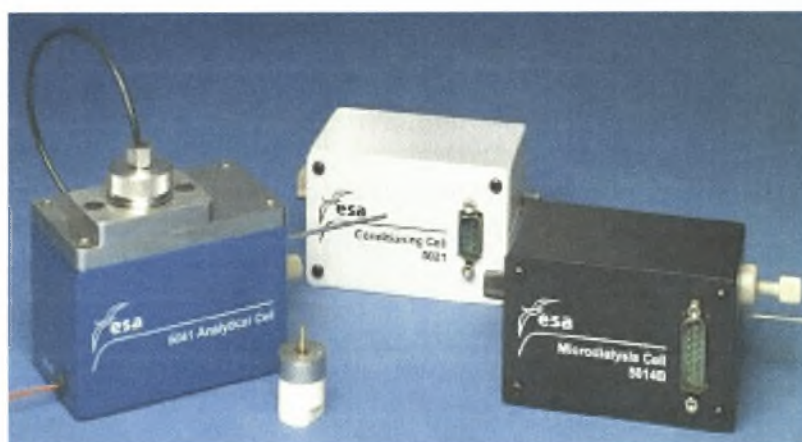
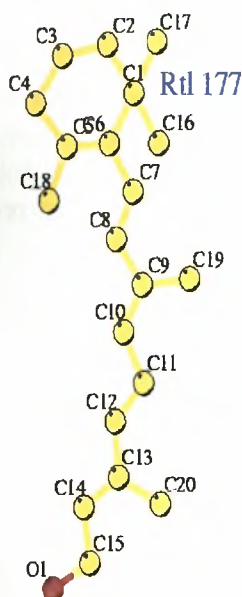


**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

*ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ*  
*ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΤΗΣ ΦΕΤΙΝΟΛΗΣ*  
*ΜΕ ΧΡΗΣΗ*  
*ΥΠΕΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ*  
*ΚΑΙ ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ*



**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**  
**ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ ΧΡΗΣΤΟΣ**

ΛΑΡΙΣΑ 2005



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ**  
**ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 4657/1  
Ημερ. Εισ.: 27-10-2005  
Δωρεά: Π.Θ.  
Ταξιδετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ  
2005  
ΠΑΠ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087872

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία με τίτλο «Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού μεταβολιτών της ρετινόλης με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης και ηλεκτροχημική ανίχνευση» εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ζωικής Παραγωγής της σχολής Τεχνολογίας Γεωπονίας του Τ.Ε.Ι. Λάρισας από τον Παπανικολάου Χρήστο φοιτητή του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ο επιβλέπων και υπεύθυνος καθηγητής της διπλωματικής εργασίας είναι ο κ. Μουλάς Ανάργυρος, Αναπληρωτής Καθηγητής του τμήματος Ζωικής Παραγωγής.

Τα μέλη που συμπληρώνουν την τριμελή εξεταστική επιτροπή είναι: ο κ. Κουρέτας Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας Ζώων του τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και ο κ. Σταθόπουλος Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Αισθάνομαι την υποχρέωση να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον καθηγητή κ. Μουλά Ανάργυρο για την παροχή του θέματος της διπλωματικής, την πολύτιμη βοήθεια κατά το πέρας της πειραματικής διαδικασίας, για τις χρήσιμες συμβουλές και για τις διορθώσεις που μου υπέδειξε κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<u>Περίληψη</u> .....	IV
<u>1) Εισαγωγή</u>	
<u>1.1 Βιταμίνες</u>	
1.1.1 Γενικά.....	1
1.1.2 Ορισμός βιταμινών.....	1
1.1.3 Κατάταξη βιταμινών.....	1
<u>1.2 Βιταμίνη Α – Ρετινοειδή</u>	
1.2.1 Χημεία, ιδιότητες και πηγές.....	2
1.2.2 Λειτουργίες-Έλλειψη και τοξικότητα.....	3
1.2.3 Πρωτεΐνες δέσμευσης-Υποδοχείς ρετινοειδών.....	3
<u>1.3 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography)</u>	
1.3.1 Γενικά .....	4
1.3.2 Θεωρία υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης.....	5
I. Η χρωματογραφία.....	5
II. Διαχωριστική ικανότητα.....	6
1.3.3 Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης.....	8
I. Αντλίες.....	9
II. Μονάδα εισαγωγής δείγματος.....	10
III. Χρωματογραφική στήλη.....	11
IV. Ανιχνευτές – Ηλεκτροχημική ανίχνευση.....	12
V. Μέθοδοι διαχωρισμού.....	20
<u>2) Υλικά και Μέθοδοι</u> .....	25
<u>2.1 Συσκευές</u> .....	25
<u>2.2 Αντιδραστήρια</u> .....	25
<u>2.3 Πρότυπα διαλύματα</u> .....	25
<u>2.4 Χρωματογραφικές συνθήκες</u> .....	26
<u>2.5 Ανίχνευση</u> .....	27
<u>3) Αποτελέσματα</u> .....	28
<u>4) Συζήτηση</u> .....	32

## Περίληψη

Η βιταμίνη Α και τα παράγωγα της επιτελούν διάφορες βιολογικές λειτουργίες όπως όραση, αναπαραγωγή, κυτταρική διαφοροποίηση και συμμετέχουν και στις αναπτυξιακές διαδικασίες του οργανισμού. Διάφορες χρωματογραφικές μέθοδοι με ποικίλους τρόπους ανίχνευσης έχουν χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό ρετινοειδών σε βιολογικά δείγματα.

Σκοπός της παρούσης έρευνας ήταν η ανάπτυξη μιας μεθόδου προσδιορισμού τεσσάρων ρετινοειδών, του 13-*cis* ρετινοϊκού οξέος, του 9-*cis* ρετινοϊκού οξέος, του all-*trans* ρετινοϊκού οξέος και της ρετινόλης με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης και με ηλεκτροχημική ανίχνευση. Για την ανάπτυξη της μεθόδου δοκιμάστηκαν διάφοροι διαλύτες για κινητή φάση οι οποίοι αποτελούταν από μεθανόλη, ακετονιτρίλιο και νερό με ρυθμιστικό διάλυμα. Η κινητή φάση που έδωσε καλύτερο διαχωρισμό είχε σύσταση 40% ακετονιτρίλιο, 41% μεθανόλη και 19% νερό με ρυθμιστικό διάλυμα CH<sub>3</sub>COOH 0,03M-CH<sub>3</sub>COONa 0,03M. Με αυτήν την κινητή φάση τρέξαμε τα standard πρότυπα διαλύματα σε δυναμικά του ηλεκτροχημικού ανιχνευτή από 200 έως 1200mV. Το ηλεκτροδυναμικό βολταμογράφημα που προέκυψε υπέδειξε πως το βέλτιστο δυναμικό για την ανίχνευση των ρετινοειδών είναι τα 900mV, τιμή στην οποία το σήμα του θορύβου είναι αρκετά μεγάλο και γι' αυτό ως βέλτιστο δυναμικό θεωρήθηκαν τα 800mV. Η εφαρμογή αυτής της μεθόδου σε βιολογικά δείγματα ορού ανθρώπου ήταν επιτυχής ως προς την ανίχνευση. Λόγω του αυξημένου σήματος του θορύβου δεν κατέστη δυνατή η εφαρμογή της σε δείγματα με πολύ μικρές συγκεντρώσεις ισομερών του ρετινοϊκού οξέος.

Η παρούσα μελέτη βρίσκεται σε εξέλιξη με σκοπό την βελτιστοποίηση της ηλεκτροχημικής ανίχνευσης ώστε να εφαρμοστεί με επιτυχία και σε βιολογικά δείγματα, με την πιθανότητα να υπάρξει κάποια συσχέτιση των επιπέδων των ρετινοειδών με ασθένειες του ήπατος και να βρει και κλινική εφαρμογή μελλοντικά.

# **1) Εισαγωγή**

## **1.1) Βιταμίνες**

### **1.1.1) Γενικά**

Από τους παράγοντες που επηρεάζουν την υγεία και την ανάπτυξη των ανθρώπων, κανένας δεν είναι πιο βασικός από τις βιταμίνες. Αν και η έλλειψη μιας απλής βιταμίνης είναι σχετικά ασυνήθιστη στους ανθρώπους, μπορεί να συμβεί σαν αποτέλεσμα ενός εσωτερικού σφάλματος του μεταβολισμού ή σαν αποτέλεσμα ασυνήθιστης πρόσληψης στην καθημερινή διατροφή. Πιο συχνά αντιμετωπιζόμενα είναι σύνθετες ελλείψεις που παρουσιάζονται σαν αποτέλεσμα των λιπών των φαγητών, σαν περιπλοκές ορισμένων ασθενειών, ειδικά αυτών που επηρεάζουν την απορρόφηση των τροφών, από μεγάλης έκτασης αιμορραγικές καταστάσεις ή από αιμοδιάλυση και σαν συνέπεια της χρήσης συγκεκριμένων φαρμάκων. Εκτεταμένη χρήση βιταμινών σημειώνεται κατά κύριο λόγο στον δυτικό κόσμο[1].

### **1.1.2) Ορισμός βιταμινών:**

Οι βιταμίνες είναι οργανικές ενώσεις απαιτούμενες σε ιχνοποσότητες (σε ποσότητες μm-ml την ημέρα) στην διατροφή για υγεία, ανάπτυξη και αναπαραγωγή. Οι βιταμίνες είναι φυσικά συστατικά που μπορούν να απομονωθούν από οργανισμούς (όπως φυτά που έχουν την ικανότητα να παρασκευάζουν τις περισσότερες από αυτές τις ενώσεις) ή μπορούν να είναι χημικώς συνθεμένα. Επιπρόσθετα, τα συνθετικά ανάλογα και τα παράγωγα των βιταμινών σχεδιάζονται για να χρησιμεύσουν σαν αναστολείς. Μόνο μικρά ποσά βιταμινών απαιτούνται για την λειτουργία τους, συχνά καταλυτικών (συνενζυματικών) ρόλων[1].

### **1.1.3) Κατάταξη βιταμινών:**

Υπάρχουν διάφοροι τρόποι για να κατατάξει κανείς τις βιταμίνες. Ένας από τους πιο σημαντικούς είναι αυτός που σχετίζεται με την διαλυτότητα των βιταμινών. Έτσι διακρίνονται δύο κατηγορίες, οι λιποδιαλυτές βιταμίνες και οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες. Οι λιποδιαλυτές βιταμίνες είναι διαλυτές μόνο σε οργανικούς διαλύτες και εδώ ανήκουν οι βιταμίνες A, D, E και K. Αντίθετα οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες όπως γίνεται φανερό είναι διαλυτές μόνο σε νερό και περιλαμβάνουν την βιταμίνη C και όλες τις κατηγορίες των B βιταμινών. Οι λιποδιαλυτές βιταμίνες απορροφούνται, μεταφέρονται και αποθηκεύονται στο σώμα για μεγάλες χρονικές περιόδους και γενικά δεν λειτουργούν σαν συνένζυμα, ενώ οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες έχουν την τάση να παραμένουν στο σώμα για μικρά χρονικά διαστήματα και να απεκκρίνονται μέσω της ουροποιητικής οδού. Επίσης οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες έχουν συνενζυματική δράση σε έναν αριθμό αντιδράσεων τόσο στα θηλαστικά όσο και στους μικροοργανισμούς[1].

## **1.2) Βιταμίνη A**

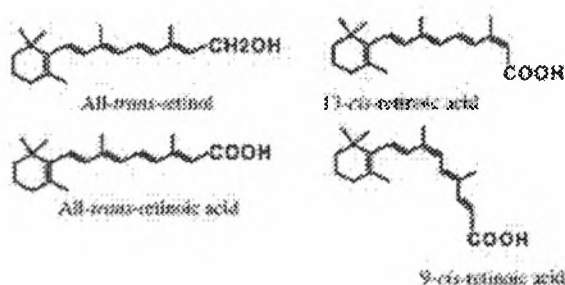
Ο θρεπτικός όρος βιταμίνη A προσδιορίζει μια οικογένεια βασικών, λιποδιαλυτών διαιτητικών συστατικών που σχετίζονται δομικά με την λιπιδική αλκοόλη ρετινόλη ενώ ο γενικότερος όρος ρετινοειδή περιλαμβάνει τόσο την ρετινόλη όσο και τα μεταβολικά παράγωγα της, καθώς και ένα μεγάλο αριθμό συνθετικών αναλόγων που έχουν ή όχι την βιολογική δράση της ρετινόλης[2]. Σύμφωνα με την IUPAC και την IUB, ρετινοειδή είναι μία ομάδα ενώσεων που αποτελείται από τέσσερις ισοπρενοειδείς ομάδες ενωμένες με τρόπο ουράς-κεφαλιού. Όλα τα ρετινοειδή



μπορούν σχηματικά να παραχθούν από μία μονοκυκλική πατρική ένωση που περιέχει πέντε διπλούς δεσμούς άνθρακα-άνθρακα και μία λειτουργική ομάδα στο τέλος του άκυκλου μέρους. Παρόλα αυτά ανακαλύφθηκαν συνθετικές ενώσεις όπως η TTNPB (Εικ. 1), που ανταποκρινόταν στον κλασικό ορισμό της ρετινόλης, όμως δεν συμφωνούσε με αυτόν της IUPAC-IUB για τα ρετινοειδή. Γι' αυτό το 1983 οι Sponn και Roberts πρότειναν πως ένα ρετινοειδές μπορεί να ορίζεται σαν ένα συστατικό που δύναται να εξάγει ειδικές βιολογικές αποκρίσεις με σύνδεση και ενεργοποίηση ενός ειδικού υποδοχέα ή μιας ομάδας υποδοχέων[3-4].

### 1.2.1) Χημεία, ιδιότητες και πηγές

Ο σκελετός των φυσικών ρετινοειδών αποτελείται από έναν μη αρωματικό δακτύλιο έξι ανθράκων με μία πολυισοπρενοειδή πλευρική αλυσίδα 11 ανθράκων η οποία καταλήγει σε μία λειτουργική ομάδα[3,4]. Η λειτουργική ομάδα στην αλυσίδα της ρετινόλης είναι η υδροξυλική. Οι πέντε συζευγμένοι δεσμοί της ρετινόλης επιτρέπουν την ισομερίωση του μορίου, περιλαμβάνοντας ένα *all-trans* και τέσσερα *cis* ισομερή (Εικ. 1). Οι εστέρες της ρετινόλης σχηματίζονται με εστεροποίηση του υδροξυλίου με μακριάς αλυσίδας λιπαρά οξέα. Η υδροξυλική ομάδα της ρετινόλης μπορεί να οξειδωθεί και να παράγει την αλδεύδη ρετινάλη. Περαιτέρω οξείδωση της ρετινάλης παράγει τελικά το ρετινοϊκό οξύ. Όπως η ρετινόλη έτσι και η ρετινάλη με το ρετινοϊκό οξύ μπορούν να υπάρξουν σαν διαφορετικά γεωμετρικά ισομερή, εκ των οποίων τα σημαντικότερα είναι η 11-*cis* ρετινάλη, και τα *all-trans*, 9-*cis* και 13-*cis* ρετινοϊκά οξέα (Εικ. 1)[2].



Εικόνα 1: Η χημική δομή των σημαντικότερων ρετινοειδών και των κυριότερων ισομερών τους.

Παρόλο που τα ρετινοειδή έχουν τον ίδιο μοριακό σκελετό, διαφέρουν πολύ στις φυσικοχημικές τους ιδιότητες[3]. Τα καθαρά ρετινοειδή εμφανίζονται σαν κίτρινοι κρύσταλλοι ή σαν λάδι όπως σε κάποιους εστέρες[1,3]. Όπως ήδη αναφέρθηκε τα ρετινοειδή είναι διαλυτά σε οργανικούς διαλύτες και αδιάλυτα στο νερό. Για τα ιόνισμα ρετινοειδή όπως το ρετινοϊκό οξύ, η διαλυτότητα εξαρτάται από το pH του διαλύτη ενώ οι ρετινυλικοί εστέρες είναι πολύ λίγο διαλυτοί σε οργανικούς διαλύτες όπως η μεθανόλη και το ακετονιτρίλιο[3].

Τα ρετινοειδή είναι ευαίσθητα σε ισομερισμό, οξείδωση και πολυμερισμό στην παρουσία φωτός, υψηλής θερμοκρασίας και οξυγόνου[2,3]. Οι οπτικές ιδιότητες τους χρησιμοποιούνται στην ανίχνευση, αναγνώριση και ποσοτικοποίηση τους[2]. Το  $\lambda_{max}$  των ρετινοειδών, διαλυμένων σε αιθανόλη ή μεθανόλη, ποικίλει από κάτω από 300 έως πάνω από 400 nm, οπότε μπορεί να επιτευχθεί εκλεκτική και ευαίσθητη ανίχνευση με ανιχνευτές υπεριώδους. Για την ρετινόλη το  $\lambda_{max}$  είναι 325 ενώ για την ρετινάλη και το ρετινοϊκό οξύ είναι 380 και 350 nm αντίστοιχα[3].

Η πηγή των ρετινοειδών είναι η διατροφή[5]. Τα φυτά και οι μικρότεροι οργανισμοί συνθέτουν τα καροτενοειδή που είναι πρόδρομα μόρια της ρετινόλης[2]. Ο άνθρωπος και τα ζώα προσλαμβάνουν τα καροτενοειδή από την τροφή και τα μετατρέπουν στην ρετινόλη και τα παράγωγα της[2,5]. Επίσης, ο άνθρωπος μπορεί να

προσλάβει την ρετινόλη από κατανάλωση κρέατος και ψαριών καθώς το ήπαρ των ζώων αποτελεί χώρο αποθήκευσης ρετινόλης[1].

### 1.2.2) Λειτουργίες-Έλλειψη και τοξικότητα

Η ρετινόλη και τα ρετινοειδή είναι απαραίτητα για μια σειρά από φυσιολογικές λειτουργίες που περιλαμβάνουν την όραση, την κυτταρική αύξηση και διαφοροποίηση, την αναπαραγωγή και την ρύθμιση του ανοσοποιητικού[1,5-8]. Στην όραση συμμετέχει με την μορφή της ρετινάλης και εμπλέκεται σε έναν αντιστρεπτό κύκλο με την οψίνη και την ροδοψίνη, με αποτέλεσμα την διέγερση του οπτικού νεύρου[1]. Ως προς την αναπαραγωγή τα ρετινοειδή συμμετέχουν στην ρύθμιση της λειτουργίας του όρχεως και τη σπερματογένεση, παίζουν ρόλο στη σύλληψη και τον σχηματισμό του πλακούντα και είναι απαραίτητα στην ανάπτυξη του εμβρύου[5]. Επίσης η ρετινόλη συμβάλλει στη σταθεροποίηση των κυτταρικών και ενδοκυτταρικών μεμβρανών, την διατήρηση της ακεραιότητας του επιθηλιακού ιστού και την σύνθεση των γλυκοπρωτεϊνών[1].

Έλλειψη ρετινόλης υπάρχει ακόμα σε μέρη του αναπτυσσόμενου κόσμου και κυρίως σε νεαρά παιδιά. Η στέρηση της οδηγεί αρχικά σε κερατινοποίηση συγκεκριμένων επιθηλίων (τραχεία, δέρμα) και σε οπτική ανικανότητα (νυκτερινή τύφλωση). Οι πρώτες αυτές ενδείξεις έλλειψης ρετινόλης ακολουθούνται από φανερές κλινικές αλλαγές όπως ξήρανση του κερατοειδή χιτώνα και του δέρματος και αλλαγές στην όρεξη που συμβάλλουν στην μικρή ανάπτυξη. Όλα αυτά διορθώνονται με πρόσληψη ρετινόλης. Όμως, αν μείνει αδιόρθωτη η έλλειψη, τότε τα άτομα οδηγούνται σε μη αντιστρεπτή τύφλωση[2].

Οι ποσότητες της ρετινόλης που είναι απαραίτητες για την υγεία των ζώων και του ανθρώπου είναι μικρές. Η υπερβολική πρόσληψη ( 300 mg για ενήλικες-100 mg για παιδιά) οδηγεί σε υπερβιταμίνωση και τοξικότητα[4]. Η τοξικότητα συνδέεται με υψηλά επίπεδα λιποπρωτεϊνών δεσμευμένων σε ρετινυλικούς εστέρες και πιστεύεται να είναι μία εκδήλωση της επαγόμενης από ρετινοειδή μεμβρανικής ζημιάς, ενδοκυτταρικής συσσώρευσης ή μη κατάλληλων σημάτων ανάμεσα στα κύτταρα. Τα σημάδια της τοξικότητας κυμαίνονται από αλλαγές στην πίεση του υγρού, πυρετός, πονοκέφαλος, ίλιγγος, αϋπνία, αδιαθεσία, ναυτία, ξηρότητα των βλεννοδών μεμβρανών, αυξημένες τρανσαμινάσες ορού και ανωμαλίες των οστών μέχρι αιμορραγία, κόμα και θάνατο. Η τοξικότητα απορρέει από υψηλές δόσεις *all-trans* ρετινοϊκού οξέος, *13-cis* ρετινοϊκού οξέος και γενικά των συνθετικών ρετινοειδών[2].

### 1.2.3) Πρωτεΐνες δέσμευσης-Υποδοχείς ρετινοειδών

Τα ρετινοειδή όπως προαναφέρθηκε, δεν έχουν καλή διαλυτότητα στο νερό και η λύση της φύσης σε αυτό το πρόβλημα έγινε με την εξέλιξη ειδικευμένων πρωτεϊνών που εξυπηρετούν στο να διαλυτοποιούν και να συνοδεύουν τα διάφορα ρετινοειδή στο πλάσμα και τα κύτταρα[2]. Η πρωτεΐνη του πλάσματος που συνδέει την ρετινόλη και την μεταφέρει στα κύτταρα ονομάζεται πρωτεΐνη δέσμευσης ρετινόλης (*retinol-binding protein*, RBP). Η ρετινόλη κατόπιν εισέρχεται στα κύτταρα όπου συνδέεται από ειδικές πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος, τις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες δέσμευσης ρετινοειδών I και II (*cellular retinoid-binding proteins*, CRBP I-II)[9].

Η RBP απομονώθηκε από το πλάσμα του ανθρώπου για πρώτη φορά το 1968 και βρέθηκε να είναι μία απλή πολυπεπτιδική αλυσίδα 182 αμινοξέων μοριακού βάρους 21,2 kD, με τεταρτοταγή δομή που περιγράφεται σαν «βήτα βαρέλι», με οχτώ αντιπαράλληλα βήτα-φύλλα. Η ρετινόλη συνδέεται με την RBP σε αναλογία 1:1 μέσω της υδροξυλικής της ομάδας με υδροφοβικούς δεσμούς σε σταθερά σύνδεσης  $K_a \approx 1.5 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ . Ο ενδογενής προσδέτης βασικά είναι η ρετινόλη, όμως



μπορούν να συνδεθούν και άλλα ρετινοειδή όπως τα *cis* ισομερή της ρετινάλης και του ρετινοϊκού οξέος. Η CRBP βρέθηκε στο κυτοσολικό κλάσμα ενός αριθμού οργάνων, και είναι ένα μέλος μιας οικογένειας τουλάχιστον 11 πρωτεϊνών 14 με 15kD η κάθε μία. Αυτή η οικογένεια περιλαμβάνει επίσης τρεις άλλες CRBP: την CRBP II, και τις δύο μορφές της κυτταρικής πρωτεΐνης δέσμευσης ρετινοϊκού οξέος (cellular retinoic acid-binding protein I-II, CRABP I-II). Η CRBP-I παρουσιάζει μεγαλύτερη έκφραση στο ήπαρ, τους νεφρούς και την εγγύς επιδιδυμίδα ενώ η CRBP-II εκφράζεται σχεδόν αποκλειστικά στο λεπτό έντερο. Τέλος η CRABP I και II εκφράζεται κατά κύριο λόγο στα μάτια και σε κάποια αναπαραγωγικά όργανα ενώ η CRABP-II εκφράζεται έντονα στο δέρμα κατά την εμβρυογένεση και περιορίζεται στους ενήλικες[2].

Τα ρετινοειδή, όπως αναφέρεται στην προηγούμενη ενότητα, είναι απαραίτητα για πολλές φυσιολογικές λειτουργίες των οργανισμών και συμμετέχουν σε αυτές ρυθμίζοντας την γονιδιακή έκφραση των κυττάρων[5]. Αυτές οι επιδράσεις μεσολαβούνται από ειδικούς πυρηνικούς μεταγραφικούς παράγοντες[10], οι οποίοι είναι υποδοχείς ρετινοειδών και διακρίνονται σε δύο βασικές οικογένειες: τους υποδοχείς ρετινοϊκού οξέος (Retinoic Acid Receptors, RAR) και τους υποδοχείς X ρετινοειδών (Retinoic X Receptors, RXR)[2,5,9,10], και τρεις υπότυποι (άλφα, βήτα, γάμα) σε κάθε οικογένεια[2]. Η ενεργοποίηση των υποδοχέων εξαρτάται από τους προσδέτες των[10]. Ο φυσιολογικός προσδέτης για τους RAR είναι το *all-trans* ρετινοϊκό οξύ, ενώ για τους RXR το *9-cis* ρετινοϊκό οξύ[2,5,10,11], αν και το τελευταίο έχει την ικανότητα να συνδέεται και με τους RAR[5,9,10].

Οι RAR και RXR έχουν υψηλή ομολογία ως προς τη δομή και το μηχανισμό δράσης με την υπεροικογένεια των υποδοχέων των στεροειδών-θυροειδών ορμονών[2] και περιέχουν μία περιοχή δέσμευσης του προσδέματος και μία περιοχή σύνδεσης με το DNA[2,9]. Οι περιοχές του DNA όπου συνδέονται οι RAR και RXR είναι ειδικά στοιχεία γνωστά σαν στοιχεία απόκρισης στο ρετινοϊκό οξύ (Retinoic Acid Responsive Elements, RARE) που αποτελούνται από την επαναλαμβανόμενη αλληλουχία AGGTCA με δύο ή πέντε νουκλεοτίδια ανάμεσα στις επαναλήψεις[2,9]. Οι υποδοχείς συνδέονται ως διμερή και ενεργοποιούν ή καταστέλλουν την μεταγραφή των γονιδίων στόχων που περιέχει ένα RARE[9]. Το διμερές που δημιουργείται συνήθως είναι το ετεροδιμερές RAR/RXR, όμως οι RXR υποδοχείς μπορούν να σχηματίσουν και ομοδιμερή[2,9,11]. Επιπλέον οι RXR σχηματίζουν ετεροδιμερή με άλλα μέλη της υπεροικογένειας των υποδοχέων των στεροειδών-θυροειδών ορμονών.

### **1.3) Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)**

#### **1.3.1) Γενικά**

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) έχει γίνει το χρησιμότερο εργαλείο των βιοτεχνολογικών και φαρμακευτικών βιομηχανιών όπου χρησιμοποιείται για να αναγνωρίσει, να χαρακτηρίσει και να καθαρίσει μόρια σε όλα τα στάδια μιας διαδικασίας από έρευνα και ανάπτυξη μέχρι βεβαίωση ποιότητας και εγκυρότητα. Η HPLC προσφέρει ένα πεδίο τεχνικών διαχωρισμού οι οποίες είναι ιδανικές για την ανάλυση και τον καθαρισμό διαλυτών μορίων που κυμαίνονται από φάρμακα έως πρωτεΐνες. Έτσι, αποτελεί μία τεχνική για την ανάλυση των περισσότερων βιομορίων, συμπεριλαμβανομένων αμινοξέων, πεπτιδίων, πρωτεϊνών, υδρογονανθράκων, νουκλεϊνικών οξέων και λιπιδίων[12]. Η HPLC σαν τεχνική έχει ορισμένα πλεονεκτήματα σε σχέση με τις παραδοσιακές τεχνικές, αλλά και κάποια μειονεκτήματα. Τα πλεονεκτήματα που χαρακτηρίζουν την HPLC είναι η ταχύτητα

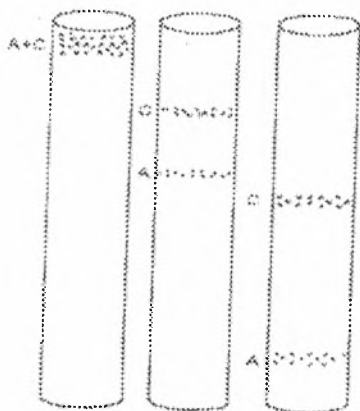
(λεπτά αντί ώρες της απλής χρωματογραφίας), η ανάλυση, η ευαισθησία, η επαναληψιμότητα, η ανάκτηση, η ακρίβεια και ο αυτοματισμός. Παρόλα αυτά, υπάρχουν κάποιες συγκεκριμένες δυσκολίες όπως το κόστος, η πολυπλοκότητα, η ευαισθησία (για κάποιες ενώσεις), η δύσκολη σειριακή ανάλυση μερικές φορές, η μη ανίχνευση των μη αντιστρεπτά απορροφούμενων ενώσεων και η δυσκολία στην ανίχνευση ενώσεων που εκκλύονται ταυτόχρονα[12].

### 1.3.2) Θεωρία HPLC

Το να δουλεύει κανείς με οικειότητα με τη βασική θεωρία της χρωματογραφίας είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για το σχεδιασμό νέων σχημάτων διαχωρισμού ή νοητά να τροποποιεί τα υπάρχοντα, ακόμα και αν οι θεωρητικές απόψεις αυτού ή όποιες επιστημονικής πειθαρχίας συχνά περιλαμβάνει μια έκταση εξισώσεων και αξιώσεων οι οποίες μπορεί να φαίνονται άσχετες ή ακόμα αντιφατικές με την πρακτική εμπειρία[12].

#### I) Η χρωματογραφία

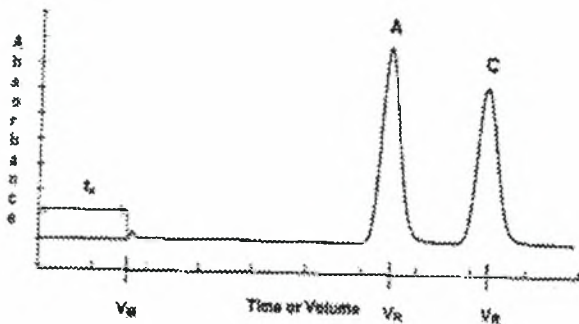
Στην χρωματογραφία, ένα υγρό δείγμα εισέρχεται σε ένα στενό τμήμα μίας στήλης η οποία είναι πακεταρισμένη με ένα συγκεκριμένο σωματίδιο ή υλικό πλήρωσης. Ένας διαλύτης αντλείται μέσα στη στήλη, μεταφέροντας το δείγμα από την είσοδο στην έξοδο και μέσα από έναν ανιχνευτή. Η διαφορετική αλληλεπίδραση των διάφορων συστατικών του δείγματος με το υλικό πλήρωσης είναι που επιφέρει τον διαχωρισμό(Εικ. 2).



Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση μιας χρωματογραφικής στήλης και του διαχωρισμού δύο συστατικών που επιτελείται μέσα στη στήλη σαν αποτέλεσμα διαφορετικής αλληλεπίδρασης των συστατικών με την στατική φάση.

Κατά την κίνηση τους με τον διαλύτη, τα συστατικά A και C διαχωρίζονται ελαφρώς διότι η C δείχνει μεγαλύτερη συγγένεια για την στατική φάση και κινείται πιο αργά από την A και τελικά η A εκκλύεται πρώτη, διακριτά από την C που ακολουθεί. Αυτός ο διαχωρισμός είναι ο στόχος της χρωματογραφίας.

Ένα χρωματογράφημα είναι ένα διάγραμμα δύο διαστάσεων των μορίων που εκκλύονται από μία στήλη. Η μέτρηση κάποιας προσδιοριστικής ιδιότητας των μορίων σχεδιάζεται έναντι του χρόνου ή του όγκου έκλουσης, όπως φαίνεται στην Εικ. 3 για τα μόρια A και C.



**Εικόνα 3: Το χρωματογράφημα είναι το αποτέλεσμα της έκλουσης των ουσιών από τη χρωματογραφική στήλη.**

Τα περισσότερα οργανικά μόρια εκθέτουν κάποια απορρόφηση στη χαμηλή υπεριώδη περιοχή του φάσματος (210nm) και η έκλουση μπορεί να ανιχνευθεί φασματοφωτομετρικά. Ο όγκος διάχυσης ή όγκος κινητής φάσης ( $V_M$ ) είναι ο όγκος της κινητής φάσης μέσα στη στήλη. Η  $V_M$  είναι ο όγκος του υγρού που απαιτείται για μία πλήρως μη ανακτημένη κορυφή να περάσει μέσα από τη στήλη και είναι ένα χρήσιμο σημείο αναφοράς

για τον χρωματογραφικό διαχωρισμό και καλείται επίσης νεκρός όγκος. Ο νεκρός χρόνος ( $t_0$ ) είναι ο απαιτούμενος χρόνος για τον νεκρό όγκο να περάσει μέσα από τη στήλη. Αν η σύνθεση του διαλύματος του δείγματος διαφέρει λίγο από την σύσταση της κινητής φάσης, μία παροδική παρέκκλιση που οφείλεται σε αλλαγές στο δείκτη διάθλασης μπορεί να συμβεί στην βασική γραμμή. Οι μοντέρνοι ανιχνευτές συχνά μειώνουν αυτή την παρέκκλιση κοντά στο μηδέν. Ο νεκρός χρόνος και ο νεκρός όγκος μπορούν να υπολογιστούν με μία ακρίβεια περίπου 10% από τον τύπο:  $V_M = 0.5Ld^2$  (Εξ. 1), όπου  $L$  το μήκος της στήλης και  $d$  η διάμετρος σε cm και τα δύο. Για να βρεθεί ο νεκρός χρόνος, ο νεκρός χρόνος θα διαιρεθεί από το ρυθμό ροής ( $F$ ) σε ml/min:  $t_0 = V_M/F$  (Εξ. 2). Για παράδειγμα, για μία 250x4.6mm ID στήλη σε ροή 1ml/min, ο νεκρός χρόνος είναι 2.5 λεπτά.

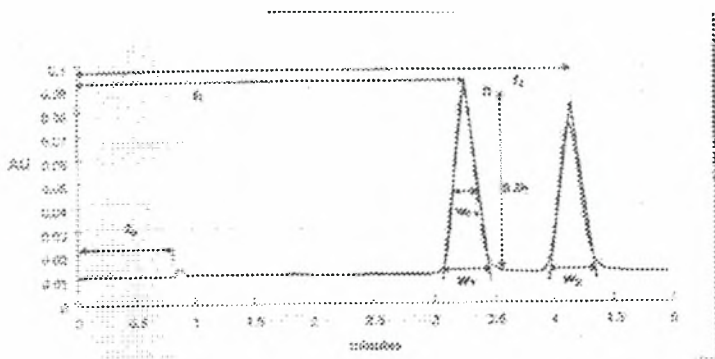
Ο ολικός όγκος της στήλης ( $V_T$ ) είναι το άθροισμα του νεκρού όγκου και του όγκου που καταλαμβάνεται από το υλικό πλήρωσης, γι' αυτό είναι ο όγκος του άδειου κυλίνδρου:  $V_T = \pi r^2 L$  (Εξ. 3), όπου  $r$  είναι η ακτίνα και  $L$  το μήκος της στήλης αντίστοιχα. Ο όγκος ανάκτησης ( $V_R$ ) είναι ο όγκος που περνάει από την στήλη από την στιγμή εισαγωγής του δείγματος έως την ανίχνευση της κορυφής μετρούμενη στην κορυφή της. Η  $V_R$  για ένα συγκεκριμένο συστατικό αντιστοιχεί σε ένα διακριτό χρόνο που καλείται χρόνος ανάκτησης ( $t_R$ ) και σχετίζονται μέσω του ρυθμού ροής,  $F$ :  $V_R = F \times t_R$  (Εξ. 4)

Τα μόρια που διαχωρίζονται αποδοτικά από οποιοδήποτε χρωματογραφικό σύστημα μπορεί να έχουν διαφορετικούς χρόνους ανάκτησης από τρέξιμο σε τρέξιμο, το οποίο μπορεί να προκαλείται από χειριζόμενες διακυμάνσεις στον ρυθμό ροής, την κινητή φάση και άλλες παραμέτρους. Οι χρόνοι ανάκτησης μπορούν να ομαλοποιηθούν για να μετακινήσουν αυτή τη διακύμανση προσδιορίζοντας τον παράγοντα ανάκτησης ( $k$ ) ο οποίος είναι ο αριθμός των νεκρών όγκων που απαιτούνται για να εκλουσθεί το μόριο ή η κορυφή που ενδιαφέρει. Πιο συχνά, ο  $k$  εκφράζεται μέσω του χρόνου ανάκτησης επειδή ο χρόνος είναι η συνήθης μονάδα μέτρησης:  $k = (V_R - V_M)/V_M = (t_R - t_0)/t_0$  (Εξ. 5)

## II) Διαχωριστική ικανότητα

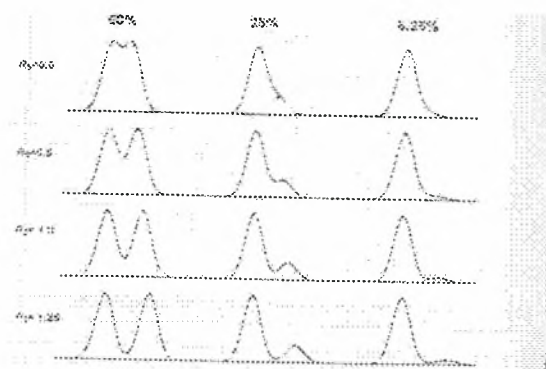
Ο στόχος της χρωματογραφίας είναι ο διαχωρισμός πολλαπλών κορυφών. Η διαχωριστική ικανότητα ( $R_S$ ) δύο κορυφών μπορεί να οριστεί ποσοτικά ως:

$R_S = 2(t_2 - t_1)/(w_2 + w_1)$  (Εξ. 6), όπου  $w_1$  και  $w_2$  είναι τα πλάτη των κορυφών μετρημένα στις αντίστοιχες βάσεις τους σε ίδιες χρονικές μονάδες με τους χρόνους ανάκτησης. Αυτό επιτυγχάνεται χειροκίνητα με το να χαράζουμε τις εφαπτόμενες των κορυφών στην βασική γραμμή όπως δείχνει η εικόνα 4:



**Εικόνα 4: Βασικοί παράμετροι στην γρήχη χρωματογραφία.**

Αν τα πλάτη των κορυφών είναι περίπου ίσα η Εξ. 2.6 γίνεται:  $R_s = \Delta t_R/w_2$  (Εξ. 7)  
 Ο διαχωρισμός μπορεί να εκτιμηθεί οπτικά χωρίς καμία θεώρηση ή υπολογισμό της διαχωριστικής ικανότητας, όπως παρουσιάζεται στα διαγράμματα της εικόνας 5.



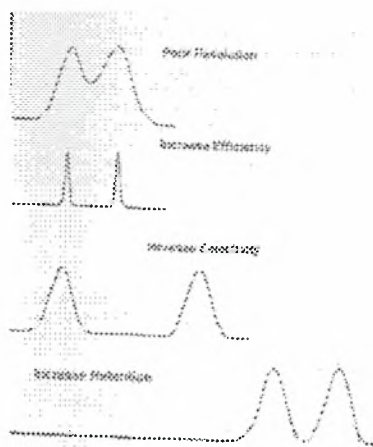
**Εικόνα 5: Διαχωριστικές ικανότητες δύο κορυφών σε διαφορετικές συγκεντρώσεις συστατικών.**

Είναι φανερό πως οι κορυφές του τελευταίου διαγράμματος διαχωρίζονται η μία από την άλλη και αυτές του πρώτου διαχωρίζονται πάρα πολύ λίγο. Στην τιμή  $R_s = 1$  η παρουσία δύο κορυφών είναι αλάνθαστη, οι κορυφές μπορούν να ποσοτικοποιηθούν και είναι κατά 98% διαχωρισμένες, κοντά στη βασική γραμμή. Όταν η  $R_s$  είναι μικρότερη από 1, τα συστατικά με χαμηλή συγκέντρωση μπορεί να καλυφθούν από αυτά με μεγάλη συγκέντρωση, όπως φαίνεται στο πάνω δεξιά παράδειγμα της Εικ. 5. Όταν η  $R_s$  είναι μικρότερη από 0,6, υπάρχει μία

πολύ μικρή ένδειξη δύο κορυφών ακόμα και για τα συστατικά με ίσες συγκεντρώσεις.

Η διαχωριστική ικανότητα είναι πιο δύσκολο να προσδιοριστεί όταν δύο κορυφές διαφέρουν ευρέως στις συγκεντρώσεις τους ή στην ικανότητα ανίχνευσης τους, όπως δείχνουν τα δεξιά παραδείγματα της εικόνας. Η δεύτερη κορυφή σε  $R_s$  0,6 και 0,8 ενδείκνυται από την ασυμμετρία της πρώτης κορυφής με μία “αυξανόμενη ουρά”. Η  $R_s$  με τιμή 1 απαιτείται για να διακρίνουμε πλήρως την δεύτερη κορυφή, ακόμα και αν διαχωρίζεται πολύ κοντά στην πρώτη κορυφή.

Η  $R_s$  ανάμεσα σε δύο κορυφές θα βελτιωθεί αν οι κορυφές είναι μυτερές με στενά πλάτη βάσεων, δηλαδή με υψηλή απόδοση, αν οι κορυφές είναι απομακρυσμένες, δηλαδή με καλή εκλεκτικότητα ή αν έχουν υψηλή ανάκτηση, όπως στην εικόνα 6.



**Εικόνα 6: Η διαχωριστική ικανότητα εξαρτάται από την απόδοση, την εκλεκτικότητα και την ανάκτηση.**



➤ **Ανάκτηση:**

Σε μία χρωματογραφική διαδικασία, τα μόρια ταξιδεύουν μέσα σε μία κινητή φάση και αλληλεπιδρούν με την στατική φάση. Οι διαφορετικές αλληλεπιδράσεις των μορίων συνεισφέρουν στο διαχωρισμό τους. Ένα μόριο ανακτείται εάν διαχωρίζεται στην στατική φάση περισσότερο από ότι ταξιδεύοντας με την κινητή φάση. Η ανάκτηση δίνει μία μέτρηση της ικανότητας της στατικής φάσης να συνδέει ένα συγκεκριμένο μόριο μέσω του παράγοντα ανάκτησης  $k$ . Αν ο παράγοντας ανάκτησης  $k$  είναι μηδέν τότε το μόριο δεν ανακτείται καθόλου και δεν θα διαχωριστεί. Επομένως, όσο αυξάνεται η ανάκτηση τόσο βελτιώνεται ο διαχωρισμός.

➤ **Εκλεκτικότητα:**

Η ικανότητα της στατικής φάσης να διακρίνει ανάμεσα σε δύο μόρια είναι μία βασική όψη της χρωματογραφίας. Η εκλεκτικότητα ( $\alpha$ ) ορίζεται ως ο λόγος των παραγόντων ανάκτησης του πιο υψηλά ανακτημένου μορίου προς το λιγότερο ανακτημένο:  $\alpha = k_1/k_2$  (Εξ. 8). Η εκλεκτικότητα εξαρτάται από τις φυσικές και χημικές ιδιότητες του αναλύτη, της στατικής και της κινητής φάσης και δεν επηρεάζεται από την αλλαγή του ρυθμού ροής και τις διαστάσεις της στήλης. Η εκλεκτικότητα είναι το πιο σημαντικό εργαλείο για επιτυχημένη χρωματογραφία.

➤ **Αποδοτικότητα:**

Από τα χρωματογραφήματα της Εικ. 6 γίνεται φανερό πως το εύρος των κορυφών είναι ένα άλλο ολοκληρωτικό συστατικό της διαχωριστικής ικανότητας, της οποίας η βάση πρέπει να κατανοηθεί για να επιτευχθεί ένας αποδεκτός διαχωρισμός. Η θεωρία των “θεωρητικών πλακών” αναπτύχθηκε για να εξηγήσει τις διακυμάνσεις στα πλάτη των κορυφών και τους υπεύθυνους παράγοντες.

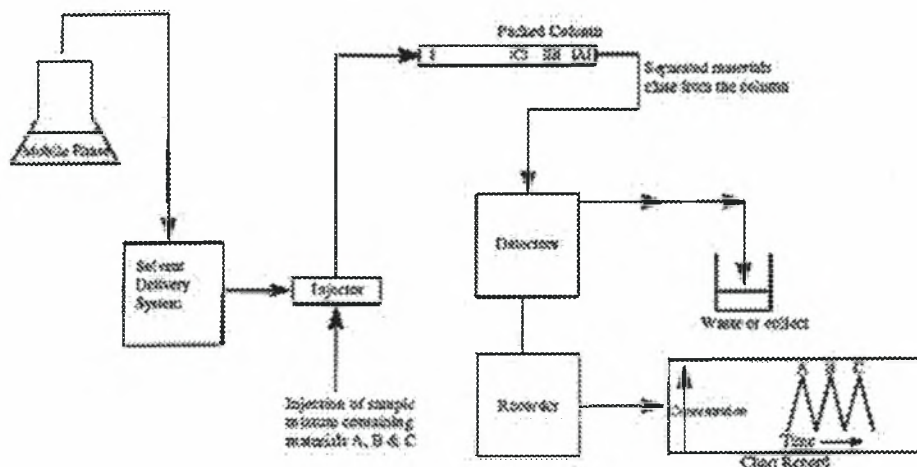
Η αποδοτικότητα είναι μία μέτρηση της ευκολίας με την οποία μία ένωση κινείται μέσα σε μία στήλη και κατά επέκταση μέτρηση της μεταφοράς ανάμεσα σε στατική και κινητή φάση και αποτελεί μία κινητική παράμετρο. Η αποδοτικότητα είναι ένας στατιστικός υπολογισμός της σταθερής απόκλισης της κορυφής σε μονάδες χρόνου και μετρείται σε θεωρητικές πλάκες ( $N$ ):  $N = (t_R/\sigma)^2$  (Εξ. 9), όπου  $\sigma$  η σταθερή απόκλιση της μάντας σε μονάδες χρόνου.

Μία μεγάλη τιμή για τις θεωρητικές πλάκες δείχνει μία αποδοτική στήλη, δυναμικά ικανή να δώσει μυτερές κορυφές. Γι’ αυτό η απόδοση δύο παρόμοιων στηλών μπορεί να συγκριθεί χρησιμοποιώντας αυτή τη μέτρηση με ίδια δείγματα και συνθήκες. Το ύψος ισοδύναμο με μία θεωρητική πλάκα ( $H$ ) συσχετίζει τον αριθμό των πλακών με το μήκος της στήλης ( $L$ ):  $H = L/N$  (Εξ. 10). Αυτή είναι η προτιμώμενη περιγραφή της αποδοτικότητας στήλης επειδή στήλες οποιασδήποτε γεωμετρίας μπορούν να συγκριθούν σαν οι αποδοτικότητες τους ανά μονάδα μήκους[12].

### 1.3.3 Σύστημα HPLC

Η επικέντρωση της συζήτησης για την HPLC είναι συχνά πάνω στη στήλη, η οποία προάγει τον μηχανισμό του διαχωρισμού. Όμως ο σχεδιασμός και ο χειρισμός είναι επίσης κρίσιμα για την επιτυχία της ανάλυσης. Ένα σχεδιάγραμμα μίας HPLC φαίνεται στην εικόνα 7, όπου διακρίνονται τα βασικά της μέρη που είναι το σύστημα εισαγωγής κινητής φάσης (διαλύτη), η εισαγωγή δείγματος, ο διαχωρισμός (στήλη) και η ανίχνευση των συστατικών. Η κατανόηση των λειτουργιών και του χειρισμού αυτών των μονάδων βοηθάει στην σωστή επιλογή τους, την αποτελεσματική τους χρήση και την αντιμετώπιση των προβλημάτων όταν είναι απαραίτητο.





Εικόνα 7: Σχηματική αναπαράσταση των κυριότερων μονάδων μίας υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης(HPLC).

### 1) Αντλίες

Η αντλία είναι ένα από τα πιο σημαντικά μέρη ενός συστήματος HPLC. Η αντλία σε μία HPLC αναμένεται να αποφέρει αμετάβλητη απόδοση για ένα μεγάλο εύρος ρυθμών ροής σε πιέσεις άνω των 5000psi. Ιδανικά, μία αντλία πρέπει να παράγει απείρως ακριβείς ρυθμούς ροής με ελάχιστο ή καθόλου παλμό και θα πρέπει επίσης να είναι συμβιβάσιμη με όλους τους διαλύτες, με γρήγορες και εύκολες αλλαγές. Το σύστημα άντλησης χρησιμοποιείται για να παρέχει είτε σταθερό όγκο είτε σταθερή πίεση. Είναι εύκολο να μετρήσουμε πίεση σχεδόν σε κάθε σημείο του συστήματος ενώ ο ρυθμός ροής μπορεί να εκτιμηθεί σε ορισμένες μόνο θέσεις. Κατά κύριο λόγο, στην HPLC χρησιμοποιούνται αντλίες σταθερής ροής και σπάνια σταθερής πίεσης.

Η συμπιεστότητα των υγρών είναι ένας σημαντικός φυσικός παράγοντας ο οποίος μπορεί να επηρεάσει την ακρίβεια των συστημάτων άντλησης, ειδικά όταν εργαζόμαστε με υψηλές πιέσεις. Η συμπιεστότητα, η οποία είναι η αλλαγή στον όγκο ανά μονάδα πίεσης, μπορεί να διαφέρει από έναν παράγοντα του τρία για τους διαλύτες που χρησιμοποιούνται συνήθως στην HPLC. Το νερό, το οποίο έχει χαμηλή συμπιεστότητα, διαφέρει από το εξάνιο το οποίο συμπιέζεται πάνω από τρεις φορές υψηλότερα. Η συμπιεστότητα είναι μια υπόθεση αν μία ποικιλία διαλυτών τρέχουν υπό συνθήκες υψηλής πίεσης. Σε αυτές τις περιπτώσεις, για να πετύχουμε ακριβείς ρυθμούς ροής, τα συστήματα άντλησης πρέπει να προσαρμόζονται ή με χειρισμό ή αυτόματα[12].

Αριθμούνται τρεις βασικοί τύποι αντλιών, η κάθε μία με τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα της: ανταλλακτικές, συριγγώδεις ή τύπου εκτοπίσματος και πνευματικές ή σταθερής πίεσης αντλίες[13].

#### 1. Ανταλλακτικές αντλίες

Οι ανταλλακτικές αντλίες, οι οποίες χρησιμοποιούνται στο 90% των εμπορικά διαθέσιμων συστημάτων HPLC, συνήθως αποτελούνται από ένα μικρό θάλαμο στον οποίο ο διαλύτης αντλείται από τα δοχεία και κινείται εμπρός από ένα έμβολο. Δύο βαλβίδες ελέγχου οι οποίες ανοιγοκλείνουν εναλλακτικά, ελέγχουν την ροή του διαλύτη μέσα και έξω από ένα κύλινδρο. Ο διαλύτης είναι σε απευθείας σύνδεση με το έμβολο. Σαν εναλλακτικό, η πίεση μπορεί να μεταφερθεί στο διαλύτη μέσω ενός εύκαμπτου διαφράγματος, το οποίο με τη σειρά υδραυλικά αντλείται από ένα ανταλλακτικό έμβολο. Οι ανταλλακτικές αντλίες έχουν το μειονέκτημα να παράγουν

μία παλμική ροή, η οποία πρέπει να μετριαστεί επειδή η παρουσία της φανερώνεται σαν θόρυβος στη βασική γραμμή του χρωματογράφηματος. Τα πλεονεκτήματα είναι ο μικρός εσωτερικός τους όγκος (35 με 400  $\mu\text{L}$ ), οι υψηλές αποδόσεις πιέσεων (πάνω από 10,000psi), η έτοιμη προσαρμοστικότητα στη βαθμιδωτή έκλυση και οι σταθεροί ρυθμοί ροής[13].

## **2. Συριγγώδεις ή αντλίες εκτοπίσματος**

Οι αντλίες εκτοπίσματος συνήθως αποτελούνται από μεγάλους, συριγγώδεις θαλάμους εξοπλισμένους με ένα έμβολο που ενεργοποιείται από έναν αγόμενο με κοχλία μηχανισμό που ανάβει με βηματικό κινητήρα. Οι αντλίες εκτοπίσματος επίσης παράγουν μία ροή που τείνει να είναι ανεξάρτητη του ιζώδους. Επιπλέον η έξοδος είναι ελεύθερη παλμού. Τα μειονεκτήματα περιλαμβάνουν περιορισμένη χωρητικότητα διαλύτη (  $\approx 250 \text{ mL}$ ) και αξιοσημείωτη δυσκολία όταν οι διαλύτες πρέπει να αλλαχθούν[13].

## **3. Υδραυλικές αντλίες**

Στις απλούστερες υδραυλικές αντλίες, η κινητή φάση περιέχεται σε ένα διπλωμένο δοχείο τοποθετημένο σε ένα σωλήνα που μπορεί να διατηρείται υπό κανονική πίεση από ένα συμπιεσμένο αέριο. Οι αντλίες αυτού του τύπου είναι φθηνές και ελεύθερες παλμού. Έχουν περιορισμένη χωρητικότητα και απόδοση πίεσης καθώς και εξάρτηση του ρυθμού ροής από το ιζώδες του διαλύτη και την πίεση της στήλης. Επιπρόσθετα, δεν είναι υπαγόμενες σε βαθμιδωτή έκλυση και περιορίζονται σε πιέσεις λιγότερο από περίπου 2000psi[13].

## **II) Μονάδα εισαγωγής δείγματος**

Η καλή απόδοση της στήλης σχετίζεται ευθέως με την σωστή εισαγωγή στη στήλη του δείγματος σε μορφή στενού εμβόλου. Διακρίνονται δύο βασικές κατηγορίες, οι σύριγγες έγχυσης και οι βαλβίδες δείγματος[14].

### **➤ Σύριγγες έγχυσης**

Η έγχυση με σύριγγα είναι ο πιο απλός τρόπος για να εισάγουμε ένα δείγμα στο σύστημα. Το δείγμα μεταφέρεται με μία σύριγγα μέσα στην συμπιεσμένη στήλη. Μία ειδικά σχεδιασμένη, ανθεκτική στην πίεση, μικροσύριγγα πρέπει να χρησιμοποιηθεί. Ένα μειονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι πως μπορεί να συμβεί και η αναπαραγωγικότητα της έγχυσης δείγματος είναι συχνά λιγότερο από 2% και γι' αυτό χρησιμοποιείται σπάνια[14].

### **➤ Βαλβίδες δείγματος**

Η πιο κοινές βαλβίδες δείγματος λειτουργούν με τον τρόπο πλήρωσης βρόγχων και καλούνται *υψηλής πίεσης εισαγωγής δείγματος*. Αυτό σημαίνει πως το δείγμα μεταφέρεται σε ατμοσφαιρική πίεση από μία σύριγγα σε ένα βρόγχο δείγματος. Με τρόπους βαλβιδικής λειτουργίας, ο βρόγχος δείγματος συνδέεται με το υψηλής πίεσης ρεύμα κινητής φάσης, το οποίο μεταφέρει το δείγμα στη στήλη. Εμπορικοί βρόγχοι δείγματος διατίθενται από 0,2 $\mu\text{L}$  έως 5 $\text{mL}$  ή και περισσότερο. Από την άλλη, ένας βρόγχος δείγματος μπορεί να κατασκευαστεί εύκολα κόβοντας ένα κατάλληλο μήκος ενός τριχοειδούς και συνδέοντας το με τον εγχυτήρα του δείγματος. Κανονικά, η ολοκληρωμένη πλήρωση προτιμάται από την μερική επειδή ο σχηματισμός έχει τέλεια ογκομετρική ακρίβεια, αν και παρόλα αυτά η μερική πλήρωση ακόμη έχει μία ογκομετρική ακρίβεια καλύτερη από 1% της σχετικής σταθεράς απόκλισης[14].

### **III) Χρωματογραφική στήλη**

Οι στήλες της HPLC κατά κανόνα κατασκευάζονται από ανοξείδωτο ατσάλι αν και περιστασιακά χρησιμοποιούνται στήλες περιτοιχισμένες από βαρύ γυαλί, οι οποίες περιορίζονται σε πιέσεις κάτω των 600psi. Οι διάφορες στήλες διαφέρουν σε μέγεθος και υλικό πλήρωσης και είναι διαθέσιμες από διάφορους κατασκευαστές.

#### **➤ Αναλυτικές στήλες**

Η καρδιά μιας HPLC είναι η στήλη επειδή προάγει τη δυνατότητα για διαχωρισμό. Η ποικιλία των στηλών κυμαίνονται σε μήκος από 10 έως 30cm. Φυσιολογικά, οι στήλες είναι ευθείες, με προστιθέμενο μήκος για την δυνατότητα σύζευξης δύο ή περισσότερων στηλών μαζί. Η εσωτερική διάμετρος είναι συχνά 4 με 10mm και το πιο κοινό μέγεθος των μορίων του υλικού πλήρωσης είναι 5 με 10 $\mu$ m. Ίσως, η πιο κοινή σε χρήση στήλη είναι με 25cm μήκος, 4,6mm εσωτερική διάμετρο και πακεταρισμένη με μόρια 5 $\mu$ m. Οι στήλες αυτού του τύπου περιέχουν 40000 με 60000 πλάκες ανά μέτρο. Πρόσφατα οι επιστήμονες κατασκεύασαν στήλες υψηλής ταχύτητας και απόδοσης οι οποίες έχουν μικρότερες διαστάσεις από αυτές που μόλις περιγράφηκαν. Αυτές οι στήλες έχουν εσωτερική διάμετρο από 1 έως 4,6mm και μπορούν να πακεταριστούν με μόρια 3-5 $\mu$ m. Συχνά, τα μήκη τους είναι μικρά, περίπου 3-7,5cm, περιέχουν έως 100000 πλάκες ανά μέτρο και έχουν το πλεονέκτημα της ταχύτητας και της ελάχιστης κατανάλωσης διαλύτη[13].

#### **➤ Προστατευτικές στήλες**

Συνήθως μία προστατευτική στήλη τοποθετείται πριν την αναλυτική στήλη για να αυξήσει την ζωή της αναλυτικής στήλης μετακινώντας όχι μόνο μολυσματικό υλικό από τους διαλύτες αλλά επίσης και συστατικά του δείγματος που συνδέονται μη αντιστρεπτά στη στατική φάση. Επιπλέον, εξυπηρετεί στο να διαβρέχει την κινητή φάση με την στατική ώστε απώλειες του διαλύτη από την αναλυτική στήλη να ελαχιστοποιούνται. Η σύνθεση του υλικού πλήρωσης της προστατευτικής στήλης πρέπει να είναι παρόμοια με αυτήν της αναλυτικής στήλης[13].

#### **➤ Θερμοστάτες στήλης**

Για πολλές εφαρμογές, ο στενός έλεγχος της θερμοκρασίας της στήλης δεν είναι απαραίτητος και οι στήλες χειρίζονται στην περικλείουσα θερμοκρασία. Όμως, συχνά καλύτερα χρωματογραφήματα παρατηρούνται διατηρώντας τις θερμοκρασίες της στήλης σταθερές σε βαθμούς λίγων δεκάτων σε θερμομέτρο εκατό βαθμών. Τα πιο καινούρια εμπορικά διαθέσιμα όργανα είναι τώρα εξοπλισμένα με θερμάστρες στηλών που ελέγχουν τις θερμοκρασίες των στηλών[13].

#### **➤ Υλικό πλήρωσης στηλών**

Δύο βασικοί τύποι πακεταρίσματος χρησιμοποιούνται στην HPLC: τα κλειστά σφαιρικά σωματίδια και τα πορώδη σωματίδια. Τα πρώτα συνίστανται από σφαιρικό, μη πορώδες γυαλί ή πολυμερικές χάντρες, με τυπικές διαμέτρους 30-40 $\mu$ m. Μία λεπτή πορώδης πλάκα από πυρίτιο, μία συνθετική ρητίνη πολυστυρενίου-διβυνιλοβενζενίου ή μία ιονανταλλακτική ρητίνη τοποθετείται στην επιφάνεια αυτών των χαντρών. Εναλλακτικά, οι χάντρες μπορούν να κατεργασθούν χημικά και για να δώσουν ένα στρώμα οργανικής επιφάνειας. Τα κλειστά σφαιρικά σωματίδια χρησιμοποιούνται κυρίως για τις προστατευτικές στήλες παρά για τις αναλυτικές[13].

Τα τυπικά πορώδη μόρια πακεταρίσματος αποτελούνται από μικροπορώδη μόρια με διαμέτρους από 3 έως 10 $\mu$ m. Τα μόρια συντίθενται από πυρίτιο, την συνθετική



ρητίνη πολυστυρενίου-διβυνιλοβενζενίου ή την ιονανταλλακτική ρητίνη. Το πυρίτιο είναι το πιο συνηθισμένο πακετάρισμα στην HPLC[13].

#### **IV) Ανιχνευτές**

Ένα συστατικό κλειδί σε μία HPLC είναι ο ανιχνευτής. Όλα τα μόρια τα οποία διαχωρίζονται από τη χρωματογραφία πρέπει να αναλυθούν ποιοτικά ή/και ποσοτικά για να αποφέρουν ουσιώδη αποτελέσματα. Η λειτουργία ενός ανιχνευτή είναι να παράγει ένα ηλεκτρικό σήμα αντίστοιχο στην συγκέντρωση του δείγματος το οποίο καταγράφεται και αποθηκεύεται[12]. Ένας ιδανικός ανιχνευτής είναι ευαίσθητος σε χαμηλές συγκεντρώσεις του κάθε αναλύτη, παράγει γραμμική απόκριση σε σχέση με την συγκέντρωση του αναλύτη και δεν συνεισφέρει στην διεύρυνση των εκλούμενων κορυφών[15].

Οι ανιχνευτές μπορούν να διακριθούν από τις φυσικές ή τις χημικές τους αρχές από τις οποίες διέπονται. Υπάρχουν διάφοροι τύποι ανιχνευτών και θα αναφερθούμε στους πιο ευρέως χρησιμοποιημένους[12].

#### **➤ Ανιχνευτές υπεριώδους-ορατού (UV-VIS)**

Ο ανιχνευτής υπεριώδους ορατού είναι ο πιο κοινός ανιχνευτής στην HPLC επειδή οι πιο πολλές ενώσεις απορροφούν στο υπεριώδες και το ορατό φάσμα του φωτός[15]. Όταν το φως περάσει μέσα από την κινητή φάση η ένταση της απορρόφησης είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του αναλύτη και του μήκους του οπτικού μονοπατιού (νόμος Lambert-Beer):  $A = \epsilon bc = \log(I_0/I)$ , όπου  $\epsilon$  είναι η μοριακή απορροφητικότητα,  $b$  το μήκος της διαδρομής μέσα στο διάλυμα σε cm,  $c$  η συγκέντρωση του δείγματος σε mol/L,  $I_0$  η ένταση αναφοράς και  $I$  η ένταση του δείγματος. Επειδή το μήκος της διαδρομής και η μοριακή απορροφητικότητα είναι σταθερές για μία συγκεκριμένη ένωση σε ένα δεδομένο ανιχνευτή, η απορρόφηση εξαρτάται μόνο από την συγκέντρωση. Η μοριακή απορροφητικότητα είναι συγκεκριμένη για κάθε μόριο, βασίζομενη στην κατασκευή και το μήκος κύματος που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και ποικίλλει ευρέως ανάμεσα σε μόρια σε κάθε δεδομένο μήκος κύματος και ανάμεσα στα μήκη κύματος για όποιο δεδομένο μόριο. Αυτό εξηγεί τις διαφορές στην ευαισθησία και την εκλεκτικότητα για την απορρόφηση στο UV των διαφόρων ενώσεων[12].

Τα μήκη κύματος που δημιουργεί ένας ανιχνευτής UV-VIS εξαρτάται από τις ειδικές λάμπες του ανιχνευτή. Λάμπες υδραργύρου, καδμίου και ψευδαργύρου έχουν χρησιμοποιηθεί για αυτούς τους ανιχνευτές. Οι λάμπες υδραργύρου δημιουργούν φασματικές γραμμές στα 254 και 314nm, οι λάμπες ψευδαργύρου στα 214nm και του καδμίου στα 229nm. Οι λάμπες, οι οποίες έχουν ένα συνεχόμενο φάσμα από 190-350nm, χρησιμοποιούνται κυρίως σε μικρά μήκη κύματος ( $\leq 300$ nm), ενώ για μήκη κύματος του ορατού, συχνά χρησιμοποιείται μία λάμπα βολφραμίου[12]. Οι UV-VIS ανιχνευτές έχουν πολλές βιοχημικές εφαρμογές. Τα νουκλεϊνικά οξέα απορροφούν στα 280nm, οι πρωτεΐνες και τα πεπτίδια ανιχνεύονται στα 254 και 280 παρουσία αρωματικών αμινοξέων, τρυπτοφάνης, τυροσίνης και φαινυλαλανίνης. Πρωτεΐνες ή πεπτίδια χωρίς τέτοια αμινοξέα απορροφούν περίπου στα 240nm[12].

Τα πλεονεκτήματα των ανιχνευτών αυτών όπως υψηλή ευαισθησία ( $10^{-10}$ - $10^{-11}$ g) και εκλεκτικότητα, χαμηλός θόρυβος, δεν καταστρέφει τα δείγματα και είναι εύκολοι στο χειρισμό. Σαν μειονεκτήματα αναφέρονται η υποχρεωτική απορρόφηση των αναλυτών στ UV-VIS, η αδυναμία χειρισμού σε μήκη κύματος κάτω του υπεριώδους και πως η απορρόφηση εξαρτάται από την απορροφητικότητα σε ένα δεδομένο μήκος κύματος[12].

### ➤ Ανιχνευτές διαθλαστικού δείκτη

Οι ανιχνευτές διαθλαστικού δείκτη (RI) συγκρίνουν το δείκτη διάθλασης της καθαρής κινητής φάσης με τον δείκτη διάθλασης της κινητής φάσης που περιέχει τον αναλύτη. Η γωνία της διάθλασης είναι μία λειτουργία του κάθε συστατικού ενός διαλύματος και μπορεί να είναι είτε θετική είτε αρνητική. Ο ολικός δείκτης διάθλασης είναι το άθροισμα όλων των δεικτών των συστατικών σε ένα διάλυμα.

Υπάρχουν τρεις κύριοι σχεδιασμοί για τους RI ανιχνευτές. Ο τύπος εκτροπής μετράει την διάθλαση μιας ακτίνας φωτός που περνάει μέσα από ένα πρίσμα. Ο δεύτερος τύπος είναι ο σχεδιασμός διάθλασης Fresnel, ο οποίος μετράει την ένταση μιας διαθλασμένης ακτίνας στο ενδιάμεσο ενός υγρού και ενός υάλινου φράγματος. Δύο ακτίνες φωτός περνούν μέσα από ένα υάλινο πρίσμα και μετά μέσα από τον έναν από τους δύο φωτονικούς θαλάμους, ένα θάλαμο αναφοράς και ένα θάλαμο δείγματος. Ο ανιχνευτής μετράει τη διαφορά ανάμεσα στο διαθλαστικό τους φως. Ο τρίτος RI ανιχνευτής είναι ο σχεδιασμός μέτρησης παρεμβολής, ο οποίος χρησιμοποιεί σχιστές ακτινών για να χωρίσει την ακτίνα πριν τους θαλάμους δείγματος και αναφοράς και για να τις συνδυάσει ξανά πριν την ανίχνευση. Αν τα περιεχόμενα του θαλάμου δείγματος διαφέρουν από αυτά του θαλάμου αναφοράς, μία αλλαγή στο μήκος του οπτικού μονοπατιού παράγεται η οποία μπορεί να είναι εποικοδομητική ή καταστρεπτική. Αυτός ο σχεδιασμός είναι ο πιο ευαίσθητος RI ανιχνευτής ( $10^{-6}M$ ).

Οι RI ανιχνευτές είναι σχεδόν παγκόσμιοι καθώς αποκρίνονται δυναμικά στα πάντα εκτός από ενώσεις που έχουν διαθλαστικό δείκτη παρόμοιο με αυτόν του διαλύτη. Οι διαθλαστικοί δείκτες είναι ίδιοι για παρόμοια μόρια όπως πρωτεΐνες και νουκλεϊνικά οξέα. Χρησιμοποιούνται μικροί όγκοι ροής στους θαλάμους για να ελαχιστοποιηθεί η διεύρυνση κορυφών. Οι διαθλαστικοί δείκτες όλων των ενώσεων και των διαλυτών αλλάζουν με τη θερμοκρασία εξαιτίας της επίδρασης της στην πυκνότητα. Επίσης, οι RI θάλαμοι ροής γενικά έχουν χαμηλή ανεκτικότητα στην πίεση. Αυτοί οι περιορισμοί συν την χαμηλή ευαισθησία κάνουν τους RI ανιχνευτές ακατάλληλους για καθημερινή ανάλυση με HPLC.

### ➤ Φθορισμομετρικοί ανιχνευτές

Κάποια μόρια φυσιολογικά φθορίζουν. Αυτά είναι ικανά να απορροφούν ενέργεια σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος που καλείται μήκος κύματος διέγερσης ( $\lambda_{ex}$ ), να μεταβαίνουν σε μία διεγερμένη κατάσταση και μετά να επιστρέφουν στην κανονική κατάσταση με την επακόλουθη εκπομπή φωτός σε μεγαλύτερο μήκος κύματος που ονομάζεται μήκος κύματος εκπομπής ( $\lambda_{em}$ ). Οι φθορισμομετρικοί ανιχνευτές λειτουργούν διεγείροντας το δείγμα στο  $\lambda_{ex}$  και μετά ανιχνεύοντας το φθορισμό που εκπέμπεται. Η φθορισμομετρία προσφέρει υψηλή εκλεκτικότητα αντίθετα με την χρήση δύο μηκών κύματος. Υπάρχουν ελάχιστες αλληλεπικαλύψεις κορυφών επειδή το μήκος κύματος της ανίχνευσης είναι διαφορετικό από αυτό της διέγερσης και ο συνδυασμός είναι αρκετά εκλεκτικός για κάθε ένωση. Η ευαισθησία είναι επίσης υψηλή ( $10^{-12}g$ ) επειδή η αλλαγή στο επίπεδο του φωτός είναι σε ένα μήκος κύματος με ασήμαντο φως θορύβου[12].

Η φθορισμομετρική ανίχνευση έχει τέλεια εκλεκτικότητα και πολύ χαμηλά όρια ανίχνευσης ( $<1pg$ ) για τα κατάλληλα μόρια. Πρακτικά δεν υπάρχει αλληλεπίδραση από την κινητή φάση και τα περισσότερα άλλα συστατικά του δείγματος. Το κύριο μειονέκτημα αυτής της ανίχνευσης είναι πως τα απαραίτητα για την διέγερση και την εκπομπή διακριτά μήκη κύματος απαιτούν βελτίωση για την κάθε ένωση[12].



### ➤ Ανιχνευτές σκέδασης φωτός με εξάτμιση

Οι ανιχνευτές σκέδασης φωτός με εξάτμιση (ELSD) είναι κοινοί ανιχνευτές που μπορούν να ανιχνεύσουν όλες τις ενώσεις με μικρότερη εξάτμιση από την κινητή φάση. Σε αυτούς τους ανιχνευτές η εκρέουσα στήλη νεφελοποιείται για να σχηματίσει μία γενική ομίχλη η οποία θερμαίνεται για να μετακινήσει τους πτητικούς διαλύτες. Οι μη πτητικοί αναλύτες ρέουν μέσω ενός θαλάμου όπου σκεδάζουν μία τυχαία ακτίνα από μία πηγή φωτός. Η μέθοδος δεν απαιτεί υψηλή ποιότητα αερίου ή διαλυτών. Οι ELS ανιχνευτές είναι ειδικά χρήσιμοι για υδρογονάνθρακες και λιπίδια που μπορεί να ανιχνεύονται δύσκολα από άλλες τεχνικές και μπορεί να ανιχνεύσει μη πολυμερισμένα αμινοξέα. Η τεχνική δεν εξαρτάται από τη θερμοκρασία και μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολλοί διαλύτες. Ο κύριος περιορισμός είναι πως οι διαλύτες είναι πιο πτητικοί από τα διαλύματα. Τα όρια ανίχνευσης είναι περίπου 20ng. Η μη γραμμική καμπύλη αναφοράς είναι το κύριο μειονέκτημα[12].

### ➤ Φασματομετρία μάζας

Η φασματομετρία μάζας (MS) είναι ένας ιδανικός τρόπος ανίχνευσης λόγω της γενικότητας και της εκλεκτικότητας της. Η MS δεν είναι τόσο απλό να προστεθεί στην HPLC επειδή το έκλουσμα της στήλης είναι υγρό και δεν μπορεί να εισαχθεί απευθείας στο κενό περιβάλλον του αναλυτή. Το κλειδί στην επιτυχία της LC-MS είναι η αλληλεπίδραση ανάμεσα τους η οποία μετακινεί τον όγκο της κινητής φάσης από το δείγμα. Η MS είναι σχεδόν γενική για ενώσεις οι οποίες ιονίζονται υπό πειραματικές συνθήκες. Η τεχνική προάγει τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους των βιοπολυμερών, την αναγνώριση των φαρμάκων και μεταβολιτών, τον χαρακτηρισμό υδρογονανθράκων, φωσφολιπιδίων και νουκλεϊκών οξέων. Η ευαισθησία της φασματομετρίας μάζας είναι πάρα πολύ βελτιωμένη και η ποσοτικοποίηση είναι δυνατή όταν ένα ή δύο ιόντα διαλέγονται για έλεγχο. Η μέθοδος MS δίνει πληροφορία για το μοριακό βάρος και την δομή για να επιτευχθεί η αναγνώριση. Έχει χαμηλό θόρυβο (εξαρτάται από την σύνθεση της κινητής φάσης), ακρίβεια μάζας 0,01% και όρια ανίχνευσης της τάξης των picomole. Ένα σοβαρό μειονέκτημα της τεχνικής είναι η καταστροφή του δείγματος, ειδικά όταν το δείγμα είναι περιορισμένο.

### ➤ Ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές

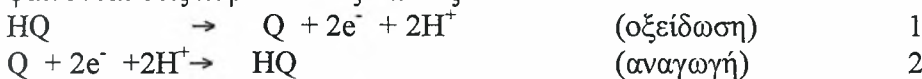
Η ηλεκτροχημεία περιλαμβάνει τη χρήση ενός ηλεκτρικού δυναμικού για να επηρεάσει μία χημική αντίδραση. Το δυναμικό που εφαρμόζεται είναι χαρακτηριστικό της ενδιαφερόμενης ένωσης και του περιβάλλοντος της. Το φορτίο που μετρείται σε μία ηλεκτροχημική αντίδραση είναι ανάλογο της συγκέντρωσης των ειδών (ένωση, ιόν ή στοιχείο) που οξειδώνονται ή ανάγονται. Σε έναν ηλεκτροχημικό ανιχνευτή, το έκλουσμα περνάει μέσα από ένα ηλεκτρόδιο ροής το οποίο εφαρμόζει το κατάλληλο δυναμικό και ελέγχει το φορτίο[13].

Η ηλεκτροχημεία μπορεί να παρέχει έναν αριθμό συγκεκριμένων πλεονεκτημάτων συγκριτικά με άλλους μεθόδους ανίχνευσης[13]:

- ❖ Ευαισθησία: Τυπικά οι ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές μπορούν να παρέχουν όρια ανίχνευσης (limits of detection, LOD's) στα επίπεδα των picogram έως femtogram. Το όριο ανίχνευσης εξαρτάται από την ίδια την ένωση και τις αναλυτικές συνθήκες που χρησιμοποιούνται.
- ❖ Ευρεία έκταση γραμμικότητας: Η έκταση της γραμμικότητας για έναν ηλεκτροχημικό ανιχνευτή είναι κατά προσέγγιση  $10^6$ . Αυτή η έκταση είναι μεγαλύτερη από πολλούς άλλους τρόπους ανίχνευσης.

- ❖ **Εκλεκτικότητα:** Αν δύο ή περισσότερες ενώσεις εκλούνται στον ίδιο χρόνο και έχουν διαφορετικά δυναμικά οξείδωσης ή αναγωγής, το δυναμικό χειρισμού μπορεί να επιλέχθει ώστε μόνο η ενδιαφερόμενη ένωση να ανιχνεύεται στο ηλεκτρόδιο εργασίας.

Η ηλεκτροχημεία αφορά χημικές αντιδράσεις στις οποίες ένα ηλεκτρόνιο μεταφέρεται από μία ένωση σε μία άλλη. Τυπικές ηλεκτροχημικές αντιδράσεις φαίνονται στις παρακάτω εξισώσεις:



Η εξίσωση 1 περιγράφει την οξείδωση της υδροκουνίνης (HQ), ενώ η εξίσωση 2 δείχνει την αναγωγή της κουνίνης (Q). Σε μία οξείδωση, η ένωση χάνει ηλεκτρόνια, ενώ σε μία αναγωγή η ένωση κερδίζει ηλεκτρόνια. Για να συμβεί μία οξείδωση ή μία αναγωγή απαιτείται ενέργεια στη μορφή ενός ηλεκτρικού δυναμικού. Οι διαδικασίες των εξισώσεων 1 και 2 ονομάζονται ημιαντιδράσεις. Ένα ζεύγος ενώσεων που συμμετέχουν σε μία ηλεκτροχημική αντίδραση είναι ένα οξειδωαναγωγικό ζεύγος. Όταν χρησιμοποιείται η ηλεκτροχημική ανίχνευση, ο αναλυτής τυπικά ασχολείται με μία μόνο διαδικασία (π.χ. την οξείδωση της HQ). Ωστόσο, να σημειωθεί πως κάθε ηλεκτροχημική διαδικασία περιλαμβάνει μία οξείδωση και μία αναγωγή. Αν μια ένωση χάνει ένα ηλεκτρόνιο κάποια άλλη ένωση στο σύστημα πρέπει να κερδίσει αυτό το ηλεκτρόνιο[13].

Σε μία ηλεκτροχημική διαδικασία, ένα ζευγάρι ηλεκτροδίων τοποθετούνται σε ένα θάλαμο και ένα δυναμικό εφαρμόζεται ανάμεσα στα ηλεκτρόδια όπως φαίνεται στην εικόνα 8[13]:

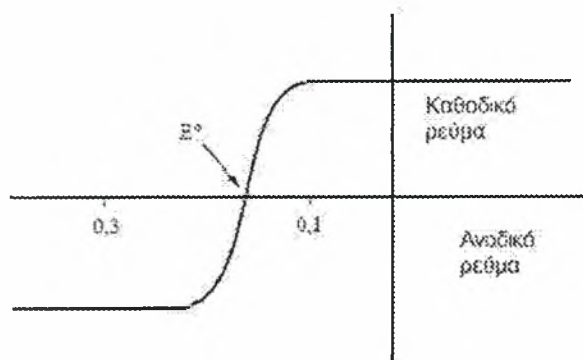


**Εικόνα 8:** Σχεδιάγραμμα ενός ηλεκτροχημικού θαλάμου. Δύο ηλεκτρόδια τοποθετούνται σε ένα διάλυμα που περιέχει μια ηλεκτρολυτική ένωση.

Αν το δυναμικό είναι αρκετά μεγάλο θα λάβει χώρα μία αντίδραση και θα υπάρξει ροή φορτίου. Το φορτίο μπορεί να μετρηθεί με τη χρήση ενός ηλεκτροχημικού ανιχνευτή. Το μέγεθος του φορτίου που δημιουργείται σχετίζεται με την συγκέντρωση της ένωσης στο διάλυμα. Με αυτόν τον τρόπο ένας ηλεκτροχημικός ανιχνευτής μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν ένα εργαλείο ποσοτικοποίησης για να προσδιοριστεί η συγκέντρωση μιας συγκεκριμένης ένωσης σε κάποιο διάλυμα. Η βάση του χειρισμού ενός ηλεκτροχημικού ανιχνευτή είναι η μέτρηση του φορτίου καθώς το δυναμικό στα άκρα του ηλεκτροχημικού στοιχείου κρατείται σταθερό (DC mode). Το ηλεκτρόδιο στο οποίο συμβαίνει η επιθυμητή ηλεκτροχημική διεργασία ονομάζεται ηλεκτρόδιο εργασίας (working electrode), ενώ το ηλεκτρόδιο στο οποίο λαμβάνει χώρα η συμπληρωματική ηλεκτρολυτική αντίδραση ονομάζεται βοηθητικό ηλεκτρόδιο ή ηλεκτρόδιο μέτρησης. Ένα ηλεκτρόδιο αναφοράς είναι επίσης

ενσωματωμένο για να παρέχει ένα σταθερό δυναμικό για να ελέγχει το δυναμικό του ηλεκτροδίου εργασίας[13].

Η επιτυχής χρήση ενός ηλεκτροχημικού ανιχνευτή στην υγρή χρωματογραφία απαιτεί γνώση των κατάλληλων δυναμικών για να επιτελέσει την επιθυμητή ηλεκτροχημική αντίδραση (π.χ. οξείδωση ή αναγωγή των ειδών που ενδιαφέρουν). Αυτό το δυναμικό εξαρτάται από ένα μεγάλο αριθμό παραγόντων συμπεριλαμβανομένων της φύσης της επιφάνειας του ηλεκτροδίου, το pH, τη σύνθεση της κινητής φάσης και της χημικής δομής των ειδών που ενδιαφέρουν. Το κατάλληλο δυναμικό για την ηλεκτροχημική ανίχνευση μπορεί να προσδιοριστεί μετρώντας το οξειδωτικό ή το αναγωγικό φορτίο του αναλύτη μιας σταθερής συγκέντρωσης σε σχέση με ένα εύρος δυναμικών του ηλεκτροδίου εργασίας. Ένα σχεδιάγραμμα του φορτίου που δημιουργείται (ύψος κορυφής) έναντι του εφαρμοσμένου δυναμικού καλείται υδροδυναμικό βολταμογράφημα (hydrodynamic voltammogram, HDV) ή καμπύλη φορτίου/δυναμικού. Ένα τυπικό HDV φαίνεται στην εικόνα 9. Η οπτική θεώρηση της καμπύλης δείχνει το δυναμικό όπου η απόκριση του οξειδωτικού ή του αναγωγικού φορτίου είναι μεγαλύτερη και για την οξειδωτική και για την αναγωγική μέθοδο. Αφού η συγκέντρωση του δείγματος είναι ορισμένη στο πείραμα, η καμπύλη φορτίου/δυναμικού μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να βρεθούν τοπικά μέγιστα. Στην εικόνα 9 φαίνεται πως το καθοδικό φορτίο εμφανίζει ένα πλατό στα 100mV. Εναλλακτικά, ο αναλυτής μπορεί να χρησιμοποιήσει πίνακες προτύπων δυναμικών ηλεκτροδίων για να προσδιορίσει ένα κατάλληλο σημείο έναρξης για το δυναμικό μιας δεδομένης αντίδρασης. Το πρότυπο



**Εικόνα 9: Καμπύλη φορτίου/δυναμικού για ένα οξειδωαναγωγικό ζεύγари.**

πρωταρχική σχέση που περιγράφει το δυναμικό ενός ηλεκτροδίου βυθισμένο σε ένα ηλεκτρενεργό διάλυμα σαν μία λειτουργία της συγκέντρωσης των ηλεκτρενεργών ειδών που είναι παρόντα. Η εξίσωση Nernst δίνεται από τη σχέση:  $E_{app} = E^{\circ} -$

$$\frac{0,059}{n} \log \left( \frac{[ox]}{[red]} \right),$$

όπου  $E_{app}$  είναι το εφαρμοσμένο δυναμικό,  $E^{\circ}$  είναι το πρότυπο

δυναμικό αναγωγής για το οξειδωαναγωγικό ζεύγари (25 °C, 1 atm), [ox] η συγκέντρωση της οξειδωμένης μορφής της ένωσης στην αντίδραση στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, [red] η συγκέντρωση της αναγωγικής μορφής της ένωσης και n είναι ο αριθμός των ηλεκτρονίων που μετακινούνται κατά την ηλεκτροχημική διαδικασία. Η εξίσωση του Nernst υποδεικνύει πως αν το εφαρμοσμένο δυναμικό ( $E_{app}$ ) είναι μεγαλύτερο από το  $E^{\circ}$ , η επιφανειακή συγκέντρωση της οξειδωμένης

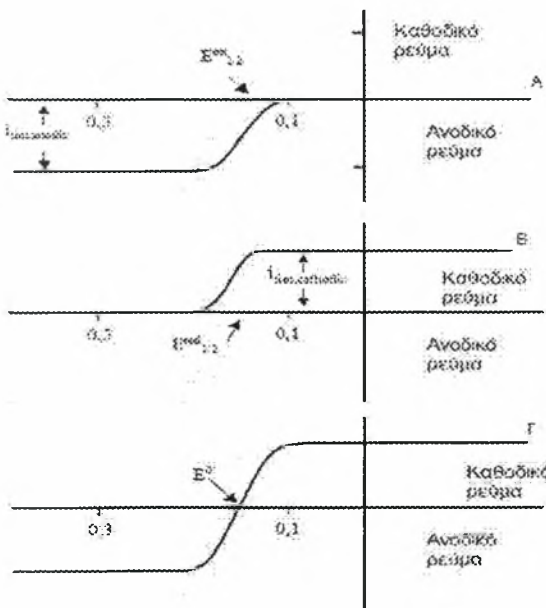
δυναμικό ηλεκτροδίου για μία γνωστή ημιαντίδραση μπορεί να προσδιοριστεί με χρήση των δυναμικών της ημιαντίδρασης ενός στοιχείου που περιέχει το κατάλληλο οξειδοαναγωγικό ζεύγари και του προτύπου ηλεκτροδίου υδρογόνου. Αν το δυναμικό για μια διαδικασία έχει προσδιοριστεί από πίνακες προτύπων δυναμικών ηλεκτροδίου, η καμπύλη φορτίου/δυναμικού θα πρέπει να επιτευχθεί για την εύρεση του όψιμου δυναμικού για να μεγιστοποιηθεί η ευαισθησία[13].

Η εξίσωση Nernst είναι η



μορφής της ένωσης θα πρέπει να είναι μικρή συγκρινόμενη με την επιφανειακή συγκέντρωση της αναγωγικής μορφής για να προχωρήσει η αντίδραση[13].

Οι περισσότερες ηλεκτροχημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα σε έναν ανιχνευτή είναι αντιστρέψιμες. Ένα αντιστρέψιμο οξειδοαναγωγικό ζεύγος διέπεται από τις ακόλουθες χημικές και θερμοδυναμικές καταστάσεις: (1) ένα αντιστρέψιμο ζεύγος είναι παρών όταν οι οξειδωμένες και αναγωγικές μορφές μιας ένωσης είναι σε χημική ισορροπία η μία με την άλλη. Τέτοια παραδείγματα είναι τα ζεύγη υδροκουινόνης-κουινόνης και σιδηρικού-σιδηροκυανίου. (2) μία μικρή αλλαγή στο δυναμικό μπορεί να προκαλέσει αλλαγή στη διεύθυνση της αντίδρασης. Στο ξεκίνημα μιας ηλεκτροχημικής αντίδρασης μόνο ένα είδος μορφής είναι παρών, η οξειδωμένη ή η αναγωγική. Λίγο μετά την έναρξη της αντίδρασης και οι δυο μορφές είναι παρούσες. Όταν το δείγμα περιέχει μόνο την αναγωγική μορφή ενός οξειδοαναγωγικού ζεύγους η ηλεκτροχημική διαδικασία θα περιγραφεί από το βολταμογράφημα στην Εικόνα 10Α. Αυτό το βολταμογράφημα υποδεικνύει ότι: (a) σε δυναμικά που είναι αρνητικά σε σχέση με το  $E^0$ , θα συμβεί μικρή ή καθόλου οξείδωση, (b) σε δυναμικά θετικά σε σχέση με το  $E^0$  το φορτίο θα φτάσει γρήγορα την οριακή τιμή του. Η αύξηση του δυναμικού σε αυτό το σημείο δεν θα έχει καμιά επιπρόσθετη επιρροή στην παρατηρούμενη απόκριση του φορτίου. Το αντίστοιχο βολταμογράφημα για την οξειδωμένη μορφή φαίνεται στην Εικόνα 10Β. Για μια ακόμα φορά η καμπύλη χαρακτηρίζεται από μία περιοχή όπου δεν υπάρχει

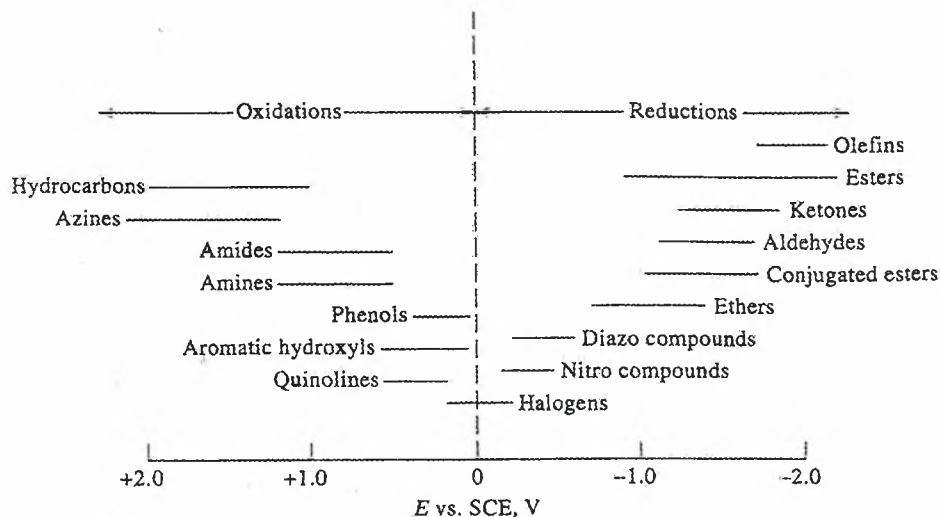


ηλεκτροχημική δραστηριότητα, καθώς και μία περιοχή όπου το φορτίο έχει φτάσει την οριακή τιμή του. Σε ένα αντιστρέψιμο ηλεκτροχημικό ζεύγος η τιμή του  $E_{1/2}$  για την οξείδωση και η τιμή  $E_{1/2}$  για την αναγωγή θα πρέπει να είναι ίσες.  $E_{1/2}$  είναι το δυναμικό στο οποίο η παρατηρούμενη τιμή του φορτίου είναι η μισή από την οριακή τιμή. Στην Εικόνα 10Γ, παρουσιάζεται το βολταμογράφημα μιας ισομοριακής συγκέντρωσης και των δυο μορφών του οξειδοαναγωγικού ζεύγους. Παρατηρείται ένα ανοδικό και ένα καθοδικό οριακό φορτίο. Το δυναμικό όπου το φορτίο γίνεται μηδέν ονομάζεται  $E^0$  [13].

Εικόνα 10: Καμπύλες φορτίου/δυναμικού για την αναγωγική μορφή (Α) και την οξειδωτική μορφή (Β) ενός οξειδοαναγωγικού ζεύγους. Η καμπύλη Γ είναι ο συνδυασμός των καμπυλών Α και Β.

Οι ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές μετράνε ηλεκτρικά δεδομένα από διαλύματα με χρήση δύο ηλεκτροδίων και βασίζονται στην αμπερομετρία, την κουλομετρία, και την αγωγιμότητα[12,14]. Οι ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές ελέγχουν φορτία, δυναμικά ηλεκτροδίων ή ηλεκτρολυτικές αγωγιμότητες. Σε όλες τις περιπτώσεις το σήμα είναι ευθέως ανάλογο με την συγκέντρωση του αναλύτη[15]. Οι ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές έχουν ένα μεγάλο εύρος εφαρμογών. Η τελευταία ιδιότητα φαίνεται στην παρακάτω εικόνα, η οποία περιγράφει το εύρος των δυναμικών στα οποία συμβαίνει οξείδωση ή αναγωγή 16 οργανικών λειτουργικών ομάδων. Μία ποικιλία από HPLC/

ηλεκτροχημικούς ανιχνευτές υπάρχει στη βιβλιογραφία και διάφοροι είναι διαθέσιμοι από εμπορικές πηγές[14].



Εικόνα 11: Οι ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές έχουν ευρύ φάσμα εφαρμογών στην ανίχνευση διαφόρων ουσιών.

#### ➤ Αγωγιμομετρικοί ανιχνευτές

Οι αγωγιμομετρικοί ανιχνευτές είναι ευαίσθητοι σε ιονικά διαλύματα σε ένα μέσο με χαμηλή αγωγιμότητα, όπως το νερό. Η απόκριση είναι μη ειδική αφού προσδιορίζεται η αγωγιμότητα όλων των ιόντων στο έκλουσμα. Οι ανιχνευτές αγωγιμότητας είναι σημαντικοί κυρίως για χρωματογραφία ιονανταλλαγής, για τον υψηλά ευαίσθητο προσδιορισμό των ανόργανων και οργανικών ανιόντων και των κατιόντων των αλκαλίων και των αλκαλικών γαιών. Τα όρια ανίχνευσης είναι της τάξης των ng. Η αγωγιμότητα μετρείται σε ένα κουτί που περιέχει δύο πλάκες σαν ηλεκτρόδια, συνήθως φτιαγμένα από πλατίνα, μέσα από το οποίο περνάει το υγρό της στήλης. Αν το κουτί αγωγιμότητας χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με μία χρωματογραφική στήλη, τα ηλεκτρόδια μέτρησης έχουν τη μορφή τριχοειδών για να κρατούν τον όγκο του κουτιού μικρό όπως απαιτείται[15].

#### ➤ Ποτενσιομετρικοί ανιχνευτές

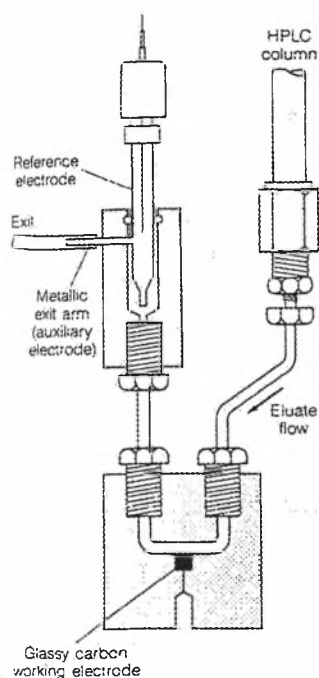
Βασικά, οι ποτενσιομετρικοί ανιχνευτές αποτελούνται από ιόν-εκλεκτικά ηλεκτρόδια (ISEs) για να ελέγχει ιονικά είδη στο χρωματογραφικό έκλουσμα. Παραδείγματα ISEs είναι γυαλί και ενζυμικά ηλεκτρόδια. Η απόκριση του ανιχνευτή είναι το δυναμικό του ηλεκτροδίου, το οποίο εξαρτάται από την ενεργότητα του αναλύτη. Αυτό το δυναμικό μετρείται με αντιστοίχιση σε ένα ηλεκτρόδιο αναφοράς. Τα κύρια χαρακτηριστικά των ποτενσιομετρικών ανιχνευτών είναι υψηλή ειδικότητα, χαμηλή ευαισθησία και αργή απόκριση[15].

#### ➤ Αμπερομετρικοί ανιχνευτές

Ο όρος ηλεκτροχημική ανίχνευση συνήθως αναφέρεται στην αμπερομετρική ανίχνευση, όπου το δείγμα υπόκειται σε μία αντίδραση ηλεκτρόλυσης[12]. Οι περισσότεροι ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές για HPLC είναι σχεδιασμένοι έτσι ώστε το έκλουσμα να ρέει υπό την επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας. Κάποιο κλάσμα των ηλεκτρενεργών ειδών στο εκλουόμενο υγρό θα οξειδώνονται ή θα ανάγονται. Το μεγαλύτερο ποσοστό της ηλεκτρενεργής ένωσης ρέει υπό την επιφάνεια του



ηλεκτροδίου αλλά δεν αντιδρούν. Το κλάσμα της ένωσης που αντιδρά είναι τυπικά της τάξης του 5-15%. Ο χειρισμός ενός ηλεκτροχημικού ανιχνευτή με αυτόν τον τρόπο ονομάζεται αμπερομετρία και ο ανιχνευτής καλείται αμπερομετρικός.



**Εικόνα 12:** Σχηματική παράσταση ενός αμπερομετρικού ανιχνευτή. Αποτελείται από τρία ηλεκτρόδια: εργασίας, ανάφοράς και βοηθητικό ηλεκτρόδιο.

Οι αμπερομετρικοί ανιχνευτές είναι οι πιο κοινώς χρησιμοποιούμενοι ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές για προσδιορισμούς υψηλής ευαισθησίας και εκλεκτικότητας και τα όρια ανίχνευσης που μπορούν να επιτευχθούν είναι της τάξης των  $\text{pmol}$ [14]. Ο απλούστερος και πιο κοινός τρόπος ανίχνευσης είναι η μέτρηση του φορτίου σε σταθερό δυναμικό. Αφού εφαρμοστεί το δυναμικό το φορτίο που προκύπτει μετρείται σε σχέση με το χρόνο. Ενώσεις που οξειδώνονται ή ανάγονται ανιχνεύονται συχνά με αυτή τη μέθοδο. Το σήμα διαφέρει ανάλογα με την συγκέντρωση του αναλύτη. Αυτή είναι μία άκρως εκλεκτική μέθοδος όπου μόνο μόρια που μπορούν να οξειδωθούν ή να αναχθούν από το δυναμικό εργασίας του ηλεκτροδίου θα ανιχνευθούν. Η χρωματογραφία αντίστροφης φάσης χρησιμοποιείται πιο συχνά με τους αμπερομετρικούς ανιχνευτές επειδή απαιτούν πολική κινητή φάση η οποία έχει ηλεκτρική αγωγιμότητα. Η κινητή φάση πρέπει να είναι ηλεκτροχημικά αδρανής και ικανή στήριξης ενός χωριστού ηλεκτρολύτη (0,01M-0,1M). Αυτή η τεχνική προσφέρει υψηλή ευαισθησία ( $10^{-11}\text{g}$ ) και εκλεκτικότητα[12].

Στην εικόνα 12 φαίνεται ένα σχηματικό διάγραμμα ενός συστήματος τριών ηλεκτροδίων στο οποίο το έκλουσμα περνάει μέσα από ένα στενό κανάλι πάνω στην επιφάνεια ενός ηλεκτροδίου. Το δυναμικό του ηλεκτροδίου διατηρείται σε μία

επιλεγμένη τιμή με αντιστοιχία με ηλεκτρόδιο αναφοράς και το φορτίο μετρείται ανάμεσα στο ηλεκτρόδιο εργασίας το βοηθητικό ηλεκτρόδιο[12].

### ➤ Κουλομετρικοί ανιχνευτές

Η κουλομετρική ανίχνευση είναι μία τροποποίηση της αμπερομετρικής ανίχνευσης στην οποία το έκλουσμα ρέει διαμέσου ενός πορώδους ηλεκτροδίου γραφίτη. Με αυτόν τον σχεδιασμό επιτυγχάνεται η συνολική μετατροπή όλων των ηλεκτρενεργών ουσιών που υφίστανται αντίδραση. Αφού ένα μεγαλύτερο ποσοστό των ηλεκτρενεργών ενώσεων (10 με 20 φορές περισσότερο) οξειδώνεται ή ανάγεται χωρίς μία αντιστοιχη αύξηση στον θόρυβο, αυτός ο ανιχνευτής μπορεί να παρέχει ενισχυμένη ευαισθησία έως και σε επίπεδα μικρότερα των 5pg. Στην εικόνα 10 φαίνεται ο σχεδιασμός ενός κουλομετρικού ανιχνευτή. Σε έναν παραδοσιακό ηλεκτροχημικό ανιχνευτή, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το δυναμικό κρατείται σταθερό και το φορτίο μετρείται σε σχέση με το χρόνο[13].

## Υ) Μέθοδοι διαχωρισμού

### ➤ Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους

Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (size exclusion chromatography, SEC) διαχωρίζει τα μόρια με εκλεκτικό αποκλεισμό τους από μία πορώδη μήτρα βάσει του μεγέθους τους. Μόρια τόσο μεγάλα ή μεγαλύτερα από τους πόρους αποκλείονται από αυτούς και εκλούνται πρώτα, ενώ μόρια ίσα με ένα συγκεκριμένο μέγεθος ή μικρότερα από αυτό που διαπερνούν ολικά τους πόρους εκλούνται τελευταία. Τα μόρια με ενδιάμεσα μεγέθη έχουν μερική πρόσβαση στους πόρους και εκλούνται ανάμεσα στα αποκλεισμένα και τα μη αποκλεισμένα. Το υλικό πλήρωσης που χρησιμοποιείται είναι υψηλά πορώδες με προσεκτικά ελεγχόμενους διαμέτρους πόρων με στενή κατανομή. Είναι σημαντικό η επιφάνεια του υλικού πλήρωσης να μην αλληλεπιδρά με τους διαλύτες[12].

Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους έχει ευρεία χρησιμότητα σε μεθόδους καθαρισμού πρωτεϊνών. Χρησιμοποιείται για να προσεγγίσει το μοριακό βάρος ή μέγεθος μιας πρωτεΐνης[12].

Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους είναι μία απλή ισοκρατική μέθοδος όπου τα μακρομόρια μπορούν να διαχωριστούν με βάση το μέγεθος τους. Είναι μία μέθοδος γρήγορου διαχωρισμού (30 λεπτά ή λιγότερο), αναπτύσσεται εύκολα, έχει υψηλή ανάκτηση και είναι επαναλήψιμη και αποδοτική. Από την άλλη δέχεται μικρό όγκο δείγματος, έχει περιορισμένη διαχωριστική ικανότητα και περιορισμένο εύρος pH[12].

### ➤ Χρωματογραφία υδροφοβικής αλληλεπίδρασης

Η χρωματογραφία υδροφοβικής αλληλεπίδρασης (Hydrophobic Interaction Chromatography, HIC) είναι μία μέθοδος διαχωρισμού στην οποία τα μόρια σε ένα περιβάλλον υψηλής αλατότητας αλληλεπιδρούν υδροφοβικά με μία μη πολική επιφάνεια. Τέτοιες αλληλεπιδράσεις έχουν παρατηρηθεί σαν δευτερεύοντα ανεπιθύμητα φαινόμενα κατά το διαχωρισμό πρωτεϊνών με χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους και χρωματογραφία συγγένειας. Η ανακάλυψη πως αυτός ο υδροφοβικός μηχανισμός παρείχε την βάση για έναν αποδοτικό τρόπο διαχωρισμού πρωτεϊνών επέφερε την ανάπτυξη της HIC ως μία ξεχωριστή τεχνική[12].

Στην χρωματογραφία υδροφοβικής αλληλεπίδρασης, ένα περιβάλλον με υψηλή συγκέντρωση άλατος προκαλεί την επικοινωνία των υδροφοβικών μορίων στην επιφάνεια των πρωτεϊνών με τους μη πολικούς συνδέτες της δεσμευμένης φάσης. Η έκλυση επηρεάζεται από μία “αντίστροφη” βαθμίδωση, δηλαδή από υψηλές σε χαμηλές συγκεντρώσεις άλατος. Επειδή η αλληλεπίδραση είναι μόνο με την επιφάνεια της πρωτεΐνης, ο αριθμός των αμινοξέων που συμμετέχουν στην χρωματογραφία είναι σχετικά μικρός και αλλαγές στην δομή της επιφάνειας μπορεί να προκαλέσει διαφορετική αλληλεπίδραση και κατ’ αυτόν τον τρόπο διαχωρισμό. Οι δεσμευμένες φάσεις για την HIC αποτελούνται από μια υδροφοβική πολυμερική πλάκα στην οποία τοποθετούνται οι υδροφοβικοί συνδέτες. Στην HIC ακόμα και μικροί συνδέτες προκαλούν ουσιαστική σύνδεση και υπάρχει ορισμένη σχέση ανάμεσα στο μήκος της αλυσίδας του συνδέτη και την ανάκτηση[12].

Η κύρια χρήση της HIC είναι στην ανάλυση πρωτεϊνών. Μία τέλεια εφαρμογή της μεθόδου είναι να ελέγχει τις αλλαγές που προκαλούνται από διαλύτες, θερμοκρασία και τον χρόνο επαφής στη διαμόρφωση των πρωτεϊνών. Η HIC αν και είναι μία ήπια μέθοδος, η επιφάνεια του υλικού πλήρωσης μπορεί να διασπάσει την τεταρτοταγή δομή κάποιων πρωτεϊνών. Επιπλέον η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την ανάλυση πεπτιδίων και για τον διαχωρισμό νουκλεϊκών οξέων[12].

### ➤ Χρωματογραφία ιονανταλλαγής

Η χρωματογραφία ιονανταλλαγής (Ion-Exchange Chromatography, IEC) έχει γίνει η πρώτη μέθοδος ανάλυσης και καθαρισμού πρωτεϊνών, εξαιτίας της τέλει διαχωριστικής ικανότητας υπό γενικά μη αποδιατακτικές συνθήκες. Οι πρωτεΐνες συνήθως ανακτώνται ποσοτικά, διατηρώντας την βιολογική τους δραστηριότητα. Η IEC αναπαριστά μία βασική προσέγγιση στον διαχωρισμό μορίων βάσει του φορτίου τους και είναι συμπληρωματική των μεθόδων διαχωρισμού που βασίζονται σε διαφορές στο μοριακό μέγεθος και την υδροφοβικότητα[12].

Στην χρωματογραφία ιονανταλλαγής τα μόρια συνδέονται με την αντιστρεπτή αλληλεπίδραση των ηλεκτροστατικών φορτίων τοποθετημένων στην εξωτερική επιφάνεια του διαλυτού μορίου με πυκνά συμπλέγματα ομάδων αντίθετων φορτίων ενός ιονανταλλάκτη. Αν το υλικό πλήρωσης φέρει θετικά φορτία είναι ανιονανταλλακτικό ενώ αν φέρει αρνητικά φορτία είναι κατιονανταλλακτικό[12].

Η IEC είναι η βάση για την ανάλυση των αμινοξέων εξαιτίας των διαχωριστικών της ικανοτήτων. Τα τελευταία χρόνια αυτή η μέθοδος εφαρμόζεται ευρύτατα για τον διαχωρισμό των πεπτιδίων επειδή μπορεί να χρησιμοποιηθεί συμπληρωματικά με την χρωματογραφία αντίστροφης φάσης. Μία από τις πιο κοινές χρήσεις της IEC όπως ήδη αναφέρθηκε στην βιοχημεία είναι η ανάλυση και ο καθαρισμός πρωτεϊνών. Επίσης εφαρμόζεται στην ανάλυση μεμονωμένων νουκλεοτιδίων και μικρών πολυνουκλεοτιδίων, καθώς και στην ανάλυση υδρογονανθράκων[12].

### ➤ Χρωματογραφία συγγένειας

Η χρωματογραφία συγγένειας περικλείει μία οικογένεια τεχνικών στις οποίες ένας ακινητοποιημένος προσδέτης χρησιμοποιείται για να παγιδεύσει ένα συγκεκριμένο μόριο από το διάλυμα βασιζόμενο σε βιοειδική σύνδεση. Σε ένα διαχωρισμό συγγένειας, η διαχωριστική ικανότητα εξαρτάται πρωταρχικά από την εκλεκτικότητα της ακινητοποιημένης ένωσης παρά από την μετανάστευση δια μέσου του χρωματογραφικού στρώματος και γι' αυτό χρησιμοποιούνται στο υλικό πλήρωσης μόρια μεγαλύτερης διαμέτρου από αυτά που χρησιμοποιούνται κανονικά στην HPLC. Για αναλυτικές εφαρμογές είναι επιθυμητό να έχει μία καλά πακεταρισμένη στήλη έτσι ώστε τα σχήματα και οι περιοχές των κορυφών να είναι σωστά. Όμως, η διαχωριστική ικανότητα μπορεί να μην βελτιώνεται σημαντικά με την αύξηση του μήκους της στήλης ή της απόδοσης. Οι συνδέτες για την χρωματογραφία συγγένειας περιλαμβάνουν πολλές ομάδες ενώσεων, όπως πρωτεΐνες, πεπτίδια, υδρογονάνθρακες, ορμόνες, λιπίδια και νουκλεϊκά οξέα[12].

Η χρωματογραφία συγγένειας μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε για ανάλυση είτε για καθαρισμό, αποδίδοντας πολύ καθαρό προϊόν με ένα απλό βήμα. Επειδή οι στήλες είναι τόσο εκλεκτικές μπορούν να λειτουργήσουν σε πολύ υψηλούς ρυθμούς ροής με μικρή ή καθόλου απώλεια του προϊόντος ή μείωση της καθαρότητας του. Για αναλυτικούς διαχωρισμούς, μεγάλοι όγκοι ακατέργαστου δείγματος μπορούν να τρέχουν γρήγορα, αυξάνοντας έτσι την ευαισθησία της ανίχνευσης για πολύ διαλυμένους αναλύτες[12].

### ➤ Χρωματογραφία αντίστροφης φάσης

Η χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (Reversed-Phase Chromatography, RPC) ένα από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα και πιο δυνατά εργαλεία διαχωρισμού στην βιοχημεία. Ο όρος "αντίστροφη φάση" επινοήθηκε για να αντιπαραβάλει την τεχνική με χρωματογραφία κανονικής φάσης. Στην χρωματογραφία κανονικής φάσης η στατική φάση είναι πολική. Η αρχική κινητή φάση είναι ένας μη πολικός διαλύτης



όπως το εξάνιο, με δυνατότερους, πιο πολικούς διαλύτες όπως προπανόλη ή μεθανόλη που χρησιμοποιούνται για να επιτελέσουν την έκλυση. Τα αντίθετα χαρακτηριστικά για τους διαλύτες απαιτούνται για την RPC. Η στατική φάση είναι μη πολική και υδροφοβική και η κινητή φάση είναι πολική όπως μεθανόλη, ισοπροπανόλη και ακετονιτρίλιο[12].

Η συμπεριφορά ενός πεπτιδίου στην χρωματογραφία αντίστροφης φάσης συχνά διαφέρει από αυτήν των μικρών μορίων, αν και οι υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις είναι ιδανικές. Μίγματα μικρών μορίων μπορούν να διαχωριστούν ισοκρατικά σε μία κλασική χρωματογραφική διαδικασία όπου συνεχώς κατανέμονται ανάμεσα στην κινητή και τη στατική φάση καθώς διασχίζουν τη στήλη. Αντίθετα, τα πολυπεπτίδια έχουν δυνατές και συχνά σε πολλές περιοχές του μορίου αλληλεπιδράσεις με τη στατική φάση, οπότε συνήθως απαιτείται βαθμιδωτή έκλυση. Στην βαθμιδωτή έκλυση, ένα πολυπεπτίδιο απορροφείται πάνω στη στήλη σε χαμηλή δύναμη διαλύτη και παραμένει στερεωμένο μέχρι η συγκέντρωση του οργανικού μετατροπέα στην κινητή φάση να φτάσει σε μία διακεκριμένη δύναμη διαλύτη, στην οποία το πεπτίδιο αποκολλάται και εκλύεται[12].

Εξαιτίας του κρίσιμου ρόλου που παίζει το μέγεθος των μορίων της στατικής φάσης στη διαχωριστική ικανότητα, για αναλυτικές εφαρμογές χρησιμοποιούνται μόρια 2-5 $\mu\text{m}$  και για προπαρασκευαστικούς διαχωρισμούς μόρια 15-30 $\mu\text{m}$ . Αυξημένη ικανότητα επιτυγχάνεται με χρήση πορωδών μορίων για να αυξηθεί η διαθέσιμη για σύνδεση έκταση επιφάνειας. Η όψιμη διάμετρος των πόρων υπαγορεύεται από το συγκεκριμένο δείγμα, με 8-12nm για ανάλυση μικρών μορίων και 30-100nm για τα περισσότερα πεπτίδια και πρωτεΐνες. Το υλικό πλήρωσης μπορεί να είναι διοξείδιο του πυριτίου ( $\text{SiO}_2$ ), πολυστερενδιβινύλιο βενζένιο ή πολυστυρένιο. Το διοξείδιο του πυριτίου είναι το πιο δημοφιλές και ευρέως χρησιμοποιούμενο υλικό, αλλά για εφαρμογές με ισχυρό οξύ ή βάση χρησιμοποιείται επιτυχώς το πολυστυρένιο[12].

Μία ποικιλία από υδροφοβικούς συνδέτες που ποικίλουν από ελαφρώς μη πολικούς έως πολύ υδροφοβικούς χρησιμοποιούνται σαν στατικές φάσεις στην RPC. Κοινοί συνδέτες παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα[12]:

- ❖ Trimethyl
- ❖ Butyl (C4)
- ❖ Octyl (C8)
- ❖ Octadecyl (C18)
- ❖ Phenyl
- ❖ Diphenyl
- ❖ Cyano

**Πίνακας 1: Συνδέτες χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης**

Τα περισσότερα υλικά πλήρωσης που βασίζονται στο  $\text{SiO}_2$  συνθέτονται με σιλάνια. Τα μονολειτουργικά σιλάνια αποφέρουν πολύ αναπαραγωγίσιμες δεσμευμένες φάσεις, αλλά τα προκύπτοντα υλικά πλήρωσης πάντα περιέχουν κάποια κατάλοιπα σιλανολών τα οποία εμποδίζονται από το να αντιδράσουν και επιπροσθέτως υφίστανται όξινη υδρόλυση. Τα πολυλειτουργικά σιλάνια προσφέρουν πιο σταθερές δεσμευμένες φάσεις αλλά είναι κάπως λιγότερο αναπαραγωγίσιμες επειδή ο πολυμερισμός εξαρτάται από την περιεκτικότητα σε νερό και τόσο του διαλύτη όσο και του διοξειδίου του πυριτίου. Αυτές οι συνθετικές μέθοδοι επίσης αφήνουν μη αντιδρώντες σιλανόλες[12].

Τα υλικά πλήρωσης της RPC για ανάλυση πεπτιδίων περιλαμβάνουν ελεύθερα και δεσμευμένα, μονομερικά και πολυμερικά υλικά. Τα περισσότερα έχουν καλή εκλεκτικότητα με χρήση βαθμιδωτής έκλουσης[12].

Οι C8 και C18 συνδέτες είναι οι πιο κοινοί για την RPC και συνήθως είναι η καλύτερη αρχική επιλογή όταν αναπτύσσεται μία μέθοδος ανάλυσης μικρών μορίων και πεπτιδίων. Και οι δύο είναι αρκετά διαρκείς και μερικώς προστατεύουν τον σκελετό των ομάδων SiO<sub>2</sub> από υποβάθμιση, ιδιαίτερα σε υψηλά υδατικά διαλύματα. Οι C18 είναι οι πιο υδροφοβικοί, αλλά σε υδατικό περιβάλλον με μόνο ένα μικρό ποσοστό οργανικού μετατροπέα, οι αλκυλικές αλυσίδες τείνουν να τραβηχτούν από την κινητή φάση και να προσεγγίσουν τον υδροφοβικό σκελετό, μειώνοντας έτσι τον υδροφοβικό τους χαρακτήρα. Αυτοί οι συνδέτες μπορούν να συνδέονται πολύ δυνατά με συγκεκριμένες υδροφοβικές πρωτεΐνες καθιστώντας την έκλουση δύσκολη και παραπλανητική. Αυτά οδήγησαν στην χρήση των C8 και C4 συνδετών για ανάλυση πρωτεϊνών και πεπτιδίων[12]. Λιγότερο μη πολικές δεσμευμένες φάσεις, όπως οι τριμεθυλικές και οι βουτυλικές, επιτελούν έκλουση αρκετά υδροφοβικών βιομορίων με μέτριες μόνο συγκεντρώσεις οργανικών μετατροπέων. Οι φαινυλικές και διφαινυλικές στήλες παρέχουν υδροφοβικότητα παρόμοια με τους συνδέτες C5 και C6 και μερικές φορές έχουν μία συγκεκριμένη εκλεκτικότητα λόγω π-π αλληλεπιδράσεων για διαλύτες που περιέχουν πολλά αρωματικά αμινοξέα. Οι κυανικές ομάδες, οι πιο πολικοί συνδέτες στην RPC, χρησιμοποιούνται για να διαχωρίσουν πάρα πολύ υδροφοβικά πεπτίδια[12].

Τα μικρά μόρια που αναλύονται ισοκρατικά με RPC δείχνουν την τυπική δράση των αυξανόμενων πλακών και της αυξανόμενης διαχωριστικής ικανότητας με το μήκος της στήλης. Όμως, για την βαθμιδωτή έκλουση, το μήκος της στήλης παίζει έναν εκπληκτικά μικρό ρόλο στη διαχωριστική ικανότητα των πεπτιδίων. Συχνά, μία στήλη 5cm θα δώσει εξίσου ή καλύτερη διαχωριστική ικανότητα από ότι μία στήλη 25cm με μικρότερη κατανάλωση διαλύτη και μικρότερους χρόνους ανάλυσης. Μερικές φορές στήλες μεγαλύτερων μηκών βελτιώνουν την διαχωριστική ικανότητα πολύπλοκων μιγμάτων[12].

Τα αντιδραστήρια ζευγών ιόντων χρησιμοποιούνται για να μεταβάλλουν τα ιονικά ή τα υδροφοβικά χαρακτηριστικά του υλικού πλήρωσης ή του διαλύματος. Τα αντιδραστήρια ζευγών ιόντων μπορεί να είναι οξέα ή βάσεις. Τα πιο κοινά φαίνονται στον επόμενο πίνακα[12]:

#### ΟΞΕΑ

Οξικό (acetic)  
Φορμικό (formic)  
Υπερχλωρικό (perchloric)  
Φωσφορικό (phosphoric)  
Trifluoroacetic (TFA)  
Heptafluorobutyric (HFBA)  
Hexanesulfonic  
Heptanesulfonic

#### ΒΑΣΕΙΣ

Τριαιθυλαμίνη (triethylamine, TEA)  
Τετραμεθυλαμμώνιο (tetramethylammonium, TMA)  
Τετραβουτυλαμμώνιο (tetrabutylammonium, TBA)  
Οξικό τριαιθυλαμμώνιο (triethylammonium acetate, TEAA)  
Nonylamine

Πίνακας 2: Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια ζευγών ιόντων στην RPC.



Τα τέσσερα πρώτα οξέα είναι πολικά και έτσι σχηματίζουν υδροφιλικά ζεύγη ιόντων. Αυτά τα οξέα δεν ενισχύουν την υδροφοβική σύνδεση των πεπτιδίων στο υλικό πλήρωσης της αντίστροφης φάσης και επιπλέον ίσως να μειώνουν την σύνδεση λόγω του σχηματισμού υδροφιλικών ζευγών ιόντων. Αυτά τα οξέα ουδετεροποιούν τα θετικά φορτία στους διαλύτες. Τα TFA και HFBA είναι αντιδραστήρια υδροφοβικών ζευγών ιόντων τα οποία αυξάνουν την υδροφοβικότητα, καθώς επίσης μειώνουν το θετικό φορτίο των διαλυτών και έτσι προάγουν την σύνδεση στο υλικό πλήρωσης. Οι βάσεις που αναφέρονται στον παραπάνω πίνακα χρησιμοποιούνται κυρίως στην ανάλυση μικρών κατιονικών μορίων για να μειώσουν ή την απορρόφηση στα υλικά πλήρωσης που δεν έχουν απενεργοποιημένες βάσεις. Αυτές συνδέονται σε κατάλοιπα σιλανολών και ανιονικών ομάδων φορτισμένων διαλυτών. Η πιο κοινή μέθοδος για την μείωση των αλληλεπιδράσεων των μικρών μορίων με τις σιλανόλες σε αυτές τις περιπτώσεις είναι η προσθήκη ζεύγους ιόντων βάσης στην κινητή φάση. Αυτή η προσθήκη μειώνει [12].

Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται για κινητή φάση στην RPC κατηγοριοποιούνται από αδύναμοι έως δυνατοί ανάλογα με την ικανότητα τους να εκκλούν τους αναλύτες από την δεσμευμένη φάση. Στον πίνακα 3 παρατίθενται ορισμένοι κοινοί διαλύτες με βάση την ισχύ τους[12]:

Νερό με άλας ή ρυθμιστικό διάλυμα	Αδύνατος
Νερό	
Μεθανόλη	
Ακετονιτρίλιο	
Ισοπροπανόλη	Δυνατός

**Πίνακας 3: Διαλύτες που χρησιμοποιούνται στην RPC για κινητή φάση,**

Ο συγκεκριμένος οργανικός διαλύτης που χρησιμοποιείται σε μια διαδικασία αντίστροφης φάσης ασκεί συγκεκριμένη επιρροή στον προκύπτοντα διαχωρισμό, όπως για παράδειγμα στον χρόνο έκλουσης μιας ένωσης, όπου οι αδύναμοι διαλύτες τον αυξάνουν ενώ οι πιο δυνατοί συντομεύουν τον χρόνο έκλουσης[12].

Η επίδραση του ισοκρατικού ρυθμού ροής στο ύψος των θεωρητικών πλακών σχετίζεται με το μοριακό βάρος του αναλύτη. Υπό ισοκρατικές συνθήκες, ο ρυθμός ροής έχει μόνο μία μέτρια επίδραση στο ύψος των πλακών των μικρών μορίων όπως μιας αλκοόλης ή ενός μικρού πεπτιδίου. Για μεγαλύτερα πολυπεπτίδια και πρωτεΐνες, ο ρυθμός ροής παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην ισοκρατική διαχωριστική ικανότητα και δείχνει την σημαντικότητα του σχετικά χαμηλού ρυθμού ροής στο τρέξιμο των ουσιών. Στην βαθμιδωτή έκλουση ο ρυθμός αλλαγής βαθμού παίζει μεγαλύτερο ρόλο στον προσδιορισμό της διαχωριστικής ικανότητας από ότι παίζει ο ρυθμός ροής[12].

Η αύξηση της θερμοκρασίας στην RPC είναι ένας άλλος τρόπος βελτίωσης της διαχωριστικής ικανότητας. Η απόδοση αυξάνεται λόγω μείωσης της ταχύτητας της κινητής φάσης και αύξησης του συντελεστή διάχυσης. Όμως, θερμοκρασίες πάνω από ένα σημείο πρέπει να χρησιμοποιούνται προσεκτικά για τα βιολογικά μακρομόρια επειδή πολλά αποδιατάσσονται σε αυξημένες θερμοκρασίες. Οι υψηλές θερμοκρασίες επίσης αυξάνουν τον υποβιβασμό της στήλης με υδρόλυση της δεσμευμένης φάσης και του διοξειδίου του πυριτίου[12].

Διάφορες διαδικασίες έχουν δημοσιευθεί για την ανάλυση των ρετινοϊδών, με την κάθε μία να διαφέρει στον σκοπό της. Λίγες μέθοδοι καλύπτουν την ανάπτυξη μιας

τεχνικής για τον προσδιορισμό και τον διαχωρισμό ρετινοϊδών. Η μέθοδος επιλογής στις διάφορες έρευνες είναι η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)[5].

## 2) Υλικά και Μέθοδοι

### 2.1) Συσκευές

Η υγρή χρωματογραφία εκτελέστηκε στο σύστημα HP1100 της Hewlett-Packard (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) αποτελούμενο από μία τετραδική αντλία G1311A, ένα G1322A, μία βαλβίδα έγχυσης Rheodyne, μοντέλο 7725, (Cotati, CA) εξοπλισμένη με ένα βρόγχο των 100 μl και έναν ανιχνευτή υπεριώδους (UV) μεταβλητού μήκους κύματος G1314A[6]. Επίσης στο σύστημα ήταν συνδεδεμένος και ένας ηλεκτροχημικός κουλομετρικός ανιχνευτής, Coulochem 2 (ESA, Chelmsford, MA, USA) εξοπλισμένο με ένα αναλυτικό ηλεκτρόδιο ( analytical cell) μοντέλο 5010, και μία προστατευτικό ηλεκτρόδιο (guard cell) μοντέλο 5020. Η αναλυτική μονάδα τοποθετήθηκε μετά την αναλυτική στήλη.

### 2.2) Αντιδραστήρια

Το ακετονιτρίλιο αποκτήθηκε από την E. Merck (Darmstadt, Germany). Η μεθανόλη αγοράστηκε επίσης από την E. Merck ή την Malinckrodt Baker BV (Deventer, Holland). Το οξικό οξύ αποκτήθηκε από την E. Merck ή από την Sigma (St. Louis, MO, USA). Το νερό παράχθηκε από στήλη νερού με χρήση ενός συστήματος καθαρισμού USF ELGA Purgelab Plus. Τα *all-trans* ρετινοϊκό οξύ, *9-cis* ρετινοϊκό οξύ και *13-cis* ρετινοϊκό οξύ αποκτήθηκαν από την Sigma και η *all-trans* ρετινόλη από την Fluka (Buchs, Switzerland)[6,10,17,18].

### 2.3) Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων

Τα stock πρότυπα διαλύματα για τη ρετινόλη, και τα *all-trans*, *13-cis* και *9-cis* ρετινοϊκά οξέα παρασκευάστηκαν σε ογκομετρικές φιάλες των 100ml ζυγίζοντας σε αναλυτικό ζυγό τις κατάλληλες ποσότητες για κάθε ένωση και τις διαλύσαμε με μεθανόλη μέχρι τον τελικό όγκο. Για την ρετινόλη ζυγίσαμε 0,0111gr ή 11,1mg, τα οποία διαλύθηκαν αρχικά σε μία ελάχιστη ποσότητα αιθανόλης και συμπληρώσαμε με μεθανόλη μέχρι τον τελικό όγκο των 100ml οπότε η συγκέντρωση στο διάλυμα ήταν 111000ng/ml. Από το stock διάλυμα πάρθηκαν 0,901ml τα οποία αναμίχθηκαν με 10ml μεθανόλης οπότε δημιουργήθηκε ένα spike πρότυπο διάλυμα αραιωμένο

κατά  $\frac{10}{0,901}=11,1$  φορές με συγκέντρωση  $\frac{111000}{11,1}=10000\text{ng/ml}$ . Έπειτα πάρθηκαν

90,01μl από το stock τα οποία αναμίχθηκαν με 10ml μεθανόλη για τη δημιουργία του test προτύπου διαλύματος το οποίο αραιώθηκε κατά  $\frac{10}{0,0901}=111$  φορές και έχει

συγκέντρωση  $\frac{111000}{111}=1000\text{ng/ml}$ . Για τα stock διαλύματα των ρετινοϊκών οξέων

ζυγίστηκαν 98mg *13-cis* ρετινοϊκού οξέος, 14,4ng *all-trans* ρετινοϊκού οξέος και 1mg *9-cis* ρετινοϊκού οξέος καθένα από τα οποία διαλύθηκαν με 100ml μεθανόλη οπότε η συγκέντρωση των διαλυμάτων ήταν 98000ng/ml, 144000ng/ml και 10000ng/ml αντίστοιχα. Από τα stock διαλύματα πάρθηκαν 102μl *13-cis*, 69,4μl *all-trans* και 1ml *9-cis* ρετινοϊκού οξέος τα οποία αναμίχθηκαν έκαστος με 10ml μεθανόλη, για να δώσουν spike αραιωμένα διαλύματα με συγκέντρωση 1000ng/ml το καθένα. Στη συνέχεια 100μl από το κάθε spike προστέθηκαν σε 5ml μεθανόλης και

συμπληρώθηκαν με ακετονιτρίλιο μέχρι τα 10ml για να γίνουν τα ακόμα πιο αραιωμένα test διαλύματα με συγκέντρωση 10ng/ml για το κάθε ρετινοϊκό οξύ. Τα spike και test πρότυπα διαλύματα χρησιμοποιήθηκαν για να σαρωθεί το δυναμικό του ηλεκτροχημικού ανιχνευτή ώστε να βρεθεί το κατάλληλο δυναμικό ανίχνευσης των ρετινοειδών. Στη συνέχεια δημιουργήθηκαν οκτώ standard (st) πρότυπα διαλύματα με την εξής διαδικασία: από τα spike διαλύματα που έγιναν παραπάνω για την ρετινόλη και τα τρία ρετινοϊκά οξέα (13-*cis*, all-*trans*, 9-*cis*) πάρθηκαν 200μl για την κάθε ένωση και τοποθετήθηκαν σε ένα σωληνάκι στο οποίο προστέθηκαν 1200μl διαλύτη σύστασης 40% ακετονιτρίλιο, 41% μεθανόλη και 19% υδατικού ρυθμιστικού διαλύματος για να αποτελέσει αυτό το διάλυμα το st1 με συγκέντρωση 1000ng/ml για την ρετινόλη, 100ng/ml για το 13-*cis* ρετινοϊκό οξύ, 100ng/ml για το all-*trans* ρετινοϊκό οξύ και 100ng/ml για το 9-*cis* ρετινοϊκό οξύ. Τα υπόλοιπα επτά standard διαλύματα δημιουργήθηκαν με διαδοχικές αραιώσεις έτσι ώστε να προκύπτουν κάθε φορά διαλύματα με τη μισή συγκέντρωση από το προηγούμενο για το κάθε ρετινοειδές. Έτσι, 1ml από το διάλυμα st1 προστέθηκε σε 1ml διαλύτη δίνοντας έτσι το st2 με συγκεντρώσεις 500ng/ml για την ρετινόλη και από 50ng/ml για καθένα από τα τρία ρετινοϊκά οξέα. Εν συνεχεία, 1ml από το st2 προστέθηκε σε 1ml διαλύτη για να δώσει το st3 και η διαδικασία συνεχίζεται με τον ίδιο τρόπο για την παρασκευή των υπολοίπων standard διαλυμάτων με την συγκέντρωση των ουσιών να μειώνεται κατά το ήμισυ με κάθε αραιώση και τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

	ROL	all-trans	9-cis	13-cis
st1	1000	100	100	100
st2	500	50	50	50
st3	250	25	25	25
st4	125	12,5	12,5	12,5
st5	62,5	6,25	6,25	6,25
st6	31,25	3,125	3,125	3,125
st7	15,625	1,56	1,56	1,56
st8	7,81	0,78	0,78	0,78

Πίνακας 4: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της παρασκευής των standard προτύπων διαλυμάτων όπου φαίνονται οι συγκεντρώσεις του κάθε ρετινοειδούς σε ng/ml.

#### 2.4) Χρωματογραφικές συνθήκες

Η υγρή χρωματογραφία πραγματοποιήθηκε σε μία στήλη αντίστροφης φάσης, 250x4.0mm (LOT No: P1L11), με υλικό πλήρωσης Hypersil Betabasic C<sub>18</sub>, 5nm και διάμετρο πόρων 150Å. Προκειμένου να καταλήξουμε στην τελική σύσταση της κινητής φάσης πραγματοποιήθηκε μια σειρά δοκιμών κατά την οποία ο διαλύτης αποτελούταν από μεθανόλη, ακετονιτρίλιο και νερό, ενώ δοκιμάστηκαν διάφορα ρυθμιστικά διαλύματα σε διάφορες συγκεντρώσεις και συνδυασμούς κάθε φορά, όπως βλέπουμε στον παρακάτω πίνακα. Ο ρυθμός ροής της κινητής φάσης ήταν 1ml/min και ο όγκος των προτύπων που εισερχόταν από την βαλβίδα έγχυσης 100μl..

	A	B	Γ	Δ	E	Z	H	Θ	I	K	Λ	M
CH <sub>3</sub> OH	40%	40%	40%	40%	40%	40%	40%	30%	38%	38%	38%	41%
CH <sub>3</sub> CN	45%	45%	40%	40%	40%	42%	42%	50%	40%	40%	40%	40%
H <sub>2</sub> O	15%	15%	20%	20%	20%	18%	18%	20%	22%	22%	22%	19%
CH <sub>3</sub> COONa					0,01M		0,01M			0,03M		0,03M
CH <sub>3</sub> COOH					0,1M		0,1M			0,03M		0,03M
HClO <sub>4</sub>	15-25-30-40-60mM			90μl		60mM		100μl				
TBAClO <sub>4</sub>		0,25	2%	2%				0,5gr/l	3%			
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> -NaOH											0,01M-pH 3,5-4,99-6,1	

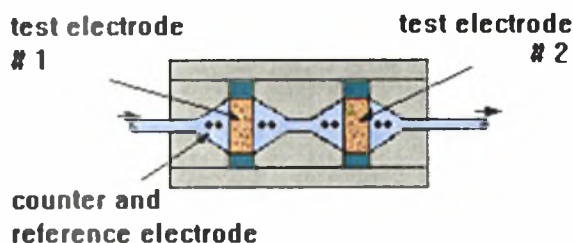
Πίνακας 5: Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στη χρωματογραφία. Κάθε διαλύτης αποτελούταν από μεθανόλη, ακετονιτρίλιο και νερό με διαφορετικές συγκεντρώσεις κάθε φορά ενώ δοκιμάστηκαν ρυθμιστικά διαλύματα διάφορων συνδυασμών και συγκεντρώσεων, τους οποίους τους βλέπουμε διαβάζοντας κάθετα κάθε στήλη.

Ο σκοπός της χρήσης των ρυθμιστικών διαλυμάτων ήταν η κατάλληλη ρύθμιση του pH της εκάστοτε κινητής φάσης ούτως ώστε τα ρετινοϊκά οξέα να μη δίστανται και να καθίστανται έτσι πιο ανιχνεύσιμα.

Στο τέλος κάθε δοκιμής η στήλη πλενόταν με έγχυση 100μl καθαρής μεθανόλης για 3 λεπτά και εν συνεχεία το σύστημα διαπερνώταν από τον εκάστοτε διαλύτη για μερικά λεπτά έως ότου επέλθει ισορροπία στη στήλη πριν την επόμενη έγχυση.

### 2.5) Ηλεκτροχημική ανίχνευση

Η ηλεκτροχημική ανίχνευση έγινε με έναν κουλομετρικό ανιχνευτή, Coulochem 2 Multi-Electrode Detector, (ESA, Chelmsford, MA, USA) εξοπλισμένο με ένα αναλυτικό ηλεκτρόδιο Model 5010 Standard Analytical Cell (P/N 55-0411) και μία προστατευτική μονάδα Model 5020 Guard Cell (P/N 55-0417). Το αναλυτικό ηλεκτρόδιο του ηλεκτροχημικού ανιχνευτή αποτελούταν από δύο ηλεκτρόδια τοποθετημένα στη σειρά, ένα ηλεκτρόδιο αναφοράς και ένα ηλεκτρόδιο εργασίας, με μεγάλη επιφανειακή έκταση για να προσδίδει εξαιρετική μακροπρόθεσμη σταθερότητα και αναπαραγωγιμότητα με την καθημερινή χρήση(Εικ. 11).



Εικόνα 13: Σχηματική αναπαράσταση της αναλυτικής μονάδας του ηλεκτροχημικού ανιχνευτή που χρησιμοποιήθηκε στο εργαστήριο για την ανίχνευση των ρετινοειδών που εκλύονται από τη χρωματογραφική στήλη.



Μία απευθείας έγχυση 100μl στο χρωματογραφικό σύστημα χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία των βολταμογραφημάτων. Το πρότυπο διάλυμα περιείχε από 1ml spike προτύπου για κάθε ρετινοϊκό οξύ και 1ml test προτύπου ρετινόλης. Οι εγχύσεις έγιναν σε διάφορα δυναμικά, ξεκινώντας από τα 200mV και φτάνοντας έως τα 1200mV για το ένα ηλεκτρόδιο ενώ το δεύτερο ηλεκτρόδιο διατηρούνταν στα 0mV και η απόκριση καταγραφόταν από τον ανιχνευτή.

### **3) Αποτελέσματα**

Παρά την συνεχόμενη ανάπτυξη και βελτίωση του αναλυτικού εξοπλισμού και των σπηλών υγρής χρωματογραφίας, ο χρωματογραφικός προσδιορισμός της βιταμίνης Α και των μεταβολιτών της ακόμη αποτελεί μια μεγάλη πρόκληση. Αυτό οφείλεται κυρίως στις χαμηλές συγκεντρώσεις των αναλυτών που συνδυάζονται με το μεγάλο εύρος πολικότητας τους και την αστάθεια τους στο φως και στη θερμοκρασία λόγω ισομερισμού και στο οξυγόνο λόγω οξειδωσης.

#### **➤ Υγρή χρωματογραφία**

Αρχικά δοκιμάστηκε μία στήλη ODS C8 η οποία, όμως, δεν έδωσε τα επιθυμητά αποτελέσματα εξαιτίας του μικρού της μήκους και κατά συνέπεια της μικρής έκτασης αλληλεπίδρασης με την επιφάνεια της στατικής φάσης αλλά και του λιγοστού χρόνου ανάκτησης. Έτσι, η στήλη που χρησιμοποιήθηκε για το στήσιμο της μεθόδου ήταν η Hypersil Betabasic C18.

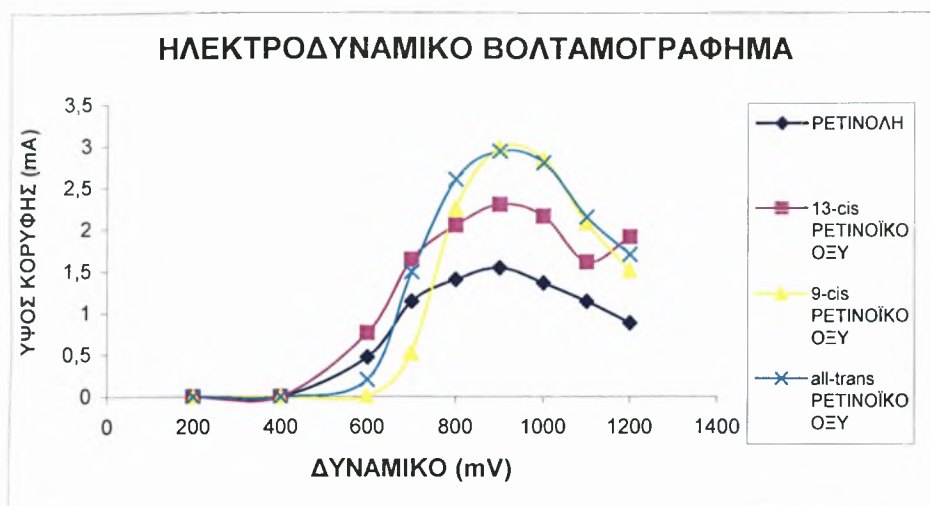
Το επόμενο βήμα ήταν η εύρεση εκείνης της κινητής φάσης που θα βοηθούσε στον καλύτερο διαχωρισμό και προσδιορισμό των τεσσάρων ρετινοειδών. Αφού, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι περισσότερες έρευνες χρησιμοποιούσαν στην κινητή τους φάση ένα ή περισσότερα συστατικά εκ των μεθανόλη, ακετονιτρίλιο και νερό, δημιουργήθηκε η σκέψη πως ένας κατάλληλος συνδυασμός αυτών των τριών συστατικών θα απέφερε τα επιθυμητά αποτελέσματα. Έτσι, δημιουργήθηκε ένα πρωτόκολλο διαλυτών στο οποίο η κινητή φάση αποτελούνταν από μεθανόλη, ακετονιτρίλιο και νερό με διαφορετικά ποσοστά των τριών αυτών συστατικών στον τελικό όγκο της κινητής φάσης κάθε φορά και από ένα ρυθμιστικό διάλυμα, όπως φαίνεται στον Πίνακα 5. Ο διαλύτης Α, με αναλογίες 40%-45%-15% για μεθανόλη-ακετονιτρίλιο-νερό αντίστοιχα και ρυθμιστικό  $\text{HClO}_4$  διαφόρων συγκεντρώσεων, έδωσε πολύ καλό διαχωρισμό των τεσσάρων ρετινοειδών αλλά οι χρόνοι ανάκτησης ήταν πολύ μεγάλοι και έπρεπε να μειωθούν. Επιπλέον, η ρετινόλη εκλούονταν αρκετά μακριά από τα τρία ρετινοϊκά οξέα. Κρατώντας τις ίδιες αναλογίες του ακετονιτρίλιου, της μεθανόλης και του νερού στην κινητή φάση και δοκιμάζοντας το ρυθμιστικό διάλυμα  $\text{TBAClO}_4$  στο διαλύτη Β, οι χρόνοι ανάκτησης μειώθηκαν επηρεάζοντας ελάχιστα το διαχωρισμό των οξέων, αλλά κρατώντας σχεδόν το ίδιο μακριά τη ρετινόλη από τα οξέα. Προσπαθώντας να μικρύνουν κι άλλο οι χρόνοι ανάκτησης αλλά και να έρθει πιο κοντά η ρετινόλη στα οξέα, στους διαλύτες Γ, Δ και Ε μεταβλήθηκαν τόσο οι αναλογίες στην κινητή φάση και συγκεκριμένα αυξήσαμε την υδατική φάση και μειώνοντας την συγκέντρωση του ακετονιτρίλιου όσο και το ρυθμιστικό διάλυμα αλλάζοντας την συγκέντρωση του  $\text{TBAClO}_4$  σε 2%w/v στο διαλύτη Γ ενώ στο Δ προστέθηκε και μια ποσότητα  $\text{HClO}_4$ . Στο διαλύτη Ε δοκιμάστηκε ρυθμιστικό  $\text{CH}_3\text{COOH}$  0,1M- $\text{CH}_3\text{COONa}$  0,01M. Τα αποτελέσματα ήταν ενθαρρυντικά καθώς και ο διαχωρισμός των ρετινοειδών ήταν ακόμη πιο ικανοποιητικός στους τρεις διαλύτες συγκριτικά με τα προηγούμενα αποτελέσματα και η ρετινόλη μετατοπίστηκε πιο κοντά στα τρία οξέα, κυρίως στον διαλύτη Ε. Θέλοντας να βελτιστοποιήσουμε περισσότερο το χρωματογραφικό διαχωρισμό

δοκιμάσαμε πολύ μικρές μεταβολές στους διαλύτες Z και H (40%CH<sub>3</sub>OH, 42%CH<sub>3</sub>CN, 18%H<sub>2</sub>O) με ρυθμιστικά διαλύματα HClO<sub>4</sub> 60mM και CH<sub>3</sub>COOH 0,1M-CH<sub>3</sub>COONa 0,01M αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα ήταν ανάλογα με τα προηγούμενα με τον διαλύτη H να δίνει καλύτερες κορυφές. Στον διαλύτη Θ υπήρξε μεγάλη μεταβολή στις αναλογίες της κινητής φάσης κυρίως μεταξύ του ακετονιτριλίου και της μεθανόλης (30% και 50% αντίστοιχα) καθώς και αλλαγή του ρυθμιστικού διαλύματος, με χρήση TBAClO<sub>4</sub>- HClO<sub>4</sub>, χωρίς όμως να αποδώσει τα επιθυμητά αποτελέσματα, όπως και ο διαλύτης I όπου οι συγκεντρώσεις μεθανόλης και ακετονιτριλίου ήρθαν σε περίπου ίσα επίπεδα ενώ αυξήθηκε ελαφρώς η συγκέντρωση του νερού. Στους διαλύτες K και Λ συνδυάσαμε την κινητή φάση του διαλύτη I με δύο διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα. Στον διαλύτη K χρησιμοποιήσαμε ρυθμιστικό CH<sub>3</sub>COOH 0,03M-CH<sub>3</sub>COONa 0,03M, όπου τα αποτελέσματα ήταν πολύ ικανοποιητικά και ως προς το διαχωρισμό αλλά και ως προς τους χρόνους ανάκτησης. Στον διαλύτη Λ χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>0,01M-NaOH σε τρεις διαφορετικές τιμές pH: 3,5, 4,99, 6,1. Το αποτέλεσμα δεν ήταν το αναμενόμενο καθώς δεν πήραμε καθόλου σήμα κατά την έκλυση. Αφού είδαμε πως οι διαλύτες που έδωσαν τα καλύτερα αποτελέσματα ήταν οι E, H και K όπου χρησιμοποιήθηκε για ρυθμιστικό CH<sub>3</sub>COOH-CH<sub>3</sub>COONa, δημιουργήσαμε ένα διαλύτη M ο οποίος είχε σύσταση 41% μεθανόλη, 40% ακετονιτρίλιο, 19 % νερό με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος CH<sub>3</sub>COOH 0,03M-CH<sub>3</sub>COONa 0,03M και που έδωσε τα πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα για τον διαχωρισμό των τεσσάρων ρετινοϊκών οξέων αλλά και για την ανίχνευση τους στον ηλεκτροχημικό ανιχνευτή όπως θα δούμε παρακάτω.

### ➤ Ανίχνευση

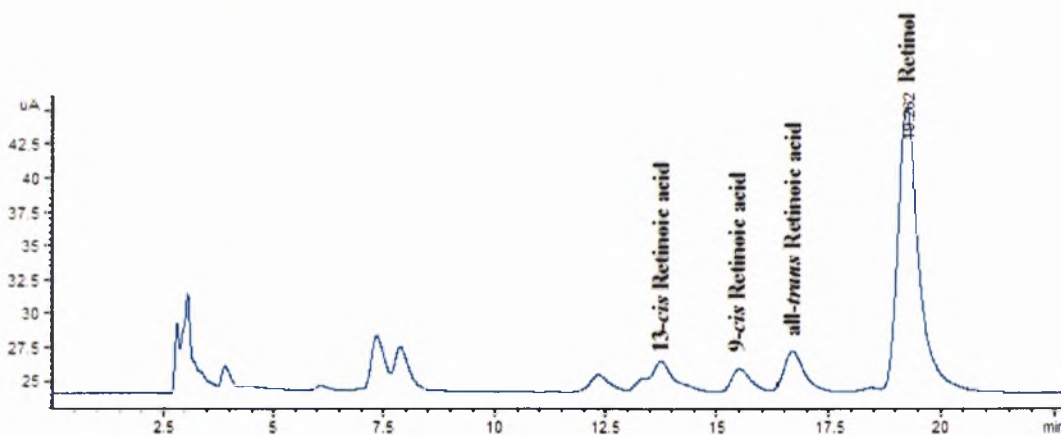
Η ηλεκτροχημική ανίχνευση είναι πολύ διαδεδομένη για τεχνικές ανάλυσης όπως η HPLC καθώς παρέχει χαμηλά όρια ανίχνευσης. Ο κουλομετρικός ανιχνευτής που χρησιμοποιήθηκε σε αυτήν την έρευνα παρέχει από τα χαμηλότερα όρια ανίχνευσης και επίσης μια σταθερή βασική γραμμή.

Για το βολταμογράφημα χρησιμοποιήθηκε η κινητή φάση K. Με αρχή τα 200mV όπου δεν υπήρχε σήμα για κανένα ρετινοειδές και αυξάνοντας ανά 200mV σε κάθε έγχυση, το πρώτο σήμα το πήραμε στα 600mV όπου ανιχνεύθηκαν τα τρία από τα τέσσερα ρετινοειδή με την εξής σειρά: 13-*cis* ρετινοϊκό οξύ, all-*trans* ρετινοϊκό οξύ και ρετινόλη. Το 9-*cis* ρετινοϊκό οξύ δεν εμφανίστηκε στο χρωματογράφημα. Από τα 600mV και μετά η αλλαγή του δυναμικού γινόταν ανά 100mV μέχρι και τα 1200mV. Στα 700mV εμφανίστηκε και το 9-*cis* ρετινοϊκό οξύ ανάμεσα στο 13-*cis* και το all-*trans* ρετινοϊκό οξύ. Από τα 600 έως τα 900mV το ύψος των κορυφών είχε αύξουσα μορφή, στα 900mV παρουσιάστηκε ένα πλατό και από τα 1000 έως τα 1200mV το ύψος των κορυφών έφθινε. Οπότε το πιο κατάλληλο δυναμικό για τον διαχωρισμό και την ανίχνευση των τεσσάρων ρετινοειδών ήταν τόσο το δυναμικό των 900mV όπου παρουσιάστηκε το πλατό αλλά και το δυναμικό των 800mV λόγω χαμηλού θορύβου. Το σήμα του θορύβου ήταν χαμηλό στην αρχή έως και τα 800mV ενώ άρχισε να αυξάνει σημαντικά μετά τα 800mV.



Εικόνα 14: Το ηλεκτροδυναμικό βολταμογράφημα, που είναι η γραφική παράσταση του ύψους της κορυφής της εκλούμενης ένωσης προς το εφαρμοσμένο δυναμικό του ανιχνευτή, των τεσσάρων ρετινοειδών του πειράματος. Και τα τέσσερα ρετινοειδή παρουσιάζουν ένα πλατό μεταξύ 800 και 900mV.

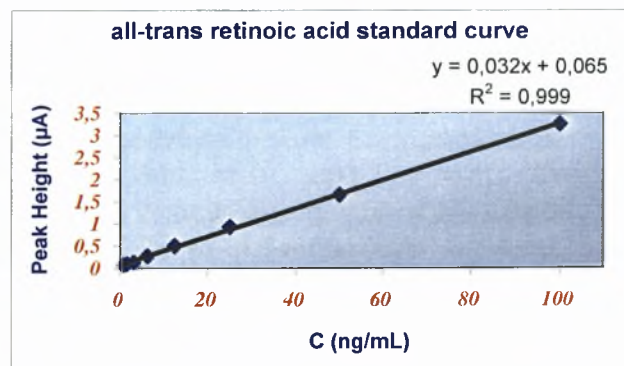
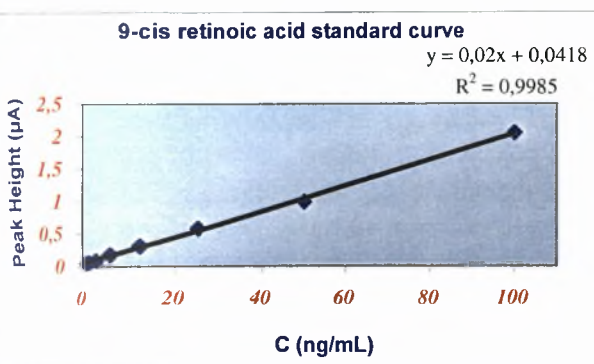
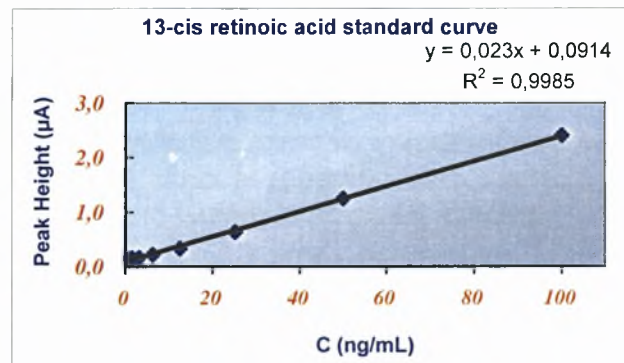
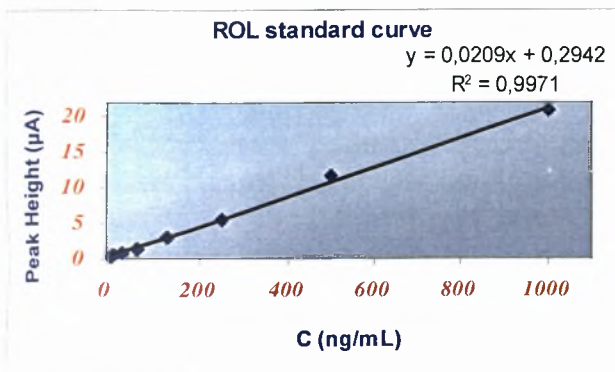
Η ηλεκτροχημική ανίχνευση των εκλούμενων ρετινοειδών έδωσε το χρωματογράφημα της εικόνας 15. Η ρετινόλη εμφανίζεται τελευταία, στα 19,262 λεπτά, ενώ τα τρία ρετινοϊκά οξέα έχουν χρόνους



Εικόνα 15: Το χρωματογράφημα που έδωσε η ηλεκτροχημική ανίχνευση για τα τέσσερα ρετινοειδή. Το 13-cis εμφανίζεται ελαφρώς ισομεριωμένο. Οι χρόνοι ανάκτησης είναι πλήρως διακριτοί μεταξύ τους.

➤ Πρότυπες καμπύλες και όρια ανίχνευσης

Η γραμμικότητα του ηλεκτροχημικού ανιχνευτή μελετήθηκε στο εύρος των 0,78-100ng για κάθε ένα από τα τρία ρετινοϊκά οξέα και στο εύρος των 7,8-1000ng για τη ρετινόλη. Η ανάλυση έγινε τρέχοντας εγχύσεις των 100μl, εις διπλούν, και από τα οχτώ standard πρότυπα διαλύματα, χρησιμοποιώντας τον διαλύτη M ως κινητή φάση. Η απόκριση του ανιχνευτή είναι γραμμική για όλους τους αναλύτες στο εύρος που εξετάστηκαν. Η εξίσωση για το 13-*cis* ρετινοϊκό οξύ στο εύρος 0,78-100ng/ml είναι  $y=0,023x + 0,0914$  με  $r^2=0,9985$ , για το 9-*cis* ρετινοϊκό οξύ στο εύρος 0,78-100ng/ml είναι  $y=0,02x + 0,0418$  με  $r^2=0,9985$ , για το all-*trans* ρετινοϊκό οξύ στο εύρος 0,78-100ng/ml είναι  $y=0,032x + 0,065$  με  $r^2=0,999$  και για τη ρετινόλη στο εύρος 7,81-1000ng/ml είναι  $y=0,0209x + 0,2942$  με  $r^2=0,9971$ , όπου το  $y$  είναι το ύψος των κορυφών σε  $\mu A$  και το  $x$  η συγκέντρωση του αναλύτη σε ng/ml.



Εικόνα 16: Η γραμμικότητα του ηλεκτροχημικού για τα τέσσερα ρετινοειδή. Και για τα τέσσερα μόρια ο ανιχνευτής παρουσιάζει υψηλή γραμμικότητα.



#### **4) Συζήτηση**

Διάφορες χρωματογραφικές διαδικασίες έχουν περιγραφεί για τον διαχωρισμό των ρετινοειδών[3,4]. Οι περισσότερες έρευνες βασίστηκαν σε χρωματογραφία αντίστροφης φάσης[19-21,23-26], που συνοδεύεται κατά κύριο λόγο από βαθμιδωτή έκλυση[18,19,23-25,27] και λιγότερο από ισοκρατική έκλυση[19,22,25,26]. Αφού η πλειοψηφία αυτών των ερευνών στηρίχτηκε στη χρήση C18 στατικών φάσεων και σε κινητές φάσεις που περιλάμβαναν μεθανόλη, ακετονιτρίλιο και νερό ξεχωριστά ή σε συνδυασμούς, έγινε προσπάθεια να στηθεί ένα τέτοιο χρωματογραφικό σύστημα με ισοκρατική έκλυση κατάλληλο για τον διαχωρισμό της ρετινόλης και τριών ρετινοϊκών οξέων: του *all-trans*, του 9-*cis* και του 13-*cis*.

Μια τέτοια προσπάθεια ανάπτυξης μεθόδου για τον χρωματογραφικό διαχωρισμό και προσδιορισμό τεσσάρων ρετινοειδών, του 13-*cis* ρετινοϊκού οξέος, του 9-*cis* ρετινοϊκού οξέος, του *all-trans* ρετινοϊκού οξέος και της ρετινόλης, ήταν και ο σκοπός της παρούσας έρευνας. Η σύγκριση μεταξύ C<sub>8</sub> και C<sub>18</sub> στατικών φάσεων είναι υπέρ της δεύτερης αφού λόγω του μεγαλύτερου της μήκους και θα έχει μεγαλύτερη επιφάνεια αλληλεπίδρασης και θα δώσει την ευκαιρία να παραμείνουν περισσότερο χρόνο τα τέσσερα ρετινοειδή μέσα στη στήλη οπότε να εκλουστούν σε πιο διακριτούς χρόνους, πάντα με τον κίνδυνο όμως αυτοί οι χρόνοι να είναι αρκετά μεγάλοι. Όμως ο χρόνος έκλυσης εξαρτάται και από άλλους παράγοντες πέραν της στήλης.

Σημαντικότερο ρόλο παίζει η κινητή φάση, η οποία είναι αυτή που προκαλεί την έκλυση. Ο διαλύτης έχει μεγάλη σημασία καθώς η σύσταση του παίζει κεντρικό ρόλο στην απομάκρυνση ή μη των ρετινοειδών από την στατική φάση. Όσο πιο ισχυρός είναι ένας διαλύτης τόσο πιο γρήγορα θα εκλούει τα ρετινοειδή σε αντίθεση με έναν αδύναμο διαλύτη που θα έχει μεγάλους χρόνους ανάκτησης. Στη βιβλιογραφία υπάρχει μια μεγάλη «γκάμα» διαλυτών που έχουν χρησιμοποιηθεί στις μέχρι τώρα έρευνες. Ο συνδυασμός δύο αρκετά δυνατών διαλυτών, του ακετονιτρίλιου και της μεθανόλης, με έναν πολύ αδύναμο διαλύτη όπως το νερό με ρυθμιστικό διάλυμα (πίνακας 3) αποδείχτηκε μία πολύ καλή επιλογή. Αν χρησιμοποιούταν μόνο δυνατοί διαλύτες οι χρόνοι ανάκτησης θα ήταν πολύ μικροί και οι κορυφές των ρετινοειδών θα βρισκόταν πολύ κοντά στο νεκρό όγκο. Αντίθετα, με χρήση αδύναμων διαλυτών οι χρόνοι ανάκτησης θα ήταν υπερβολικά μεγάλοι. Μία μέση κατάσταση όπως αυτή που περιγράφηκε σε αυτήν την έρευνα δίνει πολύ καλούς χρόνους ανάκτησης οι οποίοι μπορούν με επιπλέον δοκιμές να βελτιωθούν ακόμη περισσότερο. Οι διαλύτες που δοκιμάστηκαν (πίνακας 5) εδώ περιείχαν μεθανόλη σε ίσα ή ελαφρώς μεγαλύτερα ποσοστά από αυτά του ακετονιτρίλιου διότι η μεθανόλη σαν διαλύτης έχει βρεθεί να είναι πιο αποδοτική από το ακετονιτρίλιο στην έκλυση των ουσιών, αυξάνει δηλαδή την εκλουστική δύναμη της κινητής φάσης[6]. Το τρίτο συστατικό της κινητής φάσης, το νερό με το ρυθμιστικό διάλυμα, περιορίστηκε στο 15-22% του διαλύτη επειδή μεγαλύτερα ποσοστά αύξαναν κατά πολύ τους χρόνους ανάκτησης και μικρότερα θα δημιουργούσαν μη ικανοποιητικό διαχωρισμό των ρετινοϊκών οξέων αφού θα έφερνε τις κορυφές πολύ κοντά τη μία με την άλλη.

Τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είχαν σαν σκοπό τον περιορισμό του ιονισμού των ρετινοϊκών οξέων. Χωρίς το ρυθμιστικό διάλυμα έχουν παρατηρηθεί μεγάλες διακυμάνσεις στους χρόνους ανάκτησης των ρετινοϊκών οξέων που προφανώς οφείλεται στο διαφορετικό βαθμό ιονισμού του αναλύτη ο οποίος εξαρτάται από το pH κάθε δείγματος. Θεωρώντας πως η pK<sub>a</sub> ενός ρετινοϊκού οξέος είναι μεταξύ 6 και 8, ανάλογα με το μέσο, ρυθμίζοντας την κινητή φάση σε pH 5 αναστέλλεται ικανοποιητικά ο ιονισμός των οξέων[6]. Βέβαια παίζει σπουδαίο ρόλο

ο συνδυασμός κινητής φάσης και ρυθμιστικού διαλύματος. Για παράδειγμα, για τους διαλύτες Α και Ζ οι οποίοι έχουν τον ίδιο ηλεκτρολύτη ( $\text{HClO}_4$  60mM) αλλά διαφέρουν ελαφρώς οι αναλογίες μεθανόλης-ακετονιτριλίου-νερού, παρατηρούνται καλύτεροι χρόνοι ανάκτησης στον Ζ από ότι στον Α. Από τα ρυθμιστικά που χρησιμοποιήθηκαν τα περισσότερα έδωσαν καλά αποτελέσματα. Το ρυθμιστικό  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0,01M-NaOH δεν έδωσε ένδειξη για κανένα ρετινοειδές, ενώ σε άλλα πειράματα χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία, με διαφορετική όμως σύνθεση της κινητής φάσης[18]. Το ρυθμιστικό διάλυμα που έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα από τα υπόλοιπα ρυθμιστικά ήταν το  $\text{CH}_3\text{COOH-CH}_3\text{COONa}$  που χρησιμοποιήθηκε με τέσσερις διαφορετικούς διαλύτες, τους Ε, Η, Κ και Μ, σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις 0,01M-0,1M στους διαλύτες Ε και Η και 0,03M-0,03M στους Κ και Μ. Ο τελευταίος συνδυασμός (διαλύτης Μ-συγκέντρωση 0,03M-0,03M) ήταν πιο αποδοτικός από τους άλλους επειδή το pH ήταν αρκετά χαμηλό οπότε δεν υπήρχε ιονισμός σε βαθμό που να επηρεάσει τους χρόνους ανάκτησης κυρίως των οξέων. Ο ηλεκτρολύτης  $\text{HClO}_4$  και το ρυθμιστικό  $\text{TBAClO}_4$ , έδωσαν μεν καλά αποτελέσματα πιθανόν όμως με διαφορετική σύσταση κινητής φάσης να είναι πιο αποδοτικοί από ότι το ρυθμιστικό  $\text{CH}_3\text{COOH-CH}_3\text{COONa}$ .

Υπάρχουν αρκετές μέθοδοι ανίχνευσης ρετινοειδών που εκλούνται από μια χρωματογραφική στήλη[3,4,12]. Η ηλεκτροχημική ανίχνευση είναι από τις πιο απλές, ευαίσθητες και ακριβείς μεθόδους που χρησιμοποιούνται σήμερα και περιλαμβάνει κυρίως την αμπερομετρία και την κουλομετρία. Οι Hagen et al έκαναν ανίχνευση ρετινοειδών με αμπερομετρία[30]. Η κουλομετρική μέθοδος που χρησιμοποιήσαμε στα πειράματα μας είναι από τις πιο ευαίσθητες καθώς τα όρια ανίχνευσης μπορούν να φτάσουν βάσει και άλλων ερευνών στα επίπεδα των pg[21]. Το ηλεκτροδυναμικό βολταμογράφημα που φτιάχτηκε τρέχοντας στη στήλη πρότυπα διαλύματα αλλάζοντας κάθε φορά το δυναμικό του ανιχνευτή, υποδεικνύει πως το βέλτιστο δυναμικό για την ανίχνευση των τεσσάρων ρετινοειδών με βάση το ύψος της κορυφής είναι τα 900mV, μία τιμή όμως στην οποία ο θόρυβος που παράγεται από τον ανιχνευτή είναι σε αυξανόμενο ρυθμό. Στην τιμή των 800mV έχουμε τη δεύτερη μεγαλύτερη κορυφή με χαμηλό όμως θόρυβο. Γι' αυτό το λόγο προτιμήθηκε από το δυναμικό των 900mV αφού όσο πιο χαμηλό θόρυβο θα έχουμε στον ανιχνευτή τόσο πιο καθαρό σήμα θα πάρουμε στο χρωματογράφημα. Εδώ να σημειώσουμε πως η ανίχνευση επηρεάζεται από το pH και κατά συνέπεια από το βαθμό ιονισμού των ρετινοειδών. Δηλαδή η διαμόρφωση του pH στην κινητή φάση από το ρυθμιστικό διάλυμα δεν επηρεάζει μόνο τον διαχωρισμό των ρετινοειδών αλλά και το κατά πόσο αυτά γίνονται ανιχνεύσιμα. Τα ρετινοϊκά οξέα ανιχνεύονται μόνο στη μη δισταμένη μορφή τους, οπότε τυχόν παράγοντες που προκαλούν ιονισμό των οξέων πρέπει να αποφεύγονται καθώς το σήμα που θα δώσει ο ανιχνευτής δεν θα αντιστοιχεί στην πραγματική συγκέντρωση των οξέων στο δείγμα αλλά σε ένα μέρος της το οποίο ποικίλει ανάλογα με το βαθμό ιονισμού.

Όσον αφορά την ανίχνευση των ρετινοειδών τίθεται και ένα άλλο ζήτημα. Τα ρετινοειδή ισομεριώνονται πολύ εύκολα υπό την επίδραση του φωτός. Αυτό έχει επιπτώσεις στο χρωματογράφημα κατά την ανίχνευση επειδή θα υπάρχουν πολλαπλές κορυφές για το κάθε οξύ και αυτό θα δυσκολεύει τον προσδιορισμό και την ποσοτικοποίηση τους. Γι' αυτό στα εργαστήρια οι συνθήκες εργασίας γίνονται υπό την έλλειψη φωτός και με λάμπες φθορίου. Για παράδειγμα στο χρωματογράφημα της εικόνας 16, το 13-*cis* ρετινοϊκό οξύ παρουσιάζει μία ελαφρά ισομερίωση αφού η κορυφή δεν είναι οξεία αλλά παρουσιάζει στην αριστερή της πλευρά ένα μικρό πλατό.

Όλα τα παραπάνω αναφέρονται σε πειράματα με πρότυπα δείγματα. Θέλοντας να δοκιμάσουμε την μέθοδο σε βιολογικά δείγματα εκχλίσαμε ορό από αίμα ανθρώπων και τα τρέξαμε με την μέθοδο που στήσαμε. Ο διαχωρισμός ήταν ικανοποιητικός και η μέθοδος αποδείχτηκε απολύτως αποτελεσματική για τη μέτρηση της ρετινόλης. Για τα ρετινοϊκά οξέα όμως, παρατηρήθηκε αυξημένος θόρυβος σε χαμηλές συγκεντρώσεις με αποτέλεσμα την μη ικανοποιητική ανίχνευση και μέτρηση τους με την ηλεκτροχημική ανίχνευση. Η έρευνα συνεχίζεται όσον αφορά τα βιολογικά δείγματα με την πεποίθηση πως στο τέλος η ηλεκτροχημική ανίχνευση των ρετινοειδών σε βιολογικά δείγματα θα είναι πραγματικότητα.

## **Βιβλιογραφία**

- [1] Tietz: Fundamentals of clinical chemistry, D. B. McCormick: Vitamins, 4<sup>th</sup> ed. W.B. Saunders Company.
- [2] Zakim-Boyer: Hepatology: A textbook of liver diseases, A. Catherine Ross: Vitamin A Metabolism, 3<sup>rd</sup> ed. Vol. 1, W.B. Saunders Company.
- [3] Thomas E. Gundersen, Rune Blomhoff. Qualitative and quantitative liquid chromatographic determination of natural retinoids in biological samples. J. Chromatogr. A 935 (2001) 13-43.
- [4] Ronald Wyss. Chromatographic and electrophoretic analysis of biomedically important retinoids. J. Chromatogr. B 671 (1995) 381-425.
- [5] C. K. Schmidt, A. Brouwer, H. Nau. Chromatographic analysis of endogenous retinoids in tissues and serum. Anal. Biochem. 315 (2003) 36-48.
- [6] A. N. Moulas, I. A. Zervos, I. A. Taitzoglou, M. A. Tsantarliotou, N. A. Botsoglou. Simultaneous determination of retinoic acid, retinol and retinyl palmitate in ram plasma by liquid chromatography. J. Liquid Chromatogr. And Related Technologies 26 (2003) 559-572.
- [7] L. Got, T. Gousson, E. Delacoux. Simultaneous determination of retinyl esters and retinol in human livers by reversed-phase high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. B 668 (1995) 233-239.
- [8] G. Taibi, C.M.A. Nicotra. Development of a fast and sensitive chromatographic assay for all-*trans*-retinol and tocopherol in human serum and plasma using liquid-liquid extraction. J. Chromatogr. B 780 (2002) 261-267.
- [9] M. Lei, H. de The. Retinoids and retinoic acid in cancer. EJC Supplements Vol 1 No. 2 (2003) 13-18.
- [10] C. K. Schmidt, J. Volland, G. Hamscher, H. Nau. Characterization of a new endogenous vitamin A metabolite. Biochim. Biophys. Acta 1583 (2003) 237-251.
- [11] T. Tsutsumi, T. Suzuki, T. Shimoike, R. Suzuki, K. Moriya, Y. Shintani, H. Fujie, Y. Matsuura, K. Koike, M. Miyamura. Interaction of hepatitis C virus core protein with retinoid X receptor  $\alpha$  modulates its transcriptional activity. J. Hepatol. Vol 35 No. 4 (2002) 937-946.
- [12] Robert L. Cunico, Karen M. Gooding, Tim Wehr: Basic HPLC and CE of Biomolecules. Bay Bioanalytical Laboratory, Richmond, CA, 1998.
- [13] ESA inc. Coulochem II Operating Manual.
- [14] Skoog, D. M. West, Anal. Chemistry, An Introduction 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Saunders College Publishing 1993, 725-767.
- [15] Liquid Chromatography
- [16] HPLC



- [17] M. Miyagi, H. Yokoyama, H. Shirashi, M. Matsumoto, H. Ishii. Simultaneous quantification of retinal, retinal and retinoic acid isomers by high-performance liquid chromatography with a simple gradient. *J. Chromatogr. B* 757 (2001) 365-368.
- [18] L. H. Wang, J. F. Wang. Determination of retinoids in human serum, tocopherol and retinyl acetate in pharmaceuticals by RP-LC with electrochemical detection. *J. Pharm. And Biomed. Analysis* 25 (2001) 785-793.
- [19] B. Disdier, H. Bun, J. Catalin, A. Durand. Simultaneous determination of all-*trans*-, 13-*cis*-, 9-*cis*- retinoic acid and their 4-oxo-metabolites in plasma by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* 683 (1996) 143-154.
- [20] C. Ceugniet, L. Lepetit, N. L. Viguerie, H. Jammes, N. Peyrot, M. Riviere. Single-run analysis of retinal isomers, retinal and photooxidation products by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr. A* 810 (1998) 237- 240.
- [21] A.K. Sakhi, T.E. Gundersen, S.M. Ulven, R. Blomhoff, E. Lundanes. Quantitative determination of endogenous retinoids in mouse embryos by high-performance liquid chromatography with on-line solid-phase extraction, column switching and electrochemical detection. *J. Chromatogr. A* 828 (1998) 451-460.
- [22] R. Wyss, F. Bucheli. Determination of endogenous levels of 13-*cis*-retinoic acid (isotretinoin), all-*trans* retinoic acid (tretinoin) and their 4-oxo metabolites in human and animal plasma by high-performance liquid chromatography with automated column switching and ultraviolet detection. *J. Chromatogr. B* 700 (1997) 31-47.
- [23] A. B. Barua, J. A. Olson. Reversed-phase gradient high-performance liquid chromatographic procedure for simultaneous analysis of very polar to nonpolar retinoids, carotenoids and tocopherols in animal and plant samples. *J. Chromatogr. B* 707 (1998) 69-79.
- [24] A. B. Barua. Improved normal-phase and reversed-phase gradient high-performance liquid chromatography procedures for the analysis of retinoids and carotenoids in human serum, plant and animal tissues. *J. Chromatogr. A* 936 (2001) 71-82.
- [25] J. M. Lunetta, R. A. Zulim, S. R. Dueker, Y. Lin, V. Flaig, P. D. Schneider, B. M. Wolfe, A. J. Clifford. Method for the simultaneous determination of retinol and  $\beta$ -carotene concentrations in human tissues and plasma. *Anal. Biochem.* 304 (2002) 100-109.
- [26] A. M. Dzerk, A. Carlson, G. R. Loewen, M. A. Shirley, J. W. Lee. A HPLC method for the determination of 9-*cis* retinoic acid (ALRT1057) and its 4-oxo metabolite in human plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 16 (1998) 1013-1019.
- [27] P. Agrafiotou, S. Sotiropoulos. Characterisation of a simple electrochemical detector for high-performance liquid chromatography and flow-injection analysis based on carbon microcylinder electrodes. *Anal. Chim. Acta* 497 (2003) 175-189.
- [28] H. S. Han, Y. J. Kwon, M. S. Park, S. K. Cho, Y. S. Rho, J. W. Kim, H. S. Sin, S. J. Um. Efficacy validation of synthesized retinol derivatives in vitro: stability, toxicity and activity. *Bioorg. Medic. Chem.* 11 (2003) 3839-3845.
- [29] R. Rühl, F. J. Schweigert. Automated solid-phase extraction and liquid chromatographic method for retinoid determination in biological samples. *J. Chromatogr. B* 798 (2003) 309-316.
- [30] J. J. Hagen, K. A. Washco, C. A. Monnig. Determination of retinoids by reversed-phase capillary liquid chromatography with amperometric electrochemical detection. *J. Chromatogr. B* 677 (1996) 225-231.