατεχίνη.

Όσον αφορά τον προσδιορισμό της φαρμακευτικής ένωσης ριβαστιγμίνης, πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά με επιτυχία σύζευξη του συστήματος CE με ανιχνευτή ESI-MS. Με χρήση του συγκεκριμένου ανιχνευτή λήφθηκε οκτώ φορές μεγαλύτερος λόγος S/N σε σχέση με τον ανιχνευτή UV. Ένας αριθμός παραμέτρων βρέθηκαν να είναι καθοριστικοί για τη λήψη υψηλής ευαισθησίας. Σαν βέλτιστο BGE για τον προσδιορισμό της ριβαστιγμίνης και της νεοστιγμίνης (I.S.) με χρήση της μεθόδου CZE-ESI-MS όσον αφορά την ευαισθησία της μεθόδου, αλλά και τους χρόνους ανάλυσης, βρέθηκε να είναι το οξικό αμμώνιο 40 mM σε pH 9.0, αφού αύξηση είτε της συγκέντρωσης είτε του pH του BGE είχε σαν συνέπεια την αύξηση των χρόνων κατακράτησης λόγω μείωσης της ταχύτητας της EOF. Σαν sheath liquid επιλέχθηκε οξικό οξύ 1 % σε διαλύτη H₂O:MeOH (50:50), με ρυθμό ροής 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. Όπως παρατηρήθηκε, με αύξηση του ποσοστού της μεθανόλης στο sheath liquid ή με μείωση του ρυθμού ροής, ο λόγος S/N μειώνεται λόγω μη ικανοποιητικού ηλεκτροψεκασμού. Η ευαισθησία της μεθόδου βρέθηκε να επηρεάζεται επίσης σημαντικά από κάποιες παραμέτρους του θαλάμου ψεκασμού. Συγκεκριμένα,

βρέθηκε ότι ο βέλτιστος ρυθμός ροής του αερίου ξήρανσης είναι τα 6 L/min, σε θερμοκρασία 200 °C, αφού το αέριο ξήρανσης επηρεάζει την ταχύτητα απομάκρυνσης του διαλύτη και κατά συνέπεια τη σταθερότητα του ηλεκτροψεκασμού και τα επίπεδα του θορύβου. Επιπλέον, σαν βέλτιστη πίεση του αερίου ψεκασμού βρέθηκαν να είναι τα 20 psi λόγω μίας βελτιωμένης διαδικασίας εξάτμισης των ιόντων.

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε χαρακτηρίζεται από πολύ καλή γραμμικότητα, επαναληψιμότητα και σταθερότητα και έδωσε πολύ ικανοποιητικά όρια ανίχνευσης. Κατασκευάστηκαν καμπύλες βαθμονόμησης για τη ριβαστιγμίνη τόσο με χρήση πρότυπων διαλυμάτων όσο και στο πλάσμα. Και στις δύο περιπτώσεις λήφθηκε πολύ καλή γραμμικότητα με συντελεστές συσχέτισης μεγαλύτερους από 0.997. Η επαναληψιμότητα εκτιμήθηκε για το εμβάδόν και το χρόνο μετανάστευσης της κορυφής της ριβαστιγμίνης, με και χωρίς τη χρήση I.S. Σε όλες τις περιπτώσεις λήφθηκαν ικανοποιητικές τιμές RSD, όμως όπως παρατηρήθηκε, η χρήση του I.S. οδήγησε σε βελτίωση της επαναληψιμότητας. Όσον αφορά τις μελέτες σταθερότητας, το δείγμα βρέθηκε να είναι σταθερό για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και για 24 ώρες στους 4 °C. Τέλος, λήφθηκαν ικανοποιητικές τιμές LOD και LOQ, τόσο στο πλάσμα όσο και σε πρότυπα διαλύματα. Στο πλάσμα, οι τιμές που υπολογίστηκαν ήταν 2.8 ng/mL και 8.4 ng/mL, αντίστοιχα, ενώ οι τιμές που λήφθηκαν σε πρότυπα διαλύματα ήταν 1.6 ng/mL και 5.0 ng/mL, αντίστοιχα.

Κάτω από τις βέλτιστες συνθήκες, η μέθοδος CZE-ESI-MS που αναπτύχθηκε εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό της ριβαστιγμίνης στο πλάσμα. Αρχικά δοκιμάστηκαν διάφορες διαδικασίες προετοιμασίας του πλάσματος για την εξαγωγή της ριβαστιγμίνης από δείγμα πλάσματος, το οποίο εμβολιάστηκε με γνωστή ποσότητα ριβαστιγμίνης και I.S., όπως είναι η LLE και η SPE. Η διαδικασία SPE με χρήση στήλης από C18, έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά την ευαισθησία και τα ποσοστά ανάκτησης, ενώ δεν παρατηρήθηκαν παρεμβολές από ενδογενή συστατικά του δείγματος. Στη συνέχεια, η μέθοδος που αναπτύχθηκε εφαρμόστηκε σε πλάσμα ασθενή, ο οποίος πάσχει από τη νόσο AD και λαμβάνει θεραπεία με ριβαστιγμίνη μέσω διαδερμικού αυτοκόλλητου. Η συγκέντρωση της ριβαστιγμίνης στο πλάσμα του ασθενή βρέθηκε να είναι 14.6 ± 1.7 ng/mL. Τέλος, διερευνήθηκε η παρουσία του βασικότερου μεταβολίτη της ριβαστιγμίνης στο αίμα, του NAP 226-90. Η ένωση αυτή δεν ανιχνεύτηκε, γεγονός που οφείλεται στο γεγονός ότι ο μεταβολίτης της ριβαστιγμίνης εμφανίζεται στο αίμα οκτώ ώρες μετά από την απελευθέρωση του φαρμάκου.

Συνοψίζοντας, από τα αποτελέσματα που λήφθηκαν, φαίνεται η ικανότητα της μεθόδου CE να χρησιμοποιηθεί τόσο για τον προσδιορισμό φυτικών συστατικών, όπως είναι οι πολυφαινόλες, σε φυσικά προϊόντα, όσο και για τον προσδιορισμό φαρμακευτικών ενώσεων, όπως είναι η ριβαστιγμίνη, σε βιολογικά δείγματα με σύζευξη με τον ανιχνευτή MS. Έγινε κατορθωτός ο προσδιορισμός των πολυφαινολικών ενώσεων σε κυπριακά κρασιά και οι συγκεντρώσεις που βρέθηκαν ήταν για κάποιες από τις ενώσεις αυτές, παρόμοιες με αυτές της βιβλιογραφίας, ενώ για κάποιες άλλες ήταν λίγο μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες της βιβλιογραφίας. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι η σύσταση των πολυφαινολών στο κρασί επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, όπως καιρικά φαινόμενα και βιολογικές επιδράσεις. Όσον αφορά την ανάλυση της ριβαστιγμίνης, είναι η πρώτη φορά που επιτυγχάνεται προσδιορισμός της ριβαστιγμίνης με χρήση της τεχνικής CE-MS. Συγκρίνοντας με τις υπάρχουσες HPLC-MS μεθόδους της βιβλιογραφίας, το βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου που αναπτύχθηκε είναι η σημαντική μείωση του κόστους των αντιδραστηρίων, η μικρότερη κατανάλωση δείγματος και η αποφυγή απόρριψης μεγάλου όγκου οργανικών αποβλήτων. Έτσι, η μέθοδος που αναπτύχθηκε μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν εναλλακτική ως προς την τεχνική HPLC-MS. Η μέθοδος αυτή είναι κατάλληλη για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ριβαστιγμίνης στο πλάσμα κατά τη διάρκεια φαρμακοκινητικών μελετών και μελετών βιοδιαθεσιμότητας. Επιπλέον, μπορεί να δώσει πληροφορίες για τη συσχέτιση της συγκέντρωσης της ριβαστιγμίνης στο πλάσμα και την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου σε ασθενείς με τη νόσο AD.

6. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ως μελλοντική εργασία της παρούσας έρευνας, θα μπορούσε να γίνει προσδιορισμός και άλλων AChEIs, οι οποίοι χρησιμοποιούνται κλινικά για τη θεραπεία της νόσου του AD, με χρήση της μεθόδου CE-MS που αναπτύχθηκε. Τέτοιες ουσίες είναι η τακρίνη, η γαλανθαμίνη και η δονεπεξίλη, οι οποίες έχουν αρχίσει πρόσφατα να χρησιμοποιούνται στην Κύπρο για το σκοπό αυτό. Με τον προσδιορισμό των ουσιών αυτών στο πλάσμα ασθενών που λαμβάνουν τη συγκεκριμένη θεραπεία, θα μπορούσε να γίνει σύγκριση των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων και της βιοδιαθεσιμότητας των ουσιών αυτών και κατά συνέπεια να βρεθεί η πιο αποτελεσματική θεραπεία για τον κάθε ασθενή.

Επιπλέον, θα μπορούσε να μελετηθεί η ικανότητα της μεθόδου CE-MS να προσδιορίσει και άλλες ομάδες φαρμακευτικών ενώσεων και να πραγματοποιηθεί και πάλι ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των ουσιών αυτών σε αίμα ασθενών που λαμβάνουν τη συγκεκριμένη θεραπεία. Μία κατηγορία φαρμακευτικών ουσιών που εμφανίζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον είναι τα αντιεπιληπτικά φάρμακα, όπως είναι η φαινυτοΐνη, η καρβαμαζεπίνη και η καρβαμαζεπίνη. Η επιληψία, όπως και η νόσος AD, αποτελεί μία πάθηση των νευρώνων στον εγκέφαλο. Συγκεκριμένα, είναι αποτέλεσμα ξαφνικών, συνήθως σύντομων, διαδοχικών βιοηλεκτρικών εκκενώσεων μιας ομάδας νευρώνων που προκαλούν σπασμούς ή οπτικές, ακουστικές και οσφρητικές ψευδαισθήσεις. Καθώς η επιληψία αποτελεί μία νόσο από την οποία πάσχουν πάνω από 50 εκατομμύρια άνθρωποι παγκοσμίως, η αύξηση της γνώσης των ουσιών που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία της νόσου είναι ιδιαίτερα σημαντική.

Όσον αφορά το δεύτερο μέρος της παρούσας έρευνας που αφορά τις πολυφαινολικές ενώσεις, μελλοντικά, θα μπορούσε να διερευνηθεί η ικανότητα της μεθόδου CZE-MS που αναπτύχθηκε να προσδιορίσει τις συγκεκριμένες ενώσεις και σε άλλα κυπριακά προϊόντα, όπως είναι για παράδειγμα το μέλι. Στην περίπτωση αυτή, θα πρέπει να βρεθεί και πάλι η βέλτιστη διαδικασία για την απομόνωση των πολυφαινολικών ενώσεων από το φυσικό προϊόν που θα μελετηθεί.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] A. Cifuentes, *Electrophoresis* **2006**, 27, 283-303.
- [2] E. Hurtado-Fernandez, M. Gomez-Romero, A. Carrasco-Pancorbo, A. Fernandez-Gutierrez, *J. Pharm. Biom. Anal.* **2010**, 53, 1130-1160.
- [3] M. Herrero, V. Garcia-Canas, C. Simo, A. Cifuentes, *Electrophoresis* **2010**, 31, 205-228.
- [4] S.A. Shamsi, B.E. Miller, *Electrophoresis* **2004**, 25, 3927-3961.
- [5] S.Y. Park, *Arch. Pharm. Res.* **2010**, 33, 1589-1609.
- [6] L. Azevedo Marques, M. Giera, H. Lingeman, W. MA Niessen, *Biomed. Chromatogr.* **2011**, 25, 278-299.
- [7] A. Wimo, B. Winblad, H. Aguero-Torres, E. von Strauss, *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* **2003**, 17, 63-67.
- [8] Y. Gilgun, E. Melamed, D. Offen, *J. Mol. Neurosci.* **2003**, 21, 1-11.
- [9] P.T. Francis, A.M. Palmer, M. Snape, G.K. Wilcock, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **1999**, 66, 137.
- [10] D.J. Selkoe, *Physiol. Rev.* **2001**, 81, 741-766.
- [11] A. Serretti, P. Olgiati, D. De Ronchi, *J. Alz. Dis.* **2007**, 12, 73-92.
- [12] D.M. Walsh, D.J. Selkoe, *J. Neurochem.* **2007**, 101, 1172-1184.
- [13] J.L. Cummings, H.V. Vinters, G.M. Cole, Z.S. Khachaturian, *Neurology* **1998**, 51, S2-S17.
- [14] A.K. Wallin, K. Blennow, N. Andreasen, L. Minthon, *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* **2006**, 21, 131-138
- [15] Y. Christen, *Am. J. Clin. Nutr.* **2000**, 71, 621S-629S.
- [16] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge. *Free radicals in biology and medicine*. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press; **1999**.
- [17] A. Nunomura, G. Perry, G. Aliev, K. Hirai, A. Takeda E.K. Balraj, P.K. Jones, H. Ghanbari, T. Wataya, S. Shimohama, S. Chiba, C.S. Atwood, R.B. Petersen, M.A. Smith, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2001**, 60, 759-767.
- [18] D.S. Auld, T.J. Kornecook, S. Bastianetto, R. Quirion, *Prog. Neurobiol.* **2002**, 68, 209-245.
- [19] K.L.Davis, P. Powchick, *Lancet*.**1995**, 345, 625-630.
- [20] R.J. Polinsky, *Clinical Therapeutics* **1998**, 20, 634-647.

- [21] A. Enz, D. Meier, R. Spiegel, Effects of novel cholinesterase inhibitors based on the mechanism of enzyme inhibition. In: Giacobini E, Becker R, eds. *Alzheimer Disease: Therapeutic Strategies*. Boston: Birkhauser: 1994: 125-130.
- [22] R. Anand, G. Gharabawi, *J Drug Dev Clin Pratt*. **1996**, 8, 9-14.
- [23] M. Rosler, W. Retz, P. Retz-Junginger, H.J. Dettle, *Behav. Neurol*. **1998/1999**, 11, 211-216.
- [24] Y. Agid, B. Dubois, R. Anand, G. Gharabawi, *Curr. Therap. Res*. **1998**, 59, 837-845.
- [25] F. Pommier, R. Frigola, *J. Chromatogr. B* **2003**, 784, 301-313.
- [26] A. Enz, A. Chappuis, A. Dattler, *Biomed. Chromatogr*. **2004**, 18, 160-166.
- [27] Y. Sha, C. Deng, Z. Liu, T. Huang, B. Yang, G. Duan, *J. Chromatogr. B* **2004**, 806, 271-276.
- [28] J. Bhatt, G. Subbaiah, S. Kambli, B. Shah, S. Nigam, M. Patel, A. Saxena, A. Baliga, H. Parekh, G. Yadav, *J. Chromatogr. B* **2007**, 852, 115-121.
- [29] S.V. Frankfort, M. Ouwehand, M.J. van Maanen, H. Rosing, L.R. Tulner, J.H. Beijnen, *Rapid Commun. Mass Spectrom*. **2006**, 20, 3330-3336.
- [30] I. Ignat, I. Volf, V.I. Popa, *Food Chemistry* **2011**, 126, 1821-1835.
- [31] L. Bravo, *Nutrition Reviews* **1998**, 56, 317-333.
- [32] D. A. Butterfield, A. Castegna, C.B. Pocernich, J. Drake, G. Scapagnini, V. Calabrese, *J. Nutr. Biochem*. **2002**, 13, 444-461.
- [33] A.K. Ratty, N.F. Das, *Biochem. Med. Metab. Biol*. **1988**, 39, 69-79.
- [34] J. Valls, S. Millan, M.P. Marti, E. Borrás, L. Arola, *J. Chromatogr. A* **2009**, 1216, 7143-7172.
- [35] M.G.L. Hertog, P.C.H. Hollman, M.B. Katan, D. Kromhout, *Nutr. Cancer* **1993**, 20, 21-29.
- [36] T. Leth, U. Justesen, *Office for Official Publications of the European Communities*, 1998, 39-40.
- [37] J. Kuhnau, *World Rev. Nutr. Diet* **1976**, 24, 117-191.
- [38] D.P. Makris, G. Boskou, N.K. Andrikopoulos, *Bioresour. Technol*. **2007**, 98, 2963-2967.
- [39] A.S. St Legar, F. Moore, A.L. Cochrane, *Lancet* **1979**, 1, 1017-1020.
- [40] A.L. Klatsby, G.D. Friedman, A.B. Siegalub, *Ann. Intern. Med*. **1974**, 81, 294-301.
- [41] S. Renaud, M. de Lorgeril, *Lancet* **1992**, 339, 1523-1526.
- [42] A.L. Waterhouse, *Ann. NY Acad. Sci*. **2002**, 957, 21-36.

- [43] B. Fuhrman, N. Volkova, A. Suraski, M. Aviram, *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 3164–3168.
- [44] L. Alvarez-Sala, K. Slowing, P. Gomez-Serranillos, *Med. Clin. (Barc)* 2000, 114, 331–332.
- [45] B.P.F. Rutten, H.W.M. Steinbusch, H. Korr, C. Schmitz, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **2002**, 5, 645-651.
- [46] N.T. Zaveri, *Life Sci.* **2006**, 78, 2073-2080.
- [47] L.C. Lin, M.N. Wang, T.Y. Tseng, J.S. Sung, T.H. Tsai, *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, 1517-1524.
- [48] L. Letenneur, J.F. Dartigues, J.M. Orgogozo, *Ann. Intern. Med.* **1993**, 118, 317-318.
- [49] J.M. Orgogozo, J.F. Dartigues, S. Lafont, L. Letenneur, D. Commenges, R. Salamon, S. Renaud, M.B. Breteler, *Rev. Neurol.* **1997**, 153, 185-192.
- [50] V. Vingtdeux, U. Dreses-Werringloer, H. Zhao, P. Davies, P. Marambaud, *BMC Neuroscience* **2008**, 9, S2-S6.
- [51] T. Truelsen, D. Thudium, M. Gronbaek, *Neurology* **2002**, 59, 1313-1319.
- [52] Lindsay J, Laurin D, Verreault R, Hebert R, Helliwell B, Hill GB, McDowell I: *Am. J. Epidemiol.* **2002**, 156, 445-453.
- [53] D. Commenges, V. Scotet, S. Renaud, H. Jacqmin-Gadda, P. Barberger-Gateau, J.F. Dartigues, *Eur. J. Epidemiol.* **2000**, 16, 357-363.
- [54] M.C. Morris, D.A. Evans, J.L. Bienias, C.C. Tangney, D.A. Bennett, N. Aggarwal, R.S. Wilson, P.A. Scherr, *ScDJAMA* **2002**, 287, 3230-3237.
- [55] C. Garcia-Viguera, P. Bridle, *Food Chem.* **1995**, 54, 349–352.
- [56] M.I. Gil, C. Garcia-Viguera, P. Bridle, F.A. Tomas-Barberan, *Z. Lebensm., Unters. Forsch. A* **1995**, 200, 278–281.
- [57] Z. Demianova, H. Siren, R. Kuldvee, M.L. Riekkola, *Electrophoresis* **2003**, 24, 4264-4271.
- [58] M.A. Rodriguez-Delgado, J.P. Perez, R. Corbella, G. Gonzalez, F.J. Garcia Montelongo, *J. Chromatogr. A* **2000**, 871, 427-438.
- [59] J. Worapatphoka, K.O. Intarapichet, K. Indrapichate, *Food Chem.* **2007**, 104, 1485-1490.
- [60] J. Pazourek, D. Gajdosova, M. Spanila, M. Farkova, K. Novotna, J. Havel, *J. Chromatogr. A* **2005**, 1081, 48–54.
- [61] L. Arce, M.T. Tena, A. Rios, M. Valcarcel, *Anal. Chim. Acta* **1998**, 359, 27-38.

- [62] R. Hamoudova, M. Urbanek, M. Pospisilova, M. Polasek, *J. Chromatogr. A* **2004**, 1032, 281–287.
- [63] X. Gu, Q. Chu, M. O'Dwyer, M. Zeece, *J. Chromatogr. A* **2000**, 881, 471–481.
- [64] J. Pazourek, G. Gonzalez, A.L. Revilla, J. Havel, *J. Chromatogr. A* **2000**, 874, 111–119.
- [65] B.C. Prasongsidh, G.R. Skyrrey, *Food Chem.* **1998**, 62, 355–358.
- [66] R. Saenz-Lopez, P. Fernandez-Zurbano, M.T. Tena, *J. Chromatogr. A* **2003**, 990, 247–258.
- [67] D.N. Heiger, In *High Performance Capillary Electrophoresis – An Introduction*. 2nd ed., Hewlett-Packard Company **1992**, France.
- [68] D.A. Skoog, J.F. Holler, T.A. Nieman, *Αρχές της ενόργανης ανάλυσης*, 5^η έκδοση, Εκδόσεις Κωσταράκη, **2007**.
- [69] W.M.A. Niessen, U.R. Tjaden, J.van der Greef, *J. Chromatogr.* **1993**, 636, 3–19.
- [70] S.F.Y. Li, *Capillary Electrophoresis – Principles, Practice and Applications (Journal of Chromatography Library 1992, Vol. 52)*, Elsevier, Amsterdam.
- [71] J.W. Jorgenson, K.D. Lukacs, *Anal. Chem.* **1981**, 53, 1298–1302.
- [72] S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando, *Anal. Chem.* **1984**, 56, 111–113.
- [73] L.A. Holland, N.P. Chetwyn, M.D. Perkins, S.M. Lunte, *Pharm. Res.* **1997**, 14, 372–387.
- [74] B. Chankvetadze, In *Capillary Electrophoresis in chiral analysis*, John Wiley & Sons Ltd **1997**, London, UK.
- [75] H.V. Helmholtz, *Wiedemanns Ann. (Ann. Phys., Leipzig)*, **1877**, 7, 337.
- [76] A. Cohen, B.L. Karger, *J. Chrom.* **1987**, 397, 409–417.
- [77] S.A. Shamsi, *Electrophoresis* **2002**, 23, 4036–4051.
- [78] Ι.Ν. Παπαδογιάννης, Β.Φ. Σαμανίδου, *Ενόργανη Χημική Ανάλυση*, Εκδόσεις Πήγασος **2001**, Θεσσαλονίκη.
- [79] Θ.Π. Χατζηιωάννου, Μ.Α. Κουπάρης, *Ενόργανη Ανάλυση*, Εκδόσεις Δ. Μαυρομάτη **1990**, Αθήνα.
- [80] R.D. Smith, C.J. Barinaga, S.R. Udseth, *Anal. Chem.* **1998**, 60, 1948–1952.
- [81] J.F. Banks, *Electrophoresis* **1997**, 18, 2255–2266.
- [82] M. Yamashita, J.B. Fenn, *J. Phys. Chem.* **1984**, 88, 4671–4675.
- [83] N.B. Cech, C.G. Enke, *Mass Spectrom. Rev.* **2001**, 20, 362–387.
- [84] D.C. Taflin, T.L. Ward, E.J. Davis, *Langmuir* **1989**, 5, 376–384.

- [85] M. Dole, L.L. Mack, R.L. Hines, R.C. Mobley, L.D. Ferguson, M.B. Alice, *J. Chem. Phys.* **1968**, 49, 2240-2249.
- [86] J.V. Iribarne, B.A. Thomson, *J. Chem. Phys.* **1976**, 64, 2287-2294.
- [87] J. Ohnesorge, C. Sanger-van de Griend, H. Watzig, *Electrophoresis* **2005**, 26, 2360-2375.
- [88] Y. Sun, N. Fang, D.D. Chen, K.K. Donkor, *Food Chem.* **2008**, 106, 415-420.
- [89] M.A. Rodriguez-Delgado, S. Malovana. J.P. Perez, T. Borges, F.J. Garcia Montelongo, *J. Chromatogr. A* **2001**, 912, 249-257.
- [90] A. Kavalirova, M. Pospisilova, R. Karlicek, *Anal. Chim. Acta* **2004**, 525, 43.
- [91] D.A. Armbruster, M.D. Tillman, L.M. Hubbs, *Clin. Chem.* **1994**, 40, 1233-1238.
- [92] J.P. Foley, J.G. Dorsey, *Chromatographia* **1984**, 18, 503-511.
- [93] S. Zhang, S. Dong, L. Chi, P. He, Q. Wang, Y. Fang, *Talanta* **2008**, 76, 780-784.
- [94] S.P. Wang, K.J. Huang, *J. Chromatogr. A* **2004**, 1032, 273-279.
- [95] J.A.B. Baptista, J.F. da P. Tavares, R.C.B. Carvalho, *Food Res. Intern.* **2001**, 34, 345-355.
- [96] M. Luo, H. Lu, H. Ma, L. Zhao, X. Liu, S. Jiang, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, 44, 881-886.
- [97] J. Chen, S.L. Li, P. Li, Y. Song, X.Y. Chai, D.Y. Ma, *J. Sep. Sci.* **2005**, 28, 365-372.
- [98] Z.Y. Ren, Y. Zhang, Y.P. Shi, *Talanta* **2009**, 78, 959-963.
- [99] A. Zotou, E. Frangi, *Chromatographia* **2008**, 67, 789-793.
- [100] L. Geiser, S. Cherkaoui, J.L. Veuthey, *J. Chromatogr. A* **2000**, 895, 111-121.
- [101] S. Sentellas, E. Moyano, L. Puignou, M.T. Galceran, *Electrophoresis* **2003**, 24, 3075-3082.
- [102] M.J. Hilhorst, G.W. Somsen, G.J. de Jong, *J. High Resol. Chromatogr.* **1998**, 21, 608-612.
- [103] P. Jac, M. Polasek, M. Pospisilova, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, 40, 805-814.
- [104] S.F. Wang, J.Y. Zhang, X.G. Chen, Z.D. Hu, *Chromatographia* **2004**, 59, 507-511.
- [105] O.S. Wolfbeis, M. Leiner, P. Hochmuth, H. Geiger, *Ber. Bunsenges Phys. Chem.* **1984**, 88, 795-767.
- [106] M. Vaheer, M. Koel, *J. Chromatogr. A* **2003**, 990, 225-230.
- [107] P. Pietta, P. Mauri, A. Bruno, C. Gardana, *Electrophoresis* **1994**, 15, 1326-1331.
- [108] C.P. Palmer, *Electrophoresis* **2000**, 21, 4054-4072.
- [109] A. Dobashi, M. Hamada, Y. Dobashi, *Anal. Chem* **1995**, 67, 3011-3017.
- [110] P. Li, S.P. Li, Y.T. Wang, *Electrophoresis* **2006**, 27, 4808-4819.

- [111] Ph. Schmitt-Kopplin, N. Hertkorn, A.W. Garrison, D. Freitag, A. Kettrup, *Anal. Chem.* **1998**, 70, 3798-3808.
- [112] R. Gotti, *J. Pharm. Biom. Anal.* **2011**, 55, 775-801.
- [113] C.D. Stalikas, *J. Sep. Sci.* **2007**, 30, 3268-3295.
- [114] A.C. Cordova, L.S.M. Jackson, D.W. Berke-Schlessel, B.E. Sumpio, *J. Am. Coll. Surg.* **2005**, 200, 3, 428-439.
- [115] S.F. Price, P.J. Breen, M. Valladao, B.T. Watson, *Am. J. Enol. Vitic.* **1995**, 46, 187-194.
- [116] J.G. Ritchey, A.L. Waterhouse, *Am. J. Enol. Viticulture* **1999**, 50, 91-100.
- [117] D.M. Goldberg, E. Tsang, A. Karumanchiri, E.P. Diamandis, G. Soleas, E. Ng, *Anal. Chem.* **1996**, 68, 1688-1694.
- [118] C. Dominguez, D.A. Guillen, C.G. Barroso, *J. Chromatogr. A* **2001**, 918, 303-310.
- [119] L. Geiser, S. Rudaz, J.L. Veuthey, *Electrophoresis* **2003**, 24, 3049-3056.
- [120] H.L. Cheng, M.C. Tseng, P.L. Tsai, G.R. Her, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2001**, 15, 1473-1480.
- [121] C.Y. Tsai, G.R. Her, *J. Chromatogr. A* **1996**, 743, 315-321.
- [122] E. Varesio, S. Cherkaoui, J.L. Veuthey, *J. High Resol. Chromatogr.* **1998**, 21, 653-657.
- [123] R. Mol, E. Kragt, I. Jimidar, G.J. de Jong, G.W. Somsen, *Electrophoresis* **2006**, 843, 283-288.
- [124] S.A. Shamsi, *Anal. Chem.* **2001**, 73, 5103-5108.
- [125] M. Thevis, F. Wilkens, H. Geyer, W. Schanzer, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, 20, 3393-3402.
- [126] E.F. Hilder, C.W. Klampfl, W. Buchberger, P.R. Haddad, *Electrophoresis* **2002**, 23, 414-420.
- [127] J. Zheng, M.W. Jann, Y.Y. Hon, S.A. Shamsi, *Electrophoresis* **2004**, 25, 2033-2043.
- [128] J. Zheng, S.A. Shamsi, *Anal. Chem.* **2003**, 75, 6295-6305.
- [129] U.L. Peri-Okonny, E. Kenndler, R.J. Stubbs, N.A. Guzman, *Electrophoresis* **2003**, 24, 139-150.
- [130] S. Terabe, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1992**, 10, 705-715.
- [131] S. Cherkaoui, J.L. Veuthey, *Electrophoresis* **2002**, 23, 442-448.
- [132] A. Baldacci, F. Prost, W. Thormann, *Electrophoresis* **2004**, 25, 1607-1614.
- [133] C.S. Liu, X.F. Li, D. Pinto, E.B. Hansen, C.E. Cerniglia, N.J. Dovichi, *Electrophoresis* **1998**, 19, 3183-3189.

- [134] G. Lefevre, M. Allison, Y.Y. Ho, *J. Clin. Pharmacol.* **2008**, 48, 246-252.

ΕΙΡΗΝΗ Ν. ΝΙΚΟΛΑΟΥ