



Πανεπιστήμιο
Ιωαννίνων

Τμήμα Χημείας

Παπαδημητρίου Ειρήνη

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Αυτοματοποίηση της ανίχνευσης μεταλλικών ιόντων ασβεστίου, μαγνησίου και ψευδαργύρου μέσω EDTA στο αίμα: έλεγχος ποιότητας φασμάτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), μεταβολομική ανάλυση ακριβείας, επιπλέον κλινική αξία»

Επιβλέπων καθηγητής: κ. Τάκης Παντελεήμων

Ιωάννινα, 2025

Η Τριμελής επιτροπή που ορίστηκε:

κ. Τάκης Παντελεήμων

κ. Σακκάς Βασίλειος

κ. Σταλίκας Κωνσταντίνος

Πίνακας περιεχομένων

Ευχαριστίες.....	5
Μέρος Α: Θεωρητικό Μέρος.....	7
Περίληψη.....	8
Abstract	9
1. Εισαγωγή.....	11
2. Βασικές Αρχές Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού	13
2.1 Ορισμός και Επεξήγηση.....	13
2.1.1 Μαγνητικό Πεδίο και Ανίχνευση Σήματος	14
2.2 Αλληλεπίδραση πυρήνων με μαγνητικό πεδίο.....	15
2.2.1 Εφαρμογή μαγνητικού πεδίου B_0	15
2.2.2 Μετάπτωση Larmor και φαινόμενο συντονισμού	16
2.3 Χημική Μετατόπιση και Κλίμακα δ	17
2.4 Σύζευξη spin-spin - Σταθερά σύζευξης J coupling	20
2.4.1 Πολλαπλότητα και κανόνας n+1	21
2.5 Επεξεργασία δεδομένων NMR.....	22
2.6 Μετασχηματισμός Fourier.....	23
2.7 Μονοδιάστατη φασματοσκοπία πρωτονίου ^1H - NMR 1D NMR.....	24
2.7.1 Χαρακτηριστικά των σημάτων στο ^1H NMR.....	24
2.8 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα του NMR.....	25
3. Μέθοδοι NOESY και CPMG	26
3.1 Μέθοδος 1D NOESY: Μηχανισμός και Εφαρμογές.....	26
3.2 Μέθοδος CPMG: Φίλτρο T2, για καταστολή μακρομορίων.....	26
3.2.1 Μηχανισμός δράσης της CPMG	26
4. SMolESY-Small Molecule Enhancement Spectroscopy (SMolESY).....	26
5. Μέταλλα.....	27
6. EDTA	28
6.1 Χημική δομή και Ιδιότητες.....	28
6.1.1 Σχηματισμός και σταθεροποίηση συμπλόκων	29
6.1.2 Ιοντική μορφή και επίδραση pH.....	29
6.2 Σύμπλοκα EDTA-μετάλλου	30
6.3 Αντιπηκτική Δράση του EDTA.....	30
6.4 Φασματοσκοπία NMR και EDTA.....	31
7. Ποιοτικός έλεγχος	31
8. Ποσοτικοποίηση με την φασματοσκοπία NMR.....	32
8.1 Σχετική ποσοτικοποίηση	32
8.2 Απόλυτη ποσοτικοποίηση	33

9. Σκοπός.....	34
Μέρος Β: Πειραματική πορεία και αποτελέσματα.....	35
10. Αντιδραστήρια.....	36
11. Πειραματική πορεία	36
11.1 Πειράματα φασματοσκοπίας NMR.....	36
11.2 Γενικοί παράμετροι διεξαγωγής πειραμάτων.....	37
11.3 Υπολογιστικό μέρος -Μέθοδοι.....	39
12. Αποτελέσματα.....	49
12.1 Συσχετίσεις μεταξύ μεταβολιτών και σημάτων EDTA.....	49
12.2 Αποτελέσματα δοκιμής του αλγορίθμου.....	62
12.3 Αποτελέσματα από νοσοκομειακά δείγματα.....	64
12.4 Ποσοτικοποίηση μετάλλων.....	65
13. Συμπεράσματα και παρατηρήσεις.....	68
Βιβλιογραφία.....	69

Ευχαριστίες

Η ερευνητική εργασία για την απόκτηση διπλώματος εκπονήθηκε στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών (ΠΜΣ) του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Τάκη Παντελεήμων Επίκουρο Καθηγητή της αναλυτικής χημείας που ήταν στο πλευρό μου καθ' όλη την διεξαγωγή της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Καθώς μου έδωσε την ευκαιρία να εργαστώ και να εκπονήσω την διπλωματική μου εργασία δίπλα του. Τον ευχαριστώ για την ευκαιρία που μου έδωσε στην εκμάθηση της τεχνολογίας NMR καθώς και για τις επιπλέον γνώσεις που με μεταλαμπάδευσε κατά την διάρκεια των σπουδών μου. Είμαι ευγνώμων για την καθοδήγηση του καθώς και για την υπομονή και την πολύτιμη του βοήθεια κατά την διάρκεια των πειραμάτων μου. Επιπλέον, θέλω να τον ευχαριστήσω για την εύλογη βοήθεια και τις πολύτιμες συμβουλές που μου έδινε στην διάρκεια των σπουδών μου. Ακόμη, θέλω να ευχαριστήσω τον κ. Σταλίκια Κωνσταντίνο και τον κ. Σακκά Βασίλειο Καθηγητές του Τμήματος Χημείας και για την βοήθεια και την προθυμία τους στην επιμέλεια της διπλωματικής μου εργασίας, καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές τους. Τέλος, ευχαριστώ όλους τους Καθηγητές του Τμήματος Χημείας για τις πολύτιμες γνώσεις που μου δίδαξαν στην διάρκεια του μεταπτυχιακού μου.

Τέλος θέλω να ευχαριστήσω τους γονείς μου Κωνσταντίνο και Όλγα, τον αδερφό μου Παντελή καθώς και όλα τα άτομα που ήταν δίπλα μου, καθ' όλη την διάρκεια των σπουδών μου για την συνεχή υποστήριξη τους καθώς και την υπομονή, την κατανόηση και την ενθάρρυνση τους.

Συνέδρια

- 1) Anastasios Theodorou, Eirini Papadimitriou, Konstantinos Papakonstantinou, Vasiliki Taki, Alexandra Louka, Costas Papaloukas, Constantine D. Stalikas, Nikolaos Giormezis, Fotini Paliogianni, Justin Stebbing, Panteleimon G. Takis: Automated Quality Control and Enriched Metabolic Information Recovery from Blood ^1H NMR Profiles (Poster), 6th Workshop on Analytical Metabolomics (Thessaloniki, 2025)

Υπό δημοσίευση

- 1) Anastasios Theodorou, Ivan Vučković, Eirini Papadimitriou, Konstantinos Papakonstantinou, Vasiliki Taki, Alexandra Louka, Costas Papaloukas, Constantine D. Stalikas, Nikolaos Giormezis, Fotini Paliogianni, Ian R. Lanza, Justin Stebbing, and Panteleimon G. Takis: Automated blood ionome profiling and “smart” quality control for metabolomics via ^1H NMR.

Μέρος Α: Θεωρητικό Μέρος

Περίληψη

Η παρούσα διπλωματική εργασία εστιάζει στην τεχνική της φασματοσκοπίας NMR και την εφαρμογή της στη μεταβολομική ανάλυση ακριβείας του αίματος, με ιδιαίτερη έμφαση στη μελέτη του EDTA και των συμπλόκων που σχηματίζει με μεταλλικά ιόντα Ca^{2+} , Mg^{2+} και Zn^{2+} .

Παρουσιάζεται η βασική αρχή λειτουργίας του Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού, όπου στηρίζεται στην αλληλεπίδραση του πυρηνικού spin των πρωτονίων με ένα εφαρμοζόμενο εξωτερικό μαγνητικό πεδίο. Αναφέρονται οι κύριες παράμετροι που χαρακτηρίζουν την φασματοσκοπία NMR, όπως είναι η χημική μετατόπιση και η σταθερά σύζευξης. Επιπλέον, γίνεται αναφορά στα πλεονεκτήματα και στα μειονεκτήματα της τεχνικής καθώς και σε κάποιες ειδικές ακολουθίες παλμών, όπως η NOESY και η CPMG. Επιπλέον, γίνεται αναφορά στην πλατφόρμα SMOIESY, η οποία χρησιμοποιείται για την βελτίωση ανάλυσης και της ερμηνείας των φασμάτων.

Η μελέτη εστιάζει αποκλειστικά στο πρωτονιακό μονοδιάστατο (^1H 1D) φάσμα NMR. Στο πλαίσιο της παρούσας ερευνητικής εργασίας εντοπίστηκαν ποιοτικά 13 μεταβολίτες, καθώς και οι χαρακτηριστικές κορυφές του EDTA, τόσο στην ελεύθερη μορφή του όσο και όταν αυτό είναι δεσμευμένο με μεταλλικά ιόντα Ca^{2+} , Mg^{2+} και Zn^{2+} σε δείγματα αίματος. Μέσω των συσχετίσεων που έγιναν μεταξύ των σημάτων αυτών ανά ζεύγη, διαπιστώθηκε ότι η κορυφή της γλυκόζης παρουσιάζει τη καλύτερη συσχέτιση με το σήμα του συμπλόκου Ca-EDTA. Με βάση τη συγκεκριμένη συσχέτιση, αναπτύχθηκε ένας αλγόριθμος αυτόματης πρόβλεψης των χημικών μετατοπίσεων των συμπλόκων του EDTA με τα μεταλλικά ιόντα, συμβάλλοντας στην αυτοματοποίηση της διαδικασίας ανίχνευσης των χημικών μετατοπίσεων και στο έλεγχο ποιότητας (Quality Control, QC) των φασμάτων.

Η τεχνική της φασματοσκοπίας NMR χρησιμοποιείται εκτενώς στη μεταβολομική ανάλυση, όπου η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα των φασμάτων είναι κρίσιμες για την εξαγωγή αξιόπιστων βιολογικών συμπερασμάτων. Στο πλαίσιο αυτό, ο έλεγχος ποιότητας παρουσιάζει καθοριστικό ρόλο, εξασφαλίζοντας ότι οι παρατηρούμενες διαφορές μεταξύ των δειγμάτων οφείλονται σε πραγματικές βιοχημικές μεταβολές από δείγμα σε δείγμα και όχι σε τεχνικά σφάλματα ή παρεμβολές.

Για την επικύρωση του αυτοματοποιημένου αλγορίθμου που αναπτύχθηκε, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές σε μεγάλο αριθμό φασμάτων πλάσματος και ορού αίματος, τόσο από υπάρχουσες βάσεις δεδομένων όσο και από δείγματα που αναλύθηκαν στο εργαστήριο. Τέλος, εφαρμόστηκε η μέθοδος SMOIESY για τον ποσοτικό προσδιορισμό των μεταλλικών ιόντων και τη σχετική ποσοτικοποίηση τους, προσδίδοντας πρόσθετη κλινική αξία στην συνολική ανάλυση.

Abstract

This thesis focuses on the analytical method of Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy, and its application to precision metabolomic analysis of blood, with particular emphasis on the study of EDTA and the complexes it forms with the metallic ions of calcium, magnesium and zinc.

The basic principle of Nuclear Magnetic Resonance is presented, which is based on the interaction between the proton spins and an applied external magnetic field. The main parameters that characterize it, such as chemical shift and coupling constant. Furthermore, the advantages and disadvantages of the technique are discussed, as well as specialized pulse sequences such as NOESY and CPMG. Additionally, reference to the SMoESY platform, used to enhance the spectral analysis.

This study focuses exclusively on one-dimensional proton NMR spectra (^1H 1D). Within the framework of this research, 13 metabolites were qualitatively identified, along with the characteristic peaks of EDTA in both its free form and when complexed with calcium, magnesium, and zinc metal ions in blood samples. Though the correlations made between these signals in pairs, it was found that the glucose peak shows the best correlation with the signal of Ca-EDTA, complex. Based on this correlation, an automated algorithm was developed for the detection of the chemical shifts of EDTA-metal ion complexes, contributing to the automation of the detection process and the correct quality control of the spectra.

NMR is extensively used in metabolomics, where the accuracy and reproducibility of spectra are critical for deriving reliable biological conclusions. In this context, quality control (QC) has a crucial role in ensuring that observed differences between samples are due to true biochemical variations rather than technical artifacts.

To validate the developed automated algorithm, tests were conducted on a large number of plasma and serum blood spectra, using both existing databases and analysed samples in the laboratory. Finally, the SMoESY method was applied to the quantitative determination and relative quantification of metals, providing additional clinical value to the overall analysis.

1. Εισαγωγή

Η παρούσα έρευνα βασίζεται στην χρήση της φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Spectroscopy, NMR) πρωτονίου (^1H), η οποία έχει μια ευρεία χρήση στο τομέα της χημείας, της βιοχημείας και της μεταβολομικής ανάλυσης. Η φασματοσκοπία NMR παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα που είναι ωφέλιμα για τον τομέα της μεταβολομικής.^{1,2} Μερικά από αυτά τα σημαντικά χαρακτηριστικά είναι η υψηλή αναπαραγωγιμότητα, η ποσοτική ακρίβεια, ενώ η χρήση μίας μόνο εσωτερικής αναφοράς αρκεί για την απόλυτη ποσοτικοποίηση όλων των μεταβολιτών στο φάσμα.

Επιπλέον, η φασματοσκοπία NMR επιτρέπει την ταυτοποίηση αγνώστων μεταβολιτών, γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό, δεδομένου ότι οι εξελίξεις στις αναλυτικές τεχνολογίες έχουν επιτρέψει την ανίχνευση ενός αυξανόμενου αριθμού σημάτων σε πολύπλοκα βιολογικά μείγματα, πολλά από τα οποία δεν έχουν ακόμη χαρακτηριστεί. Παράλληλα, η τεχνική αυτή επιτρέπει την ανάλυση άθικτων βιορευστών και ιστών χωρίς την ανάγκη διαχωρισμού ή προετοιμασίας δείγματος, κάτι που είναι σημαντικό δεδομένου ότι οι διαδικασίες προετοιμασίας και διαχωρισμού δειγμάτων συμβάλλουν σημαντικά στην αναλυτική μεταβλητότητα. Επιπρόσθετα, η φασματοσκοπία NMR δεν είναι καταστροφική, γεγονός που σημαίνει ότι το δείγμα παραμένει άθικτο μετά την ανάλυση και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για εκ νέου ανάλυση χρησιμοποιώντας NMR σε μεταγενέστερο χρόνο.

Γενικά, η φασματοσκοπία NMR έχει την ικανότητα να ανιχνεύει μεταβολίτες μέσω ενός ή περισσότερων τύπων ατομικών πυρήνων όπως ^1H , ^{13}C , ^{31}P ή ^{15}N . Ωστόσο, η συγκεκριμένη εργασία επικεντρώνεται αποκλειστικά στη μελέτη των πυρήνων πρωτονίου. Τέλος, η φασματοσκοπία NMR δεν περιλαμβάνει πολύπλοκη επεξεργασία δείγματος πριν ή κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, κάτι που είναι σημαντικό για την ανάλυση μεταβολιτών, ενισχύοντας την αξιοπιστία.³

Έτσι, λόγω των παραπάνω πλεονεκτημάτων μπορούμε να χαρακτηρίσουμε ότι η φασματοσκοπία NMR είναι μια βασική ισχυρή αναλυτική τεχνική καθώς και ένα χρήσιμο εργαλείο για τις μεταβολομικές μελέτες, προσφέροντας μια μη καταστροφική προσέγγιση για τον εντοπισμό και την ποσοτικοποίηση ενός ευρέος φάσματος μεταβολιτών σε βιολογικά δείγματα.³ Ως εκ τούτου, χρησιμοποιείται εκτενώς για την κατανόηση βιοχημικών διεργασιών και την εξαγωγή αξιόπιστων βιολογικών και κλινικών συμπερασμάτων.

Εκτός από τη μεταβολομική, παράλληλα η φασματοσκοπία NMR μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταλλικών ιόντων με χηλικούς παράγοντες, όπως το αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA).⁴ Στην περίπτωση δισθενών κατιόντων, η αντίδραση με το EDTA συνήθως ακολουθεί στοιχειομετρία 1:1, όπου ένα μόριο EDTA δεσμεύει ένα μεταλλικό ιόν.⁵ Η ανάγκη για αναλύσεις υψηλής απόδοσης σε μεγάλης κλίμακας επιδημιολογικές και κλινικές μελέτες καθιστά αναγκαία την ανάπτυξη και εφαρμογή αυτοματοποιημένων μεθόδων ελέγχου ποιότητας και ποσοτικοποίησης.⁵ Οι αυτοματοποιημένες προσεγγίσεις μπορούν να βελτιώσουν την αποτελεσματικότητα και την ακρίβεια της μεταβολομικής ανάλυσης,

καθώς και την αναπαραγωγιμότητα της ποσοτικοποίησης μετάλλων από δεδομένα NMR, ανοίγοντας τον δρόμο για ευρύτερες εφαρμογές στην έρευνα και την κλινική αξία.⁵

Έχουν αναπτυχθεί διάφορα βιοπληροφορικά εργαλεία για τη μερική ή τη πλήρη αυτοματοποίηση της ανάλυσης και της ποσοτικοποίησης σημάτων μεταβολιτών σε δείγματα ούρων και ορού/πλάσματος αίματος. Ενδεικτικά εργαλεία, όπως τα BATMAN,⁶ Bayesil,⁷ AQuA,⁸ ASICS,⁹ και rDolphin,¹⁰ χρησιμοποιούν βάσεις δεδομένων μεταβολιτών όπως οι HMDB (Human Metabolome Database)¹¹ και BMRB (Biological Magnetic Resonance Data Bank)¹² για την εξαγωγή των χαρακτηριστικών ¹H NMR "δακτυλικών αποτυπωμάτων" των μεταβολιτών, τα οποία χρησιμοποιούνται για την αναγνώριση προτύπων στα προφίλ NMR των βιορευστών. Παρ' όλα αυτά τα βιοπληροφορικά εργαλεία, δεν έχει γίνει μέχρι τώρα έρευνα που να εστιάζει στην αυτόματη ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των μεταλλικών ιόντων Ca²⁺, Mg²⁺ και Zn²⁺ μέσω των συμπλόκων τους με το EDTA. Στην παρούσα έρευνα, γίνεται ένα πρώτο βήμα για την ακριβή εύρεση των κορυφών και την ποσοτικοποίηση των μετάλλων αυτών μέσω ενός αυτοματοποιημένου τρόπου σε ένα μεγάλο αριθμό φασμάτων.

Παράλληλα, από τη διαθέσιμη βιβλιογραφία απουσιάζουν μελέτες που να εστιάζουν στην συστηματική και ακριβή απομάκρυνση των σημάτων του EDTA από τα φάσματα NMR. Αντιθέτως, παραμένει ανοιχτό το ερώτημα κατά πόσο η αφαίρεση των σημάτων αυτών είναι επιθυμητή ή αν, υπό προϋποθέσεις, μπορούν να προσφέρουν επιπλέον κλινική και αναλυτική πληροφορία.

Ο ορός αίματος αποτελεί μια εγγενώς πολύπλοκη βιολογική μήτρα, η οποία περιέχει μεγάλο πλήθος μεταβολιτών, πρωτεϊνών, ιχνοστοιχείων και άλλων βιομορίων, τα οποία συμβάλλουν στο τελικό φάσμα NMR.³ Η πολυπλοκότητα αυτή οδηγεί συχνά σε επικάλυψη των σημάτων, καθιστώντας δύσκολη την ανάλυση και τον ακριβή ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό μεμονωμένων ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων των σημάτων από σύμπλοκα μετάλλου-EDTA.³ Επιπλέον, τα σήματα που προέρχονται από το ελεύθερο EDTA μπορούν να επικαλύπτουν σήματα των ενδογενών μεταβολιτών, αυξάνοντας την πολυπλοκότητα της φασματικής ανάλυσης.⁸

Για την αντιμετώπιση αυτών των προκλήσεων, μπορούν να εφαρμοστούν αλγόριθμοι φασματικής αποσυνέλιξης (deconvolution), οι οποίοι επιτρέπουν τον διαχωρισμό των επικαλυπτόμενων σημάτων, βελτιώνοντας την ακρίβεια της ολοκλήρωσης και της ποσοτικοποίησης.³ Επιπλέον, αλγόριθμοι ειδικά σχεδιασμένοι για να μοντελοποιούν και να αφαιρούν τα σήματα που προκύπτουν από το ελεύθερο EDTA μπορούν επίσης να εφαρμοστούν για να βελτιώσουν την ορατότητα και τον ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό των σημάτων μετάλλου-EDTA.⁸

Μια άλλη πρόκληση προκύπτει από τις παρεμβολές όχι μόνο από το EDTA αλλά και από άλλα συστατικά που υπάρχουν στον ορό του αίματος. Το EDTA, που είναι παρόν σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις, μπορεί να παράγει έντονα σήματα που συγκαλύπτουν τους συντονισμούς άλλων μεταβολιτών και πιθανώς των συμπλόκων μετάλλου-EDTA.⁸ Άλλα συστατικά του ορού αίματος μπορούν επίσης να συμβάλλουν στο φασματικό υπόβαθρο και να παρεμβαίνουν στην ακριβή μέτρηση των σημάτων

ενδιαφέροντος.³ Μια πολλά υποσχόμενη λύση για την αντιμετώπιση των παρεμβολών από το EDTA είναι η εφαρμογή αλγορίθμων όπως ο βελτιωμένος AQuA,⁸ οι οποίοι είναι ειδικά σχεδιασμένοι για να παρακολουθούν και να χαρακτηρίζουν τα σήματα από το EDTA και να προσαρμόζουν ανάλογα τη φασματική βιβλιοθήκη για να λάβουν υπόψη αυτές τις παρεμβολές. Επιπλέον, τεχνικές φασματικής επεξεργασίας, οι οποίες χρησιμοποιούν συγκεκριμένες ακολουθίες παλμών NMR για την επιλεκτική καταστολή ανεπιθύμητων σημάτων με βάση τις ιδιότητες χαλάρωσης ή τα μοτίβα σύζευξης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να ελαχιστοποιηθεί ο αντίκτυπος των σημάτων παρεμβολής τόσο από το EDTA όσο και από άλλα συστατικά ορού.¹³

Τέλος, η πολυπλοκότητα της ίδιας της βιολογικής μήτρας αποτελεί πρόκληση για αυτοματοποιημένη ανάλυση. Ο ορός αίματος περιέχει ένα τεράστιο αριθμό συστατικών, καθιστώντας τα φάσματα NMR εξαιρετικά πολύπλοκα και δύσκολα στην αυτόματη ερμηνεία.³ Για να απλοποιηθεί η ανάλυση, μπορούν να υιοθετηθούν στοχευμένες προσεγγίσεις μεταβολομικής που εστιάζουν σε συγκεκριμένα σύμπλοκα μετάλλου-EDTA και στις χαρακτηριστικές φασματικές περιοχές τους.⁵ Εναλλακτικά, ο συνδυασμός της φασματοσκοπίας NMR με άλλες αναλυτικές τεχνικές, όπως η φασματοσκοπία μάζας ή η φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης, μπορεί να παρέχει μια πιο ολοκληρωμένη και αξιόπιστη προσέγγιση για ανάλυση μετάλλων σε ιδιαίτερα πολύπλοκες βιολογικές μήτρες.³

Το EDTA, το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως ως αντιπηκτικός παράγοντας, εμφανίζει χαρακτηριστικές κορυφές στα φάσματα ¹H-NMR που παρεμποδίζουν την ανάκτηση βιοχημικών πληροφοριών για ενδογενείς μεταβολίτες. Αυτό αυξάνει τον κίνδυνο λανθασμένης βιολογικής ερμηνείας, λόγω πιθανής επικάλυψης των σημάτων τους. Η επικάλυψη αυτή μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένη ερμηνεία των δεδομένων, δυσχεραίνει την ανάλυση μεγάλου αριθμού δεδομένων φασμάτων NMR. Συνεπώς, η παρουσία του EDTA και των μεταλλικών συμπλόκων του, καθιστά αναγκαία την εφαρμογή αυστηρών διαδικασιών ποιοτικού ελέγχου, με στόχο τη διασφάλιση της αξιοπιστίας και της ορθής ερμηνείας των φασμάτων NMR.

2. Βασικές Αρχές Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού

2.1 Ορισμός και Επεξήγηση

Η φασματοσκοπία του Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού αποτελεί μία μέθοδο φασματοσκοπίας απορρόφησης, κατά την οποία οι πυρήνες ενός δείγματος τοποθετούνται σε ένα ισχυρό, στατικό και ομογενές μαγνητικό πεδίο και ταυτόχρονα διεγείρονται από ένα δεύτερο ταλαντευόμενο μαγνητικό πεδίο ραδιοσυχνοτήτων (radiofrequency, RF). Κατά την εφαρμογή των παλμών RF, οι πυρήνες απορροφούν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία χαρακτηριστικής συχνότητας, η οποία εξαρτάται τόσο από το είδος του παρατηρούμενου πυρήνα όσο και από το χημικό του περιβάλλον. Μετά την διέγερση, οι πυρήνες επανέρχονται στην κατάσταση ισορροπίας επανεκπέμποντας ενέργεια, η οποία ανιχνεύεται σχηματίζοντας χαρακτηριστικά σήματα που καταγράφονται από ανιχνευτές του φασματόμετρου NMR.

Το αρχικό σήμα που λαμβάνεται από το φασματόμετρο βρίσκεται στο πεδίο του χρόνου ως ελεύθερη επαγωγική απόσβεση (Free Induction Decay, FID) αλλά προκειμένου να μελετηθεί και να είναι δυνατή η φασματοσκοπική ανάλυση μετατρέπεται, με τη χρήση του μετασχηματισμού Fourier (Fourier transform, FT), στο πεδίο της συχνότητας. Το τελικό φάσμα NMR αποτελείται από ένα πλήθος κορυφών, καθεμία από τις οποίες συντονίζεται σε συγκεκριμένο πυρηνικό περιβάλλον.¹⁴

Η φασματοσκοπία NMR βασίζεται στην ανίχνευση πυρήνων με συγκεκριμένες τιμές ιδιοστροφορμής (spin). Συγκεκριμένα, πυρήνες με μη μηδενικές τιμές spin είναι κατάλληλοι για να μελετηθούν με τη μέθοδο NMR, ενώ πυρήνες με μηδενικές τιμές spin δεν ανιχνεύονται με τη συγκεκριμένη μέθοδο. Ενδεικτικά παραδείγματα πυρήνων κατάλληλων για ανάλυση αποτελούν οι ^1H , ^{13}C , ^{15}N και ^{27}Al , ενώ πυρήνες όπως οι ^{12}C , ^{16}O και ^{56}Fe δεν ανιχνεύονται. Οι συχνότεροι πυρήνες που μελετώνται με τη φασματοσκοπία NMR είναι οι ^1H και ^{13}C , λόγω της υψηλής φυσικής αφθονίας και της αυξημένης ευαισθησίας τους.¹⁵

2.1.1 Μαγνητικό Πεδίο και Ανίχνευση Σήματος

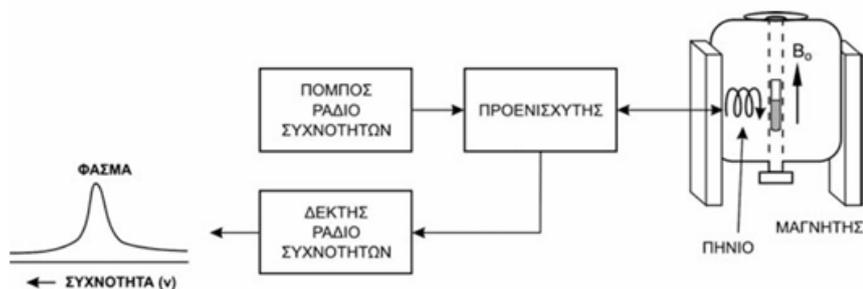
Η λήψη των φασμάτων NMR πραγματοποιείται εντός ισχυρού μαγνητικού πεδίου, το οποίο παράγεται από τον υπεραγωγίμο μαγνήτη του φασματογράφου. Η ένταση του πεδίου καθορίζει τη διακριτική ικανότητα των φασμάτων που λαμβάνονται. Ακόμη, η ομοιογένεια και η σταθερότητα του πεδίου αποτελούν βασικούς παράγοντες για την αξιόπιστη απόδοση της τεχνικής, η οποία επιβεβαιώνεται με την εκπομπή και λήψη μίας δεδομένης συχνότητας αναφοράς.¹⁶

Ο συντονισμός στον οποίο βασίζεται η τεχνική NMR αποτελεί την ταυτόχρονη διέγερση όλων των πυρήνων του δείγματος που μελετάται και επιτυγχάνεται στο τμήμα του φασματογράφου που ονομάζεται αισθητήρας (Probe). Ο αισθητήρας διαθέτει τον απαραίτητο εξοπλισμό (συντονιζόμενα κυκλώματα) για την παραγωγή παλμοσειρών, οι οποίες καλύπτουν το πιθανό εύρος συχνοτήτων ώστε να διεγερθούν όλοι οι παρατηρούμενοι πυρήνες και να γίνει λήψη της κυματομορφής αποδιέγερσης.¹⁶

Τα βασικά βήματα του NMR συνοψίζονται ως εξής:

1. Εισαγωγή του δείγματος σε ένα ομογενές μαγνητικό πεδίο. Οι πυρήνες προσανατολίζονται σύμφωνα με το πεδίο, αποκτώντας συγκεκριμένες ενεργειακές καταστάσεις.
2. Διέγερση των πυρήνων μέσω απορρόφησης ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, προκαλώντας τη διέγερση των πυρήνων και τη μετάβασή τους σε ένα άλλο ενεργειακό επίπεδο.
3. Μετά το τέλος του παλμού RF, οι πυρήνες επιστρέφουν στην ελάχιστη ενεργειακή τους κατάσταση (ισορροπία) και εκπέμπουν ραδιοκύματα (FID). Αυτά τα εκπεμπόμενα ραδιοκύματα ανιχνεύονται από τον φασματογράφο.
4. Επεξεργασία του σήματος, μέσω μετασχηματισμού Fourier, ώστε να παραχθεί το τελικό φάσμα NMR στο πεδίο της συχνότητας.

Τα βήματα αυτά παρουσιάζονται στην Εικόνα 1.¹⁶

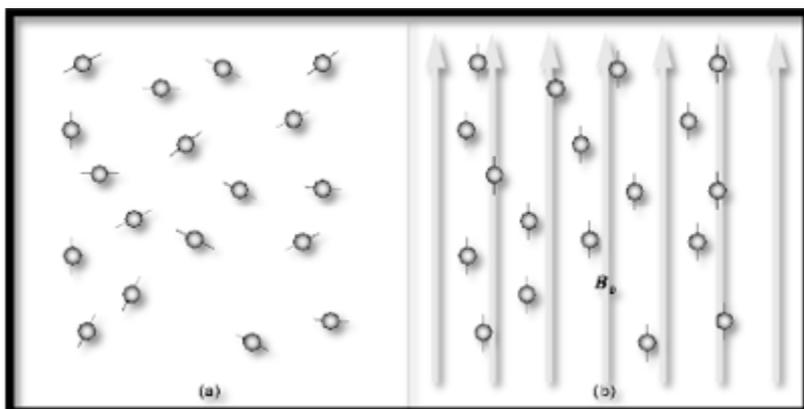


Εικόνα 1: Περιληπτική περιγραφή λήψης φάσματος Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού.

2.2 Αλληλεπίδραση πυρήνων με μαγνητικό πεδίο

2.2.1 Εφαρμογή μαγνητικού πεδίου B_0

Όταν οι πυρήνες βρίσκονται εκτός μαγνητικού πεδίου, τα spin τους κατανέμονται τυχαία σε όλους τους πιθανούς προσανατολισμούς και οι πυρήνες περιστρέφονται γύρω από τον άξονα τους. Ωστόσο, όταν το δείγμα εισαχθεί σε ένα ισχυρό σταθερό ομογενές μαγνητικό πεδίο (B_0), τα spin προσανατολίζονται και ευθυγραμμίζονται είτε παράλληλα είτε αντιπαράλληλα προς την κατεύθυνση του πεδίου B_0 ,¹⁷ δημιουργώντας μια διαφορά ΔE ανάμεσα στα δύο επίπεδα, όπως απεικονίζονται στην Εικόνα 2.



Εικόνα 2: Προσανατολισμός των spin a) Απουσία μαγνητικού πεδίου τα spin των πρωτονίων προσανατολίζονται προς όλες τις πιθανές κατευθύνσεις b) Με παρουσία μαγνητικού πεδίου προσανατολίζονται παράλληλα ή αντιπαράλληλα προς το πεδίο.

Ενεργειακή διαφορά

Η ενεργειακή διαφορά (ΔE) μεταξύ των καταστάσεων spin α και β εξαρτάται γραμμικά από την ισχύ του εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου (B_0) δηλαδή όσο μεγαλύτερη είναι η ισχύς του εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου, τόσο μεγαλύτερη είναι η ΔE , και εκφράζεται από την ακόλουθη σχέση:¹⁸

$$\Delta E = \gamma \hbar B_0$$

όπου:

- γ ο γυρομαγνητικός λόγος του πυρήνα
- \hbar η ανηγμένη σταθερά του Planck

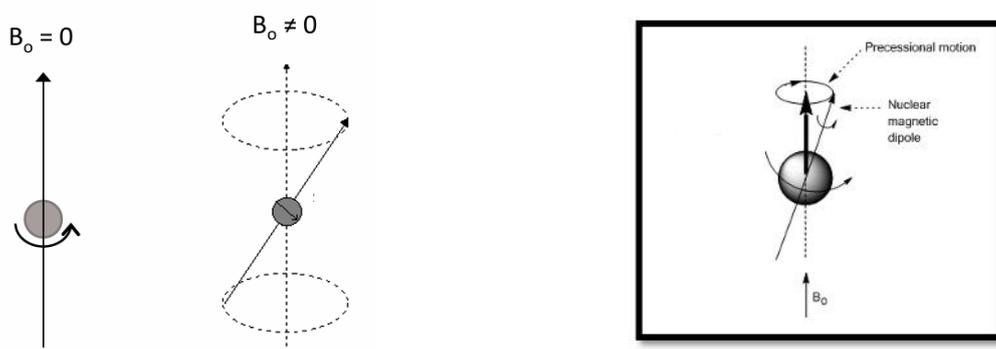
2.2.2 Μετάπτωση Larmor και φαινόμενο συντονισμού

Με την εφαρμογή ενός δεύτερου μαγνητικού πεδίου B_1 (υπό μορφή παλμών RF), ο άξονας περιστροφής του πυρήνα μεταπίπτει γύρω από τη διεύθυνση του ομογενούς πεδίου B_0 , δηλαδή ο άξονας περιστροφής της μαγνητικής ροπής μ εκτελεί περιστροφή γύρω από το B_0 (Εικόνα 3). Η κίνηση αυτή ονομάζεται μετάπτωση Larmor (Larmor precession).¹⁹ Η συχνότητα στην οποία επιτυγχάνεται η ταυτόχρονη διέγερση των πυρήνων, με αποτέλεσμα να συντονίζονται με την εφαρμοσμένη ακτινοβολία, καλείται συχνότητα Larmor και ορίζεται σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\omega_L = \gamma B_0 \text{ (rad/s)}$$

και η αντίστοιχη γραμμική συχνότητα Larmor δίνεται:

$$\nu_L = \frac{\omega_0}{2\pi} = (\gamma/2\pi) B_0 \text{ (Hz)}$$



Εικόνα 3: Αναπαράσταση της κίνησης του πυρήνα όταν $B_0 = 0$ (αριστερά), και όταν $B_0 \neq 0$ όπου φαίνεται ότι το πυρηνικό μαγνητικό δίπολο δεν ευθυγραμμίζεται με το πεδίο B_0 αλλά μεταπίπτει ελαφρώς εκτός του άξονα (δεξιά).

Η κατανομή των πυρήνων μεταξύ των δύο ενεργειακών επιπέδων υπακούει στον νόμο κατανομής Boltzmann.²⁰ Η αναλογία μεταξύ των πληθυσμών στο υψηλότερο (N^-) και χαμηλότερο (N^+) ενεργειακό επίπεδο σε θερμοκρασία δωματίου υπακούει στο νόμο κατανομής Boltzmann, σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\frac{N^-}{N^+} = e^{-\Delta E/kT}$$

όπου:

- ΔE : ενεργειακή διαφορά μεταξύ των δύο ενεργειακών επιπέδων
- k : σταθερά Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23} \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}$)
- T : θερμοκρασία δωματίου

Φαινόμενο Συντονισμού

Όταν σε ένα δείγμα εφαρμοστεί παλμός ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με ενέργεια ακριβώς ίση με την ΔE , οι πυρήνες μεταπιδούν από τον χαμηλότερο στο υψηλότερο ενεργειακό επίπεδο, αυτή η μετάβαση ονομάζεται "αναστροφή" (flipping) των spin. Τα σήματα που εκπέμπονται κατά τη διάρκεια αυτή ανιχνεύονται από το φασματοόμετρο NMR, το οποίο καταγράφει τη συχνότητα μετάβασης των spin σε σχέση με την ένταση τους, δημιουργώντας το φάσμα NMR.^{18,21}

Όταν η συχνότητα της ακτινοβολίας RF ταυτίζεται με τη συχνότητα Larmor, επιτυγχάνεται συντονισμός και η ακτινοβολία απορροφάται από τους πυρήνες:

$$\nu_L = \nu_0 = (\gamma / 2\pi) B_0 \text{ (Hz)}$$

Η ενεργειακή διαφορά σχετίζεται με την ένταση του μαγνητικού πεδίου B_0 μέσω της εξίσωσης:

$$\Delta E = h\nu$$

$$\nu = \gamma / 2\pi B_0$$

$$\Delta E = (h\gamma / 2\pi) B_0 = \gamma \hbar B_0$$

όπου: $\hbar = h/2\pi$ η ανηγμένη σταθερά Planck.

2.3 Χημική Μετατόπιση και Κλίμακα δ

Η χημική μετατόπιση (chemical shift, δ) εκφράζει τη μετατόπιση της συχνότητας συντονισμού ενός πυρήνα στο φάσμα NMR λόγω της ηλεκτρονιακής αλληλεπίδρασης του μοριακού τροχιακού με το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο. Η μετατόπιση αυτή εξαρτάται από το χημικό περιβάλλον του πυρήνα. Τα πρωτόνια που βρίσκονται σε διαφορετικό χημικό περιβάλλον θα παρουσιάζουν και διαφορετικές τιμές χημικής μετατόπισης. Η κλίμακα του φάσματος NMR δείχνει τις διάφορες χημικές μετατοπίσεις του παρατηρούμενου πυρήνα.^{15,22}

Η χημική μετατόπιση ορίζεται ως το πηλίκο της συχνότητας σε Hz του συγκεκριμένου πρωτονίου ως προς τη συχνότητα σε Hz του φασματογράφου NMR που χρησιμοποιείται πολλαπλασιαζόμενο επί 10^6 :

$$\delta = [(\nu_0 - \nu_R) / \nu_R] 10^6$$

όπου: ν_0 η συχνότητα του δείγματος και $\nu_R = \nu_{TMS}$ η συχνότητα προτύπου αναφοράς.

Η χημική μετατόπιση δ είναι αδιάστατο μέγεθος και ανεξάρτητο του οργάνου που χρησιμοποιείται και εκφράζεται σε μονάδες ppm (parts per million) σε σχέση με τη θέση που συνήθως εμφανίζεται η κορυφή απορρόφησης των πρωτονίων του $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ -τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS), στην οποία αυθαίρετα προσδίδεται η τιμή $\delta=0$ ppm. Έτσι, όλες οι άλλες κορυφές εκφράζονται σε σχέση με αυτήν.^{23,24}

Πυρηνική θωράκιση

Για να γίνει κατανοητή η έννοια της χημικής μετατόπισης, πρέπει να αναπτυχθεί ο όρος της πυρηνικής θωράκισης. Εντός ενός μαγνητικού πεδίου έντασης B_0 , όλοι οι πυρήνες πρωτονίου (ή γενικά οι ενεργοί πυρήνες στο NMR) ενός οργανικού μορίου θα έπρεπε

να συντονίζονται στην ίδια συχνότητα. Στην πραγματικότητα όμως αυτό δεν συμβαίνει, γιατί η επίδραση και επομένως η τιμή της έντασης του μαγνητικού πεδίου φθάνει σε κάθε πυρήνα διαφοροποιημένη. Αυτό γίνεται κατανοητό, αν ληφθεί υπόψη, ότι στο εξωτερικό μαγνητικό πεδίο B_0 αντιτίθεται ένα μικρότερου μεγέθους μαγνητικό πεδίο έντασης B_1 που επάγεται από την κίνηση των ηλεκτρονίων σθένους (Εικόνα 4).¹⁵

Η ένταση του πεδίου B_1 σχετίζεται με την ένταση του πεδίου B_0 και δίνεται από τη σχέση:

$$B_1 = \sigma B_0$$

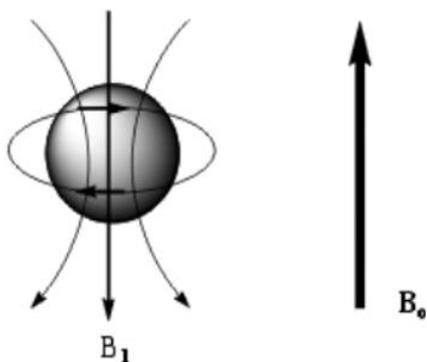
όπου: σ είναι η σταθερά θωράκισης (ή προάσπισης/προστασίας) του πυρήνα. Η σταθερά σ εξαρτάται από το ηλεκτρονιακό περιβάλλον του πυρήνα.¹⁵

Έτσι, κάθε ενεργός πυρήνας στο μόριο, ο οποίος μελετάται με την τεχνική του NMR, δέχεται διαφορετική αποτελεσματική ένταση πεδίου (B_{eff}), η οποία εκφράζεται από τη σχέση:

$$B_{eff} = B_0 - B_1$$

$$B_{eff} = B_0 (1 - \sigma)$$

Πυρήνες με υψηλή σ είναι περισσότερο θωρακισμένοι και εμφανίζονται σε υψηλότερα πεδία (δηλαδή χαμηλότερες τιμές δ), ενώ πυρήνες με χαμηλή τιμή σ είναι αποθωρακισμένοι και εμφανίζονται σε χαμηλότερα πεδία (υψηλότερες τιμές δ).



Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση δυναμικών μαγνητικών γραμμών ηλεκτρονίων σθένους τα οποία κινούνται κάθετα προς την ένταση του μαγνητικού πεδίου B_0 .

Η χημική μετατόπιση είναι ανεξάρτητη του φασματογράφου που χρησιμοποιείται, όπως έχει ήδη αναφερθεί. Αν αντίθετα, ως μονάδα μέτρησης της χημικής μετατόπισης χρησιμοποιούνται το Hz, τότε η χημική μετατόπιση ενός συγκεκριμένου πρωτονίου θα ήταν διαφορετική στα διάφορα NMR όργανα επειδή η συχνότητα απορρόφησης είναι συνάρτηση της έντασης του μαγνητικού πεδίου B_0 .

Παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν τη Χημική Μετατόπιση – Η θέση των σημάτων NMR

Όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως η χημική μετατόπιση αποτελεί θεμελιώδη παράμετρο της φασματοσκοπίας NMR που αντανακλά το ηλεκτρικό περιβάλλον των

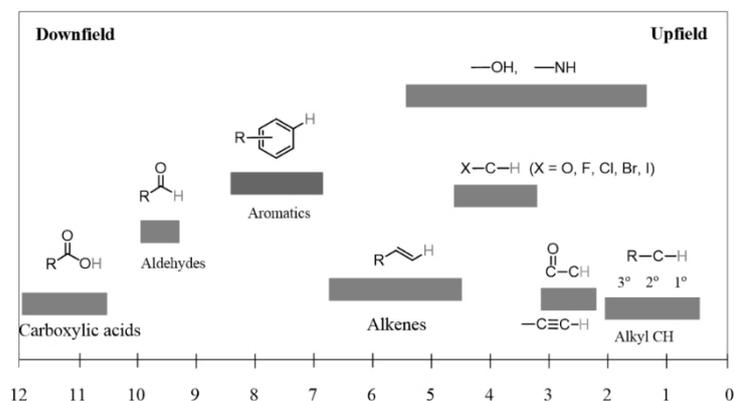
πυρήνων και συνεπώς τη μοριακή δομή των ενέσεων. Οι κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν την χημική μετατόπιση είναι: ²⁵⁻²⁷

- **Επαγωγικό φαινόμενο- Ηλεκτραρνητικότητα:** Τα ηλεκτροαρνητικά άτομα μειώνουν την ηλεκτρονιακή πυκνότητα γύρω από τον πυρήνα, προκαλώντας αποθωράκιση και μετατόπιση προς χαμηλότερα πεδία (δηλαδή υψηλότερες τιμές δ (ppm)). Αντίθετα τα ηλεκτροθετικά προκαλούν θωράκιση και μετατόπιση σε χαμηλότερες τιμές δ (ppm).^{28,29}
- **Μαγνητική ανισοτροπία -Αρωματικότητα:** Η συμμετρική κατανομή ηλεκτρονιακών νεφών στους διπλούς και τριπλούς δεσμούς καθώς και οι αρωματικοί δακτύλιοι δημιουργούν ισχυρά διπολικά μαγνητικά πεδία που επηρεάζουν σημαντικά τη χημική μετατόπιση γειτονικών πυρήνων.^{28,29}
- **Στερεοχημικοί Παράγοντες (Van der Waals):** Η χημική μετατόπιση εξαρτάται επίσης από της επίδραση ογκωδών πλευρικών ομάδων λόγω χωρικών αλληλεπιδράσεων, προκαλώντας μικρές μετατοπίσεις στη θέση των σημάτων, μειώνεται η θωράκιση και αυξάνοντας την χημική μετατόπιση.²⁸
- **Υβριδισμός του ατόμου άνθρακα (Sp , $Sp2$, $Sp3$):** Η υβριδοποίηση του άνθρακα που συνδέεται με τον πυρήνα υδρογόνου επηρεάζει τη θέση των ηλεκτρονίων και επομένως τη θωράκιση των πρωτονίων, με μεγαλύτερη αποθωράκιση (υψηλές τιμές δ) συνήθως στα Sp .²⁸
- **Συγκέντρωση και θερμοκρασία:** Αλλαγές στη θερμοκρασία ή στην συγκέντρωση δειγμάτων μπορούν να επηρεάσουν την κινητικότητα των μορίων και τη σταθερότητα δεσμών, ιδιαίτερα σε πρωτόνια που μπορούν να σχηματίσουν δεσμούς υδρογόνου, προκαλώντας μεταβολές στις τιμές των χημικών μετατοπίσεων.
- **Δεσμοί υδρογόνου:** Ο σχηματισμός δεσμών υδρογόνου προκαλεί σημαντική μετατόπιση προς χαμηλότερα πεδία (υψηλότερες τιμές δ) λόγω μείωσης της ηλεκτρονιακής πυκνότητας.²⁸

Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων για τις πιο συνηθισμένες λειτουργικές ομάδες σε μόρια καθώς και στην εικόνα 5 απεικονίζονται οι χημικές μετατοπίσεις χαρακτηριστικών ενώσεων.²⁶

Πίνακας 1: Τιμές δ (ppm) χαρακτηριστικών ομάδων σε μόρια.

Τύποι λειτουργικών ομάδων	τιμή δ (ppm)
Αμίνες	1-5
Αλκοόλες	1-5.5
Καρβονύλιο	2-2.7
Αιθέρας	3.3-4
Αλκένιο	4,5-7,5
Αρωματικοί δακτύλιοι	6-9
Αλδεΐδες	9-10



Εικόνα 5: Απεικόνιση χημικών μετατοπίσεων χαρακτηριστικών ενώσεων.

Από τα παραπάνω γίνεται σαφές ότι η χημική μετατόπιση αποτελεί θεμελιώδη παράμετρο της φασματοσκοπίας NMR, καθώς αντανακλά με ακρίβεια το ηλεκτρονιακό περιβάλλον και συνεπώς τη δομή του μορίου. Η κατανόηση των παραγόντων που την επηρεάζουν είναι απαραίτητη για τη σωστή ερμηνεία των φασμάτων NMR και την σωστή ταυτοποίηση των ενώσεων.²²

2.4 Σύζευξη spin-spin - Σταθερά σύζευξης J coupling

Οι πυρήνες που βρίσκονται στο ίδιο χημικό περιβάλλον ή εμφανίζουν την ίδια χημική μετατόπιση ονομάζονται ισοδύναμοι. Ενώ, αντίστοιχα οι πυρήνες που βιώνουν διαφορετικό περιβάλλον ή έχουν διαφορετική χημική μετατόπιση ονομάζονται μη ισοδύναμοι. Όταν δύο μη ισοδύναμοι πυρήνες βρίσκονται σε κοντινή απόσταση, ασκούν αμοιβαία επίδραση στα αποτελεσματικά μαγνητικά τους πεδία. Αυτή η αλληλεπίδραση ονομάζεται spin-spin ή σύζευξη J (J coupling), και εκφράζει το μέγεθος της μαγνητικής αλληλεπίδρασης μεταξύ δύο πυρήνων.^{20,30} Το φαινόμενο αυτό εμφανίζεται στα φάσματα NMR μέσω διάσπασης των κορυφών σε πολλαπλές υποκορυφές (multiplets) που αντανακλούν τη χωρική και στερεοχημική δομή ενός μορίου.³⁰⁻³²

Οι συζεύξεις J μπορούν να διακριθούν σε ομοπυρηνικές όταν συμβαίνουν μεταξύ ίδιου στοιχείου και ετεροπυρηνικές αν συμβαίνουν μεταξύ διαφορετικών στοιχείων. Η απόσταση μεταξύ των επιμέρους κορυφών αποτελεί τη σταθερά σύζευξης J και παραμένει σταθερή αποτελώντας ιδιαίτερο χαρακτηριστικό κάθε χημικής ένωσης.³³ Η σταθερά σύζευξης J (Scalar Coupling J), εκφράζει το μέτρο της αλληλεπίδρασης μεταξύ δύο μαγνητικών ενεργών πυρήνων και μετριέται σε Hz. Η αλληλεπίδραση αυτή οφείλεται στη μετάδοση του μαγνητικού αποτελέσματος του spin ενός πυρήνα προς τους γειτονικούς πυρήνες μέσω των ενδιάμεσων ηλεκτρονίων.²⁰ Η σύζευξη spin-spin δεν εξαρτάται από την ένταση του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου (B_0), αλλά εξαρτάται από τη σχετική θέση και τη γεωμετρική διάταξη των πυρήνων, οπότε είναι χαρακτηριστική της κάθε ένωσης.^{31,34}

Για να είναι εμφανής η σύζευξη spin-spin ή σύζευξη J (J coupling), η απόσταση μεταξύ των μη ισοδύναμων πυρήνων πρέπει να είναι μικρότερη ή ίση με τρεις δεσμούς.

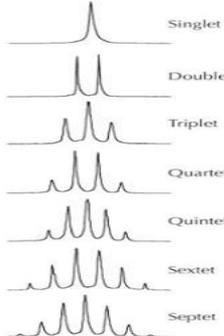
2.4.1 Πολλαπλότητα και κανόνας n+1

Η πολλαπλότητα ενός σήματος μπορεί να προβλεφθεί χρησιμοποιώντας τον κανόνα (n+1), όπου το n αντιπροσωπεύει τον αριθμό των ισοδύναμων γειτονικών πρωτονίων.^{18,35,36} Αυτός ο κανόνας εκφράζεται μαθηματικά ως:

$$\text{Πολλαπλότητα} = n + 1$$

Για να βρούμε την πολλαπλότητα μπορούμε ως εργαλείο να χρησιμοποιήσουμε το τρίγωνο του Pascal. Το τρίγωνο του Pascal (Εικόνα 6), είναι ένα αριθμητικό μοτίβο που εφευρέθηκε από τον διάσημο Γάλλο μαθηματικό, το Blaise Pascal,³⁷ το οποίο περιγράφει την ένταση των υποκορυφών αυτών, με τις σχετικές αναλογίες των κορυφών να ακολουθούν τους αριθμούς του τριγώνου σε σχέση με το πλήθος των γειτονικών πρωτονίων. Στην Εικόνα 7 απεικονίζονται οι τιμές των J κάποιων χαρακτηριστικών ενώσεων.³⁸

n	2 ⁿ	Multiplet Intensities - Pascal's triangle	
0	1	1	Singlet (s)
1	2	1 1	Doublet (d)
2	4	1 2 1	Triplet (t)
3	8	1 3 3 1	Quartet (q)
4	16	1 4 6 4 1	Pentet
5	32	1 5 10 10 5 1	Sextet
6	64	1 6 15 20 15 6 1	Septet
7	128	1 7 21 35 35 21 7 1	Octet
8	256	1 8 28 56 70 56 28 8 1	Nonet



Εικόνα 6: Απεικόνιση του τριγώνου του Pascal.

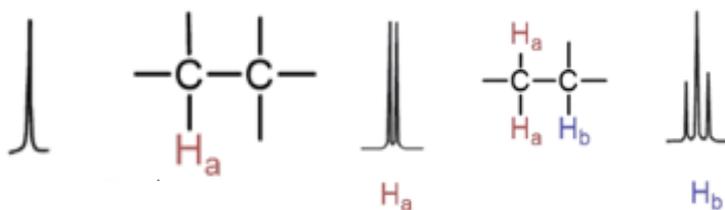
Structural Type	J (Hz)	Structural Type	J (Hz)
	0 (unless in a rigid ideal orientation)		12 to 18
	6 to 8		7 to 12
	5 to 7		0.5 to 3
	2 to 12 (depends on dihedral angle and the nature of X and Y)		3 to 11 (depends on dihedral angle)
	0.5 to 3		2 to 3
	12 to 15 (must be diastereotopic)		o 6 to 9 m 1 to 3 p 0 to 1

Εικόνα 7: Χαρακτηριστικές τιμές σταθερών σύζευξης J.

Παραδείγματα πολλαπλότητας^{30,36} (Εικόνα 8):

- Απλή κορυφή (singlet): όταν δεν υπάρχουν γειτονικά πρωτόνια.
- Διπλή κορυφή (doublet): όταν υπάρχει ένα γειτονικό πρωτόνιο.

- Τριπλή κορφή (triplet): όταν υπάρχουν δύο γειτονικά πρωτόνια.



Εικόνα 8: Απεικόνιση απλών παραδειγμάτων πολλαπλότητας.

Έτσι, η σύζευξη spin-spin αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά της φασματοσκοπίας NMR, καθώς παρέχει πολύτιμες πληροφορίες για τη γεωμετρία, τη στερεοχημεία ενός μορίου. Η ανάλυση της πολλαπλότητας των σημάτων και των σταθερών σύζευξης επιτρέπει την ακριβή ταυτοποίηση των διαφόρων χημικών περιβαλλόντων και την δομική αποσαφήνιση πολύπλοκων οργανικών ενώσεων.

2.5 Επεξεργασία δεδομένων NMR

Γενικά, η επεξεργασία των δεδομένων NMR αποτελεί κρίσιμο στάδιο για την εξαγωγή αξιόπιστων και ακριβών αποτελεσμάτων. Η ορθή ρύθμιση συγκεκριμένων παραμέτρων είναι απαραίτητη, ώστε να εξασφαλιστεί η σωστή απεικόνιση, ερμηνεία και ποσοτική ανάλυση των φασμάτων. Για τον λόγο αυτό πρέπει να γίνουν κάποια βήματα επεξεργασίας, ώστε να λάβουμε ένα τελικό εύκολα αναγνωρίσιμο και ποσοτικά αξιόπιστο φάσμα NMR.^{17,39}

Οι βασικοί παράμετροι που ρυθμίζονται πριν την εφαρμογή του μετασχηματισμού Fourier είναι:

- **Εφαρμογή φίλτρου (windowing):** Αρχικά εφαρμόζεται ένα φίλτρο στον αριθμό χρονικών σημείων (Time Domain, TD) για τη βελτίωση τόσο της ανάλυσης του φάσματος όσο και την αύξηση του λόγου S/N (θόρυβο).
- **Προσθήκη μηδενικών σημείων (zero filling):** Είναι σημαντικό μετά την εφαρμογή του φίλτρου να προστεθούν μηδενικά σημεία στην FID. Βασική προϋπόθεση είναι στο τέλος του χρόνου λήψης του φάσματος η FID να φθίνει μέχρι περίπου το μηδέν, ώστε να επιτυγχάνεται βέλτιστη ψηφιακή ανάλυση στο τελικό φάσμα.

Αντίστοιχα, οι παράμετροι που ρυθμίζονται μετά την εφαρμογή του μετασχηματισμού Fourier είναι:

- **Διόρθωση φάσης φάσματος (phase correction):** Είναι εξίσου σημαντική παράμετρος, καθώς η εσφαλμένη διόρθωση φάση σημάτων οδηγεί τελικά σε λανθασμένους υπολογισμούς συγκεντρώσεων του δείγματος στην ποσοτική ανάλυση. Η διόρθωση φάσης προτείνεται να πραγματοποιείται χειροκίνητα, καθώς στην αυτόματη διόρθωση συχνά παρατηρούνται παραμορφώσεις ειδικά σε σήματα χαμηλής έντασης.
- **Διόρθωση γραμμής βάσης φάσματος (baseline correction):** Η διόρθωση της γραμμής της βάσης στο φάσμα πρέπει να γίνεται ώστε να μην υπάρξουν

λανθασμένες ολοκληρώσεις των περιοχών κάτω από τις κορυφές και συνεπώς λανθασμένα ποσοτικά αποτελέσματα. Γενικά, προτιμάται η αυτόματη διόρθωση καθώς διεξάγεται ευκολότερα από την χειροκίνητη, ωστόσο εξαρτάται από το είδος του δείγματος καθώς κάποιες φορές, η χειροκίνητη μπορεί να παρέχει καλύτερα αποτελέσματα.

- **Ολοκλήρωση κορυφών σημάτων συντονισμού (integration):** Αποτελεί ένα από τα πιο κρίσιμα στάδια της ποσοτικής φασματοσκοπίας NMR (qNMR), καθώς το εμβαδόν κάτω από κάθε κορυφή είναι ανάλογο του αριθμού των πυρήνων που την παράγουν. Για ακριβή ολοκλήρωση, η περιοχή ολοκλήρωσης θα πρέπει θεωρητικά να επεκταθεί στο άπειρο και προς τις δύο κατευθύνσεις.
- **Μαθηματική ανάλυση συνιστωσών κορυφών συντονισμού / Μαθηματική εξομοίωση γραμμών φάσματος (deconvolution / line-fitting):** Είναι μια διαδικασία που εφαρμόζεται ώστε να καθοριστεί το ποσοστό συνεισφοράς μιας κορυφής του φάσματος στη συνολική περιοχή του φάσματος, επιτρέποντας την απομόνωση επιμέρους συνιστωσών και τη βελτίωση της ακρίβειας της ανάλυσης.

Εκτός από τις προαναφερθείσες παραμέτρους, σημαντικό ρόλο για την ορθή διεξαγωγή του πειράματος NMR και για την λήψη ακριβούς και αξιόπιστου αποτελέσματος είναι και ορισμένοι φυσικοχημικοί παράμετροι όπως: το pH του δείγματος, η ιοντική ισχύς, οι συνθήκες αποθήκευσης των δειγμάτων, η συγκέντρωση του αναλύτη και των ενώσεων αναφοράς, η διαλυτότητα του αναλύτη αλλά και η χημική αλληλεπίδραση μεταξύ του αναλύτη και των ενώσεων αναφοράς.

2.6 Μετασχηματισμός Fourier

Ο μετασχηματισμός Fourier είναι μια μαθηματική τεχνική για την μετατροπή δεδομένων του πεδίου του χρόνου σε δεδομένα του πεδίου συχνότητας και αντίστροφα. Στην φασματοσκοπία NMR, χρησιμοποιείται για τη μετατροπή του σήματος που λαμβάνεται από την ανίχνευση των πυρήνων του σήματος FID σε ένα φάσμα NMR που εκφράζεται σε συνάρτηση του χρόνου, σε ένα φάσμα που εκφράζεται σε συχνότητες (Εικόνα 9). Με αυτόν τον τρόπο, το σήμα NMR γίνεται πιο εύκολα αναλύσιμο και μπορούμε να ταυτοποιήσουμε τις ενώσεις με μεγαλύτερη ευκολία.²⁰

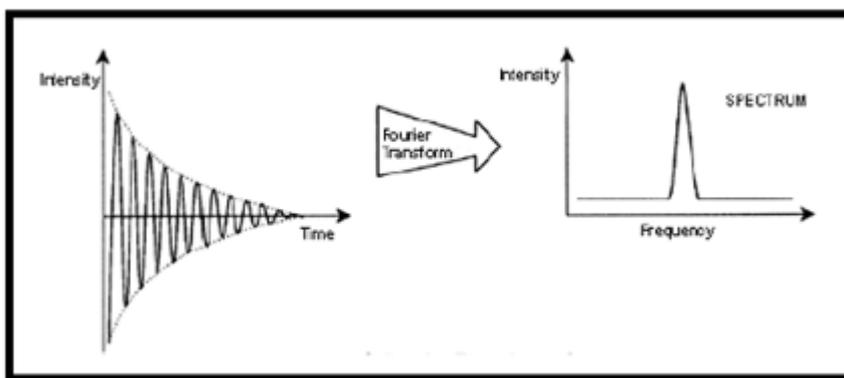
Ο μετασχηματισμός Fourier ορίζεται από το ολοκλήρωμα:

$$f(x) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t)e^{-iwt} dt$$

$$f(w) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t)[\cos(wt) - i\sin(wt)] dt$$

όπου:

- $f(t)$, το σήμα στο πεδίο του χρόνου
- $f(w)$, το σήμα στο πεδίο της συχνότητας



Εικόνα 9: Μετασχηματισμός Fourier του σήματος FID που βρίσκεται στο πεδίο του χρόνου στο φάσμα NMR που βρίσκεται στο πεδίο της συχνότητας.

Η εφαρμογή του μετασχηματισμού Fourier καθιστά το σήμα NMR πιο εύκολα στην ανάλυση του και επιτρέπει την εξαγωγή κρίσιμων πληροφοριών για τη δομή και τη χημική σύσταση του δείγματος.

2.7 Μονοδιάστατη φασματοσκοπία πρωτονίου ^1H - NMR 1D NMR

Το φάσμα ^1H NMR αποτελεί ένα ομοπυρηνικό πείραμα, στο οποίο καταγράφονται οι συχνότητες συντονισμού των πρωτονίων ενός δείγματος.⁴⁰ Το φάσμα διαθέτει ένα οριζόντιο άξονα, όπου παρουσιάζονται κορυφές, οι οποίες αντιστοιχούν στις τιμές συντονισμού για κάθε άτομο πρωτονίου που υπάρχει στο δείγμα. Συγκεκριμένα, το κάθε άτομο πρωτονίου ανάλογα με τη θέση που βρίσκεται στο μόριο, αλλά και το περιβάλλον γύρω από αυτό, διαθέτει και την αντίστοιχη χημική μετατόπιση. Το περιβάλλον (ομάδες, δεσμοί) επηρεάζουν αισθητά τη τιμή συντονισμού κάθε ατόμου, με αποτέλεσμα αρκετές φορές η ταυτοποίηση κάθε κορυφής συγκεκριμένων ατόμων πρωτονίου να είναι ευδιάκριτη.⁴¹ Παράλληλα το φάσμα ^1H NMR, παρέχει την δυνατότητα ολοκλήρωσης κάθε κορυφής. Συγκεκριμένα, η ολοκλήρωση κάθε κορυφής του φάσματος υποδηλώνει την αναλογία του αριθμού των πρωτονίων που προκαλούν την αντίστοιχη κορυφή. Σύμφωνα με τον νόμο του Beer η περιοχή κάτω από κάθε κορυφή είναι ανάλογη με την ποσότητα ενέργειας που απορροφάται ή μεταδίδεται και είναι ανάλογη με τον αριθμό των ατόμων πρωτονίου που δημιουργούν το αντίστοιχο σήμα. Μέσω αυτής της τεχνικής διαπιστώνεται ο σχετικός αριθμός ατόμων πρωτονίου που αντιστοιχούν σε αυτήν την κορυφή.¹⁸ Ωστόσο, ένα σημαντικό μειονέκτημα που παρατηρείται στα φάσματα αυτά είναι η αλληλοεπικάλυψη των κορυφών συντονισμού με αποτέλεσμα να μην είναι ξεκάθαρη η αναγνώριση τους.

2.7.1 Χαρακτηριστικά των σημάτων στο ^1H NMR

Στη φασματοσκοπία NMR τα παρατηρούμενα σήματα διαθέτουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά τα οποία είναι ο αριθμός, η θέση, η ένταση και η σχάση τα οποία δίνουν συγκεκριμένες πληροφορίες.²³ Συγκεκριμένα στην πρωτονιακή φασματοσκοπία υδρογόνου ^1H NMR:

- Η θέση (χημική μετατόπιση) των σημάτων δείχνει πόσο είναι προστατευμένος ή αποπροστατευμένος ένας πυρήνας πρωτονίου.

- Ο αριθμός των σημάτων δείχνει πόσα διαφορετικά είδη πρωτονίων βρίσκονται στην ένωση.
- Η ένταση των σημάτων δείχνει τον αριθμό πρωτονίων του ίδιου τύπου.
- Η σχάση των σημάτων δείχνει τον αριθμό των πρωτονίων σε γειτονικά άτομα.

2.8 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα του NMR

Η φασματοσκοπία NMR αποτελεί μία από τις πλέον ισχυρές και ευέλικτες αναλυτικές τεχνικές της σύγχρονης επιστήμης, με ευρεία εφαρμογή στη χημεία, την βιοχημεία, την φαρμακευτική τα υλικά, την μεταβολομική κ.α.

Ωστόσο, όπως κάθε πειραματική μέθοδος χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα έτσι και η φασματοσκοπία NMR παρουσιάζει ποικίλα από αυτά.^{1,42,43 42-45}

Πλεονεκτήματα:

- Μη καταστροφική τεχνική: Η φασματοσκοπία NMR επιτρέπει τη μελέτη δειγμάτων χωρίς να καταστρέφει ή να επηρεάζει χημικά και φυσικά τα δείγματα, γεγονός που την καθιστά ιδανική για πολύτιμα, σπάνια ή ευαίσθητα δείγματα.
- Επαναχρησιμοποίηση δείγματος: Το δείγμα μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί, γεγονός που καθιστά τη μέθοδο ιδανική για πολύτιμα ή περιορισμένα δείγματα, όπως είναι και τα βιολογικά υγρά.
- Πλούσια και πολυδιάστατη πληροφορία: Η NMR παρέχει ποιοτικές και ποσοτικές πληροφορίες για τη δομή, την στερεοχημεία, τη δυναμική και τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις.
- Ποσοτική και ποιοτική ανάλυση: Η φασματοσκοπία NMR μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο για ποιοτικό προσδιορισμό (ταυτοποίηση ενώσεων) όσο και για ποσοτικό προσδιορισμό (υπολογισμός συγκεντρώσεων), λόγω της αναλογικότητας μεταξύ του εμβαδού των κορυφών και του αριθμού των πυρήνων που τις παράγουν.
- Ευρεία εφαρμογή σε πολλά επιστημονικά πεδία: Εφαρμόζεται σε ανάλυση τροφίμων, φαρμάκων, περιβάλλοντος καθώς και στην μεταβολομική.
- Συμβατότητα για πολλούς τύπους δειγμάτων: Μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε υγρά, στερεά, ιστούς, αέρια δείγματα
- Υψηλή αναπαραγωγιμότητα: Τα αποτελέσματα της είναι εξαιρετικά σταθερά και αναπαραγώγιμα, καθιστώντας την ως μια αξιόπιστη τεχνική.
- Εύκολη και οικονομική προετοιμασία δειγμάτων: Συνήθως απαιτείται ελάχιστη προετοιμασία πριν την ανάλυση χωρίς χημικές τροποποιήσεις ή πολύπλοκες διαδικασίες καθαρισμού.

Μειονεκτήματα:

- Χαμηλή ευαισθησία: Η NMR παρουσιάζει χαμηλή ευαισθησία σε ανεπαρκείς συγκεντρώσεις δειγμάτων.
- Υψηλό κόστος εξοπλισμού.
- Απαιτεί εξειδίκευση, τεχνογνωσία και ερμηνεία.
- Ορισμένα πειράματα είναι χρονοβόρα.

3. Μέθοδοι NOESY και CPMG

Στη μεταβολομική ανάλυση βιολογικών δειγμάτων χρησιμοποιούνται ευρέως μονοδιάστατες φασματοσκοπικές παλμικές ακολουθίες (1D) για την ανίχνευση πρωτονίων (^1H), λόγω της υψηλής αναπαραγωγιμότητας, της ευκολίας χρήσης και της υψηλής απόδοσης.³ Δύο από τις πλέον πιο κοινές μέθοδοι είναι οι ακόλουθες:

- 1D NOESY (Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy)
- CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill)

Οι ακολουθίες αυτές εξυπηρετούν διαφορετικούς αναλυτικούς σκοπούς και έχουν διαφορετικά πλεονεκτήματα ανάλογα με τη φύση του βιολογικού δείγματος που εξετάζεται.^{46,47}

3.1 Μέθοδος 1D NOESY: Μηχανισμός και Εφαρμογές

Η μέθοδος 1D NOESY αποτελεί την προτιμότερη επιλογή για την μεταβολομική ανάλυση δειγμάτων με χαμηλή περιεκτικότητα σε μακρομόρια, όπως τα ούρα, τα κυτταρικά εκχυλίσματα και τα εκχυλίσματα ιστών. Ο κύριος σκοπός της μεθόδου 1D NOESY presat είναι η αποτελεσματική καταστολή του σήματος του νερού μέσω προκορεσμού, επιτρέποντας την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών χαμηλού μοριακού βάρους.

3.2 Μέθοδος CPMG: Φίλτρο T_2 , για καταστολή μακρομορίων

Η ακολουθία Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) χρησιμοποιείται ευρέως ως φίλτρο χαλάρωσης T_2 για την καταστολή σημάτων που προέρχονται από μακρομόρια, όπως πρωτεΐνες και λιπίδια. Η ιδιότητα αυτή την καθιστά ιδανική για την ανάλυση σύνθετων και πολύπλοκων βιολογικών δειγμάτων όπως ο ορός και το πλάσμα αίματος, τα οποία χαρακτηρίζονται από υψηλές συγκεντρώσεις μακρομοριακών συστατικών.⁴⁸

3.2.1 Μηχανισμός δράσης της CPMG

Η μέθοδος CPMG βασίζεται στην εφαρμογή μιας διαδοχικής σειράς παλμών 180° , που προκαλούν την εστίαση εκ νέου του μαγνητισμού, δημιουργώντας ηχώ σημάτων. Τα μακρομόρια, λόγω των σύντομων χρόνων χαλάρωσης T_2 που παρουσιάζουν, υφίστανται μεγαλύτερη απώλεια σήματος κατά τη διάρκεια της ακολουθίας παλμών, ενώ οι μικροί μεταβολίτες με μεγαλύτερους χρόνους T_2 , διατηρούν την ένταση των σημάτων τους.^{47,48}

4. SMolESY-Small Molecule Enhancement Spectroscopy (SMolESY)

Η πλατφόρμα SMolESY αποτελεί μια επικυρωμένη υπολογιστική μέθοδο, η οποία χρησιμοποιεί αποκλειστικά το τυπικό πείραμα ^1H 1D NMR για την εξαγωγή βελτιωμένων φασμάτων αυξημένης διακριτικής ικανότητας από δείγματα που είναι πλούσια σε μακρομόρια, όπως είναι ο ορός και το πλάσμα αίματος.

Η μέθοδος SMolIESY διατηρεί αναλλοίωτα τόσο τα ποιοτικά όσο και τα ποσοτικά χαρακτηριστικά του αρχικού πειράματος, ενώ παράλληλα εφαρμόζεται μια μαθηματική επεξεργασία στο φάσμα, καταστέλλοντας τα σήματα των μακρομορίων που υπάρχουν στο δείγμα μας, ενισχύοντας παράλληλα τα σήματα των μικρών μορίων. Αυτή η καταστολή των σημάτων οδηγεί σε αύξηση της διακριτικής ικανότητας, επιτρέποντας την ανίχνευση μεταβολιτών που δεν διακρίνονται ή διακρίνονται ελάχιστα στα αρχικά φάσματα. Επιπλέον, η πλατφόρμα επιτρέπει την άμεση ολοκλήρωση των παραγόμενων κορυφών χωρίς την ανάγκη πολύπλοκης αποσύνθεσης σημάτων ή προσαρμογής γραμμής βάσης, μειώνοντας παράλληλα σημαντικά τον υπολογιστικό χρόνο. Το αποτέλεσμα της πλατφόρμα SMolIESY είναι η παραγωγή φασμάτων με βελτιωμένη διακριτική ικανότητα για την ευκολότερη ολοκλήρωση των σημάτων των μεταβολιτών σε σύνθετα βιολογικά δείγματα, διατηρώντας αναλλοίωτα τα ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά του αρχικού φάσματος.^{49,50}

5. Μέταλλα

Τα μέταλλα αποτελούν ευρέως διαδεδομένα χημικά στοιχεία στη φύση και είναι προφανές ότι πολλά από αυτά θα βρίσκονται και στον ανθρώπινο οργανισμό. Από τα μεταλλικά στοιχεία, άλλα είναι κύρια και βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις (συνήθως χαρακτηρίζονται ως μακροστοιχεία) όπως το Ca, K, Na και Mg, ενώ άλλα είναι δευτερεύοντα ή ιχνοστοιχεία (χαρακτηρίζονται μικροστοιχεία) όπως ο Fe, Zn, Cu, Co κ.α.⁵¹

Βιολογικός ρόλος των μετάλλων ασβεστίου μαγνησίου και ψευδαργύρου

Ασβέστιο: Το ασβέστιο αποτελεί το πλέον άφθονο μέταλλο στον ανθρώπινο οργανισμό, αντιπροσωπεύοντας περίπου το 1,5-2 % του σωματικού βάρους. Μαζί με το φώσφορο συμμετέχει καθοριστικά στη δομή των οστών και των δοντιών, ενώ παράλληλα συνεργάζεται με το μαγνήσιο για τη σωστή καρδιαγγειακή λειτουργία. Η έλλειψη του ασβεστίου χαρακτηρίζεται ως υποασβεσταιμία και προκαλεί νευρομυικές διαταραχές και καρδιακές ανωμαλίες. Ενώ, η αυξημένη συγκέντρωση του ασβεστίου στο αίμα ονομάζεται υπερασβεστιαμία και μπορεί να προκαλέσει νεφρική ανεπάρκεια καθώς και πέτρα στα νεφρά.^{4,51}

Μαγνήσιο: Το μαγνήσιο μαζί με το ασβέστιο, συμβάλει στην καλή υγεία και λειτουργία των οστών, δοντιών, νευρών και της καρδιάς. Επιπλέον, εμποδίζει την πήξη του αίματος και προστατεύει από θρομβώσεις των αγγείων και από εμφράγματα. Επίσης, συμβάλλει στην πρόληψη του άγχους και την άμυνα του οργανισμού από ασθένειες. Η ανεπάρκεια μαγνησίου έχει συσχετιστεί με σακχαρώδη διαβήτη, χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, οστεοπόρωση καθώς προκαλεί κόπωση και μυϊκές κράμπες.^{4,51}

Ψευδάργυρος: Ο ψευδάργυρος αποτελεί βασικό συστατικό εκατοντάδων ενζύμων, συμπεριλαμβανομένων των DNA και RNA πολυμερασών, και είναι απαραίτητος για την κυτταρική ανάπτυξη, την ανοσολογική λειτουργία και την αναπαραγωγική υγεία. Η ανεπάρκεια του μπορεί να οδηγήσει σε καθυστέρηση της ανάπτυξης, μειωμένη επούλωση τραυμάτων, δερματίτιδα, γαστρεντερικές διαταραχές, ατροφία όρχεων και απώλεια τριχών.^{4,51}

Οι φυσιολογικές συγκεντρώσεις των μετάλλων στο αίμα κυμαίνονται εντός των ακόλουθων ορίων που παρουσιάζονται παρακάτω.^{4,52}

- Ca 2250–2590 μM
- Mg 570–830 μM
- Zn 13,6–19,8 μM

6. EDTA

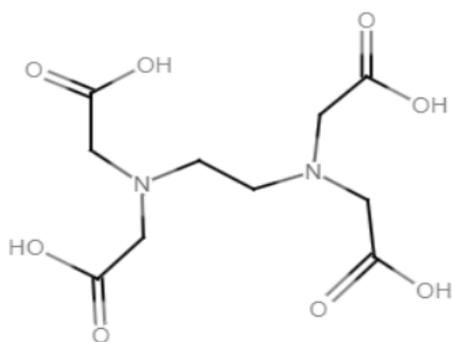
6.1 Χημική δομή και Ιδιότητες

Το αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA) αποτελεί έναν από τους πλέον πιο ευρέως διαδεδομένους χηλικούς παράγοντες, με εκτεταμένη χρήση στη χημεία, τη βιοχημεία και την βιοϊατρική ανάλυση. Πρόκειται για ένα πολυδοντικό μόριο, που μπορεί να σχηματίσει ισχυρά και σταθερά σύμπλοκα με μεταλλικά ιόντα, αφού διαθέτει έξι θέσεις δέσμευσης για μεταλλικά ιόντα.

Η υψηλή σταθερότητα των συμπλόκων του EDTA οφείλεται στα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

- Το μόριο του EDTA διαθέτει τέσσερις καρβοξυλικές ομάδες ($-\text{COO}^-$), οι οποίες φέρουν αρνητικό φορτίο και δεσμεύονται ισχυρά σε θετικά φορτισμένα ιόντα μετάλλων μέσω έντονων ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων.⁵³ Αυτό οδηγεί σε σταθερά σύμπλοκα, καθώς η αρνητική πυκνότητα αυτών των ομάδων ελκύει έντονα τα θετικά ιόντα.
- Εκτός από τις καρβοξυλικές ομάδες, το EDTA παράλληλα διαθέτει δύο αμινικές ομάδες ($-\text{NH}_2$) που συνεισφέρουν σημαντικά ως δότες ηλεκτρονίων στο μεταλλικό σύμπλοκο, μέσω δεσμών συντονισμού.⁵⁴

Η ισχυρή αυτή ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση μεταξύ των αρνητικά φορτισμένων καρβοξυλικών ομάδων και των θετικά φορτισμένων μετάλλων εξασφαλίζει τη σταθερότητα των συμπλόκων, σχηματίζοντας κλειστούς χηλικούς δακτυλίους. Η χημική δομή του EDTA απεικονίζεται στην Εικόνα 10.



Εικόνα 10: Χημική δομή του EDTA.

6.1.1 Σχηματισμός και σταθεροποίηση συμπλόκων

Το EDTA, λόγω του ότι διαθέτει δύο άτομα αζώτου και τέσσερις καρβοξυλικές ομάδες όπως προαναφέρθηκε, μπορεί να συνδεθεί με μέταλλα όπως είναι το ασβέστιο, το μαγνήσιο και ο ψευδάργυρος.⁵⁵ Η σταθερότητα των συμπλόκων εκφράζεται από την σταθερά σχηματισμού K_f , η οποία κυμαίνεται ανάλογα με το ιόν και τη δομή του συμπλόκου και δίνεται από τη ακόλουθη εξίσωση:^{56,57}

$$K_f = [ML^{n-}]/[M^{m+}][L^{4-}]$$

όπου:

- M: είναι το μεταλλικό ιόν
- L: το πλήρως αποπρωτονιωμένο EDTA

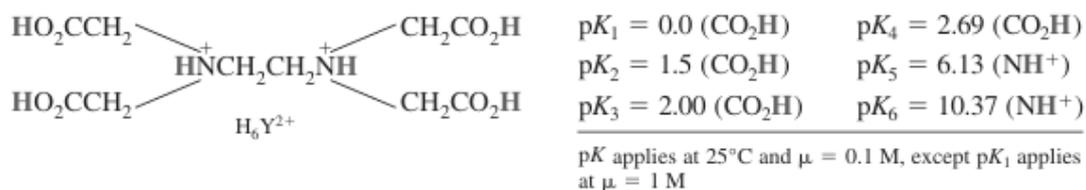
Η διαμόρφωση του EDTA του επιτρέπει να περιβάλλει το μεταλλικό ιόν σχηματίζοντας κλειστό, πολυδεκτικό χηλικό δακτύλιο. Οι υψηλές τιμές της σταθεράς K_f αντικατοπτρίζουν την εξαιρετική μεγάλη θερμοδυναμική σταθερότητα στα παραγόμενα σύμπλοκα.

6.1.2 Ιοντική μορφή και επίδραση pH

Το EDTA όπως έχει προαναφερθεί, δρα ως πολυδοντικός χηλικός παράγοντας, ικανός να προσφέρει ζεύγη ηλεκτρονίων για τον σχηματισμό συμπλόκων με μεταλλικά ιόντα. Η μορφή στην οποία βρίσκεται το EDTA εξαρτάται άμεσα από το pH του δείγματος, καθώς το μόριο παρουσιάζει πολλαπλές ισορροπίες πρωτονίωσης. Το μόριο του EDTA διαθέτει έξι pKa τιμές, επιτρέποντας την ύπαρξη επτά διαφορετικών μορφών πρωτονίωσης. Σε $pH \approx 7,4$, η κυρίαρχη μορφή του είναι H_2Y^{2-} , όπου οι καρβοξυλικές ομάδες βρίσκονται αποπρωτιωμένες ενώ οι αμινοομάδες παραμένουν πρωτονιωμένες. Ενώ, η πλήρως αποπρωτονιωμένη μορφή του Y^{4-} κυριαρχεί σε $pH > 10$ και αποτελεί την πιο δραστική μορφή για να συμπλοκοποιηθεί με μέταλλα.⁵⁷ Η κατανομή των μορφών του EDTA συνάρτηση του pH συνοψίζεται στον Πίνακα 2, ενώ οι τιμές pKa απεικονίζονται στην Εικόνα 11.

Πίνακας 2: Η κυρίαρχη μορφή του EDTA ανάλογα με το pH.

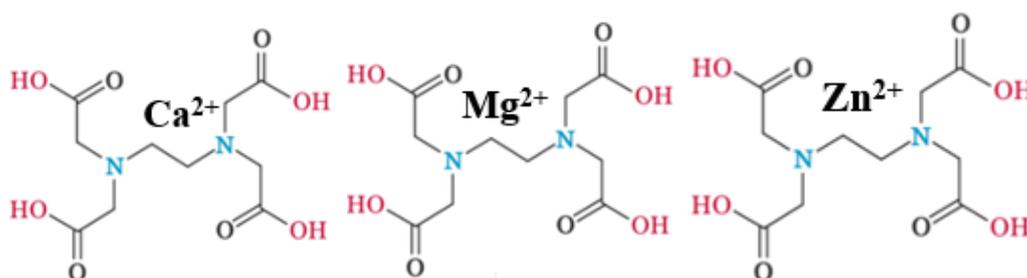
pH	Κυρίαρχη Μορφή	Συμπεριφορά
$pH < 2$	H_6Y^{2+}	Πλήρως πρωτονιωμένο (οξύ)
$pH \approx 7,4$	H_2Y^{2-}	Μερικώς αποπρωτονιωμένο-Οξύ (από $-NH_2^+$)
$pH > 10$	Y^{4-}	Πλήρως αποπρωτονιωμένο (βάση)



Εικόνα 11: Δομή του EDTA (σε πρωτονιωμένη μορφή H_6Y^{2+}) και οι έξι διαφορετικές τιμές pK_a που διαθέτει.

6.2 Σύμπλοκα EDTA-μετάλλου

Το EDTA δρα ως χηλικός παράγοντας, δεσμεύοντας μεταλλικά κατιόντα μέσω τεσσάρων ατόμων οξυγόνου από τις καρβοξυλικές ομάδες και δύο ατόμων αζώτου από τις αμινομάδες του, σχηματίζοντας ιδιαίτερα σταθερά σύμπλοκα (Εικόνα 12).



Εικόνα 12: Απεικόνιση δομής συμπλόκου EDTA με ένα μεταλλικό ιόντα Ca^{2+} , Mg^{2+} και Zn^{2+} .

Ca-EDTA:

Το ιόν Ca^{2+} συνδέεται με τα 4 οξυγόνα των καρβοξυλικών ομάδων και τα 2 άτομα αζώτου του EDTA σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο. Το οποίο είναι εξαιρετικά σταθερό, με σταθερά σχηματισμού K_f της τάξης 10^{11} .⁵⁷

Mg-EDTA:

Παρόμοια με το Ca^{2+} , έτσι και το Mg^{2+} συνδέεται με τα 4 οξυγόνα των καρβοξυλικών ομάδων και τα 2 άτομα αζώτου του EDTA σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο. Το οποίο έχει μικρότερη σταθερά σταθερότητας K_f της τάξης 10^8 . Η μικρή ιοντική ακτίνα του Mg^{2+} επιτρέπει πιο στενή σύνδεση με τους δότες ατόμου.⁵⁷

Zn-EDTA:

Έτσι και ο Zn^{2+} συνδέεται με παρόμοιο τρόπο με τα 4 οξυγόνα των καρβοξυλικών ομάδων και τα 2 άτομα αζώτου του EDTA σχηματίζοντας σύμπλοκο. Το οποίο είναι εξαιρετικά σταθερό, με σταθερά σταθερότητας K_f της τάξης 10^{16} .

6.3 Αντιπηκτική Δράση του EDTA

Το EDTA διαθέτει εξαιρετική αντιπηκτική δράση όταν προστίθεται στο αίμα, η δράση αυτήν βασίζεται στην δέσμευση των ιόντων ασβεστίου, Ca^{2+} , τα οποία είναι απαραίτητα για τη διαδικασία πήξης του αίματος. Με τον τρόπο αυτό, το EDTA

εμποδίζει την πήξη κατά τη συλλογή και επεξεργασία δειγμάτων αίματος γεγονός που είναι εξαιρετικά χρήσιμο στην αιματολογική και βιοχημική ανάλυση.^{4,58,59}

Οι πιο συνηθισμένοι τύποι EDTA που χρησιμοποιούνται ως αντιπηκτικά στην βιοχημική ανάλυση είναι:

- Δινάτριο EDTA (Na_2EDTA): Χρησιμοποιείται συνήθως για εργαστηριακές εξετάσεις αίματος.
- Τρικαλιούχο EDTA (K_3EDTA): Συχνά βρίσκεται σε σωλήνες συλλογής αίματος κενού για γρήγορη και αποτελεσματική αντιπηκτική δράση.
- Δικαλιούχο EDTA (K_2EDTA): Είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μορφή σε αυτόματους αιματολογικούς αναλυτές λόγω της συμβατότητάς του.^{59,60}

6.4 Φασματοσκοπία NMR και EDTA

Η ανίχνευση και η μελέτη των συμπλόκων EDTA με μέταλλα μέσω της φασματοσκοπίας NMR βασίζεται σε χαρακτηριστικές αλλαγές στην δομή και τις ηλεκτρονιακές ιδιότητες του κατά την δέσμευση του με τα μέταλλα. Αυτές οι αλλαγές επηρεάζουν τα φασματικά μοτίβα, προσφέροντας πληροφορίες για τον τύπο του μετάλλου και την δομή του συμπλόκου και την σταθερότητα αυτών.

Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται οι χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις των συμπλόκων Ca-EDTA, Mg-EDTA και Zn-EDTA.⁴

Πίνακας 3: Χημικές μετατοπίσεις των συμπλόκων Ca^{2+} , Mg^{2+} και Zn^{2+} με το EDTA, (όπου q: quartet s: singlet).

Μέταλλα	Χημικές μετατοπίσεις (8-πρωτονίων EDTA συμπλόκου) $[-\text{N}-\text{CH}_2-\text{COOH}]_4$	Χημικές μετατοπίσεις (4-πρωτονίων EDTA συμπλόκου) $[-\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}-]$
Zn	3.36 q (CH_2) ₄	2.87 s (CH_2) ₂
Mg	3.23 q (CH_2) ₄	2.70 s (CH_2) ₂
Ca	3.13 q (CH_2) ₄	2.56 s (CH_2) ₂

7. Ποιοτικός έλεγχος

Η διασφάλιση ποιότητας (Quality Assurance, QA) αποτελεί ένα ολοκληρωμένο και προληπτικό σύστημα οργάνωσης, διαδικασιών και πρωτοκόλλων στην αναλυτική χημεία, το οποίο αποσκοπεί στη διασφάλιση ότι οι αναλυτικές μέθοδοι σχεδιάζονται, εφαρμόζονται και τεκμηριώνονται σύμφωνα με προκαθορισμένα πρότυπα ποιότητας. Η διασφάλιση ποιότητας καλύπτει όλα τα στάδια της αναλυτικής διαδικασίας, από τον σχεδιασμό του πειράματος και την προετοιμασία των δειγμάτων έως τη διαχείριση των δεδομένων και την εκπαίδευση του προσωπικού, με στόχο την πρόληψη σφαλμάτων και τη συνολική αξιοπιστία των αποτελεσμάτων.

Αντίθετα, ο έλεγχος ποιότητας (Quality Control, QC) αναφέρεται σε συγκεκριμένες και επαναλαμβανόμενες πειραματικές διαδικασίες που εφαρμόζονται κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, με σκοπό την αξιολόγηση της ακρίβειας, της επαναληψιμότητας και της σταθερότητας των μετρήσεων. Ο έλεγχος ποιότητας αποτελεί θεμελιώδη συνιστώσα

της αναλυτικής χημείας και ειδικότερα της μεταβολομικής ανάλυσης, όπου απαιτείται υψηλός βαθμός αξιοπιστίας των παραγόμενων δεδομένων.^{61,62}

Γενικότερα, ο έλεγχος ποιότητας περιλαμβάνει ένα σύνολο διαδικασιών και ελέγχων που διασφαλίζουν ότι τα αναλυτικά αποτελέσματα πληρούν προκαθορισμένα κριτήρια ποιότητας, όπως είναι ορθή ταυτοποίηση χημικών ενώσεων, η σταθερότητα των σημάτων και η απουσία τεχνικών παρεμβολών. Η διαδικασία αυτή στοχεύει στην έγκαιρη ανίχνευση και διόρθωση πιθανών σφαλμάτων ή αποκλίσεων, διασφαλίζοντας την εγκυρότητα και την αναπαραγωγιμότητα των πειραματικών μετρήσεων.

Βασικός σκοπός ενός συστήματος ελέγχου ποιότητας είναι να μπορεί να αναγνωρίσει μια κατάσταση όπου αναφέρονται εσφαλμένα αποτελέσματα, να εντοπίσει την αιτία του σφάλματος και έπειτα να το διορθώσει.⁶² Για τον λόγο αυτό, οι μετρήσεις οφείλουν να είναι επαναλήψιμες και συγκρίσιμες, ώστε να διασφαλίζεται η ποιότητα και η πιστότητα των δεδομένων.⁶¹

Στο πλαίσιο της μεταβολομικής ανάλυσης με τη χρήση φασματοσκοπίας NMR, ο έλεγχος ποιότητας αποκτά ιδιαίτερη σημασία, καθώς η τεχνική NMR παρέχει σύνθετα και πλούσια φασματικά δεδομένα που απαιτούν αυστηρούς ελέγχους για την διασφάλιση της ποιότητας των αποτελεσμάτων.⁶¹ Ο έλεγχος ποιότητας περιλαμβάνει την παρακολούθηση σταθερότητας του οργάνου, την ορθή προετοιμασία των δειγμάτων, τον έλεγχο της χημικής μετατόπισης και της μορφολογίας των κορυφών, καθώς και την αποφυγή σφαλμάτων λόγω θορύβου ή παρεμβολών που μπορούν να αλλοιώνουν τα δεδομένα.⁶³ Η εφαρμογή συστημάτων ελέγχου ποιότητας στην μεταβολομική ανάλυση NMR εξασφαλίζει την ακρίβεια και την επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων, όπου είναι σημαντικά για την κλινική και βιολογική ερμηνεία των δεδομένων.⁶¹

8. Ποσοτικοποίηση με την φασματοσκοπία NMR

Η ποσοτικοποίηση με την χρήση της φασματοσκοπίας NMR, αποτελεί μια αξιόπιστη και ακριβή μέθοδος για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων χημικών ενώσεων, ακόμα και σε ιδιαίτερα σύνθετα μείγματα, όπως είναι και τα βιολογικά υγρά (π.χ. ορός και πλάσμα αίματος, ούρα). Η βασική αρχή της ποσοτικοποίησης με NMR βασίζεται στο γεγονός ότι η ένταση (ή ολοκλήρωμα) ενός σήματος (μιας κορυφής) είναι ευρέως ανάλογη του αριθμού των πυρήνων που συνεισφέρουν σε αυτό το σήμα, επιτρέποντας έτσι την εκτίμηση της ποσότητας κάθε ένωσης στο δείγμα.

Σε αντίθεση με τη δομική ταυτοποίηση μέσω NMR, η ποσοτικοποίηση (quantitative NMR, qNMR) απαιτεί αυστηρή τήρηση θεωρητικών και πειραματικών προϋποθέσεων, για να διασφαλιστεί η ακρίβεια των αποτελεσμάτων.⁶⁴

8.1 Σχετική ποσοτικοποίηση

Ο προσδιορισμός σχετικών συγκεντρώσεων μέσω NMR είναι ο πιο συνηθισμένη και μεθοδολογικά απλούστερη μεθοδολογία, όπου υπολογίζονται οι αναλογίες μεταξύ διαφορετικών ενώσεων σε ένα μείγμα-δείγμα (όπως είναι και ο ορός του αίματος), μέσω άμεσης σύγκρισης των ολοκληρωμάτων των χαρακτηριστικών κορυφών τους. Η σχετική ποσοτικοποίηση δεν απαιτεί τη χρήση προτύπων ενώσεων αναφοράς, καθώς

συγκρίνει απευθείας τα ολοκληρώματα των χαρακτηριστικών κορυφών των συστατικών.⁶⁵ Για την βέλτιστη ποιότητα των αποτελεσμάτων, το δείγμα πρέπει να είναι καλά διαλυτό στον επιλεγμένο διαλύτη, η συγκέντρωση πρέπει να είναι υψηλή ώστε να εξασφαλίζεται καλός λόγος σήματος προς τον θόρυβο (S/N) και σε κατάλληλο όγκο για το σωλήνα NMR (NMR tube).⁶⁶

Η σχετική ποσοτικοποίηση χρησιμοποιείται ευρέως στην μεταβολομική ανάλυση, όπου το κύριο ενδιαφέρον εστιάζει στη σύγκριση συγκεντρώσεων μεταβολιτών μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων χωρίς να απαιτείται ο απόλυτος προσδιορισμός συγκεντρώσεων.

Μπορεί να υπολογιστεί από τον τύπο:

$$\frac{M_x}{M_y} = \frac{I_x}{I_y} \cdot \frac{N_y}{N_x}$$

όπου:

- I είναι το ολοκλήρωμα (η επιφάνεια του σήματος)
- N είναι ο αριθμός των πυρήνων που συνεισφέρουν σε κάθε σήμα.

8.2 Απόλυτη ποσοτικοποίηση

Από την άλλη πλευρά, η απόλυτη ποσοτικοποίηση μέσω NMR επιτρέπει τον ακριβή υπολογισμό της συγκέντρωσης ή της περιεκτικότητας μιας ένωσης, με βάση την αναλογία ολοκληρωμάτων του αναλυόμενου συστατικού και μιας πρότυπης ένωσης αναφοράς. Απαιτεί την παρουσία γνωστής πρότυπης ένωσης αναφοράς γνωστής συγκέντρωσης. Όλες οι ενώσεις, συμπεριλαμβανομένου του προτύπου, πρέπει να ζυγίζονται με υψηλή ακρίβεια.⁶⁵

Μπορεί να υπολογιστεί από τον τύπο:

$$C_x = \frac{I_x}{I_{cal}} \times \frac{N_{cal}}{N_x} \times C_{cal}$$

όπου:

- I η επιφάνεια ολοκλήρωσης
- N ο αριθμός των πυρήνων
- C η συγκέντρωση της ένωσης

9. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η ανάπτυξη και η εφαρμογή μιας αυτοματοποιημένης μεθοδολογίας για την ακριβή ανίχνευση, την ποιοτική αξιολόγηση και την μετέπειτα απομάκρυνση των παρεμβαλλόμενων σημάτων που προκύπτουν από αντιπηκτικές ενώσεις στα φάσματα Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού ($^1\text{H-NMR}$). Ειδικότερα, η διπλωματική εργασία επικεντρώνεται στα σήματα του χηλικού παράγοντα EDTA σε δείγματα αίματος.

Η ανάγκη αυτής της μελέτης εστιάζει στην κρισιμότητα του ελέγχου ποιότητας στην μεταβολομική ανάλυση, όπου η ακρίβεια, η επαναληψιμότητα και η αξιοπιστία των φασματικών δεδομένων αποτελούν έναν βασικό παράγοντα για την εξαγωγή αξιόπιστων βιολογικών και κλινικών συμπερασμάτων. Ο έλεγχος ποιότητας στη μεταβολομική μέσω NMR διασφαλίζει ότι οι διακυμάνσεις που παρατηρούνται στα φάσματα αντικατοπτρίζουν πραγματικές βιολογικές διαφορές και όχι τεχνικά σφάλματα ή παρεμβολές.

Για τον λόγο αυτό, κύριος στόχος της εργασίας είναι η αυτοματοποιημένη εύρεση των παρεμβαλλόμενων σημάτων του EDTA τόσο στην ελεύθερη μορφή του όσο και όταν βρίσκεται δεσμευμένο με τα μεταλλικά ιόντα Ca^{2+} , Mg^{2+} και Zn^{2+} . Αυτό στοχεύει στην αποτελεσματική διαχείριση φασμάτων σε μια μεγάλη κλίμακα και έναν μεγάλο όγκο δεδομένων προκειμένου να επιτευχθεί η βελτίωση του ελέγχου ποιότητας των φασμάτων και η ενίσχυση της αξιοπιστίας και της ακρίβειας της μεταβολομικής ανάλυσης.

Η προτεινόμενη μεθοδολογία βασίζεται στην ανάπτυξη στατιστικών μοντέλων και ενός αυτοματοποιημένου αλγόριθμου ανίχνευσης των σημάτων του EDTA, ο οποίος δεν στηρίζεται αποκλειστικά στις χημικές μετατοπίσεις κάθε ένωσης, αλλά αξιοποιεί συσχετίσεις μεταξύ των χημικών μετατοπίσεων αυτών των κορυφών, με σκοπό την μεγαλύτερη ακρίβεια και την αναπαραγωγιμότητα στην επεξεργασία των φασμάτων.

Παράλληλα, επιδιώκεται η ανάπτυξη και η επικύρωση του αυτοματοποιημένου αλγορίθμου, διασφαλίζοντας την αναπαραγωγιμότητα και την εγκυρότητα της μεθόδου για την αξιοπιστία της μεθόδου και τον ποιοτικό έλεγχο στην μεταβολομική ανάλυση.

Τέλος, ένας επιπρόσθετος στόχος είναι η διερεύνηση της δυνατότητας ποσοτικοποίησης των μεταλλικών ιόντων μέσω της ολοκλήρωση των χαρακτηριστικών κορυφών που αντιστοιχούν στα σύμπλοκα ασβεστίου και μαγνησίου με το EDTA. Η ολοκλήρωση των κορυφών έγινε με την βοήθεια της πλατφόρμας SMOIESY και έτσι πραγματοποιείται σύγκριση των ολοκληρωμάτων (σχετική ποσοτικοποίηση) με πραγματικές τιμές (συγκεντρώσεις) των μετάλλων. Η προσέγγιση αυτή συμβάλλει στην ακριβέστερη εκτίμηση των συγκεντρώσεων έχοντας ως απώτερο σκοπό την επιπλέον κλινική και διαγνωστική αξία της μεταβολομικής ανάλυσης σε βιολογικά δείγματα αίματος μέσω NMR.

Μέρος Β: Πειραματική πορεία και αποτελέσματα

10. Αντιδραστήρια

Τα υλικά και αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας παρουσιάζονται παρακάτω:

- Δισόξινο φωσφορικό νάτριο (NaH_2PO_4 , Monosodium Phosphate)
- Απιονισμένο νερό (H_2O)
- 3-(τριμεθυλοσίλυλο)-2,2,3,3-τετραδετεροπροπιονικό οξύ (TMSP-d₄, 3-(Trimethylsilyl) propionic-2,2,3,3-d₄ acid sodium salt, 99 %)
- Δευτεριωμένο νερό (D_2O , Deuterium oxide)
- Αζίδιο του νατρίου (NaN_3 , Sodium azide) 4%
- Υδροξείδιο του νατρίου (NaOH , Sodium hydroxide) 4 M
- Επταένυδρος θειικός ψευδάργυρος ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- Διένυδρο τρικαλιούχο άλας του αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος ($\text{K}_3\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Ethylenediamine tetraacetic acid tripotassium salt dihydrate)

Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ορού αίματος από 98 διαφορετικά άτομα, τα οποία ελήφθησαν τυχαία από τις συνήθεις αιματολογικές αναλύσεις ασθενών του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Πατρών (αριθμός πρωτοκόλλου 459/5-12-2024). Όλα τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους $-80\text{ }^\circ\text{C}$ έως την χρονική στιγμή της ανάλυσης.

11. Πειραματική πορεία

11.1 Πειράματα φασματοσκοπίας NMR

Για την ανάλυση των δειγμάτων ορού αίματος εφαρμόστηκε ένα συγκεκριμένο τυποποιημένο πρωτόκολλο προετοιμασίας και αναλυθήκαν σε φασματόμετρο NMR Bruker λειτουργίας στα 500,13 MHz για πρωτονιακά πειράματα.

Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος

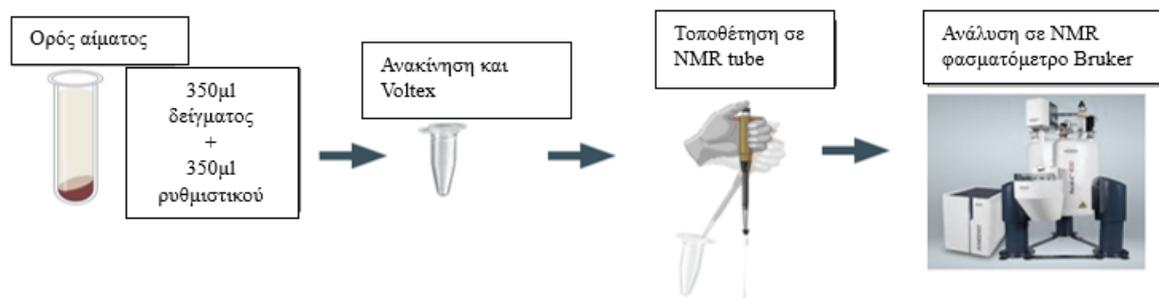
Το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) παρασκευάστηκε με τα ακόλουθα αντιδραστήρια: NaH_2PO_4 , απιονισμένο νερό, TMSP-d₄ 99 % (ως εσωτερικό πρότυπο αναφοράς), D_2O (για το κλείδωμα του πεδίου) και NaN_3 4% (ως συντηρητικό), το οποίο παρασκευάστηκε στο εργαστήριο.⁶⁷ Έπειτα, έγινε ρύθμιση του pH = 7,4, με προσθήκη διαλύματος NaOH (4 M και 1 M). Τέλος, έγινε προσθήκη $\text{K}_3\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.⁶⁸

Η σταθερότητα του pH αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την ανάλυση των φασμάτων NMR, γιατί τα σήματα NMR εμφανίζουν διαφορετικές χημικές μετατοπίσεις ανάλογα με την τιμή του pH. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι το pH πρέπει να είναι σταθερό καθ' όλη την διάρκεια και σε όλα τα δείγματα (πρακτικά όμως υπάρχει ένα μικρό εύρος στις τιμές λόγω της ύπαρξης buffer και της ομοιόστασης του αίματος). Γενικά η σταθερότητα και ο έλεγχος του pH είναι απαραίτητα για την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, καθώς η μεταβλητότητα του μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετικές μετρήσεις χημικών μετατοπίσεων και κατά συνέπεια όχι μεγάλη ακρίβεια στην ανάλυση.

Η τελική συγκέντρωση στους σωλήνες NMR (NMR tubes) είναι για το EDTA 2824 μM (αφού γίνεται αραιώση 50%), που προστέθηκε στο ρυθμιστικό διάλυμα, διότι αυτό που μας ενδιαφέρει είναι η ανίχνευση των NMR κορυφών των μεταλλικών ιόντων ασβεστίου, μαγνησίου και ψευδαργύρου που συμπλοκοποιούνται με αυτό.

Προετοιμασία δειγμάτων ορού

Αρχικά, τα δείγματα ορού αίματος καταψύχθηκαν στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Πριν από την ανάλυση, τα δείγματα αποψύχθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 1 ώρα. Στην συνέχεια, λήφθηκαν 350μl από κάθε δείγμα ορού και αναμίχθηκαν με 350μl ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχει EDTA, σε σωλήνες φυγοκέντρησης (Eppendorf tube), έπειτα έγινε σύντομη ανάδευση στο Vortex και 600μl από το μείγμα μεταφέρθηκαν σε NMR tube και τέλος έγινε η τοποθέτηση τους στο φασματόμετρο και έγινε καταγραφή των φασμάτων. Η διαδικασία απεικονίζεται στην Εικόνα 13.



Εικόνα 13: Διαδικασία προετοιμασίας δειγμάτων μέχρι την εισαγωγή τους στον Όργανο..

Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε 97 δείγματα ορού αίματος.

Επιπλέον, σε ένα δείγμα ορού αίματος πραγματοποιήθηκε το ακόλουθο πείραμα προκειμένου να αξιολογηθεί η επίδραση του EDTA στα φάσματα:

- Αρχικά 350μl από το δείγμα ορού αναμίχθηκε με 350μl από το ρυθμιστικό διάλυμα χωρίς EDTA σε ένα σωλήνα φυγοκέντρησης, έπειτα από ανάδευση στο Vortex, 600μl από το μίγμα μας μεταφέρθηκαν σε NMR tube και τέλος έγινε η τοποθέτηση τους στο φασματόμετρο και λάβαμε τα αποτελέσματα.

Πειράματα με διαλύματα Zn^{2+}

Για την μελέτη των σημμάτων του ψευδαργύρου παρασκευάστηκε ένα πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης $10\text{ }\mu\text{M Zn}^{2+}$ σε απιονισμένο νερό και σε 38 δείγματα πραγματοποιήθηκε επιπλέον προσθήκη διαλύματος Zn^{2+} ξεχωριστά από το αρχικό πείραμα.

Επιπλέον, σε ένα επιλεγμένο δείγμα ορού αίματος εκτελέστηκε μια σειρά πειραμάτων με διαφορετικές συγκεντρώσεις του Zn^{2+} , με τις τελικές συγκεντρώσεις στο NMR tube να κυμαίνονται σε 10-20-40-80-180 μM αντίστοιχα. Η προσθήκη Zn^{2+} είχε ως σκοπό τον ακριβή εντοπισμό των χαρακτηριστικών κορυφών του συμπλόκου Zn-EDTA, καθώς η φυσιολογική συγκέντρωση του Zn^{2+} στο αίμα είναι σχετικά χαμηλή, με αποτέλεσμα οι κορυφές να μην είναι εύκολα αναγνωρίσιμες σε ένα πρωτονιακό φάσμα NMR.⁵² Το πείραμα αυτό, έγινε για τον εντοπισμό της χαρακτηριστικής κορυφής του Zn^{2+} στο φάσμα NMR χωρίς την ύπαρξη παρεμβολών και αλληλοεπικαλύψεων από κορυφές άλλων οργανικών ενώσεων και συστατικών του ορού αίματος.

11.2 Γενικοί παράμετροι διεξαγωγής πειραμάτων

Όλα τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε NMR tubes 5 mm και αναλύθηκαν σε φασματόμετρο NMR Bruker 500,13 MHz ($^1\text{H-NMR}$) μέσω αυτόματου δειγματολήπτη,

ελεγχόμενου από το πρόγραμμα αυτοματοποίησης ICON-NMR. Τα πειράματα έγιναν με τις ακολουθίες ^1H 1D NOESY και CPMG.

Οι πειραματικές παράμετροι διατηρήθηκαν σταθερές σε όλα τα δείγματα, ώστε να εξασφαλιστεί η επαναληψιμότητα και συγκρισιμότητας των φασμάτων, χωρίς να έχουμε παρατηρούμενες διαφορές πέρα από την διαφορά των βιολογικών δειγμάτων που έχουν μεταξύ τους. Οι βασικές παράμετροι παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4: Παράμετροι πειραμάτων NMR.

Παράμετροι	Τιμές
T	310 K
DS (Number of dummy scans)	4
NS (Number of scans)	32
D1(Delays)	4 sec
RG (Receiver gain)	90,5
P1(Pulse)	10 μsec

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων έγιναν και περαιτέρω διεργασίες ώστε να μπορέσουμε να τα αναλύσουμε με ακρίβεια (αναφέρονται στην παράγραφο 2.5). Επιπλέον, προκειμένου να καταστεί δυνατή η αποτελεσματική παρακολούθηση μεγαλύτερου εύρους συγκεντρώσεων μεταβολιτών, απαιτείται η καταστολή του σήματος του νερού (water suppression), που πραγματοποιείται με εφαρμογή του παλμού PRESAT, ο οποίος μειώνει τη συνεισφορά του σήματος και βελτιώνει τη διακριτική ικανότητα του φάσματος.

Οι βασικές πειραματικές παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων περιγράφονται συνοπτικά παρακάτω:

- **T** (Temperature): Αντιστοιχεί στη θερμοκρασία κατά την οποία πραγματοποιείται η μέτρηση και αποτελεί κρίσιμο παράγοντα για τη σταθερότητα των χημικών μετατοπίσεων και την αναπαραγωγιμότητα των φασμάτων.
- **DS** (Number of dummy scans): Αναφέρεται στον αριθμό των σαρώσεων που εκτελούνται πριν από την πραγματική καταγραφή δεδομένων. Αυτές οι σαρώσεις δεν καταγράφουν δεδομένα αλλά χρησιμεύουν για να φέρουν το σύστημα σε μία σταθερή κατάσταση ισορροπίας όπου το σήμα είναι σταθερό, ώστε να επιταχυνθεί η διαδικασία και να αποφευχθεί η αναμονή για πλήρη επαναφορά των spin.
- **Ns** (Number of scans): Είναι ο αριθμός των σαρώσεων που γίνονται και των οποίων τα φάσματα προστίθενται μεταξύ τους για να παραχθεί το τελικό φάσμα. Αυξάνοντας τον αριθμό των σαρώσεων αυξάνεται το λόγος σήματος προς θόρυβο (Signal to Noise Ratio, SNR).
- **D1** (Relaxation delays): Αναφέρεται στον χρόνο καθυστέρησης μεταξύ των σαρώσεων (relaxation delay, σε δευτερόλεπτα). Είναι σημαντικό να επιλέγεται ο κατάλληλος χρόνος ώστε να επιτρέπει στα πυρηνικά μαγνητικά στιγμιαία να χαλαρώσουν επαρκώς πριν την επόμενη σάρωση.
- **RG** (Receiver gain): Πρόκειται για την παραμετροποίηση της ενίσχυσης του λήπτη που χρησιμοποιείται για την ενίσχυση του σήματος που λαμβάνεται από

το δείγμα. Η ρύθμιση του RG είναι κρίσιμη για τη μεγιστοποίηση του λόγου σήματος προς θόρυβο, αποφεύγοντας όμως την κορεσμό του δέκτη. Υψηλότερη τιμή RG σημαίνει μεγαλύτερη ενίσχυση σήματος.

- **P1 (Pulse):** Αναφέρεται στα χαρακτηριστικά του παλμού RF που εφαρμόζεται στο δείγμα, όπως η διάρκεια και η ισχύς του παλμού, που καθορίζουν τη γωνία στροφής των πυρηνικών στιγμιαίων. Ο παλμός P1 είναι συνήθως ο κύριος παλμός διέγερσης στην πειραματική διαδικασία.

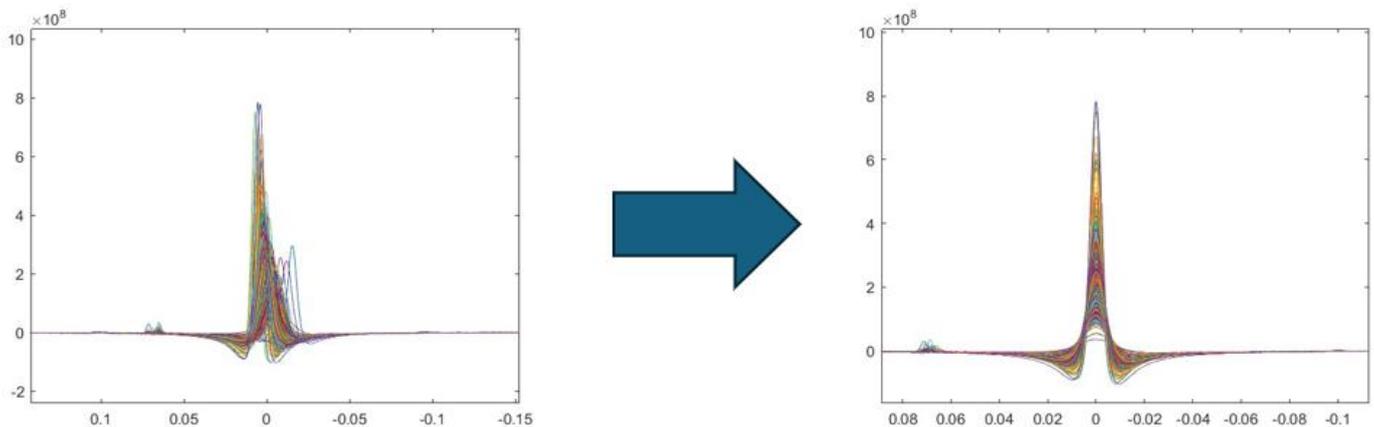
Συνολικά, οι παραπάνω παράμετροι ρυθμίζουν τη διαδικασία καταγραφής στον πειραματικό κύκλο του NMR, επηρεάζοντας την ποιότητα, ευαισθησία και αποδοτικότητα της μέτρησης.^{69 39}

11.3 Υπολογιστικό μέρος -Μέθοδοι

Για την ανάπτυξη του αλγορίθμου χρησιμοποιήσαμε φάσματα ^1H NMR που αναλύθηκαν σε φασματογράφο Bruker 600 MHz (Bruker BioSpin) με τη μέθοδο CPMG. Αρχικά πραγματοποιήθηκε ανάλυση σε 978 φάσματα ^1H -NMR πλάσματος, τα οποία ελήφθησαν από αποθετήριο των Metabolights, όπου αποτελεί μια διεθνή βάση δεδομένων πειραμάτων μεταβολομικής. Τα δείγματα είχαν ληφθεί μετά από περίοδο νηστείας και περιείχαν EDTA ως αντιπηκτικό.⁷⁰

Επεξεργασία φασμάτων

Αρχικά, όλα τα φάσματα ευθυγραμμίστηκαν σε μία οργανική ένωση αναφοράς του TSP (trimethylsilylpropionate), στα 0 ppm (κορυφή αναφοράς). Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε μέσω του λογισμικού MATLAB σε ένα αντιπροσωπευτικό φάσμα και στην συνέχεια μέσω μια ειδικής συνάρτησης ευθυγράμμισης των φασμάτων εφαρμόστηκε αυτόματα σε ολόκληρο το σύνολο των φασμάτων (Εικόνα 14).



Εικόνα 14: Μηδενισμός όλων των φασμάτων στα 0 ppm (ένωση TSP). Στα αριστερά δεν έχει γίνει ευθυγράμμιση, ενώ στα δεξιά έχει γίνει η ευθυγράμμιση.

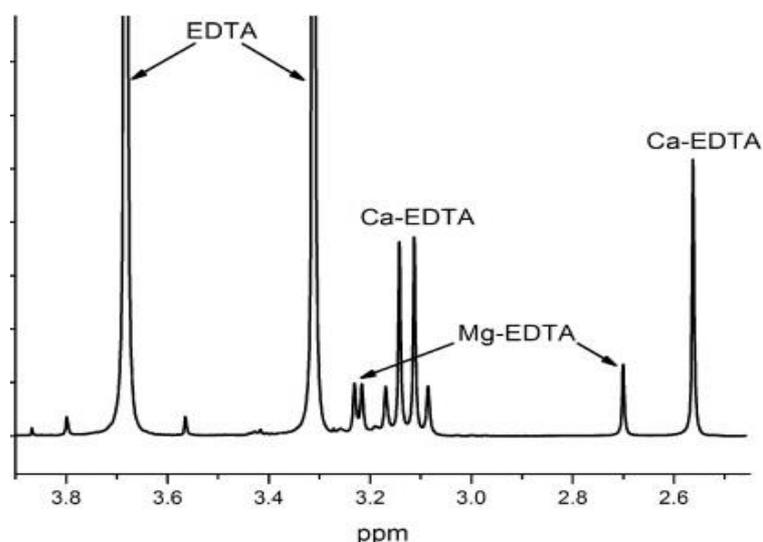
Ταυτοποίηση σημάτων

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε η ταυτοποίηση ορισμένων ενδογενών μεταβολιτών που περιέχονται στο αίμα, καθώς και οι χαρακτηριστικές κορυφές του ελεύθερου EDTA και των συμπλόκων του EDTA με τα ιόντα Ca^{2+} και Mg^{2+} . Μέσω της MATLAB διερευνήθηκαν οι συσχετίσεις μεταξύ των σημάτων αυτών, τόσο στην ελεύθερη όσο και στην συμπλοκοποιημένη μορφή του.

Για κάθε ζεύγος σημάτων υπολογίστηκε ο συντελεστής συσχέτισης (R^2) και επιλέχθηκαν εκείνα τα ζεύγη με την καλύτερη συσχέτιση. Έτσι, με βάση αυτά τα αποτελέσματα αναπτύχθηκε ένας αυτοματοποιημένος αλγόριθμος για την ανίχνευση των συμπλόκων του EDTA με τα μεταλλικά ιόντα.

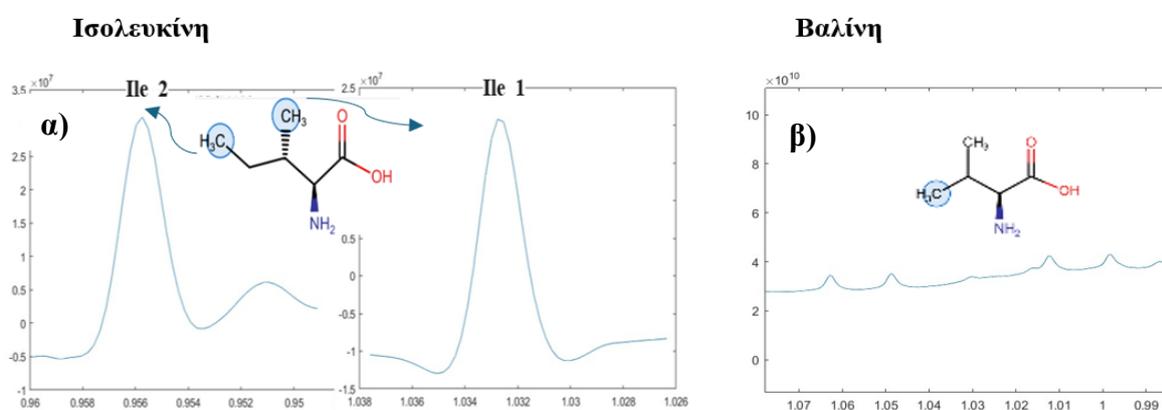
Από το αρχικό σύνολο των 978 φασμάτων, αφαιρέθηκε ένα μικρό ποσοστό (< 4 % του συνόλου) λόγω χαμηλής ποιότητας λόγω τεχνικών αποκλίσεων. Ο τελικός αλγόριθμος αναπτύχθηκε χρησιμοποιώντας 942 φάσματα.

Στην Εικόνα 15 παρουσιάζεται ένα χαρακτηριστικό φάσμα NMR στο απεικονίζονται οι κορυφές του ελεύθερου EDTA και των συμπλόκων του με τα μεταλλικά ιόντα Ca^{2+} και Mg^{2+} .



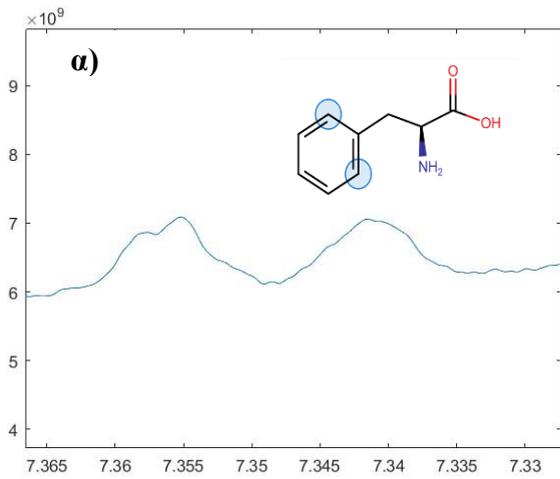
Εικόνα 15: Απεικόνιση ενός φάσματος NMR που παρουσιάζει τις κορυφές του ελεύθερου και συμπλοκοποιημένου EDTA με τα μέταλλα Ca^{2+} και Mg^{2+} .

Η ταυτοποίηση των μεταβολιτών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού Chenomx Profiler, το οποίο περιλαμβάνει μια εκτενή βιβλιοθήκη φασματικών δεδομένων μεταβολιτών. Στις Εικόνες 16-18 παρουσιάζονται οι χημικές δομές των μεταβολιτών με τις αντίστοιχες χημικές μετατοπίσεις των κορυφών σε ένα φάσμα NMR. Οι μοριακές δομές όλων των ενώσεων σχεδιάστηκαν με την χρήση του RSCB Chemical Sketch ⁷¹.

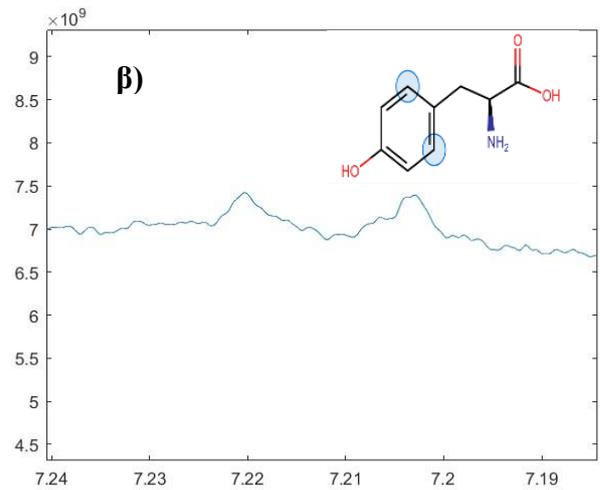


Εικόνα 16: Απεικόνιση των χημικών μετατοπίσεις μεταβολιτών καθώς και των χημικών δομών τους: α) Ισολευκίνη και β) Βαλίνη.

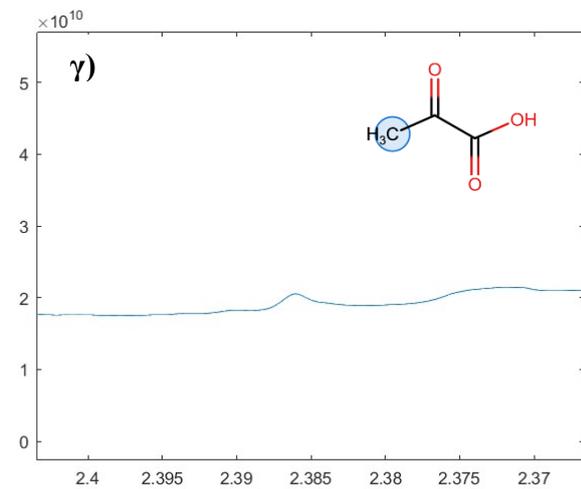
Φαινυλαλανίνη



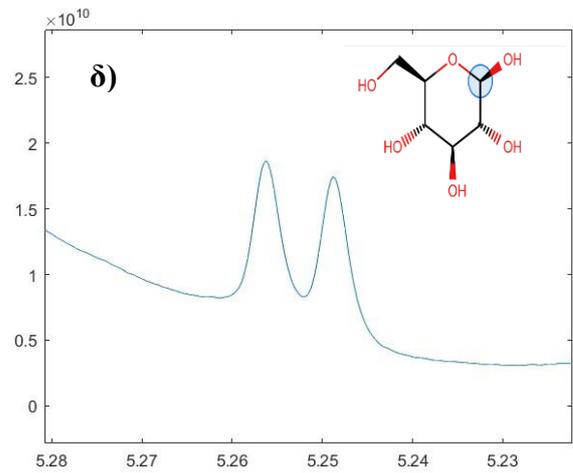
Τυροσίνη



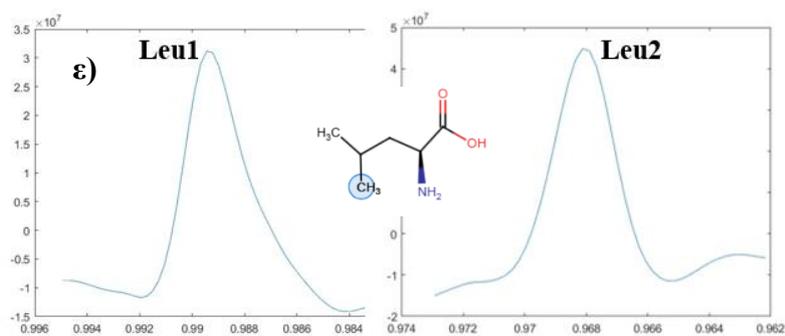
Πυρουβικό οξύ



Γλυκόζη

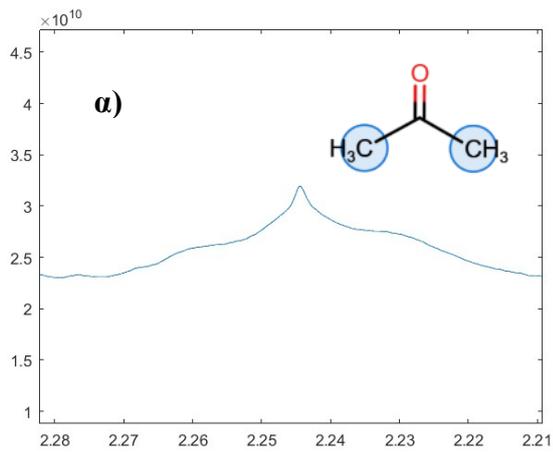


Λευκίνη

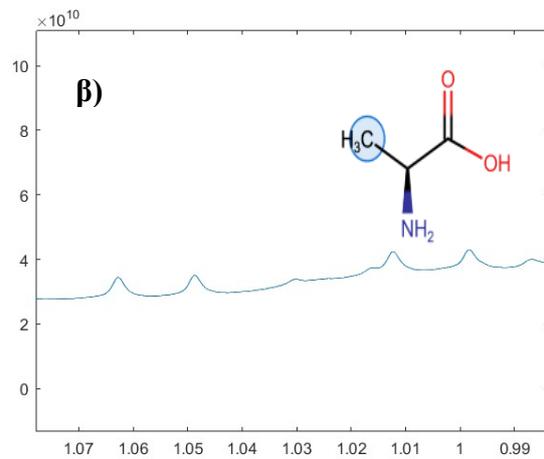


Εικόνα 17: Απεικόνιση των χημικών μετατοπίσεις μεταβολιτών καθώς και των χημικών δομών τους: α) Φαινυλαλανίνη β) Τυροσίνη γ) Πυρουβικό Οξύ δ) Γλυκόζη και ε) Λευκίνη.

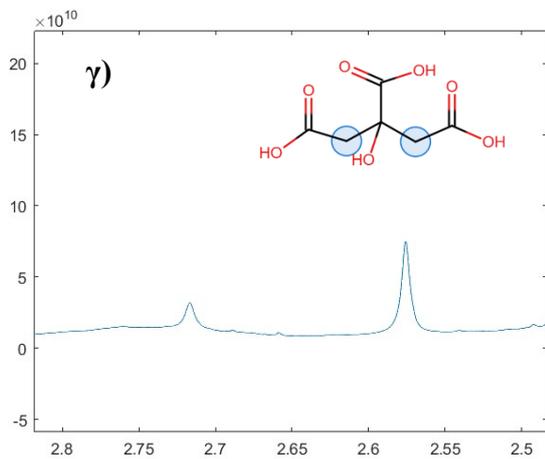
Ακετόνη



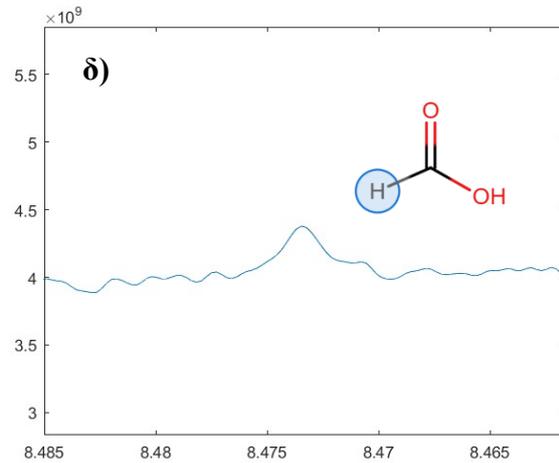
Αλανίνη



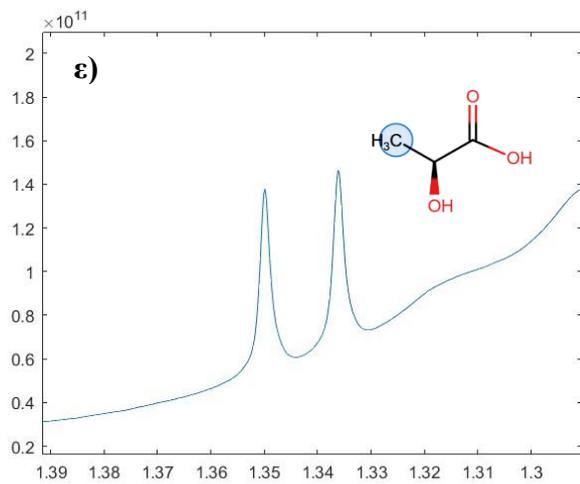
Κιτρικό οξύ



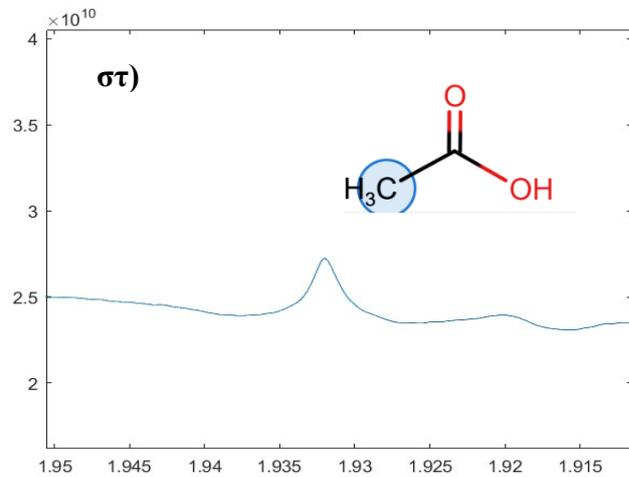
Φορμικό Οξύ



Γαλακτικό Οξύ

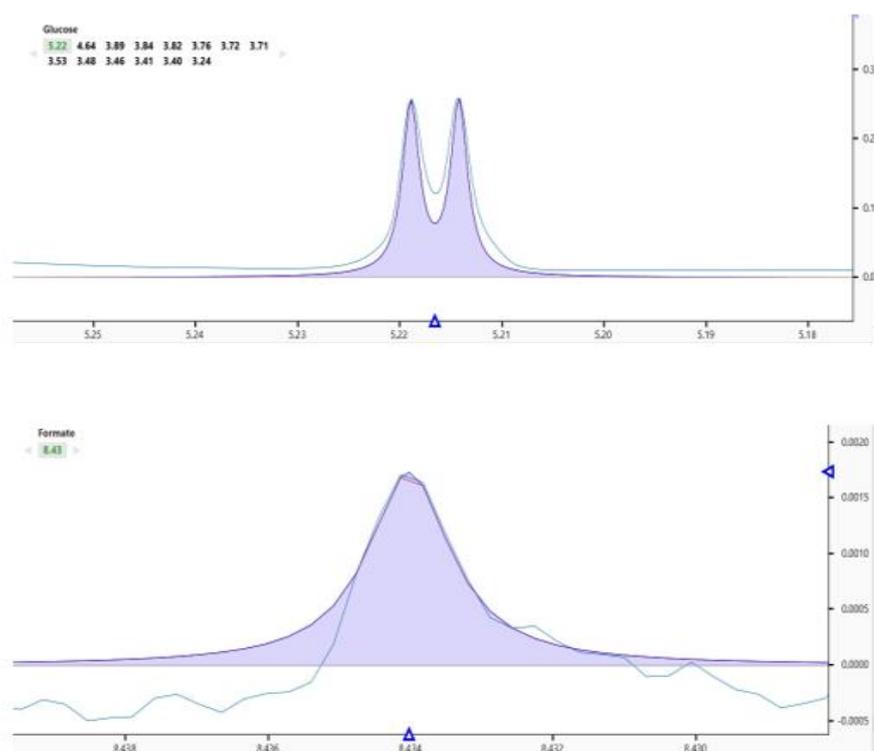


Οξικό οξύ



Εικόνα 18: Απεικόνιση των χημικών μετατοπίσεις μεταβολιτών καθώς και των χημικών δομών τους: α) Ακετόνη β) Αλανίνη γ) Κιτρικό Οξύ δ) Φορμικό Οξύ ε) Γαλακτικό οξύ και στ) Οξικό οξύ.

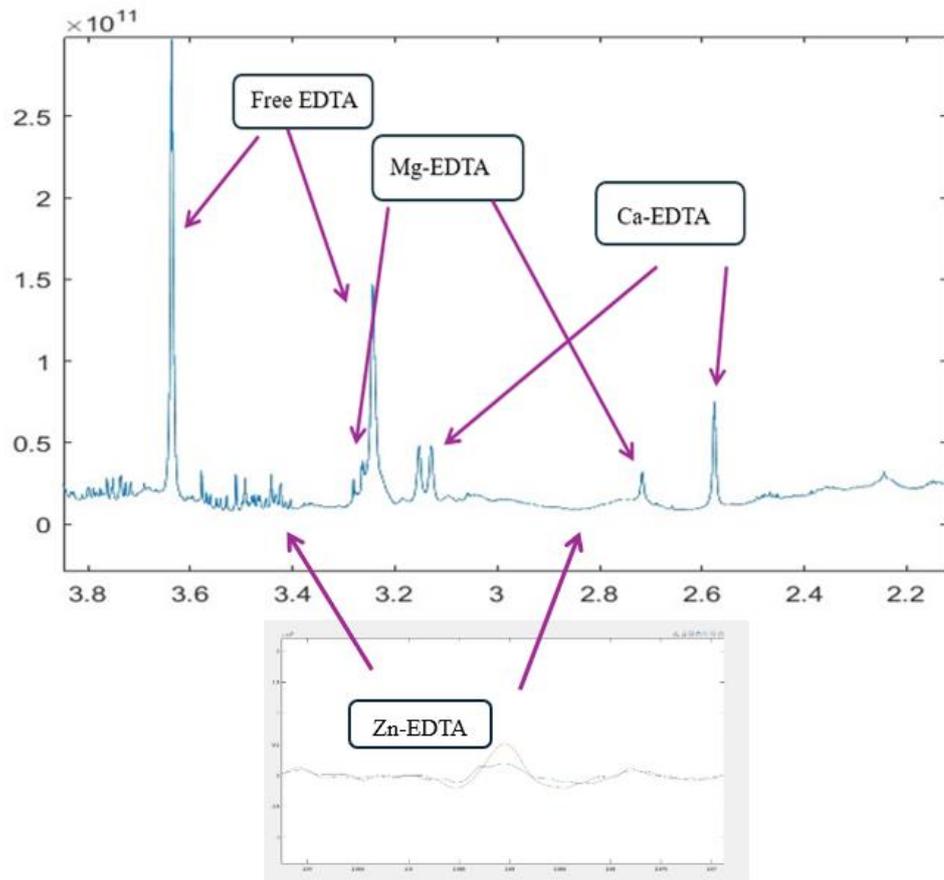
Στην Εικόνα 19 απεικονίζονται δύο ενδεικτικά παράδειγμα ταυτοποίησης μεταβολιτών (γλυκόζη και φορμικό οξύ) σε φάσματα ορού αίματος με την χρήση του λογισμικού Chenomx.



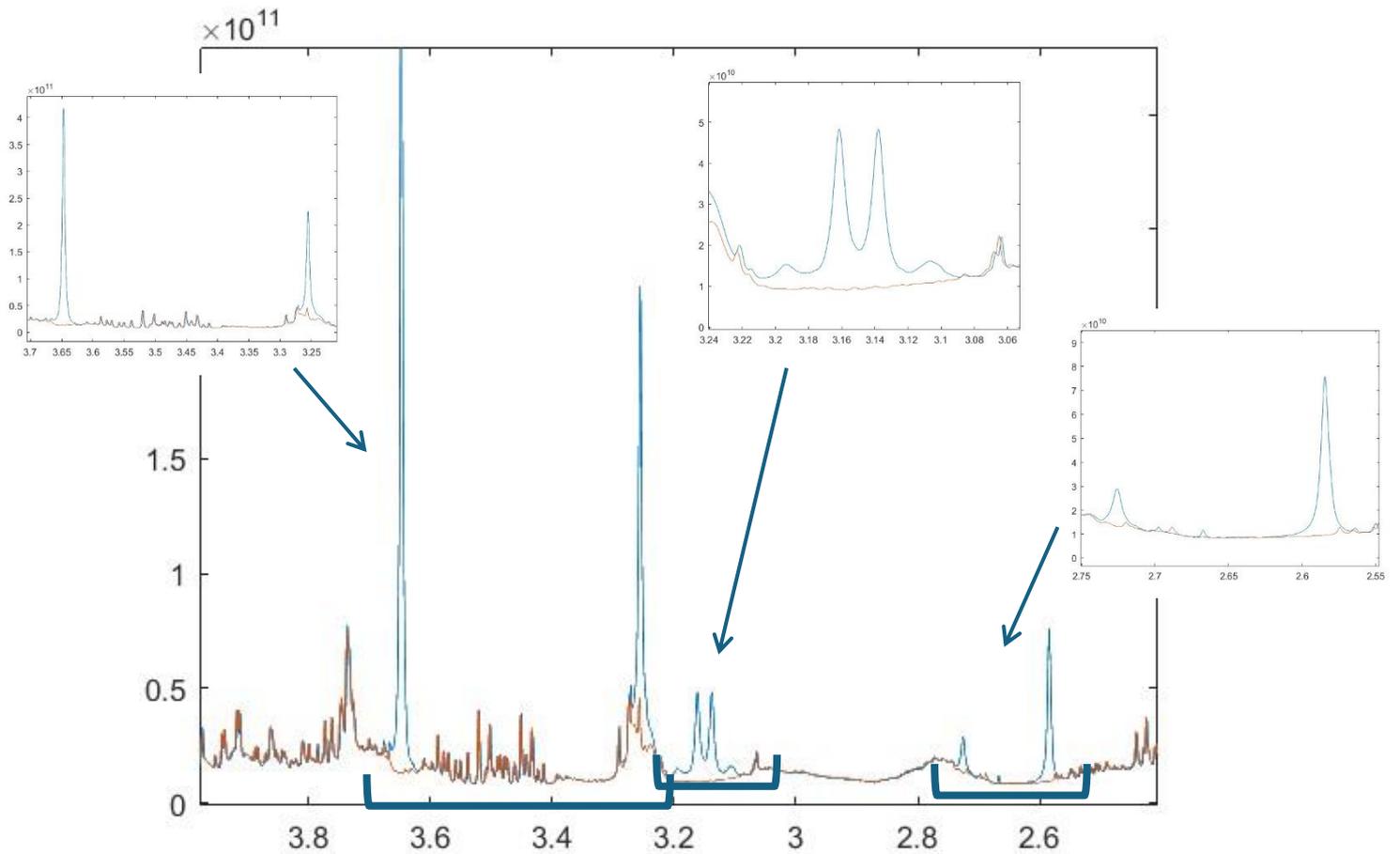
Εικόνα 19: Στιγμιότυπα κατά την επεξεργασία των φασμάτων NMR ορού αίματος της παρούσας εργασίας προς ταυτοποίηση των παρατηρούμενων μεταβολιτών. Στην πάνω εικόνα απεικονίζεται η γλυκόζη, ενώ στην κάτω εικόνα είναι το φορμικό οξύ.

Επιπλέον, πέρα από την ταυτοποίηση των μεταβολιτών εντοπίστηκαν και οι κορυφές του ελεύθερου EDTA και οι κορυφές των συμπλόκων του EDTA με τα ιόντα Ca^{2+} και Mg^{2+} . Για την εύρεση των κορυφών των συμπλόκων που σχηματίζουν τετραπλές κορυφές λήφθηκε υπόψη και η σταθερά σύζευξης J για τον ακριβή εντοπισμό των κορυφών. Οι κορυφές των συμπλόκων απεικονίζονται στο Εικόνα 20.

Ενώ, στην Εικόνα 21 απεικονίζεται ένα φάσμα NMR ^1H ίδιου δείγματος ορού αίματος με ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει EDTA και ένα φάσμα που δεν περιέχει EDTA.



Εικόνα 20: Απεικόνιση των κορυφών του ελεύθερου EDTA και των συμπλόκων του με τα μεταλλικά ιόντα του Ca^{2+} , Mg^{2+} και Zn^{2+} .



Εικόνα 21: Απεικόνιση ενός φάσματος ορού αίματος με ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει EDTA (μπλε) και ένα φάσμα NMR ^1H χωρίς EDTA (πορτοκαλί).

Εντοπισμός κορυφών

Ο εντοπισμός των κορυφών πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια της MATLAB, χρησιμοποιώντας την συνάρτηση `findpeaks`. Τα Scripts που αναπτύχθηκαν απεικονίζονται στην Εικόνα 22 και στην Εικόνα 23.

```
[i,ii]=find(X<= region1 & X>=region2);
Ymetabolite= Y (:,ii);
Xmetabolite = X (1,ii);
for j=1:length(A)
[pks,locs]=findpeaks(fliplr(Ymetabolite (j,:)),fliplr(X (1,ii)));
[k,kk]=sort(pks);
sorted_locs=locs(1,kk);
Xmaxmetabolite (j,:)=sorted_locs(1,end);
end
```

Εικόνα 22: Script απομόνωσης μονών κορυφών.

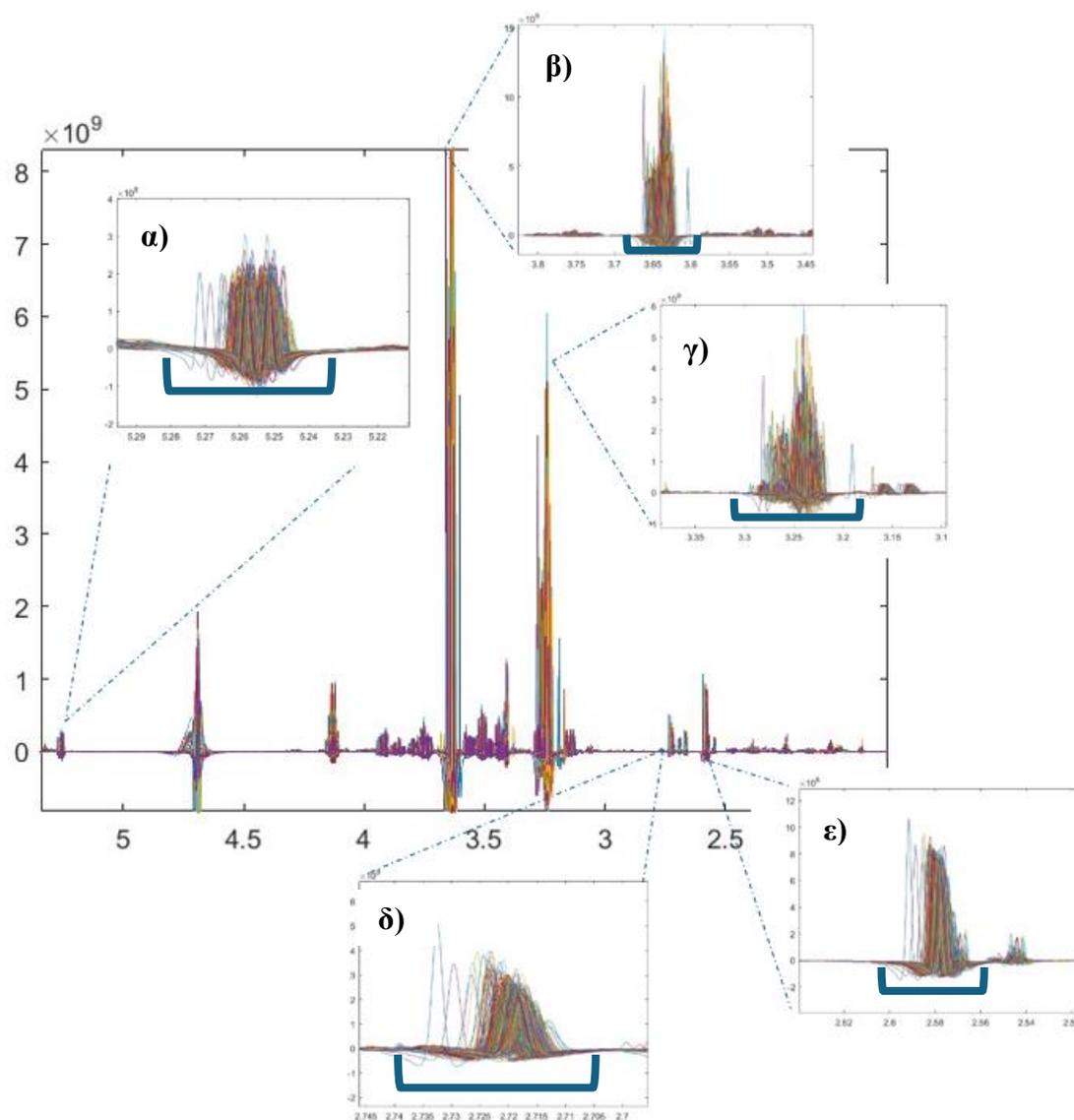
```

for j=1:length(A)
[~,ii]=find(X<= region1 & X>=region2);
Ymetabolites = Y (:,ii);
Xmetabolites = X(1,ii);
[pks,locs]=findpeaks(fliplr(Ymetabolites (j,:)),fliplr(X(1,ii)));
[~,kk]=sort(pks);
sorted_locs=locs(1,kk);
Xmetabolites_12 (j,:)=sorted_locs(1,end-1:end);
Xmaxmetabolites_12(j,:) = sort(Xmaxmetabolites_12(j,:));
end
Xmaxmetabolite1_ = Xmaxmetabolites_12(:,1);
Xmaxmetabolite2_ = Xmaxmetabolites_12(:,2);

```

Εικόνα 23: Script απομόνωσης διπλών κορυφών.

Η συνάρτηση $[pks,locs] = findpeaks(y,x)$ εντοπίζει τα μέγιστα μια καμπύλης/ενός σήματος του διανύσματος εισόδου y , καθώς επιστρέφει και τους δείκτες στους οποίους εμφανίζονται οι κορυφές, όπου pks είναι οι τιμές των κορυφών και $locs$ η θέση των κορυφών στον άξονα x .



Εικόνα 24: Απεικόνιση 942 φασμάτων και μεγέθυνση στις περιοχές α) της γλυκόζης, β) μονή κορυφή ελεύθερου EDTA, γ) μονή κορυφή ελεύθερου EDTA, δ) μονή κορυφή συμπλόκου Mg-EDTA, ε)μονή κορυφή συμπλόκου Ca-EDTA.

Στον Πίνακα 5 αναφέρονται όλοι οι μεταβολίτες που εντοπίστηκαν καθώς και η χημική μετατόπιση και η πολλαπλότητα των κορυφών αυτών. Ενώ στην Εικόνα 24 απεικονίζεται το σύνολο των 942 φασμάτων NMR καθώς και κάποιες περιοχές του φάσματος που έχει γίνει μεγέθυνση.

Πίνακας 5: Το εύρος των χημικών μετατοπίσεων μεταβολιτών και του EDTA (ελεύθερου και συμπλοκοποιημένου) μαζί με την πολλαπλότητα των κορυφών τους.

Ενώσεις-Σύμπλοκα	δ (χημική μετατόπιση)	Πολλαπλότητα κορυφών
Free EDTA1	3.59-3.67	Singlet
Free EDTA2	3.18-3.29	Singlet
[Ca (EDTA)]	2.56-2.59	Singlet
[Ca (EDTA)]	3.30-3.10	Quartet

[Mg (EDTA)]	2.71-2.73	Singlet
[Mg (EDTA)]	3.24-3.29	Quartet
[Zn (EDTA)]	2.71-2.74	Singlet
[Zn (EDTA)]	3.38-3.45	Quartet
Γλυκόζη	5.23-5.28	Doublet
Φορμικό Οξύ	8.46-8.485	Singlet
Τυροσίνη	7.19-7.23	Doublet
Φαινολαλανίνη	7.33-7.37	Doublet
Οξικό οξύ	1.92-1.94	Singlet
Ακετόνη	2.23-2.26	Singlet
Πυρουβικό Οξύ	2.38-2.40	Singlet
Ισολευκίνη	1.026-1.037 και 0.94-0.96	Doublet και triplet
Λευκίνη	0.98-0.995	2 Doublets
Αλανίνη	1.4-1.5	Doublets
Βαλίνη	0.9-1.1	2 Doublets
Γαλακτικό οξύ	1.3-1.4	Doublet
Κιτρικό οξύ	2.68-2.70	Doublet

Επικύρωση της μεθόδου

Για την επικύρωση αυτής της μεθοδολογίας, ο αυτοματοποιημένος αλγόριθμος δοκιμάστηκε σε ένα μεγάλο αριθμό φασμάτων (1096 φάσματα)⁷² ¹H-NMR πλάσματος, προκειμένου να αξιολογηθεί η ικανότητα του στην ακριβή ανίχνευση και την ταυτοποίηση των κορυφών του EDTA, καθώς και των συμπλόκων του με τα ιόντα Ca²⁺ και Mg²⁺. Τα δείγματα αυτά λήφθηκαν με αιμοληψία φλεβικού αίματος σε σωλήνες συλλογής αίματος με αντιπηκτικό K₂EDTA, και ακολούθησε απομόνωση του πλάσματος και αποθήκευση σε θερμοκρασία -80 °C μέχρι την ανάλυση. Οι μετρήσεις έγιναν με τη χρήση φασματογράφου 600 MHz.

Παράλληλα, ο αλγόριθμος δοκιμάστηκε στα 97 δείγματα ορού αίματος, τα οποία αναλύθηκαν πειραματικά στο εργαστήριο. Η εφαρμογή αυτή είχε ως στόχο την αξιολόγηση της αξιοπιστίας και της επαναληψιμότητας της αυτοματοποιημένης διαδικασίας ποιοτικής ανάλυσης σε πραγματικά κλινικά δείγματα.

Ποσοτικοποίηση μετάλλων

Η σχετική ποσοτικοποίηση των μεταλλικών ιόντων Ca²⁺ και Mg²⁺ έγινε μέσω ολοκλήρωσης των χαρακτηριστικών κορυφών στα φάσματα NMR των 97 δειγμάτων ορού αίματος, χρησιμοποιώντας το λογισμικό SMolESY platform. Η συγκεκριμένη πλατφόρμα βελτιώνει αξιόπιστα τη διακριτική ικανότητα των φασμάτων και καταστέλλει αποτελεσματικά τα μακρομοριακά σήματα απευθείας από το φάσμα ¹H 1D-NMR.

Για σκοπούς σύγκρισης και επικύρωσης, οι συγκεντρώσεις των μετάλλων αυτών στα ίδια δείγματα ορού αίματος προσδιορίστηκαν με κλινικές/βιοχημικές μεθόδους στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Πατρών, σύμφωνα με τυποποιημένες διαδικασίες λειτουργίας (SOP). Συγκεκριμένα, η ποσοτικοποίηση του ασβεστίου προσδιορίστηκε με χρωματομετρική μέθοδο ανάλυσης με την χρήση του αντιδραστήριου Arsenazo III (χρωστική), ενώ το μαγνήσιο προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά μέσω μιας ενζυμικής αντίδρασης.

12. Αποτελέσματα

12.1 Συσχετίσεις μεταξύ μεταβολιτών και σημάτων EDTA

Για την ανάλυση των συσχετίσεων μεταξύ των σημάτων Free-EDTA, [Ca-(EDTA)], [Mg-(EDTA)] και των 13 μεταβολιτών πραγματοποιήθηκε σε 942 φάσματα που επιλέχθηκαν από το σύνολο των 978 φασμάτων του MTBLS147, μετά από αποκλεισμό φασμάτων χαμηλής ποιότητας.

Με βάση αυτό, αναπτύχθηκε ένας αυτοματοποιημένος αλγόριθμος ο οποίος είναι ικανός να προβλέπει με αξιοπιστία τα σήματα του EDTA τα οποία είχαν συμπλοκοποιηθεί με τα μέταλλα. Η απόδοση του αλγορίθμου αξιολογήθηκε τόσο υπολογιστικά όσο και μέσω πειραμάτων που διεξάχθηκαν στο εργαστήριο.

Γραμμική Παλινδρόμηση

Αρχικά, η διερεύνηση των συσχετίσεων ανά ζεύγη μεταξύ των κορυφών του EDTA ελεύθερου και συμπλοκοποιημένου με τους μεταβολίτες πραγματοποιήθηκε μέσω τις βοήθειας της γραμμικής παλινδρόμησης (Linear Regression Analysis).

Η γραμμική παλινδρόμηση αποτελεί μια στατιστική μέθοδος η οποία αποσκοπεί στον προσδιορισμό ενός μαθηματικού μοντέλου για την περιγραφή/ερμηνεία/πρόβλεψη των τιμών ενός χαρακτηριστικού(μεταβλητή) σε σχέση με τις τιμές ενός πλήθους άλλων χαρακτηριστικών (μεταβλητών) και χρησιμοποιείται για την μοντελοποίηση με την εξίσωση ευθείας :

$$f(x) = y = ax + b + \varepsilon$$

όπου:

- Y: εξαρτημένη μεταβλητή
- X: ανεξάρτητη μεταβλητή
- a, b: πραγματικοί αριθμοί
- ε: σφάλμα (πραγματικό αριθμός)

Η ανάλυση έγινε στη MATLAB με την χρήση της συνάρτησης *fitlm* (Fit Linear regression model)

$mdl = fitlm(X,Y)$: όπου επιστρέφει ένα γραμμικό μοντέλο παλινδρόμησης, το οποίο περιλαμβάνει διάφορες πληροφορίες/παραμέτρους όπως είναι οι τιμές *a* (κλίση ευθείας) καθώς και στατιστικά μέτρα αξιολόγησης του μοντέλου όπως είναι το R^2 καθώς και τιμές σφαλμάτων όπως είναι RMSE (Root Mean Squared Error), το οποίο υπολογίζεται από την σχέση:

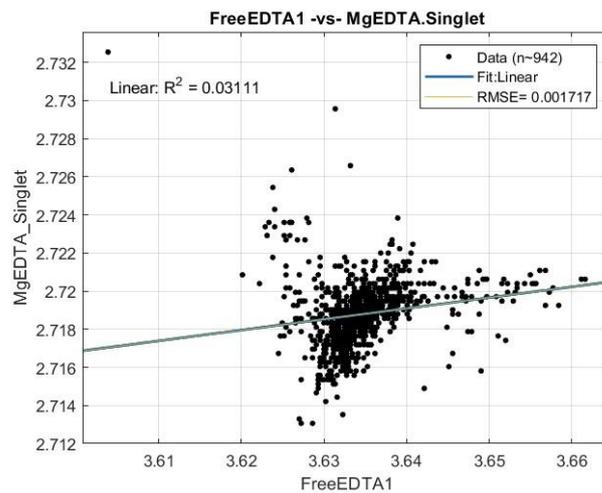
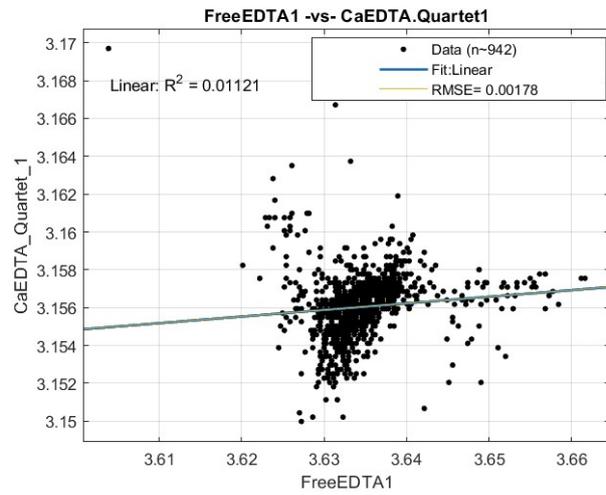
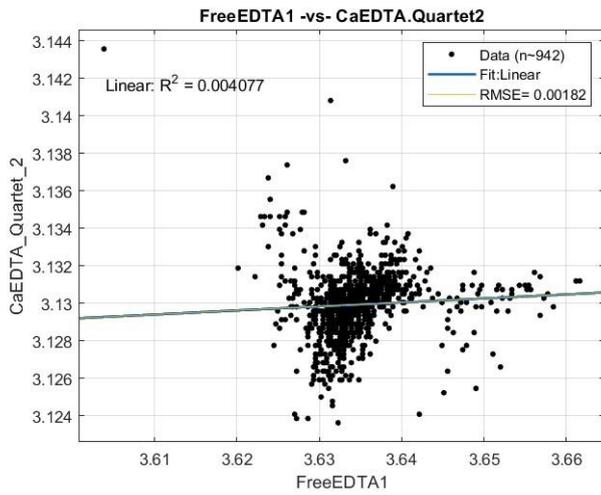
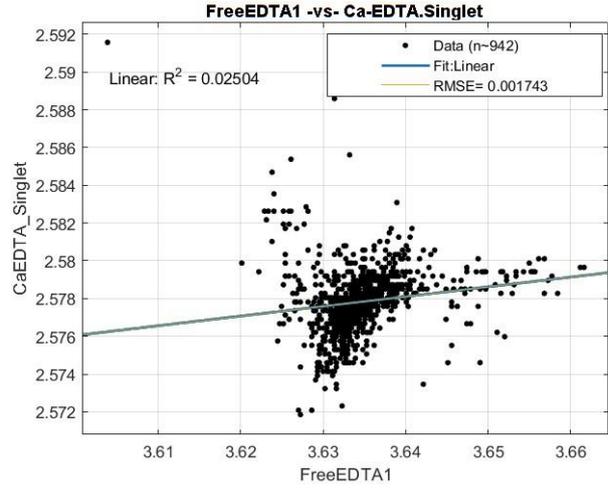
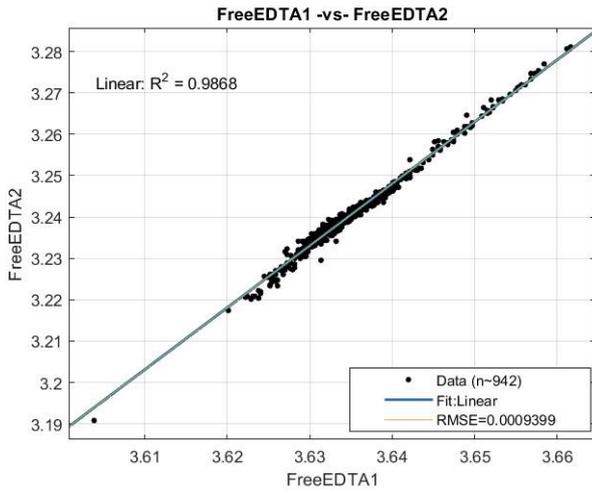
$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (P_i - O_i)^2}{n}}$$

όπου:

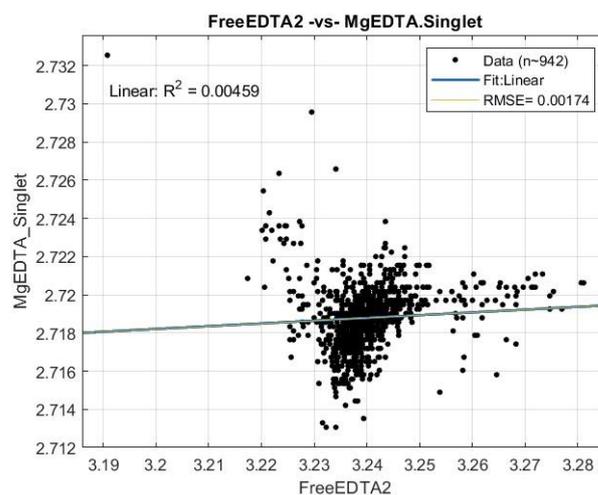
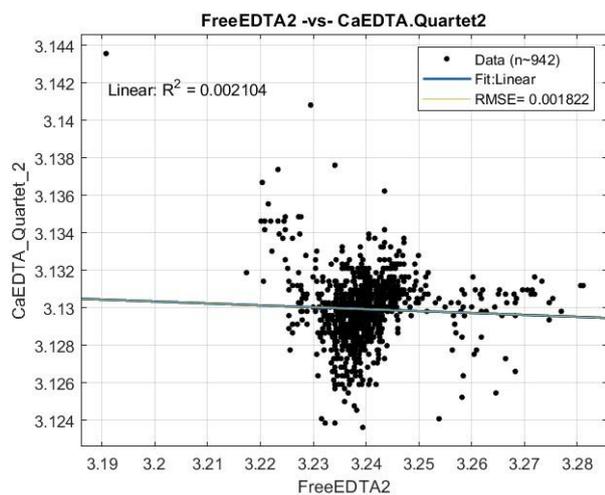
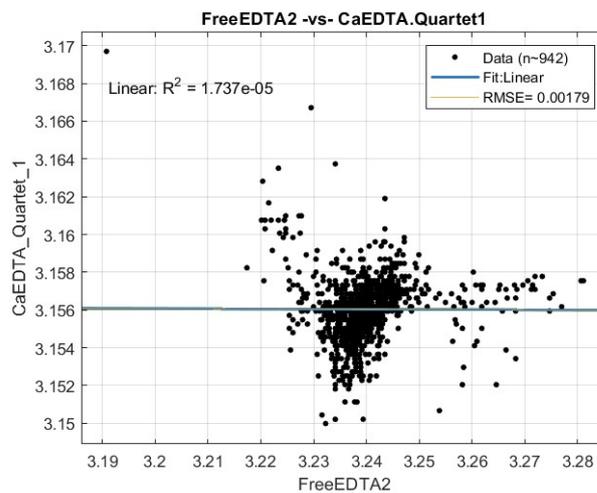
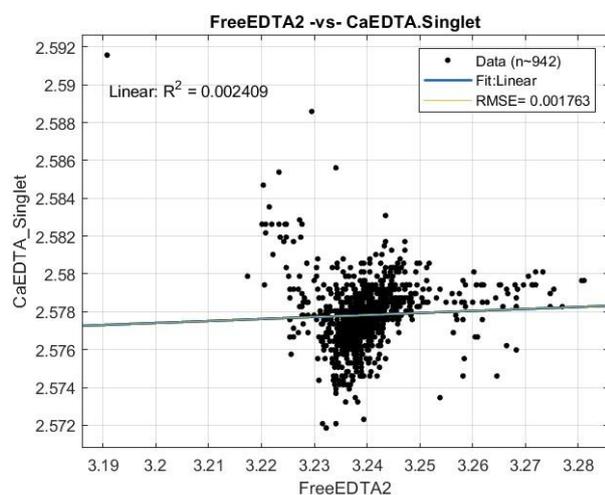
- Σ : το άθροισμα
- P_i : η προβλεπόμενη τιμή
- O_i : η παρατηρούμενη τιμή ή πραγματική τιμή
- n : είναι ο συνολικός αριθμός των παρατηρήσεων ή μέγεθος του δείγματος

Συσχετίσεις EDTA-Μετάλλων

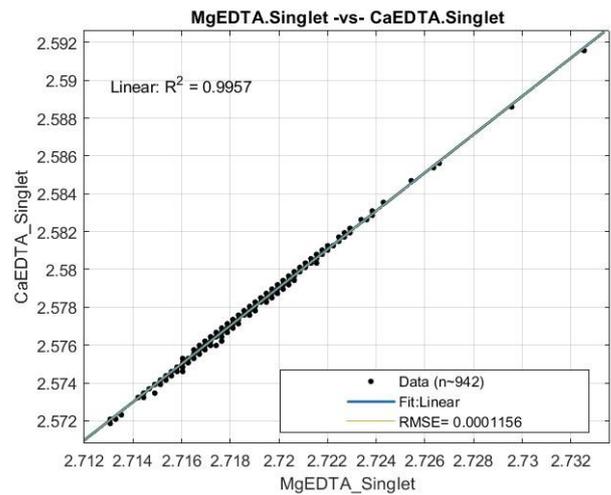
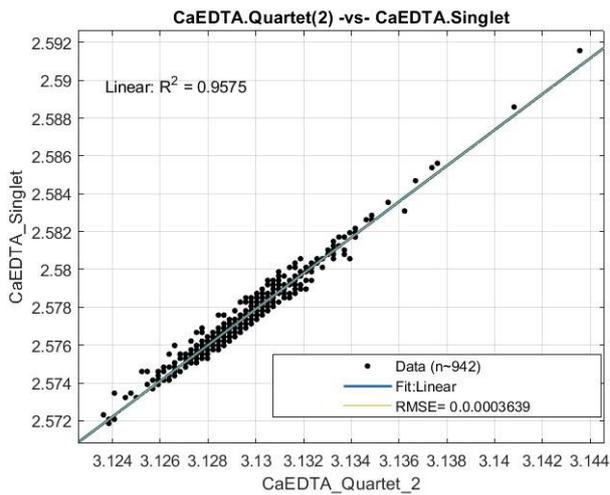
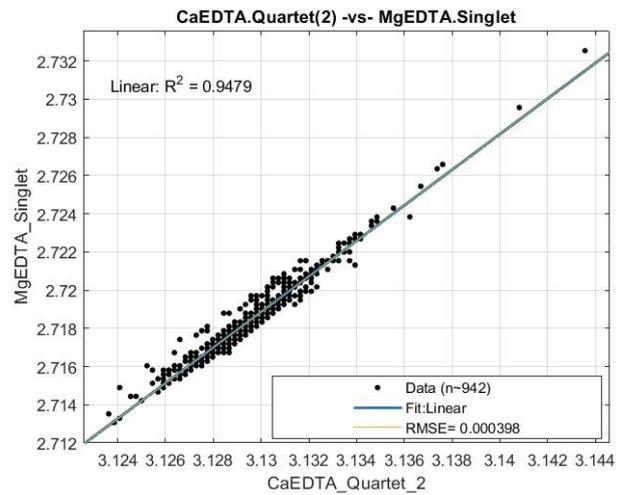
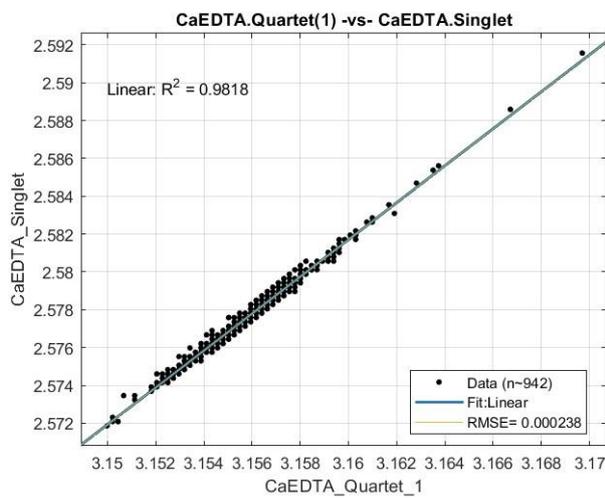
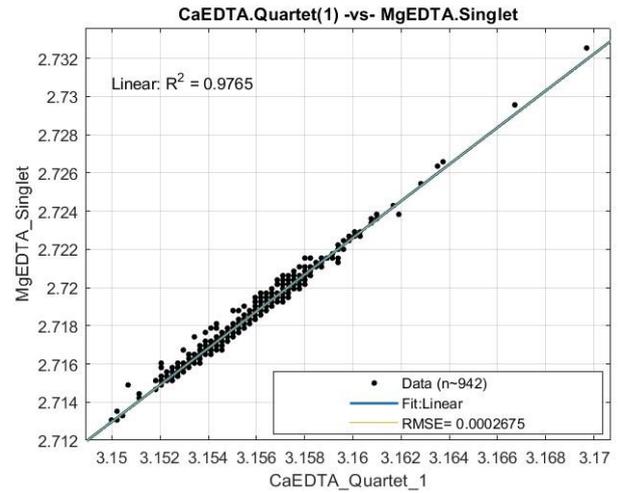
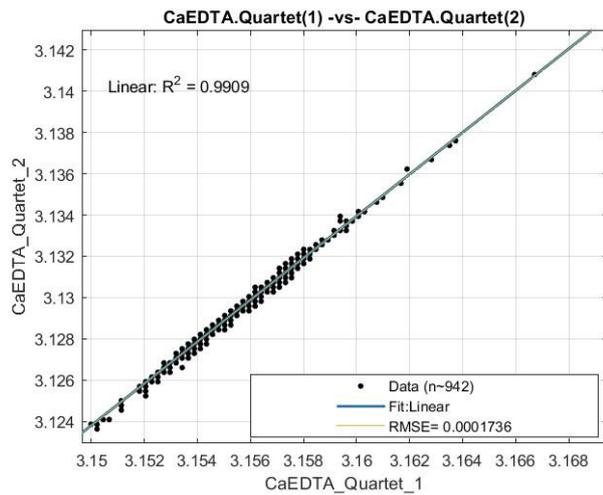
Στις Εικόνες 25, 26 και 27 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των συσχετίσεων μεταξύ των σημάτων του EDTA ελεύθερου και συμπλοκοποιημένου με τα μεταλλικά ιόντα, όπως προέκυψαν από την εφαρμογή της γραμμικής παλινδρόμησης.



Εικόνα 25: Διαγραμματική απεικόνιση των συσχετίσεων του Free EDTA1(3.59-3.67ppm)-Singlet με α) Free EDTA2(3.18-3.29ppm)-Singlet, β) [Ca (EDTA)] (2.56-2.59ppm)-Singlet, γ) [Ca (EDTA)](3.12-3.15ppm)-Quartet, δ) [Ca (EDTA)](3.15-3.17ppm)-Quartet, ε) [Mg (EDTA)](2.70-2.73ppm)-Singlet.



Εικόνα 26: Διαγραμματική απεικόνιση συσχετίσεων των Free EDTA2(3.18-3.29ppm)-Singlet με α) [Ca (EDTA)](2.56-2.59ppm)-Singlet, β) [Ca (EDTA)](3.12-3.15ppm)-Quartet, γ) [Ca (EDTA)](3.15-3.17ppm)-Quartet, δ) [Mg (EDTA)]- (2.70-2.73ppm)-Singlet.

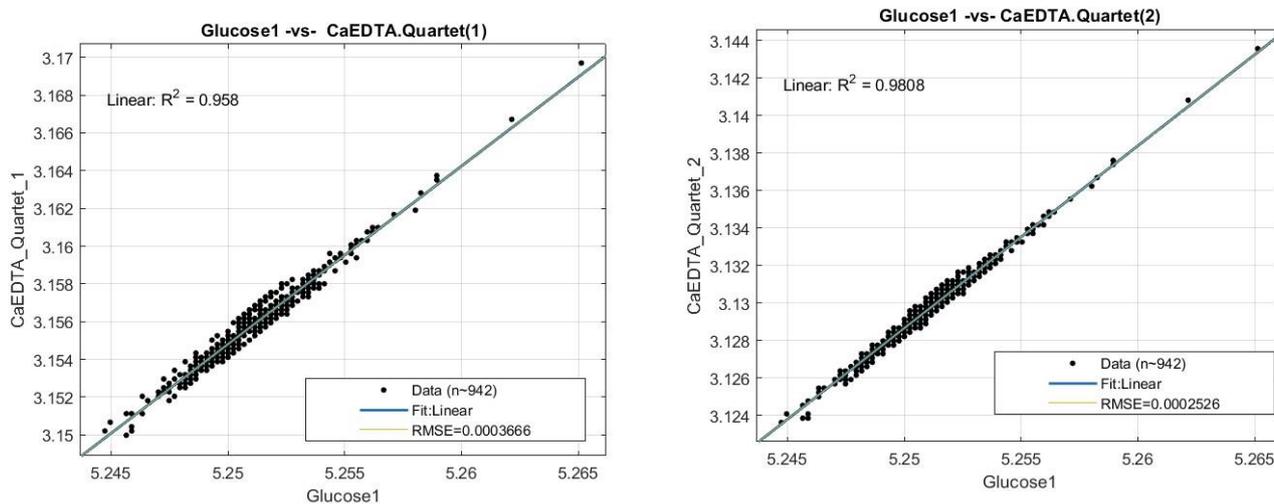


Εικόνα 27: Διαγραμματική απεικόνιση συσχετίσεων των α) $[Ca(EDTA)](3.15-3.17ppm)$ -Quartet με $[Ca(EDTA)](3.12-3.15ppm)$ -Quartet, β) $[Ca(EDTA)](3.15-3.17ppm)$ -Quartet με $[Mg(EDTA)](2.71-2.73ppm)$ -Singlet β) γ) $[Ca(EDTA)](3.15-3.17ppm)$ -Quartet με $[Ca(EDTA)](2.56-2.59ppm)$ -Singlet, δ) $[Ca(EDTA)](3.12-3.15ppm)$ -Quartet με $[Mg(EDTA)](2.71-2.73ppm)$ -Singlet ε) $[Ca(EDTA)](3.12-3.15ppm)$ -Quartet με $[Ca(EDTA)](2.56-2.59ppm)$ -Singlet στ) $[Mg(EDTA)](2.71-2.73ppm)$ -Singlet με $[Ca(EDTA)](2.56-2.59ppm)$ -Singlet.

Συσχετίσεις EDTA με μεταβολίτες

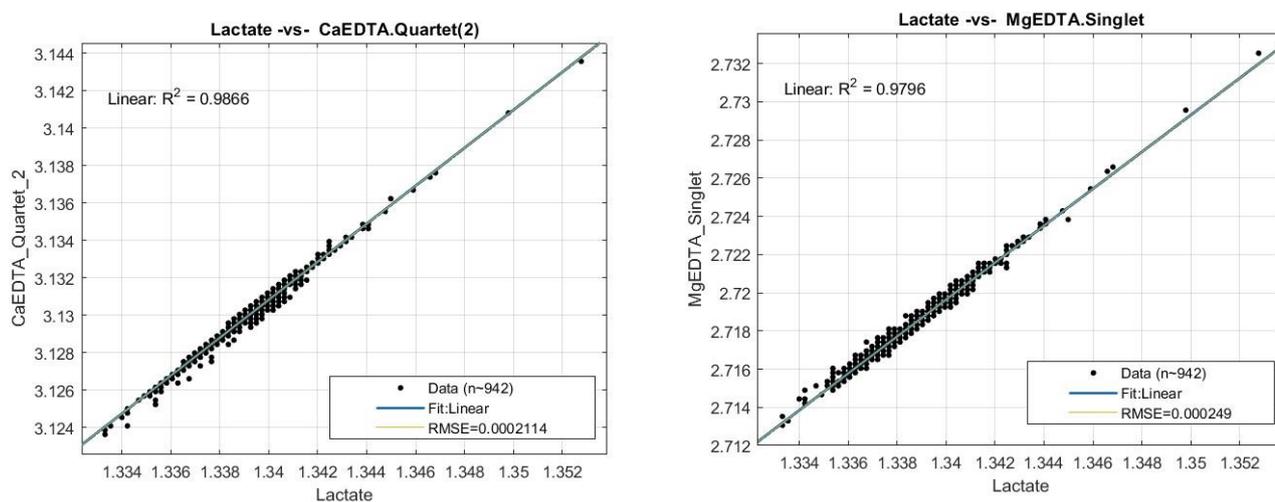
Στις Εικόνες 28-34 παρουσιάζονται οι ισχυρότερες συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν με $R^2 > 95\%$ μεταξύ των ενδογενών μεταβολιτών και των συμπλόκων του EDTA.

Γλυκόζη

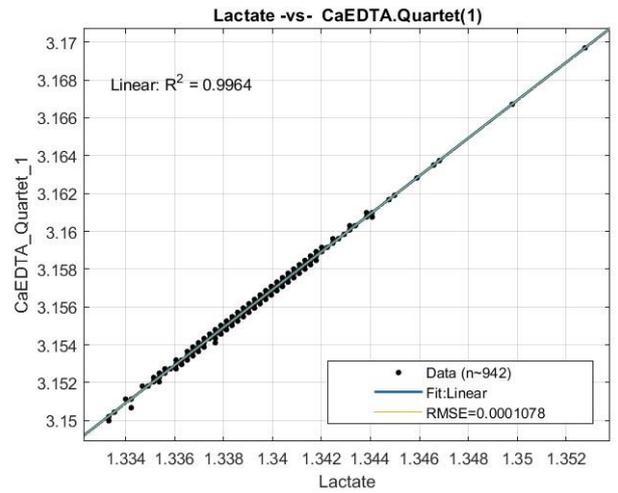
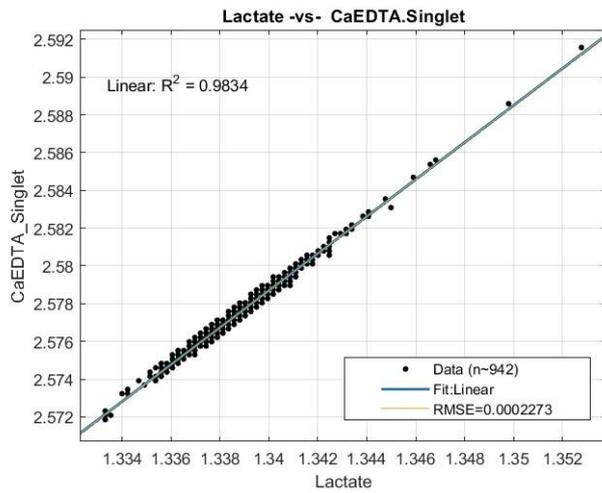


Εικόνα 28: Απεικόνιση συσχετίσεων της διπλής κορυφής της γλυκόζης με το σύμπλοκο του [Ca (EDTA)].

Γαλακτικό οξύ:

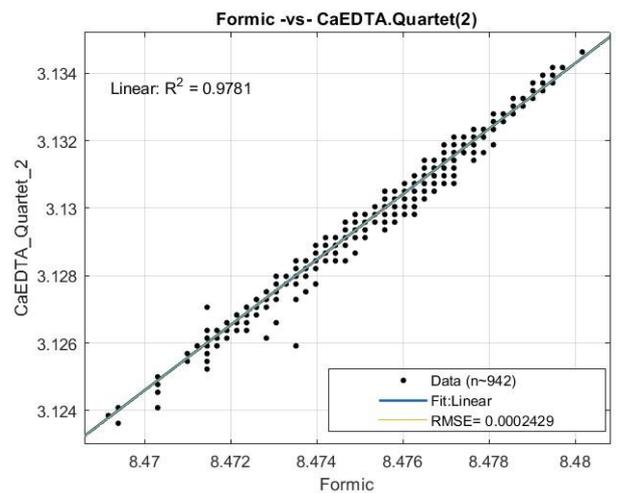
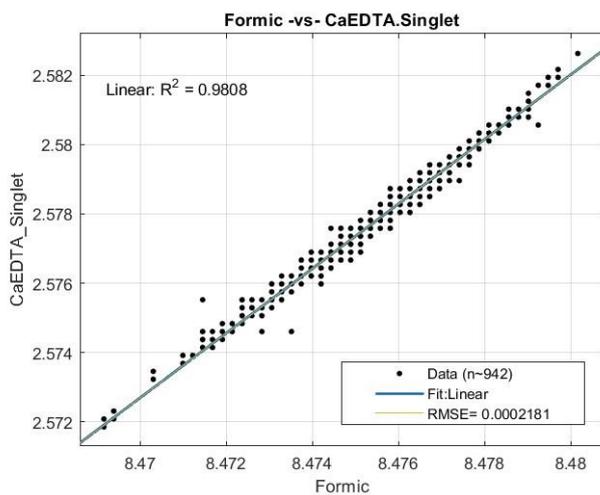
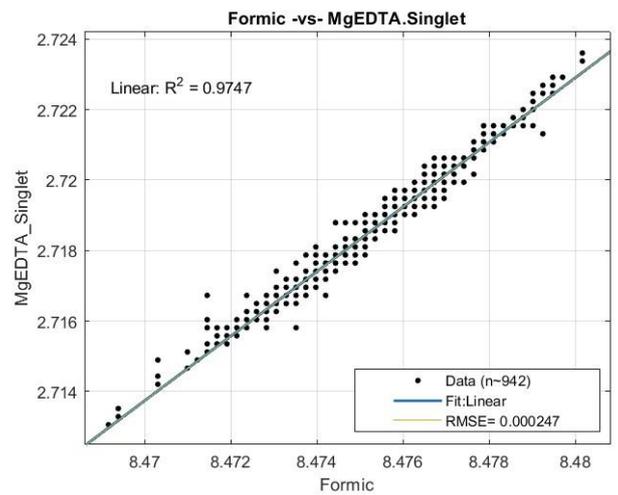
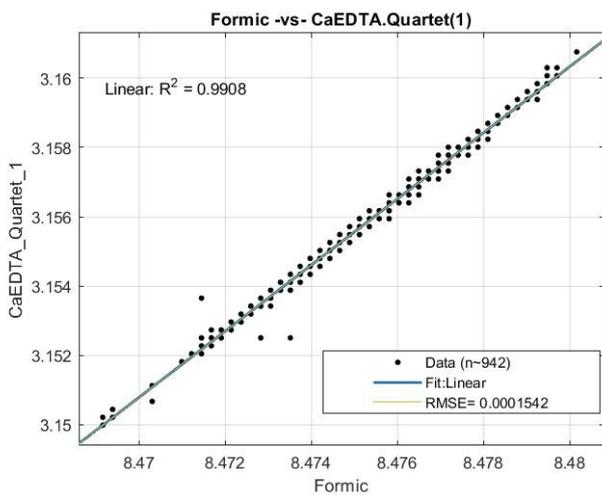


Εικόνα 29: Απεικόνιση συσχετίσεων της διπλής κορυφής της γαλακτικού οξέος με το σύμπλοκο του [Ca (EDTA)] και του [Mg (EDTA)].



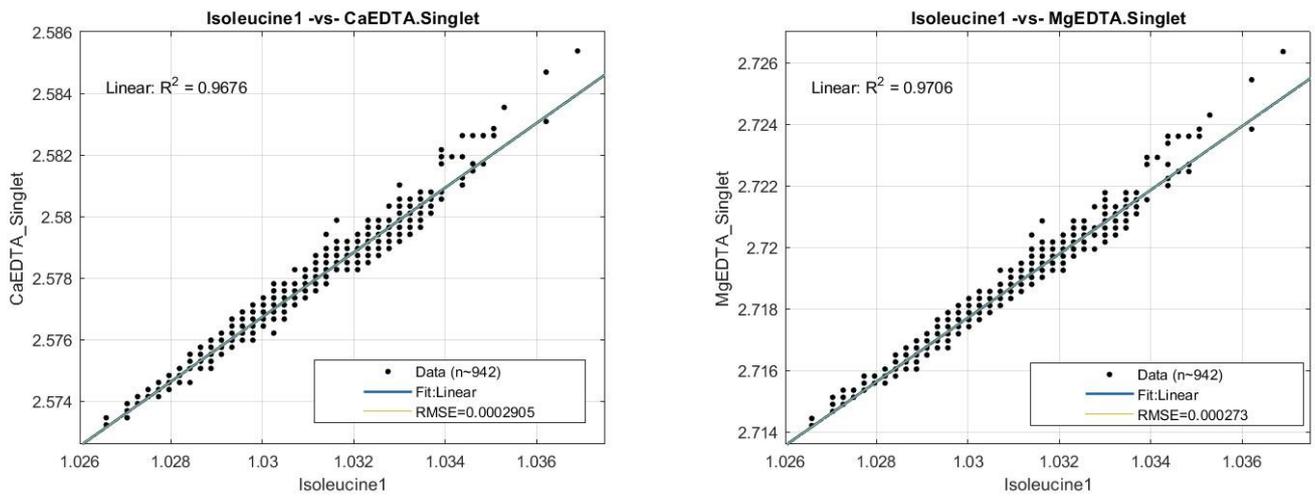
Εικόνα 30: Απεικόνιση συσχετίσεων της διπλής κορυφής της γαλακτικού οξέος με το σύμπλοκο του [Ca (EDTA)].

Φορμικό Οξύ



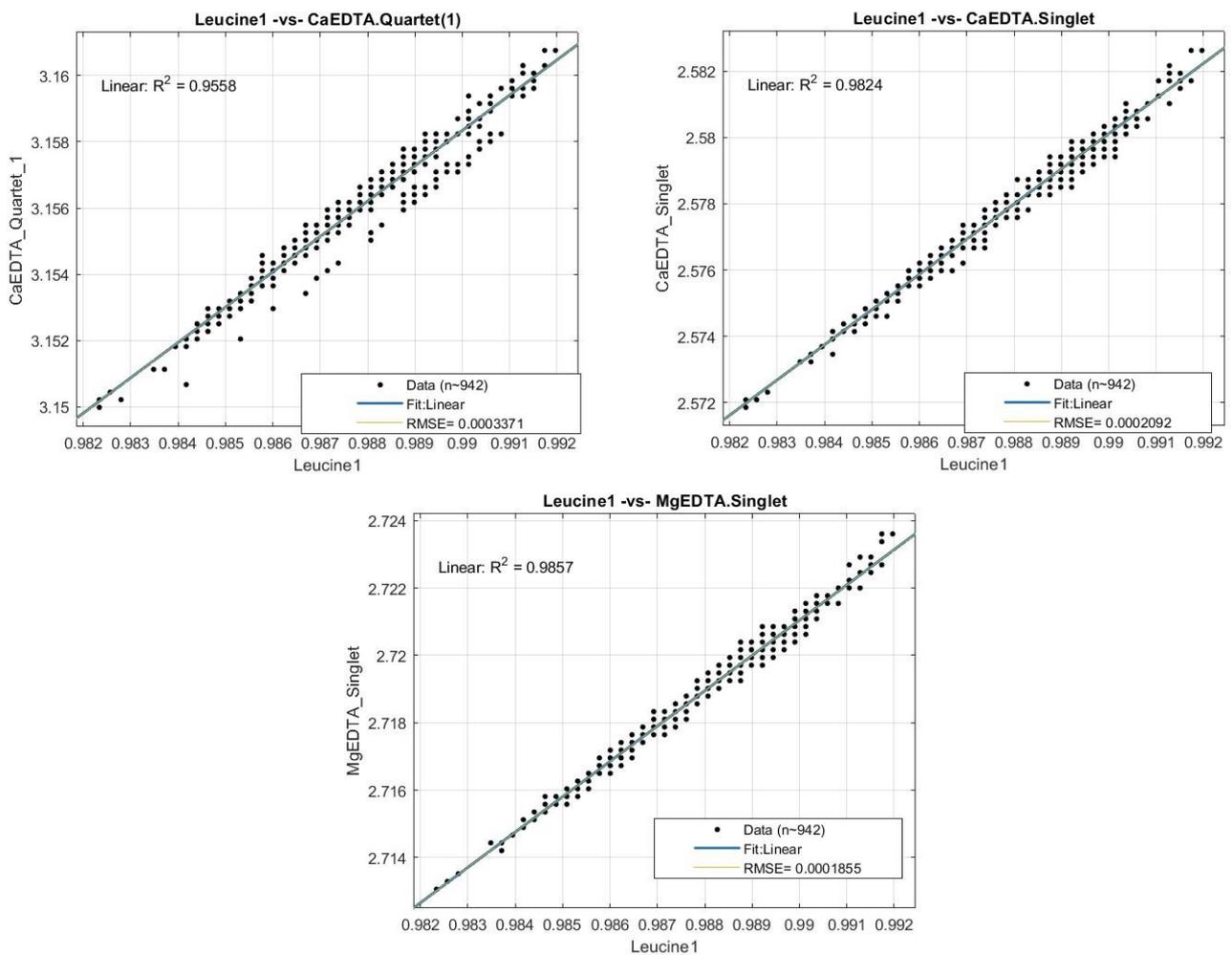
Εικόνα 31: Απεικόνιση συσχετίσεων της κορυφής του φορμικού οξέος με τα σύμπλοκα [Ca (EDTA)] και του [Mg (EDTA)].

Ισολευκίνη



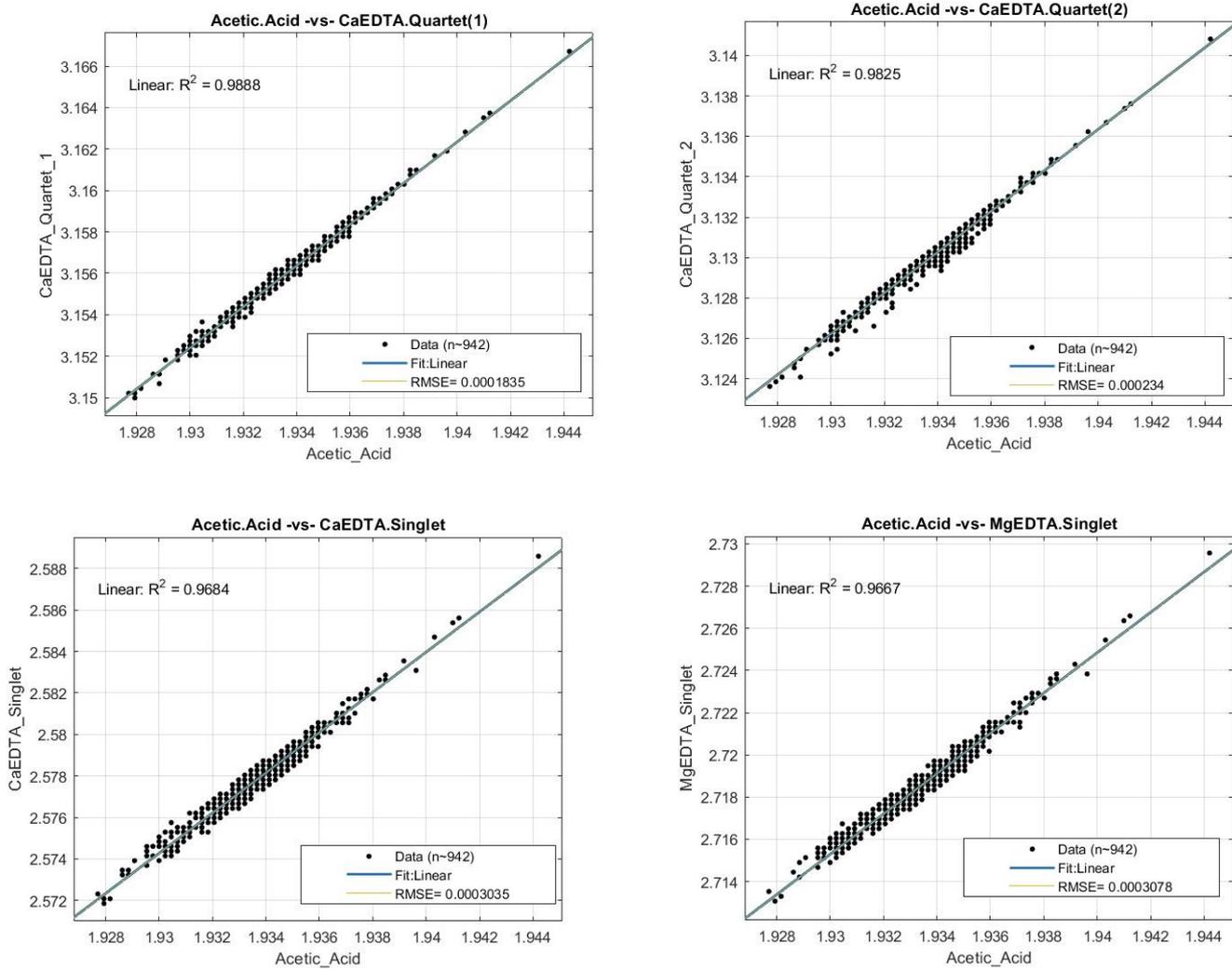
Εικόνα 32: Απεικόνιση συσχετίσεων της διπλής κορυφής της ισολευκίνης με τα σύμπλοκα [Ca (EDTA)] και του [Mg (EDTA)].

Λευκίνη



Εικόνα 33: Απεικόνιση συσχετίσεων της διπλής κορυφής της λευκίνης με τα σύμπλοκα [Ca (EDTA)] και του [Mg (EDTA)].

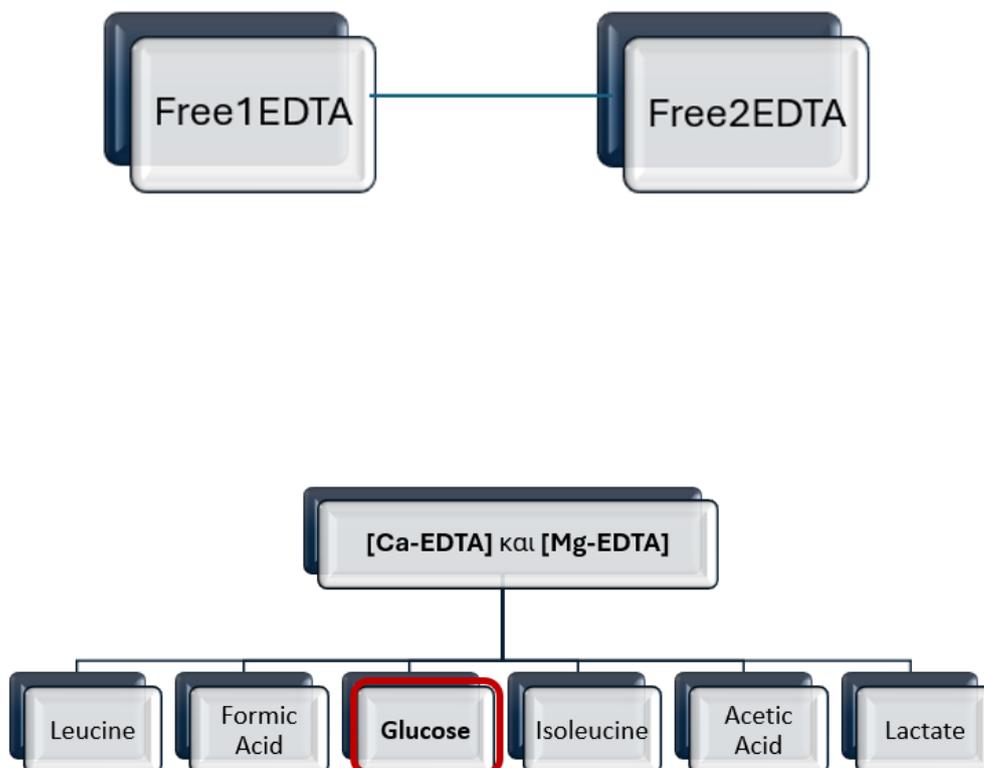
Οξικό οξύ



Εικόνα 34: Απεικόνιση συσχετίσεων της κορυφής του οξικού οξέος με τα σύμπλοκα [Ca (EDTA)] και του [Mg (EDTA)].

Χάρτης με τις καλύτερες συσχετίσεις

Με βάση τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης, δημιουργήθηκε ένας χάρτης συσχετίσεων, ο οποίος απεικονίζεται στην Εικόνα 35.

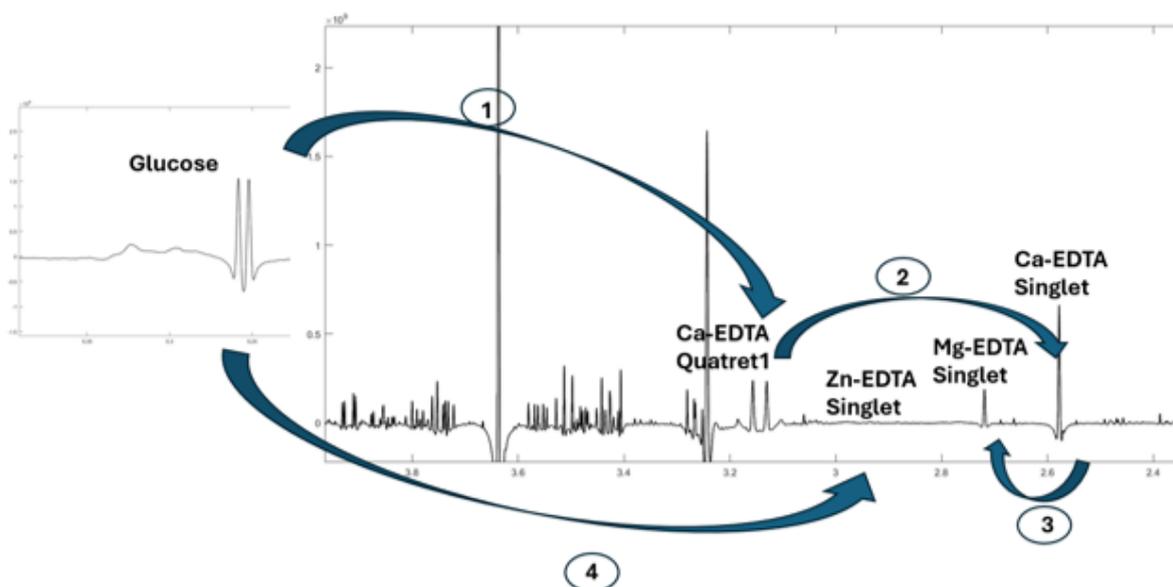
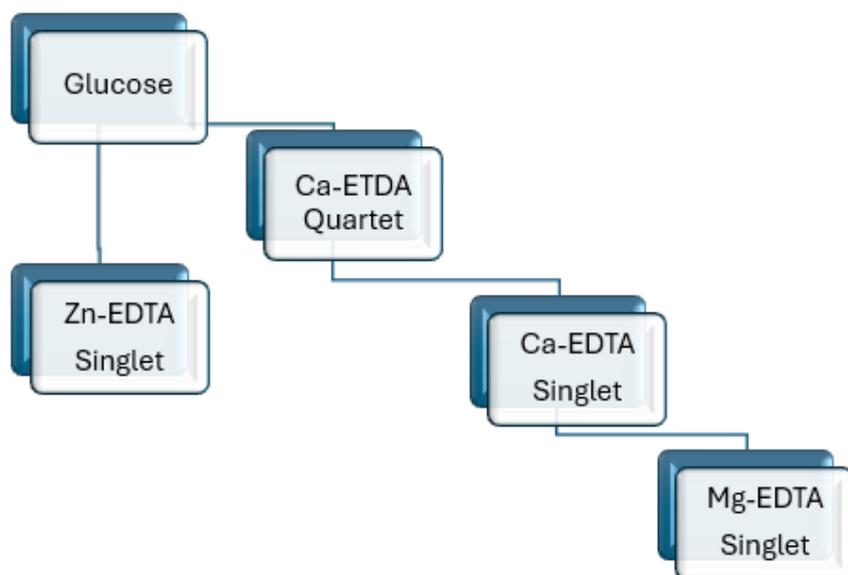


Εικόνα 35: Χάρτης συσχετίσεων μεταξύ μεταβολιτών και σημάτων του EDTA.

Παρατηρούμε ότι η καλύτερη συσχέτιση παρουσιάζεται μεταξύ της διπλής κορυφής της γλυκόζης και της τετραπλής κορυφής του συμπλόκου [Ca (EDTA)] ($\delta = 3.30-3.10$ ppm), με τιμή $R^2 = 0,98$. Η συγκεκριμένη συσχέτιση αποτέλεσε το βασικό σημείο αναφοράς για την ανάπτυξη του αυτοματοποιημένου αλγορίθμου.

Έτσι, αξιοποιώντας την γλυκόζη ως μεταβολίτη αναφοράς και το σύμπλοκο του [Ca (EDTA)] εντοπίζονται οι χημικές μετατοπίσεις των άλλων σημάτων του EDTA, μέσω των συσχετίσεων που ενσωματώθηκαν στον αναπτυγμένο αλγόριθμο.

Η διαδρομή που ακολουθήθηκε για την ανάπτυξη του αλγορίθμου απεικονίζεται σχηματικά στην Εικόνα 36.



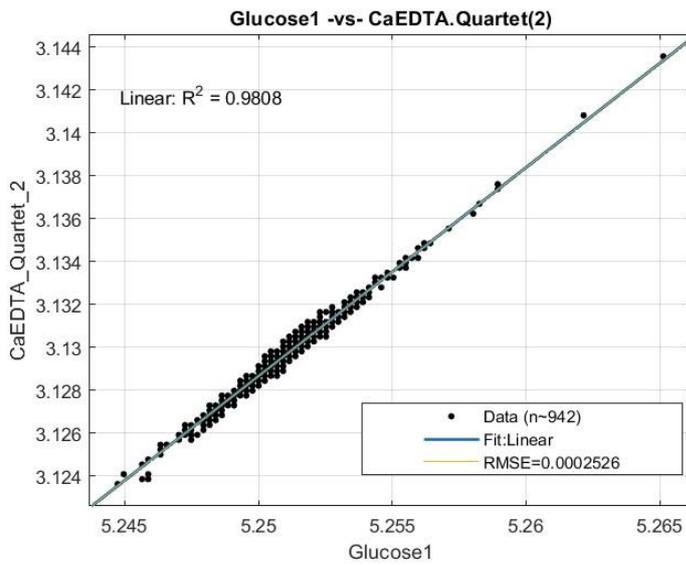
Εικόνα 36: Σχηματική απεικόνιση της ροής ανάπτυξης του αλγορίθμου.

Ανάπτυξη αλγορίθμου

Για την ολοκλήρωση του αλγορίθμου επιλέχθηκαν οι ισχυρότερες και στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των σημάτων του EDTA, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν ως κανόνες πρόβλεψης. Οι συσχετίσεις αυτές επιτρέπουν την ποιοτική ανίχνευση των σημάτων των συμπλόκων του EDTA με υψηλή ακρίβεια και αναπαραγωγιμότητα.

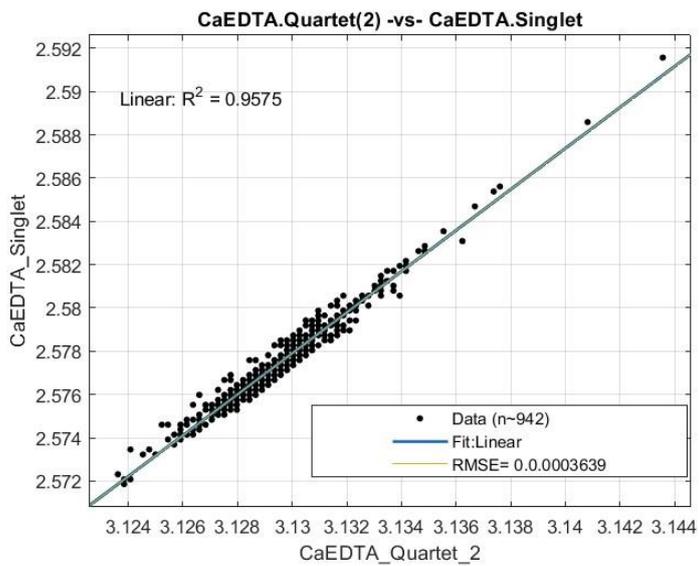
Επιπλέον, στις Εικόνες 37-40 παρουσιάζονται οι καλύτερες συσχετίσεις μεταξύ των σημάτων EDTA με τις οποίες βασιστήκαμε για να ολοκληρώσουμε τον αλγόριθμο με τον καλύτερο δυνατό τρόπο.

Γλυκόζη με Ca-EDTA(quartet) με $R^2 = 0,98$



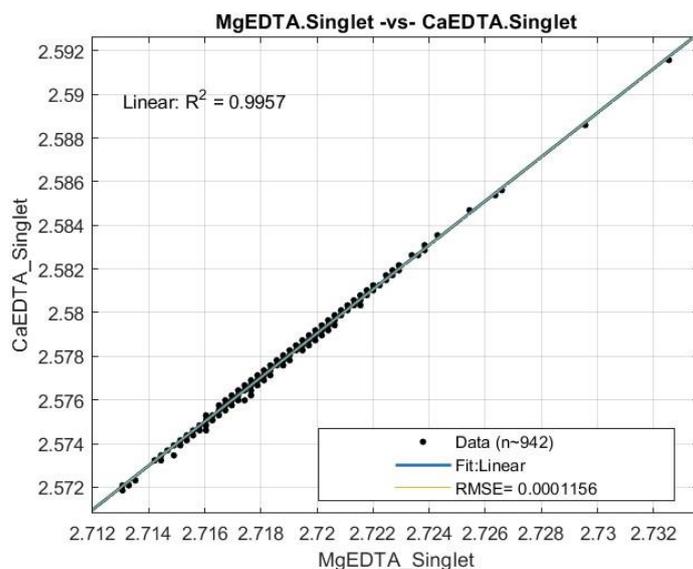
Εικόνα 37: Συσχέτιση της διπλής κορυφής της γλυκόζης με μία από την τετραπλή κορυφή του συμπλόκου [Ca (EDTA)].

Ca-EDTA (quartet) με Ca-EDTA (Singlet) με $R^2 = 0,96$



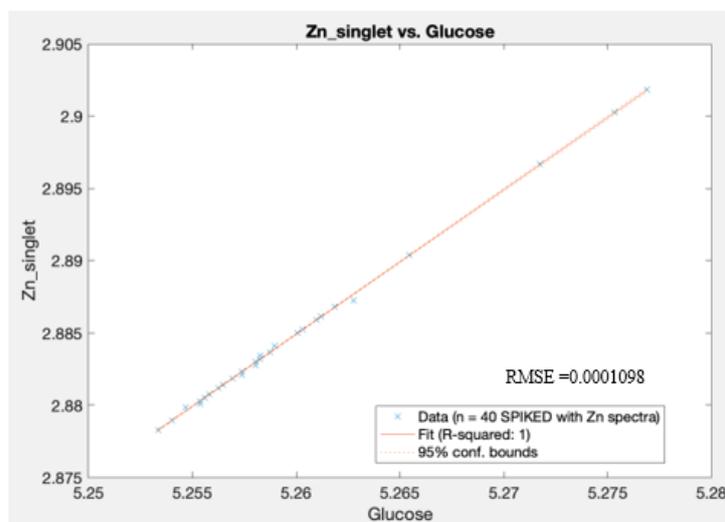
Εικόνα 38: Συσχέτιση μίας από την τετραπλή κορυφή του συμπλόκου [Ca (EDTA)] με την μονή κορυφή του ίδιου συμπλόκου.

Mg-EDTA (Singlet) με Ca-EDTA (Singlet) με $R^2 = 0,99$



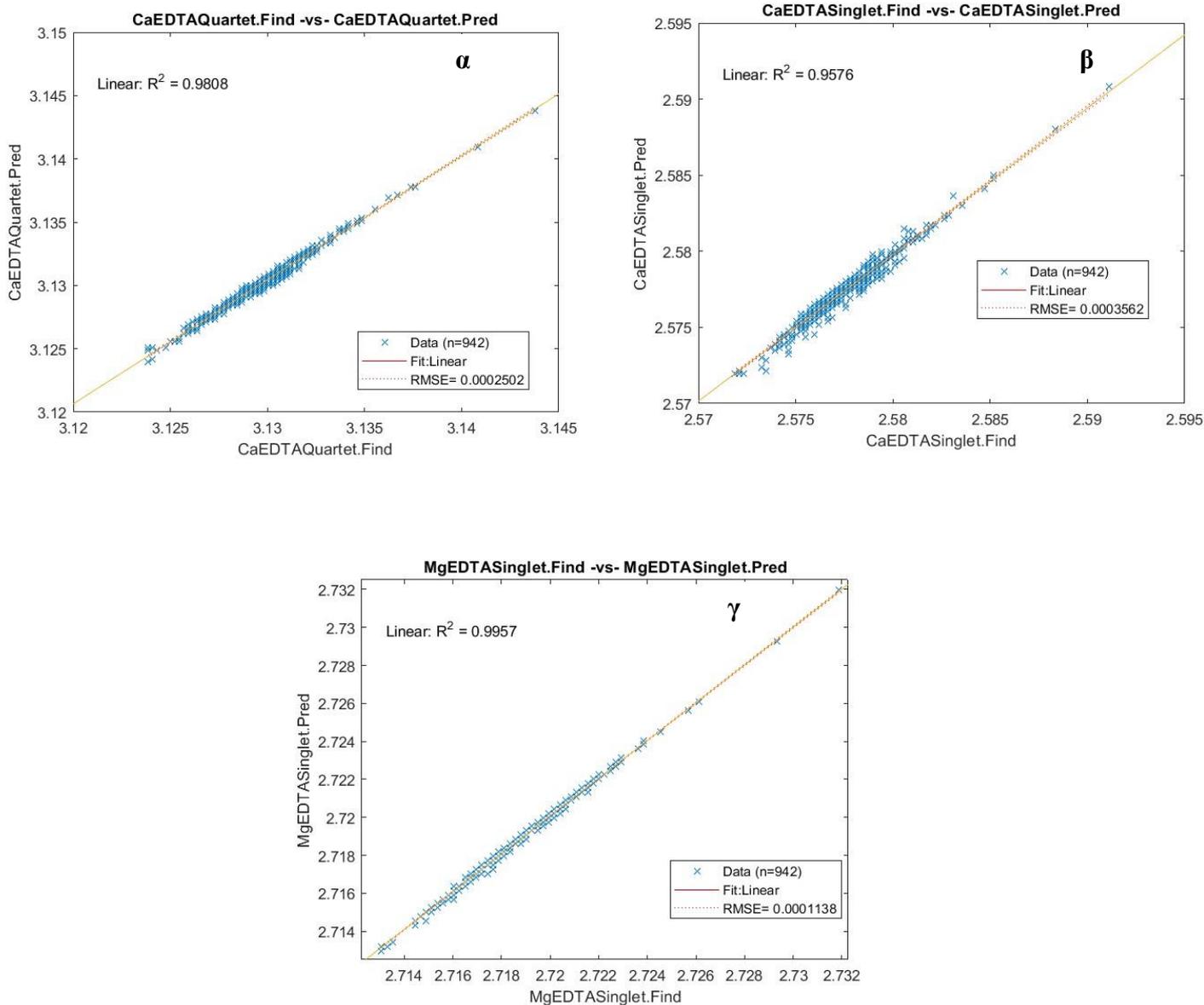
Εικόνα 39:Συσχέτιση της μονής κορυφής του συμπλόκου [Ca (EDTA)] με την μονή κορυφή του συμπλόκου [Mg (EDTA)].

Γλυκόζη με Zn-EDTA (Singlet) με $R^2 = 1$



Εικόνα 40:Συσχέτιση της διπλής κορυφής της γλυκόζης με την μονή κορυφή του συμπλόκου του [Zn (EDTA)].

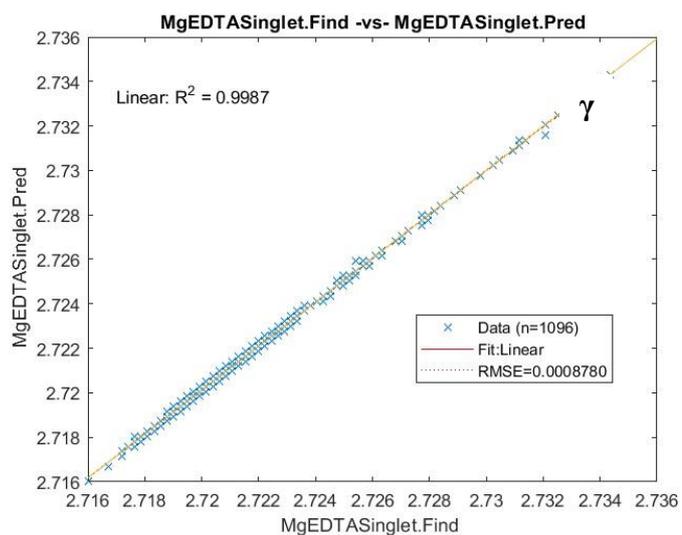
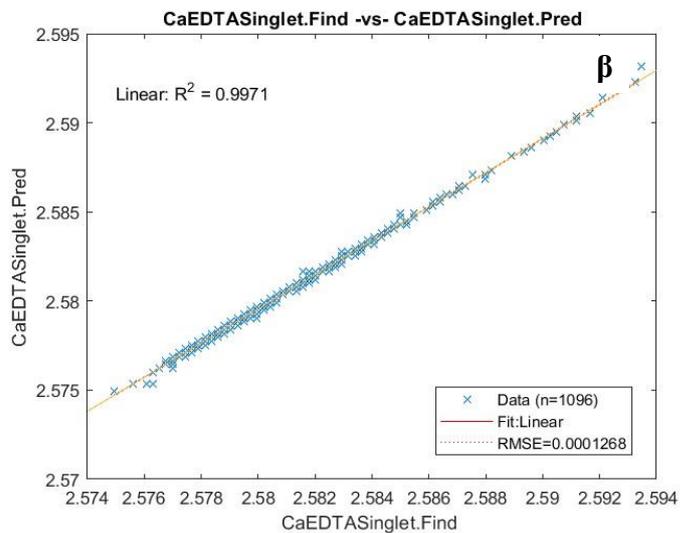
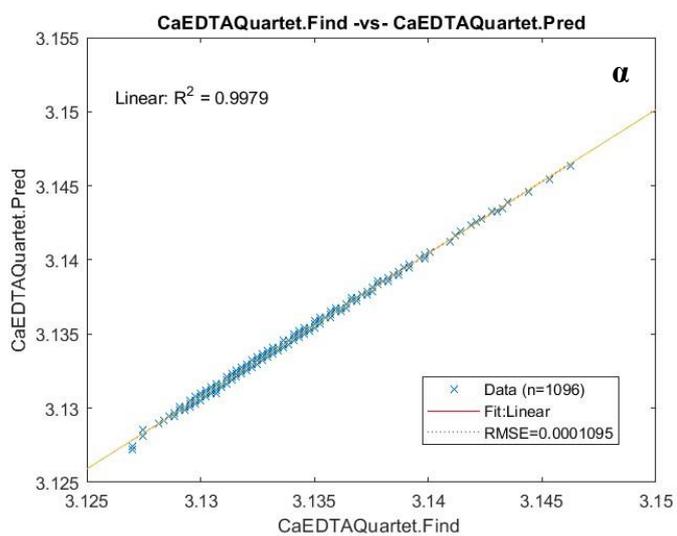
Μέσω των συσχετίσεων αυτών, αναπτύχθηκε ο αλγόριθμος για τον αυτοματοποιημένο εντοπισμό των σημάτων του EDTA. Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας, η έμφαση δόθηκε κυρίως στην ποιοτική ανίχνευση των σημάτων και στη σχετική ποσοτικοποίηση των μετάλλων. Ο αλγόριθμος βασίστηκε στο να προβλέπει τις χημικές μετατοπίσεις των κορυφών αυτών με τα αποτελέσματα να απεικονίζονται στην Εικόνα 41.



Εικόνα 41: Απεικόνιση αποτελεσμάτων με εφαρμογή του αλγορίθμου ανά κορυφή γίνοντας η συσχέτιση της πραγματικής τιμής των χημικών μετατοπίσεων και τις τιμές που προβλέπει ο αλγόριθμος σε 942 δείγματα πλάσματος. α) [Ca (EDTA)](3.12-3.15ppm)-Quartet, β) [Ca (EDTA)] (2.56-2.59ppm)-Single, γ)Mg (EDTA)] (2.70-2.73ppm)-Single.

12.2 Αποτελέσματα δοκιμής του αλγορίθμου

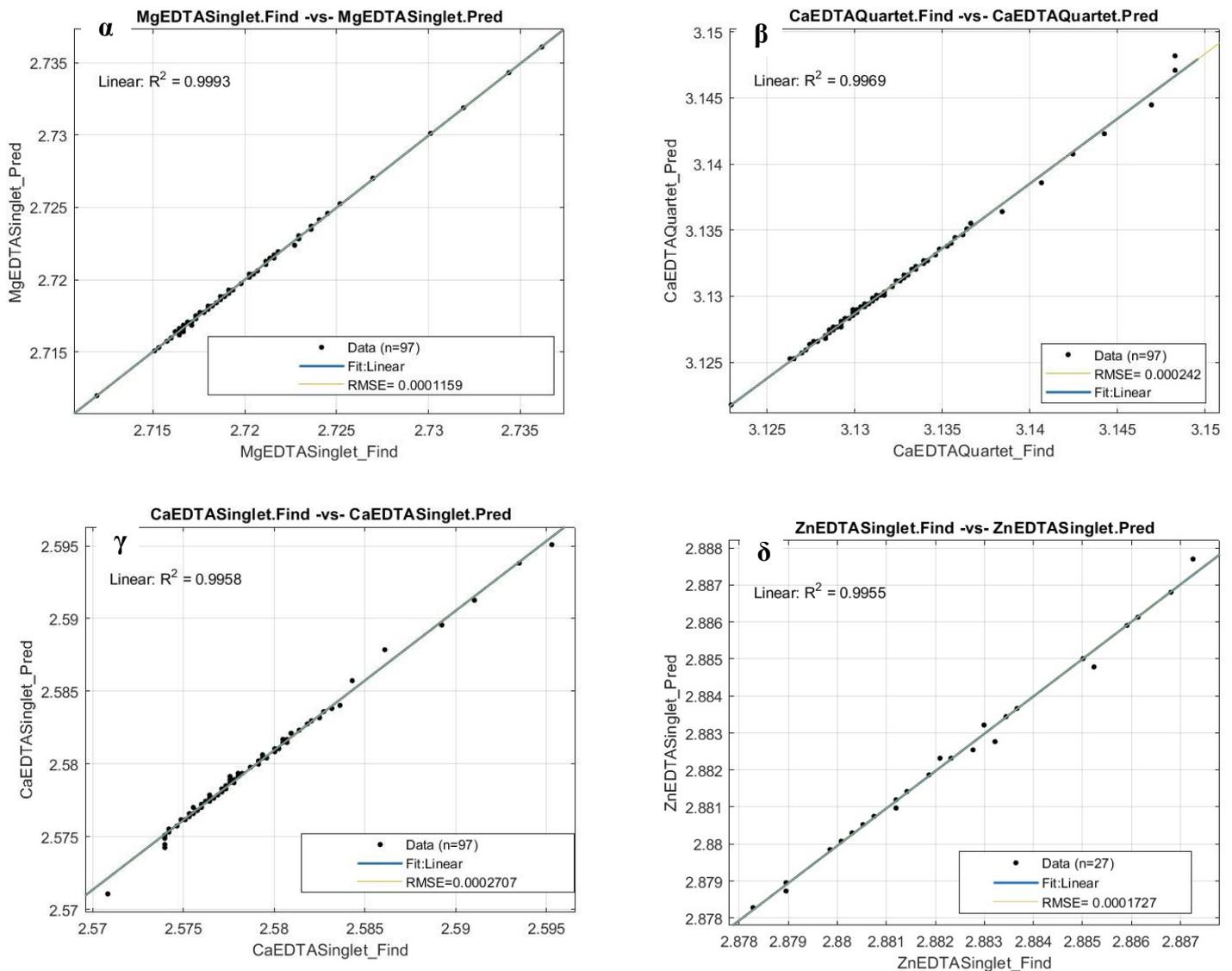
Στην Εικόνα 42 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της εφαρμογής του αλγορίθμου σε σύνολο 1096 φασμάτων $^1\text{H-NMR}$, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν αποκλειστικά για τη δοκιμή και την αξιολόγηση της μεθόδου. Ο αλγόριθμος μπορεί να προβλέψει με επιτυχία τις χημικές μετατοπίσεις των σημάτων του EDTA χρησιμοποιώντας ως σημείο αναφοράς την γλυκόζη.



Εικόνα 42: Απεικόνιση αποτελεσμάτων με εφαρμογή του αλγορίθμου ανά κορυφή γίνοντας η συσχέτιση της πραγματικής τιμής των χημικών μετατοπίσεων και τις τιμές που προβλέπει ο αλγόριθμος σε 1096 δείγματα πλάσματος, α) [Ca (EDTA)] (3.12-3.15ppm)-Quartet, β) [Ca (EDTA)] (2.56-2.59ppm)-Singlet, γ) Mg (EDTA)](2.70-2.73ppm)-Singlet.

12.3 Αποτελέσματα από νοσοκομειακά δείγματα

Η εφαρμογή του αλγορίθμου στα 97 δείγματα ορού αίματος που αναλύθηκαν στο εργαστήριο έδειξαν υψηλό βαθμό συμφωνίας και επαναληψιμότητας. Τα αποτελέσματα αυτών παρουσιάζονται στην Εικόνα 43 και επιβεβαιώνουν την καταλληλότητα της μεθοδολογίας και την αξιοπιστία της προτεινόμενης μεθοδολογίας σε πραγματικά κλινικά δείγματα.



Εικόνα 43: Απεικόνιση αποτελεσμάτων με εφαρμογή του αλγορίθμου ανά κορυφή γίνοντας η συσχέτιση της πραγματικής τιμής των χημικών μετατοπίσεων και τις τιμές που προβλέπει ο αλγόριθμος σε 97 δείγματα ορού αίματος για το ασβέστιο και το μαγνήσιο και σε 29 δείγματα για τον ψευδάργυρο. α) [Ca (EDTA)] (3.12-3.15ppm)-Quartet, β) [Ca (EDTA)] (2.56-2.59ppm)-Singlet, γ) Mg (EDTA)] (2.70-2.73ppm)-Singlet και δ) Zn (EDTA)] (2.87-2.89ppm)-Singlet

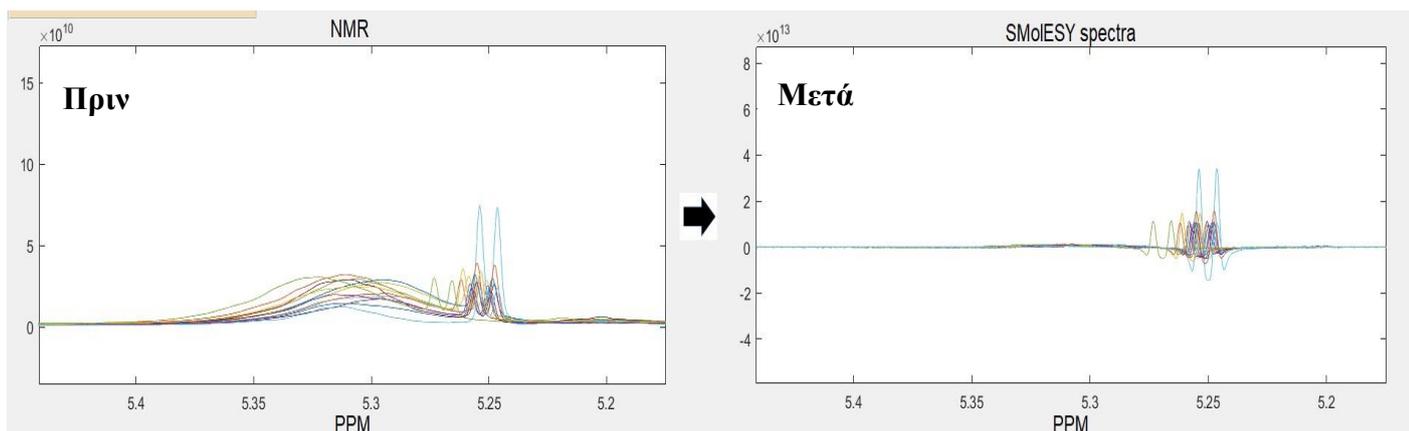
12.4 Ποσοτικοποίηση μετάλλων

Σε αυτήν την διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε σχετική ποσοτικοποίηση των μεταλλικών ιόντων μέσω της φασματοσκοπίας NMR. Ο προσδιορισμός της σχετικής ποσοτικοποίησης είναι ο πιο συνηθισμένος τύπος ποσοτικής φασματοσκοπίας NMR και πιο εύκολος στην υλοποίηση διότι δεν απαιτείται πρότυπο, αλλά μελετάμε μόνο τις αναλογίες των ολοκληρωμάτων.

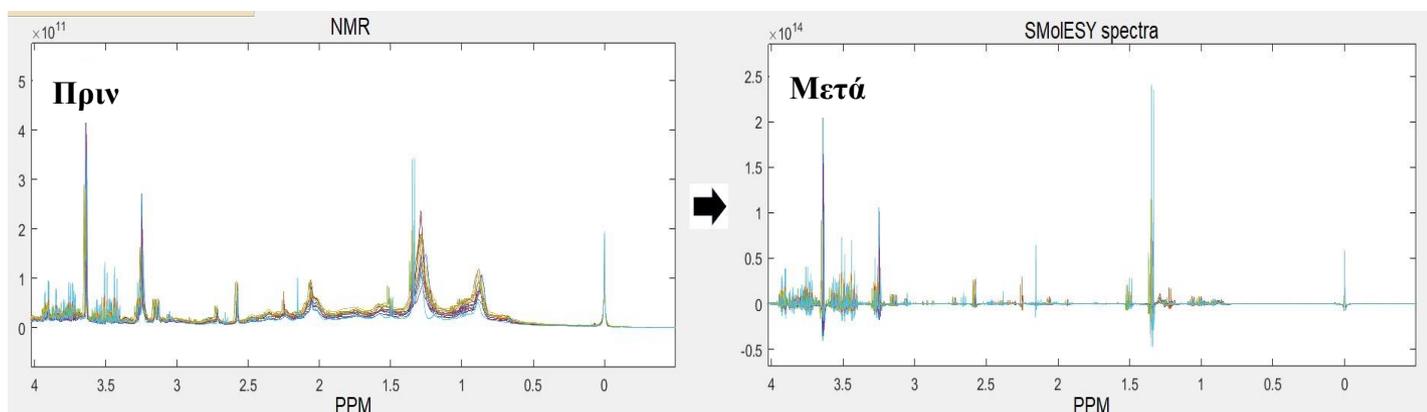
Η σχετική ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε μέσω ολοκλήρωσης των κορυφών στα φάσματα NMR, χρησιμοποιώντας το λογισμικό SMOIESY platform. Η πλατφόρμα αυτή βελτιώνει τη φασματική ανάλυση μέσω υπολογισμού της πρώτης παραγώγου των δεδομένων επιτυγχάνοντας την αποτελεσματική καταστολή των μακρομοριακών σημάτων και την εξάλειψη παρεμβολών γραμμής βάσης, καθώς και διακυμάνσεων από δείγμα σε δείγμα.

Στην Εικόνα 44 παρουσιάζονται ενδεικτικά φάσματα πριν και μετά την εφαρμογή της πλατφόρμας SMOIESY, ενώ στην Εικόνα 45 και στην Εικόνα 46 απεικονίζονται τα σήματα των συμπλόκων [Ca (EDTA)] και [Mg (EDTA)] για τα 97 δείγματα ορού αίματος στα φάσματα NMR πριν και μετά την χρήση της πλατφόρμας, επιβεβαιώνοντας τη σημαντική βελτίωση της ποιότητας των φασμάτων μετά την επεξεργασία.

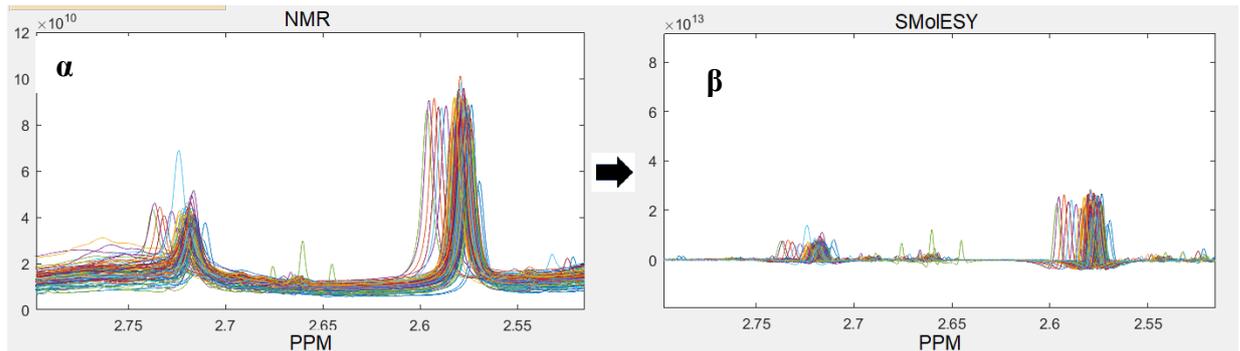
Γλυκόζη



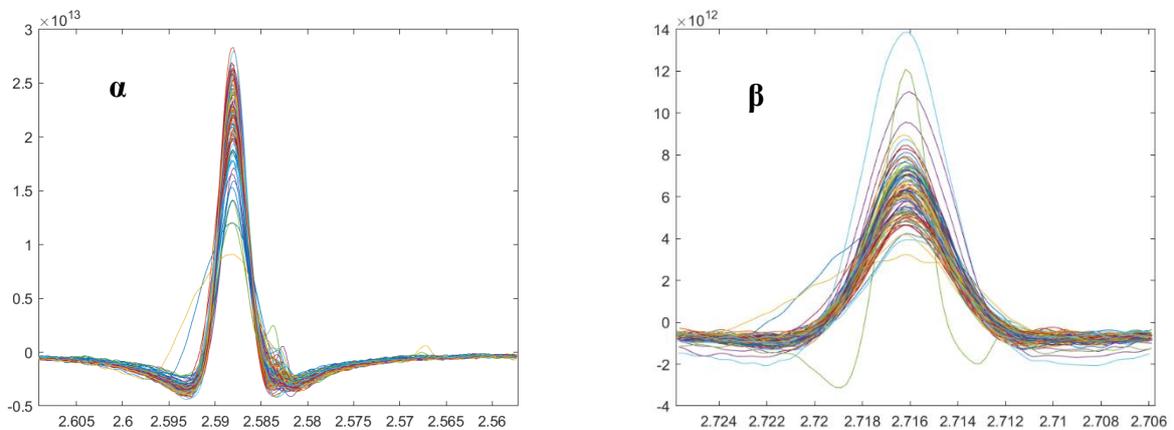
Φάσματα NMR



Εικόνα 44: Απεικόνιση φασμάτων NMR πριν και μετά την χρήσης της πλατφόρμας SMOIESY.

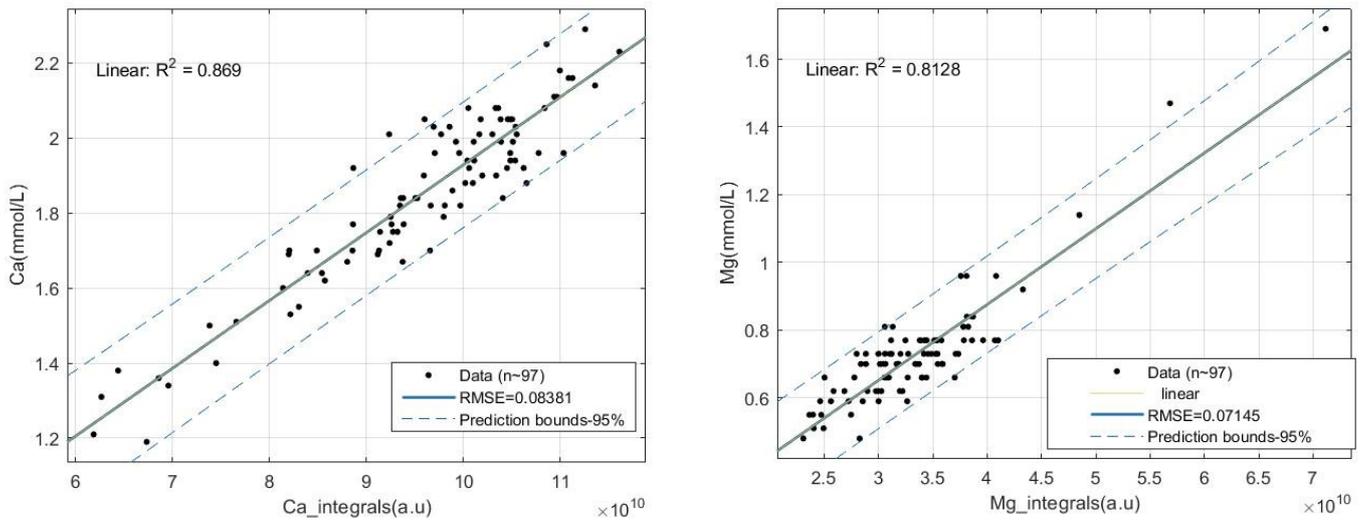


Εικόνα 45: Απεικόνιση φασμάτων NMR πριν και μετά την χρήσης της πλατφόρμας SMOIESY, των σημάτων των συμπλόκων των μονών κορυφών α) [Ca (EDTA)] και β) [Mg (EDTA)] (97 δειγμάτων ορού αίματος).



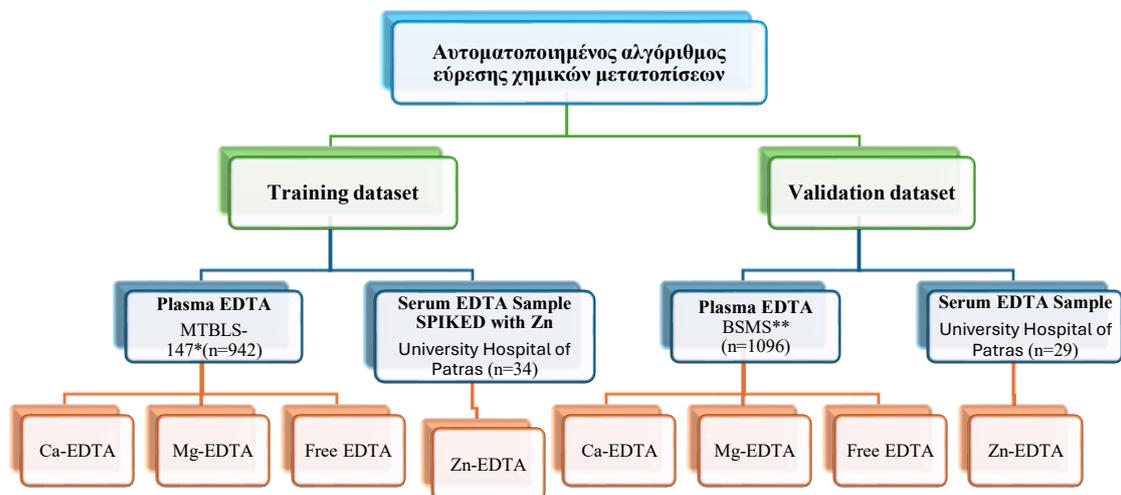
Εικόνα 46: Απεικόνιση σημάτων των συμπλόκων α) [Ca (EDTA)] και β) [Mg (EDTA)] μετά την ευθυγράμμιση.

Στην συνέχεια, στην Εικόνα 47 παρουσιάζονται τα διαγράμματα τα οποία δείχνουν τις συσχετίσεις μεταξύ των πραγματικών τιμών των συγκεντρώσεων των μετάλλων, όπως προσδιορίστηκαν με κλινικές μεθόδους σε συνάρτηση με τα ολοκληρώματα των κορυφών που προέκυψαν από τα φάσματα που λάβαμε από την ανάλυση NMR μέσω SMOIESY. Τα αποτελέσματα δείχνουν ικανοποιητική συσχέτιση.



Εικόνα 47: Γραμμική συσχέτιση των ολοκληρωμάτων μέσω SMoIESY με τις πραγματικές συγκεντρώσεις σε (mmol/L). Αριστερά είναι του ασβεστίου και δεξιά του μαγνησίου.

Τέλος, στην Εικόνα 48 παρατίθεται συνοπτικά ένα διάγραμμα με τα φασματικά δεδομένα που μελετήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία.



Εικόνα 48: Συνοπτικό διάγραμμα με τα φασματικά δεδομένα που ερευνήθηκαν.

13. Συμπεράσματα και παρατηρήσεις

Η παρούσα διπλωματική εργασία επικεντρώθηκε στην ανάπτυξη και την εφαρμογή μιας αυτοματοποιημένης μεθοδολογίας ελέγχου ποιότητας (QC) για την ανίχνευση των παρεμβαλλόμενων σημάτων του αντιπηκτικού EDTA στα πρωτονιακά φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ($^1\text{H-NMR}$) σε βιολογικά δείγματα αίματος. Η μεθοδολογία αφορά τόσο την ελεύθερη μορφή EDTA όσο και όταν είναι συμπλοκοποιημένο με τα μέταλλα Ca^{2+} , Mg^{2+} , και Zn^{2+} .

Η ανάγκη ανάπτυξης της συγκεκριμένης μεθοδολογίας προέκυψε από το γεγονός ότι η παρουσία του EDTA, ενός ευρέως χρησιμοποιούμενου αντιπηκτικού, στην μεταβολομική ανάλυση μπορεί να προκαλέσει επικαλύψεις με σήματα ενδογενών μεταβολιτών, οδηγώντας σε σφάλματα στην ερμηνεία των φασματικών δεδομένων και σε μειωμένη αναπαραγωγιμότητα των αποτελεσμάτων. Συνεπώς, καθίσταται απαραίτητη η ύπαρξη αξιόπιστων και αυτοματοποιημένων εργαλείων ελέγχου ποιότητας για την διασφάλιση της αναπαραγωγιμότητας και της εγκυρότητας των μεταβολομικών δεδομένων NMR.

Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας αναπτύχθηκε ένας αυτοματοποιημένος αλγόριθμος πρόβλεψης χημικών μετατοπίσεων, βασισμένος σε στατιστικά μοντέλα συσχετίσεων που υλοποιήθηκαν στο περιβάλλον της MATLAB. Ο αλγόριθμος αξιοποίησε τη γλυκόζη ως μεταβολίτη αναφοράς, δεδομένου ότι βρίσκεται σχεδόν πάντα σε αφθονία στο αίμα και εμφανίζει διακριτά σήματα NMR, συνήθως χωρίς επικαλύψεις από άλλους μεταβολίτες ($\delta = 5,23\text{-}5,28$ ppm). Η γλυκόζη συσχετίζεται με τη χαρακτηριστική κορυφή του συμπλόκου $[\text{Ca}-(\text{EDTA})]$, με συντελεστή συσχέτισης $R^2 = 0,98$, γεγονός που υποδηλώνει υψηλή ακρίβεια στη στατιστική πρόβλεψη των σημάτων.

Μέσω της ανάλυσης των συσχετίσεων αυτών, καθώς και των μεταξύ τους σχέσεων με άλλους ενδογενείς μεταβολίτες, διαπιστώθηκε ότι τα σήματα του EDTA, τόσο στην ελεύθερη όσο και στη συμπλοκοποιημένη μορφή του με μεταλλικά ιόντα (Ca^{2+} , Mg^{2+} , και Zn^{2+}), μπορούν να εντοπιστούν αξιόπιστα και πλήρως αυτοματοποιημένα, μέσω της πρόβλεψης των χημικών τους μετατοπίσεων.

Η αξιολόγηση και η επικύρωση της μεθόδου έγινε σε 1096 φάσματα από διαφορετικά βιολογικά δείγματα, όπου παρατηρήθηκαν πολύ καλές συσχετίσεις μεταξύ των προβλεπόμενων και των πραγματικών τιμών των χημικών μετατοπίσεων των φασμάτων, με συντελεστή $R^2 > 0,99$. Επιπλέον, αντίστοιχα αποτελέσματα προέκυψαν και στα 97 δείγματα ορού αίματος που ελήφθησαν από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Πατρών με συντελεστή συσχέτισης $R^2 > 0,99$, γεγονός που επιβεβαιώνει την αναπαραγωγιμότητα και την αξιοπιστία της προτεινόμενης μεθοδολογίας.

Επιπλέον, με τη χρήση της πλατφόρμας SMOIESY, πραγματοποιήθηκε ποσοτική ανάλυση των μεταλλικών ιόντων. Αρχικά, έγινε ολοκλήρωση των κορυφών των συμπλόκων $[\text{Ca}-(\text{EDTA})]$ και $[\text{Mg}-(\text{EDTA})]$, και μετέπειτα πραγματοποιήθηκε σύγκριση των ολοκληρωμάτων με τις πραγματικές μετρήσεις των κλινικών τιμών (συγκεντρώσεων) των μετάλλων αυτών, δίνοντας συντελεστή συσχέτισης $R^2 > 0,80$. Αυτό το αποτέλεσμα υποδηλώνει ότι η μέθοδος δεν περιορίζεται μόνο στην ανίχνευση των σημάτων του EDTA, αλλά μπορεί να συμβάλει και στην ποσοτική φασματοσκοπία NMR των μεταλλικών ιόντων στο αίμα, ενισχύοντας την διαγνωστική και κλινική αξία της φασματοσκοπίας NMR.

Συμπερασματικά, η προτεινόμενη μέθοδος αποτελεί μια αξιόπιστη αυτοματοποιημένη τεχνική που συνεισφέρει στον έλεγχο ποιότητας (QC) στην μεταβολομική ανάλυση μέσω NMR, προσφέροντας υψηλή ακρίβεια στον εντοπισμό των χημικών μετατοπίσεων καθώς και την δυνατότητα για περαιτέρω κλινική και μεταβολομική αξία μέσω της ποσοτικοποίησης των μετάλλων.

Παρόλα αυτά, η εργασία μπορεί να προσφέρει προοπτικές για περαιτέρω έρευνα, τόσο στον τομέα της μεταβολομικής όσο και στην ποσοτική φασματοσκοπία NMR. Κάποιες μελλοντικές προοπτικές μπορεί να είναι η αυτόματη αφαίρεση αυτών των παραβαλλομένων σημάτων του EDTA ώστε να είναι πιο εύκολη η ανάλυση των φασμάτων για ενδογενείς μεταβολίτες. Επιπλέον άλλη μια προοπτική είναι η απόλυτη ποσοτικοποίηση των μεταλλικών ιόντων μέσω της ανάπτυξης και της συνέχειας αυτού του αλγορίθμου.

Έτσι μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η εργασία συμβάλει στην βελτίωση των εργαλείων ελέγχου ποιότητας στη μεταβολομική ανάλυση και μπορεί να ανοίξει νέους δρόμους για εφαρμογές στη ποσοτική και την κλινική ερμηνεία των φασματικών δεδομένων.

Βιβλιογραφία

- (1) Nagana Gowda, G. A.; Raftery, D. Chapter 8 - Advances in NMR-Based Metabolomics. In *Comprehensive Analytical Chemistry*; Simó, C., Cifuentes, A., García-Cañas, V., Eds.; Elsevier, 2014; Vol. 63, pp 187–211. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62651-6.00008-8>.
- (2) Nagana Gowda, G. A.; Raftery, D. Can NMR Solve Some Significant Challenges in Metabolomics? *Journal of Magnetic Resonance* **2015**, *260*, 144–160. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmr.2015.07.014>.
- (3) Gowda, N.; Raftery, D. NMR-Based Metabolomics. In *Advances in experimental medicine and biology*; 2021; Vol. 1280, pp 19–37. https://doi.org/10.1007/978-3-030-51652-9_2.
- (4) Mathuthu, E.; Janse van Rensburg, A.; Du Plessis, D.; Mason, S. EDTA as a Chelating Agent in Quantitative ¹H-NMR of Biologically Important Ions. *Biochemistry and Cell Biology* **2021**, *99* (4), 465–475. <https://doi.org/10.1139/bcb-2020-0543>.
- (5) Hafer, E.; Dr. Holzgrabe, U.; Kraus, K.; Adams, K.; Hook, J.; Diehl, B. Qualitative and Quantitative ¹H NMR Spectroscopy for Determination of Divalent Metal Cation Concentration in Model Salt Solutions, Food Supplements and Pharmaceutical Products by Using EDTA as Chelating Agent. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2020**, *58*. <https://doi.org/10.1002/mrc.5009>.
- (6) Hao, J.; Liebeke, M.; Astle, W.; De Iorio, M.; Bundy, J. G.; Ebbels, T. M. D. Bayesian Deconvolution and Quantification of Metabolites in Complex 1D

- NMR Spectra Using BATMAN. *Nat. Protoc.* **2014**, *9* (6), 1416–1427.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2014.090>.
- (7) Ravanbakhsh, S.; Liu, P.; Bjordahl, T. C.; Mandal, R.; Grant, J. R.; Wilson, M.; Eisner, R.; Sinelnikov, I.; Hu, X.; Luchinat, C.; Greiner, R.; Wishart, D. S. Accurate, Fully-Automated NMR Spectral Profiling for Metabolomics. *PLoS One* **2015**, *10* (5), e0124219-.
 - (8) Röhnisch, H. E.; Eriksson, J.; Tran, L. V; Müllner, E.; Sandström, C.; Moazzami, A. A. Improved Automated Quantification Algorithm (AQuA) and Its Application to NMR-Based Metabolomics of EDTA-Containing Plasma. *Anal. Chem.* **2021**, *93* (25), 8729–8738.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c04233>.
 - (9) Tardivel, P. J. C.; Canlet, C.; Lefort, G.; Tremblay-Franco, M.; Debrauwer, L.; Concordet, D.; Servien, R. ASICS: An Automatic Method for Identification and Quantification of Metabolites in Complex 1D 1H NMR Spectra. *Metabolomics* **2017**, *13* (10), 109. <https://doi.org/10.1007/s11306-017-1244-5>.
 - (10) Gómez, J.; Brezmes, J.; Mallol, R.; Rodríguez, M. A.; Vinaixa, M.; Salek, R. M.; Correig, X.; Cañellas, N. Dolphin: A Tool for Automatic Targeted Metabolite Profiling Using 1D and 2D 1H-NMR Data. *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406* (30), 7967–7976. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8225-6>.
 - (11) 29140435 (1).
 - (12) Hoch, J. C.; Baskaran, K.; Burr, H.; Chin, J.; Eghbalnia, H. R.; Fujiwara, T.; Gryk, M. R.; Iwata, T.; Kojima, C.; Kurisu, G.; Maziuk, D.; Miyanoiri, Y.; Wedell, J. R.; Wilburn, C.; Yao, H.; Yokochi, M. Biological Magnetic Resonance Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **2023**, *51* (D1), D368–D376.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkac1050>.
 - (13) NMR-Active Nuclei for Biological and Biomedical Applications. *J. Diagn. Imaging Ther.* **2016**, *3*, 7–48. <https://doi.org/10.17229/jdit.2016-0618-021>.
 - (14) Becker, Edwin D. *High Resolution NMR Theory and Chemical Applications THIRD EDITION*.
 - (15) Marion, D. An Introduction to Biological NMR Spectroscopy. *Molecular and Cellular Proteomics*. November 2013, pp 3006–3025.
<https://doi.org/10.1074/mcp.O113.030239>.
 - (16) *NMR ΑΡΧΕΣ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ ΣΤΗΝ • Ιατρική • Φαρμακευτική Χημεία • Βιοχημεία • Χημεία Τροφίμων Και Ποτών*; 2005. www.jb-designs.gr/parisianos.
 - (17) Wu, S. *Experiment Methods 1D and 2D NMR 1D and 2D NMR Experiment Methods*; 2011. <http://www.emory.edu/NMR/>.
 - (18) Donald Pavia, G. L. , G. K. , J. V. Introduction to SPECTROSCOPY 3th Edition.

- (19) AN INTRODUCTION TO NMR SPECTROSCOPY.
- (20) Joseph P. Hornak, Ph. D. *Basics of NMR*. www.cis.rit.edu.
<https://www.cis.rit.edu/htbooks/nmr/> (accessed 2025-10-13).
- (21) Levitt, M. H. . *Spin Dynamics : Basics of Nuclear Magnetic Resonance*; John Wiley & Sons, 2008.
- (22) 5.5: *Chemical Shift*. Chemistry LibreTexts.
[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Introduction_to_Organic_Spectroscopy/05:_Proton_Nuclear_Magnetic_Resonance_Spectroscopy_\(NMR\)/5.05:_Chemical_Shift](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Introduction_to_Organic_Spectroscopy/05:_Proton_Nuclear_Magnetic_Resonance_Spectroscopy_(NMR)/5.05:_Chemical_Shift) (accessed 2025-10-15).
- (23) Αντόνιος Κολοκούρης, Ι. Γ. Γ. Σ. Α. Τ. Κ. Π. Ι. Μ. Θ. Μ. Ε. Μ. *Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός* ; 2018.
- (24) *Chemical Shift and Splitting Patterns | Solubility of Things*.
Solubilityofthings.com.
- (25) ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΧΗΜΙΚΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ.
- (26) *Chemical Shifts*.
- (27) *NMR Spectroscopy- Diamagnetic Shielding, Electronegativity, Hybridization Effects*. Chem Article.
- (28) *1H Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Chemical shifts*. Conduct Science.
<https://conductscience.com/1h-nuclear-magnetic-resonance-nmr-chemical-shifts/> (accessed 2025-10-14).
- (29) Καθηγητής, Ε.; Αλιγιάννης, Ν. *ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ ΦΑΣΜΑΤΑ 1 H-NMR*.
- (30) *NMR Spectroscopy-5.3 Spin-Spin Splitting: J-Coupling*.
<https://organicchemistrydata.org/hansreich/resources/nmr/?page=05-hmr-03-jcoup1%2F> (accessed 2025-10-14).
- (31) Joyce, S. A.; Yates, J. R.; Pickard, C. J.; Mauri, F. A First Principles Theory of Nuclear Magnetic Resonance J-Coupling in Solid-State Systems. **2007**.
<https://doi.org/10.1063/1.2801984>.
- (32) 3.1 Σταθερά σύζευξης.
<https://eclass.uoa.gr/modules/document/file.php/CHEM207/Chap3.pdf>
(accessed 2025-10-14).
- (33) ROGER S. MACOMBER. A Complete Introduction to Modern NMR Spectroscopy.
- (34) Green, T. F. G.; Yates, J. R. Relativistic Nuclear Magnetic Resonance J-Coupling with Ultrasoft Pseudopotentials and the Zeroth-Order Regular Approximation. **2014**. <https://doi.org/10.1063/1.4882678>.

- (35) *Chemical Shift and Splitting Patterns | Solubility of Things*. Solubilityofthings.com. <https://www.solubilityofthings.com/chemical-shift-and-splitting-patterns> (accessed 2025-10-14).
- (36) *Splitting and Multiplicity (N+1 rule) in NMR Spectroscopy*. Chemistry Steps. <https://www.chemistrysteps.com/splitting-multiplicity-n1-rule-nmr/> (accessed 2025-10-14).
- (37) Jaspreet Singh Grewal. *Spin-Spin coupling in NMR - Conduct Science*. Conduct Science. https://conductscience.com/spin-spin-coupling-in-nmr/?srsltid=AfmBOopo6rOjltThg2W--j7d_WL83eisBXlm--N1-Nvu8Ic9gZOm2r7c (accessed 2025-10-14).
- (38) William Reusch. *NMR Spectroscopy*. Msu.edu. NMR Spectroscopy (accessed 2025-10-14).
- (39) Zerbe, O. Lecture Course: NMR Spectroscopy Educational Material. <https://doi.org/10.3929/ethz-a-004337721>.
- (40) Zondlo, N. J. SAR by 1D NMR. *Journal of Medicinal Chemistry*. American Chemical Society November 14, 2019, pp 9415–9417. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01688>.
- (41) *Hydrogen (Proton, Deuterium and Tritium) NMR*. chem.ch.huji.ac.il. <https://chem.ch.huji.ac.il/nmr/techniques/1d/row1/h.html#BM1H> (accessed 2025-10-15).
- (42) Emwas, A. H. M. The Strengths and Weaknesses of NMR Spectroscopy and Mass Spectrometry with Particular Focus on Metabolomics Research. *Methods in Molecular Biology* **2015**, 1277, 161–193. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2377-9_13.
- (43) Bhavna Kaveti. *What are the Advantages and Limitations of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy?*. AZoOptics.com.
- (44) Wishart, D. S. Metabolomics: Applications to Food Science and Nutrition Research. *Trends in Food Science and Technology*. September 2008, pp 482–493. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.03.003>.
- (45) *Principles of NMR Spectroscopy | Solubility of Things*. Solubilityofthings.com. https://www.solubilityofthings.com/principles-nmr-spectroscopy#google_vignette (accessed 2025-10-14).
- (46) Singh, U.; Alsuhaymi, S.; Al-Nemi, R.; Emwas, A. H.; Jaremko, M. Compound-Specific 1D ¹H NMR Pulse Sequence Selection for Metabolomics Analyses. *ACS Omega* **2023**, 8 (26), 23651–23663. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c01688>.
- (47) Le Guennec, A.; Tayyari, F.; Edison, A. S. Alternatives to Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy Presat and Carr-Purcell-Meiboom-Gill Presat for NMR-Based Metabolomics. *Analytical Chemistry*. American Chemical Society

- September 5, 2017, pp 8582–8588.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b02354>.
- (48) *CPMG EXPERIMENT*. Northwestern.edu.
<https://imserc.northwestern.edu/guide/eNMR/eNMR1D/cpmg.html> (accessed 2025-10-14).
- (49) Takis, P. G.; Jiménez, B.; Sands, C. J.; Chekmeneva, E.; Lewis, M. R. SMoESY: An Efficient and Quantitative Alternative to on-Instrument Macromolecular ¹H-NMR Signal Suppression. *Chem. Sci.* **2020**, *11* (23), 6000–6011. <https://doi.org/10.1039/d0sc01421d>.
- (50) Takis, P. G.; Jiménez, B.; Al-Saffar, N. M. S.; Harvey, N.; Chekmeneva, E.; Misra, S.; Lewis, M. R. A Computationally Lightweight Algorithm for Deriving Reliable Metabolite Panel Measurements from 1D ¹H NMR. *Anal. Chem.* **2021**, *93* (12), 4995–5000.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c00113>.
- (51) Χημεία, Β. ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΘΕΟΔΩΡΙΑΗΣ ΣΤΕΛΛΑ ΓΗΡΟΥΣΗ ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΖΑΧΑΡΙΑΔΗΣ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ-ΣΤΕΛΛΑ ΖΩΤΟΥ ΒΙΚΤΩΡΙΑ ΣΑΜΑΝΙΔΟΥ.
- (52) *Human Metabolome Database*. hmdb.ca. <https://hmdb.ca/> (accessed 2025-10-15).
- (53) Kovács, A.; Nemcsok, D. S.; Kocsis, T. Bonding Interactions in EDTA Complexes. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* **2010**, *950* (1), 93–97. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.theochem.2010.03.036>.
- (54) *Complexation Titration*. Chemistry LibreTexts.
https://chem.libretexts.org/Ancillary_Materials/Demos_Techniques_and_Experiments/General_Lab_Techniques/Titration/Complexation_Titration (accessed 2025-10-16).
- (55) Arena, G.; Musumeci, S.; Purrello, R.; Sammartano, S. *CALCIUM-AND MAGNESIUM-EDTA COMPLEXES. STABILITY CONSTANTS AND THEIR DEPENDENCE ON TEMPERATURE AND IONIC STRENGTH*; 1983.
- (56) Burgot, J.-L. Complexometry II: Titrations with EDTA. In *Ionic Equilibria in Analytical Chemistry*; Springer New York, 2012; pp 513–523.
https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8382-4_28.
- (57) Daniel C. Harris. *Quantitative Chemical Analysis*.
- (58) Rabenstein, D. L.; Millis, K. K.; Strauss, E. J. *PROTON NMR SPECTROSCOPY OF HUMAN BLOOD PLASMA*; 1988.
- (59) Banfi, G.; Salvagno, G. L.; Lippi, G. The Role of Ethylenediamine Tetraacetic Acid (EDTA) as in Vitro Anticoagulant for Diagnostic Purposes. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. May 1, 2007, pp 565–576.
<https://doi.org/10.1515/CCLM.2007.110>.

- (60) *EDTA Anticoagulant: Principles and Applications Explained*.
<https://www.edtatable.com/what-is-the-principle-of-edta-anticoagulant/>
(accessed 2025-10-16).
- (61) Kirwan, J. A.; Gika, H.; Beger, R. D.; Bearden, D.; Dunn, W. B.; Goodacre, R.; Theodoridis, G.; Witting, M.; Yu, L. R.; Wilson, I. D. Quality Assurance and Quality Control Reporting in Untargeted Metabolic Phenotyping: MQACC Recommendations for Analytical Quality Management. *Metabolomics*. Springer September 1, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11306-022-01926-3>.
- (62) Badrick, T. *The Quality Control System*; 2008; Vol. 29.
- (63) González-Domínguez, Á.; Estanyol-Torres, N.; Brunius, C.; Landberg, R.; González-Domínguez, R. QComics: Recommendations and Guidelines for Robust, Easily Implementable and Reportable Quality Control of Metabolomics Data. *Anal. Chem.* **2024**, *96* (3), 1064–1072.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c03660>.
- (64) Drevet Mulard, E.; Gilard, V.; Balayssac, S.; Rautureau, G. J. P. Quantitative Nuclear Magnetic Resonance for Small Biological Molecules in Complex Mixtures: Practical Guidelines and Key Considerations for Non-Specialists. *Molecules*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI) April 1, 2025. <https://doi.org/10.3390/molecules30081838>.
- (65) *Quantitative NMR Spectroscopy*. <http://www.sigmaaldrich.com/analytical->
- (66) *NMR sample preparation for liquid-state NMR*.
<https://www.uib.no/en/kj/132254/nmr-sample-preparation-liquid-state-nmr?#nmr-tubes> (accessed 2026-01-22).
- (67) Dona, A. C.; Jiménez, B.; Schäfer, H.; Humpfer, E.; Spraul, M.; Lewis, M. R.; Pearce, J. T. M.; Holmes, E.; Lindon, J. C.; Nicholson, J. K. Precision High-Throughput Proton NMR Spectroscopy of Human Urine, Serum, and Plasma for Large-Scale Metabolic Phenotyping. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (19), 9887–9894. <https://doi.org/10.1021/ac5025039>.
- (68) Somashekar, B. S.; Ijare, O. B.; Nagana Gowda, G. A.; Ramesh, V.; Gupta, S.; Khetrpal, C. L. Simple Pulse-Acquire NMR Methods for the Quantitative Analysis of Calcium, Magnesium and Sodium in Human Serum. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2006**, *65* (2), 254–260.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.saa.2005.10.039>.
- (69) *NMR Parameter Primer*.
https://nmr.tamu.edu/pdf/tidbits/NMRTotM_202203.pdf (accessed 2025-10-15).
- (70) Edoardo Saccenti, M. S.-D. C. L. C. S. L. T. *MTBLS147: Probabilistic networks of blood metabolites in healthy subjects as indicators of latent cardiovascular risk*. Ebi.ac.uk.
<https://www.ebi.ac.uk/metabolights/editor/MTBLS147/descriptors> (accessed 2025-10-15).

- (71) *RCSB PDB: Chemical Sketch Tool*. www.rcsb.org.
<https://www.rcsb.org/chemical-sketch> (accessed 2025-10-15).
- (72) Stebbing, J.; Takis, P. G.; Sands, C. J.; Maslen, L.; Lewis, M. R.; Gleason, K.; Page, K.; Guttery, D.; Fernandez-Garcia, D.; Primrose, L.; Shaw, J. A. Comparison of Phenomics and CfDNA in a Large Breast Screening Population: The Breast Screening and Monitoring Study (BSMS). *Oncogene* **2023**, *42* (11), 825–832. <https://doi.org/10.1038/s41388-023-02591-z>.