

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Ανάπτυξη και εφαρμογή πηγών ιοντισμού υπερηχητικής
εκνέφωσης με φασματομετρία μάζας για την ανάλυση
περιβαλλοντικών και βιολογικών δειγμάτων**

ΣΟΦΙΑ ΓΡΑΦΑΝΑΚΗ

Υπεύθυνος Καθηγητής: Σπυρίδων Α. Περγαντής

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2021

**UNIVERSITY OF CRETE
DEPARTMENT OF CHEMISTRY**

**GENERAL POSTGRADUATE STUDIES PROGRAMME IN
CHEMISTRY**



Master Thesis

**Development and application of sonic spray ionization
sources for mass spectrometric analysis of environmental
and biological samples**

SOFIA GRAFANAKI

Master Thesis Supervisor: Spiros A. Pergantis

HERAKLION 2021

Στην αδερφή μου Εύα

Εξεταστική Επιτροπή

Σπύρος Α. Περγαντής

**Καθηγητής, Τομέας Αναλυτικής και Περιβαλλοντικής Χημείας, Τμήμα Χημείας,
Πανεπιστήμιο Κρήτης**

Σπύρος Απόστολος

**Αναπληρωτής Καθηγητής, Τομέας Αναλυτικής και Περιβαλλοντικής Χημείας,
Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης**

Νικόλαος Λυδάκης – Σημαντήρης

**Καθηγητής, Τομέας Χημείας και Βιοχημείας, Τμήμα Γεωπονίας, Ελληνικό
Μεσογειακό Πανεπιστήμιο**

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης για την ευκαιρία και για την υλικοτεχνική υποδομή που μου παρείχε ώστε να ολοκληρώσω τις μεταπτυχιακές σπουδές μου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον επιβλέποντα καθηγητή μου Δρ. Σπύρο Περγαντή που με εμπιστεύτηκε από την πρώτη στιγμή και μου έδωσε την ευκαιρία να γίνω μέλος της ερευνητικής του ομάδας για τέσσερα συναπτά έτη. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερος για την πολύτιμη καθοδήγηση του, την έμπρακτη βοήθεια του, την κατανόηση και το χρόνο που μου αφιέρωσε όλα αυτά τα χρόνια.

Επιπλέον, ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής μου επιτροπής Δρ. Απόστολο Σπύρο και Δρ. Νικόλαο Λυδάκη που δέχτηκαν να αξιολογήσουν την παρούσα μεταπτυχιακή εργασία.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ξεχωριστά τον καθηγητή του Ελληνικού Μεσογειακού Πανεπιστημίου, Δρ. Νικόλαο Λυδάκη για την παροχή κυτταρικών δειγμάτων, και τις συμβουλές για την διαχείρισή τους.

Στην υλοποίηση της παρούσας εργασίας συνέβαλλαν και τα μέλη της ερευνητικής ομάδας, με το ευχάριστο κλίμα και φιλικό περιβάλλον που επικρατούσε εντός εργαστηρίου. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Μάνο Μαυράκη για την εξαιρετική συνεργασία, τις συμβουλές, την βοήθεια αλλά και την στήριξη που έλαβα καθώς και για την φιλία που αναπτύξαμε.

Ταυτόχρονα, ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να εκφράσω σε όλους τους φίλους μου που με στηρίζουν με κάθε τρόπο, ακόμη και όταν βρίσκονται μακριά μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τους γονείς μου, τον πατέρα μου Νέστορα και τη μητέρα μου Χαρά που με στήριξαν με κάθε δυνατό τρόπο και είναι δίπλα μου σε κάθε μου προσπάθεια.

Θα ήθελα να αφιερώσω την παρούσα εργασία στον πιο σημαντικό άνθρωπο για εμένα, την αδερφή μου Εύα, την ευχαριστώ για την αστείρευτη υπομονή της, την αγάπη και την ενθάρρυνση όλων αυτών των χρόνων που συνέβαλε στην ολοκλήρωση της.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΣΟΦΙΑ ΓΡΑΦΑΝΑΚΗ

sof.grafanaki@gmail.com

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ

Μεταπτυχιακό δίπλωμα στη Αναλυτική Χημεία **ΟΚΤ. 2018- ΣΕΠ. 2021**

Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

- Μεταπτυχιακή Εργασία: Ανάπτυξη και εφαρμογή πηγών ιοντισμού υπερηχητικής εκνέφωσης με φασματομετρία μάζας για την ανάλυση περιβαλλοντικών και βιολογικών δειγμάτων.

(Επιβλέπων καθηγητής: Σπύρος Α. Περγαντής)

Πτυχίο στη Χημεία (8,02/10) **ΣΕΠ. 2014- ΟΚΤ. 2018**

Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

- Διπλωματική Εργασία: Ανάπτυξη ορθόγωνης πηγής υπερηχητικού ιοντισμού για την σύζευξη Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης με διαδοχική φασματομετρία μάζας.

(Επιβλέπων καθηγητής: Σπύρος Α. Περγαντής)

ΕΡΓΑΣΙΑ

Πρακτική άσκηση ως αναλυτικός χημικός. **ΙΟΥΛ. 2018- ΣΕΠ. 2018**

ΙΔΑΙΑ οινοποιητική, Βενεράτο Ηρακλείου, Κρήτη

Ποιοτικός έλεγχος και χημικές αναλύσεις για τους οίνους του Οινοποιείου.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- Φασματομετρική ανάλυση μάζας δειγμάτων που υποβλήθηκαν από ερευνητικές ομάδες του Πανεπιστημίου Κρήτης (Υπηρεσία στο Τμήμα Χημείας) (2019-2020)

- Εκπαίδευση προπτυχιακών φοιτητών σχετικά με τη χρήση φασματομέτρων μάζας για το πτυχίο τους(2019-2020).

ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

Βοηθός στο προπτυχιακό εργαστήριο Αρχές Αναλυτικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης. (Χειμερινό Εξάμηνο 2018-Εαρινό εξάμηνο 2019).

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

L. Mavroudakis, E. Valsami, S. Grafanaki, T. Andreadaki, D. F. Ghanotakis, S. A. Pergantis, The effect of nitrogen starvation on membrane lipids of *Synechocystis* sp. PCC 6803 investigated by using easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Biomembranes* 2019.

ΣΥΝΕΔΡΙΑ

Παρουσιάστηκαν από άλλα μέλη του Group:

S. Grafanaki, L. Mavroudakis, E. Mavrakis, S. A. Pergantis (oral presentation), ‘A novel orthogonal sonic-spray Ionization source’ 11th International Conference on Instrumental Methods of Analysis: Modern Trends and Applications (IMA-2019) held in Ioannina, Greece, September 22-25,2019

E. Mavrakis, S. Grafanaki, L. Mavroudakis, N. Lydakis-Simantiris, S.A. Pergantis (oral presentation), “Advancements and challenges for the determination of metals in individual cells using single cell inductively coupled plasma – Mass Spectrometry” 11th International Conference on Instrumental Methods of Analysis: Modern Trends and Applications (IMA-2019) held in Ioannina, Greece, September 22-25,2019

E. Mavrakis, S. Grafanaki, E. Zkeri, L. Mavroudakis, S.A. Pergantis, N. Lydakis-Simantiris (poster presentation), “Selenium accumulation in unicellular photosynthetic algae *Chlamydomonas reinhardtii* grown in Se-contaminated media” 16th International Conference on Environmental Science and Technology CEST2019, 4-7 September 2019, Rhodes, Greece

Sofia Grafanaki, Leonidas Mavroudakis, Spiros A. Pergantis (poster presentation), “Coanda effect sonic-spray ionization mass spectrometry (orthogonal-SSI-MS) for coupling conventional and microbore high performance liquid chromatography to mass spectrometry”, 66th Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, American Society for Mass Spectrometry (ASMS), San Diego, CA, USA, 3/6 – 7/6/2018

ΓΛΩΣΣΕΣ

- Ελληνικά (Μητρική Γλώσσα)
- Αγγλικά (Πιστοποιητικό Edexcel Επιπέδου 3, Διεθνές πρόγραμμα ESOS (CEF C2) (2013))

ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ

Χορήγηση Υποτροφίας από το Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας του ΙΤΕ για την συμμετοχή στην υλοποίηση του έργου «Ανάλυση δειγμάτων με MS σε αρθρόποδα στα πλαίσια της λειτουργικής ανάλυσης των μηχανισμών ανθεκτικότητας εχθρών καλλιεργειών στα εντομοκτόνα». (ΙΑΝ 2020-ΦΕΒ 2020)

ΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ ΣΕ Η/Υ

- Πιστοποιητικό Πληροφορικής Global Intermediate, GLOBAL CERT-Αύγουστος 2019 (Windows, Word, Excel, Outlook, Access, PowerPoint)
- Xcalibur (Thermo Fisher Scientific)
- OriginPro (OriginLab)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η τεχνική ιοντισμού υπερηχητικής εκνέφωσης (SSI) έχει χρησιμοποιηθεί στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή ως η βάση για την ανάπτυξη και εφαρμογή δύο τεχνικών, τη φασματομετρία μάζας (MS) με ορθόγωνη πηγή ιοντισμού υπερηχητικής εκνέφωσης (Ortho-SSI) και με την πηγή εκρόφησης με ιοντισμό υπερηχητικής εκνέφωσης (EASI). Κάθε πηγή πέρασε από στάδια βελτιστοποίησης σημαντικών παραμέτρων για την εύρυθμη λειτουργία της πριν την εφαρμογή σε πραγματικά δείγματα. Η πρώτη ενότητα περιλαμβάνει την αναλυτική κατασκευή της πηγής Ortho-SSI, η οποία είναι ικανή να μεταβάλει την αρχική κλίση του αερολύματος, με την χρήση μίας κυλινδρικής ράβδου χωρίς να απαιτείται η χρήση δυναμικού. Αυτό επιτρέπει την επιτυχημένη σύζευξη του SSI-MS με την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Η τεχνική HPLC-Ortho-SSI-MS/MS χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση και τον διαχωρισμό χλωρικών (ClO_3^-), υπερχλωρικών (ClO_4^-) και βρωμικών (BrO_3^-) ιόντων και για την ποσοτική ανάλυση των ανιόντων αυτών σε νερό. Στο δεύτερο μέρος, μελετήθηκε ο μεταβολισμός του εντομοκτόνου Chlorfenapyr από 4 ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες του κυτοχρώματος P450 κουνουπιών του είδους *Anopheles gambiae* και *Aedes aegypti* που έχουν παρουσιάσει ανοχή σε διάφορες κατηγορίες εντομοκτόνων. Η ανάλυση έγινε με την τεχνική HPLC-ESI-MS και η απόκριση του συστήματος συγκρίθηκε με την τεχνική HPLC-Ortho-SSI-MS. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως μόνο ένα από τα τέσσερα ένζυμα δεν ήταν ικανό να μεταβολίσει το εντομοκτόνο. Στην τελευταία ενότητα, αναπτύχθηκε και εφαρμόστηκε η τεχνική της φασματομετρίας μάζας με ιοντισμό εκρόφησης υπερηχητικής εκνέφωσης (EASI-MS) με σκοπό την ταχεία ανάλυση κυττάρων *C. reinhardtii* CC-1690 τα οποία αναπτύχθηκαν σε υποθανατηφόρες συγκεντρώσεις σεληνίου. Κύριο χαρακτηριστικό της τεχνικής είναι η ελάχιστη προετοιμασία του δείγματος. Ανιχνεύθηκαν διάφορα μεμβρανικά λιπίδια όπως η φωσφατιδυλο-γλυκερόλη (PG), η σουλφοκινοβοσυλοδιακυλογλυκερόλη (SQDG) και η 1,2-διακυλογλυκερυλο-3O-4'-(N,N,N-τριμεθυλο)-ομοσερίνη (DGTS). Παρατηρήθηκε από το λιπιδικό προφίλ τους πως η επίδραση τοξικών ενώσεων του μεταλλοειδούς σεληνίου [Se(IV) και Se(VI)] μπορεί να προκαλέσει την αναδιοργάνωση τους με μείωση της ακορεστότητάς τους.

Λέξεις κλειδιά: Φασματομετρία μάζας, ιοντισμός υπερηχητικής εκνέφωσης, υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

ABSTRACT

The technique of Sonic Spray Ionization Mass Spectrometry (SSI-MS) was the basis of the development and application of two analytical methods, Orthogonal Sonic spray Ionization (Ortho-SSI) and Desorption sonic spray Ionization Mass Spectrometry (DeSSI-MS). The development of each ionization source involves the selection of optimum parameters before the analysis of real samples.

The first part consists of the detailed development of the Orthogonal Sonic spray Ionization source. That involves the interaction of a high velocity spray with a cylindrical rode that bends the spray from a SSI nebulizer and thus introduces SSI – originating droplets into the MS in order to improve the efficiency with which high performance liquid chromatography (HPLC) can be coupled to SSI-MS. The HPLC-Ortho-SSI-MS/MS was used to separate and detect chlorate (ClO_3^-), perchlorate (ClO_4^-) and bromate (BrO_3^-) ions and quantitate these anions in water samples.

In the second part, Chlorfenapyr insecticide metabolism was investigated for four recombinant proteins of the cytochrome p450 from *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti* mosquitoes, which associated with insecticide resistance. The technique of HPLC-ESI-MS was used for this analysis, and the response of the system was compared to HPLC-Ortho-SSI-MS. Only one of the three enzymes was not able to metabolise this insecticide.

In the last section, Easy Ambient Sonic Spray Mass Spectrometry (EASI or DeSSI-MS) was developed and applied for the rapid analysis of *C. reinhardtii* cells incubated with sub lethal concentrations of selenium. The main characteristic is that minimal sample preparation is needed for the analysis of cells. Membrane lipids such as phosphatidylglycerol (PG), sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG) and 1,2-diacylglycerol-3-O-4'-(N,N,N-trimethyl)-homoserine (DGTS) were detected. The effect of toxic metalloids [Se(IV) και Se(VI)] resulted in different profiles of lipids in the mass spectra that possibly indicate membrane lipid double-bond reduction.

Key words: Mass spectrometry, Sonic spray ionization, High performance Liquid Chromatography.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	9
ABSTRACT	10
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	13
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	14
1.1 Φασματομετρία Μάζας	14
1.2 Πηγές ιοντισμού	14
1.2.1 Ιοντισμός με Ηλεκτροψεκάσμο (ESI)	15
1.3 Ambient τεχνικές ιοντισμού	16
1.3.1 Ιοντισμός με Υπερηχητική Εκνέφωση	17
1.3.2 Εκρόφηση Με Ιοντισμό Υπερηχητικής Εκνέφωσης.....	19
1.4 Αναλυτές Μάζας	20
1.4.1 Τετραπολική Παγίδα Ιόντων	21
1.4.2 Αναλυτής Μάζας Τριπλού Τετραπόλου.....	22
ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	24
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΟΡΘΟΓΩΝΗΣ ΠΗΓΗΣ ΙΟΝΤΙΣΜΟΥ ΥΠΕΡΗΧΗΤΙΚΗΣ ΕΚΝΕΦΩΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΟΡΓΑΝΩΝ ΑΝΙΟΝΤΩΝ ΣΕ ΝΕΡΟ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ	26
2.1 Εισαγωγή	26
2.2 Πειραματικό μέρος	27
2.2.1 Χημικά αντιδραστήρια και εξοπλισμός	27
2.2.2 Παρασκευή διαλυμάτων	27
2.2.3 Ορθογώνια πηγή ιοντισμού υπερηχητικής εκνέφωσης	28
2.2.4 Έλεγχος λειτουργίας οργάνων με διάλυμα Sodium Trifluoroacetate (STFA).....	35
2.2.5 Υγρή Χρωματογραφία – Φασματομετρία Μάζας (LC-MS)	35
2.3 Αποτελέσματα και Συζήτηση	38
2.3.1 Αξιολόγηση εκνεφωτών στο σύστημα Orthogonal-SSI-MS	38
2.3.2 Αξιολόγηση του Orthogonal- SSI σε διαφορετικές ταχύτητες ροής.....	41
2.3.3 Πίεση αερίου εκνέφωσης για την ανάλυση ανόργανων ανιόντων	42
2.3.4 Ανίχνευση και διαχωρισμός ανόργανων ανιόντων με το σύστημα HPLC-Ortho-SSI-MS	43
2.3.5 Αξιολόγηση Μεθόδου με τον εκνεφωτή PFA.....	45

2.4 Συμπεράσματα.....	53
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΧΡΗΣΗ HPLC-ESI-MS/MS ΚΑΙ HPLC-ORTHO-SSI-MS/MS.....	54
3.1 Εισαγωγή	54
3.2 Πειραματικό μέρος	56
3.2.1 Χημικά αντιδραστήρια και εξοπλισμός	56
3.2.2 Παρασκευή διαλυμάτων	56
3.2.3 Παρασκευή Δειγμάτων	57
3.2.4 Υγρή Χρωματογραφία – Φασματομετρία Μάζας (LC-MS)	57
3.3 Αποτελέσματα και Συζήτηση	60
3.3.1 Ανίχνευση και διαχωρισμός του Chlorfenapyr και του μεταβολίτη του από τέσσερα διαφορετικά ένζυμα με το σύστημα HPLC-ESI-MS.	60
3.3.2 Καμπύλες Βαθμονόμησης	62
3.3.3 Ποσοτικοποίηση του Chlorfenapyr και σύγκριση μεταβολισμού των ενζύμων.	66
3.4 Συμπεράσματα.....	67
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΑΠΕΥΘΕΙΑΣ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΑΣ ΕΚΡΟΦΗΣΗΣ ΜΕ ΙΟΝΤΙΣΜΟ ΥΠΕΡΗΧΗΤΙΚΗΣ ΕΚΝΕΦΩΣΗΣ.....	68
4.1 Εισαγωγή	68
4.2 Πειραματικό μέρος	69
4.2.1 Easy Ambient Sonic Spray Ionization source	69
4.2.2 Φασματομετρία μάζας	72
4.2.3 Κυτταρικές καλλιέργειες.....	73
4.2.4 Προετοιμασία δειγμάτων	74
4.3 Αποτελέσματα και Συζήτηση	74
4.3.1 Σύγκριση εκνεφωτών στο σύστημα EASI.....	74
4.3.2 Το προφίλ των λιπιδίων με το σύστημα EASI-MS	75
4.3.3 Επίδραση του μεταλλοειδούς Σεληνίου (Se) στα λιπίδια της μεμβράνης των κυττάρων <i>C. reinhardtii</i>	77
4.4 Συμπεράσματα.....	85
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	86

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

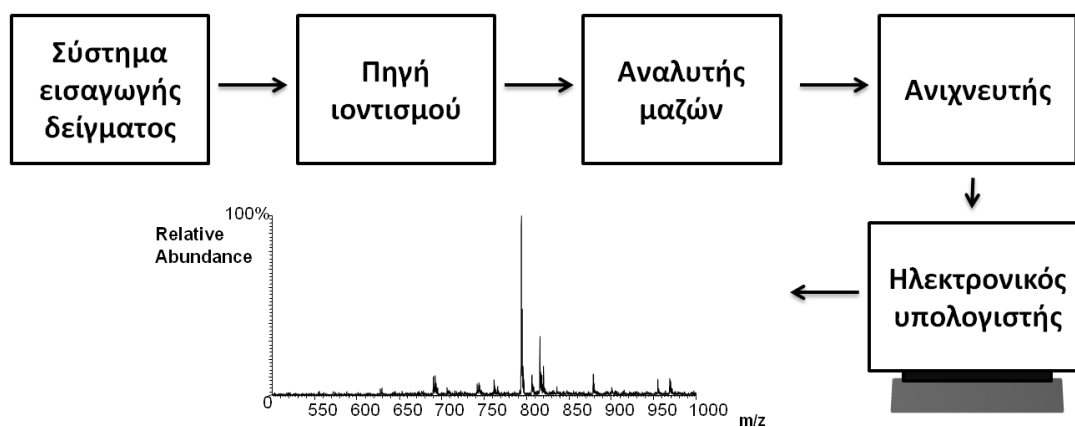
ACN	Ακετονιτρίλιο
APCI	Χημικός ιοντισμός ατμοσφαιρικής πίεσης
DESI	Εκρόφηση με ιοντισμό ηλεκτροψεκασμού
DeSSI	Εκρόφηση με ιοντισμό υπερηχητικής εκνέφωσης
DGTS	1,2-διακυλογλυκερυλο-3Ο-4'-(N,N,N-τριμεθυλο)-ομοσερίνη
DMF	N,N-Διμέθυλοφορμαμίδιο
EI	Ηλεκτρονιακός Ιοντισμός
ESI	Ιοντισμός ηλεκτροψεκασμού
FS	Τηγμένη πυριτία
HPLC	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
ID	Εσωτερική διάμετρος
LOD	Όριο ανίχνευσης
MALDI	Ιοντισμός Εκρόφησης Με Λείζερ Υποβοηθούμενος Από Μήτρα
MS	Φασματομετρία μάζας
OD	Εξωτερική διάμετρος
PEEK	Polyether ether ketone
PG	Φωσφατιδυλο-γλυκερόλη
PI	Φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη
RF	Ραδιοσυχνότητες
RSD	Σχετική τυπική απόκλιση
SQDG	Σουλφοκινοβοσυλοδιακυλογλυκερόλη
SRM	Επιλεγμένη παρακολούθηση αντίδρασης
SSI	Ιοντισμός υπερηχητικής εκνέφωσης
STFA	Τριφθοροξικό νάτριο

Κεφάλαιο 1 | Εισαγωγή

1.1 Φασματομετρία Μάζας

Η φασματομετρία μάζας αποτελεί ένα σημαντικό και ευέλικτο αναλυτικό εργαλείο καθώς έχει ασύγκριτη ευαισθησία, χαμηλά όρια ανίχνευσης, ταχύτητα και μεγάλο εύρος στις εφαρμογές της. Διάφορες επιστήμες όπως η χημεία, βιοχημεία, η φυσική, η δικανική, η φαρμακευτική, η περιβαλλοντική, επιστήμες υγείας και άλλες έχουν ωφεληθεί από τις ακριβείς ποιοτικές και ποσοτικές πληροφορίες που παρέχει.

Η τεχνική της φασματομετρίας μάζας μελετά τη μάζα ατόμων, μορίων ή θραυσμάτων μορίων. Η βασική αρχή της, είναι η παραγωγή ιόντων του αναλύτη στην αέρια φάση είτε από οργανικές, είτε από ανόργανες ενώσεις με οποιαδήποτε ικανή μέθοδο, ο διαχωρισμός των ιόντων από έναν αναλυτή μαζών βάσει του λόγου μάζας-προς-φορτίο m/z , η ποιοτική και ποσοτική ανίχνευση των ιόντων μετατρέποντάς τα σε ηλεκτρικό σήμα και τέλος η καταγραφή σε φάσμα μάζας με το αντίστοιχο m/z (x-άξονας) και την αφθονία του (y-άξονας).



Εικόνα 1.1- 1. Γενικό μοτίβο φασματομετρίας μάζας.

1.2 Πηγές ιοντισμού

Με τις πηγές ιοντισμού το αναλυόμενο δείγμα ιοντίζεται πριν εισαχθεί στο φασματόμετρο μάζας. Μία πληθώρα τεχνικών ιοντισμού χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μάζας ανάλογα με την εσωτερική ενέργεια που μεταφέρεται κατά τη διαδικασία του ιοντισμού και τις φυσικοχημικές ιδιότητες του αναλύτη που ιοντίζεται. Μερικές πηγές ιοντισμού μεταφέρουν μεγάλο ποσό ενέργειας με αποτέλεσμα την εκτεταμένη θραυσματοποίηση. Άλλες τεχνικές είναι ηπιότερες και

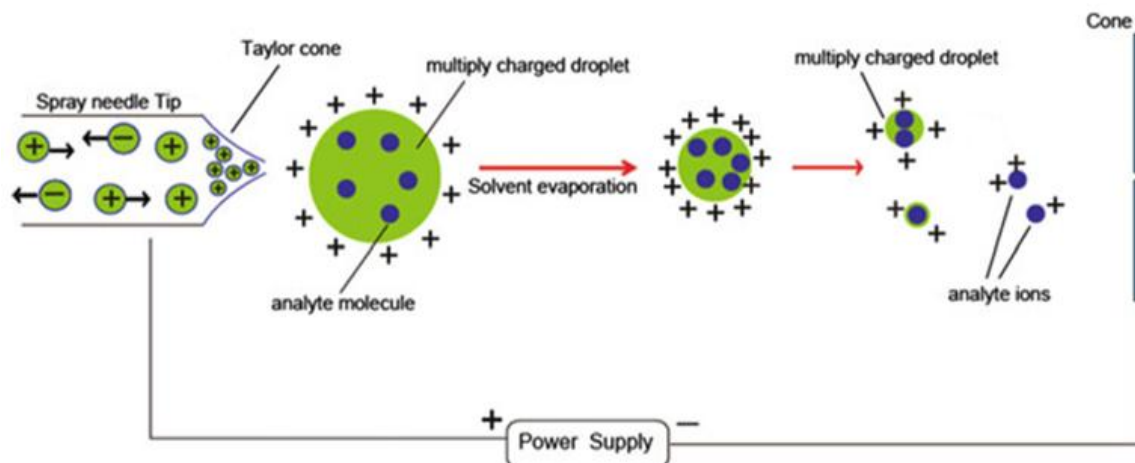
παράγουν μόνο τα μοριακά ιόντα. Ο Ηλεκτρονιακός Ιοντισμός (EI) και ο Χημικός Ιοντισμός (CI) είναι κατάλληλοι για ιοντισμό στην αέρια φάση και έτσι η χρήση τους περιορίζεται σε αρκετά πτητικές και θερμικά σταθερές ενώσεις. Ενώσεις που δεν ανήκουν σε αυτήν την κατηγορία ιοντίζονται με πηγές ιοντισμού υγρής ή στερεάς φάσης. Στις πηγές ιοντισμού υγρής φάσης, το δείγμα είναι ένα διάλυμα το οποίο μετατρέπεται σε αερόλυμα και παράγονται ιόντα στην αέρια φάση υπό ατμοσφαιρικές συνθήκες. Αφού εισέλθουν μέσω του κώνου εισαγωγής του φασματομέτρου μάζας, εστιάζονται μέσω μιας σειράς φακών που βρίσκονται υπό κενό ώστε να αποφεύγονται οι συγκρούσεις των ιόντων με τα μόρια του αερίου του υποβάθρου. Ο Ηλεκτροψεκασμός (ESI) και ο Χημικός Ιοντισμός Ατμοσφαιρικής Πίεσης (APCI) εμπίπτουν σε αυτό τον τύπο πηγών ιοντισμού. Στον ιοντισμό με στερεή φάση, ο αναλύτης είναι μία μη πτητική ουσία. Χρειάζονται διάφορες παρασκευαστικές μέθοδοι πριν την ανάλυση του, οι οποίες περιλαμβάνουν την ανάμειξη μίας μήτρας (στερεό ή ιξώδες ρευστό) με τον αναλύτη. Στη συνέχεια το ξηρό μείγμα αναλύτη και μήτρας ακτινοβολείται με σωματίδια ή φωτόνια υψηλής ενέργειας που εκροφούν ιόντα από την επιφάνεια του μείγματος. Τα ιόντα εξαπλώνονται μέσα στην πηγή και ωθούνται μέσω ηλεκτρικού πεδίου στον αναλυτή. Σε αυτήν την κατηγορία ιοντισμού ανήκει ο Ιοντισμός Εκρόφησης Με Λείζερ Υποβοηθούμενος από Μήτρα (MALDI).^{1,2}

1.2.1 Ιοντισμός με Ηλεκτροψεκασμό (ESI)

Ο πνευματικά υποβοηθούμενος ηλεκτροψεκασμός προτάθηκε πρώτη φορά από τους Fenn και Yamashita το 1984 για την ανάλυση βιολογικών μορίων με μεγάλο μοριακό βάρος³ και σήμερα αποτελεί μια από τις σπουδαιότερες τεχνικές ιοντισμού για την ανάλυση μιας μεγάλης ποικιλίας μορίων.

Τα ιόντα του αναλύτη προϋπάρχουν στο υγρό δείγμα και δεν σχηματίζονται κατά τον ηλεκτροψεκασμό. Στο υγρό δείγμα που διέρχεται μέσα από έναν τριχοειδή σωλήνα εφαρμόζεται ηλεκτρικό δυναμικό (3-6 kV). Ανάλογα με το είδος των ιόντων που επιλέγονται προς ανάλυση, το δυναμικό μπορεί να είναι θετικό ή αρνητικό και εφαρμόζεται μεταξύ του εκνεφωτή και του θαλάμου εκνέφωσης. Στο άκρο του τριχοειδούς σχηματίζεται ένας κώνος που προέρχεται από την περίσσεια φορτισμένων σωματιδίων και ονομάζεται «κώνος του Taylor». Όταν η απωστική δύναμη Coulomb μεταξύ των φορτίων στον κώνο ξεπεράσει την επιφανειακή τάση του υγρού, δηλαδή, το «όριο Rayleigh» τότε ο κώνος σχάζεται σε ένα λεπτόκοκκο

αερόλυμα από φορτισμένα σταγονίδια που κατευθύνονται μέσω αερίου N₂ προς την είσοδο του φασματομέτρου μάζας. Οι μεταφερόμενες στο αερόλυμα σταγόνες υφίστανται απομάκρυνση του διαλύτη κι έτσι μόνο φορτισμένα μόρια, στην αέρια φάση, φτάνουν στον αναλυτή μαζών.⁴



Εικόνα 1.2.1- 1. Αναπαράσταση διεργασιών σχηματισμού ιόντων στην αέρια φάση με ηλεκτροψεκασμό.⁵

1.3 Ambient τεχνικές ιοντισμού

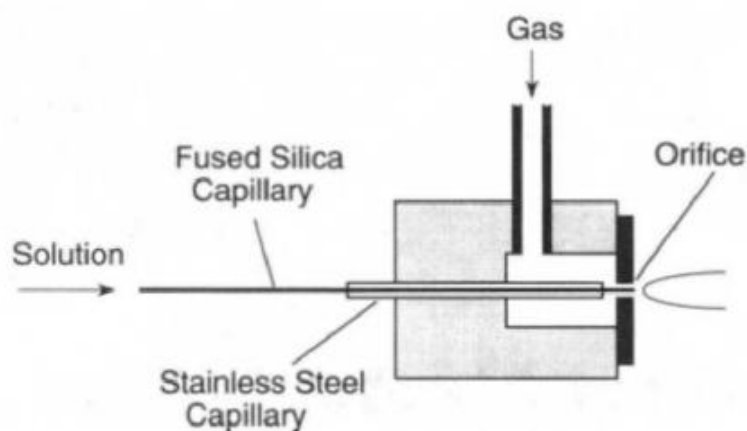
Μια καινοτομία στη φασματομετρία μάζας είναι οι ambient τεχνικές ιοντισμού, οι οποίες είναι ένα σύνολο τεχνικών που δίνουν τη δυνατότητα καταγραφής φασμάτων μάζας κοινών δειγμάτων, στο φυσικό τους περιβάλλον δηλαδή, σε συνθήκες ανοιχτής ατμόσφαιρας και σε αρκετές περιπτώσεις το δείγμα μπορεί να βρίσκεται τοποθετημένο σε στερεή επιφάνεια. Το σημαντικότερο πλεονέκτημα είναι ότι απαιτείται ελάχιστη ή και καθόλου προετοιμασία δείγματος. Άλλα χαρακτηριστικά είναι οι μικροί χρόνοι ανάλυσης και η λήψη των αποτελεσμάτων σε πραγματικό χρόνο. Γενικά πρόκειται για τεχνικές υψηλής απόδοσης καθώς μπορεί να αναλυθεί ένας μεγάλος όγκος δειγμάτων σε σχετικά μικρούς χρόνους.⁶ Οι τεχνικές αυτές είναι γνωστές για την ευχρηστία και την απλότητα στις διατάξεις τους.

Η εισαγωγή των ambient τεχνικών ιοντισμού έγινε το 2004 με την τεχνική ιοντισμού με εκρόφηση ηλεκτροψεκασμού (DESI)⁷ και τη συνόδευσε η απευθείας ανάλυση σε πραγματικό χρόνο (DART)⁸ το 2006 που καθιέρωσε το πεδίο της ambient φασματομετρίας μάζας. Από τότε το πεδίο αυτό έχει γνωρίσει μεγάλο ενδιαφέρον και αρκετές νέες τεχνικές έχουν αναπτυχθεί. Η εκρόφηση με ιοντισμό υπερηχητικής εκνέφωσης που χρησιμοποιήθηκε σε αυτήν την μελέτη είναι μία ambient τεχνική ιοντισμού.

1.3.1 Ιοντισμός με Υπερηχητική Εκνέφωση

Η ανακάλυψη του ιοντισμού υπερηχητικής εκνέφωσης έγινε τυχαία το 1994 από τον Hirabayashi και τους συνεργάτες του. Στην δημοσίευση τους αναφέρουν την διάταξη της πηγής ιοντισμού υπερηχητικής εκνέφωσης (SSI source).⁹ Η τεχνική αυτή δεν χρησιμοποιεί εξωτερικό ηλεκτρικό πεδίο για την μεταφορά ιόντων από το διάλυμα στην αέρια φάση, λειτουργεί κάτω από ατμοσφαιρική πίεση και τα ιόντα που δημιουργούνται στην αέρια φάση προϋπάρχουν στο διάλυμα όπως συμβαίνει και στο ESI.

Στην **Εικόνα 1.3.1- 1** παρουσιάζεται η διάταξη της πηγής αυτής, η οποία αποτελείται από ένα εσωτερικό τριχοειδή σωλήνα τηγμένης πυριτίδας, μέσα από τον οποίο ρέει το δείγμα και μεταφέρεται στην αέρια φάση υπό ατμοσφαιρικές συνθήκες με την βοήθεια ομοαξονικής ροής αζώτου. Εξωτερικά του πρώτου εκνεφωτή υπάρχει ένας ακόμα τριχοειδής με μεγαλύτερη διάμετρο που στηρίζει τον εσωτερικό, ενώ μέσα από αυτόν ρέει το αέριο άζωτο. Στο ακροφύσιο των δύο τριχοειδών σχηματίζεται ένα αερόλυμα από σταγονίδια και ιόντα.

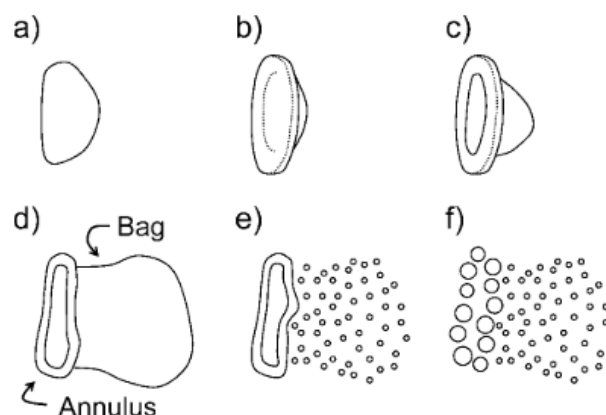


Εικόνα 1.3.1- 1. Διάταξη της πηγής ιοντισμού υπερηχητικής εκνέφωσης όπως προτάθηκε από τον Hirabayashi και τους συνεργάτες του.⁹

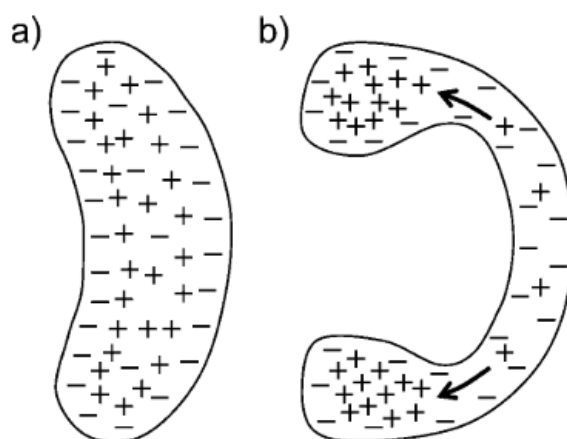
Η ονομασία της τεχνικής προέρχεται από την εξάρτηση που παρουσιάζει το αερόλυμα από την ομοαξονική ροή N_2 . Πιο συγκεκριμένα, η μέγιστη ένταση των ανιχνευόμενων ιόντων, παρατηρήθηκε όταν η γραμμική ταχύτητα ροής του N_2 ήταν ίδια με την ταχύτητα του ήχου, δηλαδή ίση με 1 αριθμό Mach (Ma). Το Ma είναι ένας αριθμός στη μηχανική ρευστών που αντιπροσωπεύει το λόγο της γραμμικής ταχύτητας ενός αερίου προς την ταχύτητα του ήχου κατά τη διάδοση σε ένα μέσο.

Το μοντέλο που προτείνεται για το μηχανισμό παραγωγής φορτισμένων σταγονιδίων, είναι αυτό του υπολειμματικού φορτίου (charge residue model-CRM)¹⁰ και αναφέρει πως τα σταγονίδια του αερολύματος θα είναι κυρίως ουδέτερα λόγω της ίσης κατανομής των φορτίων. Παρ' όλα αυτά, κάποιες σταγόνες θα εμφανίσουν διακυμάνσεις και λόγω της στατιστικής ανισορροπίας των φορτίων θα παραχθεί ένα φορτισμένο αερόλυμα.

Ο Zilch και οι συνεργάτες του¹¹ πρότειναν το μηχανισμό σχάσης της σταγόνας «σακούλα-στεφάνη». Παρατήρησαν πως με τον ιοντισμό υπερηχητικής εκνέφωσης, τα αρχικά σταγονίδια με ακτίνες 10-100 μm έφτασαν τα 2-3 μm και από εκείνο το σημείο δεν συνεχίστηκε η περαιτέρω διάσπαση τους. Ο διαχωρισμός των φορτίων μπορεί να εξηγηθεί με το μηχανισμό «σακούλα-στεφάνη» για την αεροδυναμική σχάση των σταγονιδίων και με την ηλεκτρική διπλοστιβάδα στη επιφάνεια των υγρών. Στην **Εικόνα 1.3.1- 2** υπάρχει η εικονική αναπαράσταση του μηχανισμού «σακούλα-στεφάνη». Η ταχύτητα του αερίου είναι πολύ μεγαλύτερη από αυτήν των σταγονιδίων, αναγκάζοντας τα σταγονίδια να διασπαστούν από αεροδυναμικές δυνάμεις. Αρχικά, η σταγόνα που προκύπτει από τον εκνεφωτή είναι επίπεδη (**Εικόνα 1.3.1- 2a**). Εν συνεχεία, δημιουργείται ένα κοίλωμα στο κέντρο της που γίνεται μεγαλύτερο και δημιουργεί μια σακούλα έχοντας ως βάση μία στεφάνη (**Εικόνα 1.3.1- 2d**). Το δεύτερο βήμα είναι η σχάση αυτής της σακούλας και της στεφάνης δημιουργώντας μικρά και μεγάλα φορτισμένα σταγονίδια (**Εικόνα 1.3.1- 2e-f**).



Εικόνα 1.3.1- 2. Αεροδυναμική σχάση σταγονιδίων με το μηχανισμό σακούλας – στεφάνης.¹¹



Εικόνα 1.3.1- 3. Διαχωρισμός φορτίων στη σταγόνα κατά την αεροδυναμική σχάση.¹¹

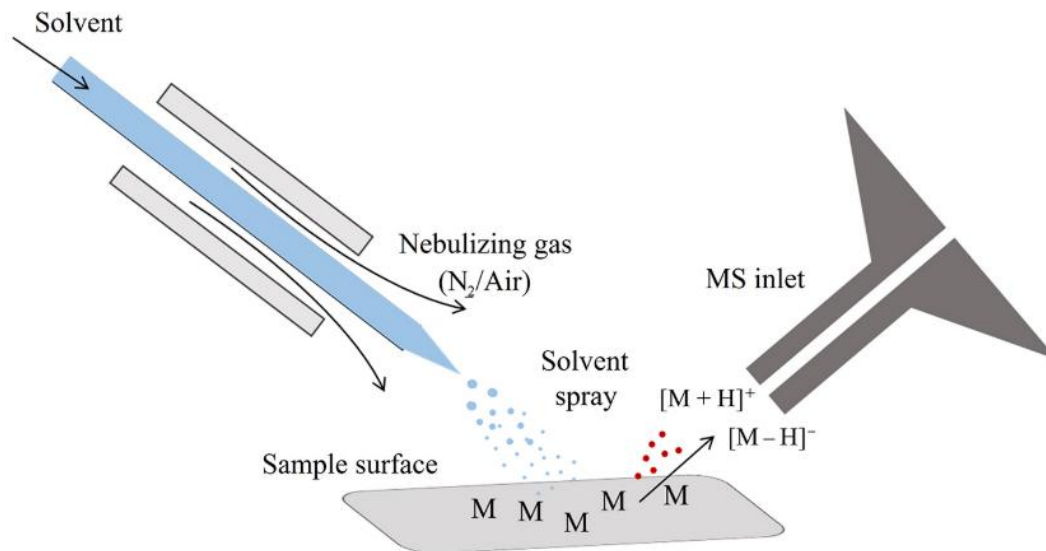
Τα μόρια του νερού που βρίσκονται στο εσωτερικό της σταγόνας λειτουργούν ως ηλεκτρικά δίπολα. Το νερό έχει θετικό επιφανειακό δυναμικό και έτσι για να εξισορροπηθούν τα φορτία, τα ηλεκτρικά δίπολα προσανατολίζονται με τον αρνητικό πόλο προς την διεπιφάνεια του νερού και του περιβάλλοντος.¹¹

Όταν αρχίσει ο σχηματισμός της σακούλας όπως περιγράφηκε προηγουμένως, η σακούλα σχηματίζει μία λεπτή στιβάδα κατά την οποία τα αρνητικά φορτία συσσωρεύονται στο κέντρο της σακούλας, ενώ τα θετικά φορτία στο εσωτερικό της στεφάνης όπως φαίνεται στην **Εικόνα 1.3.1- 3**. Επομένως, όταν γίνει η διάσπαση της σακούλας θα προκύψουν σταγόνες αρνητικά φορτισμένες με μικρή διάμετρο και σταγόνες θετικά φορτισμένες με μεγαλύτερη διάμετρο. Η ήπιες συνθήκες που χρησιμοποιούνται στην συγκεκριμένη πηγή ιοντισμού οδηγεί σε περιορισμένη ή και καθόλου θραυσματοποίηση των αναλυτών. Ο ιοντισμός υπερηχητικής εκνέφωσης είναι η βάση των τεχνικών που αναπτύχθηκαν σε αυτή την εργασία.

1.3.2 Εκρόφηση Με Ιοντισμό Υπερηχητικής Εκνέφωσης

Η ανάπτυξη της τεχνικής ιοντισμού εκρόφησης με ιοντισμό υπερηχητικής εκνέφωσης (DeSSI) έγινε το 2006 από τον Haddad και τους συνεργάτες του¹² και διαφοροποιείται από την τεχνική DESI⁷ καθώς δεν εφαρμόζεται εξωτερικό δυναμικό υψηλής τάσης στο διαλύτη. Το DESI-MS βασίζεται στην τεχνική του ηλεκτροψεκασμού και πραγματοποιείται εκρόφηση των ιόντων από την επιφάνεια του δείγματος από ένα διαλύτη με φορτισμένα σταγονίδια ενώ το DeSSI-MS έχει ως βάση μόνο την υπερηχητική εκνέφωση. Η τεχνική Desorption Sonic-Spray Ionization (DeSSI-MS) μετά από δύο χρόνια ονομάστηκε Easy Ambient Sonic-Spray Ionization

(EASI-MS)¹³ για να τονιστεί η ευκολία στην χρήση της και η αυτοτροφοδότηση της. Η διάταξη της πηγής αυτής δεν είναι εμπορικώς διαθέσιμη, αλλά η κατασκευή της είναι εφικτή με τον κατάλληλο εξοπλισμό στο εργαστήριο.



Εικόνα 1.3.2- 1. Σχηματική αναπαράσταση μιας τυπικής πηγής ιοντισμού EASI-MS.¹⁴

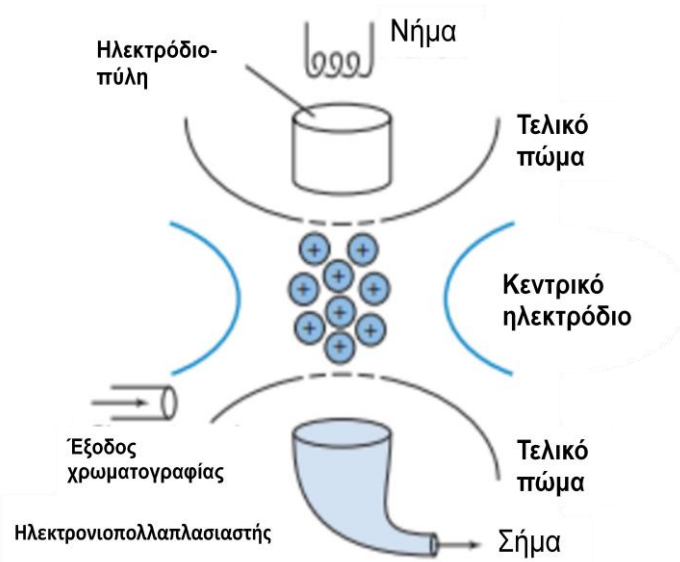
Ο διαλύτης συνήθως ρέει μέσα από έναν εσωτερικό τριχοειδή σωλήνα τηγμένης πυριτίας ενός εκνεφωτή και παράλληλα στον εξωτερικό τριχοειδή ρέει αέριο άζωτο. Με την ομοαξονική ροή N_2 προκαλείται η εκνέφωση του διαλύτη και ο σχηματισμός σταγονιδίων που προσπίπτουν στην επιφάνεια του δείγματος σχηματίζοντας ένα στρώμα. Στο στρώμα αυτό γίνεται εκχύλιση των αναλυτών και με την συνεχή ροή του διαλύτη, τα νέα σταγονίδια ωθούν τα υπάρχοντα ιόντα στο φασματόμετρο μάζας όπου αναλύονται.¹⁵ Τα ιόντα που προκύπτουν με αυτήν την τεχνική είτε μπορεί να προϋπάρχουν στο δείγμα, είτε σχηματίζονται με την εκχύλιση που λαμβάνει χώρα. Η πιθανότερη αιτία όμως είναι να προέρχονται από αντιδράσεις μεταφοράς φορτίου με κατιοντικές ρίζες αζώτου (N_2^{+}), που είναι δυνατό να παραχθούν εξ αιτίας της μεγάλης κινητικής ενέργειας που έχουν τα μόρια αζώτου κατά τις κρούσεις μεταξύ τους.¹⁶

1.4 Αναλυτές Μάζας

Οι αναλυτές μάζας είναι ένα μέρος του φασματόμετρου μάζας που μεταφέρονται τα ιόντα, μέσω φακών εστίασης υπό κενό, και εκεί διαχωρίζονται βάση του λόγου μάζας-προς-φορτίο m/z με τη χρήση μαγνητικών ή ηλεκτρικών πεδίων. Στο τέλος του διαχωρισμού ωθούνται στον ανιχνευτή.

1.4.1 Τετραπολική Παγίδα Ιόντων

Στο συγκεκριμένο αναλυτή μάζας, τα ιόντα παγιδεύονται για ένα χρονικό διάστημα μέσα στην παγίδα με την βοήθεια εναλλασσόμενου (RF) και συνεχούς (DC) ηλεκτρικού πεδίου. Η παγίδα αποτελείται από το κεντρικό ηλεκτρόδιο – δακτύλιο και δύο τελικά ηλεκτρόδια «πώματα». Ηλεκτρόνια αφήνονται από το νήμα στο πάνω μέρος μέσω του ηλεκτροδίου πύλης και δυναμικό ραδιοσυχνότητας (RF) ξεκινά να εφαρμόζεται. Για κάθε τιμή δυναμικού ραδιοσυχνότητας (RF), ιόντα με διαφορετικό λόγο μάζα-προς-φορτίο (m/z) συντονίζονται και περιστρέφονται σε κυκλικές τροχιές γύρω από την κοιλότητα. Με την αύξηση δυναμικού RF δημιουργείται διαφορά δυναμικού που έχει ως αποτέλεσμα να αυξάνει το μήκος κύματος της ταλάντωσης που ακολουθούν τα ιόντα που δεν συντονίστηκαν, να προσκρούσουν στα τοιχώματα και να απομακρύνονται από την παγίδα με την βοήθεια οπών εξόδου στα τελικά πώματα. Τα ιόντα που συντονίστηκαν κατευθύνονται στον ανιχνευτή και στο καταγραφικό δίνοντας φάσματα μάζας. Ο συγκεκριμένος αναλυτής μάζας δίνει την δυνατότητα για θραυσματοποίηση επιλεγμένων ιόντων με συγκεκριμένο m/z παγιδεύοντας τα και στη συνέχεια μέσω σύγκρουσης με αέριο ήλιο (He) να διασπαστούν σε θυγατρικά ιόντα και να ανιχνευθούν.



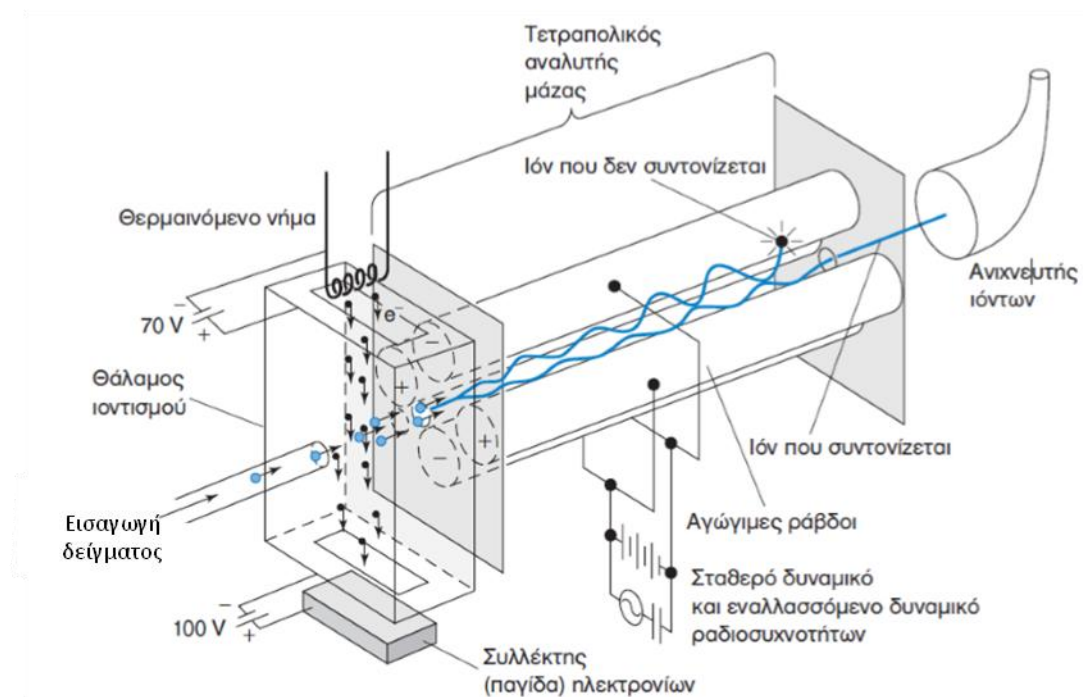
Εικόνα 1.4.1- 1. Φασματόμετρο μάζας παγίδευσης ιόντων με πηγή ιοντισμού με ηλεκτρόνια.²

1.4.2 Αναλυτής Μάζας Τριπλού Τετραπόλου

Στους τετραπολικούς αναλυτές μαζών χρησιμοποιούνται εναλλασσόμενα και σταθερά ηλεκτρικά πεδία για να αλλάξουν την τροχιά των ιόντων και να προκαλέσουν τον διαχωρισμό τους.

Οι τετραπολικοί αναλυτές μάζας αποτελούνται από τέσσερις παράλληλες μεταλλικές ράβδους, που ισαπέχουν από έναν κεντρικό άξονα. Στις ράβδους αυτές εφαρμόζεται ένα σταθερό δυναμικό (DC) και ένα εναλλασσόμενο δυναμικό ραδιοσυχνότητας (RF), με τα ζεύγη των ράβδων που βρίσκονται απέναντι να φέρουν το ίδιο φορτίο. Με τα ηλεκτρικά πεδία γίνεται η επιλεκτική σταθεροποίηση ή αποσταθεροποίηση των ιόντων, καθώς αυτά προχωρούν μέσα στο τετράπολο, διαγράφοντας διάφορες τροχιές. Μόνο ιόντα με συγκεκριμένη τιμή m/z μπορούν να επιτύχουν σταθερή τροχιά που τους επιτρέπει να φτάσουν στον ανιχνευτή. Τα ιόντα με άλλες τιμές m/z δεν συντονίζονται και κατά συνέπεια, συγκρούονται με τις ράβδους ή αποβάλλονται από τον αναλυτή πριν φτάσουν στον ανιχνευτή.

Στην **Εικόνα 1.4.2- 1**, υπάρχει η σχηματική αναπαράσταση ενός τετραπολικού αναλυτή μάζας.

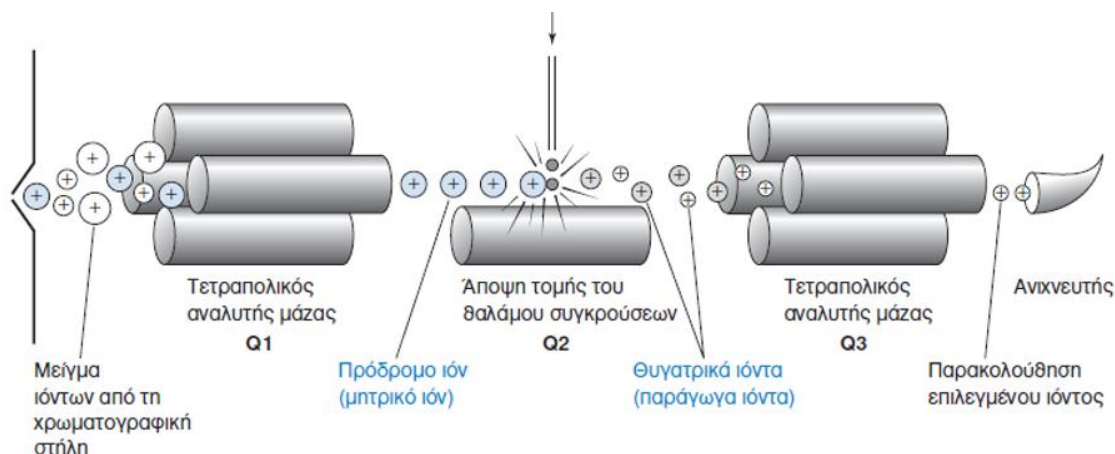


Εικόνα 1.4.2- 1. Τετραπολικός αναλυτής μάζας.²

Στη διαδοχική φασματομετρία μάζας το όργανο TSQ (Thermo Scientific) που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των αμινοξέων αποτελείται από τρία τετράπολα σε σειρά.

Το πρώτο και το τρίτο τετράπολο (Q_1 και Q_3) είναι αναλυτές μάζας, ενώ το δεύτερο (Q_2) είναι θάλαμος συγκρούσεων, όπου τα ιόντα που φθάνουν από το πρώτο τετράπολο, θραυσματοποιούνται.

Στην **Εικόνα 1.4.2- 2**, φαίνεται σχηματικά η διάταξη της συζευγμένης φασματομετρίας μάζας τριπλού τετραπόλου. Τα ιόντα εισάγονται στο τετράπολο Q_1 από την πηγή ιοντισμού. Στη συνέχεια, στο τετράπολο Q_2 γίνεται σύγκρουση των ιόντων με ένα αδρανές αέριο, συνήθως άζωτο ή αργό ή μπορεί να γίνει ακόμα και αντίδραση του αερίου με τα ιόντα. Τα θυγατρικά θραύσματα και τα μόρια που προέκυψαν από την αντίδραση, περνούν στο τετράπολο Q_3 στο οποίο γίνεται η ανάλυση τους.



Εικόνα 1.4.2- 2. Φασματόμετρο μάζας τριπλού τετραπόλου. Απεικονίζεται η αρχή λειτουργίας παρακολούθησης διαδοχικής φασματομετρίας μάζας (MS/MS).²

Σκοπός διατριβής

Ο ιοντισμός υπερηχητικής εκνέφωσης (SSI) είναι μία ήπια τεχνική ιοντισμού η οποία δεν απαιτεί την εφαρμογή δυναμικού, ενώ λειτουργεί υπό ατμοσφαιρικές συνθήκες με τη ροή αερίου υψηλής ταχύτητας παράγοντας τόσο θετικά όσο και αρνητικά ιόντα. Ως ατμοσφαιρική πηγή ιοντισμού αυτή η τεχνική, από την αρχή της ανάπτυξης της, χρησιμοποιήθηκε ευρέως για την σύζευξη με υγροχρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (LC-MS). Με βάση την αρχή του ιοντισμού υπερηχητικής εκνέφωσης έχει αναπτυχθεί μία ποικιλία ambient τεχνικών που έχουν χρησιμοποιηθεί για την ταχεία και σε πραγματικό χρόνο ανάλυση δειγμάτων. Ο σκοπός αυτής της έρευνας είναι η περαιτέρω ανάπτυξη του υπερηχητικού ιοντισμού φασματομετρίας μάζας με την ανάπτυξη δύο τεχνικών, μίας ορθογώνιας πηγής ιοντισμού υπερηχητικής εκνέφωσης (Ortho-SSI-MS) και μίας πηγής εκρόφησης με ιοντισμό υπερηχητικής εκνέφωσης με φασματομετρία μάζας (DeSSI-MS).

Η πρώτη πηγή αναπτύχθηκε προκειμένου να βελτιωθεί η αποτελεσματικότητα με την οποία η HPLC μπορεί να συζευχθεί με το SSI-MS. Αυτή είναι μια ιδιαίτερη πρόκληση, καθώς ο SSI δεν λειτουργεί αποτελεσματικά όταν ο εκνεφωτής τοποθετείται ορθογώνια στην είσοδο του MS. Αυτό συμβαίνει επειδή τα σταγονίδια του αερολύματος που προκύπτουν είτε έχουν μεγάλη ορμή ακολουθώντας μια ευθεία διαδρομή, είτε δεν φέρουν επαρκές φορτίο ώστε να κάμπτονται προς το MS, καθώς η πηγή είναι απαλλαγμένη από κάποιο ηλεκτρικό δυναμικό. Η πρόθεσή μας είναι η δοκιμή μίας κυλινδρικής ράβδου μπροστά από τη ροή του αερολύματος. Έτσι πραγματοποιείται το φαινόμενο Coanda κατά το οποίο, το αερόλυμα θα αλληλεπιδράσει με την κεκκαμμένη επιφάνεια, μεταβάλλοντας την αρχική του κατεύθυνση. Επίσης, στην μελέτη αυτή κατασκευάστηκε μία πηγή εκρόφησης με ιοντισμό υπερηχητικής εκνέφωσης (DeSSI), με τον εξοπλισμό του εργαστηρίου, για την ταχεία ανάλυση άθικτων κυττάρων σε συνθήκες ανοιχτής ατμόσφαιρας και την ελάχιστη απαιτούμενη προετοιμασία του δείγματος. Ανάλογα με τα είδος του δείγματος που θέλουμε να αναλύσουμε μπορούμε να μεταβάλουμε την κλίση του εκνεφωτή και να αντικαταστήσουμε την κυλινδρική ράβδο με την αντικειμενοφόρο πλάκα, έχοντας την ικανότητα ανάλυσης μίας πληθώρας διαφορετικών δειγμάτων.

Η εργασία αυτή εστίασε στην ανάλυση περιβαλλοντικών και βιολογικών δειγμάτων. Πιο συγκεκριμένα, διαχωρίστηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν χλωρικά, υπερχλωρικά και βρωμικά ανιόντα σε νερό, τα οποία είναι είτε παραπροϊόντα απολύμανσης του νερού είτε συστατικά των στερεών προωθητικών για πυραύλους, εκρηκτικά, πυροτεχνήματα και αερόσακους. Αυτά τα ιόντα επηρεάζουν την ανθρώπινη υγεία. Επίσης, μελετήθηκε η ικανότητα μεταβολισμού ενός εντομοκτόνου στον τοξικότερο μεταβολίτη του, από τέσσερις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες του κυτοχρώματος P450 δύο διαφορετικών ειδών κουνουπιών – φορέων ασθενειών. Τέλος, διερευνήθηκε η επίδραση που έχουν τοξικά μεταλλοειδή στα μεμβρανικά λιπίδια μονοκύτταρων πράσινων φυκιών. Η μελέτη αυτή παρουσιάζει αρκετό ενδιαφέρον, καθώς μπορεί να παρέχει πληροφορίες για πιθανούς μηχανισμούς τοξικότητας.

Κεφάλαιο 2 | Ανάπτυξη ορθόγωνης πηγής ιοντισμού υπερηχητικής εκνέφωσης και ανίχνευση ανόργανων ανιόντων σε νερό με υγροχρωματογραφία

2.1 Εισαγωγή

Η πηγή ιοντισμού ηλεκτροψεκασμού (ESI) χρησιμοποιείται ευρέως συζευγμένη με Υγροχρωματογραφία – Φασματομετρία Μάζας (LC-MS), παρόλα αυτά παρουσιάζει χαμηλή ευαισθησία σε μεγάλες ταχύτητες ροής στη χρωματογραφία.^{17–20} Για να επιτευχθεί μια πιο ανθεκτική και αποτελεσματική πηγή εξετάστηκε μια πρόσφατη δημοσίευση που αναφέρεται στον ηλεκτροψεκασμό (ESI) με χρήση υψηλών ταχυτήτων ροής που βασίζεται στο φαινόμενο Coanda.²¹ Αυτή η πηγή περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση αερολύματος μεγάλης ταχύτητας με μία μεταλλική κυλινδρική ράβδο **στην οποία έχει εφαρμοστεί ισχυρό ηλεκτρικό δυναμικό** και είναι τοποθετημένη εκτός άξονα, κάθετα διασταυρούμενη στη ροή του αερολύματος. Η συγκεκριμένη πηγή ονομάζεται UnisprayTM και είναι εμπορικώς διαθέσιμη.^{22–25}

Η πρόθεση της παρούσας έρευνας είναι η μελέτη της χρήσης μιας κυλινδρικής ράβδου η οποία είναι ικανή να αλλάζει την αρχική κλίση του αερολύματος που προέρχεται από ένα εκνεφωτή υπερηχητικού ιοντισμού (SSI) και έτσι για πρώτη φορά να εισάγονται τα σταγονίδια που έχουν παραχθεί από πηγή ιοντισμού υπερηχητικής εκνέφωσης, μέσα στο φασματόμετρο μάζας με έναν ορθογώνιο τρόπο. Μια σημαντική διαφορά της ορθόγωνης πηγής ιοντισμού υπερηχητικής εκνέφωσης σε σχέση με την πηγή UnisprayTM είναι ότι δεν εφαρμόζεται ηλεκτρικό δυναμικό στην κυλινδρική ράβδο. Αυτή η πηγή ιοντισμού αξιολογήθηκε σε σύζευξη με φασματομετρία μάζας, με τον χρωματογραφικό διαχωρισμό και την ανίχνευση χλωρικών, υπερχλωρικών και βρωμικών ανιόντων σε νερό βρύσης.

2.2 Πειραματικό μέρος

2.2.1 Χημικά αντιδραστήρια και εξοπλισμός

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- Ακετονιτρίλιο, Chromasolv gradient grade, for HPLC, $\geq 99,9\%$, Sigma Aldrich Chemie
- Μεθανόλη, Chromasolv for HPLC, $\geq 99,9\%$, Sigma Aldrich Chemie
- Φορμικό οξύ, ACS reagent, $\geq 88-91\%$, Sigma Aldrich Chemie
- Χλωρικό νάτριο (NaClO_3), Sigma Aldrich Chemie
- Υπερχλωρικό μαγνήσιο ($[\text{MgClO}_4]_2$), Sigma Aldrich Chemie
- Βρωμικό νάτριο (NaBrO_3), Sigma Aldrich Chemie
- Απιοντισμένο νερό (nanopure $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$)

Ο εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των διαλυμάτων ήταν:

- Πιπέτες ακριβείας, Gilson 1000 μL και Eppendorf Research 2,2, 100, 1000 μL
- Σύριγγα υγροχρωματογραφίας Hamilton, 500 μL
- Αναλυτικός ζυγός με ακρίβεια 0,1 mg, Kern ABS
- Αναλυτικός ζυγός με ακρίβεια 0,01 g Kern S72
- Φίλτρα Αργύρου (Ag) (Dionex OnGuard II, 2,5 ml)

2.2.2 Παρασκευή διαλυμάτων

Τα πρότυπα διαλύματα παρασκευάστηκαν με διάλυση υπερχλωρικού μαγνησίου, χλωρικού νατρίου και βρωμικού νατρίου σε απιοντισμένο νερό ($18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$). Τα stock διαλύματα για κάθε ανιόν είχαν την ίδια συγκέντρωση των 200 ppm.

Τα υδατικά διαλύματα που περιείχαν τα τρία ανιόντα και χρησιμοποιήθηκαν για τις καμπύλες βαθμονόμησης παρασκευάστηκαν με διαδοχικές αραιώσεις από τα stock διαλύματα. Η κινητή φάση και τα διαλύματα προς ανάλυση παρασκευάζονταν καθημερινά πριν από κάθε πείραμα. Η κινητή φάση που ήταν $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 30:70 με 0,1% φορμικό οξύ.

Το δείγμα νερού που αναλύθηκε για να βρεθεί η ανάκτηση των αναλυτών, πέρασε πρώτα από φίλτρο αργύρου για να μειωθεί η καταστολή του σήματος από την μήτρα του δείγματος, η οποία έχει υψηλές συγκεντρώσεις σε άλατα όπως τα

θειικά, όξινα ανθρακικά αλλά και τα χλωριούχα. Ο καθαρισμός έγινε με τη βοήθεια σύριγγας η οποία εισήγαγε το δείγμα μέσα στο φίλτρο και έπειτα έγινε η συλλογή του εκλούσματος.

Για την ανάκτηση προστέθηκαν 20 ppb των ανιόντων σε φιλτραρισμένο νερό. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν επεξεργάστηκαν όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα ώστε να έχουν την ίδια σύσταση.

Πίνακας 2.2.2- 1. Τρόπος παρασκευής δειγμάτων νερού για την ανάκτηση των ανιόντων.

Δείγματα	Ανάκτηση 20 ppb	
	Unspiked^a	Spiked^b
Διαλύματα		
Φιλτραρισμένο νερό βρύσης	3,6 ml	3,6 ml
Κινητή φάση	0,4 ml	-
Πρότυπο διάλυμα των τριών ανιόντων	-	0,4 ml

^a Διάλυμα που περιέχει το δείγμα

^b Διάλυμα που περιέχει το δείγμα αλλά και πρότυπο διάλυμα με γνωστή ποσότητα

2.2.3 Ορθογώνια πηγή ιοντισμού υπερηχητικής εκνέφωσης

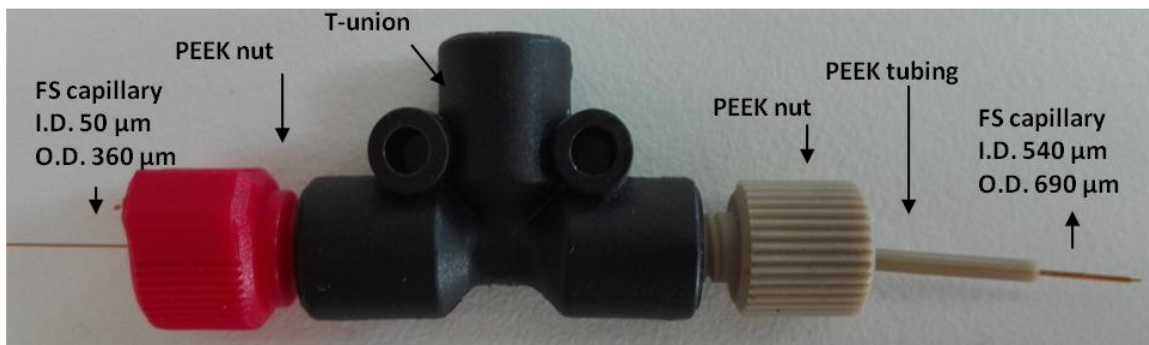
Ο ένας από τους εκνεφωτές που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη αυτής της τεχνικής συναρμολογήθηκε στο εργαστήριο σύμφωνα με το μοντέλο του Takats και των συνεργατών του.²⁶ Για την κατασκευή του χρειάστηκαν συνηθισμένα υλικά του εργαστηρίου:

- Τριχοειδής σωλήνας τηγμένης πυριτίας, με εσωτερική διάμετρο 50 μm και εξωτερική διάμετρο 360 μm (Eksigent Technologies)
- Τριχοειδής σωλήνας τηγμένης πυριτίας, με εσωτερική διάμετρο 540 μm και εξωτερική διάμετρο 690 μm (Polymicro Technologies)
- Πλαστικό T-union
- Σφικτήρες από PEEK (Polyether ether ketone nuts)
- Σωλήνωση από PEEK με εσωτερική διάμετρο 0,762 mm και εξωτερική διάμετρο 1,58 mm (PEEK tubing)

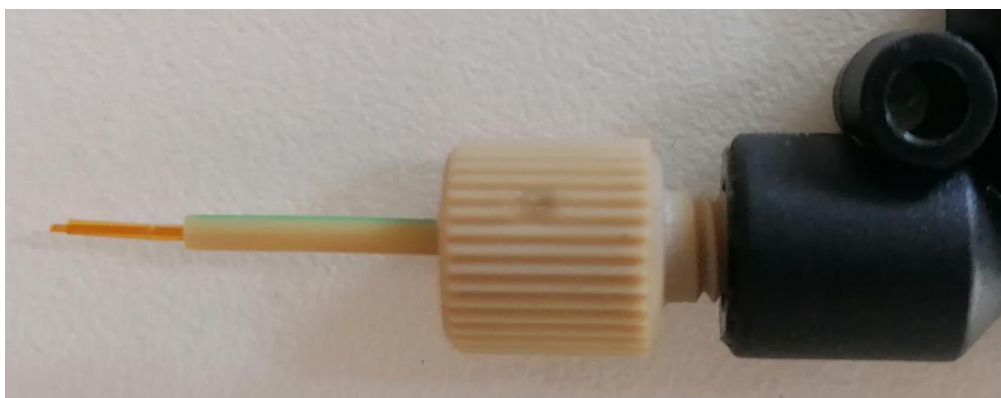
Πιο αναλυτικά, ο εκνεφωτής κατασκευάστηκε από ένα T-union, PEEK nuts για να σταθεροποιούν τους τριχοειδείς τηγμένης πυριτίας, σωλήνωση από PEEK ώστε να

στερεώνεται ο εξωτερικός τριχοειδής τηγμένης πυριτίας που θα επιτρέψει τη χρήση ομοαξονικής ροής αζώτου και στο εσωτερικό του ένας τριχοειδής μικρότερης διαμέτρου από τον οποίο διέρχεται ο διαλύτης.

Με τη βοήθεια μεγεθυντικού φακού και βερνιέρου ο εσωτερικός τριχοειδής ρυθμίστηκε να προεξέχει από τον εξωτερικό περίπου 0,85 mm όπως φαίνεται στην **Εικόνα 2.2.3- 2**. Η απόσταση του εσωτερικού από τον εξωτερικό τριχοειδή διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο για την εκνέφωση του διαλύτη, καθώς εάν το τέλος του εσωτερικού τριχοειδή βρίσκεται πίσω από του εξωτερικού τότε φαίνεται πως δεν υπάρχει ιοντισμός. Αν το τέλος του εσωτερικού τριχοειδή με του εξωτερικού ταυτίζονται, τότε φαίνεται να αρχίζει ο ιοντισμός ενώ όταν ο εσωτερικός εξέχει ο ιοντισμός μεγιστοποιείται.



Εικόνα 2.2.3- 1. Ο εκνεφωτής που κατασκευάστηκε στο εργαστήριο και τα μέρη που τον αποτελούν.



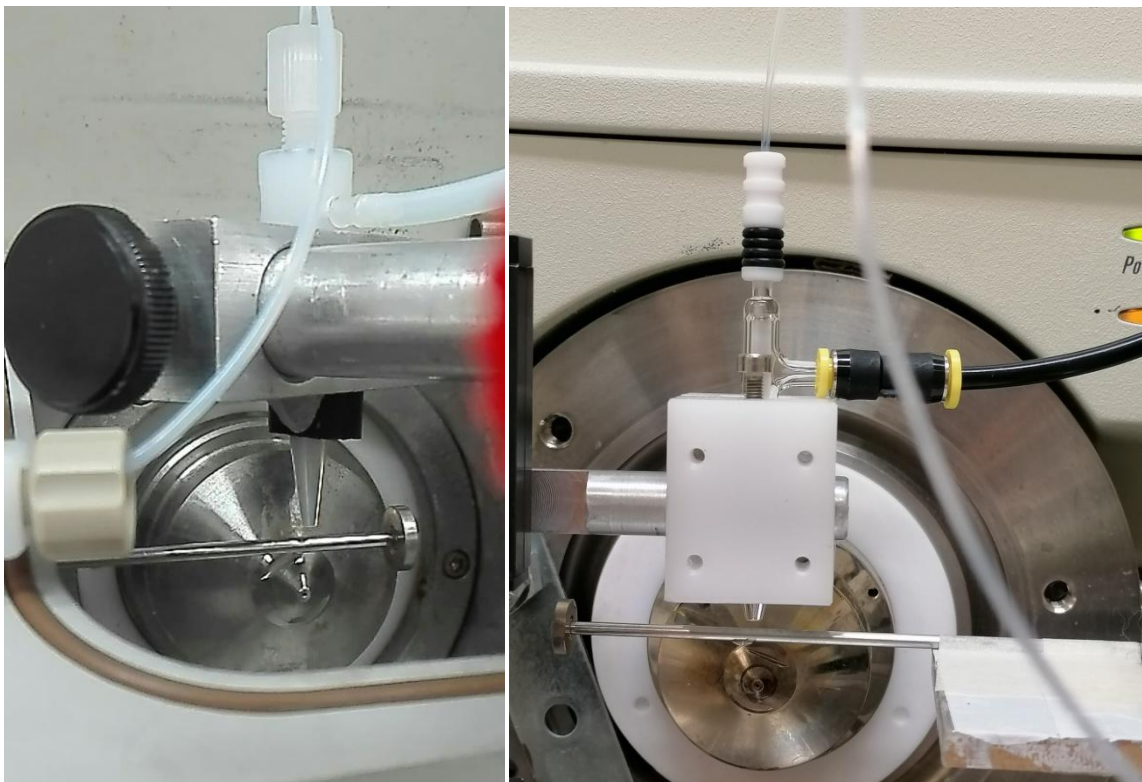
Εικόνα 2.2.3- 2. Το μπροστινό μέρος του εκνεφωτή με τον εσωτερικό και εξωτερικό τριχοειδή σωλήνα.

Εκτός του εκνεφωτή που κατασκευάστηκε στο εργαστήριο, δοκιμάστηκαν ακόμα δύο εκνεφωτές βιοπυριτικής υάλου της σειράς MicroMist U-Series που έχουν δυνατότητα εισαγωγής δείγματος με ροές έως 0,2 και 0,6 ml min⁻¹ από την εταιρία Glass Expansion και ένας PFA (Perfluoroalkoxy alkane polymer) εκνεφωτής της

εταιρείας Elemental Scientific Inc. Στην **Εικόνα 2.2.3- 3** παρουσιάζονται οι εκνεφωτές τοποθετημένοι στην πηγή ιοντισμού.

Το σύστημα φασματομετρίας μάζας που χρησιμοποιήθηκε για τη συναρμολόγηση και τη βελτιστοποίηση της αρχικής πηγής ήταν ένα φασματόμετρο μάζας εξοπλισμένο με μία τετραπολική ιοντική παγίδα (LCQ Advantage, Thermo Scientific).

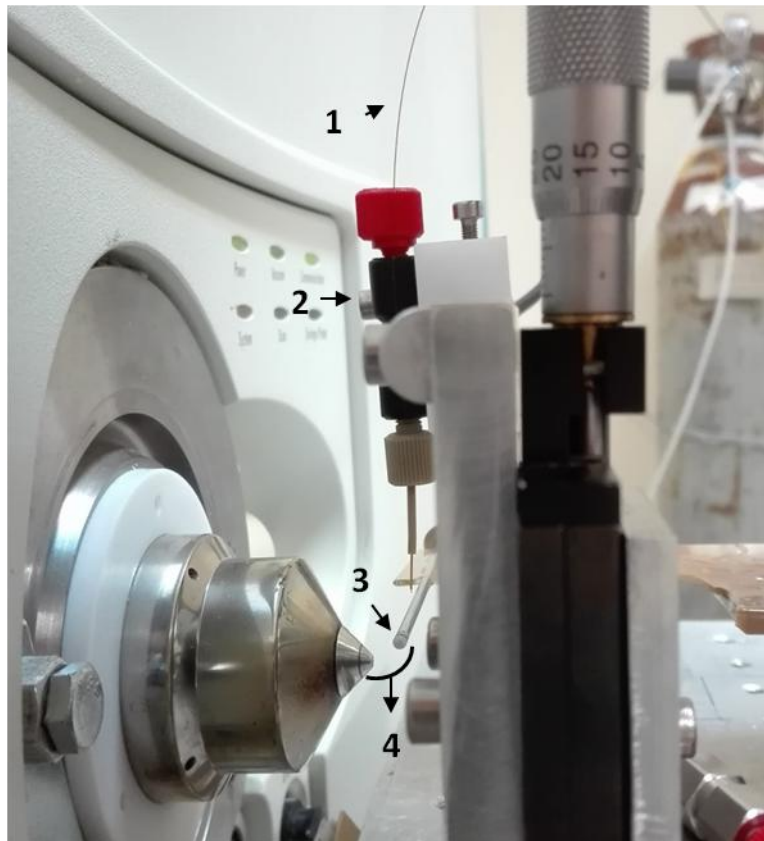
Ο κάθε εκνεφωτής στηρίχθηκε σε ειδικά σχεδιασμένη βάση με βαθμονομημένους κοχλίες που επέτρεπε τη χειροκίνητη μεταβολή της θέσης σε τρία διαφορετικά επίπεδα x-y-z. Το αυξητικό ή μειωτικό βήμα σε κάθε επίπεδο ήταν 0,5 mm. Η βάση επίσης, επέτρεπε και τη ρύθμιση της γωνίας του εκνεφωτή από τη βάση του δείγματος.



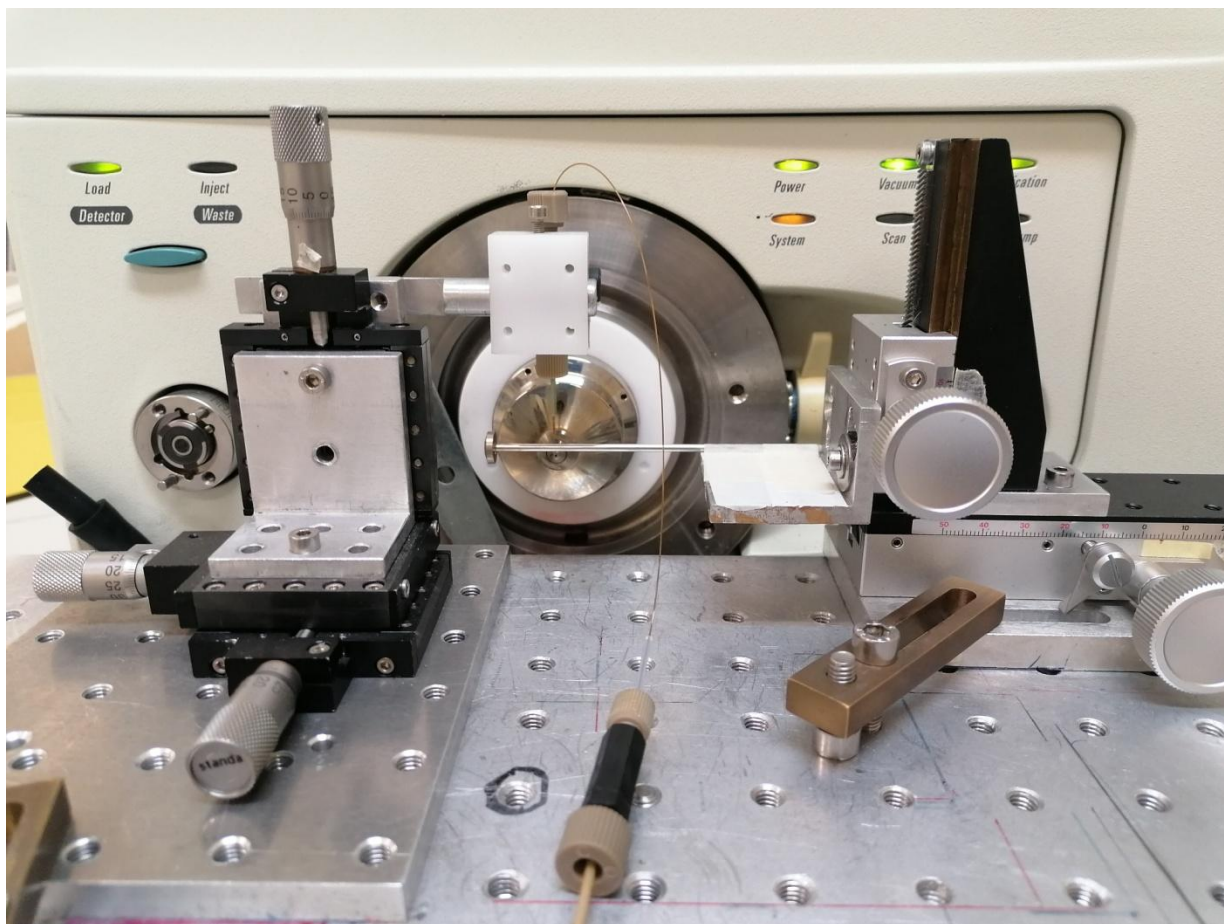
Εικόνα 2.2.3- 3. Η πηγή ορθογώνιου ιοντισμού υπερηχητικής εκνέφωσης που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο χρησιμοποιώντας εκνεφωτή PFA (αριστερά) και βιοπυριτικής υάλου (δεξιά).

Ακολουθως, με τη βοήθεια της ειδικής βάσης, ο εκνεφωτής τοποθετήθηκε μπροστά από την είσοδο του φασματομέτρου μάζας με παρόμοιο τρόπο με αυτόν που περιγράφεται από τον Lubin και τους συνεργάτες του.²¹ Ο πνευματικός εκνεφωτής που χρησιμοποιήθηκε, τοποθετήθηκε υπό γωνία 90° προς την είσοδο του φασματομέτρου μάζας, στην οποία προστέθηκε μια κυλινδρική ράβδος εκτός άξονα,

στη διαδρομή του αερολύματος ως προς τον μεταλλικό κώνο δειγματοληψίας του οργάνου. Η ράβδος είχε διάμετρο 1,85 mm και τοποθετήθηκε σε μια δεύτερη βάση που επέτρεπε την μεταβολή της κίνησης στο επίπεδο y (πάνω και κάτω) και x (δεξιά-αριστερά) από τη είσοδο του φασματόμετρου μάζας. Η πηγή αυτή παρουσιάζει μια σημαντική διαφορά από την πηγή Unispray™ καθώς δεν εφαρμόζεται ηλεκτρικό δυναμικό στην κυλινδρική ράβδο.



Εικόνα 2.2.3- 4. Αριστερή πλάγια όψη ορθόγωνης πηγής υπερηχητικού ιοντισμού (SSI) συζευγμένη με σύστημα φασματομετρίας μάζας. (1) Τριχοειδής σωλήνας τηγμένης πυριτίας για την εισαγωγή του δείγματος. (2) Εκνεφωτής που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο. (3) Κυλινδρική ράβδος με διάμετρο 1,85 mm. (4) Παραγωγή ιόντων σε αέρια φάση και είσοδος στον μεταλλικό κώνο δειγματοληψίας του οργάνου.



Εικόνα 2.2.3- 5. Πρόσωση πηγής ορθογώνιου ιοντισμού υπερηχητικής εκνέφωσης (SSI) συζευγμένης με σύστημα φασματομετρίας μάζας.

Το φαινόμενο Coanda οφείλεται στο γεγονός της αλληλεπίδρασης της ροής ενός ρευστού με μία κεκαμμένη επιφάνεια. Στη συγκεκριμένη πηγή που αναπτύχθηκε, το ρευστό είναι το αερόλυμα που παράγεται από τον εκνεφωτή. Κατά τη ροή του αερολύματος, αυτό προσκολλάται σε μία επιφάνεια που βρίσκεται μπροστά από τη διεύθυνση της ροής του (κυλινδρική ράβδος) και παραμένει συνδεδεμένο ακόμα και όταν η επιφάνεια κάμπτεται αλλάζοντας την αρχική κατεύθυνση του υγρού. Στη συνέχεια, φορτισμένα σωματίδια που υπάρχουν στο αερόλυμα εισέρχονται στο φασματόμετρο μάζας (MS). Για την αποτελεσματική μεταφορά των ιόντων στην είσοδο του φασματόμετρου μάζας υπάρχουν τρεις γεωμετρικές παράμετροι που παίζουν καθοριστικό ρόλο. Η πιο σημαντική παράμετρος στο σύστημα αυτό είναι το σημείο στο οποίο το αερόλυμα προσκρούει στην κυλινδρική ράβδο. Η θέση στην οποία παρατηρείται η μέγιστη ένταση του σήματος είναι όταν προσκρούει στο ανώτερο τεταρτημόριο της ράβδου.^{21,23}

Για τη βελτιστοποίηση των σχετικών θέσεων του συστήματος κυλίνδρου, του εκνεφωτή και της εισόδου του φασματομέτρου μάζας έγινε έγχυση του διαλύματος άλατος του νατρίου με τριφθοροξικό οξύ (Sodium Trifluoroacetate - STFA) που χρησιμοποιήθηκε και για τον έλεγχο λειτουργίας του οργάνου LCQ. Η παρασκευή του διαλύματος STFA έγινε με το συγκεκριμένο πρωτόκολλο.²⁷ Για την εισαγωγή του διαλύματος χρησιμοποιήθηκε μία αντλία σύριγγας (Cole Parmer) και η ταχύτητα ροής ήταν $100 \mu\text{L min}^{-1}$.

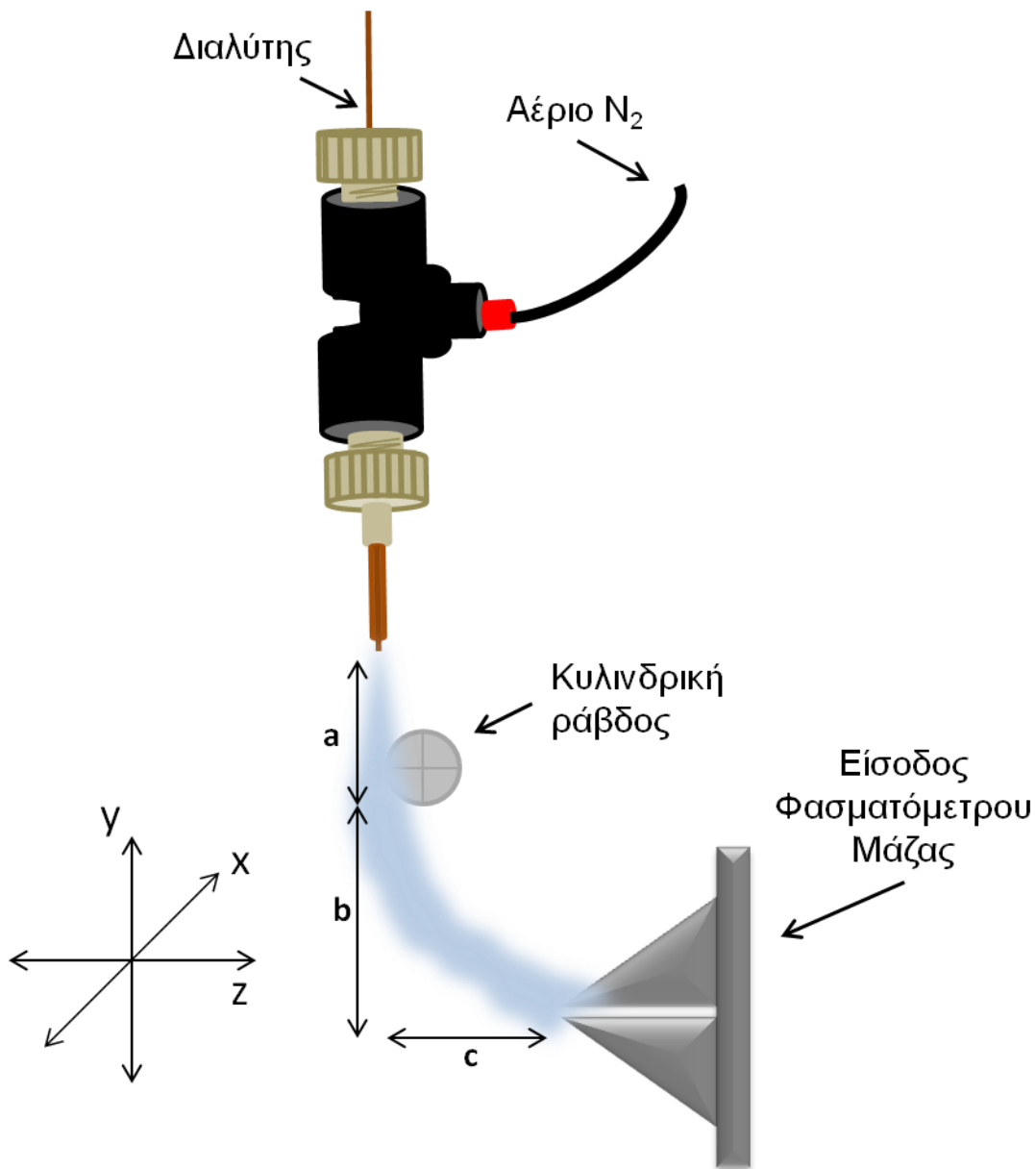
Επίσης, έγιναν περαιτέρω δοκιμές σε διαφορετικές ταχύτητες ροής για να εξεταστεί η σταθερότητα και η αντοχή του συστήματος. Για να γίνει αυτό χρησιμοποιήθηκε μια αντλία για την παροχή κινητής φάσης σε σταθερή ροή (SHIMADZU LC-20AD LIQUID CHROMATOGRAPH, USA), ένας εισαγωγέας δείγματος με 6 βρόγχους (Rheodyne) και βρόγχο δείγματος όγκου 200 μL . Τέλος, η κινητή φάση που χρησιμοποιήθηκε περιείχε 100% ακετονιτρίλιο και έγινε δοκιμή σε ταχύτητες ροών από $100\text{-}500 \mu\text{L min}^{-1}$.

Οι γεωμετρικές παράμετροι παρουσιάζονται στην **Εικόνα 2.2.3- 6** και είναι οι εξής:

a: Απόσταση του εκνεφωτή από την κυλινδρική ράβδο

b: Ύψος της κυλινδρικής ράβδου από την είσοδο του φασματομέτρου μάζας

c: Οριζόντια απόσταση της κυλινδρικής ράβδου από την είσοδο του φασματομέτρου μάζας



Εικόνα 2.2.3- 6. Σχηματική απεικόνιση του εκνεφωτή μπροστά από το φασματομέτρο μάζας στην πηγή ορθογωνίου ιοντισμού υπερηχητικής εκνέφωσης.

Οι τιμές των γεωμετρικών παραμέτρων που χρησιμοποιήθηκαν βρίσκονται στον **Πίνακας 2.2.3- 1** και ο προσδιορισμός τους έγινε με τη χειροκίνητη μεταβολή της σχετικής θέσης του εκνεφωτή και της ράβδου και την ταυτόχρονη παρακολούθηση του φάσματος μάζας ώστε να λαμβάνεται το μέγιστο δυνατό σήμα του αναλύτη. Πιο αναλυτικά, για να βρεθεί η βέλτιστη θέση έγινε καταγραφή του σήματος για κάθε θέση που δοκιμάστηκε. Το σύστημα εκνεφωτή – ράβδου όπως προαναφέρθηκε ήταν στηριγμένο σε ειδικές βάσεις και έτσι επιτρεπόταν η ελεύθερη κίνηση σε τρία διαφορετικά επίπεδα.

Οι μετρήσεις ξεκίνησαν από τις θέσεις a: 2,5 mm, b: 7 mm, c: 6 mm κρατώντας σταθερές δύο παραμέτρους, ενώ η μία άλλαζε κατά 0,5 mm. Στο τέλος της διαδικασίας αυτής έγινε συγκέντρωση των φασμάτων και σύγκριση της έντασης του σήματος που λήφθηκε σε κάθε θέση, για να βρεθεί η βέλτιστη.

Πίνακας 2.2.3- 1. Βέλτιστες γεωμετρικές παράμετροι για την πηγή Ortho-SSI.

Γεωμετρική παράμετρος	Τιμή (mm)
a	1,5 – 3
b	8 – 9
c	3 – 4

2.2.4 Έλεγχος λειτουργίας οργάνων με διάλυμα Sodium Trifluoroacetate (STFA)

Για την επιβεβαίωση της σωστής λειτουργίας των φασματομέτρων μάζας TSQ και LCQ, χρησιμοποιήθηκε πριν από κάθε ανάλυση ένα πρότυπο διάλυμα άλατος του νατρίου με τριφθοροξικό οξύ (Sodium Trifluoroacetate - STFA), pH=3,5.

Η ένωση αυτή παρουσιάζει κορυφές σε όλο το εύρος του οργάνου (50- 2000 m/z) σε θετικό και αρνητικό ιοντισμό και έτσι επιλέχθηκε ως ένας ικανοποιητικός τρόπος βαθμονόμησης του οργάνου και έλεγχος της ευαισθησίας του.²⁷

2.2.5 Υγροχρωματογραφία – Φασματομετρία Μάζας (LC-MS)

Το σύστημα φασματομετρίας μάζας που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των αμινοξέων ήταν ένα τριπλό τετράπολο (TSQ Quantum, Thermo Scientific, San Jose, CA). Τα ανιόντα ανιχνεύθηκαν με την μέθοδο της παρακολούθησης επιλεγμένης αντίδρασης (Selected Reaction Monitoring, SRM) παρακολουθώντας τις αντιδράσεις απώλειας ενός ατόμου οξυγόνου από τους αναλύτες κατά την θραυσματοποίηση. Οι αντιδράσεις αυτές ήταν:

- $^{35}\text{ClO}_3^-$ (m/z 82,9) \rightarrow $^{35}\text{ClO}_2^-$ (m/z 66,9)
- $^{35}\text{ClO}_4^-$ (m/z 98,9) \rightarrow $^{35}\text{ClO}_3^-$ (m/z 82,9)
- $^{79}\text{BrO}_3^-$ (m/z 126,9) \rightarrow $^{79}\text{BrO}_2^-$ (m/z 110,9)

Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν ακόμη τρεις μεταβάσεις για την ταυτοποίηση των ανιόντων οι οποίες ήταν:

- $^{37}\text{ClO}_3^-$ (m/z 84,9) \rightarrow $^{37}\text{ClO}_2^-$ (m/z 68,9)
- $^{37}\text{ClO}_4^-$ (m/z 100,9) \rightarrow $^{37}\text{ClO}_3^-$ (m/z 84,9)
- $^{81}\text{BrO}_3^-$ (m/z 128,9) \rightarrow $^{81}\text{BrO}_2^-$ (m/z 112,9)

Τα ισότοπα του χλωρίου εμφανίζουν ισοτοπική αναλογία που είναι ίση περίπου με 3 ($^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$) ενώ για τα ισότοπα του βρωμίου είναι περίπου 1 ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$). Με την παρακολούθηση της αναλογίας του σήματος μεταξύ ισοτόπων του ίδιου στοιχείου μπορεί να ταυτοποιηθεί η παρουσία του αναλύτη.

Οι τιμές των παραμέτρων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των ιόντων με τη μέθοδο παρακολούθησης επιλεγμένης αντίδρασης φαίνονται στον **Πίνακας 2.2.5- 1**.

Πίνακας 2.2.5- 1. Παράμετροι παρακολούθησης επιλεγμένης αντίδρασης με το σύστημα HPLC-Ortho-SSI-MS/MS.

Αναλύτης	m/z πρόδρομου ιόντος	m/z θυγατρικού ιόντος	Ενέργεια διάσπασης (Collision Energy, V)	Δυναμικό οπτικών εστίασης (Tube lens offset, V)	Εύρος Q1 (m/z)	Εύρος Q3 (m/z)
$^{35}\text{ClO}_3^-$	82,9	66,9	30	-128	0,7	0,7
$^{37}\text{ClO}_3^-$	84,9	68,9	30	-128	0,7	0,7
$^{35}\text{ClO}_4^-$	98,9	82,9	30	-128	0,7	0,7
$^{37}\text{ClO}_4^-$	100,9	84,9	30	-128	0,7	0,7
$^{79}\text{BrO}_3^-$	126,9	110,9	30	-126	0,7	0,7
$^{81}\text{BrO}_3^-$	128,9	112,9	30	-160	0,7	0,7

Οι παράμετροι του συστήματος φασματομετρίας μάζας και οι τιμές που χρησιμοποιήθηκαν, για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των αναλυτών, μετά από βελτιστοποιήσεις φαίνονται στον **Πίνακα 2.2.5- 2**.

Πίνακας 2.2.5- 3. Παράμετροι συστήματος φασματομετρίας μάζας με το σύστημα HPLC-Ortho-SSI-MS/MS.

Παράμετρος	Τιμή
Εύρος σάρωσης (scan width)	0,5 m/z
Χρόνος σάρωσης (scan time)	0,1 s
Ενέργεια συγκρουσιογενούς διάσπασης στην πηγή (source collision induced dissociation)	10 V
Θερμοκρασία τριχοειδή μεταφοράς ιόντων (ion transfer capillary temperature)	350 °C

Για τον προσδιορισμό της τιμής ενέργειας διάσπασης και του δυναμικού οπτικών εστίασης κατασκευάστηκαν καμπύλες διάσπασης (breakdown curves) για κάθε ανιόν. Αυτό επιτεύχθηκε με την εισαγωγή σταθερής ροής του επιθυμητού αναλύτη στο όργανο, το οποίο αυτόματα σαρώνει όλο το εύρος δυναμικών οπτικών εστίασης με σκοπό, την εύρεση της τιμής που το σήμα του αναλύτη είναι μέγιστο. Η ενέργεια διάσπασης προσδιορίστηκε και πάλι αυτόματα. Αρχικά το όργανο ελέγχει όλα τα θραύσματα του αναλύτη και έπειτα σαρώνει όλο το εύρος των ενεργειών διάσπασης μέχρι να προσδιορίσει την τιμή που το σήμα του αναλύτη φτάνει στο μέγιστο. Όταν τελείωσε αυτή η διαδικασία επιλέχθηκαν τα πιο άφθονα θραύσματα για την παρακολούθηση επιλεγμένης αντίδρασης και έγινε χειροκίνητη βελτιστοποίηση των παραμέτρων παρακολουθώντας το σήμα του αναλύτη στο φάσμα μάζας.

Τα ανιόντα θραυσματοποιούνται στο δεύτερο τετράπολο q2 του φασματομέτρου μάζας, μεταξύ του Q1 και του Q3, με τη χρήση αερίου αργού (Ar) σε πίεση 1,5 mTorr. Η θραυσματοποίηση προέρχεται από την εφαρμογή ενέργειας διάσπασης στα ιόντα με συνδυασμό της πίεσης του αερίου.

Το σύστημα της φασματομετρίας μάζας ορθογώνιου ιοντισμού υπερηχητικής εκνέφωσης (Ortho-SSI-MS) συζεύχθηκε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) για το διαχωρισμό των ανιόντων. Η υγρή χρωματογραφία HPLC απαρτιζόταν από μια αντλία για την παροχή της κινητής φάσης σε σταθερή ροή (Thermo Finnigan Surveyor® MS Pump) και από μια βαλβίδα έγχυσης με 6 εναλλάξιμους βρόγχους (Rheodyne, EV750-100-S2) και με βρόγχο δείγματος όγκου 100 μL. Τέλος, χρησιμοποιήθηκε μια στήλη αντίστροφης φάσης ZORBAX Eclipse® XDB-C8, 5μm, 4.6 mm (i.d) x 150 mm. Η κινητή φάση που

παρασκευάστηκε ήταν MeOH/H₂O 30:70 με 0,1% φορμικό οξύ. Η έκλουση των ανιόντων έγινε ισοκρατικά με ταχύτητα ροής 800 $\mu\text{L min}^{-1}$. Η μεθανόλη είναι πολύ σημαντική για την κατακράτηση των αναλυτών από τη στήλη καθώς, τα ανιόντα παρουσιάζουν χαμηλή διαλυτότητα στον οργανικό διαλύτη της κινητής φάσης με αποτέλεσμα να αλληλεπιδρούν με τη στατική φάση της στήλης και να κατακρατούνται ώστε να γίνει ο διαχωρισμός. Το νερό από την άλλη πλευρά και η παρουσία του φορμικού οξέος είναι υπεύθυνα για την έκλουση των ανιόντων από τη στήλη και για το διαχωρισμό τους καθώς ο κάθε αναλύτης αλληλεπιδρά διαφορετικά με τη στατική φάση. Επίσης, η χρήση στήλης χρωματογραφίας με στατική φάση C₈ προϋποθέτει την παρουσία οργανικού διαλύτη στην κινητή φάση ώστε να υπάρχει ανταγωνισμός μεταξύ των μορίων του διαλύτη και του αναλύτη για τις θέσεις της στατικής φάσης.

Ο εκνεφωτής που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη διάταξη ήταν ο PFA (Elemental Scientific Inc.). Το αέριο που χρησιμοποιήθηκε για την εκνέφωση του εκλούσματος της στήλης, προήλθε από κύλινδρο πεπιεσμένου αερίου αζώτου (N₂) (99,99% καθαρότητα) και η πίεση της ομοαξονικής ροής του ήταν 6,5 bar.

Η σάρωση και η επεξεργασία των ληφθέντων φασμάτων μάζας πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Xcalibur (Thermo Scientific) που εξασφαλίζει τον έλεγχο των οργάνων και την ανάλυση δεδομένων στο φασματομέτρο μάζας.

2.3 Αποτελέσματα και Συζήτηση

Σε αυτό το κεφάλαιο παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης, παρατίθενται φάσματα μάζας και χρωματογραφήματα, η προβολή και η επεξεργασία των οποίων έγινε με το πρόγραμμα Xcalibur. Επιπροσθέτως, παρουσιάζονται διαγράμματα που βοηθούν στην καλύτερη κατανόηση των αποτελεσμάτων τα οποία σχεδιάστηκαν με το πρόγραμμα Microsoft Office Excel 2007.

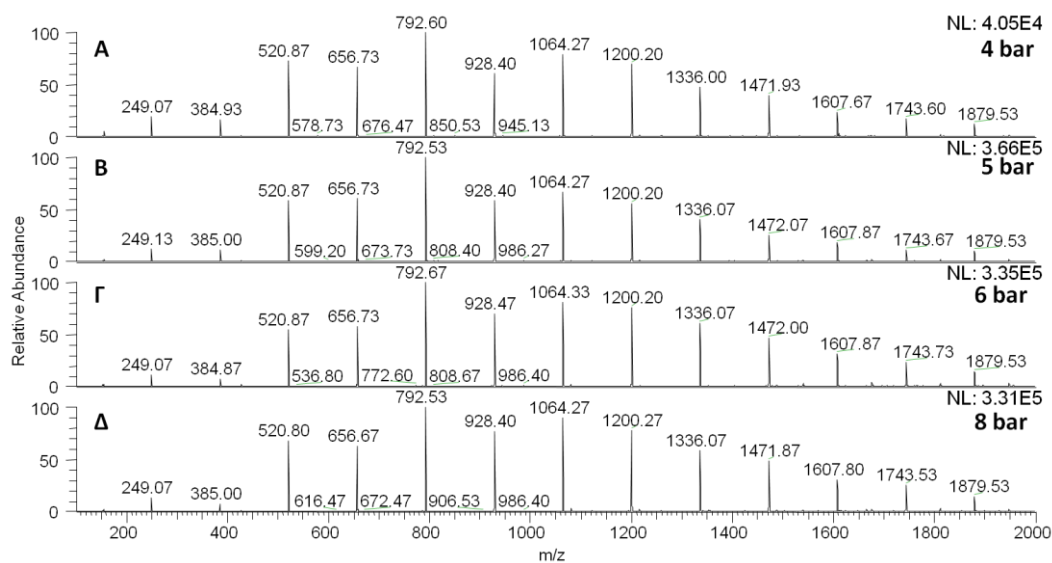
2.3.1 Αξιολόγηση εκνεφωτών στο σύστημα Orthogonal-SSI-MS

Δύο εκνεφωτές μελετήθηκαν στην πηγή ιοντισμού που κατασκευάστηκε στο εργαστήριο σε διαφορετικές πιέσεις αερίου (N₂) εκνέφωσης για να δούμε την ευαισθησία που θα προσφέρουν στο σύστημα και την αντοχή που θα παρουσιάσουν. Το διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν STFA και η ροή ήταν 100 $\mu\text{L min}^{-1}$. Τα

φάσματα μάζας καταγράφηκαν σε λειτουργία αρνητικού ιοντισμού για όλους τους εκνεφωτές και θετικού ιοντισμού για τον γυάλινο εκνεφωτή.

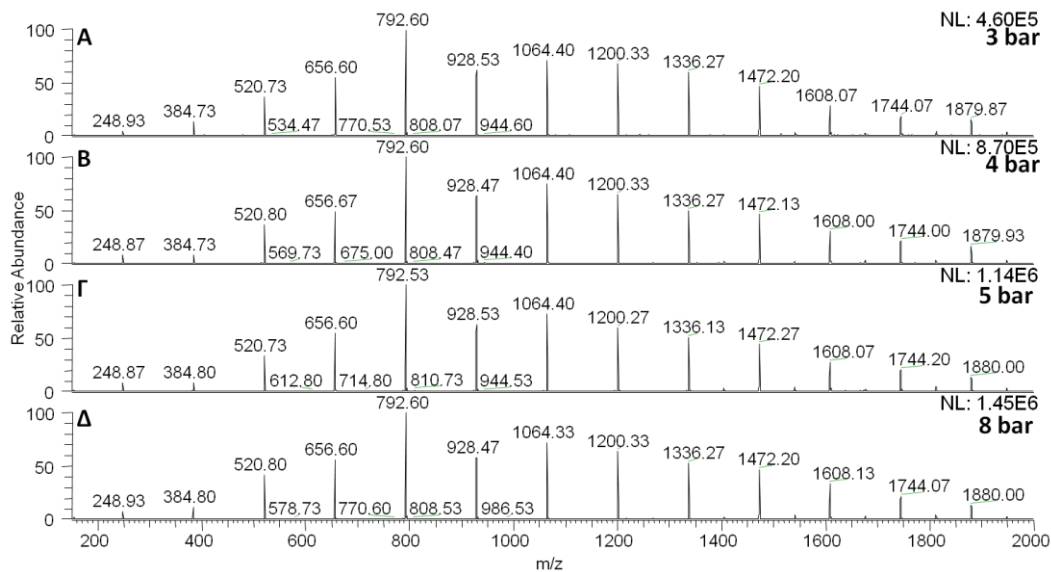
Αρνητικός Ιοντισμός

Ο πρώτος εκνεφωτής που μελετήθηκε ήταν αυτός που κατασκευάστηκε στο εργαστήριο όπως περιγράφεται στην αρχή της **Ενότητας 2.2.3**, οι πιέσεις στις οποίες δοκιμάστηκε είναι 4, 5, 6 και 8 bar. Τα φάσματα μάζας που λήφθηκαν παρουσιάζονται στην παρακάτω **Εικόνα 2.3.1- 1**.



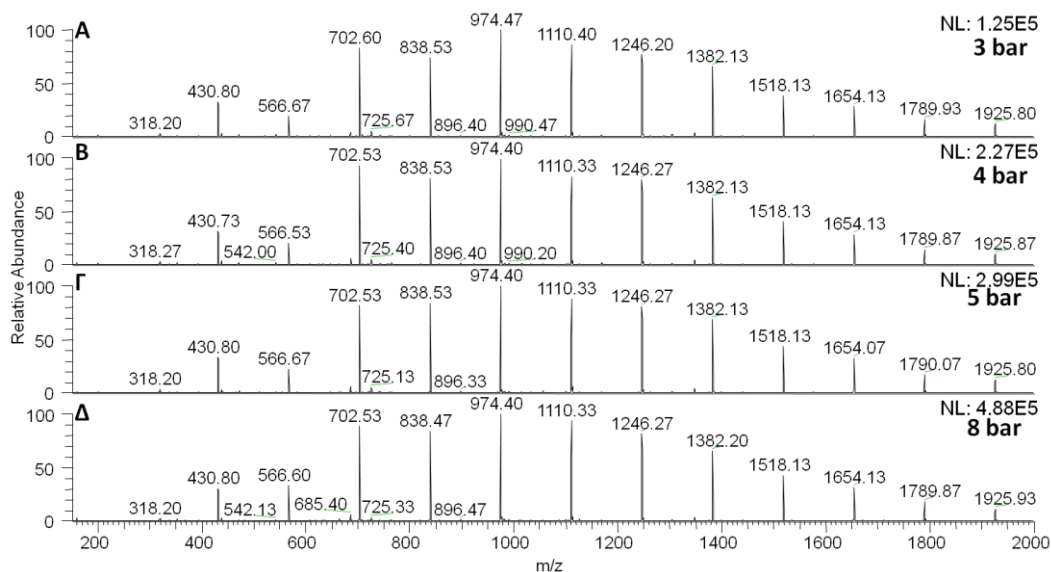
Εικόνα 2.3.1- 2. Φάσματα μάζας αρνητικού ιοντισμού που αποκτήθηκαν με την πηγή Ortho-SSI και τον Homebuilt εκνεφωτή σε διαφορετικές πιέσεις αερίου εκνέφωσης. Το διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν STFA με ροή 100 $\mu\text{L min}^{-1}$. (A) 4 bar (B) 5 bar (Γ) 6 bar (Δ) 8 bar.

Ο δεύτερος εκνεφωτής ήταν γυάλινος της εταιρίας Glass Expansion με δυνατότητα εισαγωγής δείγματος σε ροή έως 0,6 ml min^{-1} . Οι πιέσεις στις οποίες δοκιμάστηκε είναι 3, 4, 5 και 8 bar. Τα φάσματα που λήφθηκαν βρίσκονται στην **Εικόνα 2.3.1- 3**.



Εικόνα 2.3.1- 4. Φάσματα μάζας αρνητικού ιοντισμού που αποκτήθηκαν με την πηγή Ortho-SSI και τον γυάλινο εκνεφωτή ($0,6 \text{ mL min}^{-1}$) σε διαφορετικές πιέσεις αερίου εκνέφωσης. Το διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν STFA με ροή $100 \text{ } \mu\text{L min}^{-1}$. (A) 3 bar (B) 4 bar (Γ) 5 bar (Δ) 8 bar.

Θετικός Ιοντισμός



Εικόνα 2.3.1- 5. Φάσματα μάζας θετικού ιοντισμού που αποκτήθηκαν με την πηγή Ortho-SSI και τον γυάλινο εκνεφωτή ($0,6 \text{ mL min}^{-1}$) σε διαφορετικές πιέσεις αερίου εκνέφωσης. Το διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν STFA με ροή $100 \text{ } \mu\text{L min}^{-1}$. (A) 3 bar (B) 4 bar (Γ) 5 bar (Δ) 8 bar.

Σε κάθε περίπτωση τα ιόντα που ανιχνεύονται είναι τα ίδια και παρουσιάζουν περίπου την ίδια αναλογία μεταξύ τους. Αυτό που παρατηρείται για το γυάλινο εκνεφωτή σε θετικό ιοντισμό είναι πως η ένταση του σήματος (NL) αυξάνει καθώς αυξάνεται η πίεση του αερίου εκνέφωσης, ενώ στον αρνητικό ιοντισμό το σήμα για τις πιέσεις 5 και 8 bar δεν σημειώνει μεγάλη διαφοροποίηση. Στον εκνεφωτή που

κατασκευάστηκε στο εργαστήριο (homebuilt nebulizer) παρατηρείται πως η ένταση του σήματος για τις πιέσεις 5 έως 8 bar δεν εμφανίζει κάποια αξιοσημείωτη αύξηση.

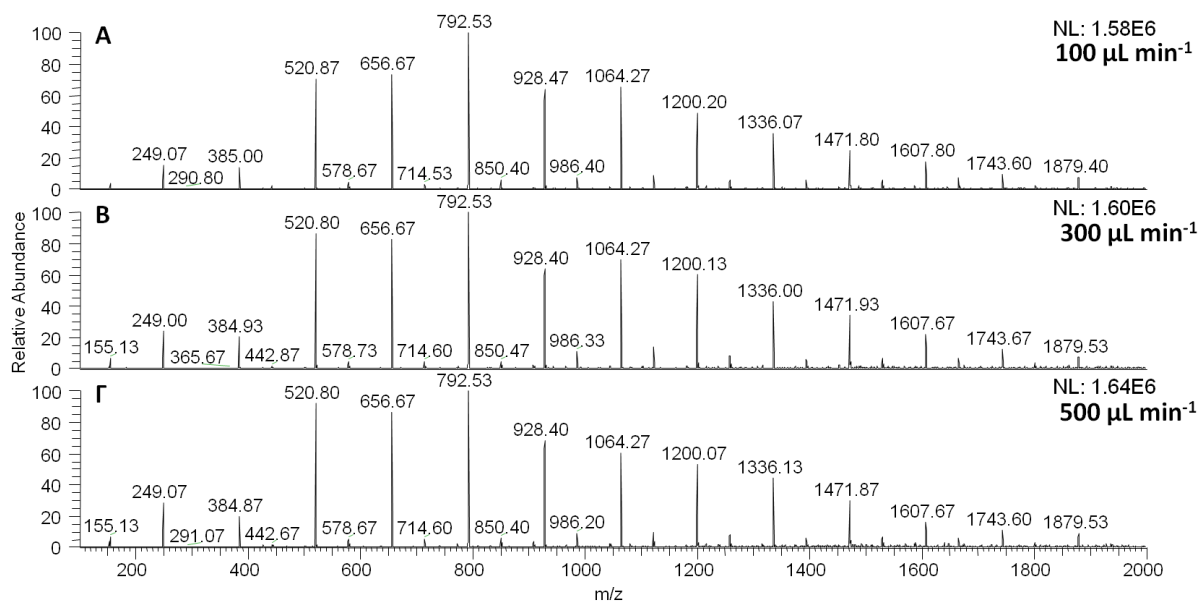
Πίνακας 2.3.1- 1. Επίδραση εκνεφωτή και πίεσης αερίου εκνέφωσης στην ένταση του σήματος του αναλύτη.

Πίεση αερίου εκνέφωσης (bar)	Homebuilt nebulizer (negative ionization)	Glass nebulizer (0,6 $\mu\text{L min}^{-1}$) (negative ionization)	Glass nebulizer (0,6 $\mu\text{L min}^{-1}$) (positive ionization)
3	-	4.60E5	1.25E5
4	4.05E4	8.70E5	2.27E5
5	3.66E5	1.14E6	2.99E5
6	3.35E5	-	-
8	3.31E5	1.46E6	4.88E5

Επιπλέον, η πηγή αυτή μπορεί να λειτουργήσει τόσο στον θετικό όσο και στον αρνητικό ιοντισμό χωρίς να απαιτούνται αλλαγές στην πηγή, καθώς δεν χρησιμοποιούνται ηλεκτρικά δυναμικά.

2.3.2 Αξιολόγηση του Orthogonal- SSI σε διαφορετικές ταχύτητες ροής

Για να μελετηθεί η αντοχή του συστήματος σε υψηλές ταχύτητες ροής χρησιμοποιήθηκε αντλία για την παροχή κινητής φάσης και ένας εισαγωγέας δείγματος για την έγχυση του διαλύματος STFA, ώστε να παρατηρηθούν τυχών διαφοροποιήσεις στην ένταση του σήματος. Η κινητή φάση που χρησιμοποιήθηκε ήταν 100% ακετονιτρίλιο και έγινε δοκιμή σε ταχύτητες ροών από 100, 300 και 500 $\mu\text{L min}^{-1}$. Η πίεση του αερίου εκνέφωσης ήταν 8 bar. Παρακάτω παρουσιάζονται τα φάσματα μάζας σε αρνητικό ιοντισμό.

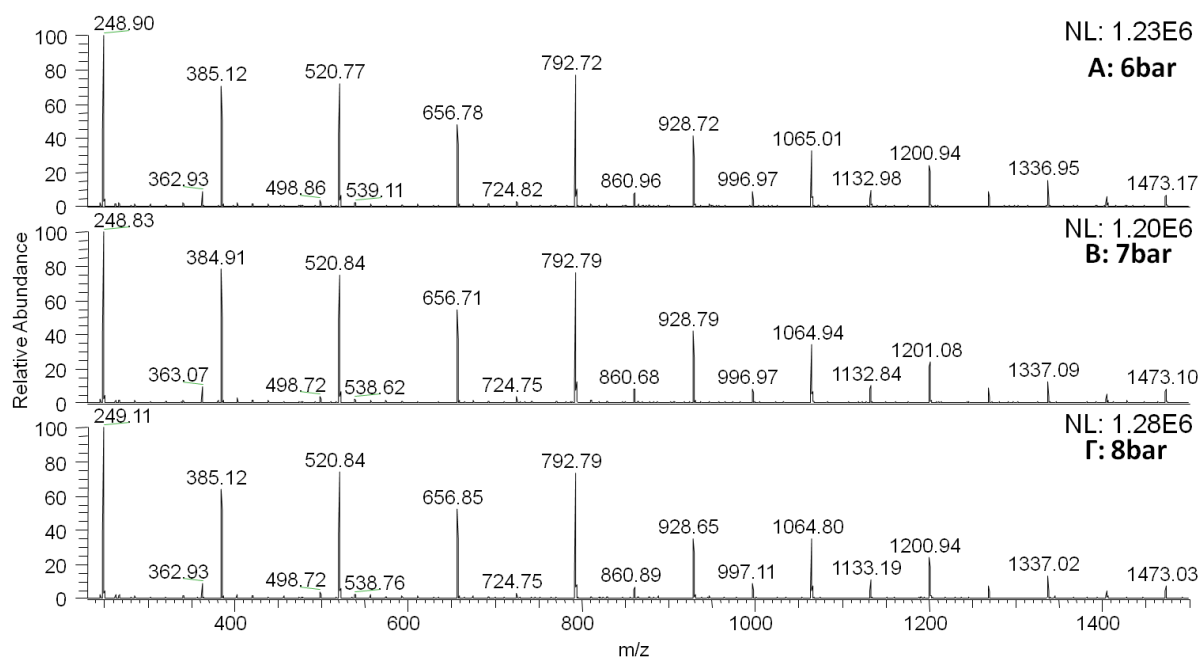


Εικόνα 2.3.2- 1. Φάσματα μάζας αρνητικού ιοντισμού που αποκτήθηκαν με την πηγή Ortho-SSI και τον Homebuilt εκνεφωτή σε διαφορετικούς ρυθμούς ροής. Το διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν STFA με πίεση αερίου εκνέφωσης 8 bar (A) 100 $\mu\text{L min}^{-1}$ (B) 300 $\mu\text{L min}^{-1}$ (C) 500 $\mu\text{L min}^{-1}$.

Από τα παραπάνω φάσματα μάζας διαπιστώνεται πως υψηλές ροές μπορούν να εφαρμοστούν εύκολα στην ορθόγωνη πηγή ιοντισμού χωρίς να δημιουργείται κάποια σημαντική αύξηση της πίεσης στον μεταλλικό τριχοειδή μεταφοράς ιόντων του φασματομέτρου μάζας. Το σύστημα δείχνει μεγάλη σταθερότητα και ανθεκτικότητα ακόμα και σε τέτοιες υψηλές ροές, όπως φαίνεται από τα σήματα που λαμβάνονται σε ροή 100 $\mu\text{L min}^{-1}$ η ένταση είναι 1.58E6, σε ροή 300 $\mu\text{L min}^{-1}$ η ένταση είναι 1.60E6 και σε ροή 500 $\mu\text{L min}^{-1}$ η ένταση του σήματος είναι 1.64E6. Η διαμόρφωση αυτής της πηγής της επιτρέπει να είναι συμβατή με διάφορους τύπους HPLC.

2.3.3 Πίεση αερίου εκνέφωσης για την ανάλυση ανόργανων ανιόντων

Ο εκνεφωτής που χρησιμοποιήθηκε για αυτή την ανάλυση ήταν ο PFA της εταιρίας Elemental Scientific Inc. Για την εύρεση της βέλτιστης πίεσης του αερίου εκνέφωσης (N_2), έγινε εισαγωγή δείγματος STFA με την βοήθεια αντλίας σύριγγας και η ροή ήταν 100 $\mu\text{L min}^{-1}$. Στην **Εικόνα 2.3.3- 1** υπάρχουν τα φάσματα μάζας αρνητικού ιοντισμού που καταγράφηκαν σε τρεις διαφορετικές πιέσεις 6, 7 και 8 bar.

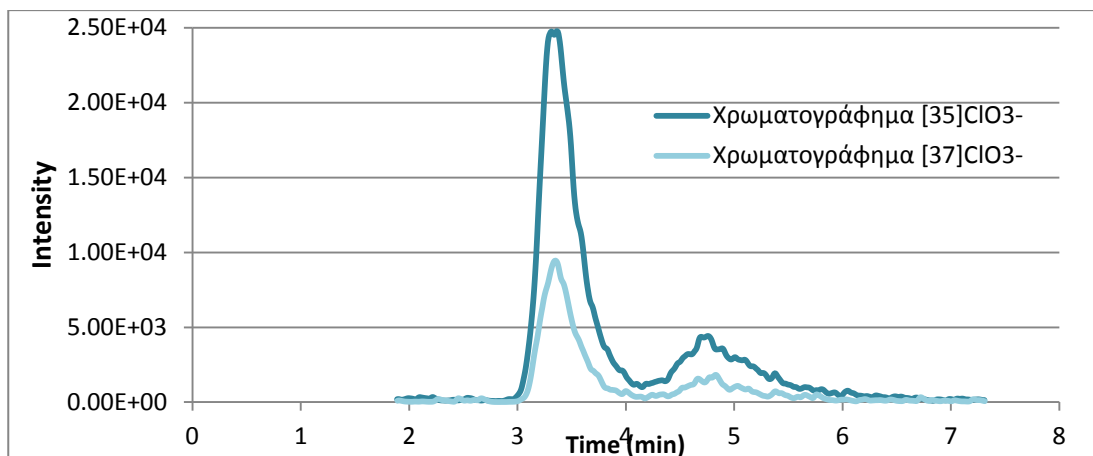


Εικόνα 2.3.3- 1. Φάσματα μάζας αρνητικού ιοντισμού που αποκτήθηκαν με την πηγή Ortho-SSI και τον PFA σε διαφορετικές πιέσεις αερίου εκνέφωσης. Το διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν STFA με ροή 100 $\mu\text{L min}^{-1}$. (A) 6 bar (B) 7 bar (C) 8 bar.

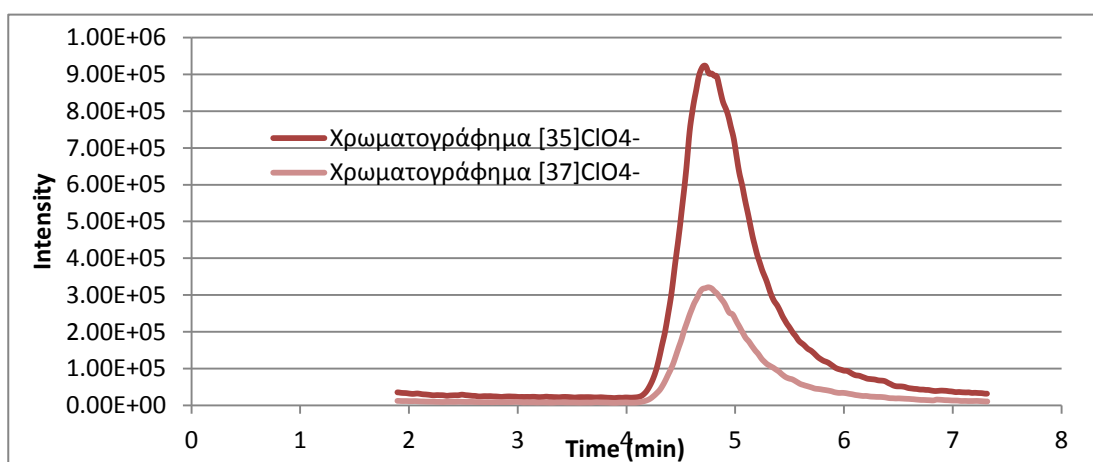
Όπως φαίνεται στην παραπάνω εικόνα, η αύξηση της πίεσης δεν αναλογεί σε αντίστοιχη αύξηση της έντασης του σήματος. Οπότε η χαμηλότερη πίεση αερίου εκνέφωσης επιλέχθηκε για την συνέχεια της ανάλυσης.

2.3.4 Ανίχνευση και διαχωρισμός ανόργανων ανιόντων με το σύστημα HPLC-Ortho-SSI-MS

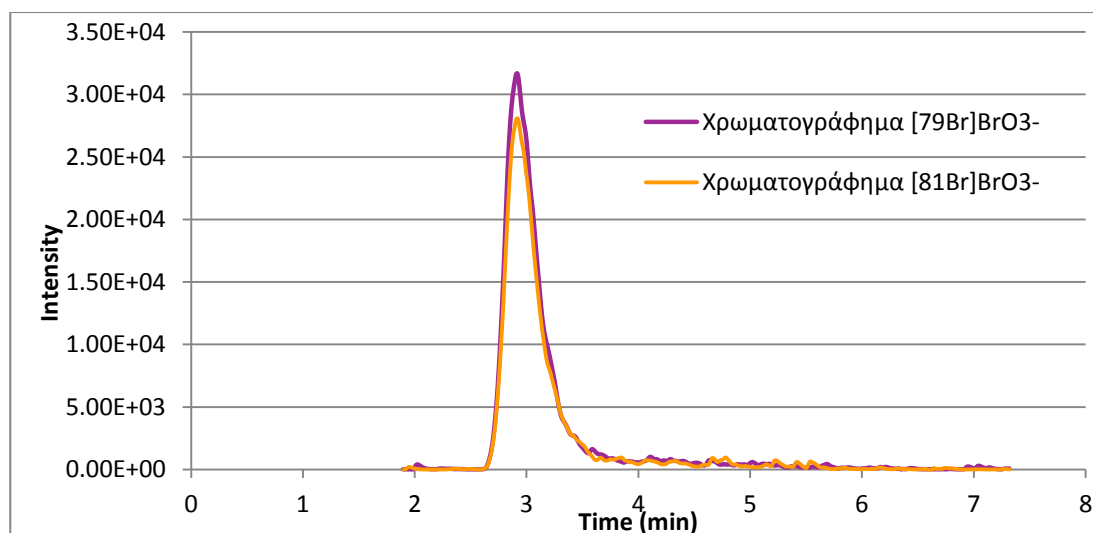
Η ανίχνευση των χλωρικών, υπερχλωρικών και βρωμικών ανιόντων έγινε στο φασματόμετρο μάζας TSQ (τριπλό τετράπολο) με μία συμβατική στήλη χρωματογραφίας, αντίστροφης φάσης (C8). Τα χρωματογραφήματα για κάθε ανιόν παρουσιάζονται παρακάτω με το αντίστοιχο χρωματογράφημα για κάθε ισότοπο του χλωρίου και του βρωμίου. Η συγκέντρωση όλων των ανιόντων είναι 100 $\mu\text{g L}^{-1}$.



Εικόνα 2.3.4- 1. Χρωματογραφήματα για τα χλωρικά ανιόντα συγκέντρωσης $100 \mu\text{g L}^{-1}$. Με σκούρο μπλε το χρωματογράφημα για το ισότοπο ^{35}Cl και με ανοιχτό μπλε για το ισότοπο ^{37}Cl .



Εικόνα 2.3.4- 2. Χρωματογραφήματα για τα υπερχλωρικά ανιόντα συγκέντρωσης $100 \mu\text{g L}^{-1}$. Με σκούρο κόκκινο το χρωματογράφημα για το ισότοπο ^{35}Cl και με ανοιχτό για το ισότοπο ^{37}Cl .



Εικόνα 2.3.4- 3. Χρωματογραφήματα για τα βρωμικά ανιόντα συγκέντρωσης $100 \mu\text{g L}^{-1}$. Με μωβ το χρωματογράφημα για το ισότοπο ^{79}Br και με πορτοκαλί για το ισότοπο ^{81}Br .

Στον παρακάτω πίνακα υπάρχουν οι μεταβάσεις επιλεγμένης αντίδρασης και οι χρόνοι κατακράτησης των ανιόντων από την στήλη.

Πίνακας 2.3.4- 1. Μεταβάσεις επιλεγμένης αντίδρασης και χρόνος κατακράτησης για κάθε ανιόν.

Αναλύτης	Χρόνος κατακράτησης (min)	m/z πρόδρομου ιόντος	Μετάβαση SRM (πρόδρομο → θυγατρικό)
$^{35}\text{ClO}_3^-$	3.31	82,9	82,9→66,9
$^{37}\text{ClO}_3^-$	3.30	84,9	84,9→68,9
$^{35}\text{ClO}_4^-$	4.70	98,9	98,9→82,9
$^{37}\text{ClO}_4^-$	4.70	100,9	100,9→84,9
$^{79}\text{BrO}_3^-$	2.90	126,9	126,9→110,9
$^{81}\text{BrO}_3^-$	2.90	128,9	128,9→112,9

2.3.5 Αξιολόγηση Μεθόδου με τον εκνεφωτή PFA

2.3.5.1 Όρια ανίχνευσης για τα ανόργανα ανιόντα

Ως όριο ανίχνευσης μίας ουσίας ορίζεται ως η συγκέντρωση του αναλύτη που δίνει σήμα το οποίο ξεχωρίζει με βεβαιότητα από το υπόβαθρο.²⁸

Το όριο ανίχνευσης για τα χλωρικά, υπερχλωρικά και βρωμικά ιόντα υπολογίστηκε αρχικά κάνοντας, επτά εισαγωγές τυφλού διαλύματος (blank). Στην περίπτωση μας το τυφλό διάλυμα είναι η κινητή φάση που χρησιμοποιήθηκε στη χρωματογραφία, δηλαδή MeOH/H₂O 30:70 με 0,1% φορμικό οξύ. Κατόπιν, έγιναν τουλάχιστον τρεις εισαγωγές του κάθε προτύπου διαλύματος των τριών ανιόντων για πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις 3,12 ppb, 6,25 ppb, 12,5 ppb, 25 ppb, και 50 ppb. Αυτή που χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση του ορίου ανίχνευσης ήταν η μικρότερη συγκέντρωση. Ο χρόνος κατακράτησης της ουσίας από την στήλη είναι γνωστός, οπότε έγινε ολοκλήρωση στην περιοχή του τυφλού διαλύματος στην οποία υπολογίστηκε ότι θα εμφανιζόταν η ουσία. Από την ολοκλήρωση αυτή προέκυψε το σήμα του λευκού και αφαιρέθηκε από την τιμή της ολοκλήρωσης της κορυφής του αναλύτη, δίνοντας έτσι το καθαρό σήμα του αναλύτη (S). Στη συνέχεια έγινε διαίρεση του καθαρού σήματος με την τυπική απόκλιση των επτά ολοκληρώσεων του τυφλού διαλύματος και έτσι προέκυψε η τιμή S/N (σήμα προς θόρυβο) που αντιστοιχεί σε γνωστή συγκέντρωση αναλύτη. Το όριο ανίχνευσης υπολογίστηκε από την συγκέντρωση εκείνη που το σήμα προς θόρυβο (S/N) είναι 3.

Τα όρια ανίχνευσης για τα τρία ανιόντα που μελετήθηκαν, καθώς και το απόλυτο όριο ανίχνευσης που προέκυψε από τον πολλαπλασιασμό του ορίου ανίχνευσης με τον όγκο εισαγωγής δείγματος στη στήλη (100 µL) παρουσιάζονται στον **Πίνακας 2.3.5- 1**.

Πίνακας 2.3.5- 1. Όρια ανίχνευσης της μεθόδου HPLC-Ortho-SSI-MS/MS για τα χλωρικά υπερχλωρικά και βρωμικά ανιόντα.

Αναλύτης	Όριο ανίχνευσης (µg L ⁻¹)	RSD%	Απόλυτο όριο ανίχνευσης (pg)
³⁵ ClO ₃ ⁻	0,80	2,97	80
³⁷ ClO ₃ ⁻	5,35	5,81	535
³⁵ ClO ₄ ⁻	6,02	3,52	602
³⁷ ClO ₄ ⁻	1,57	3,71	157
⁷⁹ BrO ₃ ⁻	0,60	3,16	60
⁸¹ BrO ₃ ⁻	0,24	2,49	24

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται τα όρια ανίχνευσης για τα χλωρικά, υπερχλωρικά και βρωμικά της παρούσας τεχνικής που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο. Αυτά συγκρίνονται με όρια ανίχνευσης που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία χρησιμοποιώντας τεχνικές όπως η φασματομετρία μάζας με ηλεκτροψεκασμό (ESI-MS/MS) και με ιοντισμό υπερηχητικής εκνέφωσης (SSI-MS) καθώς και η ιοντική χρωματογραφία με αγωγιμομετρική ανίχνευση.

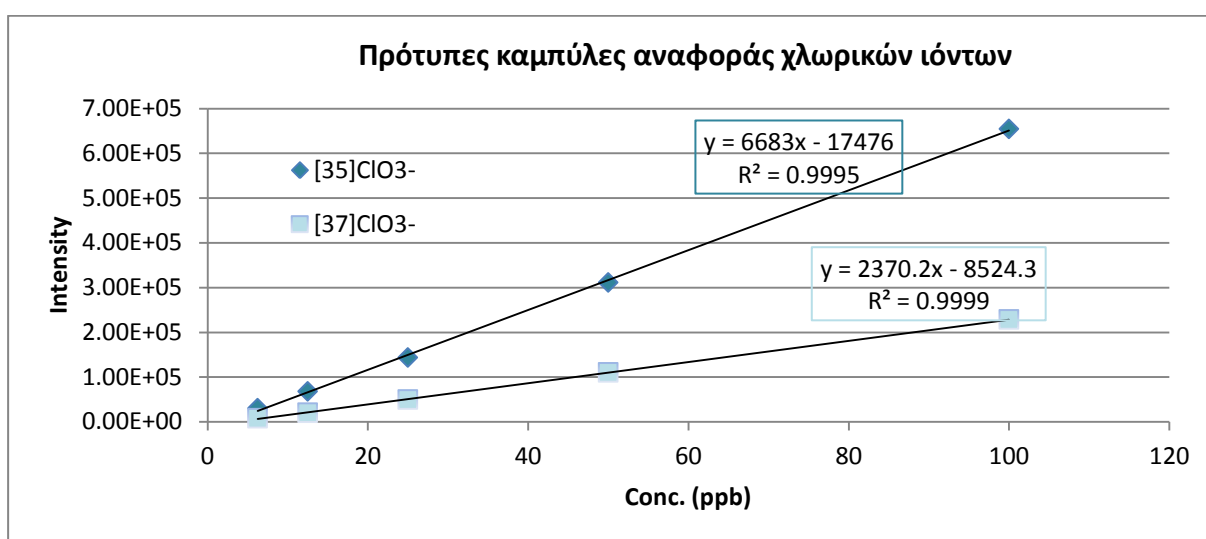
Πίνακας 2.3.5- 2. Σύγκριση ορίων ανίχνευσης (µg L⁻¹) χλωρικών, υπερχλωρικών και βρωμικών με άλλες τεχνικές ανάλυσης.

Μέθοδος	Χλωρικά	Υπερχλωρικά	Βρωμικά
ESI-MS/MS	0,002 ²⁹	0,007 ³⁰	0,049 ²⁹
IC-CD	0,080 ³¹	0,052 ³²	0,060 ³¹
SSI-MS/MS	0,005 ³³	0,010 ³³	0,034 ³³
Ortho-SSI-MS/MS	0,80	1,57	0,60

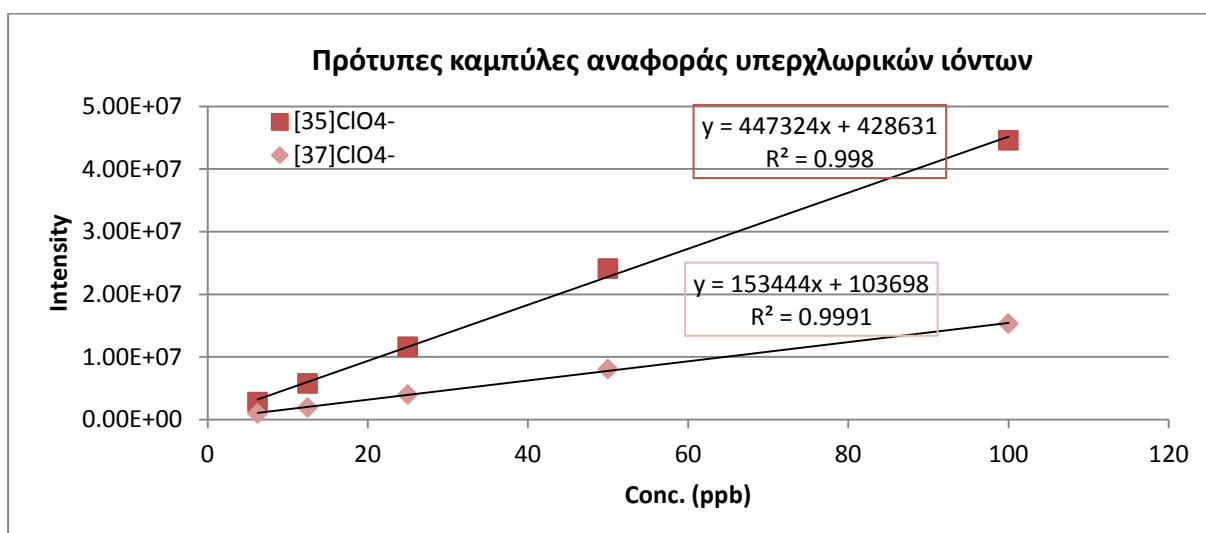
Με την σύγκριση των ορίων ανίχνευσης για τα χλωρικά, υπερχλωρικά και βρωμικά με άλλες τεχνικές που αναφέρονται στη βιβλιογραφία παρατηρείται πως η τεχνική που αναπτύχθηκε, χρειάζεται περαιτέρω βελτίωση. Τα όρια αυτά πρέπει να μειωθούν, ώστε να είναι συγκρίσιμα με τις τεχνικές που έχουν καθιερωθεί μέσα στα χρόνια για την ανάλυση αυτών των ανόργανων ανιόντων. Η ευαισθησία της τεχνικής θα μπορούσε αρχικά να βελτιωθεί με τη βαθύτερη κατανόηση του μηχανισμού ιοντισμού της πηγής αλλά και με την εύρεση καταλληλότερων γεωμετρικών παραμέτρων που θα αυξήσουν τη μεταφορά των ανιόντων στην είσοδο του φασματομέτρου μάζας.

2.3.5.2 Πρότυπες Καμπύλες αναφοράς

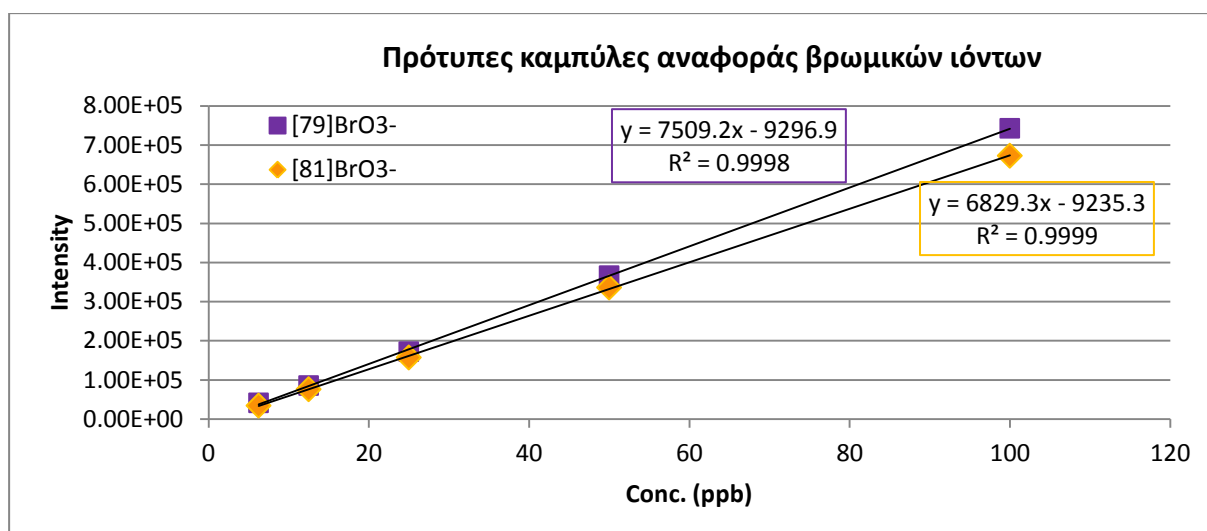
Για να δημιουργηθούν οι πρότυπες καμπύλες αναφοράς παρασκευάστηκαν διαλύματα που περιείχαν τα ανιόντα σε συγκεντρώσεις 6,25, 12,5, 25, 50 και 100 ppb σε MeOH/H₂O 30:70 με 0,1% φορμικό οξύ. Έγινε εισαγωγή του κάθε διαλύματος διαφορετικής συγκέντρωσης, τρεις φορές για τον υπολογισμό του μέσου όρου του ολοκληρώματος της κορυφής του αναλύτη, της τυπικής απόκλισης και της σχετικής τυπικής απόκλισης επί τοις εκατό. Στις παρακάτω εικόνες παρουσιάζονται οι πρότυπες καμπύλες των τριών ανιόντων και παρατίθενται οι πίνακες με τα απαιτούμενα δεδομένα για την κατασκευή τους.



Εικόνα 2.3.5- 1. Πρότυπες καμπύλες αναφοράς για τα χλωρικά ανιόντα. Με σκούρο μπλε παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για το ισότοπο ³⁵Cl ενώ με ανοιχτό μπλε για το ³⁷Cl.



Εικόνα 2.3.5- 2. Πρότυπες καμπύλες αναφοράς για τα υπερχλωρικά ανιόντα. Με σκούρο κόκκινο παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για το ισότοπο ³⁵Cl ενώ με ανοιχτό κόκκινο για το ³⁷Cl.



Εικόνα 2.3.5- 3. Πρότυπες καμπύλες αναφοράς για τα βρωμικά ανιόντα. Με μωβ παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για το ισότοπο ⁷⁹Br ενώ με ανοιχτό κόκκινο για το ⁸¹Br.

Όλες οι καμπύλες βαθμονόμησης των ανιόντων που προκύπτουν από τα παραπάνω διαγράμματα περιγράφονται από την εξίσωση $y = a + b x$, η οποία είναι γραμμική. Ο συντελεστής προσδιορισμού (R^2) για τα χλωρικά είναι 0,9995, για τα υπερχλωρικά 0,998 και για τα βρωμικά 0,9998. Οι πειραματικές μας μετρήσεις παρουσιάζουν αρκετά καλή γραμμική προσαρμογή, στο εύρος των συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή τους.

Πίνακας 2.3.5- 3. Στατιστικά δεδομένα που προέκυψαν από την ολοκλήρωση των κορυφών για τα χλωρικά ανιόντα.

Conc. (ppb)	³⁵ ClO ₃ ⁻			³⁷ ClO ₃ ⁻		
	Μέσος όρος ολοκληρώματος	Τυπική απόκλιση	Σχετική τυπική απόκλιση %	Μέσος όρος ολοκληρώματος	Τυπική απόκλιση	Σχετική τυπική απόκλιση %
6,25	30284,80	4254,16	14,0	7866,43	955,337	12,1
12,5	67871,51	2454,82	3,62	20121,83	1361,05	6,74
25	143582,6	8497,62	5,92	49644,87	5142,93	10,4
50	311300,6	8336,80	2,68	110264,5	4078,14	3,70
100	654417,2	9418,80	1,44	228638,1	4002,34	1,75

Πίνακας 2.3.5- 4. Στατιστικά δεδομένα που προέκυψαν από την ολοκλήρωση των κορυφών για τα υπερχλωρικά ανιόντα.

Conc. (ppb)	³⁵ ClO ₄ ⁻			³⁷ ClO ₄ ⁻		
	Μέσος όρος ολοκληρώματος	Τυπική απόκλιση	Σχετική τυπική απόκλιση %	Μέσος όρος ολοκληρώματος	Τυπική απόκλιση	Σχετική τυπική απόκλιση %
6,25	2773173,28	63273,63	2,28	962843,3	96620,3	10,0
12,5	5758741,54	46475,93	0,807	1925056	69282,94	3,60
25	11609472,4	508736,6	4,40	3985657	117210,4	2,94
50	24101841,1	1069979	4,44	8063544	271666,2	3,37
100	44569019,0	623566,6	1,40	15311082	67797,03	0,443

Πίνακας 2.3.5- 5. Στατιστικά δεδομένα που προέκυψαν απο την ολοκλήρωση των κορυφών για τα βρωμικά ανιόντα.

Conc. (ppb)	⁷⁹ BrO ₃ ⁻			⁸¹ BrO ₃ ⁻		
	Μέσος όρος ολοκληρώματος	Τυπική απόκλιση	Σχετική τυπική απόκλιση %	Μέσος όρος ολοκληρώματος	Τυπική απόκλιση	Σχετική τυπική απόκλιση %
6,25	21461,43	2935,65	7,08	34496,04	4369,50	12,7
12,5	85675,28	3482,19	4,06	76271,91	2528,62	3,31
25	172253,2	5113,40	2,97	157400,9	615,620	0,391
50	366326,2	14042,3	3,83	336162,2	3832,08	1,14
100	742713,9	12752,7	1,72	672669,4	7454,61	1,11

Η επαναληψιμότητα και η σταθερότητα της μεθόδου που παρουσιάζονται ως σχετικές τυπικές αποκλίσεις (RSD%) κυμαίνονται στην περιοχή 1,44% έως 14,0% για τα χλωρικά, 0,80% έως 4,44% για τα υπερχλωρικά και 1,72% έως 7,08% για τα βρωμικά ιόντα. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η παρούσα μέθοδος HPLC-Ortho-SSI-MS/MS είναι επαναλήψιμη για την ανίχνευση των ανιόντων.

2.3.5.3 Ταυτοποίηση κορυφών με την χρήση ισοτοπικής αναλογίας

Συνήθως, η ταυτοποίηση μίας ένωσης σε μια χρωματογραφική τεχνική γίνεται με την παρατήρηση του χρόνου κατακράτησης και την σύγκρισή του με το χρόνο κατακράτησης με μίας γνωστής πρότυπης ένωσης. Ωστόσο, είναι πιθανό ο χρόνος αυτός να μετατοπιστεί λόγω αποδόμησης της στήλης ή της επίδρασης της μήτρας του δείγματος.

Επιπλέον, σε φασματομέτρα μάζας χαμηλής διακριτικής ικανότητας είναι πιθανή η ύπαρξη ισοβαρικής παρεμπόδισης που μπορεί να επηρεάσει την ανίχνευση του αναλύτη ή ακόμη και να παράγει ψευδώς θετικό αποτέλεσμα.

Για την αντιμετώπιση αυτών των προβλημάτων χρησιμοποιήθηκαν οι φυσικές ισοτοπικές αφθονίες του χλωρίου και του βρωμίου. Η αναλογία της ισοτοπικής αφθονίας ³⁵Cl/³⁷Cl είναι 3:1 και ο λόγος ⁷⁹Br/⁸¹Br είναι 1:1.

Σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, κοντά στα όρια ανίχνευσης, υπάρχει πιθανότητα να διαφοροποιηθούν οι αναλογίες παρέχοντας αναξιόπιστα αποτελέσματα, ειδικά στην περίπτωση λιγότερο άφθονων ισοτόπων.^{29,34} Σύμφωνα με τον παγκόσμιο οργανισμό περιβαλλοντικής προστασίας των Ηνωμένων Πολιτειών (US EPA) η αναλογία των ισοτόπων του χλωρίου κυμαίνεται από 2,31 έως 3,85 προκειμένου να είναι έγκυρη η επαλήθευση της.³⁵

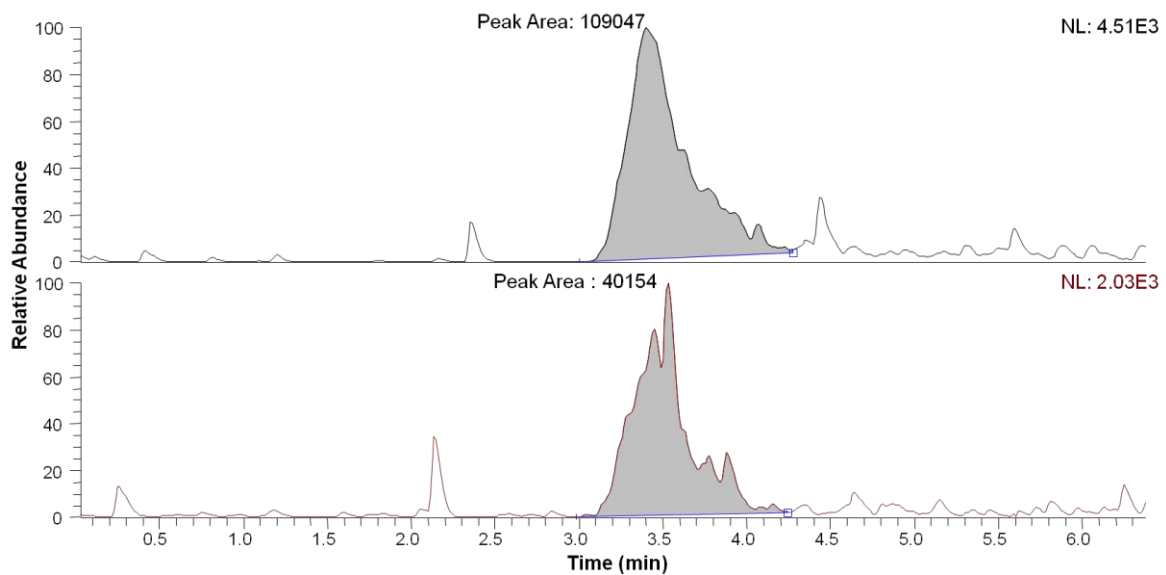
Στις εικόνες **Εικόνα 2.3.4- 1**, **Εικόνα 2.3.4- 2** και **Εικόνα 2.3.4- 3** παρουσιάζονται τα χρωματογράφημα που προέκυψαν ύστερα από την εισαγωγή πρότυπου διαλύματος που περιείχε 100 ppb όλων των ανιόντων και για τα δύο ισότοπα. Ο λόγος του εμβαδού των κορυφών για τα ανιόντα είναι:

$$^{35}\text{ClO}_3^- / ^{37}\text{ClO}_3^- = \frac{654417.2}{228638.1} = 2,86$$

$$^{35}\text{ClO}_4^- / ^{37}\text{ClO}_4^- = \frac{44569019.0}{15311082} = 2,91$$

$$^{79}\text{BrO}_3^- / ^{81}\text{BrO}_3^- = \frac{742713.9}{672669.4} = 1,10$$

Συνεπώς, χρησιμοποιήθηκαν οι αναλογίες ισωτόπων χλωρίου για την επαλήθευση της παρουσίας χλωρικών ιόντων στο δείγμα του νερού που χρησιμοποιήθηκε για τις ανακτήσεις.



Εικόνα 2.3.5- 4. Χρωματογράφημα για τα χλωρικά ανιόντα σε δείγμα νερού. Το πάνω χρωματογράφημα αντιστοιχεί στο ισότοπο του ^{35}Cl και το κάτω στο ^{37}Cl .

Στο δείγμα νερού που μετρήθηκε, η αναλογία ήταν 2,72, που βρίσκεται εντός των ορίων επαλήθευσης του EPA.

$$^{35}\text{ClO}_3^- / ^{37}\text{ClO}_3^- = \frac{109047}{40154} = 2,72$$

2.3.5.4 Φαινόμενο μήτρας σε δείγμα νερού βρύσης

Στην συνέχεια μελετήθηκε η ανάκτηση των ανιόντων σε μήτρα νερού βρύσης, καθώς η απόκριση του φασματομέτρου μάζας για έναν αναλύτη μπορεί να διαφέρει από την απόκριση του σε ένα πρότυπο διάλυμα.

Με την τεχνική HPLC-Ortho-SSI-MS/MS αναλύθηκε δείγμα νερού βρύσης που έχει καθαριστεί με φίλτρο αργύρου και έχει κατεργαστεί όπως περιγράφεται στην **Ενότητα 2.2.2**. Επίσης, παρασκευάστηκε διάλυμα με γνωστή ποσότητα δείγματος και προτύπου διαλύματος του αναλύτη, ώστε η τελική συγκέντρωση να έχει αυξηθεί κατά 20 ppb για να μελετηθεί η ανάκτηση των αναλυτών στη συγκεκριμένη μήτρα. Η ποσοτικοποίηση έγινε με την μέθοδο του εξωτερικού προτύπου χρησιμοποιώντας τις πρότυπες καμπύλες των ανιόντων που παρατίθενται στην **Ενότητα 2.3.5.2**. Στο δείγμα νερού δεν ποσοτικοποιήθηκαν τα υπερχλωρικά και τα βρωμικά ιόντα.

Ο τύπος που χρησιμοποιήθηκε για την ανάκτηση είναι:

$$\text{Ανάκτηση \%} = \frac{C_{\text{spiked}} - C_{\text{unspiked}}}{C_{\text{added}}} \times 100$$

C_{spiked} : Η συγκέντρωση του διαλύματος που περιέχει δείγμα και πρότυπο διάλυμα του αναλύτη σε γνωστή ποσότητα

C_{unspiked} : Η συγκέντρωση του δείγματος χωρίς την προσθήκη προτύπου διαλύματος

C_{added} : Η συγκέντρωση του αναλύτη που προστέθηκε στο διάλυμα του δείγματος

Για τον υπολογισμό της ανάκτησης των υπερχλωρικών και βρωμικών ανιόντων τα οποία δεν ποσοτικοποιήθηκαν στο δείγμα του νερού καθώς είχαν πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις που δεν ανιχνεύθηκαν η C_{unspiked} θεωρήθηκε 0.

Πίνακας 2.3.5- 6. Συγκέντρωση χλωρικών ιόντων και ανάκτηση των μελετώμενων ανιόντων σε νερό βρύσης που έχει καθαριστεί με φίλτρο Ag.

Δείγμα	Conc. (ppb) ³⁵ ClO ₃ ⁻	Conc. (ppb) ³⁷ ClO ₃ ⁻	Ανάκτηση ³⁵ ClO ₃ ⁻	Ανάκτηση ³⁷ ClO ₃ ⁻	Ανάκτηση ³⁵ ClO ₄ ⁻	Ανάκτηση ³⁷ ClO ₄ ⁻	Ανάκτηση ⁷⁹ BrO ₃ ⁻	Ανάκτηση ⁸¹ BrO ₃ ⁻
Νερό βρύσης	17	13,5	54.3%	53.7%	59.3%	57.6%	66.7%	67.6%

Η σύσταση της μήτρας ευθύνεται σημαντικά για την καταστολή του σήματος των ανιόντων. Η συγκέντρωση των χλωρικών ιόντων που έχει ποσοτικοποιηθεί επηρεάζεται από αυτή την καταστολή με αποτέλεσμα οι ανακτήσεις που λαμβάνονται να είναι χαμηλές. Επίσης, παρόλο που τα υπερχλωρικά και τα βρωμικά δεν ανιχνεύθηκαν, οπότε δεν ποσοτικοποιήθηκαν, είναι φανερό ότι οι ανακτήσεις κυμαίνονται στην ίδια κλίμακα με τα χλωρικά ιόντα.

Για να μειωθεί η καταστολή του αναλύτη από την μήτρα του δείγματος και να ληφθούν μεγαλύτερες ανακτήσεις, θα μπορούσε να δοκιμασθεί η αραίωση του δείγματος νερού πριν την ανάλυση με υπερκάθαρο νερό ή θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν διαφορετικά φίλτρα που απομακρύνουν αποτελεσματικότερα τα συστατικά της μήτρας. Εναλλακτικά θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί εσωτερικό πρότυπο κατά την φασματομετρική ανάλυση.

2.4 Συμπεράσματα

Ανακεφαλαιώνοντας, αναπτύχθηκε μια ορθόγωνη πηγή ιοντισμού υπερηχητικής εκνέφωσης για την σύνδεση με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με διαδοχική φασματομετρία μάζας η οποία βασίζεται στο φαινόμενο Coanda. Το φαινόμενο αυτό επέτρεψε την κατασκευή μιας πολύ αποτελεσματικής πηγής ιοντισμού υψηλής ροής, χωρίς να εφαρμοστεί υψηλή τάση στην πηγή, η οποία είναι ικανή να διαχειριστεί ταχύτητες ροής από 20 έως 800 mL min⁻¹. Η ορθόγωνη πηγή ιοντισμού υπερηχητικής εκνέφωσης παρουσιάζεται για πρώτη φορά και η διαμόρφωσή της δίνει πλεονεκτήματα όπως η σταθερότητα και η ανθεκτικότητα, ενώ παράλληλα επιτρέπει την σύζευξη με διάφορους τύπους χρωματογραφίας HPLC.

Επιπροσθέτως, το σύστημα που την αποτελεί είναι αρκετά απλό καθώς απαιτείται μόνο ομοαξονική ροή αερίου αζώτου, ένας υπερηχητικός εκνεφωτής και ένας μεταλλικός κύλινδρος. Με την χρήση της παρούσας τεχνικής, είναι δυνατός ο ταυτόχρονος θετικός και αρνητικός ιοντισμός χωρίς κάποια αλλαγή στην πηγή ιοντισμού, αφού δεν απαιτούνται ισχυρά δυναμικά, παρά μόνο η αλλαγή της πολικότητας στο φασματόμετρο μάζας. Στην συγκεκριμένη πηγή επιτεύχθηκε η βελτιστοποίηση των σχετικών θέσεων του εκνεφωτή και της κυλινδρικής ράβδου σε σχέση με την είσοδο του φασματομέτρου μάζας με αποτέλεσμα το μέγιστο παρατηρούμενο σήμα στα φάσματα μάζας. Η πηγή αυτή είναι συμβατή με αρκετούς διαλύτες στην κινητή φάση όπως η μεθανόλη, το ακετονιτρίλιο και το νερό.

Τέλος, διαχωρίστηκαν και ανιχνεύθηκαν χλωρικά, υπερχλωρικά και βρωμικά ανιόντα σε νερό. Τα όρια ανίχνευσης της τεχνικής αυτής χρήζουν περαιτέρω βελτίωσης όταν συγκρίνονται με τεχνικές που χρησιμοποιούνται εδώ και χρόνια για την ανάλυση τέτοιων ανόργανων οξοανιόντων σε νερά. Η ορθόγωνη πηγή ιοντισμού παρουσίασε επαναλήψιμα αποτελέσματα και καλή γραμμική προσαρμογή. Επιπλέον, οι ανακτήσεις που υπολογίστηκαν δεν είναι ικανοποιητικές καθώς υπάρχουν ενώσεις στην μήτρα του δείγματος που καταστέλλουν το σήμα του αναλύτη. Μελλοντικά θα μπορούσαν να μειωθούν τα φαινόμενα μήτρας με την αραίωση των δειγμάτων νερού, την δοκιμή αποτελεσματικότερων φίλτρων καθαρισμού και την χρήση εσωτερικού προτύπου κατά την φασματομετρική ανάλυση.

Κεφάλαιο 3 | Ανάλυση εντομοκτόνου με την χρήση HPLC-ESI-MS/MS και HPLC-Ortho-SSI-MS/MS

3.1 Εισαγωγή

Διάφορες ομάδες εντομοκτόνων όπως είναι το DDT (οργανοχλωριούχες ενώσεις) και malathion (οργανοφωσφορικές ενώσεις) έχουν χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο των πληθυσμών εντόμων-φορέων ασθενειών στην Ινδία. Αργότερα, έγινε η εισαγωγή των συνθετικών πυρεθροειδών για εσωτερικό υπολειμματικό ψεκάσμο επιφανειών (Indoor residual spraying- IRS) σε περιοχές με πολλούς φορείς που παρουσιάζουν ανοχή σε εντομοκτόνα και για τον εμποτισμό σε δίχτυα κατά των εντόμων (Insecticide-treated nets or ITNs) ενώ πιο πρόσφατα για την κατασκευή διχτύων εμποτισμένων με εντομοκτόνο που έχουν μεγάλη διάρκεια (Long lasting insecticidal nets-LLINs). Λόγω της συνεχούς χρήσης αυτών των εντομοκτόνων, δύο σημαντικά είδη φορέων ελονοσίας στην Ινδία, το *Anopheles culicifacies* και *Anopheles stephensi* έχουν αναπτύξει ανοχή σε πολλά εντομοκτόνα. Τα συνθετικά πυρεθροειδή παρουσιάστηκαν σε επιχειρήσεις προστασίας της δημόσιας υγείας σε ορισμένες περιοχές τη δεκαετία του 1990, για τον έλεγχο των ανθεκτικών κουνουπιών στο DDT – malathion. Το *Anopheles culicifacies*, ο κύριος φορέας ελονοσίας σε αγροτικές και περιαστικές περιοχές της Ινδίας έχει παρουσιάσει ανοχή στα πυρεθροειδή. Το *Anopheles stephensi* ένας άλλος σημαντικός φορέας ελονοσίας στις αστικές περιοχές που έχει επίσης αναπτύξει ανοχή στο DDT, malathion και dieldrin.³⁶ Έτσι πρέπει να αναπτυχθούν εντομοκτόνα για τον έλεγχο του πληθυσμού των κουνουπιών που είναι ανθεκτικά στα ήδη χρησιμοποιούμενα εντομοκτόνα και την πρόληψη της περαιτέρω εξάπλωσης της αντίστασης τους σε αυτά.

Για τον λόγο αυτό τα εντομοκτόνα που ανήκουν σε άλλες κατηγορίες από αυτές τις τρεις που αναφέρθηκαν και έχουν διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης, πρέπει να διερευνηθούν περαιτέρω για το δυνητικό έλεγχο πληθυσμού εντόμων-φορέων. Σε αυτή την προσπάθεια που γίνεται, έχει δοκιμαστεί το Chlorfenaργ, μια ένωση που ανήκει στην κατηγορία εντομοκτόνων που φέρουν ομάδα πυρρολίου στο μόριο τους. Το Chlorfenaργ χρησιμοποιείται εμπορικά για τον έλεγχο του πληθυσμού των τερμιτών και την προστασία καλλιεργειών φρούτων, λαχανικών και άλλων από μία ποικιλία παρασίτων, εντόμων και ακάρεων.^{37,38} Το Chlorfenaργ είναι ένα προ-

εντομοκτόνο, δηλαδή, η βιολογική του δράση εξαρτάται από το μεταβολισμό του σε ενεργό εντομοκτόνο μετά την είσοδο του σε κάποιον ξενιστή. Η οξειδωτική απομάκρυνση της N-αιθοξυμεθυλομάδας του Chlorfenapyr από οξειδάσες μικτής λειτουργίας, οδηγεί στο σχηματισμό μιας τοξικής ένωσης, το Tralopyril (ή μεταβολίτης CL 303268). Αυτή η ένωση διαταράσσει την οξειδωτική φωσφορυλίωση στα μιτοχόνδρια με αποτέλεσμα τη διακοπή της παραγωγής ATP και την απώλεια ενέργειας, οδηγώντας σε κυτταρική δυσλειτουργία και επακόλουθο θάνατο του οργανισμού. Αυτό το μόριο έχει χαμηλή τοξικότητα στα θηλαστικά και ταξινομείται ως ελαφρώς επικίνδυνο εντομοκτόνο σύμφωνα με τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας (WHO).³⁹

Τρεις οικογένειες ενζύμων, οι μονοοξυγενάσες του κυτοχρώματος P450 (P450s), οι τρανσφεράσες γλουταθειόνης (GST) και οι καρβοξυ/χολιστερινάσες (CCE) εμπλέκονται στο μεταβολισμό εντομοκτόνων. Υπερβολική έκφραση ενζύμων αποτοξίνωσης, όπως οι μονοοξυγενάσες κυτοχρώματος P450, συχνά φαίνεται να σχετίζεται με την ανοχή στα εντομοκτόνα σε μεταβολικά μονοπάτια του είδους *Anopheles gambiae*.⁴⁰⁻⁴⁶ Τα γονίδια P450 *CYP6M2* και *CYP6P3* συχνά υπερεκφράζονται σε κουνούπια του είδους *Anopheles gambiae* που παρουσιάζουν αντίσταση σε εντομοκτόνα,⁴⁷ ενώ και τα δύο μεταβολίζουν το permethrin και το deltamethrin.^{48,49} Αυξημένος μεταβολισμός πυρεθροειδούς deltamethrin συσχετίστηκε με την αναγωγή του κυτοχρώματος P450 *CYP9K1*.⁵⁰ Επιπλέον, το *CYP9J32* είναι ένα ένζυμο στο κυτόχρωμα P450 που έχει διαπιστωθεί ότι συνδέεται με την αντίσταση του μεταβολισμού στα πυρεθροειδή στελέχη σε ευρέως διαχωρισμένους πληθυσμούς όπως είναι το Βιετνάμ, το Μεξικό και η Ταϊλάνδη.^{41,51,52}

Κατά την παρούσα έρευνα χρησιμοποιήθηκαν οι παρτίδες τεσσάρων ανασυνδυασμένων P450s από το *Anopheles gambiae* (CYPs 6M2, 6P3, 9K1) και *Aedes aegypti* (CYP9J32) που σχετίζονται όπως προαναφέρθηκε με την ανοχή στα πυρεθροειδή, με σκοπό να διερευνηθεί εάν αυτές οι P450s είναι ικανές να ενεργοποιήσουν την n-απαλκυλιωμένη μορφή του εντομοκτόνου Chlorfenapyr, δηλαδή τον πιο τοξικό μεταβολίτη Tralopyril, που διαταράσσει την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Ο διαχωρισμός και η ποσοτικοποίηση του εντομοκτόνου και του μεταβολίτη του έγινε με την βοήθεια HPLC-ESI-MS/MS και έγιναν δοκιμές και με την πηγή Ortho-SSI.

3.2 Πειραματικό μέρος

3.2.1 Χημικά αντιδραστήρια και εξοπλισμός

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- Μεθανόλη, Chromasolv for HPLC, $\geq 99,9\%$, Sigma Aldrich Chemie
- Απιοντισμένο νερό (nanopure $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$)
- Οξικό αμμώνιο, $\geq 99,9\%$, Sigma Aldrich Chemie
- Chlorfenapyr, Fluka
- Tralopyril $\geq 96,5\%$, Fluka

Ο εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή των διαλυμάτων ήταν:

- Πιπέτες ακριβείας, Gilson 1000 μL και Eppendorf Research 100, 1000 μL
- Σύριγγα υγρής χρωματογραφίας Hamilton, 500 μL
- Αναλυτικός ζυγός με ακρίβεια 0,1 mg, Kern ABS
- Αναλυτικός ζυγός με ακρίβεια 0,01 g Kern S72

Ο εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό του εκλούμενου διαλύματος μετά την χρωματογραφία:

- Πλαστικό T-union
- Σφικτήρες από PEEK (Polyether ether ketone nuts)
- Σωλήνωση από PEEK με εσωτερική διάμετρο 0,127 mm και εξωτερική διάμετρο 1,58 mm (PEEK tubing-red) και μήκος 53,5 cm
- Σωλήνωση από PEEK με εσωτερική διάμετρο 0,254 mm και εξωτερική διάμετρο 1,58 mm (PEEK tubing-striped blue)

3.2.2 Παρασκευή διαλυμάτων

Τα πρότυπα διαλύματα παρασκευάστηκαν με διάλυση του στερεού Chlorfenapyr και Tralopyril σε μεθανόλη. Τα stock διαλύματα για κάθε αναλύτη είχαν την ίδια συγκέντρωση των 1000 ppm.

Τα διαλύματα που περιείχαν τους δύο αναλύτες και χρησιμοποιήθηκαν για τις καμπύλες βαθμονόμησης παρασκευάστηκαν με διαδοχικές αραιώσεις από τα stock διαλύματα. Η κινητή φάση και τα διαλύματα προς ανάλυση παρασκευάζονταν

καθημερινά πριν από κάθε πείραμα. Η κινητή φάση που ήταν 85% MeOH και 15% H₂O με 40 mM οξικού αμμωνίου.

3.2.3 Παρασκευή Δειγμάτων

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση του εντομοκτόνου και του μεταβολίτη του, προήλθαν από την κα Δήμητρα Τσακιρέλη ερευνήτρια στο Εργαστήριο Μοριακής Εντομολογίας, Τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Έγινε επώαση 0,25 μM ανασυνδυασμένων CYP (CYP9K1, CYP9J32, CYP6M2 και CYP6P3) και 2 μM *cytb5* σε 100 μL ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl. Αυτές οι αντιδράσεις 100 μL περιείχαν οργανικό διαλύτη με τελική συγκέντρωση 2% (v/v) με 20 μM Chlorfenapyr σε 200 mM Tris-HCl με pH 7,4 και συστατικά αναγέννησης NADPH (1 mM 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6P), 0,25 mM MgCl₂, 0,1 mM NADP⁺, και 1 U mL⁻¹ Αφυδρογονάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PDH)).

Οι αντιδράσεις επωάστηκαν για 0 και 2 ώρες στους 30 °C με τροχιακή ανακίνηση (orbital shaking) 1240 rpm και τερματίστηκαν με την προσθήκη 100 μL ακετονιτριλίου.

Τα δείγματα στην συνέχεια επωάστηκαν με ανακίνηση για επιπλέον 30 min, πριν από τη φυγοκέντρωση στα 14000 g για 5 min. Το υπερκείμενο υγρό μεταφέρθηκε σε φιαλίδια LC-MS και η ανάλυση έγινε εντός 24 ωρών. Οι αντιδράσεις αυτές συγκρίθηκαν με ένα negative control που δεν περιείχε NADPH για τον υπολογισμό της ελάττωσης του υποστρώματος (Chlorfenapyr).

3.2.4 Υγρή Χρωματογραφία – Φασματομετρία Μάζας (LC-MS)

Το σύστημα της υγρής χρωματογραφίας HPLC αποτελείται από αντλία για την παροχή της κινητής φάσης σε σταθερή ροή (Thermo Finnigan Surveyor[®] MS Pump) και από ένα εισαγωγέα δείγματος με 6 εναλλάξιμους βρόγχους που ήταν συνδεδεμένος στο φασματόμετρο μάζας, με βρόγχο χωρητικότητας δείγματος 10 μL. Οι αναλύτες διαχωρίστηκαν σε μία στήλη αντίστροφης φάσης UniverSilHS C18 column (250 mm × 4.5 mm i.d, 5 μm, Fortis Tech.). Η κινητή φάση που παρασκευάστηκε ήταν (A) 85% μεθανόλη και (B) 15% νερό με 40 mM οξικό αμμώνιο. Η έκλυση των εντομοκτόνων έγινε ισοκρατικά και η ροή που χρησιμοποιήθηκε ήταν 800 μL min⁻¹. Το εκλουόμενο διάλυμα από την στήλη της χρωματογραφίας

διαμερίστηκε (splitting) ώστε μόνο το 30% να εισέρχεται στον ανιχνευτή του φασματομέτρου μάζας, δηλαδή περίπου τα 240 $\mu\text{L min}^{-1}$ ενώ το υπόλοιπο 70% να εξέρχεται στα απόβλητα. Για την επίτευξη του διαμερισμού μετά την στήλη χρειάστηκε ένα πλαστικό T-union και τρεις σωλήνες από PEEK. Ο ένας σωλήνας ήταν αυτός που έφερε το εκλουόμενο διάλυμα στο T-union, ο δεύτερος σωλήνας μετέφερε το διάλυμα στην πηγή ιοντισμού του φασματομέτρου μάζας, ενώ στην τρίτη κάθετη θέση του T-union βρισκόταν ένας σωλήνας από PEEK με υποδιπλάσια εσωτερική διάμετρο ώστε η πίεση που δημιουργείται σε αυτόν να στέλνει το διάλυμα προς την πηγή και να μην εξέρχεται όλο στα απόβλητα. Οι ουσίες αυτές κατακρατούνται ισχυρά από τη στήλη. Η παρουσία της μεθανόλης σε μεγάλο ποσοστό είναι απαραίτητη καθώς τα εντομοκτόνα αυτά παρουσιάζουν υψηλή διαλυτότητα σε οργανικούς διαλύτες, η οποία είναι υπεύθυνη για την έκλουση τους από τη στήλη.

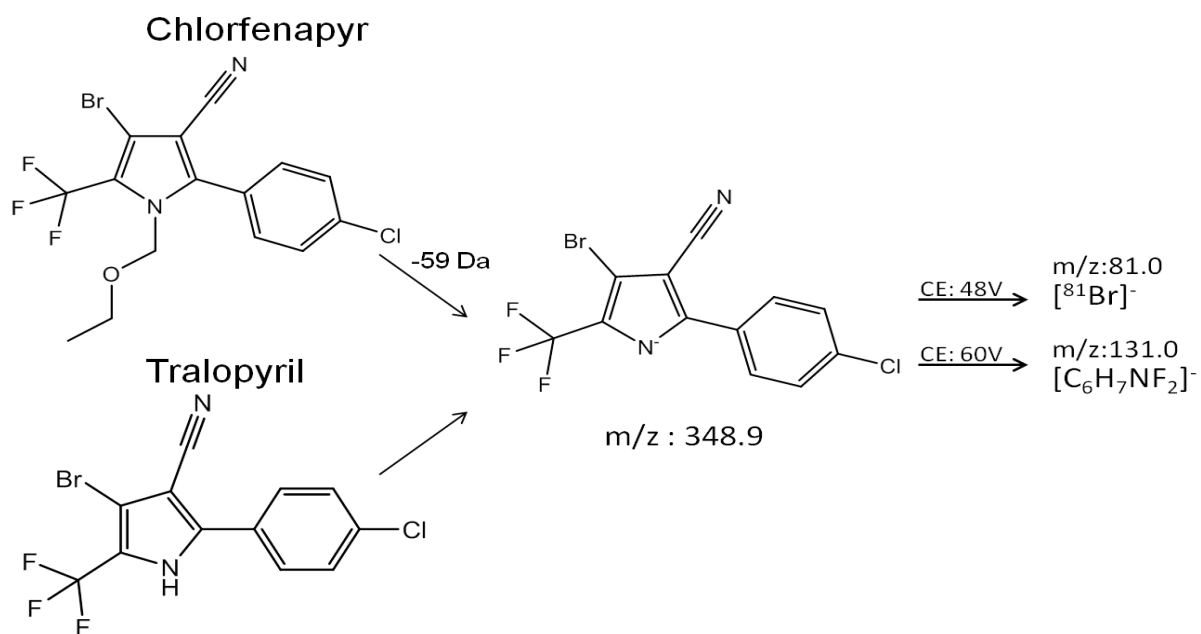
Η ανάλυση του chlorfenapyr και του tralopyril έγινε με φασματομέτρο μάζας τριπλού τετραπόλου (TSQ Quantum, Thermo Scientific, San Jose, CA) εξοπλισμένο με μια πηγή ιοντισμού ηλεκτροψεκασμού (ESI). Η ανίχνευση με ESI-MS/MS έγινε σε αρνητικό ιοντισμό και οι συνθήκες του ιοντισμού και της φασματομετρίας βελτιστοποιήθηκαν συγκεκριμένα για κάθε ένωση που μελετήθηκε. Οι συνθήκες ήταν οι εξής:

Πίνακας 3.2.4- 1. Παράμετροι συστήματος φασματομετρίας μάζας για το σύστημα HPLC-ESI-MS/MS.

Παράμετροι	Τιμές
Spray Voltage	3,5 kV
Capillary Temperature	320 °C
Sheath Gas pressure	30 arb units
Aux Gas pressure	15 arb units

Οι αναλύτες ανιχνεύτηκαν με τη μέθοδο της παρακολούθησης επιλεγμένης αντίδρασης (SRM). Οι μεταβάσεις επιλεγμένης αντίδρασης SRM ήταν ίδιες για το Chlorfenapyr και Tralopyril (**Εικόνα 3.2.4- 1**). Όλες οι παράμετροι των μεταβάσεων βελτιστοποιήθηκαν προκειμένου να επιτευχθεί η υψηλότερη ευαισθησία και υπάρχουν στον **Πίνακα 3.2.4- 2**. Το Chlorfenapyr ανιχνεύθηκε με αρνητικό ιοντισμό και όχι πρωτονιωμένο σαν μοριακό ιόν, λόγω της απώλειας της N-

αιθοξυμεθυλομάδας κατά την εισαγωγή του στην πηγή ESI. Η ίδια μετάβαση έχει χρησιμοποιηθεί και στην βιβλιογραφία για την ανίχνευση του Chlorfenapyr.^{53,54} Η ποσοτικοποίηση έγινε μετά τον διαχωρισμό του Chlorfenapyr και του Tralopyril με υψηλή χρωματογραφία HPLC.



Εικόνα 3.2.4- 1. Οι μεταβάσεις επιλεγμένης αντίδρασης SRM για τα Chlorfenapyr και Tralopyril. Το Chlorfenapyr χάνει την N-αιθοξυμεθυλομάδα (-59Da) κατά την εισαγωγή του στην πηγή ESI και ανιχνεύεται με αρνητικό ιοντισμό.

Πίνακας 3.2.4- 2. Βέλτιστες συνθήκες για την ανάλυση με HPLC-ESI-MS/MS.

Αναλύτης	(m/z) πρόδρομου ιόντος	(m/z) θυγατρικού ιόντος	Ενέργεια διάσπασης SRM (eV)	Δυναμικό οπτικών εστίασης (V)	Χρόνος κατακράτησης (min)
Chlorfenapyr	348,9	81	48	106	11,57
		131	60		
Tralopyril	348,9	81	48	106	8,10
		131	60		

Στη συνέχεια, για την ανίχνευση και το διαχωρισμό των αναλυτών με το σύστημα HPLC-Ortho-SSI-MS/MS αποσυνδέθηκε η πηγή ESI και τοποθετήθηκε στη θέση της το σύστημα του ορθογώνιου υπερηχητικού ιοντισμού χρησιμοποιώντας τον εκνεφωτή που είχε κατασκευαστεί στο εργαστήριο. Χρησιμοποιήθηκε το ίδιο όργανο για την

ανάλυση και η ίδια στήλη για τον διαχωρισμό αλλά, δεν χρειάστηκε να γίνει διαμερισμός (splitting) του εκλούμενου διαλύματος καθώς χρησιμοποιήθηκε η ορθογώνια πηγή ιοντισμού. Οι παράμετροι για την ανίχνευση με τη μέθοδο επιλεγμένης αντίδρασης ήταν αυτές που χρησιμοποιήθηκαν στο προηγούμενο σύστημα και υπάρχουν στον **Πίνακας 3.2.4- 2**. Το αέριο εκνέφωσης που χρησιμοποιήθηκε προήλθε από κύλινδρο πεπιεσμένου αερίου αζώτου (99,99% καθαρότητα) και η πίεση που για την εκνέφωση ήταν τα 7 bar. Οι παράμετροι για τον ιοντισμό και την φασματομετρία μάζας ήταν οι εξής:

Πίνακας 3.2.4- 3. Παράμετροι συστήματος φασματομετρίας μάζας για το σύστημα HPLC-Ortho-SSI-MS/MS.

Παράμετροι	Τιμές
Spray Voltage	0 kV
Capillary Temperature	350° C
Sheath Gas pressure	0 arb
Aux Gas pressure	0 arb

3.3 Αποτελέσματα και Συζήτηση

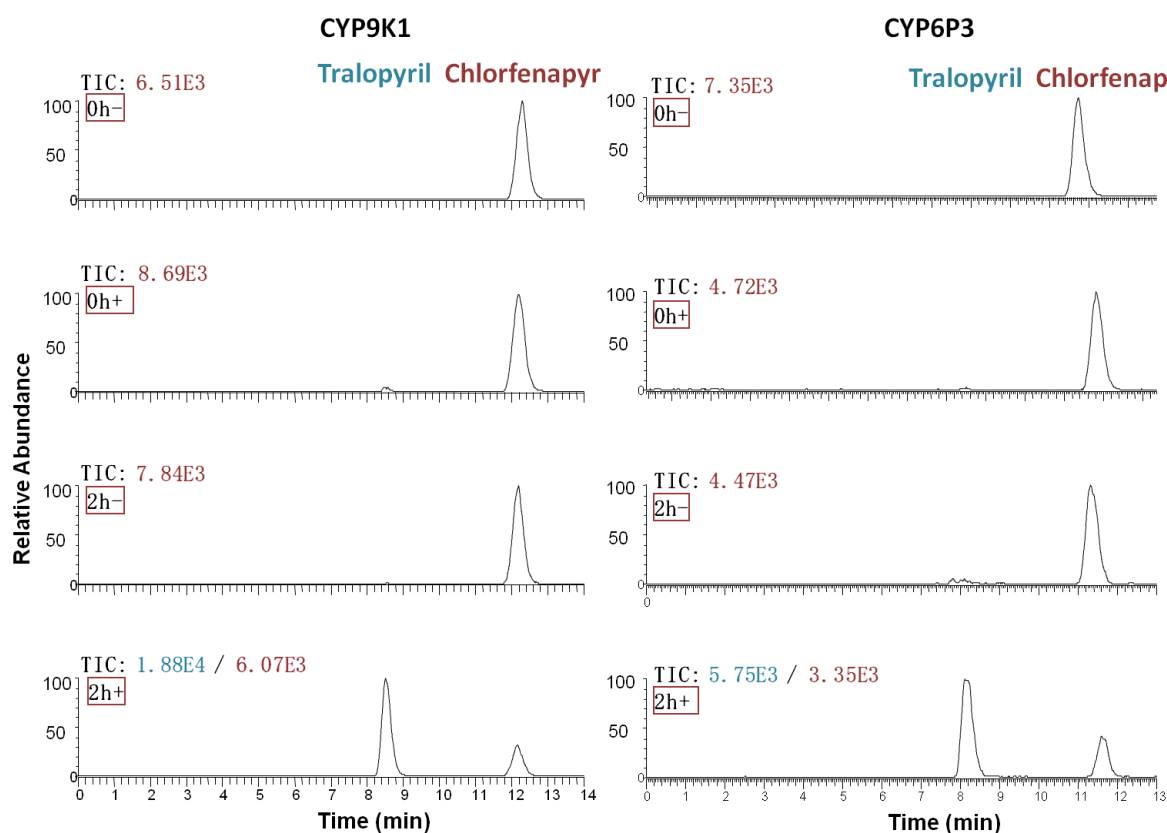
3.3.1 Ανίχνευση και διαχωρισμός του Chlorfenapyr και του μεταβολίτη του από τέσσερα διαφορετικά ένζυμα με το σύστημα HPLC-ESI-MS.

Στην παρούσα ενότητα εμφανίζονται 16 διαφορετικά χρωματογραφήματα που προήλθαν από το μεταβολισμό του Chlorfenapyr από τέσσερα διαφορετικά ένζυμα του κυτοχρώματος P450. Αυτά ήταν τα CYP9K1, CYP6P3, CYP6M2 από το κουνούπι *Anopheles gambiae* και τέλος το CYP9J32 από το *Aedes aegypti*. Για κάθε ένζυμο έγιναν 4 αντιδράσεις και έτσι προέκυψαν 4 δείγματα.

Τα δύο δείγματα προήλθαν από αντιδράσεις στις οποίες προστέθηκε NADPH, καθώς είναι ο κύριος δότης ηλεκτρονίων της ενζυμικής αντίδρασης. Η αντίδραση σε ένα από αυτά τερματίστηκε στις 0 hr για να επιβεβαιωθεί ότι δεν υπάρχει ο μεταβολίτης στο δείγμα πριν την αντίδραση (ονομασία δείγματος: 0 h+) και στις 2 hr στο δεύτερο ώστε να παρατηρηθεί αν το ένζυμο είναι ικανό να μεταβολίσει το εντομοκτόνο στο χρόνο αυτό (ονομασία δείγματος: 2 h+). Επιπροσθέτως, οι αντιδράσεις αυτές συγκρίθηκαν και με δύο αρνητικά control που δεν περιείχαν NADPH ώστε να επιβεβαιωθεί ότι χωρίς την παρουσία του, το ένζυμο δεν θα είναι

ικανό να παράγει τον πιο τοξικό μεταβολίτη. Οι αντιδράσεις αυτές επίσης τερματίστηκαν στις 0 και 2 ώρες, οπότε τα υπόλοιπα δείγματα ονομάστηκαν 0 h- και 2 h-.

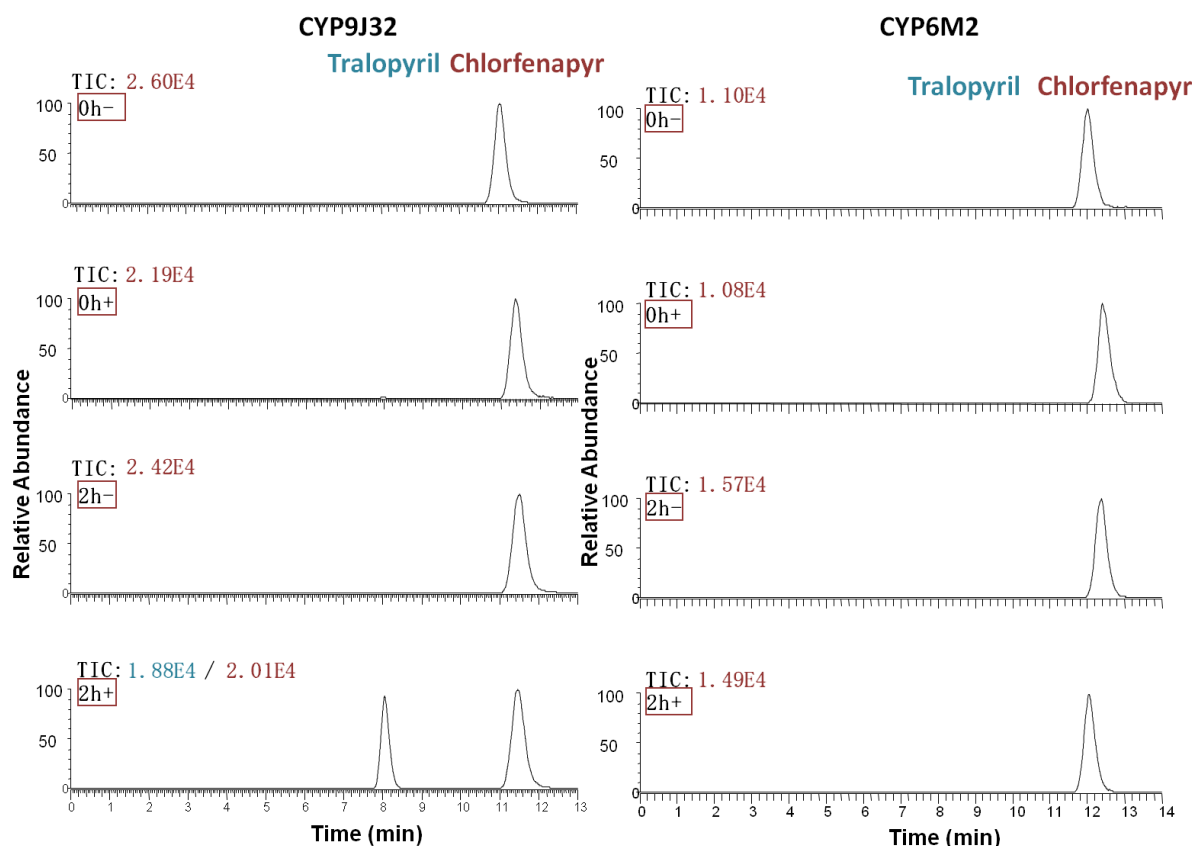
Στην **Εικόνα 3.3.1- 1** υπάρχουν τα χρωματογραφήματα που προήλθαν από τα δύο ένζυμα CYP9K1 και CYP6P3. Είναι φανερό ότι ο πιο τοξικός μεταβολίτης σχηματίζεται με την βοήθεια του NADPH μετά από 2 ώρες τις αντίδρασης, ενώ όπως ήταν αναμενόμενο το Tralopyril δεν ανιχνεύεται στα αρνητικά Control αλλά ούτε στο δείγμα που περιέχει NADPH και η αντίδραση τερματίστηκε αμέσως.



Εικόνα 3.3.1- 1. Αριστερά: Χρωματογραφήματα που προήλθαν από 4 αντιδράσεις με το ένζυμο CYP9K1. Δεξιά: Χρωματογραφήματα που προήλθαν από 4 αντιδράσεις με το ένζυμο CYP6P3.

Στην **Εικόνα 3.3.1- 2** υπάρχουν τα χρωματογραφήματα που προήλθαν από τα δύο ένζυμα CYP9J32 και CYP6M2. Για το ένζυμο CYP9J32 είναι φανερό ότι ο πιο τοξικός μεταβολίτης σχηματίζεται με τη βοήθεια του NADPH μετά από 2 ώρες τις αντίδρασης, ενώ όπως ήταν αναμενόμενο το Tralopyril δεν ανιχνεύεται στα αρνητικά Control αλλά ούτε στο δείγμα που περιέχει NADPH και που η αντίδραση τερματίστηκε αμέσως μετά την προσθήκη του. Αντίθετα το ένζυμο CYP6M2 δεν είναι

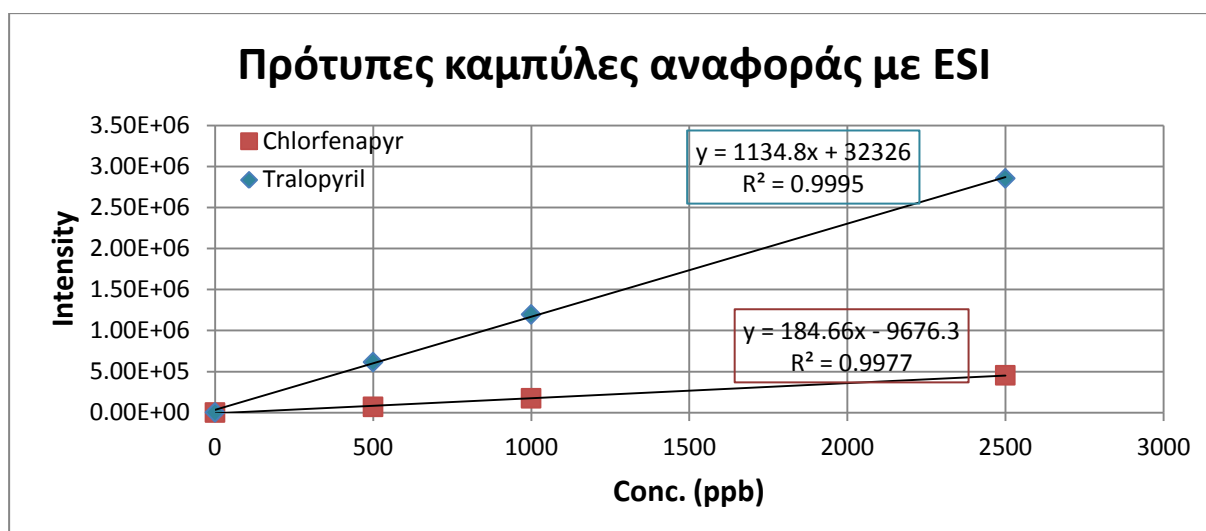
ικανό να μεταβολίσει το εντομοκτόνο Chlorfenapyr στον πιο τοξικό μεταβολίτη του, καθώς αυτός, όπως φαίνεται δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα χρωματογράφημα.



Εικόνα 3.3.1- 2. Αριστερά: Χρωματογραφήματα που προήλθαν από 4 αντιδράσεις με το ένζυμο CYP9J32. Δεξιά: Χρωματογραφήματα που προήλθαν από 4 αντιδράσεις με το ένζυμο CYP6M2.

3.3.2 Καμπύλες Βαθμονόμησης

Για να δημιουργηθούν οι πρότυπες καμπύλες αναφοράς με την πηγή ESI, τα πρότυπα διαλύματα που αναλύθηκαν, περιείχαν το Chlorfenapyr και το Tralopyril σε συγκεντρώσεις 0 (blank), 500, 1000 και 2500 ppb σε 85% MeOH και 15% H₂O με 40 mM οξικού αμμωνίου. Στη συνέχεια, έγινε έγχυση κάθε προτύπου διαλύματος επί τρεις φορές ώστε να υπολογιστεί ο μέσος όρος του ολοκληρώματος της κορυφής του αναλύτη, της τυπικής απόκλισης και της σχετικής τυπικής απόκλισης επί τοις εκατό. Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζεται η πρότυπη καμπύλη αναφοράς των δύο αναλυτών που προήλθαν από το σύστημα HPLC-ESI-MS/MS και παρατίθεται ο **Πίνακας 3.3.2- 1** με τα απαιτούμενα δεδομένα για την κατασκευή της.

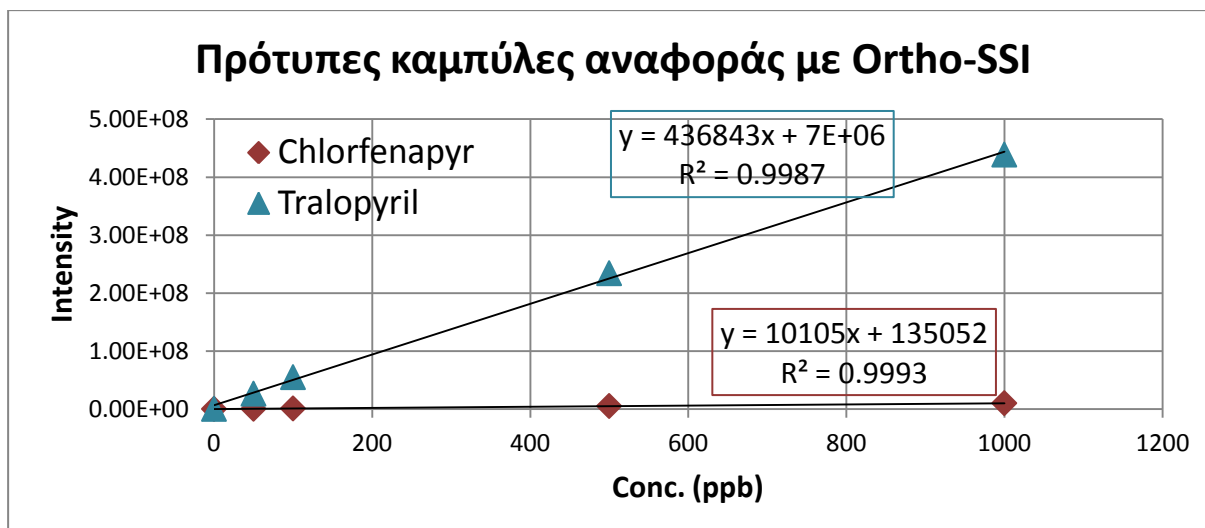


Εικόνα 3.3.2- 1. Πρότυπες καμπύλες αναφοράς για το Chlorfenapyr και το Tralopyril. Με μπλε παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για το Tralopyril ενώ με κόκκινο χρώμα για το Chlorfenapyr.

Πίνακας 3.3.2- 1. Στατιστικά δεδομένα που προέκυψαν από την ολοκλήρωση των κορυφών για το Chlorfenapyr και το Tralopyril με το σύστημα HPLC-ESI-MS/MS.

Conc. (ppb)	Chlorfenapyr			Tralopyril		
	Μέσος όρος ολοκληρώματος	Τυπική απόκλιση	Σχετική τυπική απόκλιση %	Μέσος όρος ολοκληρώματος	Τυπική απόκλιση	Σχετική τυπική απόκλιση %
0	850,89	256,71	30,2	2261,82	300,51	13,3
500	70028,19	4879,05	6,97	615434,71	10233,45	1,66
1000	174264,80	2537,06	1,46	1196308,93	20505,01	1,71
2500	454772,69	34176,77	7,52	2854547,55	42161,05	1,48

Η διαδικασία της κατασκευής των πρότυπων καμπύλων αναφοράς με την **Ορθογώνια πηγή ιοντισμού υπερηχητικής εκνέφωσης (Ortho-SSI)** ήταν η ίδια που ακολουθήθηκε και προηγουμένως, χωρίς τη χρήση του διαμερισμού του εκλουόμενου διαλύματος. Τα πρότυπα διαλύματα που αναλύθηκαν, περιείχαν το Chlorfenapyr και το Tralopyril σε συγκεντρώσεις 0 (blank), 50, 100, 500, 1000 ppb σε 85% MeOH και 15% H₂O με 40 mM οξικού αμμωνίου. Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζεται η πρότυπη καμπύλη αναφοράς των δύο αναλυτών που προήλθαν από το σύστημα HPLC-Ortho-SSI-MS/MS και παρατίθεται ο **Πίνακας 3.3.2- 2** με τα απαιτούμενα δεδομένα για την κατασκευή της.



Εικόνα 3.3.2- 2. Πρότυπες καμπύλες αναφοράς για το Chlorfenapyr και το Tralopyril. Με μπλε παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για το Tralopyril ενώ με κόκκινο χρώμα για το Chlorfenapyr.

Πίνακας 3.3.2- 2. Στατιστικά δεδομένα που προέκυψαν από την ολοκλήρωση των κορυφών για το Chlorfenapyr και το Tralopyril με το σύστημα HPLC-Ortho-SSI-MS/MS.

Conc. (ppb)	Chlorfenapyr			Tralopyril		
	Μέσος όρος ολοκληρώματος	Τυπική απόκλιση	Σχετική τυπική απόκλιση %	Μέσος όρος ολοκληρώματος	Τυπική απόκλιση	Σχετική τυπική απόκλιση %
0	239828,58	19970,10	8,33	382769,39	58348,38	15,2
50	536075,86	83083,06	15,5	26584107,44	1133403,91	4,26
100	1066623,17	102256,27	9,6	55093396,04	1101671,96	2,00
500	5318135,68	282990,86	5,3	234334541,81	4581837,47	1,96
1000	10187924,58	580966,45	5,7	438892599,15	5067998,06	1,15

Επαναληψιμότητα

Όλες οι καμπύλες αναφοράς που προκύπτουν για τα ανιόντα από τα παραπάνω διαγράμματα περιγράφονται από την γραμμική εξίσωση $y = a + bx$. Με την πηγή ESI ο συντελεστής προσδιορισμού (R^2) για το Chlorfenapyr είναι 0,9977 και για το Tralopyril είναι 0,9995. Με την πηγή Ortho-SSI ο συντελεστής προσδιορισμού (R^2) για το Chlorfenapyr είναι 0,9993 και για το Tralopyril είναι 0,9987. Παρατηρείται πως και με τις δύο πηγές οι μετρήσεις παρουσιάζουν αρκετά καλή γραμμική προσαρμογή, στο εύρος των συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή τους. Η επαναληψιμότητα των μεθόδων που παρουσιάζεται ως σχετική τυπική απόκλιση (RSD%) κυμαίνονταν από 1,46 έως 6,97 με την πηγή ESI και 1,15 έως 5,3 για την πηγή Ortho-SSI, για τις συγκεντρώσεις από 500-1000 ppb.

Ευαισθησία Μεθόδων

Ο δείκτης για τη σύγκριση της ευαισθησίας μεταξύ των δύο αυτών τεχνικών είναι η κλίση της πρότυπης καμπύλης για το Chlorfenapyr και για το Tralopyril καθώς υποδεικνύει την μεταβολή της έντασης του σήματος του αναλύτη προς τη μεταβολή της συγκέντρωσης του. Από τις γραμμικές εξισώσεις για τις καμπύλες αναφοράς του Tralopyril προκύπτει ότι η κλίση της ευθείας που αντιστοιχεί στη πηγή ESI είναι 1134,8 ενώ με την πηγή Ortho-SSI είναι 436843. Για το εντομοκτόνο Chlorfenapyr, η κλίση με τη πηγή ESI είναι 184,66 ενώ με τη πηγή Ortho-SSI είναι 10105. Επομένως, η πηγή Ortho-SSI που κατασκευάστηκε στο εργαστήριο προσφέρει μεγαλύτερη ευαισθησία για τη συγκεκριμένη ανάλυση καθώς δίνει πιο απότομες ευθείες με μεγαλύτερη κλίση.

Όρια Ανίχνευσης

Τα όρια ανίχνευσης προέκυψαν με την ανάλυση παλινδρόμησης που έγινε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Microsoft Excel και ορίστηκαν ως εξής:

$$LOD = \frac{3.3 \times SD_{intercept}}{slope}$$

$SD_{intercept}$: Τυπική απόκλιση του intercept που προέκυψε από την αντίστοιχη γραμμική εξίσωση κάθε αναλύτη.

Slope: Η κλίση που προέκυψε από την αντίστοιχη γραμμική εξίσωση κάθε αναλύτη.

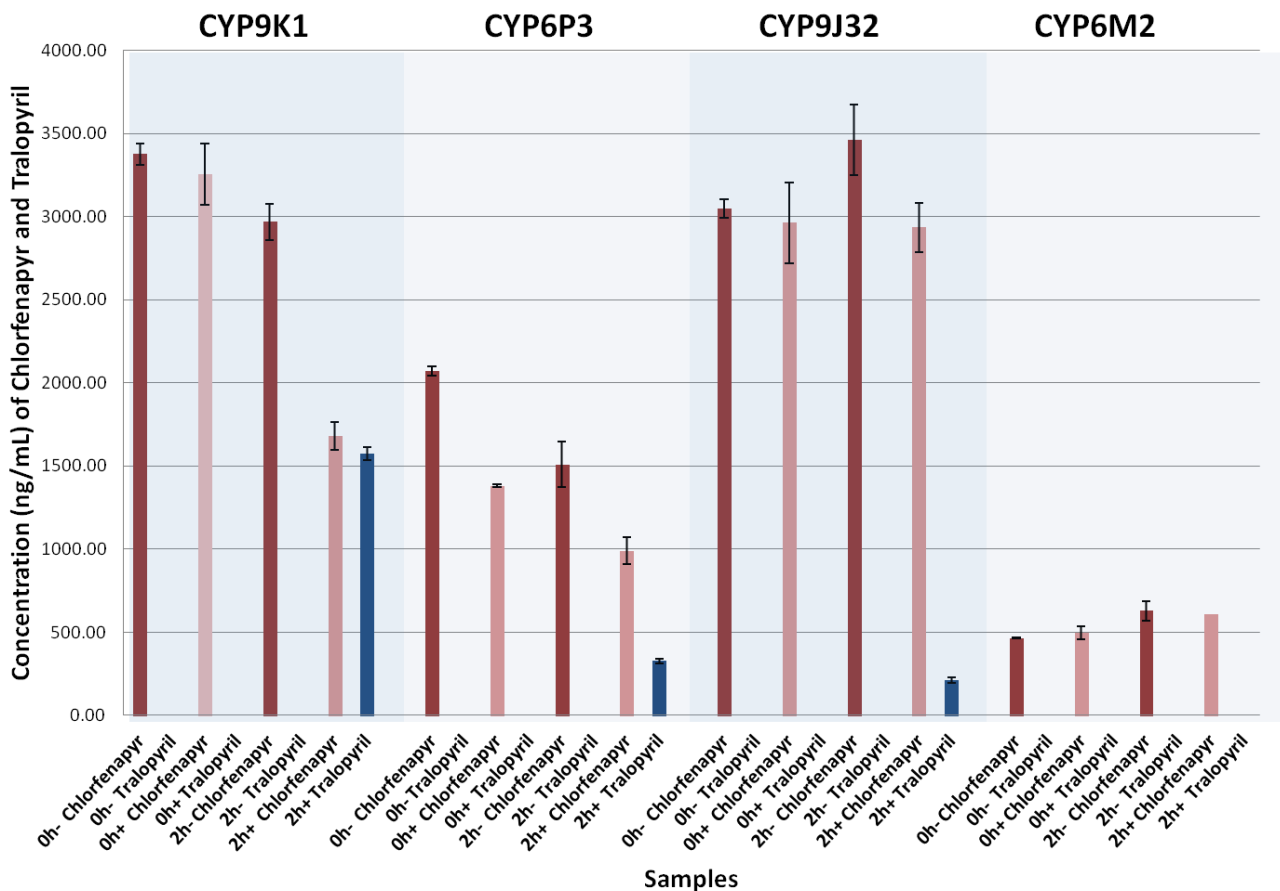
Τα όρια ανίχνευσης παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 3.3.2- 3. Όρια ανίχνευσης Chlorfenapyr και Tralopyril με την χρήση των πηγών ιοντισμού ESI και Ortho-SSI.

Αναλύτες	ESI LOD (ppb)	Ortho-SSI LOD (ppb)
Chlorfenapyr	308.7	54.7
Tralopyril	141.8	75.9

Όπως παρατηρείται, η ορθογώνια πηγή ιοντισμού υπερηχητικής εκνέφωσης προσφέρει χαμηλότερα όρια ανίχνευσης από την πηγή ESI που χρησιμοποιείται εδώ και πολλά χρόνια για τη σύζευξη της HPLC με ένα φασματόμετρο μάζας (MS).

3.3.3 Ποσοτικοποίηση του Chlorfenapyr και σύγκριση μεταβολισμού των ενζύμων.



Εικόνα 3.3.3- 1. Γράφημα στηλών όπου η κάθε μία υποδεικνύει την μέση τιμή της συγκέντρωσης του Chlorfenapyr και του Tralopyril των πειραματικών μετρήσεων των δειγμάτων και οι γραμμές σφάλματος προκύπτουν από το τυπικό σφάλμα κάθε προσδιοριζόμενης τιμής. Με κόκκινο χρωματίστηκαν οι στήλες με την συγκέντρωση του Chlorfenapyr για τα αρνητικά control που δεν περιέχουν NADPH. Με ροζ χρωματίστηκαν οι στήλες με την συγκέντρωση του Chlorfenapyr που προέκυψαν από αντιδράσεις με NADPH. Με μπλε χρωματίστηκαν οι στήλες με την συγκέντρωση του Tralopyril που προέκυψαν από αντιδράσεις με NADPH.

Η ποσοτικοποίηση των αναλυτών έγινε με την χρήση της καμπύλης αναφοράς που αναφέρεται στην προηγούμενη ενότητα με τη μέθοδο HPLC-ESI-MS/MS. Στο παραπάνω γράφημα παρατίθενται η συγκέντρωση του Chlorfenapyr και του μεταβολίτη του σε ng mL^{-1} για κάθε δείγμα που αναλύθηκε. Η μείωση του Chlorfenapyr με το ένζυμο CYP9K1 ήταν 43,3%, με το CYP6P3 ήταν 34,4%, με το CYP9J32 ήταν 15,2% ενώ για το CYP6M2 ήταν 0%. Φαίνεται πως το ένζυμο που μεταβολίζει καλύτερα το συγκεκριμένο εντομοκτόνο ήταν το CYP9K1 και τα υπόλοιπα ακολουθούν όπως φαίνεται στο παραπάνω διάγραμμα.

3.4 Συμπεράσματα

Στο συγκεκριμένο ερευνητικό πρόγραμμα αναπτύχθηκε και χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος HPLC-ESI-MS/MS για το διαχωρισμό και την ποσοτικοποίηση του εντομοκτόνου Chlorfenvinphos και του μεταβολίτη του για την αξιολόγηση της ενζυμικής αντίδρασης τεσσάρων πρωτεϊνών του κυτοχρώματος P450 στα είδη κουνουπιού *Anopheles gambiae* και *Aedes aegypti*. Με την ανάλυση αυτή προέκυψε ότι τρεις στις τέσσερις πρωτεΐνες είναι ικανές να μεταβολίσουν το εντομοκτόνο στον πιο τοξικό μεταβολίτη του. Το ένζυμο CYP9K1 είναι αυτό που παρουσίασε την μεγαλύτερη μείωση του υποστρώματος και στη συνέχεια έρχεται το CYP6P3 και το CYP9J32 ενώ τα δείγματα που δεν ανιχνεύθηκε ο μεταβολίτης, ανήκουν στο ένζυμο CYP6M2.

Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε και το σύστημα HPLC-Ortho-SSI-MS/MS με πρότυπα διαλύματα ώστε να αξιολογηθεί σε σύγκριση με την πηγή ESI. Η πηγή Ortho-SSI είχε σαφώς μεγαλύτερη ευαισθησία και για τους δύο αναλύτες αφού τα όρια ανίχνευσης που υπολογίστηκαν ήταν χαμηλότερα σε σχέση με αυτά που προέκυψαν χρησιμοποιώντας την πηγή του ηλεκτροψεκασμού. Η επαναληψιμότητα και η γραμμικότητα των δύο τεχνικών για τις ίδιες συγκεντρώσεις, βρέθηκαν συγκρίσιμες.

Το σύστημα HPLC-Ortho-SSI-MS/MS που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα έναντι του ηλεκτροψεκασμού σε αυτή τη μελέτη. Η πηγή Ortho-SSI απαιτεί μόνο την ομοαξονική ροή αερίου αζώτου, έναν εκνεφωτή και μία κυλινδρική ράβδο χωρίς να εφαρμοστεί κανένα δυναμικό, κάτι που την καθιστά πολύ απλή και εύκολη στη χρήση της. Σημαντικό είναι να αναφερθεί, ότι είναι δυνατή η ταυτόχρονη παραγωγή θετικών και αρνητικών ιόντων που η ανίχνευση τους χρειάζεται μόνο την αλλαγή της πολικότητας στο φασματόμετρο μάζας. Τέλος, δεν απαιτείται ο διαμερισμός του εκλουόμενου διαλύματος που ρέει με μεγάλες ταχύτητες πριν την πηγή ιοντισμού όπως είναι απαραίτητο στον ηλεκτροψεκασμό. Έτσι μια χρωματογραφική ανάλυση απαιτεί πολύ λιγότερο χρόνο καθώς δεν χρειάζεται η κατασκευή συστήματος διαμερισμού και επειδή μπορούν να χρησιμοποιηθούν μεγάλες ταχύτητες ροής χωρίς να μειώνεται η ευαισθησία του συστήματος.

Κεφάλαιο 4 | Απευθείας ανάλυση μεμβρανικών λιπιδίων σε κύτταρα μικροοργανισμών με τη μέθοδο φασματομετρίας μάζας εκρόφησης με ιοντισμό υπερηχητικής εκνέφωσης

4.1 Εισαγωγή

Η φασματομετρία μάζας (MS) αποτελεί μια από τις πιο σημαντικές τεχνολογίες για την ανάλυση λιπιδίων σε κύτταρα. Οι πιο συνηθισμένες τεχνικές που συνδυάζονται μαζί της για την ανίχνευση και την ποσοτική ανάλυση των λιπιδίων είναι η υγρή και η αέρια χρωματογραφία (LC-MS & GC-MS).⁵⁵⁻⁵⁸ Οι τεχνικές αυτές παρουσιάζουν μεγάλη ευαισθησία, επιλεκτικότητα και ακρίβεια στην ποσοτικοποίηση. Παρόλα αυτά, ένα βιολογικό σύστημα όπως είναι ένα κύτταρο είναι εξαιρετικά πολύπλοκο και απαιτείται εκχύλιση των λιπιδίων του, με χρονοβόρες διαδικασίες προετοιμασίας δείγματος, για την περαιτέρω ανάλυσή τους. Μέθοδοι που χρειάζονται λιγότερα στάδια προετοιμασίας δείγματος περιλαμβάνουν την ανάλυση μεμονωμένων κυττάρων μέσω φασματομετρίας μάζας με ιοντισμό εκρόφησης με λέιζερ υποβοηθούμενο από μήτρα (SC-MALDI-MS)⁵⁹ και ambient τεχνικές ιοντισμού όπως είναι ο ιοντισμός με εκρόφηση ηλεκτροψεκασμού (DESI-MS)^{60,61} και η φασματομετρία μάζας με ιοντισμό εκρόφησης υπερηχητικής εκνέφωσης (EASI-MS)⁶² η οποία χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία για τη σχετική ποσοτικοποίηση μεμβρανικών λιπιδίων από κύτταρα. Τα κύτταρα που μελετήθηκαν ήταν του είδους *Chlamydomonas reinhardtii*, ένα πρότυπο άλγος του γλυκού νερού που χρησιμοποιείται εκτεταμένα για πολλές βιοχημικές έρευνες.⁶³

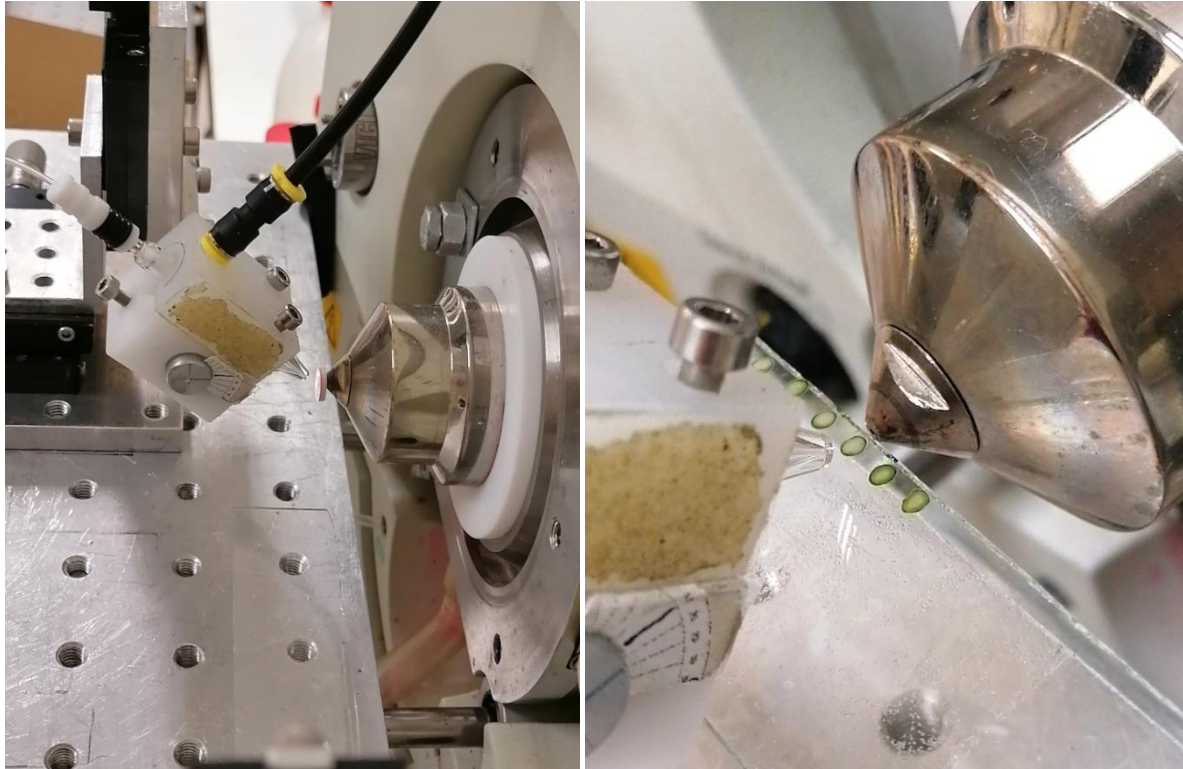
Ο σκοπός αυτής της μελέτης ήταν η ανάπτυξη και η βελτιστοποίηση της τεχνικής EASI-MS για την ταχεία ανάλυση αέριων κυττάρων που επωάστηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις σεληνίου, το οποίο ενώ είναι απαραίτητο για το μεταβολισμό τους, μπορεί να προκαλέσει τοξικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις.⁶⁴ Στην προσπάθεια αυτή χρησιμοποιήθηκαν δύο εκνεφωτές, ένας γυάλινος και ένας που κατασκευάστηκε στο εργαστήριο και έγινε η σύγκρισή τους με την τεχνική EASI-MS. Ο γυάλινος εκνεφωτής βρίσκει αποκλιστική εφαρμογή στις τεχνικές ICP-MS.

4.2 Πειραματικό μέρος

4.2.1 Εκρόφηση με ιοντισμό υπερηχητικής εκνέφωσης

Ο ένας από τους δύο εκνεφωτές που χρησιμοποιήθηκε είναι ο “Homebuilt” εκνεφωτής που κατασκευάστηκε στο εργαστήριο όπως περιγράφεται στην **Ενότητα 2.2.3**. Εκτός από αυτόν τον εκνεφωτή χρησιμοποιήθηκε και ένας γυάλινος εκνεφωτής της σειράς MicroMist U-Series με δυνατότητα εισαγωγής δείγματος ροής έως $0,6 \text{ ml min}^{-1}$ της εταιρίας Glass Expansion. Σε συνεργασία με την εταιρεία αυτή θέλαμε να αξιολογήσουμε τον εκνεφωτή για EASI-MS, ενώ η εταιρεία το διαθέτει αποκλειστικά για εφαρμογές ICP-MS. Είναι η πρώτη φορά που γίνεται η αξιολόγηση αυτού του εκνεφωτή στο εργαστήριο μας ή οπουδήποτε αλλού για εφαρμογές EASI-MS.

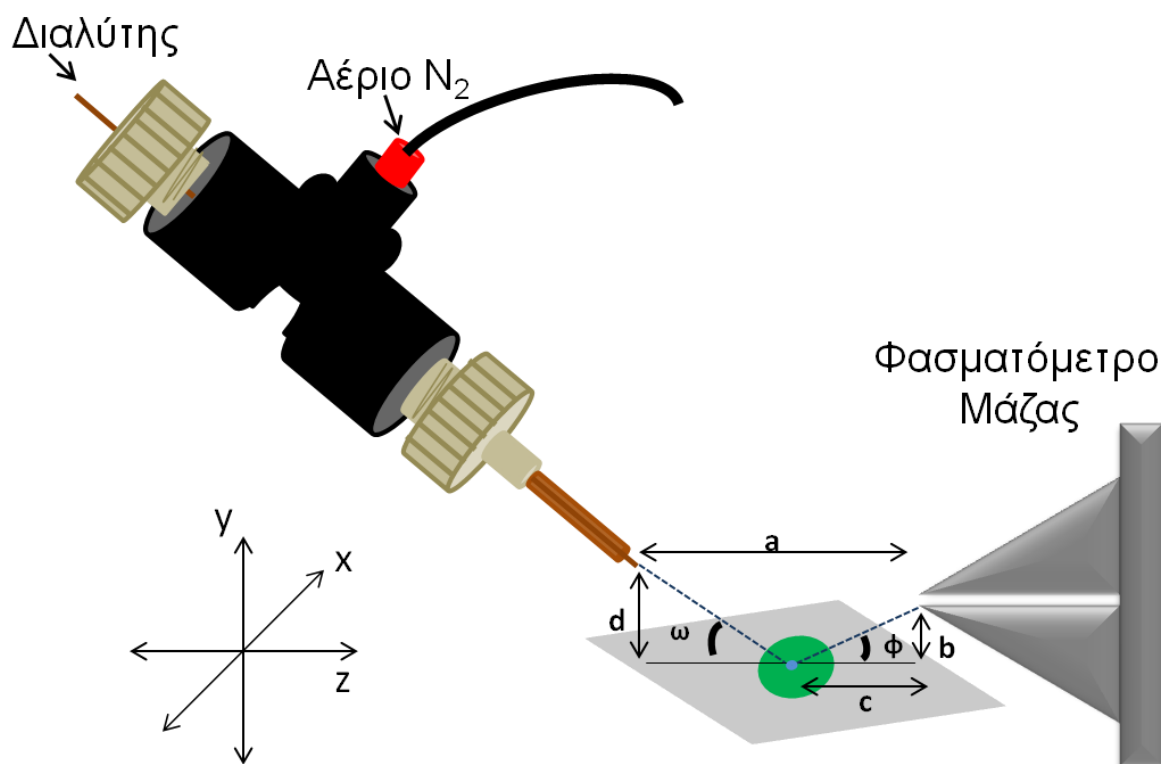
Ο κάθε εκνεφωτής στηρίχθηκε σε ειδικά σχεδιασμένη βάση με βαθμονομημένους κοχλίες που επέτρεπε την χειροκίνητη μεταβολή της θέσης σε τρία διαφορετικά επίπεδα x-y-z. Το αυξητικό ή μειωτικό βήμα σε κάθε επίπεδο ήταν $0,5 \text{ mm}$. Η βάση επίσης επέτρεπε και τη ρύθμιση της γωνίας του εκνεφωτή από τη βάση του δείγματος. Παράλληλα, υπήρχε μια δεύτερη βάση για το δείγμα που επέτρεπε την μεταβολή της κίνησης στο επίπεδο y (πάνω και κάτω) και x (δεξιά- αριστερά) από την είσοδο του φασματομέτρου μάζας. Η επιφάνεια που τοποθετήθηκε το κάθε δείγμα ήταν μία γυάλινη αντικειμενοφόρος πλάκα.



Εικόνα 4.2.1- 1. Φωτογραφίες της διάταξης EASI-MS του εργαστηρίου με το γυάλινο εκνεφωτή (Αριστερά). Ανάλυση κυτάρων *C. reinhardtii* (Δεξιά).

Είναι χρήσιμο να επισημανθεί ότι υπάρχουν αρκετές γεωμετρικές παράμετροι της συγκεκριμένης πηγής ιοντισμού που πρέπει να ληφθούν υπόψη για την αποτελεσματική εκρόφηση και μεταφορά του αναλύτη στο εσωτερικό του φασματομέτρου μάζας. Οι γεωμετρικές παράμετροι παρουσιάζονται στην **Εικόνα 4.2.1- 1** και είναι οι εξής:

- a:** Απόσταση του εκνεφωτή από την είσοδο του φασματομέτρου μάζας
- b:** Ύψος της επιφάνειας του δείγματος από το φασματομέτρο μάζας
- c:** Απόσταση του δείγματος από το φασματομέτρο μάζας
- d:** Ύψος εκνεφωτή από την επιφάνεια του δείγματος
- ω:** Γωνία που σχηματίζει ο εκνεφωτής με την επιφάνεια της βάσης του δείγματος
- φ:** Γωνία που σχηματίζει το φασματομέτρο μάζας με την επιφάνεια της βάσης του δείγματος



Εικόνα 4.2.1- 2. Σχηματική απεικόνιση του εκνεφωτή μπροστά από το φασματοόμετρο μάζας στην διάταξη ιοντισμού με εκρόφηση υπερηχητικής εκνέφωσης.

Οι τιμές των γεωμετρικών παραμέτρων που χρησιμοποιήθηκαν βρίσκονται στον **Πίνακας 4.2.1- 1** και προσδιορίστηκαν με παράλληλη χειροκίνητη μεταβολή της σχετικής θέσης και παρακολούθηση του φάσματος ώστε να λαμβάνεται η μέγιστη δυνατή ένταση του σήματος του αναλύτη.

Πίνακας 4.2.1- 1. Βέλτιστες γεωμετρικές παράμετροι για την πηγή EASI.

Γεωμετρική παράμετρος	Τιμή
a	7,5 – 6,5 mm
b	1 – 2 mm
c	5 – 6 mm
d	2 mm
ω	40°
φ	~ 9° – 11°

Ο τριχοειδής τηγμένης πυριτιάς του εκνεφωτή συνδέθηκε μέσω union με έναν σωλήνα PEEK (I.D. 0,254mm, O.D. 1,58mm) για την εισαγωγή του διαλύτη με την βοήθεια της αντλίας σύριγγας του οργάνου (LCQ Advantage) και ροή 3 – 5 $\mu\text{L min}^{-1}$.

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα με την τεχνική EASI-MS περιλαμβάνουν Ακετονιτρίλιο (CHROMASOLV® grade, > 99,9 %, Sigma Aldrich) και Διμεθυλοφορμαμίδιο, DMF (ACS reagent, \geq 99,8 %, Honeywell) σε αναλογία 1:1 v/v.

Όλες οι αναλύσεις των κυττάρων έγιναν με αυτό το μείγμα διαλυτών εκτός από την ανάλυση σε θετικό ιοντισμό των *Chlamydomonas reinhardtii* που επωάστηκαν με σεληνικό νάτριο (Na_2SeO_4) ή Se(VI). Για την συγκεκριμένη ανάλυση το μείγμα των διαλυτών που αναφέρθηκε περιείχε και 0,5% Φορμικό οξύ (ACS reagent, $\geq 88 - 91\%$, Sigma Aldrich Chemie) ώστε να ενισχυθεί το σήμα των θετικών ιόντων με πρωτονίωση.

Το αέριο εκνέφωσης που χρησιμοποιήθηκε με τον Homebuilt εκνεφωτή προήλθε από κύλινδρο πεπιεσμένου αερίου αζώτου (99,99 % καθαρότητα) και η πίεση που χρησιμοποιήθηκε ήταν 8 bar. Ο εκνεφωτής αυτός χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των δειγμάτων που ήταν επωασμένα με Se(IV). Παρατηρήθηκε από τις δοκιμές που έγιναν για τη βελτίωση του συστήματος, με τον εκνεφωτή που κατασκευάστηκε στο εργαστήριο, πως υψηλότερες τιμές πίεσης έδωσαν μεγαλύτερη ένταση στο σήμα. Συνεπώς, επιλέχθηκε η μεγαλύτερη πίεση που μπορούσε να επιτευχθεί από τον ρυθμιστή πίεσης που υπήρχε. Υπάρχουν και άλλες εργασίες στη βιβλιογραφία που έρχονται σε συμφωνία με την συγκεκριμένη παρατήρηση και έφθασαν σε τιμές πίεσης έως 10 bar.^{62,65,66}

Η πηγή αερίου εκνέφωσης για τον γυάλινο εκνεφωτή που χρησιμοποιήθηκε, ήταν γεννήτρια αζώτου (Peak Scientific). Ο εκνεφωτής αυτός χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των δειγμάτων που ήταν επωασμένα με Se(VI). Παρατηρήθηκε από τις δοκιμές που έγιναν στο εργαστήριο, πως οι πιέσεις από 5 έως 8 bar έδιναν περίπου την ίδια ένταση σήματος και για αυτό επιλέχθηκε η τιμή των 5 bar και η παροχή της από γεννήτρια αζώτου ώστε να μειωθεί το κόστος της ανάλυσης και να αυξηθεί η ευελιξία.

4.2.2 Φασματομετρία μάζας

Η ανάλυση των κυττάρων με την πηγή EASI έγινε με φασματόμετρο μάζας τετραπολικής ιοντικής παγίδας (LCQ Advantage, Thermo Finnigan). Το όργανο ήταν εξοπλισμένο με μία πηγή ιοντισμού ηλεκτροψεκασμού, η οποία απομακρύνθηκε και στην θέση της, μπροστά από την είσοδο του φασματόμετρου μάζας τοποθετήθηκε μια ειδικά σχεδιασμένη πλατφόρμα που έφερε την πηγή EASI, η οποία κατασκευάστηκε στο εργαστήριο μας πρώτη φορά κατά την εκπόνηση της μεταπτυχιακής διατριβής του φοιτητή Λεωνίδα Μαυρουδάκη.⁶⁷

Για τη βαθμονόμηση της μάζας του οργάνου κάθε φορά που κρινόταν απαραίτητο, γινόταν έγχυση διαλύματος τριφθοροξικού νατρίου (STFA) το οποίο χρησιμοποιείται στην φασματομετρία μάζας για τη ρύθμιση και βαθμονόμηση των οργάνων.²⁷ Για την ρύθμιση του οργάνου για κάθε αναλύτη δεν ήταν εύκολο να χρησιμοποιηθεί η πηγή EASI, έτσι η ρύθμιση των παραμέτρων γινόταν με την πηγή ιοντισμού ηλεκτροψεκασμού και χρησιμοποιώντας m/z ιόντων τριφθοροξικού νατρίου που είχαν παρόμοιο m/z με τον αναλύτη. Οι παράμετροι αυτοί ήταν το δυναμικό του μεταλλικού τριχοειδή (Capillary Voltage) και το δυναμικό οπτικών εστίασης, όπου για τον αρνητικό ιοντισμό οι τιμές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν -34 V και -20 V, αντίστοιχα. Για το θετικό ιοντισμό η τιμή ήταν 20 V και για τις δύο αυτές παραμέτρους. Η θερμοκρασία του τριχοειδή μεταφοράς ιόντων ορίστηκε στους 300 °C ώστε να γίνεται αποτελεσματικά η αποδιάλυση των σταγονιδίων που εισέρχονται στον τριχοειδή. Οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν για την πηγή ESI ήταν για το Spray Voltage: 4,5 kV, Sheath Gas flow rate: 45 arb units, auxiliary gas flow rate: 5 arb units. Το δυναμικό του μεταλλικού τριχοειδή και των οπτικών εστίασης ήταν το ίδιο με αυτό που χρησιμοποιήθηκε στην πηγή EASI.

Η καταγραφή και η επεξεργασία των φασμάτων μάζας έγινε με την χρήση του λογισμικού Xcalibur 2.0.7 (Thermo Fisher Scientific).

4.2.3 Κυτταρικές καλλιέργειες

Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση με την τεχνική EASI-MS ήταν τα πράσινα μικροφύκη *Chlamydomonas reinhardtii* του στελέχους 1690 (wild type) και τα δείγματα προήλθαν από τον Δρ. Νικόλαο Λυδάκη, καθηγητή στο Τμήμα Γεωπονίας του Ελληνικού Μεσογειακού Πανεπιστημίου.

Αναπτύχθηκαν δύο ομάδες καλλιεργειών κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* του στελέχους 1690. Οι κυτταρικές αποικίες μεταφέρθηκαν από πλάκες με άγαρ σε 3 λίτρα θρεπτικού διαλύματος (TAP medium) το οποίο περιείχε Tris-base ($\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$), φωσφορικά ανιόντα (PO_4^{3-}) και οξικά ανιόντα, το CH_3COOH_3 λειτουργεί ως πηγή οργανικού άνθρακα, σε pH 7 - 7,2 υπό συνεχή ακτινοβολία ορατού φωτός και ανάδευση σε θερμοκρασία 25 °C μέσα σε θάλαμο σταθερής κατάστασης. Η πρώτη ομάδα αναπτύχθηκε με παρουσία σεληνιώδους νατρίου (Na_2SeO_3) ή Se(IV) σε συγκεντρώσεις 20, 50, 100 150 μM ενώ η δεύτερη ομάδα με παρουσία σεληνικού νατρίου (Na_2SeO_4) ή Se(VI) σε συγκεντρώσεις 20, 50, 100 150

μM. Επιπλέον, αναπτύχθηκαν και καλλιέργειες κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* χωρίς την παρουσία σεληνίου ώστε να χρησιμοποιηθούν σαν control. Δείγματα κυττάρων με και χωρίς την παρουσία του σεληνίου χρησιμοποιήθηκαν για την εξακρίβωση της ανάπτυξης των κυττάρων, δηλαδή το αν γίνεται ομαλά ο πολλαπλασιασμός τους ή αν επηρεάζεται από την παρουσία του σεληνίου. Αυτό έγινε με την φασματοφωτομετρική παρακολούθηση της κάθε καλλιέργειας, κάθε δώδεκα ώρες, με την καταγραφή της οπτικής πυκνότητας δηλαδή της τιμής της απορρόφησης στα 750 nm. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν στις 96 h, 132 h και 192 h μετά τον εμβολιασμό τους με άλατα σεληνίου, πλύθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (15 mM NaCl, 4 mM MgCl₂·6H₂O, 20 mM Trizma base, pH 7,0) και διατηρήθηκαν σε διάλυμα σακχαρόζης υψηλής πυκνότητας (0,8 M sucrose, 50 mM Trizma base, pH 7,0) στους -80 °C μέχρι τη χρήση τους.

4.2.4 Προετοιμασία δειγμάτων

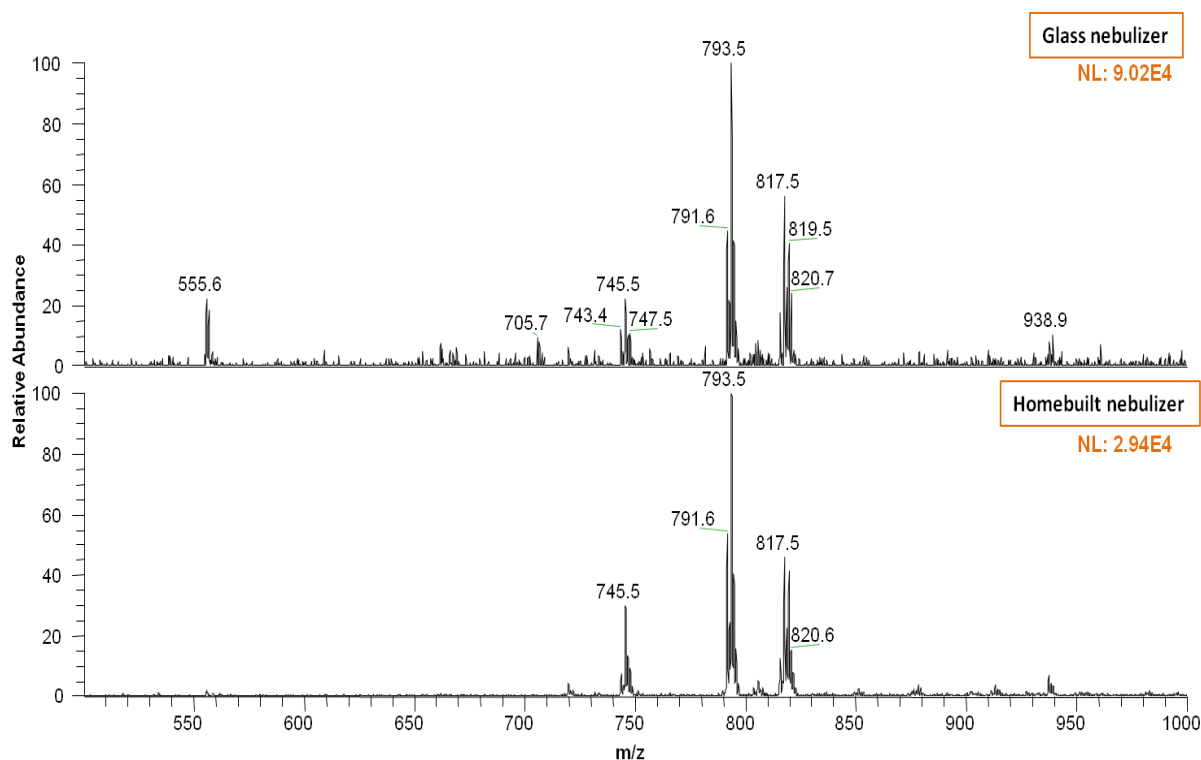
Για τις κυτταρικές καλλιέργειες που επώαστηκαν με την προσθήκη Se(IV) και Se(VI), μια μικρή ποσότητα (40 - 50 μL και 15 - 200 μL αντίστοιχα, ώστε να υπάρχουν στο τελικό δείγμα 3- 4E6 κύτταρα/ μL) πλύθηκε τρεις φορές με απιοντισμένο νερό για την απομάκρυνση των συστατικών του θρεπτικού διαλύματος της καλλιέργειας και του διαλύματος σακχαρόζης υψηλής πυκνότητας που χρησιμοποιήθηκε για την αποθήκευσή τους, ώστε να αποφευχθεί η καταστολή του ιοντισμού η οποία προκαλείται από άλατα στα μέσα της καλλιέργειας. Το πλύσιμο έγινε με φυγοκέντριση των κυττάρων στις 14500 rpm για 6 min, επαναιώρησή τους μέσα σε 1 mL απιοντισμένου νερού με αναδευτήρα περιδίνησης (vortex) για τουλάχιστον 40 sec. Μετά το τελευταίο πλύσιμο το ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε σε 10 - 20 μL απιοντισμένου νερού και 1 μL από αυτό τοποθετήθηκε πάνω σε γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα για να στεγνώσει κάτω από συνθήκες περιβάλλοντος για περίπου 25 min πριν την ανάλυση με την τεχνική EASI-MS.

4.3 Αποτελέσματα και Συζήτηση

4.3.1 Σύγκριση εκνεφωτών στο σύστημα EASI

Στην πηγή εκρόφησης με ιοντισμό υπερηχητικής εκνέφωσης δοκιμάστηκαν δύο εκνεφωτές για να μελετηθεί η ευαισθησία που θα προσφέρουν στο σύστημα. Αναλύθηκαν control δείγματα κυττάρων *Synechocystis* sp PCC 6803 που

προετοιμάστηκαν όπως περιγράφεται στην **Ενότητα 4.2.4**. Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε για την εκρόφηση των μεμβρανικών τους λιπιδίων ήταν ACN:DMF 1:1 v/v και η ροή ήταν $5 \mu\text{L min}^{-1}$ και η πίεση του αερίου εκνέφωσης ήταν 5 bar για τον γυάλινο εκνεφωτή και 8 bar για τον εκνεφωτή που κατασκευάστηκε στο εργαστήριο. Τα φάσματα μάζας λήφθηκαν σε λειτουργία αρνητικού ιοντισμού και για τους δύο εκνεφωτές.



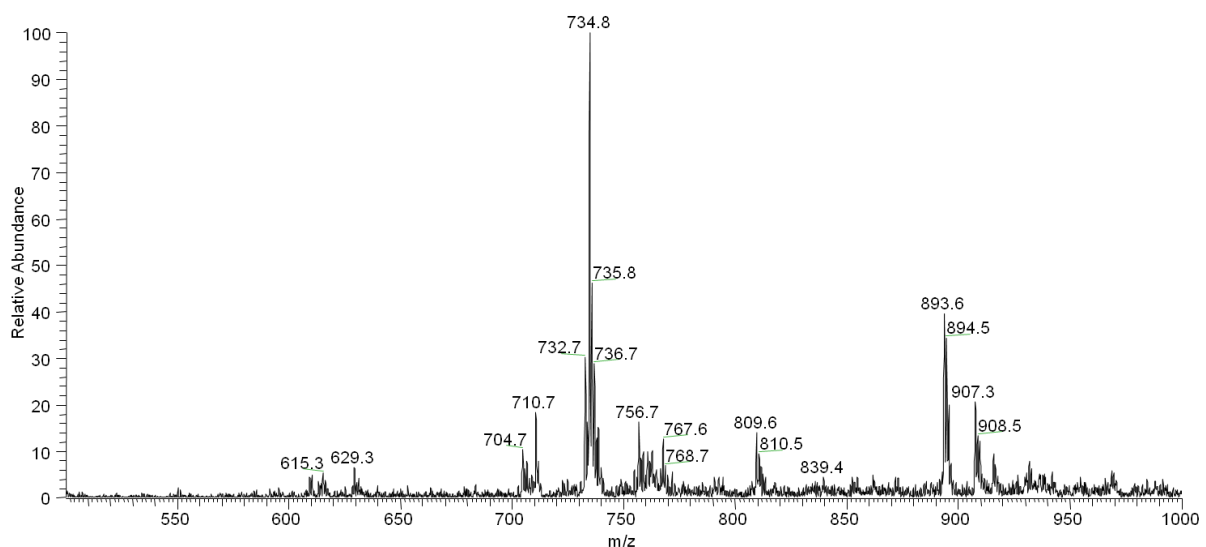
Εικόνα 4.3.1- 1. Φάσματα μάζας σε αρνητικό ιοντισμό με την τεχνική EASI-MS για την σύγκριση του γυάλινου και του Homebuilt εκνεφωτή.

Όπως φαίνεται με την χρήση του γυάλινου εκνεφωτή λαμβάνεται μεγαλύτερη ένταση στο σήμα των αναλυτών, σε μικρότερη πίεση εκνέφωσης από ότι συμβαίνει με τον Homebuilt εκνεφωτή στον οποίο έχει παρατηρηθεί πως το σήμα αυξάνεται σε αυξημένες πιέσεις αερίου εκνέφωσης.

4.3.2 Το προφίλ των λιπιδίων με το σύστημα EASI-MS

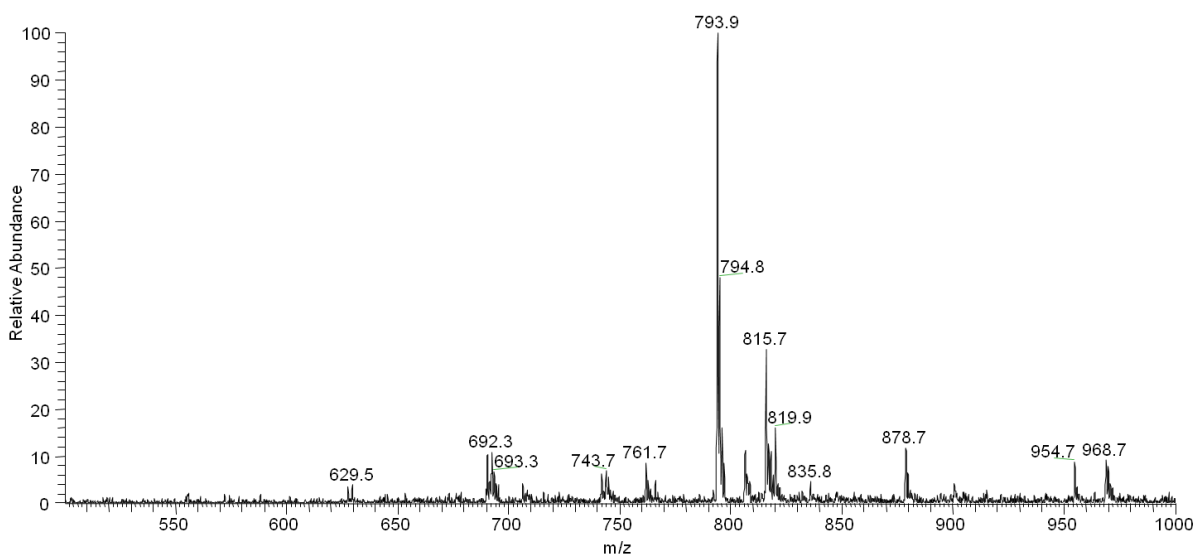
Η καταγραφή των φασμάτων μάζας έγινε τόσο σε θετικό όσο και σε αρνητικό ιοντισμό σε εύρος m/z 500-1000. Η λήψη φασμάτων μάζας που περιέχουν πυκνές κορυφές, δηλαδή αρκετά μεμβρανικά λιπίδια, γίνεται με την απευθείας τοποθέτηση του εκνεφωτή της πηγής ιοντισμού στο δαχτυλίδι που σχηματίζει η σταγόνα του $1 \mu\text{L}$ κυτάρων, όταν στεγνώσει πάνω στην γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα.

Στις παρακάτω εικόνες παρουσιάζονται τα φάσματα μάζας σε θετικό και αρνητικό ιοντισμό που αποκτήθηκαν από την ανάλυση των κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* καλλιεργημένα υπό κανονικές συνθήκες, με την τεχνική EASI-MS. Για την ανάλυση με θετικό ιοντισμό παρατηρείται πως οι κορυφές με την μεγαλύτερη ένταση βρίσκονται σε εύρος m/z 700 - 950. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου⁶⁸ τα κύρια είδη που βρέθηκαν είναι οι χλωροφύλλες α και β, η διγαλακτοζυλοδιακυλογλυκερόλη (DGDG) λιπίδια και η 1,2-διακυλογλυκερυλο-3O-4'-(N,N,N-τριμεθυλο)-ομοσερίνη (DGTS) λιπίδια όπως είναι η κύρια κορυφή που εμφανίζεται στα 734.8 m/z. Με τον αρνητικό ιοντισμό, οι περισσότερες κορυφές με την μεγαλύτερη ένταση παρατηρούνται σε εύρος m/z 700-900 και η κύρια κορυφή στα 793.9 m/z. Τα κύρια είδη μεμβρανικών λιπιδίων που καταγράφηκαν είναι η σουλφοκινοβοσυλοδιακυλογλυκερόλη (SQDG), η φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη (PI) και η φωσφατιδυλο-γλυκερόλη (PG).



Εικόνα 4.3.2- 1. Φάσμα μάζας σε θετικό ιοντισμό, με την τεχνική EASI-MS χρησιμοποιώντας τον “Homebuilt” εκνεφωτή, από την ανάλυση των κυττάρων *C.reinhardtii* καλλιεργημένα κάτω από κανονικές συνθήκες.

Τα λιπίδια DGDG, SQDG, PG και PI είναι συστατικά των θυλακοειδών που αποτελούν το εσωτερικό σύστημα μεμβρανών των χλωροπλαστών, όπου λαμβάνει χώρα η φωτοσύνθεση.^{69,70} Τα λιπίδια DGTS υποκαθιστούν τη φωσφατιδυλοχολίνη (PC) σαν κύριο συστατικό της εξωτερικής μεμβράνης των πλαστών στα κύτταρα *C. reinhardtii* καθώς πραγματοποιούν παρόμοιες λειτουργίες για τη δομή της μεμβράνης, όπως κάνουν οι PC σε άλλους οργανισμούς.⁷¹



Εικόνα 4.3.2- 2. Φάσμα μάζας σε αρνητικό ιοντισμό, με την τεχνική EASI-MS χρησιμοποιώντας τον “Homebuilt” εκνεφωτή, από την ανάλυση των κυττάρων *C.reinhardtii* καλλιεργημένα κάτω από κανονικές συνθήκες.

4.3.3 Επίδραση του μεταλλοειδούς Σεληνίου (Se) στα λιπίδια της μεμβράνης των κυττάρων *C. reinhardtii*

Τα γλυκερολιπίδια είναι τα κύρια συστατικά των φωτοσυνθετικών μεμβρανών που έχουν διατηρηθεί με την εξέλιξη στα πράσινα μικροφύκη. Οι χλωροπλάστες των κυττάρων αυτών όπως φαίνεται στην παραπάνω ενότητα περιέχουν χαμηλές ποσότητες λιπιδίων PI και PG και υψηλότερες ποσότητες από SQDG και DGDG. Τα ουδέτερα λιπίδια, DGDG είναι τα πιο άφθονα λιπίδια στις φωτοσυνθετικές μεμβράνες. Αυτά τα λιπίδια έχουν ζωτικούς ρόλους για τη σταθεροποίηση της λιπιδικής διπλοστιβάδας της μεμβράνης του κυττάρου.⁷⁰ Η ακεραιότητα των φωτοσυνθετικών μεμβρανών είναι βασισμένη στην κατάλληλη αναλογία γαλακτογλυκερολιπιδίων και σε μικρότερο ποσοστό των πολικών λιπιδίων όπως είναι τα SQDG και τα PG.⁷⁰ Εκτός από τη σταθεροποίηση της λιπιδικής διπλοστιβάδας, τα λιπίδια αυτά έχουν σημαντικό ρόλο στις βιολογικές δραστηριότητες του κυττάρου όπως είναι η απέκκριση, η μεταφορά, η μεταγωγή σήματος, η συλλογή του φωτός για την φωτοσύνθεση και η μεταφορά ηλεκτρονίων.⁶² Τα λιπίδια DGTS όπως αναφέρθηκε πρωτίτερα υποκαθιστούν την PC στις μεμβράνες του κυττάρου *C. reinhardtii*.⁷²

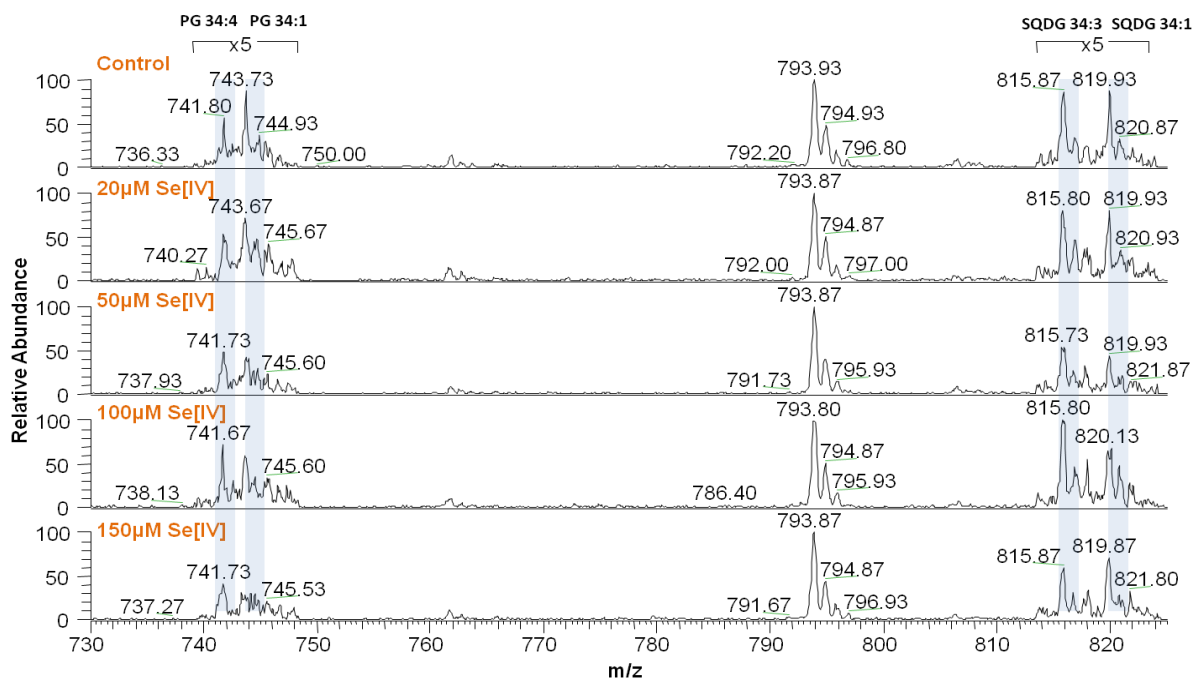
Στην παρούσα εργασία, διερευνήθηκε η επίδραση του μεταλλοειδούς Se στο προφίλ των μεμβρανικών λιπιδίων των κυττάρων *C.reinhardtii*. Αυτά τα ευκαρυωτικά

μονοκύτταρα πράσινα μικροφύκη, χρησιμοποιούνται εκτενώς ως πρότυποι οργανισμοί για τη μελέτη διεργασιών όπως είναι η φωτοσύνθεση και η αναπνοή.⁶³ Τα κύτταρα αποτελούνται από τον πυρήνα, τους χλωροπλάστες όπου γίνεται η φωτοσύνθεση, το χυμοτόπιο, από ένα λεπτό κυτταρικό τοίχωμα που αποτελείται από γλυκοπρωτεΐνες και υδατάνθρακες και τέλος από δύο μαστίγια με τα οποία κινούνται.^{73,74} Η ανάπτυξη των κυττάρων έγινε σε υγρές καλλιέργειες που περιείχαν μη θανατηφόρες συγκεντρώσεις σεληνιώδους νατρίου (Na_2SeO_3) και σεληνικού νατρίου (Na_2SeO_4). Η προσθήκη αυτών των αλάτων είχε ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη καλλιεργειών με αυξανόμενες συγκεντρώσεις Se(IV) και Se(VI). Κάθε δείγμα (control και επωασμένο με Se) αναλύθηκε τρεις φορές (τεχνικό αντίγραφο) με την τεχνική EASI-MS. Μόνο η σχετική ποσοτικοποίηση των μεμβρανικών λιπιδίων ήταν δυνατή επειδή οι σταγόνες των κυττάρων όταν στεγνώνουν πάνω στην γυάλινη πλάκα κατανέμονται ετερογενώς και τείνουν να συγκεντρωθούν σε έναν εξωτερικό δακτύλιο. Έτσι παρακολουθήσαμε τις σχετικές μεταβολές των λιπιδίων χωρίς να χρειάζεται η γνώση του ακριβή αριθμού των κυττάρων. Στις επόμενες ενότητες θα παρουσιαστεί και θα συζητηθεί η επίδραση του Se(IV) και Se(VI) στο προφίλ των μεμβρανικών λιπιδίων.

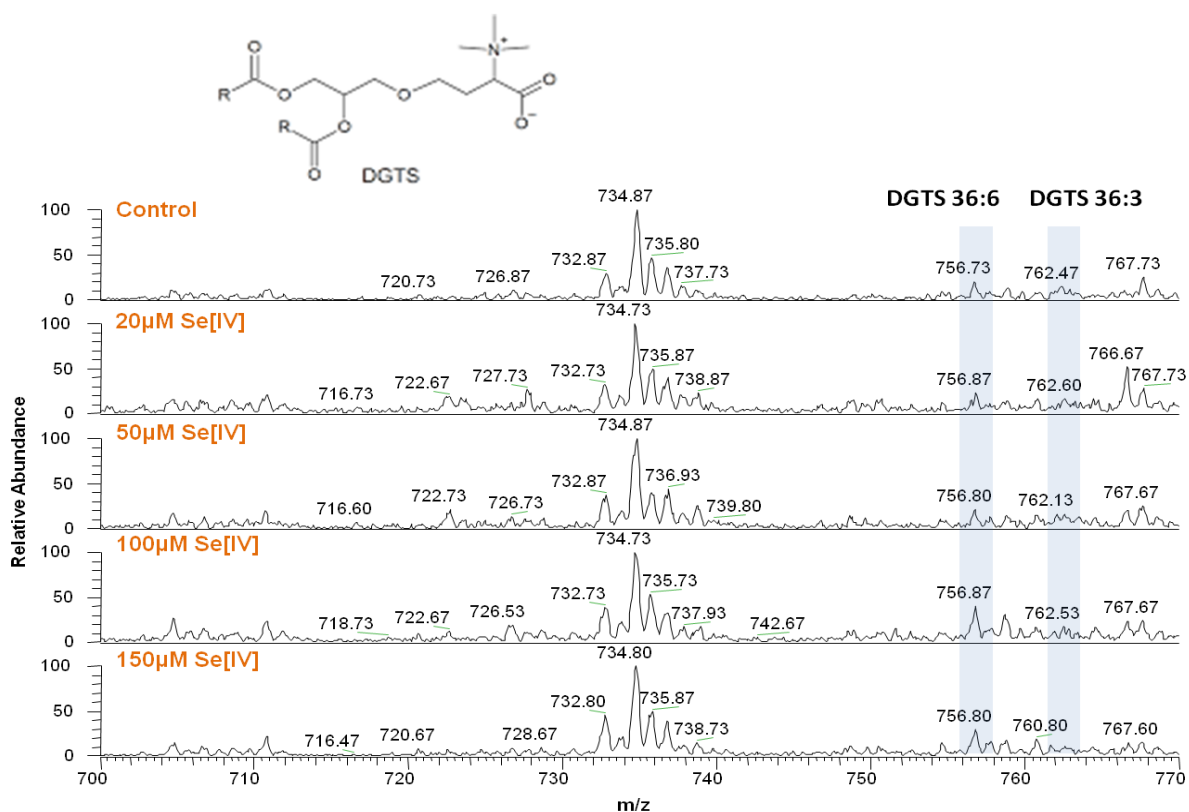
4.3.3.1 Επίδραση του Se(IV) στα μεμβρανικά λιπίδια των κυττάρων *C. reinhardtii*

Η μία από τις δυο κυριότερες κατηγορίες υδατικού σεληνίου είναι τα σεληνιώδη ιόντα Se(IV) και ο βέλτιστος ρυθμός πρόσληψης τους στα κύτταρα *C. reinhardtii* επιτυγχάνεται σε τιμές pH κάτω του 5. Στο γλυκό νερό το Se(IV) είναι λιγότερο βιοδιαθέσιμο από το Se(VI) καθώς απορροφάται σε επιφάνειες οργανικής ύλης και ορυκτών.⁷⁵ Η απορρόφηση των σεληνιωδών από τα κύτταρα των φυτών και από τα φύκη γίνεται μέσω διαμεμβρανικών πρωτεϊνών που μεταφέρουν πυριτικά ή φωσφορικά ιόντα.⁷⁶

Στις Εικόνες **Εικόνα 4.3.3.1- 1** και **Εικόνα 4.3.3.1- 2** υπάρχουν φάσματα μάζας σε θετικό και αρνητικό ιοντισμό, που λήφθηκαν με την τεχνική EASI-MS χρησιμοποιώντας τον “Homebuilt” εκνεφωτή, για δείγματα κυττάρων *C. reinhardtii*, επωασμένων και μη, σε σεληνιώδη Se(IV) διαφορετικών συγκεντρώσεων. Τόσο στον θετικό, όσο και στον αρνητικό ιοντισμό με την παρατήρηση των κορυφών που αφορούν τα λιπίδια PG (εύρος m/z 741- 747), SQDG (εύρος m/z 815- 821) και DGTS (εύρος m/z 756- 762) δεν εμφανίζεται κάποια διαφοροποίηση στην ένταση του σήματος μεταξύ των περισσότερο και λιγότερο ακόρεστων λιπιδίων.



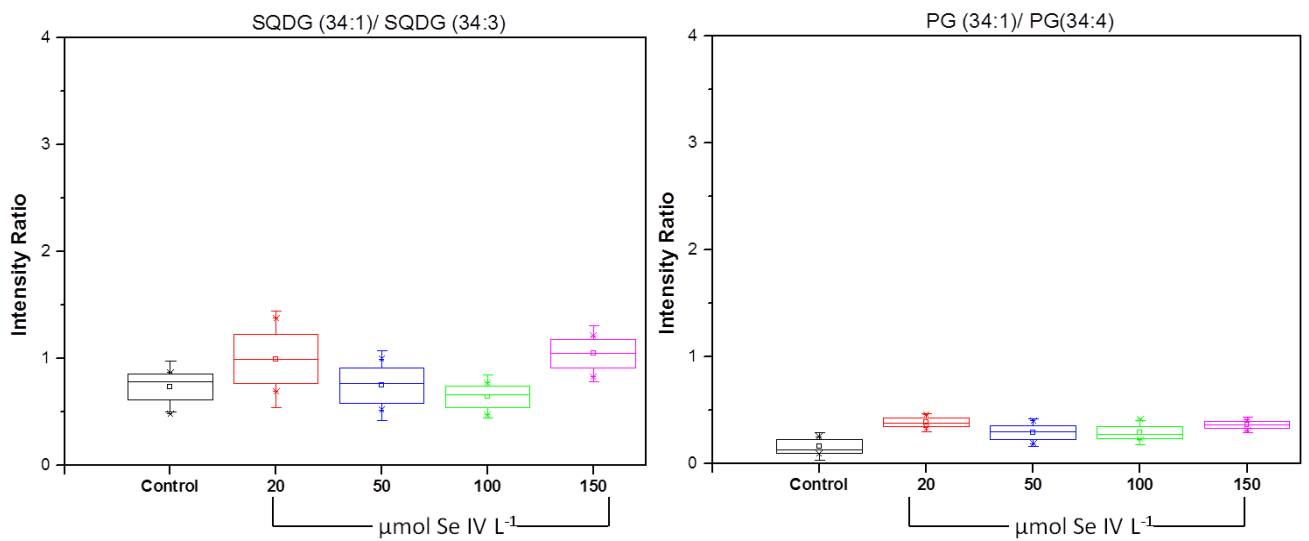
Εικόνα 4.3.3.1- 1. Φάσματα μάζας αρνητικού ιοντισμού, με εύρος m/z 730 - 830, που λήφθηκαν από την ανάλυση του control και των selenite-incubated καλλιιεργειών με την τεχνική EASI-MS.



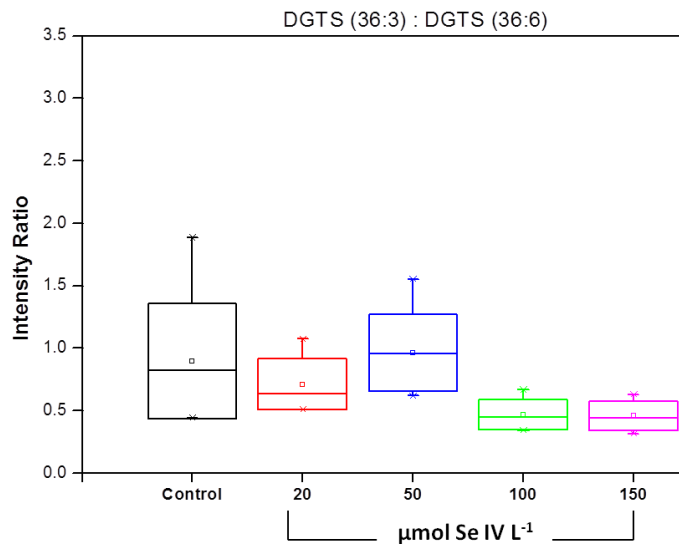
Εικόνα 4.3.3.1- 2. Φάσματα μάζας σε θετικό ιοντισμό, με εύρος m/z 700 - 770, που λήφθηκαν από την ανάλυση του control και των selenite-incubated καλλιιεργειών με την τεχνική EASI-MS. Πάνω αριστερά βρίσκεται η γενική χημική δομή των λιπιδίων DGTS. Οι ομάδες R είναι πλευρικές αλυσίδες λιπαρών οξέων.

Η παρατήρηση των παραπάνω φασμάτων μάζας επαληθεύεται γραφικά στα θηκογράμματα (Box plot) στις Εικόνες **Εικόνα 4.3.3.1- 3** και **Εικόνα 4.3.3.1- 4**. Όπως

φαίνεται, η επώαση των κυττάρων σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις σεληνιώδους νατρίου δεν επηρεάζει το λιπιδικό προφίλ των μεμβρανών των κυττάρων.



Εικόνα 4.3.3.1- 3. Μονοπαραμετρικά θηκογράμματα του λόγου της έντασης του σήματος των λιπιδίων PG και SQDG για τα control και selenite –incubated κύτταρα *C. reinhardtii*. Οι αριθμητικές μέσες τιμές αναπαριστούνται με ένα μικρό κουτί, με ± 1 SD (τυπική απόκλιση) σαν μεγαλύτερο κουτί και με ± 1.96 SD σαν whiskers. Με την ευθεία γραμμή ανάμεσα στα μεγαλύτερα κουτιά αναπαρίσταται η τιμή της διαμέσου και με το σύμβολο X η ελάχιστη και η μέγιστη τιμή των δεδομένων.

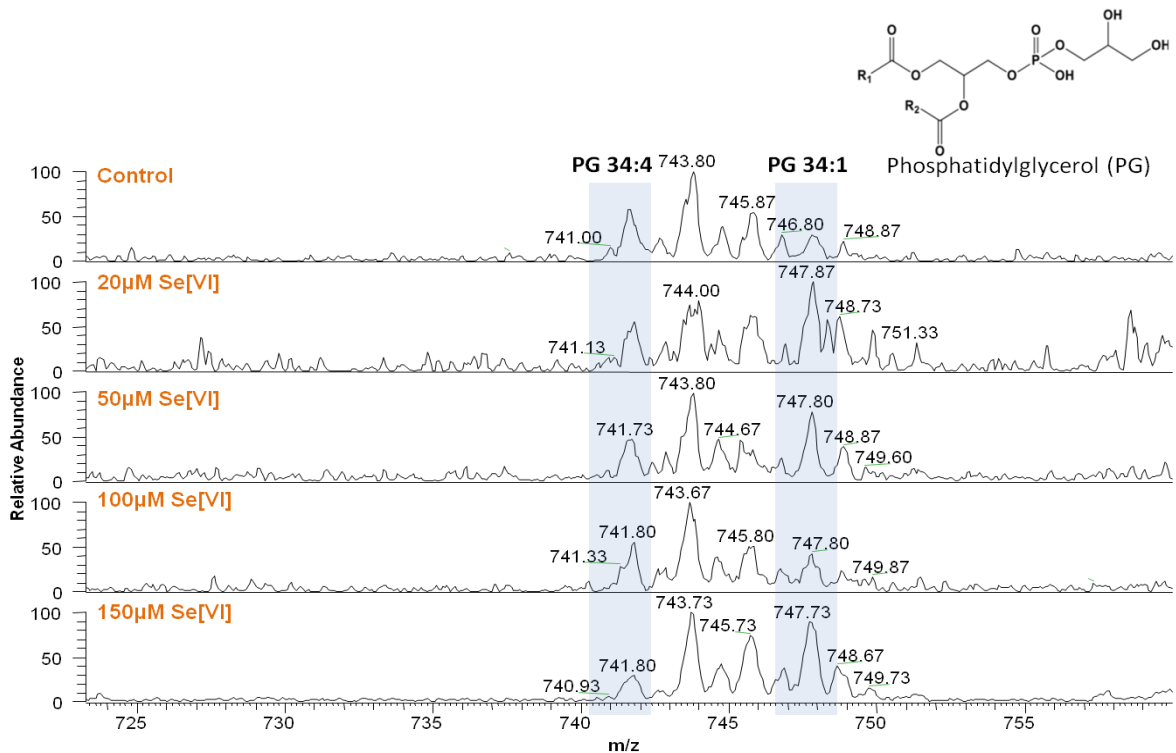


Εικόνα 4.3.3.1- 4. Μονοπαραμετρικά θηκογράμματα του λόγου της έντασης του σήματος των λιπιδίων DGTS για τα control και selenite –incubated κύτταρα *C. reinhardtii*. Οι αριθμητικές μέσες τιμές αναπαριστούνται με ένα μικρό κουτί, με ± 1 SD (τυπική απόκλιση) σαν μεγαλύτερο κουτί και με ± 1.96 SD σαν whiskers. Με την ευθεία γραμμή ανάμεσα στα μεγαλύτερα κουτιά αναπαρίσταται η τιμή της διαμέσου και με το σύμβολο X η ελάχιστη και η μέγιστη τιμή των δεδομένων.

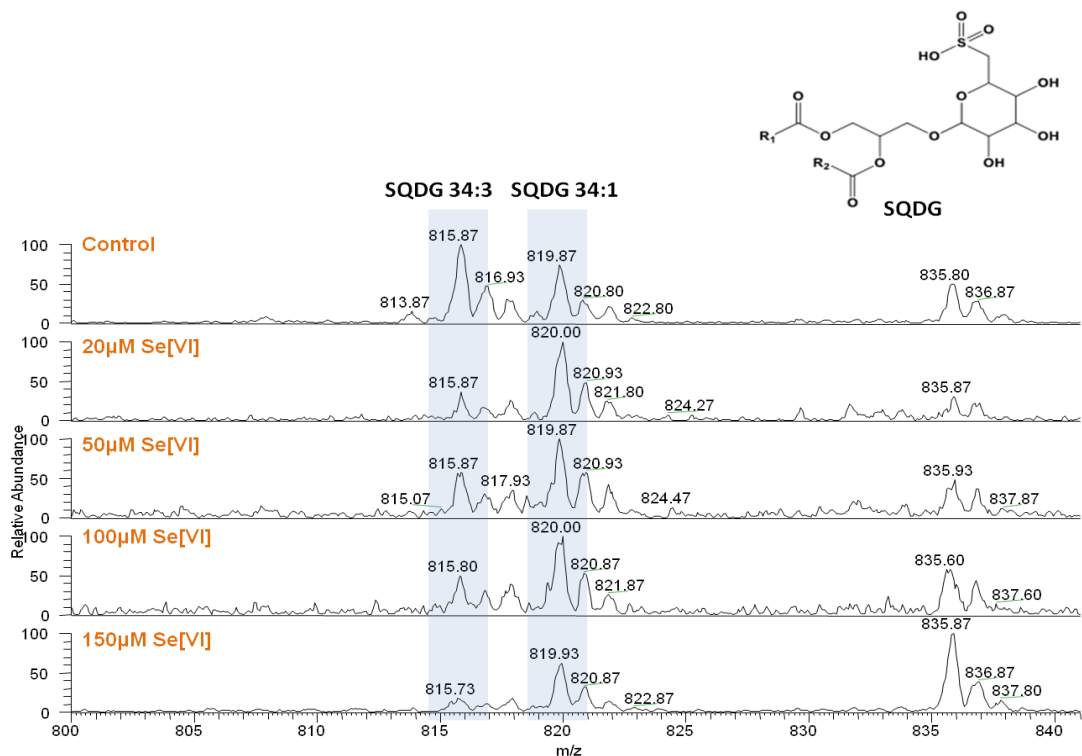
4.3.3.2 Επίδραση του Se(VI) στα μεμβρανικά λιπίδια των κυττάρων *C. reinhardtii*

Το Se(VI) η δεύτερη κύρια ανόργανη μορφή του σεληνίου. Έχει παρατηρηθεί ότι στα μονοκύτταρα πράσινα φύκη *C. reinhardtii* οι βέλτιστοι ρυθμοί πρόσληψης του Se(VI) επιτυγχάνονται σε τιμές pH κοντά στο 8. Λόγω της μεγάλης χημικής ομοιότητας που έχει το σεληνικό ανιόν (SeO_4^{2-}) με το θειικό ανιόν (SO_4^{2-}), τα δύο αυτά ανταγωνίζονται για τις θέσεις δέσμευσης των θειικών στις περμεάσες, (διαμεμβρανικά ένζυμα) ώστε να εισέλθουν μέσα στα φύκη και μεταβολίζονται στα ίδια μονοπάτια, κυρίως στους χλωροπλάστες.⁷⁷ Εικάζεται ότι το σεληνικό ανιόν (SeO_4^{2-}) επηρεάζει την αποτελεσματικότητα της φωτοσυνθετικής διαδικασίας καθώς υποκαθιστά το θείο σε Fe-S πρωτεΐνες που βρίσκονται στους χλωροπλάστες και εμπλέκονται σε διάφορες διεργασίες, με κύρια την φωτοσύνθεση.⁷⁸

Στο θετικό ιοντισμό δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική διαφοροποίηση στο προφίλ των μεμβρανικών λιπιδίων στο control και στα selenate - incubated δείγματα για αυτό και δεν παρατίθεται κάποιο φάσμα μάζας. Στις παρακάτω εικόνες υπάρχουν φάσματα μάζας σε αρνητικό ιοντισμό, που λήφθηκαν με την τεχνική EASI-MS χρησιμοποιώντας το γυάλινο εκνεφωτή, στα οποία φαίνεται η διαφοροποίηση της σχετικής έντασης δύο ομάδων μεμβρανικών λιπιδίων, των PG και των SQDG. Η ένταση του σήματος των λιπιδίων με μικρότερο αριθμό διπλών δεσμών (λιγότερο ακόρεστων) PG (34:1) (m/z 747.8) σε σχέση με των λιπιδίων με μεγαλύτερο αριθμό διπλών δεσμών (περισσότερο ακόρεστων) PG (34:4) (m/z 741.7) αυξάνεται στα κύτταρα που επωάστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις Se(VI) και ιδιαίτερα στην μεγαλύτερη συγκέντρωση 150 μM όπως αυτό είναι εύκολο να παρατηρηθεί στο γράφημα της **Εικόνα 4.3.3.2- 3**.

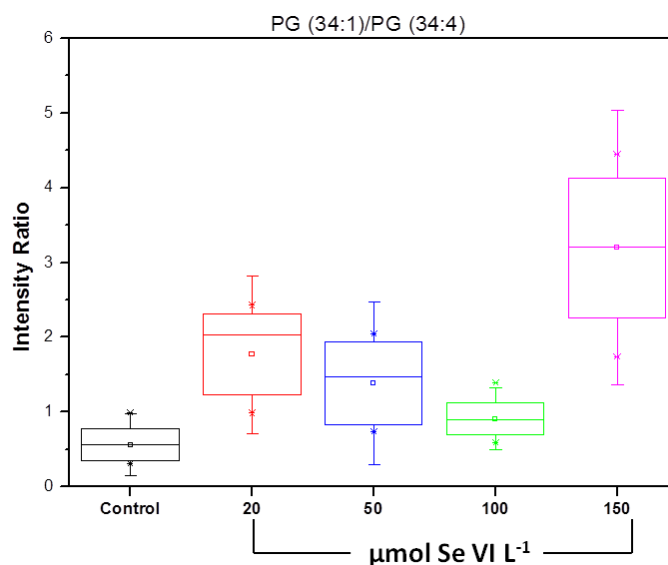


Εικόνα 4.3.3.- 1. Φάσματα μάζας αρνητικού ιοντισμού, με εύρος m/z 723 - 760, που λήφθηκαν από την ανάλυση του control και των selenate-incubated καλλιεργειών με την τεχνική EASI-MS. Πάνω δεξιά βρίσκεται η γενική χημική δομή των φωσφατιδυλογλυκερών. Οι ομάδες R1 και R2 είναι πλευρικές αλυσίδες λιπαρών οξέων.

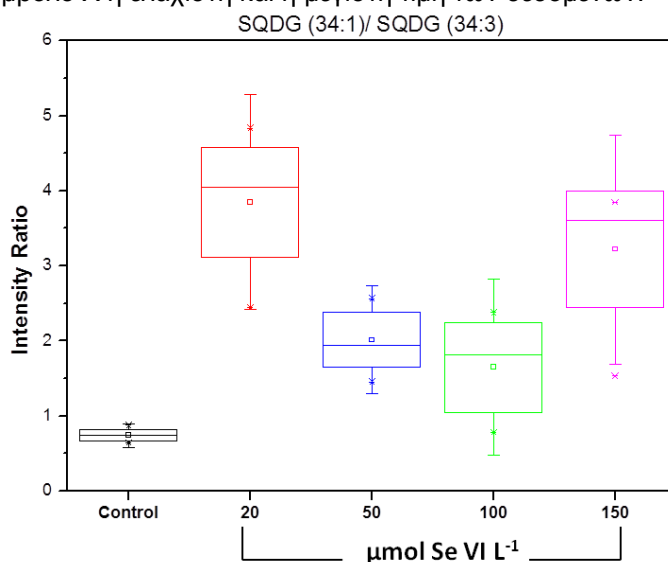


Εικόνα 4.3.3.- 2. Φάσματα μάζας αρνητικού ιοντισμού, με εύρος m/z 800 - 841, που λήφθηκαν από την ανάλυση του control και των selenate-incubated καλλιεργειών με την τεχνική EASI-MS. Πάνω δεξιά βρίσκεται η γενική χημική δομή των SQDG. Οι ομάδες R1 και R2 είναι πλευρικές αλυσίδες λιπαρών οξέων.

Με την παρατήρηση των θηκογραμμάτων στις παραπάνω εικόνες, οι λόγοι έντασης του σήματος των PG(34:1)/PG(34:4) και SQDG(34:1)/SQDG(34:3) έδειξαν ελάχιστη αύξηση στα κύτταρα που επωάστηκαν με 50 και 100 μM Se(VI). Παρόλα αυτά στα κύτταρα που επωάστηκαν με συγκεντρώσεις 20 και 150 μM Se(VI) οι αναλογίες των λιπιδίων αυτών μεταβλήθηκαν αρκετά καθώς η παρουσία του Se(VI) προκάλεσε την μετατροπή των περισσότερο ακόρεστων λιπιδίων σε λιγότερο ακόρεστα.



Εικόνα 4.3.3.2- 3. Μονοπαραμετρικά θηκογράμματα του λόγου της έντασης του σήματος των λιπιδίων PG για τα control και selenate –incubated κύτταρα *C. reinhardtii*. Οι αριθμητικές μέσες τιμές αναπαριστούνται με ένα μικρό κουτί, με ± 1 SD (τυπική απόκλιση) σαν μεγαλύτερο κουτί και με ± 1.96 SD σαν whiskers. Με την ευθεία γραμμή ανάμεσα στα μεγαλύτερα κουτιά αναπαρίσταται η τιμή της διαμέσου και με το σύμβολο X η ελάχιστη και η μέγιστη τιμή των δεδομένων.



Εικόνα 4.3.3.2- 4. Μονοπαραμετρικά θηκογράμματα του λόγου της έντασης του σήματος των λιπιδίων SQDG για τα control και selenate –incubated κύτταρα *C. reinhardtii*. Οι αριθμητικές μέσες τιμές αναπαριστούνται με ένα μικρό κουτί, με ± 1 SD (τυπική απόκλιση) σαν μεγαλύτερο κουτί και με ± 1.96 SD σαν whiskers. Με την ευθεία γραμμή ανάμεσα στα μεγαλύτερα κουτιά αναπαρίσταται η τιμή της διαμέσου και με το σύμβολο X η ελάχιστη και η μέγιστη τιμή των δεδομένων.

Εν κατακλείδι με τα δεδομένα που παρουσιάζονται, υποδηλώνεται ότι όταν τα κύτταρα επωάζονται με τοξικούς επιμολυντές σε υποθανατηφόρες συγκεντρώσεις τα μεμβρανικά λιπίδια μετατρέπονται σε λιγότερο ακόρεστα, μεταβάλλοντας έτσι την σύνθεση και την ρευστότητα των μεμβρανών του κυττάρου καθιστώντας τις πιο συμπαγείς. Το σεληνίο με την μορφή Se(IV) δεν εμφανίζει κάποια αναδιοργάνωση σε σχέση με την μορφή Se(VI). Συμπληρωματικά, και σε άλλες μελέτες που έχουν γίνει σε θαλάσσια φύκη, φυτοπλαγκτόν αλλά και στα πράσινα φύκη *C. reinhardtii* παρατηρήθηκε πως η τοξικότητα του σεληνικού ανιόντος είναι μεγαλύτερη του σεληνιώδους ανιόντος.⁷⁹ Από όσο γνωρίζουμε δεν υπάρχει κάποια μελέτη που να έχει εξετάσει την τοξικότητα του μεταλλοειδούς σεληνίου στα λιπίδια της μεμβράνης των κυττάρων *C. reinhardtii*, έτσι θα πρέπει να διερευνηθεί πιο λεπτομερώς η λιπιδική ανάλυση, με ποσοτικοποίηση των κυτταρικών λιποειδών ώστε να υπάρξει μεγαλύτερη κατανόηση της αλληλεπίδρασης τους με άλλα λιποειδή και της επίδρασης τους με τις μεμβράνες του κυττάρου.

4.4 Συμπεράσματα

Η φασματομετρία μάζας εκρόφησης με ιοντισμό υπερηχητικής εκνέφωσης χρησιμοποιήθηκε για την ταχεία ανάλυση μεμβρανικών λιπιδίων από άθικτα κύτταρα. Η διαδικασία της προετοιμασίας των δειγμάτων περιορίστηκε στο ελάχιστο, χωρίς να χρειαστεί εκχύλιση των κυττάρων. Η μόνη απαραίτητη προετοιμασία του δείγματος ήταν το πλύσιμο των κυττάρων με απιοντισμένο νερό ώστε να απομακρυνθούν τα συστατικά του θρεπτικού υλικού της καλλιέργειας τους και του διαλύματος διατήρησης τους, που θα προκαλούσαν καταστολή του σήματος των αναλυτών. Με αυτήν την τεχνική κατέστη δυνατή η ταχεία απόκτηση φασμάτων μάζας με το προφίλ των μεμβρανικών λιπιδίων των κυττάρων. Ο διαλύτης εκνέφωσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ικανός να εκχυλίσει αποτελεσματικά λιπίδια της μεμβράνης όπως είναι τα DGTS, SQDG, PG και PI από τα κύτταρα.

Μετά τη βελτιστοποίηση διαφόρων παραμέτρων, η τεχνική χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση πράσινων φυκιών του είδους *Chlamydomonas reinhardtii* που καλλιεργήθηκαν υπό διαφορετικές συνθήκες. Τα κύτταρα επωάστηκαν σε αυξανόμενες υποθανατηφόρες συγκεντρώσεις τοξικών μεταλλοειδών σεληνίου [Se (IV) και Se(VI)] και παρατηρήθηκε πως το Se(IV) δεν εμφάνισε κάποια αναδιοργάνωση στα λιπίδια του κυττάρου σε σχέση με το Se(VI) που έδειξε την αύξηση των λιγότερο ακόρεστων λιπιδίων σε σχέση με τα περισσότερα ακόρεστα. Οι ακριβείς μηχανισμοί για την αναδιοργάνωση αυτή δεν είναι γνωστοί καθώς δεν υπάρχει άλλη αναφορά για την επίδραση του σεληνίου στα λιπίδια της μεμβράνης των κυττάρων αυτών. Έτσι θα πρέπει να γίνουν πιο λεπτομερείς ενζυμικές και λιπιδωμικές μελέτες ώστε να εξακριβωθούν οι μηχανισμοί με τους οποίους τα λιπίδια αναδιοργανώνονται κατά την αλληλεπίδραση του κυττάρου με τοξικά μεταλλοειδή αλλά και να παρέχουν ποσοτικές πληροφορίες για την κατανομή των λιποειδών μέσα στα κύτταρα.

Βιβλιογραφία

- (1) Gross, J. H. *Mass Spectrometry, A Textbook*. Second Edition. Springer, Berlin. (2011)
- (2) Harris, Daniel C., 1948- Ποσοτική χημική ανάλυση / Ηράκλειο : Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2009-2010.
- (3) Yamashita, M.; Fenn, J. B. Electrospray Ion Source. Another Variation on the Free-Jet Theme. *J. Phys. Chem.* **1984**, *88* (20), 4451–4459.
- (4) Banerjee, S.; Mazumdar, S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *Int. J. Anal. Chem.* **2012**, *2012*, 1–40.
- (5) Noda, M.; Fukui, K.; Uchiyama, S. Mass Spectrometry. In *Advanced Methods in Structural Biology*; 2016; pp 185–198.
- (6) Huang, M. Z.; Cheng, S. C.; Cho, Y. T.; Shiea, J. Ambient Ionization Mass Spectrometry: A Tutorial. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *702* (1), 1–15.
- (7) Takáts, Z.; Wiseman, J. M.; Gologan, B.; Cooks, R. G. Mass Spectrometry Sampling under Ambient Conditions with Desorption Electrospray Ionization. *Science (80-.)*. **2004**, *306* (5695), 471–473.
- (8) Fernández, F. M.; Cody, R. B.; Green, M. D.; Hampton, C. Y.; McGready, R.; Sengaloundeth, S.; White, N. J.; Newton, P. N. Characterization of Solid Counterfeit Drug Samples by Desorption Electrospray Ionization and Direct-Analysis-in-Real-Time Coupled to Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Chem. Med. Chem* **2006**, *1* (7), 702–705.
- (9) Hirabayashi, A.; Sakairi, M.; Koizumi, H. Sonic Spray Ionization Method for Atmospheric Pressure Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **1994**, *66* (24), 4557–4559.
- (10) Touboul, D.; Jecklin, M. C.; Zenobi, R. Ion Internal Energy Distributions Validate the Charge Residue Model for Small Molecule Ion Formation by Spray Methods. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2008**, *22* (7), 1062–1068.
- (11) Zilch, L. W.; Maze, J. T.; Smith, J. W.; Ewing, G. E.; Jarrold, M. F. Charge Separation in the Aerodynamic Breakup of Micrometer-Sized Water Droplets. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112* (51), 13352–13363.
- (12) Haddad, R.; Sparrapan, R.; Eberlin, M. N. Desorption Sonic Spray Ionization for (High) Voltage-Free Ambient Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20* (19), 2901–2905.

- (13) Haddad, R.; Milagre, H. M. S.; Catharino, R. R.; Eberlin, M. N. Easy Ambient Sonic-Spray Ionization Mass Spectrometry Combined with Thin-Layer Chromatography. *Anal. Chem.* **2008**, *80* (8), 2744–2750.
- (14) Garrett, R.; Schwab, N. V.; Cabral, E. C.; Henrique, B. V. M.; Ifa, D. R.; Eberlin, M. N.; Rezende, C. M. Ambient Mass Spectrometry Employed for Direct Analysis of Intact Arabica Coffee Beans. *J. Braz. Chem. Soc.* **2014**, *25* (7), 1172–1177.
- (15) Costa, A. B.; Graham Cooks, R. Simulated Splashes: Elucidating the Mechanism of Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Chem. Phys. Lett.* **2008**, *464* (1–3), 1–8.
- (16) Zivolic, F.; Zancanaro, F.; Favretto, D.; Davide Ferrara, S.; Seraglia, R.; Traldi, P. Pneumatically Assisted Desorption/Ionization: 1. Some Thoughts on the Possible Ionization Mechanism(S). *J. Mass Spectrom.* **2010**, *45* (4), 411–420.
- (17) Leito, I.; Herodes, K.; Huopola, M.; Virro, K.; Kunnapas, A.; Kruve, A.; Tanner, R. Towards the Electrospray Ionization Mass Spectrometry Ionization Efficiency Scale of Organic Compounds. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2008**, *22*, 379–384.
- (18) Oss, M.; Kruve, A.; Herodes, K.; Leito, I. Electrospray Ionization Efficiency Scale of Organic Compound. *Anal. Chem.* **2010**, *82* (7), 2865–2872.
- (19) Covey, R. T.; Thomson, A. B.; Schneider, B. B. Atmospheric Pressure Ion Sources. *Mass Spectrom. Rev.* **2009**, *28* (6), 870–897.
- (20) Page, J. S.; Kelly, R. T.; Tang, K.; Smith, R. D. Ionization and Transmission Efficiency in an Electrospray Ionization-Mass Spectrometry Interface. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**, *18* (9), 1582–1590.
- (21) Lubin, A.; Bajic, S.; Cabooter, D.; Augustijns, P.; Cuyckens, F. Atmospheric Pressure Ionization Using a High Voltage Target Compared to Electrospray Ionization. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2017**, *28* (2), 286–293.
- (22) Lubin, A.; Geerinckx, S.; Bajic, S.; Cabooter, D.; Augustijns, P.; Cuyckens, F.; Vreeken, R. J. Enhanced Performance for the Analysis of Prostaglandins and Thromboxanes by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Using a New Atmospheric Pressure Ionization Source. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1440*, 260–265.
- (23) Bajic, S. Waters UniSpray Ionization Source. **2017**, 1–10.
- (24) Ciclet, O.; Barron, D.; Bajic, S.; Veuthey, J. L.; Guillarme, D.; Grand-Guillaume Perrenoud, A. Natural Compounds Analysis Using Liquid and Supercritical Fluid Chromatography Hyphenated to Mass Spectrometry: Evaluation of a New Design of Atmospheric Pressure Ionization Source. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2018**, *1083*, 1–11.

- (25) Lubin, A.; De Vries, R.; Cabooter, D.; Augustijns, P.; Cuyckens, F. An Atmospheric Pressure Ionization Source Using a High Voltage Target Compared to Electrospray Ionization for the LC/MS Analysis of Pharmaceutical Compounds. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2017**, *142*, 225–231.
- (26) Takats, Z.; Nanita, S. C.; Cooks, R. G.; Schlosser, G.; Vekey, K. Amino Acid Clusters Formed by Sonic Spray Ionization. *Anal. Chem.* **2003**, *75* (6), 1514–1523.
- (27) Moini, M.; Jones, B. L.; Rogers, R. M.; Jiang, L. 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* (9), 977–980.
- (28) Thomsen, V.; Schatzlein, D.; Mercurio, D. Limits of Detection in Spectroscopy. *Spectroscopy* **2003**, *18* (12), 112–114.
- (29) Rao, B.; Hatzinger, P. B.; Böhlke, J. K.; Sturchio, N. C.; Andraski, B. J.; Eckardt, F. D.; Jackson, W. A. Natural Chlorate in the Environment: Application of a New IC-ESI/MS/MS Method with a Cl18O3- Internal Standard. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44* (22), 8429–8434.
- (30) Li, Y.; George, E. J. Reversed-Phase Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry for Analysis of Perchlorate in Water. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1133* (1–2), 215–220.
- (31) Liu, Y.; Mou, S. Determination of Bromate and Chlorinated Haloacetic Acids in Bottled Drinking Water with Chromatographic Methods. *Chemosphere* **2004**, *55* (9), 1253–1258.
- (32) Tian, K.; Dasgupta, P. K.; Anderson, T. A. Determination of Trace Perchlorate in High-Salinity Water Samples by Ion Chromatography with on-Line Preconcentration and Preelution. *Anal. Chem.* **2003**, *75* (3), 701–706.
- (33) Mavrouidakis, L.; Mavrakis, E.; Kouvarakis, A.; Pergantis, S. A. Determination of Chlorate, Perchlorate and Bromate Anions in Water Samples by Microbore Reversed-Phase Liquid Chromatography Coupled to Sonic-Spray Ionization Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2017**, *31* (11), 911–918.
- (34) Li, Y.; George, E. J. Analysis of Perchlorate in Water by Reversed-Phase LC/ESI-MS/MS Using an Internal Standard Technique. *Anal. Chem.* **2005**, *77* (14), 4453–4458.
- (35) Wendelken, S. C.; Munch, David, J.; Pepich, B. V.; Later, D. W.; Pohl, C. A. Determination of Perchlorate in Drinking Water by Liquid Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *U.S. E.P.A Method 331.0* **2005**, 1–34.
- (36) Nauen, R. Insecticide Resistance in Disease Vectors of Public Health Importance. *Pest Manag. Sci.* **2007**, *63* (7), 628–633.
- (37) Sheppard, C. D.; Joyce, J. A. Increased Susceptibility of Pyrethroid-Resistant Horn Flies

- (Diptera: Muscidae) to Chlorfenapyr. *J. Econ. Entomol.* **1998**, *91* (2), 398–400.
- (38) Pimprale, S. S.; Besco, C. L.; Bryson, P. K.; Brown, T. M. Increased Susceptibility of Pyrethroid-Resistant Tobacco Budworm (Lepidoptera: Noctuidae) to Chlorfenapyr. *J. Econ. Entomol.* **1997**, *90* (1), 49–54.
- (39) Raghavendra, K.; Barik, T. K.; Sharma, P.; Bhatt, R. M.; Srivastava, H. C.; Sreehari, U.; Dash, A. P. Chlorfenapyr: A New Insecticide with Novel Mode of Action Can Control Pyrethroid Resistant Malaria Vectors. *Malar. J.* **2011**, *10* (16), 1–7.
- (40) Toé, K. H.; N'Falé, S.; Dabiré, R. K.; Ranson, H.; Jones, C. M. The Recent Escalation in Strength of Pyrethroid Resistance in *Anopheles Coluzzi* in West Africa Is Linked to Increased Expression of Multiple Gene Families. *BMC Genomics* **2015**, *16* (1), 146.
- (41) Stevenson, B. J.; Pignatelli, P.; Nikou, D.; Paine, M. J. I. Pinpointing P450s Associated with Pyrethroid Metabolism in the Dengue Vector, *Aedes Aegypti*: Developing New Tools to Combat Insecticide Resistance. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2012**, *6* (3), 1–8.
- (42) Liu, N. Insecticide Resistance in Mosquitoes: Impact, Mechanisms, and Research Directions. *Annu. Rev. Entomol.* **2015**, *60*, 537–559.
- (43) Edi, C. V.; Djogbénou, L.; Jenkins, A. M.; Regna, K.; Muskavitch, M. A. T.; Poupardin, R.; Jones, C. M.; Essandoh, J.; Kétoh, G. K.; Paine, M. J. I.; Koudou, B. G.; Donnelly, M. J.; Ranson, H.; Weetman, D. CYP6 P450 Enzymes and ACE-1 Duplication Produce Extreme and Multiple Insecticide Resistance in the Malaria Mosquito *Anopheles Gambiae*. *PLoS Genet.* **2014**, *10* (3).
- (44) Ingham, V. A.; Jones, C. M.; Pignatelli, P.; Balabanidou, V.; Vontas, J.; Wagstaff, S. C.; Moore, J. D.; Ranson, H. Dissecting the Organ Specificity of Insecticide Resistance Candidate Genes in *Anopheles Gambiae*: Known and Novel Candidate Genes. *BMC Genomics* **2014**, *15* (1), 1–9.
- (45) Djouaka, R. F.; Bakare, A. A.; Coulibaly, O. N.; Akogbeto, M. C.; Ranson, H.; Hemingway, J.; Strode, C. Expression of the Cytochrome P450s, CYP6P3 and CYP6M2 Are Significantly Elevated in Multiple Pyrethroid Resistant Populations of *Anopheles Gambiae* s.s. from Southern Benin and Nigeria. *BMC Genomics* **2008**, *9* (538), 1–10.
- (46) Mitchell, S. N.; Stevenson, B. J.; Müller, P.; Wilding, C. S.; Egyir-Yawson, A.; Field, S. G.; Hemingway, J.; Paine, M. J. I.; Ranson, H.; Donnelly, M. J. Identification and Validation of a Gene Causing Cross-Resistance between Insecticide Classes in *Anopheles Gambiae* from Ghana. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109* (16), 6147–6152.
- (47) Donnelly, M. J.; Isaacs, A. T.; Weetman, D. Identification, Validation, and Application of Molecular Diagnostics for Insecticide Resistance in Malaria Vectors. *Trends Parasitol.* **2016**, *32* (3), 197–206.

- (48) Müller, P.; Warr, E.; Stevenson, B. J.; Pignatelli, P. M.; Morgan, J. C.; Steven, A.; Yawson, A. E.; Mitchell, S. N.; Ranson, H.; Hemingway, J.; Paine, M. J. I.; Donnelly, M. J. Field-Caught Permethrin-Resistant *Anopheles Gambiae* Overexpress CYP6P3, a P450 That Metabolises Pyrethroids. *PLoS Genet.* **2008**, *4* (11), e1000286.
- (49) Stevenson, B. J.; Bibby, J.; Pignatelli, P.; Muangnoicharoen, S.; O'Neill, P. M.; Lian, L. Y.; Müller, P.; Nikou, D.; Steven, A.; Hemingway, J.; Sutcliffe, M. J.; Paine, M. J. I. Cytochrome P450 6M2 from the Malaria Vector *Anopheles Gambiae* Metabolizes Pyrethroids: Sequential Metabolism of Deltamethrin Revealed. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2011**, *41* (7), 492–502.
- (50) Vontas, J.; Grigoraki, L.; Morgan, J.; Tsakireli, D.; Fuseini, G.; Segura, L.; Niemczura de Carvalho, J.; Nguema, R.; Weetman, D.; Slotman, M. A.; Hemingway, J. Rapid Selection of a Pyrethroid Metabolic Enzyme CYP9K1 by Operational Malaria Control Activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, *115* (18), 4619–4624.
- (51) Strode, C.; Wondji, C. S.; David, J.-P.; Hawkes, N. J.; Lumjuan, N.; Nelson, D. R.; Drane, D. R.; Karunaratne, P. S. H. .; Hemingway, J.; Black IV, W. C.; Ranson, H. Genomic Analysis of Detoxification Genes in the Mosquito *Aedes Aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2008**, *38* (1), 113–123.
- (52) Bingham, G.; Strode, C.; Tran, L.; Khoa, P. T.; Jamet, H. P. Can Piperonyl Butoxide Enhance the Efficacy of Pyrethroids against Pyrethroid-Resistant *Aedes Aegypti*? *Trop. Med. Int. Heal.* **2011**, *16* (4), 492–500.
- (53) Huang, J. X.; Liu, C. Y.; Lu, D. H.; Chen, J. J.; Deng, Y. C.; Wang, F. H. Residue Behavior and Risk Assessment of Mixed Formulation of Imidacloprid and Chlorfenapyr in Chieh-qua under Field Conditions. *Environ. Monit. Assess.* **2015**, *187*, 650.
- (54) Zhang, P.; Ding, J.; Hou, J.; Zhao, L.; Chen, Y.; Ding, L. Dynamic Microwave Assisted Extraction Coupled with Matrix Solid Phase Dispersion for the Determination of Chlorfenapyr and Abamectin in Rice by LC-MS/MS. *Microchem. J.* **2017**, *133*, 404–411.
- (55) Shan, Y.; Liu, Y.; Yang, L.; Nie, H.; Shen, S.; Dong, C.; Bai, Y.; Zhao, J.; Liu, H. Lipid Profiling of Cyanobacteria *Synechococcus* Sp. PCC 7002 Using Two-Dimensional Liquid Chromatography with Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Sci. J. Sep.* **2016**, *39* (19), 3745–3753.
- (56) Tomčala, A.; Kyselová, V.; Schneedorferová, I.; Opekarová, I.; Moos, M.; Urajová, P.; Kručinská, J.; Oborník, M. Separation and Identification of Lipids in the Photosynthetic Cousins of Apicomplexa *Chromera Velia* and *Vitrella Brassicaformis*. *J. Sep. Sci.* **2017**, *40* (17), 1–22.
- (57) Biller, P.; Ross, A. B. Pyrolysis GC – MS as a Novel Analysis Technique to Determine the Biochemical Composition of Microalgae. *Algal Research* **2014**, *6*, 91–97.
- (58) Furuhashi, T.; Nakamura, T.; Fagner, L.; Roustan, V.; Schön, V.; Weckwerth, W. Biodiesel

- and Poly-unsaturated Fatty Acids Production from Algae and Crop Plants — a Rapid and Comprehensive Workflow for Lipid Analysis. *Biotechnol. J.* **2016**, *11* (10), 1262–1267.
- (59) Krismer, J.; Steinhoff, R. F.; Zenobi, R. Single-Cell MALDI Tandem Mass Spectrometry: Unambiguous Assignment of Small Biomolecules from Single *Chlamydomonas Reinhardtii* Cells. *Chimia (Aarau)*. **2016**, *70* (4), 236–239.
- (60) Bodzon-Kulakowska, Anna Cichon, T.; Golec, A.; Drabik, A.; Suder, P. DESI – MS as a Tool for Direct Lipid Analysis in Cultured Cells. *Cytotechnology* **2015**, *67*, 1085–1091.
- (61) Zhang, J. I.; Talaty, N.; Costa, A. B.; Xia, Y.; Tao, W. A.; Bell, R.; Callahan, J. H.; Cooks, R. G. Rapid Direct Lipid Profiling of Bacteria Using Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* **2011**, *301* (1–3), 37–44.
- (62) Liu, Y.; Zhang, J.; Nie, H.; Dong, C.; Li, Z.; Zheng, Z.; Bai, Y.; Liu, H.; Zhao, J. Study on Variation of Lipids during Different Growth Phases of Living Cyanobacteria Using Easy Ambient Sonic-Spray Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (14), 7096–7102.
- (63) Hanikenne, M. *Chlamydomonas Reinhardtii* as a Eukaryotic Photosynthetic Model for Studies of Heavy Metal Homeostasis and Tolerance. *New Phytol.* **2003**, *159*, 331–340.
- (64) Vriens, B.; Behra, R.; Voegelin, A.; Zupanic, A.; Winkel, L. H. E. Selenium Uptake and Methylation by the Microalga *Chlamydomonas Reinhardtii*. *Environ. Sci. Technol.* **2015**, *50* (2), 711–720.
- (65) Lalli, P. M.; Sanvido, G. B.; Garcia, J. S.; Haddad, R.; Cosso, R. G.; Maia, D. R. J.; Zacca, J. J.; Maldaner, A. O.; Eberlin, M. N. Fingerprinting and Aging of Ink by Easy Ambient Sonic-Spray Ionization Mass Spectrometry. *Analyst* **2010**, *135* (4), 745–750.
- (66) Alberici, R. M.; Vendramini, P. H.; Eberlin, M. N. Easy Ambient Sonic-Spray Ionization Mass Spectrometry for Tissue Imaging. *Anal. Methods* **2017**, *9* (34), 5029–5036.
- (67) Mavroudakis, L. Development and Application of Desorption Sonic- Spray Ionization Mass Spectrometry for the Direct Analysis of Membrane Lipids in Microorganism Cells, University of Crete, 2018.
- (68) Mavrakis, E.; Mavroudakis, L.; Lydakis-Simantiris, N.; Pergantis, S. A. Investigating the Uptake of Arsenate by *Chlamydomonas Reinhardtii* Cells and Its Effect on Their Lipid Profile Using Single Cell ICP-MS and Easy Ambient Sonic-Spray Ionization-MS. *Anal. Chem.* **2019**, *91* (15), 9590–9598.
- (69) Vieler, A.; Wilhelm, C.; Goss, R.; Rosmarie, S.; Schiller, J. The Lipid Composition of the Unicellular Green Alga *Chlamydomonas Reinhardtii* and the Diatom *Cyclotella Meneghiniana* Investigated by MALDI-TOF MS and TLC. *Chem. Phys. Lipids* **2007**, *150*, 143–155.

- (70) Boudière, L.; Michaud, M.; Petroustos, D.; Rébeillé, F.; Falconet, D.; Bastien, O.; Roy, S.; Finazzi, G.; Rolland, N.; Jouhet, J.; Block, M. A.; Maréchal, E. Glycerolipids in Photosynthesis : Composition , Synthesis and Trafficking. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1837*, 470–480.
- (71) Riekhof, W. R.; Sears, B. B.; Benning, C.; Grossman, A. Annotation of Genes Involved in Glycerolipid Biosynthesis in *Chlamydomonas Reinhardtii*: Discovery of the Betaine Lipid Synthase BTA1 Cr. *Eukaryot. Cell* **2005**, *4* (2), 242–252.
- (72) Yang, D.; Song, D.; Kind, T.; Ma, Y.; Hoefkens, J.; Fiehn, O. Lipidomic Analysis of *Chlamydomonas Reinhardtii* under Nitrogen and Sulfur Deprivation. *PLoS One* **2015**, *10*, 1–16.
- (73) Jamers, A.; Blust, R.; Coen, W. De; Griffin, J. L.; Jones, O. A. H. An Omics Based Assessment of Cadmium Toxicity in the Green Alga *Chlamydomonas Reinhardtii*. *Aquat. Toxicol.* **2013**, *126*, 355–364.
- (74) Imam, S. H.; Buchanan, M. J.; Shin, H.; Snell, W. J. The *Chlamydomonas* Cell Wall: Characterization of the Wall Framework. *J. Cell Biol.* **1985**, *101* (17), 1599–1607.
- (75) Fernandez-Martinez, A.; Charlet, L. Selenium Environmental Cycling and Bioavailability : A Structural Chemist Point of View. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **2009**, *8*, 81–110.
- (76) Zhang, B.; Duan, G.; Fang, Y.; Deng, X.; Yin, Y.; Huang, K. Selenium(IV) Alleviates Chromium(VI)-Induced Toxicity in the Green Alga *Chlamydomonas Reinhardtii*. *Environ. Pollut.* **2021**, *272*, 116407.
- (77) Schiavon, M.; Ertani, A.; Parrasia, S.; Vecchia, F. D. Selenium Accumulation and Metabolism in Algae. *Aquatic Toxicology*. Elsevier B.V. August 1, 2017, pp 1–8.
- (78) Geoffroy, L.; Gilbin, R.; Simon, O.; Floriani, M.; Adam, C.; Pradines, C.; Cournac, L.; Garnier-laplace, J. Effect of Selenate on Growth and Photosynthesis of *Chlamydomonas Reinhardtii*. *Aquat. Toxicol.* **2007**, *83*, 149–158.
- (79) Fournier, E.; Adam-guillermin, C.; Potin-gautier, M.; Pannier, F. Selenate Bioaccumulation and Toxicity in *Chlamydomonas Reinhardtii*: Influence of Ambient Sulphate Ion Concentration. *Aquat. Toxicol.* **2010**, *97* (1), 51–57.