

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

*Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης
Ανάπτυξη της Φασματομετρίας Μάζας Υπερηχητικής
Εκνέφωσης - Σύγκριση με τον Ηλεκτροψεκασμό*

ΑΝΤΩΝΑΚΗΣ ΜΑΝΟΣ

Επιβλέπων Καθηγητής: Περγαντής Σπύρος

Ηράκλειο, 2013

UNIVERSITY OF CRETE
DEPARTMENT OF CHEMISTRY
GENERAL DEPARTMENT OF POST-GRADUATE STUDIES

MASTER OF SCIENCE

*Development of Sonic Spray Mass Spectrometry-
Comparison with Electrospray*

ANTONAKIS MANOS

Supervisor: Pergantis Spiros

Heraklion, 2013

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

1. **Περγαντής Σπυρίδων**, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
2. **Βασιλικογιαννάκης Γεώργιος**, Καθηγητής τμήματος Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
3. **Σπύρος Απόστολος**, Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Στους γονείς μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Πανεπιστήμιο Κρήτης για την παροχή της υλικοτεχνικής υποδομής και την εξασφάλιση του κατάλληλου περιβάλλοντος καθώς και όλο το εκπαιδευτικό-ερευνητικό προσωπικό του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου κρήτης για την συμβολή τους, μικρή ή μεγαλύτερη, στην κατάρτιση μου ως χημικού.

Μεγάλες ευχαριστίες επίσης στον επιβλέποντα Καθηγητή κ. Περγαντή Σπύρο για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με μια πρωτότυπη μελέτη και την στήριξη και συμβουλές που μου παρείχε σε κάθε δυσκολία που συνάντησα κατά την διεξαγωγή της έρευνας. Επίσης θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την ελευθερία που μου έδωσε στην μελέτη θεμάτων και ιδεών κάτι που μου επέτρεψε να καταλάβω τα λάθη μου και να γίνω καλύτερος.

Ευχαριστώ θερμά τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής μου επιτροπής κ. Βασιλικογιαννάκη Γιώργο (Καθηγητής Τμήματος Χημείας) και Σπύρο Απόστολο (Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Χημείας) γιατί δέχτηκαν να κρίνουν την παρούσα διατριβή και να μου προτείνουν βελτιώσεις και διορθώσεις που συνέβαλαν στην καλύτερη και ορθότερη παρουσίαση της διατριβής μου. Ιδιαίτερα τον κ. Βασιλικογιαννάκη Γιώργο θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την ηθική του συμπαράσταση σε δύσκολες στιγμές που απαιτούσαν ηρεμία.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη της ερευνητικής ομάδας του εργαστηρίου μας για τις χρήσιμες συζητήσεις και συμβουλές καθώς και τα μέλη του εργαστηρίου του καθηγητή Στεφάνου Ευρυπίδη για την συνεργασία τους και την βοήθεια που μου δόθηκε όποτε τους ζητήθηκε.

Τελειώνοντας, ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου, Μάμμα και Ελευθερία, για την ηθική και οικονομική υποστήριξη και για την πίστη τους στις δυνατότητες μου. Χωρίς την υποστήριξη τους αυτή η διατριβή δεν θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί. Επίσης ευχαριστώ τον αδερφό μου Δημήτρη για τις συμβουλές του και τους φίλους μου για την στήριξη τους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η φασματομετρία μάζας έχει καθιερωθεί ως μία από τις κυρίαρχες τεχνικές στην χημική ανάλυση λόγω της υψηλής της ευαισθησίας, επιλεκτικότητας και ταχύτητας ανάλυσης. Για την δημιουργία των ιόντων από τα όργανα φασματομετρίας μάζας ένας αριθμός διαφορετικών πηγών έχουν δημιουργηθεί, κατάλληλες για διαφορετικές κατηγορίες ενώσεων. Κάποιες χρειάζονται την παρουσία υψηλού κενού για να λειτουργήσουν, π.χ ηλεκτρονικός ιοντισμός ενώ άλλες λειτουργούν σε ατμοσφαιρικές συνθήκες π.χ ηλεκτροψεκασμός. Η διαφορά τους είναι ότι ενώσεις ευαίσθητες σε αποδόμηση στις συνθήκες του ηλεκτρονικού ιοντισμού μπορούν να αναλυθούν με τον ηλεκτροψεκασμό. Μια σειρά εναλλακτικών πηγών ιοντισμού με ψεκασμό έχουν προταθεί για εφαρμογές σε βιομόρια και άλλες ευαίσθητες ενώσεις όπως θερμοψεκασμός, ιοντοψεκασμός, χημικός ιοντισμός ατμοσφαιρικής πίεσης κ.α.

Πρόσφατα, η δημιουργία ιόντων από διάλυμα χωρίς την εφαρμογή δυναμικού, θερμότητας ή διεγερμένου αερίου προτάθηκε από τον Hirabayashi. Η πηγή ιοντισμού υπερηχητικής εκνέφωσης, όπως ονομάστηκε, δημιουργεί ιόντα από διάλυμα το οποίο ψεκάζεται από ομοαξονικό αδρανές αέριο που κινείται με την ταχύτητα του ήχου. Η απουσία θερμικών και ηλεκτροχημικών παρεμβολών, οι πολύ ήπιες συνθήκες δημιουργίας ιόντων και η απλότητα στην χρήση είναι τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της πηγής υπερηχητικής εκνέφωσης.

Το 2011, η ομάδα του Marcos Eberlin, πρότεινε την χρήση πηγής υπερηχητικής εκνέφωσης με αυτοτροφοδοτούμενη ροή βασισμένη στο φαινόμενο Venturi. Με αυτό τον τρόπο η διαδικασία εισαγωγή δείγματος-δημιουργία ιόντων δεν απαιτεί σύστημα αντλίας-σύριγγας ούτε δυναμικό ή θερμότητα για την δημιουργία ιόντων. Η τεχνική ονομάστηκε Venturi Easy Ambient Sonic Spray Ionization (V-EASI).

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι 1) η χρήση πνευματικών εκνεφωτών ατομικής φασματομετρίας μάζας ως βάση συναρμολόγησης πηγής υπερηχητικής εκνέφωσης αυτοτροφοδοτούμενης ροής για εφαρμογές μοριακής φασματομετρίας μάζας, 2) η βελτιστοποίηση των παραμέτρων λειτουργίας της πηγής V-EASI και 3) η σύγκριση της με τον ηλεκτροψεκασμό και η εφαρμογή της στην ανάλυση διαφορετικών πρότυπων και συνθετικών ενώσεων.

Λέξεις κλειδιά: υπερηχητική εκνέφωση, ηλεκτροψεκασμός, φαινόμενο Venturi, πηγή ιόντων, φασματομετρία μάζας.

ABSTRACT

Mass spectrometry has been established as a predominant technique in chemical analysis due to its high sensitivity, selectivity and speed. To generate ions mass spectrometers use a number of different sources appropriate for different categories of molecules. Some operate under high vacuum i.e. electron ionization, while others operate under atmospheric pressure i.e. electrospray ionization. Thus, molecules sensitive to decomposition under electron ionization conditions can be analyzed with electrospray. A number of alternative spraying sources i.e. thermospray, ionspray, atmospheric pressure chemical ionization, have been proposed for generating ions from sensitive biomolecules and inorganic compounds.

Recently, the generation of ions from solution without applying heat, potential or excited gas has been proposed by Hirabayashi. The sonic spray ionization source, as named, generates ions from solution being sprayed from a coaxial inert gas with speed approximating that of sound i.e. sonic speed. The major advantages of sonic spray source are the absence of thermal, electrochemical interference, generation of ions under soft conditions and simplicity of usage.

In 2011, Eberlin's research group, proposed the combination of sonic spray ionization and Venturi effect for self-aspiration of solution and ionization of analyte. Thus, no voltage is needed nor pump-syringe system for introducing solution. This technique was named Venturi Easy Ambient Sonic Spray Ionization (V-EASI).

The objective of the present study is 1) utilize pneumatic nebulizers, used in atomic techniques, to create a sonic spray source with self-aspirating introduction of solution sample i.e. V-EASI, for analysis of molecules 2) optimization of parameters affecting source sensitivity and 3) comparison of V-EASI source with electrospray source and application of the V-EASI source to chemical analysis of sensitive compounds.

Key words: *sonic spray, electrospray, Venturi effect, ion source, mass spectrometry.*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Εισαγωγή –Κεφάλαιο 1

1.1	Πηγές Ιοντισμού Ατμοσφαιρικής Πίεσης.....	11
1.2	Ηλεκτροψεκασμός.....	12
1.3	Ιοντισμός Υπερηχητικής Εκνέφωσης.....	13
1.4	Venturi Easy Ambient Sonic spray Ionization.....	14
1.5	Μηχανισμός Ιοντισμού στο Sonic Spray-MS.....	15
1.6	Αεροδυναμική σχάση μικροσταγονιδίων στην περιοχή ενδιάμεσης πίεσης και διαχωρισμός φορτίων.....	18
	Σκοπός Διατριβής.....	21

Οργανολογία-Κεφάλαιο 2

2.1.1	Σύστημα Αντλίας Σύριγγας.....	22
2.1.2	Πηγή ιοντοψεκασμού	22
2.1.3	Περιοχή Ενδιάμεσης Πίεσης.....	22
2.1.4	Οπτικό Σύστημα Κατεύθυνσης Ιόντων.....	23
2.1.5.	Αναλυτής Μαζών Ιοντικής Παγίδας.....	23
2.2.1	Ομόκεντροι Πνευματικοί Εκνεφωτές Ατομικής Φασματομετρίας Μάζας..	25
2.2.2	Τεχνικά Χαρακτηριστικά Εκνεφωτών.....	27
2.2.3	Συνδεσμολογία V-Easi-MS με την χρήση εκνεφωτή	27

Σύγκριση της πηγής V-Easi με την πηγή ηλεκτροψεκασμού-Κεφάλαιο 3

3.1.	Ενώσεις Συναρμογής.....	29
3.1.1	Πειραματική διαδικασία.....	30
3.1.2	Αποτελέσματα-Συζήτηση.....	31
3.2.	Προϊόντα αντιδράσεων πεντασθενούς αντιμονίου με βιομόρια.....	38
3.2.1	Πειραματική διαδικασία.....	39
3.2.2	Αποτελέσματα-Συζήτηση.....	40
3.3	Βορονικά Οξέα και Βοροξίνες.....	44
3.3.1	Πείραμα και Αποτελέσματα.....	44

3.4	L-Ανηγγμένη Γλουταθειόνη.....	49
3.4.1	Επίδραση οξύτητας στην ένταση του σήματος κορυφής της L-Ανηγγμένης Γλουταθειόνης-Πειραματική διαδικασία.....	51
3.4.1.1	Επίδραση οξύτητας στην ένταση του σήματος κορυφής της L-Ανηγγμένης Γλουταθειόνης-Αποτελέσματα.....	52
3.4.1.2	Επίδραση οξύτητας στην ένταση του σήματος κορυφής της L-Ανηγγμένης γλουταθειόνης-Συζήτηση Αποτελεσμάτων.....	55
3.5	Πρωτεΐνες.....	57
3.5.1	Αποτελέσματα -Συζήτηση της Ανάλυσης Πρωτεϊνών με Φασματομετρία Μάζας.....	59

Βελτιστοποίηση Πηγής Ιοντισμού V-EASI-Κεφάλαιο 4

4.1	Επίδραση μείγματος διαλυτών στην ροή του υγρού δείγματος.....	68
4.2	Επίδραση της θέσης του τριχοειδούς, της πίεσης του εκνεφωτικού αερίου και της περιεκτικότητας σε πολικό οργανικό διαλύτη στην σχετική ένταση ιόντων διαφόρων ενώσεων.....	71
4.2.1	Ένωση Συναρμογής $Cu_6Dy(CH_3COO)_3(NO_3)_3(OH)_3(AibH)_6$	71
4.2.2	L-Ανηγγμένη Γλουταθειόνη.....	72
4.2.3	Σεληνιώδες Οξύ - Ιππουρικό Οξύ.....	77
4.2.4	Ιωδιούχο Καΐσιο - Δωδεκυλοσουλφονικό Νάτριο (SDS).....	81
4.3.	Συμπεράσματα.....	85

Εφαρμογές της πηγής V-EASI-Κεφάλαιο 5

5.1	Φασματομετρία Ακρίβειας Μάζας.....	86
5.1.1	Διπλός Εκνεφωτής V-EASI για Εφαρμογές Ακρίβειας Μάζας.....	92
5.2	Πολυμερισμός του πυριτικού οξέος σε ολιγομερή δομικά είδη κρυστάλλω.90	
5.2.1	Πείραμα-Αποτελέσματα	92
5.3	Επίδραση της προσθήκης ηλεκτρολυτών χλωριούχου νατρίου και ιωδιούχου καΐσιου στην ένταση σήματος του αναλύτη L-Ανηγγμένη γλουταθειόνη.....	96

5.4 Επίδραση πρόσθετων συστατικών στην ανάλυση ολιγονουκλεοτιδίων με V-EASI MS.....	106
<i>Γενικά Συπεράσματα.....</i>	<i>113</i>
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α. Δεδομένα των ενώσεων συναρμογής των λανθανιδών.....	115
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β. Αλληλεπίδραση Μεθανόλης με το Σεληνιώδες Οξύ.....	127
Βιβλιογραφία.....	128

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Εισαγωγή

1.1 Πηγές Ιοντισμού Ατμοσφαιρικής Πίεσης

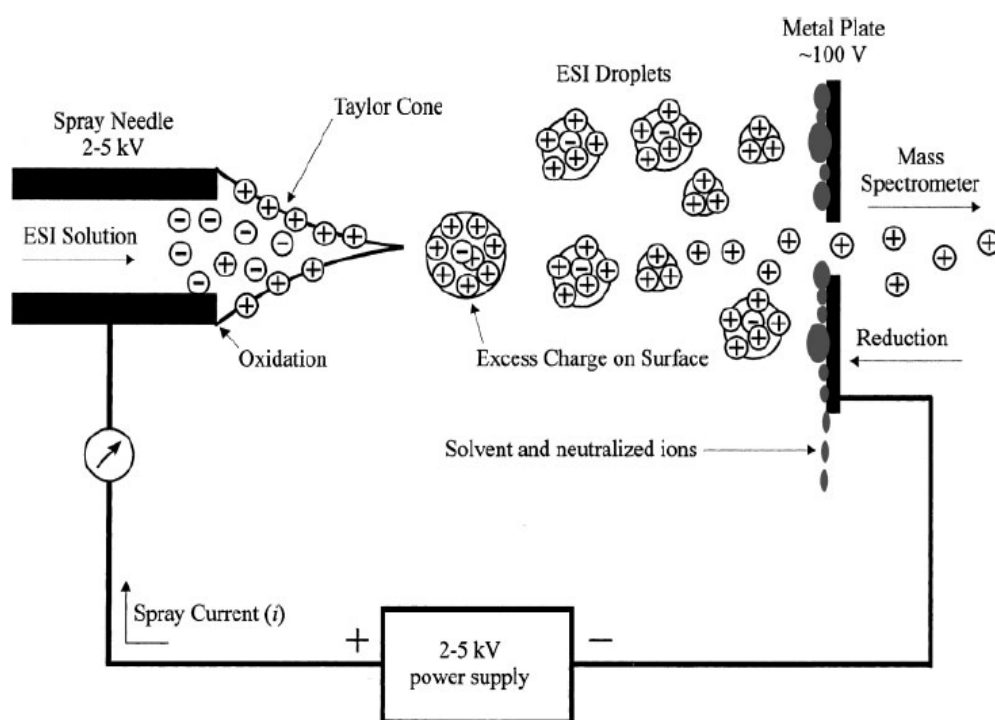
Οι πηγές ιοντισμού ατμοσφαιρικής πίεσης ήρθαν να καλύψουν ένα μεγάλο κενό στις εφαρμογές φασματομετρίας μάζας. Η απευθείας ανάλυση βιομορίων και άλλων πολικών, εύθραστων μορίων από το διάλυμα και η αποφυγή ενδιάμεσων βημάτων παραγωγίσισης έδωσε μια τεράστια ώθηση στην ανάλυση τέτοιων μορίων. Επιπλέον, η σύνδεση της Υγρής Χρωματογραφίας με τις πηγές ιοντισμού ατμοσφαιρικής πίεσης επέτρεψε τον διαχωρισμό και ανάλυση πολύπλοκων μειγμάτων περιβαλλοντικής και βιολογικής προέλευσης. Η πιο ευρέως διαδεδομένη πηγή ιοντισμού στις σύγχρονες εφαρμογές φασματομετρίας μάζας είναι ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI)¹. Η τεχνική αυτή χωρίζεται σε δύο κύριες κατευθύνσεις, τις υψηλής και χαμηλής ροής εισαγωγής υγρού δείγματος. Η χαμηλής ροής τεχνική ή νανοηλεκτροψεκασμός (nano-ESI) χαρακτηρίζεται από ροές 1-1000 nL/min και υψηλή ευαισθησία αφού ο ιοντισμός είναι πιο αποδοτικός αλλά και η μεταφορά των ιόντων στα υψηλά κενά πιά ούτως εύκολη. Η υψηλής ροής τεχνική χαρακτηρίζεται από ροές 1-1000 μL/min και παράγει ένα σταθερό ρεύμα ιόντων σε διαφορετικές ροές ενώ μεταβολές στην σύσταση της υγρής φάσης, του δυναμικού κ.α δεν επηρεάζουν σημαντικά. Χαρακτηριστικό της πηγής αυτής είναι και η χρήση εκνεφωτικού αερίου ως βοηθητικού παράγοντα στις υψηλές ροές. Έτσι προκύπτει και το όνομα πνευματικά υποβοηθούμενος ηλεκτροψεκασμός ή ιοντοψεκασμός (IonSpray).

Ο Ατμοσφαιρικής Πίεσης Χημικός Ιοντισμός (APCI) αν και ανακαλύφθηκε πριν τον ηλεκτροψεκασμό απέκτησε αξία με την αύξηση του ενδιαφέροντος για εφαρμογές Υγρής Χρωματογραφίας/Φασματομετρίας Μάζας (LC/MS). Το κύριο χαρακτηριστικό της πηγής αυτής είναι η χρήση ενός θερμαινόμενου εκνεφωτή που μετατρέπει τον διαλύτη σε αερόλυμα, το οποίο στην συνέχεια μετατρέπεται σε ένα πληθυσμό δραστικών ιόντων με την βοήθεια δυναμικού εκκένωσης. Αυτά τα δραστικά μόρια του διαλύτη, μέσω αντιδράσεων μεταφοράς πρωτονίου στην αέρια φάση, ιοντίζουν τον ουδέτερο αναλύτη.

Μια πληθώρα ατμοσφαιρικών πηγών ιοντισμού έχουν αναπτυχθεί την τελευταία δεκαετία. Η πηγή Υπερηχητικής Εκνέφωσης (Sonic Spray) χρησιμοποιεί αέριο εκνέφωσης με την ταχύτητα του ήχου που κινείται ομοαξονικά με τριχοειδή στήλη με αποτέλεσμα την στατιστική φόρτιση των μικροσταγονιδίων. Το νέφος των μικροσταγονιδίων μπορεί να χρησιμοποιηθεί ακόμα και στην εκρόφιση μορίων από στερεές επιφάνειες χωρίς καμία προεπεξεργασία. Η Εκρόφιση με Ηλεκτροψεκασμό (DESI²) χρησιμοποιεί φορτισμένα σταγονίδια μεγάλης ταχύτητας, από πηγή ESI, τα οποία συγκρούονται με την επιφάνεια του στερεού και εκροφούν μόρια. Μια άλλη τεχνική εκρόφισης στερεών δειγμάτων από επιφάνειες είναι η Απευθείας Ανάλυση σε Πραγματικό Χρόνο (DART)³. Ένα θερμό ρεύμα ευγενούς αερίου όπως ήλιο ή αργό, ιοντίζεται με εκκένωση λάμπης, σχηματίζοντας μετασταθερά διεγερμένα άτομα. Το ρεύμα αυτό προσκρούει στην επιφάνεια και εκροφά στην αέρια φάση ουδέτερα μόρια του αναλύτη, τα οποία στη συνέχεια ιοντίζονται με μεταφορά φορτίου από τα διεγερμένα άτομα του ευγενούς αερίου.

1.2 Ηλεκτροψεκασμός

Ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό σε σύνδεση με τη φασματομετρία μάζας (ESI-MS) είναι η κύρια επιλογή, για τον προσδιορισμό της μάζας βιομορίων. Χρησιμοποιείται ευρέως στην βιοχημική ανάλυση αφού επιτρέπει την ανάλυση μεγάλων, μη-πτητικών μορίων απευθείας από υγρό διάλυμα ενώ συνδέεται με τεχνικές διαχωρισμού Υγρής Χρωματογραφίας (HPLC) και Ηλεκτροφόρησης Τριχοειδούς (CE). Με το ESI-MS, αραιωμένο διάλυμα αναλύτη, αντλείται σε χαμηλή ροή, (0.1-10 $\mu\text{l}/\text{min}$), μέσω τριχοειδή σωλήνα. Στην άκρη του τριχοειδή σωλήνα εφαρμόζεται υψηλό δυναμικό (2-5 kV) θετικής ή αρνητικής πολικότητας ανάλογα με τον αναλύτη. Το ηλεκτρικό πεδίο που δημιουργείται στο διάλυμα από το εφαρμοζόμενο δυναμικό διαχωρίζει τα φορτία στην επιφάνεια του υγρού, το οποίο σχηματίζει στην άκρη του τριχοειδή σωλήνα τον λεγόμενο 'κώνο Taylor' (Σχήμα 1.1). Όταν το υγρό που αποτελεί τον κώνο Taylor πιάσει το όριο Rayleigh (το σημείο όπου η απώθηση Coulomb του επιφανειακού φορτίου γίνεται ίση με την επιφανειακή τάση του υγρού) φορτισμένα σταγονίδια θετικά ή αρνητικά εκτοξεύονται από τον κώνο.



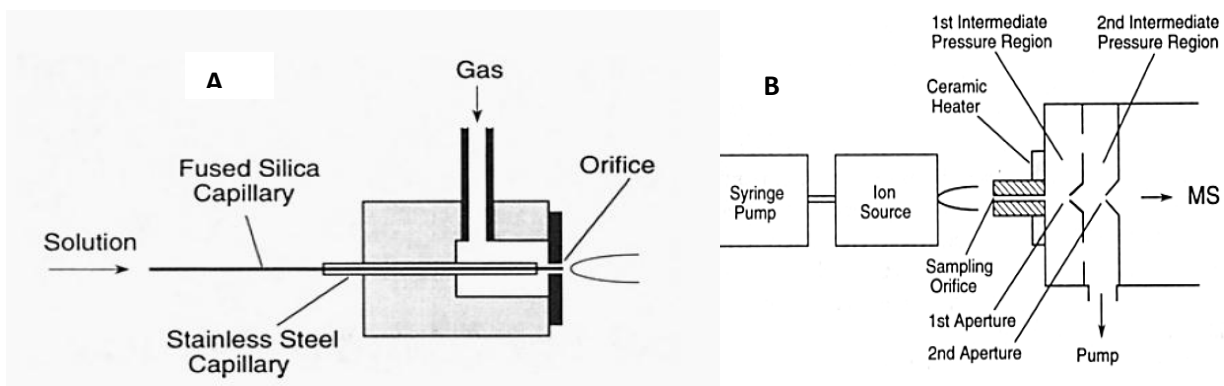
Σχήμα 1.1. Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό.

Τα φορτισμένα αυτά σταγονίδια, εισέρχονται στο φασματομετρο μάζας μέσω ενός αποκορυφωτή, όπου εντοπίζονται ως αέρια ιόντα. Τα δύο μοντέλα που έχουν προταθεί για να εξηγήσουν τον μηχανισμό παραγωγής ιόντων στην αέρια φάση είναι το Μοντέλο Υπολειματικού Φορτίου (**Charge Residue Model**)⁴ όπου διαδοχικοί κύκλοι εξάτμισης και σχάσης (λόγω της πυκνότητας φορτίου) των φορτισμένων σταγονιδίων οδηγούν σε όλο και μικρότερα σταγονίδια και τελικά σε αέρια ιόντα. Το Μοντέλο Εξάτμισης Ιόντος (**Ion Evaporation Model**)⁵ προβλέπει ότι η αυξημένη πυκνότητα φορτίου, λόγω εξάτμισης διαλύτη, τελικά οδηγεί σε εκρόφιση ιόντων από την επιφάνεια της σταγόνας όταν η απώθηση Coulomb ξεπεράσει την επιφανειακή τάση του διαλύτη.

1.3 Ιοντισμός Υπερηχητικής Εκνέφωσης (Sonic Spray Ionization)

Το 1994, ο Atsumu Hirabayashi και οι συνεργάτες του, ανακοίνωσαν την ανακάλυψη μίας νέας τεχνικής εκνέφωσης υγρών διαλυμάτων, κατάλληλη για εφαρμογές φασματομετρίας μάζας. Την νέα αυτή τεχνική την ονόμασαν **Sonic Spray Ionization**⁶, λόγω της υπερηχητικής ταχύτητας του αερίου εκνέφωσης που χρησιμοποίησαν για τον ιοντισμό των δειγμάτων τους.

Η πειραματική διάταξη (Σχήμα 1.2.A) αποτελείται από αντλία σύριγγας (Harvard Apparatus, Model 11) συνδεδεμένη σε σειρά με σωλήνα Teflon μήκους 0.5 m και τριχοειδή τηγμένου πυριτίου (0.1 mm i.d, 0.2 mm o.d). Ο τριχοειδής τηγμένου πυριτίου σταθεροποιήθηκε σε τριχοειδή σωλήνα ανοξείδωτου χάλυβα, το οποίο στην συνέχεια τοποθετήθηκε με ακρίβεια σε ακροφύσιο Duralumin (0.4 mm διάμετρος). Ο τριχοειδής τηγμένου πυριτίου εξείχε από το ακροφύσιο της πηγής ιοντισμού κατά 0.6 mm. Υπερκαθαρό αέριο άζωτο περνούσε μέσα από το ακροφύσιο ομοαξονικά με τον τριχοειδή πυριτίου. Η ροή του αερίου αζώτου μετρήθηκε με ροόμετρο (Brooks, 5850E).

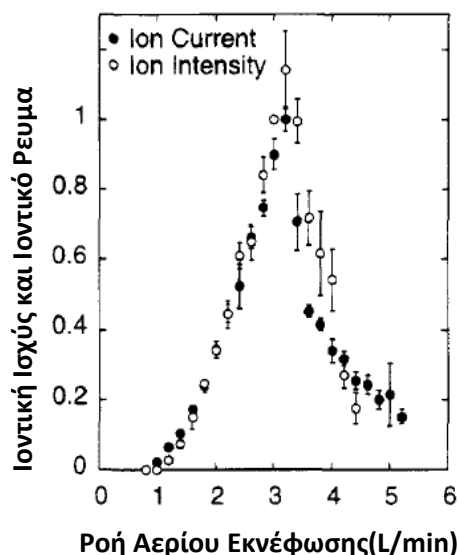


Σχήμα 1.2.A) Κάτοψη της πηγής ιοντισμού Υπερηχητικής Εκνέφωσης. **B)** Σχηματική απεικόνιση πειραματικής διάταξης.

Στις μέχρι τώρα υπάρχουσες πηγές ιοντισμού εκνέφωσης, (Ιοντοψεκασμός, Θερμοψεκασμός, Ηλεκτροψεκασμός), εφαρμόζονται στην άκρη του τριχοειδή σωλήνα είτε υψηλό δυναμικό (2-5 kV) ή πολύ μεγάλη θερμοκρασία. Στην πηγή υπερηχητικής εκνέφωσης αντιθέτως κάτι τέτοιο δεν είναι απαραίτητο. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.3 η παρατήρηση σήματος του αναλύτη Gramicidin S ως διπλά πρωτονιομένο κατιόν, αρχίζει σε ροή αερίου 1.3 L/min, φτάνει στο μέγιστο της σε ροή περίπου 3 L/min και σε μεγαλύτερες ροές παρατηρείται μείωση του σήματος ιόντος. Χρησιμοποιώντας τον τύπο

$$(1) P = \{1 + 0.5(\gamma - 1)Ma^2\}^{\gamma/(\gamma-1)}$$

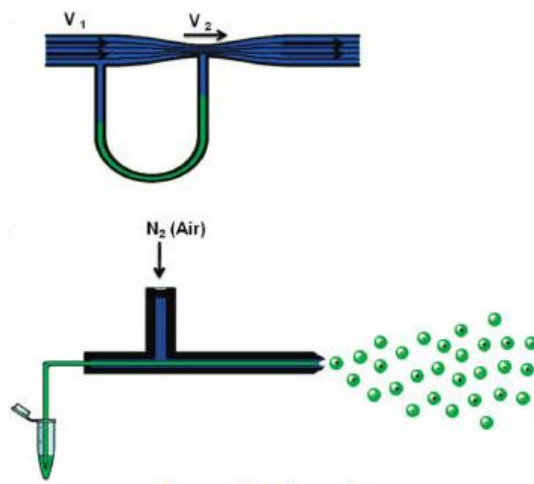
όπου Ma είναι ο αριθμός Mach, P η πίεση και γ ο αδιαβατικός δείκτης (1.4 για το άζωτο) υπολογίστηκε ότι σε ροή 6.1 L/min και πίεση στο εσωτερικό της πηγής ιοντισμού 7 atm, εκτιμάται ο αριθμός Mach σε 1.93. Επιπλέον φωτογραφίες που τραβήχτηκαν με την μέθοδο Schlieren έδειξαν ότι σε ροές 2.2 L/min και 4 L/min παρατηρήθηκαν υποηχητικές και υπερηχητικές ροές αντίστοιχα. Συμπερασματικά, το μέγιστο της έντασης σήματος παρατηρήθηκε σε αριθμό Mach ~ 1 , δηλ την ταχύτητα του ήχου.



Εικόνα 1.3. Ιοντική ισχύς και Ιοντικό Ρεύμα του αναλύτη Gramidin S σε διάλυμα νερό /μεθανόλης 1 μ M και συχέτιση με την ροή του αερίου εκνέφωσης.[Hirabayashi, Anal.Chem,1994]

1.4 Venturi Easy Ambient Sonic Spray Ionization

Το φαινόμενο Venturi, ανακαλύφθηκε πριν από δύο αιώνες από τον ιταλό φυσικό Giovanni Bartista Venturi. Όταν ένα ρευστό που κινείται μέσα σε σωλήνα διατομής d_0 , με ταχύτητα v_0 περάσει από στενότερο σημείο $d_1 < d_0$, τότε η ταχύτητα του ρευστού αυξάνεται και μεταξύ των δύο σημείων παρατηρείται πτώση πίεσης.



Σχήμα 1.4. A) Σχηματική αναπαράσταση του φαινομένου Venturi **B)** Venturi Easy Ambient Sonic Spray Ionization.

Η διαφορά πίεσης που δημιουργείται επιτρέπει την φυσική αναρρόφηση διαλύματος (Σχήμα 1.4.B) και άρα χρησιμεύει στην αυτόματη εισαγωγή υγρού δείγματος. Η αυτόματη αναρρόφηση υγρού δείγματος μέσα σε τριχοειδή σωλήνα πυριτίου από εκνεφωτικό αέριο υψηλής ταχύτητας (ταχύτητα του ήχου) και η ταυτόχρονη εκνέφωση και ιοντισμός του δείγματος ονομάζεται Venturi-Easy Ambient Sonic Spray Ionization⁷.

Τα κύρια χαρακτηριστικά της μεθόδου είναι η απλότητα στην λειτουργία, αφού αποφεύγεται η χρήση ηλεκτρικών αντλιών για την εισαγωγή του δείγματος, η έλλειψη

ηλεκτρικών και θερμικών παρεμβολών αφού δεν χρησιμοποιείται ηλεκτρικό δυναμικό ή υψηλή θερμοκρασία για την εκνέφωση, ο διπολικός ιοντισμός των σταγόνων με παρουσία θετικών και αρνητικών ιόντων χωρίς την χρήση θετικών και αρνητικών δυναμικών (ESI) και ανεξάρτητα από το pH του διαλύματος. Σε σύγκριση με τον ηλεκτροψεκασμό το σήμα που παρατηρήθηκε με το V-EESI είναι χαμηλότερο αλλά οι λόγοι σήματος προς θόρυβο είναι αρκετά βελτιωμένοι. Επιπλέον η δημιουργία διμερών και θραυσμάτων είναι μειωμένη σε σύγκριση με τον ηλεκτροψεκασμό αυξάνοντας την ευαισθησία.

1.5 Μηχανισμός Ιοντισμού στο *Sonic Spray-MS*

Ο μηχανισμός ιοντισμού με την πηγή *Sonic Spray* είναι κάτι που απασχόλησε τους ερευνητές που ασχολήθηκαν με τις δυνατότητες της πηγής αυτής. Τα αποτελέσματα της έρευνας τους είναι αντικρουόμενα σε πολλές περιπτώσεις, κάτι που αποδεικνύει την ανάγκη για περαιτέρω διερεύνηση. Πρώτος, ο Atsumu Hirabayashi αναφέρει ότι ο σχηματισμός αέριων ιόντων και φορτισμένων σταγόνων συνδέονται με το μέγεθος των σταγόνων, αφού παρατηρείται αύξηση του συνολικού ρεύματος ιόντων με αύξηση της ταχύτητας(ροής) του εκνεφωτικού αερίου κάτι που αναμένεται να ελατώνει το μέγεθος της σταγόνας⁸. Ο σχηματισμός φορτισμένων σταγόνων μέσω τριβής της επιφάνειας του τριχοειδή σωλήνα και του διαλύματος εξετάστηκε με δύο υλικά διαφορετικής ηλεκτρικής αγωγιμότητας (τριχοειδές τηγμένου πυριτίου και ανοξειδωτού χάλυβα) αλλά η ένταση σήματος της πηγής δεν διαφοροποιήθηκε.

Το μοντέλο στατιστικής φόρτισης⁹, που προτάθηκε από τον Dodd και θεωρήθηκε ότι εξηγεί τον θερμοψεκασμό, προβλέπει ότι οι φορτισμένες σταγόνες σχηματίζονται με μικροσκοπικές διαφοροποιήσεις της ιοντικής συγκέντρωσης στο υγρό με αποτέλεσμα η πλειονότητα των σταγόνων να είναι ουδέτερες και κάποιες φορτισμένες είτε θετικά είτε αρνητικά. Το μέσο φορτίο της σταγόνας, με βάση αυτό το μοντέλο, είναι ανάλογο της τετραγωνικής ρίζας της ιοντικής συγκέντρωσης N στο διάλυμα,

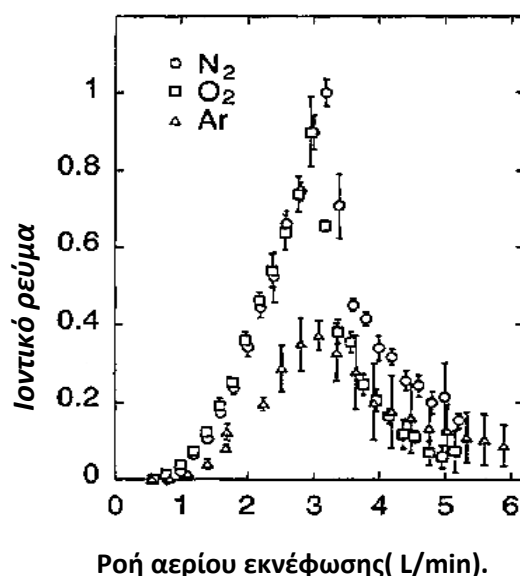
$$(2) \{ |q| \} = \sqrt{N}$$

Με βάση αυτήν την εξίσωση, το ιοντικό ρεύμα που εντοπίζεται από το ηλεκτρόδιο του οργάνου, πρέπει να αυξάνεται με αύξηση της συγκέντρωσης ηλεκτρολύτη στο διάλυμα. Ο Hirabayashi χρησιμοποιώντας οξικό αμμώνιο ως ηλεκτρολύτη παρατήρησε μείωση του ιοντικού ρεύματος με αύξηση της συγκέντρωσης του ηλεκτρολύτη και άρα απέρριψε το μοντέλο αυτό.

Μια άλλη πιθανή εξήγηση των αποτελεσμάτων είναι το μοντέλο της ηλεκτρικής διπλής στοιβάδας στην διεπιφάνεια υγρού-ατμόσφαιρας που δημιουργείται στα σταγονίδια που εκπέμπονται στην ατμόσφαιρα. Τα διαφορετικά συστατικά που βρίσκονται σε ένα διάλυμα συμπεριφέρονται διαφορετικά αναλόγως με την επιφανειακή δράση τους και την σφαίρα επιδιалύτωσης που σχηματίζουν. Άρα αναμένεται ενώσεις με μεγάλη επιφανειακή τάση να βρίσκονται στην επιφάνεια της σταγόνας και ενώσεις με μεγάλη σφαίρα επιδιалύτωσης στο εσωτερικό της σφαίρας. Για παράδειγμα σε υδατικό διάλυμα (pH=5) δημιουργείται ηλεκτρική διπλή στοιβάδα βάθους ~ 100 nm κοντά στην επιφάνεια του νερού με το αρνητικό 'στρώμα' να είναι το εξωτερικό και το θετικό στρώμα το εσωτερικό. Επιπλέον με άυξηση της συγκέντρωσης του ηλεκτρολύτη αναμένεται να αυξηθούν οι αλληλεπιδράσεις των ιόντων και ο σχηματισμός συνδυαστικών ιόντων μεταξύ τους με αποτέλεσμα την μείωση του βάθους του στρώματος διάχυσης. Το μοντέλο προβλέπει ότι το βάθος του στρώματος διάχυσης είναι ανάλογο της σχέσης $1/\sqrt{N}$, όπου N η συγκέντρωση του ηλεκτρολύτη.

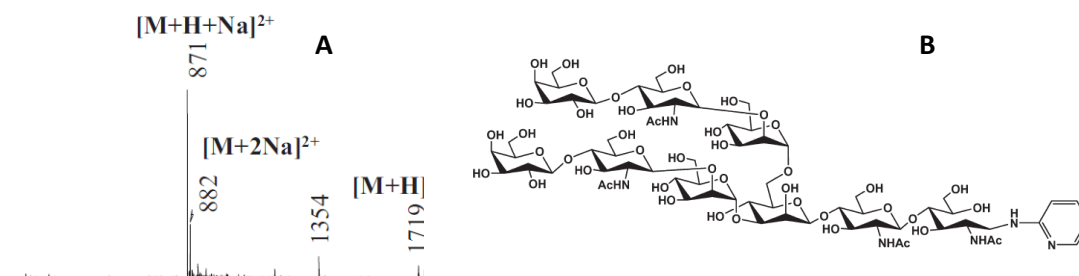
Αντιθέτως, σε μια πρόσφατη μελέτη, από τον Zoltan Takats¹⁰, το μοντέλο στατιστικής φόρτισης προκρίθηκε ως το πιο κατάλληλο να εξηγήσει τα πειραματικά αποτελέσματα. Στην έρευνα τους για τον σχηματισμό οκταμερών συστάδων αμινοξέων με την χρήση της πηγής sonic spray παρατήρησαν ότι με αύξηση της συγκέντρωσης χλωριούχου νατρίου που πρόσθεταν σε διάλυμα 0.01 M L-serine το ιοντικό ρεύμα αυξανόταν. Οι συνθήκες του φασματομέτρου μάζας που χρησιμοποίησαν ήταν τέτοιες που να ελαχιστοποιούν το 'σπάσιμο' των συστάδων (clusters) στην περιοχή ενδιάμεσης πίεσης. Στην ίδια μελέτη, εξετάστηκε η εξάρτηση του συνολικού ιοντικού ρεύματος από την σχετική περιεκτικότητα του διαλύματος σε μεθανόλη. Η αύξηση της περιεκτικότητας σε μεθανόλη οδηγεί σε αύξηση του ιοντικού ρεύματος. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί με βάση την αλλαγή στην επιφανειακή τάση της σταγόνας και την πητικότητα της μεθανόλης. Η μείωση της επιφανειακής τάσης της σταγόνας, λόγω της αυξημένης περιεκτικότητας σε μεθανόλη, οδηγεί σε περαιτέρω κύκλους εξάτμισης και σχάσης της αρχικής σταγόνας και άρα σε αύξηση των 'fine droplets' και αύξηση του σήματος.

Η εξάρτηση του ιοντικού ρεύματος που παρατηρείται από το μέγεθος της αρχικής σταγόνας που εκπέμπεται στο Sonic Spray, επιβεβαιώνεται και από πειραματικά δεδομένα που αποδεικνύουν ότι το ιοντικό ρεύμα που παρατηρείται με πηγή ιοντισμού Sonic Spray μεταβάλλεται ανάλογα με την πυκνότητα και την ατομική ή μοριακή μάζα του αερίου εκνέφωσης⁸. Άλλωστε έχει επισημανθεί από μελέτες ότι αέρια εκνέφωσης με χαμηλότερες πυκνότητες έχουν την δυνατότητα να παράξουν σταγονίδια μικρότερης διαμέτρου¹¹.



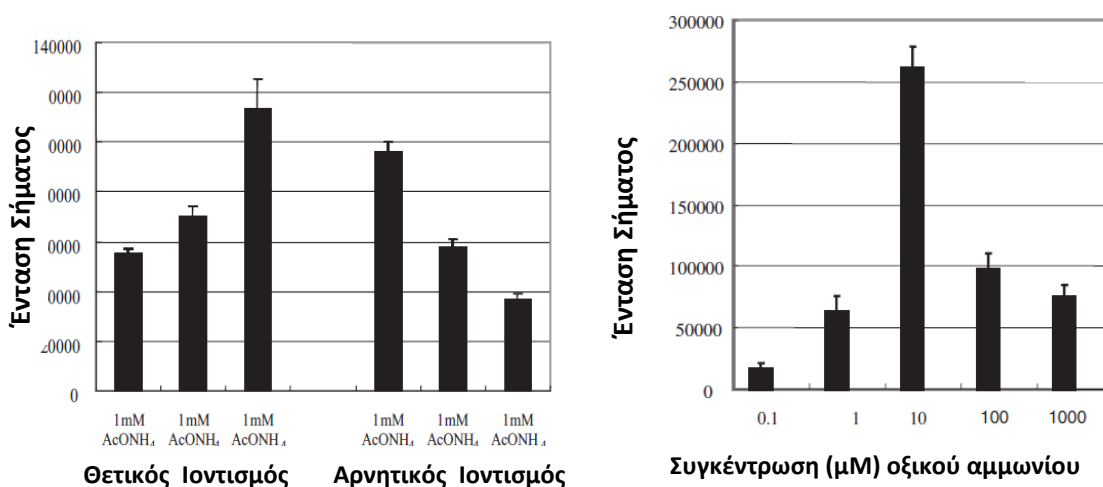
Εικόνα 1.5. Εξάρτηση ιοντικού ρεύματος από την ροή του αερίου εκνέφωσης με τρία διαφορετικά αέρια N₂, O₂, Ar. Το N₂ και το O₂ εμφανίζουν παρόμοια αποτελέσματα ενώ το Ar ως το στοιχείο με την μεγαλύτερη μάζα παρουσιάζει μειωμένη αποτελεσματικότητα παραγωγής ιόντων.

Μια διαφορετική εκδοχή για τον μηχανισμό του Sonic Spray δίνει ο Kisaburo Deguchi με την μελέτη του σε παράγωγα με 2-αμινοπυριδίνη ολιγοσακχαριτών (Εικόνα 1.6). Αφού μελέτησε την ένταση του σήματος κορυφής, τόσο στον θετικό όσο και στον αρνητικό ιοντισμό, μεταβάλλοντας τη συγκέντρωση ηλεκτρολύτη αλλά και το pH παρατήρησε σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ θετικού και αρνητικού ιοντισμού που δεν ερμηνεύονταν από τους μέχρι τότε προτεινόμενους μηχανισμούς.



Εικόνα 1.6. Α) Φάσμα μαζών του παραγώγου 2-αμινοπυριδίνης ολιγοσχαρίτη με Sonic Spray στον θετικό Ιονισμό. **Β)** Απεικόνιση της ένωσης.

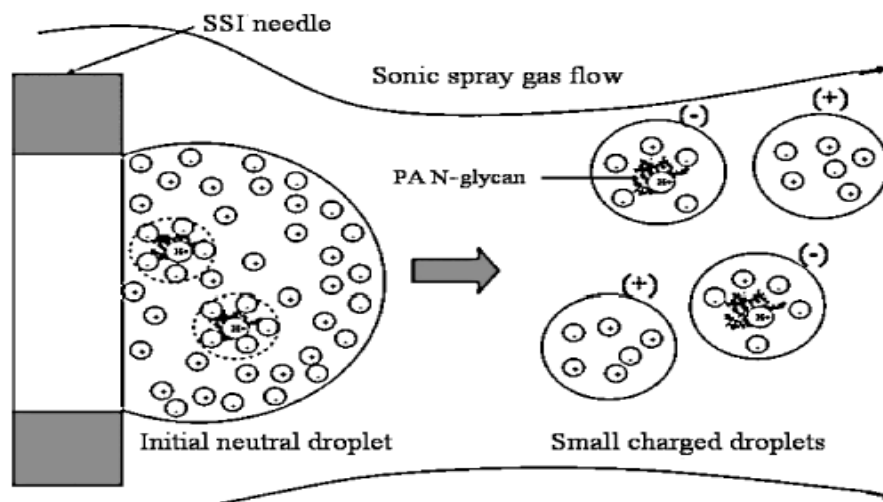
Η εικόνα 1.7 παρουσιάζει διαγραμματικά τα αποτελέσματα της μελέτης. Το μέγιστο της έντασης κορυφής στον θετικό ιοντισμό αντοπίζεται σε pH 8.6, δηλ. σε βασικό pH, ενώ το μέγιστο της έντασης κορυφής στον αρνητικό ιοντισμό εντοπίζεται σε pH 4.3, δηλ. σε όξινο pH. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με τα μέχρι τώρα γνωστά από άλλες τεχνικές εκνέφωσης όπως ο ηλεκτροψεκασμός, όπου ο θετικός ιοντισμός ευνοείται σε όξινα pH και ο αρνητικός ιοντισμός σε βασικά pH, λόγω περίσσειας φορτίου θετικού και αρνητικού αντίστοιχα. Επιπροσθέτως παρατήρησαν ότι με αύξηση της συγκέντρωσης του ηλεκτρολύτη η ένταση του σήματος κορυφής (στον αρνητικό ιοντισμό) μεγιστοποιείται σε συγκέντρωση 10 μM οξικού αμμωνίου και μειώνεται είτε σε μεγαλύτερες είτε μικρότερες συγκεντρώσεις ηλεκτρολύτη. Ουσιαστικά από 0.1-10 μM οξικού αμμωνίου παρατηρείται αύξηση του σήματος κορυφής και από 10-1000 μM οξικού αμμωνίου παρατηρείται μείωση του σήματος αναλύτη.



Εικόνα 1.7. Α) Εξάρτηση της έντασης κορυφής σε θετικό και αρνητικό ιοντισμό από το pH. **Β)** Εξάρτηση της έντασης σήματος κορυφής από την συγκέντρωση του ηλεκτρολύτη στον αρνητικό ιοντισμό. (Αναφορά 12).

Το μοντέλο που προτάθηκε από τον Deguchi θα μπορούσαμε να το ονομάσουμε **μοντέλο αντισταθμιστικού ιόντος**¹². Ο ίδιος προτείνει ότι στα χαμηλά pH ο αναλύτης είναι θετικά φορτισμένος γιατί γύρω του σχηματίζει ένα στρώμα από αντισταθμιστικά αρνητικά ιόντα (Σχήμα 1.8) στην αρχική ουδέτερη σταγόνα. Αυτό το επιδιαλυτωμένο αρνητικό ιόν πλέον

μετά από εξάτμιση και σχάση της αρχικής σταγόνας σε μικρότερες σταγόνες εντοπίζεται από το φασματομέτρο μάζας.



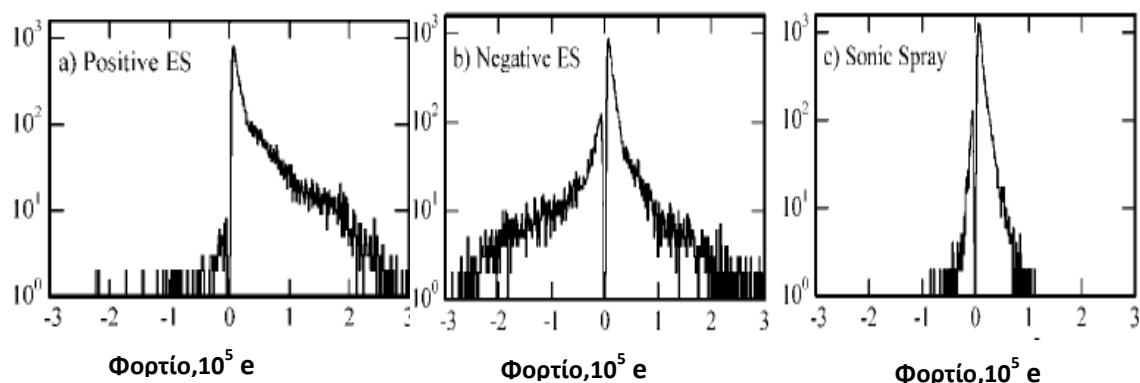
Σχήμα 1.8. Σχηματική απεικόνιση του προτεινόμενου μηχανισμού αντισταθμιστικού ιόντος.

1.6 Αεροδυναμική σχάση μικροσταγονιδίων στην περιοχή ενδιάμεσης πίεσης και διαχωρισμός φορτίων

Σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν από ερευνητές του Πανεπιστημίου της Ιντιάνα¹³, έγινε εκτίμηση της κατανομής των μεγεθών, του φορτίου αλλά και της ταχύτητας σταγόνων νερού από τρεις πηγές εκνέφωσης (ESI, Sonic Spray, VOAG) πριν εισέλθουν σε μεταφορική στήλη από ανοξείδωτο χάλυβα (12.7 cm μήκος, εσωτερική διάμετρος 500 μm) και στην έξοδο προς τον αναλυτή μαζών. Η χρήση μεταφορικής στήλης ανοξείδωτου χάλυβα για την εισαγωγή δείγματος σε τεχνικές ηλεκτροψεκασμού είναι πολύ συνηθισμένη. Χρησιμοποιήθηκε ψηφιακή μικροφωτογραφία για τον υπολογισμό του μεγέθους της αρχικής σταγόνας πριν εισέλθει στη στήλη και Image Charge Detection-Mass Spectrometry για την μέτρηση του φορτίου και του μεγέθους της σταγόνας στην έξοδο της από αυτήν. Η περιγραφή της πολύπλοκης αυτής τεχνικής ξεπερνά τα όρια της παρούσας διατριβής και για αυτό θα ασχοληθούμε μόνο με τα αποτελέσματα των μετρήσεων και την ερμηνεία τους.

Η κατανομή των μεγεθών των μικροσταγονιδίων πριν την είσοδο τους στην στήλη, για την τεχνική Sonic Spray, κυμαίνεται μεταξύ 6-100 μm (ακτίνα κύκλου) ενώ για την πηγή ηλεκτροψεκασμού αναμένεται να έχουμε κατανομές προς μικρότερες ακτίνες. Επιπλέον με την χρήση ενός μετατροπέα δυναμικού-ρεύματος στην είσοδο της στήλης επιβεβαιώθηκε ότι στον θετικό ηλεκτροψεκασμό παρατηρείται θετικό ρεύμα ιόντων, στον αρνητικό ηλεκτροψεκασμό αρνητικό ρεύμα ιόντων και στο Sonic Spray δεν εντοπίστηκε κανένα ρεύμα, άρα οι αρχικές σταγόνες είναι ουδέτερες. Το μέγεθος των σταγόνων στην έξοδο από την στήλη υπολογίστηκε 2-3 μm, με την τεχνική Image Charge Detection, και για τον ηλεκτροψεκασμό και για το Sonic Spray. Από την άλλη μεριά, οι κατανομές των φορτίων είναι πολύ διαφορετικές. Οι κατανομές των φορτίων για τις δύο τεχνικές συγκριτικά, φανερώνουν ότι ο ηλεκτροψεκασμός δημιουργεί περισσότερα φορτία και άρα οι σταγόνες του ηλεκτροψεκασμού, τόσο στον θετικό όσο και στον αρνητικό ιοντισμό, έχουν περισσότερα φορτία από τις σταγόνες του Sonic Spray. Ο μεγαλύτερος πληθυσμός των σταγόνων που εντοπίστηκαν είναι θετικά φορτισμένες ακόμα και στον αρνητικό ηλεκτροψεκασμό (Εικόνα 1.9) όπου το 77% των σταγόνων ήταν θετικά φορτισμένες ενώ το

ρεύμα ιόντων στην αρχή της στήλης ήταν καθαρά αρνητικό. Στο Sonic Spray οι θετικά φορτισμένες σταγόνες αποτελούν το 91% του συνολικού πληθυσμού ενώ οι αρχικές σταγόνες δεν είχαν φορτίο.

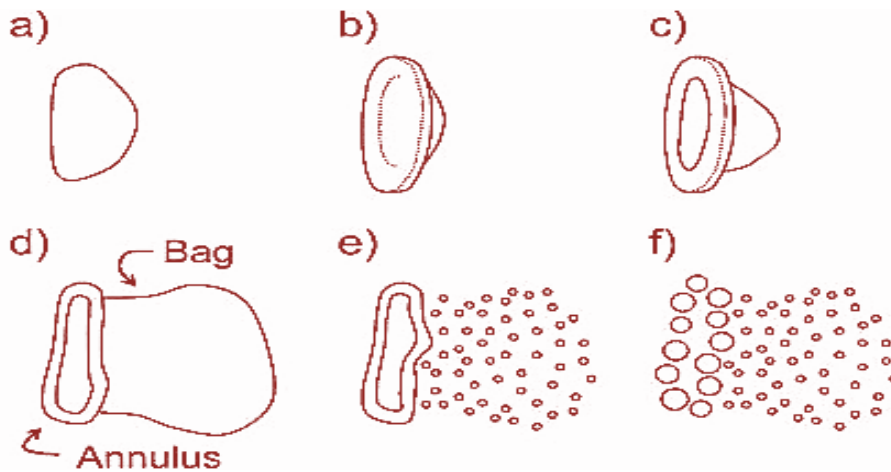


Εικόνα 1.9. Κατανομή φορτίων από σταγόνες νερού **α)**Θετικός Ηλεκτροψεκασμός **β)**Αρνητικός Ηλεκτροψεκασμός **γ)** Sonic Spray.

Όταν οι σταγόνες εισέρχονται στην στήλη ενδιάμεσης πίεσης η ταχύτητα του αερίου εκνέφωσης είναι πολύ μεγαλύτερη από αυτή των σταγόνων. Λόγω της διαφοράς αυτής οι σταγόνες επιταχύνονται μέσα στη στήλη και τους ασκείται μια αεροδυναμική δύναμη. Αν η διαφορά ταχύτητας είναι πολύ μεγάλη τότε οι σταγόνες σχάζονται αεροδυναμικά, μέσω κάποιων προτεινόμενων μηχανισμών. Κρίσιμη παράμετρος για την αεροδυναμική σχάση σταγόνας μέσα σε επιταχυνόμενο ρεύμα αέρα είναι ο αριθμός Weber. Για να συμβεί αεροδυναμική σχάση ο αριθμός Weber πρέπει να ξεπερνά το 10.

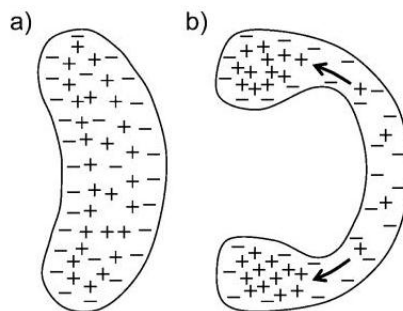
$$(3) \quad W_e = \frac{\rho_G v^2 d}{\sigma}$$

όπου ρ_G η πυκνότητα αερίου, v η σχετική ταχύτητα του αερίου, d η διάμετρος της σταγόνας και σ η επιφανειακή τάση. Μια μέση τιμή διαμέτρου για τις αρχικές σταγόνες του Sonic Spray είναι 80 μm . λόγω της πτώσης πίεσης στην είσοδο της στήλης ενδιάμεσης πίεσης το αέριο επιταχύνεται με αποτέλεσμα η ταχύτητα να προσεγγίζει τιμές 170 m/s. Στην έξοδο της στήλης προς την περιοχή υψηλού κενού $\sim 10^{-5}$ torr, η ταχύτητα του ρεύματος αερίου αναμένεται να προσεγγίζει τα 320 m/s. Άρα η αεροδυναμική σχάση στην είσοδο και έξοδο της στήλης είναι εφικτή αφού ο αριθμός Weber ξεπερνά κατά πολύ το 10. Όπως φαίνεται από την εξίσωση (3) όσο πιο μικρή είναι η σταγόνα τόσο πιο μεγάλη είναι η ταχύτητα του αερίου που απαιτείται για αεροδυναμική σχάση. Επιπλέον όσο πιο μικρή είναι η σταγόνα θα επιταχύνεται πιο πολύ μειώνοντας την διαφορά ταχύτητας ροής μεταξύ σταγόνας και αερίου. Τα συμπεράσματα αυτά συμφωνούν με την παρατήρηση ότι οι σταγόνες στην έξοδο της στήλης καταλήγουν σε ένα ομογενοποιημένο νούμερο (2-3 μm) ανεξάρτητα από το μέγεθος της αρχικής σταγόνας. Η αεροδυναμική σχάση σταγόνων όταν επιταχύνονται σε ρεύμα αερίου είναι μια καλά μελετημένη διαδικασία. Οι μηχανισμοί που προβλέπει η θεωρία κατά σειρά αύξησης του αριθμού Weber είναι α) ο μηχανισμός σακούλας β) ο μηχανισμός σακούλας-πίδακα γ) ο μηχανισμός μετάβασης και δ) ο μηχανισμός διάτμησης. Κατά την σχάση με μηχανισμό σακούλας (Σχήμα 1.10), σε χαμηλούς αριθμούς Weber, α)πρώτα η σταγόνα γίνεται επίπεδη, β)στη συνέχεια σχηματίζεται ένα κοίλωμα, γ) και δ) σχηματίζεται η σακούλα από το κέντρο υποστηριζόμενη από ένα δακτύλιο, ε) η σακούλα σπάει σε μικρές σταγόνες, f) ο δακτύλιος σπάει σε λίγες μεγαλύτερες σταγόνες.



Σχήμα 1.10. Μηχανισμός σακούλας και αεροδυναμική σχάση των σταγόνων.

Το επιφανειακό δυναμικό για το νερό είναι $+0.10 \text{ V}$. Η παρουσία θετικού δυναμικού στην επιφάνεια του νερού σημαίνει ότι τα δίπολα του νερού έχουν κατεύθυνση με τον αρνητικό πόλο στην διεπιφάνεια νερού-ατμόσφαιρας. Με βάση αυτή την παραδοχή, η ηλεκτρική διπλή στοιβάδα που σχηματίζεται στην επιφάνεια των σταγόνων περιμένουμε να έχει ως εξωτερικό στρώμα τα ιόντα OH^- και ως εσωτερικό στρώμα τα ιόντα H_3O^+ . Αν ξαναδούμε τώρα τον μηχανισμό σακούλας, βλέπουμε ότι στον δακτύλιο που σχηματίζεται μαζεύεται η μεγαλύτερη ποσότητα του νερού ενώ το μέρος της σακούλας είναι λεπτό και άρα σε μεγαλύτερη επαφή με την ατμόσφαιρα. Για αυτό τον λόγο αναμένεται τα θετικά ιόντα να συγκεντρωθούν στο δακτύλιο ενώ τα αρνητικά ιόντα στην σακούλα.



Σχήμα 1.11. Σχηματική αναπαράσταση του προτεινόμενου μηχανισμού διαχωρισμού φορτίων κατά την αεροδυναμική σχάση σταγόνων νερού με τον μηχανισμό σακούλας.

Σύμφωνα με τα προηγούμενα, ένας μεγάλος αριθμός μικρών αρνητικά φορτισμένων σταγόνων θα δημιουργηθεί και ένας μικρός αριθμός θετικά φορτισμένων σταγόνων. Το σχετικό φορτίο ανά σταγόνα αναμένεται να είναι μικρότερο για τις περισσότερες αρνητικές σταγόνες και πιθανώς κάτω από το όριο ανίχνευσης του αιχινευτή. Συμπερασματικά, η παρατήρηση περισσότερων θετικών φορτίων στο Sonic Spray αλλά ακόμα και στον αρνητικό Ηλεκτροψεκασμό δικαιολογείται με βάση την μή-ανίχνευση των αρνητικών σταγόνων.

Σκοπός Διατριβής

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η χρήση εκνεφωτών ατομικής φασματομετρίας μάζας, εμπορικά διαθέσιμων, προς συναρμολόγηση πηγής υπερηχητικής εκνέφωσης με αυτοτροφοδοτούμενη ροή υγρού δείγματος (V-EASI) για εφαρμογές μοριακής φασματομετρίας μάζας. Σκοπός επίσης είναι η αξιολόγηση της χρησιμότητας, η βελτιστοποίηση της ανάλυσης με την πηγή αυτή και η σύγκριση της με την πηγή ηλεκτροψεκασμού.

Στην μελέτη βελτιστοποίησης θα εξεταστεί η επίδραση της σχετικής θέσης του τριχοειδή σωλήνα ως προς την άκρη του εκνεφωτή στην ένταση σήματος, η επίδραση της σύστασης του διαλύτη στην ένταση σήματος αναλύτη και στην ροή διαλύματος, η επίδραση της πίεσης του εκνεφωτικού αερίου στην ένταση σήματος και στην ροή διαλύματος αλλά και η επίδραση της επιφανειακής τάσης του ίδιου του αναλύτη. Επιπλέον θα εξεταστεί η επίδραση της συγκέντρωσης χλωριούχου νατρίου και ιωδιούχου καισίου στην ανάλυση της ένωσης L-ανηγμένη γλουταθειόνη με πηγή V-EASI.

Για την σύγκριση της πηγής V-EASI και ESI θα χρησιμοποιηθούν, ετερομεταλλικές σύμπλοκες ενώσεις γενικού μοριακού τύπου $Cu_6Ln(aib)_6(OH)_3(OAc)_3(NO_3)_3$ που παρουσιάζουν ενδιαφέρον λόγω της 'ευαισθησίας' των ενώσεων αυτών στις συνθήκες ανάλυσης, σύμπλοκες ενώσεις του αντιμονίου με βιομόρια μετά από αντίδραση Sb(V) με νουκλεοζίτες/νουκλεοτίδια, πρωτεΐνες (μυογλοβίνη), φαινυλοξική βοροξίνη καθώς και το τριπεπτιδίο L-ανηγμένη γλουταθειόνη. Επιπλέον θα γίνει μελέτη της επίδρασης της οξύτητας στην ένταση σήματος του αναλύτη L-ανηγμένη γλουταθειόνη με πηγή V-EASI και ESI ενώ και τα είδη των ευδιάλυτων προϊόντων πολυμερισμού του πυριτικού οξέος θα αναλυθούν και με τις δύο πηγές.

Τέλος, θα εξεταστεί η πιθανότητα της χρήσης διπλού εκνεφωτή με αυτοτροφοδοτούμενη ροή για ταυτόχρονη εισαγωγή αναλύτη και πρότυπης ένωσης βαθμονόμησης για εφαρμογές μέτρησης μάζας με μεγάλη ακρίβεια.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Οργανολογία

Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε για την παρούσα μελέτη είναι ένα *Thermo Finnigan LCQ Advantage*, εξοπλισμένο με αντλία σύριγγας, πηγή ηλεκτροψεκασμού πνευματικής εκνέφωσης (ιοντοψεκασμός), θερμαινόμενη μεταφορική στήλη ενδιάμεσης πίεσης, σύστημα υψηλού κενού, οπτικά συστήματα εστίασης ιόντων, ιοντική παγίδα ως αναλυτή μαζών και σύστημα ανίχνευσης ιόντων.

2.1.1 Σύστημα Αντλίας Σύριγγας

Η αντλία σύριγγας είναι ένα ηλεκτρονικά ελεγχόμενο, ολοκληρωμένο σύστημα εισαγωγής υγρού δείγματος. Η σύριγγα διατηρείται σε σταθερή θέση με την χρήση ειδικά διαμορφωμένου έγκλειστρου. Το έμβολο της σύριγγας πιέζεται με σταθερό ρυθμό από ένα μηχανικό σύστημα ώθησης του εμβόλου. Σε κανονική λειτουργία, το σύστημα ώθησης πιέζει το έμβολο με ρυθμό 1% του όγκου της σύριγγας ανά λεπτό, ενώ με επιλογή της λειτουργίας έκπλυσης (purge) αυξάνεται ο ρυθμός ώθησης του εμβόλου σε 5% του όγκου της σύριγγας ανά λεπτό. Η σύριγγα εφαρμόζεται σε συνδέσμους πολυαιθερικής κετόνης (PEEK fitting) και σωλήνα πολυαιθερικής κετόνης (PEEK tubing) εσωτερικής διαμέτρου 0.01" in. για την μεταφορά του διαλύματος στην πηγή ιοντοψεκασμού.

2.1.2. Πηγή ιοντοψεκασμού

Η πηγή ιοντοψεκασμού αποτελείται από το σύστημα εισαγωγής δείγματος το οποίο αποτελείται από τριχοειδή σωλήνα πυριτίου εσωτερικής διαμέτρου 100 μm και εξωτερικής διαμέτρου 200 μm, μέσω του οποίου το δείγμα καταλήγει στην άκρη του ακροφύσιου, περίπου 1 mm πριν την άκρη της βελόνας. Η βάση πολλαπλής εισαγωγής αερίων εξυπηρετεί την είσοδο του δείγματος, την παροχή εκνεφωτικού αερίου, την παροχή βοηθητικού αερίου καθώς και το δυναμικό. Η απόστασης της βάσης από την είσοδο του φασματόμετρου ρυθμίζεται και βελτιστοποιείται. Στην άκρη της βελόνας της πηγής εφαρμόζεται δυναμικό (συνήθως 3-5 kV) με αποτέλεσμα την δημιουργία 'νέφους' φορτισμένων μικροσταγόνων. Το ακροφύσιο της πηγής κατευθύνει το εκνεφωτικό και βοηθητικό αέριο προς τις σταγόνες. Το **εκνεφωτικό αέριο** είναι το εσωτερικό, ομοαξονικό ρεύμα αερίου αζώτου που εκνεφώνει το διάλυμα μαζί με το εφαρμοζόμενο δυναμικό. Το **βοηθητικό αέριο** είναι το εξωτερικό, ομοαξονικό ρεύμα αερίου αζώτου και συμβάλλει στην καλύτερη και σταθερότερη εκνέφωση. Συνήθως η ροή του βοηθητικού αερίου είναι 3 φορές μικρότερη από αυτή του εκνεφωτικού αερίου. Στον θάλαμο εκνέφωσης επικρατούν ατμοσφαιρικές συνθήκες πίεσης.

2.1.3. Περιοχή Ενδιάμεσης Πίεσης

Οι τιμές της πίεσης μέσα στην περιοχή ενδιάμεσης πίεσης είναι συνήθως μεταξύ 0.9-1.3 torr. Λόγω της διαφοράς πίεσης μεταξύ του θαλάμου εκνέφωσης και της περιοχής ενδιάμεσης πίεσης, φορτισμένες και ουδέτερες σταγόνες, εισέρχονται με άντληση διαφορικής πίεσης, σε αυτή την περιοχή μέσω ενός κώνου δειγματοληψίας (ion sweep cone). Στο εσωτερικό της περιοχής ενδιάμεσης πίεσης, έντονες συνθήκες θερμοκρασίας

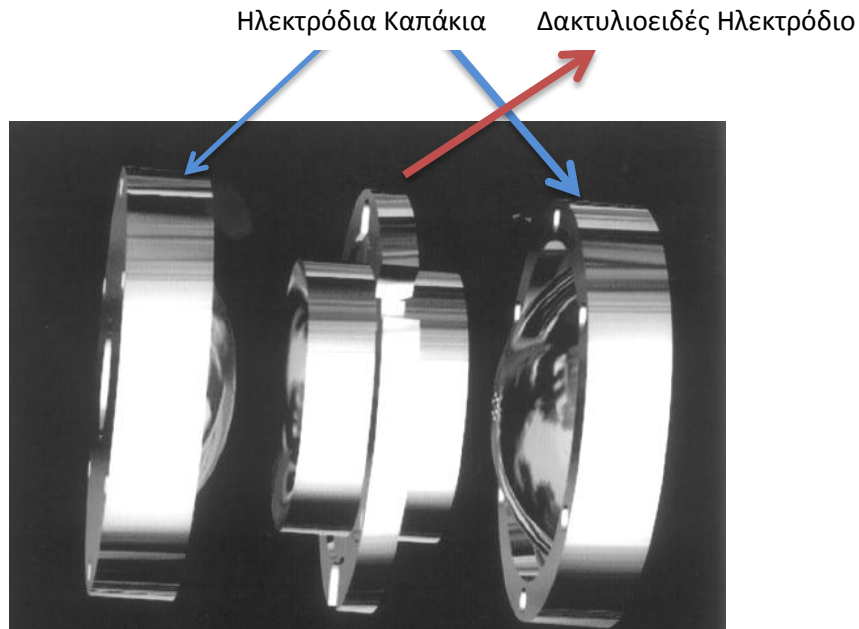
και παρουσία δυναμικών συμβάλλουν στην περαιτέρω εξάτμιση του διαλύτη από τις σταγόνες αλλά και στην παρεμπόδιση δημιουργίας συστάδων του αναλύτη με ουδέτερα μόρια διαλύτη. Στον κώνο δειγματοληψίας είναι ενσωματωμένη η *θερμαινόμενη μεταφορική στήλη*, ένας κυλινδρικός σωλήνας από ανοξείδωτο χάλυβα που περιβάλλεται από θερμοαντήρα. Οι θερμοκρασίες στο εσωτερικό της στήλης μπορούν να κυμανθούν από 60°C έως 400 °C. Στην ίδια περιοχή εφαρμόζεται το δυναμικό στήλης (**Capillary voltage**). Στην έξοδο της θερμαινόμενης μεταφορικής στήλης οι φορτισμένες μικροσταγόνες κατευθύνονται προς περιοχή χαμηλότερης πίεσης από το δυναμικό φακού εστίασης (**tube lens voltage**) μέσω ενός αποκορρύφωτή. Το δυναμικό φακού εστίασης μπορεί να είναι είτε θετικό είτε αρνητικό ανάλογα με την πολικότητα ιοντισμού και κατευθύνει τα ιόντα Η θερμοκρασία της στήλης μεταφοράς ιόντων και το δυναμικό SID (Source Induced Dissociation) βοηθούν το σπάσιμο των συστάδων και αυξάνουν την ευαισθησία της τεχνικής. Σε περίπτωση που η ενεργητική αυτή διαδικασία ξεπεράσει κάποιο όριο παρατηρείται θραυσματοποίηση του αναλύτη (**Collision Induced Dissociation**) και η ευαισθησία μειώνεται.

2.1.4. Οπτικό Σύστημα Κατεύθυνσης Ιόντων

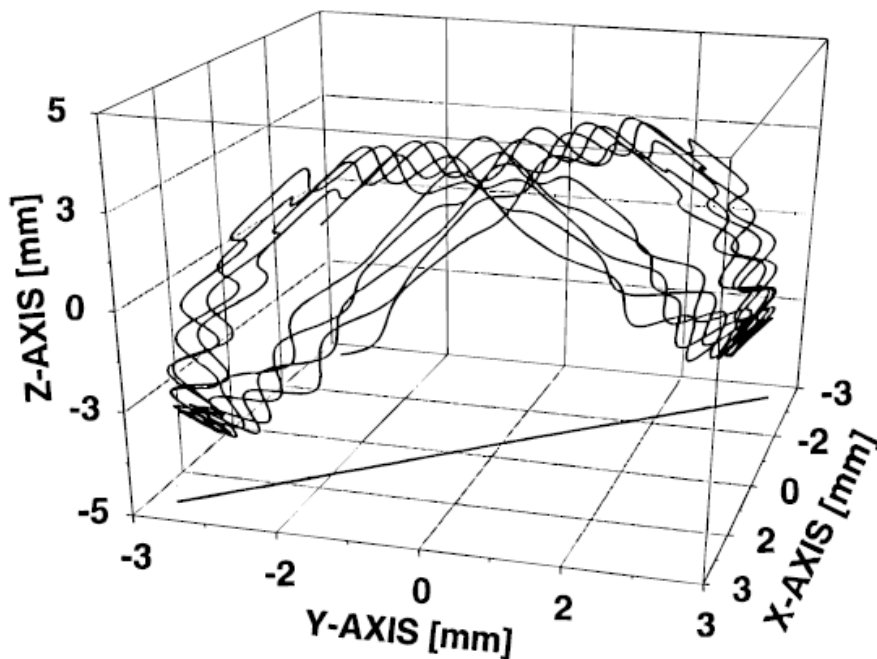
Το οπτικό σύστημα κατεύθυνσης ιόντων αποτελείται από δύο οκτάπολα και τον ενδιάμεσο φακό εστίασης (interoctapole lens) που κατευθύνει τα ιόντα από το ένα οκτάπολο στο άλλο και τα διαχωρίζει σε δύο περιοχές διαφορετικής πίεσης. Κάθε οκτάπολο είναι ένα οκτάγωνο κυλινδρικών ράβδων στα οποία εφαρμόζεται ένα μεταβαλλόμενο δυναμικό ραδιοσυχνότητας (RF voltage) και ένα συνεχές δυναμικό ρεύματος (DC voltage). Τα δύο αυτά δυναμικά δημιουργούν ηλεκτρικό πεδίο που κατευθύνει τα ιόντα στον άξονα του οκτάπολου. Η πίεση στην περιοχή του πρώτου οκτάπολου είναι 2×10^{-3} torr και στην περιοχή του δεύτερου οκτάπολου 2×10^{-5} torr με αποτέλεσμα τα ιόντα να επιταχύνονται προς την ιοντική παγίδα που είναι στην ίδια πίεση (2×10^{-5} torr) με την περιοχή του δεύτερου οκτάπολου.

2.1.5. Αναλυτής Μαζών Ιοντικής Παγίδας

Στην έξοδο από το δεύτερο οκτάπολο τα ιόντα εισέρχονται μέσω μιας οπής στην παγίδα ιόντων. Η παγίδα ιόντων αποτελείται από το ηλεκτρόδιο καπάκι εισόδου (entrance endcap electrode), το ηλεκτρόδιο καπάκι εξόδου (exit endcap electrode) και το δακτυλιοειδές ηλεκτρόδιο (ring electrode). Στο εσωτερικό της παγίδας αέριο ήλιο μερικής πίεσης 10^{-3} torr χρησιμοποιείται για την παγίδευση των ιόντων αλλά και για συγκρούσεις θραυσματοποίησης. Συνεχές δυναμικό ρεύματος (DC Trap Voltage) εφαρμόζεται στην παγίδα για να τραβήξει τα ιόντα από το σύστημα οπτικών.



Στο δακτυλιοειδές ηλεκτρόδιο εφαρμόζεται ένα μεταβλητό δυναμικό ραδιοσυχνότητας με σταθερή συχνότητα και μεταβλητό πλάτος (ring electrode RF voltage) το οποίο δημιουργεί στο εσωτερικό της κοιλότητας της παγίδας ένα τρισδιάστατο ηλεκτρικό πεδίο. Το πεδίο αυτό δημιουργεί κίνηση των ιόντων σε αξονική κατεύθυνση προς τα ηλεκτρόδια καπάκια, αλλά και σε κάθετη κατεύθυνση προς το δακτυλιοειδές ηλεκτρόδιο. Έτσι δημιουργείται μια σταθερή κυκλική ταλαντευόμενη τροχιά των ιόντων που περιορίζει τα ιόντα στο εσωτερικό της κοιλότητας της παγίδας.



Σχήμα 2.1. Παράδειγμα ταλαντευόμενης κυκλικής τροχιάς και 'παγίδευση' ιόντων (αναφορά 14).

Με αύξηση του δυναμικού ραδιοσυχνότητας του δακτυλιοειδούς ηλεκτροδίου (ring electrode RF voltage), ιόντα αυξανόμενου λόγου μάζας προς φορτίο (m/z) διαδοχικά αποσταθεροποιούνται στην αξονική κατεύθυνση με αποτέλεσμα την διαδοχική έξοδο των ιόντων από τηλεκτρόδιο καπάκι εξόδου προς τον αιχινευτή. Το δυναμικό στο οποίο ένα ιόν αποχωρεί από την παγίδα ιόντων ονομάζεται δυναμικό ιδιοσυχνότητας (resonance voltage)

του συγκεκριμένου ιόντος. Το δυναμικό κυματομορφής (waveform voltage) αποτελείται από κατανομή συχνοτήτων που περιέχει όλες τις ιδιοσυχνότητες εκτός από αυτές των ιόντων προς ανάλυση. Το δυναμικό κυματομορφής απομόνωσης ιόντος (ion isolation waveform voltage) εφαρμόζεται στα ηλεκτρόδια καπάκια και σε συνδυασμό με το δυναμικό ραδιοσυχνοτήτων του δακτυλιοειδούς ηλεκτροδίου οδηγούν στην έξοδο από την παγίδα όλα τα ιόντα εκτός από τα επιλεγμένα ή ένα επιλεγμένο εύρος λόγων μάζας προς φορτίο. Αυτή η απομόνωση ιόντων χρησιμοποιείται για βελτίωση ευαισθησίας του υπό ανάλυση ιόντος [Ανάλυση Επιλεγμένου Ιόντος (SIM)] αλλά και σαν πρώτο βήμα στην παρακολούθηση επιλεγμένων αντιδράσεων (SRM) και διαδοχικής φασματομετρίας μάζας (MSⁿ). Για την θραυσματοποίηση μητρικών ιόντων σε παράγωγα ιόντα στην παγίδα ιόντων χρησιμοποιείται το δυναμικό ιδιοσυχνότητας διέγερσης (resonance excitation RF voltage) που εφαρμόζεται στα ηλεκτρόδια καπάκια. Αυτό το δυναμικό δεν είναι αρκετά ισχυρό για εξάγει το ιόν από την παγίδα αλλά είναι αρκετό για να κερδίσει το ιόν αρκετή κινητική ενέργεια στην αξονική του κίνηση και να αυξήσει τις συγκρούσεις με το αδρανές αέριο ήλιο, με αποτέλεσμα την θραυσματοποίηση του μητρικού ιόντος. Το δυναμικό ιδιοσυχνότητας εξαγωγής (resonance ejection RF voltage) που εφαρμόζεται στα ηλεκτρόδια καπάκια λειτουργεί σε συνδυασμό με την αύξηση του δυναμικού ραδιοσυχνοτήτων του δακτυλιοειδούς ηλεκτροδίου.

2.2.1. Ομόκεντροι Πνευματικοί Εκνεφωτές Ατομικής Φασματομετρίας Μάζας

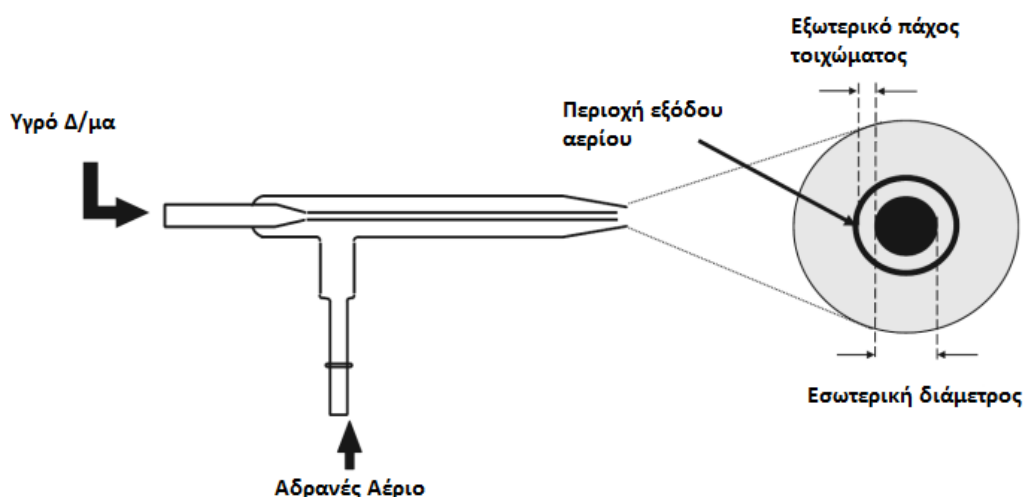
Οι πνευματικοί εκνεφωτές χρησιμοποιούνται ευρέως στην ατομική φασματομετρία μάζας για την εισαγωγή υγρού δείγματος. Τα κύρια χαρακτηριστικά τους είναι η ευκολία στην λειτουργία, η ελεύθερη αναρρόφηση του υγρού δείγματος και η εκνέφωση του υγρού με την χρήση αδρανούς εκνεφωτικού αερίου. Το υγρό εισάγεται μέσω σωλήνα εισαγωγής που καταλήγει σε υάλινο τριχοειδή στο εσωτερικό του εκνεφωτή. Η εισαγωγή του αερίου εκνέφωσης γίνεται από σωλήνα κάθετα στον εκνεφωτή, και το αέριο κινείται ομόκεντρα προς το αναρροφούμενο υγρό. Η ελεύθερη αναρρόφηση του υγρού επιτυγχάνεται λόγω της απότομης μείωσης της διαμέτρου του κελυφους του εκνεφωτή στην άκρη του, από όπου εξέρχεται το αέριο. Η επιτάχυνση του αερίου στην άκρη του εκνεφωτή οδηγεί σε πτώση πίεσης και φυσιολογική κίνηση του υγρού από την περιοχή υψηλής πίεσης (ατμοσφαιρική) στην περιοχή χαμηλής πίεσης. Η μαθηματική σχέση που αναπτύχθηκε από τον Hagen και Poiseuille εξάγει τον ρυθμό πρόσληψης υγρού από γεωμετρικά χαρακτηριστικά του εκνεφωτή αλλά και φυσικοχημικές ιδιότητες του υγρού.

$$(4) \quad \frac{dV}{dt} = \frac{\pi r^4}{8\eta} \frac{\Delta p}{l}$$

Στην εξίσωση 4 r η ακτίνα του σωλήνα αναρρόφησης, Δp η πτώση πίεσης, l το μήκος του σωλήνα και η το ιξώδες του υγρού.

Η γεωμετρική διαμόρφωση του εκνεφωτή επηρεάζει σημαντικά την απόδοση της εκνέφωσης. Μία από τις παραμέτρους που επηρεάζει σημαντικά είναι η απόσταση του υάλινου τριχοειδούς στο εσωτερικό του εκνεφωτή από την άκρη του. Το μέγεθος και το σχήμα του προθάλαμου που σχηματίζεται καθορίζει την πτώση πίεσης (Δp). Οι εκνεφωτές που σχηματίζουν προθάλαμο στην άκρη του εκνεφωτή εμφανίζουν αύξηση του ρυθμού πρόσληψης υγρού 1.5-2 φορές σε σχέση με αυτούς που η άκρη του υάλινου τριχοειδούς

είναι στην άκρη του εκνεφωτή. Το ρεύμα αέρα που κινείται ομόκεντρα, εξωτερικά του υάλινου τριχοειδούς δειγματοληψίας, έρχεται σε επαφή με το ρεύμα υγρού και μεταφέρει ένα μέρος της κινητικής του ενέργειας με αποτέλεσμα την δημιουργία αερολύματος μικροσταγόνων. Η μεταφορά της ενέργειας είναι πιο αποτελεσματική όταν το υγρό και το ρεύμα αέρα έρχονται σε επαφή περισσότερο. Η τοποθέτηση του τριχοειδή στο εσωτερικό του εκνεφωτή συμβάλλει στην αποτελεσματικότερη εκνέφωση λόγω του αυξημένου μήκους επαφής του ρεύματος αέρα με το υγρό. Αυτή η τοποθέτηση του τριχοειδή όμως μπορεί να έχει και αρνητικά αποτελέσματα λόγω επανασυμπύκνωσης του ρευστού μετά από συγκρούση στα τοιχώματα του κέλυφους. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το μερικό μπλοκάρισμα της άκρης του εκνεφωτή και μείωση της απόδοσης εκνέφωσης. Η επιφάνεια διατομής της περιοχής εξόδου του αερίου επηρεάζει σημαντικά την ταχύτητα του αερίου και άρα την μεταφορά ενέργειας από το αέριο προς το υγρό. Όσο μειώνεται η επιφάνεια αυτή τόσο αυξάνεται η πίεση του αερίου και άρα και η ταχύτητα του. Σημαντικό ρόλο επίσης παίζει η διάμετρος του εσωτερικού υάλινου τριχοειδούς αλλά και πάχος του εξωτερικού τοίχους του τριχοειδή σωλήνα. Όσο πιο μικρές είναι αυτές οι παράμετροι τόσο πιο αποτελεσματική εκνέφωση γίνεται.



Σχήμα 2.2 Σχηματική αναπαράσταση πνευματικού εκνεφωτή και οι κρίσιμες διαστάσεις του (από αναφορά 15).

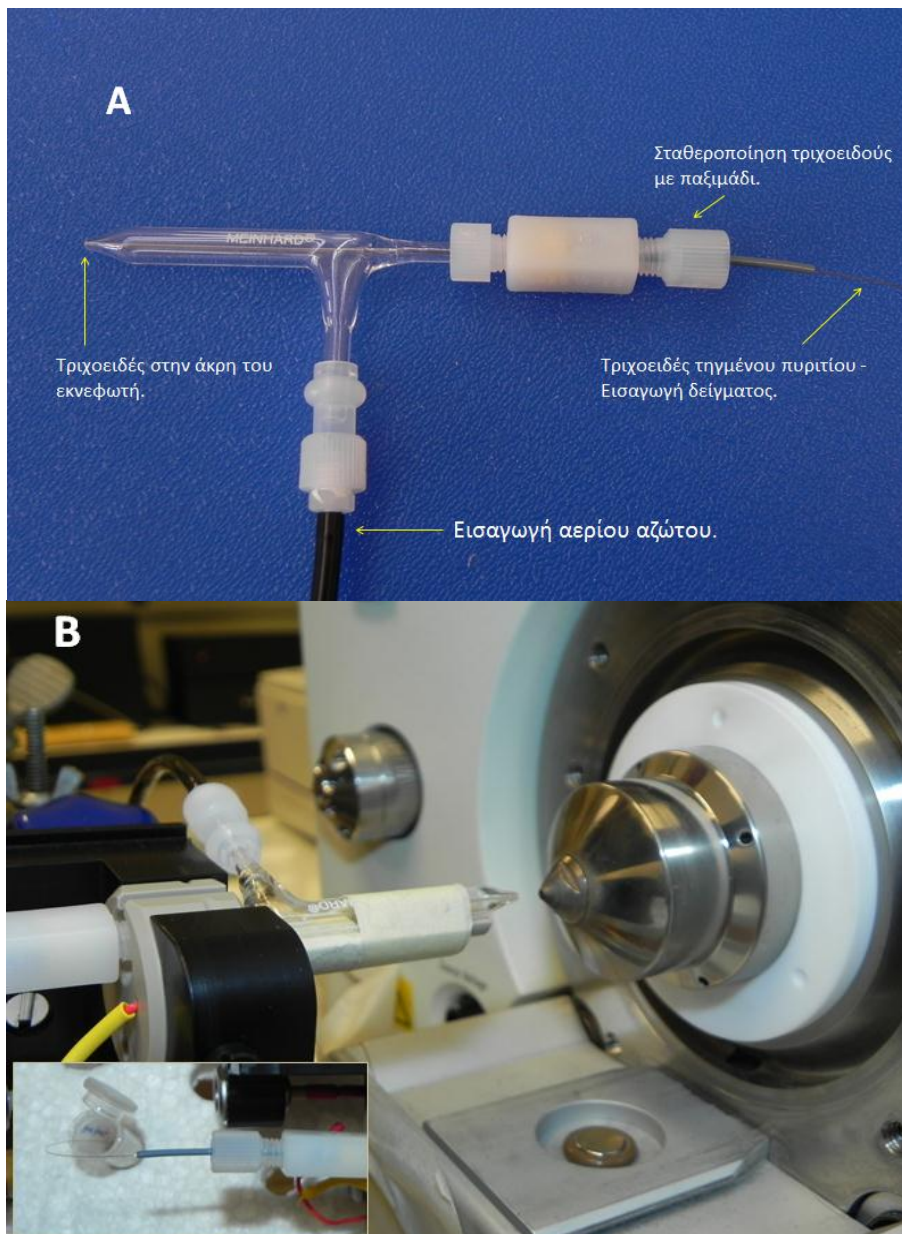
2.2.2. Τεχνικά Χαρακτηριστικά Εκνεφωτών

Για την ανάπτυξη της τεχνικής χρησιμοποιήθηκαν τρεις εκνεφωτές ατομικής φασματομετρίας Μάζας Meinhard TR-30-C1, TR-50-C1 και SB-50-C1.

	Μοντέλο Εκνεφωτή			
		TR-30-C1	TR-50-C1	SB-50-C1
Υλικό Κατασκευής	Γυαλί βοροπυριτίου	Γυαλί βοροπυριτίου	Γυαλί βοροπυριτίου	Γυαλί βοροπυριτίου
Εξωτερική διάμετρος σωλήνα εισαγωγής δείγματος	4 mm	4 mm	4 mm	1/8"
Απόσταση υάλινου τριχοειδούς από την άκρη του εκνεφωτή	~0.5 mm	~0.5 mm	~0.5 mm	~0.5 mm
Εσωτερική διάμετρος υάλινου τριχοειδούς	0.22-0.32 mm	0.22-0.32 mm	0.22-0.32 mm	0.22-0.32 mm
Ονομαστική Πίεση	30 psi	50 psi	50 psi	50 psi
Ρυθμός πρόσληψης υγρού δείγματος στην ονομαστική πίεση(ml/min)	1	1	1	1

2.2.3. Συνδεσμολογία V-Easi-MS με την χρήση εκνεφωτή

Η πηγή ιοντισμού V-EASI που συναρμολογήθηκε στο εργαστήριο μας, αποτελείται από τριχοειδή σωλήνα τηγμένου πυριτίου με επικάλυψη πολυιμιδίου και έναν από τους τρεις διαθέσιμους εκνεφωτές. Έναν τριχοειδή σωλήνα τηγμένου πυριτίου 15-20 cm (εσωτερικής διαμέτρου 100 μm, εξωτερικής διαμέτρου 200 μm) περνάει αρχικά από σωλήνα 1/16" επεξεργασμένου αιθυλενίου-τετραφθοροαιθυλενίου (Tefzel) που εφαρμόζει σε παξιμάδι 1/16". Ένας ενδιάμεσος συνδετήρας με 0.030" σπή συνδέει το παξιμάδι εισόδου 1/16" με το παξιμάδι εξόδου 1/8" που εφαρμόζει στον εκνεφωτή. Και τα δύο παξιμάδια σφίγγουν το σωλήνα 1/16" για την διασφάλιση της σταθερότητας. Η εισαγωγή αερίου αζώτου από τον πλάγιο σωλήνα εισαγωγής επιτρέπει την ταυτόχρονη κίνηση του αερίου και του υγρού δείγματος που αναρροφάται μέσω του τριχοειδούς τηγμένου πυριτίου από την διαφορά πίεσης στην άκρη του εκνεφωτή. Η απόσταση της πηγής ιοντισμού από τον κώνο δειγματοληψίας του φασματομέτρου μάζας ιοντικής παγίδας κυμαίνεται από 1-5 mm σε ομοαξονική θέση.



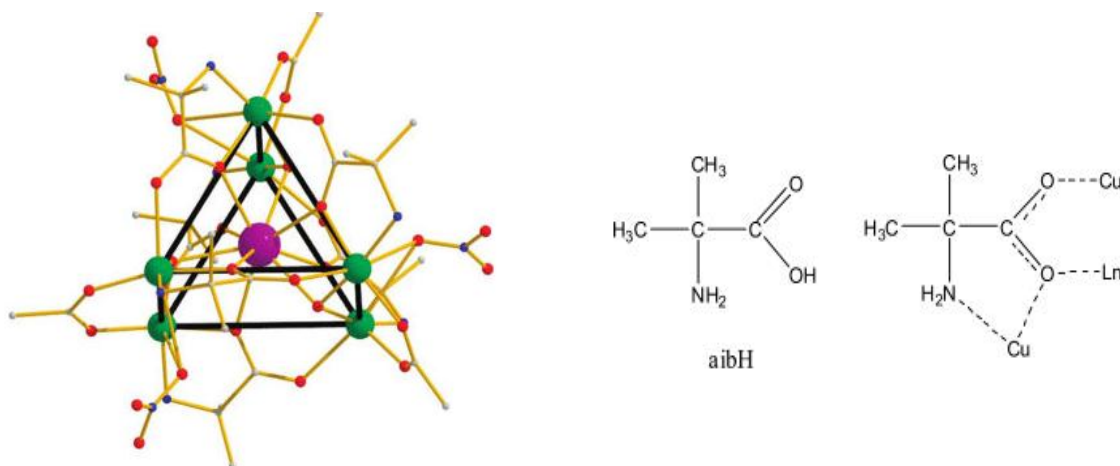
Εικόνα 2.3. **A.** Συνδεσμολογία της πηγής ιοντισμού V-EASI. **B.** Τοποθέτηση της πηγής ιοντισμού V-EASI ομοαξονικά προς τον κώνο δειγματοληψίας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Σύγκριση της πηγής V-Easi με την πηγή ηλεκτροψεκασμού

3.1. Ενώσεις Συναρμογής

Οι ενώσεις συναρμογής αποτελούνται από ένα κεντρικό μεταλλικό άτομο που περιβάλλεται από υποκαταστάτες συναρμοσμένους στο κεντρικό άτομο με δεσμούς δότη-δέκτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Η ανάλυση αυτών των ενώσεων με την φασματομετρία μάζας έχει κάποια ιδιαίτερα χαρακτηριστικά σε σύγκριση με τις οργανικές και τις βιοοργανικές ενώσεις.¹⁶ Μέχρις στιγμής ο ηλεκτροψεκασμός δείχνει κυρίαρχος στην ανάλυση αυτών των ενώσεων λόγω της ήπιας μετάβασης των ιόντων από το υγρό διάλυμα στην αέρια φάση. Οι μηχανισμοί ιοντισμού είναι ίδιοι με αυτούς των οργανικών μορίων όπως πρωτονίωση/αποπρωτονίωση και/ή σχηματισμός παραγώγων με κατιόντα νατρίου και καλίου. Τα μεταλλικά στοιχεία έχουν συνήθως μεγάλο αριθμό φυσικών ισότοπων σε σχέση με τα αμέταλλα και έτσι η χαρακτηριστική τους μάζα αποτελείται από κατανομή ισοτοπικών κορυφών χαρακτηριστική του μετάλλου αλλά και του αριθμού των ατόμων σε κάθε μόριο. Έτσι, η ταυτοποίηση της παρουσίας κάποιου μετάλλου γίνεται εύκολη υπόθεση. Η μελέτη των ετερομεταλλικών συμπλοκών ενώσεων της μορφής $Cu_6Ln(aib)_6(OH)_3(OAc)_3(NO_3)_3$ αποτέλεσε το πρώτο στάδιο της σύγκρισης. Τα συμπλοκα αυτά έχουν στο κέντρο το τρικατιόν της λανθανίδας (Pr, Gd, Eu, Tb, Dy, Er, Yb) το οποίο περιβάλλεται από ένα εξαγωνικό πρίσμα από χαλκούς. Η συντομογραφία aib αντιστοιχεί στο αποπρωτονιωμένο αμινο-ισοβουτυρικό οξύ το οποίο συναρμόζεται με δύο χαλκούς και το εκάστοτε λανθάνιο.



Εικόνα 3.1. Αριστερά Δομή των ετερομεταλλικών συμπλόκων ενώσεων Cu(πράσινο), Ln(μώβ), O(κόκκινο), N(μπλέ), C(κιτρινό). Δεξιά Συναρμογή του αμινοισοβουτυρικού οξέος με τον χαλκό και το λανθάνιο. (από αναφορά 17)

Σκοπός της πειραματικής διαδικασίας είναι η μελέτη του ιοντισμού των ετερομεταλλικών ενώσεων $Cu_6Ln(aib)_6(OH)_3(OAc)_3(NO_3)_3$ με τις πηγές ιόντων ESI και V-EASI, η μελέτη της

σταθερότητας του πλέγματος των ενώσεων στις υψηλές θερμοκρασίες της στήλης μεταφοράς ιόντων με τις πηγές ιόντων ESI και V-EASI και η σύγκριση τους.

3.1.1. Πειραματική διαδικασία

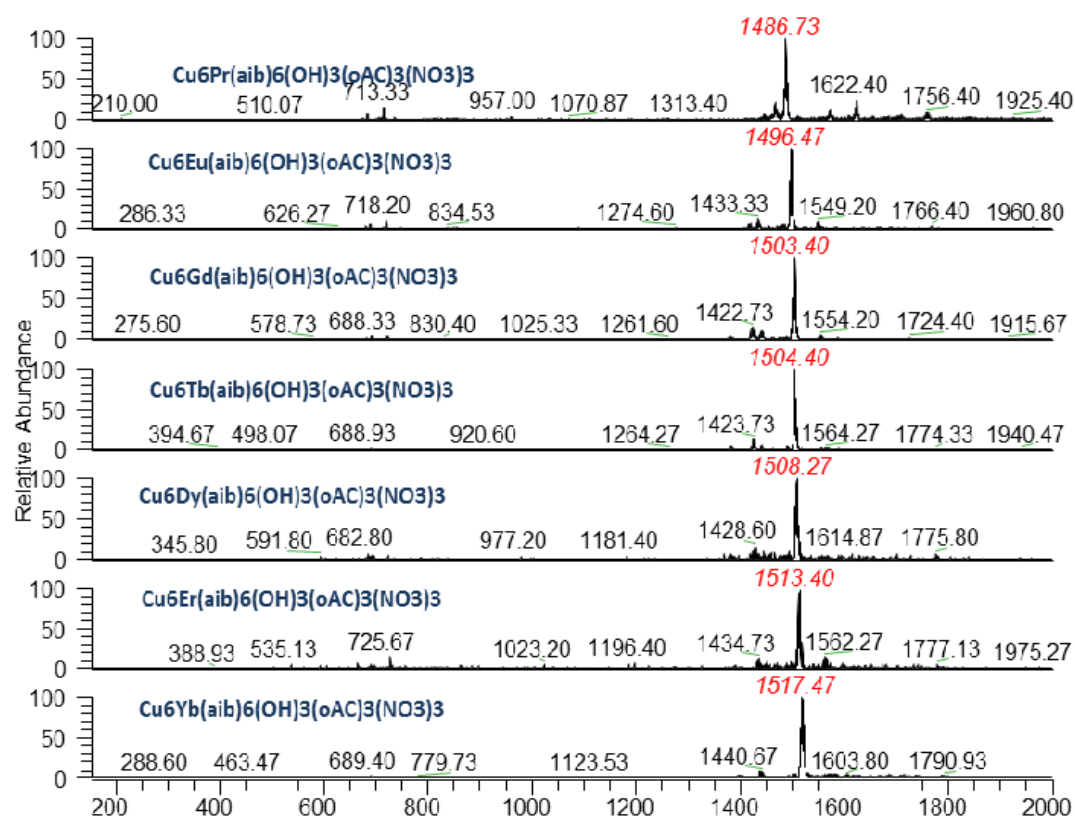
Όλες οι ενώσεις $Cu_6Ln(aib)_6(OH)_3(OAc)_3(NO_3)_3$ [σύνθεση της ερευνητικής ομάδας του Επίκουρου Καθηγητή του Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Κρήτης κ. Κωνσταντίνου Μήλιου] διαλύθηκαν σε πολικό, απρωτικό διαλύτη ακετονιτρίλιο [CHROMASOLV, $\geq 99.9\%$, Sigma Aldrich] όπου ήταν γνωστό από προηγούμενες μελέτες¹⁸ ότι τα σύμπλοκα λανθανιδών διατηρούν την δομική τους ακεραιότητα. Η χρήση κάποιου οξέος, που ως συνήθως χρησιμοποιείται στον ηλεκτροψεκασμό, δεν αποτελεί επιλογή για το συγκεκριμένο μόριο.

Για την εισαγωγή του δείγματος στον ηλεκτροψεκασμό σύριγγα 500 μ l στην ροή έκπλυσης (purge) αποδίδει τελική ροή περίπου 17 μ l/min. Στην πηγή V-Easi η ακριβής εκτίμηση της ροής πρόσληψης δείγματος δεν πραγματοποιήθηκε. Τα πειράματα διεξήχθησαν και για τις δύο πηγές ιοντισμού σε θερμοκρασίες μεταφορικής στήλης 100°C, 150°C, 200°C και 300°C ενώ το δυναμικό αποσυσσώματωσης (SID) μεταβαλλόταν από 5-25 V. Τα πειράματα διεξήχθησαν σε θετικό και αρνητικό ιοντισμό ενώ οι παρακάτω συνθήκες παρέμειναν σταθερές καθ' όλη την διάρκεια των πειραμάτων για την καλύτερη σύγκριση των αποτελεσμάτων. Η απόσταση και κατεύθυνση(για το V-Easi) του ακροφύσιου της κάθε πηγής διατηρήθηκε σταθερή κατά την διάρκεια των πειραμάτων. Η πηγή V-Easi συνδέθηκε με το σωλήνα του εκνεφωτικού αερίου sheath gas και ασφαλίστηκε με κατάλληλους συνδετήρες.

Συνθήκες οργάνου	Ηλεκτροψεκασμός		V-Easi	
	(+)	(-)	(+)	(-)
Δυναμικό πηγής (kV)	5	5	0	0
Αέριο εκνέφωσης (sheath gas) [σχετικές μονάδες]	50	50	45	45
Βοηθητικό αέριο (aux gas) [σχετικές μονάδες]	15	15	0	0
Θερμοκρασία στήλης (°C)	100, 150, 200 και 300			
Δυναμικό στήλης (V)	7	-80	7	-80
Δυναμικό εστίασης φακού (V)	15	-95	15	-95
Sid (V)	5-25			

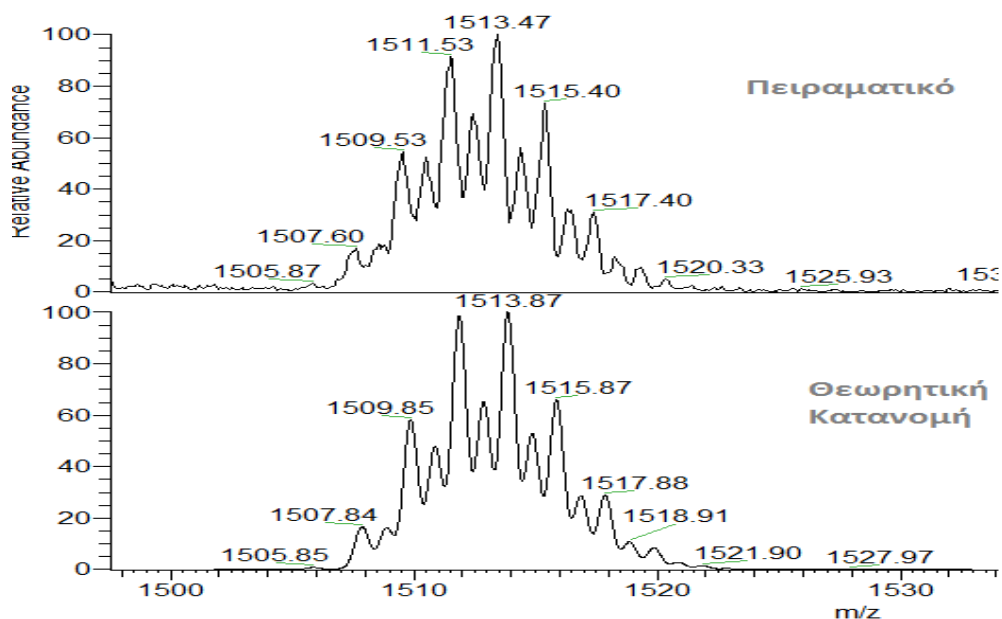
3.1.2. Αποτελέσματα-Συζήτηση

Η ταυτοποίηση των ενώσεων συναρμογής των λανθανιδών βασίστηκε στην συσχέτιση της μάζας της κορυφής με το γνωστό μοριακό βάρος και στην κατανομή των ισοτοπικών κορυφών. Οι ονομαστικές μοριακές μάζες αυξάνονται με την αύξηση της ατομικής μάζας της λανθανίδας που χρησιμοποιείται από το πρασαιοδίμιο (Pr) προς το υτέρβιο (Yb). Η κύρια κορυφή που παρατηρήθηκε και για τις δύο τεχνικές, στον θετικό ιοντισμό είναι η *ψευδομοριακή* κορυφή $[M-NO_3]^+$, όπου M η εκάστοτε ένωση συναρμογής. Η αποκόλληση του αρνητικά φορτισμένου νιτρικού ανιόντος αφήνει το ψευδομοριακό ιόν με περίσσειμα μίας μονάδας θετικού φορτίου. Στον αρνητικό ιοντισμό, και πάλι και για τις δύο τεχνικές, εντοπίζεται *ψευδομοριακή κορυφή με ένα επιπλέον νιτρικό ανιόν $[M+NO_3]$* , με αποτέλεσμα την περίσσεια μίας μονάδας αρνητικού φορτίου.



Εικόνα 3.1.2. Ψευδομοριακές κορυφές των ενώσεων συναρμογής κατά αυξημένη ατομική μάζα λανθανίδας. Θετικός Ιοντισμός, V-Easi-MS,sid=10.

Η κύρια κορυφή ταυτίζεται συνήθως με την την μοριακή μάζα της ένωσης συναρμογής με το πιο άφθονο ισότοπο. Κάποιες φορές αυτό δεν συμβαίνει λόγω πειραματικού σφάλματος του οργάνου και έτσι ισότοπα μικρότερης αφθονίας παρουσιάζονται ως κύρια κορυφή.

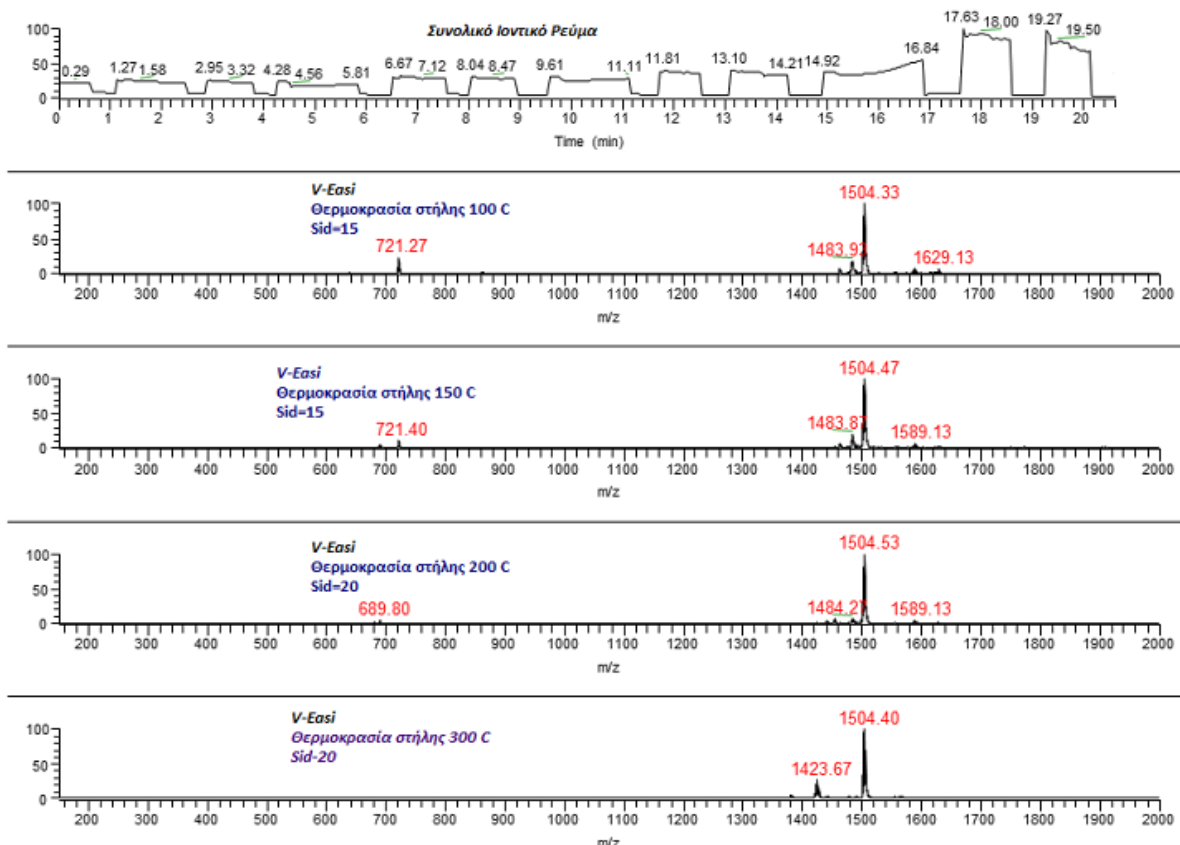


Σχήμα 3.1.3. Κατανομή ισοτόπων της ψευδομοριακής κορυφής $[M-NO_3]^+$ για την ένωση συναρμογής $[Cu_6Er(aib)_6(OH)_3(OAC)_3(NO_3)_2]^+$ και η θεωρητικά προβλεπόμενη κατανομή των ισοτόπων (Διακριτική Ικανότητα=0.7).

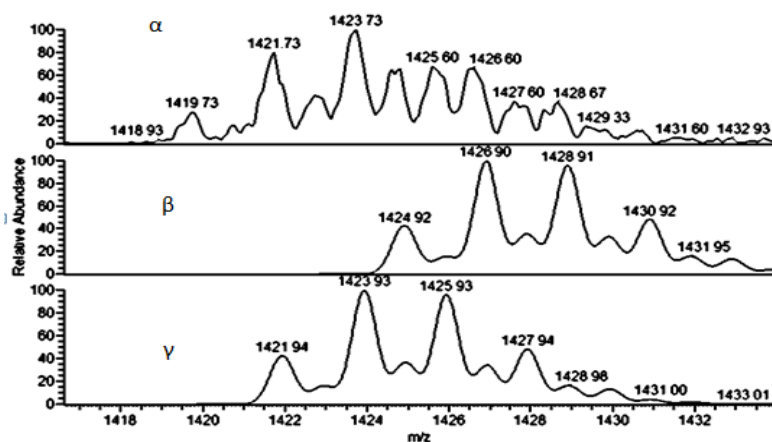
Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων η περίπτωση της ένωσης $Cu_6Tb(aib)_6(OH)_3(OAC)_3(NO_3)_3$ θα αναλυθεί διεξοδικά ενώ περαιτέρω αποτελέσματα για τις υπόλοιπες ενώσεις συναρμογής βρίσκονται στο Παράρτημα Α.

Στις εικόνες 3.1.5 και 3.1.6 η κύρια κορυφή που παρατηρείται και με τις δύο πηγές ιοντισμού στον θετικό ιοντισμό είναι η ψευδομοριακή $[M-NO_3]^+$ σε μάζα πρὸς φορτίο 1504.2 (η κορυφή αντιστοιχεί στο πιό άφθονο ισότοπο της κατανομής). Στις χαμηλές θερμοκρασίες στήλης (100°C, 200°C) παρατηρούνται ψευδομοριακές διφορτισμένες κορυφές όπως η κορυφή με μάζα πρὸς φορτίο 721.3 που αντιστοιχεί στο διφορτισμένο $[M-2NO_3]^{+2}$ αλλά και οι κορυφές με μάζα πρὸς φορτίο 690 και 681 που αντιστοιχούν στην $[M-2NO_3-HNO_3]^{+2}$ διφορτισμένη ψευδομοριακή κορυφή και στην αφυδατωμένη της, δηλ. $[M-2NO_3-HNO_3-H_2O]^{+2}$. Η κορυφή 721.3 κυρίως παρατηρείται με την πηγή V-Easi στους 100°C ενώ με πηγή ηλεκτροψεκασμού η σχετική ένταση της κορυφής είναι μειωμένη σε σχέση με την V-EASI. Στις υψηλότερες θερμοκρασίες (200°C, 300°C) εμφανίζεται μονοφορτισμένη κορυφή θραυσματοποίησης $[M-Cu(OH)(NO_3)+H]^+$ με μάζα πρὸς φορτίο 1426.5 στο κυριότερης αφθονίας ισότοπο. Η θραυσματοποίηση των ενώσεων συναρμογής έχει παρατηρηθεί και ως $[M-Cu(OH)(OAC)+H]^+$ ή και με μείγμα των δύο θραυσμάτων (Εικόνα 3.1.5) κάτι που κάνει πιό πολύπλοκα τα φάσματα. Η θραυσματοποίηση αυτή επηρεάζει το εξαγωνικό πρίσμα του μορίου και άρα η σταθερότητα της ένωσης συναρμογής είναι οριακή. Η θραυσματοποίηση αυτή είναι χαρακτηριστική της ένωσης και παρατηρείται και με τις δύο πηγές αλλά σε διαφορετικό βαθμό. Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα η θραυσματοποίηση είναι πιο σημαντική, σε παρόμοιες συνθήκες με την πηγή ηλεκτροψεκασμού.

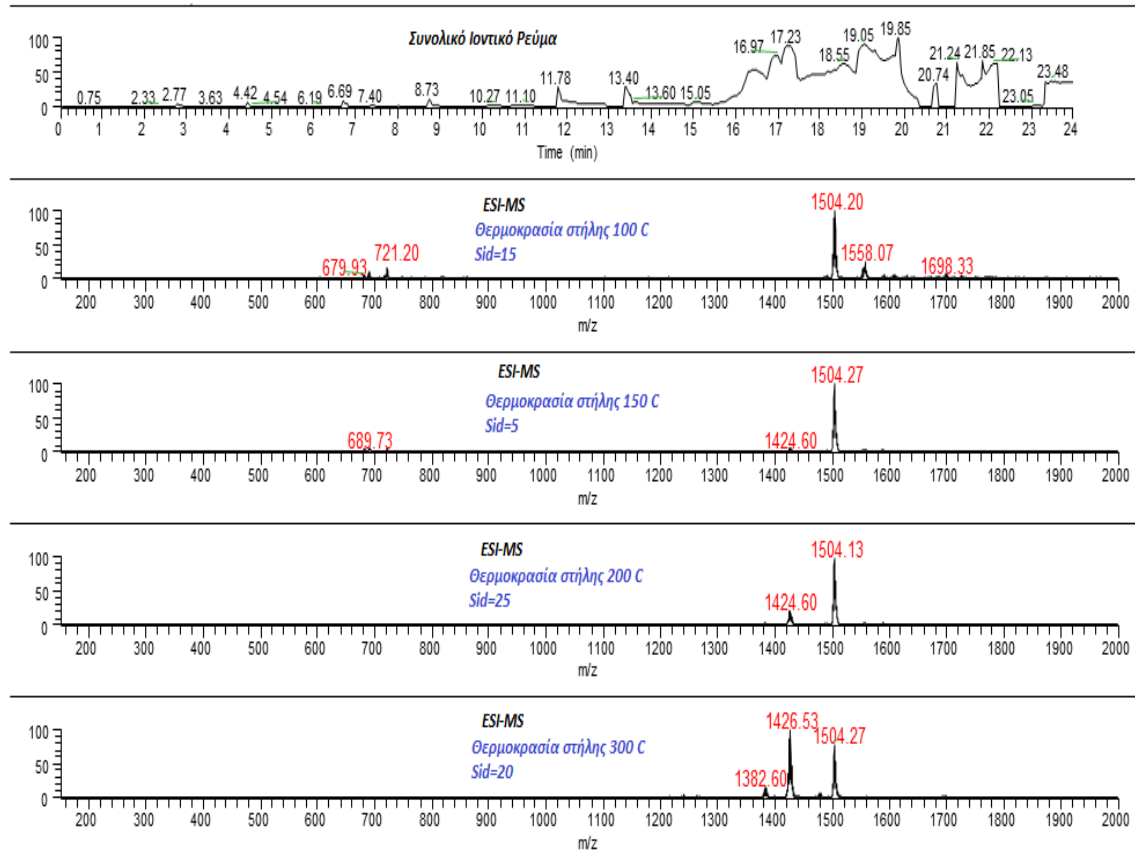
Με την πηγή V-Easi, η μεταβολή του ιοντικού ρεύματος είναι ομαλή και η μετάβαση από τον θετικό στον αρνητικό ιοντισμό γίνεται άμεσα. Η σταθερότητα του σήματος συμβάλλει στην σταθερότητα της πηγής αλλά και στην επαναληψιμότητα των μετρήσεων. Με την πηγή ηλεκτροψεκασμού αντιθέτως κάποιες απότομες εξάρσεις στο ιοντικό ρεύμα συμβαίνουν ενώ και η μετάβαση από τον θετικό στον αρνητικό δεν είναι ομαλή. Αυτό συμβαίνει γιατί πολλές φορές ο αρνητικός ιοντισμός χρειάζεται εκ νέου βελτιστοποίηση. Το αποτέλεσμα αυτών των εξάρσεων είναι η μείωση της επαναληψιμότητας.



Εικόνα 3.1.4. Φάσματα Μαζών της ένωσης $\text{Cu}_6\text{Tb}(\text{aib})_6(\text{OH})_3(\text{oAC})_3(\text{NO}_3)_3$ με την πηγή V-Easi στον Θετικό Ιοντισμό σε διαφορετικές συνθήκες. Το συνολικό ιοντικό ρεύμα αυξάνεται ομαλά με αύξηση της θερμοκρασίας.

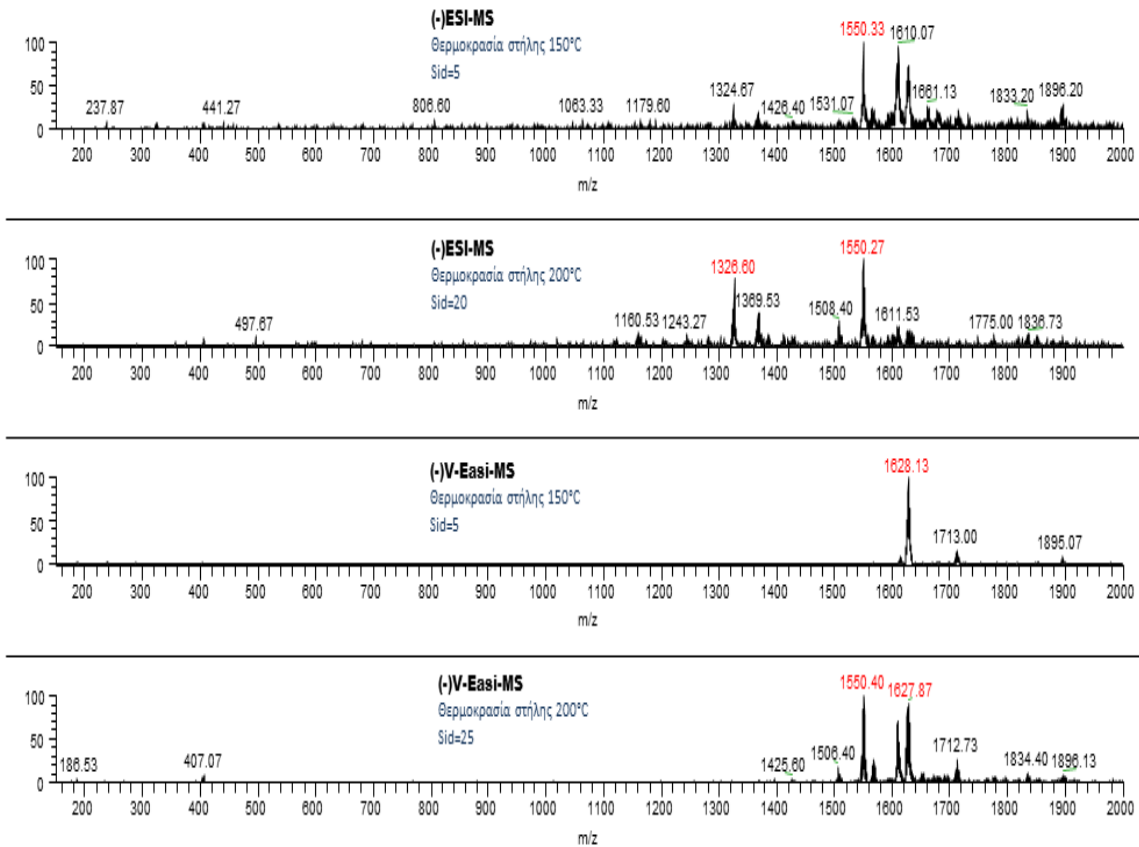


Εικόνα 3.1.5. α. Μείγμα των θραυσμάτων $[\text{M-Cu}(\text{OH})(\text{NO}_3)+\text{H}]^+$ και $[\text{M-Cu}(\text{OH})(\text{oAC})+\text{H}]^+$. β. Θεωρητική κατανομή του θραύσματος $[\text{M-Cu}(\text{OH})(\text{oAC})+\text{H}]^+$. γ. Θεωρητική κατανομή του θραύσματος $[\text{M-Cu}(\text{OH})(\text{NO}_3)+\text{H}]^+$.



Εικόνα 3.1.6. Φάσματα Μαζών της ένωσης $\text{Cu}_6\text{Tb}(\text{aib})_6(\text{OH})_3(\text{OAc})_3(\text{NO}_3)_3$ με την πηγή Ηλεκτροψεκασμού στον Θετικό Ιοντισμό σε διαφορετικές συνθήκες. Το συνολικό ιοντικό ρεύμα εμφανίζει απότομες μεταβολές.

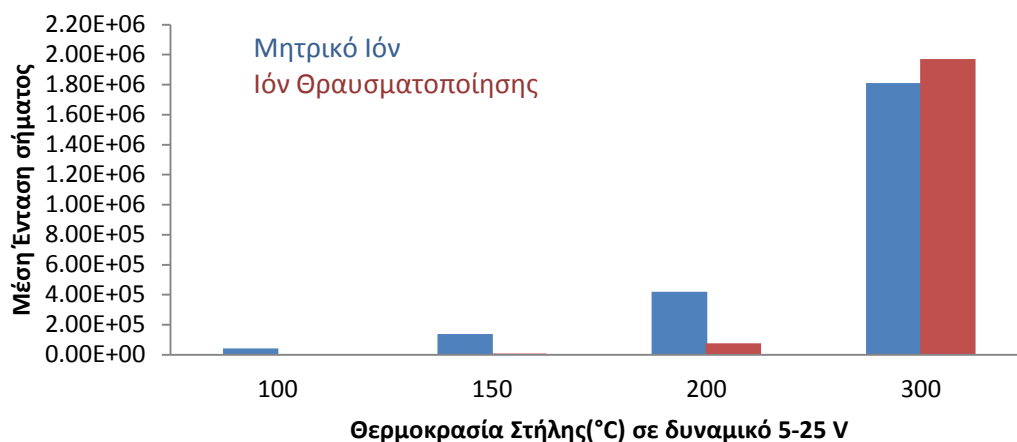
Στον αρνητικό ιοντισμό, η κύρια ψευδομοριακή κορυφή $[\text{M}+\text{NO}_3]^-$, με μάζα προς φορτίο 1628.1 σχεδόν δεν παρατηρείται με την πηγή ηλεκτροψεκασμού στις συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν. Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.1.7, στις ίδιες συνθήκες θερμοκρασίας και δυναμικού αποσυσσωμάτωσης (150°C, 5V), τα ιόντα που εντοπίστηκαν με πηγή ηλεκτροψεκασμού στον αρνητικό είναι κυρίως το αφυδατωμένο ανιόν 1610 $[\text{M}+\text{NO}_3-\text{H}_2\text{O}]^-$ και η κορυφή με μάζα προς φορτίο 1550.4 που αντιστοιχεί σε αποκόλληση του ουδέτερου μέρους $(\text{AcOH})(\text{H}_2\text{O})$ από το ανιόν $[\text{M}+\text{NO}_3]^-$ ενώ με την πηγή V-Easi η κύρια κορυφή είναι η ψευδομοριακή $[\text{M}+\text{NO}_3]^-$. Σε υψηλότερης ενέργειας συνθήκες (200°C, 20-25V) παρατηρείται αύξηση της θραυσματοποίησης και με τις δύο τεχνικές. Με την πηγή ηλεκτροψεκασμού το φάσμα μαζών αποτελείται από διάφορα θραύσματα με χαρακτηριστική νέα κορυφή αυτή με μάζα προς φορτίο 1326.6 που αντιστοιχεί σε περαιτέρω θραυσματοποίηση και αποκόλληση του $\text{Cu}(\text{aib})(\text{OAc})$ από το ήδη θραυσματοποιημένο ανιόν 1550.4. Αντιθέτως με την πηγή V-Easi η ενέργεια μόλις που είναι αρκετή για να αρχίσει η θραυσματοποίηση της ψευδομοριακής κορυφής και παρατηρείται το αφυδατωμένο ανιόν 1610 $[\text{M}+\text{NO}_3-\text{H}_2\text{O}]^-$ και η κορυφή με μάζα προς φορτίο 1550.4 $[\text{M}+\text{NO}_3-(\text{AcOH})(\text{H}_2\text{O})]^-$. Άρα, η θραυσματοποίηση ξεκινάει ακόμα και σε πολύ ήπιες συνθήκες στον αρνητικό ιοντισμό με την πηγή ηλεκτροψεκασμού ενώ η πηγή V-Easi δημιουργεί ιόντα χαμηλότερης εσωτερικής ενέργειας που διατηρούν την δομική τους ακεραιότητα.



Εικόνα 3.1.7. Φάσματα Μαζών της ένωσης $Cu_6Tb(aib)_6(OH)_3(oAC)_3(NO_3)_3$ και σύγκριση των πηγών ηλεκτροψεκασμού και V-Easi στον αρνητικό Ιοντισμό σε διαφορετικές συνθήκες.

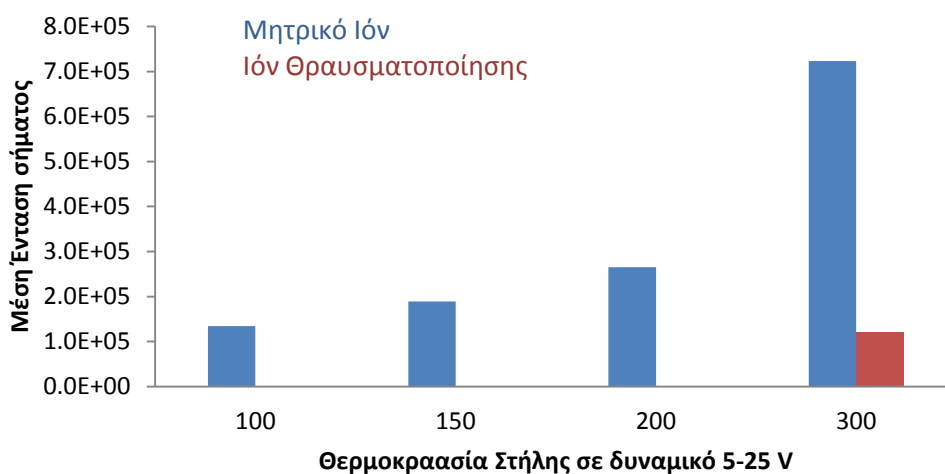
Η μέση ένταση σήματος του ψευδομοριακού ιόντους αλλά και του ιόντος θραυσματοποίησης είναι η μέση τιμή της έντασης σήματος για τα διαφορετικά δυναμικά αποσυσσώματωσης (sid) σε κάθε θερμοκρασία.

(+) ESI Cu6Tb



Γράφημα 3.1.8. Μέση ένταση των ιόντων με την πηγή Ηλεκτροψεκασμού (ESI) στον θετικό ιοντισμό.

(+)V-Easi Cu6Tb



Γράφημα 3.1.9. Μέση ένταση των ιόντων με την πηγή V-EASI στον θετικό ιοντισμό.

Από τα γραφήματα 3.1.8 και 3.1.9 παρατηρούμε ότι με αύξηση της θερμοκρασίας αλλά και της ενέργειας γενικά η μέση ένταση του μητρικού ιόντος αυξάνεται στα όρια που έχουμε ορίσει. Η αύξηση της έντασης με την αύξηση της ενέργειας στην ενδιάμεση περιοχή συνδέεται με αύξηση του ρυθμού εξάτμισης-σχάσης και άρα με μείωση του μεγέθους των φορτισμένων σταγονιδίων και για τις δύο τεχνικές. Η διαφορά των τεχνικών παρατηρείται στην μέση ένταση του ιόντος θραυσματοποίησης η οποία στην περίπτωση του ηλεκτροψεκασμού μετά τους 300°C γίνεται πολύ σημαντική και μπορεί να ξεπεράσει την μέση ένταση του μητρικού ιόντος ενώ στην περίπτωση του V-Easi η εσωτερική ενέργεια τής ένωσης είναι σαφέστατα μικρότερη και άρα μικρότερη είναι η θραυσματοποίηση σχεδόν κατά 1 τάξη μεγέθους.

Συγκεντρώνοντας τα δεδομένα έντασης σε διαφορετικές θερμοκρασίες και δυναμικά Sid και για τις δύο τεχνικές, τόσο σε θετικό ιοντισμό όσο και σε αρνητικό ιοντισμό, καταλήγουμε στον Πίνακα 3.1.10. Επιλέχθηκε το πρώτο ιόν θραυσματοποίησης ως αντιπροσωπευτικό της εσωτερικής ενέργειας του μορίου και άρα και της 'ηπιότητας' της τεχνικής. Το ιόν θραυσματοποίησης $[M-Cu(OH)(NO_3)+H]^+$ ή/και $[M-Cu(OH)(OAC)+H]^+$ για τον θετικό ιοντισμό και το ιόν $[M+NO_3-(AcOH)(H_2O)]^-$ για τον αρνητικό ιοντισμό. Τα στοιχεία αυτά δείχνουν, εκτός από την διαφορά ηλεκτροψεκασμού με V-Easi, την διαφορά της εσωτερικής ενέργειας των ιόντων του θετικού και αρνητικού ιοντισμού, με τα ανιόντα να είναι αρκετά πιο ευαίσθητα στις συνθήκες του πειράματος. Αν για τον ηλεκτροψεκασμό, φαινόμενα όπως ο ηλεκτρικός σπινθήρας ειδικά στον αρνητικό ιοντισμό, δικαιολογούν την μείωση της ευαισθησίας και τα θραύσματα, στην περίπτωση του V-Easi η απουσία οποιουδήποτε δυναμικού στην πηγή δεν φαίνεται να αλλοιώνει τις διαφοροποιήσεις. Άρα οι διαφορές μεταξύ θετικού και αρνητικού ιοντισμού είναι ενδογενείς διαφορές του μηχανισμού ιοντισμού που είναι παρόμοιος και με τις δύο τεχνικές. Η αρχική θραυσματοποίηση γίνεται σε διαφορετικές συνθήκες για κάθε τεχνική και πολικότητα ιοντισμού. Η μηδενική ένταση του θραύσματος σε κάποιες συνθήκες απλώς σημαίνει ότι η

ένταση είναι στην περιοχή υποβάθρου της τεχνικής και όχι ότι δεν υπάρχει καθόλου θραυσματοποίηση.

	Cu6Tb			
	Πρώτο Ιόν Θραυσματοποίησης			
Θερμοκ./Δυναμικό	(+) ESI	(-)ESI	(+)V-Easi	(-)V-Easi
100/5	0	0	0	0
100/10	0	0	0	0
100/15	0	0	0	0
100/20	0	0	0	0
100/25	0	0	0	0
150/5	0	5.10E+03	0	0
150/10	0	χ.δ	0	0
150/15	0	χ.δ	0	0
150/20	9.00E+03	7.00E+03	0	0
150/25	χ.δ	χ.δ	0	0
200/5	χ.δ	χ.δ	0	0
200/10	3.90E+04	1.30E+04	0	0
200/15	χ.δ	χ.δ	0	3.60E+03
200/20	8.90E+04	1.70E+04	0	χ.δ
200/25	χ.δ	0	0	1.5E+04
300/5	2.10E+06	0.00E+00	0	2.30E+04
300/10	χ.δ	0	1.00E+05	χ.δ
300/15	χ.δ	0.00E+00	1.20E+05	8.30E+03
300/20	χ.δ	0	χ.δ	χ.δ
300/25	1.47E+06	0	1.50E+05	5.20E+03

Πίνακας 3.1.10. Συγκέντρωση των δεδομένων έντασης σήματος του ιόντος $[M-Cu(NO_3)(OH)+H]^+$ και $[M+NO_3-(AcOH)(H_2O)]^-$ σε όλες τις θερμοκρασίες στήλης αλλά και τα διάφορα δυναμικά που χρησιμοποιήθηκαν. χ.δ=χωρίς δεδομένα

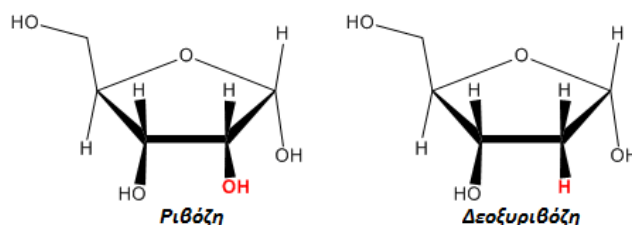
Με βάση τα δεδομένα αυτά η τάση αύξησης της `ηπιότητας' των τεχνικών είναι :

$$(-)ESI < (+) ESI < (-)V-Easi < (+)V-Easi$$

3.2. Προϊόντα αντιδράσεων πεντασθενούς αντιμονίου με βιομόρια.

Παρά την χρήση του πεντασθενούς αντιμονίου Sb(V) για την καταπολέμηση της λείσμανιάσης ή αλλιώς καλαζάρ, ο μηχανισμός δράσης του δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητός. Η επίδραση που παρουσιάζουν τα αντιμονιακά φάρμακα στον μεταβολισμό των νουκλεοτιδίων¹⁹ κατέστησαν αναγκαία την μελέτη της αλληλεπίδρασης του αντιμονίου με τέτοια βιομόρια.

Το DNA είναι πολυμερές νουκλεοτιδίων και τα νουκλεοτίδια αποτελούνται από τρία μέρη: 1) ένα σάκχαρο που μπορεί να είναι είτε ριβόζη (RNA) ή δεοξυριβόζη (DNA), 2) μια βάση που μπορεί να είναι αδενίνη, γουανίνη, κυτοσίνη και θυμίνη (DNA) ή ουρακίλη (RNA), 3) μία φωσφορική ομάδα, που συνδέει τα σάκχαρα μεταξύ τους με 3→5 φωσφοδιεστερικούς δεσμούς. Το υποσύνολο της βάσης συνδεδεμένο με ένα σάκχαρο ονομάζεται νουκλεοζίτης. Η αντίδραση του πεντασθενούς αντιμονίου με νουκλεοζίτες ή/και νουκλεοτίδια μελετήθηκε σε υδατικά διαλύματα Αδενοσίνης, μονοφωσφορικής Αδενοσίνης (AMP) και δεοξαδενοσίνης (dA) με την χρήση φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και Φασματοσκοπίας Κυκλικού Διχρωσισμού(CD) από την DeMicheli²⁰, η οποία παρατήρησε συμπλοκοποίηση του αντιμονίου με την αδενοσίνη και την μονοφωσφορική Αδενοσίνη στο 2' υδροξύλιο της ριβόζης. Καμία αλληλεπίδραση δεν παρατηρήθηκε με την δεοξαδενοσίνη. Η αντίδραση του πεντασθενούς αντιμονίου Sb(V) με μια σειρά παρόμοιων βιομορίων (αδενοσίνη, κυτιδίνη, γουανοσίνη, ουριδίνη, 5'-φωσφορική αδενοσίνη, ριβόζη, 2'-δεοξαδενοσίνη) σε διάφορες συνθήκες μοριακότητας και pH, και η ανάλυση τους με ηλεκτροψεκασμό και φασματομετρία μάζας ανέδειξε την παρουσία των γειτονικών cis-υδροξυλικών ομάδων ως αυτές που καθορίζουν τον σχηματισμό συμπλόκων με το αντιμόνιο Sb(V) ενώ σύμπλοκα με στοιχειομετρία Sb:βιομορίου 1:1,1:2 και 1:3 εντοπίστηκαν²¹.



Εικόνα 3.2.1. Στερεοχημική απεικόνιση των cis-γειτονικών υδροξυλίων της ριβόζης και η απουσία τους στην δεοξυριβόζη.

Οι συνθήκες που η αντίδραση του πεντασθενούς αντιμονίου με τα νουκλεοτίδια/νουκλεοζίτες ευνοείται, είναι παρόμοιες με τις φυσιολογικές συνθήκες οργανισμού και για αυτό θεωρείται ότι μπορεί να έχουν βιολογική σημασία. Από την μελέτη της DeMicheli φάνηκε ότι σε pH=5 η συμπλοκοποίηση προχωράει ενώ σε ουδέτερα pH 7.20 όχι. Σκοπός της πειραματικής διαδικασίας είναι η αντίδραση του πεντασθενούς αντιμονίου Sb(V) με τα βιομόρια D(-) Ριβόζη και Ουριδίνη και η ανάλυση του αντιδρώντος μείγματος με πηγή ESI και V-EASI πρὸς σύγκριση των αποτελεσμάτων.

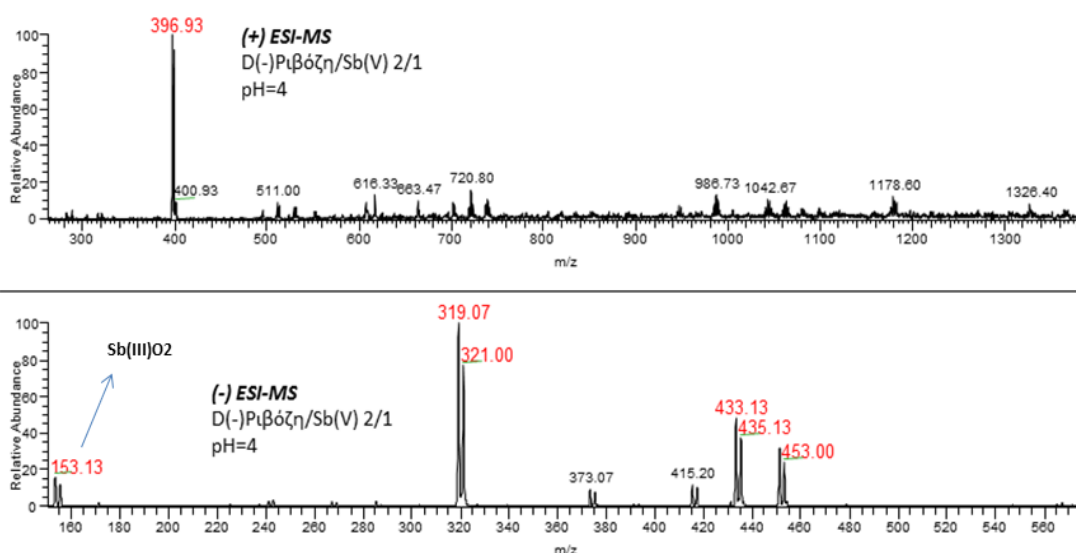
3.2.1 Πειραματική διαδικασία

Οι αντιδράσεις του πεντασθενούς αντιμονίου με τα βιομόρια έγιναν με μοριακότητα αντίδρασης 1:2 Sb(V):βιομόριο. Για αυτό τον σκοπό διάλυμα εξαυδροαντιμονιούχου άλατος του καλίου (KSb(OH)₆) [≥99.0%,Sigma Aldrich] συγκέντρωσης 5 mmol/L και διαλύματα D(-)-ριβόζης [≥98.0%, Sigma Aldrich] και ουριδίνης[≥99.0%, Sigma Aldrich] επίσης 5 mmol/L διαλυμένα σε υπερκαθαρό νερό αντίστασης 18,2 mΩ παρασκευάστηκαν. Στη συνέχεια 9.83 ml από το εκάστοτε δ/μα του βιομορίου αραιώθηκαν με νερό σε τελικό όγκο 20 ml, τα οποία προστέθηκαν σε υάλινο ποτήρι όπου περιέχει ήδη 4.88 ml του διαλύματος του αντιμονίου αραιωμένα σε τελικό όγκο 10 ml. Με αυτό τον τρόπο η τελική μοριακότητα της αντίδρασης έγινε 0.82 mmole/1.64 mmole Sb(V):βιομόριο σε τελικό όγκο 30 ml στο δοχείο αντίδρασης. Η ρύθμιση του pH στο τελικό διάλυμα έγινε με διάλυμα φορμικού οξέος 0.005% (αποφεύχθηκε η χρήση οξικού οξέος αφού έχει αναφερθεί συμπλοκοποίηση του με το αντιμόνιο²²). Ο χρόνος της αντίδρασης κυμάνθηκε από 2 ώρες έως και 1 μέρα ενώ σε κάποιες περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε θέρμανση και σε κάποιες όχι. Για την ανάλυση των δειγμάτων κατάλληλη ποσότητα αραιωνόταν σε οργανικό διαλύτη (μεθανόλη ή ακετονιτρίλιο) για καλύτερα αποτελέσματα. Οι ρυθμίσεις του αναλυτικού οργάνου και της εκάστοτε πηγής ιοντισμού φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Συνθήκες οργάνου	Ηλεκτροψευκασμός				V-Easi			
	(+)Sb(V)/Ριβόζη	(+)Sb(V)/Ουριδίνη	(-)Sb(V)/Ριβόζη	(-)Sb(V)/Ουριδίνη	(+)Sb(V)/Ριβόζη	(+)Sb(V)/Ουριδίνη	(-)Sb(V)/Ριβόζη	(-)Sb(V)/Ουριδίνη
Δυναμικό πηγής(kV)	4	5	4	5	0	0	0	0
Αέριο εκνέφωσης (sheath gas) [σχετικές μονάδες]	60	60	60	60	45	50	45	50
Βοηθητικό αέριο(aux gas)[σχετικές μονάδες]	15	15	15	15	0	0	0	0
Θερμοκρασία στήλης (°C)	200°C - 350°C							
Δυναμικό στήλης(V)	46	46	-80	-80	46	46	-80	-80
Δυναμικό εστίασης φακού(V)	15	15	-95	-95	15	15	-95	-95
Sid(V)	5-35							

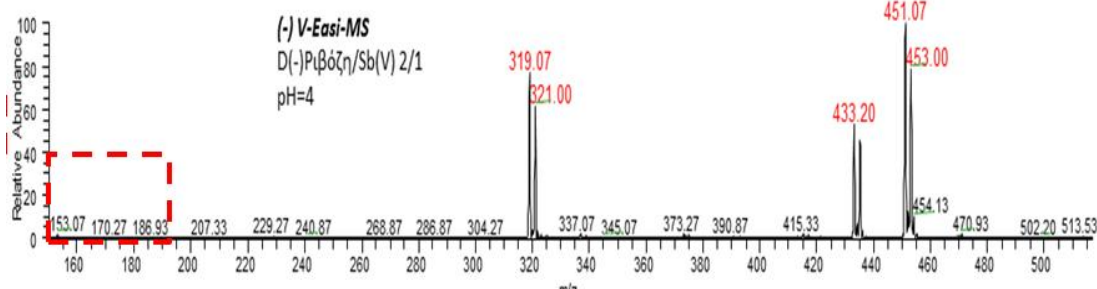
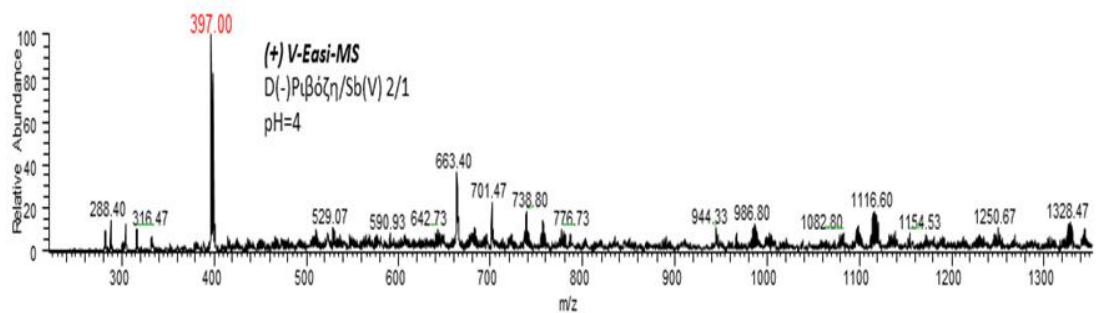
3.2.2 Αποτελέσματα-Συζήτηση

Τα πειράματα με πηγή ηλεκτροψεκασμού είχαν σταθερό δυναμικό και η ροή του υγρού δείγματος ήταν περίπου 17μl/min σε ροή surge με σύριγγα 500 μl. Το όργανο λειτουργούσε σε πλήρη σάρωση μεταξύ 150-2000 μάζα προς φορτίο και η θερμοκρασία της στήλης ξεκινούσε από 200°C και έφτανε μέχρι τους 350°C. Με το αντιδρών μείγμα του Sb(V) με την D(-)-Ριβόζη σε pH=4 εντοπίστηκαν (Εικόνες 3.2.2 και 3.2.3), στον θετικό ιοντισμό, η κύρια μονοφορτισμένη διπλή κορυφή (αφού το Sb έχει δύο ισότοπα με σχετικές αφθονίες 57.3%(121) και 42.7%(123) με μάζες προς φορτίο 397.0 και 399.0 και πολλές μικρές κορυφές υποβάθρου αφού η παρουσία του κατιόντος καλίου αλλά και του φορμικού οξέος αυξάνει την παραγωγή συσσωμάτων. Η κύρια κορυφή ανήκει στο κατιόν σύμπλοκο του αντιμονίου $[Sb+Ριβόζη-3H+3OH+2K]^+$. Στον αρνητικό ιοντισμό αναγνωρίστηκαν οι μονοφορτισμένες διπλές κορυφές (319, 321), (433, 435) και (451, 453) ενώ η κορυφή με μάζα προς φορτίο 153, 155 εντοπίστηκε μόνο με πηγή ιοντισμού τον ηλεκτροψεκασμό. Οι κορυφές (319, 321), (433, 435) και (451, 453) αντιστοιχούν στα σύμπλοκα $[Sb+Ριβόζη-3H+3OH]^-$, $[Sb+2Ριβόζες-5H+OH]^-$ και $[Sb+2Ριβόζες-5H+OH+H_2O]^-$.



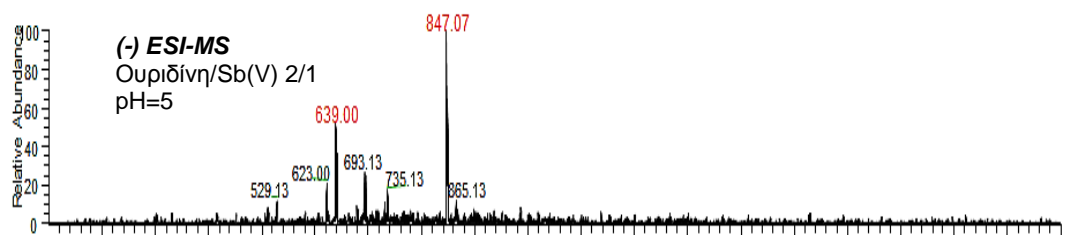
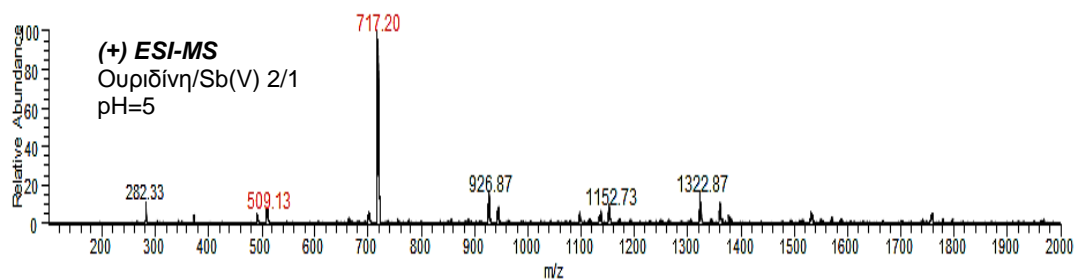
Εικόνα 3.2.2 Φάσματα Μαζών του αντιδρών μείγματος Sb(V) με D(-)-Ριβόζη σε διάλυμα νερού/ακετονιτριλίου 40/60 και Θερμοκρασία στήλης 350°C με πηγή Ηλεκτροψεκασμού.

Τα φάσματα από τις δύο πηγές ιοντισμού είναι σχεδόν ίδια. Η μονοφορτισμένη διπλή κορυφή 153,155 αντιστοιχεί στο διοξείδιο του τρισθενούς αντιμονίου $Sb(III)O_2$ (Εικόνα 3.2.2), που είναι προϊόν αναγωγικής διαδικασίας και παρατηρείται μόνο με πηγή ηλεκτροψεκασμού και όχι με την V-Easi πηγή που δεν εμφανίζει ηλεκτροχημικές παρεμβολές. Επίσης η σχετική κατανομή της έντασης των κορυφών στον αρνητικό ιοντισμό είναι διαφορετική για τις δύο πηγές. Στην πηγή ηλεκτροψεκασμού η κύρια κορυφή είναι σύμπλοκο του αντιμονίου με ένα μόριο ριβόζης ενώ με την πηγή V-Easi η κύρια κορυφή ανήκει σε σύμπλοκο του αντιμονίου με δύο ριβόζες. Η διαφοροποίηση αυτή πιθανώς συνδέεται με την σταθερότητα των συμπλόκων ενώσεων αφού η εσωτερική ενέργεια που αποκτούν τα μόρια με την πηγή V-Easi είναι μικρότερη από αυτή που αποκτούν με πηγή ηλεκτροψεκασμού.

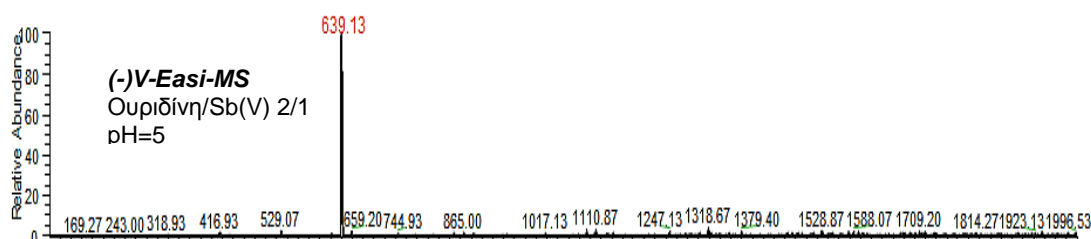
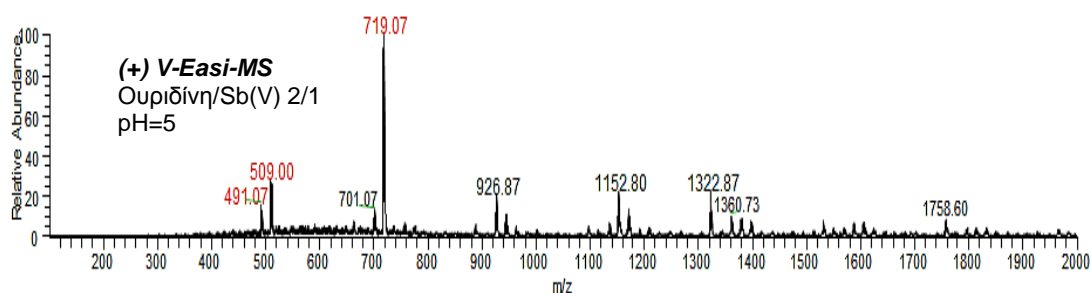


Εικόνα 3.2.3 Φάσματα Μαζών του αντιδρών μείγματος Sb(V) με D(-)-Ριβόζη σε διάλυμα νερού/ακετονιτριλίου 40/60 και Θερμοκρασία στήλης 350°C με πηγή V-Easi.

Στην περίπτωση του αντιδρώντος μείγματος του πεντασθενούς αντιμονίου με ουριδίνη και με ρύθμιση του pH=5 (Εικόνες 3.2.4 και 3.2.5) ο θετικός ιοντισμός παρουσιάζει ένα εύρος κορυφών με κύριες τις (491,493) που αντιστοιχεί στο σύμπλοκο κατιόν $[Sb+Oυριδίνη-3H+3OH+2K]^+$, (509, 511) που αντιστοιχεί στο σύμπλοκο κατιόν $[Sb+Oυριδίνη-3H+3OH+2K+H_2O]^+$, (717,719) που αντιστοιχεί στο σύμπλοκο κατιόν $[Sb+2Oυριδίνες-4H+2OH+2K]^+$, (887, 889) που αντιστοιχεί στο σύμπλοκο κατιόν $[Sb+3Oυριδίνες-5H+K]^+$, (943, 945) που αντιστοιχεί στο σύμπλοκο κατιόν $[2(Sb+Oυριδίνη-3H+3OH+2K)-K]^+$ και είναι ουσιαστικά διμερές της κορυφής (491, 493) και (961, 963) που αντιστοιχεί στο σύμπλοκο κατιόν $[2(Sb+Oυριδίνη-3H+3OH+2K)-K+H_2O]^+$ και είναι το ενυδατωμένο διμερές. Στον αρνητικό ιοντισμό, οι κύριες κορυφές που εντοπίζονται είναι η (639, 641) που αντιστοιχεί στο σύμπλοκο ανιόν $[Sb+2Oυριδίνες-4H+2OH]^-$ και η (847, 849) που αντιστοιχεί στο σύμπλοκο ανιόν $[Sb+3Oυριδίνες-6H]^-$. Τα φάσματα για τον θετικό ιοντισμό είναι πανομοιότυπα και κάποιες μικρές διαφορές στις σχετικές εντάσεις των κορυφών δεν μπορούν να αποδοθούν σε κάποια συγκεκριμένη αιτία. Στον αρνητικό ιοντισμό όμως το φάσμα με πηγή ηλεκτροψεκασμού είναι πολύ πιό σύνθετο σε σχέση με αυτό με πηγή V-Easi που εντοπίζει μόνο μία μονοφορτισμένη διπλή κορυφή του συμπλόκου $[Sb+2Oυριδίνες-4H+2OH]^-$ ενώ με τον ηλεκτροψεκασμό εντοπίζεται ως κύρια κορυφή το σύμπλοκο $[Sb+3Oυριδίνες-6H]^-$. Εδώ είναι σωστό να αναφερθεί ότι η παρουσία ηλεκτροχημικών παρεμβολών (σπινθήρας) ειδικά στον αρνητικό ιοντισμό είναι κάτι συνηθισμένο. Τα δεδομένα του πειράματος το αποδεικνύουν αφού το ρεύμα πηγής (source current) ήταν ~ 80 μA . Τέτοιες τιμές ρεύματος σημαίνουν ότι ηλεκτρόνια από το μέταλλο του ακροφυσίου συμμετείχαν σε οξειδοαναγωγικές διαδικασίες μεταβάλλοντας σημαντικά τις φυσικοχημικές ιδιότητες του διαλύματος. Μπορούμε να θεωρήσουμε ότι η V-Easi πηγή σε αυτή την περίπτωση αντανακλά περισσότερο την φυσιολογική σύσταση του διαλύματος.



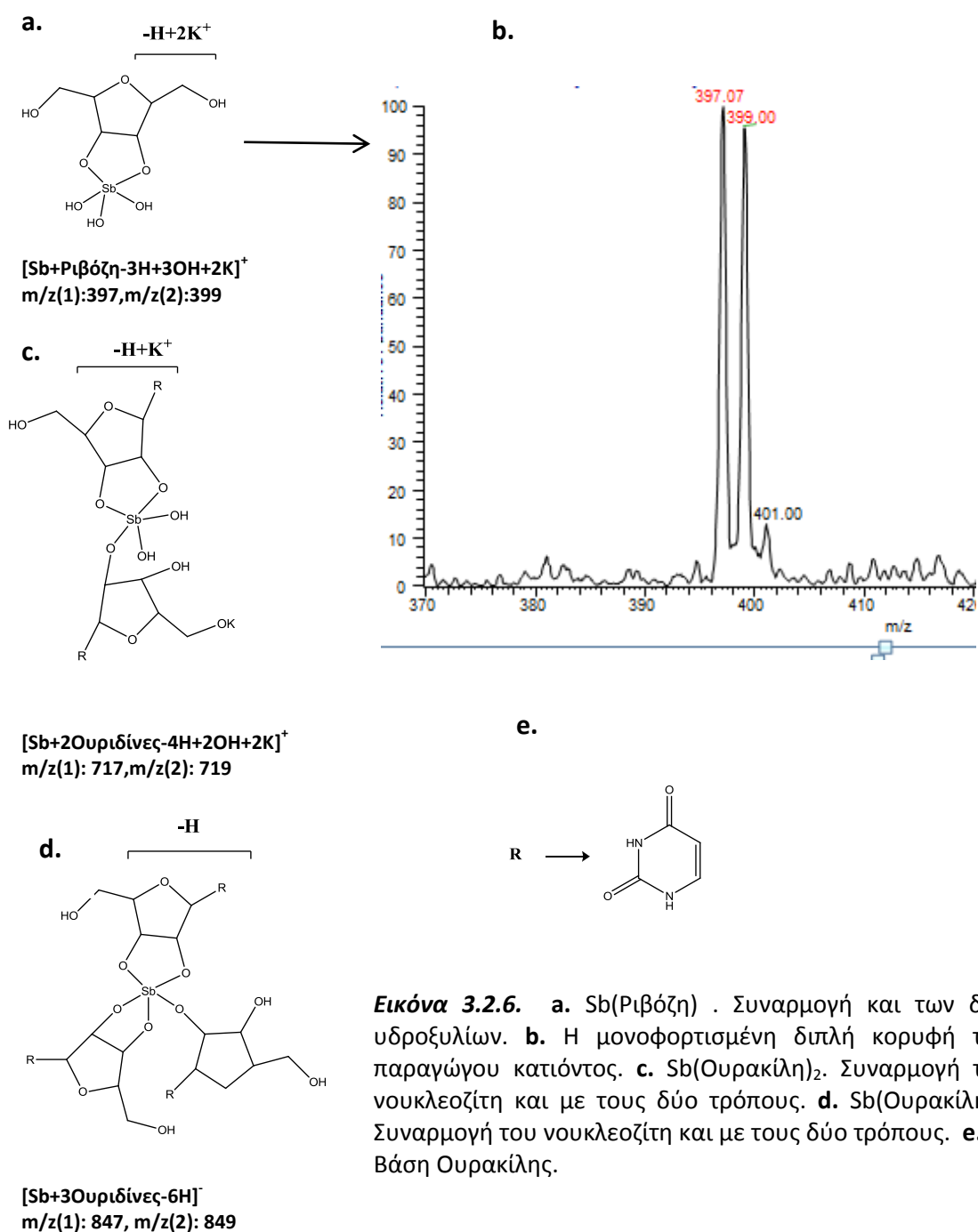
Εικόνα 3.2.4 Φάσματα Μαζών του αντιδρών μείγματος Sb(V) με Ουριδίνη σε διάλυμα νερού/ακετονιτριλίου 50/50 και Θερμοκρασία στήλης 350°C με πηγή Ηλεκτροψεκασμού.



Εικόνα 3.2.5 Φάσματα Μαζών του αντιδρών μείγματος Sb(V) με Ουριδίνη σε διάλυμα νερού/ακετονιτριλίου 50/50 και Θερμοκρασία στήλης 350°C με πηγή V-Easi.

Από προηγούμενες μελέτες^{20,21}, έχει αναφερθεί ότι η συμπλοκοποίηση του αντιμονίου με την ριβόζη των νουκλεοζιτών/νουκλεοτιδίων μπορεί να επιτευχθεί με συμμετοχή του ενός ή και των δύο *cis*-γειτονικών υδροξυλίων ενώ η πιθανότητα η συμπλοκοποίηση να προχωράει μέσω του αζώτου (N7) της βάσης (π.χ ουρακίλη) είναι πολύ μικρή. Στα φάσματα μαζών που αποκτήθηκαν, και με τις δύο πηγές ιοντισμού, παρατηρήθηκαν σύμπλοκα με διαφορετική στοιχειομετρία αλλά και διαφορετική σύνδεση της ριβόζης του νουκλεοζίτη που χρησιμοποιήθηκε (ουριδίνη). Όπως λοιπόν και στις προηγούμενες μελέτες, σύμπλοκα στοιχειομετρίας Sb(V)/Βιομορίου 1:1, 1:2 και 1:3 εντοπίστηκαν αλλά και ο τρόπος

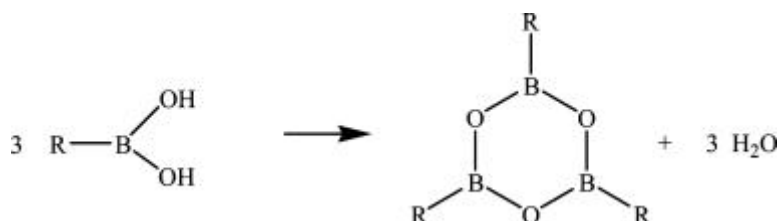
σύνδεσης τους μπορεί να μεταβληθεί από συναρμογή μόνο του υδροξυλίου στην 2' θέση ή και των δύο *cis*-γειτονικών 2'-3' υδροξυλίων. Τα φάσματα του θετικού ιοντισμού και για τις δύο τεχνικές, παρουσιάζουν κυρίως παράγωγες ενώσεις των προϊόντων συμπλοκοποίησης με κατιόντα K^+ που βρίσκονται άφθονα από το άλας του πεντασθενούς αντιμονίου. Τα φάσματα μαζών του αρνητικού ιοντισμού αντιθέτως εμφανίζουν κορυφές μοριακών ιόντων.



Εικόνα 3.2.6. **a.** $Sb(Piβόζη)$. Συναρμογή και των δύο υδροξυλίων. **b.** Η μονοφορτισμένη διπλή κορυφή του παραγώγου κατιόντος. **c.** $Sb(Oυρακίλη)_2$. Συναρμογή του νουκλεοζίτη και με τους δύο τρόπους. **d.** $Sb(Oυρακίλη)_3$. Συναρμογή του νουκλεοζίτη και με τους δύο τρόπους. **e.** R-Βάση Ουρακίλης.

3.3. Βορονικά Οξέα και Βοροξίνες.

Τα βορονικά οξέα αποτελούνται από ένα κεντρικό άτομο τρισθενούς βορίου (B) συνδεδεμένο με δεσμό B-C με κάποιο οργανικό υποκαταστάτη και με δύο υδροξύλια²³. Τα βορονικά οξέα είναι ήπια οξέα Lewis, λόγω του ελεύθερου p τροχιακού του βορίου, ενώ η σταθερότητα και χαμηλή τοξικότητα τους τα καθιστά κατάλληλα για χρήση ως ενδιάμεσα αντιδράσεων. Οι βοροξίνες ή κυκλικά τριμερείς ανυδρίτες των βορονικών οξέων παρασκευάζονται είτε με αφυδάτωση των βορονικών οξέων (αζεοτροπική θέρμανση, απομάκρυνση με ξηραντικό θειικό οξύ κ.α) είτε μέσω τριμερισμού υποβοηθούμενου από υποκαταστάτη.



Εικόνα 3.3.1. Αντίδραση σχηματισμού βοροξίνης με αφυδάτωση από βορονικό οξύ.

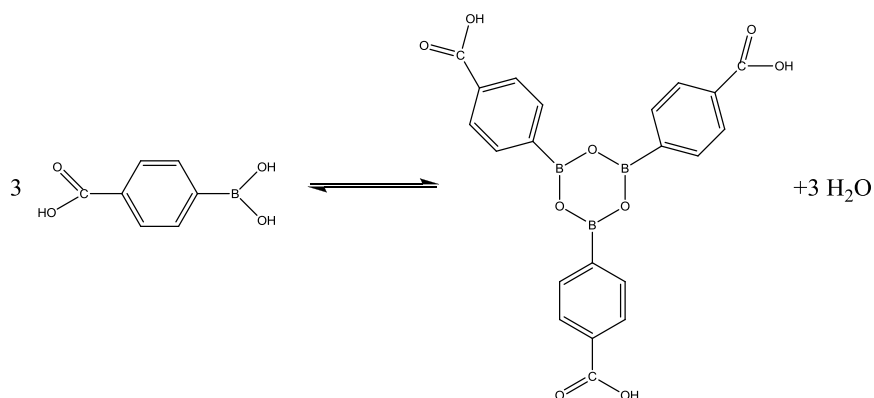
Τα οργανοβοριομένα αυτά μόρια έχουν βρεί ένα πλήθος εφαρμογών σε υλικά απόσβεσης φωτιάς, ως αποδέκτης ανιόντων σε μπαταρίες, στην κατασκευή νέων πολυμερών με κεντρικό σημείο τον δακτύλιο της βοροξίνης, σε προϊόντα δερματικών παθήσεων, φαρμακευτική αγωγή κ.α²⁴. Ο δακτύλιος των βοροξινών είναι ισοηλεκτρονιακός με αυτόν του βενζολίου και άρα η αρωματικότητα του δακτυλίου συμβάλλει στην σταθερότητα του μορίου. Ο τύπος του οργανικού υποκαταστάτη επηρεάζει σημαντικά την σταθερότητα της παραγόμενης βοροξίνης. Έτσι οργανικοί υποκαταστάτες με ηλεκτρονιοελκτικές ιδιότητες αποσταθεροποιούν την παραγόμενη βοροξίνη και οργανικοί υποκαταστάτες με ηλεκτρονιοδοτικές ιδιότητες ευνοούν την σταθερότητα της βοροξίνης. Ο σχηματισμός του δακτυλίου της βοροξίνης ωθείται από την αύξηση της εντροπίας λόγω της αποβολής μορίων νερού. Παρουσία νερού η αντίδραση τριμερισμού των βορονικών οξέων αλλάζει κατεύθυνση και με υδρόλυση του δακτυλίου επιστρέφει στα μονομερή μόρια²⁵.

Σκοπός του πειράματος ήταν να ταυτοποιήσουμε την παρουσία της φαινυλοξικής βοροξίνης ως προϊόντα αντίδρασης του βορονικού οξέος, και επίσης να μελετήσουμε την σταθερότητα της βοροξίνης σε υδατικά διαλύματα υπό διαφορετικές συνθήκες φασματομετρικής ανάλυσης.

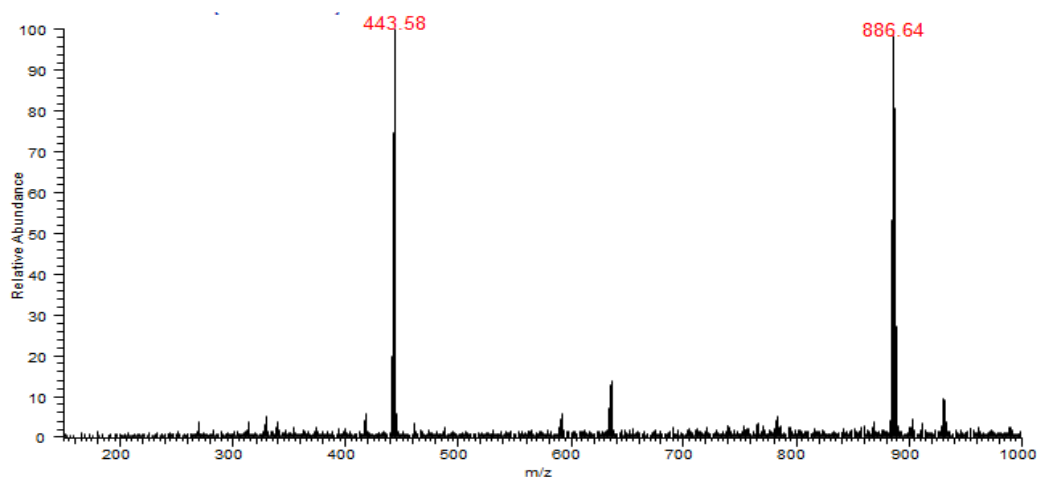
3.3.1. Πείραμα και Αποτελέσματα

Φαινυλοξική βοροξίνη διαλυμένη σε μεθανόλη [HPLC GRADE, FisherScientific, UK] αναλύθηκε αρχικά με πηγή ηλεκτροψεκασμού στο όργανο LCQ Thermo Finnigan. Η φαινυλοξική βοροξίνη συντέθηκε από την ερευνητική ομάδα του αναπληρωτή Καθηγητή Παντελή Τρικαλίτη του Τμήματος Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης (Σύνθεση με αφυδάτωση του 4-καρβοξυβένζυλο βορονικού οξέος [Alfa Aesar, 97%, στερεό] σε φούρνο στους 120°C για 24 ώρες). Το καλύτερο φάσμα μαζών καταγράφηκε με δυναμικό πηγής ηλεκτροψεκασμού 5 kV, θερμοκρασία μεταφορικής στήλης 250°C, δυναμικό στήλης -100 V, δυναμικό φακού εστίασης -110 V και δυναμικό αποσυσσώματωσης (SID) 45 V. Πρίν την ανάλυση το δείγμα αραιώθηκε με νερό σε τελικό διάλυμα μεθανόλη/νερό 50:50. Η ανάλυση της βοροξίνης έγινε στον αρνητικό ιοντισμό. Για την ταυτοποίηση της ένωσης η μάζα της κύριας κορυφής αλλά και η κατανομή των ισοτόπων χρησιμοποιήθηκαν μιάς και το B έχει δύο ισότοπα (σχετική ατομική μάζα 10 με αφθονία 19.9% και σχετική ατομική μάζα 11 με αφθονία 80.1%). Η φαινυλοξική βοροξίνη (Μέση Μοριακή Μάζα 443.7)

παράγεται με κυκλικό τριμερισμό του 4-καρβοξυβένζυλο βορονικού οξέος (Μέση Μοριακή Μάζα 165.9) και αποβολή 3 μορίων νερού.

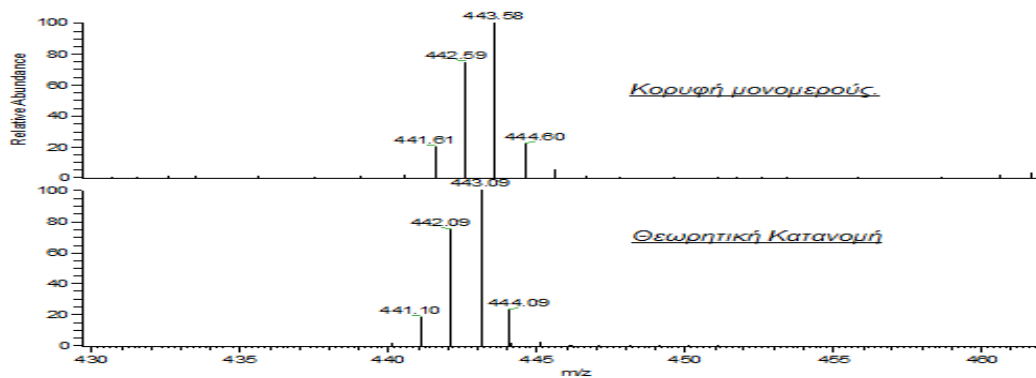


Εικόνα 3.3.2. Κυκλικός τριμερισμός του 4- καρβοξυβένζυλο βορονικού οξέος προς σχηματισμό φαινυλοξικής βοροξίνης.



Εικόνα 3.3.3. Φάσμα Μαζών ηλεκτροψεκασμού στον αρνητικό ιοντισμό δια/τος μεθανόλης/νερού 50:50 της Φαινυλοξικής Βοροξίνης.

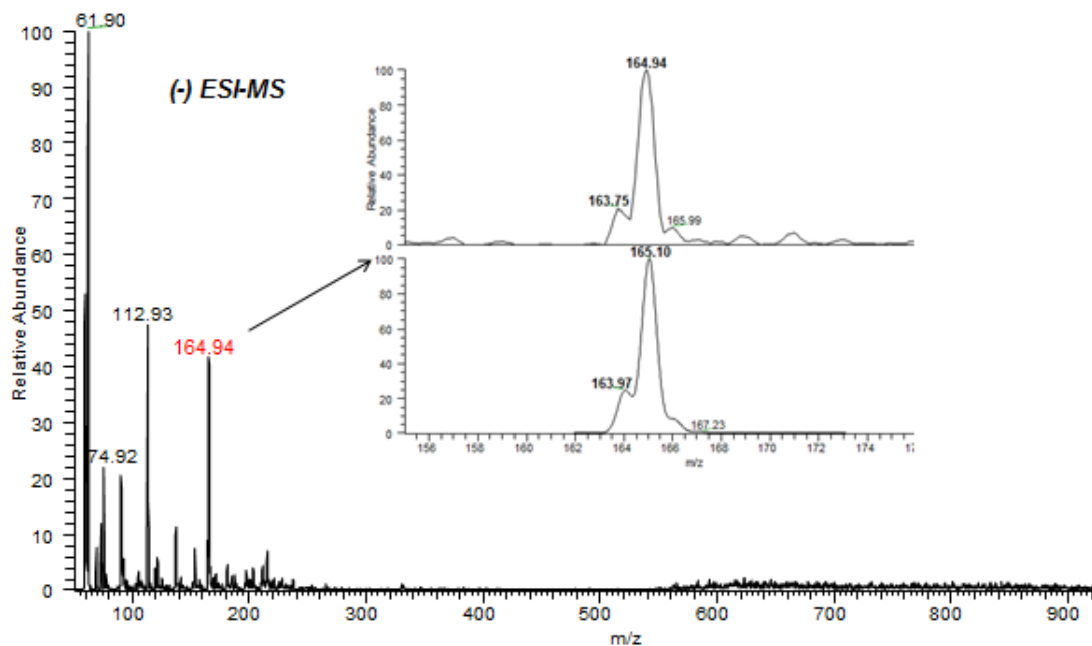
Οι κύριες κορυφές 443.58 και 886.64 αποτελούν το μονομερές και το διμερές της φαινυλοξικής Βοροξίνης, αντίστοιχα, που εντοπίζονται στον αρνητικό ιοντισμό. Οι συνθήκες στις οποίες εντοπίζονται τα συγκεκριμένα μόρια αποδεικνύουν και την σταθερότητα τους. Η κατανομή των ισοτόπων των εντοπισμένων κορυφών συνάδουν με τις προβλεπόμενες από την θεωρία. Η ύπαρξη διμερών ίσως να οφείλεται στην αυξημένη συγκέντρωση της βοροξίνης στα διαλύματα που αναλύθηκαν. Το φαινόμενο αυτό δεν μελετήθηκε περαιτέρω.



Εικόνα 3.3.4 Σύγκριση της κατανομής ισotόπων της κορυφής 433.58 με την θεωρητική πρόβλεψη.

Σε άλλο πείραμα μελετήθηκε η υδρόλυση της φαινυλοξικής βοροξίνης, συγκέντρωσης 100 ppm σε νερό, και η ανάλυση έγινε και με τις δύο πηγές ιοντισμού (ESI, V-EASI) για σύγκριση, στο όργανο TSQ Quantum Thermo Finnigan. Αναμένεται ότι παρουσία νερού ο δακτύλιος του κυκλικού τριμερούς της φαινυλοξικής βοροξίνης αποσταθεροποιείται και επιστρέφει στο αρχικό μονομερές, δηλ το 4-καρβόξυβενζυλο βορονικό οξύ. Με την πηγή ηλεκτροψεκασμού χρησιμοποιήθηκε δυναμικό πηγής 5 kV, δυναμικό αποσυσσωμάτωσης (SID) 10 V και θερμοκρασία στήλης μεταφοράς ιόντων 220°C.

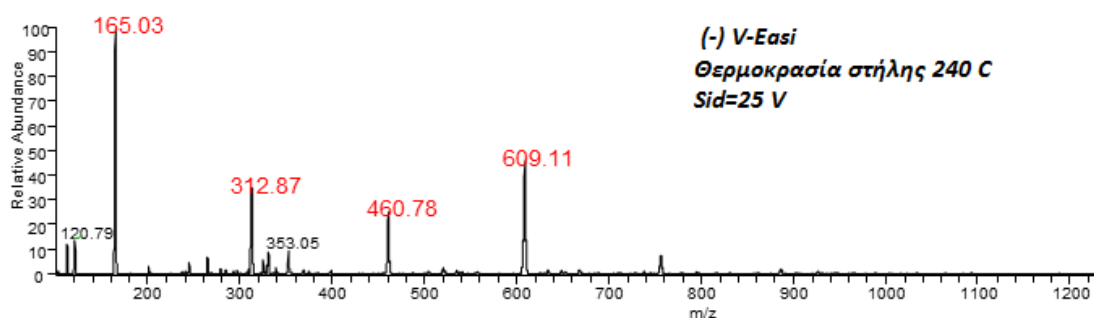
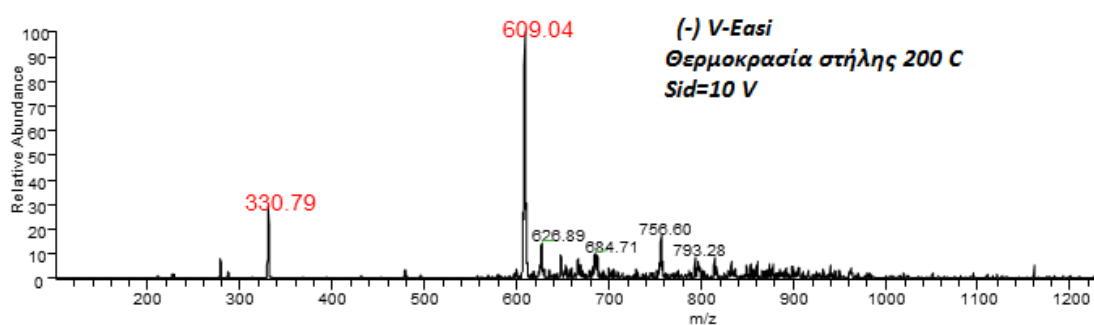
Με την πηγή V-Easi καταγράφηκαν φάσματα μαζών 1) με θερμοκρασία στήλης 200°C και δυναμικό (SID) 10 V και 2) με θερμοκρασία στήλης 240°C και δυναμικό (SID) 25 V. Η πίεση του ομοαξονικού αερίου εκνέφωσης ήταν και στις δύο περιπτώσεις 40 psi και άρα η ροή του υγρού δείγματος ίδια. Οι αναλύσεις έγιναν στον αρνητικό ιοντισμό.



Εικόνα 3.3.5. Φάσμα μαζών της φαινυλοξικής βοροξίνης που έχει μετατραπεί σε 4-καρβοξυβένζυλο βορονικό οξύ στο νερό στον αρνητικό Ιονισμό με Ηλεκτροψεκασμό. Η κορυφή 164.94 ταυτοποιείται από την ιστοπική κατανομή .

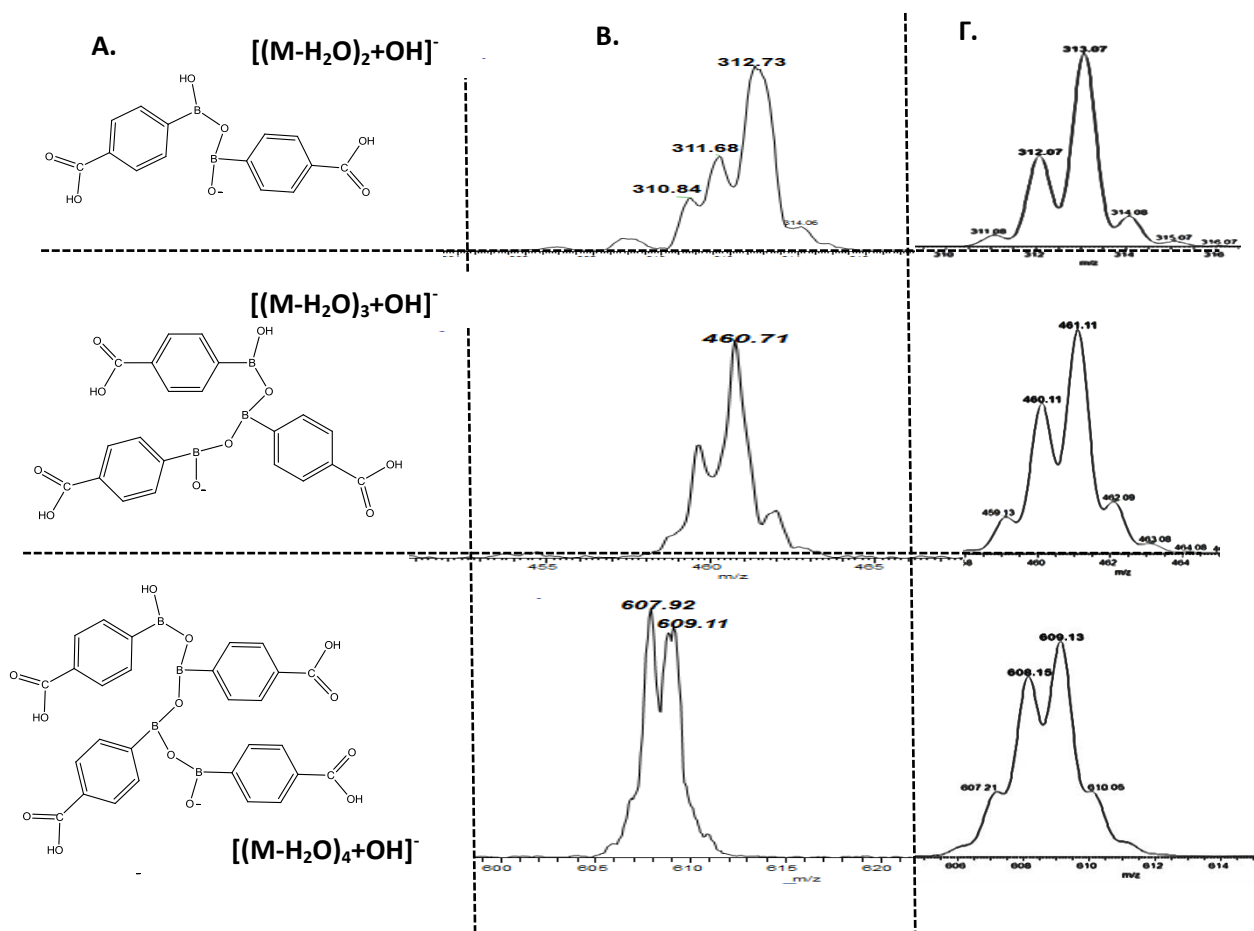
Με την πηγή ηλεκτροψεκασμού εντοπίστηκε η αποπρωτονιωμένη μοριακή κορυφή 164.94 του 4-καρβοξυβένζυλο βορονικού οξέος δίπλα σε κορυφές συσσωματωμάτων του διαλύτη. Τα φάσματα μαζών που καταγράφηκαν με την πηγή V-Easi του ίδιου διαλύματος παρουσιάζουν αρκετές διαφορές. Έτσι σε θερμοκρασία στήλης 200°C και δυναμικό αποσυσσωμάτωσης 10 V η κύρια κορυφή που εντοπίζεται είναι η μονοφορτισμένη κορυφή

609.04 και σαν δευτερεύουσα η μονοφορτισμένη κορυφή 330.79. Αν θεωρήσουμε το 4-καρβοξυβένζυλο βορονικό οξύ ως το μονομερές M τότε η κορυφή 330.79 αντιστοιχεί στο διμερές του $[2M-H]^-$. Η κορυφή 609.04 αντιστοιχεί σε ένα ανοικτό τετραμερές προϊόν πολυμερισμού του 4-καρβοξυβένζυλο βορονικού οξέος μετά από αφυδάτωση του μονομερούς $[(M-H_2O)_4+OH]^-$. Ο εντοπισμός ενός τέτοιου μορίου επιβεβαιώνει την τάση του μονομερούς για πολυμερισμό αλλά και την αδυναμία να κλείσει ο δακτύλιος της βοροξίνης παρουσία του νερού. Με αύξηση της ενέργειας στην περιοχή ενδιάμεσης πίεσης (μεταφορική στήλη) σε 240°C και 25 V δυναμικό αποσυσσώματωσης (SID) παρατηρήθηκε μείωση της σχετικής έντασης σήματος της κορυφής 609.04, εμφάνιση των κορυφών 460.78, 312.87 και επανεμφάνιση της κορυφής του μονομερούς 165.03. Η κορυφή 460.78 αντιστοιχεί στο τριμερές ανοικτής αλυσίδας προϊόν πολυμερισμού $[(M-H_2O)_3+OH]^-$ και η κορυφή 312.87 στο διμερές ανοικτής αλυσίδας προϊόν πολυμερισμού $[(M-H_2O)_2+OH]^-$.



Εικόνα 3.3.5. Φάσματα μάζας της φαινυλοξικής βοροξίνης που έχει μετατραπεί σε 4-καρβοξυβένζυλο βορονικό οξύ στο νερό με πηγή V-Easi στον αρνητικό ιοντισμό

Η εμφάνιση της κορυφής του μονομερούς με την πηγή V-Easi, με αύξηση της ενέργειας στην περιοχή ενδιάμεσης πίεσης, επιβεβαιώνει ότι και δύο πηγές εντοπίζουν τα ίδια μόρια και άρα ο μηχανισμός είναι παρόμοιος αλλά με μια σημαντική διαφορά. Η εσωτερική ενέργεια των μορίων-αναλυτών είναι μεγαλύτερη με τον ηλεκτροψεκασμό και άρα η αποσύνδεση των μορίων που αλληλεπιδρούν χαλαρά δεν ευνοεί τον εντοπισμό τους με τον ηλεκτροψεκασμό. Αντιθέτως με την πηγή V-EASI, ο εντοπισμός των πολυμερών ανοικτής αλυσίδας μας δείχνει ότι 1) η πηγή V-EASI δημιουργεί ιόντα χαμηλότερης εσωτερικής ενέργειας, 2) τα ιόντα αυτά δημιουργήθηκαν πιθανώς στην αέρια φάση με αντίδραση των πρόδρομων ιόντων μετά την απομάκρυνση του νερού ή κατά την συρρίκνωση της σταγόνας και λίγο πριν εξέλθουν τα ιόντα στην αέρια φάση.

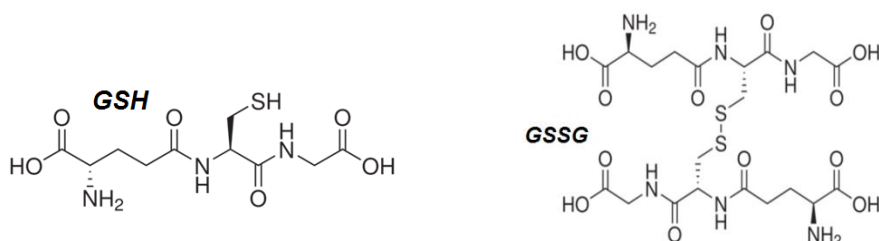


Σχήμα 3.3.6. Α. Πολυμερή ανοικτής αλυσίδας του 4-ΒορονοΒενζοϊκού Οξέος, Β. ισοτοπική κατανομή των προϊόντων υδρόλυσης της φαινολυξικής βοροξίνης σε νερό / μεθανόλη 50:50, Γ. Θεωρητικές ισοτοπικές κατανομές των πολυμερών.

Συμπερασματικά μπορούμε να πούμε ότι η παραγόμενη βοροξίνη παρουσιάζει σταθερότητα σε διαλύτη μεθανόλη, συγκριτικά με το νερό, όπως διαπιστώθηκε με την ανάλυση της με ηλεκτροψεκασμό. Σε νερό παρατηρείται άμεση υδρόλυση της βοροξίνης όπως επιβεβαιώθηκε με ηλεκτροψεκασμό και V-EASI, με την τελευταία να δίνει δείγματα ηπιότερου ιοντισμού αλλά και σχηματισμό προϊόντων πολυμερισμού ανοικτής αλυσίδας.

3.4 L-Ανηγγεμένη Γλουταθειόνη

Η L-ανηγμένη γλουταθειόνη ή συντομογραφικά GSH, είναι ένα τριπεπτιδίο που προκύπτει με σύνδεση του L-γλουταμινικού οξέος με την γλυκίνη και με την L-κυστεΐνη. Η GSH είναι γνωστό ότι λειτουργεί ως αντιοξειδωτική ουσία κατά τον κυτταρικό μεταβολισμό, απευθείας αλλά και σαν συμπαράγοντας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης. Επιπλέον, η δυνατότητα της GSH να σχηματίζει δισουλφιδικούς δεσμούς με τις πρωτεΐνες, έχει αναγνωρισθεί ως πιθανός μηχανισμός τροποποίησης της δραστηριότητας της πρωτεΐνης στα κύτταρα²⁶. Ός αναλύτης η GSH περιέχει όξινες καρβοξυλικές, μια βασική-άμινο ομάδα και μια σουλφυδρυλική με $pK_{a1}=2.12$ (COOH), $pK_{a2}=3.59$ (COOH), $pK_{a3}=8.66$ (NH₂) και $pK_{a4}=9.12$ (SH), ενώ σε υδατικά διαλύματα και παρουσία ατμοσφαιρικού οξυγόνου οξειδώνεται στην διμερή οξειδωμένη μορφή της GSSG, με γέφυρα δισουλφιδικού δεσμού.

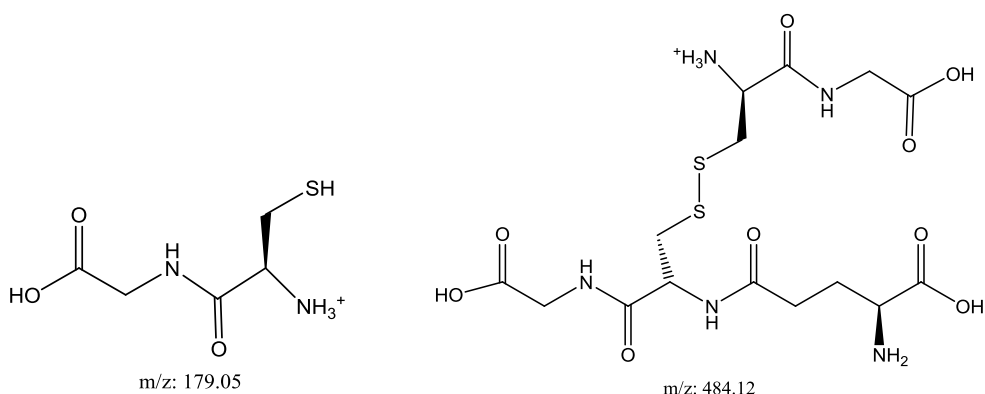


Εικόνα 3.4.1. Μοριακή Δομή της GSH και GSSG.

Τα φάσματα μαζών της GSH και με τις δύο τεχνικές, παρουσιάζουν πανομοιότυπη μορφή τόσο στον θετικό όσο και στον αρνητικό ιοντισμό. Η κύρια κορυφή στον θετικό ιοντισμό είναι η πρωτονιωμένη μονοφορτισμένη κορυφή $[GSH+H]^+$ με μάζα προς φορτίο 308.3 και στον αρνητικό ιοντισμό η κύρια κορυφή είναι η αποπρωτονιωμένη μονοφορτισμένη κορυφή $\{GSH-H\}^-$ με μάζα προς φορτίο 306.4. Πέρα από τις δύο κύριες κορυφές ένα πλήθος κορυφών εντοπίζονται κοντά στην περιοχή υποβάθρου και με τις δύο πολικότητες, χαρακτηριστικό ενώσεων με έντονη χημεία.

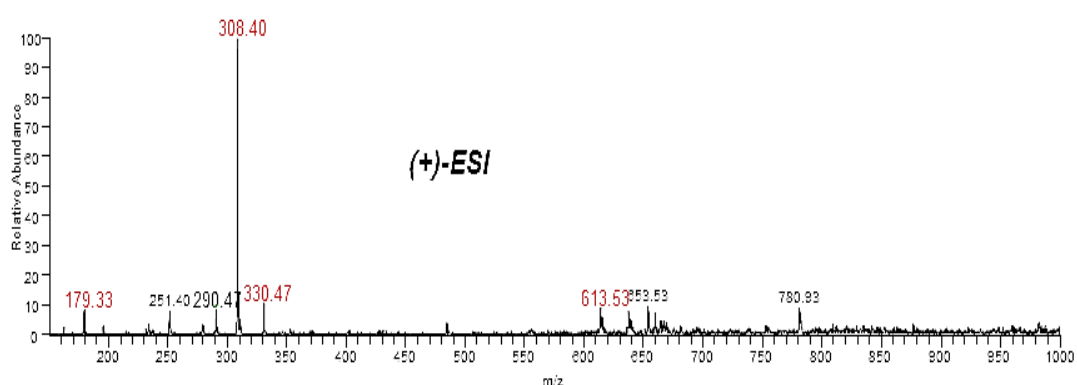
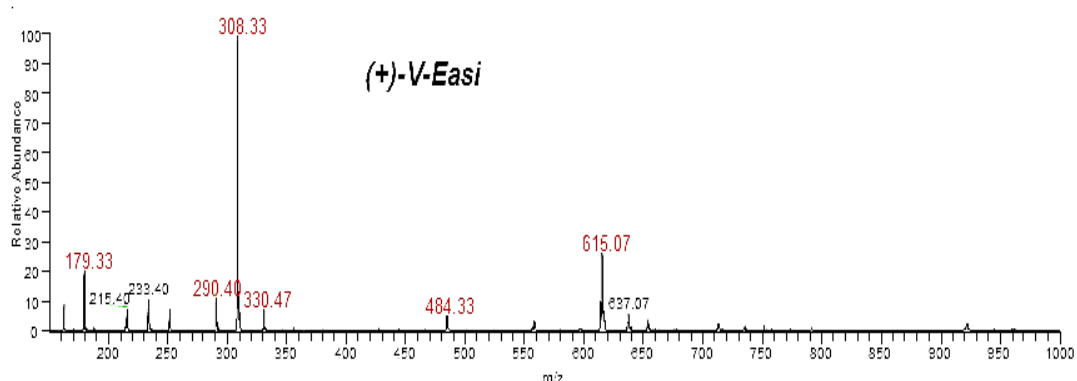
Όπως φαίνεται στις εικόνες 3.4.3 και 3.4.3, αφυδατωμένες κορυφές εντοπίζονται τόσο στον θετικό ιοντισμό $[GSH-H_2O+H]^+$ με μάζα προς φορτίο 290.4 όσο και στον αρνητικό ιοντισμό με μάζα προς φορτίο 288.2. Επίσης το μονοφορτισμένο κατιόν παράγωγο της GSH με νάτριο $[GSH+Na^+]^+$ με μάζα προς φορτίο 330.4 στον θετικό ιοντισμό και το μονοφορτισμένο ανιόν παράγωγο $[GSH-2H+Na^+]^-$ στον αρνητικό ιοντισμό, με μάζα προς φορτίο 328.4. Επίσης ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι κορυφές 179.3 και 484.3 στον θετικό ιοντισμό. Οι κορυφές αυτές πιθανότατα αντιστοιχούν στο θραύσμα της GSH στον αμιδικό δεσμό του γλουταμινικού οξέος και στο οξειδωμένο παράγωγο του θραύσματος με την GSH. Κάποια άλλη πιθανή εξήγηση δεν μπορεί να αποκλεισθεί λόγω της απουσίας δομικής ανάλυσης των κορυφών αυτών με διαδοχική φασματομετρία μάζας (MS^n). Η πιο σημαντική διαφορά των δύο πηγών ιοντισμού εντοπίζεται στην παρουσία των κορυφών 615.1 και 613.4 στον θετικό ιοντισμό. Η κορυφή 615.1 αντιστοιχεί στο διμερές της GSH $[2 GSH+H]^+$ και εντοπίζεται με την πηγή ιοντισμού V-EASI ενώ η κορυφή 613.4 αντιστοιχεί στο οξειδωμένο διμερές της GSH, GSSG και εντοπίζεται τόσο με την πηγή ESI όσο και με την πηγή V-EASI, αλλά σε μικρότερη σχετική ένταση ως προς την κύρια κορυφή. Η παρατήρηση της οξείδωσης της GSH και με την πηγή V-EASI είναι αναμενόμενη αφού η οξείδωση αυτή

πραγματοποιείται από το ατμοσφαιρικό οξυγόνο, χωρίς να χρειάζεται το υψηλό δυναμικό της πηγής ESI.



Εικόνα 3.4.2. Μοριακή Δομή του θραύσματος με μάζα προς φορτίο 179.3 και του οξειδωμένου παραγώγου του θραύσματος με την GSH.

Η μόνη λυτόν διαφοροποίηση είναι η παρουσία του διμερούς $[2 \text{ GSH} + \text{H}]^+$ με την πηγή V-Easi.



Εικόνα 3.4.3. Φάσμα μαζών στον θετικό ιοντισμό διαλύματος GSH σε νερό/μεθανόλη 50/50 με περιεκτικότητα σε οξικό οξύ 0.5%. **Εικόνα 3.4.4. Α.** Άνοιγμα της κορυφής 615.1 στον θετικό ιοντισμό με την πηγή V-Easi. Παρουσία και του οξειδωμένου διμερούς 613.4. **Β.** Φάσμα μαζών στον αρνητικό ιοντισμό διαλύματος GSH σε νερό/μεθανόλη 50/50 με περιεκτικότητα σε οξικό οξύ 0.5%.

3.4.1. Επίδραση οξύτητας στην ένταση του σήματος κορυφής της L-Ανηγμένης Γλουταθειόνης-Πειραματική Διαδικασία

Η μέτρηση της έντασης σήματος της μοριακής κύριας κορυφής της L-ανηγμένης γλουταθειόνης ($\geq 97.0\%$, Fluka) έγινε και με τις δύο πηγές ιοντισμού σε θετικό και αρνητικό ιοντισμό. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν όλα συγκέντρωσης 20 ppm ενώ η σύσταση του διαλύτη κυμαινόταν από σκέτο νερό σε μείγματα διαλυτών νερού/μεθανόλης 50/50 και 10/90. Για την κάθε σύσταση διαλύτη, τρία διαλύματα οξύτητας (περιεκτικότητα v/v) 0.1%, 0.5% και 1% σε οξικό οξύ παρασκευάστηκαν, τα οποία αναλύθηκαν σε θετικό και αρνητικό ιοντισμό και με τις δύο πηγές. Το νερό που χρησιμοποιήθηκε είναι αγωγιμότητας 18,2 mΩ και η μεθανόλη (LC-MS CHROMANSOLV, $\geq 99.9\%$, Fluka).

Για την πιο αξιόπιστη σύγκριση των αποτελεσμάτων, έγιναν ξεχωριστές βελτιστοποιήσεις της ανάλυσης για τον θετικό και αρνητικό ιοντισμό αλλά και για διαφορετική σύσταση διαλύτη με την κάθε πηγή. Σε όλες τις περιπτώσεις, επιλέχθηκε το διάλυμα οξύτητας 0.5% σε οξικό οξύ [Merck, Pro Analysis, Glacial Acetic Acid 100%], σαν ενδιάμεσης οξύτητας ως το πιο κατάλληλο να γίνει βελτιστοποίηση. Αρχικά βελτιστοποιήθηκαν χαρακτηριστικές παράμετροι των πηγών ιοντισμού και στη συνέχεια ρυθμίσεις εσωτερικές του οργάνου. Η βελτιστοποίηση της πηγής ηλεκτροψεκασμού έγινε με ρύθμιση της κάθετης και παράλληλης απόστασης της πηγής από τον κώνο δειγματοληψίας αλλά και του δυναμικού πηγής, έτσι ώστε να μην παρατηρείται εκκένωση λάμπης στο ακροφύσιο και το σήμα να βελτιώνεται. Με την πηγή V-EASI, βελτιστοποιήθηκε η θέση του του τριχοειδούς τηγμένου πυριτίου (στην άκρη του εκνεφωτή) αλλά και η πίεση του αερίου εκνέφωσης που ρυθμίστηκε στα 70 psi για όλα τα πειράματα [*H βελτιστοποίηση της V-EASI πηγής στο επόμενο Κεφάλαιο*]. Στη συνέχεια ρυθμίστηκαν το δυναμικό στήλης, δυναμικό φακού εστίασης, δυναμικό αποσυσσωμάτωσης (SID) [Περιοχή Ενδιάμεσης Πίεσης] αλλά και τα δυναμικά του πρώτου και δεύτερου οκταπόλου και το δυναμικό εστίασης της ιοντικής παγίδας. Η θερμοκρασία της μεταφορικής στήλης στην περιοχή ενδιάμεσης πίεσης ήταν σε όλες τις περιπτώσεις 300°C.

Ρυθμίσεις οργάνου	H ₂ O				H ₂ O/MeOH 50:50				H ₂ O/MeOH 10:90			
	ESI		V-Easi		ESI		V-Easi		ESI		V-Easi	
	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Δυναμικό πηγής (kV)	5.0	3.5	0	0	4.8	4.0	0	0	5.0	4.5	0	0
Δυναμικό στήλης (V)	3.8	-85	22	-70	24	-74	24	-46	9	-100	3.5	-52
Δυναμικό εστίασης φακού (V)	-14	- 100	28	-95	-12	-75	15	-97	-12	-98	20	-97
Sid (V)	0	0	15	15	0	10	15	15	0	5	15	15

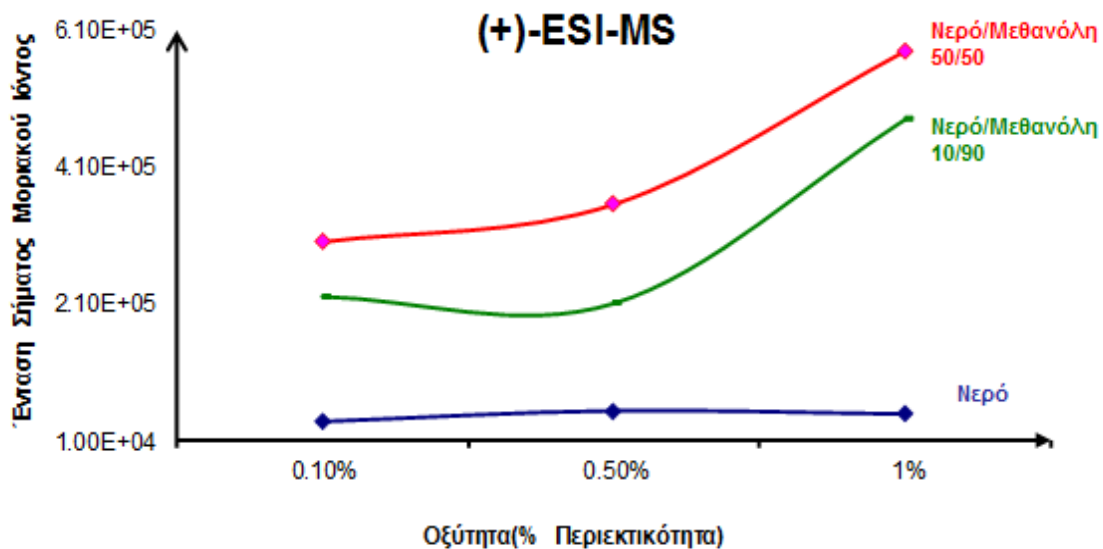
3.4.1.1 Επίδραση οξύτητας στην ένταση του σήματος κορυφής της L-Ανηγγμένης Γλουταθειόνης-Αποτελέσματα

Οξύτητα %	Σχετική Ένταση Σήματος Μοριακού Ιόντος											
	H ₂ O				H ₂ O/MeOH 50:50				H ₂ O/MeOH 10:90			
	ESI		V-Easi		ESI		V-Easi		ESI		V-Easi	
	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
0.1 %	3.70 E+04	7.90 E+03	5.80 E+05	3.50 E+05	3.00 E+05	2.30 E+04	9.80 E+05	7.60 E+05	2.20 E+05	3.65 E+04	9.20 E+05	2.00 E+06
0.5 %	5.30 E+04	5.00 E+03	7.40 E+05	3.90 E+05	3.55 E+05	3.90 E+04	9.20 E+05	4.70 E+05	2.10 E+05	6.70 E+04	5.20 E+06	3.30 E+06
1.0 %	4.80 E+04	7.60 E+03	4.50 E+05	4.80 E+05	5.80 E+05	4.10 E+04	1.10 E+06	4.20 E+05	4.80 E+05	8.25 E+04	4.30 E+06	2.10 E+06

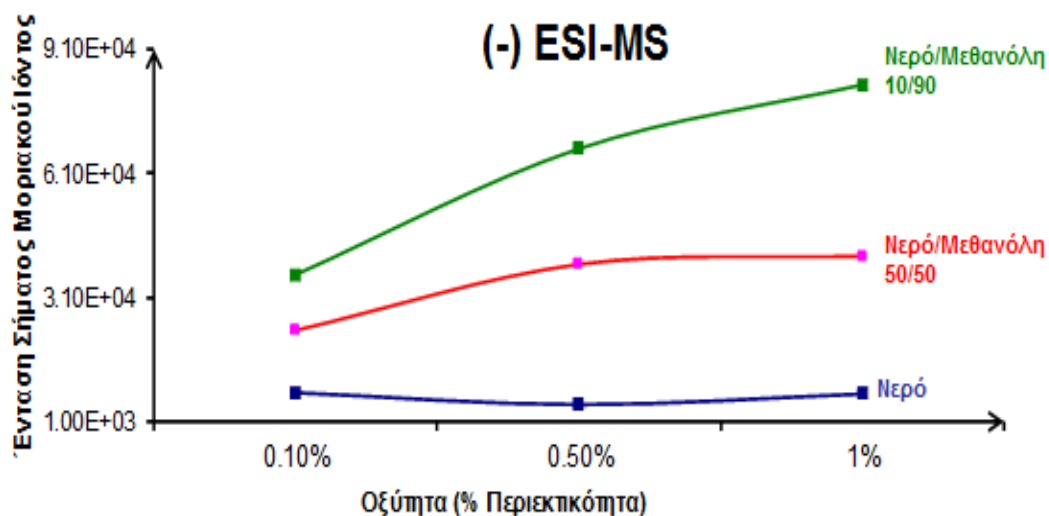
Με την προσθήκη οξέος στο κάθε διάλυμα πριν την ανάλυση αναμένεται το pH διαλύματος να είναι από ελαφρά όξινο έως και όξινο. Υπολογίζουμε το ισοηλεκτρικό σημείο(pI) της L-ανηγγμένης γλουταθειόνης από τον τύπο:

$$pI = \frac{pKa1 + pKa2 + pKa3 + pKa4}{4} \sim 5.9$$

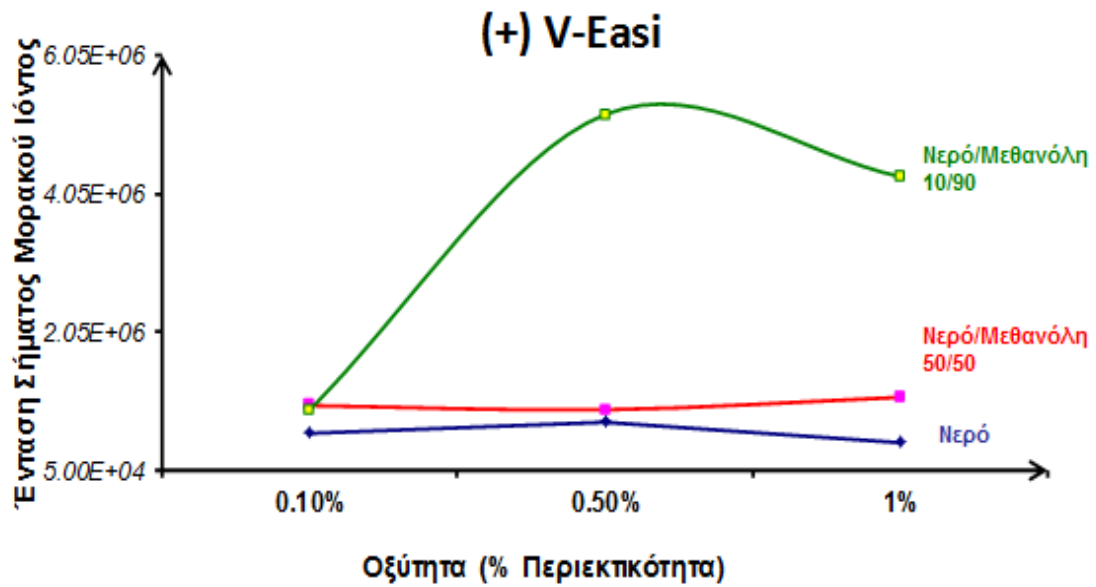
Σε τιμές κατώτερες του ισοηλεκτρικού σημείου αναμένεται η γλουταθειόνη να είναι θετικά φορτισμένη. Η L-ανηγγμένη γλουταθειόνη εντοπίζεται τόσο στον θετικό όσο και στον αρνητικό ιοντισμό με την ένταση του σήματος του μοριακού ιόντος στον θετικό ιοντισμό να υπερισχύει σχεδόν πάντα. Οι χαμηλότερες εντάσεις σήματος μοριακού ιόντος στον αρνητικό ιοντισμό παρατηρήθηκαν με τον ηλεκτροψεκασμό σε διαλύτη νερό. Αυτή η τάση εξηγείται εύκολα από το μικρότερο δυναμικό πηγής που χρησιμοποιήθηκε με το νερό (λόγω σπινθήρα εκκένωσης λάμψης).



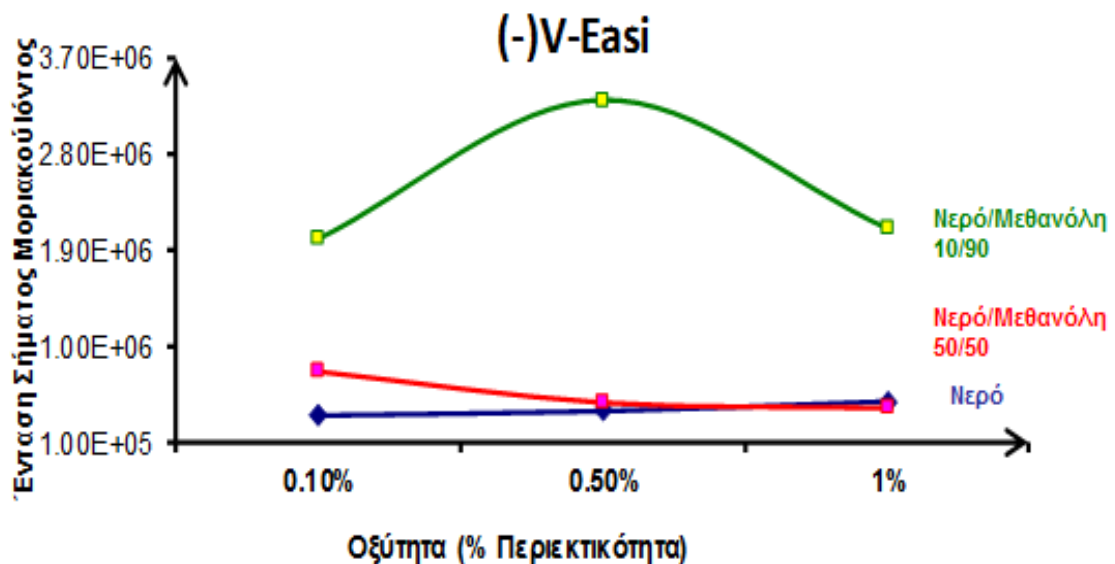
Γράφημα 3.4.5 Συσχέτιση της σχετικής έντασης σήματος του μοριακού ιόντος στον θετικό ιοντισμό με ESI της L-ανηγμένης γλουταθειόνης με την όγκο/όγκο περιεκτικότητα σε οξύ.



Γράφημα 3.4.6 Συσχέτιση της σχετικής έντασης σήματος του μοριακού ιόντος στον αρνητικό ιοντισμό με ESI της L-ανηγμένης γλουταθειόνης με την όγκο/όγκο περιεκτικότητα σε οξύ.



Γράφημα 3.4.7 Συσχέτιση της σχετικής έντασης σήματος του μοριακού ιόντος στον θετικό ιοντισμό με V-EASI της L-ανηγμένης γλουταθειόνης με την όγκο/όγκο περιεκτικότητα σε οξύ.



Γράφημα 3.4.8 Συσχέτιση της σχετικής έντασης σήματος του μοριακού ιόντος στον Αρνητικό Ιονισμό με V-Easi της L-Ανηγμένης Γλουταθειόνης με την όγκο/όγκο περιεκτικότητα σε οξύ.

3.4.1.2 Επίδραση οξύτητας στην ένταση του σήματος κορυφής της L-ανηγμένης γλουταθειόνης-Συζήτηση Αποτελεσμάτων

Τα γραφήματα 3.4.5, 3.4.6, 3.4.7 και 3.4.8 αποκαλύπτουν δύο κυρίαρχες διαφοροποιήσεις μεταξύ των δύο πηγών ιοντισμού:

- 1) Με την πηγή ηλεκτροψεκασμού ο θετικός και ο αρνητικός ιοντισμός λειτουργούν διαφορετικά σε διαφορετικούς διαλύτες ενώ με την πηγή V-EASI οι δύο πολικότητες λειτουργούν παρόμοια. Έτσι, στον θετικό ηλεκτροψεκασμό η σύσταση νερού/μεθανόλης 50:50 εμφανίζει καλύτερη ένταση σήματος ενώ στον αρνητικό ιοντισμό η σύσταση νερού/μεθανόλης 10:90. Αντιθέτως με την πηγή V-Easi και στις δύο πολικότητες εμφανίζεται καλύτερη ένταση σήματος με σύσταση νερού/μεθανόλης 10:90.
- 2) Με την πηγή ηλεκτροψεκασμού παρατηρείται αύξηση της έντασης σήματος στην πλειονότητα των συνθηκών με αύξηση της οξύτητας τόσο σε θετικό όσο και σε αρνητικό ιοντισμό. Αντιθέτως με την πηγή V-EASI παρατηρείται μια σταθεροποίηση της έντασης σήματος σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις οξέος και στις περισσότερες περιπτώσεις το μέγιστο της έντασης σήματος παρατηρείται σε οξύτητα 0.5% και όχι 1.0%.

Γενικότερα, η αύξηση της σύστασης του διαλύτη ως προς την μεθανόλη αναμένεται να οδηγεί σε αύξηση της έντασης σήματος αφού η μεθανόλη μειώνει την επιφανειακή τάση της σταγόνας αλλά και ο ρυθμός εξάτμισης της είναι μεγαλύτερος. Βέβαια, στον ηλεκτροψεκασμό η παρουσία δυναμικού στο ακροφύσιο της πηγής επηρεάζει καταλυτικά την αποτελεσματικότητα του ιοντισμού. Όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως, ο σχηματισμός του κώνου Taylor και η συγκέντρωση επιπλέον φορτίου (excess charge) στην διεπιφάνεια αέρα-υγρού του κώνου, οδηγεί σε σχηματισμό φορτισμένων μικροσταγονιδίων από Κουλομπική απώθηση αφού ξεπεραστεί το όριο Rayleigh. Η συγκέντρωση του επιπλέον φορτίου οδηγεί σε μικροσταγονίδια διαφορετικής οξύτητας από το αρχικό διάλυμα^{27,28}. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί μείωση του pH των μικροσταγονιδίων στον θετικό ιοντισμό και αύξηση του pH στον αρνητικό ιοντισμό. Η δημιουργία του επιπλέον φορτίου είναι μια ηλεκτροχημική διαδικασία όπου ρόλο παίζουν η αγωγιμότητα του διαλύτη και τα χημικά συστατικά του δείγματος και η ικανότητα τους για συμμετοχή σε ηλεκτροχημικές αντιδράσεις. Π.χ στον θετικό ιοντισμό το επιπλέον φορτίο δημιουργείται με οξείδωση των αρνητικά φορτισμένων μορίων ή με δημιουργία θετικά φορτισμένων μορίων. Η συμμετοχή στις ηλεκτροχημικές αντιδράσεις μορίων του διαλύτη είναι κάτι πολύ συνηθισμένο. Συγκεκριμένα, το νερό μπορεί να συμμετάσχει και σε οξειδωτικές και αναγωγικές διαδικασίες ενώ η μεθανόλη συμμετέχει σε αναγωγικές αντιδράσεις κατανάλωσης υδρογονοκατιόντων. Τελικά η μεθανόλη ευνοεί τον αρνητικό ιοντισμό στον ηλεκτροψεκασμό και για ηλεκτροχημικούς λόγους. Από την άλλη μεριά, το νερό φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην ηλεκτροχημεία του θετικού ιοντισμού αλλά και η μεθανόλη συμβάλλει στην μείωση της επιφανειακής τάσης. Έτσι, το μέγιστο της έντασης σήματος στον θετικό ιοντισμό σε σύσταση νερό/μεθανόλης 50:50 είναι το αποτέλεσμα δύο ξεχωριστών επιδράσεων.

<u>ΟΞΕΙΔΩΣΗ (ΘΕΤΙΚΟΣ ΙΟΝΤΙΣΜΟΣ)</u>	<u>E°(V)</u>	<u>ΜΕΤΑΒΟΛΗ ΡΗ</u>
$4\text{OH}^- \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 + 4\text{e}^-$	0.401	↓
$2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^-$	1.229	↓
<u>ΑΝΑΓΩΓΗ (ΑΡΝΗΤΙΚΟΣ ΙΟΝΤΙΣΜΟΣ)</u>		
$\text{CH}_3\text{OH} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O}$	0.58	↑
$2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 + 4\text{e}^- \rightarrow 4\text{OH}^-$	0.401	↑
$2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2$	0.0	↑

Η απουσία δυναμικού με την πηγή V-EASI και άρα η απουσία ηλεκτροχημικών αντιδράσεων αφήνει την επιφανειακή τάση του διαλύτη να παίζει κυρίαρχο ρόλο στην ένταση σήματος και έτσι με την αύξηση της περιεκτικότητας σε μεθανόλη αυξάνεται και το σήμα. (Θα δούμε στο επόμενο κεφάλαιο μια ακόμη παράμετρο που συνδέεται με την σύσταση διαλύτη, την ροή).

Τα αποτελέσματα δείχνουν η αύξηση της οξύτητας μπορεί να αυξήσει την ένταση σήματος για τον θετικό αλλά και τον αρνητικό ιοντισμό. Και ενώ η αύξηση του θετικού ιοντισμού μπορεί να εξηγηθεί εύκολα με πρωτονίωση του αναλύτη στο διάλυμα σε χαμηλά pH, η αύξηση του σήματος στον αρνητικό ιοντισμό αντιτίθεται σε αυτά που αναμένονται να συμβούν στο διάλυμα.

Για να εξηγηθεί αυτό το αποτέλεσμα οι αντιδράσεις που γίνονται στην αέρια φάση (κυρίως αντιδράσεις ανταλλαγής υδρογόνου) και η έννοια της βασικότητας (πρωτονιοελκτικότητα) αέριας φάσης πρέπει να εισαχθούν στην συζήτηση. Η βασικότητα αέριας φάσης ορίζεται ως η ελεύθερη ενέργεια Gibbs σχηματισμού του πρωτονιωμένου παράγωγου ανιόντος ή ουδέτερου μορίου²⁹. Η επίδραση αυτής της ιδιότητας στην απόκριση ενός αναλύτη ή στην καταστολή του σήματος παρουσία συγκεκριμένων πρόσθετων ουσιών είναι σημαντική^{29,30}. Η χρήση οξέων για την βελτίωση της αποτελεσματικότητας αρνητικού ιοντισμού έχει χρησιμοποιηθεί, ενώ στην σύγκριση της αποτελεσματικότητας μεταξύ φορμικού, οξικού, προπιονικού και βουτυρικού οξέος το οξικό οξύ παρήγαγε τα καλύτερα αποτελέσματα. Το οξικό ανιόν παρουσιάζει μεγάλη βασικότητα αέριας φάσης αλλά σε σύγκριση με τα άλλα οξέα ευνοείται και από άλλες ιδιότητες του. Π.χ το ανιόν του βουτυρικού οξέος λόγω μεγαλύτερης οργανικής αλυσίδας έχει μεγαλύτερη επιφανειακή δράση στην διεπιφάνεια αέρα-υγρού και ανταγωνίζεται τα μόρια του αναλύτη που βρίσκονται εκεί.

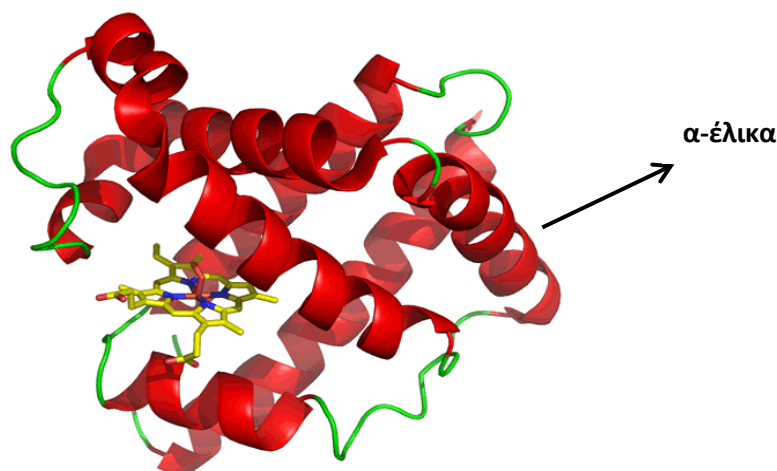
Μια άλλη παράμετρος που επηρεάζει την τελική αφθονία του αναλύτη στην διεπιφάνεια αέρα-υγρού είναι η συγκέντρωση του πρόσθετου οξέος. Με αύξηση της συγκέντρωσης του οξέος αυξάνεται ο αριθμός των ανιόντων στον όγκο. Αν και σε πολλές περιπτώσεις η επιφανειακή δράση του ανιόντος είναι μικρή, φαινόμενα διάχυσης σε υψηλότερες συγκεντρώσεις μπορούν να επιβάλουν ανταγωνισμό μεταξύ αναλύτη και οξέος στην διεπιφάνεια. Το σύνολο αυτής της θεώρησης μπορεί να εξηγήσει την αύξηση του σήματος και στον αρνητικό ιοντισμό με την προσθήκη οξικού οξέος αλλά και την μείωση της έντασης

στην υψηλότερη οξύτητα που δοκιμάστηκε 1.0% με την πηγή V-EASI, σε θετικό και αρνητικό ιοντισμό λόγω ανταγωνισμού στην διεπιφάνεια υγρού-αέρα .

3.5. Πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες είναι τα πιο πολυδύναμα μακρομόρια στους ζώντες οργανισμούς και εξυπηρετούν βασικές λειτουργίες σε όλες σχεδόν τις βιολογικές διεργασίες. Λειτουργούν ως καταλύτες (ένζυμα), μεταφορείς οξυγόνου, διαβιβαστές νευρικών ώσεων και πολλά άλλα³¹. Οι πρωτεΐνες είναι μακρομόρια πολυμερή και δομούνται από 20 διαφορετικά αμινοξέα. Όλα τα αμινοξέα αποτελούνται από ένα κεντρικό άτομο άνθρακα συνδεδεμένο με μια αμινική ομάδα, μια καρβοξυλική ομάδα και μια πλευρική ομάδα που διαφοροποιείται. Τα αμινοξέα σε ουδέτερο διάλυμα έχουν την τάση να συμπεριφέρονται ως αμφοτερικά ιόντα, με την αμινική ομάδα πρωτονιωμένη ($-NH_3^+$) και την καρβοξυλική αποπρωτονιωμένη ($-COO^-$). Σε όξινα pH η αμινική ομάδα θα είναι πρωτονιωμένη και η καρβοξυλική ομάδα ανέπαφη ενώ σε βασικά pH η αμινική ομάδα θα είναι ανέπαφη και η καρβοξυλική ομάδα αποπρωτονιωμένη. Ο βαθμός ιοντισμού της πλευρικής ομάδας εξαρτάται από το είδος της. Έτσι, η αργινίνη και η λυσίνη με πλευρικές ομάδες που τελειώνουν σε γουανιδίνη και αμίνη αντίστοιχα αναμένεται να είναι θετικά φορτισμένες σε ουδέτερα pH, και πολλές φορές αναφέρονται ως βασικά αμινοξέα. Αντιθέτως, το γλουταμινικό και το ασπαραγινικό οξύ με όξινες πλευρικές ομάδες αναμένεται να είναι αρνητικά φορτισμένα σε ουδέτερα pH. Επίσης αποκαλούνται όξινα αμινοξέα.

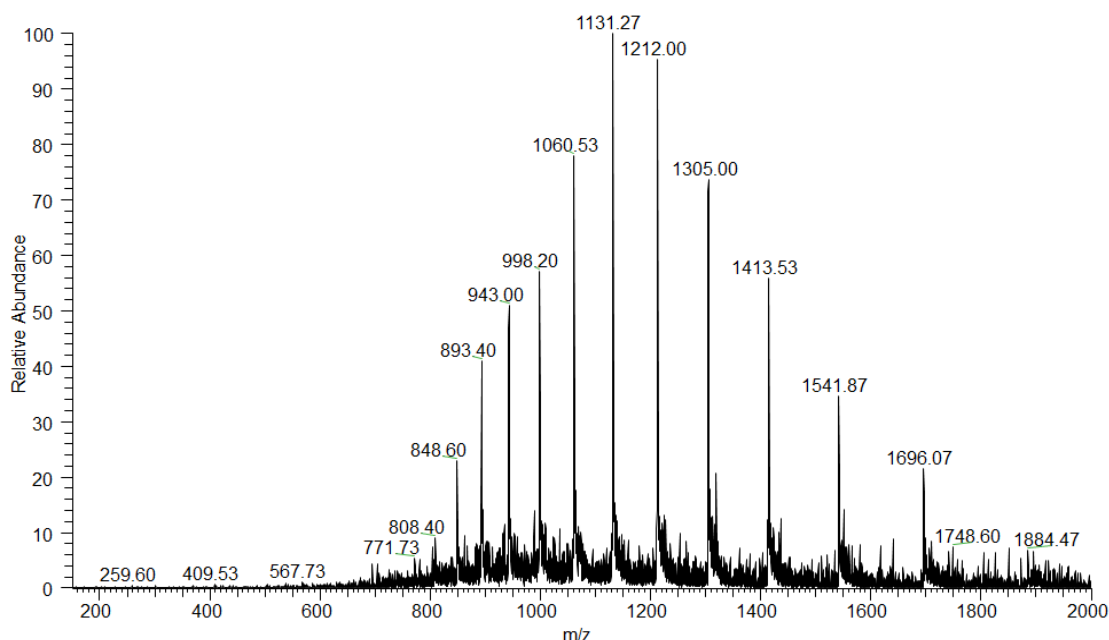
Οι πρωτεΐνες αποτελούνται από πολυπεπτιδικές αλυσίδες αμινοξέων που σχηματίζονται με αντίδραση της α -καρβοξυλικής ομάδας ενός αμινοξέος με την α -αμινική ομάδα ενός δεύτερου αμινοξέος. Με απώλεια ενός μορίου νερού σχηματίζεται ο πεπτιδικός δεσμός. Η αλληλουχία των αμινοξέων που σχηματίζουν την πολυπεπτιδική αλυσίδα είναι μοναδική για κάθε πρωτεΐνη και απόλυτα καθορισμένη. Η απόλυτα καθορισμένη αλληλουχία των αμινοξέων της κάθε πρωτεΐνης ονομάζεται *πρωτοταγής δομή* της πρωτεΐνης. Η *δευτεροταγής δομή* της πρωτεΐνης αναφέρεται στην χωρική τοποθέτηση των αμινοξέων στις πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Η επανάληψη ενός μοτίβου στην δευτεροταγή δομή μιας πρωτεΐνης συναντάται είτε με α -έλικα είτε με β -πτυχωτή επιφάνεια. Η α -έλικα έχει μορφή σπειράματος και μπορεί να είναι δεξιόστροφη ή αριστερόστροφη. Η β -πτυχωτή επιφάνεια αποτελείται από απλωμένες πτυχωσεις που έρχονται σε επαφή με δεσμούς υδρογόνου.



Εικόνα 3.5.1 Τριτοταγής δομή της πρωτεΐνης μυογλοβίνης.

Η τρισδιάστατη δομή (τριτοταγής δομή) της πρωτεΐνης εξαρτάται από τον τρόπο που η πολυπεπτιδική αλυσίδα αναδιπλώνεται στον χώρο. Η αλληλουχία των αμινοξέων παίζει σημαντικό ρόλο στην αναδίπλωση κυρίως με την παρουσία σε συγκεκριμένες θέσεις του αμινοξέος κυστεΐνη που έχει την δυνατότητα να σχηματίζει δισουλφιδικούς δεσμούς με τον εαυτό του. Στις τριτοταγείς δομές παρατηρείται τα άπολα αμινοξέα να βρίσκονται στο εσωτερικό της δομής και τα πολικά αμινοξέα προς το υδατικό περιβάλλον. Για πρωτεΐνες με παραπάνω από μία πολυπεπτιδική αλυσίδα αναφερόμαστε σε *τεταρτοταγή δομή* και εκφράζει την χωροδιάταξη των διαφορετικών υπομονάδων και τις αλληλεπιδράσεις τους, π.χ η ανθρώπινη αιμοσφαιρίνη είναι τετραμερές δύο διαφορετικών πολυπεπτιδικών αλυσίδων.

Το φάσμα μάζας μιας πρωτεΐνης αποτελείται από έναν αριθμό κορυφών σε σχήμα καμπάνας (Εικόνα 3.5.2) που αντιπροσωπεύουν την κατανομή των πολυφορτισμένων κορυφών.



Εικόνα 3.5.2. Φάσμα μάζας μυογλοβίνης από καρδιά αλόγου σε διαλύτη νερό στον θετικό ιοντισμό με πηγή ESI.

Η κατανομή των φορτίων των πρωτεϊνών έχει αναφερθεί ότι συνδέεται με την τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης που αποτελεί τον κυρίαρχο παράγοντα που διαμορφώνει την κατανομή καθώς και η ισορροπία οξέος/βάσης των αμινοξέων των πρωτεϊνών.

Το μοντέλο ισορροπίας οξέος/βάσης³² προβλέπει ότι κατανομή των ιόντων στο διάλυμα είναι αυτή που καθορίζει το σχήμα της κατανομής των πολυφορτισμένων κορυφών. Προτείνεται ότι η σταθερά διάστασης οξέος των αμινοξέων επηρεάζεται από το 'περιβάλλον' τους με αποτέλεσμα την κατανομή διαφορετικών pKa. Με την αύξηση του φορτίου μιας πρωτεΐνης οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ αμινοξέων αυξάνονται μειώνοντας το pKa όξινων αμινοξέων και αυξάνοντας το pKa βασικών αμινοξέων. Το αποτέλεσμα είναι να διαμορφώνεται μια ισορροπία γύρω από την κύρια κορυφή και μια κατανομή σχήματος καμπάνας.

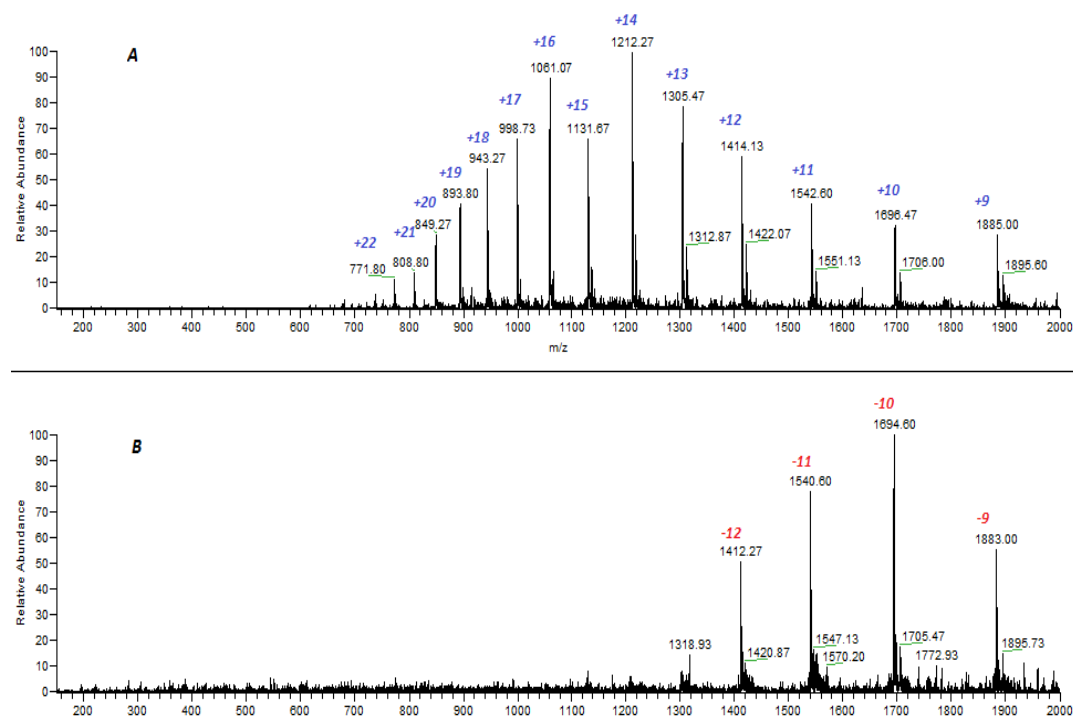
Η τριτοταγής δομή της πρωτεΐνης δηλ, ο τρόπος που η πολυπεπτιδική αλυσίδα διαμορφώνεται στον χώρο προτείνεται ότι καθορίζει τον αριθμό των φορτίων και την

κατανομή των πολυφορτισμένων κορυφών. Οι πρωτεΐνες στην αποδιαταγμένη μορφή τους (χαλάρωση δομής) αναμένεται να παρουσιάζουν την μορφή της εικόνας 3.5.2 ενώ οι μη-αποδιαταγμένες (σε συμπαγή μορφή) αναμένεται να εμφανίζουν πολύ λιγότερα φορτία. Η αποδιάταξη των πρωτεϊνών μπορεί να επιτευχθεί με οξύ, με βάση, με αναγωγικό μέσο (για την αναγωγή των ενδομοριακών δισουλφιδικών δεσμών) και με θερμότητα³³. Η κατανομή των πολυφορτισμένων κορυφών προτείνεται ότι αντικατοπτρίζει τις στερικές παρεμποδίσεις και την προσβασιμότητα των διαφορετικών αμινοξέων από τον διαλύτη.

Μια πιο πρόσφατη ερμηνεία της κατανομής των πολυφορτισμένων κορυφών και της διαφοράς μεταξύ αποδιαταγμένης διαμόρφωσης και κλειστής διαμόρφωσης είναι η πρόταση του Lars Konegmann³⁴ που προτείνει μηχανισμό υπολειματικότητας φορτίου (C.R.M) για τις κλειστές συμπαγείς πρωτεΐνες και τον μηχανισμό εξόδου αλυσίδας (Chain Ejection Model) για τις αποδιαταγμένες πρωτεΐνες. Με βάση την θεώρηση αυτή, οι συμπαγείς πρωτεΐνες είναι πολύ μεγάλες για να επιτρέπουν σχάση της σταγόνας και έτσι ο διαλύτης εξατμίζεται μέχρι τέλους. Επειδή όμως η σταγόνα βρίσκεται συνεχώς στο όριο Rayleigh, η αποχώρηση φορτίων με την μορφή του διαλύτη ή αντισταθμιστικού είναι πιθανή. Έτσι, η σταγόνα χάνει φορτία με αποτέλεσμα το τελικό φάσμα μάζας της πρωτεΐνης να έχει περιορισμένο αριθμό φορτίων. Η αποδιαταγμένη πρωτεΐνη αντιθέτως καταλαμβάνει περισσότερο χώρο ενώ και τα αμινοξέα της εσωτερικής περιοχής της πρωτεΐνης είναι τα πιο υδρόφοβα με αποτέλεσμα την σταδιακή έξοδο της πολυπεπτιδικής αλυσίδας πριν την πλήρη εξάτμιση του διαλύτη και την ταυτόχρονη φόρτιση της με εξισσορόπηση φορτίων μεταξύ της πολυπεπτιδικής αλυσίδας και των φορτισμένων μορίων.

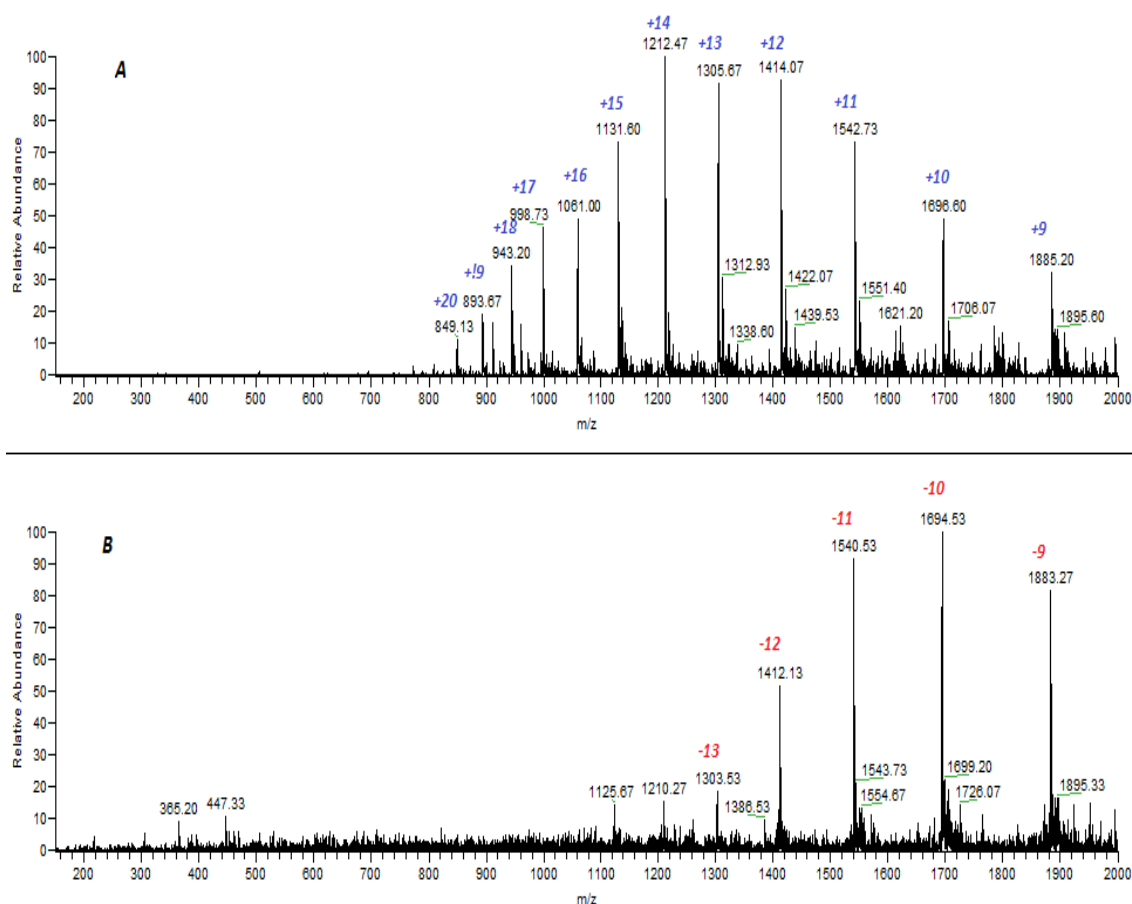
3.5.1 Αποτελέσματα -Συζήτηση της Ανάλυσης Πρωτεϊνών με Φασματομετρία Μάζας

Τα φάσματα μαζών που ελήφθησαν τόσο με V-EASI όσο και με πηγή ηλεκτροψεκασμού παρουσιάζουν σημαντικές ομοιότητες μεταξύ τους. Μια πολύ σημαντική παράμετρος των αποτελεσμάτων της ανάλυσης πρωτεϊνών με φασματομετρία μάζας είναι το εύρος κατανομής των πολυφορτισμένων κορυφών που έχει συνδεθεί με την τριτοταγή δομή τους.



Εικόνα 3.5.3. Ταυτόχρονος εντοπισμός θετικών και αρνητικών ιόντων με διάλυμα μυογλοβίνης 200 ppm, 1% Οξικό Οξύ και εκνεφωτή **TR-C-30**, θερμοκρασία στήλης 300°C και πίεση αερίου εκνέφωσης 40 psi.. **A.** Θετικός ιοντισμός, sid=15 **B.** Αρνητικός ιοντισμός,

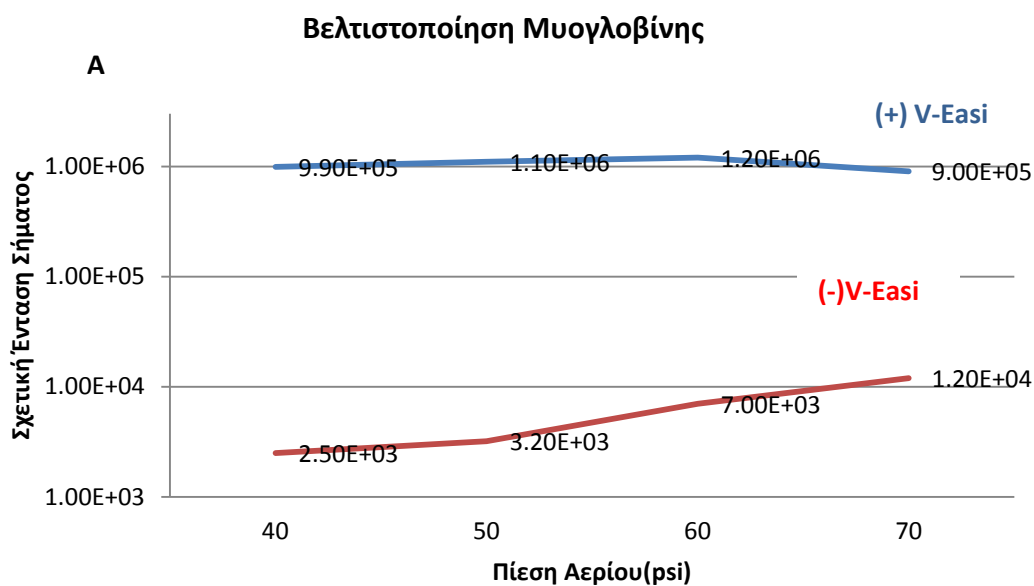
Ένας πρώτος έλεγχος των πιθανών διαφοροποιήσεων των αποτελεσμάτων της ανάλυσης του ίδιου διαλύματος πρωτεΐνης, με διαφορετικούς εκνεφωτές παραγματοποιήθηκε χωρίς όμως την εμβάνυση και μελέτη διαφορετικών συνθηκών. Υδατικό διάλυμα μυογλοβίνης [Horse Heart Myoglobin, $\geq 90.0\%$, Sigma Aldrich] σε νερό με περιεκτικότητα 1% σε οξικό οξύ δοκιμάστηκε με εκνεφωτές Meinhard TR-C-30 και SB-C-50. Οι διαφορετικές γεωμετρίες στην 'μύτη' των εκνεφωτών όπως έχει ήδη αναφερθεί (βλέπε ΚΕΦ 2, υποπαράγραφος 2.2.2), αναμένεται να επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της εκνέφωσης. Η πίεση του αερίου εκνέφωσης ήταν 40 psi και με τους δύο εκνεφωτές και η θερμοκρασία της μεταφορικής στήλης 300°C. Από τα φάσματα των εικόνων 3.5.3 και 3.5.4 φαίνεται ότι τα αποτελέσματα είναι παρόμοια με μόνη διαφορά ότι ο θετικός ιοντισμός με εκνεφωτή TR-C-30 παρουσιάζει μέγιστο φορτίο +22 και ο SB-C-50 +20. Η διαφορά αυτή ωστόσο είναι μικρή ενώ και το δυναμικό αποσυσσωμάτωσης δεν είναι ίδιο στις δύο περιπτώσεις. Επιπλέον, παρα το ότι υπάρχουν όξινες συνθήκες στο διάλυμα, παρατηρούνται αρνητικές κορυφές ταυτόχρονα με τις θετικές αν και η ένταση σήματος ήταν 2 τάξεις μεγέθους χαμηλότερη σε σχέση με τον θετικό ιοντισμό.



Εικόνα 3.5.4. Ταυτόχρονος εντοπισμός θετικών και αρνητικών ιόντων με διάλυμα μυογλοβίνης 200 ppm, 1% Οξικό Οξύ και εκνεφωτή **SB-C-50**, θερμοκρασία στήλης 300°C και πίεση αερίου εκνέφωσης 40 psi.. **A.** θετικός ιοντισμός, sid=5 **B.** αρνητικός ιοντισμός, sid=35.

Η ένταση σήματος των πολυφορτισμένων κορυφών της μυογλοβίνης βελτιστοποιήθηκε ως προς την πίεση του εκνεφωτικού αερίου με τον εκνεφωτή SB-C-50 και σε υδατικό διάλυμα

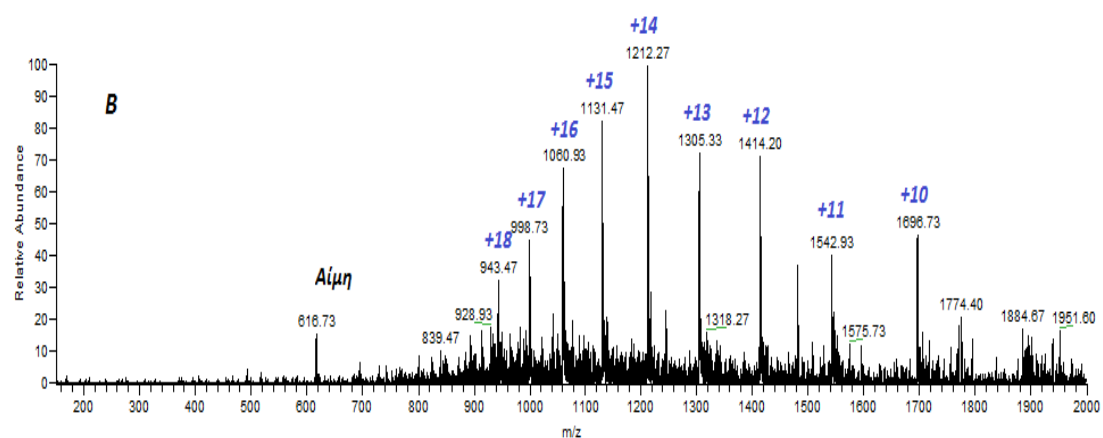
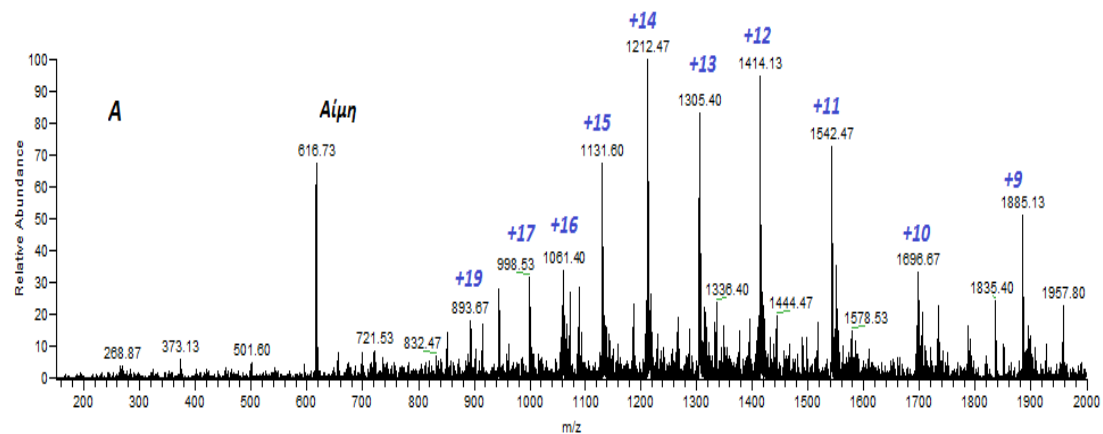
200 ppm 1% σε οξικό οξύ. Επειδή η ανάλυση πρωτεϊνικών πρότυπων δειγμάτων συνήθως αναλύονται σε θερμοκρασίες 200-300 °C, επιλέχθηκε θερμοκρασία μεταφορικής στήλης 250°C, δηλ. η μέση τιμή. Τα αποτελέσματα της βελτιστοποίησης παρουσιάζονται στο γράφημα 3.5.5. Η ένταση σήματος της κύριας κορυφής στον θετικό ιοντισμό δεν μεταβάλλεται σημαντικά με αύξηση της πίεσης του εκνεφωτικού αερίου, αντιθέτως φαίνεται να παραμένει σταθερή με το συγκεκριμένο διάλυμα. Στον αρνητικό ιοντισμό παρατηρείται αύξηση της έντασης σήματος καθώς αυξάνεται η πίεση του αερίου. Άρα, ένα πρώτο συμπέρασμα είναι ότι για τον ταυτόχρονο εντοπισμό θετικών και αρνητικών πολυφορτισμένων κορυφών όξινων υδατικών διαλυμάτων πρωτεϊνών, με την τεχνική V-Easi, ευνοείται σε πιέσεις αερίου 60-70 psi.



B

	Θερμοκρασία Στήλης	Δυναμικό Στήλης(V)	Δυναμικό Φακού Εστίασης (V)	Δυναμικό Αποσυσσωμάτωσης (Sid)
(+) V-EASI	250°C	15	30	30 V
(-) V-Easi	250°C	-80	-95	30 V

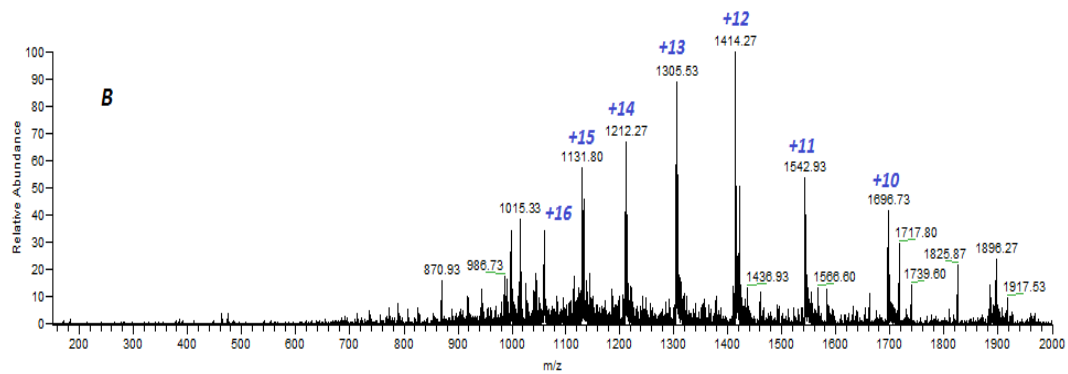
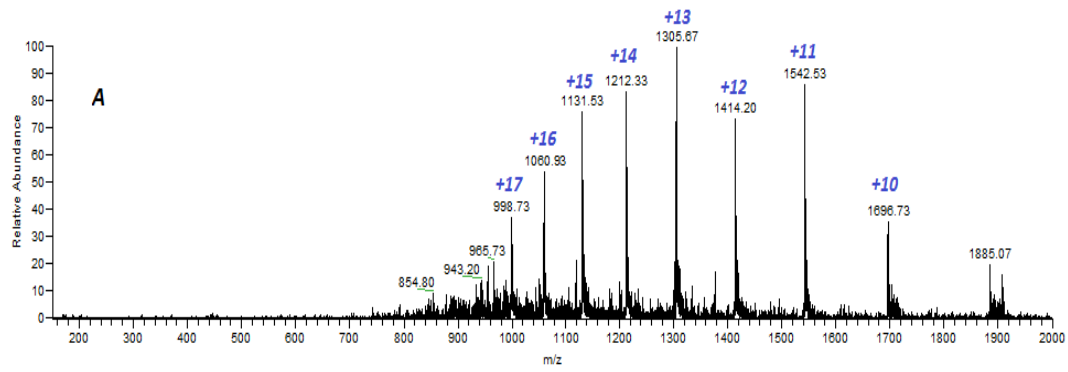
Γράφημα 3.5.5. A. Εξάρτηση της έντασης σήματος της κύριας εκ των πολυφορτισμένων κορυφών της μυογλοβίνης από την πίεση του εκνεφωτικού αερίου. **B.** Συνθήκες οργάνου



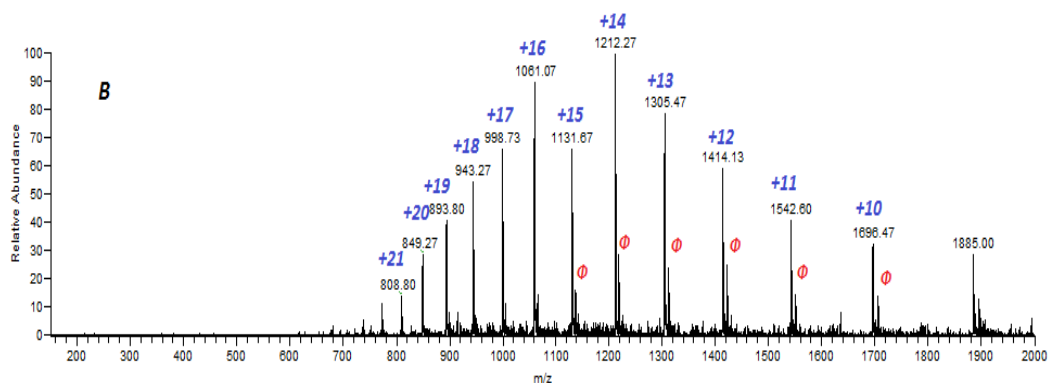
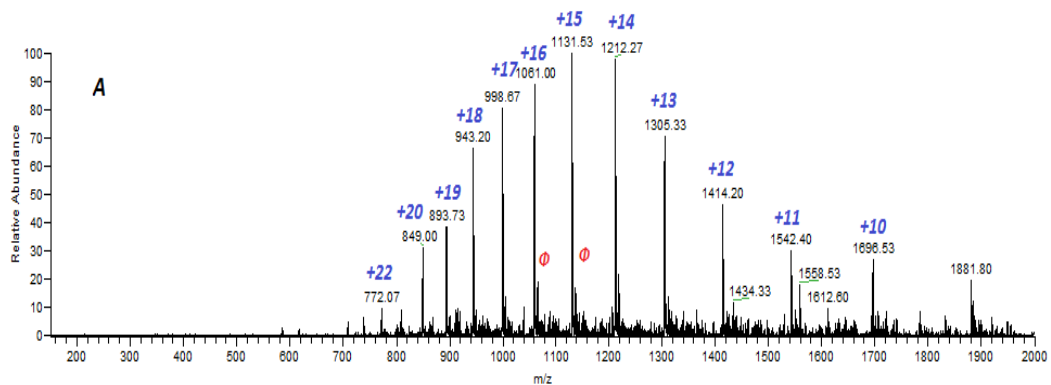
Εικόνα 3.5.6. Φάσματα μαζών δ/τος Μυογλοβίνης σε διαλύτη νερό/μεθανόλη 50:50 (1% Οξικό οξύ). **A. V-EASI** (πίεση αερίου 40 psi, sid=25) **B. ESI** (Δυναμικό Πηγής=5kV, sid=20). Η θερμοκρασία στήλης είναι 200 °C και στις δύο περιπτώσεις.

Στην εικόνα 3.5.6 παρουσιάζονται τα φάσματα μαζών στον θετικό ιοντισμό από διάλυμα μυογλοβίνης 200 ppm, σε νερό/μεθανόλη 50:50 και περιεκτικότητα σε οξύ 1%. Η κατανομή των πολυφορτισμένων κορυφών είναι παρόμοια με τις δύο τεχνικές. Επιπλέον, και με τις δύο πηγές ιοντισμού εντοπίζεται η κορυφή 616.73 που αντιστοιχεί στο πρωτονιωμένο μόριο της αίμης. Η συνδυαστική δράση της μεθανόλης και του οξέος, συμβάλλουν στην πλήρη αποδιάταξη της πρωτεΐνης και την απελευθέρωση της αίμης. Η σύγκριση της ευαισθησίας των δύο πηγών, υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες, ευνοεί τον ηλεκτροψεκασμό με ένταση κύριας κορυφής 10^6 ενώ με την πηγή V-Easi η σχετική ιοντική ισχύ κύριας κορυφής είναι 10^4 .

Η απελευθέρωση της αίμης στο δ/μα δεν συμβαίνει όταν χρησιμοποιείται όξινο υδατικό δ/μα (μέχρι 1%) ενώ και η σχετική ιοντική ισχύς μεταξύ των δύο πηγών είναι παρόμοιας έντασης. Οι εικόνες 3.5.7 και 3.5.8 παρουσιάζουν τα φάσματα μαζών όξινων υδατικών διαλυμάτων της μυογλοβίνης στον θετικό ιοντισμό και με τις δύο πηγές ιοντισμού σε παρόμοιες συνθήκες. Η κατανομή των πολυφορτισμένων κορυφών φαίνεται να καταλήγει σε μεγαλύτερα φορτία με την πηγή V-EASI (μέχρι 22 πρωτόνια) σε σύγκριση με την πηγή ESI. Παρόλα αυτά και επειδή η ροή του υγρού δείγματος με την σύριγγα 250 μl που χρησιμοποιήθηκε, είναι αρκετά μικρότερη σε σχέση με την ροή δείγματος με την πηγή V-EASI, επιβεβαιωμένα συμπεράσματα δεν μπορούν να βγούν, αν δεν ξεκαθαριστεί πρώτα η επίδραση της ροής υγρού στην κατανομή των πολυφορτισμένων κορυφών.



Εικόνα 3.5.7. Φάσματα μαζών υδατικού δ/τος μυογλοβίνης 1% σε οξικό οξύ με ESI. **A.** Θερμοκρασία στήλης 200°C, sid=30. **B.** Θερμοκρασία στήλης 300°C, sid=15. Και στις δύο περιπτώσεις το δυναμικό πηγής είναι 3.5 kV.



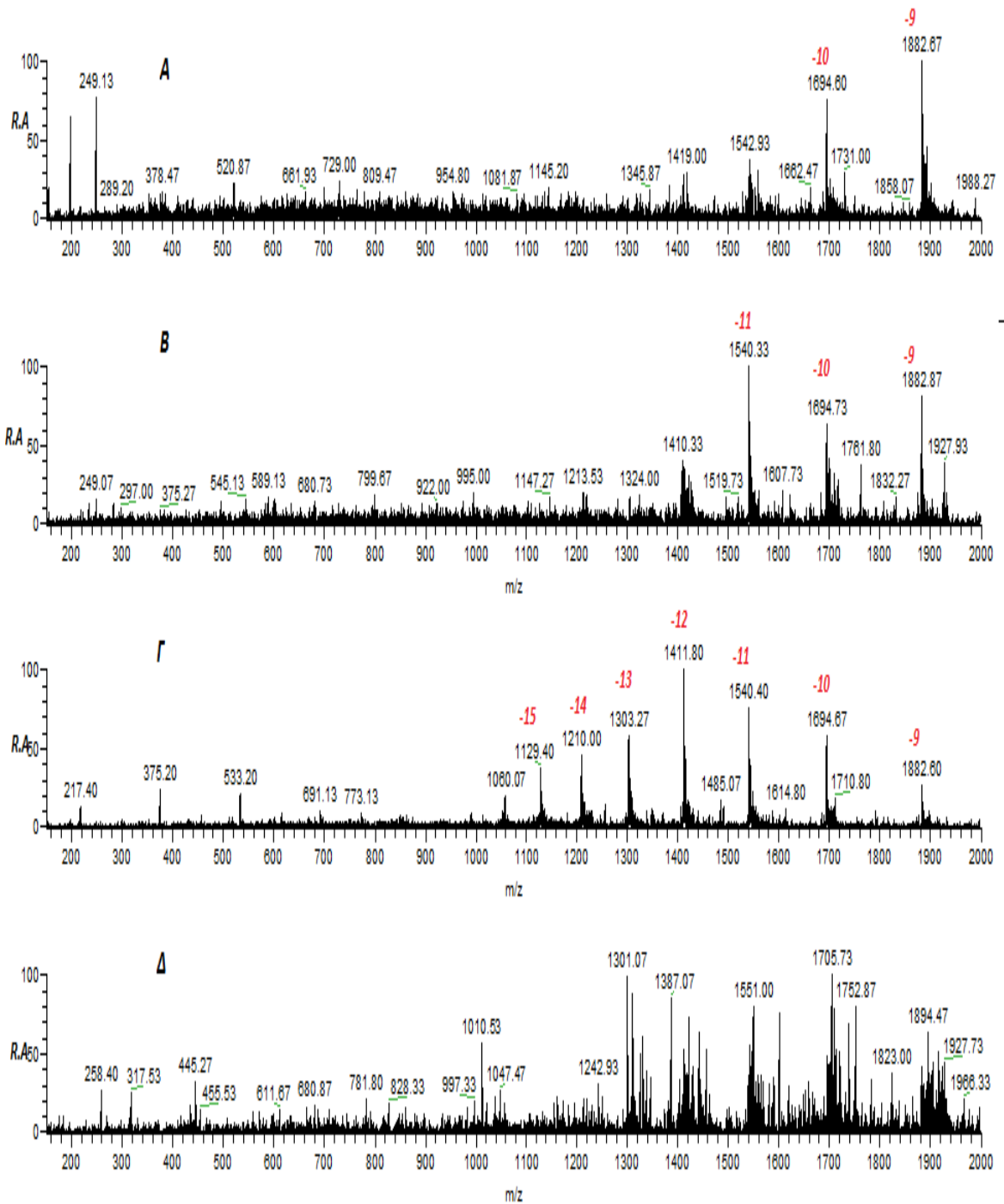
Εικόνα 3.5.8. Φάσματα μαζών υδατικού δ/τος μυογλοβίνης 1% σε οξικό οξύ με V-EASI. **A.** Θερμοκρασία στήλης 200°C, sid=35. **B.** Θερμοκρασία στήλης 300°C, sid=15. Και στις δύο περιπτώσεις η πίεση του αερίου εκνέφωσης είναι 40 psi. Φ: Φωσφορυλιωμένες κορυφές.

Λόγω της ύπαρξης των αρνητικών κορυφών της μυογλοβίνης, σε όξινα δ/τα, ένας αριθμός πειραμάτων πραγματοποιήθηκε, σχετικά με τις ιδιότητες του δ/τος στις οποίες έχουμε καλύτερη ευαισθησία αλλά και μεγαλύτερο αριθμό κορυφών στον αρνητικό ιοντισμό.

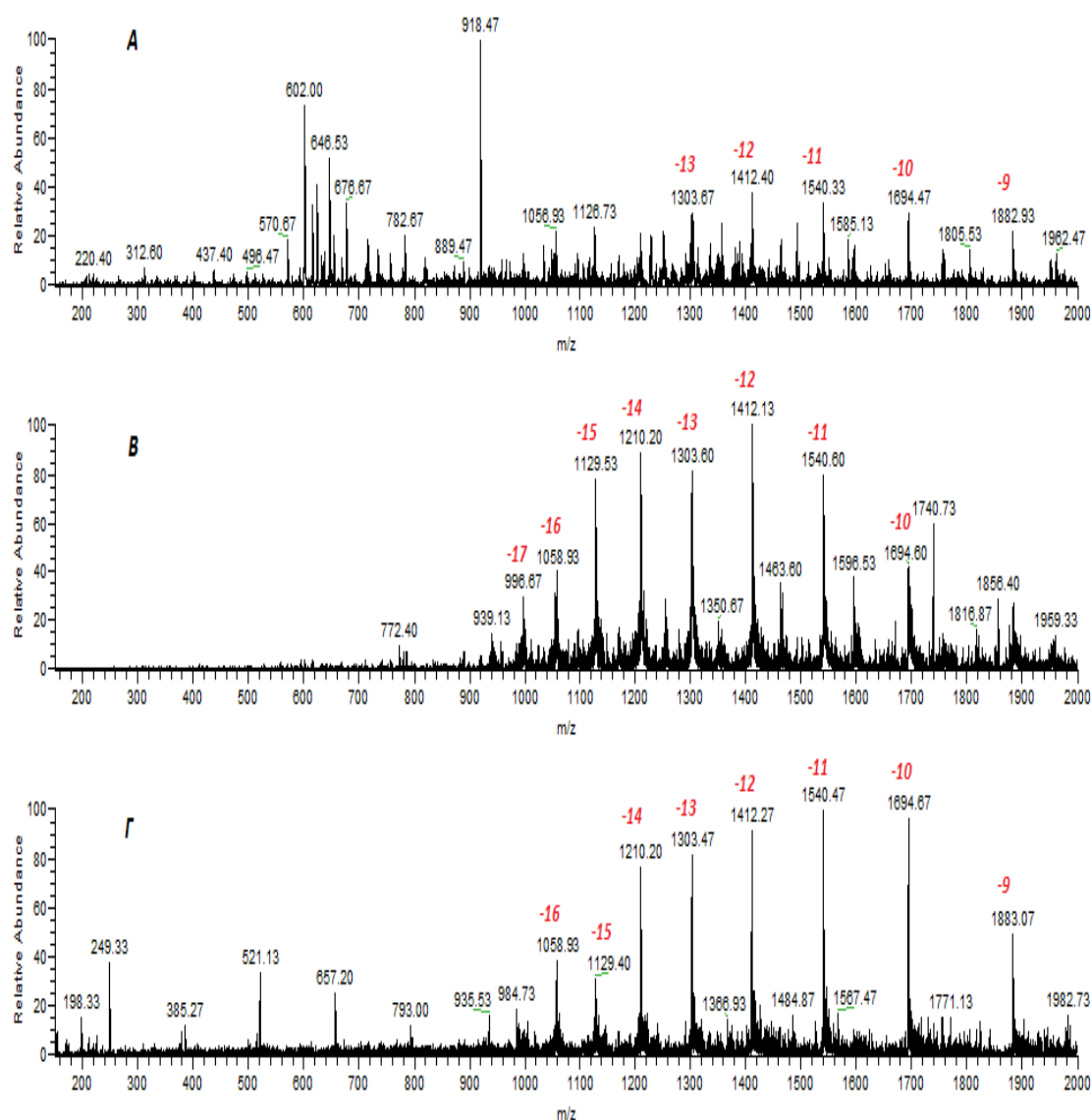
Στην εικόνα 3.5.9 παρουσιάζονται ενδεικτικά φάσματα, όπου η συγκέντρωση της μυογλοβίνης και η οξύτητα του δ/τος αλλάζουν. Το καλύτερο αποτέλεσμα, μέχρι στιγμής, είναι σε συγκέντρωση 100 ppm και οξύτητα 0.1% (σε οξικό οξύ). Αυτό το φάσμα καταγράφηκε με πηγή ιοντισμού V-EASI ενώ το ίδιο δ/μα με πηγή ιοντισμού ESI δεν δίνει το ίδιο αποτέλεσμα. Η παρουσία του κατάλληλου αντισταθμιστικού ιόντος και ο ανταγωνισμός για την κορυφή της σταγόνας φαίνεται να είναι σημαντικοί παράγοντες, στον εντοπισμό αρνητικά φορτισμένων κορυφών σε όξινα δ/τα μυογλοβίνης, με την πηγή V-EASI.

Πέρα από τα ελαφρά όξινα pH, έγινε έλεγχος επίσης σε ελαφρά βασικά pH, χρησιμοποιώντας υδατικό δ/μα αμμωνίας 2.5% για την ρύθμιση. Σε δ/μα νερό/μεθανόλη 50:50, 100 ppm και σε pH~9 (έλεγχος με πεχαμετρικό χαρτί) το φάσμα μαζών αρνητικού ιοντισμού με την πηγή ESI είναι το καλύτερο από αυτά που αποκτήθηκαν. Το ίδιο δ/μα ωστόσο, με πηγή V-EASI, δεν αποδίδει την ίδια ποιότητα φάσματος, με πολύ σημαντικές παρεμβολές στο φάσμα. Τέλος, στην εικόνα 3.5.10 Γ. φαίνεται το αρνητικό φάσμα μαζών με πηγή V-EASI σε υδατικό δ/μα μυογλοβίνης 1% σε οξικό οξύ μετά από προσθήκη δ/τος NH₃. Μέτρηση pH στο συγκεκριμένο δ/μα δεν πραγματοποιήθηκε αλλά λόγω της παρουσίας οξέος αναμένεται το pH είναι κοντά στην ουδέτερη ή ελαφρά βασική περιοχή.

Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι με χρήση πηγής ηλεκτροψεκασμού, ο αρνητικός ιοντισμός ευνοείται σε βασικά pH, όπως είναι το αναμενόμενο με βάση την αρχή της χημικής ισοροπίας. Με την χρήση της πηγής υπερηχητικής εκνέφωσης όμως τον κυρίαρχο ρόλο φαίνεται να παίζει το αντισταθμιστικό ανιόν του οξικού. Η ικανότητα του οξικού ανιόντος να δρά ως βάση στην αέρια φάση είναι πιθανότατα ο λόγος που παρατηρούνται οι αρνητικές κορυφές. Έτσι, και στην περίπτωση του φάσματος της εικόνας 3.5.9 Γ. είναι το αντισταθμιστικό ανιόν που λειτουργεί ευνοικά στον εντοπισμό των αρνητικών κορυφών αφού η αμμωνία κατανάλωσε έναν αριθμό υδρογονοκατιόντων. Μια ακόμα σημαντική παράμετρος είναι ο διαλύτης αφού με πηγή V-EASI τα καλύτερα φάσματα μάζας καταγράφηκαν σε διαλύτη νερό ενώ όπως έχουμε προαναφέρει ο αρνητικός ιοντισμός ευνοείται παρουσία μεθανόλης με πηγή ESI. Τελικά, το κατά πόσο ο διαλύτης επηρεάζει σημαντικά τις διαφοροποιήσεις που παρατηρήθηκαν πρέπει να επιβεβαιωθεί σε μελλοντικά πειράματα. Άξιο αναφοράς είναι ότι η επίδραση του αντισταθμιστικού ανιόντος του οξικού επιβεβαιώνεται και με την μυογλοβίνη μετά την επίδραση της οξύτητας στο τριπεπτιδίο L-ανηγμένη Γλουταθειόνη. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι ανάλογα με την πηγή ιοντισμού η χημική σύσταση του δ/τος που ευνοεί την δημιουργία αρνητικά φορτισμένων πρωτεϊνών (μυογλοβίνη) μεταβάλλεται και ως συμπέρασμα αυτού το μοντέλο ισοροπίας οξέος/βάσης σίγουρα δεν αρκεί για να εξηγήσει τα αποτελέσματα αυτά.



Εικόνα 3.5.9. Αρνητικός ιοντισμός **Α.** V-EASI σε υδατικό δ/μα μυογλοβίνης 50 ppm, 0.5% σε οξύ. **Β.** V-EASI σε υδατικό δ/μα μυογλοβίνης 100 ppm, 0.05% σε οξύ. **Γ.** V-EASI σε υδατικό δ/μα μυογλοβίνης 100 ppm, 0.1% σε οξύ. **Δ.** ESI σε υδατικό δ/μα μυογλοβίνης 100 ppm, 0.1% σε οξύ. Σε όλες τις περιπτώσεις η θερμοκρασία στήλης είναι 300°C και πίεση του αερίου ήταν 60 psi.

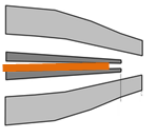


Εικόνα 3.5.10. Αρνητικός ιοντισμός **A.** V-EASI σε δ/μα νερό/μεθανόλη 50:50 μυογλοβίνης 100 ppm, NH₃ (pH~9). **B.** ESI σε δ/μα νερό/μεθανόλη 50:50 μυογλοβίνης 100 ppm, NH₃ (pH~9). **Γ.** V-EASI σε υδατικό δ/μα μυογλοβίνης 100 ppm, 1% σε οξύ και μετά προσθήκη NH₃. Σε όλες τις περιπτώσεις η θερμοκρασία στήλης είναι 300°C και πίεση του αερίου ήταν 60 psi.

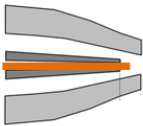
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Βελτιστοποίηση Πηγής Ιοντισμού V-EASI

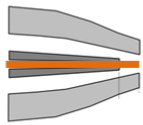
Μετά από ένα αριθμό πειραμάτων και με την πηγή V-EASI, έγινε εμφανές ότι ένας αριθμός πειραματικών παραμέτρων επηρέαζε σημαντικά την ευαισθησία της. Η βελτιστοποίηση των παραμέτρων αυτών και η εξερεύνηση των ορίων της τεχνικής μας απασχόλησε και μελετήθηκε. Οι παράγοντες που επηρεάζουν σημαντικά την ευαισθησία της πηγής V-EASI είναι το μήκος του τριχοειδούς σωλήνα τηγμένου πυριτίου, η θέση του τριχοειδή σωλήνα ως προς την άκρη του ομοκεντρικού εκνεφωτή, η πίεση του αερίου αζώτου (εκνεφωτικό αέριο), η σύσταση του μείγματος διαλυτών και οι φυσικοχημικές ιδιότητες του αναλύτη. Η γεωμετρία της εξόδου του εκνεφωτή αναμένεται να παίζει μικρότερο ρόλο αλλά στα πειράματα που παρουσιάζονται ο εκνεφωτής ήταν πάντα τύπου C-type SB-50 και δεν επηρέασε. Επίσης, το μήκος του τριχοειδούς κυμαινόταν από 27-30 εκατοστά σε όλες τις περιπτώσεις. Η ρύθμιση της θέσης του τριχοειδούς τηγμένου πυριτίου έγινε σε τέσσερις θέσεις με την χρήση του στερεομικροσκοπίου της OLYMPOUS SZX-9.



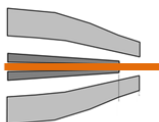
Θέση 1: 1.0-0.8 χιλιοστά πίσω από την άκρη του εκνεφωτή.



Θέση 2: 0.6-0.4 χιλιοστά πίσω από την άκρη του εκνεφωτή.



Θέση 3: Στην άκρη του εκνεφωτή.



Θέση 4: 0.2-0.4 χιλιοστά μπροστά από την άκρη του εκνεφωτή.

Η πίεση του εκνεφωτικού αερίου ορίσθηκε στις τιμές 30, 40, 50, 60 και 70 psi.

4.1 Επίδραση μείγματος διαλυτών στην ροή του υγρού δείγματος

Η χρήση μείγματος διαλυτών νερού/μεθανόλης είτε νερού/ακετονιτριλίου σε εφαρμογές υγρής χρωματογραφίας με πηγή ιοντισμού ηλεκτροψεκασμού είναι γνωστό πώς λειτουργεί αποδοτικά. Σημαντικό ρόλο σε αυτό παίζει η καλή διαλυτότητα σε αυτά τα μείγματα των πολικών ενώσεων αλλά και η μείωση της επιφανειακής τάσης από τον πολικό οργανικό διαλύτη. Για την καλύτερη κατανόηση των αποτελεσμάτων, δεδομένα ροών στις τέσσερις διαφορετικές θέσεις που προαναφέρθηκαν, στο εύρος πιέσεων αερίου εκνέφωσης 30 έως 70 psi, καταγράφηκαν σε μείγματα διαλυτών νερού μεθανόλης. Αρχικά, μετρήθηκε η πυκνότητα των μειγμάτων από τον τύπο πυκνότητα = μάζα/όγκος. Δ/μα νερού/μεθανόλης 100:0 όγκου 100 mL βρέθηκε να είναι 99.1 mg. Άρα, η πυκνότητα του νερού στη θερμοκρασία του εργαστηρίου βρέθηκε να είναι 0.991 mg/mL. Με τον ίδιο τρόπο, υπολογίσθηκε και η πυκνότητα των μειγμάτων νερού/μεθανόλης 50:50 και είναι 0.882 mg/mL και νερού/μεθανόλης 10:90 που είναι 0.743 mg/mL. Στη συνέχεια, μετρήθηκε η μάζα των αρχικών διαλυμάτων. Για κάθε θέση του εκνεφωτή, χρησιμοποιήθηκαν τα τρία μείγματα διαλυτών σε πιέσεις του αερίου εκνέφωσης 30, 40, 50, 60, 70 psi. Ο χρόνος ροής του μείγματος, σε όλες τις περιπτώσεις, ήταν 2 λεπτά ενώ μετά γινόταν ζύγιση του δείγματος πριν και μετά. Από την διαφορά μάζας και την πυκνότητα του κάθε μείγματος, υπολογιζόταν ο όγκος του διαλύματος και από εκεί η ροή σε mL/min.

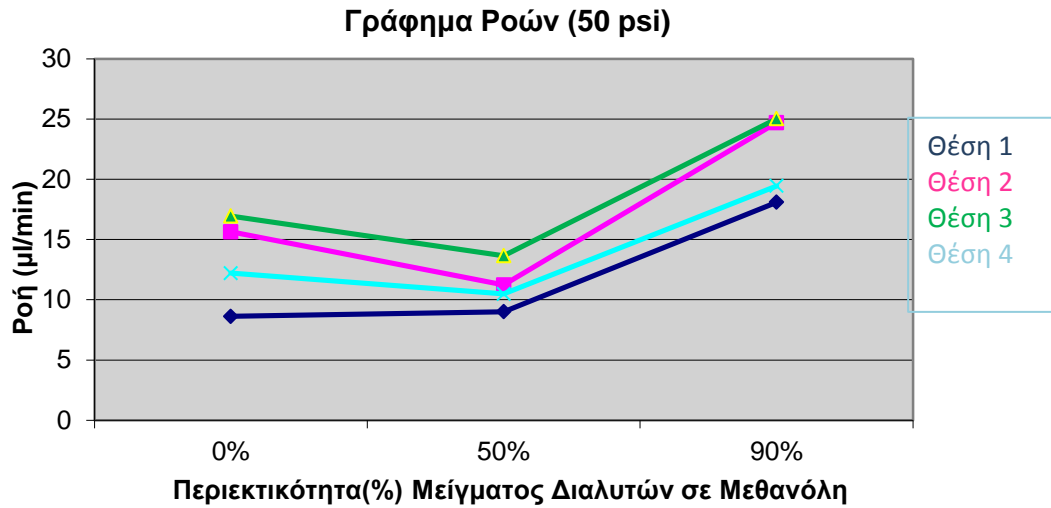
Θέση Τριχοειδούς 1			
	Νερό/Μεθανόλη 100:0	Νερό/Μεθανόλη 50:50	Νερό/Μεθανόλη 10:90
Πίεση Αερίου (psi)	Ροή (μL/min)	Ροή (μL/min)	Ροή (μL/min)
30	7.92	8.33	14.94
40	9.84	8.79	16.69
50	8.63	9.02	18.1
60	7.1	7.14	15.01
70	5.8	6.01	10.7

Θέση Τριχοειδούς 2			
	Νερό/Μεθανόλη 100:0	Νερό/Μεθανόλη 50:50	Νερό/Μεθανόλη 10:90
Πίεση Αερίου (psi)	Ροή (μL/min)	Ροή (μL/min)	Ροή (μL/min)
30	1.31	3	5.85
40	11.75	9.47	18.44
50	15.64	11.22	24.7
60	17.66	13.83	26.31
70	17.61	12.98	24.56

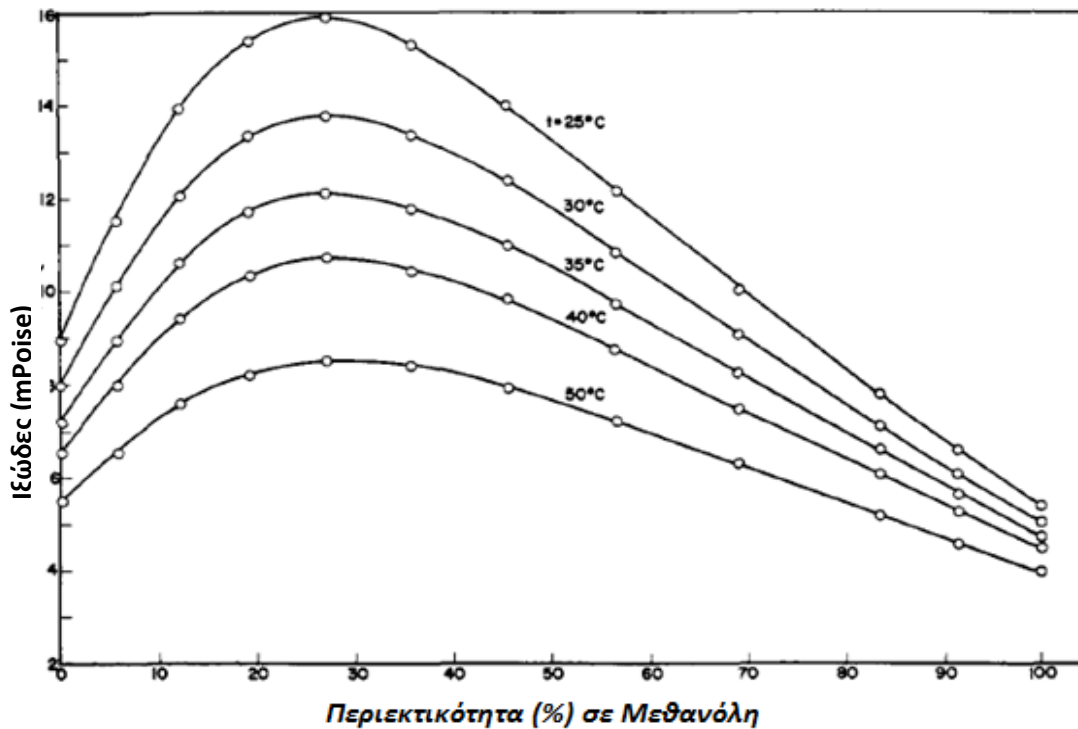
Θέση Τριχοειδούς 3			
	Νερό/Μεθανόλη 100:0	Νερό/Μεθανόλη 50:50	Νερό/Μεθανόλη 10:90
Πίεση Αερίου (psi)	Ροή (μl/min)	Ροή (μl/min)	Ροή (μl/min)
30	12.56	9.52	19.04
40	14.68	11.73	22.81
50	16.95	13.66	25.03
60	14.68	12.98	22.95
70	14.63	11.22	22.88

Θέση Τριχοειδούς 4			
	Νερό/Μεθανόλη 100:0	Νερό/Μεθανόλη 50:50	Νερό/Μεθανόλη 10:90
Πίεση Αερίου (psi)	Ροή (μl/min)	Ροή (μl/min)	Ροή (μl/min)
30	6.96	7.03	13.46
40	9.54	8.39	17.02
50	12.21	10.49	19.45
60	13.32	10.43	19.85
70	13.77	10.26	21

Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν την εξάρτηση της ροής του υγρού δείγματος προς την άκρη του εκνεφωτή, από την πίεση του εκνεφωτικού αερίου αλλά και από την θέση του εκνεφωτή. Στα όρια της πίεσης του αερίου που ελέγχθηκαν, με αύξηση της πίεσης έχουμε αύξηση της ροής υγρού δείγματος ή σταθεροποίηση σε 70 psi. Αυτή η σχέση φαίνεται να διαταράσσεται στη θέση 1. Οι μεγαλύτερες ροές, για ίδιες πιέσεις, παρατηρούνται στις θέσεις 2 και 3, όπου ο τριχοειδής σωλήνας που μεταφέρει το υγρό δείγμα, βρίσκεται κοντά ή ακριβώς στην άκρη του εκνεφωτή. Στην άκρη του εκνεφωτή η πτώση πίεσης λόγω του 'στενέματος' της εξόδου του αερίου, δημιουργεί πιο αποτελεσματική αναρόφηση και εκνέφωση του υγρού δείγματος. Η περιεκτικότητα του μείγματος διαλυτών σε μεθανόλη επηρεάζει σημαντικά την ροή του υγρού δείγματος αλλά όχι με γραμμικό τρόπο. Όπως φαίνεται στο γράφημα 4.1, παρατηρείται μείωση της ροής του μείγματος διαλυτών σε διαλύματα νερού/μεθανόλης 50:50 ενώ σε διαλύματα νερού/μεθανόλης 10:90, οι ροές είναι οι υψηλότερες εκ των τριών. Για να εξηγηθεί αυτή η διαφορά το γράφημα 4.2 περιγράφει πώς η περιεκτικότητα σε μεθανόλη ενός μείγματος νερού/μεθανόλης επηρεάζει το ιξώδες του υγρού. Όπως φαίνεται λοιπόν από το γράφημα 4.2, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (25 °C), το ιξώδες ενός μείγματος νερού/μεθανόλης 50:50 είναι λίγο μεγαλύτερο από το ιξώδες του νερού και όταν η περιεκτικότητα σε μεθανόλη φτάσει το 90% τότε το ιξώδες του μείγματος μειώνεται σημαντικά και γίνεται χαμηλότερο από αυτό του νερού. Το συμπέρασμα είναι ότι η σχέση μεταξύ ιξώδους του μείγματος διαλυτών και ροής είναι αντίστροφη. Εκεί που το ιξώδες μειώνεται η ροή του υγρού αυξάνεται για την ίδια πίεση αερίου.



Γράφημα 4.1. Επίδραση της περιεκτικότητας του μείγματος διαλυτών σε μεθανόλη στην ροή του.



Γράφημα 4.2. Μεταβολή του ιξώδους σε διάφορες θερμοκρασίες, σε σχέση με την περιεκτικότητα σε μεθανόλη, σε μείγματα νερού/μεθανόλης. (Αναφορά 32)

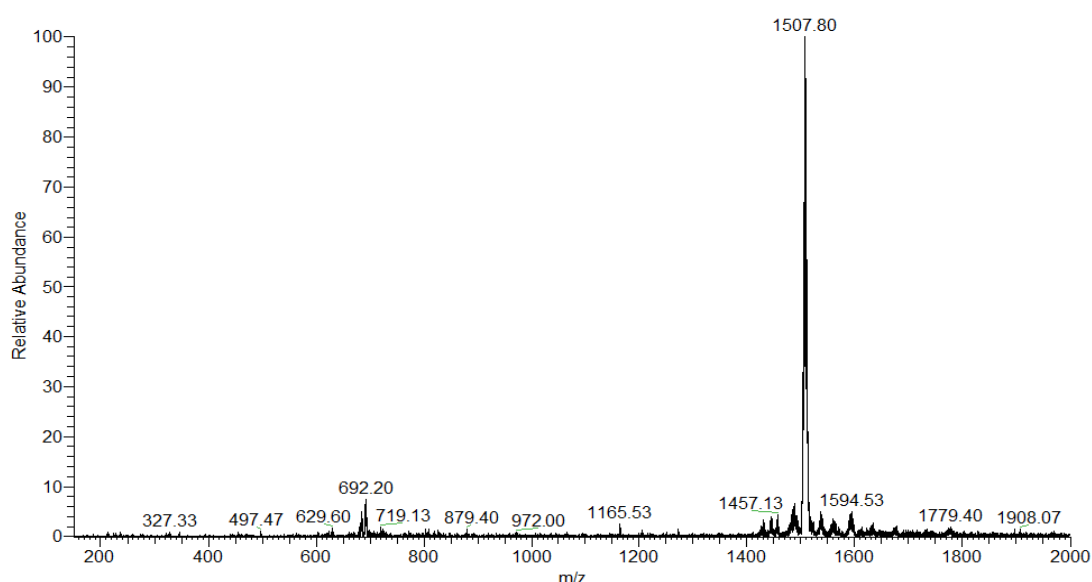
4.2 Επίδραση της θέσης του τριχοειδούς, της πίεσης του εκνεφωτικού αερίου και της περιεκτικότητας σε πολικό οργανικό διαλύτη στην σχετική ένταση ιόντων διαφόρων ενώσεων.

Πειραματική διαδικασία:

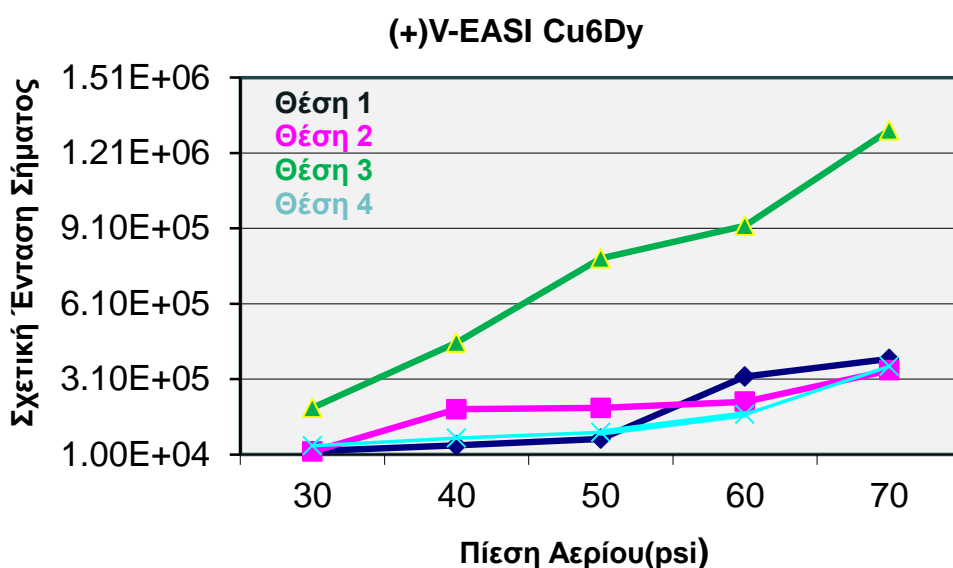
Αρχικά ρυθμιζόταν η θέση του τριχοειδή σωλήνα και σταθεροποιόταν με πλαστικό κοχλία. Η μέτρηση της απόστασης του τριχοειδή από την άκρη του εκνεφωτή γινόταν με την χρήση παχύμετρου Vernier και ενός οπτικού μικροσκοπίου Olympus SZX-9. Σε όλες τις περιπτώσεις, σε μετρήσεις της ίδιας ένωσης, οι ρυθμίσεις του οργάνου (δυναμικό αποσυσσώματωσης (SID), θερμοκρασία μεταφορικής στήλης κτλ.) παρέμεναν σταθερές και μόνο ο διαλύτης ή η θέση του τριχοειδή και η πίεση του αερίου μεταβάλλονταν.

4.2.1 Ένωση Συναρμογής $\text{Cu}_6\text{Dy}(\text{CH}_3\text{COO})_3(\text{NO}_3)_3(\text{OH})_3(\text{AibH})_6$

Τα επταπυρηνικά σύμπλοκα των λανθανιδών διαλύθηκαν σε διαλύτη ακετονιτρίλιο διατηρώντας όμως την ακεραιότητα της δομής τους. Έτσι η ένωση $\text{Cu}_6\text{Dy}(\text{CH}_3\text{COO})_3(\text{NO}_3)_3(\text{OH})_3(\text{aib})_6$ διαλύθηκε σε ακετονιτρίλιο σε συγκέντρωση 50 μέρη ανα εκατομμύριο (ppm). Ο θετικός ιοντισμός επιλέχθηκε για να παρουσιαστούν πιο ασφαλή συμπεράσματα λόγω της πολυπλοκότητας του φάσματος μαζών στον αρνητικό ιοντισμό στην συγκεκριμένη κατηγορία ενώσεων. Η θερμοκρασία της μεταφορικής στήλης ήταν 200°C , το δυναμικό στήλης 24 V και το δυναμικό εστίασης φακού 30 V. Επίσης, το δυναμικό αποσυσσώματωσης (SID) παρέμεινε σταθερά ίσο με 15 V. Σε αυτές τις συνθήκες ανάλυσης, το θετικό φάσμα μαζών παρουσιάζει την μορφή της εικόνας 4.3. Κυριαρχεί λοιπόν, η ψευδομοριακή κορυφή $[\text{M}-\text{NO}_3]^+$ σε μάζα προς φορτίο 1507.8. Η σχετική ένταση της συγκεκριμένης κορυφής συσχετίστηκε με την πίεση του αερίου εκνέφωσης αλλά και την θέση του τριχοειδούς.



Εικόνα 4.3. Φάσμα μαζών της ένωσης $\text{Cu}_6\text{Dy}(\text{CH}_3\text{COO})_3(\text{NO}_3)_3(\text{OH})_3(\text{AibH})_6$ στον θετικό ιοντισμό.

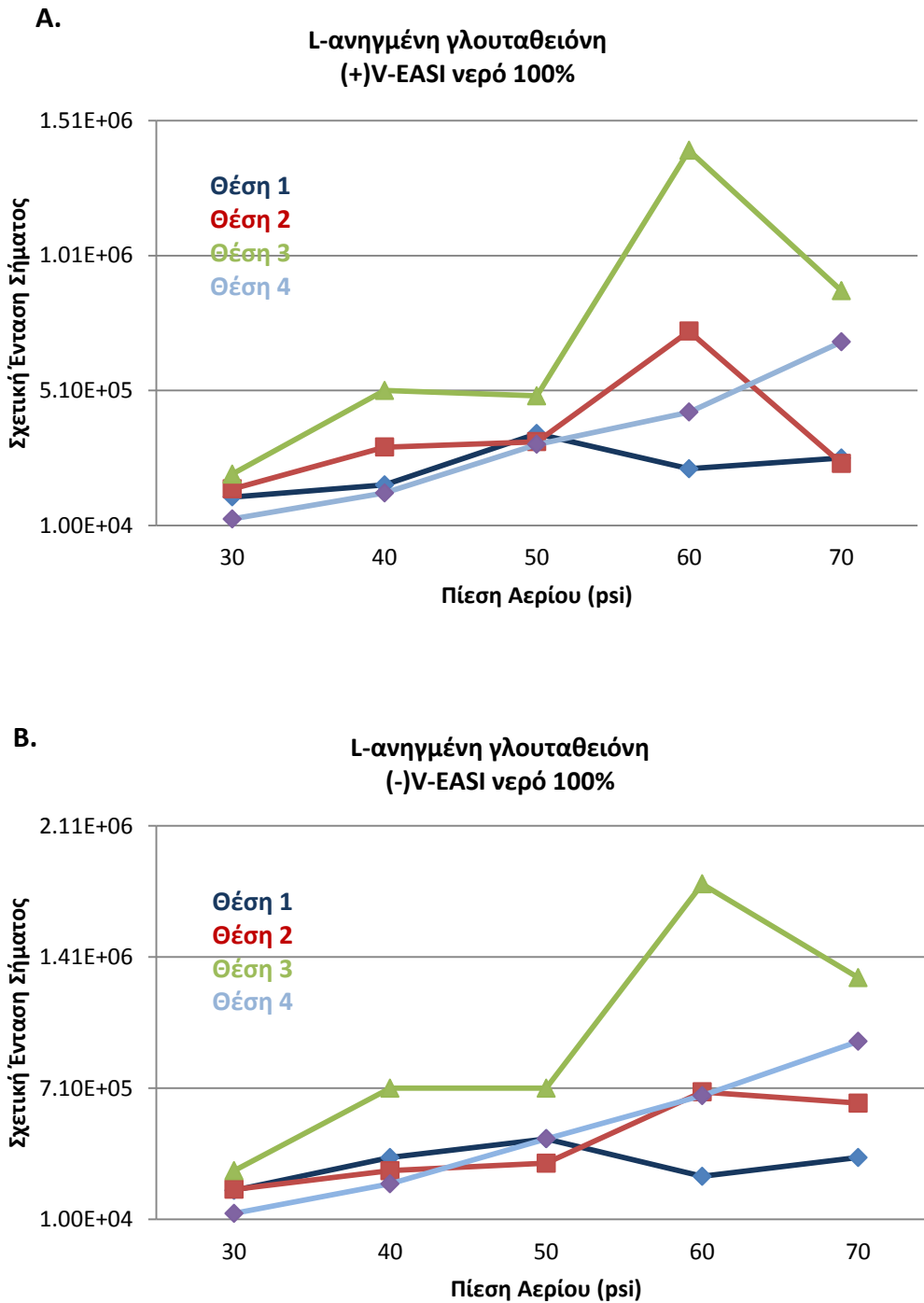


Γράφημα 4.4. Εξάρτηση της έντασης ιόντων της ένωσης $\text{Cu}_6\text{Dy} (\text{CH}_3\text{COO})_3 (\text{NO}_3)_3 (\text{OH})_3 (\text{AibH})_6$ από την πίεση του αερίου εκνέφωσης και από την θέση του τριχοειδούς.

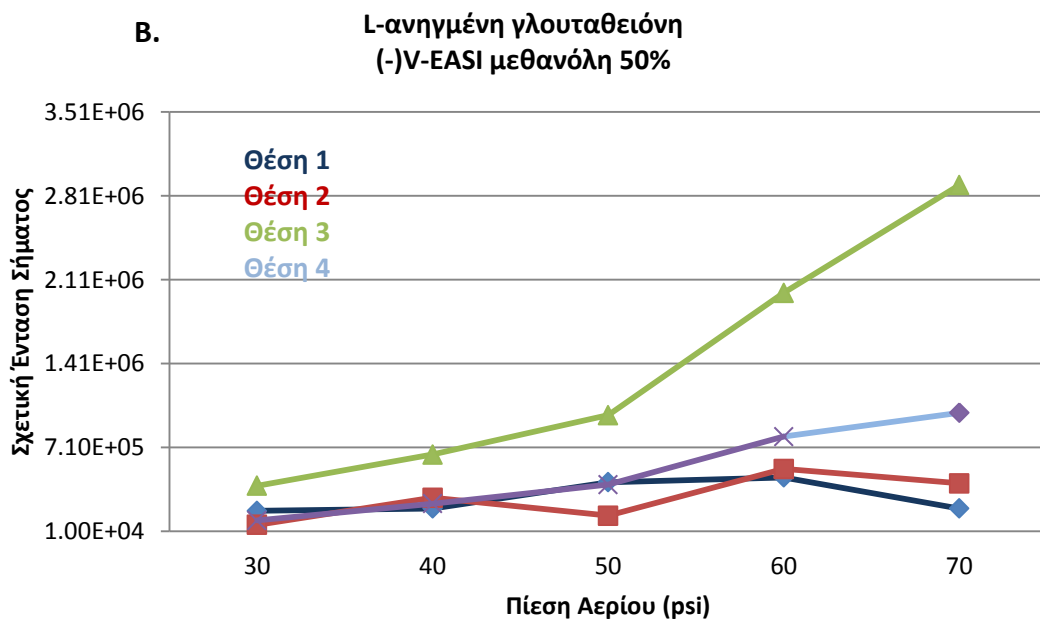
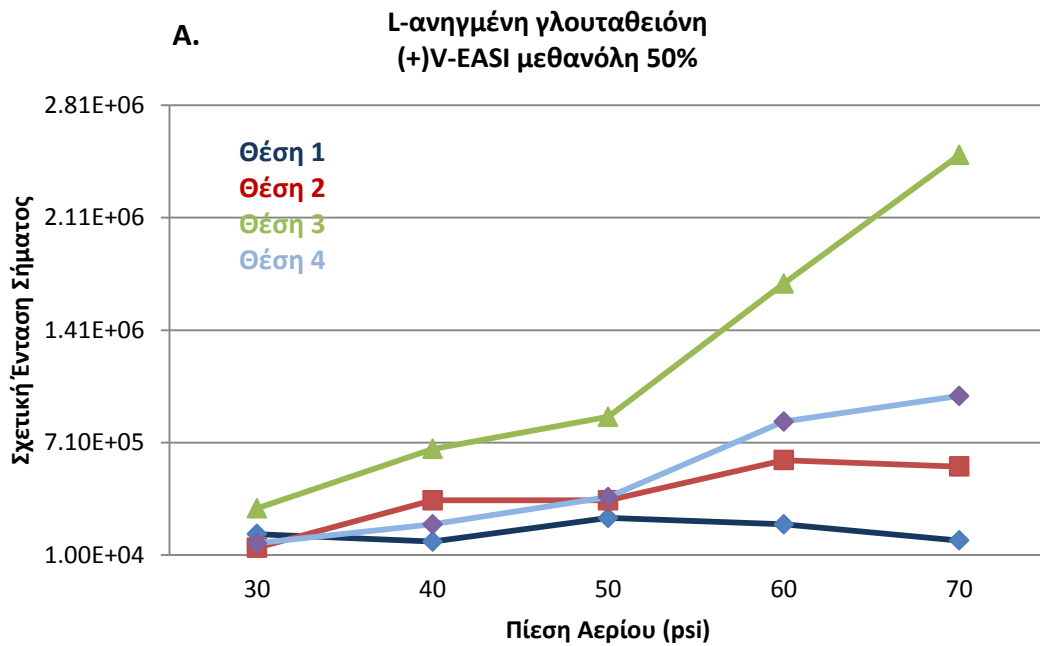
Στο γράφημα 4.4 φαίνεται ότι με αύξηση της πίεσης του αερίου εκνέφωσης αυξάνεται και η ένταση του ιόντος της ένωσης. Επίσης, από όλες τις θέσεις του τριχοειδούς, η θέση 3, δηλ στην άκρη του εκνεφωτή καταγράφηκε η υψηλότερη ένταση ιόντος.

4.2.2 L-Ανηγμένη Γλουταθειόνη

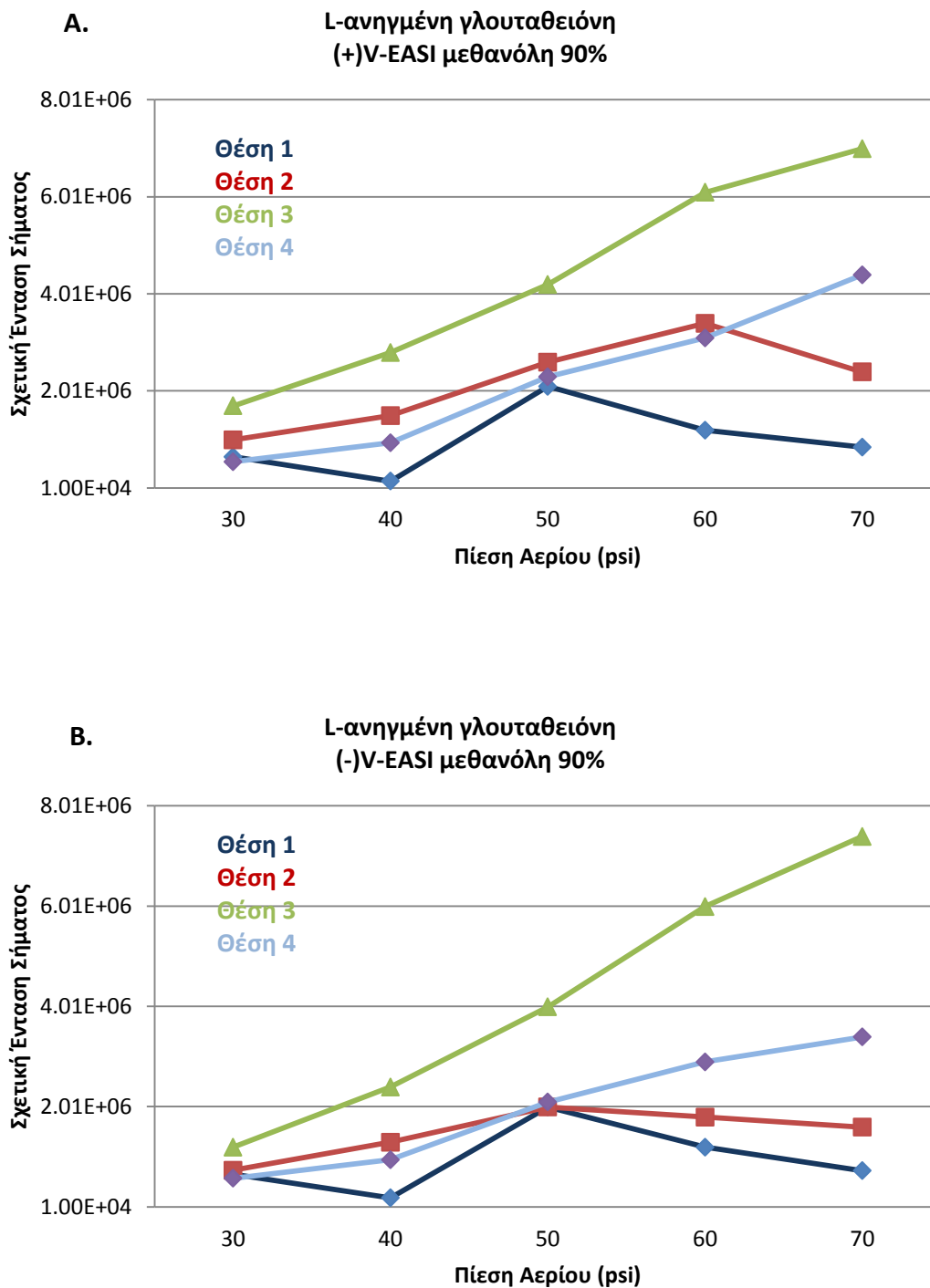
Το τριπεπτίδιο L-ανηγμένη γλουταθειόνη είναι ένα βιομόριο με αντιοξειδωτική δράση. Όπως έχει ήδη εξηγηθεί στο Κεφάλαιο 3, παράγραφος 3.4, η γλουταθειόνη δίνει φάσμα τόσο στον θετικό όσο και στον αρνητικό ιοντισμό και διαλύεται καλά τόσο σε νερό όσο και σε μείγματα νερού με μεθανόλη. Η χρησιμότητα αυτή του αναλύτη βοηθά στην μελέτη της πηγής V-EASI, σε μείγματα διαλυτών σε θετικό και αρνητικό ιοντισμό. Παρασκευάστηκαν τρία διαλύματα L-ανηγμένης γλουταθειόνης (νερό 100%, μεθανόλη 50%, μεθανόλη 90%) με συγκέντρωση 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Η θερμοκρασία της μεταφορικής στήλης ήταν 200°C σε όλες τις περιπτώσεις και το δυναμικό αποσυσσωμάτωσης (SID) 40 V. Το δυναμικό στήλης και το δυναμικό εστίασης φακού ήταν 20V και 30 V αντίστοιχα για τον θετικό ιοντισμό και -60 V και -80 V αντίστοιχα για τον αρνητικό ιοντισμό. Για την μέτρηση της σχετικής έντασης σήματος επιλέχθηκαν τα ιόντα 308.4 και 615.2 του φάσματος μαζών στον θετικό ιοντισμό, που αντιστοιχούν στο πρωτονιωμένο μόριο $[\text{M}+\text{H}]^+$ και στο διμερές μονοκατιόν $[2\text{M}+\text{H}]^+$, και τα ιόντα 306.5 και 613.3 του φάσματος μαζών στον αρνητικό ιοντισμό, που αντιστοιχούν στο αποπρωτονιωμένο μόριο $[\text{M}-\text{H}]^-$ και στο διμερές ανιόν $[2\text{M}-\text{H}]^-$. Τα ιόντα αυτά είναι κυρίαρχα, σε όλες τις συνθήκες, και άρα αντιπροσωπευτικά της ευαισθησίας της μεθόδου. Να σημειωθεί ότι στα γραφήματα που ακολουθούν η ένταση του διμερούς ιόντος διπλασιάζεται και προστίθεται σε αυτή του μονομερούς.



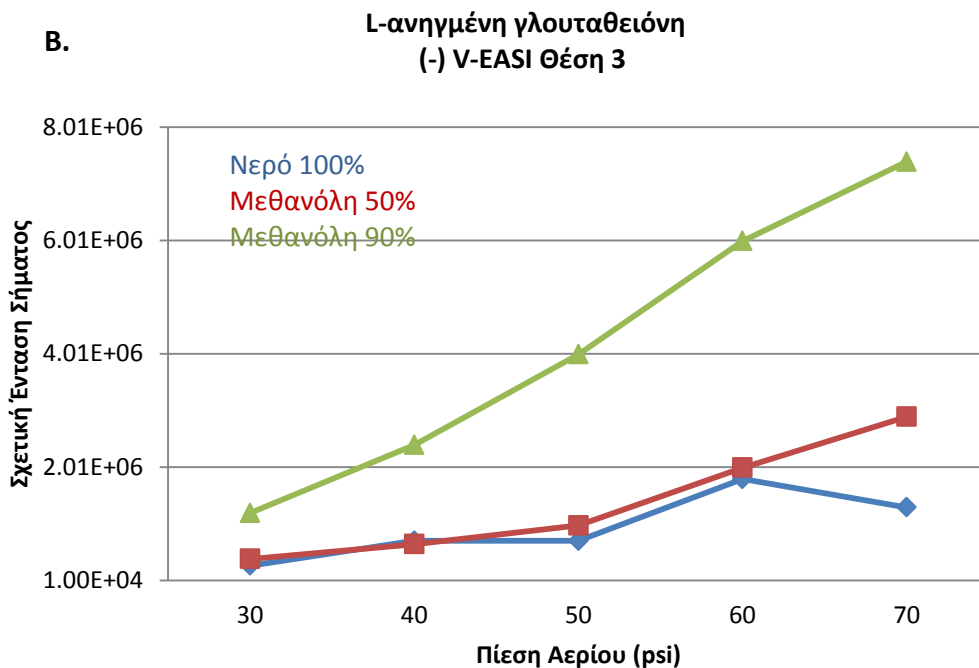
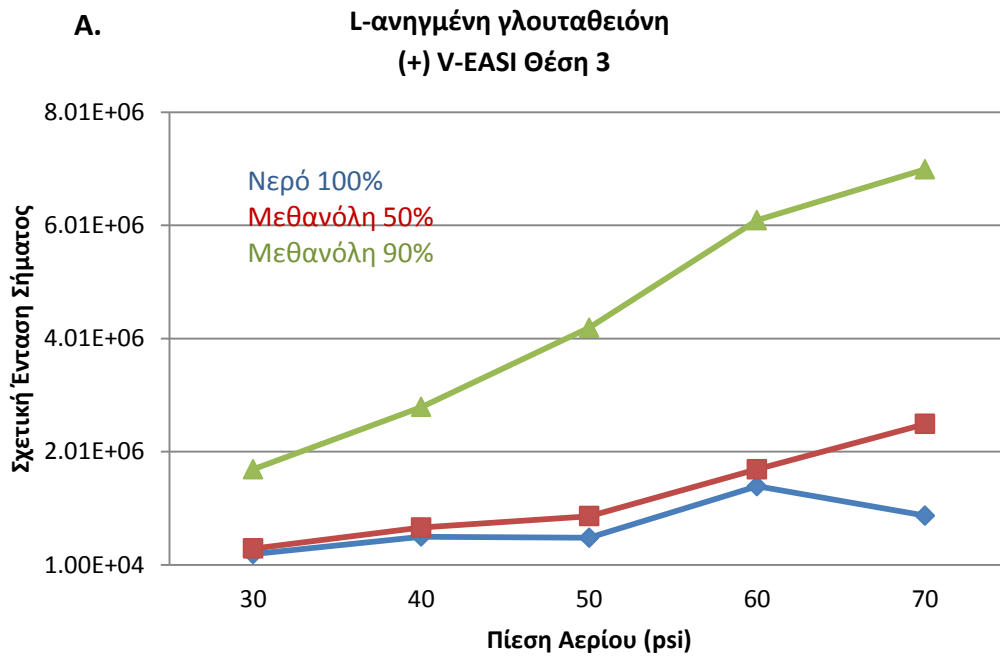
Γράφημα 4.5. Εξάρτηση της σχετικής έντασης των ιόντων του αναλύτη L-ανηγμένη γλουταθειώνη από την πίεση αερίου και την θέση του τριχοειδούς με πηγή ιοντισμού V-EASI. **A.** Θετικός ιοντισμός σε νερό 100%. **B.** Αρνητικός ιοντισμός σε νερό 100%.



Γράφημα 4.6. Εξάρτηση της σχετικής έντασης των ιόντων του αναλύτη L-ανηγμένη γλουταθειώνη από την πίεση αερίου και την θέση του τριχοειδούς με πηγή ιοντισμού V-EASI. **A.** Θετικός ιοντισμός σε νερό/μεθανόλη 50:50 . **B.** Αρνητικός ιοντισμός σε νερό/μεθανόλη 50:50.



Γράφημα 4.7. Εξάρτηση της έντασης των ιόντων του αναλύτη L-ανηγμένη γλουταθειώνη από την πίεση αερίου και την θέση του τριχοειδούς με πηγή ιοντισμού V-EASI. **A.** Θετικός ιοντισμός σε νερό/μεθανόλη 10:90 . **B.** Αρνητικός ιοντισμός σε νερό/μεθανόλη 10:90.



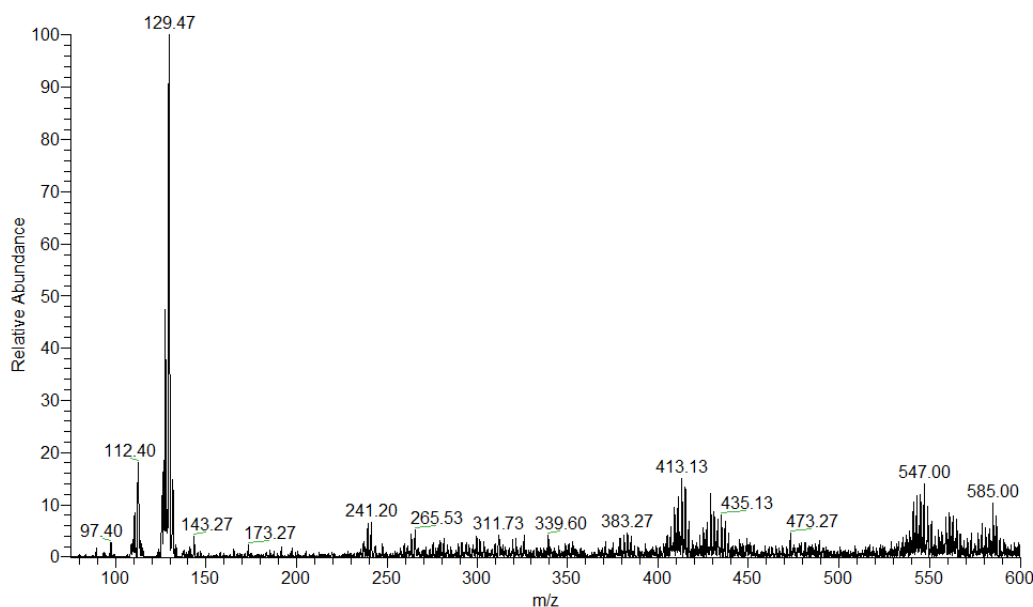
Γράφημα 4.8. Εξάρτηση της έντασης των ιόντων του αναλύτη L-ανηγμένη γλουταθειόνη από την πίεση αερίου και την σύσταση του διαλύτη με πηγή ιοντισμού V-EASI. **A.** Θετικός ιοντισμός στην Θέση 3. **B.** Αρνητικός ιοντισμός στην Θέση 3.

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στα Γραφήματα 4.5, 4.6, 4.7 και 4.8 δείχνουν παρόμοιες τάσεις μεταξύ θετικού και αρνητικού ιοντισμού. Στις περισσότερες των

περιπτώσεων αύξηση της πίεσης του αερίου ισοδυναμεί με αύξηση της έντασης σήματος των ιόντων. Αυτός ο κανόνας φαίνεται να αναιρείται όταν ο τριχοειδής βρίσκεται στη Θέση 1, πιθανώς λόγω συγκρούσεων με το υάλινο εσωτερικό τοίχωμα του εκνεφωτή, αλλά και στις πιέσεις 60-70 psi που η αντίστροφη δυναμική παρατηρείται κάποιες φορές. Επίσης, η σύσταση του μείγματος των διαλυτών επηρεάζει σημαντικά την ένταση των ιόντων. Η μεγαλύτερη ένταση σήματος των ιόντων παρατηρείται σε περιεκτικότητα 90% σε μεθανόλη. Κατα πόσον αυτή η τάση εξηγείται από το ιξώδες του μείγματος και την ροή του δείγματος ή από την μείωση της επιφανειακής τάσης ή και από τα δύο δεν μπορεί να συγκεκριμενοποιηθεί.

4.2.3 Σεληνιώδες Οξύ - Ιππουρικό Οξύ

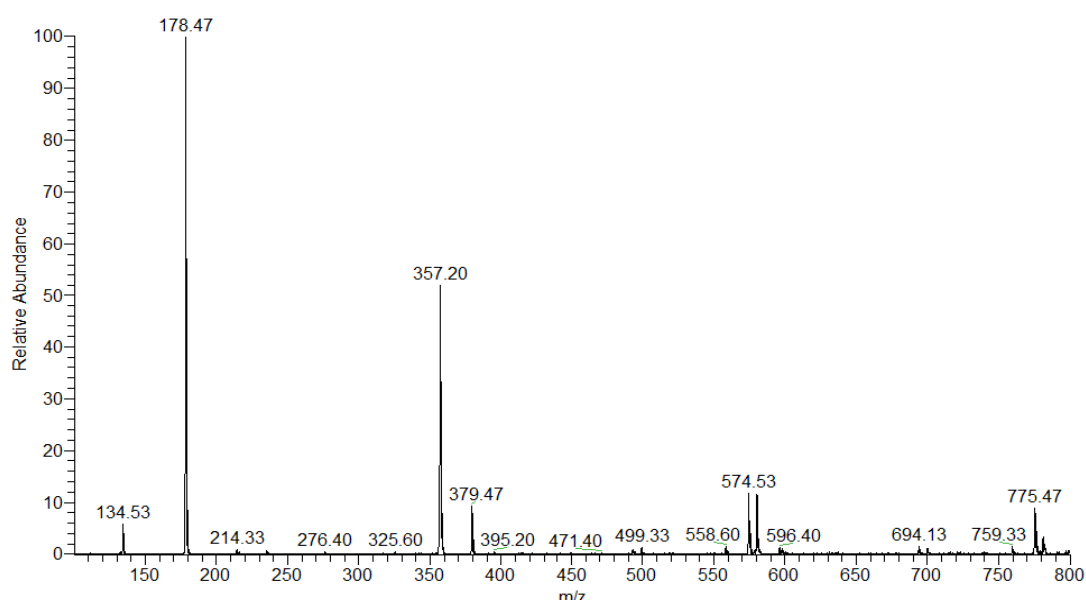
Το σεληνιώδες οξύ είναι ένα ανόργανο διπρωτικό οξύ με μοριακό τύπο SeO_3H_2 [$\geq 97.0\%$, Fluka, Chemika]. Η πρώτη σταθερά διάστασης του σεληνιώδους οξέος είναι $\text{p}K_{a1}=2.64$ και η δεύτερη $\text{p}K_{a2}=8.27$. Το ιππουρικό οξύ ή βενζουλοαμινοαιθανοϊκό οξύ με μοριακό τύπο $\text{C}_9\text{H}_9\text{NO}_3$ [$\geq 97.0\%$, Fluka], είναι ένα μονοπρωτικό οργανικό οξύ με σταθερά διάστασης οξέος $\text{p}K_{a}=3.62$. Η ανάλυση και των δύο οξέων έγινε στον αρνητικό ιοντισμό. Το φάσμα μαζών του σεληνιώδους οξέος έχει την μορφή της εικόνας 4.9. Η κύρια κορυφή με μάζα προς φορτίο 129.47 αντιστοιχεί στο αποπρωτονιωμένο μόριο του οξέος $[\text{M}-\text{H}]^-$ ενώ η κορυφή με μάζα προς φορτίο 112.40 αντιστοιχεί στο αφυδατωμένο οξείδιο SeO_2 . Με πρόσθεση της έντασης των ιόντων των δύο κορυφών υπολογίστηκε η σχετική ένταση που καταγράφηκε για το σεληνιώδες οξύ. Η θερμοκρασία στήλης ρυθμίστηκε στους 200°C και το δυναμικό αποσυσσώματωσης στα 15 V. Το δυναμικό στήλης ήταν -60 V και το δυναμικό εστίασης φακού -80 V.



Εικόνα 4.9. Φάσμα Μαζών του σεληνιώδους οξέος στον αρνητικό ιοντισμό με την πηγή V-EASI.

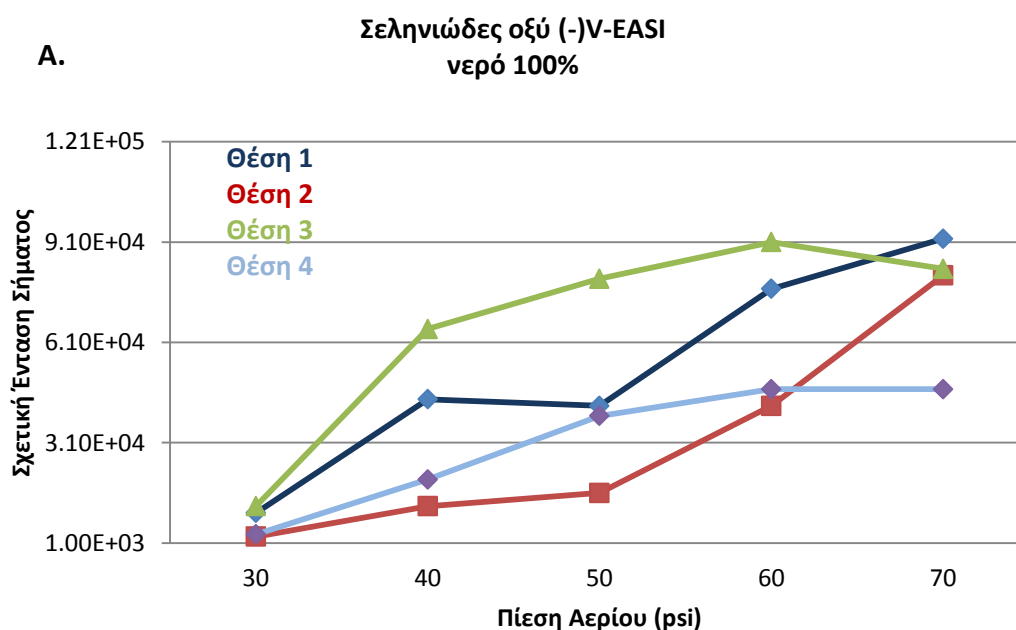
Το φάσμα μαζών του ιππουρικού οξέος έχει την μορφή της εικόνας 4.10. Η κύρια κορυφή 178.47 αντιστοιχεί στο αποπρωτονιωμένο μόριο $[\text{M}-\text{H}]^-$. Η κορυφή 357.20 αντιστοιχεί στο διμερές ανιόν $[\text{2M}-\text{H}]^-$ και η κορυφή 379.47 στο διμερές ανιόν με ένα νάτριο $[\text{2M}+\text{Na}-\text{2H}]^-$.

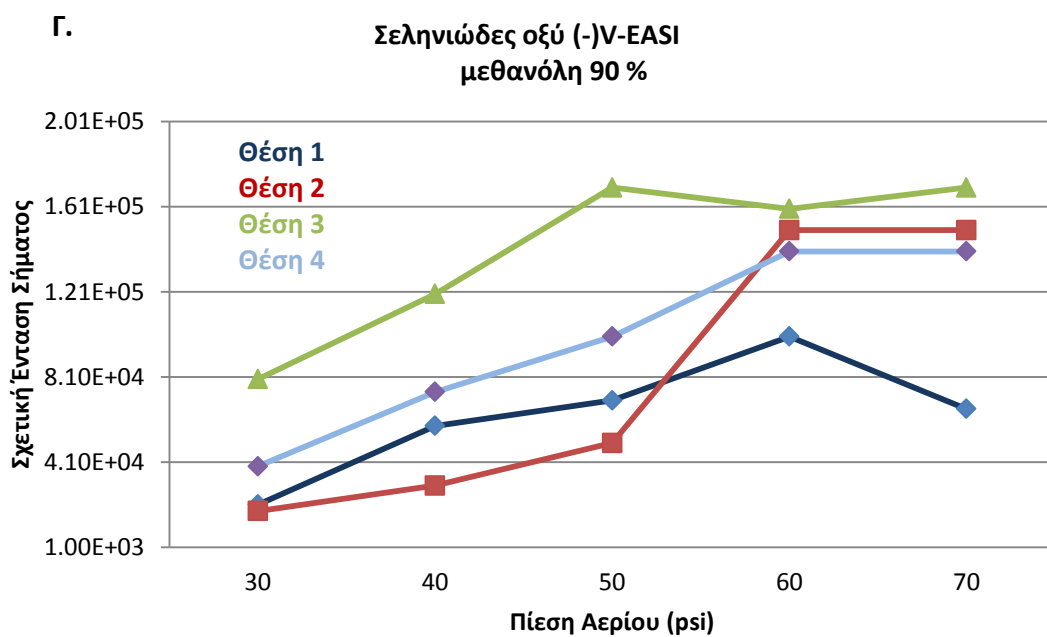
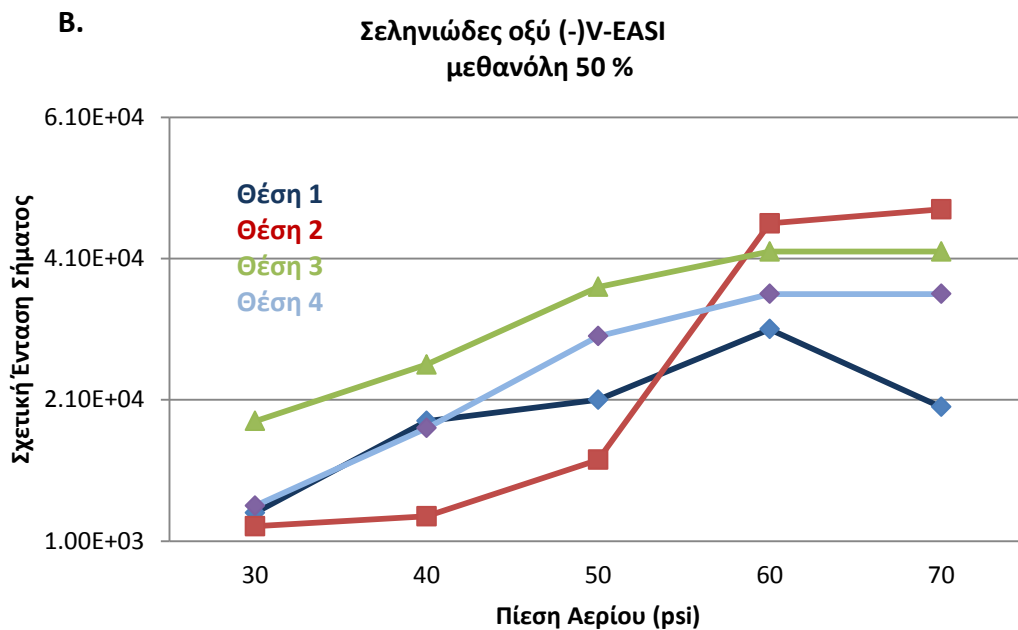
Η κορυφή 574.53 αντιστοιχεί σε τριμερές του ιππουρικού οξέος $[3M+K-2H]^-$ όπως και η κορυφή 580.3 που αντιστοιχεί στο $[3M+2Na-3H]^-$. Τέλος η κορυφή 775.47 αντιστοιχεί στο τετραμερές $[4M+Na+K-3H]^-$. Η σχετική ένταση υπολογίστηκε με πρόσθεση της έντασης των κορυφών και πολλαπλασιασμό τους επί τον αριθμό των μονομερών της ένωσης (π.χ επί 4 η ένταση του τετραμερούς). Η θερμοκρασία στήλης ρυθμίστηκε στους 300°C και το δυναμικό αποσυσσώματωσης στα 5 V. Το δυναμικό στήλης ήταν -62 V και το δυναμικό εστίασης φακού -35 V.



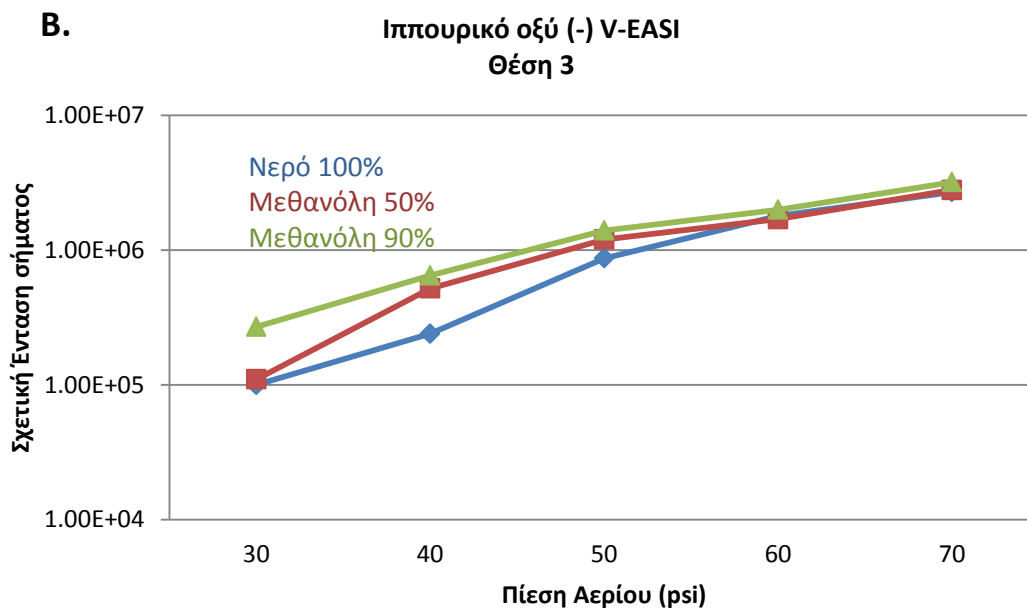
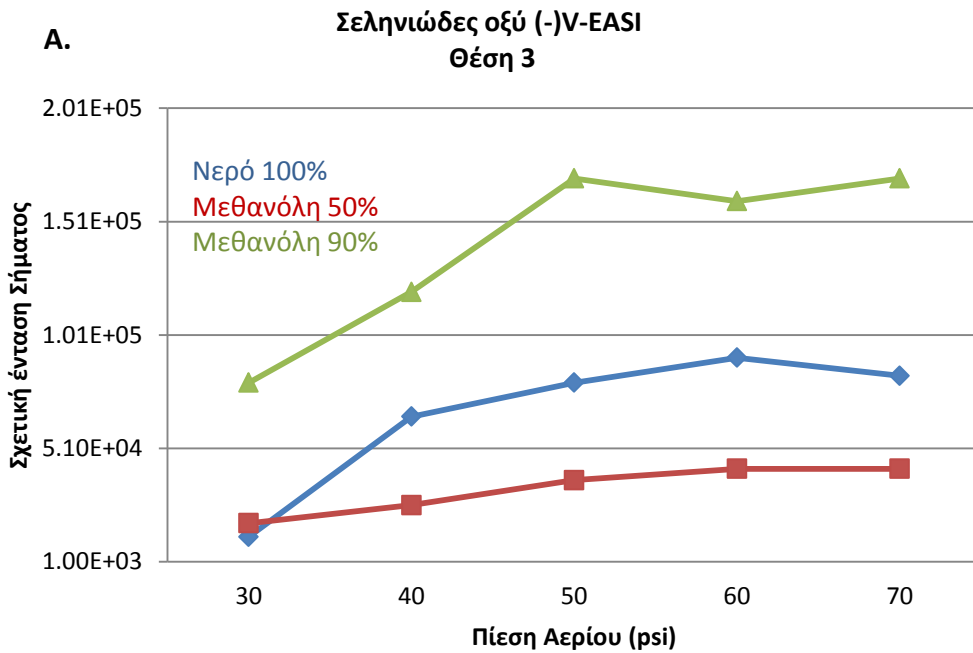
Εικόνα 4.10. Φάσμα Μαζών του Ιππουρικού Οξέος στον Αρνητικό Ιοντισμό με την πηγή V-EASI.

Παρασκευάστηκαν τρία διαλύματα αεληνιώδους οξέος (νερό, νερό/μεθανόλη 50:50, νερό/μεθανόλη 10:90) συγκέντρωσης 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ και τρία διαλύματα ιππουρικού οξέος (νερό, νερό/μεθανόλη 50:50, νερό/μεθανόλη 10:90) συγκέντρωσης 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$.





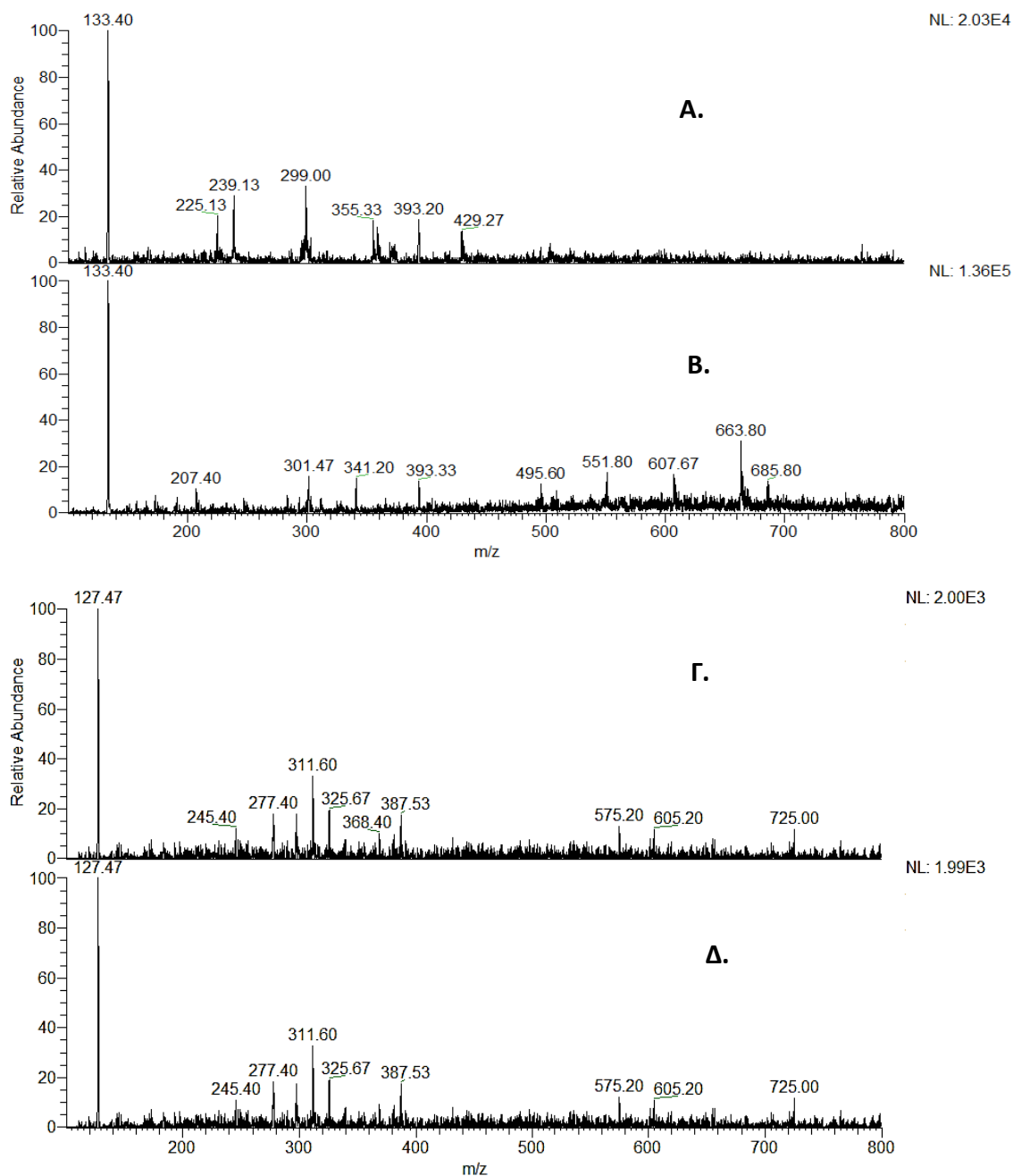
Γράφημα 4.11. Εξάρτηση της σχετικής έντασης των ιόντων του σεληνιώδους οξέος από την πίεση του αερίου και από την θέση του τριχοειδούς με πηγή V-EASI σε διαλύτη **Α.**Νερό 100 % **Β.**Μεθανόλη 50 % **Γ.** Μεθανόλη 90 %.



Γράφημα 4.12. Εξάρτηση της σχετικής έντασης των ιόντων του σεληνιώδους και ιππουρικού οξέος από την πίεση του αερίου και από την σύσταση του διαλύτη με πηγή V-EASI στην Θέση 3 **A.** Σεληνιώδες οξύ 20 µg/mL **B.** Ιππουρικό οξύ 16 µg/mL.

4.2.4 Ιωδιούχο Καίσιο - Δωδεκυλοσουλφονικό Νάτριο (SDS)

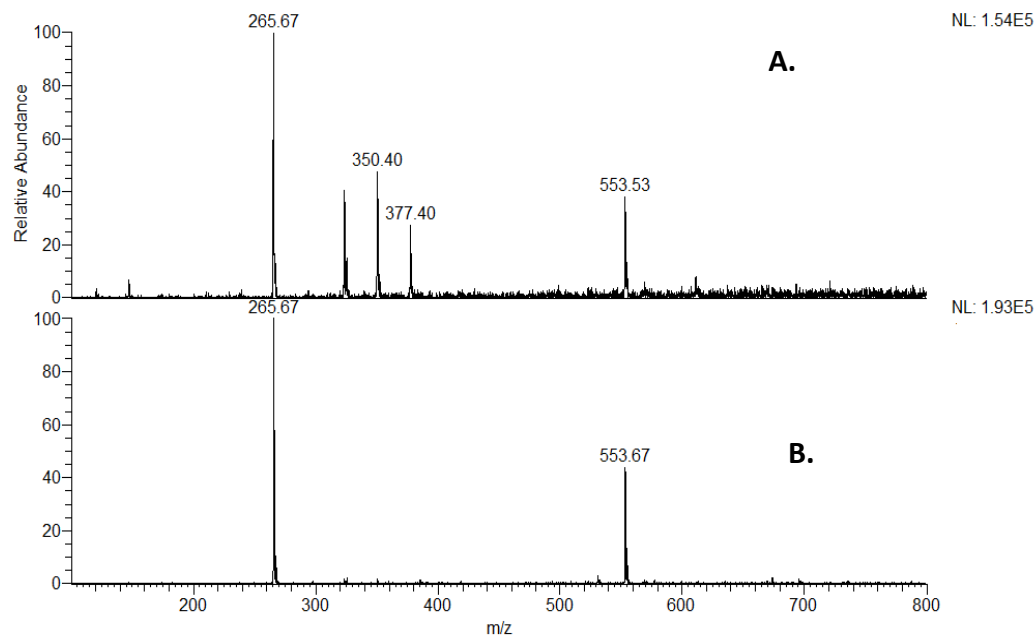
Το ιωδιούχο καίσιο [CsI, 99.999%, Sigma Aldrich] είναι ένα ευδιάλυτο αλάτι στους διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν. Πολλές φορές στην βιβλιογραφία αναφέρεται ως ένωση ελάχιστης επιφανειακής δράσης, σε πειράματα μελέτης μηχανισμού σχηματισμού ιόντων. Το δωδεκυλοσουλφονικό νάτριο [SDS, $\geq 99.0\%$, Fluka] αντιθέτως είναι ένας καθαριστικός παράγοντας με μεγάλη επιφανειακή δράση. Έτσι είναι ασφαλές να ορίσουμε ότι σε μια σχετική κλίμακα το ιωδιούχο καίσιο μπορεί να θεωρηθεί επιφανειακής δράσης 0 και το δωδεκυλοσουλφονικό νάτριο επιφανειακής δράσης 1. Παρασκευάστηκαν τρία διαλύματα (νερό 100%, νερό/μεθανόλη 50:50, νερό/μεθανόλη 10:90) συγκέντρωσης 10 $\mu\text{g/mL}$ ή 38 nmoles/ml ιωδιούχου καϊσίου και 1 $\mu\text{g/mL}$ ή 3.5 nmoles/ml δωδεκυλοσουλφονικό νάτριο. Το φάσμα μαζών του ιωδιούχου καϊσίου παρουσιάζεται στην εικόνα 4.13 σε θετικό και αρνητικό ιοντισμό.



Εικόνα 4.13. Φάσμα μαζών του ιωδιούχου καΐσιου με πηγή V-EASI. **A.** Θετικός ιοντισμός σε διαλύτη νερό 100 % **B.** Θετικός ιοντισμός σε διαλύτη νερό /μεθανόλη10:90 **Γ.** Αρνητικός ιοντισμός σε διαλύτη νερό 100 % **Δ.** Αρνητικός ιοντισμός σε διαλύτη νερό/μεθανόλη 10:90 .

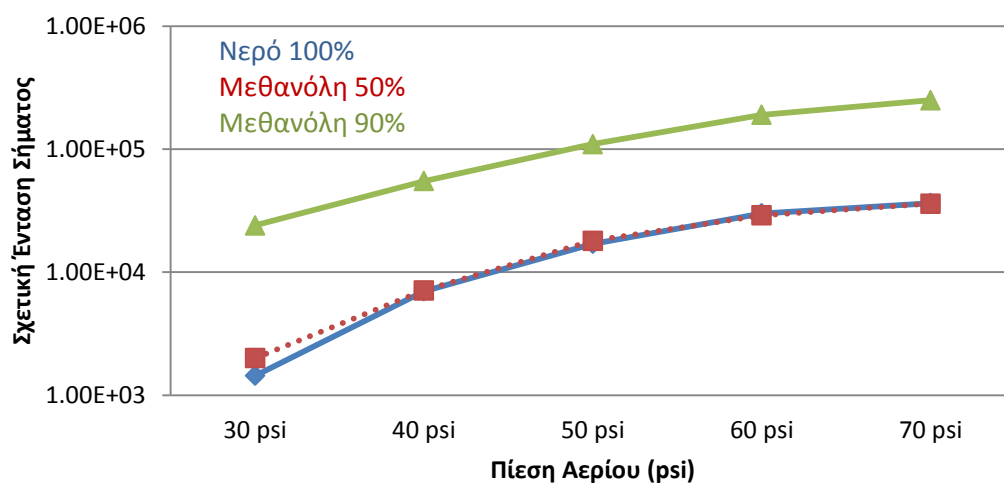
Στον θετικό ιοντισμό η κύρια κορυφή είναι το κατιόν καΐσιου με μάζα προς φορτίο 133.4. Οι κορυφές 299 και 393 αντιστοιχούν στα $[CsI+K]^+$ και Cs_2I^+ . Στον αρνητικό ιοντισμό η κύρια κορυφή είναι το ανιόν ιωδίου με μάζα προς φορτίο 127.47 ενώ οι κορυφές 277.40 και 387.53 αντιστοιχούν στα ανιόντα $[CsI+OH]^-$ και CsI_2^- . Το φάσμα μαζών του δωδεκυλοσουλφονικού νατρίου (SDS) παρουσιάζεται στην εικόνα 4.14. Η κύρια κορυφή

265.67 αντιστοιχεί στο μονομερές ανιόν $[C_{12}H_{25}SO_4]^-$ και η κορυφή 553.67 αντιστοιχεί στο διμερές ανιόν $[C_{12}H_{25}SO_4Na+ C_{12}H_{25}SO_4]^-$.

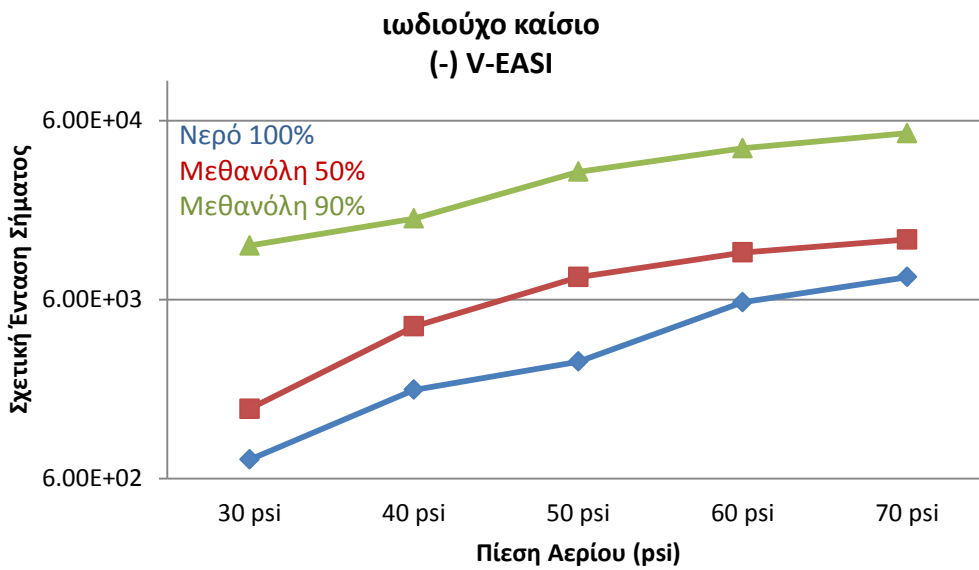


Εικόνα 4.14. Φάσμα μαζών του SDS με πηγή V-EASI. **A.** αρνητικός ιοντισμός σε διαλύτη νερό/μεθανόλη 10:90. **B.** αρνητικός ιοντισμός σε διαλύτη νερό 100 %.

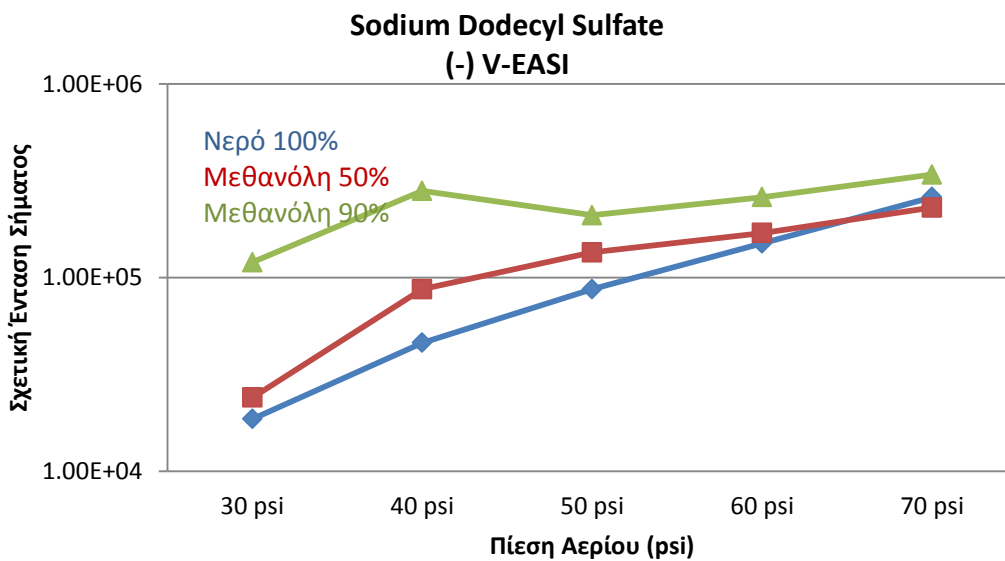
ιωδιούχο καίσιο (+) V-EASI



Γράφημα 4.15. Εξάρτηση της σχετικής έντασης των ιόντων του ιωδιούχου καΐσιου από την πίεση του αερίου και από την σύσταση του διαλύτη στην θέση 3 και στον θετικό ιοντισμό.



Γράφημα 4.16. Εξάρτηση της σχετικής έντασης των ιόντων του ιωδιούχου καίσιου από την πίεση του αερίου και από την σύσταση του διαλύτη στην θέση 3 και στον αρνητικό ιοντισμό.



Γράφημα 4.17. Εξάρτηση της σχετικής έντασης των ιόντων του δωδεκυλοσουλφονικού νατρίου από την πίεση του αερίου και από την σύσταση του διαλύτη στην θέση 3 και στον αρνητικό ιοντισμό.

4.3. Συμπεράσματα

- Η βέλτιστη θέση του τριχοειδή σωλήνα είναι **στην άκρη του εκνεφωτή (θέση 3)**. Εκεί η διατομή του υάλινου σωλήνα μικραίνει απότομα και το Φαινόμενο Venturi είναι πιο αποτελεσματικό και γίνεται καλύτερη εκνέφωση. Στην πλειονότητα των συνθηκών με διαφορετικούς αναλύτες, η ένταση των ιόντων ήταν μεγαλύτερη στη θέση αυτή.
- Η πίεση του εκνεφωτικού αερίου κυμάνθηκε ανάμεσα στα 30 έως 70 psi. Μέσα σε αυτές τις πιέσεις αύξηση της πίεσης οδηγούσε σε αύξηση της έντασης του σήματος σε μείγμα διαλυτών 10:90 νερού/μεθανόλης. Σε διαλύτη νερό παρατηρήθηκε μια σταθεροποίηση στις πιέσεις 60-70 psi αλλά κάποιες φορές και μείωση έντασης σήματος στα 70 psi. Στο μείγμα νερό/μεθανόλη 50/50 γενικά το σήμα φαίνεται να σταθεροποιείται στους 70 psi. Ο αναλύτης επηρεάζει τις φυσικές ιδιότητες της σταγόνας και έτσι αποκλίσεις σε αυτές τις τάσεις είναι αναμενόμενες. Γενικά, **πιέσεις 60-70 psi θα θεωρούνται βέλτιστες**.
- Το διάλυμα **νερό/μεθανόλη 50:50** παρουσιάζει το μεγαλύτερο ιξώδες και τις **χαμηλότερες ροές** εν συγκρίσει με τα άλλα διαλύματα. Αυτή η διαφορά εξηγεί την μικρή διαφορά στην ένταση σήματος που παρουσιάζουν τα διαλύματα νερού και νερού/μεθανόλης 50:50 παρα το ότι αυξάνουμε την περιεκτικότητα σε μεθανόλη. (Η μεθανόλη μειώνει την επιφανειακή τάση της σταγόνας και αυξάνει θεωρητικά την πιθανότητα δημιουργίας αερίων ιόντων).
- Η επιφανειακή τάση του αναλύτη επηρεάζει σημαντικά την ένταση σήματος του φάσματος μαζών όπως αναμένεται. Έτσι, στην περίπτωση σύγκρισης της σχετικής έντασης σήματος του ιωδιούχου καΐσιου με το δωδεκυλοσουλφονικό νάτριο αν και η συγκέντρωση (mole/mL) είναι 1 τάξη μεγέθους χαμηλότερη του δωδεκυλοσουλφονικού νάτριου, η ένταση των ιόντων είναι μεγαλύτερη σχεδόν κατά μία τάξη μεγέθους στον αρνητικό ιοντισμό. Τα ίδια συμπεράσματα μπορούν να βγούν και από την σύγκριση της έντασης των ιόντων του σεληνιώδους οξέος με το ιππουρικό οξύ. Το ιππουρικό οξύ, λόγω της οργανικής υδρόφοβης αλυσίδας, αναμένεται να έχει μεγαλύτερη επιφανειακή τάση.
- Η ροή του υγρού δείγματος εξαρτάται από το μείγμα του διαλύτη (ιξώδες), την πίεση του αερίου και την θέση του τριχοειδούς ως προς την άκρη του εκνεφωτή.
- Οι μεγαλύτερες ροές καταγράφηκαν σε μείγμα διαλύτη νερό/μεθανόλη 10:90, στις θέσεις τριχοειδούς 2 και 3 και στις πιέσεις 50-70 psi. Η ροή του υγρού δείγματος συνδέεται με την αύξηση της έντασης σήματος στο μείγμα διαλυτών 10:90 αλλά και με την αύξηση της έντασης στις υψηλές πιέσεις αλλά δεν είναι η μοναδική παράμετρος

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Εφαρμογές της πηγής V-EASI

5.1 Φασματομετρία Ακρίβειας Μάζας

Η χρησιμότητα της Φασματομετρίας Ακρίβειας Μάζας με την μέχρι τώρα ανάπτυξη της οργανολογίας είναι στην αναγνώριση και ταυτοποίηση του μοριακού τύπου ενός μορίου. Η χρήση οργάνων υψηλής διακριτικής ικανότητας, όπως Μαγνητικού Τομέα (Magnetic Sector), Ιοντικού Κυκλοτρονικού Συντονισμού με μετασχηματισμό Fourier (FT-ICR) ή κάποιο άλλο όργανο υψηλής διακριτικής ικανότητας, αν και θεωρητικά δεν είναι αναγκαία συνθήκη, παραμένουν τα πιο κατάλληλα. Η ταυτοποίηση της μοριακής μάζας με ακρίβεια επιτρέπει την αναγωγή σε μοριακό τύπο της μοριακής μάζας, σε συνδυασμό με τα χαρακτηριστικά ιόντα θραύσματα της κύριας κορυφής. Η ακρίβεια μάζας σε μια μέτρηση έχει οριστεί ως η μέτρηση με σφάλμα μικρότερο από 5 μέρη ανα εκατομύριο.

Τα πιο συνηθισμένα σφάλματα που διευρύνουν τις κορυφές και μειώνουν την διακριτική ικανότητα είναι η εξάρτηση του αιχνευτή και αναλυτή από την αφθονία των ιόντων και το φαινόμενο επίδρασης του φορτίου στο χώρο³⁶ (space charge effect). Στην περίπτωση της ιοντικής παγίδας το φαινόμενο αυτό είναι έντονο και επηρεάζει την ακρίβεια της μέτρησης, επειδή τα ιόντα εισάγονται ταυτόχρονα και αλληλεπιδρούν. Ένας ακόμα παράγοντας που επηρεάζει την ακρίβεια μιας μέτρησης είναι η μάζα της ένωσης. Στα περισσότερα όργανα η διακριτική ικανότητα εξαρτάται από την μάζα προς φορτίο³⁷. Για αυτό τον λόγο μέχρις στιγμής οι εφαρμογές της μεθόδου αφορούν κυρίως μικρές ενώσεις με μοριακή μάζα έως 500 ατομικές μονάδες μάζας. Η μόνη εξαίρεση σε αυτό τον κανόνα είναι το όργανο μαγνητικού τομέα. Σε κάθε περίπτωση, λόγω της πολυπλοκότητας των αναλυτικών οργάνων και των πολλών πειραματικών παραμέτρων που μετρούνται απαιτείται τα αποτελέσματα να διορθώνονται χρησιμοποιώντας πρότυπες ενώσεις βαθμονόμησης.

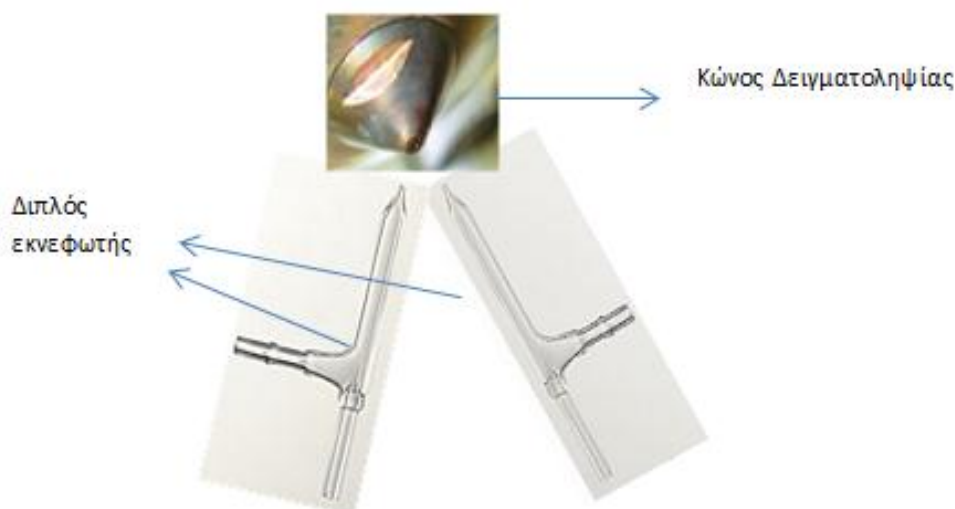
Οι ενώσεις βαθμονόμησης (Lock Mass) διορθώνουν την μέτρηση της μάζας από τις μεταβολές του οργάνου κατά την διάρκεια του πειράματος. Η χρήση τους μπορεί να γίνει είτε ως εσωτερικό πρότυπο, δηλ. προσθέτοντας την ένωση βαθμονόμησης στο διάλυμα είτε ως εξωτερικό πρότυπο, δηλ. από ξεχωριστό διάλυμα. Η χρήση του εσωτερικού πρότυπου εμπεριέχει τον κίνδυνο να υποβαθμίσει την ευαισθησία της μεθόδου ενώ και η χρήση ενός συνδέσμου 'T' για εισαγωγή στην ροή μετά τον διαχωρισμό διευρύνει τις κορυφές και μειώνει την ακρίβεια³⁷. Για την αντιμετώπιση αυτών των δυσκολιών, μια σειρά από νέες κατασκευές πολλαπλών πηγών ηλεκτροψεκασμού για διαδοχική εισαγωγή του αναλύτη και της ένωσης βαθμονόμησης δημιουργήθηκαν. Έτσι ο Jiang πρότεινε την χρήση ενός πολλαπλού εισαγωγέα ροών με παραπάνω από μία πηγές ηλεκτροψεκασμού³⁹. Έτσι ενώ μπορούν να φτάνουν στην είσοδο του οργάνου ταυτόχρονα πολλές ροές η βάση των πολλαπλών ροών περιστρεφόταν επιτρέποντας μόνο μια πηγή ηλεκτροψεκασμού να ψεκάζει την φορά. Παρόμοιες κατασκευές έχουν προταθεί και από άλλους όπως ο Chambers, που πρότεινε την χρήση μιας συσκευής μικροροών με διπλή πηγή ηλεκτροψεκασμού³⁸. Οι δύο πηγές ηλεκτροψεκασμού απείχαν 3.6 χιλιοστά μεταξύ τους και ήταν τοποθετημένες σε γωνία 50°. Η εναλλαγή του δυναμικού μεταξύ των δύο πηγών επέτρεπε την διαδοχική εισαγωγή αναλύτη και ένωσης βαθμονόμησης. Το μειονέκτημα αυτής της λύσης είναι στη μη ταυτόχρονη εισαγωγή του αναλύτη με την ένωση βαθμονόμησης. Ακόμα και οι μικρές αλλαγές που συμβαίνουν συστηματικά στα δυναμικά που χρησιμοποιούνται επηρεάζουν την ακρίβεια της μέτρησης. Παρακάτω περιγράφεται η

ταυτόχρονη εισαγωγή αναλύτη και ένωσης βαθμονόμησης με την χρήση διπλού πνευματικού εκνεφωτή ατομικής φασματομετρίας. Αυτή η συνδεσμολογία θεωρείται κατάλληλη για εφαρμογές Φασματομετρίας Ακρίβειας Μάζας Μοριακών Μαζών αν συνδυαστεί με την χρήση ενός οργάνου υψηλής διακριτικής ικανότητας.

5.1.1 Διπλός Εκνεφωτής V-EASI για Εφαρμογές Ακρίβειας Μάζας

Συνδεσμολογία

Χρησιμοποιήθηκε μεταλλική βάση με δύο υπομονάδες με ειδικά διαμορφωμένες εσοχές που να ταιριάζουν για την τοποθέτηση των κυλινδρικών εκνεφωτών. Η βάση ασφαλιζόταν με μεταλλικά παξιμάδια. Οι δύο υπομονάδες μπορούσαν να κινηθούν πάνω στην βάση, τόσο πάνω στην ευθεία του άξονα όσο και σχηματίζοντας γωνία μεταξύ τους. Η δυνατότητα ρύθμισης της θέσης και της γωνίας αποδείχτηκε σημαντική. Ο ένας εκνεφωτής συνδέθηκε με την παροχή αερίου του οργάνου και ελεγχόταν ηλεκτρονικά ενώ ο άλλος εκνεφωτής συνδέθηκε, μέσω ενός συνδέσμου Υ από την αρχική παροχή αερίου αζώτου, με έναν ρυθμιστή πίεσης και ελεγχόταν χειροκίνητα. Η πίεση του αερίου εκνέφωσης από το όργανο μετρείται σε σχετικές μονάδες πίεσης ενώ ο ρυθμιστής που χρησιμοποιήθηκε σε psi (pounds per square inch). Και στους δύο εκνεφωτές εφαρμόστηκε τριχοειδής σωλήνας τηγμένου πυριτίου εσωτερικής διαμέτρου 100 μm. Ο ένας εκνεφωτής εισήγαγε τον αναλύτη και ο άλλος την ένωση βαθμονόμησης.

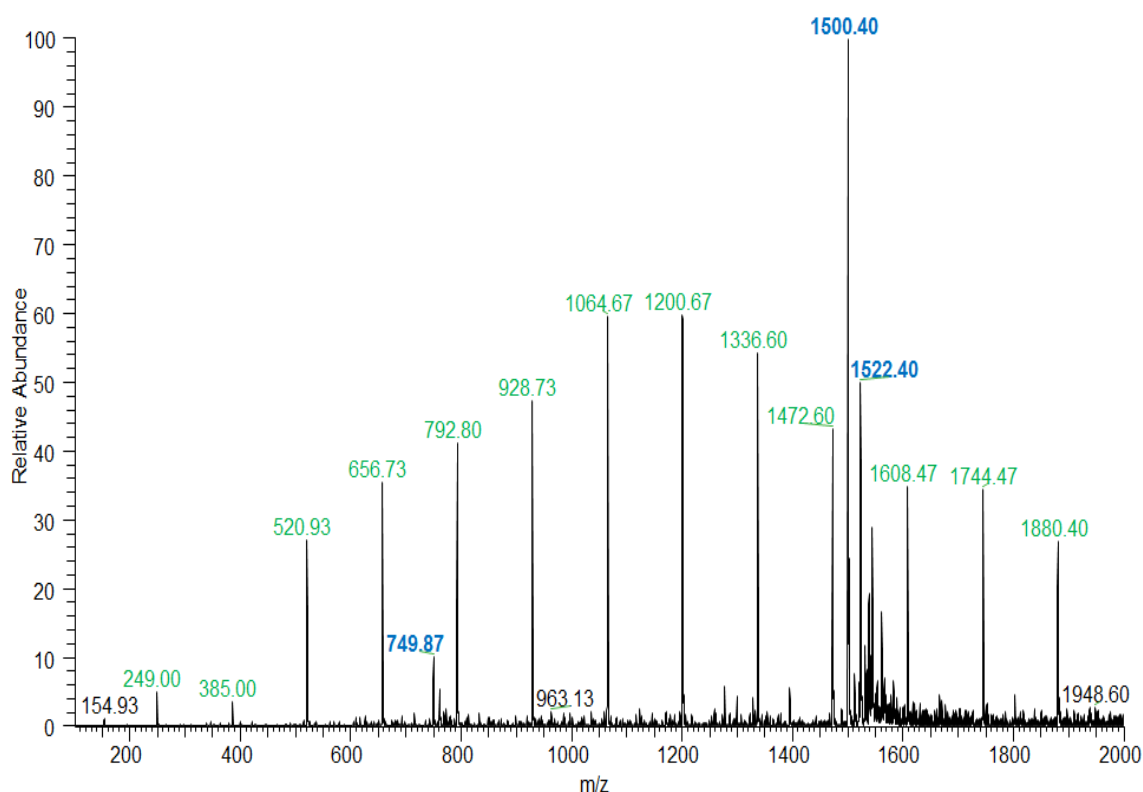


Εικόνα 5.1.1. Αναπαράσταση διπλού εκνεφωτή υπό γωνία για ταυτόχρονη εισαγωγή αναλύτη και ένωσης βαθμονόμησης.

Για να μπορέσει η παραπάνω συνδεσμολογία να παράξει ταυτόχρονα ιόντα και από τους δύο εκνεφωτές αποδείχτηκε ότι έπρεπε να βρεθεί η κατάλληλη γωνία αλλά και η 'σχετική' πίεση του αερίου. Ο όρος 'σχετική' εδώ υποδηλώνει ότι η πίεση που πρέπει να εφαρμοσθεί στον ένα εκνεφωτή εξαρτάται από την πίεση που εφαρμόζεται στον άλλο. Η ρύθμιση αυτή έγινε ποιοτικά στα αποτελέσματα που παρουσιάζονται. Η γωνία που σχηματίζουν οι εκνεφωτές ήταν σε κάθε περίπτωση μικρότερη των 45°.

Πειραματική Διαδικασία-Αποτελέσματα

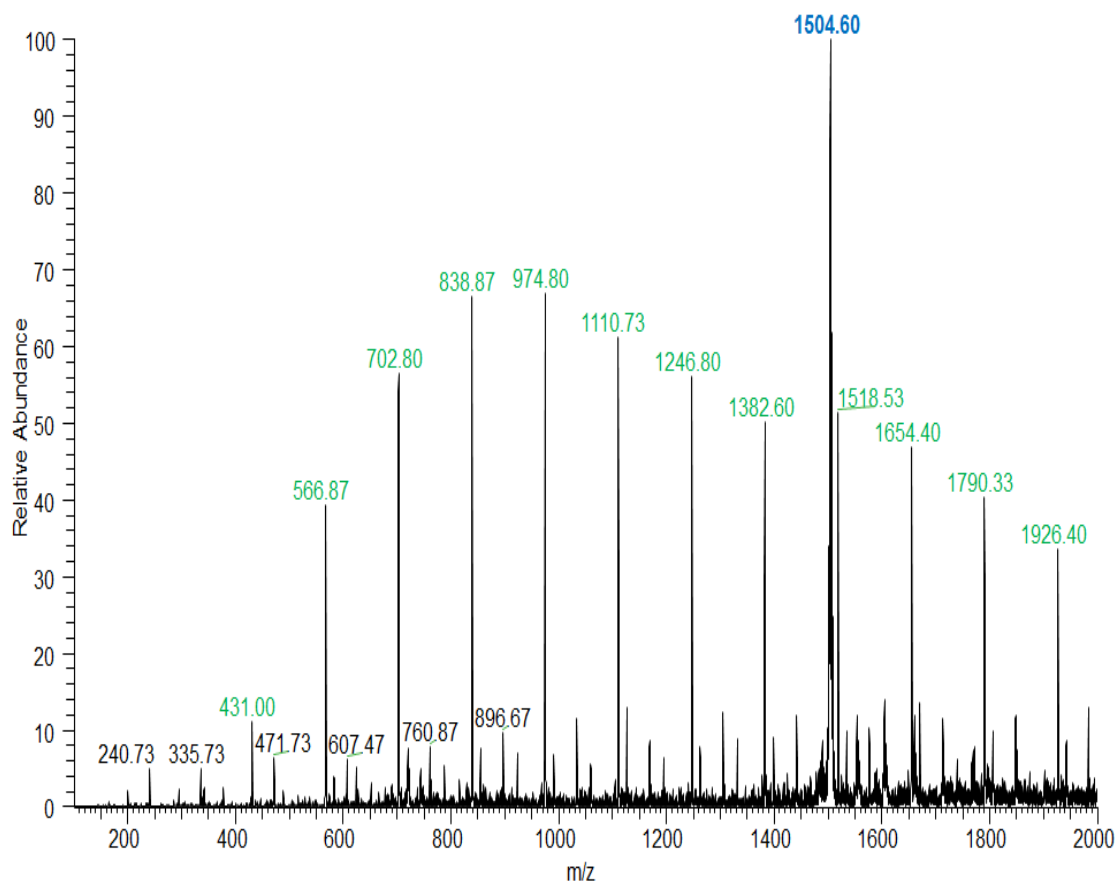
Το άλας του νατρίου του τριφθοροξικού οξέος (STFA) επιλέχθηκε ως ένωση βαθμονόμησης αφού παράγει κορυφές σε όλο το εύρος μαζών του οργάνου⁴⁰ (100-2000 μάζα πρὸς φορτίο) σε θετικό και αρνητικό ιοντισμό. Οι κορυφές επαναλαμβάνονται κατα 136 μονάδες μάζας πρὸς φορτίο και αντιστοιχούν στα παράγωγα πολυμερή της μορφής $[\text{CF}_3\text{COONa}]_n\text{Na}^+$ στον θετικό ιοντισμό και $[\text{CF}_3\text{COONa}]_n\text{CF}_3\text{COO}^-$ στον αρνητικό ιοντισμό. Κατά την πειραματική διαδικασία η πίεση του αερίου στον ένα εκνεφωτή (αυτὸν που ελεγχόταν ἀπὸ τον υπολογιστή) διατηρείτο σταθερή και μεταβαλλόταν η πίεση του αερίου εκνέφωσης στον δεύτερο εκνεφωτή μέχρι να παρουσιάζονται ξεκάθαρα οι κορυφές του STFA και του εκάστοτε αναλύτη.



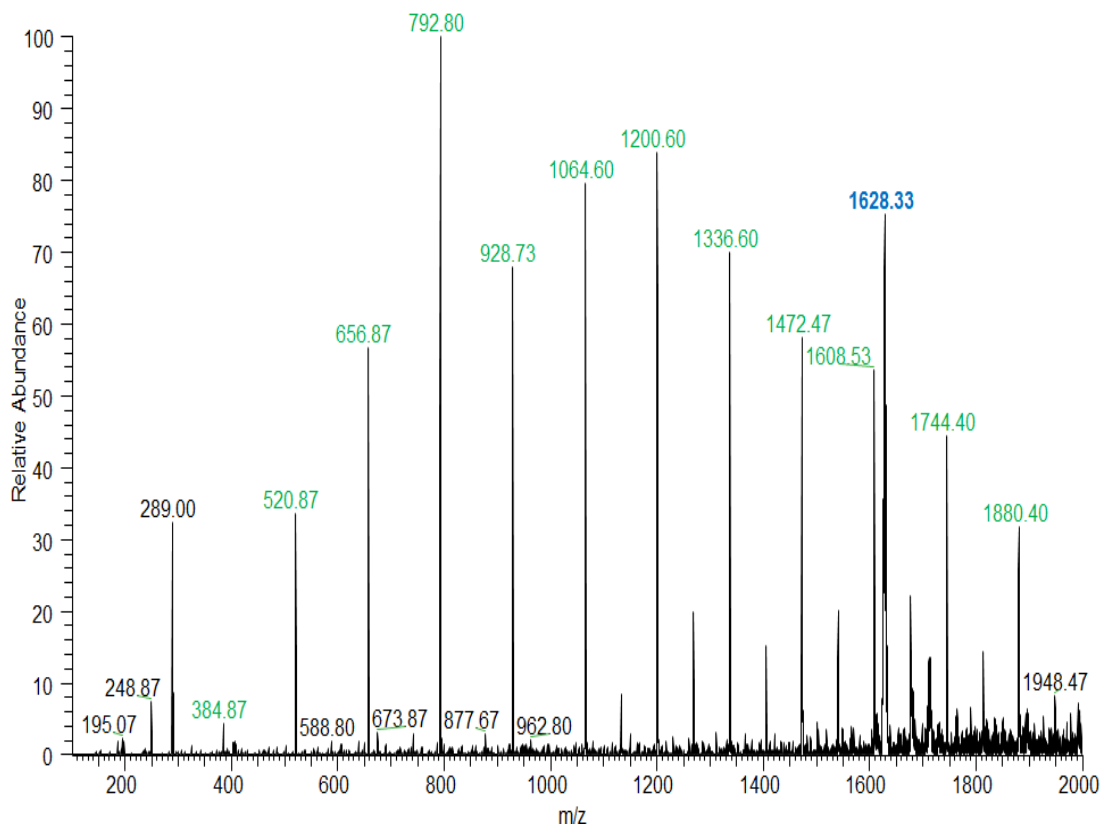
Εικόνα 5.1.2. Φάσμα μαζών με διπλό εκνεφωτή . Με **πράσινο** οι κορυφές του STFA και με **μπλέ** οι κορυφές του ολιγονουκλεοτιδίου 5'-TATAG-3', στον αρνητικό ιοντισμό.

Η εικόνα 5.1.2. παρουσιάζει την επιτυχή ταυτόχρονη παραγωγή ιόντων STFA και του ολιγονουκλεοτιδίου 5'-TATAG-3'. Το γραμμικό αυτό βιοπολυμερές περιέχει τις βάσεις θυμίνη, αδενίνη, και γουανίνη κατά την σειρά αρίθμησης. Το φάσμα του αρνητικού ιοντισμού στην συγκεκριμένη ένωση περιέχει λιγότερες κορυφές παραγώγων λόγω επιμόλυνσης με κατιόντα του αρχικού προτύπου αυξάνοντας έτσι την ευαισθησία και για αυτό προτιμήθηκε. Το θεωρητικό του μοριακό βάρος όπως υπολογίστηκε ἀπὸ το online εργαλείο Oligo Calc είναι 1502.1. Οι κορυφές που εντοπίζονται ἀπὸ το φάσμα μαζών είναι 1500.4 και 1522.4 που αντιστοιχεί στο αποπρωτονιωμένο μόριο $[\text{M}-\text{H}]^-$ και στο παράγωγο του του νατρίου $[\text{M}+\text{Na}-2\text{H}]^-$. Η μικρότερης έντασης κορυφή 749.87 αντιστοιχεί στο διφορτισμένο ανιόν του πολυμερούς $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$ ($1502.1-2/2=750.05$). Ένα ἄλλο παράδειγμα επιτυχούς εφαρμογής του διπλού εκνεφωτή είναι η ταυτόχρονη παραγωγή ιόντων STFA και της ψευδομοριακής κορυφής της ένωσης συναρμογής $\text{Cu}_6\text{Tb}(\text{aib})_6(\text{OH})_3(\text{OAc})_3(\text{NO}_3)_3$ τόσο

στον θετικό (Εικόνα 5.1.3) όσο και στον αρνητικό ιοντισμό (Εικόνα 5.1.4). Η επιτυχία αυτής της εφαρμογής θα μπορούσε να θεωρηθεί 'παράδοξη' αφού το STFA είναι διαλυμένο σε μείγμα νερού ακετονιτριλίου 50:50 και η δομή του πλέγματος του συμπλόκου αποσταθεροποιείται από το νερό με υδρόλυση. Παρ'όλα αυτά, τα αποτελέσματα του πειράματος αποκαλύπτουν ότι η ροή του ενός εκνεφωτή δεν επηρεάζει την ροή του άλλου. Αυτό σημαίνει 'πιθανώς την απουσία αερίων αντιδράσεων' του συμπλόκου με υδρατμούς λόγω του μεγέθους της σταγόνας που δημιουργεί η πηγή V-EASI.



Εικόνα 5.1.3. Φάσμα μαζών με διπλό εκνεφωτή . Με **πράσινο** οι κορυφές του STFA και με **μπλέ** η κορυφή του συμπλόκου $Cu_6Tb(aib)_6(OH)_3(OAc)_3(NO_3)_3$, στον θετικό ιοντισμό.

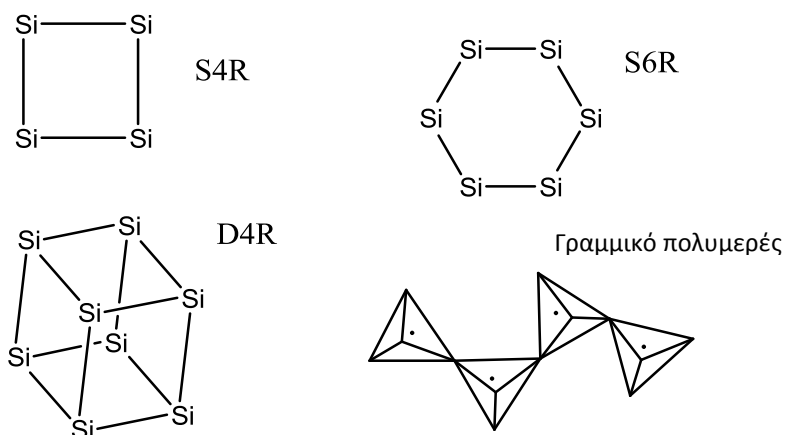


Εικόνα 5.1.4. Φάσμα μαζών με διπλό εκνεφωτή . Με **πράσινο** οι κορυφές του STFA και με **μπλέ** η κορυφή του συμπλόκου $Cu_6Tb(aib)_6(OH)_3(OAc)_3(NO_3)_3$, στον αρνητικό Ιοντισμό.

5.2. Πολυμερισμός του πυριτικού οξέος σε ολιγομερή δομικά είδη κρυστάλλων.

Οι επαναλαμβανόμενες μονάδες του οξειδίου του πυριτίου είναι το δομικό συστατικό ενός μεγάλου αριθμού ορυκτών, κάποια από τα οποία με μεγάλη οικονομική σημασία, όπως οι ζεόλιθοι. Για την σύνθεση των ζεόλιθων εργαστηριακά, έχει παρατηρηθεί ότι η ανάπτυξη κρυστάλλων μπορεί να ξεκινήσει σε διάλυμα που περιέχει πυρήνες κρυστάλλωσης αλλά και σε διάλυμα που δεν περιέχει⁴¹. Άρα, τα ευδιάλυτα είδη του πυριτικού οξέος είναι υπεύθυνα για δημιουργία πυρήνων κρυστάλλωσης και ανάπτυξης του κρύσταλλου. Έχει προταθεί, ότι τα διαφορετικά είδη ζεόλιθων προέρχονται από κάποιες δευτεροταγείς δομικές μονάδες που σχηματίζονται στο διάλυμα⁴¹. Κάποιες από τις προτεινόμενες δομικές μονάδες παρουσιάζονται στην εικόνα 5.2.1. Ο σχηματισμός αυτών των ολιγομερών δομικών μονάδων στο διάλυμα εξαρτάται από έναν αριθμό παραγόντων όπως το μέγεθος και το είδος των κατιόντων στο διάλυμα, το pH του διαλύματος, την θερμοκρασία του διαλύματος και την συγκέντρωση του πυριτικού οξέος.

Το μέγεθος του κατιόντος ως παράγοντας που επηρεάζει το είδος των ολιγομερών που σχηματίζονται στο διάλυμα έχει μελετηθεί κυρίως με σύγκριση των κατιόντων νατρίου και καλίου⁴². Τα μικρά κατιόντα αναφέρονται ως 'σταθεροποιητές δομής' ενώ τα μεγάλα κατιόντα ως 'αποσταθεροποιητικά δομής'. Γενικώς τα κατιόντα θεωρείται ότι συμμετέχουν στην οργάνωση της δομής των ανιοντικών πυριτικών πολυμερών σταθεροποιώντας συγκεκριμένες δομές, που ευνοούνται από τις αλληλεπιδράσεις Coulomb και στερικές παρεμποδίσεις.



Εικόνα 5.2.1. Κάποιες από τις δευτεροταγείς δομικές μονάδες. Οι γραμμές που συνδέουν τα άτομα Si συμβολίζουν δεσμούς -O-. Στο γραμμικό πολυμερές τα άτομα Si βρίσκονται στο κέντρο του τετράεδρου.

Έτσι ενώ τα κατιόντα του τετράκυλαμμωνίου (TAA) σε διάλυμα είναι αρκετά μεγάλα και άρα πιθανοί `αποσταθεροποιητές δομών` αυτό δεν παρατηρείται. Πιθανότατα, τα κατιόντα αυτά συμμετέχουν στην οργάνωση των δομών στο διάλυμα.

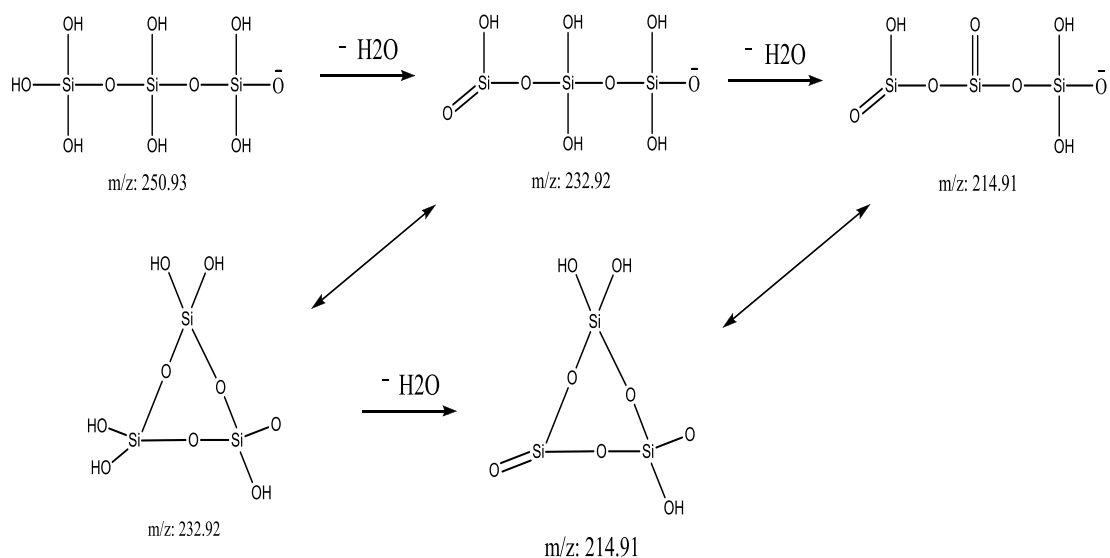
Το pH του διαλύματος επίσης επηρεάζει την κατανομή και το είδος των ολιγομερών που υπάρχουν στο διάλυμα με τον γενικό κανόνα να λέει ότι η μείωση του pH αυξάνει την έκταση του πολυμερισμού.

Η θερμοκρασία μπορεί να επηρεάσει ποικιλοτρόπως τα πυριτικά ολιγομερή του διαλύματος. Αύξηση τη θερμοκρασίας επταχύνει τον πολυμερισμό. Ταυτοχρόνως όμως η σταθερότητα κάποιων δομών αποσταθεροποιείται πάνω από κάποιες θερμοκρασίες όπως ή κυβική δομή D4R που αποσταθεροποιείται σε θερμοκρασία άνω των 100°C.

Σε υψηλές συγκεντρώσεις πυριτικού οξέος, κολλοειδή σωματίδια σχηματίζονται στο διάλυμα. Τα κολλοειδή αυτά σωματίδια πιθανώς να δρουν ως κέντρα πυρηνοποίησης των ανιόντων. Ένας αριθμός μελετών ασχολείται με τον εντοπισμό των ολιγομερών ανιόντων στο διάλυμα χρησιμοποιώντας διαφορετικά αντισταθμιστικά κατιόντα (Na, K, TAA⁴⁴) και pH που ξεκινούν από τα βασικά⁴⁵ και καταλήγουν στα όξινα^{43,44}.

Μέχρις στιγμής η κυρίαρχη τεχνική που χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό των επιμερους δομών είναι ο Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (NMR) με ²⁹Si. Η τεχνική NMR επιτρέπει τον χαρακτηρισμό του `περιβάλλοντος` και άρα του τρόπου σύνδεσης των ατόμων. Τελευταία, η χρήση της φασματομετρίας μάζας και η μελέτη αντιδράσεων με την χρήση ηλεκτροψεκασμού οδήγησε στον εντοπισμό ενός αριθμού ανιόντων σε διαλύματα υδατικά και υδατικά μείγματα (μεθανόλης, αιθανόλης). Τα ανιόντα αυτά είναι το μονομερές, το διμερές και το τριμερές στην πλειονότητα των περιπτώσεων ενώ εντοπίζονται και τετραμερή, πενταμερή κ.ο.κ Η δομική ποικιλομορφία αυτών των ολιγομερών επηρεάζεται από την έκταση της αφυδάτωσης που οδηγεί σε πιο οργανωμένες τρισδιάστατες δομές εν συγκρίσει με τα απλά γραμμικά πολυμερή (Εικόνα 5.2.2). Το 2005, σε μια μελέτη του K. Eggers⁴³, η ανταλλαγή δευτερίου/υδρογόνου σε διάλυμα D₂O/DCl απέδειξε ότι ανάλογα με τον αριθμό των δευτερίων που ανταλλάσσονται μπορούν να βγούν συμπεράσματα σχετικά με τον τρόπο σύνδεσης των ατόμων σε περίπτωση που παραπάνω από μία δομές μπορούν να αποδωθούν σε μία μάζα προς φορτίο Το 2000, σε μελέτη του Patric Bussian⁴⁴, επιβεβαιώθηκε ότι η χρήση της ίδιας τεχνικής (ηλεκτροψεκασμός) αλλά διαφορετικών πηγών (διαφορετική γεωμετρία, προδιαγραφές) επηρεάζει τα τελικά αποτελέσματα. Η

μελέτη αυτή επαναφέρει το θέμα της συσχέτισης αυτού που εντοπίζεται από το όργανο με αυτό που υπάρχει στο διάλυμα.



Εικόνα 5.2.2. Αφυδάτωση του γραμμικού τριμερούς και συνακτικά ισομερή.

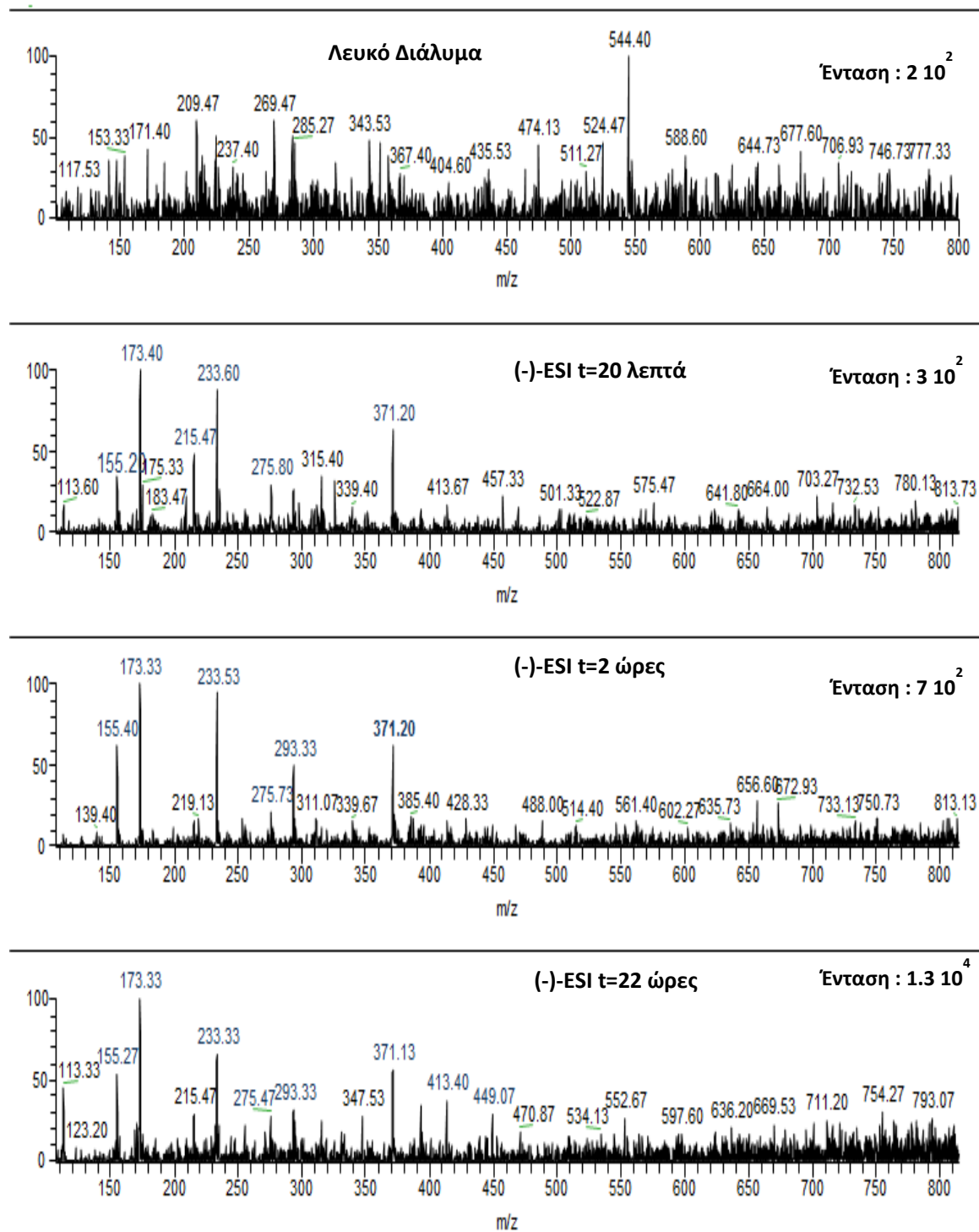
5.2.1 Πείραμα-Αποτελέσματα

Πειραματική Διαδικασία

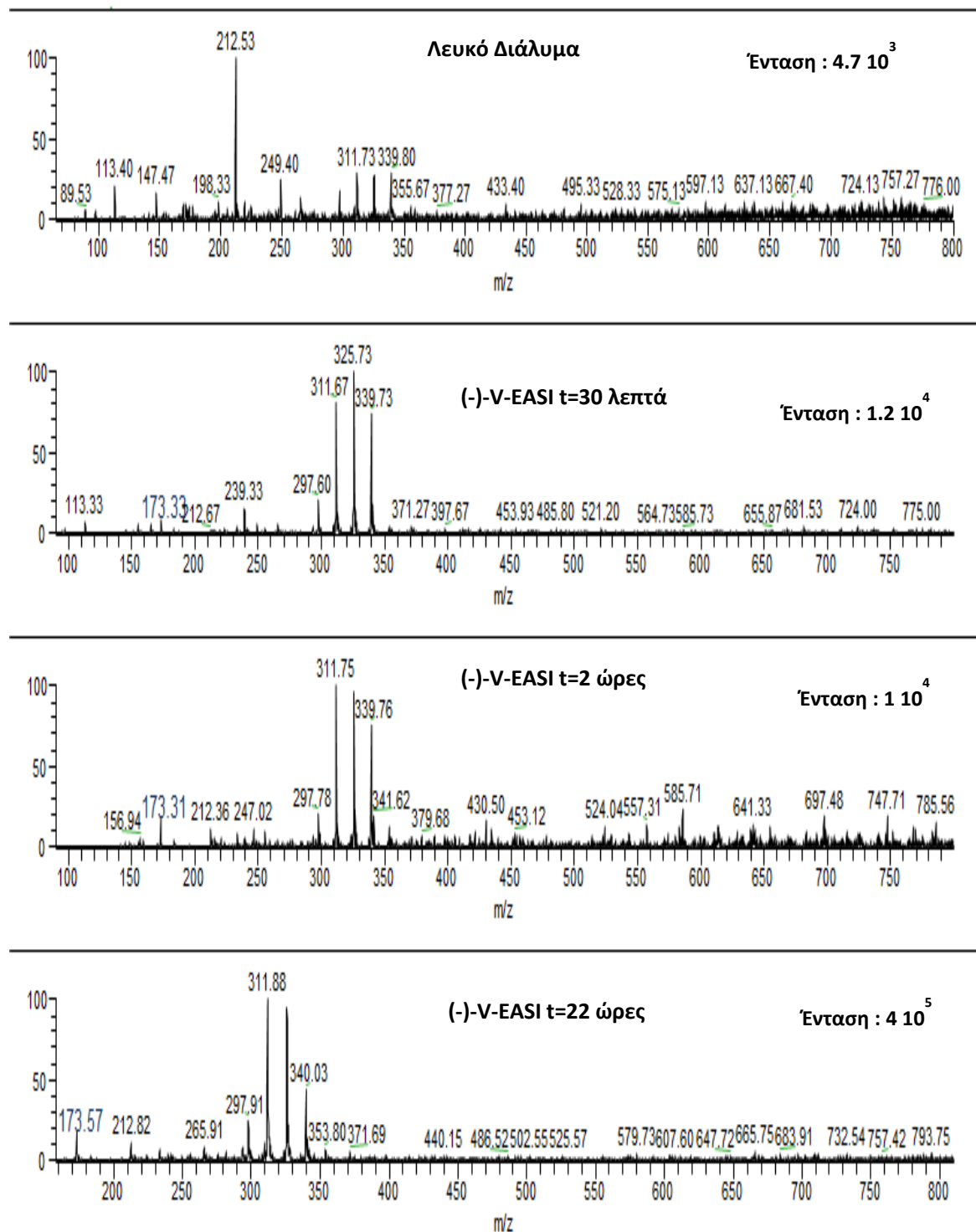
Σε όλα τα διαλύματα που παρασκευάστηκαν χρησιμοποιήθηκε τετραμέθυλοαμμωνιούχο πυριτικό άλας σε υδατικό διάλυμα (15-20 %) και καθαρότητας 99.99% που προμηθευτήκαμε από την Sigma Aldrich. Οι αραιώσεις του αρχικού διαλύματος πραγματοποιήθηκαν με υπερκαθαρό νερό 18,2 mΩ. Για την ρύθμιση του pH στα όξινα χρησιμοποιήθηκε Οξικό Οξύ υψηλής καθαρότητας και για τα βασικά Υδροξείδιο του Αμμωνίου. Ως ρυθμιστική ένωση προτιμήθηκε το οξικό αμμώνιο. Δύο αρχικά υδατικά διαλύματα παρασκευάστηκαν. Ένα που περιέχει τετραμέθυλοαμμωνιούχο πυριτικό άλας και ένα χωρίς αυτό. Στη συνέχεια έγινε ρύθμιση του pH του διαλύματος που περιείχε το τετραμέθυλοαμμωνιούχο πυριτικό άλας σε 6.4 και ταυτοχρόνως ίδια ακριβώς ποσότητα οξέος προστέθηκε και στο λευκό διάλυμα. Και τα δύο διαλύματα βρίσκονταν συνεχώς υπό ανάδευση καθ'όλη την διάρκεια του πειράματος. Δείγματα από το αρχικό διάλυμα αραιώνονταν σε τελική συγκέντρωση 1.7 μg/mL. Η εξέλιξη της αντίδρασης παρακολούθηθηκε για 22 ώρες και τα δείγματα αναλύθηκαν με χρήση πηγής ηλεκτροψεκασμού και V-EASI.

Αποτελέσματα

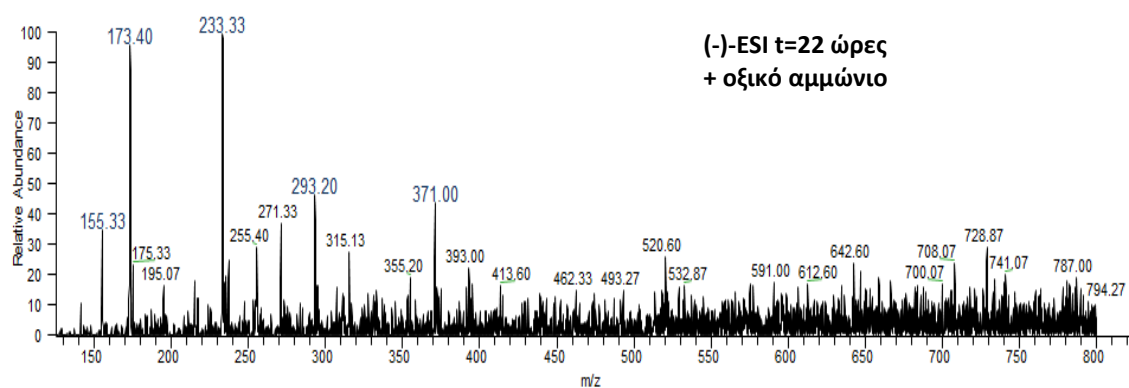
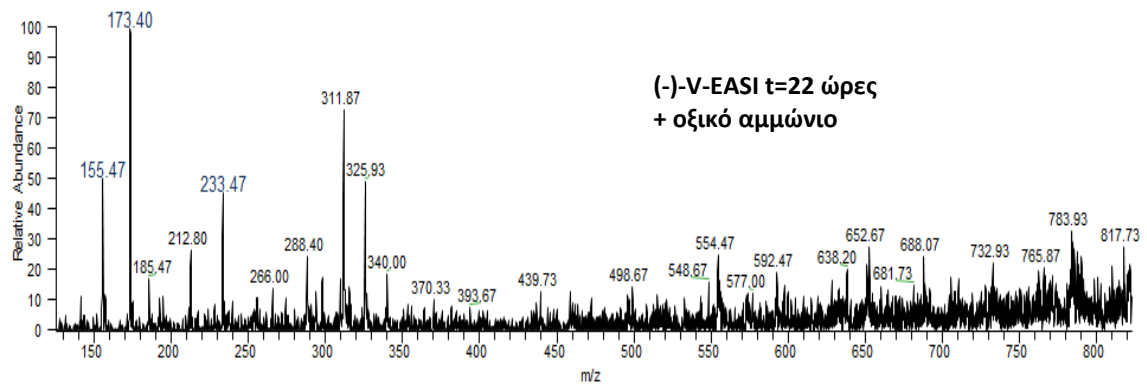
Η εικόνα 5.2.3 παρουσιάζει τα φάσματα μαζών που αποκτήθηκαν με πηγή ηλεκτροψεκασμού, στον αρνητικό ιοντισμό, σε ελαφρά όξινα pH. Οι κορυφές που εντοπίζονται είναι μονοφορτισμένες και έχουν μάζα προς φορτίο 155, 173, 215, 233, 275, 293, 371, 413 και 449. Η ένταση του σήματος αυξάνεται αισθητά στην μέτρηση 22 ώρες μετά την ρύθμιση του pH, άρα έχουμε μεγαλύτερη παραγωγή ολιγομερών ενώ και κάποια εξαμερή (413, 449) εντοπίζονται μετά από 22 ώρες.



Εικόνα 5.2.3. Φάσματα μαζών στον αρνητικό ιοντισμό με πηγή ESI διαλύματος TMA Silicate 1.7 μg/mL σε pH=6.4. Η ρύθμιση του pH έγινε με οξικό οξύ.



Εικόνα 5.2.4. Φάσματα μαζών στον αρνητικό ιοντισμό με πηγή V- EASI διαλύματος TMA Silicate 1.7 µg/mL σε pH=6.4. Η ρύθμιση του pH έγινε με οξικό οξύ αλλά χωρίς ρυθμιστική ένωση.



Εικόνα 5.2.5. Φάσματα μαζών στον αρνητικό ιοντισμό με πηγή **V- EASI** και **ESI** διαλύματος TMA Silicate 1.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ σε $\text{pH}=6.4$ μετά από προσθήκη οξικού αμμωνίου (περίπου 5 mM).

Η εικόνα 5.2.4 παρουσιάζει τα φάσματα μαζών του ίδιου διαλύματος σε $\text{pH}=6.4$ και στους ίδιους χρόνους με πηγή V-EASI αυτή την φορά. Οι κύριες κορυφές του αρνητικού φάσματος μαζών δεν αντιστοιχούν σε κορυφές ολιγομερών του πυριτικού οξέος με βάση την διαδικασία αφυδάτωσης-συμπύκνωσης που περιγράψαμε παραπάνω. Οι κορυφές 311.7, 325.7 και 339.7 με διαφορά μάζας προς φορτίο 14 εμφανίζονται και στο λευκό διάλυμα. Αυτό σημαίνει ότι παρεμβολές προερχόμενες από την μήτρα ή από την ίδια την πηγή (υάλινος εκνεφωτής) υποβαθμίζουν την ικανότητα ανάλυσης. Ταυτοχρόνως, το σήμα φαίνεται να αυξάνεται στη μέτρηση που έγινε 22 ώρες μετά ενώ και η κορυφή 173 εντοπίζεται αφού βρίσκεται πάνω από το υπόβαθρο. Η σημασία αυτών των κορυφών και αν συνδέονται με τον πολυμερισμό του πυριτικού οξέος δεν μπορεί να βεβαιωθεί. Για την καλύτερη κατανόηση του φαινομένου στο διάλυμα που αναλύθηκε μετά από 22 ώρες προστέθηκε οξικό αμμώνιο σε τελική συγκέντρωση περίπου 5 mM και επαναλήφθηκε η ανάλυση και με τις δύο πηγές. Τα αποτελέσματα της εικόνας 5.2.5 δείχνουν ότι ενώ το φάσμα μαζών με πηγή ηλεκτροψεκασμού δεν παρουσιάζει μεγάλες διαφοροποιήσεις, το φάσμα μαζών με πηγή V-EASI αλλάζει καταλυτικά. Εντοπίζονται οι κορυφές 155 και 233 εκτός από την κορυφή 173 ενώ και η σχετική ένταση των κορυφών 311.7, 325.7 και 339.7 μειώνεται αισθητά. Τα αποτελέσματα λοιπόν επισημαίνουν ότι η βελτιστοποίηση των συνθηκών ανάλυσης πρέπει να γίνεται ξεχωριστά για τις δύο πηγές. Η απουσία της κορυφής 551 που αντιστοιχεί στην D4R κυβική διάταξη του αφυδατωμένου οκταμερούς, και αναφέρεται ως η κύρια κορυφή σε προηγούμενες αναλύσεις με ηλεκτροψεκασμό, μπορεί να οφείλεται στην γεωμετρία της πηγής και πιθανώς σε διαφορετικές συνθήκες να εντοπίζεται. Στο σύνολο 8 διαφορετικές κορυφές εντοπίστηκαν που παρουσιάζονται στον

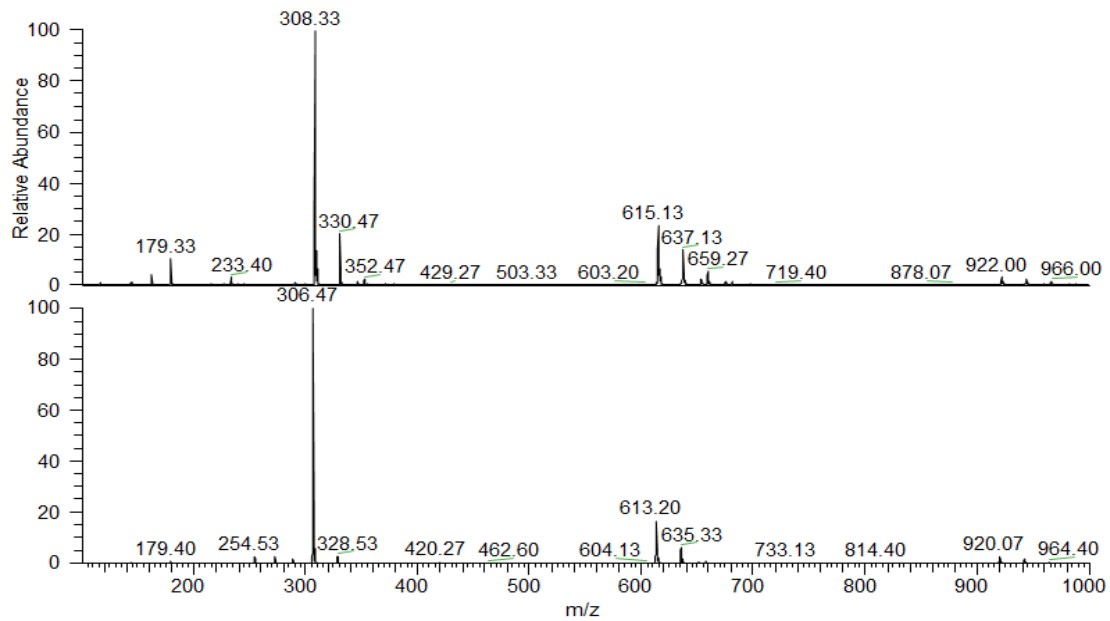
πίνακα 5.2.6 με την μοναδική μη αφυδατωμένη να είναι το διμερές με μάζα προς φορτίο 173 ενώ οι αφυδατωμένες κορυφές κυριαρχούν.

Πίνακας 5.2.6

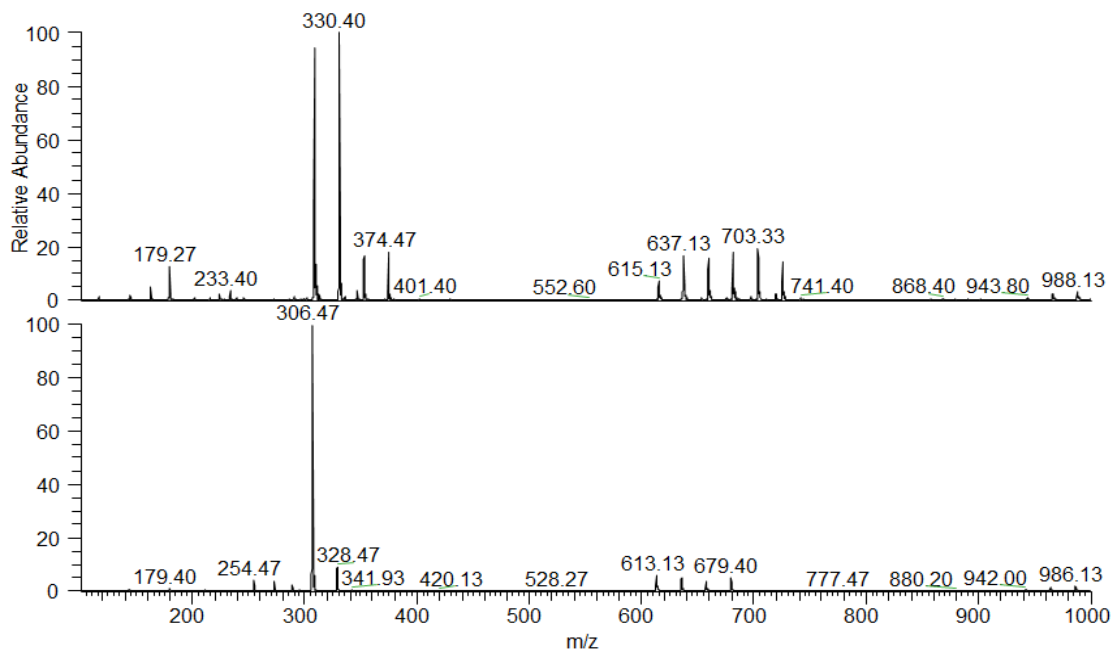
Αριθμός Κορυφών	Μάζα προς φορτίο (m/z)	Μοριακός Τύπος	Αφυδάτωση
1	155	Si ₂ O ₆ H ₃	-1 H ₂ O
2	173	Si ₂ O ₇ H ₅	
3	233	Si ₃ O ₉ H ₅	-1 H ₂ O
4	275	Si ₄ O ₁₀ H ₃	-3 H ₂ O
5	293	Si ₄ O ₁₁ H ₅	-2 H ₂ O
6	371	Si ₅ O ₁₄ H ₇	-2 H ₂ O
7	413	Si ₆ O ₁₅ H ₅	-4 H ₂ O
8	449	Si ₆ O ₁₇ H ₉	-2 H ₂ O

5.3 Επίδραση της προσθήκης ηλεκτρολυτών χλωριούχου νατρίου και ιωδιούχου καΐσιου στην ένταση σήματος του αναλύτη L-ανηγμένη γλουταθειόνη

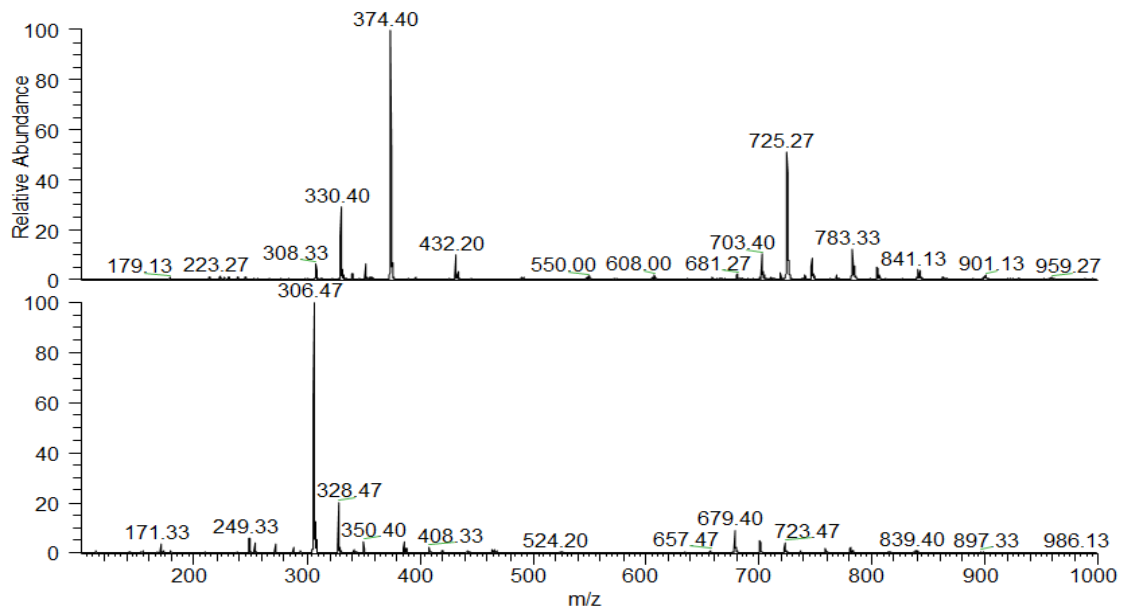
Η χρήση διαλυτών μεγάλης καθαρότητας κατά την ανάλυση ενός δείγματος με φασματομετρία μάζας και πηγή ηλεκτροψεκασμού, θεωρείται απαραίτητη για να αποφευχθεί η υποβάθμιση του σήματος του αναλύτη. Είναι γνωστό ότι μη-πτητικά άλατα σε υπολογίσιμες συγκεντρώσεις μειώνουν την τάση ατμών του διαλύτη και άρα παρεμβάνουν αρνητικά στον μηχανισμό εξάτμισης διαλύτη-συγκέντρωσης φορτίου-σχάσης σταγονιδίων που είναι καθοριστικός για την παραγωγή αερίων ιόντων. Ταυτόχρονα, στο εσωτερικό της σταγόνας φαινόμενα διάχυσης των ιόντων αυξάνονται με αύξηση της ποσότητας (συγκέντρωσης) ανά σταγόνα. Η διάχυση και αλληλεπίδραση μεταξύ αναλύτη και ιόντων υποβαθμίζει την συγκέντρωση του φορτίου στο μοριακό ιόν (πρωτονιωμένο, αποπρωτονιωμένο) μειώνοντας την ένταση σήματος. Τελικά, ο ανταγωνισμός μεταξύ διαφορετικών ιόντων για την κορυφή της σταγόνας και η αλληλεπίδραση τους δεν δρά ενισχυτικά της ανίχνευσης του αναλύτη που μας ενδιαφέρει. Για την κατανόηση της επίδρασης των μη-πτητικών αλάτων στην αναλυτική ικανότητα με την πηγή V-EASI χρησιμοποιήθηκε ο αναλύτης L-ανηγμένη γλουταθειόνη σε συγκέντρωση 300 μmole/lit σε όλες τις περιπτώσεις. Η πηγή V-EASI που συναρμολογήθηκε για το πείραμα είχε ως βάση τον εκνεφωτή TR-C-30 με πίεση εκνεφωτικού αερίου 40 psi σε όλες τις περιπτώσεις. Τα διαλύματα που παρασκευάστηκαν περιέχουν σε όλες τις περιπτώσεις 300 μmole/lit L-ανηγμένη γλουταθειόνη και 10,100,1000 και 10000 μmole/lit του ηλεκτρολύτη [χλωριούχο νάτριο (99.5%,Fluka) και ιωδιούχο καΐσιο (99.999% Sigma Aldrich)] για να εξακριβωθεί η επίδραση της συγκέντρωσης του ηλεκτρολύτη στον αναλύτη. Τα 4 αυτά διαλύματα παρασκευάστηκαν ως υδατικά διαλύματα αλλά και ως μείγματα 50:50 με μεθανόλη. Η θερμοκρασία της μεταφορικής στήλης ήταν 300°C, το δυναμικό στήλης 82 V στον θετικό ιοντισμό και -80 V στον αρνητικό ιοντισμό, το δυναμικό εστίασης φακού 95 V στον θετικό ιοντισμό και -95 V στον αρνητικό ιοντισμό. Το δυναμικό αποσυσωμάτωσης SID ήταν 45 V σε όλες τις περιπτώσεις.



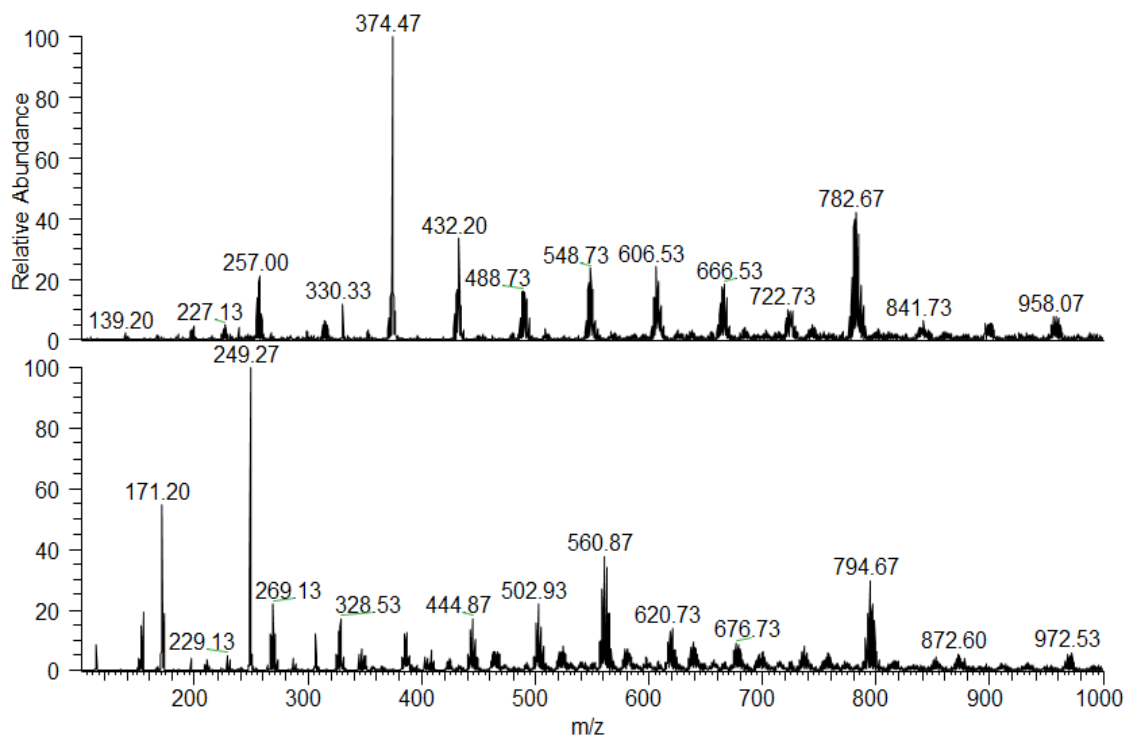
Εικόνα 6.2.1. Φάσματα μαζών υδατικού δ/τος L-ανηγμένης γλουταθειόνης με προσθήκη **10 μmole/lit NaCl** με πηγή V-EASI στον θετικό ιοντισμό(πάνω) και αρνητικοί (κάτω).



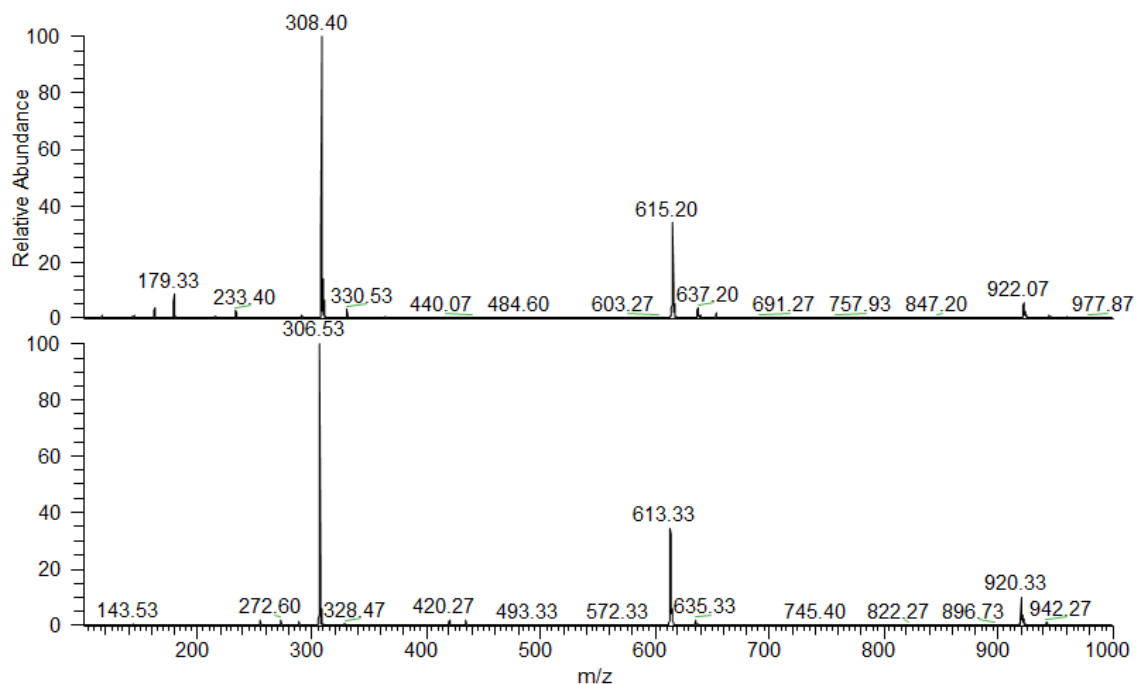
Εικόνα 6.2.2. Φάσματα μαζών υδατικού δ/τος L -ανηγμένης γλουταθειόνης με προσθήκη **100 μmole/lit NaCl** με πηγή V-EASI στον θετικό ιοντισμό(πάνω) και αρνητικό ιοντισμό (κάτω).



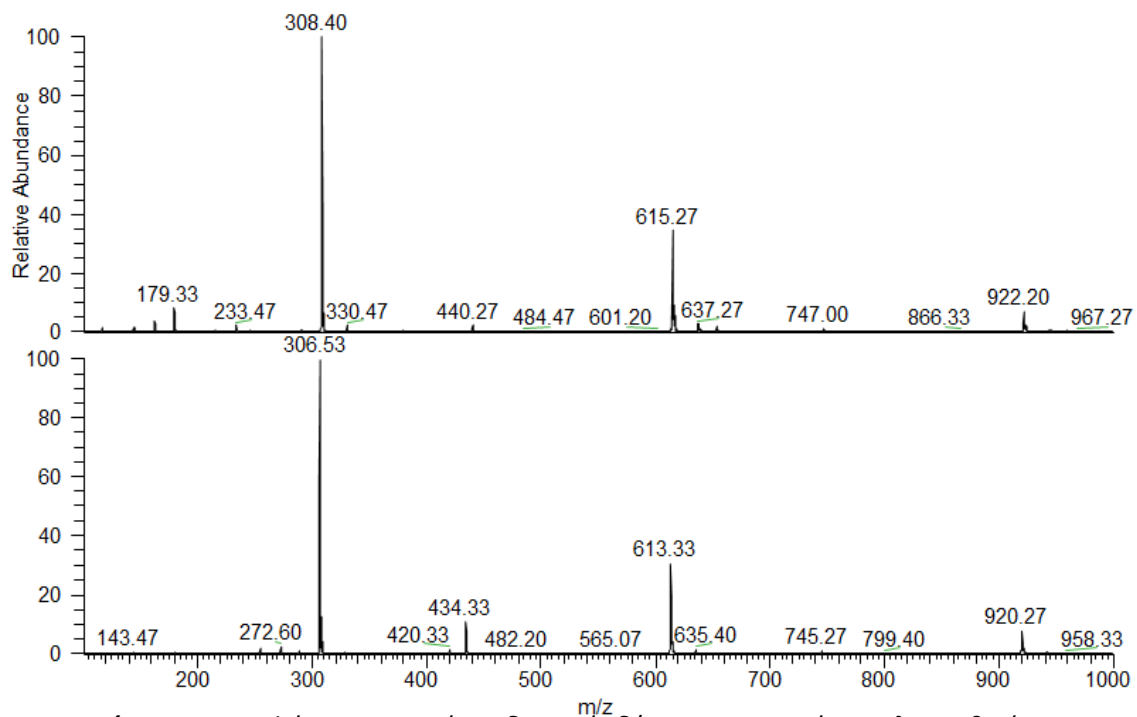
Εικόνα 6.2.3. Φάσματα μαζών υδατικού δ/τος L –ανηγμένης γλουταθειόνης με προσθήκη **1000 μmole/lit NaCl** με πηγή V-EASI στον θετικό ιοντισμό(πάνω) και αρνητικό ιοντισμό (κάτω).



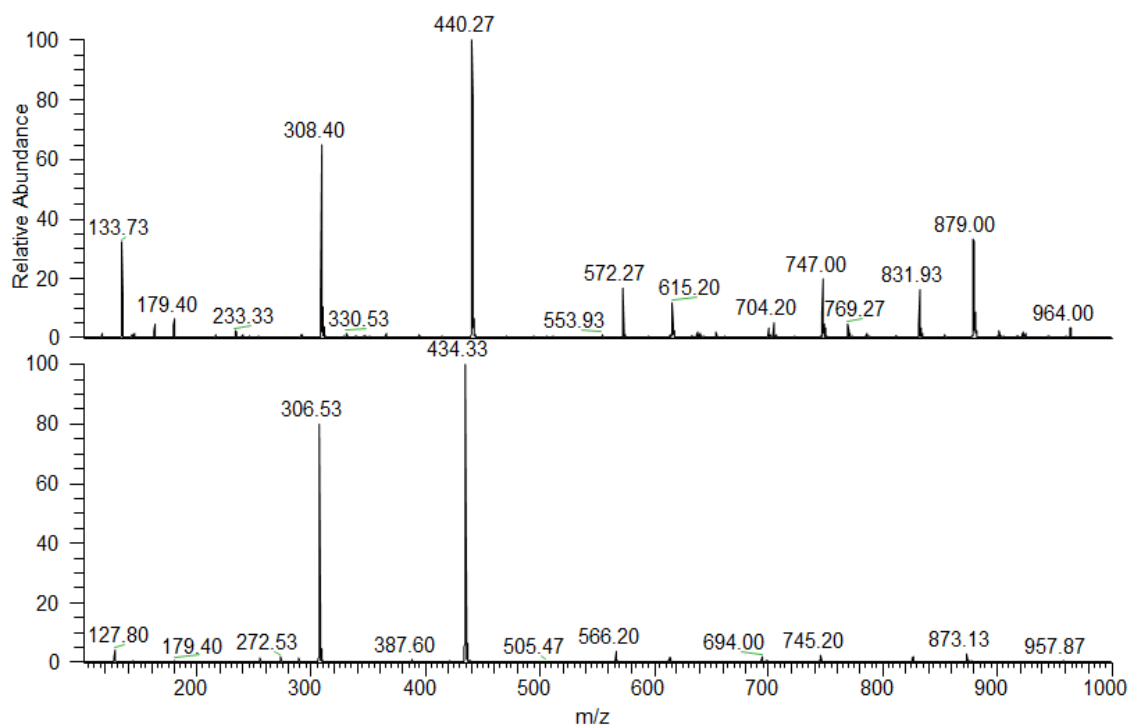
Εικόνα 6.2.4. Φάσματα μαζών υδατικού δ/τος L –ανηγμένης γλουταθειόνης με προσθήκη **10000 μmole/lit NaCl** με πηγή V-EASI στον θετικό ιοντισμό(πάνω) και αρνητικό ιοντισμό (κάτω).



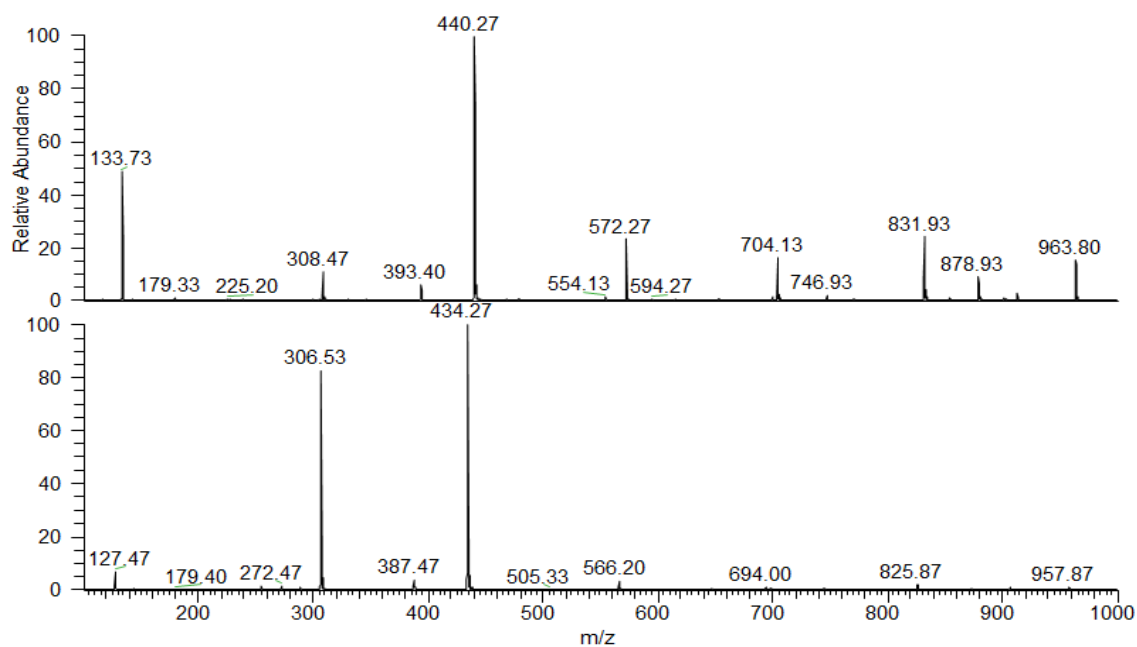
Εικόνα 6.2.5. Φάσματα μαζών υδατικού δ/τος L –ανηγμένης γλουταθειόνης με προσθήκη **10 μmole/lit CsI** με πηγή V-EASI στον θετικό ιοντισμό(πάνω) και αρνητικό ιοντισμό (κάτω).



Εικόνα 6.2.6. Φάσματα μαζών υδατικού δ/τος L –ανηγμένης γλουταθειόνης με προσθήκη **100 μmole/lit CsI** με πηγή V-EASI στον θετικό ιοντισμό (πάνω) και αρνητικό ιοντισμό (κάτω).

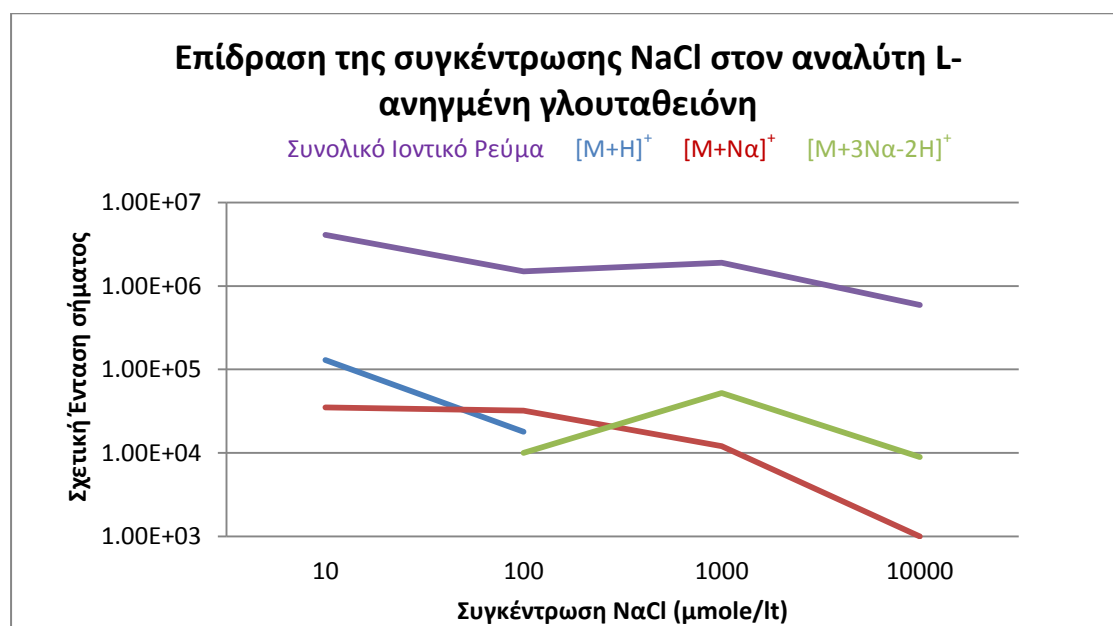


Εικόνα 6.2.7. Φάσματα μαζών υδατικού δ/τος L-ανηγμένης γλουταθειόνης με προσθήκη **1000 μmole/lit CsI** με πηγή V-EASI στον θετικόιοντισμό (πάνω) και αρνητικό ιοντισμό (κάτω).

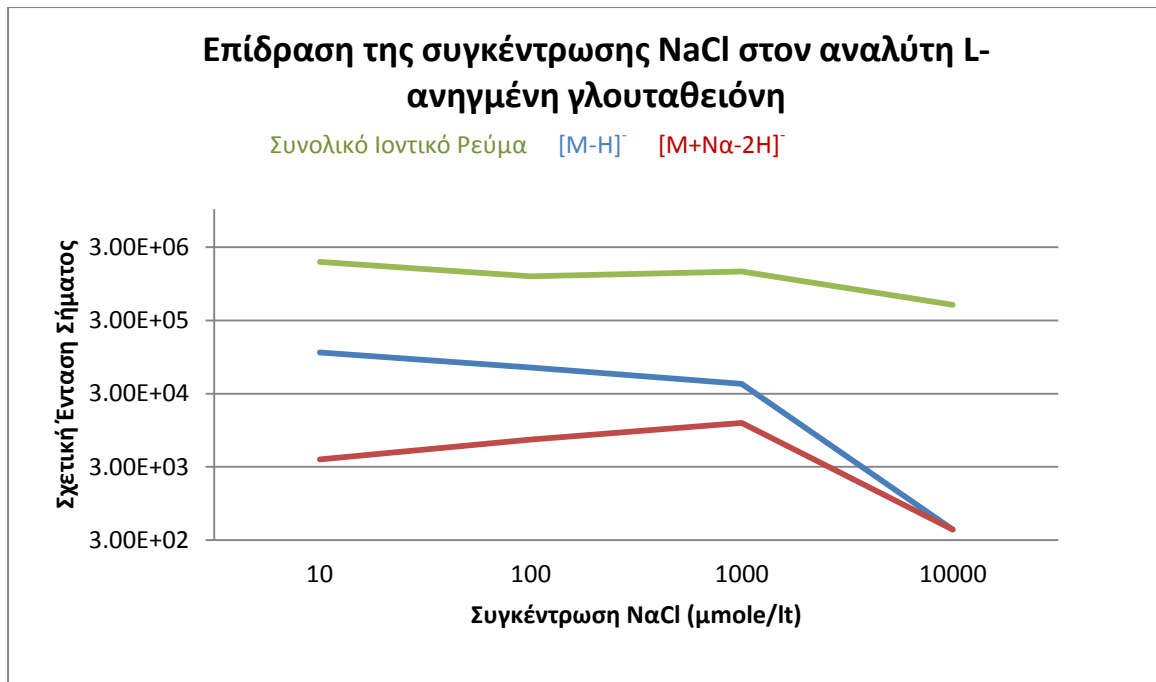


Εικόνα 6.2.8. Φάσματα μαζών υδατικού δ/τος L-ανηγμένης γλουταθειόνης με προσθήκη **10000 μmole/lit CsI** με πηγή V-EASI στον θετικό ιοντισμό(πάνω) και αρνητικό ιοντισμό (κάτω).

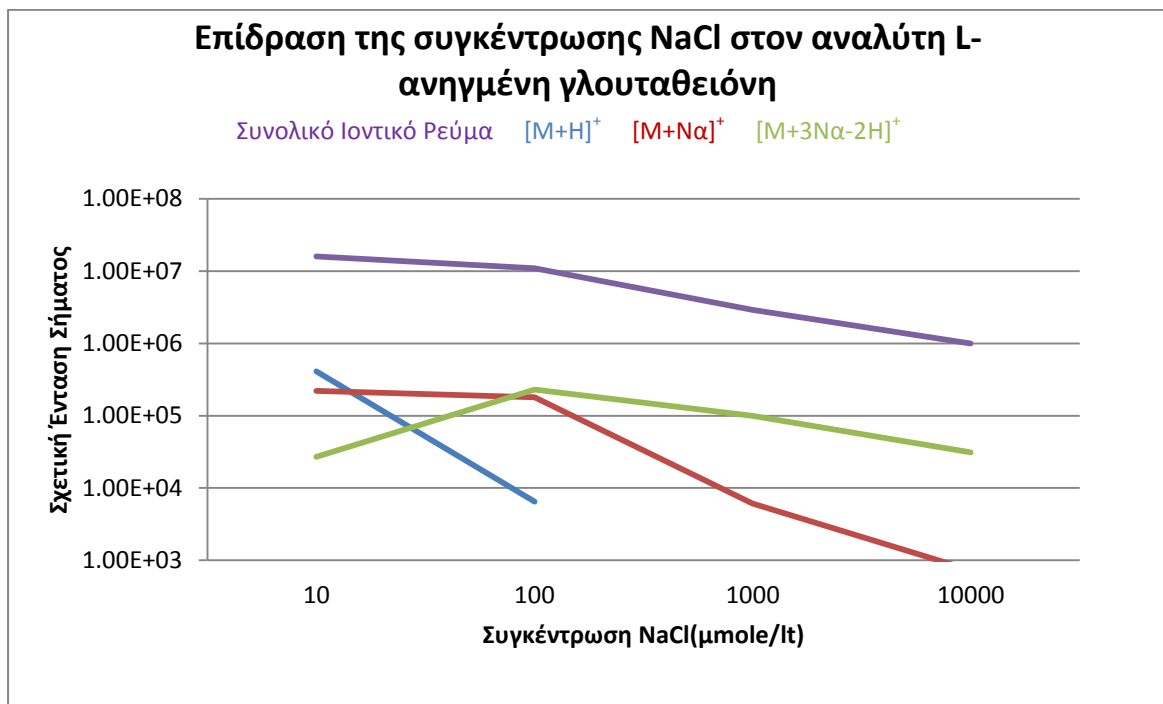
Η εικόνα 6.2.1 παρουσιάζει τα φάσματα σε θετικό και αρνητικό ιοντισμό του υδατικού δ/τος L-ανηγμένης γλουταθειόνης 300 $\mu\text{mole/lit}$ με προσθήκη 10 $\mu\text{mole/lit}$ χλωριούχου νατρίου. Οι κορυφές που εμφανίζονται είναι το πρωτονιωμένο μόριο $[\text{M}+\text{H}]^+$ με μάζα πρὸς φορτίο 308.4, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ με μάζα πρὸς φορτίο 330.5, το αποπρωτονιωμένο μόριο $[\text{M}-\text{H}]^-$ με μάζα πρὸς φορτίο 306.5, $[\text{M}+\text{Na}-2\text{H}]^-$ με μάζα πρὸς φορτίο 328.5, οι κορυφές των διμερών $[\text{2M}+\text{H}]^+$ με μάζα πρὸς φορτίο 615.1 και $[\text{2M}+\text{Na}]^+$ με μάζα πρὸς φορτίο 637.1, $[\text{2M}-\text{H}]^-$ με μάζα πρὸς φορτίο 613.1 και άλλες. Στη μελέτη αυτή θα επικεντρωθούμε στην κύρια κορυφή του μοριακού ιόντος και τα παράγωγα της που είναι χαρακτηριστικά των μεταβολών που συμβαίνουν στην σταγόνα. Οι εικόνες 6.2.2, 6.2.3 και 6.2.4 παρουσιάζουν τα φάσματα με προσθήκη χλωριούχου νατρίου 100, 1000 και 10000 $\mu\text{mole/lit}$. Αυτό που παρατηρείται είναι η αύξηση της σχετικής έντασης σήματος της κορυφής $[\text{M}+\text{Na}]^+$ και μείωση της σχετικής έντασης σήματος της κορυφής $[\text{M}+\text{H}]^+$. Η κορυφή $[\text{M}+3\text{Na}-2\text{H}]^+$ κυριαρχεί στις υψηλές συγκεντρώσεις NaCl ενώ στα φάσματα μαζών με προσθήκη 10000 $\mu\text{mole/lit}$ NaCl εμφανίζονται συσσωματώματα αλάτων και απουσία σήματος του αναλύτη. Ο αρνητικός ιοντισμός φαίνεται να είναι πιο επιλεκτικός ὡς προς το μοριακό ιόν αλλά ο εντοπισμός του καθίσταται αδύνατος με την προσθήκη 10000 $\mu\text{mole/lit}$ NaCl. Η εικόνα 6.2.5 παρουσιάζει τα φάσματα μαζών υδατικού δ/τος L-ανηγμένης γλουταθειόνης 300 $\mu\text{mole/lit}$ με προσθήκη 10 $\mu\text{mole/lit}$ ιωδιούχου καΐσιου όπου εντοπίζονται το μοριακό ιόν και το διμερές απο/πρωτονιωμένο σε θετικό και αρνητικό ιοντισμό. Με αύξηση της συγκέντρωσης του CsI σε 100, 1000 και 10000 παρατηρείται η παρουσία κορυφών ὡπως $[\text{M}+\text{Cs}]^+$ με μάζα πρὸς φορτίο 440.3, $[\text{M}+\text{I}]^-$ με μάζα πρὸς φορτίο 434.3, $[\text{M}+2\text{Cs}-\text{H}]^+$ με μάζα πρὸς φορτίο 572.3, $[\text{M}+3\text{Cs}-2\text{H}]^+$ με μάζα πρὸς φορτίο 704.1, $[\text{2M}+\text{Cs}]^+$ με μάζα πρὸς φορτίο 747.0 και άλλες. Η διαφορά μεταξύ των δύο αλάτων είναι ὅτι με το ιωδιούχο καΐσιο δεν παρατηρούνται συσσωματώματα του αλάτος και μη-εντοπισμός της αποπρωτονιωμένης κορυφής με προσθήκη 10000 $\mu\text{mole/lit}$ CsI.



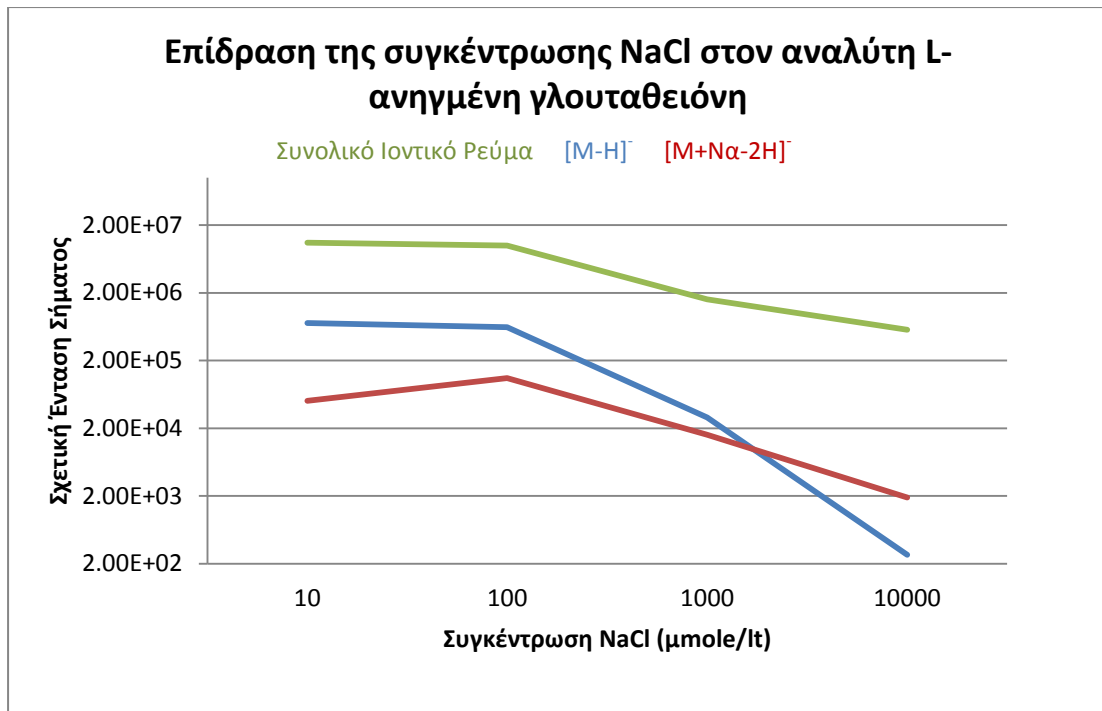
Γράφημα 6.2.9. Υδατικό δ/μα L-ανηγμένης γλουταθειόνης 300 $\mu\text{mole/lit}$ και ανάλυση με (+) V-EASI.



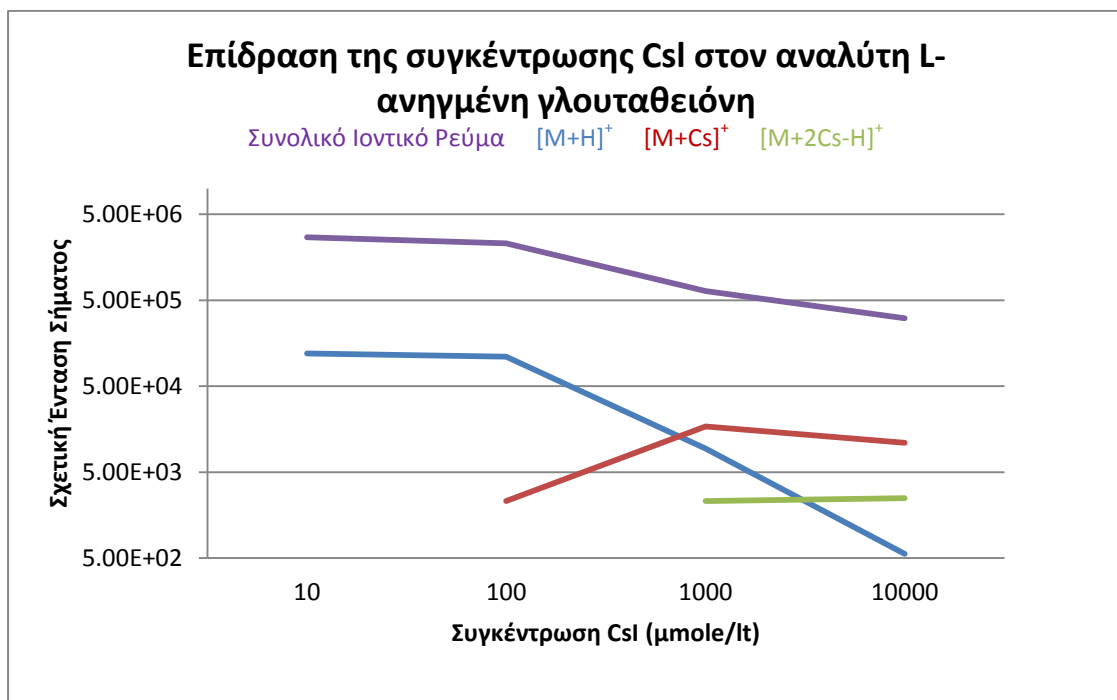
Γράφημα 6.2.10. Υδατικό δ/μα L-ανηγμένης γλουταθειόνης 300 μmole/lit και ανάλυση με (-) V-EASI.



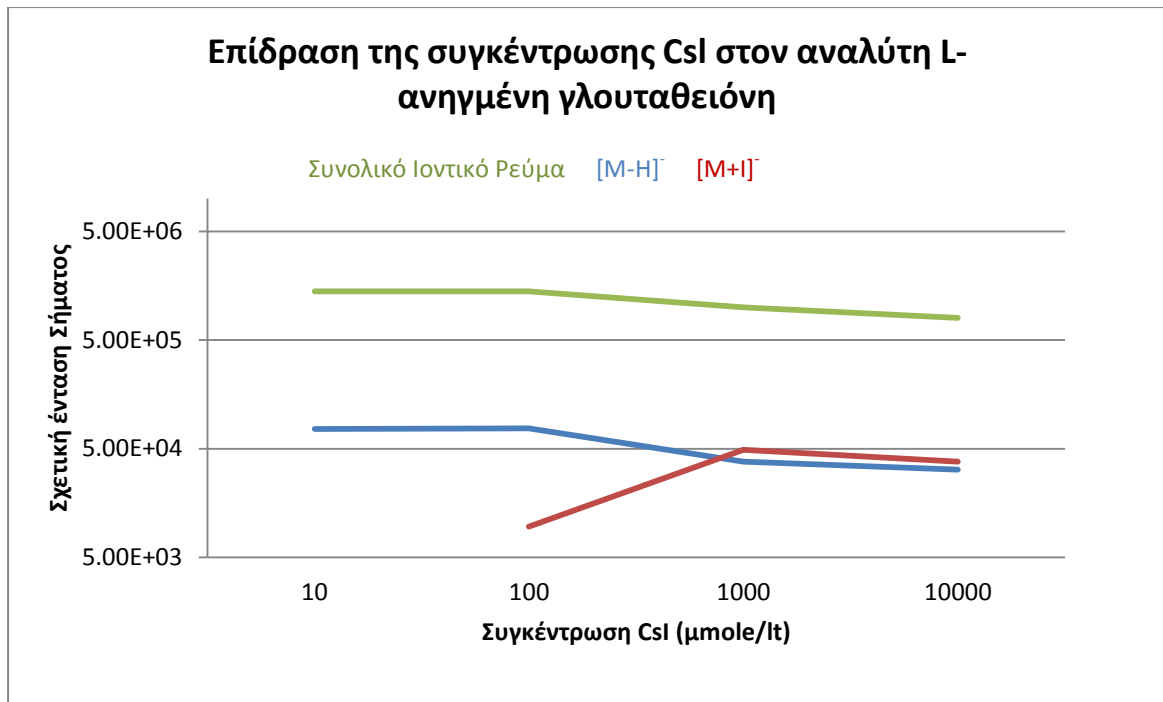
Γράφημα 6.2.11. Δ/μα Νερό/Μεθανόλη 50:50 L-ανηγμένης γλουταθειόνης 300 μmole/lit και ανάλυση με (+) V-EASI.



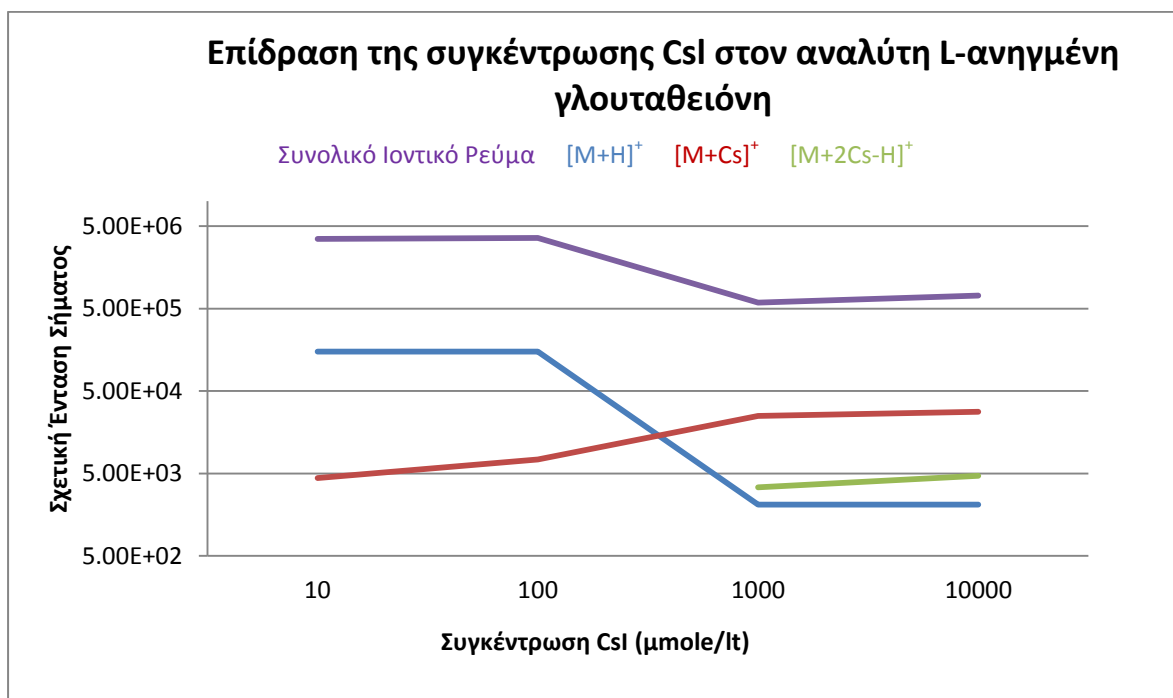
Γράφημα 6.2.12. Δ/μα Νερό/Μεθανόλη 50:50 L-ανηγμένης γλουταθειόνης 300 μmole/lit και ανάλυση με (-) V-EASI.



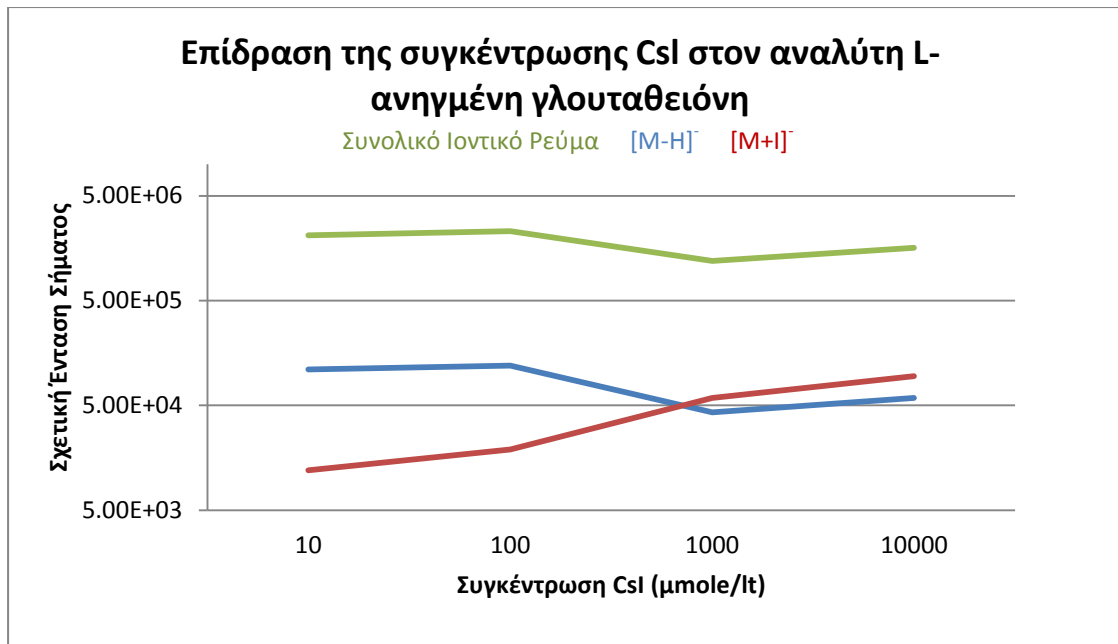
Γράφημα 6.2.13. Υδατικό δ/μα L-ανηγμένης γλουταθειόνης 300 μmole/lit και ανάλυση με (+) V-EASI.



Γράφημα 6.2.14. Υδατικό δ/μα L-ανηγμένης γλουταθειόνης 300 μmole/lit και ανάλυση με (-) V-EASI.



Γράφημα 6.2.15. Δ/μα Νερό/Μεθανόλη 50:50 L-ανηγμένης γλουταθειόνης 300 μmole/lit και ανάλυση με (+) V-EASI.



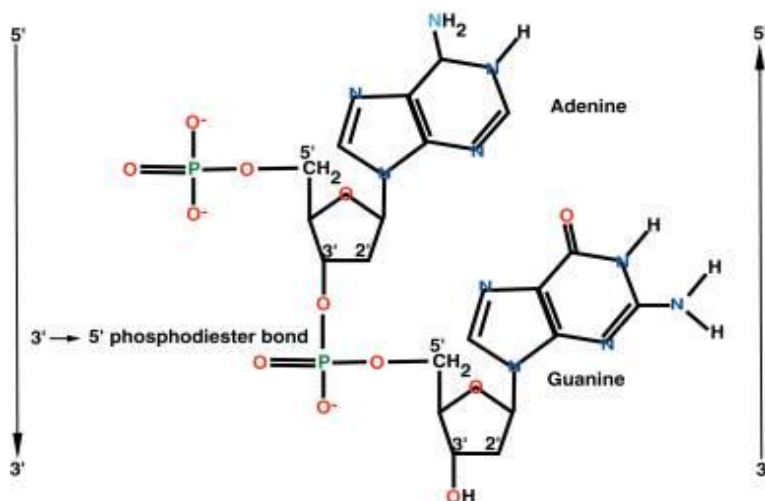
Γράφημα 6.2.16. Δ/μα Νερό/Μεθανόλη 50:50 L-ανηγμένης γλουταθειόνης 300 μmole/lit και ανάλυση με (-) V-EASI.

Συμπεράσματα

- Η προσθήκη ηλεκτρολύτη οδηγεί σε μείωση της σχετικής έντασης σήματος του μοριακού ιόντος.
- Η επίδραση του ηλεκτρολύτη είναι διαφορετικής έκτασης σε θετικό και αρνητικό ιοντισμό, με τον αρνητικό ιοντισμό να εμφανίζεται πιο εκλεκτικός στο μοριακό ιόν και σε «απλότερα» ιόντα. Το αποπρωτονιωμένο μόριο εντοπίζεται σε συγκέντρωση 1000 μmole/lit NaCl ενώ το πρωτονιωμένο κατιόν δεν εντοπίζεται.
- Η παρουσία του διαλύτη μεθανόλη επιδρά στο συνολικό ιοντικό ρεύμα, όπως αναμένεται, αλλά και στον σχηματισμό παραγώγων ενώσεων με το άλας στην περίπτωση του NaCl. Όπως φαίνεται στο γράφημα 6.2.11 οι κορυφές [M+H]⁺ και [M+Na]⁺ είναι συγκρίσιμης έντασης ακόμα και σε συγκέντρωση 10 μmole/lit NaCl.
- Ο σχηματισμός παραγώγων ενώσεων με το ιωδιούχο καίσιο είναι σημαντικός αλλά σε αντίθεση με το χλωριούχο νάτριο η κορυφή [M-H]⁻ εντοπίζεται ακόμα και όταν προστέθηκαν 10000 μmole/lit CsI.
- Το συνολικό ιοντικό ρεύμα είναι μικρότερο με την προσθήκη ιωδιούχου καϊσίου σε σύγκριση με την προσθήκη των ίδιων γραμμομορίων χλωριούχου νατρίου. Η γενικότερη τάση είναι το συνολικό ιοντικό ρεύμα να μειώνεται σημαντικά στις υψηλές συγκεντρώσεις άλατος με εξαίρεση τα συνολικά αρνητικά ιόντα στην περίπτωση προσθήκης ιωδιούχου καϊσίου.

5.4 Επίδραση πρόσθετων συστατικών στην ανάλυση ολιγονουκλεοτιδίων με V-EASI MS.

Τα μονόκλινα πολυμερή νουκλεϊκά οξέα (ολιγονουκλεοτίδια) του DNA αποτελούνται από τις βάσεις θυμίνη, αδενίνη, γουανίνη και κυτοσίνη συδεδεμένες με δεοξυριβόζη και ένα φωσφορικό. Οι δεοξυριβόζες συνδέονται μεταξύ τους με φωσφοδιεστερικούς δεσμούς κατά την αντίδραση ενός τριφωσφορικού εστέρα της 3' υδροξυλικής ομάδας της δεοξυριβόζης με την 5' υδροξυλική ομάδα της επόμενης βάσης³¹.



Εικόνα 6.4.1 Ο φωσφοδιεστερικός δεσμός και τα ελεύθερα άκρα 5' και 3'.

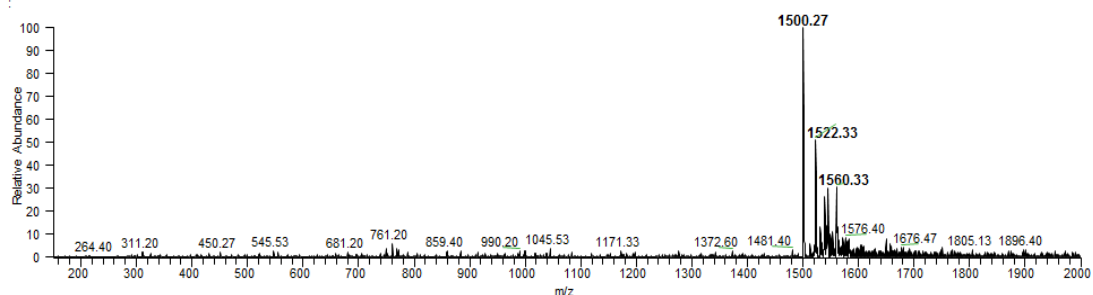
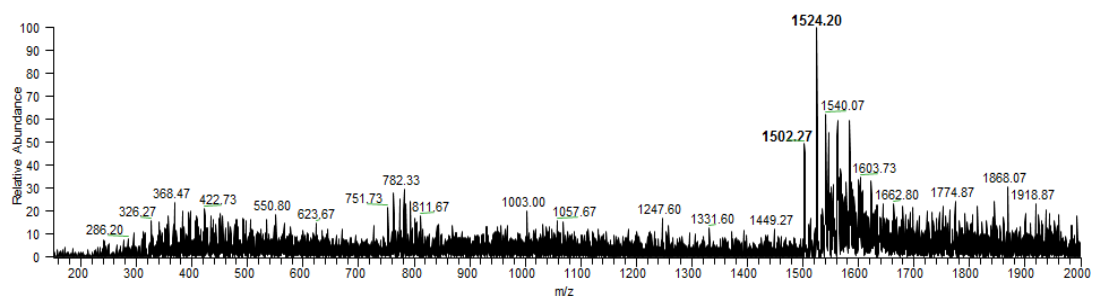
Η ανάλυση των ολιγονουκλεοτιδίων με την χρήση της φασματομετρίας μάζας προσφέρει συγκριτικά πλεονεκτήματα όπως τις δομικές πληροφορίες που μπορεί να εξάγει ο ερευνητής με την χρήση διαδοχικής φασματομετρίας μάζας και ακρίβειας μάζας. Παράγοντες που επηρεάζουν σημαντικά την ανάλυση των ολιγονουκλεοτιδίων με την χρήση φασματομετρίας μάζας είναι η μήτρα του δείγματος που τυχαίνει πολλές φορές να είναι φορτωμένη με πρόσθετα άλατα κ.α και η ευαισθησία των ολιγονουκλεοτιδίων στις μεταβολές των συνθηκών του οργάνου. Πρόσφατα αναφέρθηκε, ότι η χρήση της ρυθμιστικής ένωσης Tris ([υδροξύμεθυλο] αμινομεθάνιο) που περιέχει τρεις υδροξύλο ομάδες και μια αμινο ομάδα, ενισχύει την ιοντική ισχύ του αρνητικού ιοντισμού καθώς και μεταβάλλει την κατανομή των αρνητικών ιόντων σε υψηλότερα φορτία⁴⁶. Μάλιστα, η συγκέντρωση του Tris που δρά θετικά στον αρνητικό ιοντισμό είναι μεταξύ 0.4-0.5 μM. Στην ίδια μελέτη, αναφέρεται ότι το Tris επιδρά θετικά στην ένταση σήματος του ολιγονουκλεοτιδίου παρουσία αλάτων και άλλων πρόσθετων που συνήθως εντοπίζονται σε δείγματα PCR (Polymerase Chain Reaction). Από την άποψη των φυσικοχημικών επιπτώσεων, το Tris είναι μη-πτητική ένωση και άρα αναμένεται σε υψηλές συγκεντρώσεις να δρά αρνητικά στον ιοντισμό. Από χημική άποψη όμως λειτουργεί εξαιρετικά ως δέκτης πρωτονίων μειώνοντας την παρουσία τους στο διάλυμα και στα σταγονίδια. Ο λόγος της ενίσχυσης του αρνητικού ιοντισμού φαίνεται να είναι χημικός. Η άποψη αυτή επιβεβαιώνεται με την χρήση οξικού οξέος σε υδατικό διάλυμα ενός 20-μερούς ολιγονουκλεοτιδίου. Τα αποτελέσματα έδειξαν την μετατόπιση της κύριας κορυφής του δείγματος σε χαμηλότερα φορτία⁴⁷. Δηλαδή η αυξημένη συγκέντρωση υδρογονοκατιόντων μετατόπισε την κατανομή στον αρνητικό ιοντισμό σε χαμηλότερα φορτία.

Πείραμα

Προμηθεύσαμε τα ολιγονουκλεοτίδια 5'-TATAG[(SIGMA, Genosys) με μοριακό βάρος 1502.0 και 5'-GAT CGC AGC CCA TTA TGA AG-3' (H. Tzortzatos & CO) με μοριακό βάρος 6126.0. Ως βάση χρησιμοποιήθηκε το Tris(hydroxymethyl) aminomethane hydrochloride ($\geq 99.0\%$, Fluka). Το δυναμικό στήλης ήταν 7.5 V και -80V σε θετικό και αρνητικό ιοντισμό αντίστοιχα και το δυναμικό εστίασης φακού 20V και -95V σε θετικό και αρνητικό ιοντισμό αντίστοιχα. Η θερμοκρασία της στήλης κυμαινόταν μεταξύ 150°C έως 300°C και το δυναμικό αποσυσώματωσης από 5V έως 35V. Η συγκέντρωση των διαλυμάτων του ολιγονουκλεοτιδίου 5'-TATAG ήταν 0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ και του 5'-GAT CGC AGC CCA TTA TGA AG-3' ήταν 1.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Αποτελέσματα

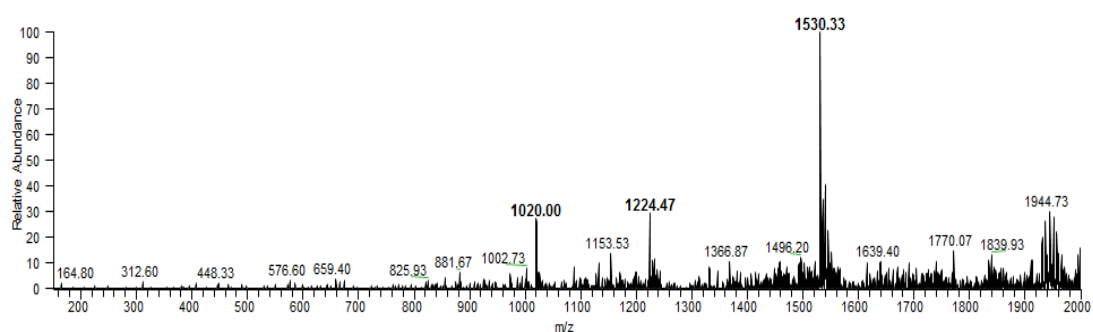
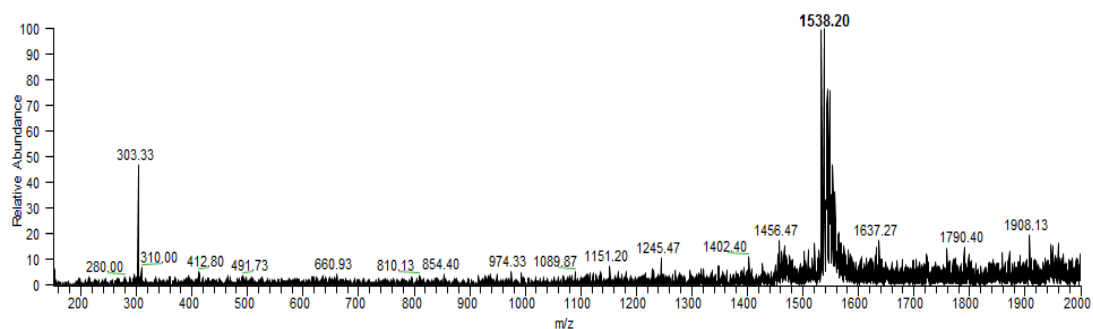
Η εικόνα 6.4.2 παρουσιάζει τα φάσματα του υδατικού δ/τος του ολιγονουκλεοτιδίου 5'-TATAG. Εντοπίζονται το πρωτονιωμένο μόριο $[M+H]^+$ με μάζα προς φορτίο 1502.2 καθώς και κορυφές $[M+Na]^+$ με μάζα προς φορτίο 1524.2, $[M+K]^+$ με μάζα προς φορτίο 1540.2, $[M+K+Na-H]^+$ με μάζα προς φορτίο 1562.2 κ.α. Επίσης εντοπίζονται τα αρνητικά ιόντα $[M-H]^-$ με μάζα προς φορτίο 1500.3, $[M+Na-2H]^-$ με μάζα προς φορτίο 1522.3, $[M+K-2H]^-$ 1538.3, $[M+K+Na-3H]^-$ με μάζα προς φορτίο 1560.3 κ.α Η παρουσία αρκετών παραγώγων ενώσεων αλκαλιμετάλλων είναι ενδειξη επιβαρυμένης μήτρας του δείγματος.



Εικόνα 6.4.2. Φάσματα μαζών υδατικού δ/τος του ολιγονουκλεοτιδίου 5'-TATAG με πηγή V-EASI σε θετικό (πάνω) και αρνητικό (κάτω) ιοντισμό. Θερμοκρασία στήλης: (+) (-) 300°C. Δυναμικό αποσυσώματωσης SID (+)(-) 20 V.

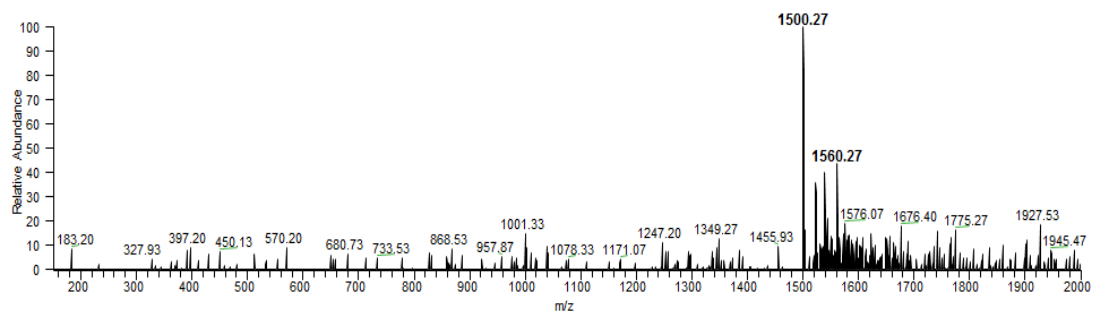
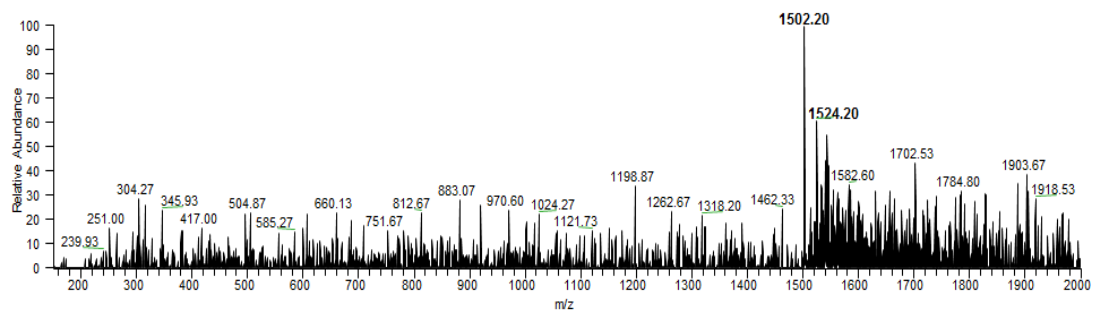
Η εικόνα 6.4.3 παρουσιάζει τα φάσματα του υδατικού δ/τος του ολιγονουκλεοτιδίου 5'-GAT CGC AGC CCA TTA TGA AG-3'. Στον θετικό ιοντισμό εντοπίζονται οι κορυφές $[M+4H]^{+4}$ με μάζα προς φορτίο 1532.3, $[M+Na+3H]^{+4}$ με μάζα προς φορτίο 1538.3, $[M+K+3H]^{+4}$ με μάζα προς φορτίο 1542.3, $[M+Na+K+2H]^{+4}$ με μάζα προς φορτίο 1547.3 κ.α. Στον αρνητικό ιοντισμό εντοπίζονται οι κορυφές $[M-4H]^{-4}$ με μάζα προς φορτίο 1530.3, $[M-5H+Na]^{-4}$ με μάζα προς φορτίο 1536.3, $[M-5H+K]^{-4}$ με μάζα προς φορτίο 1540.3, $[M-5H]^{-5}$ με μάζα προς

φορτίο 1224.5, $[M-6H+K]^{-5}$ με μάζα πρὸς φορτίο 1231.6 και $[M-6H]^{-6}$ με μάζα πρὸς φορτίο 1020.0.

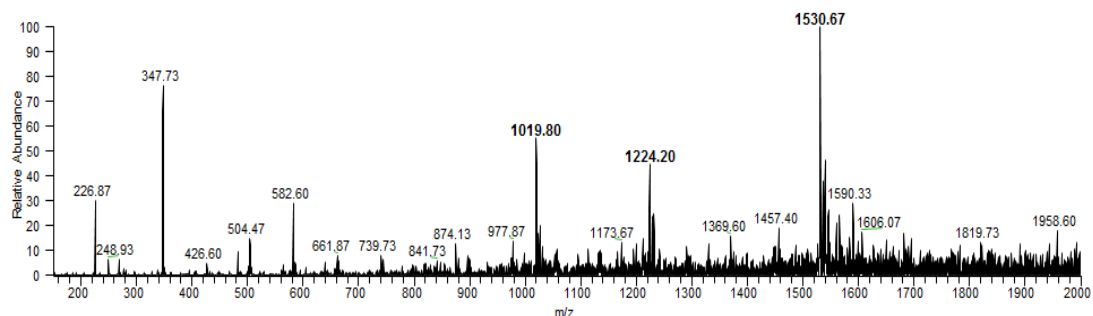
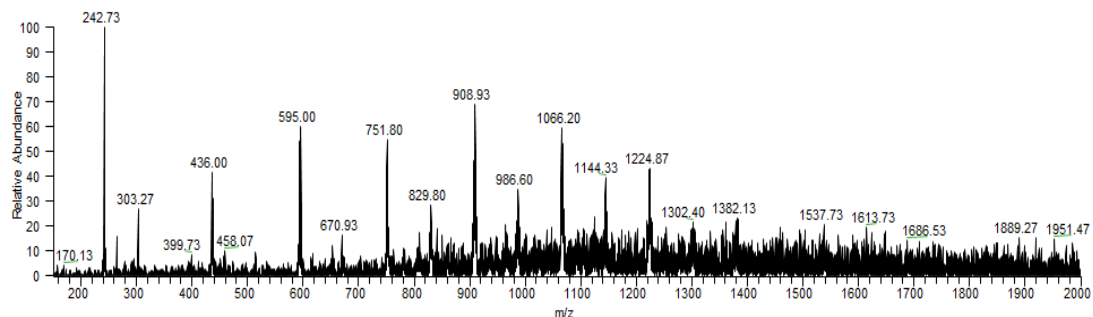


Εικόνα 6.4.3. Φάσματα μαζών υδατικού δ/τος του ολιγονουκλεοτιδίου 5`-GAT CGC AGC CCATTA TGA AG-3' με πηγή V-EASI σε θετικό (πάνω) και αρνητικό (κάτω) ιοντισμό. Θερμοκρασία στήλης: (+) (-) 200°C. Δυναμικό αποσυσμάτωσης SID (+)(-) 30 V.

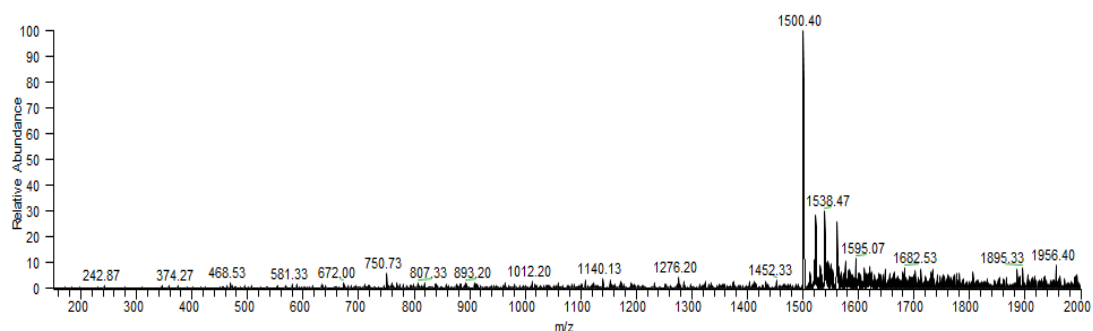
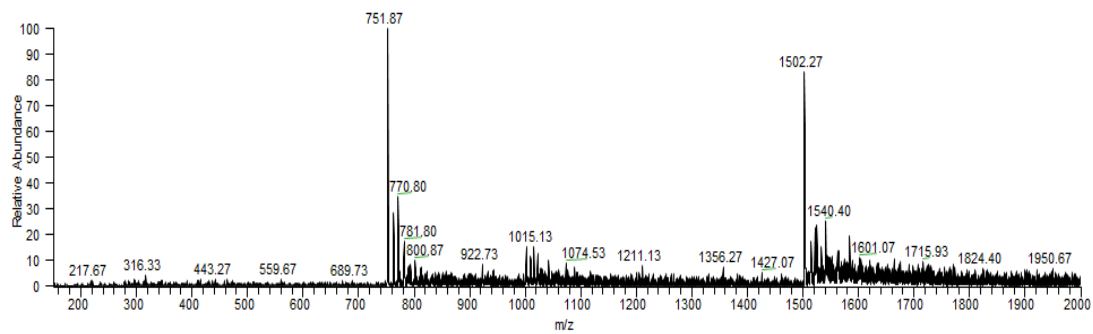
Οι εικόνες 6.4.4 και 6.4.5 παρουσιάζουν τα φάσματα μαζών των δύο ολιγονουκλεοτιδίων όταν προστέθηκε στο διάλυμα Tris. Τα αποτελέσματα δείχνουν δύο τελείως διαφορετικά πράγματα. Στην περίπτωση του ολιγονουκλεοτιδίου 5`-TATAG προκαλείται μία μείωση της έντασης σήματος ενώ και ο αρνητικός ιοντισμός δεν εμφανίζει παραπάνω φορτία. Αντίθετα το ολιγονουκλεοτίδιο 5`-GAT CGC AGC CCA TTA TGA AG-3' με προσθήκη 500 μM Tris παρουσιάζει αύξηση της συνολικού ιοντικού ρεύματος στον αρνητικό ιοντισμό και αύξηση της σχετικής αφθονίας των κορυφών $[M-5H]^{-5}$ και $[M-6H]^{-6}$. Στον θετικό ιοντισμό εμφανίζονται συσσωματώματα του Tris με διαφορά μάζας 157.0 και δεν εντοπίζεται καθόλου το ολιγονουκλεοτίδιο. Οι εικόνες 6.4.6 και 6.4.8 παρουσιάζουν τα φάσματα μαζών του ολιγονουκλεοτιδίου 5`-TATAG με προσθήκη 100 μM οξικού αμμωνίου και 1% Οξικό Οξύ αντίστοιχα. Η κατανομή των ιόντων είναι πανομοιότυπη. Εμφανίζονται οι διφορτισμένες κορυφές $[M+2H]^{+2}$ με μάζα πρὸς φορτίο 752.0, $[M+Na+H]^{+2}$ με μάζα πρὸς φορτίο 763.5, $[M+K+H]^{+2}$ με μάζα πρὸς φορτίο 771.0, $[M+Na+K]^{+2}$ με μάζα πρὸς φορτίο 782.1 κ.α



Εικόνα 6.4.4. Φάσματα μαζών υδατικού δ/τος του ολιγονουκλεοτιδίου 5'-TATAG(+ Tris 400 μM) με πηγή V-EASI σε θετικό (πάνω) και αρνητικό (κάτω) ιοντισμό. Θερμοκρασία στήλης: (+) (-) 300°C. Δυναμικό αποσυσμάτωσης SID (+)(-) 10 V.

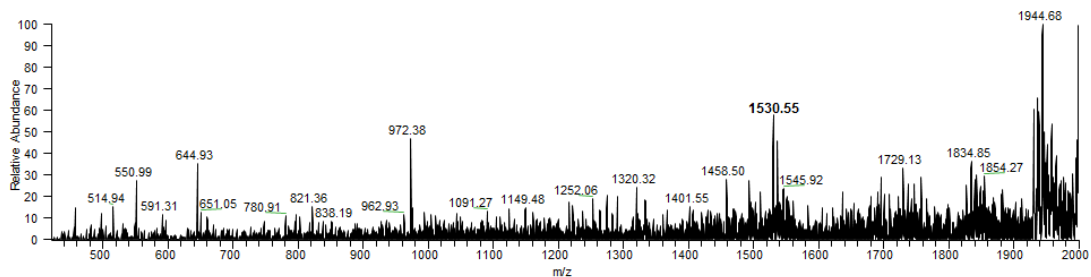
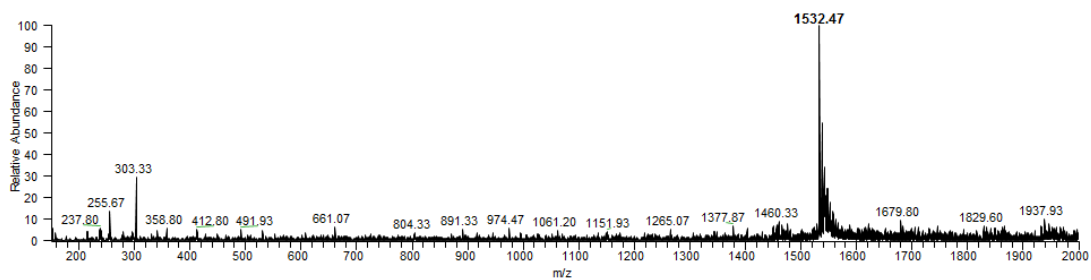


Εικόνα 6.4.5. Φάσματα μαζών υδατικού δ/τος του ολιγονουκλεοτιδίου 5'-GAT CGC AGC CCATTA TGA AG-3'(+ Tris 500 μM) με πηγή V-EASI σε θετικό (πάνω) και αρνητικό (κάτω) ιοντισμό. Θερμοκρασία στήλης: (+) (-) 1500°C. Δυναμικό αποσυσμάτωσης SID (+)(-) 35 V.

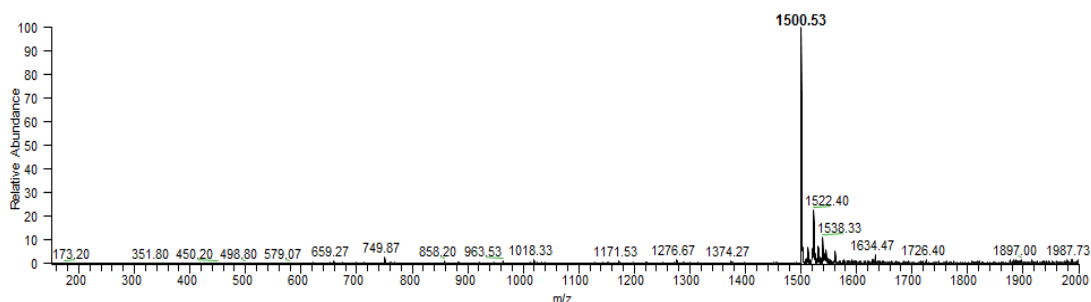
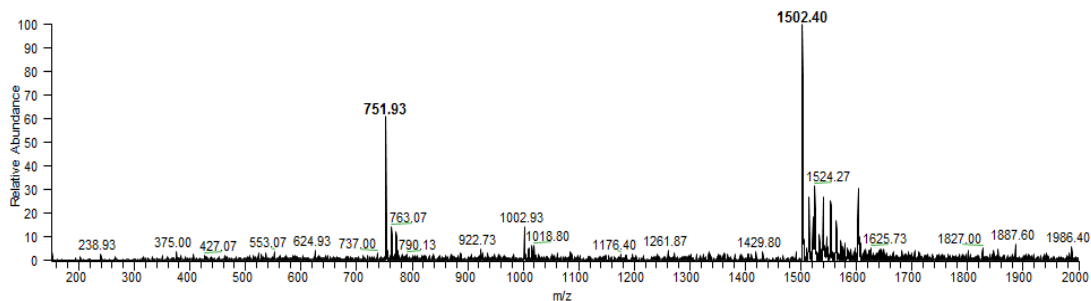


Εικόνα 6.4.6. Φάσματα μαζών υδατικού δ/τος του ολιγονουκλεοτιδίου 5`-TATAG(+οξικό αμμώνιο 100 μ M) με πηγή V-EASI σε θετικό (πάνω) και αρνητικό (κάτω) ιοντισμό. Θερμοκρασία στήλης: (+) (-) 300°C. Δυναμικό αποσυσωμάτωσης SID (+)(-) 10 V.

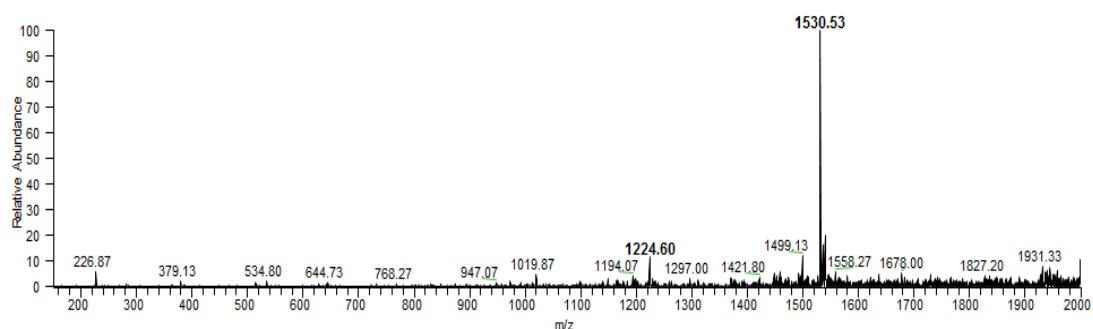
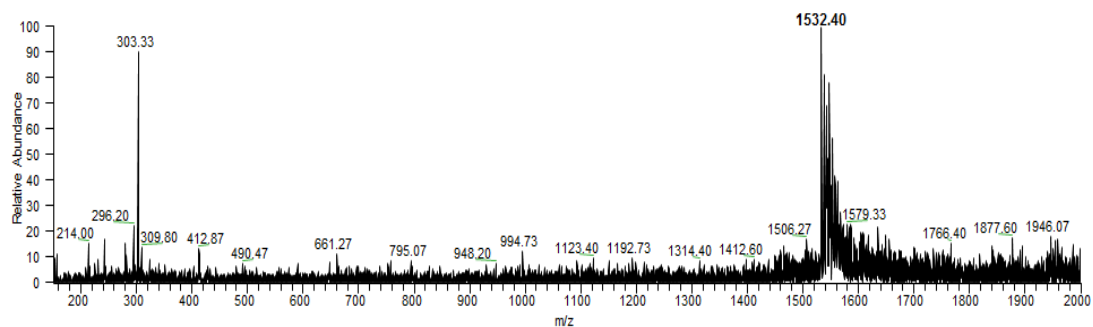
Στην περίπτωση του ολιγονουκλεοτιδίου 5`-GAT CGC AGC CCA TTA TGA AG-3' η προσθήκη οξικού αμμωνίου λειτουργεί με διαφορετικό τρόπο. Πρέπει να σημειωθεί βέβαια ότι οι ποσότητες που προστέθηκαν δεν είναι ίδιες. Ο αρνητικός ιοντισμός με προσθήκη 100 mM οξικού αμμωνίου υποβαθμίζεται σημαντικά ενώ στον θετικό ιοντισμό η ένταση σήματος διατηρείται ενώ και το φάσμα απλοποιείται με μείωση του θορύβου. Πολύ ενιαφέρον είναι το φάσμα του αρνητικού ιοντισμού της εικόνας 6.4.9 με προσθήκη 0.1% Οξικό Οξύ στο διάλυμα του ολιγονουκλεοτιδίου 5`-GAT CGC AGC CCA TTA TGA AG-3'. Η ένταση σήματος συγκεντρώνεται στην κορυφή $[M-4H]^{-4}$ απλοποιώντας το φάσμα και αυξάνοντας την ευαισθησία. Η αύξηση της ιοντικής ισχύς του αρνητικού ιοντισμού με προσθήκη μικρής ποσότητας του οξικού οξέος δεν αποτελεί παράδοξο αφού το ανιόν του οξικού στην αέρια φάση λειτουργεί ως βάση αφαιρώντας πρωτόνια από τον αναλύτη. Στις μελέτες του Huang^{43,44}, υπολογίστηκε ότι αντιστοιχεί ένα φορτίο ανα 3 νουκλεοτίδια ως προς την κύρια κορυφή. Άρα θα αναμέναμε το ολιγονουκλεοτίδιο με 20 βάσεις που χρησιμοποιήθηκε να έχει κύρια κορυφή με 6 ή 7 φορτία και όχι με 4 που παρατηρούμε. Αυτό οφείλεται στην πηγή ιοντισμού του Huang που αν και αναφέρεται ως υπερηχητικής εκνέφωσης, χρησιμοποιεί δυναμικό πηγής έως 1.6 kV, αυξάνοντας την συγκέντρωση φορτίου και την αποτελεσματικότητα του ιοντισμού. Το Tris φαίνεται να οδηγεί την κατανομή των αρνητικών κορυφών σε χαμηλότερες μάζες προς φορτίο ενώ η προσθήκη οξέος σε περιεκτικότητα 0.1 % παρουσιάζει ενδιαφέρον αν αναζητείται τρόπος αύξησης της ευαισθησίας.



Εικόνα 6.4.7. Φάσματα μαζών υδατικού δ/τος του ολιγονουκλεοτιδίου 5'-GAT CGC AGC CCATTA TGA AG-3'(+ οξικό αμμώνιο 100 mM) με πηγή V-EASI σε θετικό (πάνω) και αρνητικό (κάτω) ιοντισμό. Θερμοκρασία στήλης: (+) (-) 200°C. Δυναμικό αποσυσωμάτωσης SID (+)(-) 35 V.



Εικόνα 6.4.8. Φάσματα μαζών υδατικού δ/τος του ολιγονουκλεοτιδίου 5'-TATAG(+Οξικό Οξύ 1.0 %) με πηγή V-EASI σε θετικό (πάνω) και αρνητικό (κάτω) ιοντισμό. Θερμοκρασία στήλης: (+) (-) 300°C. Δυναμικό αποσυσωμάτωσης SID (+)(-) 10 V.



Εικόνα 6.4.9. Φάσματα Μαζών υδατικού δ/τος του ολιγονουκλεοτιδίου 5`-GAT CGC AGC CCATTA TGA AG-3'(+ **Οξικό Οξύ 0.1%**) με πηγή V-EASI σε θετικό (**πάνω**) και αρνητικό(**κάτω**) ιοντισμό. Θερμοκρασία στήλης: (+)200°C (-) 160°C. Δυναμικό αποσυσμάτωσης SID (+)(-) 35 V.

Πίνακας 6.4.10

Υδατικό Δ/μα 5`-TATAG 0.6 ppm	Σχετική ένταση σήματος	Υδατικό Δ/μα 5`-GAT CGC AGC CCATTA TGA AG-3' 1.7 ppm	Σχετική ένταση σήματος
Σκέτο νερό (+)	$1 \cdot 10^4$	Σκέτο νερό (+)	$1.5 \cdot 10^5$
Σκέτο νερό (-)	$3.4 \cdot 10^4$	Σκέτο νερό (-)	$7.5 \cdot 10^4$
+Tris 400 μM (+)	$9 \cdot 10^2$	+Tris 500 μM (+)	0
+Tris 400 μM (-)	$1.7 \cdot 10^3$	+Tris 500 μM (-)	$1.2 \cdot 10^5$
+100 μM Οξικό Αμμώνιο (+)	$4.5 \cdot 10^4$	+100 mM Οξικό Αμμώνιο (+)	$1.4 \cdot 10^5$
+100 μM Οξικό Αμμώνιο (-)	$1.8 \cdot 10^4$	+100 mM Οξικό Αμμώνιο (-)	$5 \cdot 10^3$
+1.0% Οξικό Οξύ (+)	$1 \cdot 10^5$	+0.1% Οξικό Οξύ (+)	$1.6 \cdot 10^5$
+1.0% Οξικό Οξύ (-)	$6 \cdot 10^4$	+0.1% Οξικό Οξύ (-)	$1.6 \cdot 10^5$

* Η σχετική ένταση σήματος υπολογίστηκε με προσθήκη της έντασης όλων των κορυφών

Γενικά Συμπεράσματα

- Η πηγή ιοντισμού V-EASI είναι απλή στην συνδεσμολογία, εύκολη στην χρήση και μη-ενεργοβόρα. Τα επιμέρους μέρη από τα οποία κατασκευάζεται μια πηγή V-EASI βρίσκονται εύκολα σε κάθε αναλυτικό εργαστήριο ενώ και το κόστος τους είναι μικρό. Έτσι η συναρμολόγηση μιας τέτοιας πηγής είναι εύκολη, γρήγορη και δεν κοστίζει πολύ. Η χρήση της είναι πολύ εύκολη με αποτέλεσμα να καθίσταται κατάλληλη για καθολική χρήση, εκτός των εξειδικευμένων αναλυτικών χημικών. Επίσης, με την πηγή V-EASI, η εισαγωγή του διαλύματος επιτυγχάνεται με αυτοτροφοδοτούμενη ροή χωρίς την χρήση συστήματος αντλίας-σύριγγας ενώ τα ιόντα δημιουργούνται μόνο με εκνεφωτικό αέριο, χωρίς δυναμικά. Έτσι, η κατανάλωση σε ενέργεια είναι μηδενική.
- Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η πηγή V-EASI δημιουργεί ιόντα χαμηλότερης εσωτερικής ενέργειας, σε σύγκριση με τον ηλεκτροψεκασμό. Αυτή η παρατήρηση πιθανώς οφείλεται στην διάμετρο της αρχικής σταγόνας, που είναι αρκετά μεγαλύτερη με την πηγή V-EASI. Οι μεγαλύτερες σταγόνες μεταφράζονται σε μεγαλύτερη προστασία των ιόντων από τις υψηλές θερμοκρασίες της στήλης μεταφοράς ιόντων, στο χρόνο που βρίσκονται εκεί. Στην περίπτωση των ετερομεταλλικών συμπλόκων των λανθανιδών, παρατηρούνται διαφορές μεταξύ των δύο πηγών ιοντισμού αλλά και διαφορές μεταξύ της θετικής και αρνητικής πολικότητας ανάλυσης με την αρνητική πολικότητα να δείχνει πιο ευαίσθητη στις συνθήκες ανάλυσης και με τις δύο πηγές. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν να συμφωνούν με το μοντέλο αεροδυναμικής σχάσης αλλά και κάποια άλλη εξήγηση δεν μπορεί να αποκλεισθεί (π.χ ασύμμετρη σχάση στο μοντέλο C.R.M).
- Η πηγή V-EASI δημιουργεί ταυτόχρονα θετικά και αρνητικά ιόντα (\pm V-EASI) από την ίδια αρχική σταγόνα, ενώ παράμετροι όπως η οξύτητα και η σύσταση του διαλύτη επιδρούν με παρόμοιο τρόπο σε θετικό και αρνητικό ιοντισμό. Αντιθέτως, ο ηλεκτροψεκασμός ευνοεί σε διαφορετικές συνθήκες θετικό(+ESI) και αρνητικό ιοντισμό(-ESI).
- Η επίδραση χημικών παραμέτρων όπως το pH, η οξύτητα, η σύσταση του διαλύτη στην μορφή του φάσματος και την ευαισθησία δεν είναι ίδια στις πηγές ηλεκτροψεκασμού και V-EASI. Το αποτέλεσμα αυτό σημειώνει την σημασία της πηγής ιόντων στην μορφή του φάσματος.
- Με την πηγή V-EASI απουσιάζουν πιθανές ηλεκτροχημικές παρεμβολές.
- Η ένταση σήματος αναλύτη και άρα η ευαισθησία, επηρεάζονται από την σχετική θέση του τριχοειδή σωλήνα ως προς την άκρη του εκνεφωτή, την πίεση του αερίου εκνέφωσης, την περιεκτικότητα του διαλύτη σε πολικό οργανικό διαλύτη (μεθανόλη) και την επιφανειακή τάση του αναλύτη. Μια παράμετρος που επηρεάζεται από όλες τις προηγούμενες παραμέτρους είναι η ροή του διαλύματος που με την σειρά του συνδέεται με το ιξώδες του διαλύματος. Έτσι, με αύξηση της πίεσης του αερίου εκνέφωσης, στις περισσότερες περιπτώσεις, παρατηρείται αύξηση της ροής διαλύματος και αύξηση έντασης σήματος. Οπότε η ροή διαλύματος επηρεάζει την ένταση σήματος. Η ροή επηρεάζεται επίσης από την σχετική θέση του τριχοειδή σωλήνα, με την θέση στην άκρη του εκνεφωτή και λίγο πριν να έχουν τις μεγαλύτερες ροές. Η ένταση σήματος σχετίζεται με αυτές τις τάσεις αλλά όχι ακριβώς αφού το μέγιστο της έντασης σήματος παρατηρείται στην άκρη του εκνεφωτή πάντα. Το ιξώδες του διαλύτη

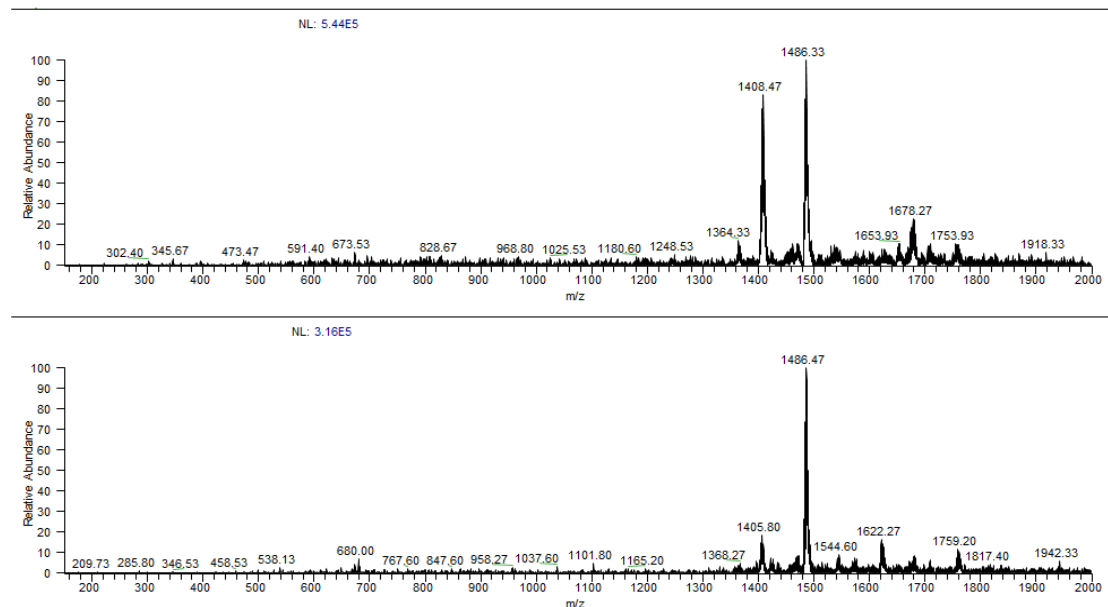
έχει αντίστροφη σχέση με την ροή. Σε διαλύτες νερό 100 %, μεθανόλη 50% και μεθανόλη 90% το μικρότερο ιξώδες και μεγαλύτερη ροή παρατηρήθηκε με περιεκτικότητα σε μεθανόλη 90% και το μεγαλύτερο ιξώδες και μικρότερη ροή με περιεκτικότητα σε μεθανόλη 50%.

- Η προσθήκη ηλεκτρολύτη οδηγεί σε μείωση της σχετικής έντασης σήματος του μοριακού ιόντος με την πηγή V-EASI. Η επίδραση του ηλεκτρολύτη είναι διαφορετικής έκτασης σε θετικό και αρνητικό ιοντισμό, με τον αρνητικό ιοντισμό να εμφανίζεται πιο εκλεκτικός στο μοριακό ιόν. Η παρουσία του διαλύτη μεθανόλη επιδρά στο συνολικό ιοντικό ρεύμα, όπως αναμένεται, αλλά και στον σχηματισμό παραγώγων ενώσεων με το άλας στην περίπτωση του NaCl. Ο σχηματισμός παραγώγων ενώσεων με το ιωδιούχο καίσιο είναι σημαντικός αλλά μικρότερης έντασης σε σχέση με το χλωριούχο νάτριο. Το συνολικό ιοντικό ρεύμα είναι μικρότερο με την προσθήκη ιωδιούχου καΐσιου σε σύγκριση με την προσθήκη των ίδιων γραμμομορίων χλωριούχου νατρίου.
- Η χρήση διπλής πηγής V-EASI, για ταυτόχρονη εισαγωγή ένωσης βαθμονόμησης και αναλύτη, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για εφαρμογές μέτρησης μάζας με ακρίβεια και συναρμολογείται εύκολα. Το συγκριτικό πλεονέκτημα της διάταξης αυτής, εκτός από την ταυτόχρονη εισαγωγή ένωσης βαθμονόμησης-αναλύτη, είναι η μη-αλληλεπίδραση της ροής του ενός εκνεφωτή με τον άλλο.

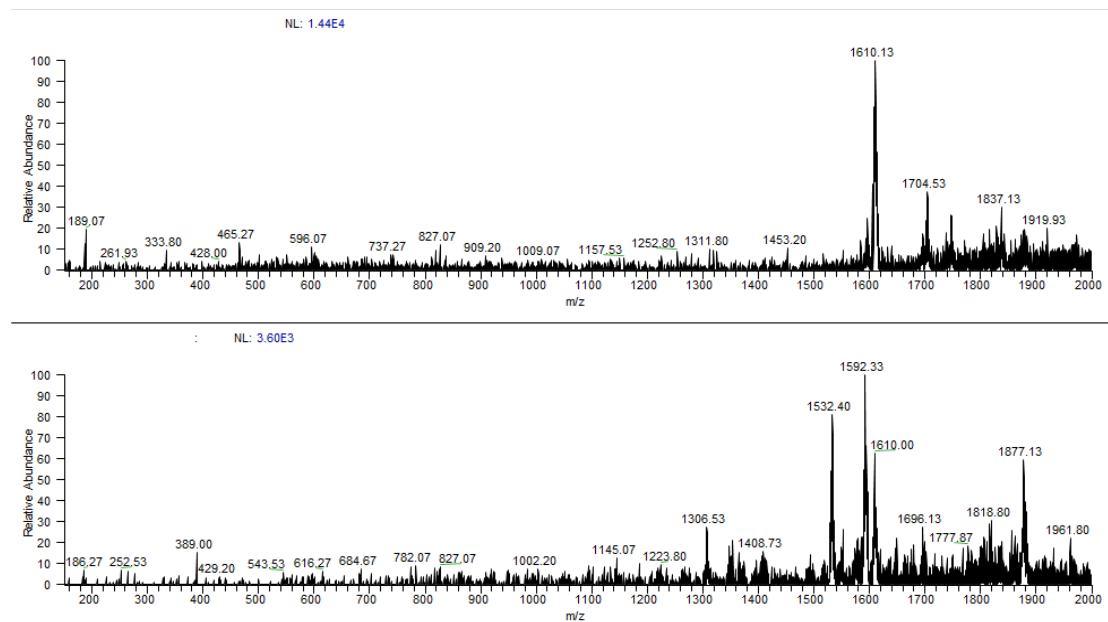
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α. Δεδομένα των ενώσεων συναρμογής των λανθανιδών.

Διάλυμα $Cu_6Pr(aib)_6(OH)_3(oAC)_3(NO_3)_3$ σε ακετονιτρίλιο συγκέντρωσης 67 ppm

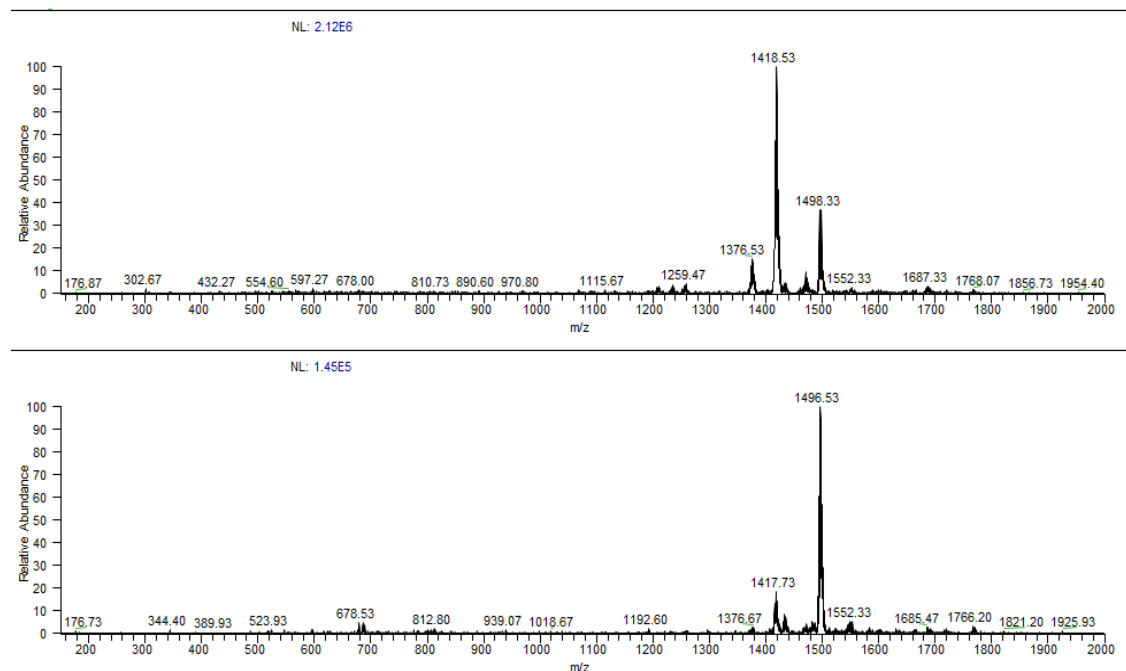


Εικόνα 6.1.1 Φάσματα μαζών στον θετικό ιοντισμό της ένωσης $Cu_6Pr(aib)_6(OH)_3(oAC)_3(NO_3)_3$ με **ESI(πάνω)** και **V-EASI(κάτω)** με θερμοκρασία στήλης 300°C και δυναμικό αποσυσσωμάτωσης (SID) 15 V.

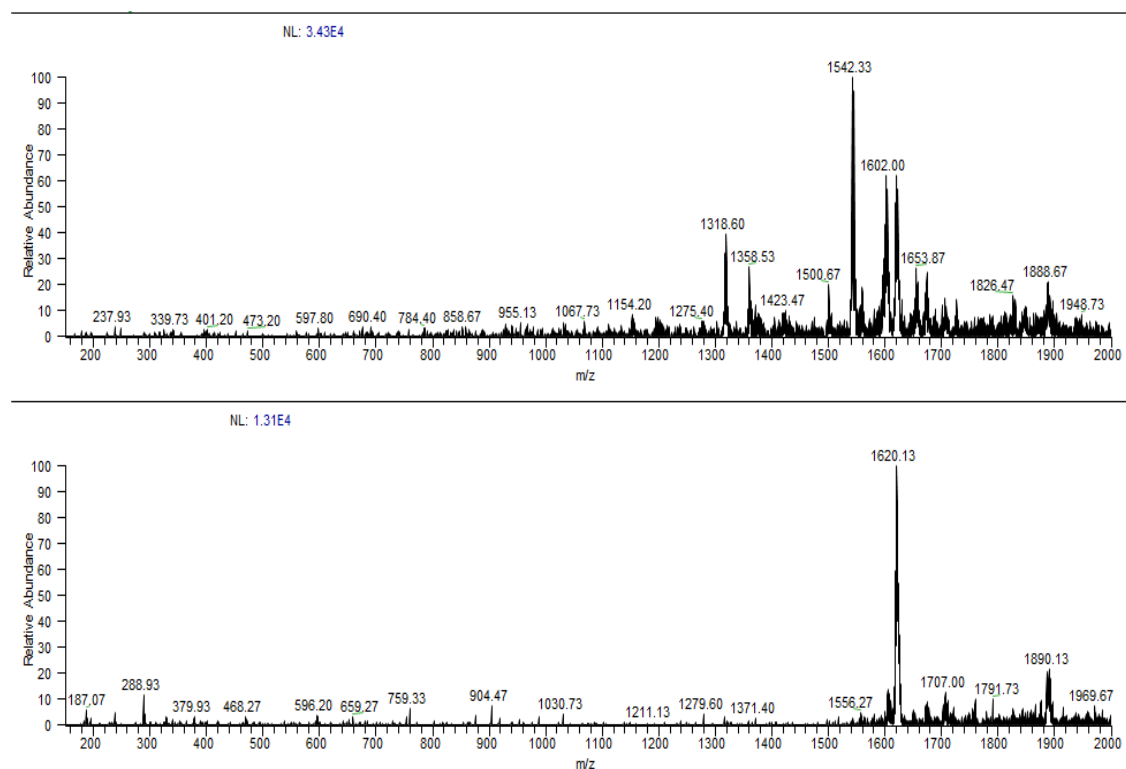


Εικόνα 6.1.2 Φάσματα μαζών στον αρνητικό ιοντισμό της ένωσης $Cu_6Pr(aib)_6(OH)_3(oAC)_3(NO_3)_3$ με **ESI(κάτω)** και **V-EASI(πάνω)** με θερμοκρασία στήλης 150°C και δυναμικό αποσυσσωμάτωσης (SID) 5 V.

Διάλυμα $Cu_6Eu(aib)_6(OH)_3(oAC)_3(NO_3)_3$ σε ακετονιτρίλιο συγκέντρωσης 50 ppm

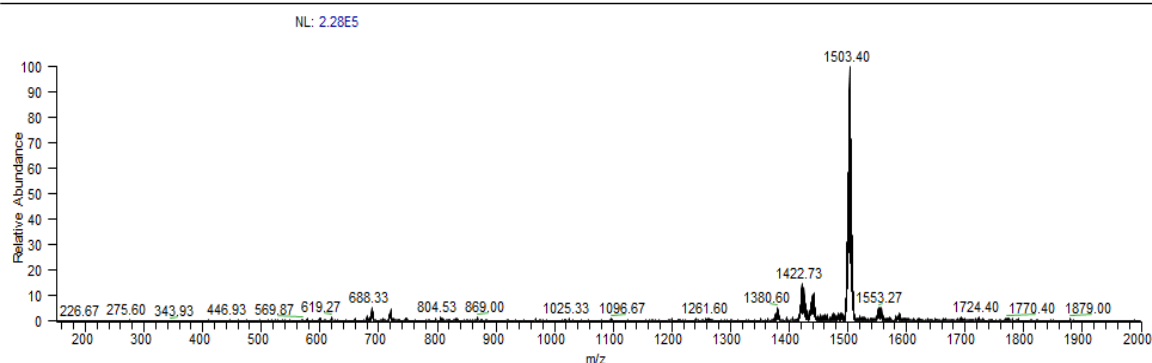
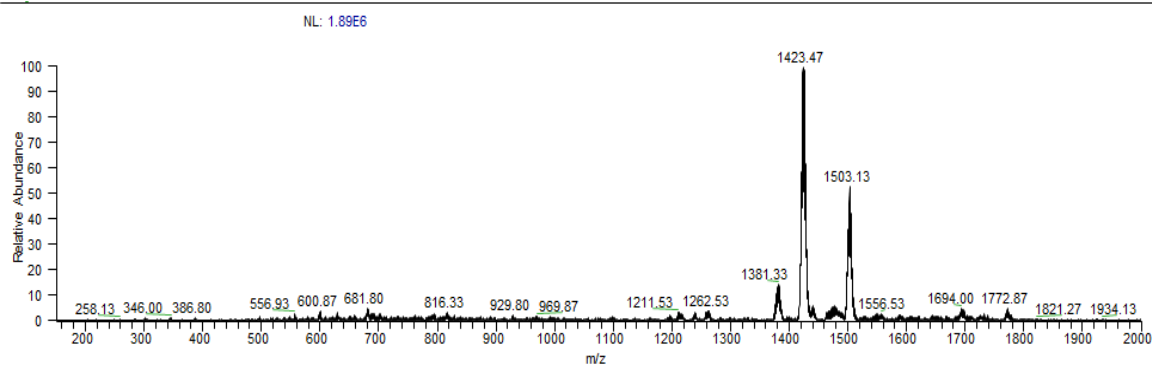


Εικόνα 6.1.3 Φάσματα μαζών στον θετικό ιοντισμό της ένωσης $Cu_6Eu(aib)_6(OH)_3(oAC)_3(NO_3)_3$ με ESI(πάνω) και V-EASI(κάτω) με θερμοκρασία στήλης 300°C και δυναμικό αποσυσσώματωσης (SID) 15 V.

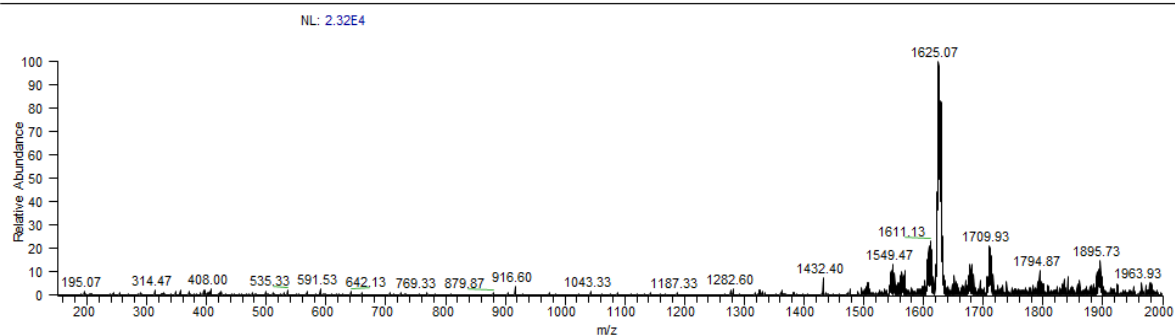
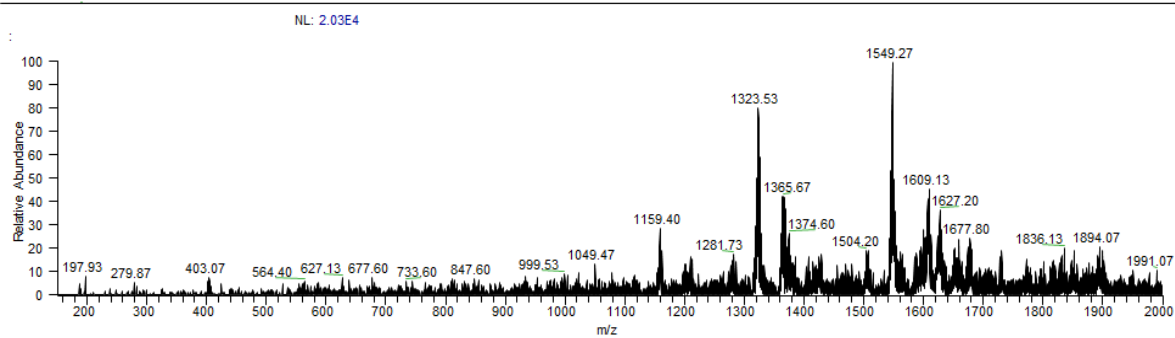


Εικόνα 6.1.4 Φάσματα μαζών στον αρνητικό ιοντισμό της ένωσης $Cu_6Eu(aib)_6(OH)_3(oAC)_3(NO_3)_3$ με ESI(πάνω) και V-EASI(κάτω) με θερμοκρασία στήλης 150°C και δυναμικό αποσυσσώματωσης (SID) 10 V.

Διάλυμα $Cu_6Gd(aib)_6(OH)_3(oAC)_3(NO_3)_3$ σε ακετονιτρίλιο συγκέντρωσης 68 ppm

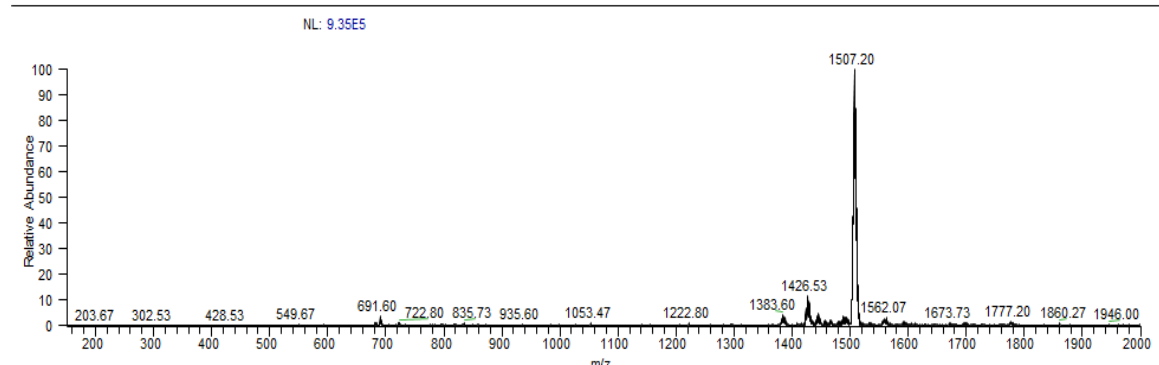
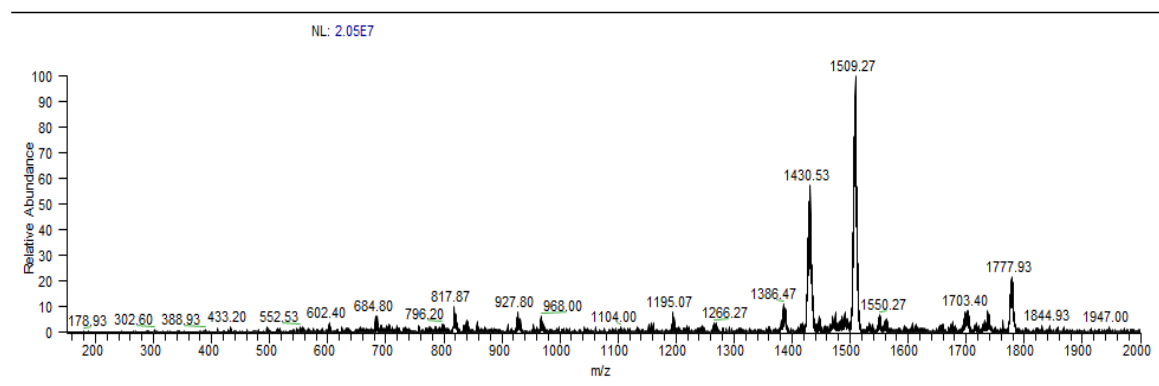


Εικόνα 6.1.5 Φάσματα μαζών στον θετικό ιοντισμό της ένωσης $Cu_6Gd(aib)_6(OH)_3(oAC)_3(NO_3)_3$ με **ESI(πάνω)** και **V-EASI(κάτω)** με θερμοκρασία στήλης 300°C και δυναμικό αποσυσσωμάτωσης (SID) 10 V.

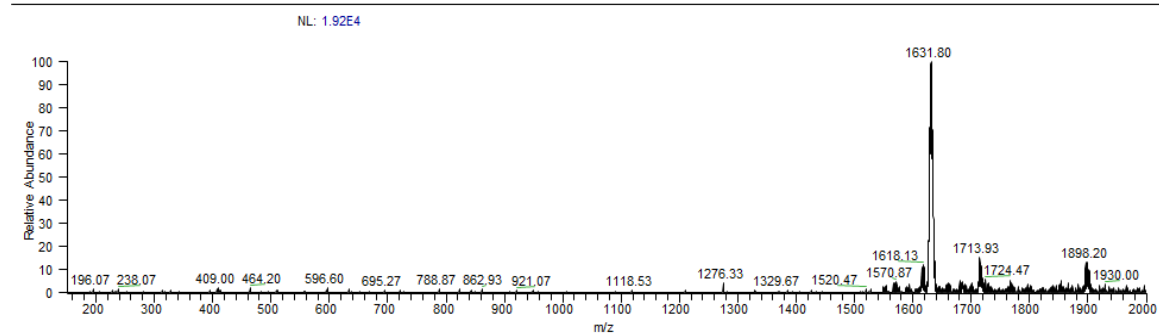
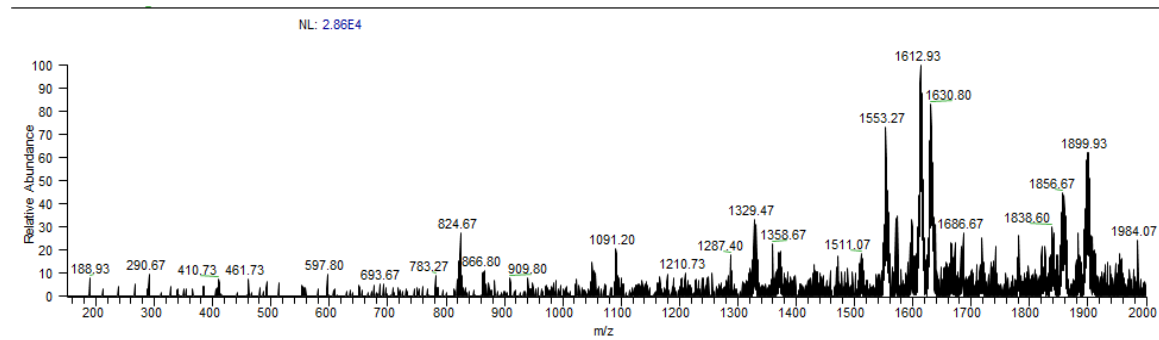


Εικόνα 6.1.6 Φάσματα μαζών στον αρνητικό ιοντισμό της ένωσης $Cu_6Gd(aib)_6(OH)_3(oAC)_3(NO_3)_3$ με **ESI(πάνω)** και **V-EASI(κάτω)** με θερμοκρασία στήλης 200°C και δυναμικό αποσυσσωμάτωσης (SID) 15 V.

Διάλυμα $Cu_6Dy(aib)_6(OH)_3(oAC)_3(NO_3)_3$ σε ακετονιτρίλιο συγκέντρωσης 50 ppm

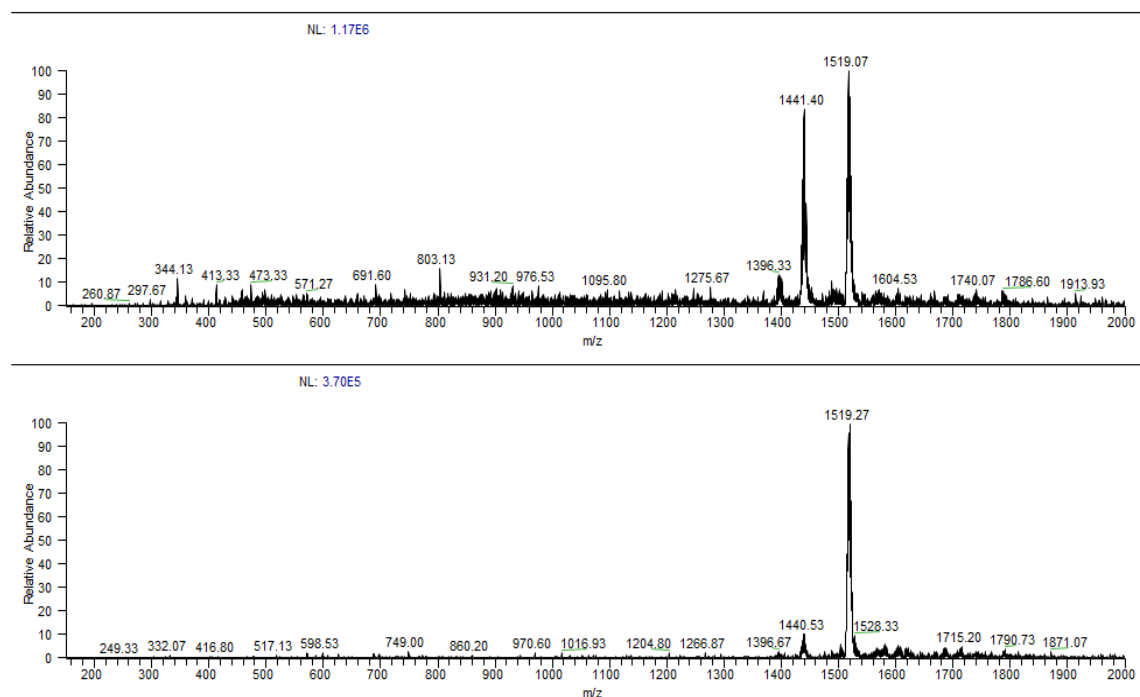


Εικόνα 6.1.7 Φάσματα μαζών στον θετικό ιοντισμό της ένωσης $Cu_6Dy(aib)_6(OH)_3(oAC)_3(NO_3)_3$ με ESI(πάνω) και V-EASI(κάτω) με θερμοκρασία στήλης 300°C και δυναμικό αποσυσσώματωσης (SID) 10 V.

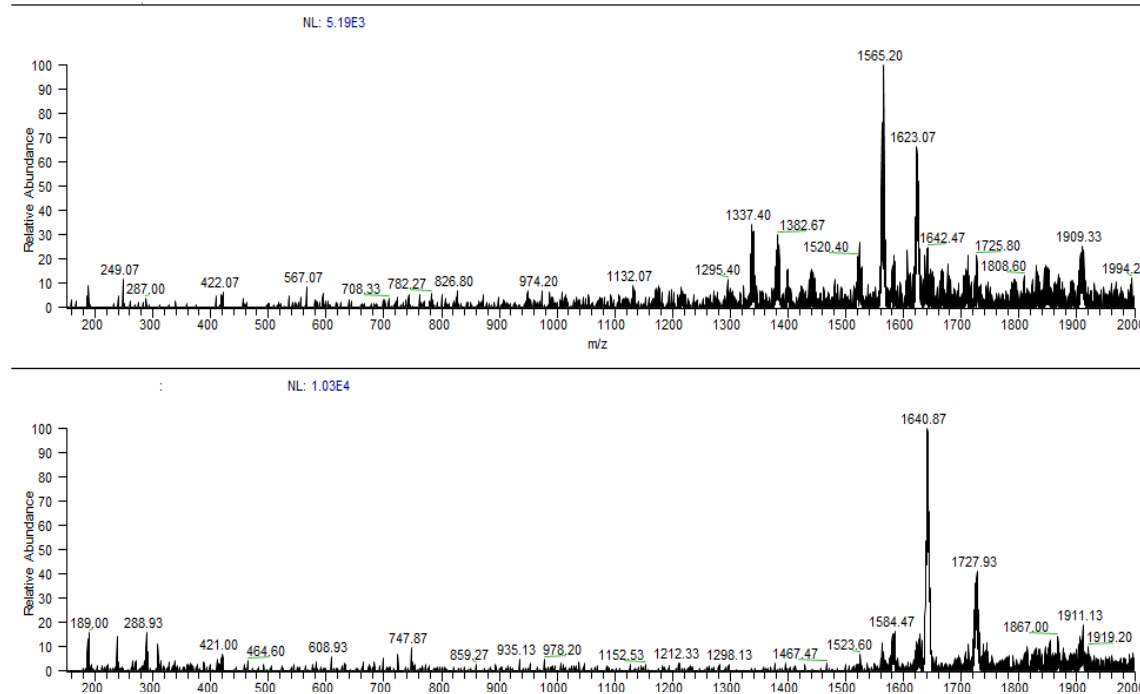


Εικόνα 6.1.8 Φάσματα μαζών στον αρνητικό ιοντισμό της ένωσης $Cu_6Dy(aib)_6(OH)_3(oAC)_3(NO_3)_3$ με ESI(πάνω) και V-EASI(κάτω) με θερμοκρασία στήλης 150°C και δυναμικό αποσυσσώματωσης (SID) 10 V.

Διάλυμα $Cu_6Yb(aib)_6(OH)_3(oAC)_3(NO_3)_3$ σε ακετονιτρίλιο συγκέντρωσης 100 ppm

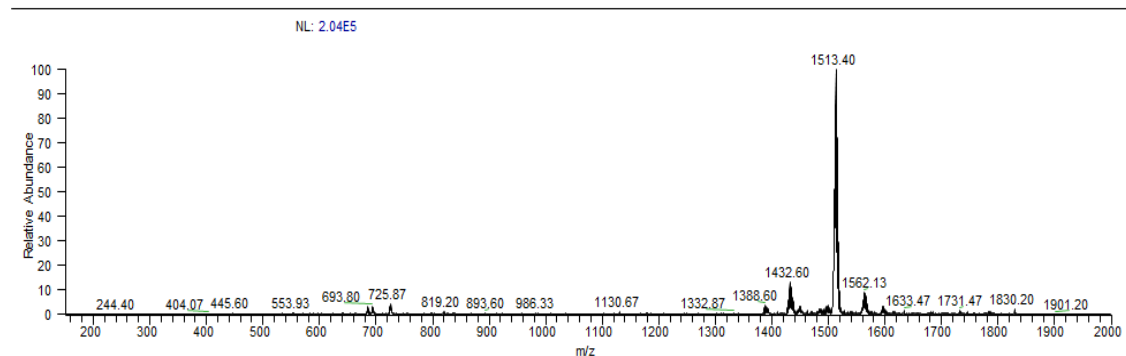
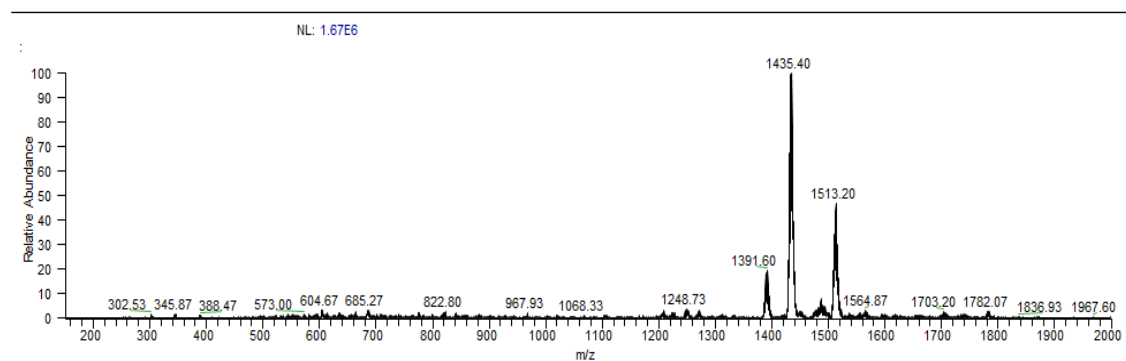


Εικόνα 6.1.9 Φάσματα μαζών στον θετικό ιοντισμό της ένωσης $Cu_6Yb(aib)_6(OH)_3(oAC)_3(NO_3)_3$ με ESI(πάνω) και V-EASI(κάτω) με θερμοκρασία στήλης 300°C και δυναμικό αποσυσσώματωσης (SID) 15 V.

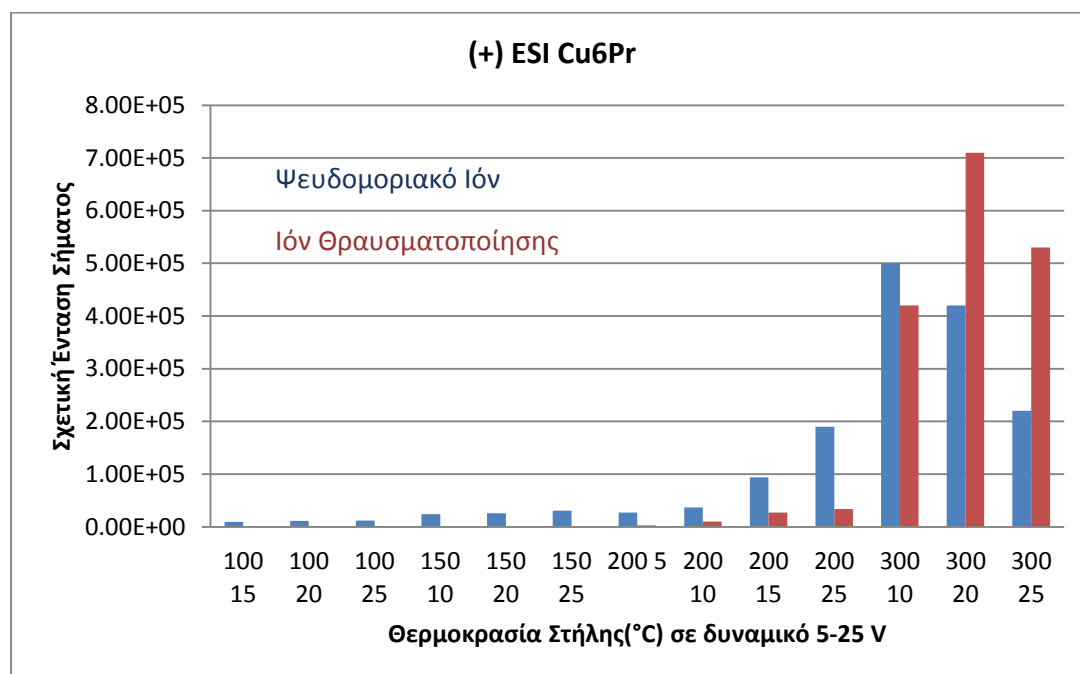


Εικόνα 6.1.10 Φάσματα μαζών στον αρνητικό ιοντισμό της ένωσης $Cu_6Yb(aib)_6(OH)_3(oAC)_3(NO_3)_3$ με ESI(πάνω) και V-EASI(κάτω) με θερμοκρασία στήλης 150°C και δυναμικό αποσυσσώματωσης (SID) 5 V.

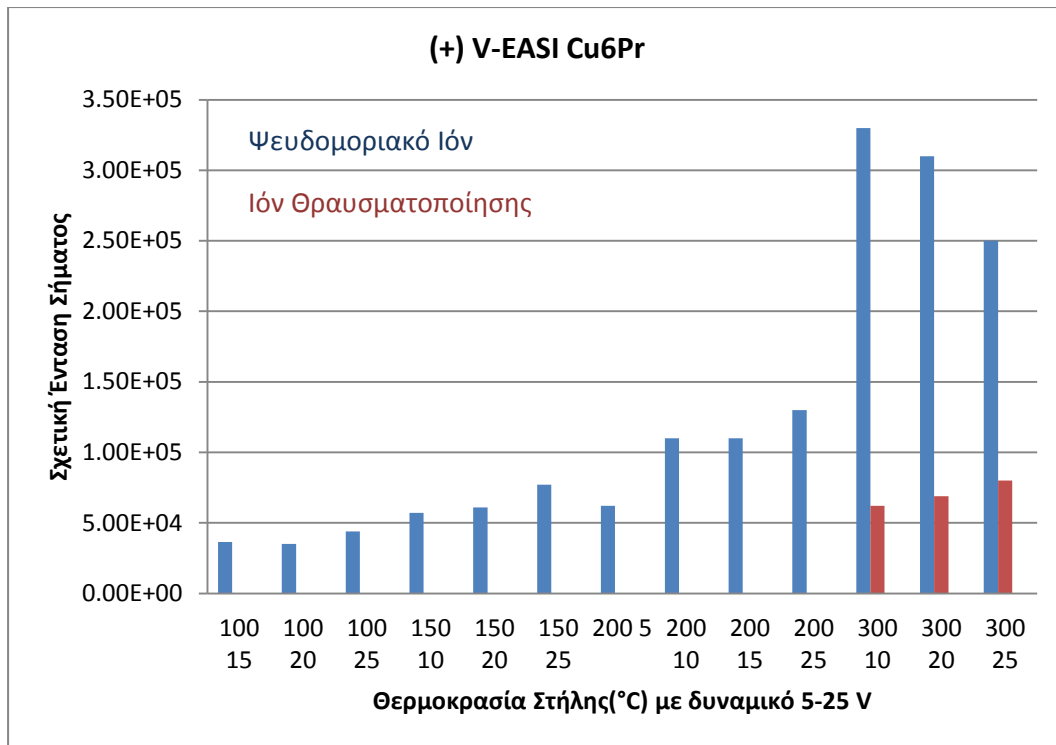
Διάλυμα $Cu_6Er(aib)_6(OH)_3(oAC)_3(NO_3)_3$ σε ακετονιτρίλιο συγκέντρωσης 56 ppm



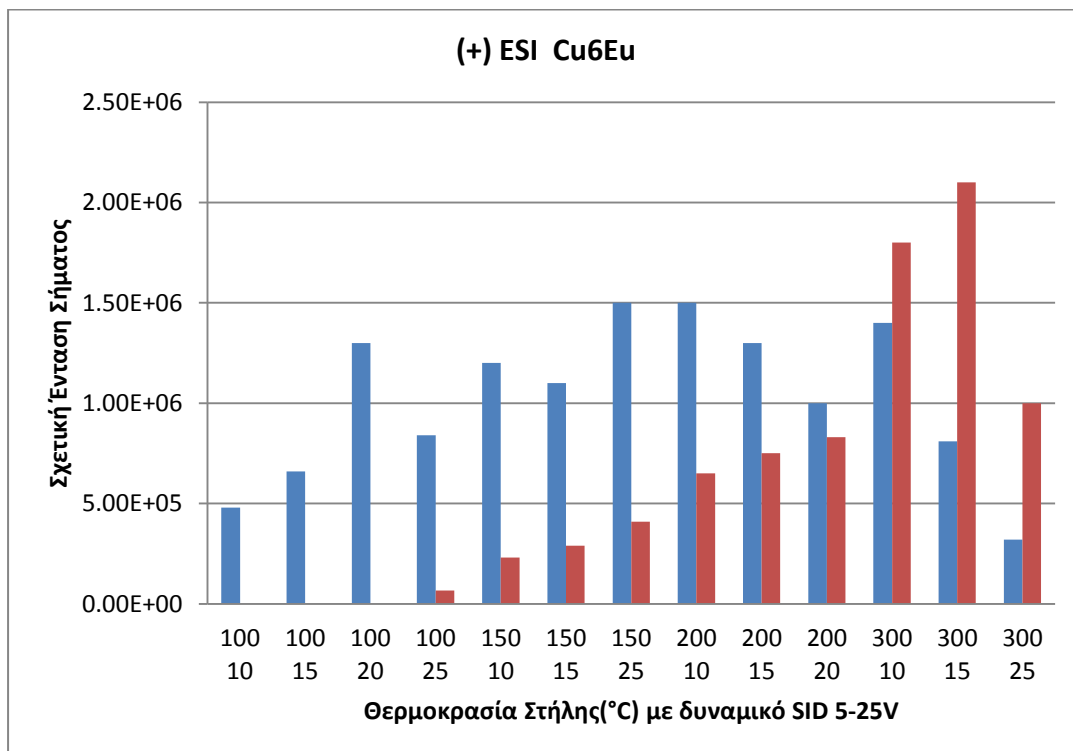
Εικόνα 6.1.11 Φάσματα μαζών στον θετικό ιοντισμό της ένωσης $Cu_6Er(aib)_6(OH)_3(oAC)_3(NO_3)_3$ με ESI(πάνω) και V-EASI(κάτω) με θερμοκρασία στήλης 300°C και δυναμικό αποσυσσώματωσης (SID) 10 V.



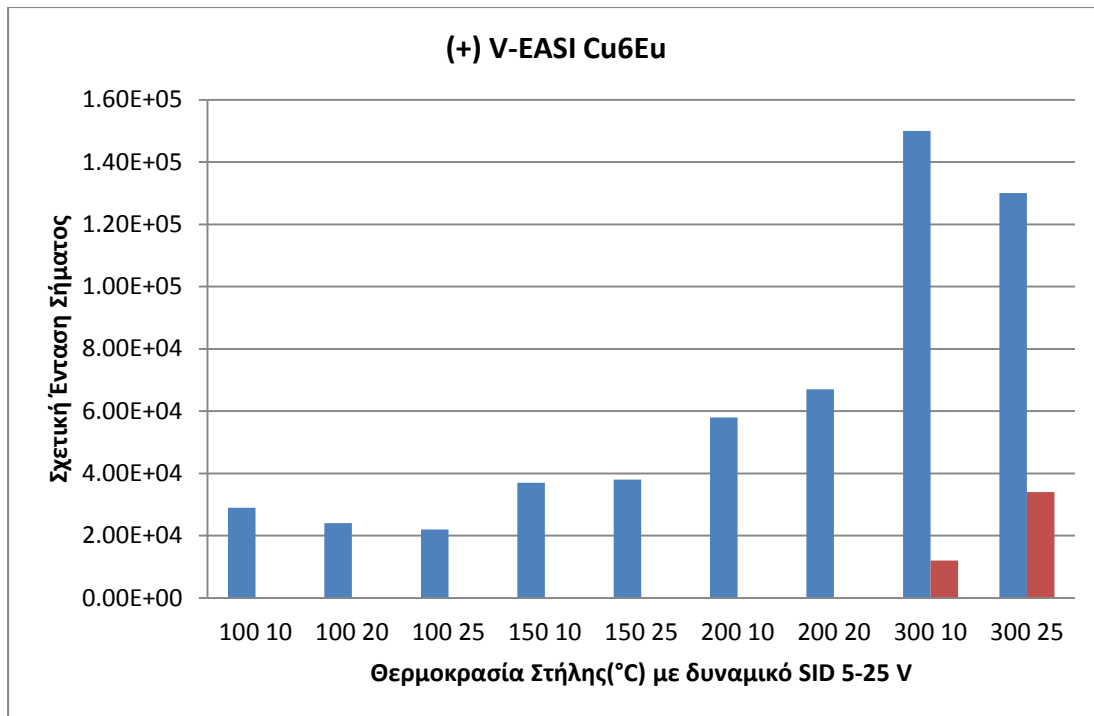
Γράφημα 6.1.12 Εξάρτηση της σχετικής έντασης σήματος της ένωσης $Cu_6Pr(aib)_6(OH)_3(oAC)_3(NO_3)_3$ από την θερμοκρασία της στήλης και το δυναμικό αποσυσσώματωσης, με πηγή ηλεκτροψεκασμού.



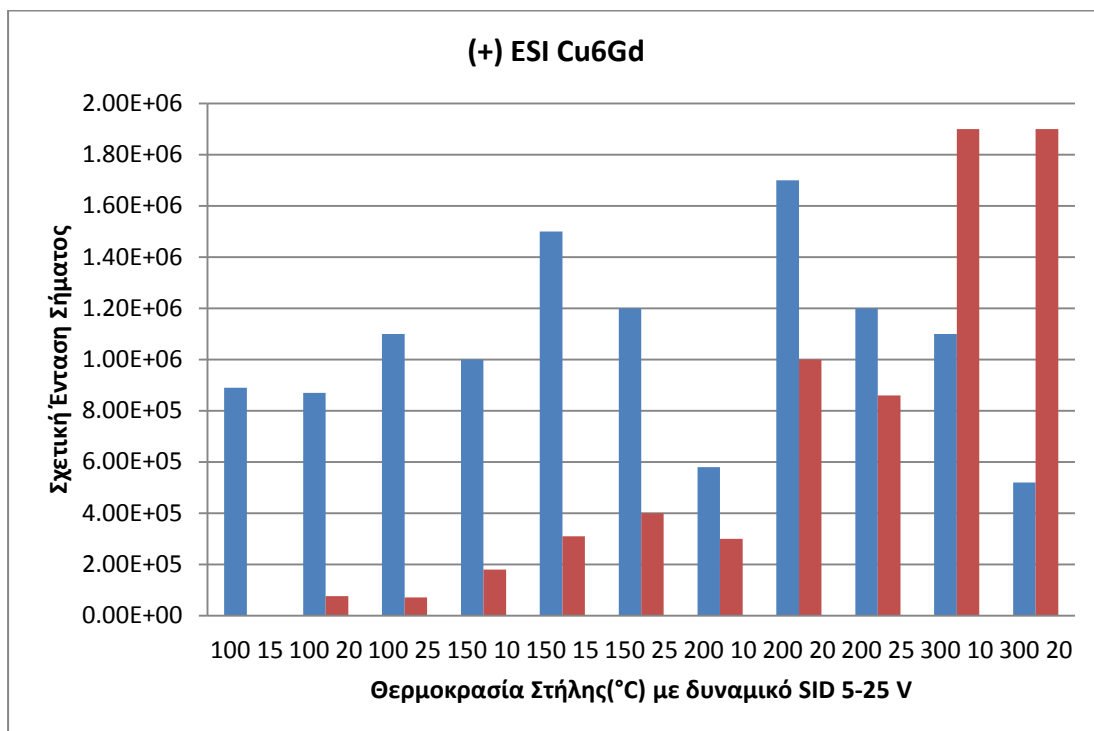
Γράφημα 6.1.13 Εξάρτηση της σχετικής έντασης σήματος της ένωσης $\text{Cu}_6\text{Pr}(\text{aib})_6(\text{OH})_3(\text{oAc})_3(\text{NO}_3)_3$ από την θερμοκρασία της στήλης και το δυναμικό αποσυσσωμάτωσης, με πηγή V-EASI.



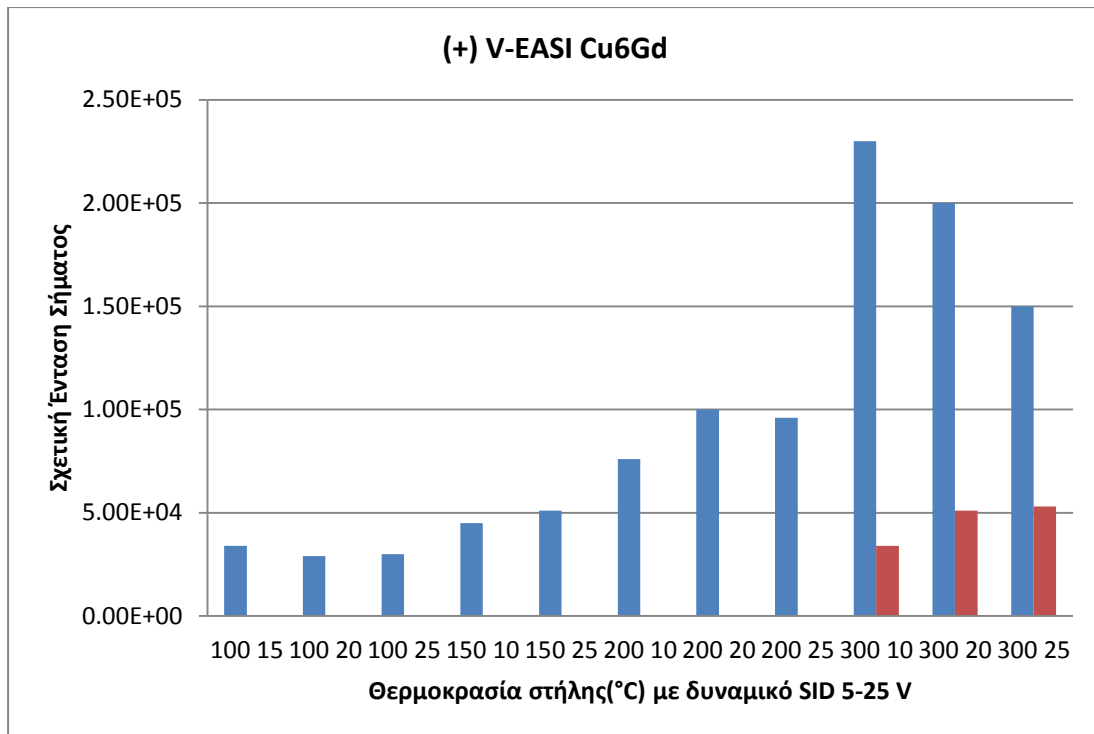
Γράφημα 6.1.14 Εξάρτηση της σχετικής έντασης σήματος της ένωσης $\text{Cu}_6\text{Eu}(\text{aib})_6(\text{OH})_3(\text{oAc})_3(\text{NO}_3)_3$ από την θερμοκρασία της στήλης και το δυναμικό αποσυσσωμάτωσης, με πηγή ηλεκτροψεκασμού.



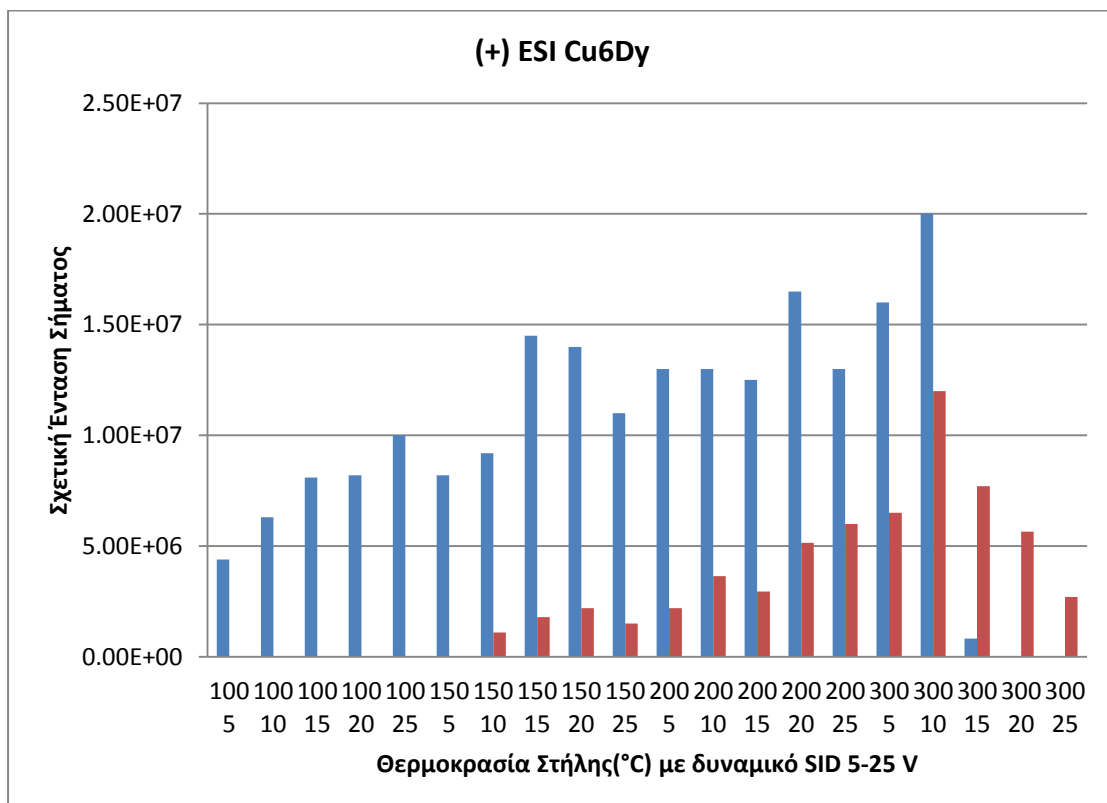
Γράφημα 6.1.15 Εξάρτηση της σχετικής έντασης σήματος της ένωσης $\text{Cu}_6\text{Eu}(\text{aib})_6(\text{OH})_3(\text{oAC})_3(\text{NO}_3)_3$ από την θερμοκρασία της στήλης και το δυναμικό αποσυσωμάτωσης, με πηγή V-EASI.



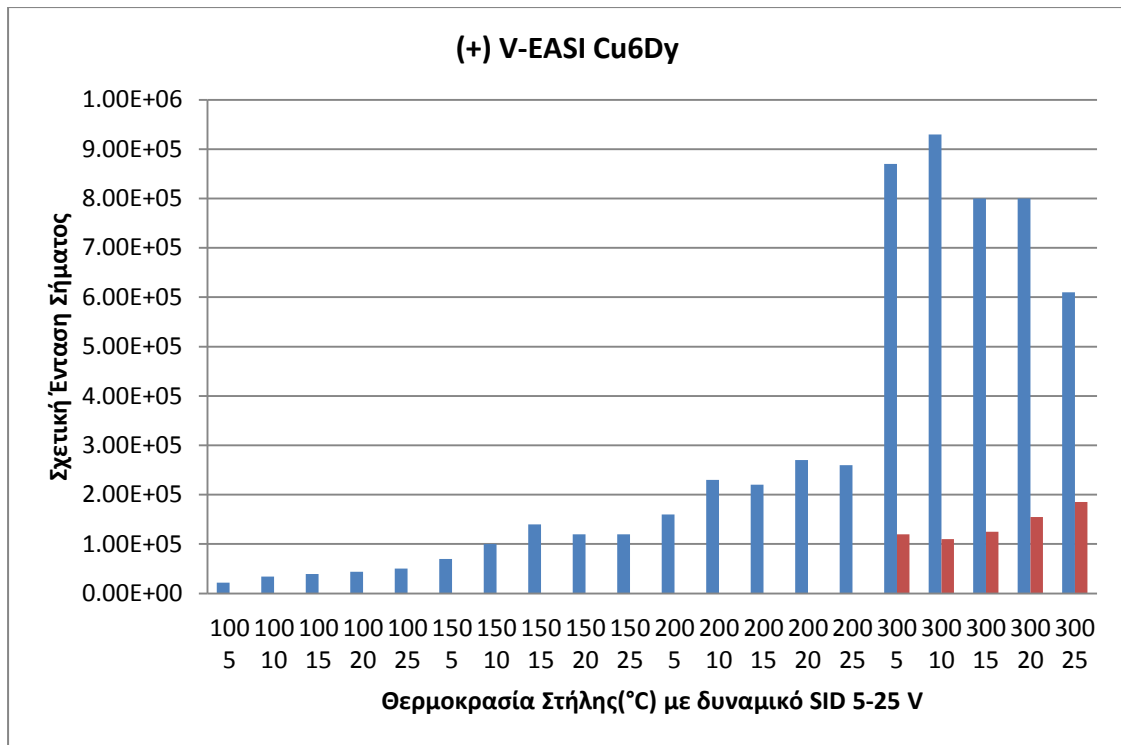
Γράφημα 6.1.16 Εξάρτηση της σχετικής έντασης σήματος της ένωσης $\text{Cu}_6\text{Gd}(\text{aib})_6(\text{OH})_3(\text{oAC})_3(\text{NO}_3)_3$ από την θερμοκρασία της στήλης και το δυναμικό αποσυσωμάτωσης, με πηγή ηλεκτροψεκασμού.



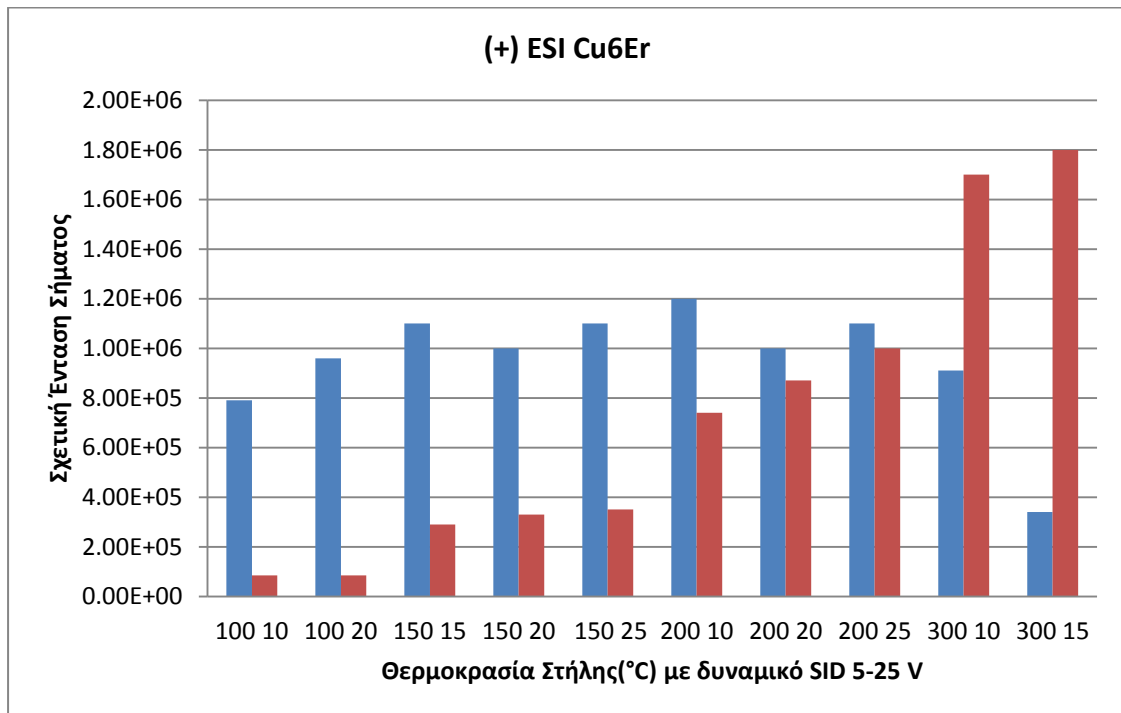
Γράφημα 6.1.17 Εξάρτηση της σχετικής έντασης σήματος της ένωσης **Cu₆Gd(aib)₆(OH)₃(oAC)₃(NO₃)₃** από την θερμοκρασία της στήλης και το δυναμικό αποσυσωμάτωσης, με πηγή V-EASI.



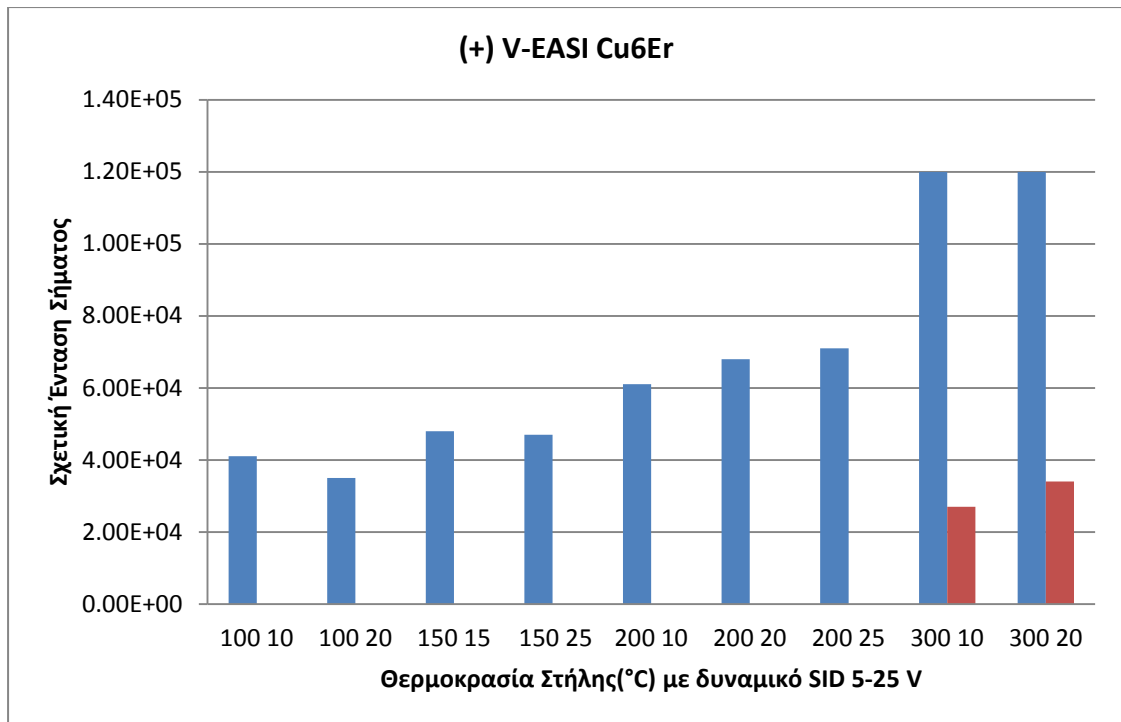
Γράφημα 6.1.18 Εξάρτηση της σχετικής έντασης σήματος της ένωσης **Cu₆Dy(aib)₆(OH)₃(oAC)₃(NO₃)₃** από την θερμοκρασία της στήλης και το δυναμικό αποσυσωμάτωσης, με πηγή ηλεκτροψεκασμού.



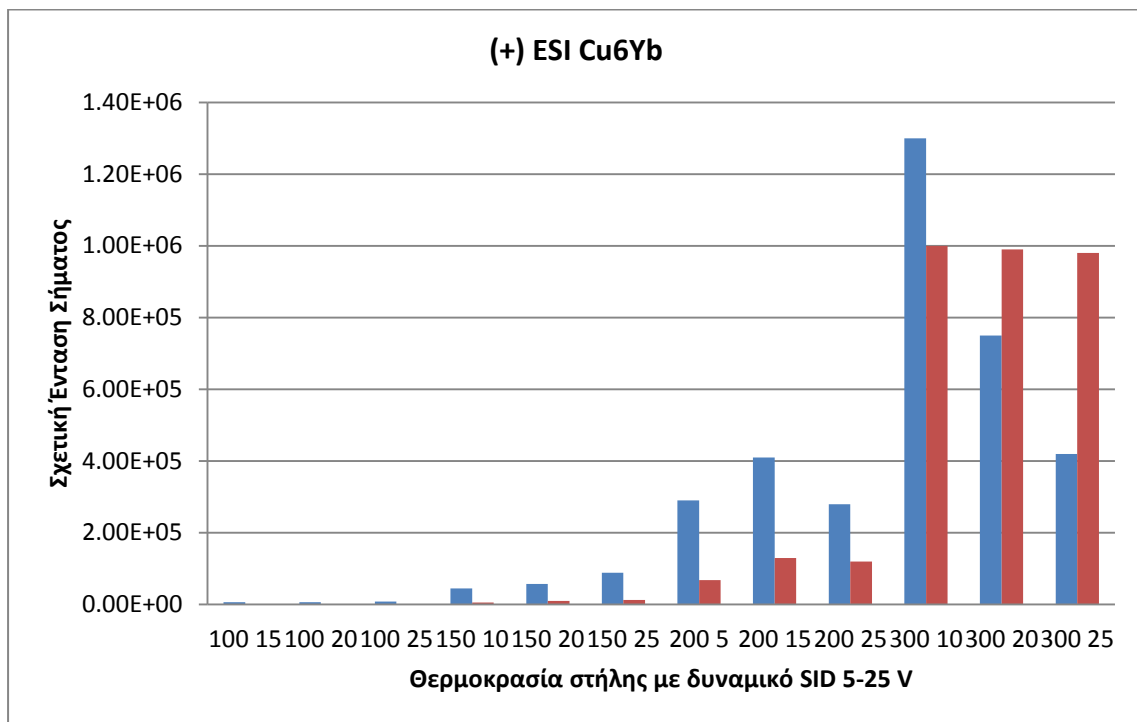
Γράφημα 6.1.19 Εξάρτηση της σχετικής έντασης σήματος της ένωσης **Cu₆Dy(aib)₆(OH)₃(oAC)₃(NO₃)₃** από την θερμοκρασία της στήλης και το δυναμικό αποσυσσωμάτωσης, με πηγή V-EASI.



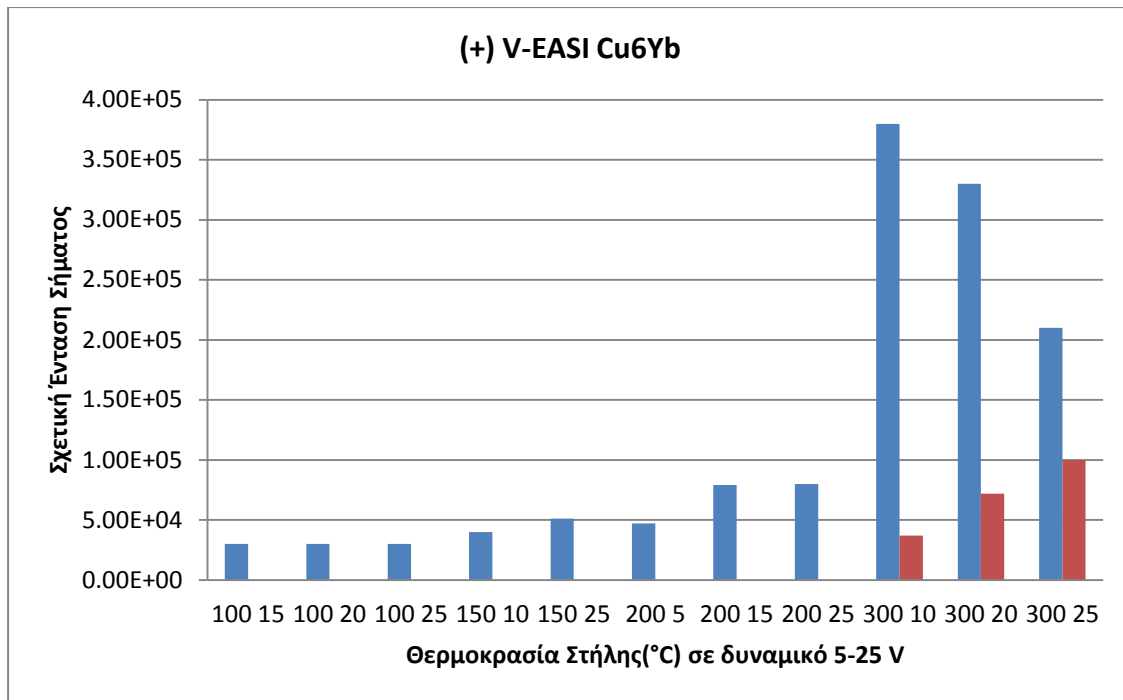
Γράφημα 6.1.20 Εξάρτηση της σχετικής έντασης σήματος της ένωσης **Cu₆Er(aib)₆(OH)₃(oAC)₃(NO₃)₃** από την θερμοκρασία της στήλης και το δυναμικό αποσυσσωμάτωσης, με πηγή ηλεκτροψεκασμού.



Γράφημα 6.1.21 Εξάρτηση της σχετικής έντασης σήματος της ένωσης $\text{Cu}_6\text{Er}(\text{aib})_6(\text{OH})_3(\text{oAC})_3(\text{NO}_3)_3$ από την θερμοκρασία της στήλης και το δυναμικό αποσυσσωμάτωσης, με πηγή V-EASI.

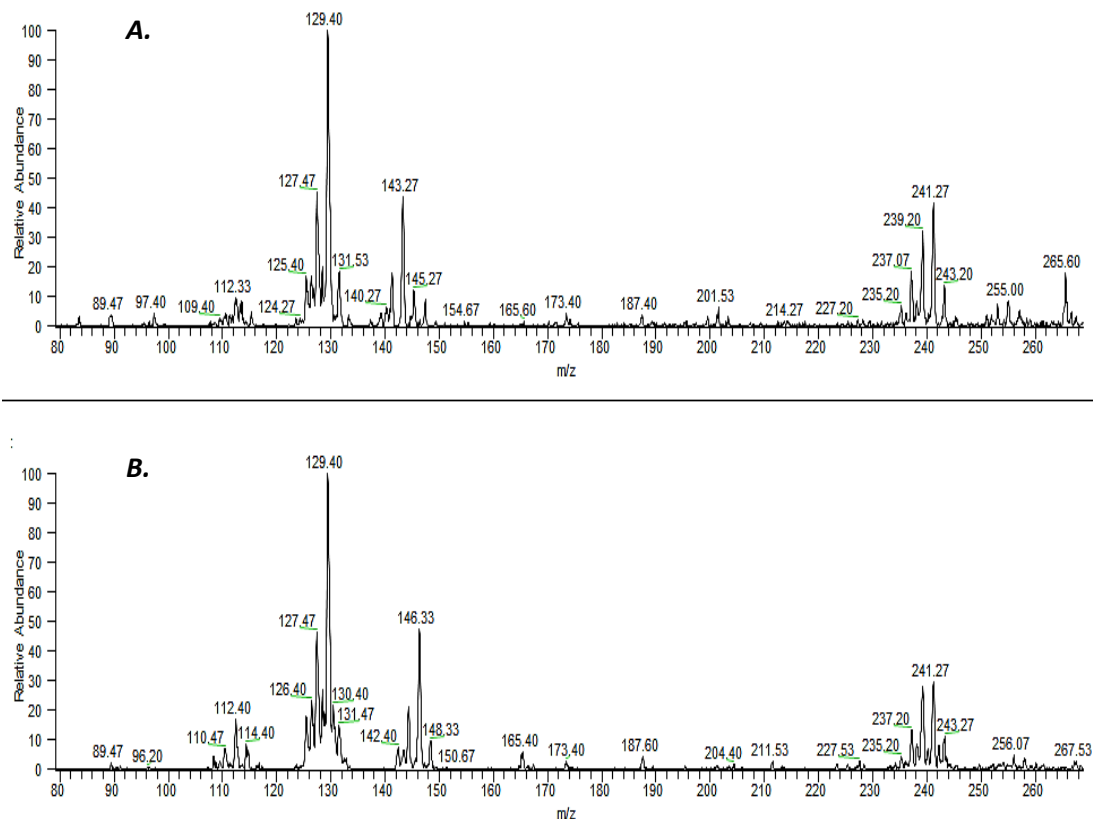


Γράφημα 6.1.22 Εξάρτηση της σχετικής έντασης σήματος της ένωσης $\text{Cu}_6\text{Yb}(\text{aib})_6(\text{OH})_3(\text{oAC})_3(\text{NO}_3)_3$ από την θερμοκρασία της στήλης και το δυναμικό αποσυσσωμάτωσης, με πηγή ηλεκτροψεκασμού.



Γράφημα 6.1.23 Εξάρτηση της σχετικής έντασης σήματος της ένωσης **Cu₆Yb(aib)₆(OH)₃(oAc)₃(NO₃)₃** από την θερμοκρασία της στήλης και το δυναμικό αποσυσωμάτωσης, με πηγή V-EASI.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β: Αλληλεπίδραση Μεθανόλης με το Σεληνιώδες Οξύ



Εικόνα 6.3.1 **A.** Φάσμα μάζας του σεληνιώδους οξέος σε διαλύτη νερό/μεθανόλη 10:90 με (-) V-EASI. **B.** Φάσμα μάζας του σεληνιώδους οξέος σε διαλύτη νερό/ δευτεριωμένη μεθανόλη 10:90 με (-) V-EASI. (Η θέση του τριχοειδούς είναι μετά την άκρη του εκνεφωτή).

Κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων βελτιστοποίησης της πηγής V-EASI με το σεληνιώδες οξύ, παρατηρήθηκε ότι παρουσία περίσσειας διαλύτη μεθανόλη και ιδιαίτερα στην θέση εκνέφωσης 4, δηλ. λίγο μετά την άκρη του εκνεφωτή, παρατηρείται η κορυφή με μάζα προς φορτίο 143.3 του πιο άφθονου ισότοπου. Η κορυφή αυτή με διαφορά μάζας 14 από την κύρια αποπρωτονιωμένη κορυφή $[\text{SeO}_3\text{H}]^-$ μας οδήγησε στην σκέψη ότι η υδρόξυλο ομάδα έχει αντικατασταθεί από μια μεθόξυ-ομάδα. Η υποψία αυτή επιβεβαιώθηκε με την χρήση διαλύτη $\text{H}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{OD}$ 10:90. Η κορυφή μετατοπίστηκε σε μάζα προς φορτίο 146.3 με τρεις ατομικές μονάδες μάζας διαφορά, όση είναι η διαφορά μεταξύ της ένωσης SeO_2OCH_3 και SeO_2OCD_3 .

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Thomas R. Covey,* Bruce A. Thomson, Bradley B. Schneider, ATMOSPHERIC PRESSURE ION SOURCES, *Mass Spectrometry Reviews*, **2009**, 28, 870– 897.
2. R. Graham Cooks, Zheng Ouyang, Zoltan Takats, Justin M. Wiseman, Ambient Mass Spectrometry, *Science*, **17 March 2006**, 1566-1570
3. Robert B. Cody,* James A. Laramée, H. Dupont Durst, Versatile New Ion Source for the Analysis of Materials in Open Air under Ambient Conditions, *Anal. Chem.* **2005**, 77, 2297-2302.
4. Dole M, Mack LL, Hines RL, Mobley RC, Ferguson LD, Alice MB , Molecular Beams of Macroions, *Journal of Chemical Physics* ,**1968**,49 (5): 2240–2249.
5. Iribarne JV, Thomson BA ,On the evaporation of small ions from charged droplets, *Journal of Chemical Physics* ,**1976**,64 (6): 2287–2294.
6. Atsumu Hirabayashi,* Minoru Sakairi,Hideaki Koizumi, Sonic Spray Ionization Method for Atmospheric Pressure Ionization Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* **1994**, 66,4557-4559.
7. Vanessa G. Santos, Thaís Regiani, Fernanda F. G. Dias, Wanderson Romao, Jose Luis Paz Jara,Clecio F. Klitzke, Fernando Coelho, Marcos N. Eberlin*,Venturi Easy Ambient Sonic-Spray Ionization, *Anal. Chem.* **2011**, 83, 1375–1380.
8. Atsumu Hirabayashi,* Minoru Sakairi,Hideaki Koizumi, Sonic Spray Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* **1995**, 67,2878-2882.
9. Dodd EE,*J. App. Phys.***1953**,24: 73
10. Zoltan Takats,Sergio C. Nanita, R. Graham Cooks,* , Gitta Schlosser, Karoly Vekey,Amino Acid Clusters Formed by Sonic Spray Ionization, *Anal. Chem.* **2003**, 75, 1514-1523.
11. Robert Aftel, Effect of Atomization Gas Properties on Droplet Atomization in an 'Air-Assist' Atomizer, Report- Virginia Polytechnic Institute and State University,**1996**.
12. Kisaburo Deguchi*, Yasuhiro Takegawa, Atsumu Hirabayashi, Hiroaki Nakagawa, Shin-Ichiro Nishimura, Characteristic pH and electrolyte concentration dependences of 2-aminopyridine-derivatized oligosaccharides (N-glycans) in sonic-spray ionization mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**; 19: 2325–2330.
13. Lloyd W. Zilch, Joshua T. Maze, John W. Smith, George E. Ewing,* Martin F. Jarrold*,Charge Separation in the Aerodynamic Breakup of Micrometer-Sized Water Droplets, *J. Phys. Chem. A*, **2008**, 112, 13352–13363.
14. March, Raymond,An Introduction to Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry,*Journal of Mass Spectrometry*, **1997**, 32 (4): 351–369.
15. Jose-Luis Todoli, Jean-Michelle Mermet, Liquid Sample Introduction in ICP Spectrometry,A Practical Guide, First Edition **2008**.
16. Jirasco R., Holcapek M, Structural analysis of organometallic compounds with soft ionization mass spectrometry, *Mass Spectrom Rev.*, **2011** Nov-Dec;30(6).
17. George J. Sopsis, Angelos B. Canaj, Aggelos Philippidis, Milosz Siczek,Tadeusz Lis,James R. O'Brien,Manolis M. Antonakis,Spiros A. Pergantis,†Constantinos J. Milios*, Heptanuclear Heterometallic [Cu6Ln] Clusters: Trapping Lanthanides into Copper Cages with Artificial Amino Acids, *Inorg. Chem.* **2012**, 51, 5911–5918.
18. M. Orfanoudaki, I. Tamiolakis, M. Siczek, T. Lis, G. S. Armatas, S. A. Pergantis and C. J. Milios, Unique trigonal prism encapsulated Ln complexes: A [Coll6Eu] and a [Coll6Dy] cage, *Dalton Transactions*, 40, 4793, **2011**.
19. Jonathan D. Berman, Chemotherapy for Leishmaniasis: Biochemical Mechanisms, Clinical Efficacy, and Future Strategies, *Clin Infect Dis.* **1988** 10 3): 560-586.

20. Cynthia Demicheli *, Frederic Frezard, Marc Lecouvey, Arlette Garnier-Suillerot, Antimony(V) complex formation with adenine nucleosides in aqueous solution, *Biochimica et Biophysica Acta* 1570, **2002**, 192–198.
21. H.R.Hansen, S.A.Pergantis*, Mass Spectrometric Identification and Characterization of Antimony Complexes with Ribose Containing Biomolecules and an RNA Oligomer, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2006**, 385, 821–833.
22. J. Lintschinger, O. Schramel and A. Kettrup, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **1998**, 361, 96.
23. Dennis G. Hall, Boronic Acids: Preparation and Applications in Organic Synthesis, Medicine and Materials, Second Edition, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.
24. Krishna L.Bhat, George D. Markham, Joseph D. Larkin, Charles W. Bock*, Thermodynamics of Boroxine Formation from the Aliphatic Boronic Acid Monomers R B(OH)₂ (R = H, H₃C, H₂N, HO, and F): A Computational Investigation, *J. Phys. Chem. A*, **2011**, 115, 7785–7793.
25. Andrew L. Korich and Peter M. Iovine*, Boroxine chemistry and applications: A perspective, *Dalton Trans.*, **2010**, 39, 1423–1431.
26. Alfonso Pompella*, Athanase Visvikis, Aldo Paolicchi, Vincenzo De Tata, Alessandro F. Casini, The changing faces of glutathione, a cellular protagonist, *Biochemical Pharmacology* 66, **2003**, 1499–1503.
27. Christine L. Gatlin and Frantisek Turacek, Acidity Determination in Droplets Formed by Electrospraying Methanol-Water Solutions, *Anal. Chem.* **1994**, 66, 712–718.
28. Gary J. Van Berkel*, Feimeng Zhou, Joseph T. Aronson, Changes in bulk solution pH caused by the inherent controlled-current electrolytic process of an electrospray ion source, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 162, **1997** 55–67.
29. Zengru Wu, Wenqing Gao, Mitch A. Phelps, Di Wu, Duane D. Miller, and James T. Dalton*, Favorable Effects of Weak Acids on Negative-Ion Electrospray Ionization Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* **2004** February 1; 76(3): 839–847.
30. Ma'an H. Amad, Nadja B. Cech, George S. Jackson and Christie G. Enke*, Importance of gas-phase proton affinities in determining the electrospray ionization response for analytes and solvents, *J. Mass Spectrom.*, **2000**, 35, 784–789.
31. Βιοχημεία I, Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΚΡΗΤΗΣ
32. S.Z. MIKHAIL and W.R. KIMEL, Densities and Viscosities of Methanol-Water Mixtures, *Journal OF Chemical and Engineering Data*, VOL. 6, NO. 4, OCTOBER **1961**.
33. J.C.Y. Le Blanc, R. Guevremont, K.W.M. Siu*, Electrospray mass spectrometry of some proteins and the aqueous solution acid/base equilibrium model in the negative ion detection mode, *Int J Mass Spectrom Ion Processes* 125, **1993**, 145–IS3
34. Lars Konermann* and D. J. Douglas, Unfolding of Proteins Monitored by Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Comparison of Positive and Negative Ion Modes, *J Am Soc Mass Spectrom* **1998**, 9, 1248–1254.
35. Lars Konermann*, Elias Ahadi, Antony D. Rodriguez, and Siavash Vahidi, Unraveling the Mechanism of Electrospray Ionization, *Anal. Chem.* **2013**, 85, 2–9
36. Tao Liu, Mikhail E. Belov, Navdeep Jaitly, Wei-Jun Qian, and Richard D. Smith*, Accurate Mass Measurements in Proteomics, *Chem. Rev.* **2007**, 107, 3621–3653.
37. David H. Russell* and Ricky D. Edmondson, High-resolution Mass Spectrometry and Accurate Mass Measurements with Emphasis on the Characterization of Peptides and Proteins by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, *JOURNAL OF MASS SPECTROMETRY*, **1997**, VOL. 32, 263–276.

38. Andrew G. Chamber, J. Michael Ramsey*, Microfluidic Dual Emitter Electrospray Ionization Source for Accurate Mass Measurements, *Anal. Chem.*, **2012**, 84, 1446–1451.
39. Longfei Jiang and Mehdi Moini*, Development of Multi-ESI-Sprayer, Multi-Atmospheric-Pressure-inlet Mass Spectrometry and Its Application to Accurate Mass Measurement Using Time-of-Flight Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*, Vol. 72, No. 1, January 1, **2000** 21.
40. Mehdi Moini, Bruce L. Jones, Robin M. Rogers, and Longfei Jiang, Sodium Trifluoroacetate as a Tune/Calibration Compound for Positive- and Negative-Ion Electrospray Ionization Mass Spectrometry in the Mass Range of 100–4000 Da, *J Am Soc Mass Spectrom*, **1998**, 9, 977–980.
41. A. v. McCormick, A. T. Bell, The Solution Chemistry of Zeolite Precursors, *Catalysis Reviews: Science and Engineering*, **1989**, 31:1-2, 97-127.
42. Morten E. Simonsen, Camilla Sønderby, Erik G. Sjøgaard, Synthesis and characterization of silicate polymers, *J Sol-Gel Sci Technol*, **2009**, 50:372–382.
43. K. Eggers, T. Eichner, J. Woenckhaus*, Mass spectrometric investigation of small silicate polyhedra in solution, *International Journal of Mass Spectrometry* 244, **2005**, 72–75.
44. Patrick Bussian, Frank Sobott, Bernhard Brutschy, Wolfgang Schrader, Ferdi Schüth, Speciation in Solution: Silicate Oligomers in Aqueous Solutions Detected by Mass Spectrometry, *Angewandte Chemie International Edition*, Volume 39, Issue 21, pages 3901–3905, November 3, **2000**.
45. Morten E. Simonsen, Erik G. Sjøgaard*, ESI-MS investigation of the polymerization of inorganic polymers, *International Journal of Mass Spectrometry*, 285, **2009**, 78–85.
46. Min Huang, Atsumu Hirabayashi, Akihiko Okumura, Yukiko Hirabayashi, Matrix Effects On the Analysis of Oligonucleotides by Using a Mass Spectrometer with a Sonic Spray Ionization Source, *Analytical Sciences*, October **2001**, vol. 17.
47. Min Huang, Atsumu Hirabayashi, Multi-Charged Oligonucleotide Ion Formation in Sonic Spray Ionization, *Analytical Sciences*, April **2002**, vol. 18.