

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΣΑΚΧΑΡΩΝ ΣΤΗΝ ΗΡΛC-ΡCΔ ΜΕΤΑ ΑΠΟ
ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΙΑΣΠΑΣΗ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΙΣΗ ΜΕ
4-ΑΜΙΝΟ-3-ΠΕΝΤΕΝ-2-ΟΝΗ**

ΜΟΝΕΜΒΑΣΙΟΣ ΓΙΑΝΝΗΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΧΑΝΙΩΤΑΚΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**

2005

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΜΟΝΕΜΒΑΣΙΟΣ ΓΙΑΝΝΗΣ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ : 18-11-1980

ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ

Χριστοφόρου Νέζερ 16
14451, Μεταμόρφωση Αττικής
Τηλ. 210-2819816, 6972-270282
e-mail : giamon@chemistry.uoc.gr

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

2002-σήμερα : Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης στο Γενικό Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης.

1998-2002 : Πτυχίο Χημείας, Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης

1998: Απολυτήριο Λυκείου, 2^ο Γενικό Λύκειο Ν. Ηρακλείου

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

2002-σήμερα : Εκπόνηση μελέτης στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του τμήματος Χημείας, του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Θέμα: «Ανίχνευση σακχάρων στην HPLC-PCD μετά από οξειδωτική διάσπαση και παραγωγή με 4-αμινο-3-πεντεν-2-ονη». Υπεύθυνος καθηγητής: Νικόλαος Χανιωτάκης.

2001-2002 : Διπλωματική Εργασία στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του τμήματος Χημείας, του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Θέμα: «Ανίχνευση φορμαλδεΐδης στην υγρή χρωματογραφία με παραγωγή μετά τη στήλη». Υπεύθυνος καθηγητής: Νικόλαος Χανιωτάκης.

ΧΗΜΙΚΗ ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

Στα πλαίσια της εργαστηριακής έρευνας του μεταπτυχιακού προγράμματος χρησιμοποιήθηκαν όργανα Αέριας και Υγρής Χρωματογραφίας/Φασματογράφος μάζας (GC-MS, LC-MS) και Στοιχειακής Ανάλυσης. Εκπόνηση εργασίας για το μεταπτυχιακό δίπλωμα ειδίκευσης σχετική με ανάπτυξη και εφαρμογή χρωματογραφικών μεθόδων ανάλυσης και ανίχνευσης με φασματομετρία μάζας, φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού και φθορισμού.

ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

02-05/2003 Βοηθός στα εργαστήρια Αναλυτικής Χημείας II. Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης. Υπεύθυνος κ. Ι. Σαριδάκης.

02-05/2004 Βοηθός στα εργαστήρια Αναλυτικής Χημείας ΙΙ. Τμήμα Χημείας,
Πανεπιστήμιο Κρήτης. Υπεύθυνος κ. Ι. Σαριδάκης.

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

Αγγλικά (Certificate of Proficiency in English)

Γερμανικά (Grundstufe)

ΓΝΩΣΕΙΣ Η/Υ

Windows

Microsoft Word, Excel, Power Point

Microcal Origin

Internet

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα Διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Κρήτης, υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Νικόλαου Χανιωτάκη, τον οποίο ευχαριστώ ιδιαίτερα για την επιστημονική του καθοδήγηση, αλλά κυρίως για την αμέριστη εμπιστοσύνη που μου έδειξε σε ολόκληρο το διάστημα της συνεργασίας μας για την ανεξαρτησία στο χειρισμό θεμάτων που αφορούσαν την πορεία της ερευνητικής μου δουλειάς, τη συνεχή ενθάρρυνση καθώς και για την οικονομική βοήθεια που μου παρείχε.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, καθώς και τους καθηγητές που με δέχτηκαν ως μεταπτυχιακό φοιτητή τους και ιδιαίτερα τους κύριους Βασιλικογιαννάκη Γιώργο και Περγαντή Σπύρο, που δέχτηκαν να κρίνουν την παρούσα εργασία συμμετέχοντας στην εξεταστική επιτροπή μου.

Επίσης τον Dr Π. Ρήγα για την χορήγηση του οργάνου Prometheus PCD 300 Plus και για την καθοδήγηση του.

Θα ήταν παράληψη εκ μέρους μου να μην ευχαριστήσω τον Επίκουρο καθηγητή κ. Γιώργο Βασιλικογιαννάκη για τις συμβουλές του στην διαδικασία σύνθεσης του αντιδραστηρίου παραγωγίσις της φορμαλδεϋδης, καθώς και του μηχανισμού παραγωγίσις της φορμαλδεϋδης όπως επίσης και την Τόφη Μαρία για την σύνθεση του αντιδραστηρίου.

Ακολούθως, θα επιθυμούσα να ευχαριστήσω τους φίλους και συνεργάτες μου Φουσκάκη Μαίρη, Βαμβακάκη Βίκη, Βόλοσυράκη Αντώνη, Σωτηροπούλου Σοφία, Δημάκη Βαγγέλη, Καραπιδάκη Κλαίρη, Σοφικίτη Νικολέτα, Αλιφραγκή Γιάννη, Σφακιωτάκη Ζαχάρη και Γκέργκη Ιωάννα για τις ατέλειωτες ώρες που περάσαμε μαζί στο εργαστήριο όλο το διάστημα της ερευνητικής μου σταδιοδρομίας, για τη στήριξη και συμπαράστασή τους σε κάθε προσπάθειά μου, για τις πολύτιμες συμβουλές τους καθώς και για το υπέροχο κλίμα που δημιούργησαν στο εργαστήριο κατά την συνεργασία μας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου, τον Καντώνη Γιώργο, Μαργέλου Μίνα, Σαράφη Παναγιώτη, Ξημεράκη Δημήτρη και Τσαγκαράκη Κώστα για τις ευχάριστες ώρες που περάσαμε μαζί και για την στήριξή τους σε όλη την διάρκεια των πανεπιστημιακών μου σπουδών.

Τελειώνοντας θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την ηθική και οικονομική τους συμπαράσταση κατά τη διάρκεια των φοιτητικών μου σπουδών, για την στήριξη και ενθάρρυνσή τους κάθε χρονική στιγμή της ζωής μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η ανάπτυξη και η βελτιστοποίηση μεθόδου ανίχνευσης των υδατανθράκων. Η αναπτυχθείσα μεθοδολογία περιλαμβάνει το διαχωρισμό των υδατανθράκων σε χρωματογραφική στήλη, την παραγωγή αυτών σε όργανο PCD και τελικά την φθορισμομετρική ανίχνευση του παραγώγου. Η χρήση PCD με δύο θερμοστατούμενα σπειράματα αντίδρασης δίνει τη δυνατότητα πραγματοποίησης αυτών των αντιδράσεων σε ροή. Αρχικά πραγματοποιείται οξειδωτική διάσπαση των υδατανθράκων με τη χρήση διαλύματος υπεριωδικού νατρίου συγκέντρωσης 0,05 M στους 120 °C. Στη συνέχεια πραγματοποιείται αντίδραση παραγωγής της φορμαλδεΐδης που παράγεται από την αντίδραση οξειδωτικής διάσπασης με χρήση διαλύματος 4-άμινο-3πεντέν-όνης 6 mM το οποίο περιέχει επίσης οξικό αμμώνιο 0,5 M και θειοθειικό νάτριο 0,2 M, σε θερμοκρασία 120 °C. Η ανίχνευση πραγματοποιείται με μέτρηση του φθορισμού του παραγώγου σε $\lambda_{ex}=402$ nm και $\lambda_{em}=520$ nm. Τα όρια ανίχνευσης για την γλυκόζη είναι 0,42 μ g, για την μαννόζη 0,3 μ g και για την φρουκτόζη 0,22 μ g.

Λέξεις κλειδιά: υδατάνθρακες, παραγωγή, φθορισμός, υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

ABSTRACT

The objective of the present work is the development and optimization of an analytical method for carbohydrates. The developed method includes the chromatographic separation of carbohydrates their derivatization in a Post Column Derivatization (PCD) system and finally the fluorometric detection of the derivative. The use of PCD instrument with two thermostated reaction coils makes the on-line reactions possible. Initially, the periodate oxidation of carbohydrates takes place with the use of 0,05 M sodium periodate at 120 °C. Subsequently the derivatization reaction of the formaldehyde formed from the above reaction is carried out with a 6 mM 4-amino-3-penten-2-one solution containing also 0,5 M sodium acetate and 0,2 M sodium thiosulfate. The detection is based on the fluorescence of the derivative formed which is monitored at 520 nm (emission) with an excitation wavelength of 402 nm. The detection limits of the method are 0,42 µg for glucose, 0,3 µg for mannose and 0,22 µg for fructose.

Keywords: carbohydrates, derivatization, fluorescence, HPLC-PCD

| | |
|--|----|
| 1. ΠΡΟΛΟΓΟΣ | 1 |
| 2. ΠΑΡΑΓΩΓΙΣΗ | 2 |
| 2.1 ΓΙΑΤΙ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΜΕ ΠΑΡΑΓΩΓΙΣΗ | 2 |
| 2.2 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΠΑΡΑΓΩΓΙΣΗΣ | 4 |
| 2.2.1 Παραγωγή εντός και εκτός συστήματος χρωματογραφίας | 4 |
| 2.2.2 Σύγκριση παραγωγίσις πριν και μετά τη στήλη | 4 |
| 3. ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΕΣ | 8 |
| 3.1 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ | 9 |
| 3.1.1 Μονοσακχαρίτες | 9 |
| 3.1.2 Δισακχαρίτες | 14 |
| 3.1.3 Πολυσακχαρίτες | 16 |
| 3.2 ΑΞΙΑ ΤΩΝ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ | 17 |
| 3.2.1 Οι υδατάνθρακες στα τρόφιμα | 17 |
| 3.2.2 Οι υδατάνθρακες στον οργανισμό | 18 |
| 3.3 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ | 19 |
| 3.3.1 Διαχωρισμός των υδατανθράκων | 19 |
| 3.3.2 Ανίχνευση των υδατανθράκων | 22 |
| 4. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ ΜΕ ΗPLC | 25 |
| 4.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΠΑΡΑΓΩΓΙΣΗΣ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ | 25 |
| 4.1.1 Μετατροπή των σακχάρων σε φουρφουράλες | 26 |
| 4.1.2 Αντιδράσεις που στηρίζονται στην αναγωγικά ικανότητα των σακχάρων | 27 |
| 4.1.3 Αντιδράσεις με αντιδραστήρια που σχηματίζουν φθορίζοντα προϊόντα | 27 |
| 4.1.4 Οξειδωτική διάσπαση των υδατανθράκων και ανίχνευση των προϊόντων αυτής | 28 |
| 4.2 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΣΑΚΧΑΡΩΝ | 31 |
| 5. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΑΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΣΑΚΧΑΡΩΝ | 35 |
| 5.1 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ | 35 |
| 5.2 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΙΣΗΣ | 36 |
| 5.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΤΑΞΗ – ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΗPLC-PCD | 37 |
| 5.4 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΗPLC-PCD | 41 |
| 5.5 ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΣΑΚΧΑΡΩΝ | 42 |
| 5.5.1 Ανάπτυξη μεθοδολογίας ανίχνευσης σακχάρων | 43 |
| 5.5.2 Αποτελέσματα των μελετών βελτιστοποίησης της μεθόδου | 49 |
| 5.6 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΗPLC – PCD ΣΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ | 53 |
| 5.6.1 Ανάλυση μονοσακχαριτών – δισακχαριτών | 53 |
| 5.7 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ | 58 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 60 |

1. ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) είναι μία από τις αποτελεσματικότερες μεθόδους ποσοτικής και ποιοτικής ανάλυσης και είναι ευρύτατα διαδεδομένη στους βιοϊατρικούς και σε άλλους τομείς. Η πρόοδος της έρευνας των υδατανθράκων σχετίζεται άμεσα με την ανάπτυξη της HPLC καθώς ο διαχωρισμός τους έχει προωθηθεί από την ανάπτυξη τεχνικών HPLC. Οι τεχνικές αυτές ανάλογα με τη κινητή και τη στατική φάση της χρωματογραφικής στήλης βρίσκουν εφαρμογές σε διαφορετικές κατηγορίες υδατανθράκων. Οι διαφορετικές συνθήκες που αναπτύχθηκαν οδήγησαν στον ποιοτικό αλλά και στον ποσοτικό προσδιορισμό των υδατανθράκων.

Παρόλη την ανάπτυξη της HPLC, η ανίχνευση των διαχωρισμένων σακχάρων δεν είναι εύκολη. Ο βασικός λόγος για αυτό είναι ότι τα σάκχαρα δεν διαθέτουν κάποια φθορίζουσα ή χρωμοφόρο ομάδα. Η ύπαρξη αυτών των ιδιοτήτων όμως είναι απαραίτητη για την ανίχνευση ενώσεων οι οποίες βρίσκονται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις μέσα σε πολύπλοκα βιολογικά κυρίως δείγματα όπως είναι το αίμα, τα ούρα και οι ιστοί. Επιπλέον, η μεγάλη ευαισθησία που προσφέρουν οι μέθοδοι ανίχνευσης που στηρίζονται στις οπτικές ιδιότητες των ενώσεων επιτρέπει την εισαγωγή πολύ μικρών ή αραιωμένων διαλυμάτων στο χρωματογραφικό σύστημα, κάτι που έχει ως συνέπεια την μικρή μόλυνση του συστήματος και την παράταση της ζωής της χρωματογραφικής στήλης.

Οι τεχνικές της HPLC που εφαρμόζονται στο διαχωρισμό των σακχάρων έχουν συνδυαστεί με πολλούς ανιχνευτές όπως είναι οι ανιχνευτές απορρόφησης υπεριώδους, δείκτη διάθλασης, ο παλμικός αμπερομετρικός, σκέδασης φωτός και μάζας. Όλοι οι παραπάνω ανιχνευτές έχουν τη δυνατότητα να ανιχνεύσουν τα σάκχαρα χωρίς τη μετατροπή τους σε άλλα μόρια τα οποία έχουν διαφορετικές ιδιότητες.[1,2] Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον στράφηκε προς την εφαρμογή αντιδράσεων παραγωγίσις των σακχάρων μετά την στήλη έτσι ώστε να ενισχυθεί η ευαισθησία και επιπλέον να είναι δυνατή η χρήση των συμβατικών φθορισμομετρικών και φωτομετρικών ανιχνευτών.[3] Έχουν αναφερθεί πολλά αντιδραστήρια παραγωγίσις τα οποία όμως δεν είναι πάντα συμβατά με την υγρή

χρωματογραφία και επιπλέον δεν είναι κατάλληλα για την ανίχνευση όλων των ειδών των υδατανθράκων.

ΠΑΡΑΓΩΓΙΣΗ

Παραγωγή είναι η χρήση φυσικών μεθόδων ή χημικών αντιδράσεων προκειμένου να μεταβληθούν οι φυσικές ή οι χημικές ιδιότητες του αναλύτη.

Υπάρχουν κάποιες κατηγορίες ενώσεων των οποίων η ανίχνευση είναι πρακτικά αδύνατη αν δεν έχει προηγηθεί παραγωγή. Τέτοιες ενώσεις είναι τα αμινοξέα, τα σάκχαρα και τα καρβοξυλικά οξέα.

Σε ορισμένες περιπτώσεις μια απλή φωτοχημική ή θερμική αντίδραση τροποποιεί τον αναλύτη σε κάποιο παράγωγο που εμφανίζει διαφορετικές χρωματογραφικές ιδιότητες ή ανιχνεύεται με διαφορετικό τρόπο από την αρχική ουσία. Σε κάποιες άλλες περιπτώσεις η δομή του αναλύτη μπορεί να αλλάξει εξαιτίας μίας αλλαγής της συζυγίας ή από την προσθήκη ενός άλλου μορίου πάνω στον αναλύτη ώστε να σχηματιστεί το τελικό παράγωγο.[4]

Σε ορισμένες μεθόδους παραγωγής το προϊόν το οποίο τελικά ανιχνεύουμε είναι μόνο ένα, ενώ σε άλλες περιπτώσεις ανιχνεύεται μείγμα προϊόντων.[5]

Η πιο δημοφιλής μέθοδος παραγωγής είναι η μετατροπή των αναλυτών σε χρωμοφόρα ή φθορίζοντα μόρια. Ο βασικός λόγος είναι ότι η ευαισθησία της φωτομετρικής και ιδιαίτερα της φθορισμομετρικής ανίχνευσης είναι πολύ μεγάλη. Συνεπώς η χρήση φθορισμομετρικής ανίχνευσης δίνει τη δυνατότητα επίτευξης πολύ χαμηλών ορίων ανίχνευσης.

Οι περισσότερες αντιδράσεις παραγωγής βασίζονται σε ομογενείς αντιδράσεις διαλυμάτων. Πρόσφατα ξεκίνησαν να χρησιμοποιούνται και αντιδράσεις στερεάς φάσης με μεγάλη επιτυχία.[6]

2.1. ΓΙΑΤΙ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΜΕ ΠΑΡΑΓΩΓΙΣΗ

Γενικά η χημική παραγωγή χρησιμοποιείται για την βελτίωση της ευαισθησίας μιας μεθόδου κατά την ανίχνευση μιας ένωσης. Αυτό

επιτυγχάνεται με τη μετατροπή μίας δύσκολα ανιχνεύσιμης ένωσης σε ένα παράγωγο το οποίο ανιχνεύεται εύκολα.[7] Η παραγωγή επίσης αυξάνει κατά πολύ την επιλεκτικότητα της μεθόδου. Από το μείγμα των προς ανάλυση ουσιών αντιδρούν επιλεκτικά ορισμένες ουσίες και συνεπώς ελαττώνονται οι τυχόν παρεμβολές.

Η παραγωγή διακρίνεται σε δύο βασικές κατηγορίες (α) την παραγωγή πριν τη στήλη και (β) τη παραγωγή μετά τη στήλη. Κατά την παραγωγή πριν τη στήλη η αντίδραση πραγματοποιείται πριν την είσοδο του αναλύτη στην χρωματογραφική στήλη. Όταν η παραγωγή πραγματοποιείται πριν τη στήλη, τότε μεταβάλλεται επίσης και η χρωματογραφική συμπεριφορά του αναλύτη. Συνήθως η παραγωγή πριν τη στήλη πραγματοποιείται εκτός ροής του συστήματος χρωματογραφίας.

Στην παραγωγή μετά τη στήλη η αντίδραση πραγματοποιείται μετά την έξοδο του αναλύτη από τη στήλη και πριν την είσοδό του στο ανιχνευτή. Η παραγωγή μετά τη στήλη πραγματοποιείται συνήθως στη ροή της χρωματογραφικής διάταξης.

Γενικότερα, δεν έχει τόσο μεγάλη σημασία που πραγματοποιούνται οι αντιδράσεις παραγωγής αλλά το πως αυτές βελτιώνουν το διαχωρισμό και την ανίχνευση. Η παραγωγή ουσιών στη χρωματογραφία πραγματοποιείται για την βελτίωση ενός ή περισσότερων χαρακτηριστικών της προς ανάλυση ένωσης, με σκοπό τη βελτίωση της μεθόδου. Η κατάλληλη και επιλεκτική αντίδραση παραγωγής μπορεί να βελτιώσει το σχήμα των κορυφών του χρωματογραφήματος, το ύψος των θεωρητικών πλακών, την επιλεκτικότητα, τον διαχωρισμό των ενώσεων, την απόδοση και άλλες χρωματογραφικές παραμέτρους.

Έτσι η εφαρμογή της παραγωγής έχει ως συνέπεια:

1. Την εμφάνιση και αύξηση των οπτικών ιδιοτήτων μίας ένωσης, όπως είναι ο φθορισμός και η απορρόφηση.
2. Τη μετατροπή των ιδιοτήτων μίας ένωσης ή κατηγορίας ενώσεων έτσι ώστε να επιτυγχάνεται καλύτερος διαχωρισμός τους από την χρωματογραφική στήλη.
3. Τη βελτίωση της διακριτικής ικανότητας μιας μεθόδου για ένα συγκεκριμένο μόριο ενός περίπλοκου μίγματος.

4. Την επιλεκτική ανίχνευση ενός αναλύτη μέσω επιλεκτικής αντίδρασης παραγωγίσης.
5. Την βελτίωση των αναλυτικών χαρακτηριστικών μιας μεθόδου όπως είναι η ευαισθησία και το όριο ανίχνευσης. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με την μετατροπή του αναλύτη σε περισσότερα από ένα ανιχνεύσιμα προϊόντα.

Με τη χρήση τεχνικών που χρησιμοποιούν ενζυμικές μετατροπές είναι δυνατόν να παραχθούν από τον αναλύτη περισσότερα από ένα διαφορετικά προϊόντα των οποίων το σήμα ανίχνευσης θα είναι ενισχυμένο σε σχέση με το σήμα ανίχνευσης του αρχικού αναλύτη. Η ιδέα κατά την οποία παράγονται πολλά προϊόντα από έναν αναλύτη μέσω ενζυμικών αντιδράσεων είναι μία σημαντική τεχνική η οποία έχει βρει πολλές εφαρμογές στην HPLC. [8,9,10]

2.2. ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΠΑΡΑΓΩΓΙΣΗΣ

2.2.1. Παραγωγή εντός και εκτός ροής χρωματογραφίας

Η παραγωγή των μορίων διακρίνεται σε ορισμένες κατηγορίες ανάλογα με το που και πότε πραγματοποιείται. Έτσι αρχικά διακρίνεται σε παραγωγή εκτός ροής και σε ροή. Στην παραγωγή εκτός ροής τα προς ανάλυση μόρια αντιδρούν και μετατρέπονται στο επιθυμητό παράγωγο εκτός του συστήματος HPLC. Κατά την παραγωγή σε ροή οι αντιδράσεις παραγωγίσης αποτελούν ένα μέρος της ανάλυσης και ενσωματώνονται στην οργανολογία της HPLC, ενώ πρέπει να είναι συγκεκριμένης χρονικής διάρκειας και μεγάλης απόδοσης στο παράγωγο που ανιχνεύεται.

2.2.2. Σύγκριση παραγωγίσης πριν και μετά τη στήλη

Οι δύο τρόποι παραγωγίσης, πριν και μετά τη στήλη, έχουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα διαφορετικά ο καθένας και συνεπώς χρησιμοποιούνται σε διαφορετικές περιπτώσεις.

Στην παραγωγή μετά την στήλη, οι ουσίες όταν φτάνουν στο αντιδραστήριο παραγωγίσης έχουν ήδη διαχωριστεί. Για το λόγο αυτό η αντίδραση παραγωγίσης δεν είναι υποχρεωτικό να δίνει μόνο ένα σταθερό

προϊόν. Πολλές αντιδράσεις δίνουν και παραπροϊόντα τα οποία συνήθως δεν ανιχνεύονται στις συνθήκες στις οποίες ανιχνεύεται το κύριο προϊόν, και άρα δεν αποτελούν πρόβλημα. Επιπλέον, το γεγονός ότι η αντίδραση πραγματοποιείται μετά το διαχωρισμό του προς ανάλυση μίγματος, παρέχει τη δυνατότητα να διακρίνονται ακόμα και ενώσεις οι οποίες μετά την παραγωγή δίνουν το ίδιο προϊόν.

Η μέθοδος αυτή όμως έχει πολλούς περιορισμούς οι οποίοι πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψιν. Οι σημαντικότεροι είναι:

1. Η κινητική των αντιδράσεων πρέπει να είναι γρήγορη έτσι ώστε να πραγματοποιούνται σε πολύ μικρό χρόνο δίνοντας ταυτόχρονα όσο το δυνατόν μεγαλύτερη απόδοση. Γενικά στις χρωματογραφικές μεθόδους ο χρόνος ο οποίος μεσολαβεί από την έξοδο της προς ανάλυση ουσίας από τη χρωματογραφική στήλη, μέχρι τον ανιχνευτή είναι περιορισμένος σε διάρκεια (1-3 λεπτά). Η υγρή χρωματογραφία είναι μία μέθοδος η οποία έχει τη δυνατότητα ρύθμισης ορισμένων παραμέτρων όπως ο όγκος και η θερμοκρασία των σπειραμάτων αντίδρασης καθώς και η ταχύτητα ροής των αντιδραστηρίων έτσι ώστε η αντίδραση να δίνει την μεγαλύτερη δυνατή απόδοση.
2. Η ανάμιξη των διαλυτών της κινητής φάσης με τους διαλύτες των αντιδραστηρίων παραγωγής. Απαιτείται πλήρης μίξη των διαλυτών των αντιδραστηρίων παραγωγής με τους διαλύτες της κινητής φάσης για την πραγματοποίηση της αντίδρασης. Επιπλέον πολύ σημαντική είναι και η απαίτηση για πλήρη διαλυτότητα των αντιδραστηρίων στους διαλύτες που χρησιμοποιούνται στο χρωματογραφικό σύστημα.
3. Η ανάγκη ύπαρξης διαφοράς μεταξύ των φυσικών ή χημικών ιδιοτήτων του προϊόντος παραγωγής με αυτές του αντιδραστηρίου παραγωγής προκειμένου να επιτευχθεί ποσοτική ανίχνευση του αναλύτη. Αυτό επιβάλλεται καθόσον όλη η ποσότητα του διαλύματος οδηγείται στον ανιχνευτή, χωρίς απομάκρυνση της περίσσειας των αντιδραστηρίων. Επιπλέον, η αντίδραση παραγωγής δεν θα πρέπει να σχηματίζει ίζημα γιατί αυτό θα έχει καταστροφικές συνέπειες στον ανιχνευτή και το σύστημα ροής.
4. Η απαίτηση για επιπλέον αντλίες για τα αντιδραστήρια παραγωγής καθώς και ένα αρκετά πολύπλοκο σύστημα για την επίτευξη των

κατάλληλων συνθηκών προκειμένου να πραγματοποιηθούν οι αντιδράσεις παραγωγίσις.[4]

Η παραγωγή πριν τη στήλη έχει διαφορετικά πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα από αυτά που παρουσιάστηκαν παραπάνω και επομένως εφαρμόζεται σε διαφορετικές περιπτώσεις. Στις περισσότερες εφαρμογές η αντίδραση πραγματοποιείται εκτός του συστήματος της χρωματογραφίας. Τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζει η μέθοδος είναι τα παρακάτω:

1. Αύξηση του ορίου ανίχνευσης εφόσον δεν υπάρχει περιορισμός στον χρόνο αντίδρασης, καθόσον η αντίδραση πραγματοποιείται εκτός του χρωματογραφικού συστήματος.[11]
2. Δυνατότητα χρήσης μιας ευρείας ποικιλίας διαλυτών. Εφόσον η αντίδραση πραγματοποιείται εκτός χρωματογραφικού συστήματος οι διαλύτες των αντιδραστηρίων παραγωγίσις δεν είναι υποχρεωτικό να αναμιγνύονται με την κινητή φάση.
3. Δυνατότητα χρήσης μεγάλης ποικιλίας αντιδραστηρίων, ακόμα και διαβρωτικών, εφόσον δεν εισέρχονται στο χρωματογραφικό σύστημα.
4. Τέλος η μέθοδος αυτή επιτρέπει την εφαρμογή αντιδράσεων κατά τις οποίες προσκολλούνται μόρια στην προς ανάλυση ουσία και της προσδίδουν συγκεκριμένες ιδιότητες, όπως είναι για παράδειγμα ο φθορισμός και η απορρόφηση.

Η παραγωγή πριν τη στήλη που πραγματοποιείται εντός ή εκτός συστήματος χρωματογραφίας παρουσιάζει και σημαντικά μειονεκτήματα:

1. Θα πρέπει να απομακρύνεται η περίσσεια των αντιδραστηρίων παραγωγίσις, ή εφόσον αυτό δεν είναι εφικτό, όπως για παράδειγμα στην περίπτωση της παραγωγίσις πριν τη στήλη σε σειρά με την χρωματογραφία, θα πρέπει να διαχωρίζεται η κορυφή τους από αυτή του αναλύτη.
2. Θα πρέπει ο κάθε αναλύτης να δίνει διαφορετικό προϊόν παραγωγίσις. Σε περίπτωση που δύο ή περισσότεροι αναλύτες δίνουν το ίδιο προϊόν, δεν μπορούν να διαχωριστούν από την χρωματογραφική στήλη. Αυτός είναι ένας σημαντικός λόγος για τον οποίο χρησιμοποιείται συχνότερα η παραγωγή μετά τη στήλη και συγκεκριμένα, η σε ροή παραγωγή μετά τη στήλη.

Όταν η παραγωγή πριν τη στήλη πραγματοποιείται σε σειρά με την υγρή χρωματογραφία εκτός από τα παραπάνω μειονεκτήματα παρουσιάζει και κάποιους επιπλέον περιοριστικούς παράγοντες όπως είναι:

1. Η ανάγκη ανάμιξης της κινητής φάσης με τους διαλύτες των αντιδραστηρίων παραγωγής καθώς και η διαλυτότητα του προϊόντος παραγωγής στη κινητή φάση.
2. Ο σχηματισμός ιζήματος ή η έκλυση αερίου κατά την αντίδραση, διότι κάτι τέτοιο οδηγεί στην καταστροφή της στήλης.

Πολλές φορές σε μεθόδους παραγωγής πριν τη στήλη υπάρχουν αυτοματοποιημένες συσκευές εκχύλισης ή διαχωρισμού του επιθυμητού μορίου. Έτσι μειώνεται κατά πολύ η επεξεργασία των δειγμάτων πριν την εισαγωγή τους στο σύστημα χρωματογραφίας.[12]

Γενικά η αντίδραση παραγωγής είτε πραγματοποιείται πριν τη στήλη είτε μετά θα πρέπει πάντα να χαρακτηρίζεται από τα εξής γενικά χαρακτηριστικά:

1. Σταθερότητα των αντιδραστηρίων παραγωγής έτσι ώστε το σήμα υποβάθρου να είναι σταθερό καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης.
2. Μικρή απόκριση του αντιδραστηρίου παραγωγής, το οποίο βρίσκεται σε περίσσεια, στον ανιχνευτή.
3. Ολοκλήρωση της αντίδρασης έτσι ώστε να ανιχνεύεται όλη η ποσότητα του αναλύτη. Γενικά όμως θα πρέπει ο όγκος του υγρού έκλυσης που μεσολαβεί από την στήλη μέχρι τον ανιχνευτή να είναι μικρός έτσι ώστε να μην αλλοιώνονται τα χαρακτηριστικά της κορυφής. Επομένως εάν η αντίδραση πραγματοποιείται σχετικά αργά και προκειμένου να αυξήσουμε την ταχύτητά της, δεν θα πρέπει να αυξάνουμε τον όγκο του σπειράματος αντίδρασης αλλά την θερμοκρασία της αντίδρασης.
4. Επαναληψιμότητα έτσι ώστε κάθε φορά ο ανιχνευτής να δίνει το ίδιο σήμα για τον ίδιο αναλύτη.
5. Διαλυτότητα όλων των μορίων που υπάρχουν στο σύστημα.

3. ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΕΣ

Οι υδατάνθρακες βρίσκονται σε κάθε ζωντανό οργανισμό και απαντούν στην καθημερινή ζωή μας. Η ζάχαρη και το άμυλο βρίσκονται στις τροφές, η κυτταρίνη στο ξύλο, το χαρτί και το βαμβάκι. Τροποποιημένοι υδατάνθρακες συνιστούν μέρος του εξωτερικού των κυττάρων, άλλοι απαντούν στα μόρια των DNA που μεταφέρουν γενετικές πληροφορίες, ενώ άλλοι χρησιμοποιούνται ως φάρμακα.

Η ονομασία υδατάνθρακας προέρχεται ιστορικά από το γεγονός ότι η γλυκόζη, ο πρώτος απλός υδατάνθρακας ο οποίος απομονώθηκε, έχει την μοριακή δομή $C_6H_{12}O_6$ και αρχικά θεωρήθηκε ότι είναι «υδρίτης του άνθρακα, $C_6(H_2O)_6$ ». Η άποψη αυτή σύντομα εγκαταλείφθηκε αλλά η ονομασία παρέμεινε.

Οι υδατάνθρακες σχηματίζονται στα φύλλα των φυτών από τις απλές ενώσεις διοξείδιο του άνθρακα και νερό, οι οποίες αντιδρούν και σχηματίζουν (+)-γλυκόζη. Για να πραγματοποιηθεί αυτή η διεργασία απαιτείται η καταλυτική δράση της χλωροφύλλης και η ύπαρξη ενέργειας υπό την μορφή φωτός. Στην συνέχεια με βάση μόρια (+)-γλυκόζης βιοσυντίθενται τα πολύ μεγαλύτερα μόρια της κυτταρίνης, η οποία υπάρχει στον φλοιό στήριξης του φυτού. Επίσης τα μόρια της (+)-γλυκόζης μπορούν να δώσουν άμυλο αν συνδυαστούν κατά έναν διαφορετικό τρόπο. Έχει υπολογιστεί ότι πάνω από το 50% του καθαρού βάρους της βιομάζας της γης, αποτελείται από πολυμερή της γλυκόζης. Το άμυλο και η κυτταρίνη κατά την χρησιμοποίησή τους ως τροφή από ένα ζώο, διασπώνται στην αρχική δομική τους μονάδα, την (+)-γλυκόζη. Η (+)-γλυκόζη μεταφέρεται μέσω του αίματος στους ιστούς όπου οξειδώνεται τελικώς προς διοξείδιο του άνθρακα και νερό, με ταυτόχρονη απελευθέρωση ενέργειας. Επομένως, οι υδατάνθρακες δρουν σαν ένα χημικό ενδιάμεσο με το οποίο η ηλιακή ενέργεια αποθηκεύεται και χρησιμοποιείται για την συντήρηση της ζωής.[13]



Η γλυκόζη αποθηκεύεται στο ήπαρ υπό την μορφή γλυκογόνου το οποίο διασπάται όταν υπάρχει ενεργειακή ανάγκη στον οργανισμό. Επίσης, ορισμένη ποσότητα γλυκόζης μετατρέπεται σε λίπη ενώ άλλη ποσότητα μέσω καταβολικών διεργασιών αντιδρά με ενώσεις που περιέχουν άζωτο και σχηματίζονται τα αμινοξέα, τα οποία είναι οι δομικές μονάδες των πρωτεϊνών, οι οποίες αποτελούν ένα μεγάλο μέρος του σώματος των ζώων.

Ο ανθρώπινος οργανισμός αλλά και τα περισσότερα θηλαστικά δεν διαθέτουν τα απαραίτητα ένζυμα για την πέψη της κυτταρίνης. Επομένως ως διαιτητική πηγή υδατανθράκων χρησιμοποιούν το άμυλο. Αντίθετα τα μηρυκαστικά ζώα όπως είναι τα βοοειδή, φέρουν στο στομάχι τους μικροοργανισμούς οι οποίοι είναι ικανοί να διασπάσουν την κυτταρίνη σε γλυκόζη. Επομένως όταν το κρέας αυτών των ζώων χρησιμοποιείται ως τροφή από τον άνθρωπο, η αποθηκευμένη ενέργεια της κυτταρίνης μεταφέρεται έμμεσα μέσω της βιολογικής αλυσίδας.

3.1. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ

3.1.1. Μονοσακχαρίτες

Οι υδατάνθρακες γενικά ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες, στους απλούς και στους σύνθετους. Απλά σάκχαρα ή *μονοσακχαρίτες* είναι υδατάνθρακες όπως η D-γλυκόζη και η D-φρουκτόζη, τα οποία δεν μπορούν να υδρολυθούν σε μικρότερα μόρια.

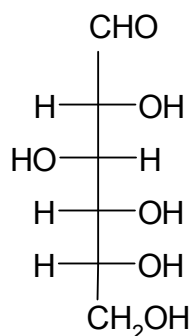
Η D-γλυκόζη είναι ο κύριος υδατάνθρακας στο ανθρώπινο σώμα, αν και με αυτή τη μορφή καταναλώνεται σε μικρή ποσότητα. Προέρχεται κυρίως από τη διάσπαση του αμύλου και έχει την ιδιότητα να στρέφει το επίπεδο του πολωμένου φωτός δεξιόστροφα. Η D-φρουκτόζη έχει τον ίδιο μοριακό τύπο με την γλυκόζη, αλλά τα μόριά της στρέφουν το επίπεδο του πολωμένου φωτός αριστερόστροφα. Οι πεντόζες, ριβόζη και δεοξυριβόζη αν και δεν λαμβάνονται μέσω της τροφής σε αυτή τη μορφή, αποτελούν κύρια συστατικά των νουκλεϊνικών οξέων.

Εκτός από τους μονοσακχαρίτες υπάρχουν οι δισακχαρίτες και οι πολυσακχαρίτες. Δισακχαρίτες ονομάζονται οι υδατάνθρακες οι οποίοι

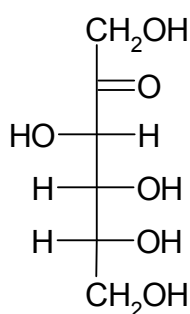
υδρολύονται σε δύο μόρια μονοσακχαριτών, ενώ πολυσακχαρίτες ονομάζονται οι υδατάνθρακες οι οποίοι υδρολύονται σε πολλά μόρια μονοσακχαριτών. Η υδρόλυση των πολυσακχαριτών πραγματοποιείται σε όξινες συνθήκες. Οι σύνθετοι υδατάνθρακες αποτελούνται από δύο ή περισσότερα απλά σάκχαρα που είναι ενωμένα μεταξύ τους. Η σουκρόζη, για παράδειγμα, η οποία αποτελείται από ένα μόριο D-φρουκτόζης και ένα μόριο D-γλυκόζης είναι ένας *δισακχαρίτης*. Η σουκρόζη στρέφει το επίπεδο του πολωμένου φωτός δεξιόστροφα. Όταν υδρολυθεί στα μόρια από τα οποία αποτελείται το μίγμα το οποίο προκύπτει ονομάζεται «ιμβερτοποιημένο διάλυμα» επειδή στρέφει το επίπεδο του πολωμένου φωτός αριστερά. Η λακτόζη είναι ένας *δισακχαρίτης* ο οποίος αποτελείται από γλυκόζη και γαλακτόζη. Επειδή η λακτόζη βρίσκεται στο γάλα, απαντά μόνο στα θηλαστικά. Η μαλτόζη αποτελείται από δύο μόρια γλυκόζης και σχηματίζεται κατά τη διάσπαση του αμύλου.

Ομοίως, η κυτταρίνη η οποία αποτελείται από πολλές εκατοντάδες μόρια γλυκόζης ενωμένα μεταξύ τους είναι ένας *πολυσακχαρίτης*. Ένας άλλος σημαντικός πολυσακχαρίτης είναι το άμυλο. [13,14]

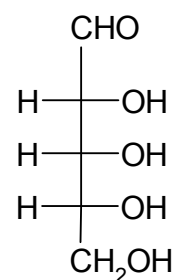
Οι μονοσακχαρίτες ταξινομούνται περαιτέρω σε *αλδόζες* και *κετόζες*. Αλδόζες ονομάζονται όταν στο μόριο τους περιέχουν αλδεϋδική ομάδα, ενώ κετόζες ονομάζονται όταν περιέχουν κετονομάδα. Η κατάληξη *-όζη* και στις δύο περιπτώσεις υποδηλώνει την κατηγορία των υδατανθράκων. Επιπλέον ένας μονοσακχαρίτης ονομάζεται *τριόζη*, *τετρόζη*, *πεντόζη*, *εξόζη*, ανάλογα με τον αριθμό ατόμων άνθρακα που περιέχει. Οι περισσότεροι από τους μονοσακχαρίτες που υπάρχουν στη φύση είναι πεντόζες και εξόζες. Τρία παραδείγματα μονοσακχαριτών φαίνονται στο σχήμα 1.



D-Γλυκόζη
(αλδοεξόζη)



D-Φρουκτόζη
(κετοεξόζη)



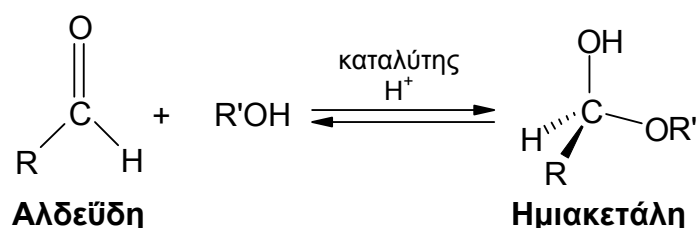
D-Ριβόζη
(αλδοπεντόζη)

Σχήμα 1. Τρεις διαφορετικοί τύποι μονοσακχαριτών

- **Υδατάνθρακες κυκλικής δομής**

Οι μονοσακχαρίτες στην φύση υπάρχουν σαν κυκλικά ή ανοικτής αλυσίδας μόρια συνήθως σε αναλογία 99/1.[15] Η κυκλική δομή τους συχνά αποτελεί πρόβλημα για την ανάπτυξη μεθόδων ανίχνευσης με αντιδράσεις παραγωγίσης.

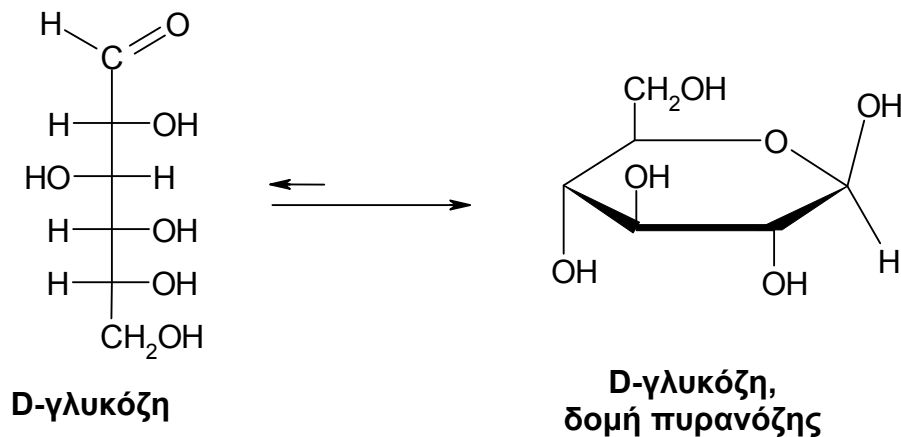
Η κυκλική δομή των υδατανθράκων οφείλεται στην ύπαρξη υδροξυλομάδων και αλδεϋδομάδας στο ίδιο μόριο. Οι αλκοόλες γενικά όταν αντιδράσουν με ένα μόριο αλδεϋδης ή κετόνης, μέσω μιας αντιστρεπτής πυρηνόφιλης προσθήκης, σχηματίζουν ημιακετάλες σύμφωνα με την αντίδραση:



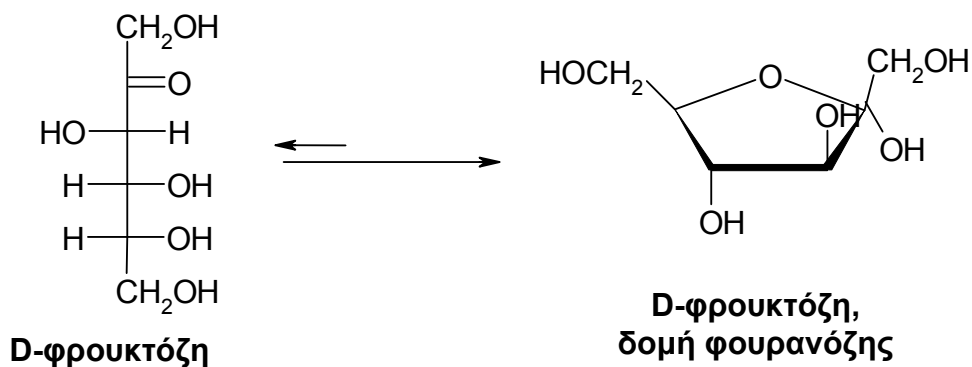
Σχήμα 2. Σχηματισμός ημιακετάλης

Εάν η υδροξυλομάδα και η καρβονυλομάδα βρίσκονται στο ίδιο μόριο, μπορεί να γίνει μια ενδομοριακή πυρηνόφιλη προσθήκη, προς σχηματισμό μιας κυκλικής ημιακετάλης. Με αυτό τον τρόπο μπορεί να σχηματιστεί ένας πενταμελής δακτύλιος *φουρανόζης*, ή ένας πιο σταθερός εξαμελής δακτύλιος *πυρανόζης*. Οι πενταμελείς και οι εξαμελείς δακτύλιοι που σχηματίζονται είναι ιδιαίτερα σταθερά μόρια και γι' αυτό το λόγο οι υδατάνθρακες βρίσκονται σε κατάσταση ισορροπίας μεταξύ των δομών της ανοικτής και της κλειστής αλυσίδας. Έτσι, για παράδειγμα, στη D-γλυκόζη το οξυγόνο του υδροξυλίου το οποίο βρίσκεται στον C-5 της ανθρακικής αλυσίδας αντιδρά με την αλδεϋδομάδα η οποία βρίσκεται στον C-1 και σχηματίζεται ο κυκλικός εξαμελής δακτύλιος όπως φαίνεται στο σχήμα 3. Η φρουκτόζη σχηματίζει κατά 80% την πυρανοζικό δακτύλιο και κατά 20% τον φουρανοζικό δακτύλιο ο

οποίος σχηματίζεται με αντίδραση μεταξύ του υδροξυλίου του C-5 και του C-2 στον οποίο βρίσκεται το καρβονύλιο όπως φαίνεται στο σχήμα 4. Η συγκέντρωση της δομής ανοικτής αλυσίδας των υδατανθράκων είναι πολύ μικρή (πολλές φορές είναι μικρότερη του 0,5%). Σε αντιδράσεις όπου απαιτούνται ανοικτής μορφής σάκχαρα η ισορροπία εύκολα μετατίθεται προς αυτά αφού όσο γρήγορα καταναλώνονται τόσο γρήγορα αναπληρώνονται.



Σχήμα 3. Η γλυκόζη στην κυκλική δομή πυρανόζης



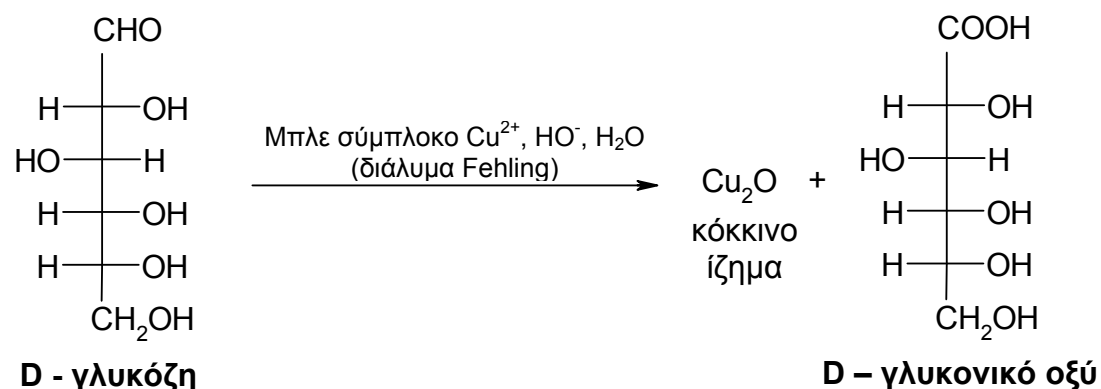
Σχήμα 4. Η φρουκτόζη στην κυκλική δομή φουρανόζης

Όταν οι υδατάνθρακες ενώνονται μεταξύ τους για να σχηματίσουν δισακχαρίτες ή πολυσακχαρίτες, βρίσκονται πάντα στην κυκλική τους μορφή.[13]

Τα σάκχαρα επιπλέον ταξινομούνται σε αναγωγικά και μη-αναγωγικά. Η ιδιότητα αυτή των υδατανθράκων είναι αυτή που θα μας απασχολήσει περισσότερο στην ανάπτυξη μεθοδολογίας ανίχνευσης των σακχάρων. Ως

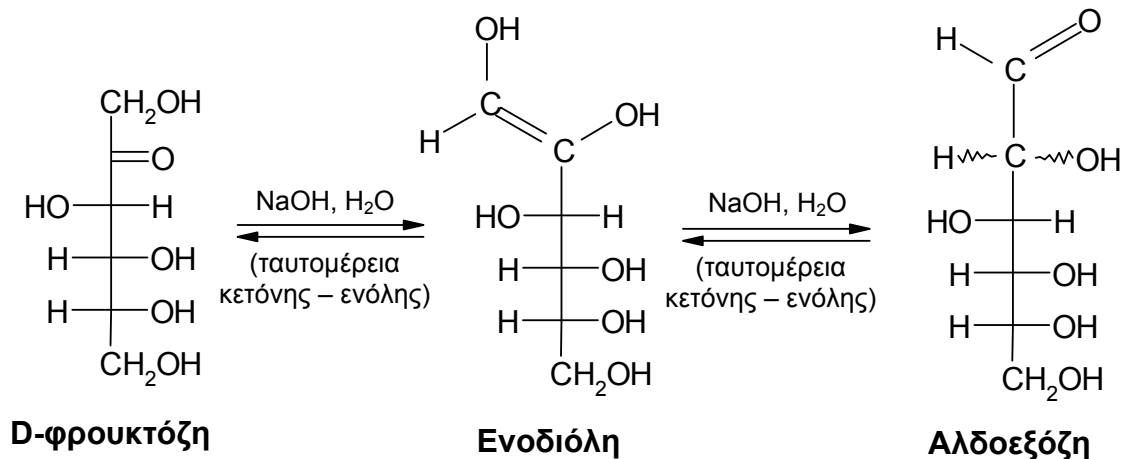
αναγωγικά χαρακτηρίζονται εκείνα τα οποία ανάγουν το αντιδραστήριο Fehling (Cu^{2+} σε υδατικό διάλυμα τρυγικού νατρίου), το αντιδραστήριο Benedict (Cu^{2+} σε υδατικό διάλυμα κιτρικού νατρίου) ή το αντιδραστήριο Tollens (Ag^+ σε υδατικό διάλυμα αμμωνίας). Κατά την αναγωγή των αντιδραστηρίων αυτών σχηματίζεται το οξειδωμένο σάκχαρο, ενώ τα μεταλλοϊόντα ανάγονται όπως φαίνεται στα σχήματα 5 και 7. Κατά την οξείδωση των σακχάρων οι αλδόζες μετατρέπονται σε αλδονικά οξέα. Εάν η οξείδωση γίνει με το αντιδραστήριο Tollens εναποτίθεται μεταλλικός άργυρος στα τοιχώματα του δοκιμαστικού σωλήνα με αποτέλεσμα να σχηματίζεται καθρέπτης. Εάν η οξείδωση πραγματοποιηθεί με το αντιδραστήριο Fehling ή το αντιδραστήριο Benedict καθιζάνει κόκκινο ίζημα Cu_2O . Εκτός από τις αλδόζες, τα αντιδραστήρια αυτά ανάγονται και από τις κετόζες.[15]

Οι αλδόζες και οι κετόζες ανάγουν τα αντιδραστήρια Fehling και Tollens. Οι αλδόζες, όπως όλες οι αλδεΐδες, είναι δυνατόν να οξειδωθούν και να σχηματίσουν το αντίστοιχο αλδονικό οξύ, όπως φαίνεται στο σχήμα 5.



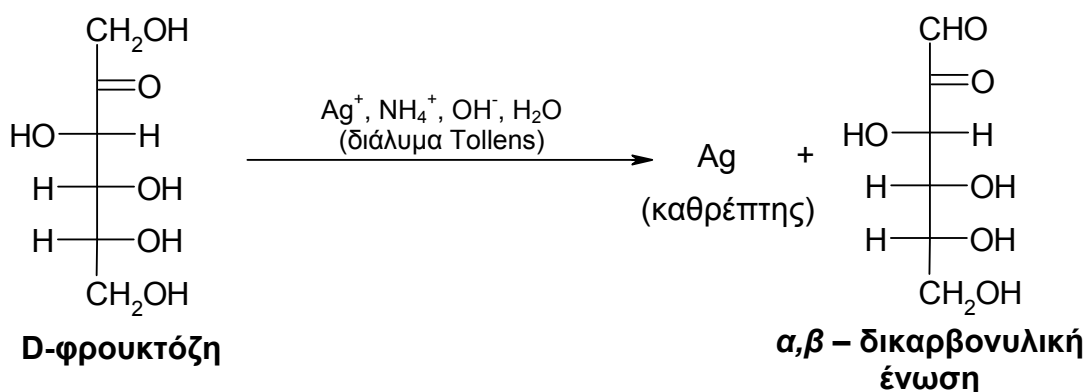
Σχήμα 5. Οξείδωση των αναγωγικών σακχάρων από το διάλυμα Fehling

Ανάλογα οξειδώνονται και οι κετόζες, οι οποίες όμως δεν περιέχουν αλδεΐδομάδα, και από τα δύο αντιδραστήρια σύμφωνα με το σχήμα 7. Αυτό συμβαίνει με τις κετόζες γιατί σε βασικό περιβάλλον ισομερίζονται ταχύτατα προς τις ανάλογες αλδόζες, μέσω μιας ακολουθίας αντιδράσεων ταυτομερείωσης κετόνης-ενόλης, όπως φαίνεται στο σχήμα 6.



Σχήμα 6. Βασικώς καταλυόμενη ταυτομερείωση κετόνης-ενόλης μέσω της οποίας η φρουκτόζη μετατρέπεται σε αναγωγικό σάκχαρο

Λόγω της ταυτομέρειας αυτής οι κετόζες μετατρέπονται σε α,β -δικαρβονυλικές ενώσεις όπως φαίνεται στο σχήμα 7.[13]

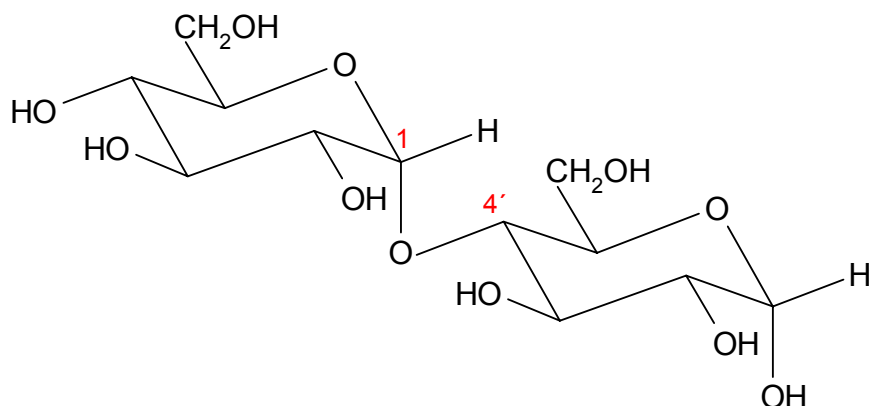


Σχήμα 7. Οξειδωση των αναγωγικών σακχάρων από το διάλυμα Tollens

3.1.2. Δισακχαρίτες

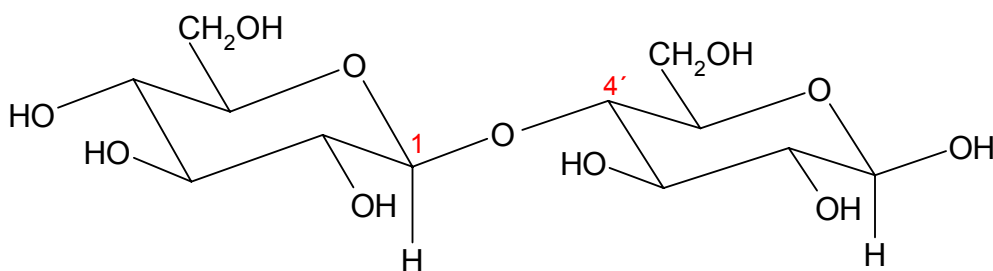
Οι δισακχαρίτες περιέχουν έναν γλυκοζιτικό ακεταλικό δεσμό ανάμεσα στο C1 του ενός σακχάρου και μια ομάδα -OH σε οποιαδήποτε πιθανή θέση του άλλου σακχάρου. Συνήθως ο γλυκοζιτικός δεσμός σχηματίζεται ανάμεσα στον C1 του πρώτου σακχάρου και στο -OH που βρίσκεται στο C4 του άλλου σακχάρου. Αυτού του είδους ο δεσμός ονομάζεται 1,4' δεσμός. Ο τόνος πάνω στο 4 υποδηλώνει ότι ο C4 βρίσκεται σε διαφορετικό σάκχαρο από το C1.

Ο γλυκοζιτικός δεσμός μπορεί να είναι είτε α είτε β τύπου. Η μαλτόζη, είναι ένας δισακχαρίτης ο οποίος αποτελείται από δύο D-γλυκοπυρανόζες συνδεδεμένες με έναν 1,4'- α -γλυκοζιτικό δεσμό όπως φαίνεται στο σχήμα 8.



Σχήμα 8. Μαλτόζη, [4-O-(α -D-γλυκοπυρανοζυλο)- α -D-γλυκοπυρανόζη

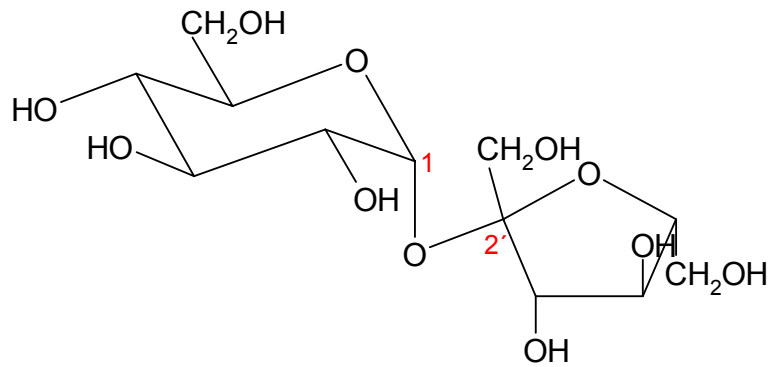
Η κελλοβιόζη αποτελείται από δύο μόρια D-γλυκοπυρανόζης συνδεδεμένα με έναν 1,4'- β -γλυκοζιτικό δεσμό όπως φαίνεται στο σχήμα 9.



Σχήμα 9. Κελλοβιόζη, [4-O-(β -D-γλυκοπυρανοζυλο)- β -D-γλυκοπυρανόζη

Οι δύο αυτοί πολυσακχαρίτες είναι αναγωγικά σάκχαρα αφού οι ανωμερικοί άνθρακες που βρίσκονται στο δεξιό τμήμα τους έχουν ημιακεταλικές ομάδες. Επομένως βρίσκονται σε ισορροπία με τις αλδεϋδικές δομές ανοικτής αλυσίδας, αντίστοιχα με τους μονοσακχαρίτες, οι οποίες μπορούν να ανάγουν τα αντιδραστήρια Fehling και Tollens.

Η σακχαρόζη, η γνωστή ζάχαρη, είναι η πιο διαδεδομένη οργανική ένωση σε όλο τον κόσμο. Η σακχαρόζη είναι ένας δισακχαρίτης ο οποίος αποτελείται από ένα ισοδύναμο γλυκόζης και ένα ισοδύναμο φρουκτόζης και είναι ένας 1,2'-γλυκοζίτης. Η δομή της φαίνεται στο σχήμα 10.



Σχήμα 10. Σακχαρόζη, [2-O-(α-D-γλυκοπυρανοζυλο)-β-D-φρουκτοπυρανόζη
 Η σακχαρόζη δεν είναι αναγωγικό σάκχαρο γιατί δεν περιέχει στο μόριό της ημιακεταλική ομάδα. Είναι από τους λίγους δισακχαρίτες που δεν είναι αναγωγικός.[13]

3.1.1. Πολυσακχαρίτες

Οι πολυσακχαρίτες είναι ενώσεις οι οποίες οικοδομούνται από πολλές δεκάδες, εκατοντάδες ή ακόμα και χιλιάδες μονάδες μονοσακχαριτών ανά μόριο, τα οποία ενώνονται μεταξύ τους με γλυκοζιτικούς δεσμούς. Είναι φυσικά πολυμερή, τα οποία προκύπτουν από τις αλδόζες με πολυμερισμό, με ταυτόχρονη απώλεια μορίων νερού. Οι πιο διαδεδομένοι πολυσακχαρίτες που υπάρχουν στη φύση είναι το άμυλο, το γλυκογόνο και η κυτταρίνη.

- **Άμυλο**

Το άμυλο περιέχεται σε μεγάλες ποσότητες στις πατάτες, το καλαμπόκι και τα δημητριακά. Είναι πολυμερές το οποίο αποτελείται από μονομερή γλυκόζης ενωμένα μεταξύ τους με 1,4-α-γλυκοζιτικούς δεσμούς. Περιέχει ένα υδατοδιαλυτό κλάσμα το οποίο ονομάζεται αμυλόζη (20%) και ένα αδιάλυτο στο νερό κλάσμα (80%) το οποίο ονομάζεται αμυλοπηκίνη.

Η αμυλόζη αποτελείται από πολλά μόρια D-(+)-γλυκόζης τα οποία ενώνονται μεταξύ τους με 1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς. Η αμυλοπηκίνη αποτελείται επίσης από πολλές μονάδες D-(+)-γλυκόζης οι οποίες εκτός από 1,4-α-γλυκοζιτικούς δεσμούς, σχηματίζουν και 1,6-α-γλυκοζιτικούς δεσμούς. Οι 1,6-α-γλυκοζιτικοί απαντούν ανά 25 περίπου μονάδες γλυκόζης και

αποτελούν διακλαδώσεις στο μόριο. Η δομή δηλαδή της αμυλοπηκτίνης είναι διακλαδισμένη, σε αντίθεση με τις δομές της κυτταρίνης και της αμυλόζης οι οποίες είναι ευθύγραμμες αλυσίδες.[14]

- **Γλυκογόνο**

Το γλυκογόνο είναι ένας ζωικός πολυσακχαρίτης ο οποίος αποτελείται από περίπου 100.000 μονάδες γλυκόζης. Ο ρόλος του είναι να αποθηκεύει ενέργεια. Οι υδατάνθρακες που δεν καταναλώνονται άμεσα από τον οργανισμό μετατρέπονται σε γλυκογόνο και φυλάσσονται για μεγάλο χρονικό διάστημα. Το γλυκογόνο όπως και η αμυλοπηκτίνη, έχει διακλαδισμένη δομή η οποία περιέχει 1,4 και 1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς. [14]

- **Κυτταρίνη**

Η κυτταρίνη είναι το κύριο συστατικό των ξύλων και των φυτικών ινών. Γενικότερα προσδίδει σκληρότητα και μηχανική αντοχή στους φυσικούς ιστούς. Είναι αδιάλυτη στο νερό και άγευστη. Αποτελείται από μερικές χιλιάδες μονάδες D-(+)-γλυκόζης συνδεδεμένες μεταξύ τους με 1,4-β-γλυκοζιτικούς δεσμούς. Πολλά μόρια κυτταρίνης αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και σχηματίζουν ένα συσσωμάτωμα. [14]

3.2. ΑΞΙΑ ΤΩΝ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ

3.2.1. Οι υδατάνθρακες στα τρόφιμα

Οι υδατάνθρακες αποτελούν τα τρία τέταρτα του καθαρού βάρους όλων των φυτών της γης καθώς και των θαλάσσιων φυκών. Απαντούν στα δημητριακά, τα λαχανικά, τα φρούτα και σε άλλα μέρη των φυτών που καταναλώνονται από τον άνθρωπο. Είναι φυσικό να επιλέγονται από τον άνθρωπο για κατανάλωση, τα φυτά εκείνα τα οποία είναι πλούσια σε υδατάνθρακες που μεταβολίζονται όπως είναι η σουκρόζη και το άμυλο. Πρέπει να σημειωθεί, όμως, ότι οι πολυσακχαρίτες οι οποίοι δε αφομοιώνονται από τον οργανισμό, υπάρχουν κυρίως στις φλούδες των

φρούτων. Η κατανάλωση φρούτων δρα ευεργετικά για την καλή λειτουργία του εντέρου.

Η γλυκόζη υπάρχει άφθονη στα φρούτα, στο γλυκό καλαμπόκι, στο μέλι και σε ορισμένους βολβούς. Είναι το κύριο προϊόν που σχηματίζεται από την υδρόλυση των σύνθετων υδατανθράκων κατά τη διαδικασία της πέψης και είναι το είδος του σακχάρου που υπάρχει στο αίμα υπό κανονικές συνθήκες. Οξειδώνεται στα κύτταρα για να δώσει ενέργεια και αποθηκεύεται στο συκώτι και στους μυς με τη μορφή γλυκογόνου. Υπό φυσιολογικές συνθήκες το κεντρικό νευρικό σύστημα χρησιμοποιεί μόνο γλυκόζη σαν κύρια πηγή κατανάλωσης ενέργειας.

Η φρουκτόζη βρίσκεται μαζί με τη γλυκόζη και τη σουκρόζη στο μέλι και στα φρούτα. Είναι το σάκχαρο με τη μεγαλύτερη γλυκύτητα. Μεγάλες ποσότητες φρουκτόζης μπορούν να παρασκευαστούν, με σχετικά μικρό κόστος, από το άμυλο και γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιείται στο εμπόριο ως γλυκαντικό. Στα αναψυκτικά, για παράδειγμα, χρησιμοποιείται για γλυκαντικό σχεδόν αποκλειστικά η φρουκτόζη. Η γαλακτόζη δεν υπάρχει ελεύθερη στη φύση αλλά παράγεται από την λακτόζη (σάκχαρο του γάλακτος) με υδρόλυση κατά την διαδικασία της πέψης.[16]

3.2.2 Οι υδατάνθρακες στον οργανισμό

Οι υδατάνθρακες είναι η κατηγορία ενώσεων που υπάρχουν σε πολύ μεγάλο ποσοστό μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό. Η κύρια λειτουργία τους είναι να παρέχουν ενέργεια. Το μεγαλύτερο μέρος της ενέργειας που καταναλώνουμε για να ζούμε είναι υπό τη μορφή υδατανθράκων. Το 80% της θερμιδικής πρόσληψης από τον άνθρωπο είναι υδατάνθρακες.

Οι υδατάνθρακες για να απορροφηθούν από τον οργανισμό πρέπει να υδρολυθούν στους μονοσακχαρίτες από τους οποίους αποτελούνται. Έτσι κατανέμονται στα κύτταρα αρχικά με την μορφή της γλυκόζης μαζί με μικρές ποσότητες από άλλους μονοσακχαρίτες. Η φρουκτόζη και η γαλακτόζη μετατρέπονται σε γλυκόζη στο συκώτι. Ένα μεγάλο ποσοστό της γλυκόζης οξειδώνεται μέσω του κύκλου του κιτρικού οξέος έτσι ώστε να ικανοποιήσει τις ενεργειακές ανάγκες όλων των ιστών του οργανισμού. Ένα άλλο ποσοστό της

γλυκόζης μετατρέπεται σε άλλους απαραίτητους μονοσακχαρίτες, όπως η ριβόζη και η φρουκτόζη, καθώς και σε πρόδρομες ενώσεις των αμινοξέων. Η περίσσεια των υδατανθράκων μετατρέπεται σε γλυκογόνο ή σε λιπαρά οξέα.[16,17]

Το επίπεδο της γλυκόζης στο αίμα διατηρείται σε φυσιολογικά επίπεδα μέσω της απελευθέρωσης της γλυκόζης από το γλυκογόνο που αποθηκεύεται στο συκώτι. Όταν είναι απαραίτητο, η γλυκόζη μπορεί να παραχθεί στο συκώτι μέσω της διαδικασίας της γλυκονεογένεσης, κατά την οποία βιοσυντίθεται από μη υδατανθρακικές ανθρακικές αλυσίδες, όπως των λιπαρών οξέων ή των αμινοξέων. Το επίπεδο της γλυκόζης στο αίμα διατηρείται σταθερό και ίσο με 70-100mg/100ml.[16]

3.3. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ

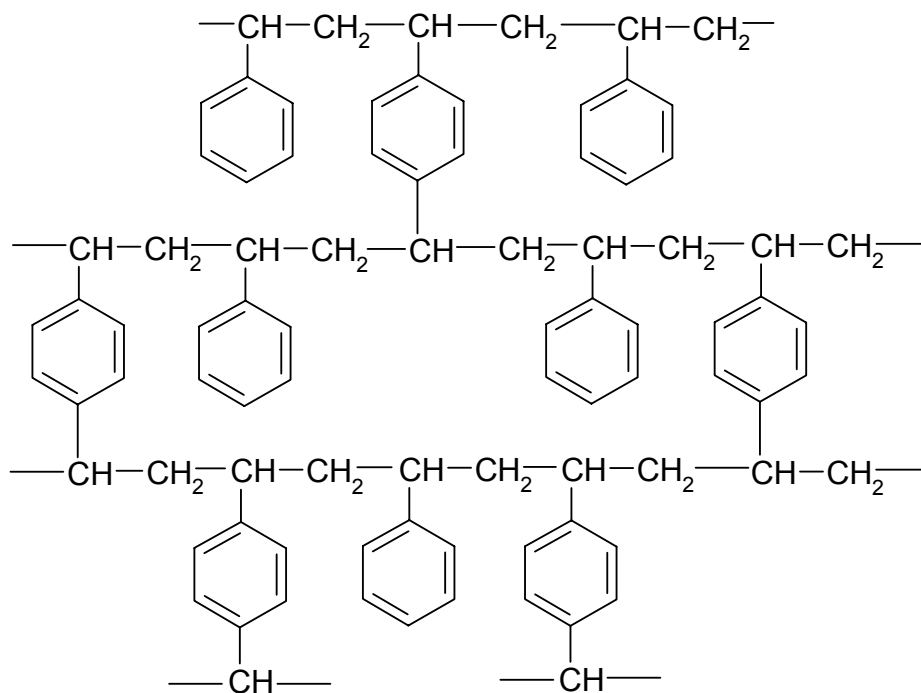
3.3.1. Διαχωρισμός των υδατανθράκων

Οι υδατάνθρακες είναι μια πολύ περίπλοκη κατηγορία ενώσεων γιατί αποτελείται από πολλά διαφορετικά είδη μορίων. Οι μονοσακχαρίτες αποτελούνται από αλδόζες, κετόζες, αλδιτόλες, αλδονικά οξέα, ουρονικά οξέα, αλδαρικά οξέα κ.α. Κάθε κατηγορία από αυτές χωρίζεται σε υποκατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό των ανθράκων, ενώ κάθε υποκατηγορία περιλαμβάνει διαφορετικά ισομερή. Οι ολιγο- και οι πολυσακχαρίτες αποτελούνται από διαφορετικό συνδυασμό μονοσακχαριτών που είναι ενωμένοι μεταξύ τους με διαφορετικό είδος δεσμών. Λόγω αυτών των διαφορών δεν υπάρχει μία γενική μέθοδος προσδιορισμού όλων των σακχάρων.[18]

Η υγρή χρωματογραφία είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη τεχνική για το διαχωρισμό και την ανάλυση μιγμάτων μονοσακχαριτών και ολιγοσακχαριτών.[19] Πολλές χρωματογραφικές τεχνικές αναπτύχθηκαν αποκλειστικά για τα σάκχαρα και τις συγγενείς τους ενώσεις. Τέτοιες είναι οι χρωματογραφίες υδρόφιλης αλληλεπίδρασης, η αντίστροφης φάσης και η ανιονανταλλακτική σε υψηλό pH.[20]

Μια τεχνική διαχωρισμού με υψηλή ευαισθησία είναι η ανιονανταλλακτική χρωματογραφία σε υψηλό pH. Αυτή η κατηγορία διαχωρισμού χρησιμοποιεί έναν επιφανειακό πορώδη ανιονανταλλάκτη του οποίου οι λειτουργικές

ομάδες συνήθως είναι τεταρτοταγείς αμινομάδες. Υπάρχουν όμως και άλλου είδους ιονανταλλακτικές στήλες για το διαχωρισμό των σακχάρων, όπως είναι αυτές που έχουν ως πληρωτικό υλικό οργανικά πολυμερή. Μια τέτοια στήλη είναι αυτή που έχει ως στατική φάση ένα συμπολυμερές στυρενίου-διβινυλοβενζολίου πάνω στο οποίο είναι προσκολλημένες είτε θετικά φορτισμένες ομάδες τριμεθυλαμμωνίου είτε αρνητικά φορτισμένες σουλφονικές ομάδες. Μία τέτοια στήλη κατασκευάζεται μέσω ριζικού πολυμερισμού μονομερών στυρενίου και 1,4-διβινυλοβενζολίου.[20] Υπάρχουν διασταυρούμενες συνδέσεις μεταξύ των δύο πολυμερών και όσο περισσότερες είναι αυτές τόσο καλύτερος είναι ο διαχωρισμός. Το πολυμερές υλικό φαίνεται στο σχήμα 11.



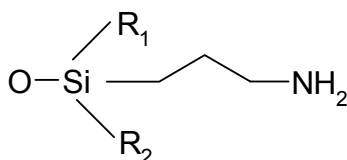
Σχήμα 11. Πολυμερές στυρενίου-διβινυλοβενζολίου με διακλαδούμενες διασυνδέσεις

Ορισμένες εμπορικά διαθέσιμες στήλες που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία και χρησιμοποιούνται στην ανίχνευση των υδατανθράκων είναι οι:

- RCX-30, Hamilton
- HC-75, Hamilton
- CarboPac, Dionex

Η κινητή φάση που χρησιμοποιείται είναι βασικό διάλυμα, συνήθως NaOH, εάν πρόκειται για ανιονανταλλακτική στήλη ενώ ως κινητή φάση στις κατιονανταλλακτικές στήλες χρησιμοποιείται νερό .

Εάν δεν απαιτείται πολύ υψηλή ευαισθησία, όπως για παράδειγμα σε αναλύσεις δειγμάτων σακχάρων σε τρόφιμα, η χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης είναι η καλύτερη επιλογή. Σε αυτή τη κατηγορία χρωματογραφίας χρησιμοποιείται μία πολική πορώδης στατική φάση με κινητή φάση ακετονιτρίλιο-νερό με υψηλή περιεκτικότητα σε ακετονιτρίλιο (70-80%). Αύξηση της συγκέντρωσης του νερού προκαλεί μείωση στο χρόνο κατακράτησης. Η πιο συνήθης στατική φάση της χρωματογραφίας υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων είναι σίλικα η οποία έχει χημικά προσδεσμένες πρότυλοαμινο ομάδες και η οποία απεικονίζεται στο σχήμα 12.[21]



Σχήμα 12. Σίλικα προσδεσμένη με αμινοπροπυλ-ομάδες

Οι υδατάνθρακες απαντούν σε δύο ανωμερικές μορφές οι οποίες αλληλομετατρέπονται. Η κινητική αυτής της μετατροπής όμως είναι αργή σε όξινο ή ουδέτερο pH. Ο διαχωρισμός των δύο αυτών ανωμερικών μορφών είναι εύκολος με χρωματογραφία HPLC και επομένως κάθε σάκχαρο που αναλύεται μπορεί να δώσει δύο κορυφές οφειλόμενες στα ανωμερή, κάτι το οποίο δεν είναι επιθυμητό αφού περιπλέκει το χρωματογράφημα. Αντίθετα, σε αλκαλικό περιβάλλον η ταχύτητα της αλληλομετατροπής των δύο ανωμερών αυξάνεται σημαντικά και οι δύο ανωμερικές κορυφές ενώνονται σε μία. Επομένως η άμινο-αλκυλιωμένη σίλικα η οποία παρέχει αυτό το βασικό περιβάλλον έχει ένα σημαντικό πλεονέκτημα για την ανάλυση των υδατανθράκων έναντι των άλλων στατικών φάσεων. Οι στήλες αυτές, όμως, έχουν και ένα σημαντικό μειονέκτημα. Η υψηλή συγκέντρωση των αμινομάδων (1 mol/L) στους πόρους της κινητής φάσης παρέχει ένα ισχυρά αλκαλικό περιβάλλον, στο οποίο όμως η σίλικα καταστρέφεται αργά. Αυτή η

διάλυση σχηματίζει όξινες σιλανόλες οι οποίες αλλάζουν τοπικά το pH, ενώ ταυτόχρονα διασπώνται οι αμινοπροπυλο ομάδες. Επομένως, η στατική φάση δεν έχει την αρχική της σύσταση και αυτό επιδρά στην ποιότητα του διαχωρισμού. Γι' αυτό, οι εμπορικά διαθέσιμες αμινοαλκυλιωμένες στήλες τα τελευταία χρόνια είναι σταθεροποιημένες ώστε να μην διαλύεται η síλικά.[20] Στήλες αυτής της κατηγορίας που χρησιμοποιούνται για τον διαχωρισμό των υδατανθράκων είναι οι:

- PRP-X700, Hamilton
- Supercosil LC-NH₂, Supelco
- Alltech Amino, Alltech

Και οι τρεις παραπάνω τύποι χρησιμοποιούν ως κινητή φάση CH₃CN:H₂O με μεγάλη περιεκτικότητα σε CH₃CN.

Μία μέθοδος που εφαρμόστηκε σε σχεδόν όλες τις ομάδες των μονο- και πολυσακχαριτών είναι η ανιοανταλλακτική χρωματογραφία με σύμπλοκα βορίου. Η κινητή φάση της μεθόδου είναι ρυθμιστικό διάλυμα βορικών ιόντων με pH 8-10, οπότε τα σάκχαρα ανιχνεύονται ως σύμπλοκα του βορίου. Ένα μειονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι προκαλεί πλάτυνση των κορυφών του χρωματογραφήματος λόγω της συνεχούς απόσπασης των συμπλόκων που δημιουργούνται, κατά την έκλουση.[22]

3.3.2. Ανίχνευση των υδατανθράκων

Η ανίχνευση των σακχάρων τα οποία διαχωρίζονται με την υγρή χρωματογραφία γίνεται βάση των οπτικών ή των ηλεκτροχημικών τους ιδιοτήτων.

Συνήθως χρησιμοποιούνται οι ανιχνευτές δείκτη διάθλασης ή απορρόφησης στο υπεριώδες.[23] Ο διαφορικός ανιχνευτής του δείκτη διάθλασης παρακολουθεί τις διαφορές στο δείκτη διαθλάσεως του υγρού έκλουσης οι οποίες προκαλούνται από την παρουσία των προς ανάλυση ουσιών. Το μεγάλο πλεονέκτημα του ανιχνευτή είναι ότι αποκρίνεται σε όλες σχεδόν τις ενώσεις. Έχει όμως και πολλά μειονεκτήματα όπως είναι:

1. Μικρή ευαισθησία (αποκρίνεται σε διαλύματα συγκεντρώσεων 1-10μg/ml).[24]
2. Μικρή επιλεκτικότητα. Για το λόγο αυτό το προς ανάλυση δείγμα θέλει επεξεργασία ώστε να καθαριστεί πολύ καλά πριν την εισαγωγή του στο χρωματογραφικό σύστημα.
3. Ακαταλληλότητα όταν πρόκειται για μεθόδους που απαιτούν βαθμιδωτή έκλουση, αφού αλλάζοντας η σύσταση της κινητής φάσης, αλλάζει και ο δείκτης διάθλασής της.
4. Μεγάλη ευαισθησία σε μεταβολές της θερμοκρασίας, της πίεσης που αναπτύσσεται στο χρωματογραφικό σύστημα, καθώς και της ταχύτητας ροής. Αυτές οι φυσικές παράμετροι θα πρέπει να διατηρούνται σταθερές προκειμένου να μην αυξάνεται ο θόρυβος.

Η ανίχνευση των σακχάρων με τον ανιχνευτή απορρόφησης στο υπεριώδες γίνεται στα 190 nm. Ο ανιχνευτής αυτός παρουσιάζει:

1. Μεγαλύτερη ευαισθησία από αυτήν του διαφορικού ανιχνευτή του δείκτη διάθλασης (αποκρίνεται σε διαλύματα συγκεντρώσεων 0,01μg/ml).[25]
2. Καταλληλότητα για μεθόδους που απαιτούν βαθμιδωτή έκλουση.
3. Σταθερότητα σε μεταβολές της θερμοκρασίας, της πίεσης και της ταχύτητας ροής.
4. Ασθενή απορρόφηση στο μήκος κύματος ανίχνευσης των σακχάρων. Τυχόν ακαθαρσίες του διαλύματος ή του διαλύτη ίσως απορροφούν (εάν έχουν χρωμοφόρο ομάδα), επηρεάζοντας την ανίχνευση. Επομένως το προς ανάλυση δείγμα θα πρέπει να είναι απολύτως καθαρό.

Στην ανίχνευση σακχάρων ένας άλλος συχνά χρησιμοποιούμενος ανιχνευτής είναι ο αμπερομετρικός ανιχνευτής. Η ηλεκτροχημική ανίχνευση σακχάρων η οποία γίνεται σε συγκεκριμένο δυναμικό έχει σαν αποτέλεσμα τη μόλυνση του ηλεκτροδίου εργασίας, εξαιτίας των ριζών που παράγονται κατά την οξειδωση των σακχάρων.[26] Έτσι η απόδοση του ανιχνευτή μειώνεται. Ο παλμικός αμπερομετρικός ανιχνευτής, ο οποίος χρησιμοποιείται ευρύτατα για την ανίχνευση των σακχάρων αντιμετωπίζει με επιτυχία αυτό το πρόβλημα. Τα σάκχαρα ανιχνεύονται μετρώντας το ρεύμα το οποίο δημιουργείται από την οξειδωσή τους στην επιφάνεια ενός ηλεκτροδίου χρυσού. Για να καθαριστεί το

ηλεκτρόδιο από τα προϊόντα της οξειδωσης αυξάνεται το δυναμικό που εφαρμόζεται στο ηλεκτρόδιο τόσο ώστε να οξειδωθεί η επιφάνεια του χρυσού. Αυτό όμως προκαλεί εκρόφηση των προϊόντων οξειδωσης των σακχάρων οπότε το ηλεκτρόδιο καθαρίζει. Τότε το δυναμικό του ηλεκτροδίου μειώνεται ώστε να αναχθεί η επιφάνεια του ηλεκτροδίου πάλι σε χρυσό. Συνολικά η παλμική αμπερομετρική ανίχνευση χρησιμοποιεί τρία δυναμικά. Το ρεύμα που προκαλείται από την οξειδωση των υδατανθράκων μετράται κατά την εφαρμογή του πρώτου δυναμικού.[25, 27,28,29] Η μέθοδος αυτή είναι μια πολύ ευαίσθητη μέθοδος ανίχνευσης με όριο ανίχνευσης περίπου 10 picomoles.[24]

Ένας άλλος ανιχνευτής ο οποίος χρησιμοποιείται σε συστήματα υγρής χρωματογραφίας για τον προσδιορισμό σακχάρων είναι ο ανιχνευτής σκέδασης του φωτός μετά από εξάτμιση του διαλύτη. Είναι ένας ανιχνευτής μάζας ο οποίος μετράει τη σκέδαση του φωτός που προκαλείται από μη πτητικούς αναλύτες.[30] Για να γίνει η σκέδαση του φωτός αρχικά το προς ανάλυση δείγμα εκνεφώνεται με τη βοήθεια αερίου. Στη συνέχεια απομακρύνεται από το εκνέφωμα η κινητή φάση, με εξάτμιση μέσα σε θάλαμο υψηλής θερμοκρασίας όπου τα σταγονίδια μετατρέπονται σε στερεά σωματίδια καθαρού αναλύτη. Τα σωματίδια αυτά σκεδάζουν το φως το οποίο εκπέμπεται από μια (πηγή ακτινοβολίας) ακτίνα laser.[31] Είναι μία αρκετά ευαίσθητη μέθοδος[32,33] για την ανίχνευση μη πτητικών ενώσεων, όπως είναι τα σάκχαρα, και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μεθόδους που περιλαμβάνουν βαθμιδωτή έκλυση, επηρεάζοντας σε μικρό βαθμό το σήμα υποβάθρου. Το μοναδικό μειονέκτημα του ανιχνευτή αυτού είναι ότι απαιτείται πλήρης εξάτμιση του διαλύτη. Έτσι η τυχόν παρουσία μη πτητικών ενώσεων θα δημιουργούσε αυξημένο σήμα υποβάθρου με αποτέλεσμα την μείωση της ευαισθησίας.[31]

Τέλος τα σάκχαρα μπορούν να ανιχνευτούν από έναν φασματογράφο μάζας με τον οποίο είναι δυνατή η ανίχνευση καθώς και η ανάλυση της δομής της ένωσης, εάν πρόκειται για ανάλυση πολυσακχαριτών. Βέβαια τα σάκχαρα τα οποία είναι πολικά, δεν ιονίζονται πολύ εύκολα, είναι θερμικά ασταθή και μη πτητικά. Για να ανιχνευτεί ένα σάκχαρο με τον φασματογράφο μάζας θα πρέπει να απαλλαγεί από την κινητή φάση και να μετατραπεί σε ιόν. Η σειρά με την οποία γίνονται οι δύο αυτές διεργασίες εξαρτάται από τη μέθοδο

ιονισμού που χρησιμοποιείται. Μία μέθοδος ιονισμού που συναντάται συχνά στα σάκχαρα είναι η μέθοδος χημικού ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό, η οποία είναι κατάλληλη για πολικά μόρια.[32, 33] Κατά τη μέθοδο αυτή αρχικά ιονίζεται το σάκχαρο με τη βοήθεια υψηλού δυναμικού, στη συνέχεια το δείγμα εκνεφώνεται και εξατμίζεται ο διαλύτης και τέλος τα ιόντα οδηγούνται στον τετραπολικό ανιχνευτή όπου ανιχνεύεται η μάζα τους. Ο ανιχνευτής αυτός έχει μεγάλη ευαισθησία, το όριο ανίχνευσής του είναι περίπου 0,1 ng,[24] και είναι κατάλληλος για βαθμιδωτή έκλυση. Το μοναδικό του μειονέκτημα είναι το πολύ υψηλό κόστος του.

Όλοι οι ανιχνευτές που αναφέρθηκαν παραπάνω είναι δυνατόν να ανιχνεύσουν τους υδατάνθρακες χωρίς αυτοί να υποστούν αντίδραση παραγωγής πριν ή μετά τη στήλη και να μετατραπούν σε κάποιο άλλο μόριο που φέρει (χαρακτηριστική) οπτικά ενεργή ομάδα.

Είναι επιθυμητό να αναπτυχθεί μία μέθοδος ανίχνευσης σακχάρων, με μεγάλη ευαισθησία και επιλεκτικότητα, η οποία να χρησιμοποιεί φωτομετρικούς και φθορισμομετρικούς ανιχνευτές οι οποίοι είναι ευρέως χρησιμοποιούμενοι. Η χρήση των ανιχνευτών αυτών σε συνδυασμό με την εφαρμογή αντιδράσεων που οδηγούν στο σχηματισμό οπτικώς ενεργών μορίων, μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του ορίου ανίχνευσης μίας μεθόδου. Αναπτύχθηκαν αρκετές μέθοδοι ανίχνευσης σακχάρων που στηρίζονται στον παραπάνω συνδυασμό, και οι οποίες αναπτύσσονται αναλυτικά στο επόμενο κεφάλαιο.

4. ΑΝΑΛΥΣΗ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ ΜΕ HPLC-PCD.

4.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΠΑΡΑΓΩΓΙΣΗΣ ΤΩΝ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ

Υπάρχουν πολλές μέθοδοι παραγωγής των σακχάρων, μετά την έξοδό τους από τη χρωματογραφική στήλη, με τις οποίες τα σάκχαρα μετατρέπονται σε ενώσεις τέτοιες ώστε να ανιχνεύονται φωτομετρικά, φθορισμομετρικά και ηλεκτροχημικά. Αρχικά, τα σάκχαρα μετατρέπονται συνήθως σε κάποια άλλη οργανική ένωση, όπως σε φουρφουράλες, σε φορμαλδεΐδη, σε γλυκαμίνες κ.α., και στη συνέχεια αντιδρούν με κάποιο χρωμοφόρο ή φθορίζον αντιδραστήριο. Επιπλέον μπορούν να αντιδράσουν με κάποιο αντιδραστήριο

και να σχηματίσουν προϊόντα τα οποία ανιχνεύονται φωτομετρικά ή φθορισμομετρικά.

4.1.1 Μετατροπή των υδατανθράκων σε φουρφουράλες

Μια σημαντική μέθοδος ανίχνευσης των σακχάρων είναι η κατεργασία τους με ισχυρά οξέα, όπως το H_2SO_4 , και στη συνέχεια η αντίδρασή τους με μία κατάλληλη χρωμοφόρα ουσία, όπως π.χ. φαινόλη[34], ορχινόλη[35], ή ινδόλιο[36], έτσι ώστε να επιτυγχάνεται η φωτομετρική τους ανίχνευση. Σε αυτές τις μεθόδους τα σάκχαρα αφυδατώνονται κατά την κατεργασία τους με τα ισχυρά οξέα και στη συνέχεια μετατρέπονται με κυκλοποίηση σε κάποιο παράγωγο της φουρφουράλης. Το παράγωγο αυτό αντιδρά με το μόριο που φέρει τη χρωμοφόρο ομάδα. Οι oligo- και πολυσακχαρίτες, προκειμένου να ανιχνευτούν φωτομετρικά, υδρολύονται αρχικά σε μονοσακχαρίτες[37] και στην συνέχεια αντιδρούν με το κατάλληλο αντιδραστήριο το οποίο τους μετατρέπει σε χρωμοφόρο προϊόν.

Η παραγωγή των σακχάρων μετά τη στήλη που στηρίζεται σε αυτή τη μέθοδο έχει ιστορική αξία και είναι μέχρι σήμερα πολύ σημαντική γιατί επιτρέπει τη γρήγορη ανίχνευση των αναγωγικών αλλά και των μη-αναγωγικών σακχάρων. Παρόλη την αξία της η μέθοδος αυτή παρουσιάζει ένα σημαντικό μειονέκτημα. Το ισχυρό οξύ που χρησιμοποιείται για τη μετατροπή των σακχάρων σε φουρφουράλες είναι διαβρωτικό αντιδραστήριο και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να καταστρέφεται ολόκληρο το σύστημα ροής καθώς και ο ανιχνευτής.

Μερικές από αυτές τις αντιδράσεις των σακχάρων που αναφέρθηκαν παραπάνω δίνουν εκτός από έγχρωμα προϊόντα και προϊόντα που φθορίζουν, όπως για παράδειγμα η μέθοδος της ρεσορκινόλης σε HCl . [38] Το αντιδραστήριο της ρεσορκινόλης παρασκευάζεται διαλύοντας 50 mg της ένωσης σε 20 ml HCl περιεκτικότητας 60% v/v. Το προϊόν της αντίδρασης του αντιδραστηρίου αυτού με τα σάκχαρα παρακολουθείται με φθορισμό σε $\lambda_{ex}=488$ nm και $\lambda_{em}=508$ nm. Αυτού του είδους οι φθορίζουσες αντιδράσεις όμως δεν εφαρμόζονται για παραγωγή των σακχάρων μετά τη στήλη γιατί απαιτούν τη χρήση ισχυρών διαβρωτικών οξέων, σε αντίθεση με πολλές

άλλες μεθόδους φθορισμού. Συνήθως χρησιμοποιούνται άλλες μέθοδοι με ηπιότερες συνθήκες.

4.1.2 Αντιδράσεις που στηρίζονται στην αναγωγική ικανότητα των υδατανθράκων

Μία άλλη μέθοδος παραγωγίσης των αναγωγικών σακχάρων στηρίζεται στην ιδιότητά τους να ανάγουν διάφορες ουσίες. Έτσι, για παράδειγμα, παρουσία τους, τα ιόντα Fe(III) και Cu(II) ανάγονται σε Fe(II) και Cu(I).[39] Επομένως, εάν υπάρχουν ενώσεις ικανές να προσδένονται στα μέταλλα αυτά αποκλειστικά στη χαμηλότερη οξειδωτική τους κατάσταση και να σχηματίζουν χηλικές ενώσεις οι οποίες απορροφούν στην περιοχή UV-Vis, τότε είναι δυνατός ο φωτομετρικός προσδιορισμός των αναγωγικών σακχάρων.

Ένα άλλο ιόν το οποίο ανάγουν τα αναγωγικά σάκχαρα είναι το Ce(IV) που το μετατρέπουν στο Ce(III). Το ανηγμένο ιόν φθορίζει και έτσι είναι δυνατή και η φθορισμομετρική ανίχνευση των αναγωγικών σακχάρων.[40]

4.1.3 Αντιδράσεις με αντιδραστήρια που σχηματίζουν φθορίζοντα προϊόντα

Υπάρχουν πολλές αντιδράσεις παραγωγίσης των σακχάρων οι οποίες δίνουν ως προϊόντα φθορίζοντα παράγωγα. Οι αντιδράσεις αυτές μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες.

Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν αυτές που οδηγούν στη δημιουργία φθορίζοντος παραγώγου από μη φθορίζουσες ουσίες. Σε αυτή τη περίπτωση το αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται για την δημιουργία φθορίζοντος προϊόντος και το οποίο δεν φθορίζει, αντιδρά με την προς ανάλυση ένωση σχηματίζοντας μόρια που περιέχουν συζυγείς δακτυλίους, και επομένως φθορίζουν. Οι αντιδράσεις της κατηγορίας αυτής μπορούν να εφαρμοστούν στη παραγωγή πριν και μετά τη στήλη.

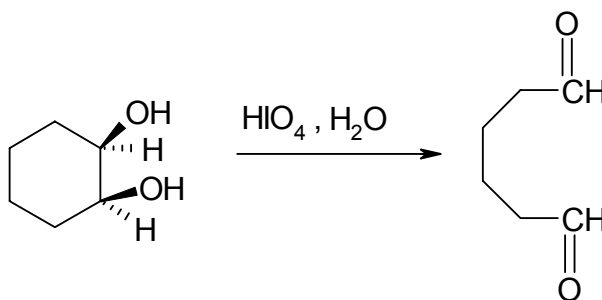
Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν οι αντιδράσεις κατά τις οποίες γίνεται προσκόλληση φθορίζουσας ένωσης στο προς ανάλυση μόριο. Σε αυτή την

περίπτωση το αντιδραστήριο αποτελείται από ένα τμήμα το οποίο παρουσιάζει συζυγία και φθορίζει ισχυρά, και από ένα τμήμα το οποίο έχει κάποια δραστική ομάδα που αντιδρά με το προς ανάλυση μόριο και έτσι σχηματίζεται ένα φθορίζον παράγωγο το οποίο τελικά ανιχνεύεται.[41] Οι αντιδράσεις αυτές εφαρμόζονται μόνο στην παραγωγή πριν τη στήλη. Οι αντιδράσεις παραγωγής μπορούν να βελτιώσουν κατά πολύ την ευαισθησία και την επιλεκτικότητα μίας μεθόδου ανάλυσης σακχάρων.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή μπορούν να ταξινομηθούν ανάλογα με τις συνθήκες αντίδρασης. Έτσι στην πρώτη κατηγορία είναι αντιδραστήρια όπως η αιθυλενοδιαμίνη, η 2-αιθανολαμίνη, το 2-κυανοακεταμίδιο και η αργινίνη τα οποία επιτρέπουν τη φθορισμομετρική ανίχνευση των σακχάρων σε ελαφρώς αλκαλικό ή ουδέτερο περιβάλλον με χρόνο αντίδρασης περίπου 30 min.[42,43,44] Τα αναγωγικά σάκχαρα αντιδρώντας με αυτές τις ενώσεις σχηματίζουν συζυγή δακτύλιο ο οποίος φθορίζει. Στην άλλη κατηγορία ανήκουν αντιδραστήρια όπως οι αρυλαμιδίνες και οι διαρυλαιθυλενοδιαμίνες οι οποίες απαιτούν ισχυρά αλκαλικό περιβάλλον και χρόνο αντίδρασης λιγότερο από 15 min. [45,46,47]

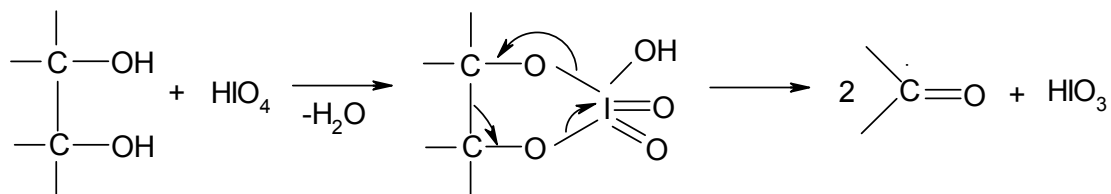
4.1.4 Οξειδωτική διάσπαση των υδατανθράκων και ανίχνευση των προϊόντων αυτής.

Η οξειδωτική διάσπαση των σακχάρων έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε μεθόδους παραγωγής. Η δημοφιλέστερη μέθοδος η οποία εφαρμόζεται, είναι η οξειδωτική διάσπαση των υδατανθράκων με υπερϊωδικό οξύ σύμφωνα με την αντίδραση που απεικονίζεται στο σχήμα 13:



Σχήμα 13. Οξειδωτική διάσπαση της κυκλικής δομής των σακχάρων

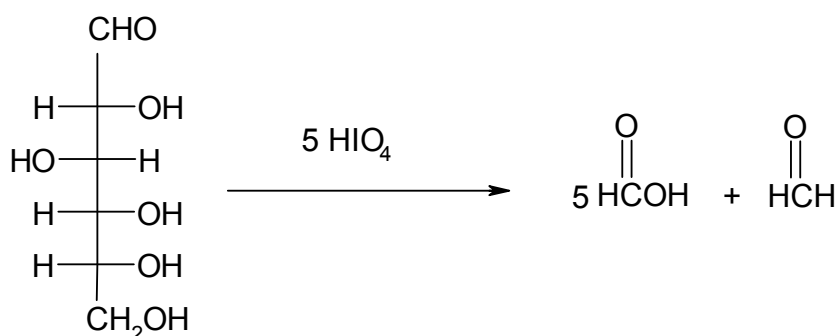
Ο μηχανισμός σύμφωνα με τον οποίο πραγματοποιείται η οξειδωτική διάσπαση των 1,2-διολών φαίνεται στο σχήμα 14. [15]



Σχήμα 14. Μηχανισμός οξειδωτικής διάσπασης 1,2-διολών από το HIO_4 .

Γενικότερα το υπεριωδικό οξύ χρησιμοποιείται για την οξειδωτική διάσπαση 1,2-διολών. Εάν τα δύο υδροξύλια βρίσκονται σε δακτύλιο, σχηματίζεται μία δικαρβονυλική ένωση, ενώ όταν βρίσκονται σε ανοικτή ανθρακική αλυσίδα, τότε σχηματίζονται δύο καρβονυλικές ενώσεις.

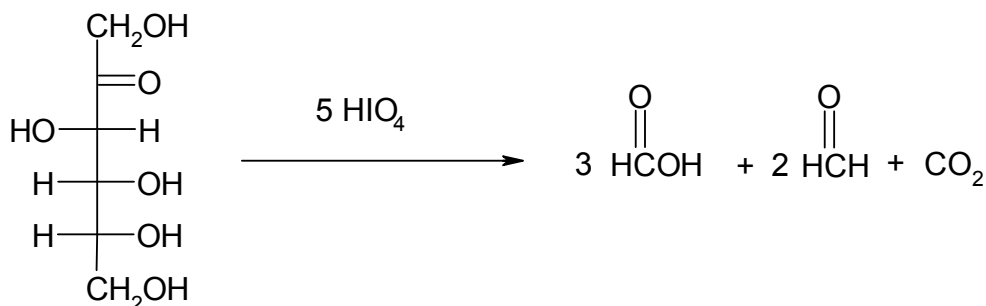
Επειδή τα σάκχαρα περιέχουν πολλά ζεύγη 1,2-διολών, η οξείδωσή τους με υπεριωδικό οξύ μπορεί να δώσει περίπλοκα μίγματα προϊόντων. Επαρκής ποσότητα του οξειδωτικού μπορεί να προκαλέσει πλήρη αποικοδόμηση της ανθρακικής αλυσίδας σε ενώσεις ενός ατόμου άνθρακα. Έτσι, για παράδειγμα, κατεργασία της γλυκόζης με πέντε ισοδύναμα HIO_4 καταλήγει στο σχηματισμό πέντε ισοδυνάμων φορμικού οξέος και ενός ισοδυνάμου φορμαλδεΐδης όπως φαίνεται στο σχήμα 15.



Σχήμα 15. Οξειδωτική διάσπαση της γλυκόζης με HIO_4

Αντίστοιχα, κατεργασία της φρουκτόζης με τα ίδια ισοδύναμα HIO_4 έχει ως αποτέλεσμα την αποικοδόμηση της ανθρακικής αλυσίδας, αλλά τα προϊόντα που σχηματίζονται είναι διαφορετικά. Σ' αυτή τη περίπτωση σχηματίζονται

τρία ισοδύναμα φορμικού οξέος, δύο ισοδύναμα φορμαλδεΐδης και ένα ισοδύναμο διοξειδίου του άνθρακα όπως φαίνεται στην αντίδραση του σχήματος 16.[15]

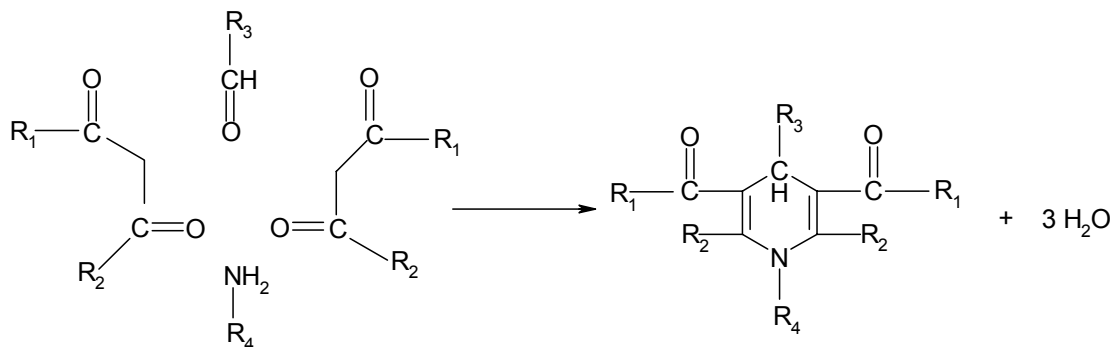


Σχήμα 16. Οξειδωτική διάσπαση της φρουκτόζης με HIO_4

Αντί για HIO_4 έχει χρησιμοποιηθεί και NaIO_4 , το οποίο πραγματοποιεί την οξειδωση σε υψηλότερες τιμές pH.[44] Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις της οξειδωτικής διάσπασης των σακχάρων σχηματίζονται αλδεΐδες.

Με βάση τα παραπάνω θα μπορούσε να αναπτυχθεί μία μέθοδος ανίχνευσης σακχάρων με παραγωγή, κατά την οποία στο πρώτο στάδιο το σάκχαρο θα υποστεί οξειδωτική διάσπαση σχηματίζοντας μίγμα υποπροϊόντων που αποτελείται από φορμαλδεΐδη, φορμικό οξύ και ιωδικά ιόντα. Ο προσδιορισμός οποιουδήποτε από τα τρία υποπροϊόντα σε ένα δεύτερο στάδιο μπορεί να οδηγήσει σε ποσοτικό προσδιορισμό του σακχάρου.

Μια ευρέως διαδεδομένη αντίδραση για την παραγωγή των αλδευδών είναι η αντίδραση Hantzsch, η οποία έχει σαν προϊόν πυριδινικά παράγωγα. Πραγματοποιείται με τρία αντιδρώντα, μία αλδεΐδη, μία β-δικετόνη ή β-οξοεστέρα και μία αμίνη όπως φαίνεται στο σχήμα 17.[42] Το πυριδινικό παράγωγο που σχηματίζεται απορροφά και φθορίζει στην ορατή περιοχή.



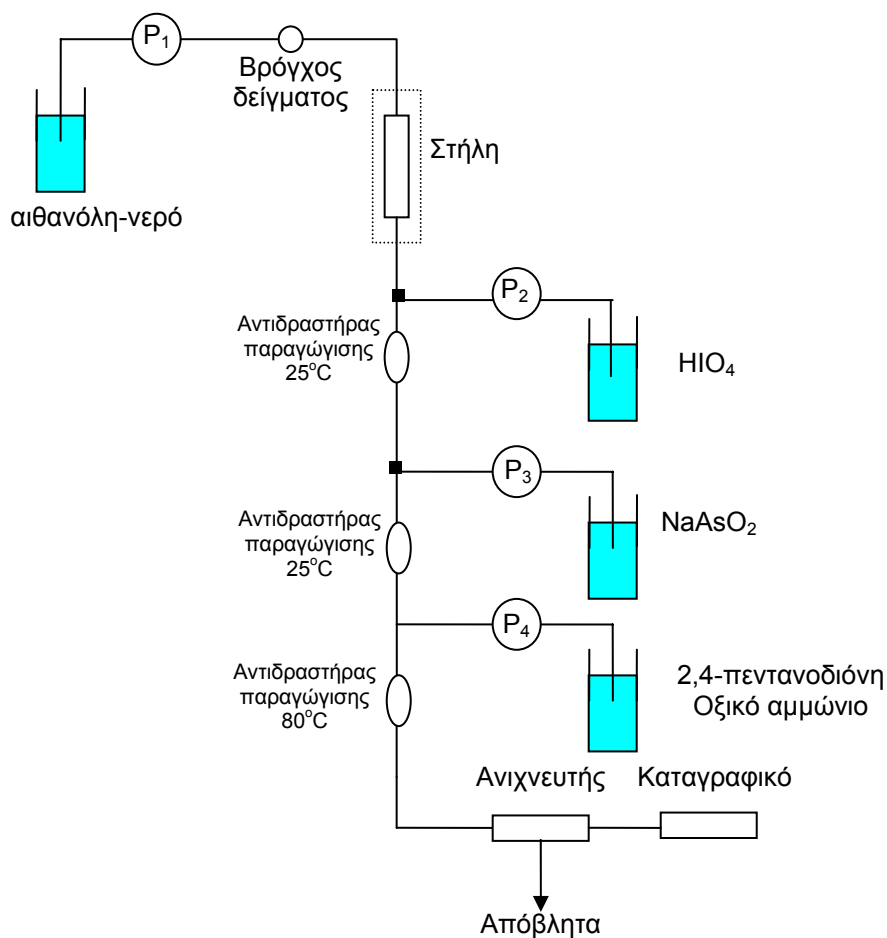
Σχήμα 14. Αντίδραση Hantzsch

Η φορμαλδεΰδη μπορεί να αντιδράσει με μία δικετόνη, όπως η 2,4-πεντανοδιόνη, παρουσία αμμωνίας, και να δώσει ένα πυριδινικό παράγωγο, 3,5-διακέτυλο-1,4-διυδρολουτιδίνη. Προσδιορίζοντας τη συγκέντρωση του παραγώγου αυτού μπορεί να προσδιοριστεί ακολούθως και η συγκέντρωση του σακχάρου. Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε αρχικά από τους Samuelson και Stromberg. [48]

4.2 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ

Για τον προσδιορισμό των σακχάρων με βάση την οξειδωτική τους διάσπαση έχουν αναπτυχθεί πολλά αυτοματοποιημένα συστήματα χρωματογραφίας.[48,49,50] Στα συστήματα αυτά η ανίχνευση πραγματοποιείται φωτομετρικά ή φθορισμομετρικά με βάση το πυριδινικό παράγωγο που προκύπτει από την αντίδραση της φορμαλδεΰδης, η οποία παράγεται από την οξειδωτική διάσπαση των σακχάρων, με την 2,4-πεντανοδιόνη που χρησιμοποιείται ως αντιδραστήριο παραγωγίσης. Εκτός από την 2,4-πεντανοδιόνη άλλες ενώσεις για την φθορισμομετρική ανίχνευση της φορμαλδεΰδης είναι η 1,3-κυκλοεξανοδιόνη και η 4-αμινο-3-πεντεν-2-όνη.[51,52] Παρόλο που οι παραπάνω ενώσεις έχουν χρησιμοποιηθεί σε συστήματα ροής για την ανίχνευση της φορμαλδεΰδης, η χρήση τους σε αυτοματοποιημένα συστήματα χρωματογραφίας για τον προσδιορισμό σακχάρων δεν έχει αναφερθεί.

Το πρώτο αυτοματοποιημένο σύστημα ανάλυσης σακχάρων αναφέρθηκε από τους Samuelson και Stromberg το 1966 [48]. Η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε απεικονίζεται στο σχήμα 18.

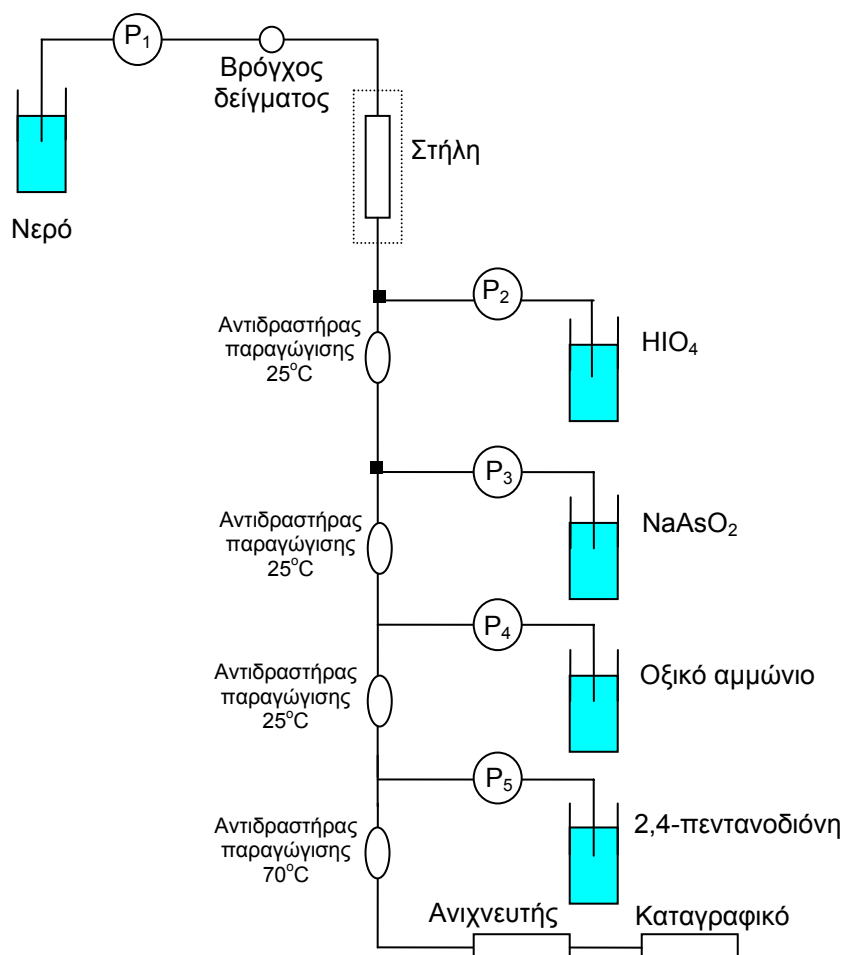


Σχήμα 18. Πειραματική διάταξη ανίχνευσης υδατανθράκων με παραγωγή μετά τη στήλη

Η κινητή φάση είναι μίγμα αιθανόλης νερού και η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης είναι 0,4 ml/min. Για τον διαχωρισμό των σακχάρων χρησιμοποιήθηκε ανιονανταλλακτική στήλη. Μετά τον διαχωρισμό τους τα σάκχαρα αναμιγνύονται με το υπεριοδικό οξύ το οποίο είναι σε συγκέντρωση 0,015 M και έχει ταχύτητα ροής 0,6 ml/min. Η αντίδραση της οξειδωτικής διάσπασης πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια το μίγμα αναμιγνύεται με το δεύτερο αντιδραστήριο παραγωγίσης το οποίο αποτελείται από 0,5 M αρσενικόδες νάτριο. Το αρσενικόδες νάτριο χρησιμοποιείται για την αναγωγή των υπεριοδικών ιόντων που δεν αντέδρασαν, καθώς αυτά παρεμποδίζουν την ανίχνευση του πυριδινικού παραγώγου. Το δεύτερο αντιδραστήριο παραγωγίσης έχει ταχύτητα ροής 0,6 ml/min και το σπείραμα αντίδρασης βρίσκεται σε θερμοκρασία 25°C. Κατά το

τρίτο στάδιο παραγωγής το μίγμα αναμιγνύεται με το τρίτο αντιδραστήριο παραγωγής το οποίο αποτελείται από 0,02 M 2,4-πεντανοδιόνη, 2 M οξικό αμμώνιο και 0,05 M οξικό οξύ, ενώ το σπείραμα αντίδρασης βρίσκεται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 80°C. Το προϊόν παραγωγής ανιχνεύεται με ανιχνευτή ορατού στα 420 nm.

Η εξέλιξη του παραπάνω αυτοματοποιημένου συστήματος ανάλυσης σακχάρων αναφέρθηκε από τον Woodbury και τους συνεργάτες του το 1969 [49]. Η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε απεικονίζεται στο σχήμα 19.

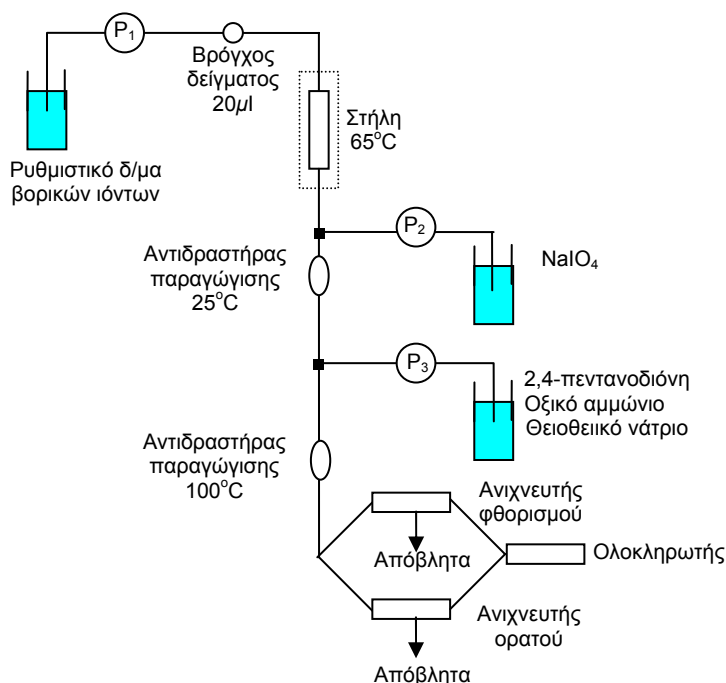


Σχήμα 19. Πειραματική διάταξη ανίχνευσης υδατανθράκων με παραγωγή μετά τη στήλη

Για τον διαχωρισμό των σακχάρων στο παραπάνω σύστημα χρησιμοποιήθηκε στήλη ιονικού αποκλεισμού. Η κινητή φάση είναι νερό με

ταχύτητα ροής 0,32 ml/min. Η ταχύτητα ροής των αντιδραστηρίων παραγωγίσης είναι επίσης 0,32 ml/min και επιτυγχάνεται με τη χρήση μίας περισταλτικής αντλίας. Μετά τον διαχωρισμό τους τα σάκχαρα αναμιγνύονται με το υπεριωδικό οξύ το οποίο είναι σε συγκέντρωση 0,015 M. Η αντίδραση της οξειδωτικής διάσπασης πραγματοποιείται για 20 min σε θερμοκρασία 20°C. Στη συνέχεια τα υπεριωδικά ιόντα που δεν αντέδρασαν εξουδετερώνονται από το δεύτερο αντιδραστήριο παραγωγίσης το οποίο αποτελείται από 0,1 M αρσενικό οξύ. Η διαφορά αυτού του συστήματος από το πρώτο είναι ότι το οξικό αμμώνιο, που βρίσκεται σε συγκέντρωση 0,05 M, και η 2,4-πεντανοδιόνη συγκέντρωσης 0,05 M προστίθενται ξεχωριστά. Το μίγμα που προκύπτει θερμαίνεται στους 70°C επί 30 min. Το προϊόν παραγωγίσης ανιχνεύεται με ανιχνευτή φθορισμού σε $\lambda_{ex}=420$ nm και $\lambda_{em}=480$ nm.

Αυτοματοποιημένη ανάλυση αλδιτολών με παραγωγή μετά τη στήλη και φωτομετρική αλλά και φθορισμομετρική ανίχνευση πραγματοποιήθηκε από τον S. Honda και τους συνεργάτες του. Η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε απεικονίζεται στο σχήμα 20.[50]



Σχήμα 20. Πειραματική διάταξη ανίχνευσης υδατανθράκων με παραγωγή μετά τη στήλη

Η κινητή φάση είναι ρυθμιστικό διάλυμα βορικών ιόντων συγκέντρωσης 0,5 M με pH 9.0 και η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης είναι 0,5 ml/min. Ο όγκος του βρόγχου δείγματος είναι 20 μl. Για τον διαχωρισμό των σακχάρων χρησιμοποιήθηκε στήλη με υλικό πλήρωσης ανιονανταλλακτική ρητίνη τεταρτοταγούς αμμωνίου, η οποία θερμοστατείται στους 65°C. Μετά τον διαχωρισμό τους τα σάκχαρα αναμιγνύονται με το υπεριωδικό οξύ το οποίο είναι σε συγκέντρωση 0,05 M και έχει ταχύτητα ροής 0,5 ml/min. Η αντίδραση της οξειδωτικής διάσπασης πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια το μίγμα αναμιγνύεται με το δεύτερο αντιδραστήριο παραγωγίσης το οποίο αποτελείται από 15% οξικό αμμώνιο, 2% 2,4-πεντανοδιόνη και 0,2 M θειοθειικό νάτριο. Το θειοθειικό νάτριο χρησιμοποιείται για την αναγωγή των υπεριωδικών ιόντων που δεν αντέδρασαν, καθώς αυτά παρεμποδίζουν την ανίχνευση του πυριδινικού παραγώγου. Το δεύτερο αντιδραστήριο παραγωγίσης έχει ταχύτητα ροής 0,5 ml/min και για να πραγματοποιηθεί η παραγωγή το σπείραμα αντίδρασης βυθίζεται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 100°C. Το προϊόν παραγωγίσης ανιχνεύεται είτε με ανιχνευτή φθορισμού σε $\lambda_{ex}=410$ nm και $\lambda_{em}=503$, είτε με ανιχνευτή ορατού στα 412 nm. Τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου για αλδιτόλες είναι 2 και 0,5 nmol αντίστοιχα.

5. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΑΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ

5.1 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Όπως αναφέρθηκε στα προηγούμενα κεφάλαια, οι μέθοδοι ανίχνευσης των σακχάρων μέσω παραγωγίσης που έχουν αναπτυχθεί και συζητηθεί με την υγρή χρωματογραφία έχουν σημαντικά μειονεκτήματα όπως:

1. Η εφαρμογή τους περιορίζεται στην ανίχνευση κυρίως αναγωγικών σακχάρων, ενώ οι μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί για μη αναγωγικά σάκχαρα, στηρίζονται σε δύσχρηστη οργανολογία.
2. Το όριο ανίχνευσης των μεθόδων αυτών δεν είναι αρκετά χαμηλό για τον προσδιορισμό σακχάρων σε δείγματα όπως είναι τα βιολογικά υγρά.

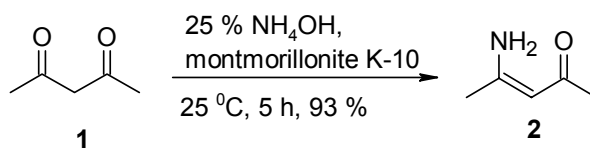
Μία μεθοδολογία ανίχνευσης σακχάρων πρέπει να πληρεί ορισμένες προϋποθέσεις έτσι ώστε να ανταποκρίνεται σε όσο το δυνατόν περισσότερα είδη σακχάρων και σε περισσότερες κατηγορίες δειγμάτων. Οι σημαντικότερες προϋποθέσεις οι οποίες πρέπει να πληρούνται είναι:

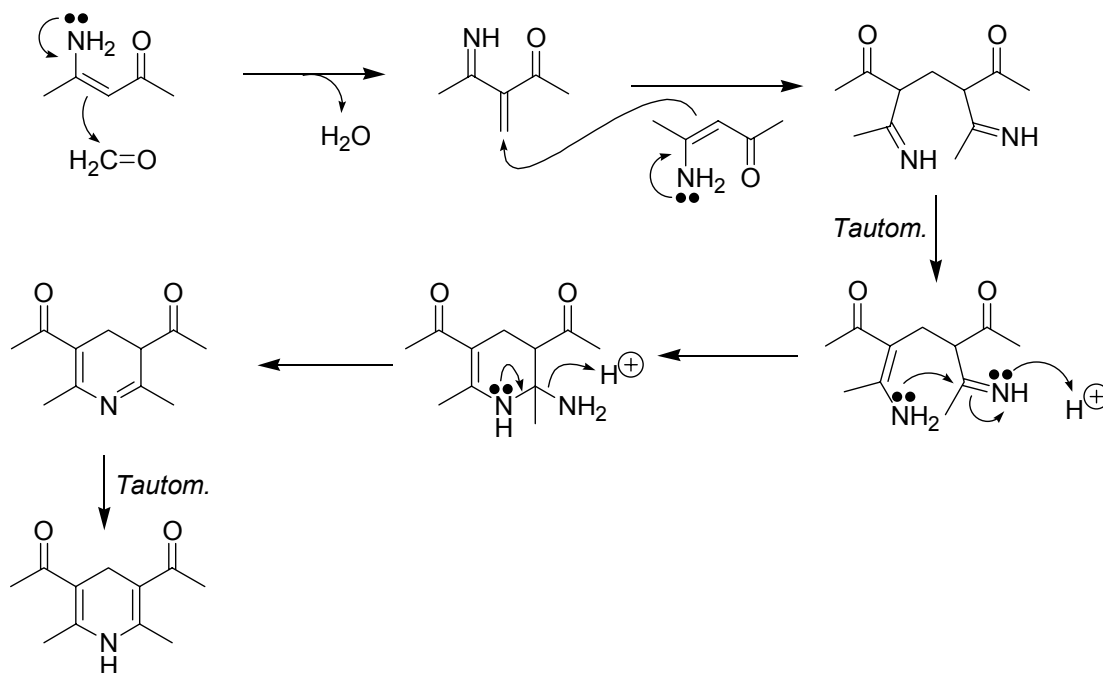
- Η ικανότητα ανίχνευσης αναγωγικών και μη αναγωγικών σακχάρων.
- Η επαναληψιμότητα των προϊόντων παραγωγίσις.
- Το χαμηλό όριο ανίχνευσης.

Σκοπός, λοιπόν, της παρούσας εργασίας είναι η ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μίας μεθόδου ανίχνευσης των σακχάρων η οποία να πληρεί τις παραπάνω προϋποθέσεις. Πιο συγκεκριμένα, να δίνει το ίδιο προϊόν κάθε φορά, να είναι γενική για αναγωγικά και μη αναγωγικά σάκχαρα και τέλος να έχει χαμηλό όριο ανίχνευσης, της τάξης των ng.

5.2 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΙΣΗΣ

Όπως αναφέρθηκε, ο φθορισμός είναι πιο ευαίσθητη μέθοδος ανίχνευσης μιας ένωσης σε σύγκριση με την απορρόφηση στην περιοχή του υπεριώδους και του ορατού. Γι' αυτό το λόγο σε αυτή την εργασία επιλέχθηκε η ανίχνευση των σακχάρων να γίνει με μετατροπή τους σε φθορίζοντα προϊόντα. Αυτό επιτυγχάνεται με οξειδωτική διάσπαση των σακχάρων και στη συνέχεια ανίχνευση της φορμαλδεΐδης που παράγεται. Ως αντιδραστήριο παραγωγίσις για την οξειδωτική διάσπαση επιλέχτηκε το υπερϊωδικό νάτριο, ενώ για την ανίχνευση της φορμαλδεΐδης η 4-αμινο-3-πεντεν-2-όνη. Η αντίδραση παρασκευής⁵³ της καθώς και ο προτεινόμενος μηχανισμός της αντίδρασης της 4-αμινο-3-πεντεν-2-όνης με τη φορμαλδεΐδη φαίνεται στο σχήμα 21.





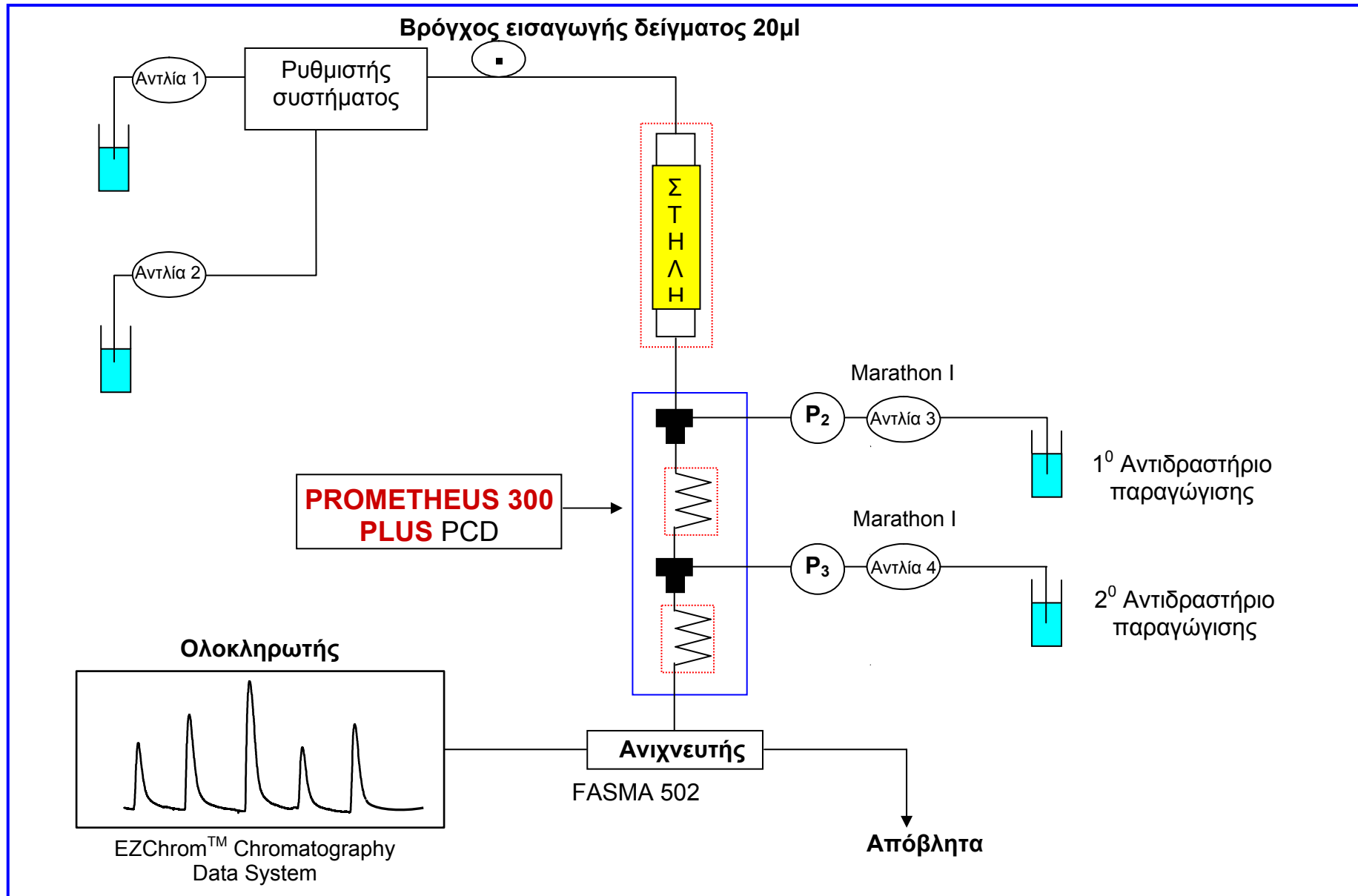
Σχήμα 21. Αντίδραση παρασκευής της 4-αμινο-3-πεντεν-2-όνης και προτεινόμενος μηχανισμός αντίδρασης παραγωγής της φορμαλδεΐδης με 4-αμινο-3-πεντεν-2-ονη

5.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΤΑΞΗ – ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ HPLC-PCD

Η πειραματική διάταξη η οποία χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία αποτελείται από ένα σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης συζευγμένο με ένα αυτοματοποιημένο σύστημα παραγωγής μετά τη στήλη που απεικονίζεται στο σχήμα 22.

Το σύστημα υγρής χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από τα εξής μέρη:

- Δύο αντλίες Shimadzu τύπου LC-10AD Vp για την άντληση της κινητής φάσης.
- Ρυθμιστή συστήματος Shimadzu τύπου SCL-10A Vp ο οποίος δίνει την δυνατότητα βαθμιδωτής έκλουσης.
- Βρόγχο δείγματος όγκου 20 μl, όπου εισέρχεται το δείγμα στο σύστημα χρωματογραφίας.
- Λογισμικό πρόγραμμα QP8000 έκδοση 1.21.



Σχήμα 22. Πειραματική διάταξη

Για την αντίδραση παραγωγίσις των σακχάρων μετά τη στήλη χρησιμοποιήθηκε το σύστημα PROMETHEAS 300 Plus, Rigas Labs. Το σύστημα αυτό αποτελείται από τα εξής μέρη:

- Δύο αντλίες Marathon I, Rigas Labs για την άντληση των αντιδραστηρίων παραγωγίσις.
- Δύο θερμοστατούμενα σπειράματα αντίδρασης όγκου 500 μl το κάθε ένα.

Το σύστημα αυτό διαθέτει μανόμετρα έτσι ώστε να ελέγχονται οι πιέσεις των αντλιών και εξομαλυντές θορύβου οι οποίοι αποσβένουν τον παλμό των αντλιών και εξομαλύνουν το σήμα υποβάθρου. Επιπλέον διαθέτει σημείο ανάμιξης μέσα στα οποία γίνεται αρχικά η ανάμιξη του αναλύτη με τα αντιδραστήρια παραγωγίσις.

Για την ανίχνευση των προϊόντων της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε ο φθορισμομετρικός ανιχνευτής FASMA 502 Programmable Fluorescent και η καταγραφή των φασμάτων έγινε με το λογισμικό πρόγραμμα EZChrom.

- **Ανάλυση τεχνικών χαρακτηριστικών PCD**

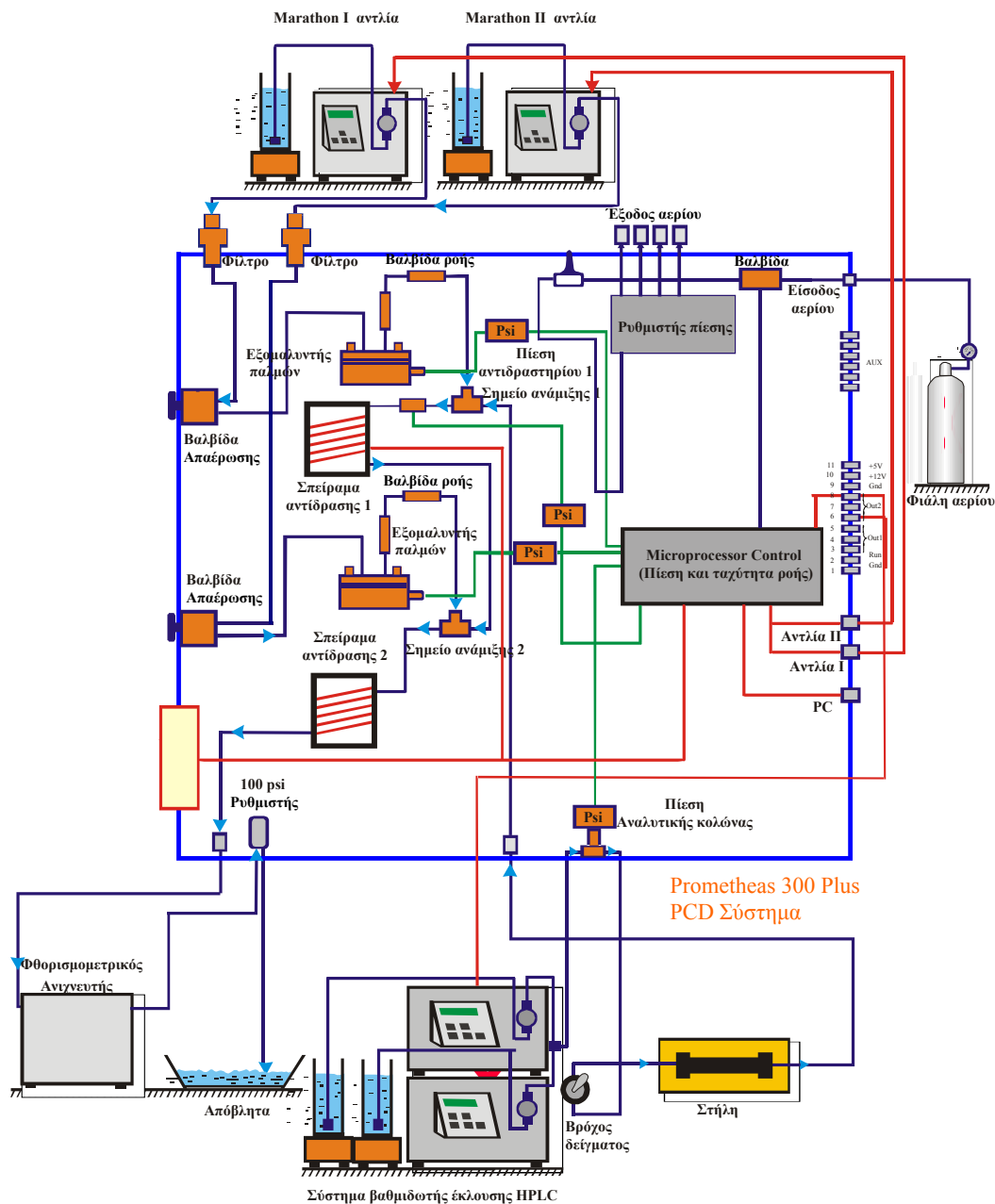
Στο σχήμα 23 φαίνεται σχηματικά το εσωτερικό του οργάνου Prometheas 300 Plus PCD System. Διαθέτει όργανα έτσι ώστε να ελέγχονται όλες οι παράμετροι της ανάλυσης προκειμένου να βελτιωθεί ο φασματοσκοπικός προσδιορισμός μίας ένωσης. Το σάκχαρο μετά την έξοδό του από την αναλυτική στήλη εισέρχεται στο PCD. Αρχικά η κινητή φάση η οποία παρασύρει τον αναλύτη περνάει από έναν εξομαλυντή παλμών, ο οποίος αποσβένει τους παλμούς που δημιουργούνται από τις αντλίες της κινητής φάσης. Επιπλέον, στον εξομαλυντή παλμών είναι συνδεδεμένο μανόμετρο έτσι ώστε να ελέγχεται η πίεση της αντλίας του πρώτου αντιδραστηρίου παραγωγίσις. Στη συνέχεια το υγρό εισέρχεται στο πρώτο σημείο ανάμιξης στο οποίο γίνεται η ανάμιξη του αναλύτη με το πρώτο αντιδραστήριο παραγωγίσις. Ο όγκος ανάμιξης των σημείων ανάμιξης είναι μεταβαλλόμενος. Υπάρχει η δυνατότητα επιλογής για 50, 150 και 250 μl. Η ικανότητα μετατροπής του όγκου των σημείων ανάμιξης παρέχει δυνατότητα στο PCD για μεταβολή των ταχυτήτων ροής των αντιδραστηρίων και της

κινητής φάσης προκειμένου να βελτιωθεί το χρωματογράφημα χωρίς να επηρεαστεί από τον παλμό και το θόρυβο του συστήματος. Μεταξύ του εξομαλυντή παλμών και του σημείου ανάμιξης παρεμβάλλονται ένας ρυθμιστής πίεσης και μία βαλβίδα ροής. Η βαλβίδα ροής διασφαλίζει ότι η ροή των αντιδραστηρίων θα είναι πάντα προς την ίδια κατεύθυνση και δεν θα ρέουν προς την κολώνα όταν οι αντλίες σταματούν να λειτουργούν. Ο ρυθμιστής πίεσης εξομαλύνει τους παλμούς που προέρχονται από τις αντλίες των αντιδραστηρίων.

Μετά το σημείο ανάμιξης το αντιδραστήριο οδηγείται στο πρώτο σπείραμα αντίδρασης το οποίο θερμοστατείται. Η έξοδος του πρώτου σπειράματος αντίδρασης ενώνεται με το δεύτερο σημείο ανάμιξης το οποίο ενώνεται και με την αντλία του δεύτερου αντιδραστηρίου παραγωγίσισης. Μεταξύ της αντλίας του δεύτερου αντιδραστηρίου παραγωγίσισης και του σημείου ανάμιξης παρεμβάλλονται πάλι ένας εξομαλυντής παλμών, ένας ρυθμιστής πίεσης και μία βαλβίδα ροής για τους ίδιους λόγους που αναφέρθηκαν πριν. Για τον έλεγχο της πίεσης που αναπτύσσεται στην αντλία του δεύτερου αντιδραστηρίου παραγωγίσισης υπάρχει μανόμετρο συνδεδεμένο στον εξομαλυντή παλμών. Τα δύο σπειράματα αντίδρασης και το δεύτερο σημείο ανάμιξης είναι συνδεδεμένα σε σειρά, και επομένως η πίεσή τους ελέγχεται από ένα μανόμετρο.

Μετά την έξοδό του από το δεύτερο σπείραμα αντίδρασης το μίγμα οδηγείται στον ανιχνευτή και κατά την έξοδο του από τον ανιχνευτή μέσω ενός ρυθμιστή πίεσης εξόδου οδηγείται στα απόβλητα. Εξαιτίας των μεγάλων θερμοκρασιών που αναπτύσσονται στα σπειράματα αντίδρασης οι διαλύτες προσεγγίζουν τα σημεία ζέσεως τους. Ο ρόλος του ρυθμιστή πίεσης εξόδου είναι να ασκεί πίεση έτσι ώστε οι τυχόν φυσαλίδες οι οποίες να σχηματίζονται λόγω του βρασμού των διαλυτών, να διαλύονται για να μην δημιουργήσουν πρόβλημα στην κυψελίδα του ανιχνευτή. Η πίεση η οποία αναπτύσσεται από τον ρυθμιστή πίεσης εξόδου μπορεί να μεταβληθεί από 10-100 psi.

Τέλος το όργανο έχει υποδοχές μέσω των οποίων οι φιάλες των αντιδραστηρίων παραγωγίσισης ενώνονται με φιάλη αερίου. Έτσι στα ευπαθή στον αέρα αντιδραστήρια μπορεί να διοχετεύεται αδρανές αέριο και να φυλάσσονται σε αδρανείς συνθήκες.



Σχήμα 23. Εσωτερική διάταξη του οργάνου Prometheas 300 Plus PCD System

5.4 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ HPLC-PCD

Κατά την ανάλυση ενός δείγματος σακχάρων με την μέθοδο HPLC-PCD, ακολουθούνται τα παρακάτω στάδια:

1. Το δείγμα εισέρχεται στο βρόχο δείγματος (A) του οποίου ο όγκος είναι 20 μl.

2. Η κινητή φάση παρασύρει το μίγμα από το βρόχο δείγματος και το κατευθύνει στη χρωματογραφική στήλη. Η σύσταση της κινητής φάσης ανάλογα με τη μέθοδο διαχωρισμού, μπορεί να είναι σταθερή ή να μεταβάλλεται.
3. Στη στήλη πραγματοποιείται ο διαχωρισμός του μίγματος στα συστατικά του.
4. Το σάκχαρο, το οποίο έχει διαχωριστεί από το μίγμα, εισέρχεται στο πρώτο σημείο ανάμιξης (B), όπου αναμιγνύεται με το πρώτο αντιδραστήριο παραγωγίσης.
5. Το μίγμα εισέρχεται στο πρώτο σπείραμα αντίδρασης (Γ) όπου πραγματοποιείται η αντίδραση οξειδωτικής διάσπασης του σακχάρου. Στο σπείραμα ελέγχεται η θερμοκρασία υδρόλυσης με θερμοζεύγος.
6. Τα προϊόντα της πρώτης αντίδρασης εισέρχονται στο δεύτερο σημείο ανάμιξης (Δ), όπου αναμιγνύονται με το δεύτερο αντιδραστήριο παραγωγίσης.
7. Το μίγμα οδηγείται στο δεύτερο σπείραμα αντίδρασης (Ε), όπου πραγματοποιείται η αντίδραση παραγωγίσης της φορμαλδεΐδης με την 4-αμινο-3-πεντεν-2-όνη. Η θερμοκρασία του σπειράματος ελέγχεται με θερμοζεύγος.
8. Το φθορίζον προϊόν εισέρχεται στον φθορισμομετρικό ανιχνευτή όπου μετράται ο φθορισμός του. Το φάσμα του προϊόντος παραγωγίσης καταγράφεται με το λογισμικό πρόγραμμα EZChrom Chromatography Data System.
9. Το διάλυμα οδηγείται στα απόβλητα.

5.5 ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ

Αρχικά πραγματοποιήθηκε μελέτη βελτιστοποίησης των συνθηκών της δεύτερης αντίδρασης παραγωγίσης κατά την οποία χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα φορμαλδεΐδης. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση των υπολοίπων συνθηκών παραγωγίσης κατά την οποία χρησιμοποιήθηκαν τα σάκχαρα γλυκόζη, μαννόζη και φρουκτόζη.

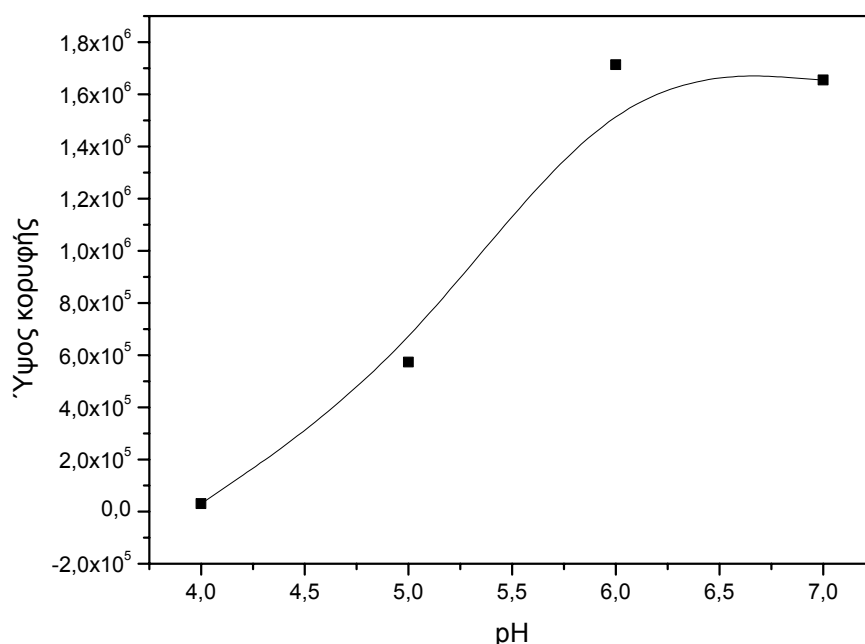
5.5.1 Ανάπτυξη μεθοδολογίας ανίχνευσης υδατανθράκων

Το H_2O είναι η κινητή φάση η οποία χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν χωρίς στήλη. Η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης αρχικά επιλέχθηκε να είναι 0,5 ml/min. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν χωρίς χρωματογραφική στήλη.

Το αντιδραστήριο παραγωγίσις της φορμαλδεΐδης που χρησιμοποιήθηκε αρχικά περιείχε 4-αμινο-3-πεντεν-2-όνη σε συγκέντρωση 4,5 mM, οξικό αμμώνιο σε συγκέντρωση 1,5 M, θειοθειικό νάτριο σε συγκέντρωση 0,2 M ενώ το pH του ήταν 7,3. Η ταχύτητα ροής του αντιδραστηρίου επιλέχθηκε να είναι 0,5 ml/min. Η θερμοκρασία του σπειράματος αντίδρασης στο οποίο πραγματοποιείται η παραγωγή είναι 105 °C.

- **Βελτιστοποίηση pH**

Αρχικά έγινε βελτιστοποίηση του pH στο οποίο πραγματοποιείται η παραγωγή της φορμαλδεΐδης. Οι τιμές που ελέγχθηκαν κυμαίνονται από 7 έως 4, ενώ η ρύθμιση του pH πραγματοποιήθηκε με π.HCl . Τα αποτελέσματα φαίνονται στο σχήμα 24.

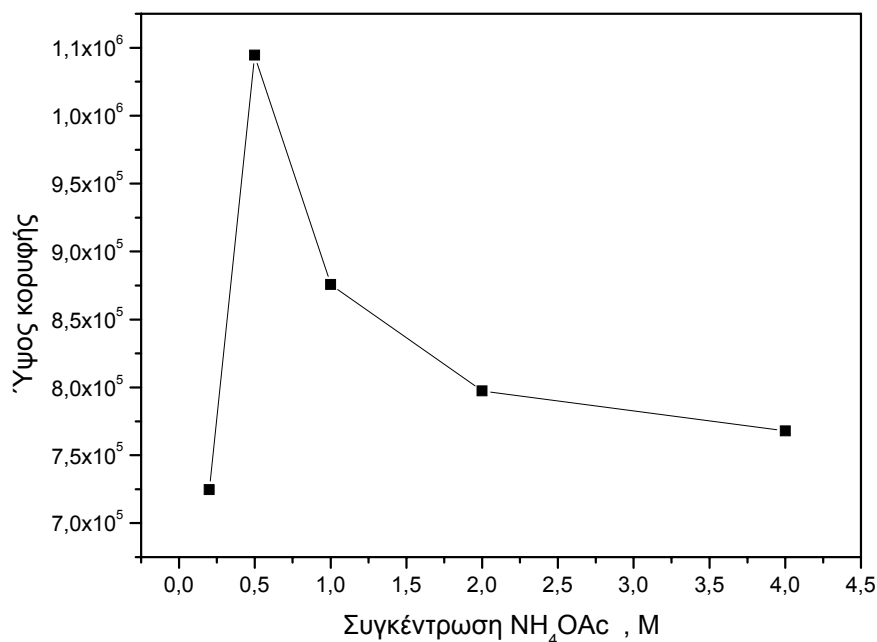


Σχήμα 24. Βελτιστοποίηση του pH της αντίδρασης παραγωγίσις της φορμαλδεΐδης

Από την μελέτη αυτή διαπιστώθηκε ότι το pH της αντίδρασης θα πρέπει να είναι 6 καθώς για μικρότερες τιμές pH η απόδοση της αντίδρασης μειώνεται σημαντικά.

- **Βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης του οξικού αμμωνίου.**

Για τον προσδιορισμό της βέλτιστης συγκέντρωσης του οξικού αμμωνίου χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες συνθήκες με το προηγούμενο πείραμα ενώ το pH του αντιδραστήριου ρυθμίστηκε στο 6. Οι συγκεντρώσεις οξικού αμμωνίου που ελέγχθηκαν κυμαίνονται από 0,2 έως 4M. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο σχήμα 25

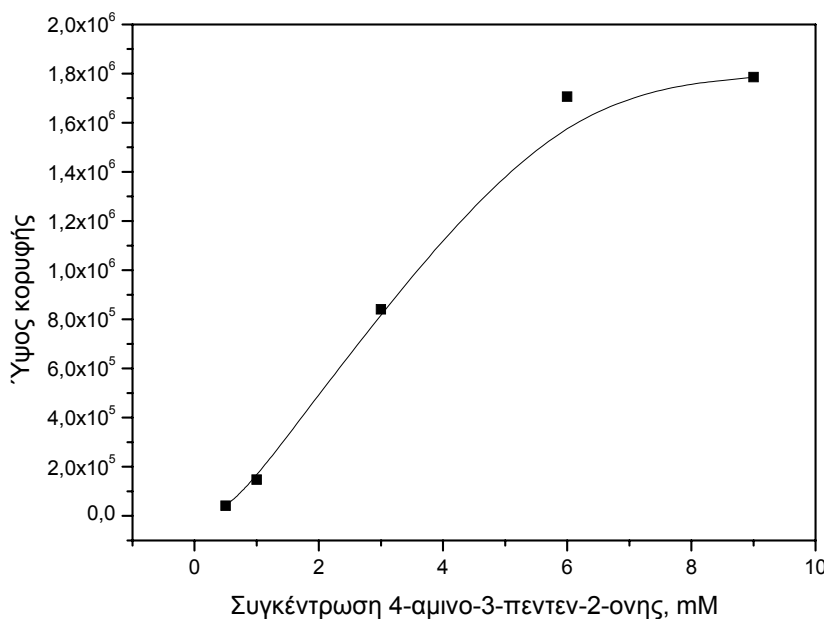


Σχήμα 25. Βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης του οξικού αμμωνίου στην αντίδραση παραγωγής της φορμαλδεΐδης

Η βέλτιστη συγκέντρωση οξικού αμμωνίου όπως φαίνεται και στο σχήμα είναι 0,5M.

- **Βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης της 4-αμινο-3-πεντεν-2-ονης.**

Για τον προσδιορισμό της βέλτιστης συγκέντρωσης της 4-αμινο-3-πεντεν-2-ονης χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες συνθήκες με το προηγούμενο πείραμα ενώ το pH του αντιδραστηρίου ρυθμίστηκε στο 6 και η συγκέντρωση του οξικού αμμωνίου σε 0,5M. Οι συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν κυμαίνονται από 0,5 έως 9mM. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο σχήμα 26.



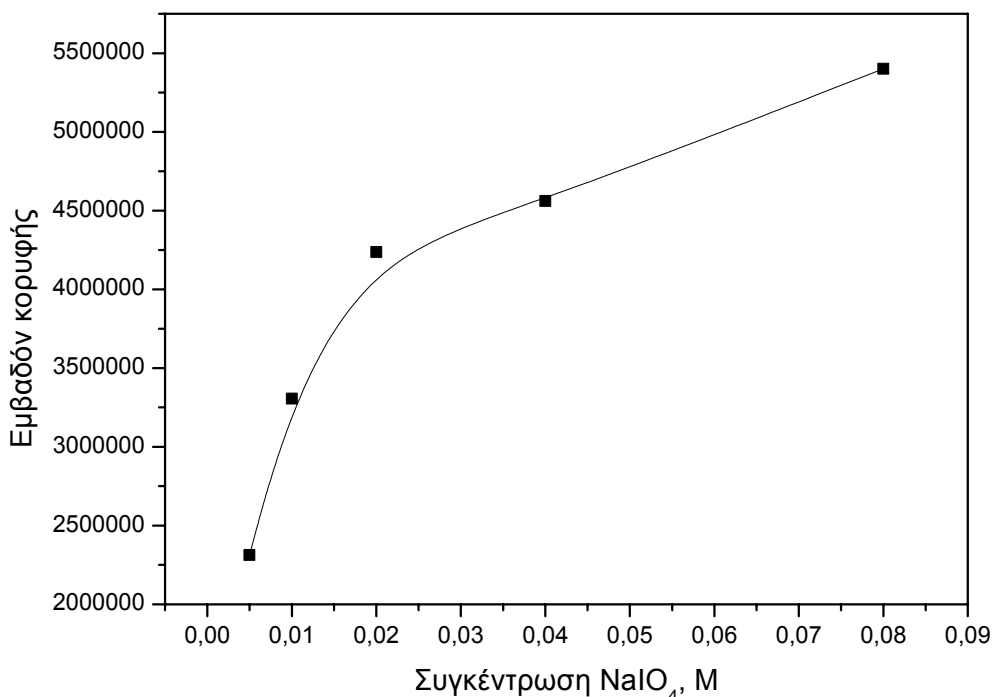
Σχήμα 26. Βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης της 4-αμινο-3-πεντεν-2-ονης στην αντίδραση παραγωγίσης της φορμαλδεΐδης

Σύμφωνα με το σχήμα 26 η συγκέντρωση της 4-αμινο-3-πεντεν-2-ονης που επιλέχθηκε είναι 6 mM.

Η συγκέντρωση της φορμαλδεΐδης η οποία χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να πραγματοποιηθούν τα πειράματα αυτά είναι 1E-4M.

- **Βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης υπεριωδικού νατρίου.**

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης υπεριωδικού νατρίου χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες χρωματογραφικές συνθήκες με το προηγούμενο πείραμα, ενώ το αντιδραστήριο παραγωγίσης της φορμαλδεΐδης παρασκευάστηκε σύμφωνα με τα αποτελέσματα των παραπάνω πειραμάτων. Οι συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν κυμαίνονται από 0,005 έως 0,08M. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο σχήμα 27.

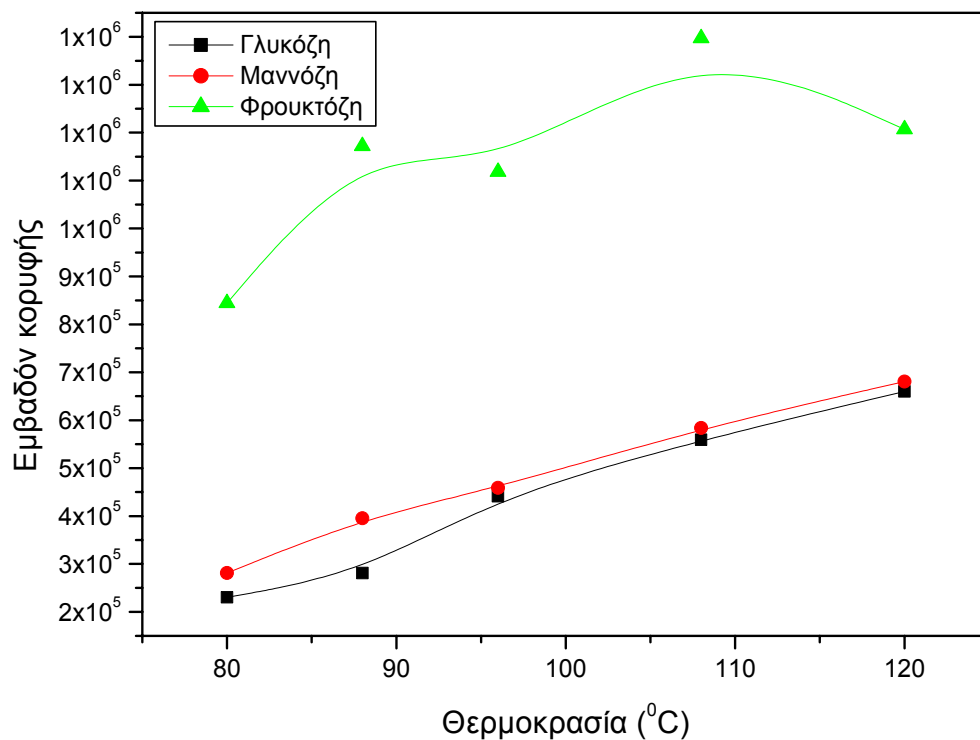


Σχήμα 27. Βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης του υπεριωδικού νατρίου στην αντίδραση οξειδωτικής διάσπασης των σακχάρων

Η συγκέντρωση του υπεριωδικού νατρίου που επιλέχθηκε είναι 0,05M και όχι υψηλότερη προκειμένου να αποφευχθούν προβλήματα λόγω κρυσταλλοποίησης του στις γραμμές ροής.

- **Βελτιστοποίηση θερμοκρασίας της οξειδωτικής διάσπασης.**

Έγινε βελτιστοποίηση της θερμοκρασίας στην οποία πραγματοποιείται η οξειδωτική διάσπαση των σακχάρων από το υπεριωδικό νάτριο. Δηλαδή προσδιορίστηκε η θερμοκρασία του πρώτου σπειράματος αντίδρασης και οι τιμές που ελέγχθηκαν κυμαίνονται από 80 έως 120 °C. Για τη μελέτη αυτή τα σάκχαρα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η γλυκόζη, η μαννόζη και η φρουκτόζη σε συγκέντρωση 1E-3 M. Όλες οι χρωματογραφικές συνθήκες διατηρήθηκαν σταθερές, ενώ τα δύο αντιδραστήρια παραγωγής παρασκευάστηκαν με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα παραπάνω πειράματα βελτιστοποίησης. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο σχήμα 28.

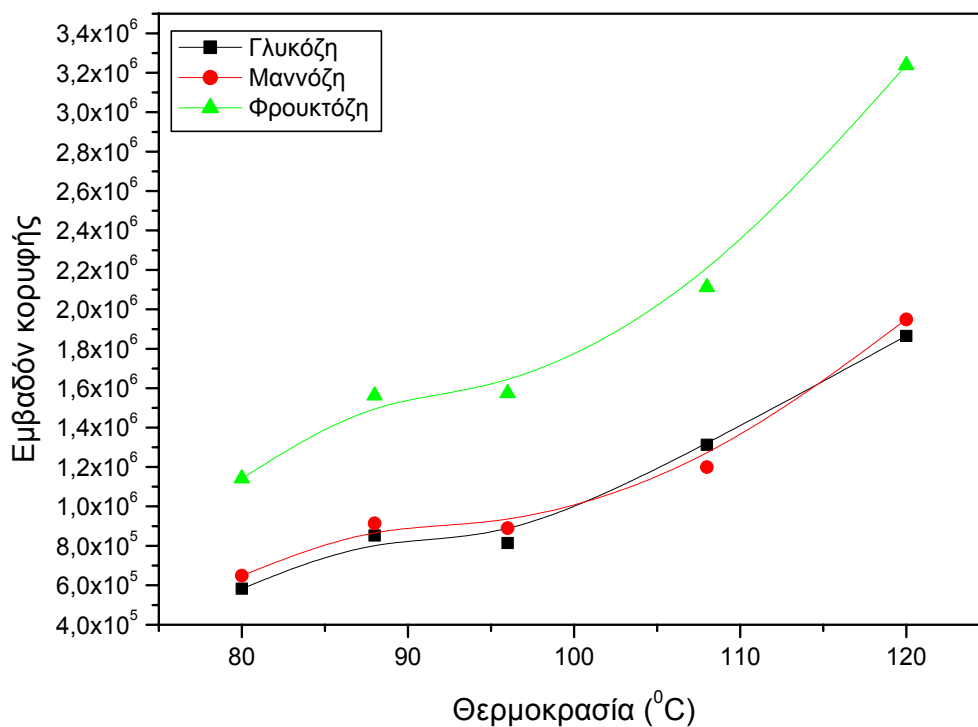


Σχήμα 28. Επίδραση της θερμοκρασίας του 1ου σπειράματος αντίδρασης και για τα τρία σάκχαρα

Όπως φαίνεται στο σχήμα 30 επιλέχτηκε ως βέλτιστη θερμοκρασία οι 120 °C.

- **Βελτιστοποίηση θερμοκρασίας της αντίδρασης παραγωγής της φορμαλδεΐδης.**

Για τον προσδιορισμό της θερμοκρασίας της δεύτερης αντίδρασης παραγωγής χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες χρωματογραφικές συνθήκες με το προηγούμενο πείραμα. Οι τιμές της θερμοκρασίας που ελέγχθηκαν κυμαίνονται από τους 80 έως τους 120°C.

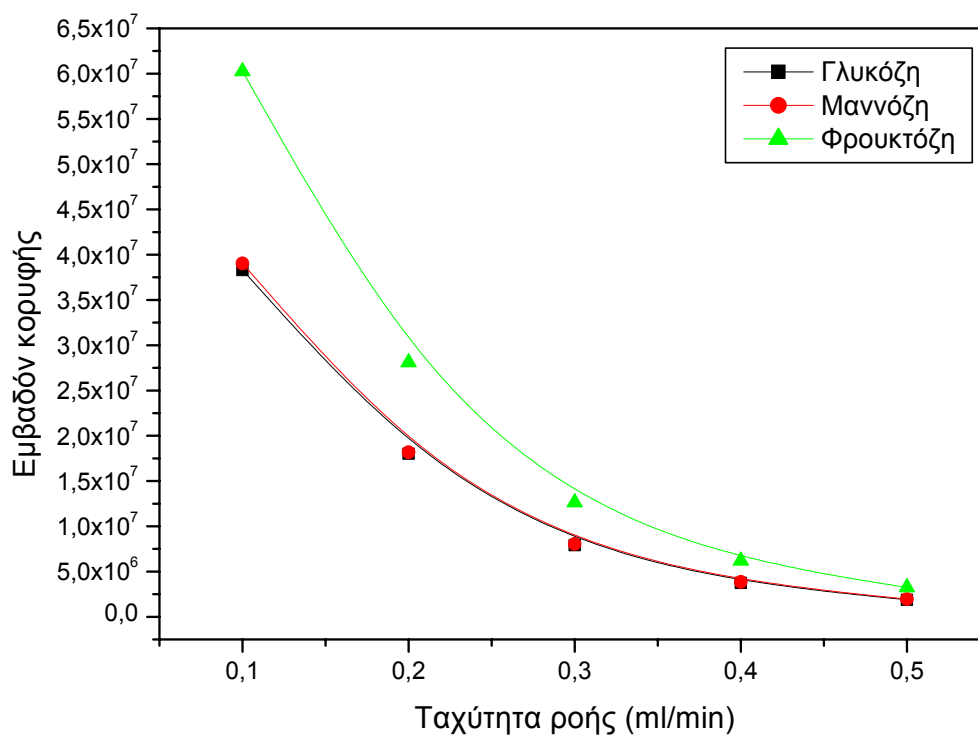


Σχήμα 29. Επίδραση της θερμοκρασίας του 2ου σπειράματος αντίδρασης και για τα τρία σάκχαρα

Από την μελέτη αυτή διαπιστώθηκε ότι η θερμοκρασία στη οποία πραγματοποιείται η δεύτερη αντίδραση θα πρέπει να είναι $120\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- **Βελτιστοποίηση της ταχύτητας ροής της κινητής φάσης**

Για τη βελτιστοποίηση της ταχύτητας ροής της κινητής φάσης και των αντιδραστηρίων παραγωγής χρησιμοποιήθηκαν τα τρία σάκχαρα σε συγκέντρωση $1\text{E-}3\text{ M}$. Οι ταχύτητες ροής που δοκιμάστηκαν είναι 0,1-0,5 ml/min. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο σχήμα 30.



Σχήμα 30. Επίδραση της ταχύτητας ροής της κινητής φάσης και των αντιδραστηρίων παραγωγής

Από το σχήμα 32 προκύπτει ότι η βέλτιστη ταχύτητα ροής της κινητής φάσης και των αντιδραστηρίων παραγωγής είναι 0,1 ml/min. Παρόλα αυτά η ταχύτητα ροής που επιλέχθηκε είναι 0,2 ml/min προκειμένου να μειωθεί ο χρόνος ανάλυσης.

5.5.2 Αποτελέσματα των μελετών βελτιστοποίησης της μεθόδου

Από όλες τις μελέτες οι οποίες πραγματοποιήθηκαν καταλήξαμε στις παρακάτω συνθήκες παραγωγής οι οποίες μας έδωσαν τα βέλτιστα αποτελέσματα. Οι συνθήκες αυτές συνοψίζονται στον Πίνακα 1.

| | |
|---|------------------|
| Κινητή φάση | H ₂ O |
| C _{NaIO₄} | 0.05 M |
| pH | 6 |
| C _{4-αμινο-3-πεντεν-2-ονη} | 6 mM |
| C _{NH₄OAc} | 0.5 M |
| C _{Na₂S₂O₃} | 0.2 M |
| Ταχύτητα ροής κινητής φάσης | 0.2 ml/min |
| Ταχύτητα ροής 1ου αντιδραστηρίου παραγωγίσης. | 0.2 ml/min |
| Ταχύτητα ροής 2ου αντιδραστηρίου παραγωγίσης. | 0.2 ml/min |
| Θερμοκρασία 1ου σπειράματος αντίδρασης | 1 20 °C |
| Θερμοκρασία 2ου σπειράματος αντίδρασης | 120 °C |
| λ _{exc} | 402 nm |
| λ _{em} | 520 nm |

Πίνακας 1. Βέλτιστες συνθήκες παραγωγίσης

Χρησιμοποιώντας τις παραπάνω πειραματικές συνθήκες υπολογίστηκε το όριο ανίχνευσης της μεθόδου για τα τρία σάκχαρα γλυκόζη, μαννόζη, και φρουκτόζη. Για τον υπολογισμό του ορίου ανίχνευσης θεωρήσαμε ότι ο λόγος του σήματος ως προς τον θόρυβο είναι 3, με όγκο δείγματος 20 μl.

- **Όριο ανίχνευσης της γλυκόζης**

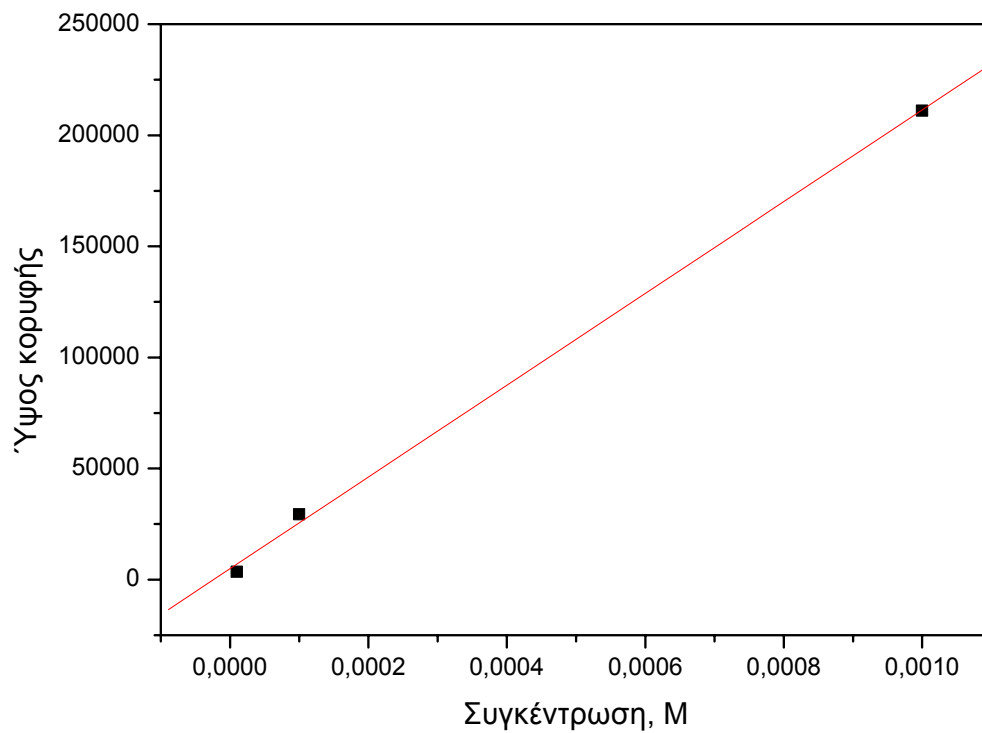
Το όριο ανίχνευσης της γλυκόζης υπολογίστηκε από την καμπύλη αναφοράς που φαίνεται στο σχήμα 31.

Η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς του σχήματος 41 είναι

$$Y = 4924,61 + 6,62E6 \cdot x$$

$$R=0,99949$$

Από την εξίσωση αυτή προκύπτει ότι το όριο ανίχνευσης για τη γλυκόζη είναι **198 ng**.



Σχήμα 31. Καμπύλη αναφοράς υπολογισμού του ορίου ανίχνευσης της μεθόδου για τη γλυκόζη

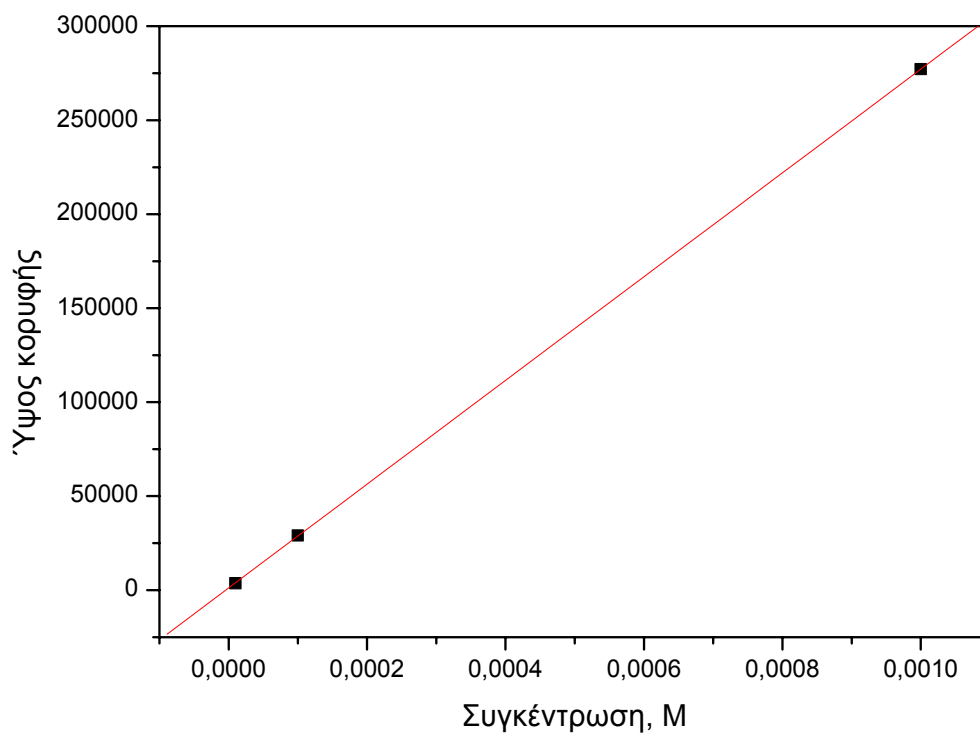
- **Όριο ανίχνευσης της μαννόζης**

Το όριο ανίχνευσης της μαννόζης υπολογίστηκε από την καμπύλη αναφοράς που φαίνεται στο σχήμα 32.

Η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς του σχήματος 32 είναι

$$Y = 1205,3 + 2,7E8 \cdot x$$
$$R=1$$

Από την εξίσωση αυτή προκύπτει το όριο ανίχνευσης για τη μαννόζη είναι **148 ng**.



Σχήμα 32. Καμπύλη αναφοράς υπολογισμού του ορίου ανίχνευσης της μεθόδου για τη μαννόζη

- **Όριο ανίχνευσης της φρουκτόζης**

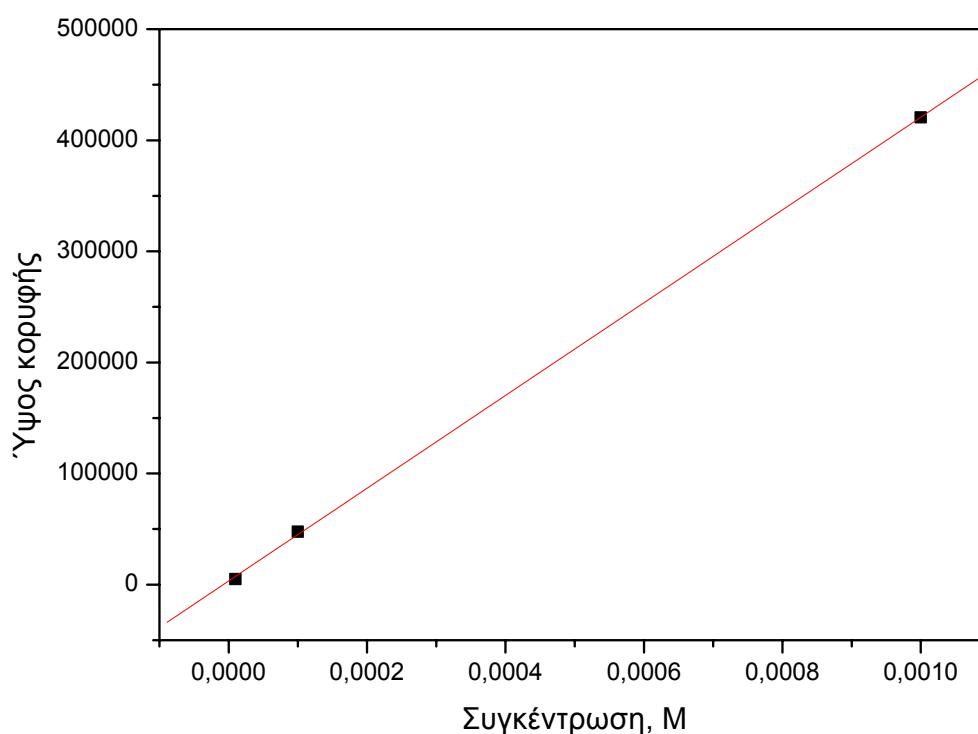
Το όριο ανίχνευσης της φρουκτόζης υπολογίστηκε από την καμπύλη αναφοράς που φαίνεται στο σχήμα 33.

Η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς του σχήματος 33 είναι

$$Y = 3251,44 + 4,17E8 \cdot x$$

$$R = 0,99994$$

Από την εξίσωση αυτή προκύπτει ότι το όριο ανίχνευσης για τη φρουκτόζης είναι **98 ng**.



Σχήμα 33. Καμπύλη αναφοράς υπολογισμού του ορίου ανίχνευσης της μεθόδου για τη φρουκτόζη

5.6 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ HPLC-PCD ΣΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ

5.6.1 Ανάλυση μονοσακχαριτών – δισακχαριτών

Η μέθοδος ανίχνευσης των σακχάρων που αναπτύχθηκε, εφαρμόστηκε σε συνδυασμό με σύστημα διαχωρισμού HPLC. Η χρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιήθηκε, HC-75, είναι κατιονανταλλακτική στήλη ασβεστίου η οποία έχει ως στατική φάση το συμπολυμερές στυρενίου-διβινυλοβενζολίου πάνω στο οποίο υπάρχουν ομοιοπολικά προσδεδωμένες αρνητικά φορτισμένες σουλφονικές ομάδες. Οι διαστάσεις της στήλης είναι 305x7,8 mm με πληρωτικό υλικό διαμέτρου 10-15 μm. Εκτός όμως από το μηχανισμό της κατιονανταλλαγής σε αυτού του είδους τις στήλες λειτουργεί και ο μηχανισμός του μοριακού αποκλεισμού. Το πολυμερές υλικό το οποίο αποτελεί την στατική φάση της στήλης σχηματίζει διασταυρούμενες συνδέσεις μεταξύ των

ομάδων του. Επομένως, από τη στήλη εξέρχονται πρώτα τα μικρού μοριακού βάρους σάκχαρα και στη συνέχεια οι δισακχαρίτες και οι πολυσακχαρίτες με σειρά αυξανόμενου μοριακού βάρους.

Οι προδιαγραφές της στήλης αυτής υποδεικνύουν ότι η κινητή φάση θα πρέπει να είναι νερό. Επιπλέον απαιτείται η στήλη να θερμοστατείται στους 60 °C προκειμένου ο διαχωρισμός να είναι ικανοποιητικός.

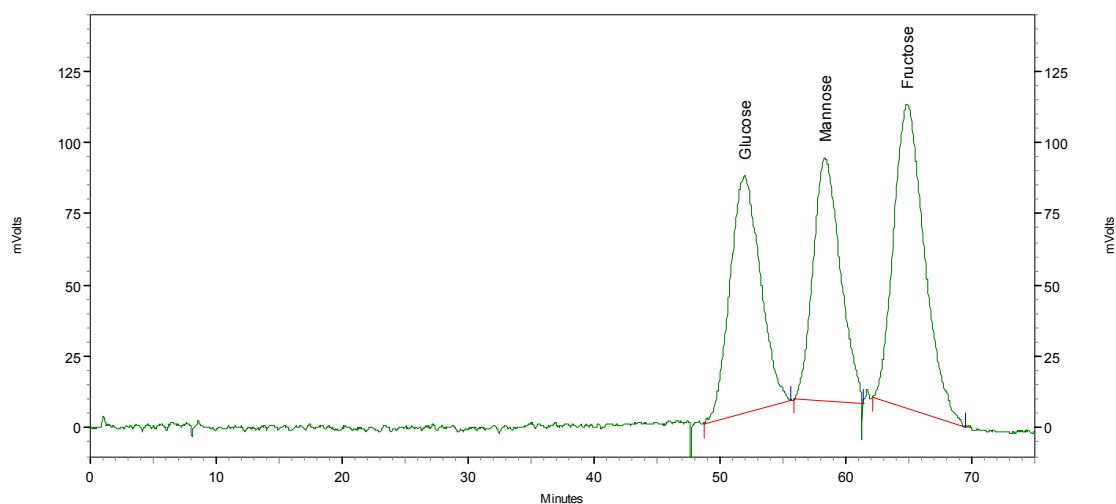
Αρχικά στο σύστημα έγιναν ενέσεις με το καθένα από τα τρία σάκχαρα ξεχωριστά και σε συγκέντρωση 1E-3M. Η γλυκόζη έδωσε κορυφή σε χρόνο κατακράτησης 52 min, η μαννόζη σε χρόνο 58 min ενώ η φρουκτόζη έδωσε κορυφή σε χρόνο κατακράτησης 64 min.

| Σάκχαρο | Χρόνος κατακράτησης |
|-----------|---------------------|
| Γλυκόζη | 52 min |
| Μαννόζη | 58 min |
| Φρουκτόζη | 64 min |

Πίνακας 2. Χρόνοι κατακράτησης για τα σάκχαρα γλυκόζη, μαννόζη και φρουκτόζη

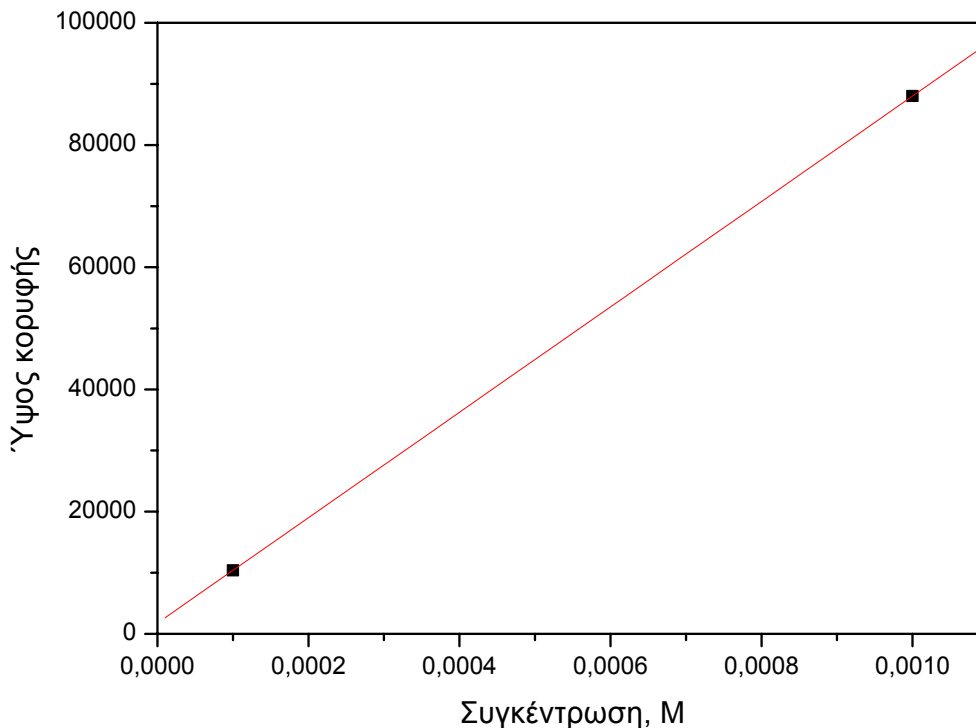
Οι χρόνοι κατακράτησης που παρατηρούνται είναι αρκετά μεγάλοι. Αυτό οφείλεται στην χαμηλή ταχύτητα ροής της κινητής φάσης που χρησιμοποιείται. Η αύξηση της ταχύτητας της κινητής φάσης μπορεί να οδηγήσει σε μικρότερο χρόνο ανάλυσης αλλά θα έχει σαν συνέπεια την σημαντική μείωση του παρατηρούμενου σήματος.

Στο σχήμα 34 φαίνεται το χρωματογράφημα μετά από ένεση μίγματος των τριών σακχάρων, στο οποίο βρίσκονταν σε συγκέντρωση 1E-3M.



Σχήμα 34. Χρωματογράφημα διαχωρισμού των σακχάρων γλυκόζη, φρουκτόζη και μαννόζη

Έγινε καμπύλη αναφοράς για τη γλυκόζη η οποία φαίνεται στο σχήμα 35. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν είναι από 1E-4 M έως 1E-3 M.



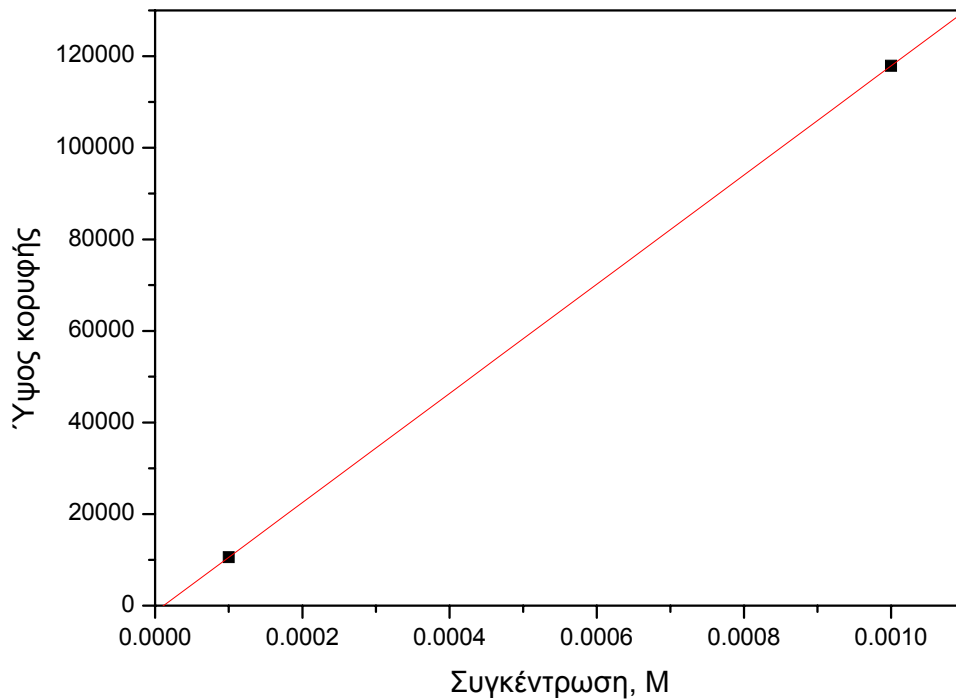
Σχήμα 35. Καμπύλη αναφοράς για τη γλυκόζη

Η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς του σχήματος 35 είναι

$$Y = 1752,11111 + 8,62689E7 \cdot x$$

Από την εξίσωση αυτή προκύπτει ότι το όριο ανίχνευσης για τη γλυκόζη είναι **0,42 μg**.

Επιπλέον έγινε καμπύλη αναφοράς για την μαννόζη που φαίνεται στο σχήμα 36. Οι συγκεντρώσεις που μετρήθηκαν είναι από 1E-4 M έως 1E-3 M.



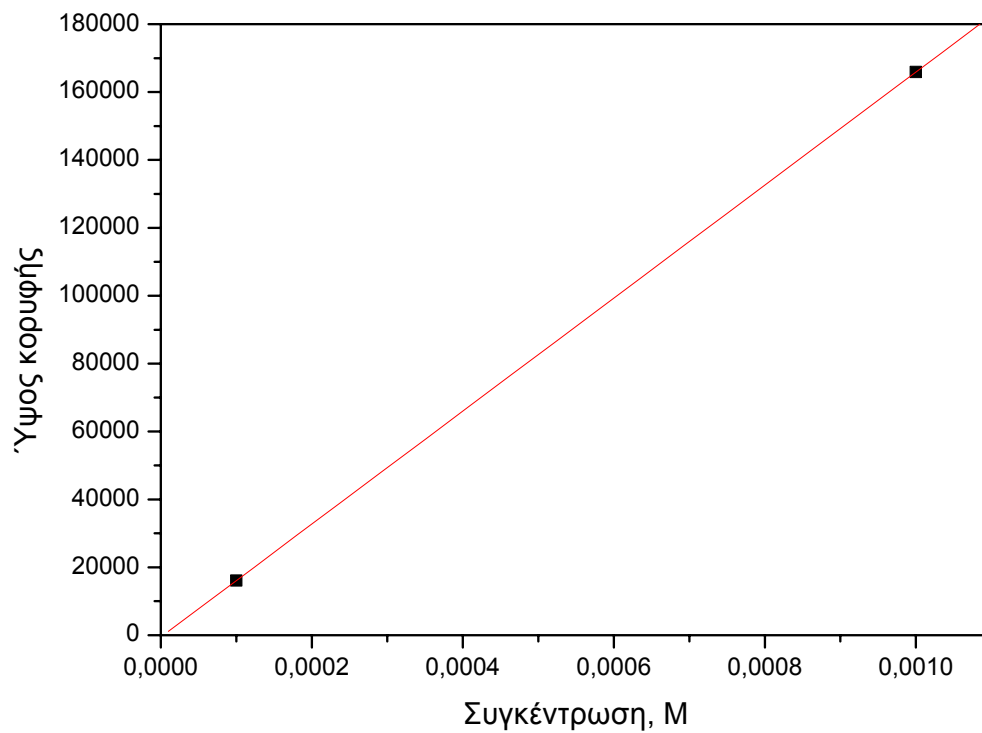
Σχήμα 36. Καμπύλη αναφοράς για τη μαννόζη

Η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς του σχήματος 36 είναι

$$Y = -1330,11111 + 1,19221E8 \cdot x$$

Από την εξίσωση αυτή προκύπτει ότι το όριο ανίχνευσης για τη μαννόζη είναι **0,3 μg.**

Έγινε καμπύλη αναφοράς για τη φρουκτόζη η οποία φαίνεται στο σχήμα 37. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν είναι από 1E-4 M έως 1E-3 M.



Σχήμα 37. Καμπύλη αναφοράς για τη φρουκτόζη

Η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς του σχήματος 37 είναι

$$Y = -579,44444 + 1,66484E8 \cdot x$$

Από την εξίσωση αυτή προκύπτει ότι το όριο ανίχνευσης για τη μαννόζη είναι **0,22 μg.**

5.7 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στη παρούσα εργασία αναπτύχθηκε και βελτιστοποιήθηκε μέθοδος με την οποία μπορούν να ανιχνευτούν τα σάκχαρα, τόσο αναγωγικά όσο και μη αναγωγικά, μέσω της μετατροπής του σε φθορίζοντα προϊόντα. Ελέγχθηκαν διάφορες πειραματικές συνθήκες της μεθόδου και προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες οι οποίες αναφέρονται στον πίνακα 3:

| | |
|---|------------------|
| Κινητή φάση | H ₂ O |
| C _{NaIO₄} | 0.05 M |
| pH | 6 |
| C _{4-αμινο-3-πεντεν-2-ονη} | 6 mM |
| C _{NH₄OAc} | 0.5 M |
| C _{Na₂S₂O₃} | 0.2 M |
| Ταχύτητα ροής κινητής φάσης | 0.2 ml/min |
| Ταχύτητα ροής 1ου αντιδραστήριου παραγωγίσης. | 0.2 ml/min |
| Ταχύτητα ροής 2ου αντιδραστήριου παραγωγίσης. | 0.2 ml/min |
| Θερμοκρασία 1ου σπειράματος αντίδρασης | 120 °C |
| Θερμοκρασία 2ου σπειράματος αντίδρασης | 120 °C |
| λ _{exc} | 402 nm |
| λ _{em} | 520 nm |

Πίνακας 3. Χρωματογραφικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στην μέθοδο ανίχνευσης των σακχάρων

Με βάση τις συνθήκες αυτές προσδιορίστηκε το όριο ανίχνευσης της μεθόδου για τα σάκχαρα γλυκόζη, μαννόζη και φρουκτόζη. Τα όρια ανίχνευσης που υπολογίστηκαν θεωρώντας τον λόγο του σήματος ως προς το θόρυβο ίσο με τρία (S/N=3) είναι τα ακόλουθα:

- Γλυκόζη 0,42 μg
- Μαννόζη 0,3 ng
- Φρουκτόζη 0,22 ng

Επιπλέον, η μέθοδος συζεύχθηκε με σύστημα υγρής χρωματογραφίας και πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός και ανίχνευση πολυσακχαριτών. Οι

συνθήκες οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν είναι οι ίδιες που αναφέρονται στον πίνακα 7:

Τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου αυτής είναι δυνατόν να μειωθούν σε επίπεδα της τάξης των μg , για εφαρμογή της στον ποσοτικό προσδιορισμό των σακχάρων σε δείγματα όπως είναι τα βιολογικά υγρά. Το σημαντικότερο πρόβλημα το οποίο δεν επιτρέπει κάτι τέτοιο είναι η κυκλική δομή των σακχάρων. Τα σάκχαρα στο μεγαλύτερο ποσοστό τους (99%) βρίσκονται στην κυκλική δομή (γλυκοζίτες). Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης οξειδωτικής διάσπασης, και την παραγωγή με αυτόν τον τρόπο φορμαλδεΐδης, όμως απαιτείται η δομή της ανοικτής αλυσίδας. Η ύπαρξη των υδατανθράκων σε μεγάλο ποσοστό στην κυκλική δομή αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα για την πραγματοποίηση της αντίδρασης. Η αλλαγή στην δομή του αντιδραστήριου παραγωγής της φορμαλδεΐδης θα μπορούσε να επιφέρει καλύτερα αποτελέσματα. Η προσθήκη φαινυλίων αντί των μεθυλίων στα δυο άκρα πιθανώς να είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του παρατηρούμενου φθορισμού, καθώς αυξάνεται η συζυγία.

Επίσης οι υψηλές θερμοκρασίες που είναι απαραίτητες για τις δύο αντιδράσεις παραγωγής, έχουν σαν αποτέλεσμα την είσοδο στον ανιχνευτή του προϊόντος σε υψηλή θερμοκρασία. Κάτι τέτοιο όμως έχει ως αποτέλεσμα την μείωση του παρατηρούμενου φθορισμού λόγω αποσβέσεων. Η ψύξη του μίγματος πριν την είσοδο του στον ανιχνευτή θα μπορούσε να ελαττώσει τα όρια ανίχνευσης.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. D.A. Martens, W.T, Frankenberger Jr, **Chromatographia** 29 (1990)
2. R. Macrae, J. Dick, **J. Chromatogr** 210 (1981) 138
3. Y. Ohkura, **Anal. Sci.** 5 (1989) 371
4. I.S. Krull, Z. Deyl, H. Lingeman, **J. Chromatogr. B**, 659 (1994) 1
5. S.T. Colgan, I.S. Krull, C. Dorshel, B. Bidlingmeyer, **Anal. Chem.** 58 (1985) 236
- 6 I.S. Krull, M.E.Szulc, A.J. Bourque, F-X Zhou, J. Yu, R. Strong **J. Chromatogr** 659 (1994) 19
7. J.F. Lawrence, R.W Frei **Chemical derivatization in Liquid Chromatography** Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 1976
8. H. Godel, T. Graser, P. Foldi, P. Pfaender, P. Furst **J. Chromatogr.** 297 (1984) 49
9. N. Nimura, T. Kinoshita **J. Chromatogr.** 352 (1986) 169
10. A. Hashimoto, T. Nishikawa, T. Oka, K. Takahashi, T. Hayashi **J. Chromatogr.** 582 (1992) 41
11. S. Houdier, S. Perrier, E. Defrancq, M. Legrand, **Anal. Chim Acta**, 412 (2000) 221
- 12 . R.W. Frei, K. Zech, **Selective Sample Handling and Detection in High Performance Liquid Chromatography**, Elsevier, Amsterdam, Netherlands, Parts A (1988) and B (1989)
13. J. McMurry, **Οργανική Χημεία Τόμος II**, Π.Ε.Κ., 1^η έκδοση, 1999
14. R.T. Morrison, R.N. Boyd, **Organic Chemistry**, Allyn and Bacon, 5th edition
15. K.P.C. Vollhardt, N.E. Schore, **Organic Chemistry**, W.H. Freeman and Company, 2nd edition, New York, 1994
16. L.K. Maham, M. Arlin, Krause's FOOD, **NUTRITION and DIET THERAPY**, Saunders, 8th edition
17. M.E. Shils, J.A. Olson, M. Shike, **Modern nutrition in health and disease**, Lea and Febiger, 8th edition
18. S. Honda, **Anal Biochem**, 140 (1984) 1
19. M.F. Chaplin, in M.F. Chaplin and J.F. Kennedy, **Carbohydrate analysis**, IRL Press, Oxford, 1987, 1

-
20. U.D. Neue **HPLC Columns** Wiley-VCH, 1st edition, 1997
 21. F.M. Rabel, A.G. Caputo, E.T. Bulls **J. Chromatogr** 126 (1976) 731
 22. K. Mopper, R. Dawson, G. Liebezeit, H.P. Hansen **Anal. Chem.** 52 (1980) 2018
 23. A. Coquet, J-L. Veuthey, W. Haerdi **J. Chromatogr**, 553 (1991) 255
 24. E.W. Yeung, R.E Synovec **Anal. Chem.** 58 (1986) 1237A
 25. Y.C. Lee **Anal. Biochem.** 189 (1990) 151
 26. A.W. Bott **Current Separations** 17:1 (1998)
 27. C.M. Zook, W.R. LaCourse **Current Separations** 14:2 (1995)
 28. B.P. Solomon **Current Separations** 18:4 (2000)
 29. Dionex, Technical Note 20
 30. Y. Wei, M-Y Ding **J. Chromatogr. A** 904 (2000) 113
 31. M. Kohler, W. Haerdi, P. Christen, J-L Veuthey, **Trends in anal. Chem.** 16 (1997) 475
 32. A. Coquet, J-L. Veuthey, W. Haerdi, **Chromatographia** 34, 11/12 (1992) 651
 33. X. Shen, H. Perreault, **J. Chromatogr. A** 811 (1998) 47
 34. M. Dubois, K.A. Gilles, J. K. Hamilton, R.A. Rebers, F. Smith **Anal. Chem.** 28 (1956) 350
 35. J. Bruckner **Biochem. J.** 60 (1995) 200
 36. G. Gerriotti **J. Biol. Chem.** 198 (1952) 297
 37. J. Havlicek, O. Samuelson **Anal. Chem.** 47 (1975) 1854
 38. C.J. Rogers, C.W. Chambers, N.A. Clarke **Anal. Chem.** 38 (1966) 1851
 39. K. Mopper, E.M. Gindler **Anal Biochem.** 56 (1973) 440
 40. S. Katz, W.W. Pitt, J.E. Mrochok, S. Dinsmore **J. Chromatogr** 101 (1974) 193
 41. Y. Ohkura, M. Kai, H. Nohta **J. Chromatogr B**, 659 (1994) 85
 42. S. Honda, K. Kakimoto, K. Sudo, K. Takehi, K. Takiura, **Anal. Chim. Acta** 70 (1974) 133
 43. S. Honda, Y. Maysuda, M. Takahashi, K. Kaheki, S. Ganno **Anal. Chem.** 52 (1980) 1079
 44. S. Honda **J. Chromatogr. A** 720, (1996) 183
 45. M. Kai, K. Tamura, M. Yamaguchi, Y. Ohkura **Anal. Sci.** 1 (1985) 59

-
46. M. Kai, K. Tamura, H. Watanabe Y. Ohkura **Bunseki Kagaku** 38 (1989) 568
 47. Y. Umegae, H. Nohta, Y. Ohkura **Anal. Chim. Acta** 217 (1988) 263
 48. O. Samuelson, H. Stromberg **Carbohydr. Res.** 3 (1966) 89
 49. R. Woodbury, M. Stacey, F. Kennedy **Carbohydr. Res.** 11 (1969) 225
 50. S. Honda, M. Takahashi, S. Shimada **Anal Biochem.** 128 (1983) 429
 51. P. Dasgupta, Q. Fan **Anal. Chem.** 66 (1994) 551
 52. J. Andrade, A. Costa, H. Pinheiro **Talanta** 64 (2004) 711
 53. M Braibante, L. Missio, A. Andricopoulo **Synthesis** 9 (1994) 898