

2015

Βιοαναλυτική Χημεία

Κύριος Συγγραφέας:

Γ. Θεοδωρίδης

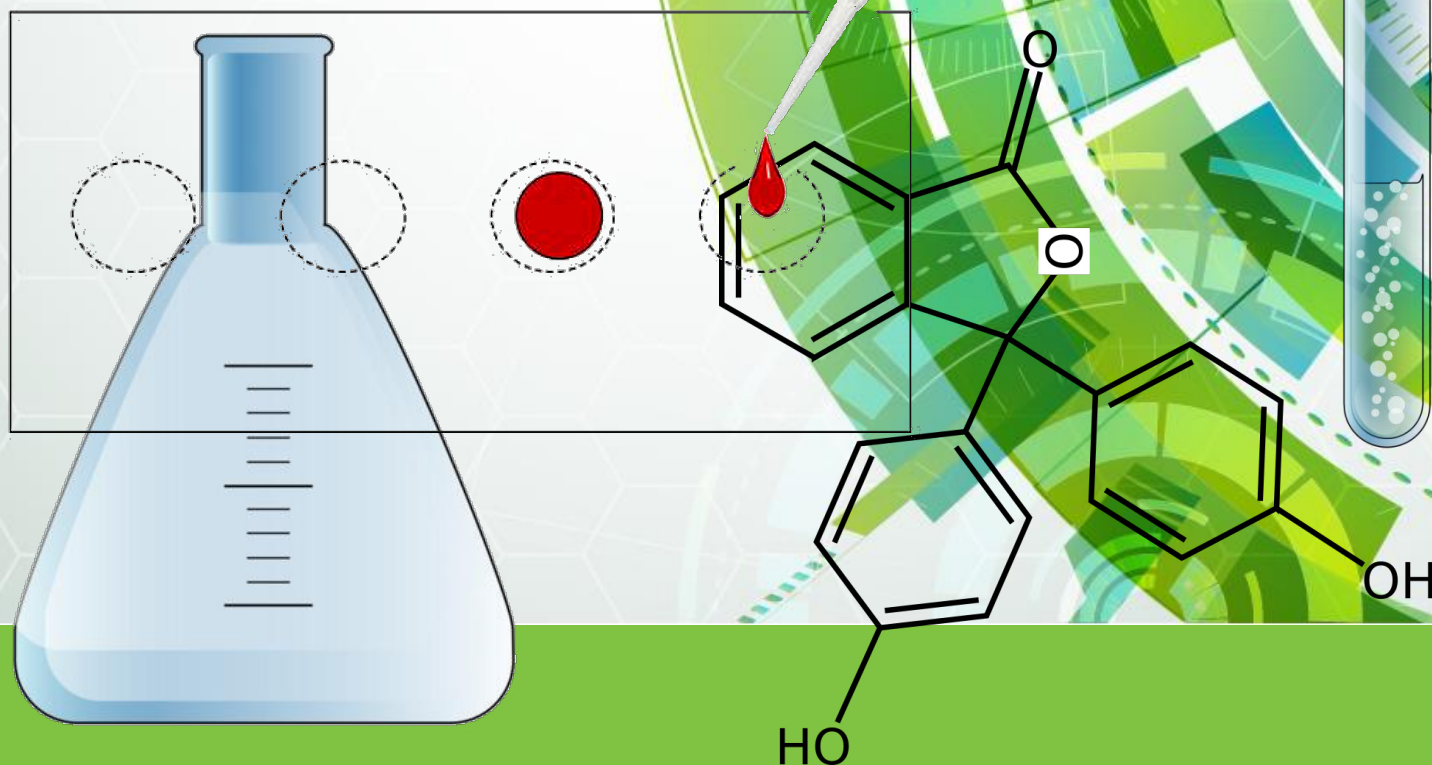
Συνεργάτες:

Σ. Γηρούση

Γ. Ζαχαριάδης

Α. Ζώτου

Β. Σαμανίδου



Ελληνικά Ακαδημαϊκά Ηλεκτρονικά
Συγγράμματα και Βοηθήματα
www.kallipos.gr

HEALLINK
Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ



ΕΣΠΑ
2007-2013
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΘΕΟΔΩΡΙΔΗΣ

ΣΤΕΛΛΑ ΓΗΡΟΥΣΗ

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΖΑΧΑΡΙΑΔΗΣ

ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ-ΣΤΕΛΛΑ ΖΩΤΟΥ

ΒΙΚΤΩΡΙΑ ΣΑΜΑΝΙΔΟΥ

Βιοαναλυτική Χημεία



Ελληνικά Ακαδημαϊκά Ηλεκτρονικά
Συγγράμματα και Βοηθήματα
www.kallipos.gr

Βιοαναλυτική Χημεία

Συγγραφή

Γεώργιος Θεοδωρίδης (κύριος συγγραφέας)

Στέλλα Γηρούση

Γεώργιος Ζαχαριάδης

Αναστασία-Στέλλα Ζώτου

Βικτωρία Σαμανίδου

Κριτικός αναγνώστης

Ελένη Γκίκα

Συντελεστές έκδοσης

Γλωσσική Επιμέλεια: Σοφία Σέγκουλη

Γραφιστική Επιμέλεια: Ιωάννης Παλιόκας

Τεχνική Επεξεργασία: Ιωάννης Παλιόκας

ISBN: 978-960-603-052-9

Copyright © ΣΕΑΒ, 2015



Το παρόν έργο αδειοδοτείται υπό τους όρους της άδειας Creative Commons Αναφορά Δημιουργού - Μη Εμπορική Χρήση - Όχι Παράγωγα Έργα 3.0. Για να δείτε ένα αντίγραφο της άδειας αυτής επισκεφτείτε τον ιστότοπο <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/gr/>

ΣΥΝΔΕΣΜΟΣ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΩΝ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΩΝ

Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο

Ηρώων Πολυτεχνείου 9, 15780 Ζωγράφου

www.kallipos.gr

Πίνακας περιεχομένων

Πίνακας συντομεύσεων-ακρωνύμια	8
Πρόλογος.....	13
Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή	14
1.1. Αντικείμενο, Ανάγκες και Εφαρμογές της Βιοανάλυσης	14
Βιβλιογραφία	16
Κεφάλαιο 2: Βιολογία Συστημάτων, Τεχνολογίες Omics.....	17
2.1. Ολιστική Ανάλυση	17
2.2. Βιολογία Συστημάτων.....	17
2.3. Πεδία της Βιολογίας Συστημάτων.....	19
2.4. Βιοαναλυτικές προκλήσεις στα πεδία της Βιολογίας Συστημάτων	21
2.5. Εφαρμογές της βιολογίας συστημάτων	23
2.6. Επεξεργασία και ανάλυση δεδομένων	32
2.7. Πολυπαραμετρική Στατιστική Ανάλυση	33
Αναφορές.....	36
Βιβλιογραφία	37
Δικτυογραφία.....	37
Κεφάλαιο 3: Βιοφαρμακευτική Ανάλυση	38
3.1. Εισαγωγή	38
3.2. Διαδικασία Έρευνας και Ανάπτυξης φαρμάκων.....	40
3.3. Έλεγχος και εκτίμηση της Βιοϊσοδυναμίας	41
3.4. Φαρμακοκινητική-Φαρμακολογικές μελέτες	42
3.5. Θεραπευτική Παρακολούθηση Φαρμάκου	42
3.6. Δέσμευση Φαρμάκων από Πρωτεΐνες	47
3.7. Βιοφάρμακα.....	49
Βιβλιογραφία	50
Δικτυογραφία.....	50
Κεφάλαιο 4: Βιολογικά Υποστρώματα	51
4.1. Εισαγωγή	51
4.2. Συμβατικά Βιολογικά Υποστρώματα	51
4.2.1. Αίμα	51
4.2.2. Ούρα	52
4.3. Εναλλακτικά ή μη συμβατικά υποστρώματα	53
4.3.1. Τρίχες	53
4.3.2. Όνυχες	54
4.3.3. Υδατοειδές υγρό	55
4.3.4. Εγκεφαλονωτιαίο υγρό	56
4.3.5. Στοματικά υγρά.....	56

4.3.6. Ιδρώτας	57
4.3.7. Αμνιακό υγρό και μηκόνιο.....	57
4.4. Συλλογή δειγμάτων-Δειγματοληψία.....	58
4.4.1. Δειγματοληψία ξηρής κηλίδας αίματος (Dried blood spot sampling)	58
4.4.2. Στάδια δειγματοληψίας- προκατεργασίας	59
Βιβλιογραφία	59
Δικτυογραφία.....	60
Κεφάλαιο 5: Τα Μεταλλικά Στοιχεία στον Οργανισμό.....	61
5.1. Μέταλλα και μεταλλομική	61
5.2. Απαραίτητα και ουσιώδη μέταλλα	64
5.3. Μη Ουσιώδη και Τοξικά Μέταλλα στον Οργανισμό	69
5.4. Μεταλλοφάρμακα Εισαγόμενα στον Οργανισμό	73
5.5. Μέταλλα σε Ιατρικές και Διαγνωστικές Εφαρμογές.....	75
Βιβλιογραφία	76
Κεφάλαιο 6: Τεχνικές Προκατεργασίας Βιολογικών Δειγμάτων	77
6.1. Εισαγωγή	77
6.2. Απομάκρυνση Πρωτεϊνών	79
6.3. Τεχνικές Εκχύλισης.....	80
6.4. Άμεσες Βιοαναλυτικές Τεχνικές.....	90
6.4.1. Εκχύλιση αέριας φάσης	90
6.4.2. Εκχύλιση μεμβράνης.....	91
Βιβλιογραφία	93
Κεφάλαιο 7: Βιοαισθητήρες.....	95
7.1. Εισαγωγή	95
7.2. Ορισμός.....	96
7.3. Ακινητοποίηση Βιομορίων	97
7.4. Τεχνικές Ακινητοποίησης.....	97
7.5. Αισθητηριακά Συστήματα σε Βιοαισθητήρες (δέκτες)	99
7.6. Τεχνητοί Δέκτες-Βιομιμητές (Biomimetics).....	102
7.7. Ανιχνευτές ή Μεταλλάκτες Σήματος.....	103
7.8. Ηλεκτροχημικοί Μεταλλάκτες Σήματος.....	103
7.9. Ορισμοί	104
7.10. Ηλεκτροδιακές Διεργασίες ή Δράσεις	104
7.11. Βολτ – αμπέρ – μετρώ, Βολταμετρία.....	105
7.12. Κυκλική Βολταμετρία	105
7.13. Τεχνικές Σάρωσης του Δυναμικού.....	105
7.14. Τεχνικές Αναδιάλυσης	107
7.15. Ηλεκτροδραστικότητα DNA	108
7.15.1. Δομή και ιδιότητες του DNA.....	108
7.15.2. Χρήση Ηλεκτροαναλυτικών Τεχνικών για τη Διερεύνηση της Δομής του DNA	109
7.16. Βιοαισθητήρες/Μεταλλάκτες σήματος.....	111

7.16.1. Ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες/ Ηλεκτροχημικοί μεταλλάκτες σήματος	111
7.16.2. Οπτικοί Μεταλλάκτες Σήματος	112
7.16.3. Εφαρμογές: Πλεονεκτήματα, Μειονεκτήματα	113
7.16.5. Θερμικοί Μεταλλάκτες Σήματος	114
7.16.6. Μαγνητικοί Μεταλλάκτες Σήματος	115
7.17. Εφαρμογές Βιοαισθητήρων	115
7.17.1. Ανίχνευση Καρκινικών Δεικτών	115
7.18.1. Χρήση Βιοαισθητήρων σε Εφαρμογές Φροντίδας Σημείου (point of care, POC)	116
7.18.2. Βιοαισθητήρες για Μετρήσεις Γλυκόζης in vivo	117
7.18.3. Άλλες Εφαρμογές των Βιοαισθητήρων	118
7.18.4. Υπάρχουσες Τεχνολογίες	119
Βιβλιογραφία	120
Κεφάλαιο 8: Ανοσοχημικές Τεχνικές Ανάλυσης	123
8.1. Εισαγωγή	123
8.2. Αντισώματα	123
8.3. Ακινητοποίηση Βιομορίων σε Επιφάνειες.....	124
8.4. Ανοσοχημικές Τεχνικές Ανάλυσης.....	125
8.4.1. Ράδιο-ανοσοχημική Ανάλυση.....	126
8.4.2. Ενζυμο-ανοσοχημική Ανάλυση	126
8.4.2. Φθόρο-ανοσοχημική ανάλυση (FIA).....	131
8.5. Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα Ανοσοχημικών Τεχνικών.....	133
8.6. Εφαρμογές Ανοσοχημικών Τεχνικών	133
Βιβλιογραφία	134
Κεφάλαιο 9: Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση	136
9.1. Εισαγωγή – Ιστορική Αναδρομή.....	136
9.2. Αρχές Λειτουργίας.....	136
9.3. Θεωρία	138
9.3.1. Ορολογία της Ηλεκτροφόρησης.....	138
9.3.2. Ηλεκτροφόρηση	139
9.3.3. Ηλεκτροοσμωτική Ροή	140
9.3.4. Αναλυτικές Παράμετροι	143
9.4. Τρόποι Διαχωρισμού.....	149
9.4.1. Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση Ζώνης (CZE).....	149
9.4.4. Τριχοειδής Ισοηλεκτρική Εστίαση (CIEF).....	157
9.4.5. Τριχοειδής Ισοταχοφόρηση (CITP).....	158
9.4.6. Επιλογή Ηλεκτροφορητικής Τεχνικής	160
9.5. Οργανολογία και Λειτουργικές Παράμετροι της Τριχοειδούς Ηλεκτροφόρησης	161
9.5.1. Εισαγωγή Δείγματος	161
9.5.2. Ανίχνευση.....	163
9.5.3. Ποσοτική Ανάλυση.....	170
Βιβλιογραφία	171

Κεφάλαιο 10: Η Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση στη Βιοανάλυση	173
10.1. Εισαγωγή	173
10.2. Αύξηση Ευαισθησίας με Εφαρμογή Ηλεκτροφορητικών Τεχνικών Προσυγκέντρωσης	173
10.3. Επικάλυψη Τριχοειδούς και Τροποποίηση της Επιφάνειάς του για Ανάλυση Βιομορίων	175
10.4. Δειγματοληψία και Προκατεργασία Δείγματος.....	176
10.5. Βιοαναλυτικές Εφαρμογές της Τριχοειδούς Ηλεκτροφόρησης.....	177
Βιβλιογραφία	181
Κεφάλαιο 11: Χρωματογραφικές Τεχνικές στη Βιοανάλυση.....	183
11.1. Εισαγωγή	183
11.2. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης	183
11.3. Υγρή χρωματογραφία Υδρόφιλων Αλληλεπιδράσεων	186
11.4. Χρωματογραφικός Διαχωρισμός Εναντιομερών με HPLC	187
11.4.1. Διαχωρισμός Εναντιομερών Μορφών	189
11.5. Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους.....	192
11.5.1. Παραδείγματα Εφαρμογών	193
11.6. Ιοντική Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης.....	193
11.6.1. Η Ιοντική Χρωματογραφία στη Βιοανάλυση.....	195
11.7. Χρωματογραφία Εκλεκτικής Συγγένειας.....	195
11.7.1. Χρωματογραφία ανοσοσυγγένειας.....	197
11.8. Παρασκευαστική Χρωματογραφία.....	197
11.8.1. Χρωματογραφία Αντιρροής, Χρωματογραφία Προσομοιωμένης Κινούμενης Κλίνης.....	198
11.9. Αέρια Χρωματογραφία	199
Βιβλιογραφία	200
Δικτυογραφία.....	201
Κεφάλαιο 12: Φασματομετρία Μάζας	203
12.1. Εισαγωγή στη Φασματομετρία Μάζας	203
12.2. Ο φασματογράφος Μαζών.....	204
12.2.1. Σύστημα Εισαγωγής του Δείγματος	204
12.3. Τεχνικές Ανάλυσης στη Φασματογραφία Μαζών	207
12.4. Φάσμα Μαζών	210
12.5. Εφαρμογές.....	211
12.6. Φασματομετρική Απεικόνιση Μαζών (MS imaging).....	213
12.7. Εφαρμογές Φασματομετρίας Μάζας στη Βιοανάλυση	213
Βιβλιογραφία	214
Δικτυογραφία.....	215
Κεφάλαιο 13: Εφαρμογές Μεταλλομικής στη Βιοανάλυση	216
13.1. Γενικά για τη Μεταλλοδομική και Ειδομορφική Ανάλυση με Συζευγμένες Τεχνικές	216
13.2. Τεχνική SEC-ICP-MS για τον Προσδιορισμό Μεταλλοπρωτεϊνών σε Εκχυλίσματα Βιολογικών Ιστών ..	220
13.3. Τεχνική HPLC-IT-TOF-MS για τον Προσδιορισμό Ειδόμορφων Σεληνίου σε Βιολογικά Υγρά	221
13.4. Τεχνικές LLE και SPME σε Σύζευξη με GC-MIP-AED και GC-MS για τον Προσδιορισμό Ειδόμορφων Κασσιτέρου σε Βιολογικά Υγρά.....	223

13.5. Τεχνική HPLC-IT-TOF-MS για τον Προσδιορισμό Τριαλκυλιωμένων Ειδόμορφων Κασσιτέρου σε Ούρα	226
13.6. Τεχνική IC-ICP-MS για τον Προσδιορισμό Ειδόμορφων Αρσενικού σε Βιολογικά Υγρά	228
13.7. Συνδυασμός Τεχνικής SPME με GC-MS για τον Προσδιορισμό Ειδόμορφων Υδραργύρου σε Ούρα.....	229
13.8. Τεχνική LC-MS για τη Μελέτη Σύζευξης Αντικαρκινικού Φαρμάκου Λευκόχρυσου και Νουκλεοσιδίων του DNA	231
Βιβλιογραφία	232
Κεφάλαιο 14: Εφαρμογές της Ατομικής Φασματομετρίας στη Βιοανάλυση.....	234
14.1. Εισαγωγικά.....	234
14.2. Μέθοδος Προσδιορισμού Pb, Cd, Cr σε Ορό Αίματος και Ολικό Αίμα, με την Τεχνική ETAAS	236
14.3. Μέθοδος Προσδιορισμού Fe σε Ορό Αίματος και Ολικό Αίμα με την Τεχνική FAAS	239
Βιβλιογραφία	240
Κεφάλαιο 15: Επικύρωση Βιοαναλυτικών Μεθόδων.....	241
15.1. Εισαγωγή	241
15.2. Ακρίβεια-Πιστότητα	241
15.2.1. Δείγματα ελέγχου - Quality control	242
15.3. Ανθεκτικότητα - Αντοχή.....	242
15.4. Όρια ανίχνευσης-Ποσοτικού προσδιορισμού-Εναισθησία	242
15.5. Γραμμικότητα.....	242
15.6. Ειδικότητα / εκλεκτικότητα.....	243
15.7. Ανάκτηση.....	243
15.8. Σταθερότητα.....	243
15.8.1. Σταθερότητα των Ενώσεων σε Κύκλους Κατάψυξης – Απόψυξης	244
15.9. Οδηγίες Ελεγκτικών Μηχανισμών για την Επικύρωση Βιοαναλυτικών Μεθόδων	245
15.9.1. Χρωματογραφικές Τεχνικές	246
15.9.2. Τεχνικές Δέσμευσης	246
15.10. Φαινόμενα Επίδρασης Υποστρώματος.....	248
15.11. Προσδιορισμός ενδογενών ενώσεων	249
15.12. Βιοδείκτες	250
Βιβλιογραφία	250
Δικτυογραφία.....	250
Ευρετήριο Επιστημονικών Όρων.....	252

Πίνακας συντομεύσεων-ακρωνύμια

APA	American Psychological Association
A	Adenine, Αδενίνη
AAG	Alpha-acid glycoprotein
Ab	Antibody, Αντίσωμα
AC	Alternating Current, Εναλασσόμενο ρεύμα
ACV	Alternating current voltammetry, Βολταμμετρία εναλασσόμενου ρεύματος
ADS	Alkyl-diol-silica, Στατική Φάση με Συζευγμένη Διόλη
AdSV	Adsorptive Stripping Voltammetry, Προσροφητική αναδιαλυτική βολταμμετρία
AED	Atomic Emission Detector, Ανιχνευτής Ατομικής Εκπομπής
Ag	Antigen, Αντιγόνο
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization, Χημικός Ιοντισμός σε Ατμοσφαιρική Πίεση
API	Atmospheric Pressure Ionization, Ιοντισμός σε Ατμοσφαιρική Πίεση
APPI	Atmospheric Pressure Photoionization, Φωτοϊοντισμός σε Ατμοσφαιρική Πίεση
ASE	Accelerated Solvent Extraction, Επιταχυνόμενη Εκχύλιση Διαλύτη
ASV	Anodic stripping voltammetry, Ανοδική Αναδιαλυτική Βολταμμετρία
AUC	Area Under Curve, Εμβαδό Κάτω από την Καμπύλη
AUNP	Aurum nanoparticles, Νανοδοματίδια Χρυσού
B	Magnetic Sector, Μαγνητικός Τομέας Διαχωρισμού στη Φασματομετρία μαζών
BAW	Bulk acoustic wave, Αισθητήρας Ακουστικών Κυμάτων κύριας μάζας
BGE	Background Electrolyte, Φέρον Ηλεκτρολύτης ή Ρυθμιστικό Διάλυμα Ηλεκτροφόρησης
BP	British Pharmacopoeia, Βρετανική Φαρμακοποιία
BSA	Bovine Serum Albumin, Αλβουμίνη Ορού Βοδινού
C	Cytosine, Κυτοσίνη
CCD	Conductless Conductivity Detection, Αγωγιμομετρική Ανίχνευση χωρίς Επαφές
CE	Capillary Electrophoresis, Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση
CEC	Capillary Electrochromatography, Τριχοειδής Ηλεκτροχρωματογραφία
CE-MS	Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση- Φασματομετρία Μαζών
CGE	Capillary Gel Electrophoresis, Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση Πηκτής
CI	Chemical Ionization, Χημικός Ιοντισμός
CIEF	Capillary Isoelectric Focusing, Τριχοειδής Ισοηλεκτρική Εστίαση
CITP	Capillary Isotachopheresis, Τριχοειδής Ισοταχυφόρηση
CMC	Critical Micelle Concentration, Κρίσιμη Συγκέντρωση Μικυλλίου

CRM	Certified Reference Material, Πιστοποιημένο Υλικό Αναφοράς
CSF	Cerebrospinal Fluid, Εγκεφαλονωτιαίο Υγρό
CSP	Chiral Stationary Phases, Χειρόμορφες Στατικές Φάσεις
CSV	Cathodic Stripping Voltammetry, Καθοδική Αναδιαλυτική Βολταμμετρία
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide, Χλωριούχο Κητυλοτριμεθυλαμμώνιο
CVAAS	Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry, Φασματομετρία Ατομικής Απορρόφησης Ψυχρού Ατμού
CZE	Capillary Zone Electrophoresis, Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση Ζώνης
DAD	Diode Array Detector, Ανιχνευτής Παράταξης ή Συστοιχίας Διόδων
DART	Direct Analysis in real time, Άμεση Ανάλυση σε Πραγματικό χρόνο
DESI	Desorption Electrospray Ionization, Ιονισμός με Εκρόφηση σε Ηλεκτρικό Δυναμικό
DI – SPME	Direct immersion Solid phase microextraction-Μικροεκχύλιση Στερεάς Φάσης Με Απευθείας Εμβάπτιση
DIP/DEP	Direct Insertion Probe/Direct Exposure Probe, Σύστημα Εισαγωγής Δείγματος με Ακροφύσιο
DLLME	Dispersive liquid-liquid microextraction, Μικροεκχύλιση Διασποράς Υγρού-Υγρού
DNA	Deoxyribonucleic Acid, Δεοξυριβονουκλεϊκό Οξύ
DPV	Differential Pulse Voltammetry, Διαφορική Παλμική Βολταμμετρία
DPX	Disposable Pipette Extraction, Εκχύλιση σε Σωλήνα Πιπέτας
ds DNA	double stranded, DNA δίκλωνο
DTAB	Dodecyl Trimethyl Ammonium Bromide, Βρωμιούχο Δωδεκυλοτριμεθυλαμμώνιο
EB/BE	Electro-Magnetic Sector, Συνδυασμός Ηλεκτροστατικού-Μαγνητικού Τομέα
EC	Electrochromatography, ΗλεκτροΧρωματογραφία
ECD	Electron Capture Detector, Ανιχνευτής Σύλληψης Ηλεκτρονίων
ED	Effective Dose, Αποτελεσματική Δόση
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic acid, Αιθυλενοδιάμινο Τετραοξικό οξύ
EI	Electron Impact, Ιονισμός με Σύγκρουση με Ηλεκτρόνια
EIA	Enzyme ImmunoAssay Ενζυμο-ανοσοχημική Ανάλυση
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay, Ενζυμική ανοσοπροσρόφηση
EMIT	Enzyme Multiplied ImmunoAssay Technique, Ανοσοχημική Ανάλυση Πολλαπλασιαζόμενου Ενζύμου
EOF	Electroosmotic Flow, Ηλεκτροωσμωτική Ροή
ESA	Electrostatic Analyzer, Ηλεκτροστατικός Ανιχνευτής
ESI	Electrospray, Ψεκασμός σε Ηλεκτρικό Πεδίο ή Ηλεκτροψεκασμός
ETAAS	Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry, Ηλεκτροθερμική Φασματομετρία Ατομικής Απορρόφησης
ETD	Electron Transfer Dissociation, Διαχωρισμός με Μεταφορά Ηλεκτρονίων
FAAS	Flame Atomic Absorption Spectrometry, Φλογο Φασματομετρία Ατομικής Απορρόφησης

FAB/SIMS	Fast Atom Bombardment/Secondary Ion Mass Spectrometry,
FASI	Field Amplified Sample Injection, Έγχυση Δείγματος με Ενισχυμένο Πεδίο
FASS	Field Amplified Sample Stacking, Επιστοίβαγμα Δείγματος με Ενισχυμένο Πεδίο
FD	Field Desorption, Εκρόφιση σε Ηλεκτρικό Πεδίο
FFF	Field Flow Fractionation, Μονοφασική Χρωματογραφία Πεδίου
FI	Field Ionisation, Ιονισμός Ηλεκτρικού Πεδίου
FIA	Fluorescence ImmunoAssay, Φθόρο-Ανοσοχημική Ανάλυση
FPIA	Fluorescent Polarisation ImmunoAssay, Φθόρο-Ανοσοχημική Ανάλυση Πολωμένης Ακτινοβολίας
FT-ICR-MS	Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance, Φασματοσκοπία Μάζας σε Ιοντικό Κύκλοτρο, με Μετασχηματισμό Fourier
FTMS	Fourier Transform Mass Spectrometry, Φασματοσκοπία Μάζας με Μετασχηματισμό Fourier
G	Guanine, Γουανίνη
GC	Gas Chromatography, Αέριος Χρωματογραφία
GC-MS	Gas Chromatography-Mass Spectrometry, Αέρια Χρωματογραφία-Φασματομετρία Μαζών
GSH	Glutathione, Γλουταθειόνη
HBV	Hepatitis B virus, Ιός Ηπατίτιδας Β
HCL	Hierarchical Clustering, Ιεραρχική Ομαδοποίηση
HDL	High Density Lipoprotein, Λιποπρωτεΐνη Υψηλής Πυκνότητας
HETP	Height Equivalent to the Theoretical Plate, Ύψος Ισοδύναμο προς μια Θεωρητική Πλάκα
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography, Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης
ic	Capacitive current, Χωρητικό ρεύμα
ICPAES	Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry, Φασματομετρία Ατομικής Εκπομπής Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος
ICPMS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, Φασματομετρία Μάζας Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος
ICR	Ion Cyclotron Resonance, Κύκλοτρο Ιοντικού Συντονισμού
iF	Faradaic Current, Φαρανταϊκό Ρεύμα
Ig	Immunoglobulins, Ανοσοσφαιρίνες
IgG	Immunoglobulin G, Ανοσοσφαιρίνη Γ
ISFET	Ion – Selective Field – Effect Transistor, Ιοντοεκλεκτικό Τρανζίστορ Επίδρασης Πεδίου
IT	Ion Trap, Παγίδα Ιόντων
LC	Liquid Chromatography, Υγρή Χρωματογραφία
LC-MS	Liquid Chromatography Mass Spectrometry, Υγρή Χρωματογραφία-Φασματομετρία Μαζών
LD	Laser Desorption, Εκρόφιση με Ακτινοβολία Laser
LDL	Low Density Lipoprotein, Λιποπρωτεΐνη Χαμηλής Πυκνότητας
LIF	Laser Induced Fluorescence, Φθορισμός Επαγόμενος από Λείζερ

LINAC	Linear Particle Accelerator, Γραμμικός Επιταχυντής Σωματιδίων
LLE	Liquid Liquid Extraction, Εκχύλιση Υγρού Υγρού
LOD	Limit of Detection, Όριο Ανίχνευσης
LSD	Lysergic Acid Diethylamide, Διαιθυλαμίδιο του Λυσεργικού Οξέος
LVSS	Large volume Sample Stacking, Επιστοιβάγμα Δείγματος Μεγάλου Όγκου
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization, Ιονισμός με Εκρόφηση Υποβοηθούμενος από Laser
MECC	Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography, Μικυλλιακή Ηλεκτροκινητική Τριχοειδής Χρωματογραφία
MIP	Microwave Induced Plasma, Μικροκυματικά Επαγόμενο Πλάσμα
MRI	Magnetic Resonance Imaging, Απεικόνιση Μαγνητικού Συντονισμού
NMR	Nuclear Magnetic Resonance, Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός
oc-DNA	Open circular DNA, DNA Ανοιχτής δομής
OVA	Ovalbumin, αλβουμίνη αυγού
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis, Ηλεκτροφόρηση Πηκτής Πολυακρυλαμιδίου
PBS	Phosphate Buffer Saline, ρυθμιστικό φωσφορικών
PCA	Principal Component Analysis, Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών
PCP	Phencyclidine, Φαινκυκλιδίνη
PCR	Protein Chain Reaction, Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης
PD	Plasma Desorption, εκρόφηση από πλάσμα
PDA	Photo Diode Array, Παράταξη Φωτοδιόδων
PLS-DA	Partial Least Square-Discriminant Analysis
PMPs	Platelet- Derived Microparticles, Μικροσωματίδια Προερχόμενα από Αιμοπετάλια
POC	Point of care, Φροντίδα Σημείου
Q	Quadrupole, Τετράπολο
QC	Quality Control, Δείγμα Ελέγχου
QCM	Quartz crystal microbalance, Μικροζυγός Κρύσταλλου Χαλαζία
QQQ	Triple Quadrupole, Τριπλό Τετράπολο
RIA	RadioimmunoAssay, Ραδιοανοσοχημική Ανάλυση
RNA	Ribonucleic Acid, Ριβονουκλεϊκό Οξύ
RSD	Relative Standard Deviation, Σχετική Τυπική Απόκλιση
SAM	Significance Analysis of Microarrays.
SAMs	Self Assembled Monolayers, Αυτοσυγκροτούμενες Μονομοριακές Στοιβάδες
SAW	Surface acoustic Wave, Αισθητήρας Επιφανειακών Ακουστικών Κυμάτων
sc DNA	Supercoiled DNA, Υπερελικομένο DNA
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate, Δωδεκυλοθειικό Νάτριο
SIM	Single Ion Monitoring, Παρακολούθηση Επιλεγμένου Ιόντος
SLD	Soft Laser Desorption, Εκρόφηση με Μαλακή Ακτινοβολία Laser

SNPs	Single Nucleotide Polymorphisms
SOMs	Self Organizing Maps
SPE	Solid Phase Extraction, Εκχύλιση Στερεάς-Φάσης Υγρού
SPME	Solid Phase Microextraction, Μικροεκχύλιση Στερεάς Φάσης
SPR	Surface Plasmon Resonance, Συντονισμός Επιφανειακών Πλασμονίων
ss DNA	Single Stranded DNA, Μονόκλωνο DNA
SVM	Support Vector Machine, Διάνυσμα Υποστήριξης Μηχανής
SWV	Square Wave Voltammetry, Βολταμμετρία Τετραγωνικού Παλμού
T	Thymine, Θυμίνη
TIC	Total Ion Current, Ολικό Ρεύμα Ιόντων
TLC	Thin Layer Chromatography, Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας
TOF	Time of Flight, Χρόνος Πτήσης
TOF- MS	Time of Flight Mass Spectrometry, Φασματομετρία Μαζών με Αναλυτή Χρόνου Πτήσης
TSP	Thermospray, Ψεκασμός εν Θερμώ
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography, Υγρή Χρωματογραφία Υπερ-Υψηλής Απόδοσης
ΒΣ	Βιολογία Συστημάτων

Πρόλογος

Ως Βιοανάλυση θεωρείται η ανάλυση βιολογικών δειγμάτων όπως αίμα, πλάσμα-ορός αίματος, ούρα, εγκεφαλονωτιαίο υγρό, εγκεφαλικός ιστός, σπείλος, χολικά υγρά, οστά διαφόρων τύπων, ιστοί, αρθρικό υγρό, τρίχες κ.ά. για προσδιορισμό διάφορων ενώσεων και των μεταβολιτών τους.

Η Βιοανάλυση αποτελεί κλάδο της Αναλυτικής Χημείας, ο οποίος ξεκίνησε με στόχο τη μελέτη μικρών μορίων στη συνέχεια όμως, η επιστήμη της βιοαναλυτικής χημείας επεκτάθηκε και στην ανάλυση μακρομορίων, όπως πρωτεΐνες, πεπτίδια, DNA, συμβάλλοντας με τον τρόπο αυτό και σε άλλα πεδία όπως π.χ. η βιοφαρμακευτική ή η πρωτεομική.

Οι βιοαναλυτικές μέθοδοι αφορούν όλα τα αναλυτικά προβλήματα που σχετίζονται με την ποιοτική και την ποσοτική ανάλυση των βιολογικών δειγμάτων χρησιμοποιώντας τις σύγχρονες τεχνικές προκατεργασίας δειγμάτων και ανάλυσης.

Στο παρόν σύγγραμμα δίνονται γίνεται μια πρώτη προσπάθεια για τη δημιουργία εκπαιδευτικού υλικού στο μάθημα της Βιοαναλυτικής Χημείας. Πέραν αυτού στόχος είναι να χρησιμοποιηθεί και ως εργαλείο για τον αναλυτικό χημικό που ασχολείται με τη βιοανάλυση.

Είναι ευπρόσδεκτα τα σχόλια και η κριτική για τυχόν λάθη και παραλείψεις, ώστε να είναι δυνατή η βελτίωσή του σε μελλοντική επανέκδοση.

Οι συγγραφείς

Στέλλα Γηρούση
Γεώργιος Ζαχαριάδης
Αναστασία-Στέλλα Ζώτου
Γεώργιος Θεοδωρίδης
Βικτωρία Σαμανίδου

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

Γεώργιος Θεοδωρίδης

Σύνοψη

Στο κεφάλαιο αυτό γίνεται σύντομη περιγραφή του αντικειμένου και δίνονται συνοπτικά οι κύριες ανάγκες και εφαρμογές της Βιοανάλυσης.

Προαπαιτούμενη Γνώση

Πριν την ανάγνωση του βιβλίου χρήσιμη γνώση για τον αναγνώστη μπορεί να βρεθεί σε συγγράμματα Ενόργανης Ανάλυσης, Βιοχημείας και στο σύγγραμμα του μαθήματος Ειδικές Μέθοδοι Διαχωρισμού και Χημικής Ανάλυσης.

1.1. Αντικείμενο, Ανάγκες και Εφαρμογές της Βιοανάλυσης

Η ΒιοΑναλυτική Χημεία αντιπροσωπεύει ένα ταχέως αναπτυσσόμενο διεπιστημονικό πεδίο το οποίο σε ορισμένες περιπτώσεις απαιτεί συνδυαστική σκέψη και συνεργασία μεταξύ επιστημόνων από συμπληρωματικά πεδία όπως αναλυτική χημεία, βιολογικές επιστήμες, ιατρική, μαθηματικά και στατιστική, βιοτεχνολογία και άλλες επιστήμες. Επειδή το πεδίο της ΒιοΑναλυτικής Χημείας είναι σχετικά νέο και εξελίσσεται, τίθεται εδώ το ερώτημα που αναφέρεται στους φοιτητές του μαθήματος κατά την πρώτη παράδοση: τι είναι ΒιοΑναλυτική Χημεία; Είναι η ανάλυση βιοδραστικών ενώσεων; Είναι η ανάλυση βιολογικών δειγμάτων (ούρων, αίματος, ιστών); Είναι η εφαρμογή της χημικής ανάλυσης στις βιολογικές επιστήμες; Η μήπως όλα τα παραπάνω όταν έχουν αρχικό σημείο και στόχευση την απόκτηση γνώσης για τους βιολογικούς μηχανισμούς στις επιστήμες της ζωής;

Τελικά καταλαβαίνουμε ότι είναι δύσκολο να αποκλείσεις τεχνικές ή εφαρμογές της Αναλυτικής Χημείας, από τις επιστήμες της ζωής. Ακόμη και οι αναλύσεις περιβαλλοντικών δειγμάτων για τη μέτρηση π.χ. ενδοκρινικών διαταρακτών συσχετίζονται με την υγεία και τη ζωή των ανθρώπων.

Η Βιοαναλυτική Χημεία όπως πραγματοποιείται σε Πανεπιστήμια, ερευνητικά κέντρα και ερευνητικά εργαστήρια στη Φαρμακοβιομηχανία και άλλους ιδιωτικούς φορείς εφαρμόζει ενόργανες τεχνικές ανάλυσης μεγάλης διακριτικής ικανότητας. Το ζητούμενο σε κάποιες αναλύσεις είναι η μεγάλη ειδικότητα, όπως συμβαίνει για παράδειγμα στις αναλύσεις φαρμακοκινητικής και μεταβολισμού φαρμάκων, αναλύσεις απαγορευμένων ουσιών (στεροειδή αναβολικά, ναρκωτικά κ.ά.), όπου ο αναλυτής πρέπει να είναι σίγουρος ότι μετρά μόνο την ένωση-στόχο και όχι κάποιο συγγενές μόριο. Τις περισσότερες φορές το ζητούμενο είναι η μεγαλύτερη δυνατή ευαισθησία ώστε να είναι εφικτή η μέτρηση πολύ χαμηλών συγκεντρώσεων κατά την ανάλυση περίπλοκων δειγμάτων. Για παράδειγμα ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων πρωτεϊνών σε βιολογικά δείγματα απαιτεί τη μέτρηση ποσοτήτων χαμηλών έως το επίπεδο των fg. Σε άλλες περιπτώσεις ζητούμενο είναι η άμεση απάντηση με απλές, φορητές ειδικές διατάξεις όπως κάποιες διατάξεις βιοαισθητήρα που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ακόμη και μέσα σε μία κλινική δίπλα στο κρεβάτι του ασθενούς. Η επίτευξη τέτοιων αποτελεσμάτων δε γίνεται δυνατή μόνο με τη χρήση ακριβών οργάνων, αλλά απαιτεί γνώση των βιοχημικών μηχανισμών που μπορεί να εμπλέκονται και πολύ βαθιά γνώση της αναλυτικής τεχνικής που χρησιμοποιείται. Απαιτεί, επίσης, γνώση και εμπειρία της αναλυτικής διαδικασίας από τη συλλογή του δείγματος έως την επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Τα δεδομένα που προκύπτουν έχουν μεγαλύτερη αξία εφόσον συσχετιστούν με κλινικά ή άλλα εργαστηριακά δεδομένα. Η εργασία για την ανάπτυξη και επικύρωση/διακρίβωση οργάνων, τεχνικών ή μεθόδων μπορεί να έχει υψηλό κόστος, οικονομικό και χρονικό. Μια τέτοια επένδυση γίνεται εφόσον το τελικό προϊόν έχει πραγματική εφαρμογή στις επιστήμες της ζωής: στην υγεία του ανθρώπου, στην ανάπτυξη προηγμένων μορφών τροφίμων-προϊόντων, στην προώθηση της Βιοτεχνολογίας στη Γεωργία-Κτηνοτροφία. Για παράδειγμα κατά την ανάπτυξη νέων φαρμάκων χρειάζονται μέθοδοι που θα επιτρέψουν τον απόλυτο και αδιαμφισβήτητο προσδιορισμό της φαρμακευτικής ένωσης σε διαφορετικά υποστρώματα όπως κυτταρικές καλλιέργειες, βιολογικά υγρά και άλλα βιολογικά δείγματα. Όσο πιο γρήγορα αναπτυχθεί η μέθοδος και όσο πιο γρήγορη, αξιόπιστη και αποδοτική είναι αυτή, τόσο πιο γρήγορα θα προχωρήσει το υποψήφιο φάρμακο μέσα στη γραμμή παραγωγής, όπου είτε θα απορριφθεί (πιθανότερη περίπτωση) είτε θα φτάσει τελικά στην κυκλοφορία και στο ράφι του φαρμακείου. Η τεχνολογική πρόοδος που θα επιταχύνει οποιοδήποτε από αυτά

τα στάδια και επομένως θα επισπεύσει είτε την έγκριση είτε την απόρριψη της υπονήφιας ένωσης μπορεί να μεταφραστεί σε πολλούς μήνες ή δεκάδες εκατομμύρια € ως εξοικονόμηση για την εταιρεία, γεγονός που καταδεικνύει ότι η επένδυση στις νέες τεχνολογίες είναι ιδιαίτερος συμφέρουσα.

Πέραν, όμως, των αναγκών από την πλευρά του τελικού χρήστη, οι δραστηριότητες και η ανάπτυξη μεθόδων ΒιοΑναλυτικής Χημείας συνεισφέρουν σημαντικά στη βελτίωση αλλά και τη δημιουργία νέας γνώσης στην ίδια την επιστήμη της Αναλυτικής Χημείας αλλά και τις επιστήμες της ζωής. Τεχνικές της φασματομετρίας μάζας, διαχωριστικές τεχνικές σε τριχοειδή ή κάποιοι από τους βιοαισθητήρες και τις τεχνικές προκατεργασίας δείγματος, αναπτύχθηκαν από εταιρίες με δραστηριότητα στις επιστήμες της ζωής για να λύσουν συγκεκριμένα προβλήματα. Όμως, μετά την ανάπτυξη και δημοσιοποίησή τους, βρήκαν εφαρμογή σε πολλά άλλα πεδία βοηθώντας ερευνητές από διαφορετικές επιστημονικές περιοχές.

Η Βιοαναλυτική Χημεία αποτελεί ουσιαστικά κάτι διαφορετικό από ένα ακόμη υποπεδίο της Αναλυτικής Χημείας. Η ανάπτυξη των τεχνικών ανάλυσης και της υπολογιστικής ισχύος επιτρέπει την αντιμετώπιση ιδιαίτερα περίπλοκων προβλημάτων όπως η χαρτογράφηση του ανθρώπινου γονιδιώματος. Έως πρόσφατα σκοπός της ανάπτυξης αναλυτικών μεθόδων ήταν η ανάλυση ορισμένων μόνων ενώσεων. Σήμερα μεγάλο τμήμα της παγκόσμιας επένδυσης σε έρευνα και ανάπτυξη στοχεύει σε μεγάλα, πολυ-παραμετρικά και δύσκολα προβλήματα, όπως η εύρεση και ο προσδιορισμός βιοδεικτών.

Το μέγεθος της απαιτούμενης έρευνας και εργασίας είναι εντυπωσιακό: αν ο στόχος είναι οι γονιδιακοί δείκτες, η έρευνα πρέπει να επεξεργαστεί περί τα 20.000 γονίδια στον άνθρωπο ή ανάλογους αριθμούς σε άλλους οργανισμούς. Αυτά τα γονίδια κωδικοποιούν από 100.000 έως 1.000.000 πρωτεΐνες/πεπτίδια τα οποία υφίστανται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Στο επίπεδο των μεταβολιτών και των μικρών μορίων οι αριθμοί δεν είναι ακόμη τελικοί: αναφέρονται εκτιμήσεις από 30.000 έως 300.000 μόρια για τον άνθρωπο. Πολλά από αυτά είναι ισομερή, ενώ το εύρος των ιδιοτήτων τους είναι πολύ μεγάλες. Γίνεται, λοιπόν, σαφές ότι τα προβλήματα αυτά δεν επιλύονται σε ένα εργαστήριο ή σε ένα Ίδρυμα. Όπως αναπτύσσεται στα σχετικά κεφάλαια, τα προβλήματα και οι προκλήσεις της ΒιοΑναλυτικής Χημείας απαιτούν μακρόχρονη συνεργασία μεταξύ επιστημόνων οι οποίοι πρέπει να προσφέρουν συμπληρωματική γνώση και εμπειρία. Είναι άλλωστε ουσιαστικά ανέφικτο για έναν Αναλυτικό Χημικό να εκτιμήσει μόνος του χωρίς τη συνεισφορά της στατιστικής ανάλυσης, χημειομετρίας, βιοχημείας αλλά και άλλων σχετικών επιστημών, τις χιλιάδες αποκρίσεις (αναλυτικά σήματα), ώστε να εντοπίσει και να προσδιορίσει με ακρίβεια και αποδοτικότητα βιοδείκτες ασθένειας στα αναλυόμενα περίπλοκα δείγματα.

Κατά τη συγγραφή του παρόντος βιβλίου προσπαθήσαμε να δομήσουμε το κείμενο όχι, μόνο σαν ένα σύγγραμμα ενόργανης ανάλυσης το οποίο περιγράφει αναλυτικές τεχνικές αλλά και αναφορικά με τις τελικές εφαρμογές της Βιοαναλυτικής Χημείας στις επιστήμες της ζωής. Στην πράξη, στη Βιοαναλυτική Χημεία, πιο πολύ από οποιοδήποτε άλλη δραστηριότητα των αναλυτικών χημικών οι τεχνικές είναι πιο πολύ τα εργαλεία, από τα οποία μπορεί να επιλεγθούν ένα, δύο ή παραπάνω εργαλεία για να δοθεί λύση σε ένα αρχικό ερώτημα. Για παράδειγμα στην πρωτεομική μπορεί να χρησιμοποιηθούν δύο ή τρεις τεχνικές για το διαχωρισμό πρωτεϊνών σε μία συγκεκριμένη εργασία: ηλεκτροφόρηση πηκτής, υγρή χρωματογραφία, τριχοειδής ηλεκτροφόρηση.

Στο βιβλίο αυτό αναπτύσσονται κεφάλαια που περιγράφουν τα βιολογικά δείγματα ως αναλυτικά υποστρώματα, δίνοντας τις ανάγκες που παρουσιάζονται κατά την ανάλυση τους. Στο δεύτερο κεφάλαιο παρουσιάζονται οι νέες τεχνολογίες ολιστικής ανάλυσης δηλαδή τα πεδία Omics (γονιδιωματική, πρωτεομική, μεταβολομική). Στο κεφάλαιο της Βιο-φαρμακευτικής Ανάλυσης περιγράφεται η ανάλυση φαρμάκων και μεταβολιτών τους και δίνονται βασικά στοιχεία σχετικά με τη βιοδιαθεσιμότητα και βιοϊσοδυναμία, καθώς και έλεγχο πρωτότυπων και γενόσημων φαρμάκων. Στο κεφάλαιο που αναφέρεται στα μεταλλικά στοιχεία που υπάρχουν στον οργανισμό, περιγράφεται η σημασία των απαραίτητων και των τοξικών μετάλλων αλλά και σύγχρονα αντικαρκινικά μεταλλοφάρμακα. Η ανάπτυξη νέων αποτελεσματικών τεχνικών προκατεργασίας βιολογικών αποτελεί ένα από τα πιο δυναμικά πεδία, όπου υπάρχει συνεχής ανάγκη ανάπτυξης ή βελτίωσης μεθόδων. Στο σχετικό κεφάλαιο περιγράφονται τεχνικές που στηρίζονται στη χρήση μεμβρανών ή υλικών περιορισμένης προσέγγισης, νέες τεχνικές εκχύλισης σε διασπορά, τεχνικές δειγματοληψίας αίματος σε ξηρή κηλίδα, τεχνικές εκλεκτικής απομόνωσης βιο-μορίων όπως η εφαρμογή χρωματογραφίας ανοσο-συγγένειας και άλλες τεχνικές.

Τα κεφάλαια που περιγράφουν αναλυτικές τεχνικές οι οποίες εφαρμόζονται στη ΒιοΑναλυτική Χημεία, δίνουν βασικές αρχές των τεχνικών και προχωρούν στην περιγραφή εφαρμογών κατά την ανάλυση πραγματικών δειγμάτων. Καθώς υπάρχουν συγγράμματα που καλύπτουν τις βασικές αρχές και την οργανολογία των τεχνικών ενόργανης ανάλυσης, δόθηκε έμφαση σε τεχνικές και (υπο)-πεδία που είτε δεν έχουν περιγραφεί (τριχοειδής ηλεκτροφόρηση, βιο-αισθητήρες, ανοσοχημικές τεχνικές) είτε βρίσκουν μεγάλη

εφαρμογή στη ΒιοΑναλυτική Χημεία. Αν σκεφτούμε ότι υπάρχουν δεκάδες αναλυτικές τεχνικές με εφαρμογή στις επιστήμες της ζωής και δεκαπέντε κεφάλαια στο παρόν σύγγραμμα από τα οποία τα οκτώ μόνο είναι αφιερωμένα σε συγκεκριμένες αναλυτικές τεχνικές καταλαβαίνει ο αναγνώστης, ότι αναγκαστικά υπάρχουν τεχνικές στις οποίες δεν αφιερώνεται ξεχωριστό κεφάλαιο. Ως εκ τούτου η εφαρμογή τεχνικών όπως κυτταρομετρία ροής, φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, τεχνικές συστοιχιών (array techniques) κ.ά δεν περιγράφεται στο παρόν σύγγραμμα. Οι τεχνικές που παρουσιάζονται, περιλαμβάνουν τις ηλεκτροχημικές τεχνικές και τους βιοαισθητήρες, τις Ανοσοχημικές Τεχνικές Ανάλυσης, τις τεχνικές Τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης, τις Χρωματογραφικές τεχνικές, τη Φασματομετρία μάζας, καθώς και τις ατομικές και μοριακές φασματοσκοπικές τεχνικές στη μεταλλομική ανάλυση.

Τέλος, περιγράφεται η Επικύρωση Βιοαναλυτικών Μεθόδων όπου δίνονται συνοπτικά οι κυριότερες παράμετροι που αφορούν στην επικύρωσή τους σύμφωνα με τις οδηγίες ελεγκτικών φορέων (όπως FDA ή EMEA).

Το σύγγραμμα αυτό ελπίζουμε ότι θα βοηθήσει τους φοιτητές του μαθήματος ΒιοΑναλυτική Χημεία σε προπτυχιακό και μεταπτυχιακό επίπεδο. Πέραν αυτού ελπίζουμε ότι το σύγγραμμα θα βοηθήσει επιστήμονες και ερευνητές από διάφορα άλλα πεδία, προσφέροντας βασικά στοιχεία για τις αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται στο δι-επιστημονικό αυτό πεδίο. Οι τεχνικές που περιγράφονται στο παρόν σύγγραμμα πέραν από τους Αναλυτικούς χημικούς βρίσκουν ευρεία εφαρμογή και από βιοχημικούς, βιολόγους, φαρμακολόγους, τοξικολόγους και επιστήμονες άλλων ειδικοτήτων. Οι συγγραφείς προσπάθησαν να δώσουν τις βασικές αρχές της χρήσης των τεχνικών στην επίλυση βιολογικών προβλημάτων. Ελπίζουμε τέλος ότι αυτή η παράθεση πληροφορίας από διαφορετικές επιστήμες θα προετοιμάσει τους νέους επιστήμονες για συνέργια και αλληλεπίδραση με επιστήμονες από άλλα πεδία και τομείς (Πανεπιστημιακά εργαστήρια, Ερευνητικά κέντρα, ελεγκτικό μηχανισμό, βιομηχανία φαρμάκων, κατασκευαστές/αντιπροσώπους οργάνων/αναλυτικών συσκευών, εργαστήρια παροχής υπηρεσιών κ.ά.)

Καθώς το βιβλίο είναι το πρώτο στα Ελληνικά αναφορικά με το συγκεκριμένο αντικείμενο, ελπίζουμε η προσπάθεια απόδοσης αγγλικών όρων να έγινε με επιτυχία. Στην προσπάθεια αυτή βασιστήκαμε στους όρους που χρησιμοποιούμε στην εργασία μας, ενώ συμβουλευτήκαμε και συναδέλφους ή σημειώσεις τους καθώς και πηγές στο διαδίκτυο. Το βιβλίο πραγματεύεται επιστημονικά/ερευνητικά πεδία και τεχνικές που αναπτύσσονται και αλλάζουν ταχέως και είναι αναμενόμενο να μην μπορεί να τα καλύψει ολικά. Ο απώτερος στόχος των συγγραφέων είναι να ελκύσουν την προσοχή του αναγνώστη στο ενδιαφέρον αντικείμενο της Βιοαναλυτικής Χημείας. Για περαιτέρω εμπάθυνση, ο αναγνώστης μπορεί να αναζητήσει γνώση στα πολλά εξαιρετικά βιβλία ή άρθρα επισκόπησης που έχουν αναφερθεί για καθεμία από τις αναλυτικές τεχνικές που περιγράφονται στο βιβλίο, ή το ιδανικότερο να ασχοληθεί στην πράξη με τη Βιοανάλυση.

Βιβλιογραφία

- Hansen S.H., Pedersen-Bjergaard S. (2015). *Bioanalysis of Pharmaceuticals: Sample Preparation, Separation Techniques and Mass Spectrometry*, Wiley.
- Li W, Jie Zhang J. (2013). *Handbook of LC-MS Bioanalysis: Best Practices, Experimental Protocols, and Regulations*, Willey.
- Manz A., Pamme N., Iossifidis D. (2004). *Bioanalytical Chemistry*, ICP London.
- Mikkelsen S.R., Cortun E. (2004). *Bioanalytical Chemistry*, Wiley-Interscience.
- Sonnleitner B. (2000). *Bioanalysis and Biosensors for Bioprocess Monitoring* (Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology), Springer.
- Venn RF. (2008). *Principles and Practice of Bioanalysis*, Second Edition, CRC Press.
- Xu A., Timothy L. Madden T.L. (2011). *LC-MS in Drug Bioanalysis*, Springer.

Κεφάλαιο 2: Βιολογία Συστημάτων, Τεχνολογίες Omics

Γεώργιος Θεοδωρίδης

Σύνοψη

Στο παρόν κεφάλαιο γίνεται σύντομη περιγραφή του πεδίου της Βιολογίας Συστημάτων και των προσεγγίσεων μη-στοχευμένης ανάλυσης δειγμάτων για την εύρεση βιοδεικτών. Περιγράφονται σύντομα τα βασικά υποπεδία: Γονιδιωματική, Πρωτεομική, ενώ δίνεται πιο αναλυτική περιγραφή του πεδίου της Μεταβολομικής και των εφαρμογών αυτής. Περιγράφονται εφαρμογές στις επιστήμες της ζωής: προσεγγίσεις για την εύρεση βιοδεικτών στις κλινικές επιστήμες (διαγνωστική), βιοτεχνολογία, φυτική παραγωγή, ιχθυλασιμότητα, ενώ δίνονται συνοπτικά οι κύριες ανάγκες και εφαρμογές της Βιοανάλυσης.

Προαπαιτούμενη Γνώση

Πριν την ανάγνωση του βιβλίου χρήσιμη γνώση για τον αναγνώστη μπορεί να βρεθεί σε συγγράμματα *Ενόργανης Ανάλυσης*, *Βιοχημείας* και στο σύγγραμμα του μαθήματος *Ειδικές Μέθοδοι Διαχωρισμού και Χημικής Ανάλυσης*

2.1. Ολιστική Ανάλυση

«Παραδοσιακά», στόχος του Αναλυτικού Χημικού είναι να ανιχνεύει και να προσδιορίζει τα συστατικά διαφόρων δειγμάτων ή να ανιχνεύει και να ταυτοποιεί άγνωστες ενώσεις σε άγνωστα δείγματα. Μέχρι πρόσφατα οι τεχνολογικές δυνατότητες περιόριζαν την ανάλυση στη μέτρηση-προσδιορισμό μικρού αριθμού μορίων και ως εκ τούτου η σχετική βιβλιογραφία αναφέρεται κατά μεγάλο ποσοστό σε ειδικές μεθόδους, με ζητούμενα χαρακτηριστικά την ευαισθησία, την αποτελεσματικότητα, την ειδικότητα και την εκλεκτικότητα ως προς τον προσδιορισμό αυτών των ενώσεων. Κατά την ανάπτυξη νέων μεθόδων, στόχος είναι η απομόνωση των προσδιοριζόμενων συστατικών και η μείωση παρεμποδίσεων από όλα τα υπόλοιπα συστατικά του δείγματος. Τα τελευταία χρόνια, η ανάπτυξη των φασματοσκοπικών τεχνικών ανάλυσης και της υπολογιστικής ισχύος έχει κάνει εφικτή την προοπτική η οποία έως πρόσφατα θεωρούνταν ανέφικτη: την ολιστική ανάλυση, δηλαδή, την ανάλυση δειγμάτων με στόχο τη λήψη του ολικού «αποτυπώματος» του δείγματος: μια «ολική χαρτογράφηση» των συστατικών του. Ολιστική ανάλυση σημαίνει στην πράξη ότι επιλέγεται μια μέθοδος η οποία μπορεί να συλλέξει δεδομένα, πλούσια σε πληροφορίες, χωρίς αρχικές προεπιλογές για την ανίχνευση των ορισμένων συστατικών. Στόχος της μέτρησης είναι η ανίχνευση του μέγιστου δυνατού αριθμού από τα συστατικά ενός δείγματος. Η ειδικότητα στη μέτρηση και την απόκριση κάποιων συστατικών θεωρείται μη επιθυμητή. Τα δεδομένα αναλύονται με προηγμένα υπολογιστικά εργαλεία, όπως η στατιστική ανάλυση πολλαπλών μεταβλητών και τεχνικές όπως Principal Component Analysis (PCA), Partial Least Squares-Discriminant Analysis (PLS-DA) καθώς και άλλες. Οι κύριες αναλυτικές τεχνικές οι οποίες εφαρμόζονται στην ολιστική ανάλυση είναι οι τεχνικές συστοιχιών (array), η φασματοσκοπία πυρηνικού συντονισμού (NMR) και η φασματομετρία μαζών σε διάφορες μορφές της είτε μόνη της είτε σε συνδυασμό με υγρή χρωματογραφία (LC-MS), αέρια χρωματογραφία (GC-MS), ή τριχοειδή ηλεκτροφόρηση (CE-MS).

2.2. Βιολογία Συστημάτων

Πεδίο εφαρμογής των ολιστικών αναλυτικών τεχνολογιών είναι οι μελέτες των υπο-ενοτήτων της βιολογίας συστημάτων, τα οποία προσεγγίζονται με τις τεχνολογίες - omics: γονιδιωματική, πρωτεομική, μεταβολομική κλπ. Η Βιολογία Συστημάτων (BS) είναι η μελέτη της βιολογίας ως ολοκληρωμένο σύστημα γενετικών, πρωτεϊνικών, μεταβολικών και βιοσυνθετικών δράσεων, οι οποίες βρίσκονται σε αλληλεξάρτηση και συν-διακύμανση. Αντί να ξεκινούμε από συγκεκριμένη επιστημονική θεωρία (υπόθεση) όπου αναλύουμε περιορισμένα επιμέρους υποσύνολα και ανεξάρτητες συνιστώσες ενός οργανισμού (όπως το μεταβολισμό των σακχάρων, μικρό αριθμό ιντερλευκινών, ή την έκφραση ενός γονιδίου), στη BS προσπαθούμε να μετρήσουμε όλες τις συνιστώσες να τις συσχετίσουμε, ώστε να προσδιορίσουμε τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών σε ένα οργανισμό και να οδηγηθούμε από τα δεδομένα σε νέες υποθέσεις.

Η κατανόηση της πορείας και του τελικού αποτελέσματος διαφόρων παρεμβάσεων σε ζώντες οργανισμούς μπορεί να είναι δύσκολη και αβέβαιη, όταν δεν έχουμε πλήρη γνώση των εμπλεκόμενων βιοσυνθετικών μηχανισμών. Η πορεία μιας συμβατικής μελέτης περιλαμβάνει την εκτέλεση διαφορετικών βιοχημικών/εργαστηριακών μετρήσεων που μας δίνουν περιορισμένη πληροφορία για την κατάσταση του υπό μελέτη συστήματος. Για παράδειγμα γίνονται κλινικές μετρήσεις στις επιστήμες της ζωής ή εκτιμήσεις ωριμότητας φρούτων στον τομέα τροφίμων, με μετρήσεις συγκεκριμένων μορίων στόχων με διαφορετικές τεχνολογίες, μεθόδους και πρωτόκολλα μέτρησης ή βαθμονόμησης. Με την τακτική αυτή, οι περισσότερες λειτουργίες παραμένουν ουσιαστικά, μερικώς, μόνο χαρτογραφημένες, οπότε προσπαθούμε να καταλάβουμε την πορεία των φαινομένων βασιζόμενοι σε διάσπαρτα ευρήματα.

Από τα παραπάνω γίνεται κατανοητό ότι η «παραδοσιακή» προσέγγιση της βιολογίας στοχεύει στη μελέτη της λειτουργίας ανεξάρτητων γονιδίων, πρωτεϊνών ή μεταβολιτών. Για παράδειγμα μια βιοτεχνολογική μελέτη μπορεί να στοχεύει στην αύξηση της παραγωγής ενός τελικού προϊόντος (π.χ. ενός αλκαλοειδούς με φαρμακευτική χρήση) από ένα φυτό ή κυτταρική καλλιέργεια. Η γνώση στην οποία βασιζόταν έως πρόσφατα μια τέτοια μελέτη περιοριζόταν στη μελέτη της επίδρασης σε ορισμένα σημεία της βιοσυνθετικής οδού, για παράδειγμα σε κάποια (συνήθως 2 ή 3) στάδια πριν από τη σύνθεση του επιθυμητού προϊόντος, εξετάζοντας περιορισμένα δεδομένα σχετικά με τη λειτουργία του εξεταζόμενου συστήματος, όπως την έκφραση μιας καταλυτικής πρωτεΐνης και τις συγκεντρώσεις μιας ή δύο πρόδρομων ενώσεων. Αντίστοιχα στις επιστήμες υγείας, οι δυνατότητες θεραπείας πολύπλοκων, πολυ-παραμετρικών ασθενειών όπως ο καρκίνος ή ο διαβήτης περιορίζονται, όταν μελετώνται μερικές μόνον παραμέτροι κάθε φορά (π.χ. τα επίπεδα μερικών γενικών δεικτών, όπως τρασφεράσες, ιντερλευκίνες κλπ.).

Σε αντίθεση με αυτήν την τακτική, στη ΒΣ γίνεται προσπάθεια κατανόησης των οργανισμών στο σύνολό τους, δηλαδή όχι ξεχωριστά ενός ενζύμου ή ενός γονιδίου αλλά συνδυαστική μελέτη της δράσης του ενζύμου ή της έκφρασης του γονιδίου με τη φυσιολογία του οργανισμού. Για παράδειγμα, το ανοσοποιητικό σύστημα ενός οργανισμού δεν είναι αποτέλεσμα απλών μηχανισμών ή γονιδίων και δεν μπορεί να περιγραφεί ικανοποιητικά με τη μέτρηση μόνον των συγκεντρώσεων ή της δραστηριότητας κάποιων ανοσοσφαιρινών. Στη ΒΣ το ανοσοποιητικό σύστημα θεωρείται ως σύνολο αλληλεπιδράσεων διαφορετικών γονιδίων, πρωτεϊνών, μηχανισμών και εξωτερικών παραγόντων με στόχο την επιτυχή αντιμετώπιση ασθενειών, επιθέσεων και μολύνσεων. Επομένως, για να γίνει πρόβλεψη της αντίδρασής του σε μια ορισμένη επέμβαση ή αγωγή (π.χ. μεταμόσχευση), οι πληροφορίες μπορεί να βρίσκονται κρυμμένες στο γονιδίωμα, το σύνολο των πρωτεϊνών ή το σύνολο των μεταβολιτών του οργανισμού ή στο συνδυασμό και τη σύνθεση των πληροφοριών.

Για παράδειγμα, στις εφαρμογές της ΒΣ στη διαγνωστική αναλύουμε βιολογικά υγρά ασθενών και υγιών οργανισμών, μετρώντας μη στοχευμένα, τα χιλιάδες βιομόρια που περιέχονται σε αυτά και προσπαθούμε να εντοπίσουμε τυχόν διαφορές στις συγκεντρώσεις των βιομορίων μεταξύ των πληθυσμών. Εάν βρεθούν διαφορές, προσπαθούμε στη συνέχεια να ταυτοποιήσουμε το/τα μόρια δείκτη (βιοδείκτης, biomarker) και να καταλάβουμε για ποιο λόγο αυτοί διαφέρουν ανάμεσα στις δύο ομάδες.

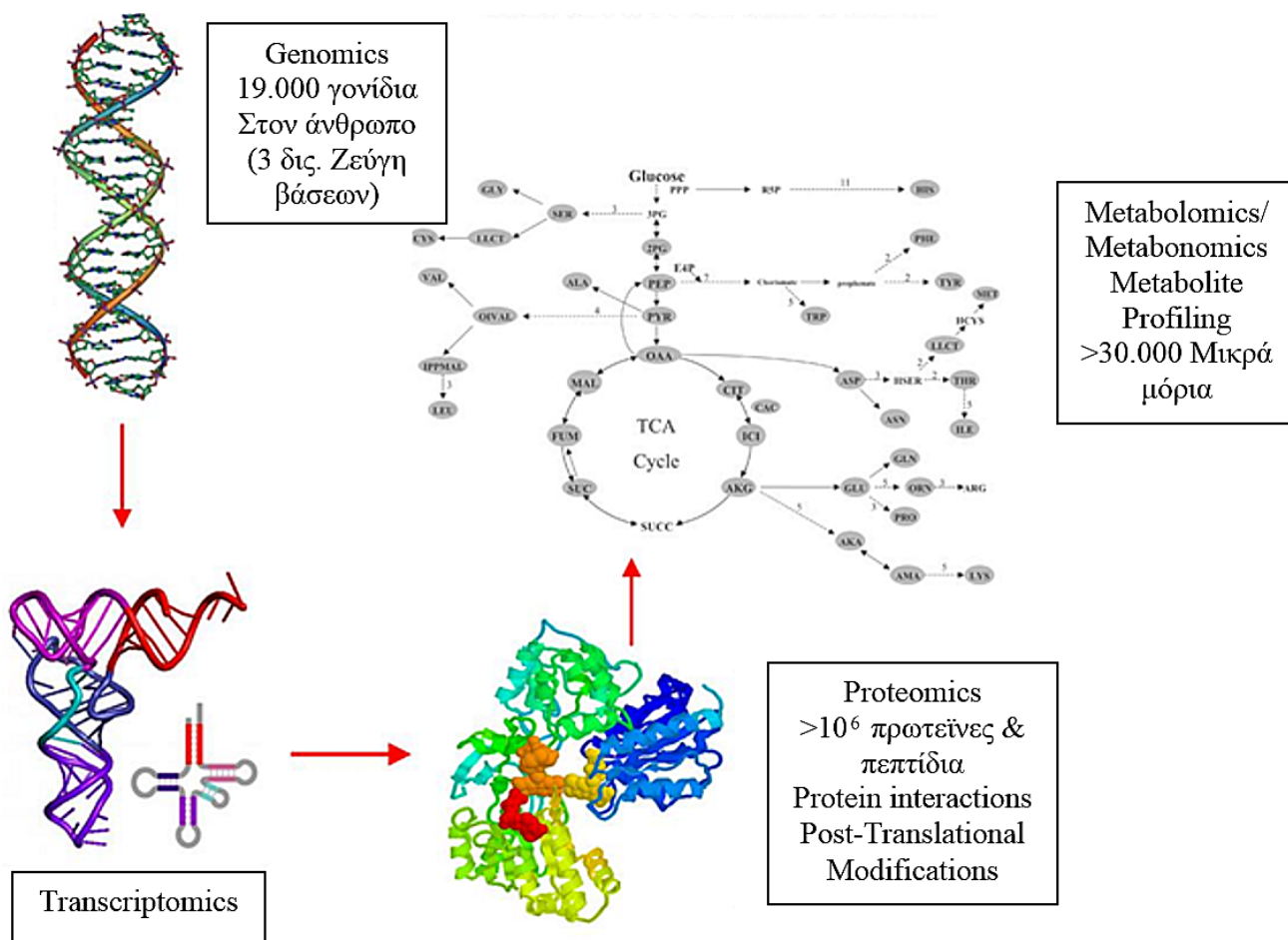
Αποκρυπτογραφώντας τις οδούς βιοσύνθεσης, οι ερευνητές μπορούν να προβλέψουν την επίδραση διαφόρων ερεθισμάτων (εξωγενών ουσιών, ασθένειας, γενετικής τροποποίησης) σε κάποιον οργανισμό. Με τη συσσώρευση αδιαμφισβήτητων δεδομένων, την ολοκλήρωση της περιγραφής των βιοσυνθετικών οδών και την αποκωδικοποίηση των μηχανισμών, τα μοντέλα πρόβλεψης γίνονται πιο ακριβή και αξιόπιστα, γεγονός που οδηγεί την έρευνα και ανάπτυξη πιο κοντά στην επίλυση περίπλοκων βιολογικών προβλημάτων.

Λόγω της φύσης της μη-στοχευμένης ανάλυσης, η βιολογία συστημάτων επεξεργάζεται μεγάλες ποσότητες δεδομένων που περιγράφουν ένα ή περισσότερα συστήματα. Για να γίνει εκμετάλλευση της πληροφορίας από τέτοια περίπλοκα και ογκώδη δεδομένα, πρέπει αυτά να μελετηθούν συστηματικά με προηγμένες μαθηματικές μεθόδους και στατιστικά εργαλεία, τα οποία αναδεικνύουν και προβάλλουν με αποτελεσματικό τρόπο τα αποτελέσματα. Ο συνδυασμός επιστημών, όπως βιολογία, ιατρική, χημεία, μαθηματικά βιοστατιστική/βιοπληροφορική, δίνει τη δυνατότητα αποτελεσματικότερης αντιμετώπισης τέτοιων πολύπλοκων προβλημάτων. Επιπλέον, η ΒΣ μπορεί να συνδυάσει ευρήματα από την ανάλυση γονιδίων, πρωτεϊνών, μεταβολιτών μεταξύ τους αλλά και με τη φυσιολογία (κλινική εικόνα) του υπό μελέτη συστήματος και να επιτρέψει την καλύτερη κατανόηση των πραγματικών μηχανισμών των βιολογικών δράσεων και την πρόβλεψη της πορείας του μελετώμενου οργανισμού.

Η ΒΣ αναδύθηκε μέσα από την πρόοδο της μελέτης του ανθρώπινου γονιδιώματος και την κατανόηση των μηχανισμών από το σύστημα των γονιδίων, πρωτεϊνών ως τη σύνθεση και αλληλεπίδραση βιομορίων. Ο χώρος των διαφόρων πεδίων -omics προϋπήρχε της ΒΣ, αλλά χαρακτηριζόταν από διάσπαση: διάσπαρτες μετρήσεις, μικρή συνέργεια στη μελέτη μεταξύ επιπέδων της γονιδιακής έκφρασης (συνδυασμός γονιδιακής με πρωτεϊνική πληροφορία). Η συνδυασμένη μελέτη εν γένει των διαφόρων πεδίων – omics (**Σχήμα 2.1**)

συσσωρεύει νέα γνώση και επιτρέπει τη μελέτη αυτής με αποτελεσματικό τρόπο, ώστε να αποκαλύψει «κρυμμένη» πληροφορία η οποία μπορεί να οδηγήσει στην εύρεση βιοδεικτών για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων και τη διάγνωση ασθενειών (μεταξύ άλλων εφαρμογών). Με τις προσεγγίσεις της ΒΣ δε συσχετίζουμε απλώς τις παρατηρήσεις μεταξύ τους αλλά, ξεκινώντας, συχνά, χωρίς κάποια θεωρία, δομείται το βιολογικό σύστημα με βάση μοριακές πληροφορίες και αδιαμφισβήτητα δεδομένα: τα δεδομένα οδηγούν στη θεωρία κι όχι το αντίθετο.

Οι εφαρμογές της νέας γνώσης η οποία παράγεται είναι πολλές και πολύ σημαντικές. Για παράδειγμα, στην ανάπτυξη φαρμάκων πολλές ενώσεις οι οποίες είναι σε στάδιο υποψήφιας φαρμακευτικής ένωσης (candidate) μπορούν να απορριφθούν σε αρχικό στάδιο μελέτης, μειώνοντας έτσι το χρόνο και το κόστος ανάπτυξης νέων φαρμάκων. Η απόρριψη μπορεί να βασιστεί στην πρόβλεψη τοξικής δράσης της υποψήφιας φαρμακευτικής ένωσης ή στη μικρή αποτελεσματικότητά της δράσης του. Παράδειγμα σχεδιασμού τέτοιας μελέτης δίνεται συνοπτικά στην παράγραφο 2.4.



Σχήμα 2.1. Τα τέσσερα βασικά πεδία της Βιολογίας συστημάτων και η σχετική σύνδεσή τους

2.3. Πεδία της Βιολογίας Συστημάτων

Τα επιμέρους πεδία της βιολογίας συστημάτων δίνονται στο Σχήμα 2.1 και είναι:

Γονιδιωματική: Η μελέτη του συνόλου των γονιδίων ενός οργανισμού. Ο καθορισμός της δομής, της αλληλουχίας των γονιδίων και η διαλεύκανση της λειτουργίας τους και του ρόλου τους. Κατανοώντας τη βιολογική διαφοροποίηση σε επίπεδο γονιδιώματος, μπορούμε να βγάλουμε συμπεράσματα για την προέλευση ατομικών χαρακτηριστικών και τάσεις εκδήλωσης νόσων. Η γονιδιωματική είναι το πιο αναπτυγμένο και ώριμο πεδίο της ΒΣ. Έχει, ήδη, ολοκληρωθεί η χαρτογράφηση του γονιδιώματος σε διάφορους οργανισμούς, ενώ πλέον υπάρχει μεγάλος αριθμός εμπορικών εταιριών που προσφέρουν

υπηρεσίες πλήρους Γονιδιωματικής ανάλυσης. Οι τεχνικές έχουν, ουσιαστικά, φτάσει σε τέτοιο τεχνολογικό επίπεδο, ώστε στόχος της έρευνας και ανάπτυξης στο πεδίο είναι η ταχύτερη και οικονομικότερη ανάλυση.

Παρόλο που τα άτομα ενός είδους, είναι πολύ όμοια σε γενετικό επίπεδο (σε ποσοστό κοντά στο 99.9%), υπάρχουν διαφορές στην αλληλουχία του σε συχνότητα περίπου 1 σε κάθε 300 βάσεις νουκλεοτιδίων. Λαμβάνοντας υπόψη ότι το σύνολο των βάσεων (που είναι κοντά στα 3 δισεκατομμύρια στον άνθρωπο), το ποσοστό μεταφράζεται σε 10.000.000 βάσεις οι οποίες διαφέρουν μεταξύ των ατόμων. Οι διαφοροποιήσεις μεμονωμένων βάσεων ονομάζονται Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) και η μελέτη τους αποτελεί ένα μεγάλο τμήμα της γονιδιωματικής.

Βασικά εργαλεία της έρευνας αποτελούν οι DNA μικροδιατάξεις (μικροσυστοιχίες), οι οποίες εφαρμόζονται 1) στη χαρτογράφηση του γονιδιώματος ή γενοτύπηση (Genome-wide genotyping) που εξετάζει ποια γονίδια υπάρχουν σε ένα άτομο, 2) στη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης στους διάφορους ιστούς (Tissue-specific gene expression) η οποία μελετά ποια γονίδια χρησιμοποιούνται για την παραγωγή πρωτεϊνών και 3) στη μελέτη μεταλλάξεων (Mutational analysis).

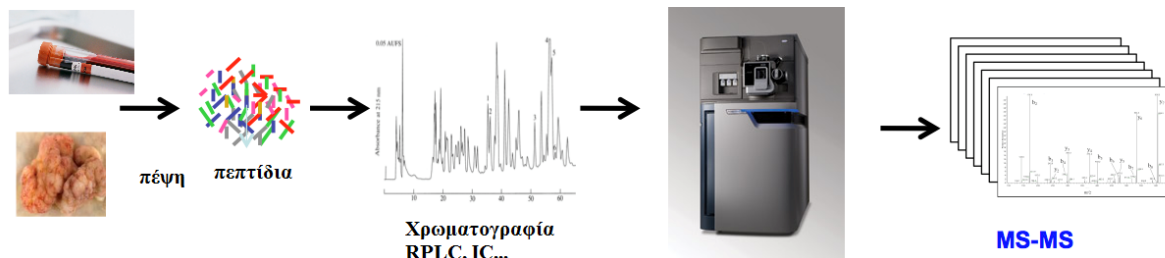
Ένα σύγχρονο πεδίο που αναπτύσσεται τα τελευταία χρόνια είναι η Επιγενετική. Αντικείμενό της είναι η μελέτη των (ενίοτε) κληρονομήσιμων αλλαγών στη λειτουργία των γονιδίων, λόγω κυτταρικών και φαινοτυπικών μεταβολών. Είναι η μελέτη της επίδρασης στη δράση ενός γονιδίου (π.χ. από λειτουργικό σε μη-λειτουργικό), χωρίς να αλλάζει η αλληλουχία των βάσεων στο DNA του γονιδίου. Οι επιγενετικοί παράγοντες οδηγούν κύτταρα στη διαφοροποίηση και στην εξέλιξή τους σε διάφορους ιστούς, παρότι τα κύτταρα έχουν το ίδιο DNA. Οι επιγενετικοί μηχανισμοί (μεθυλίωση βάσεων, ακετυλίωση ιστονών) παραμένουν σημαντικοί σε όλη τη διάρκεια της ζωής. Μπορεί να εκκινούν επιλεκτικά κάποια γονίδια σε διαφορετικούς ιστούς ως απάντηση σε περιβαλλοντικά και άλλα ερεθίσματα.

Μεταγραφωματική (Transcriptomics) είναι η μελέτη του συνόλου των μεταγραφωμάτων (mRNA) τα οποία παράγονται σε ένα κύτταρο ή είδος κυττάρων ή οργανισμό. Η ανάλυση γίνεται με μεθόδους υψηλής απόδοσης, όπως αυτές οι οποίες χρησιμοποιούνται στη γονιδιωματική, για παράδειγμα η ανάλυση μικροσυστοιχιών. Σύγκριση των συνόλων των μεταγραφωμάτων επιτρέπει την ταυτοποίηση των γονιδίων τα οποία εκφράζονται διαφορετικά σε διακριτούς πληθυσμούς κυττάρων, ή για παράδειγμα την απόκριση σε διαφορετικές θεραπείες· αναφέρεται και ως expression profiling.

Η Πρωτεομική (proteomics) πραγματεύεται την ανάλυση του πρωτεώματος, δηλαδή, του συνόλου των πρωτεϊνών και πεπτιδίων τα οποία κωδικοποιούνται και παράγονται από το γονιδίωμα ενός οργανισμού. Στόχοι της είναι 1) ο διαχωρισμός, η ταυτοποίηση, ο χαρακτηρισμός και η αλληλούχιση πρωτεϊνών, 2) η μελέτη αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών σε σύμπλοκα και 3) η ποσοτικοποίησή τους και συσχέτιση με την κυτταρική λειτουργία. Η πρωτεομική χρησιμοποιεί μια ποικιλία τεχνικών, για να επιτύχει τους στόχους της όπως η ηλεκτροφόρηση πηκτής (διαχωρισμός), η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (διαχωρισμός) και η υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μάζας (διαχωρισμός και ποσοτικοποίηση), η φασματομετρία μάζας σε σειρά (αλληλούχιση), η φασματοσκοπία NMR (αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών), και η κρυσταλλογραφία (μελέτη τρισδιάστατης δομής). Στο **Σχήμα 2.2**, δίνεται η πορεία μιας πρωτεομικής μελέτης. Η πρωτεομική αντιπροσωπεύει το πιο δυναμικό τμήμα των ολιστικών αναλυτικών τεχνολογιών και ως εκ τούτου μεγάλος αριθμός ερευνητών και χρηματοδοτούμενης έρευνας εντοπίζεται στην πρωτεομική. Η πρωτεομική προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για τη γονιδιακή έκφραση και την κατανόηση βιοχημικών μηχανισμών οι οποίες έχουν άμεση εφαρμογή και δυνητικό αποτέλεσμα στη μελέτη επιστημών ζωής (γνώση στο μηχανισμό εκδήλωσης ασθένειας) αλλά και στις μοριακές επιστήμες φυτών ή επιστήμες τροφίμων κ.ά.

Μεταβονομική ή μεταβολομική (metabonomics/metabolomics) είναι η ποσοτική μέτρηση της αντίδρασης των ζωντανών συστημάτων σε παθοφυσιολογική διέγερση ή γενετική τροποποίηση μέσω της μέτρησης του προφίλ των μικρών μορίων (μεταβολιτών, όπως οργανικά οξέα, αμινοξέα, σάκχαρα, νουκλεοτίδια κ.ά.). Ουσιαστικά είναι η ολιστική μελέτη της σύστασης, δυναμικής, και των αλληλεπιδράσεων των μεταβολιτών, σε σχέση με παρεμβολές ή αλλαγές στο περιβάλλον τους, σε κύτταρα, ιστούς και βιολογικά υγρά. Οι μεταβολίτες μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες: τους πρωτογενείς και τους δευτερογενείς. Οι πρωτογενείς μεταβολίτες συνδέονται άμεσα με την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή των οργανισμών, ενώ οι δευτερογενείς δε συνδέονται άμεσα με αυτήν τη διαδικασία, ωστόσο παίζουν σημαντικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις του οργανισμού με το περιβάλλον του. Αποτελούν τα αντιδρώντα και προϊόντα του μεταβολισμού και γι' αυτό οι μεταβολές των συγκεντρώσεων συγκεκριμένων ομάδων μεταβολιτών μας δίνει πληροφορίες της αντίδρασης των συστημάτων σε διάφορες παρεμβολές (περιβαλλοντικές, γενετικές ή άλλες).

Η μελέτη των παρεμβολών μπορεί να γίνει σημαντικό εργαλείο για το χαρακτηρισμό σύνθετων φαινοτύπων καθώς και την ανακάλυψη βιοδεικτών (biomarkers) για συγκεκριμένες φυσιολογικές αντιδράσεις.



Ποσοτική Ανάλυση

Μέτρηση της "αφθονίας κορυφής"
Μετρήσεις του σήματος κάθε πεπτιδίου
Στατιστική ανάλυση

Protein	Ratio	Quasi.fdr	Counts	Spec1 Rep1	Spec1 Rep2	Spec1 Rep3	Spec2 Rep1	Spec2 Rep2	Spec2 Rep3
MX2	-37.59	0.0000	47	0	0	0	16	15	16
IGF2BP3	-36.52	0.0010	61	0	0	0	18	22	21
ACSS1	-36.40	0.0004	56	0	0	0	20	17	19
HSD17B4	-36.17	0.0012	48	0	0	0	17	14	17
AGPS	-35.50	0.0009	30	0	0	0	10	9	11
MMP1	-35.50	0.0009	30	0	0	0	10	11	9
IFIT2	-35.11	0.0037	23	0	0	0	9	7	7
COL6A3	-7.090	0.0040	549	2	1	1	186	206	153
MVP	-5.864	0.0047	237	1	2	1	81	87	65
OAS3	-5.554	0.0039	96	1	0	1	32	33	29
KRT6B	4.115	0.0042	110	36	36	32	1	2	3
MSH2	4.432	0.0018	113	38	37	33	2	1	2
POGZ	34.19	0.0040	33	12	12	9	0	0	0
WDR70	34.76	0.0047	18	7	6	5	0	0	0
RFC4	34.98	0.0031	21	6	8	7	0	0	0
UGT8	36.73	0.0002	26	9	8	9	0	0	0
LSP1	37.22	0.0004	99	31	36	32	0	0	0

Επεξεργασία δεδομένων
Αναζήτηση σε βάσεις δεδομένων
Ταυτοποίηση πεπτιδίων
Κανονικοποίηση
Σύγκριση ομάδων...

Η ταυτοποίηση βασίζεται στη μέτρηση της μάζας του πεπτιδίου, στη μέτρηση της μάζας των θραυσμάτων και η αλληλούχηση γίνεται με βοήθεια κατάλληλου λογισμικού

Σχήμα 2.2. Η πορεία τυπικής μελέτης πρωτεομικής. Αίμα ή άλλο δείγμα από τον υπό μελέτη οργανισμό υπόκειται σε κατεργασία για παραλαβή των πρωτεϊνών και στη συνέχεια ακολουθεί διαχωρισμός των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση ή χρωματογραφία. Επιλέγεται μια πρωτεΐνη η οποία υφίσταται πέψη με πρωτεολυτικό ένζυμο, για διάσπασή της σε πεπτίδια. Τα πεπτίδια αναλύονται σε σύστημα LC-MS(/MS) όπου επιτυγχάνεται, σε διαφορετικά στάδια, διαχωρισμός, ταυτοποίηση, αλληλούχηση και ποσοτικοποίηση των πεπτιδίων.

Κύριες τεχνικές ανάλυσης είναι οι φασματοσκοπικές (φασματοσκοπία NMR, φασματομετρία μάζας συζευγμένη με χρωματογραφία) ενώ τεχνικές λεπτομέρειες με παραδείγματα δίνονται στη συνέχεια του κεφαλαίου. Τα τελευταία χρόνια αναπτύσσεται η απεικόνιση με MS (MS imaging), που περιγράφεται εν συντομία στο κεφάλαιο 12.

Πέραν αυτών των βασικών πεδίων, υπάρχει μια σειρά δραστηριοτήτων, όπως λιπιδιομική, γλυκομική, μεταλομική, φαρμακογενομική. Η μεταλομική αναπτύσσεται στο κεφάλαιο 5. Η λιπιδιομική αναπτύσσεται, ταχέως, και εστιάζει στη χαρτογράφηση των λιπιδίων ενός κυττάρου, οργάνου ή οργανισμού. Πραγματοποιείται, κυρίως, με χρήση LC-MS, GC-MS, στοχεύοντας στην ανάλυση ιστών ή αίματος για τον προσδιορισμό φωσφολιπιδίων (φωσφατιδυλοχολινών), γλυκεριδίων, χολικών οξέων, ελεύθερων λιπαρών οξέων, ακυλοκαρνιτινών και άλλων ομάδων λιπόφιλων ενώσεων. Έως τις μέρες μας αρκετές εκατοντάδες διακριτών λιπιδίων έχουν ανιχνευθεί σε διάφορα δείγματα προερχόμενα από ζώα ή φυτά.

2.4. Βιοαναλυτικές προκλήσεις στα πεδία της Βιολογίας Συστημάτων

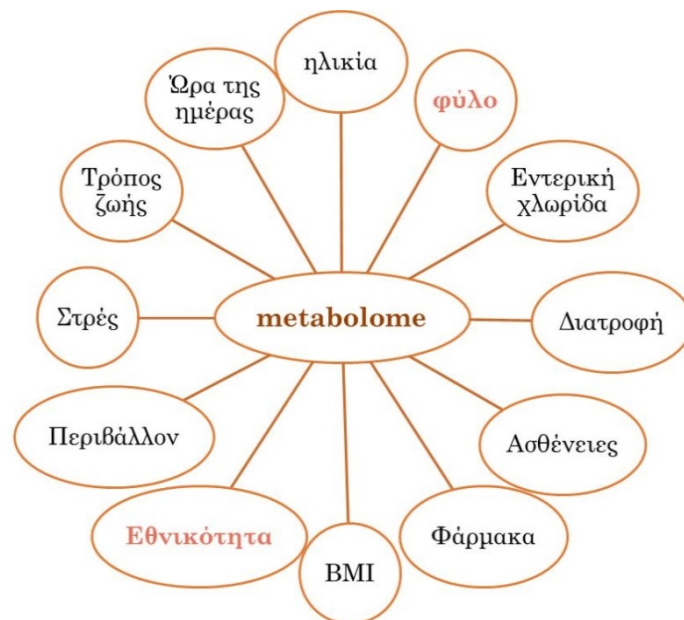
Η ολιστική αντίληψη της αναλυτικής διαδικασίας είναι κοινή ανάμεσα στα διάφορα πεδία omics, όμως, η φύση των πεδίων αυτών είναι διαφορετική και γι' αυτόν το λόγο οι βιοαναλυτικές προκλήσεις και πιθανά προβλήματα που καλείται να λύσει ο ερευνητής είναι διαφορετικά σε κάθε πεδίο.

Τα κύτταρα ενός οργανισμού έχουν κοινό γονιδιακό φορτίο το οποίο μπορεί να προσδιοριστεί σε διάφορα σημεία του οργανισμού (π.χ. διαφορετικοί ιστοί και βιολογικά υγρά του ανθρώπου σίελο, αίμα κ.ά.). Όμως τα κύτταρα διαφοροποιούνται ανάλογα με το υποσύνολο των γονιδίων που είναι ενεργά και κωδικοποιούν διαφορετικές πρωτεΐνες οι οποίες καθορίζουν την κυτταρική λειτουργία. Επομένως, το σύνολο των πρωτεϊνών μπορεί να αλλάζει δραματικά από ιστό σε ιστό. Επίσης, η κατανομή των πρωτεϊνών ή των μεταβολιτών είναι διαφορετική μεταξύ ιστών, υγρών ή άλλων δειγμάτων. Έτσι το πρωτόωμα και το μεταβόλωμα του ήπατος, για παράδειγμα, είναι τελείως διαφορετικά από τα αντίστοιχα σύνολα σε εγκέφαλο,

αίμα και ούρα. Άρα διαφορετικά δείγματα από τον ίδιο οργανισμό θα δώσουν διαφορετικά μεταβολικά ή πρωτεϊνικά προφίλ.

Το γονιδίωμα ενός οργανισμού είναι σχετικά σταθερό, με την έννοια ότι δεν παρατηρούνται αλλαγές στη διάρκεια μιας ημέρας, ενώ σε μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα αλλαγές και (επι)γενετικές τροποποιήσεις είναι σχετικά περιορισμένες. Το γεγονός αυτό επιτρέπει (ανάμεσα στα άλλα) την πραγματοποίηση ελέγχων πατρότητας ή δικανικών ελέγχων ακόμη σε πολύ παλαιά δείγματα (δεκαετιών): το γονιδιακό φορτίο αίματος ή άλλων δειγμάτων είναι «στατικό» και προσφέρει τη δυνατότητα ταυτοποίησης ατόμων (π.χ. ύποπτοι συμμετοχής ή θύματα εγκληματικής ενέργειας τα οποία ταυτοποιούνται από το DNA τους) και διερεύνησης της γενετικής σύνδεσής τους. Σε αντίθεση, το πρωτέωμα ή το σύνολο των μεταβολιτών ενός δείγματος, αλλάζει δραστικά στη διάρκεια ακόμη και μιας ημέρας ακολουθώντας το βιολογικό ρολόι του οργανισμού. Οι συγκεντρώσεις σε ορμόνες, σάκχαρα, αμινοξέα, οργανικά οξέα και άλλα μόρια μπορεί, επίσης, να αυξομειωθούν δραστικά (σε κάποιες περιπτώσεις πάνω από δύο τάξεις μεγέθους) στα διάφορα βιολογικά δείγματα λόγω ήπιας επίδρασης, όπως φυσική άσκηση, διατροφή, κάπνισμα ή άλλη δραστηριότητα. Οι παράγοντες που επηρεάζουν το μεταβολικό προφίλ δίνονται παραστατικά στο **Σχήμα 2.3**. Η μεταβλητότητα αυτή επιβάλλει ιδιαίτερη επιμέλεια στο σχεδιασμό πειραμάτων και δυσχεραίνει την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

Πέραν αυτού, το πρωτέωμα και το μεταβόλωμα είναι πιο περίπλοκα από το γονιδίωμα. Ο αριθμός των γονιδίων είναι μικρότερος από τον αριθμό πρωτεϊνών ή μεταβολιτών (19.000-20.000 περίπου γονίδια στον άνθρωπο, >1.000.000 πρωτεΐνες και άγνωστος αριθμός μεταβολιτών, με εκτιμήσεις που κυμαίνονται από 30.000 έως >100.000). Τα γονίδια σχηματίζονται από DNA, το οποίο περιέχει τέσσερις επαναλαμβανόμενες αζωτούχες βάσεις: την αδενίνη, τη θυμίνη, τη γουανίνη και την κυτοσίνη. Η αλληλουχία αυτών των βάσεων καθορίζει την αλληλουχία των 20 αμινοξέων κατά τη μετάφραση. Ενώ, όμως, η αλληλούχιση του DNA προσφέρει γνώση του λειτουργικού γονιδιώματος, η γνώση της αλληλουχίας των αμινοξέων δε συνεπάγεται γνώση της τρισδιάστατης δομής μιας πρωτεΐνης, της συγκέντρωσης ή των τάσεων αυτής, της λειτουργίας της πρωτεΐνης και των αλληλεπιδράσεών της με άλλες πρωτεΐνες. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες τροποποιούνται ομοιοπολικά μετά τη μετάφραση με μια μεγάλη ποικιλία τρόπων, δυσχεραίνοντας ακόμη περισσότερο την ολοκλήρωση της χαρτογράφησης του πρωτεώματος.



Σχήμα 2.3. Παράγοντες που επηρεάζουν το μεταβολικό προφίλ. Οι δύο παράγοντες με κόκκινο χρώμα είναι γενετικά καθορισμένοι. Το μεταβόλωμα είναι προϊόν δυναμικής αλληλεπίδρασης μεταξύ γενετικής επίδρασης, περιβαλλοντικής επίδρασης, τρόπου ζωής και άλλων παραγόντων.

Στο επίπεδο των μικρών μορίων, οι διάφορες οργανικές ενώσεις (μεταβολίτες) οι οποίες συνθέτουν το μεταβόλωμα, παρουσιάζουν πολύ διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες: από πολύ πολικές (οξέα, βάσεις) έως πολύ άπολες (λιπίδια). Παρουσιάζουν μεγάλες διαφορές στη μοριακή τους δομή, πολλές πιθανές

ισομέρειες (π.χ. πολλά σάκχαρα με μοριακή μάζα 180 amu) και απαντώνται στα διάφορα βιολογικά δείγματα σε πολύ μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων το οποίο να φτάνει τις 7 τάξεις μεγέθους.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα των βιοαναλυτικών προκλήσεων είναι η διερεύνηση της δομής άγνωστων μορίων στη λιπιδιομική, λόγω των πολλών πιθανών ισομερών. Τα γλυκεροφωσφολιπίδια αποτελούνται από ένα σκελετό γλυκερόλης, όπου συνδέονται αλκυλο-, ακυλο- ή αλκενυλομάδες. Αυτές οι αλυσίδες είναι συχνά διαφορετικού μήκους ανθρακικής αλυσίδας, διαφορετικού βαθμού κορεσμού και διαφορετικής θέσης των διπλών δεσμών. Αυτή η πολυπλοκότητα έχει ως αποτέλεσμα να υπάρχουν 10 ή περισσότερες πιθανές διαφορετικές μοριακές δομές για έναν ευρεθέντα μοριακό τύπο. Τελικά, λόγω των πολλών παραλλαγών, η ταυτοποίηση της πραγματικής δομής μπορεί να μη γίνεται πάντα εφικτή. Περαιτέρω παράγοντες που μπορεί να δημιουργήσουν προβλήματα στη μεταβολομική και μπορεί να προέρχονται από τη συλλογή και κατεργασία δείγματος, αναφέρονται στην αρχή της παραγράφου 2.5.2.

Στο πεδίο της πρωτεομικής, περιορισμοί και προβλήματα που παραμένουν για επίλυση είναι τα:

- 1) Το υψηλό κόστος της ανάλυσης και τα χρονοβόρα πειράματα.
- 2) Η αδυναμία ανάλυσης πρωτεϊνών οι οποίες βρίσκονται σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση.
- 3) Ο μέγιστος αριθμός πεπτιδίων ο οποίος μπορεί να ανιχνευθεί σε μια ανάλυση είναι της τάξης των 5.000 πεπτιδίων, που είναι πολύ μικρό ποσοστό του αναμενόμενου συνόλου (περί το 10⁶). Σημειωτέον ότι μια τέτοια ανάλυση απαιτεί χρονοβόρα ανάπτυξη μεθόδου, χρονοβόρα κατεργασία δείγματος από πολύ εξειδικευμένο αναλυτή και τα πιο εξελιγμένα αναλυτικά συστήματα. Μετά την ανάπτυξη, μια ανάλυση απαιτεί 6-7 ώρες τουλάχιστον ανά δείγμα.
- 4) Προβλήματα με τον καθαρισμό και τη σταθερότητα των πρωτεϊνών.
- 5) Προβλήματα στο διαχωρισμό πρωτεϊνών οι οποίες είναι είτε πολύ μικρές είτε πολύ μεγάλες, είτε πολύ υδρόφιλες, είτε πολύ υδρόφοβες.

Για τους παραπάνω λόγους, η τεχνολογική ολοκλήρωση της χαρτογράφησης του πρωτεώματος ή του μεταβολώματος δεν είναι ακόμη εφικτή και υπάρχει μεγάλη ανάγκη για ανάπτυξη νέων μεθόδων. Για παράδειγμα, η χαρτογράφηση του μεταβολώματος με τεχνική RPLC-MS προσφέρει κάλυψη ενός μόνο ποσοστού. Η χαρτογράφηση του μεταβολώματος με GC-MS μπορεί να προσφέρει κάλυψη ενός ακόμη μικρότερου ποσοστού. Τα δύο αυτά υποσύνολα μπορεί να αλληλεπικαλύπτονται κατά 30-50%· αυτό σημαίνει ότι με τη χρήση και των δυο μεθόδων συνδυαστικά, μπορεί ο αναλυτής να ανιχνεύσει ένα άγνωστο ποσοστό του συνόλου των μεταβολιτών οι οποίοι πραγματικά υπάρχουν στο δείγμα. Η αβεβαιότητα αυτή ακόμη και στην εκτίμηση του ποσοστού κάλυψης του συνόλου, καταδεικνύει την ανάγκη ανάπτυξης του πεδίου. Η κάλυψη, δηλαδή η ανίχνευση και ημι-ποσοτική ανάλυση των ενώσεων εξαρτάται και από άλλους παράγοντες, για παράδειγμα τον τρόπο κατεργασίας του δείγματος. Αν για παράδειγμα γίνει εκχύλιση με οργανικό διαλύτη πριν την ανάλυση, υπάρχει σοβαρή πιθανότητα μη παραλαβής πολικών οργανικών μορίων. Αν γίνει ρύθμιση του pH, ανάλογα με την τελική τιμή pH, υπάρχει σοβαρή πιθανότητα να μην παραληφθούν ορισμένες ιονικές ή ιονιζόμενες ενώσεις. Όλα αυτά τα προβλήματα συμβάλλουν στο να παραμένει η τεχνολογία ατελής προς το παρόν και δείχνουν την ανάγκη για ανάπτυξη νέων πιο αποτελεσματικών μεθόδων.

2.5. Εφαρμογές της βιολογίας συστημάτων

Οι εφαρμογές που έχουν τα πεδία της ΒΣ είναι μεγάλης σημασίας και πολλές. Η χαρτογράφηση των επιμέρους συστημάτων προσφέρει νέα γνώση σε μοριακό πεδίο για τους μηχανισμούς της ζωής και τις αιτίες διάφορων φαινομένων (ανάπτυξη, γήρανση, ασθένεια, τοξικότητα κ.ά.). Η παρέμβαση βασίζεται, πλέον, σε δεδομένα και γνώση της αρχικής αιτίας (evidence-based), σε αντίθεση με την έως πρόσφατα αντιμετώπιση, κυρίως, των συμπτωμάτων (φλεγμονή, πόνος ή πυρετός). Για παράδειγμα, εφόσον γίνει γνωστή μια γενετική τροποποίηση η οποία οδηγεί σε λάθος κωδικοποίηση και παραγωγή λανθασμένης πρωτεϊνικής αλληλουχίας, στόχος της θεραπευτικής αντιμετώπισης γίνεται η παρεμπόδιση της μετάφρασης ή η απενεργοποίηση (μπλοκάρισμα) της μη κανονικής πρωτεΐνης, ώστε να σταματήσει ο μηχανισμός της ασθένειας στην αρχή του.

Η ΒΣ έχει χρησιμοποιηθεί σε διαφορετικούς τομείς των βιολογικών και των κλινικών επιστημών και σχετικά παραδείγματα αναφέρονται παρακάτω:

1. Κλινική διάγνωση και πρόγνωση ασθενειών. Η χρήση της ΒΣ στην κλινική διαγνωστική εστιάζεται στην εύρεση βιοδεικτών. Βιοδείκτες ασθένειας αποκαλούνται τα βιομόρια τα οποία παρουσιάζουν διαφοροποίηση στη συγκέντρωσή τους κατά την εκδήλωση και πορεία μιας ασθένειας.

Η εύρεση βιοδεικτών (οι βιοδείκτες αναφέρονται και στο κεφάλαιο 15) μπορεί να βοηθήσει στην κατανόηση των μηχανισμών ασθένειας, να οδηγήσει στην ανακάλυψη νέας γενιάς φαρμάκων, τα οποία και θα καταπολεμούν την αιτία της ασθένειας, και να βοηθήσει στην άμεση και αποτελεσματική παρακολούθηση της πορείας θεραπείας και ανταπόκρισης σε φαρμακευτική αγωγή. Είναι γνωστό ότι, συχνά, η αρχή της ασθένειας προηγείται πολλούς μήνες ή και χρόνια (όπως π.χ. σε νευροεκφυλιστικές παθήσεις) της εκδήλωσης συμπτωμάτων και της τελικής διάγνωσης.

Η έγκαιρη και ασφαλής διάγνωση βασισμένη σε απόλυτα στοιχεία (όπως συγκεντρώσεις επικυρωμένων βιοδεικτών) και όχι σε μόνο σε κλινικές εξετάσεις οι οποίες κάποιες φορές μπορεί να είναι υποκειμενικές, μπορεί να βοηθήσει στην έγκαιρη αντιμετώπιση της νόσου, την προετοιμασία και τον καλύτερο προγραμματισμό της ζωής του ασθενούς και της οικογένειάς του. Έπειτα η συνεχής παρακολούθηση των συγκεντρώσεων μοριακών δεικτών μπορεί να βοηθήσει στη λήψη αποφάσεων σε κλινικό επίπεδο, για παράδειγμα στην εξατομικευμένη θεραπευτική, στην αναγνώριση της απόκρισης ή μη του ασθενούς σε αγωγή, πολύ νωρίτερα από τις όποιες αλλαγές στη φυσιολογία. Για παράδειγμα, η μέτρηση βιοδεικτών απόκρισης σε θεραπεία μπορεί να γίνει μέσα σε λίγα λεπτά. Αντίθετα, η αλλαγή στην κλινική εικόνα λόγω της ανταπόκρισης στη θεραπεία μπορεί να απαιτεί μέρες, γεγονός που μπορεί να έχει μεγάλο κόστος αλλά και να επιδράσει ακόμη και στην υγεία και τη ζωή του ασθενούς ο οποίος δεν ανταποκρίνεται στην αγωγή και παραμένει υπό μη αποτελεσματική αγωγή.

Στην έρευνα για βιοδείκτες, η επιλογή των ομάδων και ο πειραματικός σχεδιασμός πρέπει να ακολουθεί κανόνες και σαφή κριτήρια επιλεξιμότητας ή απόρριψης των ατόμων/πειραματόζωων. Επίσης, είναι σημαντικό να συλλέγονται δεδομένα, όπως διατροφικά, στυλ ζωής, συνήθειες όπως κατανάλωση αλκοόλ ή κάπνισμα, δημογραφικά στοιχεία, δείκτης μάζας/σώματος, στοιχεία φαρμακευτικής αγωγής κ.ά. τα οποία μπορεί στη συνέχεια να χρησιμοποιηθούν για να δοθεί ερμηνεία σε ευρήματα, όπως μη αναμενόμενες ομαδοποιήσεις δειγμάτων. Για να γίνει αυτό κατανοητό, σε μια επιδημιολογική μελέτη όπου συλλέγονται 1000 δείγματα ούρων γυναικών, μπορεί η ολιστική ανάλυση να αναδείξει μια ομαδοποίηση γυναικών οι οποίες βρίσκονται στην εμμηνόπαυση, ή βρίσκονται σε εγκυμοσύνη, ή ορμονική ή άλλη θεραπεία. Εάν δεν έχει γίνει η σχετική συλλογή των δημογραφικών στοιχείων, έρευνα ετών και πολύ υψηλού κόστους μπορεί να σταματήσει στο σημείο αυτό χωρίς να δώσει ουσιαστικό αποτέλεσμα.

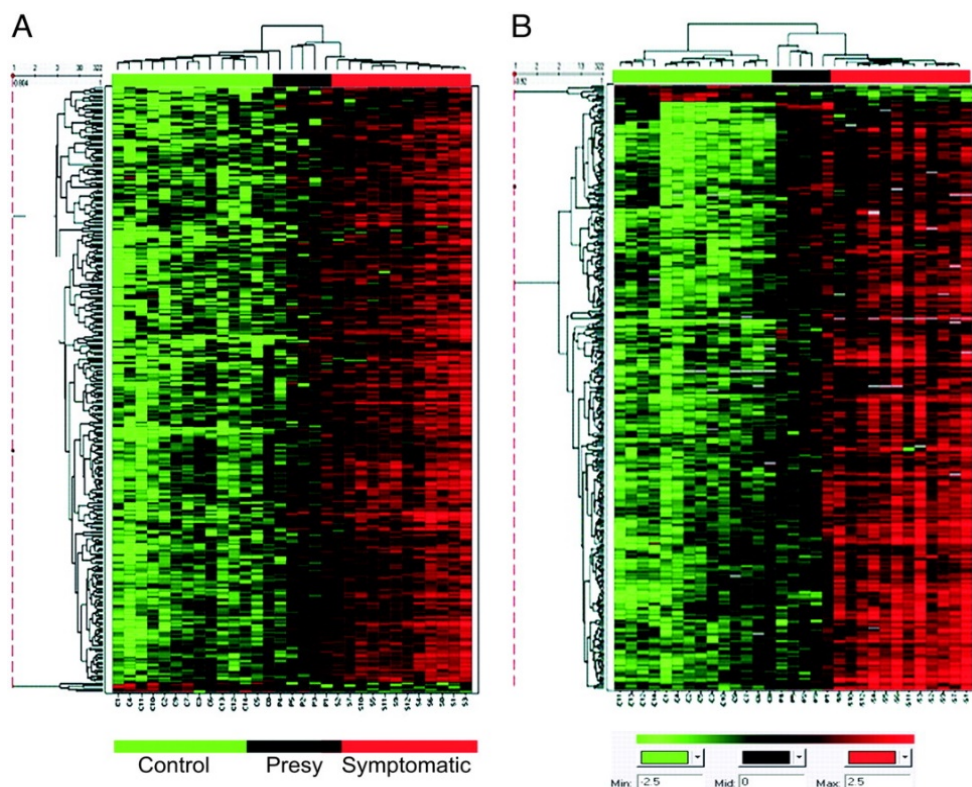
Για να χαρακτηριστεί ένα μόριο ή μια γενετική τροποποίηση ως βιοδείκτης πρέπει να παρουσιάζει χαρακτηριστικές, επαναλήψιμες και αξιόπιστες διαφοροποιήσεις μεταξύ των συγκρινόμενων ομάδων πληθυσμού. Η επικύρωση των διαφορών αυτών πρέπει να είναι ενδεδειγμένη και στατιστικά αποδεκτή, μέσω διαφορετικών μεθόδων στατιστικής ανάλυσης, όπως με Student's *t* test, θηκογράμματα ή πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση.

Στην πράξη όλα τα πεδία των επιστημών της ζωής παρουσιάζουν εντατική δραστηριότητα προς την εύρεση βιοδεικτών. Πολύ μεγάλος αριθμός μελετών πραγματοποιήθηκε ή πραγματοποιείται για την εύρεση βιοδεικτών σε διάφορα δείγματα για ασθένειες όπως καρκίνος, καρδιοαγγειακά νοσήματα, αυτοάνοσα νοσήματα, διαβήτης αλλά και καταστάσεις όπως παχυσαρκία, φυσική άσκηση κ.ά.

Στο **Σχήμα 2.4** δίνονται τα αποτελέσματα της μελέτης γονιδιακής έκφρασης σε δείγματα αίματος ασθενών με νόσο Huntington, με δύο διαφορετικές μικροσυστοιχίες. Τα αποτελέσματα που δίνονται στο σχήμα, προέρχονται από Ανάλυση Ιεραρχικής Ομαδοποίησης (Hierarchical Clustering). Στο **Σχήμα 2.5** δίνεται η πορεία για την εύρεση πρωτεϊνικού καρκινικού βιοδείκτη σε πλάσμα αίματος. Στο **Σχήμα 2.6** δίνεται ένα παράδειγμα από την εφαρμογή μεταβολομικής για την εύρεση βιοδεικτών παχυσαρκίας μέσω της ανάλυσης ούρων από παχύσαρκα και φυσιολογικά πειραματόζωα. Στο σχήμα φαίνεται η διαφοροποίηση των δειγμάτων ούρων με βάση την ανάλυσή τους με LC-MS και πολυπαραμετρική ανάλυση.

2. Εξατομικευμένη ιατρική (Personalized medicine) είναι ένας από τους πιο μεγαλεπίβλους στόχους εφαρμογής της ΒΣ και των τεχνολογιών omics. Αφορά τη συλλογή πληροφοριών και δεδομένων "omics" (genomic, proteomic, metabolomic) για καθένα άνθρωπο καθώς και κλινικών και περιβαλλοντικών δεδομένων, τα οποία στη συνέχεια θα συσχετίζονται για την ιατρική διάγνωση, την απόφαση για ιατρική πράξη, φαρμακευτική αγωγή και δοσολογία. Θεωρείται ότι με τον τρόπο αυτό είναι δυνατή η βελτιστοποίηση της θεραπείας και της απόκρισης του ασθενούς. Το πιο ανεπτυγμένο έως τώρα τμήμα είναι το πεδίο της φαρμακογενομικής, όπου η χαρτογράφηση του γονιδιώματος είναι, απολύτως, εφικτή και δυνατή ακόμη και από διάφορες ιδιωτικές εταιρίες. Επιπλέον, έχουν ήδη προταθεί δεκάδες γονιδιακοί δείκτες για διάφορες

ασθένειες. Η σύγκριση του γενότυπου ενός ασθενούς με γενότυπους αναφοράς μπορεί να αναδείξει διαφοροποιήσεις και να υποδείξει πιθανότητα για εκδήλωση νόσου. Με βάση αυτήν την πληροφορία μπορεί ο ιατρός να επιτύχει ταχύτερη διάγνωση και αποτελεσματικότερη θεραπεία: για παράδειγμα μπορεί ο ιατρός να βοηθηθεί στην επιλογή θεραπείας από γενετική πληροφορία η οποία μπορεί να υποδείξει χαμηλή ανταπόκριση σε κάποιο φάρμακο.

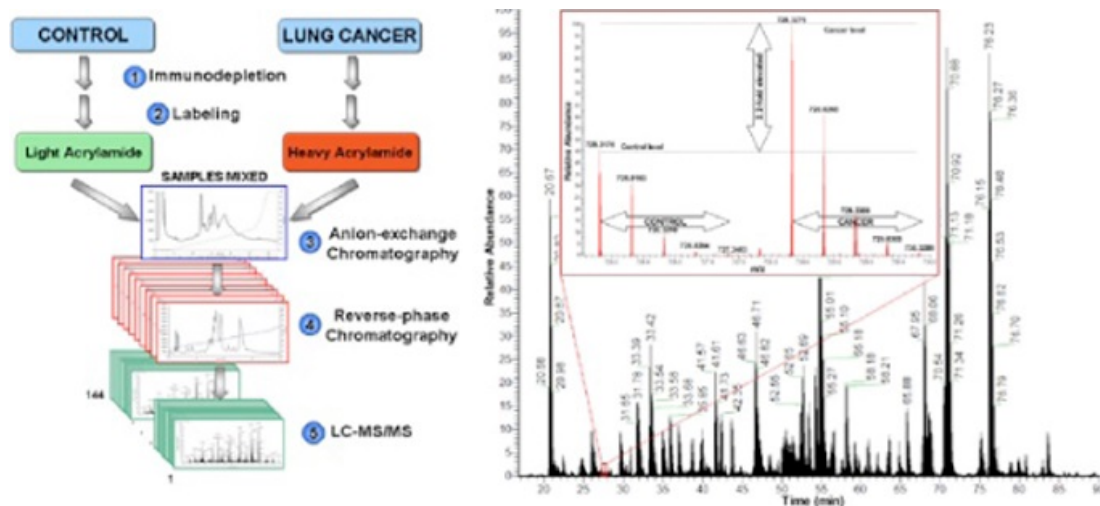


Σχήμα 2.4. Μελέτη γονιδιακής έκφρασης σε ασθενείς με νόσο Huntington. Ανάλυση Ιεραρχικής Ομαδοποίησης (Hierarchical Clustering), σε δείγματα αίματος ασθενών για 322 γονίδια των οποίων η έκφραση διαφοροποιείται σε πλάκα μικροσυστοιχίας Affymetrix (A) και Amersham Biosciences (B). Τα γονίδια αυτά βρέθηκαν να έχουν σημαντική διαφοροποίηση ($P < 0.0005$), λόγος μεταβολής (>1.8 ή <0.6) στον πληθυσμό της μελέτης που νοσούσε. Ο πληθυσμός περιλάμβανε 17 ασθενείς με τη νόσο Huntington και 14 υγιείς μάρτυρες. Κάθε στήλη αντιστοιχεί σε δείγμα και κάθε γραμμή σε ένα γονίδιο. Με κόκκινο φαίνονται τα γονίδια με υψηλά επίπεδα έκφρασης και με πράσινο τα γονίδια με χαμηλά επίπεδα έκφρασης. Παρατηρούνται οι ομαδοποιήσεις των δειγμάτων σε υγιείς (πράσινο χρώμα), προσυμπτωματικούς (μαύρο χρώμα) και συμπτωματικούς ασθενείς (κόκκινο χρώμα, με βάση την έκφραση των εξεταζόμενων γονιδίων [Borovecki et al., 2005]).

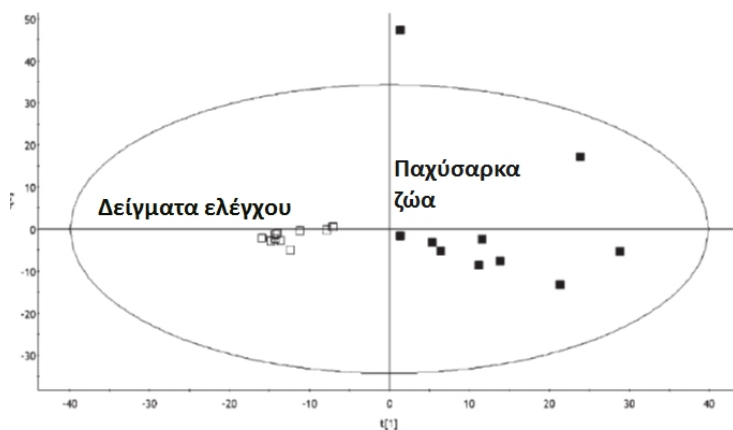
3. Εξατομικευμένη ιατρική (Personalized medicine) είναι ένας από τους πιο μεγαλεπίβλους στόχους εφαρμογής της ΒΣ και των τεχνολογιών omics. Αφορά τη συλλογή πληροφοριών και δεδομένων "omics" (genomic, proteomic, metabolomic) για καθένα άνθρωπο καθώς και κλινικών και περιβαλλοντικών δεδομένων, τα οποία στην συνέχεια θα συσχετίζονται για την ιατρική διάγνωση, την απόφαση για ιατρική πράξη, φαρμακευτική αγωγή και δοσολογία. Θεωρείται ότι με τον τρόπο αυτό είναι δυνατή η βελτιστοποίηση της θεραπείας και της απόκρισης του ασθενούς. Το πιο ανεπτυγμένο έως τώρα τμήμα είναι το πεδίο της φαρμακογενομικής, όπου η χαρτογράφηση του γονιδιώματος είναι, απολύτως, εφικτή και δυνατή ακόμη και από διάφορες ιδιωτικές εταιρίες. Επιπλέον, έχουν ήδη προταθεί δεκάδες γονιδιακοί δείκτες για διάφορες ασθένειες. Η σύγκριση του γενότυπου ενός ασθενούς με γενότυπους αναφοράς μπορεί να αναδείξει διαφοροποιήσεις και να υποδείξει πιθανότητα για εκδήλωση νόσου. Με βάση αυτήν την πληροφορία μπορεί ο ιατρός να επιτύχει ταχύτερη διάγνωση και αποτελεσματικότερη θεραπεία: για παράδειγμα μπορεί ο ιατρός να βοηθηθεί στην επιλογή θεραπείας από γενετική πληροφορία η οποία μπορεί να υποδείξει χαμηλή ανταπόκριση σε κάποιο φάρμακο.

Ειδικά για τη θεραπεία του καρκίνου, έχει βρεθεί τα τελευταία χρόνια μεγάλη γενετική διαφοροποίηση κάποιων μορφών καρκίνου οι οποίες στη συμβατική ιατρική εμφανίζονται ως ίδιες και

κατηγοροποιούνται μαζί. Γενετικές αναλύσεις υποδεικνύουν μεγάλη ετερογένεια σε όγκους ή ακόμη και διαφοροποιήσεις μέσα στον ίδιο όγκο. Αυτές οι εξελίξεις βοηθούν την ανάπτυξη φαρμάκων τα οποία μπορεί να επιτύχουν πολύ καλά αποτελέσματα σε τέτοιες μορφές καρκίνου, παρόλο που δεν έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα σε γενικότερες μελέτες.



Σχήμα 2.5. Πρωτεομική ανάλυση για την ταυτοποίηση καρκινικού βιοδείκτη σε πλάσμα αίματος. Αριστερά: δείγματα πλάσματος από ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα και αντίστοιχα δείγματα από φυσιολογικούς μάρτυρες (controls), στα οποία απομακρύνθηκαν οι πρωτεΐνες υψηλής συγκέντρωσης (βήμα 1), έγινε επισήμανση με ισότοπα ακρυλαμίδιου (ελαφρύ για κανονικό και βαρύ για καρκίνο) (βήμα 2). Έπειτα από ανάμειξη, τα δείγματα κλασματοποιήθηκαν σε επίπεδο πρωτεϊνών σε 144 κλάσματα (βήματα 3 και 4). Καθένα από αυτά τα κλάσματα αναλύθηκε με γρήγη χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας σε σειρά (LC-MS / MS) μετά από πέψη της πρωτεΐνης με θρυψίνη (βήμα 5). Δεξιά: Το χρωματογράφημα δείχνει την πολυπλοκότητα των αποτελεσμάτων από αναλύσεις LC -MS/MS. Ένα πεπτίδιο της ινσουλίνης, ταυτοποιήθηκε με έκλουσή του σε περίπου 27,5 λεπτά στο χρωματογράφημα, και η λεπτομερής εικόνα υποδεικνύει ότι το πεπτίδιο που προέρχεται από δείγματα καρκίνου (επισημασμένο βαρύ ισότοπο), όπου έχει περίπου 2 φορές μεγαλύτερης έντασης σήμα σε σχέση με δείγματα από φυσιολογικούς μάρτυρες. [Faca et al., 2010].



Σχήμα 2.6. Αποτελέσματα μεταβολομικής μελέτης σε μοντέλο ζώου με παχυσαρκία. Διαφοροποίηση δειγμάτων ούρων από παχύσαρκα (σκούρα τετράγωνα) και φυσιολογικά πειραματόζωα (ανοικτά τετράγωνα) μετά τη μεταβολομική ανάλυση σε LC-TOF-MS και PCA. Οι δείκτες που βρέθηκαν ως υπεύθυνοι για τη διαφοροποίηση των παχύσαρκων ζώων, περιλάμβαναν λιπίδια όπως: Myristoyl L- α -lysophosphatidylcholine, 1-Linoleoylglycerophosphocholine, 1-Palmitoyllysosphosphatidylcholine και άλλες φωσφοχολίνες, που εμφάνισαν υψηλότερες συγκεντρώσεις στα ούρα των παχύσαρκων ζώων [Lofthus et al, 2008].

Έως πρόσφατα η ανάπτυξη των φαρμάκων και η εφαρμογή τους στη θεραπευτική βασιζόταν στην αντίληψη ότι το φάρμακο θα εφαρμοστεί σε μεγάλο τμήμα του πληθυσμού σε μία συγκεκριμένη δόση. Η εξατομικευμένη θεραπεία βαδίζει με τη λογική: το κατάλληλο φάρμακο για τον κατάλληλο ασθενή και στην

κατάλληλη δόση. Η θεραπευτική αγωγή προσαρμόζεται μετά τη λήψη δεδομένων (εργαστηριακών, κλινικών και δεδομένων μελετών ΒΣ) (Σχήμα 2.7). Οι ερευνητές συνεκτιμούν τη γενετική ή πρωτεομική πληροφορία σε συνδυασμό με την αντίδραση του οργανισμού του ασθενούς και αποφασίζουν για την καταλληλότερη φαρμακευτική ένωση: σχήμα, δοσολογία, συχνότητα εφαρμογής. Αυτό μπορεί να βοηθήσει την επίτευξη αποτελεσματικής, μη επεμβατικής, οικονομικής θεραπείας. Για παράδειγμα, το φάρμακο ταμοξιφαίνη (Tamoxifen) χρησιμοποιούνταν συχνά στη θεραπεία καρκίνου με θετικούς υποδοχείς οιστρογόνων για μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Όμως το 65% των γυναικών ανέπτυξαν ανοχή, μειώνοντας το θεραπευτικό αποτέλεσμα. Μετά από έρευνα βρέθηκε ότι αυτό οφειλόταν στο γεγονός ότι γυναίκες με μετάλλαξη στο γονίδιο CYP2D6, δεν μπορούσαν να μεταβολίσουν το φάρμακο προς τον ενεργό του μεταβολίτη και, επομένως, η θεραπεία αυτή δεν ήταν αποτελεσματική. Έκτοτε γίνεται έλεγχος ως προς τη συγκεκριμένη μετάλλαξη πριν από την εφαρμογή της αγωγής, ώστε οι ασθενείς να έχουν από την αρχή αποτελεσματική θεραπεία. Ασθενείς με τη συγκεκριμένη μετάλλαξη υποβάλλονται σε εναλλακτική αγωγή.

Με την εξέλιξη των υπόλοιπων πεδίων Omics, η εξατομικευμένη θεραπεία έχει μετακινηθεί από την αρχική εστίαση των μοντέλων της στη γονιδιωματική και περιλαμβάνει πλέον και πρωτεϊνικούς, μεταβολικούς ή άλλους δείκτες.

Μελλοντικός στόχος είναι με την εξατομικευμένη ιατρική να είμαστε σε θέση να μπορούμε να προβλέψουμε για κάθε άνθρωπο ποιες νόσους έχει την πιθανότητα να εμφανίσει, την πορεία της νόσου καθώς και την ανταπόκριση στη θεραπεία.

Κάτι τέτοιο, βέβαια, ακόμα δεν είναι απολύτως εφικτό, καθώς η λήψη μεγάλου όγκου πληροφορίας και η διαχείριση όλων αυτών των πληροφοριών είναι τεχνικά δύσκολη και υπόκειται σε περιορισμούς. Προς το παρόν πιο κοντινός στόχος είναι η κατηγοριοποίηση του πληθυσμού με βάση τα 'omic' προφίλ τους (patient stratification) και στη συνέχεια η προσαρμογή της θεραπείας ανάλογα με την κατηγορία του πληθυσμού στην οποία ανήκει, λαμβάνοντας υπόψη και κάποιους άλλους προσωπικούς παράγοντες του ατόμου για το οποίο προορίζεται.



Σχήμα 2.7. Η θεωρία της εξατομικευμένης θεραπείας σε απλοποιημένο σχήμα. Ο πληθυσμός που πάσχει από την ασθένεια είναι ετερογενής και μπορεί να χωριστεί σε 3 υποομάδες των οποίων ο φαινότυπος μπορεί να περιγραφεί ικανοποιητικά από τα ευρήματα μελέτης ΒΣ. Με βάση αυτήν τη γνώση, ο ιατρός μπορεί να επιλέξει τρεις διαφορετικές αγωγές που θα έχουν καλύτερο θεραπευτικό αποτέλεσμα.

4. Έλεγχος Τοξικότητας, για την αναγνώριση και παρακολούθηση τοξικότητας σε όργανα και ιστούς. Οι κλασικές μελέτες φαρμακοκινητικής και μεταβολισμού που μελετούν μόνον τους γνωστούς μεταβολίτες του φαρμάκου και δεν εξετάζουν την υπόλοιπη βιοσύνθεση, θα αγνοήσουν τέτοια φαινόμενα, οπότε υπάρχει ο

κίνδυνος μια ένωση που παρουσιάζει τοξικότητα, να προχωρήσει σε επόμενα στάδια ανάπτυξης και να απορριφθεί μετά από μεγαλύτερο χρόνο και κόστος ανάπτυξης ή ακόμη μετά από την κυκλοφορία της και τις τραγικές επιπτώσεις της στην υγεία των ανθρώπων.

Πρόσφατο παράδειγμα κατά το οποίο τοξικά φάρμακα διέφυγαν του μηχανισμού συμβατικού ελέγχου, είναι η απόσυρση (κατά τα έτη 2004, 2005) δύο φαρμάκων αναστολέων της COX-II, τα οποία χορηγούνταν για θεραπεία αρθρίτιδας. Την εποχή της απόσυρσής τους από την αγορά τα φάρμακα συνταγογραφούνταν σε εκατοντάδες χιλιάδες πασχόντων και είχαν στις ΗΠΑ κύκλο εργασιών άνω των \$ 3 δισεκατομμυρίων. Οι προκλινικοί έλεγχοι απέτυχαν να αναδείξουν την ισχυρή καρδιοτοξικότητα των φαρμάκων οδηγώντας στο θάνατο εκατοντάδων ασθενών.

Μελέτη ΒΣ μπορεί να εφαρμοστεί για παράδειγμα για την προκλινική μελέτη φαρμάκων (πριν από την εμπορική τους κυκλοφορία). Χορηγείται το φάρμακο σε πειραματόζωα (ποντίκια ή/και αρουραίους) και ακολουθεί ολιστική ανάλυση δειγμάτων ούρων και πλάσματος με χρήση NMR, LC-MS ή άλλων τεχνικών. Χαρτογραφείται η σύσταση των βιολογικών υγρών ή των ιστών που έχουν υποστεί βλάβη, προσφέροντας πληροφορία για το μηχανισμό τοξικότητας (βιοσυνθετικών οδών και ροών). Για παράδειγμα, μπορεί να αποκαλυφθεί υψηλή συγκέντρωση πεπτιδίων ή άλλων ενδογενών ενώσεων, οι οποίες λόγω της επίδρασης του φαρμάκου συσσωρεύονται και δρουν τοξικά στον ιστό, χωρίς, όμως, να συνδέονται άμεσα με το μεταβολισμό του φαρμάκου, δηλαδή, δεν είναι μεταβολίτες αυτού. Αυτό μπορεί να συμβεί για πολλούς λόγους π.χ. αδρανοποίηση ενζύμου, μπλοκάρισμα συνενζύμων και άλλοι μηχανισμοί οι οποίοι δεν μπορούν να προβλεφτούν. Το αποτέλεσμα είναι η διαταραχή της βιοσύνθεσης, η συσσώρευση ενώσεων ή η έλλειψη άλλων ενδιάμεσων μεταβολιτών απαραίτητων για τη βιοσύνθεση άλλων ενώσεων.

5. Βιοτεχνολογικές μελέτες σε φυτά, για την ανακάλυψη βιομορίων τα οποία επηρεάζονται από γενετικές τροποποιήσεις, φλεγμονές ή προσβολές από άλλους παράγοντες. Ειδικά σε τρόφιμα και ποτά υψηλής αξίας (π.χ. κρασί, λάδι, μέλι) η χαρτογράφηση του γονιδιώματος ή των μεταβολιτών επιτρέπει την κατηγοριοποίησή τους ως προς τη γεωγραφική προέλευση και τους ελέγχους αυθεντικότητας.

Στα φυτά και τρόφιμα φυτικής προέλευσης μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο υβριδισμός και η μεταφορά γονιδιακού υλικού μεταξύ φυτών ή καλλιεργειών και στη συνέχεια ο έλεγχος της επιτυχούς παρέμβασης, ο οποίος συχνά περιλαμβάνει τον προσδιορισμό λειτουργικών πρωτεϊνών και εύρεση των τάσεων των μεταβολιτών σε σχέση για παράδειγμα με την ωρίμανση καρπών, την έκθεση στο ηλιακό φως ή άλλους παράγοντες. Οι τεχνικές Omics βοηθούν και επιταχύνουν την ανάπτυξη νέων μεθόδων υβριδισμού για την παραγωγή διαποικιλιακών φυτών με επιθυμητές ιδιότητες ή την ανάπτυξη νέων τεχνικών φυτοπροστασίας. Όπως στην περίπτωση παραγωγής νέων ποικιλιών τομάτας, ο στόχος μπορεί να είναι η αυξημένη συγκέντρωση συστατικών, όπως λυκοπένιο, αργινίνη, κιτρικό οξύ ή άλλα επιθυμητά βιομόρια τα οποία να βελτιώνουν τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του καρπού (άρωμα, γεύση, διάρκεια ζωής, χρώμα ή άλλο). Η ΒΣ προσφέρει γνώση για την καλύτερη επιλογή των ποικιλιών προς υβριδισμό (αυτές που περιέχουν ενεργά γονίδια τα οποία εκφράζουν και παράγουν υψηλότερα επίπεδα των επιθυμητών συστατικών). Στη συνέχεια, μετά τη διασταύρωση, επιλέγονται τα υβρίδια που, όντως, ικανοποιούν με τον καλύτερο τρόπο τις αρχικές απαιτήσεις και στόχους. Ο έλεγχος δε γίνεται μόνο στη συγκέντρωση ενός μορίου- στόχου π.χ. αργινίνη, αλλά μπορεί να καλύπτει μεγάλο μέρος ή όλη τη στοχευμένη βιοσυνθετική οδό (arginine pathway).

6. Μελέτες στις επιστήμες διατροφής. Σε συνδυασμό με την άνω ερευνητική δραστηριότητα, τρόφιμα με ορισμένες επιθυμητές ιδιότητες (π.χ. πλούσια σε βιταμίνες ή πολυφαινόλες) χορηγούνται σε πληθυσμούς (ανθρώπους ή πειραματόζωα) και ελέγχεται η διαθεσιμότητα και η κατανομή των διατροφικών συστατικών στον οργανισμό. Μπορεί να πραγματοποιηθεί στοχευμένη ανάλυση για τη μέτρηση των επιπέδων των επιθυμητών συστατικών (όπως αναφέρθηκε παραπάνω) αλλά και η συνολική διαφοροποίηση του προφίλ των βιολογικών δειγμάτων. Για παράδειγμα, η διατροφή με συγκεκριμένο τρόφιμο μπορεί να μειώσει τις συγκεντρώσεις λιπιδίων (ανεπιθύμητων σε σχέση με την υγεία του καταναλωτή), ενώ ταυτόχρονα αυξάνει τις συγκεντρώσεις άλλων επιθυμητών λιπιδίων στο αίμα ή σε άλλο ιστό.

7. Μελέτες της επίδρασης δραστηριοτήτων και συνηθειών του ανθρώπου. Αυτές μπορεί να περιλαμβάνουν το κάπνισμα, τη φυσική άσκηση, την κατανάλωση αλκοόλης και άλλες συνήθειες. Για την περίπτωση της άσκησης έχουν αναπτυχθεί πολλά μοντέλα άσκησης και προπόνησης για διαφορετικά αθλήματα ή ζητούμενα αποτελέσματα. Η παρακολούθηση των αλλαγών σε μοριακό επίπεδο μπορεί να δώσει άμεση και αξιόπιστη πληροφορία για το μηχανισμό ανταπόκρισης του οργανισμού στην κατανάλωση ενέργειας, την εξάντληση των μηχανισμών τροφοδοσίας (ATP, γλυκόλυση), το πιθανό οξειδωτικό στρες.

2.5.1. Μελέτες Βιολογικών Συστημάτων στην πράξη

Για την πραγματοποίηση αναλύσεων στα πεδία Omics απαιτούνται ισχυρές αναλυτικές μέθοδοι, ικανές να παράγουν το πλήρες προφίλ γονιδιώματος, μεταβολιτών, πρωτεϊνών από πολυσύνθετα βιολογικά δείγματα, τα οποία μπορεί να είναι από βακτηριακής μέχρι ανθρώπινης προέλευσης.

Η εισαγωγή διαταραχών και η παρατήρηση των επιδράσεών τους είναι ένας τρόπος για τη διεξοδική μελέτη και την απόκτηση γνώσης για το εξεταζόμενο σύστημα. Αυτή η προσέγγιση απαιτεί τη διεξοδική παρακολούθηση του συστήματος, έτσι ώστε οι επιδράσεις των διαταραχών να μπορούν να αναγνωριστούν και να ερμηνευθούν χωρίς λάθη. Αυτό σημαίνει ότι πρέπει να εντοπιστούν οι διαφορές που οφείλονται μόνο στην επιβαλλόμενη διαταραχή από μεταβολές γενικές οι οποίες μπορεί να οφείλονται στην ανάπτυξη του οργανισμού, τις αλλαγές εποχής κλπ. Αυτή είναι και η βασική απαίτηση για τη βαθύτερη κατανόηση του συστήματος. Σε μελέτες βιολογικών συστημάτων, οι διαταραχές αυτές μπορεί να είναι διαφόρων ειδών, όπως είναι:

1. τοξική προσβολή,
2. περιβαλλοντικές αλλαγές,
3. γενετική τροποποίηση ή
4. συγκεκριμένη ασθένεια.

Τέτοιες παρεμβολές έχουν αντίκτυπο σε μοριακό επίπεδο. Εξαιτίας της πολυπλοκότητας των βιολογικών δειγμάτων και της ευαισθησίας των σημερινών αναλυτικών συστημάτων, τα αποτελέσματα τέτοιου είδους μελετών είναι εξαιρετικά ογκώδη και πλούσια σε πληροφορία. Η πληροφορία αποτελείται από μεγάλο αριθμό συσχετιζόμενων μεταβλητών των οποίων η ερμηνεία είναι εξαιρετικά επίπονη.

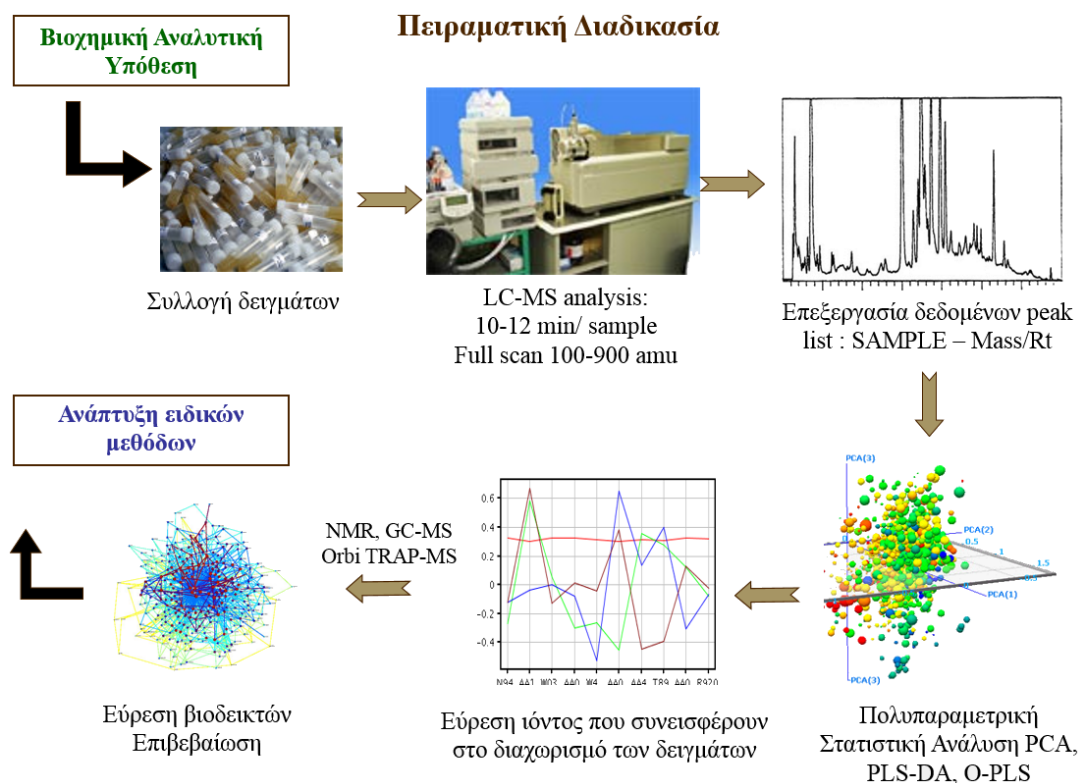
Για τη μελέτη όλων αυτών των μεταβλητών χρησιμοποιούνται, κυρίως, πολυπαραμετρικές μέθοδοι προβολής (παράγραφος 2.7), γιατί οι μέθοδοι αυτές είναι σχεδιασμένες να αντιμετωπίζουν ακριβώς αυτού του είδους τις καταστάσεις και έχει αποδειχθεί ότι είναι κατάλληλες για την επεξεργασία και ανάλυση δεδομένων από πολύπλοκα βιολογικά δείγματα. Για την πλήρη αξιοποίηση αυτών των μεθόδων, συχνά τα δεδομένα πρέπει να υποστούν προκατεργασία, ώστε να είναι κατάλληλα για την περαιτέρω ανάλυση.

Γι' αυτόν το λόγο είναι απαραίτητα σταθερά και ορθολογιστικά πρωτόκολλα επεξεργασίας δεδομένων, ώστε να διατηρούνται όλες οι απαραίτητες πληροφορίες που θα επιτρέψουν την αποτελεσματική πολυπαραμετρική ανάλυση. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να διεξαχθεί αξιόπιστη ανάλυση των δεδομένων, η οποία οδηγεί στη βαθύτερη κατανόηση του συστήματος υπό μελέτη. Η επεξεργασία δεδομένων στη μεταβολομική ανάλυση αναλύεται στο τέλος του κεφαλαίου.

2.5.2. Πορεία της μελέτης

Στο **Σχήμα 2.9** παριστάνεται η ολική πορεία της μεταβολομικής ανάλυσης με χρήση LC-MS. Ξεκινώντας από μια αρχική ιδέα (π.χ. τη μελέτη σταθερότητας δειγμάτων ούρων, τη μελέτη μεθόδων εκχύλισης, την ανακάλυψη βιοδεικτών αρθρίτιδας σε γονιδιακά τροποποιημένα ποντίκια), πρέπει τα δείγματα να συλλεχθούν σύμφωνα με αυστηρά προεπιλεγμένα κριτήρια, ώστε να εξαλειφθεί η πιθανότητα εισαγωγής μη απαραίτητων παραγόντων στατιστικού ή χημικού θορύβου. Για παράδειγμα, δείγματα αίματος τα οποία έχουν συλλεχθεί σε διαφορετικούς σωληνίσκους ή σύριγγες, μπορεί να παρουσιάσουν μεγάλες διαφορές στο προφίλ των μεταβολιτών λόγω διαφορετικών προσθέτων των σωλήνων/συρίγγων (όπως PEG) τα οποία δίνουν πολύ ισχυρό σήμα στο LC-MS.

Αντιστοίχως, δείγματα αίματος τα οποία συλλέγονται σε διαφορετική ώρα ή αφήνονται για παραλαβή ορού για διαφορετικό χρονικό διάστημα (κάποια δείγματα για 20 λεπτά, κάποια άλλα για 40 λεπτά) μπορεί να περιέχουν διαφορετικές συγκεντρώσεις βιομορίων, επειδή οι συγκεντρώσεις αυτών κυμαίνονται στη διάρκεια της ημέρας ή επειδή άλλαξαν στη διάρκεια της διαφορετικής διάρκειας αναμονής στον εργαστηριακό πάγκο. Τέτοια ευρήματα δεν προέρχονται από την πραγματική βιολογική/κλινική αιτία (π.χ. ασθένεια) και μπορεί να ακυρώσουν ακριβείς και πολύχρονες μελέτες, λόγω αύξησης της αβεβαιότητας. Σε συμβατική φαρμακοκινητική ανάλυση, η σταθερότητα του φαρμάκου μπορεί να ελεγχθεί με ειδική μελέτη. Αυτό, όμως, δεν είναι δυνατό για το σύνολο των ενδογενών μεταβολιτών ή πρωτεϊνών του δείγματος: γι' αυτόν το λόγο χρειάζεται επιμελής σχεδιασμός και προσοχή κατά την παραλαβή των δειγμάτων μελετών ΒΣ.



Σχήμα 2.9. Πορεία πραγματοποίησης μιας μεταβολομικής μελέτης με χρήση LC-MS

Εφόσον ακολουθηθεί ενδεδειγμένη και αναλυτικός πειραματικός σχεδιασμός, τα δείγματα αναλύονται στο LC-MS με ολική σάρωση στο φασματογράφο μαζών και βαθμωτή έκλουση στο χρωματογράφο, ώστε να συλλεχθεί όσο πιο πλούσιο προφίλ είναι δυνατόν: να εκλουσθούν και να μετρηθούν όσο περισσότερες ενώσεις γίνεται. Το χρωματογράφημα μοιάζει με κύβο που έχει στις τρεις διαστάσεις του: το χρόνο, την κλίμακα m/z και την ένταση σήματος. Τα δεδομένα εξετάζονται ως ιοντικό χρωματογράφημα και μελετάται η σταθερότητα του συστήματος με κριτήρια τη σταθερότητα απόκρισης του ανιχνευτή και τη σταθερότητα των χρόνων συγκράτησης. Μελετώνται δείγματα ελέγχου ποιότητας με ιδιαίτερη προσοχή. Εφόσον οι μετρήσεις είναι ικανοποιητικές, τα δεδομένα αναλύονται με ειδικό λογισμικό το οποίο συρρικνώνει τις δύο διαστάσεις: χρόνο και κλίμακα m/z , σε μία, την ταυτότητα της κορυφής, οπότε παράγεται πίνακας που περιέχει τις εντάσεις σήματος για κάθε κορυφή και δείγμα. Ο πίνακας εισάγεται για στατιστική ανάλυση με στόχο τη μελέτη τάσεων μεταξύ των δειγμάτων. Αν για παράδειγμα στη μελέτη παχυσαρκίας, μια χωριστή ομάδα που αντιπροσωπεύει δείγματα από παχύσαρκους ασθενείς/πειραματόζωα, μελετάται η αξιοπιστία του στατιστικού μοντέλου, η ικανότητα κατηγοριοποίησης και πρόβλεψης των δειγμάτων. Εάν αυτά είναι ικανοποιητικά, μελετώνται οι βιοδείκτες/μεταβλητές που ευθύνονται για την ομαδοποίηση. Ο αναλυτής αναζητεί ποιες κορυφές έχουν διαφορετική συγκέντρωση στις ομάδες και συνεισφέρουν στην αναλυτική τους διαφοροποίηση. Εφόσον οι δείκτες είναι αξιόπιστοι και επαναλήψιμοι, ακολουθεί μελέτη με επιπλέον τεχνικές για την εύρεση της δομής τους. Αυτό είναι συχνά το πιο δύσκολο τμήμα της μελέτης, όπου μπορεί να μην υπάρξει τελικό αποτέλεσμα. Η μελέτη ξεκινά με αναζήτηση σε τοπικές βιβλιοθήκες ή βιβλιοθήκες στο internet (massbank, HMDB, lipidMaps κλπ.) για εύρεση πιθανών μοριακών τύπων και δομών με βάση τη μετρούμενη μοριακή μάζα. Ακολουθούν επιπλέον αναλύσεις MS-MS για λήψη δομικής πληροφορίας (χαρακτηριστικά θραύσματα) ή σε ανεξάρτητες τεχνικές. Για να υπάρξει απόλυτη ταυτοποίηση πρέπει να αναλυθεί το δείγμα επιμολυσμένο με την υποψήφια ένωση και να παρατηρηθεί αύξηση σήματος και ταύτιση φασμάτων. Στο τέλος, οι επιβεβαιωμένοι βιοδείκτες πρέπει να τοποθετηθούν στη βιοσυνθετική οδό και να αποκαλυφθεί ο μηχανισμός αύξησης ή μείωσης της συγκέντρωσής τους στην κάθε περίπτωση.

Οι πορείες ανάλυσης και ανάπτυξης μεθόδου στη πρωτεομική περιέχουν κάποια αντίστοιχα στάδια, αλλά γενικά μπορεί να διαφέρουν πάρα πολύ (κεφάλαιο 12). Σε όλα τα πεδία της ΒΣ, μεγάλο κομμάτι της εργασίας (συνήθως, το περισσότερο χρονοβόρο) αποτελεί η επεξεργασία των δεδομένων για την ανάκτηση της πληροφορίας.

2.6. Επεξεργασία και ανάλυση δεδομένων

Η ανάκτηση της πληροφορίας από δεδομένα ανάλυσης ΒΣ δεν είναι εύκολη. Την τελευταία δεκαετία, η πρόοδος της αναλυτικής τεχνολογίας μάς έχει εφοδιάσει με αξιόπιστα όργανα τα οποία παράγουν τεράστιους όγκους δεδομένων υψηλής αξίας με ταχύτατους ρυθμούς (κάτι το οποίο ήταν και το ζητούμενο των αναλυτικών χημικών). Οι τεράστιοι αυτοί όγκοι δεδομένων και ο χειρισμός τους αποτελούν, πλέον, το μεγαλύτερο πρόβλημα που αντιμετωπίζει σήμερα και θα αντιμετωπίζει στο προσεχές μέλλον η επιστημονική κοινότητα που δραστηριοποιείται στη ΒΣ.

Για να έχει ο αναγνώστης μια εικόνα της διαδικασίας, αναπτύσσεται στη συνέχεια η διαδικασία επεξεργασίας δεδομένων στο πεδίο της μεταβολομικής. Στη μεταβολομική υπάρχει στροφή από τις τεχνικές του NMR προς τεχνικές που βασίζονται στο MS, κυρίως, λόγω του ότι η φασματοσκοπία μαζών είναι πιο ευαίσθητη και προσφέρει επιπλέον διαχωρισμό σε χρωματογραφικές και ηλεκτροφορητικές τεχνικές για την απόκτηση περιεκτικών δεδομένων. Οι τεχνικές MS προσφέρουν υψηλό ρυθμό παραγωγής δεδομένων και πολύ μεγάλο δυναμικό εύρος (μετρούν συγκεντρώσεις από mM έως 10^{-10} M).

Η επεξεργασία των δεδομένων είναι δύσκολη ακόμη και για δεδομένα NMR που είναι πιο απλά διδιάστατα δεδομένα (καταγραφή της έντασης σε σχέση με τη χημική μετατόπιση). Υπάρχει σοβαρή διένεξη σε σχέση με την καλύτερη μέθοδο για την ανάκτηση των δεδομένων (data extraction). Χρησιμοποιούνται τεχνικές χωρισμού του φάσματος σε μικρές περιοχές (binning) τα οποία στη συνέχεια εξετάζονται χωριστά αλλά και τεχνικές αναγνώρισης και ευθυγράμμισης κορυφών σε όλο το φάσμα (peak-picking and alignment). Για την επεξεργασία πολυδιάστατων δεδομένων LC-MS, GC-MS, η κατάσταση είναι, σαφώς, πιο περίπλοκη.

Το βασικό πρόβλημα με τις μεθόδους ανάκτησης δεδομένων είναι η έλλειψη προτυποποίησής τους: όταν γίνεται ανάκτηση από τα ίδια δεδομένα, με n διαφορετικές μεθόδους, μπορεί να ληφθούν n διαφορετικά σετ δεδομένων (datasets) και πιθανότατα n διαφορετικά στατιστικά μοντέλα (εάν ακολουθηθεί ένα και μόνο είδος στατιστικής ανάλυσης). Σε εφαρμογές στις οποίες λαμβάνουν χώρα μεγάλης κλίμακας αλλαγές, όπως για παράδειγμα σε μοντέλα τοξικότητας, οι διαφορές στη μέθοδο ανάκτησης δεδομένων ίσως να μην είναι τόσο επιδραστικές ως προς το τελικό αποτέλεσμα και τα τελικά ευρήματα μπορεί να είναι πρακτικά τα ίδια. Σε άλλες περιπτώσεις, όμως, όπου οι αλλαγές στο σύνολο των μεταβολιτών είναι ελάχιστες (π.χ. επιδημιολογικές μελέτες περιβαλλοντικής έκθεσης ανθρώπων), ακόμη και οι μικρές διαφοροποιήσεις στην επεξεργασία των δεδομένων μπορεί να έχουν δραματικό αντίκτυπο στα αποτελέσματα μιας μελέτης. Γι' αυτόν το λόγο χρειάζεται προσοχή και μεθοδικότητα κατά την επεξεργασία των δεδομένων, η οποία πρέπει να γίνει με τις ίδιες βασικές παραμέτρους για όλα τα δείγματα, εκτός εάν συντρέχει κάποιος σοβαρός και ειδικός λόγος.

Τεχνικές όπως η LC-MS, η GC-MS, και κυρίως η GCxGC-MS, έχουν ως αποτέλεσμα πολύ πιο πολύπλοκα δεδομένα (τριδιάστατα ή ακόμη και τετραδιάστατα) σε σχέση με τα δεδομένα του NMR. Επίσης, οι φασματογράφοι μάζας έχουν ένα πλήθος λειτουργιών και μεθόδων καταγραφής (acquisition modes) καθώς και άλλων παραμέτρων, οι οποίες αυξάνουν την πολυπλοκότητα των δεδομένων. Για παράδειγμα, υπάρχουν οι εξής περιπτώσεις:

1. Ανάκτηση δεδομένων σε centroid ή profile data acquisition mode.
2. Σταθερός χρόνος σάρωσης (όργανα τύπου TOF, Q) ή μεταβλητός (όργανα τύπου IT).
3. Θετική, αρνητική ή εναλλασσόμενη πολικότητα.
4. Σάρωση (full scan MS) ή επιλογή ιόντων (SIM MS).
5. Χαμηλή ή πολύ υψηλή διαχωριστική ικανότητα.
6. Την ικανότητα για συνδυασμό όλων των παραπάνω.
7. Τύποι δεδομένων και μέθοδοι καταγραφής μοναδικοί για το κάθε όργανο.

Τα διάφορα αυτοματοποιημένα εργαλεία εξαγωγής δεδομένων χρησιμοποιούν διαφορετικούς αλγόριθμους. Οι πιο συχνά απαντώμενες προσεγγίσεις περιλαμβάνουν τις εξής διεργασίες:

1. Ανίχνευση κορυφών και ολοκλήρωση, ακολουθούμενη από ευθυγράμμιση (alignment).
2. Στρέβλωση του επιπέδου (warping of the m/z –retention time plane (alignment at raw data level)), αφαίρεση σήματος υποβάθρου, ακολουθούμενη από εντοπισμό κορυφών και ολοκλήρωσή τους.

3. Αφαίρεση των ισοτοπικών κορυφών μετά τα βήματα 1 και 2 (de-isotoping of data).
4. Εξαγωγή μεταβολιτών με τη χρήση φασματοσκοπικών δεδομένων (deconvolution, φασματοσκοπικές βιβλιοθήκες, ακριβής μάζα, κλπ.).

Υπάρχουν περίπου 20 διαφορετικά υπολογιστικά εργαλεία για την αυτόματη εξαγωγή δεδομένων, εμπορικά και δωρεάν διαθέσιμα, τα οποία δίνονται στους **Πίνακες 2.1** και **2.2** αντίστοιχα.

Το τελικό αποτέλεσμα της εφαρμογής αυτών των λογισμικών είναι ο πίνακας δεδομένων που εξάγεται με μορφή xls, csv, txt, και εισάγεται για στατιστική ανάλυση.

ΟΝΟΜΑ	ΚΑΤΑΣΚΕΥΑΣΤΗΣ	ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ
BlueFuse	BlueGnome, Cambridge, UK	Metabolomics με δεδομένα MS και NMR
Chenomx NMR Suite	Chenomx, Edmonton, Canada	Metabolomics με δεδομένα NMR
Genedata Expressionist	Genedata, Basel, Switzerland	Πλατφόρμα για γενική χρήση σε τεχνολογίες –omics. Το τμήμα των metabolomics δέχεται δεδομένα MS
LineUp	Infometrix	Χρωματογραφική ευθυγράμμιση
MarkerLynx	Waters, Milford, MA, USA	Metabolomics με δεδομένα LC-MS
MarkerView	Applied Biosystems, Foster City, CA	Metabolomics με δεδομένα LC-MS
MassHunter Profiling Software	Agilent Technologies, Santa Clara, CA	Proteomics με δεδομένα LC-MS
Metabolic Profiler	Bruker Daltonic & Bruker Biospin, Billerica, MA, USA	Metabolomics με δεδομένα MS και NMR
MS Resolver	Pattern Recognition Systems, Bergen, Norway	Δεδομένα GC-MS και LC-MS
Profile	Phenomenone Discoveries, Saskatoon, Canada	Metabolomics με δεδομένα MS και NMR
Rosetta Elucidation	Rosetta Biosoftware, Seattle, WA, USA	Proteomics με δεδομένα LC-MS
Sieve	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	Proteomics με δεδομένα LC-MS

Πίνακας 2.1. Εμπορικά λογισμικά για την ανάλυση δεδομένων μεταβολομικής

2.7. Πολυπαραμετρική Στατιστική Ανάλυση

Μετά την αρχική επεξεργασία δεδομένων, ακολουθεί στατιστική ανάλυση με διάφορες πολυπαραμετρικές και μονοπαραμετρικές τεχνικές στατιστικής ανάλυσης. Για την ανάλυση δεδομένων μικροσυστοιχιών μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια πληθώρα στατιστικών μεθόδων, αλγορίθμων ταξινόμησης και διάκρισης των στοιχείων, τα οποία εντάσσονται στα πλαίσια της πολυπαραμετρικής ανάλυσης. Η πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση αφορά αλγορίθμους ανάλυσης δεδομένων που χρησιμοποιούν περισσότερες από μία μεταβλητές σε κάθε βήμα. Υπάρχουν δύο ευρείες κατηγορίες στατιστικής ανάλυσης που αναφέρονται ως επιβλεπόμενες και μη επιβλεπόμενες τεχνικές. Στις επιβλεπόμενες, η ανάλυση των αποτελεσμάτων προϋποθέτει τη γνώση των κατηγοριών στις οποίες ανήκουν τα δείγματα. Μ' αυτές τις μεθόδους γίνεται δυνατή η διάκριση γονιδίων, μεταβολιτών κ.ά. που διαφέρουν σε συγκεκριμένες καταστάσεις (παράδειγμα τέτοιας τεχνική είναι η SAM). Στις μη επιβλεπόμενες, τα δεδομένα αναλύονται ανεξαρτήτως διαθέσιμης πληροφορίας. Ουσιαστικά είναι μια «τυφλή» ανάλυση, που αποσκοπεί στην κατηγοριοποίηση των δεδομένων των πειραματικών μετρήσεων (παράδειγμα ή PCA και η HCL).

Στην πολυπαραμετρική ανάλυση, αλγόριθμοι ομαδοποίησης ταξινομούν τα δεδομένα και τις ομάδες, με βάση το διαχωρισμό τους σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης. Εφαρμόζονται διάφορες τεχνικές ομαδοποίησης: ιεραρχικές (hierarchical), όπου η ταξινόμηση που προκύπτει έχει έναν αυξανόμενο αριθμό εμφωλευμένων κλάσεων και το αποτέλεσμα μοιάζει με φυλογενετική ταξινόμηση, και μη ιεραρχικοί αλγόριθμοι (non – hierarchical), όπως ο k – means, οι οποίοι, απλώς, διαχωρίζουν τα αντικείμενα σε διαφορετικές ομάδες, χωρίς να προσπαθούν να βρουν τη σχέση μεταξύ των ξεχωριστών αντικειμένων, που αποτελεί και το ζητούμενο στις ιεραρχικές ομαδοποιήσεις.

ΟΝΟΜΑ	ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ	ΠΛΑΤΦΟΡΜΑ	ΤΥΠΟΣ ΑΔΕΙΑΣ
Chrompare	Metabolomics με δεδομένα GC-FID	Microsoft Excel Visual Basic	Διαθέσιμο για download
COMSPARI	Metabolomics με δεδομένα LC-MS και GC-MS	Γραμμένο σε γλώσσα C, για κάθε πρόσφατη πλατφόρμα, όπως Linux και Windows	GNU General Public Licence
Continuous profile models	Proteomics με δεδομένα LC-MS	Toolbox για το Matlab	Δωρεάν για εκπαιδευτική και ερευνητική χρήση, διαθέσιμος πηγαίος κώδικας
HiRes	Metabolomics με δεδομένα NMR	Γραμμένο σε γλώσσα C++, για Windows	Δωρεάν για εκπαιδευτικούς και κλινικούς σκοπούς
LCMSWARP	Proteomics με δεδομένα LC-MS και LC-MS/MS	Γραμμένο σε γλώσσα C++	Άγνωστο
MapQuant	Proteomics με δεδομένα LC-MS	Γραμμένο σε γλώσσα C, για Windows και Linux	Harvard University open-source compatible licence
MathDAMP	Metabolomics με δεδομένα LC-MS, GC-MS και CE-MS	Πακέτο για το Mathematica	Δωρεάν
metAlign	Για δεδομένα GC-MS και LC-MS	Windows	Δωρεάν
MET-IDEA	Metabolomics με δεδομένα LC-MS, GC-MS και CE-MS	Windows, πλατφόρμα .NET	Δωρεάν διαθέσιμο για ακαδημαϊκούς σκοπούς κατόπιν αίτησης
MSFACTs	Metabolomics με δεδομένα LC-MS και GC-MS	Γραμμένο σε Java	Δωρεάν διαθέσιμο για ακαδημαϊκούς σκοπούς κατόπιν αίτησης
MSight	Proteomics με δεδομένα LC-MS	Windows	Δωρεάν
msInspect	Proteomics με δεδομένα LC-MS	Γραμμένο σε Java, απαιτεί τη στατιστική γλώσσα R	Δωρεάν λογισμικό διαθέσιμο με άδεια Apache 2.0
MZmine	Metabolomics με δεδομένα LC-MS και GC-MS	Γραμμένο σε Java	GNU General Public Licence
SpecArray	Proteomics με δεδομένα LC-MS	Γραμμένο σε γλώσσα C, για Linux	GNU General Public Licence
Xalign	Proteomics με δεδομένα LC-MS	Γραμμένο σε γλώσσα C++	Διαθέσιμο μετά από αίτηση στον προγραμματιστή
XCMS	Metabolomics με δεδομένα LC-MS και GC-MS	Γραμμένο στη στατιστική γλώσσα R	GNU General Public Licence

Πίνακας 2.2. Δωρεάν διαθέσιμα λογισμικά για την ανάλυση δεδομένων metabolomics και proteomics

Η ιεραρχική ομαδοποίηση έχει το πλεονέκτημα ότι είναι σχετικά απλή και μπορεί να γίνει εύκολα αντιληπτή μέσω γραφημάτων. Είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος ανάλυσης δεδομένων γονιδιακής έκφρασης. Αποτελεί μια συνενωτική μέθοδο κατά την οποία το κάθε δεδομένο εντάσσεται σε ομάδες, οι οποίες ομαδοποιούνται και μεταξύ τους μέχρι να ολοκληρωθεί η διαδικασία η οποία θα δώσει ένα ιεραρχικό δένδρο. Η διαδικασία προχωρά με απλό τρόπο. Αρχικά, υπολογίζεται ένας πίνακας αποστάσεων για όλα τα γονίδια που πρέπει να ομαδοποιηθούν. Στη συνέχεια, ο πίνακας αποστάσεων εξερευνάται για την εύρεση των δύο πιο όμοιων γονιδίων ή ομάδων. Κάθε ομάδα περιέχει αρχικά ένα μόνο γονίδιο, δηλαδή, έχουμε τόσες ομάδες όσα και τα γονίδια. Αν υπάρχουν περισσότερα του ενός ζευγάρια με ίσες αποστάσεις, καλό θα ήταν να έχει καθοριστεί εκ των προτέρων ένας κανόνας απόφασης για τέτοιες περιπτώσεις. Τώρα, τα δύο γονίδια – ομάδες ενώνονται και παράγουν μια ομάδα με δύο μέλη το ελάχιστο. Συνεχίζοντας, επανυπολογίζονται οι αποστάσεις μεταξύ της νέας ομάδας και των υπόλοιπων ομάδων. Δεν είναι απαραίτητο να υπολογιστούν εκ νέου όλες οι αποστάσεις, παρά μόνον αυτές που συμπεριλαμβάνουν την ομάδα που σχηματίστηκε. Τέλος, επαναλαμβάνονται οι διαδικασίες σχηματισμού ομάδων με βάση τις αποστάσεις, μέχρι να ομαδοποιηθούν όλα τα δεδομένα σε μία και μόνο ομάδα.

Αν διαθέτουμε προχωρημένη γνώση για τον αριθμό των ομάδων στις οποίες πρέπει να διαχωριστούν τα δεδομένα μας, ο αλγόριθμος *k – means* είναι μια καλή εναλλακτική πρόταση στις ιεραρχικές μεθόδους. Εδώ τα δεδομένα χωρίζονται σε προκαθορισμένο αριθμό (*k*) ομάδων, έτσι ώστε τα δεδομένα να είναι παρόμοια εντός μιας ομάδας και ανόμοια μεταξύ διαφορετικών ομάδων. Ο αλγόριθμος δεν παράγει δένδρογράμματα.

Οι *SOM* (*self organizing maps*) είναι αλγόριθμοι οι οποίοι βασίζονται σε νευρωνικά δίκτυα και ανήκουν στις διαχωριστικές προσεγγίσεις. Ένας *SOM* διακρίνει τα γονίδια σε σειρά διαχωρισμών με βάση την ομοιότητα των διανυσμάτων έκφρασης σε σύγκριση με διανύσματα αναφοράς τα οποία καθορίζονται για κάθε διαχωρισμό.

Οπτικοποίηση είναι η τεχνική κατά την οποία δημιουργούνται γραφήματα τα οποία μας επιτρέπουν να εξάγουμε συμπεράσματα για τα δεδομένα μας. Ο ανθρώπινος νους μπορεί να αντιλαμβάνεται εικόνες σε τρισδιάστατο χώρο μόνο. Όταν τα δεδομένα ξεπερνούν τις τρεις διαστάσεις, δεν μπορούμε να κάνουμε αποτελεσματική διάκριση χαρακτηριστικών και προτύπων και να αντιληφθούμε τις τάσεις διαφοροποίησης μέσα στα δεδομένα. Για το λόγο αυτό έχουν εξελιχθεί αλγόριθμοι που μας επιτρέπουν να αντιληφθούμε πιο εύκολα τα δεδομένα. Γίνεται ειδική μορφοποίηση και τελική παρουσίαση των δεδομένων και, πλέον, γινόμαστε ικανοί να διακρίνουμε τα στοιχεία που μας ενδιαφέρουν. Στη συνέχεια της παραγράφου περιγράφονται εν συντομία μέθοδοι οπτικοποίησης οι οποίες χρησιμοποιούνται, συχνά, κατά την ανάλυση δεδομένων βιολογίας συστημάτων.

PCA (*principal component analysis – ανάλυση κυρίων συνιστωσών*). Πολλές από τις τεχνικές μέτρησης που χρησιμοποιούνται στις επιστήμες ζωής, συγκεντρώνουν δεδομένα για πολύ περισσότερες μεταβλητές ανά δείγμα, από τον αριθμό των δειγμάτων. Για παράδειγμα, οι μικροσυστοιχίες DNA μετρούν τα επίπεδα χιλιάδων mRNA από εκατοντάδες δείγματα. Αυτή η πολυδιάστατη συλλογή δεδομένων κάνει δύσκολη την οπτικοποίηση των δειγμάτων και περιορίζει την εξερεύνηση των δεδομένων. Η ανάλυση κύριων ή πρωταρχικών συνιστωσών είναι ένας μαθηματικός αλγόριθμος που μειώνει τις διαστάσεις των δεδομένων, ενώ ταυτόχρονα διατηρεί το μεγαλύτερο μέρος της πληροφορίας: επομένως, διατηρεί τη δυνατότητα απόκτησης γνώσης για τις αποκλίσεις μεταξύ δεδομένων άρα και δειγμάτων. Αυτό γίνεται δυνατό με το να αναγνωρίζει κατευθύνσεις οι οποίες ονομάζονται πρωταρχικές συνιστώσες, κατά μήκος της μέγιστης απόκλισης. Με βάση λίγες συνιστώσες, κάθε δείγμα αναπαριστάται από σχετικά λίγα νούμερα σε σχέση με τις τιμές των χιλιάδων μεταβλητών που έχουμε στην πραγματικότητα. Τα δείγματα τώρα, μπορούν να αναπαρασταθούν σε διάγραμμα και μπορούμε να δούμε ομοιότητες και διαφορές μεταξύ τους, αλλά και να τα ομαδοποιήσουμε.

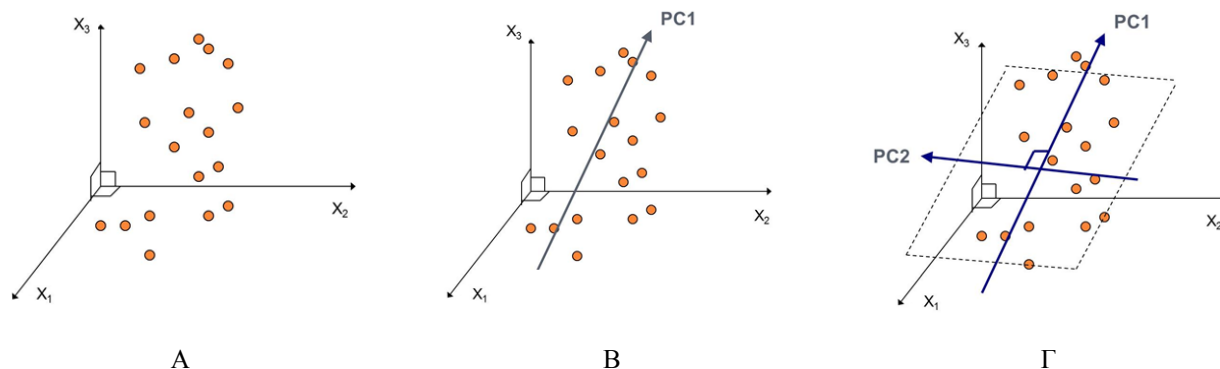
Η *PCA* είναι, δηλαδή, μια μέθοδος οπτικοποίησης των δεδομένων από τον πολυδιάστατο στο γεωμετρικό τρισδιάστατο (συνήθως) χώρο, έτσι ώστε να γίνονται πιο κατανοητά τα αποτελέσματα και ευρήματα. Η *PCA* μετατρέπει τον πειραματικό χώρο σε λιγότερες διαστάσεις βάσει του πίνακα συσχέτισης (*correlation matrix*) των δεδομένων, στηριζόμενη σε γραμμικό μετασχηματισμό. Στόχος είναι να μειωθούν οι διαστάσεις των δεδομένων, ενώ ταυτόχρονα διατηρείται το μεγαλύτερο μέρος της διακύμανσής τους, για να εντοπιστούν οι ομοιότητες και οι διαφορές μεταξύ των στοιχείων, όπως και οι ομαδοποιήσεις που προκύπτουν από το μεγάλο πλήθος των δεδομένων. Γίνεται προσπάθεια μελέτης όσο το δυνατόν λιγότερων μεταβλητών και συγκεκριμένα των πιο αντιπροσωπευτικών μεταβλητών του πειράματος, χωρίς να χαθεί σημαντική πληροφορία για το βαθμό συσχέτισης των αποτελεσμάτων. Αυτό είναι περισσότερο εφικτό όταν τα πειραματικά δεδομένα σχετίζονται πολύ μεταξύ τους και μπορούν να παραλειφθούν κάποια ή να υπολογιστεί ένας μέσος όρος. Στην περίπτωση που η συσχέτιση των αρχικών μεταβλητών δεν είναι μεγάλη, τότε η ανάλυση με *PCA* καθίσταται ακατάλληλη μέθοδος.

Η *PCA* ξεκινάει με τη δημιουργία του πίνακα των δεδομένων όπου σειρές του πίνακα είναι τα δείγματα που εξετάστηκαν και οι στήλες του είναι οι εξεταζόμενες μεταβλητές (αναλυτικό σήμα, αναλυόμενες ενώσεις). Ο αλγόριθμος της *PCA* ανακατασκευάζει τον αρχικό πίνακα μεταβλητών σε έναν πίνακα με μικρότερο αριθμό στηλών οι οποίες ονομάζονται κύριες συνιστώσες και ανταποκρίνονται στο γραμμικό συνδυασμό των αρχικών μεταβλητών. Οι νέοι άξονες είναι κάθετοι μεταξύ τους έτσι ώστε οι συντεταγμένες των παρατηρήσεων να είναι οι τιμές των κύριων συνιστωσών. Οι νέες μεταβλητές είναι γραμμικός συνδυασμός των αρχικών μεταβλητών. Η πρώτη συνιστώσα αντιστοιχεί στο άνυσμα που περιγράφει τη μέγιστη διαφοροποίηση μεταξύ των δειγμάτων. Η δεύτερη συνιστώσα είναι άνυσμα σε γωνία 90 μοιρών με την πρώτη συνιστώσα και εξηγεί τη δεύτερη μεγαλύτερη διακύμανση, δηλαδή τη μέγιστη διαφοροποίηση της διακύμανσης που δεν μπορεί να εξηγήσει η πρώτη συνιστώσα, και ούτω καθεξής με τις υπόλοιπες συνιστώσες.

Για να γίνει πιο αντιληπτός ο τρόπος λειτουργίας της PCA, περιγράφεται συνοπτικά η μελέτη συγκεκριμένης εργασίας. Η ανάλυση είχε ως αποτέλεσμα 704 κορυφές, σε 18 δείγματα. Ο αλγόριθμος της PCA θα δημιουργήσει ένα σύννεφο (Σχήμα 2.10Α), και θα τραβήξει το άνωμα κατά μήκος του μεγαλύτερου ποσοστού διακύμανσης των δεδομένων. Αυτό το άνωμα είναι η κύρια συνιστώσα 1 (Σχήμα 2.10Β). Έπειτα θα βρεθεί η αμέσως επόμενη κατεύθυνση με το μεγαλύτερο ποσοστό δεδομένων, αυτή, δηλαδή, που περιγράφει το 2ο μεγαλύτερο ποσοστό διαφοροποίησης. Αυτή θα είναι η δεύτερη συνιστώσα που θα είναι κάθετη στην πρώτη και τα δεδομένα θα μπορούν, πλέον, να προβληθούν σε διδιάστατο χώρο (Σχήμα 2.10Γ) σε μορφή επιπέδου, όπως δίνεται στα Σχήματα 2.6 και 2.8. Όταν προστεθεί η 3η κύρια συνιστώσα λαμβάνουμε τρισδιάστατα γραφήματα, όπως αυτό του Σχήματος 2.9. Από τις κύριες συνιστώσες, συνήθως, εξετάζονται ανά δύο ή ανά τρεις οι 4-5 πρώτες συνιστώσες οι οποίες εκφράζουν το μεγαλύτερο ποσοστό της διακύμανσης στα δεδομένα.

SAM (Significance Analysis of Microarrays). Η SAM είναι μια στατιστική μέθοδος η οποία χρησιμοποιείται, κυρίως, στη γονιδιωμική. Αναγνωρίζει γονίδια με στατιστικά σημαντικές αλλαγές στην έκφραση συνταυριάζοντας ένα σύνολο t tests τα οποία αφορούν συγκεκριμένα γονίδια. Κάθε γονίδιο παίρνει μια συγκεκριμένη τιμή που βασίζεται στην αλλαγή της έκφρασής του σχετικά με την τυπική απόκλιση επαναλαμβανόμενων μετρήσεων για το γονίδιο. Τα γονίδια με τιμές μεγαλύτερες από ένα δεδομένο όριο καθορίζονται ως, δυναμικώς, σημαντικά. Το ποσοστό αυτών των γονιδίων που θα προκύψουν τυχαία, αποτελεί το ρυθμό λανθασμένης ανακάλυψης (FDR), ο οποίος προσδιορίζεται από ανάλυση πολλαπλών συνδυασμών των μετρήσεων.

Support Vector Machine (SVM). Είναι αλγόριθμοι οι οποίοι μπορούν να μαθαίνουν από παραδείγματα και εκπαιδευτικά υποσύνολα δεδομένων, ώστε να αναγνωρίζουν και να κατηγοριοποιούν αντικείμενα και δείγματα. Βασική τους εφαρμογή στη βιοϊατρική είναι στην κατηγοριοποίηση δεδομένων γονιδιακής έκφρασης από πειράματα μικροσυστοιχιών. Αποτελούν επιβλεπόμενους αλγόριθμους οι οποίοι χρησιμοποιούν έναν αρχικό αριθμό δεδομένων για εκπαίδευση της συνάρτησής τους και, στη συνέχεια, είναι σε θέση να αναγνωρίσουν και να ξεχωρίσουν τα υπόλοιπα δεδομένα με βάση την έκφρασή τους. Με λίγα λόγια, ένα βασικό τους πλεονέκτημα είναι ότι χρησιμοποιούν βιολογικές πληροφορίες για να καθορίσουν τα στοιχεία έκφρασης τα οποία χρειάζονται για να χαρακτηρίσουν τις ομάδες και, μετά, είναι ικανοί να κατηγοριοποιήσουν οποιοδήποτε άλλο δείγμα/αντικείμενο.



Σχήμα 2.10. Α: Προβολή στο χώρο των δειγμάτων σε διάγραμμα κύριων συνιστωσών. Κάθε κουκκίδα αντιστοιχεί σε ένα δείγμα. Β: Κύρια συνιστώσα 1, περιγράφει ποσοστό διαφοροποίησης των δειγμάτων μεγαλύτερο από οποιαδήποτε άλλη συνιστώσα. Γ: Κύρια συνιστώσα 2, περιγράφει το 2^ο μεγαλύτερο ποσοστό διαφοροποίησης.

Αναφορές

Borovecki F. et al. (2005). *Genome-wide expression profiling of human blood reveals biomarkers for Huntington's disease*. PNAS;102, 11023-11028.

Faca V., Krasnoselsky A., Hanash S. (2007). *Innovative proteomic approaches for cancer biomarker discovery*, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA, USA BioTechniques, 43, 279–283

- Loftus N., Miseki K., Iida J., Gika H.G., Theodoridis G., Wilson I.D. (2008). *Profiling and Biomarker Identification in plasma from different Zucker rat strains via high mass accuracy multistage mass spectrometric analysis using liquid chromatography/mass spectrometry with a quadrupole ion trap-time of flight mass spectrometer*, Rapid Communications in Mass Spectrometry 22, 2547-2554.
- Pechlivanis A., Kostidis S., Saraslanidis P., Petridou A., Tsalis G., Mougios V., Gika H.G., Mikros E., Theodoridis G.A., (2010). *H-NMR-based metabolomic investigation of the effect of two different exercise sessions on the metabolic fingerprint of human urine*, J. Proteome Res., 9 6405-16.

Βιβλιογραφία

- Bolouri H. (2009). *Personal Genomics and Personalized Medicine*, Imperial College Press
- Brown T.A. (2002). *Genomes, 2nd edition*, Oxford: Wiley-Liss.
- Chadwick B.P. (2015). *Epigenetics: Current Research and Emerging Trends*, Caister Academic Press.
- Fuentes M., LaBaer J., (2014). *Proteomics: Targeted Technology, Innovations and Applications*, Caister Academic Press.
- Ginsburg G.S., Willard H.F. (2012). *Genomic and Personalized Medicine*, Second Edition: V1-2, Academic Press.
- Issaq H.J., Veenstra T.D. (2013). *Proteomic and Metabolomic Approaches to Biomarker Discovery*, Academic Press.
- Lindon J.C., Nicholson J.K. (2007). *The Handbook of Metabonomics and Metabolomics*, Elsevier.
- Liu Y. (2014). *Omics in Clinical Practice: Genomics, Pharmacogenomics, Proteomics, and Transcriptomics in Clinical Research*, Yu Liu, 2014, Apple Academic Press.
- Mishra N. (2010). *Introduction to Proteomics: Principles and Applications*, Willey.
- Twyman R., (2004). *Principles of Proteomics*, Taylor & Francis.

Δικτυογραφία

National Institutes of Health (NIH) Human Microbiome Project (HMP)	http://hmpdacc.org/
The Human Metabolome Database (HMDB)	www.hmdb.ca/
The Human Proteome Project	www.thehpp.org/
KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)	www.kegg.jp
LIPID MAPS Lipidomics Gateway	www.lipidmaps.org/
Proteomics Database	https://www.proteomicsdb.org/
ExpASY: SIB Bioinformatics Resource Portal	www.expasy.org
Gene Database	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene

Κεφάλαιο 3: Βιοφαρμακευτική Ανάλυση

Βικτωρία Σαμανίδου

Σύνοψη

Στο κεφάλαιο αυτό δίνονται στοιχεία που αφορούν σε θέματα φαρμακοκινητικής, βιοδιαθεσιμότητας και βιοϊσοδυναμίας φαρμακευτικών σκευασμάτων. Γίνεται αναφορά σε μελέτες που αφορούν το θεραπευτικό αποτέλεσμα, με παρακολούθηση της συγκέντρωσης του φαρμάκου στο αίμα, ώστε να βρεθεί η θεραπευτική δόση (therapeutic drug monitoring) αλλά και στον έλεγχο πρωτότυπων και γενόσημων φαρμάκων, πριν την άδεια έγκρισης για την κυκλοφορία τους στο εμπόριο.

Προαπαιτούμενη Γνώση

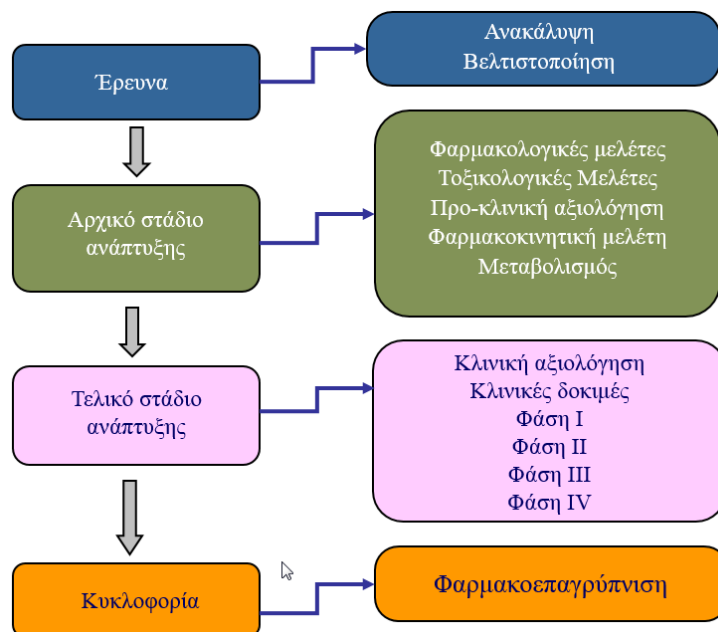
Πριν την ανάγνωση του κεφαλαίου, χρήσιμη γνώση για τον αναγνώστη μπορεί να βρεθεί σε συγγράμματα Ενόργανης Χημικής Ανάλυσης, Διαχωριστικών Τεχνικών και Φαρμακευτικής Ανάλυσης.

3.1. Εισαγωγή

Όλα τα προϊόντα τα οποία προορίζονται για κατανάλωση και χρήση από τον άνθρωπο, υπόκεινται σε διαδικασίες έρευνας, ανάπτυξης και έγκρισης κυκλοφορίας, μέσω των οποίων διασφαλίζεται η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητά τους. Στα προϊόντα αυτά συμπεριλαμβάνονται κυρίως, τα φάρμακα αλλά και συμπληρώματα διατροφής, καλλυντικά κ.ά.

Σύμφωνα με τους οργανισμούς FDA (Food and Drug Administration), EMEA (European Medicines Agency), ως **φάρμακο** ορίζεται οτιδήποτε προορίζεται για χρήση από τον άνθρωπο, με σκοπό να αντιμετωπίσει, θεραπεύσει, προλάβει και μετριάσει τα συμπτώματα ασθενειών.

Τα στάδια που πρέπει να περάσει ένα φάρμακο, από την ανακάλυψή του μέχρι να λάβει έγκριση από τις αρμόδιες αρχές και να διατεθεί στο εμπόριο, φαίνονται στο **Σχήμα 3.1**.



Σχήμα 3.1. Στάδια που απαιτούνται για την κυκλοφορία των φαρμάκων

Σε ό,τι αφορά την ποιότητα του φαρμάκου, ο έλεγχος περιλαμβάνει τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

- **Ταυτότητα δραστικού συστατικού:** Ένα φαρμακευτικό σκεύασμα πρέπει να περιέχει τη δραστική ουσία που αναγράφεται στη συσκευασία.

- **Καθαρότητα:** Να μην περιέχει προσμίξεις με πιθανές βλαβερές ουσίες.
- **Ικανότητα-Ισχύ:** Να κυμαίνεται στο 90–110% της αναγραφόμενης περιεκτικότητας.
- **Ομοιομορφία ως προς το χρώμα, τη μορφή και το μέγεθος:** Να περιέχεται η ίδια ποσότητα δραστικής ουσίας σε κάθε δοσολογική μονάδα και σε κάθε παρτίδα παρασκευής.
- **Σταθερότητα:** Να διατηρεί μέχρι την ημερομηνία λήξης του, τόσο την ποιότητά του, όσο και τη δραστικότητά του.
- **Ελεγχόμενη απελευθέρωση:** Να απελευθερώνονται τα δραστικά του συστατικά, έτσι ώστε να είναι πλήρως βιολογικά διαθέσιμα.

Τα φάρμακα διακρίνονται σε πρωτότυπα και γενόσημα. Τα **πρωτότυπα φάρμακα** είναι αποτέλεσμα μακροχρόνιας έρευνας των φαρμακοβιομηχανιών και καλύπτονται από δίπλωμα ευρεσιτεχνίας (πατέντα) για κάποιο χρονικό διάστημα, μέσα στο οποίο η φαρμακοβιομηχανία που τα έχει ανακαλύψει, κατέχει τα αποκλειστικά δικαιώματα κυκλοφορίας και εμπορικής εκμετάλλευσης. Μετά τη λήξη της πατέντας, μπορεί να γίνει παραγωγή αντιγράφου ή **γενόσημου φαρμάκου** από άλλη φαρμακοβιομηχανία.

Ως **γενόσημο (Generic)** θεωρείται κάθε φαρμακευτικό προϊόν που παρασκευάζεται με τον ίδιο τρόπο, ώστε να εξασφαλίζεται η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητά του, περιέχει την ίδια δραστική ουσία σε ίδια ποσότητα και είναι «ισοδύναμο» με το πρωτότυπο.

Στην αγορά, πλέον, εμφανίζονται ολοένα και περισσότερα φαρμακευτικά σκευάσματα διαφορετικών εταιριών, τα οποία έχουν την ίδια δραστική ουσία και την ίδια περιεκτικότητα. Το κύριο ερώτημα που προκύπτει είναι κατά πόσο μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα γενόσημα με την ίδια αποτελεσματικότητα στη θέση των πρωτοτύπων. Αν το δραστικό συστατικό αποδεδειχθεί και φτάνει στη γενική κυκλοφορία, με την ίδια ταχύτητα, στην ίδια έκταση, και στον ίδιο χρόνο (ισχύει η βιοϊσοδυναμία), τότε τα φαρμακευτικά σκευάσματα θεωρούνται ανταλλάξιμα, αφού παρουσιάζουν το ίδιο φαρμακολογικό (θεραπευτικό ή τοξικό) αποτέλεσμα. Θεωρητικά, το ζητούμενο για κάθε ασθενή είναι η επίτευξη και η διατήρηση ενός θεραπευτικού επιπέδου του φαρμάκου στο αίμα. Επιπλέον, τα εγκεκριμένα από τον Οργανισμό Φαρμάκων γενόσημα φάρμακα πρέπει να έχουν την ίδια μορφή δόσης, καθώς και την ίδια μορφή χορήγησης. Ένα γενόσημο φαρμακευτικό σκεύασμα διαφέρει από το πρωτότυπο μόνο στους παράγοντες μορφοποίησης (έκδοχα), όπου ως έκδοχα ορίζονται τα αδρανή (χωρίς φαρμακολογική δράση) υλικά μορφοποίησης.

Η φαρμακοβιομηχανία, λοιπόν, πρέπει να αποδείξει ότι το γενόσημο φάρμακο είναι **«βιοϊσοδύναμο»**, (bioequivalent) προς το πρωτότυπο. Η **βιοϊσοδυναμία** είναι ένας σχετικός όρος σύγκρισης ενός σκευάσματος με άλλο, η οποία ορίζεται με διαφορετικούς τρόπους.

- **Χημική Ισοδυναμία:** δηλώνει ότι δύο ή περισσότερα σκευάσματα (μορφές) περιέχουν τις δηλωθείσες ποσότητες φαρμάκου (εντός προκαθοριζόμενων ορίων).
- **Κλινική Ισοδυναμία:** ισχύει, όταν το ίδιο φάρμακο δύο ή περισσότερων φαρμακευτικών μορφών δίνει τα ίδια in vivo αποτελέσματα σχετικά με τη φαρμακολογική ανταπόκριση, ή με τον έλεγχο ενός συμπτώματος ή ασθένειας.
- **Θεραπευτική ισοδυναμία:** σημαίνει ότι μια ουσία διαφορετικής χημικής δομής μπορεί να δώσει το ίδιο κλινικό αποτέλεσμα με μια άλλη χημική ουσία. Στην περίπτωση αυτή τα φάρμακα είναι ανταλλάξιμα.
- **Φαρμακευτική ισοδυναμία:** σημαίνει ότι τα σκευάσματα έχουν ίδιο (με χημική και φυσική ισοδυναμία) δραστικό συστατικό, (active pharmaceutical ingredient-API), ίδια **μορφή δόσης** και **οδό χορήγησης**, ίδια **ισχύ** και συγκρίσιμη επισήμανση (**labeling**), ισοδυναμία σε σχέση με τη **φαρμακευτική ανάπτυξη**, ισοδυναμία σε σχέση με τη **σταθερότητα** και σε σχέση με την **παρασκευή τους**.

Η αξιολόγηση της θεραπευτικής ισοδυναμίας φαρμακευτικών γίνεται με τις λεγόμενες **μελέτες βιοϊσοδυναμίας**. Οι μελέτες αυτές απαιτούν σύγκριση της **βιοδιαθεσιμότητας** του νέου παρασκευάσματος με το σκεύασμα αναφοράς.

Η σύγκριση φαρμακοτεχνικών σκευασμάτων βασίζεται σε φαρμακοκινητικές μελέτες, δηλαδή, στον έλεγχο καμπυλών του επιπέδου του φαρμάκου στο αίμα, καθώς τα επίπεδα του φαρμάκου στο πλάσμα δίνουν αντιπροσωπευτικές πληροφορίες για τη δραστικότητα και την επικινδυνότητα των σκευασμάτων. Στην περίπτωση αυτή, εφόσον ισχύει η βιοδιαθεσιμότητα των δύο σκευασμάτων, οι καμπύλες των επιπέδων του φαρμάκου στο πλάσμα πρέπει να «συμπίπτουν» εντός λογικών ορίων. Είναι ευνόητο ότι η συγκέντρωση του

φαρμάκου στο αίμα πρέπει να είναι μικρότερη από την ελάχιστη τοξική και μεγαλύτερη από την ελάχιστη δραστική.

Υπάρχει διακριτή διαφορά στους όρους **βιοϊσοδυναμία** και **βιοδιαθεσιμότητα**. Η διαφορά αυτή θα πρέπει να τονιστεί στο σημείο αυτό για να γίνουν κατανοητές οι διάφορες μελέτες.

Βιοδιαθεσιμότητα, σύμφωνα με την FDA, είναι το μέγεθος και η ταχύτητα που απορροφάται και βρίσκεται διαθέσιμη, στον τόπο δράσης μια θεραπευτική δραστική ουσία, η οποία απελευθερώνεται από ένα σκεύασμα, μετά την από του στόματος λήψη. Ο προσδιορισμός της βιοδιαθεσιμότητας βασίζεται, κυρίως, σε μετρήσεις της συγκέντρωσης του δραστικού συστατικού στο πλάσμα ή στον ορό ή στα ούρα.

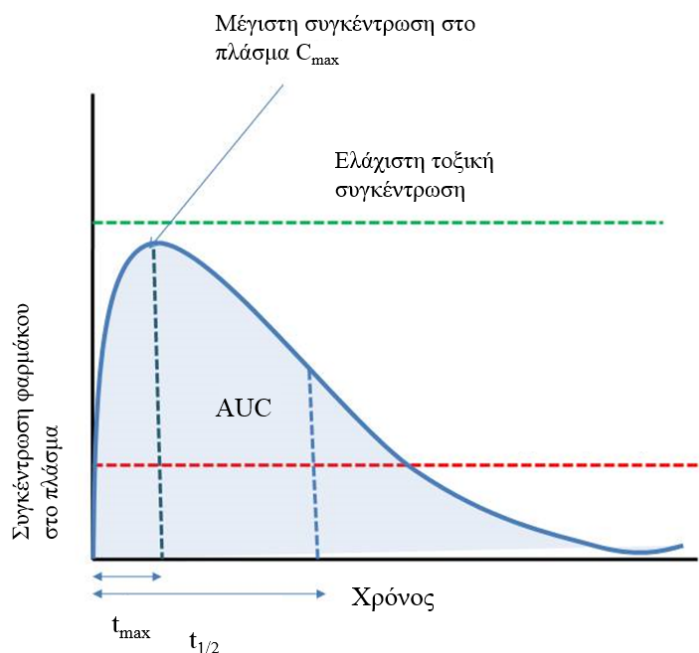
Η βιοδιαθεσιμότητα είναι ένας γενικός όρος, που δηλώνει το αποτέλεσμα της μέτρησης, του ολικού ποσού και του αληθούς ρυθμού με τον οποίον φτάνει το φάρμακο στη γενική κυκλοφορία μετά τη χορήγηση ενός φαρμακευτικού σκευάσματος.

Ως **απόλυτη βιοδιαθεσιμότητα** ορίζεται το ποσοστό της ολικής δόσης, η οποία φθάνει στην κυκλοφορία του αίματος και μπορεί να λάβει τιμές μεταξύ 0%, όταν το φάρμακο δεν απορροφάται καθόλου έως 100%, όταν όλη η χορηγηθείσα δόση φθάνει στην κυκλοφορία του αίματος.

Ως **σχετική βιοδιαθεσιμότητα ορίζεται** η βιοδιαθεσιμότητα ενός φαρμακευτικού προϊόντος σχετικά με τη βιοδιαθεσιμότητα ενός άλλου φαρμακευτικού προϊόντος (πρότυπο σκεύασμα αναφοράς). Η σχετική βιοδιαθεσιμότητα μπορεί να λάβει κάθε τιμή πάνω από μηδέν. Μπορεί να είναι μεγαλύτερη από τη μονάδα, όταν το φαρμακευτικό προϊόν υπό δοκιμή έχει βιοδιαθεσιμότητα μεγαλύτερη από αυτήν του προτύπου σκευάσματος αναφοράς.

Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοδιαθεσιμότητα εξαρτώνται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες των φαρμάκων, αλλά και από τα χαρακτηριστικά μορφής δόσης, καθώς και την παρουσία άλλων φαρμακευτικών συστατικών (έκδοχα).

Στο **Σχήμα 3.2** δίνεται η χαρακτηριστική καμπύλη επιπέδου φαρμάκου στο πλάσμα με το δραστικό και το τοξικό επίπεδο και τα φαρμακοκινητικά μεγέθη που καθιστούν δυνατή την εκτίμηση της βιοδιαθεσιμότητας.



Σχήμα 3.2. Χαρακτηριστική καμπύλη επιπέδου φαρμάκου στο πλάσμα με το δραστικό και το τοξικό επίπεδο. Φαρμακοκινητικά μεγέθη για την εκτίμηση της βιοδιαθεσιμότητας: Επιφάνεια κάτω από την καμπύλη (AUC), μέγιστη συγκέντρωση δραστικής ουσίας (C_{max}), χρόνος εμφάνισης μέγιστης συγκέντρωσης (t_{max}).

3.2. Διαδικασία Έρευνας και Ανάπτυξης φαρμάκων

Πριν την κυκλοφορία ενός φαρμάκου απαιτείται να γίνουν μακροχρόνιες **προκλινικές δοκιμές**, οι οποίες να επιβεβαιώνουν ότι μια ουσία θα έχει ουσιαστικά τα αναμενόμενα αποτελέσματα, σύμφωνα με κατάλληλα

περιθώρια ασφαλείας σε ζώα. Πριν τη χορήγηση του φαρμάκου στον άνθρωπο, ακολουθεί μια σειρά **κλινικών δοκιμών**, όπως καθορίζονται από τις αρμόδιες αρχές και τις αντίστοιχες επιτροπές δεοντολογίας για την αξιολόγηση κάθε ερευνητικού φαρμάκου, ώστε να καθοριστεί ο τρόπος με τον οποίο δρα και εάν είναι ασφαλές και αποτελεσματικό για τον άνθρωπο.

Το **πρώτο στάδιο των κλινικών δοκιμών (Phase I)** περιλαμβάνει τη χορήγησή του σε υγιείς εθελοντές (20-100). Αυτές οι δοκιμές ερευνούν την ασφάλεια του φαρμάκου και την αλληλεπίδρασή του με το σώμα, συμπεριλαμβανομένης της συγκέντρωσής του στο αίμα. Στο στάδιο αυτό μελετάται η απορρόφηση και η απομάκρυνση του φαρμάκου και έχει διάρκεια 1 έτος περίπου.

Στο **δεύτερο στάδιο των κλινικών δοκιμών (Phase II)** χορηγείται η δοσολογία που έχει προκύψει κατά το πρώτο στάδιο των δοκιμών σε μικρό αριθμό πασχόντων από την ασθένεια (100-300), π.χ. ένα αντικαρκινικό φάρμακο χορηγείται σε καρκινοπαθείς και γίνεται προσπάθεια να προσδιοριστεί η κατάλληλη δοσολογία για την παροχή αποτελεσματικής θεραπείας. Στο στάδιο αυτό μελετάται η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα του φαρμάκου. Οι ασθενείς παρακολουθούνται για τυχόν παρενέργειες. Το στάδιο αυτό έχει διάρκεια 2-4 έτη.

Εάν τα αποτελέσματα της δεύτερης φάσης κλινικών δοκιμών είναι ενθαρρυντικά, ακολουθεί **το τρίτο στάδιο κλινικών δοκιμών (Phase III)** σε μεγάλο αριθμό ασθενών (1000-3000) υπό ελεγχόμενες συνθήκες σε κλινικές και νοσοκομεία, έτσι ώστε να ληφθούν επιβεβαιωτικά στοιχεία που αφορούν την αποτελεσματικότητα και ασφάλεια του φαρμάκου και, παράλληλα, μελετώνται οι τυχόν υπάρχουσες παρενέργειες.

Τα στοιχεία που έχουν συλλεχθεί, συνιστούν το φάκελο που υποβάλλεται στις αρμόδιες αρχές και ακολούθως αναμένεται η έγκριση του φαρμάκου. Η διαδικασία αυτή διαρκεί 2-5 έτη. Μετά την έγκριση για εμπορική διάθεση, ακολουθεί ένα επιπλέον **στάδιο κλινικών δοκιμών, το τέταρτο στάδιο (Phase IV)**, ώστε να συλλεχθούν περισσότερα στοιχεία για το φάρμακο, με επιπλέον αριθμό εθελοντών.

Είναι ευνόητο ότι όλες οι κλινικές δοκιμές πρέπει να διεξάγονται σύμφωνα με τα υψηλότερα ιατρικά και δεοντολογικά πρότυπα και την Ορθή Κλινική Πρακτική (GCP, Good Clinical Practice), καθώς και με την εποπτεία θεσμικών επιτροπών δεοντολογίας.

3.3. Έλεγχος και εκτίμηση της Βιοϊσοδυναμίας

Η αξιολόγηση της θεραπευτικής ισοδυναμίας των φαρμακευτικών σκευασμάτων με ανάλογη σύνθεση (**γενόσημα φάρμακα-Generics**) επιτυγχάνεται με φαρμακοκινητικές μελέτες, δηλαδή, στηρίζεται στον έλεγχο καμπυλών του επιπέδου του φαρμάκου στο αίμα.

Οι *in vivo* μελέτες είναι, κυρίως, απαραίτητες ως προς την εκτίμηση της ανταλλαγής φαρμακευτικών σκευασμάτων με ανάλογη σύνθεση. εξετάζουν, συνήθως, τρεις φαρμακοκινητικές παραμέτρους: C_{max} , T_{max} και επιφάνεια κάτω από την καμπύλη $AUC_{0-\infty}$. Όταν οι διαφορές είναι <20%, τότε τα σκευάσματα θεωρούνται ανταλλάξιμα.

Η επιφάνεια αυτή μεταβάλλεται ανάλογα με την ποσότητα της δραστικής ουσίας που απελευθερώνεται από ένα σκεύασμα, ενώ από το **ύψος της μέγιστης συγκέντρωσης** (C_{max}) λαμβάνονται πληροφορίες για το μέγεθος της δράσης. Ο **χρόνος μέχρι την εμφάνιση της κορυφής μέγιστης συγκέντρωσης** (t_{max}) καθορίζεται, κυρίως, από την ταχύτητα απελευθέρωσης της δραστικής ουσίας από το σκεύασμα και από την ταχύτητα απορρόφησης της δραστικής ουσίας. Η σύγκριση της δόσης, του ρυθμού και του βαθμού της απορρόφησης του εξεταζόμενου σκευάσματος επιτυγχάνεται πολύ εύκολα και με μεγάλη αξιοπιστία μέσω της χρήσης σύγχρονων τεχνικών ανάλυσης, όπως είναι η HPLC, η LC-MS κ.ά.

Για τις μελέτες βιοϊσοδυναμίας απαιτείται η εύρεση ενός σημαντικού αριθμού εθελοντών, οι οποίοι να πληρούν κάποιες προϋποθέσεις σε ό,τι αφορά την ηλικία, κατάσταση υγείας, συνηθειών κλπ. Στη συνέχεια και σύμφωνα με το πρωτόκολλο, γίνεται η χορήγηση του φαρμάκου παρουσία των υγειονομικών αρχών, του κλινικού, εργαστηριακού και του γενικού υπεύθυνου της μελέτης. Δείγματα αίματος λαμβάνονται σε προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα, τα οποία υφίστανται την κατάλληλη προκατεργασία και διατηρούνται σε κατάλληλες συνθήκες μέχρις ότου αναλυθούν. Τα πειράματα εκτελούνται σε εγκεκριμένα εργαστήρια σύμφωνα με συγκεκριμένο πρωτόκολλο, ενώ η ανάλυση των δειγμάτων γίνεται με επικυρωμένη στατιστικά μέθοδο.

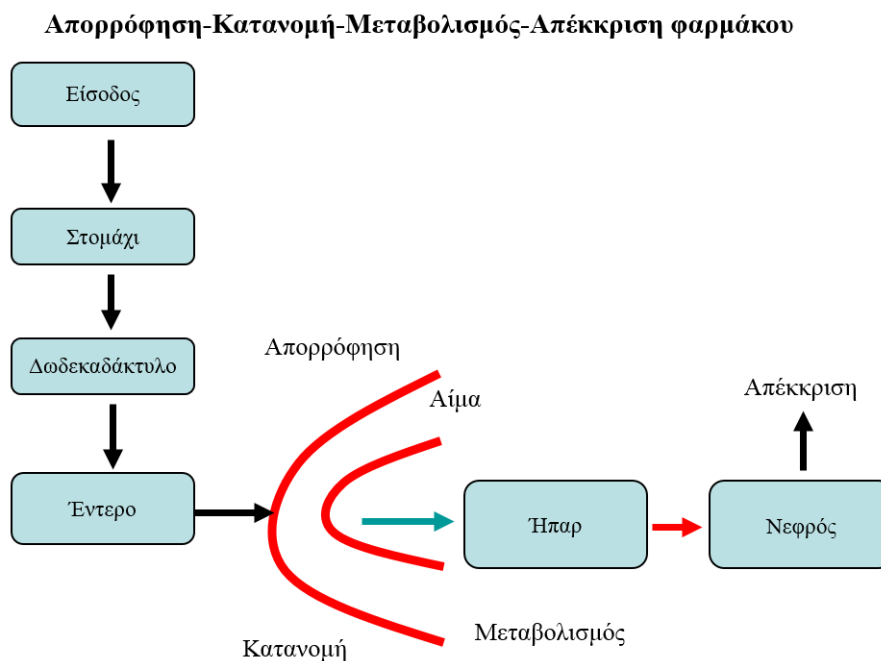
Στην ανάπτυξη ενός νέου φαρμάκου απαιτούνται: 1. δοκιμές σε πειραματόζωα, 2. δοκιμές σε ανθρώπους (κλινικές δοκιμές) και 3. μελέτες βιοδιαθεσιμότητας. Στην περίπτωση των γενοσήμων απαιτούνται μελέτες βιοϊσοδυναμίας.

3.4. Φαρμακοκινητική-Φαρμακολογικές μελέτες

Ως φαρμακολογικές αναφέρονται οι μελέτες που αφορούν στην *Απορρόφηση* (Absorption) του φαρμάκου, η οποία σχετίζεται με την καλή διαλυτότητα και τη δυνατότητα να διαπερνά τις μεμβράνες, στην *Κατανομή* (Distribution), στο στόχο, στο *Μεταβολισμό* (Metabolism), και στην *Απέκκριση* (Excretion) που αφορά την ισορροπία μεταξύ μεταβολιτών και απέκκρισης αρχικής ένωσης (**Σχήμα 3.3**).

Για να εκτιμηθούν τα χαρακτηριστικά αυτά απαιτούνται:

- Για την **απορρόφηση**: *in vivo* φαρμακοκινητικά προφίλ.
- Για την **κατανομή**: *in vitro* μελέτες δέσμησης με πρωτεΐνες και, *in vivo* μελέτες κατανομής σε ιστούς.
- Για το **μεταβολισμό**: χαρακτηρισμός μεταβολιτών, μελέτη αναστολής - P450, σταθερότητα στα μικροσωμάτια κλπ., και
- Για την **απέκκριση**: ποσοτικός προσδιορισμός του φαρμάκου και των μεταβολιτών στα βιολογικά υγρά.



Σχήμα 3.3. Πορεία του φαρμάκου στον οργανισμό

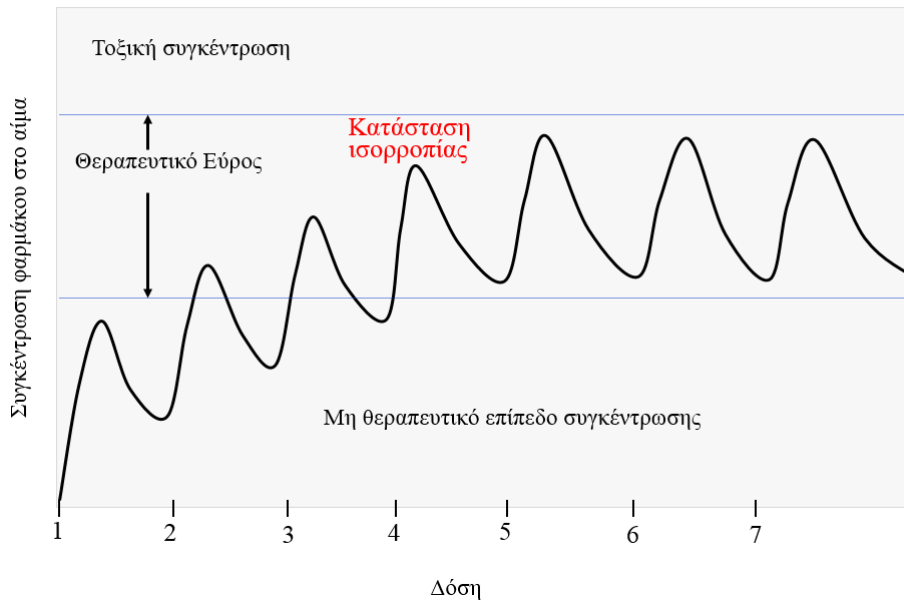
3.5. Θεραπευτική Παρακολούθηση Φαρμάκου

Τα περισσότερα φάρμακα έχουν ένα ευρύ θεραπευτικό φάσμα και μπορούν να συνταγογραφηθούν με βάση προκαθορισμένα σχήματα δοσολογίας, χωρίς να είναι, συνήθως, απαραίτητο να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του φαρμάκου στην κυκλοφορία του αίματος. Υπάρχουν, όμως, φάρμακα για τα οποία η αποτελεσματικότητα της θεραπείας αξιολογείται με συνεχείς μετρήσεις των επιπέδων του φαρμάκου στο αίμα. Η αξιολόγηση αυτή ονομάζεται **Θεραπευτική παρακολούθηση φαρμάκου (Therapeutic Drug Monitoring, TDM)** και συνίσταται στη μέτρηση συγκεκριμένων φαρμάκων σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα, ώστε να παρακολουθείται η διατήρηση μίας σχετικά σταθερής συγκέντρωσης του φαρμάκου στην κυκλοφορία του αίματος. Φάρμακα τα οποία απαιτούν παρακολούθηση είναι αυτά που έχουν ένα στενό "θεραπευτικό εύρος": αυτό σημαίνει ότι η απαραίτητη ποσότητα φαρμάκου για να είναι αποτελεσματική, δεν απέχει πολύ από την ποσότητα που προκαλεί σημαντικές παρενέργειες και / ή σημάδια τοξικότητας.

Η διατήρηση αυτής της σταθερής κατάστασης είναι υποχρεωτική, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 3.4**. Στα φάρμακα αυτά παίζει σημαντικό ρόλο η εξατομίκευση της δοσολογίας, δεδομένου ότι η απορρόφηση, ο

μεταβολισμός, η χρήση, και ο ρυθμός απέκκρισής τους διαφέρουν σε κάθε άτομο, ανάλογα με την ηλικία, τη γενική κατάσταση της υγείας, γενετικούς παράγοντες αλλά και την πιθανή παράλληλη χορήγηση άλλων φαρμάκων. Ακόμη άλλοι παράγοντες, όπως η εγκυμοσύνη, προσωρινές ασθένειες, λοιμώξεις, συναισθηματική και σωματική καταπόνηση, ατυχήματα και χειρουργικές επεμβάσεις μπορεί να επηρεάσουν την ποσότητα του φαρμάκου που απαιτείται για σταθερή συγκέντρωση στο αίμα: παρατηρείται, δηλαδή, τέτοια μεταβολή με την πάροδο του χρόνου, ώστε να διαφέρει από μέρα σε μέρα.

Κατάσταση ισορροπίας (steady-state)



Σχήμα 3.4. Επίπεδα συγκέντρωσης του φαρμάκου στο πλάσμα αίματος κατά τη θεραπευτική παρακολούθηση

Για το βιοαναλυτικό χημικό η παρακολούθηση της θεραπευτικής αγωγής έχει την έννοια του ποσοτικού προσδιορισμού των επιπέδων του φαρμάκου στο αίμα, ενώ για το γιατρό τα επίπεδα αυτά σχετίζονται με την παρακολούθηση του θεραπευτικού αποτελέσματος.

Η παρακολούθηση της πορείας του φαρμάκου στο αίμα και άρα η παρακολούθηση της Φαρμακευτικής Θεραπευτικής Αγωγής είναι ιδιαίτερα σημαντική στις περιπτώσεις φαρμάκων με χαμηλό θεραπευτικό δείκτη. Ως θεραπευτικός δείκτης (TI=therapeutic index) ορίζεται ο λόγος της θανατηφόρας (lethal dose), προς την αποτελεσματική δόση (ED):

$$\text{Θεραπευτικός δείκτης (TI)} = \text{LD}_{50} / \text{ED}_{50}$$

Φάρμακα με χαμηλό θεραπευτικό δείκτη π.χ. η διγοξίνη, η φαινοβαρβιτάλη, το λίθιο, κάποια αντιβιοτικά όπως π.χ. η αμικασίνη, διάφορα ανοσοκατασταλτικά κ.ά., χορηγούνται μόνο σε σοβαρές περιπτώσεις, καθώς η τοξικότητά τους είναι σημαντική και ο στόχος είναι πάντα να επιτυγχάνεται το θεραπευτικό αποτέλεσμα με τις λιγότερες πιθανότητες για παρενέργειες στον οργανισμό.

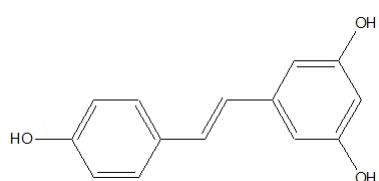
Αντίθετα, δεν απαιτείται θεραπευτική παρακολούθηση για ενώσεις με υψηλό θεραπευτικό δείκτη, όπως τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη (NSAIDs), τα περισσότερα αντιβιοτικά, τα ηρεμιστικά, οι βενζοδιαζεπίνες κ.ά.

Τα κριτήρια που μελετώνται κατά τη θεραπευτική παρακολούθηση του φαρμάκου περιλαμβάνουν:

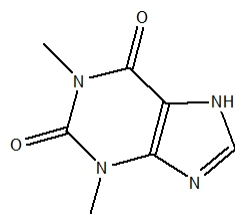
1. Την αναλογία της συγκέντρωσης του φαρμάκου στο αίμα προς την τοξικότητα.
2. Την αναλογία ανάμεσα στη συγκέντρωση του φαρμάκου στο αίμα και στη δόση του φαρμάκου.
3. Κλινικές ενδείξεις που αφορούν μη συμβατότητα, πιθανή τοξικότητα, μη ανταπόκριση του οργανισμού στη θεραπευτική αγωγή.

Οι in-vivo παράγοντες που επηρεάζουν τα επίπεδα του φαρμάκου είναι η συμβατότητα του ασθενούς, η βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου, το ποσοστό ελεύθερου και δεσμευμένου σε πρωτεΐνες φαρμάκου και η φαρμακοκινητική. Η συγκέντρωση του φαρμάκου στο αίμα επηρεάζεται, επίσης, από αλληλεπιδράσεις με τη διατροφή, τη συγχορήγηση άλλων φαρμάκων, τη λιποδιαλυτότητα (λιποδιαλυτές ενώσεις βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στο αίμα), και από ενζυμικές δράσεις και βιομετατροπές μέσω μεταβολισμού στο ήπαρ (π.χ. οξείδωση, αναγωγή, υδρόλυση που έχουν ως αποτέλεσμα την εισαγωγή πολικών ομάδων στο μόριο του φαρμάκου). Φυσιολογικοί παράγοντες, όπως η ηλικία, αναμένεται να επηρεάσουν τα επίπεδα του φαρμάκου στο αίμα. Προβλήματα στη νεφρική και ηπατική λειτουργία μπορούν να επηρεάσουν, επίσης, το μεταβολισμό.

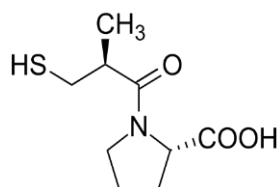
Τα φάρμακα που, συνήθως, απαιτούν παρακολούθηση ανήκουν στις ακόλουθες ομάδες: καρδιοδραστικά φάρμακα, αντιεπιληπτικά φάρμακα, αντιβιοτικά (π.χ. αμινογλυκοσίδες), αντικαρκινικά φάρμακα, ανοσοκατασταλτικά, αντικαταθλιπτικά (π.χ. τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά), βρογχοδιασταλτικά (θεοφυλλίνη), αντιψυχωσικά, αντιεπιληπτικά, κλπ. Στο **Σχήμα 3.5** δίνονται οι χημικές δομές των κυριότερων φαρμάκων που απαιτούν θεραπευτική παρακολούθηση.



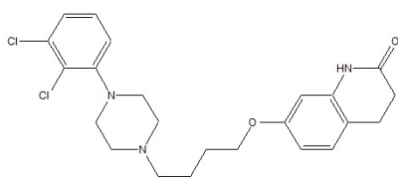
Ρεσβερατρόλη



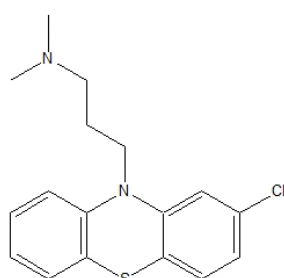
Θεοφυλλίνη



Καπτοπρίλη

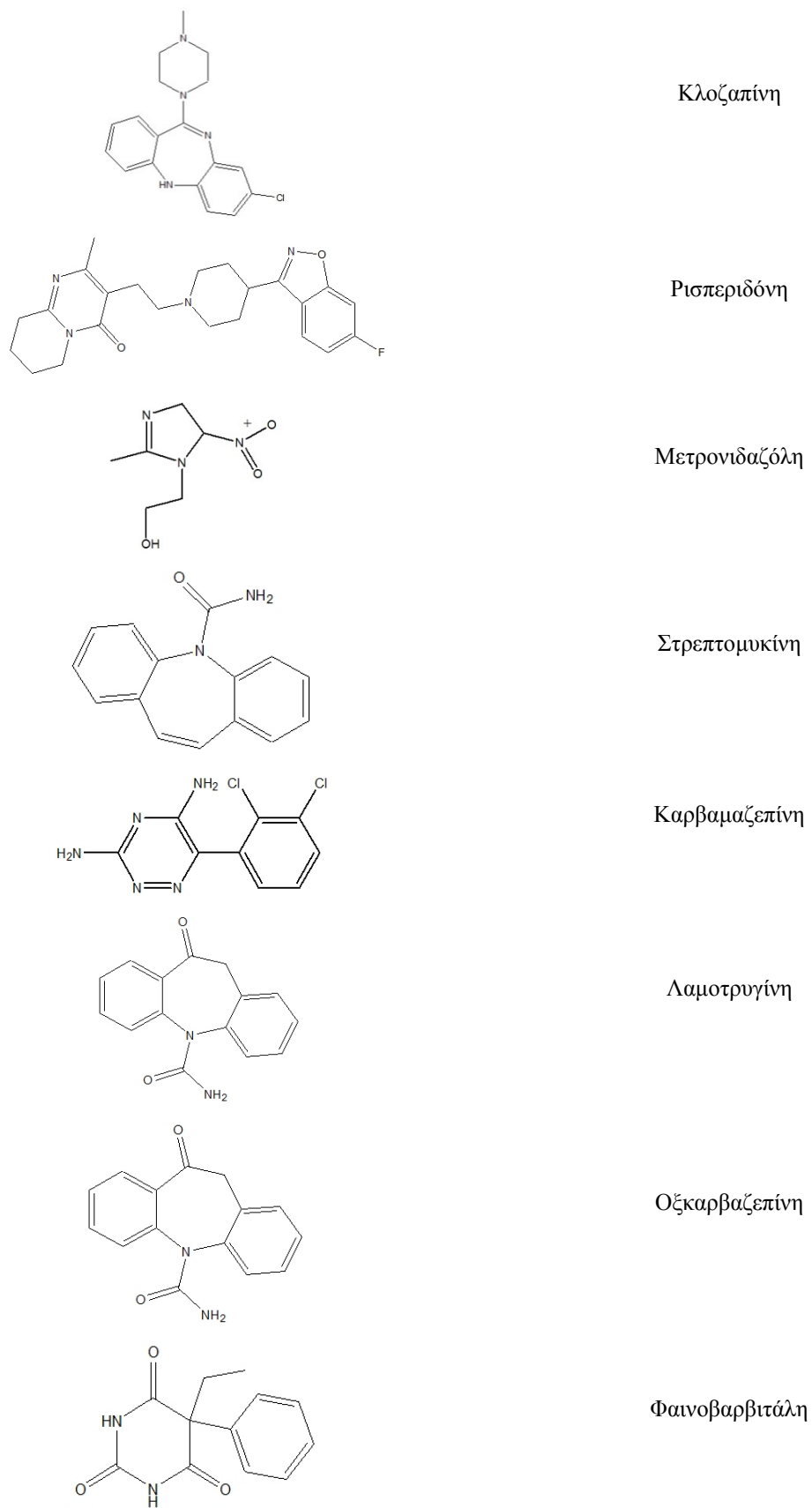


Αριπιπραζόλη

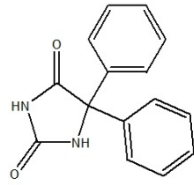


Χλωροπρομαζίνη

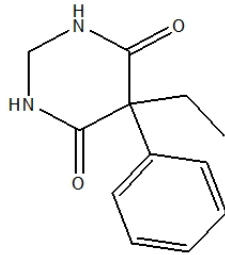
Σχήμα 3.5. Χημικές δομές των κυριότερων φαρμάκων που απαιτούν θεραπευτική παρακολούθηση



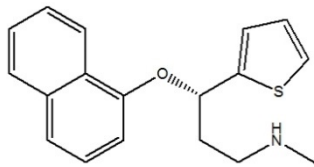
Σχήμα 3.5. Χημικές δομές των κυριότερων φαρμάκων που απαιτούν θεραπευτική παρακολούθηση



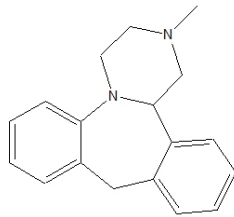
Φαινυτοΐνη



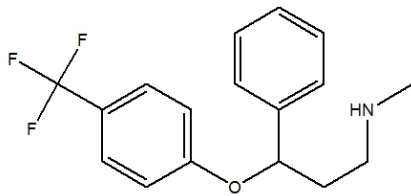
Πριμιδόνη



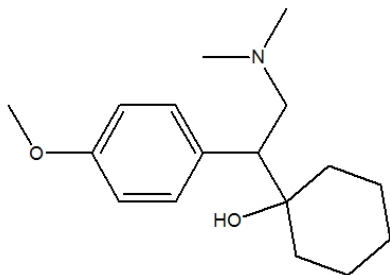
Δουλοξετίνη



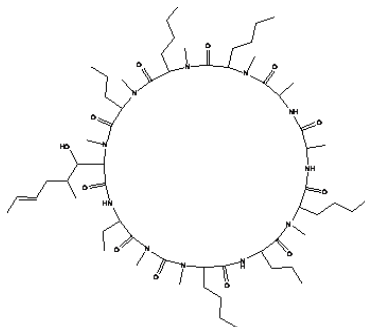
Μιανσερίνη



Βενλαφαξίνη



Φλουοξετίνη



Κυκλοσπορίνη

Σχήμα 3.5. Χημικές δομές των κυριότερων φαρμάκων που απαιτούν θεραπευτική παρακολούθηση

Τα επίπεδα του φαρμάκου στο αίμα προσδιορίζονται με αιμοληψία σε τακτά χρονικά διαστήματα. Ειδικότερα, προσδιορίζεται η συγκέντρωση του φαρμάκου στο αίμα με χρήση διαφόρων αναλυτικών τεχνικών.

Οι διαθέσιμες αναλυτικές μέθοδοι για την παρακολούθηση των επιπέδων φαρμάκου σε δείγματα ασθενών σε ανθρώπινο αίμα ή ορό / πλάσμα περιλαμβάνουν: ανοσοενζυμικές τεχνικές, όπως (MEIA, EMIT, FPIA, RIA, ELISA κλπ.), χρωματογραφικές τεχνικές (HPLC-UV, HPLC-MS, HPLC-MS/MS). Τα τελευταία χρόνια πολύ ισχυρή είναι η τάση εφαρμογής της τεχνικής HPLC-MS/MS, η οποία σχεδόν μονοπωλεί το πεδίο.

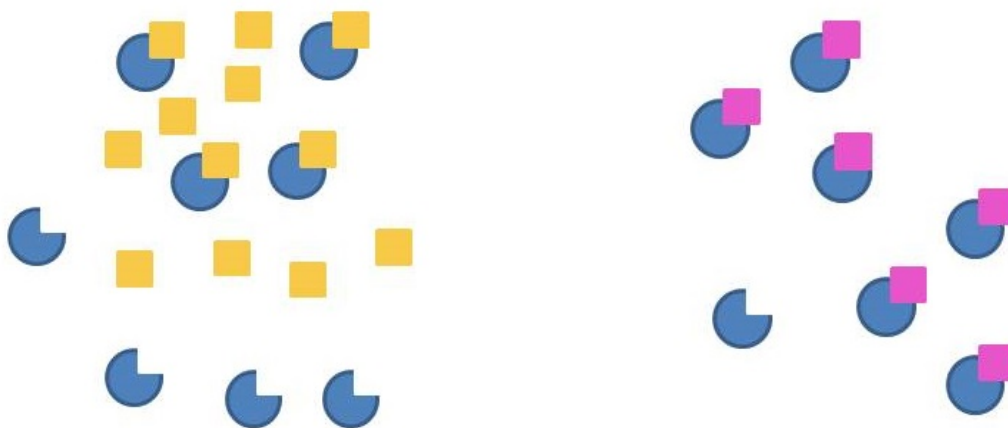
3.6. Δέσμευση Φαρμάκων από Πρωτεΐνες

Όταν ένα φάρμακο εισέρχεται στον οργανισμό, κατανέμεται στα συστατικά του αίματος ή στις πρωτεΐνες του πλάσματος. Ένα μέρος του φαρμάκου δεσμεύεται από τις πρωτεΐνες του πλάσματος. Το ποσοστό του φαρμάκου δε δεσμεύεται από τις πρωτεΐνες, κυκλοφορεί ελεύθερο και μεταφέρεται από το αίμα σε διάφορα όργανα όπου διαχέεται σε διαφορετικό βαθμό, όπως φαίνεται και στο **Σχήμα 3.6**.

Οι πρωτεΐνες του πλάσματος που έχουν την ιδιότητα να δεσμεύουν τα φάρμακα, είναι περισσότερες από εξήντα. Οι κυριότερες από αυτές είναι: η αλβουμίνη, η αλφα-όξινη πρωτεΐνη (AAG) και οι λιποπρωτεΐνες.

Η αλβουμίνη είναι μια πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 66.300 που αποτελεί το 60% της ολικής ποσότητας πρωτεΐνης του πλάσματος και παρουσιάζει τη δυνατότητα να δεσμεύει τόσο ανιονικά όσο και κατιονικά φάρμακα. Είναι υδατοδιαλυτή και εμφανίζει ισοηλεκτρικό σημείο σε pH 5, επομένως σε φυσιολογικό pH είναι αρνητικά φορτισμένη και τα όξινα φάρμακα δεσμεύονται στο αμινο-τελικό άκρο. Η πρωτεΐνη αυτή συντίθεται στο ήπαρ και έχει χρόνο ημίσειας ζωής δεκαεννιά ημέρες.

Η AAG είναι μια πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 40.000 που συντίθεται και μεταβολίζεται στο ήπαρ και έχει χρόνο ημίσειας ζωής 5,5 ημέρες. Έχει την ιδιότητα να δεσμεύει βασικά και ουδέτερα φάρμακα και σπανιότερα ορισμένα όξινα. Έχει αναφερθεί ότι τα φάρμακα που δεσμεύονται και από την αλβουμίνη, αλλά και από την AAG, έχουν μεγαλύτερη συγγένεια ως προς την AAG.



(α) Ελεύθερο δραστικό φάρμακο π.χ. διαζεπάμη

(β) Ελεύθερο δραστικό φάρμακο π.χ. φαινυταΐνη

Σχήμα 3.6. Δέσμευση φαρμάκων με πρωτεΐνες πλάσματος

Οι λιποπρωτεΐνες είναι μια ετερογενής ομάδα πρωτεϊνών με μέσο μοριακό βάρος 2.500.000. Πιο συγκεκριμένα οι λιποπρωτεΐνες κατατάσσονται σε τέσσερις ή πέντε ομάδες ανάλογα με το φορτίο ή την πυκνότητά τους αντίστοιχα. Στις λιποπρωτεΐνες δεσμεύονται, κυρίως, ουδέτερα και βασικά φάρμακα, ενώ τα όξινα φάρμακα δεσμεύονται σε περιορισμένη έκταση.

Σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρείται αλλαγή στην ικανότητα δέσμευσης της πρωτεΐνης. Η αλλαγή αυτή ενδέχεται να οφείλεται σε παράγοντες που επηρεάζουν τη συγκέντρωση των πρωτεϊνών καθώς, επίσης, σε παράγοντες που συμβάλλουν στη μεταβολή της διαμόρφωσης της πρωτεΐνης ή στη μετατόπιση του σημείου δέσμευσης της πρωτεΐνης. Η διαφοροποίηση της ικανότητας δέσμευσης των πρωτεϊνών έχει

μεγαλύτερες επιπτώσεις σε φάρμακα με μεγάλη ικανότητα δέσμευσης (<90%) σε θεραπευτικές συγκεντρώσεις και σε φάρμακα με μικρού εύρους θεραπευτικές ενδείξεις. Τέτοιες αλλαγές μπορεί να είναι μη αναμενόμενες ή μη προβλέψιμες και να οδηγήσουν σε δραστικές αλλαγές στη συγκέντρωση του φαρμάκου σε έναν οργανισμό είτε με αύξηση είτε με μείωση της ελεύθερης συγκέντρωσης που κυκλοφορεί στο αίμα.

Η συγκέντρωση του μη δεσμευμένου φαρμάκου είναι ιδιαίτερα σημαντική γιατί συνδέεται άμεσα με την επίδρασή του στον οργανισμό, δεδομένου ότι το μη δεσμευμένο φάρμακο είναι διαθέσιμο για να προσεγγίσει τους υποδοχείς σε όργανα / κύτταρα. Συνήθως, προσδιορίζεται η ολική ποσότητα του φαρμάκου (δεσμευμένη και μη) προκειμένου να διαπιστωθεί, εάν η ποσότητα που λαμβάνεται είναι σε επιτρεπτά όρια είτε από άποψη αποτελεσματικότητας είτε από άποψη τοξικότητας. Είναι, όμως, σαφές ότι η χρήση μεθόδων για τον προσδιορισμό του ποσοστού δέσμευσης του φαρμάκου στις πρωτεΐνες είναι απαραίτητες.

Ως μέθοδοι που έχουν χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της δέσμευσης του φαρμάκου από τις πρωτεΐνες αναφέρονται: η διαπίδυση (equilibrium dialysis), η υπερδιήθηση (ultrafiltration) και η διήθηση πηκτής (gel filtration). Οι παραπάνω μέθοδοι μπορεί να είναι χρονοβόρες, επίπονες και μερικές φορές μη συμβατές με το δείγμα ή το διαθέσιμο όγκο. Η τεχνική της διαπίδυσης είναι απλή και έχει τη δυνατότητα να χρησιμοποιείται για την ανάλυση πολλαπλών δειγμάτων, ωστόσο παρουσιάζει το μειονέκτημα ότι είναι αναγκαία μια περίοδος αναμονής σχεδόν δώδεκα ωρών προκειμένου να φτάσει το σύστημα σε κατάσταση ισορροπίας, γεγονός που συμβάλλει στην ενδεχόμενη αποσύνθεση μη σταθερών ουσιών ή μπορεί να ευνοήσει τη δημιουργία βακτηρίων. Η μέθοδος της υπερδιήθησης είναι, ευρέως, διαδεδομένη. Συγκριτικά με τη διαπίδυση ισορροπίας έχει το πλεονέκτημα ότι διαρκεί λιγότερο χρόνο, είναι απλή, τα υλικά είναι εμπορικά και δε λαμβάνουν χώρα φαινόμενα αραίωσης. Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιεί σχετικά υψηλού κόστους αναλώσιμα υλικά και εμφανίζει ένα σημαντικό σφάλμα μεθόδου· εφόσον ένα μέρος της υδατικής φάσης αναγκάζεται να απομακρυνθεί από το χώρο που κατανέμεται η πρωτεΐνη, κατά το διάστημα εφαρμογής το διάλυμα της πρωτεΐνης συμπυκνώνεται και κατά αυτόν τον τρόπο αυξάνεται η δέσμευση του φαρμάκου. Η τεχνική της διήθησης με πηκτή (Gel Filtration) είναι μια διαχωριστική τεχνική, η οποία τα τελευταία χρόνια έχει σχετικά περιορισμένη εφαρμογή στην εκτίμηση του ποσοστού δέσμευσης φαρμάκων καθώς έχουν αναφερθεί εφαρμογές της χρωματογραφίας συγγένειας της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης και της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (SPME, Solid Phase Micro-Extraction). Η εφαρμογή της τελευταίας θα αναπτυχθεί εν συντομία στη συνέχεια.

Η SPME, ως γνωστό, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εκχύλιση στην κατάσταση ισορροπίας ή σε καθορισμένη χρονική στιγμή, γεγονός που αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματά της. Όταν λαμβάνει χώρα εκχύλιση σε καθορισμένη χρονική στιγμή του χημικού συστήματος, η ποσότητα της ουσίας η οποία εκχυλίζεται από το υδατικό διάλυμα είναι αμελητέα. Στην προκειμένη περίπτωση και εάν θεωρηθεί ότι το σύστημα είναι ενός διαμερίσματος (one-compartment) και η κινητική πρώτης τάξης, τότε η συγκέντρωση στην επιφάνεια της ίνας είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης στο υδατικό διάλυμα:

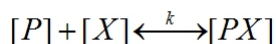
$$\frac{d[X]_{SPME}}{dt} = k_1[X]_a - k_2[X]_{SPME}$$

όπου $[X]_{SPME}$ είναι η συγκέντρωση στην επιφάνεια της ίνας, $[X]_a$ είναι η συγκέντρωση στην υδατική φάση και k_1 και k_2 είναι οι σταθερές των λόγων πρόσθεσης και απομάκρυνσης αντίστοιχα.

Στην κατάσταση ισορροπίας, η συγκέντρωση στην επιφάνεια της ίνας είναι ανάλογη της συγκέντρωσης στην υδατική φάση και του συντελεστή κατανομής (distribution coefficient):

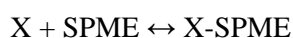
$$K_{SPME}(X) = \frac{[X]_{SPME}}{[X]_a} = \frac{k_1}{k_2}$$

Η δέσμευση ενός φαρμάκου από μια πρωτεΐνη είναι μια αμφίδρομη αντίδραση μεταξύ ενός μορίου του φαρμάκου και μιας πρωτεΐνης που περιγράφεται ως εξής:



όπου [P] είναι η συγκέντρωση της ελεύθερης πρωτεΐνης, [X] είναι η συγκέντρωση του ελεύθερου φαρμάκου (μη δεσμευμένου) και [PX] είναι η συγκέντρωση του συμπλόκου φάρμακο«πρωτεΐνη».

Στην περίπτωση όπου η εκχύλιση είναι μερική και όχι εξαντλητική, η ισορροπία μεταξύ της πρωτεΐνης και του φαρμάκου ουσιαστικά δε διαταράσσεται, αφού μόνο το μη δεσμευμένο φάρμακο θα εκχυλιστεί από την ίνα και η ισορροπία που θα αποκατασταθεί κατά την εκχύλιση, θα είναι η εξής:



Η συγκέντρωση του ελεύθερου φαρμάκου στο δείγμα μπορεί να προσδιοριστεί από τη συγκέντρωση στην ίνα, βάσει μιας ήδη υπολογισμένης σταθεράς (K_{SPME}) του φαρμάκου για ισορροπία με καθαρή υδατική φάση και SPME ή μέσω μιας καμπύλης αναφοράς από υδατική φάση για συγκεκριμένο χρόνο έκθεσης της ίνας.

Σε ένα υδατικό δείγμα το οποίο περιέχει το φάρμακο, η εφαρμογή της SPME έχει ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση μιας πολύ μικρής ποσότητας της προσδιοριζόμενης ένωσης (περί το 2-5%), γεγονός που δεν εκτρέπει την ισορροπία. Η χρήση SPME για τη μέτρηση της συγκέντρωσης ελεύθερου φαρμάκου, συνήθως, γίνεται σε τεχνητό υπόστρωμα π.χ. ισοτονικό διάλυμα πρωτεϊνών, αλλά, όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο επικύρωσης (Κεφ. 15), η χρήση πραγματικού υποστρώματος, σε τέτοιες μελέτες δείγματος πλάσματος αίματος είναι η πιο αποδεκτή τακτική.

3.7. Βιοφάρμακα

Τα βιοφάρμακα, όπως μονοκλωνικά αντισώματα και γενικότερα πρωτεΐνες, αποτελούν, πλέον, τη νέα τάση στη φαρμακευτική και χρησιμοποιούνται ολοένα και περισσότερο στην ιατρική παρέχοντας τη δυνατότητα θεραπείας ασθενειών, όπως ο καρκίνος και πολλά αυτοάνοσα νοσήματα, σακχαρώδης διαβήτης, αναιμία κλπ. Αναμένεται στο μέλλον 7 στα 10 φάρμακα να είναι αντισώματα.

Λόγω της πολυπλοκότητας των μορίων που προέρχεται και από την ετερογένειά τους αποτελούν πρόκληση για τον αναλυτικό χημικό. Αξίζει δε να τονιστεί ότι τόσο για τον προσδιορισμό τους, όσο και για το χαρακτηρισμό τους εφαρμόζονται τεχνικές χρωματογραφίας υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων, αποκλεισμού μεγέθους, ιοντοανταλλαγής κλπ.

Μέρος της έρευνας στη βιοφαρμακευτική βασίζεται στη δυνατότητα των πρωτεϊνών να ανταποκρίνονται ως συστήματα άμυνας του οργανισμού. Τα μονοκλωνικά αντισώματα αναγνωρίζουν συγκεκριμένες πρωτεΐνες και η δράση τους εξαρτάται από τις πρωτεΐνες στόχους τους. Η χρήση των μονοκλωνικών αντισωμάτων (mAb) στη θεραπευτική προσφέρει φάρμακα με μεγάλη εξειδίκευση στη δραστηρότητά τους.

Ενώ η κλασική φαρμακευτική έρευνα εστιάζεται σε μικρού μεγέθους μόρια, όπως π.χ. η παρακεταμόλη, η ασπιρίνη κλπ., τα βιοφάρμακα είναι μεγάλου μεγέθους και πολύπλοκα μόρια με αποτέλεσμα να μην είναι εύκολος ο χαρακτηρισμός και ο ποσοτικός προσδιορισμός τους. Έτσι, ενώ για παράδειγμα η μοριακή μάζα της ασπιρίνης είναι 180 Da, τα βιοφάρμακα, όπως το Avastin Remicade Herceptin, Enbrel, έχουν μοριακή μάζα η οποία φθάνει τα 148-150 kDa.

Στον **Πίνακα 3.1** δίνονται συγκριτικά τα χαρακτηριστικά των φαρμάκων και των βιοφαρμάκων.

Χαρακτηριστικά	Φάρμακα	Βιοφάρμακα
Σύνθεση	Χημική	Προϊόντα βιοτεχνολογίας από ζώντες οργανισμούς
Σύσταση	Γνωστή	Πολύπλοκη
Μοριακή μάζα	100-1500 Da	2000-2000000 Da
Δραστικές ομάδες	1-5	10-2000
Σταθερότητα	Σχετικά σταθερά μόρια	Σχετικά έως σημαντικά ευκίνητα

Πίνακας 3.1. Συγκριτικά χαρακτηριστικά φαρμάκων και βιοφαρμάκων

Βιβλιογραφία

- Brodie B.B. & Heller W.M, (1972). *Bioavailability of Drugs*, S. Karger, New York.
- Chiou W.L. (2001). *The rate and extent of oral bioavailability versus the rate and extent of oral absorption: clarification and recommendation of terminology*. Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics, 28(1), 3-6.
- Guidelines for biopharmaceutical studies in man*. A.Ph.A. Academy of Pharmaceutical Science, Washington, DC. Feb. 1972.
- Samanidou V.F. & Karageorgou E.G. (2009). *Recent Developments in Drug monitoring by HPLC*, In Andreev B., Egorov V. (eds) Handbook of Drug Targeting and Monitoring, Nova Science Publishers Inc., NY., ISBN: 978-1-60741-839-9.
- Wagner J.G. (1969). *Design of Clinical Studies to Access Physiological Bioavailability*, Drug Inf. Bull. Jan./June, 45.
- Γεωργαράκης Μ. (2009). *Μέθοδοι Ελέγχου Φαρμάκων*, Έκδοση: 004/2009, ISBN: 960-317-004-6, Εκδότης: Όλγα Σιμώνη (December 2014), <http://www.virbac.gr/p-virbacgrpugr/pdf/2FarmacocineticN.pdf> (December 2014).

Δικτυογραφία

- <http://www.fda.gov/cder/ogd/index.htm> (December 2014).
- http://www.ifet.gr/site_lab/article.htm (December 2014)
- <http://www.med.uoa.gr/pharmacology/Anakoinwseis/Pharmacologyproblems2012dalla.pdf> (December 2014)
- http://www.medicalrecords.gr/debe_2010/slides/Day%201/016.Georgarakis.pdf

Κεφάλαιο 4: Βιολογικά Υποστρώματα

Βικτωρία Σαμανίδου

Σύνοψη

Τα βιολογικά δείγματα αποτελούν ενδιαφέροντα υποστρώματα για τοξικολογικές μελέτες, φαρμακοκινητικές μελέτες, μελέτες μεταβολισμού, κλινική ανάλυση, διαγνωστική κλπ. Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφονται τα προβλήματα και οι ιδιαιτερότητες των βιολογικών υποστρωμάτων που παρατηρούνται στη βιοανάλυση. Δίνονται τα χαρακτηριστικά των κυριότερων βιολογικών δειγμάτων, τόσο των συμβατικών, όπως είναι το αίμα-πλάσμα και τα ούρα, αλλά και μη συμβατικών ή εναλλακτικών δειγμάτων, όπως οι τρίχες, οι όνυχες κλπ. Ακόμη, περιγράφονται τα προβλήματα ή οι αναλυτικές δυνατότητες που προσφέρονται από τη δέσμευση ενώσεων (π.χ. φαρμάκων) σε πρωτεΐνες ή DNA.

Προαπαιτούμενη Γνώση

Πριν την ανάγνωση του κεφαλαίου, χρήσιμη γνώση για τον αναγνώστη μπορεί να βρεθεί σε συγγράμματα *Κλινικής Χημείας, Κλινικής Ανάλυσης και Βιοχημείας*.

4.1. Εισαγωγή

Τα βιολογικά υποστρώματα είναι δείγματα που προέρχονται από ζωντανούς οργανισμούς π.χ. τον άνθρωπο, τα ζώα, τα φυτά, τους μικροοργανισμούς ή παράγονται με βιοτεχνολογικές μεθόδους και έχουν μεγάλο ενδιαφέρον στην:

- Τοξικολογία: σε τοξικολογικές μελέτες, όπως γενotoξικότητα, οξεία τοξικότητα, χρόνια τοξικότητα, τοξικότητα αναπαραγωγής, ανάπτυξης, καρκινογένεσης.
- Στη φαρμακευτική σε φαρμακοκινητικές μελέτες, σε κλινικές δοκιμές, μελέτες βιοδιαθεσιμότητας και βιοϊσοδυναμίας.
- Στη βιοϊατρική σε μελέτες μεταβολισμού, κλινικές αναλύσεις, μελέτες θεραπευτικού αποτελέσματος με παρακολούθηση συγκέντρωσης φαρμάκου στο αίμα, ώστε να βρεθεί η θεραπευτική δόση, στη διαγνωστική.

Τα πλέον χρησιμοποιούμενα βιολογικά δείγματα είναι το **αίμα-πλάσμα** και τα **ούρα** τα οποία είναι δείκτες έκθεσης σε κάποιο φάρμακο (συνήθως) τις τελευταίες 2 μέρες πρόσληψής του. Τα περισσότερα εργαστήρια προτιμούν τα προαναφερόμενα δείγματα, λόγω της υψηλότερης συγκέντρωσης των ενώσεων και των μεταβολιτών τους, αλλά και της εύκολης λήψης τους. Ωστόσο έχουν, το μειονέκτημα της εύκολης νοθείας και της αντικατάστασής τους. Για το λόγο αυτό και άλλα υποστρώματα μπορούν, επίσης, να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες. Έτσι τα βιολογικά δείγματα ταξινομούνται σε **συμβατικά** και **μη συμβατικά-εναλλακτικά**. Στη συνέχεια, θα γίνει σύντομη αναφορά στα διάφορα βιολογικά υποστρώματα και ειδικότερα σε ό,τι αφορά στη σύστασή τους και στη σημασία τους στη βιοανάλυση.

4.2. Συμβατικά Βιολογικά Υποστρώματα

4.2.1. Αίμα

Το αίμα χαρακτηρίζεται ως το βιολογικό υλικό που προσφέρει την καλύτερη συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης μίας ουσίας και της ληφθείσας δόσης. Ο όρος ολικό αίμα αναφέρεται στο αίμα εκείνο, το οποίο συνδυάζεται με έναν αντιπηκτικό παράγοντα κατά τη διαδικασία συλλογής και θεωρείται ένα ειδικά τυποποιημένο προϊόν για μετάγγιση ή για περαιτέρω επεξεργασία για αναλυτικούς σκοπούς.

Το ανθρώπινο αίμα αποτελείται από το **πλάσμα**, μέσα στο οποίο περιέχονται τρεις τύποι κυττάρων: τα **ερυθρά αιμοσφαίρια** ή ερυθροκύτταρα, τα **λευκά αιμοσφαίρια** ή λευκοκύτταρα και τα θραύσματα κυττάρων ή **αιμοπετάλια**, ή θρομβοκύτταρα. Περιέχει, επίσης, αέρια, όπως το οξυγόνο, το διοξείδιο του άνθρακα και το άζωτο και μεταφέρει σε μικρές ποσότητες μια μεγάλη ποικιλία διαλυμένων χημικών ουσιών, στις οποίες περιλαμβάνονται υδατάνθρακες (γλυκόζη), πρωτεΐνες (λευκώματα), ορμόνες, λίπη, ανόργανοι

ηλεκτρολύτες και αζωτούχες ενώσεις. Η σύστασή του αποτελείται κατά 22 % από στερεά και κατά 78 % από νερό (Σχήμα 4.1).

Το **πλάσμα αίματος** είναι υποκίτρινο υγρό το οποίο αποτελεί τη βάση του συνδετικού ιστού του κυκλοφορικού συστήματος, ως άμορφο συστατικό, "υδαρές υπόστρωμα", του αίματος. Το πλάσμα περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες πλάσματος, νερό κατά 90% περίπου και διάφορους διαλύτες, αυτά που ονομάζουμε αιμοσφαίρια και τα οποία αποτελούν και το 45% του συνολικού όγκου του αίματος. Στο πλάσμα αίματος περιλαμβάνεται και το ινωδογόνο με προσθήκη αντιπηκτικών παραγόντων, όπως ηπαρίνη, EDTA, οξαλικά άλατα κλπ.

Ο **ορός** μοιάζει με το **πλάσμα** στη σύνθεση, αλλά στερείται τους θρομβωτικούς παράγοντες πήξης. Προτιμάται σε πολλές δοκιμές, δεδομένου ότι τα αντιπηκτικά στο πλάσμα, ενδεχομένως, παρεμποδίζουν τα αποτελέσματα.

Πλάσμα

91% νερό,

7% πρωτεΐνες (ινωδογόνο, αλβουμίνη, σφαιρίνη)

2% θρεπτικά συστατικά αμινοξέα, σάκχαρα, λιπίδια, ομόνες, ηλεκτρολύτες

Ερυθρά αιμοσφαίρια

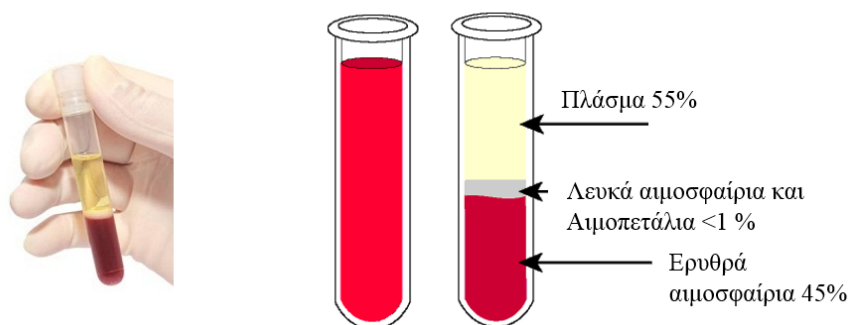
(μεταφορά οξυγόνου)

Λευκά αιμοσφαίρια

(ανοσοποιητικό σύστημα)

Αιμοπετάλια

(πήξη αίματος)



Σχήμα 4.1. Σύσταση του αίματος

Το αίμα στη βιοανάλυση έχει τα εξής μειονέκτηματα:

- Οι συγκεντρώσεις των φαρμάκων είναι σε μερικές περιπτώσεις χαμηλές και ανιχνεύσιμες για σύντομο χρονικό διάστημα.
- Δεν υπάρχει πάντα συσχέτιση των κλινικών αποτελεσμάτων με τη συγκέντρωση στο αίμα.
- Σε περιπτώσεις φαρμάκων με μεγάλο ποσοστό κατανομής, και πιο συγκεκριμένα σε αυτά που έχουν βασικά δραστικά συστατικά, είναι προτιμότερη η ανάλυση άλλων βιολογικών δειγμάτων, όπως τα ούρα.

4.2.2. Ούρα

Ο μεταβολισμός των ενώσεων δημιουργεί πολλά υποπροϊόντα τα οποία απομακρύνονται από την κυκλοφορία του αίματος και αποβάλλονται με τα ούρα. Ως «**ούρα**» ορίζεται το σύνολο των υδατοδιαλυτών ουσιών οι οποίες αποβάλλονται από τους νεφρούς και διαμέσου των υπόλοιπων οργάνων του ουροποιητικού συστήματος αποβάλλονται από το σώμα. Τα ούρα δεν έχουν σταθερή σύσταση, αλλά αποτελούν ένα υδατικό διάλυμα που αποτελείται κατά 95 % από νερό. Στο διάλυμα αυτό περιέχεται ουρία σε συγκέντρωση 9,3 g/L, χλώριο σε συγκέντρωση 1,87 g/L, νάτριο σε συγκέντρωση 1,17 g/L, κάλιο σε συγκέντρωση 0,750 g/L. Το υπόλοιπο ποσοστό είναι διαλυμένα ανόργανα ιόντα και οργανικές ενώσεις, όπως πρωτεΐνες ή ορμόνες, καθώς επίσης και ένα ευρύ φάσμα προϊόντων του μεταβολισμού. Ειδικότερα στα ούρα περιέχονται: ουρία, ουρικό οξύ, κρεατινίνη, αμμωνία, οξαλικό οξύ, διάφορα άλατα (φωσφορικά, θειικά, χλωριούχα κ.ά.), καθώς και άλλες οργανικές ή ανόργανες ουσίες, που αποτελούν παραπροϊόντα του μεταβολισμού.

Πολλοί παράγοντες επιδρούν στη σύσταση των ούρων, με κυριότερους την πρόσληψη νερού και τη σύσταση της τροφής. Όταν απομακρύνονται από τους νεφρούς, υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα ούρα είναι στεία, ενώ μπορεί να προστεθούν σε αυτά προσμίξεις βλέννας ή βακτηρίων μέχρι την έξοδό τους από τον οργανισμό.

Το φυσιολογικό pH των ούρων στον άνθρωπο είναι γύρω στο 6. Το χρώμα και ο όγκος των ούρων αποτελούν αξιόπιστους δείκτες ενυδάτωσης του οργανισμού. Το σκούρο χρώμα των ούρων είναι ενδεικτικό της αφυδάτωσης του οργανισμού. Η χρήση αλκοόλ, καφεΐνης ή άλλων διουρητικών μπορεί να μεταβάλουν το χρώμα, τη σύσταση και τον όγκο των ούρων.

Η δειγματοληψία είναι εύκολη και μη παρεμβατική. Οι συγκεντρώσεις των ουσιών είναι υψηλότερες απ' ό,τι στο αίμα. Τα ούρα είναι υδατικό διάλυμα χωρίς πρωτεΐνες. Κατά την ανάλυσή τους ανιχνεύονται τόσο οι μητρικές ουσίες, όσο και οι μεταβολίτες τους.

Τα ούρα είναι δείκτες έκθεσης σε κάποιο φάρμακο τις τελευταίες 2 μέρες (συνήθως).

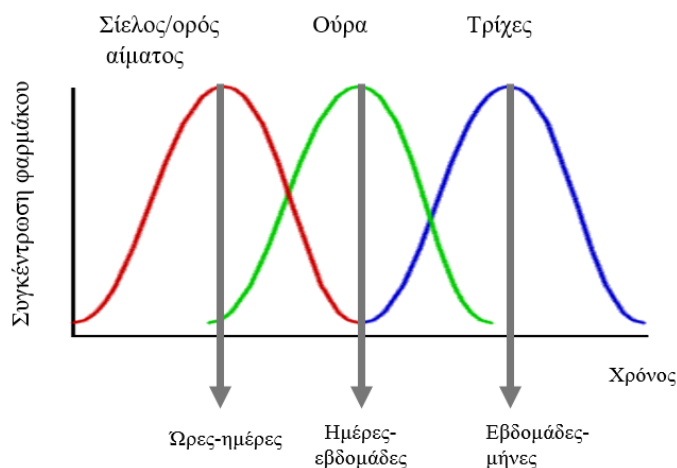
Την εξέταση ούρων την προτιμούν τα περισσότερα εργαστήρια, λόγω της υψηλότερης συγκέντρωσης των ενώσεων και των μεταβολιτών τους και της εύκολης λήψης τους.

Έχουν, όμως, το μειονέκτημα της εύκολης νοθείας και αντικατάστασής τους, καθώς και της βακτηριακής μόλυνσης, εάν δε συντηρηθούν σε χαμηλή θερμοκρασία. Επίσης, σε περίπτωση πρόσφατης λήψης του φαρμάκου, αυτό δεν έχει προλάβει να απεκκριθεί με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η ανίχνευσή του στα ούρα.

4.3. Εναλλακτικά ή μη συμβατικά υποστρώματα

Όταν το αίμα και τα ούρα δεν αναμένεται, πλέον, να περιέχουν την ένωση που αναζητείται και όταν απαιτείται η τεκμηρίωση της χρόνιας λήψης μίας ουσίας, αναζητούνται νέα υποστρώματα, τα οποία έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην τοξικολογία και γενικότερα στη βιοανάλυση και ονομάζονται «εναλλακτικά». Ως εναλλακτικά θεωρούνται οι τρίχες, οι όνυχες, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό, του οποίου η ανάλυση δίνει πληροφορίες για την ποσότητα μίας ουσίας στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) κατά τη στιγμή του θανάτου, τα στοματικά υγρά, ο ιδρώτας, το μηκόνιο, το περικαρδικό υγρό, το οφθαλμικό υγρό, οι ιστοί από όργανα, αδένες, οστά, γαστρικό περιεχόμενο κλπ.

Στο Σχήμα 4.2 δίνεται κατά προσέγγιση το διάστημα ανίχνευσης ουσιών συγκριτικά στα διάφορα βιολογικά υποστρώματα.



Σχήμα 4.2. Διάστημα ανίχνευσης ουσιών συγκριτικά στα διάφορα βιολογικά υποστρώματα

4.3.1. Τρίχες

Οι τρίχες δίνουν τη δυνατότητα για πληροφορίες που αφορούν σχετικά μεγάλο χρονικό διάστημα, π.χ. εβδομάδες ή μήνες. Επειδή δε τα φάρμακα είναι εγκλωβισμένα στο εσωτερικό της τρίχας, δεν απομακρύνονται με τις συνήθεις διαδικασίες υγιεινής και γι' αυτόν το λόγο θεωρούνται και ως ημερολόγια της έκθεσης σε φάρμακα. Ένα δείγμα τρίχας που θα ληφθεί μετά από μερικές μέρες από το πρώτο δείγμα, θα είναι πανομοιότυπο, οπότε, αν υπάρξει υπόνοια αντικατάστασης του πρώτου, είναι εύκολο να αποδειχθεί.

Ωστόσο μειονέκτημά τους θεωρούνται τα πιθανά ψευδώς θετικά αποτελέσματα, λόγω επιμόλυνσης από το περιβάλλον. Για το λόγο αυτό συνιστάται η πλύση τους πριν την ανάλυση, καθώς και η χρήση των λόγων αρχικής ένωσης/μεταβολίτες.

Η εξέταση των δειγμάτων τρίχας είναι μια διαδικασία ρουτίνας σε μια ποικιλία εφαρμογών, ωστόσο, συνδέεται, επίσης, με έναν **αριθμό αβεβαιότητας**. Σε περιπτώσεις χρήσης προϊόντων και διαδικασιών περιποίησης όπως π.χ. βαφή, λεύκανση, περμανάντ, ίσιωμα, οι ενσωματωμένες ουσίες μπορεί να αποικοδομηθούν ή να απομακρυνθούν. Επιπλέον, λόγω ιατρικών καταστάσεων (π.χ., αλωπεκία) τα μαλλιά μπορεί να έχουν αφαιρεθεί ή να είναι πολύ κοντά.

Το κύριο συστατικό της τρίχας είναι η κερατίνη η οποία είναι πρωτεΐνη. Η τρίχα αποτελείται από δύο ευδιάκριτες δομές:

1. Το **Εξωτερικό** ή ορατό τμήμα που ονομάζεται **στελέχος**. Πρόκειται για ένα μακρύ, λεπτό κύλινδρο που καλύπτεται από κύτταρα, τα οποία είναι δεμένα μεταξύ τους και αποτελούνται από 3 στοιβάδες: **τη μυελώδη**, που είναι η εσωτερική στοιβάδα της τρίχας, έχει σπογγώδη πυκνότητα και αποτελείται από έναν αριθμό κυττάρων τα οποία είναι το ένα δίπλα στο άλλο σε σειρές που διαχωρίζονται από κενά αέρα, **το φλοιό**, που είναι η δεύτερη στοιβάδα και η οποία αποτελείται από κύτταρα που περιέχουν κερατίνη και μελανίνη, τη χρωστική που καθορίζει το χρώμα των μαλλιών και την **επιδερμίδα**, η οποία είναι η εξωτερική, ορατή στοιβάδα που αποτελείται από κύτταρα τα οποία μοιάζουν με λέπια και περιέχουν κερατίνη, έχει μορφή κεραμιδιών και εσωκλείει τη μυελώδη στοιβάδα και το φλοιό. Η επιδερμίδα είναι η βασική στοιβάδα του στελέχους.
2. Το **Εσωτερικό τμήμα**, που βρίσκεται σε μία κοιλότητα η οποία ονομάζεται **τριχοφόρος θύλακας** ή **σημηματογόνος θύλακας**. Το τμήμα αυτό αποτελείται από: **τη ρίζα**, που είναι το τμήμα της τρίχας το οποίο είναι “βυθισμένο” στο ανώτερο τμήμα του θύλακα και **το βολβό**, ο οποίος είναι το κατώτερο τμήμα του τριχοφόρου θύλακα που έχει ένα διεσταλμένο ωοειδές σχήμα. Όλη η διαδικασία της ανάπτυξης που οδηγεί στη σύνθεση της δομής της τρίχας, συμβαίνει στο σημείο αυτό. Στο εσωτερικό υπάρχει, επίσης, ο **επιθηλιακός ιστός ή ιστός της ρίζας** ο οποίος είναι πλούσιος σε αιμοφόρα αγγεία που οξυγονώνουν, θρέφουν το βολβό και αναπαράγουν τα βλαστικά κύτταρα που ωθούν προς τα επάνω τα νέα κύτταρα της τρίχας. Ο **σημηματογόνος αδένας** ο οποίος είναι τοποθετημένος δίπλα στο θύλακα, παράγει σμήγμα, μια λιπαρή ουσία που θρέφει και λιπαίνει τα λέπια, για να δώσει λάμψη και ελαστικότητα στα μαλλιά. Ο **ανορθωτήρας μυς της τρίχας**, ο οποίος βρίσκεται διαγώνια στο πλάι του σημηματογόνου αδένου, έχει τη λειτουργία της εκκένωσης του, μέσω συμπίεσης. Επιπλέον, διατηρεί το φυσιολογικό pH (5,5), την ενυδάτωση και την ελαστικότητα του δέρματος.

4.3.1.1. Οι τρίχες ως υπόστρωμα στον προσδιορισμό ναρκωτικών

Οι **τρίχες** αποτελούν ένα σημαντικό υπόστρωμα στην ανάλυση ναρκωτικών ουσιών, δεδομένου ότι συλλέγονται πολύ εύκολα και μπορούν να αποθηκευτούν για χρόνια, χωρίς να υποστούν απώλεια ή κάποια μεταβολή. Η προτίμησή τους στον προσδιορισμό ναρκωτικών ουσιών έγκειται στη δυνατότητα να παρέχουν ένα υψηλό ιστορικό της εκάστοτε έκθεσης/λήψης ουσιών, αν και συνήθως μειονεκτούν όσον αφορά στην ποσοτικοποίηση. Έτσι, είναι δυνατόν να δυσχεραίνεται ο ακριβής προσδιορισμός της συγκέντρωσης της ναρκωτικής ουσίας, ανάλογα το είδος της τρίχας και τη χημική συγγένεια που μπορεί να παρουσιάζει με την ουσία. Ένα επιπρόσθετο πλεονέκτημα που καθιστά τις τρίχες ιδανικό υπόστρωμα προς ανάλυση, είναι το γεγονός ότι πρόκειται για ένα αρκετά μη πολικό υπόστρωμα, που τείνει να προσροφά την αρχική ουσία (μητρική), η οποία είναι κατά κανόνα λιγότερο πολική από τους μεταβολίτες της. Το γεγονός αυτό προσφέρει τη δυνατότητα προσδιορισμού ναρκωτικών ουσιών, οι οποίες είναι σε θέση να μεταβολίζονται, συνεχώς, και να μην είναι δυνατή η ανίχνευσή τους σε άλλα υποστρώματα.

4.3.2. Όνυχες

Με τον όρο «**όνυχας**» εννοείται η ονυχία πλάκα ή πλάκα του όνυχα ή πέταλο, η οποία είναι το σκληρό, ημιδιαφανές τμήμα του όνυχα. Η πλάκα του όνυχα αποτελείται από νεκρά, συμπιεσμένα κύτταρα, τα οποία έχουν ως βασικό συστατικό τους την κερατίνη, καθώς επίσης και λιπίδια, τα οποία εξασφαλίζουν την απαραίτητη περιεκτικότητα νερού στη δομή του, για τη διασφάλιση της ελαστικότητάς του. Η κοίτη του

όνυχα βρίσκεται κάτω από την πλάκα του όνυχα, εκτείνεται από τη μήτρα έως το υπονύχιο (το σημείο κάτω από το ελεύθερο άκρο του όνυχα) και έχει δύο λειτουργίες: αφενός επιτρέπει στην πλάκα να προχωρά καθώς μεγαλώνει και αφετέρου την κρατάει συνδεδεμένη στο δάκτυλο.

Η μήτρα του όνυχα βρίσκεται κάτω από την κεντρική παρανυχίδα και είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό της πλάκας του όνυχα. Τέλος, η πλάκα του όνυχα περιβάλλεται από τις παρανυχίδες, οι οποίες προσφέρουν προστασία στη μήτρα του όνυχα. Οι όνυχες, όπως και οι τρίχες, είναι πολύ καλοί δείκτες μακροχρόνιας χρήσης ουσιών.

Υπάρχουν διάφορες τεχνικές δειγματοληψίας νυχιών κατάλληλες για τοξικολογική ανάλυση:

1. Τεμαχισμός προεξοχής των ονύχων με ειδικά εργαλεία κοπής.
2. Απόξεση των ανωτέρων στρωμάτων των νυχιών με τη χρήση μίας αιχμηρής λεπίδας.
3. Λήψη ολόκληρου όνυχα σε νεκροτομικά δείγματα.

4.3.3. Υδατοειδές υγρό

Το ανθρώπινο μάτι αποτελείται από 3 θαλάμους: τον πρόσθιο, τον οπίσθιο και το υαλοειδές υγρό. Ο βολβός του ματιού αποτελείται από τρία στρώματα: το σκληρό χιτώνα, το χοριοειδή χιτώνα και τον αμφιβληστροειδή χιτώνα. Κάθε οφθαλμικός βολβός είναι περίπου σφαιρικός, με διάμετρο περίπου 2,5 cm και βρίσκεται προφυλαγμένος μέσα στην οφθαλμική κόγχη την οποία σχηματίζουν τα οστά του κρανίου. Ο σκληρός χιτώνας (ή το λευκό του ματιού) είναι ένα ανθεκτικό περίβλημα που περιβάλλει τον οφθαλμικό βολβό και διατηρεί το σχήμα του. Ο χοριοειδής χιτώνας, ο οποίος τροφοδοτεί το μάτι με τις απαραίτητες θρεπτικές ουσίες, καλύπτει εσωτερικά το σκληρό. Ο χιτώνας αυτός περιλαμβάνει τον κερατοειδή χιτώνα, τον κρυσταλλοειδή φακό και την ίριδα. Η σύνδεση του ματιού με τον εγκέφαλο γίνεται με το οπτικό νεύρο, ενώ ο μήνιγγας περιβάλλει το οπτικό νεύρο που ενώνεται με το σκληρό χιτώνα, για να καταλάβει τον οπίσθιο ή ραχιαίο θάλαμο, ο οποίος αποτελεί τα 5/6 του συνόλου του οφθαλμού. Η κόρη του ματιού προστατεύει τον αμφιβληστροειδή χιτώνα, το πιο φωτοευαίσθητο μέρος του ματιού. Ο αμφιβληστροειδής χιτώνας καλύπτει εσωτερικά το χοριοειδή και περιέχει δύο ειδών φωτοευαίσθητα κύτταρα: τα ραβδία, τα οποία είναι υπεύθυνα για την όραση σε αμυδρά φωτιζόμενους χώρους και τα κωνία, τα οποία χρησιμοποιούν για την όραση στο φως και την αντίληψη των χρωμάτων. Ο αμφιβληστροειδής και το οπτικό υγρό 'εσωκλείονται' από πυκνούς ινώδεις ιστούς: το μήνιγγα και το σκληρό χιτώνα. Το υπόλοιπο 1/6 του οφθαλμού ανήκει στον πρόσθιο θάλαμο που περιέχει τον κερατοειδή χιτώνα, ο οποίος διαθλά το προσπίπτον φως. Το υαλοειδές σώμα βρίσκεται ανάμεσα στον κρυσταλλοειδή φακό και στον αμφιβληστροειδή και καλύπτει το κέντρο του ματιού, αποτελώντας συνολικά το 80% του όγκου του.

4.3.3.1. Το υδατοειδές υγρό στην ανάλυση

Το υδατοειδές υγρό αποτελεί μετά το αίμα και τα ούρα, ένα εναλλακτικό δείγμα για αναλυτικούς σκοπούς, παρόλο που δεν παρουσιάζεται σε μεγάλο εύρος δημοσιευμένων εργασιών. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο μικρό όγκο (5 mL) που μπορεί να συγκεντρωθεί σε σχέση με το αίμα και τα ούρα. Έτσι, η χαμηλή βάση δεδομένων έχει ως αποτέλεσμα να αλλοιώνεται εν μέρει η ερμηνευτική αξία των αποτελεσμάτων.

Κάθε μέθοδος χρωματογραφίας ή ανοσοχημείας που εφαρμόζεται σε δείγματα ούρων και αίματος, μπορεί να εφαρμοστεί και σε δείγματα υδατοειδούς υγρού με υψηλή ακρίβεια, όμως, το υδατοειδές υγρό φαίνεται να πλεονεκτεί έναντι των άλλων δειγμάτων, κυρίως λόγω της σύστασής του. Καθώς περιέχει ένα πολύ μικρό ποσοστό στερεού υπολείμματος (1%), το υπόστρωμα του υαλοειδούς υγρού χρειάζεται μερική ή καθόλου προκατεργασία, οπότε μειώνεται σημαντικά η ταχύτητα και ο χρόνος ανάλυσης. Επίσης, το υπόστρωμά του, παρουσιάζει σταθερότητα σε ένα μεγάλο αριθμό ναρκωτικών. Ακόμα, είναι σημαντική η συμβολή του υδατοειδούς υγρού σε μεταθανάτιες τοξικολογικές εξετάσεις. Λόγω της απομονωμένης θέσης που κατέχει στον οφθαλμό, προστατεύεται από οποιαδήποτε επιμόλυνση, σήψη ή τραύμα. Τα προϊόντα αποικοδόμησης του σώματος δεν επηρεάζουν σημαντικά τη δομή και τη σύσταση του υδατοειδούς υγρού· και όσο αυτό αποξηραίνεται με τη σήψη, τόσο δυσκολεύει η συλλογή του.

4.3.3.2. Μεταφορά ουσιών στο υδατοειδές υγρό

Το υαλοειδές στρώμα αποτελείται από ένα δίκτυο λεπτών ινιδίων που αποτελούνται από νημάτια πρωτεΐνης, με το υδατοειδές υγρό να γεμίζει τα διάκενα του υαλοειδούς στρώματος. Παρόλο που η δομή της πρωτεΐνης

μοιάζει με αυτήν του κολλαγόνου των χόνδρων, παρουσιάζει κάποιες διακριτές διαφορές. Το υδατοειδές υγρό συνίσταται από υαλουρονικό οξύ.

Το υαλουρονικό οξύ είναι ένα πολυσακχαρίδιο που αποτελείται από επαναλαμβανόμενες μονάδες δισακχαρίτη, με καθεμία ομάδα να φέρει μία εξοξαμίνη ενωμένη με το υαλουρονικό οξύ. Το υδατοειδές υγρό αποτελείται από επαναλαμβανόμενα μόρια υαλουρονικού οξέος και ινιδίων κολλαγόνου. Ωστόσο, η σύνθεση του υδατοειδούς υγρού στον άνθρωπο, αποτελείται και από υπόλοιπες έξι πρωτεΐνες και 2 τύπους γλυκοπρωτεϊνών. Ανάμεσα σε αυτά τα μόρια του υδατοειδούς υγρού υπάρχει ένα μεγάλος αριθμός ιόντων και ουσιών. Τα επίπεδα συγκεντρώσεων του νατρίου, του χλωρίου και του ασβεστίου είναι συγκρίσιμα με αυτά του ορού του αίματος, από υγιείς ενήλικες σε αρχικό στάδιο σε μεταθανάτιες αναλύσεις. Οι συγκεντρώσεις του καλίου αυξάνονται ραγδαία μετά το θάνατο, καθώς το κάλιο μεταναστεύει από τα κύτταρα στα γειτονικά υγρά του σώματος. Δύο αζωτούχες ενώσεις: η ουρία και η κρεατινίνη βρίσκονται σε αναλογία στο υδατοειδές υγρό και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες με τον ορό του αίματος.

Η ισορροπία ανάμεσα στο αίμα και το υδατοειδές υγρό είναι αργή σε σχέση με το αίμα και τα άλλα εξωκυτταρικά υγρά. Αυτό προϋποθέτει την παρουσία ενός φράγματος. Η κίνηση και η μεταφορά των μορίων προς και από το υδατοειδές υγρό γίνεται με διάφορους μηχανισμούς, όπως διάχυση, διαφορά υδροστατικής και οσμωτικής πίεσης, μετάδοση θερμότητας κ.ά. Οι υψηλού μοριακού βάρους ουσίες και τα κολλοειδή σωματίδια «ταξιδεύουν» με μεταφορά θερμότητας, ενώ τα μικρού μοριακού βάρους μόρια κινούνται, κυρίως, με διάχυση μέσα και έξω από το υδατοειδές υγρό. Υπάρχει μία ένδειξη για αμφίδρομη πορεία που μετέχει στην κίνηση αυτών των μορίων.

Τα κοινά ναρκωτικά είναι μικρού μοριακού βάρους μόρια και έτσι κινούνται μέσα και έξω από το υδατοειδές υγρό με διάχυση. Μόνον το ναρκωτικό σε ελεύθερη μορφή είναι ικανό να αφήσει το αίμα και να εισέλθει στο υδατοειδές υγρό. Επίσης, ναρκωτικά που δεν είναι δεσμευμένα με πρωτεΐνες, αναμένεται να βρίσκονται σε σημαντικές συγκεντρώσεις στο υδατοειδές υγρό.

4.3.4. Εγκεφαλονωτιαίο υγρό

Το **εγκεφαλονωτιαίο υγρό** (ENY, cerebrospinal fluid, CSF) είναι ένα διαυγές, άχρωμο υγρό, ελαφρά αλκαλικό που καταλαμβάνει το χώρο μεταξύ του αραχνοειδούς μήνιγγα (το μεσαίο στρώμα της κάλυψης του εγκεφάλου, τις μήνιγγες) και του υπαραχνοειδούς μήνιγγα (το στρώμα των μηνίγγων που βρίσκεται πλησιέστερα προς τον εγκέφαλο). Στην ουσία, ο εγκέφαλος "επιπλέει" σε αυτό. Το ENY αποτελεί το περιεχόμενο όλης της ενδοεγκεφαλικής κοιλίας (το εσωτερικό του εγκεφάλου, cerebrum) και το κεντρικό κανάλι του νωτιαίου μυελού. Λειτουργεί ως ένα "μαξιλάρι" ή ρυθμιστικό για το φλοιό, παρέχοντας, κατά κύριο λόγο, μια μηχανική και ανοσολογική προστασία στον εγκέφαλο μέσα στο κρανίο. Σε αυτό περιέχονται, κυρίως, λεμφοκύτταρα, μικρή ποσότητα γλυκόζης, καθώς και ίχνη πρωτεϊνών. Το ENY γεμίζει τον υπαραχνοειδή χώρο, τις κοιλίες του εγκεφάλου και τον κεντρικό σωλήνα του νωτιαίου μυελού. Το εγκεφαλονωτιαίο υγρό είναι σημαντικό βιολογικό υλικό που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην τοξικολογία. Η ανάλυσή του μας δίνει πληροφορίες για την ποσότητα μίας ουσίας στο ΚΝΣ κατά τη στιγμή του θανάτου. Παραλαμβάνεται όλος ο όγκος του ENY από το νεκρό, με παρακέντηση της παρεγκεφαλονωτιαίας δεξαμενής ή μέσω οσφυϊκής παρακέντησης.

Ο ολικός όγκος είναι περίπου 130 mL, αλλά μετά από 72 ώρες από το θάνατο, απορροφάται από τους περιβάλλοντες ιστούς.

4.3.5. Στοματικά υγρά

Τα στοματικά υγρά έχουν δύο πλεονεκτήματα: Εύκολη λήψη και όχι εύκολη αντικατάσταση. Αφορούν τις ενώσεις που δεν είναι δεσμευμένες σε πρωτεΐνες, οι οποίες και είναι οι φαρμακολογικά ενεργές. Οι φαρμακοκινητικές μελέτες σε στοματικά υγρά είναι παρόμοιες με αυτές στο πλάσμα.

Στην κοκαΐνη ο λόγος συγκέντρωσης στοματικού υγρού/πλάσμα είναι 3 και η ένωση και οι μεταβολίτες της ανιχνεύονται μέχρι 17 ώρες από τη χρήση. Παρατηρείται μεγαλύτερη ημιπερίοδος ζωής σε σύγκριση με το πλάσμα.

Το **σάλιο** ή **σιελος** αποτελεί το έκκριμα των μικρών και μεγάλων σιελογόνων αδένων (παρωτίδα, υπογνάθιοι & υπογλώσσιοι αδένες). Το σάλιο αποτελείται από 99,5% περίπου νερό και 0,5% από ανόργανα (κυρίως ηλεκτρολύτες, όπως ιόντα καλίου, νατρίου, χλωρίου και τα όξινα ανθρακικά ιόντα. Σε μικρότερη ποσότητα περιέχει φωσφορικά ιόντα και ιόντα ασβεστίου, μαγνησίου, ιωδίου, και θειοκυανικά) και οργανικά

συστατικά (όπως ένζυμα: πτυαλίνη (αμυλάση), λυσοζύμη, καλλικρεΐνη, αλκαλική φωσφατάση κτλ.). Περιέχει επίσης πρωτεΐνες: φωσφοπρωτεΐνες (σταθερίνη, ιστατίνη κτλ.) και γλυκοπρωτεΐνες (μουκίνες), Αντισώματα, συγκολλητινογόνα του συστήματος ABO, ορμόνες, αυξητικούς παράγοντες). Το pH του κυμαίνεται 5,2 και 7,8 (μέση τιμή 6,7).

Ο όγκος του εκκρινόμενου σάλιου κατά τη διάρκεια ενός εικοσιτετραώρου κυμαίνεται μεταξύ 0,75-1,2 L. Το 90% του σάλιου παράγεται κατά τη διάρκεια της ημέρας, ενώ κατά τη διάρκεια του ύπνου η έκκριση είναι ελάχιστη. Διάφορα ερεθίσματα μπορούν να αυξήσουν ή να μειώσουν την έκκριση του σάλιου.

Υπάρχουν 2 τρόποι συλλογής δείγματος σιέλου:

1. Με **απόχρεμψη**: Έχει το πλεονέκτημα ότι αντιπροσωπεύει καλύτερα τις συγκεντρώσεις του προσδιοριζόμενου φαρμάκου στον απεκκρινόμενο σίελο, αλλά και το μειονέκτημα της δυσάρεστης διαδικασίας συλλογής.
2. Με **εξειδικευμένη συσκευή**: έχει το πλεονέκτημα ότι είναι ευκολότερη και ταχύτερη η συλλογή, με ελάχιστη παρέμβαση από το χειριστή. Επιπλέον, διατηρείται η ιδιωτικότητα του εθελοντή. Ως μειονέκτημα μπορεί να θεωρηθεί η μεταβλητότητα της ποσότητας του δείγματος που συλλέγεται από συσκευή σε συσκευή, καθώς και το γεγονός ότι η προσρόφηση φαρμάκων στην ίδια τη συσκευή μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα δοκιμής.

Σχετικά με την ανάλυση των στοματικών υγρών μπορούμε να πούμε ότι:

- i. Η ανάλυση επηρεάζεται από την παρουσία πρωτεϊνών σε ευρεία περιοχή συγκεντρώσεων.
- ii. Η δειγματοληψία του είναι εύκολη και μη επεμβατική, εξαλείφοντας έτσι οποιαδήποτε ταλαιπωρία και πιθανό πόνο που συνδέεται με τη συλλογή του αίματος. Σε σύγκριση με το αίμα, το σάλιο περιέχει μικρότερη ποσότητα πρωτεϊνών.
- iii. Αποφεύγονται, επίσης, θέματα προστασίας της ιδιωτικής ζωής που σχετίζονται με τη συλλογή των ούρων.
- iv. Η σύνθεση του σάλιου αντικατοπτρίζει με μεγαλύτερη ακρίβεια την πρόσφατη κατάσταση του σώματος σε κάθε δεδομένη στιγμή.

Στον **Πίνακα 4.1** δίνονται συγκριτικά τα χαρακτηριστικά σιέλου και ούρων στη βιοανάλυση.

Παράμετρος	Σίελος	Ούρα
Συλλογή	Μη επεμβατική	Παραβίαση ιδιωτικότητας
Ένωση	Αρχική	Μεταβολίτες
Συγκέντρωση	Χαμηλή	Μέτρια με υψηλή
Πιθανά προβλήματα	Επιμόλυνση από τροφές κλπ.	Πιθανότητα νοθείας
Πλεονεκτήματα	Δύσκολο να νοθευτούν	Σχετικά μεγάλο χρονικό διάστημα ανίχνευσης

Πίνακας 4.1. Σύγκριση των χαρακτηριστικών των δύο βιολογικών δειγμάτων: σιέλου και ούρων

4.3.6. Ιδρώτας

Ο ιδρώτας ως βιολογικό υπόστρωμα δε συνηθίζεται σε ανάλυση ρουτίνας, καθώς είναι δύσκολη η συλλογή δείγματος, ενώ γίνεται συνήθως με επιδερμικά αυτοκόλλητα (patches) και επηρεάζεται εύκολα από περιβαλλοντική επιμόλυνση. Στα δείγματα αυτά οι αρχικές ενώσεις είναι σε μεγαλύτερη συγκέντρωση από τους μεταβολίτες.

4.3.7. Αμνιακό υγρό και μηκόνιο

Το **αμνιακό υγρό** είναι διάφανο, υπόλευκο και άοσμο υγρό και αποτελείται σε ποσοστό 97% από νερό. Η δημιουργία του οφείλεται στις εκκρίσεις από το σώμα του εμβρύου αλλά και του οργανισμού της μητέρας. Αναεώνεται συνέχεια και η ποσότητά του ποικίλλει ανάλογα με το στάδιο της εγκυμοσύνης. Κατά την

έβδομη εβδομάδα, για παράδειγμα, φτάνει τα 300 με 400 mL, στην εικοστή είναι ένα λίτρο περίπου, ενώ αργότερα αυξάνεται στα δύο λίτρα. Το αμνιακό υγρό περιέχει όλες τις ουσίες που υπάρχουν μέσα στο αίμα αλλά και νεκρά κύτταρα, τα οποία αποβάλλονται από το έμβρυο. Εκκρίνεται και ανανεώνεται διαρκώς, κάθε τρεις ώρες προς το τέλος της εγκυμοσύνης, γιατί το μωρό απορροφά καθημερινά μεγάλες ποσότητες.

Το **μηκόνιο** είναι το αποτέλεσμα των πρώτων εντερικών κενώσεων του νεογέννητου. Το μεταβολικό προφίλ στο μηκόνιο είναι διαφορετικό από των ούρων.

4.4. Συλλογή δειγμάτων-Δειγματοληψία

Το πρώτο στάδιο της προκατεργασίας είναι η δειγματοληψία, η οποία πρέπει να είναι αντιπροσωπευτική για το δείγμα και να μην αλλοιώνει τη σύστασή του.

Μετά τη συλλογή τους τα βιολογικά δείγματα πρέπει να αποθηκεύονται και να συντηρούνται με ειδικούς τρόπους μέχρι την ανάλυσή τους, ανάλογα με την περίπτωση. Πρέπει να λαμβάνονται τα απαραίτητα μέτρα προστασίας κατά τη μεταφορά και φύλαξη των βιολογικών υλικών και πειστηρίων (δειγματοληψία, σωστή συσκευασία, σωστή συντήρηση, επισήμανση κάθε περιέκτη και ασφαλής μεταφορά δειγμάτων στο εργαστήριο).

Η συλλογή των δειγμάτων γίνεται, συνήθως, σε πλαστικούς περιέκτες. Στην περίπτωση, όμως, που οι ενώσεις οι οποίες πρόκειται να ανιχνευθούν και να προσδιορισθούν είναι πτητικές, απαιτείται αεροστεγής πωματισμός, σε φιαλίδια με τον ελάχιστο δυνατό υπερκείμενο χώρο (head-space). Χρήση συντηρητικών δεν απαιτείται στα ούρα ή π.χ. στο γαστρικό περιεχόμενο, όμως στο αίμα προστίθεται ηπαρίνη, ως αντιπηκτικό και φθοριούχο νάτριο (2 mg/dL) ως συντηρητικό.

4.4.1. Δειγματοληψία ξηρής κηλίδας αίματος (Dried blood spot sampling)

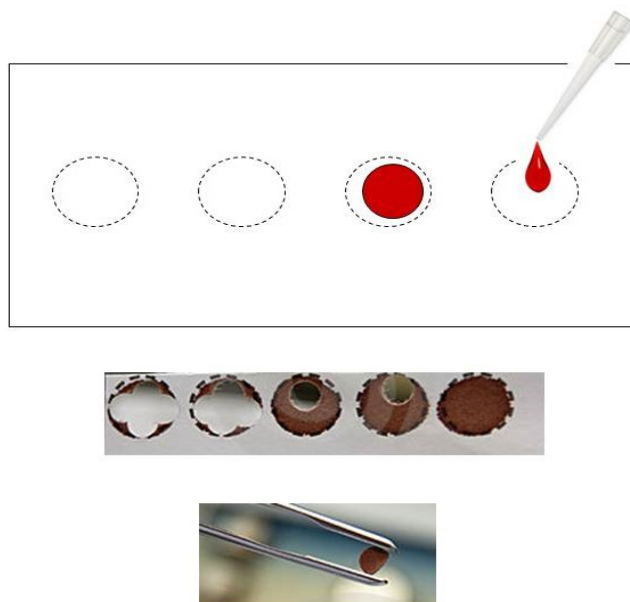
Η δειγματοληψία ξηρών ή αποξηραμένων κηλίδων αίματος (Dried Blood Spot, DBS) χρησιμοποιείται για πάνω από 40 χρόνια, κυρίως στα νεογνά, κατά τον έλεγχο για συγγενή μεταβολικά νοσήματα. Η τεχνική αυτή γνώρισε πρόσφατα απότομη αύξηση του ενδιαφέροντος, στο πλαίσιο της ανάπτυξης φαρμάκων και εφαρμόζεται όλο και περισσότερο για τη στήριξη τοξικοκινητικών (TK) και φαρμακοκινητικών (PK) μελετών, καθώς το κόστος της ανάπτυξης φαρμάκων έχει αυξηθεί δραματικά τα τελευταία χρόνια και οι φαρμακευτικές εταιρίες βρίσκονται υπό μεγάλη πίεση να αναζητήσουν έξυπνες και αποτελεσματικές λύσεις που θα επιφέρουν μείωση του συνολικού κόστους.

Ένα μειονέκτημα των μέχρι σήμερα διαθέσιμων μεθόδων DBS, είναι η μείωση της σταθερότητας των αποξηραμένων δειγμάτων, όταν αυτά εκτεθούν σε υγρασία. Επιπλέον, η έκθεση του διηθητικού χαρτιού στον αέρα και τις επιφάνειες κατά τη διάρκεια της ξήρανσης ή αποστολής μπορεί να οδηγήσει σε επιμόλυνση του δείγματος. Τα επιμέρους εξαρτήματα που απαιτούνται για τη δειγματοληψία με τις τρέχουσες τεχνικές, περιλαμβάνουν νυστέρι, διηθητικό χαρτί, ένα στήριγμα για την ξήρανση και δοχεία για τη μεταφορά.

Τα πλεονεκτήματα της δειγματοληψίας DBS είναι ότι απαιτούνται ελάχιστοι όγκοι δειγμάτων (περίπου 30 - 100 µL, ανά κηλίδα), η ευκολία παραλαβής του δείγματος από το δάχτυλο ή με μεταλλική μικροράβδο από το πέλμα με ελάχιστη εκπαίδευση, η ευκολία μεταφοράς και η σταθερότητα του δείγματος. Μόλις στεγνώσει το δείγμα, είναι σταθερό για εβδομάδες ή και μήνες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και μήνες ή και χρόνια υπό ψύξη.

Πρόσθετο πλεονέκτημα είναι, επίσης, το γεγονός ότι οι ιοί (HIV, HCV) και τα βακτήρια είναι αδρανοποιημένα, όταν είναι τοποθετημένα στο διηθητικό χαρτί, βελτιώνοντας σημαντικά την ασφάλεια για τους αναλυτικούς χημικούς, αλλά και για τους μεταφορείς των δειγμάτων και τους τεχνικούς των εργαστηρίων. Ακόμη δεν απαιτείται φυγοκέντρηση ή κατάψυξη των δειγμάτων και είναι η διαδικασία είναι ιδιαίτερα οικονομική. Δεδομένου δε ότι οι αποστολές δειγμάτων που πραγματοποιούνται σε ξηρό πάγο, χρήζουν ιδιαίτερης προσοχής, σημαντική μείωση του συνολικού κόστους μπορεί να γίνει με τη χρήση της τεχνολογίας DBS, που θα απλουστεύσει σημαντικά τη διοικητική μέριμνα, ενώ τα αποξηραμένα δείγματα σε διηθητικό χαρτί μπορούν να αποστέλλονται σε έναν απλό φάκελο, σε συνθήκες περιβάλλοντος. Αυτά τα σημαντικά χαρακτηριστικά έχουν κάνει πρόσφατα τη DBS ως την πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο δειγματοληψίας για τους γενετικούς ελέγχους και μακροχρόνια δείγματα *bio-banking*. Μέσα στα τελευταία χρόνια, έχει γίνει χρήση δειγματοληψίας DBS για κλινικές και προκλινικές φαρμακοκινητικές μελέτες, ενώ έχει, επίσης, χρησιμοποιηθεί και για την παρακολούθηση των ασθενειών. Σε προκλινικές μελέτες, η δειγματοληψία DBS επιτρέπει μια πιο αποτελεσματική χρήση των δειγμάτων αίματος που οδηγεί στη μείωση

του αριθμού των πειραματόζωων. Αυτό μεταφράζεται ταυτόχρονα σε αύξηση της οικονομικής απόδοσης και βελτιωμένη ηθική.



Σχήμα 4.3. Δειγματοληψία ξηρής κηλίδας αίματος DBS

4.4.2. Στάδια δειγματοληψίας- προκατεργασίας

Η τεχνική DBS περιλαμβάνει τη δειγματοληψία αίματος, κατά την οποία μικρές ποσότητες αίματος 20-50 μL είτε από το σημείο του δακτύλου είτε από το πέλμα ενσταλάζονται σε ειδικό, προτυπωμένο διηθητικό χαρτί-κάρτα (σχήμα 4.3). Το δείγμα στη συνέχεια αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου είτε 2 ώρες, είτε 3 ώρες, είτε κατά τη διάρκεια όλης της νύχτας. Έπειτα με ειδικό για την περίπτωση των κηλίδων, εργαλείο διακόρευσης, αποσπώνται κυκλικοί δίσκοι, οι διάμετροι των οποίων μπορεί να κυμαίνονται μεταξύ των τιμών 3 mm, 6 mm και 8 mm. Ακολουθεί η εκχύλιση του δίσκου με κατάλληλο διαλύτη και η προσθήκη του εκάστοτε εσωτερικού προτύπου, όπου αυτό προβλέπεται. Η διευκόλυνση της εκχύλισης γίνεται είτε με ανάδευση με vortex, είτε με φυγοκέντρηση και ακολουθεί η ανάλυση του δείγματος.

Παρόμοια τεχνική εφαρμόζεται και στη δειγματοληψία ούρων (Dried urine spot (DUS)), π.χ. στον προσδιορισμό οπιούχων και κοκαΐνης σε δείγματα ούρων, αλλά και στην ανάλυση σιέλου και αμνιακού υγρού (dried amniotic fluid on filter paper).

Βιβλιογραφία

- Fragou D., Dotsika S., Sarafidou P., Samanidou V., Njau S. & Kovatsi L. (2012). *A typical antipsychotics: trends in analysis and sample preparation of various biological samples*. *Bioanalysis*, 4(8) 961-980.
- Gigis, P. & Paraskevas, G. (1999). *Neuroanatomy*, Thessaloniki.
- Hinchliffe E., Adaway J.E. & Keevil B.G. (2012). *Simultaneous measurement of cyclosporin A and tacrolimus from dried blood spots by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry*. *Journal of Chromatography B*, 883, 102-107.
- Inoue Y., & Ohse, M. (2011). *Prenatal diagnosis of methylmalonic aciduria by measuring methylmalonic acid in dried amniotic fluid on filter paper using gas chromatography-mass spectrometry*. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 400(7), 1953-1958.

- Livadiotou D. & Samanidou V. (2015). *Dried Blood Spots in TDM*, in Future Science eBook chapter - New sampling strategies in toxicology and therapeutic drug monitoring, 66-78, doi: 10.4155/fseb2013.14.33
- Mycek M.J., Harvey R.A., Champe P.C. (2003). *Φαρμακολογία*, Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε., Αθήνα.
- Otero-Fernández M., Cocho J.Á., Taberner M.J., Bermejo A.M., Bermejo-Barrera P., & Moreda-Piñeiro A. (2013). *Direct tandem mass spectrometry for the simultaneous assay of opioids, cocaine and metabolites in dried urine spots*. *Analytica chimica acta*, 784, 25-32.
- Page C., Curtis M., Sutter M., Walker M., Hoffman B.B. (2000). *Φαρμακολογία*, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, Αθήνα, 2000.
- Rang H.P., Dale M.M. (2007). *Φαρμακολογία*, 5^η έκδοση, Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε., Αθήνα.
- Skopp G., Meyer L. von. (2004). *Recommendations for sampling postmortem specimens for forensic toxicological analyses and special aspects of a postmortem toxicology investigation*. Appendix D of the GTFCh Guideline for Quality Control in Forensic Toxicological Analyses. 1^η.
- Vu D.H., Koster R.A., Alffenaar J.W.C., Brouwers J.R.B.J. & Uges D.R.A. (2011). *Determination of moxifloxacin in dried blood spots using LC-MS/MS and the impact of the hematocrit and blood volume*. *Journal of Chromatography B*, 879(15), 1063-1070.
- Yakkundi S., Millership J., Collier P., Shields M.D. & McElnay J. (2011). *Development and validation of a dried blood spot LC-MS/MS assay to quantify ranitidine in paediatric samples*. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 56(5), 1057-1063.

Δικτυογραφία

Δικαστική Τοξικολογία
Αίμα (Δεκέμβριος 2014)
Ούρο (Δεκέμβριος 2014)
Εγκέφαλος

<http://panacea.med.uoa.gr/topic.aspx?id=240>
<https://el.wikipedia.org/wiki/Αίμα>
<https://el.wikipedia.org/wiki/Ούρο>
<http://el.science.wikia.com/wiki/Εγκέφαλος>

Κεφάλαιο 5: Τα Μεταλλικά Στοιχεία στον Οργανισμό

Γεώργιος Ζαχαριάδης

Σύνοψη

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφεται συνοπτικά ο ρόλος των μετάλλων στον ανθρώπινο οργανισμό καθώς και η σημασία της Μεταλλομικής στη Βιοανάλυση. Εκτός από τα απαραίτητα μέταλλα, μελετώνται και τα μη απαραίτητα καθώς και τα τοξικά μέταλλα, αλλά και εκείνα που εισάγονται στον οργανισμό με τη μορφή μεταλλοφαρμάκων ή άλλων σκευασμάτων.

Προαπαιτούμενη γνώση

Για την καλύτερη κατανόηση των εννοιών αυτών είναι απαραίτητες ορισμένες βασικές γνώσεις Ενόργανης Χημικής Ανάλυσης, Βιοχημείας και Βιοανόργανης Χημείας.

5.1. Μέταλλα και μεταλλομική

Τα μέταλλα είναι εξαιρετικά διαδεδομένα χημικά στοιχεία στη φύση και είναι προφανές ότι πολλά από αυτά θα βρίσκονται και στον ανθρώπινο οργανισμό. Από τα μεταλλικά στοιχεία, άλλα είναι κύρια και βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις (συνήθως χαρακτηρίζονται ως μακροστοιχεία) όπως το Ca, P, Cl, K, Na και Mg, ενώ άλλα είναι δευτερεύοντα ή ιχνοστοιχεία (χαρακτηρίζονται μικροστοιχεία) όπως ο Fe, Zn, Cu, Co, κλπ. Παρά τις αναμενόμενες διακυμάνσεις των συγκεντρώσεών τους, ανάλογα με την ηλικία, το φύλο τη διατροφή κλπ., είναι ήδη γνωστές οι μέσες ποσότητες των απαραίτητων στον άνθρωπο μετάλλων, όπως καταγράφονται στον Πίνακα 5.1, με τις σημαντικές βιολογικές λειτουργίες στις οποίες συμμετέχουν.

Κατηγορία Στοιχείων	Χημικό Στοιχείο	Ποσότητα Ανά 70 kg	Βιολογική λειτουργία
Κύρια	O	45,5 kg	Σύσταση οργανικών ενώσεων και νερού
	C	12,6 kg	Σύσταση οργανικών ενώσεων και CO ₂
	H	7,0 kg	Σύσταση οργανικών ενώσεων και νερού
	N	2,1 kg	Σύσταση αμινοξέων, πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων
	Ca	1,2 kg	Σύσταση οστών, κυτ. μεμβρανών, πηκτικών αίματος
	P	0,7 kg	Σύσταση οστών, ATP σε DNA,
Δευτερεύοντα	S	160 g	Σύσταση κυστεΐνης, μεθειονίνης, ηπαρίνης, B ₁
	K	140 g	Σύσταση ενδοκυτταρικών ηλεκτρολυτών, ώσμωση
	Na	110 g	Σύσταση εξωκυτταρικών ηλεκτρολυτών, ώσμωση
	Cl	100 g	Σύσταση ηλεκτρολυτών
	Mg	35 g	Συμπαράγοντες ενζύμων
Ιχνοστοιχεία	Fe	4,2 g	Μεταφορά/ αποθήκευση οξυγόνου, αντιοξειδωτικό
	Si	1,4 g	Άγνωστη χρησιμότητα
	Zn	2,3 g	Πολυμεράσες νουκλεϊκών οξέων, συμπαραγόντων ενζύμων
	Cu	80 mg	Μεταφορά οξυγόνου, Οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις
	Mn	15 mg	Συμπαράγων δισμουτάσης, κινάσης
Υπεριχνοστοιχεία	Se	16 mg	Αντιοξειδωτικές διεργασίες
	I	15 mg	Ενεργοποίηση θυρεοειδορμόνης
	Mo	5 mg	Μεταβολισμός ουρικού οξέος, συμπαραγόντων ενζύμων
	Cr	4 mg	Παράγοντας ανοχής σε γλυκόζη
	Co	2 mg	Βιταμίνη B ₁₂ , μεθυλοκοβαλαμίνη

Πίνακας 5.1. Μέταλλα και άλλα χημικά στοιχεία που περιέχονται στο ανθρώπινο σώμα, οι μέσες εκτιμώμενες ποσότητές τους και οι σημαντικές βιολογικές λειτουργίες τους.

Για να απλοποιηθεί η μελέτη της παρουσίας και της δράσης των μεταλλικών στοιχείων στον ανθρώπινο οργανισμό, τα κατανέμουμε σε τέσσερις μεγάλες ομάδες:

- i. **Απαραίτητα μέταλλα στον οργανισμό (essential elements).** Πολλά από τα μέταλλα που υπάρχουν στη φύση αποτελούν απόλυτα χρήσιμα συστατικά για τον οργανισμό. Άλλα είναι αναγκαία σε μεγάλες ποσότητες (π.χ. το νάτριο, το κάλιο, το ασβέστιο, το μαγνήσιο) και φυσικά δεν έχουν τοξικές επιπτώσεις, άλλα είναι απαραίτητα σε μικρές ποσότητες (π.χ. ο σίδηρος, ο χαλκός, ο ψευδάργυρος, το σελήνιο) και σχετικά τοξικά σε πολύ μεγαλύτερες.
- ii. **Τοξικά μέταλλα στον οργανισμό (toxic-elements).** Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν, όμως, και τα μη ουσιώδη μέταλλα και συγκεκριμένα τα τοξικά μέταλλα όπως ο υδράργυρος, ο μόλυβδος, το κάδμιο, το αρσενικό, το χρώμιο, κ.ά., που είναι μόνον επιβλαβή για τον άνθρωπο και σχεδόν όλους τους οργανισμούς, ακόμη και όταν βρίσκονται σε ίχνη της τάξης των μg ή mg. Πρέπει να σημειωθεί ότι υπάρχουν και μεταλλικά στοιχεία, που χωρίς να είναι απαραίτητα, δεν είναι και ιδιαίτερος τοξικά για τον οργανισμό. Αυτά χαρακτηρίζονται, απλώς, μη ουσιώδη (non-essentials), όπως για παράδειγμα το Si, Ti κλπ.
- iii. **Μεταλλοφάρμακα (metallo-drugs).** Η χρήση μετάλλων που εισάγονται στον οργανισμό στα πλαίσια της φαρμακευτικής του περίθαλψης είναι σημαντική, αν και μόλις στο 0,5% είναι ανόργανα φάρμακα, ενώ το υπόλοιπο 99,5% είναι οργανικά. Οργανομεταλλικές ενώσεις χρησιμοποιούνται ως μεταλλοφάρμακα για συγκεκριμένες παθήσεις: για παράδειγμα ως χημειοθεραπευτικά για την αντιμετώπιση του καρκίνου, ως αντιελκωτικά, για λοιμώξεις, αρθρίτιδα, νευροεκφυλιστικές ασθένειες κλπ. Επιπλέον, τα μεταλλικά ιχνοστοιχεία είναι μέρος των πολυβιταμινούχων σκευασμάτων που καταναλώνονται ως διαιτητικά πρόσθετα.
- iv. **Μέταλλα σε άλλες ιατρικές εφαρμογές.** Είναι ευρεία η χρήση μετάλλων που εισάγονται στον οργανισμό στα πλαίσια της ιατρικής του περίθαλψης, είτε ως διαλύματα μεταλλικών αλάτων και οργανομεταλλικών ενώσεων που χρησιμοποιούνται σε διαγνωστικές τεχνικές, ως σκιαστικά μέσα (contrast agents), είτε τέλος ως μεταλλικά υλικά και κράματα σε προσθετικές εργασίες της ορθοπεδικής, της χειρουργικής και της οδοντιατρικής.

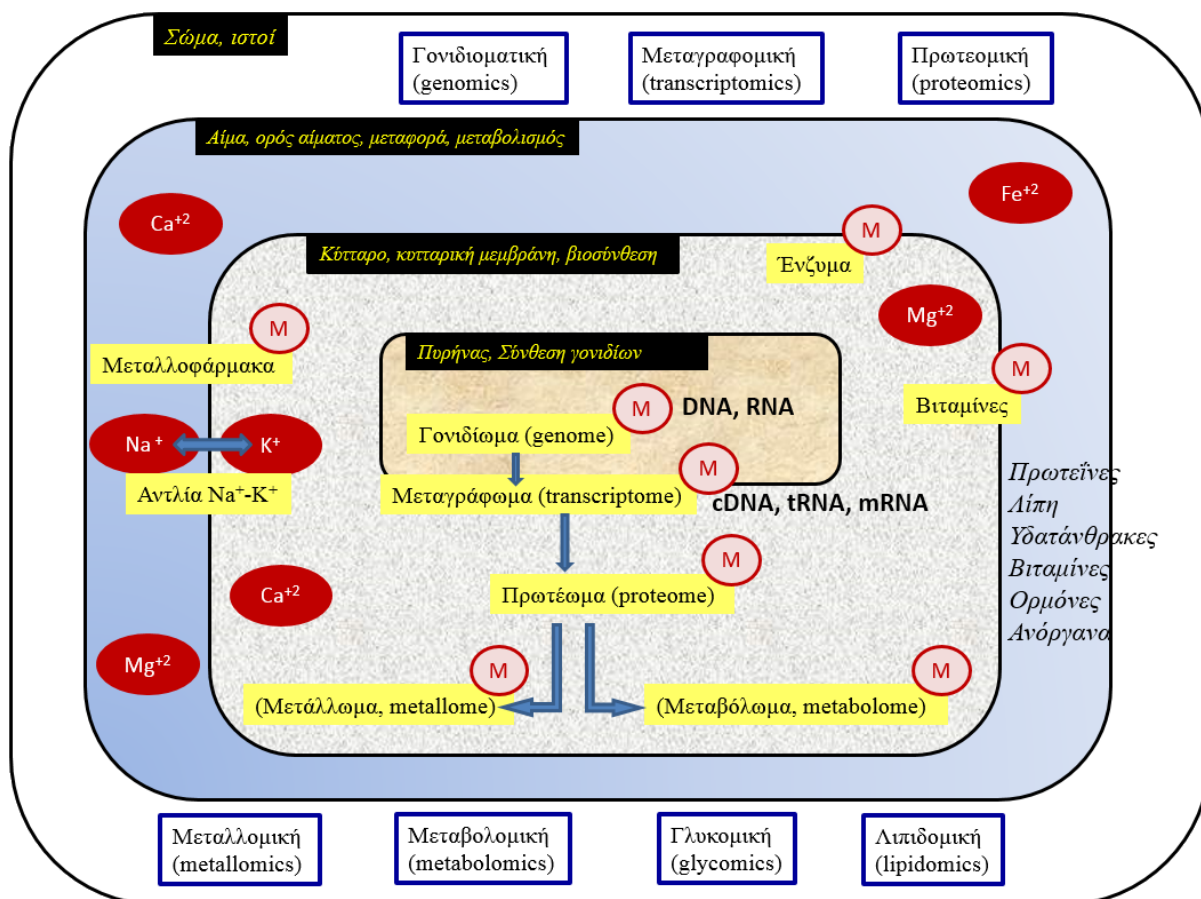
Για τις παραπάνω κατηγορίες που αναφέρονται στα μέταλλα, όπως περιγράφονται στον **Πίνακα 5.2**, θα γίνει αναλυτικότερη αναφορά σε επόμενες παραγράφους του βιβλίου, με έμφαση όχι στις βιοανόργανες αλλά στις βιοαναλυτικές εφαρμογές που σχετίζονται με αυτά.

Απαραίτητα	Τοξικά	Μεταλλοφάρμακα	Διάγνωση-Πρόσθετα
Κάλιο	Υδράργυρος	Λευκόχρυσος	<i>Σκιαστικά διαλύματα</i>
Νάτριο	Μόλυβδος	Χρυσός	Γαδολίνιο
Ασβέστιο	Κάδμιο	Ρουθίνιο	Θάλλιο
Μαγνήσιο	Χρώμιο (VI)	Βισμούθιο	Γάλλιο
Σίδηρος	Αρσενικό	Άργυρος	Τεχνήτιο
Μαγγάνιο	Άργυρος	Λίθιο	Ρήνιο
Ψευδάργυρος	Χρυσός	Κοβάλτιο	Βάριο
Χαλκός	Κασσίτερος	Βανάδιο	
Κοβάλτιο	Αντιμόνιο	Όσμιο	<i>Μεταλλικά πρόσθετα</i>
Σελήνιο	Νικέλιο	Μολυβδαίνιο	Χρώμιο
Μολυβδαίνιο (Βανάδιο)	Τελλούριο		Κοβάλτιο
(Χρώμιο (III))	Ουράνιο		Τιτάνιο
	Αργίλιο		Χρυσός
			Λευκόχρυσος
			Υδράργυρος (αμάλαμα)

Πίνακα 5.2. Κατηγορίες των σπουδαιότερων μεταλλικών στοιχείων στον οργανισμό

Η **μεταλλομική (Metallo-mics)** είναι ένας σχετικά νέος κλάδος στο πεδίο των -omics με συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον. Η σύγχρονη τάση της δημιουργίας επιστημονικών πεδίων στη βιολογία που στην ονομασία τους υπάρχει, διεθνώς, η κατάληξη -omics, προέρχεται καταρχήν από την ονομασία «χρωμόσωμα» (ορθότερα «χρωματόσωμα»). Από την αγγλική ονομασία (chromosome) προέρχεται η κατάληξη -ome και

δημιουργήθηκε αντίστοιχα η κατάληξη -omics. Στη συνέχεια, η κατάληξη -omics χρησιμοποιείται για την ονομασία του επιστημονικού πεδίου και η κατάληξη -ome για την ονομασία του κυρίως αντικείμενου που μελετάται όπως για παράδειγμα οι όροι: proteomics/proteome και genomics και genome. Ωστόσο, στην ελληνική γλώσσα δεν έχουν αποδοθεί όλοι οι σχετικοί ή παρεμφερείς διεθνείς όροι που εμφανίζονται με ταχείς ρυθμούς ενώ σε πολλούς όρους γίνεται απλή μετατροπή τους από την αγγλική με την κατάληξη -ομική (π.χ. πρωτεομική, γονιδιοματική, μεταλλομική κλπ.) ή σπανιότερα με κατάληξη -ομική (π.χ. πρωτεομική, γονιδιοματική κλπ.). Στα κεφάλαια του βιβλίου αυτού οι όροι για τα πεδία χρησιμοποιούνται ως πρωτεομική (proteomics), μεταλλομική (metallomics), κλπ. ενώ οι όροι για τα αντικείμενα της μελέτης ως πρωτέωμα ή πρωτεΐωμα (proteome), μέταλλωμα (metallome), κλπ. Στο **Σχήμα 5.1** δίνεται μια προσεγγιστική συσχέτιση των πεδίων αυτών με πληροφορίες για το αντικείμενο ερεύνης.



Σχήμα 5.1. Γενική σχέση μεταξύ των πεδίων των omics στο κύτταρο και τον οργανισμό (όπου M: μεταλλικό στοιχείο)

Η μεταλλομική συνδυάζει τις γνώσεις της Βιοανάλυσης, της Πρωτεομικής, της Μεταβολομικής, της Γονιδιοματικής, της Βιοανόργανης Χημείας, και της Χημείας των Ενώσεων Συναρμογής, ειδικά για τα Βιομέταλλα και τις ενώσεις τους που έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τον ανθρώπινο οργανισμό αλλά και ευρύτερα για τους έμβιους οργανισμούς. Από την πλευρά της Βιοανάλυσης, η μεταλλομική αποσκοπεί στη μελέτη, το χαρακτηρισμό, την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση του είδους και της μοριακής δομής των ενώσεων των μετάλλων με βιομόρια αλλά και των μεταβολιτών των μεταλλοφαρμάκων.

Όπως θα περιγραφεί αναλυτικότερα σε επόμενο κεφάλαιο, για την επίτευξη των παραπάνω στόχων της, η Μεταλλομική αναπτύσσει και εφαρμόζει βιοαναλυτικές μεθόδους με βάση συζευγμένες ή συνδυασμένες τεχνικές, όπου περιλαμβάνονται η Φασματομετρία Μάζας (MS και MSⁿ), η Φασματομετρία Μάζας με Επαγωγικά Συζευγμένο πλάσμα (ICP-MS) το οποίο διαθέτει υψηλή ευαισθησία στην ανίχνευση στοιχείων και χρησιμοποιείται, συνήθως, σε σύζευξη με την υγρή χρωματογραφία. Στον **Πίνακα 5.3**, περιγράφονται συνοπτικά οι σημαντικότερες αναλυτικές τεχνικές που εφαρμόζονται στη μεταλλομική ανάλυση.

Αντικείμενο μελέτης	Αναλυτική τεχνική
Μελέτες τοξικότητας μετάλλων και μηχανισμών αποτοξίνωσης	ICP-MS, ICP-AES, GFAAS, Ειδιομορφική ανάλυση (speciation), Μοριακή ή Ατομική ταυτοποίηση
Μελέτη κατανομής μετάλλων στα βιολογικά υγρά, όργανα, ιστούς, κύτταρα	ICP-MS, ICP-AES, ETAAS, Ειδιομορφική ανάλυση (speciation), Μοριακή ή Ατομική ταυτοποίηση
Ειδιομορφικοί προσδιορισμοί σε βιολογικά υλικά και συστήματα	Συζευγμένες μέθοδοι, όπως LC-ICP-MS, GC-ICP-MS, MALDI-MS, ESI-MS
Δομική (κρυσταλλογραφική) ανάλυση μεταλλώματος (βιομόρια που συνδέονται με μέταλλα)	XRD, EXAFS
Διερεύνηση μηχανισμών αντίδρασης του μεταλλώματος με χρήση προτύπων συμπλόκων	NMR, XPS, Laser Raman Spectroscopy, DNA Sequencing, Aminoacids Sequencing,
Μοριακή ταυτοποίηση μεταλλοπρωτεϊνών, μεταλλοπεπτιδίων και μεταλλοενζύμων	LC-ES-MS, LC-MALDI-MS, LC-ICP-MS
Μελέτη μεταβολισμού βιομορίων που έχουν βιομέταλλα και μελέτη μεταβολιτών	LC, GC, LC-MS, GC-MS, ESI-MS, API-MS, Βιοαισθητήρες
Διάγνωση ασθενειών με συσχέτιση βιομετάλλων, σε πολυστοιχειακή βάση	ICP-AES, ICP-MS, GFAAS,
Σχεδιασμός μεταλλοφαρμάκων για χημειοθεραπεία και μηχανισμών δράσης	LC-MS, LC-ICP-MS, Ανίχνευση ισοτοπικών ιχνηθετών
Μελέτη μεταβολισμού μεταλλοφαρμάκων και μελέτη μεταβολιτών	LC, LC-MS, GC-MS, ESI-MS, API-MS

Πίνακας 5.3 Αναλυτικές τεχνικές που εφαρμόζονται στη μεταλλομική ανάλυση

5.2. Απαραίτητα και ουσιώδη μέταλλα

Σε πολλές περιπτώσεις, τα απαραίτητα μέταλλα βρίσκονται απλώς ως ιόντα αλάτων (π.χ. ηλεκτρολύτες) ή ως σύμπλοκα με οργανικά μόρια, ενώ σε άλλες περιπτώσεις βρίσκονται ενσωματωμένα μέσα σε βιομόρια (πεπτίδια, πρωτ εϊ νες, ένζυμα, σύμπλοκα με νουκλειικά οξέα, κλπ.).

Τα απαραίτητα ή ουσιώδη στοιχεία χρησιμεύουν σε κάποια από τις παρακάτω κύριες λειτουργίες:

- (α) **συμπεριφέρονται ως κύρια στοιχεία σύστασης** βιολογικών υγρών, βιομορίων και ιστών (macrominerals), όπως για παράδειγμα τα στοιχεία Na, Mg, K, Ca, Cl και P. Ο φώσφορος και το ασβέστιο είναι κύρια στοιχεία των οστών, τα νάτριο, κάλιο και χλώριο των ηλεκτρολυτών, κλπ.
- (β) **συμμετέχουν στην κατάλυση βιοχημικών αντιδράσεων μεταφοράς ομάδων** (group-transfer reactions) όπως για παράδειγμα στη μεταφορά της φωσφορυλομάδας ($-PO^3$). Τέτοια μέταλλα είναι Zn^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} και Fe^{3+} , κ.ά.
- (γ) **συμμετέχουν σε αντιδράσεις οξειδωσης-αναγωγής, όπου απαιτείται η μεταφορά ηλεκτρονίων**. Στις περιπτώσεις αυτές είναι χρήσιμα τα μεταβατικά μέταλλα, που έχουν πολλούς αριθμούς οξειδωσης και μπορούν να δρουν ως μεταφορείς ηλεκτρονίων. Για παράδειγμα, διαφέρουν κατά μία μονάδα τα ζεύγη μορφών (Fe^{+3}/Fe^{+2}), (Cu^{+2}/Cu^{+1}), ($Mo^{+6}/Mo^{+5}/Mo^{+4}$), ($Co^{+3}/Co^{+2}/Co^{+1}$) και είναι χρήσιμα για μεταφορά ενός κάθε φορά ηλεκτρονίου, ενώ το ζεύγος (Se^{+4}/Se^{+2}) είναι χρήσιμο για τη μεταφορά δύο ηλεκτρονίων.
- (δ) **αποτελούν δομικά ιχνοσυστατικά βιομορίων, συμπαραγόντων ενζύμων κλπ.** Γενικά τα στοιχεία αυτά θεωρείται ότι υποβοηθούν τη δομή του βιομορίου και δε συμμετέχουν σε θέσεις που μπορεί να υποστούν οξειδοαναγωγή. Παραδείγματα τέτοιων στοιχείων είναι το Ca και ο Zn ως ιόντα μέσα σε ένζυμα, αλλά και τα αμέταλλα, όπως το I που είναι συστατικό σε μία μόνο ορμόνη, τη θυροξίνη, και το F που εισέρχεται στο κρυσταλλικό πλέγμα του απατίτη των δοντιών και οστών, αντικαθιστώντας OH και σχηματίζοντας φθοροαπατίτη.

Στο **Σχήμα 5.2** που ακολουθεί, δίνονται αθροιστικά από περίπου 20.000 πρωτεΐνες που προκύπτουν από αντίστοιχα γονίδια, και αυτές οι οποίες σχετίζονται με την παρουσία μετάλλων. Προκύπτει ότι το ένα τρίτο των πρωτεϊνών έχουν κάποια λειτουργική σχέση με συμπράγοντα που διαθέτει μεταλλικό στοιχείο.



Σχήμα 5.2. Το ένα τρίτο των πρωτεϊνών σχετίζονται με την παρουσία μετάλλων σε κάποιο συμπράγοντά τους.

Τα μέταλλα, συνήθως, αντιδρούν με δύο, τέσσερις ή έξι υποκαταστάτες, οπότε παρόμοια συμπεριφέρονται και στις συνδέσεις τους μέσα στα βιομόρια. Αν ένα μέταλλο δεσμεύεται με δύο υποκαταστάτες, σχηματίζει ένα γραμμικό σύμπλοκο. Αν συμπλέκεται με τέσσερις υποκαταστάτες, το μέταλλο βρίσκεται στο κέντρο ενός επίπεδου τετραγώνου ή μιας τετραεδρικής δομής. Όταν, τέλος, συνδέεται με έξι υποκαταστάτες, θα βρίσκεται στο κέντρο ενός οκταέδρου.

Στον **Πίνακα 5.4** δίνονται γνωστά μεταλλοένζυμα και το μοριακό τους βάρος, το οποίο είναι χρήσιμο για την ταυτοποίησή τους με την τεχνική MS. Παράλληλα, αναφέρονται και οι αντίστοιχες βιολογικές τους λειτουργίες. Επισημαίνεται εδώ ότι η σύνδεση των μετάλλων μπορεί να παρατηρείται είτε στην εσωτερική δομή της αντίστοιχης πρωτεΐνης είτε στην εξωτερική (ως συμπράγων του ενζύμου). Γενικά, όμως, η σύνδεση των μετάλλων στη δομή του ενζύμου/πρωτεΐνης είναι τέτοια που, όταν απομονώνεται εργαστηριακά η πρωτεΐνη, απομονώνονται μαζί της και τα άτομα του μετάλλου, ενώ στα φάσματα μαζών αυτών των ενζύμων τα μέταλλα ανιχνεύονται και στο μοριακό ιόν και σε κάποια πρωτεϊνικά θραύσματα τα οποία δημιουργούνται κατά τον ιοντισμό (ηλεκτροψεκασμός ESI, χημικός ιοντισμός CI, ατμοσφαιρικός ιοντισμός API, κλπ.).

Ειδικότερα στοιχεία για τα ουσιαδή μέταλλα στον οργανισμό δίνονται με συνοπτικό τρόπο παρακάτω. Στα αλκάλια και τις αλκαλικές γαίες, η σύγχρονη Βιοανάλυση χρησιμοποιεί τις κλασικές μεθόδους της Κλινικής Χημείας. Αξίζει να σημειωθεί ότι και για τα μέταλλα που εισέρχονται και εξέρχονται μέσω της κυτταρικής μεμβράνης υφίσταται ένα μηχανισμός **ομοιόστασης** (*metal homeostasis*), ώστε ο οργανισμός να διατηρεί σταθερό το ισοζύγιό τους.

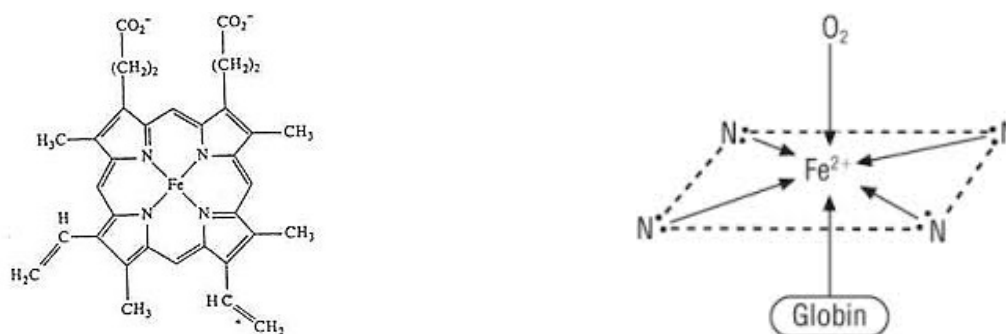
Σίδηρος (Fe): Είναι ένα από τα σημαντικότερα μέταλλα που αποτελεί βασικό στοιχείο για τη σύνθεση της αιμοσφαιρίνης του αίματος (**Σχήμα 5.3**) και διαφόρων ενζύμων, συμβάλλει στην ανάπτυξη, αυξάνει την αντίσταση στις ασθένειες και προλαμβάνει την κόπωση. Η έλλειψή του είναι συχνή στην εφηβική ηλικία, με την εκδήλωση αναιμίας (σιδηροπενική) και προκαλεί ζαλάδες και ατονίες, αφού η αιμοσφαιρίνη δε μεταφέρει επαρκώς το οξυγόνο στον εγκέφαλο. Εκτός από την αιμοσφαιρίνη, ο σίδηρος υπάρχει στη φερριτίνη του οργανισμού καθώς και στη μυοσφαιρίνη που παραλαμβάνεται μέσω των ζωϊκών τροφών. Η φερριτίνη αποτελεί την πρωτεΐνη που λειτουργεί ως αποθήκη του σιδήρου στον οργανισμό, όπως και η παραλλαγή της η αιμοσιδηρίνη. Η μεταφορά του σιδήρου γίνεται μέσω συναρμογής του με την τρανσφερίνη. Τα επίπεδα του σιδήρου στον ορό είναι για μεν τους άνδρες 0,6-1,6 mg/L ενώ για τις γυναίκες είναι 0,4-1,4 mg/L. Αντίστοιχα σε παιδιά μέχρι 12 ετών κυμαίνεται μεταξύ 0,3-1,5 mg/L, ανάλογα με την ηλικία.

Ψευδάργυρος (Zn): Έχει ως βασική λειτουργία να κατευθύνει και να ρυθμίζει τη ροή των διαδικασιών του σώματος, καθώς και να διατηρεί τα κύτταρα σε καλή κατάσταση. Είναι γνωστοί οι «δάκτυλοι ψευδαργύρου» (*zinc finger motifs*) που σχηματίζονται με συνδέσεις του μετάλλου με τα αμινοξέα ιστιδίνη και κυστεΐνη. Στις περιοχές αυτών των μορφωμάτων υπάρχει ειδική δυνατότητα σύνδεσης της πρωτεΐνης με άλλα βιομόρια και DNA, οπότε οι περιοχές αυτές λειτουργούν ως ρυθμιστές της μεταγραφής. Είναι βασικός δομικός λίθος του

γεννητικού συστήματος των αρρένων και πολύ χρήσιμος για τα νύχια, το δέρμα και τις τρίχες. Ανεπάρκεια του Zn μπορεί να προκαλέσει καθυστέρηση στην ανάπτυξη, μειωμένη ικανότητα θεραπείας τραυμάτων, δερματίτιδα, ανορεξία, νόσους γαστρεντερικού συστήματος, ατροφία όρχεων, πτώση μαλλιών, κλπ. Αποτελεί βασικό συστατικό εκατοντάδων ενζύμων, όπως οι πολυμεράσες του DNA και του RNA, κ.ά. Γενικά τα φυσιολογικά επίπεδα του ψευδαργύρου που μετρούνται στον ορό του αίματος κυμαίνονται μεταξύ 0,6-1,5 mg/L.

Μεταλλοένζυμο	Μολαρική μάζα (MW) σε kDa	Αριθμός ατόμων σε μετάλλου/μόριο	Βιολογική λειτουργία
Αιμοσφαιρίνη	64-68	1 Fe	Μεταφορά οξυγόνου
Τρανσφερίνη	76-78	2 Fe	Μεταφορά σιδήρου
Φερριτίνη	440-460	1 Fe	Αποθήκευση σιδήρου
Φωσφοτρανσφεράσες		1 Mg	Μεταφορά ηλεκτρονίων
Καταλάση	225	4 Fe	Αποσύνθεση H ₂ O ₂
Νιτρογενάση	200-220	24 Fe, 2 Mo	Σταθεροποίηση αζώτου
Οξυγονάση κυτοχρώματος P-450	50	1 Fe	Μεταβολισμός στεροειδών
Οξειδάσες κυτοχρώματος		1 Cu	Μεταφορά ηλεκτρονίων σε οξυγόνο
Ανυδράση ανθρακικού οξέος	30	1 Zn	Κατάλυση ισορροπίας ανθρακικών
Καρβοξυπεπτιδάση	34	1 Zn	Υδρόλυση πεπτιδικών δεσμών
Ηπατική αλκοολική αφυδρογονάση	150	4 Zn	Οξείδωση αλκοολών
Αλκαλική φωσφατάση	89	3,5 Zn	Υδρόλυση φωσφορικών εστέρων
DNA πολυμεράση	109	2 Zn	Σύνθεση DNA
RNA πολυμεράση	370	2 Zn	Σύνθεση RNA
Πλαστοκυανίνη	134	1 Cu	Μεταφορά ηλεκτρονίου
Υπεροξειδάση γλουταθειόνης	76-92	1 Se	Αποσύνθεση H ₂ O ₂

Πίνακας 5.4. Μεταλλοένζυμα και μεταλλοπρωτεΐνες, το μοριακό βάρος τους, άτομα μετάλλου ανά μόριο, και βιολογικές τους λειτουργίες



Σχήμα 5.3. Αίμη που περιέχεται στην αιμοσφαιρίνη, και τρόπος δέσμωσης και μεταφοράς οξυγόνου

Χαλκός (Cu): Ενσωματώνεται σε μεταλλοένζυμα με πολλούς τρόπους σχηματίζοντας «κέντρα χαλκού» (κέντρα τύπου T1Cu, T2Cu, T3Cu, Cu_A, Cu_Z κλπ.), όταν συνδέεται με αμινοξέα όπως ιστιδίνες, μεθειονίνες, κυστεΐνες, κ.ά. Γενικά είναι απαραίτητος για τον ενεργειακό μεταβολισμό των κυττάρων και την παραγωγή του συνδετικού ιστού μέσω ενώσεών του με τουλάχιστον 16 πρωτεΐνες. Στο ήπαρ μεταφέρεται ως σύμπλοκο του με αλβουμίνη. Δρα μέσω μεταλλοενζύμων που σχετίζονται με τη σύνθεση της αιμοσφαιρίνης, το μεταβολισμό των ξενοβιοτικών ουσιών, των υδατανθράκων, τη σύνθεση της κατεχολαμίνης, του κολλαγόνου,

της ελαστίνης και της κερατίνης, και στον αντιοξειδωτικό μηχανισμό του οργανισμού. Εξαρτώμενα από το χαλκό είναι τα ένζυμα κυτόχρωμα της c οξειδάσης, των φεροξειδασών, της β-μονοοξυγενάσης της ντοπαμίνης κλπ. Η έλλειψή του σχετίζεται με την εμφάνιση υποχρωμικής αναιμίας, λευκοπενίας, οστεοπόρωσης, κ.ά. Στον ορό βρίσκεται σχεδόν ποσοτικά δεσμευμένος με τη σερουλοπλασμίνη και δευτερευόντως με την αλβουμίνη. Χαμηλά επίπεδα χαλκού συνδέονται με τη νόσο Wilson, κατά την οποία έχουμε μειωμένη παραγωγή σερουλοπλασμίνης. Αντίστοιχο είναι και το σύνδρομο Menke στα νεογνά. Γενικά τα φυσιολογικά επίπεδα του χαλκού που μετρούνται στα ούρα είναι της τάξης των 5-30 μg/L, ενώ στον ορό του αίματος κυμαίνονται μεταξύ 0,7-1,5 μg/L.

Μαγγάνιο: Το μαγγάνιο είναι χρήσιμο στον οργανισμό, γιατί συμβάλλει στην ανάπτυξη του συνδετικού ιστού και στο μεταβολισμό των υδατανθράκων και λιπών. Παραλαμβάνεται μέσω της διατροφής και απορροφάται εύκολα μέσω της γαστρεντερικής οδού. Τα επίπεδα του μαγγανίου στον ορό του αίματος κυμαίνονται συνήθως μεταξύ 6-16 mg/L.

Σελήνιο (Se). Είναι άριστο αντιοξειδωτικό, προστατεύει τη βιταμίνη E και καθυστερεί τη γήρανση του δέρματος. Επίσης, διατηρεί την ελαστικότητα του δέρματος και των ιστών, αυξάνει την αντοχή και παίζει ρόλο στην αντρική αναπαραγωγή. Έλλειψη του πιθανώς προκαλεί καρδιοαγγειακά νοσήματα. Το σελήνιο είναι ουσιώδες ιχνοστοιχείο στη δομή των σεληνοαμινοξέων όπως η σεληνοκυστεΐνη (SeCys) και η διμερής σεληνοκυστίνη ((SeCys)₂), που συντίθενται στον ανθρώπινο οργανισμό αλλά και του παρόμοιου αμινοξέος σεληνομεθειονίνη (SeMet), που συντίθεται στα φυτά και καταναλώνεται από τον άνθρωπο. Οι πρωτεΐνες που περιέχουν σεληνοκυστεΐνη ή σεληνομεθειονίνη χαρακτηρίζονται σεληνοπρωτεΐνες. Το σελήνιο παρουσιάζει κάποια ομοιότητα με το θείο στη συμπεριφορά, αφού άλλωστε ανήκουν στην ίδια ομάδα του περιοδικού πίνακα. Ο βασικός του ρόλος, όμως, συνίσταται στη μεταφορά δύο ηλεκτρονίων. Υπάρχει στα ένζυμα που καταλύουν την οξείδωση της γλουταθειόνης (GSH) προς σχηματισμό της δισουλφιδικής διμερούς μορφής της (GSSG):

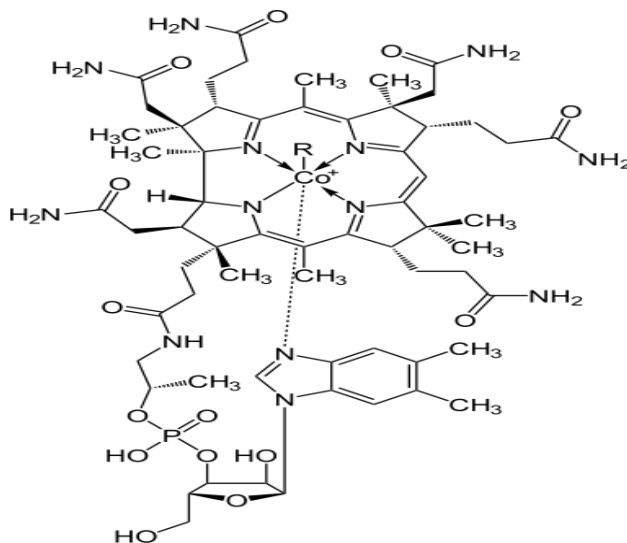


Η συμπεριφορά και η ικανότητα άμεσου αντιδράσεως του σεληνίου εξαρτώνται από το βαθμό οξειδώσεώς του. Σε μεγάλες συγκεντρώσεις, όμως, ή σε άλλες μορφές μπορεί να έχει τοξική δράση. Γενικά, οι ανόργανες μορφές του σεληνίου είναι τοξικότερες από τις οργανικές μορφές. Για τους ανθρώπους και τα περισσότερα θηλαστικά, η τοξικότητα του σεληνίου αυξάνεται κατά τη σειρά: σεληνιώδη [Se(IV)] < σεληνικά [Se(VI)] < σεληνιούχα [Se(II)]. Εκτός των παραπάνω οργανοσεληνικών ενώσεων, ενδιαφέρον παρουσιάζουν και οι ενώσεις διμεθυλοσελήνιο, σεληνουρία, κ.ά., οι οποίες θεωρούνται συνηθείς μεταβολίτες του σεληνίου. Η ένωση μονομεθυλο-σεληνοϋδριδίου (MeSeH), ίσως, έχει προστατευτική για τον καρκίνο δράση. Οι ενώσεις του σεληνίου και γενικότερα οι χημικές μορφές του προσδιορίζονται με τις τεχνικές LC-MS, LC-ICP-MS, GC-MS, HG-AAS. Στο αίμα τα επίπεδά του κυμαίνονται μεταξύ 0,05-0,15 μg/L, ενώ στα ούρα 0,01-0,16 μg/L. Ο Πίνακας 5.5 συνοψίζει τις μορφές του σεληνίου και των μεταβολιτών του.

Όνομα	Σύμβολο	Μοριακή μάζα	Μοριακός τύπος
Σεληνο-μεθειονίνη	SeMet	195,102	C ₅ H ₁₀ NO ₂ Se
Σεληνο-εθειονίνη	SeEt	210,130	C ₅ H ₁₂ NO ₂ Se
Σεληνο-κυστεΐνη	SeCys	168,056	C ₃ H ₇ NO ₂ Se
Σεληνο-κυστίνη	(SeCys) ₂	333,089	C ₆ H ₁₁ N ₂ O ₄ Se ₂
Διμεθυλο-σεληνιούχα	DMSe	109,032	C ₂ H ₆ Se
Σεληνουρία	SeUr	123,019	C(NH ₂) ₂ Se
Σεληνο-κυσταμίνη	SeCM	246,078	C ₄ H ₁₇ N ₂ Se ₂
Τριμεθυλο-σεληνιούχα	TMSe ⁺	124,067	C ₃ H ₆ Se ⁺

Πίνακας 5.5. Μορφές και είδη του σεληνίου καθώς και των μεταβολιτών του στον οργανισμό

Κοβάλτιο: Το κοβάλτιο είναι βασικό στον οργανισμό, γιατί αποτελεί μέρος της βιταμίνης B12 (Σχήμα 5.4) Παραλαμβάνεται μέσω της διατροφής και απορροφάται εύκολα μέσω της γαστρεντερικής οδού. Ραδιενεργό ^{60}Co χρησιμοποιείται ως πηγή ακτινοβολίας γ στην ακτινοθεραπεία. Τα επίπεδα του κοβαλτίου στον ορό του αίματος κυμαίνονται συνήθως μεταξύ 0,1-0,4 $\mu\text{g/L}$.



Σχήμα 5.4. Η βιταμίνη B12 περιέχει κοβάλτιο.

Χρόμιο (Cr): Μόνο το τρισθενές χρώμιο σε ίχνη θεωρείται απαραίτητο στον οργανισμό, πιθανώς για το μεταβολισμό των υδατανθράκων, ενώ το εξασθενές είναι πολύ τοξικό. Μεταφέρεται στο αίμα συνδεδεμένο με την τρανσφερίνη. Όπως και ο χαλκός, σημαντικές ποσότητες χρωμίου απεκκρίνονται με τη χολή. Συνεργάζεται με την ινσουλίνη και λειτουργεί προστατευτικά απέναντι στο διαβήτη. Επιδρά θετικά και στο μεταβολισμό των λιπιδίων, ενώ υποβοηθά και τη διαδικασία ανάπτυξης. Γενικά τα επίπεδα του χρωμίου που μετρούνται στα ούρα, όπως και στον ορό, είναι της τάξης των $<0,1-0,5 \mu\text{g/L}$.

Κάλιο (K): Προστατεύει την καρδιά από τις αρρυθμίες και μαζί με το νάτριο δρουν ρυθμιστικά, διατηρώντας το pH σε επιθυμητά οργανικά επίπεδα καθώς και την ισορροπία του ύδατος στον οργανισμό. Καρδιακές αρρυθμίες, μυϊκοί πόνοι και κόπωση είναι μερικά από τα συμπτώματα που προκαλεί η έλλειψη του καλίου στον οργανισμό.

Νάτριο (Na): Βοηθά στη διατήρηση της ηλεκτρολυτικής ισορροπίας στα υγρά του σώματος και στο αίμα και ρυθμίζει την ποσότητα του νερού μέσα και έξω από τα κύτταρα. Είναι απαραίτητο για τη μεταβίβαση των ερεθισμάτων στους μύες και τα νεύρα. Η έλλειψή του μπορεί να προκαλέσει κατάπωση και μυϊκές κράμπες.

Ασβέστιο (Ca): Υπάρχει στον οργανισμό σε μεγαλύτερες ποσότητες από όλα σχεδόν τα μέταλλα. Μαζί με το φώσφορο αναλαμβάνει το ρόλο της στήριξης των οστών και των δοντιών, ενώ συνεργάζεται με το μαγνήσιο για τη σωστή καρδιαγγειακή λειτουργία. Ανεπάρκεια ασβεστίου στον οργανισμό προκαλεί την οστεοπόρωση.

Μαγνήσιο (Mg): Διασφαλίζει, μαζί με το ασβέστιο, την καλή υγεία και λειτουργία των οστών, δοντιών, νεύρων και της καρδιάς. Εμποδίζει την πήξη του αίματος και προστατεύει από θρομβώσεις των αγγείων και από εμφράγματα. Συμβάλλει στην πρόληψη του άγχους και την άμυνα του οργανισμού από ασθένειες. Έλλειψη του μαγνησίου προκαλεί κόπωση και μυϊκές κράμπες.

Φώσφορος (P): Συμμετέχει σε όλες, σχεδόν, τις χημικές αντιδράσεις του οργανισμού. Είναι απαραίτητος για την ομαλή λειτουργία του εγκεφάλου, των νεύρων, της καρδιάς και των οστών. Η έλλειψη φωσφόρου προκαλεί διαταραχές στην όραση. Η φωσφορική, η διφωσφορική και η τριφωσφορική αδενοσίνη, (AMP, ADP, ATP) είναι από τα βασικότερα δομικά στοιχεία του γενετικού υλικού. Αποτελούνται από την αδενίνη

και το σάκχαρο ριβόζη, η ένωση των οποίων δημιουργεί την αδενοσίνη. Σ' αυτήν προσκολλώνται μία, δύο ή τρεις αντίστοιχα φωσφορικές ομάδες, με μοριακό τύπο ($C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3$) και μοριακή μάζα 507,18 g/mol.

Ιώδιο (I): Είναι απαραίτητο συστατικό της θυροξίνης και συμβάλλει στη σωστή λειτουργία του μεταβολισμού. Η ανεπάρκεια του οργανισμού σε ιώδιο μπορεί να προκαλέσει βρογχοκήλη και υποθυρεοειδισμό. Στη βιοανάλυση έχει ενδιαφέρον η μέτρηση των μεταβολών των συγκεντρώσεων των ορμονών TSH (thyroid stimulating hormone), T3 και T4, για τη διάγνωση παθήσεων του θυρεοειδούς αδένα.

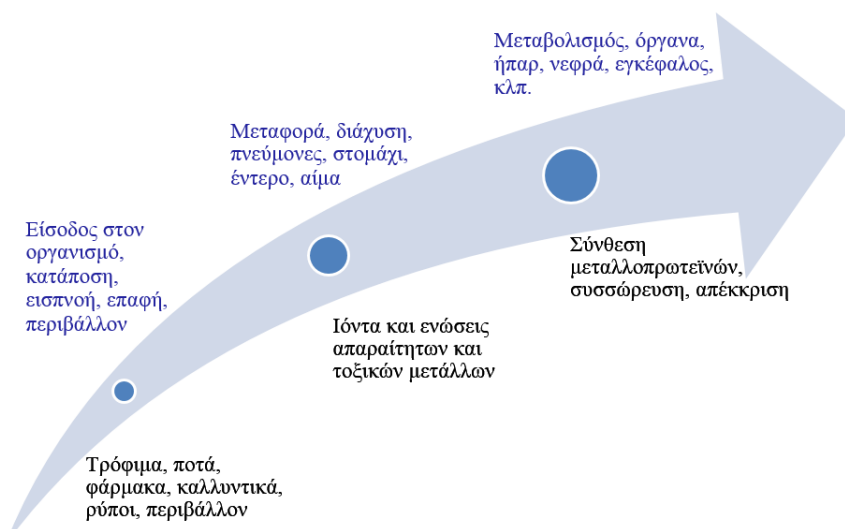
5.3. Μη Ουσιώδη και Τοξικά Μέταλλα στον Οργανισμό

Ως τοξικά χαρακτηρίζονται τα μέταλλα που έχουν την τάση να ενώνονται με βιολογικής σημασίας μόρια και να αναστέλλουν ή μεταβάλλουν τη δράση τους με τρόπο αρνητικό για τις βιολογικές λειτουργίες των οργανισμών. Πολλά από τα τοξικά ανήκουν και στην κατηγορία των βαρέων μετάλλων. Με τον όρο βαριά μέταλλα περιγράφονται, συνήθως, τα μέταλλα εκείνα που έχουν πυκνότητα μεγαλύτερη από 6 g/cm³, είτε έχουν γενικά μεγαλύτερη πυκνότητα από το σίδηρο (7,87 g/cm³) είτε μεγαλύτερη σχετική ατομική μάζα από το ασβέστιο (40,08). Πολλά από τα βαρέα μέταλλα είναι τοξικά ακόμη και σε ίχνη, και για να αποφεύγεται η ασάφεια, πολλές φορές αναφέρονται ως **τοξικά βαριά μέταλλα**, άσχετα από την πυκνότητα ή τη σχετική ατομική τους μάζα, ώστε να διακρίνονται, σαφώς, από τα υπόλοιπα μη τοξικά μέταλλα. Τα πιο συνήθη τοξικά μέταλλα στα οποία υπάρχει πιθανότητα να εκτεθεί ο άνθρωπος είναι ο υδράργυρος, ο μόλυβδος, το κάδμιο, το αρσενικό, και το χρώμιο, τα οποία είναι επιβλαβή για τον άνθρωπο και σχεδόν όλους τους οργανισμούς, ακόμη και όταν βρίσκονται σε ίχνη της τάξης του εκατομμυριοστού του γραμμαρίου. Στα τοξικά αυτά μέταλλα θα εστιάσουμε την αναφορά μας παρακάτω, χωρίς να επεκταθούμε και στα ραδιενεργά μέταλλα ούτε και σε εκείνα από τα απαραίτητα μέταλλα, όπως για παράδειγμα ο χαλκός, που σε μεγάλες συγκεντρώσεις δρουν πλέον τοξικά.

Μέχρι πριν μερικές δεκαετίες, το ενδιαφέρον για την τοξικότητα των μετάλλων εστιαζόταν στην επαγγελματική έκθεση των εργαζομένων σε βιομηχανικούς χώρους που επιβαρύνονται από βαριά μέταλλα. Σήμερα, όμως, για πολλά από αυτά τα τοξικά μέταλλα, υπάρχουν κοινές χρήσεις και πιθανές πηγές μόλυνσης σε αρκετές καθημερινές δραστηριότητες του ανθρώπου. Τα περισσότερα από τα βαριά μέταλλα ήταν παρόντα στο άμεσο περιβάλλον του ανθρώπου μόνο σε ασήμαντες ποσότητες μέχρι τα τέλη του 19ου αιώνα. Στη συνέχεια, όμως, η ραγδαία εκβιομηχάνιση, η αύξηση της παραγωγής και η τεχνολογική πρόοδος οδήγησαν σε ανεξέλεγκτη διασπορά τους και επικίνδυνη αύξηση της παρουσίας τους στο περιβάλλον και στους ζωικούς και φυτικούς οργανισμούς. Η αμερικανική ομοσπονδιακή υπηρεσία για την υγεία και τον άνθρωπο (U.S. Agency for Toxic Substances and Disease Registry), καταρτίζει κάθε δύο χρόνια, έναν κατάλογο εκατοντάδων τοξικών ουσιών· στις 8 πλέον τοξικές περιλαμβάνονται τουλάχιστον 4 μέταλλα, δηλαδή ο μόλυβδος, το αρσενικό, ο υδράργυρος, και το κάδμιο. Η κατάρτιση του καταλόγου αυτού βασίζεται σε κριτήρια όπως οι τοξικές ιδιότητες των ουσιών στον άνθρωπο, οι πιθανότητες έκθεσης του ανθρώπου στην επίδρασή τους και, τέλος, η συχνότητα εμφάνισης αναφορών για περιοχές τοξικής ρύπανσης.

Όλα τα χημικά στοιχεία, άρα και τα τοξικά μέταλλα, σχηματίζουν αρκετές χιλιάδες χημικών ενώσεων. Η τοξικότητα ενός μετάλλου στον ανθρώπινο οργανισμό εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως ο τρόπος έκθεσης (κατάποση νερού και τροφής, εισπνοή, επαφή), η διάρκεια της έκθεσής του, η ηλικία του, η υγεία του, αλλά σε μεγάλο βαθμό εξαρτάται και από τη **χημειομορφή**, δηλαδή το είδος της χημικής του ένωσης (*species*) με την οποία ένα τοξικό μέταλλο εισέρχεται σχηματίζεται στον οργανισμό. Οι μορφές αυτές μπορεί να είναι είτε ελεύθερα ιόντα, είτε ασθενώς δεσμευμένες χημικές ενώσεις, ευδιάλυτα σύμπλοκα, υδροξείδια, άλατα, οργανομεταλλικές ενώσεις, είτε τέλος ισχυρά δεσμευμένες μορφές σε βιομόρια, όπως αμινοξέα, πρωτεΐνες και ένζυμα, υδατάνθρακες, ακόμη και σε βιταμίνες ή στο DNA. Οι χημειομορφές ανιχνεύονται στον οργανισμό με μια κατηγορία αναλυτικών μεθόδων που χαρακτηρίζονται με τον όρο «**ειδομορφική ανάλυση**» (*speciation*). Την τελευταία δεκαετία, αναπτύσσεται ταχύτατα ο κλάδος της μεταλλομικής (*metallomics*) παράλληλα με την πρωτεομική και γονιδιοματική, ειδικά για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης των μετάλλων με τα βιομόρια, την επίδρασή τους στο μεταβολισμό και την κατανομή τους μέσα στα κύτταρα. Οι αλκυλιωμένες ενώσεις ορισμένων μετάλλων, όπως ο μεθυλιούχος υδράργυρος (που σχηματίζεται από ανόργανο υδράργυρο με τη δράση βακτηρίων στα επιφανειακά νερά), ο τετρααιθυλιούχος μόλυβδος (που έχει χρησιμοποιηθεί ως βελτιωτικό της βενζίνης), ο τριβουτυλιούχος κασσίτερος (που χρησιμοποιείται ως βακτηριοκτόνο στις καρίνες των πλοίων), τα μονομεθυλοαρσενικόδη άλατα (που χρησιμοποιήθηκαν ως γεωργικά και κτηνιατρικά φάρμακα) κ.ά., είναι γενικά περισσότερο τοξικές σε σχέση

με τις ανόργανες ενώσεις των μετάλλων αυτών. Οι τρόποι εισόδου των τοξικών αλλά και των απαραίτητων μετάλλων φαίνονται σχηματικά στο **Σχήμα 5.5**.



Σχήμα 5.5. Είσοδος, μεταφορά, δέσμευση και συσσώρευση μετάλλων στα όργανα

Η τοξική δράση των μετάλλων μπορεί να εκδηλωθεί με διαφορετικούς βιοχημικούς μηχανισμούς που αρχίζουν με τη πρόκληση οξειδωτικού στρες από την απελευθέρωση ενεργού οξυγόνου, υπεροξειδικών και σουπεροξειδικών ριζών και φτάνουν μέχρι την παρεμβολή του μετάλλου σε διαδικασίες μεταγραφής του DNA και την πρόκληση γενετικών ανωμαλιών. Ένας συνήθης μηχανισμός βασίζεται στην παρόμοια δομή και συμπεριφορά των βαριών μετάλλων με κάποιο από τα χρήσιμα στοιχεία, ο οποίος ξεγελά τον οργανισμό και τα συγκρατεί σε θέσεις που κανονικά έπρεπε να βρίσκονται τα χρήσιμα μεταλλικά στοιχεία. Για παράδειγμα, το κάδμιο μιμούμενο τον ψευδάργυρο μπορεί να τον αντικαταστήσει σε ορισμένες πρωτεΐνες (μεταλλοθειονίνες), ο υδράργυρος σχηματίζει με την κυστεΐνη ένωση που μιμείται το αμινοξύ μεθειονίνη, ενώ ο μόλυβδος αντικαθιστά το ασβέστιο στα οστά. Όταν αυτό συμβαίνει, το κάδμιο, ή ο υδράργυρος ή ο μόλυβδος αποθηκεύονται στα όργανα ή τα οστά ή άλλους ιστούς και γίνεται δύσκολη η αποβολή τους, ενώ οι σημαντικές λειτουργίες των χρήσιμων στοιχείων που αντικαθίστανται δεν μπορούν πλέον να γίνουν και εδώ οφείλεται η τοξική δράση των μετάλλων αυτών. Ειδικότερα:

Ο μόλυβδος (Pb) εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος και αντικαθιστά το ασβέστιο στον ερειστικό ιστό ή στις νευρικές συνάψεις, λόγω του παρόμοιου μεγέθους και φορτίου του. Είναι πιθανή η επιβράδυνση της παιδικής ανάπτυξης καθώς και η εμφάνιση μαθησιακών δυσκολιών. Στο νευρικό σύστημα προκαλεί νευροτοξικότητα, νεφροτοξικότητα και υπέρταση, ενώ με την εισπνοή συσσωρεύεται στους πνεύμονες (μολυβδίαση). Εκτός από τις ανόργανες μορφές του, ιδιαίτερα τοξικές είναι ορισμένες οργανομεταλλικές ενώσεις τους, όπως ο τετρααιθυλιούχος μόλυβδος, που στο παρελθόν χρησιμοποιήθηκε ως πρόσθετο καυσίμων αυτοκινήτων. Οι αναλυτικές μέθοδοι που είναι κατάλληλες για τον προσδιορισμό του μολύβδου σε βιολογικά υλικά είναι: (α) η φασματομετρία ατομικής απορρόφησης με φούρνο θερμαινόμενου γραφίτη (ETAAS) για συγκεντρώσεις της τάξης των mg/kg, και (β) η φασματομετρία μάζας με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (ICPMS) για συγκεντρώσεις της τάξης των ng/kg.

Το αρσενικό (As) προκαλεί ισχυρή τοξική αντίδραση στον οργανισμό μετά από κατάποση μέσω επιμολυσμένης τροφής και ιδιαίτερα νερού. Το αρσενικό είναι ο σημαντικότερος ρύπος που κάνει απαγορευτική τη χρήση υπόγειων νερών ως ποσίων, ιδιαίτερα σε χώρες της Ασίας. Άμεσα συμπτώματα είναι η τάση για εμετό, διάρροια, και καρδιακή ανωμαλία, δερματικές παθήσεις, ενώ είναι θανατηφόρο σε μεγαλύτερες δόσεις. Έχει δείχθει ότι η βιομεθυλίωση είναι το κύριο μεταβολικό μονοπάτι για το ανόργανο αρσενικό στον άνθρωπο και σε πολλά είδη ζώων. Σύμφωνα μ' αυτό το μεταβολικό μονοπάτι, το αρσενικό υποβάλλεται αρχικά σε μετατροπή από πεντασθενές αρσενικό άλας (As^V) στο τρισθενές αρσενικό άλας (As^{III}), και με την επακόλουθη μεθυλίωση παράγονται διμεθυλιωμένοι και μεθυλιωμένοι μεταβολίτες. Μια προτεινόμενη σειρά είναι η ακόλουθη: $As^V \rightarrow As^{III} \rightarrow$ Methylarsonic οξύ (MA, As^V) \rightarrow methylarsonous οξύ

(As^{III}) → dimethylarsinic οξύ (DMA, As^V) και dimethylarsinous οξύ (As^{III}). Εκτός από τις παραπάνω είδη-μορφές αρσενικού, υπάρχουν στον οργανισμό και άλλες λιγότερο επικίνδυνες έως και ακίνδυνες μορφές όπως τα αρσενοσάκχαρα, αρσενοβεταΐνες καθώς και οι αρσενοχολίνες. Πάνω από 20 διαφορετικές οργανοαρσενικές ενώσεις έχουν ενδιαφέρον από την βιοαναλυτική οπτική. Το μεθυλαρσενικό (methylarsonous) οξύ και το διμεθυλαρσενικό (dimethylarsinous) οξύ έχει ανιχνευθεί στα ούρα των υγιών ατόμων τα οποία έχουν καταναλώσει νερό που περιέχει ανόργανο αρσενικό, σε ασθενείς με προμυελοκυτταρική λευχαιμία που υποβάλλονται σε θεραπεία με As₂O₃, και σε ανθρώπινα ηπατικά κύτταρα (HepG2) που εκτίθενται σε As^{III}. Έχει αποδειχθεί ότι οι μεθυλιωμένοι μεταβολίτες αρσενικού ελέγχουν τη δράση ενάντια στα κύτταρα λευχαιμίας και λεμφώματος, και ίσως υφίσταται θεραπευτική επίδραση π.χ. του As₂O₃ σε ασθενείς. Επομένως, η διευκρίνιση του μεταβολισμού του αρσενικού είναι πολύ σημαντική για καλύτερα θεραπευτικά αποτελέσματα, και είναι κρίσιμη στη μείωση των παρενεργειών του As₂O₃. Οι αναλυτικές μέθοδοι που είναι κατάλληλες για το προσδιορισμό ενώσεων του αρσενικού είναι: (α) η φασματομετρία ατομικής απορρόφησης με γεννήτρια υδριδίων ατμού (HGAAS) για ανόργανες και απλές οργανοαρσενικές ενώσεις, και (β) η αέρια χρωματογραφία σε σύζευξη με φασματομετρία μαζών (GC-MS) με δυνατότητα μοριακής ταυτοποίησης ή η υγρή χρωματογραφία σε σύζευξη με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα και φασματομετρία μάζας (LC-ICPMS) για μίγματα των οργανοαρσενικών ενώσεων.

Ο υδράργυρος (Hg) σε θερμοκρασία δωματίου είναι υγρός. Εξαιτίας της υψηλής τάσης ατμών που παρουσιάζει αυτή η μορφή του υδραργύρου καθώς και ορισμένα άλατά του, διαχέεται στον αέρα ως ατμός. Οι οργανικές, όμως, ενώσεις του υδραργύρου είναι ακόμη πιο τοξικές. Η χρήση του υδραργύρου ως αμαλγάματος, που περιέχει περίπου 50% υδράργυρο και το υπόλοιπο άργυρο, κασσίτερο, χαλκό κ.ά., μέχρι σήμερα στην οδοντιατρική, είναι δυνατό υπό προϋποθέσεις να προκαλεί την έκθεση του οργανισμού στο μέταλλο αυτό, λόγω της βραδείας αποδέσμευσής του με τη μάσηση και το σάλιο. Ο μεθυλιούχος υδράργυρος (CH₃Hg⁺) εισέρχεται με τη διατροφή στον ανθρώπινο οργανισμό, κυρίως από λιπαρά ψάρια και προκαλεί χρόνια ή οξεία δηλητηρίαση ή και θάνατο (υδραργυρίωση). Επειδή ο υδράργυρος είναι λιποδιαλυτός, τείνει να συσσωρεύεται στον εγκέφαλο. Τα συμπτώματα είναι νεφρίτιδα, και κατάρρευση του κυκλοφοριακού, νευρικές βλάβες και τερατογενέσεις. Τα ελεύθερα ιόντα υδραργύρου (Hg²⁺) μπορούν να δημιουργήσουν δεσμούς με άτομα θείου και ειδικά με αυτά που βρίσκονται σε βιομόρια, όπως η γλουταθειόνη και η κυστεΐνη. Οι αναλυτικές μέθοδοι που είναι κατάλληλες για το προσδιορισμό ενώσεων του υδραργύρου είναι: (α) η φασματομετρία ατομικής απορρόφησης ψυχρού ατμού (CVAAS) για ανόργανες και απλές οργανοϋδραργυρικές ενώσεις, και (β) η αέρια χρωματογραφία σε σύζευξη με φασματομετρία μαζών (GC-MS) ή η υγρή χρωματογραφία σε σύζευξη με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα και φασματομετρία μάζας (LC-ICPMS) για σχεδόν όλες τις οργανοϋδραργυρικές ενώσεις σε μίγματά τους.

Το κάδμιο (Cd) παρεμποδίζει την ικανότητα της μεταλλοθειονίνης στη ρύθμιση των συγκεντρώσεων ψευδαργύρου και χαλκού στο σώμα. Η μεταλλοθειονίνη είναι μια πρωτεΐνη που δεσμεύει την περίσσεια των μετάλλων αυτών και τα αδρανοποιεί προσωρινά, ενώ παρουσία καδμίου η διαδικασία αυτή διακόπτεται. Όταν, δηλαδή, στα νεφρά ή στο ήπαρ συσσωρευτεί περισσότερο κάδμιο από αυτό που μπορεί να δεσμευτεί με τη μεταλλοθειονίνη, τότε γίνεται ανταλλαγή του καδμίου με τον ψευδάργυρο που υπάρχει στα ένζυμα με αποτέλεσμα τον καταβολισμό των αντίστοιχων πρωτεϊνών. Οι ενώσεις του καδμίου θεωρούνται υπεύθυνες για αναπνευστικές δυσλειτουργίες και καρκινογενέσεις, ενώ το κάπνισμα αυξάνει την επιβάρυνση του οργανισμού με κάδμιο. Οι αναλυτικές μέθοδοι που είναι κατάλληλες για τον προσδιορισμό του καδμίου σε βιολογικά υλικά είναι: (α) η φασματομετρία ατομικής απορρόφησης με φούρνο θερμαινόμενου γραφίτη (ETAAS) για συγκεντρώσεις της τάξης των mg/kg, και (β) η φασματομετρία μάζας με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (ICPMS) για συγκεντρώσεις της τάξης των ng/kg. Ειδικότερα ο προσδιορισμός κάποιων βιοδεικτών (biomarkers), όπως της β2-μικροσφαιρίνης στα ούρα, πρωτεΐνης δέσμευσης της ρετινόλης, κ.ά. απαιτεί χρήση συζευγμένων τεχνικών.

Το χρώμιο, ως εξασθενές, (Cr(VI)), προκαλεί συμπτώματα χρόνιας δηλητηρίασης τα οποία είναι συνήθως αντιστρεπτά, και περιλαμβάνουν αναπνευστικές και δερματολογικές βλάβες. Ωστόσο μετά από χρόνια έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις του, είναι καρκινογόνο. Αποθηκεύεται, κυρίως, στα νεφρά και τον σπλήνα, με ίχνη ποσοτήτων του να ανιχνεύονται και στην καρδιά, τους πνεύμονες, το πάγκρεας και τον εγκέφαλο. Αντίθετα, οι ενώσεις του τρισθενούς χρωμίου είναι σε πολλούς οργανισμούς χρήσιμες, όπως για τη διατήρηση του βάρους του με την ενεργοποίηση των ενζύμων που μεταβολίζουν τη γλυκόζη και τα λίπη σε ενέργεια. Οι αναλυτικές μέθοδοι που είναι κατάλληλες για τον προσδιορισμό του καδμίου σε βιολογικά υλικά είναι: (α) η

φασματομετρία ατομικής απορρόφησης με φούρνο θερμαινόμενου γραφίτη (ETAAS) για συγκεντρώσεις της τάξης των $\mu\text{g}/\text{kg}$, και (β) η φασματομετρία μάζας με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (ICPMS) για συγκεντρώσεις της τάξης των ng/kg .

Ο χαλκός (Cu), απορροφάται εύκολα από το στομάχι και το έντερο, αλλά σπάνια προκαλεί προβλήματα εκεί. Είναι, άλλωστε, γνωστό ότι σε πολύ μικρές ποσότητες είναι χρήσιμο ιχνοστοιχείο για οξειδοαναγωγικές δράσεις στον οργανισμό. Παρόλο που ο μηχανισμός ομοιόστασης του χαλκού είναι αποτελεσματικός, η έκθεση σε μεγάλες ποσότητες που μεταφέρονται με την κυτταροπλασμίνη και συσσωρεύονται στο συκώτι, προκαλεί αντιστρεπτά και, σπανίως, μη αντιστρεπτά κλινικά συμπτώματα. Ανάμεσα σ' αυτά συγκαταλέγεται η νόσος Wilson, ενώ ασθένειες όπως η παιδική κίρρωση που παρατηρείται σε ορισμένες περιοχές (Ινδία, Τυρόλο, κλπ.) έχουν σχέση με γενετικές ανωμαλίες που προκαλούνται από μεγάλες συγκεντρώσεις χαλκού. Είναι γνωστό, άλλωστε, ότι η δέσμευση ομάδων $-\text{SH}$ από το χαλκό σε ένζυμα εξασθενίζει τον προστατευτικό τους ρόλο έναντι ελευθέρων ριζών.

Το αργίλιο (Al) ενοχοποιείται για νευροτοξικές βλάβες, και ίσως σε κάποιο βαθμό για τη νόσο Alzheimer, όταν συσσωρεύεται στον εγκέφαλο (*dialysis encephalopathy*). Παρά το γεγονός ότι ανόργανες ενώσεις του χρησιμοποιούνται, ευρέως, ως αντιόξινα σκευάσματα, δεν έχουν ενοχοποιηθεί για τις νευρολογικές ασθένειες και γενικότερα υπάρχουν διστάμενες απόψεις για τη σχέση και την επικινδυνότητα του στοιχείου αυτού στις παθήσεις αυτές. Ειδικότερα, μπορεί να μην αποτελεί αίτιο της έναρξης μιας ασθένειας, αλλά να παίζει κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη της. Εκτός από την είσοδο του αργιλίου με κατάποση, υπάρχουν πολλά στοιχεία για την επίδρασή του και στους πνεύμονες κατά την επαγγελματική έκθεση εργατών σε εισπνεόμενη αργιλιούχα σκόνη. Έχουν προταθεί και φάρμακα-συμπλοκοποιητικά, όπως για παράδειγμα διφεροξαμίνη, για απομάκρυνση του συσσωρευόμενου αργιλίου, όπως στην περίπτωση των αιμοκαθαριζόμενων ασθενών με νεφρική ανεπάρκεια.

Αποτοξίνωση (detoxification)

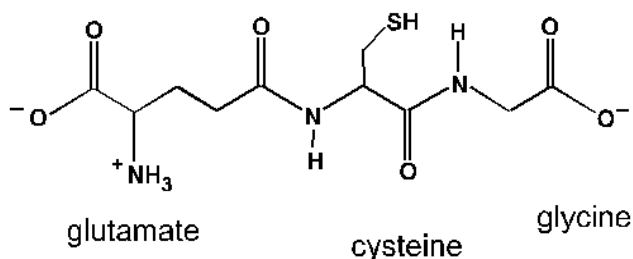
Σε ό,τι αφορά την αποτοξίνωση του οργανισμού, ή τον περιορισμό των τοξικολογικών συνεπειών των ξενοβιοτικών ουσιών (xenobiotics), είναι φανερό ότι λόγω της συχνά επιλεκτικής συσσώρευσής τους σε όργανα του σώματος, όπως στα νεφρά, στο ήπαρ και στον εγκέφαλο, πολλά από τα τοξικά στοιχεία είναι, πλέον, πολύ δύσκολο να απομακρυνθούν πλήρως. Ο ανθρώπινος οργανισμός είναι, βέβαια, σε θέση να αποβάλλει μεγάλο μέρος της ποσότητας ορισμένων τοξικών μετάλλων μέσω των ούρων, του ιδρώτα, και των περιττωμάτων, πάντοτε, όμως, με κάποια μικρή ή μεγάλη χρονική υστέρηση.

Στο βασικό αμυντικό μηχανισμό που διαθέτει ο οργανισμός, συμμετέχει ένα πεπτιδίο, η γλουταθειόνη (GSH), που είναι το πιο διαδομένο τριπεπτιδίο στον οργανισμό (L-γλουταμινικό οξύ, L-κυστεΐνη, γλυκίνη) και δίνεται στο **Σχήμα 5.6**. Όταν το κύτταρο εκτεθεί σε επίθεση ξενοβιοτικής ουσίας, συνήθως οξειδωτικής (δημιουργία οξειδωτικού stress), που μπορεί πιο συγκεκριμένα να γίνει όταν επιτίθεται από τοξικές ουσίες, όπως τα μεταλλικά ιόντα, τα φάρμακα, υπεροξείδιο του υδρογόνου H_2O_2 , ρίζα του υδροξειδίου HO^\bullet , κ.ά., τότε παράγονται τα αναφερόμενα ως ενεργά οξυγονούχα είδη, (*reactive oxygen species, ROS*), που έχουν τη δυνατότητα να επηρεάσουν τα βιομόρια και τις βιοχημικές λειτουργίες. Η γλουταθειόνη, όμως, αντιδρά και εξουδετερώνει τα ROS, και κατά τη διάρκεια της διαδικασίας μετατρέπεται η ίδια στην οξειδωμένη της μορφή (GSSG). Αντίστοιχα και οι φυτοχελατίνες (PCs) (**Σχήμα 5.7**) όπως και οι μεταλλοθειονίνες (MTs), λόγω του σουλφυδρυλίου των κυστεϊνών τους έχουν ενεργό ρόλο στην αποτοξίνωση του οργανισμού και στην ομοιόσταση.

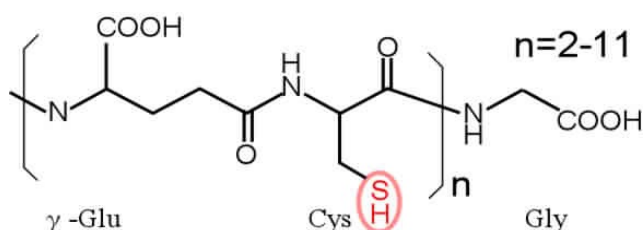
Στη δηλητηρίαση, όμως, με τοξικά στοιχεία που δεν αποβάλλονται εύκολα, πρέπει να ληφθούν πιο δραστηκά μέτρα, όπως χορήγηση άλλων ανταγωνιστικών μη τοξικών χημικών ουσιών τα οποία θα τα αντικαταστήσουν ή θα συμπληρωθούν με αυτά (π.χ. διαλύματα EDTA για μεταβατικά στοιχεία, BAL (*dimercaptopropanol*) για τον υδράργυρο και το αρσενικό, κ.ά.), και θα επιταχύνουν την αποβολή τους μέσω των ούρων. Έχει παρατηρηθεί ότι η χρησιμοποίηση ορισμένων συνδυασμών μετάλλων ευνοεί την απομάκρυνση της τοξικής περισσειας ενός απ' αυτά, όπως στις περιπτώσεις Cu-Mo και Hg-Se. Εξάλλου, ορισμένοι συνδυασμοί μετάλλων σε υψηλές δόσεις, όπως Cd-Cu, Ni-Zn, κ.ά., μπορεί να ενισχύσουν πολλαπλασιαστικά την τοξικότητα ενός μεμονωμένου μετάλλου.

Ο έλεγχος της παρουσίας των τοξικών μετάλλων στον ανθρώπινο οργανισμό γίνεται εφαρμόζοντας, κυρίως, πρότυπες μεθόδους ατομικής φασματομετρίας και φασματομετρίας μάζας όπως προαναφέρθηκε, στην ανάλυση ούρων, αίματος (ορού, ερυθρά), σιέλων, τριχών, κοπράνων, καθώς και ιστολογικών δειγμάτων

που λαμβάνονται με παρακέντηση ή μετά από χειρουργική επέμβαση. Σπανιότερη είναι η χρήση αναλυτικών τεχνικών που βασίζονται στις ακτίνες X, όπως η φθορισμομετρία ακτίνων X, για επιφανειακή ανάλυση ιστών, η ανάλυση με νετρονική ενεργοποίηση, κλπ.



Σχήμα 5.6. Χημική δομή της γλουταθειόνης. Η δέσμευση των μετάλλων γίνεται μέσω του θείου της κυστεΐνης.



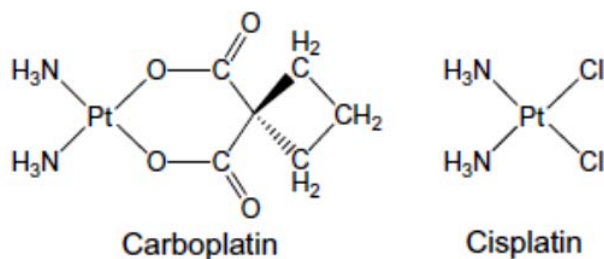
Σχήμα 5.7. Χημική δομή φυτοχελαινών, (πολυμερή του διπεπτιδίου γ -Glu-Cys, στα οποία εμφανίζεται από 2 έως 11 φορές). Η δέσμευση των μετάλλων γίνεται μέσω του θείου της κυστεΐνης.

5.4. Μεταλλοφάρμακα Εισαγόμενα στον Οργανισμό

Εκτός από τη φυσιολογική παρουσία των απαραίτητων μετάλλων στον οργανισμό, καθώς και την παρουσία τοξικών μετάλλων από τυχόν έκθεση του οργανισμού, πολλά μέταλλα εισέρχονται στον οργανισμό μέσω θεραπευτικών διαδικασιών, όπως η χορήγηση φαρμάκων, βιταμινών, η εμφύτευση υλικών, κ.ά. Τα μεταλλοφάρμακα (metallo drugs) μπορούν να καταταγούν αδρομερώς σε ορισμένες γενικές κατηγορίες, με βάση τη θεραπευτική τους δράση, όπως περιγράφονται ενδεικτικά παρακάτω, χωρίς, όμως, αυτού του τύπου η κατάταξη να είναι αυστηρή και απόλυτη:

- i. Μεταλλικά και οργανομεταλλικά άλατα μέσα σε πολυμεταλλικά (multiminerals) και πολυβιταμινούχα (multivitamins) σκευάσματα. Τα σκευάσματα αυτά χορηγούνται ως διατροφικά πρόσθετα ή για την αντιμετώπιση έλλειψης βιταμινών και ιχνοστοιχείων του οργανισμού. Συχνά περιέχουν ασβέστιο, σίδηρο, ψευδάργυρο, σελήνιο, χαλκό, τρισθενές χρώμιο, μολυβδαίνιο, κλπ. Η βιταμίνη B12 (μεθυλοκοβαλαμίνη) περιέχει οπωσδήποτε κοβάλτιο.
- ii. Αδρανή σύμπλοκα και ενώσεις των μετάλλων. Δεν ενεργούν άμεσα ως φάρμακα, αλλά με κάποιο έμμεσο τρόπο. Για παράδειγμα για την εξουδετέρωση της οξύτητας των γαστρικών υγρών χρησιμοποιούνται αντιόξινα σκευάσματα, συνήθως, σε μορφή εναιωρήματος ή γαλακτώματος, με βάση το αργίλιο και το μαγνήσιο (υδροξειδία) ή ανθρακικό ασβέστιο, ή όξινο ανθρακικό νάτριο, κλπ. Επίσης, για την αναπλήρωση των απαραίτητων ηλεκτρολυτών του οργανισμού (Na, K, κλπ.) χορηγούνται αντίστοιχα διαλύματα χλωριούχων και ανθρακικών αλάτων.
- iii. Σύμπλοκα μεταφοράς δραστικού υποκαταστάτη. Για παράδειγμα, σύμπλοκα μόρια απελευθέρωσης μονοξειδίου του άνθρακα.
- iv. Δραστικά σύμπλοκα μετάλλων. Για παράδειγμα, τα μιμητικά της δισμουτάσης του υπεροξειδίου. Η δισμουτάση είναι βασικό ένζυμο διάσπασης υπεροξειδικών δεσμών και χρειάζεται για τη δράση του την παρουσία των Cu και Zn.

- v. Σύμπλοκα που μεταφέρουν δραστικό συνεργιστικό μέταλλο. Για παράδειγμα σύμπλοκα μεταφοράς βαναδίου για τη δράση της ινσουλίνης. Πρακτικά μόνο τα αμινοξέα ασπαρτικό και γλουταμινικό οξύ, ιστιδίνη, λυσίνη, μεθειονίνη, κυστεΐνη, και τυροσίνη, έχουν άτομα δότες στις πλευρικές τους αλυσίδες που με βάση τη χημεία του συντονισμού, μπορούν να αποτελέσουν πιθανούς στόχους των μεταλλο-φαρμάκων.
- vi. Σύμπλοκα μετάλλων που μεταφέρουν δραστικό υποκαταστάτη (χηλικού ligand). Για παράδειγμα σύμπλοκα του EDTA με αλκαλιμέταλλα που χρησιμοποιούνται για αποτοξίνωση από τοξικά μέταλλα, με τη μέθοδο της χηλικοποίησης.
- vii. Αντιβακτηριδιακές ενώσεις των μετάλλων. Για παράδειγμα, στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα βισμούθικά φάρμακα τα οποία έχουν ευρεία χρήση ως αντιόξινα, αντιδιαρροϊκά, αντιελκωτικά (anti-ulcers) κατά του έλκους του στομάχου, όπως το ροζ αιώρημα από την υδρόλυση του σαλικυλικού βισμούθιου ($\text{Bi}[\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})\text{CO}_2]_3$). Η ακριβής δομή και δράση του δεν είναι γνωστή, πάντως, έχει γενικά αντιβακτηριακές ιδιότητες. Εξάλλου, ορισμένα σύμπλοκα μετάλλων, όπως τα φεροκένια, έχουν ενισχυτικό αποτέλεσμα στη δράση άλλων αντιβακτηριδιακών φαρμάκων με τα οποία ενώνονται.
- viii. Αντιμυκητσιακές ενώσεις. Παράδειγμα αποτελούν διάφορες ενώσεις του χαλκού και του αργύρου (π.χ. σύμπλοκο του αργύρου με σουλφοδιαζίνη). Επειδή έχουν κάποια αντιμικροβιακή δράση, χρησιμοποιούνται για εμποτισμό γαζών σε εγκαύματα ή και ως πρόσθετα σε πλαστικά επιθέματα.
- ix. Ακτινοθεραπευτικά σύμπλοκα. Για παράδειγμα, σύμπλοκα που εκπέμπουν ακτινοβολία β, όπως αυτά του ^{67}Cu , ^{188}Re , ^{90}Y κ.ά.
- x. Τοξικές ενώσεις και σύμπλοκα μετάλλων με κυτταροστατικές ιδιότητες. Για παράδειγμα τα αντικαρκινικά χημειοθεραπευτικά φάρμακα σισπλατίνια (cisplatin) και καρβοπλατίνια (carboplatin) τα οποία βασίζονται στο Pt και ως σύμπλοκα περιέχουν αμμωνιακούς και χλωριούχους υποκαταστάτες (Σχήμα 5.8). Χορηγούνται με ενέσιμη μορφή και παραμένουν, χημικώς, αναλλοίωτα λόγω της υψηλής συγκέντρωσης ιόντων χλωρίου. Το φάρμακο εισέρχεται στο κύτταρο είτε με παθητική διάχυση είτε με ενεργητική πρόσληψη· μέσα στο κύτταρο υπόκειται σε σταδιακή υδρόλυση ενώ τα άτομα του χλωρίου αντικαθίστανται με μόρια ύδατος. Το οξειδίο του τρισθενούς αρσενικού χρησιμοποιείται, επίσης, ως αντινεοπλαστικό στη λευχαιμία, πολλαπλό μυέλωμα κ.ά, ενώ άλλα χημειοθεραπευτικά μεταλλοφάρμακα βασίζονται στο χρυσό, στο ρουθίνιο, κλπ.



Σχήμα 5.8. Χημικές δομές της καρβοπλατίνιας και της σισπλατίνιας

- xι. Διαλύματα αλάτων που βελτιώνουν την ευκρίνεια ορισμένων ακτινοδιαγνωστικών εξετάσεων. Τα διαλύματα αλάτων αυτών των μετάλλων μπορεί να προκαλούν ισχυρή αντίθεση στις τεχνικές ιατρικής απεικόνισης. Όπου χρησιμοποιείται ο μαγνητικός συντονισμός (magnetic resonance imaging, MRI contrast agents), τυπικό παράδειγμα αποτελούν διαλύματα χηλικών ενώσεων του τρισθενούς γαδολινίου. Δε θεωρείται τοξικότερο από τις ιωδιομένες ενώσεις που, επίσης, μπορεί να χρησιμοποιηθούν στις δόσεις που εγχύεται ενδοφλέβια (π.χ. $0,1 \text{ mmol/kg}$ του σώματος). Εκτός του παραμαγνητικού γαδολινίου μπορεί να χρησιμοποιηθούν και νανοσωματίδια οξειδίων σιδήρου ή υπερπαραμαγνητικά κρμάτα σιδήρου-λευκοχρύσου, μαγγανίου, κλπ. Όταν τέλος χρησιμοποιούνται ακτίνες X αυξάνουν την απορροφητικότητά τους από τους ιστούς (radiocontrasting agents) και για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται, κυρίως, το Ba.

5.5. Μέταλλα σε Ιατρικές και Διαγνωστικές Εφαρμογές

Στην ιατρική αλλά και σε άλλες παρεμφερείς εφαρμογές, είναι χρήσιμα πλήθος από βιοσυνθετικά σύγχρονα υλικά, όπως για παράδειγμα:

- Πολυμερή για μεταφορά φαρμάκων, καθετήρες, εμφυτεύματα, οφθαλμολογικά, κλπ.
- Κεραμικά υλικά για δόντια, βαλβίδες, οστέινα πρόσθετα, κλπ.
- Ημιαγωγικά υλικά που χρησιμοποιούνται για εμφυτεύσεις και βιοαισθητήρες.
- Μέταλλα για σύριγγες, καθετήρες, για ορθοπεδικές και οδοντιατρικές εφαρμογές, κλπ.

Ειδικότερα για τα μέταλλα που χρησιμοποιούνται περισσότερο στην ιατρική και οδοντιατρική πράξη, και με τα οποία έρχεται σε μακροχρόνια ή βραχυχρόνια επαφή ο ανθρώπινος οργανισμός, επιδιώκεται να είναι κατά το δυνατό βιοσυμβατά και να προκαλούν ελάχιστες παρενέργειες.

Το τιτάνιο (Ti) είναι από τα πλέον χρησιμοποιούμενα μέταλλα στην ορθοπεδική, στην αρθροπλαστική, κλπ. Το κόστος του είναι μέτριο έως υψηλό. Έχει τα παρακάτω πλεονεκτήματα:

1. απόλυτα βιοσυμβατό μέταλλο,
2. πολύ μικρό ειδικό βάρος,
3. πολύ υψηλή αντοχή στη χημική διάβρωση,
4. πολύ υψηλή ειδική ισχύ και μηχανική αντοχή,
5. δεν έχει μαγνητικές ιδιότητες.

Το ανοξείδωτο ατσάλι χρησιμοποιείται, επίσης, σε πολλές ιατρικές εφαρμογές και θεωρείται γενικά πολύ αδρανές. Για παράδειγμα, τα σύγχρονα «μπαλονάκια» (stent) είναι κατασκευασμένα από ανοξείδωτο χάλυβα, και δε χρειάζονται επιχρυσωση για να μην οξειδωθούν. Χρησιμοποιούνται στην αγγειοπλαστική και στην επεμβατική καρδιολογία για διάνοιξη αρτηριών με αθηρωματική πλάκα.

Ιατρικές συσκευές ή εμφυτεύματα κατασκευασμένα από μέταλλα μπορούν, επίσης, να προκαλέσουν δηλητηρίαση από μέταλλα, η οποία χαρακτηρίζεται γενικά «μετάλλωση». Πρόκειται για ανεπιθύμητη παρενέργεια που μπορεί να προκύψει από ορισμένες διατάξεις αντικατάστασης της άρθρωσης, τύπου μέταλλο-επί-μέταλλου (metal-on-metal hip replacements) που χρησιμοποιούνται, για παράδειγμα, ως εμφυτεύματα ισχίου ή μέρη εμφυτευμάτων γονάτου. Επιπλέον, μπορεί να οδηγήσει σε άλλες επιπλοκές, όπως για παράδειγμα σε αποτυχία του εμφυτεύματος, τη νέκρωση του ιστού και των οστών, καθώς και τη βλάβη των άλλων οργάνων. Πολλά από αυτά τα εμφυτεύματα είναι κατασκευασμένα από κοβάλτιο και χρώμιο.

Στις απεικονιστικές διαγνωστικές τεχνικές της σύγχρονης τομογραφίας είναι αναγκαία η αριστοποίηση της ευκρίνειας της απεικόνισης των εσωτερικών οργάνων και ιστών του σώματος. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται διαλύματα αλάτων και χηλικών ενώσεων των μετάλλων που βελτιώνουν την ευκρίνεια ορισμένων ακτινοδιαγνωστικών εξετάσεων. Τα διαλύματα αλάτων αυτών των μετάλλων μπορεί να προκαλούν ισχυρή αντίθεση στις τεχνικές ιατρικής απεικόνισης. Στην τεχνική του μαγνητικού συντονισμού (magnetic resonance imaging, MRI contrast agents) τυπικό παράδειγμα αποτελούν τα διαλύματα χηλικών ενώσεων του τρισθενούς γαδολινίου. Δε θεωρείται τοξικότερο από τις ιωδιομένες ενώσεις που, επίσης, μπορεί να χρησιμοποιηθούν, στις δόσεις που εγχύεται ενδοφλέβια (π.χ. 0,1 mmol/kg του σώματος). Εκτός του παραμαγνητικού γαδολινίου, μπορεί να χρησιμοποιηθούν και νανοσωματίδια οξειδίων σιδήρου ή υπερπαραμαγνητικά κράματα σιδήρου-λευκοχρύσου, μαγγανίου, κλπ. Όταν τέλος χρησιμοποιούνται ακτίνες X αυξάνουν την απορροφητικότητά τους από τους ιστούς (radiocontrasting agents) και για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται, κυρίως, το Ba.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι ο οργανισμός του ανθρώπου είναι δυνατό να έρχεται σε επαφή με ενώσεις των μετάλλων που βρίσκονται μέσα σε καλλυντικά και άλλα προϊόντα περιποίησης και υγιεινής του σώματος. Στην κοσμητολογία εξακολουθούν να εφαρμόζονται ουσίες που περιέχουν μέταλλα σε διάφορες μορφές (οργανικές, ανόργανες), και αυτά εισέρχονται στον οργανισμό, συνήθως, μέσω του δέρματος. Η χρήση τέτοιων ουσιών ανάγεται ήδη στην αρχαιότητα, όταν χρησιμοποιούνταν βαφές προσώπου, κραγιόν, βαφές μαλλιών, κλπ. με βάση ανόργανα άλατα ή οξείδια μετάλλων. Ακόμη και σήμερα κυκλοφορούν τέτοια προϊόντα που περιέχουν χρώμιο, μόλυβδο, κ.ά. Σε πολλούς τύπους αντηλιακών προϊόντων χρησιμοποιείται το TiO₂ ως φίλτρο της υπεριώδους ακτινοβολίας, το οποίο, όμως, δε θεωρείται τοξικό για τον οργανισμό.

Βιβλιογραφία

- Alimonti A., Bocca B., Pino A., Ruggieri F., Forte G. & Sancesario G. (2007). *Elemental profile of cerebrospinal fluid in patients with Parkinson's disease*. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 21(4), 234-241.
- Aitio A., Aro A., Jarvisalo J. & Vainio H. (1991). *Trace elements in health and disease*. Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Dabrowiak J.C. (2009). *Metals in Medicine*, Wiley, London.
- Kahakachchi C.L., Moore D.A., (2010). *Identification and characterization of gadolinium(III) complexes in biological tissue extracts*. Metallomics 2, 490–497.
- Kendrick M.J., May M.T., Plishka M.J., Robinson K.D. (1992). *Metals in Biological Systems*, Ellis Horwood Limited, England.
- Lavilla I., Costas M., San Miguel P., Millos J., Bendicho C. (2009). *Elemental fingerprinting of tumorous and adjacent non-tumorous tissues from patients with colorectal cancer using ICP-MS, ICP-OES and chemometric analysis*, Biometals, 22, 863–875.
- Manley S.A., Byrns S., Lyon A., Brown P., Gailer J. (2009). *Simultaneous Cu-, Fe-, and Zn-specific detection of metalloproteins contained in rabbit plasma by size-exclusion chromatography–inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy*, Journal of Biological and Inorganic Chemistry, 14, 61–74.
- Sooriyaarachchi A., Narendran A., Gailer J. (2011). *Comparative hydrolysis and plasma protein binding of cis-platin and carboplatin in human plasma in vitro*, Metallomics, 2011, 3, 49–55.
- Szpunar J. (2000). *Bio-inorganic speciation analysis by hyphenated techniques*, Analyst, 125, 963–988.
- Zachariadis G.A., Vogiatzis C.G. (2014). *Tandem mass spectrometry in metallomics and the involving role of ICP-MS detection: A review*. Analytica Chimica Acta, 819, 1–14.
- Zachariadis G.A. (2013). *Metal Speciation and Metallomics*, Current Analytical Chemistry, 9, 226-228.
- Versieck J., Cornelis R. (1989). *Trace Elements in Human Plasma and Serum*, CRC Press, Boca Raton.

Κεφάλαιο 6: Τεχνικές Προκατεργασίας Βιολογικών Δειγμάτων

Βικτωρία Σαμανίδου

Σύνοψη

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφονται οι τεχνικές προκατεργασίας βιολογικών δειγμάτων, όπως αυτές οι οποίες στηρίζονται στη χρήση μεμβρανών (π.χ. μικροδιαπίδυση, υπερδιήθηση κλπ.), στη χρήση υλικών περιορισμένης πρόσβασης (*Restricted Access Materials, RAM*), αλλά και οι τεχνικές εκχύλισης σε διασπορά (*DPX*), εκχύλισης σε αέρια φάση, καθώς επίσης και οι τεχνικές εκλεκτικής απομόνωσης βιομορίων, όπως η εφαρμογή χρωματογραφίας ανοσοσυγγένειας στην εκχύλιση.

Προαπαιτούμενη Γνώση

Πριν την ανάγνωση του κεφαλαίου, χρήσιμη γνώση για τον αναγνώστη μπορεί να βρεθεί σε συγγράμματα *Ενόργανης Χημικής Ανάλυσης και Διαχωριστικών Τεχνικών*.

6.1. Εισαγωγή

Ένα δείγμα από τη στιγμή της παραλαβής του και μέχρι την τελική έκφραση του αποτελέσματος της ανάλυσής του διέρχεται από διάφορα στάδια:

1. Δειγματοληψία, η οποία αποτελεί τη διαδικασία της παραλαβής από τη συνολική ποσότητα του υλικού, ενός μικρού κλάσματός του, του οποίου η χημική σύσταση είναι ίδια με τη μέση σύσταση του συνόλου του υλικού.
2. Συντήρηση του δείγματος σε ειδικές συνθήκες π.χ. φωτός και θερμοκρασίας, ώστε να μην αλλοιωθεί η αρχική του σύσταση.
3. Προκατεργασία του δείγματος, ώστε να έρθει σε κατάλληλη μορφή για ανάλυση.
4. Ανάλυση του δείγματος για τον ποσοτικό προσδιορισμό των συστατικών που ενδιαφέρουν.
5. Επεξεργασία του αποτελέσματος, για να μετατραπεί το σήμα του οργάνου σε χημική πληροφορία (π.χ. συγκέντρωση).

Η προκατεργασία του δείγματος είναι ένας σημαντικός παράγοντας σε κάθε προτεινόμενη αναλυτική μέθοδο. Καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος του συνολικού χρόνου ανάλυσης, οπότε παίζει καθοριστικό ρόλο στη διαμόρφωση του τελικού χρόνου που απαιτείται για την έκδοση του αποτελέσματος για κάθε δείγμα.

Τα δείγματα υφίστανται κατάλληλη τροποποίηση και προετοιμασία, έτσι ώστε να απομακρυνθούν οι οποιεσδήποτε παρεμποδίσεις, να προσυγκεντρωθεί εκλεκτικά το σύνολο των προσδιοριζόμενων ενώσεων, ενώ παράλληλα προστατεύεται και το χρησιμοποιούμενο όργανο αποφεύγοντας προβλήματα, όπως το μπλοκάρισμα της αναλυτικής στήλης ή η μη αναστρέψιμη προσρόφηση των ενώσεων στη στήλη.

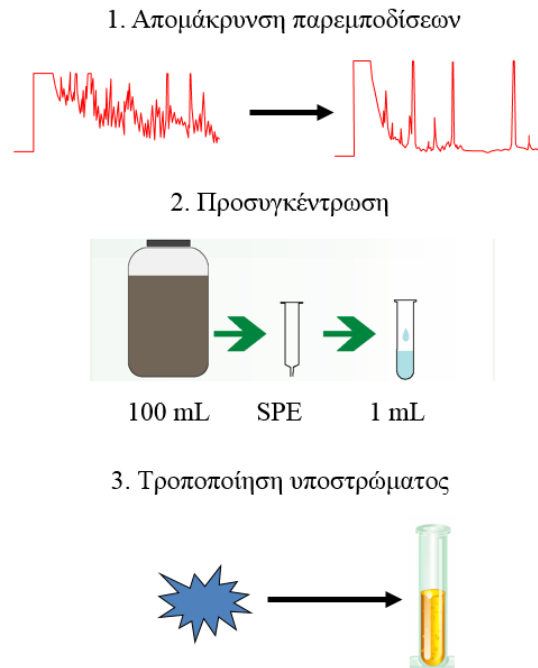
Στο **Σχήμα 6.1** δίνονται οι στόχοι της προκατεργασίας του δείγματος. Η αποτελεσματικότητα μιας μεθόδου προκατεργασίας έγκειται:

- Στην εκλεκτική παραλαβή των ενώσεων, αφήνοντας στο υπόστρωμα τις τυχόν υπάρχουσες παρεμποδίσεις.
- Στην αυξημένη ταχύτητα ανάλυσης, έτσι ώστε να μπορεί να εφαρμοστεί σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων.
- Στην επαναληψιμότητα των ανακτήσεων των ενώσεων για τις ίδιες συνθήκες.
- Στην ευκολία της προκατεργασίας.
- Στο χαμηλό κόστος αγοράς αλλά και στη φιλικότητα ως προς το περιβάλλον, βάσει του συνολικού όγκου κατανάλωσης των διαλυτών.
 - Επιπλέον, στις σύγχρονες απαιτήσεις συμπεριλαμβάνονται και η δυνατότητα αυτοματοποίησης, σμίκρυνσης, αλλά και η προσαρμογή στις προσταγές της πράσινης αναλυτικής χημείας.

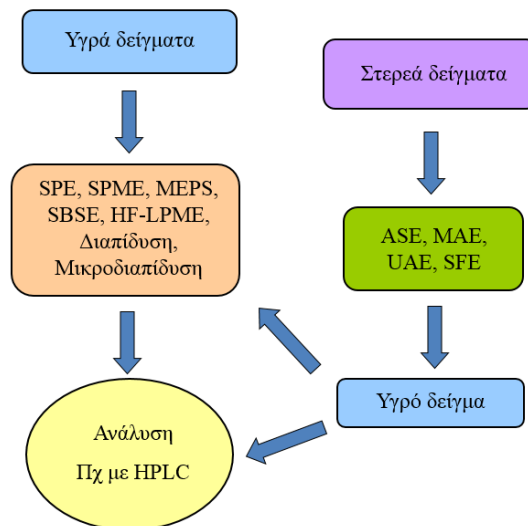
- Στο στάδιο της προκατεργασίας επιτυγχάνεται αλλαγή φάσης, ώστε να είναι συμβατό το δείγμα με το όργανο ή τον ανιχνευτή.

Διαφορετική προσέγγιση ακολουθείται ανάλογα με τη φύση του δείγματος, όπως φαίνεται στο **Σχήμα**

6.2.



Σχήμα 6.1. Στόχοι προκατεργασίας δείγματος.



Σχήμα 6.2. Τεχνικές προκατεργασίας ανάλογα με τη φύση του δείγματος

Σκοπός των εφαρμοζόμενων τεχνικών διαχωρισμού είναι η βελτιστοποίηση των πειραματικών συνθηκών, οι οποίες θα οδηγήσουν στη μεγιστοποίηση των διαφορών μεταξύ του προσδιοριζόμενου συστατικού και των παρεμποδίσεων και έτσι στον αποτελεσματικότερο διαχωρισμό τους. Στις τεχνικές διαχωρισμού το επιθυμητό συστατικό και οι ενώσεις που παρεμποδίζουν, μπορούν να διαχωριστούν, εάν υπάρχει μία τουλάχιστον σημαντική διαφορά στις φυσικοχημικές τους ιδιότητες.

Στον **Πίνακα 6.1** δίνονται παραδείγματα τεχνικών διαχωρισμού ταξινομημένων με βάση την ιδιότητα, η οποία χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό.

Ιδιότητα Διαχωρισμού	Διαχωριστική Τεχνική
Μέγεθος	Διήθηση, Διαπίδυση
Μάζα και Πυκνότητα	Φυγοκέντρωση
Μεταβολή φυσικής κατάστασης	Απόσταξη, Ανακρυστάλλωση
Μεταβολή χημικής κατάστασης	Ιοντοανταλλαγή, Εξάτμιση
Κατανομή μεταξύ φάσεων	Εκχύλιση, Χρωματογραφία

Πίνακας 6.1. Διαχωριστικές τεχνικές, ταξινομημένες με βάση την ιδιότητα διαχωρισμού τους

6.2. Απομάκρυνση Πρωτεϊνών

Στο Σχήμα 6.3 δίνεται ένα τυπικό διάγραμμα ροής προκατεργασίας δείγματος σε βιοαναλυτικό εργαστήριο.

Οι πρωτεΐνες που υπάρχουν στα βιολογικά υγρά πρέπει να απομακρυνθούν πριν την ανάλυση με HPLC, γιατί καθιζάνουν παρουσία οργανικού διαλύτη στην κινητή φάση ή δεσμεύονται μη εκλεκτικά και μη αναστρέψιμα ή μετουσιώνονται από τις ελεύθερες σιλανόλες στην επιφάνεια του χρωματογραφικού υποστρώματος.

Λόγω του μεγέθους τους προσροφούνται ή καταβυθίζονται στην εξωτερική επιφάνεια της πορώδους στατικής φάσης, όπου και μπλοκάρουν την πρόσβαση στους πόρους με αποτέλεσμα να ελαττώνονται οι θέσεις προσρόφησης και έτσι να προκαλείται:

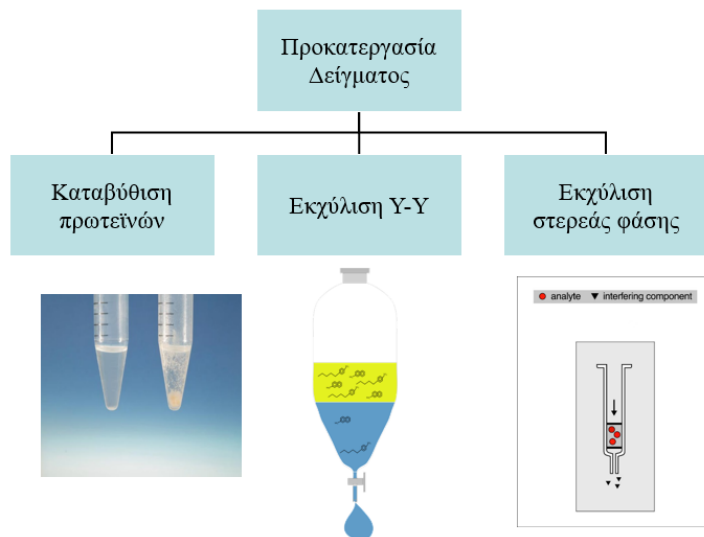
1. μη αναστρέψιμη αύξηση της πίεσης,
2. ελάττωση της χωρητικότητας της στήλης,
3. και μείωση της εκλεκτικότητας (καθώς τα αμινοξέα των προσροφημένων πρωτεϊνών μεταβάλλουν την επιφάνεια του υποστρώματος),
4. καταστροφή της στήλης.

Οι συμβατικές τεχνικές προκατεργασίας για απομάκρυνση πρωτεϊνών περιλαμβάνουν τη μετουσίωσή τους με προσθήκη οργανικού διαλύτη π.χ. CH_3OH ή CH_3CN ή με ελάττωση του pH π.χ. με HClO_4 , CCl_3COOH και φυγοκέντρωση (Σχήμα 6.4).

Οι τεχνικές αυτές παρότι είναι απλές, έχουν το μειονέκτημα ότι κατά την καταβύθιση μπορεί να συγκαταβυθιστούν και τα συστατικά, των οποίων η ανάλυση ενδιαφέρει ή να εγκλειστούν στο ίζημα.

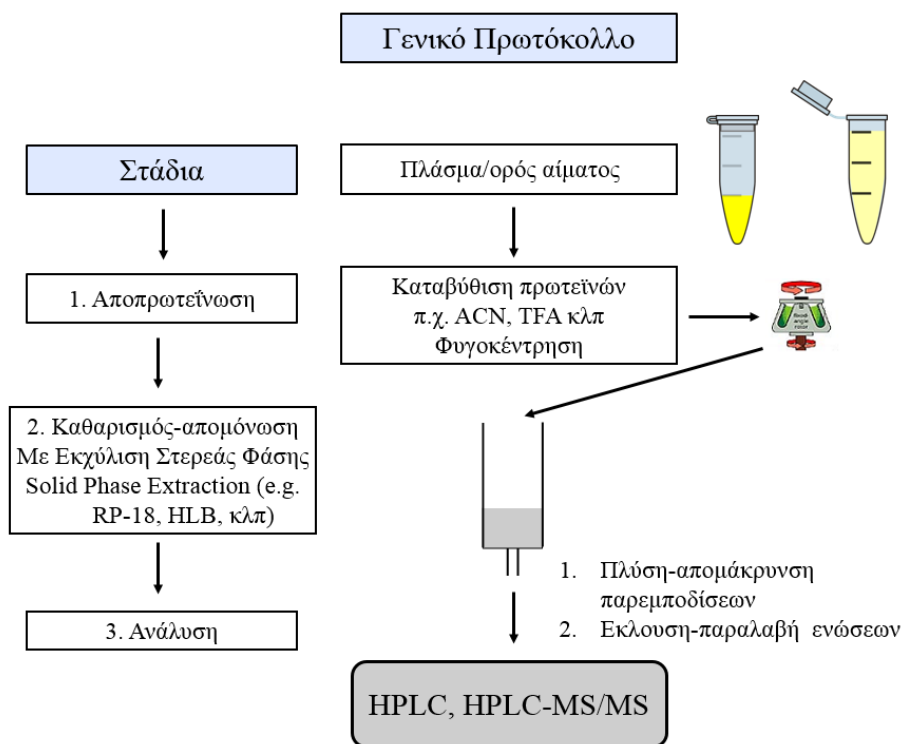
Βιοαναλυτικό εργαστήριο-Διάγραμμα ροής

Δείγμα → Προκατεργασία → Ανάλυση → Επεξεργασία αποτελεσμάτων



Σχήμα 6.3. Διάγραμμα ροής προκατεργασίας δείγματος σε βιοαναλυτικό εργαστήριο.

Στο Σχήμα 6.4 δίνεται ένα γενικό πρωτόκολλο προκατεργασίας ορού/πλάσματος αίματος.



Σχήμα 6.4. Γενικό πρωτόκολλο προκατεργασίας αίματος στη χημική ανάλυση

6.3. Τεχνικές Εκχύλισης

Οι τεχνικές εκχύλισης που χρησιμοποιούνται σήμερα για αναλυτικούς σκοπούς είναι, κυρίως, η εκχύλιση υγρού-υγρού, η εκχύλιση στερεού-υγρού και η εκχύλιση στερεάς φάσης, οι οποίες κυριαρχούν και στις βιοαναλυτικές εφαρμογές.

6.3.1. Εκχύλιση Υγρού-Υγρού

Στην εκχύλιση υγρού-υγρού χρησιμοποιείται διαλύτης μη αναμίξιμος με το διαλύτη του δείγματος. Οι επιθυμητές ενώσεις κατανέμονται στον κατάλληλο διαλύτη ανάλογα με τις ιδιότητές τους. Αφού διαχωριστούν τα μη-αναμίξιμα υγρά, η οργανική στιβάδα που περιέχει την εκχυλισμένη ένωση απομακρύνεται, εξατμίζεται μέχρι ξηρού, και επαναδιαλύεται σε έναν κατάλληλο διαλύτη συμβατό με το αναλυτικό σύστημα π.χ. την κινητή φάση HPLC. Ένας περιορισμός αυτής της τεχνικής είναι ότι πολικοί υδατοδιαλυτοί διαλύτες δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εκχύλιση. Άλλα μειονεκτήματα της τεχνικής είναι η χρήση μεγάλων ποσοτήτων οργανικών διαλυτών, η οποία οδηγεί σε ένα υπολογίσιμο κόστος για την απόκτηση και τη διάθεσή τους, όπως και ο σχηματισμός γαλακτωμάτων κατά τη διάρκεια της ανάμιξης και το γεγονός ότι απαιτείται απομάκρυνση του οργανικού διαλύτη με εξάτμιση, η οποία συνεπάγεται αύξηση του χρόνου προκατεργασίας. Επίσης, δε μπορεί να αποφευχθεί η συνεκχύλιση άλλων συστατικών του υποστρώματος που παρεμποδίζουν, λόγω του ότι έχουν παραπλήσιες ιδιότητες, καθώς οι διαλύτες δεν είναι εκλεκτικοί.

Είναι δύσκολο να αυτοματοποιηθεί στην κλασική μορφή της (με τη χρήση ενός διαχωριστικού χωνιού ή στήλης), αν και διάφορες προσεγγίσεις συστημάτων ροής- εκχύλισης υγρού-υγρού (LLE) έχουν παρουσιαστεί, εφαρμόζοντας την αρχή της τεχνικής ανάλυσης συνεχούς ροής (FIA).

Σύγχρονες τάσεις που τροποποιούν την εκχύλιση υγρού- υγρού με σκοπό να εξαλείψουν σε μεγάλο βαθμό τα μειονεκτήματά της, είναι η εκχύλιση σε αδρανές στερεό υπόστρωμα (Supported Liquid Extraction, SLE) με χρήση μη αναμίξιμου διαλύτη ακινητοποιημένου σε γη διατόμων ή συνθετικά υλικά σε μικροστήλη

από πολυπροπυλένιο ανάλογη με αυτή της εκχύλισης στερεάς φάσης καθώς και η Μικροεκχύλιση Υγρής Φάσης (Liquid Phase Microextraction-LPME), η οποία μπορεί να εφαρμοστεί με διάφορους τρόπους όπως:

1. Με χρήση σταγόνας μη αναμιξιμου διαλύτη (Single Drop Microextraction, SDME).
2. Μικροεκχύλιση υγρής φάσης κοίλης ίνας (Hollow Fiber Liquid-Phase Microextraction, HF-LPME).
3. Μικροεκχύλιση στερεοποιημένης επιπλέουσας οργανικής σταγόνας (Solidified Floating Organic Drop Microextraction, SFODME).
4. Μικροεκχύλιση διασποράς υγρού-υγρού (Dispersive Liquid-Liquid Microextraction, DLLME).

Στη Μικροεκχύλιση Υγρής Φάσης Κοίλης Ίνας (HF-LPME), ο πολύ μικρός όγκος του διαλύτη εκχύλισης περιέχεται στην κοιλότητα της πορώδους ίνας, έτσι κατά τη διάρκεια της εκχύλισης ο διαλύτης δεν έρχεται σε άμεση επαφή με το διάλυμα του δείγματος. Μπορεί να εφαρμοστεί με δύο τύπους:

- α) HF-LPME δύο φάσεων, όπου το διάλυμα-δέκτης είναι ο ίδιος οργανικός διαλύτης, ο οποίος είναι ακινητοποιημένος στους πόρους της ίνας.
- β) HF-LPME τριών φάσεων, όπου το διάλυμα-δέκτης είναι μία υδατική φάση. Το επιθυμητό συστατικό εκχυλίζεται από την αρχική υδατική φάση του δείγματος στο διαλύτη εκχύλισης και στη συνέχεια στην υδατική φάση που βρίσκεται στην εσωτερική κοιλότητα της ίνας.

6.3.2. Εκχύλιση Στερεού-Υγρού

Η εκχύλιση στερεού-υγρού (Solid Liquid Extraction-SLE) αναφέρεται στην κλασική τεχνολογία εκχύλισης, η οποία επιτυγχάνεται με τη χρησιμοποίηση του κατάλληλου διαλύτη, οποίος διαλύει επιλεκτικά την ένωση που μας ενδιαφέρει, όχι όμως και το υπόστρωμα.

Η πιο κοινή μορφή της τεχνικής SLE είναι η μέθοδος “shake-filter” η οποία περιλαμβάνει την προσθήκη ενός οργανικού διαλύτη για τις οργανικές ενώσεις ή αραιού οξέος ή βάσης για τις ανόργανες ενώσεις, στο δείγμα και την ανάδευση, για να επιτρέψει στις ενώσεις να διαλυθούν στο υγρό περιβάλλον, έως ότου παραληφθούν πλήρως. Η διαδικασία εκχύλισης μπορεί να επιταχυνθεί με θέρμανση, καθώς και με επίδραση υπερήχων ή και μικροκυμάτων. Οι αδιάλυτες ενώσεις απομακρύνονται στη συνέχεια με διήθηση ή φυγοκέντρηση.

6.3.3. Εκχύλιση Στερεάς Φάσης

Η αρχή της SPE περιλαμβάνει την κατανομή των εκχυλιζόμενων συστατικών ανάμεσα σε 2 φάσεις: τη στερεή φάση που αποτελεί το προσροφητικό υλικό και την υγρή που αποτελεί το υπόστρωμα με όλες τις παρεμποδίσεις. Οι προσδιοριζόμενες ενώσεις πρέπει να εμφανίζουν μεγαλύτερη συγγένεια με τις ομάδες της στερεής φάσης, έτσι ώστε να διαχωριστούν. Η παραλαβή των ενώσεων από το στερεό υπόστρωμα γίνεται με την επιλογή κατάλληλων διαλυτών. Οι διαμοριακές δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ των προσδιοριζόμενων συστατικών, των ενεργών ομάδων στην επιφάνεια του προσροφητικού υλικού και της υγρής φάσης του υποστρώματος του δείγματος ή του διαλύτη, είναι υπεύθυνες για τους διάφορους μηχανισμούς συγκράτησης και έκλουσης των ενώσεων.

Τα στάδια της SPE είναι (**Σχήμα 6.5**):

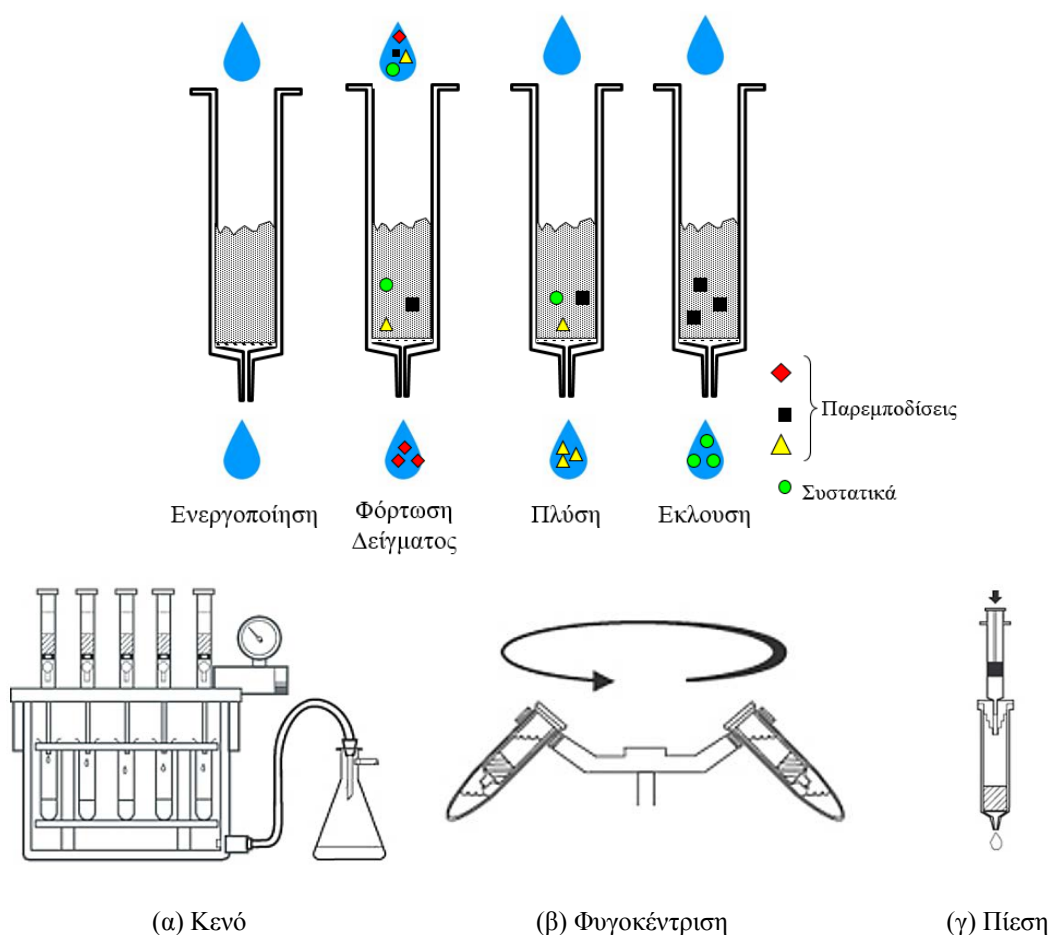
- ενεργοποίηση του προσροφητικού,
- φόρτωση του δείγματος,
- έκπλυση για την απομάκρυνση των ανεπιθύμητων πολικών συστατικών του υποστρώματος,
- έκλυση του δείγματος με τον κατάλληλο διαλύτη ή μίγμα διαλυτών,
- εξάτμιση του διαλύτη.

Τα βασικά πλεονεκτήματα της εκχύλισης στερεάς φάσης είναι ότι:

- Απαιτείται σχετικά μικρός χρόνος εκτέλεσης.

- Χρησιμοποιούνται μικροί όγκοι διαλυτών.
- Είναι κατάλληλη τεχνική για συνδυασμό με διάφορες τεχνικές χρωματογραφίας (HPLC, GC κ.ά.).
- Μπορεί να αυτοματοποιηθεί και να αναλυθεί μεγάλος αριθμός δειγμάτων.
- Επιτυγχάνεται ικανοποιητικός καθαρισμός του δείγματος.
- Επιτυγχάνεται προσυγκέντρωση των συστατικών με αποτέλεσμα την αυξημένη ευαισθησία στην ανάλυση.
- Έχει καλή επαναληψιμότητα.
- Παρέχει υψηλά ποσοστά ανάκτησης.

Στην εκχύλιση στερεάς φάσης χρησιμοποιούνται υλικά πλήρωσης παρόμοια με αυτά που χρησιμοποιούνται στην HPLC, αλλά σε άλλη κοκκομετρική σύσταση. Οι μηχανισμοί διαχωρισμού περιλαμβάνουν **SPE αντίστροφης φάσης**, για μη πολικές ενώσεις με χρήση μη πολικού προσροφητικού υλικού π.χ. κυκλοεξυλο, οκτυλο-, δεκαοκτυλο-σιλάνιο. Ο διαχωρισμός στην SPE αντίστροφης φάσης βασίζεται σε ελκτικές δυνάμεις van der Waals ή δυνάμεις διασποράς. Η παραλαβή της επιθυμητής ένωσης στη συνέχεια γίνεται με χρήση κατάλληλου διαλύτη.



Σχήμα 6.5. Στάδια και τρόποι εφαρμογής της Εκχύλισης Στερεάς Φάσης (SPE)

SPE κανονικής φάσης, που εφαρμόζεται για πολικές ενώσεις και στηρίζεται στο σχηματισμό δεσμών υδρογόνου με το δεσμευμένο προσροφητικό του silica gel με ομάδες, όπως CN-, NH₂-, -NH₂CH₂CH₂NH₂-.

SPE με ιοντοανταλλαγή, η οποία χρησιμοποιείται για ενώσεις, που σε υδατικό διάλυμα είναι σε ιονισμένη μορφή. Ο κύριος μηχανισμός συγκράτησης της ένωσης βασίζεται στις ηλεκτροστατικές έλξεις της φορτισμένης δραστικής ομάδας του συστατικού προς τις φορτισμένες ομάδες, οι οποίες είναι συνδεδεμένες στο υπόστρωμα του silica gel. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται σουλφονυλο-, καρβοξυλο-, διαιθυλαμινο-

και τριμεθυλαμινο- ομάδες, για τη δημιουργία δεσμευμένης φάσης. Για τη συγκράτηση μιας ένωσης στον ιοντοανταλλάκτη από ένα υδατικό διάλυμα πρέπει το pH του δείγματος να είναι τέτοιο, ώστε και η προσδιοριζόμενη ένωση και η δραστική ομάδα που είναι προσδεμένη στο προσροφητικό να είναι φορτισμένες. Για την αποδέσμευση των συστατικών αρκεί είτε αυτά είτε το υπόστρωμα να βρίσκονται σε μη ιονισμένη μορφή. Εναλλακτικά χρησιμοποιείται διάλυμα υψηλής ιοντικής ισχύος ή διάλυμα, το οποίο περιέχει ιόντα που αντικαθιστούν (άρα δρουν ανταγωνιστικά) την ένωση.

Η επιλογή του κατάλληλου μηχανισμού εξαρτάται μεταξύ άλλων από το υπόστρωμα του δείγματος και τις ιδιότητες των συστατικών (**Σχήμα 6.6**).

Στην SPE, εκτός από τα πυριτικά υλικά, χρησιμοποιούνται ολοένα και περισσότερο πολυμερικά υλικά, τα οποία πλεονεκτούν έναντι των πυριτικών προσροφητικών επειδή παραμένουν σταθερά σε ένα μεγάλο εύρος pH. Τα υλικά αυτά, επίσης, χαρακτηρίζονται από τις μικτές τους ιδιότητες, καθώς περιέχουν ομάδες με υδρόφιλο και ομάδες με λιπόφιλο χαρακτήρα. Τέτοια υλικά είναι τα OASIS[®] HLB της Waters, τα ABSELUT NEXUS της Varian, τα Strata-X της Phenomenex κ.ά.



Σχήμα 6.6. Επιλογή κατάλληλου μηχανισμού SPE

Για παράδειγμα οι μικροστήλες εκχύλισης OASIS[®] HLB, περιέχουν πολυμερικό προσροφητικό αντίστροφης φάσης, το οποίο αποτελείται από δύο μονομερή: την υδρόφιλη N – βινυλοπυρρολιδόνη και το λιπόφιλο διβινυλοβενζόλιο, με αποτέλεσμα να είναι υδατικά διαβρέξιμο. Έτσι μπορεί να αποφευχθεί το στάδιο της ενεργοποίησης, με την απλοποίηση του πρωτοκόλλου, χωρίς να υποβαθμιστεί η αποτελεσματικότητά του υλικού.

Ένα γενικό πρωτόκολλο εργασίας με τις μικροστήλες SPE για γρήγορες μεθόδους προκατεργασίας βιολογικών δειγμάτων με υψηλά ποσοστά ανάκτησης και καλή πιστότητα δίνεται στο **Σχήμα 6.7**.

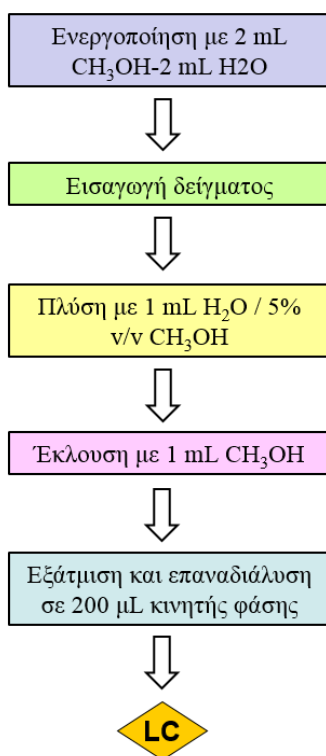
6.3.4. Εκχύλιση στερεάς φάσης σε διασπορά

Ένα νέο είδος εκχύλισης στερεάς φάσης για βιολογικά δείγματα (με εφαρμογή σε ναρκωτικές ενώσεις κ.ά), είναι η εκχύλιση στερεάς φάσης σε διασπορά με στήλη DPX (Disposable Pipette Extraction).

Η τεχνική της εκχύλισης με τη χρήση της στήλης DPX χρησιμοποιεί μία στήλη με συνολικό όγκο 1 mL ή 5 mL, η οποία περιέχει ένα προσροφητικό υλικό ανάλογο με αυτό που χρησιμοποιείται στην εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE). Κάθε στήλη φέρει μία σύριγγα των 10 mL, η οποία προσαρμόζεται στην κορυφή της στήλης, έτσι ώστε με τη βοήθεια του αέρα να αναμιγνύεται το δείγμα με το προσροφητικό υλικό που βρίσκεται σε διασπορά, αλλά και με τους διαλύτες έκπλυσης και έκλουσης. Σε πολλές βιβλιογραφικές αναφορές, προτείνεται να απομακρύνεται το άνω προσροφητικό και οι ποσότητες των διαλυτών να

εισάγονται από την κορυφή της στήλης με τη βοήθεια της σύριγγας, έτσι ώστε να μη χάνεται κάποια ποσότητα προσροφητικού στα τοιχώματα της στήλης.

Γενικό πρωτόκολλο SPE



Σχήμα 6.7. Γενικό πρωτόκολλο εκχύλισης στερεάς φάσης

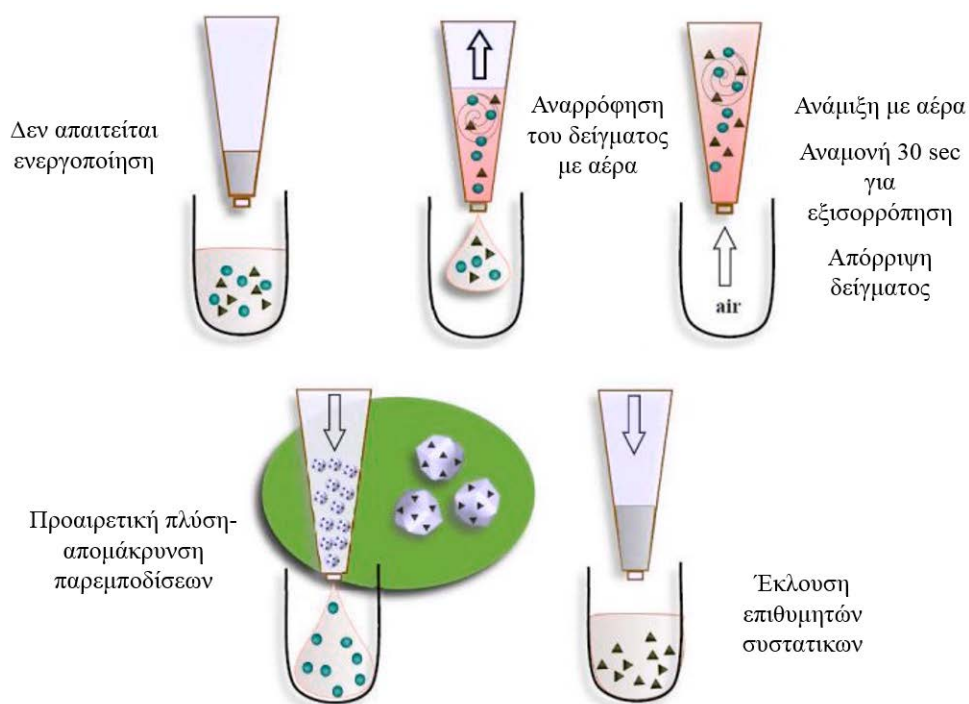
Η κύρια διαφορά των στηλών DPX είναι ότι το προσροφητικό υλικό δεν είναι δεσμευμένο, όπως στην περίπτωση της SPE, αλλά ελεύθερο και σε διασπορά κατά την επαφή του με το χρησιμοποιούμενο διαλύτη, έτσι ώστε να υπάρχει η δυνατότητα εισαγωγής και απομάκρυνσης του διαλύτη σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα. Σε ό,τι αφορά τις ανακτήσεις σε σχέση με την SPE, η εκχύλιση με DPX δίνει συγκρίσιμα αποτελέσματα (περίπου 90% ανάκτηση).

Τα στάδια της εκχύλισης με DPX, όπως φαίνονται στο **Σχήμα 6.8** είναι:

1. Εισαγωγή του ακροφυσίου του DPX στο δείγμα.
2. Αναρρόφηση από το διάλυμα του δείγματος, χωρίς να απαιτείται ενεργοποίηση με μίγμα διαλυτών.
3. Ανάμιξη του διαλύματος του δείγματος- προσροφητικού στον αέρα, έτσι ώστε το διάλυμα του δείγματος να γίνει πρακτικά "ψευδοομογενές" με το προσροφητικό και να επέλθει ισορροπία.
4. Απομάκρυνση του διαλύματος του δείγματος και επίτευξη ισορροπίας του προσροφητικού με τις ενώσεις που συγκρατήθηκαν (20 δευτερόλεπτα).
5. Πλύση του προσροφητικού υλικού με εισαγωγή του στο κατάλληλο διάλυμα έκπλυσης και ανάμιξη στον αέρα, έτσι ώστε να επέλθει ισορροπία και έπειτα απομάκρυνση του διαλύματος έκπλυσης.
6. Έκλουση της στήλης με το μίγμα των διαλυτών έκπλυσης και ανάμιξης στο κενό για την επίτευξη ισορροπίας. Επακόλουθη απομάκρυνση του μίγματος διαλυτών έκπλυσης.
7. Συλλογή του επιθυμητού κλάσματος, απαλλαγμένο από προσμίξεις, ώστε να χρησιμοποιηθεί για χρωματογραφική ανάλυση.

Η εκχύλιση DPX, ως μια νέα τεχνική προκατεργασίας δείγματος *πλεονεκτεί* έναντι των άλλων τεχνικών εκχύλισης διότι:

1. Χρησιμοποιεί μικρή ποσότητα διαλυτών συγκριτικά με την SPE και την LLE.
2. Εμφανίζει μειωμένο αριθμό βημάτων χειρισμού, αφού δεν απαιτεί την ενεργοποίηση της στήλης και γενικά είναι αρκετά απλή.
3. Είναι αρκετά ταχεία, ενώ απαιτεί μικρότερο χρόνο ανάλυσης (περίπου 5 λεπτά συνολικού χρόνου εκχύλισης για κάθε δείγμα) και εμφανίζει μεγαλύτερη συχνότητα για μεγάλο αριθμό δειγμάτων.
4. Είναι αρκετά αποτελεσματική, παρέχοντας υψηλά ποσοστά ανάκτησης ανά εκχύλιση.
5. Παρουσιάζει εκλεκτικότητα και μεγάλη διαχωριστική ικανότητα για τις μελετώμενες ενώσεις.
6. Μπορεί να αυτοματοποιηθεί.



Σχήμα 6.8. Στάδια εκχύλισης με DPX

Τα *μειονεκτήματά* της σχετίζονται με:

- A. Το αυξημένο κόστος αγοράς, το οποίο, όμως, είναι μικρότερο από το συνολικό κόστος των αναλύσεων με άλλες τεχνικές εκχύλισης.
- B. Την ελλιπή έκλυση ή ελλιπή καθαρισμό των μελετώμενων ενώσεων, αφού λόγω της αιώρησης του προσροφητικού μπορεί να υπάρξουν σημεία με τα οποία ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης να μην έρθει σε επαφή.
- Γ. Το μειωμένο αριθμό εφαρμογών της συγκεκριμένης τεχνικής έως σήμερα, αφού είτε οι αναλυτικοί χημικοί προτιμούν τις παραδοσιακές τεχνικές προκατεργασίας δείγματος και δεν είναι εξοικειωμένοι είτε επειδή βρίσκεται ακόμη σε πειραματικό στάδιο και δεν έχει εφαρμοστεί σε μεγάλο αριθμό τάξης ενώσεων, ενώ παρουσιάζει καλύτερα αποτελέσματα μόνο σε αυτοματοποιημένες τεχνικές ανάλυσης.

6.3.5. Μικροεκχύλιση Στερεάς Φάσης (Solid phase microextraction, SPME)

Η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (SPME) αναπτύχθηκε το 1990 από τους Arthur και Pawliszyn και επιτρέπει την επίτευξη ορίων ανίχνευσης της τάξης των 5 – 50 ng/L (ppt) για πτητικά, ημιπτητικά και μη πτητικά συστατικά με καλή γραμμικότητα και ευαισθησία. Είναι μια γρήγορη, ευαίσθητη, εύκολα

αυτοματοποιούμενη, οικονομική και χωρίς χρήση διαλυτών (solvent-free), διαχωριστική τεχνική. Παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα έναντι άλλων συμβατικών τεχνικών διαχωρισμού, καθώς συνδυάζει ταυτόχρονη εκχύλιση και προσυγκέντρωση του επιθυμητού συστατικού από αέρια, υγρά ή στερεά δείγματα, με άμεση μεταφορά του για ανάλυση σε ένα κλασικό σύστημα αέριας ή υγρής χρωματογραφίας.

Πρόκειται για μια διαδικασία δύο σταδίων η οποία περιλαμβάνει ταυτόχρονη εκχύλιση και προσυγκέντρωση των αναλυτών από το υπόστρωμα των δειγμάτων. Στο πρώτο στάδιο, μια ίνα τετηγμένου διοξειδίου του πυριτίου (SiO_2) επικαλυμμένη με μια στατική φάση (coating) από πολυμερές υλικό, εκτίθεται στο φιαλίδιο το οποίο περιέχει το δείγμα ενώ το προσδιοριζόμενο συστατικό κατανέμεται μεταξύ του υποστρώματος και του πολυμερούς υλικού της στατικής φάσης. Σε δεύτερο στάδιο, η ίνα με τα επιθυμητά συστατικά μεταφέρεται στον εισαγωγέα του αναλυτικού οργάνου για εκρόφηση, διαχωρισμό και ποσοτικοποίηση. Συνήθως, δεν απαιτείται ενδιάμεσο στάδιο καθαρισμού, λόγω της μεγάλης εκλεκτικότητας του πολυμερούς υλικού.

Η αρχική συσκευή στηριζόταν σε μια επικαλυμμένη ίνα στερεωμένη σε ακροφύσιο σύριγγας. Σε αυτήν την κατασκευή, η λεπτή στερεωμένη ίνα τετηγμένου SiO_2 επικαλύπτεται με μια πολυμερική στατική φάση στην οποία προσροφάται εκλεκτικά το επιθυμητό συστατικό.

Η εκχύλιση με την τεχνική SPME βασίζεται στην κατανομή του επιθυμητού συστατικού μεταξύ της υδατικής φάσης και της στατικής φάσης του πολυμερούς. Τυπικά, η εκχύλιση με την τεχνική SPME θεωρείται ότι έχει ολοκληρωθεί, όταν η συγκέντρωση του επιθυμητού συστατικού έχει φτάσει σε ισορροπία μεταξύ του υποστρώματος του δείγματος και του πολυμερούς της ίνας. Αυτό σημαίνει ότι, όταν επέλθει ισορροπία, το ποσό του επιθυμητού συστατικού που εκχυλίζεται είναι σταθερό μέσα στα όρια του πειραματικού σφάλματος και ανεξάρτητο του επιπλέον χρόνου εκχύλισης.

Οι συνθήκες ισορροπίας έχουν μελετηθεί και η δυναμική της απορρόφησης περιγράφεται μαθηματικά από τη σχέση:

$$n = [(K_{fs} \times V_f \times V_s) / (K_{fs} \times V_f + V_s)] C_0$$

όπου, n είναι τα γραμμομόρια του επιθυμητού συστατικού που προσροφώνται από τη στατική φάση, K_{fs} ο συντελεστής κατανομής μεταξύ της υδατικής και στατικής φάσης, V_s και V_f είναι ο όγκος του δείγματος και της ίνας αντίστοιχα και C_0 είναι η αρχική συγκέντρωση του επιθυμητού συστατικού στο διάλυμα.

Η εξίσωση αυτή αναφέρεται, κυρίως, σε υγρή επίστρωση ίνας, όπως το πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο (PDMS), αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για στερεές επιστρώσεις για μικρές, όμως, συγκεντρώσεις αναλυτών, ώστε να μην επέλθει κορεσμός της πορώδους επίστρωσης. Επίσης, προϋποθέτει ότι το διάλυμα είναι ομοιογενές και ότι δεν υπάρχει διαφυγή αναλυτών στην αέρια φάση.

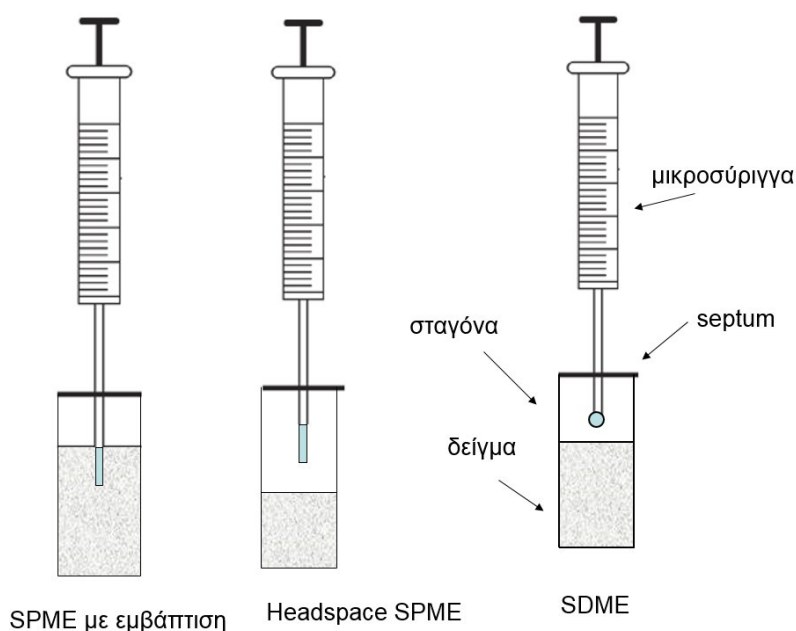
Τα στάδια της SPME είναι: (Α) διάτρηση του ελαστικού διαφράγματος του φιαλιδίου από τη βελόνα, (Β) μεταφορά των συστατικών στην ίνα, (Γ) προστασία της ίνας εντός της βελόνας και απόσυρσή της από το φιαλίδιο, (Δ) εισαγωγή της βελόνας στον εισαγωγέα δείγματος του χρωματογράφου, (Ε) εκρόφηση των επιθυμητών συστατικών από την ίνα και μεταφορά τους από την κινητή φάση προς τη χρωματογραφική στήλη (για διαχωρισμό και στη συνέχεια ανίχνευση/μέτρηση) και (ΣΤ) εξαγωγή της βελόνας από τον εισαγωγέα δείγματος.

Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη διαδικασία εκχύλισης και την εκχυλιστική ικανότητα της SPME εξαρτώνται από:

- την επίστρωση της ίνας,
- το χρόνο δειγματοληψίας και εκρόφησης,
- τη θερμοκρασία δειγματοληψίας και εκρόφησης,
- την ανάδευση του δείγματος,
- την ιοντική ισχύ του διαλύματος (αναλόγως της προσδιοριζόμενης ένωσης).

Άλλοι παράγοντες που μπορούν να επιδράσουν θετικά, με αύξηση της απόδοσης της εκχύλισης και σημαντική ελάττωση του απαιτούμενου χρόνου, είναι η προσθήκη αλάτων όπως το NaCl και το Na_2SO_4 . Επίσης, βελτίωση της εκλεκτικότητας και ταχύτερη αποκατάσταση της ισορροπίας μπορεί να επιτευχθεί με ρύθμιση του pH, ανάλογα με την pK_a της προσδιοριζόμενης ένωσης. Παραδείγματος χάρι, στην περίπτωση που το επιθυμητό συστατικό είναι όξινη ή βασική ένωση, συνιστάται η προσθήκη κάποιου οξέος ή βάσης αντίστοιχα στο διάλυμα του δείγματος. Αξίζει να σημειωθεί ότι η εφαρμογή ανάδευσης μπορεί να οδηγήσει

σε υψηλότερους συντελεστές εμπλουτισμού, με αποτέλεσμα τη βελτίωση της απόδοσης της εκχύλισης. Η επίδραση της θερμοκρασίας διαφέρει ανάλογα με το είδος της SPME (στον υπερκείμενο χώρο-headspace ή με εμβάπτιση, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 6.9**), και εξαρτάται, συνεπώς, από την πτητικότητα του επιθυμητού συστατικού.



Σχήμα 6.9. Τεχνικές μικροεκχύλισης: Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (SPME), βασισμένη σε μια απλή μικροσύριγγα και η τεχνική της μικροεκχύλισης υγρής φάσης σε σταγόνα.

6.3.5.1. Μικροεκχύλιση Στερεάς Φάσης στον υπερκείμενο χώρο-Headspace – Solid phase microextraction (HS – SPME)

Η headspace εκδοχή της SPME επιλέγεται στην περίπτωση που το επιθυμητό συστατικό είναι μία πτητική ή ημιπτητική ουσία. Με εφαρμογή της SPME υπερκείμενης φάσης μπορεί να επιτευχθεί αποτελεσματικός διαχωρισμός του επιθυμητού συστατικού, όταν συνυπάρχουν στο ίδιο υπόστρωμα μη πτητικές παρεμποδίσες, ενώ παράλληλα ελαχιστοποιείται η προσρόφηση ουσιών που μπορούν να αλλοιώσουν ή να καταστρέψουν την ίνα. Με τον τρόπο αυτό, περισσότερες από 100 επαναλήψιμες εκχυλίσεις μπορούν να πραγματοποιηθούν με τη χρήση της ίδιας ίνας.

Στην εξέλιξή της, η SPME μπορεί, πλέον, να χρησιμοποιείται *in vivo*, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 6.10**, ενώ στο **Σχήμα 6.11**, δίνονται συγκριτικά τα στάδια εκχύλισης της *in vivo* SPME ως προς την *in vitro* SPME.

6.3.5.2. Απευθείας Εμβάπτιση - Direct immersion – Solid phase microextraction (DI – SPME)

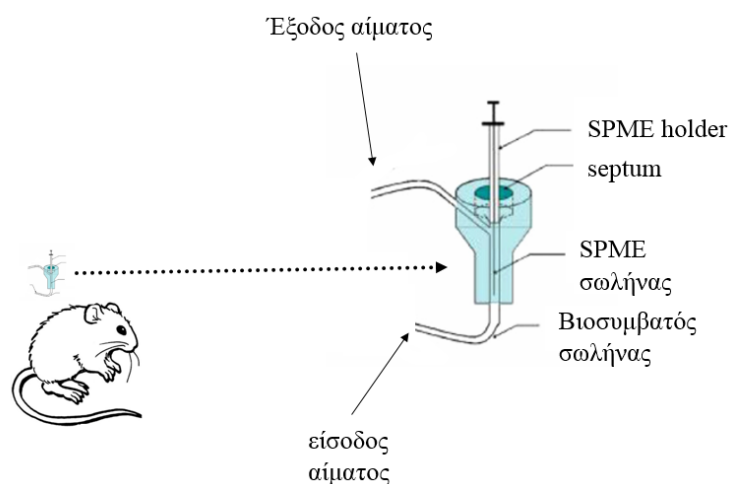
Η απευθείας εκχύλιση του επιθυμητού συστατικού, με απευθείας εμβάπτιση δηλ. με βύθιση της ίνας στο διάλυμα του δείγματος εφαρμόζεται, όταν η προσδιοριζόμενη ένωση εμφανίζει πολύ μικρή ή καθόλου πτητικότητα. Στην περίπτωση της άμεσης εκδοχής, λόγω της άμεσης επαφής της ίνας με το διάλυμα του δείγματος, θα πρέπει να αποφεύγονται οι ιδιαίτερα όξινες ή αλκαλικές συνθήκες, για την απομάκρυνση του ενδεχόμενου καταστροφής της ίνας.

Η εφαρμογή της DI – SPME προϋποθέτει την έκθεση της ίνας στο διάλυμα του δείγματος, σε ορισμένη θερμοκρασία που ποικίλλει (από 30–100°C) με παράλληλη ανάδευση για 15–60 min, ενώ έπεται ένα σύντομο στάδιο καθαρισμού με εμβάπτιση της ίνας σε διαλύτη, πριν την έγχυση στο GC/LC/HPLC για ανάλυση.

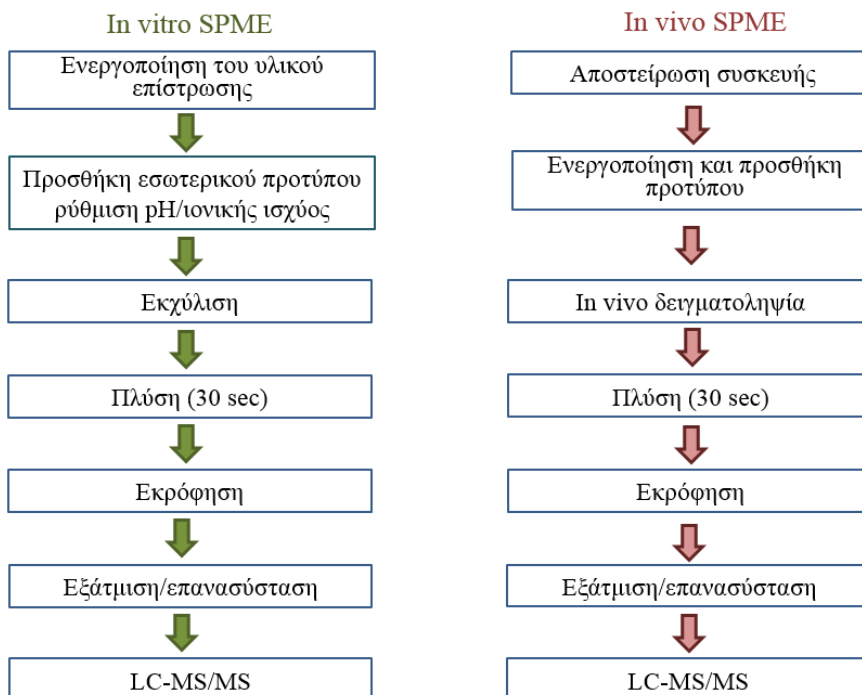
Η εφαρμογή της SPME δεν αποτελεί την καταλληλότερη προσέγγιση για την εκχύλιση μη πτητικών ή θερμικά ασταθών ενώσεων. Επίσης, κατά την εκχύλιση πολικών ενώσεων από βιολογικά δείγματα, συνιστάται παραγωγοποίηση. Υπάρχουν τέσσερα είδη παραγωγοποίησης που μπορούν να χρησιμοποιηθούν συνδυαστικά με τη SPME:

- (i) Απευθείας παραγωγοποίηση στο φιαλίδιο του δείγματος, πριν την εφαρμογή της SPME,
- (ii) In-coating παραγωγοποίηση (επάνω στην ίνα), που περιλαμβάνει δύο στάδια και συνδυάζει ταυτόχρονη παραγωγοποίηση και εκχύλιση· αρχικά η ίνα ενισχύεται, καθώς εμβολιάζεται με το αντιδραστήριο παραγωγοποίησης και στη συνέχεια εκτίθεται στο δείγμα για την εκχύλιση και η μέθοδος αυτή επιλέγεται, συνήθως, στην περίπτωση πολικών πτητικών ενώσεων,
- (iii) Διαφορετική εκδοχή της in-coating παραγωγοποίησης, κατά την οποία προηγείται εμβολιασμός της ίνας με το δείγμα προς εκχύλιση και έπειτα ακολουθεί έκθεση της ίνας στην υπερκείμενη φάση του αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης,

Παραγωγοποίηση μετά την ολοκλήρωση της εκχύλισης, στο σύστημα έγχυσης του αναλυτικού οργάνου. Κατά τη διαδικασία αυτή, το επιθυμητό συστατικό εφόσον έχει προσροφηθεί στην ίνα, εισάγεται στο σύστημα εκρόφησης του GC και ακολουθεί η παραγωγοποίηση.



Σχήμα 6.10. *In vivo* SPME

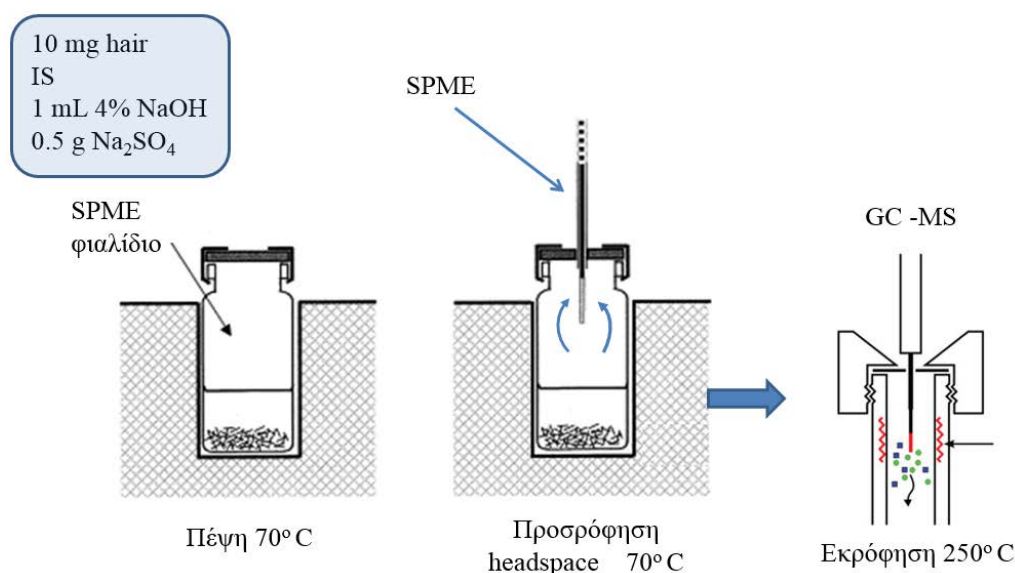


Σχήμα 6.11. Σύγκριση *In vivo* in vitro SPME

6.3.5.3. Εφαρμογή της τεχνικής στον προσδιορισμό ναρκωτικών ουσιών σε τρίχες

Στην περίπτωση που το υπόστρωμα του δείγματος είναι τρίχα, προαπαιτείται πέψη του δείγματος με NaOH ή εκχύλιση με κατάλληλο διαλύτη (Σχήμα 6.12). Γενικότερα, όμως, η προκατεργασία του δείγματος και η εφαρμογή της SPME εξαρτώνται από τη δομή και τις ιδιότητες του επιθυμητού συστατικού (όπως πτητικότητα, πολικότητα, pKa), παρά από το υπόστρωμα.

Δείγμα από το τριχωτό της κεφαλής εθελοντών, παραλαμβάνεται και πλένεται για 5 min με απιονισμένο νερό και ακετόνη σε λουτρό υπερήχων, ξηραίνεται και κόβεται σε κομμάτια μήκους 2–5 mm, τα οποία αναμιγνύονται προσεκτικά. Στη συνέχεια, ακολουθεί αλκαλική υδρόλυση του δείγματος, κατά την οποία σε ένα φιαλίδιο όγκου 4 mL, εισάγονται 10 mg καθαρού και ξηρού δείγματος τρίχας, 100 ng εσωτερικού προτύπου, 0.5 g Na₂SO₄ και 1 mL NaOH (1 M). Το φιαλίδιο σφραγίζεται και θερμαίνεται για 30 min (70–90°C).



Σχήμα 6.12. Βασικές αρχές της εκδοχής υπερκείμενης φάσης της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (HS – SPME) στην ανάλυση της τρίχας

Μετά την ολοκλήρωση της υδρόλυσης, η βελόνα SPME εισέρχεται στο φιαλίδιο και η ίνα εξάγεται στην υπερκείμενη φάση του δείγματος, ενώ η θερμοκρασία προσρόφησης ρυθμίζεται στους 60–90°C (ανάλογα με την προς ανάλυση ουσία). Η διάρκεια έκθεσης της ίνας είναι 15–20 min. Μόλις ολοκληρωθεί η προσρόφηση, η ίνα επανεισάγεται στη βελόνα και η SPME – συσκευή μεταφέρεται στο σημείο έγχυσης του GC. Ο χρόνος εκρόφησης καθορίστηκε στα 5 min, ενώ η θερμοκρασία κατά την εκρόφηση ποικίλλει μεταξύ 250° έως 290°C (ανάλογα την επίστρωση της ίνας). Καθόλη τη διάρκεια της εκρόφησης, συντελείται παράλληλα αναγέννηση της ίνας, για τη χρήση της σε επόμενη εκχύλιση.

Γενικότερα, η πέψη της τρίχας με αλκαλικό διάλυμα, συνήθως σε 1M NaOH, αποτελεί το καταλληλότερο είδος προκατεργασίας του υποστρώματος της τρίχας, με τον όρο ότι τα επιθυμητά συστατικά παραμένουν σταθερά υπό αυτές τις συνθήκες, όπως π.χ. η καρβαμαζεπίνη, οι αμφεταμίνες, και τα τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά, σε αντίθεση με τους εστέρες, όπως η ηρωίνη και η κοκαΐνη που υδρολύονται σε αλκαλικό περιβάλλον. Σημαντικό πλεονέκτημα της HS–SPME, είναι ότι η διάλυση του υποστρώματος της τρίχας και η εκχύλιση μπορούν να πραγματοποιηθούν στο ίδιο φιαλίδιο, χωρίς περαιτέρω προεργασία.

Με κατάλληλη προκατεργασία του υποστρώματος της τρίχας (αλκαλική υδρόλυση), είναι δυνατή η ταυτόχρονη ανίχνευση διαφόρων βασικών ναρκωτικών ουσιών, στο ίδιο φιαλίδιο, σε μία απευθείας διαδικασία πέψης/SPME.

Μέσω της SPME είναι εφικτή η ανίχνευση της νικοτίνης, σε πολύ χαμηλά επίπεδα ($C < 1$ ng/mg), σε υπόστρωμα τρίχας, αλλά και άλλων ναρκωτικών ουσιών που μεταβολίζονται ταχύτατα και δεν είναι δυνατός ο προσδιορισμός τους στα συνήθη βιολογικά υγρά.

6.4. Άμεσες Βιοαναλυτικές Τεχνικές

Ως άμεσες τεχνικές στη βιοανάλυση αναφέρονται αυτές, κατά τις οποίες δε χρειάζεται να προηγηθεί κατακρήμνιση των πρωτεϊνών του βιολογικού δείγματος.

Οι άμεσες βιοαναλυτικές τεχνικές χρησιμοποιούν ειδικά υλικά πλήρωσης στηλών, τα οποία επιτρέπουν την **άμεση εισαγωγή** δείγματος βιολογικών υγρών (αίμα, πλάσμα, ορός, γάλα, ιστοί, καλλιέργειες κυττάρων κ.λπ.) χωρίς άλλη προκατεργασία, τα οποία ονομάζονται **Υλικά Περιορισμένης Πρόσβασης (Restricted Access Materials)**. Αυτό επιτυγχάνεται με:

- Κλασμάτωση του δείγματος σε προστήλη και απομάκρυνση του υποστρώματος των πρωτεϊνών, ενώ το κλάσμα των συστατικών παραλαμβάνεται εκλεκτικά στην προστήλη και μεταφέρεται στην αναλυτική στήλη, όπου διαχωρίζεται και υπολογίζεται ποσοτικά με το συμβατικό τρόπο.
- Ταυτόχρονα με την ανάλυση του πρώτου δείγματος λαμβάνει χώρα ο καθαρισμός του επόμενου δείγματος, οπότε με τον τρόπο αυτόν περιορίζεται ο χρόνος προκατεργασίας.

Το υλικό πλήρωσης της προστήλης στην άμεση εισαγωγή του δείγματος έχει μέγεθος πόρων 6 nm (physical diffusion barrier) και αποκλείει τα μακρομόρια π.χ. πρωτεΐνες που έχουν M.B.>15000 Da.

Ένα τέτοιο υλικό είναι το Lichrospher RP-ADS (alkyl-diol-silica), το οποίο έχει δύο διαφορετικές χημικές επιφάνειες: την **εξωτερική** των σφαιρικών σωματιδίων, η οποία είναι **υδρόφιλη**, λόγω των **διολών** και εμποδίζει την αλληλεπίδραση με το υπόστρωμα των πρωτεϊνών και την **εσωτερική** των πορωδών σωματιδίων η οποία είναι καλυμμένη με **υδρόφοβη** φάση **C₄-C₈-C₁₈**. Αυτά τα κέντρα προσρόφησης είναι ελεύθερα και προσιτά για τα συστατικά χαμηλού μοριακού βάρους. Τα διάφορα προσροφητικά υποστρώματα εμφανίζουν διαφορετικές ιδιότητες συγκράτησης και εκχύλισης μη πολικών συστατικών του δείγματος.

Στο ίδιο υλικό μπορεί να προστεθεί το κατάλληλο αντιδραστήριο σχηματισμού Ζεύγους ιόντων π.χ. οκτανοσουλφονικό οξύ, ώστε να μπορούν να εκχυλιστούν και φορτισμένες ενώσεις.

Τα πλεονεκτήματα της άμεσης εισαγωγής δείγματος είναι:

- η άμεση εισαγωγή βιολογικών υγρών χωρίς άλλη προκατεργασία,
- η μείωση κόστους και χρόνου επειδή είναι, πλήρως, αυτοματοποιήσιμη .
- ο ασφαλέστερος χειρισμός μολυσματικών βιολογικών υγρών,
- ο ποσοτικός περιορισμός του υποστρώματος των πρωτεϊνών,
- η προσυγκέντρωση στη στήλη,
- η ποσοτική παραλαβή/ανάκτηση ανεξάρτητα του υποστρώματος,
- η βελτιωμένη ακρίβεια, επαναληψιμότητα και ευαισθησία,
- η αυξημένη χωρητικότητα στήλης,
- ο υψηλός αριθμός κύκλων ανάλυσης,
- το χαμηλό κόστος ανά δείγμα,
- η μεγάλη ποικιλία προσροφητικών υλικών τα οποία υπάρχουν διαθέσιμα στο εμπόριο.

6.4.1. Εκχύλιση αέριας φάσης

Η **αέρια εκχύλιση (Gas Extraction)** εφαρμόζεται σε πτητικές ενώσεις και αφορά την εκχύλιση των συστατικών από το υπόστρωμα απευθείας σε αέρια φάση, σε θερμοκρασία δωματίου ή υψηλότερη. Είναι ιδανική τεχνική πριν την ανάλυση με Αέρια Χρωματογραφία.

Η εκχύλιση αέριας φάσης έχει τα **πλεονεκτήματα** του χαμηλού κόστους, δεν είναι βλαβερή, χρησιμοποιεί λίγα αναλώσιμα, έχει δυνατότητα αυτοματοποίησης και δεν απαιτείται απομάκρυνση του διαλύτη. Το τελευταίο πλεονέκτημα είναι ιδιαίτερα σημαντικό, αν λάβουμε υπόψη μας ότι γενικά ο διαλύτης εισάγει στο δείγμα επιμολυντές. Αξιοσημείωτο είναι ότι η συμπύκνωση του δείγματος, για να απομακρυνθεί ο διαλύτης, προκαλεί αύξηση της συγκέντρωσης των επιμολυντών.

Η αέρια εκχύλιση μπορεί να γίνει με δυο τρόπους:

- **Στατική Εκχύλιση:** Εκχύλιση ισορροπίας στον υπερκείμενο χώρο (Equilibrium headspace sampling), όπου τα συστατικά εκχυλίζονται σε κλειστό σύστημα το οποίο εξασφαλίζει

ισορροπία ανάμεσα στη συγκέντρωση των συστατικών στο υπόστρωμα και στην αέρια φάση ή στον υπερκείμενο χώρο (headspace).

- **Δυναμική εκχύλιση:** α) Με θερμική εκρόφιση (thermal desorption), β) Με διατάξεις παγίδευσης (purge and trap techniques). Τα συστατικά εκχυλίζονται θερμικά από το υπόστρωμα και απομακρύνονται με ρεύμα αδρανούς φέροντος αερίου.

Οι **τεχνικές headspace** εφαρμόζονται, συνήθως, για ανάλυση πτητικών ενώσεων. Παράδειγμα αποτελεί η στατική headspace που είναι η πιο απλή solvent-free τεχνική προκατεργασίας δείγματος και εφαρμόζεται για πτητικές οργανικές ενώσεις σε τρόφιμα, ποτά, κλινικά και άλλα δείγματα. Ωστόσο έχει, το μειονέκτημα της χαμηλής ευαισθησίας, γιατί δε μεσολαβεί προσυγκέντρωση και ακόμη επειδή δεν επιτυγχάνει πλήρη εκχύλιση, απαιτεί προσεκτική βαθμονόμηση. Επίσης, εφαρμόζεται για αιθανόλη στο αίμα.

Η **δυναμική (dynamic) headspace** και, κυρίως, η purge and trap, χρησιμοποιεί πολλαπλή κατανομή και επιτρέπει ποσοτική απομάκρυνση των πτητικών ενώσεων. Το φέρον αέριο διαβιβάζεται μέσω υδατικού δείγματος για παραλαβή (purge) των πτητικών από το υπόστρωμα. Οι ενώσεις αυτές στη συνέχεια συλλέγονται με τη χρήση ψυχρής ή προσροφητικής παγίδας.

Στα μειονεκτήματά της συγκαταλέγονται ο αφρισμός του δείγματος που δεν επιτρέπει την on-line λειτουργία, λόγω υψηλών ταχυτήτων ροής.

Παρόλο που οι headspace τεχνικές περιορίζονται για ανάλυση πτητικών ενώσεων, μπορούν να συνδυαστούν με θερμική εκρόφιση για ανάλυση στερεών δειγμάτων και λιγότερο πτητικών συστατικών. Κατά τη θέρμανση του δείγματος σε υψηλή θερμοκρασία, τα πτητικά συστατικά εκφορτώνονται θερμικά από τα στερεά δείγματα και τα λιγότερο πτητικά είδη σε υδατικά ή στερεά δείγματα κατανέμονται ευκολότερα στην αέρια φάση. Πολλές φορές, όμως, η ύπαρξη συστατικών που είναι θερμικά ευαίσθητα και το υψηλό ποσοστό υγρασίας των εκροφημένων αερίου μίγματος, συχνά, εμποδίζουν τη χρήση της θερμικής εκρόφισης.

Η εκχύλιση υπερκρίσιμου ρευστού (SFE) είναι μία εναλλακτική λύση, επειδή τα υπερκρίσιμα ρευστά έχουν τις ιδιότητες των αερίων όσον αφορά τη μεταφορά μάζας και τα χαρακτηριστικά των υγρών όσον αφορά τη διαλυτική ικανότητα. Ωστόσο απαιτείται ακριβής διάταξη υψηλής πίεσης και μεγάλο ποσοστό υψηλής καθαρότητας. CO₂ και, βέβαια, είναι δύσκολο να εφαρμοστεί on-site.

6.4.2. Εκχύλιση μεμβράνης

Η εκχύλιση μεμβράνης περιλαμβάνει δύο ταυτόχρονες διεργασίες: πολυμερή εκχύλιση από το υπόστρωμα του δείγματος και αέρια εκχύλιση από την πολυμερή φάση. Σε πιο πρόσφατες εξελίξεις, χρησιμοποιούνται κοίλες ίνες (hollow fibers) με σημαντικά μεγαλύτερο λόγο ειδικής επιφάνειας/ όγκο από τις επίπεδες μεμβράνες και έτσι πιο αποτελεσματική εκχύλιση. Μπορεί δε να συζευχθεί άμεσα με MS ή GC για συνεχή παρακολούθηση (monitoring). Συνήθως εφαρμόζεται για πτητικές ενώσεις, αλλά με χρήση υψηλής πίεσης αερίου μπορεί να εφαρμοστεί και σε ημιπτητικές.

Μειονεκτήματα της τεχνικής είναι η αργή απόκριση της μεμβράνης σε μεταβολή της συγκέντρωσης και η περιορισμένη δυνατότητα στον προσδιορισμό πολικών ενώσεων, επειδή δεν υπάρχουν στο εμπόριο πολικές μεμβράνες, αυτό, βέβαια, στο μέλλον μπορεί να αλλάξει, αν λάβουμε υπόψη την ταχεία πρόοδο στην τεχνολογία των πολυμερών.

Οι τεχνικές μεμβράνης εφαρμόζονται για:

1. καθαρισμό,
2. προσυγκέντρωση και
3. διαχωρισμό.

Μεμβράνες από οργανικά πολυμερή π.χ. PTFE, Nylon, PVC, κυτταρίνη, ίνες υάλου, χρησιμοποιούνται στη διήθηση, και στην SPE με τεχνολογία δίσκων.

Η μεταφορά του συστατικού γίνεται με διάχυση ως αποτέλεσμα διαφορετικής:

- χημικής ιδιότητας (συγκέντρωση) ή
- ηλεκτροχημικής ιδιότητας (φορτίο)

Μπορεί να επιτευχθεί η διάχυση παρεμποδίσεων προς το δέκτη οπότε επέρχεται καθαρισμός του δότη, ή πιο συχνά: η διάχυση του καθαρού συστατικού προς το δέκτη και η παραμονή των παρεμποδίσεων

στο δότη. Το δε σύστημα μπορεί να είναι είτε στατικό είτε συνεχούς ροής. Οι πιο συνήθεις τεχνικές περιλαμβάνουν:

1. υπερδιήθηση,
2. αντίστροφη ώσμωση,
3. διαπίδυση
4. μικροδιαπίδυση
5. ηλεκτροδιαπίδυση

Η μεμβράνη μπορεί να έχει διάφορες μορφές όπως: Φύλλο, Ρολλό, Δίσκος, Κάψουλα, Μικροστήλη (cartridge), Σπιράλ, Κοίλη ίνα (hollow fiber) κ.λπ. Ως *Δότης* θεωρείται το Δείγμα, ενώ ως *Δέκτης* το άλλο διάλυμα, ρυθμιστικό ή νερό.

6.4.2.1. Μικροδιαπίδυση (Microdialysis)

Η **μικροδιαπίδυση** είναι μία βιοαναλυτική μέθοδος δειγματοληψίας για τη μελέτη συστατικών στον εξωτερικό χώρο των κυττάρων σε ζωντανούς ιστούς. Μπορεί να εφαρμοστεί σε μελέτες που γίνονται σε ζώα, φυτά, καλλιέργειες κυττάρων και μύρες στο στάδιο της ζύμωσης.

Δεν εισάγονται ούτε απομακρύνονται υγρά από τους ιστούς, ενώ μπορούν να ληφθούν πληροφορίες σχετικά με τις συγκεντρώσεις των συστατικών που ενδιαφέρουν σε συγκεκριμένους ιστούς από πειραματόζωα, τα οποία έχουν τις αισθήσεις τους και κινούνται ελεύθερα, κάθε λίγα λεπτά, για περιόδους που διαρκούν μέχρι ορισμένες ημέρες.

Η μικροδιαπίδυση επιτυγχάνεται εισάγοντας μία μικροσκοπική μεμβράνη διαπίδυσης στο ζωντανό ιστό και έχει τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

- Η μεμβράνη αποτελεί μέρος ενός σωλήνα (probe) που διαρρέεται από ένα ισοτονικό υγρό (perfusion) σε σταθερή ταχύτητα ροής.
- Η διαφορά ανάμεσα στη συγκέντρωση του συστατικού στον ιστό και στο υγρό προκαλεί διαβάθμιση στη συγκέντρωση, που οδηγεί σε μεταφορά του συστατικού κατά μήκος της μεμβράνης διαπίδυσης.
- Επειδή η διάχυση είναι διπλής κατεύθυνσης, η ίδια διάταξη μπορεί είτε να εισάγει, είτε να δέχεται συστατικά από τον επιθυμητό ιστό.
- Τα δείγματα είναι καθαρά χωρίς πρωτεΐνες, άρα δεν απαιτούν προκατεργασία πριν την ανάλυση.
- Η ανάλυση στη συνέχεια μπορεί να γίνει με υγρή χρωματογραφία, τριχοειδή ηλεκτροφόρηση ή ανοσοενζυμικές τεχνικές.

Σε σχέση με τη λήψη αίματος, η μικροδιαπίδυση έχει τα ακόλουθα πλεονεκτήματα:

1. Δεν υπάρχει απώλεια συστατικού.
2. Τα δείγματα είναι ελεύθερα πρωτεϊνών, έτοιμα για ανάλυση.
3. Δεν υπάρχει απώλεια αίματος ή άλλου βιολογικού υγρού.
4. Μεγάλη συχνότητα δειγματοληψίας.
5. Αποφεύγεται ο τραυματισμός του υποκειμένου.
6. Δυνατότητα παροχής φαρμάκου με ταυτόχρονη δειγματοληψία.

Σε σχέση με άλλες τεχνικές: Δε χρειάζεται να θυσιαστεί το πειραματόζωο και εξάγονται πιο αντιπροσωπευτικά συμπεράσματα.

6.4.2.2. Υπερδιήθηση

Η **υπερδιήθηση** είναι μέθοδος αποχωρισμού των στερεών σωματιδίων τα οποία περιέχονται στο υγρό με τη χρήση πορώδους (ημιπερατής) μεμβράνης.

Η υπερδιήθηση είναι μία διαδικασία διήθησης σε επίπεδο εκατοντάδων Angstrom. Αυτό, πρακτικά σημαίνει ότι το μέσο διήθησης έχει πόρους μικρότερους από το μέγεθος ιού και βακτηρίου. Η τεχνική αυτή

εφαρμόζεται ευρύτατα στα νοσοκομεία, όπου χρησιμοποιούνται ειδικές συσκευές υπερδιήθησης για τον καθαρισμό του αίματος των ασθενών με νεφρική ανεπάρκεια, τις γνωστές ως συσκευές αιμοκάθαρσης.

Η πολύ επιλεκτική διαπερατότητα της ανισότροπης, υδρόφιλης μεμβράνης υπερδιήθησης Ultracel® οφείλεται στην κατανομή στενού μεγέθους πόρων. Τυπικά, οι συσκευές Centrifree® συγκρατούν το 99,9% της πρωτεΐνης του ορού και < 5% L-θυροξίνης (0,1 mg/mL σε 0,1 M NaOH).

Στον Πίνακα 6.2 αναφέρονται οι κυριότερες διαχωριστικές διεργασίες με χρήση μεμβρανών και οι – εφαρμογές τους.

Διεργασία διαχωρισμού	Κινητήρια δύναμη	Μηχανισμός διαχωρισμού	Εφαρμογές	Δομή μεμβράνης
Διαπίδυση	Διαφορά συγκέντρωσης	Διαφορά στην ταχύτητα διάχυσης	Διαχωρισμός ενώσεων υψηλού και χαμηλού μοριακού βάρους	Συμμετρική, πορώδης/μη-πορώδης
Ωσμωση	Διαφορά συγκέντρωσης	Διαφορά στην ταχύτητα διάχυσης	Αφαλάτωση νερού	Συμμετρική, πορώδης
Υπερδιήθηση	Διαφορά πίεσης (1-10 MPa)	Διαφορά στη διαλυτότητα και στην ταχύτητα διάχυσης	Διαχωρισμός ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους από διαλύματα	Ασύμμετρη, μη-πορώδης (0.1-1nm)
Ultra διήθηση	Διαφορά πίεσης (50kPa-1MPa)	Διαπίδυση μεμβράνης	Διαχωρισμός ενώσεων υψηλού και χαμηλού μοριακού βάρους	Ασύμμετρη, πορώδης (1-100 nm)
Μικροδιήθηση	Διαφορά πίεσης (10-100kPa)	Διαπίδυση μεμβράνης	Διήθηση βακτηρίων	Συμμετρική, πορώδης (100-1000 nm)
Ηλεκτροδιαπίδυση	Διαφορά δυναμικού	Εκλεκτική μεταφορά ιόντων	Αφαλάτωση νερού	Συμμετρική, ιοντική
Ηλεκτροώσμωση	Διαφορά δυναμικού	Διαφορά στην ταχύτητα διάχυσης	Ξήρανση εδαφικών δειγμάτων	Συμμετρική, ιοντική
Αέριος φάσης	Διαφορά πίεσης	Διαφορά στη διαλυτότητα και στην ταχύτητα διάχυσης	Διαχωρισμός αερίων μιγμάτων	Ασύμμετρη, μη-πορώδης
Υπερεξάτμιση	Διαφορά πίεσης	Διαφορά στη διαλυτότητα και στην ταχύτητα διάχυσης	Διαχωρισμός αερίων μιγμάτων	Ασύμμετρη, μη-πορώδης

Πίνακας 6.2. Διαχωριστικές Διεργασίες Με Χρήση Μεμβρανών-Εφαρμογές

Βιβλιογραφία

- Μπακέας Ε., Ευστάθιος Κ. (2008). *Εισαγωγή στους Αναλυτικούς Διαχωρισμούς – Ενόργανη Χημική Ανάλυση I*, Εκπαιδευτικό υλικό, Αθήνα.
- Παπαδογιάννης Ι.Ν. (2004). Σύγχρονες Διαχωριστικές Τεχνικές στην Ενόργανη Χημική Ανάλυση, Πήγασος.
- Arsenault J.C. & McDonald P.D. (2007). *Beginners Guide to Liquid Chromatography*, Waters (2007); Order P/N 715001531 on waters.com.
- Barker S.A. (2000). *Matrix solid-phase dispersion*, Journal of chromatography A, 885 115-127.
- Bermejo A.M., Lopez P., Alvarez I., Tabernero M.J., Fernandez P., (2006). *Solid-phase microextraction for the determination of cocaine and cocaethylene in human hair by gas chromatography-mass spectrometry*. Forensic Sci. Int., 156, 2–8.

- Gentili S., Cornetta M., Macchia T. (2004). *Rapid screening procedure based on headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry for the detection of many recreational drugs in hair*, J. Chromatogr. B, 801(2), 289–296.
- Junting L., Peng C., Suzuki O. (1998). *Solid-phase microextraction (SPME) of drugs and poisons from biological samples*. Forensic Sci Int. 97, 93–100.
- Karacnji I., Zimic L., Brajenovic N., Skender L., (2011). *Optimisation of a solid-phase microextraction method for the analysis of nicotine in hair*, J. Sep. Sci.. 34, 2726–2731.
- Kataoka H. (2005). *Recent Advances in Solid-Phase Microextraction and Related Techniques for Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Cur. Pharm Anal, 1(1), 65-84.
- Kintz P. , Marescaux C., Mangin P. (1995). *Testing human hair for carbamazepine in epileptic patients: Is hair investigation suitable for drug monitoring?* Hum. Exp. Toxicol., 14, 812–815.
- Kristenson E. M., Ramos L., Brinkman U.A.Th.. (2006). *Recent advances in matrix solid-phase dispersion*, Trends in Analytical Chemistry, 25 (2) 96-111.
- Lord H. & Pawliszyn J. (2000). *Microextraction of drugs*. J. Chromatogr. A, 902, 17–63.
- McDonald P.D. & Bouvier E.S.P. (2001). *A Sample Preparation Primer and Guide to Solid-Phase Extraction Methods Development*, Waters [2001] Search for WA20300 on waters.com.
- Waters, *Purity by SPE* [2008]; Search for 720001692en on waters.com
- Musshoff F., Junker H.P, Lachenmeier D.W, Kroener L, Madea B. (2002). *Fully automated determination of cannabinoids in hair samples using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry*. J. Anal. Toxicol. 26, 554–560.
- Nasir U.M., Samanidou V.F. & Papadoyannis I.N. (2013). *Sample preparation overview for the chromatographic determination of 1,4-Benzodiazepines in biological matrices*. Chapter 7 in e-book under the title “Reviews in Pharmaceutical and Biomedical Analysis” of Bentham Science Publishing. Dr P. D. Tzanavaras, C. K. Zacharis, E-book Editors.
- Neue U.D., McDonald P.D. (2005). *Topics in Solid-Phase Extraction. Part 1. Ion Suppression in LC/MS Analysis: A Review. Strategies for its elimination by well-designed, multidimensional solid-phase extraction [SPE] protocols and methods for its quantitative assessment* [2005]; Search for 720001273en on waters.com.
- Papadoyannis I.N. & Samanidou V.F. (2003). *Sample Pretreatment in Clinical Chemistry*. Chapter 1. in Separation Techniques in Clinical Chemistry. Ed. Hassan Y. Aboul-Enein. Marcel Dekker. New York USA p.1-102.
- Papadoyannis I.N. & Samanidou V.F. (2005). *Sample Preparation Prior to HPLC*. Encyclopedia of Chromatography. Marcel Dekker. Jack Cazes Ed. Second Edition, June 2005, p. 1499 – 1515.
- Pragst F, (2007). *Application of solid-phase microextraction in analytical toxicology*, Anal Bioanal Chem, 388, 1393–1414.
- Rothe M., Pragst F., Spiegel K., Harrach T., Fischer K., Kunkel J.(1997). *Hair concentrations and self-reported abuse history of 20 amphetamine and ecstasy users*, Forensic Sci. Int., 89 (1-2), 111–128.
- Sporkert F., Pragst F. (2000). *Use of headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) in hair analysis for organic compounds*, Forensic Sci Int, 107, 129–148.
- Stashenko J.R., Martinez E.E., (2004), *Derivatization and solid phase microextraction*. Trends Anal. Chem., 23 (8), 553-561.
- Strano-Rossi S., Chiarotti M. (1999). *Solid-phase microextraction for cannabinoids analysis in hair and its possible application to other drugs*, J. Anal. Toxicol., 23, 7–10.

Κεφάλαιο 7: Βιοαισθητήρες

Στέλλα Γηρούση

Σύνοψη

Σ' αυτό το κεφάλαιο παρουσιάζονται έννοιες, ιστορικά ορόσημα και ορισμοί που αφορούν στους βιοαισθητήρες. Αναπτύσσονται διάφορες κατηγορίες βιοαισθητήρων αναφορικά με τα διάφορα Βιοσυστατικά (πρωτεΐνες, ένζυμα, νουκλεϊνικά οξέα, αντισώματα) καθώς και τις ιδιότητες των βιοσυστατικών (οπτικές, ηλεκτροχημικές κλπ.). Επιπλέον, αναπτύσσονται οι διάφορες κατηγορίες μεταλλακτών σήματος και οι αναλυτικές τεχνικές ανίχνευσης που εφαρμόζονται στους βιοαισθητήρες. Γίνεται ακόμη αναφορά στις γενικές αρχές των ηλεκτροχημικών τεχνικών και ιδιαίτερα της βολταμετρίας και αναπτύσσονται οι εφαρμογές των ηλεκτροχημικών τεχνικών στη διερεύνηση της δομής του DNA και των βιοαισθητήρων στην ανίχνευση καρκινικών δεικτών καθώς και σε εφαρμογές φροντίδας σημείου.

Προαπαιτούμενη Γνώση

Πριν την ανάγνωση του κεφαλαίου, χρήσιμη γνώση για τον αναγνώστη μπορεί να βρεθεί σε συγγράμματα *Ενόργανης Ανάλυσης, Ηλεκτροχημείας, Βιολογίας, Βιοχημείας και Ενζυμολογίας*. Επιπλέον πληροφορίες μπορούν να αναζητηθούν σε σχετικά συγγράμματα: *Κοκκινίδης Γ.Ι.(1992) «Αρχές και μέθοδοι μελέτης ηλεκτροδιακών δράσεων» Εκδόσεις Γιαχούδη-Γιαπούλη, Θεσσαλονίκη, Μουμτζής Ι.Α, Σαζού Δ,(1997) Ηλεκτροχημεία, Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη, Προδρομίδης Μ.(2010) Ηλεκτροχημικοί αισθητήρες & βιοαισθητήρες, Διδακτικές σημειώσεις, Ιωάννινα.*

7.1. Εισαγωγή

Η λέξη “sensor” (αισθητήρας) προέρχεται από τη λατινική λέξη sentire, η οποία σημαίνει “αισθάνομαι”. Ένας αισθητήρας είναι μια διάταξη που αποκρίνεται σε μια φυσική ή χημική διέγερση, όπως θερμότητα, φως, ήχος, πίεση, μαγνητισμός, ή μια συγκεκριμένη κίνηση και μεταδίδει το αποτέλεσμα το οποίο προκύπτει με τη μορφή ώσης. Ένας αισθητήρας, συνεπώς, μπορεί να αναγνωρίσει ένα εσωτερικό σήμα (ή ενέργεια) και να το μετατρέψει στο κατάλληλο εξωτερικό σήμα (ή άλλη μορφή ενέργειας).

Οι Clark και Lyons υπήρξαν πρωτοπόροι στη σύλληψη της έννοιας των βιοαισθητήρων με μία δημοσίευσή τους το 1962. Ειδικότερα, έκαναν αναφορά σε ένα ‘ενζυμικό ηλεκτρόδιο’ αποτελούμενο από ένα ακινητοποιημένο ένζυμο σε έναν ηλεκτροχημικό ανιχνευτή. Έτσι παρήγαγαν έναν αισθητήρα που ανταποκρινόταν στο υπόστρωμα του ενζύμου. Από τότε οι βιοαισθητήρες εξελίχθηκαν σημαντικά χάρη στην πρόοδο που πραγματοποιήθηκε στις τεχνολογίες ανίχνευσης και μετασηματισμού σήματος. Στη σημερινή εποχή διατίθεται ένα ευρύ φάσμα βιολογικών και συνθετικών δεκτών και μεταλλακτών σήματος. Η συνηθέστερη προσέγγιση βασίζεται αρχικά στην επιλογή του προς ανάλυση στόχου (ή την προς ανάλυση ουσία) και στη συνέχεια του μορίου-δέκτη που έχει την απαιτούμενη συγγένεια και εκλεκτικότητα με την προς ανάλυση ουσία. Στον **Πίνακα 7.1** παρουσιάζεται μια ιστορική αναδρομή στην εξέλιξη των βιοαισθητήρων.

Η ανάπτυξη των βιοαισθητήρων, κατά κύριο λόγο, υπαγορεύτηκε από τις ανάγκες της ιατρικής διάγνωσης καθώς και η ταχεία ανάλυση των κλινικών δειγμάτων η οποία παρέχει τη δυνατότητα για παροχή καλύτερης φροντίδας στον ασθενή (point of care detection). Οι βιοαισθητήρες, όμως, μπορεί να αξιοποιηθούν με επιτυχία και σε άλλους τομείς, όπως η κτηνιατρική, η αναπαραγωγή των ζώων, ο έλεγχος των τροφίμων και η προστασία του περιβάλλοντος. Στην αρχή, οι προσπάθειες επικεντρώθηκαν σε βιοαισθητήρες για την υγρή φάση, ωστόσο πρόσφατα άρχισαν να μελετώνται και περισσότερο ελκυστικά περιβάλλοντα, όπως η αέρια φάση και οι οργανικοί διαλύτες. Η βιομηχανία διαγνωστικών μέσων είναι πολυποικίλη και εξυπηρετεί αγορές με απαιτήσεις για διαφορετικά προϊόντα. Οι κύριες παράμετροι που επηρεάζουν την αγορά είναι: η τιμή του εξοπλισμού και των αναλώσιμων για την εφαρμογή της μεθόδου, η ακρίβεια, η ευαισθησία, ο αριθμός των απαιτούμενων παραμέτρων για τη διενέργεια της μέτρησης, η ταχύτητα και η φορητότητα του εξοπλισμού. Έως σήμερα έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία πολλές έρευνες σε σχέση με τους βιοαισθητήρες με διαφορετικές προσεγγίσεις στο θέμα της κατασκευής τους.

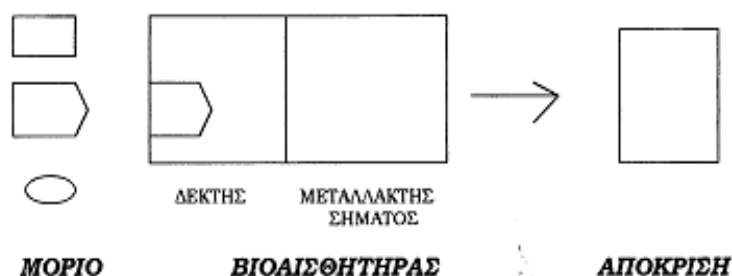
Παρόλα αυτά εξαιτίας του σημερινού περιβάλλοντος και τρόπου ζωής υπάρχει μια αυξανόμενη ανάγκη για περισσότερο εύρηστες, σταθερές, γρήγορες και σχετικά οικονομικές τεχνολογίες. Οι τεχνολογίες αυτές θα διευκόλυναν την ανάλυση δειγμάτων πεδίου ('on-site' ανάλυση), με αποτέλεσμα τον περιορισμό του αριθμού των δειγμάτων που θα αποστέλλοταν για περαιτέρω ανάλυση στο εργαστήριο. Συνεπώς, υπάρχει σαφής ανάγκη για απλούστερα, εναλλακτικά συστήματα ανάλυσης που επιτρέπουν την καταγραφή αποτελεσμάτων πραγματικού χρόνου (real-time) και στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι βιοαισθητήρες.

Έτος	Σημείωση σε σχέση με την εξέλιξη των βιοαισθητήρων
1916	Πρώτη αναφορά στην ακινητοποίηση πρωτεϊνών.
1922	Ηλεκτρόδιο υάλου για τη μέτρηση του pH
1956	Ηλεκτρόδιο του οξυγόνου (από τον Clark)
1962	Πρώτη περιγραφή βιοαισθητήρα: αμπερομετρικό ενζυμικό ηλεκτρόδιο για τη γλυκόζη
1969	Ποτενσιομετρικός βιοαισθητήρας: ακινητοποίηση ενζύμου σε ηλεκτρόδιο αμμωνίας για την ανίχνευση ουρίας
1970	Εύρεση Ion – Selective Field – Effect Transistor (ISFET)
1972 / 1975	Εμπορικός βιοαισθητήρας (Yellow Spring Instrument): Βιοαισθητήρας γλυκόζης
1980	Αισθητήρας pH για <i>in vivo</i> μετρήσεις αερίων αίματος
1982	Βιοαισθητήρας γλυκόζης (με οπτικές ίνες)
1983	Πρώτος ανοσοαισθητήρας SPR
1984	Αμπερομετρικός βιοαισθητήρας: οξειδάση γλυκόζης και φεροκενίου για την ανίχνευση γλυκόζης
1987	MediSense ExacTech: Βιοαισθητήρας ανίχνευσης γλυκόζης αίματος
1990	Εμπορικά διαθέσιμος βιοαισθητήρας του οίκου Pharmacia Biacore SRP
1992	i-STAT φορητός αναλυτής αίματος
1998	Βιοαισθητήρας γλυκόζης αίματος FastTake (LifeScan)
1999-σήμερα	Quantum dots, Νανουλικά (νανοσωματίδια, νανοσωλήνες κλπ.)

Πίνακας 7.1. Εξέλιξη βιοαισθητήρων

7.2. Ορισμός

Οι βιοαισθητήρες είναι αναλυτικές διατάξεις (analytical devices) οι οποίες αξιοποιούν είτε ένα βιολογικό υλικό (βιοσυστατικό) είτε ένα υλικό 'βιομιμητή' (biomimic) ως μόριο αναγνώρισης το οποίο είτε συνδέεται είτε ενσωματώνεται σε ένα φυσικοχημικό μεταλλάκτη σήματος (**Σχήμα 7.1**). Ο συνήθης στόχος είναι η παραγωγή ενός ψηφιακού ηλεκτρονικού σήματος (**Σχήμα 7.1**), το οποίο είναι ανάλογο της συγκέντρωσης του συγκεκριμένου προς ανάλυση στοιχείου.



Σχήμα 7.1. Σχηματική απεικόνιση ενός βιοαισθητήρα

Το σήμα μπορεί να είναι αποτέλεσμα μεταβολής της συγκέντρωσης των πρωτονίων, της πρόσληψης ή απελευθέρωσης αερίων όπως το οξυγόνο και η αμμωνία, της εκπομπής φωτός, ανάκλασης ή απορρόφησης, θερμικής εκπομπής ή άλλων μηχανισμών που απορρέουν από τη δράση των μορίων-αισθητήρων. Αυτό το σήμα μπορεί στη συνέχεια να μετατραπεί από ένα μεταλλάκτη σήματος σε ένα μετρήσιμο φυσικοχημικό

μέγεθος. Και το βιολογικό και το ηλεκτρικό σήμα μπορούν στη συνέχεια να αξιοποιηθούν περαιτέρω με ενίσχυση ή προώθηση.

Η ικανότητα ανάλυσης που παρέχουν οι βιοαισθητήρες έχει αυξηθεί περαιτέρω μέσω της ελάττωσης του μεγέθους τους και της βελτίωσης των δυνατοτήτων της μικροηλεκτρονικής. Διαφορετικές φόρμες βιοαισθητήρων έχουν αναπτυχθεί για την ανάλυση ενός στόχου αλλά και για την καταγραφή μετρήσεων σε ευρύ φάσμα. Από αυτόν τον ορισμό είναι φανερό ότι ένας αριθμός διαφορετικών βιοαισθητήρων είτε ήδη υπάρχει είτε είναι θεωρητικά δυνατός.

7.3. Ακίνητοποίηση Βιομορίων

Ακίνητοποίηση βιομορίων σε μια επιφάνεια ονομάζεται η διαδικασία της σύνδεσης ενός βιομορίου σε κάποιο υπόστρωμα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση ή την απώλεια της κινητικότητάς του. Για την καθήλωση μιας βιολογικής οντότητας σε μια επιφάνεια, είναι απαραίτητη η σύνδεση μιας ομάδας της βιολογικής ουσίας με μια ομάδα της επιφάνειας.

Η επιλεκτική ακίνητοποίηση βιομορίων αποτελεί τεχνολογία που βρίσκει εφαρμογές σε κλάδους της βιοτεχνολογίας και της βιοϊατρικής. Έτσι, καθίσταται δυνατή η δημιουργία βιοαναλυτικών διατάξεων με εφαρμογές που εκτείνονται από τη βασική βιολογική έρευνα μέχρι τη διαγνωστική. Σημαντική παράμετρος είναι η δημιουργία κατάλληλα τροποποιημένων επιφανειών μέσω της ακίνητοποίησης βιομορίων με τέτοιο τρόπο, ώστε να επιτευχθούν η ευαισθησία, η επιλεκτικότητα και η διάρκεια ζωής.

Η τροποποίηση επιφανειών μέσω της ακίνητοποίησης βιομορίων, βρίσκει εφαρμογές σε πολλούς κλάδους, όπως η βιοϊατρική, η βιοχημεία και η ανοσοχημεία. Βιομόρια που έχουν ενδιαφέρον και επιλέγονται συχνά για καθήλωση σε μια επιφάνεια περιλαμβάνουν ένζυμα, νουκλεϊκά οξέα, αντιγόνα/αντισώματα, κύτταρα, πρωτεΐνες κ.ά.).

Για την ακίνητοποίηση βιομορίων σε μια επιφάνεια είναι σημαντικό να αναπτυχθούν τεχνικές που να συνδυάζουν χαρακτηριστικά τα οποία θα κάνουν δυνατή την εφαρμογή τους σε μεγάλη κλίμακα και όχι μόνο σε εργαστηριακή. Έτσι οι τεχνικές χρειάζεται να είναι απλές, δηλαδή να εμφανίζουν μικρό αριθμό βημάτων, ώστε να είναι γρήγορες, να μην απαιτούν ειδική προετοιμασία των δειγμάτων ή των επιφανειών και να μην απαιτούν ειδικό περιβάλλον για την τροποποίηση της επιφάνειας π.χ. υψηλό κενό, που θα αύξανε σημαντικά και το κόστος για την εφαρμογή μιας τέτοιας τεχνικής. Η ακίνητοποίηση των βιομορίων θα πρέπει να εμφανίζει μεγάλη διάρκεια ζωής, ώστε οι επιφάνειες να μπορούν να χρησιμοποιηθούν αρκετό καιρό μετά την τροποποίησή τους. Επίσης, η ακίνητοποίηση των βιολογικών ουσιών θα πρέπει να γίνει με τέτοιο τρόπο, ώστε να μη χάνεται η λειτουργικότητά τους. Η ακίνητοποίηση μπορεί να προκαλέσει δομικές αλλαγές στο βιομόριο οι οποίες ενδέχεται να το απενεργοποιήσουν κατά ένα ποσοστό. Το βιομόριο μπορεί να ακίνητοποιηθεί με λάθος προσανατολισμό με αποτέλεσμα το ενεργό κέντρο του να δεσμευτεί ή “κρυφτεί” από το υλικό στήριξης και οι αναλύτες προς ανίχνευση να μην έχουν πλέον πρόσβαση σε αυτό.

Φυσικά θα πρέπει τα αποτελέσματα από την τροποποίηση να είναι επαναλήψιμα και να εμφανίζουν σταθερότητα. Τέλος, σε μερικές εφαρμογές είναι επιθυμητό να επιτύχουμε συγκεκριμένη διάταξη των ακίνητοποιημένων βιομορίων. Σε τέτοιες περιπτώσεις η δυνατότητα χρήσης τεχνικών που θα μας επιτρέπουν την ελεγχόμενη ακίνητοποίηση των βιομορίων σε μια επιφάνεια είναι σημαντική.

Οι τεχνικές που έχουν αναπτυχθεί και εφαρμόζονται, ευρέως, για την τροποποίηση επιφανειών με βιολογικά ενεργές ουσίες, διακρίνονται σε τρεις κύριες κατηγορίες με βάση το είδος της αλληλεπίδρασης μεταξύ των βιολογικών ουσιών και της επιφάνειας:

- Μέθοδος της φυσικής προσρόφησης,
- Μέθοδος της χημικής σύνδεσης ή χημικής προσρόφησης,
- Σύνδεση συγγένειας.

Συνήθως, κατά την τροποποίηση μιας επιφάνειας χρησιμοποιείται συνδυασμός των παραπάνω τεχνικών.

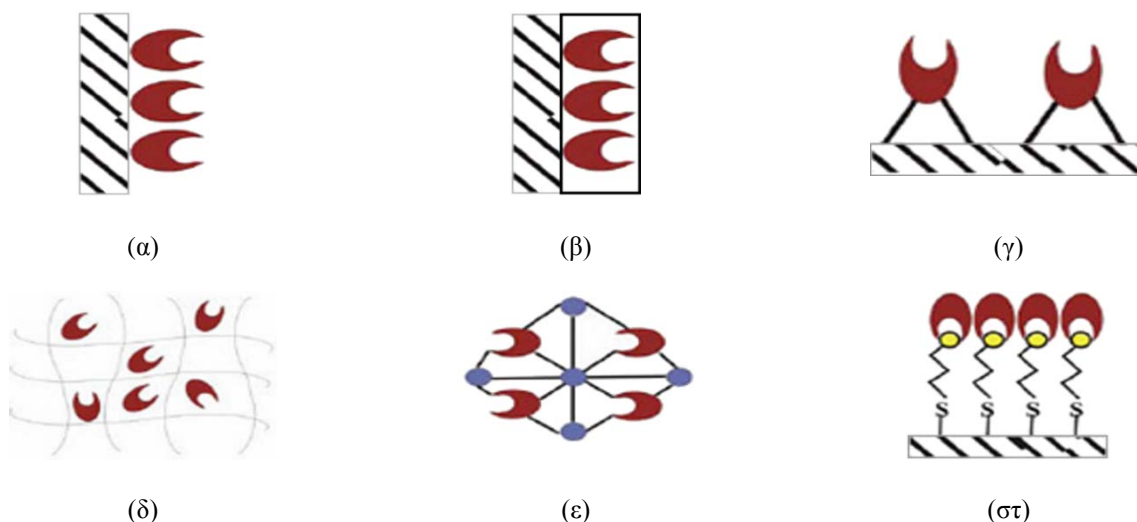
7.4. Τεχνικές Ακίνητοποίησης

Ένα πολύ σημαντικό στοιχείο της επιτυχίας ενός βιοαισθητήρα είναι η επιλογή του κατάλληλου υλικού στήριξης για την ακίνητοποίηση των βιομορίων. Το βιομόριο πρέπει να συνδεθεί και να σταθεροποιηθεί στο

υλικό με τέτοιο τρόπο, ώστε να διατηρήσει της φυσικοχημικές και καταλυτικές του ιδιότητες στο μέγιστο δυνατό βαθμό. Είναι απαραίτητη η όσο το δυνατόν καλύτερη εγγύτητα μεταξύ του βιομορίου και της επιφάνειας στήριξης / μεταλλάκτη σήματος, η δομική του σταθερότητα καθώς και η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης.

Τα βιομόρια ακινητοποιούνται στην επιφάνεια του εκάστοτε ηλεκτροδίου, τόσο φυσικά όσο και χημικά. Επιπλέον, η ακινητοποίηση μπορεί να πραγματοποιηθεί τόσο ομοιοπολικά όσο και μη ομοιοπολικά. Οι κυριότεροι τρόποι ακινητοποίησης των βιομορίων είναι η *προσρόφηση*, η *παγίδευση*, η *ομοιοπολική δέσμευση*, ο *εγκλωβισμός*, η *διαμοριακή σύνδεση* και η *δημιουργία αυτοσυγκροτούμενων μονομοριακών στειβάδων* (*self assembled monolayer, SAMs*).

Η ακινητοποίηση επιτυγχάνεται με προσρόφηση στο στερεό υλικό του ηλεκτροδίου, εφόσον υπάρχει αγγιστεία μεταξύ του υλικού του ηλεκτροδίου και του βιομορίου. Το βιομόριο είτε ακινητοποιείται απευθείας στην ηλεκτροδιακή επιφάνεια είτε με τη βοήθεια ενός βοηθητικού υλικού. Η προσρόφηση (**Σχήμα 2α**) διακρίνεται στη *φυσιορρόφηση*, η οποία λαμβάνει χώρα μέσω ασθενών van der Waals αλληλεπιδράσεων, δεσμών υδρογόνου ή υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων και τη *χημειορρόφηση*, που λαμβάνει χώρα μέσω χημικών δεσμών. Το μειονέκτημα αυτής της διαδικασίας είναι ότι, συνήθως, η δέσμευση είναι ασθενής και το βιομόριο είναι εκτεθειμένο σε αλλαγές του pH, της θερμοκρασίας και της ιοντικής ισχύος.



Σχήμα 7.2. Μέθοδοι ακινητοποίησης βιομορίων στους βιοαισθητήρες. (α) Προσρόφηση, (β) παγίδευση, (γ) ομοιοπολική δέσμευση, (δ) εγκλωβισμός, (ε) διαμοριακή σύνδεση και (στ) δημιουργία αυτοσυγκροτούμενων μονομοριακών στρωμάτων (SAMs).

Μια άλλη στρατηγική ακινητοποίησης είναι η παγίδευση των βιομορίων (**Σχήμα 7.2β**). Σύμφωνα με την τεχνική αυτή, ένα λεπτό φιλμ βιομορίου τοποθετείται στην ηλεκτροδιακή επιφάνεια με τη βοήθεια κάποιου πολυμερικού υλικού (οξική κυτταρίνη, κολλαγόνο, Teflon και πολυουρεθάνη) διαπερατού στην προσδιοριζόμενη ουσία. Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε στις πρώτες κατασκευές βιοαισθητήρων και έχει το πλεονέκτημα ότι περιορίζει την επιμόλυνση των βιομορίων από συστατικά του δείγματος. Το κυριότερο μειονέκτημά της είναι η χαμηλή σταθερότητα.

Κατά τη διαδικασία της ομοιοπολικής δέσμευσης (**Σχήμα 7.2γ**), τα βιομόρια προσδένονται πάνω στην ηλεκτροδιακή επιφάνεια με ομοιοπολικούς δεσμούς οι οποίοι σχηματίζονται μεταξύ των δραστικών ομάδων της επιφάνειας του ηλεκτροδίου και των δραστικών ομάδων των κατάλοιπων αμινοξέων του βιομορίου. Η διαδικασία αυτή ευνοεί την ακινητοποίηση βιομορίων με ελεγχόμενο προσανατολισμό. Τα βιομόρια διατηρούνται σε στενή επαφή με το ηλεκτρόδιο, ευνοώντας τη γρήγορη μεταφορά ηλεκτρονίων και επιπλέον δεν υπάρχουν εμπόδια στη διάχυση του υποστρώματος. Η συγκεκριμένη μέθοδος, όμως, δημιουργεί βιοαισθητήρες με χαμηλή μηχανική σταθερότητα και απαιτείται προσοχή, ώστε η πρόσδεση του βιομορίου να γίνει μέσω των αμινοξέων.

Ο εγκλωβισμός (**Σχήμα 7.2δ**) αποτελεί μια επιπλέον τεχνική ακινητοποίησης βιομορίων σε ηλεκτροδιακές επιφάνειες. Στην τεχνική αυτή τα βιομόρια αναμιγνύονται με διαλύματα μονομερών, τα οποία στη συνέχεια πολυμερίζονται και εγκλωβίζουν το βιομόριο. Πολυμερή υλικά που χρησιμοποιούνται είναι, συνήθως, το πολυακρυδονιτρίλιο και οι πυριτικές ηλεκτρες. Τελευταία χρησιμοποιούνται και τα αγωγά

πολυμερή, ώστε να επιτευχθεί ταχύτερη μεταφορά ηλεκτρονίων από το βιομόριο στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Τα κυριότερα μειονεκτήματα της διαδικασίας αυτής είναι ο μεγάλος χρόνος απόκρισης, εξαιτίας της αργής διάχυσης του υποστρώματος μέσα από το πολυμερές και ο μικρός χρόνος ζωής, ο οποίος καθορίζεται από τη σταθερότητα του πλέγματος του πολυμερούς.

Η διαμοριακή σύνδεση (Σχήμα 7.2ε), από την άλλη, συνίσταται στην πρόσδεση των βιομορίων στην ηλεκτροδιακή επιφάνεια ή του υλικού στήριξης με τη βοήθεια διαδραστικών αντιδραστηρίων, όπως είναι γλουταριναιαλδεύδη και το καρβοδιμίδιο. Τα βιομόρια συνδέονται είτε μεταξύ τους είτε με άλλα μη δραστικά βιομόρια σχηματίζοντας διαμοριακούς δεσμούς. Το βασικό μειονέκτημα της μεθοδολογίας αυτής είναι η απώλεια της ενεργότητας του βιομορίου, λόγω της χρήσης χημικών αντιδραστηρίων και οργανικών διαλυτών.

Τέλος, η δημιουργία αυτοσυγκροτούμενων μονομοριακών στρωμάτων (SAMs) (σχήμα στ) στηρίζεται στην αυθόρμητη οργάνωση μικρότερων μορίων σε μακρομοριακές οργανωμένες δομές. Σ' αντίθεση με την κλασική οργανική σύνθεση, όπου τα διάφορα στάδια της σύνθεσης περιλαμβάνουν τη δημιουργία και λύση δεσμών και πραγματοποιούνται κάτω από κινητικό έλεγχο, η δημιουργία των SAMs βασίζεται στην ανάπτυξη ασθενών δεσμών (δεσμοί υδρογόνου, van der Waals αλληλεπιδράσεις και άλλα) και η διαδικασία ελέγχεται θερμοδυναμικά.

Γενικά, δεν υπάρχει κάποια καθολική μέθοδος ακινητοποίησης βιομορίων η οποία να εφαρμόζεται σ' όλα τα βιομόρια και σ' όλα τα υλικά στήριξης. Τα κυριότερα προβλήματα που προκύπτουν, αφορούν τη σταθερότητα του βιοαισθητήρα και την επαναληψιμότητα των μετρήσεων. Για καθένα βιομόριο επιλέγεται η κατάλληλη μέθοδος ακινητοποίησης.

7.5. Αισθητηριακά Συστήματα σε Βιοαισθητήρες (δέκτες)

α) Φυσικοί δέκτες. Υπάρχει ένα ευρύ φάσμα από φυσικά παραγόμενα μόρια από φυτά, ζώα και μικροοργανισμούς που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δέκτες σε βιοαισθητήρες. Αυτά τα μόρια μπορούν να διαιρεθούν σε δύο ομάδες: 1. τη βιοκαταλυτική ομάδα (ένζυμα, ολόκληρα κύτταρα, μιτοχόνδρια, ιστός) και 2. την ομάδα αντίδρασης συγγένειας (νουκλεϊκά οξέα, αντισώματα, κυτταρικοί υποδοχείς). Σε κάθε περίπτωση, ο βιοαισθητήρας αξιοποιεί τη δυνατότητα εκλεκτικής σύνδεσης που έχουν τα βιομόρια. Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα μόρια-δέκτες και οι αντίστοιχες ουσίες προς ανάλυση.

Αισθητήριο μόριο	Προσδιοριζόμενη ουσία
Ένζυμο	Ανάλογο υπόστρωμα, αναστολέας, συμπαράγοντας, χρώμα, μέταλλο chelates
Αντίσωμα	Αντιγόνο, ιός, κύτταρο
Νουκλεϊκό οξύ	Συμπληρωματική αλληλουχία βάσεων, νουκλεϊκού οξέος: πολυμεράση, ιστόνη, πρωτεΐνη σύνδεσης
Κύτταρο	Ειδική κυτταρική επιφανειακή πρωτεΐνη, λεκτίνη
Δέκτης, μεταφορέας πρωτεΐνης	Ορμόνες, βιταμίνες

Πίνακας 7.2. Βιολογικά συστήματα που χρησιμοποιούνται περισσότερο στην κατασκευή των βιοαισθητήρων και τα αντίστοιχα υποστρώματα σύνδεσής τους.

β) Στους καταλυτικούς αισθητήρες η αλλαγή στη συγκέντρωση ενός συστατικού η οποία προκύπτει από μία καταλυτική αντίδραση, είναι η παράμετρος που ανιχνεύεται. Στην περίπτωση των αισθητήρων συγγένειας καταγράφεται το γεγονός της σύνδεσης ανάμεσα στο δέκτη και τον προς ανάλυση στόχο.

Λόγω της ειδικότητας και των καταλυτικών ιδιοτήτων τους, τα ένζυμα έχουν βρει ευρεία εφαρμογή στους βιοαισθητήρες (ενζυμικοί βιοαισθητήρες). Έχει σημειωθεί μεγάλη εξέλιξη στις εφαρμογές των ενζυμικών βιοαισθητήρων που αφορούν ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων, από την εποχή δημιουργίας του πρώτου ανιχνευτή γλυκόζης, ο οποίος βασιζόταν στην ακινητοποίηση της οξειδάσης της γλυκόζης πάνω σε ένα ηλεκτρόδιο ανιχνευσης οξυγόνου (Πίνακας 7.1). Πολλά ένζυμα που ανήκουν στις οξειδοαναγωγάσες, υδρολάσες και λυάσες έχουν ακινητοποιηθεί σε διάφορους μεταλλάκτες με στόχο τη δημιουργία βιοαισθητήρων με εφαρμογές στην ιατρική, την κτηνιατρική, τη βιομηχανία τροφίμων, την περιβαλλοντική μελέτη και την άμυνα. Η πιο σημαντική ομάδα είναι οι οξειδοαναγωγάσες, καταλύοντας την οξείδωση ή αναγωγή, χρησιμοποιώντας είτε το οξυγόνο είτε συμπαράγοντες. Τα ένζυμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν

είτε μόνα τους, όπως στους καταλυτικούς βιοαισθητήρες, είτε σε σύζευξη με άλλα συστατικά, όπως είναι τα αντισώματα ως δείκτες σήμανσης.

Ολόκληρα κύτταρα ζώντων οργανισμών όπως τα βακτήρια, οι μύκητες, φυτικά και ζωικά κύτταρα ή ακόμη και *ιστοί* έχουν χρησιμοποιηθεί ως δέκτες σε βιοαισθητήρες. Η αρχή της μεθόδου, συνήθως, βασίζεται στη διερεύνηση της γενικής μεταβολικής κατάστασης των κυττάρων μέσω της ανίχνευσης της κατανάλωσης του οξυγόνου ή του υποστρώματος, της παραγωγής διοξειδίου του άνθρακα ή μεταβολιτών, του φθορισμού των βακτηρίων ή της μεταφοράς ηλεκτρονίων κατά μήκος της οξειδοαναγωγικής αλυσίδας. Μία ομάδα από ολόκληρα κύτταρα (whole-cell) ή μικροβιακούς αισθητήρες έχει κατασκευαστεί για την ανίχνευση τοξικών και ρυπογόνων στοιχείων. Το ενδιαφέρον για αυτού του τύπου τις διατάξεις με στόχο την καταγραφή των συνθηκών περιβάλλοντος και της τοξικότητας αυξάνεται εξαιτίας της ικανότητάς τους να καταγράφουν άμεσα τις βιολογικές επιδράσεις σε αντίθεση με το να παρέχουν απλώς και μόνο μία χημική ανάλυση.

Αντιδράσεις αντιγόνου-αντισώματος χρησιμοποιούνται, κυρίως, σε **αισθητήρες συγγενείας**. Παρόλα αυτά και άλλα βιολογικά συστατικά, όπως είναι *οι υποδοχείς κυττάρων*, *η μονή έλικα του DNA* (που θα συνδεθεί και θα ανιχνεύσει τη συμπληρωματική της ακολουθία) και *οι λεκτίνες* (πρωτεΐνες φυτών που χρησιμοποιούνται για τη δέσμευση υδρογονανθράκων) έχουν χρησιμοποιηθεί. Συνδυασμοί των παραπάνω βιολογικών συστατικών έχουν χρησιμοποιηθεί, για να παρέχουν νέες ή βελτιωμένες αναλυτικές δυνατότητες. Οι βελτιώσεις των πολυκλωνικών αντισωμάτων και η τεράστια πρόοδος στον τομέα των μονοκλωνικών αντισωμάτων και στην παραγωγή ανασυνδυασμένων αντισωμάτων, έχουν δώσει μία τεράστια ώθηση στην αγορά διαγνωστικών προϊόντων. Τα αντισώματα έχουν, ευρέως, χρησιμοποιηθεί σε μία ποικιλία συσκευών που χρησιμοποιούν ταχείες χημικές μεθόδους, όπως είναι τα ανοσολογικά kits, τα stick εμφάπτισης και οι βιοαισθητήρες. Η χρησιμοποίηση τμημάτων των αντισωμάτων και μοριακά σχεδιασμένων αντισωμάτων είναι το πεδίο μελλοντικής ανάπτυξης για τους ανοσοαισθητήρες. Μία νέα ερευνητική προσέγγιση είναι να χρησιμοποιηθούν τα γονίδια που κωδικοποιούν χρήσιμα αντισώματα, να εκφραστούν σε βακτήρια ή φυτά, να αναπτυχθούν τρισδιάστατα δομικά μοντέλα και να προκύψουν βελτιωμένα στοιχεία από άμεση ή συνδυασμένη μεταλλαξιγένεση. Η συγγένεια και η εκλεκτικότητα των ανασυνδυασμένων αντισωμάτων είναι τα σπουδαιότερα προς αξιοποίηση στοιχεία.

Το κύριο μειονέκτημα της χρησιμοποίησης βιολογικών μορίων είναι η αστάθειά τους, η οποία συχνά αποτρέπει την ευρύτερη εμπορική τους χρήση. Η έρευνα στη βελτίωση της σταθερότητας αυτών των συστατικών επεκτείνεται. Ένας τρόπος για να ξεπεράσουμε το πρόβλημα της αστάθειας των βιολογικών μορίων, είναι να τα αντικαταστήσουμε με τεχνητούς δέκτες ή βιομιμητές (biomimetics).

γ) Ανοσοαισθητήρες. Πρόκειται για ένα είδος βιοαισθητήρα ο οποίος χρησιμοποιεί τη σύνδεση αντιγόνου-αντισώματος. Η ειδική φύση της αλληλεπίδρασης αντισώματος-αντιγόνου είναι ανάλογη με αυτήν του κλειδιού με την κλειδαριά. Έτσι εξασφαλίζεται ότι το αντιγόνο θα δεσμευτεί μόνο στο αντίσωμα, εάν έχει τη σωστή διαμόρφωση. Η σύνδεση αυτή οδηγεί σε μια φυσικοχημική μεταβολή, η οποία σε συνδυασμό με έναν ιγνηθέτη, όπως φθορίζοντα μόρια, ένζυμα ή ραδιοϊσότοπα, μπορεί να δημιουργήσει ένα σήμα. Η αλληλεπίδραση αντισώματος-αντιγόνου είναι γενικά μη αναστρέψιμη. Ωστόσο, έχει δειχθεί ότι η σύνδεση μπορεί να ανασταλεί με τη χρήση οργανικών διαλυτών ή ακόμη και υπερηχητική ακτινοβολία.

Με βάση την αρχή λειτουργίας του ανοσο-βιοαισθητήρα γίνεται αντιληπτό ότι αυτός μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μια ποικιλία εφαρμογών όπως:

1. Διάγνωση λοιμώξεων,
2. Παθογένεια ποικίλων νοσημάτων,
3. Διάγνωση καρκίνου και στοχευόμενη θεραπεία,
4. Εκτίμηση αποτελεσματικότητας θεραπευτικής μεθόδου,
5. Ανίχνευση επιπέδων φαρμάκων,
6. Μικροβιολογία: Ανίχνευση ιών και βακτηρίων,
7. Παραγωγή και τον ποιοτικό έλεγχο των τροφίμων,
8. Κτηνιατρική διάγνωση,
9. Έλεγχος βιομηχανικών αποβλήτων,
10. Προσδιορισμός βιομηχανικών (τοξικών) αερίων,
11. Έλεγχος της ρύπανσης του περιβάλλοντος,
12. Στρατιωτικές εφαρμογές: Ανίχνευση ουσιών χημικού / βιολογικού πολέμου.

Οι ανοσοαισθητήρες ταξινομούνται με βάση:

1. τη χρήση ή μη ιχνηθέτη,
2. τον τύπο του ανοσοπροσδιορισμού,
3. το υλικό κατασκευής του στερεού φορέα,
4. τη χημεία πρόσδεσης του βιομορίου αναγνώρισης στο στερεό φορέα,
5. τη φυσικοχημική παράμετρο.

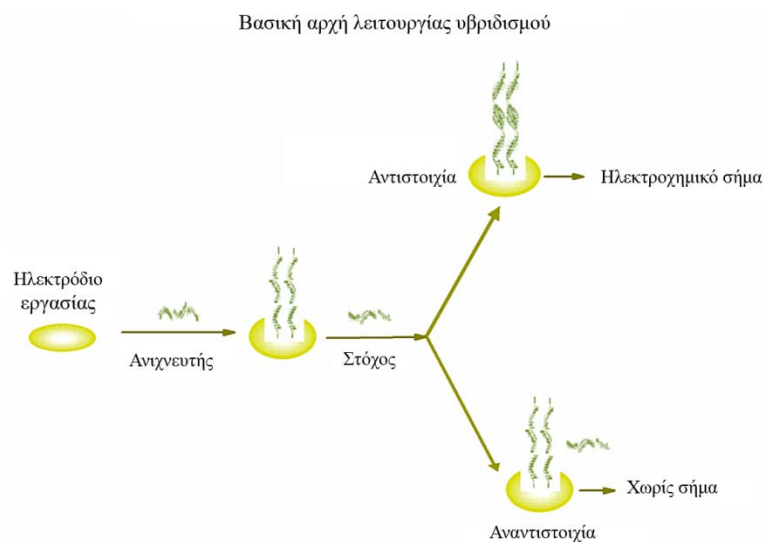
Συμπερασματικά, οι ανοσοαισθητήρες αναμένεται να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο τόσο στη διάγνωση και πρόληψη πολλών νοσημάτων όσο και σε πολλά άλλα πεδία της ανοσολογίας. Επίσης, φαίνεται ότι χρησιμοποιούν φτηνή οργανολογία, εμφανίζουν σημαντική ταχύτητα και έχουν σαφή εκλεκτικότητα. Στα πλεονεκτήματά τους, τέλος, εμπεριέχεται η σημαντική ευαισθησία την οποία φαίνεται να παρουσιάζουν, αλλά και το γεγονός ότι απαιτούν μικρούς όγκους δειγμάτων για τον προσδιορισμό μεταβολών.

δ) Αισθητήρες γονιδίων (Genosensors). Ο σχηματισμός και ο μηχανισμός των αισθητήρων γονιδίων (genosensors) βασίζεται στον υβριδισμό του DNA. Οι περισσότερες εφαρμογές των αισθητήρων γονιδίων βασίζονται στο υβριδισμό ενός μονόκλωνου DNA-ανιχνευτή με ένα μόριο DNA-στόχο για την ανίχνευση μιας συγκεκριμένης γονιδιακής αλληλουχίας μέσω του υβριδισμού του DNA. Ουσιαστικά, η αναγνώριση μιας ειδικής αλληλουχίας DNA βασίζεται, κυρίως, στους δεσμούς υδρογόνου και στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις.

Αναλυτικότερα, ο υβριδισμός DNA είναι μια διαδικασία κατά την οποία οι κλώνοι του DNA, οι οποίοι διαθέτουν μια εξειδικευμένη οργάνωση των νουκλεοτιδίων, εμφανίζουν συμπληρωματικότητα μεταξύ τους κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες αντίδρασης, και σχηματίζουν κατά αυτόν τον τρόπο μια σταθερή δομή διπλής έλικας. Αυτό το φαινόμενο είναι δυνατό εξαιτίας της βιοχημικής ιδιότητας της συμπληρωματικότητας των βάσεων, και επιτρέπει σε τμήματα γνωστής αλληλουχίας να βρίσκουν συμπληρωματικές αλληλουχίες σε ένα άγνωστο δείγμα DNA. Πιο συγκεκριμένα, τα πειραματικά στάδια έχουν ως εξής:

- Ακτινοποίηση μιας μικρής αλληλουχίας 20-40 βάσεων ενός συνθετικού ολιγονουκλεοτιδίου, του οποίου η αλληλουχία είναι συμπληρωματική ως προς το «στόχο» ολιγονουκλεοτίδιο.
- Έκθεση του αισθητήρα σε δείγμα το οποίο περιέχει το «στόχο», καταλήγει στο σχηματισμό του υβριδίου στην επιφάνεια του αισθητήρα.
- Ηλεκτροχημικός έλεγχος του σχηματισμού της διπλής έλικας οδηγεί στην παραγωγή ενός χρήσιμου αναλυτικού σήματος.

Η βασική αρχή λειτουργίας φαίνεται στο **Σχήμα 7.3**.



Σχήμα 7.3. Βασική αρχή λειτουργίας DNA υβριδισμού

Οι βιοαισθητήρες DNA υβριδισμού είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν στην έγκαιρη και γρήγορη διάγνωση λοιμωδών και κληρονομικών ασθενειών (κυστική ίνωση, αχονδροπλασία, ιός HBV). Είναι, επίσης, δυνατό να αξιοποιηθούν στην παρακολούθηση της αλληλουχίας εξειδικευμένων παραγόντων είτε άμεσα είτε με ενώσεις που παρεμβάλλονται στη διπλή έλικα του DNA (συμπλόκων, αντιβιοτικών κλπ.) και οι οποίες σχηματίζουν σύμπλοκα με τις αζωτούχες βάσεις του DNA. Οι βιοαισθητήρες προσφέρουν μια ενδιαφέρουσα οδό για τη μετατροπή του υβριδισμού σε χρήσιμο αναλυτικό σήμα.

Η ανάπτυξη βιοαισθητήρων DNA υβριδισμού υπόσχεται πολλά αναφορικά με την απόκτηση πληροφοριών που αφορούν στη διεκρίνιση της αλληλουχίας του DNA και η οποία θα ήταν χρήσιμη σε κλινικές, περιβαλλοντικές καθώς και εγκληματολογικές έρευνες.

7.6. Τεχνητοί Δέκτες-Βιομιμητές (Biomimics)

Οι νεότερες εξελίξεις, όπως η ανάπτυξη τεχνητών δεκτών με τη χρήση υπολογιστικής μοντελοποίησης (computer modeling) και μοριακής αποτύπωσης των πολυμερών (molecularly imprinted polymers) ή συνδυασμένης σύνθεσης, έχουν αυξήσει την ποικιλία των δεκτών οι οποίοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν στους βιοαισθητήρες. Η μοριακή μοντελοποίηση (molecular modeling) είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη της μοριακής αναγνώρισης, δηλαδή της ειδικής αλληλεπίδρασης ανάμεσα στο υπόστρωμα και το δέκτη. Οι αντιδράσεις συγγένειας ανάμεσα στους συνθετικούς δέκτες και τους στόχους προς ανάλυση περιλαμβάνουν υδρογονικούς δεσμούς, αλληλεπιδράσεις Van Der Waals και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Για να σχεδιάσουμε τεχνητούς υποδοχείς, η υπολογιστική μοντελοποίηση έχει χρησιμοποιηθεί προκειμένου να παρέχει πληροφορίες για τη δομή του στόχου προς ανάλυση· οι πληροφορίες αυτές μπορούν στη συνέχεια να χρησιμοποιηθούν για το σχεδιασμό των τεχνητών υποδοχέων. Η μοριακή μοντελοποίηση επιτρέπει την πρόβλεψη των συνδέτων οι οποίοι αναμένεται να συνδεθούν ισχυρά με περιοχές-κλειδιά βιολογικά σημαντικών μορίων γνωστής τρισδιάστατης δομής, έτσι ώστε να αναστέλλουν ή να διαφοροποιούν τη δράση τους.

Η μοριακή αποτύπωση των πολυμερών (molecular imprinting polymerization) αποτελεί τελευταία αντικείμενο έντονου ερευνητικού ενδιαφέροντος και χρησιμοποιείται σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών, όπως είναι η προετοιμασία υλικών εκλεκτικού διαχωρισμού, συνθετικών αντισωμάτων, συνθετικών ενζύμων καθώς και η μοριακή αναγνώριση. Η μοριακή αποτύπωση (molecular imprinting) βασίζεται στην παρουσία συμπληρωματικών αλληλεπιδράσεων ανάμεσα σε περιοχές του πρότυπου μορίου-φόρμας και του λειτουργικού μονομερούς το οποίο χρησιμοποιείται στη διαδικασία πολυμερισμού. Το λειτουργικό μονομερές είναι ένα εργαλείο-κλειδί στη διαδικασία της αποτύπωσης, άρα αποτελεί ένα σχετικά μικρό τμήμα του προκύπτοντος μοριακά αποτυπωμένου πολυμερούς. Η συμμετοχή του πρότυπου μορίου πριν και κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού, προκειμένου να σχηματιστούν οι θέσεις συμπληρωματικής σύνδεσης, αποτελεί την κεντρική ιδέα της μοριακής αποτύπωσης.

Η συνδυαστική χημεία (combinatorial chemistry) είναι ένας γρήγορα αναπτυσσόμενος τομέας σε σχέση με την ανάπτυξη τεχνητών δεκτών και χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία φαρμάκων (Σχήμα 7.2). Ένα παράδειγμα εφαρμογής της είναι η βελτιστοποίηση ενός αντικαταθλιπτικού φαρμάκου, της βενζοδιαζεπίνης. Οι βιβλιοθήκες ανασυνδυασμού αποτελούνται από μια σειρά διαφορετικών μορίων που δημιουργούνται από τη συστηματική και επαναλαμβανόμενη ομοιοπολική σύνδεση μιας ομάδας διαφορετικών δομικών στοιχείων. Ο αριθμός των πιθανών συστατικών (n) που δημιουργείται από μία βιβλιοθήκη, μπορεί να βρεθεί με την παρακάτω σχέση 1.

$$n=b^x \quad (1)$$

όπου

b : ο αριθμός των δομικών στοιχείων σε κάθε βήμα και

x : ο αριθμός των συνθετικών βημάτων

Τεράστια προσπάθεια έχει καταβληθεί για την ανάπτυξη πεπτιδικών και μη πεπτιδικών βιβλιοθηκών. Ένας μεγάλος αριθμός συστατικών μπορεί να δημιουργηθεί σε σύντομο χρόνο με τη χρήση τεχνικών συνδυαστικών βιβλιοθηκών, γεγονός σχεδόν αδύνατο στην περίπτωση χρήσης μεθόδων κλασικής οργανικής σύνθεσης. Η συνδυαστική χημεία χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τη *μοριακή μοντελοποίηση (molecular modeling)* προκειμένου να επιτευχθεί η ανακάλυψη νέων καλύτερων τεχνητών δεκτών· έχει επίσης

χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία συνδεδετών συγγένειας οι οποίοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε διατάξεις βιοαισθητήρων.

Η ερευνητική δραστηριότητα στον τομέα της ανάπτυξης τεχνητών δεκτών έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια, ιδιαίτερα για ιατρικές και περιβαλλοντικές εφαρμογές. Η ανάπτυξη τεχνητών δεκτών για διάφορες χρήσεις παραμένει μία σημαντική πρόκληση. Η συνδυαστική σύνθεση και τα μοριακά αποτυπωμένα πολυμερή είναι δύο από τις πιο συναρπαστικές και ταχέως αναπτυσσόμενες μεθόδους προκειμένου να ξεπεραστούν τα προβλήματα σταθερότητας των φυσικών συνδεδετών. Η πρόκληση είναι να παράγουμε δέκτες που ανταγωνίζονται τα φυσικά μόρια σε ευαισθησία και σταθερότητα.

7.7. Ανιχνευτές ή Μεταλλάκτες Σήματος

Το τμήμα του μεταλλάκτη σήματος ενός βιοαισθητήρα πρέπει να είναι ικανό να μετατρέπει μία ειδική βιολογική απάντηση σε ένα ποσοτικό σήμα. Οι μεταλλάκτες πρέπει να είναι κατάλληλοι για ακινητοποίηση των δεκτών στην επιφάνεια ή κοντά σ' αυτήν. Ορισμένοι από τους μεταλλάκτες σήματος που χρησιμοποιούνται στην κατασκευή βιοαισθητήρων, παρουσιάζονται στον **Πίνακα 7.3**.

Μεταλλάκτης σήματος	Αποτιμώμενο σήμα
Ηλεκτροχημικοί (ηλεκτρόδια)	
Αμπερομετρικοί	Εφαρμοζόμενο ρεύμα
Ποτενσιομετρικοί	Δυναμικό
Αγωγιμομετρικοί/Εμπέδησης	Αγωγιμότητα/Εμπέδηση
Οπτικοί	
Χρωματομετρικοί	Χρώμα
Φωταύγειας	Ένταση ακτινοβολίας
Φθορισμού	Ένταση ακτινοβολίας
Θερμικοί	
Θερμίστορες	Θερμοκρασία
Μάζας	
Πιεζοηλεκτρικοί	Ακουστικού κύματος
Μαγνητικοί	

Πίνακας 7.3. Μεταλλάκτες σήματος με εφαρμογές σε βιοαισθητήρες

Σημαντική προσπάθεια έχει καταβληθεί με στόχο τη βελτίωση των μεταλλακτών σήματος μέσω της χρήσης διάφορων τεχνολογιών.

7.8. Ηλεκτροχημικοί Μεταλλάκτες Σήματος

Οι ηλεκτροχημικοί μεταλλάκτες σήματος βασίζονται στις φυσικοχημικές αρχές οι οποίες διέπουν τις ηλεκτροχημικές τεχνικές ανάλυσης. Οι ηλεκτροχημικές τεχνικές ανάλυσης περιλαμβάνουν μία μεγάλη ποικιλία τεχνικών, καθεμία από τις οποίες βασίζεται σε ένα ιδιαίτερο φαινόμενο το οποίο πραγματοποιείται σε ένα ηλεκτροχημικό στοιχείο. Το πειραματικό ηλεκτροχημικό σύστημα αποτελείται από τον ηλεκτρολύτη, που άγει το ρεύμα, τα ηλεκτρόδια καθώς και από το κύκλωμα μετρήσεως ή το εξωτερικό κύκλωμα το οποίο χρησιμοποιείται για την εφαρμογή και μέτρηση ηλεκτρικών σημάτων. Μετρώνται διάφορα ηλεκτρικά μεγέθη, όπως π.χ. ένταση ρεύματος, δυναμικό, αντίσταση (αγωγιμότητα), μόνα ή σε συνδυασμούς, και με βάση τις μετρούμενες τιμές επιτελείται ποσοτική ή ποιοτική ανάλυση. Σε μία ηλεκτροχημική ανάλυση, είτε καθορίζεται η σχέση μεταξύ μεγέθους ηλεκτρικού σήματος και ενεργότητας (συγκεντρώσεως) είτε το ηλεκτρικό σήμα χρησιμοποιείται για τον καθορισμό του τελικού σημείου μίας τιτλομέτρησης είτε το ηλεκτρικό ρεύμα μετατρέπει την προσδιοριζόμενη χημική οντότητα σε μία καθορισμένη μορφή· η μορφή αυτή προσδιορίζεται είτε σταθμικά είτε από την ποσότητα του ηλεκτρικού φορτίου που καταναλώθηκε.

Οι ηλεκτροχημικές τεχνικές χαρακτηρίζονται από ευρύτατη περιοχή ευαισθησίας (mg – ng) και ακρίβειας (0,1 - 10%), και από μικρό σχετικά κόστος των χρησιμοποιούμενων αναλυτικών οργάνων.

Ταξινόμηση ηλεκτροχημικών τεχνικών ανάλυσης. Οι κυριότερες ηλεκτροχημικές τεχνικές ανάλυσης παρέχονται στον **Πίνακα 7.4**. Κάθε τεχνική απαιτεί τον άμεσο έλεγχο τουλάχιστον μίας από τις τρεις βασικές παραμέτρους: ένταση ρεύματος I , δυναμικό E , χρόνος t .

Τεχνική	Ελεγχόμενη ηλεκτρική παράμετρος	Μετρούμενη φυσική ιδιότητα
Ποτενσιομετρία	$i=0$	E
Ποτενσιομετρική ογκομέτρηση	$i=0$	E σε συναρτήση με το V
Χρονοποτενσιομετρία	i	E σε συναρτήση με το t
Βολταμμετρία	E	i σε συναρτήση με το E
Αναδιαλυτική Βολταμμετρία	E	i σε συναρτήση με το E
Πολαρογραφία	E	i σε συναρτήση με το E
Αμπερομετρική ογκομέτρηση	E	i σε συναρτήση με το V
Κουλομετρία	E ή i	Ποσότητα ηλεκτρισμού
Κουλομετρική ογκομέτρηση	i	t
Ηλεκτροσταθμική ανάλυση	E ή i	Βάρος αποτιθέμενης ουσίας
Αγωγιμομετρία	E (AC)	$1/R$
Αγωγιμετρική ογκομέτρηση	E (AC)	$1/R$ σε συνάρτηση με το V

i = ένταση ρεύματος, E = τάση, V = όγκος τιτλοδότη, t = χρόνος, AC = εναλλασσόμενο ρεύμα, $1/R$ = αγωγιμότητα

Πίνακας 7.4. Ηλεκτροχημικές τεχνικές ανάλυσης

7.9. Ορισμοί

Τα ηλεκτρόδια του ηλεκτροχημικού στοιχείου αποτελούν την **άνοδο** και την **κάθοδο** του στοιχείου. Ανεξάρτητα από το είδος του στοιχείου, στην κάθοδο πραγματοποιούνται πάντοτε αντιδράσεις αναγωγής και στην άνοδο αντιδράσεις οξειδωσης. **Ηλεκτρόδιο εργασίας** (working electrode) είναι το ηλεκτρόδιο στο οποίο πραγματοποιείται η ελεγχόμενη ή παρακολουθούμενη ηλεκτροδιακή αντίδραση. **Ηλεκτρόδιο αναφοράς** (reference electrode) είναι το ηλεκτρόδιο το οποίο εμφανίζει σταθερό και επαναλήψιμο δυναμικό, ανεξάρτητο από τη σύσταση του διαλύματος και τις μεταβολές στην ένταση του ρεύματος και **βοηθητικό ή αντίθετο ηλεκτρόδιο** (counter electrode) είναι αυτό το οποίο αποτελείται από ένα αδρανές μέταλλο, διαμέσου του οποίου διέρχεται το ρεύμα, ώστε να αποφεύγεται η διέλευση ρεύματος από το ηλεκτρόδιο αναφοράς.

7.10. Ηλεκτροδιακές Διεργασίες ή Δράσεις

Στα ηλεκτρόδια πραγματοποιούνται δύο τύποι διεργασιών: **φαρανταϊκές** (faradaic processes) και **μη φαρανταϊκές** (non faradaic processes). Στις φαρανταϊκές διεργασίες ή δράσεις, που διέπονται από το νόμο του Faraday (σύμφωνα με τον οποίο η ποσότητα της ουσίας που οξειδώνεται ή ανάγεται, είναι ανάλογη της ποσότητας του ηλεκτρισμού που διέρχεται από το διάλυμα), γίνεται μεταφορά ηλεκτρονίων διαμέσου της διεπιφάνειας (μεσόφαση) ηλεκτροδίου – διαλύματος και επομένως λαμβάνει χώρα οξειδωση ή αναγωγή, γιατί δεν είναι δυνατόν να επιβιώσει ελεύθερο ηλεκτρόνιο στο διάλυμα. Τα ηλεκτρόδια στις φαρανταϊκές διεργασίες ονομάζονται ηλεκτρόδια μεταφοράς φορτίου και το παρατηρούμενο ρεύμα ονομάζεται **φαρανταϊκό ρεύμα (faradaic current), i_F** . Στις μη φαρανταϊκές διεργασίες δε γίνεται μεταφορά ηλεκτρονίων διαμέσου της διεπιφάνειας ηλεκτροδίου – διαλύματος, γιατί δεν ευνοείται κινητικά ή θερμοδυναμικά. Τέτοιες διεργασίες είναι η προσρόφηση και η εκρόφηση ουσιών στο ηλεκτρόδιο και η αλλαγή ιδιοτήτων της διεπιφάνειας κατά τις αλλαγές του δυναμικού του ηλεκτροδίου ή της συστάσεως του διαλύματος. Παρόλο, όμως, που δε διακινούνται ηλεκτρόνια στις μη φαρανταϊκές διεργασίες, εντούτοις μπορεί να παρατηρηθεί διέλευση ρεύματος, έστω και παροδικά, όταν αλλάζει το δυναμικό ή η επιφάνεια του ηλεκτροδίου ή η σύσταση του διαλύματος. Το ρεύμα αυτό ονομάζεται **χωρητικό ρεύμα (capacitive current), i_c** . Ένα ενδιαφέρον παράδειγμα μη φαρανταϊκής διεργασίας είναι η φόρτιση ενός ηλεκτροδίου, κατά την οποία το χωρητικό ρεύμα φορτίζει την ηλεκτρική διπλοστοιβάδα η οποία υπάρχει στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, στην τιμή ισορροπίας, που αντιστοιχεί στο δυναμικό του ηλεκτροδίου.

Η πρώτη βολταμετρική τεχνική η οποία αναπτύχθηκε ιστορικά, το 1922 από τον Τσέχο ηλεκτροχημικό Jaroslav Heyrovsky ήταν η πολαρογραφία που περιελάμβανε δύο ηλεκτρόδια: το ηλεκτρόδιο εργασίας (σταγονικό ηλεκτρόδιο υδραργύρου, DME Dropping Mercury Electrode) και το ηλεκτρόδιο αναφοράς· η τεχνική αυτή εξελίχθηκε σε ηλεκτροχημική τεχνική τριών ηλεκτροδίων (συμπεριλαμβανομένου και του βοηθητικού ή αντίθετου ηλεκτροδίου). Το σταγονικό ηλεκτρόδιο του υδραργύρου αντικαταστάθηκε από το ηλεκτρόδιο κρεμάμενης σταγόνας υδραργύρου (HMDE) (ηλεκτρόδιο Kemula, επωνομαζόμενου προς τιμήν του Πολωνού ηλεκτροχημικού Wiktor Kemula) ενώ η τεχνική απέκτησε την ευρύτερη ονομασία βολταμετρία.

7.11. Βολτ – αμπέρ – μετρώ, Βολταμετρία

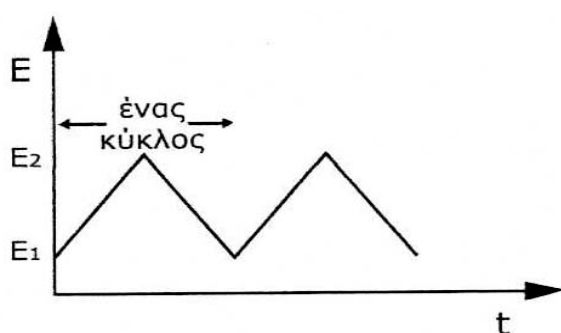
Η βολταμετρία είναι μια ηλεκτροανλυτική τεχνική κατά την οποία το ρεύμα στο ηλεκτρόδιο εργασίας μετράται ως συνάρτηση του εφαρμοζόμενου δυναμικού. Ο όρος ηλεκτρόδιο εργασίας αποδίδεται στο ηλεκτρόδιο εκείνο στο οποίο συμβαίνει η οξειδοαναγωγική αντίδραση του συστήματος που μελετάται. Το ηλεκτροδιακό δυναμικό αποτελεί την ελεγχόμενη παράμετρο η οποία αναγκάζει τα μόρια ή τα ιόντα που βρίσκονται στο διάλυμα, να αναχθούν ή να οξειδωθούν πάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας. Το δυναμικό μπορεί να εφαρμοστεί κατά διάφορους συστηματικούς τρόπους, όπως γραμμική, παλμική, εναλλασσόμενη, κλιμακωτή ή άλλη μεταβολή σε σχέση με το χρόνο.

7.12. Κυκλική Βολταμετρία

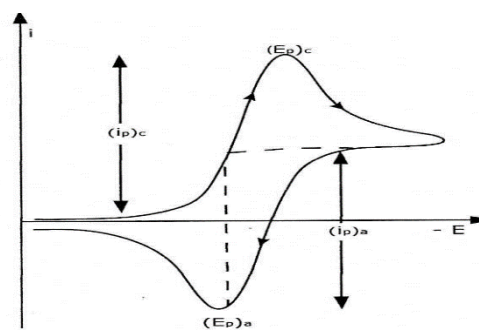
Χρησιμοποιείται, κυρίως, για τη μελέτη του μηχανισμού οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων και το χαρακτηρισμό των οξειδοαναγωγικών ιδιοτήτων των διάφορων ενώσεων. Συχνά αποτελεί το πρώτο πείραμα το οποίο εκτελείται σε μια ηλεκτροχημική μελέτη.

Στην κυκλική βολταμετρία εφαρμόζεται επί του ηλεκτροδίου εργασίας τριγωνικό κύμα δυναμικού, πρώτα προς μία διεύθυνση και ύστερα συμμετρικά στην αντίθετη διεύθυνση (σχήμα), αυτό το κύμα δυναμικού επαναλαμβάνεται ταχέως. Το δυναμικό σαρώνεται στην καθοδική κατεύθυνση, στη διαδικασία αναγωγής και στη συνέχεια αντίστροφα στην ανοδική κατεύθυνση μετά τον τερματισμό του κύματος αναγωγής. Το δυναμικό είναι δυνατό να σαρώνεται σαν απλός ή σαν πολλαπλός κύκλος και η ταχύτητα σάρωσης του δυναμικού μπορεί να φτάσει και τα 100 Vs⁻¹.

Το τυπικό κυκλικό βολταμογράφημα για ένα αντιστρεπτό σύστημα αναγωγής φαίνεται στο **Σχήμα 7.5**. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις ηλεκτροδραστικών ουσιών το ρεύμα φόρτισης γίνεται μεγαλύτερο από το φαρανταϊκό και είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθούν πιο ευαίσθητες τεχνικές, όπως είναι οι παλμικές τεχνικές.



Σχήμα 7.4. Εφαρμογή της κυματομορφής του δυναμικού στην κυκλική βολταμετρία σε συνάρτηση με το χρόνο



Σχήμα 7.5. Τυπικό αντιστρεπτό κυκλικό βολταμογράφημα

7.13. Τεχνικές Σάρωσης του Δυναμικού

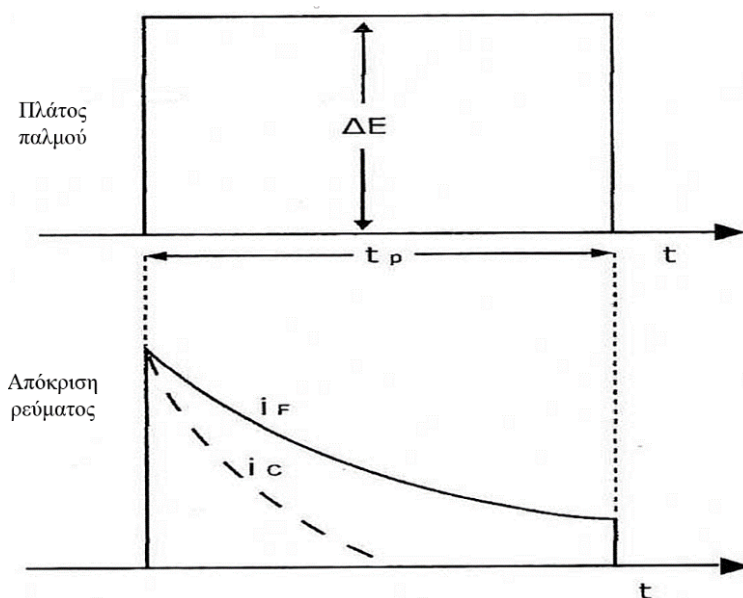
7.13.1. Βολταμετρία γραμμικής σάρωσης του δυναμικού

Στην τεχνική αυτή το δυναμικό μεταβάλλεται γραμμικά σε σχέση με το χρόνο. Η κορυφή του ρεύματος μπορεί να αυξηθεί με ταχύτερη σάρωση του δυναμικού. Το χωρητικό ρεύμα, όμως, που φορτίζει το

ηλεκτρόδιο στο εφαρμοζόμενο δυναμικό, είναι επίσης ανάλογο της ταχύτητας σάρωσης του δυναμικού. Έτσι, αύξηση της ταχύτητας σάρωσης του δυναμικού έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του ρεύματος φόρτισης, δηλαδή το χωρητικό ρεύμα περιορίζει το όριο ανίχνευσης.

7.13.2. Παλμική βολταμετρία

Με την παλμική βολταμετρία (pulse voltammetry) προκαλείται σημαντική μείωση του ανεπιθύμητου χωρητικού ρεύματος και βελτίωση της ευαισθησίας των αναλυτικών προσδιορισμών. Η τεχνική στηρίζεται στην εφαρμογή παλμού σε σταθερό ή αυξανόμενο δυναμικό επάνω στο ηλεκτρόδιο εργασίας και διακρίνεται σε κανονική και διαφορική παλμική. Μετά την εφαρμογή του παλμού, το χωρητικό ρεύμα φθίνει ταχέως, ενώ το φαρανταϊκό βραδύτερα (**Σχήμα 7.6**). Εξετάζοντας το ρεύμα στα τελευταία χιλιοστοδευτερόλεπτα της διάρκειας του παλμού, το ρεύμα είναι σχεδόν φαρανταϊκό. Η ευαισθησία αυξάνεται πέντε έως επτά φορές συγκρινόμενη με αυτήν της κλασικής πολαρογραφίας.



Σχήμα 7.6. Δυναμικό και ρεύμα κατά τη διάρκεια του παλμού

7.13.3. Διαφορική παλμική βολταμετρία

Στη διαφορική παλμική βολταμετρία (differential pulse voltammetry, DPV) οι παλμοί είναι σταθερού πλάτους και υπερτίθενται σε γραμμικώς μεταβαλλόμενο δυναμικό. Η μέτρηση του ρεύματος γίνεται δύο φορές: πριν την εφαρμογή και αμέσως μετά το τέλος του παλμού (**Σχήμα 7.6**). Το μέγεθος του πρώτου ρεύματος αφαιρείται αυτόματα από το μέγεθος του δεύτερου και αυτή η διαφορά του ρεύματος παριστάνεται γραφικά σε σχέση με το εφαρμοζόμενο δυναμικό.

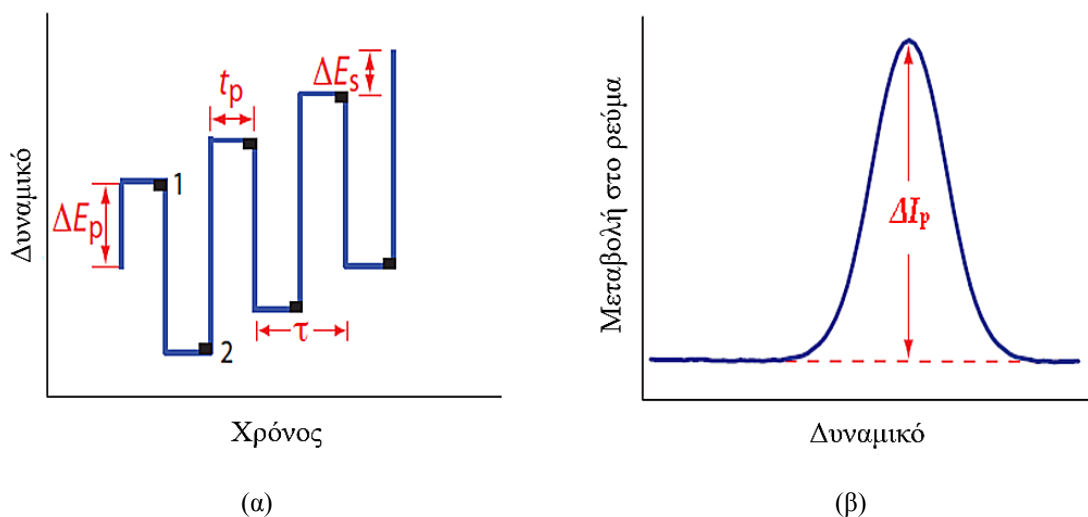
7.13.4. Βολταμετρία τετραγωνικού παλμού

Μια ακόμη βολταμετρική τεχνική παλμών και η **βολταμετρία τετραγωνικού παλμού** (square wave voltammetry, SWV) απεικονίζεται στο **Σχήμα 7.7**. Ένα πλεονέκτημα της βολταμετρίας τετραγωνικού παλμού είναι ότι το τ μπορεί να γίνει πολύ μικρό, ίσως και να φτάνει τα 5 ms σε σχέση με το 1 ms των άλλων τεχνικών και η αύξηση του δυναμικού (βήμα) είναι τυπικά της τάξης των 2 mV, γεγονός που μικραίνει δραματικά το χρόνο ανάλυσης.

Η σάρωση του δυναμικού στη βολταμετρία τετραγωνικού παλμού γίνεται με την πρόσθεση ενός τετραγωνικού παλμού σε μια βαθμιδωτή μεταβολή του δυναμικού. Το ύψος του παλμού είναι, συνήθως, της τάξης των 50 mV. Η ένταση του ρεύματος λαμβάνεται στο τελευταίο διάστημα του παλμού ορθής φοράς και στο τελευταίο διάστημα του παλμού αντίστροφης φοράς και η διαφορά μεταξύ των δύο εντάσεων ρεύματος καταγράφεται ως απόκριση ρεύματος.

7.14. Τεχνικές Αναδιάλυσης

Οι τεχνικές αναδιάλυσης είναι συνδυαστικές πολυσταδιακές τεχνικές, με το χαρακτηριστικό ότι ο προσδιορισμός στηρίζεται αρχικά στην προσυγκέντρωση της αναλυόμενης χημικής οντότητας επάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας με ηλεκτρόλυση. Ακολουθεί ηλεκτροχημική αναδιάλυση της ουσίας και το παραγόμενο ρεύμα είναι ανάλογο της ηλεκτροχημικά δραστικής ουσίας. Η αναδιάλυση των προσυγκεντρωμένων συστατικών πραγματοποιείται με εφαρμογή βολταμετρίας συνεχούς ή εναλλασσόμενου ρεύματος, βολταμετρίας τετραγωνικού παλμού καθώς και με διαφορική παλμική βολταμετρία. Έχουν επιτευχθεί όρια ανίχνευσης μέχρι και 10^{-9} M.



Σχήμα 7.7. Σήματα διέγερσης (α) δυναμικού και (β) βολταμμογραφήματα για τη βολταμετρία τετραγωνικού παλμού. Το ρεύμα μετράται δειγματοληπτικά στα χρονικά διαστήματα που συμβολίζονται με τα μαύρα ορθογώνια σχήματα. Όταν μετράται μια μεταβολή στο ρεύμα ΔI , τότε το ρεύμα στο σημείο 1 αφαιρείται από το ρεύμα στο σημείο 2. Τα σύμβολα έχουν την εξής σημασία: τ είναι ο χρόνος του κύκλου, ΔE_p είναι ένας σταθερός ή μεταβαλλόμενος παλμός, ΔE_p είναι η σταθερή μεταβολή στο δυναμικό ανά κύκλο και το t_p είναι ο χρόνος του παλμού.

Αναδιαλυτική βολταμετρία

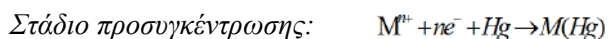
Η αναδιαλυτική βολταμετρία είναι μία τεχνική δύο σταδίων, του σταδίου της προσυγκέντρωσης και του σταδίου της αναδιάλυσης. Στο πρώτο στάδιο προσυγκεντρώνεται η προς μελέτη ένωση από το διάλυμα του δείγματος επάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας είτε με ηλεκτρόλυση (με εφαρμογή κατάλληλου δυναμικού προσυγκέντρωσης) είτε με προσρόφηση (σχηματισμός συμπλόκου). Στο δεύτερο στάδιο επιτυγχάνεται η ηλεκτροχημική αναδιάλυση της ένωσης που έχει προσυγκεντρωθεί στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας.

Χαρακτηριστικά αναδιαλυτικής βολταμετρίας

Η τεχνική μπορεί να εφαρμοστεί σε χημικές οντότητες που είναι ηλεκτροενεργές ή που μπορούν να μετατραπούν σε μια ηλεκτροενεργή μορφή· χαρακτηρίζεται από χαμηλά όρια ανίχνευσης, φθινό αναλυτικό εξοπλισμό, ταχύτητα και δυνατότητα μορφοειδικών προσδιορισμών (speciation). Τέλος, σημειώνεται ότι δεν αποτελεί τεχνική πολυστοιχειακής χημικής ανάλυσης.

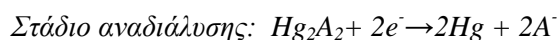
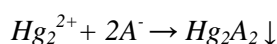
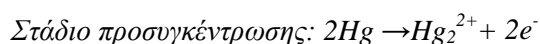
α) Ανοδική αναδιαλυτική βολταμετρία. Η ανοδική αναδιαλυτική βολταμετρία (Anodic stripping voltammetry, ASV) είναι η πιο διαδεδομένη τεχνική αναδιάλυσης. Σε αυτήν την περίπτωση η προς ανάλυση χημική οντότητα (αναλύτης) προσυγκεντρώνεται (αφού προηγηθεί η αναγωγή της) στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας (ηλεκτροστατικά) και στο στάδιο της αναδιάλυσης το δυναμικό σαρώνεται ανοδικά, (προς θετικότερες του δυναμικού προσυγκέντρωσης, τιμές) ενώ ο αναλύτης αναδιαλύεται με επαναοξειδωση

και επιστρέφει στο ηλεκτρολυτικό διάλυμα (φέρων ηλεκτρολύτης) με τη μορφή κατιόντος. Ακολουθούν οι χημικές αντιδράσεις που πραγματοποιούνται σε ηλεκτρόδιο υδραργύρου.



Όπου M είναι το μέταλλο, M^{n+} είναι το κατιόν του μετάλλου, ne^- είναι το πλήθος των ηλεκτρονίων και M(Hg) είναι το αμάλγαμα υδραργύρου. Η τεχνική εφαρμόζεται, κατά κύριο λόγο, στον προσδιορισμό κατιόντων (π.χ βαρέα μέταλλα).

β) Καθοδική αναδιαλυτική βολταμμετρία. Κατά την καθοδική αναδιαλυτική βολταμμετρία (Cathodic stripping voltammetry, CSV) ο αναλύτης προσυγκεντρώνεται στην οξειδωμένη ηλεκτροδιακή επιφάνεια και ακολουθεί αναδιάλυση του σχηματιζόμενου δυσδιάλυτου άλατος με καθοδική σάρωση (προς αρνητικότερες του δυναμικού προσυγκέντρωσης τιμές). Ακολουθούν οι χημικές αντιδράσεις που πραγματοποιούνται σε ηλεκτρόδιο υδραργύρου.



Όπου A^- είναι το ανιόν, Hg_2A_2 είναι ένα δυσδιάλυτο άλας του υδραργύρου. Η τεχνική εφαρμόζεται στον προσδιορισμό ανιόντων (αλογονοιόντων, θειούχων κλπ.).

γ) Προσροφητική αναδιαλυτική βολταμμετρία (AdSV). Στην προσροφητική αναδιαλυτική βολταμμετρία (Adsorptive Stripping Voltammetry), κατά το στάδιο της προσυγκέντρωσης, λαμβάνει χώρα προσρόφιση του αναλύτη στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας. Στη συνέχεια ακολουθεί το στάδιο αναδιάλυσης, όπου το δυναμικό σαρώνεται ανοδικά ή καθοδικά, ανάλογα με τη φύση της προς ανάλυση χημικής οντότητας που μελετάται.

Προσροφητική βολταμμετρία αλλαγής μέσου

Η βολταμμετρία αλλαγής μέσου ενδείκνυται σε περιπτώσεις όπου είναι απαραίτητη η αποφυγή παρεμποδίσεων. Έτσι, είναι δυνατή η παρακολούθηση διεργασιών που λαμβάνουν χώρα μόνον πάνω στην ηλεκτροδιακή επιφάνεια. Στην περίπτωση ανάπτυξης των ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων είναι απαραίτητη η αλλαγή μέσου, καθώς ενδιαφέρει η διαμόρφωση βιομορίων πάνω στην ηλεκτροδιακή επιφάνεια χωρίς την ύπαρξη παρεμποδίζουσων συστατικών.

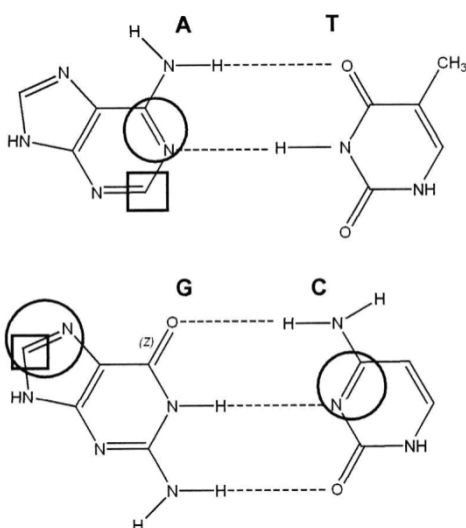
7.15. Ηλεκτροδραστικότητα DNA

7.15.1. Δομή και ιδιότητες του DNA

Οι Watson και Crick το 1953, στηριζόμενοι κυρίως σε κρυσταλλογραφικές μελέτες που έκαναν οι ίδιοι και ο Wilkins σε ίνες DNA, δημοσίευσαν ένα μοντέλο DNA του οποίου το μόριο αποτελείται από μια διπλή έλικα. Η ραχοκοκαλιά του καθενός από τους δύο κλώνους της έλικας αποτελείται από αλληλοδιάδοχα μόρια φωσφορικού οξέος και δεοξυριβόζης, ενώ προς το εσωτερικό του μορφώματος προεξέχουν οι αζωτούχες βάσεις κατά τέτοιο τρόπο, ώστε απέναντι από κάθε μόριο αδενίνης να βρίσκεται ένα μόριο θυμίνης και απέναντι από κάθε μόριο γουανίνης ένα μόριο κυτοσίνης. Μεταξύ των βάσεων κάθε ζεύγους αναπτύσσονται δεσμοί υδρογόνου και ειδικότερα δύο στο ζεύγος αδενίνης-θυμίνης και τρεις στο ζεύγος γουανίνης – κυτοσίνης. Οι βάσεις αδενίνης (A) και θυμίνης (T) είναι συμπληρωματικές, όπως και οι βάσεις γουανίνης (G) και κυτοσίνη (C). επίσης, συμπληρωματικοί είναι ο ένας προς τον άλλο και οι κλώνοι του DNA, οι οποίοι είναι και αντιπαράλληλοι δηλαδή η 3'→5' κατεύθυνση των φωσφοδιεστερικών δεσμών είναι αντίθετη στους δύο κλώνους. Το παραπάνω μοντέλο περιγράφει τη B-δομή της διπλής έλικας του DNA.

Τα ηλεκτροενεργά τμήματα στα νουκλεϊνικά οξέα είναι οι βάσεις τους. Συγκεκριμένα, η αδενίνη (A) και η γουανίνη (G) οξειδώνονται σε ηλεκτρόδια γραφίτη, ενώ η αδενίνη (A) και η κυτοσίνη (C) ανάγονται σε ηλεκτρόδια υδραργύρου. Οι οξειδωμένες περιοχές δεν αποτελούν τμήμα των δεσμών υδρογόνου και γι' αυτό οι διαφορές στη βολταμμετρική συμπεριφορά του δίκλωνου από το μονόκλωνο DNA καθορίζονται, κυρίως, από τις διαφορές στην ευκαμψία των δύο μορφών του DNA. Έτσι, το μονόκλωνο που είναι σχετικά πιο ευλύγιστο, κατά την προσρόφηση στο ηλεκτρόδιο γραφίτη παίρνει θέση προς την επιφάνεια με αποτέλεσμα να είναι προσβάσιμες περισσότερες βάσεις αδενίνης και γουανίνης, απ' ό,τι στο δίκλωνο DNA το οποίο έχει πιο άκαμπτη δομή, οπότε εμφανίζονται και αυξημένα ρεύματα κορυφής.

Οι αναγόμενες, όμως, περιοχές των A και C αποτελούν τμήμα του συστήματος των δεσμών υδρογόνου, οπότε ένας παράγοντας που παίζει ρόλο στην αναγωγή των A και C είναι η πρωτονίωσή τους, η οποία μπορεί να λάβει χώρα σε ουδέτερο pH, αρκεί το άζωτο της θέσης 1 της αδενίνης ή αυτό στη θέση 3 της κυτοσίνης να μπορούν να δεχθούν πρωτόνιο.



Σχήμα 7.8. Θέσεις οξείδωσης και αναγωγής των βάσεων. Οι κύκλοι υποδηλώνουν θέσεις που μπορούν να αναχθούν σε ηλεκτρόδια υδραργύρου και τα τετράγωνα δείχνουν τις θέσεις οξείδωσης στα ηλεκτρόδια γραφίτη.

Αλλαγές στην ηλεκτροχημική συμπεριφορά του DNA εμφανίζονται και λόγω της διαμόρφωσης της έλικας. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται διαχωρισμός των ανοιχτών δομών (open coiled-ocDNA) από τις υπερελικωμένες περιοχές (super coiled-scDNA).

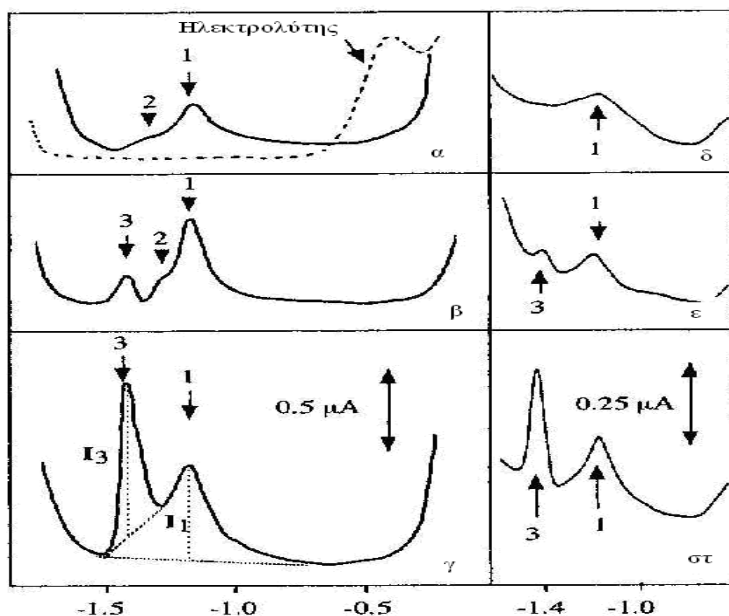
7.15.2. Χρήση Ηλεκτροαναλυτικών Τεχνικών για τη Διερεύνηση της Δομής του DNA

Η χρήση της προσροφητικής βολταμμετρίας εναλλασσόμενου ρεύματος (ACV) σε ηλεκτρόδιο υδραργύρου έδωσε τη δυνατότητα προσδιορισμού ποσοτήτων DNA κάτω από το 1μg/mL και έκανε εφικτό το διαχωρισμό των τριών μορφών DNA σε αλκαλικό pH. Στο σχήμα 9, παρουσιάζονται οι εικόνες των τριών μορφών: πλασμιδιακού, δίκλωνου και μονόκλωνου DNA, όπου η κορυφή 1 (στα -1,2 V) οφείλεται στον προσανατολισμό των ελικοειδών περιοχών που προσροφώνται, κυρίως, μέσω των φωσφοδιεστερικών δεσμών, η κορυφή 2 (στα -1,3 V περίπου) είναι χαρακτηριστική μόνο του δίκλωνου DNA και οφείλεται στις ανοιχτές περιοχές του και η κορυφή 3 (στα -1,4 V) οφείλεται στην προσρόφηση των τμημάτων του DNA μέσω των βάσεων. Στο σχήμα δίνονται οι αλλαγές στην ηλεκτροχημική συμπεριφορά του DNA, εξαιτίας της διαμόρφωσής του. Όπως φαίνεται, λοιπόν, από το σχήμα, το πλασμιδιακό DNA δεν παρουσιάζει την κορυφή 3 και η εμφάνισή της λόγω παρουσίας άλλων παραγόντων μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως κριτήριο για τη μετατροπή του σε χαλαρωμένο (oc-DNA). Το σύστημα αυτό χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στον προσδιορισμό των αλλαγών στη δομή του πλασμιδιακού DNA λόγω φυσικών ή χημικών παραγόντων, όπως οι ρίζες •OH που προκύπτουν από μίγμα αντίδρασης Fe(II)/EDTA. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε και για τον προσδιορισμό ουρανίου σε περιβαλλοντικά δείγματα, όπου μελετήθηκαν οι αλλαγές στη δομή του πλασμιδιακού DNA. Γύρω στο 2000 άρχισαν να γίνονται οι πρώτες μελέτες για τον προσδιορισμό της αλληλεπίδρασης των διαφόρων μορφών του DNA και ενώσεων όπως η γλωροκινόνη, η ντοξορουμισίνη, το

$[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ και το $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+}$, καθώς και γνωστών παρεμβόλιμων ουσιών, όπως το πορτοκαλόχρουν της ακριδίνης, το βρωμιούχο αιθίδιο και η ακτινομυκίνη D1, 1.

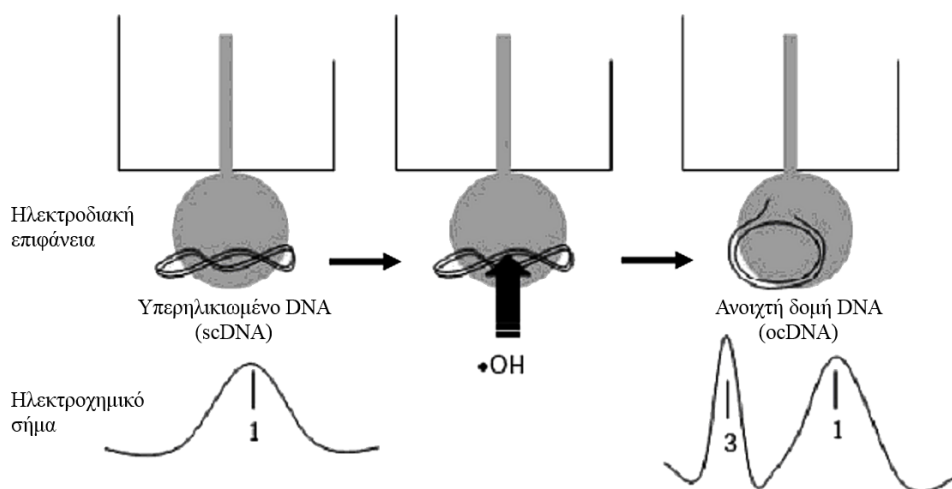
Διαφορές στην ηλεκτροχημική συμπεριφορά λόγω της διαμόρφωσης του DNA.

1. Εκρόφιση ελικοειδών περιοχών που έχουν προσροφηθεί μέσω των φωσφοδιεστερικών δεσμών
2. Εκρόφιση των ανοιχτών τμημάτων
3. Εκρόφιση περιοχών που έχουν προσροφηθεί μέσω των βάσεων



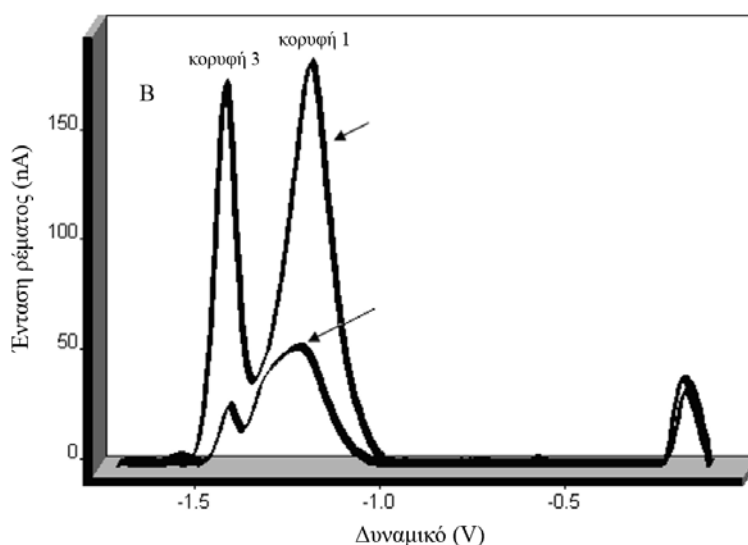
Σχήμα 7.9. Βολταμμογραφήματα εναλλασσόμενου ρεύματος του πλασμιδιακού υπερελικωμένου *scDNA* (a,d), του δίκλωνου *dsDNA* (b,e) και του μονόκλωνου *ssDNA* (c,f). (a)-(c) πλήρης κάλυψη της ηλεκτροδιακής επιφάνειας HMDE με *scDNA* 150 mg/L, *dsDNA* 80 mg/L, *ssDNA* 40mg/L, (d)-(f) μερική κάλυψη της επιφάνειας HMDE. Φέρων ηλεκτρολύτης 0,2M NaCl+50mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, συχνότητα 230Hz, ταχύτητα σάρωσης 20mV/s1.

Ωστόσο, περισσότερες πληροφορίες λαμβάνονται όταν τα αποτελέσματα της ACV συνδυάζονται με τα αποτελέσματα των παλμικών τεχνικών, όπως της DPV και της SWV. Συγκεκριμένα, το DNA εμφανίζει με DPV με ηλεκτρόδιο πάστας άνθρακα και κατά την ανοδική σάρωση, χαρακτηριστική κορυφή στα +1.0V (κορυφή G) η οποία οφείλεται στην οξείδωση την γουανίνης.



Σχήμα 7.10. Διαφορές στην ηλεκτροχημική συμπεριφορά λόγω της διαμόρφωσης του DNA

Κατά την εφαρμογή της SWV σε ηλεκτρόδια υδραργύρου εμφανίζονται δύο κορυφές ρεύματος. Μία πρώτη χαρακτηριστική κορυφή στα -1.4V που οφείλεται στην αναγωγή των βάσεων αδενίνης-κυτοσίνης (κορυφή CA)¹, δεδομένου ότι η αδενίνη μπορεί να πρωτονιωθεί στη θέση N-1 και η κυτοσίνη στη θέση N-3 και μία δεύτερη κορυφή στα -1.2V (κορυφή B), η οποία έχει αποδοθεί στο ξεδίπλωμα της δίκλωνης έλικας πάνω στην ηλεκτροδιακή επιφάνεια). Αυτό το άνοιγμα της δίκλωνης έλικας οφείλεται στη δυνατή απώθηση των αρνητικά φορτισμένων φωσφορικών ομάδων του DNA από την επιφάνεια του ηλεκτροδίου υδραργύρου. Στην ηλεκτροδιακή επιφάνεια υδραργύρου, το DNA προσροφάται μέσω των υδρόφοβων βάσεων. Η δεύτερη αυτή κορυφή ελαχιστοποιείται όταν υπάρχει η δυνατότητα αύξησης της ταχύτητας σάρωσης.



Σχήμα 7.11. α) Δείγμα μη καρκινικού DNA, που απομονώθηκε από παρακείμενο μακροσκοπικά υγιή πνευμονικό ιστό. β) Δείγμα καρκινικού DNA που απομονώθηκε από καρκινικό πνευμονικό ιστό, μετά από την αφαίρεση της βασικής γραμμής.

7.16. Βιοαισθητήρες/Μεταλλάκτες σήματος

7.16.1. Ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες/ Ηλεκτροχημικοί μεταλλάκτες σήματος

Οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες, συνήθως, καταγράφουν το ρεύμα κατά την εφαρμογή ενός σταθερού δυναμικού (αμπερομετρία), το δυναμικό σε μηδενικό ρεύμα (ποτενσιομετρία), την αγωγιμότητα ή αλλαγές στην αντίσταση.

Οι αμπερομετρικοί βιοαισθητήρες παρακολουθούν τα φαρανταικά ρεύματα τα οποία προκύπτουν όταν συμβαίνει μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ του βιολογικού συστήματος και του ηλεκτροδίου στο οποίο εφαρμόζεται ένα κατάλληλο σταθερό δυναμικό. Πρόκειται για τον πρώτο τύπο βιοαισθητήρων που αναπτύχθηκε και χρησιμοποιούνται ως βιοαισθητήρες γλυκόζης για πάνω από 35 χρόνια. Αυτές οι διατάξεις συνεχίζουν να είναι οι πιο δημοφιλείς, κυρίως, λόγω της απλότητας στη χρήση, της ευκολίας στην κατασκευή και του χαμηλού κόστους. Το σήμα στις αμπερομετρικές συσκευές εξαρτάται από το ρυθμό της μεταφοράς μάζας στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Οι πιο κοινά χρησιμοποιούμενες συσκευές καταγράφουν τη συγκέντρωση του στοιχείου προς ανάλυση μέσω της μέτρησης της πτώσης της πίεσης του οξυγόνου, της παραγωγής υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) ή της παρακολούθησης της αντίδρασης επαναοξειδωσης ενός ενδιάμεσου μορίου (mediator).

Οι ποτενσιομετρικοί βιοαισθητήρες βασίζονται σε εκλεκτικές, σε ιόντα, μεμβράνες οι οποίες, όταν βρίσκονται σε επαφή με το διάλυμα της αναλυόμενης ουσίας, μεταβάλλουν την πυκνότητα φορτίου στη διεπιφάνεια και η μεταβολή αυτή έχει ως συνέπεια τη μεταβολή στο δυναμικό της μεμβράνης.

Ο ποτενσιομετρικός βιοαισθητήρας λειτουργεί σε συνθήκες ρεύματος κοντά στο μηδέν και μετρά τη διαφορά δυναμικού μεταξύ του ηλεκτροδίου εργασίας και του ηλεκτροδίου αναφοράς. Ιοντοεκλεκτικά ηλεκτρόδια, από τα οποία το pH ηλεκτρόδιο αποτελεί ένα γνωστό παράδειγμα, είναι τα πιο σημαντικά από αυτήν την κατηγορία των μεταλλακτών. Η ειδικότητα παρέχεται από εκλεκτικές σε ιόντα μεμβράνες, οι

οποίες μπορούν να σχηματιστούν από άλατα μετάλλων, ή μεμβράνες πολυμερών που περιέχουν ιοντοανταλλάκτες ή ουδέτερους φορείς. Σήμερα υπάρχει μία ποικιλία εμπορικά διαθέσιμων ιοντοανταλλακτικών ηλεκτροδίων για την ανίχνευση συγκεκριμένων ιόντων. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν και τα ηλεκτρόδια ανίχνευσης αερίων, τα οποία είναι ιοντοανταλλακτικά ηλεκτρόδια τροποποιημένα με τη χρήση μιας διαπερατής σε αέρια μεμβράνης, και τα χημικά ευαίσθητα transistor (FETs). Πρόκειται για ημιαγωγικές συσκευές οι οποίες ανταποκρίνονται στην επιφανειακή ηλεκτρική βαθμίδωση του ηλεκτροδίου πύλης. Τελευταία, έχουν κατασκευαστεί ποτενσιομετρικοί αισθητήρες που επηρεάζονται από το φως βασισμένοι στην τεχνολογία του πυριτίου. Μια χημική αντίδραση στην επιφάνεια της ψηφίδας (chip) πυριτίου μπορεί να αλλάξει το δυναμικό επιφανείας και, συνεπώς, να επηρεάσει το ρεύμα επιτρέποντας την καταγραφή του ρυθμού της αντίδρασης.

Οι αγωγιμομετρικοί βιοαισθητήρες βασίζονται στο γεγονός της μεταβολής της αγωγιμότητας λόγω μεταβολής της συγκέντρωσης ιονικών ενώσεων. Οι αγωγιμομετρικοί βιοαισθητήρες βασίζονται στη μέτρηση της χρονικά εξαρτώμενης μεταβολής της αγωγιμότητας, ως αποτέλεσμα της αναγνώρισης του συμπληρωματικού προς το δέκτη στοιχείου προς ανάλυση.

Τέλος, υπάρχουν και οι βιοαισθητήρες που βασίζονται στη μέτρηση των μεταβολών της ηλεκτρικής αντίστασης, κατά τη διέλευση ενός μεταβαλλόμενου ρεύματος από συγκεκριμένο μέσο. Κατά τη διάρκεια της μέτρησης, η αντίσταση ελαττώνεται με παράλληλη αύξηση της αγωγιμότητας.

7.16.2. Οπτικοί Μεταλλάκτες Σήματος

Οι οπτικοί μεταλλάκτες σήματος βασίζονται σε διάφορες αρχές, όπως είναι η επίδραση μιας βιολογικής μεταβολής στην απορρόφηση του φωτός, το φθορισμό / φωσφορισμό, το δείκτη ανάκλασης ή άλλες οπτικές παραμέτρους. Αυτός ο τύπος των μεταλλακτών έχει γίνει εξαιρετικά δημοφιλής τα τελευταία χρόνια και, πλέον, πολλές διατάξεις είναι εμπορικά διαθέσιμες. Οι πρώτοι οπτικοί βιοαισθητήρες χρησιμοποιούσαν την αλλαγή χρώματος που συνέβαινε σε δείκτες ευαίσθητους στις μεταβολές του pH λόγω της δράσης ενός ενζύμου που δημιουργούσε ή καταλάωνε πρωτόνια.

Οι πιο πρόσφατες εξελίξεις σχετικά με τους οπτικούς βιοαισθητήρες έχει επικεντρωθεί στη χρήση της τεχνολογίας παροδικού κύματος. Όταν το φως υφίσταται ολική ανάκλαση, όπως κατά τη διάρκεια της μετάδοσης μέσω ενός οδηγού οπτικού κύματος, ένα μικρό μέρος της ενέργειας διαδίδεται πέρα από την οπτική διεπιφάνεια. Το γεγονός αυτό μπορεί να συνδυαστεί με τη χρήση φθορίζοντων δεικτών κοντά στην οπτική διεπιφάνεια, ως αποτέλεσμα για παράδειγμα αλληλεπιδράσεων αντιγόνου-αντισώματος. Εναλλακτικά, ένας άμεσος ανοσοαισθητήρας, ο οποίος δεν απαιτεί τη χρήση δεικτών, μπορεί να κατασκευαστεί μετρώντας την αλλαγή στο δείκτη ανάκλασης, χάρη στην αλληλεπίδραση του δέκτη με το στόχο προς ανάλυση.

Τα τελευταία χρόνια ιδιαίτερο ενδιαφέρον συγκεντρώνει η τεχνική του συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων (Surface Plasmon Resonance, SPR) και δημιουργεί τη βάση για έναν εμπορικά επιτυχημένο εξοπλισμό· αποτελεί μια ευαίσθητη οπτική τεχνική που χρησιμοποιείται για τη μελέτη επιφανειακών φαινομένων πάνω σε ένα λεπτό στρώμα ενός μετάλλου. Η προαναφερόμενη τεχνική βασίζεται στην ύπαρξη ενός παροδικού ηλεκτρομαγνητικού πεδίου πάνω στην επιφάνεια του μετάλλου και στη μέτρηση της μεταβολής του δείκτη διάθλασης του διαλύτη κοντά σε μεταλλική επιφάνεια, λόγω π.χ. της σύνδεσης ενός αντιγόνου με το ειδικό προς αυτό αντίσωμα, το οποίο βρίσκεται ακινητοποιημένο στη μεταλλική επιφάνεια.

Η τεχνολογία αυτή βασίζεται στη διέγερση του πλάσματος ηλεκτρονίων (πλάσματος επιφανείας) ενός λεπτού μεταλλικού υμενίου που καλύπτει την επιφάνεια του οδηγού κύματος. Η αλλαγή στη γωνία του προσπίπτοντος φωτός ή το ελάχιστο ανάκλασης, εξαιτίας της αλλαγής στο δείκτη ανάκλασης στην περιοχή της μεταλλικής επιφάνειας, μπορούν να καταγραφούν.

Τέλος, σε αναλυτές οι οποίοι χρησιμοποιούν οπτικές ίνες, αντί της γωνίας πρόσπτωσης, μεταβάλλεται το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το φαινόμενο SPR παρατηρείται σε μέταλλα των οποίων τα ηλεκτρόνια συμπεριφέρονται σαν αέριο ελεύθερων ηλεκτρονίων (plasma), δηλαδή οι κινήσεις τους είναι ανεξάρτητες του φορτίου τους. Αυτό περιορίζει την επιλογή του μετάλλου σε υλικά όπως ο χρυσός, ο χαλκός, ο άργυρος, το παλλάδιο και το αλουμίνιο. Το πάχος του μεταλλικού στρώματος εξαρτάται από τις οπτικές σταθερές του υλικού και από το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας.

Στους περισσότερους αναλυτές SPR, το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας είναι 670 nm και το βέλτιστο πάχος της μεταλλικής επιφάνειας περίπου 50 nm. Υπάρχει μια γραμμική σχέση ανάμεσα στην ποσότητα της δεσμευόμενης πρωτεΐνης και της μεταβολής στη γωνία συντονισμού. Η ευαισθησία της μεθόδου σε ένα συγκεκριμένο διαλύτη εξαρτάται από την ευαισθησία του οργάνου στον υπολογισμό της

μεταβολής της γωνίας συντονισμού. Ενδεικτικά, η δέσμευση 1 ng πρωτεΐνης σε επιφάνεια 1 mm² χρυσού προκαλεί μεταβολή της γωνίας συντονισμού κατά 0.12 μοίρες ή αντίστοιχα μεταβολή του δείκτη διάθλασης του διαλύματος κατά 0.001.

Η ευαισθησία της μεθόδου εξαρτάται, επίσης, από το μοριακό βάρος (όγκο) του αναλύτη. Αν το μοριακό βάρος του αναλύτη είναι μικρότερο από 5 kDa, τότε η αλλαγή στο δείκτη διάθλασης και κατ'επέκταση η μεταβολή της γωνίας συντονισμού είναι πολύ μικρή και δεν μπορεί να μετρηθεί με ακρίβεια. Το βάθος διείσδυσης του παροδικού κύματος 300-400 nm καθορίζει, επίσης, το μέγεθος των μορίων που μπορούν να μελετηθούν. Για μόρια μεγαλύτερα από 400 nm είναι δυνατή μόνον η ποιοτική παρακολούθηση της αλληλεπίδρασης με την επιφάνεια του αισθητήρα.

7.16.3. Εφαρμογές: Πλεονεκτήματα, Μειονεκτήματα

Η τεχνική SPR μας επιτρέπει να αντληθούμε ποια μόρια αλληλεπιδρούν μεταξύ τους (σχέση ligand-analyte) και πόσο ισχυρή είναι η αλληλεπίδραση. Υπολογίζοντας ακόμη και τη σταθερά k της αντίδρασης μπορούμε να δούμε πόσο γρήγορα αντιδρούν τα μόρια μεταξύ τους.

Έτσι μπορεί να γίνει μέτρηση της ισορροπίας της αντίδρασης καθώς και μετρήσεις που αφορούν στην κινητικότητα και ανάλυση των αλληλεπιδρούσων πρωτεϊνών. Άλλα πλεονεκτήματα αφορούν στο γεγονός ότι γίνεται μελέτη αλληλεπιδράσεων σε πραγματικό χρόνο (real-time) και ότι δεν αποτελεί καταστρεπτική τεχνική.

Τα μειονεκτήματα από την άλλη έχουν να κάνουν με το ότι μια τέτοια αναλυτική διάταξη είναι εξαιρετικά ακριβή (55.000€), και ότι δεν μπορούμε να αντλήσουμε πληροφορίες για μεγάλα μόρια, αφού η έκταση του πεδίου είναι μέχρι 400 nm. Τέλος, με τη μέθοδο αυτή δεν μπορούμε να πάρουμε πληροφορίες για την τρισδιάστατη δομή των μορίων.

7.16.4. Πιεζοηλεκτρικοί Μεταλλάκτες Σήματος

Μια κατηγορία βιοαισθητήρων μάζας είναι οι αισθητήρες που βασίζονται στο πιεζοηλεκτρικό φαινόμενο και χρησιμοποιούν την αλλαγή στη συχνότητα συντονισμού ενός κύματος διάδοσης μέσω ενός πιεζοηλεκτρικού υλικού. Βασίζόμενοι σ' αυτήν την αρχή είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν για να μετρήσουν μάζα, ιξώδες ή αλλαγές στην πυκνότητα στην επιφάνεια του αισθητήρα. Αυτές οι συσκευές μπορούν να δημιουργήσουν και να μεταδώσουν ακουστικά κύματα με έναν τρόπο εξαρτώμενο από τη συχνότητα.

Το θεωρητικό υπόβαθρο για τη χρήση του πιεζοηλεκτρισμού τέθηκε για πρώτη φορά από τον Rayleigh [1885], όμως, η πρώτη εμπειριστατωμένη έρευνα έγινε από τους Jacques και Pierre Curie το 1880 [Curie and Curie, 1880]. Το πιεζοηλεκτρικό φαινόμενο αναφέρεται στη μετατροπή της ηλεκτρικής ενέργειας, σε ένα κρύσταλλο, σε μηχανική και αντίστροφα.

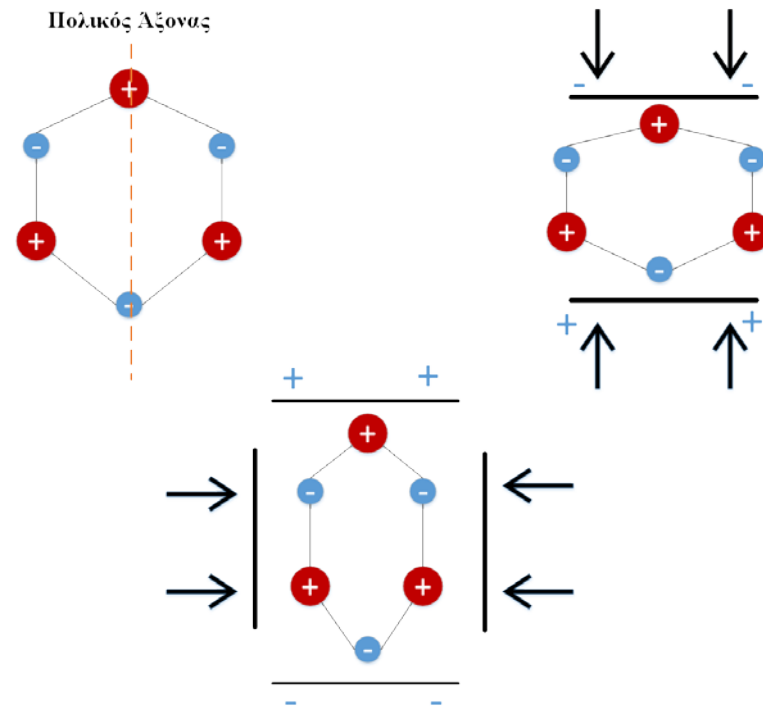
Τα πιεζοηλεκτρικά υλικά εμφανίζουν παραμόρφωση, αν εφαρμοστεί σ' αυτά ηλεκτρικό πεδίο και αντίστροφα. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται από τη στιγμή που ένας κρύσταλλος ενός πιεζοηλεκτρικού υλικού κατέχει έναν πολικό άξονα, εξαιτίας των δίπολων που σχετίζονται με τη διεύθυνση των ατόμων στο κρυσταλλικό πλέγμα. Υπό την εφαρμοζόμενη μηχανική τάση (αντίστροφο πιεζοηλεκτρικό φαινόμενο), παρατηρείται φυσική μετατόπιση των ατόμων, δηλαδή ταλάντωση αυτών γύρω από μία θέση ισορροπίας, οπότε λαμβάνει χώρα η αντίστοιχη μεταβολή στο δίκτυο των στιγμιαίων δίπολων και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φορτίου στον κρύσταλλο (**Σχήμα 7.12**).

Οι διατάξεις αυτού του είδους λειτουργούν με τη διάδοση ενός κύματος από τη μία πλευρά του κρυστάλλου στην άλλη όσο το επιφανειακό ακουστικό κύμα μεταδίδεται με κύματα κατά μήκος μίας κρυσταλλικής επιφάνειας.

Μία τέτοια παραμόρφωση ονομάζεται «ακουστικό κύμα». Επομένως, τα ακουστικά κύματα είναι αρμονικές ελαστικές παραμορφώσεις, που μπορούν να παραχθούν σε στερεά, όταν οι αποστάσεις μεταξύ των ατόμων μεταβάλλονται εξαιτίας της άσκησης μίας εξωτερικής δύναμης.

Εξαιτίας του φαινομένου του ακουστικού κύματος προκύπτει μια ενδιαφέρουσα κατηγορία αισθητήρων που ονομάζονται ακουστικοί αισθητήρες. Η τεχνολογία των ακουστικών βιοαισθητήρων αξιοποιεί ένα εναλλασσόμενο ηλεκτρικό πεδίο για τη δημιουργία του ακουστικού (μηχανικού) κύματος, το οποίο διαδίδεται στο υπόστρωμα και μετατρέπεται σε ηλεκτρικό σήμα. Βασική προϋπόθεση για τη λειτουργία των ακουστικών βιοαισθητήρων είναι η χρήση πιεζοηλεκτρικών υλικών, για τη δημιουργία ακουστικών κυμάτων.

Η διάταξη περιλαμβάνει το πιεζοηλεκτρικό υλικό και ηλεκτρόδια. Τα ηλεκτρόδια χρησιμοποιούνται για την εφαρμογή του ηλεκτρικού πεδίου, του επαρκούς για την παραγωγή του ακουστικού κύματος, ενώ ταυτόχρονα χρησιμεύουν και στην ανίχνευση του κύματος αυτού. Τα πιεζοηλεκτρικά υλικά που χρησιμοποιούνται είναι, κυρίως, ο χαλαζίας (SiO_2), το οξείδιο λιθίου τανταλίου (LiTaO_3) και το οξείδιο λιθίου-νιοβίου (LiNbO_3).



Σχήμα 7.12. Σχηματική αναπαράσταση του πιεζοηλεκτρικού φαινομένου

Ανάλογα με τον τρόπο διάδοσης του ακουστικού κύματος μέσα στο πιεζοηλεκτρικό υλικό, διακρίνονται δύο τύποι ακουστικών βιοαισθητήρων:

- Οι αισθητήρες επιφανειακού ακουστικού κύματος (Surface Acoustic Wave, SAW), όπου το ακουστικό κύμα διαδίδεται στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα.
- Οι αισθητήρες ακουστικού κύματος όγκου (Bulk Acoustic Wave, BAW), όπου το ακουστικό κύμα διαδίδεται σε όλο τον όγκο του πιεζοηλεκτρικού υλικού. Στην κατηγορία αυτή ανήκει και ο μικροζυγός κρυστάλλου χαλαζία.

Ο μικροζυγός κρυστάλλου χαλαζία (Quartz Crystal Microbalance, QCM) είναι μία διάταξη ανίχνευσης μάζας, που έχει τη δυνατότητα να μετρά πολύ μικρές μεταβολές μάζας πάνω σε έναν κρύσταλλο χαλαζία, ο οποίος βρίσκεται σε κατάσταση συντονισμού. Η ευαισθησία του QCM είναι περίπου 100 φορές μεγαλύτερη από έναν ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας με ευαισθησία 0.1 mg. Αυτό σημαίνει ότι οι QCM είναι ικανοί να μετρήσουν μεταβολές μάζας, όσο ένα τμήμα μίας μονοστιβάδας ή απλής στιβάδας ατόμων. Η υψηλή ευαισθησία και η πραγματικού χρόνου παρακολούθηση των μεταβολών μάζας στον ανιχνευτή κρυστάλλου καθιστούν το QCM μία ελκυστική τεχνική για ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών.

7.16.5. Θερμικοί Μεταλλάκτες Σήματος

Οι θερμομετρικές συσκευές λειτουργούν μετρώντας μεταβολές της ενθαλπίας κατά τη διάρκεια βιολογικών αντιδράσεων με τη χρήση μιας ποικιλίας από θερμομέτρα ή θερμίστορες. Η ανίχνευση της θερμοότητας κατά τη διάρκεια της ενζυμικής κατάλυσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην παρασκευή θερμικών-ενζυμικών βιοαισθητήρων. Από τη στιγμή που θερμότητα είτε παράγεται είτε καταναλώνεται στις πιο πολλές

αντιδράσεις, η μεταβολή αυτή μπορεί να μετατραπεί σε αναλυτικό σήμα για την καταγραφή των συγκεντρώσεων του στοιχείου προς ανάλυση.

7.16.6. Μαγνητικοί Μεταλλάκτες Σήματος

Τελευταία, έχουν γίνει λίγες δημοσιεύσεις αναφορικά με βιοαισθητήρες που βασίζονται σε μαγνητικό μετασχηματισμό. Άλλωστε, οι εφαρμογές αυτών των βιοαισθητήρων είναι ακόμα περιορισμένες.

7.17. Εφαρμογές Βιοαισθητήρων

Οι βιοαισθητήρες βρίσκουν πολλές κλινικές εφαρμογές, όπως η ηλεκτροχημική μέτρηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης του αίματος, της λακτάσης, της ουρίας και της κερατίνης, της χοληστερόλης, του ουρικού οξέος· εφαρμογές, επίσης, βρίσκουν στην ανίχνευση καρδιολογικών ασθενειών και ορμονών όπως τα στεροειδή, η κορτιζόλη, κ.ά.

7.17.1. Ανίχνευση Καρκινικών Δεικτών

Τα τελευταία χρόνια η τεχνολογία των βιοαισθητήρων βρίσκει εφαρμογές και στην ανίχνευση καρκινικών δεικτών. Με τον αυξανόμενο αριθμό περιπτώσεων καρκίνου παγκοσμίως αλλά και με το υψηλό ποσοστό θνησιμότητας λόγω του καρκίνου, ο έγκαιρος εντοπισμός του είναι υψίστης σημασίας. Η εφαρμογή των βιοαισθητήρων στην ανίχνευση του καρκίνου πλεονεκτεί έναντι άλλων τεχνικών, αφού προσφέρει ταχύτητα, ευελιξία, αυτοματοποίηση, μειωμένο κόστος και δυνατότητα πολλαπλής ανάλυσης. Η ταχεία και σε πραγματικό χρόνο ανάλυση μπορεί να μας παρέχει άμεσα και διαδραστικά πληροφορίες για την πορεία της νόσου. Η ανίχνευση του καρκίνου με τη χρήση βιοαισθητήρων παρέχει επιπρόσθετα και τη δυνατότητα αναπαράστασης και οπτικοποίησης του καρκίνου, αυξάνοντας τα ποσοστά έγκαιρου εντοπισμού και προηγμένης πρόγνωσης. επίσης, οι βιοαισθητήρες μπορούν να εντοπίσουν ταυτόχρονα πολλά είδη καρκινικών δεικτών. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό, αφού για πολλά είδη καρκίνου αντιστοιχούν περισσότερα από ένα είδη καρκινικών δεικτών.

Καρκινικοί δείκτες ονομάζονται οι πρωτεΐνες που παράγονται από τα καρκινικά κύτταρα ή από υγιή κύτταρα ως απάντηση στη παρουσία ενός όγκου και μπορούν να μετρηθούν ποσοτικά, παρέχοντας πληροφορίες που συμβάλλουν στη καλύτερη πρόγνωση, διάγνωση, και παρακολούθηση της θεραπευτικής αγωγής της νόσου. Σε κάθε είδος καρκίνου απαντάται ένα σύνολο καρκινικών δεικτών, το οποίο αν επιλεγεί σωστά κατά την ανάλυση μπορεί να οδηγήσει στη θεραπεία της νόσου.

Είδος καρκίνου	Καρκινικός δείκτης
Καρκίνος του προστάτη	PSA, PAP
Καρκίνος του μαστού	CA15-3, CA125, CA27.29, CEABRCA1, BRCA2,
Καρκίνος του παχέος εντέρου	MUC-1, CEA, NY-BR-1, ING-1 BAT, FDP, NMP22, HA-Hase, BLCA-4, CYFRA 21-1
Καρκίνος των πνευμόνων	NY-ESO-1, CEA, CA19-9, SCC, CYFRA21-1, NSE
Λευχαιμία	Χρωμοσωμικές ανωμαλίες
Μελάνωμα	Τυροσινάση, NY-ESO-1

Πίνακας 7.5. Οι κυριότεροι καρκινικοί δείκτες ανάλογα με το είδος του καρκίνου

α) Ανίχνευση με ηλεκτροχημικούς βιοαισθητήρες. Με τη χρήση ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων είναι δυνατό να ανιχνευθούν γονιδιακές μεταλλάξεις. Συγκεκριμένα, ένας μονός κλώνος DNA αλληλουχίας ακινητοποιείται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου και όταν ο υβριδισμός του DNA λαμβάνει χώρα, διεξάγεται η ανίχνευση. Για τον εντοπισμό της σημειακής μετάλλαξης αναπτύχθηκε μια τεχνολογία, σύμφωνα με την οποία, οι ηλεκτροδιακές επιφάνειες επικαλύπτονται με νανοσωληνές άνθρακα, ρουθηνίου (II) και τρις-(διπυριδίνης), και στη συνέχεια καλύπτονται από πολυπυρρόλη για την ακινητοποίηση των ssDNA, η οποία θα μπορούσε να αναγνωρίσει το νανοσωματίδια χρυσού (AUNP) με το επισημασμένο γονίδιο, παράγοντας το

κατάλληλο σήμα. Τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιούνται και μαγνητικά σωματίδια στους ηλεκτροχημικούς βιοαισθητήρες για την ενίσχυση των σημάτων τους.

β) Ανίχνευση μέσω βιοαισθητήρων μάζας. Επειδή πολλές χημικές διεργασίες συνδέονται με τη μεταβολή μάζας, οι βιοαισθητήρες αυτού του τύπου βρίσκουν πολλές εφαρμογές. Ο QCM είναι ένας αισθητήρας που περιλαμβάνει ένα λεπτό δισκοειδές ηλεκτρόδιο από κρύσταλλο χαλαζία επικαλυμμένο με χρυσό. Ένα ταλαντούμενο ηλεκτρικό πεδίο εφαρμόζεται σε όλη τη συσκευή, επάγοντας ένα ακουστικό κύμα που διαδίδεται μέσω του κρυστάλλου. Η μάζα ενός λεπτού στρώματος που συνδέεται με την επιφάνεια του κρυστάλλου μπορεί να υπολογιστεί από τη μετρούμενη μεταβολή της συχνότητας συντονισμού της διάταξης. Η συχνότητα συντονισμού έχει αποδειχθεί πως μειώνεται γραμμικά με την αύξηση της μάζας επί του ηλεκτροδίου QCM σε επίπεδο νανογραμμάρων.

Με τη χρήση αντισωμάτων στη θέση του κρυστάλλου, οι άνοσο-αισθητήρες είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν στην ανίχνευση πρωτεϊνικών δεικτών. Έτσι, η μέθοδος αυτή βρίσκει εφαρμογές και στην ανίχνευση μια σημειακής μετάλλαξης στο γονίδιο TP53, υπεύθυνη για το καρκίνου των πνευμόνων. Σε πειράματα που έγιναν, ανιχνεύθηκαν συγκεντρώσεις εύρους 0,03 με 2 μM , ενώ τα αποτελέσματα βρέθηκαν ίδια και σε μελέτη με βιοαισθητήρες SPR (βιοαισθητήρες με μεταλλάκτες σήματος).

γ) Ανίχνευση μέσω βιοαισθητήρων με οπτικούς μεταλλάκτες σήματος. Για την έγκαιρη ανίχνευση του καρκίνου των πνευμόνων με αυτό το είδος βιοαισθητήρων, χρησιμοποιείται ένα τσιπ από γυαλί το οποίο επικαλύπτεται με ένα φιλμ χρωμίου ή τιτάνιου (πάχος, 2 nm) και ένα φιλμ χρυσού (πάχος, 45-60 nm). Τα μόρια δέσμευσης ακινητοποιούνται στην επίχρυση επιφάνεια και έπειτα προστίθεται ο επισημασμένος αναλύτης. Ο δείκτης διάθλασης αλλάζει στη διεπαφή χρυσού-τσιπ όταν τα βιομόρια αλληλεπιδρούν με τον ακινητοποιημένο παράγοντα δέσμευσης, και ανιχνεύεται μέσω μεταβολών της γωνίας μιας ανακλώμενης δέσμης λέιζερ, η οποία σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα των επιφανειακά δεσμευμένων βιομορίων. Ο αισθητήρας SPR είναι ένα πραγματικά ευέλικτο εργαλείο, αλλά απαιτεί μεγάλη ποσότητα δειγμάτων για την ανάλυση σε κάθε πείραμα.

7.18.1. Χρήση Βιοαισθητήρων σε Εφαρμογές Φροντίδας Σημείου (point of care, POC)

Ένα ακόμα πλεονέκτημα (δυνατότητα) των βιοαισθητήρων είναι η ικανότητα τους να λειτουργήσουν ως συστήματα POC, (point of care), τα συστήματα αυτά, παρέχουν τον κλινικό την δυνατότητα πρόσβασης σε ένα πλήθος μοριακών πληροφοριών, μια τεχνολογία που θα μεταφέρει την ανάλυση υψηλού επιπέδου και ευαισθησίας στο γραφείο του γιατρού κάνοντας την προσβάσιμη σε ένα μεγάλο αριθμό ασθενών και μη.

Στην εποχή μας η τεχνολογική εξέλιξη προοδεύει με τέτοιο επιταχυνόμενο ρυθμό ώστε να επηρεάζει κάθε έκφανση της ζωής μας. Κάτι τέτοιο είναι ιδιαίτερα αισθητό στον τομέα της ιατρικής και της παροχής υπηρεσιών υγειονομικής περίθαλψης. Παρόλο που η ιατρική επιστήμη έχει μακρά ιστορία, η εξέλιξη ενός τεχνολογικά βασισμένου συστήματος υγειονομικής περίθαλψης ικανού να προσφέρει μιας ευρείας κλίμακας αποτελεσματική διαγνωστική και θεραπευτική αγωγή είναι ένα σχετικά νέο φαινόμενο. Ιδιαίτερη σημασία στην εξελικτική αυτή διαδικασία έχει η καθιέρωση του μοντέρνου νοσοκομείου ως το κέντρο ενός τέτοιου τεχνολογικά εξελιγμένου συστήματος υγειονομικής περίθαλψης.

Ο δραματικός αντίκτυπος της τεχνολογίας στην ιατρική περίθαλψη ώθησε επαγγελματίες μηχανικούς να ασχοληθούν στενά με πολλά ιατρικά ζητήματα. Ως αποτέλεσμα, η υιοθέτηση της βιοϊατρικής μηχανικής αναδείχθηκε ως μέσον ενοποίησης για δύο επαγγέλματα, την ιατρική και τη μηχανική, και βοήθησε στον αγώνα ενάντια στις παθήσεις και τις ασθένειες προσφέροντας εργαλεία που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για έρευνα, διάγνωση και θεραπεία από επαγγελματίες της υγειονομικής περίθαλψης.

Τέτοια εργαλεία που πλέον είναι αναπόσπαστα στοιχεία ενός σύγχρονου νοσοκομείου και είναι προϊόντα της βιοϊατρικής μηχανικής είναι τα βιοϋλικά, οι βιοϊατρικοί αισθητήρες, η ανάλυση και επεξεργασία βιοσημάτων, τα βιοηλεκτρικά φαινόμενα, η μοντελοποίηση της ανθρώπινης φυσιολογίας, η γονιδιωματική, η βιοπληροφορική, η ακτινοδιαγνωστική, η ιατρική απεικόνιση, η μέθοδος υπολογιστικής κυτταρικής βιολογίας και πολυπλοκότητας. Κάνοντας χρήση τέτοιων εργαλείων αναπτύχθηκε η τεχνολογία του ιατρικού εξοπλισμού και έγινε εφικτή η δημιουργία συστημάτων παρακολούθησης ασθενών.

Τα Point of Care συστήματα χρησιμοποιούνται για διαγνωστικές εξετάσεις στο περιβάλλον του ασθενούς, αντικαθιστώντας κάποιες από τις παραδοσιακές διαγνωστικές μεθόδους που γίνονται σε μικροβιολογικά εργαστήρια και νοσοκομειακούς χώρους.

Μία συσκευή POC είναι χρήσιμη στον τομέα της υγειονομικής περίθαλψης καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επιβεβαίωση της διάγνωσης για έναν ασθενή ο οποίος βρίσκεται στο ιατρείο. Η ταχεία επιβεβαίωση μιας κλινικής διάγνωσης με την εφαρμογή μιας δοκιμής ποσοτικοποίησης, είναι σημαντικό εάν η ασθένεια είναι μεταδοτική ή εάν ο ασθενής χρειάζεται άμεση θεραπεία. Για παράδειγμα οι εξετάσεις για την ανίχνευση των σεξουαλικά μεταδιδόμενων νοσημάτων τυπικά διαρκούν 2-14 μέρες μέχρι την λήψη των αποτελεσμάτων, ενώ ένα τεστ POC αναμένεται στα 5 min. Μια πρότυπη συσκευή POC θα απαιτούσε ένα μόνο δείγμα δοκιμής και ένα μόνο άτομο για την επεξεργασία και την ανάλυση του δείγματος σε περίπτωση που απαιτούνταν εξετάσεις αίματος ή ούρων του ασθενή. Αυτά τα πλεονεκτήματα μπορούν να αυξήσουν την πιθανότητα για έναν ασθενή να ακολουθήσει κατευθείαν μια αγωγή ή να μάθει τα αποτελέσματα μιας εξέτασης, βελτιώνοντας έτσι το επίπεδο της παρεχόμενης φροντίδας. Στην κλινική πρακτική, ο προσδιορισμός της παρουσίας βιοδεικτών απαιτεί μια ποικιλία εργαστηριακών δοκιμών και εξοπλισμό που χρησιμοποιεί τεχνολογίες διαφόρων τύπων. Για μία μόνο διάγνωση, μπορεί να χρειαστεί η συμμετοχή πολλών εργαστηρίων και προσωπικού για την διεξαγωγή της κάθε εξέτασης. Όσο περισσότερα εργαστήρια και προσωπικό απαιτούνται για την ανάλυση δειγμάτων, τόσο αυξάνεται η αβεβαιότητα των αποτελεσμάτων. Τυπικές δοκιμασίες όπως η ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) επιτρέπουν την ανίχνευση ενός αναλύτη, ενώ συσκευές POC μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση πολλών βιοδεικτών ταυτόχρονα, χρησιμοποιώντας μία ομοίμορφη μέθοδο δοκιμής, επιτρέποντας έτσι μια καλύτερη συνοχή για τα δεδομένα που λαμβάνονται για κάθε αναλύτη. Επιπλέον, ο προσδιορισμός της σχέσης μεταξύ των βιοδεικτών είναι ευκολότερος και πιο αξιόπιστος όταν χρησιμοποιείται η ίδια μέθοδος δοκιμής και το ίδιο δείγμα, όπως σε μια σύνθετη συσκευή POC. Η πολυπλοκότητα της συσκευής αυξάνει την ταχύτητα της ανίχνευσης και η ποσοτικοποίηση είναι πιο απλή γιατί τα σήματα από τα δείγματα μπορούν άμεσα να συγκριθούν από συστήματα ελέγχου που βρίσκονται στην ίδια συσκευή. Αναλύσεις με πολύπλοκες συσκευές POC απαιτούν λιγότερο χρόνο, λιγότερα χρήματα, λιγότερο προσωπικό και μικρότερο μέγεθος δείγματος. Το μέγεθος του δείγματος είναι συχνά ανεξάρτητο από τον αριθμό των αναλυτών που θα εξεταστούν και εξαρτάται μόνο από την τεχνική ανίχνευσης που θα χρησιμοποιηθεί.

Στο παρελθόν έχουν σχεδιαστεί βιοαισθητήρες για μόρια όπως η γλυκόζη, το ασκορβικό οξύ, το ουρικό οξύ, για πρωτεΐνες, για DNA κλπ. Μέχρι στιγμής δεν έχει αναφερθεί κανένας ηλεκτροχημικός βιοαισθητήρας που θα διευκόλυε τη γρήγορη εξέταση και διάγνωση ατόμων που βρίσκονται σε 'υψηλό' κίνδυνο για την εμφάνιση καρδιαγγειακών ασθενειών. Η καινοτομία του συγκεκριμένου προϊόντος βασίζεται στην ευκολία κατασκευής του και στη μέθοδο ανίχνευσης που χρησιμοποιείται.

7.18.2. Βιοαισθητήρες για Μετρήσεις Γλυκόζης in vivo

Ο συνεχώς αυξανόμενος αριθμός διαβητικών σε όλο τον κόσμο που συνδέεται με τον εντυπωσιακά αυξανόμενο αριθμό επιπλοκών του διαβήτη τα τελευταία περίπου 20 έτη, οδήγησε στην ανάπτυξη της τεχνικής βιοαισθητήρων, η οποία στοχεύει στη συνεχή μέτρηση της συγκέντρωσης γλυκόζης του αίματος. Σαν πρώτο βήμα αναπτύχθηκαν και εφαρμόστηκαν συσκευές κοντά στον ασθενή που ήταν σε θέση να υπολογίσουν τη συγκέντρωση γλυκόζης αίματος περιοδικά υπό κλινικές συνθήκες. Κατασκευάστηκαν αφενός ως συσκευές ανάλυσης ροής και αφετέρου ως συσκευές εφαρμογής ενζυμικών ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων μέσα σε ένα σύστημα ροής.

Η ανάπτυξη τέτοιων ειδικών βιοαισθητήρων για ιατρική χρήση θα μπορούσε να ωφεληθεί από ένα αυξανόμενο γενικό ενδιαφέρον για τους βιοαισθητήρες σε διάφορες εφαρμογές που άρχισαν στις αρχές της δεκαετίας του '80 και που συνεχίζονται μέχρι σήμερα. Η απαίτηση για εμφυτεύσιμους αισθητήρες γλυκόζης υποστηρίχθηκε πρόσθετα από μεγάλο αριθμό ασθενών-διαβητικών που θέλησαν να βελτιστοποιήσουν την καθημερινή θεραπεία ινσουλίνης τους, βάσει συχνά μετρώμενων τιμών συγκέντρωσης γλυκόζης καθώς και από τη βιομηχανία λόγω της ταυτόχρονης ανάπτυξης των προγραμματιζόμενων αντλιών ινσουλίνης. Εντούτοις, κατά τη διάρκεια της πρώτης δεκαετίας έρευνας αισθητήρων γλυκόζης, η κύρια ιδέα ήταν να αποκατασταθούν τα διαταραγμένα φυσιολογικά επίπεδα και οι σχέσεις γλυκόζης-ινσουλίνης στους διαβητικούς με τη βοήθεια ενός τεχνητού κλειστού βρόχου που αποτελείται από τον αισθητήρα ως συσκευή αποστολής σημάτων και την αντλία ως οδηγό η οποία συνδέεται με έναν ειδικό υπολογιστή που ουσιαστικά πραγματοποιεί τη μαθηματική σχέση γλυκόζης/ινσουλίνης αποκαλούμενη και ως, "τεχνητό ενδοκρινές πάγκρεας" ή "τεχνητό βήτα-κύτταρο", αντίστοιχα.

Μεταξύ των διάφορων αρχών για τη μέτρηση της γλυκόζης, οι περισσότερες από τις εξελίξεις είναι βασισμένες στους ενζυμικούς αμπερομετρικούς αισθητήρες γλυκόζης. Σε αυτόν τον τύπο βιοαισθητήρων η γλυκόζη οξειδώνεται συγκεκριμένα με καταλύτη την οξειδάση ενζυμικής γλυκόζης και το υπεροξείδιο

υδρογόνου (H₂O₂) το οποίο προκύπτει ως αποτέλεσμα αυτής της αντίδρασης ανίχνευσης και οξειδώνεται ηλεκτροχημικά σε δυναμικό + 700 mV από ένα χημικά μορφοποιημένο ηλεκτρόδιο.

7.18.3. Άλλες Εφαρμογές των Βιοαισθητήρων

Μια ακόμη εφαρμογή των βιοαισθητήρων είναι και ο ηλεκτροχημικός βιοαισθητήρας που βασίζεται στο οξειδίο του γραφενίου για την ανίχνευση μικροσωματιδίων τα οποία προέρχονται από αιμοπετάλια (platelet-derived microparticles, PMPs). Η τεχνολογία αυτή μπορεί να αποτελέσει πιθανό εργαλείο για τον εντοπισμό πιθανού κινδύνου θρόμβωσης. Τα μικροσωματίδια αυτά αποτελούν σημαντικό παράγοντα κινδύνου για αρτηριακές προ-θρομβωτικές παθολογίες, όπως το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου και το εγκεφαλικό επεισόδιο. Τα ηλεκτρόδια που χρησιμοποιήθηκαν, κατασκευάστηκαν με ακινητοποιημένα στρώματα οξειδίου του γραφενίου και με ένα ειδικό αντίσωμα στοχευμένο κατά της δραστηρικής διαμόρφωσης της ιντεγκρίνης αIIbβ3 σε επιφάνειες PMP. Τα αποτελέσματα έδειξαν μια προοδευτική αύξηση της αντίστασης με την αύξηση του αριθμού των PMP στον αναλύτη. Ο αισθητήρας ήταν πολύ ειδικός για τα PMPs και δεν ανίχνευσε μικροσωματίδια που προέρχονται από άλλα κύτταρα. Το αίμα που λήφθηκε από ασθενείς οι οποίοι είχαν διαγνωστεί με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, εμφάνισε υψηλότερες τιμές αντίστασης σε συμφωνία με το μεγαλύτερο αριθμό κυκλοφορούντων PMPs σε αυτούς τους ασθενείς, σε σύγκριση με τα δείγματα από υγιή άτομα, επικυρώνοντας έτσι το βιοαισθητήρα ως ειδικό, ευαίσθητο, οικονομικό και αποτελεσματικό εργαλείο για την ταχεία ανίχνευση PMPs σε εφαρμογές φροντίδας σημείου.

Μια ακόμη αξιολογη εφαρμογή των βιοαισθητήρων είναι και η κατασκευή μιας απλής συσκευής «έξυπνου τηλεφώνου» (smartphone) για ποσοτική ανοσολογική δοκιμή πλευρικής ροής, με στόχο την ανίχνευση κορτιζόλης στο σάλιο, βασιζόμενη στη χημειοφωταύγεια. Έτσι, αναπτύχθηκε ένας απλός και ακριβής βιοαισθητήρας ο οποίος βασίζεται σε μια ανοσολογική μέθοδο χημειοφωταύγειας ενσωματωμένης σ' ένα smartphone, για να γίνει ποσοτική ανίχνευση της κορτιζόλης στο σάλιο. Ο βιοαισθητήρας βασίζεται σε μια άμεσα ανταγωνιστική ανοσοδοκιμασία χρησιμοποιώντας το συζυγές υπεροξειδάσης-κορτιζόλης το οποίο ανιχνεύεται με την προσθήκη υποστρώματος που έχει χημειοφωταύγεια. Η κάμερα του smartphone χρησιμοποιείται ως ανιχνευτής φωτός για την απόκτηση της εικόνας και για το χειρισμό των δεδομένων μέσω μιας συγκεκριμένης εφαρμογής όπου εκτυπώθηκαν τρισδιάστατα απλά εξαρτήματα για την προσαρμογή του smartphone. Η μέθοδος είναι απλή και γρήγορη με χαμηλά όρια ανίχνευσης· παρέχει ποσοτική ανίχνευση κορτιζόλης στο σάλιο, σε κλινικό επίπεδο. Θα μπορούσε, επομένως, να βρει εφαρμογή στην αναπτυσσόμενη τεχνολογία για τη διάγνωση κατ' οίκον, για την παρακολούθηση κλινικών βιοδεικτών, ώστε να ξεπεραστούν οι υπάρχουσες δυσκολίες αναφορικά με την απόκτηση ευαίσθητων και ποσοτικών πληροφοριών με τα συμβατικά συστήματα.

Επίσης, ο ηλεκτρικός βιοαισθητήρας αποτελεί εφαρμογή για την ειδική ανίχνευση των βήτα ολιγομερών- αμυλοειδών της νόσου του Αλτσχάιμερ. Η νόσος του Αλτσχάιμερ (AD) είναι η πιο κοινή μορφή άνοιας, με πάνω από 37 εκατομμύρια πάσχοντες. Δεν υπάρχει μέχρι στιγμής θεραπεία για τη νόσο και καμία αξιόπιστη μέθοδος διάγνωσης, πέρα από τη μεταθανάτια εξέταση του εγκεφάλου. Η ανάπτυξη ενός τεστ για το Αλτσχάιμερ που να έχει εφαρμογή στη φροντίδα σημείου, είναι μια επείγουσα απαίτηση με σκοπό την παροχή μιας έγκαιρης διάγνωσης. Στην εργασία αυτή παρουσιάζεται ένας βιοαισθητήρας για την ειδική ανίχνευση των αμυλοειδών- βήτα ολιγομερών, τα οποία είναι τα κύρια νευροτοξικά είδη στη νόσο και έχουν προταθεί ως οι καλύτεροι βιοδείκτες για τη νόσο του Αλτσχάιμερ. Το στοιχείο του βιοαισθητήρα που πραγματοποιεί την ανίχνευση, είναι ένα τμήμα της κυτταρικής πρωτεΐνης prion (PrPC), μία πρωτεΐνη που εκφράζεται έντονα και μεσολαβεί της νευρωνικής δέσμωσης. Κατά τη κατασκευή του αισθητήρα, η PrPc συνδέθηκε μέσω μιας γέφυρας σε πολυμερικά ηλεκτρόδια χρυσού.

Επιπλέον, πρόσφατα χρησιμοποιήθηκε μια συσκευή ολοκληρωμένου πολύ-πυριτικού βιοαισθητήρα σε τσιπ (ψηφίδα), για τη βελτίωση της απόδοσης των βιομοριακών αναλυτών σε δείγματα ορού αίματος. Η ικανότητα ανίχνευσης των περισσότερων βιοαισθητήρων POC για την επί τόπου διάγνωση βιομορίων είναι περιορισμένη λόγω παρεμπόδισης από την ανίχνευση άλλων πρωτεϊνών σε δείγματα αίματος από ασθενείς, αλλά και σε άλλα πιο περίπλοκα δείγματα. Για να ξεπεραστεί αυτό το εμπόδιο, η παρούσα εργασία παρουσιάζει ένα ολοκληρωμένο πολύ-πυριτικό σύστημα (βιοαισθητήρα με νανο-ίνες σε τσιπ/ψηφίδα), για την ενίσχυση της απόδοσης της ανίχνευσης των επιπέδων συγκέντρωσης της ειδικής καρδιακής τροπονίνης- I (cTnI) σε δείγματα ορού αίματος.

Αξιοσημείωτος είναι και ο ευαίσθητος, ομοιοπολικός και λειτουργικός βιοαισθητήρας πυριτίου με νανο-ίνες για την ανίχνευση βιοδεικτών αναφορικά με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου. Μια ηλεκτροχημική μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για να εμβολιαστούν αντισώματα στοχευμένα κατά των βιοδεικτών για τον

κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου (8 – hydroxydeoxyguanosine) 8-OHdG σε επιφάνειες πυριτίου με νανο-ίνες . Ο βιοαισθητήρας χρησιμοποιήθηκε για να ανιχνεύσει τη δέσμευση του βιοδείκτη 8-OHdG στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα εντός λίγων δευτερολέπτων από την έκθεσή του σε αυτά.

Η βασική παρατήρηση που προκύπτει, είναι το γεγονός ότι με τη συνεχόμενη ανάπτυξη της τεχνολογίας είναι δυνατός ο σχεδιασμός και η υλοποίηση συστημάτων βιοαισθητήρων τα οποία είναι ικανά να πραγματοποιήσουν ανιχνεύσεις με ιδιαίτερη σημασία στην κλινική διαγνωστική. Σημαντικά βήματα φαίνεται να πραγματοποιούνται σχετικά με την έγκαιρη διάγνωση ασθενειών που απαιτούν άμεση φροντίδα και θεραπεία, με στόχο τη βελτίωση της υγείας των ανθρώπων που νοσούν.

Σε σύγκριση με τις υπάρχουσες μεθόδους ανάλυσης, οι βιοαισθητήρες προσφέρουν αρκετά πλεονεκτήματα, όπως είναι η συνεχής λειτουργία, η δυνατότητα ταυτόχρονου προσδιορισμού διαφορετικών ουσιών στο ίδιο δείγμα, η χαμηλότερη κατανάλωση αντιδραστηρίων και δείγματος, ο μικρότερος χρόνος ανάλυσης, το χαμηλότερο κόστος, η δυνατότητα κατασκευής φορητών διατάξεων, η εξαιρετική απλότητα στην εκτέλεσή τους, και το γεγονός ότι για την εκτέλεση των αναλύσεων δεν απαιτείται εξειδικευμένο προσωπικό. Από αναλυτική άποψη, οι βιοαισθητήρες δεν εμφανίζουν μειονεκτήματα ως προς τις υπάρχουσες μεθόδους ανάλυσης. Αυτό που περιορίζει, προς το παρόν, την ευρεία εφαρμογή τους στην κλινική πράξη είναι η έλλειψη προτυποποίησης, γεγονός που αναμένεται να αποτελέσει αντικείμενο μελλοντικών ερευνών.

7.18.4. Υπάρχουσες Τεχνολογίες

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων ετών, η έρευνα και η ανάπτυξη ευφυών φορητών συστημάτων που αποσκοπούν στη συνεχή παρακολούθηση της υγείας, παρουσιάζει πρόοδο που οφείλεται, κυρίως, στη συνεχή δημόσια και ιδιωτική χρηματοδότηση. Τα θέματα που εξετάζονται αφορούν, κυρίως, το σχεδιασμό, την ανάπτυξη, την ενσωμάτωση και αξιολόγηση εξοπλισμού, λογισμικού και νέων υπηρεσιών υγείας. Ωστόσο, προκειμένου οι υπάρχουσες τεχνολογίες να αξιοποιηθούν εμπορικά, απαιτείται να επιλυθούν ζητήματα που αφορούν τους βιοαισθητήρες, σημαντικότερο τμήμα της τεχνολογίας των φορητών συστημάτων υγείας, καθώς και να βρεθούν κατάλληλοι αλγόριθμοι κλινικών αποφάσεων. Ακόμη, η μετάδοση προσωπικών δεδομένων με αξιοπιστία και ασφάλεια αλλά και το θέμα του φιλικού προς το χρήστη περιβάλλοντος είναι σημαντικά θέματα. Γενικά, εκτιμάται ότι απτά αποτελέσματα θα προκύψουν με το σημερινό ρυθμό έρευνας και ανάπτυξης σε τρία έως πέντε χρόνια.

Σήμερα, στην παγκόσμια αγορά διατίθεται ένα περιορισμένο πλήθος τεχνολογιών που αφορούν ευφυή φορητά βιοιατρικά συστήματα. Παρακάτω θα αναφερθούν και αναλυθούν τα κυριότερα από τα συστήματα αυτά καθώς και ορισμένες τεχνολογίες που βρίσκονται αρκετά κοντά στην εμπορική διάθεσή τους.

Ηλεκτροκαρδιογράφημα

Ο ηλεκτροκαρδιογράφος είναι στην ουσία ένα πολύ ευαίσθητο βολτόμετρο το οποίο καταγράφει μέσω ηλεκτροδίων τις διαφορές δυναμικού στην επιφάνεια του σώματος, οι οποίες προκύπτουν κατά τη λειτουργία της καρδιάς. Η θέση κι ο αριθμός των ηλεκτροδίων (απαγωγές) είναι συγκεκριμένος. Η καμπύλη που λαμβάνεται με αυτόν τον τρόπο ονομάζεται ηλεκτροκαρδιογράφημα.

Σήμερα στην αγορά υπάρχουν ήδη mini-ηλεκτροκαρδιογράφοι (τσέπης) οι οποίοι λειτουργούν πολύ απλά, είναι γρήγοροι (σε 10 sec δίνουν αποτελέσματα που αφορούν τις κύριες παραμέτρους του ECG) και δίνουν οπτικό σήμα (σε οθόνη), το οποίο ενημερώνει και για πιθανές αποκλίσεις από τα κανονικά όρια.

Υπερηχογράφημα

Η λήψη υπερηχογραφήματος αποτελεί πολύ χρήσιμη μέτρηση τόσο κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης όσο και για τη διάγνωση και έλεγχο πολλών άλλων παθήσεων, για παράδειγμα υπέρηχοι νεφρών, ήπατος, στομάχου, καρδιάς κλπ. Το υπερηχογράφημα βασίζεται στην εκπομπή και λήψη υπερήχων από ειδικές συσκευές, τους μετατροπείς. Ο μετατροπέας (transducer) μετατρέπει ηλεκτρικά σήματα σε κύματα πίεσης τα οποία διαδίδονται μέσα στο μέσο διάδοσης (δημιουργία υπερήχων) και παράγει το ηλεκτρικό αντίστοιχο οποιασδήποτε λαμβανόμενης ακουστικής κυματομορφής (λήψη υπερήχου).

Στις μέρες μας, είναι πλέον διαθέσιμα φορητά συστήματα λήψης υπερηχογραφήματος, τα οποία με την ανάλογη εξέλιξη και προσαρμογή μπορούν να προσαρτηθούν και σε ένα φορητό βιοιατρικό σύστημα.

Μέτρηση Αρτηριακής πίεσης

Η αρτηριακή πίεση μπορεί να μετρηθεί μη επεμβατικά με τρεις κυρίως μεθόδους:

- Η κλασική μέθοδος έμμεσης μέτρησης πίεσης αίματος γίνεται με τη χρήση ενός σφυγμομανόμετρου. (Μέθοδος Riva – Rocci).
- Με τη χρήση υπερήχων, όπου ένας Doppler αισθητήρας ανιχνεύει την κίνηση των αγγειακών τοιχωμάτων σε διάφορες καταστάσεις αποκλεισμού της αρτηρίας.
- Τέλος, υπάρχει η μέθοδος Penaz, η οποία χρησιμοποιεί έναν φωτοηλεκτρικό πληθυσμογράφο και ένα μανικέτι που φουσκώνει με αέρα γύρω από ένα δάχτυλο χεριού. Καθορίζεται το σημείο στο οποίο η εξωτερική πίεση, η οποία ασκείται στο δάχτυλο έτσι ώστε να μεταδίδεται στα υποκείμενα αγγεία και προσεγγίζει την εσωτερική πίεση, και στη συνέχεια μια γρήγορα αποκρινόμενη αντλία διατηρεί την πίεση στο μανικέτι έτσι ώστε η διαφορά τάσης μεταξύ του εσωτερικού και του εξωτερικού αρτηριακού τοιχώματος να παραμένει μηδέν. Οι πιέσεις μανικετιού αντιπροσωπεύουν τη συνολική, μέση και διαστολική πίεση.

Με τη συνεισφορά του Wesseling et al. οι οποίοι υλοποίησαν τη μέθοδο Penaz στην Finapres (FINger Arterial Pressure) έχει γίνει πλέον δυνατή η μέτρηση συνεχούς αρτηριακής πίεσης μη επεμβατικά.

Μέτρηση καρδιακής συχνότητας

Το καρδιοσυχνόμετρο ή παλμογράφος είναι ένας φορητός μετρητής της καρδιακής συχνότητας σε χτύπους ανά λεπτό. Αποτελείται από ένα ρολόι χειρός (που λειτουργεί ως δέκτης) και από έναν πομπό-ζώνη, ο οποίος τοποθετείται κατάσαρκα γύρω από το στήθος. Τα ηλεκτρόδια στον πομπό λαμβάνουν σήματα από την καρδιά, και αφού καταγράφονται, στέλνονται ασύρματα στο δέκτη. Αυτά τα σήματα εμφανίζονται συνέχεια στην οθόνη του δέκτη με τη μορφή χτύπων ανά λεπτό (bpm).

Οξυμετρία

Είναι μια αναίμακτη μέθοδος όπου μετράται ο κορεσμός του Οξυγόνου του αρτηριακού αίματος κι έτσι ελέγχουμε έμμεσα αν υπάρχει υποξυγοναιμία ή αναπνευστική ανεπάρκεια. Συγκεκριμένα, η παλμική οξυμετρία είναι μια απλή μη επεμβατική μέθοδος, η οποία παρά τους περιορισμούς της συμβατικής μορφής της, αποτελεί τη σημαντικότερη καινοτομία στη συνεχή παρακολούθηση της οξυγόνωσης του αρτηριακού αίματος, υπολογίζοντας το ποσοστό της αιμοσφαιρίνης (Hb) που είναι κορεσμένη με οξυγόνο.

Μέτρηση αναπνοών

Η χρήση πιεζοηλεκτρικών αισθητήρων τοποθετημένων σε κατάλληλα σημεία στο θώρακα και στο διάφραγμα μπορεί να δώσει μια αρκετά ακριβή εικόνα του ρυθμού των αναπνοών και έχει, ήδη, εφαρμοστεί από διάφορα φορητά βιοϊατρικά συστήματα.

Βιβλιογραφία

- Αλεξιάδου Δ. (2009). *Ανάπτυξη ηλεκτροχημικών DNA βιοαισθητήρων συνθετικών πολυνουκλεοτιδίων που περιέχουν ανάλογα βάσεων ή μεθυλιωμένη κυτοσίνη-Αλληλεπιδράσεις με προφλαβίνη*, Διδακτορική διατριβή.
- Γηρούση Σ. (1996). *Μελέτη και ανάπτυξη μεθόδων βολταμμετρικού προσδιορισμού βιοστοιχείων (χαλκός-μολυβδαίνιο)*, Διδακτορική Διατριβή.
- Ιωάννου Α. (2009). *Διερεύνηση της μεθυλίωσης του DNA με τη χρήση ηλεκτροχημικών DNA βιοαισθητήρων και με θερμική αποδιάταξη*, Διδακτορική διατριβή.

- Καραστογιάννη Σ. (υπο συγγραφή). *Σύνθεση, χαρακτηρισμός και αναλυτικές εφαρμογές, στην ανάπτυξη ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων, της ένωσης συναρμογής [Mn(thiophenyl-2-carboxylate)₂(triethanolamine)]* Διδακτορική διατριβή.
- Κοκκινίδης Γ.Ι. (1992). *Αρχές και μέθοδοι μελέτης ηλεκτροδιακών δράσεων*. Εκδόσεις Γιαχούδη-Γιαπούλη, Θεσσαλονίκη.
- Μουμτζής Ι.Α, Σαζού Δ,(1997). *Ηλεκτροχημεία*, Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη.
- Προδρομίδης Μ. (2010). *Ηλεκτροχημικοί αισθητήρες & βιοαισθητήρες*, Διδακτικές σημειώσεις, Ιωάννινα.
- Σέρπη Κ. (2013). *Ανάπτυξη ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων με τη χρήση νανουλικών και τεχνολογίας εκτύπωσης ηλεκτροδίων και εφαρμογή τους στη βιοανάλυση*. Διδακτορική διατριβή.
- Bard A.J., Faulkner L.R. (2001). *Electrochemical methods; Fundamentals and applications*, John Wiley & Sons INC, New York.
- Beattie K.L, Beattie W.G, Meng L., Turner S.L, Coral-Vazquez R., Smith D.D, McIntyre P.M, Daot D.D. (1995). *Advances In Genosensor Research*, Clin.Chem. 41/5, 700-706.
- Bohunicky B., Mousa S.A. (2011). *Biosensors: the new wave in cancer diagnosis*, Nanotechnology, Science and Applications 4, 1-10.
- Brabec V. (1980). *314-Electrochemical oxidation of nucleic acids and proteins at graphite electrode. Qualitative aspects*. Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 7(1), 69-82.
- Cruz A.P.D, Norena N., Kaushik A., Bhansali S. (2014). *A low-cost miniaturized potentiostat for point-of-care diagnosis*, Biosensors and Bioelectronics 62, 249-254.
- Thevenot D.R., Toth K., Durst R.A., Wilson G.S. (2001). *Electrochemical biosensors: recommended definitions and Classification*, Biosensors & Bioelectronics 16, 121-131.
- Dash S.K, Minakshi Sharma M., Khare S., Kumar A.(2013). *rmpM Genosensor for Detection of Human Brain Bacterial Meningitis in Cerebrospinal Fluid*, Appl Biochem Biotechnol 171, 198-208.
- Enderle J.D., Blanchard S.M., Blanchard J.D. (2005). *Introduction to Biomedical Engineering*, 2nd edition, Elsevier Academic Press.
- Fojita M, Palecek E.(1997). *Supercoiled DNA-modified mercury electrode: A highly sensitive tool for the detection of DNA damage*. Analytica Chimica Acta 342, 1-12.
- Girousi S., Serpi C., Karastogianni S., Ioannou A. (2010). *Recent advances of sensitive electroanalytical tools and probes in DNA structure*. Current organic chemistry, 14, 2300-2309.
- Girousi S., Kinigopoulou V (2010). *Detection of short oligonucleotide sequences using an electrochemical DNA hybridization biosensor*. Central European Journal of Chemistry, 8 (4), 732-736.
- Grieshaber D., MacKenzie R., Voros J, Reimhult E. (2008). *Electrochemical biosensors-Sensor principles and architectures*, Sensors, 8, 1400-1458.
- Ioannou A., Alexiadou D., Kouidou S., Girousi S., Voulgaropoulos A. (2009). *Use of Adsorptive Transfer Stripping Voltammetry for analysing variations of cytosine methylation in DNA Electroanalysis*, 21, 2685-2692.
- Kailashiya J., Singh N., Singh S.K., Agrawal V., Dash D. (2015). *Graphene oxide-based biosensor for detection of platelet-derived microparticles: A potential tool for thrombus risk identification* Biosensors and Bioelectronics, 65, 274-280.
- Kara P., Erdem A., Girousi S., Ozsoz M. (2005). *Electrochemical detection of enzyme labeled DNA based on disposable pencil graphite electrode*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 38, 191-195.
- Karastogianni S., Girousi S.(2015). *Detection of short oligonucleotide sequences of hepatitis B virus using electrochemical DNA hybridisation biosensor*, Chemical Papers, 69, DOI: 10.2478/s11696-014-0599-

6. Mascini M., Palchetti I., Marrazza G., (2001) "DNA electrochemical biosensors" *Fresenius J Anal Chem* 369 :15–22.
- Mascini M., Tombelli S.(2008). *Biosensors for biomarkers in medical diagnostics*, *Biomarkers* ,13 (7-8) 637-657.
- Moh M.A, et al.(2014). *Highly sensitive covalently functionalized integrated silicon nanowire biosensor devices for detection of cancer risk biomarker*, *Biosensors and Bioelectronics*, 52 , 216–224
- Orozco J., Medlin L.K (2013). *Review: advances in electrochemical genosensors-based methods for monitoring blooms of toxic algae*, *Environ Sci Pollut Res*, 20, 6838–6850.
- Ozsoz M., Erdem A., Ozkan D., Kara P., Karadeniz H., Meric B., Kerman K., Girousi S. (2005). *Allele-specific genotyping by using guanine and gold electrochemical oxidation signals*, *Bioelectrochemistry* 67, 199-203.
- Palecek E. (1986). *Electrochemical behavior of biological macromolecules*. *Bioelectrochemistry*. & *Bioenergetics* 15, 275-295.
- Palecek E. (2002). *Past, present and future of nucleic acids electrochemistry*, *Talanta*, 56, 809–819.
- Paniel N., Baudart J., Hayat A., Barthelmebs L. (2013). *Aptasensor and Genosensor Methods for Detection of Microbes in Real World Samples*, *Methods* 64, 229-240.
- Rasooly A., Jacobson J. (2006). *Development of biosensors for cancer clinical testing*, *Biosensors & Bioelectronics*, 21, 1851-1858.
- Rushworth J.V, Ahmed A., Griffiths H.H, Pollock N.M, Hooper N.M, Millner P.A. (2014). *A label-free electrical impedimetric biosensor for the specific detection of Alzheimer's amyloid- beta oligomers*, *Biosensors and Bioelectronics* 56, 83–90.
- Girousi S. & Stanić Z. (2011). *The Last Decade of Carbon Paste Electrodes in DNA Electrochemistry*, *Current Analytical Chemistry*, 7(1), 80-100.
- Zhang S., Wright G., Yang Y. (2000). *Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction*, *Biosensors & Bioelectronics* 15, 273–282.
- Serpi C., Kovatsi L., Girousi S. (2014). *Electroanalytical quantification of total dsDNA extracted from human sample using, an ionic liquid modified, carbon nanotubes paste electrode*. *Analytica Chimica Acta*, 812, 26-32.
- Shortliffe E.H , Cimono J.J. (2006). *Biomedical Informatics: Computer Applications in Health Care and Biomedicine*, Springer.
- Streyer J., (1997). *Βιοχημεία*, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 1997.
- Tothill I.E. (2009). *Biosensors for cancer markers diagnosis*, *Seminars in Cell and Developmental diagnosis*, 20, 55-62.
- Wang J. (2006). *Analytical Electrochemistry*, Wiley NJ USA.
- Yang M., McGovern M.E, Thompson M. (1997). *Genosensor Technology and the Detection of Interfacial Nucleic Acid Chemistry*, *Analytica Chimica Acta* 346, 259-275.
- Yen P-W, et al. (2014). *A device design of an integrated CMOS poly-silicon biosensor-on-chip to enhance performance of biomolecular analytes in serum samples*, *Biosensors and Bioelectronics* 61, 112–118.
- Zangheri M., et al. (2015). *A simple and compact smartphone accessory for quantitative chemiluminescence-based lateral flow immunoassay for salivary cortisol detection*, *Biosensors and Bioelectronics* 64, 63–68.
- Zhou Y., Zhang Z., Xu Z., Yin H., Ai S. (2012). *MicroRNA-21 detection based on molecular switching by amperometry*, *New Journal of Chemistry*, 36, 1985–1991.

Κεφάλαιο 8: Ανοσοχημικές Τεχνικές Ανάλυσης

Γεώργιος Θεοδωρίδης

Σύνοψη

Αναπτύσσονται οι αρχές της ανοσοχημείας ως αναλυτικής τεχνικής. Περιγράφονται τα αντισώματα και οι μηχανισμοί παραγωγής τους (πολυκλωνικών-μονοκλωνικών) και οι τρόποι παραγωγής αντισωμάτων για μικρά μόρια στόχους, αλλά και οι τεχνικές RIA, ELISA (μοφής sandwich, competitive κ.ά) EMIT, FPIA, τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των ανοσοχημικών τεχνικών και οι εφαρμογές τους στην κλινική διαγνωστική ή την τοξικολογική ανάλυση και άλλα πεδία της βιοαναλυτικής χημείας.

Προαπαιτούμενη Γνώση

Πριν την ανάγνωση του κεφαλαίου, χρήσιμη γνώση για τον αναγνώστη μπορεί να βρεθεί σε συγγράμματα Ενόργανης Ανάλυσης, Βιοχημείας και Ανοσολογίας.

8.1. Εισαγωγή

Οι ανοσοχημικές μέθοδοι ανάλυσης χρησιμοποιούν αντισώματα (antibody, Ab) ως αντιδραστήρια μοριακής αναγνώρισης για να επιτύχουν βιοειδική δέσμευση και ανίχνευση των αντιγόνων (antigen, Ag). Ως αντιγόνο θεωρείται κάθε ξένη ουσία που όταν εισέρχεται σε έναν οργανισμό (π.χ. θηλαστικά) αναγνωρίζεται από τα Β-λεμφοκύτταρα και/ή Τ-λεμφοκύτταρα και μπορεί να προκαλέσει την ανάπτυξη της ειδικής ή επίκτητης ανοσίας (adaptive ή specific immunity). Τα αντισώματα είναι πρωτεΐνες του αμυντικού μηχανισμού των θηλαστικών, καλούνται ανοσοσφαιρίνες (immunoglobulins) και συμβολίζονται ως Ig. Υπάρχουν διάφορες μορφές ανοσοχημικών τεχνικών ανάλυσης: εν ροή/χρωματογραφικές τεχνικές, ομογενείς/ετερογενείς, ανοσοχημικοί βιο-αισθητήρες. Η αντίδραση αναγνώρισης μπορεί να αφεθεί να φτάσει σε κατάσταση ισορροπίας στις τεχνικές σε ισορροπία, ή μπορεί να γίνει η μέτρηση άμεσα ή ακόμη να γίνει παρακολούθηση της αντίδρασης-δέσμευσης όπως π.χ. γίνεται σε βιοαισθητήρες τύπου SPR. Οι τελευταίοι περιγράφονται στο σχετικό κεφάλαιο (Βιοαισθητήρες, Κεφάλαιο 7), ενώ η ανοσοχρωματογραφία περιγράφεται στο κεφάλαιο των χρωματογραφικών τεχνικών (Κεφάλαιο 11). Στη συνέχεια του παρόντος κεφαλαίου περιγράφονται: η δομή των αντισωμάτων και η μοριακή αναγνώριση αντισώματος-αντιγόνου και οι βασικές αρχές των κυριότερων μορφών ανοσοχημικής ανάλυσης.

8.2. Αντισώματα

Η τρισδιάστατη δομή των μορίων της ανοσοσφαιρίνης προσομοιάζει στο γράμμα Y, και σχηματίζεται από συνδυασμό δύο βαριών πεπτιδικών αλυσίδων (H) και δύο ελαφριών πεπτιδικών αλυσίδων (L). Οι αλυσίδες ενώνονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς σε ορισμένα σημεία. Γενικά υπάρχουν πέντε διαφορετικοί τύποι ανοσοσφαιρινών που συμβολίζονται με τα γράμματα γ, α, μ, δ και ε, τα οποία συμβολίζονται αντίστοιχα ως IgG, IgA, IgM, IgD και IgE. Στις ανοσοχημικές τεχνικές τα αντισώματα που χρησιμοποιούνται, είναι κυρίως τύπου IgG.

Η βασική δομή των αντισωμάτων IgG είναι παρόμοια, και ειδικότερα για τον ίδιο οργανισμό η αλληλουχία είναι ουσιαστικά ταυτόσημη εκτός από μια μικρή περιοχή στα άκρα των πρωτεϊνών η οποία είναι ιδιαίτερα μεταβλητή, και για αυτόν το λόγο ονομάζεται υπερμεταβλητή περιοχή (hypervariable region). Ουσιαστικά λόγω της διαφοροποίησης ορισμένων αμινοξέων δημιουργούνται δυνατότητες έκφρασης εκατομμυρίων αντισωμάτων που αναγνωρίζουν διαφορετικά αντιγόνα. Αυτή η δυνατότητα προσφέρει στο ανοσοποιητικό σύστημα το πιο ειδικό «όπλο» απέναντι στους κινδύνους (ιούς, βακτήρια, ξένα σώματα). Η περιοχή του αντιγόνου που αναγνωρίζεται από το αντίσωμα και συνδέεται στο κέντρο σύνδεσης ονομάζεται επιτοπική περιοχή (epitope). Τα αντισώματα απομονώνονται από τον ορό αίματος πειραματόζωων στα οποία έχει χορηγηθεί το αντιγόνο μαζί με κατάλληλα αντιδραστήρια που βοηθούν την αντίδραση του οργανισμού (π.χ. Freund's adjuvant). Μετά την εισαγωγή του αντιγόνου ή του συμπλέγματός του με τη φέρουσα πρωτεΐνη, απαιτείται χρόνος κάποιων μηνών για την ωρίμανση των ανοσοσφαιρινών από το στάδιο IgA στο στάδιο IgM και τελικά στο στάδιο των IgG, οπότε και συλλέγεται ορός αίματος από τα πειραματόζωα. Μετά

από καθαρισμούς που περιλαμβάνουν ειδική καταβύθιση και φυγοκέντρηση πρωτεϊνών, παραλαμβάνονται τελικά τα επιθυμητά αντισώματα.

Τα μονοκλωνικά αντισώματα είναι από τα πιο ειδικά μόρια αναγνώρισης στη φύση. Μονοκλωνικά αντισώματα είναι αυτά που παράγονται από έναν κλώνο των ειδικών λεμφοκυττάρων του αμυντικού μηχανισμού του πειραματοζώου. Τα αντισώματα αυτά παρουσιάζουν πολύ ισχυρή σταθερά δέσμευση, ομοιόμορφη συμπεριφορά και ικανότητα αναγνώρισης και δέσμευσης των αντιγόνων. Τα μονοκλωνικά αντισώματα παράγονται σε κυτταρική καλλιέργεια με σύντηξη κυττάρων από μυέλωμα και σπληνικών κυττάρων (συνήθως, κύτταρα τρωκτικού στο οποίο εισάγεται πολυκλωνικό αντίσωμα μετά από την απομόνωση και τον καθαρισμό με χρωματογραφία ανοσοσυγγένειας). Για την παραλαβή των αντισωμάτων ακολουθούνται τα στάδια που αναφέρονται στην παραπάνω παράγραφο. Το μίγμα των αντισωμάτων που έχει απομονωθεί από το πειραματόζωο περιέχει θεωρητικά όλες τις ανοσοσφαιρίνες του αίματος του πειραματόζωου, αντισώματα δηλαδή, που έχουν κληρονομηθεί από τη μητέρα του πειραματόζωου και αντισώματα που έχουν αναπτυχθεί στην έως τότε ζωή του. Για την ανάπτυξη μονοκλωνικών αντισωμάτων απομονώνεται με χρωματογραφία ανοσοσυγγένειας το επιθυμητό αντίσωμα με την εξής διαδικασία: το σύνολο των αντισωμάτων περνά μέσα από χρωματογραφική στήλη στο υλικό πλήρωσης της οποίας έχει ακινητοποιηθεί το αντιγόνο. Στην στήλη θα δεσμευτεί μόνο το ειδικό αντίσωμα που θα αναγνωρίσει το ακινητοποιημένο αντιγόνο. Τα υπόλοιπα αντισώματα απομακρύνονται με πλύση. Τελικά, το ειδικό αντίσωμα παραλαμβάνεται από τη στήλη με έκλυση, με κατάλληλο διαλύτη ο οποίος διασπά το δεσμό αντιγόνο-αντίσωμα. Το τελικό προϊόν είναι σε πολύ καθαρή μορφή αφού έχει παραληφθεί με εκλεκτική απομόνωση. Η σύντηξη γίνεται με γενετική μέθοδο, κατά την οποία γονίδια που κωδικοποιούν την υπερ-μεταβλητή περιοχή των αντισωμάτων εισάγονται στο γενετικό υλικό κολοβακτηριδίου με τη βοήθεια ειδικού ιού. Τα μονοκλωνικά αντισώματα παρουσιάζουν πολύ μεγάλη εξειδίκευση απέναντι στα αντιγόνα και επιτυγχάνουν ισχυρή δέσμευση. Οι σταθερές δέσμευσης των συμπλόκων Ag-Ab είναι από τις πιο μεγάλες που έχουν περιγραφεί φτάνοντας σε τιμές έως 10^{14} . Τα επιτοπικά κέντρα πρωτεϊνών αντιγόνων και τα αντίστοιχα κέντρα δέσμευσης των αντισωμάτων αποτελούνται από 15 περίπου αμινοξέα. Η παραλλαγή αυτών των αμινοξέων είναι που δίνει την εκλεκτικότητα και μεταβλητότητα στα αντισώματα οπότε αυτά αναγνωρίζουν μόνο τα συμπληρωματικά τους αντιγόνα ανάμεσα στην πληθώρα μορίων που μπορεί να έρθουν σε επαφή μαζί τους. Η σταθερή περιοχή (**Σχήμα 8.1**) των αντισωμάτων προσφέρει τη δυνατότητα αναγνώρισης και δέσμευσης όλων των αντισωμάτων από ειδικές πρωτεΐνες (A, G πρωτεΐνες). Η δυνατότητα αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκλεκτική παραλαβή και καθαρισμό των ανοσοσφαιρινών αλλά και για την προσανατολισμένη ακινητοποίησή τους σε στερεές επιφάνειες. Το τελευταίο έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον σε ετερογενείς ανοσοχημείες αναλυτικές τεχνικές και βιο-αισθητήρες καθώς εξασφαλίζει την έκθεση των ενεργών κέντρων στο αναλυτικό σύστημα και επομένως, τη μεγαλύτερη και ασφαλή ανταπόκριση των αντισωμάτων.

Πέραν της βιοαναλυτικής εφαρμογής των αντισωμάτων, σημαντική είναι επίσης η χρήση τους στη φαρμακευτική και θεραπευτική όπου θεωρούνται ειδικά φάρμακα (magic bullet). Μονοκλωνικά αντισώματα χορηγούνται ως αντιοροί (δηλαδή, ως αντισώματα έναντι αντιγόνου π.χ. ιού) για επίτευξη παθητικής ανοσίας. επίσης, χρησιμοποιούνται για ανοσοκατασταλτική θεραπεία (δηλαδή, αντισώματα έναντι παθολογικών αυτο-αντισωμάτων) αλλά και ως βιολογική θεραπεία κακοηθών νεοπλασιών (αντισώματα έναντι υποδοχέων που απαντώνται σε κακοήθεις όγκους).

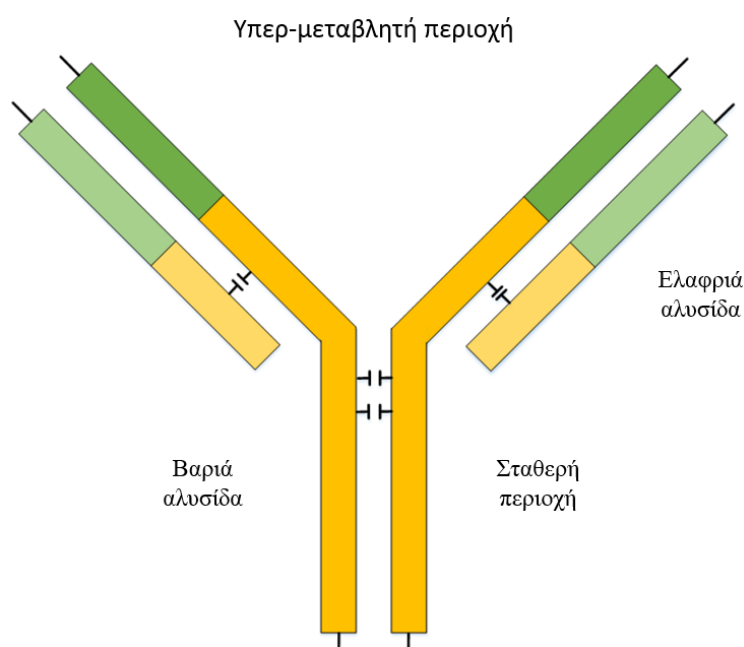
Με την πρόοδο της βιοτεχνολογίας υπάρχει, πλέον, η δυνατότητα παρασκευής χημικών μονοκλωνικών αντισωμάτων μέσω πρωτεϊνικής σύνθεσης. Τέτοια φάρμακα αναπτύσσονται, εφόσον έχει εντοπιστεί μια πρωτεΐνη-στόχος, π.χ. μια πρωτεΐνη που εμπλέκεται σε μηχανισμό φλεγμονής (αυτοάνοσα νοσήματα) ή μια ειδική πρωτεΐνη που χαρακτηρίζει καρκινικά κύτταρα. Αναπτύσσονται μονοκλωνικά αντισώματα εναντίον της πρωτεΐνης και στη συνέχεια αντικαθίσταται η σταθερή περιοχή (Fc) των αντισωμάτων με αντίστοιχη Fc περιοχή αντισωμάτων από ανθρώπινο ορό. Με τον τρόπο αυτό το παραγόμενο αντίσωμα διατηρεί την υπερμεταβλητή του περιοχή και τη λειτουργικότητά της, ενώ η Fc περιοχή του έχει τη μικρότερη δυνατή ανοσογόνο αντίδραση κατά τη χορήγησή της στον άνθρωπο. Στο **Σχήμα 8.1** δίνεται σχηματικά η δομή των αντισωμάτων IgG.

8.3. Ακινητοποίηση Βιομορίων σε Επιφάνειες

Κατά την ακινητοποίηση, δηλαδή, τη σύνδεση βιομορίου σε κάποιο υπόστρωμα στήριξης (στατική φάση), ζητούμενο είναι να διατηρηθεί η λειτουργικότητα του αντισώματος. Υπάρχουν πρωτόκολλα ακινητοποίησης μέσω διαμοριακής σύνδεσης (cross-linking) ή χημικής αντίδρασης με ομοιοπολική σύνδεση. Η διαμοριακή

σύνδεση συνδυάζεται, συνήθως, με προσρόφηση των πρωτεϊνικών μορίων. Εκτός από την απευθείας πρόσδεση αντιγόνου ή αντισώματος στην επιφάνεια στερεών φορέων, έχουν αναπτυχθεί διάφορες άλλες πιο αποτελεσματικές διαδικασίες ακινητοποίησης, όπως η πρόσδεση μέσω συστήματος αβιδίνης-βιοτίνης, πρωτεΐνης A ή G κ.ά. Πλεονεκτήματα των τεχνικών στερεάς φάσης είναι η μείωση των αναλυτικών σταδίων, καθώς δε χρειάζεται φυγοκέντρηση για το διαχωρισμό. Αυτό επιτρέπει τη δυνατότητα χρησιμοποίησής τους για οποιοδήποτε ζεύγος αντιγόνου-αντισώματος, ενώ επιτρέπει αυτοματοποίηση του διαχωρισμού των φάσεων με απλές πλύσεις, επομένως επιτρέπει την αυτοματοποίηση της πειραματικής μέτρησης (όπως περιγράφεται στην παράγραφο της ELISA). Μειονεκτήματα των τεχνικών στερεάς φάσης είναι ότι η πρόσδεση στη στερεά φάση μπορεί να επηρεάσει την ταχύτητα ή και την ικανότητα σύνδεσης μεταξύ αντιγόνων και αντισωμάτων.

Στις περισσότερες εφαρμογές ως στερεά φάση στους ανοσοχημικούς προσδιορισμούς χρησιμοποιούνται διάφοροι πλαστικοί φορείς σε ποικίλες μορφές (σωλήνες, πλάκες μικροτιτλοδότησης), ενώ τελευταία ενδιαφέρον παρουσιάζουν εφαρμογές σε μαγνητικά σωματίδια.



Σχήμα 8.1. Δομή των αντισωμάτων IgG

8.4. Ανοσοχημικές Τεχνικές Ανάλυσης

Οι ανοσοχημικές τεχνικές ανάλυσης βασίζονται στην επιλεκτική αντίδραση ενός αναλύτη (αντιγόνου (Ag)) με το αντίσωμα (Ab), για να δώσει ένα προϊόν (Ag-Ab) το οποίο μπορεί να μετρηθεί. Η αντίδραση δέσμευσης γίνεται αντιληπτή με τη χρήση ιχνηθέτη, ο οποίος μπορεί να είναι φθορίζουσα ή φωσφορίζουσα ένωση, ραδιενεργός ένωση, ή ένζυμο που καταλύει κάποια αντίδραση η οποία παράγει ακτινοβολία ή φωταύγεια.

Οι αναλυτικές μέθοδοι που βασίζονται σε ανοσοχημικές δράσεις, ταξινομούνται ανάλογα με το μηχανισμό και τη διάταξη της αλληλεπίδρασης Ag-Ab. Ανάλογα με το μηχανισμό χωρίζονται σε δύο βασικές ομάδες: τις μεθόδους ανταγωνιστικού τύπου και τις μεθόδους μη-αγωνιστικού τύπου. Οι τύποι αυτοί περιγράφονται στη συνέχεια του κεφαλαίου.

Οι ανοσοχημικές αναλυτικές μέθοδοι χωρίζονται, επίσης, σε ομογενείς και ετερογενείς. Στις ετερογενείς δράσεις λαμβάνει χώρα διαχωρισμός του δεσμευμένου και μη δεσμευμένου αντιδραστήριου (αντίσωμα ή αντιγόνου) κατά τη διάρκεια της ανάλυσης. Για το λόγο αυτό το ένα από τα δύο συστατικά ακινητοποιείται σε στερεή επιφάνεια. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται εύκολα με πλύση της στερεάς φάσης με κατάλληλο διάλυμα και απομάκρυνση του μη δεσμευμένου αντιδραστήριου. Στις ομογενείς δοκιμές δεν απαιτείται βήμα διαχωρισμού ή πλύσης και ο ιχνηθέτης πρέπει να λειτουργεί ικανοποιητικά στο υπόστρωμα του αναλυόμενου δείγματος. Ως αποτέλεσμα, υπάρχει κίνδυνος παρεμβολής/παρεμπόδισης από τα συστατικά άγνωστων δειγμάτων.

Υπάρχουν, επίσης, άλλες κατηγορίες ανοσοχημικών τεχνικών ανάλυσης που συνδυάζονται με τεχνικές διαχωρισμού όπως: 1. Ανοσοχρωματογραφία ή χρωματογραφία ανοσοσυγγένειας, όπου αντίσωμα ή αντιγόνο ακινητοποιείται σε στατική φάση και επιτυγχάνει ειδικό διαχωρισμό και 2. Ανοσο-ηλεκτροφόρηση. Οι τεχνικές αυτές αναπτύσσονται στα σχετικά κεφάλαια.

Στον **Πίνακα 8.1** δίνονται συνοπτικά οι διαφορετικές βασικές ομάδες ανοσοχημικών τεχνικών και βασικές πληροφορίες ως προς την επιλογή του ιχνηθέτη και του τρόπου μέτρησης.

Τεχνική	Σύμβολο	Ιχνηθέτης	Μέθοδος μέτρησης
Ραδιο-ανοσοχημική Ανάλυση	RIA	Ραδιενεργό ισότοπο	Ακτινοβολία ραδιενεργού ισοτόπου
Ενζυμο-ανοσοχημική	EIA	Ένζυμο	Επαγόμενη φωταύγεια, άλλες αναλυτικές μέθοδοι (φωτομετρία)
Φθορο-ανοσοχημική ανάλυση	FIA (FPIA)	Φθορίζουσα ουσία	Φθορισμός Φωτομετρία
Ανοσοχημικοί βιοαισθητήρες Immunosenors	SPR, άλλο	-	Διάθλαση φωτός ή άλλη τεχνική

Πίνακας 8.1. Είδη ανοσοχημικών τεχνικών ανάλυσης

8.4.1. Ράδιο-ανοσοχημική Ανάλυση

Η Ραδιο-ανοσοχημική Ανάλυση (Radioimmunoassay, RIA) είναι από τις παλαιότερες τεχνικές Ανοσοχημικής Ανάλυσης. Λόγω των αυξανόμενων περιορισμών, του αυξανόμενου κόστους και αυστηρότερων ελέγχων σε σχέση με τη χρήση ραδιοεπισημασμένων ισωτόπων, η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται πλέον λιγότερο, όμως βρίσκει ακόμη εφαρμογή σε αρκετές αναλύσεις. Οι εφαρμογές της RIA είναι, κυρίως, στην ανάλυση ορμονών όπως ινσουλίνη, βαζοπρεσίνη, θυροξίνη, ενδοκρινών διαταρακτών, φαρμάκων (μορφίνη και άλλες ψυχοτρόπες ενώσεις καθώς και ειδικά πεπτίδια φάρμακα), ιών καθώς και αλλεργιογόνων· χρησιμοποιείται και για διαγνωστικούς σκοπούς, στη μέτρηση βιοδεικτών καρκίνου.

Ως ιχνηθέτης της προσδιοριζόμενης ουσίας χρησιμοποιείται το ίδιο το αναλυόμενο μόριο (φάρμακο, ορμόνη, ή άλλο) ή ανάλογης δομής μόριο μετά από ραδιοσοτοπική επισήμανση. Ο ιχνηθέτης παρασκευάζεται με εισαγωγή συγκεκριμένου ραδιοϊσοτόπου στο μόριο. Συνήθως, δεσμεύεται το ισότοπο ^{125}I σε μόριο τυροσίνης. Γνωστή ποσότητα του επισημασμένου αντιγόνου αντιδρά με το αντίσωμα με αποτέλεσμα τη δέσμευση Ag-Ab. Στη συνέχεια προστίθεται το δείγμα και εφόσον το δείγμα περιέχει την αναλυόμενη ένωση (μη επισημασμένο αντιγόνο) ακολουθεί ανταγωνιστική δέσμευση της αναλυόμενης ένωσης στο αντίσωμα. Όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση της αναλυόμενης ένωσης, τόσο μεγαλύτερο είναι το ποσό του επισημασμένου αντιγόνου που θα απελευθερωθεί από το αντίσωμα. Με την αποκατάσταση ισορροπίας, το συνδεδεμένο επισημασμένο αντιγόνο, διαχωρίζεται από το ελεύθερο επισημασμένο αντιγόνο. Αυτό μπορεί να γίνει με προσθήκη δεύτερου αντισώματος, το οποίο δεσμεύει γενικά τα αντισώματα, οπότε το σύμπλοκο των δύο αντισωμάτων μπορεί να απομακρυνθεί με φυγοκέντρηση. Ακολουθεί μέτρηση της ραδιενέργειας των δύο κλασμάτων (ελεύθερο και δεσμευμένο αντιγόνο) σε μετρητή σπινθηρισμού (scintillation counter). Η πορεία της ανάλυσης φαίνεται στο **Σχήμα 8.2**.

Πλεονέκτημα της RIA είναι η μεγάλη ευαισθησία καθώς επιτυγχάνει όρια ανίχνευσης της τάξης 10^{-8} – 10^{-10} M, ενώ ως μειονεκτήματα θεωρούνται: η χρήση ραδιενεργών ιχνηθετών, οι αυστηροί κανονισμοί για την παρασκευή, φύλαξη και διάθεση ραδιενεργών ιχνηθετών, η ανάγκη ειδικού εργαστηρίου (με ειδική άδεια διαχείρισης ισωτόπων), η ανάγκη για ειδικά όργανα και ειδικευμένο προσωπικό με ειδική εκπαίδευση και άδεια, και ο περιορισμένος χρόνος ζωής των αντιδραστηρίων.

8.4.2. Ενζυμο-ανοσοχημική Ανάλυση

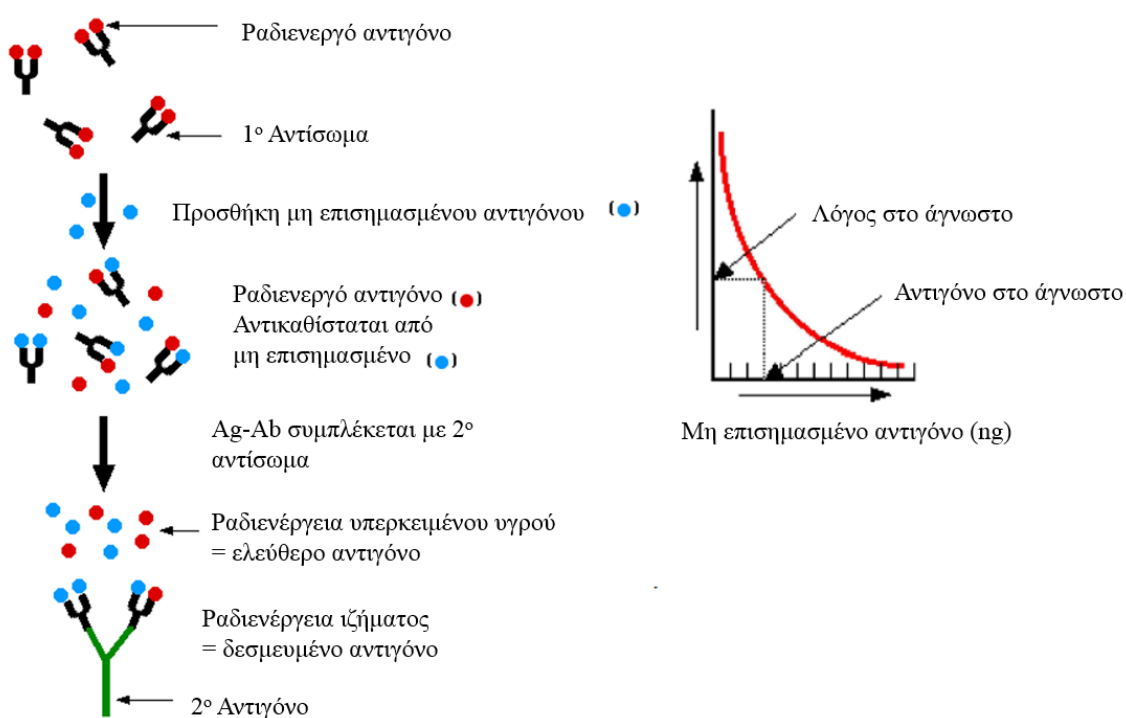
Στην Ενζυμο-ανοσοχημική Ανάλυση (Enzyme ImmunoAssay, EIA) επιλέγεται ένα ένζυμο το οποίο συνδέεται στις αναλυόμενες ενώσεις ή (πιο συχνά) στα αντισώματα, για να παραχθεί ο ιχνηθέτης. Το

αναλυτικό σήμα που μετράται, προέρχεται από το προϊόν της αντίδρασης η οποία καταλύεται από το ένζυμο. Η αντίδραση αυτή παράγει χρωματισμένο προϊόν ή φωταύγεια, η οποία μετράται σε κατάλληλη διάταξη.

Τα πλεονεκτήματα της EIA είναι η αποφυγή περιορισμών και κινδύνων κατά την παρασκευή, φύλαξη, χρήση, και απόρριψη ραδιενεργών ιχνηθετών και η μεγαλύτερη διάρκεια ζωής των ενζυμοεπισημασμένων ιχνηθετών που είναι άνω του έτους σε σχέση π.χ. με τα ραδιοεπισημασμένα αντιδραστήρια (RIA) που έχουν μικρότερη διάρκεια ζωής. Επίσης, χρησιμοποιούνται απλά και φθηνά όργανα μετρήσεως (απλό φωτόμετρο), ενώ υπάρχει δυνατότητα αυτοματοποίησης. Σημαντικό πλεονέκτημα της χρήσης ενζύμων είναι η δυνατότητα πολλαπλασιασμού του σήματος. Ένα μόριο ενζύμου, συνήθως, μετατρέπει $10^3 - 10^6$ μόρια υποστρώματος σε προϊόν ανά λεπτό.

Τα ένζυμα που επιλέγονται για σύνδεση ως ιχνηθέτες πρέπει να πληρούν κάποιες ιδιότητες: 1) Να έχουν υψηλή ενζυμική δραστηριότητα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος 2) να είναι λειτουργικά στις συνθήκες του πειράματος, 3) να μη χάνουν τη δραστηριότητά τους κατά τη σύνδεση στο αντιγόνο ή το αντίσωμα για την παρασκευή του ιχνηθέτη και 4) να καταλύουν κατά προτίμηση αντιδράσεις με προϊόν που μετράται με φθινό και απλό τρόπο π.χ. σε απλό φωτόμετρο.

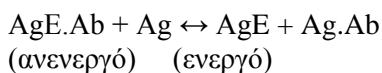
Οι τεχνικές Ενζυμο-ανοσοχημικής ανάλυσης χωρίζονται στις ομογενούς τύπου και στις ετερογενούς τύπου. Ομογενής αντίδραση είναι η Enzyme Multiplied Immunoassay Technique (EMIT) και ετερογενής η Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA), οι οποίες αναπτύσσονται παρακάτω.



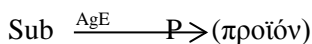
Σχήμα 8.2. Πορεία ανάλυσης στη RIA. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της αναλυόμενης ένωσης γίνεται μέσω της καμπύλης του λόγου του σήματος δεσμευμένου αντιγόνου προς ελεύθερο αντιγόνο, ως προς τη συγκέντρωση της αναλυόμενης ένωσης.

8.4.2.1. Ανοσοχημική ανάλυση πολλαπλασιαζόμενου ενζύμου (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique, EMIT)

Στην EMIT το προσδιοριζόμενο μόριο Ag συνδέεται με ένα ένζυμο E και σχηματίζει τον ιχνηθέτη AgE. Όταν στο σύστημα προστεθεί το αντίσωμα και ο ιχνηθέτης AgE συνδεθεί με το αντίσωμα Ab, σχηματίζεται σύμπλοκο AgE-Ab, το οποίο παρουσιάζει μειωμένη ενζυμική δραστηριότητα. Το ένζυμο είναι ανενεργό γιατί, συνήθως, το ογκώδες αντίσωμα παρεμποδίζει τη σύνδεση του υποστρώματος με το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Στη συνέχεια, όταν προστεθεί το δείγμα, εάν αυτό περιέχει την αναλυόμενη ένωση, δηλαδή το αντιγόνο Ag, το αντιγόνο ανταγωνίζεται με τον ιχνηθέτη AgE για τη δέσμευση στο αντίσωμα. Όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του αντιγόνου στο δείγμα τόσο πιο πολύ μετατοπίζεται η ισορροπία της αντίδρασης προς τα δεξιά, οπότε παράγεται ενεργός ιχνηθέτης:

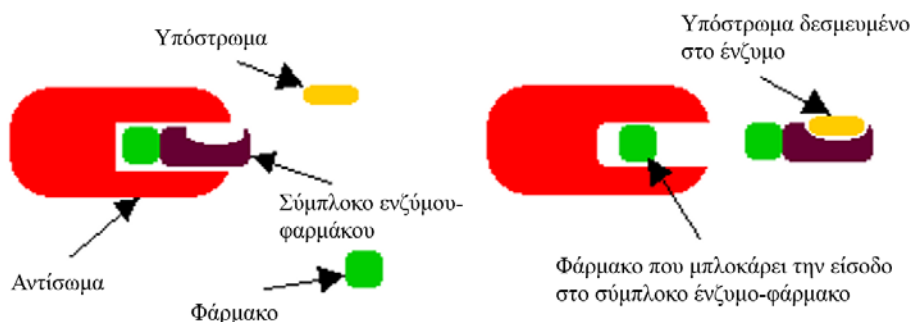


Σε αυτήν την περίπτωση με την προσθήκη του υποστρώματος (Sub) πραγματοποιείται η αντίδραση:



Η συγκέντρωση του προϊόντος μετράται και όσο πιο μεγάλη είναι αυτή, τόσο πιο μεγάλη είναι η συγκέντρωση/ενεργότητα του ιχνηθέτη AgE στο τελικό διάλυμα, άρα τόσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση της αναλυόμενης ένωσης στο δείγμα. Στο **Σχήμα 8.3** δίνεται σχηματικά η πορεία ανάλυσης της EMIT.

Η EMIT χρησιμοποιείται για διάφορες αναλύσεις σε τοξικολογικά εργαστήρια με αναλυόμενες ενώσεις: φάρμακα, ναρκωτικά κλπ. ενώ στα κλινικά εργαστήρια οι εφαρμογές είναι στην ανάλυση ιών, πρωτεϊνών κλπ.



Σχήμα 8.3. Αρχή της EMIT. Στην αριστερή πλευρά ο ιχνηθέτης (αναλυόμενη ένωση/φάρμακο δεσμευμένο στο ένζυμο) δεσμεύεται από το αντίσωμα, οπότε το ένζυμο δεν είναι ενεργό (δεν παράγεται φώς ή άλλο σήμα). Στη δεξιά πλευρά η αναλυόμενη ένωση ανταγωνίζεται τον ιχνηθέτη και δεσμεύεται αυτή στο αντίσωμα. Ο ελεύθερος ιχνηθέτης είναι ενεργός και παράγεται μετρούμενο σήμα [Pieper, 1989; p. 40, fig 12].

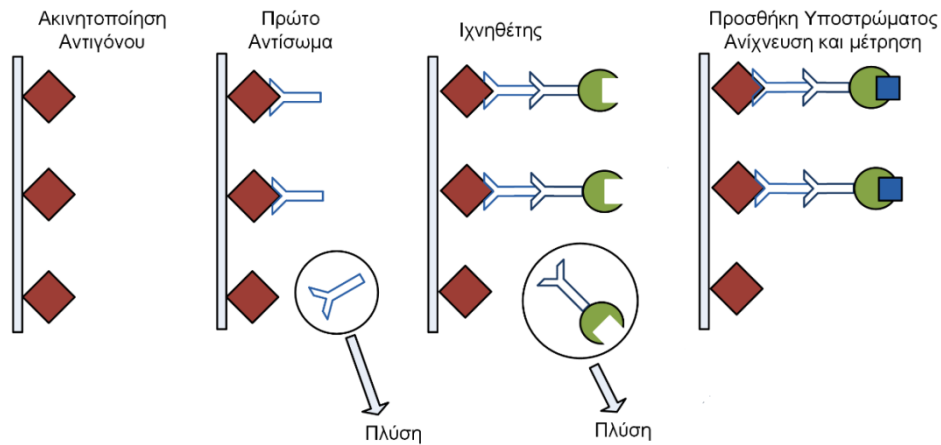
Ενζυμική ανοσοπροσρόφηση (ELISA)

Η τεχνική ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) είναι ο κυριότερος εκπρόσωπος γενικά των ανοσοχημικών τεχνικών, γιατί χρησιμοποιείται, ευρέως, σε διάφορες παραλλαγές. Η γενική αρχή της πορείας είναι: γίνεται προσρόφηση (sorption) των αντισωμάτων ή αντιγόνων σε τοιχώματα πλαστικών σωλήνων, πλακών 96 θέσεων ή σφαιριδίων. Μετά την αναγνώριση του αντιγόνου και σύνδεση Ag-Ab, ακολουθεί διαχωρισμός φάσεων. Στη συνέχεια ανάλογα με τις παραλλαγές προστίθεται δεύτερο αντίσωμα και ακολουθεί ενζυμική αντίδραση για τη μέτρηση. Μεταξύ των διάφορων σταδίων, το υγρό το οποίο βρίσκεται στην πλάκα 96 θέσεων ή στο σωλήνα, απορρίπτεται και ο σωλήνας πλένεται, ώστε να απομακρυνθούν τα αντιδραστήρια που δεν είναι δεσμευμένα με δεσμό Ag-Ab.

Στο **Σχήμα 8.4** δίνεται η πορεία κατά την οποία η προς ανάλυση ένωση προστίθεται σε σωλήνα και ακινητοποιείται. Στη συνέχεια το ειδικό αντίσωμα αναγνωρίζει την ένωση-στόχο, οπότε και δεσμεύεται πάνω της. Το υγρό αφαιρείται και μετά από πλύσεις προστίθεται δεύτερο αντίσωμα, ειδικό εναντίον του πρώτου αντισώματος. Για παράδειγμα εάν το πρώτο αντίσωμα αναπτύχθηκε σε κουνέλι προστίθεται ανοσοσφαιρίνη από αντι-ορό αίγας (κατσίκας) εναντίον κουνελιού (goat anti-rabbit).

Χρωματομετρική ELISA

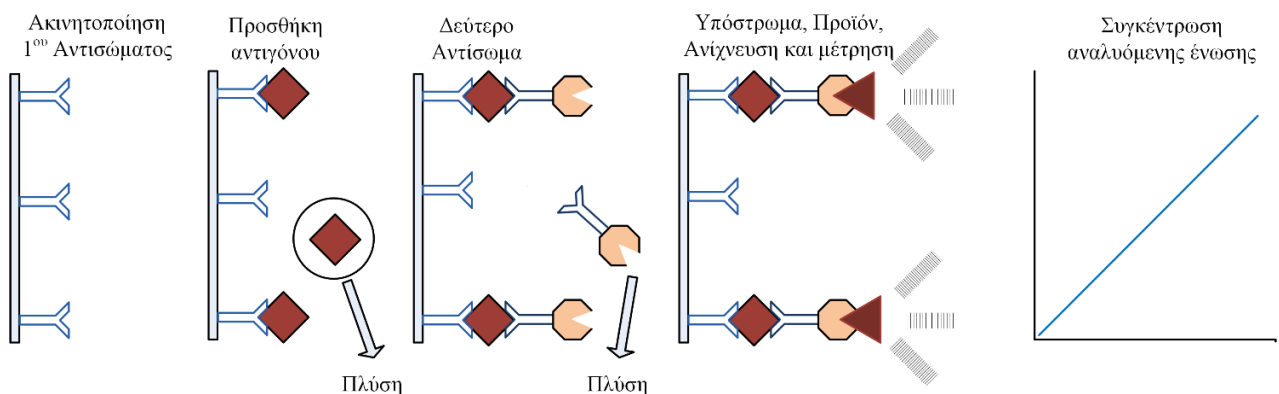
Το δεύτερο αντίσωμα είναι ενζυμικά επισημασμένο και με την προσθήκη υποστρώματος παράγεται χρώμα. Στην ανάλυση δειγμάτων το 2ο αντίσωμα θα δεσμευθεί μόνον εφόσον βρει στο σωλήνα το πρώτο αντίσωμα, το οποίο θα βρίσκεται εκεί μόνο σε περίπτωση που υπήρχε η αναλυόμενη ένωση στο αναλυόμενο δείγμα. Έτσι η ένταση του σήματος σχετίζεται με τη συγκέντρωση της αναλυόμενης ένωσης. Η τεχνική αυτή εφαρμόζεται, κυρίως, για ανάλυση πρωτεϊνών καθώς αυτές μπορούν να δεσμευθούν στα πλαστικά τοιχώματα, πλακών ή σωλήνων.



Σχήμα 8.4. Πορεία ELISA. Από αριστερά προς δεξιά: Προσθήκη του δείγματος και ακινητοποίηση αντιγόνου, εφόσον αυτό υπάρχει στο δείγμα. Προσθήκη 1ου αντισώματος και εκλεκτική δέσμευση στο αντιγόνο. Προσθήκη και δέσμευση 2ου αντισώματος. Το 2ο αντίσωμα θα δεσμευθεί μόνο εφόσον βρει το 1ο αντίσωμα στο σωλήνα. Προσθήκη υποστρώματος, ανίχνευση και μέτρηση σήματος.

Sandwich ELISA

Στη Sandwich ELISA (Σχήμα 8.5) αρχικά ακινητοποιείται το 1ο αντίσωμα στην πλάκα ή το σωλήνα. Στη συνέχεια προστίθεται το αντιγόνο και γίνεται δέσμευση στο αντίσωμα. Μετά από πλύσεις για απομάκρυνση των μη-δεσμευμένων αντιδραστηρίων προστίθεται 2ο ειδικό αντίσωμα, το οποίο αναγνωρίζει άλλο επιτοπικό κέντρο στην αναλυόμενη ένωση και δεσμεύεται πάνω από το ακινητοποιημένο σύμπλοκο. Το 2ο αντίσωμα είναι ενζυμικά επισημασμένο και με την προσθήκη υποστρώματος παράγεται χρωματισμένο προϊόν. Στην ανάλυση πραγματικών δειγμάτων το 2ο αντίσωμα θα δεσμευθεί μόνο εφόσον βρει στο σωλήνα το αντιγόνο του, έτσι η ένταση του σήματος σχετίζεται με τη συγκέντρωση της αναλυόμενης ένωσης στο δείγμα. Αυτή η τεχνική είναι κατάλληλη μόνο για μεγάλα μόρια π.χ. πρωτεΐνες, καθώς απαιτείται το αναλυόμενο μόριο να έχει μεγάλο όγκο. Επίσης, απαιτείται ικανή απόσταση μεταξύ των δύο επιτοπικών κέντρων, ώστε να μπορεί γίνει ταυτόχρονη δέσμευση σε δύο αντισώματα. Η πορεία της ανάλυσης δίνεται στο Σχήμα 8.5.

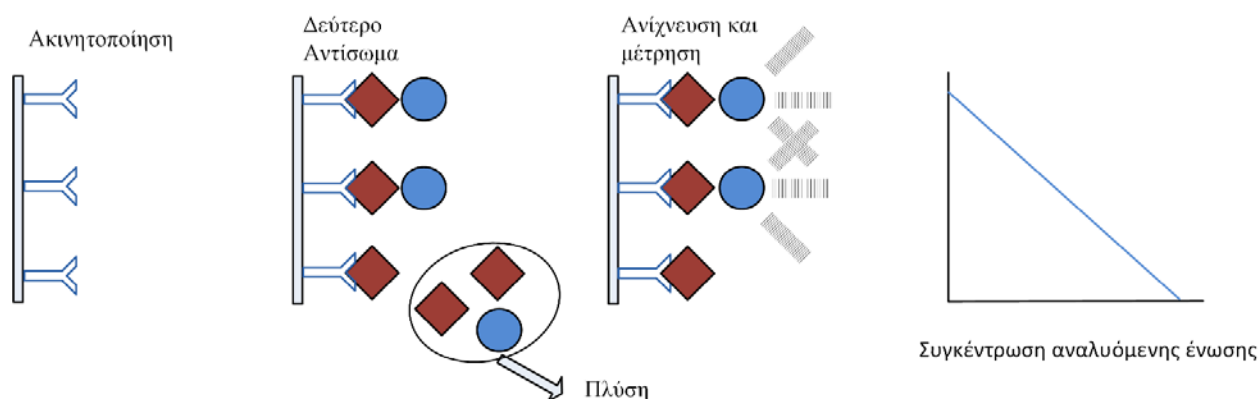


Σχήμα 8.5. Πορεία ανάλυσης σε Sandwich ELISA. Από αριστερά προς τα δεξιά: Ακίνητοποίηση 1ου αντισώματος. Δέσμευση αντιγόνου. Δέσμευση 2ου αντισώματος. Προσθήκη υποστρώματος και ανίχνευση. Η ένταση σήματος είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της αναλυόμενης ένωσης.

Ανταγωνιστική ELISA

Στην Ανταγωνιστική ELISA (Σχήμα 8.6) αρχικά ακινητοποιείται το 1^ο αντίσωμα στην πλάκα ή το σωλήνα. Προστίθεται το αντιγόνο και ο ιχνηθέτης (ο οποίος είναι το ίδιο αντιγόνο, συνήθως, επισημασμένο φθορισμομετρικά) και γίνεται δέσμευση. Μετά από πλύσεις για απομάκρυνση μη-δεσμευμένων αντιδραστηρίων μετράται φθορισμός ή απορρόφηση. Στην ανάλυση δειγμάτων όσο πιο μεγάλη η

συγκέντρωση της ένωσης στο δείγμα τόσο πιο μικρή η δέσμευση του ιχνηθέτη στο αντίσωμα και άρα τόσο μικρότερο το τελικό σήμα.



Σχήμα 8.6. Ανταγωνιστική ELISA. Από αριστερά προς τα δεξιά: Ακίνητοποίηση του αντισώματος. Προσθήκη αντιγόνου/δείγματος ιχνηθέτη και ανταγωνισμός για δέσμευση στο αντίσωμα. Μέτρηση με φθορισμό ή άλλη τεχνική. Όσο πιο μεγάλη η συγκέντρωση της ένωσης στο δείγμα τόσο πιο μικρή η δέσμευση του ιχνηθέτη στο αντίσωμα και άρα τόσο μικρότερο το τελικό σήμα.

Οι τεχνικές ELISA εφαρμόζονται πολύ ικανοποιητικά στην ανάλυση ιών, αλλεργιογόνων πρωτεϊνών σε τρόφιμα ή βιολογικά δείγματα, ορμονών και άλλων βιομορίων σε βιολογικά δείγματα, για διαγνωστικούς σκοπούς. Στον Πίνακα 2 αναφέρονται ενδεικτικά μερικά μόνο παραδείγματα φαρμακευτικών ενώσεων και βιοδεικτών, τα οποία αναλύονται με ELISA και ανίχνευση με χημειοφωταύγεια.

Αναλύομενη ένωση	Δείγμα	Όριο Ανίχνευσης	
Αντιεπιληπτικά	καρβαμαζεπίνη	Ορός	0.13 µg/ml
	φαινοβαρβιτάλη	Ορός	0.3 µg/ml
	φαινυτοΐνη	Ορός	0.45 µg/ml
	βαλπροϊκό οξύ	Ορός	0.68 µg/ml
Βρογχοδιασταλτικά	σαλβουταμόλη, κλενβουτερόλη	Ιστός	2 pg/well
	βιταμίνες	Τρόφιμα	0.1 ng/ml
Ορμόνες:	ινσουλίνη	Ορός	2 µU/ml
	θυροξίνη	Ορός	5.5 pmol
	οιστραδιόλη	Σίελος	3.8 pmol
	οιστρόνη	Ορός	55 pmol
	τεστοστερόνη	Ορός	0.13 nmol
	19-Nor- Τεστοστερόνη	Ορός	0.03 ng/ml
	Οξική Μεδροξυπρογεστερόνη	Ορός	0.83 pg
Φυτο-Οιστρογόνα:	δαϊδζεΐνη	Ορός	10 pg
Βιοδείκτες:	ειδικό αντιγόνο προστάτη (PSA)	Ορός	1.7 pg/ml

Πίνακας 8.2. Χαρακτηριστικές φαρμακευτικές ενώσεις και βιοδείκτες που αναλύονται με ELISA και ανίχνευση με χημειοφωταύγεια

Οι τεχνικές ELISA εφαρμόζονται πολύ ικανοποιητικά σε πλάκες 96 θέσεων (96-well microtiter plate). Για την αποδοτική χρήση τέτοιων πλακών έχουν αναπτυχθεί ειδικές πολλαπλές πιπέτες και όργανα για πλύση και μέτρηση των πλακών (microplate reader) όπως φαίνονται στο **Σχήμα 8.7**. Η πλάκα ELISA μορφής 96-θέσεων αποτελείται από πλέγμα 12 × 8 θέσεων. Η ετοιμασία των πλακών γίνεται ως εξής: Μία σταθερή ποσότητα πρωτεΐνης δεσμεύεται στην επιφάνεια των θέσεων/φρεατίων/πηγαδιών της πλάκας με παθητική προσρόφηση. Μετά από προκαθορισμένο χρόνο επώασης, η πλάκα πλένεται για να απομακρυνθεί η δεσμευμένη πρωτεΐνη. Γενικά στα στάδια της ανάλυσης υπάρχει μεγάλη ανάγκη μείωσης της πιθανότητας

εμφάνισης μη-εκλεκτικών δεσμών. Για να αποφευχθεί η μη-εκλεκτική δέσμευση αντισωμάτων ή άλλων πρωτεϊνών στην πλάκα, προστίθεται πρωτεΐνη μπλοκαρίσματος της πλάκας μετά την ακινητοποίηση των αντισωμάτων. Με τον τρόπο αυτό καλύπτονται τυχόν ελεύθερα κέντρα δέσμευσης των πλαστικών τοιχωμάτων με χρήση οικονομικών και διαδεδομένων πρωτεϊνών, όπως η πρωτεΐνη του ορού αίματος βοδινού (BSA), πρωτεΐνη αυγού (OVA) κ.ά. Επιπλέον, συχνά προστίθεται τασενεργός ένωση στα ρυθμιστικά διαλύματα τα οποία χρησιμοποιούνται στα διάφορα βήματα. Για παράδειγμα χρησιμοποιείται τασενεργό Tween και το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate buffer saline, PBS) μετατρέπεται σε Phosphate buffer saline Tween (PBST).



α)



β)



γ)



δ)

Σχήμα 8.7. (α): χρήση αυτόματης πιπέτας 8 θέσεων επαναλαμβανόμενης έγχυσης για προσθήκη αντιδραστηρίων ELISA σε πλάκα 96 θέσεων. (β): συσκευή πλύσης της πλάκας 96 θέσεων. Η πλάκα πλένεται αυτόματα με παροχή και αναρόφηση υγρών σε 8 θέσεις ταυτόχρονα και στη συνέχεια μετακίνηση στην επόμενη γραμμή (συστοιχία 8 θέσεων). (γ). Μετά την επώαση οι θέσεις της πλάκας, δηλαδή, τα διαφορετικά δείγματα έχουν ένταση χρώματος, σχετιζόμενης με τη συγκέντρωση της αναλυόμενης ένωσης. (δ): η πλάκα μετράται αυτόματα (ανά συστοιχία 8 θέσεων) σε ειδικό όργανο.

8.4.2. Φθόρο-ανοσοχημική ανάλυση (FIA)

Η τεχνική FIA (fluorescence Immunoassay) είναι ανάλογη της RIA με τη διαφορά ότι ο ιχνηθέτης είναι φθορίζουσα ένωση αντί για ραδιοϊσότοπο. Περιλαμβάνει παραλλαγές ομογενών και ετερογενών τεχνικών με πιο συνηθισμένο τύπο την τεχνική FPIA.

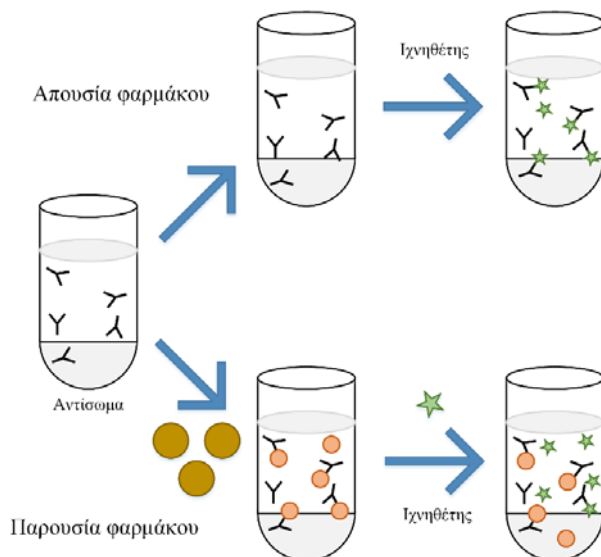
8.4.3.1. Φθόρο-ανοσοχημική ανάλυση πολωμένης ακτινοβολίας (Fluorescent Polarisation Immunoassay, FPIA)

Η τεχνική αυτή είναι ανταγωνιστική, ομογενούς μορφής. Ως ιχνηθέτης χρησιμοποιείται η ένωση-στόχος μετά την επισήμανσή της με φθορίζουσα ουσία (π.χ. φλουορεσκεΐνη). Ο Ιχνηθέτης ανταγωνίζεται στα δείγματα τη μη-επισημασμένη ουσία. Το δείγμα ακτινοβολείται σε μήκος κύματος πολωμένου φωτός (490 nm) και η φλουορεσκεΐνη εκπέμπει στα 520 nm. Η αναλυόμενη ένωση με τη σύνδεσή της στο αντίσωμα, αυξάνει κατά πολύ ως προς το μέγεθος/όγκο του μορίου. Πολλοί ιχνηθέτες έχουν μοριακό βάρος κάτω των 1000 amu (Da) και συνδέονται με ανοσοσφαιρίνες των 150 kDa, δηλαδή με μόρια τουλάχιστον 150 φορές μεγαλύτερα. Το μικρό μόριο ιχνηθέτης παρουσιάζει μεγάλη ταχύτητα περιστροφής στην πολωμένη ακτινοβολία και δίνει

χαμηλό σήμα εκπομπής. Το ογκώδες σύμπλοκο αντισώματος του ιχνηθέτη παρουσιάζει μικρή ταχύτητα περιστροφής και παράγει περισσότερη ακτινοβολία. Κατά την ανάλυση πραγματικών δειγμάτων, η προσδιορισμένη ουσία και ο ιχνηθέτης ανταγωνίζονται για τη θέση δέσμευσης στο αντίσωμα. Όσο μεγαλύτερη η συγκέντρωση της ένωσης τόσο λιγότερος ιχνηθέτης θα δεσμευθεί στο αντίσωμα, άρα και μικρότερη η τιμή του σήματος. Η πορεία της ανάλυσης FPIA δίνεται στο **Σχήμα 8.8**.

Η FPIA προσφέρει ταχεία ανάλυση για διάφορες κατηγορίες μορίων στόχων, όπως τοξίνες (μυκοτοξίνη, αφλατοξίνη, οχρατοξίνη), ορμόνες, μεταβολίτες ψυχοτρόπων ενώσεων κ.α. Στον **Πίνακα 8.3** δίνονται χαρακτηριστικά παραδείγματα εφαρμογής της.

Πλεονεκτήματα της τεχνικής είναι η ταχύτητα, η δυνατότητα αυτοματοποίησης, και η ευκολία στο χειρισμό.



Σχήμα 8.8. Αρχή μεθόδου FPIA. Απουσία αναλύομενης ένωσης, ο ιχνηθέτης δεσμεύεται από το αντίσωμα και παράγεται υψηλό σήμα. Παρουσία αναλύομενης ένωσης, ο ιχνηθέτης δε δεσμεύεται από το αντίσωμα και παράγεται χαμηλό σήμα [Maragos, 2009].

Μόριο-Στόχος	Υπόστρωμα
Τρικυκλικά Αντικαταθλιπτικά :	
Αμιτριπτυλίνη, γλωριμιπραμίνη, δοξεπίνη	Ούρα
Αντιεπιληπτικά:	
φαινοτοΐνη, καρβαμαζεπίνη, φαινοβαρβιτάλη τοπιραμάτη	Αίμα Πλάσμα αίματος
Αντιβιοτικά:	
αμικασίνη, τομπραμυκίνη βανκομυκίνη, τεικοπλανίνη	Ορός αίματος Ούρα
Χημειοθεραπευτικά:	
Αραβινόση της κυτοσίνης μεθοτρεξάτη	Εγκεφαλονωτιαίο υγρό Εγκεφαλονωτιαίο υγρό
Ψυχοτρόπες ενώσεις:	
Αμφεταμίνη, μεθαμφεταμίνη	Ούρα
νορντιζεπάμη	Ορός, ούρα
λοραζεπάμη	Ορός, ούρα
Μεταβολίτες της ηρωΐνης	Ορός
Μεθαδόνη, μεταβολίτες της κοκαΐνης	Αίμα
Κανναβινοειδή	Ούρα

Πίνακας 8.3. Χαρακτηριστικές εφαρμογές-ενώσεις-στόχοι που αναλύονται με FPIA

8.5. Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα Ανοσοχημικών Τεχνικών

Οι ανοσοχημικές τεχνικές πλεονεκτούν σε σχέση με άλλες αναλυτικές τεχνικές ως προς τα εξής: Παρέχουν μεγάλη ευαισθησία και χαμηλά όρια ανίχνευσης καθώς είναι δυνατή η ενίσχυση σήματος, έχουν μεγάλη ειδικότητα, μειωμένη ανάγκη για προετοιμασία του δείγματος και χαμηλό λόγο κόστους/ανάλυσης που μπορεί να επιτευχθεί όταν η ανάλυση εφαρμόζεται σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων. Υπάρχει δυνατότητα αυτοματοποίησης αλλά ακόμα και προσαρμογής σε μικρό, φορητό κιτ, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ακόμη και εκτός εργαστηρίου. Το πιο γνωστό παράδειγμα αυτού είναι το τεστ κηρίσματος με το οποίο μετράται η ορμόνη χοριακή γοναδοτροπίνη σε ούρα.

Ως μειονεκτήματα των ανοσοχημικών τεχνικών μπορούν να θεωρηθούν οι πιθανές θετικές παρεμπόδισεις από ενώσεις οι οποίες μπορεί να προσδεθούν στο αντίσωμα, στο κέντρο δέσμευσης (διασταυρούμενες αντιδράσεις από συγγενικής δομής ενώσεις) ή με άλλο μη-εκλεκτικό τρόπο. Ένα παράδειγμα αυτών είναι π.χ. στην τοξικολογική ανάλυση για έλεγχο χρήσης ηρωΐνης. Το αντίσωμα που χρησιμοποιείται στην ανάλυση αυτή, αναγνωρίζει την 6 μονο-ακετυλο-μορφίνη (βασικό μεταβολίτη της ηρωΐνης). Στο αντίσωμα, όμως, αυτό δεσμεύονται και άλλα οπιούχα, όπως κωδεΐνη, η οποία είναι συνταγογραφούμενο φάρμακο, οπότε υπάρχει κίνδυνος για ψευδώς θετικά αποτελέσματα (false positive). Άλλα μειονεκτήματα είναι οι περιορισμοί στην προμήθεια αντιδραστηρίων και ο μεγάλος χρόνος και το κόστος για δοκιμασία και ανάπτυξη μεθόδου. Αν τα αντισώματα εναντίον της ενώσεως-στόχου δεν είναι εμπορικά διαθέσιμα, απαιτούνται τουλάχιστον 6 μήνες για συλλογή, καθαρισμό και έλεγχο αυτών, πριν την πρώτη δοκιμή για ανάπτυξη της αναλυτικής μεθόδου. Επίσης, συνήθως, η γραμμικότητα της απόκρισης είναι περιορισμένη και η ποσοτικοποίηση όχι ιδιαίτερα ικανοποιητική, ειδικά στις μεθόδους ανταγωνισμού, όπου μπορεί να υπάρξει κορεσμός των κέντρων δέσμευσης.

Θα πρέπει να τονιστεί ότι οι ανοσοχημικές τεχνικές δεν είναι λύση για όλα τα προβλήματα. Πέρα από τους περιορισμούς που αναφέρονται παραπάνω, πρέπει να γίνει κατανοητό ότι υπάρχουν πολλά μόρια-στόχοι (κυρίως πολύ μικρά μόρια) τα οποία είναι ακατάλληλα για τη δημιουργία αντισωμάτων, διότι δε διαθέτουν επιτοπικά κέντρα και επομένως δεν μπορούν να μετρηθούν με ανοσοχημικές τεχνικές.

Κατάλληλα αντιγόνα είναι γενικά τα μεγάλα μόρια που έχουν ανοσογόνο δράση και περιέχουν δεκάδες ενεργά κέντρα όπως αμινομάδες, καρβοξυλομάδες κλπ. Η διάταξη αυτών των ομάδων στο χώρο μπορεί να προσφέρει χαρακτηριστικές τρισδιάστατες δομές οι οποίες θα αναγνωριστούν από το αντίσωμα με ειδικότητα και μεγάλη συνάφεια (σταθερά δέσμευσης). Αντίθετα τα μικρά μόρια (<1000 amu) μπορεί να έχουν αντιγονική δράση, αλλά δεν έχουν ανοσογονική δράση, γιατί είναι πολύ μικρά σε μέγεθος. Αυτό σημαίνει ότι ένα μικρό μόριο, ακόμη και εάν έχει επαρκείς ενεργές ομάδες (επιτοπικά κέντρα), όταν εισαχθεί σε πειραματόζωο, δε θα προκαλέσει δημιουργία αντισωμάτων. Τέτοια μικρά μόρια πρέπει να δεσμευθούν σε φέρουσα πρωτεΐνη με κατάλληλες χημικές αντιδράσεις. Το προϊόν της αντίδρασης πρέπει να ελεγχθεί στη συνέχεια με φασματοσκοπικές τεχνικές (NMR, MS) ώστε να επιβεβαιωθεί η επιτυχής δέσμευση. Στη συνέχεια το καθαρισμένο σύμπλοκο πρωτεΐνης-αντιγόνου πρέπει να εισαχθεί, συνήθως, με υποδόρια ένεση σε πειραματόζωα και ακολουθεί η διαδικασία που αναφέρθηκε σε προηγούμενη παράγραφο.

Για την ανάπτυξη ανοσοχημικής τεχνικής απαιτούνται αρκετά πειράματα για τη βελτιστοποίηση των τεχνικών και την επιλογή συνθηκών, αντιδραστηρίων και συγκεντρώσεων αυτών. Είναι, λοιπόν, προφανές ότι οι μέθοδοι ανοσοχημικής ανάλυσης δεν αναπτύσσονται γρήγορα, εύκολα και οικονομικά και η ανάπτυξη μεθόδου προϋποθέτει την εφαρμογή σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων.

8.6. Εφαρμογές Ανοσοχημικών Τεχνικών

Από τη στιγμή που θα αναπτυχθεί μια ανοσοχημική τεχνική, εφόσον υπάρχει ανάγκη των προσδιορισμών που προσφέρει, η χρήση της είναι ευρεία σε αναλύσεις ρουτίνας για ορμόνες, φάρμακα, βιταμίνες, ένζυμα, πρωτεΐνες-βιοδείκτες, αντιγόνα, ιούς, νουκλεοτίδια, τοξίνες, αντισώματα, φυτοφάρμακα, αναβολικά, κλπ. καθώς υπάρχει δυνατότητα πλήρους αυτοματοποίησης, με ρομποτικούς αναλυτές που διατίθενται από εμπορικές εταιρίες. Στο **Σχήμα 8.9** φαίνεται ένα αυτοματοποιημένο σύστημα ανοσοχημικής ανάλυσης το οποίο εφαρμόζεται σε αναλύσεις ρουτίνας.

Έτσι, οι ανοσοχημικές τεχνικές εφαρμόζονται, κυρίως, στην κλινική ανάλυση σε μικροβιολογικά/βιοχημικά εργαστήρια, σε νοσοκομεία, για διαγνωστικούς σκοπούς (μέτρηση βιοδεικτών), για την

παρακολούθηση θεραπευτικής δόσης φαρμάκου, για τον έλεγχο φαρμακοδιέγερσης (antidoping control) καθώς και για τοξικολογικές αναλύσεις στην ιατροδικαστική, σε βάση ρουτίνας.



Σχήμα 8.9. Αυτόματοι ανοσοχημικοί αναλυτές. Οι αναλυτές μπορούν να δεχτούν δεκάδες δείγματα σε ψυχόμενο χώρο, ενώ τα αντιδραστήρια και οι διαλύτες πλύσης βρίσκονται σε ειδικές φιάλες. Συνοδεύονται από υπολογιστή με λογισμικό, το οποίο δίνει αυτόματα τα τελικά αποτελέσματα. (Πηγή: www.abbottdiagnostics.com/)

Αυτό είναι εφικτό γιατί οι ανοσοχημικές τεχνικές δεν απαιτούν ιδιαίτερα εξειδικευμένο προσωπικό. Πολλές τέτοιες αναλύσεις έχουν οργανωθεί σε kits τα οποία περιέχουν όλα τα αντιδραστήρια αλλά και σαφείς οδηγίες χρήσης τύπου SOP (standard operating protocol) που μπορεί εύκολα να χειριστεί το παρειατρικό προσωπικό. Η χρήση των έτοιμων kit μπορεί σε κάποιες περιπτώσεις να έχει υψηλότερο κόστος, αλλά εξασφαλίζει την ποιότητα των αποτελεσμάτων και σε περιπτώσεις πολλών διαφορετικών χειριστών/αναλυτών.

Επίσης είναι σημαντικό να τονιστεί ότι εφαρμόζονται ιδανικά σε μορφή πλακών πολλαπλών θέσεων π.χ. 96 θέσεων. Έτσι, ενώ απαιτείται χρόνος 3-5 ωρών για την ολοκλήρωση μιας ανάλυσης, η ανάλυση αυτή πραγματοποιείται για πολλά δείγματα ταυτόχρονα.

Επιπλέον, δεν απαιτείται επίπονη και απαιτητική κατεργασία δείγματος. Τα kits έχουν αναπτυχθεί και επικυρωθεί για απευθείας εφαρμογή βιολογικών δειγμάτων π.χ. αίματος ή ούρων. Αυτή η άμεση εφαρμογή στην ανάλυση προσφέρει σημαντικό κέρδος τόσο οικονομικό όσο και χρόνου, στην περίπτωση μεγάλου αριθμού αναλύσεων σε καθημερινή βάση.

Βιβλιογραφία

- Chiu N.H.L., Christopoulos T.K. (2012). *Advances in Immunoassay Technology*, InTech, Chapters.
- Crowther J R. (2009). *The ELISA Guidebook Second Edition*, Springer.
- Crowther J. R. (1995). *ELISA: Theory and Practice*, Springer Science & Business Media.
- Diamandis E.P., Christopoulos T.K. (1996). *Immunoassay*, Academic Press.
- Gabor F., Hoffmann O., Pittner F., Wirth M. (2002). *Analytical Biotechnology, Immunoanalytical Methods, Methods and Tools in Biosciences and Medicine*, pp 93-133.
- Kemeny D.M., Challacombe S. (1988). *ELISA and Other Solid Phase Immunoassays: Theoretical and Practical Aspects*, John Wiley & Sons.
- Law B. (1996). *Immunoassay: A Practical Guide*, CRC Press.
- Maragos C. (2009). *Fluorescence Polarization Immunoassay of Mycotoxins: A Review*, *Toxins (Basel)*, 1(2), 196-207.

Pieper J.A. (1989). *Laboratory techniques for pharmacists (Current concepts)*, Upjohn, ISBN-10: 0895010275.

Wild D. (2005). *The Immunoassay Handbook*, Gulf Professional Publishing.

Κεφάλαιο 9: Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση

Αναστασία-Στέλλα Ζώτου

Σύνοψη

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζονται οι βασικές αρχές λειτουργίας της τεχνικής της Τριχοειδούς Ηλεκτροφόρησης, οι αναλυτικές παράμετροι, οι διάφοροι τρόποι διαχωρισμού, η οργανολογία και οι λειτουργικές παράμετροι της τεχνικής. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στην ανίχνευση με χρήση φασματομετρίας μαζών.

Προαπαιτούμενη γνώση

Για την καλύτερη κατανόηση των εννοιών του κεφαλαίου, χρήσιμη γνώση για τον αναγνώστη μπορεί να βρεθεί σε συγγράμματα Ενόργανης Ανάλυσης, Βιοχημείας και Βιολογίας.

9.1. Εισαγωγή – Ιστορική Αναδρομή

Ως *Ηλεκτροφόρηση* ορίζεται η διαφορική κίνηση φορτισμένων ειδών (ιόντων) με έλξη ή άπωση σε ηλεκτρικό πεδίο. Στην πράξη, ένα θετικό (άνοδος) και ένα αρνητικό ηλεκτρόδιο (κάθοδος) τοποθετούνται σε διάλυμα που περιέχει ιόντα. Όταν εφαρμοστεί τάση μεταξύ των ηλεκτροδίων, τα ανιόντα και τα κατιόντα του διαλύματος θα μετακινηθούν προς το ηλεκτρόδιο αντίθετου φορτίου. Η Ηλεκτροφόρηση ως τεχνική διαχωρισμού, έγινε γνωστή από τον Tiselius το 1937, ο οποίος τοποθετώντας μίγματα πρωτεϊνών μεταξύ ρυθμιστικών διαλυμάτων σε ένα σωλήνα και εφαρμόζοντας ηλεκτρικό πεδίο, διαπίστωσε ότι τα συστατικά του δείγματος μετανάστευσαν σε μια κατεύθυνση και με ένα ρυθμό, ο οποίος καθορίζεται από το φορτίο και την ευκινησία τους.

Η απόδοση του διαχωρισμού σε ελεύθερο διάλυμα, όπως πραγματοποιήθηκε από τον Tiselius, υπόκειται σε περιορισμούς λόγω θερμικής διάχυσης και μεταγωγής της θερμότητας. Για το λόγο αυτό, η Ηλεκτροφόρηση παραδοσιακά έχει πραγματοποιηθεί σε μέσα που δε μεταδίδουν τη θερμότητα, όπως πηκτές πολυακρυλαμιδίου ή αγαρόζης. Η Ηλεκτροφόρηση με πηκτή σε επίπεδη διάταξη, ή αλλιώς *Ηλεκτροφόρηση Πλάκας* (slab-gel electrophoresis) ή σε κυλινδρικούς σωλήνες έχει χρησιμοποιηθεί, κατά κύριο λόγο, για τον εξαρτώμενο από το μέγεθος διαχωρισμό βιολογικών μακρομορίων, όπως νουκλεϊκά οξέα και πρωτεΐνες.

Αν και είναι μια από τις πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενες τεχνικές διαχωρισμού, η Ηλεκτροφόρηση Πλάκας, πάσχει γενικά από μακρούς χρόνους ανάλυσης, και χαμηλές αποδόσεις και δυσκολίες στην ανίχνευση και τον αυτοματισμό. Μια εναλλακτική λύση για τη διάταξη σε επίπεδη μορφή είναι η εκτέλεση του ηλεκτροφορητικού διαχωρισμού σε ανοικτούς σωλήνες μικρής διαμέτρου ή σε τριχοειδείς.

Οι πρώτες εργασίες με ηλεκτροφόρηση σε ανοικτούς σωλήνες, δημοσιεύονται από τον Hjerten το 1967, με περιστροφή των σωλήνων κατά μήκος του διαμήκους άξονά τους για την ελαχιστοποίηση των επιπτώσεων της μεταγωγής θερμότητας. Αργότερα ο Virtanen και στη συνέχεια οι Mikkers και Everaerts πραγματοποίησαν Ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδείς κατασκευασμένους από γυαλί και τεφλόν αντίστοιχα, με εσωτερική διάμετρο (id) περίπου 200 μm. Στις αρχές της δεκαετίας του 1980, οι Jorgenson και Lukacs προώθησαν την τεχνική με τη χρήση τριχοειδούς, 75 μm id, από τηγμένο οξειδίο του πυριτίου. Ο Jorgenson διατύπωσε, επίσης τη θεωρία, περιέγραψε τις σχέσεις μεταξύ των λειτουργικών παραμέτρων και της ποιότητας διαχωρισμού και ανέδειξε το δυναμικό της Τριχοειδούς Ηλεκτροφόρησης ως αναλυτικής τεχνικής.

9.2. Αρχές Λειτουργίας

Η *Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση* (Capillary Electrophoresis, CE) μπορεί να θεωρηθεί ως η ενόργανη προσέγγιση της συμβατικής Ηλεκτροφόρησης και είναι μια διαχωριστική τεχνική υψηλής απόδοσης, στην οποία η Ηλεκτροφόρηση διεξάγεται σε στενούς τριχοειδείς σωλήνες, μικρής εσωτερικής διαμέτρου, συνήθως 25 έως 100 μm, οι οποίοι έχουν πληρωθεί με ρυθμιστικό διάλυμα και πραγματοποιούνται διαχωρισμοί τόσο μικρών όσο και μεγάλων μορίων. Οι διαχωρισμοί αυτοί διευκολύνονται από τη χρήση υψηλών τάσεων, οι οποίες δημιουργούν *ηλεκτροοσμωτική ροή* (electroosmotic flow, EOF) και *ηλεκτροφορητική ροή* των ρυθμιστικών διαλυμάτων και των φορτισμένων συστατικών, αντίστοιχα, μέσα στον τριχοειδή. Η χρήση τριχοειδούς

σωλήνα προσφέρει πολυάριθμα πλεονεκτήματα, ειδικότερα σε σχέση με τα επιβλαβή αποτελέσματα της θέρμανσης Joule. Η υψηλή ηλεκτρική αντίσταση του τριχοειδούς επιτρέπει την εφαρμογή πολύ υψηλών ηλεκτρικών πεδίων (100 έως 500 V/cm) και υψηλών τάσεων (10 έως 30 kV), με ελάχιστη μόνον παραγωγή θερμότητας. Επιπλέον, η μεγάλη αναλογία επιφανείας προς όγκο του τριχοειδούς, διαχέει αποτελεσματικά τη θερμότητα που δημιουργείται.

Η χρήση των υψηλών ηλεκτρικών πεδίων οδηγεί σε σύντομους χρόνους ανάλυσης, υψηλή απόδοση και αποτελεσματικό διαχωρισμό. Η υψηλή απόδοση, συχνά, σε περίσσεια 10^5 θεωρητικών πλακών, οφείλεται στην επίπεδη κατατομή (profile) της EOF, που είναι η ροή της κύριας μάζας του διαλύματος μέσα στον τριχοειδή. Αυτή η ροή επιτρέπει, επίσης την ταυτόχρονη ανάλυση όλων των προσδιοριζόμενων ουσιών, ανεξαρτήτως φορτίου. Οι διάφοροι τρόποι (modes) διαχωρισμού που υπάρχουν, στηρίζονται σε διαφορετικούς μηχανισμούς διαχωρισμού και προσφέρουν διαφορετική εκλεκτικότητα. Επιπλέον, οι ελάχιστες απαιτήσεις σε όγκο δείγματος (1 έως 10 nL), η δυνατότητα ανίχνευσης *επάνω στη στήλη* (on-column) και το δυναμικό της τεχνικής για ποσοτική ανάλυση και αυτοματοποίηση την καθιστούν μια διαχωριστική τεχνική υψηλών προδιαγραφών. Οι ιδιότητες των διαχωρισμών και τα ηλεκτροφερογράμματα που προκύπτουν, έχουν χαρακτηριστικά τόσο από την παραδοσιακή Ηλεκτροφόρηση Πηκτής Πολυακρυλαμίδιου (PAGE), όσο και από την Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC). Παρ' όλα αυτά, οι μηχανισμοί διαχωρισμού στη CE είναι σημαντικά διαφορετικοί απ' αυτούς της Υγρής Χρωματογραφίας κι έτσι μπορούν να προσφέρουν συμπληρωματικές αναλύσεις. Επιπλέον, η CE μπορεί να προσφέρει απλούστερη ανάπτυξη μεθόδων, ελάχιστες απαιτήσεις όγκων δείγματος και απουσία οργανικών αποβλήτων. Ένα από τα βασικότερα πλεονεκτήματα της CE είναι το ευρύ πεδίο εφαρμογών της. Ενώ αρχικά θεωρήθηκε, κατά κύριο λόγο, κατάλληλη για την ανάλυση βιολογικών μακρομορίων, αποδείχθηκε πολύ χρήσιμη για διαχωρισμούς ενώσεων, όπως αμινοξέα, χειρόμορφα φάρμακα, βιταμίνες, φυτοφάρμακα, ανόργανα ιόντα, οργανικά οξέα, χρωστικές, επιφανειοδραστικές ενώσεις, πεπτίδια και πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, ολιγονουκλεοτίδια και θραύσματα DNA και ακόμη ολόκληρα κύτταρα και σωματίδια ιών.

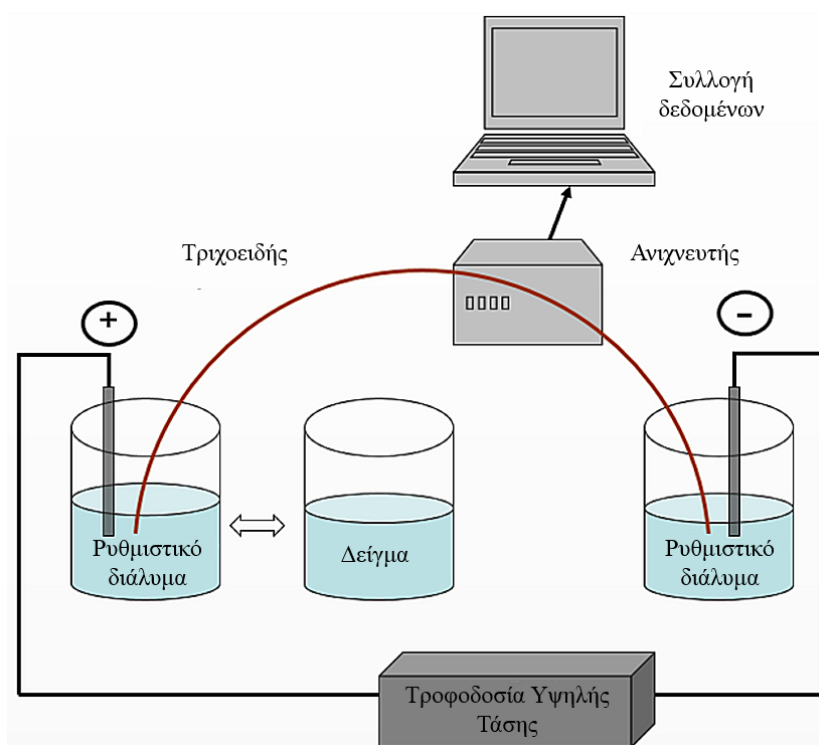
Τα βασικά χαρακτηριστικά της CE είναι:

- Χρήση τριχοειδών σωλήνων από τηγμένο οξείδιο του πυριτίου, μήκους (μέχρι τον ανιχνευτή) 10-100 cm, μικρής εσωτερικής διαμέτρου (25 έως 75 μm), εξωτερικής διαμέτρου 300-400 μm , με εξωτερική επίστρωση από πολυιμίδιο, όπου διεξάγονται οι ηλεκτροφορητικοί διαχωρισμοί.
- Εφαρμογή υψηλών τάσεων (10 έως 30 kV) και ισχυρών ηλεκτρικών πεδίων (100 έως 500 V/cm) κατά μήκος του τριχοειδούς.
- Χρήση ανιχνευτών σύγχρονης τεχνολογίας, με ανίχνευση on-column.
- Υψηλή ηλεκτρική αντίσταση του τριχοειδούς, η οποία περιορίζει τη δημιουργία ρεύματος και θέρμανσης στο εσωτερικό του.
- Υψηλή απόδοση διαχωρισμού ($N > 10^5$ ως 10^6) και σύντομοι χρόνοι ανάλυσης.
- Απαιτήση πολύ μικρών όγκων δείγματος (1 έως 50 nL).
- Κατανάλωση πολύ μικρών ποσοτήτων αντιδραστηρίων.
- Αυτοματοποιημένη οργανολογία για ακριβείς ποσοτικές αναλύσεις και ευκολία χειρισμού.
- Ποικιλία τρόπων λειτουργίας, -διαφορετικοί μηχανισμοί διαχωρισμού-, με επακόλουθη αύξηση της εκλεκτικότητας.
- Εφαρμοσιμότητα σε ευρύτερο πεδίο δειγμάτων, συγκρινόμενη με άλλες αναλυτικές διαχωριστικές τεχνικές.

Η οργανολογία που χρησιμοποιείται στη CE είναι εξαιρετικά απλή στο σχεδιασμό, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 9.1**. Τα άκρα του τριχοειδούς εμβαπτίζονται σε χωριστά δοχεία, τα οποία περιέχουν ρυθμιστικό διάλυμα. Σε κάθε δοχείο εμβαπτίζεται και ένα ηλεκτρόδιο, το οποίο συνδέεται με πηγή τροφοδοσίας υψηλής τάσης, ικανής να παρέχει μέχρι 30 kV. Μετά την πλήρωση του τριχοειδούς με ρυθμιστικό διάλυμα, το δείγμα μπορεί να εισαχθεί στον τριχοειδή, αντικαθιστώντας προσωρινά ένα από τα δοχεία του ρυθμιστικού διαλύματος (συνήθως στην άνοδο), με ένα δοχείο που περιέχει δείγμα και εφαρμόζοντας ηλεκτρικό δυναμικό ή εξωτερική πίεση, για λίγα δευτερόλεπτα. Μετά από την επανατοποθέτηση του δοχείου με το ρυθμιστικό διάλυμα, εφαρμόζεται ηλεκτρικό δυναμικό κατά μήκος του τριχοειδούς και πραγματοποιείται ο διαχωρισμός. Με ένα μη επεξεργασμένο τριχοειδή οξειδίου του πυριτίου, η ηλεκτροώσμωση προκαλεί τη ροή του ρυθμιστικού διαλύματος από την άνοδο προς την κάθοδο.

Η CE αυτοματοποιείται εύκολα και η διάταξη των εμπορικών οργάνων φαίνεται οικεία σε όσους έχουν γνώση των σύγχρονων οργάνων της HPLC. Έτσι, αν λάβουμε υπόψη ότι η παροχή ηλεκτρικού ρεύματος ισοδυναμεί με μία αντλία HPLC και ο τριχοειδής είναι ισοδύναμος με μία στήλη, η οργανολογία είναι εντελώς ανάλογη. Ένα πλήρως αυτοματοποιημένο σύγχρονο όργανο CE περιλαμβάνει έναν αυτόματο δειγματολήπτη, μια μονάδα ανίχνευσης, ένα τροφοδοτικό υψηλής τάσης, τον τριχοειδή και φυσικά έναν υπολογιστή, ο οποίος προσφέρει τον έλεγχο του συνόλου των εργασιών, αυτοματοποιημένες μεθόδους ανάπτυξης, ακριβή έλεγχο της θερμοκρασίας και ένα προηγμένο σύστημα απαγωγής της θερμότητας. Οι αυτοματισμοί είναι κρίσιμοι για τη CE, δεδομένου ότι οι επαναλαμβανόμενες λειτουργίες είναι απαραίτητες για ακριβή ποσοτική ανάλυση. Τα πακέτα λογισμικού που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο των περισσότερων εμπορικών οργάνων CE βασίζονται σε μεγάλο βαθμό σε ήδη υπάρχον λογισμικό HPLC.

Σχεδόν το σύνολο των εργασιών με CE, πριν από το 1988, διενεργούνταν σε αυτοσχέδιες συσκευές, των οποίων ο σχεδιασμός βασιζόταν στη διάταξη του **Σχήματος 9.1**. Ενώ ήταν σχετικά εύκολα στη χρήση τους για πειραματισμό, αυτά τα πρώιμα συστήματα ήταν ακατάλληλα για ποσοτικές αναλύσεις ρουτίνας.



Σχήμα 9.1. Σχηματική απεικόνιση της οργανολογίας της CE

9.3. Θεωρία

9.3.1. Ορολογία της Ηλεκτροφόρησης

Υπάρχουν μερικές σημαντικές διαφορές μεταξύ της ονοματολογίας της Χρωματογραφίας και της CE. Για παράδειγμα, ένας θεμελιώδης όρος στη Χρωματογραφία είναι ο χρόνος συγκράτησης. Στην Ηλεκτροφόρηση, υπό ιδανικές συνθήκες, τίποτα δε συγκρατείται, οπότε, ο ανάλογος όρος γίνεται *χρόνος μετανάστευσης*. Ο *χρόνος μετανάστευσης* (t_m), είναι ο χρόνος που χρειάζεται μια προσδιοριζόμενη ουσία για να μετακινηθεί από το άκρο εισόδου του τριχοειδούς, μέχρι το παράθυρο του ανιχνευτή. Άλλοι βασικοί όροι ορίζονται παρακάτω. Αυτοί περιλαμβάνουν την *ηλεκτροφορητική ευκινησία*, μ_{ep} (cm^2/Vs), την *ηλεκτροφορητική ταχύτητα*, v_{ep} (cm/s) και την *ένταση του ηλεκτρικού πεδίου*, E (V/cm). Οι σχέσεις μεταξύ αυτών των παραμέτρων δίνονται στις επόμενες ενότητες.

Για ανίχνευση επάνω στη στήλη (on-column), δύο μήκη του τριχοειδούς είναι σημαντικά: το *μήκος μέχρι τον ανιχνευτή*, L_d , και το *ολικό μήκος*, L_t . Ενώ ο μετρήσιμος διαχωρισμός λαμβάνει χώρα στο τμήμα L_d του τριχοειδούς, η ένταση του πεδίου υπολογίζεται διαιρώντας την τάση (V) προς το συνολικό μήκος του

τριχοειδούς, L_t . Το υπόλοιπο μήκος του τριχοειδούς, $L_t - L_d$, απαιτείται για να γίνει η σύνδεση με τον ηλεκτρολύτη στο δοχείο εξόδου (βλέπε Σχήμα 9.1). Το μήκος αυτό ποικίλλει στα διάφορα εμπορικά όργανα CE από 5-10 cm. Αν αντιστρέψουμε τη συμβατική διαμόρφωση του συστήματος, στην οποία η εισαγωγή δείγματος γίνεται από την πλευρά της ανόδου, το μικρό αυτό μήκος του τριχοειδούς μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να εκτελεστούν ταχύτατοι διαχωρισμοί. Στην περίπτωση αυτή, δηλαδή, η εισαγωγή δείγματος γίνεται από την πλευρά της εξόδου, οπότε το δείγμα διανύει πολύ μικρότερη απόσταση μέχρι τον ανιχνευτή. Όταν η ανίχνευση πραγματοποιείται εκτός του τριχοειδούς (off-column), όπως για παράδειγμα με φασματομετρία μάζας, τα δύο μήκη είναι ταυτόσημα. Η γνώση των δύο μηκών είναι σημαντική, αφού ο χρόνος μετανάστευσης και η ευκινησία ορίζονται από το αποτελεσματικό μήκος, ενώ το ηλεκτρικό πεδίο ορίζεται από το συνολικό μήκος.

9.3.2. Ηλεκτροφόρηση

Ο διαχωρισμός στην Ηλεκτροφόρηση βασίζεται στις διαφορές στην ταχύτητα της μετανάστευσης των ιόντων, η οποία μπορεί να εκφραστεί από την εξίσωση:

$$v_{ep} = \mu_{ep} E \quad (9.1)$$

όπου: v_{ep} = ταχύτητα μετανάστευσης του ιόντος ή ηλεκτροφορητική ταχύτητα (cm/s)
 μ_{ep} = ηλεκτροφορητική ευκινησία (cm^2/Vs)
 E = ένταση ηλεκτρικού πεδίου (V/cm)

Η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου είναι συνάρτηση της εφαρμοζόμενης τάσης διαιρούμενης με το συνολικό μήκος του τριχοειδούς. Η ηλεκτροφορητική ευκινησία δείχνει πόσο γρήγορα ένα συγκεκριμένο ιόν ή μια προσδιοριζόμενη ουσία μπορεί να κινηθεί μέσα από ένα δεδομένο μέσο (όπως ένα ρυθμιστικό διάλυμα). Είναι μια έκφραση της ισορροπίας των δυνάμεων οι οποίες επενεργούν σε κάθε ιόν. Η ηλεκτρική δύναμη δρα υπέρ της κίνησης, ενώ η δύναμη τριβής κατά της κίνησης του ιόντος. Δεδομένου ότι αυτές οι δυνάμεις είναι σε μια σταθερή κατάσταση κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης, η ηλεκτροφορητική ευκινησία είναι μια σταθερά (για ένα δεδομένο ιόν υπό δεδομένες συνθήκες). Η εξίσωση που περιγράφει την ηλεκτροφορητική ευκινησία είναι:

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (9.2)$$

όπου: q = φορτίο του ιόντος
 η = ιξώδες του διαλύματος
 r = ακτίνα του ιόντος

Το φορτίο του ιόντος (q) είναι σταθερό για πλήρως διστάμενα ιόντα, όπως ισχυρά οξέα ή μικρά ιόντα, αλλά μπορεί να επηρεαστεί από μεταβολές του pH στην περίπτωση των ασθενών οξέων ή βάσεων. Η ακτίνα του ιόντος (r) μπορεί να επηρεαστεί από ιόν αντίθετου φορτίου που βρίσκεται στο διάλυμα, ή από οποιουδήποτε συμπλοκοποιητές που χρησιμοποιούνται. Από την εξίσωση (9.2) βλέπουμε ότι, οι διαφορές στην ηλεκτροφορητική ευκινησία προκαλούνται από διαφορές στην αναλογία φορτίου - προς - μέγεθος των ιόντων του δείγματος. Μεγαλύτερο φορτίο και μικρότερο μέγεθος ιόντος προσδίδουν μεγαλύτερη ευκινησία, ενώ χαμηλότερο φορτίο και μεγαλύτερο μέγεθος προσδίδουν μικρότερη ευκινησία.

Η ηλεκτροφορητική ευκινησία που βρίσκεται, συνήθως, σε τυποποιημένους πίνακες, είναι μια φυσική σταθερά, που προσδιορίζεται στο σημείο της πλήρους φόρτισης μιας ουσίας και επεκτείνεται σε άπειρη αραιώση. Αυτή η τιμή, συνήθως, διαφέρει από εκείνη που προσδιορίζεται πειραματικά. Η τελευταία ονομάζεται *αποτελεσματική ευκινησία*, δίνεται από την εξίσωση (9.3) και συχνά εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το pH και τη σύνθεση του ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης.

$$\mu_{eff} = \alpha_i \mu_{ep} \quad (9.3)$$

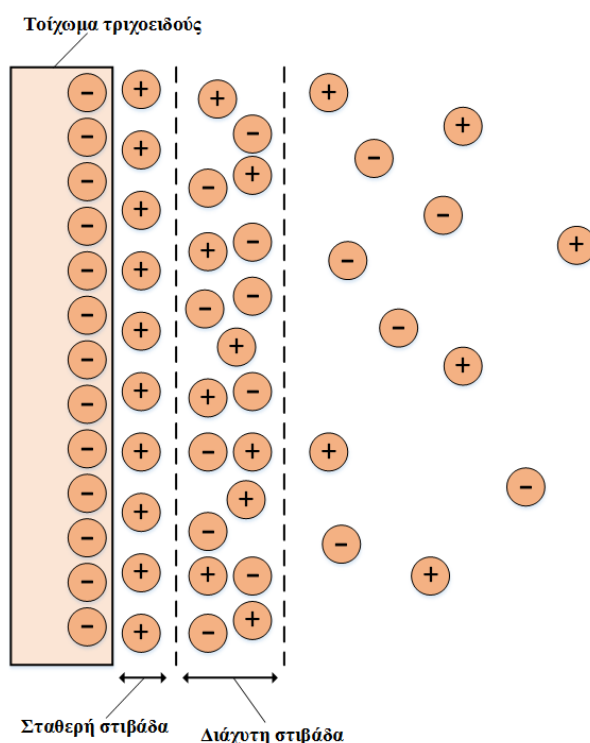
όπου: α_i = βαθμός ιοντισμού (ή διάστασης) ενός μορίου

Στις επόμενες ενότητες η αποτελεσματική ευκινησία απλά εκφράζεται με μ_{ep} .

9.3.3. Ηλεκτροοσμωτική Ροή

Ένα βασικό συστατικό της λειτουργίας της CE είναι η *ηλεκτροοσμωτική ή ηλεκτροενδοσμωτική ροή* (EOF). Η EOF είναι η μαζική ροή του υγρού διαμέσου του τριχοειδούς και αποτελεί συνέπεια του επιφανειακού φορτίου στα τοιχώματα του τριχοειδούς. Οι τριχοειδείς από τηγμένο οξείδιο του πυριτίου, που χρησιμοποιούνται, συνήθως, για διαχωρισμούς, έχουν ιοντισμένες σιλανολικές ομάδες (SiO^-), οι οποίες βρίσκονται σε επαφή με το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (background electrolyte, BGE) που περιέχεται στον τριχοειδή. Ο βαθμός ιοντισμού ελέγχεται, κυρίως, από το pH του ρυθμιστικού διαλύματος. Η pK_a των επιφανειακών σιλανολικών ομάδων είναι δύσκολο να προσδιοριστεί και ως επί το πλείστον δεν είναι γνωστή σε γενικές γραμμές, όμως η EOF γίνεται σημαντική σε τιμές $\text{pH} > 4$. Μη-ιοντικά υλικά όπως το τεφλόν, παρουσιάζουν επίσης EOF, η οποία προφανώς, προκύπτει από προσρόφηση ανιόντων. Σε κάθε περίπτωση, σε υδατικό περιβάλλον, οι περισσότερες στερεές επιφάνειες έχουν περίσσεια αρνητικών φορτίων. Αυτό μπορεί να προκύψει από τον ιοντισμό της επιφάνειας (δηλαδή, ισορροπίες οξέων-βάσεων) ή / και από την προσρόφηση ιοντικών ενώσεων στην επιφάνεια. Για το τηγμένο οξείδιο του πυριτίου και οι δύο διαδικασίες πιθανώς συμβαίνουν, αν και η EOF ελέγχεται πιο έντονα από τις πολυάριθμες σιλανολικές ομάδες (SiOH) οι οποίες μπορεί να υπάρχουν σε ανιοντική μορφή (SiO^-).

Όταν ο τριχοειδής, από τηγμένο οξείδιο του πυριτίου, γεμίζεται με ρυθμιστικό διάλυμα, τα αρνητικά φορτισμένα τοιχώματά του (SiO^-) προσελκύουν τα θετικά φορτισμένα ιόντα από το ρυθμιστικό διάλυμα, με αποτέλεσμα να δημιουργούν μια ηλεκτρική διπλοστιβάδα και μια διαφορά δυναμικού (*ζήτα δυναμικό*) κοντά στα τοιχώματα του τριχοειδούς, όπως περιγράφεται από το μοντέλο του Stern (**Σχήμα 9.2**). Το μοντέλο του Stern για μια ηλεκτρική διπλοστιβάδα, περιλαμβάνει μια σταθερή στιβάδα προσροφημένων ιόντων και μια διάχυτη στιβάδα, στην οποία η διάχυση των ιόντων μπορεί να γίνει με θερμική κίνηση. Το ζήτα δυναμικό είναι το δυναμικό σε οποιοδήποτε δεδομένο σημείο στη διπλοστιβάδα και μειώνεται εκθετικά με την αύξηση της απόστασης από την επιφάνεια των τοιχωμάτων του τριχοειδούς.



Σχήμα 9.2 . Μοντέλο του Stern για την κατανομή της διπλοστιβάδας φορτίου στα αρνητικά φορτισμένα τοιχώματα του τριχοειδούς, το οποίο οδηγεί στην ανάπτυξη του ζήτα δυναμικού και της EOF.

Όταν εφαρμόζεται τάση κατά μήκος του τριχοειδούς, τα κατιόντα στη διάχυτη στιβάδα έλκονται προς την κάθοδο και επειδή είναι επιδιалυτωμένα παρασύρουν και την κύρια μάζα του διαλύματος. Το αποτέλεσμα είναι μια καθαρή ροή (EOF) προς την κατεύθυνση της καθόδου. Αυτή η EOF μπορεί να είναι αρκετά ισχυρή, με γραμμική ταχύτητα περίπου 2 mm/s, σε pH 9, με 20 mM ρυθμιστικού διαλύματος βορικών. Για τριχοειδή εσωτερικής διαμέτρου 50 μm, αυτό μεταφράζεται σε μια ροή όγκου περίπου 4 nL/s. Σε pH 3, η EOF είναι πολύ χαμηλότερη, περίπου 0,5 nL/s.

Η γραμμική ταχύτητα της EOF περιγράφεται από τον τύπο:

$$v_{eo} = \left(\frac{\varepsilon\zeta}{4\pi\eta} \right) E \quad (9.4)$$

όπου: v_{eo} = ταχύτητα της EOF
 ε = διηλεκτρική σταθερά του ρυθμιστικού διαλύματος
 η = ιξώδες του ρυθμιστικού διαλύματος
 ζ = ζήτα δυναμικό
 E = ένταση του εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου

Οι όροι που περικλείονται στην παρένθεση, ισοδυναμούν με την ευκινησία (μ_{eo}) της ηλεκτροοσμωτικής ροής:

$$\mu_{eo} = \frac{\varepsilon\zeta}{4\pi\eta} \quad (9.5)$$

Η σχέση μεταξύ της ευκινησίας και της ταχύτητας της EOF είναι ανάλογη με εκείνη μεταξύ ηλεκτροφορητικής ευκινησίας και ταχύτητας μετανάστευσης. Πράγματι, οι μονάδες για την ευκινησία της EOF είναι οι ίδιες με εκείνες για την ηλεκτροφορητική ευκινησία.

Οι κύριες παράμετροι που επηρεάζουν την ευκινησία της EOF είναι: α) η διηλεκτρική σταθερά και το ιξώδες του ρυθμιστικού διαλύματος και β) το μέγεθος του ζήτα δυναμικού. Η χρήση προσθέτων στο ρυθμιστικό διάλυμα ή/και άλλες τροποποιήσεις στη σύνθεση του ρυθμιστικού διαλύματος, μπορεί να επηρεάσουν τη διηλεκτρική σταθερά και το ιξώδες του ρυθμιστικού διαλύματος. Το ιξώδες του ρυθμιστικού διαλύματος θα εξαρτηθεί, επίσης από τη θερμοκρασία στην οποία διεξάγεται ο διαχωρισμός.

Το ζήτα δυναμικό καθορίζεται ουσιαστικά από το επιφανειακό φορτίο στα τοιχώματα του τριχοειδούς. Δεδομένου ότι το φορτίο, σε μεγάλο βαθμό, εξαρτάται από το pH, το μέγεθος της EOF ποικίλλει ανάλογα με το pH. Σε υψηλό pH (pH>9), όπου οι σιλανόλες αποπρωτονιώνονται (πλήρως ιοντισμένες), η EOF είναι σημαντικά μεγαλύτερη απ' ό,τι σε χαμηλό pH (pH<4), όπου είναι πρωτονιωμένες και η ευκινησία της EOF είναι ασήμαντη. Ανάλογα με τις ειδικές συνθήκες, η EOF μπορεί να μεταβάλλεται κατά περισσότερο από μια τάξη μεγέθους, μεταξύ pH 2 και 12. Το ζήτα δυναμικό εξαρτάται, επίσης, από την ιοντική ισχύ του ρυθμιστικού διαλύματος, όπως περιγράφεται από τη θεωρία του διπλού στρώματος του Stern. Αυξημένες τιμές ιοντικής ισχύος έχουν ως αποτέλεσμα τη συμπίεση του διπλού στρώματος, μειωμένο ζήτα δυναμικό και μειωμένη EOF. Δηλαδή, με αύξηση της συγκέντρωσης του ηλεκτρολύτη ελαττώνεται η EOF.

Σε pH > 7, η ευκινησία της EOF είναι επαρκής για να διασφαλιστεί η καθαρή μετανάστευση των περισσότερων ιόντων προς την κάθοδο, ανεξάρτητα από το φορτίο τους. Έτσι, η παρατηρούμενη ταχύτητα μετανάστευσης ενός ιόντος μπορεί να μη σχετίζεται άμεσα με την ηλεκτροφορητική του ευκινησία. Αντίθετα, συνδέεται με ένα συνδυασμό και των δύο, δηλαδή, της ηλεκτροφορητικής του ευκινησίας και της ευκινησίας της EOF. Έτσι, η φαινόμενη ηλεκτροφορητική ευκινησία ενός ιόντος (μ_a), η οποία υπολογίζεται από την παρατηρούμενη ταχύτητα μετανάστευσής του, είναι το διανυσματικό άθροισμα της πραγματικής (ή αποτελεσματικής) ηλεκτροφορητικής ευκινησίας του (μ_{ep}) και της ευκινησίας της EOF (μ_{eo}), δηλαδή:

$$\mu_a = \mu_{ep} + \mu_{eo} \quad (9.6)$$

Δεδομένου ότι τα δείγματα, συνήθως, εισάγονται στην άνοδο και η EOF κινείται από την άνοδο προς την κάθοδο, τα κατιόντα έχουν θετική μ_{ep} , τα ουδέτερα έχουν μηδενική μ_{ep} και τα ανιόντα έχουν αρνητική μ_{ep} .

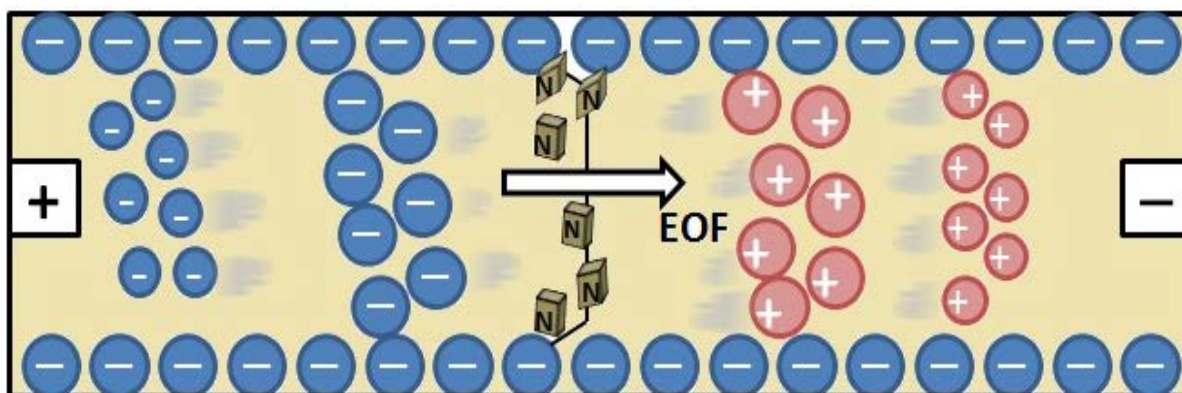
Με άλλα λόγια, τα κατιόντα μεταναστεύουν ταχύτερα από την EOF, τα ανιόντα πιο αργά από ό,τι η EOF και τα ουδέτερα είδη μεταναστεύουν με την ίδια ταχύτητα με την EOF.

Η EOF πρέπει να ελέγχεται ή ακόμη και να καταργείται, προκειμένου να λειτουργήσουν στην πράξη ορισμένοι τρόποι διαχωρισμού στη CE, όπως η ισοηλεκτρική εστίαση ή η ισοταχοφόρηση. Αυτό είναι δυνατόν, εάν χρησιμοποιηθεί τριχοειδής από μη-ιοντικό υλικό, όπως τεφλόν, ή ένας τριχοειδής με τοιχώματα κατάλληλα επικαλυμμένα. Πρόσθετα στο ρυθμιστικό διάλυμα, όπως η μεθυλοκυτταρίνη, είναι, επίσης, αποτελεσματικά στην καταστολή της EOF. Από την άλλη πλευρά, η EOF καθιστά δυνατή την ταυτόχρονη ανάλυση κατιόντων, ανιόντων και ουδέτερων ειδών σε μια μόνο ανάλυση. Σε ουδέτερο έως αλκαλικό pH, η EOF είναι επαρκώς ισχυρότερη από την ηλεκτροφορητική μετανάστευση, έτσι ώστε όλα τα είδη τελικώς σαρώνονται προς το αρνητικό ηλεκτρόδιο. Η σειρά της μετανάστευσης είναι κατιόντα, ουδέτερα και ανιόντα.

Ας φανταστούμε τη μετανάστευση μέσα στον τριχοειδή ενός διπολικού ιόντος (zwitterion), όπως ένα πεπτιδίο, σε δύο διαφορετικά pH. Σε υψηλό pH, η EOF είναι μεγάλη και το πεπτιδίο είναι αρνητικά φορτισμένο. Παρά την ηλεκτροφορητική ευκινησία του πεπτιδίου προς το θετικό ηλεκτρόδιο (άνοδος), η EOF λόγω του μεγάλου μεγέθους της, το παρασύρει και τελικά το πεπτιδίο μεταναστεύει προς το αρνητικό ηλεκτρόδιο (κάθοδος). Σε χαμηλό pH, το πεπτιδίο είναι θετικά φορτισμένο και η EOF είναι πολύ μικρή. Έτσι, η ηλεκτροφορητική ευκινησία του πεπτιδίου και η EOF είναι προς το αρνητικό ηλεκτρόδιο. Σε μη επεξεργασμένους τριχοειδείς από τηγμένο οξείδιο του πυριτίου, οι περισσότερες διαλυτές ουσίες μεταναστεύουν προς το αρνητικό ηλεκτρόδιο, ανεξάρτητα από το φορτίο τους, όταν το pH του ρυθμιστικού διαλύματος είναι πάνω από 7,0. Σε όξινο pH, τα περισσότερα διπολικά ιόντα και τα κατιόντα θα μεταναστεύσουν, επίσης, προς το αρνητικό ηλεκτρόδιο.

Στις μεθόδους όπου χρησιμοποιείται η τεχνική της CE, συχνά είναι απαραίτητο να μετρηθεί πειραματικά η EOF. Αυτό επιτυγχάνεται με έγχυση μιας ουδέτερης ουσίας και μέτρηση του χρόνου που χρειάζεται για να φτάσει στον ανιχνευτή. Ουσίες όπως μεθανόλη, ακετόνη και το μεσιτυλοξείδιο χρησιμοποιούνται συχνά.

Η EOF προκαλεί μετακίνηση σχεδόν όλων των ειδών, ανεξαρτήτως φορτίου, προς την ίδια κατεύθυνση. Υπό κανονικές συνθήκες (δηλαδή, αρνητικώς φορτισμένη επιφάνεια τριχοειδούς), η ροή είναι από την άνοδο προς την κάθοδο. Τα ανιόντα θα παρασυρθούν προς την κάθοδο, επειδή το μέγεθος της ροής μπορεί να είναι μεγαλύτερο από μια τάξη μεγέθους από τις ηλεκτροφορητικές ευκινησίες τους. Έτσι, κατιόντα, ουδέτερα και ανιόντα μπορούν να ηλεκτροφορηθούν σε μια μόνο ανάλυση, δεδομένου ότι όλα μεταναστεύουν στην ίδια κατεύθυνση. Εδώ, τα κατιόντα μεταναστεύουν ταχύτερα, λόγω του ότι η ηλεκτροφορητική έλξη τους προς την κάθοδο και η EOF είναι προς την ίδια κατεύθυνση, τα ουδέτερα όλα μεταφέρονται με την ταχύτητα της EOF, αλλά δε διαχωρίζονται το ένα από το άλλο και τα ανιόντα μεταναστεύουν βραδύτερα, επειδή έλκονται από την άνοδο, και εξακολουθούν να μεταφέρονται από την EOF προς την κάθοδο (Σχήμα 9.3).



Σχήμα 9.3. Διαφορική μετανάστευση ιόντων και ουδέτερων ειδών υπό την επίδραση της ηλεκτροωσμωτικής ροής

Στις αναλύσεις μικρών ιόντων (π.χ. νάτριο, κάλιο, χλωριούχα) το μέγεθος της EOF δεν είναι, συνήθως, μεγαλύτερο από τις ευκινησίες των ιόντων. Επιπλέον, η τροποποίηση του φορτίου των τοιχωμάτων του τριχοειδούς μπορεί να μειώσει την EOF, ενώ αφήνει ανεπηρέαστη την ευκινησία του ιόντος. Σ' αυτές τις συνθήκες, ανιόντα και κατιόντα μπορούν να μεταναστεύσουν σε αντίθετες κατευθύνσεις.

Ένα βασικό χαρακτηριστικό της EOF είναι ότι παρουσιάζει *επίπεδη κατατομή ροής*, σε αντίθεση με την παραβολική ροή που παράγεται από μια εξωτερική αντλία, όπως συμβαίνει στην HPLC. Η EOF έχει επίπεδη κατατομή, επειδή η κινητήρια δύναμή της (δηλαδή, το φορτίο στα τοιχώματα του τριχοειδούς) είναι ομοιόμορφα κατανομημένο κατά μήκος του τριχοειδούς, που σημαίνει ότι δεν υπάρχει πτώση της πίεσης μέσα στον τριχοειδή και η ροή είναι σχεδόν ομοιόμορφη σε ολόκληρο τον τριχοειδή. Η επίπεδη κατατομή ροής της EOF είναι σημαντικό φαινόμενο, επειδή ελαχιστοποιεί τη διεύρυνση των διαχωριζόμενων ζωνών, προσφέροντας υψηλές αποδόσεις διαχωρισμών, οι οποίες βασίζονται σε διαφορές της ευκινησίας των ιόντων, μικρότερες του 0,05%.

9.3.3.1. Έλεγχος της EOF

Ενώ η EOF είναι συνήθως ωφέλιμη, συχνά πρέπει να είναι ελεγχόμενη. Σε υψηλό pH, για παράδειγμα, η EOF μπορεί να είναι πολύ γρήγορη, με αποτέλεσμα την έκλυση της προσδιοριζόμενης ουσίας, πριν αρχίσει ο διαχωρισμός. Αντιστρόφως, σε χαμηλό ή μέτριο pH, τα αρνητικά φορτισμένα τοιχώματα του τριχοειδούς μπορεί να προκαλέσουν προσρόφηση κατιοντικών ουσιών, μέσω αλληλεπιδράσεων Coulomb. Το τελευταίο αυτό φαινόμενο, αποτελεί ιδιαίτερο πρόβλημα στους διαχωρισμούς πρωτεϊνών. Επιπλέον, σε μερικούς από τους ηλεκτροφορητικούς τρόπους διαχωρισμού, όπως στην ισοηλεκτρική εστίαση, στην ισοταχοφόρηση και στην ηλεκτροφόρηση πηκτής, συχνά απαιτείται μείωση της EOF.

Βασικά, ο έλεγχος της EOF απαιτεί τροποποίηση του επιφανειακού φορτίου του τριχοειδούς ή του ιξώδους του ρυθμιστικού διαλύματος. Ας σημειωθεί ότι, οι συνθήκες που επηρεάζουν το επιφανειακό φορτίο στα τοιχώματα του τριχοειδούς, επηρεάζουν συχνά τις προσδιοριζόμενες ουσίες (όπως το pH του ρυθμιστικού διαλύματος). Ικανοποιητικοί διαχωρισμοί συνήθως επιτυγχάνονται, όταν βελτιστοποιηθούν τόσο η EOF, όσο και οι συνθήκες που επηρεάζουν την ευκινησία των προσδιοριζόμενων ουσιών.

Η ταχύτητα της EOF μπορεί πιο εύκολα να ελαττωθεί με την ελάττωση του ηλεκτρικού πεδίου, όπως περιγράφεται από την εξίσωση (9.4). Η ελάττωση της έντασης του ηλεκτρικού πεδίου, όμως, έχει αρνητικές επιπτώσεις στο χρόνο της ανάλυσης, στην αποτελεσματικότητα και στη διαχωριστική ικανότητα του διαχωρισμού. Από πρακτική άποψη, οι πιο δραματικές αλλαγές στην EOF μπορεί να γίνουν απλά, με μεταβολή του pH του ρυθμιστικού διαλύματος. Η ρύθμιση του pH ωστόσο, μπορεί, επίσης, να επηρεάσει το φορτίο και την ευκινησία των προσδιοριζόμενων ουσιών. Ρυθμιστικά διαλύματα χαμηλού pH θα πρωτονιάσουν τόσο την επιφάνεια του τριχοειδούς, όσο και μια όξινη ουσία, ενώ ρυθμιστικά διαλύματα υψηλού pH αποπρωτονιώνουν και τα δύο. Η γνώση της pK_a ή του pI μιας ουσίας (για διπολικές ουσίες) είναι, επομένως, απαραίτητη για τη σωστή ρύθμιση του pH του ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης (ή φέροντος ηλεκτρολύτη).

Η EOF μπορεί ακόμη να επηρεαστεί από τη ρύθμιση της συγκέντρωσης ή /και της ιοντικής ισχύος του ρυθμιστικού διαλύματος. Υψηλές συγκεντρώσεις ρυθμιστικού είναι, επίσης, χρήσιμες για τον περιορισμό των αλληλεπιδράσεων των προσδιοριζόμενων ενώσεων με τα τοιχώματα του τριχοειδούς, ελαττώνοντας το αποτελεσματικό φορτίο στα τοιχώματα.

Η ανάπτυξη θερμότητας Joule μέσα στον τριχοειδή περιορίζει τη χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων υψηλής συγκέντρωσης. Τυπικές συγκεντρώσεις ρυθμιστικού διαλύματος κυμαίνονται από 10 έως 50 mM, αν και 100 έως 500 mM ή και υψηλότερες, έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί. Με τις συνήθεις συγκεντρώσεις ρυθμιστικού (10-50 mM), η οργανολογικά ελεγχόμενη μεταβολή της θερμοκρασίας φαίνεται να είναι ένας εύκολος και χρήσιμος τρόπος για τον έλεγχο της EOF, λόγω των εγγενών μεταβολών του ιξώδους του ρυθμιστικού διαλύματος.

Τέλος, η EOF μπορεί να ελεγχθεί με τροποποίηση των τοιχωμάτων του τριχοειδούς, με τη βοήθεια δυναμικών επικαλύψεων (δηλαδή, πρόσθετα στο ρυθμιστικό διάλυμα) ή ομοιοπολικών επικαλύψεων. Αυτές οι επικαλύψεις μπορεί να αυξήσουν, να μειώσουν ή να αντιστρέψουν το επιφανειακό φορτίο του τριχοειδούς και επομένως και την EOF.

9.3.4. Αναλυτικές Παράμετροι

Οι αναλυτικές παράμετροι στη CE μπορούν να περιγραφούν με όρους παρόμοιους με εκείνους στη χρωματογραφία στήλης. Η *Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση Ζώνης* (CZE) είναι ο απλούστερος τρόπος διαχωρισμού στη CE και όλες οι επόμενες συζητήσεις σ' αυτήν την ενότητα, αναφέρονται στη CZE. Παρακάτω περιγράφονται οι θεμελιώδεις και πρακτικές περιγραφές του χρόνου, της ευκινησίας, της διασποράς των διαχωριζόμενων ζωνών, της απόδοσης και της διαχωριστικής ικανότητας του διαχωρισμού.

9.3.4.1. Ευκινησία και Χρόνος Μετανάστευσης

Ο χρόνος που απαιτείται για μια προσδιοριζόμενη ουσία να μεταναστεύσει στο σημείο ανίχνευσης, ονομάζεται *χρόνος μετανάστευσης* (t_m) και δίνεται από το πηλίκο της απόστασης μετανάστευσης (δηλ. μήκος τριχοειδούς μέχρι το σημείο ανίχνευσης, L_d) και της ηλεκτροφορητικής ταχύτητας (v_{ep}):

$$t_m = \frac{L_d}{v_{ep}} = \frac{L_d L_t}{\mu_{ep} V} \quad (9.7)$$

Όπως είναι γνωστό:

$$v_{ep} = \mu_{ep} E \quad \text{και} \quad E = \frac{V}{L_t}$$

Ο χρόνος μετανάστευσης και άλλες πειραματικές παράμετροι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό της *φαινόμενης ευκινησίας* (μ_a) της προσδιοριζόμενης ουσίας, βάσει του τύπου:

$$\mu_a = \frac{L_d}{t_m E} = \frac{L_t}{t_m V} \quad (9.8)$$

όπου: $\mu_a = \mu_{ep} + \mu_{eo}$ (σύμφωνα με τη σχέση 9.6)

V = εφαρμοζόμενη τάση

L_d = αποτελεσματικό μήκος του τριχοειδούς (μέχρι τον ανιχνευτή)

L_t = συνολικό μήκος τριχοειδούς

t_m = χρόνος μετανάστευσης

E = ένταση ηλεκτρικού πεδίου

Παρουσία της EOF, η μετρούμενη ηλεκτροφορητική ευκινησία ονομάζεται *φαινόμενη ευκινησία*, μ_a . Η *πραγματική* ή *αποτελεσματική ευκινησία*, μ_{ep} , μπορεί να υπολογιστεί πειραματικά από τη φαινόμενη ευκινησία, με ανεξάρτητη μέτρηση της EOF, χρησιμοποιώντας μία ουδέτερη ουσία (δείκτη). Η ουσία - δείκτης κινείται με ταχύτητα ίση με την EOF (μ_{eo}). Παραδείγματα ουδέτερων δεικτών αποτελούν το διμεθυλοσουλφοξείδιο, το μεσιτυλοξείδιο και η ακετόνη.

9.3.4.2. Διασπορά

Ο διαχωρισμός στην Ηλεκτροφόρηση βασίζεται στις διαφορές ανάμεσα στις ευκινησίες των προσδιοριζόμενων ουσιών. Η διαφορά που είναι αναγκαία για το διαχωρισμό των ζωνών δύο ουσιών, εξαρτάται από το μήκος των ζωνών, το οποίο με τη σειρά του εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη διασπορά. Η διασπορά θα πρέπει να ελέγχεται, επειδή αυξάνει το μήκος των ζωνών και επομένως και τη διαφορά μεταξύ των ευκινησιών, η οποία είναι αναγκαία για την επίτευξη του διαχωρισμού.

Η διασπορά, δηλαδή η διάχυση της ζώνης μιας ουσίας, προκύπτει από τις διαφορές στην ταχύτητα της ουσίας μέσα στην εν λόγω ζώνη και μπορεί να οριστεί ως το πλάτος της κορυφής στη βάση της, w_b . Για μια κορυφή με μορφή κανονικής κατανομής:

$$w_b = 4\sigma \quad (9.9)$$

όπου: σ = τυπική απόκλιση της κορυφής (σε χρόνο, μήκος ή όγκο)

Η αποτελεσματικότητα ή *απόδοση του διαχωρισμού*, εκφραζόμενη σε αριθμό των θεωρητικών πλακών, N , είναι:

$$N = \left(\frac{L_d}{\sigma} \right)^2 \quad (9.10)$$

και μπορεί να συσχετιστεί με το HETP (ύψος ισοδύναμο προς μια θεωρητική πλάκα), H, με τη σχέση:

$$H = \left(\frac{L_d}{N} \right) \quad (9.11)$$

Υπό ιδανικές συνθήκες (δηλαδή, μικρό μήκος εγχυόμενου δείγματος, καθόλου αλληλεπιδράσεις μεταξύ προσδιοριζόμενης ουσίας - τοιχωμάτων τριχοειδούς κ.λπ.), η μόνη συνεισφορά στη διεύρυνση της ζώνης των προσδιοριζόμενων ουσιών μπορεί να θεωρηθεί η αξονική διάχυση. Η ακτινική διάχυση είναι ασήμαντη, λόγω του επίπεδου μετώπου της ροής. Έτσι, η απόδοση διαχωρισμού μπορεί να συσχετιστεί με τον όρο *μοριακή διάχυση*, ο οποίος ισχύει στη χρωματογραφία:

$$\sigma^2 = 2Dt_m = \frac{2DL_dL_t}{\mu_{ep}V} \quad (9.12)$$

όπου: D = συντελεστής διάχυσης της προσδιοριζόμενης ουσίας
 t_m , L_d , L_t , μ_{ep} και V , όπως έχουν οριστεί προηγουμένως

Αν συνδυάσουμε τις εξισώσεις (9.10) και (9.12), προκύπτει μια θεμελιώδης ηλεκτροφορητική έκφραση του αριθμού των θεωρητικών πλακών:

$$N = \frac{\mu_{ep}VL_d}{2DL_t} = \frac{\mu_{ep}EL_d}{2D} \quad (9.13)$$

Από την εξίσωση (9.13), φαίνεται ότι σε υψηλά πεδία, αυξάνεται ο αριθμός των θεωρητικών πλακών. Σε υψηλά πεδία, η προσδιοριζόμενη ουσία δαπανά λιγότερο χρόνο μέσα στον τριχοειδή και έχει λιγότερο χρόνο να διαχυθεί. Επιπλέον, αυτή η εξίσωση δείχνει ότι τα μεγάλα μόρια, όπως οι πρωτεΐνες και το DNA, τα οποία έχουν χαμηλούς συντελεστές διάχυσης, θα παρουσιάζουν μικρότερη διασπορά από ό, τι τα μικρά μόρια. Η χρήση υψηλών τάσεων θα παράσχει επίσης, τη μεγαλύτερη απόδοση, με τη μείωση του χρόνου διαχωρισμού. Το πρακτικό όριο τάσης, με την υπάρχουσα σημερινή τεχνολογία είναι περίπου 30 kV. Το πρακτικό όριο έντασης ηλεκτρικού πεδίου -θα μπορούσε κανείς να χρησιμοποιήσει πολύ κοντούς τριχοειδείς για την παραγωγή πεδίων υψηλής έντασης- είναι η θέρμανση Joule. Η θέρμανση Joule είναι η συνέπεια της αντίστασης του ρυθμιστικού διαλύματος προς τη ροή του ρεύματος.

Παρά τους περιορισμούς λόγω διάχυσης, η CE εξακολουθεί να είναι χρήσιμη για διαχωρισμούς μικρών μορίων, επειδή η μ_{ep} είναι συνάρτηση της αναλογίας φορτίου προς μάζα. Τα μικρά μόρια τείνουν να είναι πιο ευκίνητα. Για παράδειγμα, η ευκινησία της θεϊκής κίνινης είναι $4 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$. Παρά τον υψηλότερο συντελεστή διάχυσης, $0,7 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$, η εξίσωση (9.13) δίνει $N = 857000$ θεωρητικές πλάκες, όταν $V = 15 \text{ kV}$.

Ο αριθμός θεωρητικών πλακών μπορεί να προσδιοριστεί στην πράξη, απευθείας από ένα ηλεκτροφερόγραμμα, βάσει της εξίσωσης:

$$N = 5,54 \left(\frac{t_m}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (9.14)$$

όπου: t_m = χρόνος μετανάστευσης
 $w_{1/2}$ = πλάτος κορυφής στο ήμισυ του ύψους της

Στην πράξη, η μετρούμενη απόδοση, από την εξίσωση (9.14), είναι, συνήθως, χαμηλότερη από τη θεωρητικά υπολογιζόμενη, σύμφωνα με την εξίσωση (9.13). Αυτό συμβαίνει, επειδή η θεωρητικά υπολογιζόμενη, λαμβάνει υπόψη μόνον τη διεύρυνση των ζωνών η οποία οφείλεται στην αξονική διάχυση, ενώ στην πραγματικότητα συμβαίνουν κι άλλα φαινόμενα διασποράς.

9.3.4.3. Διαχωριστική Ικανότητα

Η διαχωριστική ικανότητα ορίζεται ως:

$$R = \frac{2(t_{m2} - t_{m1})}{w_1 + w_2} = \frac{t_{m2} - t_{m1}}{4\sigma} \quad (9.15)$$

όπου: t_m = χρόνος μετανάστευσης
 w = πλάτος κορυφής στη βάση της (σε μονάδες χρόνου)
 σ = τυπική απόκλιση
 οι δείκτες 1 και 2 αναφέρονται στις δύο διαχωριζόμενες ουσίες

Ο διαχωρισμός στη CE εξαρτάται, κυρίως, από την απόδοση (αριθμό θεωρητικών πλακών) και όχι από την εκλεκτικότητα, όπως στη χρωματογραφία. Λόγω των πολύ στενών ζωνών των διαχωριζόμενων ουσιών, μικρές διαφορές στις ηλεκτροφορητικές ευκινησίες τους (<0,05% σε ορισμένες περιπτώσεις), είναι συχνά επαρκείς για τον πλήρη διαχωρισμό τους.

Ο διαχωρισμός μεταξύ δύο συστατικών μπορεί, επίσης, να εκφραστεί σε σχέση με την απόδοση, ως:

$$R = \frac{1}{4} \sqrt{N} \left(\frac{\Delta\mu_{ep}}{\bar{\mu}_{ep}} \right) \quad (9.16)$$

όπου: $\Delta\mu_{ep}$ = διαφορά μεταξύ των ηλεκτροφορητικών ευκινησιών των δύο συστατικών
 $\bar{\mu}_{ep}$ = μέσος όρος των ηλεκτροφορητικών ευκινησιών των δύο συστατικών

Αν αντικαταστήσουμε την εξίσωση (9.13) στην εξίσωση (9.16), λαμβάνουμε μια θεωρητική εξίσωση για τη διαχωριστική ικανότητα, η οποία περιγράφει επίσης και την επίδραση της EOF.

$$R = \left(\frac{1}{4\sqrt{2}} \right) (\Delta\mu_{ep}) \sqrt{\frac{V}{D(\bar{\mu}_{ep} + \mu_{eo})}} \quad (9.17)$$

Σε αντίθεση με την απόδοση (αριθμό θεωρητικών πλακών), η οποία αυξάνει γραμμικά με την εφαρμοζόμενη τάση, μια παρόμοια αύξηση στη διαχωριστική ικανότητα δε συμβαίνει, λόγω της τετραγωνικής ρίζας στη σχέση (9.17). Για να διπλασιαστεί η διαχωριστική ικανότητα, πρέπει να τετραπλασιαστεί η τάση. Όμως, η παραγωγή θερμότητας Joule, σε υψηλές τιμές τάσης, συχνά, αποτελεί περιοριστικό παράγοντα για τη βελτίωση του διαχωρισμού. Το κλειδί για μεγάλη διαχωριστική ικανότητα είναι η αύξηση της $\Delta\mu_{ep}$. Ο έλεγχος της ηλεκτροφορητικής ευκινησίας επιτυγχάνεται καλύτερα μέσω της επιλογής του κατάλληλου τρόπου διαχωρισμού στη CE, σε συνδυασμό με την επιλογή των κατάλληλων ρυθμιστικών διαλυμάτων.

Είναι προφανές από την εξίσωση (9.17), ότι άπειρη διαχωριστική ικανότητα προκύπτει όταν μ_{ep} και EOF είναι ίσες αλλά αντίθετες. Δηλαδή, όταν το ιόν μεταναστεύει προς την αντίθετη κατεύθυνση και με τον ίδιο ρυθμό όπως η EOF. Σ' αυτήν την περίπτωση, ωστόσο, ο χρόνος ανάλυσης προσεγγίζει το άπειρο. Σαφώς, οι λειτουργικές παράμετροι θα πρέπει να ελέγχονται έτσι, ώστε να προκύπτει ο βέλτιστος διαχωρισμός στο συντομότερο δυνατό χρόνο.

9.3.5. Παράγοντες που Επηρεάζουν την Απόδοση Διαχωρισμού

Η διασπορά στη CE μπορεί να οφείλεται σε μια σειρά από παράγοντες, εκτός από την αξονική διάχυση. Ανάμεσα στους πιο σημαντικούς είναι η βαθμίδωση της θερμοκρασίας μέσα στον τριχοειδή -η οποία προκαλείται από την ανάπτυξη θερμότητας Joule- το μήκος της ζώνης του εισαγόμενου δείγματος και οι αλληλεπιδράσεις των προσδιοριζόμενων ουσιών με τα τοιχώματα του τριχοειδούς. Ευτυχώς, αυτά τα φαινόμενα είναι, συνήθως, ελεγχόμενα. Οι παράγοντες και οι μηχανισμοί που επηρεάζουν τη διεύρυνση των ζωνών των διαχωριζόμενων ουσιών στην CE, περιγράφονται στον **Πίνακα 9.1**.

9.3.5.1. Μήκος Εγχυόμενου Δείγματος

Κατά την εισαγωγή του δείγματος, είναι σημαντικό το μήκος του εγχυόμενου δείγματος να ελαχιστοποιηθεί. Εάν το μήκος του εγχυόμενου δείγματος είναι μεγαλύτερο από τη διασπορά που προκαλείται από τη διάχυση, η απόδοση του διαχωρισμού και η διαχωριστική ικανότητα θα ελαττωθούν. Ιδανικά, το μήκος του δείγματος θα πρέπει να είναι μικρότερο από την τυπική απόκλιση η οποία οφείλεται στη διάχυση. Το ακριβές μήκος εξαρτάται τόσο από το συντελεστή διάχυσης των προσδιοριζόμενων ουσιών, όσο και από το χρόνο ανάλυσης. Τα μακρομόρια μπορεί να έχουν συντελεστές διάχυσης (D) 100 φορές χαμηλότερους απ' αυτούς των μικρών μορίων και απαιτούν μικρότερα μήκη εγχυόμενου δείγματος. Η σχέση μεταξύ μήκους εγχυόμενου δείγματος και συντελεστή διάχυσης καθώς και η επίδρασή τους στην απόδοση διαχωρισμού απεικονίζεται στον **Πίνακα 9.2**.

Παράγοντες	Παρατηρήσεις
Αξονική διάχυση	<ul style="list-style-type: none"> Καθορίζει την απόδοση διαχωρισμού Ενώσεις με χαμηλότερο συντελεστή διάχυσης σχηματίζουν στενότερες ζώνες
Θέρμανση Joule	<ul style="list-style-type: none"> Οδηγεί σε διαφορές θερμοκρασίας (βαθμίδωση θερμοκρασίας) στον τριχοειδή και ομαλή ροή
Μήκος εγχυόμενου δείγματος	<ul style="list-style-type: none"> Το μήκος του εγχυόμενου δείγματος θα πρέπει να είναι μικρότερο από το μήκος ελεγχόμενης διάχυσης Οι δυσκολίες στην αποτίμηση των ορίων ανίχνευσης συχνά απαιτούν μεγαλύτερο από το ιδανικό μήκος έγχυσης
Προσρόφηση του δείγματος	<ul style="list-style-type: none"> Αλληλεπίδραση των συστατικών του διαλύματος με τα τοιχώματα του τριχοειδούς, συνήθως, προκαλεί σοβαρή παραμόρφωση των κορυφών (εμφάνιση ουράς)
Ηλεκτροδιασπορά	<ul style="list-style-type: none"> Συστατικά δείγματος με αγωγιμότητα υψηλότερη απ' αυτήν του ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης (φέροντος ηλεκτρολύτη) έχουν ως αποτέλεσμα κορυφές με μέτωπο Συστατικά δείγματος με αγωγιμότητα χαμηλότερη απ' αυτήν του φέροντος ηλεκτρολύτη έχουν ως αποτέλεσμα κορυφές με ουρά
Διαφορετικό ύψος ηλεκτρολύτη στα δοχεία ανόδου-καθόδου	<ul style="list-style-type: none"> Δημιουργεί ομαλή ροή
Μέγεθος κυψελίδας ανιχνευτή	<ul style="list-style-type: none"> Πρέπει να είναι μικρό σε σχέση με το πλάτος των κορυφών

Πίνακας 9.1. Παράγοντες διεύρυνσης ζωνών στη CE

Μήκος Εγχυόμενου Δείγματος (mm)	N (D=10 ⁻⁵ cm ² /s)	N (D=10 ⁻⁶ cm ² /s)
1	238000	1400000
2	164000	385000
10	81000	112000

Πίνακας 9.2. Επίδραση μήκους εγχυόμενου δείγματος και συντελεστή διάχυσης στην απόδοση διαχωρισμού

Πρακτικά, το μήκος του εγχυόμενου δείγματος πρέπει να είναι μικρότερο από 1 έως 2% του συνολικού μήκους του τριχοειδούς. Για έναν τριχοειδή μήκους 70 cm, ένα μήκος εισαγόμενου δείγματος 1% αντιστοιχεί σε 7 mm (ή 14 nL για έναν τριχοειδή εσωτερικής διαμέτρου 50 μm). Ενώ στα υπάρχοντα εμπορικά όργανα μπορούν να εισαχθούν αυτές οι μικρές ποσότητες με επαναλήψιμο τρόπο, υπό κανονικές συνθήκες, οι δυσκολίες στον προσδιορισμό των ορίων ανίχνευσης συχνά απαιτούν μεγαλύτερα μήκη εγχυόμενου δείγματος.

9.3.5.2. Αλληλεπιδράσεις Προσδιοριζόμενων Ουσιών με τα Τοιχώματα του Τριχοειδούς

Η αλληλεπίδραση μεταξύ των προσδιοριζόμενων ουσιών και των τοιχωμάτων του τριχοειδούς είναι επιζήμια για το διαχωρισμό. Ανάλογα με την έκταση της αλληλεπίδρασης, μπορεί να συμβεί εμφάνιση κορυφών με ουρά και ακόμη συνολική προσρόφηση των ουσιών στα τοιχώματα. Τα κύρια αίτια της προσρόφησης είναι οι ιοντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κατιοντικών προσδιοριζόμενων ουσιών και των αρνητικά φορτισμένων τοιχωμάτων του τριχοειδούς, αλλά και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Η μεγάλη αναλογία επιφανείας προς όγκο του τριχοειδούς, η οποία είναι ευεργετική για τη μεταφορά θερμότητας, στην πραγματικότητα αυξάνει την πιθανότητα προσρόφησης. Σημαντικά φαινόμενα προσρόφησης έχουν παρατηρηθεί ειδικά για μεγάλα πεπτίδια και πρωτεΐνες, κυρίως, επειδή τα είδη αυτά κατέχουν πολλαπλά φορτία και υδρόφοβα τμήματα.

Υπάρχουν διάφοροι τρόποι που χρησιμοποιούνται στην πράξη για τη μείωση των αλληλεπιδράσεων προσδιοριζόμενων ουσιών-τοιχωμάτων τριχοειδούς. Η αύξηση της συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος, για παράδειγμα, μειώνει τις αλληλεπιδράσεις των προσδιοριζόμενων ουσιών, μειώνοντας το αποτελεσματικό επιφανειακό φορτίο. Η υψηλή ιοντική ισχύς μειώνει, επίσης, την EOF, αυξάνοντας έτσι το χρόνο παραμονής των προσδιοριζόμενων ουσιών στον τριχοειδή. Αυτή η προσέγγιση, βέβαια, περιορίζεται από το αυξημένο ρεύμα και την επακόλουθη θέρμανση Joule. Η χρήση διπολικού ιόντος στα ρυθμιστικά διαλύματα είναι μια εναλλακτική λύση.

Μια άλλη προσέγγιση για τον περιορισμό της προσρόφησης, είναι η λειτουργία της CE σε ακραίες τιμές pH. Σε χαμηλό pH (<2 έως 3) οι ομάδες σιλανόλης του τηγμένου οξειδίου του πυριτίου θα είναι ουσιαστικά πρωτονιωμένες και μη φορτισμένες. Ενώ η EOF θα είναι σχεδόν μηδενική, δεδομένου ότι οι πρωτεΐνες (και άλλα είδη) θα είναι, επίσης, πρωτονιωμένες και θετικά φορτισμένες, θα μεταναστεύουν προς την κάθοδο. Αντίθετα, σε υψηλό pH (> 9 έως 10), τόσο τα τοιχώματα όσο και το δείγμα θα είναι αποπρωτονιωμένα και αρνητικά φορτισμένα και οι αλληλεπιδράσεις προσδιοριζόμενων ουσιών-τοιχωμάτων τριχοειδούς θα περιορίζονται από την άπωση φορτίου.

Η επικάλυψη των τοιχωμάτων του τριχοειδούς είναι μια χρήσιμη μέθοδος για την ελάττωση της προσρόφησης των προσδιοριζόμενων ουσιών, μειώνοντας την ελεύθερη ενέργεια της αλληλεπίδρασης. Η επικάλυψη μπορεί να λάβει διάφορες μορφές, συμπεριλαμβανομένης της απλής δυναμικής απενεργοποίησης, με χρήση προσθέτων στο ρυθμιστικό διάλυμα (δηλαδή, υδρόφιλα πολυμερή ή τασιενεργά) ή της ομοιοπολικής τροποποίησης των τοιχωμάτων. Και οι δύο τρόποι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να εξαλείψουν ή να αντιστρέψουν το φορτίο στα τοιχώματα, να μεταβάλουν την υδροφοβικότητα και να περιορίσουν τη μη-ειδική προσρόφηση.

9.3.5.3. Ηλεκτροδιασπορά

Οι διαφορές ανάμεσα στις αγωγιμότητες της ζώνης του δείγματος και του ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης, μπορεί να έχουν τρεις σημαντικές επιπτώσεις: 1) ασύμμετρα σχήματα κορυφών στα ηλεκτροφερογράμματα, 2) προσυγκέντρωση προσδιοριζόμενων ουσιών (χαμηλή αγωγιμότητα δείγματος), ή αραιώση προσδιοριζόμενων ουσιών (δείγμα υψηλής αγωγιμότητας), 3) προσωρινή κατάσταση ισοαχοφόρησης, λόγω της περίσσειας κάποιου ιόντος (για παράδειγμα, Cl⁻).

Όταν η ζώνη μιας ουσίας έχει μεγαλύτερη ευκινησία (δηλαδή, υψηλότερη αγωγιμότητα και χαμηλότερη αντίσταση) από εκείνη του ρέοντος ρυθμιστικού διαλύματος, το μέτωπο της ζώνης της ουσίας, το οποίο διαχέεται κατά τη μετανάστευσή της προς την κάθοδο, συναντά μια υψηλότερη πτώση τάσης καθώς εισέρχεται στη ζώνη του ρυθμιστικού διαλύματος. Αυτό προκαλεί την επιτάχυνση της διαχεόμενης ουσίας (δηλαδή, των ανιόντων, όταν η EOF είναι προς την κάθοδο) μακριά από τη ζώνη του δείγματος και την εμφάνιση κορυφών με μέτωπο. Αντίθετα, όταν η ζώνη της προσδιοριζόμενης ουσίας έχει μικρότερη ευκινησία (δηλαδή, χαμηλότερη αγωγιμότητα και υψηλότερη αντίσταση) από εκείνη του ρυθμιστικού διαλύματος, εμφανίζονται κορυφές με ουρά. Όταν οι αγωγιμότητες είναι ίδιες, δεν εμφανίζονται ασύμμετρες κορυφές. Τα ουδέτερα είδη, δεν επηρεάζονται από αυτές τις διαφορές αγωγιμότητας.

Η ασυμμετρία κορυφών είναι ιδιαίτερα εμφανής σε δείγματα τα οποία περιέχουν ουσίες με ένα ευρύ φάσμα ευκινήσιων. Μέτρα για τη μείωση των φαινομένων αυτών περιλαμβάνουν την επιλογή ρυθμιστικού διαλύματος και δείγματος με ίδιες ευκινήσιες, ή τη χρήση μιας συγκέντρωσης ρυθμιστικού διαλύματος, περίπου δύο τάξεις μεγέθους υψηλότερης από εκείνης του δείγματος.

9.4. Τρόποι Διαχωρισμού

Η ευελιξία της CE, προέρχεται εν μέρει από τους πολυάριθμους τρόπους λειτουργίας της. Ο τρόπος διαχωρισμού καθορίζεται από το μηχανισμό διαχωρισμού, ο οποίος στηρίζεται ως επί το πλείστον στην αλλαγή της σύστασης του ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης. Τα σύγχρονα εμπορικά όργανα υποστηρίζουν αυτές τις λειτουργίες, παρέχοντας συγκεκριμένες ρυθμίσεις. Ανάλογα με το μηχανισμό που επικρατεί, προκύπτουν οι εξής βασικοί τρόποι (modes) διαχωρισμού (**Πίνακας 9.3**): *Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση Ζώνης* (Capillary Zone Electrophoresis, CZE), *Μικυλλιακή Ηλεκτροκινητική Τριχοειδής Χρωματογραφία* (Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography, MECC), *Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση Πηκτής* (Capillary Gel Electrophoresis, CGE), *Τριχοειδής Ισοηλεκτρική Εστίαση* (Capillary Isoelectric Focusing, CIEF) και *Τριχοειδής Ισοταχοφόρηση* (Capillary Isotachopheresis, CITP).

Τρόπος Διαχωρισμού	Μηχανισμός Διαχωρισμού
Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση Ζώνης (CZE)	Κίνηση σε ελεύθερο διάλυμα
Μικυλλιακή Ηλεκτροκινητική Τριχοειδής Χρωματογραφία (MECC)	Υδροφοβες/ιοντικές αλληλεπιδράσεις με μικύλλια
Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση Πηκτής (CGE)	Μέγεθος & φορτίο
Τριχοειδής Ισοηλεκτρική Εστίαση (CIEF)	Ισοηλεκτρικό σημείο (pI)
Ισοταχοφόρηση (CITP)	Κινούμενα μέτωπα

Πίνακας 9.3. Τρόποι διαχωρισμού στη CE

Η εκλεκτικότητα στη CE καθορίζεται από το μηχανισμό διαχωρισμού. Οι διάφοροι τρόποι διαχωρισμού (CZE, MECC, CGE, και CIEF) προσφέρουν διαφορετικές εκλεκτικότητες, επειδή διέπονται από διαφορετικούς μηχανισμούς διαχωρισμού. Η ικανότητα ελέγχου της εκλεκτικότητας, όπως π.χ. μέσω αλλαγών στο pH του ρυθμιστικού διαλύματος, ή με προσθήκη επιφανειοδραστικών ή χειρόμορφων ενώσεων στο ρυθμιστικό διάλυμα, μπορεί να βελτιώσει την ανάλυση και να δώσει συμπληρωματικές πληροφορίες, οι οποίες είναι χρήσιμες για την επικύρωση της μεθόδου. Ας σημειωθεί ότι, οι αλλαγές αυτές στο ρυθμιστικό διάλυμα επηρεάζουν την EOF, η οποία, όμως, επηρεάζει μόνον το χρόνο μετανάστευσης και το διαχωρισμό, όχι όμως και την εκλεκτικότητα της μεθόδου.

9.4.1. Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση Ζώνης (CZE)

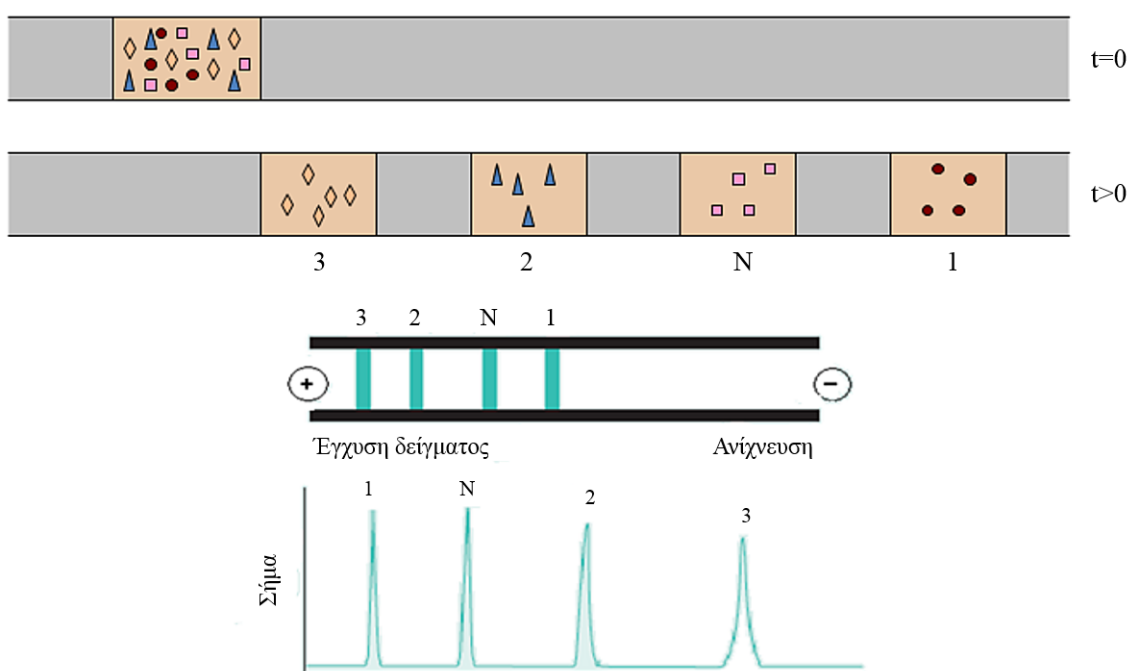
Η Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση Ζώνης (CZE) είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος, λόγω της απλότητας της λειτουργίας της και της ευελιξίας της. Η CZE είναι ουσιαστικά η πιο απλή μορφή της CE, κυρίως, επειδή ο τριχοειδής είναι γεμάτος μόνο με ρυθμιστικό διάλυμα. Ο μηχανισμός διαχωρισμού βασίζεται στις διαφορές στην αναλογία φορτίου - μάζας. Θεμελιώδης για τη CZE είναι η ομοιογένεια του ρυθμιστικού διαλύματος και η σταθερή ένταση πεδίου σε όλο το μήκος του τριχοειδούς. Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 9.4**, ο διαχωρισμός συμβαίνει, επειδή οι προσδιοριζόμενες ουσίες μεταναστεύουν σε διακριτές ζώνες και με διαφορετικές ταχύτητες. Με τη CZE, είναι δυνατός ο διαχωρισμός τόσο αρνητικά όσο και θετικά φορτισμένων ουσιών, λόγω της EOF. Τα ιόντα που κινούνται σε αντίθετη κατεύθυνση από την EOF, σαρώνονται προς τον ανιχνευτή, δεδομένου ότι η EOF είναι στις περισσότερες περιπτώσεις, σημαντικά μεγαλύτερη από την ηλεκτροφορητική ευκινήσια. Τα ουδέτερα μόρια δε μεταναστεύουν, αλλά κινούνται μαζί με την EOF, ως μια κορυφή, χωρίς να διαχωρίζονται. Η οργανολογία και η θεωρία της CE, όπως περιγράφηκαν στις προηγούμενες ενότητες, ουσιαστικά αναφέρονται στη CZE. Η CZE είναι, επίσης, γνωστή και ως Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση ανοικτού σωλήνα ή Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση σε ελεύθερο διάλυμα.

Παρά την ασάφεια, εδώ θα χρησιμοποιηθεί ο όρος CZE, ώστε να υπάρχει συμφωνία με την ονοματολογία της διεθνούς βιβλιογραφίας.

Για τη CZE είναι σημαντικό να ελέγχεται τόσο η ηλεκτροφορητική ευκινησία των προσδιοριζόμενων ουσιών, όσο και η ηλεκτροωσμωτική ροή. Έτσι, όλοι οι παράγοντες που επηρεάζουν την ευκινησία των ιόντων, την EOF και το πλάτος των διαχωριζόμενων ζωνών, λαμβάνονται υπόψη, προκειμένου να βελτιστοποιηθεί και να ελεγχθεί ο διαχωρισμός.

Η ηλεκτροφορητική ευκινησία επηρεάζεται από όλους τους παράγοντες που επηρεάζουν την αναλογία φορτίου-μεγέθους. Δηλαδή, με ρύθμιση του pH του ηλεκτρολύτη (ρέοντος ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης), ο βαθμός ιοντισμού των ιόντων μπορεί να μεταβληθεί. Εναλλακτικά, ο τύπος του ρυθμιστικού διαλύματος (ανόργανο, οργανικό, αμφολυτικό) που χρησιμοποιείται, ή η παρουσία οργανικών διαλυτών, θα επηρεάσει έντονα την ευκινησία των ιόντων και την EOF.

Οι αλληλεπιδράσεις με τα τοιχώματα του τριχοειδούς, που επηρεάζουν τη διεύρυνση των ζωνών, μπορούν να εξαλειφθούν, δουλεύοντας σε ακραίες τιμές pH. Έτσι, σε χαμηλό pH (<2 έως 3) οι ασθενώς όξινες ομάδες σιλανόλης του τηγμένου οξειδίου του πυριτίου στην εσωτερική επιφάνεια του τριχοειδούς, θα πρωτονιωθούν και θα είναι αφόρτιστες. Το ζήτα δυναμικό θα είναι ελάχιστο και, επομένως, η EOF θα είναι σχεδόν μηδενική. Δεδομένου ότι οι πρωτεΐνες (και άλλα είδη) θα είναι επίσης πρωτονιωμένες και θετικά φορτισμένες σε χαμηλό pH, θα μεταναστεύουν προς την κάθοδο, χωρίς να έλκονται από την ουδέτερη επιφάνεια του τριχοειδούς. Αντιστρόφως, σε υψηλό pH (> 8 έως 10), τόσο τα τοιχώματα του τριχοειδούς, όσο και το δείγμα θα είναι αποπρωτονιωμένα και αρνητικά φορτισμένα και οι αλληλεπιδράσεις προσδιοριζόμενων ουσιών-τοιχωμάτων θα περιορίζονται από την απόθεση φορτίου.



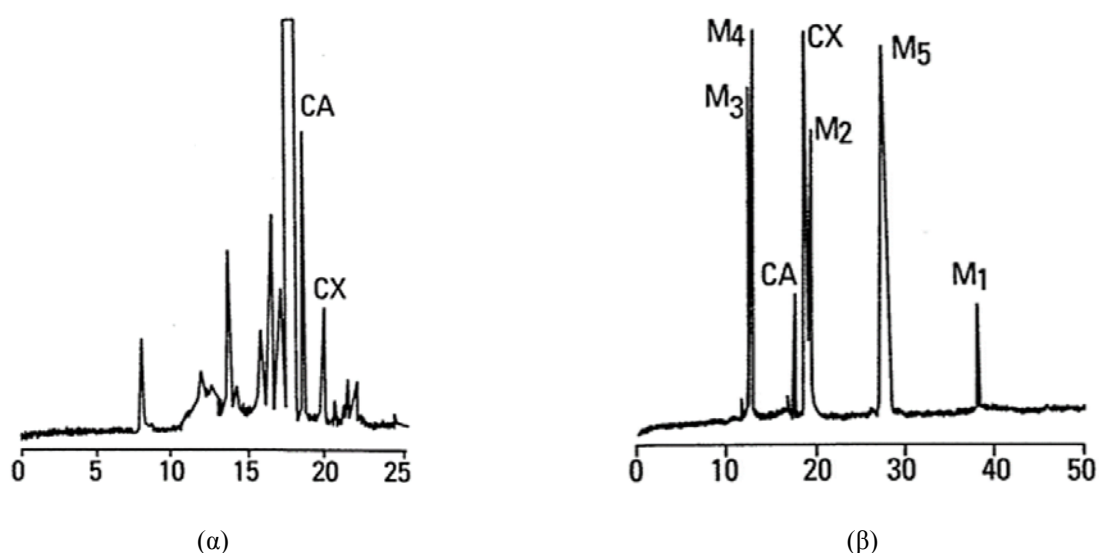
Σχήμα 9.4. Σχηματική απεικόνιση του διαχωρισμού των συστατικών ενός δείγματος με CZE. Το θετικά φορτισμένο συστατικό (1) έχει τη μεγαλύτερη ευκινησία, ακολουθούμενο από τα ουδέτερα μόρια (N) και από δύο αρνητικά φορτισμένα συστατικά (2,3).

Εφαρμογές της CZE: Η CZE βρίσκει ευρύ πεδίο εφαρμογών στις βιοεπιπτώσεις, ιδιαίτερα στους προσδιορισμούς πεπτιδίων και πρωτεϊνών. Ένα παράδειγμα, είναι ο διαχωρισμός γλυκοπρωτεϊνών. Οι γλυκοπρωτεΐνες είναι, συνήθως, δύσκολο να προσδιοριστούν με τις παραδοσιακές τεχνικές της επίπεδης Ηλεκτροφόρησης Πηκτής, της Ισοηλεκτρικής Εστίασης, ή της HPLC. Αναλύσεις φαρμάκων και των μεταβολιτών τους έχουν, επίσης, πραγματοποιηθεί επιτυχώς με CZE (Σχήμα 9.5). Η ισχυρή υδροφιλικότητα των μεταβολιτών καθιστά την εκχύλιση από βιολογικά υγρά δύσκολη. Για τον ίδιο λόγο, ο διαχωρισμός με HPLC αντίστροφης φάσης είναι ανεπαρκής, ακόμη και με σχηματισμό ζευγών ιόντων.

Η CZE έχει ακόμη χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό ανόργανων ιόντων και οργανικών οξέων, ο οποίος έχει παραδοσιακά πραγματοποιηθεί με ιοντική χρωματογραφία. Στην περίπτωση αυτή, είναι

απαραίτητη η έμμεση ανίχνευση UV, λόγω της έλλειψης χρωμοφόρων ομάδων σε αυτά τα είδη. Η έμμεση ανίχνευση πραγματοποιείται, προσθέτοντας στο ρέον ρυθμιστικό διάλυμα μια ουσία, η οποία απορροφά έντονα στο UV, όπως τα χρωμικά ιόντα ή η ιμιδαζόλη και ανίχνευση στο μέγιστο απορρόφησης των εν λόγω ειδών (για παράδειγμα, 254 nm για τα χρωμικά ιόντα). Τα ιόντα του δείγματος εκτοπίζουν τα ιόντα των χρωμικών και συμβαίνει μια μείωση στην απορρόφηση, όταν οι ζώνες περνούν την περιοχή του ανιχνευτή. Το εμβαδόν της (αρνητικής) κορυφής που δημιουργείται, σχετίζεται γραμμικά με τη συγκέντρωση του δείγματος. Η ταχύτητα μετανάστευσης των ιόντων της ουσίας που απορροφά έντονα στο UV, πρέπει να ταιριάζει πολύ με εκείνη του προσδιοριζόμενου ιόντος, αλλιώς λαμβάνονται παραμορφωμένες κορυφές και μειωμένη ευαισθησία.

Για ταχείς διαχωρισμούς ανόργανων ιόντων, η ηλεκτροφόρηση και η ηλεκτροενδοόσμωση θα πρέπει να είναι στην ίδια κατεύθυνση. Αυτό ισχύει αυτόματα για τα κατιόντα, δεδομένου ότι αυτά και η EOF κατευθύνονται προς την κάθοδο. Για τα ανιόντα, των οποίων οι ευκινήσιες είναι ιδιαίτερα αρνητικές και αντιτίθενται στην κανονική ροή της EOF, η κατάσταση αυτή θα οδηγούσε σε πολύ μεγάλους χρόνους ανάλυσης, φτωχά σχήματα κορυφών και χαμηλή ευαισθησία. Η κατεύθυνση της EOF, συνεπώς, πρέπει να αντιστραφεί, για να καταστεί ταυτόσημη με την κατεύθυνση της μετανάστευσης των μικρών ανιόντων, μειώνοντας έτσι τους χρόνους ανάλυσης. Μια σειρά από κατιοντικές επιφανειοδραστικές ενώσεις, όπως το CTAB (χλωριούχο κητυλοτριμεθυλαμμώνιο), χρησιμοποιούνται σε χαμηλές συγκεντρώσεις mM, γι' αυτόν το σκοπό. Η θετικά φορτισμένη κατιοντική επιφανειοδραστική ένωση, προσκολλάται στα αρνητικώς φορτισμένα τοιχώματα του τριχοειδούς και σχηματίζεται μια διπλοστιβάδα, που παράγει θετικό φορτίο, το οποίο αντιστρέφει την κατεύθυνση της EOF. Στη συνέχεια, εφαρμόζεται αρνητική τάση (το όργανο λειτουργεί με την αντίστροφη πολικότητα) για την ανάλυση, καθώς τόσο η EOF, όσο και τα ανιόντα μεταναστεύουν προς την ίδια κατεύθυνση. Για την ταυτόχρονη ανίχνευση ανιόντων με μεγάλη διαφορά στις ευκινήσιες τους, η EOF πρέπει οπωσδήποτε να αντιστραφεί. Διαφορετικά, τα ιδιαίτερα ευκίνητα ανιόντα μετακινούνται προς την άνοδο, ενώ τα ανιόντα χαμηλής ευκινήσιας σαρώνονται από την EOF προς την κάθοδο. Όταν διαχωρίζονται ανιόντα παρόμοιων ευκινήσιων, η ρύθμιση της EOF δεν είναι απαραίτητη, εκτός κι αν θεωρείται χρήσιμη για τη βελτιστοποίηση της ταχύτητας ή της εκλεκτικότητας του διαχωρισμού.



Σχήμα 9.5. Ηλεκτροφερόγραμμα ανάλυσης με CZE, ούρων επιμολυσμένων με το αντιβιοτικό Cefixime (CX) και με κινναμικό οξύ (CA) (α), ηλεκτροφερόγραμμα ανάλυσης Cefixime (CX) και των μεταβολιτών του (β). (Ανατύπωση με άδεια από: Honda, S., Taga, A., Kakehi, K., Koda, S. & Okamoto, Y. (1992). Determination of cefixime and its metabolites by high-performance capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography*, 590, 364-368. Copyright (2014) Elsevier).

9.4.2. Μικυλλιακή Ηλεκτροκινητική Τριχοειδής Χρωματογραφία (MECC)

Η Μικκυλλιακή Ηλεκτροκινητική Τριχοειδής Χρωματογραφία (MECC ή MEKC) είναι ένα υβρίδιο της Ηλεκτροφόρησης και της Χρωματογραφίας. Ο όρος εισήχθη από τον Terabe το 1984 και είναι ένας από τους πιο ευρέως χρησιμοποιούμενους τρόπους διαχωρισμού στη CE. Το βασικό πλεονέκτημα της MECC είναι ότι αποτελεί τη μόνη ηλεκτροφορητική τεχνική, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό τόσο

ουδέτερων, όσο και φορτισμένων ειδών, στην ίδια μέτρηση. Η προσθήκη επιφανειοδραστικών ενώσεων, οι οποίες σχηματίζουν μικύλλια στο ρυθμιστικό διάλυμα, μπορεί να οδηγήσει σε διαχωρισμούς παρόμοιους με αυτούς που συναντώνται στην Υγρή Χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, διατηρώντας, όμως, τα οφέλη της CE. Σε αντίθεση με την CIEF ή την CITP, η MECC στηρίζεται σε μια ισχυρή και ελεγχόμενη EOF.

Τα μικύλλια (ή μικκύλια από το “μικκός”: μικρός) είναι αμφίφιλα σφαιρικά συσσωματώματα μορίων, με διαστάσεις κολλοειδούς, γνωστά ως τασιενεργά ή επιφανειοδραστικά. Είναι μόρια με μακριά αλυσίδα υδρογονάνθρακα (10-50 άτομα άνθρακα) και χαρακτηρίζονται από μια μακριά υδρόφοβη ουρά (μη πολικό ή λιπόφιλο τμήμα) και μια υδρόφιλη κεφαλή (πολικό τμήμα, ιοντικό ή όχι). Τα μικύλλια σχηματίζονται κανονικά σε υδατικό διάλυμα, με τις υδρόφοβες ουρές στραμμένες προς τα μέσα και τις υδρόφιλες κεφαλές στραμμένες προς τα έξω, εκτεθειμένες στον πολικό διαλύτη. Πάνω από μια συγκέντρωση, η οποία είναι γνωστή ως η κρίσιμη μικυλλιακή συγκέντρωση (Critical Micelle Concentration, CMC), τα συσσωματώματα σχηματίζονται πλήρως.

Υπάρχουν τέσσερις κύριες κατηγορίες επιφανειοδραστικών ενώσεων: Ανιοντικές, κατιοντικές, διοντικές και μη ιοντικές. Από αυτές, οι δύο πρώτες είναι οι πιο χρήσιμες στη MECC. Επίσης, έχουν χρησιμοποιηθεί τόσο συνθετικές, όσο και φυσικές ενώσεις. Οι συνθετικές περιλαμβάνουν το ανιοντικό SDS (δωδεκυλοθειικό νάτριο) και τα κατιοντικά CTAB (χλωριούχο κητυλοτριμεθυλαμμώνιο) και DTAB (βρωμιούχο δωδεκυλοτριμεθυλαμμώνιο). Φυσικά απαντώμενες ενώσεις, όπως χολικά άλατα (ταυροχολικό νάτριο, κ.λπ.) είναι, επίσης, χρήσιμες.

Μηχανισμός διαχωρισμού: Η επιφανειοδραστική ένωση και επομένως τα μικύλλια, είναι συνήθως φορτισμένα και μεταναστεύουν είτε προς την ίδια κατεύθυνση, ή αντίθετα προς την EOF (ανάλογα με το φορτίο). Σε ουδέτερο έως αλκαλικό pH, μια ισχυρή EOF κινείται προς την κατεύθυνση της καθόδου. Αν το ανιοντικό SDS χρησιμοποιείται ως επιφανειοδραστική ένωση, η ηλεκτροφορητική μετανάστευση του ανιοντικού μικυλλίου είναι στην κατεύθυνση της ανόδου, δηλαδή, αντίθετα προς την κατεύθυνση της EOF. Ως αποτέλεσμα, η συνολική μικυλλιακή ταχύτητα μετανάστευσης επιβραδύνεται σε σύγκριση με τη ροή του διαλύτη. Όταν μια ουσία συνδέεται με ένα μικύλλιο, η συνολική ταχύτητα μετανάστευσής της επιβραδύνεται. Όταν μια αφορτιστή ουσία παραμένει στην κύρια μάζα του διαλύτη, η ταχύτητα μετανάστευσής της είναι εκείνη της EOF. Έτσι, οι προσδιοριζόμενες ουσίες που έχουν μεγαλύτερη συγγένεια για το μικύλλιο, έχουν πιο αργή ταχύτητα μετανάστευσης, σε σύγκριση με εκείνες που περνούν το μεγαλύτερο μέρος του χρόνου τους στην υδατική φάση. Δεδομένου ότι η EOF είναι γενικά ταχύτερη από την ταχύτητα μετανάστευσης των μικυλλίων σε ουδέτερο ή βασικό pH, η καθαρή κίνηση είναι προς την κατεύθυνση της EOF. Κατά τη μετανάστευση, τα μικύλλια μπορούν να αλληλεπιδρούν με τις προσδιοριζόμενες ουσίες με χρωματογραφικό τρόπο, διαμέσου υδρόφοβων και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων.

Για τα ουδέτερα είδη, μόνο η κατανομή τους μέσα και έξω από τα μικύλλια επηρεάζει το διαχωρισμό. Όσο περισσότερο αλληλεπιδρά η προσδιοριζόμενη ουσία με το μικύλλιο, τόσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος μετανάστευσής της, αφού το μικύλλιο την μεταφέρει σε κατεύθυνση αντίθετη της EOF. Όταν η προσδιοριζόμενη ουσία δεν είναι σε επαφή με το μικύλλιο, μεταφέρεται απλά με την EOF. Οι πιο υδρόφοβες ουσίες αλληλεπιδρούν πιο έντονα με τα μικύλλια και “συγκρατούνται” περισσότερο στον τριχοειδή.

Κατά την εξέταση των θεμελιωδών εξισώσεων που διέπουν τη MECC (εξισώσεις 9.18 και 9.19), τόσο ο παράγοντας συγκράτησης (ή χωρητικότητας), k' , όσο και η διαχωριστική ικανότητα, R , σε άπειρη συγκέντρωση μικυλλίων, απλοποιούνται στις γενικές εξισώσεις της LC. Ο μηχανισμός διαχωρισμού των ουδέτερων μορίων στη MECC, είναι ουσιαστικά χρωματογραφικός και μπορεί να περιγραφεί με τη χρήση τροποποιημένων χρωματογραφικών σχέσεων. Ο λόγος των συνολικών moles μιας ουσίας στο μικύλλιο, δηλαδή, στην ψευδοστατική φάση, προς τα moles στην κινητή φάση (παράγοντας συγκράτησης, k'), δίνεται από τη σχέση:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0 \left(1 - \frac{t_R}{t_{mc}} \right)} = K \left(\frac{V_S}{V_M} \right) \quad (9.18)$$

όπου: t_0 = χρόνος συγκράτησης της προσδιοριζόμενης ουσίας

t_o = χρόνος συγκράτησης του μη-συγκρατημένου συστατικού, που κινείται με την ταχύτητα της EOF (ή νεκρός χρόνος)

t_{mc} = χρόνος συγκράτησης των μικυλλίων
 K = συντελεστής κατανομής
 V_S = όγκος της φάσης των μικυλλίων
 V_M = όγκος της κινητής φάσης

Η εξίσωση αυτή είναι μια τροποποίηση της κανονικής χρωματογραφικής περιγραφής του k' για να ερμηνεύσει την κίνηση της ψευδοστατικής φάσης. Καθώς το t_{mc} γίνεται άπειρο (δηλαδή, το μικύλλιο γίνεται πραγματικά στατικό) η εξίσωση απλοποιείται στη συμβατική μορφή της.

Ο διαχωρισμός δύο ειδών στη MECC, μπορεί να περιγραφεί από τη σχέση:

$$R = \left(\frac{\sqrt{N}}{4} \right) \left(\frac{a-1}{a} \right) \left(\frac{k'_2}{k'_2+1} \right) \left(\frac{1-(t_0/t_{mc})}{1-(t_0/t_{mc}) \cdot k'_1} \right) \quad (9.19)$$

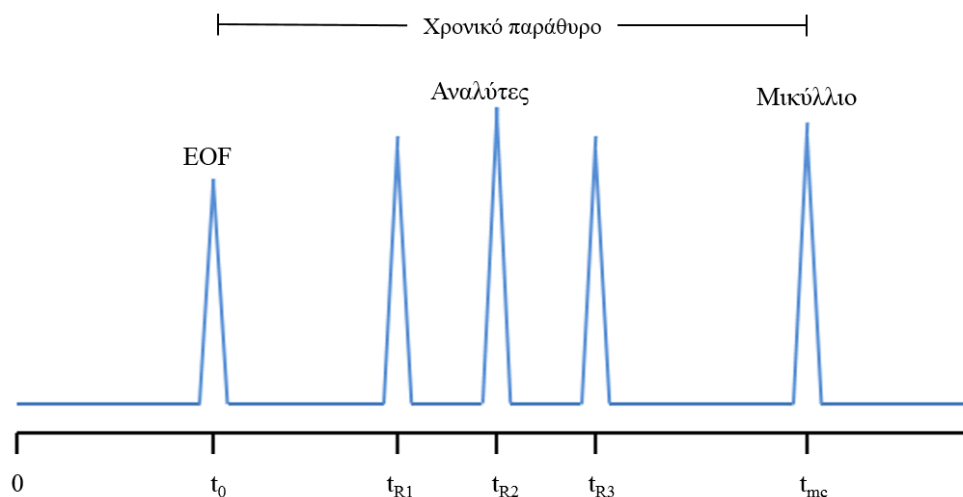
όπου: $\alpha = k'_2/k'_1$

Όπως προκύπτει από την εξίσωση (9.19), ο διαχωρισμός μπορεί να βελτιωθεί με βελτιστοποίηση της απόδοσης διαχωρισμού (N), της εκλεκτικότητας (α) και/ή του παράγοντα συγκράτησης (k').

Η διαχωριστική ικανότητα βελτιώνεται, αυξάνοντας το εύρος έκλυσης (χρονικό παράθυρο). Κατά το διαχωρισμό ουδέτερων μορίων, αυτά εκλύονται σε χρόνο μεταξύ t_0 (χρόνος συγκράτησης της EOF) και t_{mc} (χρόνος συγκράτησης των μικυλλίων), όπως φαίνεται στο **Σχήμα 9.6**. Υδροφιλά συστατικά που δεν αλληλεπιδρούν με τα μικύλλια, εκλύονται μαζί με την EOF και αυτά που συγκρατούνται από τα μικύλλια, εκλύονται μαζί μ' αυτά. Ενώ το διάστημα t_0 έως t_{mc} είναι σχετικά μικρό, η χωρητικότητα κορυφών μπορεί να είναι πολύ μεγάλη, λόγω της υψηλής απόδοσης διαχωρισμού. Είναι επιθυμητό να χρησιμοποιούμε συνθήκες οι οποίες ανοίγουν το χρονικό παράθυρο, δηλαδή, μέτρια EOF και μικύλλια που εμφανίζουν υψηλή ευκινησία.

Η εκλεκτικότητα μπορεί εύκολα να προσαρμοστεί στη MECC. Μεταβάλλοντας τη φύση (δηλαδή, μέγεθος, φορτίο, γεωμετρία) του μικυλλίου με τη χρήση διαφορετικών τασιενεργών ενώσεων, μπορεί να προκύψουν δραματικές αλλαγές στην εκλεκτικότητα, παρόμοιες με εκείνες που λαμβάνονται με αλλαγή της στατικής φάσης στην LC. Σε κάθε κατηγορία, το μήκος της αλυσίδας του αλκύλιου ή η δομή μπορεί, επίσης, να ποικίλλει. Σε όλες τις περιπτώσεις, οι μεταβολές στη συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος, το pH, η θερμοκρασία, ή η χρήση πρόσθετων, όπως ουρία, μεταλλικά ιόντα, ή χειρόμορφοι επιλογείς μπορούν, επίσης, να χρησιμοποιηθούν για να επηρεάσουν την εκλεκτικότητα.

Οι επιφανειοδραστικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται στη MECC, μπορεί ακόμη να αλληλεπιδράσουν με τα τοιχώματα του τριχοειδούς και να έχουν δραματικές επιπτώσεις στην EOF και στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ προσδιοριζόμενων ουσιών-τοιχωμάτων τριχοειδούς.

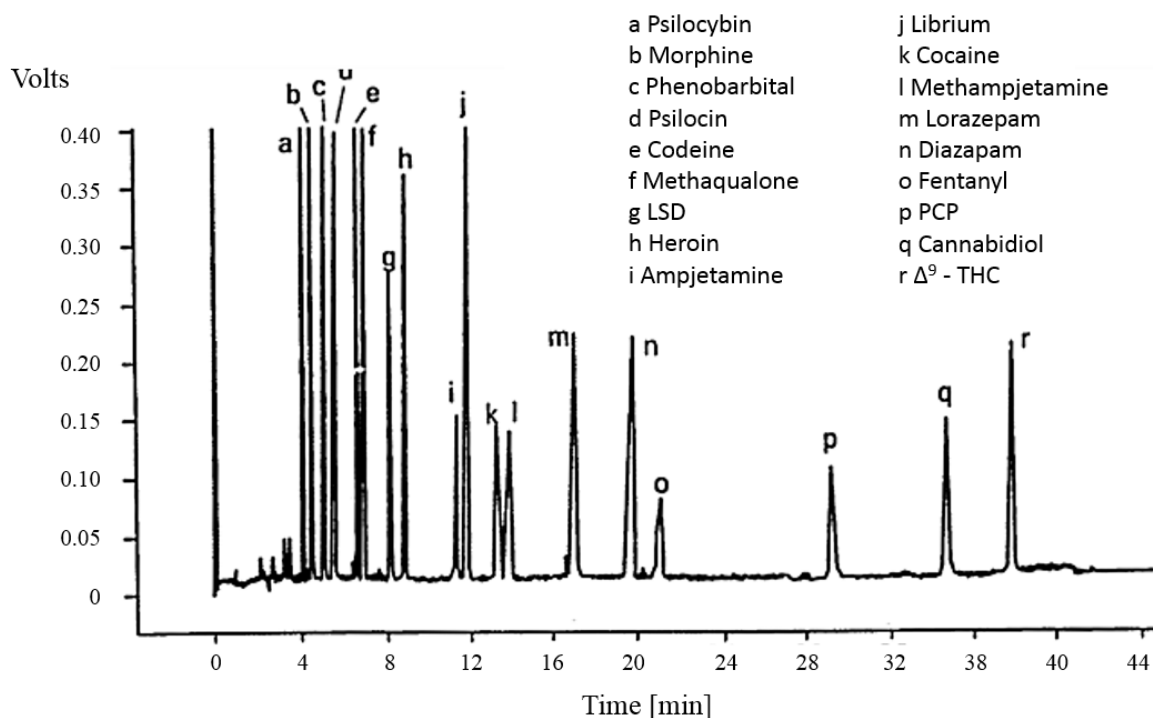


Σχήμα 9.6. Εύρος έκλυσης ουδέτερων μορίων στη MECC

Με ανιοντικά μικύλλια SDS, η γενική σειρά μετανάστευσης στον τριχοειδή θα είναι ανιόντα, ουδέτερα και κατιόντα. Τα ανιόντα ξεοδεύουν περισσότερο από το χρόνο τους στην κύρια μάζα του υγρού, εξαιτίας ηλεκτροστατικών αποθήσεων από τα μικύλλια. Όσο μεγαλύτερο είναι το ανιοντικό φορτίο, τόσο ταχύτερη είναι η έκλουση. Τα ουδέτερα μόρια διαχωρίζονται αποκλειστικά με βάση την υδροφοβικότητα. Τα κατιόντα εκλούνται τελευταία, λόγω της ισχυρής ηλεκτροστατικής έλξης (π.χ. σχηματισμός ζεύγους ιόντων με το μικύλλιο). Ενώ αυτό ισχύει γενικά, οι ισχυρές υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μπορεί να υπερβούν τις ηλεκτροστατικές δυνάμεις. Ομοίως, η ηλεκτροφορητική μετανάστευση των συστατικών ενός δείγματος μπορεί, επίσης, να επηρεάσει τη σειρά έκλουσης. Όταν χρησιμοποιείται κατιοντική επιφανειοδραστική ένωση, η EOF αντιστρέφεται και η πολικότητα των ηλεκτροδίων πρέπει να αντιστραφεί ώστε να είναι δυνατή η ανίχνευση μιας ουσίας. Η κατεύθυνση της προσδιοριζόμενης ουσίας και η μετανάστευση του μικυλλίου ποικίλλουν και εξαρτώνται από το φορτίο του μικυλλίου και την ταχύτητα της EOF. Γενικώς, χρησιμοποιούνται ρυθμιστικά διαλύματα υψηλού pH, για να διατηρηθεί ισχυρή EOF και να εξασφαλιστεί η κατεύθυνση της μετανάστευσης.

Εφαρμογές της MECC: Η MECC είναι μια δυναμική ηλεκτροφορητική τεχνική, δεδομένου ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό φορτισμένων και αφόρτιστων ουσιών και για ένα ευρύ φάσμα ουσιών, με υδρόφιλα ή υδρόφοβα χαρακτηριστικά. Οι εφαρμογές περιλαμβάνουν αμινοξέα, νουκλεοτίδια, βιταμίνες, ένα ευρύ φάσμα φαρμακευτικών προϊόντων, αρωματικών υδρογονανθράκων κ.λπ.

Σε ό,τι αφορά τα φαρμακευτικά προϊόντα, η MECC χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των δραστικών ουσιών σε δισκία, κρέμες και ενέσιμα σκευάσματα. Εφαρμόζεται, επίσης, και στον προσδιορισμό παράνομων ναρκωτικών ουσιών για ιατροδικαστικούς σκοπούς και, γενικώς, στην ανάλυση μιας μεγάλης ποικιλίας δειγμάτων ιατροδικαστικού ενδιαφέροντος (**Σχήμα 9.7**). Ουσίες που είναι δύσκολο να προσδιοριστούν με GC, όπως οι φαινιθυλαμίνες, βενζοδιαζεπίνες, ερυσιβώδη αλκαλοειδή (ergot alkaloids), psilocybin (φυσική ψυχεδελική ουσία η οποία παράγεται από μανιτάρια) και το παραισθησιογόνο φαινκυκλιδίνη ή σκόνη των αγγέλων (PCP), μπορούν να προσδιοριστούν με MECC. Για το LSD η MECC θεωρήθηκε ανώτερη από την HPLC, η οποία χρησιμοποιείται συνήθως.

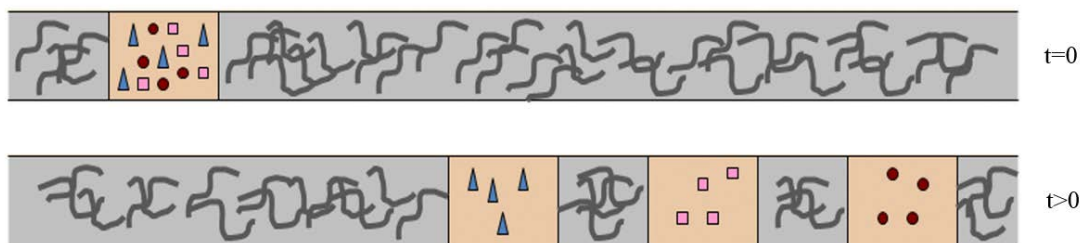


Σχήμα 9.7. Χρήση της MECC στον προσδιορισμό παραισθησιογόνων ουσιών. (Ανατύπωση με άδεια από: Weinberger, R. & Lurie, I.S. (1991). *Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography of Illicit Drug Substances*. Analytical Chemistry, 63, 823-827. Copyright (2014) American Chemical Society).

9.4.3. Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση Πηκτής (CGE)

Η Ηλεκτροφόρηση Πηκτής έχει χρησιμοποιηθεί κατά κύριο λόγο στις βιολογικές επιστήμες για διαχωρισμούς που βασίζονται στο μέγεθος μακρομορίων, όπως οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα. Ο διαχωρισμός μεγέθους επιτυγχάνεται με ηλεκτροφόρηση των προσδιοριζόμενων ουσιών μέσα από ένα κατάλληλο πολυμερές, το οποίο δρα ως «μοριακό κόσκινο». Αυτή η μορφή της ηλεκτροφόρησης ζώνης απεικονίζεται στο **Σχήμα 9.8**. Καθώς οι φορτισμένες ουσίες μεταναστεύουν μέσω του δικτύου του πολυμερούς, παρεμποδίζονται, τα μεγαλύτερα μόρια περισσότερο απ' ό,τι τα μικρότερα. Μακρομόρια όπως το DNA, δεν μπορούν να διαχωριστούν χωρίς την παρουσία γέλης, επειδή περιέχουν αναλογίες μάζας- φορτίου που δε μεταβάλλεται με το μέγεθος. Δηλαδή, με το DNA για παράδειγμα, κάθε πρόσθετο νουκλεοτίδιο που προστίθεται σε μια αλυσίδα του DNA, προσθέτει μια ισοδύναμη μονάδα μάζας και φορτίου και δεν επηρεάζει την ευκινησία σε ελεύθερο διάλυμα.

Η Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση Πηκτής (CGE) είναι άμεσα συγκρίσιμη με την παραδοσιακή επίπεδη ηλεκτροφόρηση ή την ηλεκτροφόρηση πηκτής σε σωλήνα, δεδομένου ότι οι μηχανισμοί διαχωρισμού είναι ταυτόσημοι. Η CGE, όμως, μπορεί να προσφέρει μια σειρά από πλεονεκτήματα, συμπεριλαμβανομένης της χρήσης υψηλότερων ηλεκτρικών πεδίων (10 έως 100 φορές), χωρίς τα επιβλαβή αποτελέσματα της θέρμανσης Joule (παρόλο που στην παραδοσιακή Ηλεκτροφόρηση Πηκτής πρόσφατα έχουν χρησιμοποιηθεί πηκτές σε εξαιρετικά λεπτές πλάκες, για να περιορίσουν τη θέρμανση), ανίχνευση επάνω στον τριχοειδή (on-capillary) και οργανολογικό αυτοματισμό. Επιπλέον, λόγω της ιδιότητας του τριχοειδούς να μη μεταδίδει τη θερμότητα με μεταγωγή, δεν είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθεί πηκτική.



Σχήμα 9.8. Απεικόνιση διαχωρισμού στη CGE

Παραδοσιακά, διασταυρούμενες αλυσίδες πηκτής πολυακρυλαμιδίου και αγαρόζης έχουν χρησιμοποιηθεί σε επίπεδη διάταξη ή σε σωλήνα. Το πολυακρυλαμίδιο έχει, συνήθως, μικρότερες αποστάσεις πλέγματος (ή μεγέθη πόρων) και χρησιμοποιείται για διαχωρισμούς πρωτεϊνών.

Η διαχωριστική ικανότητα και η απόδοση του διαχωρισμού στη CGE είναι πανομοιότυπες με εκείνες της CZE, δεδομένου ότι και οι δύο είναι τεχνικές ηλεκτροφόρησης ζώνης. Μια αξιοσημείωτη διαφορά μεταξύ τους είναι η εξαιρετικά υψηλή απόδοση διαχωρισμού, η οποία είναι εφικτή σε διαχωρισμούς DNA, με τη CGE. Όπως και στη CZE, η εκλεκτικότητα στη CGE μπορεί να μεταβληθεί με την προσθήκη χειρόμορφων επιλογέων, αντιδραστηρίων σχηματισμού ζευγών ιόντων, ή άλλου παράγοντα συμπλοκοποίησης (όπως βρωμιούχο αιθίδιο για το DNA και SDS για πρωτεΐνες). Αυτά τα είδη μπορούν να συνδεθούν ομοιοπολικά με την πηκτική ή απλώς προστίθενται στο ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης.

Η CGE τυπικά εκτελείται σε τριχοειδείς εσωτερικής διαμέτρου 50 - έως 100 μm και μήκους περίπου 10 cm έως 1m. Καλύτεροι διαχωρισμοί διεξάγονται σε μακρύτερους τριχοειδείς, αλλά οι χρόνοι ανάλυσης είναι μεγάλοι. Η σύνθεση της γέλης στον τριχοειδή μπορεί να ρυθμιστεί για να βελτιστοποιηθεί η ανάλυση. Για παράδειγμα, η αύξηση της συγκέντρωσης της γέλης βελτιώνει την ανάλυση, αλλά μειώνει το εύρος μοριακού βάρους των προσδιοριζόμενων ουσιών. Η εφαρμοζόμενη τάση είναι ένας περιοριστικός παράγοντας, αφού εντάσεις πεδίου πάνω από 500 V / cm μπορεί να προκαλέσουν θέρμανση του τριχοειδούς και να δημιουργήσουν κενά στη γέλη.

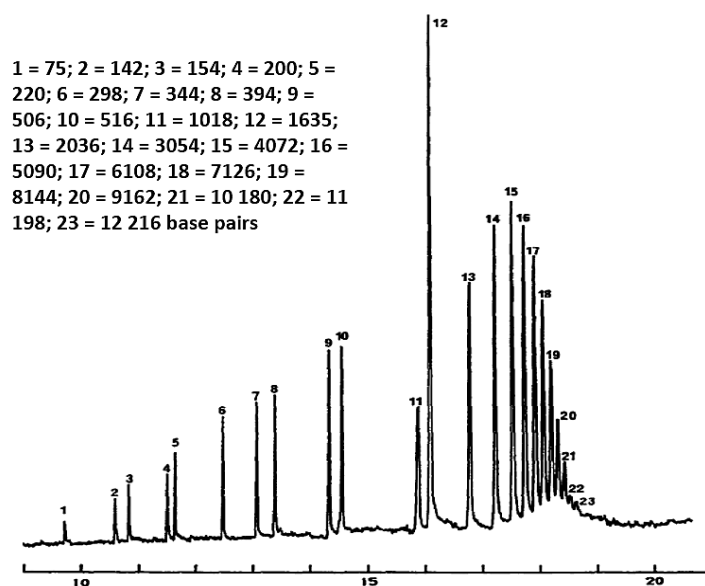
Εφαρμογές της CGE: Η CGE έχει χρησιμοποιηθεί σε εφαρμογές τόσο της μοριακής βιολογίας, όσο και της πρωτεϊνικής χημείας. Η πρώτη περιλαμβάνει την ανάλυση καθαρότητας ολιγονουκλεοτιδίων, γονιδιακή θεραπεία, ταυτοποίηση αλληλουχιών DNA, την ανάλυση προϊόντων PCR (Protein Chain Reaction, Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης) και ιατροδικαστική ανάλυση DNA. Η τελευταία περιλαμβάνει διαχωρισμούς τόσο φυσικών πρωτεϊνών, όσο και συμπλοκοποιημένων με SDS. Διαχωρισμός θραυσμάτων

δίκλωνου DNA έχει, επίσης, πραγματοποιηθεί επιτυχώς με CGE. Το δίκλωνο DNA μπορεί να διαχωριστεί με φυσικές πηκτές. Γενικότερα, τα γραμμικά πηκτώματα με πιο ανοικτή δομή ή ελάχιστα σταυροειδείς δεσμούς είναι καταλληλότερα γι' αυτά τα μεγάλα μόρια, όπως το DNA, τα οποία μπορούν να κυμαίνονται σε μέγεθος, από λίγα ζεύγη βάσεων έως περισσότερα από 10^6 ζεύγη βάσεων (Σχήμα 9.9). Τριχοειδείς με τροποποιημένη επιφάνεια χρησιμοποιούνται καλύτερα, δεδομένου ότι η ηλεκτροοσμωτική ροή εξαλείφεται εντελώς. Υπό αυτές τις συνθήκες, ο χρόνος μετανάστευσης των θραυσμάτων σχετίζεται άμεσα με τον αριθμό των βάσεων του DNA. Αυτοί οι διαχωρισμοί είναι πολύ αποτελεσματικοί, καθόσον μία κορυφή που αντιπροσωπεύει, για παράδειγμα 118 ζεύγη βάσεων, αποδίδει περίπου 2.000.000 θεωρητικές πλάκες ανά μέτρο.

Στον τομέα των πρωτεϊνών, αρκετή έρευνα έχει πραγματοποιηθεί με χρήση πηκτωμάτων και SDS για διαχωρισμούς με βάση το μέγεθος. Έχουν χρησιμοποιηθεί τόσο τα συνήθη πηκτώματα SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis), όσο και γραμμικά πηκτώματα με SDS. Εναλλακτικά, χρησιμοποιούνται γραμμικά πολυμερή δεξτράνης, δεδομένου ότι προσφέρουν μεγαλύτερη σταθερότητα πηκτώματος και χαμηλότερη απορρόφηση υποβάθρου, σε χαμηλά μήκη κύματος.

Πρωτεΐνες μετουσιωμένες με 2-μερκαπτοαιθανόλη, συνήθως, αναλύονται με ένα σύστημα SDS-PAGE. Δεδομένων αυτών των συνθηκών, όλες οι πρωτεΐνες έχουν την ίδια αναλογία φορτίου - μάζας, αφού το κανονικό φορτίο τους επισκιάζεται από το δεσμό τους με το SDS. Πράγματι, μια σταθερή ποσότητα SDS, 1,4 g, προσροφάται σε κάθε γραμμάριο πρωτεΐνης. Το SDS είναι ανιοντικό και γι' αυτό, όλες οι πρωτεΐνες γίνονται αρνητικά φορτισμένες και μεταναστεύουν προς την άνοδο. Οι πρωτεΐνες ξεδιπλώνονται (με την προϋπόθεση ότι οι δισουλφιδικοί δεσμοί σπάζουν) και η δομή τους γίνεται τέτοια ώστε να επιτρέπει ομοιόμορφο μοριακό κοσκίνισμα, για διαχωρισμό μεγέθους. Ένα τυπικό ρυθμιστικό διάλυμα είναι το 90 mM Tris-φωσφορικό, pH 8,6, με 0,1% SDS. Στη CGE χρησιμοποιείται ηλεκτροκινητική έγχυση δείγματος, δεδομένου ότι έγχυση υπό πίεση θα οδηγούσε σε εξώθηση του πηκτώματος. Χρησιμοποιούνται, επίσης, κοντοί τριχοειδείς, 10-20 cm, με εντάσεις πεδίου που πλησιάζουν τα 400 V/cm. Υπ' αυτές τις συνθήκες, υπάρχει γραμμική συσχέτιση μεταξύ της ευκινησίας και του μοριακού βάρους. Ο λογάριθμος της ευκινησίας ως προς την εκατοστιαία σύσταση του μονομερούς (% T) της γέλης έχει, επίσης, γραμμική εξάρτηση. Οι πρωτεΐνες, συνήθως, μετουσιώνονται σε 1% SDS και 2% β-μερκαπτοαιθανόλη για 30 λεπτά στους 90°C.

Όπως στη συμβατική ηλεκτροφόρηση πηκτής, οι χρόνοι μετανάστευσης μειώνονται, καθώς αυξάνεται το μέγεθος πόρων (χαμηλότερο % T). Οι χρόνοι διαχωρισμού μπορεί, επίσης, να μειωθούν με τη χρήση υψηλότερων τάσεων, με την προϋπόθεση ότι η απαγωγή θερμότητας είναι επαρκής. Κοντοί τριχοειδείς μπορούν ακόμη να χρησιμοποιηθούν στην ίδια ένταση πεδίου, για να επιταχύνουν περαιτέρω το διαχωρισμό.

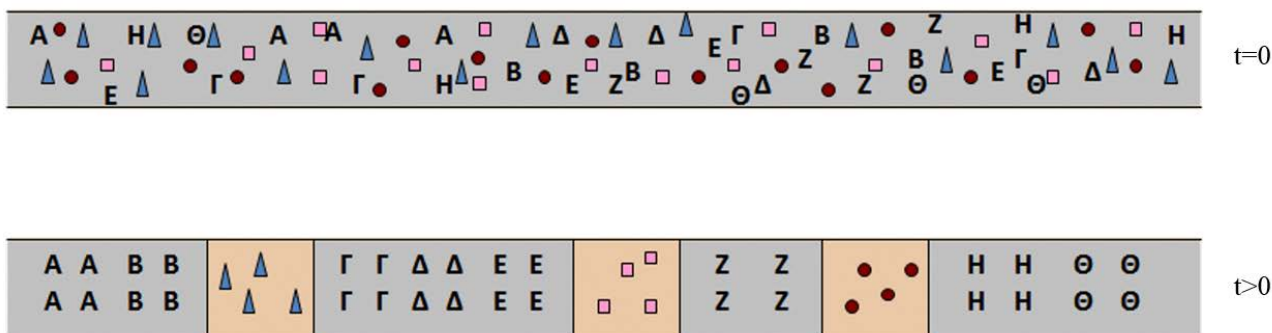


Σχήμα 9.9. CGE διαχωρισμός 1000 ζευγών βάσεων DNA. Συνθήκες: δις-διασταυρωμένο πολυακρυλαμίδιο(3% T, 0,5% C), 100mM Tris-βορικό, pH 8,3, E=250V/cm, i=12,5μA, Ld=30cm, Lt=40cm, id=75μm, λ=260nm, τριχοειδής με επικάλυψη πολυακρυλαμιδίου. (Ανατύπωση με άδεια από: Heiger, D.N., Cohen A.S.& Karger B.L. (1990). Separation of DNA restriction fragments by high performance capillary electrophoresis with low and zero crosslinked polyacrylamide using continuous and pulsed electric fields. *Journal of Chromatography*, 516, 33-48. Copyright (2014) Elsevier).

9.4.4. Τριχοειδής Ισοηλεκτρική Εστίαση (CIEF)

Η Τριχοειδής Ισοηλεκτρική Εστίαση (CIEF) είναι μια ηλεκτροφορητική τεχνική υψηλής απόδοσης, η οποία για το διαχωρισμό πεπτιδίων και πρωτεϊνών, με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο (pI). Η CIEF μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό πρωτεϊνών, που το pI τους διαφέρει λιγότερο από 0,005 μονάδες. Θεμελιώδης προϋπόθεση της CIEF είναι ότι ένα μόριο θα μεταναστεύει μέσα στον τριχοειδή εφόσον έχει φορτίο.

Στη CIEF σχηματίζεται μια βαθμίδωση pH μέσα στον τριχοειδή, όπου το pH είναι χαμηλό στην άνοδο και υψηλό στην κάθοδο, χρησιμοποιώντας αμφολύτες. Οι αμφολύτες είναι μόρια τα οποία περιέχουν και όξινη και βασική χαρακτηριστική ομάδα (δηλαδή, είναι διπολικά ιόντα), των οποίων τα ισοηλεκτρικά σημεία καλύπτουν την επιθυμητή περιοχή pH (pH 3 έως 9, για παράδειγμα). Μετά την πλήρωση του τριχοειδούς με ένα μείγμα συστατικών (δείγματος) και αμφολυτών, σχηματίζεται βαθμίδωση του pH. Με βασικό διάλυμα ηλεκτρολύτη στην κάθοδο και όξινο διάλυμα στην άνοδο, κατά την εφαρμογή του ηλεκτρικού πεδίου οι φορτισμένοι αμφολύτες και οι πρωτεΐνες μεταναστεύουν, έως ότου φθάσουν σε μια περιοχή όπου το φορτίο τους μηδενίζεται (στο pI τους). Εκεί, παύουν να μετακινούνται και εστιάζονται με τη μορφή ζωνών. Αυτή η διαδικασία είναι γνωστή ως “εστίαση”. Οι πρωτεϊνικές ζώνες παραμένουν στενές, δεδομένου ότι αν μια πρωτεΐνη εισέλθει σε μια ζώνη διαφορετικού pH, αποκτά φορτίο και αναγκάζεται να επιστρέψει στην αρχική της ζώνη, μηδενικού φορτίου. Η συνολική διαδικασία διαχωρισμού απεικονίζεται στο **Σχήμα 9.10**.



Σχήμα 9.10. Απεικόνιση διαχωρισμού στην Τριχοειδή Ισοηλεκτρική Εστίαση.

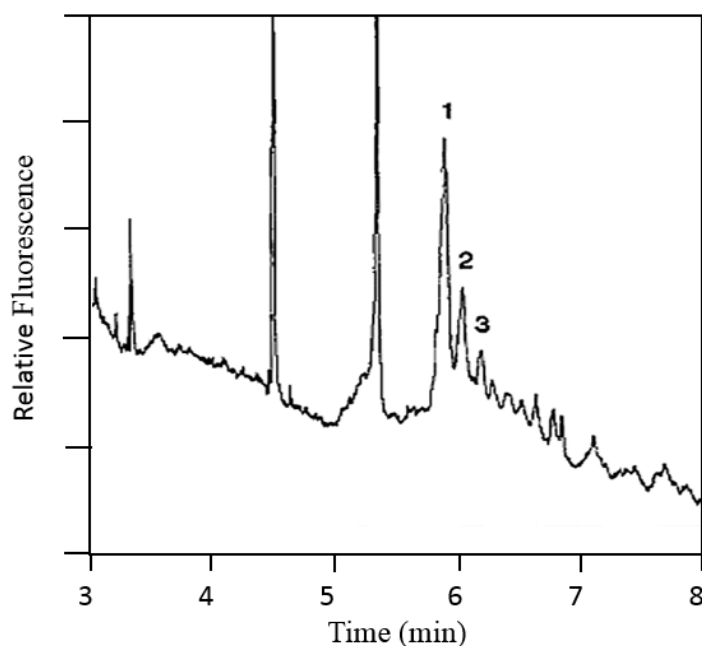
Για παράδειγμα, ουσία με καθαρό αρνητικό φορτίο θα μεταναστεύσει αρχικά προς την άνοδο, όπου συναντά ρυθμιστικό διάλυμα χαμηλού pH. Στο τέλος, η ουσία συναντά ένα pH, όπου το καθαρό φορτίο της γίνεται μηδέν, στο ισοηλεκτρικό σημείο (pI), και η μετανάστευση σταματά. Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των αμφολυτών στο διάλυμα, τόσο ομαλότερη είναι η βαθμίδωση του pH. Το pH του ανοδικού ρυθμιστικού διαλύματος πρέπει να είναι χαμηλότερο από το pI του πιο όξινου αμφολύτη, για να αποτρέψει τη μετανάστευση εντός του προσδιοριζόμενου συστατικού. Ομοίως, το καθοδικό ρυθμιστικό διάλυμα πρέπει να έχει ένα υψηλότερο pH από το pI του πιο βασικού αμφολύτη. Η CIEF χρησιμοποιείται, γενικά, για υψηλής απόδοσης διαχωρισμούς πρωτεϊνών και πολυπεπτιδίων, αλλά θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για οποιαδήποτε αμφοτερική ουσία, υπό την προϋπόθεση ότι χρησιμοποιείται μια σειρά από αμφολύτες, που καλύπτουν ολόκληρο το εύρος τιμών pI.

Η εστίαση των ζωνών γίνεται αντιληπτή από το ρεύμα. Όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία, επιτυγχάνεται κατάσταση ισορροπίας (steady state) και δεν υπάρχει διέλευση ρεύματος. Μετά την εστίαση, τα συστατικά του δείγματος και οι αμφολύτες κινητοποιούνται και οι ζώνες αρχίζουν να μετακινούνται προς τον ανιχνευτή. Η κινητοποίησή τους μπορεί να επιτευχθεί είτε με εφαρμογή πίεσης στον τριχοειδή, είτε με την προσθήκη άλατος σ' ένα από τα δοχεία του φέροντος ηλεκτρολύτη.

Η EOF πρέπει να ελαττωθεί ή να εξαλειφθεί εντελώς, επειδή υπάρχει κίνδυνος η ροή να παρασύρει τους αμφολύτες έξω από τον τριχοειδή, πριν επιτευχθεί η εστίαση των ζωνών. Η ελάττωση ή η εξάλειψή της γίνεται με επικάλυψη των τοιχωμάτων του τριχοειδούς (ομοιοπολική ή δυναμική). Η δυναμική επικάλυψη έχει το πλεονέκτημα της απλότητας, αλλά η επίτευξη αναπαραγωγίμων EOF είναι συχνά δύσκολη. Η επικάλυψη (δυναμική ή ομοιοπολική) είναι, επίσης, χρήσιμη για τον περιορισμό της προσρόφησης των πρωτεϊνών στα τοιχώματα του τριχοειδούς.

Τα τρία βασικά βήματα της CIEF είναι η φόρτωση του δείγματος, η εστίαση και η κινητοποίηση των ζωνών. Το δείγμα αναμιγνύεται με τους κατάλληλους αμφολύτες, σε μια τελική συγκέντρωση 1-2 % αμφολυτών. Οι υποδοχείς του ρυθμιστικού διαλύματος γεμίζονται με υδροξείδιο του νατρίου (κάθοδος) και φωσφορικό οξύ (άνοδος) και εφαρμόζονται ηλεκτρικά πεδία της τάξης των 500-700 V/cm. Καθώς προχωρά η εστίαση, το ρεύμα πέφτει κάτω από το 1μΑ. Η κινητοποίηση των εστιασμένων ζωνών μπορεί να επιτευχθεί είτε προς την κατεύθυνση της καθόδου, είτε προς την κατεύθυνση της ανόδου. Για κινητοποίηση προς την κάθοδο, ο υποδοχέας προς την πλευρά της καθόδου γεμίζεται με διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου-χλωριούχου νατρίου. Για κινητοποίηση προς την άνοδο, το χλωριούχο νάτριο προστίθεται στον υποδοχέα ανόδου. Η προσθήκη άλατος μεταβάλλει το pH στον τριχοειδή, όταν εφαρμόζεται τάση, καθώς τα ανιόντα / κατιόντα ανταγωνίζονται με τη μετανάστευση των ιόντων υδροξυλίου / υδρονίου. Καθώς το pH έχει αλλάξει, τόσο οι αμφολύτες όσο και οι πρωτεΐνες κινητοποιούνται προς την κατεύθυνση όπου έχει προστεθεί άλας. Επίσης, όσο προχωρεί η κινητοποίηση των ζωνών, το ρεύμα αυξάνεται καθώς τα ιόντα του άλατος μεταναστεύουν μέσα στον τριχοειδή.

Εφαρμογές της CIEF: Η CIEF έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για τον προσδιορισμό του ισοηλεκτρικού σημείου των πρωτεϊνών και για το διαχωρισμό ισομορφών των πρωτεϊνών και άλλων ειδών πρωτεϊνών, τα οποία δεν μπορούν να διαχωριστούν με άλλες μεθόδους, συμπεριλαμβανομένων των ανοσοσφαιρινών και των αιμοσφαιρινών (**Σχήμα 9.11**), των μεταφραστικών τροποποιήσεων των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, καθώς στην ανάλυση αραιών βιολογικών διαλυμάτων.



Σχήμα 9.11. Ηλεκτροφερόγραμμα CIEF διαχωρισμού των αιμοσφαιρινών F , A_0 και F_{ac} (κορυφές 1,2 και 3 αντίστοιχα) από εμβρυϊκό ερυθρό αιμοσφαίριο. (Ανατύπωση με άδεια από: Lillard, S.J.& Yeung, E. S. (1996). Analysis of single erythrocytes by injection-based capillary isoelectric focusing with laser-induced native fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 687, 363-369. Copyright (2014) Elsevier).

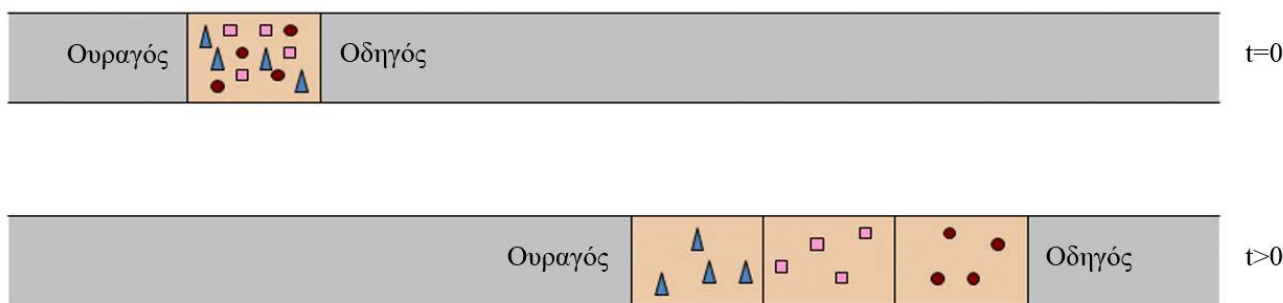
9.4.5. Τριχοειδής Ισοταχοφόρηση (CITP)

Η Τριχοειδής Ισοταχοφόρηση (CITP) είναι μια ηλεκτροφορητική τεχνική “κινούμενων ορίων”. Στη CITP, χρησιμοποιείται ένας συνδυασμός δύο συστημάτων ρυθμιστικών διαλυμάτων, για να δημιουργηθεί μια κατάσταση, στην οποία οι διαχωρισμένες ζώνες κινούνται όλες με την ίδια ταχύτητα. Όπως η CIEF, έτσι και η CITP στηρίζεται σε μηδενική ηλεκτροωσμωτική ροή και το ρυθμιστικό σύστημα είναι ετερογενές. Τα δύο άκρα του τριχοειδούς είναι εμβαπτισμένα μαζί με τα αντίστοιχα ηλεκτρόδια σε δοχεία με διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα. Το ένα ονομάζεται οδηγός (leading electrolyte) και το άλλο ουραγός (terminating electrolyte). Το δείγμα εισάγεται στον τριχοειδή, στο σημείο επαφής των δύο ηλεκτρολυτών. Οι ζώνες παραμένουν “στριμωγμένες” μεταξύ των λεγόμενων “οδηγού” και “ουραγού” ηλεκτρολύτη. Σε κάθε

συγκεκριμένο διαχωρισμό, τόσο ο οδηγός όσο και ο ουραγός ηλεκτρολύτης περιέχουν από ένα ιόν ομόσημα φορτισμένο με τα ιόντα του δείγματος που θέλουμε να διαχωριστούν, αλλά με διαφορετική ευκινησία απ' αυτά. Σ' ένα πείραμα CITP μπορούν να αναλυθούν είτε μόνο κατιόντα, είτε μόνο ανιόντα. Ο οδηγός ηλεκτρολύτης περιέχει ένα ιόν με ευκινησία μεγαλύτερη από τις ευκινησίες των ιόντων του δείγματος κι ο ουραγός ηλεκτρολύτης περιέχει ένα ιόν, με ευκινησία μικρότερη απ' αυτήν των ιόντων του δείγματος.

Για τις αναλύσεις ανιόντων, για παράδειγμα, τα ρυθμιστικά διαλύματα πρέπει να επιλεγούν έτσι ώστε, ο οδηγός ηλεκτρολύτης να περιέχει ένα ανιόν με ηλεκτροφορητική ευκινησία υψηλότερη από εκείνη των ανιόντων του δείγματος. Ομοίως, το ανιόν του ουραγού ηλεκτρολύτη πρέπει να έχει χαμηλότερη ευκινησία απ' αυτήν των ανιόντων του δείγματος. Όταν εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο, τα ανιόντα αρχίζουν να μεταναστεύουν προς την άνοδο. Επειδή το προπορευόμενο ανιόν, του οδηγού ηλεκτρολύτη, έχει την υψηλότερη ευκινησία όλων, κινείται ταχύτερα, ακολουθούμενο από το ανιόν με την επόμενη υψηλότερη ευκινησία και ούτω καθεξής. Στη CITP τα επιμέρους ανιόντα μεταναστεύουν σε διακριτές ζώνες, αλλά όλες κινούνται με την ίδια ταχύτητα, όπως ορίζεται από την ταχύτητα του οδηγού ανιόντος. Η διαδικασία διαχωρισμού απεικονίζεται στο **Σχήμα 9.12**.

Στη CITP δημιουργείται μια κατάσταση σταθερής ταχύτητας, δεδομένου ότι το ηλεκτρικό πεδίο μεταβάλλεται σε κάθε ζώνη. Το πεδίο είναι αυτορυθμιζόμενο, για να διατηρείται σταθερή η ταχύτητα (ταχύτητα = ευκινησία x πεδίο), με το χαμηλότερο πεδίο στη ζώνη υψηλότερης ευκινησίας. Το φαινόμενο αυτό διατηρεί πολύ αυστηρά όρια μεταξύ των ζωνών. Εάν ένα ιόν διαχυθεί σε μια γειτονική ζώνη, μεταβάλλεται η ταχύτητά του και επιστρέφει αμέσως στη δική του ζώνη. Έτσι, συμβαίνει μια βαθμωτή πτώση της έντασης του ηλεκτρικού πεδίου, από τη ζώνη του ουραγού-ιόντος (μικρή ευκινησία) προς τη ζώνη του οδηγού-ιόντος (μεγάλη ευκινησία).



Σχήμα 9.12. Απεικόνιση διαχωρισμού στην Τριχιοειδή Ισοταχοφόρηση.

Ένα άλλο ενδιαφέρον χαρακτηριστικό της CIPF είναι η σταθερή συγκέντρωση σε κάθε ζώνη, που καθορίζεται από τη συγκέντρωση του οδηγού ηλεκτρολύτη. Δεδομένου ότι η CIPF εκτελείται, συνήθως, σε συνθήκες σταθερού ρεύματος, πρέπει να υφίσταται μια σταθερή αναλογία μεταξύ της συγκέντρωσης και της ευκινησίας των ιόντων σε κάθε ζώνη. Οι ζώνες οι οποίες έχουν μικρότερη (ή μεγαλύτερη) συγκέντρωση από αυτήν του οδηγού ηλεκτρολύτη, στενεύουν (ή διευρύνονται) ώστε να προσαρμοστούν στην κατάλληλη συγκέντρωση. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως στάδιο προσυγκέντρωσης στη CZE, MECC ή CGE. Το “στένεμα” των ζωνών (και επομένως καλύτερος διαχωρισμός) μπορεί να συμβεί με την προσθήκη υψηλής συγκέντρωσης οδηγού και/ή ουραγού ηλεκτρολύτη στο δείγμα (δηλαδή, προσθήκη άλατος). Μια δυσκολία που προκύπτει συχνά, είναι η εύρεση ρυθμιστικών διαλυμάτων τα οποία να περιέχουν και των δύο ειδών ιόντα - οδηγούς και ουραγούς - και ταυτόχρονα να αποδίδουν το επιθυμητό pH. Ένας επιπλέον περιορισμός είναι ότι μόνον κατιόντα ή μόνον ανιόντα μπορούν να προσδιοριστούν ταυτόχρονα.

Σε σύγκριση με τη CZE, η επιλογή και η βελτιστοποίηση του ρυθμιστικού διαλύματος είναι λιγότερο άμεση. Για παράδειγμα, για τον προσδιορισμό κατιόντων ο οδηγός καθοδικός ηλεκτρολύτης μπορεί να περιέχει ένα ιδιαίτερα ευκίνητο οξύ (H⁺), ενώ ο ουραγός ανοδικός ηλεκτρολύτης μπορεί να περιέχει ένα ασθενέστερο οξύ, όπως προπιονικό οξύ.

Η λειτουργία της CIPF στα σύγχρονα όργανα υπήρξε επιτυχής, τόσο με επεξεργασμένους, όσο και μη επεξεργασμένους τριχιοειδείς τηγμένου οξειδίου του πυριτίου. Η EOF μπορεί να κατασταλεί με προσθήκη 0,25% υδροξυπροπυλομεθυλοκυτταρίνης. Ένα καλός οδηγός ηλεκτρολύτης είναι το φωσφορικό οξύ, 5 mM. Επίσης, η βαλίνη (100 mM, με ρύθμιση του pH με μια πρωτοταγή αμίνη) αποτελεί ένα χρήσιμο ουραγό ηλεκτρολύτη. Κατά την έναρξη του διαχωρισμού, το ρεύμα μπορεί να είναι αρκετά υψηλό, δεδομένου ότι ο

υψηλής ευκινησίας οδηγός ηλεκτρολύτης γεμίζει πλήρως τον τριχοειδή. Καθώς προχωρά ο διαχωρισμός, το ρεύμα μειώνεται, όταν ο ουραγός ηλεκτρολύτης εισέρχεται στον τριχοειδή.

9.4.6. Επιλογή Ηλεκτροφορητικής Τεχνικής

Ο Πίνακας 9.4 μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να μας βοηθήσει να επιλέξουμε την πιο κατάλληλη ηλεκτροφορητική τεχνική, ως σημείο εκκίνησης κατά την ανάπτυξη μιας μεθόδου. Η τεχνική που δίνεται ως πρώτη επιλογή σε κάθε κατηγορία ενώσεων, είναι πιθανό να δώσει αποδεκτά αποτελέσματα στο συντομότερο δυνατό χρόνο.

9.4.6.1. Ανάπτυξη Μεθόδου

Κατά την ανάπτυξη μιας νέας μεθόδου με CE, είναι χρήσιμη η συλλογή πληροφοριών για κάποιες ιδιότητες της/των προσδιοριζόμενων ενώσεων σε ένα δείγμα, όπως: Είναι η ένωση διαλυτή στο νερό σε συγκεντρώσεις έως 1 mg / mL; Είναι διαλυτή σε όλα τα pH; Εάν η διαλυτότητα στο νερό είναι περιορισμένη, μικρές ποσότητες (έως 25%) μεθανόλης ή ακετονιτριλίου επαρκούν για τη διαλυτοποίησή της; Μικρά μόρια διαλυτοποιούνται χρησιμοποιώντας 100 mM SDS; Για τις πρωτεΐνες, η χρήση 7 M ουρίας ή ενός μέσου διασποράς, όπως η αιθυλενογλυκόλη θα βοηθήσει; Είναι η προσδιοριζόμενη ένωση ασταθής σε ορισμένα pH; Είναι η ένωση θερμικά ασταθής; Ποιο είναι το μήκος κύματος της μέγιστης απορρόφησης UV; Πόσα συστατικά αναμένονται στο μείγμα; Ποια είναι η αναμενόμενη συγκέντρωση κάθε συστατικού;

Μικρά ιόντα	Μικρά μόρια	Πεπτίδια	Πρωτεΐνες	Ολιγονουκλεοτίδια	DNA
CZE	MECC	CZE	CZE	CGE	CGE
CITP	CZE	MECC	CGE	MECC	
	CITP	CIEF	CIEF		
		CGE	CITP		
		CITP			

Πίνακας 9.4. Επιλογή ηλεκτροφορητικής τεχνικής.

Ανάπτυξη μεθόδου με CZE: Πολλές επιλογές είναι διαθέσιμες για την ανάπτυξη μεθόδων με CZE. Για παράδειγμα, αναφέρουμε το διαχωρισμό μιας πρωτεΐνης. Έστω ότι αρχικά χρησιμοποιείται τριχοειδής συνολικού μήκους 75 cm, στους 25°C, με εφαρμογή τάσης 20 kV και με τον ανιχνευτή ρυθμισμένο στα 214 nm. Γίνεται υδροδυναμική εισαγωγή δείγματος, συγκέντρωσης 1 mg/mL, για 1s. Ως ηλεκτρολύτης ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιείται ένα ρυθμιστικό διάλυμα 100 mM, κατάλληλου pH. Ορισμένες κατευθυντήριες γραμμές είναι οι εξής:

- Είναι η ένωση σταθερή στα οξέα; - Χρησιμοποιήστε ένα ρυθμιστικό διάλυμα με pH κάτω από το pI της ένωσης. Είναι η ένωση ασταθής στα οξέα; - Επιλέξτε ένα pH, τουλάχιστον 1 μονάδα πάνω από το pI.
- Πρόβλημα διαλυτότητας; - Προσθέστε στο ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης έναν τροποποιητή, όπως ουρία ή αιθυλενογλυκόλη.
- Πρόβλημα προσρόφησης; - Χρησιμοποιήστε ένα πρόσθετο στο ρυθμιστικό διάλυμα, όπως ένα σουλφονικό οξύ, κάποιο άλας, ή αλλάξτε τριχοειδή. Χρησιμοποιήστε τροποποιημένο τριχοειδή με κατάλληλα επικαλυμμένα τοιχώματα.
- Καλή απόδοση, αλλά κακός διαχωρισμός. - Ρυθμίστε κατάλληλα το pH.
- Ανεπαρκής απόδοση. - Αυξήστε την ιοντική ισχύ του ρυθμιστικού διαλύματος, προσθέστε ένα άλας στο οποίο η πρωτεΐνη είναι σταθερή.

Λαμβάνοντας υπόψη τα ανωτέρω, στις περισσότερες περιπτώσεις, επιτυγχάνεται ένας ικανοποιητικός διαχωρισμός σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα. Μερικά δείγματα μπορεί να είναι αρκετά δύσκολα και μπορεί να χρειαστεί να δαπανηθεί πολύς χρόνος, επιλέγοντας, παράλληλα, προσεκτικά τα ρυθμιστικά διαλύματα και τα χρησιμοποιούμενα πρόσθετα.

Ανάπτυξη μεθόδου με MECC: Η MECC είναι ένας καλός μηχανισμός διαχωρισμού για μικρά μόρια. Οι πρωτεΐνες δε διαχωρίζονται ικανοποιητικά με αυτήν την ηλεκτροφορητική τεχνική. Καλές συνθήκες έναρξης ενός πειράματος με MECC είναι η χρήση 100 mM SDS, σε 50 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών-βορικών, pH 7. Στη συνέχεια, προσαρμογές στο pH και στις συγκεντρώσεις SDS και οργανικού τροποποιητή μπορεί να είναι απαραίτητες. Ορισμένες κατευθυντήριες γραμμές είναι οι εξής:

- Καλός διαχωρισμός, αλλά απαιτείται μεγάλος χρόνος. –Αυξήστε το pH, μειώστε τη συγκέντρωση του SDS.
- Κακός διαχωρισμός, μεγάλος χρόνος διαχωρισμού. - Χρησιμοποιήστε οργανικό τροποποιητή.
- Κακός διαχωρισμός, σύντομος χρόνος διαχωρισμού. - Αυξήστε τη συγκέντρωση του SDS.
- Μέτριος διαχωρισμός, σύντομος χρόνος διαχωρισμού. - Μειώστε το pH, αυξήστε τη συγκέντρωση του SDS.

Η χρήση οργανικού τροποποιητή είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική στη MECC. Το ακετονιτρίλιο είναι ο διαλύτης πρώτης επιλογής, δεδομένου ότι έχει μικρή επίδραση στην EOF. Μπορούν, επίσης, να χρησιμοποιηθούν και αλκοόλες, αλλά οι χρόνοι διαχωρισμού αυξάνονται. Υπό τις κατάλληλες συνθήκες, η διαχωριστική ικανότητα και η χωρητικότητα κορυφών υπερβαίνουν κατά πολύ αυτές της HPLC.

9.5. Οργανολογία και Λειτουργικές Παράμετροι της Τριχοειδούς Ηλεκτροφόρησης

9.5.1. Εισαγωγή Δείγματος

Στη CE, εισάγονται μόνον πολύ μικροί όγκοι δείγματος, οι οποίοι διέπονται από το μικρό όγκο του τριχοειδούς (εσωτερικής διαμέτρου 25 μm έως 150 μm και μήκους 15 – 100 cm). Ως γενικός κανόνας, ισχύει ότι το μήκος του εισαγόμενου (ή εγχυόμενου) δείγματος (injection plug length), δηλαδή το τμήμα του διαλύματος που ρέει στον τριχοειδή και αντιστοιχεί στο δείγμα, σε αντίθεση με το υπόλοιπο υγρό, το οποίο αποτελεί το *φέροντα ηλεκτρολύτη* (background electrolyte, BGE), θα πρέπει να είναι μικρότερο από 1 έως 2% του συνολικού μήκους του τριχοειδούς. Αυτό αντιστοιχεί σ' ένα μήκος εγχυόμενου δείγματος, λίγων χιλιοστών (ή 1 έως 50 nL), ανάλογα με την εσωτερική διάμετρο των τριχοειδών, γεγονός που αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα, διότι όγκοι δείγματος, τόσο μικροί όσο 5 μL , επαρκούν για εκτέλεση πολυάριθμων αναλύσεων. Αντιστρόφως, αυτές οι μικρές ποσότητες παρεμποδίζουν σοβαρά την ευαισθησία, όταν τα δείγματα είναι εξαιρετικά αραιά.

Ποσοτική εισαγωγή του δείγματος μπορεί να επιτευχθεί με διάφορες μεθόδους. Οι δύο πιο κοινές είναι η **υδροδυναμική** και η **ηλεκτροκινητική** (Σχήμα 9.13). Σε κάθε περίπτωση, ο εισαγόμενος όγκος του δείγματος δεν είναι γενικά μια γνωστή ποσότητα, αν και μπορεί να υπολογιστεί. Αντί του όγκου, οι ποσοτικά μετρήσιμες παράμετροι είναι: πίεση/χρόνος εισαγωγής του δείγματος για υδροδυναμική έγχυση, ή τάση/χρόνος εισαγωγής για ηλεκτροκινητική έγχυση.

9.5.1.1. Υδροδυναμική Έγχυση

Η υδροδυναμική έγχυση του δείγματος είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος. Μπορεί να επιτευχθεί με εφαρμογή πίεσης στο άκρο εισόδου του τριχοειδούς, ή εφαρμογή κενού στο άκρο εξόδου του, ή με σιφωνισμό, ο οποίος επιτυγχάνεται με ανύψωση του δοχείου εισόδου, σε σχέση με το δοχείο εξόδου (Σχήμα 9.13A,B,Γ). Σε μια συμβατική διάταξη CE, το άκρο εισόδου του τριχοειδούς βρίσκεται στην πλευρά της ανόδου, ενώ το άκρο εξόδου στην πλευρά της καθόδου. Με την υδροδυναμική εισαγωγή, η ποσότητα του εισαγόμενου δείγματος είναι σχεδόν ανεξάρτητη από το υπόστρωμα του δείγματος. Τυπικές πιέσεις έγχυσης και διάρκεια εισαγωγής του δείγματος κυμαίνονται από 25 ως 100 mbar και 0,5 έως 5 sec, αντίστοιχα. Ο όγκος του εισαγόμενου δείγματος (V_{inj}) είναι συνάρτηση των διαστάσεων του τριχοειδούς, του ιξώδους του ρυθμιστικού διαλύματος, της εφαρμοζόμενης πίεσης και του χρόνου εισαγωγής του δείγματος.

Μια τυπική εισαγωγή δείγματος με σιφωνισμό, επιτυγχάνεται με ανύψωση του δοχείου του δείγματος 5 έως 10 cm σε σχέση με το δοχείο εξόδου για 10 έως 30 δευτερόλεπτα, ανάλογα με τις συνθήκες (Σχήμα 9.13Γ). Ο σιφωνισμός χρησιμοποιείται, συνήθως, σε συστήματα χωρίς δυνατότητες έγχυσης υπό πίεση. Τέλος, για να αποφευχθεί η ανεπιθύμητη έγχυση του δείγματος με σιφωνισμό, είναι σημαντικό η διάρκεια της

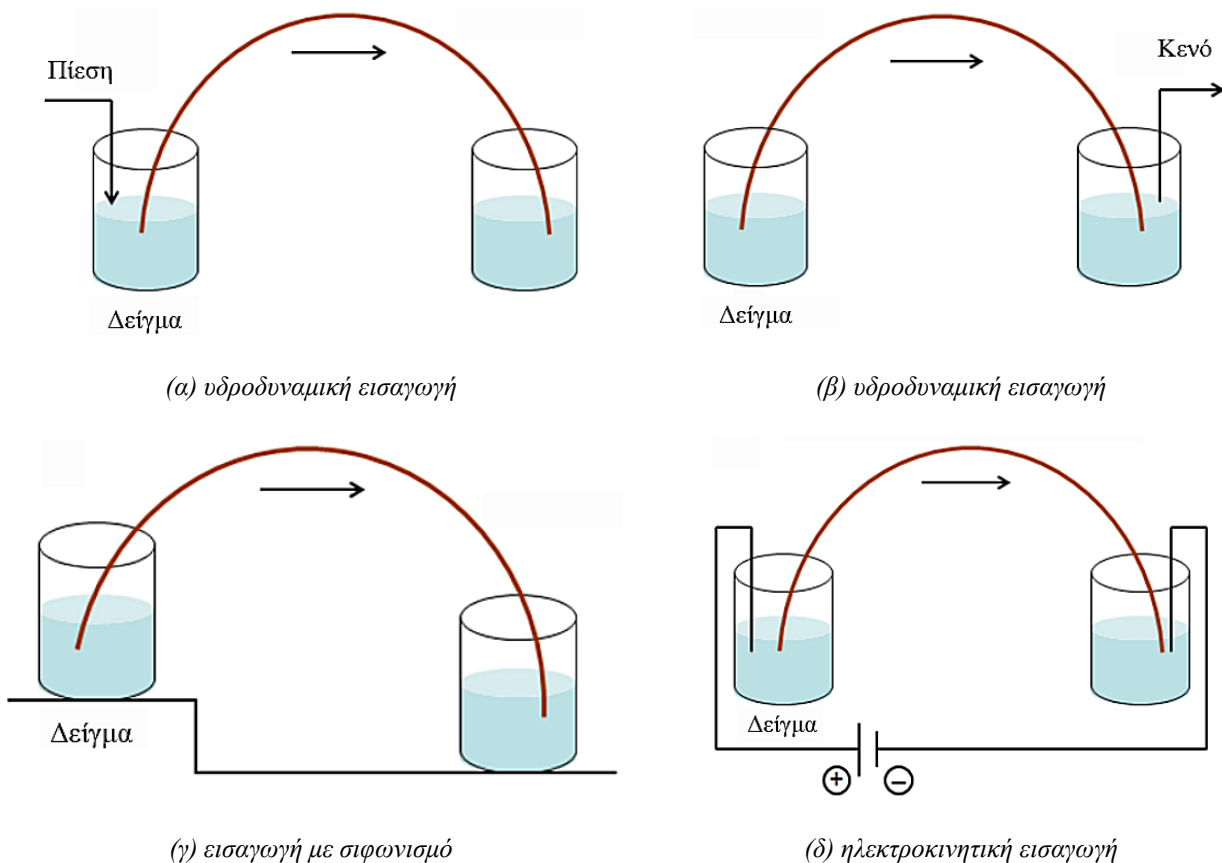
έγχυσης να είναι όσο το δυνατό συντομότερη. Επιπλέον, τα επίπεδα υγρού στα δοχεία του δείγματος και του ρυθμιστικού διαλύματος θα πρέπει να είναι ίσα. Ο σιφωνισμός μπορεί να προκαλέσει κακή επαναληψιμότητα των εμβυδών κορυφής και ακόμη και υπερφόρτωση δείγματος. Η επαναληψιμότητα έγχυσης μπορεί να δώσει τιμές σχετικής τυπικής απόκλισης (RSD), καλύτερες από 1 έως 2% .

9.5.1.2. Ηλεκτροκινητική Έγχυση

Η ηλεκτροκινητική έγχυση πραγματοποιείται με αντικατάσταση του δοχείου του ρυθμιστικού διαλύματος με το δοχείο δείγματος και εφαρμογή τάσης (Σχήμα 9.13Δ). Συνήθως, εφαρμόζονται πεδία ισχύος 3 έως 5 φορές χαμηλότερα από εκείνα που χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό, με χρόνους εισαγωγής 10-30 δευτερόλεπτα. Χαρακτηριστικό της ηλεκτροκινητικής έγχυσης είναι ότι, η εισαγόμενη ποσότητα του κάθε συστατικού εξαρτάται από την ηλεκτροφορητική ευκίνησια των μεμονωμένων διαλυμένων συστατικών. Διάκριση γίνεται για τα ιοντικά είδη, δεδομένου ότι τα περισσότερα ευκίνητα ιόντα εισάγονται στον τριχοειδή σε μεγαλύτερη έκταση απ' ό,τι τα λιγότερο ευκίνητα.

Η φόρτωση του δείγματος εξαρτάται, εκτός από τη διάρκεια εισαγωγής του, από την EOF, από τη συγκέντρωση της προσδιοριζόμενης ουσίας και την ηλεκτροφορητική ευκίνησια της ουσίας. Διαφοροποιήσεις στην αγωγιμότητα του δείγματος, οι οποίες μπορεί να οφείλονται σε επιδράσεις του υποστρώματος, όπως μεγάλη ποσότητα ενός διαλυμένου άλατος, οδηγούν σε διαφορές στην αντίσταση του δείγματος (συμβαίνει αλλαγή στο ηλεκτρικό πεδίο: $E = V/L_i$) και επομένως, στην ποσότητα του δείγματος η οποία φορτώνεται στον τριχοειδή. Λόγω αυτών των φαινομένων, η ηλεκτροκινητική εισαγωγή δείγματος δεν είναι γενικά τόσο επαναλήψιμη, όσο η υδροδυναμική.

Παρά τους ποσοτικούς περιορισμούς, η ηλεκτροκινητική έγχυση είναι πολύ απλή, δεν απαιτεί πρόσθετη οργάνολογία και πλεονεκτεί έναντι της υδροδυναμικής, όταν χρησιμοποιούνται στον τριχοειδή διαλύματα μεγάλου ιξώδους ή πηκτώματα, τα οποία καθιστούν την υδροδυναμική έγχυση λιγότερο αποτελεσματική.



Σχήμα 9.13. Μέθοδοι εισαγωγής δείγματος

9.5.2. Ανίχνευση

Αν και η CE απαιτεί μόνο μερικά νανόλιτρα του δείγματος, δεν αποτελεί τεχνική ιχνοανάλυσης, αφού χρησιμοποιεί σχετικά πυκνά διαλύματα προσδιοριζόμενων ουσιών, ή συχνά είναι απαραίτητο να εφαρμοστούν μέθοδοι προσυγκέντρωσης. Πολλές από τις μεθόδους ανίχνευσης είναι παρόμοιες με εκείνες που χρησιμοποιούνται στην HPLC. Στον **Πίνακα 9.5**, αναφέρονται οι μέθοδοι και τα όρια ανίχνευσης, καθώς και τα πλεονεκτήματα / μειονεκτήματα καθεμιάς.

Μέθοδος	Όριο Ανίχνευσης Μάζας (moles)	Όριο Ανίχνευσης Συγκέντρωσης (mol. L ⁻¹)*	Ανίχνευση on-column	Πλεονεκτήματα/Μειονεκτήματα
Απορρόφηση υπεριώδους-ορατού (UV-Vis)	10 ⁻¹² – 10 ⁻¹⁵	10 ⁻⁵ – 10 ⁻⁷	ναι	<ul style="list-style-type: none"> Καθολική Η ανίχνευση με παράταξη φωτοδιόδων (DAD) προσφέρει και φασματικές πληροφορίες
Φθορισμός	10 ⁻¹⁵ -10 ⁻¹⁷	10 ⁻⁷ – 10 ⁻⁹	ναι	<ul style="list-style-type: none"> Ευαίσθητη Συνήθως απαιτεί παραγωγοποίηση του δείγματος
Φθορισμός επαγόμενος από λέιζερ (LIF)	10 ⁻¹⁸ – 10 ⁻²⁰	10 ⁻⁹ – 10 ⁻¹²	ναι	<ul style="list-style-type: none"> Πολύ ευαίσθητη Συνήθως απαιτεί παραγωγοποίηση του δείγματος Υψηλού κόστους
Αμπερομετρία	10 ⁻¹⁸ – 10 ⁻¹⁹	10 ⁻¹⁰ – 10 ⁻¹¹	όχι	<ul style="list-style-type: none"> Ευαίσθητη Εκλεκτική, αλλά εφαρμόζεται μόνο για ηλεκτροενεργά είδη Δεν είναι εύρωστη
Αγωγιμομετρία	10 ⁻¹⁵ – 10 ⁻¹⁶	10 ⁻⁶ – 10 ⁻⁷	όχι	<ul style="list-style-type: none"> Καθολική
Φασματομετρία Μαζών (MS)	10 ⁻¹⁶ – 10 ⁻¹⁷	10 ⁻⁸ – 10 ⁻⁹	όχι	<ul style="list-style-type: none"> Ευαίσθητη Παρέχει πληροφορίες για τη δομή των μορίων Απαιτείται σύστημα σύζευξης CE και MS
Έμμεση UV	10 -1000 φορές		ναι	<ul style="list-style-type: none"> Καθολικές Λιγότερο ευαίσθητες από τις άμεσες μεθόδους
Έμμεσος φθορισμός	υψηλότερο από τις άμεσες μεθόδους		ναι	
Έμμεση αμπερομετρία			όχι	

*Υποτιθέμενος όγκος εγχυόμενου δείγματος 10 nL.

Πίνακας 9.5. Μέθοδοι ανίχνευσης

9.5.2.1. Απορρόφηση Υπεριώδους-Ορατού

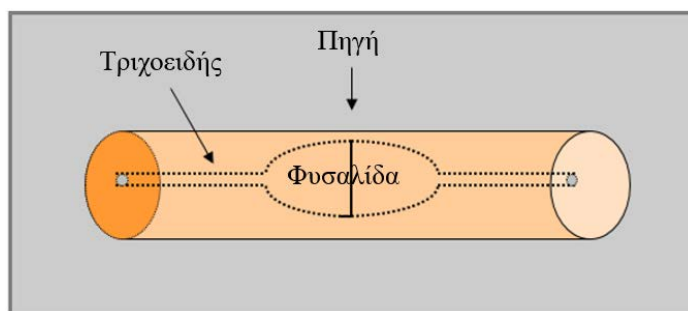
Η απορρόφηση υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος ανίχνευσης και οφείλεται, κυρίως, στη σχεδόν καθολική φύση της. Η υψηλή απόδοση που παρατηρείται στη CE, οφείλεται εν μέρει στην ανίχνευση *επάνω στη στήλη* (on-column). Επειδή το οπτικό παράθυρο, το οποίο δρα ως κυψελίδα ανίχνευσης, δημιουργείται επάνω στον τριχοειδή, κοντά στο καθοδικό άκρο του, δεν υπάρχει διεύρυνση των ανιχνευόμενων ζωνών, ως αποτέλεσμα του νεκρού όγκου ή της ανάμιξης των συστατικών. Στην πραγματικότητα, ο διαχωρισμός συνεχίζει να λαμβάνει χώρα, ενώ το δείγμα είναι ήδη στο παράθυρο ανίχνευσης. Δυστυχώς, το μήκος της οπτικής διαδρομής είναι περίπου 50 – 100 μm, γεγονός που περιορίζει

τα όρια ανίχνευσης, όταν αυτά εκφράζονται σε συγκέντρωση. Επειδή, όμως, οι εισαγόμενοι όγκοι δείγματος είναι εξαιρετικά μικροί, τα όρια ανίχνευσης εκφραζόμενα σε μάζα, είναι ίσα ή καλύτερα από αυτά της HPLC.

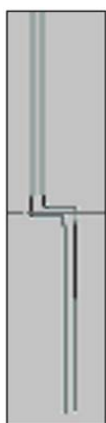
Στους φασματοφωτομετρικούς ανιχνευτές, η απορρόφηση μιας ουσίας εξαρτάται από το μήκος της οπτικής διαδρομής, b , τη συγκέντρωση, C , και τη μοριακή απορροφητικότητα, ϵ , όπως ορίζονται από το νόμο του Beer ($A=bC\epsilon$). Η μικρή οπτική διαδρομή είναι ο κύριος παράγοντας που περιορίζει την ευαισθησία στη CE. Λόγω της καμπυλότητας του τριχοειδούς, το πραγματικό μήκος της οπτικής διαδρομής στον τριχοειδή είναι μικρότερο από την εσωτερική διάμετρό του, δεδομένου ότι μόνο ένα κλάσμα του φωτός περνά κατευθείαν μέσα από το κέντρο του τριχοειδούς.

Υψηλή ευαισθησία μπορεί συχνά να πραγματοποιηθεί με τη χρήση χαμηλού μήκους κύματος ανίχνευσης στο UV. Η ανίχνευση, όμως, σε αυτά τα χαμηλά μήκη κύματος, απαιτεί τη χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων που απορροφούν ελάχιστα (όπως φωσφορικών ή βορικών αλάτων), δεδομένου ότι η υψηλή απορρόφηση υποβάθρου αυξάνει το θόρυβο της βασικής γραμμής και μειώνει το σήμα. Ας σημειωθεί ότι, η γραμμική περιοχή ανίχνευσης στη CE είναι σημαντικά χαμηλότερη απ' αυτή που παρατηρείται στην HPLC (0,4 έως 0,7 AU στη CE, έναντι 1,2 έως 1,5 AU στην HPLC), λόγω του μικρού μεγέθους και της καμπυλότητας του τριχοειδούς.

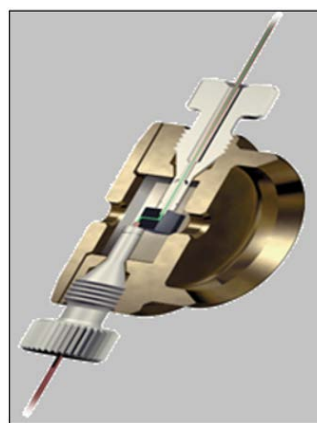
Η ευαισθησία και η γραμμική περιοχή ανίχνευσης, μπορεί, συνήθως, να βελτιωθεί με την αύξηση της εσωτερικής διαμέτρου του τριχοειδούς, η οποία ωστόσο, οδηγεί σε αύξηση του ρεύματος και επακόλουθη αύξηση της θερμοκρασίας μέσα στον τριχοειδή. Για το λόγο αυτό, έχουν προταθεί ειδικοί σχεδιασμοί του τριχοειδούς για την αύξηση της οπτικής διαδρομής της ακτινοβολίας μέτρησης, χωρίς αύξηση της συνολικής εσωτερικής διαμέτρου του τριχοειδούς. Τρεις από αυτούς τους σχεδιασμούς παρουσιάζονται στο **Σχήμα 9.14**.



(α) κυψελίδα φυσαλίδας



(β) κυψελίδα Z



(γ) κυψελίδα υψηλής ευαισθησίας

Σχήμα 9.14. Τύποι κυψελίδων για τη βελτίωση της ευαισθησίας ανίχνευσης με μέτρηση απορρόφησης

9.5.2.2. Ανίχνευση με Παράταξη Φωτοδιόδων (DAD)

Όπως στην HPLC έτσι και στη CE, η ανίχνευση με συστοιχία ή παράταξη διόδων (Diode Array Detection, DAD) μπορεί να εφαρμοστεί για την ταυτοποίηση και την εκτίμηση της καθαρότητας των κορυφών. Στα

εμπορικά διαθέσιμα συστήματα CE, με ανιχνευτές παράταξης φωτοδιόδων είναι δυνατή η συνεχής καταγραφή φασμάτων στην περιοχή UV-ορατού, σε λιγότερο από 1s. Δεδομένου ότι όλα τα μήκη κύματος αποκτώνται ταυτόχρονα, δεν υπάρχει απώλεια της ευαισθησίας κατά τη διάρκεια της φασματικής καταγραφής. Με τις βέλτιστες συνθήκες διαχωρισμού των κορυφών, τα φασματικά δεδομένα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να:

- Καθοριστεί το βέλτιστο μήκος κύματος ανίχνευσης για κάθε κορυφή.
- Γίνει ποιοτική ταυτοποίηση, μετά από αναζήτηση σε φασματικές βιβλιοθήκες.
- Υπολογιστούν οι αναλογίες των ηλεκτροφορητικών κορυφών, ώστε να αξιολογηθεί η καθαρότητά τους.
- Πραγματοποιηθούν έλεγχοι καθαρότητας κορυφών, ώστε να αποκαλυφθούν τυχόν (κρυφές) προσμίξεις.

Οργανολογικά, μια συστοιχία διόδων αποτελείται από ένα αχρωματικό σύστημα φακών, το οποίο εστιάζει το φως μέσα στον τριχοειδή. Η φωτεινή δέσμη στη συνέχεια διασπείρεται από ένα φράγμα περίθλασης και πέφτει στη συστοιχία φωτοδιόδων. Μια συστοιχία αποτελείται από πολυάριθμες διόδους (211, για παράδειγμα), καθεμία από τις οποίες μετρά μόνο μια στενή περιοχή του φάσματος. Ο αριθμός των μηκών κύματος, που πέφτουν σε μια φωτοδίοδο, ονομάζεται *εύρος ζώνης*. Η ανίχνευση με σύστημα DAD μπορεί να απλοποιήσει σημαντικά την ανάλυση στη CE. Με μια συστοιχία διόδων μπορεί να επιλεγεί ένα ευρύ φάσμα μήκους κύματος, για παράδειγμα, 190-600 nm, με ένα εύρος ζώνης των 400 nm. Σε μια ανάλυση, όλες οι ενώσεις που απορροφούν σ' αυτήν την περιοχή μηκών κύματος μπορούν να ανιχνευτούν.

Προκειμένου να ταυτοποιηθεί μια άγνωστη ένωση από το φάσμα της, θα πρέπει να συγκριθεί με τα φάσματα πρότυπων ενώσεων, οι οποίες αποθηκεύονται σε μια ή περισσότερες βιβλιοθήκες. Για τον έλεγχο της καθαρότητας μιας κορυφής, λαμβάνονται, συνήθως, φάσματα στο ανερχόμενο τμήμα, στο μέγιστο της κορυφής και στο κατερχόμενο τμήμα της κορυφής και κανονικοποιούνται (η κανονικοποίηση των φασμάτων αυτών αντισταθμίζει τη μεταβαλλόμενη συγκέντρωση του εκλουόμενου συστατικού, καθώς διέρχεται από τον ανιχνευτή). Τόσο η οπτική σύγκριση, όσο και ο υπολογιζόμενος συντελεστής καθαρότητας, μπορούν να δείξουν τη διαφορά μεταξύ μιας "καθαρής" κορυφής και μιας κορυφής που περιέχει προσμίξεις. Για αυξημένη ακρίβεια, μπορεί να γίνει ο υπολογισμός του συντελεστή καθαρότητας για όλα τα φάσματα μιας κορυφής. Ένας συντελεστής πάνω από 990, δείχνει γενικά ότι τα φάσματα είναι παρόμοια. Τιμές μεταξύ 900 και 990 δείχνουν ότι υπάρχει κάποια ομοιότητα, αλλά τα αποτελέσματα θα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή. Όλες οι τιμές κάτω από 900, δείχνουν ότι τα φάσματα είναι διαφορετικά.

Μια άλλη τεχνική για τον έλεγχο της καθαρότητας των κορυφών είναι να ληφθεί διάγραμμα των λόγων των απορροφήσεων, σε δύο ή περισσότερα μήκη κύματος, ως προς το χρόνο έκλουσης των κορυφών. Για οποιαδήποτε δεδομένη ένωση, ο λόγος (R) είναι σταθερός, ανεξάρτητα από το ύψος των κορυφών. Έτσι, ένα τέτοιο διάγραμμα παίρνει ορθογώνιο σχήμα (αν το συστατικό είναι καθαρό), με το ύψος του ορθογωνίου να ισούται με το λόγο των απορροφήσεων. Εάν τα μήκη κύματος επιλεγθούν προσεκτικά, ο λόγος αυτός μπορεί να είναι αρκετά ειδικός για κάποια ένωση.

9.5.2.3. Έμμεση Φωτομετρική Ανίχνευση

Απλά ανόργανα και οργανικά ιόντα και σάκχαρα συχνά ανιχνεύονται έμμεσα, επειδή αυτές οι ενώσεις γενικά δεν απορροφούν στο υπεριώδες φως, παρά μόνο σε εξαιρετικά μικρή κλίμακα μήκους κύματος (<190 nm). Η έμμεση ανίχνευση είναι καθολική, αλλά όχι εκλεκτική. Για την έμμεση φωτομετρική ανίχνευση, χρησιμοποιείται ως *ιόν παρακολούθησης* ένα ιοντικό χρωμοφόρο, που απορροφά έντονα στο υπεριώδες, το οποίο είναι ταυτόχρονα ένα από τα συστατικά του ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης, οπότε ο ανιχνευτής δέχεται ένα συνεχές σήμα απορρόφησης, εξαιτίας της παρουσίας αυτού του χρωμοφόρου. Η παρουσία οποιουδήποτε συστατικού που δεν απορροφά, σε μια ζώνη, προκαλεί μια αλλαγή στη συγκέντρωση των ιόντων του ρυθμιστικού διαλύματος. Όταν η ζώνη του συστατικού διέρχεται μέσω του ανιχνευτή, ανιχνεύεται από τη συνοδευόμενη αλλαγή στη συγκέντρωση του ιοντικού χρωμοφόρου. Ο μηχανισμός της εξηγείται ως η εκτόπιση του ιοντικού χρωμοφόρου από ένα προσδιοριζόμενο ιόν του ίδιου φορτίου, στη βάση της διατήρησης της ηλεκτροουδετερότητας, ώστε το σήμα απορρόφησης μειώνεται κατά τη διέλευση της ζώνης του συστατικού από τον ανιχνευτή. Αν και οι λαμβανόμενες κορυφές είναι αρνητικές, στα ηλεκτροφερογράμματα μπορεί να εμφανίζονται ως θετικές, αν αντιστραφεί η πολικότητα του ανιχνευτή.

Ως ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης μπορεί να επιλεγεί το άλας ενός μικρού ιόντος, το οποίο απορροφά έντονα στο UV. Για την ανίχνευση ανιόντων, χρωμοφόρα ιόντα, όπως χρωμικά, βενζοϊκά, φθαλικά ή σουρβικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Για την ανίχνευση κατιόντων, συνιστάται συνήθως ιμιδαζόλιο και πυριδίνη. Σε σύγκριση με την έμμεση ανίχνευση UV, η έμμεση φθορισμομετρική ανίχνευση μπορεί να προσφέρει χαμηλότερα όρια ανίχνευσης (~ 10x). Αυτό οφείλεται, κυρίως, στη διαφορά στα χαρακτηριστικά θορύβου των δύο μεθόδων ανίχνευσης.

9.5.2.4. Φθορισμομετρική Ανίχνευση

Η φθορισμομετρική ανίχνευση παρέχει αυξημένη ευαισθησία και εκλεκτικότητα για φθορίζουσες ενώσεις ή/και φθορίζοντα παράγωγα. Δεδομένου, όμως, ότι ο φθορισμός είναι ένα μάλλον σπάνιο φαινόμενο, η εφαρμοσιμότητα αυτού του τρόπου ανίχνευσης, με βάση το φυσικό φθορισμό, είναι περιορισμένη. Ωστόσο, υπάρχει διαθέσιμος ένας μεγάλος αριθμός αντιδραστηρίων, με τα οποία ορισμένες κατηγορίες ενώσεων μπορεί να μετατραπούν σε φθορίζοντα παράγωγα πριν ή μετά το διαχωρισμό τους με HPLC ή CE. Τα περισσότερα από τα συστήματα παραγωγοποίησης πριν τη στήλη, περιλαμβάνουν την ομοιοπολική προσθήκη ενός φθορίζοντος τμήματος μορίου, σε μια συγκεκριμένη λειτουργική ομάδα των μορίων των προσδιοριζόμενων ουσιών.

Εκτός από τις συμβατικές λυχνίες φθορισμού, οι ακτίνες λέιζερ χρησιμοποιούνται, επίσης, ως πηγές διέγερσης. Οι ακτίνες λέιζερ χρησιμοποιούνται για ανιχνεύσεις υψηλής ευαισθησίας, με τριχοειδείς εσωτερικής διαμέτρου μικρότερης από 50 μm, επειδή έχουν την ικανότητα να εστιάζονται σε πολύ μικρότερους όγκους, απ' ό,τι οι δέσμες που προέρχονται από λυχνίες τόξου. Το μειονέκτημα της χρήσης λέιζερ είναι ο περιορισμένος αριθμός μηκών κύματος, τα οποία διατίθενται από τις συνηθισμένες πηγές, καθώς και η πιθανότητα φωτοδιάσπασης του δείγματος, που προκαλείται από την υψηλή ένταση των λέιζερ. Για τους λόγους αυτούς, στη CE είναι προτιμότερη η ανίχνευση με φθορισμό επαγόμενο από λέιζερ (Laser Induced Fluorescence, LIF), από πηγή He-Cd. Ένα λέιζερ μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πηγή διέγερσης, παρέχοντας τα εξής πλεονεκτήματα:

- Το φως που παράγεται από το λέιζερ είναι μονοχρωματικό, επιτρέποντας τη βέλτιστη εκλεκτικότητα διέγερσης.
- Η παράλληλη δέσμη ενός λέιζερ είναι εύκολο να εστιαστεί στον τριχοειδή, έτσι ώστε μια ακτινοβολία υψηλής έντασης μπορεί να κατευθυνθεί σε ένα τμήμα του τριχοειδούς, το οποίο δρα ως οπτικό κύτταρο με μικρό όγκο ανίχνευσης. Το μειονέκτημα των μικρών εισαγόμενων όγκων στη CE, μπορεί ν' αντιμετωπιστεί με την αύξηση της έντασης του φωτός διέγερσης στο παράθυρο ανίχνευσης ή / και χρησιμοποιώντας κύτταρα με διευρυμένο φωτιζόμενο όγκο (φυσαλίδα και κυψελίδες υψηλής ευαισθησίας).
- Επιτυγχάνονται χαμηλότερα όρια ανίχνευσης. Με εξαρτήματα LIF, τα οποία μπορούν να συνδεθούν με εμπορικά όργανα CE, τα όρια ανίχνευσης φθάνουν μέχρι και τα 10 zeptomole (1 zeptomole=10⁻²¹ mole).

9.5.2.5. Ηλεκτροχημική Ανίχνευση

Η ηλεκτροχημική ανίχνευση περιλαμβάνει την αγωγιμομετρία, την αμπερομετρία και την ποτενσιομετρία. Η αγωγιμομετρική ανίχνευση μπορεί να θεωρηθεί ως καθολική μέθοδος, ενώ η αμπερομετρική ανίχνευση περιορίζεται σε ηλεκτροενεργά είδη και η ποτενσιομετρική ανίχνευση δεν είναι εφαρμόσιμη για ορισμένα μικρά ιόντα με υψηλό φορτίο. Πολύ χαμηλά όρια ανίχνευσης έχουν αναφερθεί για την αμπερομετρική ανίχνευση.

Αγωγιμομετρική ανίχνευση: Η μέτρηση της αγωγιμότητας σ' ένα διάλυμα, πραγματοποιείται με την τοποθέτηση ζεύγους ηλεκτροδίων στον τριχοειδή και μέτρηση του ρεύματος μεταξύ των δύο ηλεκτροδίων, ως συνάρτηση του εφαρμοζόμενου δυναμικού. Το κύριο πλεονέκτημα της αγωγιμομετρικής ανίχνευσης είναι η καθολικότητά της. Αποτελεί ιδανική λύση για ενώσεις που δεν απορροφούν στο υπεριώδες. Για ανίχνευση επάνω στον τριχοειδή (on-column), η αγωγιμομετρική κυψελίδα αρχικά κατασκευάστηκε, τοποθετώντας δύο σύρματα από λευκόχρυσο, εξωτερικής διαμέτρου 25 μm, το καθένα σε καθεμία από δύο διαμετρικά αντίθετες

οπές, που ανοίχθηκαν σε τριχοειδείς σωλήνες εσωτερικής διαμέτρου 50 ή 75 μm , για να χρησιμεύσουν ως ηλεκτρόδια.

Το ηλεκτροχημικό σύστημα ανίχνευσης στη CE μπορεί ν' απλοποιηθεί με τη χρήση ενός ανιχνευτή, που τοποθετείται στο άκρο εξόδου του τριχοειδούς (end-column detection). Με το σύστημα αυτό, μπορεί να πραγματοποιηθεί τόσο αγωγιμομετρική, όσο και αμπερομετρική ανίχνευση. Στην αγωγιμομετρική ανίχνευση με το σύστημα end-column, το ηλεκτρόδιο ανίχνευσης τοποθετείται στο άκρο εξόδου του τριχοειδούς. Η μέτρηση της αγωγιμότητας πραγματοποιείται μεταξύ του μικροηλεκτροδίου ανίχνευσης και του ηλεκτροδίου γείωσης, το οποίο είναι γειωμένο με την παροχή υψηλής τάσης, με τη χρήση ενός κυκλώματος εναλλασσόμενου ρεύματος. Αυτή η κατασκευή δεν εφαρμόστηκε πολύ στην πράξη, λόγω, κυρίως, της εμφάνισης της αγωγιμομετρικής ανίχνευσης χωρίς επαφές (contactless conductivity detection, CCD), με την οποία εξαλείφθηκαν όλα τα προβλήματα τα οποία προέκυπταν από την επαφή των ηλεκτροδίων με το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (BGE).

Η κατασκευή ενός ανιχνευτή CCD είναι πολύ απλή και επιτρέπει συνδυασμό με ένα δεύτερο ανιχνευτή. Τα όρια ανίχνευσης μπορούν να συγκριθούν με την end-column ανίχνευση.

Αμπερομετρική ανίχνευση: Η αμπερομετρική ανίχνευση κάνει χρήση τριών ηλεκτροδίων: του βοηθητικού, της αναφοράς και του ηλεκτροδίου εργασίας. Τα δύο πρώτα ηλεκτρόδια χρησιμοποιούνται για την παρακολούθηση του δυναμικού στο διάλυμα, ενώ το ηλεκτρόδιο εργασίας είναι το ηλεκτρόδιο ανίχνευσης. Ένα σταθερό δυναμικό διατηρείται μεταξύ του διαλύματος στην κυψελίδα και του ηλεκτροδίου εργασίας. Η αμπερομετρική ανίχνευση είναι συγκρίσιμη με την ανίχνευση LIF: είναι εκλεκτική (μόνον ηλεκτροαγώγιμα είδη ανιχνεύονται) και έχει πολύ χαμηλά όρια ανίχνευσης (femtomolar).

Η κλασική on-column ανίχνευση δεν είναι δυνατή, λόγω της αλληλεπίδρασης μεταξύ της τάσης διαχωρισμού και του ηλεκτροδίου εργασίας. Για το λόγο αυτό, βρέθηκαν άλλες οργανολογικές διαμορφώσεις, ώστε ν' απομονώνονται τα ηλεκτρόδια του ανιχνευτή από την υψηλή τάση που απαιτείται για το διαχωρισμό, προκειμένου να εφαρμοστεί η αμπερομετρική ανίχνευση στη CE. Έτσι, αναπτύχθηκε η ανίχνευση off-column, με προσθήκη ενός συνδέσμου από πορώδες αγώγιμο γυαλί ή γραφίτη, μεταξύ του άκρου του τριχοειδούς και ενός δεύτερου τριχοειδούς, που περιέχει τα ηλεκτρόδια του ανιχνευτή. Μια άλλη διαμόρφωση περιλαμβάνει την τοποθέτηση του ηλεκτροδίου εργασίας απευθείας στο άκρο του τριχοειδούς (end-column detection). Η λύση αυτή είναι εύκολη στην εφαρμογή, αλλά απαιτεί ακριβή τοποθέτηση των ηλεκτροδίων (έτσι ώστε να αποφευχθεί η διεύρυνση ζωνών).

Ποτενσιομετρική ανίχνευση: Η ποτενσιομετρική ανίχνευση είναι παρόμοια με την αμπερομετρική ανίχνευση, με την έννοια ότι και οι δύο συνεπάγονται ηλεκτροχημικές δράσεις στην επιφάνεια ενός χημικά ενεργού ηλεκτροδίου. Ένα ηλεκτρόδιο υψηλής εμπέδησης (σύνθετης αντίστασης), κρατά το ρεύμα σε αμελητέα επίπεδα και η οξειδοαναγωγική δραστηριότητα στο ηλεκτρόδιο, οδηγεί στη συσσώρευση φορτίου στην επιφάνεια. Η προκύπτουσα ελάττωση του δυναμικού, η οποία εκφράζεται ως το δυναμικό Nernst, μετρίεται. Οι πρώτες ποτενσιομετρικές μετρήσεις στη CE έγιναν με τον τρόπο end-column, αλλά και ανίχνευση on-column είναι, επίσης, δυνατή, λόγω της υψηλής εμπέδησης του ηλεκτροδίου, η οποία δεν προκαλεί ηλεκτροφορητικό ρεύμα.

9.5.2.6. Ανίχνευση με Φασματομετρία Μαζών

Η ανίχνευση με φασματομετρία μαζών (MS) στη CE, θεωρείται πιο καθολική από τη φασματοφωτομετρική ανίχνευση UV, το φθορισμό επαγόμενο από λέιζερ ή την ηλεκτροχημική ανίχνευση. Η εκλεκτικότητα και ευαισθησία της ανίχνευσης MS αντισταθμίζει τη μη-επαναληψιμότητα στους χρόνους μετανάστευσης των συστατικών, ένα πρόβλημα που συναντάται, συχνά, στη CE και το οποίο οφείλεται στις διακυμάνσεις της EOF ή/και της έλλειψης θερμοστάτησης του τμήματος του τριχοειδούς, που συνδέει τη CE με το MS. Οι διακυμάνσεις στην EOF ελαττώνονται με τη χρήση όξινων ρυθμιστικών διαλυμάτων, αν και οι αναλύσεις στη CE είναι ταχύτερες με μεγάλη EOF, η οποία επιτυγχάνεται με ρυθμιστικά διαλύματα υψηλού pH. Η χρήση μη-πητικών ρυθμιστικών διαλυμάτων μπορεί να ευθύνεται για ελάττωση του σήματος, λόγω επικάθησης αλάτων στην πηγή ιόντων και λόγω σχηματισμού ζευγών ιόντων με τα προσδιοριζόμενα συστατικά. Γι' αυτό το λόγο, προτιμούνται πτητικά ρυθμιστικά διαλύματα.

Η CE έχει συζευχθεί με πολλούς διαφορετικούς τύπους αναλυτών μάζας, όπως τριπλό τετράπολο (triple quadrupole, QQQ), κυκλοτρονικό συντονισμό ιόντων με μετασχηματισμό Fourier (Fourier transform

ion cyclotron resonance, FT-ICR), παγίδα ιόντων (ion trap, IT) και αναλυτές μαζών χρόνου πτήσης (time of flight, TOF).

Οι πολύ μικρές ταχύτητες ροής στον τριχοειδή επιτρέπουν την απευθείας εισαγωγή του εκλούσματος από τον τριχοειδή στην πηγή ιοντισμού του MS. Αν και διάφορες εργασίες αναφέρουν τη σύζευξη CE-MS με χρήση ιοντισμού εκκρόφησης με τη βοήθεια υλικού μήτρας (matrix-assisted laser desorption ionization, MALDI), ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (electrospray ionization, ESI) προτιμάται, γιατί πρωτίστως επιτρέπει την άμεση μεταφορά των μορίων από την υγρή στην αέρια φάση. Τεχνικές ιοντισμού όπως ο χημικός ιοντισμός σε ατμοσφαιρική πίεση (APCI) και ο φωτοϊοντισμός σε ατμοσφαιρική πίεση (APPI), απαιτούν τη μεταφορά των μορίων των προσδιοριζόμενων ουσιών στην αέρια φάση. Στην πράξη, οι τεχνικές APCI και APPI περιορίζονται σε ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους (<1000 Dalton), οι οποίες είναι πτητικές. Υψηλού μοριακού βάρους ενώσεις, όπως πεπτίδια και πρωτεΐνες δεν μπορούν να ιοντιστούν με αυτές τις τεχνικές.

Η απόδοση ιοντισμού και επομένως η ευαισθησία, βελτιώνεται δραματικά όταν χρησιμοποιείται ηλεκτροψεκασμός με πολύ χαμηλές ταχύτητες ροής (κάτω από 1 $\mu\text{L}/\text{min}$), κάτι κοινό στη CE. Ένα πρόσθετο πλεονέκτημα του ESI είναι ότι είναι ιδιαίτερα κατάλληλος για τον ιοντισμό πολικών και φορτισμένων ουσιών, οι οποίες διαχωρίζονται, κυρίως, με CE. Ο ηλεκτροψεκασμός είναι, εξάλλου, ο κύριος τρόπος για απευθείας εισαγωγή του εκλούσματος από μια στήλη διαχωρισμού στην πηγή ιοντισμού του MS, σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης και θερμοκρασίας περιβάλλοντος. Στον ηλεκτροψεκασμό, το υγρό δείγμα ψεκάζεται μέσα από τριχοειδή σωλήνα στον οποίο εφαρμόζεται υψηλή τάση (3-4 KV) και σχηματίζεται αερόλυμα φορτισμένων σταγονιδίων.

Η CZE είναι η απλούστερη μορφή της CE και κατά συνέπεια έχει συζευχθεί με MS πιο συχνά. Η μυκιλλιακή ηλεκτροκινητική τριχοειδής χρωματογραφία (MECC) είναι γενικώς μη-συμβατή με MS με ηλεκτροψεκασμό (ESI-MS), επειδή οι μη-πτητικές επιφανειοδραστικές ενώσεις στη μυκιλλιακή φάση οδηγούν στο σχηματισμό περίπλοκων προϊόντων προσθήκης και στην απώλεια ευαισθησίας, κατά τη διάρκεια του ηλεκτροψεκασμού, αλλά και για το λόγο ότι η παρουσία του οργανικού διαλύτη, που είναι απαραίτητος στον ηλεκτροψεκασμό, μπορεί να προκαλέσει αστάθεια στη μυκιλλιακή φάση.

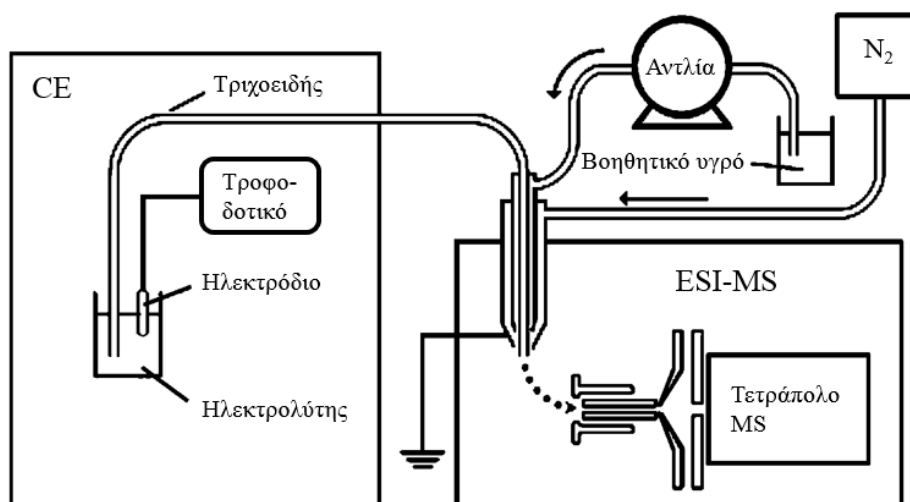
Στη σύζευξη CE-MS, η κατεύθυνση στην οποία εφαρμόζεται το ηλεκτρικό πεδίο και η κατεύθυνση του ρεύματος έχουν σημαντικές επιπτώσεις στην ηλεκτρική σύνδεση (electrical interfacing) CE-MS, η οποία θα περιγραφεί στην επόμενη παράγραφο.

Ηλεκτρική σύνδεση: Στη CE, εφαρμόζεται υψηλή τάση στο άκρο εισόδου του τριχοειδούς και απαιτείται ισχυρή ηλεκτρική επαφή μεταξύ του άκρου εξόδου του τριχοειδούς και της γείωσης του οργάνου, ώστε να εξασφαλίζεται διαδρομή επιστροφής για το ηλεκτρικό ρεύμα. Σε μια τυπική διαμόρφωση CE, αυτό επιτυγχάνεται από το ηλεκτρόδιο εξόδου (ηλεκτρόδιο γείωσης), αυτό δηλαδή που βρίσκεται βυθισμένο στον υποδοχέα, ο οποίος περιέχει τον ηλεκτρολύτη μαζί με το άκρο εξόδου του τριχοειδούς. Προκειμένου να δημιουργηθεί ο ηλεκτροψεκασμός, απαιτείται, επίσης, ένα υψηλό ηλεκτρικό πεδίο μεταξύ της εξόδου του τριχοειδούς και της εισόδου του MS. Η απλούστερη διάταξη για τη δημιουργία αυτού του ηλεκτρικού πεδίου, είναι αυτή στην οποία το άκρο εξόδου του τριχοειδούς της CE (μπεκ ψεκασμού) είναι γειωμένο και η τάση ηλεκτροψεκασμού εφαρμόζεται από το MS. Αν το δυναμικό αυτό είναι αρνητικό, τότε θα εισέλθουν στο MS θετικά ιόντα (θετικός ηλεκτροψεκασμός), ενώ αν είναι θετικό, τότε αρνητικά ιόντα θα εισέλθουν στο MS (αρνητικός ηλεκτροψεκασμός).

Υδραυλική σύνδεση: Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, σε μια τυπική διαμόρφωση CE, η απαιτούμενη ηλεκτρική επαφή μεταξύ του άκρου εξόδου του τριχοειδούς και της γείωσης του οργάνου επιτυγχάνεται από το ηλεκτρόδιο εξόδου (ηλεκτρόδιο γείωσης), αυτό δηλαδή που βρίσκεται βυθισμένο στον υποδοχέα που περιέχει τον ηλεκτρολύτη μαζί με το άκρο εξόδου του τριχοειδούς. Όταν υπάρχει σύζευξη με ένα φασματόμετρο μάζας, δε χρησιμοποιείται ο υποδοχέας εξόδου και η ηλεκτρική επαφή μεταξύ του ηλεκτρολύτη και της γείωσης του οργάνου γίνεται με άλλο τρόπο (**Σχήμα 9.15**).

Εκτός από το ηλεκτρικό κύκλωμα, απαιτείται και μια υδραυλική ροή για να σχηματιστεί ο ηλεκτροψεκασμός. Η ποσότητα της υδραυλικής ροής σχετίζεται με το μέγεθος της EOF και με τις διαστάσεις του τμήματος του τριχοειδούς όπου γίνεται ο διαχωρισμός. Σε περίπτωση που χρησιμοποιείται βελόνα ηλεκτροψεκασμού LC, η ποσότητα της υδραυλικής ροής σχετίζεται με τις διαστάσεις του τριχοειδούς ψεκασμού. Στην πράξη, η παροχή όγκου που δημιουργείται μέσω EOF, είναι της τάξης των 1-100 nL/min, ενώ μια βελόνα ηλεκτροψεκασμού LC απαιτεί κάποια $\mu\text{L}/\text{min}$. Από την άλλη πλευρά, υπό ορισμένες

συνθήκες, η EOF μπορεί να απουσιάζει. Γι' αυτόν το λόγο, μια βοηθητική ροή υγρού είναι υποχρεωτική στην περίπτωση αυτή για τη δημιουργία του ηλεκτροψεκασμού.



Σχήμα 9.15. Τυπική διάταξη σύζευξης CE με ηλεκτροψεκασμό και τετραπολικό φασματομέτρο μαζών

Για τη σύζευξη CE-MS, που να πληροί τις παραπάνω ηλεκτρικές και υδραυλικές προϋποθέσεις, έχουν αναπτυχθεί και έχουν κυκλοφορήσει εν μέρει στο εμπόριο δύο διατάξεις σύζευξης: α) με χρήση βοηθητικής ροής (sheath flow interface) και β) χωρίς βοηθητική ροή (sheathless interface). Επειδή η σύζευξη με χρήση βοηθητικής ροής είναι πιο εύρωστη απ' αυτήν χωρίς βοηθητική ροή, η πρώτη χρησιμοποιείται πιο συχνά στις εφαρμογές της CE-MS σε πραγματικά βιολογικά δείγματα. Αντίθετα με την LC-MS, στη CE-MS πρέπει να γίνει ηλεκτρική επαφή στην άκρη της βελόνας ψεκασμού. Η επαφή αυτή πραγματοποιείται με τη βοηθητική ροή, ενώ επιτυγχάνεται δυσκολότερα στη σύζευξη χωρίς χρήση βοηθητικής ροής.

α) Σύζευξη με βοηθητική ροή: Στη διαμόρφωση αυτή, υπάρχουν τρεις ομοαξονικοί σωλήνες. Ο πρώτος εσωτερικός σωλήνας είναι ο τριχοειδής της CE και αποτελεί το μπεκ ψεκασμού. Αυτός, περιβάλλεται από ένα δεύτερο σωλήνα από ανοξείδωτο χάλυβα. Το βοηθητικό υγρό (sheath liquid) ρέει μέσα στον ανοξείδωτο σωλήνα και έξω από τον τριχοειδή της CE, πραγματοποιώντας την υγρή επαφή με το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης. Ο σωλήνας από ανοξείδωτο χάλυβα, μέσα στον οποίο ρέει το βοηθητικό υγρό, είναι γειωμένος. Ο τρίτος εξωτερικός σωλήνας παρέχει το αέριο εκνέφωσης, π.χ. N₂, που βοηθά στο σχηματισμό του ψεκασμού. Το βοηθητικό υγρό προστίθεται στη ροή του εκλούσματος που προέρχεται από τη CE, με παροχή όγκου 1 – 5 μL/min, με τη βοήθεια μιας αντλίας υψηλής πίεσης, η οποία ελέγχεται από ειδικό λογισμικό. Το βοηθητικό υγρό χρησιμοποιείται για να αραιώνει το φέροντα ηλεκτρολύτη της CE και έτσι να προστατεύει την ηλεκτρική επαφή μαζί του και να διευκολύνει τη σύζευξη της χαμηλής ροής (<0,5 μL / min) της CZE με το MS. Το βοηθητικό υγρό συχνά αποτελείται από μίγμα νερού, μεθανόλης ή ισοπροπανόλης, με ρύθμιση του pH στην επιθυμητή τιμή, με τη βοήθεια πτητικών οξέων ή βάσεων. Το βοηθητικό υγρό, εκτός του ότι βοηθά στον έλεγχο της ταχύτητας ροής και των χημικών συνθηκών για τον ιοντισμό των μορίων με ηλεκτροψεκασμό, επιτρέπει τη γείωση του μη-αγώγιμου τριχοειδούς με το μεταλλικό σωλήνα της βελόνας ψεκασμού. Πρόσφατες εργασίες με χρήση συνδυασμένης CE-MS, με ροή βοηθητικού υγρού, εστιάζονται, κυρίως, στην ελάττωση της παροχής όγκου του βοηθητικού υγρού, ώστε να ελαττωθεί η αραιώση του δείγματος. Η σύζευξη CE-MS με χρήση βοηθητικής ροής έχει αποδειχθεί ως ο πιο κατάλληλος τρόπος σύνδεσης και είναι διαθέσιμη στο εμπόριο.

Οι παράμετροι που σχετίζονται με τον ηλεκτροψεκασμό (ESI), τον πιο συνήθη τρόπο σύζευξης με το MS, δηλαδή η σύσταση και η παροχή όγκου της βοηθητικής ροής, η πίεση του αερίου εκνέφωσης (nebulizing gas) και η θέση του άκρου εξόδου του τριχοειδούς, πρέπει να ρυθμίζονται προσεκτικά, μετά από βελτιστοποίηση, για να έχουμε σταθερές συνθήκες CE-ESI-MS.

β) Σύζευξη χωρίς βοηθητική ροή: Το πλεονέκτημα της σύνδεσης, χωρίς τη χρήση ροής βοηθητικού υγρού, είναι η απουσία αραιώσης και, επομένως, υψηλότερη ευαισθησία. Στην πράξη, όμως, το αποτέλεσμα αυτό

είναι δύσκολο να επιτευχθεί. Από τις διάφορες οργανολογικές διαμορφώσεις που έχουν προταθεί για σύζευξη CE-MS, χωρίς τη χρήση βοηθητικής ροής, μέχρι στιγμής καμία δεν έχει γίνει εμπορικά διαθέσιμη.

Ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό είναι ένας ευέλικτος τρόπος ιοντισμού για πολύ πολικά ή φορτισμένα μόρια, τα οποία διαχωρίζονται ως επί το πλείστον με CE, γι' αυτό και προτιμάται ως λειτουργία ιοντισμού. Παρ' όλα αυτά, σε πολλές περιπτώσεις, η απόδοση ιοντισμού είναι χαμηλή και κατά συνέπεια και η ευαισθησία χαμηλή. Επιπλέον, ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό απαιτεί τη χρήση πτητικών ρυθμιστικών διαλυμάτων, που σε πολλές περιπτώσεις ελαττώνουν την απόδοση του διαχωρισμού στη CE. Επιπλέον, δεδομένου ότι ο ηλεκτροψεκασμός καθιστά το φασματομέτρο μάζας σε μεγάλο βαθμό έναν ανιχνευτή εξαρτώμενο από τη συγκέντρωση, η απόκριση του δείγματος θα εξαρτάται από τη συνολική ταχύτητα ροής και, επομένως, σε μεγάλο βαθμό από την ταχύτητα ροής του βοηθητικού υγρού.

Απαιτήσεις για ποσοτικούς προσδιορισμούς στη CE-MS:

Η χρήση εσωτερικού προτύπου απαιτείται για αντιστάθμιση:

- Διακυμάνσεων που οφείλονται στην εισαγωγή δείγματος στη CE.
- Αλλαγών στην απόδοση ιοντισμού.

Το ιδανικό εσωτερικό πρότυπο είναι ένα ισοτοπικά επισημασμένο ανάλογο της προσδιοριζόμενης ένωσης, αφού η απόκριση ιοντισμού, η ελάττωση του σήματος MS και το μοτίβο θραυσματοποίησης, αναμένεται να είναι παρόμοια με αυτά της προσδιοριζόμενης ένωσης. Αυτό το είδος εσωτερικού προτύπου δίνει επαναληψιμότητα εμβαδού κορυφής στη CE-MS, παρόμοια με αυτήν της LC-MS.

Η παρακολούθηση επιλεγμένου ιόντος (SIM, Single Ion Monitoring) παρέχει, γενικώς, καλύτερη ευαισθησία σε σύγκριση με τη φασματομετρία πλήρους σάρωσης (full-scan mode). Όταν πραγματοποιείται ανάλυση MS/MS, η παρακολούθηση επιλεγμένου ιόντος χρησιμοποιείται για τη βελτίωση του ορίου ανίχνευσης (LOD) γνωστών ενώσεων, μέσω καλύτερης εκλεκτικότητας. Παρεμποδίζοντα ιόντα, τα οποία έχουν ένα ταυτόσημο μητρικό ιόν, αλλά διαφορετικό μοτίβο θραυσματοποίησης, δεν ανιχνεύονται.

9.5.3. Ποσοτική Ανάλυση

Στη CE, η επαναληψιμότητα των μετρήσεων του εμβαδού των κορυφών, στις βέλτιστες συνθήκες διαχωρισμού, είναι ικανοποιητική ($RSD \leq 2\%$). Οι κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν το εμβαδόν κορυφής είναι:

- διακυμάνσεις της θερμοκρασίας,
- προσρόφηση του δείγματος,
- εισαγωγή μικρών όγκων δείγματος,
- ολοκλήρωση σημάτων τα οποία έχουν μικρό λόγο "σήματος/θορύβου (S/N)".

Μερικοί απ' αυτούς τους παράγοντες μπορεί να επηρεαστούν άμεσα από το χρήστη, ενώ κάποιοι άλλοι εξαρτώνται εντελώς από το όργανο. Η χρήση εσωτερικού προτύπου συχνά αποδεικνύεται πολύ χρήσιμη. Μια ενδιαφέρουσα πτυχή της ποσοτικής αποτίμησης του εμβαδού κορυφής, απορρέει από τις διαφορετικές ταχύτητες μετανάστευσης των προσδιοριζόμενων ουσιών. Σε αντίθεση με την HPLC, όπου όλα τα συστατικά του δείγματος μεταφέρονται με την ίδια ταχύτητα από την κινητή φάση, στη CE, το εμβαδόν των κορυφών επηρεάζεται από το διαφορετικό χρόνο παραμονής των συστατικών του δείγματος στην περιοχή ανίχνευσης του τριχοειδούς. Ενώσεις με μικρή ευκινησία, παραμένουν στην περιοχή ανίχνευσης του τριχοειδούς περισσότερο χρόνο απ' αυτές που έχουν μεγαλύτερη ευκινησία, με αποτέλεσμα αυξημένες τιμές εμβαδού κορυφής. Αυτό το φαινόμενο μπορεί να διορθωθεί, διαιρώντας απλώς το ολοκληρωμένο εμβαδόν κορυφής με το χρόνο μετανάστευσης.

Το ύψος κορυφής δε χρησιμοποιείται, γενικώς, στην ποσοτική ανάλυση, επειδή εξαρτάται από το επιστοίβαγμα (stacking), που συμβαίνει κατά την εισαγωγή του δείγματος. Το επιστοίβαγμα μπορεί να προκύψει μόνον από τις διαφορές στη σύσταση του δείγματος και του ρυθμιστικού διαλύματος (για παράδειγμα, επιδράσεις υποστρώματος), που συχνά είναι δύσκολο να προσδιοριστούν. Οι διαφορές αγωγιμότητας μεταξύ προσδιοριζόμενων ουσιών και ρυθμιστικού διαλύματος μπορεί να προκαλέσουν παραμορφώσεις στο σχήμα των κορυφών (ασύμμετρες κορυφές με μέτωπο ή ουρά), που επηρεάζουν το ύψος,

αλλά όχι το εμβαδόν κορυφής. Επιπλέον, το ύψος κορυφής θα πρέπει να χρησιμοποιείται στην ποσοτική ανάλυση, μόνο εάν η ζώνη του προσδιοριζόμενου συστατικού είναι μικρότερη από το 5% περίπου του εύρους δέσμης στον ανιχνευτή. Το ύψος κορυφής μπορεί να είναι χρήσιμο, όταν ο λόγος σήματος/θορύβου είναι πολύ χαμηλός, για ακριβή ολοκλήρωση του εμβαδού κορυφής.

Η επαναληψιμότητα των χρόνων μετανάστευσης και της ευκινησίας, μεταξύ των μετρήσεων, είναι, επίσης, ικανοποιητική ($RSD \leq 0,5\%$) και εξαρτάται από:

- την κατάσταση των τοιχωμάτων του τριχοειδούς,
- τη σύσταση, την τιμή του pH και το ιξώδες του ρυθμιστικού διαλύματος,
- τη φύση του δείγματος,
- την κατάσταση του οργάνου.

Βιβλιογραφία

- Altria K. (2011). *Analysis of inorganic anions by capillary electrophoresis*. LCGC Europe, 24(1), 32-37.
- Frazier R.A., Ames J.M. & Nursten H.E. (2000). *Background theory and principles of capillary electrophoresis*. In RSC (Ed.), *Capillary electrophoresis for food analysis: Method development* (pp. 1-7). DOI:10.1039/9781847550316-00001.
- Greiner M. (2013). *Agilent 7100 Integrated CE/MS solutions*. Retrieved July 27, 2014, from <http://www.chem.agilent.com/Library/eseminars/Public/Agilent%207100%20Integrated%20CEMS%20solutions.pdf>
- Heiger D. (2000). *A primer. Agilent technologies. High performance capillary electrophoresis. An introduction*. Retrieved July 26, 2014, from <http://www.colby.edu/chemistry/CH332/laboratory/Agilent%20CE%20Primer.pdf>
- Heiger D.N., Cohen A.S. & Karger B.L. (1990). *Separation of DNA restriction fragments by high performance capillary electrophoresis with low and zero crosslinked polyacrylamide using continuous and pulsed electric fields*. *Journal of Chromatography*, 516, 33-48.
- Heiger D. & Weinberger R. (1994). *Determination of small Ions by Capillary Zone Electrophoresis with indirect photometric detection*. Application Note (Publ. nr 5963-1138E). Agilent Technologies. Environmental and Food Analysis.
- Honda S., Taga A., Kakehi K., Koda S. & Okamoto Y. (1992). *Determination of cefixime and its metabolites by high-performance capillary electrophoresis*. *Journal of Chromatography*, 590, 364-368.
- Beckman C. *Introduction to capillary electrophoresis*. Retrieved July 26, 2014, from <https://www.beckmancoulter.com/wsportal/bibliography?docname=360643-CEPrimer1.pdf>
- Kappes T. & Hauser P.C. (1999). *Electrochemical detection methods in capillary electrophoresis and applications to inorganic species*. *Journal of Chromatography A*, 834, 89-101.
- Lauer H.H. & Rozing G.P. (2010). *Second completely revised edition. A primer. Agilent technologies. High performance capillary electrophoresis*. Retrieved July 26, 2014, from http://www.chem.agilent.com/Library/primers/Public/5990_3777EN.pdf
- Laugere F.P.J. (2003). *Conductivity detection for application in capillary electrophoresis microchips*. (Doctoral dissertation, Delft University of Technology 2003). Retrieved from <http://biodevices.et.tudelft.nl/Bio-projects/BIOMAS/pdf3.pdf>
- Lillard S.J. & Yeung E. S. (1996). *Analysis of single erythrocytes by injection-based capillary isoelectric focusing with laser-induced native fluorescence detection*. *Journal of Chromatography B*, 687, 363-369.
- Mikkelsen S.R. & Corton E. (2004). *Bionalytical chemistry*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.

- Servais A-C., Crommen J. & Fillet M. (2006). *Capillary electrophoresis-mass spectrometry, an attractive tool for drug bioanalysis and biomarker discovery*. *Electrophoresis*, 27, 2616-2629.
- UC Davis Chemwiki. (n.d.). *12G Electrophoresis*. Retrieved July 27, 2014, from http://chemwiki.ucdavis.edu/Analytical_Chemistry/Analytical_Chemistry_2.0/12_Chromatographic_and_Electrophoretic_Methods/12G_Electrophoresis
- Veraart J.R., Lingeman H. & Brinkman U.A.Th. (1999). *Coupling of biological sample handling and capillary electrophoresis*. *Journal of Chromatography A*, 856, 483-514.
- Weinberger R. & Lurie I.S. (1991). *Micellar electrokinetic capillary chromatography of illicit drug substances*. *Analytical Chemistry*, 63, 823-827.

Κεφάλαιο 10: Η Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση στη Βιοανάλυση

Αναστασία-Στέλλα Ζώτου

Σύνοψη

Στο κεφάλαιο αυτό αναφέρονται οι αυτοματοποιημένες τεχνικές προσυγκέντρωσης δείγματος οι οποίες χρησιμοποιούνται στην Τριχοειδή Ηλεκτροφόρηση για αύξηση της ευαισθησίας, καθώς και οι μέθοδοι τροποποίησης της επιφάνειας του τριχοειδούς στην ανάλυση βιομορίων. Αναφέρονται, επίσης, βιοαναλυτικές μέθοδοι προκατεργασίας δείγματος, προσαρμοσμένες στην ηλεκτροφορητική ανάλυση, καθώς και εφαρμογές της Τριχοειδούς Ηλεκτροφόρησης στη βιοανάλυση.

Προαπαιτούμενη γνώση

Για την καλύτερη κατανόηση των εννοιών του κεφαλαίου, χρήσιμη γνώση για τον αναγνώστη μπορεί να βρεθεί σε συγγράμματα Ενόργανης Ανάλυσης, Βιοχημείας και Βιολογίας.

10.1. Εισαγωγή

Τα χαρακτηριστικά της Τριχοειδούς Ηλεκτροφόρησης (CE) την καθιστούν πολύ χρήσιμη τεχνική για τον προσδιορισμό φορτισμένων ουσιών σε βιολογικά δείγματα. Οι αποδόσεις διαχωρισμού είναι υψηλές και οι συνθήκες διαχωρισμού μπορούν εύκολα να προσαρμοστούν, για να βελτιστοποιηθούν οι αναλύσεις. Ωστόσο, ο αριθμός των εφαρμογών ρουτίνας σε βιολογικά δείγματα είναι περιορισμένος, επειδή εξακολουθούν να υπάρχουν πολλά προβλήματα που πρέπει να επιλυθούν. Το κύριο πρόβλημα είναι η ανιχνευσιμότητα των ουσιών, η οποία όταν εκφράζεται σε μονάδες συγκέντρωσης είναι γενικά μάλλον φτωχή, λόγω του χαμηλού μέγιστου επιτρεπόμενου όγκου που εισάγεται στον τριχοειδή. Επιπλέον, η υψηλή ηλεκτρική αγωγιμότητα των δειγμάτων, η οποία οφείλεται στις υψηλές συγκεντρώσεις ανόργανων αλάτων τα οποία βρίσκονται στα ούρα (50-500 mM χλωριούχο νάτριο) και στον ορό (περίπου 150 mM χλωριούχο νάτριο), μειώνει την αποτελεσματικότητα του διαχωρισμού στη CE.

Περαιτέρω, οι σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις πρωτεϊνών που υπάρχουν σε πολλά βιολογικά δείγματα - π.χ., περίπου 75 g/L στον ορό - μπορεί να προκαλέσουν μια σχεδόν μη αναστρέψιμη δέσμευση αυτών των μακρομορίων στις ελεύθερες σιλανόλες των τοιχωμάτων του τριχοειδούς, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε σημαντικά αλλαγμένους χρόνους μετανάστευσης των προσδιοριζόμενων ενώσεων, ή στην παρουσία κορυφών που οφείλονται σε παρεμποδίσεις, στα ηλεκτροφερογράμματα. Ένα άλλο πρόβλημα, είναι η παρουσία μικροσωματιδίων, τα οποία μπορεί εύκολα να φράξουν το σύστημα CE. Τέλος, όπως στην HPLC, τα ομογενή διαλύματα ορού και ιστών (π.χ. από ήπαρ, νεφρούς) δεν μπορούν να εγχυθούν απευθείας, λόγω του υψηλού ιξώδους τους. Για τους παραπάνω λόγους, πρέπει να εφαρμοστούν κατάλληλες διαδικασίες καθαρισμού και προσυγκέντρωσης των βιολογικών δειγμάτων, πριν από την ανάλυσή τους με CE, ή/και να γίνεται χρήση τροποποιημένων τριχοειδών.

10.2. Αύξηση Ευαισθησίας με Εφαρμογή Ηλεκτροφορητικών Τεχνικών Προσυγκέντρωσης

Παρά την υψηλή απόδοση της CE (500.000-700.000 θεωρητικές πλάκες ανά μέτρο), η χρήση της στην προσδιορισμό ιχνοσυγκεντρώσεων βιολογικών δραστικών ουσιών (πρωτεΐνες, πεπτίδια, αμινοξέα, νουκλεοτίδια, στεροειδείς ορμόνες, βιογενείς αμίνες, λιπίδια και βιταμίνες) περιορίζεται από την ανεπαρκή ευαισθησία ανίχνευσης, λόγω του μικρού όγκου του εγχυόμενου δείγματος (2-10 nL) και του μικρού μήκους της οπτικής διαδρομής (25-100 μm i.d.). Ωστόσο, εξαιρετικά όρια ανίχνευσης, εκφραζόμενα ως απόλυτη μάζα εγχυόμενου δείγματος (επίπεδο attomole), έχουν αναφερθεί. Το πρόβλημα εμφανίζεται όταν η ευαισθησία εκφράζεται ως συγκέντρωση δείγματος. Δεδομένου ότι τα περισσότερα εμπορικά όργανα CE είναι εξοπλισμένα με ανιχνευτές μέτρησης της απορρόφησης, με τους συνήθεις τριχοειδείς, το διαθέσιμο μήκος οπτικής διαδρομής είναι μικρό.

Για να βελτιωθεί η ευαισθησία - εκφραζόμενη ως συγκέντρωση δείγματος - έχουν χρησιμοποιηθεί τριχοειδείς με εκτεταμένο μήκος διαδρομής (κυψελίδα σχήματος Z, κυψελίδα με φυσαλίδα) στην περίπτωση των ανιχνευτών απορρόφησης, ή πιο ευαίσθητοι ανιχνευτές (φθορισμού επαγόμενου από λέιζερ,

χημειοφωταύγειας, αμπερομετρικοί, αγωγιμομετρικοί). Ιδιαίτερη έμφαση έχει δοθεί στις τεχνικές εμπλουτισμού του δείγματος, τόσο πριν την εισαγωγή του στον τριχοειδή (off-line), όσο και προσυγκέντρωση του δείγματος επάνω στον τριχοειδή (on-line ή on-capillary), κατά τη διάρκεια ή αμέσως μετά την εισαγωγή του στον τριχοειδή. Από αυτές τις τεχνικές, η on-line προσυγκέντρωση του δείγματος παρουσιάζει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον, επειδή απαιτεί μόνο προσεκτική ρύθμιση της σύστασης και της συγκέντρωσης των ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης (BGE) και του υποστρώματος του δείγματος, χωρίς οργανολογικές προσθήκες ή τροποποιήσεις. Οι αναλυτικές συνθήκες ρυθμίζονται έτσι, ώστε το BGE και το υπόστρωμα του δείγματος να διαφέρουν σε κάποιες φυσικοχημικές ιδιότητες (π.χ. αγωγιμότητα, περιεκτικότητα σε άλατα, pH, παρουσία κάποιου πρόσθετου), οι οποίες επιφέρουν μια μεταβολή στην ταχύτητα μετανάστευσης ενός συστατικού, καθώς διέρχεται το όριο μεταξύ των δύο αυτών περιοχών (BGE και δείγματος). Εκμεταλλευόμενοι κάποια εγγενή ιδιότητα του συστατικού (π.χ. pK_a), ή μεταβάλλοντας το περιβάλλον του (π.χ. τοπική ισχύς πεδίου), μπορούμε να αναγκάσουμε το δείγμα να κινηθεί ταχύτερα ή βραδύτερα σε διακριτά τμήματα του τριχοειδούς, επιτρέποντας τη συμπίεση ευρέων ζωνών του δείγματος σε στενές, συμπυκνωμένες ζώνες. Έτσι, μπορούν να εισαχθούν στον τριχοειδή μεγάλοι όγκοι δειγμάτων χαμηλής συγκέντρωσης, χωρίς να θυσιαστεί η διαχωριστική ικανότητα και η αποτελεσματικότητα του διαχωρισμού.

Οι on-line τεχνικές προσυγκέντρωσης ανήκουν στις ακόλουθες δύο κατηγορίες:

- Τεχνικές που βασίζονται στις μεταβολές της ηλεκτροφορητικής ευκινησίας των προσδιοριζόμενων ουσιών, με μεταβολή του pH του BGE, ή με προσθήκη οργανικών ενώσεων και συμπλοκοποιητών στο BGE, όπως αναφέρθηκε παραπάνω,
- Τεχνικές που βασίζονται στη χρήση μιας ψευδοστατικής φάσης: ουσίες που σχηματίζουν κυκλάρια και μικρογαλακτώματα μπορεί να χρησιμεύσουν σε αυτήν τη φάση.

Οι πιο γνωστές περιπτώσεις on-line προσυγκέντρωσης δείγματος στη CE είναι οι εξής: *τεχνικές επιστοιβάγματος* (stacking), όπως το *επιστοιβάγμα δείγματος με ενισχυμένο πεδίο* (FASS) και το *επιστοιβάγμα δείγματος μεγάλου όγκου* (LVSS), η *ισοταχοφόρηση*, η *ρύθμιση του pH* (δυναμικός σύνδεσμος pH και *επιστοιβάγμα με μεσολάβηση του pH*), καθώς και η *σάρωση* (sweeping).

Δύο παράγοντες επηρεάζουν την ενίσχυση της ανίχνευσης στις τεχνικές επιστοιβάγματος. Ο πρώτος είναι η συμπίεση των ζωνών των προσδιοριζόμενων συστατικών στον τριχοειδή. Καθώς το πλάτος της κορυφής ενός συστατικού μειώνεται, το ύψος της κορυφής αυξάνεται δραματικά, με αποτέλεσμα μια μεγαλύτερη αναλογία σήματος-προς-θόρυβο, βελτιώνοντας τα όρια ανίχνευσης. Ο δεύτερος παράγοντας είναι η ποσότητα του δείγματος, που μπορεί να φορτωθεί στον τριχοειδή. Επειδή το πλάτος των κορυφών μειώνεται σημαντικά με τη διαδικασία επιστοιβάγματος, πολύ μεγαλύτεροι όγκοι δείγματος μπορούν να εγχυθούν, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, χωρίς να χαθεί η απόδοση διαχωρισμού. Αυτό οδηγεί σε μια μεγαλύτερη μάζα της προσδιοριζόμενης ουσίας στον τριχοειδή και συνεπώς μεγαλύτερη απόκριση στον ανιχνευτή.

Οι τεχνικές επιστοιβάγματος βασίζονται στις διαφορές έντασης του ηλεκτρικού πεδίου μεταξύ της ζώνης του δείγματος και του BGE. Η δημιουργία ενός ισοταχοφορητικού συστήματος είναι μια τέτοια προσέγγιση. Στη CIPF, οι συγκεντρώσεις των ουσιών που μετακινούνται στον τριχοειδή, θα αποκτήσουν τελικά τη συγκέντρωση του οδηγού ηλεκτρολύτη.

Μια άλλη μέθοδος επιστοιβάγματος επιτυγχάνεται, όταν η αγωγιμότητα του δείγματος είναι σημαντικά χαμηλότερη από εκείνη του BGE. Κατά την εφαρμογή της τάσης, ένα αναλογικά μεγαλύτερο πεδίο θα αναπτυχθεί κατά μήκος της ζώνης του δείγματος, προκαλώντας έτσι την ταχύτερη μετανάστευση των ιόντων. Μόλις τα ιόντα φτάσουν στο όριο που τα χωρίζει από το BGE, το πεδίο μειώνεται και μεταναστεύουν βραδύτερα. Αυτό συνεχίζεται, μέχρις ότου όλα τα ιόντα στη ζώνη του δείγματος φτάσουν σ' αυτό το όριο και προκαλέσουν προσυγκέντρωση του δείγματος σε μια στενότερη ζώνη. Σ' αυτό το σημείο, το πεδίο γίνεται ομογενές στη ζώνη του δείγματος και ξεκινά η κανονική ηλεκτροφόρηση.

Ο απλούστερος τρόπος για να πραγματοποιηθεί επιστοιβάγμα του δείγματος, είναι να διαλυθεί το δείγμα σε νερό, ή ρυθμιστικό διάλυμα χαμηλής αγωγιμότητας (για παράδειγμα 100 έως 1000 φορές χαμηλότερης από εκείνη του BGE) και να εισαχθεί ως συνήθως, είτε υδροδυναμικά είτε ηλεκτροκινητικά. Αυτόματα, θα συμβεί επιστοιβάγμα. Μεγαλύτερη από 10-πλάσια προσυγκέντρωση του δείγματος μπορεί να επιτευχθεί έτσι. Εάν οι αγωγιμότητες του δείγματος και του BGE είναι ισοδύναμες, το επιστοιβάγμα μπορεί να προκληθεί με την έγχυση μικρής ποσότητας νερού πριν από την εισαγωγή του δείγματος. Αρκετά μεγάλοι όγκοι δειγμάτων, που έχουν χαμηλή ιοντική ισχύ, μπορούν να εισαχθούν στον τριχοειδή, χωρίς να

παρατηρηθεί υπερβολική διεύρυνση ζωνών. Αυτή η τεχνική προσυγκέντρωσης καλείται *επιστοιβάγμα δείγματος με ενισχυμένο πεδίο* (field amplified sample stacking, FASS), όταν η έγχυση του δείγματος γίνεται υδροδυναμικά, ή *έγχυση δείγματος με ενισχυμένο πεδίο* (field amplified sample injection, FASI), όταν η έγχυση εκτελείται ηλεκτροκινητικά.

Ένα μειονέκτημα της ηλεκτροκινητικής μεθόδου είναι ότι η ποσότητα των εισαγόμενων ιόντων του δείγματος εξαρτάται έντονα από την πραγματική αγωγιμότητα του δείγματος. Όταν αυτή η αγωγιμότητα δεν μπορεί να ελεγχθεί, τα αποτελέσματα είναι αναξιόπιστα. Γι' αυτό το λόγο, οι υδροδυναμικές μέθοδοι επιστοιβάγματος εφαρμόζονται πιο συχνά. Σ' αυτές τις μεθόδους, εισάγεται ένα αρκετά μεγάλο μήκος δείγματος χαμηλής αγωγιμότητας, με μια χρονικά ελεγχόμενη διαφορά πίεσης. Λόγω της διαφοράς στην αγωγιμότητα, οι ζώνες των συστατικών συμπιέζονται και γίνονται στενότερες και υψηλότερες στο πρώτο στάδιο του διαχωρισμού, μετά την εφαρμογή του ηλεκτρικού πεδίου.

Άλλες μέθοδοι επιστοιβάγματος έχουν, επίσης, προταθεί, στις οποίες μέχρι το 50% του τριχοειδούς γεμίζεται με δείγμα, το BGE απομακρύνεται με τη βοήθεια της EOF και το δείγμα στοιβάζεται σε μια στενή ζώνη, στην αρχή του τριχοειδούς. Ωστόσο, η αποτελεσματική χρήση όλων αυτών των μεθόδων περιορίζεται από διάφορους παράγοντες.

Ένας περιορισμός κατά το επιστοιβάγμα του δείγματος, σχετίζεται με τις διαφορές στις ηλεκτροωσμωτικές ταχύτητες ροής, μεταξύ του τμήματος του τριχοειδούς που περιέχει το διάλυμα του δείγματος και του υπόλοιπου τμήματος του τριχοειδούς, που περιέχει το BGE. Στο χαμηλής αγωγιμότητας τμήμα του δείγματος, η ένταση του πεδίου είναι μεγαλύτερη απ' ό,τι στο υπόλοιπο του τριχοειδούς. Επιπλέον, η ηλεκτροωσμωτική ευκινησία, συνήθως, αυξάνεται με μειούμενη συγκέντρωση άλατος. Αμφότερα τα αποτελέσματα προκαλούν υψηλότερη ηλεκτροωσμωτική ταχύτητα στο μήκος του δείγματος, απ' ό,τι στο BGE. Αυτό προκαλεί μια διαφορά πίεσης μεταξύ του τμήματος του δείγματος και της ζώνης του BGE, με αποτέλεσμα παραβολικό προφίλ ταχύτητας ροής και στα δύο τμήματα του τριχοειδούς, το οποίο προκαλεί διεύρυνση των ζωνών, τόσο του τμήματος του δείγματος, όσο και του BGE κατά το διαχωρισμό.

Ένα επιπλέον πρόβλημα με το επιστοιβάγμα κατά την έγχυση του δείγματος, είναι η παραγωγή θερμότητας στη ζώνη του δείγματος. Η μεγαλύτερη πτώση τάσης συμβαίνει στη ζώνη του προσυγκεντρωμένου δείγματος. Η αντίστοιχη παραγωγή ενέργειας μπορεί να οδηγήσει σε σημαντικά αυξημένες θερμοκρασίες. Στην πραγματικότητα, θερμοκρασίες που υπερβαίνουν τους 90°C στη ζώνη του δείγματος, ακόμη και σε τριχοειδείς που θερμοστατούνται, έχουν αναφερθεί. Αυτό μπορεί να είναι ιδιαίτερα προβληματικό για θερμικά ασταθή δείγματα.

Όταν τα προσδιοριζόμενα συστατικά είναι αδύναμα κατιόντα ή ανιόντα, το επιστοιβάγμα του δείγματος μπορεί, ακόμη, να υλοποιηθεί με ρύθμιση του pH (δυναμικός σύνδεσμος pH). Αυτό συμβαίνει όταν το pH του δείγματος είναι διαφορετικό από εκείνο του BGE, οπότε οι αποτελεσματικές ευκινησίες των ιόντων του δείγματος μπορεί, να είναι παρομοίως διαφορετικές. Οι τιμές pH του δείγματος και του BGE πρέπει, επομένως, να επιλέγονται έτσι ώστε, οι ευκινησίες στο δείγμα να είναι πολύ υψηλότερες από εκείνες στο BGE. Με τον τρόπο αυτό, ένα μεγάλο μήκος δείγματος μπορεί, επίσης, να εισαχθεί με πίεση και πλέον να συμπιέζεται κατά το πρώτο στάδιο του διαχωρισμού.

10.3. Επικάλυψη Τριχοειδούς και Τροποποίηση της Επιφάνειάς του για Ανάλυση Βιομορίων

Η CE είναι μια σημαντική τεχνική διαχωρισμού τόσο για μικρά, όσο και για μεγάλα μόρια. Από τη βασική θεωρία, είναι γνωστό ότι τα μακρομόρια όπως οι πρωτεΐνες, χαρακτηρίζονται από πολύ υψηλές αποτελεσματικότητες διαχωρισμού ($N > 10^6$) λόγω των μικρών συντελεστών διάχυσης. Έχει βρεθεί, ωστόσο, ειδικά για τις πρωτεΐνες, ότι οι αλληλεπιδράσεις τους με την αρνητικά φορτισμένη, υδρόφοβη επιφάνεια των τριχοειδών από τηγμένο οξείδιο του πυριτίου, μειώνει σημαντικά την αποτελεσματικότητα του διαχωρισμού. Παρατηρείται διεύρυνση των κορυφών, κακοί διαχωρισμοί, ασταθής EOF και μεγάλοι χρόνοι μετανάστευσης. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις μπορεί να είναι ιοντικής ή/και υδρόφοβης φύσης και σχετίζονται με το φορτίο, την υδροφοβικότητα, το μέγεθος και τη δυναμική τους φύση.

Η χρήση ακραίων τιμών pH είναι πολύ αποτελεσματική για τη μείωση των ιοντικών αλληλεπιδράσεων. Ένας πιθανός περιορισμός αυτής της προσέγγισης είναι η μεταβολή της δομής των πρωτεϊνών, σε μη βιολογικές τιμές pH. Ρυθμιστικά διαλύματα υψηλής ιοντικής ισχύος μπορούν να περιορίσουν τις ιοντικές αλληλεπιδράσεις, αν και τελικά περιορίζονται από τη θέρμανση Joule.

Η τροποποίηση των τοιχωμάτων του τριχοειδούς είναι μια εναλλακτική λύση και προορίζεται για: α) την καταστολή της αλληλεπίδρασης των διαλυμένων ουσιών με την επιφάνεια του τριχοειδούς, η οποία προκαλεί διεύρυνση των ζωνών ή εμφάνιση κορυφών με ουρά, λόγω αργής προσρόφησης/εκρόφησης και β) τον έλεγχο του μεγέθους και της κατεύθυνσης της ηλεκτροωσμωτικής ροής. Δύο βασικές προσεγγίσεις υπάρχουν:

- Μόνιμη ή στατική τροποποίηση με χημικά δεσμευμένες φάσεις (ομοιοπολικές τροποποιήσεις των σιλανολικών ομάδων), ή φυσικά προσροφημένες φάσεις (φυσική επικάλυψη των τοιχωμάτων με εγκάρσια συνδεδεμένα πολυμερή).
- Δυναμική επικάλυψη ή αλλιώς δυναμική απενεργοποίηση, με τη χρήση προσθέτων στο ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (BGE).

Και οι δύο προσεγγίσεις έχουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα, αν και καμία τους δεν είναι σαφώς ανώτερη από την άλλη. Η προετοιμασία των στατικών επικαλύψεων είναι χρονοβόρα. Οι ομοιοπολικά επικαλυμμένοι τριχοειδείς είναι εμπορικά διαθέσιμοι, αλλά είναι σχετικά ακριβοί. Άλλα μειονεκτήματα των στατικών επικαλύψεων περιλαμβάνουν σταδιακή υποβάθμιση της επικάλυψης, λόγω ευαισθησίας στο pH και διακυμάνσεις της αποτελεσματικότητας της επικάλυψης από παρτίδα σε παρτίδα.

Εκτός από τις τροποποιήσεις των τοιχωμάτων του τριχοειδούς, μια καλά καθορισμένη προετοιμασία και εξισορρόπηση με διαλύτες ή/και υδατικά διαλύματα (NaOH και ρυθμιστικά διαλύματα), των καινούριων αλλά και των ήδη μεταχειρισμένων τριχοειδών, καθώς και η σωστή αποθήκευσή τους, βάσει ενός αυστηρού πρωτοκόλλου, έχει μεγάλη σημασία για την επίτευξη αναπαραγώγιμων μεθόδων διαχωρισμού. Δύο άλλοι παράγοντες οι οποίοι μπορούν εύκολα να ελεγχθούν, όταν χρησιμοποιούνται τριχοειδείς με ή χωρίς επικάλυψη, είναι: τα άκρα του τριχοειδούς και οι διακυμάνσεις στην ποιότητα των τριχοειδών από παρτίδα σε παρτίδα.

Τα άκρα του τριχοειδούς θα πρέπει να είναι επίπεδα και ακέραια, για να αποφεύγονται τα φαινόμενα εμφάνισης κορυφών με ουρά και μεταφοράς του δείγματος από έγχυση-σε-έγχυση (sample carryover). Οι διακυμάνσεις στην ποιότητα των τριχοειδών από παρτίδα σε παρτίδα, εξαρτάται έντονα από την υπολειμματική συγκέντρωση των επιφανειακών ομάδων σιλανόλης και σε κάποιο βαθμό και από την ποσότητα των (μεταλλικών) προσμίξεων στο διοξείδιο του πυριτίου. Γι' αυτό το λόγο, κατά την ανάπτυξη μιας μεθόδου, πρέπει να εφαρμόζονται αυστηρές διαδικασίες προετοιμασίας και εξισορρόπησης του τριχοειδούς, προκειμένου να αποκτήσει η επιφάνειά του μια καλά καθορισμένη και αναπαραγώγιμη κατάσταση υδροξυλίωσης. Επίσης, πλύσεις του τριχοειδούς μεταξύ των μετρήσεων και σύντομη εξισορρόπηση με το BGE, θα πρέπει να αποτελούν μέρος της μεθόδου.

10.4. Δειγματοληψία και Προκατεργασία Δείγματος

Δειγματοληψία: Ενώ στις περισσότερες εφαρμογές της CE η δειγματοληψία γίνεται από ένα φιαλίδιο του αυτόματου δειγματολήπτη, είτε υδροδυναμικά είτε ηλεκτροκινητικά, υπάρχουν και άλλες δυνατότητες, συμπεριλαμβανομένης της δειγματοληψίας μέσω μικροδιαπίδωσης και απευθείας από στερεούς ιστούς. Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί διαδικασίες απευθείας δειγματοληψίας από ιστούς, τοποθετώντας τον τριχοειδή μέσα στον ιστό, όπως π.χ. η δειγματοληψία ταυρίνης από εγκέφαλο αρουραίου, μετά από εκτομή του εγκεφάλου. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, ο τριχοειδής απομακρύνθηκε από τον ιστό του εγκεφάλου μετά τη δειγματοληψία και ακολούθησε online προσυγκέντρωση και παραγωγοποίηση του δείγματος και στη συνέχεια ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός, με ανίχνευση με φθορισμό επαγόμενο από λέιζερ. Η δειγματοληψία με μικροδιαπίδωση χρησιμοποιείται, συνήθως, για την παρακολούθηση δυναμικών αλλαγών, σε πλήθος μικρών μορίων (π.χ., ντοπαμίνη), που βρίσκονται στα βιολογικά υγρά οργάνων (όπως π.χ. του εγκεφάλου) ελευθέρως κινούμενων ζώων.

Προκατεργασία δείγματος: Η ανάλυση των βιολογικών δειγμάτων (π.χ., αίμα, ούρα, σάλιο, ομογενοποιημένοι ιστοί) με CE, απαιτεί την αποτελεσματική προκατεργασία του δείγματος (δηλαδή, καθαρισμό και προσυγκέντρωση) για την απομάκρυνση των παρεμποδίσεων (ενδογενών/εξωγενών, χαμηλού ή/και υψηλού μοριακού βάρους), οργανικών και ανόργανων αλάτων και σωματιδιακής ύλης. Οι διατάξεις προκατεργασίας του δείγματος μπορεί να συνδυαστούν με τη CE, με τους εξής τρόπους: off-line (χειροκίνητα), at-line (με ρομποτική σύνδεση), on-line (σύνδεση μέσω γραμμής μεταφοράς), ή in-line

(πλήρης ενοποίηση μεταξύ της μονάδας προετοιμασίας του δείγματος και του συστήματος διαχωρισμού). Τα συστήματα προκατεργασίας του δείγματος τα οποία αναφέρονται στη βιβλιογραφία, βασίζονται σε χρωματογραφικές, ή ηλεκτροφορητικές διαδικασίες, ή διαδικασίες με χρήση μεμβρανών. Ο συνδυασμός της αυτοματοποιημένης προκατεργασίας δείγματος με τη CE είναι ιδιαίτερα χρήσιμος στην ανάλυση πολύπλοκων δειγμάτων και συμβάλλει στη βελτίωση της εκλεκτικότητας και ευαισθησίας.

Στη χειροκίνητη προκατεργασία του δείγματος (off-line), τα δύο στάδια (προκατεργασίας και διαχωρισμού) εκτελούνται χωριστά και η μεταφορά της προσδιοριζόμενης ουσίας διεξάγεται χειροκίνητα. Στο συνδυασμό at-line, χρησιμοποιείται ένα ρομποτικό σύστημα για να μεταφέρει τα δείγματα από τη μια μονάδα στην άλλη. Τόσο στο off-line, όσο και στο at-line σύστημα δεν υπάρχει άμεση ροή του υγρού μεταξύ των δύο μονάδων (προκατεργασίας και διαχωρισμού). Στα on-line συστήματα γίνεται άμεση μεταφορά των υγρών, μέσω σύνδεσης με τον τριχοειδή. Σε αυτήν την περίπτωση, τα δείγματα μπορούν να υποβάλλονται σε επεξεργασία είτε παράλληλα - με το δεύτερο δείγμα να υφίσταται προκατεργασία, ενώ το πρώτο δείγμα αναλύεται - ή σε σειρά - όπου τα δείγματα προκατεργάζονται και αναλύονται το ένα μετά το άλλο (και η ποσότητα των δειγμάτων τα οποία διεκπεραιώνονται είναι μικρότερη). Το υψηλότερο επίπεδο αυτοματοποίησης επιτυγχάνεται όταν οι μονάδες προετοιμασίας του δείγματος και διαχωρισμού ενσωματώνονται πλήρως, σε ένα νέο σύστημα in-line.

Η επιλογή των διαλυτών που χρησιμοποιούνται κατά τη διάρκεια της προκατεργασίας του δείγματος και του διαχωρισμού, είναι μάλλον κρίσιμη στα in-line συστήματα: μπορεί να προκύψουν προβλήματα συμβατότητας, αφού και τα δύο στάδια πραγματοποιούνται στον τριχοειδή της CE. Με τα on-line συστήματα, η επιλογή διαλυτών είναι σχετικά λιγότερο κρίσιμη, ενώ τα προβλήματα συμβατότητας στα off-line και at-line συστήματα μπορεί συνήθως ν' αποφευχθεί, με την ενσωμάτωση ενός σταδίου εναλλαγής φάσης, όπως είναι η εξάτμιση ακολουθούμενη από επαναδιάλυση. Ωστόσο, σε όλα τα off-, at- και on-line συστήματα, ο διαλύτης που χρησιμοποιείται για τη μεταφορά του δείγματος, από τη μονάδα προκατεργασίας του προς τη CE, θα πρέπει να είναι συμβατός με το ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού (BGE).

Ένα ειδικό πρόβλημα, που αφορά στη σύζευξη της προκατεργασίας του δείγματος και της CE, όπως στις at-line και on-line προσεγγίσεις, είναι ότι το άκρο εισόδου του τριχοειδούς πρέπει να είναι γειωμένο. Κατά συνέπεια, μια υψηλή τάση πρέπει να εφαρμοστεί στο άκρο εξόδου του τριχοειδούς. Όταν χρησιμοποιούνται off-column ανιχνευτές, οι οποίοι, δηλαδή, πρέπει να συζευχθούν με το άκρο εξόδου του τριχοειδούς, όπως οι ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές, η φασματομετρία μάζας ή οι αγωγιμομετρικοί ανιχνευτές, η έξοδος του τριχοειδούς θα πρέπει να είναι γειωμένη και η υψηλή τάση να εφαρμόζεται στην πλευρά εισόδου του τριχοειδούς. Αυτές οι τεχνικές ανίχνευσης δεν μπορούν εύκολα να εφαρμοστούν όταν χρησιμοποιούνται at-line και on-line διαδικασίες προκατεργασίας δειγμάτων, επειδή στην περίπτωση αυτή και τα δύο άκρα του τριχοειδούς πρέπει να είναι γειωμένα. Τέτοια προβλήματα δεν εμφανίζονται με τεχνικές ανίχνευσης που εφαρμόζονται on-column, (π.χ., απορρόφηση, φθορισμός και NMR). Οι προκατεργασίες off-line και in-line μπορούν να συνδυαστούν με όλους τους τύπους σύζευξης.

Οι περισσότερες εφαρμογές που αναφέρονται στη βιοανάλυση φαρμάκων με CE-MS, επικεντρώνονται σε δείγματα ορού και ούρων, αν και μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα βιολογικά υγρά, όπως τρίχες, εγκεφαλονωτιαίο υγρό κ.ά. Οι πρωτεΐνες, τα κύρια συστατικά του πλάσματος, προσροφώνται ισχυρά στα τοιχώματα του τριχοειδούς και, επομένως, επηρεάζουν αρνητικά την απόδοση του διαχωρισμού και τους χρόνους μετανάστευσης. Τα ούρα περιέχουν ανόργανα ιόντα και άλλες ενδογενείς ενώσεις, όπως η ουρία, που παρεμποδίζουν, επίσης, την ηλεκτροφορητική ανάλυση. Επιπλέον, η υψηλή ιοντική ισχύς των ούρων είναι προβληματική, σε περιπτώσεις που εφαρμόζεται επιστοίβαγμα του δείγματος και μπορεί να παρατηρηθεί διεύρυνση των κορυφών.

Μεταξύ των τεχνικών προκατεργασίας του δείγματος, η εκχύλιση στερεάς φάσης-υγρού (SPE) και η εκχύλιση υγρού - υγρού είναι αποτελεσματικές διαδικασίες καθαρισμού και μπορούν, επίσης, να εφαρμοστούν και για προσυγκέντρωση των προσδιοριζόμενων ενώσεων. Παρ' όλα αυτά, οι διαδικασίες αυτές είναι συχνά κουραστικές και χρονοβόρες. Γι' αυτό, σε ορισμένες εφαρμογές CE με ανίχνευση φασματομετρίας μαζών, η οποία είναι πολύ εκλεκτική, έχουν αναφερθεί απλή διήθηση του δείγματος, καθίζηση πρωτεϊνών και υπερδιήθηση ή αραιώση.

10.5. Βιοαναλυτικές Εφαρμογές της Τριχοειδούς Ηλεκτροφόρησης

Η Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση, λόγω της υψηλής ευελιξίας των τρόπων διαχωρισμού τους οποίους χρησιμοποιεί και ιδιαίτερα σε συνδυασμό με ανίχνευση φασματομετρίας μαζών (CE-MS), μπορεί να

χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό μιας μεγάλης ποικιλίας ενώσεων, από μικρά μόρια έως μεγάλες πρωτεΐνες. Η συνδυασμένη CE-MS είναι ιδιαίτερα καλά προσαρμοσμένη για κλινικές έρευνες, οι οποίες ασχολούνται με τον προσδιορισμό των εξωγενών και ενδογενών ενώσεων που υπάρχουν σε βιολογικά δείγματα. Έτσι, χρησιμοποιείται, ευρέως, για κλινικούς διαγνωστικούς σκοπούς και βρίσκει επίσης εκτεταμένη εφαρμογή στην ιατροδικαστική έρευνα, καθώς και στην ανάλυση φαρμακευτικών ουσιών και μεταβολιτών τους σε βιολογικά υγρά. Στον τομέα της ιατροδικαστικής έρευνας, μέχρι πρόσφατα, οι αναλύσεις παραδοσιακά πραγματοποιούνταν με GC και HPLC. Η CE, με τις εξαιρετικές δυνατότητες διαχωρισμού, διαχωριστικής ικανότητας, σύντομων χρόνων ανάλυσης και του ίδιου του μηχανισμού διαχωρισμού, αποτελεί πλέον μια εναλλακτική διαχωριστική τεχνική για τα ιατροδικαστικά εργαστήρια. Στις μελέτες μεταβολισμού, η μέθοδος ανίχνευσης που χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση των μεταβολιτών των φαρμάκων, εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα των πρότυπων ουσιών· αν υπάρχουν, η ανίχνευση με απορρόφηση UV είναι επαρκής στις περισσότερες περιπτώσεις, αν όχι, τότε απαιτείται η χρήση CE-MS.

10.5.1. CE-MS για Κλινικούς Διαγνωστικούς Σκοπούς

Η κλινική πρωτομική η οποία βασίζεται στην ανάλυση με MS, αποτελεί έναν ενδιαφέροντα κλάδο για την έγκαιρη ανίχνευση ασθενειών και τη διάγνωση της υγείας ενός οργανισμού. Σημαντικές βελτιώσεις στις μεθόδους διαχωρισμού, καθώς και στα συστήματα MS, έχουν αυξήσει τη διαχωριστική ικανότητα, ευαισθησία και ακρίβεια των αναλύσεων πρωτεϊνών.

Η HPLC χρησιμοποιείται, ευρέως, σε σύζευξη με MS, αλλά επιτρέπει το διαχωρισμό πολυπεπτιδίων με μοριακές μάζες μόνο μέχρι 5 kDa. Μεγαλύτερα μόρια, συχνά δεν εκλύονται από τη στήλη, με αποτέλεσμα ελάττωση της απόδοσής της και πιθανό μπλοκάρισμα. Η CE, υπερτερεί έναντι της HPLC στο διαχωρισμό μεγαλύτερων πεπτιδίων (μέχρι 20 kDa) και είναι λιγότερο ευαίσθητη στην ανίχνευση παρεμποδίσεων (ο τριχοειδής μπορεί να πλυθεί και να ξαναπροετοιμαστεί, μέσα σε λίγα λεπτά, με τη χρήση NaOH).

Στη CE, ο διαχωρισμός βασίζεται στις διαφορές του λόγου φορτίο/μέγεθος και η τεχνική αυτή είναι κατάλληλη για την ανάλυση μορίων διαφόρων μεγεθών και υδροφοβικότητας, όπως είναι τα πεπτίδια και οι πρωτεΐνες. Ο όγκος δείγματος, όμως, που μπορεί να εισαχθεί στον τριχοειδή είναι περιορισμένος και μόνο μικρές ποσότητες μπορούν ν' αναλυθούν, αναδεικνύοντας έτσι το πρόβλημα της μη ευαίσθητης ανίχνευσης. Άλλος περιορισμός της CE-MS, είναι το γεγονός ότι οι πρωτεΐνες >20 kD, δεν μπορούν ν' αναλυθούν με επαρκή επαναληψιμότητα. Αυτό οφείλεται στη μικρή διαλυτότητα αυτών των πρωτεϊνών στο φέροντα ηλεκτρολύτη της CE. Για βελτίωση της επαναληψιμότητας, θα πρέπει να απομακρυνθούν οι μεγαλύτερες πρωτεΐνες. Η CE/MS επιτρέπει την ανάλυση περισσότερων από 1000 διαφορετικών πολυπεπτιδίων, μέσα σε περίπου μια ώρα, με υψηλή επαναληψιμότητα. Παρ' όλα αυτά, μερικές από τις βασικότερες προκλήσεις, όπως η ανίχνευση μορίων με μικρή συγκέντρωση, παραμένουν.

Ανάλυση ούρων: Η υψηλή περιεκτικότητα των ούρων σε άλατα, έχει ως αποτέλεσμα μεγάλους χρόνους ανάλυσης και διεύρυνση των κορυφών. Για το λόγο αυτό, τα άλατα πρέπει να απομακρύνονται, καθώς και άλλες ουσίες μικρού μοριακού βάρους, ώστε ν' αποφεύγεται το ράγισμα του τριχοειδούς, λόγω της ανάπτυξης υψηλού ρεύματος. Συνήθως, για την απομάκρυνση ανεπιθύμητων παρεμποδίσεων χρησιμοποιούνται μικροστήλες RP-C2. Τα μεγάλα πολυπεπτίδια δεν εκλύονται αποτελεσματικά από στήλες RP-C18.

Ανάλυση ορού αίματος: Όλα τα βιολογικά υγρά περιέχουν μεγάλη ποικιλία διαφορετικών ιόντων, λιπιδίων, υδατανθράκων κ.λπ. κι έτσι αυτά τα δείγματα δεν μπορούν ν' αναλυθούν απευθείας με φασματομετρία μαζών. Εξάλλου, τα πεπτίδια πρέπει να διαχωριστούν πριν την ανίχνευσή τους. Εκτιμάται ότι πάνω από 10000 πρωτεΐνες βρίσκονται, συνήθως, στον ορό του αίματος, οι περισσότερες από τις οποίες, σε χαμηλή συγκέντρωση. Οι πρωτεΐνες που βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις (mg/mL), όπως αλβουμίνη, τρανσφερρίνη, αιπογλοβίνη και λιποπρωτεΐνες, παρεμποδίζουν την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνών, που βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις (ng/mL στον ορό). Οι πρωτεΐνες οι οποίες βρίσκονται σε αφθονία στον ορό του αίματος, μπορεί να παρεμποδίσουν την ανάλυση με CE-MS, ενδεχομένως λόγω υπερφόρτωσης του τριχοειδούς, με αποτέλεσμα διογκωμένους τριχοειδείς ή ασταθή ηλεκτροψεκασμό. Ως λύση στο πρόβλημα αυτό έχει προταθεί η υπερδιήθηση των δειγμάτων, υπό συνθήκες μετουσίωσης των πρωτεϊνών (4M ουρία, 0,1M NaCl, 0,0125% NH₃). Αυτό το πρωτόκολλο έχει οδηγήσει στην ανίχνευση 500-2000 πολυπεπτιδίων, με μοριακές μάζες από 800 – 12000Da.

Βιοδείκτες στα ούρα: Η ανάλυση ούρων με CE-MS, μπορεί να οδηγήσει στην ταυτοποίηση βιοδεικτών για μια πληθώρα ασθενειών των νεφρών και της ουροποιητικής οδού. Τα ούρα μπορούν να καταδείξουν το επίπεδο υγείας ορισμένων οργάνων, κυρίως, των νεφρών και της χολής. Το πρόβλημα με την ανάλυση των ούρων είναι ότι η σύσταση των πολυπεπτιδίων διαφοροποιείται σημαντικά κατά τη διάρκεια της ημέρας, ως αποτέλεσμα φυσικής δραστηριότητας, διαίτας, καπνίσματος κ.λπ. Δεδομένης της υψηλής βιολογικής ποικιλότητας των πολυπεπτιδίων, είναι σημαντικό οι κλινικές συνθήκες να κρίνονται όχι με βάση μεμονωμένους πολυπεπτιδικούς δείκτες, αλλά ολόκληρα πρωτεϊνικά μοτίβα.

Σε αντίθεση με τις βιοψίες ιστών, η συλλογή ούρων δεν είναι επεμβατική διαδικασία και μπορεί να πραγματοποιηθεί σε μεγάλες ποσότητες, σε πρώιμο στάδιο της νόσου. Επιπλέον, μερικές φορές είναι δύσκολο να παρακολουθησει κανείς τη θεραπευτική ανταπόκριση και την επιτυχία της θεραπείας, γι' αυτό, η χρήση αξιόπιστων βιοδεικτών στα ούρα έχει τεράστια δυναμική. Σ' αυτόν, τον τομέα, ομάδες ερευνητών έχουν εργαστεί εντατικά για την ανάπτυξη καινοτόμων μεθόδων με χρήση CE/ESI-TOF-MS για το γρήγορο και ευαίσθητο προσδιορισμό μερικών εκατοντάδων πολυπεπτιδίων στα ούρα. Οι μελέτες αυτές αποτελούν ένα πρώτο βήμα για την εφαρμογή της πρωτεομικής στην κλινική έρευνα. Αναμένεται οι βιοδείκτες αυτοί να επιτρέψουν μια λεπτομερή έρευνα και περιγραφή της νεφρικής λειτουργίας, οδηγώντας σε βαθύτερη κατανόηση της παθοφυσιολογίας της νεφρικής ανεπάρκειας στους διαβητικούς ασθενείς.

Βιοδείκτες στον ορό αίματος και άλλα βιολογικά υγρά: Επειδή ο ορός αίματος και τα άλλα βιολογικά υγρά περιέχουν συστατικά όλων των διαφοροποιημένων επιμέρους πρωτεομάτων του σώματος, η ανάλυσή τους παρέχει πληροφορίες σχεδόν για κάθε ενδεχόμενη ασθένεια. Ο ορός αίματος ιδιαίτερα, είναι εκείνο το δείγμα, που παρέχει τις περισσότερες πληροφορίες και περιγράφει με τον καλύτερο τρόπο την τρέχουσα κατάσταση υγείας του οργανισμού. Παρ' όλα αυτά, έχουν δημοσιευτεί μόνο λίγες εργασίες με CE-MS, για την ανακάλυψη βιοδεικτών στον ορό, ίσως επειδή από αναλυτική σκοπιά είναι και το δυσκολότερο δείγμα.

Ιδανικός βιοδείκτης σε κάποιο δείγμα, από ασθενείς με συγκεκριμένη νόσο, δεν υπάρχει. Ένα σύνολο πολυπεπτιδίων, όμως, το οποίο να δείχνει σημαντικές διαφορές στην κατανομή (ένταση σήματος και παρουσία/απουσία), μεταξύ ασθενούς και υγιούς δότη, μπορεί να ανιχνευθεί με CE-MS. Ο συνδυασμός δεκάδων ή ακόμη και εκατοντάδων βιοδεικτών, απαραίτητων για τη δημιουργία σαφούς διαγνωστικού μοντέλου, καθιστά την προαναφερόμενη μέθοδο περισσότερο εύρωστη και ειδική. Αυτή η πολλά υποσχόμενη προσέγγιση, μπορεί να κάνει δυνατή την εκτίμηση της πορείας μιας ασθένειας και των αποτελεσμάτων της θεραπείας. Τα περισσότερα πολυπεπτιδία τα οποία έχουν ταυτοποιηθεί, προέρχονται από πρωτεΐνες που βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις. Μελλοντικά, πρέπει να δοθεί έμφαση στην ανάπτυξη πιο ευαίσθητων μεθόδων CE-MS, για την ανίχνευση πεπτιδίων από πρωτεΐνες που βρίσκονται σε ίχνη. Επιπλέον, στον τομέα της πρωτεομικής πρέπει να δοθεί έμφαση και στην επικύρωση των αναλυτικών μεθοδολογιών.

10.5.2. Χημική Κυτταρομετρία, Εφαρμογές στις Νευροεπιστήμες, Ανάλυση DNA, Απταμερή, Ανάλυση Υδατανθράκων και Λιπιδίων

Μονοκυτταρική ανάλυση με Τριχοειδή Ηλεκτροφόρηση: Η CE με την εξαιρετική διαχωριστική της ικανότητα αποτελεί πολύ χρήσιμη τεχνική στη μονοκυτταρική ανάλυση, ειδικά όταν συνδυάζεται με ανίχνευση φθορισμού επαγόμενου από ακτίνες λέιζερ (Laser Induced Fluorescence, LIF). Η τεχνική ανάλυσης κυττάρων με CE-LIF, απαιτεί ανάπτυξη μεθόδων για την επισήμανση των κυττάρων, είτε πριν την εισαγωγή τους στον τριχοειδή, ή κατά τη διάρκεια καλλιέργειας του ιστού. Ο χειρισμός των κυττάρων περιλαμβάνει διάφορες τεχνικές εισαγωγής δείγματος στον τριχοειδή, όπως νανοπιπέττες, οπτικές λαβίδες και μικροσιφόνια λέιζερ.

Νευροεπιστήμες: Οι εφαρμογές της CE στις νευροεπιστήμες (νευροχημεία και νευροβιολογία) συνεχίζουν ν' αναπτύσσονται τα τελευταία χρόνια, παρέχοντας βελτιωμένη μοριακή, φυσιολογική και φαρμακολογική κατανόηση της πολύπλοκης χημείας του εγκεφάλου. Διαφορετικά είδη της CE συζευγμένα με διάφορες τεχνικές ανίχνευσης, έχουν εφαρμοστεί επιτυχώς για τον προσδιορισμό βιογενών αμινών, αμινοξέων και νευροπεπτιδίων σε δείγματα ιστού, εξωκυττάρων υγρών και του περιεχομένου μονών νευρώνων ή νευροκυττάρων.

Ανάλυση εξωκυττάρου υγρού: Το νευρικό σύστημα περιβάλλεται από εξωκυττάριο υγρό, όπου λαμβάνουν χώρα πολλές σημαντικές κυτταρικές διεργασίες, όπως χημική επικοινωνία και μεταφορά θρεπτικών συστατικών και μεταβολιτών, μεταξύ των νευρικών και των νευρογλοιακών κυττάρων. Ο ποιοτικός και ποσοτικός χαρακτηρισμός των αμινοξέων, βιογενών αμινών και πεπτιδίων που υπάρχουν σε αυτό το υγρό, θα μπορούσε να συνδεθεί με τη νευρωνική λειτουργικότητα.

Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες τεχνικές δειγματοληψίας *in vivo*, για ανάλυση εξωκυττάρου υγρού είναι η μικροδιαπίδυση, η χαμηλής ροής αιμάτωση ώθησης-έλξης (low-flow push-pull perfusion) και η άμεση δειγματοληψία. Σε μετρήσεις που βασίζονται στην τεχνική της μικροδιαπίδυσης, η χρονική ανάλυση (temporal resolution), δηλαδή η ακρίβεια της μέτρησης σε σχέση με το χρόνο, περιορίζεται από το όριο ανίχνευσης μάζας της χρησιμοποιούμενης μεθόδου. Όταν τα δείγματα που έχουν ληφθεί με μικροδιαπίδυση, αναλύονται με HPLC, λόγω του ότι απαιτούνται μεγάλοι όγκοι, πρέπει να συλλέγονται για τουλάχιστον 5 λεπτά, με αποτέλεσμα να προσφέρουν κακή χρονική ανάλυση. Η CE είναι σε θέση ν' αναλύσει νανόλιτρα δείγματος, με χαμηλά όρια ανίχνευσης μάζας και επιτρέπει βελτίωση της χρονικής ανάλυσης σε χρόνο μικρότερο των 10s.

Στην πρώτη εργασία της βιβλιογραφίας, όπου χρησιμοποιήθηκε δειγματοληψία με μικροδιαπίδυση on-line σε συνδυασμό με CE-LIF, αναλύθηκαν αμινοξέα σε ελεύθερα κινούμενους αρουραίους. Δεκαπέντε αμινοξέα διαχωρίστηκαν σε 30s και ταυτοποιήθηκαν με βάση τους χρόνους μετανάστευσης και με ανάλυση προτύπων, με τη χρήση MECC. Αυτή η μέθοδος εφαρμόστηκε για την παρακολούθηση αμινοξέων κατά την έγχυση αιθανόλης σε ελεύθερα κινούμενους αρουραίους.

Ανάλυση νευρώνων: Η μονοκυτταρική ανάλυση είναι πολύ σημαντική στις νευροεπιστήμες, όπου οι ιστοί είναι εξαιρετικά ανομοιογενείς και οι πληροφορίες ενδοκυτταρικής επικοινωνίας μπορεί να οδηγήσουν στην κατανόηση της νευρωνικής λειτουργίας και δυσλειτουργίας. Ο Sweedler και συνεργάτες χρησιμοποίησαν CE-LIF για τη μέτρηση νευροπεπτιδίων, που περιείχαν D-αμινοξέα, σε μεμονωμένους νευρώνες του είδους *Aplysia californica*. Αν και οι πρωτεΐνες και τα πεπτίδια που υπάρχουν στα κύτταρα των περισσότερων ζώων αποτελούνται σχεδόν αποκλειστικά από L-αμινοξέα, πεπτίδια που περιέχουν D-αμινοξέα έχουν εντοπιστεί σε διάφορα ζώα.

Υποκυτταρική ανάλυση δειγμάτων: Στο νευρικό σύστημα, οι νευρώνες χρησιμοποιούν διάφορες διαδικασίες για τη μεταφορά χημικών και ηλεκτρικών σημάτων από ένα νευρώνα στον επόμενο. Η γνώση του τρόπου κατανομής των νευροδιαβιβαστών, σ' ένα μόνο νευρώνα, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη μοντέλων για τη σύνθεση, τη μεταφορά, την αποθήκευση και απελευθέρωση των νευροδιαβιβαστών. Αν και η ανάλυση ολόκληρων των κυττάρων παρέχει πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με το περιεχόμενο και τη συμπεριφορά των μονών κυττάρων, η χωρική πληροφορία χάνεται.

Ανάλυση DNA: Η ανάλυση του DNA με CE έχει εξελιχθεί σ' ένα ώριμο ερευνητικό πεδίο, σε εξαιρετικά σύντομο χρονικό διάστημα. Η πρώτη αλληλουχία DNA που προσδιορίστηκε με CE, υποβλήθηκε στη Διεθνή Τράπεζα Γονιδίων, GenBank, το 1997 και έκτοτε η τεχνική αυτή έχει χρησιμοποιηθεί ως αξιόπιστο εργαλείο για την αλληλουχία του γονιδιώματος. Οι σημαντικές πρόοδοι που σημειώνονται στη CE, για εύρεση αλληλουχίας του DNA, επικεντρώνονται, κυρίως, στα υλικά επικάλυψης του τριχοειδούς και στα υλικά που λειτουργούν ως μοριακά κόσκινα.

Αптаμερή: Τα απταμερή (*aptamers*: από το λατινικό *aptus* - fit και το ελληνικό *μέρος*) είναι ολιγονουκλεϊκά οξέα ή πεπτίδια, τα οποία δεσμεύονται σ' ένα συγκεκριμένο μόριο - στόχο. Τα απταμερή, συνήθως, δημιουργούνται κατά την επιλογή τους από μια μεγάλη δεξαμενή τυχαίας αλληλουχίας, αλλά τα φυσικά απταμερή υπάρχουν, επίσης, σε ριβοδιακόπτες (*riboswitches*). Τα απταμερή μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο για βασική έρευνα, όσο και για κλινικούς σκοπούς, ως μακρομοριακά φάρμακα. Μπορούν ακόμη να συνδυαστούν με ριβοένζυμα για να αυτοδιασπαστούν, κατά την παρουσία του μορίου-στόχου τους.

Τα απταμερή είναι χρήσιμα σε βιοτεχνολογικές και θεραπευτικές εφαρμογές, δεδομένου ότι προσφέρουν ιδιότητες μοριακής αναγνώρισης, που ανταγωνίζεται εκείνης που προσφέρουν, συνήθως, τα αντισώματα. Τα απταμερή προσφέρουν πλεονεκτήματα έναντι των αντισωμάτων:

- Μπορούν να παρασκευαστούν σε δοκιμαστικό σωλήνα.
- Παράγονται εύκολα με χημική σύνθεση.
- Κατέχουν τις επιθυμητές ιδιότητες αποθήκευσης.

- Προκαλούν μικρή ή καθόλου ανοσογονικότητα σε θεραπευτικές εφαρμογές.

Ειδικότερα, τα απταμερή μπορούν να ταξινομηθούν ως εξής:

- DNA ή RNA απταμερή: Αποτελούνται από (συνήθως κοντές) έλικες ολιγονουκλεοτιδίων.
- Απταμερή πεπτιδίων: Αποτελούνται από ένα κοντό, μεταβλητής περιοχής πεπτίδιο, που επισυνάπτεται στα δύο άκρα σε μια πρωτεΐνη.

Οι ενώσεις προσθήκης του DNA μπορούν να αναγνωριστούν από αντιδραστήρια χημικής συγγένειας και η CE έχει αποδειχθεί ως η ιδανική τεχνική για τη μελέτη τους. Υπήρξε μεγάλο ενδιαφέρον για τη χρήση των απταμερών ως αντιδραστηρίων χημικής συγγένειας για πρωτεϊνική ανάλυση. Ο Huang και συνεργάτες χρησιμοποίησαν το απταμερές που δεσμεύεται στην α-θρομβίνη, για την παρακολούθηση της ελεύθερης πρωτεΐνης και της δεσμευμένης πρωτεΐνης από ένα αντίσωμα.

Ανάλυση υδατανθράκων και λιπιδίων: Η χημεία των υδατανθράκων είναι πολύ πιο σύνθετη από εκείνη των πρωτεϊνών ή των νουκλεϊκών οξέων και γι' αυτό έχει λάβει πολύ λιγότερη προσοχή από τους ερευνητές. Ωστόσο, οι υδατάνθρακες διαχωρίζονται εύκολα με CE, λόγω της εξαιρετικά πολικής φύσης τους και της ευκολίας με την οποία σχηματίζουν σύμπλοκα με τα βορικά (το πλέον συνηθισμένο ρυθμιστικό διάλυμα στη CE). Οι περισσότεροι υδατάνθρακες δεν μπορούν ν' ανιχνευθούν φασματοφωτομετρικά, γι' αυτό οι περισσότερες μελέτες χρησιμοποιούν είτε παραγωγοποίηση, είτε φασματομετρία μάζας για την ανίχνευσή τους. Η παραγωγοποίηση για σχηματισμό φθορίζόντων παραγώγων των υδατανθράκων, συχνά οδηγεί σε πολύ χαμηλότερα όρια ανίχνευσης.

Τα λιπίδια είναι εξαιρετικά πολικές ενώσεις και ο προσδιορισμός τους με CE σχεδόν πάντα πραγματοποιείται με Μικυλλιακή Ηλεκτροκινητική Τριχοειδή Χρωματογραφία (MECC). Έχουν δημοσιευτεί πολλές εργασίες που ασχολούνται με τη μελέτη των λιποπρωτεϊνών με CE, όπως π.χ. έχει καταγραφεί το προφίλ λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL) και λιποπρωτεϊνών υψηλής πυκνότητας (HDL), σε ανθρώπινο ορό. Επίσης, έχουν μελετηθεί οι διαφορές στις ευκινήσιες των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας σε διαβητικούς ασθενείς τύπου 2.

Βιβλιογραφία

- Espada A. & Molina-Martin M. (2012). *Capillary electrophoresis and small molecule drug discovery: a perfect match*. *Drug Discov Today*, 17(7-8), 396-404.
- Gambino R., Uberti B., Alemanno N., Pisu E., Pagano G. & Cassader M. (2004). *In vivo oxidizability of LDL in type 2 diabetic patients in good and poor glycemic control*. *Atherosclerosis*, 173, 103-107.
- Heiger D. (2000). *A primer. Agilent technologies. High performance capillary electrophoresis. An introduction*. Retrieved July 26, 2014, from <http://www.colby.edu/chemistry/CH332/laboratory/Agilent%20CE%20Primer.pdf>
- Huang C.C., Cao Z., Chang H.T. & Tan W. (2004). *Protein-protein interaction studies based on molecular aptamers by affinity capillary electrophoresis*. *Anal. Chem.*, 76, 6973-6978.
- Kappes T. & Hauser P.C. (1999). *Electrochemical detection methods in capillary electrophoresis and applications to inorganic species*. *Journal of Chromatography A*, 834, 89-101.
- Kartsova L.A. & Bessonova E. A. (2009). *Preconcentration techniques in capillary electrophoresis*, *Journal of Analytical Chemistry*, 64(4), 326-337.
- Lauer H.H. & Rozing G.P. (2010). *Second completely revised edition. A primer. Agilent technologies. High performance capillary electrophoresis*. Retrieved July 26, 2014, from http://www.chem.agilent.com/Library/primers/Public/5990_3777EN.pdf

- Liu M.Y., McNeal C.J. & Macfarlane R.D. (2004). *Charge density profiling of circulating human low-density lipoprotein particles by capillary zone electrophoresis*. *Electrophoresis*, 25, 2985-2995.
- Luraschi P., Pagani A., Infusino I., Moraschinelli I. & Franzini C. (2004). *High-density lipoproteins contribute to the α -1-globulin zone in capillary electrophoresis of human serum proteins*. *Electrophoresis*, 25, 1551-1554.
- Oguri S., Nomura M. & Fujita Y. (2006). *Site-specific sampling of taurine from rat brain followed by on-line sample pre-concentration, throughout in-capillary derivatization and capillary electrophoresis*. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 843, 194-201.
- Osborn D.M., Weiss D.J. & Lunte C.E. (2000). *On-line preconcentration methods for capillary electrophoresis*. *Electrophoresis*, 21, 2768-2779.
- Servais A-C., Crommen J. & Fillet M. (2006). *Capillary electrophoresis-mass spectrometry, an attractive tool for drug bioanalysis and biomarker discovery*. ***Electrophoresis***, 27, 2616-2629.
- Sheely S.A., Miao H., Ewing M.A., Rubakhin S.S. & Sweedler J.V. (2005). *Measuring D-amino acid-containing neuropeptides with capillary electrophoresis*. *Analyst*, 130, 1198-1203.
- Shou M., Smith A.D., Shakman J.G., Peris J. & Kennedy R.T. (2004). *In vivo monitoring of amino acids by microdialysis sampling with on-line derivatization by naphthalene-2,3-dicarboxyaldehyde and rapid micellar electrokinetic capillary chromatography*. *J. Neurosci. Methods*, 138, 189-197.
- Terabe S., Monton M.R.N., Le Saux T. & Imami K. (2006). *Applications of capillary electrophoresis to high-sensitivity analyses of biomolecules*. *Pure and Applied Chemistry*, 78, 1057-1067.
- Veraart J.R., Lingeman H. & Brinkman U.A.Th. (1999). *Coupling of biological sample handling and capillary electrophoresis*. *Journal of Chromatography A*, 856, 483-514.
- Wen Y., Li J., Ma J. & Chen L. (2012). *Recent advances in enrichment techniques for trace analysis in capillary electrophoresis*. *Electrophoresis*, 33, 2933-2952.

Κεφάλαιο 11: Χρωματογραφικές Τεχνικές στη Βιοανάλυση

Βικτωρία Σαμανίδου

Σύνοψη

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφονται οι κυριότερες χρωματογραφικές τεχνικές που εφαρμόζονται στην ανάλυση ή/και στον καθαρισμό βιομορίων. Δίνονται στοιχεία για την Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης και πιο συγκεκριμένα για τη Χρωματογραφία Διαχωρισμού εναντιομερών, την Ιοντική Χρωματογραφία, τη Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους, τη Χρωματογραφία Εκλεκτικής Συγγένειας, την Παρασκευαστική Χρωματογραφία καθώς, επίσης, και για την Αέρια Χρωματογραφία και αναφέρονται παραδείγματα εφαρμογών τους.

Προαπαιτούμενη Γνώση

Πριν την ανάγνωση του κεφαλαίου, χρήσιμη γνώση για τον αναγνώστη μπορεί να βρεθεί σε συγγράμματα Ενόργανης Χημικής Ανάλυσης, Σύγχρονων Διαχωριστικών Τεχνικών στην Ενόργανη Χημική ανάλυση και Ειδικών Μεθόδων Διαχωρισμού και Χημικής Ανάλυσης.

11.1. Εισαγωγή

Η βιοανάλυση είναι ένας τομέας της Αναλυτικής Χημείας, με ραγδαία εξέλιξη τα τελευταία χρόνια. Οι βιοαναλυτικές τεχνικές αφορούν όλα τα αναλυτικά προβλήματα, τα οποία σχετίζονται με ποιοτική και ποσοτική ανάλυση συστατικών βιολογικών υγρών και δειγμάτων και στον προσδιορισμό τόσο μικρών μορίων π.χ. φαρμάκων και των μεταβολιτών τους, όσο και μακρομορίων π.χ. πρωτεΐνες και πεπτιδία.

Στον τομέα αυτό οι χρωματογραφικές τεχνικές είναι το κύριο αναλυτικό, αλλά και παρασκευαστικό εργαλείο στα χέρια του αναλυτικού χημικού. Έτσι χρησιμοποιούνται ευρέως στην παρακολούθηση της θεραπευτικής δράσης των φαρμάκων (π.χ. αντιβιοτικών, αντικαταθλιπτικών, αντιψυχωσικών κ.ά.) (Therapeutic drug monitoring), στη φαρμακοκινητική, στις μελέτες βιοϊσοδυναμίας, σε μελέτες τοξικότητας, στην τοξικολογία, στην εγκληματολογία (forensic medicine/toxicology), στον έλεγχο ανίχνευσης απαγορευμένων ουσιών στον αθλητισμό (anti-doping control) αλλά και σε επιδημιολογικές και περιβαλλοντικές μελέτες.

Οι συνήθεις αναλυτικές τεχνικές, οι οποίες χρησιμοποιούνται στις αναλύσεις βιολογικών δειγμάτων, είναι η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (ή Απόδοσης) HPLC, η UPLC (Ultra-performance Liquid Chromatography), η Αέρια Χρωματογραφία (GC), η Χρωματογραφία υπερκρίσιμου ρευστού (SFC), αλλά και οι συζευγμένες (ή συνδυασμένες) τεχνικές, όπως: LC-MS, GC-MS.

Τα δείγματα που ενδιαφέρουν στη Βιοανάλυση περιλαμβάνουν, όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 4, αίμα, πλάσμα-ορό αίματος, ούρα, εγκεφαλονωτιαίο υγρό, σίελο, τρίχες, όνυχες, εγκεφαλικό ιστό κ.ά. Είναι ευνόητο ότι, καθώς η φύση του υποστρώματος των βιολογικών δειγμάτων είναι πολύπλοκη, πολύ σημαντικό ρόλο παίζει η προκατεργασία δείγματος, όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 6, για την εκλεκτική παραλαβή των ενώσεων από το υπόστρωμα και το μετέπειτα ποσοτικό προσδιορισμό, τόσο των αρχικών ενώσεων, όσο και των προϊόντων μεταβολισμού τους. Μετά την προκατεργασία του δείγματος ή σε ορισμένες περιπτώσεις απευθείας μετά τη δειγματοληψία ακολουθεί αυτό που ονομάζεται «ανάλυση», δηλαδή η μέτρηση μιας φυσικοχημικής παραμέτρου και η μετατροπή της σε χημική πληροφορία. Στο κεφάλαιο γίνεται μία σύντομη περιγραφή των κυριότερων χρωματογραφικών τεχνικών, οι οποίες χρησιμοποιούνται στη βιοαναλυτική χημεία.

11.2. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης

Οι χρωματογραφικές τεχνικές χρησιμοποιούνται στη χημική ανάλυση πάνω από έναν αιώνα. Η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης/Απόδοσης (High Pressure/Performance Liquid Chromatography, HPLC) είναι μια διαχωριστική τεχνική με πολλές εφαρμογές τα τελευταία χρόνια, καθώς θεωρείται η πλέον κατάλληλη για τον ακριβή και επαναλήψιμο προσδιορισμό ενός μεγάλου φάσματος χημικών ενώσεων, τόσο οργανικών, όσο και ανόργανων.

Ο μηχανισμός, ο οποίος βρίσκει τις περισσότερες εφαρμογές είναι η **Προσρόφηση**, όπου ο διαχωρισμός των διάφορων ουσιών βασίζεται στο διαφορετικό βαθμό προσρόφησης των συστατικών στη στατική φάση.

Ανάλογα με τη σχέση πολικότητας μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης διακρίνονται δύο είδη χρωματογραφίας προσρόφησης: Η **Χρωματογραφία Κανονικής Φάσης (Normal Phase NP-HPLC)**, όπου η στατική φάση (συνήθως, SiO₂ ή Al₂O₃) είναι πολικότερη από την κινητή, η οποία αποτελείται από μη πολικούς διαλύτες, όπως εξάνιο, χλωροφόρμιο κ.ά. και η **Χρωματογραφία Αντίστροφης Φάσης (Reversed Phase (RP-HPLC))**, όπου η στατική φάση, η οποία αποτελείται από SiO₂ συζευγμένο με διάφορες ομάδες, είναι λιγότερο πολική της κινητής που αποτελείται από μίγματα οργανικών διαλυτών με υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα ή νερό.

Άλλα είδη μηχανισμών περιλαμβάνουν την **κατανομή**, όπου ο διαχωρισμός στηρίζεται στη διαφορετική κατανομή των συστατικών ενός μίγματος μεταξύ της κινητής και της υγρής στατικής φάσης η οποία εφαρμόζεται στην ανάλυση ομόλογων, μη ιονικών ενώσεων· πρόκειται για την ονομαζόμενη **Ιοντοανταλλαγή**, όπου ο διαχωρισμός οφείλεται στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των προσδιοριζόμενων ιόντων και των φορτισμένων ομάδων της στατικής φάσης. Στην κατηγορία αυτή ανήκει η Ιοντική Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης.

Η **Χρωματογραφία Συγγένειας (Affinity Chromatography)**, όπου οι προσδιοριζόμενες ενώσεις δεσμεύονται εκλεκτικά σε υποκαταστάτες (ligand), οι οποίοι είναι συνδεδεμένοι στην επιφάνεια του SiO₂. Στην κατηγορία αυτή ανήκει η Χρωματογραφία Εναντιομερών.

Η **Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους ή Διάχυσης Πηκτής (Size Exclusion SEC ή Gel Permeation Chromatography GPC)**, όπου ο διαχωρισμός γίνεται με βάση το σχήμα και το μέγεθος των μορίων των προσδιοριζόμενων ενώσεων και βρίσκει εφαρμογές στην ανάλυση και το χαρακτηρισμό των ενώσεων μεγάλου μοριακού βάρους, όπως οι πρωτεΐνες.

Η οργανολογία της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης περιλαμβάνει:

- α) φιάλη(ες) αποθήκευσης διαλυτών,
- β) μονάδα εισαγωγής δείγματος,
- γ) αντλία υψηλής πίεσης,
- δ) χρωματογραφική στήλη,
- ε) ανιχνευτή,
- στ) σύστημα συλλογής, καταγραφής και επεξεργασίας των δεδομένων.

Ως ανιχνευτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι: Ανιχνευτές ορατού-υπεριώδους, παράταξης φωτοδιόδων, αγωγιμομετρικοί, φθορισμομετρικοί, ηλεκτροχημικοί, φασματόμετρα μαζών, ανιχνευτές σκεδασμού του φωτός, μετά από εξάτμιση κ.ά.

Στο **Σχήμα 11.1** δίνεται μια τυπική διάταξη ενός συστήματος Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης.

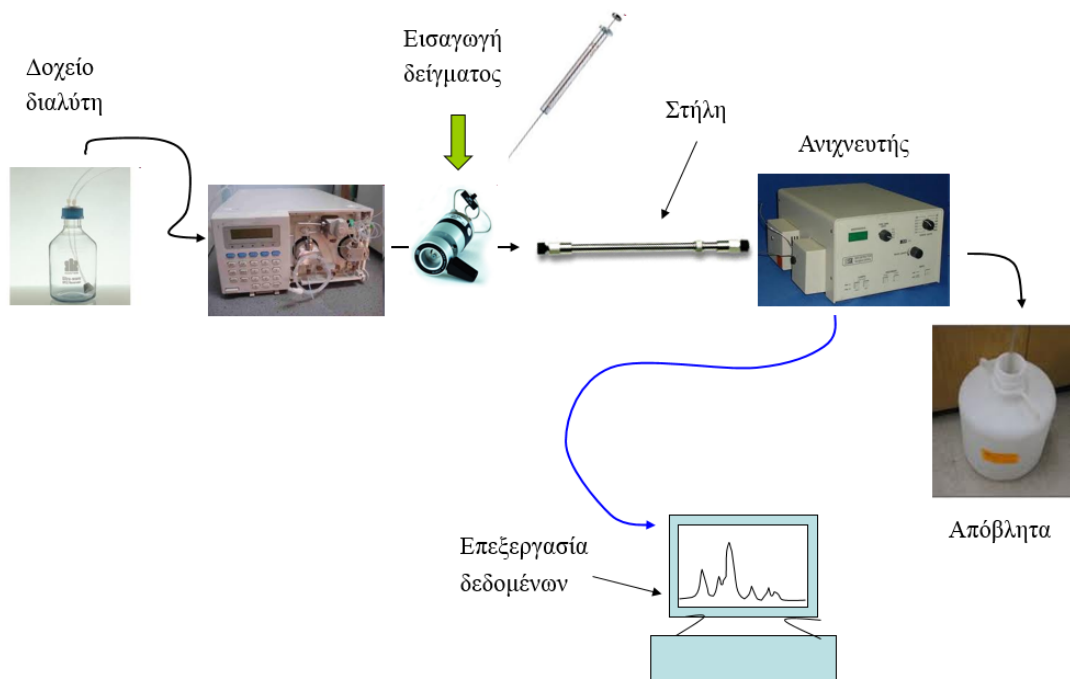
Η τεχνική αυτή αποτελεί το κυριότερο αναλυτικό εργαλείο στα χέρια του βιοαναλυτικού χημικού και βρίσκει πολυάριθμες εφαρμογές, όπως στον προσδιορισμό ορμονών, αντιβιοτικών, βιταμινών, αντιψυχωσικών, αντικαταθλιπτικών, αντικαρκινικών, τοξινών, κατεχολαμίνων, ναρκωτικών ουσιών, φαρμάκων, βιοφαρμάκων κλπ.

Στο παρόν σύγγραμμα θα αναφερθούν μόνο οι σύγχρονες τάσεις ή οι υποκατηγορίες, οι οποίες βρίσκουν τις περισσότερες εφαρμογές στη βιοανάλυση.

Η αύξηση των εφαρμογών της χρωματογραφικής ανάλυσης είχε ως αποτέλεσμα τις αυξημένες απαιτήσεις για βελτιώσεις στην οργανολογία. Οι ανάγκες σε ένα σύγχρονο αναλυτικό εργαστήριο για ταχείες αναλύσεις μεγάλου αριθμού δειγμάτων, σε συνδυασμό με την εξέλιξη στην τεχνολογία των υλικών πλήρωσης των χρωματογραφικών στηλών έδωσαν ώθηση στη νέα μορφή της HPLC, την UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography) ή UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography), ταχεία (Fast) HPLC, κλπ. Οι αντλίες υψηλής πίεσης έγιναν περισσότερο ακριβείς και τα υλικά πλήρωσης περισσότερο αποτελεσματικά για τους διάφορους διαχωρισμούς.

Τα συστήματα της UHPLC αποτελούν τα τελευταία χρόνια ένα τεχνολογικό άλμα που επιτεύχθηκε χάρη στη χημεία των σωματιδίων, στη βελτιστοποίηση του συστήματος HPLC, σε ό,τι αφορά το σχεδιασμό του ανιχνευτή, αλλά και τον έλεγχο και την επεξεργασία των δεδομένων. Όλα αυτά μαζί συνθέτουν την Υγρή Χρωματογραφία Υπερυψηλής Απόδοσης (UHPLC). Ο πρώτος όρος που χρησιμοποιήθηκε ήταν UPLC από την εταιρεία Waters, η οποία πρώτη εισήγαγε στην αγορά το σύστημα αυτό. Στη συνέχεια και άλλες εταιρείες

ακολούθησαν με παραλλαγή της ονομασίας, όπως ταχεία HPLC κλπ. Στο κεφάλαιο αυτό όπου χρησιμοποιείται ο όρος UPLC, αναφέρεται στη γενική τεχνική και όχι στη συγκεκριμένη εταιρεία, αλλιώς αναφέρεται και ως UHPLC. Η UHPLC, ως μία νέα κατηγορία στην επιστήμη του διαχωρισμού της Αναλυτικής Χημείας, διατηρεί την πρακτικότητα και τις αρχές της HPLC, ενώ βελτιώνει τα χαρακτηριστικά της ταχύτητας, ευαισθησίας και διακριτικής ικανότητας. Το πρώτο σύστημα UHPLC κυκλοφόρησε το έτος 2004, και από τότε διάφορα συστήματα UHPLC διατίθενται στο εμπόριο και μπορούν να λειτουργήσουν σε πιέσεις μέχρι και 1200-1300 bar (18000-19500 psi).



Σχήμα 11.1 . Τοπική διάταξη υγρού χρωματογράφου υψηλής πίεσης

Η βασική αρχή της UHPLC αναφέρει ότι με τη χρήση μικρότερων σωματιδίων αδρανούς υλικού ως στατική φάση (stationary phase) μπορούν να βελτιωθούν τα όρια της ανάλυσης. Τα μη πορώδη σωματίδια με μέγεθος κάτω από 2 μm και μέχρι 1,5 μm διατίθενται εμπορικά και χαρακτηρίζονται από μικρή επιφάνεια. Αυτό έχει ως συνέπεια μικρή ικανότητα συγκράτησης. Για το λόγο αυτό προτιμάται η χρήση πορώδων σωματιδίων πυριτίου με μέγεθος μικρότερο από 2 μm , με καλή ομοιομορφία στην κατανομή τους εντός της στήλης, τα οποία αντέχουν σε υψηλές πιέσεις (sub-2 μm porous silica particles).








Το 2009 αναπτύχθηκε από την εταιρεία Phenomenex μια καινούργια μέθοδος για την επίτευξη αποτελεσμάτων εξαιρετικά υψηλής πίεσης (UHPLC) σε κάθε όργανο υγρής χρωματογραφίας, επιτρέποντας στους ερευνητές να πετύχουν αποδόσεις συγκρίσιμες με αυτές των στηλών με υλικό πλήρωσης sub-2 μm , χωρίς να επενδύσουν σε συστήματα UHPLC. Οι στήλες Kinetex, βασισμένες στην καινούργια τεχνολογία των πυριτικών core-shell σωματιδίων (επιφανειακά πορώδη σωματίδια- superficially porous ή fused-core ή core-shell particles), βελτίωσαν σημαντικά την ταχύτητα και την ικανότητα διαχωρισμού σε σχέση με τις παραδοσιακές στήλες των 3- ή 5- μm .

Στον Πίνακα 11.1 δίνεται η εξέλιξη των σωματιδίων, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως στατική φάση στην HPLC.

Άλλες στήλες που θεωρούνται σταθμοί στην εξέλιξη των υλικών πλήρωσης είναι οι μονολιθικές και οι στήλες χρωματογραφίας υδρόφιλης αλληλεπίδρασης (HILIC).

Το 2000, η Merck KGaA παρουσίασε δύο μονολιθικές στήλες: τις Chromolith Performance και Chromolith SpeedROD, οι οποίες αναπτύχθηκαν για την HPLC. Οι στήλες Chromolith είναι ελαφριές, λεπτές και έχουν μήκος μέχρι 10 cm. Σε αντίθεση με τις στήλες με πορώδη (ή μη πορώδη) σωματιδιακά υλικά πλήρωσης, οι μονολιθικές στατικές φάσεις παρασκευάζονται ως μία μονοκόμμη ράβδος σε ένα σωλήνα, παρέχοντας μεγαλύτερη διαπερατότητα και επιτρέποντας έτσι ταχύτερους διαχωρισμούς, με μέτρια πίεση

λειτουργίας. Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι μονολιθικών στατικών φάσεων: μακροπορώδη / μεσοπορώδη υλικά με βάση το πυρίτιο και πορώδη μονολιθικά οργανικά πολυμερή.

Year	Particle shape	Particle size (μm)	Approximate Theoretical Plates/15cm
1950		100	200
1967		50	1000
1972		10	6000
1985		5	10.000
1992		3	20.000
2003		<2	30.000
2007		2.6	40.000

Πίνακας 11.1. Ιστορική εξέλιξη των σωματιδίων που χρησιμοποιήθηκαν ως στατική φάση στην HPLC

11.3. Υγρή χρωματογραφία Υδρόφιλων Αλληλεπιδράσεων

Η χρωματογραφία υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων (Hydrophilic Interaction Chromatography- HILIC) είναι μια τεχνική χρωματογραφίας η οποία χρησιμοποιεί μια υδρόφιλη (πολική ή μικτής λειτουργίας ή διπολικού ιόντος) στατική φάση, όπως στην υγρή χρωματογραφία κανονικής φάσης (NP-HPLC), με μια μη πολική κινητή φάση, όπως στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (RP-HPLC), η οποία, όμως, περιέχει σημαντική ποσότητα νερού. Έτσι η HILIC θεωρείται ένα υβρίδιο των δύο μηχανισμών: διαχωρισμός κατανομής κανονικής φάσης υπό συνθήκες αντίστροφης φάσης ή υδατικής κανονικής φάσης.

Στον **Πίνακα 11.2** δίνονται συγκριτικά τα χαρακτηριστικά της αντίστροφης φάσης HPLC και της HILIC.

Συνθήκες	RP-HPLC	HILIC
Στατική φάση	Μη πολική π.χ. C ₁₈	Πολική (silica)
Κινητή φάση	Πολική (π.χ. νερό-ACN, μεθανόλη)	Πολική (π.χ. νερό-ACN)
Συγκράτηση	Μείωση με αύξηση του ποσοστού του οργανικού διαλύτη της κινητής φάσης	Μείωση με αύξηση του ποσοστού του νερού στην κινητή φάση

Πίνακας 11.2. Σύγκριση RP-HPLC και HILIC

Παρά το γεγονός ότι η HILIC εμφανίστηκε για πρώτη φορά το 1990, έχει αποκτήσει πρόσφατα αυξημένο ενδιαφέρον, επειδή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό πολικών φαρμάκων και των μεταβολιτών τους, καθώς, επίσης, και βιολογικά σημαντικών ενώσεων. Ένα άλλο πλεονέκτημα της HILIC είναι ότι μπορεί να συνδυαστεί με συστήματα αντίστροφης φάσης και να χρησιμοποιηθεί σε HPLC δύο διαστάσεων (2D) με καλύτερα αποτελέσματα. Επίσης, στα πλεονεκτήματα της τεχνικής συμπεριλαμβάνεται και η αύξηση της ευαισθησίας, όταν συνδυάζεται με ταυτοποίηση με φασματοσκοπία μαζών, λόγω του υψηλού ποσοστού οργανικού διαλύτη στην κινητή φάση.

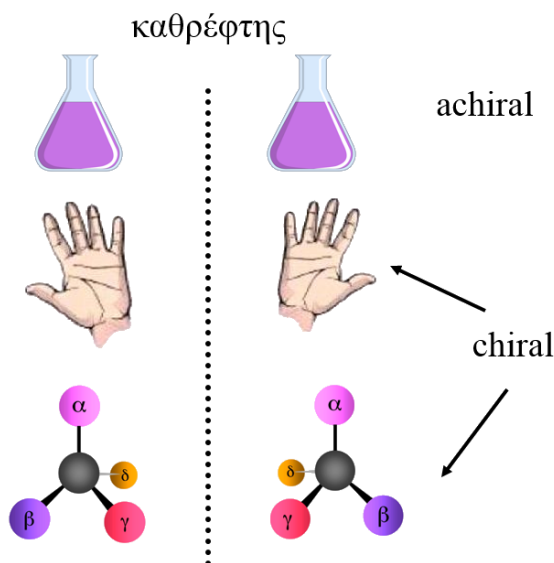
Στις στήλες **υδρόφιλης αλληλεπίδρασης (HILIC)**, η σειρά έκλουσης είναι η αντίστροφη με εκείνη στην HPLC αντίστροφης φάσης. Ακόμη μια ένωση που εκλύεται σε κενό όγκο σε κοινή στήλη, παρουσιάζει, συνήθως, υψηλή συγκράτηση σε στήλη HILIC. Το νερό θεωρείται ως ο πιο ισχυρός διαλύτης στη χρωματογραφία HILIC.

Ενώσεις όπως αμινοξέα, βάσεις νουκλεοτιδίων (πουρίνες, πυριμιδίνες), φαινόλες, αλκαλοειδή, αλλά και σάκχαρα, πεπτιδία, πρωτεΐνες, φωσφολιπίδια και άλλες φορτισμένες και ουδέτερες υδρόφιλες ενώσεις οι οποίες είναι δύσκολο να διαχωριστούν με αντίστροφης φάσης HPLC, είναι πολύ πιο εύκολο να διαχωριστούν στην HILIC, λόγω της διαφορετικής εκλεκτικότητας διαχωρισμού.

11.4. Χρωματογραφικός Διαχωρισμός Εναντιομερών με HPLC

Το φαινόμενο της χειρομορφίας (chirality) ή εναντιομέρειας προέρχεται από τη διευθέτηση των μορίων στο χώρο και έχει επιπτώσεις στη βιολογική τους ενεργότητα. Τα εναντιομερή (χειρόμορφα μόρια) είναι στερεοισομερή, με ένα χειρόμορφο κέντρο, συνήθως, **ασύμμετρο άτομο C**, και μπορούν να υπάρχουν σε δύο εναντιομερείς μορφές (**R και S ισομερή**), τα οποία δεν ταυτίζονται με τα είδωλά τους στον καθρέφτη, έχουν δηλαδή σχέση ειδώλου-αντικειμένου, όπως ακριβώς συμβαίνει με το αριστερό με το δεξί χέρι, τα κλειδιά, τις βίδες, τις έλικες κλπ. Αναφορικά με τις μη χειρόμορφες ενώσεις, καθώς περιέχουν επίπεδο, άξονα ή κέντρο συμμετρίας, ταυτίζονται με τα είδωλά τους, όπως π.χ. συμβαίνει με ένα καρφί. (Σχήμα 11.2).

Το μίγμα που περιέχει ίσες ποσότητες εναντιομερών μορφών μιας χειρόμορφης ένωσης καλείται **ρακεμικό**. Όταν ένα διάλυμα περιέχει μόνον τη μία εναντιομερή μορφή καλείται **οπτικά καθαρό**, ή **εναντιομερικά καθαρό**. Εάν υπερτερεί η μια μορφή σε ένα μίγμα, αυτό καλείται **εναντιομερικά εμπλουτισμένο**. Μόρια με δύο ή περισσότερα κέντρα ασυμμετρίας εμφανίζουν το φαινόμενο της διαστερομερείας και δεν είναι εναντιομερή, αλλά **διαστερομερή**.



Σχήμα 11.2. Διαφορά εναντιομερών και μη εναντιομερών ενώσεων. Οι πρώτες εμφανίζουν το φαινόμενο της χειρομορφίας και έχουν σχέση ειδώλου-αντικειμένου.

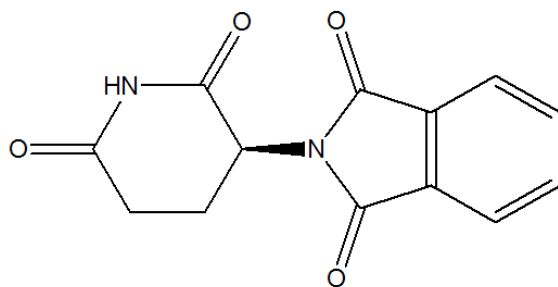
Στη φύση υπάρχουν πολλά μόρια, όπως τα σάκχαρα, οι πρωτεΐνες, τα αμινοξέα, τα ένζυμα, τα οποία είναι χειρόμορφα, με διαφορετικές ιδιότητες και συνεπώς με διαφορετική συμπεριφορά και δράση.

Στη βιοαναλυτική χημεία είναι πολλές οι περιπτώσεις, στις οποίες είναι απαραίτητη η διάκριση και ο διαχωρισμός των εναντιομερών μορφών. Για παράδειγμα, τα ένζυμα που είναι χειρόμορφα, αλληλεπιδρούν διαφορετικά με τα στερεοϊσομερή και είναι στερεοεκλεκτικά, με αποτέλεσμα να δρουν ως καταλύτες στο σχηματισμό χειρόμορφων προϊόντων από προ-χειρόμορφα υποστρώματα.

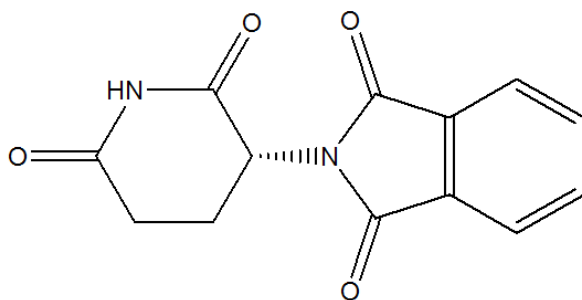
Πολλές ενώσεις με φαρμακευτική δράση είναι χειρόμορφες, αλλά οι συνήθεις συνθετικές μέθοδοι παράγουν ρακεμικά μίγματα (ίσες ποσότητες R και S ισομερών). Συνήθως, όμως, μόνο η μία εναντιομερής μορφή έχει την επιθυμητή φυσιολογική δράση. Στην περίπτωση αυτή πρέπει να ρυθμιστεί κατάλληλα η δόση, γιατί μόνο η μισή ποσότητα της δόσης είναι αποτελεσματική.

Η *ιβουπροφαίνη* (ibuprofen), για παράδειγμα, είναι μη στεροειδές φάρμακο (NSAID) με αντιφλεγμονώδη, αναλγητική και αντιπυρετική δράση και είναι ρακεμικό μίγμα των εναντιομερών S(+) και R(-). Μελέτες *in vivo* και *in vitro* δείχνουν ότι το ισομερές S(+) ευθύνεται για την κλινική δράση, R μορφή δεν είναι ενεργή αλλά ούτε και τοξική.

Υπάρχουν, βέβαια, και περιπτώσεις, στις οποίες το άλλο εναντιομερές έχει τοξική δράση. Μια τέτοια ένωση είναι η *θαλιδομίδη* (Σχήμα 11.3), της οποίας, ενώ το R είναι μη τοξικό και έχει ηρεμιστική/κατευναστική δράση, το S εναντιομερές έχει τερατογενή δράση. Η θαλιδομίδη παρασκευάστηκε το 1953, σε μια ερευνητική προσπάθεια παρασκευής ασφαλέστερων υποκατάστατων των βαρβιτουρικών και θεωρήθηκε αρχικά ότι μπορούσε να δράσει ως ήπιο υπνωτικό κατά της αϋπνίας για εγκύους. Αρχισε να διατίθεται στο εμπόριο από το 1957, αλλά παρατηρήθηκε αύξηση του αριθμού γεννήσεων νεογνών με μικρά και μη ανεπτυγμένα άκρα, μια κατάσταση γνωστή ως **φωκομέλεια**, ένα είδος τερατογένεσης.



S 2-(2,6-dioxopiperidin-3-yl) isoindoline-1,3-dione



R 2-(2,6-dioxopiperidin-3-yl) isoindoline-1,3-dione

Σχήμα 11.3. Εναντιομερείς μορφές της θαλιδομίδης R με ηρεμιστική δράση, S, με τερατογόνο δράση

Άλλες περιπτώσεις στις οποίες ενδιαφέρει η διάκριση εναντιομερών, είναι όταν ο βαθμός ενεργότητας των δύο εναντιομερών είναι διαφορετικός. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η επινεφρίνη, της οποίας το - ισομερές είναι 10 φορές πιο αποτελεσματικό από το + ισομερές. Ένα ακόμη παράδειγμα είναι κλενβουτερόλη (Clenbuterol), της οποίας τα εναντιομερή έχουν, ακριβώς, τα αντίθετα αποτελέσματα, η + είναι β2 εκλεκτικός ανταγωνιστής, ενώ το - ισομερές έχει μη ανταγωνιστική δράση.

Στη φαρμακοβιομηχανία και γενικά στον έλεγχο των φαρμάκων, είναι πολύ σημαντικός ο διαχωρισμός των εναντιομερών μορφών και στην ανάλυση αλλά και στη σύνθεση, με στερεοεκλεκτικότητα που οδηγεί στην παραγωγή καθαρών στερεοϊσομερών. Οργανισμοί, όπως η FDA απαιτούν πληροφορίες σχετικά με τη στερεοχημική σύσταση των οπτικά ενεργών φαρμάκων και σχετικά με το φαρμακολογικό και τοξικολογικό προφίλ των επιμέρους ισομερών.

11.4.1. Διαχωρισμός Εναντιομερών Μορφών

Τα εναντιομερή είναι οπτικά ενεργές ενώσεις και χαρακτηρίζονται ως οπτικά ισομερή, λόγω του ότι στρέφουν το επίπεδο του πολωμένου φωτός, στον ίδιο βαθμό, αλλά σε αντίθετη κατεύθυνση. Οι μη εναντιομερείς ενώσεις είναι οπτικά ανενεργές και δε στρέφουν το επίπεδο του πολωμένου φωτός. Επειδή οι υπόλοιπες ιδιότητες είναι ίδιες, οι εναντιομερείς μορφές δεν μπορούν να διαχωριστούν με συμβατικές τεχνικές π.χ. απόσταξη ή απλές χρωματογραφικές τεχνικές. Έτσι στη συμβατική χρωματογραφία HPLC, ένα ζεύγος εναντιομερών θα εκλουσθεί ως ένα μόνο συστατικό με μη χειρόμορφη στήλη (achiral) π.χ. Si ή C₁₈. Ενώ παρουσία χειρόμορφου περιβάλλοντος, όπως αντιδραστήριο ή στατική φάση, τα εναντιομερή εμφανίζουν διαφορετικές φυσικές και χημικές ιδιότητες, άρα είναι εφικτός ο διαχωρισμός τους.

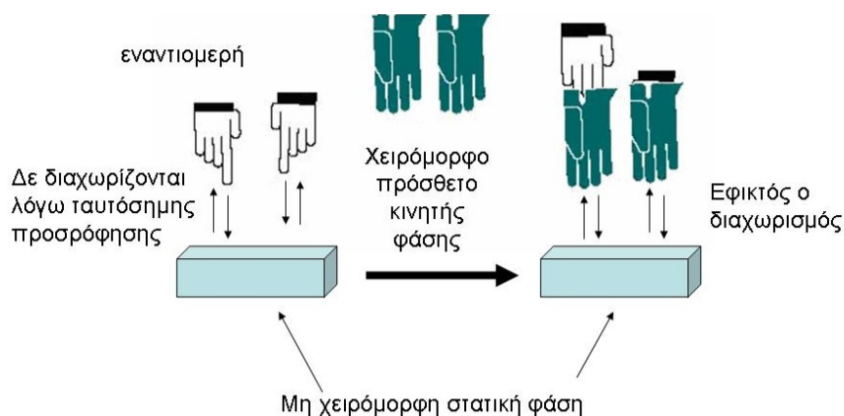
Επίσης, καθώς οι διαστερομερείς ενώσεις διαφέρουν στις φυσικές ιδιότητες, π.χ. σημείο τήξης και διαλυτότητα, και επομένως μπορούν να διαχωριστούν με μη χειρόμορφες χρωματογραφικές τεχνικές, ο διαχωρισμός εναντιομερών με HPLC μπορεί να είναι έμμεσος και να βασιστεί στο σχηματισμό σταθερών ή μεταβατικών διαστερομερών μορφών με το σχηματισμό σταθερών διαστερομερών με παραγωγοποίηση ή να είναι άμεσος και να βασιστεί στο σχηματισμό ενδιάμεσων/μεταβατικών διαστερομερών με δύο τρόπους: 1. Με προσθήκη χειρόμορφων αντιδραστηρίων στην κινητή φάση και 2. Με χρήση χειρόμορφων στατικών φάσεων (CSP).

Στην πρώτη περίπτωση η παραγωγοποίηση του συστατικού με εναντιομερές αντιδραστήριο έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή διαστερομερούς μίγματος το οποίο διαχωρίζεται με συμβατικές μη εναντιομερείς χρωματογραφικές τεχνικές, αφού όπως αναφέρθηκε τα διαστερομερή έχουν διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες. Η διαδικασία αυτή μειονεκτεί στο ότι έχει διαφορετικές ταχύτητες αντίδρασης και απαιτείται η χρήση εναντιομερικά καθαρών αντιδραστηρίων, ώστε να αποφεύγονται παράπλευρες αντιδράσεις, ενώ δεν αποκλείεται και η πιθανότητα ρακεμοποίησης κατά τη διαδικασία της παραγωγοποίησης.

Στη δεύτερη περίπτωση, δηλαδή στον άμεσο διαχωρισμό εναντιομερών με έκθεση του συστατικού σε χειρόμορφο περιβάλλον, μπορεί να ακολουθηθούν δύο διαφορετικές προσεγγίσεις.

11.4.1.1. Διαχωρισμός εναντιομερών με χρήση χειρόμορφων αντιδραστηρίων στην κινητή φάση

Στην περίπτωση αυτή ο διαχωρισμός είναι άμεσος (**Σχήμα 11.4**), με σχηματισμό σταθερών διαστερομερών συμπλόκων με τα εναντιομερή συστατικά σε συμβατικές στήλες, π.χ. C₁₈, NH₂ χαμηλότερου κόστους. Έχει, όμως, και το μειονέκτημα ότι τα πρόσθετα πολλές φορές παρεμποδίζουν στην ανίχνευση και είναι ακριβά.



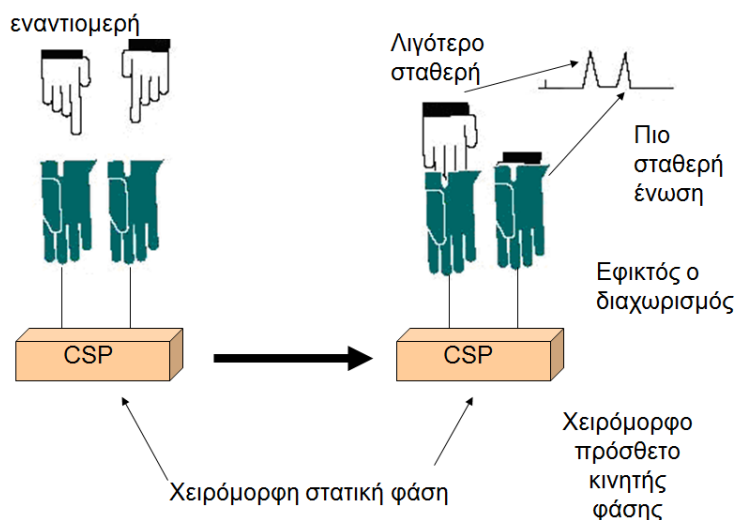
Σχήμα 11.4. Σχηματικός διαχωρισμός εναντιομερών μορφών με χρήση χειρόμορφου πρόσθετου κινητής φάσης

Πολλά ρακεμικά μίγματα μπορούν να διαχωριστούν σε συμβατικά μη χειρόμορφα χρωματογραφικά συστήματα (TLC, HPLC), με χρήση χειρόμορφων προσθέτων στην κινητή φάση. Τα πρόσθετα και η συγκέντρωσή τους μπορούν να μεταβάλλονται και στο εμπόριο υπάρχει μεγάλη ποικιλία προσθέτων. Τα πρόσθετα δεν είναι απαραίτητα να είναι οπτικά καθαρά, όπως απαιτείται π.χ. στην παραγωγοποίηση που μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένα αποτελέσματα. Η οπτική καθαρότητα των προσθέτων επηρεάζει μόνον την εκλεκτικότητα.

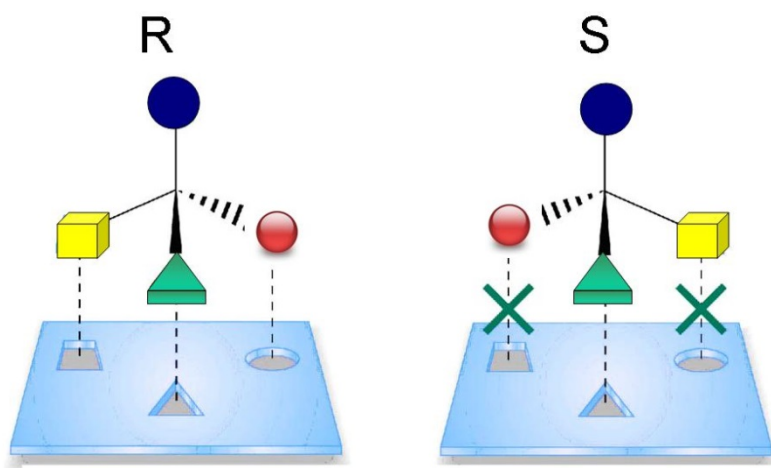
Ως πρόσθετα κινητής φάσης: μπορούν να χρησιμοποιηθούν: 1. Χειρόμορφα ιόντα αντίθετου φορτίου, 1S- (+) -10- καμφοροσουλφονικό οξύ, κινίνες, βενζοξυκαρβονυλογλυκίνη-L-προλίνη και 2. Πρόσθετα που σχηματίζουν σύμπλοκα εγκλεισμού, π.χ. κυκλοδεξτρίνες α , β , γ , και αιθέρες- στέμματα. Η συνδυασμένη χρήση των ανωτέρω οδηγεί σε βελτιωμένη εκλεκτικότητα και σε δυνατότητα ταυτόχρονης μελέτης ιονικών και μη ιονικών ειδών.

11.4.1.2. Διαχωρισμός εναντιομερών με χρήση χειρόμορφης στατικής φάσης

Η χρήση χειρόμορφης στατικής φάσης (CSP) (Σχήμα 11.5) περιλαμβάνει τη δέσμευση χειρόμορφων εκλεκτικών ενώσεων σε υπόστρωμα, συνήθως, πυριτικό. Με την τεχνική αυτή σχηματίζονται μεταβατικά διαστερομερή σύμπλοκα με διαφορετική σταθερότητα ανάμεσα στα εναντιομερή συστατικά και στο δεσμευμένο χειρόμορφο εκλεκτικό συστατικό. Ένα θεωρητικό μοντέλο που έχει προταθεί είναι αυτό της αλληλεπίδρασης τριών σημείων (three points interaction model), το οποίο εξηγεί τις εναντιοεκλεκτικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της χειρόμορφης στατικής φάσης και των εναντιομερών μορφών της ένωσης που πρόκειται να διαχωριστούν. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό πρέπει να υπάρχουν τουλάχιστον τρία σημεία χειρόμορφης αλληλεπίδρασης μεταξύ της στατικής φάσης και του συστατικού που συγκρατείται περισσότερο. Το σταθερό σύμπλοκο (Σχήμα 11.6, αριστερά) εκλύεται αργότερα. Το λιγότερο σταθερό σύμπλοκο (Σχήμα 11.6), δεξιά εκλύεται νωρίτερα.



Σχήμα 11.5. Διαχωρισμός εναντιομερών μορφών με χειρόμορφη στατική φάση



Σχήμα 11.6 . Μοντέλο αλληλεπίδρασης τριών σημείων

Οι αλληλεπιδράσεις στις οποίες στηρίζεται ο διαχωρισμός των εναντιομερών μπορούν να είναι είτε ελκτικές είτε απωστικές και περιλαμβάνουν: Σχηματισμό συμπλόκων μετάλλων (ανταλλαγή υποκαταστατών ligand exchange), Δεσμούς υδρογόνου, Εγκλεισμό, π-π αλληλεπιδράσεις, Ιοντικές αλληλεπιδράσεις, Αλληλεπιδράσεις διπόλων και, βέβαια, συνδυασμό των παραπάνω.

Οι χειρόμορφες στατικές φάσεις οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν, περιλαμβάνουν:

1. φάσεις με ιόντα μετάλλων, όπως Cu^{2+} , Ni^{2+} , που σχηματίζουν σύμπλοκα με διδραστικούς υποκαταστάτες,
2. αιθέρες- στέμματα,
3. μοντέλο πολλαπλών αλληλεπιδράσεων (Designed multiple interactions),
4. πρωτεΐνες,
5. κυκλοδεξτρίνες,
6. παράγωγα κυτταρίνης,
7. συνθετικά χειρόμορφα πολυμερή. Τα υλικά αυτά είναι απομιμήσεις των πολυμερών τύπου κυτταρίνης.

Από τα υλικά που αναφέρθηκαν, μεγάλο αριθμό εφαρμογών βρίσκουν οι Κυκλοδεξτρίνες (Cyclodextrins).

Η τεχνική αυτή περιλαμβάνει σχηματισμό συμπλόκων εγκλεισμού, όπου η κυκλοδεξτρίνη δρα ως ξενιστής “host” και το χειρόμορφο συστατικό ο οποίο διαχωρίζεται, ως ξενιζόμενος “guest”. Οι κυκλοδεξτρίνες είναι μακροκυκλικοί ολιγοσακχαρίτες, παράγονται δε με την ενζυμική αποικοδόμηση του αμύλου. Περιέχουν από 6 έως 12 D-(+)- γλυκοζιτικές μονάδες με α (1,4) δεσμούς. Μόνο οι μικρές κυκλοδεξτρίνες έχουν χειρόμορφη εκλεκτικότητα και ονομάζονται α,β,γ ανάλογα αν περιέχουν 6, 7 ή 8 μονάδες γλυκόζης.

Το φυσικό σχήμα της κυκλοδεξτρίνης μοιάζει με κοίλο κώλουρο κώνο, η εσωτερική διάμετρος της κοιλότητας είναι ανάλογη με τον αριθμό των μονάδων γλυκόζης και είναι σχετικά υδρόφοβο μόριο. Οπότε δρα ως ξενιστής προς τις αρωματικές και τις αλκυλοομάδες των εναντιομερών -ξενιζόμενων ενώσεων- που εισέρχονται και εξέρχονται με διάχυση. Όλες οι υδροξυλικές ομάδες της γλυκόζης βρίσκονται στην εξωτερική πλευρά του μορίου. Οι δευτεροταγείς 2 και 3-υδροξυομάδες είναι τοποθετημένες στο μεγάλο άνοιγμα του κώνου και, όπως όλες οι δευτεροταγείς, είναι προσανατολισμένες σε συγκεκριμένη κατεύθυνση. Οι 2- υδροξυομάδες είναι προσανατολισμένες με τη φορά του ρολογιού, ενώ οι 3- υδροξυομάδες είναι προσανατολισμένες με την αντίστροφη φορά. Οι πρωτοταγείς υδροξυομάδες οι οποίες περιστρέφονται ελεύθερα, είναι τοποθετημένες γύρω από το μικρό άνοιγμα. Μερικές από αυτές τις ομάδες χρησιμοποιούνται για να δεσμευτεί το μόριο στο πυριτικό υπόστρωμα.

Οι κυκλοδεξτρίνες χρησιμοποιούνται με υδατική κινητή φάση, οπότε σχηματίζονται σύμπλοκα εγκλεισμού με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Η προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος ή οργανικού τροποποιητή επηρεάζει τους χρόνους συγκράτησης και το διαχωρισμό των εναντιομερών.

Η επιλογή της α, β, ή γ κυκλοδεξτρίνης εξαρτάται από το μέγεθος του φιλοξενούμενου μορίου. Οι φαρμακευτικές ουσίες, όπως τα βαρβιτουρικά, τα αντιισταμινικά, τα αντιφλεγμονώδη, τα διουρητικά, οι ουσίες που ερεθίζουν το ΚΝΣ, και παράγωγα αμινοξέων, συνήθως, ταιριάζουν στις β κυκλοδεξτρίνες. Οι α και γ βρίσκουν λίγες μόνο εφαρμογές.

Για να επιτευχθεί διαχωρισμός εναντιομερών σε φάση κυκλοδεξτρίνης πρέπει:

1. Το υδρόφοβο ή αρωματικό τμήμα του ξενιζόμενου μορίου να έχει κατάλληλο μέγεθος, για να σχηματίζει σύμπλοκο εγκλεισμού.
2. Και το κέντρο ασυμμετρίας του ξενιζόμενου μορίου να προεξέχει αρκετά από την κοιλότητα, ώστε να επιτρέπει το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου με τις δευτεροταγείς υδροξυομάδες που βρίσκονται στην περιφέρεια.

Η εναντιοεκλεκτικότητα έγκειται στο σχηματισμό δεσμού υδρογόνου με το ένα εναντιομερές κατά προτίμηση. Εάν το ασύμμετρο κέντρο του ξενιζόμενου μορίου προεξέχει πολύ από την κοιλότητα, ώστε να αποτρέπει το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου, τότε δεν επιτυγχάνεται διαχωρισμός εναντιομερών. Το πρόβλημα αυτό μπορεί να λυθεί με παραγωγοποίηση των μορίων της κυκλοδεξτρίνης. Η παραγωγοποίηση

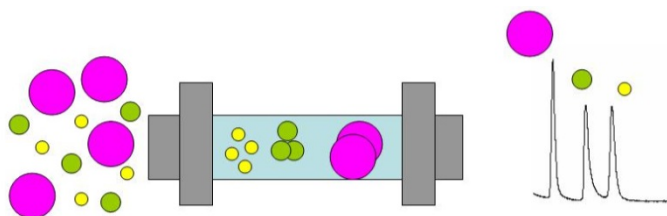
γίνεται στις δευτεροταγείς 3 υδροξυομάδες, με αποτέλεσμα να μεγαλώνει ή να μικραίνει η κοιλότητα, ώστε να επιτρέπει τον εναναντιομερή διαχωρισμό και μεγάλων ή μικρών μορίων.

Οι δραστικές ομάδες που υπεισέρχονται κατά την παραγωγή, οδηγούν σε διαχωρισμό με πρόσθετους μηχανισμούς π.χ. διπολικές ή π-π αλληλεπιδράσεις, έτσι ώστε να διαχωρίζεται ακόμη μεγαλύτερη ποικιλία ενώσεων.

Οι χειρόμορφες στατικές φάσεις CSP παρασκευάζονται με ομοιοπολική δέσμευση των κυκλοδεξτρινών στο πυριτικό υπόστρωμα και η επιλογή της κατάλληλης CSP εξαρτάται από τη διαλυτότητα του συστατικού σε πολικούς ή μη πολικούς διαλύτες. Το υψηλό κόστος είναι, επίσης, κριτήριο επιλογής.

11.5. Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους

Ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους, όπως οι πρωτεΐνες μπορούν να διαχωριστούν με χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους. Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται σε μια χρωματογραφική στήλη η οποία περιέχει πορώδη σωματίδια. Όταν ένα δείγμα πολυμερούς εισέλθει στη στήλη, τα μόρια διαχέονται στους πόρους της πηκτής ανάλογα με το μέγεθός τους και ανάλογα με την κατανομή της διαμέτρου των πόρων των σωματιδίων. Τα μεγαλύτερα μόρια μπορούν να εισέλθουν μόνο σε ένα μικρό μέρος της εσωτερικής δομής του υλικού πλήρωσης ή αποκλείονται εντελώς. Τα μικρότερα πολυμερή μόρια διεισδύουν σε ένα μεγαλύτερο μέρος του εσωτερικού των σωματιδίων και έτσι διανύουν μεγαλύτερες διαδρομές και παραμένουν μεγαλύτερο χρόνο στη στήλη απ' ό,τι τα μόρια μεγαλύτερου μεγέθους, τα οποία δεν μπορούν να διεισδύσουν στο εσωτερικό των σωματιδίων (Σχήμα 11.7).



Σχήμα 11.7. Διαχωρισμός ενώσεων διαφορετικού μεγέθους μοριακού βάρους με χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους

Τα διαφορετικά μοριακά είδη διαχωρίζονται με έκλυση από τη στήλη κατά σειρά μεγέθους. Επομένως, τα μεγαλύτερα μόρια εξέρχονται από τη στήλη πρώτα και τα μικρότερα μόρια, τελευταία.

Η Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους (Size Exclusion Chromatography-SEC), ονομάζεται επίσης και Χρωματογραφία Διήθησης ή Διάχυσης Πηκτής (Gel-Filtration ή Gel-Permeation Chromatography (GPC) και χρησιμοποιεί πορώδη υλικά για το διαχωρισμό μορίων διαφορετικού μεγέθους. Τα υλικά της στατικής φάσης είναι υδρόφοβες πηκτές, συνήθως, ρητίνες από συμπολυμερισμό πολυστυρενίου-διβινυλοβενζολίου, ενώ ως κινητή φάση χρησιμοποιούνται διάφοροι οργανικοί διαλύτες. Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους βρίσκει εφαρμογές, κυρίως, στο διαχωρισμό βιολογικών μορίων (π.χ. ανάλυση ενζύμων, πολυσακχαριτών, νουκλεϊκών οξέων, πρωτεϊνών και άλλων βιολογικών μακρομορίων), καθώς επίσης και στον προσδιορισμό του μοριακού βάρους και στο χαρακτηρισμό πολυμερών υλικών.

Ο όρος Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους έχει κυριαρχήσει και αντικατέστησε όλους τους προηγούμενους, καθώς περιγράφει και αποδίδει καλύτερα το μηχανισμό του διαχωρισμού. Τα μεγαλύτερα μόρια εκλύονται αρχικά στην πρώτη κορυφή του χρωματογραφήματος. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται *αποκλεισμός*. Ο διαχωρισμός των συστατικών στη Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους καθορίζεται από τους όγκους μέσα στη στήλη διαχωρισμού.

Μία στήλη SEC με πορώδες υλικό πλήρωσης χαρακτηρίζεται από 3 διαφορετικά είδη όγκων:

1. Τον όγκο Α, που αποτελεί τον κενό χώρο και καταλαμβάνεται από την υγρή κινητή φάση ανάμεσα στα σωματίδια της στατικής φάσης.
2. Τον όγκο Β, που αποτελεί την υγρή φάση μέσα στους πόρους της στατικής φάσης.
3. Τον όγκο Γ, που αποτελεί τον όγκο της στερεάς στατικής φάσης.

Όλα τα μόρια έχουν πρόσβαση στον όγκο Α, ενώ κανένα στον όγκο Γ. Η πρόσβαση στον όγκο Β εξαρτάται από το μέγεθος των μορίων και τις διαστάσεις των πόρων. Τα μόρια μεγάλου μεγέθους δε μπορούν

να διεισδύσουν στους πόρους του υλικού πλήρωσης και εξέρχονται με τον όγκο Α. Τα μεσαίου μεγέθους μόρια μπορούν να διεισδύσουν, μερικώς, στους πόρους, ενώ τα μικρού μεγέθους εισέρχονται πλήρως. Η στήλη επιλέγεται με βάση το μέγεθος των σωματιδίων και τις χημικές ιδιότητες των συστατικών που θα διαχωριστούν. Το υλικό πλήρωσης είναι, συνήθως, πηκτές οργανικής σύστασης με διαφορετική κατανομή μεγέθους πόρων. Όσο μικρότερο το εύρος κατανομής, τόσο μεγαλύτερη η εκλεκτικότητα της στατικής φάσης. Η εκλεκτικότητα της στατικής φάσης εξαρτάται και από τον ολικό όγκο των πόρων.

11.5.1. Παραδείγματα Εφαρμογών

Ένα παράδειγμα διαχωρισμού πρωτεϊνών είναι αυτό του μίγματος της γλουταμινικής αφυδρογονάσης, της γαλακτικής αφυδρογονάσης, αλβουμίνης ορού, οβαλβουμίνης και του κυτοχρώματος c. Με την εφαρμογή του μίγματος στη στήλη η γλουταμινική αφυδρογονάση εκλύεται πρώτη, ενώ το κυτόχρωμα τελευταίο. Οι υπόλοιπες πρωτεΐνες εκλύονται με σειρά ελάττωσης του μοριακού βάρους.

Βρίσκει, επίσης, εφαρμογή στον καθαρισμό δείγματος από λιπίδια, πολυμερή, συμπολυμερή, φυσικές ρητίνες, στεροειδή, διάφορες ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους. Μπορεί να εφαρμοστεί τόσο για πολικές, όσο και για μη πολικές ενώσεις.

11.6. Ιοντική Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης

Η Ιοντική χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPIC) είναι μια μορφή της HPLC, στην οποία ο μηχανισμός διαχωρισμού είναι η *ιοντοανταλλαγή* και διαχωρίζονται ιόντα ανόργανα ή οργανικά, σε κατιονικές ή ανιονικές θέσεις της στατικής φάσης. Η στατική φάση περιλαμβάνει ιοντοανταλλακτικές ρητίνες με σταθερές θέσεις ιοντοανταλλαγής και ιοντικές αλληλεπιδράσεις, οι οποίες χρησιμοποιούν στήλες, όπου οι ιοντικές ομάδες βρίσκονται είτε σε δυναμική ισορροπία είτε μόνιμα δεσμευμένες στο υπόστρωμα.

Η κινητή φάση είναι, συνήθως, κάποιο ρυθμιστικό διάλυμα. Η ταχύτητα μετακίνησης των ιόντων στη στήλη εξαρτάται από το είδος και τη συγκέντρωση των ιόντων του εκλουστικού.

Η συγκράτηση στηρίζεται στη συγγένεια των διάφορων ιόντων για τις θέσεις ιοντοανταλλαγής και στην ανταγωνιστική δράση ανάμεσα στα ιόντα του ρυθμιστικού διαλύματος της κινητής φάσης και των ιόντων του προς ανάλυση διαλύματος. Η συγκράτηση εξαρτάται από την ιονική ισχύ του ρυθμιστικού διαλύματος και μπορεί να ρυθμιστεί, αν μεταβληθεί η τιμή του pH της κινητής φάσης ή η συγκέντρωση του οργανικού διαλύτη στην κινητή φάση.

Η οργανολογία της Ιοντικής χρωματογραφίας είναι παρόμοια με την κλασική HPLC και εξαρτάται από το είδος της Ιοντικής που εφαρμόζεται, καθώς μπορούν να διακριθούν δύο είδη: Η Ιοντική Χρωματογραφία με ελάττωση της αγωγιμότητας του εκλουστικού (Eluent Suppressed Ion Chromatography- ESIC) και η Ιοντική Χρωματογραφία μιας στήλης ή Ιοντική Χρωματογραφία χωρίς ελάττωση αγωγιμότητας (Non-Suppressed -Single Column Ion Chromatography- SCIC).

Ο πιο συνηθισμένος ανιχνευτής ο οποίος χρησιμοποιείται στην Ιοντική Χρωματογραφία είναι ο αγωγιμομετρικός, λόγω της κοινής ιδιότητας των ιόντων, τα οποία είναι όλα αγώγιμα. Η αρχή λειτουργίας τους στηρίζεται στη μέτρηση της διαφοράς της αγωγιμότητας του εκλουστικού κατά τη διάρκεια της έκλουσης του προσδιοριζόμενου ιόντος. Η απόκριση του ανιχνευτή εξαρτάται από τη συγκέντρωση του προσδιοριζόμενου ιόντος, το βαθμό ιονισμού τόσο του εκλουστικού, όσο και του προσδιοριζόμενου συστατικού (που ελέγχονται από την τιμή pH της κινητής φάσης, και από την οριακή αγωγιμότητα των ιόντων της κινητής φάσης. Η διαφορά (θετική ή αρνητική) της αγωγιμότητας των συστατικών του εκλουστικού και των ιόντων, τα οποία διαχωρίζονται καθορίζει την ευαισθησία της μεθόδου. Για να επιτευχθεί η επιθυμητή ευαισθησία στη τεχνική αυτή, καθώς η αγωγιμότητα της κινητής φάσης παίζει καθοριστικό ρόλο, εφαρμόζεται η τεχνική της ελάττωσης της αγωγιμότητας διαβιβάζοντας την κινητή φάση σε διάταξη πριν την κυψελίδα του ανιχνευτή.

Για την ελάττωση της αγωγιμότητας και κατά συνέπεια την αύξηση της ευαισθησίας προτάθηκε η χρήση μιας δεύτερης ιοντοανταλλακτικής στήλης. Η αρχή της ελάττωσης της αγωγιμότητας του εκλουστικού είναι η μετατροπή του εκλουστικού σε ένα λιγότερο αγώγιμο μέσο π.χ. (H₂O), με αντιδράσεις εξουδετέρωσης οξέος-βάσης, ενώ ταυτόχρονα η αγωγιμότητα των ιόντων τα οποία προσδιορίζονται, αυξάνεται, καθώς μετατρέπονται σε περισσότερο αγώγιμη μορφή, οπότε τα ανιόντα μετατρέπονται στα οξέα τους και τα κατιόντα στα υδροξείδιά τους. Οι αντιδράσεις αυτές οδηγούν σε μεγαλύτερες αναλογίες S/N και επομένως, αυξάνουν σημαντικά τη σταθερότητα της βασικής γραμμής και βελτιώνουν τα όρια ανίχνευσης.

Οι διατάξεις ελάττωσης της αγωγιμότητας του εκλουστικού περιλαμβάνουν: στήλες πλήρωσης, μεμβράνες κοίλης ίνας (hollow fiber), μικρομεμβράνες, αντιδράσεις μετά τη στήλη διαχωρισμού, ηλεκτροχημικές διατάξεις με δυνατότητα αυτοαναγέννησης κ.ά.

Τα εκλουστικά τα οποία χρησιμοποιούνται, συνήθως, στον προσδιορισμό ανιόντων, είναι μίγματα αραιού ανθρακικού νατρίου με όξινο ανθρακικό νάτριο, υδροξείδιο του νατρίου, ενώ για τα κοινά αλκαλιμέταλλα και απλές αμίνες, χρησιμοποιούνται αραιά διαλύματα ορυκτών οξέων (HCl, HNO₃), BaCl₂, AgNO₃, αμινοξέα καθώς επίσης αλκυλο- και αρυλο- σουλφονικά οξέα. Κυρίως, επιλέγεται το HCl, αλλά στην περίπτωση των δισθενών ιόντων πρέπει να επιλεγεί εκλουστικό με μεγαλύτερη συγγένεια προς την ιοντοανταλλακτική ρητίνη π.χ. AgNO₃.

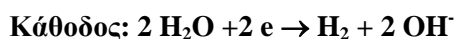
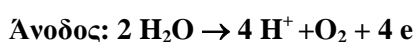
Μερικά από τα μειονεκτήματα που είχαν οι διατάξεις στήλης πλήρωσης, περιορίστηκαν με τη χρήση διατάξεων κοίλων ινών (hollow-fiber) οι οποίες εισήχθησαν το 1981. Αυτές οι διατάξεις είναι πιο αποτελεσματικές καθώς έχουν μικρότερο νεκρό όγκο, υψηλή χωρητικότητα και αναγεννώνται ευκολότερα (dynamically regenerated). Οι διατάξεις ελάττωσης αγωγιμότητας του εκλουστικού, οι οποίες χρησιμοποιούν την τεχνική των κοίλων ινών (hollow fibers), είναι κατασκευασμένες από πολυμερικό ιοντοανταλλακτικό υλικό. Το εκλουστικό διέρχεται από το εσωτερικό της ίνας, ενώ το διάλυμα αναγέννησης διέρχεται από το εξωτερικό σε αντιστροφή. Στην πρώτη τους μορφή οι διατάξεις αυτές χρησιμοποιούσαν σουλφονικές κατιοντοανταλλακτικές ίνες με H₂SO₄ ως διάλυμα αναγέννησης. Το κύριο μειονέκτημα των διατάξεων αυτών ήταν η μικρή εσωτερική διάμετρος της ίνας και άρα η μικρή εσωτερική επιφάνειά της, με αποτέλεσμα τη χαμηλή χωρητικότητα ιοντοανταλλαγής.

Άλλες διατάξεις στηρίζονται στη χρήση **ιοντοανταλλακτικών μικρομεμβρανών** σε μορφή φύλλων, οι οποίες αντικατέστησαν τις ίνες. Ο σχεδιασμός αυτός είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της ειδικής επιφάνειας και άρα της χωρητικότητας ιοντοανταλλαγής. Και στην περίπτωση αυτή, τα διαλύματα έκλουσης και αναγέννησης κυκλοφορούν σε αντιστροφή. Οι διατάξεις αυτές χαρακτηρίζονται από πολύ μικρούς νεκρούς όγκους και μικρή διασπορά.

Οι πιο σύγχρονες διατάξεις οι οποίες εμφανίστηκαν τη δεκαετία του ενενήντα έχουν τη δυνατότητα της αυτόματης αναγέννησης και χρησιμοποιούν την ηλεκτρόλυση του νερού ως πηγή των απαραίτητων υδρογονοκατιόντων ή υδροξυλιόντων για την ελάττωση της αγωγιμότητας του εκλουστικού, χωρίς προσθήκη αντιδραστηρίων. Το νερό μπορεί να παρέχεται είτε από ανακύκλωση είτε από εξωτερική πηγή. Οι διατάξεις αυτές ονομάζονται **Self Regenerating Suppressors** και δεν απαιτούν την προσθήκη διαλύματος αναγέννησης.

Η ηλεκτρόλυση επιτυγχάνεται με χρήση ηλεκτροδίων από λευκόχρυσο στους θαλάμους αναγέννησης, έτσι ώστε να μην απαιτείται εξωτερική παροχή οξέος ή βάσης.

Οι δύο αντιδράσεις ηλεκτρόλυσης που λαμβάνουν χώρα είναι:



Η δεύτερη μορφή Ιοντικής χρωματογραφίας χρησιμοποιεί μία μόνο στήλη, χωρίς να είναι απαραίτητη η χρήση διάταξης ελάττωσης της αγωγιμότητας του εκλουστικού και ονομάζεται: **Ιοντική Χρωματογραφία Μιας Στήλης (Non-Suppressed Ion Chromatography-Single Column Ion Chromatography- SCIC)**. Στην περίπτωση αυτή ο μόνος τρόπος για να αυξηθεί η ευαισθησία, είναι η μεγιστοποίηση της διαφοράς της αγωγιμότητας της κινητής φάσης και των προσδιοριζόμενων συστατικών.

Οι δύο τεχνικές χρησιμοποιούν διαφορετικά υλικά πλήρωσης και διαφορετικά εκλουστικά. Στο **Σχήμα 11.8** δίνονται σχηματικά οι δύο μορφές Ιοντικής Χρωματογραφίας.

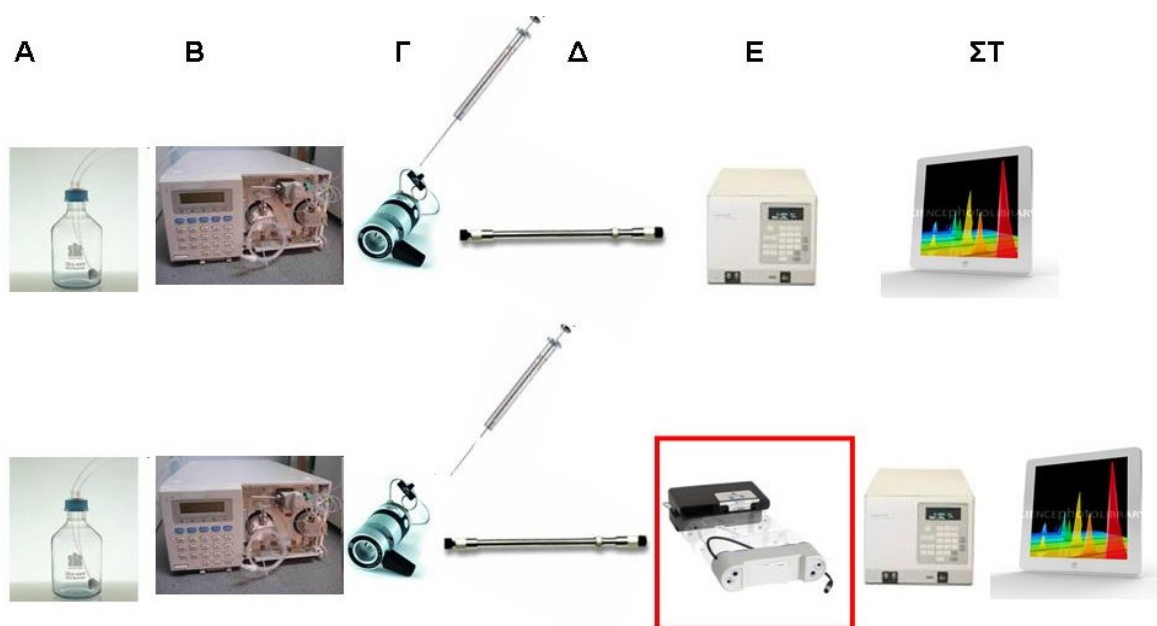
Η τεχνική Non-Suppressed ή SCIC στηρίχθηκε στη χρήση ανιοντοανταλλακτικής στήλης πολύ χαμηλής αγωγιμότητας και στη χρήση εκλουστικού, το οποίο έχει πολύ χαμηλή αγωγιμότητα και το οποίο έχει τη δυνατότητα να οδηγηθεί απευθείας στον αγωγιμομετρικό ανιχνευτή. Τυπικά εκλουστικά που χρησιμοποιούνται, συνήθως για τα ανιόντα είναι τα βενζοϊκά, φθαλικά ή άλλα άλατα αρωματικών οξέων με χαμηλές τιμές ορικής ισοδύναμης αγωγιμότητας (άμεση ανίχνευση) ή υδροξείδιο του νατρίου με υψηλή αγωγιμότητα (έμμεση ανίχνευση). Για τα κατιόντα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί διάλυμα αραιού νιτρικού οξέος (έμμεση ανίχνευση).

Εκτός από την αγωγιμομετρική ανίχνευση μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες ηλεκτροχημικές τεχνικές, όπως αμπερομετρία ή ποτενσιομετρία, αλλά και φασματοσκοπικές τεχνικές οι οποίες περιλαμβάνουν φασματοφωτομετρία ορατού-υπεριώδους, μέτρηση του δείκτη διάθλασης, φθορισμομετρία,

φασματοσκοπία ατομικής εκπομπής με διάφορες πηγές διέγερσης και φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης.

11.6.1. Η Ιοντική Χρωματογραφία στη Βιοανάλυση

Ο προσδιορισμός οργανικών ενώσεων και ειδών βιολογικού και βιοχημικού ενδιαφέροντος με την τεχνική της Ιοντικής Χρωματογραφίας αποτελεί, επίσης, πεδίο έρευνας και εφαρμογών, παράλληλα με την ανάλυση ανόργανων ιόντων. Στη βιοανάλυση, η Ιοντική Χρωματογραφία εφαρμόζεται στο διαχωρισμό φορτισμένων μορίων, όπως φάρμακα, πρωτεΐνες, νουκλεοτίδια και αμινοξέα. Συχνά εφαρμόζεται στον καθαρισμό των πρωτεϊνών (protein purification). Εάν το pH του διαλύματος είναι μικρότερο του ισοηλεκτρικού σημείου της πρωτεΐνης, η πρωτεΐνη θα είναι φορτισμένη θετικά, ενώ αν είναι μεγαλύτερο θα είναι φορτισμένη αρνητικά. Επομένως, σε μια θετικά φορτισμένη στήλη, οι πρωτεΐνες με $pI < pH$ του ρυθμιστικού διαλύματος θα είναι αρνητικά φορτισμένες και άρα θα δεσμευτούν στη στήλη, ενώ αυτές με $pI > pH$ θα είναι θετικά φορτισμένες και θα εκλουσθούν. Το αντίθετο θα συμβεί σε μια αρνητικά φορτισμένη στήλη, όπου οι πρωτεΐνες με $pI < pH$ του ρυθμιστικού θα είναι αρνητικά φορτισμένες και θα εκλουσθούν χωρίς να συγκρατηθούν. Οι πρωτεΐνες με $pI > pH$ του ρυθμιστικού διαλύματος θα δεσμευτούν στη στήλη, καθώς θα είναι θετικά φορτισμένες. Έτσι για παράδειγμα, οι ανοσοσφαιρίνες οι οποίες είναι, συνήθως, θετικά φορτισμένες, μπορούν να δεσμευτούν σε κατιοντοανταλλακτικές στήλες.



Σχήμα 11.8. Τεχνικές Ιοντικής Χρωματογραφίας

11.7. Χρωματογραφία Εκλεκτικής Συγγένειας

Η εκλεκτική συγγένεια είναι ένας από τους 5 μηχανισμούς των χρωματογραφικών διαχωρισμών, ο οποίος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον καθαρισμό μιας συγκεκριμένης ένωσης (συνήα πρωτεΐνης) από ένα μίγμα. Χρησιμοποιεί πολύ εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα μόρια (συστατικά προς διαχωρισμό) του υγρού και επιλεγμένα μόρια (ligands), τα οποία βρίσκονται ακινητοποιημένα με ομοιοπολικούς δεσμούς στη στατική φάση. π.χ. το ακινητοποιημένο μόριο μπορεί να είναι ένα είδος αντισώματος σε μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη.

Η χρωματογραφία συγγένειας διαχωρίζει τις πρωτεΐνες βάσει μιας αντιστρέψιμης αλληλεπίδρασης μεταξύ μιας πρωτεΐνης (ή της ομάδας πρωτεϊνών) και ενός συγκεκριμένου ligand, το οποίο συνδέεται με ένα χρωματογραφικό υπόστρωμα. Η τεχνική χαρακτηρίζεται από υψηλή εκλεκτικότητα και ως εκ τούτου από υψηλή διακριτική ικανότητα, και συχνά υψηλή χωρητικότητα για το επιθυμητό βιομόριο. Η χρωματογραφία συγγένειας είναι μοναδική στην τεχνολογία καθαρισμού, δεδομένου ότι είναι η μόνη τεχνική η οποία επιτρέπει τον καθαρισμό ενός βιομορίου βάσει της βιολογικής λειτουργίας ή της μεμονωμένης χημικής δομής

του. Η τεχνική μπορεί να χρησιμοποιηθεί στο διαχωρισμό ενεργών βιομορίων από τις μετουσιωμένες ή λειτουργικά διαφορετικές μορφές, για να απομονώσει τις καθарές ουσίες, οι οποίες βρίσκονται σε χαμηλή συγκέντρωση στους μεγάλους όγκους του ακατέργαστου δείγματος και, επίσης, για να απομακρύνει συγκεκριμένες παρεμποδίσσεις.

Η πρωτεΐνη-στόχος συλλέγεται σε καθαρή και προσυγκεντρωμένη μορφή. Οι βιολογικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ligand και του μορίου-στόχου μπορούν να είναι ένα αποτέλεσμα των ηλεκτροστατικών ή υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων, δυνάμεων van der Waals ή/και δεσμών υδρογόνου. Για να διαχωριστεί με εκχύλιση το μόριο-στόχος από το μέσο συγγένειας, η αλληλεπίδραση μπορεί να αντιστραφεί, είτε με τη χρήση ενός ανταγωνιστικού ligand είτε με την αλλαγή του pH, της ιοντικής ισχύος, ή της πολικότητας (π.χ. με προσθήκη οργανικού διαλύτη), ή με συνδυασμό των άνω μέσων. Σ' ένα ενιαίο στάδιο, ο καθαρισμός συγγένειας μπορεί να προσφέρει σημαντική εξοικονόμηση χρόνου σε σχέση με λιγότερο εκλεκτικές διεργασίες πολλαπλών σταδίων. Η δυνατότητα προσυγκέντρωσης επιτρέπει την προκατεργασία μεγάλων όγκων. Έτσι, τα επιθυμητά μόρια μπορούν να καθαριστούν και να απομονωθούν από σύνθετα βιολογικά μίγματα.

Οποιοδήποτε συστατικό μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ligand για να καθαρίσει το αντίστοιχο μόριο δέσμευσής του. Μερικές χαρακτηριστικές βιολογικές αλληλεπιδράσεις οι οποίες χρησιμοποιούνται συχνά στη χρωματογραφία συγγένειας είναι:

- ένζυμο, με το αντίστοιχο ανάλογο υπόστρωμα, παρεμποδιστή ή συνένζυμο,
- αντίσωμα με αντιγόνο, ιό, κύτταρο,
- συζυγής βάση νουκλεϊνικού οξέος, ιστόνες, πολυμεράση νουκλεϊνικού οξέος.
- ορμόνη, βιταμίνη, φορέας πρωτεΐνης,
- τρανσφεράση γλουταθειόνης-πρωτεΐνη,
- ιόντα μετάλλων-πρωτεΐνες.

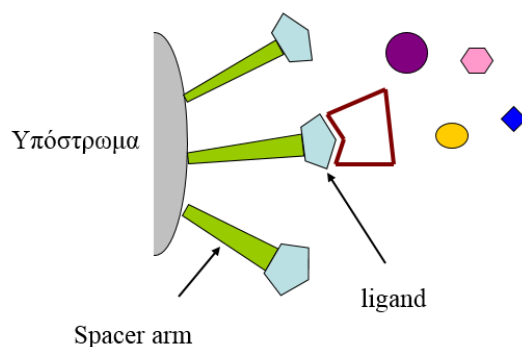
Τα στάδια κατά τον καθαρισμό με χρωματογραφία συγγένειας είναι:

1. Αρχικά το μέσο εκλεκτικής συγγένειας εξισορροπείται με το ρυθμιστικό διάλυμα δέσμευσης (binding buffer).
2. Στη συνέχεια διαβιβάζεται το δείγμα σε συνθήκες οι οποίες ευνοούν την εκλεκτική δέσμευση μόνον των επιθυμητών συστατικών στην ουσία δέσμευσης, όπου και δεσμεύεται εκλεκτικά αλλά αναστρέψιμα, ενώ οι μη δεσμευμένες ενώσεις/συστατικά απομακρύνονται με έκπλυση.
3. Τα επιθυμητά συστατικά παραλαμβάνονται από τη στήλη αλλάζοντας τις συνθήκες, έτσι ώστε να ευνοείται η έκλουσή τους. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί εκλεκτικά, όπως προαναφέρθηκε, με χρήση άλλου ανταγωνιστικού ligand ή μη εκλεκτικά, αν αλλάξουμε τις συνθήκες π.χ. pH, ιοντική ισχύ, πολικότητα. Το επιθυμητό συστατικό, όπως για παράδειγμα η πρωτεΐνη, παραλαμβάνεται σε καθαρή και εμπλουτισμένη μορφή.
4. Το μέσο εκλεκτικής συγγένειας εξισορροπείται εκ νέου με ρυθμιστικό διάλυμα δέσμευσης.

Η υψηλή εκλεκτικότητα της χρωματογραφίας εκλεκτικής συγγένειας έχει ως αποτέλεσμα πολλοί διαχωρισμοί να επιτυγχάνονται σε ένα και μόνο στάδιο, όπως π.χ. ο καθαρισμός μονοκλωνικών αντισωμάτων. Το γεγονός ότι υπάρχουν πολλά είδη στηλών, εκλεκτικών μέσων για δέσμευση με διάφορες δραστικές ομάδες, καθιστά τη χρωματογραφία εκλεκτικής συγγένειας μια τεχνική με πολλές εφαρμογές.

Το υπόστρωμα το οποίο χρησιμοποιείται πρέπει να έχει κατάλληλες ιδιότητες, τόσο χημικές, όσο και μηχανικές, π.χ. ροής για γρήγορους διαχωρισμούς και να είναι σταθερό σε υψηλές αλλά και χαμηλές τιμές pH· τέτοιο υλικό είναι π.χ. η σεφαρόζη. Το μέγεθος των σωματιδίων και το πορώδες σχεδιάζονται κατάλληλα, για να αυξηθεί η ειδική επιφάνεια η οποία είναι διαθέσιμη για σύζευξη με το ligand και το επιθυμητό μόριο. Μικρό μέγεθος σωματιδίων με μεγάλο πορώδες αυξάνει την ειδική επιφάνεια, ενώ η αύξηση του βαθμού δικτύωσης (cross-linking) του υποστρώματος βελτιώνει τη χημική σταθερότητα, ώστε να μπορεί να ανταπεξέλθει σε δραστικές συνθήκες πλύσης και έκλουσης, δίνοντας παράλληλα και ένα σταθερό υπόστρωμα το οποίο αντέχει σε υψηλές ταχύτητες ροής, ώστε να περιορίζεται ο χρόνος εξισορρόπησης και καθαρισμού.

Στο **Σχήμα 11.9** δίνεται σχηματικά η αρχή της χρωματογραφίας εκλεκτικής συγγένειας. Το υπόστρωμα όπου δεσμεύεται το ligand, πρέπει να είναι χημικά και φυσικά αδρανές.



Σχήμα 11.9. Αρχή χρωματογραφίας εκλεκτικής συγγένειας

Ο βραχίονας διαχωριστής (**Spacer arm**) χρησιμεύει για να επιτευχθεί καλύτερη έκθεση του ligand στην κινητή φάση, ώστε να ενισχύεται η δυνατότητα δέσμευσης του επιθυμητού συστατικού στο ligand ξεπερνώντας στερεοχημικές παρεμποδίσεις. Αν η θέση δέσμευσης της επιθυμητής πρωτεΐνης βρίσκεται σε βάθος και το μέσο εκλεκτικής συγγένειας χρησιμοποιεί μικρά ligand, τότε μπορεί λόγω στερεοχημικών παρεμποδίσεων να μην είναι εφικτή η προσέγγιση και η δέσμευσή της από το ligand. Στις περιπτώσεις αυτές, χρησιμοποιείται ένας βραχίονας-διαχωριστής "spacer arm", ο οποίος παρεμβάλλεται μεταξύ του υποστρώματος και του ligand και διευκολύνει τη δέσμευση. Είναι ευνόητο ότι το μέγεθος του βραχίονα-διαχωριστή παίζει σημαντικό ρόλο. Εάν είναι μικρό δεν είναι αποτελεσματικό, ενώ εάν είναι μεγάλο μειώνεται η εκλεκτικότητα, καθώς μπορούν να δεσμευτούν διάφορα μόρια. Γενικά χρησιμοποιείται διαχωριστής για δέσμευση μορίων με $MB < 1000$, ενώ δεν απαιτείται η χρήση του για μεγαλύτερα μόρια.

Το **ligand** είναι το μόριο το οποίο δεσμεύει αναστρέψιμα το επιθυμητό συστατικό. Η επιλογή του εξαρτάται και από τη δυνατότητα που προσφέρει να μετατρέπεται χημικά, ώστε να επιτρέπει την προσάρτηση στο υπόστρωμα, χωρίς να καταστρέφεται η δεσμευτική του ικανότητα.

Η δέσμευση του ligand σε κατάλληλο προ-ενεργοποιημένο υπόστρωμα, το οποίο αποτελεί το μέσο εκλεκτικής συγγένειας (affinity medium), γίνεται με ομοιοπολικούς δεσμούς.

11.7.1. Χρωματογραφία ανοσοσυγγένειας

Στη Χρωματογραφία ανοσοσυγγένειας (Immunoaffinity chromatography) χρησιμοποιούνται αντιγόνα ή αντισώματα ως ligands. Τα αντισώματα είναι πολύ χρήσιμα ως ligands για τον καθαρισμό αντιγόνων, ειδικά όταν η επιθυμητή ένωση δεν έχει συμπληρωματικό ligand.

Αντίστοιχα καθαρά αντιγόνα ή αντι-αντισώματα χρησιμοποιούνται ως ειδικά ligands για τον καθαρισμό αντισωμάτων. Μέσα ανοσοσυγγένειας παρασκευάζονται με δέσμευση ligand (καθαρό αντιγόνο, αντίσωμα, αντι-αντίσωμα) σε κατάλληλο υπόστρωμα. Ο πιο απλός τρόπος είναι μέσω πρωτοταγούς αμινοομάδας του ligand, ή αν δεν υπάρχει τέτοια, μέσω καρβοξυλο-θειολικής ή υδροξυλοομάδας.

11.8. Παρασκευαστική Χρωματογραφία

Οι χρωματογραφικές τεχνικές βρίσκουν εφαρμογές στο στάδιο της προκατεργασίας του δείγματος, στη χημική ανάλυση, αλλά και στην απομόνωση και παραλαβή των συστατικών που έχουν διαχωριστεί, σε καθαρή κατάσταση για διάφορους σκοπούς, όπως π.χ. η παραλαβή εκχυλίσματος φυτών και η χρήση του σε φαρμακευτικά σκευάσματα. Η εφαρμογή της χρωματογραφίας σε παρασκευαστικό εργαστήριο ονομάζεται: **Παρασκευαστική Χρωματογραφία** και αναφέρεται στην απομόνωση και παραλαβή μικρών ή μεγάλων ποσοτήτων συστατικών μίγματος σε καθαρή κατάσταση, για συγκεκριμένη χρήση.

Αλλά και η προσυγκέντρωση που απαιτείται, π.χ. στην ανάπτυξη νέων φαρμάκων, προκειμένου να είναι εφικτή η μελέτη τους, αποτελεί στόχο της παρασκευαστικής χρωματογραφίας. Δεν είναι η ποσότητα που απομονώνεται, αλλά ο σκοπός της απομόνωσης που μετατρέπει τη χρωματογραφία σε παρασκευαστική. Επειδή είναι ακριβή τεχνική σε σχέση με άλλες τεχνικές απομόνωσης (π.χ. εκχύλιση, εξάτμιση, ανακρυστάλλωση), εφαρμόζεται για ακριβή συστατικά στη χημική, φαρμακευτική βιομηχανία, στη βιοτεχνολογία, βιοχημεία κλπ. Έτσι μπορούν να παραληφθούν ποσότητες, όπως μερικά μg ενζύμου στη

βιοτεχνολογία, μερικά mg στη διερεύνηση δομής κατά τη σύνθεση χημικής ένωσης, ή απομόνωσης φυσικού συστατικού, μερικά g για τοξικολογικές ή φαρμακολογικές δοκιμές και Kg σε φαρμακευτικά προϊόντα.

Η παρασκευαστική HPLC μπορεί να διεξαχθεί σε κάθε κλίμακα από τη μικρή κλίμακα (συμβατική αναλυτική) μέχρι μεγάλη κλίμακα, με τα κατάλληλα όργανα και στήλες. Η κλίμακα επιλέγεται ανάλογα: με τις επιθυμητές ποσότητες των συστατικών τα οποία παραλαμβάνονται και με το βαθμό καθαρότητας που απαιτείται ανάλογα με τη χρήση/ εφαρμογή.

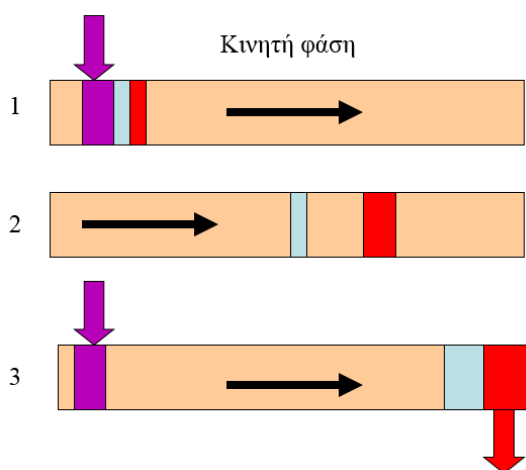
Στις εφαρμογές της παρασκευαστικής χρωματογραφίας περιλαμβάνονται:

1. ο καθαρισμός πρωτεϊνών από E.Coli με ιοντοανταλλαγή,
2. ο καθαρισμός της βιοσυνθετικά παραγόμενης ινσουλίνης,
3. ο καθαρισμός διαγνωστικών ενζύμων,
4. ο καθαρισμός της ανοσογλοβουλίνης G.

Η παρασκευαστική χρωματογραφία μπορεί να είναι ασυνεχής (σε σειρά) ή συνεχής. Η πρώτη ονομάζεται batch (**Σχήμα 11.10**), ενώ η δεύτερη είναι χρωματογραφία αντιρροής, συνήθως Χρωματογραφία προσομοιωμένης κινούμενης κλίνης- Simulated bed chromatography (SMB) (**Σχήμα 11.11**). Η χρωματογραφία σε σειρά έχει διακριτά σημεία αρχής και τέλους π.χ. διάρκεια κύκλου στην HPLC 10 min.

11.8.1. Χρωματογραφία Αντιρροής, Χρωματογραφία Προσομοιωμένης Κινούμενης Κλίνης

Καθώς είναι πολύ δύσκολο να μετατοπίζεται η στατική φάση, πραγματική χρωματογραφία αντιρροής δεν υπάρχει, αντίθετα υπάρχουν μικρά κλάσματα της στήλης των οποίων η μετακίνηση προσομοιάζεται από το ένα άκρο στο άλλο. Η προσομοίωση της μετακίνησης της κλίνης (στατικής φάσης) γίνεται με μετακίνηση των σημείων τροφοδοσίας δείγματος και κινητής φάσης καθώς και των σημείων εξόδου των δύο συστατικών, ενώ οι θέσεις των στηλών μένουν οι ίδιες.



Σχήμα 11.10. Παρασκευαστική χρωματογραφία σε σειρά. 1. Έγχυση. 2. Διαχωρισμός. 3. Νέα έγχυση και συλλογή.

Η Χρωματογραφία Προσομοιωμένης Κινούμενης Κλίνης ή SMB χρωματογραφία σε συνεχή αντιρροή (countercurrent chromatography) έχει τα ακόλουθα πλεονεκτήματα:

- μικρή κατανάλωση διαλύτη (10 φορές < από χρωματογραφία σε σειρά),
- υψηλά ποσοστά ανάκτησης,
- υψηλή καθαρότητα,
- καλύτερη απόδοση (παραγωγικότητα),
- μικρότερο κόστος,
- 10% > απόδοση από τη χρωματογραφία σε σειρά.

Ενώ ως μειονεκτήματα θεωρούνται, ο διαχωρισμός μίγματος μόνο 2 συστατικών και η πολυπλοκότητα.

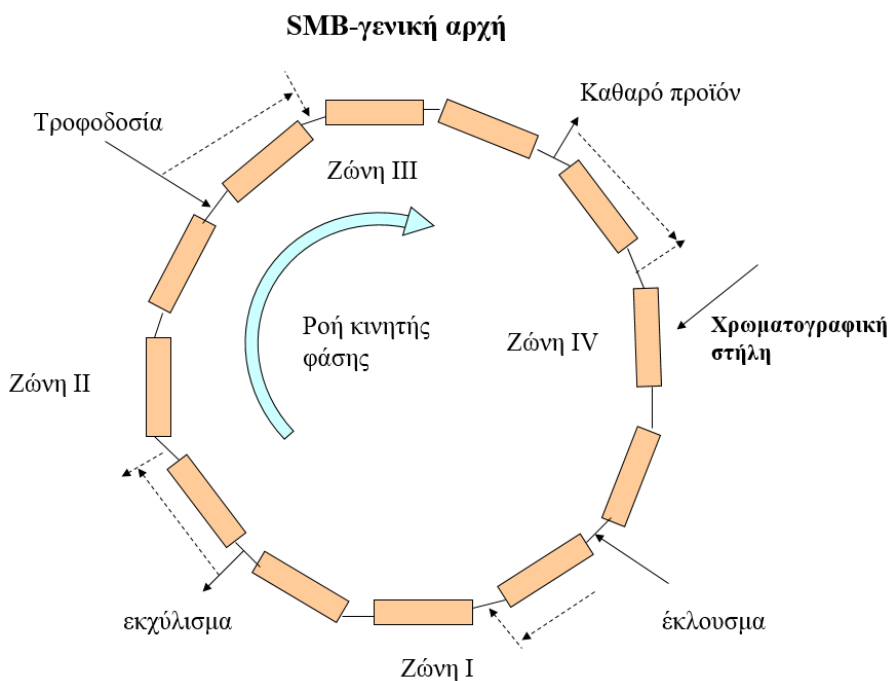
Η τεχνική αυτή βρίσκει εμπορικές εφαρμογές στην παραλαβή: σακχάρων, φυτοφαρμάκων, αντιβιοτικών, πεπτιδίων, πρωτεϊνών και φαρμάκων με εναντομέρεια.

11.9. Αέρια Χρωματογραφία

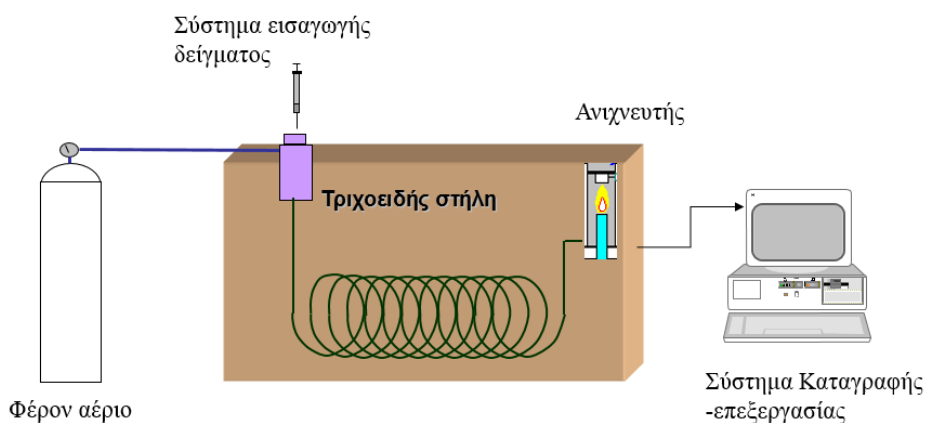
Η Αέρια Χρωματογραφία αποτελεί μια χρωματογραφική τεχνική με αέρια κινητή φάση και στατική φάση υγρή (χρωματογραφία κατανομής) ή στερεή (χρωματογραφία προσρόφησης).

Ως **φέρων αέριο** (κινητή φάση) μπορεί να χρησιμοποιηθεί ήλιο, αργό, άζωτο και υδρογόνο σε καθαρή κατάσταση, ανάλογα με τον ανιχνευτή.

Ένα τυπικό διάγραμμα αέριου χρωματογράφου φαίνεται στο **Σχήμα 11.12**. Η εισαγωγή του δείγματος στην κορυφή της στήλης, γίνεται με μικροσύριγγα, μέσω της βαλβίδας εισαγωγής. Τα συστατικά του δείγματος διαχωρίζονται, καθώς συμπαρασύρονται από το φέρον αέριο κατά μήκος της στήλης και στη συνέχεια τα κλάσματα ανιχνεύονται από τον ανιχνευτή. Τα σήματα της ανίχνευσης καταγράφονται από το καταγραφικό ή οδηγούνται σε μικροϋπολογιστή.



Σχήμα 11.11. Χρωματογραφία αντιτροής



Σχήμα 11.12. Διάγραμμα αέριου χρωματογράφου

Όσο μεγαλύτερη η χημική συγγένεια ανάμεσα στα συστατικά του αέριου μίγματος και στη στατική φάση, τόσο ο χρόνος συγκράτησης των συστατικών είναι μεγαλύτερος. Και εδώ ισχύει ο γενικός κανόνας: για την ανάλυση πολικών ενώσεων χρησιμοποιούνται στήλες με πολικό υλικό πλήρωσης, ενώ για την ανάλυση μη πολικών ενώσεων χρησιμοποιούνται μη πολικές στήλες.

Οι στήλες οι οποίες χρησιμοποιούνται πλέον, είναι τριχοειδείς με διάμετρο 0.03-1 mm και μήκος 25-100 m και μεγάλο αριθμό θεωρητικών πλακών.

Η αέρια χρωματογραφία ξεκίνησε το 1950 και οι πρώτες βιοαναλυτικές εφαρμογές περιλαμβάνουν προσδιορισμό πτητικών ενώσεων σε βιολογικά δείγματα. Η τεχνική αυτή εφαρμόστηκε και σε φαρμακοκινητικές μελέτες, καθώς πολλά φάρμακα, παρά το γεγονός ότι δεν είναι πτητικά, μπορούν να δώσουν με κατάλληλη παραγωγή (με αντιδράσεις ακυλίωσης, εστεροποίησης, σιλανοποίησης, αλκυλίωσης) πτητικά προϊόντα, τα οποία στη συνέχεια μπορούν να προσδιοριστούν με τεχνικές ανίχνευσης (FID, ECD, NPD) με μεγάλη ευαισθησία. Μεγάλη ώθηση στη χρήση της αέριας χρωματογραφίας στη βιοανάλυση έδωσε η σύζευξη με τη φασματοσκοπία μαζών.

Οι κυριότερες εφαρμογές της αέριας χρωματογραφίας περιλαμβάνουν την ανάλυση αλκοολών στο αίμα, οπιούχων και γενικότερα ναρκωτικών ουσιών, αντικαταθλιπτικών φαρμάκων, αμφεταμινών στα ούρα, φυτοφαρμάκων σε νεκροτομικά δείγματα κλπ.

Βιβλιογραφία

- Παπαδογιάννης Ι.Ν. (2004). Σύγχρονες διαχωριστικές τεχνικές στην Ενόργανη Χημική Ανάλυση. Εκδόσεις Πήγασος 2000, Θεσσαλονίκη.
- Στράτης Ι., Ζαχαριάδης Γ., Σαμανίδου Β. & Θεοδωρίδης Γ. (2004). Ειδικές Μέθοδοι Διαχωρισμού και Χημικής Ανάλυσης. Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη.
- Breslav M. (2001). Preparative HPLC Optimization. Encyclopedia of Chromatography. Editor J.Cazes. Marcel Dekker, New York.
- Cabooter D., Billen J., Terryn H., Lynen F., Sandra P., Desmet, G. (2008). *Kinetic plot and particle size distribution analysis to discuss the performance limits of sub-2 mm and supra-2 mm particle columns*; J. Chromatogr. A, 1204, 1-11.
- DeStefano J.J., Schuster S.A., Lawhorn J.M., Kirkland J.J., (2012). *Performance characteristics of new superficially porous particles*. J. Chromatogr. A, 1258, 76-83.
- Feibush B. Grinberg N. (1988). *Chromatographic Chiral Separations*. M.Zieff, L.Crane Eds. Marcel Dekker, New York (1988).p.1.
- Fekete S., Olah E., Fekete J., (2012). *Fast liquid chromatography: the domination of core-shell and very fine particles*. J. Chromatogr. A, 1228, 57-71
- Ferrito S. (2001). *Polyester analysis by GPC-SEC*. Encyclopedia of Chromatography. Ed. J.Cazes. Marcel Dekker, New York.
- Ganetsos G. & Barker P. (1993). *Preparative and Production Scale Chromatography*. Marcel Dekker, New York (1993).
- Grinberg N., Thompson R.. (2001). *Chiral Separations by HPLC*. Encyclopedia of Chromatography. Ed. J.Cazes. Marcel Dekker, New York (2001).
- Gritti F., Leonardis I., Abia J., Guiochon G., (2010). *Physical properties and structure of fine core-shell particles used as packing materials for chromatography: Relationships between particle characteristics and column performance*. J. Chromatogr. A, 1217, 3819-3843.
- Gritti F., Guiochon G., (2012). *The current revolution in column technology: How it began, where is it going?* J. Chromatogr. A, 1228, 2-19.

- Gritti F., Tanaka N., Guiochon G. (2012). *Comparison of the fast gradient performance of new prototype silica monolithic columns and columns packed with fully porous and core-shell particles*. J. Chromatogr. A, 1236, 28–41.
- Guiochon G., (2007). *Monolithic columns in high-performance liquid chromatography*. J. Chromatogr. A, 1168, 101–168.
- Jandera P. (2011). *Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review*. Anal. Chim. Acta 692, 1-25.
- Kaspereit M., Seidel-Morgenstern A. & Kienle, A. (2007). *Design of simulated moving bed processes under reduced purity requirements*. J. Chromatogr. A, 1162, 2–13.
- Lafita V.S. (2001). *GPC-SEC Introduction and Principles*. Encyclopedia of Chromatography. Ed. J.Cazes. Marcel Dekker, New York.
- Lindner W. (1988). *Chromatographic Chiral Separations*. M.Zieff, L.Crane Eds. Marcel Dekker, New York, p.39.
- Majors R.E. (2012). *Developments in HPLC/UHPLC Column Technology*. LCGC Europe, 7-14.
- Mazzotti M., Storti G. & Morbidelli M. (1997). *Optimal operation of simulated moving bed units for nonlinear chromatographic separations*, J. Chromatogr. A, 769, 3–24.
- Moori S. (2001). *GPC-SEC Effect of Experimental Conditions*. Encyclopedia of Chromatography. Ed. J.Cazes. Marcel Dekker, New York.
- Mori S. & Barth H.G. (1999). *Size Exclusion Chromatography*, Chapter 5, Springer-Verlag, New York.
- Olah E., Fekete S., Fekete J., Ganzler K. (2010). *Comparative study of new shell-type, sub-2 μm fully porous and monolith stationary phases, focusing on mass-transfer resistance*. J. Chromatogr. A, 1217, 3642-3653.
- Papadoyannis I.N. & Samanidou, V.F. (2005). *Ion chromatography principles suppressed and non-suppressed*. Encyclopedia of Chromatography: Second Edition, 859 – 862.
- Samanidou V. & Nazyropoulou C. (2013). *The new generation of HPLC columns: Evolution of packing materials*. Chapter for book High-Performance Liquid Chromatography (HPLC): Principles, Practices and Procedures. Nova Publishers.
- Snyder L.R. (1997). J.Chromatography B, 689:105.
- Stalcup A. (1994). *A practical approach to Chiral Separations by Liquid Chromatography*. VCH, Weinheim (1994).
- Swartz M.E. (2005). *UPLC: An introduction and review*. J. Liq. Chrom., 28(7&8), 1253-1263.
- Unger K.K., Liapis A.I., (2012). *Adsorbents and columns in analytical high-performance liquid chromatography: A perspective with regard to development and understanding*. J. Sep. Sci., 35, 1201-1212.
- Zhuo S., Zuo R., Zhu Z., Wu D., Vasa K., Deng Y., Zuo Y. (2013). *An eco-friendly hydrophilic interaction HPLC method for the determination of renal function biomarkers, creatine and uric acid, in human fluids*. Anal. Meth. 5, 1307.
- Zuo Y., Yang Y., Zhu Z., He W., Aydin Z., (2011). *Determination of uric acid and creatinine in human urine using hydrophilic interaction chromatography*. Talanta 83, 1707-1711.

Δικτυογραφία

Η χημική ένωση του μήνα
Γρήγορες Τεχνικές HPLC

http://www.chem.uoa.gr/chemicals/chem_thalidomide.htm

http://www.chem.uoa.gr/courses/analtechn/SAT_grhgores_texni

kes HPLC math 2 8-2-08.pdf

Affinity Chromatography: A Review of Clinical Applications

<http://www.clinchem.org/content/45/5/593.full>

GPC

<http://www.forumsci.co.il/HPLC/gpc.html>

Affinity Chromatography: Principles and Methods

<http://teachline.ls.huji.ac.il/72682/Booklets/PHARMACIA-AffinityManual.pdf>

Κεφάλαιο 12: Φασματομετρία Μάζας

Γεώργιος Θεοδωρίδης

Σύνοψη

Η φασματομετρία μάζας αποτελεί μία από τις μεγαλύτερες σε οικονομικά μεγέθη και τις πλέον αναπτυσσόμενες αναλυτικές τεχνικές. Σημαντικό μέρος της Βιοαναλυτικής χημείας βασίζεται στη συνεχή τεχνολογική ανάπτυξη της φασματομετρίας μάζας, ενώ από την άλλη πλευρά οι επιστήμες της ζωής και οι ανάγκες της φαρμακευτικής βιομηχανίας αποτελούν κύριο πεδίο εφαρμογής για τη φασματομετρία μάζας. Για το λόγο αυτό, συχνά η τεχνολογική πρόοδος της φασματομετρίας μάζας έρχεται (και) από ερευνητές από τομείς της Βιοαναλυτικής Χημείας. Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζονται τα βασικά στοιχεία της τεχνικής, η βασική οργανολογία και οι κύριες τεχνικές ανάλυσης (σάρωση, SIM, MS/MS). Επίσης γίνεται αναφορά στις αρχές της Φασματομετρίας μάζας καθώς και στις ανάγκες της Βιοαναλυτικής Χημείας και στον τρόπο που αυτές καλύπτονται από τη φασματομετρία. Περιγράφονται εν συντομία οι αρχές της Ταυτοποίησης ενώσεων με Σύγκριση Φασμάτων (Data Libraries), η Ποσοτική Ανάλυση με Φασματομετρία μαζών και η εφαρμογή της Φασματομετρικής Απεικόνισης Μάζας (MS imaging).

Προαπαιτούμενη Γνώση

Πριν την ανάγνωση του κεφαλαίου, χρήσιμη γνώση για τον αναγνώστη μπορεί να βρεθεί σε συγγράμματα Ενόργανης Ανάλυσης καθώς και στο σύγγραμμα του μαθήματος, *Ειδικές Μέθοδοι Διαχωρισμού και Χημικής Ανάλυσης*.

12.1. Εισαγωγή στη Φασματομετρία Μάζας

Φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry, MS) ονομάζεται η αναλυτική τεχνική κατά την οποία τα μόρια (συστατικά) ενός δείγματος μετατρέπονται σε ταχύτατα κινούμενα ιόντα και στη συνέχεια διαχωρίζονται σε σχέση με το λόγο της μάζας προς το φορτίο τους (m/z). Η φασματομετρία μαζών είναι από τις πλέον διαδεδομένες τεχνικές ανάλυσης και εφαρμόζεται, ευρέως, σε πολλούς τομείς τεχνολογίας και έρευνας. Η πρόοδος στη μικροηλεκτρονική και οι αυξανόμενες απαιτήσεις στη χημική ανάλυση, έχουν προωθήσει την ανάπτυξη της τεχνικής και την έχουν καταστήσει απαραίτητο εργαλείο για μεγάλο φάσμα επιστημονικών, ερευνητικών δραστηριοτήτων. Κύριο πεδίο εφαρμογής είναι οι επιστήμες ζωής, των τροφίμων, οι περιβαλλοντικές επιστήμες και οι τεχνολογίες omics. Αυτό συμβαίνει γιατί η φασματομετρία μαζών προσφέρει πληροφορίες για:

- α) την ποιοτική και ποσοτική σύσταση αγνώστων μιγμάτων,
- β) τη χημική δομή πολύ μεγάλου αριθμού ενώσεων,
- γ) την παρουσία και το ποσοστό ισοτόπων,
- δ) τη δομή και σύσταση επιφανειών με μορφή απεικόνισης (MS Imaging).

Η δυναμική της φασματομετρίας μαζών στη βιοανάλυση θα μπορούσε να αποδοθεί στις εξής ιδιότητες:

α) τη μεγάλη εκλεκτικότητα που επιτυγχάνεται με την ακριβή μέτρηση των σχετικών μοριακών μαζών, γεγονός που επιτρέπει την απόλυτη ταυτοποίηση ενώσεων ακόμη και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Η δυνατότητα αυτή έχει ως αποτέλεσμα την απόλυτη κυριαρχία των τεχνικών LC-MS στον έλεγχο τοξικότητας μεταβολισμού φαρμάκων και φαρμακοκινητικής, στη φαρμακευτική βιομηχανία (99% των εφαρμογών είναι σε LC-MS ήδη από το 2008). Αντίστοιχη είναι η εφαρμογή της MS σε περιπτώσεις ελέγχου απαγορευμένων ενώσεων π.χ. anti-doping, έλεγχος ναρκωτικών κ.ά.

β) την πολύ υψηλή ευαισθησία, που φτάνει έως τα 10^{-18} mol.

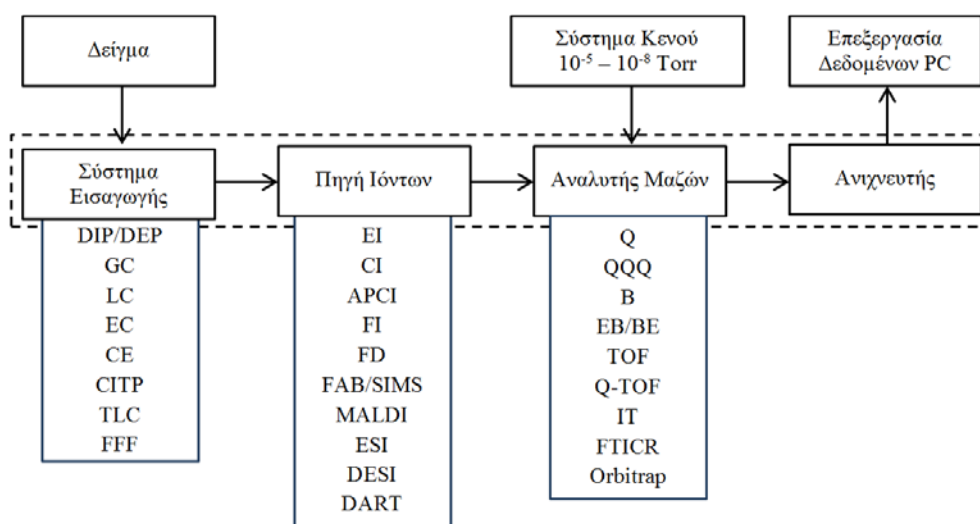
γ) το γεγονός ότι η φασματομετρία μαζών μπορεί θεωρητικά να δράσει σαν ολικός ανιχνευτής (universal detector) και, επομένως, να εφαρμοστεί για την ανάλυση οποιασδήποτε ενώσεως.

δ) τη δυνατότητα εύρεσης δομής αγνώστων ενώσεων, η οποία έχει βρει μεγάλη εφαρμογή στις τεχνολογίες omics καθώς επιτυγχάνει αποδοτική εύρεση δομής πεπτιδίων, πρωτεϊνών, νουκλεοτιδίων. Όπως αναφέρεται στο δεύτερο κεφάλαιο, πολύ μεγάλο μέρος της έρευνας και των εφαρμογών αναπτύσσεται σε φασματογράφο μαζών. Για παράδειγμα, η μεταβολομική πραγματοποιείται πλέον, κυρίως, με φασματομετρία μαζών. Στην πρωτεομική, η φασματομετρία μαζών εφαρμόζεται σε πολλά διαφορετικά στάδια: εύρεση μοριακών βαρών, ταυτοποίηση και ποσοτική αποτίμηση πεπτιδίων πρωτεϊνών, εύρεση δομής (πρωτοταγούς), μελέτη μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών κλπ.

12.2. Ο φασματογράφος Μαζών

Ένας τυπικός φασματογράφος μαζών αποτελείται, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 12.1**, από τα εξής επιμέρους τμήματα:

- 1) **Το σύστημα της εισαγωγής του δείγματος.** Τις περισσότερες φορές το δείγμα εισάγεται στην αέρια ή την υγρή μορφή.
- 2) **Την πηγή ιόντων,** όπου τα εισερχόμενα συστατικά μετατρέπονται σε ιόντα. Συχνά το σύστημα εισαγωγής συνενώνεται με την πηγή ιόντων.
- 3) **Τον αναλυτή μαζών.** Εδώ λαμβάνει χώρα ο διαχωρισμός των ιόντων ανάλογα με το m/z τους.
- 4) **Τον ανιχνευτή** που συλλαμβάνει τα διαχωριζόμενα ιόντα και τα μετατρέπει σε ηλεκτρικό σήμα.
- 5) **Το σύστημα κενού.** Ο φασματογράφος βρίσκεται υπό κενό το οποίο δημιουργείται από εσωτερικές και εξωτερικές αντλίες κενού.
- 6) **Τον ηλεκτρονικό υπολογιστή** με κατάλληλο λογισμικό.



Σχήμα 12.1. Σχηματικό διάγραμμα των τμημάτων ενός φασματογράφου μαζών με τις συντομογραφίες των κυριότερων τεχνικών κάθε σταδίου

12.2.1. Σύστημα Εισαγωγής του Δείγματος

Σκοπός της διάταξης είναι η εισαγωγή του δείγματος χωρίς τη διατάραξη του κενού. Υπάρχουν διαφορετικά συστήματα για την εισαγωγή αερίων, υγρών ή στερεών δειγμάτων.

Για την εισαγωγή στερεών ή μη πτητικών υγρών χρησιμοποιείται ειδικό σύστημα εισαγωγής δείγματος με ακροφύσιο (Direct Probe), το οποίο εισέρχεται στην πηγή ιόντων. Το ακροφύσιο συχνά είναι

ένα μεταλλικός ή υάλινος σωλήνας, ο οποίος, συνήθως, καταλήγει σε μικροδοχείο όπου και βρίσκεται το προς ανάλυση δείγμα. Ένα παράδειγμα τέτοιας διάταξης είναι το Atmospheric Solids Analysis Probe όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 12.2** και εφαρμόζεται, κυρίως, για την ταχύτερη ανάλυση στερεών δειγμάτων π.χ. χαπιών, ταμπλετών, στερεών τροφίμων.



Σχήμα 12.2. Σύστημα εισαγωγής με ακροφύσιο τύπου Atmospheric Solids Analysis Probe (Πηγή: <https://www.waters.com>)

Στην περίπτωση όπου η φασματομετρία μάζας είναι σε σύζευξη με χρωματογραφικό σύστημα, η εισαγωγή δείγματος γίνεται μέσω μιας διάταξης σύζευξης. Στην αέρια χρωματογραφία πρακτικά η εισαγωγή των μορίων προς ανάλυση γίνεται μέσω ενός θερμαινόμενου σωλήνα (interface) που ενώνει την άκρη της στήλης με την πηγή ιόντων. Στις χρωματογραφικές τεχνικές υγρής φάσης, όπως HPLC και CE, χρησιμοποιούνται ειδικές διατάξεις σύζευξης οι οποίες αναπτύσσονται σε άλλα συγγράμματα.

12.2.2. Πηγή Ιόντων

Η επιλογή της τεχνικής ιονισμού που θα εφαρμοστεί είναι μεγάλης σημασίας για την ανάλυση που θα ακολουθήσει. Για την ίδια ένωση, το λαμβανόμενο φάσμα μπορεί να είναι εντελώς διαφορετικό με εφαρμογή διαφορετικών τεχνικών και συνθηκών ιονισμού. Ένας διαχωρισμός των τεχνικών ιονισμού μπορεί να γίνει σε "μαλακές" και "σκληρές" τεχνικές. Στις σκληρές τεχνικές ιονισμού χρησιμοποιείται υψηλή ενέργεια που προκαλεί διάσπασή της σε θυγατρικά ιόντα (**θραύση**). Μαλακές καλούνται οι τεχνικές που επιτυγχάνουν τον ιονισμό σε ηπιότερες συνθήκες με μικρή ή μηδαμινή θραύση. Στον **Πίνακα 12.1** δίνονται οι κύριες τεχνικές ιονισμού που εφαρμόζονται, οι διατάξεις με τις οποίες συνδυάζονται, τα είδη των ιόντων που παράγονται καθώς και οι κατηγορίες των αναλυόμενων ενώσεων που ενδείκνυται.

Τεχνική Ιονισμού	Κύρια Ιόντα	Αναλυτής Μαζών	Τάξεις ενώσεων
Ιονισμός ηλεκτρονίων	M^+ , θυγατρικά ιόντα	Q, TOF, IT, B	Μη πολικές, κάποιες πολικές <500 datlon
MALDI	$[M+H]^+$ $[M-H]^-$	TOF, Orbitrap	Πολικές, κάποιες μη πολικές, βιοπολυμερή, συνθετικά πολυμερή Έως 10^6 datlon
Electrospray (DESI, EESI)	$[M+H]^+$ $[M-H]^-$ ιόντα προσθήκης π.χ. $[M+NH_4]^+$	Q, TOF, IT, FTICR, Orbitrap	Πολικές, κάποιες μη πολικές οργανικές, πρωτεΐνες <200.000 datlon
APCI	$[M+H]^+$ $[M-H]^-$	Q, TOF, IT	Μη πολικές, κάποιες πολικές <1000 datlon

Πίνακας 12.1. Κύριες τεχνικές ιονισμού στη φασματομετρία μάζας

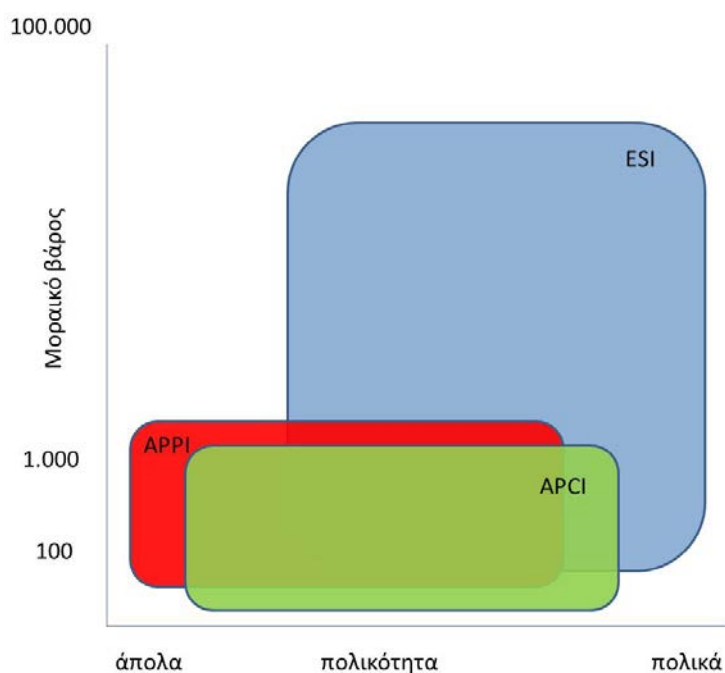
12.2.2.1. Ιονισμός σε Αέρια Φάση

Ο ιονισμός σε αέρια φάση είναι η πιο συνηθισμένη πρακτική. Οι τεχνικές ιονισμού σε αέρια φάση εφαρμόζονται κατά προτίμηση σε ενώσεις σταθερές στη θέρμανση και με σημείο ζέσεως κάτω από τους ~500 °C. Διαχωρίζονται σε αυτές που εφαρμόζονται σε συνθήκες κενού και συνδυάζονται, κυρίως, με την αέρια χρωματογραφία (π.χ. ιονισμός με ηλεκτρόνια) και στις τεχνικές ατμοσφαιρικής πίεσης, οι οποίες έχουν κυριαρχήσει στη φασματομετρία μάζας σε σύζευξη με τεχνικές διαχωρισμού στην υγρή φάση (LC-MS, CE-MS) και αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο τμήμα των εφαρμογών και της αγοράς οργάνων.

Οι τεχνικές ιονισμού ατμοσφαιρικής πίεσης περιλαμβάνουν τον Ηλεκτροψεκασμό (electrospray, ESI), το Χημικό Ιονισμό σε ατμοσφαιρική Πίεση (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation, APCI) και το Φωτοϊονισμό σε Ατμοσφαιρική Πίεση (Atmospheric Pressure Photo Ionisation, APPI). Η επιλογή της τεχνικής ή των διαφόρων μορφών αυτής εξαρτάται από την απόδοση ιονισμού ανά περίπτωση.

Η τεχνική του ηλεκτροψεκασμού αποτελεί την κυριότερη μέθοδο σύζευξης υγρής χρωματογραφίας με φασματομετρία μαζών. Το έκλουσμα της στήλης εισέρχεται μέσω τριχοειδούς σωλήνα μέσα σε πεδίο 3-5 kV. Παράλληλα με τον τριχοειδή, διαβιβάζεται αέριο για δημιουργία εκνεφώματος. Το υγρό διασπείρεται σε νέφος από μικρές φορτισμένες σταγόνες και ο διαλύτης εξατμίζεται ταχύτατα ιονίζοντας τις αναλυόμενες ενώσεις. Το φαινόμενο ονομάζεται εξάτμιση με ιονισμό (ion evaporation) και εντάσσεται στις μαλακές/ήπιες τεχνικές ιονισμού. Ανάλογα με τις συνθήκες θερμοκρασίας και το δυναμικό μπορεί να λαμβάνει ή να μη λαμβάνει χώρα θραύση των μορίων, οπότε το φάσμα μπορεί να διαφέρει πολύ. Η διάταξη επιτρέπει την ανάλυση μεγαλομορίων (πρωτεΐνες, νουκλεοτίδια κλπ.).

Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 12.3**, η ESI μπορεί να εφαρμοστεί για την ανάλυση ενώσεων μέσης πολικότητας έως υψηλής πολικότητας και μοριακά βάρη έως 100.000, ενώ οι APCI, APPI εφαρμόζονται σε μικρότερα και πιο άπολα μόρια όπως λιπίδια, στεροειδή, ορμόνες κλπ. Η ESI καλύπτει το μεγαλύτερο πεδίο εφαρμογής για την ανάλυση βιομορίων καθώς επιτυγχάνει τον ιονισμό πολλών κατηγοριών βιομορίων, όπως πεπτίδια, πρωτεΐνες, αμινοξέα, οργανικά οξέα, νουκλεοτίδια, σάκχαρα, βιταμίνες, και σχεδόν όλες τις κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών (αλκαλοειδή, φαινόλες, τερπενοειδή, γλυκοζίτες κλπ.). Επίσης στη βιο-φαρμακευτική ανάλυση, η χρήση του ESI επικρατεί, γιατί τα περισσότερα φάρμακα εμπίπτουν στις κατηγορίες μορίων τα οποία ιονίζονται αποδοτικότερα με ESI (βιομόρια, πεπτίδια ή και αντισώματα). Φάρμακα που ιονίζονται καλύτερα με APCI, είναι οι στερόλες και συγγενή μόρια όπως οι στατίνες.



Σχήμα 12.3. Το πεδίο εφαρμογής των τεχνικών ιονισμού σε ατμοσφαιρική πίεση: στους άξονες η πολικότητα και το μοριακό βάρος των αναλυόμενων ενώσεων

12.2.2.2. Δημιουργία Ιόντων με Εκρόφηση

Οι τεχνικές αυτές εφαρμόζονται σε υγρά ή στερεά δείγματα. Τα δείγματα δέχονται ενέργεια από πηγές όπως (δέσμη σωματιδίων, laser, κλπ.) και με την απορρόφηση της ενέργειας τα μόρια της αναλυόμενης εκροφώνται και ιονίζονται.

Τέτοιες τεχνικές είναι οι Βομβαρδισμός με Ατομα (Fast Atom Bombardment, FAB), Βομβαρδισμός με Ιόντα (Secondary Ion MS), Ιονισμός με λέιζερ υποβοηθούμενος από υπόστρωμα (MALDI) και εκρόφησης με πλάσμα (Plasma Desorption).

Η τεχνική MALDI έχει κυριαρχήσει στην ανάλυση μεγαλομορίων με μάζα πάνω από το 10^6 Dalton. Εφαρμόζεται, κυρίως, στην ανάλυση πρωτεϊνών και συνθετικών πολυμερών για την εύρεση του μοριακού βάρους, καθώς προσφέρει το πλεονέκτημα μέτρησης πολύ μεγάλων μοριακών μαζών. Τελευταία, έχει βρει εφαρμογή και στην ανάλυση μικρών μορίων με την τεχνική της φασματομετρικής απεικόνισης ιστών (MS imaging). Στην τεχνική αυτή ένα υπόστρωμα/διάλυμα (matrix) αναμιγνύεται με το δείγμα και αφού εξατμιστεί ο διαλύτης, το δείγμα ακτινοβολείται με δέσμη laser. Το υπόστρωμα (π.χ. νικοτινικό οξύ) απορροφά την ενέργεια της ακτινοβολίας, ιονίζεται και προκαλεί ιονισμό των μεγαλομορίων.

Μεγάλο πλεονέκτημα της τεχνικής είναι η δυνατότητα μέτρησης πολύ μεγάλων μοριακών βαρών. Για αυτόν το λόγο βρίσκει εφαρμογή στην πρωτεομική, στο πρώτο στάδιο της ανάλυσης στη μέτρηση του μοριακού βάρους μεγάλων πρωτεϊνών αλλά και στον προσδιορισμό της μοριακής μάζας συνθετικών πολυμερών.

12.2.3 Αναλυτής Μαζών

Υπάρχουν διάφορα είδη αναλυτών μαζών, όπως φαίνεται στο Σχήμα 12.1. Καθένας από αυτούς έχει κάποια ιδιαίτερα χαρακτηριστικά και επιλέγεται βάσει αυτών και η ανάλογη εφαρμογή. Ο ιδανικός αναλυτής θα πρέπει να μπορεί να διαχωρίζει όσο το δυνατόν μικρότερες διαφορές m/z , να επιτρέπει την ανάλυση μεγάλου αριθμού ιόντων, ώστε να έχει τη μεγαλύτερη ευαισθησία και να είναι συμβατός με όλες τις τεχνικές εισαγωγής δείγματος, και ιονισμού.

Ένα πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό του αναλυτή μάζας είναι η **διαχωριστική του ικανότητα (Resolution, R)**, η οποία δίνεται από τη σχέση:

$$R = m/\Delta m \quad (1)$$

όπου:

Δm η διαφορά μαζών δύο διαδοχικών κορυφών και

m η μάζα της πρώτης κορυφής.

Δύο κορυφές θεωρείται ότι διαχωρίζονται όταν το ύψος της βασικής γραμμής μεταξύ τους είναι μικρότερο του 10% του ύψους τους. Επομένως, ένας φασματογράφος μαζών με διαχωριστική ικανότητα 1.000 μπορεί να διαχωρίσει το ιόν με τιμή m/z 100.1 από το 100.2 ή το ιόν με τιμή m/z 1001 από το 1000. Η διαχωριστική ικανότητα ενός φασματογράφου μαζών κατηγοριοποιεί τα όργανα σε χαμηλής και υψηλής διαχωριστικής ικανότητας.

Η υψηλή διαχωριστική ικανότητα π.χ. $R=300.000$ και η υψηλή ευαισθησία δεν μπορούν να επιτευχθούν ταυτόχρονα. Για το λόγο αυτό σε όργανα πολύ υψηλής διαχωριστικής ικανότητας επιλέγεται συχνά από τον αναλυτή η λειτουργία σε χαμηλότερη διαχωριστική ικανότητα π.χ. $R=60.000$, όταν απαιτείται υψηλή ευαισθησία.

Τα βασικά χαρακτηριστικά των αναλυτών μάζας στα διάφορα είδη αυτών φαίνονται στον **Πίνακα 12.2**.

12.3. Τεχνικές Ανάλυσης στη Φασματογραφία Μαζών

Οι κύριες τεχνικές ανάλυσης που χρησιμοποιούνται στη φασματομετρία μαζών είναι: α) η τεχνική πλήρους σάρωσης (Full Scan), β) η τεχνική της επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων (Single Ion Monitoring-SIM), και γ) η φασματομετρία μαζών σε σειρά (Tandem Mass Spectrometry, MS/MS), η οποία διακρίνεται σε άλλες

υποκατηγορίες τεχνικών σάρωσης, όπως π.χ. η τεχνική της παρακολούθησης επιλεγμένων αντιδράσεων (Selected Reaction Monitoring-SRM ή Multiple Reaction Monitoring-MRM).

12.3.1. Τεχνική Πλήρους Σάρωσης

Στην τεχνική πλήρους σάρωσης (Full Scan) λαμβάνεται το ολικό φάσμα μεταξύ δύο τιμών m/z για καθορισμένο χρόνο. Η πλήρης σάρωση βοηθάει στον προσδιορισμό της δομής/ταυτότητας μιας άγνωστης ένωσης με προσδιορισμό του μοριακού της βάρους ή σύγκριση με πρότυπα φάσματα. Αυξάνοντας το χρόνο σάρωσης, αυξάνεται η ευαισθησία της μέτρησης, καθώς αυξάνεται ο συνολικός αριθμός των ιόντων τα οποία φθάνουν στον ανιχνευτή. Η αύξηση της ευαισθησίας επιτυγχάνεται με μείωση του εύρους σάρωσης ή με αύξηση του χρόνου σάρωσης. Στην πρώτη περίπτωση όμως, είναι δυνατόν να χαθούν πληροφορίες.

Χαρακτηριστικό	Q	TOF	IonTrap	FTMS
Εύρος μαζών	5	10	5	7
Διαχωριστική Ικανότητα	4	8	6	10
Ευαισθησία	7	9	7	8
Δυνατότητα ολικής ανίχνευσης	5	10	7	5
Αποθήκευση ιόντων	5		10	6
Ταχύτητα σάρωσης	7	10	9	3
Δυναμική Περιοχή	9	3	8	8
Ποσοτικοποίηση	8	5	5	6
Δυνατότητα αλληπάλληλων πειραμάτων MS/MS	4	5	10	8
Εισαγωγή δείγματος	9	9	8	5
Απλότητα	10	8	8	3
Συμβατότητα με αναλυτικές τεχνικές διαχωρισμού	10	10	8	5
Λόγος απόδοσης προς τιμή	8	8	8	6

Πίνακας 12.2. Σύγκριση αναλυτών μάζας με κατά προσέγγιση βαθμολόγηση από το 1 έως το 10 των σημαντικών χαρακτηριστικών τους (εύρος αναλυόμενων μαζών, διαχωριστική ικανότητα, ευαισθησία κλπ.)

12.3.2. Τεχνική Επιλεκτικής Παρακολούθησης Ιόντων

Εάν η ανάλυση αποσκοπεί στη μέτρηση ενώσεων με γνωστά φάσματα χρησιμοποιείται η τεχνική της επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων. Για ένα συγκεκριμένο συστατικό επιλέγονται κάποια χαρακτηριστικά ιόντα του φάσματός του και ο αναλυτής μεταβαίνει τάχιστα από τη μια μάζα στην άλλη, μετρώντας μόνον αυτές. Η τεχνική αυτή προσφέρει μεγάλη ευαισθησία, αλλά υπάρχει ο κίνδυνος για ψευδώς θετικά αποτελέσματα, καθώς οποιαδήποτε ένωση δίνει το συγκεκριμένο ιόν μπορεί να συμπεροδιοριστεί.

12.3.3. Τεχνική Φασματομετρίας Μαζών σε σειρά

Η φασματομετρία μαζών σε σειρά (Tandem Mass Spectrometry, MS/MS) περιλαμβάνει δύο ή περισσότερα επίπεδα φασματομετρικής ανάλυσης. Σε τριπλά τετράπολα ή υβρίδια (πχ. Q-TOF, IT-TOF, IT-Orbitrap), τα επιμέρους τμήματα μπορούν να επιλέξουν ένα ιόν να περάσει ή να μεταφέρουν όλα τα ιόντα. Μεταξύ των επιπέδων MS τα ιόντα μπορούν να υποβληθούν σε διάφορες διαδικασίες, όπως σύγκρουση με αδρανή ή δραστικά αέρια, ηλεκτρόνια ή άλλα ιόντα, επιτάχυνση, επιβράδυνση, σταθεροποίηση κτλ. Η επιλογή ανάμεσα στους διάφορους αναλυτές MS σάρωσης ή μη σάρωσης και ανάμεσα στις διάφορες διαδικασίες στις οποίες υποβάλλονται τα ιόντα μεταξύ των αναλυτών, παρέχει τη δυνατότητα πραγματοποίησης πολυάριθμων πειραμάτων MS/MS, τα οποία μπορούν να προσφέρουν πολύτιμη πληροφορία για τη δομή της αναλυόμενης ένωσης και να αυξήσουν την ευαισθησία και την ειδικότητα της μέτρησης.

Η φασματομετρία μάζας σε σειρά είναι η συχνότερα χρησιμοποιούμενη σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες τεχνικές φασματομετρίας μάζας. Η Φασματομετρία Μάζας σε σειρά μπορεί να πραγματοποιηθεί στο χώρο ή στο χρόνο. Για πειράματα φασματομετρίας μαζών σε σειρά στο χώρο (Tandem Mass Spectrometry in Space), απαιτούνται τουλάχιστον δύο αναλυτές μαζών. Η πιο κοινή διαμόρφωση είναι το τριπλό τετράπολο το οποίο χρησιμοποιεί δύο τετράπολα (Q1, Q3) ως αναλυτές MS για την ανάλυση MS. Το

ενδιάμεσο τετράπολο (Q2) χρησιμοποιείται ως χώρος θραύσης των ιονισμένων μορίων και πληρώνεται με αέριο σύγκρουσης (collision gas) που είναι, συνήθως, αδρανές αέριο όπως το αργό.

Ο συνδυασμός τετραπόλου με παγίδες ιόντων ή αναλυτή χρόνου πτήσης στη θέση του τελικού αναλυτή (αντί δηλαδή του Q3) επιτρέπει τη λήψη φασμάτων υψηλής διαχωριστικής ικανότητας καθώς και πειράματα MSⁿ. Αυτή η οργανολογία επιτρέπει αναλύσεις υψηλών απαιτήσεων και εφαρμόζεται, κυρίως, για ερευνητικούς σκοπούς ή για την ανάπτυξη νέων μεθόδων. Λόγω εγγενών περιορισμών, που η ανάπτυξή τους δεν είναι στόχος του παρόντος κειμένου, τα όργανα Q-q-ToF καλύπτουν μικρότερη δυναμική περιοχή (γραμμικότητα) σε σχέση με το τριπλό τετράπολο (Q-Q-Q). Το τριπλό τετράπολο υστερεί σχετικά στη λειτουργικότητα, αλλά είναι λιγότερο απαιτητικό όργανο τόσο σε κόστος αγοράς όσο και στη λειτουργία του, ενώ μέσω των δυνατοτήτων MS/MS που αναπτύσσονται παρακάτω, προσφέρει την υψηλότερη ευαισθησία, ειδικότητα και γραμμική περιοχή για την ποσοτική ανάλυση γνωστών ενώσεων στόχων.

Τα όργανα που χρησιμοποιούνται στη φασματομετρία μαζών σε σειρά στο χρόνο (Tandem Mass Spectrometry in Time) είναι οι παγίδες ιόντων και οι αναλυτές FT-MS (αναλυτής μαζών κυκλοτρονικού συντονισμού ιόντων ή Orbitrap με μετασχηματισμό Fourier). Τα ιόντα μπορούν να επιλεγούν και να αποθηκευτούν στον αναλυτή, να διασπαστούν και τα παραγόμενα ιόντα να αναλυθούν κατά τη διάρκεια ενός δεύτερου πειράματος MS, στον ίδιο αναλυτή. Οπότε, τα δύο πειράματα διαχωρίζονται στο χρόνο και όχι στο χώρο, όπως συμβαίνει στην περίπτωση άλλων αναλυτών MS. Το πλεονέκτημα στην περίπτωση αυτή είναι η δυνατότητα πραγματοποίησης πειραμάτων MSⁿ. Πρακτικά το n μπορεί να φτάσει την τιμή 8, αλλά έχουν αναφερθεί και η δυνατότητα για πειράματα με τιμή n=12.

Ένας περιορισμός των παγίδων είναι η αδυναμία συλλογής θυγατρικών ιόντων με m/z μικρότερο το 1/3 σε σχέση με το πρόδρομο ιόν. Γενικά τα φάσματα MS/MS που λαμβάνονται σε παγίδες μπορεί να διαφέρουν σημαντικά από φάσματα MS/MS που λαμβάνονται σε τετράπολα ή Q-TOF.

Στη φασματομετρία MS/MS υπάρχει η δυνατότητα εφαρμογής διάφορων πειραμάτων σάρωσης:

α. Σάρωση Παραγόμενων Ιόντων (Product Ion Scan)

Η σάρωση παραγόμενων ιόντων είναι από τις πιο συχνά εφαρμοζόμενες διαδικασίες σάρωσης στην MS/MS. Είναι γνωστή και ως «σάρωση θυγατρικού ιόντος» (Daughter Ion Scan). Σε αυτήν ο πρώτος αναλυτής μαζών (π.χ. τετράπολο Q1) χρησιμοποιείται για την επιλογή ενός ιόντος-πρόδρομο ιόν (precursor ion)-και το οποίο στη συνέχεια οδηγείται στο χώρο θραύσης (Q2, (collision cell)). Εκεί λόγω της υψηλής ενέργειας και της παρουσίας αερίου (αργό ή άζωτο) λαμβάνουν χώρα συγκρούσεις του πρόδρομου ιόντος με τα μόρια του αερίου και θραυσματοποίηση του πρόδρομου ιόντος σε φορτισμένα θραύσματα (ιόντα) και ένα ή περισσότερα ουδέτερα μόρια. Τα παραγόμενα ιόντα στη συνέχεια διέρχονται από τον επόμενο αναλυτή μαζών (Q3), ο οποίος λειτουργεί σε πλήρη σάρωση. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται «διάσπαση επαγόμενη από σύγκρουση» (Collision-Activated Dissociation, CAD ή collision induced Dissociation).

Τα πειράματα αυτά παρέχουν πληροφορίες για τη δομή μιας ένωσης και χρησιμοποιούνται για την εξέταση πολύπλοκων μιγμάτων (π.χ. βιολογικά δείγματα) υστερούν, όμως, λόγω της αργής σάρωσης, με αποτέλεσμα να μην ευνοείται η εφαρμογή τους σε ποσοτικές αναλύσεις. Χρησιμοποιούνται για την ποσοτική αποτίμηση ενώσεων σε περίπλοκα δείγματα συνήθως σε συνδυασμό με άλλες τεχνικές MS/MS. Στο **Σχήμα 12.4** δίνεται σχηματικά η πορεία του πειράματος.

β. Σάρωση Πρόδρομου Ιόντος (Precursor Ion Scan)

Τα ιόντα εισέρχονται στο τετράπολο Q1 το οποίο λειτουργεί σε πλήρη σάρωση. Στη συνέχεια, τα ιόντα εισέρχονται στο τετράπολο Q2, όπου υπόκεινται σε διάσπαση, σχηματίζοντας θυγατρικά ιόντα. Το τετράπολο Q3 στο δεύτερο στάδιο ανάλυσης επιτρέπει μόνο σε θυγατρικά συγκεκριμένου λόγου m/z, να εξέλθουν προς τον ανιχνευτή. Το φάσμα μαζών που προκύπτει, δείχνει τα μητρικά ιόντα που διασπάστηκαν για την παραγωγή του επιλεγμένου θυγατρικού ιόντος. Ο τύπος αυτός σάρωσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μελέτες σχετικές με τη δομή και τη θραυσματοποίηση μιας ένωσης. Στο **Σχήμα 12.4** δίνεται σχηματικά η πορεία του πειράματος.

γ. Σάρωση για την Ανίχνευση Απώλειας Ουδέτερου Μορίου (Constant Neutral Loss Scan, CNL)

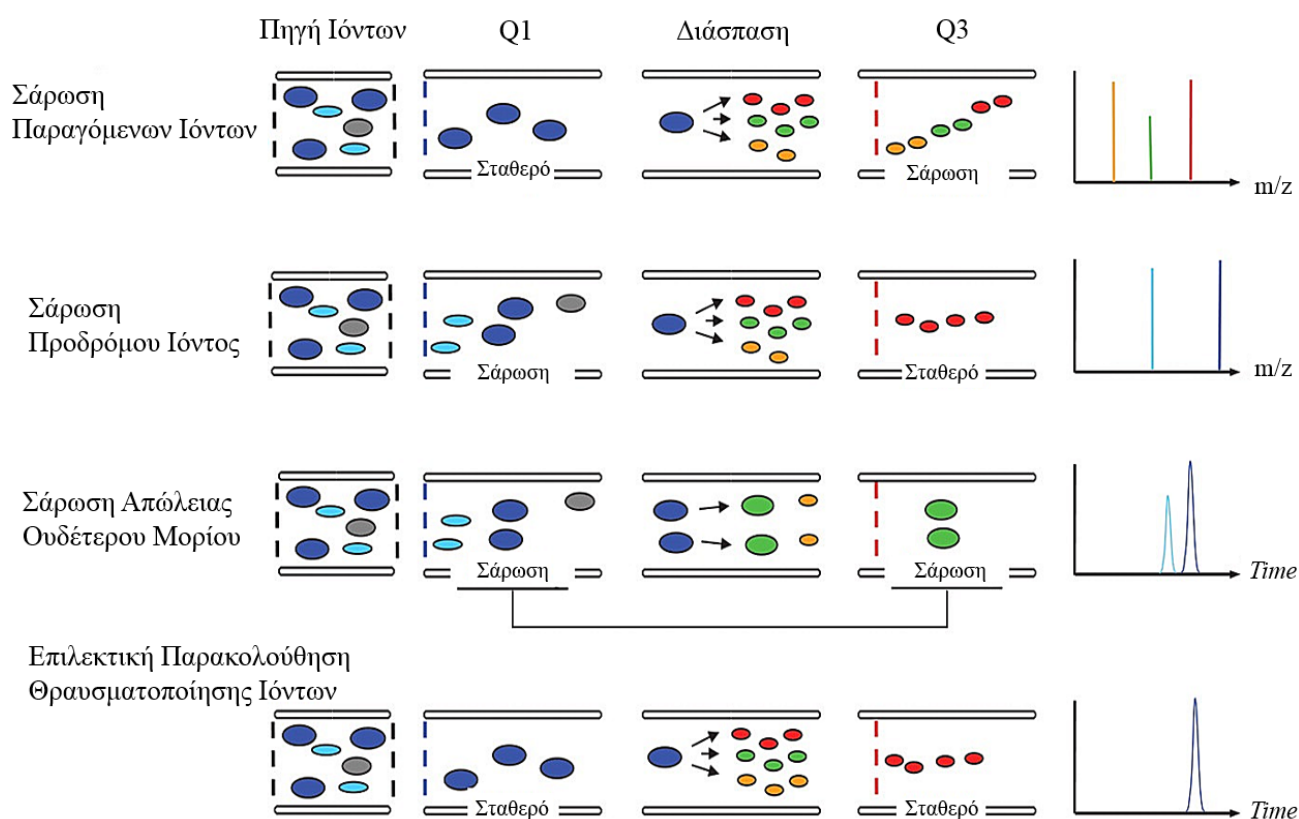
Οι δύο αναλυτές (τετράπολο Q1 και Q3) σαρώνουν με καθορισμένη διαφορά μάζας (m/z του Q1 > m/z του Q3). Ανιχνεύονται μόνον τα ιόντα τα οποία χάνουν αυτήν τη συγκεκριμένη μάζα στο θάλαμο θραύσης. Το

πείραμα παρέχει τη δυνατότητα να ανιχνευθούν παραγόμενα ιόντα, τα οποία προέρχονται από μια κατηγορία ενώσεων, με παρόμοια δομικά χαρακτηριστικά. Χρησιμοποιείται για αναλύσεις συγγενών ενώσεων οι οποίες μοιράζονται ίδια δομικά στοιχεία, όπως για παράδειγμα διάφορες κατηγορίες λιπιδίων. Η πορεία της μέτρησης στο πείραμα *Σάρωσης* για την Ανίχνευση Απώλειας Ουδέτερου Μορίου, δίνεται στο **Σχήμα 12.4**.

δ. Επιλεκτική Παρακολούθηση Θραυσματοποίησης Ιόντων

Στα πειράματα αυτά παρακολουθείται μια συγκεκριμένη αντίδραση θραυσματοποίησης ενός ιόντος ή μια ομάδα αντιδράσεων θραυσματοποίησης. Όταν επιλέγεται μία μόνο αντίδραση θραυσματοποίησης (ένα πρόδρομο ιόν προς ένα παραγόμενο ιόν), η μέθοδος ονομάζεται «επιλεκτική παρακολούθηση αντίδρασης θραυσματοποίησης ιόντων» (Single Reaction Monitoring, SRM) και παρέχει υψηλή εκλεκτικότητα και ευαισθησία, εξαιτίας της μείωσης του υποβάθρου του σήματος (χημικού θορύβου). Όταν επιλέγονται δύο ή περισσότερα χαρακτηριστικά θραύσματα, η τεχνική ονομάζεται «παρακολούθηση πολλαπλών αντιδράσεων θραυσματοποίησης ιόντων» (Multiple Reaction Monitoring, MRM). Με το πείραμα αυτό επιτυγχάνεται γρήγορη σάρωση και υψηλή εκλεκτικότητα, καθώς για να παρεμποδίσει μια ένωση τη μέτρηση, θα πρέπει συγχρόνως να σχηματίσει μητρικό ιόν του ίδιου λόγου m/z με την ένωση-στόχο και να σχηματίσει τα ίδια θυγατρικά ιόντα κατά τη διάσπασή της. Το υπόβαθρο θορύβου είναι χαμηλό, άρα ένα συγκεκριμένο σήμα αντιστοιχεί σε πολύ υψηλότερο λόγο σήματος προς θόρυβο (S/N), αυξάνοντας την ευαισθησία της μεθόδου.

Η πορεία της μέτρησης στο πείραμα *Παρακολούθησης Θραυσματοποίησης Ιόντων* δίνεται στο **Σχήμα 12.4**.



Σχήμα 12.4. Από πάνω προς τα κάτω: α) Πείραμα Σάρωσης Παραγομένων Ιόντων, β) Πείραμα σάρωσης Προδρόμου Ιόντος, γ) Πείραμα για Ανίχνευση Απώλειας Ουδέτερου Μορίου δ) Πείραμα Επιλεκτικής Παρακολούθησης Αντιδράσεων Θραυσματοποίησης Ιόντων [Domon & Aebersold, 2006]

12.4. Φάσμα Μαζών

Το φάσμα μαζών είναι το γράφημα της (σχετικής) έντασης ως προς το λόγο μάζας προς φορτίο (m/z). Η κορυφή του φάσματος που έχει τη μεγαλύτερη ένταση καλείται **κύρια κορυφή (base peak)**. Συνήθως, τα φάσματα εστιάζονται και ρυθμίζονται με βάση την κύρια κορυφή, οπότε το γράφημα προσαρμόζεται ως προς

το ύψος της κύριας κορυφής και οι εντάσεις και τα ύψη των υπόλοιπων κορυφών προβάλλονται σε σχέση με την κύρια κορυφή. Η μοριακή κορυφή (molecular peak) είναι η κορυφή που αντιστοιχεί στη σχετική μοριακή μάζα της αναλυόμενης ένωσης.

Πέρα από αυτές τις κορυφές, άλλοι τύποι κορυφών που συχνά διακρίνονται είναι: θυγατρικές κορυφές, κορυφές ισοτόπων και κορυφές του υποστρώματος-θορύβου. Οι θυγατρικές κορυφές είναι οι κορυφές που αντιστοιχούν στα ιόντα τα οποία προέρχονται από τη θραύση των μοριακών ιόντων. Συχνά οι θυγατρικές κορυφές μπορεί να είναι οι κύριες κορυφές. Αυτό συμβαίνει ιδιαίτερα σε εφαρμογές ιονισμού ηλεκτρονίων.

Κορυφές ισοτόπων λαμβάνουμε από τα ισότοπα στοιχείων, όπως π.χ. τα δύο ισότοπα του χλωρίου: ^{35}Cl , ^{37}Cl . Τα δύο αυτά ισότοπα βρίσκονται στη φύση σε αναλογία 75% και 25% αντίστοιχα. Οι κορυφές ισοτόπων παίζουν σημαντικό ρόλο στον προσδιορισμό μοριακών μαζών, στην επεξεργασία των φασμάτων και στην ταυτοποίηση αγνώστων ενώσεων.

Οι κορυφές του υποστρώματος και του θορύβου μπορεί να οφείλονται σε γνωστά και πολύ διαδεδομένα μόρια, όπως νερό, άζωτο ή μόρια που εισέρχονται στο αναλυτικό σύστημα από διάφορες πηγές π.χ. ατμούς λαδιών από τις αντλίες κενού, ολιγομερή και μονομερή ή πρόσθετα από πλαστικά σκεύη κλπ. Στις τεχνικές ιονισμού με εκρόφηση, λαμβάνουμε πολύ έντονες κορυφές υποστρώματος π.χ. από τη γλυκερόλη στο FAB ή από το νικοτινικό οξύ στο MALDI.

Κορυφές προσθήκης είναι οι κορυφές που λαμβάνονται κατά την προσθήκη διαφόρων μορίων π.χ. νερού (+18), αμωνίου (+17), νατρίου (+23), ακετονιτριλίου ή άλλου ιόντος/μορίου στα αναλυόμενα ιόντα.

Πρέπει να τονιστεί ότι το φάσμα μαζών εξαρτάται από την τεχνική ιονισμού και τις συνθήκες που εφαρμόζονται· αλλαγές σε αυτές επιφέρουν μεγάλες αλλαγές στο φάσμα μια ένωσης.

12.5. Εφαρμογές

12.5.1. Προσδιορισμός Μοριακών Μαζών

Η πρώτη και η πιο σημαντική πληροφορία που αποζητούμε από τα φάσματα είναι η σχετική μοριακή μάζα (το μοριακό βάρος) της ένωσης που αναλύουμε. Συχνά, αυτό επιβεβαιώνεται από την ύπαρξη κορυφών προσθήκης ή αφαιρέσης:

M-2 (απώλεια H_2)	M+17 (προσθήκη NH_4),
M-15 (απώλεια CH_3)	M+22 (προσθήκη Na),
M-18 (απώλεια H_2O)	M+38 (προσθήκη K)
	M+39 (προσθήκη Ca)

Ο χαρακτηρισμός ενός ιόντος ως μοριακή κορυφή δεν πρέπει να γίνεται αυτόματα, ιδιαίτερα στην ανάλυση άγνωστων δειγμάτων. Σημαντικό ρόλο παίζουν η γνώση για το δείγμα και οι πιθανές ταυτότητες των αναλυόμενων ενώσεων. Σε κάποιες περιπτώσεις επιβάλλεται και η ανάλυση του ίδιου δείγματος με δύο ή και περισσότερες τεχνικές ιονισμού και συλλογή περαιτέρω πληροφοριών από το λογισμικό του οργάνου.

Στην ανάλυση μεγαλομορίων για εύρεση μοριακής μάζας, η φασματομετρία μαζών προσφέρει ακρίβεια, ταχύτητα και ευκολία σε σχέση με άλλες αναλυτικές τεχνικές.

Κατά τον ιονισμό της, μια πρωτεΐνη, φορτίζεται πολλαπλώς, μειώνοντας έτσι το λόγο m/z. Για παράδειγμα, μια πρωτεΐνη με μοριακή μάζα 5.500 dalton, φορτιζόμενη σε 10 σημεία, θα εμφανίσει κορυφή σε m/z 550, η οποία μπορεί εύκολα να μετρηθεί από οποιοδήποτε αναλυτή μαζών.

Στο **Σχήμα 12.5** δίνεται το ESI φάσμα πρωτεΐνης. Παρατηρούμε την κατανομή των ιόντων από 2274 amu έως 853 amu. Χρησιμοποιώντας τα στοιχεία από δύο οποιοσδήποτε διαδοχικές κορυφές, μπορεί να βρεθεί το μοριακό βάρος της ένωσης. Για παράδειγμα ισχύει:

$$1364.8 = (MW+n)/n$$

$$1137.5 = (MW+n+1)/(n+1)$$

Από το σύστημα δύο εξισώσεων με δύο αγνώστους, λύνουμε ως προς MW.

12.5.2. Προσδιορισμός Μοριακών Τύπων-Μοριακής Δομής

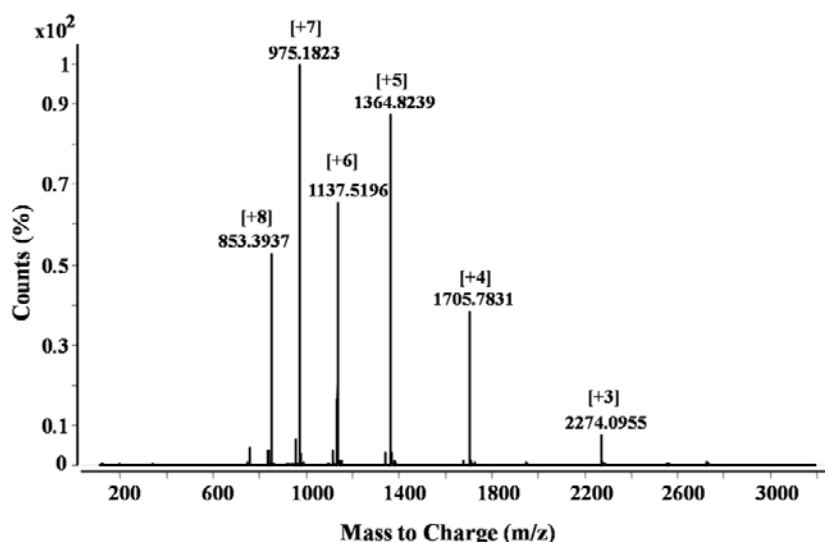
Ο προσδιορισμός του τύπου και της δομής μιας άγνωστης ένωσης είναι ένα από τα πιο δύσκολα καθήκοντα ενός χημικού. Η Φασματομετρία Μαζών είναι μαζί με τη Φασματομετρία Πυρηνικού Συντονισμού τα πιο αξιόπιστα και πολύτιμα εργαλεία για μια τέτοια εργασία. Η γνώση της ακριβούς μάζας ενός μορίου είναι σημαντική και θεμελιώδης πληροφορία, όμως δεν αρκεί για την εύρεση μοριακών τύπων και μοριακής δομής. Συχνά απαιτούνται πειράματα θραύσης του μορίου, ώστε να συλλεχθεί δομική πληροφορία (MS-MS product scan). Οι λόγοι των ισοτοπικών κορυφών σε πρόδρομο και προϊόν ιόν δίνουν επιπλέον στοιχεία. Φάσματα που έχουν ληφθεί σε όργανα υψηλής διαχωριστικής ικανότητας, εισάγονται σε λογισμικό που αναλύει τις κορυφές προσθήκης (adducts) και επιτυγχάνει ανάλυση (αποσυνέλιξη) του σήματος. Στη συνέχεια ακολουθεί χρήση βιβλιοθηκών φασμάτων για τη σύγκριση με πρότυπα φάσματα, όπως περιγράφεται στην επόμενη παράγραφο.

12.5.3. Ταυτοποίηση με Σύγκριση Φασμάτων (Data Libraries)

Οι βιβλιοθήκες φασμάτων χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: τις εμπορικές, τις τοπικές που δημιουργεί ο κάθε αναλυτής στο όργανο και τις κοινόχρηστες που είναι διαθέσιμες στο διαδίκτυο.

Οι τοπικές βιβλιοθήκες φασμάτων δημιουργούνται με την ανάλυση πρότυπων ουσιών στο όργανο. Μέσα στη λειτουργία του οργάνου και του λογισμικού δίνεται η δυνατότητα της δημιουργίας νέας βάσης δεδομένων ή της προσθήκης δεδομένων στη βάση. Στην περίπτωση του LC-MS πρέπει να δίνεται προσοχή στην εξής προϋπόθεση: για να είναι συγκρίσιμα τα φάσματα πρέπει να λαμβάνονται αυτά στις ίδιες συνθήκες (διαλύτες, τιμή pH κλπ.).

Οι εμπορικές βιβλιοθήκες φασμάτων έχουν δημιουργηθεί από εταιρίες/οργανισμούς ως βάσεις δεδομένων των αναλύσεων χιλιάδων ενώσεων με ιονισμό ηλεκτρονίων. Αποθηκεύονται φάσματα που έχουν ληφθεί από πιστοποιημένα εργαστήρια και είναι γενικές βιβλιοθήκες (NIST, Willey) ή ειδικές, με εφαρμογή σε ορισμένα πεδία (Maurer Toxicology, Fiehn Metabolomics).



Σχήμα 12.5. ESI φάσμα πολυφορτισμένης πρωτεΐνης: χαρακτηριστική είναι η κωδωνοειδής κατανομή των ιόντων από τα λιγότερο φορτισμένα (υψηλά m/z) προς τα περισσότερο φορτισμένα (χαμηλά m/z) [Munawar et al., 2014].

Οι ανοιχτές βάσεις δεδομένων που φιλοξενούνται στο διαδίκτυο, ουσιαστικά δεν ελέγχονται και μπορεί οποιοσδήποτε εγγεγραμμένος ερευνητής να συνεισφέρει και να εισάγει δεδομένα. Επειδή πρόκειται συνήθως για δεδομένα ατμοσφαιρικού ιονισμού, η σύγκριση με αυτά δεν προσφέρει μεγάλη βεβαιότητα για την ταυτοποίηση ενώσεων. Η μέτρηση στη φασματομετρία μαζών είναι πολυδύναμη διαδικασία, η οποία επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες. Μικρές διαφορές στις συνθήκες ανάλυσης μπορεί να διαφοροποιήσουν τα αποτελέσματα σε μεγάλο βαθμό. Έτσι μπορεί να λαμβάνονται φάσματα διαφορετικής μορφής για την ίδια ένωση, ακόμα κι όταν αυτή αναλύεται με την ίδια τεχνική.

Οι βιβλιοθήκες λειτουργούν με αλγόριθμο ο οποίος συγκρίνει τα φάσματα. Ανάλογα με την ακριβή μάζα του μοριακού ιόντος, τη μάζα των κορυφών και τη σχετική ένταση αυτών προτείνονται (ανάλογα με τη ρύθμιση του προγράμματος) οι πιθανότεροι μοριακοί τύποι και πιθανές ενώσεις. Η αναζήτηση σε σύγχρονες ανοιχτές βάσεις δεδομένων (ChemSpider, HMDB, MassBank, LipidMaps, METLIN) δίνει μεγάλο αριθμό πιθανών ενώσεων (hits) από όπου ακολουθεί φιλτράρισμα με κριτήρια (π.χ. χρόνος συγκράτησης στη χρωματογραφία, φύση του μορίου κ.ά.) καθώς και επιπλέον αναλύσεις.

12.5.4. Ποσοτική Ανάλυση με Φασματομετρία μαζών

Πέραν της μεγάλης αξίας της φασματομετρίας μαζών στην ταυτοποίηση (ποιοτική ανάλυση) αγνώστων ενώσεων, πολύ σημαντική είναι η εφαρμογή της τεχνικής στον ποσοτικό προσδιορισμό γνωστών ενώσεων. Στην περίπτωση αυτή ο φασματογράφος μάζας λειτουργεί ως εξειδικευμένος ανιχνευτής. Το πλεονέκτημά του είναι η υψηλή ευαισθησία και η απόλυτη μοριακή αναγνώριση, αφού σε αντίθεση με άλλες τεχνικές ανίχνευσης οι οποίες χρησιμοποιούνται στη χρωματογραφία, θεωρείται ότι πρακτικά δεν υπάρχει πιθανότητα συμπροσδιορισμού της αναλυόμενης ένωσης με άλλες ενώσεις που μπορεί να συνεκλούνται με αυτήν. Αυτό επιτυγχάνεται, κυρίως, στη Φασματομετρία μαζών σε σειρά, όπου λόγω της εκλεκτικότητας το σήμα θορύβου είναι πολύ μικρό και έτσι αυξάνεται πολύ η ευαισθησία λόγω της αύξησης του λόγου S/N. Για το λόγο αυτό πολύ μεγάλο ποσοστό των αναλύσεων στη φαρμακευτική βιομηχανία (Βιοανάλυση, Φαρμακοκινητική, Μεταβολισμός Φαρμάκων) πραγματοποιείται με Φασματομετρία μαζών σε σειρά.

12.6. Φασματομετρική Απεικόνιση Μαζών (MS imaging)

Η Φασματομετρική Απεικόνιση Μαζών (MS imaging) αναπτύσσεται τα τελευταία χρόνια με στόχο τη λήψη πληροφοριών για τη σχετική συγκέντρωση αναλυόμενων ενώσεων σε ιστούς ή άλλα στερεά δείγματα. Η νέα γνώση που μπορεί να παραχθεί από αυτήν την τεχνική είναι η πληροφορία για την απόλυτη θέση και την κατανομή στον ιστό των μορίων στόχων π.χ. μιας πρωτεΐνης σε τμήμα φλεγμονής, πολυφαινόλων στα διάφορα τμήματα του καρπού ενός φρούτου, φαρμάκων σε τμήματα ιστών, μετά από χορήγηση ή ακόμη και της γνώσης της μοριακής ταυτότητας (σύνθεσης) των αθυρωματικών πλακών. Η ανάπτυξη της τεχνολογίας αυτής επιτρέπει την εφαρμογή MALDI-TOF και σε μικρά μόρια ή ακόμη τεχνικών, όπως DESI, στην ανάλυση στερεών επιφανειών.

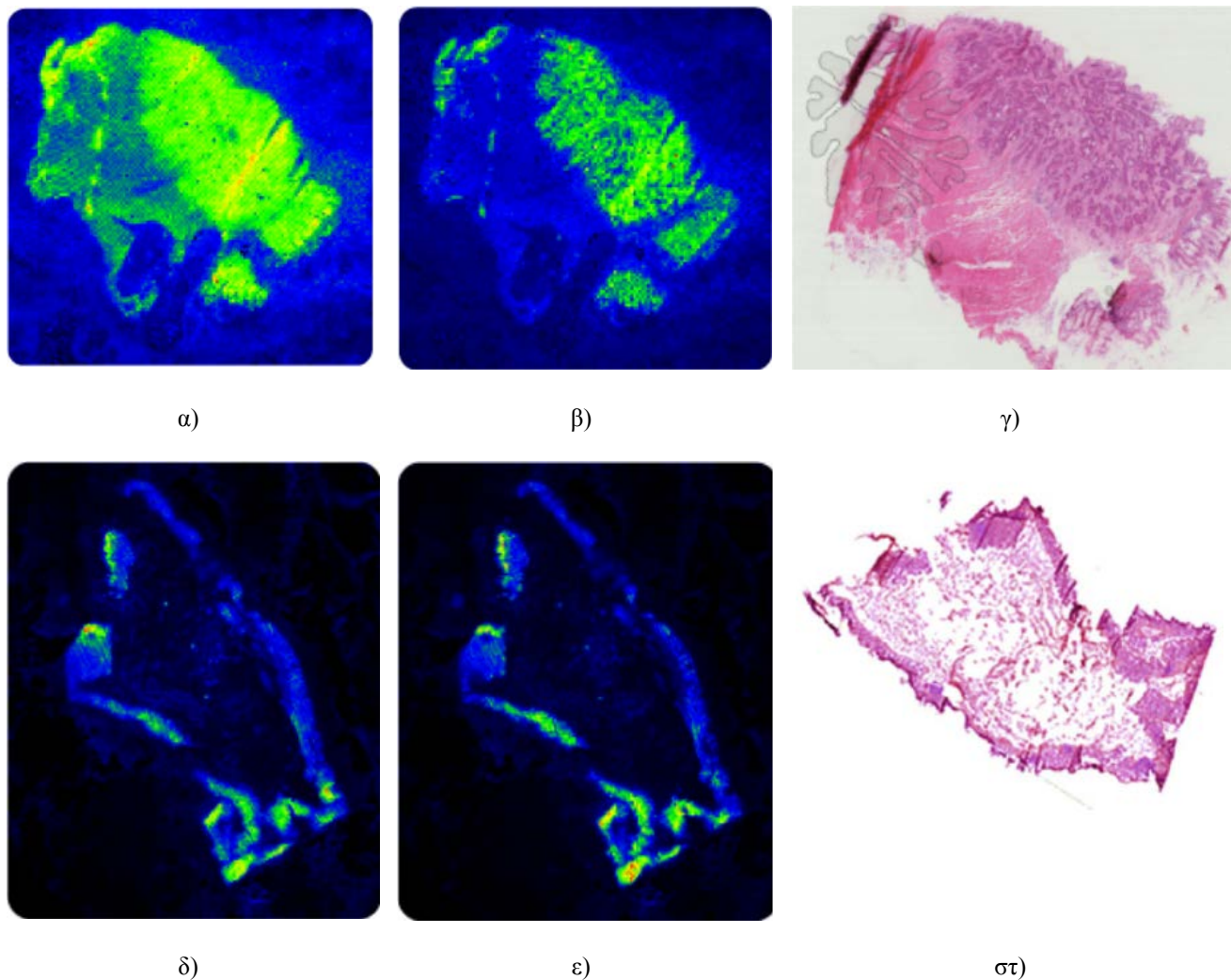
Ένα παράδειγμα στη βιοιατρική μπορεί να είναι η ανάλυση βιοδεικτών σε ιστούς υγιείς και παθολογικούς από πειραματόζωα. Με συμβατικές μεθόδους, απαιτείται μεγάλη μάζα (αρκετών mg) δείγματος και εκχύλιση για την παραλαβή των ενώσεων, οπότε σε κάποιες περιπτώσεις λαμβάνεται δείγμα ασθενούς ιστού το οποίο συνοδεύεται αναγκαστικά με (συνήα μεγάλο) μέρος και υγιούς ιστού. Το τελικό αποτέλεσμα θα είναι ο μέσος όρος των συγκεντρώσεων σε ασθενή και υγιή ιστό. Με την τεχνική φασματομετρικής απεικόνισης ιστών λαμβάνεται φάσμα ανά πολύ μικρό pixel και ουσιαστικά χαρτογραφείται η περιοχή του ενδιαφέροντος με πολύ υψηλή διαχωριστική δυνατότητα. Η ιδέα αυτή με τη μορφή DESI-MS βρίσκει, ήδη, εφαρμογή στη χειρουργική όπου το «Intelligent knife» ειδοποιεί το χειρουργό για την κατηγοριοποίηση του ιστού (καρκινικός ή μη). Ο φασματογράφος μαζών ειδοποιεί το χειρουργό με ακρίβεια ότι ο καρκινικός ιστός έχει αφαιρεθεί και ο ιστός που βλέπει είναι υγιής οπότε πρέπει να σταματήσει την αφαίρεση.

Η τεχνική απεικόνισης βρίσκει εφαρμογή, επίσης, στη φυτοπροστασία κατά τη μελέτη της αντίδρασης καρπών σε φλεγμονές (οι οποίες μπορεί να προέρχονται π.χ. από έντομα) και τη χαρτογράφηση της κατανομής μεταβολιτών σε ιστούς/τρόφιμα. Συνήθως, η απεικόνιση στο φασματογράφο μαζών συνδυάζεται με άλλη απεικονιστική τεχνική από μικροσκόπιο (π.χ., ιστολογική, χρώση κλπ.) η οποία αναδεικνύει ιστολογικά μορφολογικά χαρακτηριστικά και με τον τρόπο αυτό συνδυάζεται η γνώση των δύο απεικονίσεων, π.χ. ισχυρό σήμα για το μόριο X στον ασθενή ιστό. Στο **Σχήμα 12.6** δίνεται παράδειγμα της χρήσης της τεχνικής απεικόνισης στο φασματογράφο μαζών για την ανάλυση καρκινικού ιστού με στόχο την εύρεση βιοδεικτών.

12.7. Εφαρμογές Φασματομετρίας Μάζας στη Βιοανάλυση

Οι εφαρμογές της φασματομετρίας MS/MS περιλαμβάνουν την αποσαφήνιση της δομής μορίων, τον ποσοτικό προσδιορισμό των αναλυόμενων ενώσεων, τη μελέτη μηχανισμών θραυσματοποίησης, τον καθορισμό της στοιχειακής σύστασης ενώσεων, την παρακολούθηση αντιδράσεων ιόντων-μορίων, καθώς και

την πραγματοποίηση αναλύσεων υψηλής εκλεκτικότητας και ευαισθησίας. Είναι το κύριο εργαλείο και αυτό που πλέον απαιτείται από τους ελεγκτικούς φορείς (EMEA, FDA USA, EPA κλπ.) για αναλύσεις μεγάλης βαρύτητας, όπως μελέτες φαρμακο-κινητικής και μεταβολισμού φαρμάκων, ποιοτικό έλεγχο φαρμακευτικών παρασκευασμάτων, ανίχνευση υπολειμμάτων φυτο-φαρμάκων σε τρόφιμα, αναβολικών και ναρκωτικών σε βιολογικά υγρά κ.ά. Εφαρμόζεται, επίσης, σε μελέτες πρωτεομικής, μεταβολομικής και βιολογίας συστημάτων (κεφάλαιο 2) και αλλού. Στην πρωτεομική επιτρέπει την ακριβή και αποτελεσματική μέτρηση της μοριακής μάζας ολόκληρων πρωτεϊνών ακόμη και πολύ μεγάλων μοριακών βαρών. Εφόσον ευρεθεί αυτή η βασική πληροφορία, ακολουθεί εφαρμογή πρωτεολυτικών ενζύμων για τη διάσπαση των πρωτεϊνών σε μικρότερα πεπτιδία και ανάλυση του προϊόντος σε LC-MS, για διαχωρισμό και μέτρηση των μοριακών μαζών των επιμέρους πεπτιδίων. Για την εύρεση πρωτοταγούς δομής με αλληλούχιση, ακολουθεί ανάλυση σε MS-MS είτε σε όργανο MALDI-TOF είτε σε LC-MS/MS, με διάσπαση των πεπτιδίων με CID.



Σχήμα 12.6. Φάσματα απεικόνισης μαζών σε ιστό: Απεικόνιση βιοδεικτών με m/z 478.25 α) και m/z 504.24 β) στο κέντρο του καρκινικού ιστού και 10 cm μακριά από αυτόν (δ και, ε αντίστοιχα). Οι εικόνες γ και στ δείχνουν την ιστολογική απεικόνιση έπειτα από κατάλληλη χρώση.

Βιβλιογραφία

Θεοδωρίδης Γ., *Φασματομετρία Μαζών σε Ειδικές και Διαχωριστικές Μέθοδοι Ανάλυσης*, εκδ. Ζήτη, Θεσσαλονίκη.

Ashcroft A.E. (1997). *Ionization Methods in Organic Mass Spectrometry*, εκδ RSC,

- Busch K.L., Glish, G.L., McLuckey S.A. (1988). *Mass Spectrometry/Mass Spectrometry, Techniques and Applications of Tandem Mass Spectrometry*, εκδ VCH.
- Domon B., Aebersold R. (2006). *Mass spectrometry and protein analysis*, Science, 312(5771), 212-217, DOI: 10.1126/science.1124619
- Gross, J.H. Roepstorff P. (2011). *Mass Spectrometry: A Textbook*, Springer.
- Gross M.L. (2012). *Mass Spectrometry in the Biological Sciences: A Tutorial*, Volume 353, Springer.
- Ewing G.W. (1997). *Analytical Instrumentation Handbook*, Marcel Dekker.
- Kellner R., Mermet J.M., Otto M., Widmer H.M. (1998). *Analytical Mass Spectrometry*, p. 603-639 in *Analytical Chemistry*, εκδ Willey.
- Munawar A., Trusch M., Georgieva D. et al. (2014). *Elapid Snake Venom Analyses Show the Specificity of the Peptide Composition at the Level of Genera Naja and Notechis*, Toxins (Basel), 6(3), 850-868.
- Niessen W.M.A. (2006). *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, 3rd edition, CRC press.
- Niessen W.M.A. (1999). *State-of-the-art in liquid chromatography mass spectrometry*, Journal of Chromatography A, 856, 179-197.
- Papadoyanis I.N., Theodoridis G. (2005). *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, pp. 921-927, κεφάλαιο από "Encyclopaedia of Chromatography" J. Cazes Ed. Marcel Dekker, NY.
- Skoog, D.A, Holler F.J., Crouch S.R., Leary J.J., Cole B. (2006). *Principles of Instrumental Analysis*, 6th Edition, κεφάλαιο 20.
- Verheij E.R., (1993). *Strategies for compatibility enhancement in liquid chromatography-mass spectrometry*, Ph.D. Leiden University.

Δικτυογραφία

Mass spectrometry	en.wikipedia.org/wiki/Mass_spectrometry
Introduction to Spectroscopy	http://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/virttxtjml/spectry/spectro.htm
Internet Resources for Mass Spectrometry	www.wiley.com/legacy/wileychi/ms/articles/jms_intres.pdf
The Mass Spectroscopy Links Page	web.mit.edu/speclab/www/Facility/MS/ms_links.html
Public Databases	
ChemSpider a free chemical structure database	www.chemspider.com/
The METLIN Metabolite Database	metlin.scripps.edu/
The Human Metabolome Database (HMDB)	www.hmdb.ca/
LIPID MAPS Lipidomics Gateway	www.lipidmaps.org/

Κεφάλαιο 13: Εφαρμογές Μεταλλομικής στη Βιοανάλυση

Γεώργιος Ζαχαριάδης

Σύνοψη

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφονται παραδείγματα από διάφορες ειδομορφικές και μεταλλομικές εφαρμογές όπου γίνεται ταυτοποίηση, χαρακτηρισμός και προσδιορισμός διαφόρων ειδών και ενώσεων μετάλλων, όπως μεταλλοπρωτεΐνες, μεταλλοθειονίνες, συζεύγματα μετάλλου-DNA, κλπ. Μια άλλη κατηγορία ενώσεων με βιοαναλυτικό και τοξικολογικό ενδιαφέρον η οποία περιλαμβάνεται στο κεφάλαιο αυτό, είναι οι οργανομεταλλικές ενώσεις και μεταβολίτες τους. Επιπλέον, περιγράφεται η σύγχρονη τεχνική του *metal-tagging*, όπου επισημασμένα με μέταλλα πρωτεϊνικά μόρια ανιχνεύονται και ταυτοποιούνται ευκολότερα με τους κατάλληλους ανιχνευτές. Στο πλαίσιο αυτό, οι διάφορες τεχνικές που παρουσιάζονται, περιλαμβάνουν συζευγμένες τεχνικές μοριακής ταυτοποίησης τύπου LC-MS ή LC-MS/MS, GC-MS, GC-MIP-AED καθώς και άλλες εξελιγμένες τεχνικές όπως ICP-MS και LA-ICP-MS, οι οποίες εκτός από την υψηλή ευαισθησία έχουν δυνατότητα στοιχειακής ή ατομικής ταυτοποίησης.

Προαπαιτούμενη γνώση

Απαραίτητη προϋπόθεση για την κατανόηση των εφαρμογών που παρουσιάζονται είναι η γνώση των αρχών των συζευγμένων τεχνικών χημικής ανάλυσης και ιδιαίτερα αυτών που συνδυάζουν κάποια διαχωριστική τεχνική με πολύ ευαίσθητους ανιχνευτές.

13.1. Γενικά για τη Μεταλλοδομική και Ειδομορφική Ανάλυση με Συζευγμένες Τεχνικές

Η σύζευξη μια φασματομετρικής τεχνικής με κάποια διαχωριστική όπως εκχύλιση υγρού-υγρού, εκχύλιση στερεής φάσης, μικροεκχύλιση στερεής φάσης, αέρια χρωματογραφία, υγρή χρωματογραφία, ιοντική χρωματογραφία, χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους, τριχοειδής ηλεκτροφόρηση, κλπ. πολλαπλασιάζει τις δυνατότητες ταυτοποίησης των ουσιών σε ένα βιολογικό υλικό.

Μελέτη δομής με βιβλιοθήκες φασμάτων: Για την ταυτοποίηση των πιθανών μορφών των ιόντων με βάση το λαμβανόμενο φάσμα μαζών, στις τεχνικές της Φασματομετρίας Μάζας και στις συζευγμένες τεχνικές όπου το φασματόμετρο μάζας χρησιμοποιείται ως ανιχνευτής, είναι ιδιαίτερα χρήσιμες οι ηλεκτρονικές βάσεις δεδομένων (βιβλιοθήκες φασμάτων, libraries) που περιλαμβάνουν αρκετές χιλιάδες ή και δεκάδες χιλιάδες φασμάτων. Έτσι, σε κάθε μέτρηση το λαμβανόμενο φάσμα μαζών συγκρίνεται με αυτόματο τρόπο με όλα τα φάσματα της βιβλιοθήκης και εντοπίζονται εκείνες οι δομές που πλησιάζουν περισσότερο και έχουν όμοιο ή παρόμοιο φάσμα μαζών. Στη συνέχεια, ιεραρχούνται με βάση την ομοιότητά τους και προτείνονται οι πιθανότερες από αυτές ιεραρχικά, όπως φαίνεται στο σχήμα που ακολουθεί, όπου γίνεται σύγκριση ενός φάσματος μαζών που λαμβάνεται με την τεχνική της GC-MS και του εγγύτερου από τη βάση των φασμάτων. Εννοείται ότι για την οριστική ταυτοποίηση της ένωσης απαιτούνται και επιπλέον διαδικασίες.

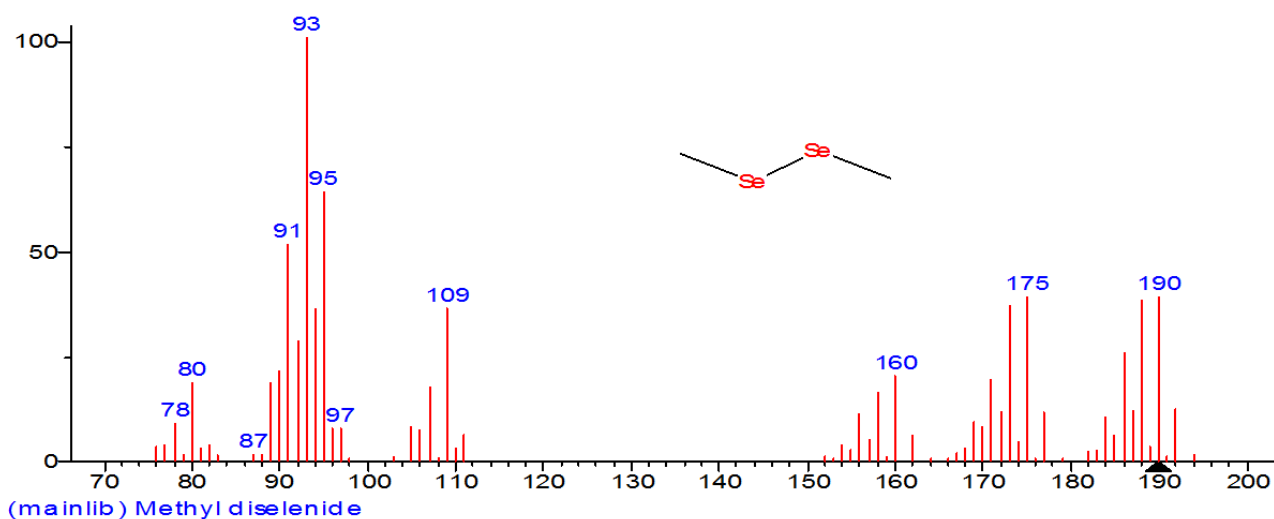
Ωστόσο, ενώ έχουν αναπτυχθεί αρκετές πλούσιες σε περιεχόμενο γενικές αλλά και ειδικές βάσεις φασμάτων μαζών από ενώσεις που μετρώνται με την τεχνική της GC-MS, δε συμβαίνει το ίδιο και στην περίπτωση της LC-MS. Αυτό οφείλεται: α) στο γεγονός ότι ένα φάσμα μαζών που λαμβάνεται από την τεχνική της GC-MS είναι αρκετά καθαρό από άλλα ιόντα ή ενώσεις προσθήκης (adducts), επειδή εκτός από το ήλιο που είναι το φέρον αέριο, δεν υπάρχει άλλη ουσία στην κινητή φάση, β) στο ότι στα λαμβανόμενα χρωματογραφήματα είναι συχνά πολύ καλύτερος ο διαχωρισμός των ενώσεων, που κατά τεκμήριο είναι πτητικές ή μετατρέπονται σε πτητικά παράγωγα, γ) στην περίπτωση της GC-MS είναι πιο διαδεδομένη η τεχνική του ιοντισμού με ηλεκτρόνια (electron ionization, EI), ενώ στην LC-MS χρησιμοποιούνται περισσότεροι εναλλακτικοί τρόποι ιοντισμού, όπως ο ESI, APCI, APPI, κλπ., με αποτέλεσμα τα φάσματα μαζών που προκύπτουν από την ίδια ένωση αλλά με διαφορετικούς τρόπους ιοντισμού, να έχουν αρκετές διαφορές μεταξύ τους. Ιδιαίτερη κατηγορία αποτελεί η τεχνική ιοντισμού MALDI η οποία χρησιμοποιείται για την άμεση εισαγωγή του βιολογικού δείγματος στο MS, με τη χρήση κατευθυνόμενης δέσμης laser

απευθείας στο κατάλληλα επεξεργασμένο βιολογικό υπόστρωμα, οπότε για την περίπτωση αυτή χρειάζεται περαιτέρω εμπλουτισμός των βάσεων με φάσματα μαζών.

Λογισμικά τύπου Profiler: Για να αντιμετωπιστεί το προαναφερόμενο πρόβλημα στην περίπτωση της LC-MS, γίνονται συνεχώς προσπάθειες για τη διευκόλυνση της ταυτοποίησης άγνωστων ενώσεων μέσω των φασμάτων μαζών τους, όπως περιγράφεται παρακάτω. Στο λογισμικό των σύγχρονων φασματομέτρων μάζας υπάρχουν ενσωματωμένοι αλγόριθμοι (τύπου profiler) οι οποίοι επιτρέπουν τη μελέτη των ιόντων που ανιχνεύονται καθώς και τον υπολογισμό των πιθανών χημικών μορφών με βάση ορισμένα κριτήρια αλλά και με πολυπαραμετρικές στατιστικές μεθόδους. Μερικά από αυτά τα κριτήρια είναι:

- ο ελάχιστος αριθμός των ατόμων άνθρακα, υδρογόνου, οξυγόνου, αζώτου, θείου, φωσφόρου, χλωρίου, άλλων αλογόνων, άλλων στοιχείων και μετάλλων,
- ο μέγιστος αριθμός των ατόμων των παραπάνω στοιχείων,
- το είδος των ισοτόπων που θα ληφθούν υπόψη, ή κάποια μέση τιμή τους,
- η πιθανότητα ακόρεστων δεσμών ή ειδικών δομών,
- η πιθανότητα ύπαρξης στο ιόν κάποιας χαρακτηριστικής ομάδας ή ομόλογης σειράς,
- ο κανόνας του αζώτου, (άρτια μάζα του ^{14}N και περιττός αριθμός 7 ηλεκτρονίων), που διευκολύνει σε σημαντικό βαθμό την επεξεργασία φασμάτων μαζών που λαμβάνονται από αζωτούχες ενώσεις.

Φασματομετρία μάζας HRMS: Ένα άλλο σημαντικό θέμα στη βιοανάλυση είναι η ακρίβεια των μετρούμενων μαζών των ιόντων που προκύπτουν μετά την έκλυση από τη χρωματογραφική στήλη και τον ιοντισμό τους. Ο αριθμός των δεκαδικών ψηφίων για την κάθε μάζα (ακριβέστερα για κάθε λόγο m/z) εξαρτάται από τη διακριτική ικανότητα του φασματομέτρου μάζας. Αν για παράδειγμα διαθέτουμε ένα απλό τετραπολικό αναλυτή στο φασματομέτρο μάζας και είναι συνδεδεμένος στην έξοδο ενός αέριου χρωματογράφου, τότε ανιχνεύουμε μάζες με ακρίβεια ακέραιου αριθμού (**Σχήμα 13.1**).

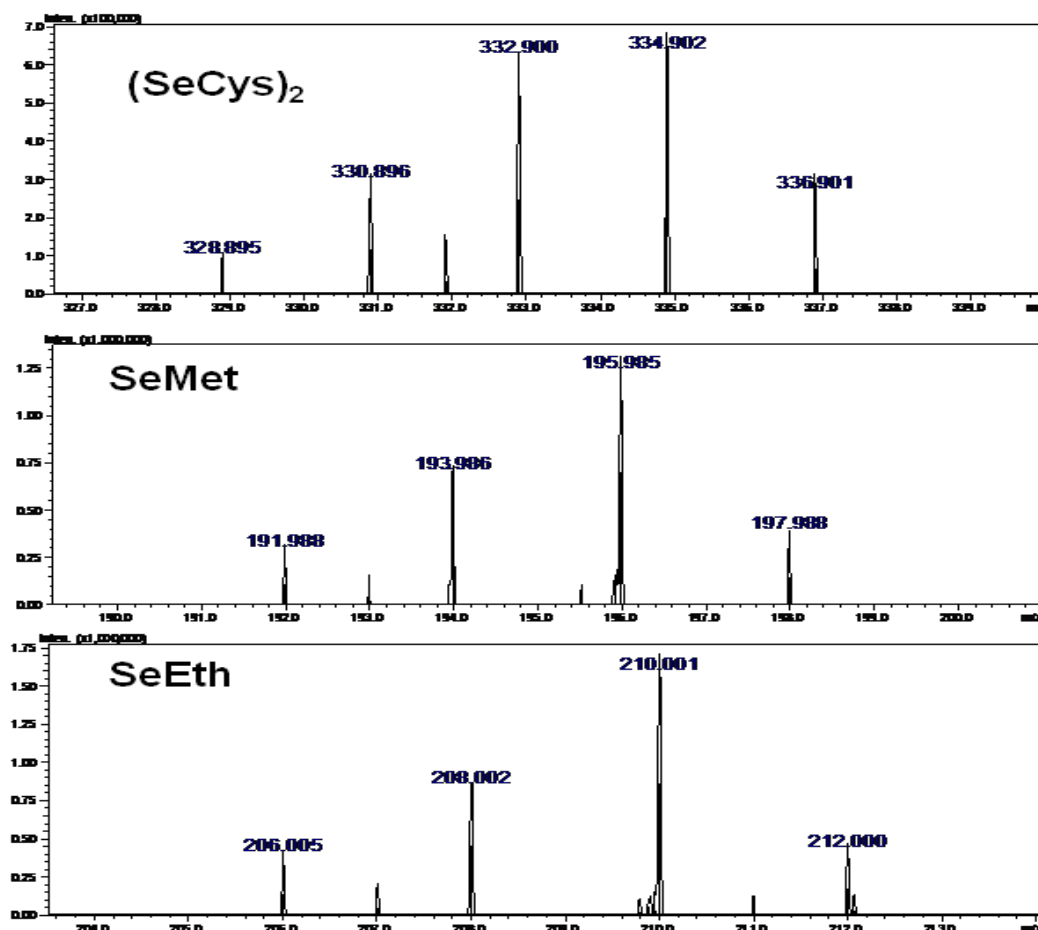


Σχήμα 13.1. Φάσμα μαζών ενός μεταβολίτη του σεληνίου (διμεθυλο-δισεληνιούχα) από GC-MS χαμηλής διακριτικής ικανότητας

Ωστόσο η ανίχνευση είναι χαμηλής διακριτικής ικανότητας. Αν, όμως, για παράδειγμα διαθέτουμε ένα «υψηλής διακριτικής ικανότητας φασματομέτρο μάζας» (High Resolution Mass Spectrometer, HRMS) ως ανιχνευτή συζευγμένο με ένα σύστημα HPLC, είναι δυνατή η ανίχνευση των μαζών με ακρίβεια τουλάχιστον μέχρι 3-4^{ου} δεκαδικού (**Σχήμα 13.2**). Αυτό διευκολύνει περαιτέρω την ακριβέστερη ταυτοποίηση, επειδή οι πιθανές εναλλακτικές δομές ιόντων αποκλείονται ευκολότερα με βάση τον αναγκαίο συνδυασμό ισοτόπων ο οποίος μπορεί να δώσει τελικά τη συγκεκριμένη μάζα.

Ποσοτικοί προσδιορισμοί πρωτεϊνών και μεταλλοπρωτεϊνών με την τεχνική metal tagging: Ένα από τα σημαντικά προβλήματα που αντιμετωπίζει όχι μόνο η μεταλλομική ανάλυση αλλά ευρύτερα η

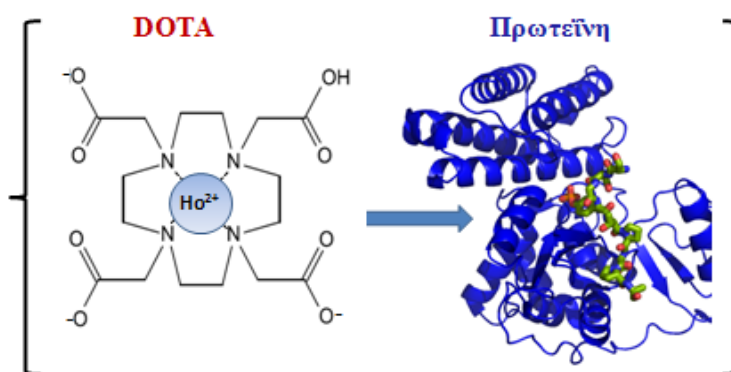
πρωτεομική ανάλυση, είναι η μετάβαση από την ανίχνευση και ταυτοποίηση των πρωτεϊνών στον ποσοτικό προσδιορισμό τους. Οι διάφορες μορφές της φασματομετρίας μάζας παρόλη την ισχυρή ανιχνευτική τους ικανότητα, δεν μπορούν να δώσουν άμεσα ακριβή ποσοτικά αποτελέσματα με βάση τα λαμβανόμενα φάσματα μαζών, γιατί όπως αναφέρθηκε ήδη, το ποσοστό των ανιχνευόμενων ιόντων (μητρικών και θυγατρικών) άρα και το εμβαδό των αντίστοιχων κορυφών εξαρτάται όχι μόνο από τον τρόπο του ιοντισμού αλλά και από τις υπόλοιπες συνθήκες που εφαρμόζονται στον εκάστοτε αναλυτή μαζών, ο οποίος εμπεριέχεται στο φασματόμετρο μάζας. Η παρεμβολή, μάλιστα, παγίδων ιόντων, κυψελών αντίδρασης με αέριο το οποίο αντιδρά με τα ιόντα, κ.ά. αποτελούν πρόσθετους παράγοντες που πρέπει να μελετώνται ως προς την επίδραση στο σήμα και να βελτιστοποιείται προσεκτικά η ποσοτική μέθοδος η οποία πρόκειται να εφαρμοστεί. Τέλος, και η παρουσία διάφορων άλλων ενώσεων μικρού, συνήθως, μοριακού βάρους στην κινητή φάση της έκλουσης η οποία δημιουργεί σύμπλοκα προσθήκης με τις προσδιοριζόμενες ενώσεις, περιπλέκει περισσότερο την ακριβή ποσοτικοποίηση. Έτσι, πέρα από τις μη εκλεκτικές φασματοφωτομετρικές μεθόδους ποσοτικού προσδιορισμού πρωτεϊνών (π.χ. Bradford, Biuret, Lowry, κ.ά.) υπάρχει ανάγκη εκλεκτικού ποσοτικού προσδιορισμού στοχευμένων πρωτεϊνών.



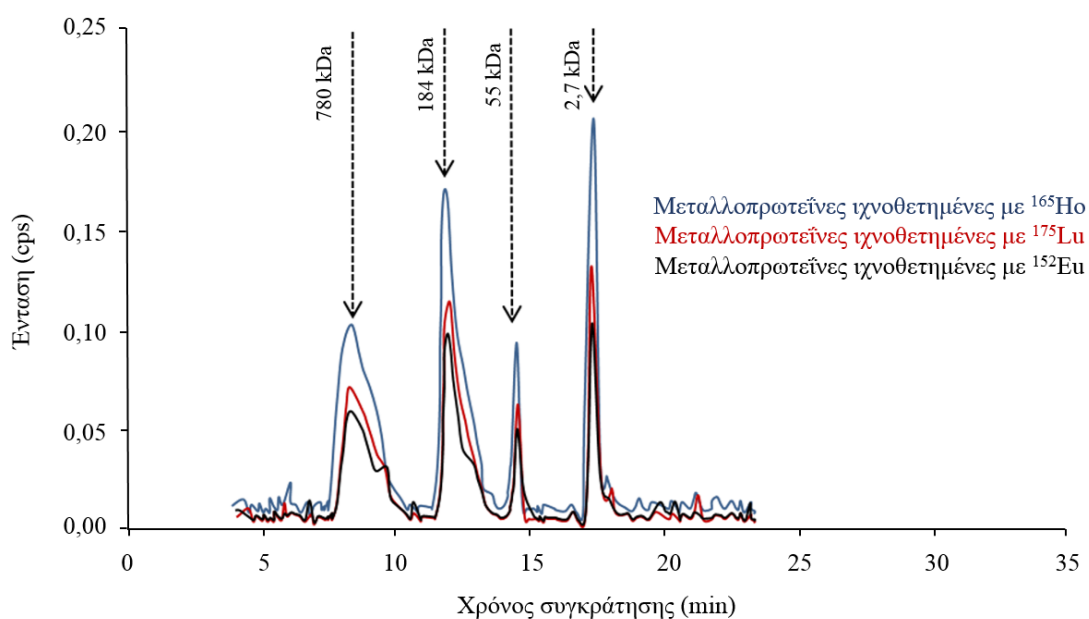
Σχήμα 13.2. Φάσμα μαζών τριών σεληνοαμινοξέων (σεληνοκυστίνη, σεληνομεθειονίνη, σεληνοεθιονίνη,) από LC-MS υψηλής διακριτικής ικανότητας

Για να αντιμετωπιστεί το παραπάνω πρόβλημα έχουν αναπτυχθεί τεχνικές σήμανσης ή επισήμανσης (labelling, tagging) των πρωτεϊνών με κατάλληλα στοιχεία ή και ενώσεις, ώστε να καθίσταται δυνατή η ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών. Για παράδειγμα, ευρεία χρήση έχει η τεχνική της ισοτοπικής επισήμανσης (isotope labelling), όταν για παράδειγμα γίνεται αντικατάσταση ατόμων υδρογόνου ¹H με άτομα δευτερίου ²D ή ατόμων άνθρακα ¹²C με ¹³C. Στο λαμβανόμενο αποτέλεσμα υπάρχει αρκετό περιθώριο σφάλματος και τιμές αβεβαιότητας ±20% θεωρούνται αποδεκτές. Το πρόβλημα περιορίζεται κάπως, όταν υπάρχουν διαθέσιμα κάποια πρότυπα παρόμοιας σύστασης. Στις τεχνικές εντάσσονται και οι isotope-coded affinity tagging, isobaric tagging, stable isotope labeling with amino acids, κλπ.

Εξάλλου, η τεχνική της ICP-MS και δευτερευόντως η λιγότερο ευαίσθητη ICP-AES έχουν πολύ καλή δυνατότητα ποσοτικοποίησης, όμως αυτό το πλεονέκτημα δεν είναι άμεσα εκμεταλλεύσιμο στην περίπτωση όλων των πρωτεϊνών, παρά μόνον των μεταλλοπρωτεϊνών, οι οποίες περιέχουν, ήδη, μεταλλικά στοιχεία και μετά την ατομοποίηση είναι ευκολότερος ο προσδιορισμός τους, και έμμεσα η ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης ως ένα βαθμό. Για να γίνει το πλεονέκτημα αυτό χρήσιμο στην ποσοτικοποίηση των υπολοίπων πρωτεϊνών και πεπτιδίων, θα πρέπει να ενσωματώνονται στο πρωτεϊνικό μόριο μέταλλα τα οποία είναι απίθανο να προϋπάρχουν εκεί, και στη συνέχεια να μετρώνται αυτά τα μέταλλα με την τεχνική της ICP-MS ή της ICP-AES. Προς την κατεύθυνση αυτή έχει αναπτυχθεί η γνωστή τεχνική MeCAT (Metal-Coded Affinity Tagging) κατά την οποία μετά από κάποιες σχετικά απλές χημικές διαδικασίες, μέταλλα της κατηγορίας των λανθανιδών (π.χ. ^{165}Ho , ^{152}Eu , ^{159}Tb , ^{169}Tm , ^{175}Lu , κ.ά.). Συγκεκριμένα, άτομα κάποιου ισότοπου της κατηγορίας των λανθανιδών ενσωματώνονται ομοιοπολικά μέσα στη δομή ενός μορίου 1,4,7,10-τετρααζακυκλοδωδεκανο-N,N',N'',N'-τετραοξικού οξέος (DOTA), και το χηλικό σύμπλοκο που προκύπτει στη συνέχεια, αντιδρά με την πρωτεΐνη και σχηματίζεται τεχνητά επισημασμένη μεταλλοπρωτεΐνη, η οποία ανιχνεύεται μετά από ατομοποίηση στην ICP-MS, όπως περιγράφεται στα **Σχήματα 13.3** και **13.4**. Με την τεχνική αυτή διευκολύνεται περισσότερο και η εφαρμογή της τεχνικής της ισοτοπικής αραίωσης με στόχο τη βελτίωση της ποσοτικοποίησης.

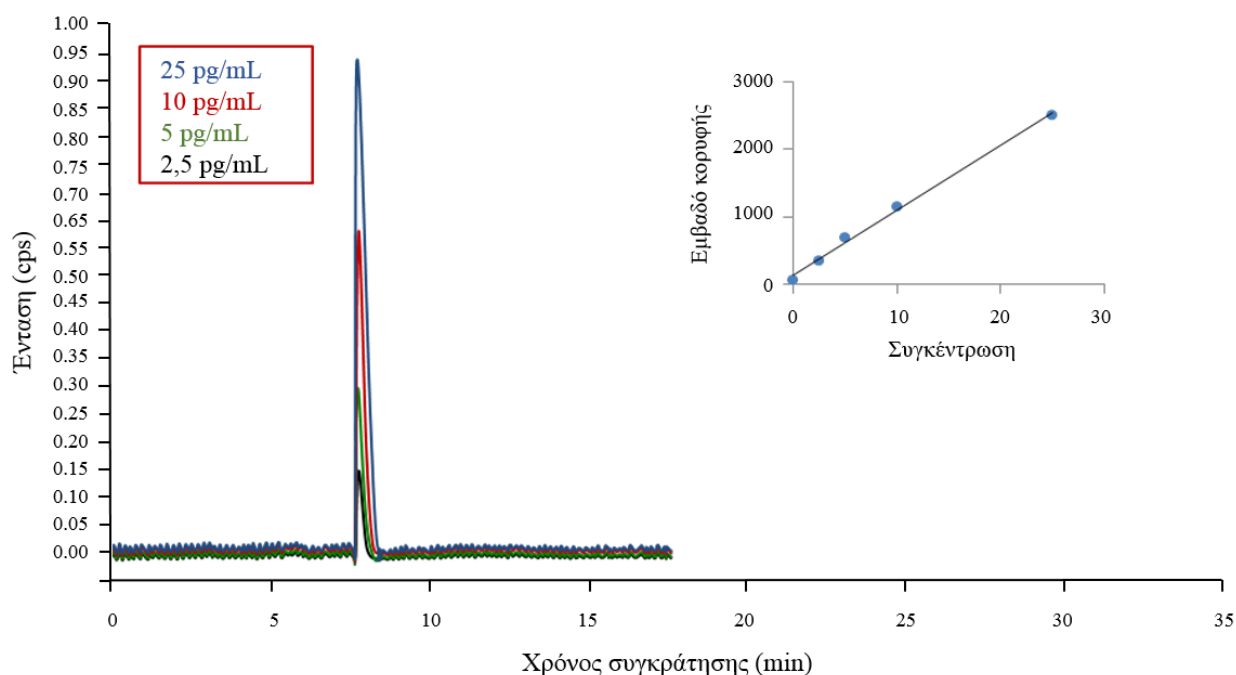


Σχήμα 13.3. Διαδικασία επισημάνσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο MeTAC: αντίδραση ενός μορίου DOTA και ατόμων λανθανιδών (π.χ. όλμιο) και στη συνέχεια δέσμευση του χηλικού συμπλόκου στην πρωτεΐνη



Σχήμα 13.4. Χρωματογραφήματα επιλεγμένων μαζών που λαμβάνονται με την τεχνική SEC-ICP-MS. Οι εκλουόμενες πρωτεΐνες έχουν επισημανθεί με κατάλληλο ισότοπο κάποιου στοιχείου της κατηγορίας των λανθανιδών (τεχνική MeCAT), ώστε να είναι μονοσήμαντα μετρήσιμο και ποσοτικοποιήσιμο με την ICP-MS. Οι χρόνοι κατακράτησης στον άξονα x είναι σε min.

Τέλος, η ποσοτικοποίηση γίνεται για κάθε πρωτεϊνικό κλάσμα όπου ανιχνεύεται το μέταλλο, με τη γνωστή μέθοδο της καμπύλης αναφοράς, όπως περιγράφεται στο παράδειγμα του Σχήματος 13.5, ή εφόσον είναι εφικτό, με τη μέθοδο της προσθήκης προτύπου.



Σχήμα 13.5. Χρωματογραφήματα επιλεγμένων μαζών ισotόπων του μετάλλου τα οποία λαμβάνονται με την τεχνική LC-ICP-MS με στόχο το σχηματισμό καμπύλης αναφοράς. Η ευθεία παλινδρόμησης στο ένθετο σχήμα, σχηματίζεται από τις συγκεντρώσεις του μετάλλου στο πρότυπο της μεταλλοπρωτεΐνης και τις αντίστοιχες τιμές σήματος στο ICP-MS.

13.2. Τεχνική SEC-ICP-MS για τον Προσδιορισμό Μεταλλοπρωτεϊνών σε Εκχυλίσματα Βιολογικών Ιστών

Μια πολύ διαδεδομένη μέθοδος για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των μεταλλοπρωτεϊνών σε εκχυλίσματα οργανικών ιστών βασίζεται στη σύζευξη της χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγέθους (SEC) με τη φασματομετρία μάζας, με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (ICP-MS). Με τη μέθοδο αυτή λαμβάνεται το προφίλ μεταλλοπρωτεϊνών και μεταλλοενζύμων και γενικότερα των μεγάλων βιομορίων τα οποία έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν μεταλλικά ιόντα. Η τεχνική είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στη μεταλλομική ανάλυση, γιατί εκτός από τις πληροφορίες για το πρωτεϊνικό κλάσμα όπου μπορεί να είναι δεσμευμένα τα μέταλλα, είναι δυνατό με τη συγκεκριμένη τεχνική να αντληθούν και πληροφορίες για την τριτοταγή και τεταρτοταγή δομή των αντίστοιχων πρωτεϊνών. Παράλληλα, εκτός από την παραπάνω τεχνική είναι χρήσιμο να προσδιορίζονται: α) η συνολική αναλυτική συγκέντρωση του κάθε μετάλλου μετά από όξινη υγρή πέψη ορισμένης ποσότητας του εκχυλίσματος και β) η συνολική πρωτεΐνη σε άλλη ποσότητα του εκχυλίσματος με την πρότυπη μέθοδο Bradford.

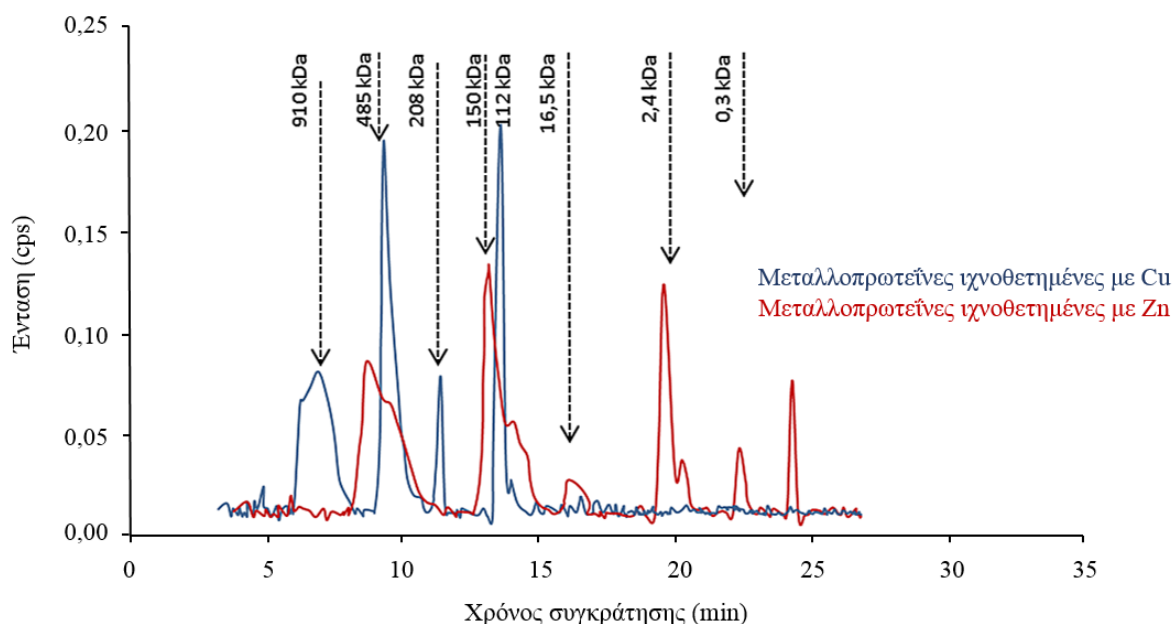
Χρησιμοποιούνται ομοιογενοποιημένα εκχυλίσματα από επεξεργασμένα δείγματα οργάνων, ιστών, καλλιιεργειών κυττάρων κλπ. Μετά από αυτήν την κατεργασία των δειγμάτων, παραλαμβάνονται διαλύματα όπου έχουν εκχυλιστεί οι πρωτεΐνες, και ανάμεσά τους οι μεταλλοπρωτεΐνες. Στο σημείο αυτό, ενδεχομένως, να είναι απαραίτητο να υποβληθούν τα εκχυλίσματα και σε διήθηση. Αναλυτικότερα, ένα τμήμα του ιστού ή ένα μέρος από ενοποιημένα δείγματα ιστών από παρόμοια πειραματόζωα, υπόκειται σε επεξεργασία με κρυογονική ομογενοποίηση, σε κατάλληλη συσκευή που είναι μύλος και καταψύκτης ταυτόχρονα. Στη συνέχεια τα μεταλλικά βιομόρια εκχυλίζονται με ένα ρυθμιστικό διάλυμα, περίπου 3-5 mL ανά γραμμάριο του υλικού. Ακολουθεί φυγοκέντρωση των εκχυλισμάτων για 1 ώρα σε ψυχόμενη υπερφυγόκεντρο. Τα τελικά εκχυλίσματα μπορούν να διατηρηθούν στους -80 °C, σε ατμόσφαιρα αζώτου, για την αποφυγή της οξειδωσής τους από τον ατμοσφαιρικό αέρα. Σημειώνεται ότι λόγω της φύσης της δέσμευσης του μετάλλου στις πρωτεΐνες αποφεύγονται ενεργειακά και χημικά δραστικές συνθήκες κατά την προκατεργασία του δείγματος,

γιατί μ' αυτές θα μπορούσε να απελευθερωθεί το μέταλλο από τη μεταλλοπρωτεΐνη και να χαθεί η πληροφορία για τη μοριακή δομή.

Ως πρότυπα μεταλλοπρωτεϊνών για την εξωτερική βαθμονόμηση, την κατασκευή καμπυλών αναφοράς και την ποσοτική αποτίμηση μπορεί να χρησιμοποιηθούν για μεν το Fe η φερριτίνη (περίπου 440-450 kDa, καθαρότητα >95%, 24 υπομονάδες), για τον Cu και τον Zn η υπεροξειδική δισμουτάση (περίπου 32 kDa, καθαρότητα >70%), η βόεια αλβουμίνη ορού (περίπου 66,4 kDa, καθαρότητα >96%), η μεταλλοθειονίνη I που μπορεί να δεσμεύει Zn, Cu και Cd μέσω κυστεϊνών (περίπου 7 kDa, > καθαρότητα 95%), η βιταμίνη B₁₂ (περίπου 1,35 kDa, > 96%) και η αναγμένη γλουταθειόνη (περίπου 307 Da, 98–100%).

Το χρωματογράφημα μπορεί να ολοκληρωθεί σε 15-40 min. Στο **Σχήμα 13.6** δίνεται ένα παράδειγμα δύο χρωματογραφημάτων τα οποία λαμβάνονται με ανίχνευση της μάζας Cu-63 και της μάζας Zn-67. Ουσιαστικά με τον ανιχνευτή ICP-MS προσδιορίζεται η μάζα του κάθε μετάλλου που εκλύεται από τη στήλη SEC σε σχέση με το χρόνο (π.χ. σε pg/s). Αυτό συμβαίνει γιατί μετά τη διάσπαση όλων των ενώσεων και την ατομοποίηση των στοιχείων στο επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα αργού, γίνεται στοιχειακή ανάλυση, χωρίς πλέον να υπάρχει κίνδυνος σύγχυσης του είδους της πρωτεΐνης μέσα στο οποίο υπήρχε το μεταλλικό στοιχείο.

Στη συνέχεια, με βάση το χρωματογράφημα και τα πρότυπα γίνεται αντιστοίχιση των μετάλλων σε πρωτεϊνικά κλάσματα ανάλογη με το κατά προσέγγιση μοριακό βάρος των πρωτεϊνών. Με τον τρόπο αυτό μπορεί στη συνέχεια να υπολογιστεί μια μοριακή αναλογία, δηλαδή πόσα άτομα του συγκεκριμένου μετάλλου δεσμεύονται στη δομή της πρωτεΐνης. Τα όρια ανίχνευσης για τα μέταλλα αυτά (π.χ. Fe, Cu και Zn) είναι της τάξης των pg έως ng. Η τεχνική (SEC-ICP-MS) έχει, επίσης, δυνατότητα αυτοματοποίησης με on-line έγχυση σε ροή. Αξίζει να σημειωθεί ότι στην τεχνική ICP-MS χρησιμοποιούνται μια σειρά από εξαιρετικώς καθαρά αέρια (>99.99%) σε ροές της τάξης των 1 έως 15 mL/min ανάλογα με το αέριο, και αυτό συνεπάγεται κάποιον πρόσθετο κόστος στην ανάλυση. Στον ατομοποιητή ICP απαιτείται αργό, ενώ στο φασματόμετρο μάζας ήλιο και υδρογόνο ως αέρια σύγκρουσης, θραυσματοποίησης και αντίδρασης αντίστοιχα.

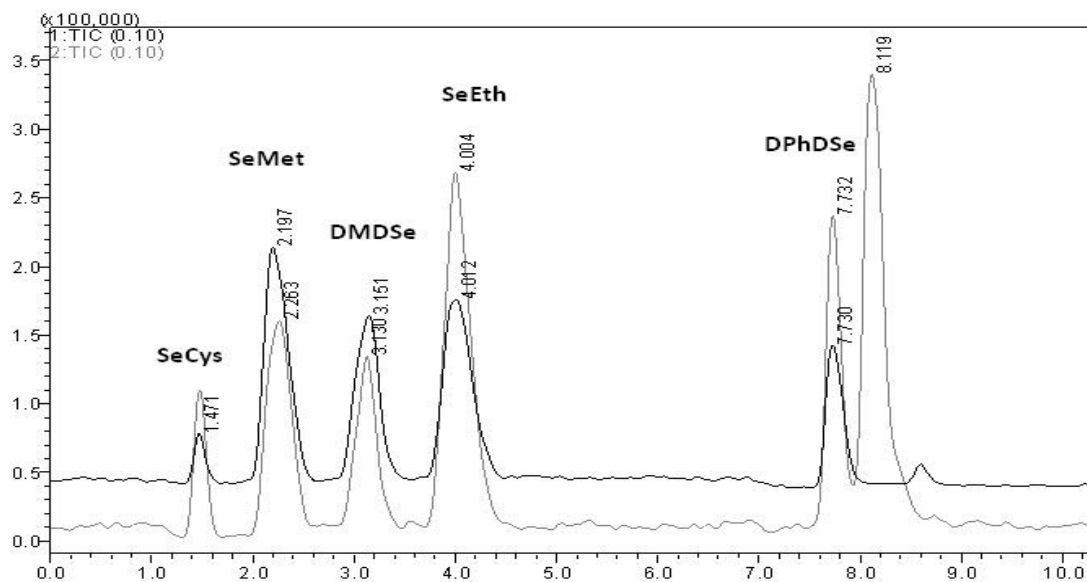


Σχήμα 13.6. Χρωματογραφήματα με βάση την ατομική μάζα του χαλκού (κόκκινη γραμμή) και του ψευδαργύρου (μπλε γραμμή) που λαμβάνονται με την τεχνική SEC-ICP-MS. Οι εκλυόμενες μεταλλοπρωτεΐνες ανιχνεύονται έμμεσα με βάση το μετρήσιμο και ποσοτικοποιήσιμο με την ICP-MS χημικό στοιχείο.

13.3. Τεχνική HPLC-IT-TOF-MS για τον Προσδιορισμό Ειδόμορφων Σεληνίου σε Βιολογικά Υγρά

Κατά την ανάλυση βιολογικών υγρών (ούρα, ορός, σίελα, κλπ.) έχει ενδιαφέρον ο ειδομορφικός προσδιορισμός διαφόρων μεταλλοενώσεων οι οποίες είτε αποτελούν ενώσεις των απαραίτητων ιχνοστοιχείων

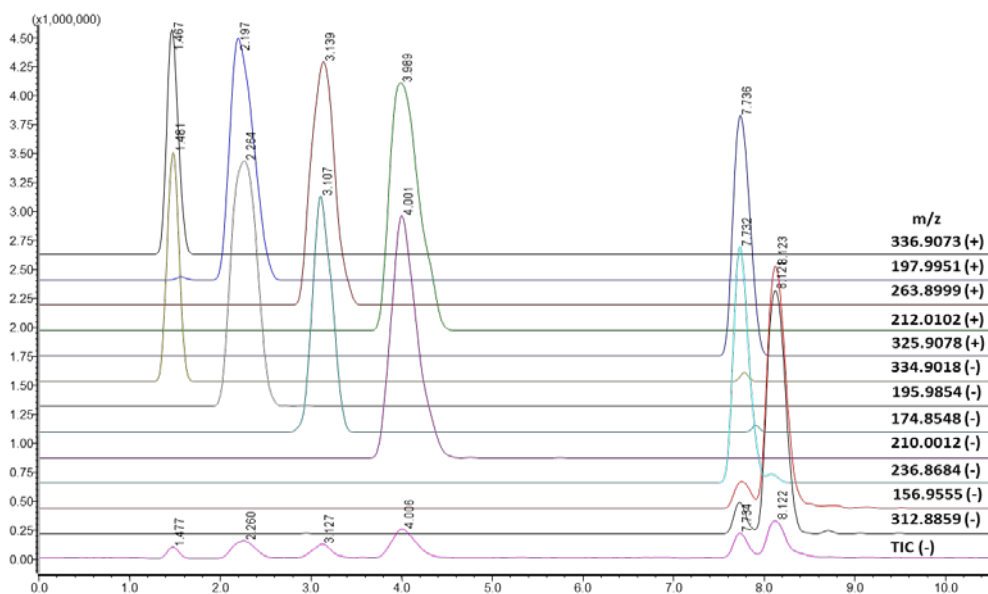
με βιομόρια είτε είναι μεταβολίτες τους. Τέτοιοι προσδιορισμοί γίνονται εφικτοί μετά από κατάλληλο χρωματογραφικό διαχωρισμό των ενώσεων και ανάλυση μαζών. Στο παράδειγμα αυτό θα περιγραφούν ορισμένα βασικά στοιχεία που αφορούν την τεχνική HPLC-IT-TOF-MS, σε σχέση με τον προσδιορισμό των ειδομορφών σεληνίου· δε θα περιγραφούν με λεπτομέρειες τα στάδια της προκατεργασίας των δειγμάτων, και ο χρωματογραφικός διαχωρισμός. Τονίζεται ότι είναι σημαντική η επιλογή των συνθηκών χημικού ιοντισμού (APCI) που επιλέχθηκε για την εφαρμογή αυτή. Με βάση αυτή τη μεθοδολογία λαμβάνεται το διπλό χρωματογράφημα του **Σχήματος 13.7**, για τις δύο πολικότητες.



Σχήμα 13.7. Ανίχνευση ειδομορφών σεληνίου με την τεχνική της HPLC-IT-TOF-MS. SeMet: σεληνομεθειονίνη, SeCys: σεληνοκυστίνη, SeEth: σεληνοαιθιονίνη, DMDSe: διμεθυλοδισεληνιούχα, DPhDSe: διφαινυλοδισεληνιούχα. Η μαύρη γραμμή αντιστοιχεί στο χρωματογράφημα που λαμβάνεται με την εφαρμογή θετικού ιοντισμού και η γκριζα γραμμή σ' αυτό που λαμβάνεται με αρνητικό ιοντισμό. Και στις δύο περιπτώσεις αποτυπώνεται στο γράφημα το χρωματογράφημα του συνολικού ρεύματος των ιόντων (TIC chromatogram).

Με βάση το χρωματογράφημα του **Σχήματος 13.7**, είναι φανερό ότι επιτεύχθηκε καλός διαχωρισμός των επιμέρους ειδομορφών. Ωστόσο η περίπτωση αυτή είναι σπάνια και προκύπτει όταν αναλύονται απλά βιολογικά υγρά δείγματα. Συνήθως, όμως, δεν είναι ξεκάθαρος ο διαχωρισμός των ενώσεων στα διάφορα δείγματα, επειδή συνεκλούνται με πλήθος από άλλες ενώσεις, χωρίς να διαχωρίζονται επαρκώς. Οι δυνατότητες, όμως, ενός ανιχνευτή τύπου Φασματομέτρου Μάζας επιτρέπουν τη σαφέστερη απεικόνιση του διαχωρισμού, επειδή αμέσως μετά τη στιγμή της έκλυσης και συνεχώς όσο διαρκεί το χρωματογράφημα, γίνεται ανάλυση και ανίχνευση όλων των ιόντων που προκύπτουν. Επομένως, είναι δυνατό στη συνέχεια να ληφθεί μια άλλη μορφή του χρωματογραφήματος, όπου, ενώ ο άξονας των x θα αναφέρεται και πάλι στο χρόνο κατακράτησης, ο άξονας των y θα αναφέρεται στην αφθονία συγκεκριμένου χαρακτηριστικού ιόντος. Με τον τρόπο αυτό εντοπίζεται σαφέστερα η κάθε ειδομορφή και ουσία που μας ενδιαφέρει. Στο συγκεκριμένο παράδειγμα λαμβάνεται το χρωματογράφημα του **Σχήματος 13.8**, όπου εμφανίζονται, ταυτόχρονα, τα επιμέρους χρωματογραφήματα για κάθε χαρακτηριστικό ιόν από τις ειδομορφές σεληνίου.

Τονίζεται ότι μέχρι το σημείο αυτό η μελέτη αφορά την ποιοτική ανίχνευση των προσδιοριζόμενων ενώσεων. Για την ποσοτικοποίηση των επιμέρους αναλυτών είναι απαραίτητη η χρήση καμπυλών αναφοράς, κατά προτίμηση με βάση το εμβαδό κορυφής. Αν και είναι επιθυμητό να χρησιμοποιούνται οι κορυφές του ολικού ρεύματος ιόντων (TIC), δηλαδή το αρχικά λαμβανόμενο χρωματογράφημα, αυτό προϋποθέτει ικανοποιητικό διαχωρισμό της κάθε ένωσης από οποιαδήποτε άλλη εκλυόμενη ένωση, πράγμα που είναι δύσκολο να επιτευχθεί. Επειδή, λοιπόν, αυτό δεν είναι εφικτό, εναλλακτικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί το χρωματογράφημα με βάση επιλεγμένα ιόντα (SIC), έχοντας υπόψη ότι η κάθε κορυφή έχει πολύ μεγάλη εξάρτηση από τις στιγμιαίες συνθήκες στο στάδιο του ιοντισμού αλλά και τους περιορισμούς του ανιχνευτή του MS.



Σχήμα 13.8. Ανίχνευση ειδομορφών σεληνίου με την τεχνική της HPLC-IT-TOF-MS. Εμφανίζονται κατά σειρά πρώτα τα σεληνοαμινοξέα, σεληνοκυστίνη και σεληνομεθειονίνη, ακολουθούν τα διμεθυλοδισεληνιούχα, στη συνέχεια η σεληνοαιθιονίνη, και τέλος με διπλή κορυφή τα διφαινυλοδισεληνιούχα. Δεξιά καταγράφονται τα αντίστοιχα χαρακτηριστικά ιόντα και σε παρένθεση ο θετικός ή αρνητικός ιοντισμός. Και στις δύο περιπτώσεις αποτυπώνεται στο γράφημα το χρωματογράφημα επιλεγμένων ιόντων (SIM chromatogram).

Γίνεται φανερό ότι στις μελέτες αυτές είναι απαραίτητο να ανιχνεύονται ορισμένα χαρακτηριστικά ιόντα που συμβάλλουν στην ασφαλέστερη ταυτοποίηση των διάφορων ειδομορφών. Ο μετρούμενος λόγος m/z των ιόντων αυτών είναι πολύ πιθανό εξαιτίας μικρών πειραματικών σφαλμάτων να αποκλίνει από την ονομαστική του τιμή, δηλαδή τη θεωρητικά υπολογιζόμενη, και αυτή η απόκλιση πρέπει να είναι μικρή και να υπολογίζεται, όπως περιγράφεται αναλυτικά στον Πίνακα 13.1. Η έκφραση ppm είναι ειδική έκφραση απόκλισης (μέρη ανά εκατομμύριο) η οποία χρησιμοποιείται στη φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας και δεν έχει σχέση με την έκφραση της περιεκτικότητας ppm. Απλώς συμπίπτουν συντομογραφικά.

Χρόνος συγκράτησης (min)	Ενώσεις σεληνίου	Τύπος ένωσης ή θραύσματος	Πο λικ.	Υπολογιζόμενη μάζα (g/mol)	Μετρούμενη μάζα (g/mol)	Ακρίβεια μάζας ppm	Πρωτόνιοση
1,47	Σεληνιοκυστίνη	C ₆ H ₁₂ N ₂ O ₄ Se ₂	+	336,9200	336,9073	37	[M+H] ⁺
	Σεληνιοκυστίνη	C ₆ H ₁₂ N ₂ O ₄ Se ₂	-	334,9055	334,9018	11	[M-H] ⁻
2,20	Σεληνομεθειονίνη	C ₅ H ₁₁ NO ₂ Se	+	198,0028	197,9951	39	[M+H] ⁺
	Σεληνομεθειονίνη	C ₅ H ₁₁ NO ₂ Se	-	195,9882	195,9854	14	[M-H] ⁻
3,14	Methylselenide	CH ₄ Se ₂	-	174,8571	174,8548	13	[M-H] ⁻
4,01	Σεληνοαιθιονίνη	C ₆ H ₁₃ NO ₂ Se	+	212,0184	212,0102	39	[M+H] ⁺
	Σεληνοαιθιονίνη	C ₆ H ₁₃ NO ₂ Se	-	211,0039	210,0012	12	[M-H] ⁻
7,73	Φαινυλοδισελήνιο	C ₆ H ₆ Se ₂	-	236,8727	236,8684	18	[M-H] ⁻
8,12	Διφαινυλοδισελήνιο	(C ₆ H ₅) ₂ Se ₂	-	312,9040	312,8859	57	[M-H] ⁻
	(Φαινυλοσελήνιο)	C ₆ H ₆ Se	-	156,9562	156,9555	5	[M-H] ⁻

Πίνακας 13.1. Παράδειγμα με μάζες ιόντων οργανοσεληνιούχων ενώσεων και σεληνοαμινοξέων και η ακρίβειά τους κατά τον προσδιορισμό τους με την τεχνική HPLC-IT-TOF-MS

13.4. Τεχνικές LLE και SPME σε Σύζευξη με GC-MIP-AED και GC-MS για τον Προσδιορισμό Ειδόμορφων Κασσιτέρου σε Βιολογικά Υγρά

Ο εκλεκτικός ειδομορφικός προσδιορισμός του κασσιτέρου είναι ιδιαίτερα χρήσιμος στην τοξικολογική ανάλυση. Στις προσδιοριζόμενες ειδομορφές περιλαμβάνονται, συνήθως, αλκυλο- και φαινυλο- ενώσεις του

κασσιτέρου που στο παρελθόν χρησιμοποιήθηκαν ως αντιμυκητιασικά υφαλοχρώματα, ενώ σήμερα έχουν μόνο άλλες χρήσεις (π.χ. σε ορισμένους τύπους πολυμερών). Επειδή οι ενώσεις αυτές καταρχήν είναι σε μορφή αλάτων (συνήθως χλωριούχων) και σε διάλυμα έχουν ιοντική μορφή, δεν είναι ιδιαίτερα πτητικές. Επομένως, για το διαχωρισμό τους με την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας απαιτείται παραγωγοποίησή τους, ώστε να γίνουν μοριακές και περισσότερο πτητικές. Αυτό επιτυγχάνεται με αλκυλίωσή τους με τη χρήση αλκυλιωτικών μέσων, όπως για παράδειγμα το τετραεθυλοβορικό νάτριο (NaBEt_4), απευθείας στο υδατικό διάλυμα του δείγματος, το οποίο μπορεί να συνίσταται σε διηθημένα ούρα, ορό κλπ. Η μέθοδος αυτή πλεονεκτεί σε σχέση με την άλλη κλασική μέθοδο αλκυλίωσης η οποία γίνεται με αντιδραστήρια Grignard σε περιβάλλον οργανικών διαλυτών.

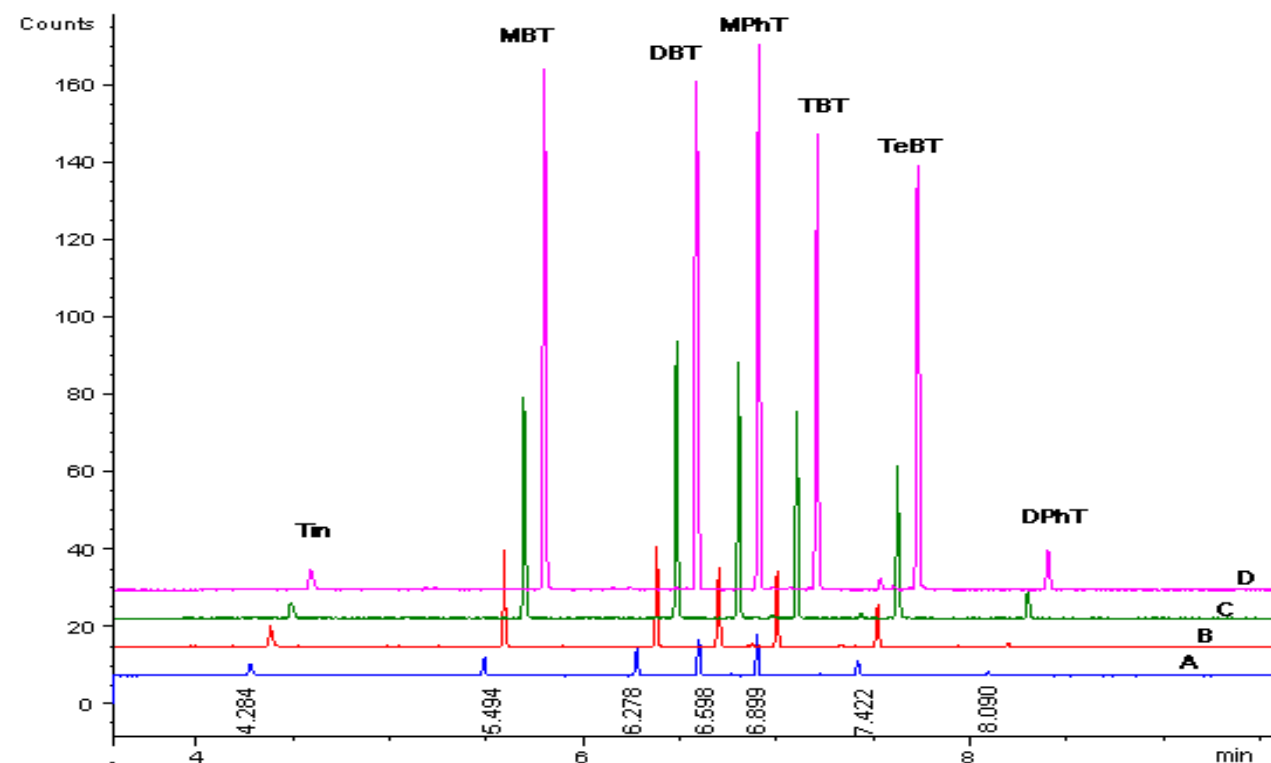
Αρχικά το τετραεθυλοβορικό νάτριο διαλύεται σε τετραϋδροφουράνιο (THF) για την παρασκευή του αντιδραστήριου αιθυλίωσης που περιέχει 20% w/v NaBEt_4 . Από το διάλυμα αυτό παρασκευάζονται κάθε φορά διαλύματα 5-10% (w/v) με αραιώση σε THF. Όταν αποθηκεύεται αεροστεγώς σε πωματισμένα φιαλίδια στους 2-4 °C, το αντιδραστήριο είναι σταθερό για αρκετές εβδομάδες. Με την προσθήκη μικρής ποσότητας (π.χ. 200 μL) του αντιδραστήριου αυτού στο διάλυμα του δείγματος μέσα σε κλειστό δοχείο των 5-10 mL, γίνεται αιθυλίωση των προσδιοριζόμενων ειδομορφών.

Στο επόμενο στάδιο, τα πτητικά παράγωγά τους εκχυλίζονται. Η εκχύλιση ενίοτε γίνεται και με κάποια ήπια θέρμανση. Η εκχύλιση μπορεί να γίνει με πολλές τεχνικές· στη μέθοδο αυτή βρίσκουν εφαρμογή οι παρακάτω τρεις τεχνικές:

- (α) Με εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE, liquid-liquid extraction), όπου χρησιμοποιείται ως διαλύτης εξάνιο.
- (β) Με μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (SPME, solid-phase microextraction), όπου μια ίνα πολυμερούς, π.χ. πολυδιμεθυλοσιλοξάνιου (PDMS) εμβαπτίζεται στο διάλυμα και δεσμεύει τα παράγωγα.
- (γ) Με μικροεκχύλιση στερεάς φάσης υπερκείμενου χώρου (HS-SPME ή απλώς HSPME, head-space solid-phase microextraction), όπου η ίνα πολυμερούς τοποθετείται στον υπερκείμενο κενό χώρο του διαλύματος και δεσμεύει τα παράγωγα μετά την πάροδο ορισμένων λεπτών.

Το διάλυμα του εξανίου (τεχνική LLE) ή η ίνα του πολυμερούς (τεχνική SPME) εισάγονται στη συνέχεια στον αέριο χρωματογράφο για το διαχωρισμό των πτητικών ενώσεων με βάση συγκεκριμένο πρόγραμμα θέρμανσης και ροής ηλίου. Για το διαχωρισμό είναι απαραίτητη κατάλληλη τριχοειδής αεριοχρωματογραφική στήλη, που το μήκος της να είναι 30 m, η εσωτερική διάμετρος 0,25 mm και το πάχος του υμενίου 0,1 μm . Η στατική φάση είναι από πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο (PDMS). Η θερμοκρασία στη βαλβίδα εισαγωγής του αέριου χρωματογράφου διατηρείται ισοθεμικά σε σταθερή θερμοκρασία 250 °C. Αρχικά πριν από την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας, η ίνα της SPME τοποθετείται για 1 ώρα στη βαλβίδα εισαγωγής του GC-MS, η οποία έχει σταθερή θερμοκρασία 260 °C για τον καθαρισμό της. Στη συνέχεια η ίνα SPME μετά από κάθε τοποθέτησή της στη βαλβίδα εισαγωγής, παρέμεινε για διάστημα 4 min σε θερμοκρασία 250 °C, προκειμένου να διασφαλιστεί, πλήρως, η θερμική εκρόφηση όλων των ενώσεων που έχουν προσροφηθεί στην επιφάνεια του υλικού της.

Μετά το διαχωρισμό τους εκλούνται από τη στήλη κατά σειρά, πρώτα τα ελαφρύτερα σε μάζα και περισσότερο πολικά και ακολουθούν τα βαρύτερα και λιγότερο πολικά, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 13.9**. Στο συγκεκριμένο παράδειγμα οι ενώσεις που προσδιορίζονται στα ούρα είναι κατά σειρά: τριχλωριούχος μονοβουτυλοκασσίτερος (MBT, ή BuSnCl_3), διχλωριούχος διβουτυλοκασσίτερος (DBT, Bu_2SnCl_2), χλωριούχος τριβουτυλοκασσίτερος (TBT, Bu_3SnCl), τριχλωριούχος μονοφαινυλοκασσίτερος (MPhT, PhSnCl_3), διχλωριούχος διφαινυλοκασσίτερος (DPhT, Ph_2SnCl_2). Εκτός αυτών, συνήθως συνυπάρχουν ή εμφανίζονται από διάσπαση και ιόντα ανόργανου κασσιτέρου. Όλες οι προσδιοριζόμενες ενώσεις μετά την αιθυλίωση δίνουν αντίστοιχα αιθυλιωμένα παράγωγα, λιγότερο πολικά και φυσικά μοριακού τύπου. Συγκεκριμένα προκύπτουν τα: BuSnEt_3 , Bu_2SnEt_2 , Bu_3SnEt , PhSnEt_3 , και Ph_2SnEt_2 . Επιπλέον, κατά την αιθυλίωση των ιόντων του ανόργανου κασσιτέρου προκύπτει τετραεθυλοκασσίτερος (TESn , SnEt_4) που εκλύεται πρώτος. Στο χρωματογράφημα του **Σχήματος 13.9**, εμφανίζεται και η κορυφή του τετραβουτυλοκασσιτέρου (TeBT , Bu_4Sn) που χρησιμοποιείται ως εσωτερικό πρότυπο, θεωρώντας ότι δεν υπόκειται σε αιθυλίωση, αφού είναι, ήδη, πλήρως αλκυλιωμένο. Υπενθυμίζεται ότι στους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς είναι ιδιαίτερα χρήσιμη η χρήση κάποιου εσωτερικού προτύπου, για την περαιτέρω εκτίμηση του χρωματογραφήματος.



Σχήμα 13.9. Τεχνική GC-MIP-AED. Χρωματογραφήματα μίγματος πέντε οργανοκασσιτερικών ενώσεων και του ανόργανου ιόντος του κασσιτέρου μετά από αιθυλίωση με NaBEt_4 και μικροεκχύλιση στερεής φάσης από υπερκείμενο χώρο (HS-SPME) σε δείγμα ούρων. Επιπλέον, εμφανίζεται και η κορυφή του εσωτερικού προτύπου (TeBT). Παράλληλα, με διαφορετικά χρώματα απεικονίζονται οι αυξανόμενες συγκεντρώσεις στα 4 πρότυπα για τη λήψη των έξι καμπυλών αναφοράς. Οι χρόνοι κατακράτησης στον άξονα x είναι σε min.

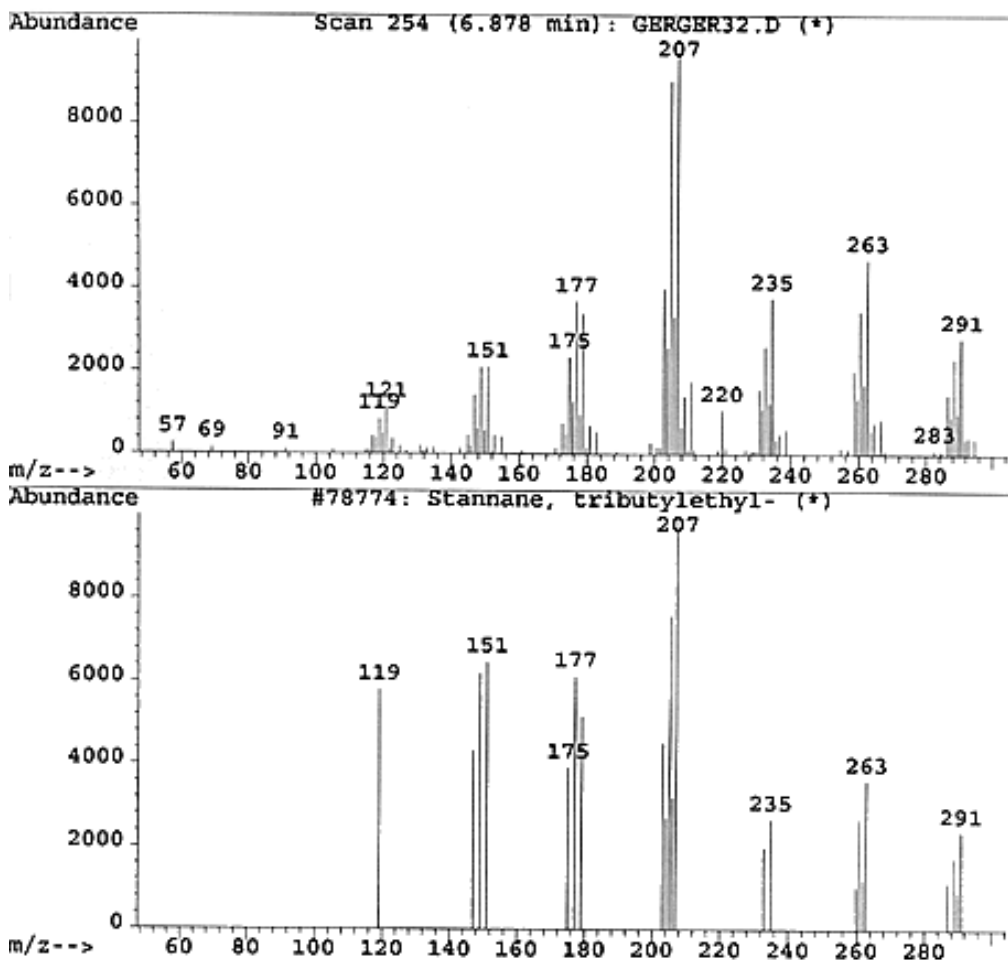
Σε σύζευξη με τον αέριο χρωματογράφο, τα εκλουόμενα παράγωγα μπορούν να μετρηθούν εναλλακτικά με δύο τεχνικές: (α) με την τεχνική της Φασματομετρίας Ατομικής Εκπομπής Μικροκυματικά Συζευγμένου Πλάσματος (GC-MIP-AED) (**Σχήμα 13.9**) και (β) με την τεχνική της Φασματομετρίας Μάζας (GC-MS). Και οι δύο τεχνικές είναι συμβατές με την αέρια χρωματογραφία, επειδή τα δείγματα μπορούν να εισάγονται απευθείας στο σημείο εισόδου του MS, δηλαδή στο χώρο ιοντισμού με πρόσκρουση ηλεκτρονίων, με παροχή φέροντος αερίου ηλίου η οποία είναι συμβατή με τις δυνατότητες του MS.

Τέλος, για την καμπύλη αναφοράς λαμβάνονται υπόψη είτε τα εμβαδά των κορυφών είτε και τα ύψη των κορυφών, όταν ο διαχωρισμός είναι πολύ καλός και η συμμετρία των κορυφών άψογη, χωρίς ουρές και παραμορφώσεις. Για την ποσοτικοποίηση υπερτερεί, σαφώς, η τεχνική GC-MIP-AED, γιατί είναι ιδιαίτερα εκλεκτική καθώς βασίζεται στη μέτρηση της χαρακτηριστικής ατομικής γραμμής του Sn στα 303,419 nm. Αντίθετα, για την ταυτοποίηση των ενώσεων μέσω των θραυσμάτων τους - όταν αυτές είναι άγνωστες- πλεονεκτεί η τεχνική GC-MS, όπως φαίνεται και από τα λαμβανόμενα φάσματα μαζών που περιέχουν τις μάζες κάποιων χαρακτηριστικών ιόντων τα οποία προκύπτουν κατά τον ιοντισμό των ενώσεων (**Σχήμα 13.10**).

Τα φάσματα μαζών του σχήματος είναι φάσματα οργανοκασσιτερικών ενώσεων και είναι χρήσιμα για την ταυτοποίηση στην τεχνική GC-MS. Στα δύο διαγράμματα του σχήματος δίνεται για παράδειγμα το φάσμα μαζών του αιθυλιωμένου παραγωγού του τριβουτυλοκασσιτέρου (tributylethyl-stannane). Συγκεκριμένα, στο πάνω διάγραμμα είναι το φάσμα που ελήφθη πειραματικά, και το κάτω αφορά το φάσμα της ίδιας ένωσης από τη βάση φασμάτων Wiley, ώστε να γίνεται η ταυτοποίηση. Τα ιόντα γύρω από το m/z 119 αντιστοιχούν στα ισότοπα του ατόμου του κασσιτέρου, ενώ τα ιόντα γύρω από το m/z 291 αντιστοιχούν στον τριβουτυλοκασσίτερο, ο οποίος διατηρεί το ισοτοπικό προφίλ του μετάλλου.

Στο παράδειγμα του **Σχήματος 13.10** φαίνεται καθαρά ότι οι διαφορές μαζών κατά 29 αντιστοιχούν σε προσθήκη ή αφαίρεση αιθυλομάδας, ενώ οι διαφορές μαζών κατά 59 αντιστοιχούν σε προσθήκη ή αφαίρεση βουτυλομάδας.

Library Searched : C:\DATABASE\WILEY.L
Quality : 87
ID : Stannane, tributylethyl-



Σχήμα 13.10. Φάσματα μαζών οργανοκασσιτερικών ενώσεων για την ταυτοποίηση στην τεχνική GC-MS. Τα παραπάνω δύο διαγράμματα απεικονίζουν το φάσμα μαζών του αιθυλιωμένου παραγώγου του τριβουτυλοκασσιτέρου (tributylethylstannane). Το πάνω διάγραμμα είναι το φάσμα που ελήφθη πειραματικά, και το κάτω είναι το φάσμα της ίδιας ένωσης από τη βάση φασμάτων Wiley, ώστε να γίνεται η ταυτοποίηση [McLafferty, 2014].

13.5. Τεχνική HPLC-IT-TOF-MS για τον Προσδιορισμό Τριαλκυλιωμένων Ειδόμορφων Κασσιτέρου σε Ούρα

Όπως περιγράφηκε στην προηγούμενη εφαρμογή, λόγω της τοξικολογικού και βιοαναλυτικού ενδιαφέροντος, συχνά είναι αναγκαίος ο προσδιορισμός των ειδομορφών του Sn, όπως μονοβουτυλοκασσιτέρος (MBT), διβουτυλοκασσιτέρος (DBT), τριβουτυλοκασσιτέρος (TBT), τριοκτυλοκασσιτέρος (TOT), μονοφαινυλοκασσιτέρος (MPhT), διφαινυλοκασσιτέρος (DPhT), τριφαινυλοκασσιτέρος (TPhT), κλπ. Με την προηγούμενη τεχνική η οποία βασίζεται στον αεριοχρωματογραφικό διαχωρισμό τους, ήταν αναγκαία η παραγωγή των ενώσεων με αλκυλίωση, ώστε να καταστούν πιο πτητικές.

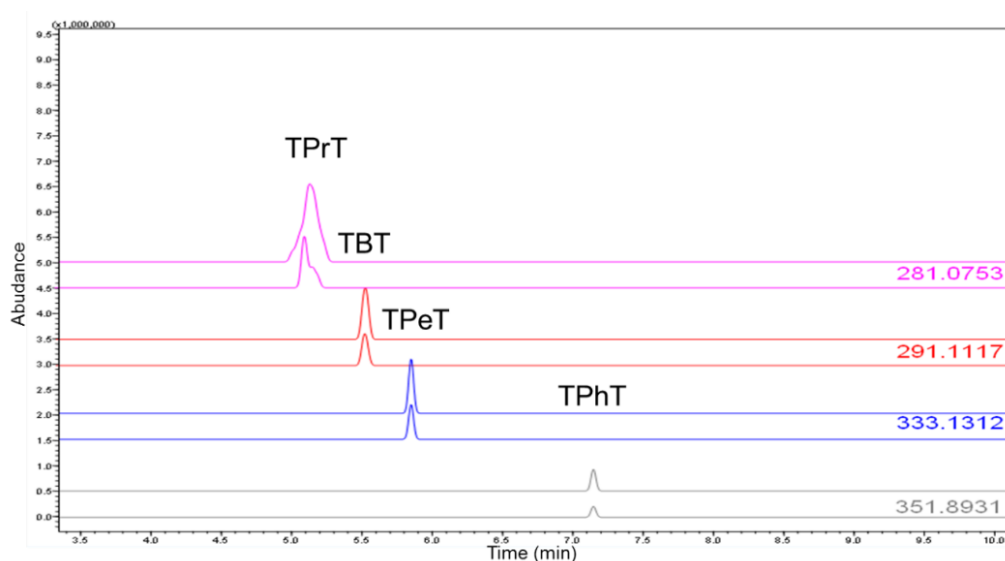
Ωστόσο, όταν είναι διαθέσιμη η συζευγμένη τεχνική HPLC-IT-TOF-MS, οι προσδιορισμοί μπορούν να γίνουν χωρίς παραγωγή απευθείας μετά τον υδροχρωματογραφικό διαχωρισμό τους. Ως παράδειγμα, λοιπόν, μιας τέτοιας εφαρμογής θα μελετηθεί η ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μιας μεθόδου ειδομορφικού προσδιορισμού κασσιτέρου, με την τεχνική HPLC-IT-TOF-MS. Στην εφαρμογή αυτή για συγκριτικούς λόγους εντάχθηκαν οι ενώσεις τριπροτυλοκασσιτέρος (TPrT), τριβουτυλοκασσιτέρος (TBT), τριπεντυλοκασσιτέρος (TPeT), και τριφαινυλοκασσιτέρος (TPhT).

Η μέθοδος περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

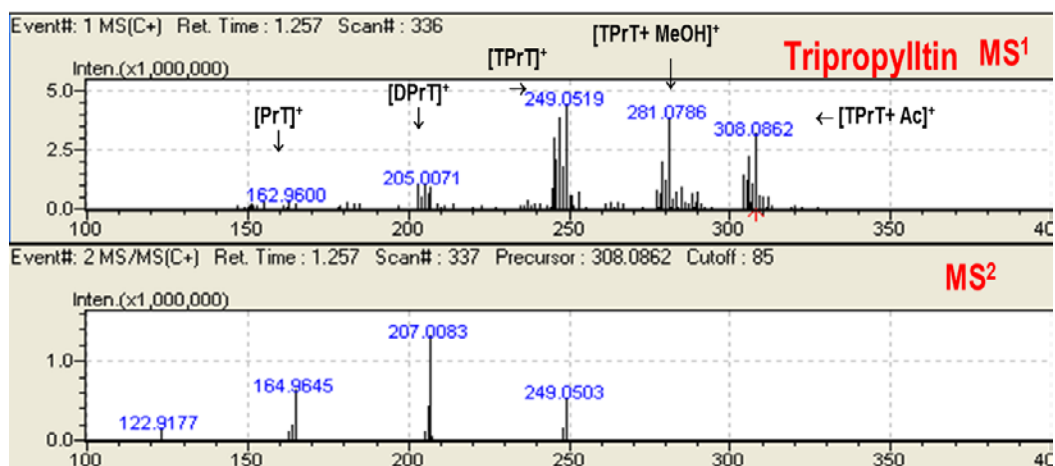
- Επιλογή των χαρακτηριστικών ιόντων της κάθε ένωσης τα οποία παρατηρούνται στο φάσμα μαζών της κάθε ένωσης μετά από απευθείας έγχυση της καθεμίας ένωσης ξεχωριστά στο MS.
- Ρύθμιση των παραμέτρων λειτουργίας του MS, όπου περιλαμβάνεται βελτιστοποίηση των συνθηκών λειτουργίας του συστήματος χημικού ιοντισμού υπό ατμοσφαιρική πίεση (APCI) και προσαρμογή του εύρους παρακολούθησης ιόντων στην παγίδα ιόντων (Ion trap, IT).
- Βελτιστοποίηση του διαχωρισμού των ενώσεων στην υγρή χρωματογραφία η οποία γίνεται με τη συγκριτική δοκιμή διαφορετικών μη πολικών χρωματογραφικών στηλών και με τη ρύθμιση των συνθηκών του διαχωρισμού στην LC (τρόπος λειτουργίας έκλουσης διαλυτών, παροχή κινητής φάσης, επιλογή διαλυτών κινητής φάσης, ποσότητα όγκου έγχυσης, κλπ.).
- Βαθμονόμηση της μεθόδου με χάραξη της καμπύλης αναφοράς για κάθε ειδομορφή και ανάλυση πιστοποιημένων υλικών αναφοράς (CRMs), εφόσον υπάρχουν, ή εναλλακτικά εφαρμογή της τεχνικής προσθήκης προτύπου (standard addition), με τη χρήση του ίδιου του υποστρώματος του δείγματος.

Στη συγκεκριμένη εφαρμογή εφαρμόστηκε ο χημικός ιοντισμός σε ατμοσφαιρική πίεση (API) και ακόμη ειδικότερα ο χημικός ιοντισμός σε ατμοσφαιρική πίεση (APCI). Σύμφωνα με την τεχνική αυτή της σύνδεσης της υγρής χρωματογραφίας με το φασματομέτρο μάζας, ο ιοντισμός επιτυγχάνεται μετά από ψεκασμό του υγρού και εκνέφωση σε χώρο, όπου ιοντίζονται τα μόρια εξαιτίας της παρουσίας ηλεκτρικού πεδίου από ένα ηλεκτρόδιο ακίδας. Γενικότερα σε κάθε εφαρμογή επιλέγεται εκείνη η τεχνική ιοντισμού η οποία είναι η καταλληλότερη για το σκοπό της ανάλυσης. Συνήθως, εφαρμόζεται ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI) ή η παραπάνω τεχνική APCI.

Με τις παραπάνω συνθήκες λαμβάνονται τα δύο αρχικά χρωματογραφήματα με τη χρήση διαδοχικά και του ανιχνευτή παράταξης φωτοδιόδων (PDA) καθώς και του ανιχνευτή MS. Από το αρχικό χρωματογράφημα του MS, μπορούν να σχηματιστούν τα επιμέρους χρωματογραφήματα που δίνονται στο **Σχήμα 13.11**. Σημειώνεται ότι το κάθε χρωματογράφημα του σχήματος αυτού αντιστοιχεί στην ανίχνευση ενός συγκεκριμένου επιλεγμένου ιόντος. Τα ιόντα αυτά επιλέγονται με κριτήριο κατά πόσο χαρακτηριστικά και αντιπροσωπευτικά είναι για την κάθε ειδομορφή. Έτσι, ενώ στα αρχικά χρωματογραφήματα δεν είναι προφανής ο διαχωρισμός των κορυφών των προσδιοριζόμενων ενώσεων, στα χρωματογραφήματα επιλεγμένων ιόντων είναι, πλέον, σαφής ο διαχωρισμός και η ανίχνευσή τους. Πέρα από αυτό, το φάσμα μαζών υψηλής διακριτικής ικανότητας, με το σύνολο των ιόντων της κάθε προσδιοριζόμενης ειδομορφής, συμβάλλει καθοριστικά στην ταυτοποίησή του, όπως παρουσιάζεται στο **Σχήμα 13.12**.

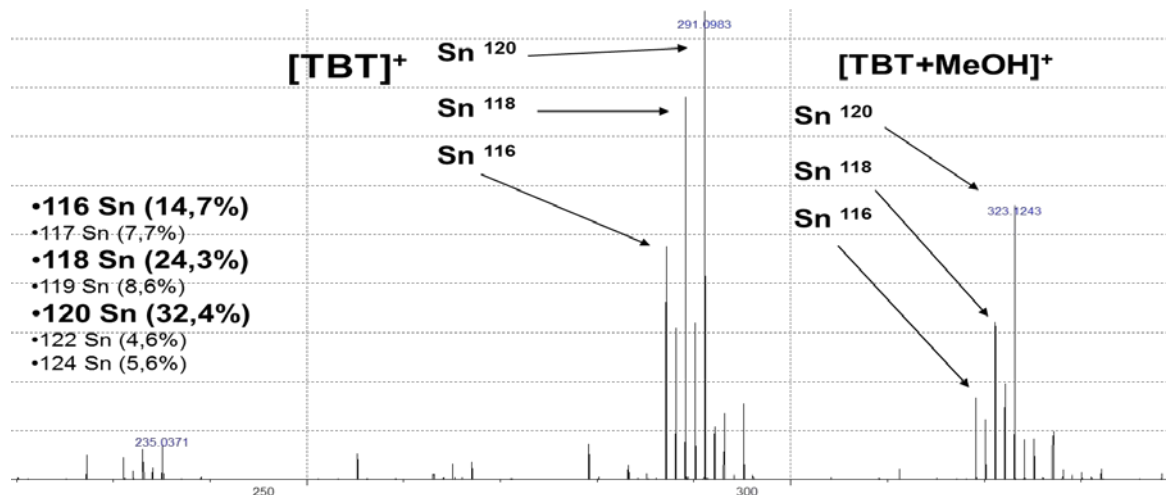


Σχήμα 13.11 Ανίχνευση ειδομορφών αλκυλο- και αρυλοκασιτέρου, με την τεχνική της Φασματομετρίας Μάζας με εν σειρά αναλυτές παγίδας ιόντων και χρόνου πτήσης (LC-IT-TOF-MS). Παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα επιλεγμένων χαρακτηριστικών ιόντων για την κάθε μορφή.



Σχήμα 13.12. Ανίχνευση και ταυτοποίηση τριπροπυλοκασσιτέρου με βάση τα χαρακτηριστικά ιόντα του, όπου ανιχνεύονται και ιόντα τα οποία προκύπτουν από θραύση και απόσπαση 1 ή 2 προπυλίων. Το φάσμα MS2 προκύπτει μετά από παγίδευση και ανάλυση εκ νέου στο TOF ενός συγκεκριμένου ιόντος (π.χ. του 249.0503). Παράλληλα, το ισοτοπικό προφίλ του κασσιτέρου καθιστά πιο σύνθετη τη μορφή στην περιοχή του κάθε ιόντος.

Το ισοτοπικό προφίλ του κασσιτέρου διευκολύνει την ταυτοποίηση ενώσεων που τον περιέχουν. Αυτό ισχύει, όπως προαναφέρθηκε, για όλα τα μέταλλα. Στο φάσμα μαζών ταυτοποιούνται το ελεύθερο ιόν του TBT καθώς και το σύζευγμά του με μεθανόλη η οποία περιέχεται στην κινητή φάση της υγρής χρωματογραφίας. Στο **Σχήμα 13.13** παρουσιάζονται τα σημαντικότερα ισότοπα του Sn καθώς και η φυσική τους αφθονία, η οποία αντανακλάται στις γραμμές του φάσματος μαζών. Αν και στο συγκεκριμένο παράδειγμα διακρίνονται επαρκώς και τα δευτερεύοντα ισότοπα, αλλά για λόγους στιγμιαίων πειραματικών συνθηκών είναι ενδεχόμενο να μην ανιχνεύεται κάποιο από τα ισοτοπικά ιόντα. Ωστόσο το γενικότερο προφίλ είναι πάντοτε ιδιαίτερα αξιόπιστο.



Σχήμα 13.13. Ταυτοποίηση μορφών τριβουτυλοκασσιτέρου (TBT) με τη Φασματομερία Μάζας με εν σειρά αναλυτές παγίδας ιόντων και χρόνου πτήσης (LC-IT-TOF-MS). Το ισοτοπικό προφίλ του κασσιτέρου διευκολύνει την ταυτοποίηση ενώσεων που τον περιέχουν. Στο φάσμα μαζών ταυτοποιούνται το ελεύθερο ιόν του TBT καθώς και το σύζευγμά του με μεθανόλη που περιέχεται στην κινητή φάση της υγρής χρωματογραφίας.

13.6. Τεχνική IC-ICP-MS για τον Προσδιορισμό Ειδόμορφων Αρσενικού σε Βιολογικά Υγρά

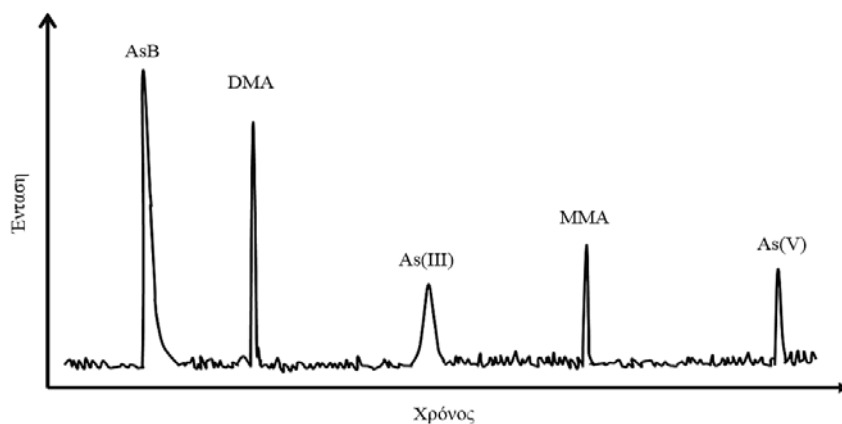
Οι ειδομορφές του αρσενικού σε βιολογικά δείγματα μπορούν να προσδιοριστούν ποσοτικά και αξιόπιστα με την τεχνική της Ιοντικής χρωματογραφίας σε σύζευξη με την τεχνική ICP-MS, με πολύ χαμηλά όρια ανίχνευσης (IC-ICP-MS). Οι μορφές που, συνήθως, ανιχνεύονται μπορεί να είναι η αρσеноβηταϊνή και σε

κάποιες περιπτώσεις η αρσενοχολίνη, ενώ σε περιπτώσεις έκθεσης του οργανισμού ανιχνεύονται το τρισθενές, το πεντασθενές αρσενικό, το μονομεθυλαρσενικό οξύ, το διμεθυλαρσενικό οξύ, κλπ.

Η προκατεργασία του δείγματος είναι σχετικά απλή και περιλαμβάνει αραίωση με υπερκαθαρό νερό και κατά προτίμηση διήθηση από ηθμό 0,45 χιλιοστών. Μετά την έγχυση στην κινητή φάση ακολουθεί διαχωρισμός σε στήλη ιοντικής χρωματογραφίας και ανίχνευση με την τεχνική ICP-MS. Εναλλακτικά, ο ειδομορφικός προσδιορισμός μπορεί να επιτευχθεί και με τη σύζευξη υγρής χρωματογραφίας με τη φασματομετρία ατομικού φθορισμού μέσω γεννήτριας υδριδίων (HPLC-HG-AFS).

Ειδικότερα, όπως φαίνεται στο χρωματογράφημα του **Σχήματος 13.14**, με την τεχνική της IC-ICP-MS, παρόλο που διαχωρίζονται στη χρωματογραφική στήλη οι διάφορες ενώσεις του As, τελικά οι ειδομορφές προσδιορίζονται έμμεσα με βάση την ανίχνευση κάποιου ισοτόπου του As, στο MS. Αυτό συμβαίνει λόγω του γεγονότος ότι στο επόμενο στάδιο μετά το διαχωρισμό, το διάλυμα που εκλύεται από τη στήλη εισέρχεται στον ατομοποιητή πλάσματος, όπου διασπώνται οι κάθε μορφής ενώσεις και προκύπτουν άτομα και ιόντα τους ή και κάποια διατομικά ανόργανα ιόντα. Επομένως, ανιχνεύονται όλα τα ισότοπα του As και κατ' επέκταση λαμβάνεται ανάλογο σήμα από τον ανιχνευτή του MS, στον αντίστοιχο χρόνο συγκράτησης για την κάθε αρχική οργανοαρσενική ή άλλη ένωση που περιέχει αρσενικό.

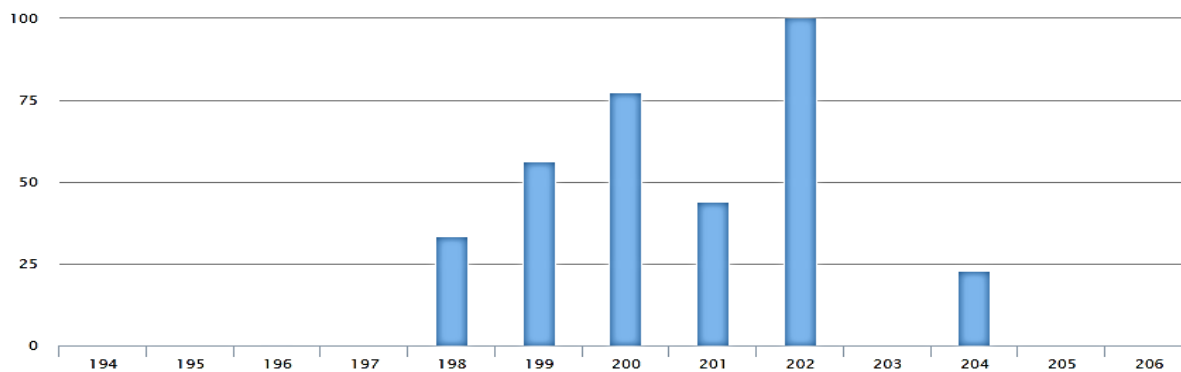
Η ποσοτικοποίηση και ο προσδιορισμός διευκολύνεται στην περίπτωση του ICP-MS σε σχέση με το απλό MS, επειδή υπάρχουν ευκολότερα διαθέσιμα πρότυπα, δε χρειάζεται άλλου τύπου ιοντισμός πριν το MS, γιατί το επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα επιτελεί και αυτόν το ρόλο με σταθερό τρόπο για τα διάφορα στοιχεία. Ειδικότερη μέριμνα, όμως, λαμβάνεται στα πλαίσια της τεχνικής αυτής, ώστε να περιορίζονται ή να διορθώνονται οι τυχόν ισοβαρείς παρεμποδίσεις που μπορεί να υφίστανται είτε από ισοβαρή στοιχεία που υπάρχουν στο υπόστρωμα του δείγματος, είτε στην κινητή φάση, είτε σχηματίζονται κατά την ατομοποίηση. Για παράδειγμα στην περίπτωση του ^{75}As από το διατομικό ιόν $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$, κλπ. Τέλος, με παρόμοιο τρόπο αλλά με ελαττωμένη ευαισθησία και ανιχνευτικότητα μπορεί η μέθοδος να εφαρμοστεί με τη χρήση ICP-AES αντί ICP-MS.



Σχήμα 13.14. Ανίχνευση ειδομορφών αρσενικού με την τεχνική της IC-ICP-MS. AsB: αρσενοβεταΐνη, As(III): τρισθενές, As(IV): πεντασθενές αρσενικό, MMA: μονομεθυλαρσενικό οξύ, DMA: διμεθυλαρσενικό οξύ.

13.7. Συνδυασμός Τεχνικής SPME με GC-MS για τον Προσδιορισμό Ειδόμορφων Υδραργύρου σε Ούρα

Ο προσδιορισμός των μορφών υδραργύρου έχει ιδιαίτερη σημασία λόγω της διαφορετικής τοξικότητάς τους στον ανθρώπινο οργανισμό. Οι οργανομεταλλικές ενώσεις του υδραργύρου έχουν τοξικολογικό ενδιαφέρον και μπορούν να προσδιορίζονται επιτυχώς με την τεχνική της Αέριας Χρωματογραφίας σε σύζευξη με τη φασματομετρία μαζών. Η ταυτοποίηση διευκολύνεται από την έντονη εμφάνιση του ισοτοπικού προφίλ του υδραργύρου σε καθεμία από τις ειδομορφές του. Συγκεκριμένα, ο υδράργυρος έχει 6-7 σημαντικά ισότοπα, όπως περιγράφονται στον **Πίνακα 13.2**, με τις αντίστοιχες μάζες και τη φυσική αφθονία του κάθε ισοτόπου. Με δεδομένο ότι ο ^{202}Hg είναι σε μεγαλύτερη φυσική αφθονία, αν θεωρηθεί ως 100, οι αντίστοιχες ισοτοπικές αναλογίες τους δίνονται στο **Σχήμα 13.15**.

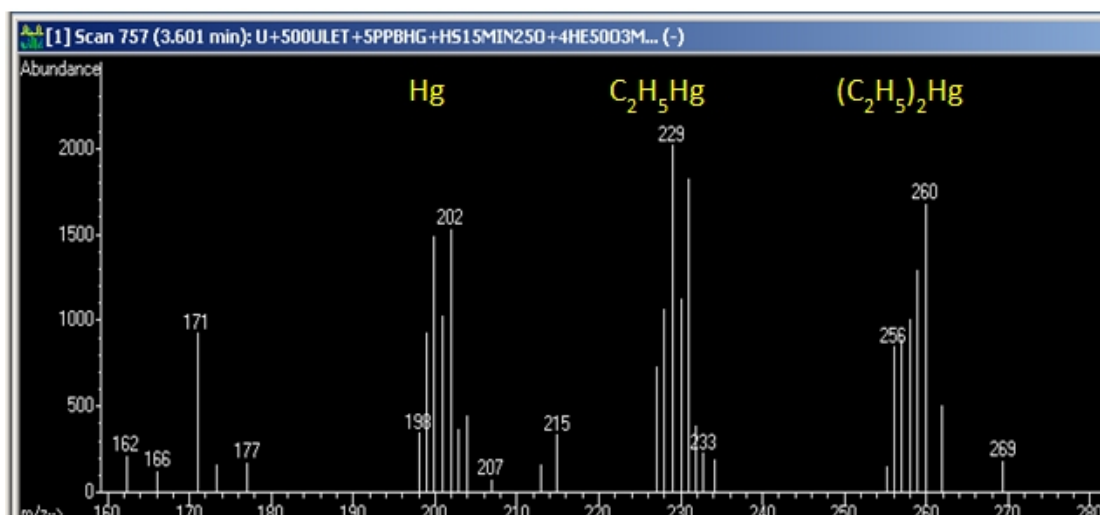


Σχήμα 13.15. Οι ισοτοπικές αναλογίες των ισότοπων του υδραργύρου, αν θεωρηθεί ως 100 ο ²⁰²Hg που βρίσκεται σε μεγαλύτερη φυσική αφθονία.

Ισότοπο	Μάζα/Da	Ισοτοπική αφθονία %
¹⁹⁶ Hg	195,9658	0,15
¹⁹⁸ Hg	197,9667	9,97
¹⁹⁹ Hg	198,9682	16,87
²⁰⁰ Hg	199,9683	23,10
²⁰¹ Hg	200,9703	13,18
²⁰² Hg	201,9706	29,86
²⁰⁴ Hg	203,9735	6,87

Πίνακας 13.2. Ισοτοπικές αφθονίες των ισότοπων του υδραργύρου και οι σχετικές ατομικές τους μάζες

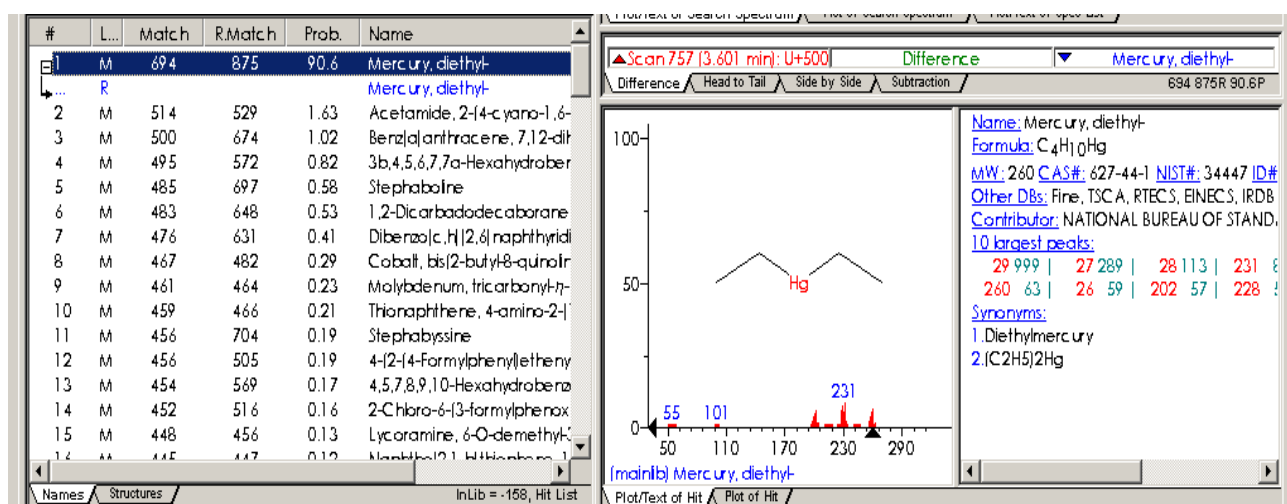
Στη συγκεκριμένη εφαρμογή προσδιορίζονται ειδομορφές του υδραργύρου με την τεχνική της μικροεκχύλισης στερεής φάσης (SPME) και αέρια χρωματογραφία σε σύζευξη με φασματομετρία μάζας (GC-MS). Κατά την ανίχνευση των ειδομορφών υδραργύρου με την τεχνική της GC-MS λαμβάνεται σχετικά σε μικρό χρόνο χρωματογράφημα με τα είδη (species), επειδή οι οργανοϋδραργυρικές ενώσεις είναι πολύ πτητικές. Στο φάσμα μαζών του **Σχήματος 13.16** διακρίνονται τρεις δέσμες ιόντων, που η καθεμία αντιστοιχεί σε ένα είδος θραύσματος αλλά με πλήρες το ισοτοπικό προφίλ, λόγω του υδραργύρου. Δηλαδή, ανιχνεύονται αρχικά τα ιόντα που αντιστοιχούν στον Hg στην περιοχή m/z 198-204 (οι υψηλότερες κορυφές ανήκουν αντίστοιχα στον ²⁰⁰Hg, ²⁰²Hg, που βρίσκονται σε μεγαλύτερη αφθονία, όπως περιγράφεται στον **Πίνακα 13.2**).



Σχήμα 13.16. Ανίχνευση ειδομορφών υδραργύρου με την τεχνική της GC-MS: στο φάσμα μαζών διακρίνονται τα ιόντα που αντιστοιχούν στον Hg, στον αιθυλδράργυρο και τέλος στον διαιθυλδράργυρο.

Στην περιοχή m/z 227-233 ανιχνεύονται όσα αντιστοιχούν στον αιθυλδράργυρο (οι υψηλότερες κορυφές 229 και 231 ανήκουν αντίστοιχα στον $^{200}\text{HgC}_2\text{H}_5$, και $^{202}\text{HgC}_2\text{H}_5$). Τέλος, στην περιοχή m/z 255-262 ανιχνεύονται όσα αντιστοιχούν στο διαιθυλδράργυρο (οι υψηλότερες κορυφές 258 και 260 ανήκουν αντίστοιχα στον $^{200}\text{Hg}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$, και $^{202}\text{Hg}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$). Αξιοσημείωτη είναι η σταθερή διαφορά κατά m/z 29, που αντιστοιχεί στη διαδοχική θραυσματοποίηση και ο μεθυλδράργυρος, στο χρωματογράφημα θα εκλουόταν νωρίτερα και στο φάσμα μαζών του θα υπήρχαν δύο δέσμες ιόντων αντί τρεις, δηλαδή αφενός για τον ^{200}Hg , ^{202}Hg και αφετέρου για το μεθυλδράργυρο $^{200}\text{HgCH}_3$, και $^{202}\text{HgCH}_3$.

Τέλος, στο **Σχήμα 13.17** δίνεται μια εικόνα από τη βάση δεδομένων φασμάτων μαζών (του ινστιτούτου NIST) για την ανίχνευση διαιθυλδραργύρου με την τεχνική της GC-MS. Στο αριστερό μέρος του παραθύρου δίνεται πρακτικά η σχετικά καλή πιθανότητα (90,6%) να αντιστοιχεί το λαμβανόμενο φάσμα στη συγκεκριμένη δομή του διαιθυλδραργύρου, καθώς και εναλλακτικές δομές, που, όμως, δεν είναι καθόλου πιθανές. Στο φάσμα μαζών στο δεξί μέρος του παραθύρου διακρίνονται τα ιόντα που αντιστοιχούν στον αιθυλδράργυρο καθώς και ο συντακτικός του τύπος. Φυσικά, όσο πληρέστερη είναι μια βιβλιοθήκη φασμάτων, τόσο διευκολύνεται η ταυτοποίηση των άγνωστων ενώσεων.



Σχήμα 13.17. Εικόνα από τη βάση δεδομένων φασμάτων μαζών (του ινστιτούτου NIST) για την ανίχνευση διαιθυλδραργύρου με την τεχνική της GC-MS

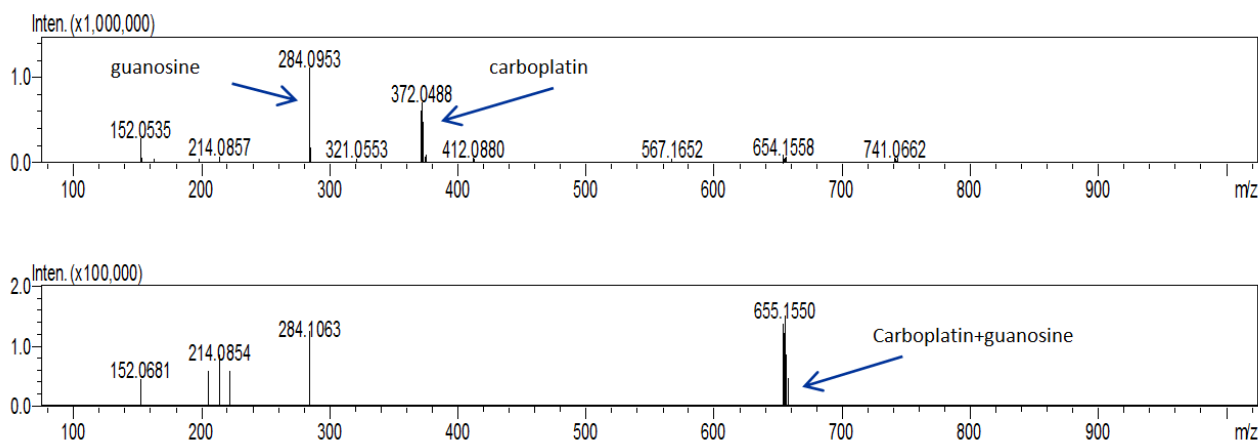
13.8. Τεχνική LC-MS για τη Μελέτη Σύζευξης Αντικαρκινικού Φαρμάκου Λευκόχρυσου και Νουκλεοσιδίων του DNA

Πολλά από τα μεταλλοφάρμακα, όπως τα χημειοθεραπευτικά, είναι δυνατό να αλληλεπιδρούν με το μόριο του DNA ή ειδικότερα με κάποιες μονάδες του, όπως τα νουκλεοτίδια αδενosίνη, γουανosίνη, κυτιδίνη και θυμιδίνη, στα οποία αντιστοίχως υπάρχουν οι νουκλεοβάσεις αδενίνη, γουανίνη, κυτοσίνη και θυμίνη. Αυτό μπορεί άλλοτε να είναι ο ίδιος ο σκοπός ενός συγκεκριμένου φαρμάκου, άλλοτε, όμως, να είναι μια ανεπιθύμητη παρενέργεια. Από πλευράς βιοανάλυσης υπάρχουν τεχνικές με τις οποίες μπορούν να μελετηθούν αυτές οι πιθανές επιδράσεις, λόγω του σχηματισμού πιθανών συμπλόκων ή άλλης δομής ενώσεων. Στην περίπτωση αυτή θα πρέπει να μπορεί καταρχήν να διαχωριστούν επαρκώς και να ταυτοποιηθούν οι ελεύθερες μορφές αφενός του νουκλεοτιδίου και του μεταλλοφαρμάκου και αφετέρου του πιθανού συζεύγματος τους. Συνεπώς, ένας υδροχρωματογραφικός διαχωρισμός είναι απαραίτητος πριν από την ανάλυση με φασματομετρία μάζας. Στο παράδειγμα αυτό θα αναφερθεί η μελέτη της πιθανής σύζευξης ενός χημειοθεραπευτικού φαρμάκου (καρβοπλατίνη) με τη γουανιδίνη.

Η καρβοπλατίνη, ως έχει ή σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα βρίσκει κλινική χρήση παγκοσμίως για τη θεραπεία ποικίλων μορφών καρκίνου. Η καρβοπλατίνη $[\text{Pt}(\text{cbdca}-O,O')(\text{NH}_3)_2]$, όπου cbdca είναι το κυκλοβουτάνιο-1,1-δικαρβοξύλιο, ανήκει στα δεύτερης γενιάς αντικαρκινικά φάρμακα τα οποία έχουν βάση το λευκόχρυσο. Αυτά είναι λιγότερο ωτοτοξικά και νεφροτοξικά σε σχέση με την πρώτη γενιά σισπλατίνη. Η κύρια διαφορά ανάμεσα στις δομές της καρβοπλατίνης και της σισπλατίνης είναι ότι η καρβοπλατίνη

διαθέτει έναν εξαμελή δικαρβοξυλικό δακτύλιο, ο οποίος λόγω της χηλικής επίδρασης, την καθιστά χημικά λιγότερο δραστική σε αντίθεση με τη σισπλατίνη και, συνεπώς, ηπιότερη στις παρενέργειές της.

Η μελέτη περιλαμβάνει μεταξύ άλλων in-vitro αντίδραση μεταξύ γουανιδίνης και καρβοπλατίνης σε θερμοκρασία 36,6 °C και στη συνέχεια ανίχνευση των σχηματιζόμενων μορφών με την τεχνική LC-MS. Για λόγους απλότητας δεν περιγράφονται εδώ οι πειραματικές συνθήκες οι οποίες υπάρχουν σε αντίστοιχες αναφορές στη βιβλιογραφία. Ο προσδιορισμός των μορφών στις οποίες εμπλέκεται ο λευκόχρυσος, γίνεται εφικτός με χρήση του ισοτοπικού προφίλ του μετάλλου, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 13.18** όπου δίνεται το φάσμα μαζών και τα ιόντα που αντιστοιχούν στο σύμπλοκο καρβοπλατίνης-γουανοσίνης.



Σχήμα 13.18. Φάσματα μαζών κατά την ανίχνευση συζευγμάτων καρβοπλατίνης και γουανοσίνης. Το σύζευγμα εντοπίζεται σε $M+H = 655$. Το ισοτοπικό προφίλ του λευκόχρυσου είναι χαρακτηριστικό στις ενώσεις όπου συμμετέχει.

Βιβλιογραφία

- Becker J.S. (2007). *Inorganic Mass Spectrometry*, John Wiley, England.
- Boyd R., Basic C., Bethem R. (2008). *Trace Quantitative Analysis by Mass Spectrometry*, Chichester, England.
- Brewer T.M., Marcus R.K. (2007). *Determination of free iron and iron bound in metalloproteins via liquid chromatography separation and inductively coupled plasma-optical emission spectroscopy (LC-ICP-OES) and particle beam/hollow cathode-optical emission spectroscopy (LC-PB/HC-OES) techniques*, Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 22, 1067–1075.
- De Laeter J., (2001). *Applications of Inorganic Mass Spectrometry*, Wiley-Interscience, New York.
- Mc Master M., (2008). *GC/MS, A Practical User's Guide*, John Wiley and Sons, New Jersey, Canada.
- Kunemeyer J., Terborg L., Nowak S., Scheffer A., Telgmann L., Tokmak F., Gonsel A., G. Wiesmuller, S. Reichelt, U. Karst, (2008). *Speciation Analysis of Gadolinium-Based MRI Contrast Agents in Blood Plasma by Hydrophilic Interaction Chromatography/Electrospray Mass Spectrometry*, Analytical Chemistry, 80, 8163–8170.
- Lewen N., Matthew S., Schenkenberger M., Raglione T. (2004). *A rapid ICP-MS screen for heavy metals in pharmaceutical compounds*. J. Pharm. Biomed. Anal. 35, 739.
- Manley S.A., Gailer J., (2009). *Analysis of the plasma metalloproteome by SEC-ICPAES: bridging proteomics and metabolomics*, Expert Reviews in Proteomics, 6, 251-265.
- McLafferty F.W. (ed.) (2014). *Wiley Registry of Mass Spectral Data*, John Wiley and Sons Inc., DOI: 10.1002/9780470175217.

- Millos J., Costas-Rodriguez M., Lavilla I., Bendicho C., (2009). *Multiple small volume microwave-assisted digestions using conventional equipment for multielemental analysis of human breast biopsies by inductively coupled plasma optical emission spectrometry*, *Talanta*, 77, 1490–1496.
- Nolte J. (2001). *ICP Emission Spectrometry, a Practical Guide*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, Weinheim, Germany.
- Sooriyaarachchi, A., Narendran A., Gailer J., *Comparative hydrolysis and plasma protein binding of cis-platin and carboplatin in human plasma in vitro*, *Metallomics*, 2011, 3, 49-55.
- Taylor A., Branch S., Day M.P., Patriarca M., White M. (2011). *Atomic spectrometry update. Clinical and biological materials, foods and beverages*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 26, 653–692.
- Zachariadis G.A., Kapsimali D., Rosenberg E. (2012). *Investigation of the HPLC-IT-TOF-MS Technique with Atmospheric Pressure Chemical Ionization for Speciation of Selenoaminoacids, Dimethyldiselenide, and Diphenyldiselenide*, *Analytical Letters*, 45, 642-650.
- Zachariadis G.A., Rosenberg E., (2009). *Determination of butyl- and phenyltin compounds in human urine by HS-SPME after derivatization with tetraethylborate and subsequent determination by capillary GC – MIP/AED and GC-MS detection*, *Talanta*, 78, 570-576.
- Zachariadis G.A., Tzollas N.M., Rosenberg E. (2013). *Speciation study of trialkyl- and triphenyl tin by liquid chromatography using Ion Trap TOF tandem MS and atmospheric pressure chemical ionization*, *Current Analytical Chemistry*, 9, 279-287.

Κεφάλαιο 14: Εφαρμογές της Ατομικής Φασματομετρίας στη Βιοανάλυση

Γεώργιος Ζαχαριάδης

Σύνοψη

Το κεφάλαιο αυτό περιλαμβάνει ορισμένες τυπικές εργαστηριακές τεχνικές προκατεργασίας και ανάλυσης βιολογικών υλικών με στόχο τον προσδιορισμό μεταλλικών ιχνοστοιχείων. Οι τεχνικές αυτές μπορούν να εφαρμοστούν με μικρές διαφοροποιήσεις σε διάφορα βιολογικά υποστρώματα, όπως ιστούς εσωτερικών οργάνων οι οποίοι λαμβάνονται με βιοψία ή εγχειρητικά, τρίχες, δέρμα, βιολογικά υγρά όπως ολικό αίμα, ορός αίματος, λεμφικό υγρό, ούρα, σπείλος, βλέννα, δάκρυα, κ.ά. Επιπλέον, περιγράφονται εφαρμογές από τις πλέον εύχρηστες τεχνικές της Ατομικής Φασματομετρίας, με στόχο τον ποσοτικό προσδιορισμό τοξικών ή απαραίτητων στον οργανισμό ιχνοστοιχείων. Οι τεχνικές αυτές είναι χρήσιμα εργαλεία στη βιοανάλυση, την κλινική ανάλυση, τη φαρμακευτική ανάλυση καθώς και στην τοξικολογική ανάλυση, ιδιαίτερα όταν είναι διαθέσιμες μικρές ποσότητες των βιολογικών δειγμάτων για ανάλυση.

Προαπαιτούμενη γνώση

Για την εφαρμογή των τεχνικών αυτών είναι απαραίτητες οι βασικές γνώσεις Ενόργανης Χημικής Ανάλυσης, και ιδιαίτερα της Ατομικής Φασματομετρίας, καθώς και γνώσεις χειρισμού και προκατεργασίας βιολογικών δειγμάτων.

14.1. Εισαγωγικά

Ο προσδιορισμός του ολικού φορτίου του δείγματος σε κάθε μέταλλο μπορεί να γίνει με τη Φασματομετρία Ατομικής Απορρόφησης με φλόγα ή φούρνο γραφίτη (FAAS, ETAAS) ή εφόσον είναι διαθέσιμη, με τεχνικές της φασματομετρίας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP-MS και ICP-AES). Σε κάποιες από τις τεχνικές αυτές, η ανάλυση απαιτεί ελάχιστη μάζα δείγματος μερικές δεκάδες mg ή μL . Εντούτοις, όσο μεγαλύτερη είναι η διαθέσιμη ποσότητα τόσο περισσότερες επαναληπτικές αναλύσεις μπορεί να γίνουν, ώστε να βελτιωθεί η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων.

Καταρχήν στη χημική ανάλυση είναι επιθυμητό να περιορίζονται τα στάδια προκατεργασίας του δείγματος στο ελάχιστο, με σκοπό την αποφυγή επιμολύνσεων ή απωλειών αλλά και την ταχύτερη ολοκλήρωση της ανάλυσης. Αν είναι εφικτό, όπως περιγράφεται παρακάτω, παρακάμπτεται η προκατεργασία του δείγματος. Σε όλες τις άλλες περιπτώσεις, όμως, που δεν είναι εφικτό να παρακαμφθεί, εφαρμόζονται με προσοχή όλα τα απαιτούμενα στάδια, ώστε να προκύπτουν αξιόπιστα ποσοτικά αποτελέσματα. Ειδικότερα εφαρμόζονται οι παρακάτω τεχνικές προκατεργασίας:

Απευθείας εισαγωγή με έγχυση ή τοποθέτηση: Η τεχνική αυτή μπορεί να εφαρμοστεί για ανάλυση στην τεχνική ETAAS. Στην περίπτωση αυτή είτε γίνεται έγχυση του ακατέργαστου βιολογικού υγρού απευθείας στο φούρνο θερμαινόμενου γραφίτη είτε τοποθέτηση του στερεού ιστού στην πλατφόρμα του φούρνου. Λόγω της απλότητας και της ταχύτητάς της η συγκεκριμένη τεχνική είναι χρήσιμη σε κάποιες αναλύσεις ρουτίνας. Η εφαρμογή της τεχνικής αυτής, όμως, περιορίζεται εξαιτίας των μεγάλων σημάτων υποβάθρου, γι' αυτό και δεν έχει πολύ καλά χαρακτηριστικά επίδοσης συγκρινόμενη με τις άλλες τεχνικές.

Χημική τροποποίηση: Ορισμένες ενώσεις αποτελούν χημικούς τροποποιητές (chemical modifiers) και τροποποιητές υποστρώματος (*matrix modifiers*) κατά τη διάρκεια του προγράμματος ατομοποίησης, στην περίπτωση που χρησιμοποιείται η τεχνική της φασματομετρίας ατομικής απορρόφησης φούρνου θερμαινόμενου γραφίτη. Ειδικά για τον προσδιορισμό μετάλλων σε βιολογικά υποστρώματα, ως χημικοί τροποποιητές μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα Pd, Pd+Mg, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, NH_4NO_3 , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, (ανάλογα με το προσδιοριζόμενο στοιχείο) αλλά και η κατεργασία με μέταλλα, όπως Pt, Zr, Ru, Rh, Ir, τα οποία παίζουν το ρόλο του σταθεροποιητή ή συμβάλλουν στον περιορισμό της φθοράς του φούρνου θερμαινόμενου γραφίτη. Οι χημικοί τροποποιητές, δηλαδή, δημιουργούν θερμικά πιο σταθερές ενώσεις του

προσδιοριζόμενου στοιχείου είτε μεταβάλλουν τα χαρακτηριστικά των άλλων συστατικών του υποστρώματος, ώστε να περιορίζεται η αρνητική τους επίδραση.

Αραιώση: Αν πρέπει οπωσδήποτε να αποφευχθούν οι δραστικές τεχνικές προκατεργασίας όπως π.χ. οξειδωτική πέψη, σε ορισμένους τύπους βιολογικών δειγμάτων είναι δυνατό το δείγμα, απλώς, να αραιώνεται με διάφορα αντιδραστήρια, π.χ. αραιό HNO_3 , διάλυμα Triton X-100, διοξάνιο, κ.ά., και να εισάγεται με τη μορφή αυτή στον αναλυτή. Η τεχνική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τα βιολογικά υγρά, που λόγω των αιωρούμενων στερεών και του ιξώδους τους δεν μπορούν να εγχυθούν άμεσα αλλά μόνο μετά από αραιώσή τους. Οι πρωτεΐνες μπορούν να προκαλέσουν απόφραξη του νεφοποιητή. Μια αναλογία αραιώσης από 1:20 έως 1:50 για το ολικό αίμα, 1:5 έως 1:10 για τον ορό και 1:1 έως 1:5 για τα ούρα είναι συνήθως επαρκής, αρκεί να μην προκύπτει τελικά μη μετρήσιμη συγκέντρωση του προσδιοριζόμενου συστατικού.

Αποπρωτεΐνωση: Η αποπρωτεΐνωση εφαρμόζεται συχνότερα στην ανάλυση βιολογικών υγρών. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών είναι γενικά απλή και γρήγορη μέθοδος, είτε αποσκοπεί στην απομάκρυνσή τους είτε τελικά στην παραλαβή τους για περαιτέρω μεταλλομική μελέτη. Ως αντιδραστήρια μπορούν να χρησιμοποιηθούν το νιτρικό οξύ (HNO_3) σε περιεκτικότητα 2-10 % m/v, το τριχλωρο-οξικό οξύ (TCA) σε περιεκτικότητα 5 - 10 % m/v, το υπερχλωρικό οξύ (HClO_4), ή άλλα αντιδραστήρια, ανάλογα με την επακόλουθη ανάλυση. Συνήθως, εφαρμόζεται διαδοχικά και φυγοκέντριση για καλύτερο διαχωρισμό.

Εκχύλιση υγρού-υγρού: Πιο περιορισμένη στους προσδιορισμούς μετάλλων σε βιολογικά υποστρώματα είναι η χρήση της εκχύλισης υγρού – υγρού (LLE) με εκχυλιστικά, όπως η μεθυλο-ισοβουτύλιο κετόνη, η ισοβουτυλική αλκοόλη, το χλωροφόρμιο κ.ά., συνήθως μετά από συναρμογή του μετάλλου που μας ενδιαφέρει με κατάλληλο υποκαταστάτη. Επιπλέον, σχετικές εφαρμογές βρίσκουν και η εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE), καθώς και η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης σε ίνα (SPME). Επειδή τα ιόντα των μετάλλων, επιδιαλυτωμένα ή μη, είναι πολικά, ο σχηματισμός μη πολικής ένωσης συναρμογής βελτιώνει την εκχύλιση του μετάλλου στον οργανικό διαλύτη ή τη συγκράτησή του πάνω στη στερεή φάση της στήλης ή της ίνας. Η εκχύλιση εκτός από τεχνική διαχωρισμού θεωρείται και τεχνική προσυγκέντρωσης του στοιχείου. Με κατάλληλη επιλογή του εκχυλιστικού συστήματος μπορεί να γίνει εκλεκτική εκχύλιση συγκεκριμένου στοιχείου. Αντιδραστήρια που λειτουργούν ως χηλικοί συναρμοτές είναι διάφορες διθειοκαρβαμιδικές ενώσεις, όπως π.χ. το NaDDC (δισουλφο-διθειοκαρβαμιδικό νάτριο), το APDC (πυρρολιδινο-διθειοκαρβαμιδικό αμμώνιο), κ.ά. Γενικά είναι γνωστό ότι τα διθειοκαρβαμιδικά δημιουργούν ενώσεις συναρμογής με πολλά μέταλλα. Ως οργανικοί διαλύτες, συνήθως, χρησιμοποιούνται το χλωροφόρμιο, η ισοβουτύλιο-μεθυλο κετόνη (IBMK), που είναι εύφλεκτοι και συμβατοί με τους ατομοποιητές φλόγας· υστερούν, όμως, αναφορικά με τη χρήση σε ατομοποιητές φούρνου θερμαινόμενου γραφίτη. Η εκλεκτικότητα της εκχύλισης μπορεί να βελτιωθεί με ρύθμιση του pH του δείγματος. Μειονέκτημα είναι ότι η διαδικασία της εκχύλισης υγρού-υγρού είναι επιπλέον στάδιο. Επίσης, η τεχνική αυτή εφαρμόζεται μετά την κατεργασία του δείγματος, ώστε να προκύψει κάποιο υδατικό διάλυμά του. Κατ' εξαίρεση ορισμένα μέταλλα εκχυλίζονται και χωρίς προηγούμενη πέψη, μετά από αποπρωτεΐνωση του ολικού αίματος ή του ορού με τη χρήση τριχλωροοξικού οξέος ή ύστερα από διαδικασία αιμόλυσης, με κάποιο τασενεργό (π.χ. triton X-100).

Εκχύλιση στερεάς φάσης: Σχετική εφαρμογή στους προσδιορισμούς μετάλλων σε βιολογικά υγρά βρίσκει η εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE, Solid Phase Extraction), καθώς και η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης σε ίνα (SPME, Solid Phase Microextraction) είτε με εμβάπτισή της (Direct Immersion SPME) είτε από τον υπερκείμενο χώρο (Head-Space SPME). Με τις τεχνικές αυτές διευκολύνεται ο μορφοειδικός προσδιορισμός ενώσεων των μετάλλων, που έχουν ή αποκτούν μη πολικό χαρακτήρα. Η εκχύλιση στερεάς φάσης εκτός από τεχνική διαχωρισμού θεωρείται και τεχνική προσυγκέντρωσης του προσδιοριζόμενου στοιχείου.

Υγρή πέψη ή χώνευση: Ειδικά για τα μέταλλα, όταν είναι επιθυμητός ο προσδιορισμός της συνολικής συγκέντρωσής τους, συνήθως, χρησιμοποιείται μια αυτοτελής διαδικασία χώνευσης (ή πέψης, digestion) του δείγματος με δραστικές συνθήκες. Συχνή εφαρμογή βρίσκει η χρήση του HNO_3 μόνου ή σε συνδυασμό με H_2SO_4 ή H_2O_2 και παροχή ενέργειας είτε με μορφή μικροκυμάτων είτε με θέρμανση. Οι χωνεύσεις γίνονται σε ανοικτά δοχεία ή κλειστά δοχεία με πίεση. Φυσικά και άλλα μίγματα οξέων και ισχυρών οξειδωτικών μέσων μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πέψη βιολογικών δειγμάτων. Σε κάποιες περιπτώσεις έχουν αναπτυχθεί ολόκληρες διατάξεις προκειμένου να πραγματοποιείται η πέψη των δειγμάτων σε συνεχή ροή ή με αρκετά αυτόματο τρόπο.

Η ξηρή τεφροποίηση: Εναλλακτικά είναι δυνατή η τεφροποίηση του βιολογικού υλικού σε θερμοκρασία μέχρι 550-600 °C μέσα σε φούρνο, με κάψα πορσελάνης, ή μέσα σε χαλαζιακά χωνευτήρια, σε κατάλληλους φούρνους μικροκυμάτων. Παρόλη, όμως, την απλότητά της η μέθοδος αυτή για την προκατεργασία βιολογικών δειγμάτων μπορεί να προκαλέσει απώλειες των προσδιοριζόμενων στοιχείων με μορφή πτητικών αλάτων τους ενώ εφαρμόζεται μόνο σε ειδικές βιοαναλυτικές μεθόδους.

Γεννήτρια υδριδίων: Προσφέρει πολύ καλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα για ορισμένα μέταλλα, αλλά δεν αντικαθιστά τις διαδικασίες προκατεργασίας, γιατί αν εφαρμοστεί απευθείας δεν παρουσιάζει καλή ανάκτηση. Η τεχνική αυτή εφαρμόζεται για τον προσδιορισμό As, Se, Te, Sb, Sn, με φασματομετρία ατομικής απορρόφησης. Με μια παραλλαγή της - μέθοδος «παραγωγής ψυχρού ατμού» - γίνεται προσδιορισμός ειδικά του Hg. Και οι δύο μορφές αποτελούν τις πρότυπες μεθόδους για τον προσδιορισμό αυτών των συγκεκριμένων μετάλλων στα βιολογικά δείγματα. Στην τεχνική των υδριδίων, αφού προηγουμένως διαλυτοποιηθεί το βιολογικό δείγμα με όξινη πέψη και απομακρυνθούν τα τυχόν οξειδωτικά, γίνεται αναγωγή των προσδιοριζόμενων στοιχείων με NaBH_4 και παράγεται πτητικό υδρίδιο (π.χ. AsH_3 , SbH_3) ή ατμός Hg^0 , τα οποία διαχωρίζονται με απαερίωση του μείγματος. Οδηγούνται στη συνέχεια στην κυψελίδα της φασματομετρίας ατομικής απορρόφησης, απαλλαγμένα από τα άλλα συστατικά του βιολογικού υποστρώματος και μετρώνται με σημαντική ευαισθησία.

Εκτομή και Εκρόφηση με χρήση laser: Οι σύγχρονες αυτές τεχνικές εφαρμόζονται στην ανάλυση στερεών βιολογικών δειγμάτων και δεν προκαλούν παρατηρήσιμες απώλειες στο υλικό του δείγματος. Στην εκτομή με laser (*laser ablation*, LA), ισχυρή ακτίνα laser εστιάζεται στην επιφάνεια του δείγματος ως έχει και προκαλεί εξόρυξη και εκτίναξη μικροσκοπικών τμημάτων του υλικού, τα οποία συμπαρασύρονται από ρεύμα αργού και οδηγούνται στον ατομοποιητή πλάσματος (ICP). Συνήθως, η τεχνική αυτή συνδυάζεται με φασματοόμετρο μαζών, ή εναλλακτικά ατομικής εκπομπής. Στην εκρόφηση με laser υποβοηθούμενη από το υπόστρωμα (*matrix assisted laser desorption ionization*, MALDI), ισχυρή ακτίνα laser εστιάζεται στην επιφάνεια του δείγματος το οποίο έχει προκατεργαστεί με κατάλληλο αντιδραστήριο και προκαλεί όχι μόνο εκτίναξη μικροσκοπικών τμημάτων του υλικού αλλά και ιοντισμό τους, ώστε να προετοιμαστούν στη συνέχεια για ανάλυση στον αναλυτή μαζών ενός φασματομέτρου μαζών.

14.2. Μέθοδος Προσδιορισμού Pb, Cd, Cr σε Ορό Αίματος και Ολικό Αίμα, με την Τεχνική ETAAS

Τα δείγματα ορού αίματος προέρχονται από φυγοκεντρικό διαχωρισμό του κλάσματος των ερυθρών αιμοσφαιρίων και λήψη του υπερκείμενου υδατικού διαλύματος, το οποίο είναι περίπου υποκίτρινο έως άχρωμο και με ελάχιστο ποσοστό αιωρούμενων. Το τοξικά στοιχεία, όμως, όπως τα Pb, Cd, Cr, αν υπάρχουν λόγω έκθεσης του οργανισμού, ανιχνεύονται σε μικρότερες συγκεντρώσεις. Ο μόλυβδος για παράδειγμα κυμαίνεται, συνήθως, σε επίπεδα κάτω από 10-50 $\mu\text{g/L}$ ανάλογα με την ηλικία και την έκθεση του οργανισμού. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι επίπεδα πάνω από 100 $\mu\text{g/l}$ θεωρούνται ότι χρήζουν ελέγχου και ενδεχόμενης θεραπείας.

Η τεχνική της φασματομετρίας ατομικής απορρόφησης με ηλεκτροθερμική ατομοποίηση (ETAAS) είναι από τις πιο ευαίσθητες τεχνικές και με σχετικά μικρό αριθμό παρεμποδίσεων, εφόσον ανήκει στην κατηγορία της ατομικής φασματομετρίας και αυτή χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό ιχνών τοξικών μετάλλων. Απαιτείται είτε πέψη του δείγματος (υγρή ή ξηρή) και στη συνέχεια αραίωσή του προς ένα υδατικό διάλυμα όλων των μεταλλικών στοιχείων, είτε απλή αραίωσή του με κάποιο διαλύτη, είτε απευθείας, όπως στη μέθοδο που περιγράφεται παρακάτω. Το ολικό αίμα αναλύεται, απαραίτητα, μετά από διαλυτοποίησή του με υγρή όξινη πέψη ή τεφροποίηση ή επίδραση μικροκυμάτων, όπως προαναφέρθηκε, και μετατρέπεται σε διαυγή υγρή μορφή, όπου έχει οξειδωθεί το οργανικό περιεχόμενό του. Σε ορισμένες περιπτώσεις είναι εφικτή η άμεση εισαγωγή του δείγματος με την αρχική μορφή του, όπως όταν αναλύεται ορός αίματος, όμως και σ' αυτήν την περίπτωση πιο ασφαλή αποτελέσματα λαμβάνονται μετά από υγρή πέψη του δείγματος. Τέλος, ακόμη και αν είναι στερεή η αρχική μορφή (π.χ. ιστός) είναι δυνατή η τοποθέτησή του δείγματος απευθείας στο φούρνο θερμαινόμενου γραφίτη, φυσικά σε περιορισμένη ποσότητα (λίγα mg) και με κατάλληλη βαθμονόμηση.

Εναλλακτικά, όπως προαναφέρθηκε, η δεύτερη μέθοδος στηρίζεται στην καύση και τεφροποίηση του αίματος ή του ορού, αφού το σύνολο της μάζας του είναι νερό και οργανική ύλη (C, H, O, N). Ορισμένο

βάρος του δείγματος τοποθετείται σε κάψα πορσελάνης και καλύπτεται. Η τεφροποίηση γίνεται σε επαγωγικό φούρνο. Μετά την τεφροποίηση, το υπόλειμμα τέφρας παραλαμβάνεται με αραιό διάλυμα νιτρικού οξέος και αραιώνεται σε κατάλληλο μικρό όγκο για περαιτέρω ανάλυσή του. Στην περίπτωση αυτή δεν απαιτείται η προσθήκη κάποιου τροποποιητή της σύστασης του δείγματος αφού ήδη έχουν απομακρυνθεί τα οργανικά συστατικά, όμως πάντοτε είναι απαραίτητη η χρήση του διορθωτή υπόβαθρου σήματος.

Η παρασκευή και χρήση των πρότυπων διαλυμάτων γίνεται ως εξής: παρασκευάζονται αρχικά πυκνά υδατικά διαλύματα των 1000 mg/L, με διάλυση κατάλληλης ποσότητας αλάτων τους (κατά προτίμηση νιτρικών αλάτων) σε 0,5 mol/L HNO₃, ή χρησιμοποιούνται προετοιμασμένα πυκνά διαλύματα που κυκλοφορούν στο εμπόριο, και παρασκευάζονται από αξιόπιστες εταιρείες με βάση διαδικασίες ιχνηλασιμότητας διεθνών οργανισμών προτυποποίησης. Τα πρότυπα διαλύματα εργασίας για την καμπύλη αναφοράς (*working standards*) παρασκευάζονται με διαδοχικές αραιώσεις των πυκνών διαλυμάτων με υπερκαθαρό ή διπλά απιονισμένο νερό, ώστε να προκύψουν τα εξής διαλύματα με συγκεντρώσεις που κυμαίνονται μεταξύ 0,50 - 1,00 - 2,00 - 5,00 - 10,0 - 20,0 - 50,0 μg/L, ανάλογα με το στοιχείο που προσδιορίζεται. Οι αραιώσεις πρέπει να γίνονται σε δύο φάσεις: πρώτα παρασκευάζεται διάλυμα των 10 mg/L και στη συνέχεια τα προαναφερόμενα διαλύματα εργασίας, ώστε να αποφεύγονται σφάλματα στη λήψη πολύ μικρών όγκων. Το pH όλων των διαλυμάτων ρυθμίζεται με HNO₃ σε 1-2, για την αποφυγή υδρόλυσης.

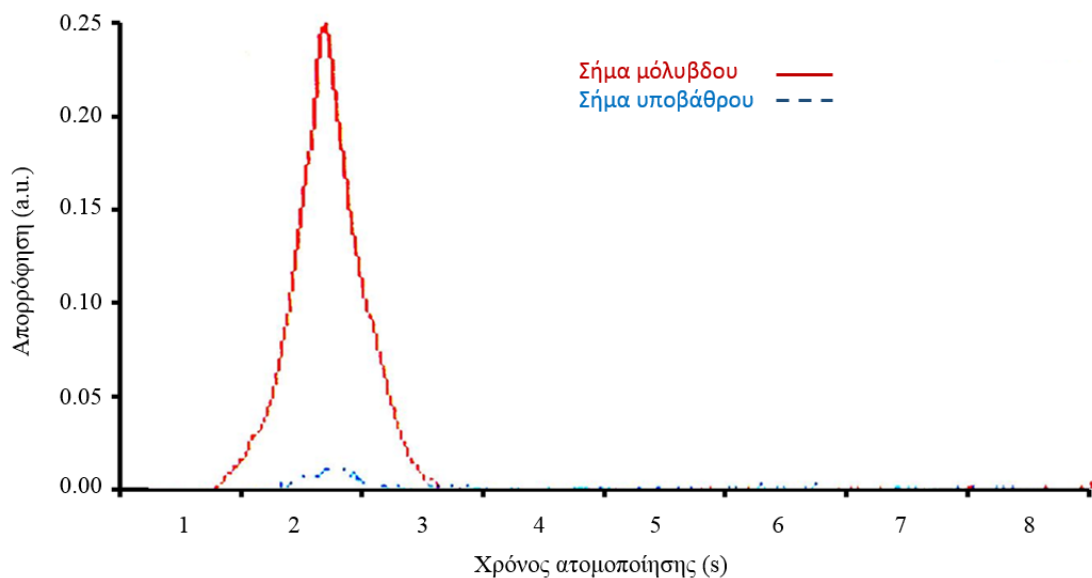
Παράλληλα, με τη χρήση πρότυπων διαλυμάτων για τη χάραξη των καμπυλών αναφοράς, πρέπει να χρησιμοποιούνται και πιστοποιημένα υλικά αναφοράς (CRMs) για τον έλεγχο της ακρίβειας και της πιστότητας της μεθόδου. Τα CRMs που έχουν υπόστρωμα αίματος ή ούρων, κυκλοφορούν στο εμπόριο με μορφή σκόνης η οποία έχει προκύψει από λυοφυλίωση αίματος ή ούρων αντίστοιχα· όταν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί, γίνεται ανασύστασή του με διάλυση της σκόνης σε καθορισμένη ποσότητα νερού ή όξινου υδατικού διαλύματος και είναι έτοιμο για περαιτέρω ανάλυση.

Το φασματόμετρο ατομικής απορρόφησης το οποίο χρησιμοποιείται, είναι προτιμότερο να είναι διπλής δέσμης και, επιπλέον, εξοπλισμένο με αυτόματο δειγματολήπτη-δειγματοδότη, για να διασφαλίζεται η επαναληψιμότητα και η αυτοματοποίηση της εισαγωγής των προς ανάλυση δειγμάτων. Όταν τέλος, είναι εξοπλισμένο και με διορθωτή θορύβου (π.χ. τύπου Zeeman, ή τύπου διακοπτόμενης δέσμης), τότε οι παρεμποδίσσεις περιορίζονται στο ελάχιστο. Οι λυχνίες που χρησιμοποιούνται είναι λυχνίες κοίλης καθόδου για το Cr και λυχνίες εκκένωσης χωρίς ηλεκτρόδια για το Cd και το Pb. Ο σωλήνας γραφίτη περιέχει πλατφόρμα L'νον και είναι θερμαινόμενος είτε σε εγκάρσια διεύθυνση ως προς τη δέσμη είτε σε διαμήκη. Η πλατφόρμα θερμαίνεται αρχικά με ακτινοβολία από τα τοιχώματα του θερμού γραφίτη, οπότε η επιφανειακή θερμοκρασία της πλατφόρμας είναι υψηλότερη και πιο σταθερή, ώστε να περιορίζονται οι φυσικές και χημικές παρεμποδίσσεις από το υπόστρωμα του δείγματος. Ο προσδιορισμός γίνεται με συνεχή ροή αργού (Ar), ώστε να απομακρύνονται τα πτητικά συστατικά του υποστρώματος τα οποία εξαχνώνονται κατά το στάδιο της πυρόλυσης, και ταυτόχρονα να προστατεύεται ο γραφίτης από οξειδώσή του από το ατμοσφαιρικό οξυγόνο. Η ροή αυτή διακόπτεται προσωρινά μόνο κατά το στάδιο της ατομοποίησης, για να γίνει η κυρίως μέτρηση.

Αρχικά προγραμματίζεται η διαδικασία εισαγωγής των πρότυπων διαλυμάτων, των λευκών διαλυμάτων, των κυρίως δειγμάτων και της πολλαπλότητάς τους, των δειγμάτων-μαρτύρων (*blind samples*) των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας (*quality control samples*) και τέλος της θέσης των διαλυμάτων επαναρύθμισης της κλίσης της καμπύλης αναφοράς (*reslope samples*). Μετά την εισαγωγή του δείγματος στον ηλεκτροθερμικό ατομοποιητή, ενεργοποιείται μέσω του λογισμικού το πρόγραμμα ατομοποίησης. Η ατομοποίηση εξελίσσεται, συνήθως, σε τέσσερα τουλάχιστον στάδια, στα οποία καθορίζεται η θερμοκρασία, ο ρυθμός ανόδου της θερμοκρασίας, η διάρκεια διατήρησης της θερμοκρασίας και τέλος η ροή αργού. Τα τέσσερα στάδια είναι: 1) Στάδιο ξήρανσης του δείγματος, 2) Στάδιο πυρόλυσης ή αποτέφρωσης, 3) Στάδιο ατομοποίησης και μέτρησης και 4) Στάδιο καθαρισμού. Ρυθμίζεται το χαρακτηριστικό μήκος κύματος και η παροχή του αδρανούς αερίου στα 0,25-0,30 L/min. Τοποθετούνται τα δείγματα στις επιθυμητές υποδοχές του δειγματολήπτη, καταγράφονται οι θέσεις αυτές στον υπολογιστή και ρυθμίζεται ο όγκος έγχυσης στα 20, 25 ή 30 μL καθώς και η σειρά της έγχυσης τυχόν πρόσθετων αντιδραστηρίων, όπως αραιωτικών, τροποποιητών σύστασης, κλπ. Καταγράφονται τα προφίλ της ατομοποίησης, δηλαδή, τα γραφήματα απορρόφησης-χρόνου παραμονής στο στάδιο της ατομοποίησης και μετράται είτε το εμβαδόν κορυφής απορρόφησης (*peak area*) είτε το ύψος κορυφής απορρόφησης (*peak height*). Παράλληλα, εφόσον το όργανο είναι διπλής δέσμης, καταγράφεται και το εμβαδόν κορυφής απορρόφησης υποβάθρου (*background peak area*) και το ύψος κορυφής απορρόφησης υποβάθρου (*background peak height*). Στο **Σχήμα 14.1**, δίνονται τα προφίλ της ατομοποίησης για το υπόβαθρο καθώς και για το στοιχείο που προσδιορίζεται. Η ποσοτικοποίηση των στοιχείων τα οποία προσδιορίζονται, βασίζεται στην απορρόφηση των χαρακτηριστικών γραμμών τους και

στη χρήση αντίστοιχης καμπύλης αναφοράς με προσομοιωμένα πρότυπα. Για να περιοριστεί ο κίνδυνος από τις παρεμποδίσεις του υποστρώματος, μπορεί να εφαρμοστεί η μέθοδος της προσθήκης προτύπου (*standard addition*). Απαραίτητες είναι τουλάχιστον 3-5 επαναληπτικές μετρήσεις για το κάθε δείγμα.

Εκτελείται ο κάθε προσδιορισμός, ακολουθώντας το αντίστοιχο πρόγραμμα ατομοποίησης, όπως αναφέρεται στον επόμενο **Πίνακα 14.1**. Στον πίνακα αυτόν, περιγράφονται, επιπλέον, όλοι οι παράμετροι για τη μέθοδο, όταν χρησιμοποιείται φασματόμετρο με διορθωτή τύπου Zeeman, και προστίθενται και οι αντίστοιχες παράμετροι για τον προσδιορισμό των στοιχείων Fe και Co, εφόσον αυτό είναι επιθυμητό.



Σχήμα 14.1. Διάγραμμα ατομοποίησης μολύβδου, κατά την ανάλυση ορού αίματος, με την τεχνική της ETAAS. Η διακεκομμένη γραμμή αντιστοιχεί στο υπόβαθρο και η συνεχής στον Pb. Ο χρόνος ατομοποίησης πρέπει να είναι επαρκής, ώστε να επανέρχεται το σήμα του μολύβδου στη βασική γραμμή.

Στοιχείο	Pb	Cd	Cr	Co	Cu	Fe
Στάδιο Ξήρανσης						
Θερμοκρασία	100-120	100-120	100-120	100-120	100-120	100-120
Χρόνος Επίτευξης (s)	5	5	5	5	5	5
Χρόνος Διατήρησης (s)	30	30	30	30	30	30
Στάδιο Τεφροποίησης						
Θερμοκρασία	450	400	1000	900	900	900
Χρόνος Επίτευξης (s)	10	10	10	10	10	10
Χρόνος Διατήρησης (s)	60	60	60	60	60	60
Στάδιο Ατομοποίησης						
Θερμοκρασία	2300	2100	2500	2700	2700	2700
Χρόνος Επίτευξης (s)	0-1	0-1	0-1	0-1	0-1	0-1
Χρόνος Διατήρησης (s)	7	8	8	8	6	8
Ροή αερίου	Παύση	Παύση	Παύση	Παύση	Παύση	Παύση
Ανάγνωση (s)	5-7 s	4-8 s	7-10 s	5-8 s	5-8 s	5-10 s
Στάδιο Καθαρισμού						
Θερμοκρασία	2700	2700	2700	-	-	-
Χρόνος Επίτευξης (s)	1	1	1	-	-	-
Χρόνος Διατήρησης (s)	2	2	2	-	-	-
Λυχνία						
Μήκος Κύματος (nm)	EDL	EDL	HCl	HCl	HCl	HCl
Εύρος Σχισμής (nm)	283,3	228,8	357,7	240,7	324,7	248,3
Αδρανές αέριο	0,2	0,2	0,2	0,2	0,7	0,2
	Ar	Ar	Ar	Ar	Ar	Ar

Πίνακας 14.1. Παράμετροι σταδίων φούρνου γραφίτη και άλλες ρυθμίσεις για τον προσδιορισμό ορισμένων τοξικών και μη τοξικών μετάλλων σε ορό αίματος ή ολικό αίμα μετά από πέψη, με την τεχνική ETAAS και όργανο P-E 5100 ZL

14.3. Μέθοδος Προσδιορισμού Fe σε Ορό Αίματος και Ολικό Αίμα με την Τεχνική FAAS

Τα δείγματα ορού αίματος υποβάλλονται σε φυγοκεντρικό διαχωρισμό του κλάσματος των ερυθρών αιμοσφαιρίων και λήψη του υπερκείμενου υδατικού διαλύματος, το οποίο είναι περίπου υποκίτρινο έως άχρωμο και με ελάχιστο ποσοστό αιωρούμενων. Ο προσδιορισμός του σιδήρου μπορεί να γίνει με απευθείας εισαγωγή του αραιωμένου δείγματος ορού στη φλόγα του ατομοποιητή της φασματομετρίας ατομικής απορρόφησης (FAAS). Με την τεχνική αυτή, οι συνθήκες ατομοποίησης στη φλόγα είναι τόσο δραστικές ώστε είναι δυνατός ο ολικός προσδιορισμός του σιδήρου, είτε σε μορφή ελεύθερων ιόντων είτε αυτού που είναι στην αίμη είτε αυτού που είναι πρωτεϊνικά δεσμευμένου στην τρανσφερίνη, που άλλωστε είναι ελάχιστο στον ορό. Για τον προσδιορισμό, όμως, του σιδήρου σε δείγμα ολικού αίματος είναι απαραίτητη είτε η ξηρή αποτέφρωση του δείγματος σε χωνευτήριο πορσελάνης στους 550 °C και η παραλαβή της τέφρας με αραιό HCl είτε η υγρή όξινη οξειδωτική χώνευση του δείγματος σε ανοικτά ή κλειστά δοχεία με HNO₃ και αραιώση του υπολείμματος με αραιό HCl. Στην περίπτωση του ολικού αίματος λαμβάνονται ιδιαίτερες προφυλάξεις για να μην είναι αλλοιωμένο, ή πλημμελώς αποπυγμένο, και οπωσδήποτε να διατηρεί την ομοιογένειά του. Τα προκύπτοντα διαλύματα εισάγονται απευθείας στη φλόγα της FAAS είτε ως έχουν είτε με κατάλληλη αραιώση, παράλληλα με κατάλληλα πρότυπα διαλύματα και πιστοποιημένα υλικά αναφοράς. Μετράται η ατομική απορρόφηση με τη χρήση του χαρακτηριστικού μήκους κύματος απορρόφησης του σιδήρου, που είναι 248,3 nm, κατά προτίμηση με όργανο διπλής δέσμης. Η καμπύλη αναφοράς πρέπει να περιλαμβάνει τουλάχιστον 5-7 πρότυπα και η γραμμικότητα εκτείνεται μέχρι συγκέντρωση σιδήρου της τάξης των 10 mg/L στα τελικά διαλύματα. Με τον τρόπο αυτό προσδιορίζεται ποσοτικά η ολική συγκέντρωση του σιδήρου στον ορό και στο αίμα.

Ειδικότερα για τον προσδιορισμό του σιδήρου στον ορό, επειδή δεν είναι πάντοτε διαθέσιμη στα βιοαναλυτικά εργαστήρια η τεχνική της FAAS, συνήθως, εφαρμόζεται κάποια εναλλακτική φασματοφωτομετρική μέθοδος ή μια τυποποιημένη δοκιμασία (*assay*). Οι μέθοδοι αυτές σήμερα εκτελούνται με αυτόματους ή ημιαυτόματους αναλυτές. Στην περίπτωση αυτή, επειδή δεν εφαρμόζεται κάποια δραστική τεχνική προκατεργασίας ή ατομοποίησης, είναι απαραίτητη η αποδέσμευση του σιδήρου από την τρανσφερίνη και για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται για παράδειγμα κάποιο παράγωγο της γουανιδίνης. Με την προσθήκη ρυθμιστικού φωσφορικών (pH=4,8), που εκτός από την γουανιδίνη περιέχει και ασκορβικό οξύ (ή υδροχλωρική υδροξυλαμίνη) το οποίο δρα ως αναγωγικό, τα ιόντα του Fe⁺³ ανάγονται προς Fe⁺². Ο δισθενής σίδηρος αντιδρά, τέλος, με φεροζίνη ή άλλη παρόμοια ένωση και σχηματίζεται ερυθροϊώδες παράγωγο που απορροφά σε μήκος κύματος περίπου 565 nm. Είναι απαραίτητη η χρήση τυφλού δείγματος για τη διόρθωση τυχόν παρεμποδίσεων λόγω θολότητας του ορού. Τα επίπεδα του Fe στον ορό κυμαίνονται, συνήθως, σε επίπεδα περίπου 0,5-1,5 mg/L (50-150 μg/dL) και χρειάζεται προσοχή στην αποτίμηση, όταν ο ασθενής ακολουθεί παράλληλα άλλη αγωγή με φάρμακα που έχουν ικανότητα να δεσμεύουν το σίδηρο.

Αξίζει να αναφερθεί στο σημείο αυτό ότι ανεξάρτητα από τον προσδιορισμό του ολικού σιδήρου στο αίμα, η φερριτίνη είναι η κύρια πρωτεΐνη αποθήκευσης σιδήρου στους ιστούς και εμπλέκεται στην πρόσληψη, τη συσσώρευση και την απελευθέρωσή του στα κύτταρα. Βρίσκεται, σχεδόν, σε όλα τα κύτταρα, παρέχοντας έτσι μία εύκολα διαθέσιμη αποθήκη σιδήρου απαραίτητη για τη σύνθεση της αιμοσφαιρίνης και της αίμης. Περίπου τα δύο τρίτα των αποθεμάτων σιδήρου στο ανθρώπινο σώμα περιέχεται στη φερριτίνη. Άλλη αποθήκη σιδήρου είναι η αιμοσιδηρίνη, η οποία πιθανότατα αντιπροσωπεύει μια μορφή μετουσιωμένης φερριτίνης. Από χημική άποψη, η φερριτίνη είναι πρωτεΐνη που περιέχει 24 μονομερή αποφερριτίνης τα οποία συνδέονται για να σχηματίσουν ένα κοίλο σφαιρικό σωματίδιο (~ 450 kDa). Έως 4.000 άτομα του σιδήρου μπορεί να δεσμεύονται στον κατάλληλο τομέα του μορίου της, όπου αποθηκεύονται ως ιόντα Fe³⁺. Στα ανθρώπινα κύτταρα υπάρχουν δύο υπομονάδες της φερριτίνης: η ελαφριά (L) και η βαριά (H). Τα μόρια στους ιστούς είναι ένα ετερογενές μίγμα, όπου η αναλογία των δύο αυτών υπομονάδων ποικίλλει. Στα φυσιολογικά άτομα, το 50 έως 81% της φερριτίνης είναι γλυκοζυλιωμένη. Παρόλο που μόνον ίχνη της υπάρχουν στο πλάσμα αίματος, αποτελεί δείκτη που αντανακλά την κατάσταση των αποθεμάτων σιδήρου στον οργανισμό και, επιπλέον, η μέτρηση στον ορό θεωρείται ιδανική, μη επεμβατική και εύκολη εξέταση.

Οι σύγχρονες αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού της βασίζονται, κυρίως, σε ανοσοδοκιμασίες, όπως π.χ. ανοσοχημειοφωταύγεια, ενζυμοσύνδετη ανοσοροφητική δοκιμή (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA), κλπ. Για τη μέτρηση στον ορό λαμβάνεται το δείγμα σε σωλήνες διαχωρισμού ορού, ή στο πλάσμα

με τη χρήση δοκιμαστικών σωλήνων με EDTA. Ακολουθεί φυγοκέντριση και διαχωρισμός εντός 24 ωρών από τη συλλογή του δείγματος.

Βιβλιογραφία

- Boyd R., Basic C., Bethem R. (2008). *Trace Quantitative Analysis by Mass Spectrometry*, Chichester, England.
- Brewer T.M., Marcus R.K. (2007). *Determination of “free” iron and iron bound in metalloproteins via liquid chromatography separation and inductively coupled plasma-optical emission spectroscopy (LC-ICP-OES) and particle beam/hollow cathode-optical emission spectroscopy (LC-PB/HC-OES) techniques*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 22, 1067–1075.
- Broekaert J.A.C. (2002). *Analytical Atomic Spectrometry with Flames and Plasmas*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany.
- Daftsis E., Zachariadis G.A. (2007). *Analytical performance of ETAAS method for Cd, Co, Cr and Pb determination in blood fraction samples*, *Talanta*, 71, 722-730.
- Kunemeyer J., Terborg L., Nowak S., Scheffer A., Telgmann L., Tokmak F., Gonsel A., Wiesmuller G., Reichelt S., Karst U. (2008). *Speciation Analysis of Gadolinium-Based MRI Contrast Agents in Blood Plasma by Hydrophilic Interaction Chromatography/Electrospray Mass Spectrometry*, *Analytical Chemistry*, 80, 8163–8170.
- Lavilla I., Costas M., San Miguel P., Millos J., Bendicho C. (2009). *Elemental fingerprinting of tumorous and adjacent non-tumorous tissues from patients with colorectal cancer using ICP-MS, ICP-OES and chemometric analysis*, *Biometals*, 22, 863–875.
- Manley S.A., Byrns S., Lyon A., Brown P., Gailer J., (2009). *Simultaneous Cu-, Fe-, and Zn-specific detection of metalloproteins contained in rabbit plasma by size-exclusion chromatography–inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy*, *Journal of Biological and Inorganic Chemistry*, 14, 61–74.
- Millos J., Costas-Rodriguez M., Lavilla I., Bendicho C. (2009). *Multiple small volume microwave-assisted digestions using conventional equipment for multielemental analysis of human breast biopsies by inductively coupled plasma optical emission spectrometry*, *Talanta*, 77, 1490–1496.
- Nolte J. (2001). *ICP Emission Spectrometry, a Practical Guide*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, Weinheim, Germany.
- Taylor A., Branch S., Day M.P., Patriarca M., White M. (2011). *Atomic spectrometry update. Clinical and biological materials, foods and beverages*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 26, 653–692.
- Versieck J., Cornelis R. (1989). *Trace Elements in Human Plasma and Serum*, CRC Press, Boca Raton
- Zachariadis G., (2012). *Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry*, Nova Science Publisher, New York, USA.

Κεφάλαιο 15: Επικύρωση Βιοαναλυτικών Μεθόδων

Βικτωρία Σαμανίδου, Γεώργιος Θεοδωρίδης

Σύνοψη

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφονται οι κυριότερες παράμετροι επικύρωσης των αναλυτικών μεθόδων, οι οποίες εφαρμόζονται σε μελέτες βιοϊσοδυναμίας και γενικότερα των βιοαναλυτικών μεθόδων, όπως προτείνονται από τους διάφορους οργανισμούς και αντιστοίχως δίνονται τα κριτήρια αποδοχής.

Προαπαιτούμενη γνώση

Πριν την ανάγνωση του κεφαλαίου, χρήσιμη γνώση για τον αναγνώστη μπορεί να βρεθεί στη σχετική νομοθεσία, καθώς και στο σύγγραμμα Σύγχρονες Διαχωριστικές Τεχνικές στην Ενόργανη Χημική Ανάλυση.

15.1. Εισαγωγή

Ο όρος «Επικύρωση αναλυτικής μεθόδου» αναφέρεται στις απαραίτητες διαδικασίες που αποδεικνύουν ότι η αναλυτική μέθοδος είναι κατάλληλη να εφαρμοστεί για το σκοπό για τον οποίο έχει αναπτυχθεί.

Η αναγκαιότητα για επικύρωση των αναλυτικών μεθόδων προέρχεται από την ανάγκη συμμόρφωσης ως προς τις απαιτήσεις της Νομοθεσίας και των διάφορων Κανονιστικών Επιτροπών. Έτσι Διεθνείς Οργανισμοί, όπως: FDA (Food Drug Administration), ICH (International Conference on Harmonization), Διεθνώς αναγνωρισμένες Φαρμακοποιίες, όπως η Διεθνής Φαρμακοποιία (Ph Int) που έχει δημοσιευτεί από τον WHO (Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας), η Αμερικανική Φαρμακοποιία (USP), η Ιαπωνική (JP), η Ευρωπαϊκή (EP) και η Βρετανική (BP) έχουν θεσπίσει οδηγίες για την επικύρωση των αναλυτικών και βιοαναλυτικών μεθόδων.

Υπάρχουν τρεις κατηγορίες επικύρωσης: 1. Η **Πλήρης** (Full Validation), η οποία απαιτείται κατά την ανάπτυξη μιας νέας βιοαναλυτικής μεθόδου, 2. Η **Μερική** (Partial Validation), μετά από τροποποίηση μιας, ήδη, επικυρωμένης βιοαναλυτικής μεθόδου, η οποία απαιτείται κατά τη μεταφορά της μεθόδου μεταξύ εργαστηρίων, και έπειτα από αλλαγή στο όργανο ή στο λογισμικό, καθώς και κατόπιν μικρών μεταβολών στις συνθήκες προκατεργασίας ή αποθήκευσης του δείγματος, στο υπόστρωμα ανάλυσης, τη γραμμική περιοχή προσδιορισμού των ενώσεων και 3. Η **Διασταυρούμενη** (Cross-Validation), η οποία αποτελεί σύγκριση των παραμέτρων επικύρωσης, όταν δύο ή περισσότερες βιοαναλυτικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται σε μια μελέτη.

Για την επικύρωση των βιοαναλυτικών μεθόδων, όπως για παράδειγμα αυτών που εφαρμόζονται σε μελέτες βιοϊσοδυναμίας απαιτείται έλεγχος των ακόλουθων παραμέτρων:

- ακρίβεια (accuracy),
- πιστότητα (precision),
- όρια ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού (limit of detection and limit of quantitation),
- ευαισθησία (sensitivity),
- ειδικότητα (specificity),
- ανάκτηση (recovery),
- σταθερότητα (stability).

15.2. Ακρίβεια-Πιστότητα

Ως **ακρίβεια** ορίζεται η προσέγγιση της προσδιοριζόμενης τιμής προς την πραγματική. Τα όρια αποδοχής είναι η μέση τιμή να αποκλίνει $\leq 15\%$ από την πραγματική τιμή. Για συγκεντρώσεις, όμως, κοντά στο όριο ποσοτικής αποτίμησης (LOQ), είναι αποδεκτή και η απόκλιση μέχρι 20% .

Ως **πιστότητα** ορίζεται η προσέγγιση των επαναλαμβανόμενων προσδιορισμών του ίδιου δείγματος μεταξύ τους. Τα όρια αποδοχής είναι η σχετική τυπική απόκλιση $\leq 15\%$. Για συγκεντρώσεις κοντά στο LOQ είναι ωστόσο αποδεκτή και τιμή απόκλισης μέχρι 20% . Εννοείται ότι μια αναλυτική μέθοδος πρέπει να χαρακτηρίζεται τόσο από εξαιρετική ακρίβεια, όσο και από εξαιρετική πιστότητα, όπως απεικονίζεται στο **Σχήμα 15.1**.



Σχήμα 15.1. Ακρίβεια και πιστότητα αναλυτικών μετρήσεων

15.2.1. Δείγματα ελέγχου - Quality control

Τα δείγματα ελέγχου καλύπτουν τουλάχιστον 3 συγκεντρώσεις: Μια χαμηλή, μια ενδιάμεση και μια υψηλή. Για κάθε δείγμα εκτελούνται διπλοί προσδιορισμοί. Για να είναι αποδεκτά τα αποτελέσματα πρέπει τα 4 από τα 6 QC δείγματα να απέχουν $\leq 15\%$ της ονομαστικής συγκέντρωσης, αλλά με την προϋπόθεση ότι τα δύο που είναι εκτός, να μην είναι της ίδιας συγκέντρωσης.

15.3. Ανθεκτικότητα - Αντοχή

Η **ανθεκτικότητα** της μεθόδου (Ruggedness) είναι μέτρο της ικανότητας της μεθόδου να παραμένει σταθερή και ανεπηρέαστη σε μικρές, αλλά σκόπιμες μεταβολές των λειτουργικών παραμέτρων, ενώ η **αντοχή** (robustness) της μεθόδου αναφέρεται σε τυχαίες, μη σκόπιμες μεταβολές των παραμέτρων.

Στην πράξη, οι δύο αυτοί όροι είναι αλληλένδετοι και πολλές φορές υπάρχει σύγχυση στη χρήση τους, καθώς και οι δύο εξετάζονται με τον ίδιο τρόπο, δηλαδή, με μικρές μεταβολές, οι οποίες π.χ. στην περίπτωση της HPLC μπορεί να αφορούν:

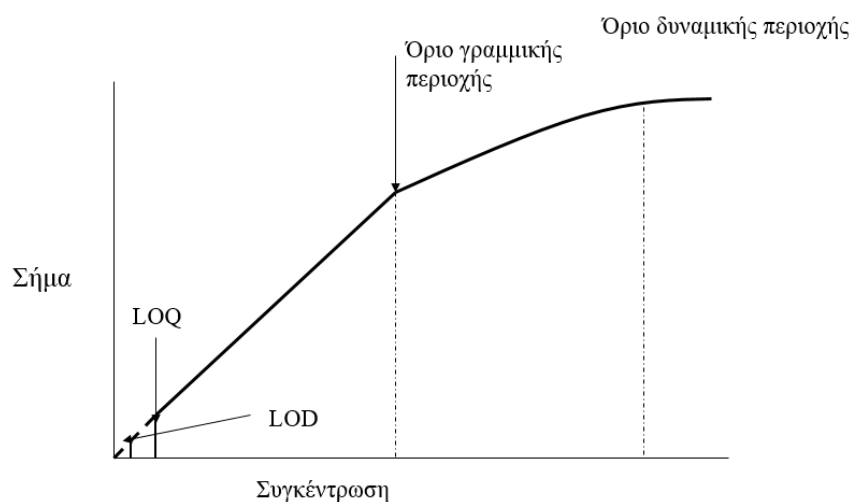
- στην % περιεκτικότητα της κινητής φάσης σε οργανικό διαλύτη,
- στο pH της κινητής φάσης,
- στην ταχύτητα ροής,
- στη θερμοκρασία ή
- στον όγκο του δείγματος που εγχύεται.

15.4. Όρια ανίχνευσης-Ποσοτικού προσδιορισμού-Ευαισθησία

Ως **όριο ποσοτικού προσδιορισμού** (LOQ) ορίζεται η χαμηλότερη συγκέντρωση η οποία μπορεί να μετρηθεί με ακρίβεια και πιστότητα, ενώ ως **όριο ανίχνευσης** (LOD), η ποσότητα που μπορεί να ανιχνευτεί χωρίς, όμως, να μπορεί να ποσοτικοποιηθεί. Ως **ευαισθησία** χαρακτηρίζεται η ικανότητα της μεθόδου να αντιλαμβάνεται μικρές μεταβολές της συγκέντρωσης ή της απόλυτης ποσότητας και εκφράζεται με την κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης.

15.5. Γραμμικότητα

Η γραμμικότητα αναφέρεται στη γραμμική εξάρτηση της μετρούμενης ιδιότητας από τη συγκέντρωση και ελέγχεται με πρότυπα διαλύματα σε 6-8 επίπεδα συγκέντρωσης ενώ εκφράζεται με το συντελεστή γραμμικής συσχέτισης (correlation coefficient r) ή το συντελεστή προσδιορισμού (coefficient of determination, r^2), οι οποίοι πρέπει να προσεγγίζουν τη μονάδα. Η γραφική παράσταση της καμπύλης διακρίβωσης δίνεται στο **Σχήμα 15.2**, μαζί με τα όρια LOD και LOQ.



Σχήμα 15.2. Όρια γραμμικής περιοχής, LOD, LOQ

15.6. Ειδικότητα / εκλεκτικότητα

Είναι η ικανότητα της μεθόδου να μετρά μόνον αυτό για το οποίο αναπτύσσεται ή προορίζεται να εφαρμοστεί, παρουσία και άλλων συστατικών του δείγματος. Στην πράξη ελέγχεται η παρουσία/απουσία παρεμποδίσεων σε λευκά (blank) δείγματα, δηλαδή, υποστρώματα που δεν περιέχουν το εξεταζόμενο βιομόριο.

15.7. Ανάκτηση

Για τον προσδιορισμό των ενώσεων-στόχων, στις περισσότερες περιπτώσεις, απαιτείται να εφαρμοστεί κάποια τεχνική προκατεργασίας για την απομόνωση και εκλεκτική παραλαβή του βιομορίου- στόχου από το βιολογικό υπόστρωμα, εφαρμόζοντας, συνήθως, κάποια τεχνική εκχύλισης. Η εκχυλιστική ικανότητα της αναλυτικής διαδικασίας που ακολουθείται, αναφέρεται ως η επί τοις εκατό ανάκτηση του προσδιοριζόμενου συστατικού μετά την εκχύλιση. Το ποσοστό της ανάκτησης δεν είναι απαραίτητο, αν και είναι επιθυμητό, να είναι 100%, αρκεί να είναι σταθερό το λαμβανόμενο ποσοστό της ένωσης που εξετάζεται.

15.8. Σταθερότητα

Η μελέτη της σταθερότητας είναι μια σημαντική παράμετρος, καθώς τις περισσότερες φορές τα δείγματα δεν αναλύονται αμέσως. Έτσι επιβάλλεται να ελέγχεται η μέθοδος για τη σταθερότητα των προσδιοριζόμενων ενώσεων. Αυτό συμβαίνει, γιατί το δείγμα μπορεί να αλλοιωθεί πριν την ανάλυση, είτε στο στάδιο προκατεργασίας ή καθαρισμού του δείγματος είτε ακόμα και κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής του. Έτσι, ο έλεγχος της σταθερότητας του συστατικού στο βιολογικό υπόστρωμα πρέπει να γίνεται σε διάφορα επίπεδα συγκέντρωσης και σε διάφορα στάδια: κατά τη δειγματοληψία, κατά την αποθήκευση του δείγματος και κατά την ανάλυση.

Υπάρχουν διάφορα είδη σταθερότητας που μελετώνται:

- Η *βραχυπρόθεσμη* σταθερότητα, η οποία εξετάζεται, συνήθως, σε θερμοκρασία δωματίου για διάστημα ωρών (Short-term stability) και σε θερμοκρασία συντήρησης (4°C) για διάστημα μερικών ημερών.
- Η *μακροπρόθεσμη*, η οποία εξετάζεται σε θερμοκρασία κατάψυξης (-18°C) για διάστημα εβδομάδων ή μηνών (Long-term stability).
- Η σταθερότητα *κύκλων κατάψυξης-απόψυξης* (Freeze-thaw stability).
- Η σταθερότητα *δείγματος μετά την προκατεργασία* (Post-preparation stability).
- Η σταθερότητα *προτύπων διαλυμάτων* (Stock solution stability).

Για την εκτίμηση της σταθερότητας γίνεται μέτρηση του διαλύματος/δείγματος σε χρόνο 0 min και στη συνέχεια συγκρίνονται τα ποσοστά ανάκτησης με βάση τη μέτρηση αυτή. Η απόκλιση από την αρχική τιμή δεν πρέπει να υπερβαίνει το 15%, ώστε να θεωρείται το διάλυμα/δείγμα σταθερό.

15.8.1. Σταθερότητα των Ενώσεων σε Κύκλους Κατάψυξης – Απόψυξης

Ένας τρόπος για να γίνει έλεγχος της σταθερότητας είναι η μελέτη της επίδρασης των κύκλων κατάψυξης-απόψυξης στη σταθερότητα ενός δείγματος. Για να γίνει ο έλεγχος αυτός, αναλύεται ένα εμβολιασμένο δείγμα, αμέσως μετά την προκατεργασία και διαδοχικά μέσα στην προβλεπόμενη περίοδο αποθήκευσης.

Πραγματοποιείται ένας αριθμός κύκλων κατάψυξης-απόψυξης (freeze-thaw cycles) π.χ. 5, όπου για κάθε προσδιορισμό λαμβάνονται τρεις μετρήσεις σε εμβολιασμένα δείγματα. Το πρώτο δείγμα εκχυλίζεται και μετριέται το ποσοστό ανάκτησής του αμέσως. Τα υπόλοιπα καταψύχονται στους -18 °C· ακολουθούν κύκλοι απόψυξης και επανακατάψυξης. Κάθε δείγμα μετά την απόψυξή του εκχυλίζεται και μετριέται η ανάκτηση του συστατικού. Η ανάκτηση συγκρίνεται με αυτήν του αρχικού δείγματος και παρατηρείται ο ρυθμός ελάττωσής της σε σχέση με την αρχική ανάκτηση. Τα υπόλοιπα δείγματα ψύχονται εκ νέου και η όλη διαδικασία επαναλαμβάνεται για όλους τους κύκλους κατάψυξης-απόψυξης. Το σύνηθες κριτήριο της σταθερότητας είναι η συγκέντρωση η οποία μετριέται να μην αποκλίνει από την αρχική περισσότερο από - 15% (Σχήμα 15.3).



Σχήμα 15.3. Έλεγχος σταθερότητας βιολογικού δείγματος σε διάφορους κύκλους ψύξης-απόψυξης

15.8.1.1. Τυπικές Διαδικασίες- Standard Operation Procedures (SOPs)

Οι αναφορές των *Τυπικών Διαδικασιών* πρέπει να περιλαμβάνουν όλα τα στοιχεία που αφορούν τον έλεγχο ποιότητας (*quality control*) και όλα τα στάδια ανάλυσης τόσο της προκατεργασίας, όσο και της μέτρησης, πρέπει να καλύπτονται με/από:

- τήρηση αρχείων,
- ασφάλεια,
- ιχνηλασιμότητα,
- διαδικασίες ελέγχου ποιότητας και επαλήθευσης των αποτελεσμάτων.

Στον Πίνακα 15.1 δίνονται οι κύριες παράμετροι και οι αντίστοιχες επεξηγήσεις που αφορούν την Επικύρωση των Βιοαναλυτικών Μεθόδων.

Παράμετρος	Ορισμός
Ακρίβεια	Απόκλιση από την πραγματική τιμή
Επαναληψιμότητα	Αναπαραγωγιμότητα πολλαπλών μετρήσεων
Ευαισθησία	Ικανότητα διάκρισης μικρών διαφορών συγκέντρωσης
Όριο Ανίχνευσης	Μικρότερη μετρήσιμη συγκέντρωση
Δυναμική γραμμική περιοχή	Γραμμική περιοχή όπου ισχύει η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς.
Εκλεκτικότητα	Ικανότητα διάκρισης του προσδιοριζόμενου συστατικού από παρεμποδίσεις
Ταχύτητα ανάλυσης	Ο χρόνος που απαιτείται για την προκατεργασία και την ανάλυση του δείγματος
Απόδοση δειγμάτων	Αριθμός δειγμάτων που αναλύονται σε συγκεκριμένο χρόνο
Δυνατότητα αυτοματοποίησης	Πόσο εύκολα μπορεί να αυτοματοποιηθεί η μέθοδος
Ανθεκτικότητα/αντοχή	Ικανότητα της μεθόδου να αντισταθεί σε μικρές μεταβολές συνθηκών
Φορητότητα	Δυνατότητα μεταφοράς οργάνου
Συμμόρφωση με τις αρχές της Πράσινης Χημείας	Οικολογική συνείδηση στην αναγέννηση των αποβλήτων και στην κατανάλωση ενέργειας
Κόστος	Κόστος εξοπλισμού, κόστος αναλωσίμων, κόστος εργατικών

Πίνακας 15.1. Παράμετροι και επεξηγήσεις χαρακτηρισμού και επικύρωσης Βιοαναλυτικών Μεθόδων

Στον **Πίνακα 15.2** δίνονται οι παράμετροι επικύρωσης, όπως απαιτείται από διάφορους οργανισμούς, ενώ στον **Πίνακα 15.3** δίνονται οι παράμετροι και τα κριτήρια που απαιτούνται από την USP 23 <621> για τις δοκιμές καταλληλότητας του συστήματος.

ICH/USP	Πρόσθετες απαιτήσεις της FDA
Ειδικότητα ^a	Ευαισθησία
Ακρίβεια ^a	Ανάκτηση
Πιστότητα ^a	Αναπαραγωγιμότητα
Επαναληψιμότητα ^a	Αντοχή
Ενδιάμεση πιστότητα ^a	Σταθερότητα διαλυμάτων των δειγμάτων
Αναπαραγωγιμότητα ^c	Καταλληλότητα συστήματος
Όρια ανίχνευσης ^a	
Όρια ποσοτικής αποτίμησης ^a	
Γραμμικότητα ^a	
Εύρος γραμμικής περιοχής ^a	
Ανθεκτικότητα ^b	
Αντοχή ^{b,c}	

a Απαιτείται από ICH και USP

b Περιλαμβάνεται στην USP.

c Περιλαμβάνεται στην ICH, αλλά όχι ως απαραίτητη.

Πίνακας 15.2. Παράμετροι επικύρωσης σύμφωνα με τους οργανισμούς ICH, USP και FDA

Παράμετρος	Αποδεκτή τιμή
Παράγοντας συγκράτησης k'	≥ 2
Επαναληψιμότητα RSD	$\leq 2\%$ (n ≥ 5)
Δακρική ικανότητα R_s	> 2
Παράγοντας ουράς T_f	≤ 2
Αριθμός Θεωρητικών Πλακών N	> 2000

Πίνακας 15.3. Παράμετροι και κριτήρια που απαιτούνται από την USP 23 <621> για τις δοκιμές καταλληλότητας του συστήματος

15.9. Οδηγίες Ελεγκτικών Μηχανισμών για την Επικύρωση Βιοαναλυτικών Μεθόδων

Ανά τακτά διαστήματα οι διεθνείς ελεγκτικοί μηχανισμοί του χώρου του φαρμάκου (Food and Drug administration (FDA), European Medicines Agency (EMA)) επεξεργάζονται κείμενα, τα οποία, μετά από διαβούλευση με τις εταιρίες που δραστηριοποιούνται στο χώρο του φαρμάκου, αποτελούν τις οδηγίες για τη σωστή εφαρμογή των αναλυτικών πρωτοκόλλων και για την επικύρωση μεθόδων και αποτελεσμάτων.

Οι οδηγίες διαχωρίζονται ως προς τη μέθοδο ανάλυσης (π.χ. Χρωματογραφικές Τεχνικές, ανοσοχημικές τεχνικές ή τεχνικές δέσμευσης Ligand Binding Assay).

Στη συνέχεια δίνονται κάποια από τα βασικά σημεία των πιο πρόσφατων οδηγιών των δύο φορέων (EMA, FDA).

15.9.1. Χρωματογραφικές Τεχνικές

Οι οδηγίες εφαρμόζονται στις μελέτες νέων φαρμάκων, νέων φαρμακομορφών και συμπληρωμάτων και εφαρμόζονται στην ανάπτυξη Βιοαναλυτικών μεθόδων σε εφαρμογές όπως βιοϊσοδυναμία, φαρμακοκινητική, μη-κλινικές τοξικολογικές μελέτες κ.ά. Οι οδηγίες εφαρμόζονται σε όλες τις διαχωριστικές τεχνικές (Gas Chromatography (GC); High Pressure Liquid Chromatography (LC); (LC-MS, LC-MS-MS, GC-MS, GC-MS-MS).

15.9.1.1. Κριτήρια αποδοχής μιας σειράς αναλύσεων (analytical run/ analytical batch).

Τα αναλυτικά εργαστήρια επιτελούν πολλές λειτουργίες και, συχνά, οι αναλύσεις κατανέμονται σε σειρές (analytical batches) διάρκειας από ώρες έως κάποιες ημέρες. Τα κριτήρια για την αποδοχή μιας ανάλυσης ή μια σειράς αναλύσεων πρέπει να έχουν τεθεί εκ των προτέρων και να αναφέρονται στο πρωτόκολλο ανάλυσης. Αν μια μεγάλη αναλυτική σειρά μοιραστεί σε μικρότερες σειρές (analytical batch), οι οποίες πραγματοποιούνται σε διαφορετικούς χρόνους, τα κριτήρια εφαρμόζονται τόσο σε κάθε σειρά, όσο και στο σύνολο αυτών. Μία μεγάλη αναλυτική σειρά μπορεί να γίνει αποδεκτή, ακόμη και αν μια μικρότερη σειρά δεν είναι αποδεκτή ή απαιτηθεί επανάληψη ορισμένων μετρήσεων ή και όλης της σειράς.

Τα ακόλουθα επιμέρους κριτήρια πρέπει να εφαρμοστούν:

Η **ακρίβεια και πιστότητα** πρέπει να είναι για κάθε ανάλυση στα όρια που αναφέρονται στην παράγραφο 14.2 (15% ή 20%). Τουλάχιστον το 75% των προτύπων βαθμονόμησης (έξι, ως ο μικρότερος αριθμός αυτών) πρέπει να ικανοποιεί τις συνθήκες αυτές. Όταν κάποιο πρότυπο δείγμα δεν ικανοποιεί τις συνθήκες, το σημείο απορρίπτεται και η καμπύλη αναφοράς επανεξετάζεται. Αν το απορριφθέν σημείο είναι το LLOQ, τότε ως LLOQ για τη σειρά μετρήσεων ή το όλο αναλυτικό έργο τίθεται ως το αμέσως μεγαλύτερο σημείο της καμπύλης.

Η **ακρίβεια** στις αναλύσεις δειγμάτων ελέγχου (QC samples) πρέπει να κυμαίνεται στο $\pm 15\%$ για το 67% κατ' ελάχιστον των δειγμάτων QC τα οποία αναλύονται. Σε κάθε σημείο (συγκέντρωση) που εξετάζεται, τουλάχιστον το 50% των δειγμάτων πρέπει να πληροί τις συνθήκες, διαφορετικά η αναλυτική σειρά απορρίπτεται.

Στην περίπτωση που προσδιορίζονται πολλά συστατικά, το καθένα από αυτά πρέπει να προσδιορίζεται από τη δική του καμπύλη αναφοράς. Αν μια σειρά αναλύσεων είναι αποδεκτή για κάποιες ενώσεις αλλά όχι για κάποιες άλλες, τα δείγματα πρέπει να επανεξεταστούν (εκχύλιση και ανάλυση) για τις απορριφθείσες ενώσεις.

Η **συνολική (μέση) ακρίβεια και πιστότητα** όλων των δειγμάτων QC από όλες τις αναλυτικές σειρές πρέπει να υπολογίζεται και εάν η διακύμανση ξεπερνά το 15%, απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση. Ιδιαίτερη βαρύτητα πρέπει να δίνεται στις μελέτες βιοϊσοδυναμίας, οι οποίες μπορεί να απορριφθούν στο σύνολό τους, αν δεν ικανοποιούνται οι προαναφερόμενες συνθήκες.

15.9.2. Τεχνικές Δέσμευσης

Στις τεχνικές δέσμευσης εφαρμόζονται τα άνω κριτήρια αλλά με μεγαλύτερη ελαστικότητα, γιατί οι τεχνικές δέσμευσης δεν προσφέρουν τόσο καλή γραμμικότητα, ενώ συχνά απαντώνται φαινόμενα συμπεροσδιορισμού, λόγω διασταυρούμενων αντιδράσεων. Οι τεχνικές δέσμευσης, όπως οι ανοσοχημικές αναλύσεις, χρησιμοποιούνται, κυρίως, για την ανάλυση μακρομορίων ή ιών. Οι αρχές επικύρωσης, όσον αφορά την ανάλυση των δειγμάτων μιας μελέτης, θα πρέπει να εφαρμόζονται και σε αναλύσεις τέτοιου τύπου, όπως

επίσης και σε τεχνικές σύνδεσης υποκαταστάτη/υποδοχέα. Ωστόσο οι τεχνικές αυτές και η επικύρωσή τους προσφέρουν προκλήσεις για λόγους που είναι εγγενή χαρακτηριστικά των μεθόδων: 1) συχνά γίνεται ανάστροφη μέτρηση, δηλαδή, λαμβάνει χώρα μείωση έντασης του σήματος με την αύξηση της συγκέντρωσης της αναλυόμενης ένωσης και 2) λόγω της πολύπλοκης δομής των μακρομορίων, η διαδικασία ανάλυση μπορεί να είναι προβληματική. Στην πράξη, οι δοκιμασίες, συχνά, εκτελούνται χωρίς προηγούμενο διαχωρισμό της αναλυόμενης ένωσης, γεγονός που προσδίδει μεγάλη ευκολία και πλεονέκτημα στις τεχνικές αυτές, καθώς αρκετές φορές παρέχεται η δυνατότητα να εφαρμοστούν από προσωπικό χωρίς υψηλή ειδίκευση. Επιπλέον, αυτές οι δοκιμασίες δε μετρούν άμεσα το ίδιο το μακρομόριο, αλλά προσδιορίζουν, εμμέσως, το προϊόν μιας αντίδρασης-σύνδεσης με αντιδραστήρια ή πρωτεΐνες που χρησιμοποιούνται στη δοκιμασία. Για τους λόγους αυτούς, πολλά ζητήματα χρήζουν ιδιαίτερης προσοχής.

Γενικά, τα μακρομόρια είναι ετερογενή ως προς τις φυσικοχημικές ιδιότητές τους. Η ισχύς και η ανοσο-δραστικότητά τους μπορεί να ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό. Για αυτούς τους λόγους τα υλικά αναφοράς πρέπει να είναι καλά χαρακτηρισμένα και να τεκμηριώνεται η δραστηριότητά τους (π.χ. με πιστοποιητικό ανάλυσης και προέλευσης). Λόγω των διασταυρούμενων αντιδράσεων (συχνά μη αναμενόμενων), ως πρότυπες ενώσεις πρέπει να χρησιμοποιούνται οι πλέον καθαρές μορφές που είναι διαθέσιμες. Συνιστάται ανεπιφύλακτα να χρησιμοποιούνται υλικά από τις ίδιες παρτίδες για την παρασκευή προτύπων αναφοράς/βαθμονόμησης, δειγμάτων QC, αλλά και για τη χορήγηση π.χ. φαρμάκου σε μη κλινικές μελέτες. Σε περίπτωση αλλαγής παρτίδας, θα πρέπει να διεξαχθεί αναλυτικός χαρακτηρισμός πριν από τη χρήση των υλικών (αντιδραστηρίων, προτύπων κλπ.), ώστε να διασφαλιστεί ότι τα χαρακτηριστικά απόδοσης της μεθόδου δε μεταβάλλονται.

15.9.2.1. Ειδικότητα Δέσμευσης

Η ειδικότητα της δέσμευσης αντιδραστηρίου αναφέρεται στην ικανότητα αυτού να συνδέεται μόνο με την ένωση-στόχο. Ιδανικά το αντιδραστήριο πρόσδεσης πρέπει να είναι εντελώς ειδικό, έτσι ώστε να συνδέεται μόνο με την ένωση-στόχο χωρίς διασταυρούμενες αντιδράσεις, χωρίς δηλαδή να συνδεθεί (δεσμεύσει ή δεσμευθεί από) δομικά «σχετικές ενώσεις», ισομερή, συγγενείς ενώσεις, ή φυσικο-χημικά παρόμοιες ενώσεις. Κατά την ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδων, συχνά αυτά τα "συγγενή μόρια" δεν υπάρχουν στα εξεταζόμενα δείγματα, οπότε η αξιολόγηση της πιθανότητας φαινομένων διασταυρούμενων αντιδράσεων δεν είναι ασφαλής. Για αυτόν το λόγο η ειδικότητα θα πρέπει να ελέγχεται με χρήση δειγμάτων QC, στα οποία προστίθενται αυξανόμενες συγκεντρώσεις από τέτοιες συγγενείς ενώσεις που πιθανόν συνυπάρχουν στα άγνωστα δείγματα ή φάρμακα, τα οποία αναμένεται να συγχορηγούνται. Ιδανικά αυτό γίνεται σε λευκό δείγμα και μετριέται το μακρομόριο του ενδιαφέροντος σε επίπεδα κοντά στο LOQ. Τα κριτήρια αποδοχής της δοκιμασίας των δειγμάτων QC θα πρέπει να είναι εντός του 25% των ονομαστικών τιμών.

15.9.2.2. Εκλεκτικότητα

Εκλεκτικότητα ενός προσδιορισμού με χρήση τεχνικής δέσμευσης καλείται η δυνατότητα να μετρηθεί η αναλυόμενη ουσία, παρουσία μη σχετικών ή συγγενών ενώσεων. Όπως έχει αναφερθεί παραπάνω αλλά και στα σχετικά κεφάλαια (Ανοσοχημικές Μέθοδοι-Βιοαισθητήρες), γενικά στις τεχνικές αυτές, η ανάλυση πραγματοποιείται κατευθείαν στο δείγμα μετά την αραιώσή του με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα, χωρίς να έχει προηγηθεί κατεργασία, παραλαβή ή εκχύλιση των αναλυόμενων ενώσεων/μακρομορίων. Η εκλεκτικότητα ελέγχεται με αναλύσεις ενώσεων, άσχετων προς την αναλυόμενη ένωση. Για παράδειγμα αν μετριέται μια πρωτεΐνη, γίνονται δοκιμές με χρήση ενζύμων αποικοδόμησης, άλλων αντισωμάτων, ρευματοειδή παράγοντα κ.ά. Η εκλεκτικότητα ελέγχεται με εμβολιασμό συγκεντρώσεων κοντά στο LLOQ, σε τουλάχιστον δέκα πραγματικά δείγματα.

15.9.2.3. Κριτήρια Αποδοχής

Οι τιμές συγκέντρωσης οι οποίες υπολογίζονται από τις καμπύλες βαθμονόμησης πρέπει να είναι εντός του 20% της ονομαστικής τιμής, εκτός από τα επίπεδα LLOQ και ULOQ, για τα οποία θα πρέπει να είναι εντός του 25%. Τουλάχιστον το 75% των προτύπων βαθμονόμησης και τουλάχιστον έξι από αυτά, πρέπει να πληρούν το κριτήριο αυτό.

Κάθε πλάκα θα πρέπει να περιέχει τουλάχιστον 3 επίπεδα δειγμάτων QC (χαμηλή, μεσαία και υψηλή συγκέντρωση) τουλάχιστον εις διπλούν. Πάνω από το 67% των δειγμάτων, QC, και το 50% σε κάθε επίπεδο

συγκέντρωσης θα πρέπει να είναι εντός του 20% της ονομαστικής αξίας. Οποιαδήποτε εξαίρεση σε αυτό το κριτήριο θα πρέπει να αιτιολογείται.

Οι μετρήσεις πραγματοποιούνται, συχνά, σε πλάκες μικροτιτλοδότησης 96 θέσεων. Μια σειρά αναλύσεων μπορεί να περιλαμβάνει διάφορες μεμονωμένες πλάκες και κάθε πλάκα θα πρέπει να περιέχει το σύνολο των προτύπων βαθμονόμησης αλλά και δείγματα ποιοτικού ελέγχου QC, για να αντισταθμίσει τυχόν διαφορές στην απόδοση της πλάκας. Εφόσον η χωρητικότητα μιας τεχνικής/πλάκας ή ο όγκος δείγματος είναι περιορισμένος, μπορεί το σύνολο των προτύπων βαθμονόμησης να τοποθετείται στην πρώτη και την τελευταία πλάκα και στις ενδιάμεσες πλάκες μόνο δείγματα QC. Συνιστάται η δοκιμασία των άγνωστων δειγμάτων να γίνεται εις διπλούν, δηλαδή, με τη χρήση τουλάχιστον δύο θέσεων αντί μίας.

15.10. Φαινόμενα Επίδρασης Υποστρώματος

Θα περίμενε κανείς ότι η σύγχρονη οργανολογία με χρήση χρωματογραφίας υπερ-υψηλής απόδοσης και φασματομετρίας μάζας σε σειρά (UPLC-MS/MS) ότι θα επέφερε απολύτως «καθαρά» και επαναλήψιμα αποτελέσματα χωρίς παρεμποδίσεις από το υπόστρωμα. Τα πλεονεκτήματα αυτής της τεχνικής περιλαμβάνουν την υψηλή εξειδίκευση, ευαισθησία και απόδοση. Στην πράξη, όμως, φαινόμενα αδικαιολόγητης μείωσης της απόδοσης σήματος παρατηρούνται συχνότατα στις αναλύσεις πραγματικών δειγμάτων ακόμα και σε αυτά τα όργανα. Το πιο χαρακτηριστικό μεταξύ αυτών είναι το «**Φαινόμενο υποστρώματος**».

Φαινόμενο υποστρώματος καλείται η μεταβολή του σήματος ανίχνευσης της αναλυόμενης ένωσης κατά την ποσοτική ανάλυση (φαρμάκων ή άλλων ενώσεων) σε βιολογικά υγρά σε σχέση με το σήμα ίδιας συγκέντρωσης της αναλυόμενης ένωσης, σε πρότυπα διαλύματα. Η διαφορά αυτή μπορεί να εμφανίζεται ως καταστολή ή ενίσχυση, ανάλογα με το αν η απόκριση του οργάνου μειώνεται ή αυξάνεται. Αυτές οι απρόβλεπτες αλλαγές αποτελούν τακτικό πρόβλημα για τις πηγές ατμοσφαιρικού ιοντισμού (API-LC-MS) και πρέπει να εξετάζονται κατά την ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου.

Μια θεωρία για την εμφάνιση του φαινομένου είναι ότι τα συνεκλούμενα συστατικά του υποστρώματος, μπορεί να έχουν αρνητικές συνέπειες στην ανάλυση, δεδομένου ότι μπορούν να προκαλέσουν καταστολή της απόδοσης ιοντισμού ή σε πιο σπάνιες περιπτώσεις, ενίσχυση ιοντισμού της αναλυόμενης ένωσης. Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων του φαινομένου υποστρώματος στην ποσοτική ανάλυση φαρμάκων σε βιολογικά υγρά είναι σημαντική, καθώς στην ανάλυση αγνώστων βιολογικών δειγμάτων δεν μπορεί να προβλεφθεί η τυχόν συνέκλυση αγνώστων ενώσεων οι οποίες μπορεί να υπάρχουν σε κάποια δείγματα και όχι σε άλλα. Έτσι, ενώ ένας αριθμός δειγμάτων έχει την ίδια συγκέντρωση στην αναλυόμενη ένωση, τελικά τα αποτελέσματα μπορεί να διαφέρουν σημαντικά.

Το φαινόμενο μπορεί να οφείλεται σε προβλήματα που μπορεί να δημιουργήσει η μη-αναμενόμενη παρουσία αγνώστων ενώσεων, στην ανάλυση. Τα προβλήματα μπορεί να εντοπιστούν στη χρωματογραφία και, κυρίως, στην πηγή ιοντισμού. Στη χρωματογραφία μπορεί, επίσης, η παρουσία πολύ μεγάλων συγκεντρώσεων ενώσεων με ιδιότητες όμοιες με αυτές της αναλυόμενης ένωσης να οδηγήσει σε συνέκλυση και πιθανή μικρή μετατόπιση του χρόνου συγκράτησης, λόγω κάλυψης της χωρητικότητας της αναλυτικής στήλης διαχωρισμού. Παρεμφερές πρόβλημα λύνεται με τη χρήση στήλης υψηλότερης διαχωριστικής ικανότητας ή μεγαλύτερου μήκους (άρα με αύξηση στον αριθμό θεωρητικών πλακών), αλλά με το αναμενόμενο κόστος στην αύξηση του χρόνου ανάλυσης.

Στην πηγή ιοντισμού, η κύρια αιτία προβλημάτων εντοπίζεται στην αλλαγή των ιδιοτήτων των σταγονιδίων της κινητής φάσης η οποία εισέρχεται στην πηγή ιοντισμού. Αυτά προκαλούνται από την παρουσία μη πηθικών ή λιγότερο πηθικών ουσιών τα οποία αλλάζουν την απόδοση σχηματισμού σταγονιδίων ή εξάτμισης αυτών, και η οποία με τη σειρά της επηρεάζει την ποσότητα φορτισμένων ιόντων στην αέρια φάση τα οποία φτάνουν τελικά στον αναλυτή μαζών.

Πολλοί διαφορετικοί μηχανισμοί καταστολής ιόντων έχουν προταθεί, οι περισσότεροι ειδικά για την τεχνική ιοντισμού η οποία χρησιμοποιείται ανά περίπτωση. Για τις δύο πιο δημοφιλείς τεχνικές ατμοσφαιρικού ιοντισμού (API) για LC-MS(MS): ιοντισμό ηλεκτροψεκασμού (ESI) και χημικό ιοντισμό ατμοσφαιρικής πίεσης (APCI), τα φαινόμενα αυτά έχουν μελετηθεί εκτενώς. Σύμφωνα με μια θεωρία, όταν μια ένωση του υποστρώματος βρεθεί σε υψηλές συγκεντρώσεις ($> 10^{-5}$ M), η γραμμικότητα της απόκρισης ιοντισμού σε πηγή ESI μπορεί να μειωθεί σημαντικά. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε περιορισμένο ποσό φορτίου διαθέσιμου στην πηγή ESI ή σε κορεσμό των σταγονιδίων από τη συνεκλούμενη ένωση. Ως

αποτέλεσμα αυτών η προσδιοριζόμενη ένωση δεν ιονίζεται ικανοποιητικά και το τελικό σήμα στο όργανο μειώνεται.

Πρέπει να γίνει κατανοητό ότι η ανάλυση λευκών δειγμάτων δε θα βοηθήσει στην εκτίμηση του φαινομένου υποστρώματος, καθώς λόγω της ειδικότητας της μέτρησης στο φασματογράφο μαζών (MS-MS) μετριέται μόνον η συγκεκριμένη ένωση-στόχος και όχι τυχόν συνεκλουόμενες ενώσεις, οι οποίες μπορεί, τελικά, να είναι υπεύθυνες για φαινόμενα υποστρώματος.

Οι επιδράσεις του υποστρώματος θα πρέπει να διερευνηθούν με χρήση τεχνικής φασματομετρίας μάζας σε σειρά, με τη χρήση μεθόδου και υλικών ακριβώς των ίδιων και με τα οποία θα γίνει ο προσδιορισμός στα πραγματικά δείγματα. Οι επιδράσεις του υποστρώματος θα πρέπει να υπολογίζονται ανεξάρτητα για κάθε αναλυόμενη ουσία και εσωτερικό πρότυπο, καθώς και για κάθε «παρτίδα» δειγμάτων, καθώς τυχόν απουσία επιδράσεων σε μια αναλυόμενη περιοχή φάσματος μαζών δε συνεπάγεται απαραίτητα απουσία επιδράσεων και στις άλλες περιοχές μετρήσεων.

Τουλάχιστον έξι δείγματα ή σειρές λευκών δειγμάτων πρέπει να χρησιμοποιηθούν στη μελέτη. Δε θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ομαδοποιημένα λευκά δείγματα ή μίγματα αυτών (Pooled matrix). Στην επιστημονική βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί τρόποι για τον υπολογισμό των φαινομένων με χρήση έγχυσης σε συνεχή ροή στο φασματογράφο μάζας ή με εισαγωγή του υποστρώματος μετά την αναλυτική στήλη. Ο υπολογισμός γίνεται με τη διαίρεση του εμβαδού της κορυφής υπό την παρουσία υποστρώματος (διάλυμα που επιμολύνεται μετά την εκχύλιση), με το εμβαδόν κορυφής, απουσία υποστρώματος (καθαρό διάλυμα προτύπου ίδιας συγκέντρωσης). Όταν υπολογίζεται επίδραση του υποστρώματος και για εσωτερικό πρότυπο, τότε η τελική τιμή προκύπτει από το κλάσμα:

Επίδραση του υποστρώματος αναλυόμενης ένωσης / Επίδραση του υποστρώματος εσωτερικού προτύπου

Η σχετική τυπική απόκλιση υπολογίζεται σε έξι παρτίδες υποστρώματος και δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 15 % . Ο προσδιορισμός αυτός θα πρέπει να γίνει σε χαμηλό και σε υψηλό επίπεδο συγκέντρωσης (κατ' ανώτατο όριο 3 φορές το LLOQ και κοντά στο ULOQ).

Εάν δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί αυτή η προσέγγιση, για παράδειγμα στην περίπτωση on-line επεξεργασίας προ-παρασκευής δείγματος, η μεταβλητότητα της απόκρισης από παρτίδα σε παρτίδα πρέπει να αξιολογείται με ανάλυση σε τουλάχιστον έξι παρτίδες υποστρώματος, «εμβολιασμένο» σε χαμηλή και σε υψηλό επίπεδο συγκέντρωσης (κατ' ανώτατο όριο 3 φορές το LLOQ και κοντά στο ULOQ).

Η έκθεση επικύρωσης θα πρέπει να περιλαμβάνει τα μετρούμενα εμβαδά κορυφής όλων των μετρούμενων ενώσεων. Η συνολική σχετική τυπική απόκλιση (CV) δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 15%.

Εκτός από τα αναμενόμενα υποστρώματα, συνιστάται να γίνεται διερεύνηση επιδράσεων παρόμοιων-συγγενών υποστρωμάτων, π.χ. αν η αρχική ανάλυση επικυρώνεται σε πλάσμα αίματος συνιστάται να γίνεται μελέτη και σε ορό ή σε αιμολυμένα δείγματα ή υπερλιπιδαιμικό πλάσμα. Αν πρόκειται να μετρηθούν δείγματα από ειδικούς πληθυσμούς (όπως πληθυσμούς με νεφρική ή ηπατική ανεπάρκεια) συνιστάται, επίσης, να μελετηθούν οι επιδράσεις υποστρώματος μέσω υποστρώματος μήτρας από τέτοιους πληθυσμούς.

15.11. Προσδιορισμός ενδογενών ενώσεων

Στην περίπτωση που αναπτύσσεται μέθοδος για τον προσδιορισμό ενώσεων οι οποίες είναι ενδογενείς στο προς ανάλυση υπόστρωμα, η επικύρωση των μεθόδων αποτελεί πρόκληση. Για παράδειγμα, αναφέρουμε την ανάλυση αμινοξέων σε αίμα: κατανοούμε ότι καθίσταται δύσκολος ο υπολογισμός της ακρίβειας της μέτρησης, της ανάκτησης και των λοιπών χαρακτηριστικών της ανάλυσης, λόγω της απουσίας κατάλληλου υποστρώματος «λευκού» από τις προσδιοριζόμενες ενώσεις. Για τέτοιες περιπτώσεις (οι οποίες είναι μεγάλο μέρος του έργου ενός Βιοαναλυτικού Εργαστηρίου) προτείνονται οι ακόλουθες προσεγγίσεις για την επικύρωση και την αξιολόγηση της απόδοσης της αναλυτικής δοκιμασίας. Άλλες προσεγγίσεις, εφόσον δικαιολογούνται σε επιστημονική βάση, μπορούν, επίσης, να εξεταστούν ανά περίπτωση.

Το βιολογικό υπόστρωμα που χρησιμοποιείται για την παρασκευή των προτύπων βαθμονόμησης πρέπει να εξεταστεί και να είναι το ίδιο με αυτό των δειγμάτων της μελέτης. Στην ιδανική περίπτωση δεν πρέπει να περιέχει την εξεταζόμενη ενδογενή ένωση. Για την εξέταση της καταλληλότητας χρήσης ενός δείγματος ως «λευκό υπόστρωμα» πρέπει να αποδειχθεί ότι: (1) η προσδιοριζόμενη ένωση είναι μη μετρήσιμη στο δείγμα αυτό (2) δεν εμφανίζεται κατά την ανάλυση κανένα φαινόμενο υποστρώματος ή τυχόν παρεμπόδιση. Η χρήση εναλλακτικών υποστρωμάτων (π.χ., ρυθμιστικά διαλύματα, μίγματα αλάτων πρωτεϊνών, ορός αίματος μετά από διαπίδυση) για την παρασκευή των προτύπων βαθμονόμησης, γενικά δε

συνιστάται, εκτός εάν δεν υπάρχει καμία δυνατότητα εύρεσης πραγματικού λευκού βιολογικού δείγματος ελεύθερου από την προσδιοριζόμενη ένωση. Σε τέτοιες περιπτώσεις, η χρήση του εναλλακτικού υποστρώματος πρέπει να αιτιολογείται και θα πρέπει να αποδειχθεί ότι η ανάλυση με πρότυπο βαθμονόμησης σε εναλλακτικό υπόστρωμα δεν έχει καμία επίδραση ή διαφορές σε σύγκριση με την ανάλυση στο πραγματικό βιολογικό υπόστρωμα των δειγμάτων μελέτης.

Τα δείγματα ελέγχου (QC) θα πρέπει να παρασκευάζονται με εμβολιασμό γνωστών ποσοτήτων των αναλυόμενων ενώσεων σε βιολογικό υπόστρωμα, ίδιο με τα δείγματα μελέτης. Οι συγκεντρώσεις των ενδογενών ενώσεων στο βιολογικό υπόστρωμα θα πρέπει να αξιολογούνται πριν την παρασκευή και ανάλυση δειγμάτων QC (όπως με επαναληπτική ανάλυση). Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων QC πρέπει να αντιπροσωπεύουν τις αναμενόμενες συγκεντρώσεις στο βιολογικό υπόστρωμα.

15.12. Βιοδείκτες

Οι βιοδείκτες χρησιμοποιούνται ολοένα και περισσότερο για την αξιολόγηση των επιπτώσεων των νέων φαρμάκων και θεραπευτικών βιολογικών προϊόντων σε πληθυσμούς ασθενών αλλά και για διαγνωστικούς σκοπούς. Λόγω των σημαντικών ρόλων που κάποιοι βιοδείκτες μπορεί να παίξουν στην αξιολόγηση της ασφάλειας ή / και της αποτελεσματικότητας ενός νέου φαρμακευτικού προϊόντος, είναι κρίσιμο να διασφαλιστεί η ακεραιότητα των δεδομένων, τα οποία προκύπτουν από τις αναλύσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρησή τους. Βιοδείκτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για μια ευρεία ποικιλία σκοπών, κατά την ανάπτυξη φαρμάκων. Ως εκ τούτου, θα πρέπει να χρησιμοποιείται η κατάλληλη κάθε φορά προσέγγιση κατά την αξιολόγηση της απαραίτητης έκτασης επικύρωσης της μεθόδου (ολική, μερική επικύρωση).

Ένα μεγάλο πρόβλημα της ανάπτυξης και επικύρωσης βιοδεικτών είναι ότι, παρόλο που η επικύρωση της βιοαναλυτικής τεχνικής μπορεί να ικανοποιεί τα κριτήρια, συχνά τα βιομόρια, τα οποία χαρακτηρίζονται ως βιοδείκτες, δεν είναι χαρακτηριστικά μιας μόνο κατάστασης, αλλά συμμετέχουν σε διαφορετικές βιοσυνθετικές οδούς. Έτσι η διακύμανση στη συγκέντρωσή τους μπορεί να μην οφείλεται στον εξεταζόμενο κλινικό λόγο, αλλά σε κάποιο παράπλευρο ή δευτερογενές αποτέλεσμα. Είναι πολύ δύσκολο να γίνει σωστός διαχωρισμός των φαινομένων π.χ. ασθένειας, ακινησίας, αφαγίας και στρες, καθώς στην πράξη, ένα ασθενές πειραματόζωο δεν κινείται, δεν τρώει και δε νιώθει το ίδιο με το υγιές. Για τους λόγους αυτούς καθίσταται επιτακτική ανάγκη αναλυτικής και συστηματικής επικύρωσης των μεθόδων και αποτελεσμάτων στην έρευνα για την ανάπτυξη βιοδεικτών.

Βιβλιογραφία

Bioanalytical Method Validation (May 2001)

(<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>) (December 2014)

Papadoyannis I.N. & Samanidou V.F. (2004). *Validation of HPLC Instrumentation*. J. Liq.Chromatogr. & Rel.Technol. Vol. 27, No. 5, 753–783.

Papadoyannis I.N. & Samanidou V.F. (2005). *Validation of HPLC Instrumentation*. Encyclopedia of Chromatography. Marcel Dekker. Jack Cazes Ed. Second Edition, Pages 1743 – 1758.

Shah V.P., Midha K.K., Dighe S.V. et al. (1992). *Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies*. Pharm Res. 9, 588–592.

Shah V.P., Midha K.K., Findlay J.W., et al. (2000). Bioanalytical method validation-a revisit with a decade of progress. Pharm Res. 17, 1551–1557.

Δικτυογραφία

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf
(December 2014)

<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM368107.pdf> (December 2014)

<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070342.pdf> (December 2014)

http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf (December 2014)

Ευρετήριο Επιστημονικών Όρων

Διεθνής Επιστημονικός Όρος	σελ.
Antibody	123
Antigen	123
Capillary Isotachopheresis	149
Electron Ionization	216
Electrospray Ionization	168
Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay	127, 128
Enzyme Multiplied ImmunoAssay Technique	127
Fluorescent Polarisation ImmunoAssay	131
Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance	167
Gas Chromatography	246
Ion Trap	168, 227
Laser Desorption	168, 236
Liquid Chromatography	183, 184, 246
Plasma Desorption	207
Principal Component Analysis	17, 35
Quality Control	237, 242, 244
Single Nucleotide Polymorphisms	20
Support Vector Machine	36
Triple Quadrupole	167
Ultra Performance Liquid Chromatography	184
Adsorptive Stripping Voltammetry	108
Background Electrolyte	140, 161
Bulk acoustic wave	114
Capillary Electrophoresis	136, 151, 157
Capillary Gel Electrophoresis	149
Capillary Isoelectric Focusing	149, 158
Capillary Zone Electrophoresis	149
Cathodic stripping voltammetry	108
Cerebrospinal fluid	56
Differential pulse voltammetry	106
Dispersive liquid-liquid microextraction	81
Disposable pipette extraction	83
Electroosmotic Flow	136
Enzyme ImmunoAssay	126
Fluorescence ImmunoAssay	131
Genomics	63
High Pressure Liquid Chromatography	246
Limit of Detection	241
Metabolomics	20, 33, 34, 212
Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography	149, 154
Proteomics	20, 34, 63

RadioimmunoAssay	126
Single Ion Monitoring	170, 207
Solid Phase Extraction	235
Solid Phase Microextraction	85, 87, 235
Square wave voltammetry	106
Surface acoustic wave	114
Surface plasmon resonance	112

Ελληνικός Επιστημονικός Όρος	σελ.
	17, 71, 163, 167, 178, 183, 199, 200, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 211, 212, 213, 216, 225, 230, 229
Αέρια Χρωματογραφία- Φασματομετρία Μαζών	229
Ανοσοσφαιρίνη	123, 128
Ανοσοχημική Ανάλυση	126, 131
Ανοσοχημική ανάλυση πολλαπλασιαζόμενου ενζύμου	127
Αντιγόνο	99, 100, 112, 123-130, 133, 196, 197
Αντίσωμα	99, 100, 118, 123, 133, 181, 196, 197
Βιολογία Συστημάτων	17, 18
Βολταμετρία τετραγωνικού παλμού	106, 107
Γονιδιωματική	15, 17, 19, 20, 27, 36, 63, 116
Διαφορική παλμική βολταμετρία	106, 107
Έγχυση Δείγματος με Ενισχυμένο Πεδίο	175
Ενζυμική ανοσοπροσρόφηση	128
Επιστοίβαγμα Δείγματος με Ενισχυμένο Πεδίο	174, 175
Ηλεκτροσωματική Ροή	136, 140, 158
Καθοδική αναδιαλυτική βολταμετρία	108
Μεταβολομική	15, 17, 20, 23, 24, 26, 29, 30, 31, 32, 33, 63, 204, 214
Μικροεκχύλιση Στερεάς Φάσης	85, 87, 224, 235
Μικυλλιακή Ηλεκτροκινητική Τριχοειδής Χρωματογραφία	149, 151
Μονόκλωνο DNA	109
Όριο Ανίχνευσης	106, 130, 163,

	180, 242
Παγίδα Ιόντων	168, 227
Παρακολούθηση Επιλεγμένου Ιόντος	170,
Παράταξη Φωτοδιδίων	163, 164
Προσοφητική αναδιαλυτική βολταμμετρία	108
	15, 17, 20, 21, 23, 26, 27, 31, 63, 69, 178, 179, 204, 207, 214, 218
Πρωτεομική	204
Σύστημα εισαγωγής δείγματος με ακροφύσιο	167, 208, 209
Τριπλό Τετράπολο	15, 20, 136, 143, 173, 177, 216
Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση	149
Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση Ζώνης	149, 155
Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση Πηκτής	149, 157
Τριχοειδής Ισοηλεκτρική Εστίαση	183, 184
Υγρή Χρωματογραφία Υπερ-Υψηλής Απόδοσης	137, 183, 193
Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης	15, 17, 20, 26, 63, 71, 92, 137, 152, 163, 167, 178, 203, 204, 206-209, 211- 213, 216, 227, 229
Υγρή Χρωματογραφία-Φασματομετρία Μαζών	71
Φασματομετρία Ατομικής Απορρόφησης Ψυχρού Ατμού	209
Φασματοσκοπία Μάζας σε ιοντικό κύκλοτρο με Μετασχηματισμό Fourier	110
Φέρων Ηλεκτρολύτης	131
Φθόρο-ανοσοχημική ανάλυση	131
Φθόρο-ανοσοχημική ανάλυση πολωμένης ακτινοβολίας	168
Φωτοϊοντισμός σε Ατμοσφαιρική Πίεση	191, 192
Χειρόμορφες στατικές φάσεις	168, 227
Χημικός Ιοντισμός σε Ατμοσφαιρική Πίεση	