



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών



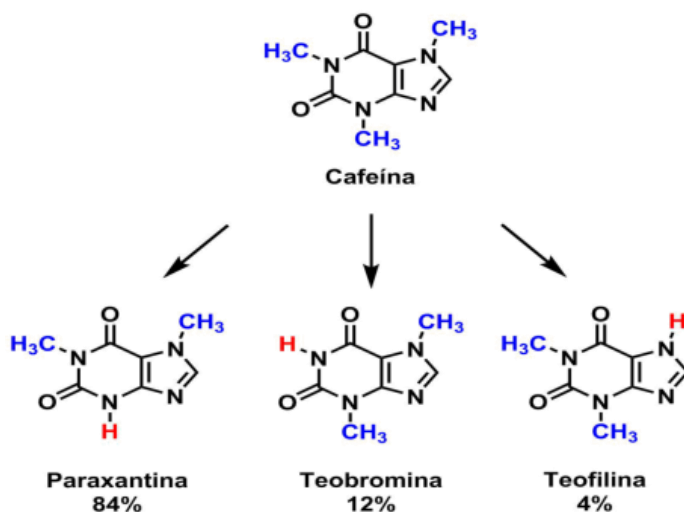
Εργαστήριο Χημείας, Βιοχημείας, Κοσμητολογίας

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Προσδιορισμός με αναλυτικές μεθόδους ουσιών που διεγείρουν το κεντρικό νευρικό σύστημα

GRADUATE THESIS

Determination by analytical methods of substances that stimulate the central nervous system



ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ(ΤΩΝ)/NAME OF STUDENTS

Ζαλοκώστα Ειρήνη

Zalokosta Eirini

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

Τράπαλη Μαρία

Trapali Maria

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2021



Faculty of Health and Caring Professions
Department of Biomedical Sciences



Laboratory of Chemistry, Biochemistry, Cosmetology

GRADUATE THESIS

Determination by analytical methods of substances that stimulate the central nervous system

ZALOKOSTA EIRINI

62117075

ml17075@uniwa.gr

FIRST SUPERVISOR

Maria Trapali

SECOND SUPERVISOR

Christine Fountzoula

THIRD SUPERVISOR

Petros Karkalousos

AIGALEO 2021

Δήλωση συγγραφέα προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Ζαλοκώστα Ειρήνη του Χρυσοστόμου, με αριθμό μητρώου 62117075 φοιτήτρια του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Όνομα φοιτητή

Ζαλοκώστα Ειρήνη

Υπογραφή φοιτητή

Ευχαριστίες

Η διπλωματική εργασία με θέμα «Προσδιορισμός με αναλυτικές μεθόδους ουσιών που διεγείρουν το κεντρικό νευρικό σύστημα» εκπονήθηκε στα πλαίσια της πτυχιακής εργασίας του τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών με κατεύθυνση Ιατρικά Εργαστήρια, το ακαδημαϊκό έτος 2020-2021.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω πρώτα από όλα την οικογένεια μου, που μου παρείχε όλα τα εφόδια για να ολοκληρώσω τις σπουδές μου, και έπειτα την εισηγήτριά μου κ. Τράπαλη Μαρία για την συμβολή της στη διεκπεραίωση της εργασίας.

Αφιέρωσεις

Στην οικογένειά μου, με αγάπη

Περίληψη

Η συγγραφή της διπλωματικής βιβλιογραφικής εργασίας έχει ως σκοπό να εισάγει, αρχικά, τους αναγνώστες της στις ουσίες που ασκούν διεγερτική δράση στο ΚΝΣ, και χαρακτηρίζονται ως ψυχοδιεγερτικά, με ιδιαίτερη έμφαση στην καφεΐνη, τη θεοφυλλίνη και τη θεοβρωμίνη. Σημαντικά σημεία, πριν την παράθεση των μεθόδων που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό τους, αποτελούν η γνώση και η κατανόηση του μεταβολισμού των ουσιών, καθώς και του μηχανισμού δράσης τους. Γενικότερα, αυτές οι ουσίες ασκούν δράση σε διάφορα συστήματα και για αυτό πραγματοποιείται αναφορά στις επιμέρους επιδράσεις τους στο ΚΝΣ. Μια πληθώρα μεθόδων, διαχρονικών αλλά και σύγχρονων νεοεισαχθέντων, χρησιμοποιούνται για τον ποιοτικό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των μεθυλοξανθινών σε διάφορα είδη τσαγιού, αναψυκτικών, κόκκων καφέ, ακόμη και σε πλάσμα αίματος. Αρκετές μέθοδοι χρησιμοποιούν παρόμοιες διαδικασίες για την προετοιμασία του δείγματος, ωστόσο η πορεία της ανάλυσης μπορεί να διαφέρει. Πλεονεκτήματα αλλά και μειονεκτήματα διέπουν κάθε μέθοδο, συνεπώς η επιλογή και η χρήση μίας μεθόδου εξαρτάται από πολλές παραμέτρους. Στόχος της εργασίας είναι να κάνει γνωστές όσες το δυνατόν περισσότερες μεθόδους για τον ταυτόχρονο ή τον επιμέρους προσδιορισμό της καφεΐνης, της θεοφυλλίνης και της θεοβρωμίνης. Εκτενέστερες πληροφορίες σχετικά με κάθε μέθοδο παρατίθενται στα επιμέρους κεφάλαια.

Λέξεις κλειδιά: καφεΐνη, θεοφυλλίνη, θεοβρωμίνη, ΚΝΣ, μέθοδοι προσδιορισμού

Abstract

The purpose of this thesis is to introduce its readers to the substances that have a stimulating effect on the CNS, and are characterized as psychostimulants, with particular emphasis on caffeine, theophylline and theobromine. Important points, before listing the methods used to determine them, are the knowledge and understanding of the metabolism of substances, as well as their mechanism of action. In general, these substances act in different systems and therefore reference is made to their individual effects on the CNS. A variety of methods, timeless and modern newly introduced, are used for the qualitative and quantitative determination of methylxanthines in various types of tea, soft drinks, coffee beans and even blood plasma. Several methods use similar procedures to prepare the sample, however the course of the analysis may differ. Advantages and disadvantages govern each method, therefore the choice and use of a method depends on many parameters. The aim of this thesis is to make known as many methods as possible for the simultaneous or partial determination of caffeine, theophylline and theobromine. More information about each method is provided in the individual chapters.

Keywords: caffeine, theophylline, theobromine, CNS, determination methods

Περιεχόμενα

Δήλωση συγγραφέα προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας.....	iv
Ευχαριστίες	v
Αφιερώσεις	vi
Περίληψη	viii
Abstract.....	ix
Συνομογραφίες.....	xiv
Πρόλογος	1
Εισαγωγή.....	2
Κεφάλαιο 1. Γενικά στοιχεία και μηχανισμός δράσης των επιμέρους ουσιών	3
1.1. Μεταβολισμός της καφεΐνης	3
1.1.1. Επιδράσεις της καφεΐνης στο ΚΝΣ	4
1.1.2. Επιδράσεις της καφεΐνης σχετιζόμενες με τη δοσολογία	5
1.1.3. Μηχανισμός δράσης της καφεΐνης	6
1.2. Μεταβολισμός της θεοβρωμίνης.....	8
1.2.1. Επιδράσεις της θεοβρωμίνης στο ΚΝΣ.....	9
1.2.2. Μηχανισμός δράσης της θεοβρωμίνης	9
1.3. Μεταβολισμός, επιδράσεις και μηχανισμός δράσης της θεοφυλλίνης.....	10
Κεφάλαιο 2. Προσδιορισμός της καφεΐνης, της θεοφυλλίνης και της θεοβρωμίνης με τη χρήση τεχνικών χρωματογραφίας.....	12
2.1. HPLC.....	13
2.1.1. Προσδιορισμός της καφεΐνης σε ροφήματα καφέ	13
2.1.2. Προσδιορισμός της θεοφυλλίνης σε βιολογικά υγρά (ούρα, πλάσμα, σάλιο)	14
2.1.3. Ταυτόχρονος προσδιορισμός της καφεΐνης, της θεοβρωμίνης και της θεοφυλλίνης σε τρόφιμα, ποτά και φυτικά προϊόντα.....	16
2.1.4. Προσδιορισμός των μεθυλοξανθινών σε ενεργειακά ποτά	17
2.2. UPLC.....	18
2.2.1. Ταυτόχρονος προσδιορισμός της καφεΐνης και της θεοβρωμίνης σε εμπορικά τσάγια	20
2.3. LC-MS/MS	21

2.3.1. Μελέτη περίπτωσης υπερβολικής κατανάλωσης καφεΐνης και προσδιορισμού της σε δείγμα αίματος	22
2.4. TLC/GC/MS.....	24
2.4.1. Διαχωρισμός και ανίχνευση της καφεΐνης και των μεταβολιτών της σε ποικιλίες καφέ, ανθρακούχα αναψυκτικά και αλκοολούχα ποτά	27
2.5. GC-FID	28
2.5.1. Προσδιορισμός της καφεΐνης σε κόκκους καφέ	30
2.6. ΜΕΚC.....	31
2.6.1. Εφαρμογή της ανάλυσης ΜΕΚC σε δείγμα πλάσματος	33
2.7. SIC	34
2.7.1. Συνδυασμός της SIC με γραμμική έκλυση για διαχωρισμό και προσδιορισμό των τριών κύριων μεθυλοξανθινών χρησιμοποιώντας μικρή μονολιθική στήλη C18	35
Κεφάλαιο 3. Εφαρμογή μη χρωματογραφικών αναλύσεων για τον προσδιορισμό των ψυχοδιεγερτικών ουσιών	38
3.1. DART-MS	38
3.1.1. Ανίχνευση της καφεΐνης στο τσάι, το στιγμιαίο καφέ, το πράσινο τσάι και τα αναψυκτικά με πηγή DART συνδεδεμένη με φασματομετρία μάζας μονού τετραπόλου	40
3.2. DART-TOFMS.....	41
3.2.1. Ταχεία ανάλυση της καφεΐνης σε ποικιλία δειγμάτων καφέ εφαρμόζοντας DART-TOFMS.....	42
3.3. FTIR	43
3.3.1. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης καφεΐνης σε ποτά μέσω φασματοσκοπίας FTIR.....	44
3.4. Σύγχρονη φασματοσκοπία φθορισμού (SSF)	45
3.4.1. Ταχύς και μη καταστροφικός προσδιορισμός των μεθυλοξανθινών (καφεΐνη και θεοβρωμίνη) και των στερεών περιεχομένων κακάο στη μαύρη σοκολάτα, με σύγχρονη φασματοσκοπία φθορισμού εμπρόσθιας όψης.....	45
Κεφάλαιο 4. Χρήση ηλεκτροχημικών μεθόδων για τον προσδιορισμό των ουσιών που διεγείρουν το ΚΝΣ	48

4.1. Ταυτόχρονος προσδιορισμός θεοβρωμίνης, θεοφυλλίνης και καφεΐνης χρησιμοποιώντας ένα τροποποιημένο ηλεκτρόδιο με νανοδομή MnO ₂ που μοιάζει με πέταλο	51
4.1.1. Χημικά και αντιδραστήρια	52
4.1.2. Συσκευή	52
4.1.3. Υδροθερμική σύνθεση του β-MnO ₂ νανολουλουδιού	52
4.1.4. Προετοιμασία και ανάλυση δείγματος.....	52
4.2. Ευαίσθητος προσδιορισμός της καφεΐνης από τροποποιημένο ηλεκτρόδιο πάστας άνθρακα (CPE) με νανοσωματίδια θειούχου χαλκού	53
4.2.1. Υλικά	54
4.2.2. Σύνθεση των CuS νανοϋλικών	54
4.2.3. Μηχανισμός της αντίδρασης	54
4.2.4. Οργανολογία	54
4.3. Χρήση τροποποιημένου ηλεκτροδίου σύνθετης μεμβράνης πολύ(φολικού οξέος)/ γραφενίου για ταυτόχρονο προσδιορισμό της θεοφυλλίνης και της καφεΐνης	55
4.3.1. Αντιδραστήρια	56
4.3.2. Οργανολογία	56
4.3.3. Κατασκευή του PFA/ GR/ GCE.....	56
4.3.4. Διαδικασίες μέτρησης.....	56
4.3.5. Προετοιμασία δείγματος	57
4.4. Νέος ηλεκτροχημικός αισθητήρας φελλού-γραφίτη για τον βολταμετρικό προσδιορισμό της καφεΐνης	57
4.4.1. Γενικά στοιχεία	58
4.4.2. Υλικά και μέθοδος	58
4.5. Ηλεκτροχημικός προσδιορισμός της καφεΐνης στο τσάι, με χρήση νανοσύνθετου πολυδοπαμίνης- χρυσού	60
4.5.1. Χημικά.....	61
4.5.2. Οργανολογία	62
4.5.3. Παρασκευή νανοσύνθετων PDA/ Au/ NPs	62
4.6. Ποτενσιομετρικός αισθητήρας με βάση στερεά σωματίδια επαφής για τον προσδιορισμό της θεοφυλλίνης σε διαφορετικούς τύπους εκχυλίσματος τσαγιού ..	62
4.6.1. Υλικά και μέθοδος	63
4.6.2. Διαδικασία.....	64

4.7. Ταυτόχρονος προσδιορισμός της καφεΐνης και της θεοφυλλίνης χρησιμοποιώντας βολταμετρία τετραγωνικού κύματος σε πολυ(L- ασπαρτικό οξύ)/ λειτουργικούς πολυστρωματικούς νανοσωλήνες άνθρακα σύνθετου τροποποιημένου ηλεκτροδίου.....	65
4.7.1. Χημικά και αντιδραστήρια	65
4.7.2. Συσκευές και όργανα	66
4.7.3. Προετοιμασία των προτύπων εργασίας και των δειγμάτων	66
4.7.4. Λειτουργία των MWCNTs	67
4.8. Μοριακά αποτυπωμένα πολυμερή σωματίδια (MIPs).....	68
4.8.1. Βολταμετρικός αισθητήρας για τη θεοφυλλίνη χρησιμοποιώντας sol-gel MIPs	70
Συμπεράσματα.....	73
Βιβλιογραφία.....	75
Πηγές Εικόνων.....	81

Συντομογραφίες

	Αγγλική ορολογία	Ελληνική ορολογία
AUC	Area Under the Curve	Περιοχή Κάτω από την Καμπύλη
CE	Capillary Electrophoresis	Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση
CF	Caffeine	Καφεΐνη
CMC	Critical Micellar Concentration	Κρίσιμη Συγκέντρωση Μικκυλίων
CNS	Central Nervous System	Κεντρικό Νευρικό Σύστημα
CV	Cyclic Voltammetry	Κυκλική βολταμετρία
FID	Flame Ionization Detector	Ανιχνευτής Ιονισμού Φλόγας
FTIR	Fourier Transform Infrared spectroscopy	Φασματοσκοπία Υπέρυθρου Μετασχηματισμού Fourier
GQDs	Graphene Quantum Dots	Κβαντικές Τελείες Γραφενίου
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης
LC	Liquid Chromatography	Υγρή Χρωματογραφία
MEKC	Micellar Electrokinetic Chromatography	Μικκυλιακή Ηλεκτροκινητική Τριχοειδής Χρωματογραφία
MIPs	Molecularly Imprinted Polymers	Μοριακά Αποτυπωμένα Πολυμερή
PKA	Protein Kinase A	Πρωτεϊνική Κινάση Α
PX	Paraxanthine	Παραξανθίνη
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate	Θειικό Δωδεκύλιο Νάτριο
SFS	Synchronous Fluorescence Spectroscopy	Σύγχρονη Φασματοσκοπία Φθορισμού
SIC	Sequential Injection Chromatography	Χρωματογραφία Διαδοχικής Έγχυσης
SS	Solid- State	Στερεή Φάση
TB	Theobromine	Θεοβρωμίνη
TF	Theophylline	Θεοφυλλίνη
THF	TetraHydroFuran	Τετραϋδροφουράνιο
TLC	Thin Layer Chromatography	Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography	Ενισχυμένης Απόδοσης Υγρή Χρωματογραφία

Πρόλογος

Η παρούσα βιβλιογραφική διπλωματική εργασία έχει ως στόχο να παρουσιάσει αναλυτικά τις μεθόδους με τις οποίες μπορούν να προσδιοριστούν ουσίες που διεγείρουν το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) εστιάζοντας στην καφεΐνη, τη θεοφυλλίνη και τη θεοβρωμίνη.

Η ξανθίνη είναι μία βάση πουρίνης που εντοπίζεται στους περισσότερους ιστούς του ανθρώπινου σώματος, όπως ο μυϊκός ιστός, καθώς και στο ήπαρ, τον σπλήνα, το πάγκρεας και τα ούρα. Σχηματίζεται κατά την αποικοδόμηση της μονοφωσφορικής αδενοσίνης, είτε δημιουργείται από την γουανίνη με την απαμινάση γουανίνης. Οι μεθυλοξανθίνες είναι μια μοναδική κατηγορία φαρμάκων που προέρχονται από την ξανθίνη και υπάρχουν ως καφεΐνη, θεοφυλλίνη και θεοβρωμίνη (Ejuh, et al., 2020). Το φυσικό αλκαλοειδές φυτό της καφεΐνης (1,3,7-τριμεθυλοξανθίνη) είναι μία από τις πιο κοινές εργογενείς ουσίες που χρησιμοποιούνται από αθλητές καθώς αυξάνει την αντοχή. Η κύρια φαρμακολογική επίδραση της καφεΐνης είναι ο μη εκλεκτικός ανταγωνισμός των υποδοχέων A1 και A2A της αδενοσίνης. Η αδενοσίνη μπορεί να δράσει ως ανασταλτικός ρυθμιστής του ΚΝΣ που σχετίζεται με κούραση και υπνηλία (Aguilar, Speck, Canas, & Cunha, 2020). Η καφεΐνη απορροφάται πρωτίστως από το λεπτό έντερο, αλλά και από τον στόμαχο εν μέρει. Οι κύριοι μεταβολίτες της είναι η παραξανθίνη, η θεοφυλλίνη και η θεοβρωμίνη (Socata, Szopa, Serefko, Poleszak, & Wlaz, 2021). Μια μέθοδος προσδιορισμού της είναι η χρήση φασματοσκοπίας Raman, η οποία προσφέρει εξαιρετική αναπαραγωγιμότητα και χημική εξειδίκευση, και χρησιμοποιείται ευρύτατα σε προσδιορισμούς για κατάχρηση ναρκωτικών ουσιών. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται, επίσης, και για τον προσδιορισμό των μεταβολιτών της καφεΐνης (Alharbi, Xu, & Goodacre, 2015). Η θεοφυλλίνη είναι μια φυσική ένωση η οποία εντοπίζεται στο τσάι. Η ιδιότητά της να χαλαρώνει το λείο μυϊκό ιστό αξιοποιείται στη φαρμακολογία για τη θεραπεία ασθενειών των αεραγωγών, όπως η Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ) και το άσθμα. Η δράση της εξαρτάται από τη δόση και σχετίζεται με την εμφάνιση ανεπιθύμητων ενεργειών (Gallelli, et al., 2017). Ένας από τους μηχανισμούς δράσης της θεοφυλλίνης είναι μέσω του ανταγωνισμού των υποδοχέων της αδενοσίνης (A1, A2 και A3). Στην πραγματικότητα παίζει το ρόλο ενός μη εκλεκτικού ανταγωνιστή για τον υποδοχέα της αδενοσίνης. Παράδειγμα μεθόδου προσδιορισμού της θεοφυλλίνης

αποτελεί η χρήση τροποποιημένου ηλεκτροδίου με κβαντικές τελείες γραφενίου (GQDs) (Ganjali, Dourandish, Beitollahi, Tajik, Hajiaghababaei, & Larijani, 2018). Όσον αφορά τη θεοβρωμίνη, γνωστή και ως ξανθόζη, ανευρίσκεται σε υψηλές ποσότητες στο κακάο και συνεπώς σε διάφορα τρόφιμα όπως η σοκολάτα και τα συναφή προϊόντα. Αν και χημικά παρόμοια με την καφεΐνη και τη θεοφυλλίνη διεγείρει σε μικρότερο βαθμό το ΚΝΣ. Αξιόπιστος προσδιορισμός της θεοβρωμίνης σε τρόφιμα που περιέχουν σοκολάτα μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση μικροσκοπικού ηλεκτροδίου με διαμάντια βορίου (Švorc, Haššo, Sarahman, Kianičková, Stanković, & Otřísal, 2018).

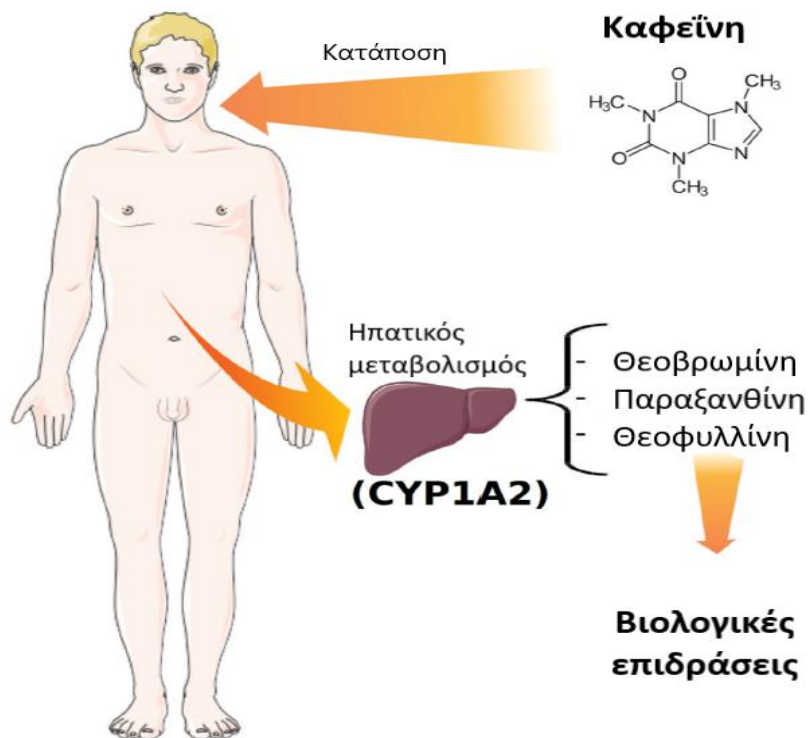
Εισαγωγή

Φυσικά προϊόντα που έχουν διεγερτικές ιδιότητες είναι γνωστά εδώ και χιλιετίες, ενώ είναι πλέον γνωστά και τα ενεργά τους τμήματα. Τα διεγερτικά του ΚΝΣ, που ονομάζονται επίσης και ψυχοδιεγερτικά, είναι ουσίες που οδηγούν σε βελτιωμένη απόδοση σε εργασίες που απαιτούν επαγρύπνηση και εγρήγορση, και σε μία αίσθηση αυτοπεποίθησης και ευεξίας. Οι υψηλές δόσεις μπορούν να παράγουν συναισθήματα ενθουσιασμού ή εφορίας ενώ εξαιτίας αυτών των ενισχυτικών ικανοτήτων είναι ικανά να προκαλέσουν εξάρτηση. Ωστόσο, επειδή κάνουν τους χρήστες να αισθάνονται «καλά», μερικές φορές λαμβάνονται για παρατεταμένες χρονικές περιόδους σε μία προσπάθεια διατήρησης της αυξημένης διάθεσης. Η ανοχή που αναπτύσσεται στις ιδιότητες των ψυχοδιεγερτικών να ανεβάζουν τη διάθεση, έχει ως αποτέλεσμα να απαιτείται η λήψη όλο και μεγαλύτερης ποσότητας των ουσιών προκειμένου να επέλθει το επιθυμητό αποτέλεσμα. Οι αυξημένες δόσεις, επίσης, αποτρέπουν τον ύπνο και η συνεχιζόμενη χρήση μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση συμπτωμάτων ψύχωσης. Η διακοπή τους (αποχή) μπορεί να έχει ως συνέπεια συναισθηματική και σωματική «κατάρρευση» ή και σοβαρή κατάθλιψη. Σε εξαρτώμενα άτομα, εμφανίζεται έντονη λαχτάρα για την ουσία και ακολουθεί μια περίοδος αναζήτησης με διαρκείς συγκρούσεις. Αυτός ο κύκλος επαναλαμβάνεται σε χρόνια ψυχοδιεγερτική εξάρτηση (Nichols, 2010).

Κεφάλαιο 1. Γενικά στοιχεία και μηχανισμός δράσης των επιμέρους ουσιών

1.1. Μεταβολισμός της καφεΐνης

Η καφεΐνη απορροφάται γρήγορα από τα όργανα του γαστρεντερικού συστήματος και έπειτα μεταβολίζεται με απομεθυλίωση και οξείδωση στο ήπαρ (Egorenko & Zabrodina, 2019). Μεταβολίζεται κυρίως σε 1,7-διμεθυλοξανθίνη(παραξανθίνη), μέσω του CYP ισοενζύμου CYP1A2, που προκαλεί 3-απομεθυλίωση της καφεΐνης. Η παραξανθίνη είναι ο κύριος μεταβολίτης (περίπου 80%) της βιομετατροπής της . Είναι ενδιαφέρον πως η ίδια η παραξανθίνη είναι επίσης φαρμακολογικά ενεργή, αν και με πιθανώς χαμηλότερη τοξικότητα. Το CYP1A2 είναι υπεύθυνο για την 1 και 7-απομεθυλίωση της καφεΐνης σε 3,7-διμεθυλοξανθίνη (θεοβρωμίνη) και 1,3-διμεθυλοξανθίνη (θεοφυλλίνη) αντίστοιχα, που είναι και αυτά φαρμακολογικά ενεργά. Η θεοβρωμίνη αντιπροσωπεύει περίπου το 11%, ενώ η θεοφυλλίνη το 5% των μεταβολιτών της καφεΐνης. Συνολικά, περισσότεροι από 25 μεταβολίτες έχουν εντοπιστεί στον ανθρώπινο οργανισμό μετά από χορήγηση καφεΐνης, υποδεικνύοντας μάλλον περίπλοκο μεταβολισμό, ενώ λιγότερο από 5% αυτής απεκκρίνεται αμετάβλητο (Willson, 2018). Ύστερα, ξεκινούν διεργασίες όπως η λιπόλυση, η τόνωση των αγγείων, η στερέωση των κυτταρικών μεμβρανών και η σύντηξη των λιπιδίων. Η λιπόλυση διασπά τα λιποκύτταρα και προωθεί την απώλεια βάρους , ενώ η τόνωση των αιμοφόρων αγγείων οδηγεί σε αύξηση της μικροκυκλοφορίας. Η στερέωση των κυτταρικών μεμβρανών διατηρεί την υγρασία στα ανώτερα στρώματα του δέρματος, αλλά μπορεί επίσης να αφαιρέσει την περίσσεια υγρού, το οποίο βοηθά στην μείωση του πρηξίματος. Τα λιπίδια σύντηξης ενισχύουν την σύνθεση λιπιδίων και χοληστερινών που προστατεύουν το δέρμα. Επίσης, η γκουαρανίνη μπλοκάρει τους υποδοχείς αδενοσίνης A1 και A2, οι οποίοι είναι παρόντες σε όλα τα μέρη του εγκεφάλου, ιδιαίτερα στον ιππόκαμπο, τον εγκεφαλικό και παρεγκεφαλικό φλοιό και στο θάλαμο (Egorenko & Zabrodina, 2019).



Εικόνα 1. Μεταβολισμός της καφεΐνης στο ήπαρ.

1.1.1. Επιδράσεις της καφεΐνης στο ΚΝΣ

Η καφεΐνη μπορεί να επηρεάσει φυσιολογικά και ψυχολογικά έναν ανθρώπινο οργανισμό. Η φυσιολογική της επίδραση περιλαμβάνει διέγερση του ΚΝΣ, του καρδιαγγειακού συστήματος και των οργάνων της πέψης. Τα αποτελέσματα αυτής διαρκούν από 1 ώρα έως 3-4 ώρες (Egorenko & Zabrodina, 2019). Το πιο εμφανές αποτέλεσμα της καφεΐνης είναι η εγρήγορση. Σε μεγαλύτερες ποσότητες, διεγείρει το ΚΝΣ, ο φλοιός στη συνέχεια τον μυελό και λίγο αργότερα διεγείρει τον νωτιαίο μυελό. Στην πραγματικότητα, η μικρή υποκίνηση του φλοιού είναι επικερδής για σαφή και κριτική σκέψη, ενώ πολλά ευρήματα συσχετίζουν την κατανάλωση καφεΐνης με αυξημένη προσοχή και ενισχυμένη νυχτερινή οδήγηση. Μελέτες έδειξαν ότι η καφεΐνη συνδέεται με χαμηλότερο κίνδυνο εμφάνισης αρκετών νευροεκφυλιστικών ασθενειών, όπως η νόσος Alzheimer και η νόσος Parkinson (Uddin, et al., 2017). Επίσης, η τελευταία ρυθμίζει τα συστήματα νευροδιαβιβαστών στις μεσοκορτικολιμπικές περιοχές του εγκεφάλου και μπορεί να επηρεάσει τη δραστηριότητα των γλουταμινεργικών νευρώνων, με αποτέλεσμα βελτιωμένες νευρο-συμπεριφορικές αντιδράσεις (Alasmari, 2020) . Ωστόσο, μια υπερβολική ποσότητα ή ακόμη και η ξαφνική διακοπή της συνηθισμένης κατανάλωσης, μπορεί να προκαλέσουν πονοκέφαλο. Οι μεγάλες

ποσότητες μπορεί να οδηγήσουν σε υπερευαισθησία, με τη σύγχυση και τις παραισθήσεις να αποτελούν βασικές ενδείξεις υπερβολικής δόσης καφεΐνης, η οποία είναι δυνατόν να επιφέρει ακόμη και το θάνατο, λόγω σπασμών (Uddin, et al., 2017).

1.1.2. Επιδράσεις της καφεΐνης σχετιζόμενες με τη δοσολογία

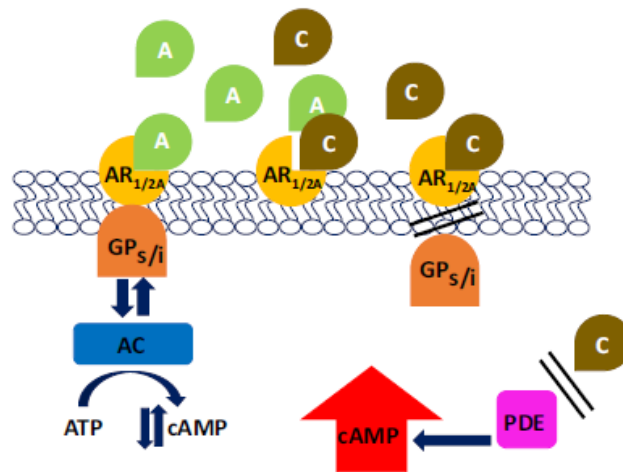
Η καφεΐνη είναι γνωστό ότι γενικά έχει δοσοεξαρτώμενες επιδράσεις με θετικά ή επιθυμητά αποτελέσματα σε χαμηλότερες δόσεις (≤ 400 mg) και ανεπιθύμητες επιδράσεις πάνω από αυτό το επίπεδο πρόσληψης, αν και αυτό διαφέρει από άτομο σε άτομο. Για παράδειγμα, αυξημένη διέγερση, εγρήγορση, συγκέντρωση και ευεξία έχουν παρατηρηθεί σε δόσεις των 250 mg, ενώ μια δόση 500 mg αποδείχθηκε ότι αυξάνει την ένταση, τη νευρικήτητα, το άγχος, τον ενθουσιασμό, την ευερεθιστότητα, τη ναυτία, την παραισθησία, τον τρόμο, την εφίδρωση, το αίσθημα των παλμών, την ανησυχία πιθανώς και τη ζάλη. Υψηλές, θανατηφόρες δόσεις ($\sim 7-10$ mg/kg) σε φυσιολογικούς ενήλικες μπορούν επίσης να προκαλέσουν συμπτώματα όπως ρίγη, έξαψη, ναυτία και πονοκέφαλο. Σε περιπτώσεις υπερδοσολογίας, συχνά σκόπιμης ή και ακούσιας, τουλάχιστον 5 g ή περισσότερα (συνήθως γύρω στα 10 g αλλά και έως 50 g) έχουν ληφθεί και οδηγούν σε θάνατο, ιδιαίτερα αν δεν αντιμετωπιστούν εγκαίρως ή καθόλου. Ακόμη και δόσεις έως 50 g έχουν αντιμετωπιστεί με επιτυχία. Σε ορισμένα άτομα όμως, έχει αποδειχθεί ότι μόλις 3 g θα μπορούσαν να είναι θανατηφόρα κάτω από ορισμένες συνθήκες (Willson, 2018). Η κανονική κατανάλωση βελτιώνει την απόδοση σε εργασίες που απαιτούν εγρήγορση (Egorenko & Zabrodina, 2019). Μελέτες που εξετάζουν τις επιπτώσεις της καφεΐνης στο άγχος έδειξαν μικτά αποτελέσματα σε εύρος δόσεων 150-500 mg, αλλά σαφέστερες επιδράσεις σε εύρος δόσεων 700-1200 mg (σε ενήλικες). Ακόμη και σε οξείες δόσεις των 100 mg, ή λιγότερο, η καφεΐνη μπορεί να παράγει φυσιολογικά αποτελέσματα στο ΚΝΣ σε έναν ενήλικα. Τα αποτελέσματα από την κατανάλωσή της είναι εντελώς αναστρέψιμα και παροδικά, όταν η κατανάλωση σταματά, και δεν έχουν αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία (Turnbull, Rodricks, & Mariano, 2016). Ο χρόνος ημιζωής της καφεΐνης σχετίζεται άμεσα με τη χορηγούμενη δόση: δόσεις μικρότερες από 10 mg οδηγούν σε χρόνο ημιζωής που κυμαίνεται από 2,5 έως 10 ώρες, ενώ υψηλότερες δόσεις έχουν ως αποτέλεσμα μεγαλύτερη ημιζωή (Barcelos, Lima, Carvalho, Bresciani, & Royes, 2020). Ο χρόνος ημιζωής μειώνεται στους καπνιστές, αλλά αυξάνεται κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και σε γυναίκες που λαμβάνουν αντισυλληπτικά από το στόμα (Uddin, et al., 2017)

1.1.3. Μηχανισμός δράσης της καφεΐνης

Η καφεΐνη είναι ένα διεγερτικό του ΚΝΣ που προάγει την ορμονική έκκριση και αλλάζει τις βιοχημικές και φυσιολογικές παραμέτρους. Είναι ικανή να διασχίσει τη βιολογική μεμβράνη και τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, λόγω των λιπόφιλων ιδιοτήτων της. Ωστόσο, η απορρόφησή της μπορεί να επηρεαστεί από χημικές και φυσικές ιδιότητες, τη ρη και την οδό χορήγησή της. Επιδράσεις της καφεΐνης παρατηρούνται και σε άλλους ιστούς, εκτός από το ΚΝΣ και το καρδιαγγειακό σύστημα, όπως ο σκελετικός μυς, ο νεφρικός και πνευμονικός ιστός. Προηγούμενες μελέτες έχουν αποδείξει ότι οι βιολογικές επιδράσεις της καφεΐνης συνδέονται στενά σε 3 κύρια ρυθμιστικά σημεία: στην ανταγωνιστική επίδραση στους υποδοχείς αδενοσίνης (δηλ., A1 και A2A υποδοχείς), στην αναστολή των φωσφοδιεστερασών και στην απελευθέρωση ασβεστίου (Barcelos, Lima, Carvalho, Bresciani, & Royes, 2020).

1. Ανταγωνισμός υποδοχέων αδενοσίνης: Αποτελεί τον κύριο μηχανισμό δράσης της καφεΐνης (Renda & Caterina, 2020). Η αδενοσίνη είναι ένας πολύ ειδικός φυσικός νευρομεταβολίτης που απελευθερώνεται στον εγκέφαλο και δεσμεύεται σε συγκεκριμένους υποδοχείς, προκειμένου να επιφέρει την υπνηλία (Ellingson, 2021). Πολλές ψυχοδραστικές επιδράσεις της καφεΐνης πιστεύεται ότι μεσολαβούνται από τους δύο υπότυπους υποδοχέων αδενοσίνης A1 και A2A, τόσο εκφρασμένων όσο και διαφορετικά κατανομημένων στον ανθρώπινο εγκέφαλο, και θεωρείται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του ύπνου. Δεδομένου ότι η αδενοσίνη επιβραδύνει τη νευρική δραστηριότητα, ο ανταγωνισμός της καφεΐνης με τους υποδοχείς εξασθενεί αυτές τις ανασταλτικές επιδράσεις, με αποτέλεσμα την αφύπνιση και οφέλη στην απόδοση (Renda & Caterina, 2020). Η καφεΐνη ανταγωνίζεται τη δράση της αδενοσίνης σε προσυναπτικές και μετασυναπτικές περιοχές, τόσο στους A1 όσο και στους A2A υποδοχείς, σε μέτριες και χαμηλές δόσεις μειώνοντας την ανασταλτική δράση της αδενοσίνης. Ο αποκλεισμός των υποδοχέων αδενοσίνης A1 και A2A μπορεί να επιτευχθεί με ποσότητες που κυμαίνονται από 40 έως 180 mg καφεΐνης, δηλαδή με ένα φλιτζάνι καφέ. Συγκεντρώσεις καφεΐνης πολύ υψηλότερες από αυτές που απαιτούνται για τον αποκλεισμό των υποδοχέων αδενοσίνης ασκούν διαφορετικά αποτελέσματα στην κυτταρική σηματοδότηση,

όπως απελευθέρωση ασβεστίου, αναστολή της φωσφοδιεστεράσης και του υποδοχέα A του γ-αμινοβουτυρικού οξέος (Stefanello, et al., 2019).



Εικόνα 2. Βασικοί μηχανισμοί δράσης της καφεΐνης.

2. Αναστολή φωσφοδιεστερασών: Συνολικά, οι φωσφοδιεστεράσες είναι υπεύθυνες για τη διάσπαση ενός δεσμού φωσφοδιεστερά, ειδικά στο cAMP, το οποίο παίζει ουσιαστικό ρόλο ως ο δεύτερος αγγελιοφόρος. Η αναστολή της φωσφοδιεστεράσης που ασκείται από την καφεΐνη προάγει τη συσσώρευση του cAMP και ενισχύει τις επιδράσεις του στον κυτταρικό μεταβολισμό. Πράγματι, μια υψηλή συγκέντρωση του cAMP θα μπορούσε να προάγει τη λιπόλυση, η οποία περιλαμβάνει υδρόλυση των τριγλυκεριδίων σε γλυκερόλη και ελεύθερα λιπαρά οξέα στον λιπώδη ιστό. Αυτά τα αποτελέσματα θα μπορούσαν να σχετίζονται στενά με την ανταγωνιστική επίδραση στους υποδοχείς αδενοσίνης, επειδή η αδενοσίνη έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει την λιπόλυση. Η καφεΐνη δρα ως ρυθμιστής μεταβολισμού του λίπους και η επιρροή της στο συμπαθητικό νευρικό σύστημα έχει ως αποτέλεσμα την έκκριση κατεχολαμινών, όπως η επινεφρίνη και η νορεπινεφρίνη, οι οποίες μπορούν να ενεργοποιήσουν τον β-αδρενεργικό υποδοχέα, διεγείροντας την παραγωγή cAMP, και κατά συνέπεια την ενεργοποίηση των μονοπατιών που εμπλέκονται στον μεταβολισμό των λιπιδίων (Barcelos, Lima, Carvalho, Bresciani, & Royes, 2020). Αν και η καφεΐνη αναφέρεται συχνά ως αναστολέας φωσφοδιεστεράσης, μπορεί να αλληλεπιδράσει με αυτό το μοριακό στόχο μόνο σε συγκεντρώσεις που υπερβαίνουν κατά πολύ αυτές που παρατηρούνται με την κανονική κατανάλωση καφεΐνης. Για παράδειγμα, η τιμή

της σταθεράς αναστολής (Ki), η οποία μετρά τη συγγένεια για τη φωσφοδιεστεράση από την καφεΐνη, είναι 480 μmol (περίπου 93,2 mg/L), ενώ η μισή μέγιστη ανασταλτική συγκέντρωση ή τιμή IC50 κυμαίνεται από 500 μmol έως 1000 μmol (περίπου 97 έως 194 mg/L, αντίστοιχα). Επομένως, είναι σαφές ότι η αναστολή της φωσφοδιεστεράσης είναι απίθανο να παίξει κάποιο ρόλο στους μηχανισμούς δράσης της καφεΐνης, εκτός ίσως των περιπτώσεων όπου έχουν ληφθεί πολύ μεγάλες, υψηλά τοξικές και δυνητικά θανατηφόρες δόσεις (Willson, 2018).

3. Η ενδοκυτταρική απελευθέρωση ασβεστίου από το σκελετικό μυ, τον καρδιακό μυ και τον νευρικό ιστό, ως αποτέλεσμα της σύνδεσης και της ενεργοποίησης των διαύλων απελευθέρωσης ασβεστίου, έχει επίσης προταθεί ως πιθανός μηχανισμός για τα αποτελέσματα της καφεΐνης. Ωστόσο, απαιτεί και αυτή συγκεντρώσεις που είναι απίθανο να επιτευχθούν από την κανονική κατανάλωση καφεΐνης. Για παράδειγμα, έχει σημειωθεί ότι απαιτούνται τουλάχιστον 250 μmol (περίπου 48,5 mg/L) για να προκαλέσουν οποιαδήποτε αύξηση της απελευθέρωσης ασβεστίου, ενώ απαιτούνται συγκεντρώσεις μεταξύ 5 έως 20 mM (περίπου 971 mg/L έως 3884 mg/L) για ουσιαστική αύξηση της απελευθέρωσης ασβεστίου. Έτσι, είναι απίθανο να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στο μηχανισμό δράσης της καφεΐνης, εκτός ίσως σε περιπτώσεις μεγάλων, τοξικών, αν όχι θανατηφόρων υπερδοσολογιών (Willson, 2018).

1.2. Μεταβολισμός της θεοβρωμίνης

Τα παράγωγα κακάο είναι οι κύριες πηγές θεοβρωμίνης στη διατροφή, και η συγκέντρωσή τους σε θεοβρωμίνη ποικίλει ανάλογα με τον κόκκο του κακάο (Cova, Leta, Mariani, Pantoni, & Pomati, 2019). Η θεοβρωμίνη απορροφάται αποτελεσματικά από το έντερο και οι μέγιστες συγκεντρώσεις της στο πλάσμα παρατηρούνται συνήθως 3 ώρες μετά την κατανάλωσή της. Μετά την απορρόφηση μεταφέρεται στο ήπαρ, όπου και μεταβολίζεται (Smolders, Mensink, & Plat, 2017). Στους ανθρώπους, η θεοβρωμίνη δεν μεταβολίζεται σε καφεΐνη. Στο ήπαρ η θεοβρωμίνη (3,7-διμεθυλοξανθίνη) διαιρείται σε 3-μεθυλοξανθίνη και 7-μεθυλοξανθίνη από το ένζυμο του κυτοχρώματος P450. Η 7-μεθυλοξανθίνη μεταβολίζεται στη συνέχεια σε 7-μεθυλουρικό οξύ από την οξειδάση της ξανθίνης και σε 3,7-διαμινοουρακίλη, μέσω λιγότερο γνωστών αντιδράσεων (Cova, Leta, Mariani, Pantoni, & Pomati, 2019). Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις των μεταβολιτών της,

3-μεθυλοξανθίνη και 7-μεθυλοξανθίνη, εντοπίζονται 3 έως 7,5 ώρες μετά την κατανάλωση της θεοβρωμίνης (Smolders, Mensink, & Plat, 2017).

1.2.1. Επιδράσεις της θεοβρωμίνης στο ΚΝΣ

Η θεοβρωμίνη διεγείρει το ΚΝΣ, αλλά σε μικρότερο βαθμό από ότι η καφεΐνη (Ejhu, et al., 2020). Αυτό πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι η τελευταία έχει μία επιπλέον μεθυλομάδα (Cova, Leta, Mariani, Pantoni, & Pomati, 2019). Πειράματα έχουν αποδείξει ότι αναστέλλει άμεσα την ενεργοποίηση των αισθητήριων νεύρων και επιβεβαιώνει την ικανότητα των μεθυλοξανθινών να ρυθμίζουν την ενεργοποίηση των ανθρώπινων ενδιάμεσων αγωγών Ca^{2+} και των ενεργοποιημένων διαύλων καλίου, που είναι το «κλειδί» στον έλεγχο της κολπικής δραστηριότητας των προσαγωγών και απαγωγών νεύρων (Ejhu, et al., 2020). Αν και η θεοβρωμίνη ασκεί περίπου το ένα πέμπτο της διεργετικής δράσης που ασκεί η καφεΐνη στο ΚΝΣ, έχει μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής από αυτή (Cova, Leta, Mariani, Pantoni, & Pomati, 2019).

1.2.2. Μηχανισμός δράσης της θεοβρωμίνης

Ένας από τους κύριους μηχανισμούς δράσης της θεοβρωμίνης είναι η αναστολή της φωσφοδιεστεράσης, η οποία αυξάνει τα επίπεδα κυτταρικού cAMP. Η μετατροπή των λευκών λιποκυττάρων σε καφέ ρυθμίζεται αυστηρά από την ενεργοποίηση των β-αδρενεργικών υποδοχέων, αυξάνοντας έτσι τα επίπεδα cAMP και την ενεργοποίηση της PKA (Jang, Kang, Mukherjee, & Yun, 2018). Οι μεθυλοξανθίνες είναι μη επιλεκτικοί ανταγωνιστές του υποδοχέα αδενοσίνης. Είναι γνωστοί τέσσερις διαφορετικοί υποδοχείς αδενοσίνης (A1, A2A, A2B και A3), οι οποίοι αποτελούνται από επτά διαμεμβρανικούς συνδεδεμένους με G- πρωτεΐνες υποδοχείς συνδεδεμένους με διαφορετικούς μηχανισμούς μεταγωγής. Οι υποδοχείς A1, A2B και A3 βρίσκονται σε μεγαλύτερη αφθονία και διανέμονται ευρέως κεντρικά (εγκέφαλος). Οι υποδοχείς A2A εντοπίζονται κυρίως περιφερειακά (αιμοφόρα αγγεία και καρδιά), ενώ έχουν περιορισμένη κατανομή στον εγκέφαλο (ραβδωτό σώμα, οπίσθιο εγκέφαλο). Ο υποδοχέας A1 συνδέεται με ενεργοποίηση των καναλιών K^{+} και αναστολή των καναλιών Ca^{2+} , αναστέλλοντας έτσι τη νευρωνική δραστηριότητα, όπως η χολινεργική μετάδοση. Η έκφραση του υποδοχέα A2A πραγματοποιείται σε υψηλά επίπεδα σε λίγες μόνο περιοχές του εγκεφάλου και συνδέεται κυρίως με την ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης. Η ενεργοποίησή τους αναστέλλει την απελευθέρωση ντοπαμίνης και γλουταμινικού, πιθανώς λόγω του σχηματισμού ετερομερών για αυτούς τους νευροδιαβιβαστές. Επομένως, ο

ανταγωνισμός των A1 και A2A υποδοχέων φαίνεται να ευθύνεται για τις επιδράσεις των μεθυλοξανθινών στο ΚΝΣ. Η θεοβρωμίνη φαίνεται να έχει ίδια συγγένεια για τους A1 και A2A υποδοχείς, ενώ η καφεΐνη έχει ελαφρώς μικρότερη συγγένεια για τους A1 υποδοχείς (Cova, Leta, Mariani, Pantoni, & Pomati, 2019).

1.3. Μεταβολισμός, επιδράσεις και μηχανισμός δράσης της θεοφυλλίνης

Η θεοφυλλίνη, που όπως έχει αναφερθεί ανήκει στις μεθυλοξανθίνες, απορροφάται εκτενώς στο γαστρεντερικό σωλήνα και μεταβολίζεται στο ήπαρ για να δώσει παράγωγα μεθυλοξανθίνης και μεθουλικά οξέα ως μείζονες μεταβολίτες, οι οποίοι τελικά απεκκρίνονται στα ούρα (Martínez-López, Sarriá, Gómez-Juaristi, Goya, Mateos, & Bravo-Clemente, 2014). Ο μεταβολισμός της θεοφυλλίνης στο ήπαρ πραγματοποιείται από το ισοένζυμο 1A2 του κυτοχρώματος (CYP1A2). Ταυτόχρονη χρήση φαρμάκων που μεταβολίζονται από το CYP1A2 ή αναστέλλουν την δραστηριότητά του έχει ως αποτέλεσμα υψηλότερο από το αναμενόμενο. Η καφεΐνη απομεθυλιώνεται από το CYP1A2 για να σχηματίσει θεοφυλλίνη μαζί με άλλα προϊόντα. Έτσι, ταυτόχρονη χρήση θεοφυλλίνης και καφεΐνης θα μπορούσαν να έχουν σημαντική επίδραση στη φαρμακοκινητική της θεοφυλλίνης. Η καφεΐνη δεν ανταγωνίζεται μόνο τη θεοφυλλίνη για το CYP1A2, αλλά επίσης μέσω του in vivo μεταβολισμού της έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή νέας θεοφυλλίνης (Navid, Ng, Wong, & Lightstone, 2016).

Η θεοφυλλίνη ανευρίσκεται και αυτή σε μεγάλη ποικιλία φαγητών και ποτών, όπως τα λεγόμενα ενεργειακά ποτά, και έχει παρόμοιες φαρμακολογικές και τοξικολογικές ιδιότητες με την καφεΐνη. Θεωρείται η πιο διουρητική μεθυλοξανθίνη και έχει ισχυρά βρογχοδιασταλτικά αποτελέσματα, αν και η χρόνια ή υπερβολική κατανάλωση μπορεί να προκαλέσει τοξικές επιδράσεις, όπως ταχυκαρδία, σπασμούς και γαστρεντερικές δυσκολίες (Martínez-López, Sarriá, Gómez-Juaristi, Goya, Mateos, & Bravo-Clemente, 2014). Ανάλογα με τη δόση και τον τρόπο χορήγησής της, η θεοφυλλίνη μπορεί να έχει ένα ευρύ φάσμα καρδιαγγειακών, νευρολογικών, μεταβολικών, μυοσκελετικών και γαστρεντερικών εκδηλώσεων (Journey & Bentley, 2020).

Η θεοφυλλίνη έχει δύο πρωταρχικούς μηχανισμούς δράσης. Ένας μηχανισμός είναι ότι αποκλείει τους υποδοχείς αδενosίνης, οι οποίοι έχουν τόσο θεραπευτικά όσο και τοξικά αποτελέσματα, όπως βρογχοδιαστολή, ταχυκαρδία, καρδιακές αρρυθμίες, επιληπτικές κρίσεις και εγκεφαλική αγγειοσυστολή. Ο δεύτερος μηχανισμός είναι ότι η θεοφυλλίνη προκαλεί ενδογενή απελευθέρωση κατεχολαμινών μέσω έμμεσης διέγερσης

των υποδοχέων βήτα-1 και βήτα-2, οι οποίοι σε θεραπευτικά επίπεδα προκαλούν επιθυμητή βρογχοδιαστολή. Δυστυχώς, η θεοφυλλίνη έχει ένα στενό θεραπευτικό παράθυρο και ακόμη και επίπεδα ελαφρώς πάνω από το θεραπευτικό παράθυρο μπορεί να έχουν δυσμενείς επιπτώσεις. Η υπερβολική κυκλοφορία κατεχολαμινών προκαλεί τις σοβαρές κλινικές επιδράσεις που σχετίζονται με την τοξικότητά της (Journey & Bentley, 2020).

Κεφάλαιο 2. Προσδιορισμός της καφεΐνης, της θεοφυλλίνης και της θεοβρωμίνης με τη χρήση τεχνικών χρωματογραφίας

Η χρωματογραφία είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος διαχωρισμού για χημική ανάλυση. Αν και δεν είναι φασματοσκοπική μέθοδος, συχνά συνδυάζεται ή χρησιμοποιείται με φασματοσκοπικές μεθόδους όπως η φασματοσκοπία απορρόφησης υπεριώδους/ορατού (UV/Vis) ή η φασματοσκοπία μάζας (MS). Ένα φασματόμετρο μπορεί να είναι αναπόσπαστο μέρος ορισμένων χρωματογραφιών, για παράδειγμα ένα φασματόμετρο UV/Vis είναι το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο σαν ανιχνευτής στην HPLC. Εναλλακτικά, οι χρωματογράφοι συνδέονται σε, ή χρησιμοποιούνται με, φασματόμετρα όπως στην MS, και στη συνδυασμένη τεχνική αέριας χρωματογραφίας –φασματοσκοπίας μάζας (GC-MS ή GC/MS), που είναι ένα παράδειγμα των λεγόμενων ενωτικών μεθόδων.

Η χρωματογραφία είναι μια μέθοδος διαχωρισμού, στην οποία τα συστατικά ενός δείγματος διαχωρίζονται μεταξύ δύο φάσεων: η μία φάση είναι μια στατική φάση (SP) με μεγάλη επιφάνεια, και η άλλη είναι ένα υγρό ή αέριο (κινητή φάση, MP), το οποίο ρέει μέσω της στατικής φάσης. Το δείγμα μεταφέρεται από την MP μέσω της στήλης. Η κατάτμηση των δειγμάτων μεταξύ MP και SP πραγματοποιείται με βάση τις διαλυτότητές τους ή τις σχετικές τους τάσεις να απορροφούν/ σε κάθε μία από τις αντίστοιχες φάσεις. Τα συστατικά του δείγματος (ονομάζονται διαλυτές ουσίες ή αναλύτες) χωρίζονται το ένα από το άλλο με βάση τη σχετική τους συγγένεια για τις δύο φάσεις. Αυτός ο τύπος της χρωματογραφικής διαδικασίας ονομάζεται έκλυση (Miller, 2003).

Η καφεΐνη προσδιορίζεται σε δείγματα καφέ συνήθως με τη χρήση HPLC. Η προετοιμασία του δείγματος πριν από αυτή την ανάλυση είναι πολύ απλή και περιλαμβάνει μόνο τα βήματα της διήθησης και της αραιώσης. Ορισμένες μέθοδοι περιλαμβάνουν διαύγαση με αντιδραστήρια Carrez ή με οξικό μόλυβδο. Εναλλακτικά, το δείγμα μπορεί να καθαριστεί με εκχύλιση νερού των κόκκων καφέ σε μορφή σκόνης αναμεμιγμένων με οξείδιο του μαγνησίου ή χρησιμοποιώντας εκχύλιση στερεής φάσης. Επίσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί HPLC με φασματομετρία μάζας για τον προσδιορισμό της καφεΐνης ή της θεοβρωμίνης ή της θεοφυλλίνης. Άλλες χρωματογραφικές τεχνικές χρησιμοποιούνται πιο σπάνια (Jeszka-Skowron, Zgoła-Grzeškowiak, & Grzeškowiak, 2015).

2.1. HPLC

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) είναι ένα ισχυρό εργαλείο για το χαρακτηρισμό συνθετικών και φυσικών πολυμερών, διαχωρίζοντάς τα σε μεμονωμένα κλάσματα με βάση το μοριακό βάρος, τη χημική σύνθεση, τις λειτουργικές μονάδες, την τοπολογία και άλλες δομικές ιδιότητές τους. Χρησιμοποιείται, επίσης, για απομόνωση και καθαρισμό βιοπολυμερών, καθώς και για ανάλυση προσθέτων σε σύνθετα πολυμερή σκευάσματα. Όπως και με οποιαδήποτε χρωματογραφική τεχνική, ο διαχωρισμός πραγματοποιείται λόγω θερμοδυναμικής κατανομής μεταξύ των συστατικών του αναλύτη στις κινητές και ακίνητες φάσεις. Στην HPLC, αυτή η διαδικασία λαμβάνει χώρα σε διάλυμα μέσα σε μία χρωματογραφική στήλη γεμάτη ανόργανη (συνήθως με οξείδιο του πυριτίου) ή οργανική (συνθετική ρητίνη, όπως πορώδη σωματίδια από πολυστυροδιβινυλικό βενζόλιο ή με βάση το ακρυλικό) ύλη, ικανή να αντιστέκεται στην υψηλή πίεση που δημιουργείται από ένα κινούμενο υγρό (κινητή φάση) που αντλείται μηχανικά μέσω της στήλης. Ανάλογα με την εφαρμογή, μπορούν να χρησιμοποιηθούν τρόποι διαχωρισμού ισοκρατικοί (στατικής σύνθεσης κινητή φάση) ή διαβαθμισμένοι (μεταβλητή σύνθεση), γεγονός που επεκτείνει σημαντικά τις δυνατότητες της τεχνικής. Μεταβολή της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια του διαχωρισμού χρησιμοποιείται, επίσης, για την αλλαγή της επιλεκτικότητας του διαχωρισμού. Ένα σύγχρονο όργανο HPLC αποτελείται από μια αντλία για παροχή διαλύτη, μια συσκευή αυτόματης δειγματοληψίας και εγχυτήρα για εισαγωγή δείγματος, στήλη(ες) για διαχωρισμό του δείγματος, φούρνο στήλης για τη διατήρηση ισοθερμικών συνθηκών, ανιχνευτή(ες) για οπτικοποίηση των διαχωρισμένων συστατικών (διαλυμένων) και έναν υπολογιστή για το συστηματικό έλεγχο και τη λήψη και αναγωγή των δεδομένων (Brun & Rasmussen, 2015).

2.1.1. Προσδιορισμός της καφεΐνης σε ροφήματα καφέ

Ως δείγματα χρησιμοποιήθηκαν 3 επώνυμα ροφήματα καφέ. Η ποσοτική ανάλυση έγινε με τη μέθοδο HPLC, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μεθανόλη-νερό (95:5 v/v) και ως στατική φάση ODS με ρυθμό ροής 1 mL/min και UV 272 nm ως ανιχνευτή. Τα δεδομένα των επιπέδων καφεΐνης αναλύθηκαν στατιστικά χρησιμοποιώντας το Anova σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95%.

2.1.1.1. Υλικά: Όλοι οι διαλύτες και τα αντιδραστήρια ήταν αναλυτικού βαθμού, δις απεσταγμένο νερό, μεθανόλη, αιθανόλη και ODS.

2.1.1.2. Πειραματική πορεία

Τα 3 ροφήματα καφέ χαρακτηρίστηκαν ως Χ,Υ και Ζ αντίστοιχα. Η δοκιμή καταλληλότητας του συστήματος πραγματοποιήθηκε με έγχυση ενός πρότυπου διαλύματος καφεΐνης 60 µg/mL έως 6 φορές σε ένα προκαθορισμένο σύστημα HPLC. Η τιμή RSD καθορίζεται για τις τιμές tR, AUC και τις τιμές παραγόντων ουράς. Το τεστ γραμμικότητας πραγματοποιήθηκε με έγχυση του διαλυμένου σε αιθανόλη πρότυπου διαλύματος καφεΐνης, με συγκεντρώσεις 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 και 200 µg/mL αντίστοιχα, στο σύστημα HPLC. Η πρότυπη καμπύλη δημιουργήθηκε ανάμεσα στην συγκέντρωση του προτύπου καφεΐνης και της τιμής AUC. Προκειμένου να προσδιοριστεί η περιεκτικότητα σε καφεΐνη στα ροφήματα καφέ, προστέθηκε δείγμα καφέ 5,0 mL σε διαχωριστική χοάνη, στη συνέχεια εκχυλίστηκε 4 φορές, καθεμία με προσθήκη 25,0 ml χλωροφορμίου. Λαμβάνεται το ίζημα, και στη συνέχεια το εκχύλισμα (στιβάδα χλωροφορμίου) αφήνεται να εξατμιστεί πάνω από το υδατόλουτρο μέχρι το χλωροφόρμιο να εξατμιστεί πλήρως. Το εκχύλισμα καφεΐνης χωρίς διαλύτη, διαλύεται με αιθανόλη έως τα 5,0 mL. Το πρότυπο διάλυμα και το δείγμα εγχύθηκαν στο σύστημα HPLC, με εφαρμοσμένες τις ακόλουθες συνθήκες: αντίστροφη φάση, στήλες C18/ODS 250 x 4,6 mm, ανιχνευτής σε μήκος κύματος 278 nm, ρυθμός ροής 1 mL/min σε θερμοκρασία δωματίου, όγκος δείγματος 20,0 µL, και μεθανόλη κινητής φάσης: δις απεσταγμένο νερό (95:5). Η περιεκτικότητα της καφεΐνης υπολογίζεται με την εξίσωση γραμμικής παλινδρόμησης $y = bx + a$ από την πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης (Fajara & Susanti, 2017).

2.1.2. Προσδιορισμός της θεοφυλλίνης σε βιολογικά υγρά (ούρα, πλάσμα, σάλιο)

2.1.2.1. Προετοιμασία δείγματος

Το πυκνό διάλυμα θεοφυλλίνης (1 mg/mL) παρασκευάστηκε με προσθήκη μεθανόλης και αποθηκεύτηκε στους -20 °C για 2 μήνες, ενώ προστατεύθηκε και από το φως. Προκειμένου να διερευνηθούν οι επιδράσεις του μέσου στη γραμμικότητα της καμπύλης βαθμονόμησης και στην παράμετρο της εξίσωσης, παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα θεοφυλλίνης σε μήτρες μεθανόλης, νερού, ούρων, πλάσματος και σάλιου. Τα δείγματα ανθρώπινων ούρων, σάλιου και πλάσματος ελήφθησαν από υγιείς εθελοντές και αποθηκεύτηκαν στους -20°C μέχρι την ανάλυση. Τα άτομα αυτά απείχαν από οποιοσδήποτε τροφές, αλκοολούχα προϊόντα ή ποτά που περιέχουν ξανθίνη για 48 ώρες πριν από τη συλλογή του δείγματος. Οι παστίλιες με γεύση πορτοκαλιού χρησίμευσαν ως

αντανακλαστικό ερέθισμα για την πρόκληση σιελόρροιας. Για την κατασκευή των καμπυλών βαθμονόμησης, δείγματα μεθανόλης, ούρων, σάλιου και πλάσματος αραιώθηκαν 1:10 με δι-ιονισμένο νερό και αναμιγνύονταν καθημερινά με πυκνό διάλυμα θεοφυλλίνης σε τελική συγκέντρωση 1, 2, 5, 10, 20, και 50 μg θεοφυλλίνης ανά χιλιοστόλιτρο για HPLC ανάλυση. Στη φασματοφωτομετρική ανάλυση, η καμπύλη βαθμονόμησης μελετήθηκε στις τελικές συγκεντρώσεις των 5, 10, 20, 50 και 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ σε 4 διαφορετικές μήτρες (νερό, μεθανόλη, ούρα και πλάσμα) καθημερινά. Δείγματα ποιοτικού ελέγχου (QC) παρασκευάστηκαν σε συγκεντρώσεις των 3, 10, 15 και 30 μg θεοφυλλίνης ανά χιλιοστόλιτρο.

2.1.2.2. Πειραματική πορεία

Ενισχυμένα δείγματα ούρων αναμίχθηκαν σε αναδευτήρα στροβιλισμού για 30 δευτερόλεπτα στη μέγιστη ταχύτητα και φυγοκεντρήθηκαν στις 1400 rpm για 2 λεπτά. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο διηθήθηκε μέσω φίλτρου μεμβράνης 0,2 μm και χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση. Για την εκχύλιση δειγμάτων πλάσματος και σιέλου, 0,5 mL πλάσματος ή 1,0 mL σιέλου (επειδή οι συγκεντρώσεις στο σάλιο είναι περίπου το 50% των συγκεντρώσεων στο πλάσμα) τοποθετήθηκαν σε σωλήνα φυγοκέντρωσης των 10 μL με βιδωτό πώμα. Προστέθηκαν 0,3 ml κορεσμένου διαλύματος θειικού αμμωνίου και αναμίχθηκαν σε αναδευτήρα στροβιλισμού για 10 δευτερόλεπτα με μέγιστη ταχύτητα. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 2,0 ml χλωροφορμίου-ισοπροπανόλης (20:1 v/v), αναμίχθηκαν σε αναδευτήρα στροβιλισμού για 1 λεπτό, φυγοκεντρήθηκαν στις 3500 rpm για 5 λεπτά και αναρροφήθηκε η υδάτινη στιβάδα. Η οργανική στιβάδα διηθήθηκε μέσω φίλτρου μεμβράνης 0,2 μm και χρησιμοποιήθηκε για ανάλυση.

2.1.2.3. Κινητή φάση

Η κινητή φάση, που περιέχει μεθανόλη και δι-ιονισμένο νερό (60:40 v/v), παρασκευάστηκε και απαερώθηκε με κενό πριν από τη χρήση. Ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου. Το προστατευτικό φυσίγγιο της στήλης (4.3x10mm ODS-C18, 5 μm μέγεθος σωματιδίων) τοποθετήθηκε λίγο πριν από τη στήλη ανάλυσης για μείωση της μόλυνσης. Ο ισοκρατικός διαχωρισμός έλαβε χώρα με ρυθμό ροής 0,75 mL/min.

2.1.2.4. Όγκος έγχυσης, χρόνος εκτέλεσης και ανίχνευση

Ο όγκος της έγχυσης ήταν 20 μL με χρόνο εκτέλεσης 5 λεπτών και οι κορυφές έκλυσης ανιχνεύθηκαν στα 280 nm. Το ύψος κορυφής χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό

της συγκέντρωσης της θεοφυλλίνης στα δείγματα (Charehsaz, Gürbay, Aydin, & Şahin, 2014).

2.1.3. Ταυτόχρονος προσδιορισμός της καφεΐνης, της θεοβρωμίνης και της θεοφυλλίνης σε τρόφιμα, ποτά και φυτικά προϊόντα

Η χρωματογραφία εκτελέστηκε σε στήλη Zorbax Eclipse XDB-C8 (4,6 x 150 mm i.d., 5-µm μέγεθος σωματιδίων) στους 25 °C με κινητή φάση νερό-THF (0,1 THF σε νερό, pH 8)-ακετονιτρίλιο (90:10, v/v). Ο ρυθμός ροής είναι 0,8 mL/min και η ανίχνευση γίνεται με υπεριώδη ακτινοβολία στα 273 nm. Αυτή η μέθοδος (HPLC) επιτρέπει τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της καφεΐνης, της θεοβρωμίνης και της θεοφυλλίνης σε τρόφιμα, ποτά και φυτικά προϊόντα με όρια ανίχνευσης 0,07-0,2 mg/L και ανακτήσεις 100,20-100,42%. Τα δεδομένα προτείνουν ότι η μέθοδος HPLC μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη ρουτίνα για ποιοτικό έλεγχο τροφίμων, ποτών και φυτικών προϊόντων.

2.1.3.1. Υλικά

Όλοι οι διαλύτες και τα αντιδραστήρια και τα αντιδραστήρια ήταν αναλυτικού βαθμού, σε αντίθετη περίπτωση αναφέρεται. Τα διαλύματα παρασκευάστηκαν με απιονισμένο νερό. Το χλωροφόρμιο και το τετραϋδροφουράνιο (THF) ήταν βαθμού HPLC.

2.1.3.2. Παρασκευή του πυκνού πρότυπου διαλύματος

Το πυκνό πρότυπο διάλυμα των CF, TB και TF παρασκευάστηκε ζυγίζοντας 30 mg, 10 mg και 10 mg των πρότυπων ουσιών αντίστοιχα, και διαλύοντάς τα σε 10 mL νερού, ενώ το pH ρυθμίζεται σε 8 με 0,1 M NaOH. Το διάλυμα ήταν σταθερό περίπου για 3 ημέρες υπό ψύξη (4 °C).

2.1.3.3. Παρασκευή του πρότυπου διαλύματος εργασίας

Ένα διάλυμα εργασίας παρασκευάστηκε αραιώνοντας 100 µL του πυκνού διαλύματος σε 1,00 mL νερό, το pH 8 ρυθμισμένο με 0,1 M NaOH για να δώσει συγκεντρώσεις CF, TB και TF στα 0,3, 0,1, και 0,1 µg/µL, αντίστοιχα.

2.1.3.4. Βαθμονόμηση

Τα πρότυπα διαλύματα εργασίας (0,2-10,0 µL) CF, TB και TF εγχύθηκαν στο μηχάνημα HPLC και σημειώθηκαν οι περιοχές των κορυφών. Χρησιμοποιήθηκε μια μέθοδος εξωτερικής τυπικής βαθμονόμησης. Οι γραμμικές πρότυπες καμπύλες των CF, TB και TF ελήφθησαν χωριστά σχεδιάζοντας τη συγκέντρωση έναντι της περιοχής.

2.1.3.5. Προετοιμασία και εξαγωγή δείγματος

Τα εκχυλίσματα νερού από ένα ινδικό τσάι (5,00 g), ένα πράσινο τσάι (5,00 g) και ένα τσάι mate (5,00 g) παρασκευάστηκαν με ανάμιξη για 30 λεπτά σε ζεστό νερό (200 mL, πρώτα βρασμένο) μέσα σε θερμική φιάλη σε μαγνητικό ανακινητή. Στη συνέχεια, τα εκχυλίσματα διηθήθηκαν μέσω ενός διηθητικού χαρτιού προκειμένου, να αφαιρεθούν τα σωματίδια. Δέκα χιλιοστόλιτρα διηθήματος, ρυθμισμένα σε pH 8 με 0,1 M NaOH, υποβλήθηκαν σε διαδικασία καθαρισμού, όπως περιγράφεται παρακάτω. Τα δείγματα σκόνης καφέ ζυγίστηκαν (5 g) και εκχυλίστηκαν με ζεστό βραστό νερό (200 mL) κατόπιν ανάμιξης σε θερμική φιάλη για 5 λεπτά στο μαγνητικό ανακινητή. Τα εκχυλίσματα, έπειτα, διήρθαν μέσω του διηθητικού χαρτιού για να αφαιρεθούν τα σωματίδια. Η σκόνη κακάο (5 g), η κουβερτούρα (8,85 g ακατέργαστης σκόνης), η σοκολάτα γάλακτος και η σοκολάτα Milka (8,22 g) αναμίχθηκαν με 200 mL νερό σε πλαστικό δοχείο και εκχυλίστηκαν για 30 λεπτά στους 60 °C σε λουτρό υπερήχων. Στη συνέχεια, ακολουθήθηκε ξανά η διαδικασία που περιγράφηκε πιο πάνω. Τα δείγματα ανθρακούχων ποτών απαερώθηκαν για 15 λεπτά στο λουτρό υπερήχων για την απελευθέρωση του CO₂. Όλα τα δείγματα εγχύθηκαν απευθείας στο μηχάνημα HPLC.

2.1.2.5. Μελέτη χρωματογραφικών μεταβλητών

Ο όγκος έγχυσης του πρότυπου διαλύματος εργασίας ήταν 5 µL και η θερμοκρασία της στήλης 25 °C. Όταν επιλέχθηκε το pH της κινητής φάσης εξετάστηκαν τρεις παράγοντες. Πρώτον, οι ξανθίνες πρέπει να είναι σε στατική μορφή. Δεύτερον, η διάρκεια ζωής της στατικής φάσης της στήλης να μειώνεται σε χαμηλό pH και τρίτον, λόγω των παρόμοιων χημικών ιδιοτήτων των τριών ουσιών, το pH είναι πολύ σημαντικό για έναν καλό διαχωρισμό. Λαμβάνοντας υπόψη αυτές τις εκτιμήσεις επιλέχθηκε τιμή pH 8 (Srdjenovic, Djordjevic-Milic, Grujic, Injac, & Lerojevic, 2008).

2.1.4. Προσδιορισμός των μεθυλοξανθινών σε ενεργειακά ποτά

2.1.4.1. Αντιδραστήρια και υλικά

- Νερό (H₂O)
- Μεθανόλη (CH₃OH)- Βαθμός LC
- Καφεΐνη (C₈H₁₀N₄O₂)- Βαθμός LC
- Οξικό αμμώνιο (CH₃CO₂NH₄)- Βαθμός αντιδραστηρίου
- Θεοβρωμίνη (C₇H₈N₄O₂)- Βαθμός LC
- Θεοφυλλίνη (C₇H₈ N₄O₂)- Βαθμός LC
- Μονάδες φίλτρου μεμβράνης. -Milllex-HN, 0,45 µm, 4 mm εσωτερική διάμετρος

2.1.4.2. Διαλύματα

- Ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου (1 M)- 77,1 g σε 1 L νερό HPLC
- Κινητή φάση A. – Μεθανόλη, 100%, v/v.
- Διάλυμα κινητής φάσης B ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4$ 0,02 M)- Ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου αραιωμένο σε νερό 50 φορές.

2.1.4.3. Πρότυπα και δείγματα

Πρότυπα πυκνά διαλύματα από τις τρεις ξανθίνες (1 mg/mL) σε νερό παρασκευάστηκε μηνιαίως και αποθηκεύτηκε στους -20°C στο σκοτάδι. Τα διαλύματα εργασίας παρασκευάζονται καθημερινά με κατάλληλη διάλυση. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν διηθήθηκαν, εάν ήταν απαραίτητο, πριν από τη χρωματογραφική ανάλυση (Buiarelli, et al., 2019).

2.2. UPLC

Οι αρχές της UPLC είναι ίδιες με αυτές της HPLC, όμως η βασική διαφορά τους είναι στο σχεδιασμό του μεγέθους των σωματιδίων της στήλης, που είναι μικρότερα από 2 μm . Για τη βελτίωση της απόδοσης της UPLC πρέπει να χρησιμοποιείται υψηλή θερμοκρασία, η οποία μειώνει το ιξώδες της κινητής φάσης, εάν αυτό είναι υψηλό, με αποτέλεσμα να αυξάνεται ο ρυθμός ροής, καθώς μειώνεται σημαντικά η αντίσταση. Επίσης, το μοναδικό χαρακτηριστικό της ανάλυσης UPLC, που την κάνει να διαφέρει από την HPLC, είναι οι διασυνδεδεμένοι σκελετοί και οι διασυνδεδεμένες διαδρομές ροής (μέσω πόρων) που βρίσκονται σε μονολιθικές στήλες. Στο χρωματογράφημα UPLC διαπιστώνεται ότι υπάρχει καλύτερη ανάλυση και διαχωρισμός, σε σύγκριση με την HPLC, ενώ ταυτόχρονα εκτελείται πιο ευαίσθητη ανάλυση, μειώνεται η κατανάλωση και επιτυγχάνεται υψηλή ταχύτητα ανάλυσης. Η καλύτερη απόδοση με γρήγορη ανάλυση οφείλεται στο μικρό μέγεθος των σωματιδίων. Η ταχύτητα επιτρέπει μεγαλύτερο αριθμό αναλύσεων που θα πραγματοποιηθούν σε μικρότερο χρονικό διάστημα, αυξάνοντας έτσι την απόδοση του δείγματος και την παραγωγικότητα του εργαστηρίου.

Στην UPLC η εισαγωγή του δείγματος είναι κρίσιμη. Οι συμβατικές βαλβίδες έγχυσης, είτε αυτοματοποιημένες είτε χειροκίνητες, δεν είναι σχεδιασμένες και σκληρυμένες να λειτουργούν σε ακραία πίεση. Για την προστασία της στήλης από ακραίες διακυμάνσεις πίεσης, η διαδικασία της έγχυσης πρέπει να είναι σχετικά παλμική και ο όγκος σάρωσης της συσκευής πρέπει, επίσης, να είναι ελάχιστος για να μειωθεί πιθανή διεύρυνση της ζώνης. Απαιτείται γρήγορος χρόνος κύκλου έγχυσης για την πλήρη

αξιοποίηση της ταχύτητας που παρέχει η UPLC, το οποίο με τη σειρά του απαιτεί υψηλή χωρητικότητα δείγματος. Ακόμη, απαιτούνται εγχύσεις χαμηλού όγκου με ελάχιστη επιμόλυνση για αύξηση της ευαισθησίας. Υπάρχουν και προσεγγίσεις για άμεση έγχυση για βιολογικά δείγματα.

Χρησιμοποιώντας την εισαγωγή δείγματος υποβοηθούμενη από πίεση, διατηρείται χαμηλή διασπορά μέσω της διαδικασίας έγχυσης και μια σειρά μετατροπών πίεσης διευκολύνει την αυτοπαρακολούθηση και τις διαγνώσεις. Η UPLC χρησιμοποιεί δειγματοληψία βελόνας σε βελόνα για βελτιωμένη ανθεκτικότητα και ο αισθητήρας βαθμονόμησης βελόνας αυξάνει την ακρίβεια. Ο χρόνος κύκλου έγχυσης είναι 25 δευτερόλεπτα χωρίς πλύσιμο και 60 δευτερόλεπτα με διπλό πλύσιμο, που χρησιμοποιείται για περαιτέρω μείωση της επιμόλυνσης. Μια ποικιλία μορφών πλάκας μικροτιτλοδότησης (βαθύ πηγαδάκι, μεσαίο ύψος ή φιαλίδια) μπορεί, επίσης, να φιλοξενηθεί σε ένα θερμοστατικά ελεγχόμενο περιβάλλον. Χρησιμοποιώντας τον προαιρετικό οργανωτή δειγμάτων, ο διαχειριστής δειγμάτων μπορεί να εγχύσει σε έως και 22 πλάκες μικροτιτλοδότησης. Ο διαχειριστής δείγματος ελέγχει και το θερμαντήρα στήλης. Μπορεί να επιτευχθεί αύξηση της θερμοκρασίας των στήλων στους 65°C. Προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η διασπορά του δείγματος, ένας σχεδιασμός «περιστροφής προς τα έξω» επιτρέπει την έξοδο της στήλης κοντά στην πηγή εισόδου ενός ανιχνευτή MS.

Τα πλεονεκτήματα της UPLC είναι:

- Απαιτεί λιγότερο χρόνο εκτέλεσης και αυξάνει την ευαισθησία.
- Παρέχει επιλεκτικότητα και δυναμικό εύρος LC ανάλυσης.
- Στο χρωματογράφημα επιτυγχάνονται διαχωρισμένες κορυφές.
- Εφαρμόζονται μέθοδοι πολλαπλών καταλοίπων.
- Ταχεία ανάλυση και ποσοτικοποίηση με ακρίβεια των αναλυτών και των σχετικών προϊόντων.
- Οι χρήσεις λεπτών σωματιδίων (2 μm) για το πακετάρισμα της στατικής φάσης καθιστούν την ανάλυση γρήγορη.
- Μειωμένος χρόνος και μειωμένο κόστος.
- Μικρότερη κατανάλωση διαλυμάτων.
- Περισσότερα προϊόντα αναλύονται με προϋπάρχοντες πόρους.

Στην ανάλυση UPLC το κύριο μειονέκτημα που προκύπτει είναι η διάρκεια ζωής των στηλών, αφού κατά την ανάλυση αναπτύσσεται υψηλή πίεση εξαιτίας του μεγέθους του σωματιδίου. Η αύξηση της πίεσης μειώνει τη διάρκεια ζωής των στηλών. Η χρήση στατικής με μέγεθος σωματιδίων 2 μm αποδίδει καλύτερη ανάλυση, χωρίς τις επιπτώσεις της υψηλής πίεσης (Taleuzzaman, Ali, Gilani, Imam, & Hafeez, 2015).

2.2.1. Ταυτόχρονος προσδιορισμός της καφεΐνης και της θεοβρωμίνης σε εμπορικά τσάγια

2.2.1.1. Χημικά και πρότυπα

Αιθανόλη (βαθμός HPLC), απεσταγμένο νερό (18,2 MΩ). Η αιθανόλη διηθήθηκε χρησιμοποιώντας φίλτρα μεμβράνης νάilon 0,45 μm x 47 mm και απαερώθηκε με υπερήχους για 20 λεπτά, χρησιμοποιώντας λουτρό υπερήχων πριν από τη χρήση. Τα πρότυπα μεθυλοξανθινών που μελετήθηκαν (θεοφυλλίνη, θεοβρωμίνη και καφεΐνη) είχαν καθαρότητα μεγαλύτερη από 98%. Όλα τα διαλύματα αποθηκεύτηκαν στο σκοτάδι στους 4°C.

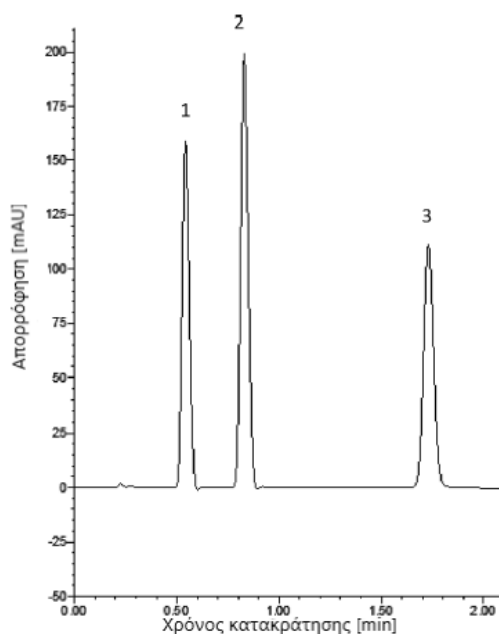
2.2.1.2. Οργανολογία

Όλοι οι διαχωρισμοί πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του συστήματος Dionex UltiMate 3000 LC εξοπλισμένο με αυτόματο δειγματολήπτη, θερμοστατικό διαμέρισμα στηλών, δυαδική αντλία και ανιχνευτή συστοιχίας διόδων DAD-3000. Η μέγιστη αντίσταση του συστήματος ήταν 620 bar και ο όγκος έγχυσης 2 μL. Το Chromeleon χρησιμοποιήθηκε για έλεγχο των οργάνων και απόκτηση των δεδομένων, ενώ ο χρωματογραφικός διαχωρισμός εκτελέστηκε σε στήλες Zorbax SB C18 3mm ID, μήκος 30 mm και σωματίδια 1,9 μm. Οι αναλύτες διαχωρίστηκαν με ισοκρατική έκλυση χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση αιθανόλη και απεσταγμένο νερό με ρυθμό ροής 1,4 mL/min. Η ανίχνευση με UV ορίστηκε στα 273 nm.

2.2.1.3. Προετοιμασία δείγματος

Είκοσι τρία δείγματα τσαγιών (10 μαύρα, 10 πράσινα και 3 λευκά) αποθηκεύτηκαν για λίγο σε θερμοκρασία δωματίου. Η εκχύλιση με βάση το νερό επιλέχθηκε για τα δείγματα τσαγιού για τους ακόλουθους δύο λόγους: πρώτον, για να αποφευχθεί η χρήση οργανικών διαλυτών και να διασφαλιστεί η διατήρηση του πράσινου χρώματος στο βήμα της προετοιμασίας, και δεύτερον, για να μιμηθεί την κατάσταση του πραγματικά παρασκευασμένου τσαγιού που χρησιμοποιείται συνήθως από τους καταναλωτές. Μια ακριβής ποσότητα 1 g κάθε δείγματος τσαγιού τοποθετήθηκε ξεχωριστά σε 50 mL

βραστό νερό και επώαστηκε στους 100°C για 5 λεπτά. Μετά από επαναφορά της θερμοκρασίας, κάθε διάλυμα δείγματος διηθήθηκε χρησιμοποιώντας χαρτιά φίλτρου Whatman, και στη συνέχεια επαναδιηθήθηκε και εγχύθηκε στο σύστημα LC. Πρέπει να σημειωθεί, ότι το χρωματογράφημα των πραγματικών δειγμάτων παρακολουθήθηκε για 15 λεπτά για να διερευνηθεί και να αποκλειστεί η πιθανότητα ύπαρξης αργά εκλουόμενων ενώσεων. Με τη χρήση των πρότυπων διαλυμάτων κατασκευάστηκε ένα πρότυπο διάγραμμα βαθμονόμησης με την συγκέντρωση έναντι της περιοχής της κορυφής (Shaaban & Mostafa, 2018).



Εικόνα 3. Τυπικό χρωματογράφημα των μελετηθέντων αναλυτών που διαχωρίζονται στα 273 nm υπό τις πειραματικές συνθήκες που περιγράφηκαν. 1=θεοβρωμίνη, 2=θεοφυλλίνη, 3=καφεΐνη.

2.3. LC-MS/MS

Η ποσοτική βιοανάλυση έχει μελετηθεί και εφαρμοστεί σε διαφορετικούς τύπους μήτρας, συμπεριλαμβανομένων διαφορετικών τύπων σωματικών υγρών (π.χ. πλάσμα, ορός, ολικό αίμα, σάλιο, δάκρυα και ούρα) και ιστών οργάνων (π.χ. ιστός νεφρού, ήπατος, πνευμόνων και εγκεφάλου). Σε αντίθεση με τα καθαρά πρότυπα διαλύματα ή τα σκευάσματα φαρμάκων, τα βιολογικά δείγματα έχουν συνήθως πολύ πιο σύνθετες βιοχημικές συνθέσεις, περιέχουν διάφορα συστατικά, όπως άλατα, μικρά οργανικά μόρια, ίνες, πρωτεΐνες και λιπίδια. Όλα αυτά μπορούν να προκαλέσουν μια σειρά προβλημάτων, όπως είναι η αποικοδόμηση της στήλης LC, η μόλυνση του

φασματομέτρου μάζας, η παρεμβολή σήματος και το πιο σημαντικό το φαινόμενο μήτρας. Το φαινόμενο μήτρας αντιπροσωπεύει ένα φαινόμενο ενίσχυσης ή καταστολής της έντασης των ιόντων αναλύτη, που προκαλείται από τη συνένωση των συστατικών της μήτρας. Επομένως, προκειμένου να βελτιωθεί η ευαισθησία, η επιλεκτικότητα και η αναπαραγωγιμότητα κατά τη μέτρηση των αναλυτών σε βιολογικά δείγματα, απαιτείται, στις περισσότερες περιπτώσεις πριν από την ανάλυση με LC-MS/MS, προετοιμασία δείγματος, γνωστή και ως προεπεξεργασία. Η προετοιμασία του δείγματος μπορεί να θεωρηθεί διαδικασία αναλυτικού διαχωρισμού στη βιοανάλυση, η οποία περιλαμβάνει κυρίως επιλεκτική απομόνωση των αναλυτών που μας ενδιαφέρουν από τη μήτρα, ελαχιστοποίηση ή εξάλειψη των συστατικών της μήτρας σε επεξεργασμένα δείγματα και, εάν απαιτείται, εμπλουτισμό των αναλυτών. Με βελτιστοποιημένες μεθόδους προετοιμασίας δείγματος και συνθήκες LC-MS/MS, μικρά μόρια σε βιολογικά δείγματα μπορούν να μετρηθούν με ευαισθησία και ακρίβεια (Li & Bartlett, 2014).

2.3.1. Μελέτη περίπτωσης υπερβολικής κατανάλωσης καφεΐνης και προσδιορισμού της σε δείγμα αίματος

Η υπερβολική πρόσληψη καφεΐνης, η οποία υπό άλλες συνθήκες είναι γνωστή ως ήπιο και ασφαλές διεγερτικό του ΚΝΣ, μπορεί να προκαλέσει ναυτία, εμετό, σπασμούς, ταχυκαρδία και τελικά θανατηφόρες αρρυθμίες και θάνατο. Επειδή η τοξικότητα της καφεΐνης αποτελεί παγκόσμιο πρόβλημα, υπάρχει ανάγκη για ταχεία και ακριβή διάγνωση της δηλητηρίασης από καφεΐνη σε ιατροδικαστικές και κλινικές τοξικολογικές έρευνες. Αρκετές αναλυτικές μέθοδοι που χρησιμοποιούν αέρια χρωματογραφία, αέρια χρωματογραφία- φασματομετρία μάζας, υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης και υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με διαδοχική φασματοσκοπία μάζας (LC-MS/MS) έχουν αναφερθεί για τον προσδιορισμό της καφεΐνης σε βιολογικά δείγματα. Ωστόσο, οι περισσότερες από αυτές απαιτούν κουραστικές και χρονοβόρες διεργασίες προεπεξεργασίας και χρειάζονται σχετικά μεγάλες ποσότητες βιολογικών δειγμάτων. Αν και οι περισσότερες από αυτές επικυρώνονται με χρήση φυσιολογικού ανθρώπινου πλάσματος/ορού ως βιολογική μήτρα με προσθήκη εσωτερικού προτύπου, είναι δύσκολο να διορθωθεί πλήρως το φαινόμενο της μήτρας (να ληφθούν ακριβείς τιμές) κατά τη χρήση ιατροδικαστικών και κλινικών δειγμάτων. Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε μία γρήγορη, απλή και ακριβής μέθοδος LC-MS/MS για την ποσοτικοποίηση της καφεΐνης χρησιμοποιώντας την πρότυπη μέθοδο προσθήκης, σε

μία εγκληματολογική υπόθεση ενός εφήβου που αυτοκτόνησε με κατάποση μεγάλης ποσότητας καθαρών δισκίων καφεΐνης που πωλούνται στο διαδίκτυο.

2.3.1.1. Αντιδραστήρια

- ❖ Ακετονιτρίλιο και μεθανόλη βαθμού LC-MS.
- ❖ Καφεΐνη (χημική καθαρότητα >98%).
- ❖ Καφεΐνη-d9 (χημική καθαρότητα >97%).
- ❖ Διάλυμα μεθανόλης Diazepam-d5 (1 mg/mL).
- ❖ Μυρμηκικό αμμώνιο.
- ❖ Προπαρασκευασμένο πακέτο εκχύλισης QuEChERS (6 g θειικού μαγνησίου και 1,5 g οξικού νατρίου).
- ❖ Πακέτο εκχύλισης στερεάς φάσης σε διασπορά (25 mg πρωτοταγούς δευτεροταγούς αμίνης, 25 mg οκταδεκυλσιλανίου τελικού καλύμματος και 150 mg θειικού μαγνησίου).

2.3.1.2. Προετοιμασία δείγματος

Για την ανάλυση πραγματοποιήθηκε λήψη ολικού αίματος. Εν συντομία, 0,5 mL αίματος αραιώθηκαν με 1,0 mL υπερ-καθαρού νερού. Στη συνέχεια, το αραιωμένο δείγμα τοποθετήθηκε σε πλαστικό σωλήνα μαζί με 0,5 g των αντιδραστηρίων QuEChERS, σφαιρίδια από ανοξείδωτο ατσάλι (5 mm O.D.) και 1 mL από τα 50 ng/mL του αντιδραστηρίου ακετονιτριλίου Diazepam-d5. Το μίγμα ανακινήθηκε έντονα για 30 δευτερόλεπτα σε ομογενοποιητή τύπου bead beater στις 3200 rpm, και έπειτα φυγοκεντρήθηκε στα 4400 x g για 5 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε αντιδραστήρια κιτ εκχύλισης στερεάς φάσης σε διασπορά (2 mL σωλήνας φυγοκέντρωσης) για καθαρισμό. Τα περιεχόμενα αναμίχθηκαν για 10 δευτερόλεπτα και φυγοκεντρήθηκαν στα 4400 x g για 1 λεπτό στους 4°C. Δέκα μικρόλιτρα του υπερκείμενου υποβλήθηκαν σε LC-MS/MS.

2.3.1.3. Ποσοτικός προσδιορισμός καφεΐνης

Ολικό αίμα και ούρα αραιώθηκαν 1000 και 500 φορές, αντίστοιχα, με απιονισμένο νερό. Το γαστρικό και δωδεκαδακτυλικό περιεχόμενο αραιώθηκε επίσης 100.000 και 50.000 φορές, αντίστοιχα, με απιονισμένο νερό. Δέκα μικρόλιτρα από το αραιωμένο δείγμα, 10 μL πρότυπης καφεΐνης κατάλληλης συγκέντρωσης (0, 150, 300, 450, 600, 750 ή 900 ng/mL), 180 μL απιονισμένο νερό και 300 μL μεθανόλης που περιέχουν 30 ng/mL καφεΐνη-d9 ως εσωτερικό πρότυπο αναμίχθηκαν έντονα. Σε αυτό το σημείο, τα δείγματα

αραιώθηκαν $25.000-5 \times 10^6$ φορές. Το μικτό διάλυμα φυγοκεντρείται στα $15.000 \times g$ για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο περνάει σε μια κασέτα Captiva ND Lipids (3 mL το φυσίγγιο) για την απομάκρυνση λιπιδίων, πρωτεϊνών και λεπτών σωματιδίων. Στη συνέχεια, 1 mL από την έκλουση υποβλήθηκε σε ανάλυση LC-MS/MS. Κάθε πρότυπη καμπύλη επτά σημείων προετοιμάστηκε τρεις φορές την ημέρα για τρεις συνεχόμενες ημέρες (N=9).

2.3.1.4. Συνθήκες LC-MS/MS

Η υγρή χρωματογραφία διεξήχθη σε ένα Shimadzu Prominence σύστημα LC, ο διαχωρισμός σε μία στήλη L ODS (150 mm x 1,5 mm i.d., 5 μm μέγεθος σωματιδίων) και η διαδοχική φασματομετρία μάζας σε σύστημα Sciex 3200 QTRAP LC/MS/MS εξοπλισμένο με ιονισμένο καθετήρα ηλεκτροψεκασμού. Η κινητή φάση ήταν 95% 10 mmol/L μυρμηκικού αμμωνίου – 5% μεθανόλη (διαλύτης A) και 5% 10 mmol/L μυρμηκικού αμμωνίου – 95% μεθανόλη (διαλύτης B). Ο ρυθμός ροής του διαλύτη ρυθμίστηκε στα 0,1 mL/min. Ο όγκος έγχυσης ήταν 1 μL, ο χρόνος κύκλου 3 λεπτά, ο ρυθμός ροής της κινητής φάσης 0,2 mL/min και η θερμοκρασία της στήλης διατηρήθηκε στους 40°C. Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν σε κατάσταση θετικού ιόντος.

2.3.1.5. Συμπεράσματα

Σε γενικές γραμμές, η κατασκευή πρότυπων διαγραμμάτων προσθήκης αυξάνει τον αριθμό των αναλύσεων, και ως εκ τούτου, απαιτούνται μεγαλύτερη ποσότητα δείγματος και περισσότερος χρόνος ανάλυσης. Ωστόσο, επειδή οι συγκεντρώσεις της καφεΐνης σε θανατηφόρες/δηλητηριώδεις περιπτώσεις είναι συνήθως πάνω από 80-100 μg/mL σε δείγματα αίματος, τα δείγματα θα πρέπει να είναι αραιωμένα τουλάχιστον 50.000 φορές για το εξαιρετικά ευαίσθητο φασματόμετρο μάζας που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη μέθοδο. Επιπλέον, η προεπεξεργασία του βιολογικού δείγματος είναι απλή και γρήγορη, απαιτώντας μόνο διέλευση από μια κασέτα αφαίρεσης λιπιδίων, ενώ ο χρόνος κύκλου είναι 3 λεπτά. Συνεπώς, η μέθοδος αυτή είναι χρήσιμη όχι μόνο για εγκληματολογικά περιστατικά αλλά και για την ταχεία διάγνωση υπερδοσολογίας καφεΐνης σε κλινικές καταστάσεις έκτακτης ανάγκης (Usui, Fujita, Kamijo, Igari, & Funayama, 2021).

2.4. TLC/GC/MS

Με τα πλεονεκτήματα της απλότητας, της οικονομίας, της εύκολης λειτουργίας και της ανάγκης για μικρές μόνο ποσότητες διαλύτη, η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) χρησιμοποιείται ευρέως σε διάφορους τομείς για τον διαχωρισμό ή τον καθαρισμό μιγμάτων χημικών και βιολογικών ενώσεων. Επειδή χρησιμοποιείται μία νέα πλάκα σε

κάθε διαχωρισμό, τα προβλήματα « φαινομένου μνήμης» που εμφανίζονται σε πολλές άλλες χρωματογραφικές τεχνικές δεν εμφανίζονται στο διαχωρισμό με TLC, γεγονός που καθιστά την TLC συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδο για την άμεση ανάλυση ακατέργαστων δειγμάτων με ελάχιστες διαδικασίες καθαρισμού. Επειδή εκτελείται υπό συνθήκες περιβάλλοντος, η TLC είναι μία από τις πιο κατάλληλες μεθόδους διαχωρισμού για ανάλυση υψηλής απόδοσης. Για παράδειγμα, πολλά δείγματα μπορούν να τοποθετηθούν σαν κηλίδες σε πλάκα TLC και να διαχωριστούν ταυτόχρονα ή πολλές πλάκες μπορούν να αναλυθούν σε μία δεξαμενή που περιέχει την ίδια κινητή φάση.

Οι σταθερές φάσεις της TLC είναι συνήθως οργανική ή ανόργανη λεπτή στιβάδα, όπως διοξείδιο του πυριτίου (silica), αλκυλ-διοξείδιο του πυριτίου (C8 ή C18), κυτταρίνη και μονολιθικό πολυμερές επικαλυμμένο σε πλαστικά ή γυάλινα φύλλα. Οι κινητές φάσεις της TLC ανάλυσης είναι συνήθως οργανικά διαλύματα, καλύπτοντας ένα ευρύ φάσμα υδρόφοβων ουσιών. Κατά τη διάρκεια του διαχωρισμού, το άκρο της πλάκας βυθίζεται στην κινητή φάση, η οποία αναπτύσσεται μέσω τριχοειδούς δύναμης. Η ποικιλία των δυνάμεων αλληλεπίδρασης μεταξύ των μορίων της αναλυόμενης ουσίας, της κινητής και ακίνητης φάσης προκαλούν την κίνηση των διάφορων αναλυτών με διαφορετικό ρυθμό πάνω στην πλάκα TLC.

Ο διαχωρισμός των χημικών ενώσεων πάνω στην πλάκα ποσοτικοποιείται με βάση την τιμή του Rf (απόσταση μετακίνησης αναλύτη/ απόσταση μετακίνησης κινητής φάσης. Μετά τον διαχωρισμό, οι διαχωρισμένες ενώσεις στην πλάκα απεικονίζονται και, σε ορισμένες περιπτώσεις, χαρακτηρίζονται. Οι κηλίδες δείγματος συνήθως ανιχνεύονται με ψεκασμό ή εμβάπτιση της πλάκας, έτσι ώστε οι αναλύτες να έρθουν σε επαφή με χημικά ή βιολογικά αντιδραστήρια, τα οποία στη συνέχεια αντιδρούν ή αλληλεπιδρούν με τις λειτουργικές ομάδες των μορίων της αναλυόμενης ουσίας. Αν και οι οπτικές και φασματοσκοπικές μέθοδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ευαίσθητη ανίχνευση των κηλίδων δείγματος λόγω του ορατού χρώματός τους, της UV απορρόφησης και του φάσματος διέγερσης φθορισμού, αυτές δεν είναι ολοκληρωμένες και τέτοιες ανιχνεύσεις είναι περιορισμένες από τις χημικές ή τις οπτικές ιδιότητες των αναλυτών (Cheng, Huang, & Shiea, 2011).

Η GS χρησιμοποιείται για ανάλυση μιγμάτων που περιέχουν ανόργανες ή οργανικές ενώσεις που έχουν πιέσεις ατμών μεγαλύτερες από περίπου 0,1 Torr (10 Pa) σε θερμοκρασίες λειτουργίας οργάνου. Η GC μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την

ανάλυση στερεών, υγρών και αέριων. Ποσότητες που κυμαίνονται από 10^{-2} έως 10^{-12} g μπορούν να εισαχθούν και να αναλυθούν. Τα πιο δημοφιλή αέρια μεταφοράς που χρησιμοποιούνται σαν κινητή φάση στην GC είναι το ήλιον και το υδρογόνο, ακολουθούμενα από άζωτο και αργό. Όπου είναι διαθέσιμο, προτιμάται το ήλιον έναντι του υδρογόνου, λόγω του εκρηκτικού χαρακτήρα του τελευταίου. Τα αέρια μεταφοράς πρέπει να είναι πολύ καθαρά και οι τεχνικές καθαρισμού των αερίων για την απομάκρυνση οξυγόνου, υδρογονανθράκων και νερού να εκτελούνται στο σημείο χρήσης για τη διασφάλιση της καθαρότητας. Οι ρυθμοί ροής ελέγχονται με ακρίβεια, και για τις περιπτώσεις όπου η πίεση μπορεί να ποικίλει, τα σύγχρονα όργανα είναι εξοπλισμένα με αυτόματη ρύθμιση πίεσης για την επίτευξη σταθερών ρυθμών ροής. Οι τυπικοί ρυθμοί ροής είναι $20-100 \text{ ml min}^{-1}$ για πακεταρισμένες στήλες και $0,1-10 \text{ ml min}^{-1}$ για τριχοειδείς στήλες (Miller, 2003).

Η MS είναι μια αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της μάζας ατόμων ή μορίων. Μέσω του κατακερματισμού των ιόντων δίνει, επίσης, δομικές πληροφορίες (De Hoffmann, 2000). Η MS μπορεί να συνδεθεί με έναν υγρό χρωματογράφο για, ίσως, το απόλυτο στις δυνατότητες αναγνώρισης. Οι βασικές εξελίξεις που κατέστησαν δυνατή την LC/MS ήταν η ανάπτυξη στηλών LC στενής οπής, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στους πολύ χαμηλούς ρυθμούς ροής της MP, και των διεπαφών για την εισαγωγή των υγρών μέσα στην πηγή ιόντων του φασματόμετρου μάζας (Miller, 2003).

Επειδή διαφορετικοί αναλύτες μπορεί να μην διαχωρίζονται πλήρως μετά την TLC, GC-MS και LC-MS χρησιμοποιούνται συχνά για περαιτέρω διαχωρισμό και χαρακτηρισμό των χημικών ενώσεων στα εκχυλίσματα. Συνήθως, απαιτείται παραγωγοποίηση των πολικών ενώσεων για να αυξηθεί: α) η ανάλυση στο διαχωρισμό με GC, β) η μεταβλητότητα και η σταθερότητα του αναλύτη, ή γ) η ευαισθησία της ανίχνευσης. Εξαιτίας του γεγονότος ότι τα εκχυλίσματα εξατμίζονται μέσω θέρμανσης κατά την ανάλυση GC-MS (π.χ. στον εγχυτήρα, στη στήλη, στη γραμμή μεταφοράς και στην πηγή ιόντων), οι αναλύτες περιορίζονται σε αυτούς που είναι πτητικοί και θερμικά σταθεροί. Ο συνδυασμός TCL και GC-MS χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό μικρών οργανικών ενώσεων, όπως τα προϊόντα οξειδωσης της φυτοστερόλης, οι ακυλογλυκερόλες, η υπεροξειδωμένη χοληστερόλη ή το υδροϋπεροξειδίο του χοληστερυλεστέρα (Cheng, Huang, & Shiea, 2011).

2.4.1. Διαχωρισμός και ανίχνευση της καφεΐνης και των μεταβολιτών της σε ποικιλίες καφέ, ανθρακούχα αναψυκτικά και αλκοολούχα ποτά

2.4.1.1. Εκχύλιση

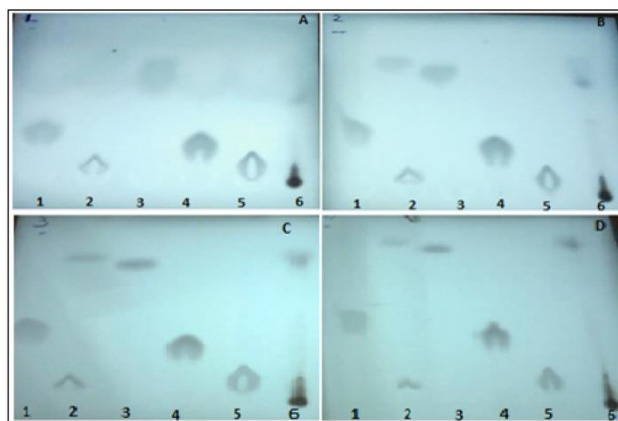
Η εκχύλιση των τριών δραστικών ουσιών στηρίζεται στα βασικά χαρακτηριστικά αυτών των αλκαλοειδών. Τα αλκαλοειδή, γενικά, εκχυλίζονται από άλατα με αραιό υδροχλωρικό ή θειικό οξύ και επανεκχυλίζονται, προετοιμαζόμενα για ανάλυση. Εμπορικά ξηρά δείγματα καφέ και τσαγιού αποξηραίνονται σε μία μέγιστη θερμοκρασία έως τους 40°C σε μορφή σκόνης, αναμιγνύονται με 15 mL H₂SO₄ 0,05 M και αφήνονται να παραμείνουν σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Στη συνέχεια, διηθούνται και το υπόλειμμα επανεκχυλίζεται με 5 mL 0,05 M H₂SO₄. Η υδατική φάση περιέχει τις ενώσεις που αλκαλίζουν με αμμωνία (4 mL) και εκχυλίζονται με 100 mL 0,05 M CH₂Cl₂. Το εκχύλισμα ξηραίνεται με άνυδρο Na₂SO₄, τότε ο διαλύτης εξατμίζεται για να δώσει τα αλκαλοειδή ως έλαιο ή κρυστάλλους.

2.4.1.2. Πειραματική πορεία

Από τα διαλύματα καφεΐνης, θεοφυλλίνης, θεοβρωμίνης, ξανθίνης και υποξανθίνης στα 60 mg/L, 5 μL/πηγαδάκι τοποθετούνται με μικροπιπέττες σε πλάκες με silica gel. Τα «ψεύτικα» δείγματα από μάρκες που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη είναι 200 mL, τα οποία με εξάτμιση στον περιστροφικό εξατμιστή, συμπυκνώνονται σε 10-15 mL. Αυτός ο όγκος μεταγγίζεται σε φιάλη των 20 mL και ανακινείται. Οι όγκοι που μεταφέρονται στην πλάκα είναι 5 mL/κηλίδα με μικροπιπέττα. Οι χρωματογραφικές πλάκες που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση TLC είναι πλάκες silica gel: Nano-Sil NH₂ / UV 254 και 60 F254, 10x20 cm, Merck. Οι αναλύσεις πραγματοποιούνται σε N-κορεσμένο θάλαμο με ανοδική τεχνική χρησιμοποιώντας μίγματα αιθανόλη- νερό (50:1, 50:3, 50:5, 50:7 v/v) ως κινητή φάση για τις πλάκες Nano-Sil NH₂ και μίγμα ακετόνη-τολουόλιο-χλωροφόρμιο (40:30:30 v/v), για την πλάκα silica gel επικαλυμμένη με δείκτη φθορισμού F254, 10x20 cm. Μετά την ανάπτυξη, οι πλάκες ξηραίνονται σε φούρνο στους 100°C και εξετάζονται κάτω από υπεριώδες φως στα 254 nm. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε ένας λαμπτήρας Camag UV. Οι κηλίδες που αντιστοιχούν στα «ψεύτικα» δείγματα καφεΐνης και θεοφυλλίνης εκχυλίζονται από την πλάκα με χλωροφόρμιο και το εκχύλισμα αναλύεται χρησιμοποιώντας αέριο χρωματογράφο HelWet Packard 5890 εξοπλισμένο με ανιχνευτή μάζας MS 5972.

2.4.1.3. Συνθήκες πειράματος

- Στήλη MP5-MS, (30x0,32x0,25)
- Αέριο μεταφοράς: ήλιον
- Πρόγραμμα θερμοκρασίας 60°C, 3°C/min
- Θερμοκρασία μεταφοράς 240°C (Badea & Levai, 2017)



Εικόνα 4. Χρωματογράφημα των ουσιών που αναλύθηκαν σε πλάκες Nano-Sil NH₂ / UV 254. Α)μεθανόλη-νερό(50:1 v/v), Β)μεθανόλη-νερό(50:3 v/v), C)μεθανόλη-νερό(50:5 v/v), D)μεθανόλη-νερό(50:7 v/v). 1-θεοφυλλίνη, 2-καφεΐνη, 3-θεοβρωμίνη, 4-υποξανθίνη, 5-ξανθίνη, 6- εκχύλισμα κονιάκ.

2.5. GC-FID

Ο ανιχνευτής ιονισμού φλόγας (FID) είναι ο πιο δημοφιλής ανιχνευτής για αέρια χρωματογραφία. Παρέχει σχεδόν καθολική απόκριση σε οργανικές ενώσεις, χαμηλά όρια ανίχνευσης, μακροπρόθεσμη σταθερότητα, απλότητα λειτουργίας, χαμηλό όγκο νεκρού, γρήγορη απόκριση και εξαιρετικό εύρος γραμμικής απόκρισης. Μόνο τα σταθερά αέρια (π.χ. He, Ar, Ne, Xe, H₂, N₂, O₂), ορισμένα οξείδια του αζώτου (N₂O, NO κτλ.), ενώσεις που περιέχουν ένα άτομο άνθρακα συνδεδεμένο με οξυγόνο ή θείο (π.χ. CO₂, CS₂, COS κτλ.), ανόργανα αέρια (π.χ. NH₃, SO₂, κτλ.), το νερό, η φορμαμίδη και το φορμικό οξύ παρέχουν μια ασθενή ή ασήμαντη απόκριση ανιχνευτή. Ο ανιχνευτής περιγράφεται μερικές φορές ως ανιχνευτής επιλεκτικός σε άνθρακα, με σχεδόν ισοδύναμη γραμμομοριακή απόκριση για υδρογονάνθρακες με βάση τον αριθμό ατόμων άνθρακα που διαθέτουν, και σχετική απόκριση για ενώσεις που περιέχουν άνθρακα με τουλάχιστον αρκετά άτομα άνθρακα που εξαρτώνται μόνο ασθενώς από τη δομή. Αυτό επιτρέπει σε μία μόνο ένωση να χρησιμοποιείται για τη βαθμονόμηση σύνθετων μιγμάτων και για ποσοστιαίες αναφορές σύνθεσης, για μίγματα που λαμβάνονται απευθείας από το άθροισμα των αποκρίσεων

του ανιχνευτή για όλες τις παρατηρούμενες κορυφές, όταν κάποια απόλυτη ακρίβεια για την ανάλυση είναι ανεκτή.

Τα αποτελέσματα της απόκρισης του ανιχνευτή προκύπτουν από την καύση οργανικών ενώσεων σε μία μικρή φλόγα διάχυσης υδρογόνου-αέρα. Το φερόμενο αέριο από τη στήλη αναμιγνύεται με αέριο υδρογονοκαύσης και πιθανώς το αέριο «makeup» στην περιοχή κάτω από το στενό στόμιο εκτόξευσης φλόγας και καίγεται στον πίδακα, σε θάλαμο μέσω του οποίου ρέει περίσσεια αέρα. Ένας προθερμαντήρας που ενεργοποιείται στιγμιαία κατά την εκκίνηση χρησιμεύει ως αναφλεκτήρας. Ένα κυλινδρικό ηλεκτρόδιο συλλέκτης που βρίσκεται σε μικρή απόσταση πάνω από τη φλόγα συλλέγει τα σωματίδια φόρτισης με εφαρμογή τάσης (200-300 V) μεταξύ του άκρου του πίδακα και του ηλεκτροδίου συλλέκτη. Το δυναμικό είναι επαρκούς μεγέθους για να εξασφαλιστεί η πλήρης συλλογή των φορτισμένων σωματιδίων. Το άκρο του πίδακα ή το ηλεκτρόδιο συλλέκτης είναι συνήθως γειωμένο. Ανάλογα με το σχεδιασμό του ανιχνευτή, συλλέγονται είτε ηλεκτρόνια είτε κατιόντα. Τα μικρά ρεύματα ιόντων, συνήθως της τάξης των picoamps, μετατρέπονται σε τάση και ενισχύονται με ένα ηλεκτρόμετρο ακριβείας. Οι πιο συνηθισμένοι ενισχυτές αντιστρέφουν τους ενισχυτές ρεύματος προς τάση, όπου το προς μέτρηση ρεύμα διέρχεται μέσω υψηλής αντίστασης.

Το όριο στην ανίχνευση μικρών ρευμάτων είναι το αποτέλεσμα θερμικού θορύβου, ο οποίος είναι συνάρτηση της αντίστασης φορτίου του ενισχυτή (θόρυβος Johnson), διακύμανσης της ροής των φορτισμένων σωματιδίων και μη προστατευμένων περιβαλλοντικών ηλεκτρομαγνητικών σημάτων. Ο θόρυβος του background ελαχιστοποιείται από ενεργά φίλτρα. Το άνω άκρο του εύρους απόκρισης επηρεάζεται κυρίως από το μέγεθος της φλόγας, τη διακύμανση της τάσης στο ηλεκτρόδιο συλλέκτη και τη γεωμετρία του ανιχνευτή. Η ταχύτητα απόκρισης περιορίζεται κυρίως από ηλεκτρονικά εξαρτήματα των κυκλωμάτων μέτρησης σήματος και λήψης δεδομένων, καθώς ο σχηματισμός φορτισμένων σωματιδίων και η μετανάστευσή τους στο ηλεκτρόδιο συλλέκτη είναι γρήγορος. Για τους περισσότερους διαχωρισμούς σε τριχοειδείς στήλες ένας ρυθμός απόκτησης δεδομένων 10 Hz είναι επαρκής, αλλά για ολοκληρωμένη δισδιάστατη και γρήγορη αέρια χρωματογραφία ενδέχεται να απαιτούνται ρυθμοί λήψης δεδομένων υψηλότεροι από 50 Hz. Ρυθμοί λήψης δεδομένων έως 200 Hz έχουν αποδειχθεί για ανιχνευτές ειδικά σχεδιασμένους για γρήγορους διαχωρισμούς. Ο αμελητέος εσωτερικός όγκος του ανιχνευτή ιονισμού

φλόγας σε συνδυασμό με τη γρήγορη μεταγωγή του χημικού σήματος, διασφαλίζει ότι ο ανιχνευτής επιβάλλει ελάχιστη επέκταση ζώνης στο χρωματογραφικό σήμα για τους πιο απαιτητικούς διαχωρισμούς (Poole, 2015).

2.5.1. Προσδιορισμός της καφεΐνης σε κόκκους καφέ

Η συγκεκριμένη ανάλυση χρησιμοποιεί τη μέθοδο GC-FID χωρίς τη χρήση εσωτερικού προτύπου. Για το λόγο αυτό, ελήφθησαν και παρουσιάζονται ειδικές προφυλάξεις για την ακρίβεια της μεθόδου.

2.5.1.1. Πειραματικές συνθήκες

Όλες οι μετρήσεις ελήφθησαν με ένα σύστημα Shimadzu GC 2010 PLUS, GC-FID, χρησιμοποιώντας μία στήλη Agilent DB-1 (30 m x 0,32 mm x 1 μm). Οι βελτιστοποιημένες συνθήκες ήταν: όγκος έγχυσης 1 μL σε λειτουργία διαίρεσης 50:1, θερμοκρασία εγχυτήρα 280°C, αέριο μεταφοράς He με στατική ροή 1,8 mL/min και θερμοκρασία ανιχνευτή 300°C. Η αρχική θερμοκρασία του φούρνου ήταν 100°C και διατηρήθηκε για 2 λεπτά, στη συνέχεια προγραμματίστηκε να αυξάνει 8°C/min μέχρι τους 180°C και τελικά προγραμματίστηκε να αυξάνει 10°C/min μέχρι τους 250°C, όπου κρατήθηκε για 0 λεπτά.

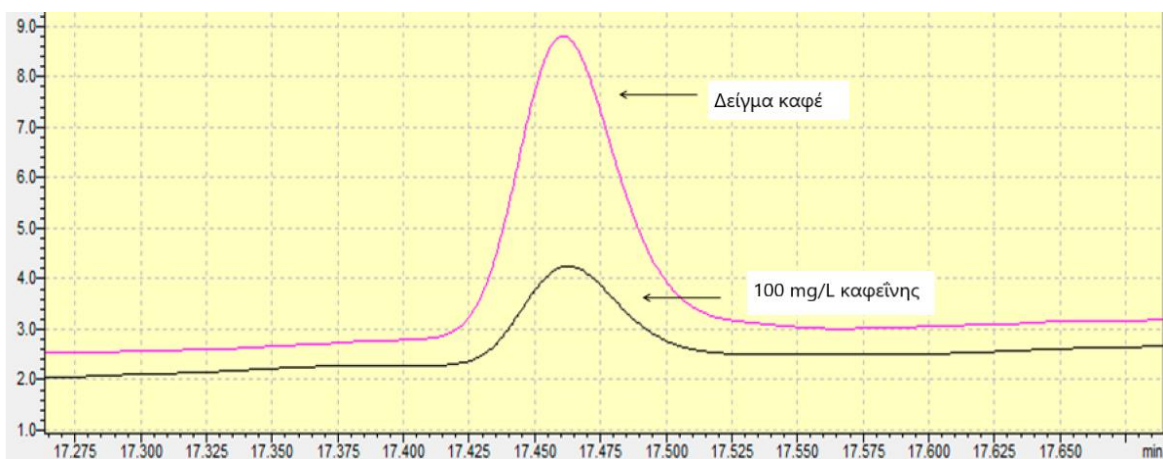
2.5.1.2. Πειραματική πορεία

Τρία διαφορετικά δείγματα από 3 ποικιλίες κόκκων καφέ αγοράστηκαν προκειμένου να εκτιμηθεί το μέσο περιεχόμενο κάθε δείγματος. Τα δείγματα ομογενοποιήθηκαν σε γουδί. Στη συνέχεια, εκχυλίστηκαν 0,5 g των ομογενοποιημένων κόκκων καφέ με 10 mL εξαιρετικά καθαρού νερού και με θέρμανση για 15 λεπτά στους 100°C. Ακολούθησε εκ νέου εκχύλιση σε 10 mL διχλωρομεθανίου και το 1 L εκχυλίσματος εγχύθηκε στο σύστημα GC. Για την ακρίβεια της μεθόδου, η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε για ενισχυμένα δείγματα με γνωστή ποσότητα αναλύτη σε τρία διαφορετικά επίπεδα περιεχομένου και πραγματοποιήθηκε η εκτίμηση της ανάκτησης και της % σχετικής τυπικής απόκλισης μεταξύ της ημέρας και μεταξύ των ημερών. Προκειμένου να αποφευχθεί η χρήση κατάλληλου εσωτερικού προτύπου κατασκευάστηκε ένα διάγραμμα ποιοτικού ελέγχου και το εσωτερικό δείγμα ποιότητας αναλύθηκε μετά από πέντε διαφορετικές δοκιμές.

2.5.1.3. Επικύρωση της μεθόδου

Ως τεχνικές ποσοτικοποίησης χρησιμοποιούνται καμπύλες πρότυπης προσθήκης γνωστής ποσότητας και εξωτερικής βαθμονόμησης. Το διάλυμα εσωτερικού προτύπου δεν χρησιμοποιήθηκε. Σε γενικές γραμμές, η χρήση ενός εσωτερικού προτύπου στην

ανάλυση GC-FID γίνεται συνήθως για τη διόρθωση τυχαίων σφαλμάτων από την επαναληψιμότητα της έγχυσης, συστηματικών σφαλμάτων από την φθορά του οργάνου και διαδικαστικών λαθών. Στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο επιλέχθηκε ως τεχνική ποσοτικοποίησης η εξωτερική βαθμονόμηση, καθώς το t-test απέδειξε ότι δεν υπήρχε σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο κλίσεων (της εξωτερικής πρότυπης καμπύλης βαθμονόμησης και της πρότυπης καμπύλης γνωστής ποσότητας). Το γραμμικό εύρος της καμπύλης βαθμονόμησης εκτείνεται από 10 έως 1000 mg/L, ένα εύρος «κατάλληλο» για την αποφυγή χρονοβόρων αραιώσεων των δειγμάτων και για να είναι το κεντρικό πρότυπο διάλυμα της καμπύλης βαθμονόμησης κοντά στο περιεχόμενο των δειγμάτων, προκειμένου να επιτευχθούν καλύτερα αποτελέσματα. Το όριο ανίχνευσης βρέθηκε να ισούται με 3,1 mg/L ή 62 mg καφεΐνης /kg, ενώ το όριο ποσοτικοποίησης βρέθηκε 9,3 mg/L ή 186 mg καφεΐνης /kg. Συγκρίνοντας τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης με αυτά που επιτυγχάνονται με άλλες μεθόδους, μπορεί να συναχθεί το συμπέρασμα ότι οι τιμές που προσδιορίζονται σε αυτό το πρωτόκολλο είναι παρόμοιες ή χειρότερες από άλλες, αλλά είναι σίγουρα «κατάλληλα» για αυτό το σκοπό, δηλαδή σχετικά με τα επίπεδα περιεκτικότητας της καφεΐνης στους κόκκους καφέ (Pasias, Kiriakou, & Proestos, 2017).



Εικόνα 5. Χρωματογραφήματα της καφεΐνης σε πρότυπο διάλυμα και σε δείγμα κόκκων καφέ.

2.6. ΜΕΚΣ

Οι περισσότερες αναλύσεις φαρμάκων, είτε από μορφή φαρμακευτικής δοσολογίας είτε από βιολογικά δείγματα, μπορούν να χαρακτηριστούν από επιτυχία με τη χρήση της ΜΕΚΣ. Είναι ιδιαίτερης σημασίας για τον αποτελεσματικό διαχωρισμό ουδέτερων

μορίων φαρμάκων, ενώ έχει εφαρμοστεί σε αναλύσεις τροφίμων, φυτών και περιβαλλοντικές αναλύσεις.

Η ΜΕΚC είναι απλώς μια μέθοδος που βασίζεται στη μικροδιαλυτοποίηση, χρησιμοποιώντας την οργανολογία της τεχνικής CE. Με τη χρήση τασιενεργών, που περιέχουν τόσο υδρόφοβες όσο και υδρόφιλες ομάδες, και την προσθήκη τους στο διάλυμα ηλεκτρολύτη σχηματίζονται μικκύλια, τα οποία ενεργούν ως ψευδο-στατική φάση (PSP). Η μικκυλιακή φάση συμπεριφέρεται ως στατική φάση, η οποία έχει διαφορετική κινητικότητα στην υδατική φάση, και ως κινητή φάση στην συμβατική χρωματογραφία. Ο μηχανισμός διαχωρισμού των αναλυτών βασίζεται στο διαφορικό διαχωρισμό μεταξύ της μικκυλιακής και της υδατικής φάσης. Σε περίπτωση φορτισμένων μικκυλίων, ο διαχωρισμός οφείλεται σε συνδυασμό διαμερισματοποίησης μεταξύ των φάσεων και της ηλεκτροφορικής ικανότητας.

Το SDS είναι το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο τασιενεργό στις εφαρμογές της ΜΕΚC. Έχει χαμηλή CMC (8,1 mM σε καθαρό νερό στους 25°C) και παρέχει καλή επιλεκτικότητα και αποτελεσματικότητα. Επίσης, είναι άμεσα διαθέσιμο και έχει χαμηλό κόστος το καθαρό προϊόν. Ο ανιονικός χαρακτήρας των θειικών ομάδων του SDS προκαλεί την ηλεκτροφορητική κινητικότητα του τασιενεργού και των μικκυλίων προς το θετικό ηλεκτρόδιο, υπό αλκαλικές συνθήκες. Ως αποτέλεσμα, τα τασιενεργά μονομερή και τα μικκύλια μεταναστεύουν αρκετά αργά, αλλά η καθαρή τους κίνηση παραμένει προς το αρνητικό ηλεκτρόδιο.

Μια αλλαγή στη θερμοκρασία μπορεί να επηρεάσει την ανάλυση ΜΕΚC. Ωστόσο, η επίδραση της θερμοκρασίας δεν είναι πολύ σημαντική στα σύγχρονα όργανα CE, που διαθέτουν ένα καλό σύστημα ψύξης είτε ένα ψυκτικό υγρό είτε ένα κυκλοφορούμενο ρεύμα αέρα. Αν και δεν είναι μία σημαντική παράμετρος, για να επιτευχθεί καλύτερο αποτέλεσμα στην επαναληψιμότητα προτιμάται η σταθεροποίησή της σε ένα ορισμένο σημείο. Το pH του ρυθμιστικού διαλύματος ελέγχει τον ιονισμό των αναλυτών. Οι ιονισμένοι αναλύτες με το ίδιο φορτίο θα είναι λιγότερο εύκολο να ενσωματωθούν στο μικκύλιο από ότι αυτοί με την ουδέτερη μορφή. Μια ισχυρή μέθοδος που χρησιμοποιείται για να επηρεάσει την επιλεκτικότητα στην ανάλυση ΜΕΚC είναι η χρήση πρόσθετων στην υδατική φάση. Ο χρόνος μετανάστευσης και ο διαχωρισμός μπορούν εύκολα να τροποποιηθούν με την προσθήκη διαφορετικών αλάτων, παραγόντων συμπλοκοποίησης και οργανικών διαλυτών στην υδατική φάση, οι οποίοι

επηρεάζουν την αλληλεπίδραση μεταξύ του μικκυλίου και των αναλυτών (Deeb, Iriban, & Gust, 2011).

2.6.1. Εφαρμογή της ανάλυσης ΜΕΚC σε δείγμα πλάσματος

2.6.1.1. Οργανολογία

Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με σύστημα Beckman P/ACE™MDQ CE εξοπλισμένο με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων. Ο διαχωρισμός έλαβε χώρα χρησιμοποιώντας ένα τριχοειδές συντηγμένης silica, το οποίο είχε συνολικό μήκος 60 cm και αποτελεσματικό μήκος 50 cm.

2.6.1.2. Αντιδραστήρια και υλικά

- CA ($\geq 99\%$), TP ($\geq 99\%$), TP ($\geq 99\%$) και PX.
- Δωδεκαϋδρικό φωσφορικό δινάτριο, διυδροφωσφορικό νάτριο, υδροξείδιο του νατρίου, φωσφορικό οξύ, SDS και όλα τα άλλα αντιδραστήρια και οι διαλύτες ήταν αναλυτικού βαθμού.
- Υπερ-καθαρό νερό ($\geq 18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$).
- Φίλτρα tips (0,45 μm).

2.6.1.3. Προετοιμασία πυκνών πρότυπων διαλυμάτων

Οι τέσσερις μεθυλοξανθίνες ζυγίστηκαν σε ογκομετρικές φιάλες των 5 mL, διαλύθηκαν σε 4 mL νερού (η TB διαλύθηκε πρώτα με 50 μL διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου 1,0 M) και γεμίστηκαν με νερό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Για την ανάλυση ΜΕΚC, προετοιμάστηκαν μεμονωμένα πυκνά διαλύματα 1,0 mg/mL για CF, TB, TP, και PX.

2.6.1.4. Προεπεξεργασία δείγματος

Τα δείγματα αίματος συλλέχθηκαν μετά από ολονύκτια νηστεία (12-14 ώρες). Σε σωληνάρια EDTA-K2 των 2 mL απομονώθηκε το πλάσμα ακολουθούμενο από δύο με τρεις ανακινήσεις. Στη συνέχεια, τα δείγματα παρέμειναν σε ηρεμία για 30-60 λεπτά και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 3500 rpm. Τα δείγματα πλάσματος διαχωρίστηκαν σε σωληνάρια συλλογής και αποθηκεύτηκαν στους -20°C μέχρι να γίνει περαιτέρω ανάλυση. Η προεπεξεργασία του δείγματος πραγματοποιήθηκε σε δείγματα πλάσματος μέσω φασματοσκοπίας με φυσίγγιο Welchrom C18E (500 mg, 6 mL). Τα φυσίγγια προετοιμάστηκαν διαδοχικά με 5 mL μεθανόλης και 5 mL υπερ-καθαρού νερού πριν το δείγμα φορτωθεί. Ένα χιλιοστόλιτρο κάθε δείγματος πλάσματος φορτώθηκε μέσω του φυσιγγίου. Έπειτα, το φυσίγγιο ξεπλύθηκε με διάλυμα φωσφορικού οξέος 2 mL σε pH 3,0. Μετά την ξήρανση, το φυσίγγιο ξεπλύθηκε με 2 mL μεθανόλη. Το έκλουσμα

εξατμίστηκε μέχρι να ξεραθεί, κάτω από ένα ρεύμα αζώτου στους 45°C. Το υπόλειμμα επαναδιαλύθηκε με 50 mL υπερ-καθαρού νερού, το οποίο εγχύθηκε απευθείας στο CE σύστημα ανάλυσης.

2.6.1.5. Συνθήκες της μεθόδου

Το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από φωσφορικά και SDS και το pH του ρυθμίστηκε με 1,0 M NaOH. Όλα τα ρυθμιστικά διαλύματα διηθήθηκαν μέσω φίλτρου 0,22 μm πριν από τη χρήση. Οι τέσσερις στοχευόμενοι αναλύτες εντοπίστηκαν στα 210 nm, αφού προηγήθηκε σάρωση εντός εύρους 190-300 nm. Οι διαχωρισμοί πραγματοποιήθηκαν στα 15 kV και το τριχοειδές διατηρήθηκε σε σταθερή θερμοκρασία 25°C. Οι εγχύσεις για τα πειράματα έγιναν χρησιμοποιώντας πίεση 0,5 psi για 15 δευτερόλεπτα (Han, et al., 2020).

2.7. SIC

Η νέα γενιά ανάλυσης διαδοχικής έγχυσης (SIA) που ονομάζεται χρωματογραφία διαδοχικής έγχυσης (SIC) έχει ήδη ενοποιηθεί ως μία καλή εναλλακτική λύση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) για γρήγορη ανάλυση απλών δειγμάτων. Τα οφέλη των μεθόδων ροής είναι ο αυτοματισμός, η σμίκρυνση και η χαμηλή κατανάλωση δείγματος και κινητής φάσης. Η σύζευξη βραχείας μονολιθικής στήλης με SIA άνοιξε μία νέα δυνατότητα ανάλυσης ροής, που μπορεί εύκολα να λύσει προβλήματα με την ανάλυση του μίγματος. Η μέθοδος SIC, που περιγράφηκε πρώτη φορά το 2003, έχει ήδη εφαρμοστεί επιτυχώς στην ανάλυση σχετικά απλών δειγμάτων πολλαπλών συστατικών, κυρίως στον τομέα της φαρμακευτικής ανάλυσης. Η SIC βασίζεται στην κλασική πολλαπλή SIA. Το χρωματογραφικό μέρος αντιπροσωπεύεται από βραχεία (συνήθως μήκους 25 ή 50 mm) εμπορικά διαθέσιμη μονολιθική στήλη (με ή χωρίς μονολιθική προστήλη μήκους 5 ή 10 mm). Η ανίχνευση παρέχεται από ανιχνευτή ινών UV-VIS DAD.

Οι μονολιθικές στήλες αποτελούνται από ένα μόνο κομμάτι ράβδου πολυμερούς πυριτικής πηκτής υψηλής καθαρότητας με διτροπική δομή πόρων (μακροπόροι και μεσοπόροι- ένα πορώδες που υπερβαίνει το 80%). Οι μακροπόροι (μέσο μέγεθος 2 μm) μειώνουν δραματικά την αντίσταση της στήλης και επιτρέπουν την χρήση υψηλότερων ποσοστών ροής. Οι μεσοπόροι (μέσο μέγεθος 13 nm) σχηματίζουν τη λεπτή πορώδη δομή και δημιουργούν τη μεγάλη ομοιόμορφη ενεργή επιφάνεια, επιτρέποντας υψηλής απόδοσης χρωματογραφικό διαχωρισμό. Η μονολιθική ράβδος δείχνει πολύ υψηλή μηχανική σταθερότητα και μεγάλη διάρκεια ζωής, που στις περισσότερες περιπτώσεις

υπερβαίνει κατά πολύ τη διάρκεια ζωής των στηλών με σωματίδια. Οι μονολιθικές στήλες εμφανίζουν, επίσης, παρόμοιες χρωματογραφικές ιδιότητες σε σχέση με τη συγκράτηση και την επιλεκτικότητα με τις στήλες σωματιδίων της ίδιας ειδικής επιφάνειας και διαμέτρου πόρων.

Για τον προσδιορισμό των ενώσεων σε υγρά μίγματα συνήθως δεν είναι απαραίτητη η προ-επεξεργασία του δείγματος. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα διαλύματα είναι αρκετά απλά και τα ενισχυτικά (ιοντικές ενώσεις) συνήθως δεν παρεμβαίνουν στη χρωματογραφική μέτρηση (Chocholouš, Solich, & Šatínský, 2007).

2.7.1. Συνδυασμός της SIC με γραμμική έκλυση για διαχωρισμό και προσδιορισμό των τριών κύριων μεθυλοξανθινών χρησιμοποιώντας μικρή μονολιθική στήλη C18

2.7.1.1. Χημικές ουσίες και αντιδραστήρια

Όλες οι χημικές ουσίες ήταν αναλυτικού βαθμού. Χρησιμοποιήθηκε διπλά απεσταγμένο νερό. Η μεθανόλη και το ακετονιτρίλιο ήταν βαθμού HPLC. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν φυσίγγια υδροχλωρικού οξέος (30% w/w) και LiChrolut C18 SPE, καφεΐνη (99,7%), θεοβρωμίνη (99%) και θεοφυλλίνη (>99%).

Πρότυπα πυκνά υδατικά διαλύματα καφεΐνης και θεοφυλλίνης $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ παρασκευάστηκαν με ζύγιση των στερεών ενώσεων και διάλυση σε διπλά απεσταγμένο νερό. Ένα πυκνό πρότυπο διάλυμα θεοβρωμίνης $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ παρασκευάστηκε με ζύγιση της στερεής ένωσης, διαλύοντας τη σε 500 μL HCl 30% (w/w) και συμπληρώνοντας με διπλά απεσταγμένο μέχρι το σημάδι την ογκομετρική φιάλη των 50 mL. Μονά και μικτά πυκνά πρότυπα διαλύματα που περιέχουν $1,0\text{-}200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ από κάθε μεθυλοξανθίνη και για τις τρεις, αντίστοιχα, παρασκευάστηκαν σε διαλύτη 1 (ACN:H₂O 1:99% (v/v)). Πριν την ανάλυση, τα πρότυπα διαλύματα υπερηχογραφήθηκαν για 5 λεπτά. Οι κινητές φάσεις παρασκευάστηκαν καθημερινά, διηθήθηκαν μέσω φίλτρων Porafil® (μέγεθος πόρων 0,45, Macherey-Nagel) και υπερήχων για την αποβολή των φυσαλίδων αέρα.

2.7.1.2. Προετοιμασία δειγμάτων

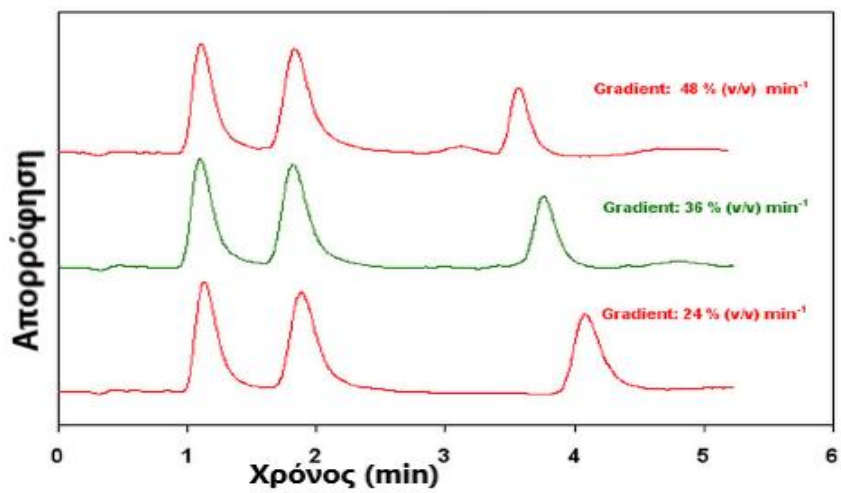
Χρησιμοποιήθηκαν αλεσμένα και στιγμιαία δείγματα καφέ, φακελάκια τσαγιού και πόσιμα δείγματα σοκολάτας σε σκόνη. Τα δείγματα αλέστηκαν και ξηράθηκαν στους 110°C για 3 ώρες. Η προετοιμασία του δείγματος πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφηκε παραπάνω.

Για το δείγμα αλεσμένου καφέ, 1 g ζυγίστηκε με ακρίβεια, προστέθηκε σε 40 mL νερού στους 90°C και η εκχύλιση έλαβε χώρα για 15 λεπτά στους 90°C υπό ανάδευση. Όταν επήλθε θερμοκρασία σε δωμάτιο, το υπερκείμενο διάλυμα μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και συμπληρώθηκε ο όγκος με απεσταγμένο νερό. Στην περίπτωση του στιγμιαίου καφέ, 1 g δείγματος διαλύθηκε σε 80 mL νερού στους 90°C. Μετά από ψύξη, το τελικό διάλυμα μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και συμπληρώθηκε ο όγκος με απεσταγμένο νερό. Τα δείγματα αραιώθηκαν περαιτέρω με διαλύτη 1 (ACN:H₂O 1:99% (v/v)) πριν από την ανάλυση.

Για τα δείγματα τσαγιού, προστέθηκε με ακρίβεια 1 g αποξηραμένου τσαγιού σε 40 mL νερού στους 90°C και η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε για 15 λεπτά στους 90°C υπό ανάδευση. Η δεύτερη εκχύλιση του υπόλοιπου δείγματος έγινε υπό τις ίδιες συνθήκες. Το υπερκείμενο εκχύλισμα αναμίχθηκε με το πρώτο εκχύλισμα στην ογκομετρική φιάλη των 100 mL και η φιάλη πληρώθηκε με απεσταγμένο νερό. Τα δείγματα αραιώθηκαν περαιτέρω 1:40 με διαλύτη 1 (ACN:H₂O 1:99% (v/v)) πριν από την ανάλυση.

Για τα δείγματα πόσιμης σοκολάτας, εφαρμόστηκε καθαρισμός με φυσιγγία SPE για την απομάκρυνση των λιπόφιλων συστατικών. Αμέσως πριν την εκχύλιση SPE, τα φυσιγγία C18 ρυθμίστηκαν με 2 mL μεθανόλης και 2 mL νερό. Ζυγίστηκαν με ακρίβεια 100 g του δείγματος, προστέθηκαν σε 10 mL νερό στους 90°C και πραγματοποιήθηκε εκχύλιση για 15 λεπτά στους 90°C υπό ανάδευση. Μετά από ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου, 2 mL του υπερκείμενου εκχυλίσματος σοκολάτας διέρρευσε μέσω του επεξεργασμένου φυσιγγίου SPE, το φυσιγγίο πλύθηκε με 2 mL νερό και οι συγκρατημένες ενώσεις εκλούστηκαν με 3 mL μεθανόλης. Το μεθανολικό έκλουσμα συμπυκνώθηκε μέχρι ξηρού υπό κενό στους 40°C και το υπόλειμμα ανασυστάθηκε σε 10 mL διαλύτη 1 (ACN:H₂O 1:99% (v/v)). Τα δείγματα αραιώθηκαν περαιτέρω 1:4 με διαλύτη 1 (ACN:H₂O 1:99% (v/v)) πριν από την ανάλυση.

Τα δείγματα διηθήθηκαν μέσω κασετών φίλτρου Chromafil® Xtra (μέγεθος πόρων 0,45 μm) και υπερήχων για 5 λεπτά πριν από την ανάλυση. Για τα πειράματα ανάκτησης, τα δείγματα καφέ ενισχύθηκαν με γνωστές ποσότητες των τριών μεθυλοξανθινών πριν από την εκχύλιση (Chorti, Ntousikou, & Economou, 2019).



Εικόνα 6. Χρωματογραφήματα γραμμικής βαθμιαίας έκλουσης χρησιμοποιώντας ACN:H₂O 1:99% (v/v) ως διαλύτη 1.

Κεφάλαιο 3. Εφαρμογή μη χρωματογραφικών αναλύσεων για τον προσδιορισμό των ψυχοδιεγερτικών ουσιών

Οι μη χρωματογραφικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για το προσδιορισμό της καφεΐνης και των μεταβολιτών της είναι πολλές. Η άμεση ανάλυση με ιονισμό πραγματικού χρόνου (DART) σε συνδυασμό με υψηλής ανάλυσης φασματομετρία μάζας χρησιμοποιείται ως γρήγορη και επιλεκτική τεχνική. Το δείγμα για αυτή την ανάλυση μπορεί να τοποθετηθεί κατευθείαν στην πηγή ιονισμού DART, και στην ώρα της ανάλυσης το φασματόμετρο μάζας είναι ικανό να παρέχει υψηλής απόδοσης μετρήσεις των λαμβανόμενων φασμάτων μάζας, δηλαδή υψηλή εκλεκτικότητα. Οι μεταβολές του σήματος λόγω της επίδρασης της μήτρας και της αστάθειας της πηγής ιόντων αντισταθμίζονται με προσθήκη πρότυπου διαλύματος ισοτοπικά επισημασμένης καφεΐνης (Jeszka-Skowron, Zgoła-Grzeškowiak, & Grzeškowiak, 2015).

3.1. DART-MS

Η φασματομετρία μάζας (MS) είναι μία από τις ταχύτατα αναπτυσσόμενες μεθόδους σε αναλυτικά όργανα. Η χρήση της για υποστήριξη στη συνθετική, οργανική και φαρμακευτική χημεία είναι καλά εδραιωμένη, ενώ χρησιμοποιείται, επίσης, και στην περιβαλλοντική έρευνα και την ιατροδικαστική χημεία. Η MS έχει εξελιχθεί σε μία από τις βασικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται στη βιοτεχνολογία. Ωστόσο, οι διαθέσιμες σήμερα πηγές ιόντων θέτουν υπερβολικούς περιορισμούς στην ταχύτητα και την ευκολία της ανάλυσης του δείγματος με αυτή τη μέθοδο.

Η μέθοδος DART είναι μία νέα πηγή ιόντων που ξεπερνά αυτούς τους περιορισμούς. Αναφέρεται ως άμεση ανάλυση σε πραγματικό χρόνο (DART_{tm}), η οποία έχει συνδεθεί με φασματόμετρο μάζας ιονισμού ατμοσφαιρικής πίεσης AccuTOF-LC_{tm} για να επιτρέψει υψηλή ανάλυση και ακριβείς μετρήσεις της μάζας αερίων, υγρών και στερεών. Μπορεί να πραγματοποιήσει με επιτυχία δειγματοληψία εκατοντάδων χημικών ουσιών, συμπεριλαμβανομένων χημικών και φαρμακευτικών παραγόντων, μεταβολιτών, φυτοφαρμάκων και περιβαλλοντικά σημαντικών ενώσεων, πεπτιδίων και ολιγοσακχαριτών, συνθετικών οργανικών, οργανομεταλλικών, ναρκωτικών κατάχρησης, εκρηκτικών και τοξικών βιομηχανικών χημικών.

Ένα αέριο (συνήθως ήλιον ή άζωτο) ρέει μέσω ενός θαλάμου, όπου μια ηλεκτρική εκκένωση παράγει ιόντα, ηλεκτρόνια, άτομα και μόρια σε διεγερμένη

κατάσταση (μεταστατικά). Τα περισσότερα από τα φορτισμένα σωματίδια αφαιρούνται καθώς το αέριο διέρχεται από διάτρητους φακούς ή πλέγματα και μόνο τα ουδέτερα μόρια αερίου, συμπεριλαμβανομένων των μεταστατικών ειδών, παραμένουν. Ένας διάτρητος φακός ή πλέγμα στην έξοδο του συστήματος DART εξυπηρετεί διάφορες λειτουργίες: αποτρέπει τον ανασυνδυασμό ιόντων-ιόντων και ιόντων-ηλεκτρονίων, ενεργεί ως πηγή ηλεκτρονίων με ιονισμό από επιφάνεια Penning και ενεργεί ως ηλεκτρόδιο για την προώθηση της μετατόπισης των ιόντων προς την επιφάνεια του στομίου της ατμοσφαιρικής πίεσης του φασματόμετρου μάζας. Είναι δυνατόν, διάφοροι μηχανισμοί ιονισμού να εξαρτώνται από την πολικότητα και την αντίδραση του αερίου, τη συγγένεια των πρωτονίων και το δυναμικό ιονισμού της αναλυόμενης ουσίας, καθώς και την παρουσία πρόσθετων ή προσμίξεων. Η απλούστερη διαδικασία είναι ο ιονισμός Penning. Ο ιονισμός αυτός είναι ένας κυρίαρχος μηχανισμός αντίδρασης όταν χρησιμοποιείται άζωτο ή νέον στην πηγή του συστήματος DART. Τα ιόντα αζώτου ή νέου απομακρύνονται αποτελεσματικά από τους ηλεκτροστατικούς φακούς και δεν διακρίνονται ποτέ στο υπόβαθρο του φάσματος μάζας στην ανάλυση DART.

Η πολικότητα της πηγής ιόντων εναλλάσσεται μεταξύ λειτουργίας θετικών ιόντων και λειτουργίας αρνητικών ιόντων, αλλάζοντας έτσι την πολικότητα του ηλεκτροδίου του δίσκου και του πλέγματος. Η πολικότητα της βελόνας εκκένωσης δεν αλλάζει, επομένως το πλάσμα δεν διακόπτεται. Η παρουσία ιχνών προσμίξεων, όπως το αμμώνιο (π.χ. από ατμούς υδροξειδίου του αμμωνίου) ή το χλωρίδιο (π.χ. από ατμούς μεθυλενοχλωριδίου) μπορεί να τροποποιήσει τις χημικές αντιδράσεις, για αυτό επιτρέπει στον χειριστή να προσαρμόσει το πείραμα για πιο ειδικές αναλύσεις.

Το πλεονέκτημα της ανάλυσης DART είναι ότι τα υλικά μπορούν να αναλυθούν απευθείας σε επιφάνειες όπως γυαλί, πλάκες TLC, τσιμέντο, χαρτί ή νόμισμα χωρίς να απαιτείται εκχύλιση με διαλύτη. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το γεγονός ότι τα ναρκωτικά μπορούν να ανιχνευθούν σε μορφή χαπιού με τοποθέτηση του χαπιού μπροστά από την πηγή DART για μερικά λεπτά. Η DART έχει εφαρμοστεί στην άμεση ανίχνευση μεταβολιτών σε μη επεξεργασμένα σωματικά υγρά, συμπεριλαμβανομένων του αίματος, των ούρων, του ιδρώτα και του σάλιου (Cody, Laramée, Nilles, & Durst, 2005).

3.1.1. Ανίχνευση της καφεΐνης στο τσάι, το στιγμιαίο καφέ, το πράσινο τσάι και τα αναψυκτικά με πηγή DART συνδεδεμένη με φασματομετρία μάζας μονού τετραπόλου

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε για ταχεία ανίχνευση της καφεΐνης σε εμπορικά δείγματα χωρίς χρωματογραφικό διαχωρισμό ή προετοιμασία του δείγματος. Η ανάλυση DART-MS είναι ένα πολλά υποσχόμενο εργαλείο για τη γρήγορη ανάλυση σημαντικών μορίων-δεικτών σε εμπορικά δείγματα, ενώ έχει αποδείξει σημαντικές δυνατότητες για υψηλή δειγματική απόδοση και ανάλυση σε πραγματικό χρόνο. Το κυρίαρχο πλεονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι ότι δεν λειτουργεί σε κενό, όπως γίνεται στην κλασική πηγή ιονισμού ηλεκτροψεκασμού MS, αλλά διεξάγεται σε φυσικό αέρα υπό συνθήκες περιβάλλοντος. Η χρήση της στην παρούσα ανάλυση στοχεύει στο να αξιολογήσει τις δυνατότητές της για γρήγορη ανίχνευση της καφεΐνης σε διαφορετικές μήτρες δείγματος χωρίς τη χρήση διαλυτών. Λόγω της έλλειψης χρωματογραφικού διαχωρισμού η απόκριση της DART είναι στιγμιαία.

3.1.1.1. Αντιδραστήρια, χημικά και υλικά

- Πρότυπο καφεΐνης (καθαρότητα $\geq 97,0\%$).
- Ακετονιτρίλιο (βαθμός HPLC).
- Τσάι, στιγμιαίος καφές, πράσινο τσάι και αναψυκτικό.

Πυκνά πρότυπα διαλύματα καφεΐνης των 10 mg/L παρασκευάστηκαν σε ακετονιτρίλιο και αποθηκεύτηκαν στους -20°C .

3.1.1.2. Συνθήκες λειτουργίας DART-MS

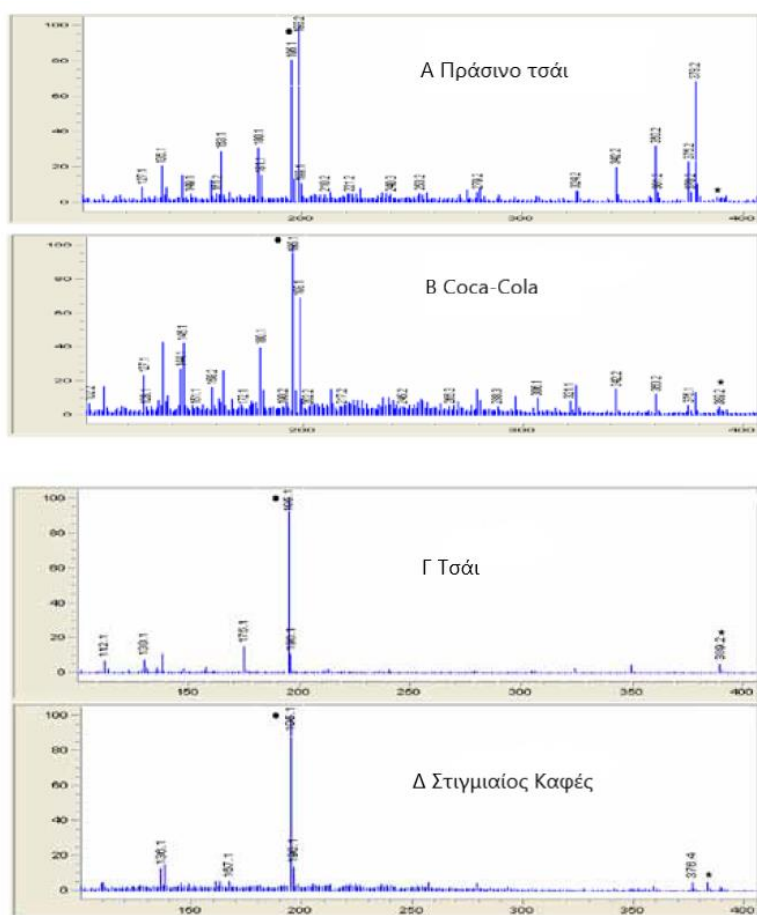
Η πηγή ιόντων ρυθμίστηκε σε λειτουργία θετικού ιόντος με ήλιον ως ιονιστικό μέσο και ρυθμό ροής 2,9 L/min. Οι παράμετροι ήταν οι εξής: ροή ηλίου 2,9 L/min, θερμοκρασία αερίου ηλίου 300°C , τάση δικτύου 200 V και τάση εκκένωσης βελόνας 3000 V. Το στόμιο της DART, ο κεραμικός σωλήνας (4 mm i.d x 8,3 cm μήκος) και το στόμιο του φασματόμετρου μάζας ευθυγραμμίστηκαν έτσι ώστε η ροή του ηλίου από την πηγή DART να εισαχθεί απευθείας στο στόμιο του φασματόμετρου και να επιτευχθεί η καλύτερη ευαισθησία. Τα δείγματα εισήχθησαν χειροκίνητα στο ρεύμα αερίου της DART. Κάθε δείγμα αναλύθηκε σε μόλις 5 δευτερόλεπτα και μετρήθηκε πέντε φορές διαδοχικά.

3.1.1.3. Προετοιμασία δείγματος

Επιλέχθηκαν δύο στερεά δείγματα (τσάι και στιγμιαίος καφές) και δύο υγρά δείγματα (πράσινο τσάι και αναψυκτικό Coca-Cola). Δεν απαιτείται προετοιμασία του δείγματος για την ποιοτική ανίχνευση της καφεΐνης στα τέσσερα αυτά δείγματα, ενώ για την άμεση

ανίχνευση η εισαγωγή τους στην πηγή ιόντων πραγματοποιήθηκε με τσιμπιδάκι (για το τσάι) ή γυάλινη ράβδο (για το στιγμιαίο καφέ, το πράσινο τσάι και το αναψυκτικό).

Παρατήρηση: Η υψηλότερη θερμοκρασία θα μπορούσε να επιταχύνει τα ποσοστά θερμικής εκρόφησης και να αφήσει περισσότερους αναλύτες να εισέλθουν στον ανιχνευτή του φασματομέτρου μάζας για να αυξήσουν την απόκριση. Ωστόσο, μία πολύ υψηλή θερμοκρασία θα μπορούσε να προκαλέσει πολύ γρήγορη θερμική απορρόφηση των δειγμάτων ή μη αναστρέψιμη αποικοδόμηση δείγματος, με αποτέλεσμα την απώλεια δείγματος και τη χαμηλότερη ευαισθησία. Η επιλεγμένη θερμοκρασία των 300°C παρείχε τις υψηλότερες αποκρίσεις (Wang, Zhao, Zhang, Bai, & Pan, 2013).



Εικόνα 7. Τυπικά φάσματα DART-MS που λαμβάνονται από: Α) πράσινο τσάι, Β) Coca-Cola, Γ) τσάι και Δ) στιγμιαίο καφέ.

3.2. DART-TOFMS

Η διαθεσιμότητα γρήγορων ηλεκτρονικών, η απόκτηση δεδομένων και η επεξεργασία τους από τη μία πλευρά και οι παλμικές πηγές ιονισμού από την άλλη, οδήγησαν τελικά την TOFMS να γίνει μία από τις κορυφαίες τεχνικές φασματοσκοπίας μάζας. Εκτός από

τις άλλες παλμικές μεθόδους ιονισμού, όπως η SIMS (δευτερεύουσα φασματομετρία μάζας ιονισμού), ειδικότερα ο ιονισμός με παλμικό φως λέιζερ ήταν υπεύθυνος για αυτή την επιτυχία. Τα παλμικά λέιζερ εφαρμόστηκαν σε αέρα φάση καθώς, επίσης, και σε στερεή φάση ιονισμού. Στην πρώτη περίπτωση, επέτρεψαν την επιλεκτική μαζική μοριακή φασματοσκοπία και τον εξαιρετικά επιλεκτικό ιονισμό. Στην δεύτερη περίπτωση, χρησιμοποιήθηκαν για την εκρόφηση και τον ιονισμό μεγάλου μεγέθους βιομορίων σε ένα μόνο στάδιο διέγερσης.

Τα κύρια χαρακτηριστικά που ευνόησαν τόσο την TOFMS είναι ένας συνδυασμός από: 1) αρκετά υψηλής ανάλυσης μάζας, 2) μίας κλίμακας μάζας η οποία θεωρητικά δεν περιορίζεται σε μεγάλες μάζες, 3) υψηλής συμβατότητας με άλλες τεχνικές επιλογής και 4) αρκετά εύκολο τρόπο σχεδιασμού, τοποθέτησης και χειρισμού (Boesl, 2017).

3.2.1. Ταχεία ανάλυση της καφεΐνης σε ποικιλία δειγμάτων καφέ εφαρμόζοντας DART-TOFMS

Τα κύρια πλεονεκτήματα των σύγχρονων μεθόδων, όπως η DART-TOFMS, σε σύγκριση με τις συμβατικές τεχνικές (GC-MS, LC-MS), περιλαμβάνουν τη δυνατότητα άμεσης εξέτασης των δειγμάτων σε συνθήκες ατμόσφαιρας, ελάχιστες ή καθόλου απαιτήσεις προετοιμασίας δείγματος (το βήμα του διαχωρισμού δεν περιλαμβάνεται) και εξαιρετικά υψηλή απόδοση δείγματος.

3.2.1.1. Αντιδραστήρια

- Μεθανόλη βαθμού HPLC.
- Απιονισμένο νερό.
- Πρότυπα διαλύματα καφεΐνης και $^{13}\text{C}_3$ – καφεΐνης αραιωμένα σε μίγμα αιθανόλης-νερού (4:1 v/v, για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης).
- Οξικό οξύ (για την κινητή φάση HPLC).
- Πολυαιθυλενογλυκόλη.

3.2.1.2. Δείγματα

Δείγματα καβουρδισμένου, στιγμιαίου και σε κάψουλες καφέ που αντιπροσωπεύουν ένα ευρύ φάσμα προϊόντων καφέ αποθηκεύτηκαν στο σκοτάδι και αφέθηκαν να στεγνώσουν στους 6°C. Παρασκευάστηκαν αφεψήματα καφέ την ημέρα της ανάλυσης, αλλά δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στην περιεκτικότητα σε καφεΐνη μετά από 7 ημέρες αποθήκευσης του υγρού δείγματος σε αεροστεγές γυάλινο δοχείο στους 6°C.

3.2.1.3. Προετοιμασία δείγματος

Μία απλή εκχύλιση καφεΐνης από 1 g ξηρού ψημένου καφέ χρησιμοποιώντας 100 mL βραστό απιονισμένο νερό έλαβε χώρα. Κάθε έγχυση φιλτράρεται με τη χρήση φίλτρου σύριγγας (0,45 μm) πριν από την ανάλυση. Ένα σημαντικό μέρος της προετοιμασίας του δείγματος πριν από την ανάλυση DART-TOFMS ήταν η αραιώσή του. Στο πρώτο βήμα τα υγρά δείγματα αραιώθηκαν με απιονισμένο νερό: α) 20 φορές για το εκχύλισμα καβουρδισμένου καφέ, β) 100 φορές για τον καφέ σε κάψουλες και γ) 10 φορές για το στιγμιαίο καφέ. Η δεύτερη αραιώση πραγματοποιήθηκε με μεθανόλη βαθμού HPLC. Σε αυτό το βήμα, τα εκχυλίσματα αραιώθηκαν περαιτέρω δέκα φορές.

3.2.1.4. Ποσοτικός προσδιορισμός στα εκχυλίσματα

Για ποσοτικοποίηση της καφεΐνης με την τεχνική DART-TOFMS, χρησιμοποιήθηκε εξωτερική βαθμονόμηση με εύρος 0,1-10 μg/mL, ενώ για ποσοτικοποίηση με HPLC-UV εξωτερική βαθμονόμηση με εύρος 1-250 μg/mL (Danhelova, et al., 2012).

3.3. FTIR

Η φασματοσκοπία υπέρυθρων ήταν πάντα ένα ισχυρό εργαλείο για τον προσδιορισμό οργανικών υλικών. Ωστόσο, με την ανάπτυξη της φασματοσκοπίας υπέρυθρων μετασχηματισμών Fourier (FTIR), έχει γίνει μία πιο δημοφιλής μέθοδος για την ποσοτική ανάλυση σύνθετων μιγμάτων, καθώς και για τη διερεύνηση επιφανειακών και διεπιφανειακών φαινομένων.

Η φασματοσκοπία υπέρυθρων (IR) είναι η μέτρηση της απορρόφησης (ή της μετάδοσης) της υπέρυθρης ακτινοβολίας από ένα υλικό ως συνάρτηση του μήκους κύματος (ή της συχνότητας). Η προκύπτουσα γραφική παράσταση απορρόφησης (ή μετάδοσης) έναντι μήκους (ή συχνότητας) είναι το φάσμα IR. Η υπέρυθρη φασματοσκοπία ανιχνεύει το βασικό θερμικό φάσμα των υλικών, που οφείλεται κυρίως στις δονήσεις και στις συνοδευτικές ζώνες περιστροφής των μορίων. Με την ανάπτυξη των οργάνων υπέρυθρων μετασχηματισμών Fourier (FTIR), μπορούν να ληφθούν γρήγορα και αναπαραγώγιμα φάσματα IR υψηλής ανάλυσης σε μεγάλη ποικιλία τύπων δειγμάτων, συμπεριλαμβανομένων αερίων, υγρών, χύμα και σε σκόνη στερεών δειγμάτων, λεπτών μεμβρανών και νανοϋλικών. Έτσι, ενισχύει τη δημοτικότητά του ως ποσοτική τεχνική με παρόμοιο τρόπο όπως η φασματομετρία απορρόφησης UV-ορατού. Σήμερα, η FTIR χρησιμοποιείται για την αναγνώριση όλων των τύπων οργανικών και πολλών ειδών ανόργανων υλικών, τον ποσοτικό προσδιορισμό τμημάτων σε σύνθετα

μίγματα, τον προσδιορισμό της μοριακής σύνθεσης επιφανειακών τμημάτων, τη διαφοροποίηση των δομικών και γεωμετρικών ισομερών και τον προσδιορισμό του μοριακού προσανατολισμού σε πολυμερή και διαλύματα (Gaffney, Marley, & Jones, 2002).

3.3.1. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης καφεΐνης σε ποτά μέσω φασματοσκοπίας FTIR

Τα μεγαλύτερα μόρια, όπως η καφεΐνη, είναι IR δραστικά και απορροφούν καλά επιτρέποντας τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων. Σε αυτό το πείραμα πρέπει να χρησιμοποιηθεί η ποσοτική ανάλυση των οργάνων στην οποία χρησιμοποιείται ο νόμος του Beer. Αυτός δείχνει τη γραμμική σχέση μεταξύ απορρόφησης και συγκέντρωσης, επιτρέποντας τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της καφεΐνης σε καθένα από τα δείγματα, βάσει της καμπύλης βαθμονόμησης και της γραμμικής παλινδρόμησης.

3.3.1.1. Αντιδραστήρια και όργανα

Αρκετά δείγματα καφεΐνης παρασχέθηκαν για δοκιμή, καθώς και χλωροφόρμιο βαθμού αντιδραστηρίου για εκχύλιση της καφεΐνης και καφεΐνη για παρασκευή πρότυπου διαλύματος. Το φασματόμετρο που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση ήταν το Shimadzu IR Affinity-1 με PIKE MIRacle, μονής αντανάκλασης εξασθενημένης συνολικής αντανάκλασης (ATR) σύνδεση.

3.3.1.2. Πειραματική πορεία

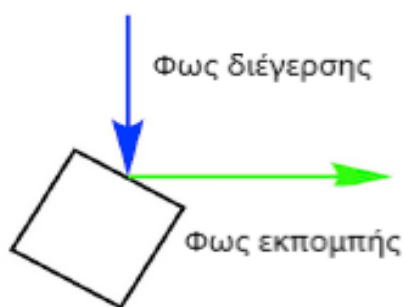
Ζυγίστηκαν 0,228 g καφεΐνης κατά περίπτωση και χρησιμοποιήθηκαν για να δημιουργηθεί ένα πυκνό διάλυμα σε χλωροφόρμιο σε ογκομετρική φιάλη των 250 mL. Ένα δείγμα 10,00 mL αυτού του διαλύματος χρησιμοποιήθηκε για να παρασκευαστεί ένα δεύτερο πυκνό διάλυμα σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Στη συνέχεια, με το τελευταίο παρασκευάστηκαν τέσσερα πρότυπα διαλύματα. Τα υγρά δείγματα προετοιμάστηκαν για ανάλυση. Με μικροπιπέττα μεταφέρθηκαν 3,00 mL κάθε δείγματος και 3,00 mL χλωροφορμίου σε διαχωριστική χοάνη των 30 mL. Μετά από διαχωρισμό φάσης, 1,00 mL της στιβάδας χλωροφορμίου αραιώθηκαν σε χλωροφόρμιο για να δώσουν τελικό όγκο 10 mL στην ογκομετρική φιάλη. Αυτό το διάλυμα χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση IR. Από την καμπύλη βαθμονόμησης υπολογίζεται η συγκέντρωση κάθε δείγματος χρησιμοποιώντας την εξίσωση γραμμικής παλινδρόμησης από την καμπύλη (Turner).

3.4. Σύγχρονη φασματοσκοπία φθορισμού (SSF)

Η εξαγωγή του αναλύτη που μας ενδιαφέρει από στερεά δείγματα πριν από την ανάλυση SS-SFS επιτρέπει την βελτίωση των αναλυτικών ικανοτήτων. Υπάρχουν δύο τρόποι για να επιτευχθεί αυτό. Η πιο κοινή προσέγγιση είναι η εκχύλιση ακολουθούμενη από προσυγκέντρωση του αναλύτη σε κατάλληλο προσροφητικό. Εναλλακτικά, μπορεί να διεξαχθεί φασματοσκοπική ανάλυση ενός ίδιου εκχυλίσματος, αλλά το εκχύλισμα πρέπει να στερεοποιηθεί πριν από την ανάλυση, για αυτό τέτοιες αναφορές είναι σχετικά σπάνιες. Η προσυγκέντρωση του αναλύτη από διάλυμα σε προσροφητικό είναι μία από τις πρότυπες μεθόδους για τη μείωση του ορίου ανίχνευσης. Οι αναλύτες που ακινητοποιούνται στα προσροφητικά της εκχύλισης στερεής φάσης (SPE) έχουν αναλυθεί με σύγχρονη φασματοφθοριμετρία (SSF) έναντι της «συμβατικής» φασματοσκοπίας φθορισμού. Τα προσροφητικά της SPE ταξινομούνται σε σφαιρίδια και επίπεδα στηρίγματα. Τα τελευταία είναι α) δίσκοι, β) μεμβράνες και φίλτρα κατασκευασμένα από συνθετικά πολυμερή και γ) φύλλα κυτταρίνης (Samokhvalon, 2020).

3.4.1. Ταχύς και μη καταστροφικός προσδιορισμός των μεθυλοξανθινών (καφεΐνη και θεοβρωμίνη) και των στερεών περιεχομένων κακάο στη μαύρη σοκολάτα, με σύγχρονη φασματοσκοπία φθορισμού εμπρόσθιας όψης

Αν και οι χρωματογραφικές μέθοδοι μπορούν να παρέχουν αξιόπιστα και ακριβή αναλυτικά αποτελέσματα, απαιτούν περίπλοκες και κουραστικές προετοιμασίες δειγμάτων και είναι χρονοβόρες και μολυσματικές για το περιβάλλον. Η απλή, γρήγορη και πράσινη ανάλυση αυτών των δραστικών ενώσεων στη μαύρη σοκολάτα έχουν επομένως μεγάλη σημασία και για τους καταναλωτές και για τις βιομηχανίες. Η φασματοσκοπία φθορισμού front-face είναι μία ταχεία και μη καταστροφική τεχνική που μετρά άμεσα το φθορισμό που διεγείρεται και εκπέμπεται στην επιφάνεια του υπό δοκιμή δείγματος. Αποφεύγοντας τη χρήση διαλύτη που απαιτείται στον παραδοσιακό φθορισμό ορθής γωνίας, η προσέγγιση εμπρόσθιας όψης μπορεί να μειώσει τις επιδράσεις του πρωτεύοντος και δευτερεύοντος εσωτερικού φίλτρου που εμφανίζονται στα δείγματα και απορροφούν έντονα. Αντικατοπτρίζει τον εγγενή φθορισμό ογκωδών και αδιαφανών δειγμάτων τροφίμων και εφαρμόζεται όλο και περισσότερο στον έλεγχο της ταυτότητας διάφορων ειδών τροφίμων και ποτών (Tan, Li, Jiang, Tang, & Wang, 2019).



Εικόνα 8. Η γεωμετρία της εμπρόσθιας όψης (FF) για στερεά και συμπυκνωμένα διαλύματα.

3.4.1.1. Υλικά και αντιδραστήρια

Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τουλάχιστον αναλυτικού βαθμού. Υπερ-καθαρό νερό χρησιμοποιήθηκε καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων. Το ορθοφωσφορικό νάτριο και το ακετονιτρίλιο ήταν βαθμού HPLC. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν μεθανόλη, καθαρό οξικό οξύ, διένυδρος οξικός ψευδάργυρος, τριένυδρο εξακυανοϊκό κάλιο (II), σακχαρόζη, υδροχλωρικό οξύ, θεοβρωμίνη και καφεΐνη.

3.4.1.2. Δείγματα σοκολάτας

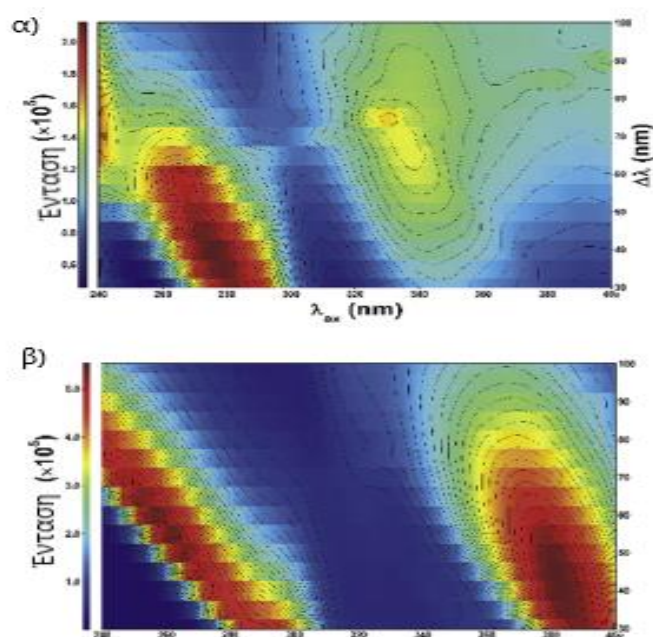
Για το πείραμα αγοράστηκαν 25 μάρκες μαύρης σοκολάτας που καταναλώνονται πιο συχνά. Συλλέχθηκαν τρεις πλάκες για κάθε μάρκα. Αυτά τα δείγματα μαύρης σοκολάτας περιέχουν μεταξύ 46-100% κατά βάρος στερεό κακάο, όπως αναγράφεται. Όλα τα δείγματα διατηρήθηκαν στους 15°C στο σκοτάδι και επισημασμένα ότι θα αναλυθούν πριν από την ημερομηνία λήξης τους.

3.4.1.3. Διαδικασία σύγχρονης φασματομετρία φθορισμού εμπρόσθιας όψης

Τα φάσματα φθορισμού ελήφθησαν με ένα φασματόμετρο FS5 με λάμπα xenon 150W ως πηγή διέγερσης. Το μήκος κύματος της διέγερσης καθορίστηκε με μονοχρωματικό φίλτρο. Προσομοιωμένα στερεά δείγματα θεοβρωμίνης και καφεΐνης αραιωμένα με ένα φθορίζον αδρανές στερεό (σακχαρόζη) παρασκευάστηκαν με παρόμοιες τιμές συγκεντρώσεις με αυτές στα δείγματα σοκολάτας. Συγκεκριμένα, οι κατάλληλες ποσότητες θεοβρωμίνης ή καφεΐνης και σακχαρόζης ζυγίστηκαν, αναμίχθηκαν καλά και τελικά ελήφθη μια ομοιογενής στερεή σκόνη. Τα επίπεδα θεοβρωμίνης και καφεΐνης στη σακχαρόζη είναι 10,0 και 1,00 mg/g, αντίστοιχα. Για να ληφθούν επαρκή σήματα φθορισμού και για να αποφευχθεί ο κορεσμός του ανιχνευτή, τα πλάτη σχισμής για διέγερση και εκπομπή προσαρμόστηκαν στα διαφορετικά δείγματα: και τα δύο στα 3 nm για τα δείγματα μαύρης σοκολάτας, 2 και 1 nm για την αραιωμένη καφεΐνη σε

σακχαρόζη, και 1 και 0,5 nm για την ακατέργαστη στερεή θεοβρωμίνη, καφεΐνη και την αραιωμένη θεοβρωμίνη σε σακχαρόζη.

Η γεωμετρία εμπρόσθιας όψης των σοκολατών χρησιμοποιήθηκε για την απόκτηση φασμάτων με μία υποδοχή δείγματος SC-10 σε θερμοκρασία δωματίου (20°C). Ένα μικρό μέρος κάθε σοκολάτας τεμαχίστηκε με μαχαίρι και τοποθετήθηκε στη βάση δείγματος. Η γωνία πρόσπτωσης της ακτινοβολίας διέγερσης ήταν 30°, η οποία διορθώθηκε από τον υποδοχέα δειγμάτων SC-10. Η διέγερση και η εκπομπή στην περιοχή 240-400 nm με ανάλυση μήκους κύματος 1 nm σαρώθηκε ταυτόχρονα. Οι εντάσεις φθορισμού απεικονίστηκαν ως συνάρτηση του μήκους κύματος διέγερσης (λ_{ex}). Για κάθε δείγμα μετρήθηκαν διαδοχικά τρία φάσματα και ο μέσος όρος των τριών μετρήσεων χρησιμοποιήθηκε για περαιτέρω ανάλυση (Tan, Li, Jiang, Tang, & Wang, 2019).



Εικόνα 9. Χάρτες περιγράμματος για τα συνολικά σύγχρονα φάσματα φθορισμού εμπρόσθιας όψης ενός τυπικού δείγματος μαύρης σοκολάτας σε: α) καθαρή στερεή θεοβρωμίνη και β) καφεΐνη.

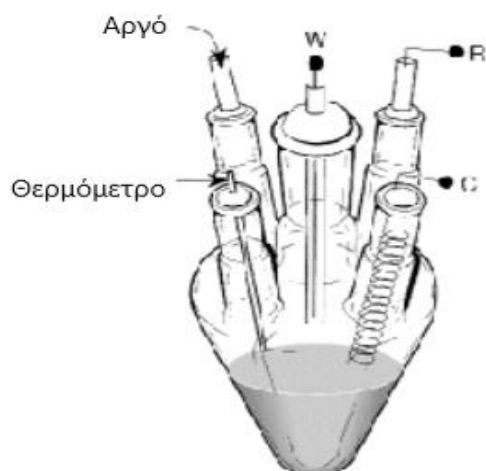
Κεφάλαιο 4. Χρήση ηλεκτροχημικών μεθόδων για τον προσδιορισμό των ουσιών που διεγείρουν το ΚΝΣ

Την τελευταία δεκαετία περίπου, έχει παρατηρηθεί αξιοσημείωτη πρόοδος στο πεδίο της βολταμετρίας. Οι βολταμετρικές μετρήσεις πραγματοποιούνται εύκολα (και φθηνά) και τα δεδομένα συσσωρεύονται γρήγορα. Ωστόσο, η ερμηνεία των τελευταίων είναι συχνά δύσκολη, ακόμη και για τους καλά μυημένους, ειδικά όταν ζητούνται ποσοτικές πληροφορίες. Πρόσφατες βολταμετρικές μελέτες των θεωριών μεταφοράς ηλεκτρονίου έχουν υποβοηθηθεί και διευκολυνθεί, σε ορισμένες περιπτώσεις, με τη χρήση παλμικών τεχνικών. Τέτοιες παλμικές τεχνικές έχουν, επίσης, ιδιαίτερη σημασία στην ευρεία περιοχή της ηλεκτρο-ανάλυσης (Batchelor-McAuley, Kätelhön, Barnes, Compton, Laborda, & Molina, 2015).

Η βολταμετρία περιλαμβάνει μία μεγάλη ομάδα ηλεκτροχημικών τεχνικών, όπου μη αυθόρμητες, διεπιφανειακές διεργασίες μεταφοράς φορτίου (μεταφορά ηλεκτρονίων ή ιόντων μέσω διεπαφής ηλεκτροδίου/ηλεκτρολύτη στο διάλυμα) καθοδηγούνται από εξωτερική εφαρμοζόμενη ηλεκτρική διαφορά δυναμικού σε ένα ηλεκτρολυτικό στοιχείο. Ο στόχος της βολταμετρίας συχνά είναι ο χαρακτηρισμός των τμημάτων οξειδοαναγωγής και ο αναλυτικός προσδιορισμός τους. Επιπλέον, η θερμοδυναμική και η κινητή της μεταφοράς φορτίου μπορεί να μελετηθεί ενδεχομένως σε συνδυασμό με χημικές αντιδράσεις και φαινόμενα προσρόφησης. Βολταμετρικά πειράματα διεξάγονται συχνά σε λίγα χιλιοστόλιτρα ενός ηλεκτρολυτικού διαλύματος, χρησιμοποιώντας μικρά ηλεκτρόδια με περιοχή επιφανείας μικρότερη από ένα τετραγωνικό εκατοστό. Εναλλακτικά, σε συγκεκριμένες περιπτώσεις τα ηλεκτρόδια χρησιμοποιούνται με διαστάσεις που κυμαίνονται στην κλίμακα μικρόμετρου έως νανόμετρου. Καθώς οι αντιδράσεις οξειδοαναγωγής των μελετώμενων ηλεκτροενεργών τμημάτων λαμβάνουν χώρα μόνο στη διεπαφή ηλεκτροδίου/ηλεκτρολύτη, καταναλώνονται ελάχιστες ποσότητες του ηλεκτροενεργού αντιδραστηρίου και η συνολική χημική σύσταση του συστήματος παραμένει πρακτικά σταθερή (Mirceski, Skrzypek, & Stojanov, Square-wave voltammetry, 2018).

Αν και είναι μία από τις πιο πολύπλοκες ηλεκτροχημικές τεχνικές, η κυκλική βολταμετρία χρησιμοποιείται πολύ συχνά, επειδή προσφέρει πληθώρα πειραματικών πληροφοριών και γνώσεων, τόσο για τις κινητικές όσο και τις θερμοδυναμικές

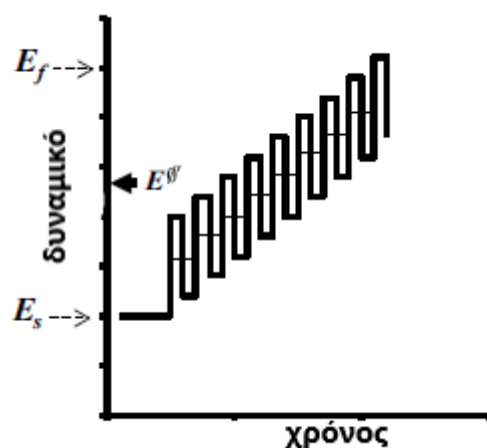
λεπτομέρειες πολλών χημικών συστημάτων. Δυστυχώς, σε ορισμένες περιπτώσεις, η ερμηνεία των κυκλικών βολταμετρικών δεδομένων μπορεί να είναι ασαφής, ειδικά όταν βασίζεται αποκλειστικά στην ανάλυση ενός ακατάλληλα μικρού συνόλου δεδομένων. Η πιο συνηθισμένη πειραματική διαμόρφωση για την καταγραφή των κυκλικών βολταγραμμάτων αποτελείται από ένα ηλεκτροχημικό στοιχείο που έχει τρία ηλεκτρόδια, δηλαδή, ένα μετρητή ή βοηθητικό ηλεκτρόδιο (C), ένα ηλεκτρόδιο αναφοράς (R) και ένα ηλεκτρόδιο εργασίας (W) όλα βυθισμένα σε υγρό και συνδεδεμένα σε ποτενσιοστάτη. Ο ποτενσιοστάτης επιτρέπει στη διαφορά δυναμικού μεταξύ του ηλεκτροδίου αναφοράς και εργασίας να ελέγχεται με ελάχιστες παρεμβολές. Σε αυτή τη διαμόρφωση, το ρεύμα που ρέει μέσω του ηλεκτροδίου αναφοράς μπορεί επίσης να ελαχιστοποιηθεί αποφεύγοντας έτσι την πόλωση του ηλεκτροδίου αναφοράς, και συνεπώς, διατηρώντας σταθερή την εφαρμοζόμενη δυναμική κατανομή μεταξύ του ηλεκτροδίου εργασίας και αναφοράς (Marken, Neudeck, & Bond, 2010)



Εικόνα 10. Στοιχείο για κυκλικά βολταμετρικά πειράματα με διαμόρφωση τριών ηλεκτροδίων.

Η βολταμετρία τετραγωνικού κύματος (SWV) είναι μία ισχυρή ηλεκτροχημική τεχνική κατάλληλη για αναλυτική εφαρμογή, μηχανιστική μελέτη των διαδικασιών των ηλεκτροδίων και ηλεκτρομαγνητικές μετρήσεις. Σήμερα, θεωρείται ως μία από τις πιο προηγμένες βολταμετρικές τεχνικές, η οποία ενοποιεί τα πλεονεκτήματα των παλμικών τεχνικών (αυξημένη ευαισθησία), της κυκλικής βολταμετρίας (διορατικότητα του μηχανισμού ηλεκτροδίων) και των τεχνικών αντίστασης (κινητικές πληροφορίες για πολύ

γρήγορες διαδικασίες των ηλεκτροδίων). Η τυπική πιθανή διαμόρφωση που χρησιμοποιείται στην SWV αποτελείται από μία κλίμακα σκάλας δυναμικού τροποποιημένης με τετραγωνικούς δυναμικούς παλμούς (Mirceski, Gulaboski, Lonric, Bogeski, Karpl, & Hoth, 2013). Η SWV διαθέτει υψηλή αναλυτική ευαισθησία και ταχύτητα μετρήσεων. Το σήμα διέγερσης, δηλαδή η δυναμική διαμόρφωση κατά τη διάρκεια της βολταμετρικής μέτρησης, επιτρέπει την αντίδραση του ηλεκτροδίου προς τόσο οξειδωτικές όσο και αναγωγικές κατευθύνσεις, επαναλαμβανόμενες σε κάθε ένα βήμα του δυναμικού σκάλας, παρέχοντας έτσι μια εικόνα για τις μηχανιστικές πτυχές της μελετώμενης αντίδρασης ηλεκτροδίου. Η τεχνική είναι γενικά γρήγορη. Τυπικά χρονικά διαστήματα για την οδήγηση της αντίδραση του ηλεκτροδίου τόσο σε ανοδικές όσο και καθοδικές κατευθύνσεις είναι της τάξης των χιλιοστών του δευτερολέπτου. Ως εκ τούτου, είναι πιο κατάλληλη για την ανάλυση αναστρέψιμων ή σχεδόν αναστρέψιμων διεργασιών ηλεκτροδίων και διεργασιών ηλεκτροδίων σε συνδυασμό με γρήγορες χημικές αντιδράσεις, παρά μελέτης αργών διαδικασιών. Όταν η αντίδραση του ηλεκτροδίου είναι πολύ αργή, η βολταμετρία τετραγωνικού κύματος παρέχει ακόμη μικρότερη απόκριση από άλλες απλούστερες μορφές βολταμετρίας (Mirceski, Gulaboski, Lonric, Bogeski, Karpl, & Hoth, 2013).

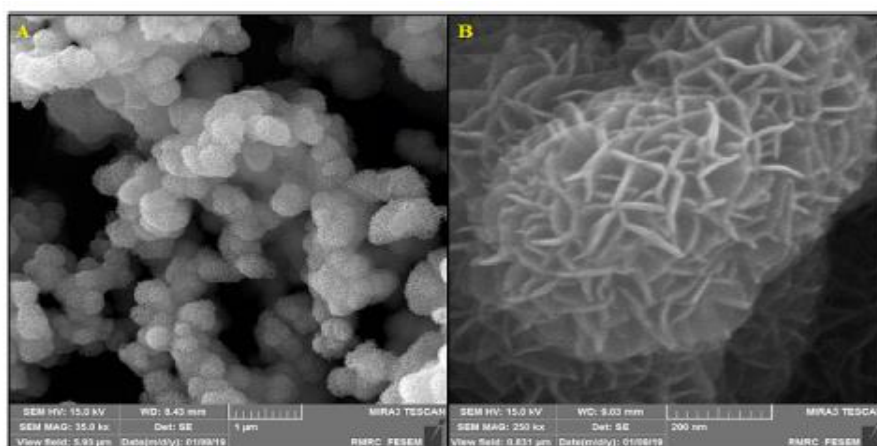


Εικόνα 11. Η διαμόρφωση του δυναμικού στη βολταμετρία τετραγωνικού κύματος.

4.1. Ταυτόχρονος προσδιορισμός θεοβρωμίνης, θεοφυλλίνης και καφεΐνης χρησιμοποιώντας ένα τροποποιημένο ηλεκτρόδιο με νανοδομή MnO_2 που μοιάζει με πέταλο

Αυτή η μελέτη συνέθεσε ουσιαστικά τα νανολούλουδα MnO_2 τύπου β που συναρμολογήθηκαν από τα ιεραρχικά νανο-φύλλα χρησιμοποιώντας μια απλοποιημένη υδροθερμική διαδικασία. Τα τροποποιημένα ηλεκτρόδια ήταν σχεδιασμένα για την ενίσχυση της επιλεκτικότητας και της ευαισθησίας των ηλεκτροδίων στον νέο αισθητήρα, με κατάλληλα και προκαθορισμένα χαρακτηριστικά.

Μεταξύ των διαφορετικών μεταλλικών οξειδίων, τα υλικά MnO_2 έδειξαν πολλαπλά ενθαρρυντικά χαρακτηριστικά όπως ευθηνία και η φιλικότητα προς περιβάλλον, καθώς και μεγαλύτερη θεωρητική ειδική χωρητικότητα, η οποία θα τα καθιστούσε πολύ καλές ουσίες ηλεκτροδίων για υπερ-πυκνωτές. Ωστόσο, η ακατάλληλη ηλεκτρική τους αγωγιμότητα και η χαμηλότερη δομική σταθερότητα περιόρισαν τη λειτουργική τους χρήση. Η παρούσα έρευνα ανέφερε μια απλοποιημένη υδροθερμική διαδικασία για την προμήθεια του ιεραρχικού νανο-λουλουδιού χωρίς τη χρήση προτύπων ή επιφανειοδραστικών. Συγκεκριμένα, η μορφολογία καθώς και η μικροσύνθεση των δειγμάτων που έχουν προετοιμαστεί έχουν εξεταστεί μέσω περίθλασης σκόνης ακτίνων X (XRD), καθώς και φασματοσκοπίας διασποράς ενέργειας με ακτίνες X (EDX).



Εικόνα 12. A) Εικόνα από FESEM με β - MnO_2 νανολουλούδια και B) Εικόνα από FESEM με μονά β - MnO_2 νανολουλούδια.

4.1.1. Χημικά και αντιδραστήρια

Όπως ορίζεται από το πρωτόκολλο μελέτης, αγοράστηκαν TB, TP και CF. Παρασκευάστηκε 0,1 M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) αναμιγνύοντας το πυκνό διάλυμα 0,1 των H_3PO_4 , NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 και Na_3PO_4 και για διαφορετικές τιμές pH. Σε ειδικές περιστάσεις, τα πυκνά διαλύματα TB, TP και CF έχουν παραχθεί πρόσφατα σε PBS.

4.1.2. Συσκευή

Σύμφωνα με τον ερευνητικό σχεδιασμό, χρησιμοποιήσαμε έναν αναλυτή SAMA 500 Electro παρακολουθούμενο από έναν υπολογιστή για την καταγραφή των ηλεκτροχημικών πειραμάτων. Ως ηλεκτρόδιο εργασίας, χρησιμοποιήθηκε ένα γυάλινο ηλεκτρόδιο άνθρακα σε μορφή δίσκου γυμνό ή τροποποιημένο. Όλα τα διαλύματα έχουν παραχθεί με διπλό απεσταγμένο νερό (ddH₂O).

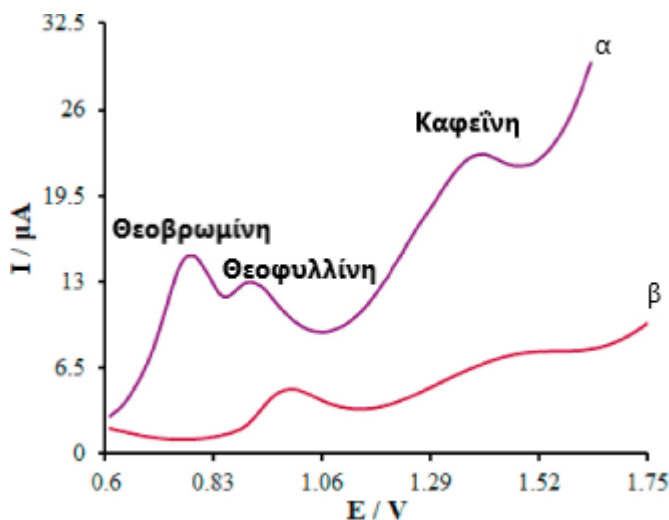
4.1.3. Υδροθερμική σύνθεση του β-MnO₂ νανολουλουδιού

Σε αυτό το στάδιο, προκειμένου να παραχθεί το νανολούλουδο β-MnO₂, πραγματοποιήθηκε διάλυση 0,4 g θειικού μαγγανίου ($MnSO_4 \cdot H_2O$) καθώς και 1 g υπερμαγγανικού ($KMnO_4$) σε 30 mL νερό. Ως εκ τούτου, μεταφέραμε το μίγμα σε αυτόματο δίσκο από ανοξείδωτο ατσάλι Teflon 50 mL. Στη συνέχεια, χρησιμοποιήσαμε έναν ηλεκτρικό φούρνο για τη θέρμανση του μίγματος στους 140°C για 1 ώρα. Το καθίζημα, έπειτα, ξεπλύθηκε με νερό και αιθανόλη και ξηράνθηκε στους 80°C για 6 ώρες.

4.1.4. Προετοιμασία και ανάλυση δείγματος

Είναι ευρέως αποδεκτό ότι το ποσοστό κακάο είναι η γνωστότερη παράμετρος της ποιότητας σοκολάτας που αναγράφεται στην ετικέτα του προϊόντος και θεωρείται ένας από τους δείκτες περιεχομένου σε TB και CF. Επιλέχθηκαν 4 είδη σοκολάτας. Αρχικά, 5 μπάρες σοκολάτας όλων των ειδών ζυγίστηκαν και αλέστηκαν μέχρι να κονιορτοποιηθούν. Στη συνέχεια, μία δεδομένη ποσότητα της σκόνης (1 g) διαλύθηκε σε βραστό νερό και η διήθηση έγινε υπό μειωμένη πίεση. Το διήθημα προστέθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και γεμίστηκε με απιονισμένο νερό για να ληφθεί το πυκνό διάλυμα του σχετικού δείγματος σοκολάτας. Έπειτα, 100 μL του διαλύματος προστέθηκαν σε ένα ηλεκτροχημικό στοιχείο έως τα 9,9 mL του υποστηρικτικού ηλεκτρολύτη και χρησιμοποιήθηκε DPV για την ανάλυσή του. Διάφορες ποσότητες όλων των διαλυμάτων μεταφέρθηκαν σε βολταμετρικό στοιχείο των 25 mL και

χρησιμοποιήθηκε πρότυπη διαδικασία προσθήκης για την ανάλυσή τους (Nia, Foroughi, & Jahani, 2021).



Εικόνα 13. Κυκλικά βολτογραφήματα από: α) $\beta\text{H-MnO}_2\text{-NF/GCE}$ και β) μη τροποποιημένου GCE παρουσία TB (100,0 μM), TP (100,0 μM) και CF (100,0 μM) σε pH 7,0, αντίστοιχα. Σε όλες τις περιπτώσεις, ο ρυθμός σάρωσης ήταν 50 mV s^{-1} .

4.2. Ευαίσθητος προσδιορισμός της καφεΐνης από τροποποιημένο ηλεκτρόδιο πάστας άνθρακα (CPE) με νανοσωματίδια θειούχου χαλκού

Τα νανοσωματίδια θειούχου χαλκού (CuS NPs) συντέθηκαν με απλή μέθοδο συν-καταβύθισης σε υδατικά μέσα χρησιμοποιώντας άμυλο ως βιοπολυμερές. Το ληφθέν προϊόν χαρακτηρίστηκε με τεχνικές XRD, SEM, EDX, TEM, FTIR και UV-ορατού. Το μέγεθος των σωματιδίων προσδιορίστηκε με ανάλυση TEM και βρέθηκε να κυμαίνεται μεταξύ 20-50 nm. Χρησιμοποιήθηκαν CuS NPs τροποποιημένα 2 ηλεκτρόδια πάστας άνθρακα (CPE CuS NPs) για τον προσδιορισμό της καφεΐνης με μεθόδους κυκλικής βολταμετρίας (CV) και διαφορικής παλμικής βολταμετρίας (DPV).

Στο πρόσφατο σενάριο, υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη υλικών ημιαγωγικής νανοδομής, λόγω των διακριτικών φυσικών και χημικών ιδιοτήτων τους. Μεταξύ των χαλκογονιδίων, ο θειούχος χαλκός (Cu_xS) έχει προσελκύσει μεγάλη προσοχή λόγω των μοναδικών του οπτικών και ηλεκτρικών ιδιοτήτων. Η ελκυστικότητα προκύπτει, επίσης, λόγω του χαμηλού συνθετικού του κόστους, της ικανότητας επεξεργασίας στο διάλυμα και της εξάρτησης των οπτικοηλεκτρονικών ιδιοτήτων του ως συνάρτηση του μεγέθους, του σχήματος, του ντόπινγκ και της επιφανειακής χημείας. Ο θειούχος χαλκός υπάρχει σε διάφορες στοιχειομετρικές ενώσεις και μορφολογία και εμφανίζει μη γραμμική οπτική ιδιότητα.

4.2.1. Υλικά

Χρησιμοποιήθηκε CAF, χλωριούχος χαλκός και βιοπολυμερές άμυλο, ενώ 0,1 M ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος (ABS) χρησιμοποιήθηκε ως υποστηρικτικός ηλεκτρολύτης καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, και το pH ρυθμίστηκε με προσθήκη οξικού οξέος και υδροξειδίου του νατρίου σε 0,1 M οξικό νάτριο. Όλα τα αντιδραστήρια παρασκευάστηκαν με διπλά απεσταγμένο νερό.

4.2.2. Σύνθεση των CuS νανοϋλικών

Τα CuS NPs παρασκευάστηκαν σε διαλυτή φάση με τη μέθοδο συν-καταβύθισης. Διάλυμα 0,1 M χλωριούχου χαλκού ελήφθη σε ποτήρι ζέσεως, στο οποίο διάλυμα αμύλου 3% (το οποίο ενεργεί τόσο ως σταθεροποιητικό όσο και ως παράγοντας κάλυψης που ελέγχει το μέγεθος των σωματιδίων) προστέθηκε κατά σταγόνες με συνεχή ανάδευση. Στη συνέχεια, προστέθηκε διάλυμα 0,1 M Na₂S κατά σταγόνες στο παραπάνω μίγμα, μέχρις ότου παρατηρηθεί ένα μαύρο χρώμα ιζήματος από τον σχηματισμό CuS. Η ανάδευση συνεχίστηκε για άλλη μία ώρα διατηρώντας τη θερμοκρασία στους 60°C. Το προκύπτον ίζημα διηθήθηκε, ξεπλύθηκε με απεσταγμένο νερό, 1:1 μίγμα νερό-αιθανόλης και ξηράνθηκε στους 170°C για περίπου 3 ώρες. Το ληφθέν προϊόν χαρακτηρίστηκε από διάφορες τεχνικές.

4.2.3. Μηχανισμός της αντίδρασης

Το άμυλο είναι ένα φυσικό βιοπολυμερές που αποτελείται από δύο συστατικά αμυλόζη και αμυλοπηκτίνη που αποτελείται από μονάδες α-γλυκόζης στη διαμόρφωση άνθρακα $1C^4$. Η ημικρυσταλλική δομή του αμύλου χάνεται όταν το άμυλο καθίσταται διαλυτό στο νερό στους 75°C. Τα κατιόντα χαλκού προσελκύονται στην ομάδα O-H του αμύλου, μετά την προσθήκη αμύλου στο διάλυμα άλατος Cu (II) για το σχηματισμό Cu(OH)₂. Σε αυτό το διάλυμα προστίθεται θειικό νάτριο για να σχηματιστεί ένα μαύρο ίζημα CuS. Κατά τη θέρμανση μικρών μορίων αμυλόζης σχηματίζεται ένα δίκτυο που συγκρατεί τα μόρια νερού και αυξάνει το ιξώδες του μίγματος. Το ληφθέν προϊόν σχηματίζει τη φάση κοβελλίτη των CuS NPs.

4.2.4. Οργανολογία

Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις κυκλικής βολταμετρίας (CV), διαφορικής παλμικής βολταμετρίας (DPV) και ηλεκτροχημικής αντίστασης (EI) χρησιμοποιώντας CH-ηλεκτροχημικό αναλυτή, συνδεδεμένο με μία κυψέλη τριών ηλεκτροδίων. Ένα γυμνό ηλεκτρόδιο πάστας άνθρακα (BCPE) και τροποποιημένο CPE χρησιμοποιήθηκαν ως

ηλεκτρόδιο εργασίας. Ως ηλεκτρόδιο μέτρησης χρησιμοποιήθηκε ένα σύρμα πλατίνας, ενώ το ηλεκτρόδιο αναφοράς σαν κορεσμένο ηλεκτρόδιο χλωριούχου υδραργύρου (SCE) (Mahanthappa, Yellappa, Kottam, & Vusa, 2016).

4.3. Χρήση τροποποιημένου ηλεκτροδίου σύνθετης μεμβράνης πολύ(φολικού οξέος)/ γραφενίου για ταυτόχρονο προσδιορισμό της θεοφυλλίνης και της καφεΐνης

Από τότε που το γραφένιο (GR) ανακαλύφθηκε το 2004, έχει γίνει ευρέως χρησιμοποιούμενο νανοϋλικό άνθρακα σε ηλεκτροχημικούς αισθητήρες, λόγω των μοναδικών ηλεκτρικών και καταλυτικών ιδιοτήτων τους. Επειδή το GR έχει καλύτερη αγωγιμότητα και ικανότητα προώθησης της αντίδρασης μεταφοράς ηλεκτρονίων, χρησιμοποιείται συνήθως με άλλα λειτουργικά υλικά για την κατασκευή ηλεκτροχημικών αισθητήρων. Πρόσφατα, τα τροποποιημένα ηλεκτρόδια ηλεκτροπολυμερούς/GR έχουν μελετηθεί εκτενώς, επειδή η ενσωμάτωση GR σε αγώγιμα πολυμερή μπορεί να οδηγήσει σε νέα σύνθετα υλικά που έχουν τις ιδιότητες κάθε επιμέρους υλικού με συνεργική δράση, και τα οποία έχουν δείξει εξαιρετικά χαρακτηριστικά ανάλυσης.

Το φολικό οξύ (FA), που ονομάζεται επίσης βιταμίνη B9, παίζει σημαντικό ρόλο στη σύνθεση του DNA και στον μεταβολισμό της ομοκυστεΐνης. Ως ηλεκτροενεργή βιταμίνη της ομάδας B, το FA έχει ανιχνευτεί με ηλεκτροχημική μέθοδο και εφαρμόζεται στην κατασκευή ηλεκτροχημικών αισθητήρων. Μέχρι στιγμής, τα τροποποιημένα ηλεκτρόδια GR συνήθως παρασκευάστηκαν με τη χημική ή ηλεκτροχημική αναγωγή της μεμβράνης οξειδίου του γραφενίου (GO) στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Τέτοιες μέθοδοι έχουν εγγενείς περιορισμούς, συμπεριλαμβανομένης της ατελούς μείωσης του GO και της έλλειψης ελέγχου του πάχους της μεμβράνης. Στο συγκεκριμένο πείραμα, ετοιμάστηκε τροποποιημένη μεμβράνη GR απευθείας από διασπορά που περιέχει οξείδιο του γραφενίου με τεχνική ηλεκτροδιάθεσης ενός σταδίου, και στη συνέχεια η μεμβράνη πολύ(FA) εναποτέθηκε στην κορυφή της μεμβράνης GR με ηλεκτροπολυμερισμό. Η προετοιμασμένη νέα σύνθετη μεμβράνη είχε εξαιρετική ηλεκτροκαταλυτική δράση για αντιδράσεις οξείδωσης των TP και CAF, η οποία έδειξε εξαιρετικά χαρακτηριστικά ανάλυσης, όπως υψηλή ευαισθησία, ευρεία γραμμικότητα, καλή επιλεκτικότητα και αναπαραγωγιμότητα για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των TP και CAF. Ως εκ τούτου, το τροποποιημένο ηλεκτρόδιο PFA/GR/GCE χρησιμοποιήθηκε

ικανοποιητικά για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό θεοφυλλίνης και καφεΐνης σε τσάι και αναψυκτικά με βολταμετρική μέθοδο.

4.3.1. Αντιδραστήρια

Χρησιμοποιήθηκαν TP, CAF και FA, οξειδίο του γραφενίου (GO, 0,5 ~5 μm διάμετρος, 0,8~1,2 nm πάχος, >99% αναλογία μονής στιβάδας και >99% καθαρότητα). Όλες οι χημικές ουσίες ήταν αναλυτικού βαθμού. Τα πυκνά διαλύματα των 0,067 mol·L⁻¹ KH₂PO₄ και Na₂HPO₄ αναμίχθηκαν για να παρασκευαστούν ρυθμιστικά διαλύματα φωσφορικών (PBS) με διάφορες τιμές pH. Το απεσταγμένο νερό που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα ήταν διπλά απεσταγμένο.

4.3.2. Οργανολογία

Οι ηλεκτροχημικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με ένα ηλεκτροχημικό σύστημα LK3200 με μικροϋπολογιστή. Χρησιμοποιήθηκε ένα συμβατικό στοιχείο τριών ηλεκτροδίων με υαλώδες ηλεκτρόδιο άνθρακα σε μορφή δίσκου 3,2 mm ως ηλεκτρόδιο εργασίας, ένα κορεσμένο ηλεκτρόδιο υποχλωριούχου υδραργύρου ως ηλεκτρόδιο αναφοράς και ένα ηλεκτρόδιο φύλλου πλατίνας ως μετρητής. Όλες οι μετρήσεις του pH έγιναν με ψηφιακό πεχάμετρο pH-3B με ένα συνδυασμένο υαλώδες ηλεκτρόδιο. Η μικροσκοπία σάρωσης ηλεκτρονίων (SEM) πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ένα μικροσκόπιο ηλεκτρονικής σάρωσης JSM-6700F.

4.3.3. Κατασκευή του PFA/ GR/ GCE

Το εναιώρημα GO παρασκευάστηκε με διασπορά 10,0 mg GO σε 10 ml PBS (pH= 9,2) υπό υπερήχους για 2 ώρες. Η μεμβράνη γραφενίου εναποτέθηκε ηλεκτροχημικά σε καθαρό GCE με κυκλική βολταμετρία, με πιθανή σάρωση μεταξύ 0,5 και -1,8 V με ρυθμό σάρωσης 50 mV · s⁻¹ για 25 κύκλους στο νέο εναιώρημα GO. Το τροποποιημένο ηλεκτρόδιο ξεπλύθηκε με διπλά απεσταγμένο νερό και ξηράνθηκε σε θερμοκρασία δωματίου. Το ηλεκτρόδιο που προέκυψε ελήφθη ως GR/ GCE. Στη συνέχεια, το PFA/ GR/ GCE λήφθηκε με κυκλική σάρωση από -2,0 έως +2,0 V στα 50 mV · s⁻¹ για 15 κύκλους σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με pH 6,8 που περιείχε 1,0 x 10⁻³ mol·L⁻¹ FA.

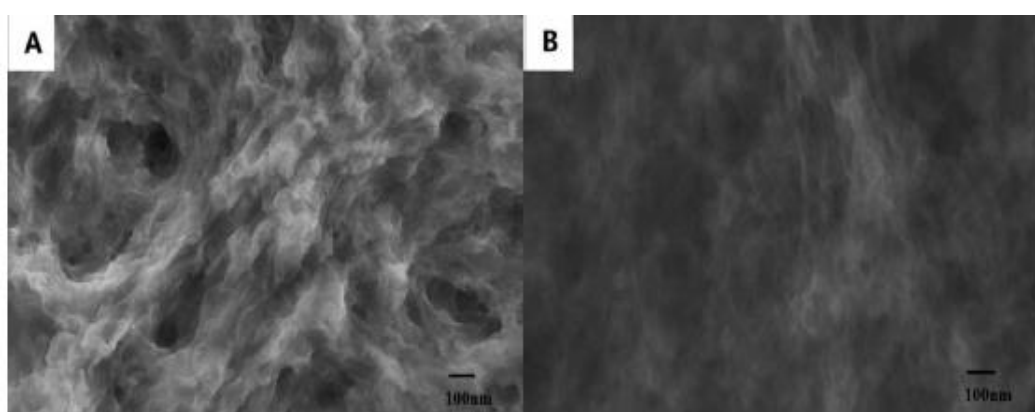
4.3.4. Διαδικασίες μέτρησης

Χρησιμοποιήθηκαν κυκλικές βολταμετρικές και διαφορικές παλμομετρικές μετρήσεις με τρία ηλεκτρόδια σε 10 ml PBS χωρίς απαέρωση. Τα κυκλικά βολτογράμματα και τα διαφορικά παλμογράμματα καταγράφηκαν στην περιοχή από 0,6 έως 1,6 V. Όλα τα

πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου. Η μέθοδος πρότυπης προσθήκης χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση δειγμάτων τροφίμων.

4.3.5. Προετοιμασία δείγματος

Για δείγματα τσαγιού, ζυγίστηκαν ακριβώς 2,0 g φύλλων τσαγιού και προστέθηκαν σε 70 mL διπλά απεσταγμένο βραστό νερό για 30 λεπτά. Μετά τη διήθηση, το διήθημα συλλέχθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και αραιώθηκε σε δείκτη με διπλά απεσταγμένο νερό για περαιτέρω μέτρηση. Για δείγματα ποτών, το ανθρακούχο πρέπει να απαερίζεται για 3 λεπτά σε λουτρό υπερήχων πριν από την περαιτέρω ανάλυση (Shu, Bian, Wang, Qin, & Wang, 2017).



Εικόνα 14. Εικόνες SEM από: A) ηλεκτροεκτιθέμενης μεμβράνης γραφενίου και B) πολύ(φολικού οξέος)/ ηλεκτροεκτιθέμενης σύνθετης μεμβράνης γραφενίου.

4.4. Νέος ηλεκτροχημικός αισθητήρας φελλού-γραφίτη για τον βολταμετρικό προσδιορισμό της καφεΐνης

Σήμερα, η ανάπτυξη εργαλείων ηλεκτροχημικής ανίχνευσης για διάφορες εφαρμογές λαμβάνει μεγάλη προσοχή. Λόγω της έμφυτης ειδικότητά τους, των διαδικασιών ταχείας μέτρησης, της υψηλής ευαισθησίας και απλότητας της προετοιμασίας, αυτές οι συσκευές μετρήσεων επιτρέπουν την παρακολούθηση διαφορετικών ειδών με ικανοποιητικό τρόπο. Το χαμηλό κόστος και η απουσία τοξικών διαλυτών απαραίτητων σε άλλες τεχνικές όπως η χρωματογραφία και η φασματοφωτομετρία, θα πρέπει επίσης να αναφερθεί.

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των συστατικών των υλικών επηρεάζουν έντονα την απόδοση ενός ηλεκτροχημικού αισθητήρα. Ηλεκτρόδια πάστας άνθρακα, όπως γραφίτης, χρησιμοποιούνται ευρέως για τη μεγάλη επιφάνεια, τη μεγάλη αντίσταση στην οξείδωση και την υψηλή θερμοκρασία, την εξαιρετική ηλεκτρική αγωγιμότητα και

ανισοτροπία καθώς και τη φυσική τους προέλευση και το χαμηλό κόστος. Ωστόσο, ο γραφίτης έχει το μειονέκτημα ότι πρέπει να χειριστεί ένα ηλεκτρόδιο αποτελούμενο από μία σκόνη, η οποία παράγει ένα υψηλό υπολειπόμενο ρεύμα. Κατά συνέπεια, είναι απαραίτητο να παρασκευαστεί ένα επικολλητικό υγρό αναμιγνύοντάς τον με λάδι σιλικόνης, κεριά κηροζίνης, έλαιο παραφίνης, βρωμοφόρμιο, νιζοί ή βρωμοναφθαλίνη.

Η σύνθεση του φελλού αποτελείται από 33-50% suberin, 13-29% λιγνίνη, 6-26% κυτταρίνη και πολυσακχαρίτες ημικυτταρίνης και 11-24% από ταννίνες και κεριά. Είναι ένα φυσικό, ανανεώσιμο και βιώσιμο υλικό με ποικιλία εφαρμογών. Ομοίως, οι κόκκοι φελλού έχουν δοκιμαστεί ως απορροφητικό οργανικών/ανόργανων προσμίξεων λόγω της αντιδραστικής χημικής τους επιφάνειας (Monteiro, Da Silva, Quiroz, Vilar, Martínez-Huitle, & Dos Santos, 2021).

4.4.1. Γενικά στοιχεία

Ο φελλός σε σκόνη και κόκκους είναι τα κύρια υποπροϊόντα της βιομηχανίας φελλού. Ένας νέος ηλεκτροχημικός αισθητήρας παρασκευάστηκε με επιτυχία και δοκιμάστηκε με βάση φελλό και γραφίτη. Η κατασκευή της συσκευής πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας φελλό και γραφίτη σε αναλογία μάζας περίπου 50% και 70%. Ο ηλεκτροχημικός αισθητήρας δοκιμάστηκε για τον προσδιορισμό της καφεΐνης σε πραγματικά δείγματα. Το ηλεκτρόδιο φελλού-γραφίτη σε αναλογία μάζας 70% έδειξε καλύτερη ευαισθησία για τον προσδιορισμό της καφεΐνης σε υδατικά διαλύματα. Σε αυτό το πείραμα, ο ηλεκτροχημικός αισθητήρας χρησιμοποιήθηκε για ποσοτικοποίηση της καφεΐνης σε φαρμακευτικά σκευάσματα και ποτά χρησιμοποιώντας διαφορική παλμική βολταμετρίας (DPV).

4.4.2. Υλικά και μέθοδος

4.4.2.1. Αντιδραστήρια και υλικά

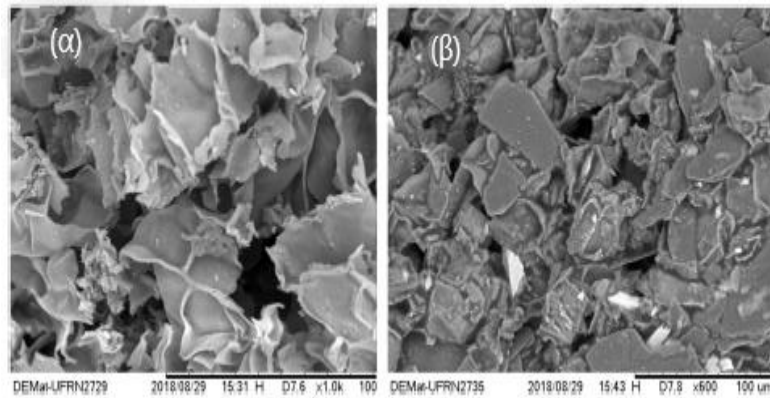
Οι χημικές ουσίες ήταν της υψηλότερης ποιότητας που διατίθεται στο εμπόριο και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό (σκόνη γραφίτη, καφεΐνη και θειικό οξύ). Το μέγεθος των κόκκων κυμαίνεται από 0,8 έως 1,0 mm. Αρχικά, ο ακατέργαστος φελλός (RAC) πλύθηκε με απεσταγμένο νερό σε κύκλους 2 ωρών στους 60°C για την απομάκρυνση των ακαθαρσιών και άλλων εκχυλίσμων υδατικών συστατικών, που ενδέχεται να επηρεάσουν τους προσδιορισμούς της ηλεκτροανάλυσης. Παρασκευάστηκε πυκνό διάλυμα καφεΐνης χρησιμοποιώντας υπερ-καθαρό νερό.

4.4.2.2. Προετοιμασία τροποποιημένου ηλεκτροδίου φελλού

Αρχικά, οι κόκκοι του RAC μειώθηκαν με χρήση άλεσης σε μύλους σφαιρών και κοσκινίστηκαν σε 200άρι κόσκινο ($\phi=0,50$ mm). Ο αισθητήρας γραφίτη-φελλού (ηλεκτρόδιο εργασίας) παρασκευάστηκε ζυγίζοντας 0,60 g σκόνης γραφίτη και 0,60 ή 0,42 g κόκκους RAC προκειμένου να ληφθούν αναλογίες 50 και 70% w/w (0,60/0,60 ή 0,42/0,18). Αυτό το μίγμα ομογενοποιήθηκε μηχανικά σε γουδί και γουδοχέρι από βοριοπυριτικό γυαλί. Μετά από αυτό, προστέθηκαν 0,3 mL ορυκτέλαιου και αναμίχθηκαν μέχρι που σχηματίστηκε μια ομοιογενής πάστα, η οποία συσκευάστηκε σε ρύγχος πολυπροπυλενίου, χωρίς φίλτρο 1-200 μ L, που χρησιμοποιείται ως υποστήριξη. Τέλος, σύρμα λευκόχρυσου με πάχος 0,5 mm συνδέθηκε στο ρύγχος με τον πολτό. Η επιφάνεια του γραφίτη λειάνθηκε σε χαρτί αφής. Οι αισθητήρες εκφράστηκαν ως GrRAC-50%, GrRAC-70% που δείχνει 50:50 (γραφίτης/RAC) και GrRAC-70% με 30:70 (γραφίτης/RAC), ενώ ο μη τροποποιημένος αισθητήρας γραφίτη (Gr) παρασκευάστηκε στις ίδιες συνθήκες που περιγράφηκαν, αλλά απουσία σκόνης RAC.

4.4.2.3. Προετοιμασία δείγματος

Αναψυκτικά και φαρμακευτικά σκευάσματα αγοράστηκαν και αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να υποβληθούν στην διαδικασία προετοιμασίας. Στην περίπτωση των αναψυκτικών, αυτά απαερώθηκαν με υπερήχους για 10 λεπτά και μετά από αυτό ένας γνωστός όγκος αραιώθηκε (1:90) με τον υποστηρικτικό ηλεκτρολύτη. Όλα τα εμπορικά δείγματα τύπου κόλα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτό το πείραμα είχαν κατασκευαστεί από γνωστές εταιρείες. Εκτός αυτού, η μέθοδος πρότυπης προσθήκης υιοθετήθηκε προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν πιθανές επιδράσεις του φαινομένου μήτρας λόγω της παρουσίας άλλων συστατικών στα πραγματικά δείγματα. Η συγκέντρωση καφεΐνης σε φαρμακευτικά σκευάσματα προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας δέκα δισκία τα οποία ζυγίστηκαν, κονιορτοποιήθηκαν και στη συνέχεια διαλύθηκαν ποσότητα σκόνης, ισοδύναμη με το μέσο βάρος ανά δισκίο, σε 30 mL νερό με υπερήχους για 5 λεπτά. Έπειτα, το δείγμα φυγοκεντρήθηκε 5 λεπτά (4000 rpm) και αραιώθηκε με συντελεστή 1:4 (v/v) σε 0,50 M H_2SO_4 . Η κατάλληλη ποσότητα από αυτό το παρασκευασμένο δείγμα προστέθηκε στον υποστηρικτικό ηλεκτρολύτη στο ηλεκτροχημικό στοιχείο. Η μέθοδος τυπικής προσθήκης πραγματοποιήθηκε για ποσοτικοποίηση της καφεΐνης στο δείγμα (Monteiro, Paiva, Da Silva, Vilar, Martínez-Huitle, & Dos Santos, 2019).



Εικόνα 15. Μικρογραφήματα SEM από: α) RAC και β) GrRAC-70% (γραφήτη/RAC – 30:70).

4.5. Ηλεκτροχημικός προσδιορισμός της καφεΐνης στο τσάι, με χρήση νανοσύνθετου πολυδοπαμίνης- χρυσού

Πρόσφατα, πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι οι βιολογικές αμίνες (DA), L-DOPA και νορεπινεφρίνη μπορούν να προσροφηθούν σε σχεδόν οποιαδήποτε επιφάνεια και μπορούν να λειτουργήσουν ως βιοσυμβατή συγκολλητική στιβάδα. Ένα συγκολλητικό στρώμα PDA μπορεί να σχηματιστεί σε πολλά διαφορετικά υλικά μέσω της αυθόρμητης οξείδωσης των βιολογικών αμινών, που συμβαίνει κάτω από ένα ατμοσφαιρικό περιβάλλον οξυγόνου και αλκαλικού pH. Οι μεμβράνες PDA δείχνουν μία εύκολη αλληλεπίδραση, με την επιφάνεια πολλών οργανικών και ανόργανων υλικών, συμπεριλαμβανομένων κεραμικών, ημιαγωγών, οξείδια μετάλλων και αγώγιμα πολυμερή. Οι επικαλύψεις PDA δείχνουν διάφορες ξεχωριστές ιδιότητες που σχετίζονται με τους τομείς της νανοεπιστήμης και της νανοτεχνολογίας. Πρώτον, ο πολυμερισμός απαιτεί εξαιρετικά ήπιες συνθήκες, που συμβαίνουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος σε συνθήκες φυσικού αέρα. Επιπλέον, ένα λεπτό και προσκολλημένο στρώμα PDA μπορεί να σχηματιστεί σε μερικές επιφάνειες από αυτοπολυμερισμένες βιολογικές αμίνες. Οι δραστικές λειτουργικές οντότητες που παράγονται από δευτερογενή αντίδραση στην επιφάνεια PDA μπορούν, επίσης, να προωθήσουν το σχηματισμό ομοιοπολικής σύνδεσης με μόρια που περιέχουν πρωτοταγείς ομάδες αμίνης και θειόλης. Επιπρόσθετα, οι επιφανειακές πολυλειτουργικές ομάδες που υπάρχουν στην επιφάνεια PDA μπορούν να μετατρέψουν μερικά ευγενή μεταλλικά άλατα σε μεταλλικά νανοσωματίδια (NPs). Οι μεταλλικές επικαλύψεις NP σε πολυμερείς επιφάνειες μπορούν να παρουσιάσουν επιθυμητές βιολογικές, ηλεκτροχημικές, ηλεκτρικές και οπτικές

ιδιότητες, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν πρόσφατα στα πεδία ηλεκτρικής, νανοϊατρικής, φωτοκατάλυσης και βιο-ανίχνευσης.

Τα Au NPs είναι ένα εξαιρετικά ενεργό υλικό που μπορεί να συνδεθεί με σχεδόν όλα τα είδη υποστρωμάτων. Επίσης, τα Au NPs μπορούν εύκολα να συνδεθούν με άλλα Au NPs μέσω ομοιοπολικής σύνδεσης της αμίνης και των δίδροξυ λειτουργικών ομάδων που υπάρχουν στην επιφάνεια των υποστρωμάτων PDA. Οι επικαλύψεις PDA μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αναγωγικός παράγοντας εναπόθεσης Au. Σε αυτή τη μελέτη, η ανίχνευση της καφεΐνης με υψηλή ευαισθησία επιτεύχθηκε μέσω μιας συνεχούς ανάπτυξης Au NPs σε ένα ενεργό υποστήριγμα αποτελούμενο από ένα συγκολλητικό στρώμα PDA. Οι λειτουργικές ομάδες που υπάρχουν στην επιφάνεια PDA παρέχουν ένα ευνοϊκό περιβάλλον για τη συνεχή ανάπτυξη των Au NPs, το οποίο βελτιώνει την ειδική επιφάνεια, την επιφανειακή αρνητικότητα και την αγωγιμότητα του ηλεκτροδίου εργασίας. Επιπλέον, ο ηλεκτροχημικός αισθητήρας επέδειξε εξαιρετική απόδοση στον προσδιορισμό των επιπέδων καφεΐνης στα δείγματα τσαγιού.

4.5.1. Χημικά

Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν:

- Τετραχλωροαουρικό υδρογόνο (II).
- Γλουταραλδεΐδη.
- 3,4-αιθυλενοδιοξυθειοφαίνιο.
- Υδροχλωρική ντοπαμίνη (DA).
- Φερροκυανιούχο κάλιο.
- 4-αμονοφαινοαζόνη.
- Ένυδρο άλας 5-τριφωσφορικής αδενosίνης.
- Τριολεΐνη.
- Οξειδάση 3-φωσφορικής γλυκερόλης.
- Κινάση της γλυκερόλης.
- Μονοένυδρο υπερχλωρικό νάτριο (NaClO_4).
- Χλωριούχο χολίνη ($\text{C}_5\text{H}_{14}\text{ClNO}$).
- Καφεΐνη.

Για την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (PBS), $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ και $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ στις απαιτούμενες ποσότητες διαλύθηκαν σε απιονισμένο νερό. Όλα τα

αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικού βαθμού και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς επιπλέον καθαρισμό.

4.5.2. Οργανολογία

Ένας ηλεκτροχημικός σταθμός εργασίας CHI-660D εφοδιασμένος με διαμόρφωση τριών ηλεκτροδίων χρησιμοποιήθηκε για όλους τους ηλεκτροχημικούς χαρακτηρισμούς, με ένα Hg/Hg₂Cl₂/3 M KCl πρότυπο ηλεκτρόδιο χλωριούχου υδραργύρου (SCE) ως ηλεκτρόδιο αναφοράς και ένα καλώδιο Pt ως ηλεκτρόδιο μετρητή. Όλες οι ηλεκτροχημικές αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν υπό ατμόσφαιρα αζώτου (N₂). Χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο για τη μέτρηση του πάχους της μεμβράνης και φασματόμετρο φωτοηλεκτρονίου ακτινών X για τη μελέτη της στοιχειακής σύνθεσης των PDA και Au.

4.5.3. Παρασκευή νανოსύνθετων PDA/ Au/ NPs

Τα οξειδωμένα μόρια DA εναποτέθηκαν σε GCE χρησιμοποιώντας 50 κύκλους θετικής κυκλικής βολταμετρίας (CV), με σάρωση από -400 mV έως 300 mV, σε DA υπό ατμόσφαιρα N₂, με ρυθμό σάρωσης 10 mV/s. Στη συνέχεια, το προϊόν PDA είχε παραχθεί και τα υποστρώματά του αποθηκεύτηκαν στους 4°C πριν από τη χρήση. Μια τροποποιημένη μέθοδος CV χρησιμοποιήθηκε για τον χαρακτηρισμό της εναπόθεσης Au NPs. Αυτή η αντίδραση διεξήχθη χρησιμοποιώντας 2 κύκλους αρνητικής CV (σάρωση από 800 mV έως -500 mV) σε διάλυμα HAuCl₄ με ρυθμό σάρωσης 5 mV/s. Το τελικό προϊόν χαρακτηρίστηκε ως PDA/AuNPs (Zhang, Fu, Zou, Xiao, Liu, & Li, 2017).

4.6. Ποτενσιομετρικός αισθητήρας με βάση στερεά σωματίδια επαφής για τον προσδιορισμό της θεοφυλλίνης σε διαφορετικούς τύπους εκχυλίσματος τσαγιού

Η συγκεκριμένη μελέτη είχε ως στόχο να αναπτύξει ένα απλό, αναπαραγωγίσιμο, ακριβές και γρήγορο στερεής επαφής ηλεκτρόδιο πάστας άνθρακα (CPE) για την ανάλυση της θεοφυλλίνης σε διαφορετικούς τύπους προϊόντων τσαγιού. Τα επιλεκτικά ηλεκτρόδια ιόντων (ISE) χαρακτηρίζονται από απλότητα, επιλεκτικότητα, ευαισθησία και ταχύτητα. Αυτά χρησιμοποιούνται αποτελεσματικά χωρίς εκλεπτυσμένες και χρονοβόρες μεθόδους εξαγωγής. Η εξάλειψη του εσωτερικού διαλύματος πλήρωσης στη στερεή επαφή ISE όχι μόνο οδηγεί στην απλότητα του σχεδιασμού, αλλά επίσης ενισχύει τη μηχανική ευκαμψία και την αναπαραγωγικότητα του ηλεκτροδίου. Γενικά, το CPE αποτελείται από ένα μορφοτροπέα και ένα στοιχείο αναγνώρισης. Οι νανοσωλήνες άνθρακα έχουν

μελετηθεί εκτενώς και χρησιμοποιούνται ως μετατροπείς ιόντων σε ηλεκτρόνια, λόγω των μοναδικών ηλεκτρικών ιδιοτήτων τους, υψηλής χημικής σταθερότητας και υψηλής αναλογίας επιφάνειας προς όγκο. Η επιφανειακή «διακόσμηση» με χρήση νανοσωματιδίων μετάλλου/ οξειδίου του μετάλλου εμπλουτίζει τις καταλυτικές, μαγνητικές, ηλεκτρικές και οπτικές ιδιότητες των MWCNTs. Νανοσωματίδια CuO εφαρμόστηκαν αποτελεσματικά στις ηλεκτροχημικές μεθόδους λόγω των καλών ηλεκτρικών ιδιοτήτων τους. Τα ηλεκτρόδια που προκύπτουν εμφανίζουν υψηλή σταθερότητα και πολύ αναπαραγωγίμη επίτευξη απόδοσης Nernstian αποκρίσεων, χαμηλό όριο ανίχνευσης και σύντομο χρόνο απόκρισης.

Τα ιονοφόρα Calixarene χρησιμοποιούνται ευρέως ως στοιχεία αναγνώρισης στην κατασκευή πολλών αισθητήρων και είναι υπεύθυνα για την επιλεκτικότητα του ηλεκτροδίου. Το ιονοφόρο έχει ισχυρότερη συγγένεια με τον αναλύτη στόχο (επίσης γνωστό ως πρωτογενές ιόν) από ότι με τα άλλα παρεμβαλλόμενα ή δευτερεύοντα ιόντα. Με αυτόν τον τρόπο, τα ιονοφόρα επιλέγονται με βάση τη φύση του μεγέθους, του σχήματος και του φορτίου της αναλυόμενης ουσίας, ώστε να επιτρέπεται ο σχηματισμός υπερμοριακής συνδεσμολογίας (host-guest) από οποιαδήποτε υδρόφιλη αλληλεπίδραση, από αδύναμες δυνάμεις van der Waals, από συντονισμό μετάλλων ή δεσμούς υδρογόνου. Σε αυτή τη μελέτη, δημιουργήθηκε ένα μακράς διάρκειας ζωής, ακριβό και ευαίσθητο ηλεκτρόδιο πάστας άνθρακα (CPE) για τον εκλεκτικό και αποτελεσματικό ποσοτικό προσδιορισμό της θεοφυλλίνης.

4.6.1. Υλικά και μέθοδος

4.6.1.1. Συσκευή

Ο ψηφιακός αναλυτής ιόντων pH CLEAN 600 χρησιμοποιήθηκε για την ποτενσιομετρική μέτρηση ως πρόσθετο στον Thermo-Orion διπλής σύνδεσης με ηλεκτρόδιο Ag/ AgCl ως εξωτερικό ηλεκτρόδιο αναφοράς με 10% KNO₃ ως ηλεκτρολύτη γέφυρα και 0,3 M KCl κορεσμένο με AgCl ως διάλυμα πλήρωσης. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε μαγνητικός αναδευτήρας.

4.6.1.2. Χημικά και αντιδραστήρια

Χρησιμοποιήθηκαν χημικά και αντιδραστήρια αναλυτικού βαθμού, όπως σκόνη γραφίτη, MWCNTs (>90%, διάμετρος 50-90 nm), τριτ-βουτυλοκαλιξ-αρένιο-τετράκις (N,N-διμεθυλακεταμίδη) (CLX), νανοσωματίδια οξειδίου του χαλκού και τετράκις καλίου. Το

πρότυπο αναφοράς της θεοφυλλίνης ήταν πιστοποιημένο ότι περιείχε 98,99%. Τέλος, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα τσαγιού.

4.6.1.3. Πρότυπα διαλύματα

Το πυκνό διάλυμα θεοφυλλίνης (1×10^{-2} M) προετοιμάστηκε σε μία ογκομετρική φιάλη των 50 mL, χρησιμοποιώντας δις απεσταγμένο νερό ως αραιωτικό. Τα διαλύματα εργασίας (1×10^{-10} - 1×10^{-3} M) παρασκευάστηκαν με αραιώση του πυκνού διαλύματος χρησιμοποιώντας ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) 0,05 M pH=6,0.

4.6.2. Διαδικασία

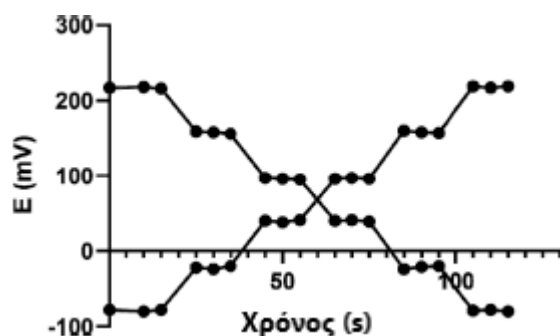
4.6.2.1. Προετοιμασία νανοϋβριδίων MWCNTs- CuO

Τα παρθένα MWCNTs γίνονται λειτουργικά και καθαρίζονται με καρβοξυλίωση για να αυξηθεί η διασπορά και να ενισχυθούν οι ιδιότητες μεταφοράς ηλεκτρονίων. Περίπου 3,0 g των ακατέργαστων MWCNTs διασκορπίστηκαν και υπέστησαν υπερήχους σε 500,0 mL ενός μίγματος H_2SO_4 και HNO_3 (3:1 v/v) για 1 ώρα και ανέρρευσε υπό συνεχή ανάδευση στους 70°C για 10 ώρες. Το διάλυμα διηθήθηκε με μεμβράνη πολυανθρακικού 0,22 μ m μετά από ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου και πλύθηκε με απιονισμένο νερό μέχρι να ληφθεί ουδέτερο διήθημα. Το προϊόν ξηράνθηκε υπό κενό στους 75°C για 10 ώρες. 1,0 g των καρβοξυλιωμένων MWCNTs αναμίχθηκαν με 0,5 g νανοσωματιδίων CuO, χρησιμοποιώντας 200,0 mL συνδετικού N,N-διμέθυλ φορμαμίδιου και υπερήχων για 1 ώρα. Η αποτελεσματική επικάλυψη των MWCNTs με νανοσωματίδια CuO επιτεύχθηκε με ανάδευση του μίγματος στις 400 rpm για 36 ώρες. Το προϊόν διηθήθηκε και ξηράνθηκε υπό κενό στους 80°C.

4.6.2.2. Εφαρμογή του μελετημένου CPE για ποσοτικό προσδιορισμό της THP σε διαφορετικά εκχυλίσματα τσαγιού

Η παρασκευή του CPE έγινε με ομοιογενή ανάμιξη της σκόνης γραφίτη, των νανοϋβριδίων MWCNTs- CuO και παραφινέλαιο ως συνδετικό (45:15: 40% w/w) σε ένα γουδί με γουδοχέρι. Η THP εκχυλίστηκε με ακρίβεια ζυγίζοντας 5 g κάθε τύπου πράσινου/μαύρου τσαγιού και έβρασε σε 100 mL απιονισμένου νερού για 30 λεπτά. Το εκχύλισμα τσαγιού διηθήθηκε μέσω χάρτινου φίλτρου 90 mm σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και αραιώθηκε μέχρι τη χαραγή με δις απεσταγμένο νερό. Τα διηθήματα αραιώθηκαν από παράγοντα 1:10 (v/v) με 0,05 M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=6,0 και μετρήθηκαν υπό τις βελτιστοποιημένες συνθήκες χρησιμοποιώντας το

προτεινόμενο CPE (Al-Haidari, Abdallah, Al-Oqail, Al-Sheddi, Al-Massarani, & Farshori, 2020).



Εικόνα 16. Δυναμικός χρόνος απόκρισης του προτεινόμενου CPE από υψηλές σε χαμηλές και από χαμηλές σε υψηλές συγκεντρώσεις THP.

4.7. Ταυτόχρονος προσδιορισμός της καφεΐνης και της θεοφυλλίνης χρησιμοποιώντας βολταμετρία τετραγωνικού κύματος σε πολυ(L-ασπαρτικό οξύ)/ λειτουργικούς πολυστρωματικούς νανοσωλήνες άνθρακα σύνθετου τροποποιημένου ηλεκτροδίου

Ένα απλό και αναπαραγωγίμο πολυ(L-ασπαρτικό οξύ)/ σύνθετο πολυστρωματικών σωλήνων άνθρακα τροποποιημένο υαλώδες ηλεκτρόδιο άνθρακα P(LeAsp)/f-MWCNTs/GCE κατασκευάστηκε για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της καφεΐνης και της θεοφυλλίνης χρησιμοποιώντας βολταμετρία τετραγωνικού κύματος. Το ηλεκτρόδιο διατηρεί και συνδυάζει τις ιδιότητες των μεμονωμένων τροποποιητών συνεργικά. Η ηλεκτροχημική απόκριση των P(LeAsp)/f-MWCNTs/GCE χαρακτηρίστηκε από κυκλική βολταμετρία. Μια σημαντική βελτίωση στην απόκριση αιχμής των CF και TP παρατηρήθηκε συνοδευόμενη με αρνητική μετατόπιση στο μέγιστο δυναμικό στο σύνθετο τροποποιημένο ηλεκτρόδιο σε σύγκριση με το γυμνό ηλεκτρόδιο.

4.7.1. Χημικά και αντιδραστήρια

Όλα τα χημικά και τα αντιδραστήρια ήταν αναλυτικού βαθμού και χρησιμοποιήθηκαν όπως ελήφθησαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Χρησιμοποιήθηκε δις απεσταγμένο νερό καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων, ενώ αγοράστηκε καφεΐνη και θεοφυλλίνη και νανοσωλήνες πολλαπλών τοιχωμάτων άνθρακα (>90% βάση άνθρακα). Επίσης, χρησιμοποιήθηκε L- ασπαρτικό οξύ όπως ελήφθη, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,1 M παρασκευασμένο από NaH_2PO_4 ως υποστηρικτικός ηλεκτρολύτης, υδροχλωρικό οξύ

(0,1 M) και υπεροξείδιο του νατρίου (0,1 M) για τη ρύθμιση του pH του υποστηρικτικού ηλεκτρολύτη στην επιθυμητή τιμή.

4.7.2. Συσκευές και όργανα

Τα βολταμετρικά πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου χρησιμοποιώντας ηλεκτροχημικό σταθμό εργασίας CHI760D διασυνδεδεμένο σε ηλεκτρονικό υπολογιστή. Όλα τα πειράματα έλαβαν χώρα με τη χρήση ενός συμβατικού συστήματος τριών ηλεκτροδίων, με γυμνό ή τροποποιημένο ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GCE, 3 mm σε διάμετρο) ως ηλεκτρόδιο εργασίας, σύρμα πλατίνας ως βοηθητικό ηλεκτρόδιο και άργυρο/ χλωριούχο άργυρο (Ag/ AgCl, KCl, κορεσμένο) ως ηλεκτρόδιο αναφοράς και οι μετρήσεις του pH ελήφθησαν με μετρητή pH. Ο καθαρισμός των ηλεκτροδίων μετά από κάθε στίλβωση του GCE πραγματοποιήθηκε σε καθαριστικό υπερήχων. Φυγόκεντρος (μοντέλο 800-1) χρησιμοποιήθηκε κατά την προετοιμασία του ορού αίματος και τον καθαρισμό των MWCNTs, τα οποία υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με οξύ. Προκειμένου να καταστούν παρθένα και λειτουργικά τα MWCNTs έγινε χρήση φασματομέτρου υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier.

4.7.3. Προετοιμασία των προτύπων εργασίας και των δειγμάτων

Πυκνά διαλύματα προτύπων καφεΐνης και θεοφυλλίνης παρασκευάστηκαν πρόσφατα, αμέσως πριν από τα πειράματα, σε δις απεσταγμένο νερό. Όλα τα πρότυπα διαλύματα εργασίας παρασκευάστηκαν σε 0,1 M PBS. Η κατάλληλη ποσότητα L-ασπαρτικού οξέος διαλύθηκε σε απεσταγμένο νερό ακολουθούμενη από αραιώση σε 0,1 M PBS pH=6 για να ληφθεί τελική συγκέντρωση 2,0 mM.

Περίπου 5 g πράσινου τσαγιού ζυγίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε 50 mL βραστό νερό για 30 λεπτά για την εκχύλιση της θεοφυλλίνης και της καφεΐνης. Μετά τη διήθηση, το διήθημα συλλέχθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και αραιώθηκε με δις απεσταγμένο νερό μέχρι την χαραγή. Πριν από τις μετρήσεις, το διήθημα ήταν αραιωμένο με τον υποστηρικτικό ηλεκτρολύτη με συντελεστή 1:100 (v/v).

Δέκα δισκία Panadol extra αλέστηκαν σε λεπτή σκόνη, αναμίχθηκαν και ομογενοποιήθηκαν σε αχάτη κονίαμα. Το βάρος που ισοδυναμούσε με ένα δισκίο ζυγίστηκε με ακρίβεια και διαλύθηκε σε 25 mL δις απεσταγμένο νερό με υπερήχους για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, το διάλυμα διηθήθηκε χρησιμοποιώντας φίλτρο χαρτιού Whatman για να παραχθεί ένα διαυγές διήθημα και έπειτα, μεταφέρθηκε ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL. Για να αποκτηθεί η τελική συγκέντρωση στο εύρος της

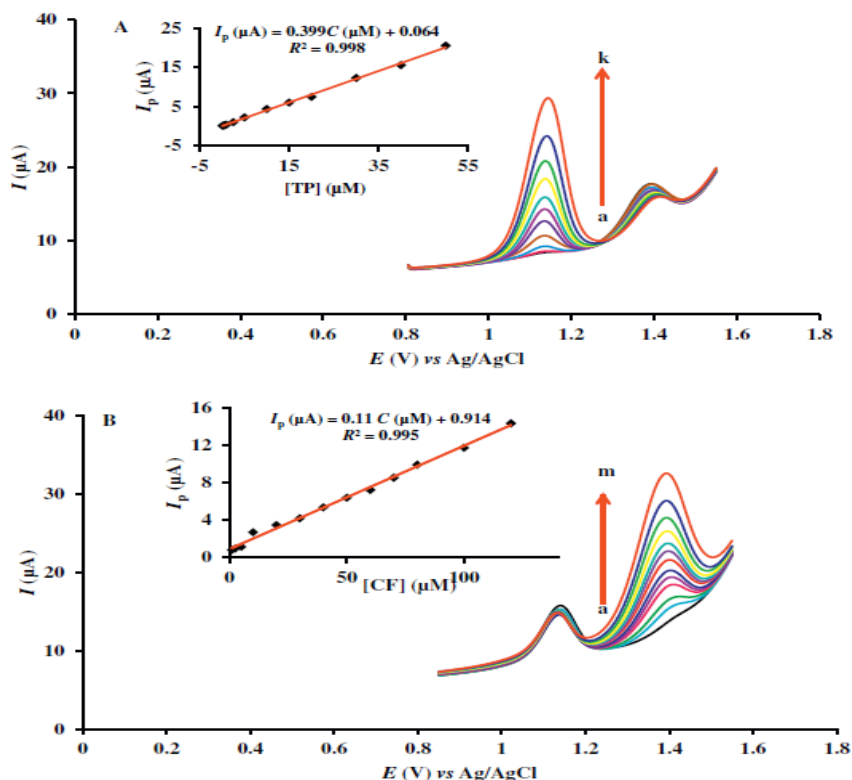
καμπύλης βαθμονόμησης, τα διαλύματα ήταν κατάλληλα αραιωμένα με τον υποστηρικτικό ηλεκτρολύτη.

Δείγμα ανθρώπινου αίματος ελήφθη από έναν υγιή εθελοντή. Λήφθηκαν περίπου 5 mL φρέσκου δείγματος αίματος και φυγοκεντρήθηκαν στις 1500 rpm για 20 λεπτά, προκειμένου να απομακρυνθούν όλα τα καταβυθιστικά υλικά. Το τυφλό δείγμα ορού παρασκευάστηκε με αραιώση 0,5 mL του ορού σε 25 mL ρυθμιστικό φωσφορικών με pH 4,5. Για την παρασκευή των ενισχυμένων δειγμάτων, 0,5 mL ορού μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 25 mL που περιείχε 10 mL PBS. Μετά από ενίσχυση με διαφορετικές συγκεντρώσεις θεοφυλλίνης και καφεΐνης, το ληφθέν διάλυμα μίγματος αραιώθηκε μέχρι τη χαραγή χρησιμοποιώντας 0,1 M PBS pH 4,5. Έπειτα, τα τυφλά και τα ενισχυμένα δείγματα ορού μεταφέρθηκαν σε ένα βολταμετρικό στοιχείο για την ανίχνευση TP και CF με την προτεινόμενη μέθοδο SWV χωρίς περαιτέρω επεξεργασία. Η μέθοδος πρότυπης προσθήκης χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της TP και CF σε όλα τα πραγματικά δείγματα.

4.7.4. Λειτουργία των MWCNTs

Το MWCNT έχει υδρόφοβη φύση και ως εκ τούτου είναι δύσκολο να διασκορπιστεί σε ένα υδατικό διάλυμα και να επιτευχθεί ένα ομοιογενές μίγμα. Προκειμένου να αποκτηθεί μία ομοιόμορφη διασπορά, ισχυρές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των νανοσωλήνων άνθρακα και της επιφάνειας GC και να επιτευχθούν σταθερές και ομοιόμορφες μεμβράνες MWCNT στην επιφάνεια GCE, τα MWCNTs λειτουργικοποιήθηκαν με αναρροή σε μίγμα από 3 M H₂SO₄ και 3 M HNO₃ (3:1 κατ' όγκο) στους 100°C για 6 ώρες σε συμπυκνωτή αναρροής. Η λειτουργικοποίηση έχει, επίσης, ως αποτέλεσμα την αφαίρεση ακαθαρσιών του καταλύτη και τη δημιουργία περισσότερων επιφανειακών λειτουργικών ομάδων. Τα άτομα άνθρακα στο επίπεδο του άκρου καθώς και στις ελλειμματικές θέσεις του βασικού επιπέδου υφίστανται οξείδωση κατά την επεξεργασία των ομάδων -COOH. Μετά από αργή ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου, τα επεξεργασμένα με οξύ MWCNTs πλύθηκαν αρκετές φορές με φυγοκέντρηση στις 3500 rpm με δις απεσταγμένο νερό, έως ότου το διήθημα έγινε ουδέτερο, και στη συνέχεια ξηράνθηκε στους 60°C σε φούρνο για 24 ώρες. Τα λειτουργικοποιημένα MWCNTs ορίστηκαν ως f- MWCNTs. Μια ομοιόμορφη διασπορά του λειτουργικού MWCNT σε απιονισμένο νερό παρασκευάστηκε από διασπορά 10 mg f-

MWCNTs σε 5 mL νερό με υπερήχους για 30 λεπτά (Mekassa, Tessema, & Chandravanshi, 2017).



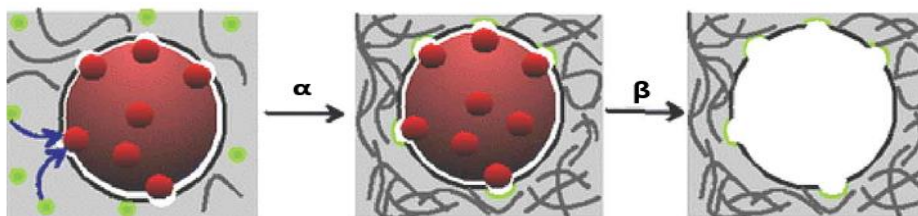
Εικόνα 17. SWVs που λαμβάνονται από P(LeAsp)/f-MWCNTs/GCE για διαφορετικές συγκεντρώσεις από (A) TP (0,1 → 50 μM) και (B) CF (0,1 → 120 μM) σε 0,1 M PBS για 10 μM σταθερής συγκέντρωσης καφεΐνης και θεοφυλλίνης, αντίστοιχα. Παρένθεση: σχεδιάγραμμα αιχμής ρεύματος έναντι συγκέντρωσης.

4.8. Μοριακά αποτυπωμένα πολυμερή σωματίδια (MIPs)

Η βασική σύνθεση των MIPs έχει ως εξής. Το πρότυπο αποτύπωσης είναι στην πραγματικότητα ο αναλύτης και η χημική του δομή καθορίζει το λειτουργικό μονομερές που χρησιμοποιείται στη διαδικασία. Η αλληλεπίδραση μεταξύ του προτύπου και του λειτουργικού μονομερούς καθορίζει βασικά τη μοριακή αναγνώριση. Το πρότυπο πρέπει να είναι σταθερό και διαλυτό υπό συνθήκες σύνθεσης. Τα λειτουργικά μονομερή είναι υπεύθυνα για το σχηματισμό των θέσεων δέσμωσης που είναι αποτυπωμένες στο πολυμερές και οι οποίες αντιστοιχούν στις λειτουργικές ομάδες μήτρας. Οι δεσμοί θα πρέπει να είναι αρκετά ισχυροί για να σχηματίζουν δεσμευτικές θέσεις, αλλά αρκετά αδύναμοι για να αφαιρεθούν περαιτέρω από το πρότυπο. Γενικά, η ποσότητα του λειτουργικού μονομερούς είναι σε σχετική περίσσεια σε σύγκριση με το πρότυπο, και μία ελάχιστη γραμμομοριακή αναλογία 4:1 χρησιμοποιείται για να εξασφαλιστεί η

ισορροπία του συμπλόκου. Το μεθακρυλικό οξύ και η 4-βινυλοπιριδίνη χρησιμοποιούνται συχνότερα ως όξινα και βασικά λειτουργικά μονομερή, αντίστοιχα. Ο παράγοντας διασύνδεσης είναι υπεύθυνος για τη σύνδεση όλων των λειτουργικών μονομερών για τον σχηματισμό του πολυμερούς. Ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος παράγοντας είναι το διμεθακρυλικό οξύ αιθυλενογλυκόλης (EDMA), το οποίο προσδίδει διάφορα χαρακτηριστικά όπως πολυμερική μορφολογία (μακρο- ή μικρο- πόροι, γέλη), σταθερότητα των αλληλεπιδράσεων του αποτυπώματος (πρότυποι- λειτουργικοί μονομερείς δεσμοί) και μηχανική σταθερότητα στο MIP.

Ο εκκινητής ριζών παράγει ελεύθερες ρίζες για αρχικοποίηση του πολυμερισμού. Οι πρώτες ρίζες σχηματίζονται με θερμική ή φωτολυτική αποσύνθεση και ο πολυμερισμός θα ξεκινήσει κατόπιν, με τη σύνδεση όλων των ουσιών που εμπλέκονται στον πολυμερισμό. Το αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται συχνότερα είναι το 2,2-αζω-δισ-ισοβουτυρονιτρίλιο. Ο διαλύτης χρησιμοποιείται ως πορογόνο αντιδραστήριο, συμμετέχοντας στη διαδικασία σύνθεσης διαλύοντας όλες τις ουσίες που εμπλέκονται σε μία μόνο φάση. Η μορφολογία και η ποσότητα των πόρων, εξ ου και η επιφάνεια, θα υπαγορεύεται από τη σύσταση, τη συγκέντρωση και τον όγκο του. Διαλύτες, όπως διχλωρομεθάνιο, ακετονιτρίλιο, τολουόλιο, διμεθυλοσουλφοξείδιο και χλωροφόρμιο, χρησιμοποιούνται κυρίως σε μη ομοιοπολικές προσεγγίσεις. Ο όγκος τους σχετίζεται άμεσα με την χωρητικότητα όλων των εμπλεκόμενων ουσιών. Επομένως, πολυμερή με μεγάλους πόρους συντίθενται όταν χρησιμοποιούνται υψηλότεροι όγκοι διαλύτη. Τα MIPs με χαμηλή κατανομή πόρων και μεγάλη επιφάνεια θα οδηγούσαν σε υψηλή διαλυτότητα στο διαλύτη, ενώ οι μεγάλοι πόροι με χαμηλή επιφάνεια θα οδηγούσαν σε χαμηλή διαλυτότητα. Αυτή η παράμετρος έχει σημαντική επίδραση στην ισορροπία του μονομερούς λειτουργικού προτύπου, η οποία είναι σταθερή όταν εφαρμόζονται μη πολικοί και απρωτικοί διαλύτες (Li & Row, 2018).



Εικόνα 18. Μηχανισμός αποτύπωσης. α) Όταν το πολυμερές σκληρύνεται παρουσία ενός προτύπου, συμβαίνουν δύο πράγματα. Πρώτον, οι λειτουργικές ομάδες εντός του προπολυμερούς (πράσινο) προσανατολίζονται προς τις λειτουργικές ομάδες στο πρότυπο με τις οποίες μπορούν να αλληλεπιδράσουν (κόκκινοι κύκλοι). Δεύτερον, οι πολυμερείς αλυσίδες (σκούρες γραμμές) σχηματίζονται και διασυνδέονται και β) όταν αφαιρείται η μήτρα, οι θέσεις παραμένουν σχηματισμένες.

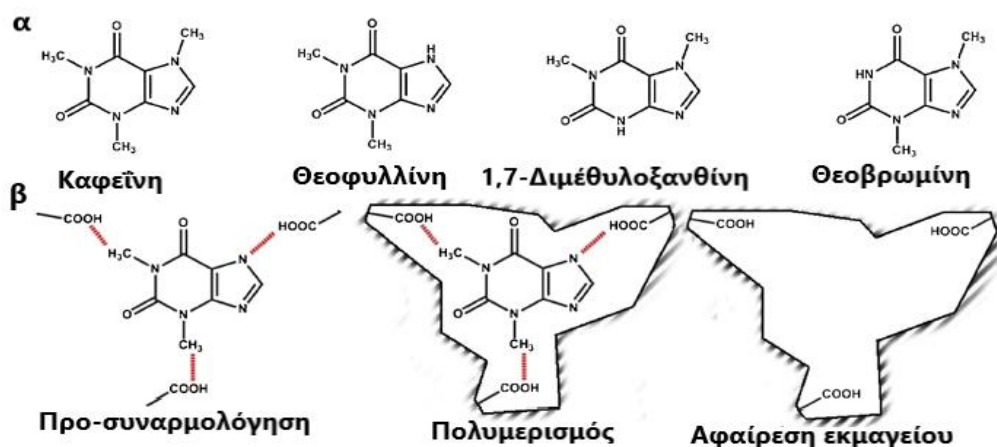
4.8.1. Βολταμετρικός αισθητήρας για τη θεοφυλλίνη χρησιμοποιώντας sol-gel MIPs

Η ανάγκη για νέα ποιοτικά συστήματα αισθητήρων με ικανότητα ανίχνευσης στοχευμένων μοριακών ενώσεων είναι πάντα παρούσα. Για αρκετές δεκαετίες, αισθητήρες βασισμένοι στη βιολογική αναγνώριση, όπως αυτοί που χρησιμοποιούν ένζυμα, αντισώματα, μικροοργανισμούς ή απταμερή, έχουν λάβει την πλειοψηφία των ενδιαφερόντων σε αυτό το πεδίο χάρη στις ανώτερες ιδιότητες αναγνώρισης. Τα βιομόρια, ωστόσο, πάσχουν γενικά από φτωχή χημική και φυσική σταθερότητα καθώς είναι δαπανηρή η σύνθεση ή η βελτίωσή τους, και έτσι τα τελευταία χρόνια έχουν αυξήσει το βαθμό προσοχής. Η μοριακή αποτύπωση ενσωματώνει τη δημιουργία μίας προσαρμοσμένης θέσης σύνδεσης για ένα επιλεγμένο πρότυπο μόριο. Οι δεσμευτικές θέσεις που δημιουργούνται μπορεί να είναι ιδιαίτερα ειδικές και να έχουν την ικανότητα να κάνουν διάκριση μεταξύ δομικά παρόμοιων ενώσεων, καθώς και χειρομορφικών μορίων.

Αν και υπάρχουν δύο βασικές στρατηγικές αποτύπωσης, ομοιοπολική και μη ομοιοπολική, η μη ομοιοπολική προσέγγιση τυγχάνει μεγαλύτερης προσοχής λόγω της ταχύτητας και της ευκολίας σύνθεσης, της ευέλικτης αναγέννησης μετά τη δέσμευση και το μεγαλύτερο επίπεδο λειτουργικότητας στη δεσμευτική θέση. Η σύνθεση τέτοιων MIPs, γενικά συνίσταται σε ένα στάδιο προ-συναρμολόγησης, όπου το μόριο του εκμαγείου αναμιγνύεται με ένα λειτουργικό μονομερές μέχρι να σχηματιστούν σύμπλοκα με το εκμαγείο στα τοπικά του δίπολα. Ο χωρικός προσανατολισμός αυτών των θέσεων δέσμευσης στη συνέχεια διασφαλίζεται μέσω της διασταύρωσης του λειτουργικού μονομερούς με ένα δευτερεύον συμπολυμερές, το οποίο στερεώνει σε κατάλληλη απόσταση και γεωμετρία τις θέσεις δέσμευσης. Σε αυτό το σημείο, το

πρότυπο μπορεί να εξαχθεί από τις νεοσυσταθείσες κοιλότητες και Μπορούν να αναπτυχθούν οι χρήσεις του MIP. Μια αναπαράσταση αυτής της διαδικασίας χρησιμοποιώντας τη θεοφυλλίνη φαίνεται στην Εικ.19. Η δημοτικότητα των MIPs προέρχεται από το χαμηλό κόστος, την ευκολία προετοιμασίας και την υψηλή σταθερότητα.

Αισθητήρες που ενσωματώνουν μοριακά αποτυπωμένα πολυμερή (MIPs) είναι εφικτοί στην έννοια, αν και η αναπαραγωγιμότητα τέτοιων συσκευών μπορεί να τεθεί σε κίνδυνο από τον μεγάλο αριθμό των αλληλοεξαρτώμενων βημάτων. Για αυτόν τον λόγο, πολλοί ερευνητές έχουν επικεντρωθεί στη σύνθεση των σωματιδίων MIPs και όχι στην ακινητοποίησή τους. Η συγκεκριμένη μελέτη παρουσιάζει μία μέθοδο βασισμένη στην τεχνική sol-gel (λύματος-πηκτής) για την ακινητοποίηση των μη τροποποιημένων σωματιδίων MIP στον ηλεκτροχημικό αισθητήρα. Τα μακροπορώδη σωματίδια παρασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας πολυμερισμό καθίζησης και αποτυπώθηκαν με θεοφυλλίνη. Το sol-gel συνδυάστηκε με μικροσωματίδια γραφίτη (50 μm) και το σύνθετο υλικό εναποτέθηκε στην επιφάνεια ενός ηλεκτροδίου εποξυ-γραφίτη. Ο αισθητήρας τότε δοκιμάστηκε για την απόκρισή του στη θεοφυλλίνη χρησιμοποιώντας διαφορική παλμική βολταμετρία.



Εικόνα 19. (α) Μοριακή δομή της καφεΐνης, της θεοφυλλίνης, της 1,7-διμεθυλοξανθίνης και της θεοβρωμίνης και (β) σχηματική αναπαράσταση της δημιουργίας μίας θέσης δέσμευσης αποτυπωμένης θεοφυλλίνης, που αποτελείται από προ-συναρμολόγηση του λειτουργικού μονομερούς και της μήτρας, τον πολυμερισμό του διασυνδεδεμένου πολυμερούς και επακόλουθη αφαίρεση του εκμαγείου για να αφήσει μια λειτουργική θέση σύνδεσης.

4.8.1.1. Αντιδραστήρια και χημικά

Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν:

- ❖ Σκόνη γραφίτη μεγέθους σωματιδίων 50 μm κατά την παρασκευή των μεμβρανών sol-gel και των ηλεκτροδίων εποξυγραφίτη.
- ❖ Erotek H77 ρητίνη και το αντίστοιχο για την κατασκευή των ηλεκτροδίων.
- ❖ 1,7- διμεθυλοξανθίνη.
- ❖ Θεοφυλλίνη.
- ❖ Καφεΐνη.
- ❖ Μεθακρυλικό οξύ (MAA).
- ❖ Ακρυλικός μεθυλεστέρας αιθυλενογλυκόλης (EGDMA).
- ❖ Τετραθυλικό ορθοσιλάνιο (TEOS).
- ❖ Ριζικός εκκινητής 2,2'-Azobis (2,4-διμεθυλοβαλερονιτρίλιο)(AIVN).
- ❖ Όξινο φθαλικό κάλιο.

Όλα τα αντιδραστήρια ήταν αναλυτικού βαθμού.

4.8.1.2. Συσκευή

Όλοι οι πολυμερισμοί έγιναν σε υδατόλουτρο ελεγχόμενο με αντλία θερμορύθμισης Hubber CC1. Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν χρησιμοποιώντας μία εμπορική 52-61 πλατίνα συνδυασμένη με Ag/AgCl ως ηλεκτρόδιο αναφοράς και μετρητή. Όλες οι βολταμετρικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση DropSens μStat800 πολύ-ποτενσιοστάτη/γαλβανοστάτη και υποβλήθηκαν σε επεξεργασία χρησιμοποιώντας λογισμικό υπολογιστή Dropview 8400. Οι χρονοαμπερομετρικές μετρήσεις έγιναν με Autolab PGStat 20.

4.8.1.3. Παρασκευή των σωματιδίων αποτυπωμένων πολυμερών θεοφυλλίνης

Το πρωτόκολλο για τη σύνθεση των σωματιδίων MIP με πολυμερισμό καθίζησης ελήφθη από τη βιβλιογραφία. Εν συντομία, ο αναστολέας στο MAA και το EGDMA αφαιρέθηκαν αμέσως πριν από τη χρήση, μέσω διέλευσης από στήλες απομάκρυνσης αναστολέων. 0,255 mmol θεοφυλλίνης συνδυάστηκαν με 0,911 mmol MAA σε 40 ml ακετονιτρίλιου σε φιάλη στρογγυλού πυθμένα. Το μίγμα στη συνέχεια αναδεύτηκε ήπια σε χαμηλή θερμοκρασία για 10 λεπτά. Έπειτα, προστέθηκαν 3,64 mmol EGDMA και 0,0852 mmol AIVN και αναμίχθηκαν για λίγο. Το διάλυμα υποβλήθηκε σε υπερήχους υπό κενό και στη συνέχεια καθαρίστηκε με άζωτο για 10 λεπτά και σε αυτό το σημείο η φιάλη σφραγίστηκε και τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο στους 60°C για 16 ώρες. Δημιουργήθηκε, επίσης, ένα μη αποτυπωμένο πολυμερές ελέγχου χρησιμοποιώντας την ίδια διαδικασία με παράλειψη όμως της θεοφυλλίνης. Τα σωματίδια MIP στη συνέχεια

απομακρύνθηκαν από το πορογόνο μέσω φυγοκέντρησης στις 4500 rpm για 10 λεπτά και έπειτα μοιράστηκαν εξίσου μεταξύ τριών σωλήνων Falcon 15 mL. Τα σωματίδια πλύθηκαν με 10 mL 9:1 μεθανόλης και διαλύματος οξικού οξέος για 1 ώρα, οπότε στο σημείο αυτό ο διαλύτης ανανεώθηκε και κατόπιν οι σωλήνες φυγοκεντρήθηκαν και το υπερκείμενο απομακρύνθηκε. Αυτή η διαδικασία επαναλήφθηκε 5 φορές για να εξασφαλιστεί η πλήρης αφαίρεση των μορίων του προτύπου, τα σωματίδια ξεπλύθηκαν ξανά μόνο με μεθανόλη και ξηράνθηκαν σε φούρνο στους 70°C.

4.8.1.4. Ηλεκτροχημικές μετρήσεις

Πραγματοποιήθηκε διαφορική παλμική βολταμετρία με εύρος σάρωσης μεταξύ 1 και 1,7 V, παλμικό δυναμικό 0,01 V, διάρκεια 300 ms και ρυθμό σάρωσης $0,04 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$. Λήφθηκε μία μέτρηση $t=0$ (t_0) από την οποία αφαιρέθηκαν όλες οι μετρήσεις της διαδικασίας. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα χρονοαμπερομετρίας στο + 1,18 V. Όλες οι μετρήσεις έγιναν σε ρυθμιστικό διάλυμα φθαλικού με $\text{pH}=3$, με το pH να ρυθμίζεται χρησιμοποιώντας 0,1 M HCl. Χρόνος συσσώρευσης 5 λεπτών χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα, εκτός εάν δηλώνεται διαφορετικά πού βυθίστηκε το ηλεκτρόδιο στον αναλύτη πριν από τη μέτρηση (Bates & del Valle, 2015).

Συμπεράσματα

Ύστερα από μελέτη των παραπάνω εισαγωγικών στοιχείων, αλλά και των αντίστοιχων μεθόδων, καταλήγουμε στα εξής συμπεράσματα. Γενικότερα, προτιμώνται μέθοδοι που δεν απαιτούν ιδιαίτερο χειρισμό για την προετοιμασία του δείγματος πριν την ανάλυση. Οι περισσότερες μέθοδοι που προαναφέρθηκαν απαιτούν μια σύντομη προετοιμασία του δείγματος, η οποία συνήθως περιλαμβάνει την εκχύλιση του προϊόντος που θέλουμε να αναλύσουμε. Η χρωματογραφία είναι μια κοινή μέθοδος για τον προσδιορισμό των επιμέρους ενώσεων και αρκετά συχνά συνδυάζεται με φασματοσκοπικές τεχνικές. Η χρωματογραφική τεχνική επιλογής είναι η HPLC, στην οποία η προετοιμασία του δείγματος περιλαμβάνει μόνο αραίωση και διήθηση. Οι άλλες τεχνικές, όπως η MEKC ή η αέρια χρωματογραφία, χρησιμοποιούνται πιο σπάνια για τον προσδιορισμό της καφεΐνης. Όσον αφορά τις μη χρωματογραφικές μεθόδους, η μέθοδος DART χρησιμοποιείται ως γρήγορη και επιλεκτική μέθοδος, καθώς το δείγμα μπορεί να εγχυθεί απευθείας στην πηγή ιονισμού. Επίσης, η φασματοσκοπία FTIR μπορεί να δώσει αρκετά υψηλά αναπαραγώγιμα φάσματα και είναι χρήσιμο εργαλείο στα χέρια των

επιστημόνων. Στις βολταμετρικές μεθόδους ανήκουν τεχνικές που χρησιμοποιούν για τις αναλύσεις τους διάφορα ηλεκτρόδια συνδεδεμένα με ουσίες που αυξάνουν την επιλεκτικότητα και την ευαισθησία των επιμέρους τεχνικών. Σε κάθε περίπτωση, σε όλες τις μεθόδους ακολουθείται ένα συγκεκριμένο πρωτόκολλο και χρησιμοποιούνται πρότυπα διαλύματα, όπου είναι απαραίτητο. Έτσι επιλέγεται, ανάλογα με την ουσία που πρέπει να προσδιοριστεί, το μέσο στο οποίο περιέχεται και την ποσοτική ή ποιοτική ανάλυση, η καταλληλότερη μέθοδος με τη μεγαλύτερη ταχύτητα, ακρίβεια και ευαισθησία.

Βιβλιογραφία

- Aguiar, A. S., Speck, A. E., Canas, P. M., & Cunha, R. A. (2020). Neuronal adenosine A_{2A} receptors signal ergogenic effects of caffeine. *Scientific reports*, *10* (1), pp. 1-10.
- Alasmari, F. (2020). Caffeine induces neurobehavioral effects through modulating neurotransmitters. *Saudi Pharmaceutical Journal*, *28*, pp. 445-451.
- Al-Haidari, R. A., Abdallah, N. A., Al-Oqail, M. M., Al-Sheddi, E. S., Al-Massarani, S. M., & Farshori, N. N. (2020). Nanoparticles based solid contact potentiometric sensor for the determination of theophylline in different types of tea extract. *Inorganic Chemistry Communications*, *119*, p. 108080.
- Alharbi, O., Xu, Y., & Goodacre, R. (2015). Simultaneous multiplexed quantification of caffeine and its major metabolites theobromine and paraxanthine using surface-enhanced Raman scattering. *Analytical and bioanalytical chemistry*, *407* (27), pp. 8253-8261.
- Badea, D. N., & Levai, C. (2017). Separation and detection of caffeine, theophylline and theobromine from coffee varieties, carbonated soft drinks and alcoholic beverages. *Rev Chim*, *68* (11), pp. 2704-2707.
- Barcelos, R. P., Lima, F. D., Carvalho, N. R., Bresciani, G., & Royes, L. F. (2020). Caffeine effects on systemic metabolism, oxidative-inflammatory pathways, and exercise performance. *Nutrition Research*, *80*, pp. 1-17.
- Batchelor-McAuley, C., Kätelhön, E., Barnes, E. O., Compton, R. G., Laborda, E., & Molina, A. (2015). Recent advances in voltammetry. *ChemistryOpen*, *4* (3), pp. 224-260.
- Bates, F., & del Valle, M. (2015). Voltammetric sensor for theophylline using sol-gel immobilized molecularly imprinted polymer particles. *Microchimica Acta*, *182* (5-6), pp. 933-942.
- Boesl, U. (2017). Time-of-flight mass spectrometry: introduction to the basics. *Mass spectrometry reviews*, *36* (1), pp. 86-109.
- Brun, Y., & Rasmussen, C. J. (2015). Chromatography, HPLC. *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, pp. 1-26.
- Buiarelli, F., Bernardini, F., Simonetti, G., Filippo, P. D., Pomata, D., Riccardi, C., et al. (2019). A rapid and accurate method for the determination of methylxanthines in different nervous system stimulant beverages. *Journal of AOAC International*, *102* (3), pp. 865-871.

- Charehsaz, M., Gürbay, A., Aydin, A., & Şahin, G. (2014). Simple, fast and reliable liquid chromatographic and spectrophotometric methods for the determination of theophylline in urine, saliva and plasma samples. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR* , 13 (2), pp. 431-439.
- Cheng, S. C., Huang, M. Z., & Shiea, J. (2011). Thin layer chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* , 1218 (19), pp. 2700-2711.
- Chocholouš, P., Solich, P., & Šatínský, D. (2007). An overview of sequential injection chromatography. *Analytica Chimica Acta* , 600 (1-2), pp. 129-135.
- Chorti, P., Ntousikou, M., & Economou, A. (2019). A linear gradient sequential injection chromatography method exploiting programmable fluidics for the determination of three methylxanthines. *Talanta* , 202, pp. 514-519.
- Cody, R. B., Laramée, J. A., Nilles, J. M., & Durst, H. D. (2005). Direct analysis in real time (DART) mass spectrometry. *JEOL news* , 40 (1), pp. 8-12.
- Cova, I., Leta, V., Mariani, C., Pantoni, L., & Pomati, S. (2019). Exploring cocoa properties: is theobromine a cognitive modulator? *Psychopharmacology* , 236 (2), pp. 561-572.
- Danhelova, H., Hradecky, J., Prinosilova, S., Cajka, T., Riddellova, K., Vaclavik, L., et al. (2012). Rapid analysis of caffeine in various coffee samples employing direct analysis in real-time ionization–high-resolution mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* , 403 (10), pp. 2883-2889.
- De Hoffmann, E. (2000). Mass spectrometry. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology* .
- Deeb, S. E., Iriban, M. A., & Gust, R. (2011). MEKC as a powerful growing analytical technique. *Electrophoresis* , 32 (1), pp. 166-183.
- Egorenko, M., & Zabrodina, I. (2019). Chemical properties of caffeine and its use in costic industry. *Проблемы геологии и освоения недр: труды XXIII Международного симпозиума имени академика МА Усова студентов и молодых ученых, посвященного 120-летию со дня рождения академика КИ Сатпаева, 120-летию со дня рождения профессора КВ Радугина, Томск, 8-12 апрел , 2* , p. 695.
- Ejuh, G. W., Ndjaka, J. M., Nya, F. T., Ndukum, P. L., Fonkem, C., Assatse, Y. T., et al. (2020). Determination of the structural, electronic, optoelectronic and thermodynamic properties of the methylxanthine molecules theophylline and theobromine. *Optical and Quantum Electronics* , 52 (11), pp. 1-22.
- Ellingson, M. (2021). The CNS and Stimulant Effects. *Microreviews in Cell and Molecular Biology* , 8 (2), pp. 1-7.
- Fajara, B. E., & Susanti, H. (2017). HPLC determination of caffeine in coffee beverage. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 259, p. 012011). IOP Publishing.

- Gaffney, J. S., Marley, N. A., & Jones, D. E. (2002). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Characterization of Materials* , pp. 1-33.
- Gallelli, L., Falcone, D., Cannataro, R., Perri, M., Serra, R., Pelaia, G., et al. (2017). Theophylline action on primary human bronchial epithelial cells under proinflammatory stimuli and steroidal drugs: a therapeutic rationale approach. *Drug design, development and therapy* , 11, p. 265.
- Ganjali, M. R., Dourandish, Z., Beitollahi, H., Tajik, S., Hajiaghababaei, L., & Larijani, B. (2018). Highly Sensitive Determination of Theophylline Based on Graphene Quantum Dots Modified Electrode. *International Journal of Electrochemical Science* , 13, pp. 2448-2461.
- Han, Y., Xun, L., Wang, X., Yang, S., Sun, Z., Shi, H., et al. (2020). Detection of caffeine and its main metabolites for early diagnosis of Parkinson's disease using micellar electrokinetic capillary chromatography. *Electrophoresis* , 41 (16-17), pp. 1392-1399.
- Jang, M. H., Kang, N. H., Mukherjee, S., & Yun, J. W. (2018). Theobromine, a Methylxanthine in Cocoa Bean, Stimulates Thermogenesis by Inducing White Fat Browning and Activating Brown Adipocytes. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* , 23, pp. 617-622.
- Jeszka-Skowron, M., Zgoła-Grześkowiak, A., & Grześkowiak, T. (2015). Analytical methods applied for the characterization and the determination of bioactive compounds in coffee. *European Food Research and Technology* , 240 (1), pp. 19-31.
- Journey, J. D., & Bentley, T. P. (2020). *Theophylline toxicity*. StatPearls [Internet].
- Li, G., & Row, K. H. (2018). Recent applications of molecularly imprinted polymers (MIPs) on micro-extraction techniques. *Separation & Purification Reviews* , 47 (1), pp. 1-18.
- Li, P., & Bartlett, M. G. (2014). A review of sample preparation methods for quantitation of small-molecule analytes in brain tissue by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Analytical Methods* , 6 (16), pp. 6183-6207.
- Mahanthappa, M., Yellappa, S., Kottam, N., & Vusa, C. S. (2016). Sensitive determination of caffeine by copper sulphide nanoparticles modified carbon paste electrode. *Sensors and Actuators A: Physical* , 248, pp. 104-113.
- Marken, F., Neudeck, A., & Bond, A. M. (2010). Cyclic voltammetry. In *Electroanalytical methods* (pp. 57-106). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Martínez-López, S., Sarriá, B., Gómez-Juaristi, M., Goya, L., Mateos, R., & Bravo-Clemente, L. (2014). Theobromine, caffeine, and theophylline metabolites in human plasma and urine after consumption of soluble cocoa products with different methylxanthine contents. *Food Research International* , 63, pp. 446-455.
- Mekassa, B., Tessema, M., & Chandravanshi, B. S. (2017). Simultaneous determination of caffeine and theophylline using square wave voltammetry at poly (L-aspartic acid)/functionalized multi-walled carbon nanotubes composite modified electrode. *Sensing and bio-sensing research* , 16, pp. 46-54.

- Miller, J. M. (2003). Chromatography. *digital Encyclopedia of Applied Physics* , 1055-1102.
- Mirceski, V., Gulaboski, R., Lovric, M., Bogeski, I., Kappl, R., & Hoth, M. (2013). Square-wave voltammetry: A review on the recent progress. *Electroanalysis* , 25 (11), pp. 2411-2422.
- Mirceski, V., Skrzypek, S., & Stojanov, L. (2018). Square-wave voltammetry. *ChemTexts* , 4 (4), pp. 1-14.
- Monteiro, M. K., Da Silva, D. R., Quiroz, M. A., Vilar, V. J., Martínez-Huitle, C. A., & Dos Santos, E. V. (2021). Applicability of Cork as Novel Modifiers to Develop Electrochemical Sensor for Caffeine Determination. *Materials* , 14, pp. 1-17.
- Monteiro, M. K., Paiva, S. S., Da Silva, D. R., Vilar, V. J., Martínez-Huitle, C. A., & Dos Santos, E. V. (2019). Novel cork-graphite electrochemical sensor for voltammetric determination of caffeine. *Journal of Electroanalytical Chemistry* , 839, pp. 283-289.
- Navid, A., Ng, D. M., Wong, S. E., & Lightstone, F. C. (2016). Application of a physiologically based pharmacokinetic model to study theophylline metabolism and its interactions with ciprofloxacin and caffeine. *CPT: pharmacometrics & systems pharmacology* , 5 (2), pp. 74-81.
- Nia, N. A., Foroughi, M. M., & Jahani, S. (2021). Simultaneous determination of theobromine, theophylline, and caffeine using a modified electrode with petal-like MnO₂ nanostructure. *Talanta* , 222, p. 121563.
- Nichols, D. E. (2010). CNS Stimulants. *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery* , pp. 1-32.
- Pasias, I. N., Kiriakou, I., & Proestos, C. (2017). Development of a rapid method for the determination of caffeine in coffee grains by GC-FID—a fully validated approach. *Antioxidants* , 6 (3), pp. 1-6.
- Poole, C. F. (2015). Ionization-based detectors for gas chromatography. *Journal of Chromatography A* , 1421, pp. 137-153.
- Renda, G., & Caterina, R. D. (2020). Caffeine. In *Principles of Nutrigenetics and Nutrigenomics* (pp. 335-340). Academic Press.
- Samokhvalov, A. (2020). Analysis of various solid samples by synchronous fluorescence spectroscopy and related methods: A review. *Talanta* , 216, p. 120944.
- Shaaban, H., & Mostafa, A. (2018). Sustainable eco-friendly ultra-high-performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of caffeine and theobromine in commercial teas: evaluation of greenness profile using NEMI and eco-scale assessment tools. *Journal of AOAC International* , 101 (6), pp. 1781-1787.
- Shu, X., Bian, F., Wang, Q., Qin, X., & Wang, Y. (2017). Electrochemical sensor for simultaneous determination of theophylline and caffeine based on a novel poly (folic

acid)/graphene composite film modified electrode. *International Journal of Electrochemical Science* , 12, pp. 4251-4264.

Smolders, L., Mensink, R. P., & Plat, J. (2017). An acute intake of theobromine does not change postprandial lipid metabolism, while a high-fat meal lowers chylomicron particle number. *Nutrition Research* , 40, pp. 85-94.

Socała, K., Szopa, A., Serefko, A., Poleszak, E., & Wlaź, P. (2021). Neuroprotective Effects of Coffee Bioactive Compounds: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* , 22 (1), p. 107.

Srdjenovic, B., Djordjevic-Milic, V., Grujic, N., Injac, R., & Lepojevic, Z. (2008). Simultaneous HPLC Determination of Caffeine, Theobromine, and Theophylline in Food, Drinks, and Herbal Products. *Journal of Chromatographic Science* , 46 (2), pp. 144-149.

Stefanello, N., Spanevello, R., Passamonti, S., Porciúncula, L., Bonan, C. D., Olabiyi, A. A., et al. (2019). Coffee, caffeine, chlorogenic acid, and the purinergic system. *Food and Chemical Toxicology* , 123, pp. 298-313.

Švorc, L., Haško, M., Sarakhman, O., Kianičková, K., Stanković, D. M., & Otřisal, P. (2018). A progressive electrochemical sensor for food quality control: Reliable determination of theobromine in chocolate products using a miniaturized boron-doped diamond electrode. *Microchemical Journal* , 142, pp. 297-304.

Taleuzzaman, M., Ali, S., Gilani, S. J., Imam, S. S., & Hafeez, A. (2015). Ultra performance liquid chromatography (UPLC)-a review. *Austin J Anal Pharm Chem* , 2 (6), pp. 1-5.

Tan, J., Li, R., Jiang, Z. T., Tang, S. H., & Wang, Y. (2019). Rapid and non-destructive prediction of methylxanthine and cocoa solid contents in dark chocolate by synchronous front-face fluorescence spectroscopy and PLSR. *Journal of Food Composition and Analysis* , 77, pp. 20-27.

Turnbull, D., Rodricks, J. V., & Mariano, G. F. (2016). Neurobehavioral hazard identification and characterization for caffeine. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* , 74, pp. 81-92.

Turner, J. *Chem 219: Determination of caffeine concentration in beverages through FTIR spectroscopy*.

Uddin, M. S., Sufian, M. A., Hossain, M. F., Kabir, M. T., Islam, M. T., Rahman, M. M., et al. (2017). Neuropsychological effects of caffeine: Is caffeine addictive. *J Psychol Psychother* , 7 (295), pp. 2161-0487.

Usui, K., Fujita, Y., Kamijo, Y., Igari, Y., & Funayama, M. (2021). LC-MS/MS method for rapid and accurate detection of caffeine in a suspected overdose case. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* , 107, p. 106946.

Wang, L., Zhao, P., Zhang, F., Bai, A., & Pan, C. (2013). Detection of caffeine in tea, instant coffee, green tea beverage, and soft drink by direct analysis in real time (DART) source

coupled to single-quadrupole mass spectrometry. *Journal of AOAC International* , 96 (2), pp. 353-356.

Willson, C. (2018). The clinical toxicology of caffeine: A review and case study. *Toxicology Reports* , 5, pp. 1140-1152.

Zhang, G., Fu, H., Zou, D., Xiao, R., Liu, J., & Li, S. (2017). Electrochemical Determination of Caffeine in Tea Using a Polydopamine-Gold Nanocomposite. *International Journal of Electrochemical Science* , 12, pp. 11465-11472.

Πηγές Εικόνων

- Εικόνα 1: Batchelor-McAuley, C., Kätelhön, E., Barnes, E. O., Compton, R. G., Laborda, E., & Molina, A. (2015). Recent advances in voltammetry. *ChemistryOpen*, 4 (3), pp. 224-260. (Τροποποιημένη)
- Εικόνα 2: Renda, G., & Caterina, R. D. (2020). Caffeine. In *Principles of Nutrigenetics and Nutrigenomics* (pp. 335-340). Academic Press.
- Εικόνα 3: Shaaban, H., & Mostafa, A. (2018). Sustainable eco-friendly ultra-high-performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of caffeine and theobromine in commercial teas: evaluation of greenness profile using NEMI and eco-scale assessment tools. *Journal of AOAC International*, 101 (6), pp. 1781-1787. (Τροποποιημένη)
- Εικόνα 4: Badea, D. N., & Levai, C. (2017). Separation and detection of caffeine, theophylline and theobromine from coffee varieties, carbonated soft drinks and alcoholic beverages. *Rev Chim*, 68 (11), pp. 2704-2707.
- Εικόνα 5: Pasiás, I. N., Kiriakou, I., & Proestos, C. (2017). Development of a rapid method for the determination of caffeine in coffee grains by GC-FID—a fully validated approach. *Antioxidants*, 6 (3), pp. 1-6. (Τροποποιημένη)
- Εικόνα 6: Chorti, P., Ntousikou, M., & Economou, A. (2019). A linear gradient sequential injection chromatography method exploiting programmable fluidics for the determination of three methylxanthines. *Talanta*, 202, pp. 514-519. (Τροποποιημένη)
- Εικόνα 7: Wang, L., Zhao, P., Zhang, F., Bai, A., & Pan, C. (2013). Detection of caffeine in tea, instant coffee, green tea beverage, and soft drink by direct analysis in real time (DART) source coupled to single-quadrupole mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, 96 (2), pp. 353-356. (Τροποποιημένη)
- Εικόνα 8: Samokhvalov, A. (2020). Analysis of various solid samples by synchronous fluorescence spectroscopy and related methods: A review. *Talanta*, 216, p. 120944. (Τροποποιημένη)
- Εικόνα 9: Tan, J., Li, R., Jiang, Z. T., Tang, S. H., & Wang, Y. (2019). Rapid and non-destructive prediction of methylxanthine and cocoa solid contents in dark chocolate by synchronous front-face fluorescence spectroscopy and PLSR. *Journal of Food Composition and Analysis*, 77, pp. 20-27. (Τροποποιημένη)
- Εικόνα 10: Marken, F., Neudeck, A., & Bond, A. M. (2010). Cyclic voltammetry. In *Electroanalytical methods* (pp. 57-106). Springer, Berlin, Heidelberg. (Τροποποιημένη)
- Εικόνα 11: Mirceski, V., Gulaboski, R., Lovric, M., Bogeski, I., Kappl, R., & Hoth, M. (2013). Square-wave voltammetry: A review on the recent progress. *Electroanalysis*, 25 (11), pp. 2411-2422. (Τροποποιημένη)
- Εικόνα 12: Nia, N. A., Foroughi, M. M., & Jahani, S. (2021). Simultaneous determination of

theobromine, theophylline, and caffeine using a modified electrode with petal-like MnO₂ nanostructure. *Talanta* , 222, p. 121563.

- Εικόνα 13: Nia, N. A., Foroughi, M. M., & Jahani, S. (2021). Simultaneous determination of theobromine, theophylline, and caffeine using a modified electrode with petal-like MnO₂ nanostructure. *Talanta* , 222, p. 121563. (Τροποποιημένη)
- Εικόνα 14: Shu, X., Bian, F., Wang, Q., Qin, X., & Wang, Y. (2017). Electrochemical sensor for simultaneous determination of theophylline and caffeine based on a novel poly (folic acid)/graphene composite film modified electrode. *International Journal of Electrochemical Science* , 12, pp. 4251-4264.
- Εικόνα 15: Monteiro, M. K., Paiva, S. S., Da Silva, D. R., Vilar, V. J., Martínez-Huitle, C. A., & Dos Santos, E. V. (2019). Novel cork-graphite electrochemical sensor for voltammetric determination of caffeine. *Journal of Electroanalytical Chemistry* , 839, pp. 283-289. (Τροποποιημένη)
- Εικόνα 16: Al-Haidari, R. A., Abdallah, N. A., Al-Oqail, M. M., Al-Sheddi, E. S., Al-Massarani, S. M., & Farshori, N. N. (2020). Nanoparticles based solid contact potentiometric sensor for the determination of theophylline in different types of tea extract. *Inorganic Chemistry Communications* , 119, p. 108080. (Τροποποιημένη)
- Εικόνα 17: Mekassa, B., Tessema, M., & Chandravanshi, B. S. (2017). Simultaneous determination of caffeine and theophylline using square wave voltammetry at poly (L-aspartic acid)/functionalized multi-walled carbon nanotubes composite modified electrode. *Sensing and bio-sensing research* , 16, pp. 46-54.
- Εικόνα 18: Li, G., & Row, K. H. (2018). Recent applications of molecularly imprinted polymers (MIPs) on micro-extraction techniques. *Separation & Purification Reviews* , 47 (1), pp. 1-18. (Τροποποιημένη)
- Εικόνα 19: Bates, F., & del Valle, M. (2015). Voltammetric sensor for theophylline using sol-gel immobilized molecularly imprinted polymer particles. *Microchimica Acta* , 182 (5-6), pp. 933-942. (Τροποποιημένη)