



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΗΛΕΚΤΡΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ ΚΑΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ

**Ανακάλυψη βιοδεικτών με τη χρήση NMR και MS
μεταβολομικής. Εφαρμογή στο διαβήτη**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

του

ΚΟΥΦΟΠΟΥΛΟΥ ΝΙΚΗΦΟΡΟΥ

Επιβλέπων : Δημήτρης-Διονύσης Γ. Κουτσούρης
Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Αθήνα, Μάρτιος 2015



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΗΛΕΚΤΡΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ
ΚΑΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ

Ανακάλυψη βιοδεικτών με τη χρήση NMR και MS μεταβολομικής. Εφαρμογή στο διαβήτη

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

του

ΚΟΥΦΟΠΟΥΛΟΥ ΝΙΚΗΦΟΡΟΥ

Επιβλέπων : Δημήτρης-Διονύσης Γ. Κουτσούρης
Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Εγκρίθηκε από την τριμελή εξεταστική επιτροπή την 23^η Μαρτίου 2015.

(Υπογραφή)

.....
Δημήτριος Κουτσούρης
Καθηγητής Ε.Μ.Π.

(Υπογραφή)

.....
Γεώργιος Ματσόπουλος
Αναπληρωτής Καθηγητής
Ε.Μ.Π.

(Υπογραφή)

.....
Δημήτριος Φωτιάδης
Καθηγητής Πανεπιστημίου
Ιωαννίνων

Αθήνα, Μάρτιος 2015

(Υπογραφή)

.....

ΚΟΥΦΟΠΟΥΛΟΣ ΝΙΚΗΦΟΡΟΣ

Διπλωματούχος Ηλεκτρολόγος Μηχανικός και Μηχανικός Υπολογιστών Ε.Μ.Π.

© 2015 – All rights reserved

Περίληψη

Μεταβολομική είναι η επιστημονική μελέτη των χημικών διαδικασιών που αφορούν τους μεταβολίτες. Συγκεκριμένα, η μεταβολομική είναι η συστηματική μελέτη των μοναδικών αποτυπωμάτων των χημικών ουσιών που συγκεκριμένες κυτταρικές διεργασίες "αφήνουν πίσω τους", ή αλλιώς, η μελέτη των μικρομοριακών τους προφίλ. Η μεταβολόμη (metabolome) αντιπροσωπεύει τη συλλογή όλων των μεταβολιτών σε ένα βιολογικό κύτταρο, ιστό, βιολογικό όργανο ή οργανισμό, που είναι τα τελικά προϊόντα των κυτταρικών διαδικασιών. Η παρούσα διπλωματική εργασία ασχολείται με τη μελέτη αναλυτικών μεθόδων που χρησιμοποιούνται στη μεταβολομική και συγκεκριμένα με τη φασματομετρία μάζας και τη φασματομετρία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού. Από τη λήψη και προετοιμασία δειγμάτων, την απόκτηση δεδομένων μέσω των παραπάνω δύο αναλυτικών μεθόδων και την επεξεργασία τους, στην ανάλυση, ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση βιοδεικτών, οι οποίοι είναι μετρήσιμοι δείκτες της σοβαρότητας ή της παρουσίας κάποιας ασθένειας και συγκεκριμένα στη διπλωματική εργασία αυτή, τον σακχαρώδη διαβήτη.

Λέξεις Κλειδιά: <<Μεταβολομική, μεταβολίτες, μεταβολόμη, βιοδείκτες, φασματομετρία μάζας, φασματομετρία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, σακχαρώδης διαβήτης>>

Abstract

Metabolomics is the scientific study of chemical processes involving metabolites. Specifically, metabolomics is the systematic study of the unique fingerprint of the chemicals that specific cellular processes "leave behind", or otherwise, the study of their micromolar profile. The metabolome represents the collection of all metabolites in a biological cell, tissue, organ or biological organism, which are the end products of cellular processes. This thesis deals with the study of analytical methods used in metabolomics and in particular by mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectrometry. Starting from receiving and preparing samples, data acquisition via the above two analytical methods, to the processing, analysis, identification and quantification of biomarkers, which are measurable indicators of severity or the presence of any disease and specifically in this thesis, diabetes.

Keywords: << Metabolomics, metabolites, metabolome, biomarkers, mass spectrometry, nuclear magnetic resonance spectrometry, diabetes >>

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Δημήτρη-Διονύση Κουτσούρη που μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα καθώς και τον κ. Ιωάννη Μακρή για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση του για την εκπόνηση αυτής της εργασίας καθώς και για το χρόνο που μου αφιέρωσε.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου Ιωάννη και Ελένη για τη στήριξή τους καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου, την κοπέλα μου Βαρβάρα για την πολύτιμη βοήθεια και ψυχολογική στήριξη που προσέφερε τις δύσκολες ώρες και τους αγαπημένους μου φίλους Παύλο, Αλμπέρτο και Στέλιο για τις ωραίες αναμνήσεις που έχω όλα αυτά τα χρόνια μέσα από το Πολυτεχνείο.

Πίνακας περιεχομένων

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1	Μεταβολομική	1
1.2	Βιολογικά δείγματα.....	5
1.3	Προετοιμασία δειγμάτων	6
1.4	Εφαρμογές της μεταβολομικής.....	7
2	ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΓΛΥΚΟΖΗ	9
2.1	Ομοιόσταση της γλυκόζης	9
2.2	Σακχαρώδης Διαβήτης.....	14
2.2.1	Στατιστικά στοιχεία	19
2.2.2	Επιπλοκές.....	23
3	ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ (MASS SPECTROMETRY, MS)	29
3.1	Αρχή.....	30
3.2	Οργανολογία	30
3.2.1	Συστήματα εισαγωγής δείγματος.....	31
3.2.2	Πηγές Ιονισμού.....	33
3.2.3	Αναλυτές μαζών στη μοριακή φασματομετρία μάζας.....	39
3.2.4	Ανιχνευτές στη μοριακή φασματομετρία μάζας.....	45
3.3	Μοριακά φάσματα μάζας.....	47
3.3.1	Βασικές έννοιες στα μοριακά φάσματα μάζας	47
3.3.2	Ερμηνεία μοριακών φασμάτων μάζας.....	49
3.4	Δυνατότητες και εφαρμογές της μοριακής φασματομετρίας μάζας	51
4	ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ (NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE SPECTROMETRY, NMR)	52
4.1	Θεωρία του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού.....	53
4.2	Φάσμα NMR.....	59
4.3	Οργανολογία	62
4.4	Εφαρμογές της φασματομετρίας NMR.....	66

5	ΕΥΡΕΣΗ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ	69
5.1	Εισαγωγή.....	69
5.2	Υλικά και μέθοδοι.....	72
5.2.1	Συνθήκες SPME και GC-MS.....	73
5.2.2	¹ H NMR Φασματομετρία.....	73
5.2.3	Ταυτοποίηση και ποσοτικός προσδιορισμός μεταβολιτών	74
5.2.4	Στατιστική ανάλυση.....	74
5.3	Αποτελέσματα και συζήτηση.....	75
5.3.1	Συνθήκες εκχύλισης SPME.....	75
5.3.2	Αναγνώριση και ποσοτικοποίηση μεταβολιτών	77
5.4	Βιοδείκτες	80
5.5	Συμπεράσματα και μελλοντική έρευνα.....	85
6	Βιβλιογραφία.....	86

1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Μεταβολομική

Το ανθρώπινο σώμα είναι ένα πολύπλοκο εργαστήριο όπου λαμβάνουν χώρα εκατομμύρια χημικές αντιδράσεις. Ένας ολόκληρος κόσμος που η επιστήμη προσπαθεί να κατανοήσει στο μεγαλύτερο δυνατό βαθμό. Χιλιάδες χημικά συστατικά αντιδρούν μεταξύ τους για την διατήρηση της ζωής, μια διαδικασία που ονομάζουμε μεταβολισμό. Ενώ έχει πραγματοποιηθεί μεγάλη πρόοδος στους τομείς της γονιδιωματικής και πρωτεομικής, η προσθήκη συνεχώς νέων πληροφοριών πάνω στις ανθρώπινες ασθένειες είναι άκρως επιθυμητή καθώς βοηθούν στη διάγνωση, πρόγνωση και εύρεση θεραπευτικής αγωγής των ασθενειών αυτών. Για αυτό το λόγο η ανίχνευση μεταβολιτών που εμπλέκονται σε ανθρώπινες ασθένειες ή που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων, με τη χρήση κυττάρων, ιστών, οργάνων ή βιολογικών υγρών έχει έρθει στο προσκήνιο τα τελευταία χρόνια.¹⁻⁶ Ο πολλά υποσχόμενος τομέας της μεταβολομικής και οι συναφείς τομείς της μεταβονομικής και προφίλ μεταβολιτών, περιλαμβάνουν την ποσοτική ανίχνευση πολλαπλών μικρών μορίων μεταβολιτών σε βιολογικά συστήματα. Μια καλύτερη κατανόηση των βιολογικών συστημάτων σε μοριακό επίπεδο, αναμένεται σαν αποτέλεσμα, από την προσέγγιση της μεταβολομικής, ειδικά όταν συνδυάζεται με

πληροφορίες από τη γονιδιωματική και πρωτεομική. Ίσως και ακόμα πιο σημαντικό είναι το γεγονός ότι η «εξατομικευμένη ιατρική» αναμένεται να γίνει πραγματικότητα μέσα από την πρόοδο της μεταβολομικής και των υπόλοιπων «ομικών» επιστημών.⁷ Ένα σημαντικό πλεονέκτημα της εφαρμογής της μεταβολομικής πηγάζει από την ικανότητα που έχει να ανιχνεύει πολλές εκατοντάδων μεταβολιτών παράλληλα, η οποία παρέχει μια αποτελεσματική μέθοδο για την παρακολούθηση βιοχημικών μεταβολών. Πιστεύεται ότι το ανθρώπινο σώμα περιέχει περίπου 3000 έως 5000 ανιχνεύσιμους μεταβολίτες, από τους οποίους ένα μεγάλο ποσοστό έχει ήδη αναγνωριστεί.⁸ Επιπλέον, οι μεταβολές συγκέντρωσης μεταβολιτών συχνά ενισχύονται σε σύγκριση με εκείνες της γονιδιακής έκφρασης ή επιπέδων πρωτεϊνών, καθιστώντας έτσι την ανίχνευση προφίλ μεταβολιτών μια σχετικά ευαίσθητη παράμετρο της βιολογικής κατάστασης. Οι αλλαγές στα βιολογικά προφίλ εν συνεχεία βασίζονται στην ανίχνευση διαταραχών στις συγκεντρώσεις συγκεκριμένων ενδογενών μεταβολιτών που σχετίζονται με βασικές νόσους ή άλλα συγκεκριμένα κυτταρικά μονοπάτια. Έτσι η μεταβολομική μπορεί να αποκαλύψει πολύ σημαντικές πληροφορίες που είναι στενά συνδεδεμένες με την τρέχουσα νόσο ή την θεραπευτική της κατάσταση. Γενικότερα, το μεταβολικό προφίλ των βιολογικών δειγμάτων επηρεάζεται από ένα πλήθος παραγόντων όπως η διατροφή, η ηλικία, η εθνικότητα, την φαρμακευτική αγωγή που μπορεί να ακολουθεί κάποιος, τον τρόπο ζωής, και αυτοί οι παράγοντες πρέπει να ληφθούν υπόψιν προκειμένου να παρθούν συγκεκριμένες πληροφορίες για τη νόσο.² Μια σειρά από άρθρα δημοσιεύτηκαν τα οποία παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τις μεθόδους της φασματομετρίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και μοριακής φασματομετρίας μάζας (MS) και άλλους συναφείς τομείς, διάφορες εφαρμογές τους και τεχνολογίες, καθώς και τα πλεονεκτήματα και τους περιορισμούς από την πλευρά της μεταβολομικής.⁸⁻¹⁵

Μεταξύ των αναλυτικών τεχνικών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη μεταβολομική, η φασματομετρία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και η μοριακή φασματομετρία μάζας (MS) είναι οι πιο κοινές. Ένας αριθμός μεθοδολογιών είναι υπό ανάπτυξη πάνω σε αυτούς τους δύο τεχνολογικούς τομείς με σκοπό την εφαρμογή τους σε δύσκολα δείγματα τα οποία αναλύονται σε μελέτες μεταβολομικής. Η φασματομετρία NMR είναι γνωστή ως μία από τις πρωτεύοντες μεθόδους για τις αναλύσεις πολυσύνθετων μιγμάτων καθώς απαιτεί ελάχιστη ή καθόλου προετοιμασία του δείγματος, είναι ταχεία, μη καταστροφική και μη επεμβατική, και παρέχει

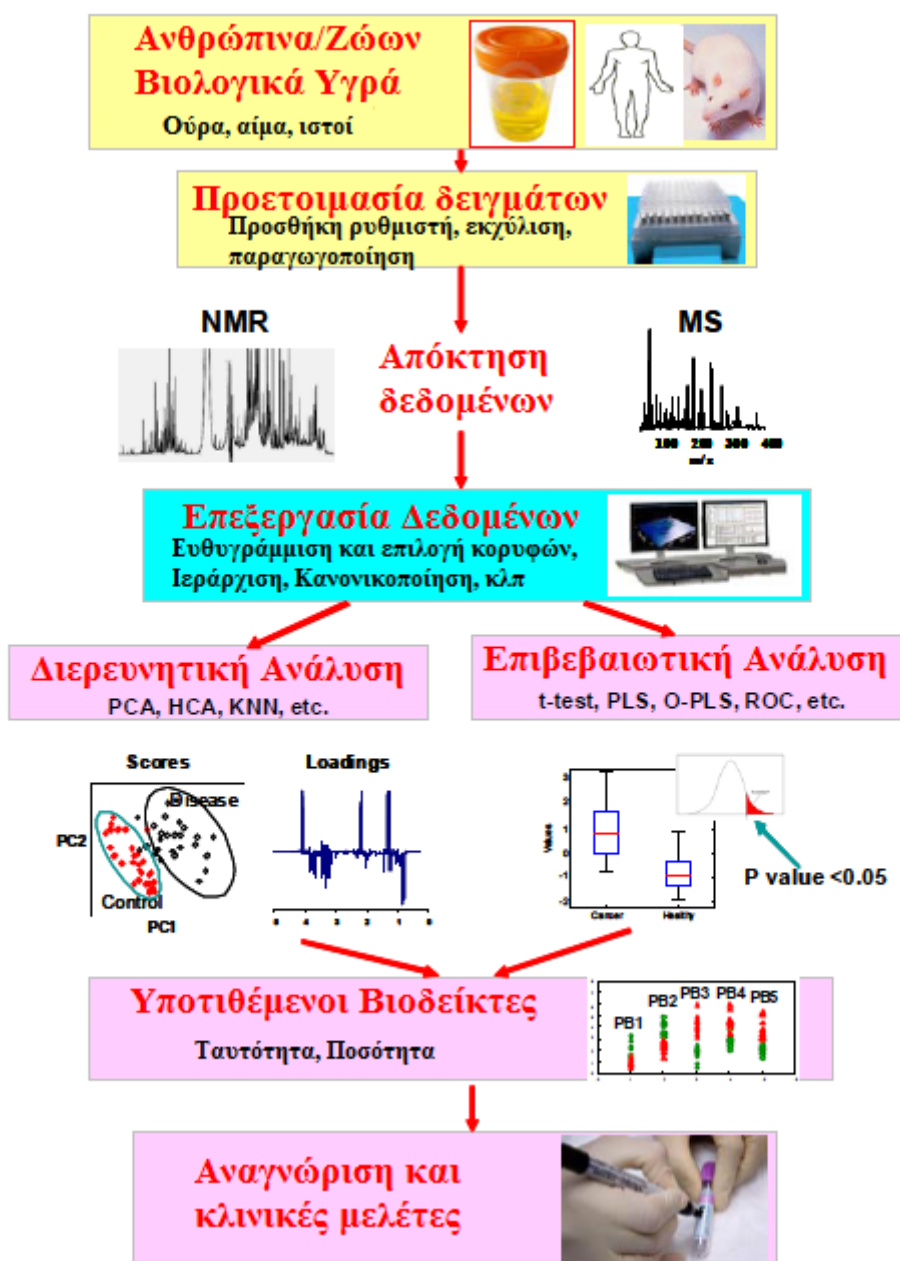
εξαιρετικά επαναλήψιμα αποτελέσματα αφού έχει συντελεστή μεταβλητότητας της τάξεως του 1-2%. Κορυφές στα φάσματα NMR μπορούν να ταυτοποιηθούν με αξιοπιστία με συγκεκριμένα μεταβολικά είδη, με βάση χημικές μετατοπίσεις και πολλαπλά μοτίβα, για αυτό το NMR παρέχει ένα πλούτο πληροφοριών σχετικά με την ταυτότητα και την ποσότητα ενός μεγάλου αριθμού μεταβολιτών παράλληλα από ένα μόνο πείραμα. Με την προηγμένη υψηλής απόδοσης NMR μεθοδολογία, έως και 200 δείγματα μπορούν να μετρηθούν σε μια μέρα με τη βοήθεια ανιχνευτών ροής-έγχυσης και αυτοματοποιημένους χειριστές υγρών. Το όριο ανίχνευσης μπορεί να μειωθεί επιπλέον σε δέκατα του ng (νανογραμμάριου) με τη χρήση μαγνητών υψηλού πεδίου, κρυογονικά ψυχόμενων ανιχνευτών, ανιχνευτές να χειρίζονται πολύ μικρά δείγματα και μεθοδολογίες οι οποίες «ζευγαρώνουν» το NMR με την υγρή χρωματογραφία.¹⁶⁻¹⁸ Από την άλλη πλευρά, η εγγενής υψηλής ευαισθησίας (συνήθως σε επίπεδο pg, πικογραμμάριο) MS ανίχνευση, την κάνει μια πολύ σημαντική μέθοδο για τη μέτρηση μεταβολιτών σε περίπλοκα βιολογικά υγρά. Μια ποικιλία τριών από τις μεθόδους της MS σε συνδυασμό με τεχνικές διαχωρισμού όπως αέρια χρωματογραφία (GC) και υγρή χρωματογραφία (LC) και οι παραλλαγές τους έχουν χρησιμοποιηθεί σε πολλές έρευνες μεταβολομικής.¹⁹⁻²² Πρόσφατα, μια ποικιλία ελπιδοφόρων μεθόδων εισαγωγής ατμοσφαιρικών δειγμάτων αναπτύχθηκε στη φασματομετρία μάζας (MS) όπου ουσιαστικά δεν απαιτείται καθόλου διαχωρισμός ή προετοιμασία του δείγματος.²³⁻²⁵

Δεδομένα από πειράματα με χρήση NMR και MS είναι γενικά περίπλοκα επειδή περιέχουν ποιοτικές/ποσοτικές πληροφορίες από αρκετές εκατοντάδες μεταβολίτες. Πολυδιάστατη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιείται για τη μείωση των δεδομένων και για τη διαφοροποίηση των δειγμάτων βιολογικών υγρών σε «περίπτωση» και «έλεγχο» με βάση τις διαφορές στα σήματα των διαφόρων μεταβολιτών.

Υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία στατιστικών μεθοδολογιών και πολλές είναι πλέον εύκολα προσβάσιμες είτε μέσω εμπορικού λογισμικού είτε ακόμα και δωρεάν, και παρέχουν εξαιρετικά χρήσιμα εργαλεία για το φιλτράρισμα μεγάλων όγκων δεδομένων.²⁶⁻²⁸ Επιπλέον, αυτές οι προσεγγίσεις χρησιμοποιούνται για την εξαγωγή ενός βιοδείκτη ή και σετ από βιοδείκτες με τις καλύτερες ιδιότητες για την εκτίμηση της κατάστασης της νόσου. Επαλήθευση των συγκεκριμένων υποθετικών βιοδεικτών

έχει μεγάλη σημασία καθώς είναι η βιολογική κατανόηση της ασθένειας και μπορεί να παρέχει επιπρόσθετη επικύρωση σε εφαρμογές της μεταβολομικής.

Στα ακόλουθα, ένας αριθμός από βασικές διαδικασίες περιγράφονται σε ένα διάγραμμα ροής εργασίας και συνοψίζονται θεματικά στο σχήμα 1.1



Σχήμα 1.1: Σχηματική αναπαράσταση της ροής εργασίας της μεταβολομικής. PCA: Principal component analysis; HCA: Hierarchical cluster analysis; KNN: K-nearest neighbor algorithm; ROC: Receiver operating characteristic; PLS: Partial least squares; O-PLS: Partial least square analysis with orthogonal signal correction; TOCSY: Total correlation spectrometry

1.2 Βιολογικά δείγματα

Τα δείγματα ορού ή πλάσματος, ούρων και αίματος είναι τα πιο κοινά χρησιμοποιούμενα βιολογικά υγρά για μελέτες μεταβολομικής για τον απλό λόγο ότι και τα δύο περιέχουν εκατοντάδες χιλιάδες ανιχνεύσιμους μεταβολίτες και μπορούν να ληφθούν καθόλου ή ελάχιστα επεμβατικά. Ένας αριθμός από άλλα υγρά όπως είναι το εγκεφαλονωτιαίο υγρό, η χολή, σπερματικό υγρό, αμνιακό υγρό, αρθρικό υγρό, υγρά από το έντερο και το σάλιο μπορούν επίσης να μελετηθούν.²⁹⁻³³ Πιο πρόσφατα, μεταβολικά προφίλ ανέπαφων ιστών και των λιπιδίων τους και εκχυλίσματα υδατικών μεταβολιτών αποκτούν όλο και περισσότερη σημασία στην ανακάλυψη βιοδεικτών³⁴ βασιζόμενοι στο γεγονός ότι όταν αλλαγές βιολογικής κατάστασης πραγματοποιούνται, είναι συγκεντρωμένες στον ιστό προέλευσης.

Σε σχέση με τα υπόλοιπα βιολογικά υγρά, η ανάλυση ούρων παρέχει συγκεκριμένα προφανή πλεονεκτήματα. Η σχετικά χαμηλή συγκέντρωση πρωτεϊνών και η συγκέντρωση μικρού μοριακού βάρους ενώσεων ελαχιστοποιούν τον χρόνο προετοιμασίας του δείγματος και έχει ως αποτέλεσμα υψηλής ποιότητας μετρήσεις λόγω του στενού πλάτους των γραμμών των φασματικών κορυφών στο φάσμα του NMR. Αυτά τα χαρακτηριστικά ενισχύουν τη διαδικασία της ταυτοποίησης βιοδεικτών με NMR τόσο για διαγνωστικούς λόγους όσο και για λόγους παρακολούθησης. Ωστόσο, η υψηλή περιεκτικότητα αλάτων στα ούρα είναι πρόκληση για μετρήσεις με MS καθώς τα δείγματα απαιτούν κάποια προεπεξεργασία.

Το αίμα διατηρεί τη φυσιολογική ομοιόστασή του στο ανθρώπινο σώμα με συνεχείς ρυθμιστικούς μηχανισμούς και κατά συνέπεια το μεταβολικό προφίλ του παρέχει μια συνολική εικόνα της στιγμιαίας μεταβολικής κατάστασης. Επιπλέον, το αίμα διαχέεται σε όλα τα ζωντανά κύτταρα του ανθρώπινου οργανισμού και όπως αναμένεται είναι φυσιολογικό να περιέχει ζωτικής σημασίας πληροφορίες σχετικά με σχεδόν κάθε κύτταρο. Σε αντίθεση με τα ούρα, το φάσμα NMR του ορού / πλάσματος περιλαμβάνει τόσο περιορισμένα σήματα από μικρού μοριακού βάρους μεταβολίτες όσο και ευρεία σήματα από πρωτεΐνες και λιπίδια. Μια ποικιλία από φασματικές μεθόδους επεξεργασίας χρησιμοποιούνται για την επιλεκτική ανίχνευση σημάτων μικρών ή μεγάλων μορίων. Η MS ανάλυση ορού διεξάγεται χρησιμοποιώντας συνήθως τη μέθοδο της εκχύλισης ενώ στην περίπτωση της GC/MS, με διαδικασίες παραγωγοποίησης.

Η δημιουργία μεταβολικών προφίλ χρησιμοποιώντας ιστούς πήρε μεγάλη έκταση ως μια καλύτερη προσέγγιση στην κατανόηση της μοριακής βάσης διαφόρων ασθενειών.³⁴ Το ενδιαφέρον αυτό πηγάζει από το γεγονός ότι οι βιοδείκτες λόγω παθοφυσιολογικού στρες αναμένεται να είναι συγκεντρωμένοι σε μεγάλο ποσοστό στην παθολογική πηγή για ασθένειες όπως ο καρκίνος. Οι τελευταίες τεχνολογικές εξελίξεις στο NMR έχουν μειώσει την απαιτούμενη ποσότητα δείγματος τόσο πολύ, που φτάνει μόλις μερικά mg, όπου ακόμα και ιστοί βιοψίας είναι επαρκείς για να αποκτήσουμε φάσματα NMR πολύ καλής ποιότητας. Τα πλούσια μεταβολικά προφίλ των ιστών πιστεύεται ότι είναι ιδιαιτέρως χρήσιμα για την καθοδήγηση της ανίχνευσης των βιοδεικτών σε σχετικά πιο εύκολα προσβάσιμα βιολογικά υγρά.

1.3 Προετοιμασία δειγμάτων

Η ποιοτική προετοιμασία των δειγμάτων είναι σημαντικός παράγοντας για την επιτυχία της εκάστοτε μεταβολομικής μελέτης. Αναλυτικές διαδικασίες στη συλλογή, αποθήκευση και προετοιμασία των βιολογικών υγρών ή δειγμάτων ιστών για NMR ανάλυση παρέχονται σαν οδηγό στις εφαρμογές της μεταβολομικής.³⁵ Συνοπτικά, τα ούρα, ο ορός και το πλάσμα συνήθως απαιτούν ελάχιστη προετοιμασία όπως προσθήκη αζιδίου του νατρίου για περιορισμό ανάπτυξης βακτηρίων, φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα για τον έλεγχο του pH, άλατα νατρίου όπως DSS και TSP ή DFTMP³⁶ για τη χημική βαθμονόμηση και ποσοτικοποίηση. Δείγματα ιστών, τα οποία μπορούν να αναλυθούν άμεσα με χρήση υψηλής ανάλυσης μαγικής γωνίας περιστροφής (HRMAS) NMR, συχνά υποβάλλονται σε εκχύλιση διαλύτη, ακολουθούμενη από υγρής κατάστασης NMR αναλύσεις. Χημική παραγωγοποίηση και σήμανση ισοτόπων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη βελτίωση της ευαισθησίας και ανάλυσης στην ανίχνευση μεταβολιτών που περιέχουν συγκεκριμένες λειτουργίες.³⁷⁻³⁹

Σε σύγκριση με τις αναλύσεις βασιζόμενες στο NMR, οι αναλύσεις με βάση το MS όπως η GC/MS και η LC/MS συνήθως απαιτούν πιο εντατική προετοιμασία του δείγματος όπως εκχύλιση στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, συχνά αποπρωτεΐνωση και μερικές φορές χημική παραγωγοποίηση. Υπάρχουν πολλές μέθοδοι εκχύλισης, οι οποίες κατηγοριοποιούνται είτε σε υγρής-υγρής εκχύλισης (Liquid-Liquid Extraction) είτε σε στερεάς φάσης εκχύλιση (Solid-Phase Extraction). Η LLE εκχύλιση επιλέγεται συχνότερα για την εκχύλιση ιστών διότι διαφορετικού

τύπου διαλύτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τους εκάστοτε επιθυμητούς μεταβολίτες. Η εκχύλιση SPE χρησιμοποιείται ευρέως σε αναλύσεις μεταβολικών προφίλ, στην οποία ειδικά στερεά προσροφητικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να διατηρήσουν παρεμβαλλόμενες ουσίες, ενώ επιτρέπουν σε αναλύτες οι οποίοι μας ενδιαφέρουν να διέρχονται. Η εκχύλιση συχνά ταυτίζεται με την αποπρωτεΐνωση. Για παράδειγμα η μεθανόλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την καθίζηση των πρωτεϊνών, και ταυτόχρονα να επιτρέπει την αποτελεσματική εκχύλιση μεταβολιτών από δείγματα όπου περιέχουν πρωτεΐνες.

Η άμεση έκχυση δειγμάτων έχει το πλεονέκτημα ότι ιδανικά κανένας μεταβολίτης δεν χάνεται κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας του δείγματος και παραμένουν πειραματικά βιώσιμοι. Για παράδειγμα δείγματα ούρων ή αραιωμένων ούρων αναλύονται κατ' ευθείαν μέσω LCESI-MS (Υγρής χρωματογραφίας - Ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό - Φασματομετρία μάζας)^{40,41}. Ο ιονισμός με νάνο-ηλεκτροψεκασμό (nanoESI) είναι πολλά υποσχόμενος στην ανάλυση ακατέργαστων βιολογικών δειγμάτων (π.χ. ούρα και αμνιακό υγρό) και επιτρέπει την ελαχιστοποίηση της καταστολής των ιόντων και μειώνεται η πιθανότητα της πηγής μόλυνσης.^{40,41} Παρ' όλα αυτά, για δείγματα όπως αίμα και ιστοί, τα οποία έχουν υψηλή περιεκτικότητα πρωτεϊνών μπορούν επίσης να προκαλέσουν μια ραγδαία επιδείνωση της απόδοσης του οργάνου λόγω μόλυνσής τους από μη πτητικά υπολείμματα.

1.4 Εφαρμογές της μεταβολομικής

Ο τομέας της μεταβολομικής βασιζόμενος στο NMR και στο MS, παρουσιάζει ένα εκθετικά αυξανόμενο αριθμό μελετών σε ένα μεγάλο εύρος εφαρμογών. Πολλές από αυτές τις μελέτες έχουν γίνει ειδικά πάνω στον τομέα της διάγνωσης ασθενειών^{10,14,49}, ανακάλυψης φαρμάκων^{12,50,51}, της διατροφής^{15,52,53}, των φυτών⁵⁴⁻⁵⁶, της τοξικολογίας⁵⁷⁻⁵⁹, της περιβαλλοντικής επιστήμης^{6,13,60} και της μικροβιολογίας⁶¹, τα οποία υπογραμμίζουν την αυξανόμενη επίδραση του πεδίου της μεταβολομικής.

Στην ιατρική, οδηγούμενοι από την πιθανότητα έγκαιρης ανίχνευσης νόσων και της θεραπείας τους, υπήρξε μια τρομακτική ανάπτυξη της μεταβολομικής^{10,18,21,22,40,43,62-64}. Η μη επεμβατική προσέγγιση είναι άκρως χρήσιμη στην αναγνώριση της παρουσίας και της σοβαρότητας νόσων από τα δείγματα ούρων και αίματος που λαμβάνουμε και βελτιώνουν την ακρίβεια των δοκιμών και

παράλληλα μειώνουν άλλου είδους δοκιμές όπως της άκρως επεμβατικής βιοψίας. Μέχρι σήμερα, μια ποικιλία ασθενειών όπως ο καρκίνος^{14,65,66}, ο σακχαρώδης διαβήτης⁶⁷⁻⁷¹, εκ γενετής δυσλειτουργίες του μεταβολισμού^{48,72,73}, το Parkinson⁷⁴, γαστρεντερικών⁷⁵ και καρδιακών νόσων⁷⁶ έχουν διακριθεί με βάση τα μεταβολικά προφίλ του NMR. Ωστόσο, οι περισσότερες από αυτές τις μελέτες είναι σε αρχικό στάδιο ως προς την εύρεση βιοδεικτών για αυτό είναι σημαντικό να πραγματοποιούνται διασταυρώσεις των αποτελεσμάτων που παίρνουμε από τις μελέτες και επανάληψη των ίδιων μελετών σε διαφορετικά δείγματα, έτσι ώστε να γίνεται επαλήθευση της αξιοπιστίας των βιοδεικτών που ανακαλύφθηκαν. Σημαντική πρόοδος έχει σημειωθεί στον τομέα της αξιολόγησης τοξικότητας φαρμάκων σε προκλινική ανακάλυψη^{50,51,58,59} και θεραπευτική παρακολούθησης μέσω φαρμάκων και διατροφής.^{53,77} Ο βασικός στόχος αυτών των μελετών είναι να επιτευχθεί μια πιο προσωποποιημένη θεραπεία⁷⁸.

Η μεταβολομική μέσω του NMR και του MS έχει επίσης μεγάλο αντίκτυπο στον τομέα της περιβαλλοντικής επιστήμης^{6,13,60,79,80} και έχει εφαρμοστεί σε πολυάριθμα ζώα και μικρόβια.^{13,81,82} Τέτοιες μελέτες υπόσχονται μια καλύτερη κατανόηση στην επίδραση που έχει το περιβάλλον στον ανθρώπινο μεταβολισμό.

2

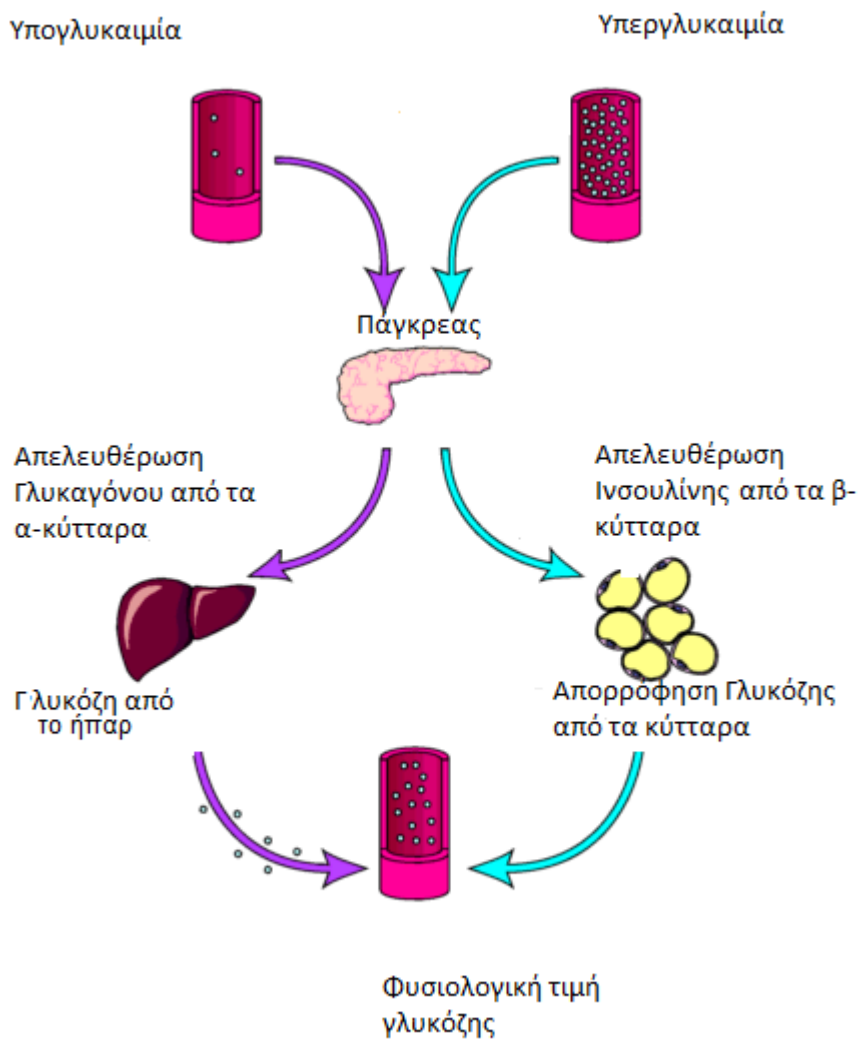
ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΓΛΥΚΟΖΗ

Το ανθρώπινο σώμα είναι ένα πολύπλοκο εργαστήριο όπου λαμβάνουν χώρα εκατομμύρια χημικές αντιδράσεις. Ένας ολόκληρος κόσμος που η επιστήμη προσπαθεί να κατανοήσει στο μεγαλύτερο δυνατό βαθμό. Χιλιάδες χημικά συστατικά αντιδρούν μεταξύ τους για την διατήρηση της ζωής, μια διαδικασία που ονομάζουμε μεταβολισμό. Ένα από τα απαραίτητα συστατικά κάθε κυτταρικού μεταβολισμού αποτελεί η γλυκόζη. Ο οργανισμός μετατρέπει κάθε τροφή που καταναλώνουμε, μέσω του μεταβολισμού, σε γλυκόζη και αυτή εισέρχεται στο εσωτερικό των κυττάρων εξαιτίας της δράσης της ινσουλίνης. Η ινσουλίνη είναι μία ορμόνη που εκκρίνεται από έναν αδένα που βρίσκεται πίσω από το στομάχι και λέγεται πάγκρεας και αυτό παράγει αρκετές ορμόνες. Κύρια λειτουργία της ινσουλίνης αποτελεί η είσοδος της γλυκόζης στο εσωτερικό του κυττάρου¹⁰¹.

2.1 Ομοιόσταση της γλυκόζης

Τα σάκχαρα και τα λιπαρά οξέα αποτελούν τις κύριες πηγές ενέργειας του ανθρώπινου οργανισμού. Αυτά βρίσκονται κυρίως στις τροφές που καταναλώνει ο άνθρωπος. Ο ανθρώπινος οργανισμός καταναλώνει ενέργεια με κάθε κίνηση του σώματος, απλά άλλοτε περισσότερη και άλλοτε λιγότερη. Κάθε τροφή μετατρέπεται σε γλυκόζη, η οποία είναι απαραίτητη για τα κύτταρα. Η γλυκόζη είναι ένας από τους

τρεις διατροφικούς μονοσακχαρίτες, μαζί με τη φρουκτόζη και τη γαλακτόζη, οι οποίοι απορροφώνται άμεσα στην κυκλοφορία του αίματος όπως παράγονται μετά από λήψη γεύματος από το έντερο κατά τη διάρκεια της πέψης. Αποτελεί τον σημαντικότερο υδατάνθρακα στη βιολογία, αφού τα κύτταρα την χρησιμοποιούν ως την πρωταρχική πηγή ενέργειας και ως μέσο μεταβολισμού. Κύριο χαρακτηριστικό της γλυκόζης αποτελεί το γεγονός πως είναι το μόνο θρεπτικό συστατικό που χρησιμοποιείται από τα εγκεφαλικά κύτταρα και το κεντρικό νευρικό σύστημα, γι' αυτό είναι τόσο σημαντική για τον ανθρώπινο οργανισμό με συνέπεια η έλλειψή της να μπορεί να αποβεί μοιραία. Η γλυκόζη παράγεται είτε από τη διαδικασία της γλυκογένεσης είτε από τη διαδικασία της γλυκογενόλυσης¹⁰². Ο οργανισμός προσπαθεί να κρατήσει σταθερή τη ποσότητα γλυκόζης που παρέχεται στα κύτταρα. Αν υπάρξει τώρα περίσσεια γλυκόζης, αποθηκεύεται στο ήπαρ και στους μύες υπό τη μορφή γλυκαγόνου. Αν συμβεί το αντίθετο, ο οργανισμός γνωρίζει την ύπαρξη αποθηκευμένης γλυκαγόνης και έτσι ενεργοποιείται η γλυκόζη και διεγείρει το άτομο να καταναλώσει τροφή. Προκειμένου η γλυκόζη στο αίμα να παραμένει σταθερή, ο ανθρώπινος οργανισμός έχει δύο ορμόνες με αντίθετη δράση: την ινσουλίνη και τη γλυκαγόνη. Η δε ινσουλίνη είναι ικανή να μειώσει αισθητά το επίπεδο της γλυκόζης στο αίμα ενώ η γλυκαγόνη να το αυξήσει, έχουν δηλαδή η ινσουλίνη και η γλυκαγόνη ακριβώς την αντίθετη δράση. Στο παρακάτω σχήμα απεικονίζεται ο μεταβολισμός της γλυκόζης και φαίνεται η αντίθετη δράση των δύο αυτών ορμονών, της ινσουλίνης και της γλυκαγόνης.

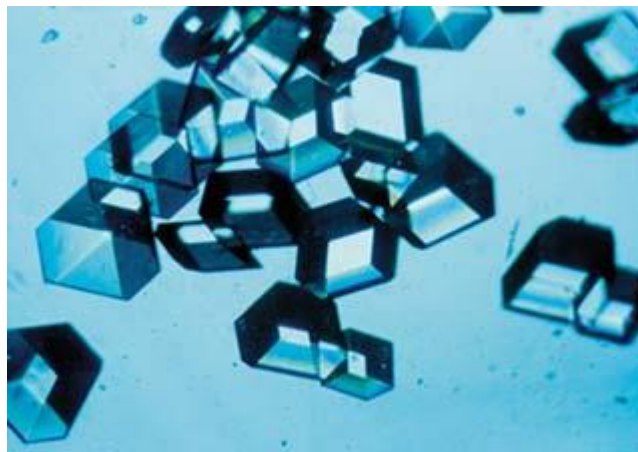


Σχήμα 2.1: Σχηματικό διάγραμμα μεταβολισμού γλυκόζης λαμβάνοντας υπόψη δύο ορμόνες ελέγχου, την ινσουλίνη και την γλυκαγόνη. Παρατηρούμε πως όταν έχουμε υπεργλυκαιμία αναλαμβάνει δράση η ινσουλίνη ενώ στην υπογλυκαιμία αναλαμβάνει δράση η γλυκαγόνη.¹⁰³

Ινσουλίνη

Η ινσουλίνη είναι μία ορμόνη που παράγεται από ομάδες κυττάρων που ονομάζονται νησίδια του Langerhans στο πάγκρεας και παίζει πρωτεύοντα ρόλο στο μεταβολισμό των υδατανθράκων του οργανισμού. Εκκρίνεται από τα β-κύτταρα των παγκρεατικών νησιδίων στην ενδοκρινή μοίρα του παγκρέατος. Είναι μία πρωτεΐνη που αποτελείται από τη σύνδεση δύο πολυπεπτιδικών αλυσίδων με 51 αμινοξέα. Η ινσουλίνη δρα σε όλους τους ιστούς του σώματος (ιδιαίτερα όμως στο ήπαρ, στους μύες και στο λιπώδη

ιστό), βοηθώντας στην πρόσληψη της γλυκόζης από τα κύτταρα. Εκτός από αυτή τη λειτουργία της για τη ρύθμιση της γλυκόζης η ινσουλίνη εμπλέκεται και στην διατήρηση επαρκών ενεργειακών αποθεμάτων ούτως ώστε να καθίσταται εφικτή η ανάπτυξη και η αναπαραγωγή. Το γεγονός ότι το κεντρικό νευρικό σύστημα παίζει ρόλο-κλειδί και στις δύο προαναφερόμενες λειτουργίες, και ότι τόσο το σωματικό βάρος όσο και η γλυκόζη του αίματος ρυθμίζονται κατά κύριο λόγο από την ίδια ορμόνη, αποτελεί αντικείμενο συνεχούς έρευνας. Η σημασία της ινσουλίνης στην εγκεφαλική λειτουργία έχει μελετηθεί πολύ λιγότερο σε σχέση με το ρόλο της στην περιφέρεια. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, εκκρίνεται για να ανταποκριθεί στα υψηλά επίπεδα γλυκόζης αίματος μετά από γεύματα. Κύριος ρόλος της είναι η απομάκρυνση της γλυκόζης από το κυκλοφορικό. Η ινσουλίνη απελευθερώνεται μόνο όταν η συγκέντρωση γλυκόζης είναι μεγαλύτερη από 3.3 mmol/l. Αν παραμένουν υψηλά τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα η ινσουλίνη συνεχίζει να εκκρίνεται¹⁰⁴. Αν και η γλυκόζη αποτελεί το βασικό ερέθισμα για την έκκριση της ινσουλίνης υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που συντελούν στην απελευθέρωσή της όπως οι GLP-1 και GIP που εκκρίνονται από το έντερο κατά τη διάρκεια λήψης γεύματος¹⁰⁵.



Σχήμα 2.2: Κρύσταλλοι ινσουλίνης¹¹³

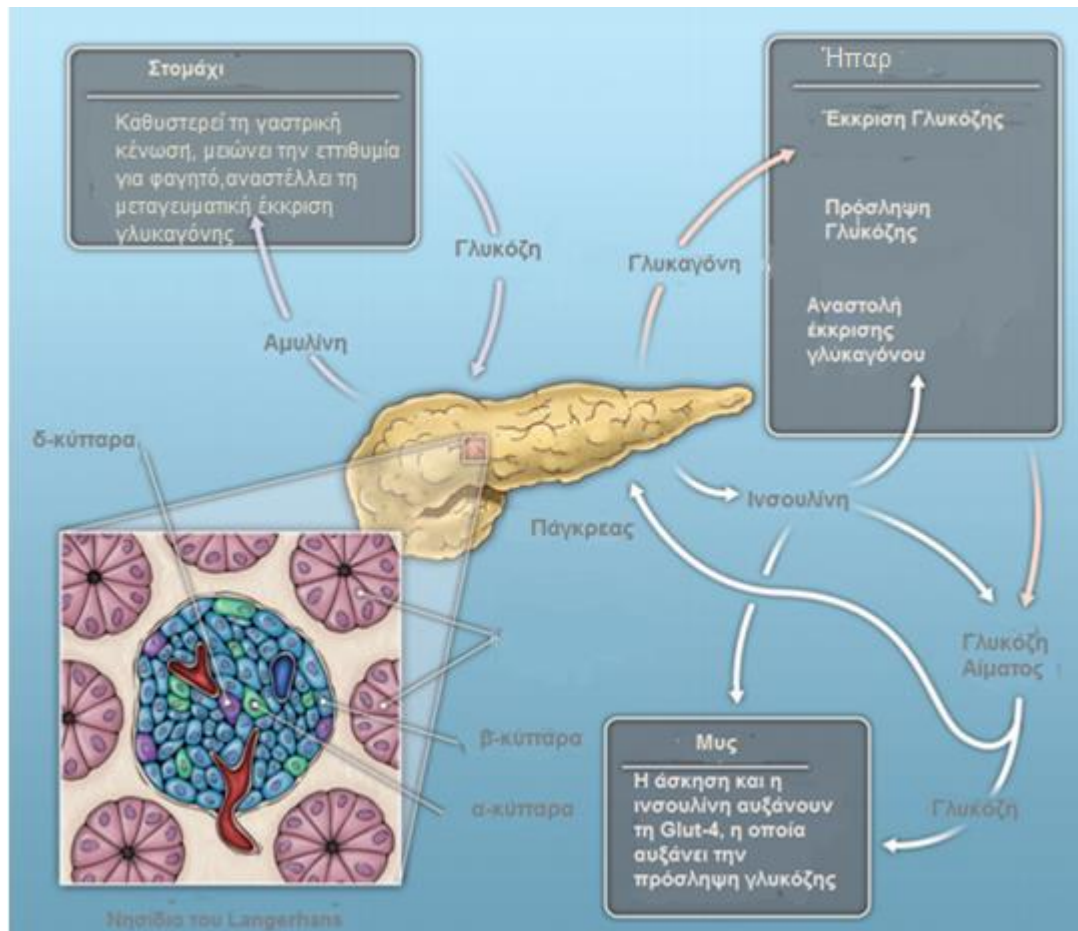
Γλυκαγόνη

Η γλυκαγόνη είναι μία ορμόνη που παράγεται στο πάγκρεας από τα α-κύτταρα στα νησίδια του Langerhans. Αποτελείται από 29 αμινοξέα και έχει ακριβώς αντίθετη δράση από αυτήν της ινσουλίνης. Όταν η γλυκόζη στον οργανισμό μειωθεί σημαντικά, αυξάνεται η έκκριση γλυκαγόνης έχοντας ως αποτέλεσμα την μετατροπή

αποθηκευμένου γλυκογόνου σε γλυκόζη από το ήπαρ. Έτσι επέρχεται ισορροπία και επανερχόμαστε σε φυσιολογικά επίπεδα. Αμέσως μετά αλλά και κατά τη διάρκεια λήψης γευμάτων δεν γίνεται έκκριση γλυκαγόνης. Η γλυκαγόνη εκκρίνεται δηλαδή σε περιόδους νηστείας (fasting conditions). Αυτό που συμβαίνει στο σακχαρώδη διαβήτη είναι πως δε σταματά η μεταγευματική έκκριση γλυκαγόνης άρα αυξάνεται δραματικά το επίπεδο γλυκόζης στο αίμα του ασθενή. Στόχος της γλυκαγόνης είναι πρώτον να διεγείρει το ήπαρ και τους μύες να διασπάσουν το αποθηκευμένο γλυκαγόνο και να απελευθερωθεί γλυκόζη (γλυκογενόλυση) και δεύτερον να διεγείρει τη διαδικασία της γλυκογένεσης στο ήπαρ και στους νεφρούς. Αν δεν υπήρχε η γλυκαγόνη τα επίπεδα της γλυκόζης θα ήταν σε αρκετά χαμηλά επίπεδα, μιας και ακόμα και σε φυσιολογικές συνθήκες τα επίπεδα ινσουλίνης και γλυκαγόνης αντισταθμίζονται στην κυκλοφορία του αίματος¹⁰⁴.

Συγκεκριμένα, στους υγιείς οργανισμούς αυτό που συμβαίνει είναι μία συνεχής αντιστάθμιση της ποσότητας της ινσουλίνης και της γλυκαγόνης. Μετά από κάθε λήψη γεύματος ο οργανισμός βρίσκεται σε ετοιμότητα να απορροφήσει γλυκόζη, αμινοξέα και άλλες ουσίες από την κατανάλωση τροφής. Διεγείρονται τα β-κύτταρα του παγκρέατος για να απελευθερώσουν ινσουλίνη και ταυτόχρονα αποτρέπουν την έκκριση γλυκαγόνης από τα αντίστοιχα α-κύτταρα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της ινσουλίνης στο αίμα και αυτή η αύξηση αναστέλλει την αύξηση του επιπέδου της γλυκόζης με σκοπό να διατηρηθεί εντός φυσιολογικών ορίων το επίπεδο της γλυκόζης. Στην αντίθετη όμως περίπτωση που το άτομο βρίσκεται σε κατάσταση νηστείας, η συγκέντρωση της γλυκόζης είναι χαμηλή. Γι' αυτό διεγείρεται η έκκριση γλυκαγόνης από τα α-κύτταρα και εμποδίζεται η έκκριση ινσουλίνης από τα β-κύτταρα. Αφού το επίπεδο της γλυκαγόνης αυξάνεται, εμποδίζεται η μείωση της συγκέντρωσης της γλυκόζης και έτσι διατηρείται μία ισορροπία.

Βεβαίως, εκτός από την ινσουλίνη και την γλυκαγόνη υπάρχουν πολλές ορμόνες που συμβάλλουν στην ομοιόσταση της γλυκόζης, όπως η αμυλίνη ή η GLP-1 και GIP. Αναφέρονται αναλυτικά τα χαρακτηριστικά των ορμονών GLP-1 και GIP στο άρθρο [106]. Η αμυλίνη, όπως φαίνεται και στο παρακάτω σχήμα, αναστέλλει την έκκριση γλυκαγόνης μετά τη λήψη γεύματος και καθυστερεί τη γαστρική κένωση ενώ μειώνει την επιθυμία για λήψη γεύματος.



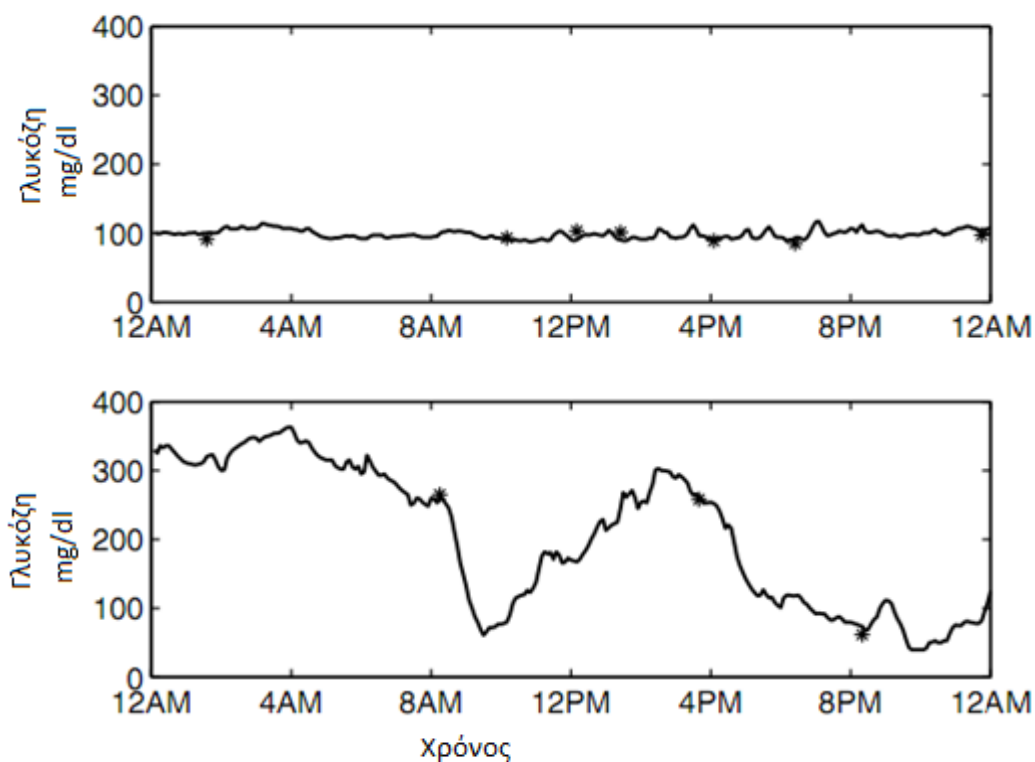
Σχήμα 2.3: Οι βασικές λειτουργίες του παγκρέατος στο μεταβολισμό γλυκόζης. Η έκκριση ινσουλίνης από τα β-κύτταρα του παγκρέατος έχει ως αποτέλεσμα την έκκριση γλυκόζης και τη σύνθεση γλυκαγόνης από το συκώτι. Η αμυλίνη αναστέλλει τη μεταγευματική έκκριση της γλυκαγόνης καθυστερεί τη γαστρική κένωση και μειώνει την επιθυμία για γεύμα¹⁰⁷.

2.2 Σακχαρώδης Διαβήτης

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης (ΣΔ) έχει να κάνει με τη μη σωστή λειτουργία του μεταβολισμού της γλυκόζης, η οποία δυσλειτουργία συναντάται είτε με τη μειωμένη έκκριση ινσουλίνης είτε με την υπολειτουργία της ινσουλίνης, αφού τα κύτταρα παύουν να είναι τόσο ευαίσθητα στην ινσουλίνη. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση που το πάγκρεας δεν παράγει αρκετή ινσουλίνη ή όταν παράγει ινσουλίνη αλλά αυτή δε

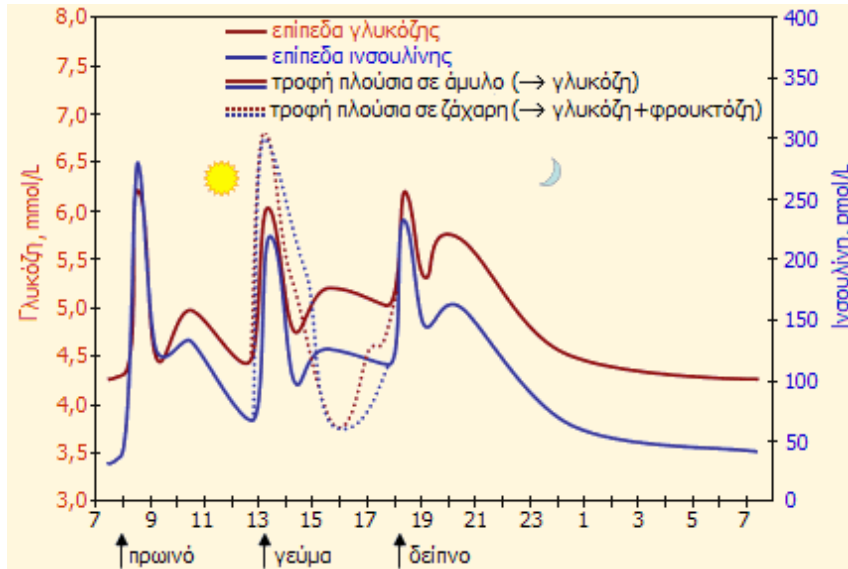
δρα σωστά, τότε η γλυκόζη δεν εισέρχεται στα κύτταρα και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων σακχάρων στο αίμα (υπεργλυκαιμία) και την εμφάνιση του σακχαρώδους διαβήτη¹⁰⁸.

Τα φυσιολογικά επίπεδα γλυκόζης αίματος είναι 70-110 mg/dl ή 3.92-6.16 mmol/l ενώ κοινό χαρακτηριστικό όλων των τύπων ΣΔ είναι οι συγκεντρώσεις γλυκόζης αίματος σε τιμές μεγαλύτερες από τις φυσιολογικές. Στο παρακάτω σχήμα φαίνεται η διαφορά στο επίπεδο της γλυκόζης και το εύρος της ανάμεσα σε ένα φυσιολογικό άτομο και σε ένα άτομο με ΣΔ.



Σχήμα 2.4: Η γλυκόζη κατά τη διάρκεια της ημέρας για ένα υγιές άτομο (πάνω) και για ένα άτομο με ΣΔ (κάτω).¹⁰⁹

Στο παρακάτω σχήμα φαίνονται οι διακυμάνσεις στα επίπεδα γλυκόζης και ινσουλίνης ενός υγιούς ατόμου κατά τη διάρκεια της ημέρας, ανάλογα και με την πρόσληψη τροφής του ατόμου.



Σχήμα 2.5: Τυπικές διακυμάνσεις των συγκεντρώσεων γλυκόζης και ινσουλίνης στο αίμα ενός υγιούς ατόμου κατά τη διάρκεια της ημέρας.¹¹⁰

Τύποι Σακχαρώδους Διαβήτη

Οι κυριότεροι τύποι ΣΔ είναι ο Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου I, ο Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου II και ο Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης. Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα βασικά χαρακτηριστικά τους.

Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου I

Αυτός ο τύπος διαβήτη ονομάζεται και ινσουλινοεξαρτώμενος ή νεανικός διαβήτης. Κύριο χαρακτηριστικό αυτού του αυτοάνοσου νοσήματος αποτελεί η καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος, τα οποία είναι υπεύθυνα για την παραγωγή της ορμόνης της ινσουλίνης. Αυτό έχει ως συνέπεια την ολική έλλειψη ινσουλίνης από τον οργανισμό ή την πολύ μειωμένη έκκριση της και την αύξηση των τιμών γλυκόζης στο αίμα του οργανισμού¹⁰¹. Έχει γενετική προδιάθεση και συναντάται κυρίως σε παιδιά, αλλά μπορεί και σε ενήλικες. Σε ένα μεγάλο ποσοστό ατόμων που πάσχουν από αυτόν τον τύπο διαβήτη παρατηρείται η ύπαρξη ενός ή περισσότερων αυτοαντισωμάτων και τα άτομα αυτά εμφανίζουν προδιάθεση και για άλλες αυτοάνοσες παθήσεις. Υπάρχουν όμως και άτομα που δεν παρουσιάζουν αυτοαντισώματα και αυτή η κατηγορία διαβήτη ονομάζεται ιδιοπαθής σακχαρώδης διαβήτης.

Κάθε άτομο καταλαβαίνει πως πάσχει από αυτόν τον τύπο διαβήτη λόγω των υψηλών τιμών γλυκόζης και την ανάπτυξης κέτωσης και διαβητικής κετοξέωσης αν δεν του χορηγηθεί ινσουλίνη. Στη συνέχεια το άτομο είναι άμεσα εξαρτώμενο από την εξωγενή χορήγηση ινσουλίνης, προκειμένου να διατηρηθούν τα επίπεδα σακχάρου μέσα σε ένα φυσιολογικό πλαίσιο¹¹⁰.

Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου II

Αυτός ο τύπος διαβήτη ονομάζεται και μη ινσουλινοεξαρτώμενος. Κύριο χαρακτηριστικό του αποτελεί ο συνδυασμός της μειωμένης έκκρισης ινσουλίνης αλλά και της μειωμένης ευαισθησίας των κυττάρων στην ορμόνη αυτή. Αυτό το φαινόμενο ονομάζεται ινσουλινοαντοχή. Στα αρχικά στάδια της νόσου κύρια διαταραχή είναι η μειωμένη δράση της ινσουλίνης και μετά παρατηρείται το φαινόμενο της υπεργλυκαιμίας. Οι βασικότερες αιτίες εμφάνισης αυτού του τύπου διαβήτη είναι η παχυσαρκία και το οικογενειακό ιστορικό. Προσβάλλει κυρίως ενήλικες και τα συμπτώματά του είναι πιο ήπια σε σχέση με τον ΣΔ Τύπου I. Για να αντιμετωπιστεί ο ΣΔ Τύπου II, αρχικά χορηγούνται στον ασθενή αντιδιαβητικά φάρμακα αλλά αν αποτύχει η συγκεκριμένη θεραπεία τότε κρίνεται σκόπιμο η εξωτερική χορήγηση ινσουλίνης. Σε κάθε όμως περίπτωση προτείνεται ο ασθενής να αλλάξει τρόπο ζωής, να χάσει βάρος, να τρέφεται σωστά και να ασκείται σωματικά καθημερινά¹¹⁰.

Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης

Αυτός ο τύπος διαβήτη εμφανίζεται για πρώτη φορά κατά τη διάρκεια της κύησης και υποχωρεί μετά τον τοκετό. Το κοινό χαρακτηριστικό του σε σχέση με τον Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου II είναι ο συνδυασμός της μειωμένης έκκρισης ινσουλίνης με την μικρή ευαισθησία των κυττάρων στην ινσουλίνη. Μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης του έχουν οι παχύσαρκες γυναίκες και περίπου 30-40 % των γυναικών που θα αναπτύξουν Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης θα εμφανίσουν Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου II στο μέλλον. Ένα πλεονέκτημα αυτού του τύπου ΣΔ είναι πως υποχωρεί μετά τον τοκετό, το πρόβλημα όμως είναι πως μπορεί να προκαλέσει περιγεννητικές επιπλοκές και προβλήματα υγείας στην μητέρα αλλά και στο παιδί.

Εκτός από τα βασικούς τύπους Σακχαρώδη Διαβήτη που προαναφέρθηκαν υπάρχουν και άλλοι που συναντώνται πιο σπάνια¹¹. Αυτοί είναι :

- Σακχαρώδης Διαβήτης που οφείλεται σε φάρμακα
- Γενετικά σύνδρομα που αφορούν τη δράση της ινσουλίνης
- Παθήσεις της εξωγενούς μοίρας του παγκρέατος
- Σακχαρώδης Διαβήτης μετά από λοιμώξεις

Διάγνωση του Διαβήτη

Η διάγνωση του Διαβήτη μπορεί να γίνει εύκολα με τη μέτρηση σακχάρου του αίματος με κάποιον από τους κλασικούς τρόπους μέτρησης γλυκόζης στο αίμα. Αν η τιμή της συγκέντρωσης της γλυκόζης είναι υψηλή για αρκετές ημέρες τότε πρέπει να υπάρξει μία ανησυχία. Στην ακραία περίπτωση που ο ασθενής έχει υψηλές τιμές σακχάρου στο αίμα για αρκετές ημέρες και δεν του έχει χορηγηθεί ινσουλίνη, θα παρουσιάσει και τα συμπτώματα της διαβητικής κετοξέωσης.

Συγκεκριμένα, ένας άνθρωπος πάσχει από Σακχαρώδη Διαβήτη αν συμβαίνει τουλάχιστον ένα από τα εξής:

1. Η τιμή της γλυκόζης σε οποιαδήποτε στιγμή είναι μεγαλύτερη ή ίση από 200 mg/dl, ακόμα και αν δεν έχει κανένα άλλο σύμπτωμα.
2. Αν η τιμή σακχάρου νηστείας είναι μεγαλύτερη από 126 mg/dl, δηλαδή μετά από 8 ώρες τουλάχιστον αφαγίας.
3. Τα εμφανή συμπτώματα του διαβήτη, όπως πολυουρία, πολυδιψία, απότομη απώλεια βάρους.
4. Όταν του έχει χορηγηθεί 75g γλυκόζη από το στόμα και μετά από 2 ώρες το επίπεδο της γλυκόζης είναι μεγαλύτερο από 200 mg/dl

Ένας άλλος χρήσιμος δείκτης είναι η τιμή της γλυκοζυλιωμένης HbA1c που πρέπει να μην είναι μεγαλύτερη από 6%. Αυτός ο δείκτης αντικατοπτρίζει το μέσο όρο των τιμών γλυκόζης τους τελευταίους τρεις μήνες αλλά χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση της γλυκόζης και όχι για τη διάγνωση του ΣΔ.

Αντιμετώπιση του Σακχαρώδους Διαβήτη

Η αντιμετώπιση του ΣΔ αποτελεί μια πολύπλοκη διαδικασία. Απαιτείται αυστηρή εκπαίδευση του ατόμου με ΣΔ σε σχέση με τον τρόπο ζωής του, τις διατροφικές του συνήθειες, την σωματική άσκηση, τα χρονικά διαστήματα λήψης γευμάτων και τη

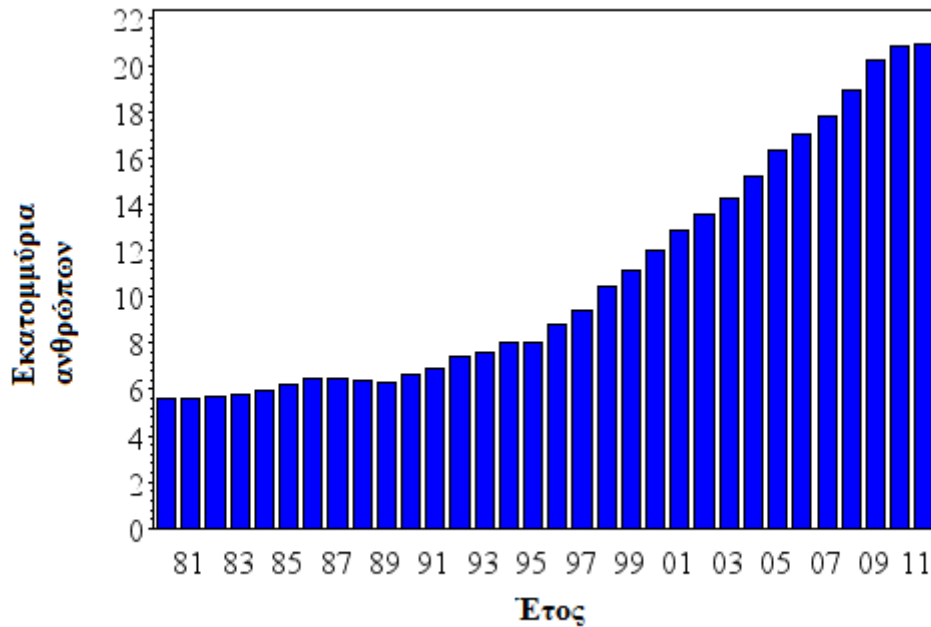
χορηγούμενη ποσότητα ινσουλίνης. Στην πραγματικότητα, η ζωή ενός ατόμου με ΣΔ είναι αυτή που θα έπρεπε να έχει κάθε υγιές άτομο, αν εξαιρέσουμε την φαρμακευτική αγωγή, δηλαδή την εξωτερικά χορηγούμενη ποσότητα ινσουλίνης. Όπως θα σημειωθεί και στη συνέχεια, υπάρχουν πολλοί παράγοντες που επηρεάζουν τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα όπως η φυσική άσκηση, η διατροφή αλλά και απρόβλεπτοι παράγοντες όπως το στρες και οι ασθένειες.

Με τη σωματική άσκηση το άτομο με ΣΔ καταναλώνει γλυκόζη. Αρχικά αυτή η κατανάλωση ίσως φαίνεται ωφέλιμη, όμως πρέπει να υπάρχει ένα μέτρο καθώς η έντονη σωματική άσκηση ίσως οδηγήσει σε υπογλυκαιμία. Πρέπει όμως κάθε άτομο με ΣΔ να γυμνάζεται καθημερινά αφού η σωματική άσκηση συντελεί στην πρόληψη των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Προτείνεται από τους ειδικούς τα άτομα με ΣΔ να περπατούν 1 ώρα μετά τη λήψη γεύματος γιατί το σάκχαρο τότε είναι υψηλότερο σε σχέση με τη χρονική περίοδο πριν τη λήψη γεύματος. Η φαρμακευτική αγωγή που θα ακολουθήσει το άτομο είναι ίσως από τους πιο σημαντικούς παράγοντες για την αντιμετώπιση του ΣΔ. Συνήθως, στα άτομα με ΣΔ Τύπου II χορηγούνται αντιδιαβητικά χάπια ενώ στα άτομα με ΣΔ Τύπου I χορηγείται ινσουλίνη. Καθοριστικό ρόλο στην αντιμετώπιση του ΣΔ αποτελεί η σωστή διατροφή, δηλαδή μια δίαιτα χαμηλή σε ζωικά λίπη, αλάτι και χοληστερόλη και πλούσια σε λαχανικά και φυτικές ίνες. Τέλος, απαγορεύονται τα αλκοολούχα ποτά καθώς μπορούν να προκαλέσουν ανωμαλίες στα επίπεδα της γλυκόζης και να οδηγήσουν σε υπογλυκαιμία όπως επίσης απαγορεύεται και το κάπνισμα¹¹¹.

2.2.1 Στατιστικά στοιχεία

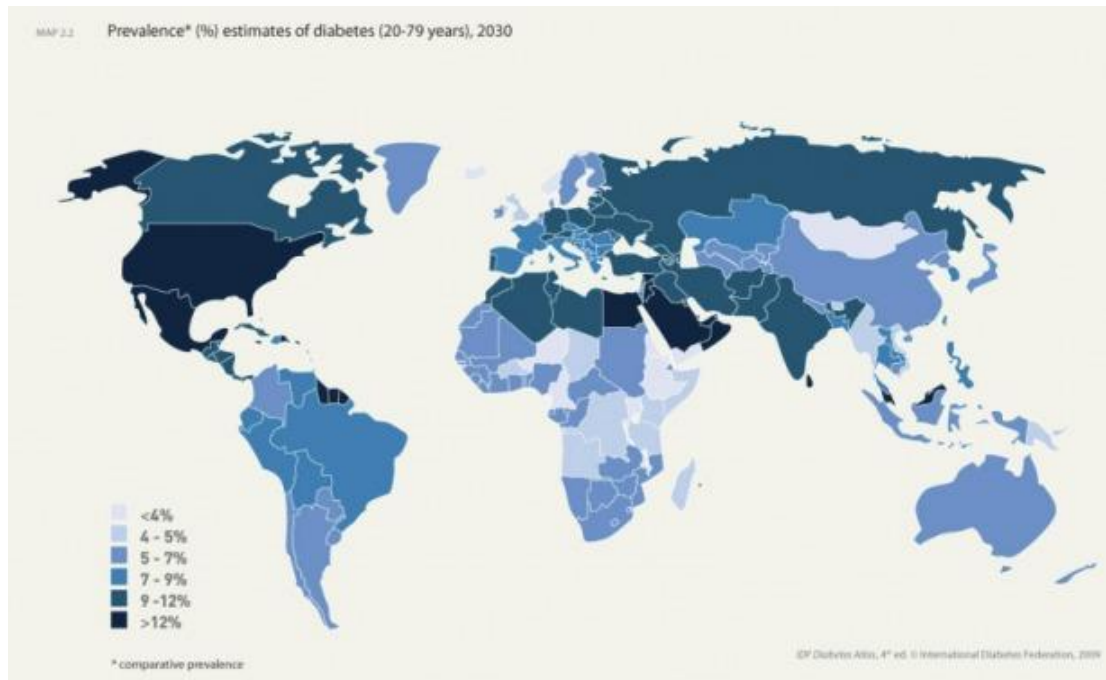
Ο ΣΔ αποτελεί μία από τις σημαντικότερες αιτίες θανάτου παγκοσμίως. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) πάνω από 220 εκατομμύρια πάσχουν από ΣΔ και δυστυχώς είναι μεγάλος και ο αριθμός ατόμων που πεθαίνουν καθημερινά από ΣΔ, ακόμα και σε νεαρές ηλικίες. Συγκεκριμένα, το 2004 περίπου 3,4 εκατομμύρια άνθρωποι πέθαναν από ΣΔ, αν λάβουμε υπόψη και τους θανάτους από τις επιπλοκές του ΣΔ όπως καρδιαγγειακά και νεφροπάθειες¹¹². Αναμένεται πως το 2030 περίπου το 3,5 % των θανάτων παγκοσμίως θα οφείλεται στο ΣΔ. Στην Ελλάδα εκτιμάται πως το 6% του πληθυσμού πάσχει από ΣΔ και η συχνότητα του διαβήτη έχει τετραπλασιαστεί τις τελευταίες δεκαετίες¹¹². Αναμένεται πως το 7,3% του

πληθυσμού της Ελλάδας θα πάσχει από ΣΔ το 2025 και οι περισσότεροι θα το παρουσιάσουν στην ηλικία 45 ετών και πάνω. Αυτήν την στιγμή πάνω από 30.000 νέοι πάσχουν από ΣΔ στη χώρα μας και περίπου 500 παιδιά ανά έτος προστίθενται σε αυτούς. Στη συνέχεια παρουσιάζεται η ανοδική τάση του ΣΔ ανά έτος.



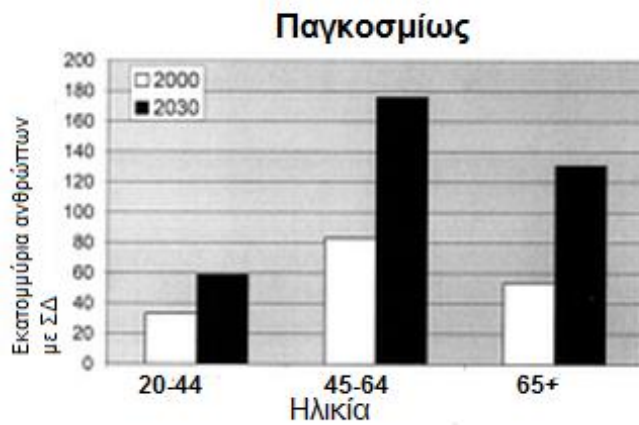
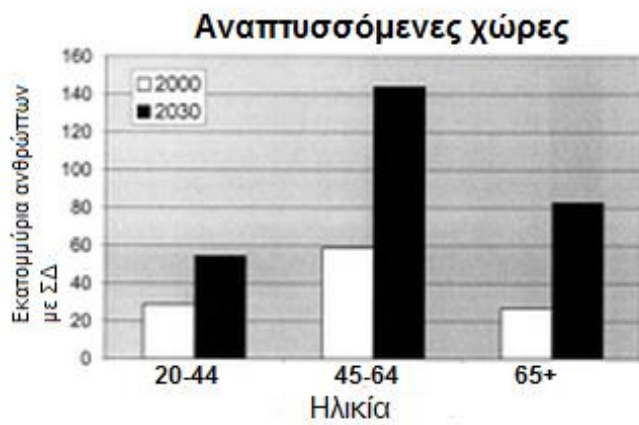
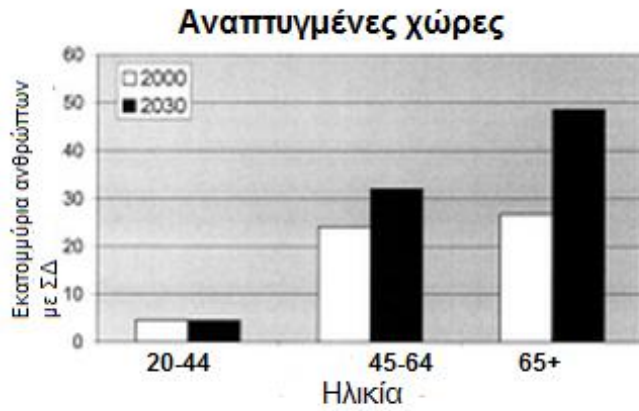
Σχήμα 2.6: Αύξηση των ατόμων με ΣΔ ανά έτος έως το 2011 .¹¹⁴

Παρακάτω δίνεται μία πρόβλεψη που έγινε από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας σχετικά με τα άτομα που θα πάσχουν από ΣΔ το 2030 ανά χώρα.

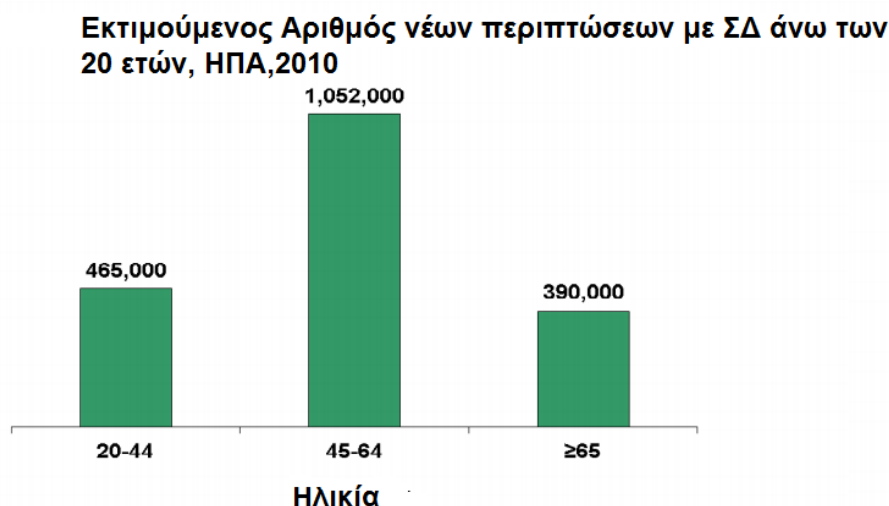


Σχήμα 2.7: Πρόβλεψη για την εξάπλωση του ΣΔ σε κάθε χώρα το 2030.¹¹⁶

Παρατηρούμε πως ο ΣΔ είναι συχνότερος στον αναπτυγμένο κόσμο, γεγονός που αποδεικνύει πως έχει άμεση σχέση με το δυτικό τρόπο ζωής δηλαδή την καθιστική ζωή, τον ανθυγιεινό τρόπο ζωής, την παχυσαρκία¹¹⁵. Το σχήμα που ακολουθεί επιβεβαιώνει την αύξηση των ατόμων με ΣΔ στις αναπτυσσόμενες χώρες και την τεράστια έκταση του ΣΔ έως το 2030.



Σχήμα 2.8: Εκτιμώμενος αριθμός ενηλίκων ατόμων με ΣΔ ανάλογα με την ηλικία τους, το 2000 και το 2030 και ανάλογα με τη χώρα γέννησης τους.¹¹⁵



Σχήμα 2.9: Περίπου 2 εκατ. άνω των 20 ετών εντοπίστηκαν με ΣΔ στις ΗΠΑ το 2010.¹¹⁶

Σε αυτό το σημείο πρέπει να αναφερθεί και το οικονομικό κόστος δαπανών για την ασθένεια του διαβήτη. Στην ΕΕ αντιστοιχεί στις περισσότερες χώρες σε πάνω από το 10% των δαπανών υγείας. Αυτός ο αριθμός είναι υποτιμημένος λόγω του ότι δεν μπορούν να εκτιμηθούν με ακρίβεια οι άμεσες και έμμεσες δαπάνες που συνδέονται με την ασθένεια αλλά σύμφωνα με τη Διεθνή Ομοσπονδία Διαβήτη υπολογίζονται πως 376 δισεκατομμύρια δολάρια αφιερώνονται ετησίως για την πρόληψη και την αντιμετώπιση του ΣΔ. Αυτό το ποσό αναμένεται να αυξηθεί σημαντικά τα επόμενα χρόνια, αφού αυξάνονται δραματικά οι περιπτώσεις των ατόμων με ΣΔ. Τέλος, αν συγκρίνουμε το πλήθος των ατόμων με ΣΔ Τύπου I και ΣΔ Τύπου II παρατηρούμε πως περίπου ένα 10% των ατόμων με διαβήτη έχουν ΣΔ Τύπου 1.¹¹⁷ Είναι προφανές λοιπόν ότι υπάρχει μεγάλο κοινωνικό και οικονομικό συμφέρον από την εύρεση ενός αποδοτικού ελέγχου γλυκόζης για τον ΣΔ Τύπου 1.

2.2.2 Επιπλοκές

Οι επιπλοκές του Σακχαρώδους Διαβήτη στην υγεία του ασθενή χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, τις βραχυπρόθεσμες και τις μακροπρόθεσμες ή αλλιώς σε οξείες και σε χρόνιες. Όσο όμως ο ασθενής καταφέρνει να βρίσκονται τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα ανάμεσα στα φυσιολογικά επίπεδα, οι πιθανότητες εμφάνισης των επιπλοκών μειώνεται. Άλλοι παράγοντες όπως η παχυσαρκία, το κάπνισμα, η κακή διατροφή, η

έλλειψη άσκησης , η υπέρταση είναι ικανοί να επιτυγχάνουν την εμφάνιση των επιπλοκών του ΣΔ¹¹⁸.

Οξείες

1. Διαβητική κετοξέωση και διαβητικό κώμα

Όπως για έναν καρδιακό άνθρωπο ο μόνιμος φόβος του είναι η εμφάνιση ενός εμφράγματος ή εκγεφαλικού επεισοδίου, έτσι για τον διαβητικό υπάρχει μόνιμος φόβος εμφάνισης διαβητικής κετοξέωσης. Άλλωστε, μπορεί να είναι και η πρώτη εκδήλωση του Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου I, όταν τα επίπεδα σακχάρου είναι αρκετά υψηλά. Είναι μια αρκετά επικίνδυνη επιπλοκή και ο ασθενής πρέπει να μεταφερθεί άμεσα σε κάποιο νοσοκομείο. Παρουσιάζεται με την εμφάνιση της αφυδάτωσης, ο ασθενής αναπνέει με βαθιές και παρατεταμένες αναπνοές, κάνει εμετούς και τέλος πονάει αρκετά στον κοιλιακό χώρο. Αν αυτό γίνεται για αρκετή ώρα και δεν νοσηλευτεί, τότε μπορεί να πέσει σε κώμα. Σε σοβαρές περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί και υπόταση και κυκλοφορική καταπληξία (shock). Όμως αν η θεραπεία γίνει σε σύντομο χρονικό διάστημα, η κατάσταση είναι πλήρως αναστρέψιμη.

2. Υπερωσμωτικό μη κετωτικό κώμα

Κύριο χαρακτηριστικό αυτής της επιπλοκής είναι πως οι τιμές σακχάρου είναι πάρα πολύ υψηλές, πάνω και από 600 mg/dl κ και συνήθως δε φτάνει το εύρος των μετρητών να καταγράψει την τιμή αυτή και γι' αυτό στην οθόνη τους παρατηρείται η ένδειξη "High", δηλαδή αρκετά υψηλό επίπεδο γλυκόζης. Έχουμε αύξηση της ωσμωτικότητας του πλάσματος, πάνω από 350mOsm/L, απουσία κετοξέωσης, και αφυδάτωση. Αιτίες εμφάνισης του υπερωσμωτικού μη κετωτικού κώματος είναι το έμφραγμα του μυοκαρδίου, η σηψαιμία, η παγκρεατίτιδα, η αιμορραγία από το γαστρεντερικό και η λήψη φαρμάκων. Αν δεν νοσηλευτεί ο ασθενής άμεσα, τα

πράγματα χειροτερεύουν αρκετά γιατί μπορεί να πέσει σε κώμα. Είναι πολύ πιο συχνή η εμφάνιση του σε ηλικιωμένους ανθρώπους που πάσχουν από Διαβήτη Τύπου II.

3. Υπογλυκαιμία

Η πιο συνηθισμένη επιπλοκή του σακχαρώδη διαβήτη είναι η υπογλυκαιμία. Αποτελεί τον σημαντικότερο φόβο κάθε διαβητικού ατόμου και η εμφάνιση της είναι ιδιαίτερα συχνή, ειδικά όταν δεν υπάρχουν τακτικές μετρήσεις στο σάκχαρο του αίματος κατά τη διάρκεια της ημέρας. Είναι η κατάσταση στην οποία τα επίπεδα της γλυκόζης μειώνονται κάτω από το φυσιολογικό, περίπου 50 mg/dl. Τις περισσότερες φορές οι μετρητές δεν μπορούν να μετρήσουν την τόσο χαμηλή τιμή γλυκόζης και εμφανίζουν την ένδειξη “Low”, δηλαδή αρκετά χαμηλή τιμή γλυκόζης. Ουσιαστικά είναι συνέπεια όχι του ΣΔ αλλά της θεραπείας του ΣΔ. Οι κυριότερες αιτίες εμφάνισης της είναι

- Υπερβολική Δόση ινσουλίνης ή αντιδιαβητικών δισκίων
- Υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ
- Έντονη σωματική άσκηση
- Πρόσληψη ανεπαρκούς ποσότητας υδατανθράκων ή καθυστερημένη πρόσληψη γευμάτων ή παράλειψή τους

Τα κυριότερα συμπτώματα της υπογλυκαιμίας είναι τα εξής:

Πίνακας 2.1: Τα συμπτώματα της υπογλυκαιμίας.

Ταχυκαρδία	Πονοκέφαλος
Αδυναμία συγκέντρωσης	Εφίδρωση
Τρέμουλο	Έντονο αίσθημα πείνας
Μούδιασμα	Λιποθυμία

Όταν τα συμπτώματα δεν είναι τόσο έντονα και βρισκόμαστε στην αρχή της υπογλυκαιμίας, ο ασθενής πρέπει λάβει ένα γεύμα, ή αν είμαστε σε προχωρημένο στάδιο πρέπει να του χορηγηθεί κάτι που θα του αυξήσει αμέσως το επίπεδο της γλυκόζης στο αίμα. Τέτοιες ουσίες είναι η ζάχαρη, το μέλι, ο χυμός . Αν αγνοηθούν τα συμπτώματα της υπογλυκαιμίας, και δε χορηγηθεί τροφή στον ασθενή, τα πράγματα είναι πολύ σοβαρά γιατί ο ασθενής μπορεί να πέσει σε κώμα. Ο πιο αποτελεσματικός τρόπος βοήθειας του ατόμου πριν νοσηλευτεί είναι η χορήγηση μια ένεσης γλυκαγόνης, η οποία είναι μια ορμόνη με ακριβώς αντίθετη δράση από την ινσουλίνη, δηλαδή ανεβάζει τις τιμές του σακχάρου¹¹⁹.

Αν τα επίπεδα γλυκόζης είναι συχνά και για αρκετό διάστημα εκτός των φυσιολογικών ορίων, τότε υπάρχει μεγάλη πιθανότητα εμφάνισης των μακροχρόνιων επιπλοκών. Αυτό οφείλεται στο ότι η μεμβράνη των αιμοφόρων αγγείων αλλάζει σύσταση αν η γλυκόζη στο αίμα δεν είναι εντός φυσιολογικών τιμών. Όσο περισσότερο δεν είναι εντός αυτών των ορίων, τόσο πιο πολύ αλλάζει σύσταση η μεμβράνη. Αυτή όμως η μεμβράνη είναι υπεύθυνη για την ανταλλαγή υγρών μεταξύ τριχοειδών και αγγείων γι' αυτό οποιαδήποτε μεταβολή της επιφέρει μακροχρόνιες συνέπειες.

Χρόνιες Επιπλοκές του ΣΔ

Μικροαγγειακές Επιπλοκές

1. Αμφιβληστροειδοπάθεια

Με τον όρο αυτό εννοούμε τη σταδιακή φθορά του αμφιβληστροειδούς χιτώνα, ο οποίος βρίσκεται στο βυθό του ματιού. Μπορεί να προκαλέσει ακόμα και τύφλωση γιατί αν ξεπεραστούν τα αρχικά στάδια έχουμε αιμορραγία στο πίσω μέρος του ματιού.

2. Νευροπάθεια

Ειδικά όταν οι τιμές σακχάρου είναι σε υψηλά επίπεδα, συναντάται η νευροπάθεια του αυτόνομου νευρικού συστήματος. Έχουμε απώλεια της αισθητικότητας, κυρίως στα κάτω άκρα και στυτική δυσλειτουργία. Η απώλεια της αισθητικότητας κρίνεται αξιολογήσιμη καθώς μπορεί να μην γίνει αντιληπτός ο οποιοσδήποτε τραυματισμός σε αυτό το σημείο και να συντελέσει σε δημιουργία έλκους λοίμωξης ή και ακρωτηριασμό (Διαβητικό Πόδι). Έχει αποδειχθεί πως περίπου το 50% των διαβητικών, μετά από 15 χρόνια θεραπευτικής αγωγής πάσχουν από νευροπάθεια.

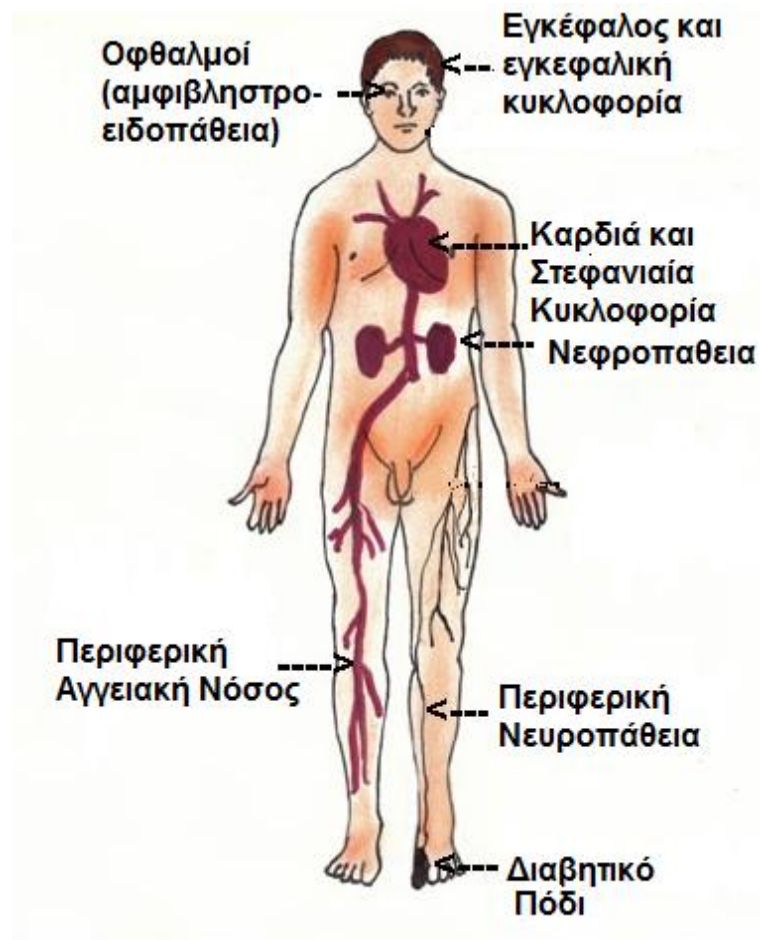
3. Νεφροπάθεια

Εδώ παρατηρείται το φαινόμενο της απώλειας της ορθής λειτουργίας των νεφρών. Το πρόβλημα είναι πως δε γίνεται εύκολα αντιληπτή καθώς δεν παρουσιάζει εμφανή συμπτώματα στις αρχές παρά μόνο όταν η κατάσταση είναι δύσκολα αντιστρέψιμη. Αν δεν εντοπιστεί έγκαιρα μπορεί να οδηγήσει και σε αιμοκάθαρση¹²⁰.

Μακροαγγειακές Επιπλοκές

- **Αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια**, κυρίως ισχαιμικού τύπου, που συναντάται όταν μια περιοχή του εγκεφάλου σταματήσει να παίρνει αίμα.
- **Στεφανιαία νόσο**, που ίσως οδηγήσει σε στηθαγχή ή οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου.
- **Περιφερική Αγγειοπάθεια**.

Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζονται επιγραμματικά οι βασικότερες μακροπρόθεσμες συνέπειες του ΣΔ.



Σχήμα 2.10: Μακροπρόθεσμες επιπλοκές του ΣΔ. ¹²¹

3

ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ (MASS SPECTROMETRY, MS)

Η φασματομετρία μάζας ή φασματομετρία μαζών, είναι ένα αναλυτικό εργαλείο απαραίτητο για τη διερεύνηση της δομής των οργανικών και ανόργανων ουσιών. Βασίζεται στη παραγωγή ιόντων κατά τον ιονισμό του μορίου και τον διαχωρισμό τους βάσει του λόγου m/z , όπου m η μάζα του ιόντος και z το φορτίο του ιόντος. Μπορεί να προσδιορίσει μοριακά βάρη ουσιών έως και 4000. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ποιοτική ανάλυση αερίων, υγρών και υπό ειδικές συνθήκες στερεών. Με τη φασματομετρία μάζας μπορούν να μετρηθούν αλλαγές στις κατανομές ισοτόπων στοιχείων, βάσει των οποίων γίνονται γεωχρονολογικές μελέτες. Η φασματομετρία ανακαλύφθηκε από τους Thomson(1910) και Aston(1919) και η πρώτη της εφαρμογή ήταν στην ανακάλυψη νέων ισοτόπων. Τα πρώτα εμπορικά όργανα εμφανίστηκαν γύρω στο 1940 και χρησιμοποιήθηκαν στη βιομηχανία πετρελαίου. Η εφαρμογή της φασματομετρίας μάζας σε αναλύσεις σειράς οργανικών μορίων άρχισε κυρίως από το 1960 και μετά.

Αν και η αρχή λειτουργίας του είναι απλή, το φασματόμετρο μάζας είναι ένα πολύπλοκο όργανο με υψηλό κόστος. Λόγω όμως των δυνατοτήτων που έχει στην

εύρεση δομής των ενώσεων, της ταχύτητας και της αξιοπιστίας του, η χρήση του στα αναλυτικά εργαστήρια συνεχώς αυξάνεται.

3.1 Αρχή

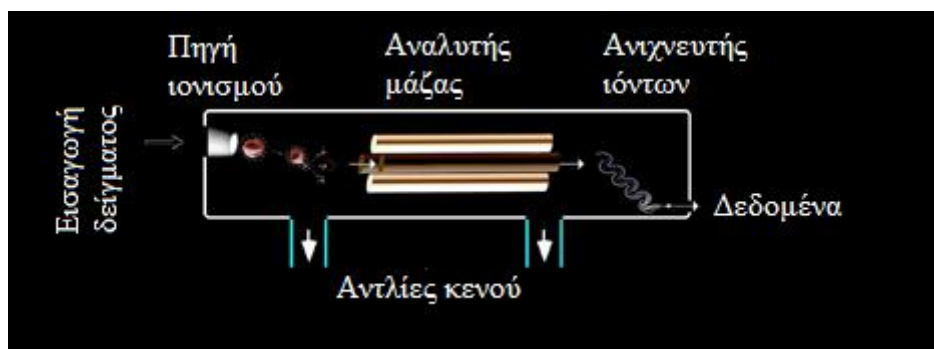
Η μέθοδος βασίζεται στην παραγωγή μοριακών ιόντων ή θραυσμάτων, συνήθως με βομβαρδισμό του δείγματος με δέσμη ηλεκτρονίων και στη συνέχεια διαχωρισμό των ιόντων με βάση τον λόγο της μάζας τους ως προς το φορτίο τους m/z . Τα ιόντα αυτά περιέχουν περίσσεια ενέργειας και θραύονται στη συνέχεια σε ιόντα μικρότερου μεγέθους. Όλη αυτή η θραυσματοποίηση δημιουργείται μέσω σχάσης ή αντιδράσεων ανασύνταξης παρέχοντας πληροφορίες για τη δομή του αρχικού μορίου. Μετά την επιτάχυνσή τους από ένα ηλεκτρικό πεδίο, τα ιόντα εισέρχονται στον αναλυτή μαζών, όπου διαχωρίζονται με βάση το λόγο m/z . Στη συνέχεια τα ιόντα διαφορετικών μαζών καταγράφονται με κατάλληλο ανιχνευτή. Το σύστημα βρίσκεται σε υψηλό κενό για αποφυγή διαμοριακών συγκρούσεων. Ύστερα τα δεδομένα αποθηκεύονται σε ηλεκτρονικό υπολογιστή με τη βοήθεια του οποίου παράγεται το φάσμα μάζας (mass spectrum).^{135,140}

3.2 Οργανολογία

Ένα φασματομέτρο μάζας αποτελείται από τα εξής βασικά τμήματα.

1. Σύστημα εισαγωγής δείγματος.
2. Πηγή ιονισμού.
3. Αναλυτής μαζών για το διαχωρισμό των ιόντων με βάση το λόγο μάζας/φορτίο.
4. Ανιχνευτής για την καταγραφή της θέσης και έντασης των ιόντων.
5. Επεξεργαστής του ηλεκτρικού σήματος του ανιχνευτή και αποθήκευση στη μνήμη του υπολογιστή.
6. Καταγραφή και εκτύπωση φασμάτων.

Το σύστημα υψηλού κενού είναι απαραίτητο για την αποφυγή της αλληλεπίδρασης των φορτισμένων σωματιδίων, που παράγονται από την πηγή ιονισμού, με τα αέρια της ατμόσφαιρας με συνέπεια την εκφόρτισή τους.^{135,140}



Σχήμα 3.1: Σχηματική διάταξη ενός φασματομέτρου μάζας.¹²²

3.2.1 Συστήματα εισαγωγής δείγματος

Τα συστήματα που χρησιμοποιούνται για την εισαγωγή του δείγματος στην πηγή ιονισμού σε ένα φασματογράφο μάζας, εξαρτώνται από τη φυσική του κατάσταση, τις χημικές του ιδιότητες και τον τρόπο ιονισμού του.

1. Σύστημα μεμονωμένης(batch) εισαγωγής δείγματος

Χρησιμοποιείται για τις αναλύσεις αερίων και πτητικών υγρών, όπου το δείγμα εισάγεται σε μια δεξαμενή σε θερμοκρασία δωματίου(σύστημα ψυχρής εισόδου). Η είσοδος από πορώδες γυαλί κρατάει σταθερή την ταχύτητα ροής των ατμών του δείγματος στον θάλαμο ιονισμού. Οι λιγότερο πτητικές ενώσεις εισάγονται στη δεξαμενή, η οποία μπορεί να θερμανθεί μέχρι 350°C (σύστημα θερμής εισόδου). Σε όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιείται σύστημα κενού για να επιτευχθεί πίεση ατμών δείγματος 10^{-4} έως 10^{-5} Torr.

2. Σύστημα άμεσης εισαγωγής (Direct inlet system)

Για να αποφευχθεί μια τυχόν θερμική διάσπαση, οι ευαίσθητες ενώσεις, όπως επίσης τα στερεά και τα μη πτητικά υγρά εισάγονται κατ' ευθείαν στο θάλαμο ιονισμού, που βρίσκεται σε υψηλό κενό, στο άκρο ενός κεραμικού σωλήνα με έναν δειγματολήπτη που δεν επηρεάζει το κενό (**vacuum lock**) του θαλάμου ιονισμού. Συνήθως υπάρχει δυνατότητα τόσο για ψύξη όσο και για θέρμανση του δείγματος στο δειγματολήπτη.

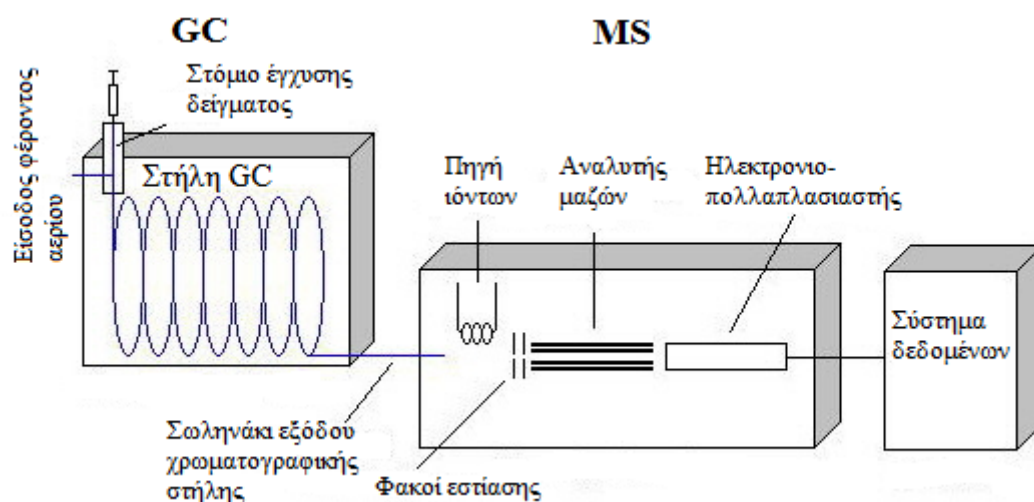
3. Σύστημα ιονισμού από αέριο ή υγρό χρωματογράφο – Συνδυασμένες τεχνικές

Σύνθετα μίγματα αναλύονται συνήθως με συνδυασμένες τεχνικές, όπου μια μέθοδος διαχωρισμού (αέρια ή υγρή χρωματογραφία ή τριχοειδής ηλεκτροφόρηση) συνδέεται με ένα φασματόμετρο μάζας.^{135,140}

(GC = Gas Chromatography – Mass Spectrometry ή LC – MS = Liquid Chromatography – Mass Spectrometry)

GC – MS

Η διασύνδεση ενός αέριου χρωματογράφου με ένα φασματογράφο μάζας είναι απλή. Το τριχοειδές σωληνάκι εξόδου της χρωματογραφικής στήλης συνδέεται απ' ευθείας με το θάλαμο ιονισμού.



Σχήμα 3.2: Σύνδεση αέριου χρωματογράφου (GC) με φασματόμετρο μάζας (MS) σχηματική διάταξη ενός φασματόμετρου μάζας.¹²³

Τα συστατικά που διαχωρίζονται στο χρωματογράφο, εκλύονται σε αέρια κατάσταση από τη στήλη, έπειτα εισάγονται στην πηγή ιονισμού και αναλύονται στο φασματόμετρο μάζας σύμφωνα με τη σειρά εξαγωγής τους από τη στήλη GC. Με το σύστημα κενού του φασματόμετρου μάζας μπορούν να επιτευχθούν ροές χρωματογραφικής στήλης 1-2 ml/min. Με τη μέθοδο αυτή χρειάζεται ελάχιστη

ποσότητα αρχικού δείγματος σε σύγκριση με τις άλλες μεθόδους εισαγωγής, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.^{135,140}

Πίνακας 3.1: Αναγκαία ελάχιστη ποσότητα δείγματος για τα διάφορα συστήματα εισόδου στη φασματομετρία μάζας.

Σύστημα εισόδου	Ελάχιστη ποσότητα δείγματος (μg)
Ψυχρή είσοδος	10
Θερμή είσοδος	1
Άμεση εισαγωγή	0,001
Αέριο-χρωματογραφική είσοδος	0,01

HPLC-MS

Η διασύνδεση υγρού χρωματογράφου υψηλής διαχωριστότητας (HPLC) ή τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης (CE) με φασματόμετρο μάζας είναι από τεχνικής πλευράς περισσότερο σύνθετη απ' ό,τι η σύνδεση GC-MS, διότι αυτές οι τεχνικές χρησιμοποιούν διαλύτες που είναι συχνά υδατικοί, πράγμα που πρέπει να αποφεύγεται σε ένα φασματόμετρο μάζας. Ως επί το πλείστον χρησιμοποιούνται μικροστήλες στην HPLC όταν συνδέεται με MS, λόγω των πολύ μικρών ταχυτήτων ροής.^{135,140}

3.2.2 Πηγές Ιονισμού

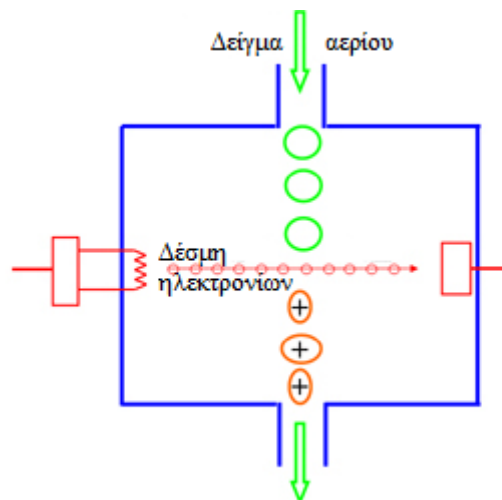
Οι πηγές ιονισμού στη φασματομετρία μάζας διακρίνονται σε **πηγές ιονισμού για πτητικές ενώσεις**, όπου το δείγμα πρώτα εξαερώνεται και μετά ιονίζεται σε συνθήκες κενού και σε **πηγές ιονισμού για μη πτητικές ενώσεις**, όπου το δείγμα σε υγρή ή στερεά κατάσταση μετατρέπεται κατ' ευθείαν σε αεριώδη ιόντα κατά τον ιονισμό του σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης.

Οι πηγές ιονισμού διακρίνονται επίσης σε **σκληρές**(hard ionization) και **μαλακές** (soft ionization), ανάλογα με την ενέργεια που μεταδίδουν στα μόρια του αναλυτή και στο σπάσιμο των δεσμών του μορίου σε μικρότερα θραύσματα. Στις σκληρές πηγές ιονισμού η ενέργεια που μεταδίδεται είναι αρκετά μεγάλη με αποτέλεσμα τη διάσπαση του μορίου σε θραύσματα με λόγους m/z μικρότερους από το μοριακό ιόν, ενώ οι μαλακές πηγές προκαλούν περιορισμένη θραύση, με αποτέλεσμα να λαμβάνονται διαφορετικά φάσματα μάζας ανάλογα με την ένταση της πηγής ιονισμού.

1. Πηγές ιονισμού για πτητικές ενώσεις(σε συνθήκες κενού)

Ιονισμός με ηλεκτρόνια

Η τεχνική αυτή είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη για αναλύσεις αερίων δειγμάτων ή αναλύσεις υγρών και στερεών δειγμάτων, τα οποία όμως εισάγονται στη μορφή αερίου στη πηγή παραγωγής ιόντων.



Σχήμα 3.3: Πηγή ιονισμού στη φασματομετρία μάζας με ηλεκτρονιακή κρούση.¹²⁴

Από τη σύγκρουση των μορίων του αερίου δείγματος, που κινούνται λόγω διαφοράς πίεσης (10^{-2} έως 10^{-5} Torr) κατά μήκος της εισόδου διαρροής, με μια δέσμη ηλεκτρονίων που παράγεται από ένα ηλεκτρικά θερμαινόμενο νήμα και επιταχύνεται προς την άνοδο, κάθετα προς τη ροή των μορίων, παράγονται θετικά φορτισμένα ιόντα. Η πηγή ιονισμού με δέσμη ηλεκτρονίων είναι μια **σκληρή πηγή ιονισμού** η οποία οδηγεί σε επαναλήψιμα φάσματα, τα οποία μπορούν να συγκριθούν με βιβλιοθήκες φασμάτων μάζας για την ταυτοποίηση των συστατικών του δείγματος.^{135,140}

Χημικός ιονισμός

Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιείται ένα αέριο, όπως μεθάνιο (CH_4) ή αμμωνία (NH_3) ή ισοβουτάνιο [$(\text{CH}_3)_3\text{CH}$], το οποίο εισερχόμενο στην πηγή ιονισμού σε αναλογία 10^3 - 10^4 ως προς το αέριο δείγμα, βομβαρδίζεται από μια δέσμη ηλεκτρονίων. Οπότε ιονίζεται το μεθάνιο και με καταλυτική διάσπασή του μέσω δευτερογενών αντιδράσεων, αντιδρά με επιπλέον μόρια του μεθανίου, σχηματίζοντας άλλα φορτισμένα ιόντα του μεθανίου. Τα ιόντα αυτά συγκρούονται κατόπιν με τα μόρια του δείγματος οπότε και παράγεται ένα **πρωτονιωμένο μοριακό ιόν**.

Τα ιόντα που προκύπτουν από τη σύγκρουση αυτή δεν είναι ρίζες και είναι σταθερότερα από τα **μοριακά ιόντα** που παράγονται από τον ιονισμό με ηλεκτρόνια. Για το λόγο αυτό εμφανίζονται στο χημικό ιονισμό, ο οποίος είναι μια **μαλακή πηγή ιονισμού** με λιγότερα θραύσματα απ' ότι στον ιονισμό με ηλεκτρόνια και από τα φάσματα του χημικού ιονισμού προκύπτουν απαραίτητες βασικές πληροφορίες για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους του αναλύτη, λόγω εμφάνισης μιας μορφής του μοριακού ιόντος. Αντίθετα στον ιονισμό με δέσμη ηλεκτρονίων η θραύση είναι τόσο εκτεταμένη ώστε δεν παραμένει ίχνος μοριακού ιόντος, αλλά είναι χρήσιμη η τεχνική αυτή για την ταυτοποίηση των ενώσεων από τα αντίστοιχα θραύσματα.

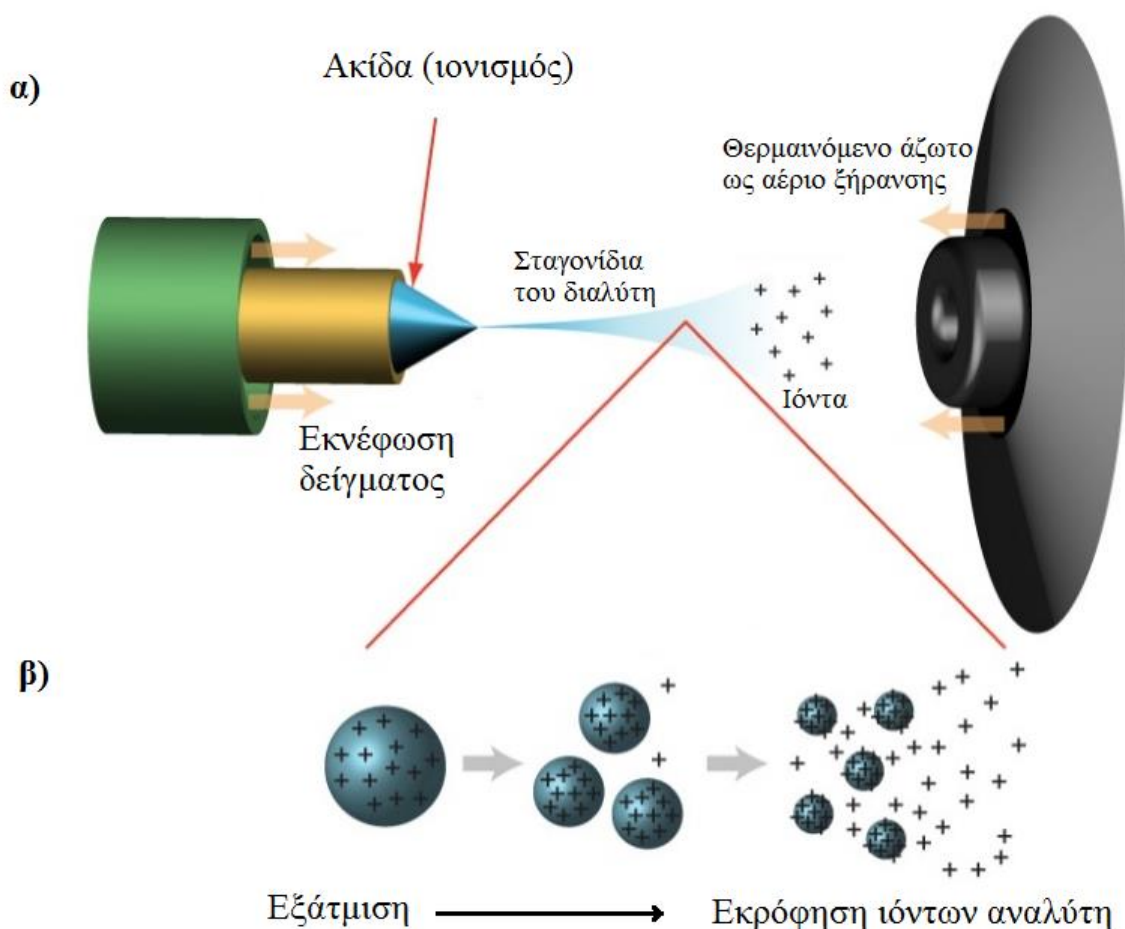
2. Πηγές ιονισμού για μη πτητικές ενώσεις(ιονοσμός σε ατμοσφαιρική πίεση)

Πολλές από τις σύγχρονες εφαρμογές της φασματομετρίας μάζας περιλαμβάνουν τον προσδιορισμό ασταθών, πολικών βιομορίων με μοριακά βάρη μεγαλύτερα των 2000Da. Αυτές οι εφαρμογές μπορούν να πραγματοποιηθούν με τη χρήση

τεχνικών ιονισμού σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (Atmospheric Pressure Ionisation) οι οποίες επιτρέπουν την ανάλυση διαλυμάτων. Οι πηγές αυτές εντάσσονται στις πηγές εκρόφησης, όπου στο στερεό ή υγρό δείγμα παρέχεται ενέργεια διαφόρων μορφών, έτσι ώστε να σχηματίζονται απ' ευθείας αέρια ιόντα. Τα φάσματα μάζας που προκύπτουν είναι πολύ απλά και αποτελούνται ως επί το πλείστον μόνο από το μοριακό ιόν ή το πρωτονιωμένο μοριακό ιόν.^{135,140}

Ιονισμός με ηλεκτροψεκάσμο (Electrospray ionization, ESI)

Η τεχνική αυτή αποτελεί σήμερα μια από τις σημαντικότερες τεχνικές για αναλύσεις πολυπεπτιδίων, πρωτεϊνών και ολιγονουκλεοτιδίων με μοριακά βάρη ≥ 100.000 Da, όπου (1 Da = 1/12 της μάζας ενός ατόμου άνθρακα, 1 Da = 1 amu)

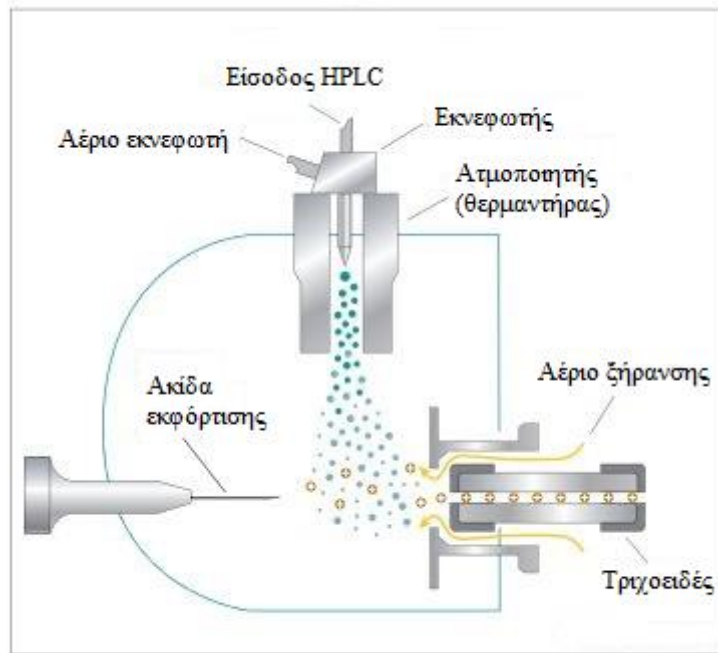


Σχήμα 3.4: α) Διάταξη ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό¹²⁵ β) Εκρόφιση ιόντων από το διάλυμα¹²⁶.

Στο σχήμα (α) απεικονίζεται η διάταξη της πηγής ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό. Το διάλυμα μέσω ενός εκνεφωτή διαβιβάζεται σε μια ακίδα που βρίσκεται σε υψηλή τάση. Τα μόρια του δείγματος ιονίζονται και περνούν κατόπι από ένα τριχοειδές, όπου με τη βοήθεια θερμαινόμενου αζώτου εξατμίζεται ο διαλύτης. Επειδή εξατμίζεται ο διαλύτης τα σταγονίδια συρρικνώνονται οπότε αυξάνει η πυκνότητα του φορτίου τους και εκροφούνται στο ρεύμα του αερίου μετά από διάσπαση, όπως φαίνεται στο σχήμα (β). Επειδή το φορτίο των πρωτεϊνών αυξάνεται με το μοριακό τους βάρος και στη φασματομετρία μάζας μετριέται ο λόγος **m/z**, προκύπτουν πολύ μικρές τιμές αυτού του λόγου και με τη μέθοδο ESI μπορούν να ανιχνευθούν ενώσεις με μεγάλα μοριακά βάρη μέχρι 150000 με ένα απλό φασματόμετρο μάζας που καλύπτει περιοχή μοριακών βαρών 1500 ή μικρότερα. Η τεχνική ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό προσαρμόζεται εύκολα στην έξοδο στηλών υγρής χρωματογραφίας υψηλής διαχωριστικότητας (HPLC) ή τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης (Capillary Electrophoresis), όπου η κινητή φάση εκνοφούται απ' ευθείας στο φασματόμετρο μάζας.^{135,140}

Χημικός ιονισμός σε ατμοσφαιρική πίεση (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI)

Ο εκνεφωτής με το δείγμα θερμαίνεται στους 250-400°C σε ατμοσφαιρική πίεση, εξατμίζοντας το διαλύτη. Το αέριο που προκύπτει από το διαλύτη ιονίζεται με τη βοήθεια ακίδας όπως φαίνεται παρακάτω



Σχήμα 3.5: Πηγή ιονισμού με χημικό ιονισμό σε ατμοσφαιρική πίεση (APCI)¹²⁷

Τα ιόντα του διαλύτη μεταφέρουν το φορτίο τους στα μόρια του δείγματος μέσω χημικών αντιδράσεων (χημικός ιονισμός). Τα ιόντα που προκύπτουν από το μόριο του δείγματος περνούν μέσω ενός τριχοειδούς στον αναλυτή μαζών. Η τεχνική APCI χρησιμοποιείται για μεγάλο εύρος πολικών και μη πολικών μορίων, μέχρι 1500 amu. Δεν ενδείκνυται για μακρομόρια και χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με υγρή χρωματογραφία λόγω της μη πολικότητας των μορίων.

3. Άλλες πηγές ιονισμού στη φασματομετρία μοριακών μαζών

Στη συνέχεια αναφέρονται μερικές ακόμη πηγές ιονισμού στη φασματομετρία μάζας, κάποιες από τις οποίες αναπτύχθηκαν πρόσφατα αλλά δεν εφαρμόζονται ακόμα για αναλύσεις ρουτίνας.

Ιονισμός εκρόφησης με λέιζερ υποβοηθούμενος από υλικό μήτρας (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization, MALDI)

Η τεχνική MALDI είναι μια τεχνική ιονισμού για τη μελέτη βιοπολυμερών μεγάλου μοριακού βάρους και ως τεχνική εκρόφησης οδηγεί σε μικρή θραυσματοποίηση. Το δείγμα αναμειγνύεται μ' ένα κατάλληλο οργανικό υλικό μήτρας που απορροφά ακτινοβολία στο UV. Η ενέργεια του λέιζερ απορροφάται από το υλικό της μήτρας και μεταδίδεται στο μόριο το οποίο εκροφάται και ιονίζεται. Η τεχνική MALDI χρησιμοποιείται κυρίως με αναλυτή μάζας χρόνου-πτήσης ο οποίος λειτουργεί με παλμικό ιονισμό και ενδείκνυται για την ανάλυση μικρών μορίων με μοριακά βάρη μικρότερα των 500Da λόγω της αποσύνθεσης του υλικού της μήτρας.^{135,140}

Βομβαρδισμός με ταχέα άτομα (Fast Atom Bombardment, FAB)

Αυτή η τεχνική επίσης χρησιμοποιείται για τη μελέτη μη πτητικών ενώσεων με μεγάλο μοριακό βάρος. Μια δέσμη ταχέων ατόμων, τα οποία δημιουργούνται από τον ιονισμό των αντίστοιχων αερίων και σύγκρουση των αντίστοιχων ιόντων με αργά κινούμενα άτομα του αερίου, βομβαρδίζουν το στερεό δείγμα που βρίσκεται σε διάλυμα γλυκερόλης. Τα ιόντα που δημιουργούνται εκροφούνται και εκτινάσσονται από την επιφάνεια του δείγματος. Η υγρή μήτρα βοηθά στην εκρόφηση του αναλύτη από τη στερεή επιφάνεια, αλλά λόγω ιονισμού της, δίνει ένα μεγάλο σήμα υποστρώματος. Για το λόγο αυτό αντικαθίστανται τα ταχέα άτομα με ταχέα ιόντα στη νεότερη τεχνική της υγρής φασματογραφίας μαζών δευτερογενούς ιόντος (Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry, LSIMS).^{135,140}

3.2.3 Αναλυτές μαζών στη μοριακή φασματομετρία μάζας

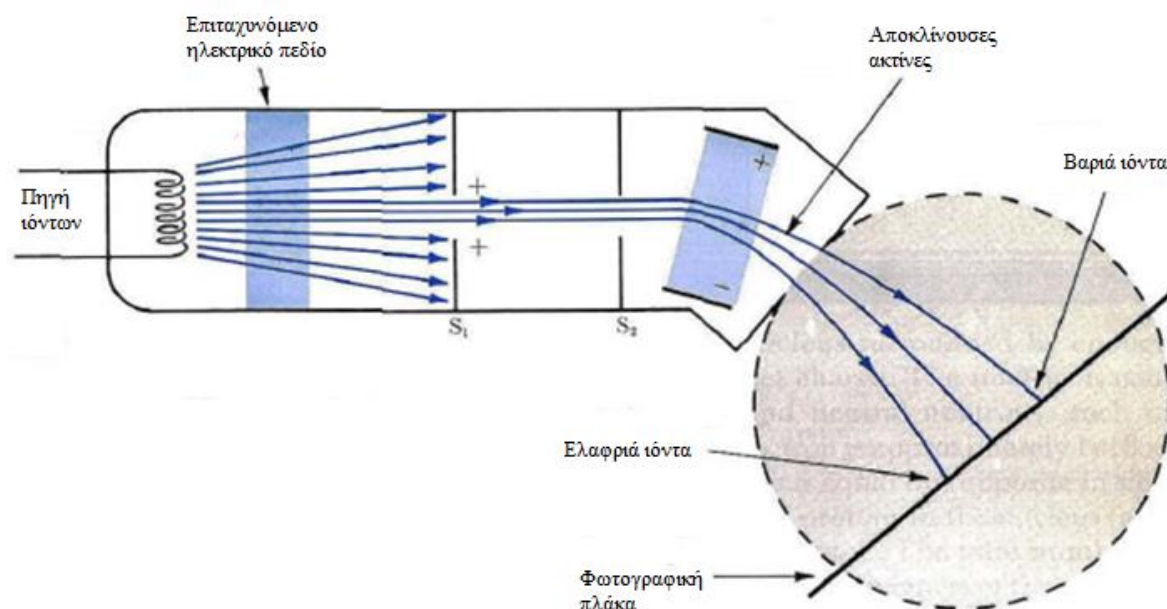
Οι αναλυτές μαζών διαχωρίζουν τα ιόντα σύμφωνα με το λόγο μάζας/φορτίο. Επίσης διακρίνονται σε απλούς αναλυτές με μικρή διαχωριστική ή διακριτική ικανότητα και σε αναλυτές με μεγάλη διαχωριστική ικανότητα. Αναλυτές με μεγάλη διακριτική ικανότητα R, είναι απαραίτητοι για την εύρεση του ακριβούς μοριακού τύπου μιας ένωσης, ενώ για τη διασάφηση απλώς της δομής ουσιών δεν χρειάζονται όργανα

μεγάλης διακριτικής ικανότητας. Γενικά όσο καλύτερος είναι ο διαχωρισμός των ιόντων, τόσο μικρότερη είναι η ποσότητα των διερχόμενων ιόντων. Οι αναλυτές με μεγάλη διακριτική ικανότητα που χρησιμοποιούνται κυρίως στη μοριακή φασματομετρία μάζας, διακρίνονται σε **αναλυτές μαγνητικού τομέα** ή **απλής εστίασης** με διαχωριστική ικανότητα $R=5000$ και σε αναλυτές **διπλής εστίασης** ή **συνδυασμού ηλεκτροστατικού και μαγνητικού πεδίου** με $R=50000$. Σε συνδυασμό με χρωματογραφικές μεθόδους χρησιμοποιούνται επίσης στη μοριακή φασματομετρία μάζας αναλυτές με μικρή διαχωριστική ικανότητα ($R=400-500$).

1. Αναλυτές μαζών με μεγάλη διαχωριστική ικανότητα

Αναλυτές μαγνητικού τομέα ή απλής εστίασης

Παρακάτω απεικονίζεται σχηματικά ένα φασματόμετρο μάζας με μαγνητικό αναλυτή απλής εστίασης.



Σχήμα 3.6: Σχηματική διάταξη φασματόμετρου μάζας με μαγνητικό αναλυτή και φωτογραφική καταγραφή¹²⁸

Στο μαγνητικό πεδίο H τα φορτισμένα σωματίδια αποκτούν μια μαγνητική δύναμη F και μία αντισταθμιστική φυγόκεντρη δύναμη E . Για να διανύσει ένα ιόν την κυκλική διαδρομή του μαγνητικού τομέα θα πρέπει οι δυνάμεις E και F να είναι ίσες και επειδή όλα τα φορτισμένα ιόντα έχουν σ' ένα δεδομένο δυναμικό επιτάχυνσης V την ίδια κινητική ενέργεια προκύπτει:

$$\frac{m}{z} = \frac{H^2 \cdot r^2 \cdot e}{2V}$$

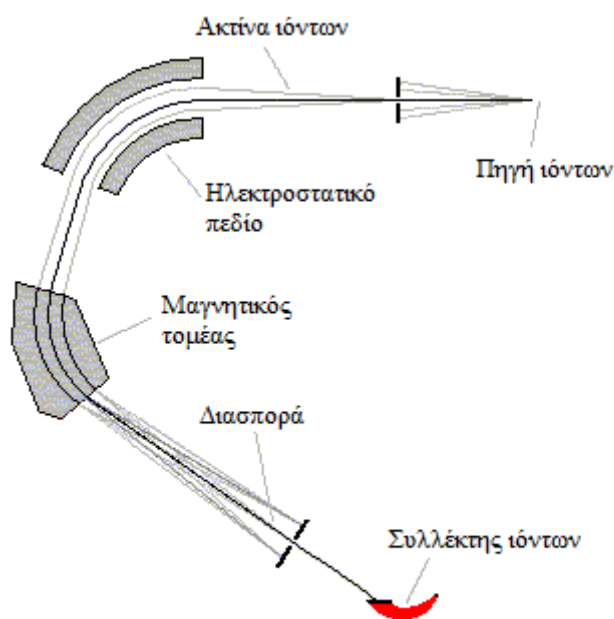
Όπου, m =μάζα ιόντος, z = φορτίο ιόντος, H =μαγνητικό πεδίο σε Tesla, r =ακτίνα κυκλικής διαδρομής του ιόντος, e =ηλεκτρονιακό φορτίο, V =δυναμικό επιτάχυνσης

Από την τελευταία εξίσωση προκύπτει ότι απλά φορτισμένα ιόντα με φορτίο z αλλά διαφορετικές μάζες m_1, m_2, \dots , διαγράφουν διαφορετικές ακτίνες κυκλικής διαδρομής r_1, r_2, \dots , για δεδομένο δυναμικό επιτάχυνσης V , σ' ένα δεδομένο μαγνητικό πεδίο ισχύος H . Επομένως το μαγνητικό πεδίο επιφέρει μια διασπορά μάζας σε ιόντα διαφορετικής μάζας και το φαινόμενο αυτό αναλογεί με τη διασπορά της πολυχρωματικής ακτινοβολίας από ένα πρίσμα.

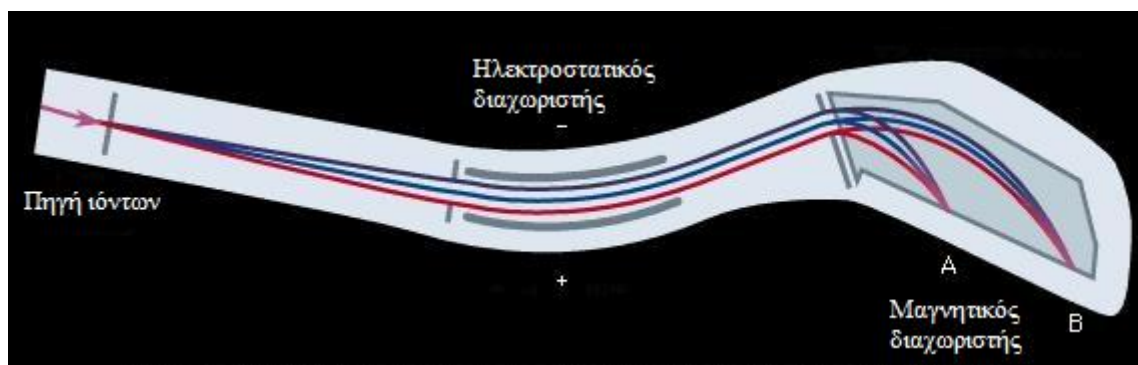
Μόνο ιόντα που κινούνται πάνω σε μια ορισμένη τροχιά ανιχνεύονται από το συλλέκτη. Πρέπει όλα τα ιόντα που θα ανιχνευθούν να ακολουθούν μια δεδομένη ακτίνα κυκλικής διαδρομής που προκαθορίζεται από το όργανο. Για να επιτευχθεί μια διαδοχική καταγραφή όλων των ιόντων με διαφορετικές μάζες πρέπει σύμφωνα με την παραπάνω εξίσωση να μεταβάλλεται είτε η ισχύς του μαγνητικού πεδίου H είτε το δυναμικό επιτάχυνσης V . Στα περισσότερα φασματομέτρα μάζας τα μεγέθη H και r διατηρούνται σταθερά, οπότε η μάζα προς το φορτίο που συλλέγεται είναι αντίστροφα ανάλογη του δυναμικού επιτάχυνσης V . Έτσι διαφορετικού μεγέθους ιόντα ανιχνεύονται σε διαφορετικές χρονικές στιγμές. Σε φασματομέτρα μάζας μαγνητικού τομέα, στα οποία χρησιμοποιείται φωτογραφική καταγραφή του φάσματος, διατηρούνται τα H και V σταθερά και μεταβάλλεται το r .

Αναλυτές μαγνητικού και ηλεκτροστατικού πεδίου ή διπλής εστίασης (double focusing)

Επειδή όλα τα ιόντα που έχουν τον ίδιο λόγο m/z δεν έχουν την ίδια κινητική ενέργεια αλλά ακολουθούν μια ενεργειακή κατανομή κατά Boltzmann, εξέρχονται από την πηγή με διαφορετικές ενέργειες το οποίο έχει επίπτωση στην εστίαση της δέσμης και το διαχωρισμό των ιόντων, διότι δεν υπάρχει μονοενεργειακή δέσμη ιόντων. Η ελάττωση της ενεργειακής διασποράς των ιόντων πριν μπουν στο μαγνητικό πεδίο επιτυγχάνεται με όργανα διπλής εστίασης, όπου ένα ακτινωτό ηλεκτροστατικό πεδίο συλλέγει μόνο εκείνα τα ιόντα που έχουν μια ορισμένη ταχύτητα ή κινητική ενέργεια. Στο παρακάτω σχήμα απεικονίζονται δύο είδη φασματομέτρων μάζας διπλής εστίασης διαφορετικής γεωμετρίας.



(α)



(β)

Σχήμα 3.7: Διάταξη φασματομέτρων μάζας μαγνητικού-ηλεκτροστατικού πεδίου διπλής εστίασης, (α) Γεωμετρία Nier-Johnson¹²⁹, (β) Γεωμετρία Mattauch-Herzog¹³⁰

2. Αναλυτές μαζών με μικρή διαχωριστική ικανότητα

Τετραπολικό φίλτρο μάζας

Πολλές εφαρμογές στη φασματομετρία μάζας δεν χρειάζονται υψηλή διαχωριστικότητα. Για το λόγο αυτό αναπτύχθηκαν αναλυτές μαζών που είναι μικρότεροι, φθηνότεροι και σε μικρότερη διαχωριστική ικανότητα απ' ό,τι οι αναλυτές μαγνητικού τομέα. Το τετραπολικό φίλτρο μάζας είναι ο περισσότερο χρησιμοποιούμενος αναλυτής μαζών στη φασματομετρία μάζας, όπου τα ιόντα διαχωρίζονται σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Έχει τη δυνατότητα γρήγορης σάρωσης, σαρώνοντας χρωματογραφικές κορυφές σε πραγματικό χρόνο και χρησιμοποιείται ευρέως στη συνδυασμένη τεχνική GC-MS και σε άλλες, σε μια ποικιλία βιομηχανικών διεργασιών.

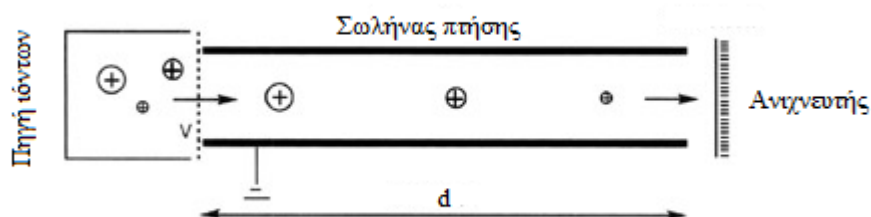
Αναλυτές μαζών χρόνου πτήσης (Time of flight analysers, TOF)

Μια ηλεκτρομαγνητική δύναμη επιβάλλεται σε όλα τα ιόντα που δημιουργούνται με παλμικό ιονισμό, στον ίδιο χρόνο και τα αναγκάζει να επιταχυνθούν και να διασχίσουν μια δεδομένη απόσταση d μέσα σε ένα σωλήνα χωρίς την ύπαρξη ηλεκτρομαγνητικών πεδίων.

Ελαφρύτερα ιόντα μετακινούνται γρηγορότερα απ' ότι βαρύτερα οπότε φθάνουν νωρίτερα στον ανιχνευτή. Οι χρόνοι πτήσης των ιόντων t εξαρτώνται από τη μάζα τους και ποικίλλουν από 1 έως 30 μs . Για τον διαχωρισμό μαζών σύμφωνα με το χρόνο πτήσης τους ισχύει η σχέση:

$$\frac{m}{z} = 2eV \left(\frac{t}{d} \right)^2$$

Όπου m =μάζα του ιόντος, z =φορτίο του ιόντος, t =χρόνος πτήσης και d =μήκος σωλήνα ελεύθερης πτήσης

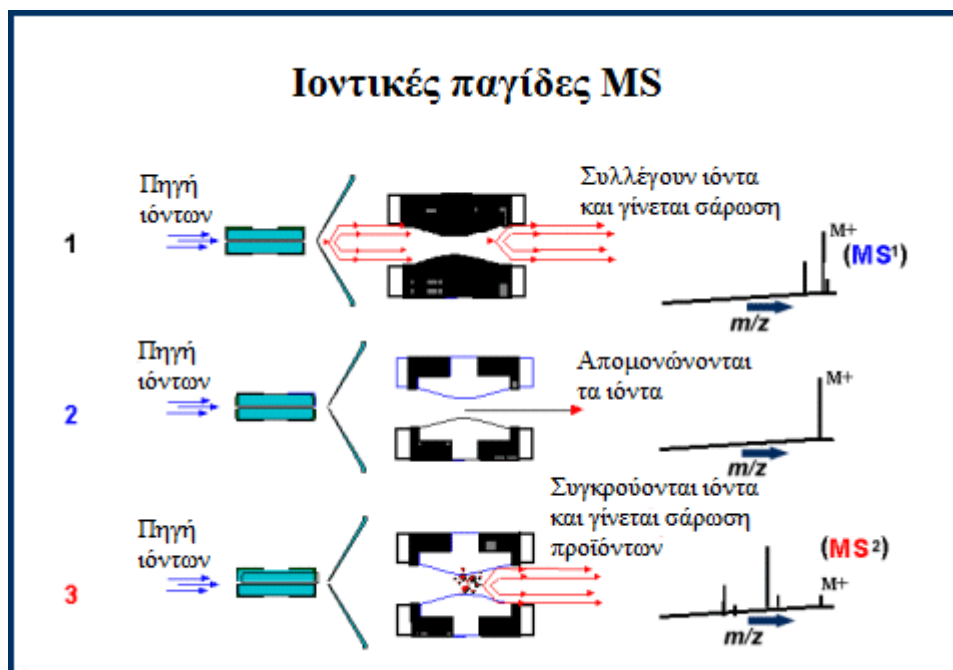


Σχήμα 3.8: Σχηματικό διάγραμμα φασματόμετρου μάζας «χρόνου πτήσης»¹³¹

Τα φασματόμετρα μάζας με αναλυτή μαζών χρόνου πτήσης είναι απλά, φθηνά και μετρούν μάζες μεγάλου εύρους μέχρι 300 kDa. Ωστόσο έχουν μικρότερη διαχωριστική ικανότητα και επαναληψιμότητα από τα τετραπολικά φίλτρα μάζας και από τους αναλυτές μαγνητικού πεδίου.^{135,140}

Ιοντικές παγίδες (Ion traps)

Στο παρακάτω σχήμα φαίνεται ο διαχωρισμός μαζών με έναν αναλυτή ιοντικής παγίδας.



*Σχήμα 3.9: Αναλυτές μαζών ιοντικής παγίδας*¹³²

Τα ιόντα παγιδεύονται σε μια κοιλότητα που περιβάλλεται από ένα δακτυλιοειδές ηλεκτρόδιο λόγω ενός επιβαλλόμενου ηλεκτρομαγνητικού πεδίου. Χρησιμοποιώντας μια αυξανόμενη ραδιοσυχνότητα, αποσταθεροποιούνται μερικά ιόντα μεγαλύτερης μάζας, εξέρχονται από το κυκλικό ηλεκτρόδιο και προσπίπτουν στον ανιχνευτή. Οι αναλυτές αυτοί είναι απλούστεροι και φθηνότεροι από τα όργανα μαγνητικού τομέα ή τετραπολικού φίλτρου μάζας, αλλά πιο ευαίσθητοι από αυτούς. Καλύπτουν περιοχές μαζών από 500-1000 Da και χρησιμοποιούνται συνήθως σε συνδυασμένες τεχνικές GC-MS, LC-MS.^{135,140}

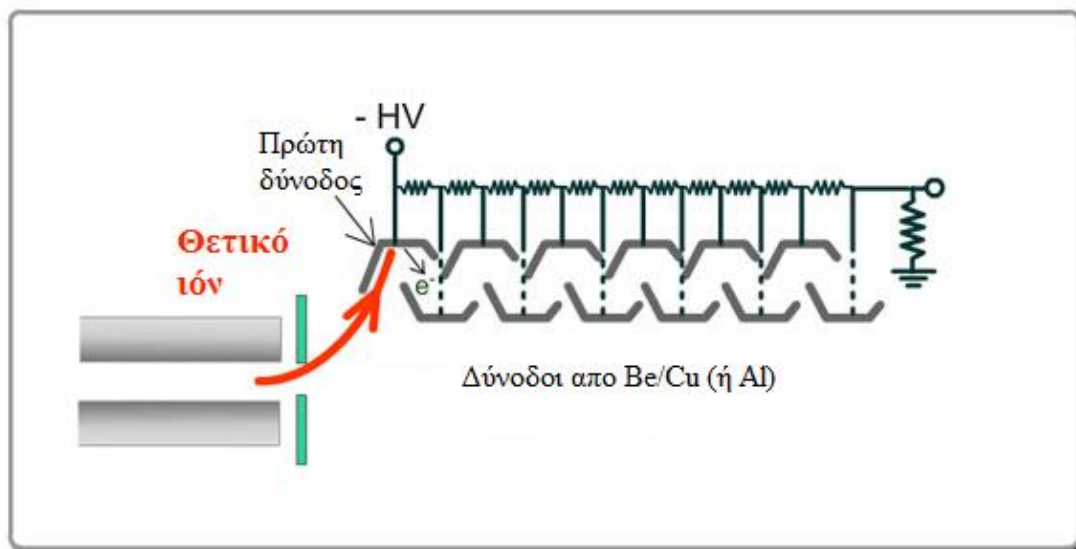
3.2.4 Ανιχνευτές στη μοριακή φασματομετρία μάζας

Στη φασματομετρία μάζας χρησιμοποιούνται ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστές (electron multipliers) των οποίων η αρχή βασίζεται στη μέτρηση των ηλεκτρικών φορτίων των ιόντων.

Ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστές διακριτών δυνόδων (discrete dynode electron multipliers)

Αποτελούνται από πολλές δυνόδους. Τα θετικά ιόντα που προκύπτουν μετά τον αναλυτή μαζών, βομβαρδίζουν μια κάθοδο από Βηρύλλιο και Χαλκό (Be/Cu) και πρόσφατα από Αλουμίνιο (Al) και ελευθερώνουν ηλεκτρόνια τα οποία επιταχυνόμενα

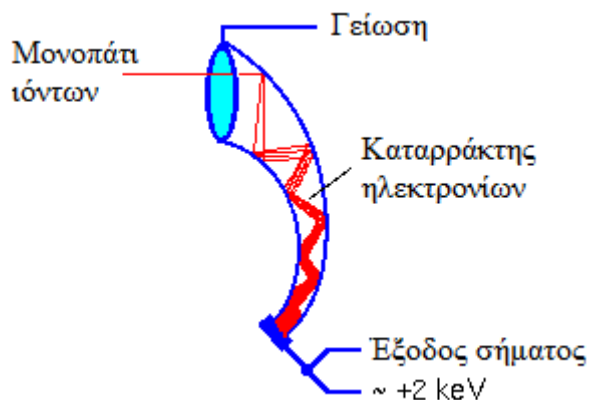
μέσω μιας σειράς δυνόδων από το ίδιο υλικό προκαλούν ένα «καταρράκτη» ηλεκτρονίων. Ο ανιχνευτής αυτός είναι πολύ ευαίσθητος και έχει ενίσχυση ρεύματος μέχρι 10^8 .



Σχήμα 3.10: Ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής διακριτών δυνόδων¹³³

Ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστές συνεχούς δυνόδου (continuous dynode multipliers, channeltron)

Έχουν το σχήμα τρομπέτας, είναι από γυαλί με προσθήκη μολύβδου και κατά μήκος τους εφαρμόζεται ένα δυναμικό περίπου 2 kV. Τα ιόντα προσκρούουν στην επιφάνεια κοντά στην είσοδο και τα εκτοξευόμενα ηλεκτρόνια προκαλούν έναν καταρράκτη ηλεκτρονίων από τις συγκρούσεις με τα τοιχώματα, κατευθυνόμενα στο θετικό ηλεκτρόδιο, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 3.11**. Οι ανιχνευτές αυτοί έχουν ενίσχυση της τάξης των 10^5 - 10^8 και χρησιμοποιούνται κυρίως στην έξοδο των αναλυτών τετραπολικού φίλτρου, όπως και στους αναλυτές μαγνητικού τομέα.^{135,140}



Σχήμα 3.11: Ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής συνεχούς δυνάμει¹³⁴

3.3 Μοριακά φάσματα μάζας

Είναι η γραφική απεικόνιση των ιόντων (μοριακών ιόντων ή θραυσμάτων μορίων) που προέρχονται από μία ένωση και περιγράφει το σχετικό ποσοστό του κάθε ιόντος (τεταγμένη) σε συνάρτηση με το λόγο της μάζας προς το φορτίο του m/z (τετμημένη) σε amu (atomic mass unit) ή Da (Dalton).

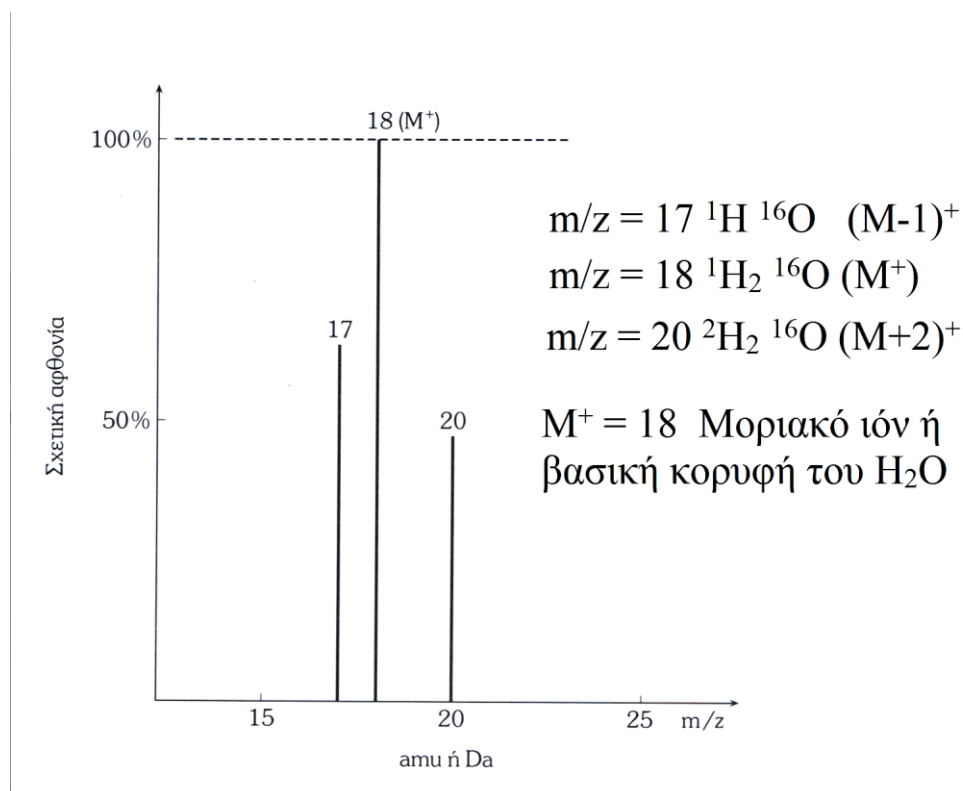
Κορυφές μαζών (mass peaks) είναι οι κορυφές που αποτελούν το φάσμα μάζας. Η θέση τους εκφράζει το λόγο της μάζας προς το φορτίο τους ενώ το ύψος τους (ένταση), το σχετικό ποσοστό του ιόντος στο σύνολο των ιόντων που παράγονται κατά τον ιονισμό.

3.3.1 Βασικές έννοιες στα μοριακά φάσματα μάζας

Μοριακό ιόν ή Μητρική κορυφή (molecular ion)

Με μια δέσμη ηλεκτρονίων ενέργειας 9 έως 15 eV το κύριο ιόν που παράγεται από την απώλεια ενός ηλεκτρονίου του μορίου μιας ένωσης είναι το **μοριακό ιόν** που συμβολίζεται με M^+ . Το μοριακό ιόν δίνει ένα πολύ απλό φάσμα μάζας, που αποτελείται μόνο από τη **μητρική κορυφή**, η οποία δίνει το ακριβές μοριακό βάρος της ένωσης. Ως μοριακό ιόν M^+ ορίζεται αυτό που αποτελείται από τα πιο διαδεδομένα ισότοπα των στοιχείων που απαρτίζουν την ένωση. Με βάση αυτό τα άλλα μοριακά είδη, που αποτελούνται από πιο βαριά ισότοπα, συμβολίζονται ως $(M + 1)^+$, $(M + 2)^+$ κ.λπ. Συνήθως τα ισότοπα που βρίσκονται σε μεγαλύτερη αναλογία σε

μια ένωση έχουν τη μικρότερη μάζα, π.χ. στο H_2O : $M^+ = 18$, $(M + 2)^+ = 20$, λόγω της παρουσίας του βαρέως ισотоπυ ^2H (δευτερίου)



Σχήμα 3.12: Φάσμα μάζας του νερού¹³⁵

Βασικό ιόν ή βασική κορυφή (base peak)

Με μια δέσμη ηλεκτρονίων ενέργειας 70 eV, που χρησιμοποιείται συνήθως σε πηγές ιονισμού με δέσμη ηλεκτρονίων, το αρχικό μοριακό ιόν διασπάται σε πολλά θραύσματα και η μητρική κορυφή εμφανίζεται συνήθως πολύ ασθενής ή καθόλου. Η μεγαλύτερη κορυφή που παρατηρείται στο φάσμα ονομάζεται **βασική κορυφή** και αντιστοιχεί στο **βασικό ιόν**, που είναι το ιόν που περιέχεται σε μεγαλύτερο ποσοστό στο μίγμα ιόντων που παράγονται κατά τον ιονισμό. Συνήθως οι εντάσεις των κορυφών του φάσματος μάζας εκφράζονται ως ποσοστό % της βασικής κορυφής.

Κορυφές θραυσμάτων (fragment peaks)

Το παραγόμενο αρχικά μοριακό ιόν έχει σημαντική περίσσεια ενέργειας που διασπείρεται και προκαλεί διασπάσεις με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός ή

περισσοτέρων θραυσμάτων. Ένα από τα θραύσματα συγκρατεί το φορτίο, ενώ τα υπόλοιπα μπορεί να είναι είτε σταθερά μόρια είτε ρίζες. Η σχετική συγκέντρωση των παραγόμενων θραυσμάτων έχει σχέση με την ισχύ και τη χημική φύση των δεσμών που συγκρατούν το θραύσμα με το υπόλοιπο μόριο. Ανάλογα με το είδος της πηγής ιονισμού (σκληρή ή μαλακή) λαμβάνονται διαφορετικά φάσματα μάζας της ίδιας ουσίας.^{135,140}

3.3.2 Ερμηνεία μοριακών φασμάτων μάζας

Ταυτοποίηση αγνώστων ενώσεων (ποιοτική ανάλυση)

Το φάσμα μάζας αποτελεί το δακτυλικό αποτύπωμα μιας ένωσης διότι δύο διαφορετικά μόρια δεν είναι δυνατόν να διασπασθούν και να ιονισθούν από μία δέσμη ηλεκτρονίων με τον ίδιο τρόπο. Ως επί το πλείστον ο μηχανισμός διάσπασης ενός μορίου μπορεί να προκαθοριστεί έτσι ώστε από τα διαγράμματα θραύσης που προκύπτουν να μπορεί να ταυτοποιηθεί η αρχική ένωση. Ακολουθείται η εξής διαδικασία για την ταυτοποίηση μιας άγνωστης ένωσης. Στην αρχή επιχειρείται από το φάσμα μάζας της ένωσης να βρεθεί ο μοριακός της τύπος. Αυτό επιτυγχάνεται:

1. Από την **ταυτοποίηση της μητρικής κορυφής** της ένωσης, με βάση την οποία μπορεί να προσδιοριστεί το μοριακό βάρος της με ακρίβεια που εξαρτάται από τη διακριτική ικανότητα του οργάνου μας.
2. Από την **ερμηνεία του φάσματος των θραυσμάτων** όπου αναζητούνται χαρακτηριστικά θραύσματα. Ομόλογες σειρές οργανικών μορίων, π.χ. κορεσμένοι αλειφατικοί υδρογονάνθρακες, ακόρεστοι αλειφατικοί υδρογονάνθρακες, αρωματικοί υδρογονάνθρακες, εστέρες, κετόνες, αλκοόλες κ.λπ δίνουν χαρακτηριστικά διαγράμματα θραύσης, λόγω των συγκεκριμένων μηχανισμών διάσπασης των δεσμών τους. Αν π.χ. σε ένα φάσμα μάζας υπάρχουν συστάδες κορυφών των οποίων οι μάζες τους διαφέρουν κατά 14 (π.χ. $m/z = 14, 28, 42$ κ.λπ.) αυτό είναι χαρακτηριστικό για τις αλκυλομάδες – CH_2 , που προέρχονται από τη διάσπαση κορεσμένων αλειφατικών υδρογονανθράκων. Η κορυφή στη μάζα $M-18$ υποδηλώνει την απώλεια ενός μορίου ύδατος όπου είναι χαρακτηριστική κορυφή των αλκοολών.
3. Με τη βοήθεια του **ισοτοπικού φαινομένου** (isotopic cluster), δηλαδή της κατανομής των φυσικών ισοτόπων μιας ένωσης, επιτυγχάνεται μια προσέγγιση στο μοριακό της τύπο. Μόρια που περιέχουν βαριά ισότοπα, θα

εμφανίσουν κορυφές σε μία ή περισσότερες μονάδες m/z μεγαλύτερες από αυτές που εμφανίζει το κανονικό ισότοπο ($M + 1$, $M + 2$). Στον παρακάτω πίνακα απεικονίζονται τα ατομικά βάρη και η κατανομή των φυσικών ισotόπων διαφόρων στοιχείων.

Πίνακας 3.2: Ατομικά βάρη και κατανομή των φυσικών ισotόπων στοιχείων.

Ισότοπο	Ατομικό βάρος	Φυσική κατανομή (%)
^1H	1,007825	99,985
^2H	2,014102	0,015
^{12}C	12,000000	98,9
^{13}C	13,003354	1,1
^{14}N	14,003074	99,64
^{15}N	15,000108	0,36
^{16}O	15,994915	99,8
^{17}O	16,999133	0,04
^{18}O	17,777160	0,2
^{32}S	31,972074	95,0
^{33}S	32,971461	0,76
^{34}S	33,967865	4,2
^{35}Cl	34,968855	75,8
^{37}Cl	36,965896	24,2

Με διάφορους εμπειρικούς κανόνες, όπως με τον **κανόνα του δακτυλίου** ή με τον **κανόνα του αζώτου** προκύπτουν και άλλες πληροφορίες για τη φύση της ένωσης που εξετάζεται, όπως ο αριθμός των ακόρεστων θέσεων ή ο αριθμός των ατόμων αζώτου σε ένα μόριο. Ο βαθμός δυσκολίας της ταυτοποίησης ενός μορίου αυξάνει με το μοριακό του βάρος και τις συνθήκες έντονου ιονισμού (μεγάλος αριθμός θραυσμάτων). Τα σύγχρονα όργανα είναι εφοδιασμένα με μεγάλες βιβλιοθήκες προτύπων φασμάτων και υπάρχει μέσω H/Y η δυνατότητα σύγκρισης του άγνωστου φάσματος με τα αντίστοιχα των βιβλιοθηκών μέσω δεικτών ομοιότητας (similarity

index). Με τη χρήση των άλλων φασματοσκοπικών δεδομένων (IR, NMR), της χρωματογραφικής συμπεριφοράς και των σημείων βρασμού και τήξης της ένωσης επιτυγχάνεται τέλος η τελική ταυτοποίηση του αναλύτη.

Ποσοτική ανάλυση

Τα διαγράμματα θραυσμάτων των συστατικών είναι προσθετικά. Έτσι είναι δυνατόν να αναλυθούν μίγματα, αν το φάσμα των συστατικών έχει ληφθεί στις ίδιες συνθήκες. Ο υπολογισμός περιλαμβάνει ένα σύστημα n εξισώσεων με n αγνώστους για ένα μίγμα με n συστατικά και γίνεται με τη βοήθεια ηλεκτρονικών υπολογιστών. Ο καλύτερος διαχωρισμός επιτυγχάνεται με χρήση συνδυαστικών μεθόδων όπως χρωματογραφικών τεχνικών με φασματομέτρα μάζας ως ανιχνευτές.^{135,140}

3.4 Δυνατότητες και εφαρμογές της μοριακής

φασματομετρίας μάζας

Απο το φάσμα μάζας προκύπτουν πληροφορίες σχετικά με τη σύνθεση μιγμάτων οργανικών ενώσεων και μπορεί να προσδιοριστεί το μοριακό βάρος μιας ένωσης. Η μέθοδος προσφέρεται για τη διερεύνηση μηχανισμών αντιδράσεων και για μελέτες ιχνηθέτησης με τη χρήση σταθερών ισοτόπων. Επίσης μελετώνται με τη φασματομετρία μάζας πολυμερή μεγάλου μοριακού βάρους και φυσικά προϊόντα αφού προηγουμένως υποστούν πυρόλυση και δημιουργηθούν προϊόντα αποσύνθεσής τους τα οποία και εξετάζονται. Μίγματα που περιέχουν έως και 30 ενώσεις μπορούν να αναλυθούν με τη χρήση ηλεκτρονικού υπολογιστή σε συγκεντρώσεις των συστατικών τους έως και 0,001 mol με ακρίβεια $\pm 0,05$ έως ± 1 %. Για συστατικά που περιέχονται σε μεγάλα ποσοστά η ακρίβεια της μεθόδου είναι μικρότερη.

Οι συζευγμένες φασματομετρικές μέθοδοι, όπως GC-MS, LC-MS, MS-MS έχουν δώσει πολύ μεγαλύτερες δυνατότητες στην ανάλυση πολύπλοκων οργανικών μιγμάτων, λόγω του διαχωρισμού των ουσιών και των χαμηλών ορίων ανίχνευσης που επιτυγχάνονται.^{135,140}

4

ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ (NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE SPECTROMETRY, NMR)

Η φασματομετρία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) είναι μια μορφή φασματομετρίας απορρόφησης, όπου το δείγμα που βρίσκεται σε ισχυρό μαγνητικό πεδίο απορροφά ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία στην περιοχή των ραδιοκυμάτων (4 έως 900 MHz) και οι προσανατολισμένοι πυρήνες των ατόμων από την κατάσταση χαμηλότερης ενέργειας μεταβαίνουν στην κατάσταση υψηλότερης ενέργειας με αντιστροφή του spin. Όταν πραγματοποιηθεί αυτή η αναστροφή, οι πυρήνες έχουν συντονισθεί με την εφαρμοζόμενη ακτινοβολία, απ' όπου προκύπτει και ο όρος «συντονισμός».

Η συχνότητα απορρόφησης της προσπίπτουσας ακτινοβολίας που παρατηρείται από την αλληλοεπίδρασή της με τους πυρήνες του αναλύτη, είναι χαρακτηριστική για κάθε πυρήνα, με αποτέλεσμα η μέθοδος NMR να αποτελεί μια αποτελεσματική

μέθοδο για την ταυτοποίηση της δομής οργανικών ενώσεων, για τον ποσοτικό προσδιορισμό τους και για το χημικό «περιβάλλον» των πυρήνων των ατόμων στα μόρια των χημικών ενώσεων.

Τα πρώτα πειράματα σε φασματομετρία NMR διεξήχθησαν από τους Bloch, του Πανεπιστημίου Stanford και Purcell, από το Harvard το 1946, οι οποίοι ανεξάρτητα απέδειξαν ότι η απορρόφηση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας από πυρήνες ατόμων που βρίσκονται σε ισχυρό μαγνητικό πεδίο έχει ως αποτέλεσμα το διαχωρισμό των ενεργειακών τους επιπέδων και τον προσανατολισμό των πυρήνων στις αντίστοιχες στάθμες, μετρώντας την ελάχιστη αυτή ενέργεια που απορροφάται κατά τη μετάβαση των πυρήνων. Για την ανακάλυψή τους αυτή μοιράστηκαν το 1952 το βραβείο Νόμπελ Φυσικής. Το 1953 παρουσιάστηκε το πρώτο εμπορικό όργανο NMR για τη μελέτη χημικών δομών και η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε ταχύτατα με ποικίλες εφαρμογές κυρίως στην οργανική χημεία και βιοχημεία.

Η φασματομετρία NMR είναι συμπληρωματική των άλλων φασματομετρικών μεθόδων, όπως της φασματομετρίας μάζας και της φασματομετρίας υπέρυθρου για την ταυτοποίηση της δομής ακόμα και εξαιρετικά περίπλοκων μορίων. Επιπλέον συμβάλλει στη στερεοχημική ταυτοποίηση των οργανικών ενώσεων παρέχοντας τη συγκεκριμένη στερεοχημική διάταξη του ανθρακικού σκελετού με τα υδρογόνα σε ένα οργανικό μόριο, δεδομένου ότι οι πυρήνες που εξετάζονται ως επί το πλείστον στο NMR για την οργανική ανάλυση είναι το υδρογόνο (^1H) και ο άνθρακας (^{13}C).

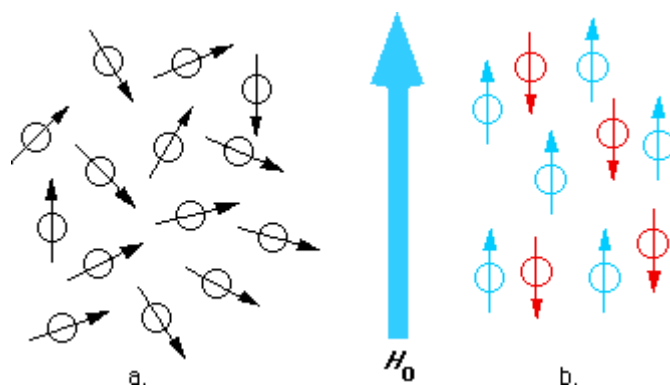
Οι καινούριες εξελίξεις στη φασματομετρία NMR, όπως ο συνδυασμός με την τεχνική μετασχηματισμού Fourier (FT-NMR) και η ανάπτυξη δισδιάστατων (2D) και πολυδιάστατων (multidimensional) τεχνικών NMR, έδωσαν άλλες διαστάσεις στη χαρτογράφηση της δομής οργανικών ενώσεων.

4.1 Θεωρία του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού

Πολλά είδη πυρήνων συμπεριφέρονται σαν να περιστρέφονται γύρω από έναν άξονα (αυτοστροφορμή, spin) και δεδομένου ότι είναι θετικά φορτισμένοι, λειτουργούν οι περιστρεφόμενοι πυρήνες ως μικροσκοπικοί μαγνήτες με τυχαίο προσανατολισμό. (Σχήμα 4.1α)

Παρουσία όμως ενός ισχυρού εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, οι πυρήνες αποκτούν συγκεκριμένους προσανατολισμούς. Για έναν ορισμένο πυρήνα με κβαντικό αριθμό πυρηνικού spin I ($I = 0, \frac{1}{2}, 1, \frac{3}{2}, \dots, \frac{9}{2}$) υπάρχουν $2I+1$ δυνατές στάθμες ή

προσανατολισμοί μέσα στο μαγνητικό πεδίο. Για πυρήνες με κβαντικό αριθμό spin $I=1/2$ (όπως πυρήνες του υδρογόνου ή του άνθρακα) μόνο δύο προσανατολισμοί με διαφορετική ενέργεια είναι πιθανοί: **παράλληλος** (μικρότερη ενέργεια) και **αντιπαράλληλος** (μεγαλύτερη ενέργεια) προς το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο H_0 (Σχήμα 4.1β)

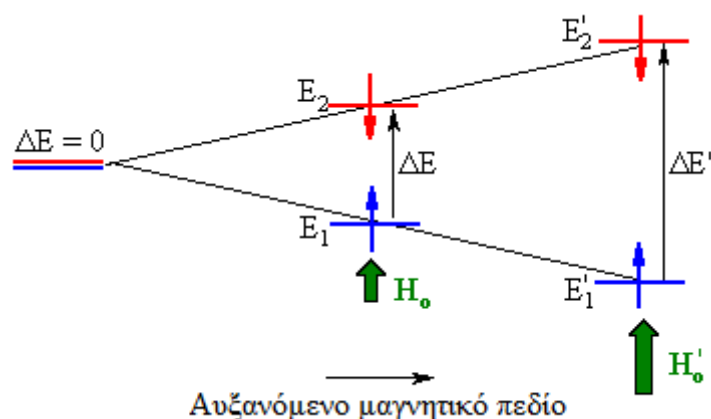


Σχήμα 4.1: Διάταξη πυρηνικών spin απουσία (α) και παρουσία (β) εξωτερικού μαγνητικού πεδίου H_0 με παράλληλη και αντιπαράλληλη κατεύθυνσή τους ως προς αυτό.¹³⁶

Αν οι προσανατολισμένοι πυρήνες ακτινοβοληθούν με κατάλληλη ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία της περιοχής ραδιοκυμάτων, απορροφάται ενέργεια από τους χαμηλότερης ενέργειας πυρήνες (παράλληλο spin προς το εξωτερικά επιβαλλόμενο πεδίο), οι οποίοι μεταβαίνουν σε κατάσταση υψηλότερης ενέργειας με **αναστροφή** του spin. Το φαινόμενο αυτό της αναστροφής του spin πυρήνων με την εφαρμοζόμενη ακτινοβολία καλείται «**συντονισμός**», απ' όπου προκύπτει και η ονομασία «**πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός**».

Η συχνότητα που απαιτείται για το συντονισμό εξαρτάται:

- α) από την ισχύ του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου H_0 και
- β) από το είδος του πυρήνα



Σχήμα 4.2: Ενεργειακή διαφορά ΔE μεταξύ της παράλληλης και αντιπαράλληλης διάταξης των πυρηνικών spin σε συνάρτηση με την ισχύ του εφαρμοζόμενου πεδίου H_0 .¹³⁷

Όσο αυξάνεται η ισχύς του εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου H_0 , τόσο αυξάνεται και η ενεργειακή διαφορά μεταξύ της παράλληλης και αντιπαράλληλης διάταξης των πυρήνων, με αποτέλεσμα να απαιτείται ακτινοβολία υψηλότερης ενέργειας για την αναστροφή του spin (Σχήμα 4.2).

Στο σημείο α του σχήματος 4.2 οι καταστάσεις spin έχουν την ίδια ενέργεια ($\Delta E=0$). Στο σημείο β, με ισχύ εφαρμοζόμενου πεδίου H_0 , η διαφορά ενέργειας ΔE αντιστοιχεί σε συχνότητα $\nu_1=60\text{MHz}$, ενώ στο σημείο γ όπου η ισχύς του εφαρμοζόμενου πεδίου είναι μεγαλύτερη $H_0' > H_0$ και η διαφορά ενέργειας $\Delta E'$, είναι μεγαλύτερη της ΔE με συχνότητα $\nu_2= 100\text{MHz}$.

Στον πίνακα 4.1 παρουσιάζονται οι συχνότητες συντονισμού για τους δύο πυρήνες ^1H και ^{13}C σε συνάρτηση με το μαγνητικό πεδίο.

Πίνακας 4.1: Συχνότητες συντονισμού των πυρήνων ^1H και ^{13}C σε διαφορετικής ισχύος μαγνητικά πεδία H_0

H_0 (Tesla)	Συχνότητες συντονισμού (MHz)	^1H Συχνότητες συντονισμού (MHz)	^{13}C Συχνότητες συντονισμού (MHz)	Τύπος χρησιμοποιούμενου μαγνήτη
1,41	60	15,1		μόνιμος μαγνήτης
2,35	100	25,15		Ηλεκτρομαγνήτης
4,70	200	50,3		υπεραγωγίμος μαγνήτης
7,05	300	75,4		υπεραγωγίμος μαγνήτης
9,40	400	100,6		υπεραγωγίμος μαγνήτης
14,09	600	150,9		υπεραγωγίμος μαγνήτης

Οι τέσσερις σημαντικότεροι πυρήνες με κβαντικό αριθμό spin $\frac{1}{2}$, οι οποίοι χρησιμοποιούνται ως επί το πλείστον στο NMR είναι οι ^1H , ^{13}C , ^{19}F και ^{31}P . Γενικά ισχύει ότι όλοι οι πυρήνες με περιττό αριθμό πρωτονίων και όλοι οι πυρήνες με περιττό αριθμό νετρονίων εκδηλώνουν το φαινόμενο του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, ενώ οι πυρήνες με άρτιο αριθμό πρωτονίων και άρτιο αριθμό νετρονίων δεν παρουσιάζουν στροφορμή (αριθμός spin=0), είναι μαγνητικά αδρανείς και δεν παρατηρούνται στο NMR.

Η ενεργειακή διαφορά ΔE μεταξύ της παράλληλης και αντιπαράλληλης διάταξης ενός πυρήνα με κβαντικό αριθμό spin $I = \pm 1/2$ δίνεται από την εξίσωση:

$$\Delta E = 2\mu H_0 \text{ με } I=1/2$$

όπου μ = μαγνητική ροπή, H_0 =ισχύς μαγνητικού πεδίου

Με την απορρόφηση ακτινοβολίας συντονισμού (αναστροφή του spin) ισχύει:

$$\Delta E = h\nu = \frac{\mu H_0}{I}$$

Με τη μετατροπή της γραμμικής ν σε γωνιακή συχνότητα $\omega = 2\pi\nu$ προκύπτει:

$$2\pi\nu = \frac{2\pi\mu H_0}{hI} = \gamma H_0$$

όπου γ = γυρομαγνητικός λόγος, μια σταθερά χαρακτηριστική για τον πυρήνα κάθε ισότοπου (σε $\text{rad T}^{-1} \text{s}^{-1}$). Ένας άλλος ορισμός του γ που προκύπτει από την παραπάνω εξίσωση είναι:

$$\text{Γυρομαγνητικός λόγος} = \gamma = \frac{2\pi\nu}{H_0}$$

απ' όπου ισχύει για τη συχνότητα συντονισμού ν_{res} (res=resonance), που θα προκαλέσει μετάπτωση η σχέση:

$$\nu_{\text{res}} = \frac{\gamma}{2\pi} H_0$$

που αποτελεί τη βασική εξίσωση για το NMR, ονομαζόμενη εξίσωση **Larmor**.

Επομένως όταν το H_0 διατηρείται σταθερό, απαιτείται μια συγκεκριμένη συχνότητα για το συντονισμό ενός πυρήνα. Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή του γ , τόσο πιο μεγάλη είναι η συχνότητα συντονισμού και επομένως τόσο πιο εύκολη η παρατήρηση του συγκεκριμένου πυρήνα.¹³⁵

Χημική μετατόπιση

Οι συχνότητες συντονισμού των πυρήνων του ίδιου στοιχείου μέσα σε ένα μόριο επηρεάζονται με χαρακτηριστικό τρόπο από το χημικό τους περιβάλλον, δηλαδή από την ηλεκτρονιακή πυκνότητα που τα περιβάλλει και το είδος των ατόμων με τα οποία συνδέονται. Γενικά οι πυρήνες προστατεύονται από την πλήρη επίδραση του εφαρμοζόμενου εξωτερικά μαγνητικού πεδίου H_0 , λόγω των ηλεκτρονίων που τους περιβάλλουν. Όταν το μόριο τοποθετείται μέσα σε ένα μαγνητικό πεδίο, τα ηλεκτρόνια προστατεύουν τον πυρήνα δημιουργώντας μαγνητικά πεδία αντίθετα προς το εφαρμοζόμενο με αποτέλεσμα η πραγματική ένταση του μαγνητικού πεδίου του πυρήνα, $H_{\text{πραγμ.}}$, να είναι λίγο μικρότερη από την ισχύ του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου H_0 σύμφωνα με την εξίσωση:

$$H_{\text{πραγμ.}} = H_0 - \sigma H_0 = H_0(1 - \sigma)$$

όπου σ = σταθερά προάσπισης (screening constant).

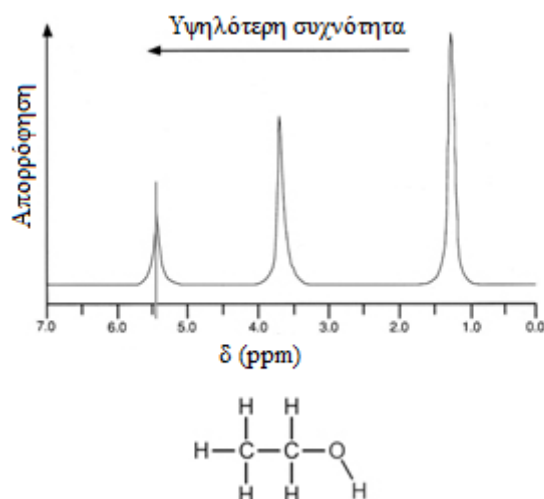
Η σταθερά προάσπισης δεν εξαρτάται από το εξωτερικά εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο, αλλά από την ηλεκτρονιακή πυκνότητα και την κατανομή της γύρω από τον πυρήνα. Δεδομένου ότι η ηλεκτρονιακή κατανομή γύρω από κάθε συγκεκριμένο πυρήνα σε ένα μόριο είναι διαφορετική, ο κάθε πυρήνας προστατεύεται σε διαφορετικό βαθμό, με αποτέλεσμα η $H_{\text{πραγμ.}}$ να μην είναι ίδια για κάθε πυρήνα.

Με αντικατάσταση της εξίσωσης **Larmor** στην παραπάνω προκύπτει για τη συχνότητα συντονισμού ν_{res} , ότι είναι ανάλογη της ισχύος του εξωτερικά εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου και του συντελεστή προάσπισης (1- σ)

$$\nu_{\text{res}} = \frac{\gamma}{2\pi} (1 - \sigma) H_0 = k (1 - \sigma)$$

με $k = \gamma H_0 / 2\pi$

Συμπεραίνουμε ότι χημικά μη ισοδύναμοι πυρήνες προστατεύονται σε διαφορετικό ποσοστό από τα ηλεκτρόνιά τους και επομένως συντονίζονται σε διαφορετικές συχνότητες δίνοντας διαφορετικά σήματα (κορυφές) στο φάσμα NMR (χημική μετατόπιση, chemical shift).



Σχήμα 4.3: Φάσμα NMR της αιθανόλης¹³⁸

Επομένως σε μια αλκοόλη (π.χ. αιθανόλη, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), επειδή η σταθερά προάσπισης για τα μεθυλικά πρωτόνια ($-\text{CH}_3$) είναι μεγαλύτερη λόγω της μεγαλύτερης ηλεκτρονιακής πυκνότητας από αυτή των μεθυλενικών πρωτονίων ($-\text{CH}_2$) και η τελευταία είναι μεγαλύτερη από τη σταθερά σ των ($-\text{OH}$), δηλαδή $\sigma_{\text{CH}_3} > \sigma_{\text{CH}_2} > \sigma_{\text{OH}}$, το απαιτούμενο εφαρμοζόμενο πεδίο θα διαφέρει από ομάδα σε ομάδα και το πρωτόνιο της ομάδας υδροξιλίου θα εμφανίζεται σε χαμηλότερο εφαρμοζόμενο πεδίο, ακολουθούμενο από τα μεθυλενικά και τέλος τα μεθυλικά πρωτόνια (σχήμα 4.3).¹³⁵

4.2 Φάσμα NMR

Σύμφωνα με το σχήμα 4.3 σε ένα φάσμα NMR παρουσιάζεται θεωρητικά η μεταβολή της απορρόφησης ως προς τη μεταβολή του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου ή της συχνότητας συντονισμού. Όμως ο προσδιορισμός της απόλυτης έντασης του μαγνητικού πεδίου ή της απόλυτης συχνότητας συντονισμού, που είναι αλληλοεξαρτώμενες σύμφωνα με την εξίσωση **Larmor** είναι δύσκολος έως αδύνατος με την ακρίβεια που απαιτείται για μετρήσεις NMR υψηλής διακρισιμότητας, λόγω των ελάχιστα μικρών διαφορών που παρατηρούνται στα μεγέθη αυτά και δεν θα προέκυπταν συγκρίσιμα αποτελέσματα με διαφορετικά φασματομέτρα.

Για το λόγο αυτό η θέση των κορυφών συντονισμού αναφέρεται σε σχετικά μεγέθη ως προς τη θέση της κορυφής μιας εσωτερικής πρότυπης ουσίας, που μετριέται και αυτή κατά τη διάρκεια του πειράματος, έτσι ώστε οι μετρήσεις που λαμβάνονται να είναι ανεξάρτητες από το όργανο. Η σχετική αυτή κλίμακα, που ονομάζεται **κλίμακα δέλτα (δ)** και αντιστοιχεί στην παράμετρο χημικής μετατόπισης, υπολογίζεται για κάθε κορυφή *i* από την εξίσωση:

$$\delta_i = \frac{\nu_i - \nu_{\text{αναφ.}}}{\nu_{\text{οργ.}}} \times 10^6 = \frac{\Delta\nu}{\nu_{\text{οργ.}}} \times 10^6$$

όπου ν_i = συχνότητα συντονισμού του αναλύτη [Hz]

$\nu_{\text{αναφ.}}$ = συχνότητα συντονισμού μιας ουσίας αναφοράς [Hz]

$\nu_{\text{οργ.}}$ = συχνότητα λειτουργίας του οργάνου [MHz]

$\Delta\nu$ = διαφορά συχνοτήτων συντονισμού του αναλύτη ως προς την ουσία αναφοράς.

Ως ουσία αναφοράς χρησιμοποιείται το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS = Si (CH₃)₄), δεδομένου ότι όλα τα πρωτόνια του (12) και τα άτομα άνθρακα (4) είναι χημικά ισοδύναμα και επομένως παρατηρείται μια μοναδική κορυφή στο φάσμα ¹H NMR και ¹³C NMR αντίστοιχα, η οποία θεωρείται ως το (0) της κλίμακας δ.

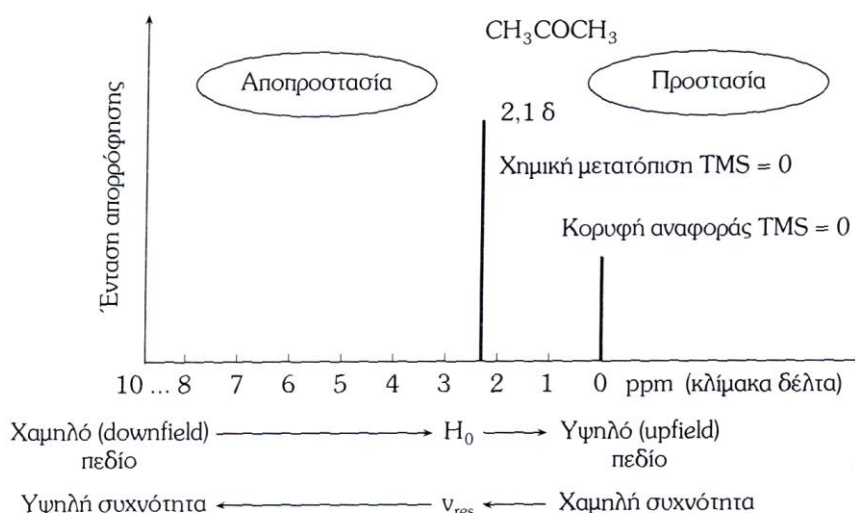
Επιπλέον η κορυφή αυτή εμφανίζεται σε υψηλότερο μαγνητικό πεδίο H₀ από όλες τις άλλες κορυφές, λόγω της μεγαλύτερης σταθεράς προστασίας σ που έχουν τα πρωτόνια του TMS σε σχέση με τις περισσότερες άλλες ενώσεις. Η ουσία TMS είναι μια αδρανής, πτητική ουσία, ευδιάλυτη στα περισσότερα οργανικά υγρά, που απομακρύνεται εύκολα από το δείγμα μετά τη μέτρηση, λόγω της μεγάλης πτητικότητάς της. Σε υδατικά δείγματα χρησιμοποιείται η ένωση DSS (CH₃)₃Si – (CH₂)₃ – SO₃Na, η οποία δίνει μια κορυφή στο φάσμα ανάλογη με το TMS.

Οι χημικές μετατοπίσεις εκφράζονται σε **ppm** και είναι ανεξάρτητες από το μαγνητικό πεδίο ή τη συχνότητα λειτουργίας του οργάνου που χρησιμοποιείται, πράγμα που είναι πολύ σημαντικό για τη σύγκριση φασμάτων που λαμβάνονται με διαφορετικά όργανα.

Οι περισσότερες κορυφές ^1H NMR βρίσκονται σε μια περιοχή τιμών δ από 1 έως 13 ppm αριστερά της κορυφής του TMS, που κατά σύμβαση έχει $\delta=0$, ενώ στο ^{13}C NMR από 1-220 ppm, λόγω της παρουσίας των 2p ηλεκτρονίων και της μεγαλύτερης αποπροστασίας των πυρήνων. Γενικά τα φάσματα NMR έχουν κλίμακες γραμμικές ως προς το δ και παρουσιάζονται με το πεδίο H_0 να αυξάνει από αριστερά προς τα δεξιά.

Στο σχήμα 4.4 παρουσιάζεται το γράφημα του φάσματος NMR της ακετόνης. Ως τεταγμένη εμφανίζεται η ένταση απορρόφησης και ως τετμημένη η κλίμακα δ . Η θέση στο διάγραμμα NMR όπου ένας πυρήνας απορροφά ενέργεια, αντιστοιχεί στη χημική μετατόπιση.

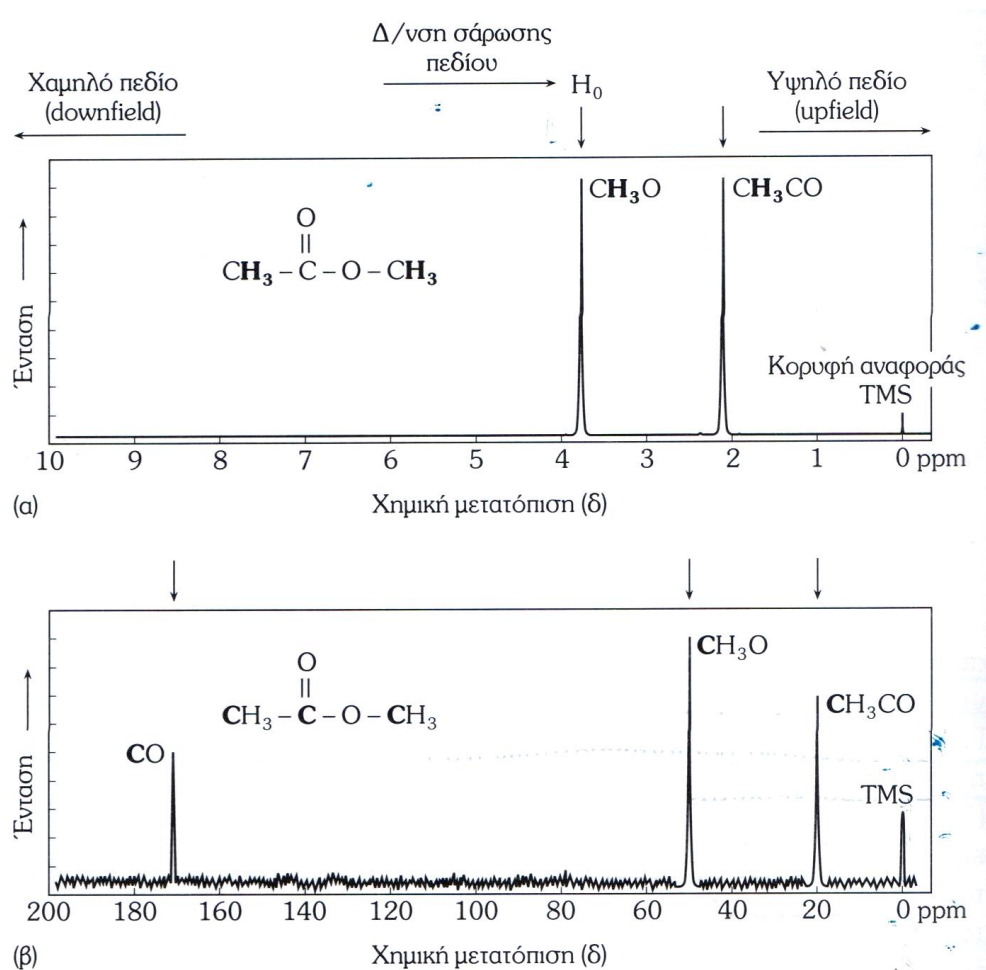
Η ισχύς του εφαρμοζόμενου πεδίου αυξάνεται από αριστερά προς τα δεξιά. Το αριστερό τμήμα του φάσματος είναι η πλευρά χαμηλού πεδίου, όπου θα εμφανίζονται κορυφές οι αποπροστατευμένοι πυρήνες, ενώ στο δεξιό τμήμα αντιπροσωπεύει την πλευρά υψηλού πεδίου, όπου εμφανίζονται κορυφές των προστατευμένων πυρήνων. Γενικά η θωράκιση ενός πυρήνα μειώνεται όταν αυξάνει η ηλεκτραρνητικότητα των γειτονικών ομάδων.¹³⁵



Σχήμα 4.4: Γράφημα ^1H NMR της ακετόνης¹³⁵

Φάσματα ^1H NMR και ^{13}C NMR

Η φασματομετρία NMR πρωτονίου και άνθρακα είναι αυτές που χρησιμοποιούνται κυρίως στην πράξη για τη διασάφηση δομής οργανικών, οργανομεταλλικών και βιοχημικών μορίων. Τα φάσματα NMR που λαμβάνονται με τις δύο αυτές μεθόδους είναι διαφορετικά όπως φαίνεται και από το σχήμα 4.5, όπου παρουσιάζονται τα φάσματα NMR του οξικού μεθυλεστέρα που προκύπτουν με φασματομετρία NMR πρωτονίου(α) και άνθρακα(β) αντίστοιχα.



Σχήμα 4.5: Φάσμα NMR (α) Πρωτονίου (^1H NMR) και (β) άνθρακα-13 (^{13}C NMR) του οξικού μεθυλεστέρα¹³⁵

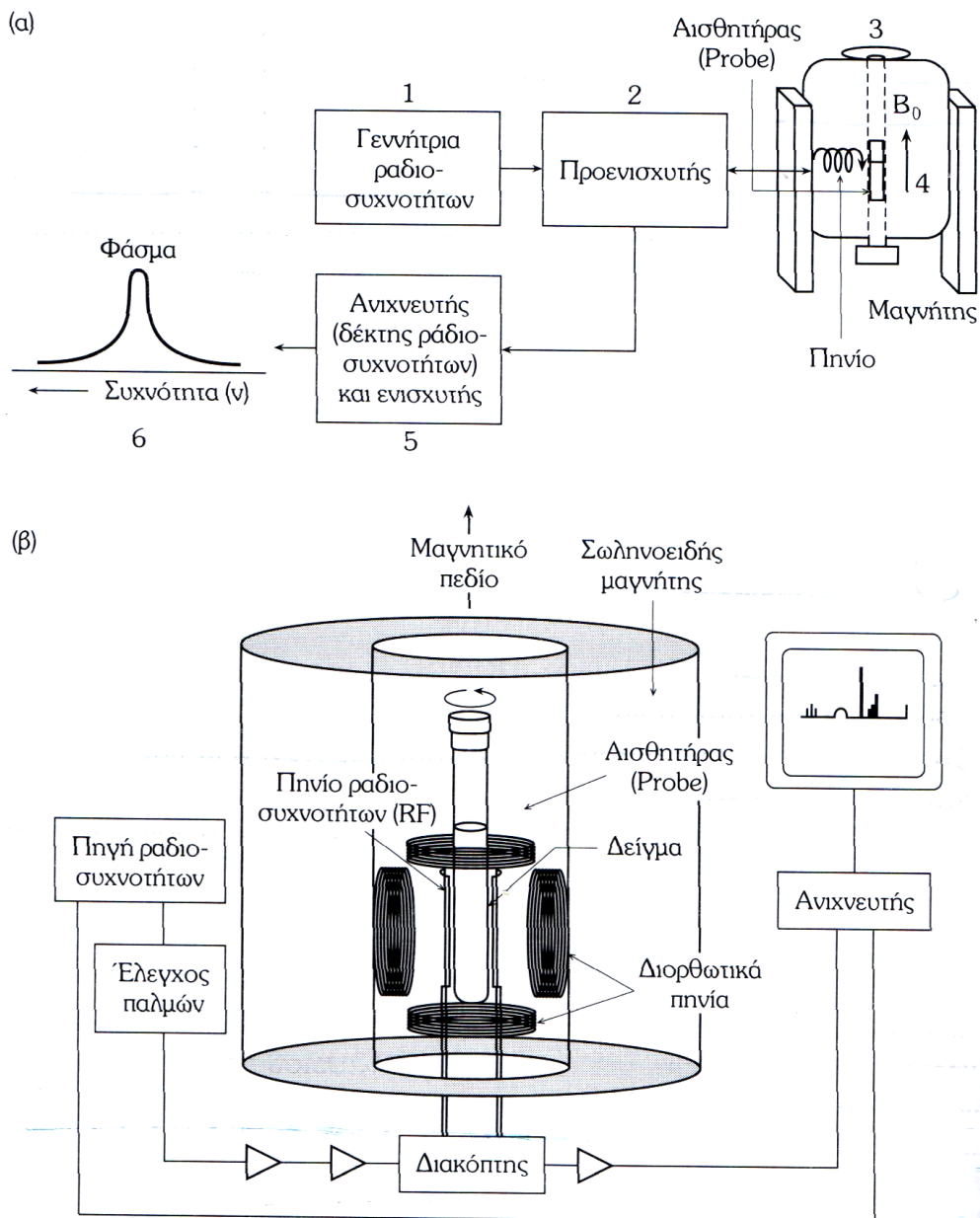
Στο φάσμα ^1H NMR (α) παρατηρούνται δύο κορυφές, που οφείλονται στα 3 ισοδύναμα υδρογόνα των ομάδων CH_3CO ($\delta \approx 2\text{ppm}$) και CH_3O ($\delta \approx 3,7\text{ppm}$), αντίστοιχα. Αντίθετα το φάσμα ^{13}C NMR (β) εμφανίζει 3 κορυφές, μια για κάθε ένα από τα τρία άτομα άνθρακα του μορίου. Η φασματομετρία ^{13}C NMR είναι εξίσου χρήσιμη και δίνει πολλές πληροφορίες για τη δομή του μορίου, δίνοντας τη

δυνατότητα απαρίθμησης των ατόμων άνθρακα ενός μορίου. Λόγω της μικρής φυσικής αφθονίας του ισοτόπου ^{13}C (1,1%) έναντι του ^1H (99,99%) έχει πολύ μικρότερη ευαισθησία από την ^1H NMR και απαιτεί πολύ περισσότερο χρόνο για τη λήψη φάσματος NMR και ισχυρότερο μαγνήτη.¹³⁵

4.3 Οργανολογία

Υπάρχουν 2 τύποι οργάνων NMR. Τα φασματόμετρα συνεχούς κύματος (continuous wave, CW) και τα παλμικά (pulsed) ή φασματόμετρα μετασχηματισμού Fourier (FT-NMR). Ένω στα φασματόμετρα CW η συχνότητα της πηγής ή το εξωτερικά εφαρμοζόμενο πεδίο σαρώνονται αργά καταγράφοντας τα αντίστοιχα σήματα απορρόφησης, στα παλμικά φασματόμετρα NMR, το δείγμα ακτινοβολείται κάθετα προς το μαγνητικό πεδίο με περιοδικούς παλμούς ραδιοσυχνοτήτων, προκαλώντας ένα αποσβεννόμενο σήμα στο χρονικό διάστημα μεταξύ παλμών. Με μετασχηματισμό Fourier προκύπτει φάσμα NMR όμοιο με αυτό που λαμβάνεται από τα όργανα συνεχούς κύματος.

Παλιότερα χρησιμοποιούνταν τα όργανα CW, ενώ σήμερα κυριαρχούν στην αγορά τα FT-NMR. Στο σχήμα 4.6 απεικονίζεται σχηματικά (α) και πιο αναλυτικά (β) η διάταξη ενός φασματομέτρου NMR.



Σχήμα 18-8: Διάταξη ενός φασματομέτρου NMR (α) σχηματικά (β) λεπτομερέστερη απεικόνιση του μαγνήτη και αισθητήρα του φασματομέτρου NMR (Varian).

Σχήμα 4.6: Διάταξη ενός φασματομέτρου NMR (α) σχηματικά (β) λεπτομερέστερη απεικόνιση του μαγνήτη και αισθητήρα του φασματομέτρου NMR¹³⁵

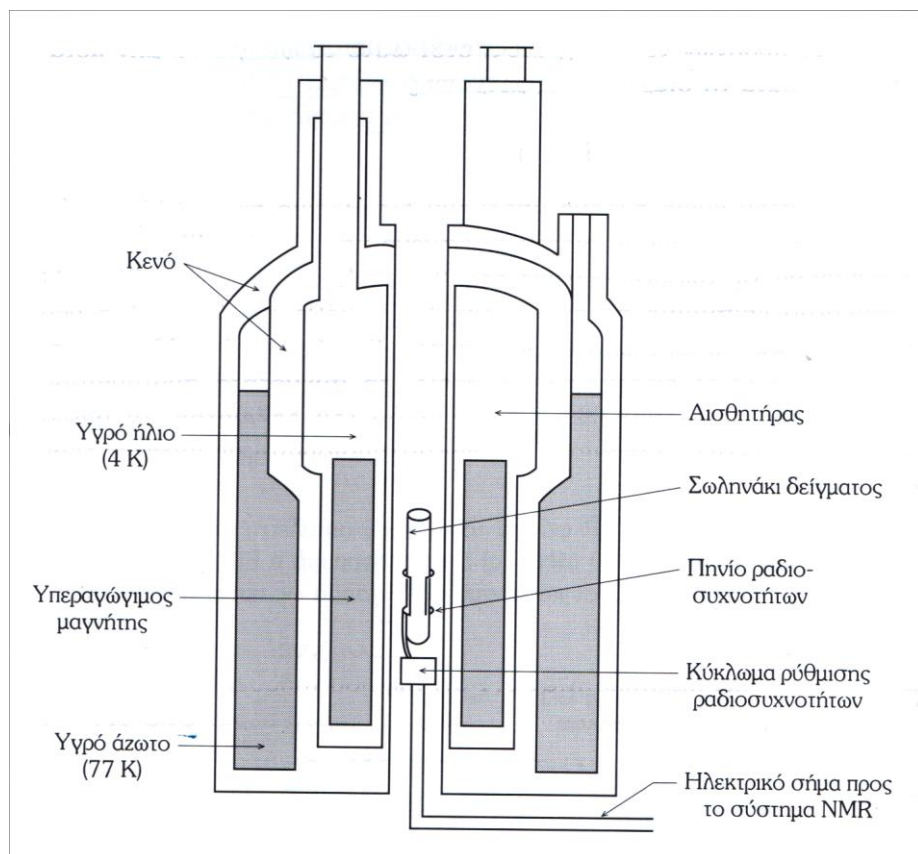
Τα κυριότερα των φασματομέτρων NMR είναι:

1. Γεννήτρια ραδιοσυχνοτήτων (RF)
2. Προενισχυτής
3. Μαγνήτης
4. Αισθητήρας (Probe)
5. Ανιχνευτής (Δέκτης ραδιοσυχνοτήτων) και ενισχυτής
6. Καταγραφέας

Μια γεννήτρια ραδιοσυχνοτήτων με ταλαντωτή παράγει κατάλληλη RF ακτινοβολία, η οποία μέσω ενός ενισχυτή μετατρέπεται σε έντονο και αναπαραγωγίμο παλμό ραδιοσυχνότητας μικρής διάρκειας, π.χ. 5μs που επιδρά στο δείγμα, το οποίο περιβάλλεται από ένα πηνίο. Το δείγμα, συνήθως οργανικό, διαλύεται στον κατάλληλο διαλύτη και τοποθετείται σε έναν λεπτό γυάλινο σωλήνα, ανάμεσα στους πόλους ενός ισχυρού μαγνήτη, όπου με την επίδραση των RF παλμών διεγείρονται συγχρόνως όλοι οι πυρήνες μιας ένωσης στο δείγμα. Το παραγόμενο σήμα, τύπου συμβολογράμματος ή FID, όπως ονομάζεται στο NMR, συλλέγεται από το ίδιο το πηνίο που χρησιμεύει τώρα ως δέκτης. Ένας ευαίσθητος ανιχνευτής συλλέγει τα σήματα που αντιστοιχούν στη διαφορά συχνοτήτων των πυρήνων και του ταλαντωτή της γεννήτριας, τα οποία κατόπιν ενισχύονται και καταχωρούνται σε ένα ηλεκτρονικό υπολογιστή, όπου στη περίπτωση των οργάνων FT-NMR υπόκεινται σε μετασχηματισμό Fourier. Με τη μαθηματική αυτή επεξεργασία μετατρέπεται το FID φάσμα (σήμα ως προς το χρόνο) σε ένα κανονικό φάσμα (σήμα ως προς συχνότητα) του δείγματος που εξετάζεται.¹³⁵

Μαγνήτης

Το σημαντικότερο και ακριβότερο τμήμα των οργάνων NMR είναι ο μαγνήτης, διότι τόσο η ευαισθησία όσο και η διαχωριστική τους ικανότητα αυξάνονται, με αυξανόμενη ένταση, ομοιογένεια και σταθερότητα του μαγνητικού πεδίου. Σήμερα χρησιμοποιούνται φασματόμετρα NMR υψηλής διαχωριστικής ικανότητας και μπορούν να διαχωρίσουν κορυφές με διαφορά 0,01 ppm και λιγότερο. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται ως μαγνήτες υπεραγωγία πηνία, μέσω των οποίων επιτυγχάνονται πεδία έως και 21 T. Οι υπεραγωγάι μαγνήτες κατασκευάζονται από σύρμα Nb-Ti (νιοβίου-τιτανίου) ή Nb-Sn (νιοβίου-κασσιτέρου) και για να επιτευχθεί μια μόνιμη μαγνήτιση διατηρούνται σε περιβάλλον υγρού ηλίου και όλο το σύστημα εμβαπτίζεται σε εξωτερικό δοχείο Dewar με υγρό άζωτο (Σχήμα 4.7).



Σχήμα 4.7: Τομή μαγνήτη φασματομέτρου NMR (Varian)¹³⁵

Επειδή το παραγόμενο μαγνητικό πεδίο στην περιοχή του δείγματος πρέπει να είναι πολύ ομοιογενές και σταθερό κατά τη διάρκεια της μέτρησης, λαμβάνονται διάφορα μέτρα για την επίτευξη του σκοπού αυτού, όπως:

1. Κλειδώμα μαγνητικού πεδίου (lock)

Για την αντιστάθμιση των διακυμάνσεων του μαγνητικού πεδίου μετά τη διάρκεια της μέτρησης χρησιμοποιείται στα φασματομέτρα NMR η τεχνική «κλειδώματος» στη συχνότητα συντονισμού ενός πυρήνα αναφοράς. Συγκεκριμένα ένας πυρήνας αναφοράς, που είναι το δευτέριο του διαλύτη ακτινοβολείται συγχρόνως με το δείγμα και παρακολουθείται η συχνότητα συντονισμού του στην επιβαλλόμενη ένταση του μαγνητικού πεδίου του φασματομέτρου. Μεταβολές στην ένταση του σήματος απορρόφησης αναφοράς, αντισταθμίζονται με τη βοήθεια διορθωτικών πηνίων τοποθετημένων μέσα στο μαγνητικό πεδίο.

Επειδή σύμφωνα με την εξίσωση Larmor, ο λόγος της συχνότητας συντονισμού και της έντασης του μαγνητικού πεδίου είναι για έναν πυρήνα μια σταθερά, ανεξάρτητα από τους πυρήνες που μετέχουν, η διόρθωση του σήματος αναφοράς, ισχύει για τα

σήματα όλων των πυρήνων του δείγματος, έτσι ώστε το φάσμα να μην μετατοπίζεται κατά τη διάρκεια της μέτρησης.

2. Ομογενοποίηση πεδίου (Shimming)

Μέσα στον κύριο πυρήνα υπάρχουν διορθωτικά πηνία τα οποία παράγουν ασθενή μαγνητικά πεδία που αντισταθμίζουν τις ανομοιογένειες του βασικού μαγνητικού πεδίου. Η διαδικασία ομογενοποίησης πεδίου πρέπει να εκτελείται κάθε φορά που ένα νέο δείγμα εισάγεται στο φασματόμετρο και εξαρτάται από πολλές παραμέτρους, όπως το εφαρμοζόμενο πεδίο, τη συχνότητα συντονισμού του πυρήνα, τη διάμετρο του σωληνίσκου του δείγματος, τα οποία ρυθμίζονται μέσω υπολογιστή και βελτιστοποιούνται με κατάλληλους αλγορίθμους.

3. Περιστροφή δείγματος

Η ανομοιογένεια του πεδίου αντισταθμίζεται επίσης με περιστροφή του δείγματος γύρω από τον άξονα του μικρού γυάλινου σωλήνα, διαμέτρου 5mm και χωρητικότητας 0,4-0,7 ml, που τοποθετείται στο δείγμα. Η περιστροφή αυτή γίνεται με τη χρήση ξηρού αέρα. Όλα αυτά τα συστήματα που προαναφέρθηκαν αποτελούν τον αισθητήρα (probe) που είναι ένα σημαντικό τμήμα ενός φασματόμετρου NMR.¹³⁵

4.4 Εφαρμογές της φασματομετρίας NMR

Η μέθοδος του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού βρίσκει σήμερα πλήθος εφαρμογών στη Φυσική, τη Χημεία, τη Βιοχημεία, τη Βιοφυσική, τη Μοριακή Βιολογία, και τα τελευταία χρόνια, στην Ιατρική. Ενδεικτικά αναφέρονται μερικές από τις εφαρμογές της φασματομετρίας NMR:

1. Προσδιορισμός και ταυτοποίηση της δομής των οργανικών ενώσεων. Με τη φασματομετρία NMR επιτυγχάνεται ο πλήρης προσδιορισμός της δομής των προϊόντων των οργανικών αντιδράσεων, όπως επίσης και ο προσδιορισμός της αναλογίας στην οποία περιέχονται δύο ή περισσότερες οργανικές ενώσεις σε ένα μίγμα. Επίσης παρέχει τη δυνατότητα της στερεοχημικής διάκρισης ισομερών οργανικών ενώσεων.
2. Μελέτη ζεολίθων, κυκλοδεξτρινών, πολυμερών, γυαλιών και κεραμικών.

3. Μελέτη αλληλεπίδρασης φαρμακευτικών και άλλων βιολογικά δραστικών ουσιών με το κέντρο δράσης τους.
4. Μελέτη της σύστασης τροφίμων και ποτών και ανίχνευση νοθείας σε αυτά.
5. Μελέτη βιοχημικών μηχανισμών.

Ιδιαίτερη σημασία έχουν οι εφαρμογές του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού στην Ιατρική, ορισμένες από τις οποίες φαίνονται παρακάτω:

Μαγνητική Τομογραφία (Magnetic Resonance Imaging, MRI)

Πρόκειται ουσιαστικά για ένα τρισδιάστατο φάσμα ^1H NMR του ανθρώπινου σώματος, όπου εντοπίζονται οι μαγνητικοί πυρήνες που απαντούν σε αφθονία οπουδήποτε υπάρχει νερό ή λίπος σε έναν ζώντα οργανισμό και δίνει πληροφορίες πως το νερό είναι συνδεδεμένο με τους ιστούς. Η μέθοδος αυτή παρουσιάζει πλεονεκτήματα ως διαγνωστική τεχνική έναντι των μεθόδων ακτίνων X και απεικονίσεων με ραδιενεργές ενώσεις, διότι είναι μη καταστρεπτική, οι απεικονίσεις λαμβάνονται κατά μη επεμβατικό τρόπο, επιτρέπει τη διάγνωση μαλακών ιστών και προς το παρόν δεν έχουν διαπιστωθεί παρενέργειες σε ανθρώπους ή ζώα, κάτι που δεν ισχύει στην περίπτωση πολλαπλής χρήσης των άλλων προαναφερθεισών τεχνικών.

Η λήψη του φάσματος διαρκεί περίπου 20 λεπτά και κατά τη διάρκειά του ο άνθρωπος πρέπει να μείνει ακίνητος μέσα στο μαγνήτη, καθώς ο μαγνήτης περιστρέφεται γύρω του. Χρησιμοποιείται μαγνήτης σταδιακά μεταβαλλόμενης έντασης, όπου τα πρωτόνια σε διαφορετικές θέσεις του εξεταζόμενου αντικειμένου δέχονται διαφορετικές εντάσεις πεδίου, με αποτέλεσμα να συντονίζονται σε διαφορετικές συχνότητες την ίδια στιγμή (εξίσωση Larmor). Με τη σταδιακή σάρωση λαμβάνονται διαφορετικά σήματα FID, τα οποία αφού μετασχηματιστούν κατά Fourier δίνουν μια τρισδιάστατη εικόνα του αντικειμένου με σήματα που ποικίλλουν, ανάλογα με την πυκνότητα των ατόμων του υδρογόνου και τα χαρακτηριστικά του περιβάλλοντος, επιτρέποντας τον προσδιορισμό ιστών διαφορετικού τύπου, ακόμη και την οπτικοποίηση των κινήσεων.

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται ευρέως, παρ' όλο το υψηλό κόστος της, για τη διάγνωση και παρακολούθηση μεγάλου αριθμού ασθενειών, όπως καλοήθεις και κακοήθεις όγκοι, σκλήρυνση κατά πλάκας, διάγνωση βλαβών σε αρθρώσεις αντί της αρθροσκόπησης, όπου εισάγεται ένα ενδοσκόπιο στο γόνατο, χωρίς να έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα παρενέργειες από την εφαρμογή της.

Σε άλλους τομείς της επιστήμης και του εμπορίου, όπως στη βιομηχανία τροφίμων για την μη καταστρεπτική εξέτασή τους δεν έχει καθιερωθεί ακόμη η MRI λόγω του υψηλού κόστους του οργάνου και της δαπάνης για την προετοιμασία του κατάλληλου χώρου για την εγκατάστασή του.

Έλεγχος του pH στο αίμα και τα κυτταρικά υγρά των διαβητικών με φασματοσκοπία ^{31}P NMR

Η απουσία της ινσουλίνης έχει ως αποτέλεσμα τα επικίνδυνα υψηλά επίπεδα οξύτητας στα κύτταρα και η χορήγηση όξινου ανθρακικού νατρίου βοηθά στην επαναφορά του pH στα φυσιολογικά επίπεδα. Η κατάσταση αυτή ελέγχεται με μέτρηση της διαφοράς στη χημική μετατόπιση μεταξύ των σημάτων που οφείλονται σε οργανικό και ανόργανο φώσφορο. Το σήμα του ανόργανου φωσφόρου στο NMR εξαρτάται από το pH σε μεγάλο βαθμό και μπορεί να μετακινηθεί από 1 ppm ανά μονάδα pH.

Εκτός από τις προαναφερθείσες τεχνικές NMR αναπτύχθηκαν τα τελευταία χρόνια και άλλες νέες τεχνικές, όπως η DEPT-NMR (distortion- less enhancement by polarization transfer) με την οποία καθίσταται εφικτός τόσο ο προσδιορισμός των ατόμων άνθρακα, όπως στην ^{13}C NMR, όσο και ο αριθμός των υδρογόνων που βρίσκονται συνδεδεμένα σε κάθε άνθρακα. Επίσης αναπτύχθηκαν η τεχνική ^{13}C NMR για στερεά δείγματα, η δισδιάστατη και τρισδιάστατη NMR με μετασχηματισμό Fourier (2D-FT-NMR) και (3D-FT-NMR) αντίστοιχα, εφαρμογή της τελευταίας αποτελεί η MRI, καθιστώντας τη φασματομετρία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ένα απαραίτητο εργαλείο για τη μη καταστρεπτική εξέταση υλικών.¹³⁵

5

ΕΥΡΕΣΗ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ

5.1 Εισαγωγή

Ένας βιοδείκτης ή βιολογικός δείκτης, γενικά αναφέρεται σε ένα μετρήσιμο δείκτη κάποιας βιολογικής κατάστασης. Ο όρος επίσης μερικές φορές χρησιμοποιείται για να αναφερθεί σε μια ουσία της οποίας η παρουσία δείχνει την ύπαρξη ενός ζωντανού οργανισμού. Οι μορφές ζωής είναι γνωστό ότι αποβάλλουν μοναδικές χημικές ουσίες, συμπεριλαμβανομένου του DNA, στο περιβάλλον ως απόδειξη της παρουσίας τους σε μια συγκεκριμένη τοποθεσία. Οι βιοδείκτες μετρούνται και αξιολογούνται για να εξεταστούν φυσιολογικές βιολογικές διεργασίες, παθογόνες διαδικασίες ή φαρμακολογικές αντιδράσεις σε μια θεραπευτική παρέμβαση. Ο προσδιορισμός μεταβολικών προφίλ σε βιολογικά δείγματα, ο οποίος χαρακτηρίζεται ως μεταβολομική ή μεταβονομική, παρέχει μια λεπτομερή και συγκεκριμένη οπτική σε κυτταρικές μεταβολικές διαδικασίες. Αυτός ο εξαιρετικά γρήγορα αναπτυσσόμενος τομέας έχει υψηλές προοπτικές σε ποικίλες εφαρμογές όπως ο χαρακτηρισμός της κατάστασης και της εξέλιξης μεταβολικών διαταραχών⁸⁵, σε πολυάριθμα είδη καρκίνων^{3,14,44,86,87}, νευροεκφυλιστικές^{74,88}, νεφρικές⁸⁹⁻⁹¹ και καρδιαγγειακές παθήσεις⁶⁸, καθώς επίσης και την ανίχνευση επίδρασης φαρμακευτικών ουσιών^{43,50,51,58,83}, της διατροφής^{15,52,53,92} και του τρόπου ζωής^{93,94}. Οι μεταβολίτες

ποικίλουν στη μοριακή δομή και στις φυσιοχημικές τους ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένου αμινοξέων και οργανικών οξέων, σακχάρων, φωσφορυλιωμένων μεταβολιτών, αμίνων, αλκοολών, αλδεϋδων, λιπιδίων και άλλα⁸. Επιπλέον, το εύρος των συγκεντρώσεων μεταβολιτών μπορεί να ποικίλλει από pM σε mM. Η συλλογική μέτρηση των μεταβολιτών είναι ένα δύσκολο έργο και βασίζεται στην ανάπτυξη τεχνολογιών που παρέχουν ικανοποιητικά υψηλή ευαισθησία, υψηλή ανάλυση και μεγάλο εύρος. Οι πλούσιες σε πληροφορίες αναλυτικές τεχνικές της φασματομετρίας μάζας (MS) και φασματομετρίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) είναι οι κύριες αναλυτικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στην εύρεση μεταβολιτών χάρη στην υψηλή ευαισθησία και ανάλυση που είναι απαραίτητα για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση γνωστών και άγνωστων μεταβολιτών^{10,19,40,43,77}. Προσπάθειες βρίσκονται σε εξέλιξη για τη βελτίωση της ικανότητας πρόσβασης και μέτρησης μεγαλύτερου αριθμού μεταβολιτών. Αντιστοίχιση αυτών των αναλυτικών τεχνικών με στατιστικές μεθόδους αναγνώρισης προτύπων επιτρέπει την αναγνώριση πιθανών βιοδεικτών για τον εντοπισμό διαταράξεων σε μεταβολικές διαδικασίες που οφείλονται λόγω κάποιας ασθένειας, τοξικότητας, φαρμάκου και διατροφικής διαταραχής. Για να καθοριστούν διαταραχές του μεταβολισμού που οφείλονται σε παράγοντες όπως διάφορες ασθένειες, θα πρέπει να υπάρξει σαφής εικόνα του προφίλ το οποίο δεν παρουσιάζει διακυμάνσεις από εγγενείς παράγοντες όπως το φύλο, τη φυλή και την ηλικία και περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως τη διατροφή, τον τρόπο ζωής, το άγχος και τη γεωγραφική ποικιλομορφία. Επιπλέον, για την ανακάλυψη φαρμάκων που μπορεί να ωφελήσουν αλλά και για να αξιολογηθεί η πιθανή τοξικότητά τους πρέπει να κατανοήσουμε ότι υπάρχουν διαφορές μεταξύ ανθρώπων διαφορετικού φύλου, φυλής ή ηλικίας οι οποίες μπορεί να ανταποκριθούν διαφορετικά σε φαρμακευτικές ή διατροφικές θεραπείες. Αυτές οι διακυμάνσεις μπορούν να αποκαλυφθούν μέσω του μεταβολικού προφίλ των βιολογικών δειγμάτων. Τα ούρα, ως μια συλλογή βιολογικών αποβλήτων και παραπροϊόντων, παρέχει μια ευαίσθητη αναφορά βιολογικών διακυμάνσεων. Μαζί με την απλή και μη επεμβατική φύση της δειγματοληψίας, τα ούρα αποτελούν μια εξαιρετική επιλογή για την αξιολόγηση φυσιολογικών διαφορών. Η ¹H NMR φασματομετρία έχει χρησιμοποιηθεί κατά κύριο λόγο για μελέτες ανθρώπων και ζώων, αντικατοπτρίζοντας την επίδραση του φύλου⁹⁵, της διατροφής⁴⁷ και της ηλικίας⁸⁴. Σποραδικές μελέτες με τη χρήση φασματομετρίας μάζας μπορούν επίσης

να βρεθούν, για παράδειγμα το LC-MS έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για να διαφοροποιήσει ανθρώπινα φύλα μέσω της μέτρησης μεταβολικών προφίλ ούρων⁹⁶.

Η αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μάζας (GC/MS) χρησιμοποιείται ευρέως εδώ και δεκαετίες για το χαρακτηρισμό μεταβολικών λόγω της φοβερής ευαισθησίας και καλής επαναληψιμότητας. Τα τελευταία χρόνια έχει επίσης χρησιμοποιηθεί σε διάφορες εφαρμογές των μεταβολικών προφίλ^{3,46}. Πτητικοί μεταβολίτες μπορούν να αναλυθούν με GC-MS απ' ευθείας. Λιγότερο πτητικοί μεταβολίτες απαιτούν χημική παραγωγοποίηση για να ενεργοποιηθεί η χρωματογραφική έκλυση. Τυπικά, η ανάλυση GC-MS βιολογικών υγρών απαιτεί μεγάλη προετοιμασία του δείγματος όπως αποπρωτεΐνωση, εκχύλιση και παραγωγοποίηση, για φυσικές μη πτητικές ενώσεις. Η στερεάς φάσης μικροεκχύλιση (Solid Phase MicroExtraction, SPME) αναπτύχθηκε τη δεκαετία του 90 για να απλοποιηθεί η προετοιμασία δείγματος⁹⁷. Από τότε έχει εφαρμοστεί εκτεταμένα λόγω της απλότητάς του, της ταχύτητας, της ικανότητας εκχύλισης χωρίς διαλύτες, της συμβατότητάς του με το GC-MS και της ικανότητάς του να παρέχει αξιόπιστα και ποσοτικά δεδομένα. Για πολλά χρόνια το SPME έχει επικεντρωθεί στην εκχύλιση περιορισμένου αριθμού αναλυτών για στοχευμένη GC-MS ανάλυση. Στη μεταβολομική πρωτοχρησιμοποιήθηκε σε μελέτες φυτών και αποδείχτηκε ένα ισχυρό εργαλείο για την εξαγωγή ευρέος φάσματος μεταβολικών⁴⁵.

Ενώ η GC-MS είναι μια ευαίσθητη αναλυτική μέθοδος που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση συγκεντρώσεων μεταβολικών πολύ κάτω από την μM (micromolar) περιοχή, τα δεδομένα από το NMR συχνά επικεντρώνονται σε μεταβολίτες με συγκέντρωση μερικών μM και άνω. Είναι επίσης περισσότερο ποσοτικά και επαναλήψιμα. Ειδικότερα, οι ίδιοι πυρήνες που ανιχνεύονται, για παράδειγμα όλοι ^1H , σε ένα πείραμα NMR έχουν την ίδια ευαισθησία, ανεξάρτητα από τις ιδιότητες των μορίων μεταβολίτη. Επομένως, οι απόλυτες ποσότητες των διαφόρων μεταβολικών μπορούν να μετρηθούν με ένα απλό εσωτερικό πρότυπο. Επιπλέον, το NMR απαιτεί ελάχιστη ή καθόλου προετοιμασία δείγματος ή διαχωρισμό του και είναι μη καταστρεπτικό. Ένα πρωτεύον πλεονέκτημα αυτής της προσέγγισης είναι ότι το προφίλ μεταβολικών του βιολογικού δείγματος μπορεί να αποκτηθεί άμεσα μέσα σε 5-15 λεπτά με επαρκή ευαισθησία. Η εφαρμογή του NMR σε ανάλυση μεταβολικών από βιολογικά δείγματα επεκτείνεται συνεχώς με τη συνεχή βελτίωση στην ευαισθησία, ανάλυση και ταχύτητα στην επεξεργασία και ανάλυση δεδομένων.

Στο παρών παράδειγμα θα δούμε το συνδυασμό των τεχνικών GC-MS και NMR στη διερεύνηση των μεταβολικών διαφορών μεταξύ δύο υγείων ομάδων ενηλίκων, αντρών και γυναικών. Ο συνδυασμός δεδομένων του NMR και του MS επιτρέπει μια βελτιωμένη αναγνώριση άγνωστων αναλυτών και δίνει μια ευκαιρία για επέκταση του πεδίου εφαρμογής της μεταβολομικής έρευνας^{47,65,98}. Για το πείραμα με την GC-MS τεχνική, πραγματοποιήθηκε μια πλήρης διερεύνηση της χρησιμότητας του SPME στα μεταβολικά προφίλ βιολογικών υγρών. Για το πείραμα με το NMR αξιοποιήθηκε η πιο ευαίσθητη και ευρέως χρησιμοποιούμενη ¹H NMR φασματομετρία. Θα δούμε ότι είτε το SPME-GC/MS ή το ¹H NMR είναι ικανό από μόνο του να απεικονίσει μεταβολικές διαφορές των δύο ανθρώπινων φύλων και ότι ο συνδυασμός και των δύο μαζί επιτρέπει ακόμα καλύτερη κατανόηση των διαφορών αυτών από την πλευρά της μεταβολομικής⁴².

5.2 Υλικά και μέθοδοι

Στο πείραμα συμμετείχαν 21 εθελοντές, 12 άντρες και 9 γυναίκες μη καπνιστές. Στους εθελοντές, ηλικίας 25-31 ετών με ΔΜΣ 20~24, ζητήθηκε να μην φάνε κατά τη διάρκεια της νύχτας και να αποφύγουν την κατανάλωση συμπληρωμάτων διατροφής όπως βιταμίνες και επίσης είχαν διατηρήσει σταθερό το βάρος τους σταθερό για πάνω από τρεις μήνες πριν τις μελέτες. Μία μέρα πριν τη συλλογή των δειγμάτων, δόθηκε στους εθελοντές το ίδιο δείπνο και το πρωί τα δείγματα ούρων συλλέχθηκαν πριν το πρωινό γεύμα και προστέθηκε στα δείγματα αζίδιο του νατρίου για την αποφυγή ανάπτυξης βακτηρίων. Έπειτα τα δείγματα ούρων καταψύχθηκαν στους -80 °C μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Το pH των δειγμάτων ούρων κυμαίνονταν από 5.6~6.5 και πριν την ανάλυσή τους αποψύχθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα φυγοκεντρίθηκαν στις 1000 ΣΑΛ για 6 λεπτά. Έπειτα τα δείγματα αναλύθηκαν με τις τεχνικές SPME-GC/MS και ¹H NMR.

5.2.1 Συνθήκες SPME και GC-MS

Το pH των δειγμάτων ούρων πρώτα ρυθμίστηκε με ρυθμιστή φωσφορικού άλατος (0.1 M, pH 7.0). Δύο ml από το κάθε δείγμα έπειτα μεταφέρθηκαν σε μία 4 mL αποστειρωμένη φιάλη με βιδωτό καπάκι. Μια μαγνητική ράβδος ανάδευσης προστέθηκε μαζί με 35% χλωριούχο νάτριο, με 99.999% καθαρότητα, ώστε να μειωθεί η διαλυτότητα του αναλύτη. Το φιαλίδιο τοποθετήθηκε σε μαγνητική πλάκα ανάδευσης και ρυθμίστηκε στις 1000 ΣΑΛ, και η ίνα από το SPME (85 μm πολυακρυλικό) εισήχθη. Μετά από 30 λεπτά χρόνο εκχύλισης, η ίνα αφαιρέθηκε και αμέσως εισήχθη εντός της θύρας εγχύσεως GC και τα παράγωγα της εκχύλισης εκροφώνται για 1 λεπτό στους 250 °C. Ο αεραγωγός εξαερισμού έκλεισε και άνοιξε σε 0.7 λεπτά. Η χρωματογραφία διεξήχθη σε στήλη με ήλιον ως φέρον αέριο (37 kPa) με σταθερή παροχή της τάξης των 1.32 ml/λεπτό. Οι θερμοκρασίες στο GC και MS ήταν 260°C και 250°C αντίστοιχα. Στο GC το πρόγραμμα θερμοκρασίας ξεκίνησε στους 40°C, έμεινε για 2 λεπτά και έπειτα αυξήθηκε στους 250°C με ρυθμό 5°C/λεπτό, και τέλος έμεινε στους 250°C για 3 λεπτά. Ο συνολικός χρόνος ήταν 47 λεπτά. Φάσματα μάζας της τάξης των 40 έως 400 m/z καταγράφηκαν από MS πρόσκρουσης ηλεκτρονίων, μονό τετραπολικό, με ταχύτητα σάρωσης 2.8 σαρώσεις/δευτ. και ενέργεια ιονισμού 70 eV. Η χρωματογραφία και τα δεδομένα φασμάτων ελήφθησαν και επεξεργάστηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα GCMSsolution (<http://www.shimadzu.com>).

5.2.2 ¹H NMR Φασματομετρία

Παγωμένα δείγματα ούρων αποψύχθηκαν και 500 μl αναμίχθηκαν με ρυθμιστή φωσφορικού άλατος (75 μl, 0.5 M, pH 7.0), D₂O, TSP και αζίδιο του νατρίου. Το διάλυμα που προέκυψε φυγοκεντρίθηκε για να αφαιρεθεί σωματιδιακή ύλη, εάν υπήρχε, και τα 500 μl μεταφέρθηκαν σε NMR σωλήνες 5mm. Όλα τα ¹H NMR πειράματα διεξήχθησαν στους 25 °C σε φασματόμετρο Bruker DRX 500-MHz εξοπλισμένο με ένα HCN ¹H αισθητήρα και τριπλού άξονα μαγνητικό πεδίο. Όλα τα φάσματα ¹H NMR πάρθηκαν χρησιμοποιώντας μονοδιάστατη ακολουθία παλμών και στα δεδομένα χρησιμοποιήθηκε μετασχηματισμός Fourier και η φάση και αρχική τιμή των φασμάτων διορθώθηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Bruker XWinNMR.

5.2.3 Ταυτοποίηση και ποσοτικός προσδιορισμός μεταβολιτών

Για τα προφίλ μεταβολιτών στα ούρα με χρήση GC-MS, το πρόγραμμα αναζήτησης μοριακών φασμάτων NIST (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD) χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό εκλουόμενων ενώσεων. 11 πρότυπες ενώσεις αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας την ανωτέρω GC-MS μέθοδο και οι χρόνοι κατακράτησης συγκρίθηκαν με αυτούς που προσδιορίστηκαν από τη βιβλιοθήκη NIST. 59 ενώσεις με υψηλή ομοιότητα (>80%) στη βιβλιοθήκη φασμάτων NIST επιλέχθηκαν για λεπτομερή αξιολόγηση. Η σχετική ποσότητα του κάθε μεταβολίτη λήφθηκε κανονικοποιώντας κάθε ολοκλήρωμα από τη καμπύλη της χρωματογραφίας με βάση το άθροισμα των ολοκληρωμάτων για κάθε συστατικό.

Για τα μεταβολικά προφίλ με χρήση ^1H NMR, συνολικά 18 μεταβολίτες προσδιορίστηκαν με βάση τις χημικές μετατοπίσεις τους και τις πολλαπλότητές τους. Η σχετική ποσότητα του κάθε μεταβολίτη λήφθηκε κανονικοποιώντας τα NMR ολοκληρώματα με βάση το άθροισμα των ολοκληρωμάτων όλων των σημάτων που ανιχνεύθηκαν αφού αφαιρέθηκαν πρώτα αυτά από το νερό, τα ούρα και την κρεατινίνη.

5.2.4 Στατιστική ανάλυση

Τα δεδομένα από το GC-MS υπέστησαν επεξεργασία χρησιμοποιώντας το ειδικό πακέτο λογισμικού μεταβολομικής MetAlign (<http://www.metalign.nl>) το οποίο περιλαμβάνει αυτοματοποιημένη διόρθωση της γραμμής βάσης, εμφάνιση φασμάτων μάζας και μετέπειτα την ευθυγράμμιση φασματικών δεδομένων. Κάθε φορέας δεδομένων από το φάσμα μάζας έπειτα ομαλοποιήθηκε κατάλληλα χρησιμοποιώντας το συνολικό εμβαδόν κάτω από την καμπύλη. Ένας μετασχηματισμός \log_2 εφαρμόζεται στα δεδομένα πριν από τις αναλύσεις πολλών μεταβλητών. Τα δεδομένα έπειτα υπόκεινται σε ανάλυση PLS-DA χρησιμοποιώντας το πακέτο λογισμικού Eigen Vector PLS Toolbox (<http://www.eigenvector.com>) και μετέπειτα ενσωματώνονται στο matlab (<http://www.mathworks.com>).

Τα δεδομένα τοποθετήθηκαν με βάση αναφοράς το σήμα TSP, και οι περιοχές που περιείχαν TSP, σήματα ουρίας και υπόλοιπο νερό αφαιρέθηκαν. Κάθε σύνολο δεδομένων NMR κανονικοποιήθηκε ως προς το άθροισμα της συνολικής φασματικής έντασης. Στα δεδομένα έπειτα αφαιρέθηκε μια σταθερά από κάθε τιμή μεταβλητής

ώστε να επαναπροσδιοριστεί το σημείο 0, και διαιρέθηκαν με την τετραγωνική ρίζα της τυπικής απόκλισης (Pareto scaling) ώστε να τονιστούν επίσης μικρής και μεγάλης συγκέντρωσης σήματα μεταβολιτών.

Οι p-τιμές για τους επιμέρους μεταβολίτες προσδιορίστηκαν από τις κανονικοποιημένες ποσότητες μεταβολιτών χρησιμοποιώντας το t-test δύο δειγμάτων μέσω του λογισμικού R software package (<http://www.r-project.org>). Μια διόρθωση Benjamini-Hochberg εφαρμόστηκε χωριστά στα δεδομένα GC-MS και NMR για να προσαρμοστούν οι p-τιμές λογαριάζοντας για όλους τους μεταβολίτες που χρησιμοποιήθηκαν στις αναλύσεις.

Επιπλέον, η συσχέτιση Pearson μεταξύ όλων των μεταβολιτών (για δείγματα γυναικών και αντρών ξεχωριστά) υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα R. Η στατιστική σημαντικότητα των συντελεστών συσχέτισης ελέγχθηκε χρησιμοποιώντας ένα t-test δίνοντας μια μηδενική υπόθεση (H_0) με $r=0$, όπου το r αντιπροσωπεύει το συντελεστή συσχέτισης. Αν το H_0 διατηρείται ακολουθεί στο περίπου την κατανομή t με βαθμό ελευθερίας ίσο με $n-2$, όπου το n αντιπροσωπεύει το μέγεθος του δείγματος. Μια χαμηλή p-τιμή ($<0,05$) για αυτή τη δοκιμή σημαίνει ότι υπάρχουν στοιχεία για να απορρίψουμε τη μηδενική υπόθεση υπέρ της εναλλακτικής υπόθεσης ή ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ δύο μεταβλητών (μεταβολιτών). Επίσης, μια απόλυτη τιμή του r μεγαλύτερη από 0,67 και 0,58 θεωρείται ως μια στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ των δύο μεταβολιτών για τα θηλυκά και αρσενικά δείγματα αντίστοιχα.

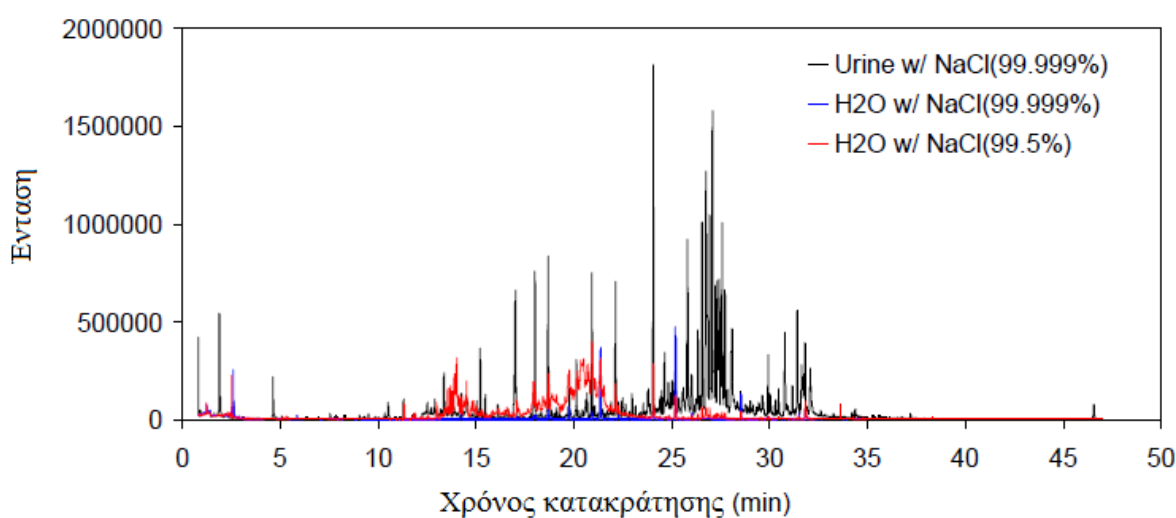
5.3 Αποτελέσματα και συζήτηση

5.3.1 Συνθήκες εκχύλισης SPME

Τρεις τύποι ινών δοκιμάστηκαν στο ίδιο δείγμα ούρων, πολυακρυλικό (polyacrylate), PDMS/DVB και Carboxen/DVB. Η επικαλυμμένη με πολυακρυλικό ίνα ανύψωσε τα "μεγαλύτερα" σήματα και χάρη στην καλύτερη ευαισθησία της, ήταν αυτή η οποία χρησιμοποιήθηκε για αυτή τη μελέτη. Εκ κατασκευής, ο χαρακτήρας απορρόφησης της επικαλυμμένης με πολυακρυλικό ίνας επιτρέπει το διαχωρισμό για την εκχύλιση και έτσι παρέχει μεγαλύτερη χωρητικότητα και γραμμικές περιοχές συγκέντρωσης. Η θερμοκρασία εκχύλισης και η ώρα βελτιστοποιήθηκαν σύμφωνα με το συνολικό άθροισμα των εντάσεων των σημάτων. Η βέλτιστη θερμοκρασία και ο χρόνος

εκχύλισης ήταν 30 λεπτά και 80°C, αντίστοιχα. Τα δείγματα ούρων με pH που κυμαίνονταν από 5,6 – 6,5 ρυθμίστηκαν στο ίδιο pH ($7,0 \pm 0,1$) πριν την ανάλυση. Επιλέχθηκε ουδέτερο pH επειδή επιτρέπει ελάχιστες διαταραχές ως προς τις αρχικές συνθήκες των δειγμάτων. Μερικοί αναλύτες μπορεί να υδρολυθούν σε κάποιο βαθμό εάν υψηλές συγκεντρώσεις οξέος ή βάσεως είχαν χρησιμοποιηθεί στις αναλύσεις. Για παράδειγμα, εστέρες αναμένεται να υδρολυθούν σε μεγαλύτερο βαθμό κάτω από βασικές συνθήκες.

Για να βελτιστοποιηθεί η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης, μία μεγάλη ποσότητα χλωριούχου νατρίου προστέθηκε για να βοηθήσει στην εξάτμιση των μεταβολιτών. Ένα πείραμα ελέγχου πραγματοποιήθηκε δοκιμάζοντας νερό με χαμηλής καθαρότητας NaCl (99.5%), νερό με υψηλής καθαρότητας NaCl (99.999%) και χωριστά ένα δείγμα ούρων όπου προστέθηκε υψηλής καθαρότητας NaCl (99.999%). Παρατηρούμε ότι η χρήση χαμηλής καθαρότητας NaCl εισήγαγε κάποιες προσμείξεις που είναι άσχετες με τα βιολογικά δείγματα αυτής της μελέτης, ενώ η χρήση υψηλής καθαρότητας NaCl δημιουργεί ένα πολύ καθαρότερο υπόβαθρο για τη μελέτη (Σχήμα 5.1). Επομένως συμπεραίνουμε ότι η χρήση υψηλής καθαρότητας άλατος είναι πολύ σημαντική στις αναλύσεις με SPME-GC/MS μεγάλου αριθμού μεταβολιτών, ειδικά όταν ο αναλυτής μάζας έχει ρυθμιστεί ώστε να ανιχνεύει όλα τα ιονισμένα είδη που παρουσιάζονται και όχι μερικά επιλεγμένα.



Σχήμα 5.1: Χρωματογραφία ιόντων τριών δειγμάτων δοκιμής όπου φαίνεται η σημασία της χρησιμοποίησης υψηλής καθαρότητας άλατος¹³⁹

5.3.2 Αναγνώριση και ποσοτικοποίηση μεταβολιτών

Πίνακας 5.1: Ταυτοποίηση πτητικών μεταβολιτών που βρίσκονται σε δείγματα ούρων.

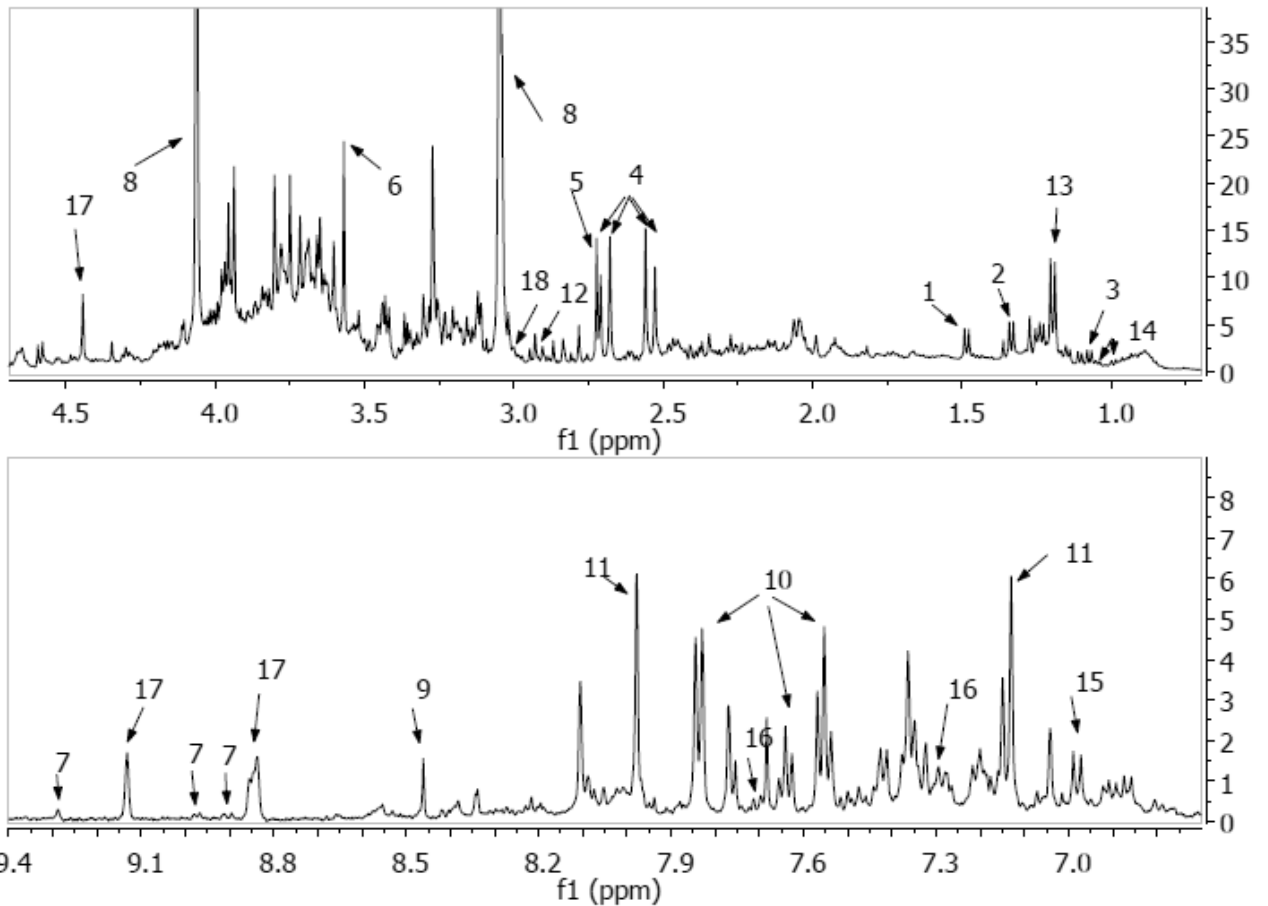
Οι μεταβολίτες ταυτοποιήθηκαν με το ταίριασμα του φάσματος μάζας τους με τη βιβλιοθήκη NIST

Χημική ένωση	Χρόνος κατακράτησης (min)	Ιόν (m/z)	Ταυτότητα	Ταύτιση με βιβλιοθήκη NIST
1	4.61	114	4-Heptanone*	98
2	5.05	71	2-Heptanone*	93
3	6.32	85	2-Methyl-4-heptanone	91
4	6.953	107	Benzaldehyde*	88
5	7.077	128	Dimethyl trisulfide*	90
6	7.527	113	4-Isothiocyanato-1-Butene	84
7	7.84	138	2-Pentyl furan	93
8	8.273	85	Octanal*	90
9	8.813	134	1-(4-Methylphenyl)-1-pentanone	84
10	9.04	84	2-Ethyl-4-methyl-1-pentanol	91
11	9.4	120	Benzeneacetaldehyde*	85
12	9.49	57	1-Nitro-hexane	86
13	9.897	97	(E)-2-Octenal	84
14	10.017	120	Acetophenone	87
15	10.327	84	1-Octanol*	90
16	10.53	120	4-Methyl-benzaldehyde	94
17	10.883	71	2-Nonanone	81
18	11.29	99	Nonanal	96
19	12.513	82	1-Nitro-heptane	90
20	12.883	111	2-Nonenal	91
21	13.36	138	5-Methyl-2-propan-2-ylcyclohexan-1-ol	89
22	14.57	121	2,3-Dihydrobenzofuran	92
23	15.21	150	(R)-Carvone*	91
24	16.117	112	1-Decanol*	92
25	16.49	117	Indole*	90
26	16.66	170	2-Undecanone	96
27	17.02	150	2-Methoxy-4-vinylphenol	88
28	17.737	95	(E)-3-Decen-1-ol	83
29	17.81	125	8-Methyl-1-undecene	85
30	18.013	98	1-(2-Hydroxy-1-methylethyl)-2,2-dimethylpropyl 2-methylpropanoate	92
31	18.683	173	3-Hydroxy-2,4,4-trimethylpentyl 2-methylpropanoate	91
32	20.67	151	6,10-Dimethyl-5,9-undecadien-2-one	86
33	20.923	220	2,6-Di-tert-butylbenzoquinone	81
34	21.39	111	1-Dodecanol*	95
35	22.133	206	2,4-Di-tert-butyl phenol	97
36	22.267	95	13-Heptadecyn-1-ol	81
37	22.647	45	Decanal*	80
38	23.433	161	transNerolidol	88
39	23.79	119	2-Methyl-2-phenyl undecane	87
40	24.04	173	Pentanoic acid, 2,2,4-trimethyl-3-carboxyisopropyl, isobutyl ester	90
41	24.637	207	3-[(2S)-6-methylhept-5-en-2-yl]-6-methylidenecyclohexene	86
42	24.937	111	1,3-Dimethyl-(3,7-dimethyloctyl)cyclohexane	82
43	25.03	138	Caryophyllene oxide	82
44	26.003	155	8-Pentadecanone	89
45	26.423	159	6-Isopropenyl-4,8a-dimethyl-1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydro-naphthalen-2-ol	84
46	26.533	107	Carbamic acid, N-[1,1-bis(trifluoromethyl)ethyl]-, 4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenyl ester ⁸	92
47	27.21	121	Benzestrol	84
48	27.423	177	3,4,4-Trimethyl-3-(3-oxo-but-1-enyl)-bicyclo[4.1.0]heptan-2-one	82
49	27.567	135	4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)-phenol	91
50	28.083	228	Tetradecanoic acid*	92
51	29.627	165	1-(2,6,6-Trimethyl-2-cyclohexen-1-yl)acetone	81
52	29.92	223	Diisobutyl phthalate	91
53	30.283	169	8-Octadecanone	89
54	30.447	101	3-Methyl-2-butenic acid, heptadecyl ester	84
55	30.777	261	7,9-Di-tert-butyl-1-oxaspiro(4,5)deca-8,9-diene-2,8-dione	84
56	31.807	149	Dibutyl phthalate	92
57	32.113	256	n-Hexadecanoic acid*	91
58	34.377	125	1-Octadecanol*	94
59	46.547	149	Squalene*	86

*: Αυτές οι χημικές ενώσεις περιλαμβάνονται και στη βάση δεδομένων HMDB

Συνολικά 98 ενώσεις ταυτοποιήθηκαν από την ανάλυση ούρων με SPME-GC/MS από τους υγιείς ενήλικες. Στον Πίνακα 5.1 παρατίθενται 59 ενώσεις οι οποίες βρέθηκαν στα ούρα και ταιριάζουν σε ποσοστό μεγαλύτερο του 80% σε σύγκριση με αυτές από το NIST. Αποτελούνται από 15 κετόνες, 13 αλκοόλες, 6 αλδεΐδες, 8 υδρογονάνθρακες, 6 εστέρες, 2 ενώσεις θείου, 2 ενώσεις αζώτου και 2 λιπαρά οξέα. 16 από τις ενώσεις που ανιχνεύτηκαν αναφέρονται στη βάση δεδομένων ανθρώπινων μεταβολιτών μερικές από τις οποίες μπορεί να προκύπτουν εν μέρει λόγω της φυσικής παραγωγής του σώματος και εν μέρει λόγω της κατάποσης θρεπτικών συστατικών υψηλής περιεκτικότητας λίπους, ενώ η εμφάνιση άλλων ενώσεων μπορεί να αποδίδεται σε εξωγενείς παράγοντες όπως πλαστικοποιητές, πρόσθετα τροφών, καλλυντικά και έκθεση σε ρύπους.

Μια σχετική ποσότητα κάθε ένωσης ελήφθη κανονικοποιώντας το εκάστοτε ολοκλήρωμα ως προς το άθροισμα των ολοκληρωμάτων όλων των κορυφών. Ο προσδιορισμός της σχετικής ποσότητας των μεταβολιτών στα ούρα και όχι η απόλυτη ποσότητα έγινε κάτω από προσεκτικές εκτιμήσεις. Πρώτον, η μέτρηση απόλυτων τιμών συγκεντρώσεων μεταβολιτών είναι λιγότερο σημαντικό εξαιτίας της φυσικώς ενυπάρχουσας αραίωσης. Δεύτερον, το SPME δεν επιτρέπει τον απόλυτο ποσοτικό προσδιορισμό για την ένωση που εκχυλίζεται εκτός αν μια σειρά πρότυπων διαλυμάτων χρησιμοποιηθούν για την κατασκευή μιας καμπύλης βαθμονόμησης, επειδή δεν γίνεται εκχύλιση της κάθε ένωσης με πανομοιότυπη απόδοση λόγω της παρουσίας επιδράσεων από τη μήτρα και μια σχετικά μικρή γραμμικότητα στο δυναμικό εύρος. Τρίτον, η μεταβολομική στοχεύει στην αναζήτηση διαφορετικών μεταβολιτών από μια συγκριτική ανάλυση μεγάλου αριθμού σημάτων που μετρούνται και αυτός ο στόχος επισφραγίζεται από την εξαιρετική επαναληψιμότητα της μεθόδου SPME-GC/MS. Στη μελέτη αυτή δείγμα ούρων μετρήθηκε δύο φορές πριν και δύο αφότου τα δείγματα προς μελέτη μετρήθηκαν και μια πολύ καλή επαναληψιμότητα ελήφθη. Όλα τα δείγματα στη μελέτη προετοιμάστηκαν και αναλύθηκαν τυχαία.



Σχήμα 5.2 Τυπικό ^1H NMR φάσμα ούρων από υγιή ενήλικα¹³⁹

18 ενώσεις ταυτοποιήθηκαν με χρήση της ^1H NMR ανάλυσης και φαίνονται στο σχήμα 5.2. Οι εργασίες έγιναν με βάση τη βάση δεδομένων ανθρωπίνων μεταβολιτών (HMDB)¹⁸⁷, τη βάση δεδομένων Chemomx (<http://www.chemomx.com>) και λογοτεχνικές τιμές¹⁸⁸. Κάποιες αβέβαιες εκχωρήσεις πραγματοποιήθηκαν λόγω της επικάλυψης ή μικρής μετατόπισης της θέσεως κάποιων ενώσεων και επιβεβαιώθηκαν με την καταγραφή με ^1H NMR φασμάτων ούρων πριν και μετά την προσθήκη μικρών ποσοτήτων αντίστοιχων πρότυπων ενώσεων που προμηθεύτηκαν από εμπορικές πηγές. Σχετικές ποσότητες ταυτοποιημένων μεταβολιτών υπολογίστηκαν με τη σύγκριση των επιπέδων τους με αυτό της κρεατινίνης, το οποίο συχνά χρησιμοποιείται κλινικά ως επίπεδο αναφοράς.

Παρατηρήθηκε ότι οι δύο αναλυτικές μέθοδοι παρήγαγαν συμπληρωματικές μεταβολικές πληροφορίες. Ενώ η φασματοσκοπία ^1H NMR εντόπισε υψηλότερης

συγκέντρωσης μεταβολίτες διαλυμένες σε βιολογικά υγρά, η μέθοδος SPME-GC/MS εστιάζει σε εξαμεισμένους μεταβολίτες που είναι συχνά παρόντες σε χαμηλότερη αφθονία. Αυτό δείχνει σαφέστατα τη σημασία του συνδυασμού των μεθόδων MS και NMR. Επίσης καταδείχθηκε ότι οι μεταβολίτες που προσδιορίστηκαν με ^1H NMR είναι ως επί το πλείστον ενδογενή συστατικά ενώ αυτοί που προσδιορίστηκαν με SPME-GC/MS περιέχουν μεγάλο αριθμό εξωγενών συστατικών.

5.4 Βιοδείκτες

Υπάρχουν πολλές ηλεκτρονικές βάσεις δεδομένων που περιέχουν χρήσιμες και αναλυτικές πληροφορίες για μικρά μόρια μεταβολιτών τα οποία εφαρμόζονται στη μεταβολομική, στη κλινική χημεία, στην εύρεση βιοδεικτών και για γενικούς εκπαιδευτικούς σκοπούς. Τέτοιες βάσεις δεδομένων είναι η Chenomx (www.chenomx.com), η METLIN Metabolomics Database (<https://metlin.scripps.edu/index.php>) και η Human Metabolome Database (HMDB) (<http://www.hmdb.ca>). Παρακάτω φαίνονται μερικοί μεταβολίτες που σχετίζονται με τους τρεις τύπους ΣΔ όπως καταγράφονται στη βάση δεδομένων HMDB:

Πίνακας 5.2: Μεταβολίτες Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 1

Μεταβολίτης	Βιολογικό υγρό	Περιεκτικότητα	Ηλικία	Φύλο
L-Lactic acid	Αίμα	500.0 +/- 130.0 uM	Ενήλικες(>18 ετών)	Κοινό

Πίνακας 5.3: Μεταβολίτες Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2

Μεταβολίτης	Βιολογικό υγρό	Περιεκτικότητα	Ηλικία	Φύλο
(R)-3-Hydroxybutyric acid	Αίμα	7700.0 +/- 300.0 uM	Παιδιά(1-13 ετών)	Κοινό
(R)-3-Hydroxybutyric acid	Αίμα	7700.0 +/- 200.0 uM	Ενήλικες(>18 ετών)	Κοινό
(R)-3-1Hydroxybutyric acid	Αίμα	1400.0 +/- 100.0 uM	Ενήλικες(>18 ετών)	Κοινό
(R)-3-Hydroxybutyric acid	Αίμα	1500.0 +/- 100.0 uM	Παιδιά(1-13 ετών)	Κοινό
(R)-3-Hydroxybutyric acid	Εγκεφαλονωτιαίο υγρό	6360 (5350-7370) uM	Ενήλικες(>18 ετών)	Κοινό
(R)-3-Hydroxybutyric acid	Ούρα	224 umol/mmol creatinine	Ενήλικες(>18 ετών)	Κοινό
(R)-3-Hydroxybutyric acid	Αίμα	38.0 +/- 5.0 uM	Ενήλικες(>18 ετών)	Κοινό
(R)-3-Hydroxyisobutyric acid	Αίμα	38.0 +/- 5.0 uM	Ενήλικες(>18 ετών)	Κοινό
(S)-3-Hydroxyisobutyric acid	Αίμα	50.0 (18.5 - 95.0) uM	Ενήλικες(>18 ετών)	Δεν διευκρινίζεται
1,5-Anhydrosorbitol	Αίμα	62.0 +/- 38.0 uM	Ενήλικες(>18 ετών)	Κοινό
1,5-Anhydrosorbitol	Αίμα	30.0 (9.7 - 66.4) uM	Έφηβοι(13-18 ετών)	Κοινό
1-Butanol	Αίμα	0.11 (0 - 2.43) uM	Ενήλικες(>18 ετών)	Κοινό

1-Methylhistidine	Ούρα	17.5 +/- 25.7 umol/mmol creatinine	Ενήλικες(>18 ετών)	Κοινό
3-Hydroxybutyric acid	Αίμα	35.5 +/- 92.2 uM	Ενήλικες(>18 ετών)	Κοινό
3-Methylhistidine	Ούρα	11.6 +/- 6.6 umol/mmol creatinine	Ενήλικες(>18 ετών)	Δεν διευκρινίζεται
4-Heptanone	Ούρα	0.1 (0.0097- 0.56) umol/mmol creatinine	Ενήλικες(>18 ετών)	Κοινό
8-Hydroxyguanine	Αίμα	0.005 +/- 0.0007 uM	Ενήλικες(>18 ετών)	Κοινό
Acetoacetic acid	Αίμα	3030.0 +/- 20.0 uM	Ενήλικες(>18 ετών)	Κοινό
Acetoacetic acid	Ούρα	237.0 umol/mmol creatinine	Ενήλικες(>18 ετών)	Κοινό
Acetone	Ούρα	13.2 umol/mmol creatinine	Ενήλικες(>18 ετών)	Κοινό
Chromium	Αίμα	0.032 +/- 0.009 uM	Ενήλικες(>18 ετών)	Κοινό
D-Fructose	Αίμα	12.00 +/- 3.8 uM	Ενήλικες(>18 ετών)	Κοινό
D-Fructose	Ούρα	8.4 +/- 7.0 umol/mmol creatinine	Ενήλικες(>18 ετών)	Κοινό
D-Glucose	Αίμα	>11100 uM	Ενήλικες(>18 ετών)	Κοινό

D-Glucose	Αίμα	>7000 uM	Ενήλικες(>18 ετών)	Κοινό
D-Glucose	Ούρα	19700.0 umol/mmol creatinine	Ενήλικες(>18 ετών)	Κοινό
D-Glucose	Ούρα	79600.0 (68300.0-90900.0) umol/mmol creatinine	Ενήλικες(>18 ετών)	Κοινό
D-Lactic acid	Αίμα	20.0 +/- 1.3 uM	Ενήλικες(>18 ετών)	Κοινό
Dimethylamine	Ούρα	25.4 (8.22-42.7) umol/mmol creatinine	Ενήλικες(>18 ετών)	Κοινό
Dodecanedioic acid	Αίμα	279.9 +/- 42.7 uM	Ενήλικες(>18 ετών)	Κοινό
Estriol	Αίμα	0.205 +/- 0.04 uM	Ενήλικες(>18 ετών)	Θηλυκό
Fructosamine	Αίμα	338.7 +/- 77.4 uM	Ενήλικες(>18 ετών)	Κοινό
Glycerol	Αίμα	16.0 +/- 6.0 uM	Ενήλικες(>18 ετών)	Κοινό
Hyaluronan	Αίμα	0.11 +/- 0.013 uM	Ενήλικες(>18 ετών)	Κοινό
L-Carnitine	Ούρα	13.3 (11.6-15.1) umol/mmol creatinine	Ενήλικες(>18 ετών)	Κοινό
L-Carnitine	Ούρα	41.3 (38.3-44.2) umol/mmol creatinine	Ενήλικες(>18 ετών)	Κοινό

Pyruvaldehyde	Αίμα	3.0 (2.4-3.6) uM	Ενήλικες(>18 ετών)	Κοινό
Pyruvaldehyde	Ούρα	0.22 (0.16-0.23) umol/mmol creatinine	Ενήλικες(>18 ετών)	Κοινό
S-Adenosylmethionine	Ούρα	28.4 (25.3-31.6) umol/mmol creatinine	Ενήλικες(>18 ετών)	Κοινό
Scyllitol	Αίμα	0.034 (0.0038-0.256) uM	Ενήλικες(>18 ετών)	Κοινό
Scyllitol	Αίμα	0.01 (0.003-0.073) uM	Ενήλικες(>18 ετών)	Κοινό
Uric acid	Αίμα	400.0 +/- 103.2 uM	Ενήλικες(>18 ετών)	Αρσενικό
Uric acid	Αίμα	368.2 +/- 115.0 uM	Ενήλικες(>18 ετών)	Θηλυκό

Πίνακας 5.4: Μεταβολίτες Διαβήτη Κόησης

Μεταβολίτης	Βιολογικό υγρό	Περιεκτικότητα	Ηλικία	Φύλο
Arachidonic Acid	Αίμα	10.27 +/- 2.11 uM	Ενήλικες(>18 ετών)	Θηλυκό
Linoleic Acid	Αίμα	22.61 +/- 2.80 uM	Ενήλικες(>18 ετών)	Θηλυκό
Oleic Acid	Αίμα	10.22 +/- 1.33 uM	Ενήλικες(>18 ετών)	Θηλυκό

5.5 Συμπεράσματα και μελλοντική έρευνα

Στη μεταγονιδιωματική εποχή, βιολόγοι και ερευνητές εκτίμησαν τη μεταβολομική ανάλυση ως ένα κρίσιμο εργαλείο για την αξιολόγηση φυσιολογικών και παθοφυσιολογικών επιπτώσεων της γενετικής ποικιλομορφίας. Η τρέχουσα εκτόξευση στην ανάπτυξη μεθόδων στον τομέα της μεταβολομικής είναι χτισμένη πάνω στα θεμέλια δεκαετιών της αναλυτικής βιοχημείας και της χρήσης της στην ανίχνευση εκ γενετής σφαλμάτων του μεταβολισμού. Η σημαντική διαφορά ανάμεσα στο τότε και στο τώρα είναι ότι τώρα δίνεται έμφαση στις μεθόδους που επιτρέπουν την ταυτόχρονη μέτρηση πολλαπλών αναλυτών σε ένα βιολογικό δείγμα, ενώ παλιότερα οι εργασίες επικεντρώνονταν σε ένα μεταβολίτη ή σε ένα μικρό αριθμό μεταβολιτών ανά χημική ανάλυση. Παρά τις σημαντικές προόδους, δεν υπάρχει ούτε μία μέθοδος σήμερα που να επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάλυση του συνόλου των μεταβολιτών σε μια μεταβολόμη. Η επίτευξη αυτού του στόχου απαιτεί συνεχή εντατική ανάπτυξη βιβλιοθηκών χημικών προτύπων και εργαλείων ευρέως φάσματος ευαισθησίας και την ενσωμάτωση των μεθόδων MS και NMR για την απόκτηση της δυνατότητας πλήρους κάλυψης των αναλυτών. Αυτές οι πρόοδοι πρέπει να συνδυαστούν με τη συνεχή ανάπτυξη των υπολογιστικών μεθόδων για την ανάλυση πολύπλοκων μεταβολομικών δεδομένων και η ενσωμάτωσή τους με εξίσου γονιδιωματικά, πρωτεομικά και transcriptomic προφίλ. Η τεράστια πρόκληση για την επόμενη φάση της μεταβολομικής έρευνας είναι το να καλυτερεύσει η συγκομιδή πληροφοριών από μεγάλα σύνολα δεδομένων για τη απόκτηση γνώσης για μεταβολικούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς, που ίσως να οδηγήσει στην καλύτερη κατανόηση διαταραχών στις χρόνιες ασθένειες και παθήσεις όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, η παχυσαρκία, τα καρδιαγγειακά νοσήματα και ο καρκίνος.

6

Βιβλιογραφία

1. J. K. Nicholson and I. D. Wilson, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 1989, 21, 449-501.
2. J. K. Nicholson, J. C. Lindon and E. Holmes, *Xenobiotica*, 1999, 29, 1181-1189.
3. A. Sreekumar, L. M. Poisson, T. M. Rajendiran, A. P. Khan, Q. Cao, J. D. Yu, B. Laxman, R. Mehra, R. J. Lonigro, Y. Li, M. K. Nyati, A. Ahsan, S. Kalyana-Sundaram, B. Han, X. H. Cao, J. Byun, G. S. Omenn, D. Ghosh, S. Pennathur, D. C. Alexander, A. Berger, J. R. Shuster, J. T. Wei, S. Varambally, C. Beecher and A. M. Chinnaiyan, *Nature*, 2009, 457, 910- 914.
4. O. Fiehn, *Plant Molecular Biology*, 2002, 48, 155-171.
5. J. K. Nicholson, J. Connelly, J. C. Lindon and E. Holmes, *Nature Reviews Drug Discovery*, 2002, 1, 153-161.
6. M. R. Viant, *Metabolomics*, 2009, 5, 1-2.
7. J. K. Nicholson, *Mol Syst Biol*, 2006, -.
8. W. B. Dunn, N. J. C. Bailey and H. E. Johnson, *Analyst*, 2005, 130, 606- 625.
9. M. Ala-Korpela, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2008, 46, 27- 42.
10. G. A. N. Gowda, S. C. Zhang, H. W. Gu, V. Asiago, N. Shanaiah and D. Raftery, *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 2008, 8, 617-633.

11. X. Lu, X. J. Zhao, C. M. Bai, C. X. Zhao, G. Lu and G. M. Xu, *J Chromatogr B*, 2008, 866, 64-76.
12. E. Y. Xu, W. H. Schaefer and Q. W. Xu, *Curr Opin Drug Disc*, 2009, 12, 40-52.
13. J. G. Bundy, M. P. Davey and M. R. Viant, *Metabolomics*, 2009, 5, 3-21.
14. J. L. Spratlin, N. J. Serkova and S. G. Eckhardt, *Clin Cancer Res*, 2009, 15, 431-440.
15. D. S. Wishart, *Trends Food Sci Tech*, 2008, 19, 482-493.
16. M. E. Lacey, R. Subramanian, D. L. Olson, A. G. Webb and J. V. Sweedler, *Chem Rev*, 1999, 99, 3133-+.
17. D. Raftery, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2004, 378, 1403-1404.
18. J. C. Lindon, *Drug Discov Today*, 2003, 8, 1021-1022.
19. S. C. Brown, G. Kruppa and J. L. Dasseux, *Mass Spectrometry Reviews*, 2005, 24, 223-231.
20. J. H. Granger, A. Baker, R. S. Plumb, J. C. Perez and I. D. Wilson, *Drug Metabolism Reviews*, 2004, 36, 252-252.
21. S. G. Villas-Boas, S. Mas, M. Akesson, J. Smedsgaard and J. Nielsen, *Mass Spectrometry Reviews*, 2005, 24, 613-646.
22. I. D. Wilson, R. Plumb, J. Granger, H. Major, R. Williams and E. A. Lenz, *J Chromatogr B*, 2005, 817, 67-76.
23. H. W. Chen, A. Venter and R. G. Cooks, *Chemical Communications*, 2006, 2042-2044.
24. Z. Takats, J. M. Wiseman, B. Gologan and R. G. Cooks, *Science*, 2004, 306, 471-473.
25. R. B. Cody, J. A. Laramee and H. D. Durst, *Anal Chem*, 2005, 77, 2297- 2302.
26. R. A. Johnson and D. W. Wichern, Prentice Hall: Upper Saddle River, NJ, 1998, 5th edition.
27. D. I. Broadhurst and D. B. Kell, *Metabolomics*, 2006, 2, 171-196.
28. S. C. Zhang, C. Zheng, I. R. Lanza, K. S. Nair, D. Raftery and O. Vitek, *Anal Chem*, 2009, 81, 6080-6088.
29. M. E. Bollard, E. G. Stanley, J. C. Lindon, J. K. Nicholson and E. Holmes, *Nmr Biomed*, 2005, 18, 143-162.

30. A. D. Maher, O. Cloarec, P. Patki, M. Craggs, E. Holmes, J. C. Lindon and J. K. Nicholson, *Anal Chem*, 2009, 81, 288-295.
31. L. Bala, U. C. Ghoshal, U. Ghoshal, P. Tripathi, A. Misra, G. A. N. Gowda and C. L. Khetrapal, *Magn Reson Med*, 2006, 56, 738-744.
32. G. A. Gowda, N. Shanaiah, A. Cooper, M. Maluccio and D. Raftery, *Lipids*, 2009, 44, 27- 35.
33. G. Graca, I. F. Duarte, B. J. Goodfellow, I. M. Carreira, A. B. Couceiro, M. D. Domingues, M. Spraul, L. H. Tseng and A. M. Gil, *Anal Chem*, 2008, 80, 6085-6092.
34. J. L. Griffin and R. A. Kauppinen, *Febs J*, 2007, 274, 1132-1139.
35. O. Beckonert, H. C. Keun, T. M. D. Ebbels, J. G. Bundy, E. Holmes, J. C. Lindon and J. K. Nicholson, *Nature Protocols*, 2007, 2, 2692-2703.
36. M. D. Reily, L. C. Robosky, M. L. Manning, A. Butler, J. D. Baker and R. T. Winters, *J Am Chem Soc*, 2006, 128, 12360-12361.
37. N. Shanaiah, M. A. Desilva, G. A. N. Gowda, M. A. Raftery, B. E. Hainline and D. Raftery, *P Natl Acad Sci USA*, 2007, 104, 11540-11544.
38. T. Ye, H. P. Mo, N. Shanaiah, G. A. N. Gowda, S. C. Zhang and D. Raftery, *Anal Chem*, 2009, 81, 4882-4888.
39. T. Ye, S. Zhang, H. Mo, T. Fariba, G. A. N. Gowda and D. Raftery, Submitted, 2009.
40. K. Dettmer, P. A. Aronov and B. D. Hammock, *Mass Spectrometry Reviews*, 2007, 26, 51-78.
41. A. D. Southam, T. G. Payne, H. J. Cooper, T. N. Arvanitis and M. R. Viant, *Anal Chem*, 2007, 79, 4595-4602.
42. L. M. Smith, A. D. Maher, O. Cloarec, M. Rantalainen, H. R. Tang, P. Elliott, J. Stamler, J. C. Lindon, E. Holmes and J. K. Nicholson, *Anal Chem*, 2007, 79, 5682-5689.
43. B. C. Chunt, *Drug Metabolism Reviews*, 2006, 38, 20-21.
44. X. W. Zhang, D. Wei, Y. Yap, L. Li, S. Y. Guo and F. Chen, *Mass Spectrometry Reviews*, 2007, 26, 403-431.
45. Y. Tikunov, A. Lommen, C. H. R. de Vos, H. A. Verhoeven, R. J. Bino, R. D. Hall and A. G. Bovy, *Plant Physiology*, 2005, 139, 1125-1137.

46. O. Fiehn, *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 2008, 27, 261-269.
47. H. W. Gu, H. W. Chen, Z. Z. Pan, A. U. Jackson, N. Talaty, B. W. Xi, C. Kissinger, C. Duda, D. Mann, D. Raftery and R. G. Cooks, *Anal Chem*, 2007, 79, 89-97.
48. Z. Pan, H. Gu, N. Talaty, H. Chen, N. Shanaiah, B. Hainline, R. Cooks and D. Raftery, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007, 387, 539-549.
49. J. C. Lindon, E. Holmes and J. K. Nicholson, *Expert Rev Mol Diagn*, 2004, 4, 189-199.
50. J. C. Lindon, E. Holmes and J. K. Nicholson, *Febs J*, 2007, 274, 1140- 1151.
51. H. C. Keun and T. J. Athersuch, *Pharmacogenomics*, 2007, 8, 731-741.
52. S. Rezzi, Z. Ramadan, L. B. Fay and S. Kochhar, *J Proteome Res*, 2007, 6, 513-525.
53. M. J. Gibney, M. Walsh, L. Brennan, H. M. Roche, B. German and B. van Ommen, *Am J Clin Nutr*, 2005, 82, 497-503.
54. N. Schauer and A. R. Fernie, *Trends in Plant Science*, 2006, 11, 508-516.
55. R. D. Hall, I. D. Brouwer and M. A. Fitzgerald, *Physiol Plantarum*, 2008, 132, 162-175.
56. S. Y. Rhee, J. Dickerson and D. Xu, *Annual Review of Plant Biology*, 2006, 57, 335-360.
57. E. T. Gatzidou, A. N. Zira and S. E. Theocharis, *J Appl Toxicol*, 2007, 27, 302-309.
58. H. C. Keun, *Pharmacol Therapeut*, 2006, 109, 92-106.
59. J. C. Lindon, H. C. Keun, T. M. D. Ebbels, J. M. T. Pearce, E. Holmes and J. K. Nicholson, *Pharmacogenomics*, 2005, 6, 691-699.
60. M. R. Viant, *Mol Biosyst*, 2008, 4, 980-986.
61. J. P. Grivet and A. M. Delort, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 2009, 54, 1-53.
62. S. A. Fancy, O. Beckonert, G. Darbon, W. Yabsley, R. Walley, D. Baker, G. L. Perkins, F. S. Pullen and K. Rumpel, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2006, 20, 2271-2280.

63. H. F. Wu, A. D. Southam, A. Hines and M. R. Viant, *Anal Biochem*, 2008, 372, 204-212.
64. D. Vuckovic, R. Shirey, Y. Chen, L. Sidisky, C. Aurand, K. Stenerson and J. Pawliszyn, *Anal Chim Acta*, 2009, 638, 175-185.
65. E. C. Y. Chan, P. K. Koh, M. Mal, P. Y. Cheah, K. W. Eu, A. Backshall, R. Cavill, J. K. Nicholson and H. C. Keun, *J Proteome Res*, 2009, 8, 352-361.
66. K. Odunsi, R. M. Wollman, C. B. Ambrosone, A. Hutson, S. E. McCann, J. Tammela, J. P. Geisler, G. Miller, T. Sellers, W. Cliby, F. Qian, B. Keitz, M. Intengan, S. Lele and J. L. Alderfer, *Int J Cancer*, 2005, 113, 782-788.
67. S. C. Zhang, G. A. N. Gowda, V. Asiago, N. Shanaiah, C. Barbas and D. Raftery, *Analytical Biochemistry*, 2008, 383, 76-84.
68. R. Roussel, F. Mentre, N. Bouchemal, S. Hadjadj, M. Lievre, G. Chatellier, J. Menard, X. Panhard, A. Le Henanff, M. Marre, L. Le Moyec and D. S. Grp, *Nature Medicine*, 2007, 13, 399-400.
69. R. M. Salek, M. L. Maguire, E. Bentley, D. V. Rubtsov, T. Hough, M. Cheeseman, D. Nunez, B. C. Sweatman, J. N. Haselden, R. D. Cox, S. C. Connor and J. L. Griffin, *Physiol Genomics*, 2007, 29, 99-108.
70. M. S. Hodavance, S. L. Ralston and I. Pelczer, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007, 387, 533-537.
71. S. R. M., M. L. Maguire, E. Bentley, D. V. Rubtsov, T. Hough, C. M., D. Nunez, B. C. Sweatman, J. N. Haselden, R. D. Cox, S. C. Connor and J. L. Griffin, *Physiol. Genomics*, 2006, doi:10.1152.
72. M. A. Constantinou, E. Papakonstantinou, M. Spraul, S. Sevastiadou, C. Costalos, M. A. Koupparis, K. Shulpis, A. Tsantili-Kakoulidou and E. Mikros, *Anal Chim Acta*, 2005, 542, 169-177.
73. M. A. Constantinou, E. Papakonstantinou, D. Benaki, M. Spraul, K. Shulpis, M. A. Koupparis and E. Mikros, *Anal Chim Acta*, 2004, 511, 303- 312.
74. M. Bogdanov, W. R. Matson, L. Wang, T. Matson, R. Saunders-Pullman, S. S. Bressman and M. F. Beal, *Brain*, 2008, 131, 389-396.
75. J. Saric, Y. Wang, J. Li, M. Coen, J. Utzinger, J. R. Marchesi, J. Keiser, K. Veselkov, J. C. Lindon, J. K. Nicholson and E. Holmes, *J Proteome Res*, 2008, 7, 352-360.

76. G. L. A. H. Jones, E. Sang, C. Goddard, R. J. Mortishire-Smith, B. C. Sweatman, J. N. Haselden, K. Davies, A. A. Grace, K. Clarke and J. L. Griffin, *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280, 7530-7539.
77. M. Coen, E. Holmes, J. C. Lindon and J. K. Nicholson, *Chem Res Toxicol*, 2008, 21, 9-27.
78. J. Van der Greef, T. Hankemeier and R. N. McBurney, *Pharmacogenomics*, 2006, 7, 1087-1094.
79. W. Tuffnail, G. A. Mills, P. Cary and R. Greenwood, *Metabolomics*, 2009, 5, 33-43.
80. C. Y. Lin, M. R. Viant and R. S. Tjeerdema, *J Pestic Sci*, 2006, 31, 245-251.
81. J. G. Bundy, B. Papp, R. Harmston, R. A. Browne, E. M. Clayson, N. Burton, R. J. Reece, S. G. Oliver and K. M. Brindle, *Genome Research*, 2007, 17, 510-519.
82. S. Mas, S. G. Villas-Boas, M. E. Hansen, M. Akesson and J. Nielsen, *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, 96, 1014-1022.
83. R. Kaddurah-Daouk, B. S. Kristal and R. M. Weinshilboum, *Annu Rev Pharmacol*, 2008, 48, 653-683.
84. H. W. Gu, Z. Z. Pan, B. W. Xi, B. E. Hainline, N. Shanaiah, V. Asiago, G. A. N. Gowda and D. Raftery, *Nmr Biomed*, 2009, 22, 826-833.
85. A. W. Strauss, *Journal of Clinical Investigation*, 2004, 113, 354-356.
86. C. Abate-Shen and M. M. Shen, *Nature*, 2009, 457, 799-800.
87. J. L. Griffin and R. A. Kauppinen, *J Proteome Res*, 2007, 6, 498-505.
88. J. L. Griffin, *Curr Opin Chem Biol*, 2006, 10, 309-315.
89. P. Espandiari, J. Zhang, B. A. Rosenzweig, V. S. Vaidya, J. Sun, L. Schnackenberg, E. H. Herman, A. Knapton, J. V. Bonventre, R. D. Beger, K. L. Thompson and J. Hanig, *Toxicological Sciences*, 2007, 99, 637-648.
90. Y. L. Wang, M. E. Bollard, J. K. Nicholson and E. Holmes, *J Pharmaceut Biomed*, 2006, 40, 375-381.
91. J. J. Xu, J. Zhang, J. Y. Dong, S. H. Cai, J. Y. Yang and Z. Chen, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009, 393, 1657-1668.
92. W. N. P. Lee and V. L. W. Go, *J Nutr*, 2005, 135, 3027s-3032s.

93. B. Ruby, R. Robergs, G. Leadbetter, C. Mermier, T. Chick and D. Stark, *Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*, 1996, 36, 246-254.
94. J. Shearer, G. Duggan, A. Weljie, D. S. Hittel, D. H. Wasserman and H. J. Vogel, *Diabetes Obes Metab*, 2008, 10, 950-958.
95. S. Kochhar, D. M. Jacobs, Z. Ramadan, F. Berruex, A. Fuerhoz and L. B. Fay, *Anal Biochem*, 2006, 352, 274-281.
96. G. Lu, J. Wang, X. Zhao, H. Kong and G. Xu, *Chinese Journal of Chromatography*, 2006, 24, 109-113.
97. C. L. Arthur and J. Pawliszyn, *Anal Chem*, 1990, 62, 2145-2148.
98. Z. Z. Pan and D. Raftery, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007, 387, 525-527.
99. D. S. Wishart, D. Tzur, C. Knox, R. Eisner, A. C. Guo, N. Young, D. Cheng, K. Jewell, D. Arndt, S. Sawhney, C. Fung, L. Nikolai, M. Lewis, M. A. Coutouly, I. Forsythe, P. Tang, S. Shrivastava, K. Jeroncic, P. Stothard, G. Amegbey, D. Block, D. D. Hau, J. Wagner, J. Miniaci, M. Clements, M. Gebremedhin, N. Guo, Y. Zhang, G. E. Duggan, G. D. MacInnis, A. M. Weljie, R. Dowlatabadi, F. Bamforth, D. Clive, R. Greiner, L. Li, T. Marrie, B. D. Sykes, H. J. Vogel and L. Querengesser, *Nucleic Acids Research*, 2007, 35, D521-D526.
100. J. C. Lindon, J. K. Nicholson and J. R. Everett, *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, Vol 38, 1999, 38, 1-88.
101. Κ. Νικήτα, Προσομοίωση Φυσιολογικών Συστημάτων, Εκδόσεις Τζιόλα, 2010
102. Glycogenolysis. Wikipedia, The Free Encyclopedia <http://en.wikipedia.org/wiki/Glycogenolysis>.
103. http://biomed.brown.edu/Courses/BI108/BI108_2002_Groups/pancstems/stemcel/insulin_glucagon.htm J. Norman MD, "Normal Regulation of Blood Glucose"
104. Ινσουλίνη. Wikipedia, The Free Encyclopedia <http://el.wikipedia.org/wiki/Ινσουλίνη>
105. Ι. Παμπούκας, Ι. Τσαβαρίδης, "Τι το νεότερο στη θεραπεία του Σακχαρώδη Διαβήτη;", *Ελληνικά Διαβητολογικά Χρονικά 20*, Vol. 20, pp 90-206, 2007
106. Chi-Chuan Tseng, Xiao-Ying Zhang, M. Michael Wolf, "Effect of GIP and GLP-1 antagonists on insulin release", *Am J Physiol Endocrinol Metab* 276: E1049-E1054, 1999

107. L. Brown , Elazer R. Edelman, “Optimal Control of Blood Glucose: The Diabetic Patient or the Machine?”, *Science Translational Medicine* , Vol.2 , Issue 27 27ps 18 ,April 2010
108. Διαβήτης, Wikipedia, The Free Encyclopedia, http://en.wikipedia.org/wiki/Diabetes_mellitus
109. F. Doyle, L. Jovanovic, D. Seborg “Glucose control strategies for treating type 1 diabetes mellitus” , *Journal of Process Control* 17: 572-576, 2007
110. http://www.chem.uoa.gr/chemicals/chem_insulin.htm
111. Α. Ζαντίδης , Ν. Κατσίκης , Φ. Ηλιάδης, Τ. Διδάγγελος, “Οδηγίες Αντιμετώπισης του Σακχαρώδους Διαβήτη”, *Ελληνικά Διαβητολογικά Χρονικά* 23,1:17-77,2010
112. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>, World Health Organization
113. Ινσουλίνη, Wikipedia, The Free Encyclopedia, <http://el.wikipedia.org/wiki/Ινσουλίνη>
114. <http://projectdiabetes.weebly.com/global-impact.html>
115. S. Wild, G. Roglic, A. Green, R. Sicree, H. King , “Global Prevalence of Diabetes Estimates for the year 2000 and projections for 2030”, *Diabetes Care* 27:1047–1053, 2004
116. <http://diabetes.niddk.nih.gov/dm/pubs/statistics/#fast>, National Diabetes Statistics 2011
117. <http://www.idf.org/fact-sheets> International Diabetes Federation , Fact Sheets
118. “Juvenile Diabetes Research Foundation International”, <http://www.jdrf.org>
119. V.J Briscoe and S.N. Davis “Hypoglycemia in Type 1 and Type 1 diabetes: Physiology, pathophysiology and management” , *Clin Diabetes*, vol. 24, no.3, pp115-121, 2006
120. <http://www.kidney.org/atoz/pdf/diabetes.pdf>, National Kidney Foundation
121. C. J. Nuble “Sugar High: Diabetes The Killer Disease”
122. http://masspec.scripps.edu/mshistory/whatisms_details.php#Basics
123. http://chemwiki.ucdavis.edu/Analytical_Chemistry/Instrumental_Analysis/Chromatography/Gas_Chromatography
124. <http://departments.agri.huji.ac.il/zabam/Polaris-Q.html>
125. <http://www.lamondlab.com/MSResource/images/lcms/ESI.jpg>

126. http://www.sec.psu.ac.th/web-board/content/view_img.php?id=906
127. <http://www.particlesciences.com/images/tb/apci-ion-source.jpg>
128. http://en.wikibooks.org/wiki/Chemical_Principles/Atoms,_Molecules,_and_Ions
129. http://www.murr.missouri.edu/ps_analytical_ICP_highres.php
130. <http://www.britannica.com/EBchecked/media/3139/Arrangement-of-the-electrostatic-and-magnetic-sectors-in-the-Mattauch>
131. <http://www.globalspec.com/reference/68924/203279/3-3-mass-analysers>
132. http://www.chem.agilent.com/cag/Other/IonTrap_fig2.gif
133. <http://www.shimadzu.com/an/qn5042000001hul2-img/qn5042000001hunp.jpg>
134. http://www.eag.com/cmss_files/imagelibrary/chanelem.gif
135. Μαρία Όξενκιουν-Πετροπούλου, Φασματομετρικές Μέθοδοι, Εκδόσεις Συμμετρία, 2008
136. <http://www.chemhume.co.uk/A2CHEM/Unit%201/7%20Polymers/Ch7Polymers.c.htm>
137. <http://www.mhhe.com/physsci/chemistry/carey/student/olc/ch13nmr.html>
138. <http://www.rsc.org/learn-chemistry/collections/spectroscopy/introduction>
139. Shucha Zhang, Biomarker Discovery Using NMR and MS-based Metabolomics: Applications to Diabetes, Dissertation submitted to the faculty of Purdue University, May 2010
140. Αθηνά Παππά, Φυσικές Μέθοδοι Ανάλυσης (Χρωματογραφικές, Θερμικές, Ηλεκτρομετρικές, Φασματομετρία Μάζας), Εκδόσεις Πολυτεχνείου, 2004