ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΑΣ ΟΡΓΑΝΟΑΡΣΕΝΙΚΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΤΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΟΥ ΗΛΕΚΤΡΟΨΕΚΑΣΜΟΥ-ΠΑΓΙΔΑΣ ΙΟΝΤΩΝ

ΧΑΛΑΜΠΑΛΑΚΗΣ ΧΡΙΣΤΟΦΟΡΟΣ

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΣΠΥΡΟΣ ΠΕΡΓΑΝΤΗΣ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

2004-2006

Πρόλογος και Ευχαριστίες

Αυτή η εργασία αποτελεί τη διατριβή μου στα πλαίσια του γενικού μεταπτυχιακού προγράμματος του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Περιβαλλοντικών Χημικών Διεργασιών (ECPL), με επιβλέποντα καθηγητή τον κ. Σπύρο Περγαντή και έλαβε χώρα το ακαδημαϊκό έτος 2004-2005. Η εργασία χωρίζεται σε δύο μέρη, στο πρώτο μέρος μελετάται η συμπεριφορά πρότυπων οργανικών ενώσεων αρσενικού κατά την ανάλυσή τους με διαδοχική φασματομετρία μάζας ηλεκτροψεκασμού ιοντικής παγίδας (electrospray-ion trap-mass spectrometry: ES-IT-MS^n, n=1-6). Σκοπός ήταν να χαρακτηρισθούν τα ιόντα-θραύσματα αυτών, τα οποία χρησιμοποιούνται για να προσδιορισθούν αυτές τις ενώσεις σε περιβαλλοντικά και βιολογικά δείγματα. Το δεύτερο μέρος περιγράφει την ανάπτυξη ποιοτικού και ποσοτικού πρωτόκολλου ανάλυσης για το αρσενοβιτάνιο με την χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης και διαδοχικής φασματομετρίας μάζας ηλεκτροψεκασμού ιοντικής παγίδας (HPLC-ES-IT-MS/MS), και την εφαρμογή του σε πρότυπο υλικό αναφοράς (standard reference material) DORM-2, με κύριο σκοπό να εξεταστούν οι δυνατότητες του συγκεκριμένου φασματόμετρου μάζας ως προς την ποσοτική ανάλυση πραγματικών δειγμάτων, αφού ανάλογη μελέτη δεν έχει γίνει στο παρελθόν.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Σπύρο Περγαντή που μου έδωσε την δυνατότητα να εργαστώ στο εργαστήριο του και για το γεγονός ότι αποτέλεσε δάσκαλος για μένα πάνω στην φασματομετρία μάζας και στην αναλυτική χημεία κατά την διάρκεια της εργασίας μου. Επίσης ευχαριστώ τους κ. Ευριπίδη Στεφάνου και Παντελή Τρικαλίτη που δέχτηκαν να είναι η επιτροπή της εξέτασής μου, την οικογένεια μου και τους φίλους μου για την συμπαράσταση τους καθώς και όλα τα παιδιά που εργάστηκαν την ίδια περίοδο με εμένα στο εργαστήριο του κ. Σπύρου Περγαντή, τόσο για το όμορφο κλίμα εργασίας που είχαμε δημιουργήσει όσο και για τις πολύτιμες συζητήσεις που είχαμε πάνω σε θέματα χημείας.

Περιεχόμενα

1 Εισαγωγή στη χημεία του αρσενικού.....5

1.1 Εισαγωγή.....5

1.2 Το αρσενικό στο περιβάλλον.....5

1.3 Χρήσεις του αρσενικού.....8

1.4 Μεταβολισμός του αρσενικού.....8

1.5 Τοξικότητα του αρσενικού.....10

1.6 Αναλυτικές τεχνικές για τον ειδοπροσδιορισμό του αρσενικού σε περιβαλλοντικά δείγματα.....12

2 Φασματομετρία μάζας ηλεκτροψεκασμού με ιοντική παγίδα.....14

2.1 Εισαγωγή.....14

2.2 Ηλεκτροψεκασμός.....15

2.2.1 Βασική διαδικασία.....15

2.2.2 Ο ηλεκτροψεκασμός σαν ηλεκτροχημική διαδικασία.....17

2.2.3 Τρόποι ιονισμού του αναλύτη στον ηλεκτροψεκασμό.....19

2.2.4 Σημαντικά χαρακτηριστικά αναλύτη και διαλύματος που επηρεάζουν την απόκριση στον ηλεκτροψεκασμό.....21

2.3 Το σύστημα μεταφοράς των ιόντων από την πηγή ιονισμού στην ιοντική παγίδα.....26

2.4 Ιοντική παγίδα και ανάλυση ιόντων.....28

2.4.1 Παγίδευση ιόντων.....28

2.4.2 Εξαγωγή ιόντων.....30

2.4.3 Απομόνωση και θραύση ιόντων.....33

3 Διαδοχική φασματομετρία μάζας ηλεκροψεκασμού-ιοντικής παγίδας (ES-IT-MS^n, n=1–6) οργανικών ενώσεων αρσενικού.....35

3.1 Εισαγωγή.....35

3.2 Πειραματικό.....40

3.2.1 Χημικές ενώσεις και Μέθοδοι.....40

3.2.2 Οργανολογία 41

3.3 Ανάλυση Αποτελεσμάτων.....42

3.3.1 d_3–Αρσενοβιτάνιο, $CD_3(CH_3)_2As^+CH_2COOH$.....42

3.3.2 d–Αρσενοβιτάνιο, $(CH_3)_3As^+CH_2COOD$.....53
3.3.3 d_9-Τετραμεθυλαρσενικικό ιόν, $(CD_3)_3As^+(CH_3)$.....55
3.3.4 d_3-Διμεθυλαρσενικικό οξύ, $(CD_3)CH_3AsOOH$.....59
3.3.5 5΄-Διμεθυλαρσενικική αδενοσίνη.....60
3.3.6 5΄-τριμεθυλαρσενικική-1΄-μέθοξυ-ριβόζη.....68
3.4 Συμπεράσματα.....76
4 Ανίχνευση του αρσενοβιτανίου, σε Πρότυπο Υλικό Αναφοράς Dorm–2.....79
4.1 Εισαγωγή.....79
4.2 Πειραματικό.....79
4.2.1 Χημικές ενώσεις και Μέθοδοι.....79
4.2.2 Οργανολογία.....80
4.3 Ανάλυση Αποτελεσμάτων.....82
4.4 Συμπεράσματα.....83
5 Ποσοτικός προσδιορισμός του αρσενοβιτανίου σε Πρότυπο Υλικό Αναφοράς Dorm–2.....85
5.1 Εισαγωγή.....85
5.2 Πειραματικό.....87
5.2.1 Χημικές ενώσεις και Πρότυπο Υλικό Αναφοράς.....87
5.2.2 Προετοιμασία Δειγμάτων.....88
5.2.3 Υγρή Χρωματογραφία.....88
5.2.4 Φασματομετρία Μάζας.....89
5.3 Ανάλυση Αποτελεσμάτων.....90
5.3.1 Βελτιστοποίηση πειραματικών παραμέτρων.....90
5.3.2. Καμπύλες Βαθμονόμησης.....96
5.3.3 Ποσοτικός προσδιορισμός αρσενοβιτανίου από καμπύλη βαθμονόμησης με εύρος 10-100 ng/mL 100
5.3.4 Ποσοτικός προσδιορισμός του αρσενοβιτανίου από καμπύλη βαθμονόμησης με εύρος από 100–500 ng/mL.... 107
5.4 Συμπεράσματα.....115
6 Αναφορές.....118

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1
Εισαγωγή στη Χημεία Αρσενικού

1.1 Εισαγωγή

Το αρσενικό ανακαλύφθηκε το 1250 μ.Χ. από τον A.D. Magnus και κατατάσσεται 20ο στην σειρά αφθονίας των στοιχείων στον φλοιό της γης [1]. Βρίσκεται στην 15η ομάδα και στην 4η περίοδο του περιοδικού πίνακα των στοιχείων, με ατομική δομή: [Ar] $3d^{10}4s^{2}4p^{3}$, είναι μονοϊσοτοπικό με σχετική ατομική μάζα 75 ατομικές μονάδες μάζας (amu). Οι σταθερές οξειδωτικές καταστάσεις στις οποίες μπορεί να βρεθεί είναι η +3 και η +5 [2]. Πριν την παρέμβαση του ανθρώπου, το αρσενικό κατανεμόταν μεταξύ του φλοιού της γης, του χώματος, του νερού, του αέρα και των ζωντανών οργανισμών μέσω φυσικών διαδικασιών όπως η αποσάθρωση ορυκτών, η βροχή, η βιολογική και ηφαιστειακή δραστικότητα. Παρόλα αυτά η εκμετάλλευση των φυσικών πόρων, που περιλαμβάνει διαδικασίες καύσης υλών, καθώς επίσης και η χρήση υλικών που περιέχουν αρσενικό από τον άνθρωπο, έχουν σαν συνέπεια την ανακατανομή του στοιχείου στο περιβάλλον. Το ενδιαφέρον με αυτό το στοιχείο επεκτείνεται σε πολλά πεδία όπως αυτό της βιοχημείας, της τοξικολογίας, των γεωργικών καλλιεργειών, της βιομηχανίας και του περιβάλλοντος. Σε αυτό το μέρος της εργασίας παρουσιάζεται μία σύντομη ανασκόπηση στα βασικά σημεία της παρουσίας και του ρόλου του αρσενικού στο περιβάλλον και στα βιολογικά συστήματα.

1.2 Το Αρσενικό στο Περιβάλλον

Το αρσενικό ανευρίσκεται στην επιφάνεια της γης σε ποσοστό 1% [3]. Κυρίως περιέχεται σε συγκεντρώσεις από 0.5-2.5 mg/Kg και σε ορυκτά όπως είναι ο σφαλερίτης και ο χαλκοπυρίτης [4,5]. Επίσης απαντάται σε ορυκτά πλούσια σε σίδηρο και μαγνήσιο, ενώ η ύπαρξη του συνδέεται άμεσα με ηφαιστειογενή πετρώματα [6]. Στο έδαφος, το αρσενικό συναντάται κυρίως σε ανόργανη μορφή (αρσενικώδη (arsenite), As^{III}, AsO_2^- και AsO_3^{3-} και αρσενικικά (arsenate), As^{V}, AsO_4^{3-}), όπου βρίσκεται σε υψηλότερη συγκέντρωση (0.1-40 mg/Kg) από ότι στα ορυκτά και σε περισσότερες μορφές ανάλογα

με τις συνθήκες [7,8]. Σε οξειδωτικές συνθήκες και αερόβια συστήματα, το αρσενικό είναι στην οξειδωτική κατάσταση +5 και είναι απορροφημένο στο χώμα μαζί με οξείδια/υδροξείδια του μαγνησίου. Σε αναγωγικές συνθήκες υπάρχει σε μορφή αρσενικωδών, σε συνθήκες όπου μπορεί να βιομεθυλιωθεί από μικροοργανισμούς υπάρχει και ως μονομεθυλαρσενικικό οξύ (monomethylarsonic acid: MMA), δυμεθυλαρσενικικό οξύ (dimethylarsinic acid: DMA), οξείδιο της τριμεθυλαρσίνης (trimethylarsine oxide: TMAO) που θεωρούνται ενδιάμεσα προϊόντα, ενώ σαν τελικό προϊόν είναι η τριμεθυλαρσίνη (Me_3As) σύμφωνα με τον προτεινόμενο μηχανισμό της βιομεθυλίωσης από τον Challenger [9]. Αυτή η βιομεθυλίωση λαμβάνει χώρα στην διεπιφάνεια νερού-εδάφους υπό την επίδραση μικροοργανισμών όπως μύκητες του γένους *Scopulariopsis breviculis* και *Penicillium brevicaule,* με τον δότη της μεθυλομάδας από τους μύκητες να είναι η S-αδενοσυλομεθειονίνη [10].

Στα φυσικά νερά το αρσενικό βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις της τάξης των μερικών μg As /L (ppb). Η μέγιστη αποδεκτή συγκέντρωση του αρσενικού στο πόσιμο νερό είναι 50 μg/L ενώ η συνιστάμενη ποσότητα από EPA και WHO είναι 10 μg/L [11,12]. Επιπλέον βρίσκεται στο θαλάσσιο νερό σε συγκεντρώσεις από 1-8 μg/L καθώς επίσης και στα υπόγεια νερά [13-18]. Στα θαλάσσια οικοσυστήματα, κυρίως στους θαλάσσιους οργανισμούς, το αρσενικό βρίσκεται σε πιο πολύπλοκες ενώσεις όπως το τετραμεθυλαρσενικικό ιόν, το αρσενοβιτάνιο, την αρσενοχολίνη, τα αρσενοσάκχαρα καθώς και τα αρσενολιπίδια [19]. Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι η συγκέντρωση του αρσενικού στους θαλάσσιους οργανισμούς είναι κατά πολύ υψηλότερη απ' ότι στο νερό, συνήθως κατά τρεις τάξεις μεγέθους [20-22]. Σε πρόσφατη μελέτη χαρακτηρίστηκαν πάνω από 20 ενώσεις του αρσενικού σε θαλάσσια υλικά αναφοράς [23], υποδεικνύοντας την ποικιλομορφία των ενώσεων του αρσενικού στους θαλάσσιους οργανισμούς. Σε είδη όπως είναι τα μύδια και διάφορα άλλα οστρακοειδή αλλά και σε ψάρια έχει βρεθεί ότι η κύρια μορφή του αρσενικού είναι το αρσενοβιτάνιο, υποστηρίζοντας κατά αυτό τον τρόπο την άποψη ότι το αρσενοβιτάνιο είναι το κύριο προϊόν του κύκλου του αρσενικού στους θαλάσσιους οργανισμούς [24-28]. Μία άλλη ομάδα ενώσεων του αρσενικού είναι τα αρσενοσάκχαρα τα οποία βρίσκονται κυρίως σε θαλάσσια άλγη (π.χ. φύκια) στο μεγαλύτερο ποσοστό (μέχρι και 80%) του ολικού αρσενικού σε αυτά [29-31]. Η προέλευση αυτών των ενώσεων σύμφωνα με τους

Edmonds και Francesconi φαίνεται να ξεκινά από το κύριο προϊόν βιομεθυλίωσης του αρσενικού, το διμεθυλαρσενικικό οξύ, DMA, και σε αυτή την περίπτωση η S-αδενοσυλομεθειονίνη είναι δότης της ομάδας της αδενοσίνης, σχηματίζοντας έτσι το ενδιάμεσο μεταβολίτη για την περαιτέρω βιοσύνθεση των αρσενοσακχάρων [32]. Επίσης τα αρσενοσάκχαρα έχουν βρεθεί και σε νεφρά γιγάντιων οστρακοειδών [33,34]. Είναι πλέον αποδεκτό ότι η παρουσία των αρσενοσακχάρων σε αυτά οφείλεται στην συμβίωση μονοκύτταρων φυκιών στον μανδύα των οστρακοειδών, και αυτά τα φύκια είναι που βιοσυνθέτουν τα αρσενοσάκχαρα [2]. Παρόλα αυτά στα νεφρά των οστρακοειδών έχουν ανιχνευτεί αρσενοσάκχαρα που δεν έχουν ανιχνευτεί στα φύκια, γεγονός που υποστηρίζει την άποψη ότι τα οστρακοειδή μεταβολίζουν περαιτέρω τα αρσενοσάκχαρα που παράγονται από τα φύκια [33]. Πρόσφατα ο Edmonds, η McSheehy και οι συνεργάτες τους συνέδεσαν αυτόν το μεταβολισμό των αρσενοσακχάρων στα νεφρά των οστρακοειδών με την παραγωγή του κύριου μεταβολίτη του αρσενικού, το αρσενοβιτάνιο στους ζωντανούς θαλάσσιους οργανισμούς, λαμβάνοντας υπόψη τους τις δομές των αρσενικών ενώσεων που ανίχνευσαν σε δείγματα νεφρών [33].

Στον αέρα το αρσενικό βρίσκεται κυρίως απορροφημένο σε σωματειακή ύλη και συνήθως είναι με την μορφή μίγματος αρσενικωδών και αρσενικικών. Η έκθεση του ανθρώπου στο αρσενικό που βρίσκεται στον αέρα θεωρείται πολύ χαμηλή και σε φυσιολογικά επίπεδα η συγκέντρωση του αρσενικού στον αέρα κυμαίνεται από 0.4–30 ng/m^3[35].

Το αρσενικό συναντάται τόσο στο χερσαίο φυτικό όσο και στο ζωικό βασίλειο. Στα φυτά και στα ζώα βρίσκεται σε διάφορες ποσότητες ανάλογα με την έκθεσή τους στο αρσενικό και οι συγκεντρώσεις του στα φυτά συνήθως κυμαίνονται από 0.001-5 μg/g [36]. Η δράση του είναι συσσωρευτική τόσο στους ιστούς των φυτών (π.χ. μανιτάρια) όσο και των ζωικών οργανισμών. Στα ζώα εντοπίζεται κυρίως σε θηλαστικά (π.χ. πρόβατα) όπου συσσωρεύεται σε ιστούς εκτομών όπως τα νύχια και τα μαλλιά, σε συγκέντρωση μικρότερη από 0.3 μg/g [37]. Όσο αφορά τον άνθρωπο, το αρσενικό περιέχεται στο ανθρώπινο σώμα σε συνολική ποσότητα 3-4 mg και τείνει να αυξάνεται με την ηλικία [38,39].

1.3 Χρήσεις του Αρσενικού

Από την ολική παραγωγή του αρσενικού, υπολογίζεται ότι περίπου το 97% χρησιμοποιείται σε βιομηχανικά προϊόντα ενώ το υπόλοιπο 3% στην μεταλλουργία σε διάφορα αρσενικικά κράματα [40]. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται τόσο σαν εντομοκτόνο με την μορφή Ca_3AsO_3 ή H_3AsO_3, όσο και σαν ζιζανιοκτόνο με την μορφή Na_3AsO_3 [41-46]. Επιπλέον ενώσεις του έχουν χρησιμοποιηθεί σαν ξηραντικά μέσα του βαμβακιού όπως είναι το αρσενικικό οξύ, καθώς και σαν συντηρητικά ξύλου [45,47]. Επίσης χρησιμοποιείται σαν πρόσθετο σε τροφές (feed additives) κυρίως με την μορφή υποκατεστημένων φαινυλο-αρσενικών οξέων [36]. Επιπλέον, πρόσφατα έχει δοθεί έγκριση από το FDA για την χρησιμοποίηση του τριοξειδίου του αρσενικού σαν φάρμακο για την καταπολέμηση ορισμένων μορφών λευχαιμίας.

1.4 Ο Μεταβολισμός του Αρσενικού

Οι άνθρωποι εκθέτονται στο ανόργανο καθώς και οργανικό αρσενικό μέσω της τροφής, του νερού και άλλων περιβαλλοντικών μέσων. Κάθε ένωση του αρσενικού χαρακτηρίζεται από τις δικές της φυσικοχημικές ιδιότητες και τη δικιά της βιοδιαθεσιμότητα με αποτέλεσμα η κινητική και ο μεταβολισμός των ενώσεων του αρσενικού να είναι ένα σύνθετο θέμα. Η κύρια δίοδος του αρσενικού *in vivo* πραγματοποιείται μέσω του αναπνευστικού συστήματος, με την εισπνοή σκόνης και καπνών, καθώς επίσης και στοματικά, από το φαγητό και το νερό. Επίσης έχει αναφερθεί και δερματική απορρόφηση του αρσενικού αλλά με χαμηλές ταχύτητες [38].

Η βιοδιαθεσιμότητα του αρσενικού που εισάγεται σε ένα βιολογικό σύστημα εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά αυτού του συστήματος. Έτσι η διάχυση του αίματος, τα χαρακτηριστικά των μεμβρανών και οι συγγένεια των ιστών για το αρσενικό, καθορίζουν την κατανομή του αρσενικού και των μορφών του στους διάφορους ιστούς. Δύο παράγοντες πρέπει να ληφθούν υπόψη για την τύχη του αρσενικού που εισάγεται σε έναν οργανισμό. Πρώτον, τις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις που συμβαίνουν μεταξύ του ανόργανου As^{III} και As^{V} στο πλάσμα και δεύτερο οι επακόλουθες αντιδράσεις

μεθυλίωσης του αρσενικού, καθώς το ανόργανο αρσενικό έχει την τάση να βιομεθυλιώνεται στον άνθρωπο. Το κύριο σημείο αυτής της βιομεθυλίωσης φαίνεται να είναι στο συκώτι, όπου η αρσενο-μεθυλοτρανσφεράση μεσολαβεί στην διαδικασία της μεθυλίωσης και η S-αδενοσυλομεθειονίνη είναι ο δότης της μεθυλικής ομάδας, ενώ η ανοιγμένη γλουταθειώνη (GSH) δρα σαν βασικός συν-παράγοντας [2]. Έτσι τα ανόργανα είδη μεθυλιώνονται σε MMA. Κατά την κυκλοφορία του MMA στο πλάσμα μεθυλιώνεται περαιτέρω σε DMA, ενώ το DMA αποβάλλεται μέσω ούρων χωρίς άλλη μεταβολή. Επομένως, σαν κύριος μεταβολίτης του αρσενικού είναι το DMA στα ζώα, ενώ στους ανθρώπους από το ολικό αρσενικό που αποβάλλεται στα ούρα το 20% είναι DMA, 20% είναι MMA και το 60% είναι ανόργανο αρσενικό [48,49]. Επίσης τα $MMAs^{V}$ και $DMAs^{V}$ όπου το αρσενικό βρίσκεται σε οξειδωτική κατάσταση +5, μπορούν να αναχθούν σχηματίζοντας τα αντίστοιχα $MMAs^{III}$ και $DMAs^{III}$ όπου το αρσενικό βρίσκεται σε οξειδωτική κατάσταση +3 [50,51].

Αν και ο κύριος τρόπος απομάκρυνσης του αρσενικού από τους οργανισμούς γίνεται μέσω των ούρων, δεν είναι ο μοναδικός. Εφόσον το αρσενικό βρίσκεται σε ιστούς πλούσιους σε κερατίνη όπως τα μαλλιά και τα νύχια, αυτές οι εκτομές μπορούν να θεωρηθούν ως δίοδοι έκκρισης του αρσενικού από τους οργανισμούς [38,52]. Έτσι για την εύρεση της ποσότητας του αρσενικού σε έναν οργανισμό, μπορούν να αναλυθούν δείγματα από τα μαλλιά, τα νύχια, τα ούρα και το αίμα, ανάλογα με το αν επιθυμείται να υπολογιστεί η μακροχρόνια ή η πρόσφατη έκθεση του οργανισμού σε ποσότητες αρσενικού. Είναι χαρακτηριστικό ότι το αρσενικό στην τρισθενή του μορφή αποθηκεύεται σε ιστούς πλούσιους σε κερατίνη, με αποτέλεσμα η ποσότητα του αρσενικού σε αυτούς να είναι ενδεικτικό της μακροχρόνιας έκθεσης του οργανισμού στο αρσενικό [52]. Η μέτρηση του αρσενικού στο αίμα μπορεί να αποτελέσει ένδειξη της πρόσφατης έκθεσης του οργανισμού σε αρσενικό (π.χ. δηλητηρίαση), αφού το ανόργανο αρσενικό έχει την τάση να απομακρύνεται γρήγορα από το αίμα [53]. Επιπλέον η πρόσφατη έκθεση ενός οργανισμού στο αρσενικό, μπορεί να υπολογιστεί και από την μέτρηση συγκεκριμένων μεταβολιτών του αρσενικού στα ούρα αφού το αρσενικό μεταβολίζεται πολύ γρήγορα. Σε αυτή την περίπτωση όμως, απαιτείται μεγάλη προσοχή αφού οι κύριοι μεταβολίτες του αρσενικού στον άνθρωπο, επίσης περιέχονται σε πολλά τρόφιμα (π.χ. θαλασσινά), όπως το DMA και MMA, και εκκρίνονται στα ανθρώπινα

ούρα χωρίς μεταβολή. Έτσι είναι πιθανόν να γίνει λανθασμένος υπολογισμός για την πρόσφατη έκθεση ενός οργανισμού στο αρσενικό εκτός αν ο δότης του δείγματος έχει ακολουθήσει αυστηρή δίαιτα στην οποία δεν περιλαμβάνονται θαλασσινά [54-57].

1.5 Τοξικότητα του Αρσενικού

Η τοξικότητα του αρσενικού, είναι κυρίως συνάρτηση της χημικής μορφής και της οξειδωτικής του κατάστασης. Η σειρά μειωμένης τοξικότητας για τις ενώσεις του αρσενικού είναι: αρσίνη(AsH_3) > ανοργ.As^{III} > οργ.As^{III} > ανοργ.As^{V} > οργ.As^{V} [58,59]. Αυτό που είναι γενικά αποδεκτό είναι ότι οι ανόργανες μορφές του αρσενικού είναι πιο τοξικές από τις οργανικές, καθώς και το τρισθενές αρσενικό είναι πιο τοξικό από το πεντασθενές [60,61].

Μια σημαντική δράση του ανόργανου As ως τοξικό στοιχείο είναι η αναστολή της δράσης ενζύμων στον άνθρωπο [62]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η αρνητική επίδραση στα ένζυμα που συμμετέχουν στον κύκλο του κιτρικού οξέος και πιο συγκεκριμένα η αναστολή του συμπλέγματος της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης. Η δράση του αρσενικού σαν αναστολέας συνίσταται στον σχηματισμό δεσμών μεταξύ του ανόργανου As^{III} και των γειτονικών θειολικών ομάδων του λιποαμιδίου σχηματίζοντας κατά αυτό τον τρόπο ένα χειλικό σύμπλοκο το οποίο εμποδίζει την επανοξείδωση αυτής της ομάδας η οποία είναι απαραίτητη για την συνέχιση της ενζυματικής δραστικότητας. Σαν αποτέλεσμα αυτής της δράσης του αρσενικού είναι η αυξημένη συγκέντρωση πυροσταφιλικού στο αίμα, η παραγωγή ATP από τα κύτταρα να μειώνεται και τελικά το κύτταρο να καταστρέφεται [63,64].

Αν και το As^{III} θεωρείται πιο τοξικό από το As^{V}, έχει βρεθεί ότι το As^{V} ως αρσενικικά μπορεί να εμποδίσει την διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση, ATP παράγεται από το ADP, καθώς το NADPH οξειδώνεται. Το αρσενικικά μπορούν κατά την διαδικασία αυτή να σχηματίσουν τον αρσενικό εστέρα του ADP, το οποίο δεν είναι σταθερό και υπόκειται σε μη-ενζυμική υδρόλυση. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται αρσενόλυσης [65,66]. Η ικανότητα των αρσενικικών να δρουν ανταγωνιστικά της φωσφορικής ομάδας έχει σαν συνέπεια τα

αρσενικικά να μπορούν να αντικαταστήσουν τις φωσφορικές ομάδες στο DNA, και έτσι να αναστέλλεται η διαδικασία επιδιόρθωσης του DNA [67].

Ένας σημαντικός παράγοντας της τοξικότητας του αρσενικού είναι η χρονική διάρκεια της έκθεσης ενός οργανισμού σε αυτό. Επειδή το αρσενικό μεταβολίζεται από τον άνθρωπο, μακροχρόνια έκθεση στο αρσενικό σημαίνει και μακροχρόνια έκθεση στα μεθυλιωμένα και διμεθυλιωμένα παράγωγα του αρσενικού [2]. Ενδεικτικό είναι ότι το $MMAs^{III}$, ένας μεταβολίτης του ανόργανου αρσενικού, έχει βρεθεί ότι είναι 26 φορές πιο τοξικό απ' ότι το ανόργανο αρσενικό στα ανθρώπινα επιφανειακά λευκοκύτταρα [68]. Επίσης από *in vitro* μελέτες έχει βρεθεί ότι τα $MMAs^{III}$ και $DMAs^{III}$ επάγουν την καταστροφή του DNA στα ανθρώπινα επιφανειακά λευκοκύτταρα [72]. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, αφενός η αυξημένη ικανότητα μεθυλίωσης του αρσενικού από τα κύτταρα δεν σχετίζεται με την προστασία των κυττάρων από την τοξικότητα του αρσενικού, αφετέρου είναι πιθανό ότι τα $MMAs^{III}$ και $DMAs^{III}$ μπορεί να μην είναι τα μόνα οργανικά παράγωγα του αρσενικού που είναι τοξικά.

Η χρόνια έκθεση των οργανισμών στο αρσενικό έχει σαν αποτέλεσμα την παρουσία προβλημάτων υγείας. Έτσι, αναπνευστικά και πνευμονικά προβλήματα έχουν παρουσιαστεί όπως βρογχίτιδα, λαρυγγίτιδα και ρινίτιδα [73-78]. Καρδιοαγγειακά προβλήματα όπως θρόμβωση του μυοκαρδίου και καρδιακές αρρυθμίες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η ασθένεια Black Foot (BFD), η οποία χαρακτηρίζεται από σταδιακή απώλεια της κυκλοφορίας του αίματος στα άκρα και την ανάπτυξη γάγγραινας και έχει παρατηρηθεί ότι σχετίζεται με την έκθεση των οργανισμών στο αρσενικό, κυρίως στο πόσιμο νερό [38,73,66,79]. Επίσης αιματολογικά προβλήματα όπως αναιμία [80-82] και δερματικά προβλήματα όπως μελανίαση, υπερστιγματισμός και καρκίνος του δέρματος σχετίζονται με την έκθεση του οργανισμού στο ανόργανο αρσενικό [60,83-88]. Εκτός από τον καρκίνο του δέρματος, μελέτες έχουν δείξει στατιστική αύξηση των κρουσμάτων καρκίνου στο πνεύμονα, στο συκώτι και στη κίστη σε ανθρώπους που έχουν εκτεθεί σε αρσενικό [89-91].

1.6 Αναλυτικές τεχνικές για τον ειδοπροσδιορισμό του αρσενικού σε περιβαλλοντικά δείγματα

Οι αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τον ειδοπροσδιορισμό του αρσενικού είναι συνήθως συνδυασμός μίας μεθόδου διαχωρισμού και μίας φασματομετρικής μεθόδου ανίχνευσης. Σαν μέθοδοι διαχωρισμού κατά κύριο λόγο χρησιμοποιείται η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (high performance liquid chromatography: HPLC), αλλά και αέρια χρωματογραφία (gas chromatography: GC), χρωματογραφία υπερκρίσιμου ρευστού (supercritical fluid chromatography: SFC) [24,25] και ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς (capillary electrophoresis: CE) [92-94].

Η κύρια υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης που έχει χρησιμοποιηθεί είναι αυτή της χρωματογραφίας ιοντικού ζεύγους (κατιοντική και ανιοντική). Σαν συνηθισμένο κατιοντικό αντιδραστήριο είναι το τετραβουτυλαμμώνιο και χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των As^{III}, As^{V}, $MMAs^{V}$, $DMAs^{V}$ [95-97], ενώ για τον διαχωρισμό των αρσενοσακχάρων και του αρσενοβιτανίου έχει χρησιμοποιηθεί το τετρα-αιθυλαμμώνιο [98,99]. Επίσης με μεγάλη επιτυχία έχει χρησιμοποιηθεί και χρωματογραφία ιονανταλλαγής για τον διαχωρισμό των ειδών του αρσενικού [100-104]. Ανιοντική χρωματογραφία χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό ενώσεων όπως As^{III}, As^{V}, $MMAs^{V}$, $DMAs^{V}$, ενώ κατιοντική χρωματογραφία χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό του αρσενοβιτανίου, του οξειδίου της τριμεθυλαρσίνης και του τετραμεθυλαρσενικικού ιόντος. Τέλος θα πρέπει να αναφερθεί ότι συνδυασμός ειδών χρωματογραφίας έχει χρησιμοποιηθεί κυρίως για το διαχωρισμό ενώσεων του αρσενικού σε θαλασσινά, όπως χρωματογραφία ιονανταλλαγής και μοριακού αποκλεισμού [105-109], καθώς επίσης και ο συνδυασμός κατιοντικής με ανιοντική χρωματογραφία ιονανταλλαγής [109-112].

Σαν κύρια φασματομετρική τεχνική που έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση των ενώσεων του αρσενικού είναι η φασματομετρία ατομικής απορρόφησης φλόγας (FAAS), σε συνδυασμό με HPLC, κυρίως κατά την δεκαετία του 1980. Η χρήση αυτής της τεχνικής έχει εκλείψει καθώς χαρακτηρίζεται από χαμηλή ευαισθησία και υψηλό θόρυβο υποβάθρου για την ανίχνευση του αρσενικού. Επίσης η φασματομετρία ατομικής

εκπομπής επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (inductively coupled plasma atomic emission spectrometry: ICP-AES) σε συνδυασμό με HPLC έχει εφαρμοστεί με επιτυχία για τον ειδοπροσδιορισμό του αρσενικού [113-116]. Το βασικό πλεονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι ότι οι στήλες μπορούν να συνδεθούν απευθείας με το ICP-AES σύστημα καθώς η ταχύτητα ροής που χρησιμοποιείται από τις στήλες (1 mL/min) είναι συμβατή με αυτό. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται κυρίως για την ανάλυση ειδών του αρσενικού που βρίσκονται σε υψηλή συγκέντρωση, για χαμηλότερες συγκεντρώσεις όμως δεν παρέχει τα επιθυμητά επίπεδα ευαισθησίας και έτσι δεν χρησιμοποιείται [117-119].

Η κύρια σύγχρονη τεχνική που χρησιμοποιείται είναι η φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP-MS) σε συνδυασμό με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC-ICP-MS), λόγω των πολλών πλεονεκτημάτων που παρουσιάζει. Η εξαιρετική ευαισθησία, η πολυστοιχειακή ικανότητα ανάλυσης, η μεγάλη δυναμική περιοχή συγκεντρώσεων και η μέτρηση ισοτοπικής αναλογίας που χαρακτηρίζουν αυτή την τεχνική την έχουν καθιερώσει ως μία από τις πιο δημοφιλής για τον ειδοπροσδιορισμό του αρσενικού [120-128].

Αν και η τεχνική HPLC-ICP-MS όπως προαναφέρθηκε χρησιμοποιείται κατά κόρον, θα πρέπει να αναφερθεί ότι αδυνατεί να παρέχει δομικές πληροφορίες για τις υπό-ανίχνευση ενώσεις του αρσενικού, αφού η ανίχνευση των ενώσεων βασίζεται μόνο στους χρόνους κατακράτησης αυτών στην χρωματογραφική στήλη. Σε αντίθεση με αυτό, η διαδοχική φασματομετρία μάζας (MS/MS) ηλεκτροψεκασμού (electrospray: ES), όπως και η διαδοχική φασματομετρία μάζας (MS/MS) βομβαρδισμού με ταχέα άτομα (FAB) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να αποδώσουν δομές στις υπό-ανίχνευση ενώσεις του αρσενικού. Αυτές οι τεχνικές μπορούν να είναι συμβατές με τις ταχύτητες ροής που χρησιμοποιούνται στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, και έτσι ο συνδυασμός τους έχει χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμό και ανίχνευση των ενώσεων του αρσενικού σε περιβαλλοντικά και βιολογικά δείγματα [129-136].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Φασματομετρία μάζας ηλεκτροψεκασμού με ιοντική παγίδα (ES-IT-MS)

2.1 Εισαγωγή

Το φαινόμενο του ηλεκτροψεκασμού (ES) είναι γνωστό εδώ και εκατοντάδες χρόνια, αλλά μόλις στις αρχές του 20^{ου} αιώνα έγινε πλήρως κατανοητό [137]. Μετά από τριάντα χρόνια περίπου ο Malcom Dole και οι συνεργάτες του επέδειξαν την δυνατότητα της χρήσης του ηλεκτροψεκασμού ως τρόπο ιονισμού μορίων και έτσι ο ιονισμός μέσω ηλεκτροψεκασμού επινοήθηκε [138]. Παρόλα αυτά χρειάστηκε να περάσουν είκοσι χρόνια ώσπου ο John Fenn παρουσίασε για πρώτη φορά την χρήση του ηλεκτροψεκασμού για τον ιονισμό βιολογικών μορίων με μεγάλη μάζα και την ανάλυση αυτών με την φασματομετρία μάζας [139]. Αυτή η εργασία του είχε σαν αποτέλεσμα να κερδίσει μέρος του βραβείου Nobel Χημείας το 2002 και να διευρύνει τις δυνατότητες της φασματομετρίας μάζας καθώς κατάφερε να δημιουργήσει μία πηγή ιονισμού ικανή να παράγει ιόντα από ενώσεις μη-πτητικές και θερμικά ασταθείς, ικανή να παράγει πολλαπλά φορτισμένα ιόντα, κάνοντας έτσι πραγματικότητα τη δυνατότητα ανάλυσης πεπτιδίων και πρωτεϊνών με μεγαλύτερη ακρίβεια και ευαισθησία και με μικρότερο χρόνο ανάλυσης από ότι οι παραδοσιακές τεχνικές ανάλυσης βιολογικών μορίων όπως είναι η ηλεκτροφόρηση πηκτής [140]. Επίσης έκανε δυνατή την απευθείας ανάλυση ιόντων από διαλύματα δίνοντας την δυνατότητα παρακολούθησης αντιδράσεων και σε συνδυασμό με HPLC τον χαρακτηρισμό ενώσεων σε ιχνοποσότητες σε βιολογικά και περιβαλλοντικά δείγματα, όπως οργανομεταλλικές ενώσεις, σύμπλοκα, φάρμακα, φυσικά προϊόντα, ολιγονουκλεοτίδια, υδρογονάνθακες καθώς και άλλα μικρά μόρια [140].

Η τετραπολική ιοντική παγίδα σαν αναλυτής διαχωρισμού μαζών αναπτύχθηκε από τον Wolfgang Paul ο οποίος κέρδισε το Nobel Φυσικής για αυτήν την εργασία [141,142]. Στην αρχή της δεκαετίας του 1950, ανάπτυξε τις κύριες αρχές λειτουργίας της ιοντικής παγίδας, παρόλα αυτά την δεκαετία του 1980 σχεδιάστηκε από την εταιρία

Finnigan MAT η ιοντική παγίδα σαν ένα απλό στην χρήση όργανο κατάλληλο για ανάλυση μαζών [143]. Η ιοντική παγίδα σαν αναλυτής μαζών έχει την δυνατότητα να παγιδεύει ταυτόχρονα ιόντα με διαφορετικό λόγο m/z και κατόπιν να τα εξάγει διαδοχικά προς τον ανιχνευτή. Επίσης παρέχει την δυνατότητα για απομόνωση ιόντων συγκεκριμένης τιμής m/z και να πραγματοποιεί εκλεκτική θραυσματοποίηση σ' αυτά, παρέχοντας έτσι την δυνατότητα για πειράματα διαδοχικής θραυασματοποίησης. Δηλαδή την θραύση ενός ιόντος, την απομόνωση κάποιου από τα ιόντα θραύσματα και την περαιτέρω θραυσματοποίηση αυτού. Η διαδικασία αυτή μπορεί να γίνει διαδοχικά μέχρι και 10 φορές σε εμπορικά διαθέσιμα όργανα.

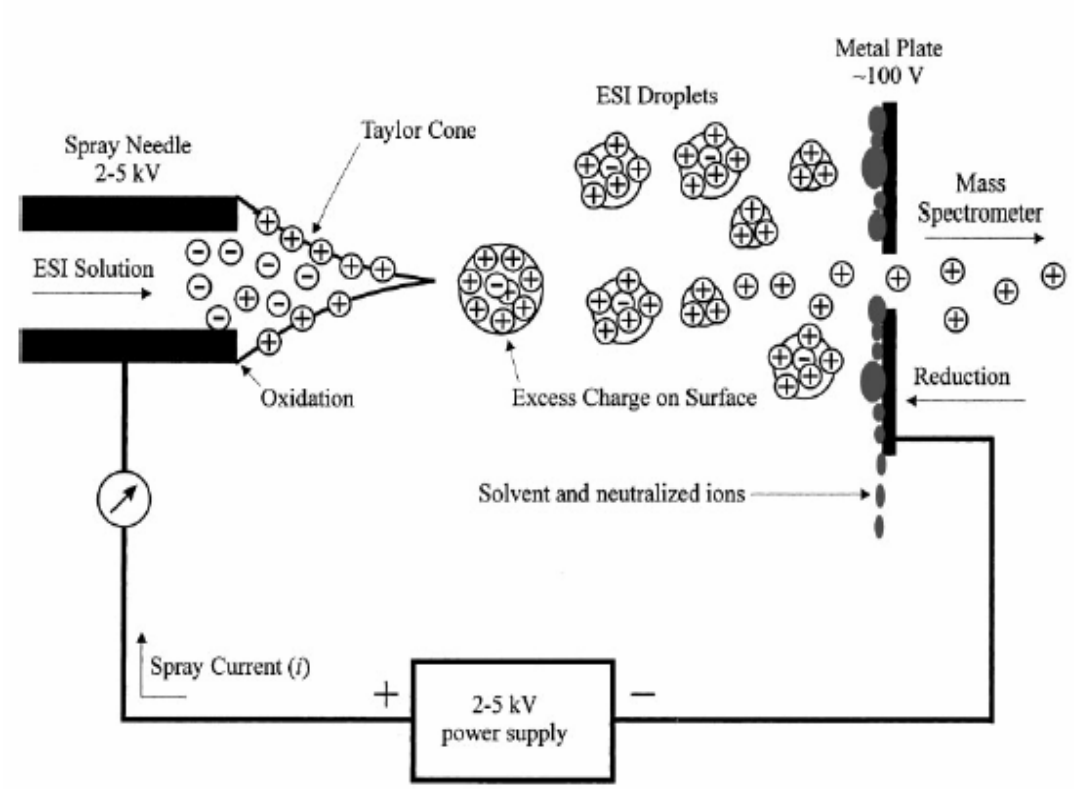
Σε αυτό το τμήμα της εργασίας παρουσιάζονται οι βασικές αρχές της λειτουργίας της φασματομετρίας μάζας ηλεκτροψεκασμού ιοντικής παγίδας καθώς επίσης και σημαντικά χαρακτηριστικά της, απαραίτητα για την πραγματοποίηση επιτυχής ανάλυσης.

2.2 Ηλεκτροψεκασμός

2.2.1 Βασική διαδικασία

Κατά τη διαδικασία του ηλεκτροψεκασμού, αραιό διάλυμα δείγματος εισάγεται σε έναν μεταλλικό τριχοειδή σωλήνα με την ταχύτητα ροής να κυμαίνεται από 0.1-10 μl/min. Μεταξύ αυτού του τριχοειδούς και ενός αντισταθμιστικού ηλεκτροδίου εφαρμόζεται διαφορά δυναμικού από 2-5 kV, τιμή ικανή να παράγει το ηλεκτρικό πεδίο που επιδρά στα φορτία του διαλύματος διαχωρίζοντας τα και συσσωρεύοντας τα θετικά ή τα αρνητικά φορτία (ανάλογα με το πρόσημο της τάσης που εφαρμόζεται στον τριχοειδή) στην άκρη του τριχοειδούς σχηματίζοντας τον "κώνο του Taylor". Αυτός ο κώνος είναι τμήμα του διαλύματος που προεξέχει από τον τριχοειδή και φέρει συσσωρεμένο φορτίο ή αλλιώς περίσσεια φορτίου δηλαδή το φορτίο που διαχωρίστηκε, στην επιφάνειά του. Καθώς το δυναμικό αυξάνει, το διάλυμα που σχηματίζει τον κώνο του Taylor ξεπερνά το σημείο Rayleigh [144], δηλαδή το σημείο εκείνο που η πίεση από τις απωστικές δυνάμεις μεταξύ των ιόντων εξισορροπείται από την επιφανειακή τάση του διαλύματος με συνέπεια ο κώνος να υφίστανται σχάση και να παράγονται φορτισμένα σταγονίδια (Σχήμα 2.1).

Αυτά τα σταγονίδια φέρουν την περίσσεια φορτίου στην επιφάνειά τους δηλαδή την περίσσεια φορτίου που βρισκόταν στην επιφάνεια του κώνου, και που περιλαμβάνει τα ιόντα που θα παραχθούν στην αέρια φάση. Για αυτή την διαδικασία έχουν προταθεί δυο κύριες θεωρίες. Σύμφωνα με την θεωρία της σχάσης Coulomb [145], τα σταγονίδια εξαιτίας της συνεχούς εξάτμισης του διαλύτη από αυτά, συρρικνώνονται αυξάνοντας έτσι τις απωστικές δυνάμεις μεταξύ των ιόντων τόσο ώστε να υφίστανται σχάση, παράγοντας έτσι μικρότερα σταγονίδια. Αυτά τα νέα μικρότερα σταγονίδια συρρικνώνονται και υφίστανται περαιτέρω σχάση. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται πολλές φορές μέχρι το σημείο που το κάθε σταγονίδιο να περιέχει μόνο ένα ιόν και έτσι με την εξάτμιση και των τελευταίων μορίων του διαλύτη παράγονται ιόντα στην αέρια φάση. Η εναλλακτική θεωρία εξάτμισης ιόντων [146] υποστηρίζει ότι λόγω εξάτμισης του διαλύτη τα σταγονίδια υφίστανται σχάση αλλά μέχρι το σημείο όπου οι απωστικές δυνάμεις των ιόντων στην επιφάνεια της σταγόνας αυξάνουν τόσο ώστε ιόντα να απελευθερώνονται στην αέρια φάση.



Σχήμα 2.1 Αναπαράσταση του διάταξης ηλεκτροψεκασμού για την παραγωγή θετικών ιόντων (από την αναφορά 179)

Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να σημειωθεί ότι η περίσσεια φορτίου που βρίσκεται στην επιφάνεια των παραγόμενων σταγονιδίων είναι αυτή που καταλήγει ως ιόντα στην αέρια φάση και διαφοροποιείται από τα αρνητικά και θετικά ιόντα που βρίσκονται στο εσωτερικό των σταγονιδίων και είναι εξουδετερωμένα από τα αντίστοιχα αντισταθμιστικά. Τα εξουδετερωμένα φορτία που βρίσκονται στο εσωτερικό των σταγονιδίων δεν φτάνουν στην αέρια φάση διότι για να γίνει κάτι τέτοιο απαιτείται να τους δοθεί ενέργεια υψηλότερη από την ελκτική ενέργεια Coulomb μεταξύ των ιόντων και των αντισταθμιστικών τους.

Κατά την διαδικασία του ηλεκτροψεκασμού εκτός από τα ιόντα του αναλύτη παράγονται και ένα πλήθος άλλων ιόντων από συσσωματώματα ιόντων του αναλύτη με μόρια του διαλύτη αλλά και συσσωματώματα μορίων του διαλύτη. Αυτό γίνεται διότι στο άκρο του τριχοειδή λαμβάνει χώρα αδιαβατική εκτόνωση του διαλύματος κατά την σχάση του κώνου και η θερμοκρασία μειώνεται προκαλώντας την συσσωμάτωση ιόντων, ιόντων-μορίων και μορίων-μορίων [147]. Για να γίνει αποδοτικότερος ο ιονισμός έχουν αναπτυχθεί τεχνικές όπου με την βοήθεια αερίων διασπώνται τα συσσωματώματα. Έτσι υπάρχει αέριο άζωτο στην περιοχή γύρω από το τριχοειδή (βοηθητικό αέριο, auxiliary gas) που βοηθά στην εξάτμιση του διαλύτη και επίσης αέριο άζωτο υπό πίεση να απελευθερώνεται γύρω από την άκρη του τριχοειδούς (εκνεφωτικό αέριο, sheath gas) βοηθώντας κατά αυτό τον τρόπο την σχάση του κώνου [148].

2.2.2 Ο ηλεκτροψεκασμός ως ηλεκτροχημική διαδικασία

Στο διάλυμα που εισάγεται στο τριχοειδή του ηλεκτροψεκασμού περιέχονται θετικά και αρνητικά ιόντα καθώς και ουδέτερα μόρια. Εφαρμόζοντας δυναμικό στον τριχοειδή τα θετικά με τα αρνητικά φορτία διαχωρίζονται με αποτέλεσμα να συσσωρεύεται κάποιο από αυτά στην άκρη του τριχοειδούς ανάλογα με το πρόσημο του δυναμικού που εφαρμόζεται. Έτσι αν εφαρμοστεί θετική τάση τα θετικά ιόντα κατά κύριο λόγο θα συσσωρευτούν στην άκρη του τριχοειδούς και συγκεκριμένα στην επιφάνεια του κώνου και θα το εγκαταλείψουν πηγαίνοντας στην αέρια φάση. Στην πράξη, το δυναμικό που εφαρμόζεται στον τριχοειδή είναι μια διαφορά δυναμικού που εφαρμόζεται μεταξύ του τριχοειδούς και του αντισταθμιστικού ηλεκτροδίου και αυτό

επιτυγχάνεται συνδέοντας μία ηλεκτρική πηγή μεταξύ του τριχοειδούς και του αντισταθμιστικού ηλεκτροδίου (Σχήμα 2.1). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός ολοκληρωμένου ηλεκτρικού κυκλώματος που αποτελείται από τον θετικό πόλο της ηλεκτρικής πηγής που μέσω ενός αγωγού συνδέεται με τον τριχοειδή, το κενό μεταξύ του τριχοειδούς και του αντισταθμιστικού ηλεκτροδίου, και τέλος το αντισταθμιστικό ηλεκτρόδιο που συνδέεται μέσω ενός αγωγού με τον αρνητικό πόλο της ηλεκτρικής πηγής. Για την σωστή λειτουργία του ηλεκτροψεκασμού θα πρέπει συνεπώς να εξασφαλίζεται η ηλεκτρική σταθερότητα του προαναφερόμενου ηλεκτρικού κυκλώματος. Αυτό σημαίνει ότι σταθερό ηλεκτρικό ρεύμα θα πρέπει να διαρρέει το κύκλωμα, δηλαδή καθώς φορτία απελευθερώνονται από τον τριχοειδή, για παράδειγμα θετικά ιόντα, την ίδια στιγμή ηλεκτρόνια φεύγουν από το διάλυμα μέσω του αγωγού και κατευθύνονται στην ηλεκτρική πηγή η οποία παρέχει αυτά τα ηλεκτρόνια προς το αντισταθμιστικό ηλεκτρόδιο. Τα ηλεκτρόνια που φεύγουν από το διάλυμα προέρχονται από την οξείδωση των χημικών ειδών στον τριχοειδή και αυτά τα ηλεκτρόνια όταν φτάσουν στο αντισταθμιστικό ηλεκτρόδιο ανάγουν τα Χημικές ενώσεις είδη που καταλήγουν σε αυτό (Σχήμα 2.1). Έτσι η ηλεκτρική σταθερότητα επιτυγχάνεται μέσω οξείδωσης που λαμβάνει χώρα στον τριχοειδή και η οποία είναι υπεύθυνη για την παροχή του φορτίου στο κύκλωμα [149].

Όσο φορτίο, δηλαδή ιόντα, απελευθερώνεται στην αέρια φάση, τόσο πρέπει να παρέχεται στο ηλεκτρικό σύστημα μέσω αναγωγής ή οξείδωσης ανάλογα με το αν το σύστημα ιονισμού λειτουργεί για ανίχνευση αρνητικών ή θετικών ιόντων αντίστοιχα. Έτσι όταν εφαρμόζεται θετική τάση στο τριχοειδή, θετικά ιόντα απελευθερώνονται ενώ στο τριχοειδή λαμβάνει χώρα οξείδωση, για την παραγωγή ηλεκτρονίων που τροφοδοτούν και διατηρούν την ισορροπία του κυκλώματος. Σε αυτήν την ηλεκτροχημική αντίδραση, τα γραμμοϊσοδύναμα που καταναλώνονται (π.χ. θετικά ιόντα που απελευθερώνονται) είναι ίσα με τα γραμμοϊσοδύναμα που παράγονται κατά την οξείδωση και παρέχονται στο διάλυμα στον τριχοειδή, και το ρεύμα (που έτσι παραμένει σταθερό) που καταγράφεται από μια τέτοια διαδικασία είναι η ταχύτητα διαχωρισμού του φορτίου κατά τον ηλεκτροψεκασμό. Για την ανίχνευση των αρνητικών ιόντων, αρνητική τάση εφαρμόζεται στον τριχοειδή και η ηλεκτροχημική αντίδραση που συμβαίνει στο σύστημα του ηλεκτροψεκασμού είναι αναγωγή. Οι ηλεκτροχημικές

αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα και οι επιπτώσεις αυτών στο σύστημα του ηλεκτροψεκασμού περιγράφονται στο τμήμα 2.4 «Ιονισμός μέσω ηλεκτροχημικής οξείδωσης ή αναγωγής».

2.2.3 Τρόποι ιονισμού του αναλύτη στον ηλεκτροψεκασμό

2.2.3.1 *Διαχωρισμός φορτίου*

Όπως προαναφέρθηκε στην εισαγωγή τα ιόντα που παράγονται στην αέρια φάση, συνήθως προϋπάρχουν στο διάλυμα και μέσω του διαχωρισμού των φορτίων στην επιφάνεια του διαλύματος καταλήγουν στην αέρια φάση σύμφωνα με τους μηχανισμούς που έχουν προταθεί. Όταν ο αναλύτης είναι φορτισμένος τότε μπορεί να αποτελεί μέρος του φορτίου που διαχωρίζεται κατά την διαδικασία του ηλεκτροψεκασμού και κατά αυτό τον τρόπο να φτάνει στην αέρια φάση. Ο διαχωρισμός του φορτίου είναι η κύρια μέθοδος παραγωγής των ιόντων του αναλύτη στην αέρια φάση και κατά αυτό τον τρόπο ανόργανα ιόντα όπως νάτριο, καίσιο και χλώριο φτάνουν στην αέρια φάση. Τα οργανικά και βιολογικά μόρια που φέρουν βασικές ή όξινες λειτουργικές ομάδες όπως αμίνες ή καρβοξυλικά οξέα και είναι φορτισμένες μέσω προτωνίωσης ή αποπροτωνίωσης αντίστοιχα, μπορούν να είναι μέρος του φορτίου που διαχωρίζεται και έτσι να καταλήγουν ως ιόντα στην αέρια φάση.

2.2.3.2 *Σχηματισμός φορτισμένων παραγώγων του αναλύτη*

Όταν ο αναλύτης είναι πολικός και δεν φέρει κάποια βασική ή όξινη λειτουργική ομάδα τότε μπορεί να φορτιστεί μέσω σχηματισμού παραγώγων του αναλύτη με κάποιο άλλο ιόν. Στην ουσία, αυτός ο τρόπος ιονισμού του αναλύτη είναι μια ειδική περίπτωση της μεθόδου του διαχωρισμού φορτίου, εφόσον αυτό που γίνεται είναι η φόρτιση του αναλύτη μέσω σχηματισμού παραγώγων στο διάλυμα και έπειτα η μεταφορά αυτών των παραγώγων στην αέρια φάση μέσω της διαδικασίας του διαχωρισμού φορτίου. Έτσι ένα πολικό και ουδέτερο μόριο ή πολύ ασθενές οξύ, μπορεί να σχηματίσει ένα φορτισμένα αρνητικά παράγωγο με ιόντα χλωρίου τα οποία προέρχονται από κάποιον χλωριωμένο

διαλύτη, όπως το χλωροφόρμιο, παράγοντας ιόντα της μορφής $[M+Cl]^-$ όπου M ο αναλύτης [150]. Στην περίπτωση που ο αναλύτης είναι πολικός και ουδέτερος ή ασθενής βάση και επιδιώκεται να φορτιστεί θετικά, τότε αυτό γίνεται με σχηματισμό παραγώγων του αναλύτη με θετικά ιόντα όπως νάτριο ή λίθιο, τα οποία προέρχονται από την εισαγωγή μικρής ποσότητας των αντίστοιχων αλάτων στο διάλυμα (ή από προσμίξεις), παράγοντας ιόντα της μορφής, για παράδειγμα $[M+Na]^+$ [151,152].

2.2.3.3 *Ιονισμός του αναλύτη μέσω αντιδράσεων στην αέρια φάση*

Επειδή κατά τον ηλεκτροψεκασμό εκτός από τα ιόντα του αναλύτη παράγεται και ένα πλήθος άλλων ειδών όπως τα συσσωματώματα μορίων που αναφέρθηκαν στην βασική διαδικασία του ηλεκτροψεκασμού (παράγραφος 2.2.1) καθώς και ουδέτερα μόρια του διαλύτη και του αναλύτη, είναι δυνατόν να συμβούν αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών των ειδών [153-156], αφού ο ηλεκτροψεκασμός γίνεται σε ατμοσφαιρική πίεση, και να επηρεάσουν το σήμα του αναλύτη. Τέτοιες αλληλεπιδράσεις είναι κατά κύριο λόγο αντιδράσεις μεταφοράς πρωτονίων μεταξύ των ειδών που καταλήγουν στην αέρια φάση [157,158]. Έτσι μόρια τα οποία είναι πρωτονιωμένα - και συνεπώς φορτισμένα - στο διάλυμα, όταν εισέλθουν στην αέρια φάση μπορούν να «δώσουν» το πρωτόνιο, δηλαδή το φορτίο τους σε μόρια του αναλύτη ή του διαλύτη τα οποία δεν είναι φορτισμένα στο διάλυμα και έχουν μεγαλύτερη βασικότητα στην αέρια φάση. Κατά αυτόν τον τρόπο ουδέτερα μόρια του αναλύτη που παράγονται από τα σταγονίδια μπορούν να φορτιστούν, αποσπώντας πρωτόνιο από κάποιο άλλο είδος παραγόμενο από την διαδικασία του ηλεκτροψεκασμού και το οποίο είναι φορτισμένο, φέροντας σαν φορτίο πρωτόνιο.

Για να συμβεί κάτι τέτοιο θα πρέπει να παρατηρηθεί μία αντιστροφή στην βασικότητα των ενώσεων [155] στην αέρια φάση και αυτό μπορεί να γίνει διότι η βασικότητα των χημικών ενώσεων στην υγρή φάση δεν είναι απαραίτητο να είναι ίδια και στην αέρια φάση. Έτσι ενώσεις με αυξημένη συγγένεια για πρωτόνια στην αέρια φάση μπορεί να έχουν χαμηλή βασικότητα στην υγρή φάση. Αυτό το φαινόμενο αφενός μπορεί να βοηθήσει τον ιοντισμό του αναλύτη, όταν αυτός έχει μεγαλύτερη συγγένεια για πρωτόνια στην αέρια φάση από τον διαλύτη, αφετέρου να παρεμποδίσει τον ιοντισμό του όταν ο αναλύτης έχει μικρότερη συγγένεια για πρωτόνια από τον διαλύτη και

συνεπώς ο διαλύτης να αποσπά τα πρωτόνια από τον αναλύτη [156]. Επίσης θα πρέπει να διευκρινισθεί ότι η αντίδραση μεταφοράς πρωτονίου μπορεί να λάβει χώρα όχι μόνο μεταξύ μορίων διαλύτη-αναλύτη αλλά και μεταξύ όλων των ειδών των συσσωματωμάτων που παράγονται με μόρια του αναλύτη και με μόρια του διαλύτη.

2.2.3.4 *Ιονισμός μέσω ηλεκτροχημικής οξείδωσης ή αναγωγής*

Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο «ο ηλεκτροψεκασμός ως ηλεκτροχημική διαδικασία» αναγωγή ή οξείδωση είναι αναγκαία να συμβεί ώστε να παραχθούν ανηγμένα ή οξειδωμένα είδη σε συγκέντρωση ίση με εκείνη του φορτίου που διαχωρίζεται έτσι ώστε να διατηρηθεί η ηλεκτρική σταθερότητα του συστήματος [159]. Σε αυτές τις ηλεκτροχημικές αντιδράσεις μπορούν να συμμετέχουν ο αναλύτης, μόρια από τον ηλεκτρικό αγωγό του κυκλώματος καθώς και μόρια του διαλύτη. Έτσι μπορεί να παρατηρηθεί αλλαγή στην οξειδωτική κατάσταση του αναλύτη, οξείδωση του υλικού του ηλεκτρικού αγωγού και οξείδωση και /ή αναγωγή μορίων του διαλύτη (αυτό το τελευταίο είναι το πιο συνηθισμένο). Στην περίπτωση που συμβαίνει οξείδωση του ηλεκτρικού αγωγού, ιόντα Fe^{2+} από αυτόν οξειδώνονται σε ιόντα Fe^{3+} και αυτά δεν παρατηρούνται στο φάσμα διότι έχουν την τάση να βρίσκονται στο εσωτερικό των σταγονιδίων εξαιτίας της μεγάλης επιδιαλύτωσής τους, και έτσι να μην φτάνουν στην αέρια φάση [160].

2.2.4 Σημαντικά χαρακτηριστικά αναλύτη και διαλύματος που επηρεάζουν την απόκριση στον ηλεκτροψεκασμό

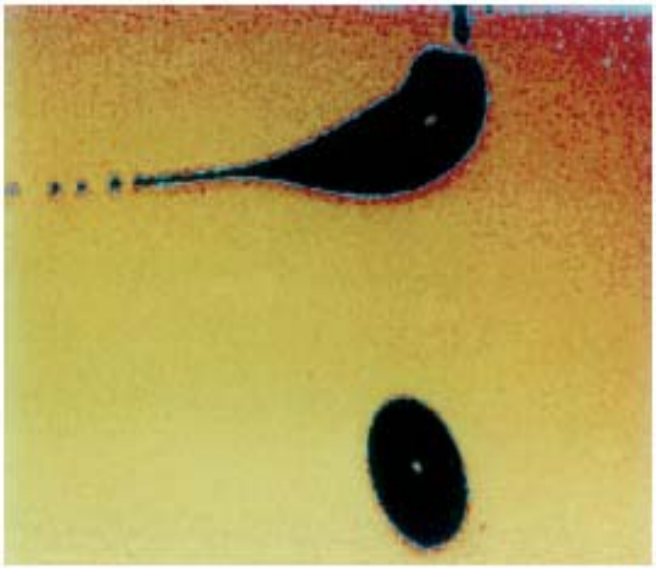
Στον ηλεκτροψεκασμό τα χαρακτηριστικά κάθε αναλύτη παίζουν σημαντικό ρόλο στην απόκριση του και είναι σημαντικό να κατανοηθεί το πως αυτά επηρεάζουν την ικανότητα του αναλύτη να βρεθεί ως ιόντα στην αέρια φάση διότι έτσι είναι δυνατό να επιτευχθεί μια επιτυχής ανάλυση. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα όπου δυο διαφορετικές χημικές ενώσεις ίδιας συγκέντρωσης στο διάλυμα που εξετάζεται δίνουν σήματα στον ηλεκτροψεκασμό διαφορετικής έντασης [161-165]. Αυτή η διακύμανση αποδίδεται στην δομή των ενώσεων που εξετάζονται, και κυρίως από το πόσο ο αναλύτης είναι διαλυτός στην σταγόνα που παράγεται καθώς και κατά πόσο είναι

επιφανειοδραστικός. Σε αυτή την παράγραφο αναλύονται οι παράμετροι που ευθύνονται για την διαφορετική απόκριση των χημικών ενώσεων κατά τον ιοντισμό στον ηλεκτροψεκασμό.

2.2.4.1 *Επιφανειακή δραστικότητα και διαδικασία σχάσης*

Η διαδικασία ιονισμού στον ηλεκτροψεκασμό γίνεται μέσω φαινομένων σχάσεων και εξάτμισης. Έχει φωτογραφηθεί η διαδικασία σχάσης δείχνοντας το σημείο Rayleigh όπου η σταγόνα παραμορφώνεται σχηματίζοντας έναν κώνο σε ένα μέρος της και μικρά πολλαπλά φορτισμένα σταγονίδια εκπέμπονται από κει (Σχήμα 2.2) [166], αφήνοντας την αρχική σταγόνα περισσότερο φτωχή σε φορτίο [144]. Κατά αυτό τον τρόπο, τα ιόντα που βρίσκονται στην επιφάνεια της αρχικής σταγόνας απελευθερώνονται όταν αυτή σχάζεται [167]. Έτσι αν οι ενώσεις δεν είναι επιφανειοδραστικές είναι πιθανό να μην καταλήξουν στην αέρια φάση. Αυτό που δεν είναι γνωστό είναι πόσες φορές γίνεται η σχάση κι αν κατά πόσο τα ιόντα παράγονται μέσω της σχάσης ή μέσω εξάτμισης από την επιφάνεια της σταγόνας. Το γεγονός ότι με την χρήση του νάνο-ηλεκτροψεκασμού πολλές ενώσεις ανιχνεύονται ενώ με τον ηλεκτροψεκασμό όχι, υποστηρίζει την θεωρία εξάτμισης ιόντων αφού κατά το νάνο-ES παράγονται αρχικά πιο μικρά σταγονίδια λόγω μικρότερης διαμέτρου του τριχοειδή (και ταχύτητα ροής) από τα οποία η εξάτμιση των ιόντων είναι πιο εύκολη [168,169].

Το γεγονός ότι η επιφανειακή δραστικότητα των ενώσεων που εξετάζονται παίζει σημαντικό ρόλο στην απόκριση δίνει την δυνατότητα να προβλεφθεί κατά πόσο κάθε ένωση είναι κατάλληλη για ανάλυση με την χρήση του ηλεκτροψεκασμού. Έτσι, ενώσεις πού έχουν αυξημένο μη πολικό (υδροφοβικό) χαρακτήρα έχουν την τάση να βρίσκονται στην επιφάνεια των παραγόμενων σταγονιδίων και έτσι να καταλήγουν πιο εύκολα σαν ιόντα στην αέρια φάση [170]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι ότι πεπτίδια με τις πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων να είναι υδρόφοβες δίνουν μεγαλύτερο σήμα από πεπτίδια με πλευρικές αλυσίδες περισσότερο υδρόφιλες [163]. Αυτή η τάση έχει επιβεβαιωθεί και από υπολογισμούς από τους οποίους προκύπτει μια γραμμική σχέση της απόκρισης του ηλεκτροψεκασμού με την μη πολική επιφάνεια των ενώσεων [171].



Σχήμα 2.2 Φορτισμένη σταγόνα καθώς φτάνει στο όριο Rayleigh και σχηματίζεται ο κώνος του Taylor όπου μικρά φορτισμένα σταγονίδια εκπέμπονται (από αναφορά 179).

2.2.4.2 *Ο ρόλος του pH του διαλύματος*

Οι χημικές ενώσεις που φέρουν βασικές ή όξινες ομάδες φορτίζονται στην διαδικασία του ηλεκτροψεκασμού μέσω πρωτονίωσης ή αποπρωτονίωσης αντίστοιχα. Αυτό, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το pH του διαλύματος είναι σημαντική παράμετρος για την επιτυχής φόρτιση. Έτσι, μόρια που φέρουν βασικές ομάδες πρωτονιώνονται πιο εύκολα σε όξινα διαλύματα, ενώ εκείνα που φέρουν όξινες ομάδες αποπρωτονιώνονται πιο εύκολα σε βασικά διαλύματα [172]. Αυτό, σε γενικές γραμμές είναι σωστό και χρησιμοποιείται αλλά είναι εξίσου πιθανό να συμβαίνει και το αντίθετο. Από βασικά διαλύματα να παράγονται πρωτονιωμένα (θετικά φορτισμένα) μόρια του αναλύτη καθώς επίσης και από όξινα διαλύματα να προκύπτουν αποπρωτονιωμένα αρνητικά ιόντα του αναλύτη [173-175].

Αυτό το φαινόμενο μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι κατά τον ηλεκτροψεκασμό αυτό που γίνεται είναι μια μεταφορά φορτίου από την υγρή στην αέρια φάση. Όταν το φορτίο που μεταφέρεται είναι σε μορφή πρωτονίων η μεταφορά του οφείλεται στο εφαρμοσμένο δυναμικό και στην ταχύτητα ροής του συστήματος και όχι στο pH του διαλύματος. Από την στιγμή που έχει επιτευχθεί η μεταφορά του φορτίου

(πρωτόνια) από το διάλυμα στις σταγόνες αυτό πρέπει να καταλήξει στον αναλύτη και αυτός να πρωτονιωθεί ανεξάρτητα αν το pKa του αναλύτη είναι μικρότερο από το pH του διαλύματος. Βέβαια, εξίσου πιθανό είναι αυτό το φορτίο να καταλήξει σε μόρια του διαλύτη [176].

Επίσης, όπως προαναφέρθηκε, είναι δυνατόν να συμβούν αντιδράσεις μεταφοράς πρωτονίων στην αέρια φάση και έτσι μόρια που απελευθερώνονται ως ουδέτερα από τις σταγόνες να φορτίζονται μέσω αυτών των αντιδράσεων αέριας φάσης [172,175]. Ακόμα είναι πιθανό το pH των παραγόμενων σταγονιδίων να είναι διαφορετικό από εκείνο του διαλύματος αφού μπορούν να παράγονται πρωτόνια από την οξείδωση του νερού κατά την διαδικασία του ηλεκτροψεκασμού και έτσι το pH στις σταγόνες να μειώνεται [177]. Επιπλέον όταν οι αρχικές σταγόνες σχάζονται παράγοντας μικρότερες παρατηρείται μια μη συμμετρική κατανομή μάζας–φορτίου στα μικρότερα παραγόμενα σταγονίδια [178]. Αυτό σημαίνει ότι όταν σχάζεται η αρχική σταγόνα απελευθερώνεται περισσότερο φορτίο από ότι μάζα, και έτσι για τα παραγόμενα σταγονίδια που φέρουν μεγάλη συγκέντρωση πρωτονίων, είναι δύσκολο κάποιος να περιγράψει με όρους pH-pKa την πρωτονίωση του αναλύτη.

2.2.4.3 *Ο διαλύτης του δείγματος στον ηλεκτροψεκασμό*

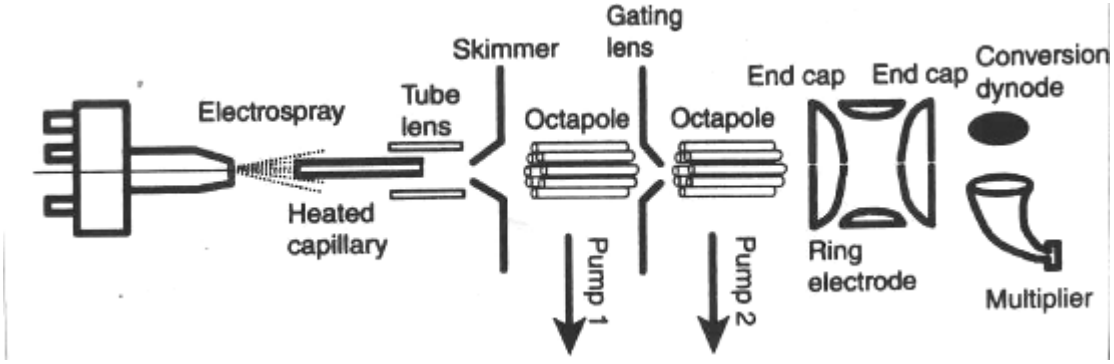
Η σύσταση του δείγματος που εξετάζεται με τον ηλεκτροψεκασμό είναι σημαντική παράμετρος έτσι ώστε να επιτευχθεί μια επιτυχής ανάλυση. Η καλή λειτουργία του ηλεκτροψεκασμού προϋποθέτει τον σχηματισμό ενός σταθερού σχήματος του κώνου του Taylor ικανό να παράγει μία σταθερή ροή σταγονιδίων από τον κώνο. Για να πραγματοποιηθεί κάτι τέτοιο πολλές παράμετροι πρέπει να ρυθμιστούν κατάλληλα όπως το δυναμικό που εφαρμόζεται στον τριχοειδή, την ταχύτητα ροής, την απόσταση του τριχοειδή από το αντισταθμιστικό ηλεκτρόδιο, την αγωγιμότητα και την επιφανειακή τάση του διαλύματος. Οι τιμές που θα πάρουν αυτοί οι παράμετροι σχετίζονται με την σύσταση του δείγματος και κυρίως με τον διαλύτη του δείγματος. Κατά αυτό τον τρόπο καθίσταται σημαντικός ο ρόλος του διαλύτη στην σωστή λειτουργία του ηλεκτροψεκασμού.

Γενικά για να παραχθεί μία σταθερή ροή σταγονιδίων από τον κώνο, θα πρέπει η σύσταση του δείγματος να περιέχει ένα ποσοστό πολικού οργανικού διαλύτη όπως μεθανόλη ή ακετονιτρίλιο, ενώ το υπόλοιπο να είναι υδατικό. Αυτό συμβαίνει γιατί όταν το δείγμα είναι μόνο υδατικό διάλυμα η επιφανειακή τάση του διαλύματος (και συνεπώς του κώνου) είναι αυξημένη και έτσι είναι πιο δύσκολο να ρυθμιστούν οι παράμετροι για να επιτευχθεί μία σταθερή ροή σταγονιδίων [179]. Από την άλλη πλευρά, με μη πολικούς διαλύτες όπως εξάνιο ή τριχλωρομεθάνιο είναι δύσκολο να επιτευχθεί σταθερή ροή εξαιτίας της πολύ χαμηλής επιφανειακής τάσης, της υψηλής πτητικότητας και της χαμηλής διηλεκτρικής σταθεράς αυτών των διαλυτών [180]. Έτσι το συνηθισμένο είναι να χρησιμοποιείται μίγμα πολικού οργανικού διαλύτη με νερό, έτσι ώστε να εξασφαλίζεται καλή επιφανειακή τάση και αγωγιμότητα του διαλύματος εξαιτίας του οργανικού διαλύτη και του νερού αντίστοιχα, και με την βοήθεια αερίων στην πηγή όπως ήδη αναφέρθηκε (πνευματικά υποβοηθούμενος ηλεκτροψεκασμός) επιτυγχάνεται σταθερή ροή σταγονιδίων από τον κώνο του Taylor. Εκτός από την σταθερότητα της ροής που μπορεί να εξασφαλίσει η σωστή επιλογή του διαλύτη, μπορεί επίσης να καθορίσει και τον χημικό θόρυβο (θόρυβος υποβάθρου) που θα εμφανιστεί στο φάσμα μάζας. Ο διαλύτης που θα επιλεχθεί για μια ανάλυση θα πρέπει να μην παράγει μεγάλο αριθμό συσσωματωμάτων και έτσι να μην δημιουργεί μεγάλο θόρυβο υποβάθρου.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, για την ανάλυση θετικών ιόντων ο διαλύτης που συνήθως χρησιμοποιείται είναι μίγμα νερού/μεθανόλης. Αν ο αναλύτης ιονίζεται μέσω πρωτονίωσης, μπορεί να προστεθεί στο δείγμα μικρή ποσότητα οξέος όπως οξικό ή μυρμιγκικό οξύ ώστε να δράσει σαν πηγή πρωτονίων. Στην περίπτωση της ανάλυσης αρνητικών ιόντων δεν αρκεί η ύπαρξη κάποιας βάσης ώστε να αποπρωτονιώσει τον αναλύτη και αυτός να φορτιστεί αρνητικά. Πιο συγκεκριμένα έχει βρεθεί ότι μίγμα νερού/μεθανόλης που περιέχει μικρή ποσότητα βάσης, π.χ. υδροξείδιο του αμμωνίου, δεν είναι ικανό να παράγει αρνητικά φορτισμένα ιόντα σε ικανοποιητικό βαθμό [181]. Έτσι, σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιείται διαλύτης που μπορεί να παράγει αρνητικά φορτισμένα ιόντα όπως αλογονούχοι διαλύτες. Για παράδειγμα ιόντα χλωρίου παράγονται από το χλωροφόρμιο όταν αυτό ανάγεται. Σε ένα τέτοιο διάλυμα τα ιόντα του αναλύτη δημιουργούνται με σχηματισμό παραγώγων με ιόντα χλωρίου [150,182].

2.3 Το σύστημα μεταφοράς των ιόντων από την πηγή ιονισμού στην ιοντική παγίδα [183,184]

Η λειτουργία του ηλεκτροψεκασμού πραγματοποιείται σε ατμοσφαιρικές συνθήκες καθώς ο ιονισμός είναι αποδοτικότερος από ότι σε συνθήκες υψηλού κενού. Αντίθετα κάθε αναλυτής ιόντων, όπως είναι η ιοντική παγίδα λειτουργεί σε συνθήκες υψηλού κενού, με συνέπεια να απαιτείται ένα σύστημα που να συνδέει αυτά τα δύο τμήματα του οργάνου και να μεταφέρει αποδοτικά τα ιόντα που παράγονται από την πηγή του ηλεκτροψεκασμού στην ιοντική παγίδα όπου και θα αναλυθούν. Αυτό το σύστημα μεταφοράς παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.3.



Σχήμα 2.3 Το σύστημα μεταφοράς των ιόντων από την πηγή ιονισμού στην ιοντική παγίδα (από αναφορά 183).

Όπως φαίνεται στο σχήμα τα παραγόμενα ιόντα περνούν από τέσσερις περιοχές διαφορετικής πίεσης πριν φτάσουν στην ιοντική παγίδα. Αυτή η σταδιακή μείωση της πίεσης (διαφορικό κενό) από την πηγή στον αναλυτή χρησιμοποιείται έτσι ώστε να γίνεται μια ομαλή μετάβαση από την ατμοσφαιρική πίεση σε πίεση υψηλού κενού. Πιο συγκεκριμένα το σύστημα μεταφοράς αποτελείται από τις εξής περιοχές:

- *Η περιοχή του θερμαινόμενου τριχοειδούς* που είναι η δεύτερη περιοχή που φτάνουν τα ιόντα, και λειτουργεί σε πίεση 1.3 Torr. Αποτελείται από έναν θερμαινόμενο τριχοειδή που βοηθά τόσο την εξάτμιση του διαλύτη λόγω της θερμοκρασίας όσο και την διάσπαση των συσσωματωμάτων που παράγονται κατά τον ιοντισμό, αφού σε αυτόν

εφαρμόζεται δυναμικό. Μετά τον τριχοειδή βρίσκονται ηλεκτρικοί φακοί που εστιάζουν τα ιόντα που βγαίνουν από τον θερμαινόμενο τριχοειδή και δεν επιτρέπουν την εκτόνωση της δέσμης των ιόντων και έτσι οδηγούνται στην επόμενη περιοχή. Τα ουδέτερα είδη που έχουν σχηματιστεί δεν εστιάζονται και απομακρύνονται μέσω της μηχανικής αντλίας που διατηρεί την πίεση στα 1.3 Torr. Αυτή η περιοχή διαχωρίζεται από την πρώτη περιοχή που βρίσκεται η πηγή ιονισμού σε πίεση 760 Torr, μέσου ενός κώνου δειγματοληψίας (sweep cone), ο οποίος επιτρέπει την εισαγωγή ενός μικρού αριθμού σωματιδίων που παράγονται στην πηγή, στο φασματόμετρο.

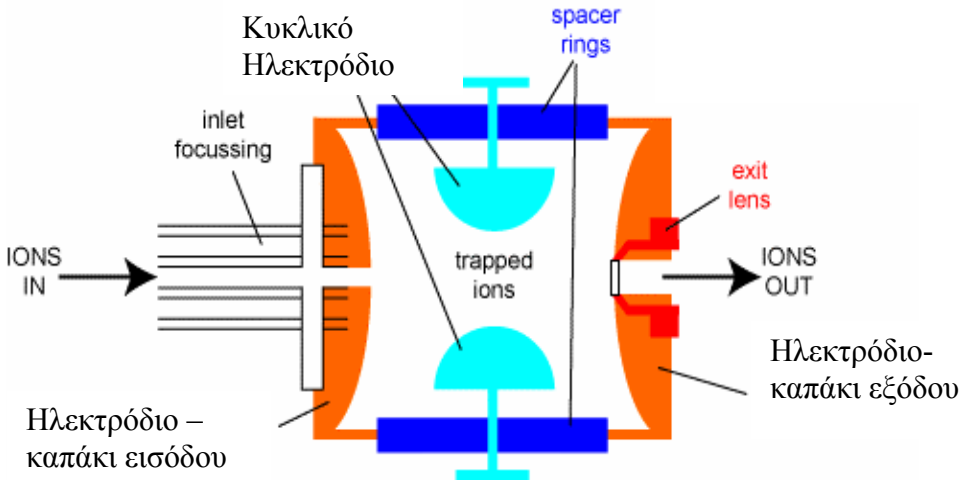
- *Η περιοχή του πρώτου οκταπόλου* που λειτουργεί σε πίεση 1.7×10^{-3} Torr, και διαχωρίζεται από την προηγούμενη περιοχή μέσω ενός αποκορυφωτή (skimmer). Ο αποκορυφωτής είναι γειωμένος και έχει μια μικρή οπή από όπου περνάνε τα ιόντα ενώ τα ουδέτερα μόρια που μπορεί να έχουν φτάσει σε αυτή την περιοχή δεν περνάνε.
- *Η περιοχή δεύτερου οκταπόλου* που λειτουργεί σε πίεση 2×10^{-5} Torr, πίεση λειτουργίας και της ιοντικής παγίδας, και διαχωρίζεται από το πρώτο οκτάπολο μεσω ηλεκτρικών φακών που χρησιμοποιούνται για την εστίαση των ιόντων από το πρώτο οκτάπολο στο δεύτερο. Η χρήση των οκταπόλων γίνεται για την εστίαση των ιόντων πριν εισέλθουν στην ιοντική παγίδα. Ο λόγος που υπάρχουν δύο οκτάπολα αντί ενός είναι ότι έτσι υπάρχει διαφορικό κενό στην περιοχή εστίασης και προκαλείται επιτάχυνση των ιόντων.

Τέλος θα πρέπει να αναφερθεί ότι η κίνηση των ιόντων από την πηγή στην ιοντική παγίδα γίνεται ηλεκτροστατικά, δηλαδή εξαιτίας της μεγάλης διαφοράς δυναμικού που υπάρχει μεταξύ της πηγής ηλεκτροψεκασμού (4kV) και του ανιχνευτή (-15 kV) δίνοντας έτσι την δυνατότητα η πηγή να τοποθετηθεί ορθογώνια σε σχέση με το σύστημα μεταφοράς με σκοπό την εισαγωγή μόνο φορτισμένων σωματιδίων στο φασματόμετρο.

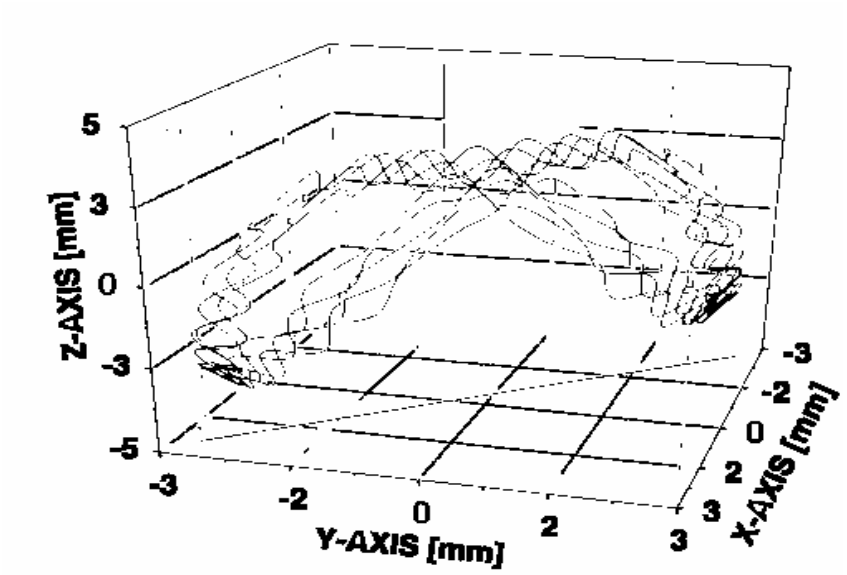
2.4 Ιοντική παγίδα και ανάλυση ιόντων [183,184]

2.4.1 Παγίδευση ιόντων

Η ιοντική παγίδα αποτελείται από τρία ηλεκτρόδια, ένα κυκλικό και δύο ηλεκτρόδια-καπάκια, τοποθετημένα κατά αυτόν τον τρόπο ώστε να περικλείουν τον χώρο που θα παγιδευτούν τα ιόντα, όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.4. Στο κυκλικό ηλεκτρόδιο εφαρμόζεται εναλλασσόμενη τάση της μορφής $V_{rf}\, cos\omega t$ με την συχνότητα αυτής της τάσης να είναι σταθερή ενώ το πλάτος της να μπορεί να αλλάζει τιμές. Τα ηλεκτρόδια–καπάκια είναι γειωμένα με αποτέλεσμα να παράγεται ένα τρισδιάστατο ηλεκτρικό πεδίο στο οποίο μπορούν να παγιδευτούν ιόντα. Αυτό γίνεται ως εξής: το πλάτος της τάσης που εφαρμόζεται στο κυκλικό ηλεκτρόδιο εναλλάσσεται μεταξύ της μέγιστης και ελάχιστης τιμής του με συχνότητα 760 kHz. Έτσι για παράδειγμα αν θετικά ιόντα εισέρχονται στην παγίδα έλκονται από το κυκλικό ηλεκτρόδιο που έχει αρνητικό πλάτος τάσης εκείνη την χρονική στιγμή ενώ απωθούνται από τα ηλεκτρόδια καπάκια που είναι γειωμένα, αλλά ηλεκτρικά ενεργά ως προς το κυκλικό. Όταν το πλάτος πάρει την θετική μέγιστη τιμή του τα ιόντα απωθούνται από το κυκλικό ηλεκτρόδιο και ξεκινούν μία κίνηση προς το ένα ηλεκτρόδιο καπάκι. Αυτή η κίνηση των ιόντων επαναλαμβάνεται με την συμμετοχή κάθε τμήματος των ηλεκτρόδιων με την συχνότητα της τάσης δηλαδη 760×10^3 το δευτερόλεπτο, με αποτέλεσμα τα ιόντα να παγιδεύονται κατά αυτό τον τρόπο μέσα στο ηλεκτρικό πεδίο (Σχήμα 2.5).



Σχήμα 2.4 Αναπαράσταση της ιοντικής παγίδας (από αναφορά 183).



Σχήμα 2.5 Οι τροχιές των ιόντων στην ιοντική παγίδα (από αναφορά 183).

Το ηλεκτρικό πεδίο που σχηματίζεται εντός της ιοντικής παγίδας μπορεί να αναπαρασταθεί σαν ένα πηγάδι δυναμικού στο οποίο παγιδεύονται τα ιόντα με συγκεκριμένες τροχιές το καθένα. Σημαντικός παράγοντας για το πόσο αποδοτικά γίνεται η παγίδευση, είναι και η αρχική ορμή που έχουν τα ιόντα καθώς εισέρχονται στην παγίδα. Ιόντα με μεγάλη μάζα και συνεπώς και με μεγάλη ορμή έχει σαν αποτέλεσμα το πηγάδι δυναμικού να μην είναι αποτελεσματικό στο να αλλάξει την τροχιά των ιόντων κατά 180°, δηλαδή να πραγματοποιηθεί η προαναφερόμενη κίνηση των ιόντων, με αποτέλεσμα τα ιόντα να χάνονται. Τα ιόντα με μικρή μάζα παγιδεύονται ικανοποιητικά αλλά τα φάσματα μάζας τους χαρακτηρίζονται από μικρή διαχωριστική ικανότητα διότι οι τροχιές τους κατά την έξοδο δεν ελέγχονται σωστά και έτσι τα ιόντα διασπείρονται.

Με την εισαγωγή αερίου ηλίου αυτά τα προβλήματα λύνονται καθώς άτομα ηλίου συγκρούονται με τα ιόντα με αποτέλεσμα μέρος της κινητικής ενέργειας τους να μετατρέπεται σε θερμική χωρίς όμως να διασπώνται τα ιόντα. Έτσι τα ιόντα «παγώνουν» ενεργειακά και οι τροχιές τους εντοπίζονται στο κέντρο της παγίδας.

2.4.2 Εξαγωγή ιόντων

Τα ιόντα στην παγίδα δεν εξάγονται όλα μαζί αλλά με έναν συγκεκριμένο τρόπο που επιτρέπει την ανίχνευσή τους. Για την κατανόηση της εξαγωγής των ιόντων θα πρέπει να μελετηθεί η σταθερότητα των τροχιών δηλαδή οι εξισώσεις κίνησης των ιόντων στην παγίδα. Οι εξισώσεις κίνησης των ιόντων βασίζονται στην θεμελιώδη εξίσωση του Newton ΣF=ma, όπου F η δύναμη που ασκείται στο ιόν από το πεδίο, m η μάζα του ιόντος και a η επιτάχυνση του ιόντος, και με αντικατάσταση των μεταβλητών και με την χρήση κυλινδρικών συντεταγμένων z, r οι εξισώσεις κίνησης των ιόντων είναι:

$$\frac{d^2z}{dt^2} - \frac{4Ze}{m(r_0^{\ 2} + 2z_0^2)}(U - V\cos\omega t)z = 0 \quad \text{και} \quad \frac{d^2r}{dt^2} + \frac{2Ze}{m(r_0^{\ 2} + 2z_0^{\ 2})}(U - V\cos\omega t)r = 0$$

Οι εξισώσεις αυτές είναι της μορφής της εξίσωσης Mathiew:

$$\frac{d^2u}{dt^2} + (a_u - 2q_u\cos 2\xi)u = 0$$

Έτσι οι εξισώσεις κίνησης των ιόντων μπορούν να δοθούν με την μορφή της εξίσωσης Mathiew, της οποίας οι λύσεις είναι γνωστές, με την παράμετρο u να μπορεί να αντικατασταθεί με τις κυλινδρικές συντεταγμένες z, r και οι παράμετροι της εξίσωσης Mathiew (ξ, α, q), για τις εξισώσεις κίνησης των ιόντων να είναι:

$$\xi = \frac{\omega t}{2}$$

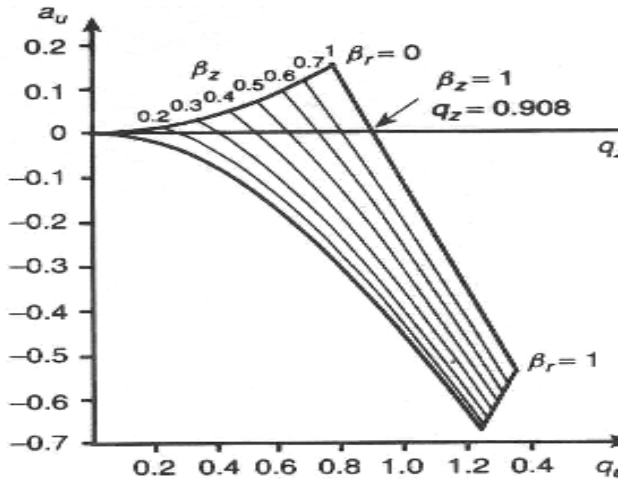
$$a_u = a_z = -2a_r = -\frac{16eU}{m\left(r^2 + 2z_0^{\ 2}\right)\omega^2} \qquad q_u = q_z = -2q_r = -\frac{8eV}{m(r^2 + 2z_0)\omega^2}$$

Όπου ω η γωνιακή ταχύτητα της εναλλασόμενης τάσης, t ο χρόνος, U η συνεχής τάση, V το πλάτος της εναλλασόμενης τάσης, r και z_0 οι διαστάσεις της παγίδας και e το φορτίο του ηλεκτρονίου

Μετά από μετασχηματισμούς Fourier, των εξισώσεων κίνησης (με μορφή της εξίσωσης Mathiew) των ιόντων προκύπτουν οι λύσεις των εξισώσεων κίνησης. Οι λύσεις αυτές είναι συναρτήσεις (μιγαδικές) της μορφής $e^{(a+i\beta)}$. Οι πραγματικές λύσεις αντιπροσωπεύουν ασταθείς τροχιές ενώ οι φανταστικές λύσεις αντιπροσωπεύουν σταθερές τροχιές των ιόντων μέσα στην παγίδα, δηλαδή όταν α=0 και $0<\beta_u<1$. Η παράμετρος β_u μπορεί να υπολογιστεί από τις παραμέτρους a_u και q_u:

$$\beta_u = (a_u + \frac{q_u^2}{2})^{1/2} \qquad \text{για } q_u<0.4$$

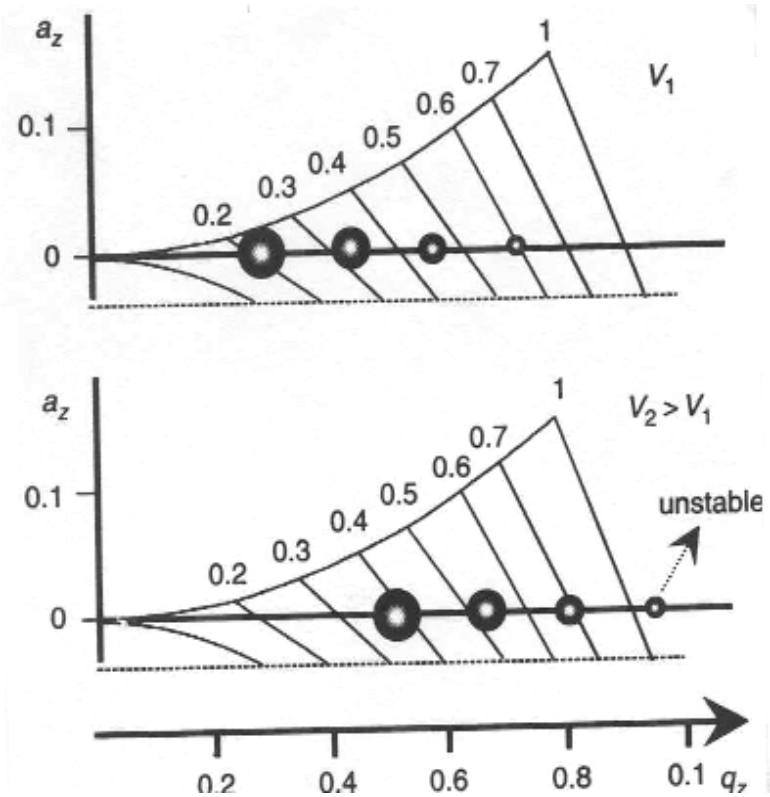
Αυτοί οι τρεις παράμετροι (α, β, q) μπορούν να αναπαρασταθούν γραφικά δίνοντας την περιοχή των τιμών που μπορούν να πάρουν ώστε αυτές οι λύσεις να είναι πραγματικές δηλαδή όταν 0<β<1 τα ιόντα έχουν σταθερές τροχιές (Σχήμα 2.6).



Σχήμα 2.6 Διάγραμμα των τιμών των παραμέτρων β, α και q ώστε τα ιόντα να έχουν πραγματικές, σταθερές τροχιές μέσα στην ιοντική παγίδα (από αναφορά 183).

Στις παραπάνω εξισώσεις όπου U είναι η συνεχής τάση που εφαρμόζεται στα ηλεκτρόδια καπάκια τα οποία είναι γειωμένα άρα α=0, επίσης οι παράμετροι r, z παραμένουν σταθερές σαν διαστάσεις τις ιοντικής παγίδας καθώς και η γωνιακή ταχύτητα ω. Έτσι η παράμετρος q είναι $q = k\frac{Vz}{m}$, όπου κ σταθερά και z το φορτίο του

ιόντος. Από αυτή την εξίσωση φαίνεται ξεκάθαρα ότι για ένα συγκεκριμένο πλάτος της τάσης κάθε ιόν με μάζα m έχε την δική του τιμή q, δηλαδή την δική του τροχιά. Αυξάνοντας το πλάτος της τάσης το q των ιόντων αυξάνει αλλά η διαφορά μεταξύ των τιμών q των ιόντων παραμένει σταθερή. Έτσι τα ιόντα εξέρχονται ως εξής: από τα ελαφρύτερα στα πιο βαριά καθώς το πλάτος της τάσης αυξάνει, αφού τα ελαφρύτερα έχουν μεγαλύτερες τιμές q και ξεπερνάνε πιο γρήγορα το όριο της περιοχής των τιμών που αντιπροσωπεύουν πραγματικές σταθερές τροχιές, από ότι τα πιο βαριά ιόντα (Σχήμα 2.7).



Σχήμα 2.7 Γραφική αναπαράσταση της εξαγωγής των ιόντων από την ιοντική παγίδα (από αναφορά 183).

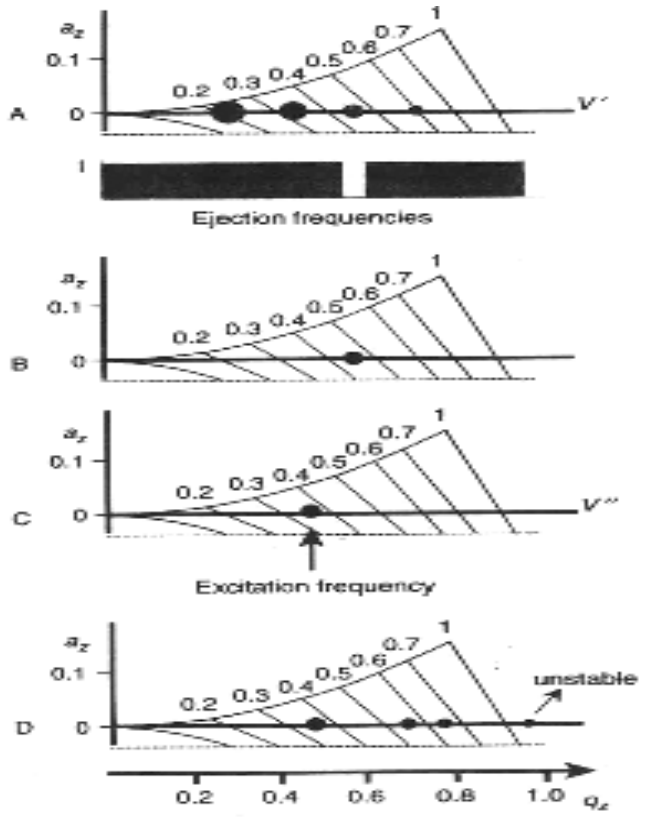
Αυτή είναι η γενική ιδέα της εξαγωγής των ιόντων από την παγίδα αλλά κατά αυτό το τρόπο τα φάσματα μάζας που προκύπτουν είναι χαμηλής διαχωριστικής ικανότητας και ευαισθησίας. Αυτό το πρόβλημα έγκειται στις αλληλεπιδράσεις των ιόντων με τα άτομα ηλίου καθώς η τάση αυξάνει και τα ιόντα εξέρχονται της παγίδας. Καθώς το q αυξάνει για ένα πληθυσμό ιόντων με συγκεκριμένη τιμή m/z, οι τροχιές

αυτών των ιόντων μεγαλώνουν και απομακρύνονται από το κέντρο της παγίδας. Όταν η τάση πάρει την τιμή $V_{εξόδου}$ κάποια ιόντα από την ομάδα βρίσκονται κοντά στην έξοδο και εξέρχονται στο σωστό χρόνο προς τον ανιχνευτή ενώ κάποια είναι απομακρυσμένα και έτσι εξέρχονται σε λάθος χρόνο, γιατί καθώς τα απομακρυσμένα ιόντα ταξιδεύουν προς την έξοδο συγκρούονται με τα άτομα ηλίου και οι τροχιές τους μεταβάλλονται. Για να αντιμετωπιστεί αυτό το πρόβλημα εφαρμόζεται επιπλέον εναλλασσόμενη τάση στα ηλεκτρόδια καπάκια με διαφορά φάσης μεταξύ των δύο ηλεκτροδίων-καπάκια 180^0, δηλαδή όταν το ηλεκρόδιο-καπάκι εισόδου είναι θετικά φορτισμένο το ηλεκρόδιο-καπάκι εξόδου είναι αρνητικά. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τα ιόντα με το ίδιο m/z να κινούνται σαν σύνολο υπό την επίδραση αυτού του σύνθετου ηλεκτρικού πεδίου και εξέρχονται σαν ομάδα και έτσι αυξάνει η διαχωριστική ικανότητα και η ευαισθησία. Σε αυτή την εναλλασσόμενη τάση που εφαρμόζεται στα ηλεκτρόδια-καπάκια η συχνότητα παραμένει σταθερή αλλά όχι το πλάτος της τάσης V, αυτό γίνεται διότι χρειάζεται να αυξηθεί ώστε να διατηρήσει τα πιο βαριά ιόντα να κινούνται σαν ομάδα.

2.4.3 Απομόνωση και θραύση ιόντων

Ένα επιπλέον στοιχείο που πρέπει να ληφθεί υπόψη είναι ότι εφόσον έχει εφαρμοστεί εναλλασσόμενη τάση στα ηλεκτρόδια με γωνιακή ταχύτητα ω=2πν τα ιόντα εξαιτίας της αδράνειάς τους δεν θα ταλαντεύονται σε αυτή την συχνότητα αλλά σε μια δευτερεύουσα η οποία είναι πάντα μικρότερη από την συχνότητα ν. Αυτή η δευτερεύουσα συχνότητα είναι $f = \frac{\beta v}{2}$ όπου ν η συχνότητα της τάσης που εφαρμόζεται στα ηλεκτρόδια και το β είναι ανάλογο του q. Αν τώρα, εκτός από την εναλλασσόμενη τάση που εφαρμόζεται στο κυκλικό ηλεκτρόδιο προστεθεί μια άλλη εναλλασσόμενη τάση στα ηλεκτρόδια-καπάκια ίδιας συχνότητας με την δευτερεύουσα συχνότητα ταλάντευσης των ιόντων, τότε αυτά τα ιόντα θα συντονιστούν με την νέα εναλλασσόμενη τάση με αποτέλεσμα το πλάτος της ταλάντευσης τους να μεγαλώνει και να αποσταθεροποιείται τόσο ώστε τα ιόντα με συγκεκριμένη δευτερεύουσα συχνότητα ταλάντευσης δηλαδή με συγκεκριμένη τιμή β (και συνεπώς και της παραμέτρους q) να εξάγονται από την παγίδα.

Το γεγονός ότι μπορεί να γίνει εξαγωγή ιόντων από την παγίδα μέσω συντονισμού παρέχει την δυνατότητα απομόνωσης και θραύσης κάποιου ιόντος. Αυτό συμβαίνει διότι μπορεί να επιλεγεί το ιόν που θα απομονωθεί και σε όλα τα άλλα τα ιόντα θα εφαρμοστεί η συχνότητα συντονισμού τους και θα εξαχθούν από την παγίδα αλλά όχι το ιόν που έχει επιλεχθεί να απομονωθεί και για το οποίο δεν εφαρμόστηκε η συχνότητα συντονισμού του. Έπειτα αφού το ιόν είναι απομονωμένο εφαρμόζεται η τάση με την συχνότητα συντονισμού του με την κατάλληλη ενέργεια (πλάτος τάσης) ώστε να το διεγείρει (αλλά χωρίς να το εξάγει!) και μέσω συγκρούσεων με τα άτομα ηλίου να θραυσματοποιηθεί (Σχήμα 2.8).



Σχήμα 2.8 Γραφική αναπαράσταση της απομόνωσης (A,B) και θραυσματοποίησης (C,D) των ιόντων στην την ιοντική παγίδα (από αναφορά 183).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Διαδοχική φασματομετρία μάζας ηλεκροψεκασμού-ιοντικής παγίδας (ES-IT-MS^n, n=1–6) οργανικών ενώσεων αρσενικού

3.1 Εισαγωγή

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης σε συνδυασμό με την φασματομετρία μάζας ηλεκτροψεκασμού και της επαγόμενης διάσπασης μέσω κρούσεων (collision induced dissociation, CID) είναι μία από τις κύριες μεθόδους που έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση ενώσεων του αρσενικού σε περιβαλλοντικά και βιολογικά δείγματα [129-136,23]. Η γενικευμένη χρήση αυτής της τεχνικής οφείλεται στο γεγονός ότι είναι πολύ ευαίσθητη, με όρια ανίχνευσης κάτω από το 1 ng/mL για αυτές τις ενώσεις και εκλεκτική [23].

Η βασική αρχή αυτής της μεθόδου είναι ότι αφού ο αναλύτης διαχωριστεί από τα υπόλοιπα συστατικά της μήτρας του δείγματος μέσω της υγρής χρωματογραφίας, απομονώνεται και διασπάται στον αναλυτή μαζών. Η ανίχνευσή του στηρίζεται στην παρακολούθηση επιλεγμένων θυγατρικών του ιόντων σε μια μεθολογία γνωστή ως παρακολούθηση επιλεγμένων αντιδράσεων (selected reaction monitoring: SRM). Η μεθοδολογία αυτή έχει σαν κύρια χαρακτηριστικά την αυξημένη ευαισθησία και τα χαμηλά όρια ανίχνευσης διότι ο χημικός θόρυβος υποβάθρου εμφανίζεται αισθητά μειωμένος. Επιπλέον επειδή κάθε ένωση διασπάται κατά συγκεκριμένο τρόπο, που εξαρτάται από την δομή της, τα δευτερεύοντα ιόντα που προκύπτουν είναι χαρακτηριστικά της κάθε ένωσης με συνέπεια να αυξάνεται σημαντικά και η εκλεκτικότητα της μεθόδου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι ότι παρέχεται ακόμα η δυνατότητα να γίνει ποιοτική και ποσοτική ανάλυση σε ενώσεις που έχουν τον ίδιο χρόνο κατακράτησης στη στήλη χρωματογραφίας, αφού για τον προσδιορισμό αυτών των ενώσεων μπορούν να παρακολουθηθούν διαφορετικά ιόντα–θραύσματα [23].

Ο αναλυτής μαζών που έχει χρησιμοποιηθεί για την επίτευξη της προαναφερόμενης μεθόδου είναι ο τριπλός τετραπολικός αναλυτής μαζών εξοπλισμένος με κυψελίδα πρόσκρουσης [23]. Αυτός ο αναλυτής μαζών αποτελείται από το πρώτο τετράπολο που είναι και ο πρώτος αναλυτής μαζών, από την κυψελίδα πρόσκρουσης που είναι συνήθως ένα τετράπολο και περιέχει αδρανές αέριο και τέλος το τρίτο τετράπολο που είναι ο δεύτερος αναλυτής. Η επιλογή του ιόντος που πρόκειται να διασπαστεί (αναφέρεται ως πρόδρομο ιόν) γίνεται στο πρώτο τετράπολο, κατόπιν το ιόν εισέρχεται στην κυψελίδα πρόσκρουσης όπου διασπάται και τα ιόντα θραύσματα αναλύονται στο τρίτο τετράπολο. Το πρόδρομο ιόν αφού εισέλθει στην κυψελίδα πρόσκρουσης με κάποια ελεγχόμενη επιτάχυνση, συγκρούεται με τα άτομα αργού και μέρος της κινητικής του ενέργειας μετατρέπεται σε δονητική ενέργεια, με αποτέλεσμα να διασπάται (CID) [183].

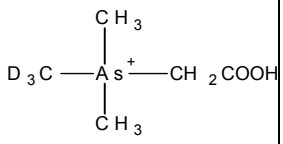
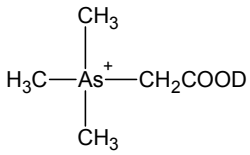
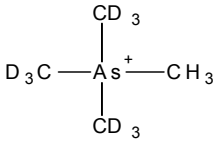
Αυτός ο τρόπος θραυσματοποίησης των ιόντων θεωρείται «σκληρός» εφόσον όπως το πρόδρομο ιόν, έτσι και τα δευτερεύοντα ιόντα που παράγονται από την αρχική θραύση του πατρικού ιόντος μπορούν να διασπαστούν και να δώσουν κι άλλα δευτερεύοντα ιόντα που σε πολλές περιπτώσεις είναι ιδιαίτερα έντονα. Αυτό έχει όμως σαν συνέπεια να μην μπορούν πάντα να αποδοθούν με βεβαιότητα οι δομές των ιόντων θραυσμάτων εφόσον δεν είναι γνωστή η αλληλουχία διάσπασής τους. Σε αντίθεση με αυτό, η θραυσματοποίηση του πατρικού ιόντος στην ιοντική παγίδα χαρακτηρίζεται ως ήπιος και εκλεκτικός τρόπος θραυσματοποίησης, αφού η ενέργεια θραυσματοποίησης που εφαρμόζεται για την διάσπαση του πατρικού ιόντος συνήθως δεν επηρεάζει και τα δευτερεύοντα του ιόντα. Αυτή η διαφορά στον τρόπο θραυσματοποίησης σε αυτούς τους δύο αναλυτές μαζών είναι εμφανής συγκρίνοντας την καμπύλη διάσπασης του αρσενοβιτανίου όπως προέκυψε από έναν τετραπολικό αναλυτή μαζών εξοπλισμένο με κυψελίδα πρόσκρουσης (Σχήμα 3.1), με εκείνη που προέκυψε από την ιοντική παγίδα (Σχήμα 3.2).

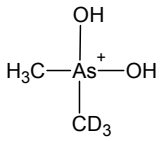
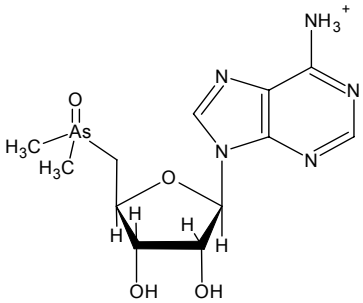
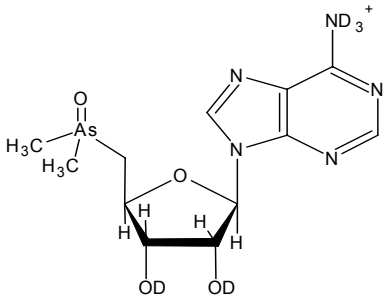
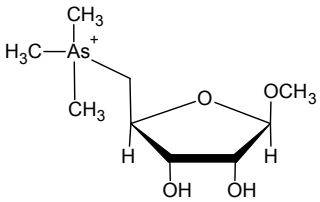
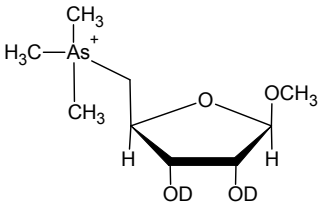
Επιπλέον η δυνατότητα πραγματοποίησης διαδοχικής φασματομετρίας μάζας με την ιοντική παγίδα, δηλαδή η δυνατότητα απομόνωσης και περαιτέρω θραύσης οποιουδήποτε θυγατρικού ιόντος μέχρι και για 10 γενεές ιόντων, κατά ανάλογο τρόπο με αυτήν του πατρικού ιόντος, παρέχει πολύτιμες πληροφορίες για τα μονοπάτια θραυσματοποίησης των θυγατρικών ιόντων και κατ' επέκταση και της δομής των ιόντων.

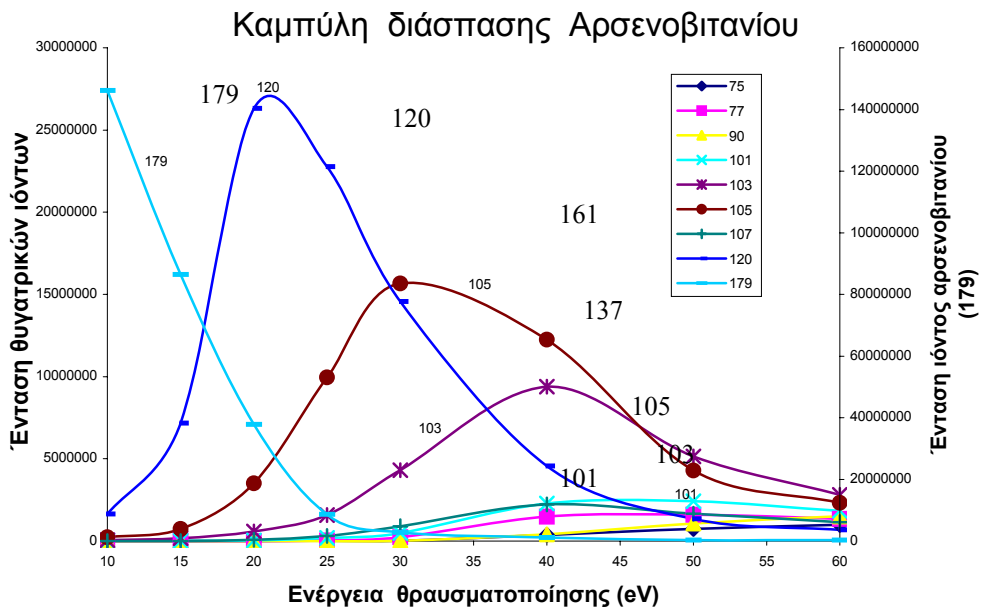
Έτσι, λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, με την διαδοχική φασματομετρίας μάζας ιοντικής παγίδας μπορεί να αποδοθεί ένα ολοκληρωμένο σχήμα θραυσματοποίησης του αναλύτη έτσι ώστε να είναι εφικτός και ο χαρακτηρισμός των ιόντων θραυσμάτων που εμφανίζονται στα φάσματα μάζας που λαμβάνονται με τριπλό τετραπολικό αναλυτή μάζας.

Σε αυτό το τμήμα της εργασίας μελετήθηκαν τα μονοπάτια θραυσματοποίησης πρότυπων οργανικών ενώσεων του αρσενικού, με σκοπό να συγκριθούν με τα λίγα που έχουν ήδη προταθεί στη βιβλιογραφία και επίσης να διευρυνθούν [185]. Αυτό επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας δευτεριωμένα πρότυπα και συγκρίνοντας τα φάσματα μάζας τους με αυτά των μη δευτεριωμένων αναλόγων τους. Από τις μετατοπίσεις των κορυφών των θυγατρικών ιόντων, που οφείλονται στην παρουσία των δευτερίων ερευνάται η ορθότητα των προτεινόμενων μηχανισμών και μονοπατιών. Επίσης, παρουσιάζεται εδώ για πρώτη φορά το σχήμα θραυσματοποίησης ενός αρσενικικού νουκλεοζίτη και του δευτεριωμένου αναλόγου του, καθώς και ενός αρσενοσακχάρου και του δευτεριωμένου αναλόγου του. Στον Πίνακα 3.1 παρουσιάζονται οι δομές των ενώσεων που εξετάστηκαν.

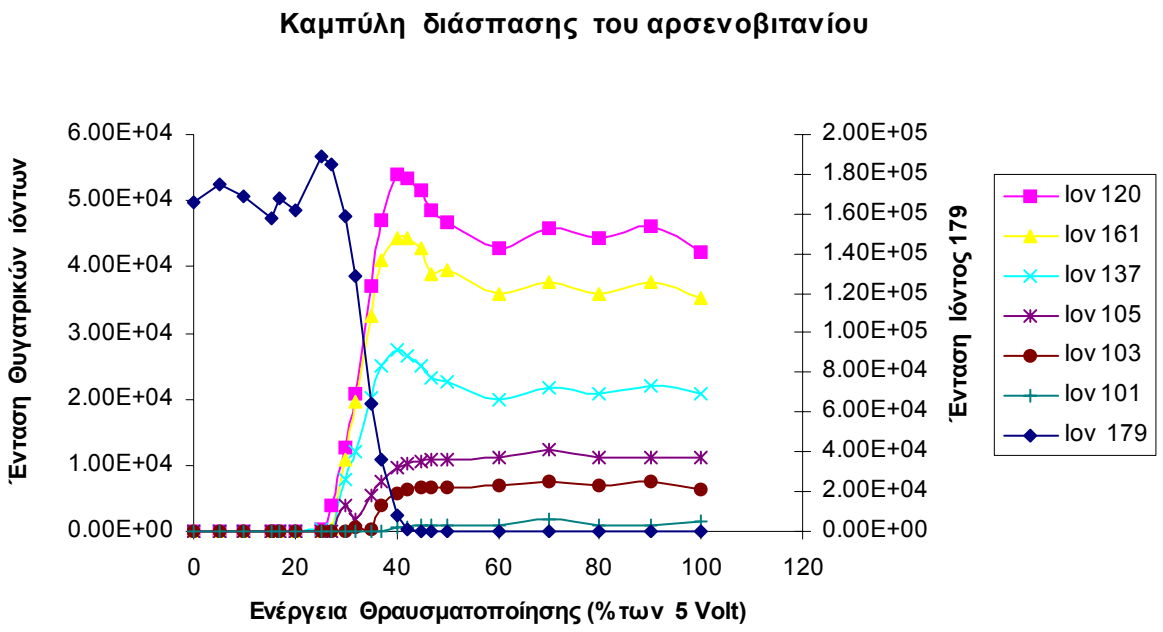
Πίνακας 3.1 Οι δομές των πρότυπων οργανοαρσενικικών ενώσεων που μελετήθηκαν.

Όνομα	Δομή	m/z (Th) Πρόδρομου Ιόντος
d_3-Αρσενοβιτάνιο		182
d-Αρσενοβιτάνιο		180
d_9-Τετραμεθυλαρσενικικό ιόν		144

		m/z (Th)
Πρωτονιωμένο d_3-Διμεθυλαρσενικικό οξύ		142
Πρωτονιωμένη 5΄-Διμεθυλαρσενικική αδενοσίνη		372
Πρωτονιωμένη d_5- 5΄-Διμεθυλαρσενικική αδενοσίνη		377
5΄-Τριμεθυλαρσενικική-1΄-μέθοξυ-ριβόζη		267
d_2-5΄-Τριμεθυλαρσενικική-1΄-μέθοξυ-ριβόζη		269



Σχήμα 3.1 Η μεταβολή των εντάσεων των θυγατρικών ιόντων του αρσενοβιτανίου συνάρτηση της ενέργειας θραυσματοποίησης σε τριπλό τετραπολικό αναλυτή μαζών εξοπλισμένο με κυψελίδα πρόσκρουσης (από το εργαστήριο μας από την αναφορά 23).



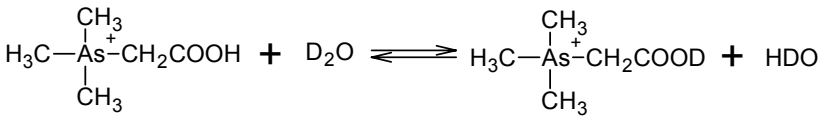
Σχήμα 3.2 Η μεταβολή των εντάσεων των θυγατρικών ιόντων του αρσενοβιτανίου συνάρτηση της ενέργειας θραυσματοποίησης στην ιοντική παγίδα.

3.2 Πειραματικό

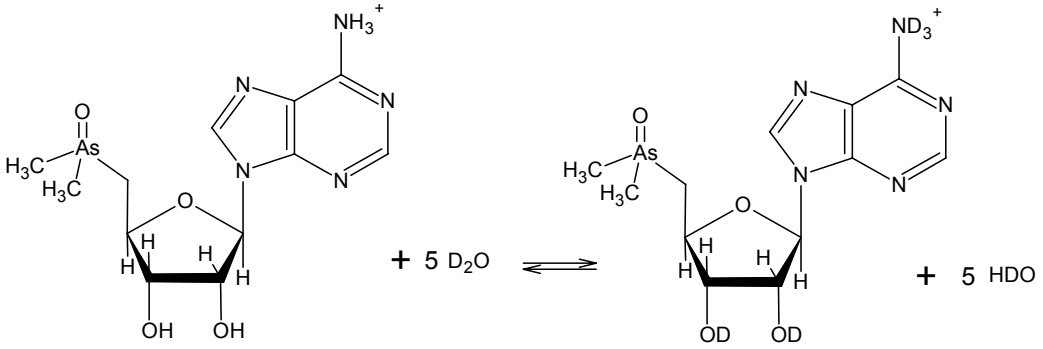
3.2.1 Χημικές ενώσεις και Μέθοδοι

Οι δευτεριωμένες πρότυπες ενώσεις του αρσενικού: d_3-αρσενοβιτάνιο, $CD_3(CH_3)_2As^+CH_2COOH$, d_9-τετραμεθυλαρσενικικό ιόν, $(CD_3)_3As^+CH_3$, και d_3-διμεθυλαρσενικικό οξύ, $(CD_3)CH_3AsOOH$, παρασκευάστηκαν σύμφωνα με μεθόδους που υπάρχουν στην βιβλιογραφία [186] και είναι μια ευγενική προσφορά του καθηγητή William R. Cullen (Environmental Chemistry Group, Department of Chemistry, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada). Το d-αρσενοβιτάνιο, $(CH_3)_3As^+CH_2COOD$, παρασκευάστηκε με διάλυση ποσότητας του βρωμιούχου άλατος αρσενοβιτανίου σε δευτεριωμένο νερό με σκοπό το όξινο πρωτόνιο του αρσενιβιτανίου να ανταλλαγεί με άτομο δευτερίου όπως φαίνεται και στο Σχήμα 3.3α. Κατά ανάλογο τρόπο παρασκευάστηκε και η d_5-5΄-διμεθυλαρσενικική αδενοσίνη (Σχήμα 3.3β). Σε αυτή την περίπτωση, επειδή η μη δευτεριωμένη πρότυπη ένωση διατίθεται σε διάλυμα, υδατικό διάλυμα αυτής αφέθηκε προς εξάτμιση του διαλύτη και έπειτα ακολούθησε επαναδιαλυτοποίηση σε δευτεριωμένο νερό. Εκτός από την διαδοχική φασματομετρία της δευτεριωμένης d_5-5΄-διμεθυλαρσενικικής αδενοσίνης πραγματοποιήθηκε και για το μη δευτεριωμένο ανάλογο της, αφού δεν έχει αναφερθεί στην βιβλιογραφία. Η πρότυπη 5΄-διμεθυλαρσενικική αδενοσίνη ήταν προϊόν απομόνωσης από οστρακοειδή. Επίσης η πρότυπη 5΄-τριμεθυλαρσενικική-1΄-μέθοξυ-ριβόζη παρασκευάστηκε σύμφωνα με μεθόδους που υπάρχουν στην βιβλιογραφία [187] και ήταν μια ευγενική προσφορά του καθηγητή Kevin A. Francesconi (Karl-Franzens University, Graz, Austria). Όλα τα διαλύματα που εξετάστηκαν ήταν συγκέντρωσης 100 μg As/mL. Το νερό που χρησιμοποιήθηκε ήταν απιονισμένο (Clear SG, 18 MΩ cm) και το δευτεριωμένο νερό (D_2O) ήταν 99.9% σε περιεκτικότητα ατόμων δευτερίου και προήλθε από την εταιρία Aldrich.

α)



β)



Σχήμα 3.3 Η προετοιμασία του d–αρσενοβιτανίου (α) και της d_5-5΄-διμεθυλαρσενικικής-αδενοσίνης (β).

3.2.2 Οργανολογία

Όλες οι μετρήσεις έγιναν στο φασματόμετρο μάζας LCQ Advantage (ThermoFinnigan, UK) εξοπλισμένο με πνευματικά υποβοηθούμενη πηγή ηλεκτροψεκασμού και με ιοντική παγίδα σαν αναλυτή μαζών με διαχωριστική ικανότητα μίας ατομικής μονάδας μάζας (atomic mass unit, amu) και δυνατότητα να πραγματοποιεί μέχρι και 10 στάδια διαδοχικής φασματομετρίας μάζας, MS^{10}. Όλα τα πειράματα έγιναν παρακολουθώντας θετικά ιόντα. Η ταχύτητα ροής των δειγμάτων προς την πηγή ιονισμού καθορίστηκε στα 10 μl/min. Σε κάθε δείγμα που εξετάστηκε έγινε αυτόματη βελτιστοποίηση των πειραματικών παραμέτρων του συστήματος μεταφοράς των ιόντων από την πηγή ιονισμού στον αναλυτή μαζών, ώστε το ιόν–στόχος της κάθε μέτρησης να έχει μέγιστο σήμα. Οι τυπικές πειραματικές παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν όπως το δυναμικό ιονισμού, η πίεση του εκνεφωτικού και βοηθητικού αερίου και η θερμοκρασία στον θερμαινόμενο τριχοειδή καθορίστηκαν με κριτήριο επιλογής την μέγιστη ένταση

του πατρικού ιόντος κάθε φορά. Για την εξέταση της 5΄-τριμεθυλαρσενικική-1΄-μέθοξυ-ριβόζης και του δευτεριωμένου αναλόγου της, χρησιμοποιήθηκε σαν πηγή ιονισμού ο νάνο-ηλεκτροψεκασμός. Αυτό έγινε επειδή διαθέταμε μικρή ποσότητα από αυτή την ένωση. Το εύρος παρακολούθησης των ιόντων ήταν από 60-500 Th. Ίδιες πειραματικές συνθήκες χρησιμοποιήθηκαν κατά την εξέταση των δειγμάτων και των αντίστοιχων δευτεριωμένων δειγμάτων. Το εύρος μαζών απομόνωσης του πατρικού ιόντος στην ιοντική παγίδα σε όλες τις περιπτώσεις ήταν από 3 έως και 1 Th έτσι ώστε να απομονώνεται μόνο το ιόν το οποίο ήταν να διασπαστεί. Η ενέργεια θραυσματοποίησης συνήθως κυμαίνονταν από 18-120 % των 5 Volt σε τιμή ικανή ανά περίπτωση ώστε να διασπαστεί το πρόδρομο ιόν. Ο χρόνος ενεργοποίησης ήταν 30 ms και η παράμετρος ενεργοποίησης (Q) κυμαίνονταν από 0.25-0.45. Τέλος η επεξεργασία όλων των φασμάτων έγινε με το λογισμικό Xcaliber έκδοσης 1.3

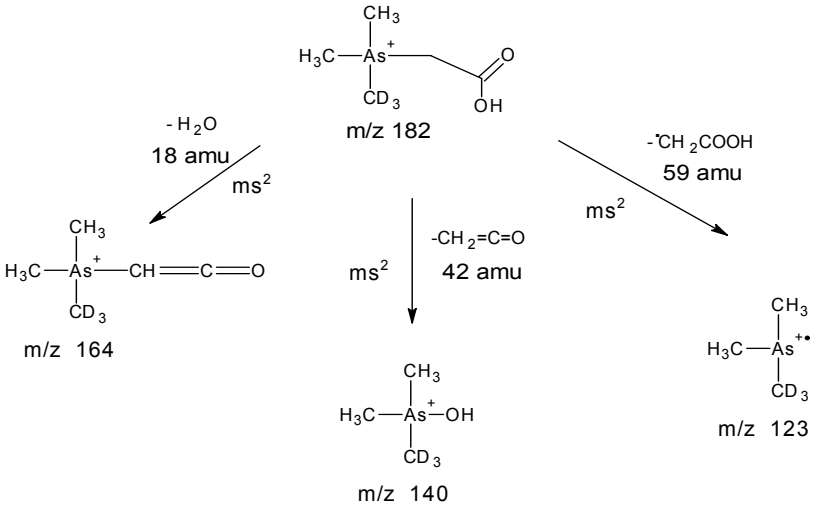
3.3 Ανάλυση Αποτελεσμάτων

3.3.1 d_3–Αρσενοβιτάνιο, $CD_3(CH_3)_2As^+CH_2COOH$

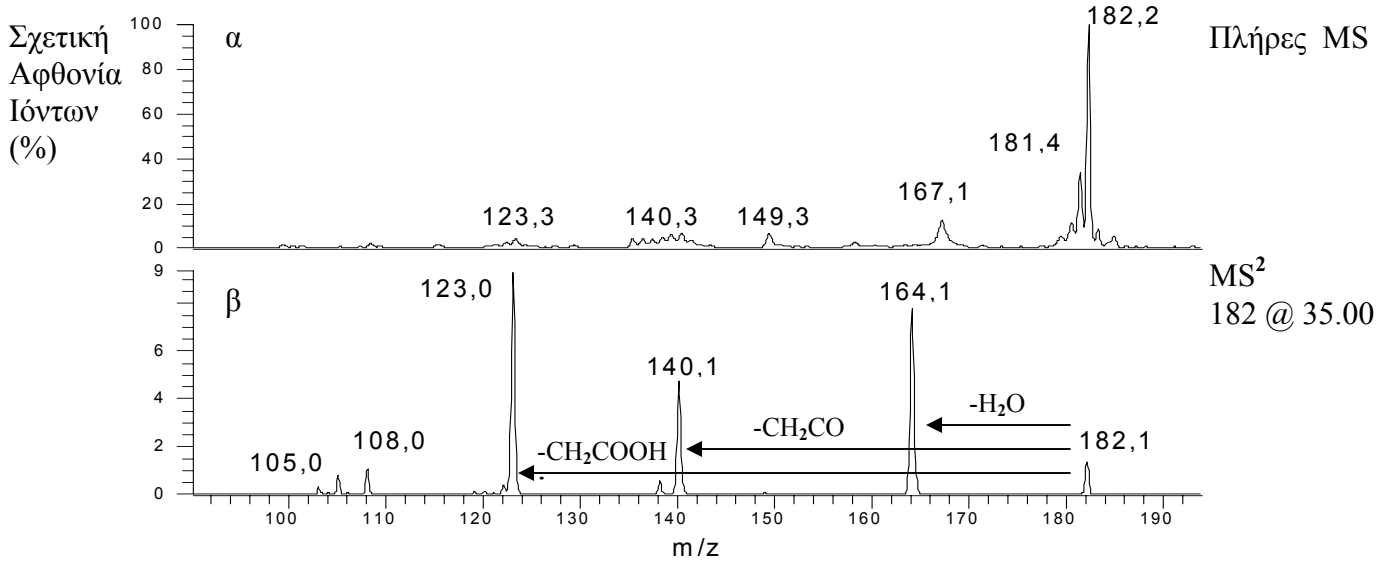
Στο ms φάσμα μάζας του d_3–αρσενοβιτανίου, το ιόν m/z 182 αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν του δευτεριωμένου αρσενοβιτανίου, $CD_3(CH_3)_2As^+CH_2COOH$. Τα ιόντα m/z 181, 167, 123, 149 και 140 πιστεύεται ότι αντιστοιχούν σε παραπροϊόντα της αντίδρασης σχηματισμού του δευτεριωμένου αρσενοβιτανίου και εμφανίζονται με πολύ χαμηλή ένταση σε αυτό το φάσμα μάζας (φάσμα μάζας: Σχήμα 3.5α).

Κατά την θραυσματοποίηση του d_3–αρσενοβιτανίου, m/z 182, παρατηρούνται στο ms^2 φάσμα μάζας τρία κύρια δευτερεύοντα ιόντα (φάσμα μάζας: Σχήμα 3.5β). Το ιόν m/z 164 προέρχεται από την απόσπαση ενός μορίου νερού από το μοριακό ιόν (προτεινόμενος μηχανισμός: Σχήμα 3.4). Η απόσπαση αυτή επιβεβαιώνεται κατά την θραυσματοποίηση του d–αρσενοβιτανίου, $(CH_3)_3As^+CH_2COOD$ (παρουσιάζεται στην επόμενη παράγραφο) όπου παρατηρείται η απόσπαση του HDO. Το άλλο δευτερεύον ιόν m/z 140 προέρχεται από την αποχώρηση του ουδέτερου μορίου CH_2CO, και συνοδεύεται από την μετάθεση της υδροξυλομάδας του d_3–αρσενοβιτάνιου στο άτομο του αρσενικού (μηχανισμός: Σχήμα 3.4). Αυτή η απόσπαση-μετάθεση επιβεβαιώνεται κατά την

θραυσματοποίηση του d–αρσενοβιτανίου (παραγ. 3.3.2) όπου παρατηρείται η μετάθεση της δευτεριωμένης υδροξυλομάδας στο άτομο του αρσενικού στο d-αρσενοβιτάνιο. Επιπλέον μέσω ομολυτικής διάσπασης του δεσμού μεταξύ του ατόμου του αρσενικού και της μεθυλενικής ομάδας, σχηματίζεται η κατιοντική ρίζα m/z 123 με αποχώρηση της $^{\cdot}CH_2COOH$ (μηχανισμός: Σχήμα 3.4). Όσο αφορά τα ιόντα χαμηλής έντασης m/z 108 και 105 αυτά πιστεύεται ότι προέρχονται από την περαιτέρω θραυσματοποίηση του ιόντος m/z 123 όπως φαίνεται παρακάτω κατά την θραυσματοποίηση του.

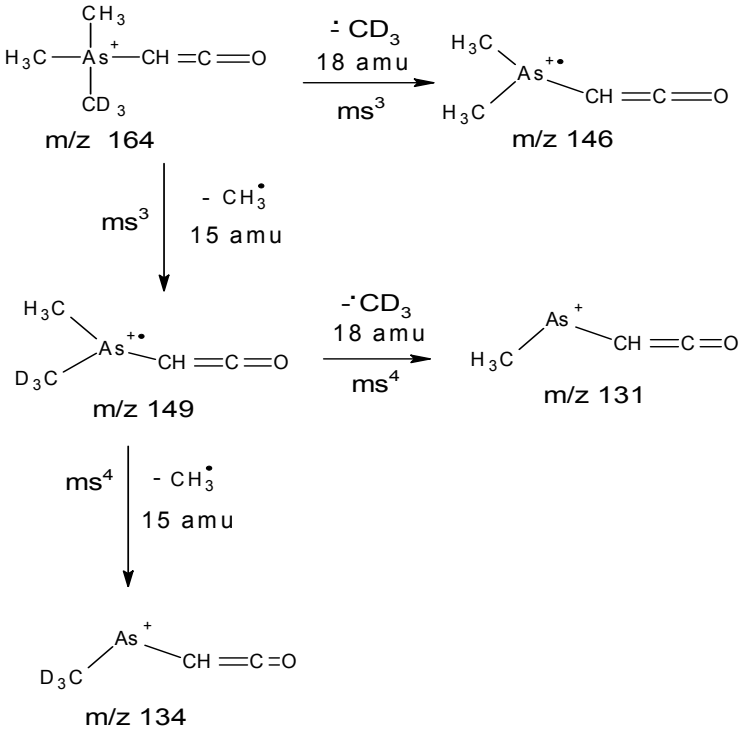


Σχήμα 3.4 Η προτεινόμενη θραυσματοποίηση του μοριακού ιόντος του d_3–αρσενοβιτανίου κατά το ms^2 στάδιο της διαδοχικής φασματομετρίας.

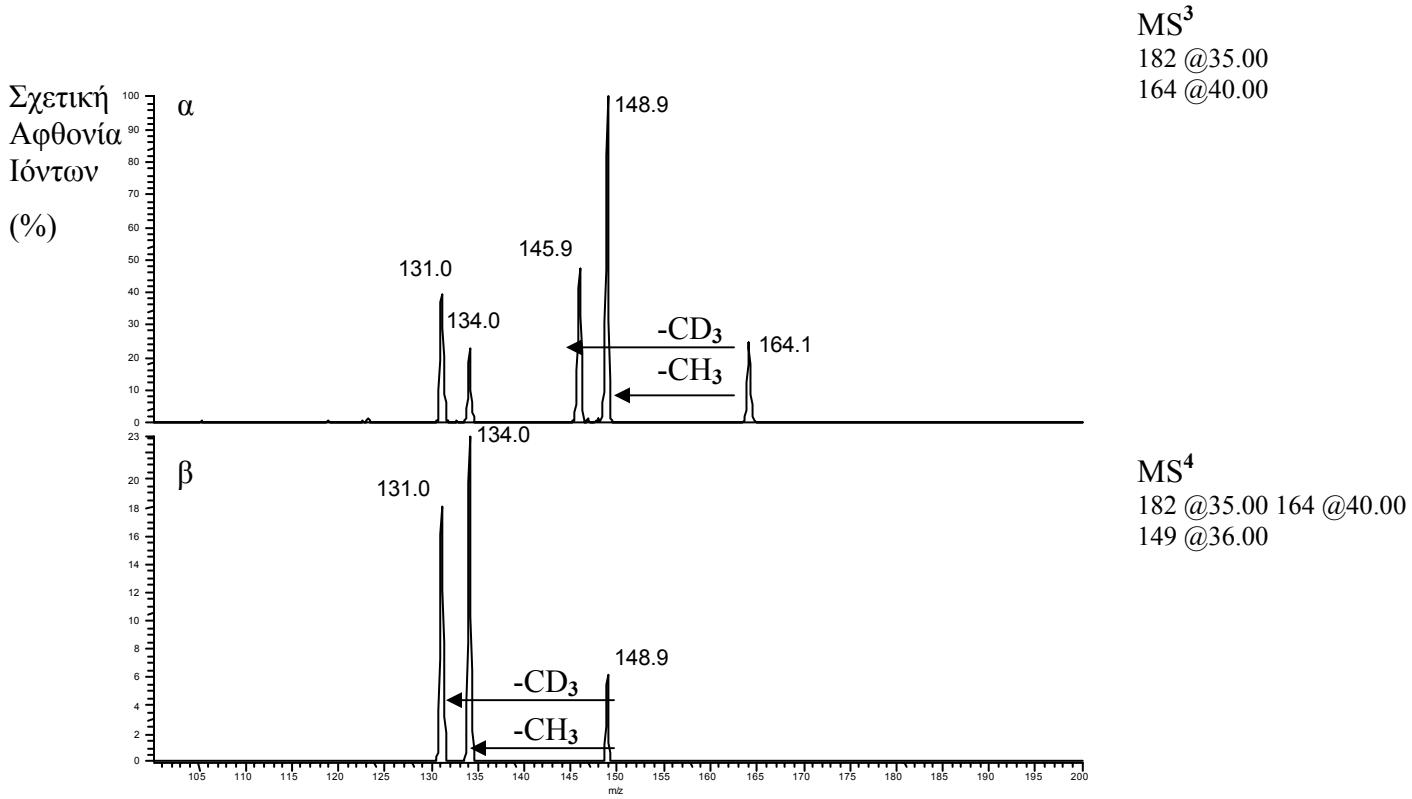


Σχήμα 3.5 Το ms (α) και ms^2 (β) φάσμα μάζας του d_3 – αρσενοβιτάνιου.

Η περαιτέρω θραυσματοποίηση του ιόντος m/z 164 (ms^3) χαρακτηρίζεται από αποσπάσεις μεθυλικής και δευτεριωμένης μεθυλικής ριζας, σχηματίζοντας τα ιόντα m/z 146 και 149, αντίστοιχα (μηχανισμός: Σχήμα 3.6, φάσμα μάζας: Σχήμα 3.7α). Η αναλογία των εντάσεων των κορυφών που αντιστοιχούν στα ιόντα αυτά είναι 1:2, κάτι αναμενόμενο αφού η αναλογία των δευτεριωμένων προς των μη–δευτεριωμένων μεθυλικών ομάδων στο μόριο d_3–αρσενοβιτανίου είναι 1:2. Τα ιόντα m/z 131 και 134 που εμφανίζονται στο ms^3 φάσμα μάζας (Σχήμα 3.7.α), σχηματίζονται από ανάλογες αποσπάσεις δευτεριωμένων και μη, μεθυλικών ριζών από την περαιτέρω θραύση των ιόντων m/z 146 και 149 (μηχανισμός: Σχήμα 3.6). Αυτό φαίνεται και από το ms^4 φάσμα μάζας, όπου η απομόνωση και θραυσματοποίηση του ιόντος m/z 149 παράγει τα ιόντα m/z 131 και 134 (φάσμα μάζας: Σχήμα 3.7β). Και σε αυτή την περίπτωση η αναλογία των εντάσεων αυτών των κορυφών είναι κοντά στην αναμενόμενη, δηλαδή 1:1. Κατά το στάδιο αυτό της διαδοχικής φασματομετρίας μάζας το αρσενικό ανάγεται από την οξειδωτική κατάσταση +5 προς την +3.



Σχήμα 3.6 Η προτεινόμενη θραυσματοποίηση του θυγατρικού ιόντος m/z 164 του d_3–αρσενοβιτάνιου.

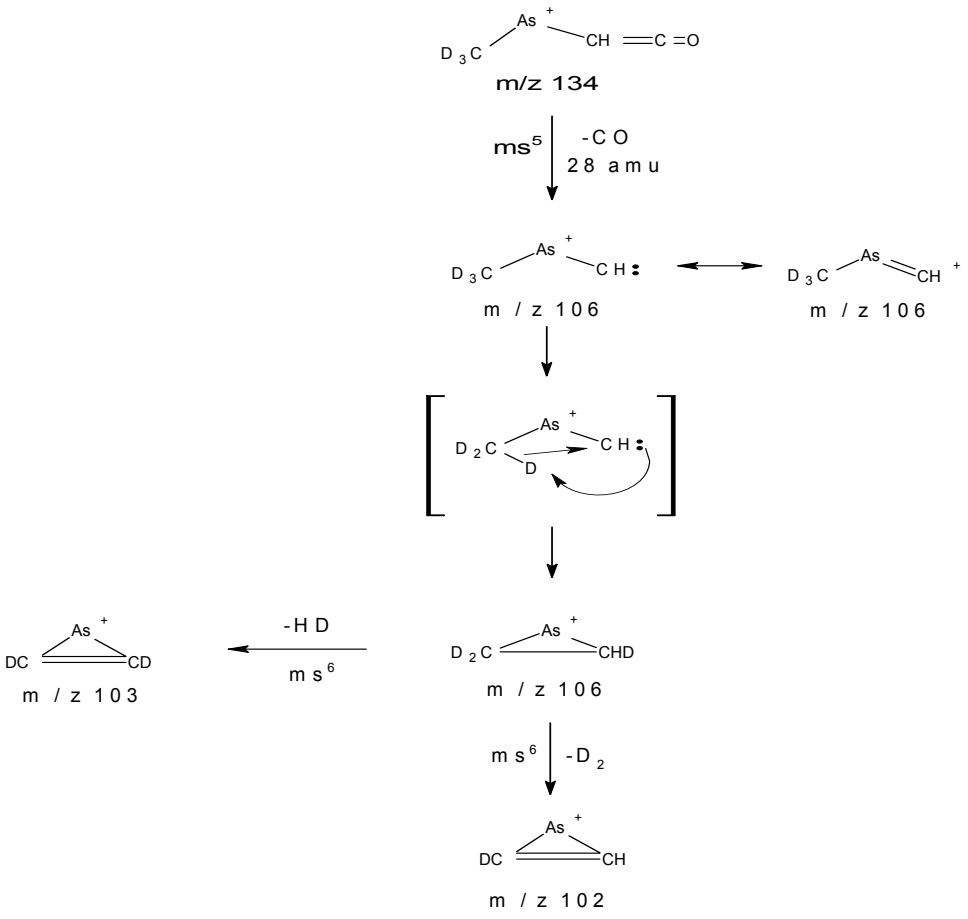


Σχήμα 3.7 Τα ms^3 (α), ms^4 (β) φάσματα μάζας του d_3 –αρσενοβιτανίου.

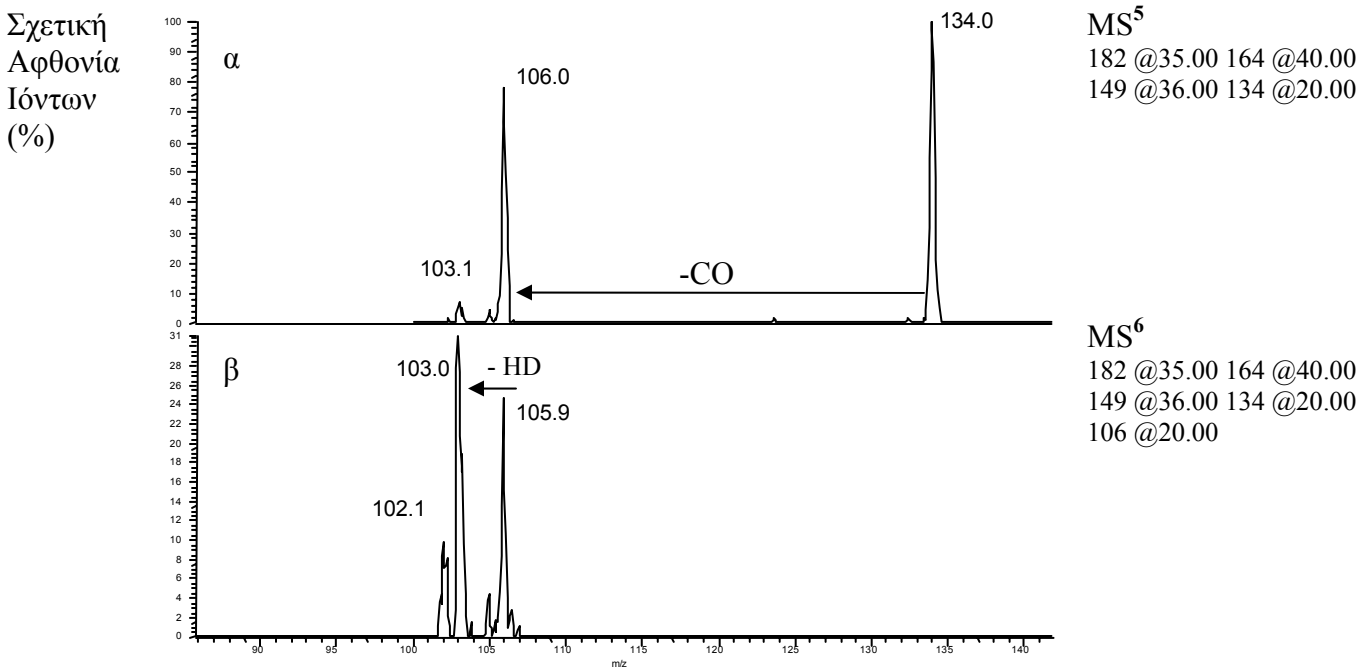
Από τα δευτερεύοντα ιόντα που σχηματίστηκαν κατά το ms^4 στάδιο της διαδοχικής φασματομετρίας, το δευτερεύον ιόν m/z 134 επιλέχθηκε για περαιτέρω θραυσματοποίηση, διότι η μεθυλομάδα με τα άτομα δευτερίου διατηρείται στην δομή του. Κατά την θραυσματοποίηση (ms^5) αυτού του ιόντος σχηματίζεται το ιόν m/z 106, έπειτα από απόσπαση ενός μορίου μονοξειδίου του άνθρακα (μηχανισμός: Σχήμα 3.8, φάσμα μάζας: Σχήμα 3.9α). Κατά αυτήν την απόσπαση φαίνεται να απομένουν στον άνθρακα που ήταν συνδεδεμένος με την ομάδα του μονοξείδιου του άνθρακα, δύο μονήρη ηλεκτρόνια τα οποία μέσω δομής συντονισμού σχηματίζουν τον διπλό δεσμό μεταξύ αυτού του άνθρακα και του ατόμου του αρσενικού μεταφέροντας το θετικό φορτίο στον άνθρακα όπως φαίνεται στο σχήμα 3.8.

Παρόλα αυτά, οι δομές συντονισμού που αποδίδονται στο ιόν m/z 106, δεν φαίνεται να είναι και οι μοναδικές δομές για το ιόν αυτό όπως προέκυψε από το ms^6 στάδιο της διαδοχικής φασματομετρίας. Κατά την θραυσματοποίηση του ιόντος m/z 106 (ms^6) παράγεται το ιόν m/z 103 (φάσμα μάζας: Σχήμα 3.9β), αυτή η διαφορά 3 ατομικών μονάδων μάζας μεταξύ πατρικού και θυγατρικού ιόντος μπορεί να αποδοθεί μόνο στην αποχώρηση ενός μορίου HD από το πρόδρομο ιόν. Είναι εμφανές ότι αν το ιόν m/z 106

έχει την δομή: $CD_3As=CH^+$, η αποχώρηση του μορίου HD δεν είναι εφικτή. Αυτό που φαίνεται να συμβαίνει είναι ότι αρχικά το ιόν m/z 106 έχει τη μορφή $CD_3As^+=CH$, που σχηματίζεται κατά την απόσπαση του μονοξειδίου του άνθρακα, αλλά αυτή η γραμμική δομή θα πρέπει να μετασχηματίζεται προς την κυκλική δομή CD_2As^+CHD (μηχανισμός: Σχήμα 3.8), μέσω μεταφοράς ενός ατόμου δευτερίου από το ένα άτομο του άνθρακα στο άλλο. Κατόπιν λαμβάνει χώρα η απόσπαση του μορίου HD, σχηματίζοντας το ιόν m/z 103 (μηχανισμός: Σχήμα 3.8). Επίσης, όπως αναμένεται, από το ίδιο ιόν λαμβάνει χώρα και απόσπαση ενός μορίου D_2 και σχηματισμός του ιόντος m/z 102 (μηχανισμός: Σχήμα 3.8, φάσμα μάζας: Σχήμα 3.9β). Η διαφορά των εντάσεων των κορυφών που αντιστοιχούν στα ιόντα m/z 103 και 102, ίσως να οφείλεται σε ισοτοπικό φαινόμενο, δηλαδή πιο εύκολα αποσπάται ένα μόριο HD απ' ότι ένα μόριο D_2 από το ιόν m/z 106.

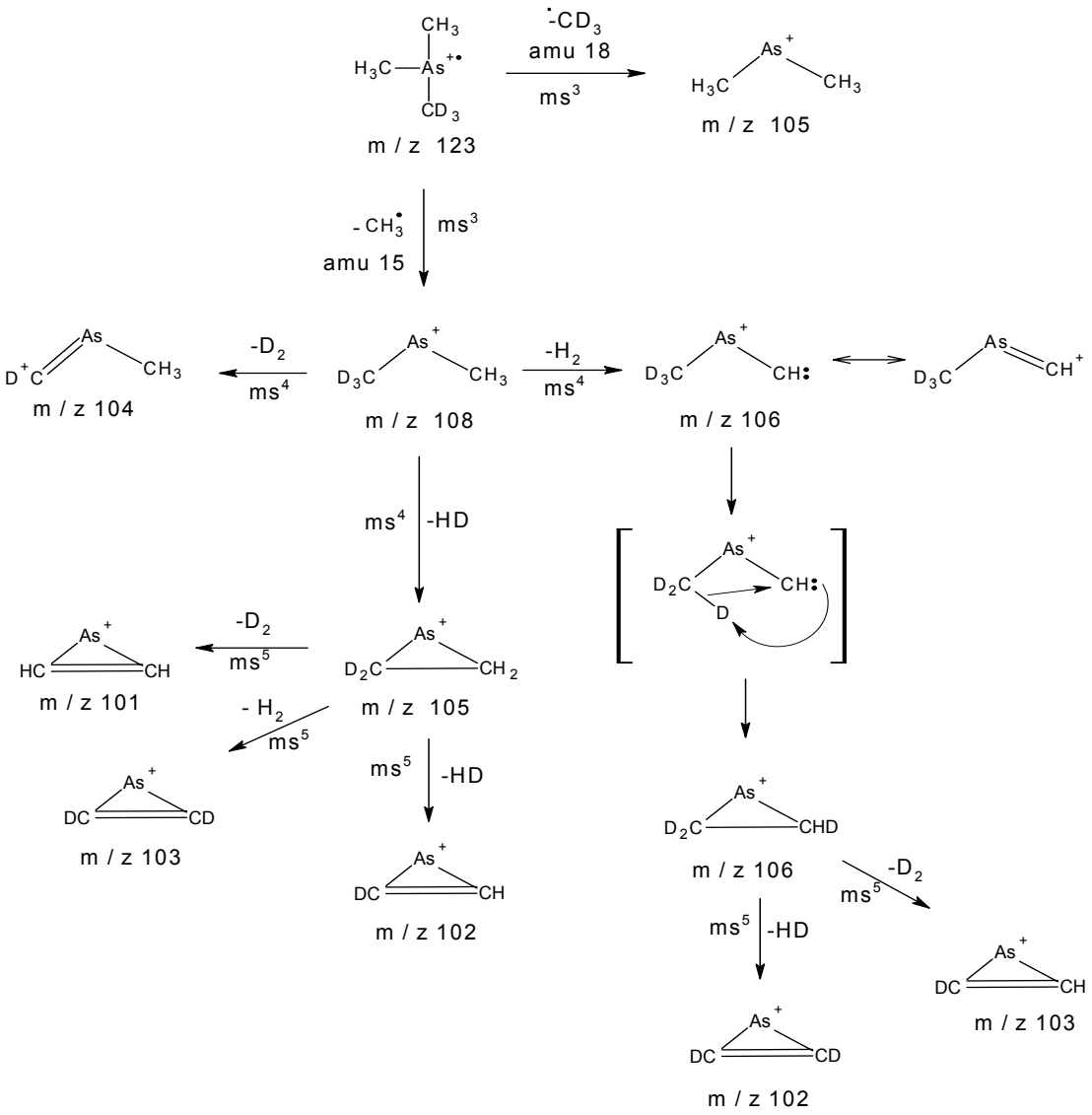


Σχήμα 3.8 Το μονοπάτι θραυσματοποίησης του θυγατρικού ιόντος m/z 164 του d_3-αρσενοβιτανίου.

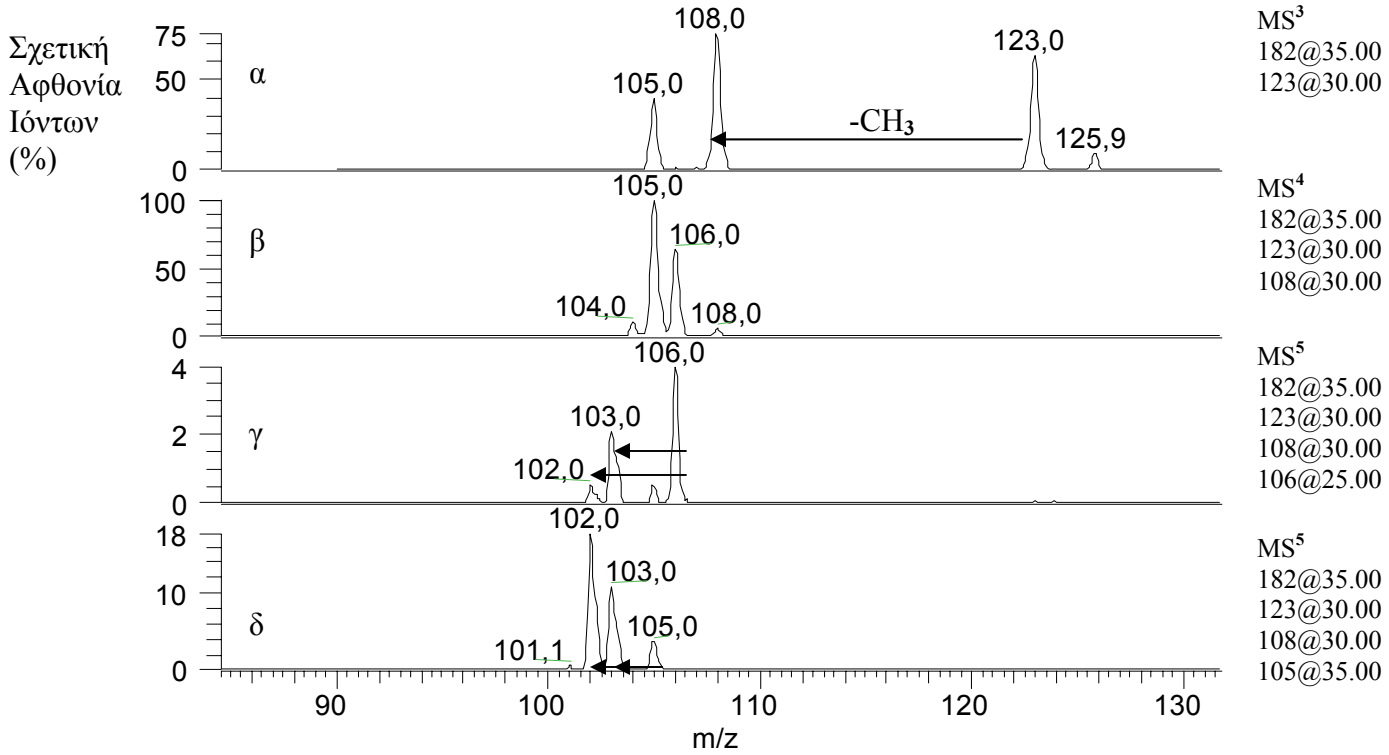


Σχήμα 3.9 Τα ms^5 (α) και ms^6 (β) φάσματα μάζας του d_3 –αρσενοβιτανίου.

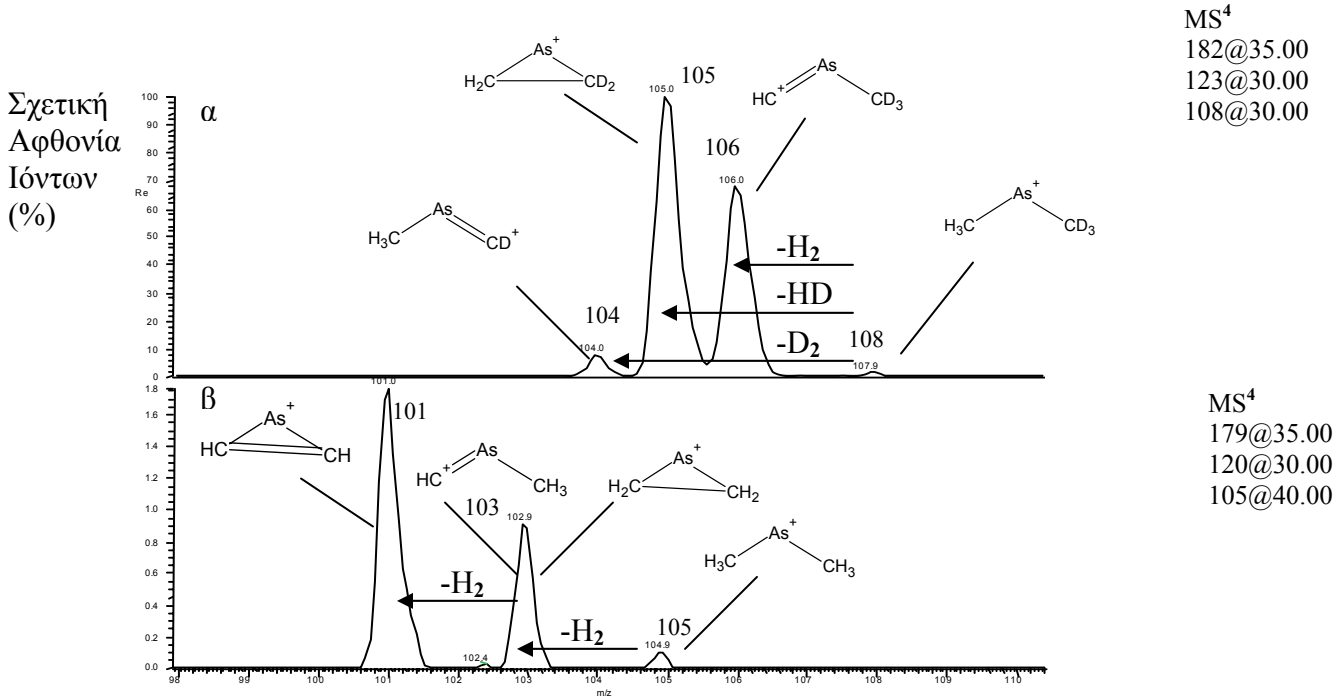
Το δεύτερο μονοπάτι θραυσματοποίησης του d_3–αρσενοβιτανίου ξεκινά από την διάσπαση του θυγατρικού του ιόντος m/z 123 (ms^3) παράγοντας τα ιόντα m/z 108 και 105 έπειτα από αποσπάσεις μεθυλικής και δευτεριωμένης μεθυλικής ρίζας, αντίστοιχα (μηχανισμός: Σχήμα 3.10, φάσμα μάζας: Σχήμα 3.11α). Η διάσπαση του ιόντος m/z 105 που δεν φέρει άτομα δευτερίου είναι ήδη γνωστή όταν αυτό προέρχεται από το μη δευτεριωμένο αρσενοβιτάνιο (φάσμα μάζας: Σχήμα 3.12β). Με την θραυσματοποίηση του ιόντος m/z 108 (ms^4) παράγονται τα ιόντα m/z 106, 105 και 104 μετά από αποσπάσεις μορίων H_2, HD και D_2 αντίστοιχα (μηχανισμός: Σχήμα 3.10, φάσμα μάζας: Σχήμα 3.11β και 3.12α). Έτσι, αντίστοιχα για το μη δευτεριωμένο ανάλογο του ιόντος m/z 108, το ιόν m/z 105, $CH_3As^+CH_3$ όταν διασπάται σχηματίζει το ιόν m/z 103 που θα πρέπει να βρίσκεται σε δύο δομές, μία κυκλική και μία γραμμική (φάσμα μάζας: Σχήμα 3.12β).



Σχήμα 3.10 Το μονοπάτι θραυσματοποιήσης του θυγατρικού ιόντος m/z 123.



Σχήμα 3.11 Το ms^3 (α), ms^4 (β) ms^5 (γ) και ms^5 (δ) φάσμα μάζας του d_3 – αρσενοβιτανίου.

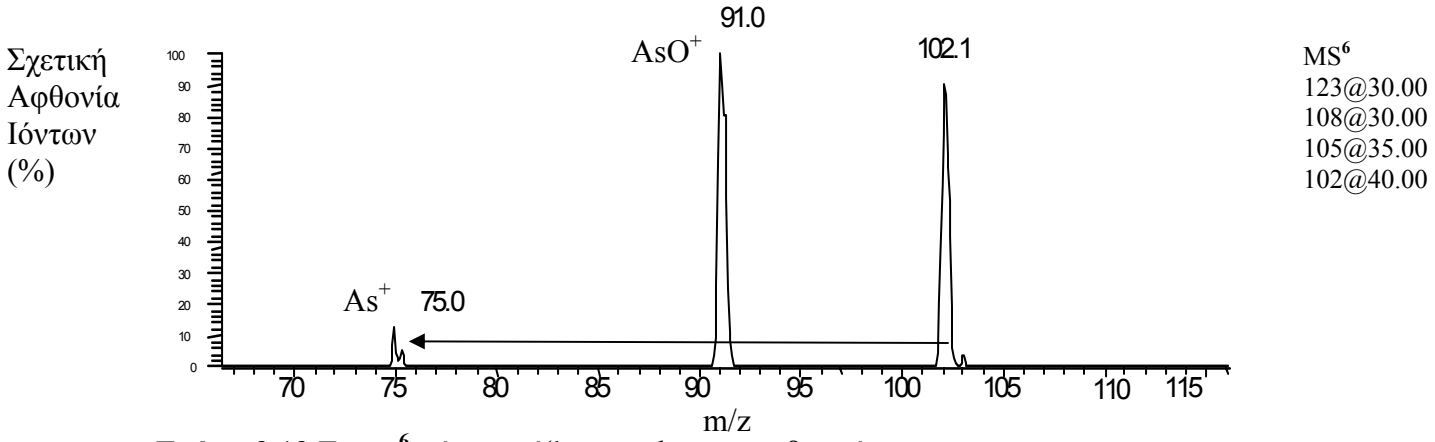


Σχήμα 3.12 Το ms^4 φάσμα μάζας του θυγατρικού ιόντος m/z 108 (α), και του μη-δευτεριωμένου αναλόγου του m/z 105.

Έπειτα ακολούθησε απομόνωση και θραυσματοποίηση του ιόντος m/z 106 (ms^5). Τα δευτερεύοντα ιόντα που παράχθηκαν, m/z 103 και 102 σχηματίστηκαν έπειτα από απόσπαση ενός μορίου HD και D_2 από το ιόν m/z 106 αντίστοιχα (μηχανισμός: Σχήμα 3.10, φάσμα μάζας: Σχήμα 3.11γ). Και σε αυτή την περίπτωση, όπως και στο προηγούμενο μονοπάτι θραυσματοποίησης του d_3-αρσενοβιτανίου, το ιόν m/z 106 με γραμμική δομή $CD_3As=CH^+$ πρέπει να μεταβαίνει στην κυκλική δομή CD_2As^+CHD μέσω μετάθεσης δευτερίου από τον έναν άνθρακα στον άλλο και από αυτή την δομή λαμβάνουν χώρα οι αποσπάσεις των μορίων HD και D_2.

Όταν το ιόν m/z 105, κυκλική δομή $CD_2As^+CH_2$, απομονώθηκε και θραυσματοποιήθηκε (ms^5) σχηματίστηκε το αναμενόμενο ιόν m/z 102 έπειτα από απόσπαση ενός μορίου HD (φάσμα μάζας: Σχήμα 3.11δ, μηχανισμός: Σχήμα 3.10). Εκτός όμως από αυτό, στο φάσμα μάζας παρατηρήθηκαν και κορυφές που αντιστοιχούν στα ιόντα m/z 103 και 101 (φάσμα μάζας: Σχήμα 3.11δ). Για να σχηματιστούν αυτά τα ιόντα από το ιόν m/z 105, με κυκλική δομή $CD_2As^+CH_2$, ο μόνος τρόπος είναι να διασπαστεί η κυκλική δομή και λάβει χώρα ανταλλαγή δευτερίου και πρωτονίου μεταξύ των ανθράκων, σχηματίζοντας το ιόν m/z 105 με γραμμικές δομές, CD_2HAsCH^+ και $^+CDAsCH_2D$ (μηχανισμός: Σχήμα 3.10). Έπειτα από το ιόν αυτό πραγματοποιούνται οι αποσπάσεις μορίων H_2 και D_2 και σχηματίζοντας τα ιόντα με m/z 103 και 101, αντίστοιχα.

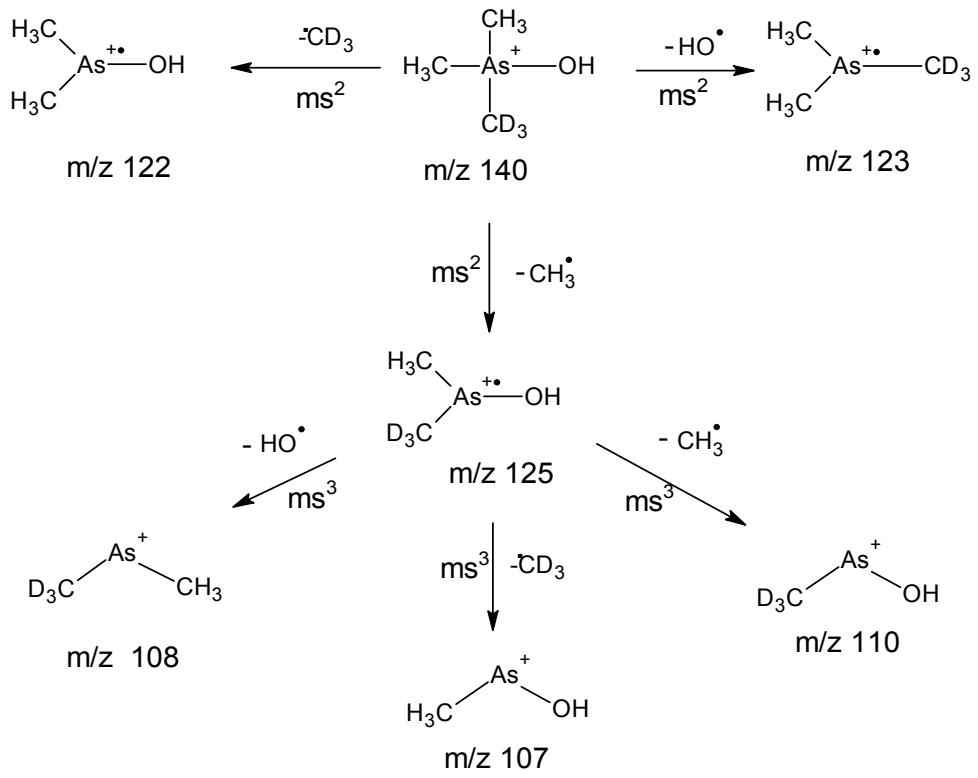
Από την περαιτέρω θραύση του ιόντος m/z 102 κατά το ms^6 στάδιο της διαδοχικής φασματομετρίας (φάσμα μάζας: Σχήμα 3.13) παράγονται ατομικά ιόντα αρσενικού (m/z 75), κάτι που αναφέρεται για πρώτη φορά σε φασματομετρία μάζας ιοντικής παγίδας. Επίσης παράγονται και τα ιόντα m/z 91, τα οποία δεν μπορεί να σχηματίζονται από την αποχώρηση κάποιου τμήματος του ιόντος m/z 102. Το πιο πιθανό είναι ότι αυτά τα ιόντα αντιστοιχούν σε οξείδια του αρσενικού AsO^+ τα οποία σχηματίζονται εξαιτίας της ύπαρξης οξυγόνου μέσα στην ιοντική παγίδα ως πρόσμιξη του αερίου ηλίου που χρησιμοποιείται ή της ύπαρξης υγρασίας στο αέριο της ιοντικής παγίδας.



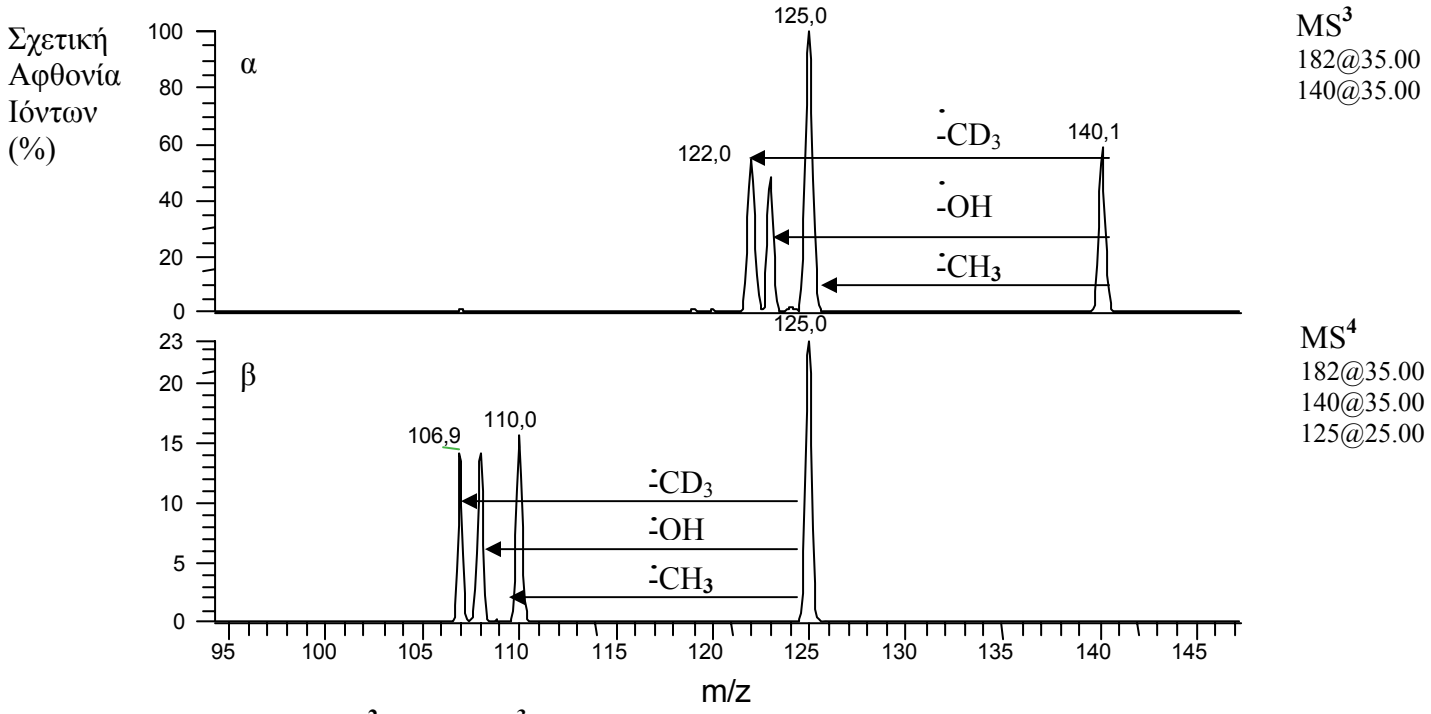
Σχήμα 3.13 Το ms^6 φάσμα μάζας του d_3–αρσενοβιτανίου.

Το τρίτο μονοπάτι θραυσματοποίησης του d_3–αρσενοβιτανίου ξεκινά με την θραύση του θυγατρικού ιόντος m/z 140 (ms^3). Κατά την διάσπαση αυτού του ιόντος παράγονται τα ιόντα m/z 122, 123 και 125 μέσω αποσπάσεων δευτεριωμένης μεθυλικής ρίζας, μεθυλικής ρίζας και ρίζας υδροξυλίου, αντίστοιχα, έπειτα από ομολυτικές διασπάσεις των δεσμών του ατόμου του αρσενικού (φάσμα μάζας: Σχήμα 3.15α, μηχανισμός: Σχήμα 3.14). Κατά το στάδιο αυτό, το άτομο του αρσενικού από την οξειδωτική κατάσταση +5 ανάγεται προς +3. Από αυτά τα δευτερεύοντα ιόντα το ιόν m/z 122 δεν φέρει στην δομή του άτομα δευτερίου και έτσι δεν θραυσματοποιήθηκε περαιτέρω. Το μονοπάτι θραυσματοποίησης για το ιόν m/z 123 μελετήθηκε και είναι όμοιο με αυτό που έχει παρουσιαστεί παραπάνω.

Κατά την θραύση του ιόντος m/z 125 (ms^4) λαμβάνουν χώρα ανάλογες αποσπάσεις ριζών με τις προαναφερόμενες, δηλαδή ομολυτικές διασπάσεις δεσμών και αποχώρηση δευτεριωμένης μεθυλικής ρίζας, μεθυλικής ρίζας και ρίζας υδροξυλίου από το ιόν m/z 125 σχηματίζοντας τα ιόντα m/z 107, 110 και 108, αντίστοιχα (φάσμα μάζας: Σχήμα 3.15β, μηχανισμός: Σχήμα 3.14). Περαιτέρω θραυσματοποιήση αυτών των θυγατρικών ιόντων δεν κατέστη δυνατή λόγω της χαμηλής τους έντασης και έτσι η απομόνωση τους δεν ήταν ικανοποιητική.



Σχήμα 3.14 Το μονοπάτι θραυσματοποιήσης του θυγατρικού ιόντος m/z 140 του d_3-αρσενοβιτανίου.



Σχήμα 3.15 Το ms^2 (α) και ms^3 (β) φάσμα μάζας του d_3 –αρσενοβιτανίου.

Πίνακας 3.2 Τα πρόδρομα και δευτερεύοντα ιόντα του d_3–αρσενοβιτανίου.

	Πρόδρομο ιόν (m/z)	Δευτερεύοντα ιόντα (m/z)
ms^2	182	164, 140, 123
ms^3	164	149, 146, 134, 131
ms^3	140	125, 123, 122
ms^3	123	108, 105
ms^4	149	131,134
ms^4	125	110, 108,107
ms^4	108	106, 105, 104
ms^5	134	106
ms^5	106	103, 102
ms^5	105	103, 102, 101
ms^6	102	91, 75

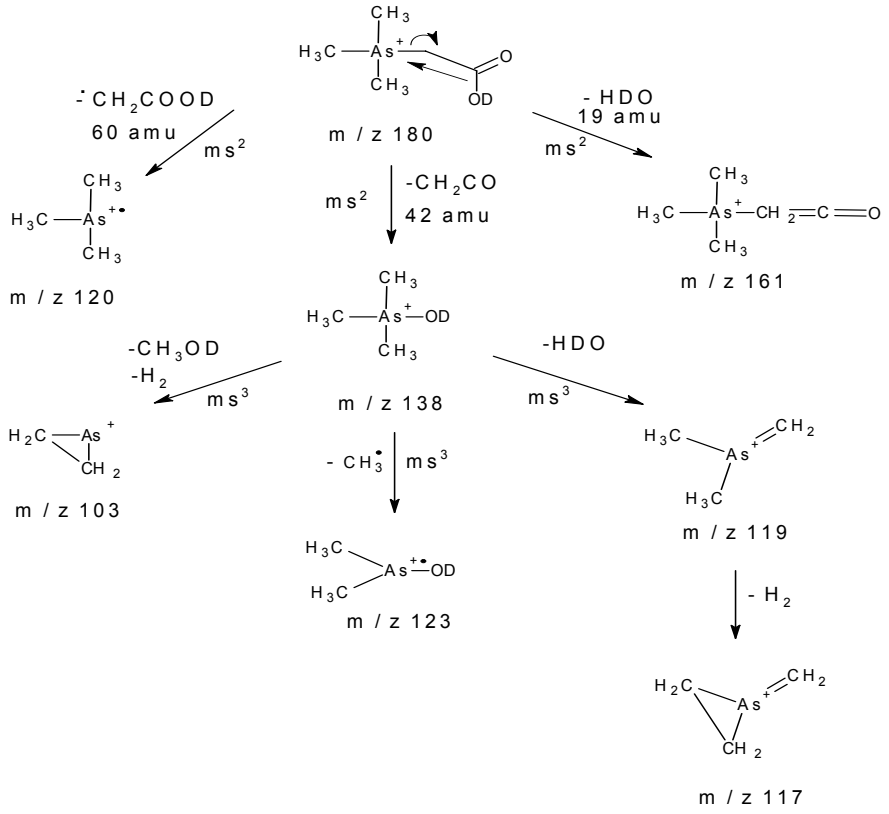
3.3.2 d–Αρσενοβιτάνιο, $(CH_3)_3As^+CH_2COOD$

Στο ms φάσμα μάζας του d–αρσενοβιτανίου (φάσμα μάζας: Σχήμα 3.17α) εμφανίζεται η κορυφή m/z 180 που αντιστοιχεί στην δομή $(CH_3)_3As^+CH_2COOD$ επιβεβαιώνοντας ότι η ανταλλαγή του όξινου πρωτονίου του αρσενοβιτανίου με ένα άτομο δευτερίου σε διάλυμα δευτεριωμένου νερού έχει επιτευχθεί. Από την διαδοχική φασματομετρία μάζας αυτού του ιόντος μπορούν να ελεγχθούν οι μηχανισμοί θραύσης που σχετίζονται με την καρβοξυλική όμαδα του αρσενοβιτανίου, και που έχουν προταθεί παραπάνω, κάτι που δεν ήταν εφικτό να γίνει από την διαδοχική φασματομετρία μάζας του $CD_3(CH_3)_2As^+CH_2COOH$.

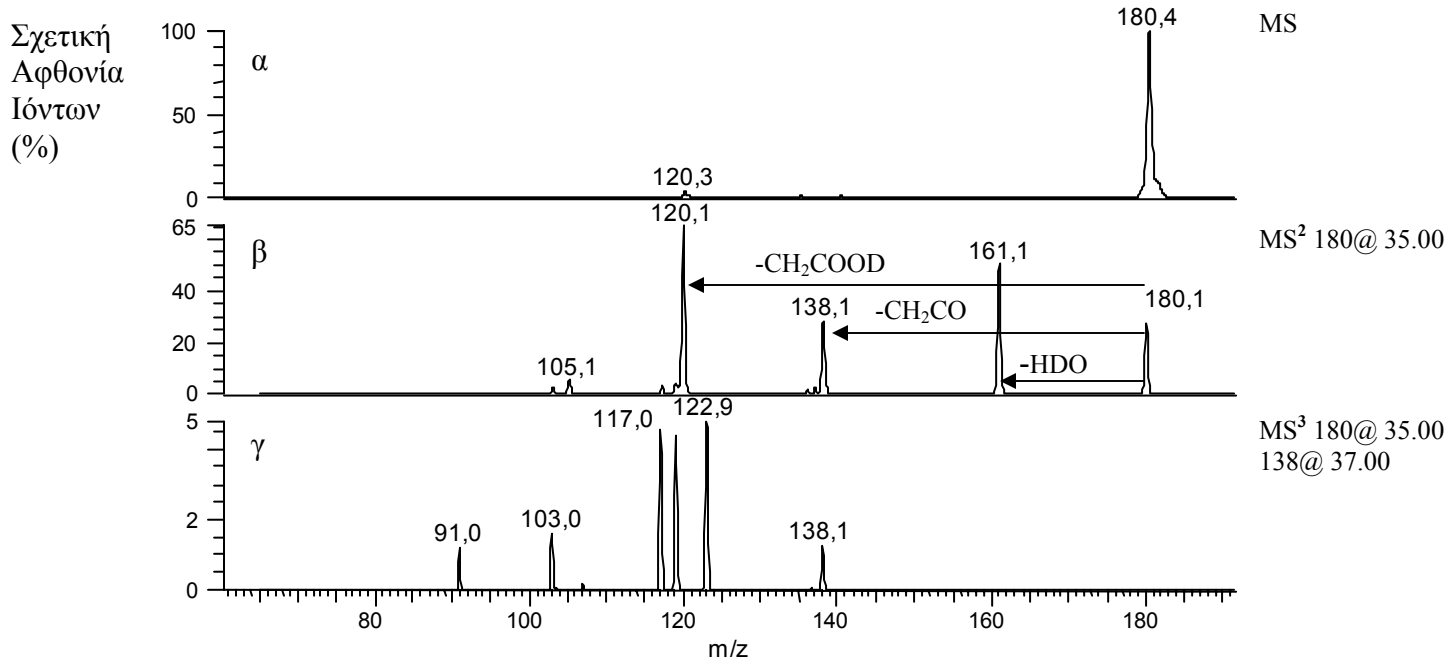
Από την διάσπαση του ιόντος m/z 180 (ms^2) παράγεται το ιόν m/z 161 (φάσμα μάζας: Σχήμα 3.17β). Η διαφορά 19 ατομικών μονάδων μάζας μεταξύ αυτού του θυγατρικού ιόντος και του πατρικού, αποδίδεται στην απόσπαση ενός μερικώς δευτεριωμένου νερού, HDO (μηχανισμός: Σχήμα 3.16). Το άλλο δευτερεύον ιόν του m/z 180, το ιόν m/z 138 παράγεται από την αποχώρηση του ουδέτερου μορίου CH_2CO, καθώς η δευτεριωμένη υδροξυλομάδα του d–αρσενοβιτάνιου μετατίθεται στο άτομο του

αρσενικού (φάσμα μάζας: Σχήμα 3.17β, μηχανισμός: Σχήμα 3.16). Τέλος, το ιόν m/z 120, σχηματίζεται με την αποχώρηση της δευτεριωμένης ρίζας $\dot{C}H_2COOD$ από το ιόν m/z 180 (φάσμα μάζας: Σχήμα 3.17β, μηχανισμός: Σχήμα 3.16).

Από αυτά τα δευτερεύοντα ιόντα, επιλέχθηκε για περαιτέρω θραυσματοποίηση το ιόν m/z 138 (ms^3) εφόσον διατηρεί το άτομο δευτερίου στην δομή του. Από αυτό το ιόν μέσω απόσπασης ενός μερικώς δευτεριωμένου μορίου νερού σχηματίζεται το ιόν m/z 119 και από αυτό με επακόλουθη αποχώρηση ενός μορίου υδρογόνου σχηματίζεται το ιόν m/z 117 (φάσμα μάζας: Σχήμα 3.17γ, μηχανισμός: Σχήμα 3.16). Επίσης από το ιόν m/z 138 σχηματίζεται το ιόν m/z 103, έπειτα από ταυτόχρονη απόσπαση ενός μορίου μεθανόλης και ενός μορίου υδρογόνου (φάσμα μάζας: Σχήμα 3.17γ, μηχανισμός: Σχήμα 3.16). Το δευτερεύον ιόν m/z 123 σχηματίζεται μέσω απόσπασης μεθυλικής ρίζας (φάσμα μάζας: Σχήμα 3.17γ, μηχανισμός: Σχήμα 3.16). Λόγω της διατήρησης του ατόμου δευτερίου στην δομή του ιόντος m/z 123 επιχειρήθηκε να θραυσματοποιηθεί, αλλά κάτι τέτοιο δεν κατέστη δυνατό εξαιτίας της χαμηλής του έντασης.



Σχήμα 3.16 Τα μονοπάτια θραυσματοποίηση του d–αρσενοβιτανίου.



Σχήμα 3.17 Το ms (α), ms^2 (β) και ms^3 (γ) φάσμα μάζας του d–αρσενοβιτανίου.

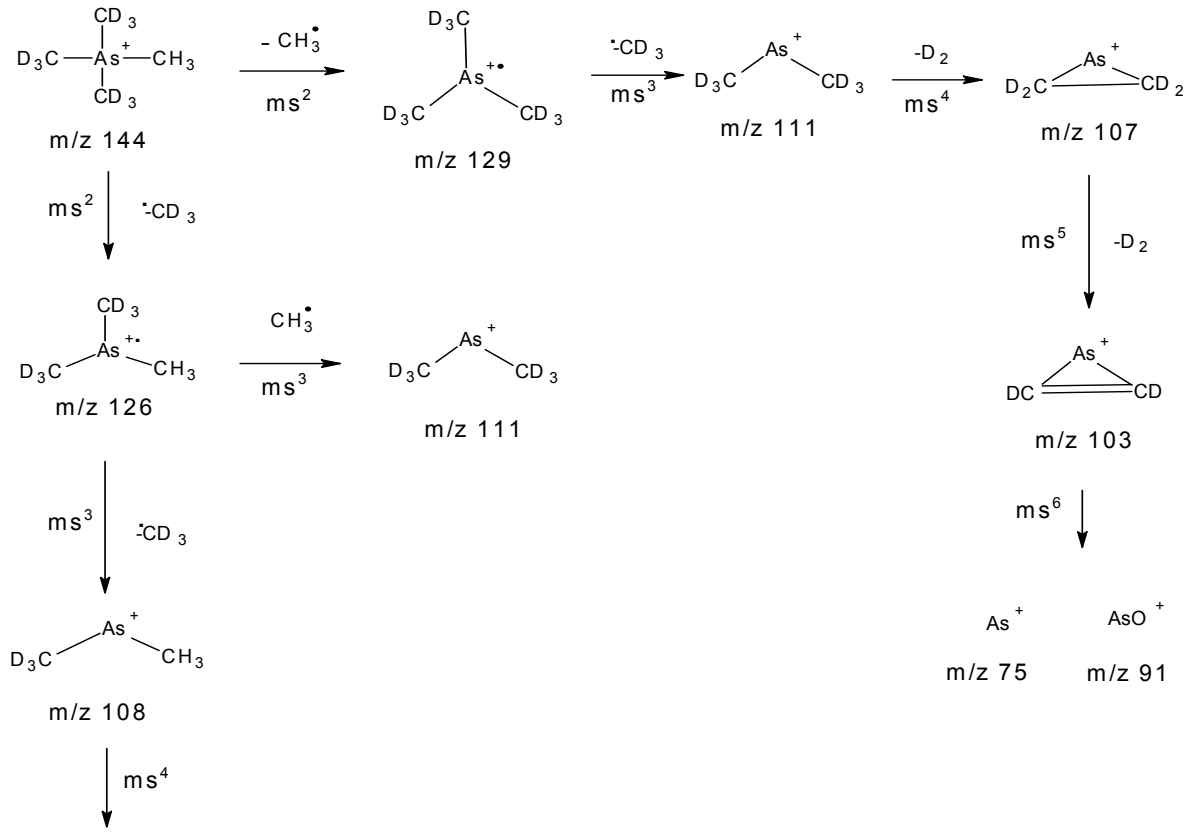
Πίνακας 3.3 Τα πρόδρομα και δευτερεύοντα ιόντα του d-αρσενοβιτανίου.

	Πρόδρομο ιόν (m/z)	Δευτερεύοντα ιόντα (m/z)
ms^2	180	161, 138, 120
ms^3	138	123, 119, 117, 103, 91
ms^4	123	Κανένα

3.3.3 d_9-Τετραμεθυλαρσενικικό ιόν, $(CD_3)_3As^+(CH_3)$

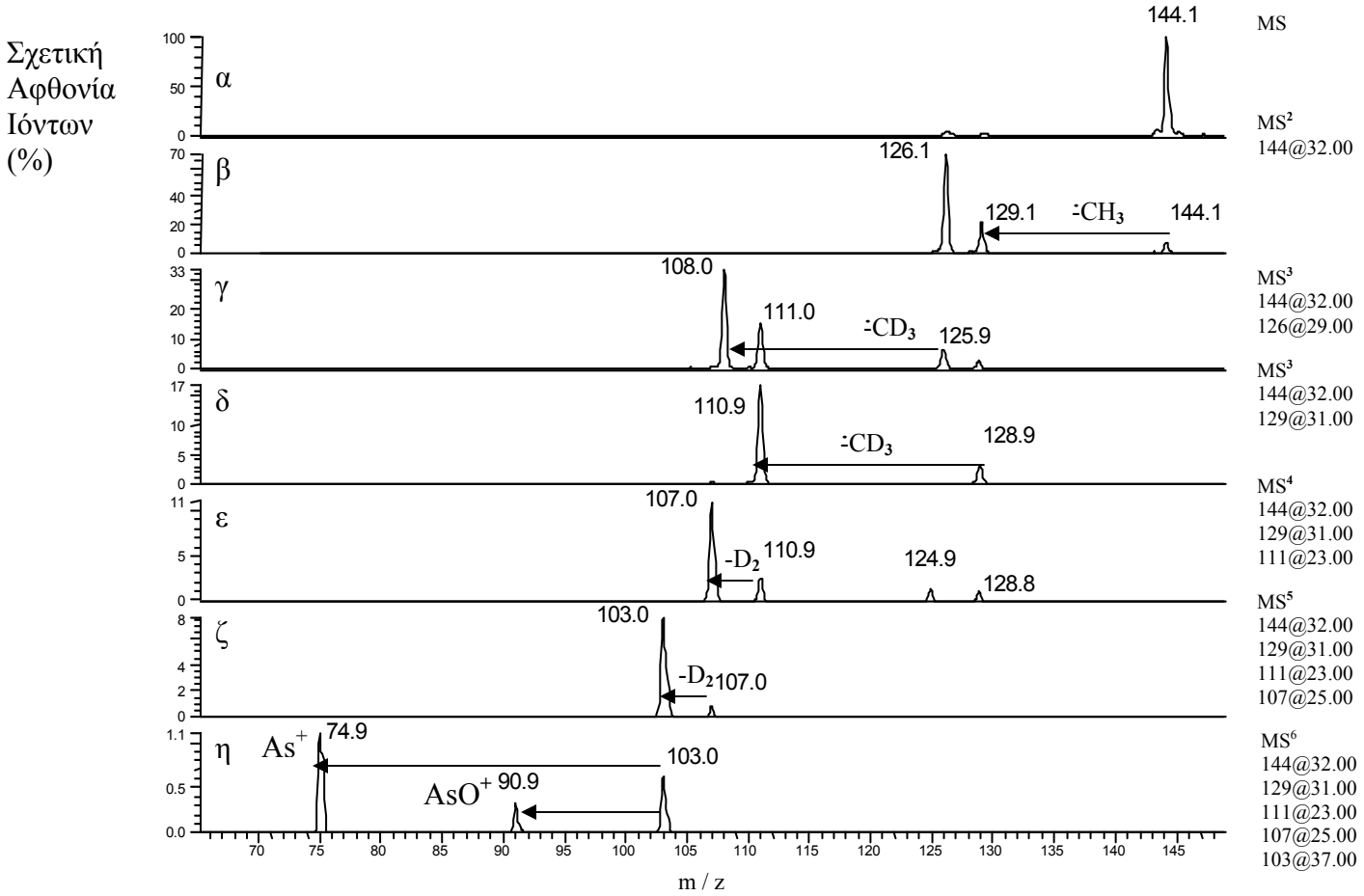
Στο ms φάσμα μάζας του d_9-τετραμεθυλαρσενικικού ιόντος εμφανίζεται το μοριακό ιόν m/z 144 (φάσμα μάζας: Σχήμα 3.19α). Η θραυσματοποίηση αυτού (ms^2), χαρακτηρίζεται από αποσπάσεις μεθυλικής και δευτεριωμένης μεθυλικής ρίζας, σχηματίζοντας τα δευτερεύοντα ιόντα m/z 129 και 126 αντίστοιχα (μηχανισμός: Σχήμα 3.18, φάσμα μάζας: Σχήμα 3.19β). Το δευτερεύον ιόν m/z 126 διασπάστηκε περαιτέρω (ms^3) ακολουθώντας ανάλογες αποσπάσεις μεθυλικής και δευτεριωμένης μεθυλικής ρίζας παράγοντας τα ιόντα m/z 111 και 108, αντίστοιχα (μηχανισμός: Σχήμα 3.18, φάσμα

μάζας: Σχήμα 3.19γ). Σε αυτό το στάδιο της διαδοχικής φασματομετρίας το άτομο του αρσενικού ανάγεται από την οξειδωτική κατάσταση +5 στην +3. Το ιόν m/z 108 έδωσε ίδιο μονοπάτι θραυσματοποίησης με εκείνου του θυγατρικού ιόντος του d_3-αρσενοβιτανίου με m/z 108. Το δευτερεύον ιόν m/z 111 που παράγεται από το ιόν m/z 126, σχηματίζεται επίσης και κατά την διάσπαση του άλλου θυγατρικού ιόντος του d_9-τετραμεθυλαρσενικικού ιόντος, από το ιόν m/z 129, μέσω απόσπασης μίας δευτεριωμένης μεθυλικής ρίζας (μηχανισμός: Σχήμα 3.18, φάσμα μάζας: Σχήμα 3.19δ). Έτσι για την περαιτέρω διάσπαση του θυγατρικού ιόντος m/z 111 επιλέχθηκε το μονοπάτι θραυσματοποίησης απ' όπου το ιόν m/z 129 σχηματίζει το ιόν m/z 111 επειδή κατά αυτό τον τρόπο το ιόν m/z 111 παράγεται σε μεγαλύτερη ένταση (φάσμα μάζας: Σχήμα 3.19δ). Η θραυσματοποίηση του ιόντος m/z 111 παράγει το ιόν m/z 107 έπειτα από απόσπαση ενός μορίου D_2 (μηχανισμός: Σχήμα 3.18, φάσμα μάζας: Σχήμα 3.19ε) και αυτό το δευτερεύον ιόν m/z 107 παράγει το ιόν m/z 103 από ανάλογη απόσπαση μορίου D_2. (μηχανισμός: Σχήμα 3.18, φάσμα μάζας: Σχήμα 3.19ζ). Τέλος, όταν το ιόν m/z 103 απομονώθηκε και διασπάστηκε παρήγαγε τα ιόντα m/z 91 και 75 (φάσμα μάζας: Σχήμα 3.19η). Τα ιόντα m/z 75 αντιστοιχούν σε ατομικά ιόντα αρσενικού, ενώ τό ιόν m/z 91 πιθανόν σε οξείδια του αρσενικού τα οποία πρέπει να σχηματίζονται εξαιτίας της ύπαρξης οξυγόνου ή υγρασίας στην ιοντική παγίδα.



Όμοιο μονοπάτι θραυσματοποίησης με αυτό του ιόντος m/z 108 του d_3-αρσενοβιτανίου

Σχήμα 3.18. Τα μονοπάτια θραυσματοποίησης του d_9-τετραμεθυλαρσενικικού ιόντος.



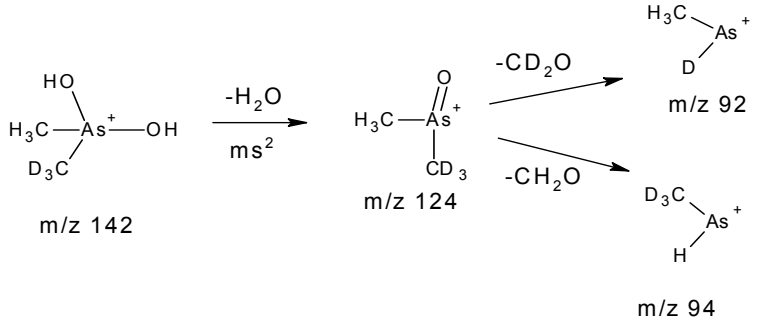
Σχήμα 3.19 Το ms (α), ms^2 (β), ms^3 (γ,δ), ms^4 (ε), ms^5 (ζ) και ms^6(η) φάσμα μάζας του d_9-τετραμεθυλαρσενικικού ιόντος.

Πίνακας 3.4. Τα πρόδρομα και δευτερεύοντα ιόντα του d_9- τετραμεθυλαρσενικικού ιόντος.

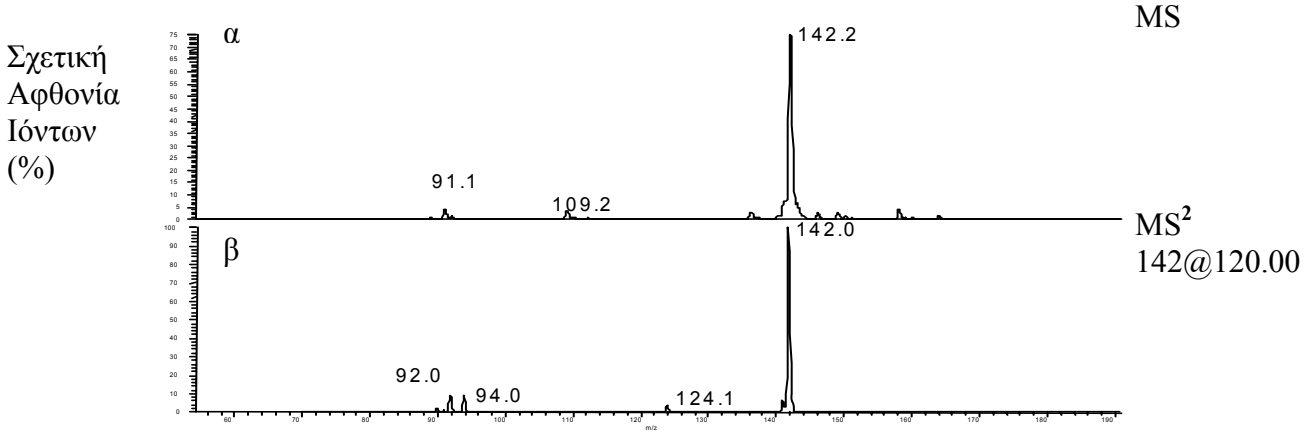
	Πρόδρομο ιόν (m/z)	Δευτερεύοντα ιόντα (m/z)
ms^2	144	129, 126
ms^3	126	111, 108
ms^3	129	111
ms^4	111	107
ms^5	107	103
ms^6	103	91, 75

3.3.4 d_3-Διμεθυλαρσενικικό οξύ, $(CD_3)CH_3AsOOH$

Το d_3-διμεθυλαρσενικικό οξύ στο ms φάσμα μάζας του εμφανίζεται σαν φορτισμένη ένωση με την δομή $(CD_3)CH_3As^+(OH)_2$ με m/z 142 (φάσμα μάζας: Σχήμα 3.21α). Αυτό το ιόν διασπάται με δυσκολία έπειτα από την εφαρμογή μεγάλης ενέργειας θραυσματοποίησης (120% των 5 Volt). Τα δευτερεύοντα ιόντα του σχηματίζονται με χαμηλή ένταση με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η θραυσματοποίηση τους και συνεπώς να μην είναι δυνατή η διευκρίνηση του τρόπου σχηματισμού τους. Από το ms^2 φάσμα μάζας που παρουσιάζεται (φάσμα μάζας: Σχήμα 3.21β), το ιόν m/z 124 σχηματίζεται έπειτα από απόσπαση ενός μορίου νερού από το πρόδρομο ιόν (μηχανισμός: Σχήμα 3.20). Τα δευτερεύοντα ιόντα m/z 94 και 92 πιθανόν να σχηματίζονται από την αποχώρηση ενός μορίου φορμαλδεύδης (CH_2O) και δευτεριωμένης φορμαλδεύδης (CD_2O), αντίστοιχα, από το δευτερεύον ιόν του διμεθυλαρσενικικού οξέος, το ιόν m/z 124 (μηχανισμός: Σχήμα 3.20).



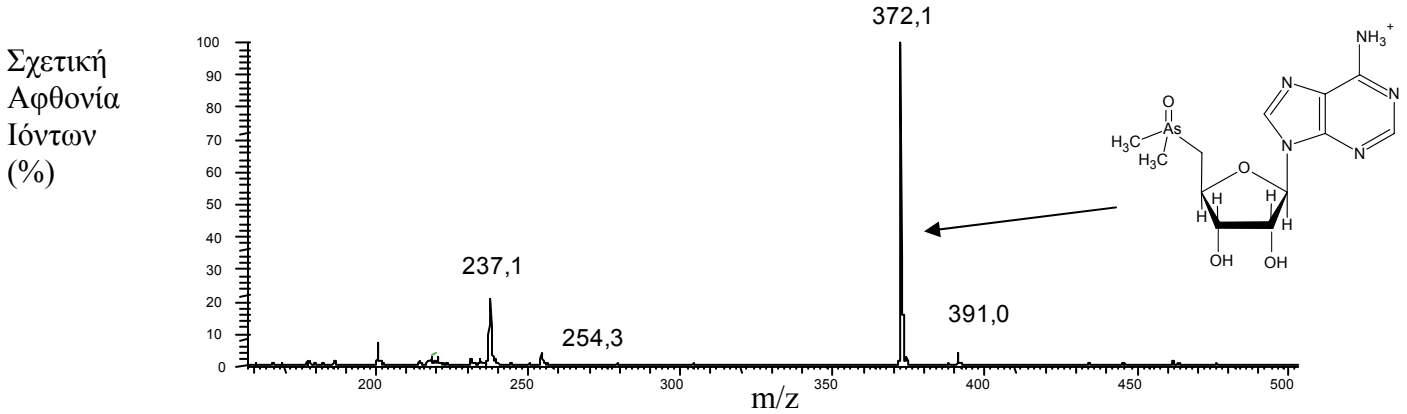
Σχήμα 3.20 Τα προτεινόμενα μονοπάτια θραυσματοποίησης του d_3-διμεθυλαρσενικικού οξέος.



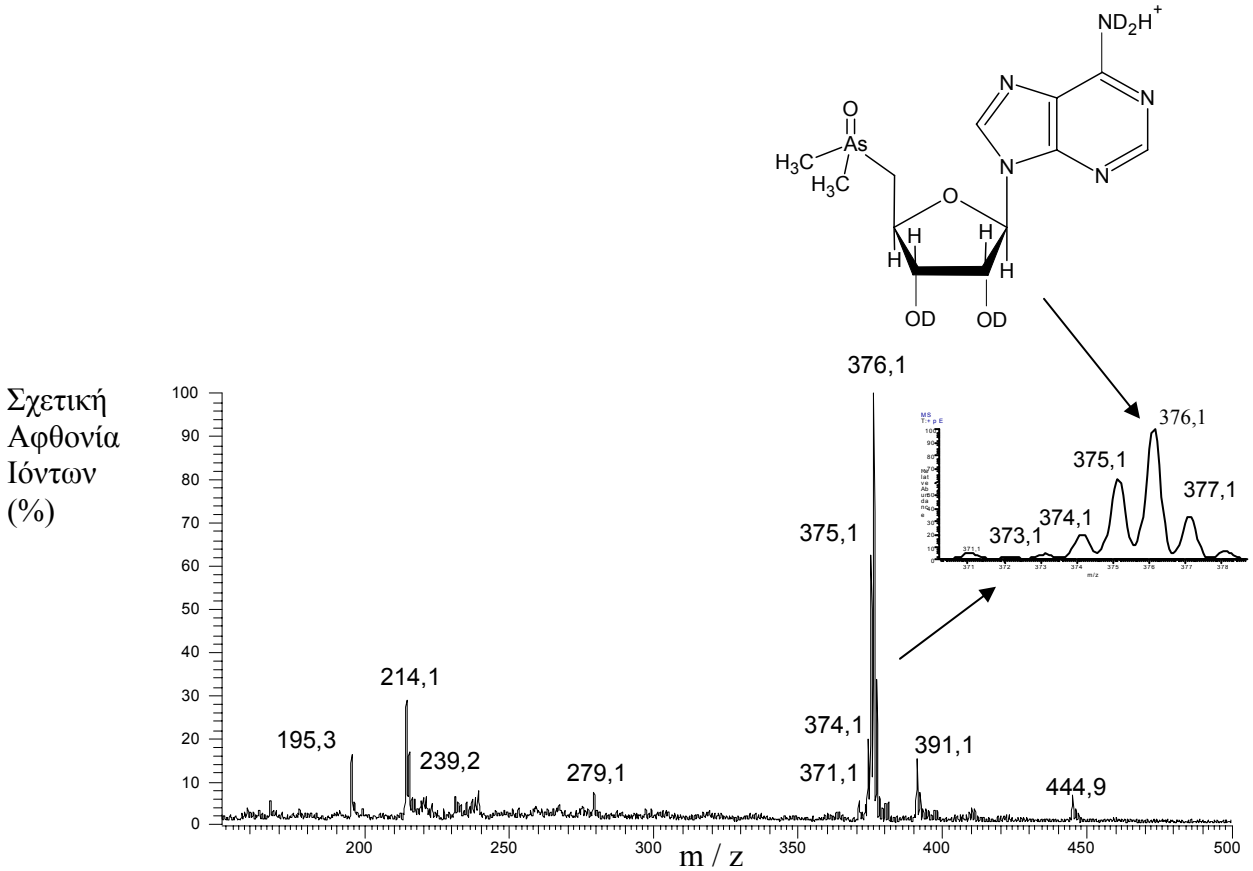
Σχήμα 3.21 Το ms (α), ms^2 (β) φάσμα μάζας του d_3-διμεθυλαρσενικικού οξέος.

3.3.5 5΄-Διμεθυλαρσενικική αδενοσίνη

Στο ms φάσμα μάζας της 5΄-διμεθυλαρσενικικής αδενοσίνης εμφανίζεται η κορυφή στα m/z 372 που αντιστοιχεί στο πρωτονιωμένο μόριο της (Σχήμα 3.22). Το ιόν αυτό απομονώθηκε και θραυσματοποιήθηκε. Για να εξακριβωθούν τα μονοπάτια θραυσματοποίησης του εξετάστηκε και η αντίστοιχη δευτεριωμένη ένωσή του, όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.23. Σε αυτό το φάσμα μάζας φαίνεται ότι το πρόδρομο ιόν είναι πλήρως δευτεριωμένο, δηλαδή όλα τα όξινα πρωτόνια του έχουν αντικατασταθεί από άτομα δευτερίου. Αυτά τα όξινα πρωτόνια είναι των δύο υδροξυλομάδων και της αμινομάδας και έχουν ανταλλαχθεί με δευτέρια μετατοπίζοντας την κορύφη από τα m/z 372 (φάσμα μάζας: Σχήμα 3.22) στα m/z 377 (φάσμα μάζας: Σχήμα 3.23). Βέβαια, το πλήρες δευτεριωμένο πρόδρομο ιόν (m/z 377) όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.23 δεν έχει την μεγαλύτερη αφθονία, σε σχέση με τα μερικώς δευτεριωμένα ιόντα που εμφανίζονται σε αυτό το φάσμα μάζας. Για αυτό το λόγο επιλέχθηκε να θραυσματοποιηθεί το μερικώς δευτεριωμένο ιόν του, m/z 376, αυτό δηλαδή που φέρει τέσσερα δευτέρια και το οποίο έχει την μέγιστη ένταση. Το πρωτόνιο που δεν ανταλλάχθηκε σε αυτό το ιόν βρίσκεται στην αμινομάδα και αυτό προέκυψε μέσω της θραυσματοποίησης αυτού του δευτεριωμένου αναλόγου, όπως παρουσιάζεται στο ms^2 φάσμα μάζας του (φάσμα μάζας: Σχήμα 3.25β). Επίσης θα πρέπει να αναφερθεί ότι κατά την ανταλλαγή των όξινων πρωτονίων του πατρικού ιόντος με δευτέρια σχηματίστηκαν και τα μερικώς δευτεριωμένα ανάλογα αυτού με ένα, δύο και τρία δευτέρια στην θέση των αντίστοιχων πρωτονίων όπως φαίνεται το Σχήμα 3.23.



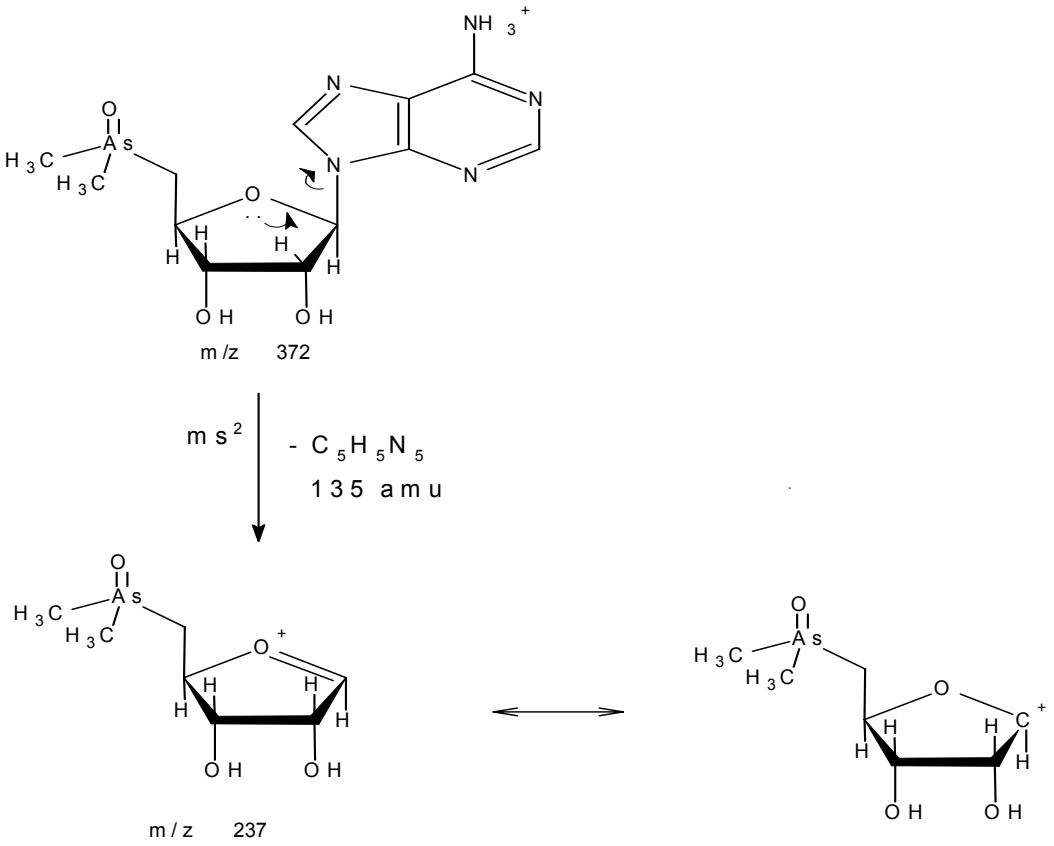
Σχήμα 3.22 Το ms φάσμα μάζας της 5΄-διμεθυλαρσενικικής αδενοσίνης.



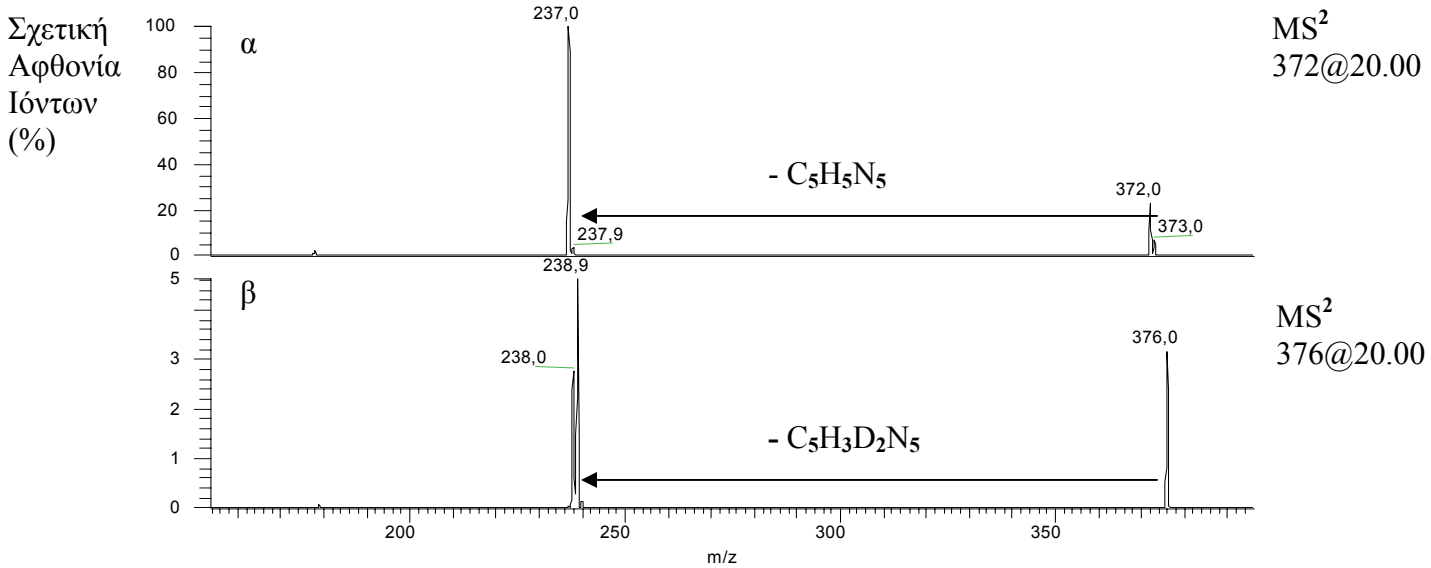
Σχήμα 3.23 Το ms φάσμα μάζας της d_4-5΄-διμεθυλαρσενικικής αδενοσίνης.

Η θραυσματοποίηση του μοριακού ιόντος της 5΄-διμεθυλαρσενικικής αδενοσίνης παρήγαγε σαν κύριο δευτερεύον ιόν το m/z 237 (φάσμα μάζας: Σχήμα 3.25α) μέσω ετερολυτικής διάσπασης του δεσμού του άνθρακα-1΄ του δακτυλίου της ριβόζης με την αδενίνη, αφήνοντας το θετικό φορτίο στον άνθρακα-1΄ (μηχανισμός: Σχήμα 3.24). Το ιόν αυτό πρέπει να έχει δύο δομές συντονισμού καθώς ένα ελεύθερο ζεύγος ηλεκτρονίων του οξυγόνου μοιράζεται μεταξύ αυτού και του άνθρακα που φέρει το θετικό φορτίο σχηματίζοντας έναν διπλό δεσμό με συνέπεια το θετικό φορτίο να μεταφέρεται στο άτομο του οξυγόνου, όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.24, δίνοντας τελικά ιόν οξωνίου. Κατ' αντιστοιχία η θραυσματοποίηση του δευτεριωμένου ιόντος της d_4-5΄-διμεθυλαρσενικικής αδενοσίνης (m/z 376), παρήγαγε το ιόν m/z 239 (φάσμα μάζας: Σχήμα 3.25β). Αυτή η διαφορά των δύο ατομικών μονάδων μάζας μεταξύ των θυγατρικών ιόντων m/z 237 και m/z 239 αφενός υποδεικνύει την ύπαρξη των ατόμων δευτερίου στις υδροξυλομάδες του ιόντος m/z 376, αφετέρου επιβεβαιώνει τον προτεινόμενο μηχανισμό θραύσης, καθώς

αυτή είναι η αναμενόμενη μετατόπιση της κορυφής από τα m/z 237 στα m/z 239, σύμφωνα με την δομή του ιόντος m/z 237 που έχει προταθεί. Όπως αναμένονταν παρουσιάζεται και ιόν στα m/z 238 λόγω της ύπαρξης ενός μόνο δευτερίου στις υδροξυλομάδες.



Σχήμα 3.24 Η θραυσματοποίηση του μοριακού ιόντος της 5΄-διμεθυλαρσενικικής αδενοσίνης.

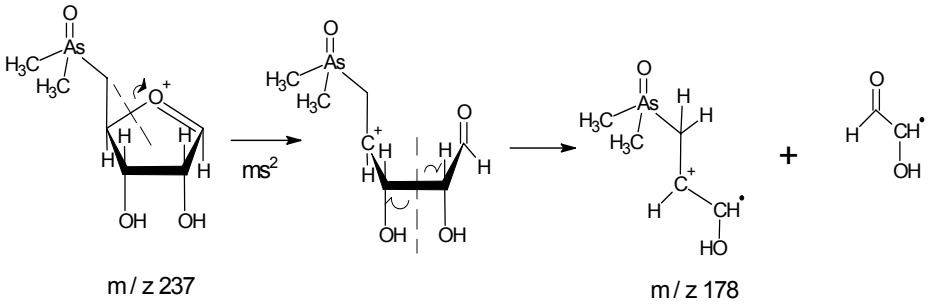


Σχήμα 3.25 Το ms^2 φάσμα μάζας της 5΄-διμεθυλαρσενικικής αδενοσίνης (α) και της d_4-5΄-διμεθυλαρσενικικής αδενοσίνης (β).

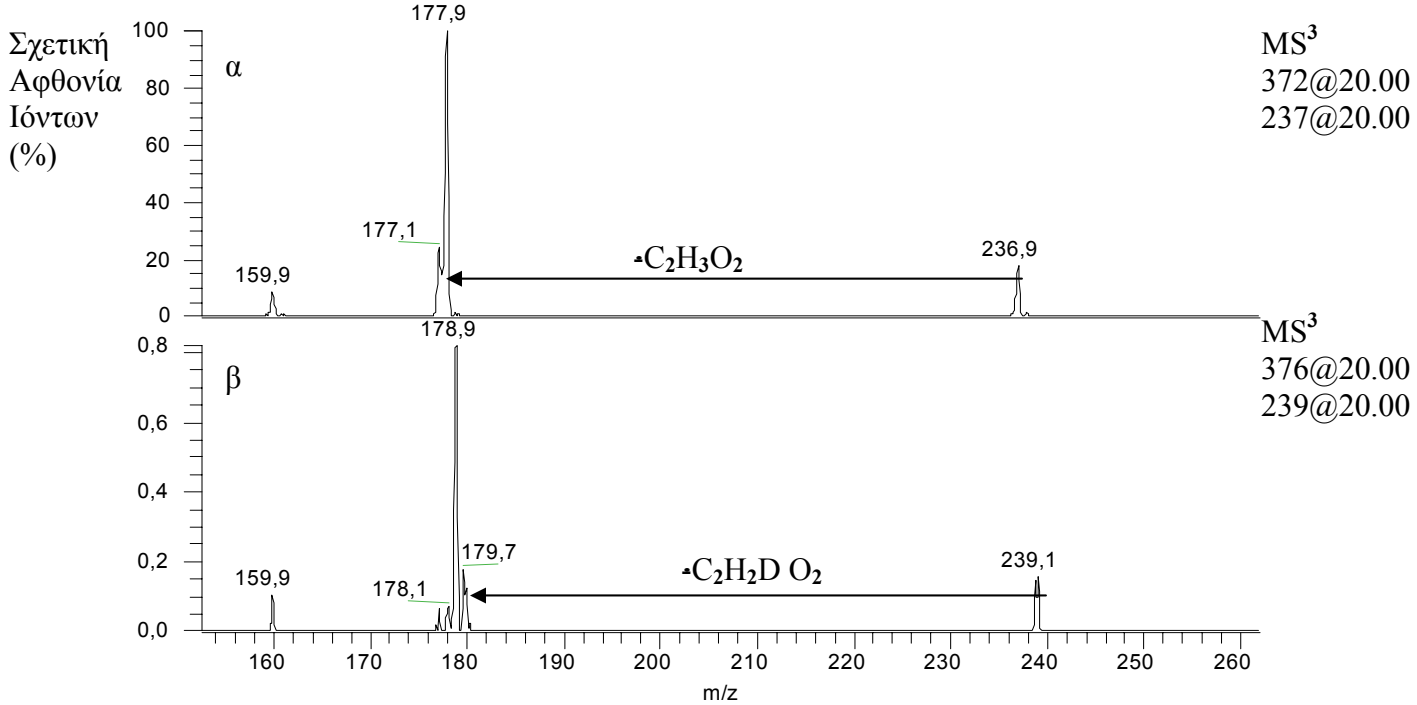
Η θραυσματοποίηση του ιόντος m/z 237 (ms^3) ξεκινά με την διάνοιξη του δακτυλίου της ριβόζης και συγκεκριμένα με την ετερολυτική διάσπαση του αιθερικού δεσμού μεταξύ του οξυγόνου και του άνθρακα-4΄, με τα ηλεκτρόνια του δεσμού να καταλήγουν στο άτομο του οξυγόνου και το θετικό φορτίο να βρίσκεται στον άνθρακα-4΄. Κατά αυτό τον τρόπο σχηματίζεται μια κετονική ομάδα στον ανοιγμένο δακτύλιο. Ακολουθεί διαδοχική ομολυτική διάσπαση του δεσμού μεταξύ του άνθρακα-2΄ και του άνθρακα-3΄ και αποχώρηση της ρίζας HCOCH˙OH, με αποτέλεσμα να σχηματίζεται η κατιοντική ρίζα m/z 178 (μηχανισμός: Σχήμα 3.26, φάσμα μάζας: Σχήμα 3.27α).

Από την θραυσματοποίηση του δευτεριωμένου αναλόγου του ιόντος m/z 237, του ιόντος m/z 239 παράχθηκε το ιόν m/z 179 (φάσμα μάζας: Σχήμα 3.27β). Από την μετατόπιση της κορυφής του θυγατρικού ιόντος m/z 178 της μη-δευτεριωμένης 5΄-διμεθυλαρσενικικής αδενοσίνης, στο ιόν m/z 179 της μερικώς δευτεριωμένης 5΄-διμεθυλαρσενικικής αδενοσίνης, επιβεβαιώνεται η ορθότητα του προτεινόμενου ιόντος. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι η διαφορά μιας ατομικής μονάδας μάζας που παρατηρείται μεταξύ του θυγατρικού ιόντος της μη-δευτεριωμένης ένωσης και της δευτεριωμένης ένωσης επιδεικνύει την διατήρηση ενός ατόμου δευτερίου στην δομή του,

και συγκεκριμένα στην μία υδροξυλομάδα όπως προτάθηκε στον μηχανισμό θραυσματοποίησης, που παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.26.



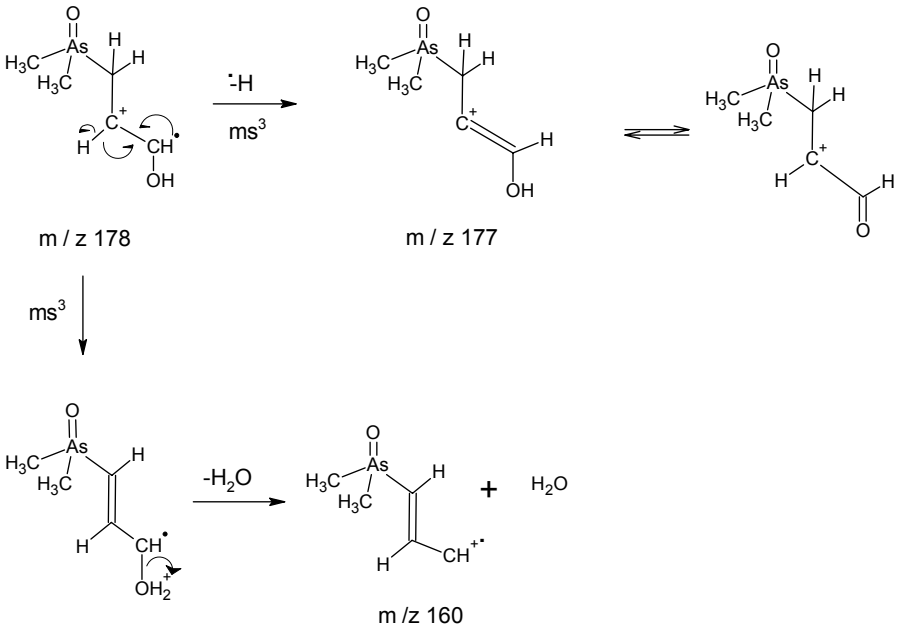
Σχήμα 3.26 Η θραυσματοποίηση του θυγατρικού ιόντος m/z 237 της 5΄-διμεθυλαρσενικικής αδενοσίνης.



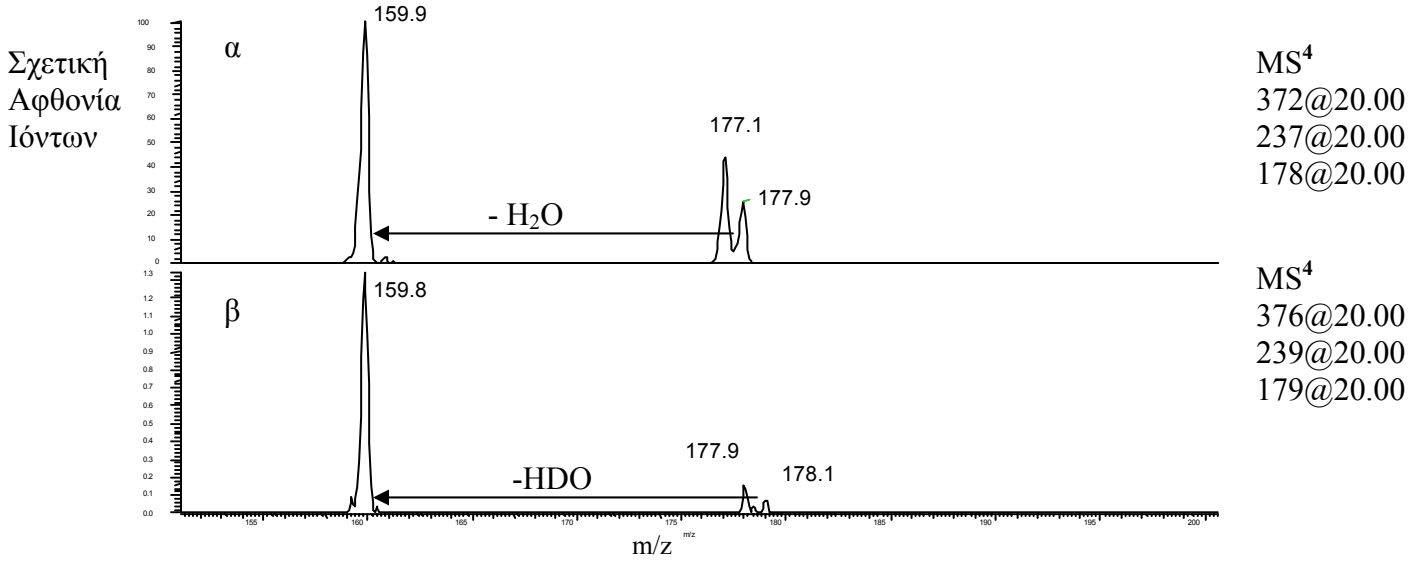
Σχήμα 3.27 Το ms^3 φάσμα μάζας της 5΄-διμεθυλαρσενικικής αδενοσίνης (α) και της d_4-5΄-διμεθυλαρσενικικής αδενοσίνης (β).

Το ιόν m/z 178 διασπάται περαιτέρω (ms^4) σχηματίζοντας δύο δευτερεύοντα ιόντα το ιόν m/z 177 και το ιόν m/z 160 (φάσμα μάζας: Σχήμα 3.29α). Το δευτερεύον ιόν m/z 177 παράγεται μέσω απόσπασης ρίζας πρωτονίου σχηματίζοντας μια κατιοντική ενόλη που πιθανόν μέσω ταυτομέρειας μετατρέπεται σε κετόνη (μηχανισμός: Σχήμα 3.28). Το ιόν m/z 160 προέρχεται επίσης από το ιόν με m/z 178 μέσω απόσπασης ενός μορίου νερού (μηχανισμός: Σχήμα 3.28). Αυτό το μόριο νερού που αποχωρεί, λογικά σχηματίζεται από την υδροξυλομάδα και από το πρωτόνιο της μεθυλενικής ομάδας που συνδέεται με το άτομο του αρσενικού. Αυτό το συμπέρασμα προέκυψε διότι κατά αυτήν την απόσπαση σχηματίζεται κατιοντική συζυγιακή ρίζα αυξημένης σταθερότητας.

Κατά την θραυσματοποίηση του αντίστοιχου δευτεριωμένου ιόντος m/z 179, σχηματίστηκαν τα δευτερεύοντα ιόντα m/z 178 και 160 (φάσμα μάζας: Σχήμα 3.29β). Ο σχηματισμός του ιόντος m/z 178 από το ιόν m/z 179 αποδεικνύει ότι η ρίζα υδρογόνου που αποσπάται από το αντίστοιχο μη δευτεριωμένο ιόν m/z 178 δεν προέρχεται από την υδροξυλομάδα. Το γεγονός ότι τόσο το μη δευτεριωμένο ιόν m/z 178 όσο και το δευτεριωμένο ανάλογο του, m/z 179 παράγουν το ίδιο ιόν m/z 160, επιβεβαιώνει την απόσπαση ενός μορίου νερού από το ιόν m/z 178 και αυτό το μόριο νερού περιέχει την υδροξυλομάδα του ιόντος m/z 178.



Σχήμα 3.28 Η θραυσματοποίηση του θυγατρικού ιόντος m/z 178 της 5΄-διμεθυλαρσενικικής αδενοσίνης.



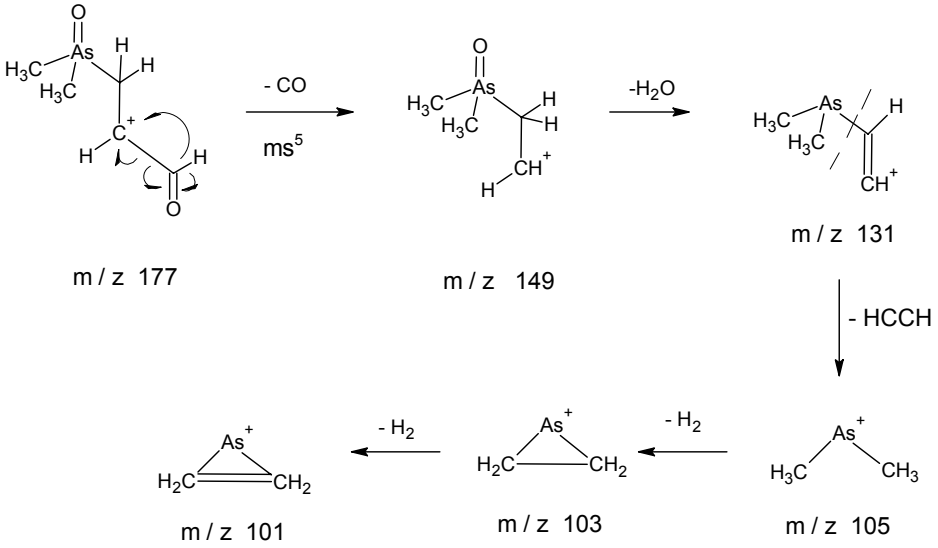
Σχήμα 3.29 Το ms^3 φάσμα μάζας της 5΄-διμεθυλαρσενικικής αδενοσίνης (α) και της d_4-5΄-διμεθυλαρσενικικής αδενοσίνης (β).

Τα δύο δευτερεύοντα ιόντα της 5΄-διμεθυλαρσενικικής αδενοσίνης, m/z 160 και 177 απομονώθηκαν και θραυσματοποιήθηκαν περαιτέρω (ms^5). Η επιβεβαίωση των μηχανισμών θραυσματοποιήσης αυτών των θυγατρικών ιόντων δεν ήταν δυνατή μέσω της θραύσης των δευτεριωμένων αναλόγων τους, αφενός γιατί το ιόν m/z 160 που προέκυψε από την θραυσματοποιήση της d_4-5΄-διμεθυλαρσενικικής αδενοσίνης δεν φέρει κάποιο δευτέριο στην δομή του, αφετέρου το δετεριώμενο ανάλογο του ιόντος m/z 177, το ιόν m/z 178 σχηματίζεται με χαμηλή ένταση από την θραύση της d_4-5΄-διμεθυλαρσενικικής αδενοσίνης και έτσι δεν ήταν δυνατή η αποδοτική απομόνωση και διάσπασή του. Παρόλα αυτά, επειδή οι δομές των θυγατρικών ιόντων m/z 160 και 177 έχουν επιβεβαιωθεί από τα προηγούμενα στάδια της διαδοχικής φασματομετρίας και επιπλέον αυτά δεν έχουν πολύπλοκες δομές, παρακάτω παρουσιάζονται οι προτεινόμενοι μηχανισμοί θραύσης τους.

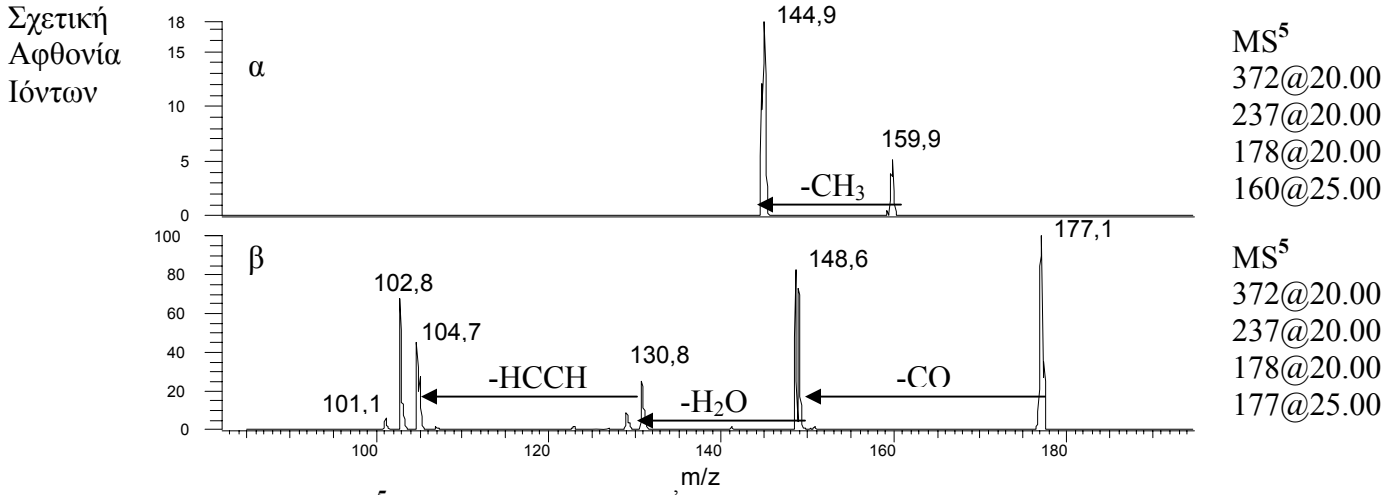
Κατά την θραυσματοποίηση του ιόντος m/z 160 σχηματίζεται ένα δευτερεύον ιόν το m/z 145, μέσω απόσπασης ρίζας μεθυλίου (φάσμα μάζας: Σχήμα 3.31α). Περαιτέρω θραύση του ιόντος m/z 145 δεν ήταν δυνατή λόγω της χαμηλής του έντασης.

Η θραυσματοποίηση του ιόντος m/z 177 χαρακτηρίζεται από διαδοχικές αποσπάσεις μορίων από τα δευτερεύοντα ιόντα του (φάσμα μάζας: Σχήμα 3.31β,

μηχανισμός: Σχήμα 3.30). Έτσι από το ιόν m/z 177, μέσω μετάθεσης ρίζας υδρογόνου της ομάδας της αλδεύδης στον άνθρακα που φέρει το θετικό φορτίο και ταυτόχρονη απόσπαση ενός μορίου μονοξειδίου του άνθρακα, σχηματίζεται το ιόν m/z 149. Από το ιόν m/z 149 έπειτα από απόσπαση ενός μορίου νερού σχηματίζεται το ιόν m/z 131, το οποίο διασπάται περαιτέρω και σχηματίζει το ιόν m/z 105, έπειτα από την αποχώρηση ενός μορίου ακετυλενίου. Τέλος, από το ιόν m/z 105 σχηματίζεται μέσω απόσπασης ενός μορίου υδρογόνου το ιόν m/z 103 και από αυτό με ανάλογη απόσπαση το ιόν m/z 101. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι όλες αυτές οι διασπάσεις έγιναν ως συνέπεια της αρχικής ενέργειας θραύσης που δόθηκε στο ιόν m/z 177.



Σχήμα 3.30 Η θραυσματοποίηση του θυγατρικού ιόντος m/z 177 της 5΄-διμεθυλαρσενικικής αδενοσίνης.



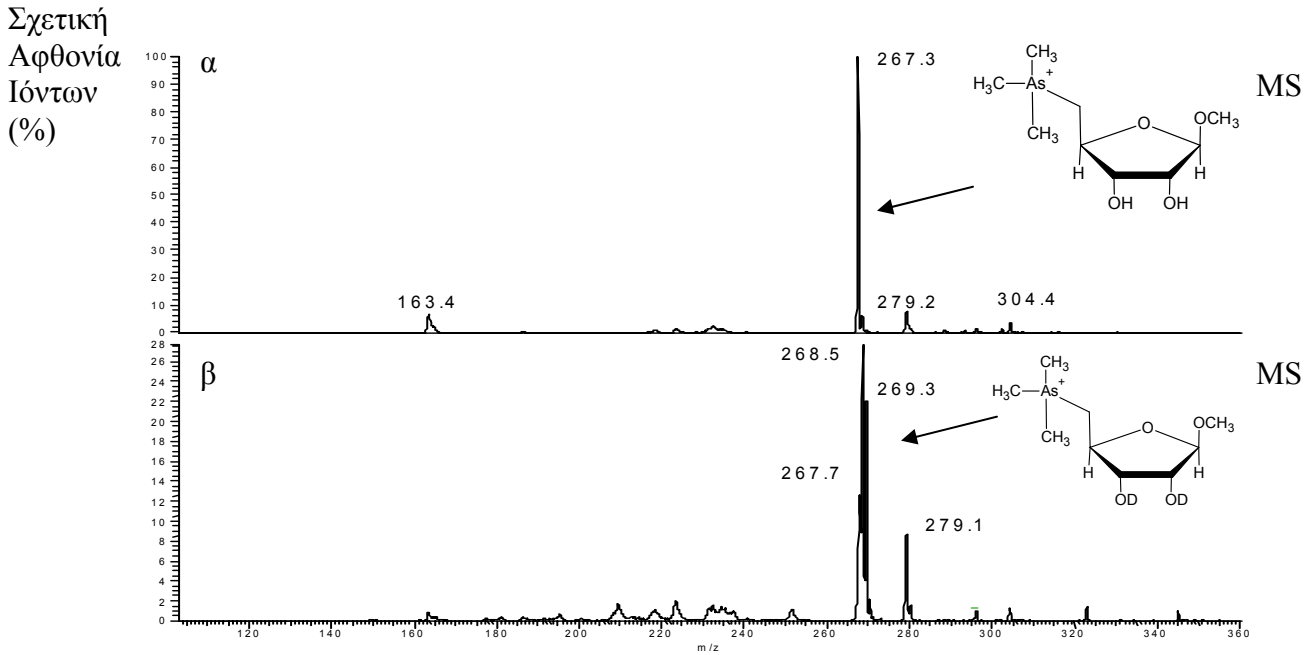
Σχήμα 3.31 Τα ms^5 φάσματα μάζας του 5΄-διμεθυλαρσενικικής αδενοσίνης.

Πίνακας 3.5 Τα πρόδρομα και δευτερεύοντα ιόντα της 5΄-διμεθυλαρσενικικής αδενοσίνης.

	Πρόδρομο ιόν (m/z)	Δευτερεύοντα ιόντα (m/z)
ms^2	372	237
ms^3	237	160, 177, 178
ms^4	178	177, 160
ms^5	177	149,131,105,103,101
ms^5	160	145

3.3.5 5΄-τριμεθυλαρσενικική-1΄-μέθοξυ-ριβόζη

Το φάσμα μάζας του υδατικού διαλύματος της 5΄-τριμεθυλαρσενικικής-1΄-μέθοξυ-ριβόζης έχει σαν κύρια κορυφή την m/z 267 που αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν της ένωσης (φάσμα μάζας: Σχήμα 3.32α). Όταν αυτή η ένωση διαλύθηκε σε δευτεριωμένο νερό η κορυφή αυτή μετατοπίστηκε από m/z 267 σε m/z 268 και 269 εξαιτίας της ανταλλαγής των πρωτονίων των υδροξυλομάδων με άτομα δευτερίου (φάσμα μάζας: Σχήμα 3.32β). Για την διευκρίνηση του τρόπου θραύσης του μοριακού ιόντος m/z 267 απομονώθηκαν ταυτόχρονα και τα δύο δευτεριωμένα ανάλογα του δηλ. τα m/z 268 και 269 τα οποία έφεραν ένα και δύο δευτέρια αντίστοιχα στην δομή τους. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι η 5΄-τριμεθυλαρσενικική-1΄-μέθοξυ–ριβόζη είναι πρότυπη ένωση και δεν έχει ανιχνευτεί σε κάποιο βιολογικό δείγμα, παράγωγα της όμως έχουν βρεθεί. Παρόλα αυτά η θραυσματοποίηση της έγινε για δύο λόγους. Πρώτον, γιατί η ταυτοποίηση πρότυπων ενώσεων μέσω φασματομετρία μάζας είναι πιο αξιόπιστη όταν στηρίζεται σε δεδομένα διαδοχικής φασματομετρίας μάζας από ότι όταν βασίζεται στο απλό ms φάσμα μάζας της ένωσης. Δεύτερον, για να συγκριθούν οι τρόποι θραυσματοποίησης αυτής της ένωσης με εκείνους της 5΄-διμεθυλαρσενικικής-αδενοσίνης (παράγραφος 3.3.5) κυρίως ως προς τον τρόπο που διασπάται ο δακτύλιος της ριβόζης, στην διαδοχική φασματομετρία μάζας ιοντικής παγίδας.

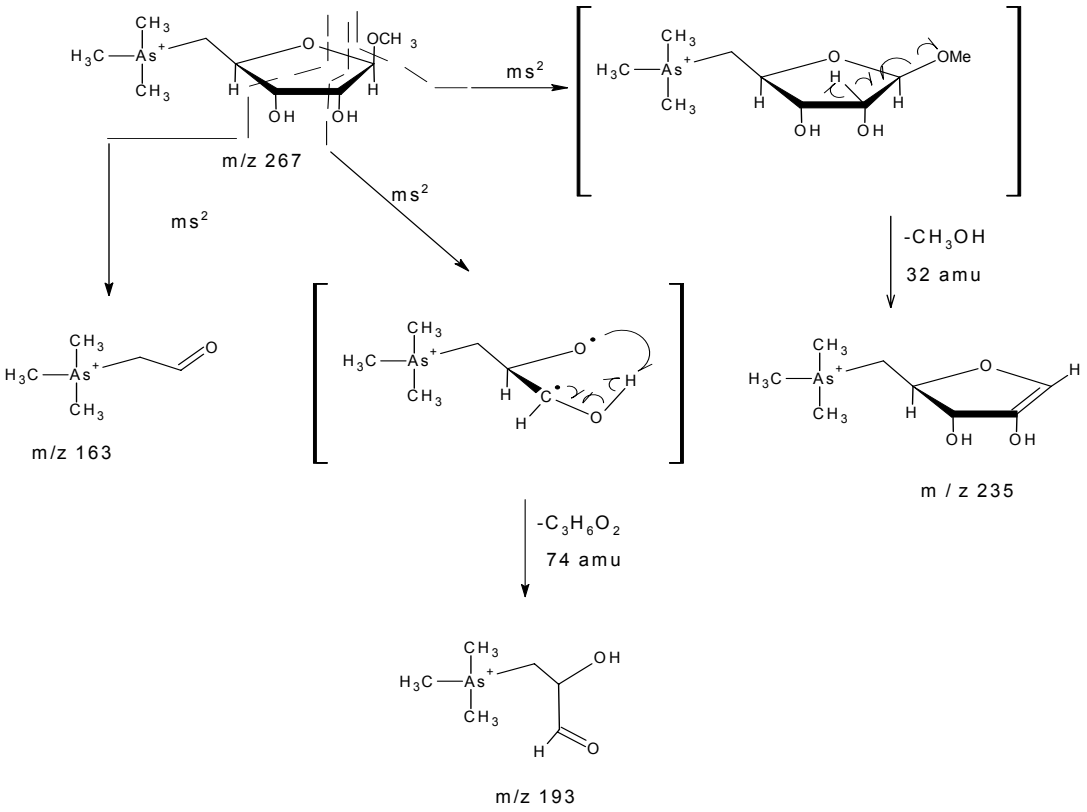


Σχήμα 3.32 Το ms φάσμα μάζας της 5΄-τριμεθυλαρσενικικής–1΄-μέθοξυ-ριβόζης (α) και της δευτεριωμένης 5΄-τριμεθυλαρσενικικής–1΄-μέθοξυ-ριβόζης (β).

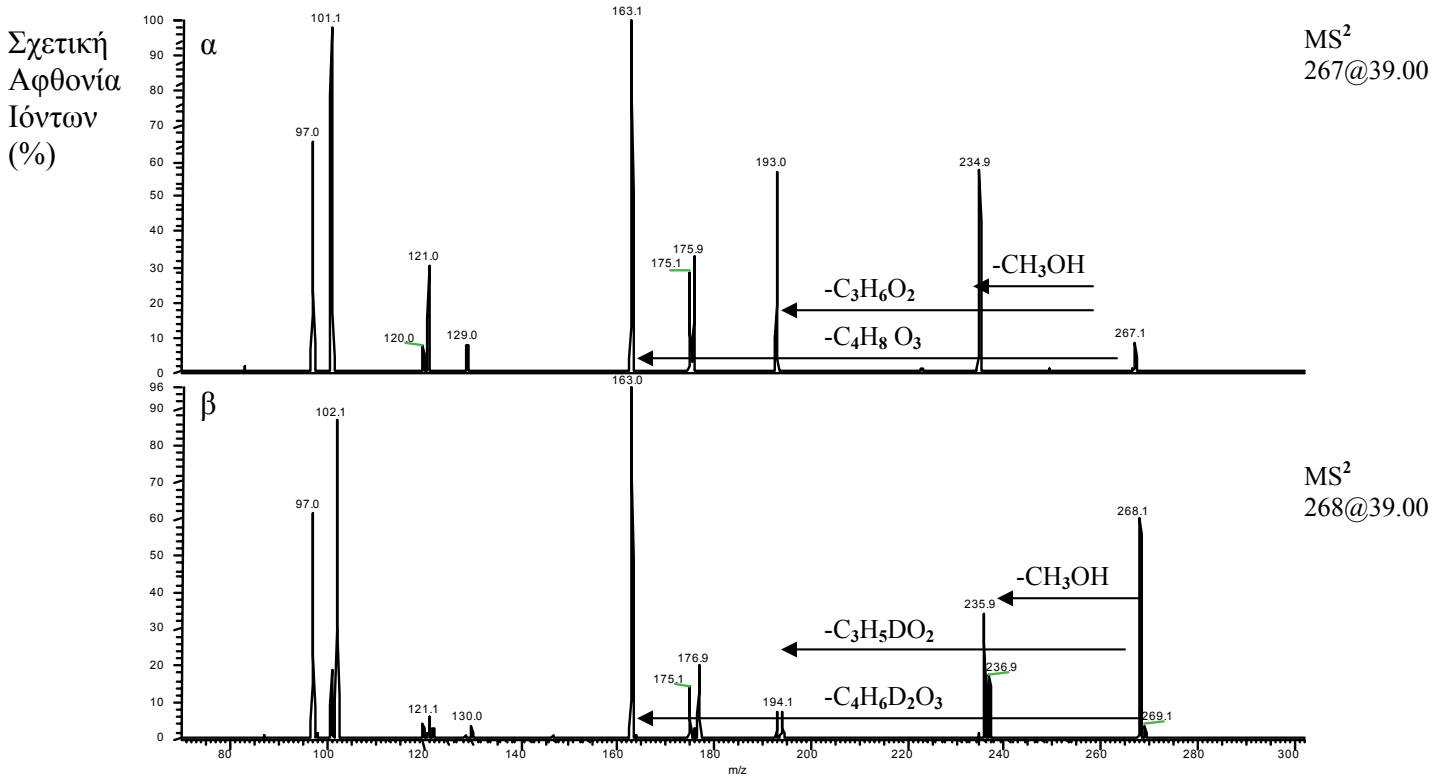
Κατά την θραυσματοποίηση του πατρικού ιόντος m/z 267, παράγονται τα δευτερεύοντα ιόντα κυρίως από την διάσπαση του δακτυλίου της ριβόζης (φάσμα μάζας: Σχήμα 3.34α). Το δευτερεύον ιόν m/z 235, σχηματίζεται με την αποχώρηση ενός μορίου μεθανόλης από το μοριακό ιόν m/z 267, έπειτα από την απόσπαση της ρίζας της μέθοξυ ομάδας του μορίου και μίας γειτονικής ρίζας υδρογόνου (μηχανισμός: σχήμα 3.33). Κατά την θραύση των δευτεριωμένων αναλόγων του μοριακού ιόντος, m/z 268 και 269 σχηματίστηκαν τα δευτεριωμένα ανάλογα δευτερεύοντα ιόντα m/z 236 και 237 (φάσμα μάζας: Σχήμα 3.34β). Αυτό σημαίνει ότι τα δευτέρια διατηρούνται στο δακτύλιο της ριβόζης μετά την θραύση και έτσι ενισχύεται η ορθότητα του προτεινόμενου μηχανισμού (μηχανισμός: σχήμα 3.33).

Τα δευτερεύοντα ιόντα με m/z 163 και 193 σχηματίζονται μετά την διάσπαση του δακτυλίου της ριβόζης με την αποχώρηση των $C_4H_8O_3$ και $C_3H_6O_2$, αντίστοιχα από το πρόδρομο 267 (φάσμα μάζας: Σχήμα 3.34α, μηχανισμός: Σχήμα 3.33). Κατά την θραύση των δευτεριωμένων μοριακών ιόντων m/z 268 και 269 εμφανίζονται οι αναμενόμενες κορυφές σύμφωνα με τον προτεινόμενο μηχανισμό, η κορυφή με m/z 194 που αντιστοιχεί στο δευτεριωμένο ανάλογο του θυγατρικού ιόντος m/z 193 με ένα άτομο δευτερίου στην δομή του και το ιόν m/z 163, χωρίς άτομα δευτερίου (φάσμα μάζας:

Σχήμα 3.34β). Έτσι, είναι εμφανές ότι ο δακτύλιος της ριβόζης χαρακτηρίζεται από ομολυτικές διασπάσεις των δεσμών του, απελευθερώνοντας ουδέτερα μόρια.

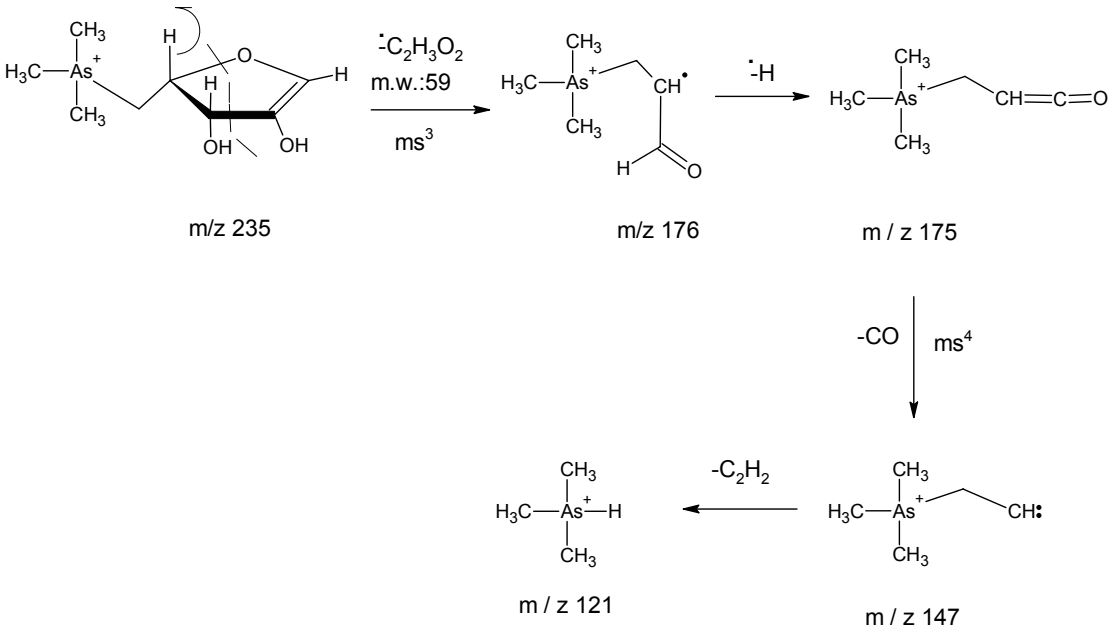


Σχήμα 3.33 Το σχήμα θραυσματοποίησης της 5΄-τριμεθυλαρσενικικής–1΄-μέθοξυ-ριβόζης.

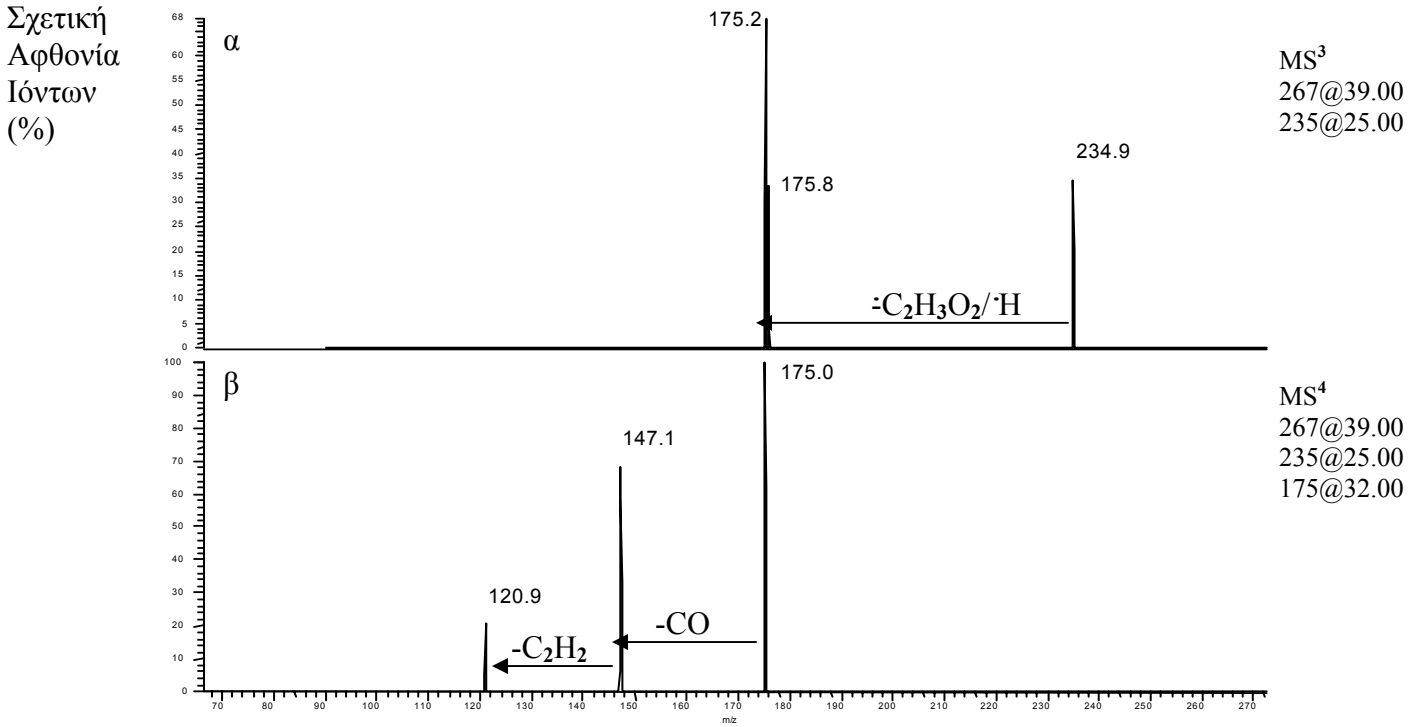


Σχήμα 3.34 Το ms^2 φάσμα μάζας της 5΄-τριμεθυλαρσενικικής–1΄-μέθοξυ-ριβόζης (α) και της δευτεριωμένης 5΄-τριμεθυλαρσενικικής–1΄-μέθοξυ-ριβόζης (β).

Το δευτερεύον ιόν m/z 235 απομονώθηκε και θραυσματοποιήθηκε περαιτέρω (ms^3) παράγοντας το ιόν m/z 176, έπειτα από διάσπαση του δακτυλίου της ριβόζης, και εν συνεχεία από αυτό το δευτερεύον ιόν m/z 176 μέσω απόσπασης μίας ρίζας υδρογόνου σχηματίζεται το ιόν m/z 175 (φάσμα μάζας: Σχήμα 3.36α μηχανισμός: Σχήμα 3.35). Η θραυσματοποίηση του ιόντος m/z 175 παρήγαγε τα ιόντα m/z 147 και m/z 121 (φάσμα μάζας: Σχήμα 3.36β). Το ιόν m/z 147 σχηματίζεται με την απόσπαση ενός μορίου μονοξειδίου του άνθρακα από το πρόδρομο ιόν m/z 175, ενώ το ιόν m/z 121 πρέπει να προέρχεται από την περαιτέρω θραύση του ιόντος m/z 147 μέσω απόσπασης ενός μορίου ακετυλενίου (μηχανισμός: Σχήμα 3.35). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η διευκρίνηση αυτών των μηχανισμών θραύσης μέσω της θραυσματοποίησης των δευτεριωμένων αναλόγων των πατρικών ιόντων δεν κατέστη δυνατή, εξαιτίας της χαμηλής έντασης των δευτεριωμένων ιόντων στο αντίστοιχο φάσμα μάζας.



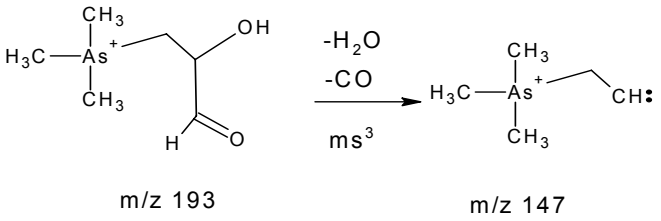
Σχήμα 3.35 Το σχήμα θραυσματοποίησης του πατρικού ιόντος m/z 235 της 5΄-τριμεθυλαρσενικικής–1΄-μέθοξυ-ριβόζης.



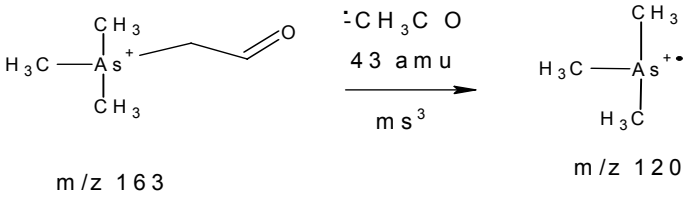
Σχήμα 3.36 Το ms^3 (α) και ms^4 (β) φάσμα μάζας της 5΄-τριμεθυλαρσενικικής–1΄-μέθοξυ-ριβόζης.

Στό ms^2 φάσμα μάζας εμφανίζονται κορυφές στις οποίες δεν αποδόθηκαν δομές για αυτά τα δευτερεύοντα ιόντα από την μέχρι τώρα διαδοχική φασματομετρία μάζας. Το δευτερεύον ιόν m/z 193 διασπάστηκε και σχηματίστηκε το ιόν m/z 147 μετά από αποσπάσεις μορίων νερού και μονοξειδίου του άνθρακα (φάσμα μάζας: Σχήμα 3.39α, μηχανισμός: Σχήμα 3.37), ενώ το άλλο δευτερεύον ιόν m/z 163 κατά την θραύση του παράγει το ιόν m/z 120 με την αποχώρηση της $^{\cdot}CH_2HCO$ (φάσμα μάζας: Σχήμα 3.39β, μηχανισμός: Σχήμα 3.38). Όσο αφορά τα ιόντα από m/z 120 - m/z 97 φαίνονται να είναι χαρακτηριστικά των τριμεθυλιωμένων αρσενικικών-ενώσεων.

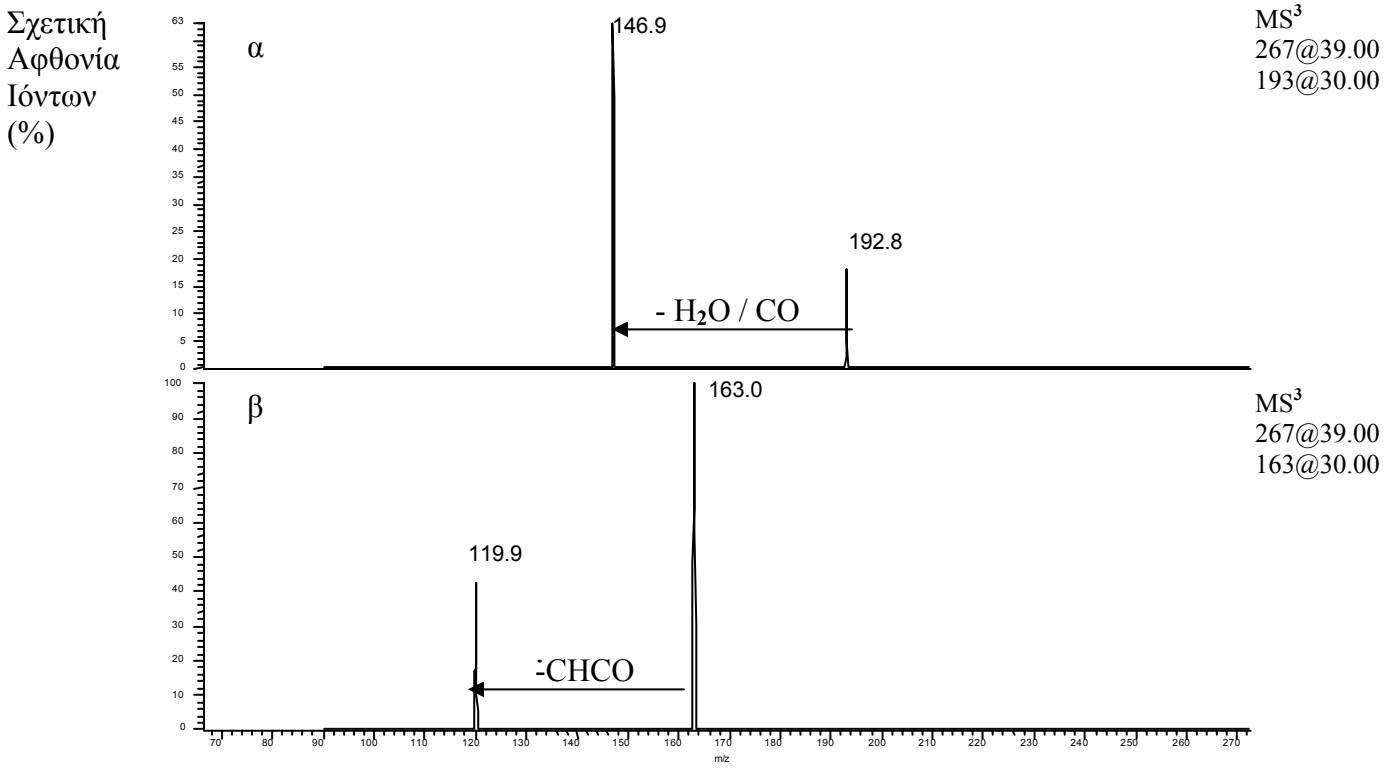
Περαιτέρω θραυσματοποίηση αυτών των παραγόμενων ιόντων δεν ήταν εφικτή εξαιτίας της χαμηλής έντασής τους. Ίσως αυτό να οφείλεται στο ότι κατά την θραύση του μοριακού ιόντος (ms^2) σχηματίζονται πολλά δευτερεύοντα ιόντα με αποτέλεσμα η αρχική ένταση του μοριακού ιόντος ($3e^5$) να καταμερίζεται στα 9 δευτερεύοντα ιόντα (μεγαλύτερη ένταση θυγατρικού ιόντος, $6e^3$). Στο Σχήμα 3.40 παρουσιάζεται ολόκληρο το προτεινόμενο σχήμα θραυσματοποίησης της 5΄-τριμεθυλαρσενικικής–1΄-μέθοξυ-ριβόζης.



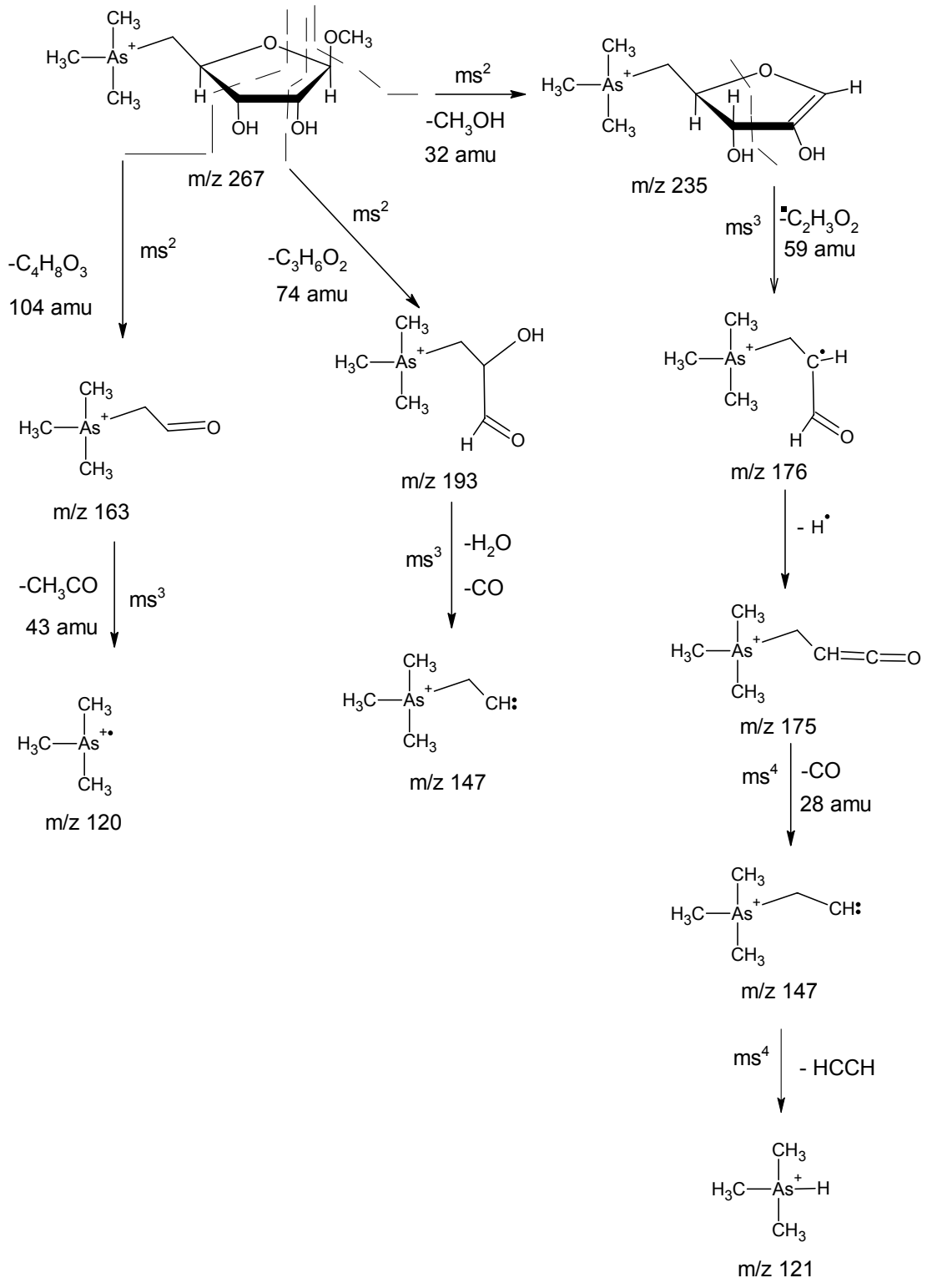
Σχήμα 3.37 Η θραυσματοποίηση του ιόντος m/z 193 της 5΄-τριμεθυλαρσενικικής–1΄-μέθοξυ-ριβόζης.



Σχήμα 3.38 Η θραυσματοποίηση του ιόντος m/z 163 της 5΄-τριμεθυλαρσενικικής–1΄-μέθοξυ-ριβόζης.



Σχήμα 3.39 Τα ms^3 (α, β) φάσματα μάζας 5΄- τριμεθυλαρσενικικής–1΄-μέθοξυ-ριβόζης.



Σχήμα 3.40 Τα μονοπάτια θραυσματοποίησης της 5΄-τριμεθυλαρσενικικής–1΄-μέθοξυ-ριβόζης.

3.4 Συμπεράσματα

Σε αυτό το τμήμα της εργασίας παρουσιάστηκε η διαδοχική φασματομετρία μάζας ιοντικής παγίδας 8 οργανικών ενώσεων του αρσενικού, από τις οποίες οι 7 βρίσκονται στο περιβάλλον. Χρησιμοποιήθηκαν δευτεριωμένα ανάλογα οργανικών ενώσεων του αρσενικού με σκοπό να διευκρινιστεί ο τρόπος θραύσης αυτών των ενώσεων και συνεπώς και να χαρακτηρισθούν οι δομές των θυγατρικών ιόντων τους και να συγκριθούν με τις περιορισμένες μελέτες που αναφέρονται στην βιβλιογραφία [184]. Επίσης μελετήθηκε η θραυσματοποίηση 2 αρσενοσακχάρων και προτάθηκαν τα μονοπάτια θραυσματοποίησης τους καθώς και των ανάλογων δευτεριωμένων ενώσεων. Το ένα από αυτά, η 5΄-διμεθυλαρσενικική αδενοσίνη έχει ανιχνευτεί πρόσφατα σε εκχυλίσματα από οστρακοειδή και τα μονοπάτια θραυσματοποίησης του παρουσιάζονται εδώ για πρώτη φορά. Το άλλο αρσενοσάκχαρο, η 5΄-τριμεθυλαρσενικική-1΄-μέθοξυ-ριβόζη, είναι μια πρότυπη ένωση και δεν έχει ανιχνευτεί σε κάποιο βιολογικό δείγμα. Παρόλα αυτά, η θραυσματοποίηση του έγινε με κύριο σκοπό να συγκριθεί ο τρόπος θραύσης του, με τον τρόπο θραυσματοποίησης της 5΄-διμεθυλαρσενικικής αδενοσίνης.

Για τις μεθυλιωμένες οργανικές ενώσεις του αρσενικού όπως μικρά οργανικά μόρια αρσενικού (αρσενοβιτάνιο, τετραμεθυλαρσενικικό ιόν,) καθώς και μεγαλύτερα όπως τα αρσενοσάκχαρα κατά την θραυσματοποίηση τους εμφανίζουν την τριπλέτα ιόντων m/z 105, 103 και 101 στα φάσματα μάζας που προκύπτουν από ES (CID) MS/MS. Το ιόν m/z 103, $CH_2As^+CH_2$, κυκλική δομή, σχηματίζεται έπειτα από αποσπάση μορίου υδρογόνου H_2 από το ιόν m/z 105, $CH_3As^+CH_3$, και το ιόν m/z 101 $CHAs^+CH$, κυκλική δομή, σχηματίζεται με ανάλογο τρόπο από το ιόν m/z 103. Οι δομές αυτών των διαγνωστικών θυγατρικών-ιόντων των ενώσεων του αρσενικού διευκρινίζονται εδώ με την θραυσματοποίηση του δευτεριωμένου αρσενοβιτανίου $CD_3(CH_3)_2As^+CH_2COOH$. Από αυτό το μοριακό ιόν κατά την θραύση του σχηματίζεται το ιόν m/z 108 $CD_3As^+CH_3$, το δευτεριωμένο ανάλογο του ιόντος m/z 105 $CH_3As^+CH_3$**.** Κατά την θραύση του θυγατρικού ιόντος m/z 108 $CD_3As^+CH_3$, παρατηρήθηκαν αποσπάσεις μορίων H_2, HD και D_2 και σχηματίστηκαν τα ιόντα m/z 106 CD_3AsCH^+, γραμμική δομή, m/z 105 $CD_2As^+CH_2$**,** κυκλική δομή, και m/z 104 CH_3AsCD^+, γραμμική δομή. Το γεγονός ότι λαμβάνουν χώρα οι αποσπάσεις των μορίων H_2, D_2, δηλαδή αποσπάσεις μορίων από ένα

άτομο άνθρακα του ιόντος m/z 108 $CD_3As^+CH_3$, κατά αντιστοιχία σημαίνει ότι και το μη δευτεριωμένο ιόν m/z 105 $CH_3As^+CH_3$ διασπάται με τον ίδιο τρόπο παράγοντας το ιόν m/z 103 σε δύο δομές: $CH_2As^+CH_2$, κυκλική δομή, και $CHAs^+CH_3$, γραμμική δομή μέσω των δύο εναλλακτικών τρόπων απόσπασης μορίου υδρογόνου από το ιόν m/z 105.

Επιπλέον με την εξέταση των δευτεριωμένων ενώσεων $(CH_3)_3As^+CH_2COOD$ και $CD_3(CH_3)_2As^+CH_2COOH$ επιβεβαιώθηκαν όλοι οι μηχανισμοί θραύσης του αρσενοβιτανίου, $(CH_3)_3As^+CH_2COOH$. Όπως, οι ομολυτικές διασπάσεις δεσμών και μεταφοράς ρίζας υδροξυλίου ή αποχώρηση ριζών όπως οι μεθυλικές και η υδροξυλική καθώς και αποχώρηση ουδέτερων μορίων όπως CH_2CO, CO, H_2O και H_2. Επίσης τα μονοπάτια θραυσματοποίησης του δευτεριωμένου τετραμεθυλαρσενικικού ιόντος και του d_3-διμεθυλαρσενικικού οξέος ήταν σε συμφωνία με αυτά των μη δευτεριωμένων αναλόγων τους που έχουν προταθεί στην βιβλιογραφία.

Τα μονοπάτια θραυσματοποίησης της 5΄-διμεθυλαρσενικικής αδενοσίνης ξεκινούν από την ετερολυτική διάσπαση του δεσμού του δακτυλίου της ριβόζης με την αδενοσίνη σχηματίζοντας κατά αυτό τον τρόπο ένα ιόν με τον δακτύλιο της ριβόζης να είναι φορτισμένος. Με την περαιτέρω θραύση παρατηρείται σταδιακή διάσπαση του δακτυλίου της ριβόζης και αποχώρηση τόσο ουδέτερων μορίων όπως CO, H_2O, H_2 όσο και ριζών, $^{\cdot}CH_3$, $^{\cdot}H$, $HCO^{\cdot}CHOH$. Οι διασπάσεις των δεσμών που συμβαίνουν στον δακτύλιο της ριβόζης είναι τόσο ομολυτικές όσο και ετερολυτικές έτσι ώστε το φορτίο να διατηρείται σε κάποιο τμήμα του δακτυλίου.

Κατά την θραυσματοποίηση της 5΄-τριμεθυλαρσενικικής–1΄-μέθοξυ-ριβόζης δεν παρατηρούνται όμοιες διασπάσεις δεσμών με εκείνες της 5΄-διμεθυλαρσενικικής αδενοσίνης. Στην περίπτωση της 5΄-τριμεθυλαρσενικικής–1΄-μέθοξυ-ριβόζης, ο δακτύλιος της ριβόζης χαρακτηρίζεται από ταυτόχρονες διασπάσεις των δεσμών του παράγοντας κατά αυτό τον τρόπο πολλά δευτερεύοντα ιόντα κατα το ms^2 στάδιο της διαδοχικής φασματομετρίας. Οι διασπάσεις αυτές είναι κυρίως ομολυτικές και μέσω αυτών σχηματίζονται είτε κατιοντικές ρίζες είτε ιόντα, με το θετικό φορτίο να παραμένει στο άτομο του αρσενικού.

Ένας πιθανός λόγος για το διαφορετικό τρόπο θραύσης αυτών των δύο αρσενοσακχάρων είναι ότι το φορτίο στην περίπτωση της 5΄-διμεθυλαρσενικικής αδενοσίνης βρίσκεται αρχικά στην αμινομάδα της αδενοσίνης και έπειτα στον δακτύλιο

της ριβόζης κατά την θραυσματοποίηση ενώ για την 5΄-τριμεθυλαρσενικική–1΄-μέθοξυ-ριβόζη το φορτίο διατηρείται στο άτομο του αρσενικού. Έτσι ο δακτύλιος της ριβόζης της 5΄-διμεθυλαρσενικικής αδενοσίνης διασπάται σταδιακά διατηρώντας κατά αυτό το τρόπο το θετικό φορτίο σε κάποιο τμήμα του δακτυλίου. Σε αντίθεση με αυτό, ο δακτύλιος της ριβόζης της 5΄-τριμεθυλαρσενικικής–1΄-μέθοξυ-ριβόζης διασπάται ταυτόχρονα σε πολλούς δεσμούς εφόσον το φορτίο είναι εντοπισμένο στο άτομο του αρσενικού, το φαινόμενο αυτό αναφέρεται στην βιβλιογραφία ως charge remote fragmentation.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Ανίχνευση του αρσενοβιτανίου, $(CH_3)_3As^+CH_2COOH$, σε Πρότυπο Υλικό Αναφοράς Dorm–2 με την χρήση ιονανταλλακτικής ρητίνης και φασματομετρίας μάζας ηλεκτροψεκασμού-ιοντικής παγίδας (ES-IT-MS/MS)

4.1 Εισαγωγή

Σε αυτό το τμήμα της εργασίας παρουσιάζεται η ανίχνευση του αρσενοβιτανίου σε πρότυπο υλικό αναφοράς (standard reference material, SRM) dorm-2. Το πρότυπο υλικό αναφοράς dorm-2 προέρχεται από μυικό ιστό σκυλόψαρου και είναι πιστοποιημένο από το Εθνικό Συμβούλιο Έρευνας του Καναδά (National Research Council of Canada, NRCC, Ontario, Canada) ότι περιέχει αρσενοβιτάνιο σε ποσότητα 39.1 ± 1.1 μg αρσενοβιτανίου/g δείγματος dorm-2. Το πρότυπο υλικό αναφοράς μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη και την επικύρωση κάθε νέας μεθόδου προσδιορισμού του αρσενοβιτανίου. Εδώ παρουσιάζεται μία απλή και γρήγορη μέθοδος ανίχνευσης του αρσενοβιτανίου στο πρότυπο υλικό αναφοράς dorm-2 χρησιμοποιώντας εκχύλιση στερεής/υγρής φάσης, ιονανταλλακτική ρητίνη για τον διαχωρισμό του αρσενοβιτανίου και φασματομετρία μάζας ηλεκροψεκασμού ιοντικής παγίδας MS/MS, για την ανίχνευσή του.

4.2 Πειραματικό

4.2.1 Χημικές ενώσεις και Μέθοδοι

0.2 γραμμάρια από το dorm-2 εκχυλίσθηκαν με 2 mL νερό υπό ανάδευση για 30 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντριση του μίγματος για 10 λεπτά και 1 mL από το υπερκείμενο συλλέχθηκε ώστε να αναλυθεί. Για την απομόνωση του αρσενοβιτανίου στο εκχύλισμα χρησιμοποιήθηκε μία στήλη ιονανταλλακτικής ρητίνης: Waters Oasis HLB (Hydrophilic-Lipophilic Balance). Η ρητίνη ενεργοποιήθηκε με 1mL μεθανόλης. Η

τροφοδοσία μεθανόλης υποβοηθήθηκε με εφαρμογή χαμηλής πίεσης. Η διαδικασία επαναλήφθηκε με 1 mL νερό. Ακολούθησε φόρτωμα 1 mL εκχυλίσματος. Η έκλουση του οποίου έγινε αρχικά με 3 mL διάλυματος NH_4Ac 2 mM και συλλέχθηκαν 3 κλάσματα του ενός mL. Η έκλουση συνεχίστηκε με 3 mL διαλύματος NH_4Ac 10mM και πάλι συλλέχθηκαν τρία κλάσματα του ενός mL. Τέλος χρησιμοποιήθηκαν 3 ml υδατικού διαλύματος 50% (V/V) μεθανόλης και συλλέχθηκαν άλλα τρία κλάσματα. Αυτά τα 9 δείγματα αναλύθηκαν με φασματομετρία μάζας για την παρουσία του αρσενοβιτανίου σε αυτά. Κατόπιν αναλύθηκε και πρότυπο διάλυμα αρσενοβιτανίου συγκέντρωσης 100 μg/mL, το οποίο παρασκευάστηκε με αραίωση από ένα πρότυπο διάλυμα αναφοράς αρσενοβιτανίου συγκέντρωσης 1031 μg/mL (BCR-626) το οποίο προήλθε από το Ινστιτούτο Υλικών και Μετρήσεων Αναφοράς (Institute for Reference Materials and Measurements, Geel, Belgium). Το νερό που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των διαλυμάτων ήταν απιονισμένο (Clear SG, 18MΩ cm). Η μεθανόλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν καθαρή σε βαθμό 99.9% και προήλθε από την εταιρία Sigma-Aldrich, ενώ το άλας του οξικού αμμωνίου ήταν κατάλληλης καθαρότητας για φασματομετρία μάζας και προήλθε από την εταιρία Sigma.

4.2.2 Οργανολογία

Όλες οι μετρήσεις έγιναν στο φασματόμετρο μάζας LCQ Advantage (ThermoFinnigan, UK). Όλα τα πειράματα έγιναν παρακολουθώντας θετικά ιόντα. Η ταχύτητα ροής των δειγμάτων προς την πηγή ιονισμού ήταν 10 μl/min. Επίσης έγινε αυτόματη βελτιστοποίηση των πειραματικών παραμέτρων του συστήματος μεταφοράς των ιόντων από την πηγή ιονισμού στον αναλυτή μαζών για το ιόν με m/z 179 που αντιστοιχεί στο αρσενοβιτάνιο, $(CH_3)_3As^+CH_2COOH$, χρησιμοποιώντας πρότυπο διάλυμα αρσενοβιτανίου συγκέντρωσης 10 μg/mL. Οι τυπικές πειραματικές παράμετροι της πηγής ιονισμού παρουσιάζονται στο Πίνακα 4.1.

Επίσης, οι πειραματικές παράμετροι της ιοντικής παγίδας κατά την απομόνωση και θραύση του πατρικού ιόντος παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.2. Η ενέργεια θραυσματοποίησης καθορίστηκε στα 40% των 5 Volt έπειτα από βελτιστοποίηση που έγινε μετρώντας την ένταση των θυγατρικών ιόντων καθώς η ενέργεια

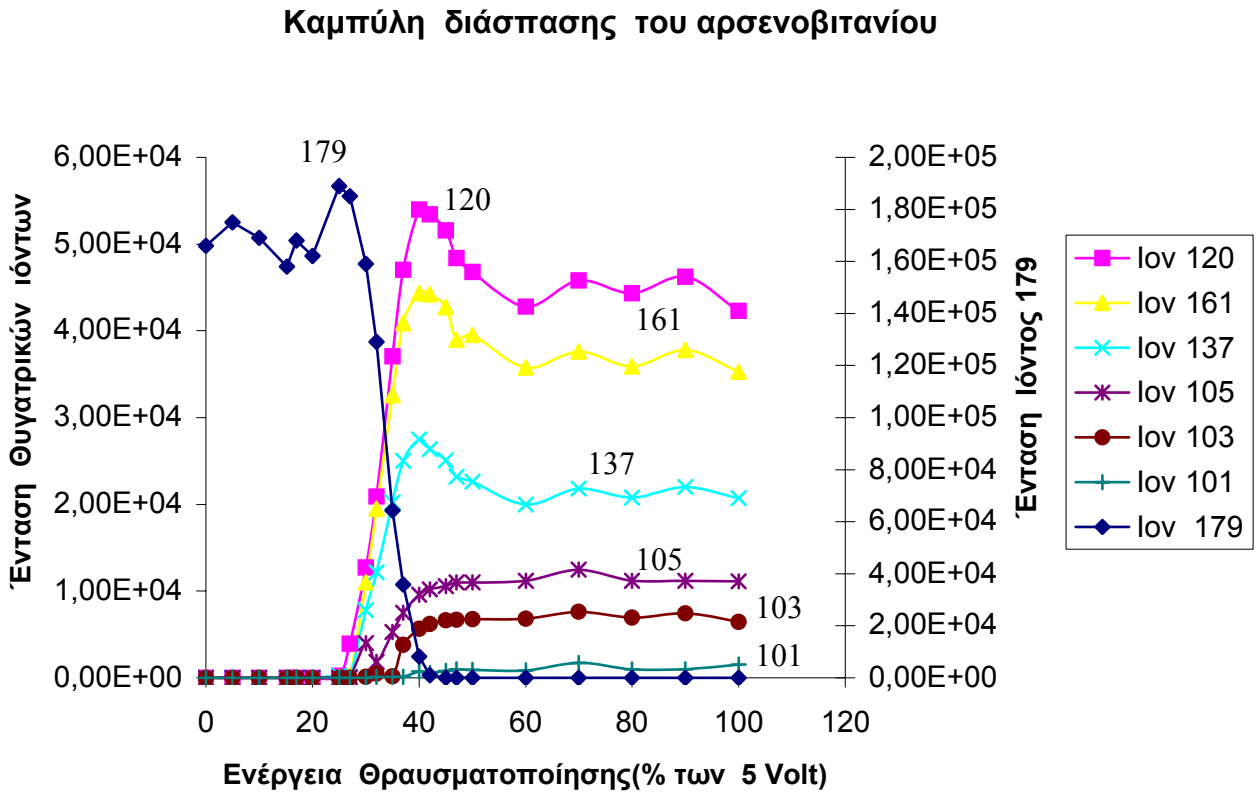
θραυσματοποίησης του πατρικού ιόντος αυξάνει. Τα αποτελέσματα της βελτιστοποίησης παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.1.

Πίνακας 4.1 Πειραματικές παράμετροι της πηγής ηλεκτροψεκασμού.

Τάση τριχοειδούς	5.5kV
Εκνεφωνητικό αέριο	60 μονάδες οργάνου
Βοηθητικό αέριο	56 μονάδες οργάνου
Θερμοκρασία τριχοειδούς	300 ^{0}C

Πίνακας 4.2 Πειραματικές παράμετροι της Ιοντικής παγίδας.

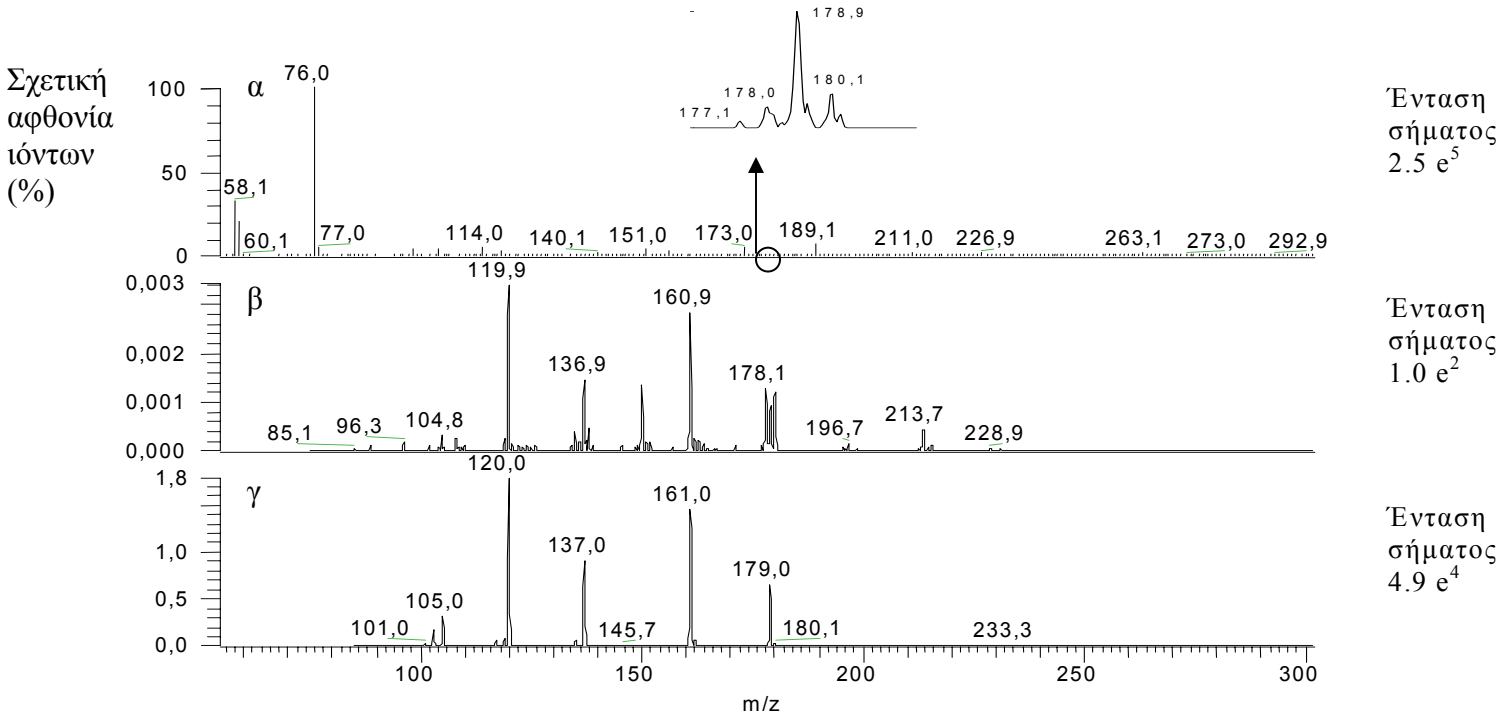
Ιον Απομόνωσης	m/z 179
Εύρος μαζών Απομόνωσης	3 amu
Ενέργεια Θραυσματοποίησης	40 %
Χρόνος Ενεργοποίησης	30 ms
Παράμετρος Ενεργοποίησης (Q)	0.35
Χρόνος ανοίγματος παγίδας	50 ms



Σχήμα 4.1 Καμπύλη βελτιστοποίησης της ενέργειας θραύσης του αρσενοβιτανίου.

4.3 Ανάλυση Αποτελεσμάτων

Από τα 9 κλάσματα που συλλέχθηκαν στο πρώτο ανιχνεύτηκε το αρσενοβιτάνιο. Όπως χαρακτηριστικά φαίνεται στο MS/MS φάσμα μάζας του (Σχήμα 4.2β), όταν το ιόν m/z 179 διασπάται παράγει ιόντα-θραύσματα που είναι ίδια με εκείνα που προκύπτουν από την διάσπαση του ιόντος m/z 179 που αντιστοιχεί στο πρότυπο αρσενοβιτάνιο (Σχήμα 4.2γ). Αυτά τα δευτερεύοντα ιόντα είναι: m/z 161: $(CH_3)_3As^+CHCO$, m/z 137: $(CH_3)_3As^+OH$, m/z 120: $(CH_3)_3As^+$ και m/z 105: $(CH_3)_2As^+$. Κατά αυτόν τον τρόπο είναι δυνατή η ανίχνευση του αρσενοβιτανίου στο πρώτο κλάσμα εκχυλίσματος του dorm-2 καθώς σε μεγάλο ποσοστό το MS/MS φάσμα μάζας του είναι ίδιο με εκείνο του πρότυπου διαλύματος αρσενοβιτανίου. Στα υπόλοιπα κλάσματα που μετρήθηκαν σε κάποια παρατηρήθηκαν (κλάσματα: 6-9) στα MS/MS φάσματα μάζας τους τα χαρακτηριστικά ιόντα θραύσματα του αρσενοβιτανίου σε πολύ χαμηλή ένταση. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι αν και στο πλήρες MS φάσμα μάζας του πρώτου κλάσματος του dorm-2 (Σχήμα 4.2α), δεν εμφανίζεται έντονη η κορυφή του ιόντος του αρσενοβιτανίου σε σχέση με τον χημικό θόρυβο που παρατηρείται, εντούτοις στο MS /MS φάσμα μάζας του υπάρχουν τα χαρακτηριστικά δευτερεύοντα ιόντα του αρσενοβιτανίου γεγονός που δείχνει την εκλεκτικότητα της μεθόδου.



Σχήμα 4.2 Το πλήρες MS φάσμα μάζας του 1ου κλάσματος του εκχυλίσματος dorm-2 (α),το MS/MS φάσμα μάζας του ιόντος m/z 179 του 1ου κλάσματος του εκχυλίσματος dorm-2 (β) και το MS/MS φάσμα μάζας πρότυπου διαλύματος αρσενοβιτανίου (γ).

4.4 Συμπεράσματα

Σε αυτό το τμήμα της εργασίας παρουσιάστηκε μία απλή και γρήγορη μέθοδο ανίχνευσης του αρσενοβιτανίου σε πρότυπο υλικό αναφοράς dorm-2 η οποία ένωση είναι η κύρια μορφή του αρσενικού στους θαλάσσιους οργανισμούς και επίσης εισέρχεται στον ανθρώπινο οργανισμό με την κατανάλωση θαλασσινών. Αυτό επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας ιονανταλλακτική ρητίνη και φασματομετρία μάζας ηλεκτροψεκασμού-ιοντικής παγίδας με την μέθοδο καταγραφής θυγατρικών ιόντων με MS/MS. Έτσι για την ανίχνευση του αρσενοβιτανίου στο εκχύλισμα του δείγματος dorm-2, καταγράφηκαν τα δευτερεύοντα ιόντα του μοριακού ιόντος του και συγκρίθηκαν με εκείνα που προήλθαν από την διάσπαση πρότυπου αρσενοβιτανίου. Η ύπαρξη όλων των θυγατρικών ιόντων του αρσενοβιτανίου μετά την θραύση του στο MS/MS φάσμα μάζας κατά την ανάλυση του πραγματικού δείγματος είναι η απαραίτητη προϋπόθεση για την ταυτοποίηση του αρσενοβιτανίου σε αυτό, όπως επίσης και η σωστή σχετική αναλογία των εντάσεων των θυγατρικών ιόντων. Από τα κλάσματα εκχυλίσματος που συλλέχθηκαν χρησιμοποιώντας

διαφορετικούς διαλύτες έκλουσης, το μεγαλύτερο μέρος του αρσενοβιτανίου ανευρίσκεται στο πρώτο κλάσμα (διαλύτης έκλουσης NH_4^+Ac 2mM) ενώ μικρή ποσότητα από το αρσενοβιτάνιο ανιχνεύτηκε και στα κλάσματα που συλλέχθηκαν με διαλύτη έκλουσης υδατικό διάλυμα 50% μεθανόλης.

Το γεγονός ότι η μέθοδος δεν απαιτεί χρονοβόρα βελτιστοποίηση των πειραματικών παραμέτρων του συστήματος εκτός εκείνης της ενέργειας θραυσματοποίησης του αρσενοβιτανίου και του συστήματος μεταφοράς των ιόντων από την πηγή ιονισμού στον αναλυτή μαζών, καθιστά αυτή την μέθοδο γρήγορη και απλή. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι σε αυτό συντέλεσε και η υψηλή συγκέντρωση του αρσενοβιτανίου στο εκχύλισμα του dorm-2, η οποία ήταν κοντά στα 4 μg/mL. Έτσι είναι φανερό ότι ενώσεις σε πραγματικά δείγματα σε επίπεδα συγκεντρώσεων όπως αυτά του αρσενοβιτανίου στο δείγμα dorm-2 μπορούν να ανιχνευτούν με ανάλογο τρόπο, χωρίς όμως να διαφεύγει της προσοχής ότι η ευαισθησία κάθε μεθόδου είναι άμεσα συνδεδεμένη με την δομή της υπό ανίχνευση ένωσης καθώς και της μήτρας του δείγματος που εξετάζεται. Τέλος η ανίχνευση του αρσενοβιτανίου σε παραπάνω από ένα κλάσμα εκχυλίσματος του δείγματος, δείχνει την δυσκολία της χρήσης των ιονανταλλακτικών ρητινών για ποσοτική ανάλυση του αρσενοβιτανίου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Ποσοτικός προσδιορισμός του αρσενοβιτανίου σε Πρότυπο Υλικό Αναφοράς Dorm–2, με την χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας ηλεκτροψεκασμού ιοντικής παγίδας (HPLC-ES-IT-MS/MS)

5.1 Εισαγωγή

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζεται η ανάπτυξη μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού του αρσενοβιτανίου σε πρότυπο υλικό αναφοράς dorm-2, χρησιμοποιώντας υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας ηλεκτροψεκασμού με αναλυτή μάζας ιοντική παγίδα (HPLC-ES-IT-MS/MS). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία παρακολούθησης επιλεγμένων αντιδράσεων (selected reaction monitoring, SRM). Θα πρέπει να αναφερθεί ότι στο δείγμα dorm-2, σαν πρότυπο υλικό αναφοράς, η ποσότητα αρσενοβιτανίου που περιέχεται είναι γνωστή και πιστοποιημένη (39.1±1.1 μg αρσενοβιτανίου / g δείγματος). Έτσι αυτό το δείγμα χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη και επικύρωση νέων μεθόδων ποσοτικού προσδιορισμού του αρσενοβιτανίου. Κατά αυτό τον τρόπο, ο προσδιορισμός της ποσότητας του αρσενοβιτανίου σε αυτό το πρότυπο υλικό αναφοράς λειτουργεί σαν έλεγχος ποιότητας της μεθόδου που αναπτύσσεται, πριν αυτή χρησιμοποιηθεί για τον ποσοτικό προσδιορισμό του αρσενοβιτανίου σε άλλα παρεμφερή περιβαλλοντικά και βιολογικά δείγματα.

Το αρσενοβιτάνιο όπως προαναφέρθηκε και στο κεφάλαιο 1, βρίσκεται σε πολλά θαλασσινά όπως μύδια και οστρακοειδή [24-28]. Επιπλέον έχει ανιχνευτεί και σε ανθρώπινα ουρά μετά από κατανάλωση θαλασσινών [188]. Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός του αρσενοβιτανίου σε αυτά τα δείγματα έχει επιτευχθεί χρησιμοποιώντας τεχνικές όπως υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης σε συνδυασμό

με φασματομετρία μάζας ηλεκτροψεκασμού με την μεθοδολογία της παρακολούθησης επιλεγμένων αντιδράσεων (SRM) [23], καθώς και με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (HPLC–ICP–MS) [120-128].

Τα πλεονεκτήματα της τεχνικής της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας ηλεκτροψεκασμού και την παρακολούθηση επιλεγμένων αντιδράσεων (SRM) της υπό προσδιορισμού ένωσης, ως προς την ανίχνευση των ενώσεων του αρσενικού στο περιβάλλον έχουν παρατεθεί στο κεφάλαιο 3. Η ποσοτική ανάλυση ιχνοποσοτήτων αυτών των ενώσεων μπορεί επίσης να γίνει με την συγκεκριμένη τεχνική με την διαφορά ότι σε αυτή την περίπτωση παρακολουθείται ένα ή περισσότερα δευτερεύοντα ιόντα του αναλύτη.

Η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (HPLC–ICP–MS) είναι μια βασική τεχνική για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ενώσεων του αρσενικού στο περιβάλλον. Τα πλεονεκτήματα αυτής βασίζονται στο γεγονός ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα μεγάλο εύρος χρωματογραφικών στατικών φάσεων, αυξάνοντας έτσι τις πιθανότητες για πλήρη διαχωρισμό των ενώσεων του αρσενικού που βρίσκονται στο δείγμα. Η φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος παρουσιάζει αυξημένη ευαισθησία και χαμηλά όρια ανίχνευσης για τις ενώσεις του αρσενικού. Το μειονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι ότι απαιτείται ο πλήρης χρωματογραφικός διαχωρισμός των ενώσεων του αρσενικού στο δείγμα, εφόσον ο προσδιορισμός των ενώσεων βασίζεται μόνο στους χρόνους κατακράτησης αυτών των ενώσεων, με συνέπεια να απαιτείται ένας μεγάλος αριθμός πρότυπων ενώσεων που στις περισσότερες περιπτώσεις δεν είναι εμπορικά διαθέσιμες.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, γίνεται κατανοητό ότι σαν κύριος σκοπός αυτής της εργασίας δεν ήταν μόνο ο ποσοτικός προσδιορισμός του αρσενοβιτανίου στο δείγμα dorm–2, αφού κάτι τέτοιο έχει ήδη γίνει, αλλά η ανάπτυξη ποσοτικού πρωτόκολλου ανάλυσης για το αρσενοβιτάνιο στο δείγμα dorm–2 με κύριο σκοπό να εξακριβωθούν οι δυνατότητες του συγκεκριμένου τύπου φασματόμετρου μάζας ηλεκτροψεκασμού-ιοντικής παγίδας (LCQ Advantage) ως προς τον ποσοτικό προσδιορισμό ιχνοποσοτήτων ενώσεων σε πραγματικά περιβαλλοντικά και βιολογικά

δείγματα. Κάτι τέτοιο έχει μεγάλη σημασία αφού με αυτό το φασματόμετρο μάζας, στο συγκεκριμένο εργαστήριο, δεν έχει γίνει ποσοτική ανάλυση στο παρελθόν και έτσι είναι αναγκαίο να εξακριβωθούν οι δυνατότητες του οργάνου ως προς την ακρίβεια, την ευαισθησία, την επαναληψιμότητα, την αντοχή και το χρόνο που απαιτείται για την ποσοτική ανάλυση. Βέβαια, οι προαναφερόμενοι όροι δεν είναι συνάρτηση μόνο του οργάνου που χρησιμοποιείται αλλά και της υπό εξέταση ένωσης και της μήτρας του δείγματος με συνέπεια από αυτή την εργασία να μην μπορούν να προκύψουν γενικά συμπεράσματα ως προς τις δυνατότητες του οργάνου, όμως μπορεί να δοθεί μία βασική ιδέα για αυτές.

5.2 Πειραματικό

5.2.1 Χημικές ενώσεις και Πρότυπο Υλικό Αναφοράς

Για την παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων αρσενοβιτανίου, χρησιμοποιήθηκε πιστοποιημένο υδατικό διάλυμα αναφοράς BCR-626 που προήλθε από το Ινστιτούτο Υλικών και Μετρήσεων Αναφοράς (Institute for References Materials and Measurements, Geel, Belgium) το οποίο περιέχει 1031 μg αρσενοβιτανίου/mL. Επίσης το πιστοποιημένο δείγμα αναφοράς: Μυς από σκυλόψαρο, dorm-2 προήλθε από το Εθνικό Συμβούλιο Έρευνας του Καναδά (National Research Council of Canada, NRCC, Ontario, Canada) με πιστοποιημένη συγκέντρωση αρσενοβιτανίου: 39.1 ±1.1 μg αρσενοβιτανίου/g δείγματος dorm-2. Το βρωμιούχο άλας του δευτεριωμένου αρσενοβιτανίου, $[CD_3(CH_3)_2As^+CH_2COOH]Br^-$, παρασκευάστηκε σύμφωνα με μέθοδο που υπάρχει στην βιβλιογραφία [186] και αποτελεί ευγενική προσφορά του καθηγητή William R. Cullen (Department of Chemistry, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada). Το νερό που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των διαλυμάτων ήταν απιονισμένο (Clear SG, 18MΩ cm). Η μεθανόλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν καθαρή σε βαθμό 99.9% και προήλθε από την εταιρία Sigma-Aldrich, ενώ το άλας οξικού αμμωνίου ήταν κατάλληλης καθαρότητας για φασματομετρία μάζας και προήλθε από την εταιρία Fluka. Το διάλυμα οξικού οξέος ήταν περιεκτικότητας 100% και προήλθε από την εταιρία Sigma.

5.2.2 Προετοιμασία Δειγμάτων

Σε 0.2 g στερεού δείγματος dorm-2 προστέθηκαν 2 mL απιονισμένου νερού, και αυτό το μίγμα αναδεύτηκε για 18 ώρες. Ακολούθησε φυγοκέντριση για 10 λεπτά (Universal, Hettich, Germany). Από το υπερκείμενο διάλυμα συλλέχθηκε 1 mL. Για να μελετηθεί η επίδραση της μήτρας του δείγματος που αναλύεται στα αποτελέσματα των μετρήσεων, κρίθηκε απαραίτητο το εκχύλισμα του δείγματος dorm-2 να αραιωθεί σε δύο επίπεδα. Το πρώτο δείγμα για ανάλυση ήταν αραιωμένο σε αναλογία 1:50 ως προς το αρχικό εκχύλισμα, ενώ το δεύτερο σε αναλογία 1:10.

Το δείγμα ανάλυσης (αραιωμένο 1:50 ως προς το αρχικό) παρασκευάστηκε ως εξής: 100 μL από το υπερκείμενο που συλλέχθηκε αραιώθηκαν με απιονισμένο νερό σε αναλογία 1:5. Σε 100 μL από αυτό το αραιωμένο διάλυμα προστέθηκαν 100 μL υδατικού διαλύματος που περιείχε εσωτερικό πρότυπο, d_3-αρσενοβιτανίου συγκέντρωσης 345 ng/mL, και επιπλέον προστέθηκαν 800 μL απιονισμένο νερό και μετρήθηκε τρεις φορές με εισαγωγή 50 μL (χωρητικότητα του βρόχου εισαγωγής: 50μL) στην χρωματογραφική στήλη. Μεταξύ αυτών των μετρήσεων έγιναν εισαγωγές απιονισμένου νερού προς καθαρισμό του συστήματος και έλεγχο επιμολύνσεως.

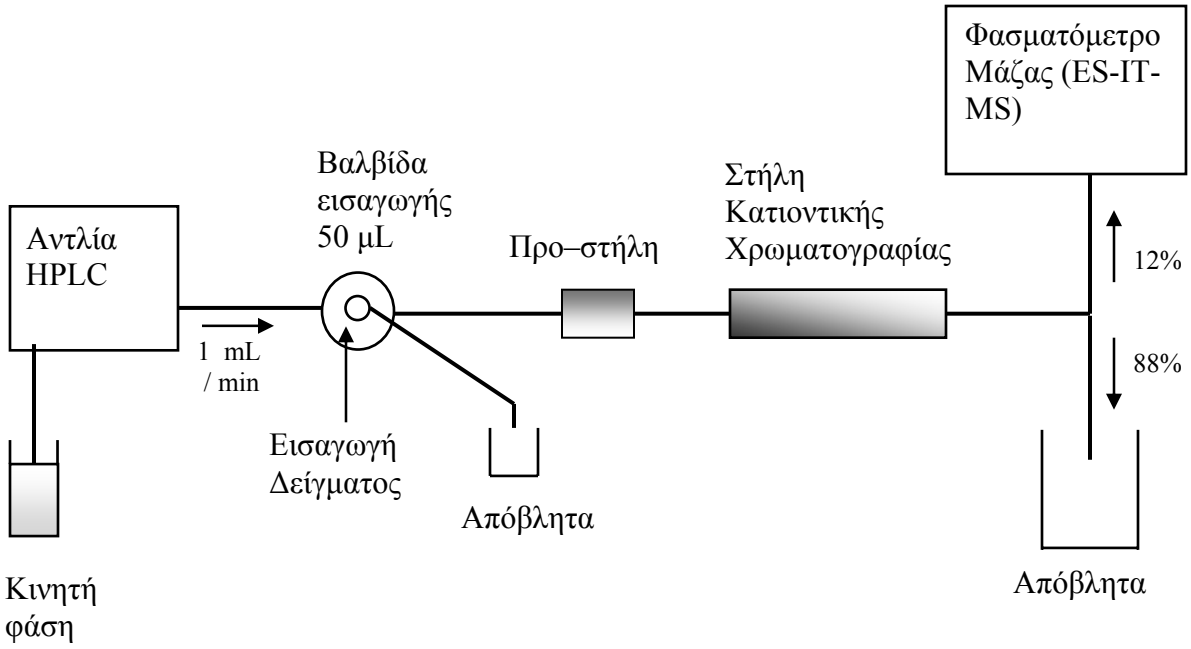
Το άλλο δείγμα ανάλυσης (αραιωμένο 1:10 ως προς το αρχικό) παρασκευάστηκε ως εξής: Σε 100 μL από το εκχύλισμα του dorm-2 προστέθηκαν 100 μL υδατικού διαλύματος εσωτερικού προτύπου, d_3-αρσενοβιτανίου συγκέντρωσης 1.72 μg/mL, και επιπλέον προστέθηκαν 800 μL απιονισμένο νερό και μετρήθηκε κατά τον ίδιο τρόπο με το πιο αραιό δείγμα. Τέλος, τα διαλύματα του εσωτερικού προτύπου που προστέθηκαν στα δείγματα, παρασκευάστηκαν από πυκνό διάλυμα d_3-αρσενοβιτανίου συγκέντρωσης 690 μg/mL με διαδοχικές αραιώσεις. Αυτό το πυκνό διάλυμα παρασκευάστηκε με διάλυση 20 mg άλατος [d_3-αρσενοβιτανίου]Br, σε 20 mL απιονισμένο νερό.

5.2.3 Υγρή Χρωματογραφία

Το σύστημα της χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκε παρουσιάζεται στο Σχήμα 5.1. Η αντλία χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (Rigas Lab) παρείχε κινητή φάση με ταχύτητα ροής 1 mL/min. Για τον διαχωρισμό του αρσενοβιτανίου

χρησιμοποιήθηκε κατιοντική στήλη χρωματογραφίας (Zorbax 300-SCX, 5μm, 4.6 x 150 mm, Agilent) συνδεδεμένη με προ-στήλη. Επίσης, μετά-στήλης σύστημα διαχωρισμού ροής χρησιμοποιήθηκε με το 12% της ροής να καταλήγει στο φασματόμετρο και το 88% στα απόβλητα. Με αυτό το τρόπο η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης προς το φασματόμετρο μάζας ήταν γύρω στα 120 μL/min.

Η κινητή φάση ήταν υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου συγκέντρωσης 10 mM, 10 % (V/V) μεθανόλη, με pH = 3.0. Το pH της κινητής φάσης ρυθμίστηκε με διάλυμα οξικού οξέος περιεκτικότητας 100% (V/V). Για το διαχωρισμό του αρσενοβιτανίου χρησιμοποιήθηκε ισοκρατική έκλουση.



Σχήμα 5.1 Αναπαράσταση του συστήματος της χρωματογραφίας της μεθόδου.

5.2.4 Φασματομετρία Μάζας

Όλες οι μετρήσεις έγιναν στο φασματόμετρο μάζας LCQ Advantage (ThermoFinnigan, UK) ρυθμισμένο για την παρακολούθηση θετικών ιόντων. Οι τυπικές πειραματικές παράμετροι της πηγής ηλεκτροψεκασμού ήταν οι εξής: Δυναμικό πηγής ηλεκτροψεκασμού 5.5 kV, πίεση εκνεφωτικού αερίου 65 μονάδες οργάνου και πίεση βοηθητικού αερίου 35 μονάδες οργάνου. Οι τιμές αυτών των παραμέτρων ορίστηκαν

μετά από βελτιστοποίηση. Η θερμοκρασία του τριχοειδή μεταφοράς ιόντων από την πηγή στον αναλυτή μάζας ρυθμίστηκε στους 300 ^{0}C.

Τόσο για τα πρότυπα διαλύματα όσο και για τα δείγματα χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία παρακολούθησης επιλεγμένων αντιδράσεων του αρσενοβιτανίου και του αντίστοιχου δευτεριωμένου εσωτερικού προτύπου. Έτσι παρακολουθήθηκε η αντίδραση m/z 179→ m/z 120, για το αρσενοβιτάνιο και η αντίστοιχη αντίδραση για το εσωτερικό πρότυπο, m/z 182→ m/z 123. Δηλαδή τα αποτελέσματα βασίστηκαν στις μετρήσεις των εντάσεων των θυγατρικών ιόντων του αρσενοβιτανίου και του εσωτερικού προτύπου: m/z 120, $(CH_3)_3As^+$ και m/z 123, $(CD_3)(CH_3)_2As^+$, αντίστοιχα. Η συγκεκριμένη αντίδραση παρακολούθησης και η ενέργεια θραύσης που χρησιμοποιήθηκε (40%) επιλέχτηκαν έπειτα από βελτιστοποίηση. Επιπλέον οι πειραματικές παράμετροι της αντίδρασης παρακολούθησης ήταν οι εξής: Κεντρικό ιόν απομόνωσης m/z 181, εύρος μαζών απομόνωσης 6 ατομικές μονάδες μάζας. Οι τιμές αυτών των παραμέτρων επιλέχθηκαν ώστε να απομονωθούν ικανοποιητικά τόσο το ιόν του αρσενοβιτανίου m/z 179, όσο και του d_3–αρσενοβιτανίου m/z 182. Ο χρόνος ενεργοποίησης ήταν 30 ms και η παράμετρος ενεργοποίησης (Q) στα 0.35. Ο μέγιστος χρόνος ανοίγματος της παγίδας καθορίστηκε στα 700 ms έπειτα από βελτιστοποίηση. Ο αριθμός σαρώσεων (microscan) ήταν 3, και επιλέχθηκε ώστε οι χρωματογραφικές κορυφές να αποτελούνται τουλάχιστον από 10 σημεία δεδομένων (data points). Επίσης, έγινε βελτιστοποίηση των παραμέτρων του συστήματος μεταφοράς των ιόντων από την πηγή ιονισμού στην ιοντική παγίδα, ως προς το ιόν m/z 179.

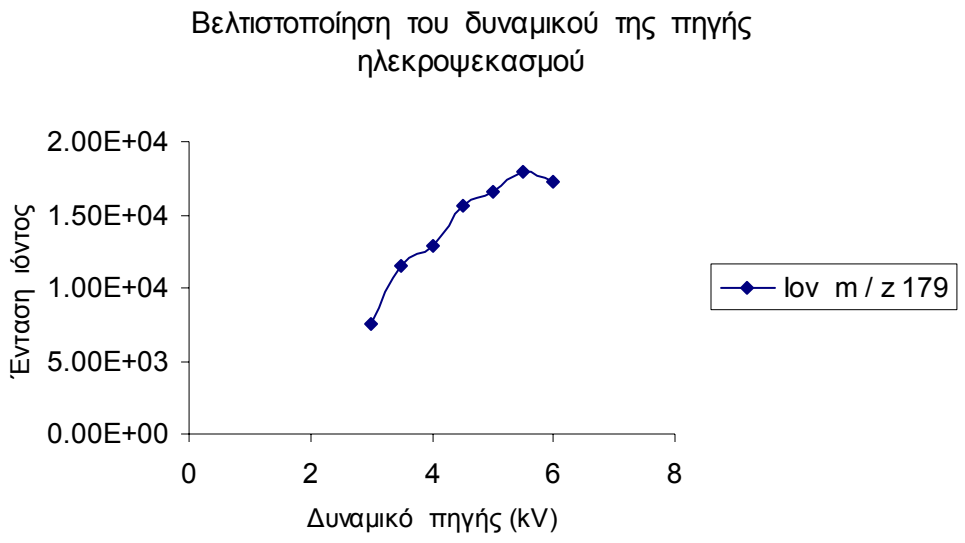
5.3 Ανάλυση Αποτελεσμάτων

5.3.1 Βελτιστοποίηση πειραματικών παραμέτρων

5.3.1.1 Βελτιστοποίηση του δυναμικού πηγής ιονισμού

Για την εύρεση του βέλτιστου δυναμικού της πηγής ιονισμού μετρήθηκε η ένταση του πατρικού ιόντος, m/z 179, σε πρότυπο υδατικό διάλυμα αρσενοβιτανίου συγκέντρωσης 100 ng/mL, μεταβάλλοντας το εφαρμοζόμενο δυναμικό της πηγής σε

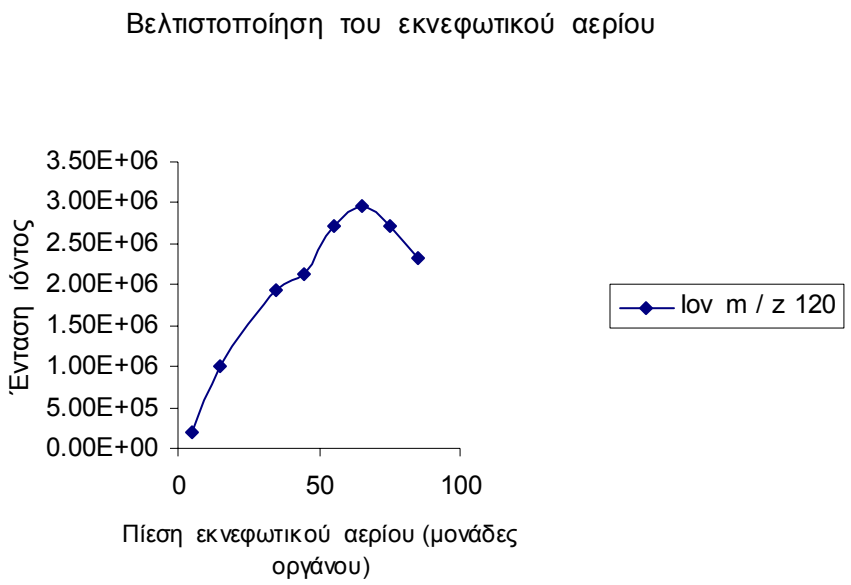
εύρος τιμών από 3–6 kV. Οι μετρήσεις αυτές έγιναν εισάγοντας 50 μL αυτού του διαλύματος στην βαλβίδα εισαγωγής (χωρητικότητα βρόχου: 50μL). Για κάθε τιμή του δυναμικού, έγινε μία μέτρηση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Σχήμα 5.2.



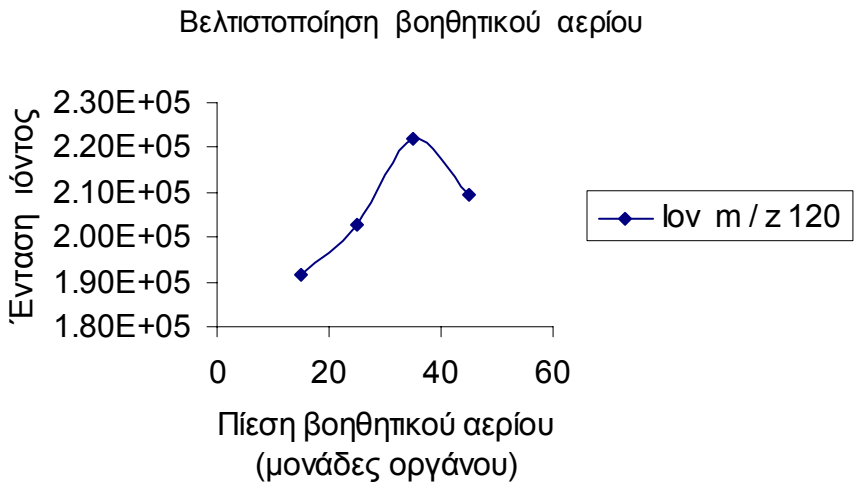
Σχήμα 5.2 Η ένταση του ιόντος m/z 179, αρσενοβιτάνιο, σε συνάρτηση με το δυναμικό της πηγής ηλεκτροψεκασμού.

5.3.1.2 Βελτιστοποίηση της πίεσης του εκνεφωτικού και βοηθητικού αεριού της πηγής ιονισμού

Για την εύρεση των βέλτιστων πιέσεων του εκνεφωτικού και βοηθητικού αεριού της πηγής ιονισμού μετρήθηκε η ένταση του θυγατρικού ιόντος, m/z 120, του αρσενοβιτανίου σε πρότυπο υδατικό διάλυμα αρσενοβιτανίου συγκέντρωσης 100 ng/mL, μεταβάλλοντας την πίεση του εκνεφωτικού αερίου σε εύρος τιμών πίεσης από 5–100 μονάδων οργάνου, διατηρώντας την πίεση του βοηθητικού αερίου σταθερή στις 5 μονάδες οργάνου, στην περίπτωση της βελτιστοποίησης της πίεσης του εκνεφωτικού αερίου. Για την βελτιστοποίηση της πίεσης του βοηθητικού αερίου έγινε η αντίστοιχη διαδικασία, μεταβάλλοντας την πίεση του βοηθητικού αερίου σε εύρος τιμών πίεσης από 15-45 μονάδων οργάνου και διατηρώντας την πίεση του εκνεφωτικού αερίου στις 5 μονάδες οργάνου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα Σχήματα 5.3 και 5.4.



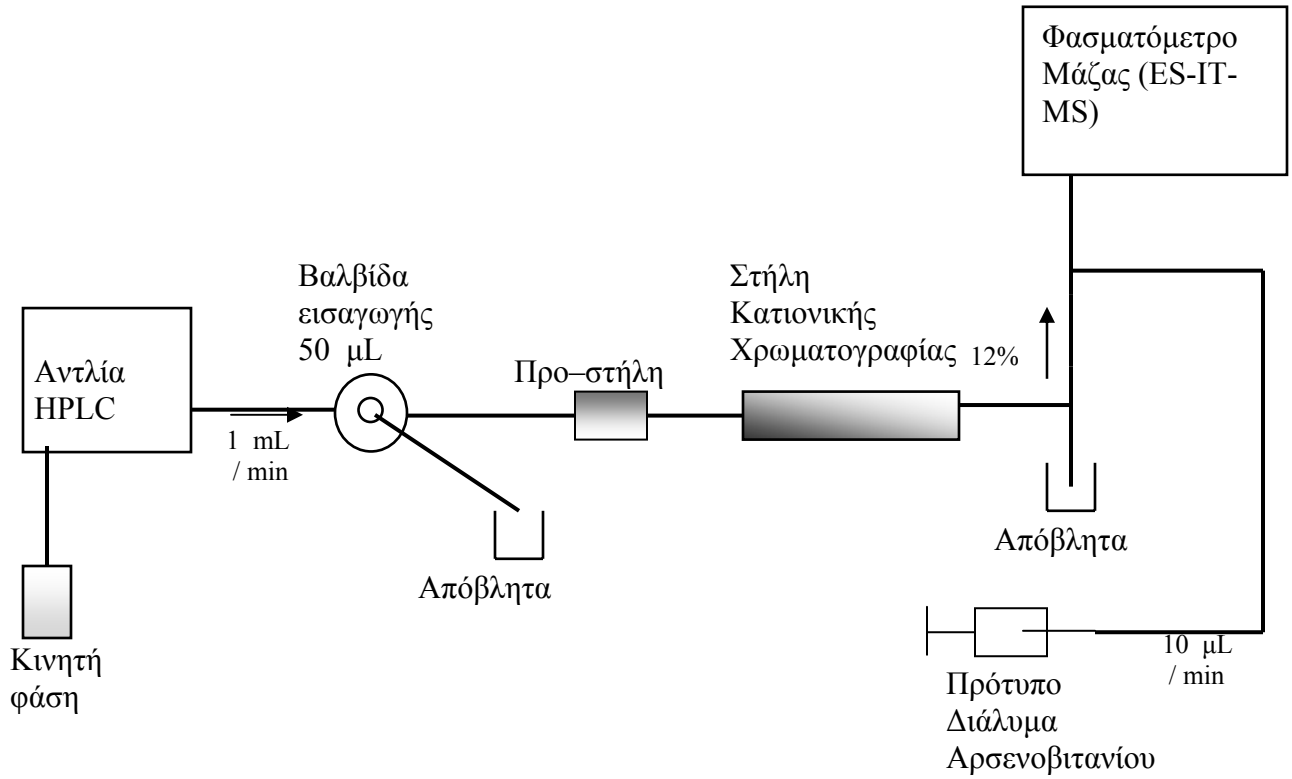
Σχήμα 5.3 Η ένταση του θυγατρικού ιόντος m/z 120, του αρσενοβιτανίου, σε συνάρτηση με την πίεση του εκνεφωτικού αερίου της πηγής ηλεκτροψεκασμού.



Σχήμα 5.4 Η ένταση του θυγατρικού ιόντος m/z 120, του αρσενοβιτανίου, σε συνάρτηση με την πίεση του βοηθητικού αερίου της πηγής ηλεκτροψεκασμού.

5.3.1.3 Βελτιστοποίηση του συστήματος μεταφοράς του ιόντος m/z 179 από την πηγή ιονισμού στην ιοντική παγίδα

Η βελτιστοποίηση του συστήματος μεταφοράς των ιόντων από την πηγή ηλεκτροψεκασμού στην ιοντική παγίδα έγινε χρησιμοποιώντας συνεχή ροή πρότυπου διαλύματος αρσενοβιτανίου συγκέντρωσης 10 μg/mL, με την ταχύτητα ροής που χρησιμοποιήθηκε στις αναλύσεις. Αυτό πραγματοποιήθηκε συνδέοντας μεταξύ της χρωματογραφικής στήλης και του φασματομέτρου μάζας μια αντλία που τροφοδοτούσε το πρότυπο διάλυμα προς το φασματόμετρο μάζας με ροή 10 μL/min. Η διάταξη συνεχούς εισαγωγής προτύπου που χρησιμοποιήθηκε για να γίνει αυτή η βελτιστοποίηση παρουσιάζεται στο Σχήμα 5.5. Η γενική ιδέα αυτής της βελτιστοποίησης βασίζεται στην εύρεση των βέλτιστων τιμών των ηλεκτρονικών συστημάτων (φακοί εστίασης ιόντων, τετράπολα) που επιτρέπουν την αποδοτική μεταφορά των ιόντων από την πηγή ιονισμού προς την ιοντική παγίδα, για το πρόδρομο ιόν (m/z 179).

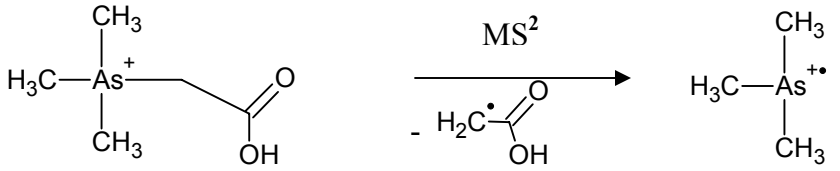


Σχήμα 5.5 Η διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για την βελτιστοποίηση του συστήματος μεταφοράς του ιόντος m/z 179 από την πηγή ιονισμού στην ιοντική παγίδα.

5.3.1.4 Βελτιστοποίηση της ενέργειας θραυσματοποίησης του αρσενοβιτανίου

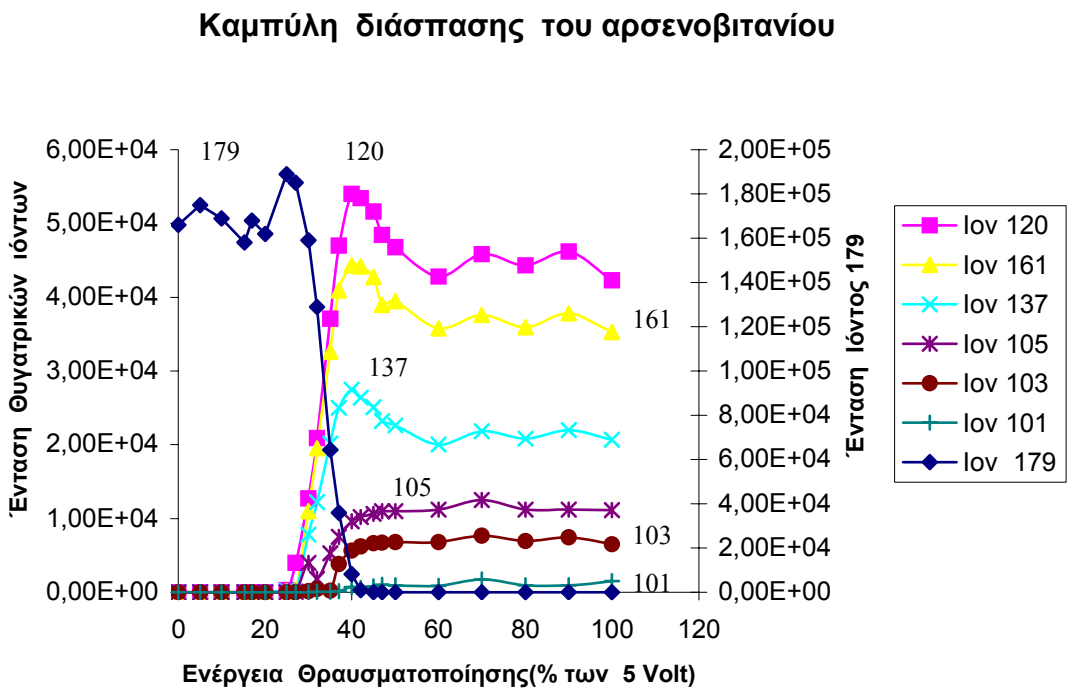
Για την επιλογή της κατάλληλης αντίδρασης διάσπασης του αρσενοβιτανίου, και της βέλτιστης ενέργειας θραυσματοποίησης αυτής της αντίδρασης μετρήθηκαν οι εντάσεις όλων των θυγατρικών ιόντων του αρσενοβιτανίου, μεταβάλλοντας την ενέργεια θραύσης. Αυτό έγινε χρησιμοποιώντας πρότυπο διάλυμα αρσενοβιτανίου συγκέντρωσης 5 μg/mL και με ταχύτητα ροής 10 μL/min. Το γεγονός ότι η ταχύτητα ροής κατά αυτή την βελτιστοποίηση είναι διαφορετική από εκείνη που χρησιμοποιήθηκε κατά τις αναλύσεις δεν έχει σημασία καθώς η ενέργεια θραυσματοποίησης είναι ανεξάρτητη από την ταχύτητα ροής που χρησιμοποιείται. Τα αποτελέσματα αυτής της βελτιστοποίησης παρουσιάζονται στο Σχήμα 5.7. Από αυτό, η αντίδραση θραυσματοποίησης του αρσενοβιτανίου που παράγει το δευτερεύον ιόν με την μέγιστη ένταση είναι η m/z 179→ m/z 120, σε ενέργεια θραυσματοποίησης 40% των 5 Volt. Επομένως αυτή η αντίδραση επιλέχθηκε για παρακολούθηση εφόσον η μέγιστη ένταση του θυγατρικού ιόντος που παρακολουθείται σημαίνει και μεγαλύτερη ευαισθησία της μεθόδου.

Επιπλέον ένας άλλος παράγοντας που πρέπει να ληφθεί υπόψη για την επιλογή της αντίδρασης παρακολούθησης, είναι η εκλεκτικότητα της αντίδρασης. Έτσι δευτερεύοντα ιόντα που παράγονται από το πρόδρομο μέσω απόσπασης μορίων νερού ή μεθανόλης, αποφεύγονται καθώς αυτού του είδους οι αποσπάσεις είναι κοινές για πολλά μοριακά ιόντα, τα οποία μπορεί να έχουν τον ίδιο χρόνο κατακράτησης με το αναλύτη και το ίδιο μοριακό βάρος. Αν η αντίδραση παρακολούθησης δεν είναι εκλεκτική για τον αναλύτη, αυτό μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένα αποτελέσματα ως προς την ποσότητα του αναλύτη στο δείγμα εφόσον το ιόν που παρακολουθείται δεν θα προέρχεται μόνο από την διάσπαση του αναλύτη αλλά και άλλων συστατικών της μήτρας. Στην συγκεκριμένη περίπτωση η αντίδραση που επιλέχθηκε για παρακολούθηση είναι χαρακτηριστική για το αρσενοβιτάνιο, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 5.6.



m/z 179 m/z 120

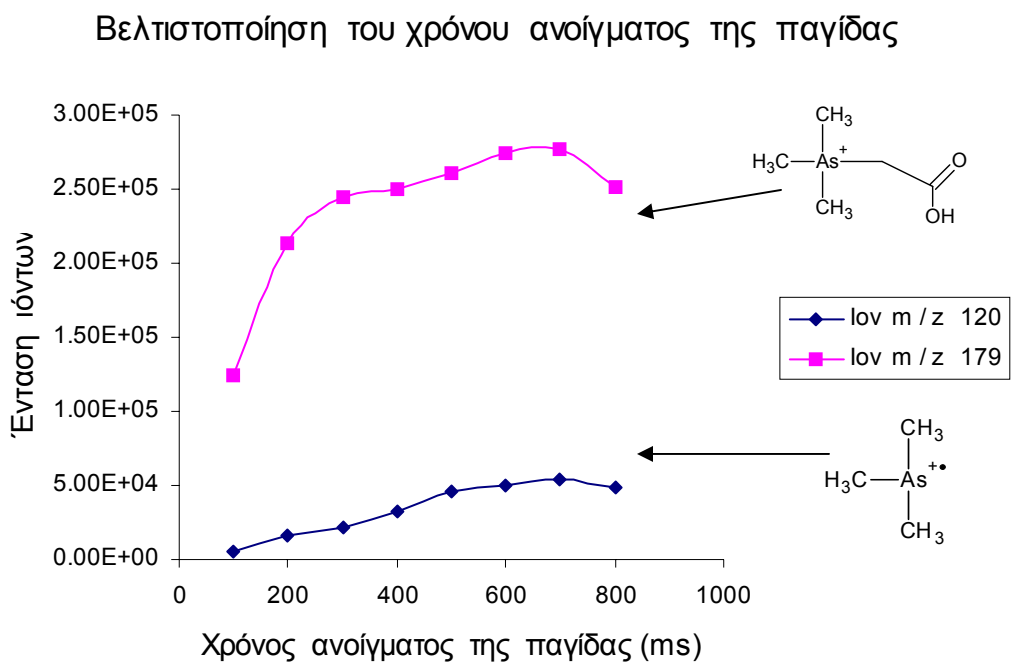
Σχήμα 5.6 Αντίδραση παρακολούθησης του αρσενοβιτανίου.



Σχήμα 5.7 Οι εντάσεις των θυγατρικών ιόντων του αρσενοβιτανίου συνάρτηση της ενέργειας θραυσματοποίησης.

5.3.1.5 Βελτιστοποίηση του χρόνου ανοίγματος της ιοντικής παγίδας

Ο βέλτιστος χρόνος ανοίγματος της ιοντικής παγίδας ώστε να δεχτεί τα ιόντα, καθορίζεται αυτόματα από το φασματόμετρο (Automatic Gain Control, AGC) με βάση τον αριθμό των ιόντων που εισάγονται. Επειδή οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων που μετρήθηκαν ήταν σε επίπεδα ppb, κρίθηκε σκόπιμο να βρεθεί ο βέλτιστος χρόνος ανοίγματος της ιοντικής παγίδας ώστε να παγιδευτούν όσο το δυνατό περισσότερα ιόντα. Η βελτιστοποίηση αυτή έγινε μετρώντας πρότυπο διάλυμα αρσενοβιτανίου συγκέντρωσης 100 ng/mL σε διαφορετικούς χρόνους ανοίγματος της ιοντικής παγίδας από 100-800 ms. Τα αποτελέσματα της βελτιστοποίησης παρουσιάζονται στο Σχήμα 5.8.



Σχήμα 5.8 Οι εντάσεις των ιόντων m/z 120 και 179 σε συνάρτηση του χρόνου ανοίγματος της ιοντικής παγίδας.

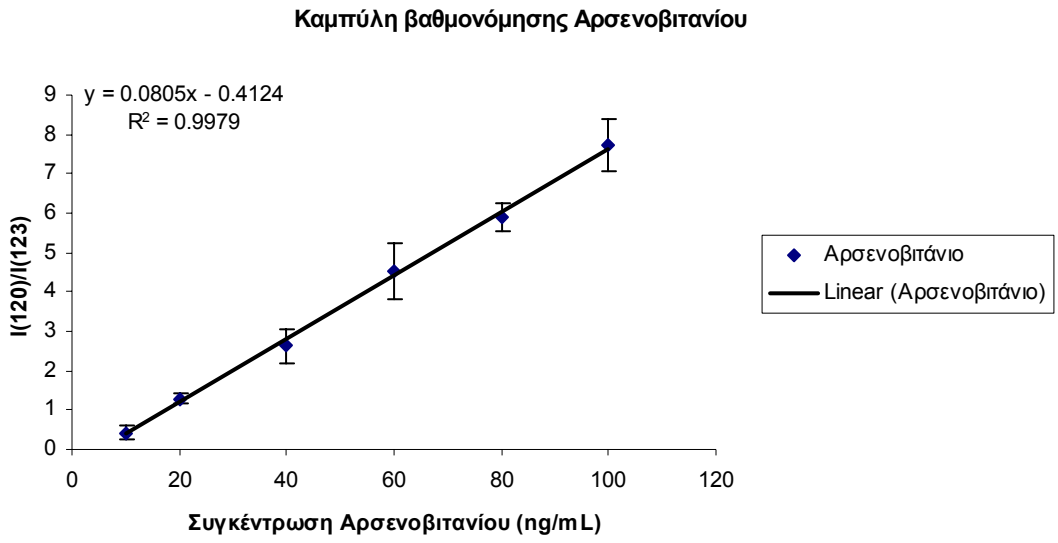
5.3.2 Καμπύλες Βαθμονόμησης

Δύο καμπύλες βαθμονόμησης κατασκευάστηκαν. Η μία ήταν για το εύρος συγκεντρώσεων αρσενοβιτανίου 10-100 ng/mL, και χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του αρσενοβιτανίου στο πιο αραιό εκχύλισμα dorm-2 (αραιωμένο1:50 ως προς το αρχικό εκχύλισμα). Η άλλη καμπύλη βαθμονόμησης ήταν για το εύρος συγκεντρώσεων αρσενοβιτανίου 100-500 ng/mL, και χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του αρσενοβιτανίου στο πιο πυκνό εκχύλισμα dorm-2 (αραιωμένο1:10 ως πρός το αρχικό εκχύλισμα).

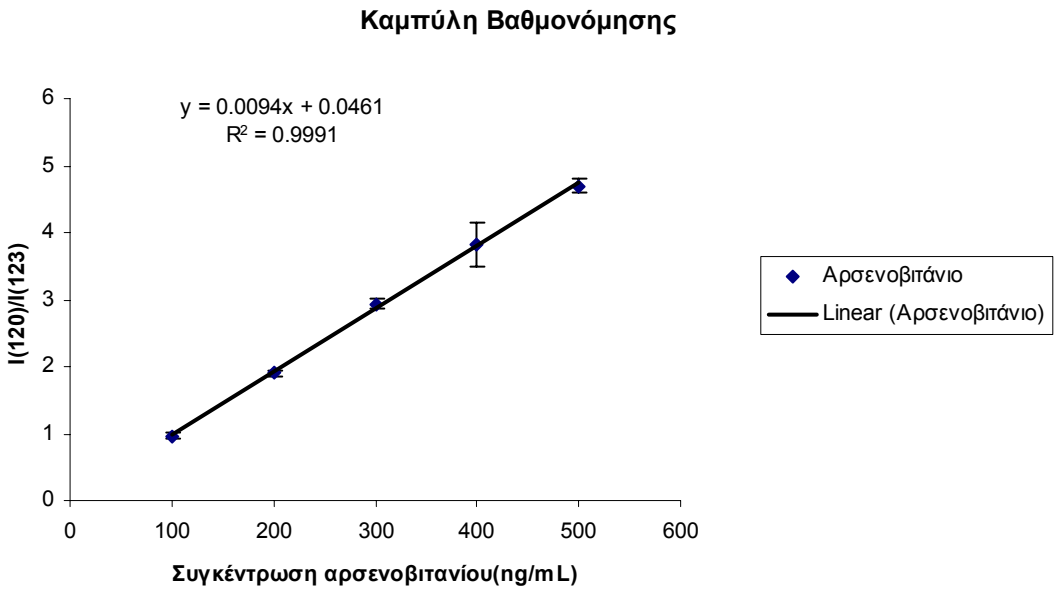
Έξι υδατικά διαλύματα που περιείχαν αρσενοβιτάνιο σε συγκέντρωση 10, 20, 40, 60, 80 και 100 ng/mL καθώς και d_3-αρσενοβιτανίο σε συγκέντρωση 34.5 ng/mL παρασκευάστηκαν και μετρήθηκαν για να κατασκευαστεί η καμπύλη βαθμονόμησης με εύρος συγκέντρωσης αρσενοβιτανίου από 10-100 ng/mL. Κάθε διάλυμα μετρήθηκε τρεις φορές και ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση αυτών των μετρήσεων

χρησιμοποιήθηκαν, ώστε έτσι να υπολογιστεί ο λόγος των εντάσεων των θυγατρικών ιόντων του αρσενοβιτανίου και του δευτεριωμένου αρσενοβιτανίου I(120)/I(123) για κάθε πρότυπο διάλυμα. Αυτό έγινε με την ολοκλήρωση των χρωματογραφικών κορυφών των ιόντων m/z 120 και 123. Επίσης ένα τυφλό διάλυμα παρασκευάστηκε και μετρήθηκε τρεις φορές πριν μετρηθούν τα πρότυπα διαλύματα. Επειδή παρατηρήθηκε ότι το συνθετικό εσωτερικό πρότυπο περιείχε μικρή ποσότητα αρσενοβιτανίου κρίθηκε απαραίτητο να γίνει διόρθωση στο σήμα των μετρούμενων εντάσεων στα πρότυπα διαλύματα. Αυτό έγινε αφαιρώντας τον μέσο όρο τριών μετρήσεων του θυγατρικού ιόντος m/z 120 του αρσενοβιτανίου στο τυφλό διάλυμα το οποίο όμως περιείχε d_3-αρσενοβιτάνιο, από την ένταση του αντίστοιχου ιόντος του αρσενοβιτανίου που μετρήθηκε για κάθε πρότυπο διάλυμα βαθμονόμησης. Η καμπύλη βαθμονόμησης παρουσιάζεται στο Σχήμα 5.9.

Κατά ανάλογο τρόπο, παρασκευάστηκαν πέντε πρότυπα διαλύματα αρσενοβιτανίου συγκέντρωσης 100, 200, 300, 400 και 500 ng/mL που το καθένα περιείχε d_3-αρσενοβιτάνιο συγκέντρωσης 172 ng/mL και μετρήθηκαν για να κατασκευαστεί η καμπύλη βαθμονόμησης με εύρος συγκέντρωσης αρσενοβιτανίου 100-500 ng/mL (Σχήμα 5.10). Κατά τον ίδιο τρόπο έγινε διόρθωση στο σήμα των εντάσεων του θυγατρικού ιόντος του αρσενοβιτανίου m/z 120 στα πρότυπα διαλύματα βαθμονόμησης. Τα διαλύματα του εσωτερικού προτύπου που χρησιμοποιήθηκαν παρασκευάστηκαν με διαδοχικές αραιώσεις από εκείνο που χρησιμοποιήθηκε κατά την προετοιμασία των δειγμάτων. Τέλος ο τρόπος εισαγωγής των πρότυπων διαλυμάτων ήταν ίδιος με εκείνον των δειγμάτων.



Σχήμα 5.9 Η καμπύλη βαθμονόμησης του αρσενοβιτανίου.



Σχήμα 5.10 Η καμπύλη βαθμονόμησης του αρσενοβιτανίου.

5.3.3 Ποσοτικός προσδιορισμός αρσενοβιτανίου από καμπύλη βαθμονόμησης με εύρος 10-100 ng/mL αρσενοβιτανίου

5.3.3.1 Χρόνος κατακράτησης του αρσενοβιτανίου

Τα χρωματογραφήματα και το φάσμα μάζας που προέκυψε από την παρακολούθηση του ιόντος m/z 120 και του ιόντος m/z 123 σε αραιωμένο (1:50) εκχύλισμα dorm-2 παρουσιάζονται στο Σχήμα 5.11, ενώ στο Σχήμα 5.12 αυτά του πρότυπου διαλύματος αρσενοβιτανίου και d_3-αρσενοβιτανίου. Ο μέσος όρος τριών μετρήσεων του χρόνου κατακράτησης του αρσενοβιτανίου στην στήλη χρωματογραφίας στο εκχύλισμα dorm-2 ήταν $\overline{t_r}$ = 3.93 min και η τυπική απόκλιση των μετρήσεων από τον μέσο όρο s= 0.04 min. Με στάθμη εμπιστοσύνης 95% (t=4.3) ο χρόνος κατακράτησης υπολογίζεται:

$$\mu = \overline{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}} \Rightarrow t_r = \overline{t_r} \pm \frac{ts_{t_r}}{\sqrt{3}} = 3.93 \pm \frac{4.3 \times 0.04}{1.73} = 3.93 \pm 0.10 \text{ min}$$

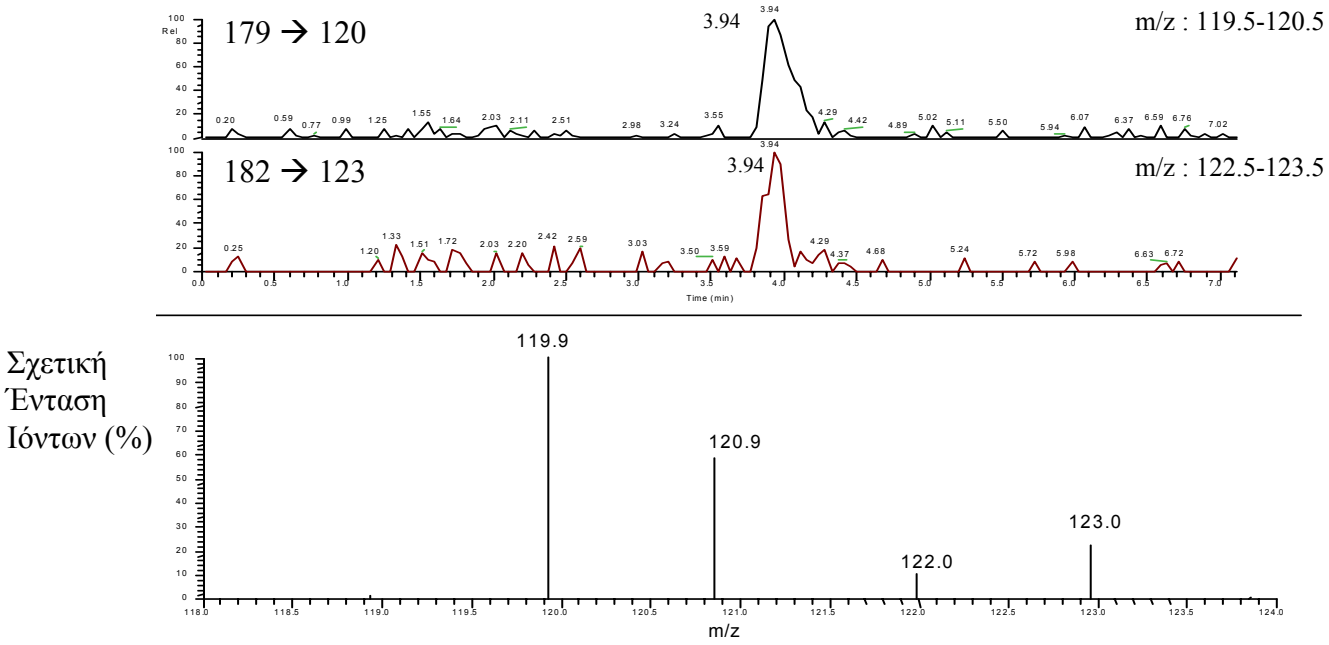
Όπου $\overline{x}$ ο μέσος όρος, t η στατιστική παράμετρος, s η τυπική απόκλιση και N ο αριθμός των μετρήσεων.

Ο μέσος όρος 18 μετρήσεων του χρόνου κατακράτησης του αρσενοβιτανίου σε πρότυπο διάλυμα βρέθηκε $\overline{t_r}$ = 3.95 min και η τυπική απόκλιση των μετρήσεων από τον μέσο όρο s= 0.04 min. Με στάθμη εμπιστοσύνης 95% (t=4.3) ο χρόνος κατακράτησης του αρσενοβιτανίου σε πρότυπο διάλυμα υπολογίζεται:

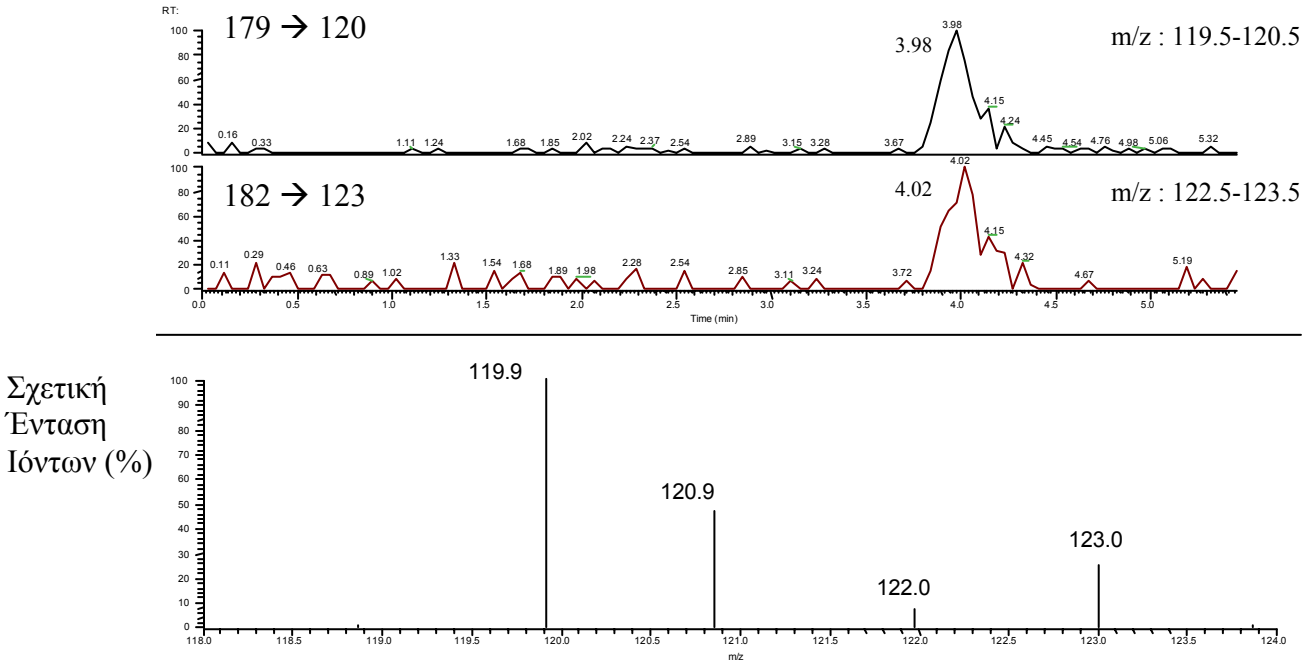
$$\mu = \overline{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}} \Rightarrow t_r = \overline{t_r} \pm \frac{ts_{t_r}}{\sqrt{15}} = 3.95 \pm \frac{4.3 \times 0.04}{3.87} = 3.95 \pm 0.04 \text{ min}$$

Θεωρώντας τον χρόνο κατακράτησης του αρσενοβιτανίου στο πρότυπο διάλυμα ως την αποδεκτή τιμή του χρόνου κατακράτησης του αρσενοβιτανίου, το σχετικό σφάλμα στον χρόνο κατακράτησης του αρσενοβιτανίου στο εκχύλισμα dorm-2 είναι:

$$\text{σχετικό σφάλμα χρόνου κατακράτησης} = \left(\frac{t_{r_{\Delta\varepsilon\acute{\iota}\gamma\mu\alpha\tau o\varsigma}} - t_{r_{\Pi\rho\acute{o}\tau\upsilon\pi o\upsilon}}}{t_{r_{\Pi\rho\acute{o}\tau\upsilon\pi o\upsilon}}} \right) \times 100 = -0.5\%$$



Σχήμα 5.11 Τα χρωματογραφήματα και το φάσμα μάζας του εκχυλίσματος dorm–2 που περιέχει εσωτερικό πρότυπο d_3-αρσενοβιτανίο.



Σχήμα 6.12 Τα χρωματογραφήματα και το φάσμα μάζας πρότυπου διαλύματος αρσενοβιτανίου και d_3-αρσενοβιτανίου.

5.3.3.2 Όρια ανίχνευσης του αρσενοβιτανίου για πρότυπο διάλυμα αρσενοβιτανίου

Σαν όριο ανίχνευσης μίας μεθόδου ορίζεται η ελάχιστη συγκέντρωση ή ποσότητα του αναλύτη η οποία μπορεί να παράγει σήμα μέτρησης ικανό να διακριθεί από τον θόρυβο υποβάθρου, ή να ανιχνευτεί, με κάποιο καθορισμένο όριο (στάθμη) εμπιστοσύνης. Είναι γενικά αποδεκτό ότι ένα τέτοιο σήμα θα πρέπει να είναι ίσο με το άθροισμα του μέσου όρου του σήματος ενός συγκεκριμένου αριθμού μετρήσεων του τυφλού διαλύματος και του πολλαπλάσιου (*k) της τυπικής απόκλισης του μέσου όρου των μετρήσεων του τυφλού διαλύματος. Σαν μία λογική τιμή για την σταθερά k έχει προταθεί η τιμή 3, στην οποία η στάθμη εμπιστοσύνης για την ανίχνευση είναι 95% στις περισσότερες περιπτώσεις [189]. Επομένως το σήμα μέτρησης που αντιστοιχεί στο όριο ανίχνευσης, δηλαδή στην ελάχιστη συγκέντρωση ή ποσότητα του αναλύτη που μπορεί να μετρηθεί με στάθμη εμπιστοσύνης 95%, θα πρέπει να διαφέρει από το σήμα του τυφλού κατά το τριπλάσιο της τυπικής απόκλισης του μέσου όρου των μετρήσεων του τυφλού, και δίνεται από την σχέση:

$$I_{\textbf{Ορίου ανίχνευσης}} = \bar{I}_{\textbf{Τυφλού διαλ.}} + 3 * s_{\textbf{Τυφλού διαλύματος}}$$

Έπειτα το όριο ανίχνευσης (η συγκέντρωση του αναλύτη που αντιστοιχεί στην ένταση $I_{\textbf{Ορίου ανίχνευσης}}$) βρίσκεται μέσω της βαθμονόμησης ενός σημείου, δηλαδή με την μέτρηση ενός πρότυπου διαλύματος του αναλύτη καθορισμένης συγκέντρωσης. Στην συγκεκριμένη περίπτωση έγιναν 7 μετρήσεις τυφλού διαλύματος (υδατικό διάλυμα που περιείχε d_3- αρσενοβιτανίου συγκέντρωσης 34.5 ng/mL) και ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση αυτών των μετρήσεων υπολογίστηκαν. Σαν σημείο βαθμονόμησης χρησιμοποιήθηκε η ένταση του σήματος πρότυπου υδατικού διαλύματος αρσενοβιτανίου συγκέντρωσης 10 ng/mL που επίσης περιείχε d_3-αρσενοβιτανίο συγκέντρωσης 34.5 ng/mL. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων και των υπολογισμών παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.1.

Πίνακας 5.1 Οι εντάσεις του ιόντος m/z 120 σε τυφλό και πρότυπο διάλυμα.

Μέτρηση	I (120) τυφλού	Μέτρηση	I(120) πρότ. (10ng/mL AsB)
1	11986	1	53711
2	11783	2	24263
3	6023	3	46766
4	7479	Μέσος όρος	41580
5	8070	Τυπική απόκλιση	15393
6	10529	$I_{\text{Ορίου ανίχνευσης}} = \bar{I}(120)_{\text{τυφλού}} + 3 * s_{\text{τυφλού}} =$ 9775 + 7692= 17467	
7	12551		
Μέσος όρος	9775		
Τυπική απόκλιση	2564		

Όριο ανίχνευσης αρσενοβιτανίου =

$$\frac{I_{Ορίου\ ανίχνευσης}}{\mathrm{I}(120)_{\Pi ροτύπου}} \times C_{\Pi ροτύπου} = \frac{17467}{41580} \times 10(ng/mL) = 4.2 ng/mL$$

Εναλλακτικά, το όριο ανίχνευσης αυτής της μεθόδου για το αρσενοβιτάνιο μπορεί να υπολογιστεί και από την καμπύλη βαθμονόμησης. Η λογική για να γίνει κάτι τέτοιο είναι η ίδια με αυτήν του προσδιορισμού του ορίου ανίχνευσης μέσω μετρήσεων του τυφλού διαλύματος. Η διαφορά είναι ότι στην περίπτωση του υπολογισμού του ορίου ανίχνευσης από την καμπύλη βαθμονόμησης τα δεδομένα που χρησιμοποιούνται όπως η απόκριση του τυφλού και η τυπική απόκλισή του, προκύπτουν από την καμπύλη βαθμονόμησης, και συνεπώς δεν εκφράζονται ως ένταση σήματος του ιόντος m/z 120 αλλά ως το πηλίκο της ένταση σήματος του ιόντος m/z 120 προς την ένταση του σήματος του ιόντος m/z 123.

Έτσι, από την καμπύλη βαθμονόμησης (Σχήμα 5.9) η εξίσωση της ευθείας είναι: y=0.0805x–0.4124 και υπολογίστηκε με την εφαρμογή της μεθόδου των ελαχίστων τετραγώνων και όπου y ο λόγος I(120)/I(123) και x η συγκέντρωση του αρσενοβιτανίου σε ng/mL. Η προαναφερόμενη εξίσωση είναι της μορφής y=ax +b και έτσι η κλίση της

καμπύλης είναι 0.0805 και ο όρος b είναι – 0.4124. Ο όρος b είναι το σημείο που η καμπύλη τέμνει τον άξονα y όταν το x=0, δηλαδή όταν η συγκέντρωση του αρσενοβιτανίου στο δείγμα είναι μηδέν και επομένως ο όρος b εκφράζει την απόκριση του τυφλού, ή πιο ορθά τον λόγο I(120) / I(123) στο τυφλό διάλυμα. Η τυπική απόκλιση αυτού του λόγου, s, δίνεται από την εξίσωση $s = \sqrt{\frac{S_{yy} - a^2 S_{xx}}{N-2}}$, όπου S_{yy} και S_{xx} είναι το άθροισμα των τετραγώνων των επιμέρους τιμών x, y από την μέση τιμή, όπου α η κλίση της καμπύλης και όπου N ο αριθμός των μετρήσεων. Τα S_{yy} και S_{xx} δίνονται από τις σχέσεις: $S_{xx} = \sum\left(x_i - \bar{x}\right) = \sum x^2{}_i - \frac{\left(\sum x_i\right)^2}{N}$ και $S_{yy} = \sum\left(y_i - \bar{y}\right) = \sum y^2{}_i - \frac{\left(\sum y_i\right)^2}{N}$.

Αντικαθιστώντας τα πειραματικά δεδομένα στις παραπάνω σχέσεις προέκυψε η τυπική απόκλιση του λόγου I(120)/I(123) του τυφλού διαλύματος, $s = 0.15$. Σύμφωνα με τον ορισμό του ορίου ανίχνευσης, ο λόγος I(120)/I(123) του ορίου ανίχνευσης θα πρέπει να είναι ίσος με το άθροισμα του λόγου I(120)/I(123) του τυφλού διαλύματος και τρείς φορές την τυπική του απόκλιση. Άρα:

$$\left(\frac{I(120)}{I(123)}\right)_{Ορίου \quad ανίχνευσης} = \left(\frac{\mathrm{I}(120)}{\mathrm{I}(123)}\right)_{\mathrm{T}υφλού} + 3 \times s = 0.038$$

Έπειτα το όριο ανίχνευσης (η συγκέντρωση του αναλύτη που αντιστοιχεί στο λόγο $\left(\frac{I(120)}{I(123)}\right)_{Ορίου \quad ανίχνευσης} = 0.038$) βρίσκεται μέσω της εξίσωσης της καμπύλης βαθμονόμησης y=0.0805x–0.4124, με αντικατάσταση της μεταβλητής y με 0.038. Έτσι το όριο ανίχνευσης βρέθηκε 5.6 ng/mL.

5.3.3.3 Ανάκτηση του αρσενοβιτανίου από το δείγμα dorm–2

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του αρσενοβιτανίου στο εκχύλισμα dorm-2 έγινε με βάση την εξίσωση της καμπύλης βαθμονόμησης που παρουσιάζεται στο Σχήμα 5.9. Το εκχύλισμα του dorm-2 που μετρήθηκε ήταν αραιωμένο σε αναλογία 1:50 ως προς το αρχικό εκχύλισμα του dorm–2. Ο μέσος όρος τριών μετρήσεων του λόγου I(120)/I(123) σε αυτό το δείγμα βρέθηκε: $\overline{\frac{I(120)}{I(123)}} = 4.46$ και η τυπική απόκλιση των μετρήσεων του λόγου I(120)/I(123) ως προς τον μέσο όρο βρέθηκε: $s_{\frac{I(120)}{I(123)}} = 0.50$. Άρα με στάθμη εμπιστοσύνης 95%, ο λόγος I(120)/I(123) στο εκχύλισμα dorm-2 υπολογίζεται:

$$\mu = \bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}} \Rightarrow \frac{I(120)}{I(123)} = \overline{\frac{I(120)}{I(123)}} \pm \frac{ts_{\frac{I(120)}{I(123)}}}{\sqrt{3}} = 4.46 \pm \frac{4.3 \times 0.5}{1.73} = 4.46 \pm 1.24$$

Ο συντελεστής μεταβλητότητας των μετρήσεων (%) υπολογίστηκε :

$$(\mathrm{CV}) = \frac{s_{(\frac{I(120)}{I(123)})_{\Delta\varepsilon\acute{\iota}\gamma\mu\alpha\tau o\varsigma}}}{(\overline{\frac{\mathrm{I}(120)}{\mathrm{I}(123)}})_{\Delta\varepsilon\acute{\iota}\gamma\mu\alpha\tau o\varsigma}} \times 100 = 11.2(\%)$$

Έπειτα γίνεται αντικατάσταση της τιμής $[\mathrm{I}(120)/\mathrm{I}(123)]_{\mathbf{\Delta\varepsilon\acute{\iota}\gamma\mu\alpha\tau o\varsigma}}$=4.46 στην εξίσωση της καμπύλης βαθμονόμησης, καθώς και διάδοση σφάλματος ώστε να βρεθεί η συγκέντρωση του αρσενοβιτανίου και η τυπική απόκλιση της συγκέντρωσης αντίστοιχα, σε αυτό το αραιωμένο εκχύλισμα dorm-2.

➢ *Υπολογισμός συγκέντρωσης αρσενοβιτανίου στο αραιωμένο εκχύλισμα dorm-2 από τη εξίσωση της καμπύλης βαθμονόμησης.*

Η εξίσωση της καμπύλης βαθμονόμησης είναι: y=0.0805x-0.4124, άρα:

$$y = 0.0805x - 0.4124 \Rightarrow \frac{\overline{I(120)}}{I(123)} = 0.0805C_{\alpha\rho\sigma\varepsilon\nu o\beta\iota\tau\alpha\nu\acute{\iota}o\upsilon}(ng/mL) - 0.04124 \Rightarrow$$

$$C_{\alpha\rho\sigma\varepsilon\nu o\beta\iota\tau\alpha\nu\acute{\iota}o\upsilon} = \frac{4.46 + 0.4124}{0.0805}(ng/mL) = 60.5ng/mL$$

➢ *Διάδοση σφάλματος για τον υπολογισμό της τυπικής απόκλισης της συγκέντρωσης του αρσενοβιτανίου.*

Από την εξίσωση της καμπύλης βαθμονόμησης προκύπτει ότι η συγκέντρωση του αρσενοβιτανίου είναι μία συνάρτηση της μορφής:

$$C_{\alpha\rho\sigma\varepsilon\nu o\beta\iota\tau\alpha\nu\acute{\iota}o\upsilon} = \frac{\frac{\mathrm{I}(120)}{\mathrm{I}(123)} + 0.4124}{0.0805}$$

Η αβεβαιότητα του λόγου I(120)/I(123) προκαλεί και αβεβαιότητα στον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του αρσενοβιτανίου. Έτσι η τυπική απόκλιση της συγκέντρωσης του αρσενοβιτανίου υπολογίζεται μέσω διάδοσης σφάλματος. Άρα:

$$s^2_{C_{\alpha\rho\sigma\varepsilon\nu o\iota\tau\alpha\nu\acute{\iota}o\upsilon}} = \left(\frac{\partial\left(C_{\text{Αρσενοβιτανίου}}\right)}{\partial(\frac{\text{I(120)}}{\text{I(123)}})} \right)^2 \times s^2_{\frac{I(120)}{I(123)}} =$$

$$\left(\frac{\partial\left(\frac{\frac{I(120)}{I(123)} + 0.4124}{0.0805} \right)}{\partial(\frac{I(120)}{I(123)})} \right)^2 \times s^2_{\frac{I(120)}{I(123)}} = \left(\left(\frac{\frac{I(120)}{\partial(\frac{I(120)}{I(123)})}}{\frac{0.0805}{\partial(\frac{I(120)}{I(123)})}} \right) + \left(\frac{\partial(\frac{0.4124}{0.0805})}{\partial(\frac{I(120)}{I(123)})} \right) \right)^2 \times s^2_{\frac{I(120)}{I(123)}} = \left(\frac{1}{0.0805} \right)^2 \times (0.5)^2 \Rightarrow$$

$$s_{C_{\alpha\rho\sigma\varepsilon\nu o\beta\iota\tau\alpha\nu\acute{\iota}o\upsilon}} = 6.2$$

Επομένως η συγκέντρωση του αρσενοβιτανίου που προσδιορίστηκε με όριο εμπιστοσύνης 95%, σε αυτό το αραιωμένο εκχύλισμα dorm-2 είναι:

$$\mu = \bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}} \Rightarrow C_{\alpha\rho\sigma\varepsilon\nu o\beta\iota\tau\alpha\nu\acute{\iota}o\upsilon} = \overline{C}_{\alpha\rho\sigma\varepsilon\nu o\beta\iota\tau\alpha\nu\acute{\iota}o\upsilon} \pm \frac{ts_{c_{\alpha\rho\sigma\varepsilon\nu o\beta\iota\tau\alpha\nu\acute{\iota}o\upsilon}}}{\sqrt{3}} = 60.5 \pm \frac{4.3 \times 6.2}{1.73} \Rightarrow$$

$C_{\boldsymbol{\alpha\rho\sigma\varepsilon\nu o\beta\iota\tau\alpha\nu\acute{\iota}o\upsilon}}$ = (60.5±15.4) ng/mL

Αυτό το διάλυμα παρασκευάστηκε με αραίωση του αρχικού εκχυλίσματος (1:50) άρα η συγκέντρωση του αρσενοβιτανίου στο αρχικό εκχύλισμα είναι:

$C_{\textbf{AsB } \alpha\rho\chi.\textbf{εκχυλίσματος Dorm–2}}$=50*(60.5±15.4) ng/mL=3025±770 ng/mL=3.025±0.77 μg/mL.

Επομένως στα 2 mL νερού που χρησιμοποιήθηκαν στην εκχύλιση θα περιέχεται ποσότητα αρσενοβιτανίου 6.05±1.54 μg. Αυτή η ποσότητα του αρσενοβιτανίου προήλθε

από την εκχύλιση 0.2 g στερεού δείγματος dorm-2, άρα σε 1 g στερεού δείγματος dorm-2 η συγκέντρωση του αρσενοβιτανίου είναι :

$$C_{\mathbf{AsB\ Dorm-2}} = \left(\frac{6.05 \pm 1.54}{0.2}\right)\ \mu g\ /g_{\mathbf{\delta\varepsilon\acute{\iota}\gamma\mu\alpha\tau o\varsigma\ Dorm\text{-}2}} = 30.25 \pm 7.7\ \mu g\ /g_{\mathbf{\delta\varepsilon\acute{\iota}\gamma\mu\alpha\tau o\varsigma\ Dorm\text{-}2}}.$$

Με δεδομένο ότι το πρότυπο υλικό αναφοράς dorm–2 περιέχει 39.1±1.1 μg αρσενοβιτανίου, η ανάκτηση (%) του αρσενοβιτανίου από το στερεό δείγμα dorm–2 ήταν:

$$\text{Ανάκτηση (\%)}_{\mathbf{Αρσενοβιτανίου}} = \frac{(30.25)}{(39.1)} \times 100 = 77.4\%$$

5.3.4 Ποσοτικός προσδιορισμός του αρσενοβιτανίου στο δείγμα dorm–2 από την καμπύλη βαθμονόμησης με εύρος συγκεντρώσεων από 100–500 ng/mL

Σε αυτή την παράγραφο παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης του πιο πυκνού εκχυλίσματος dorm-2, το οποίο παρασκευάστηκε με αραίωση (1:10) του αρχικού εκχυλίσματος. Ο κύριος σκοπός αυτής της ανάλυσης ήταν να εξεταστεί το κατά πόσο η συγκέντρωση των συστατικών της μήτρας του δείγματος επηρεάζει τα μέτρα αξιοπιστίας της μεθόδου. Αυτό επιτεύχθηκε συγκρίνοντας τα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης με τα αντίστοιχα της ανάλυσης του πιο αραιωμένου εκχυλίσματος dorm-2, το οποίο παρασκευάστηκε από αραίωση (1:50) του αρχικού εκχυλίσματος του dorm-2 και παρουσιάστηκαν στην προηγούμενη παράγραφο.

5.3.4.1 Χρόνος κατακράτησης του αρσενοβιτανίου

Τα χρωματογραφήματα και το φάσμα μάζας που προέκυψε από την παρακολούθηση του ιόντος m/z 120 και του ιόντος m/z 123 στο αραιωμένο (1:10) εκχύλισμα dorm-2 παρουσιάζονται στο Σχήμα 5.13 ενώ στο Σχήμα 5.14 αυτά του πρότυπου διαλύματος αρσενοβιτανίου και d_3-αρσενοβιτανίου. Ο μέσος όρος τριών

μετρήσεων του χρόνου κατακράτησης του αρσενοβιτανίου στη στήλη χρωματογραφίας στο εκχύλισμα dorm-2 ήταν $\overline{t_r}$ = 3.78 min και η τυπική απόκλιση των μετρήσεων από τον μέσο όρο s= 0.02 min. Με στάθμη εμπιστοσύνης 95% (t=4.3) ο χρόνος κατακράτησης υπολογίζεται:

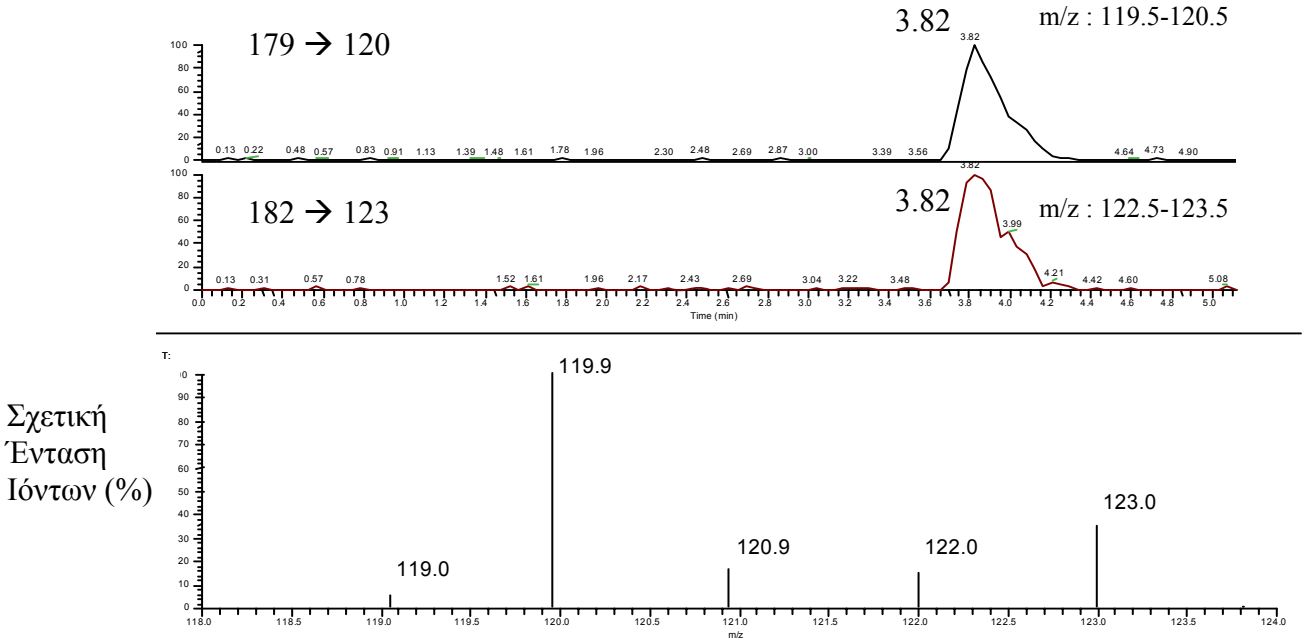
$$\mu = \overline{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}} \Rightarrow t_r = \overline{t_r} \pm \frac{ts_{t_r}}{\sqrt{3}} = 3.78 \pm \frac{4.3 \times 0.02}{1.73} = 3.78 \pm 0.05 \text{ min}$$

Ο μέσος όρος 15 μετρήσεων του χρόνου κατακράτησης του αρσενοβιτανίου σε πρότυπο διάλυμα βρέθηκε $\overline{t_r}$ = 3.81 min και η τυπική απόκλιση των μετρήσεων από τον μέσο όρο s= 0.06 min. Με στάθμη εμπιστοσύνης 95% (t=4.3) ο χρόνος κατακράτησης του αρσενοβιτανίου σε πρότυπο διάλυμα υπολογίζεται:

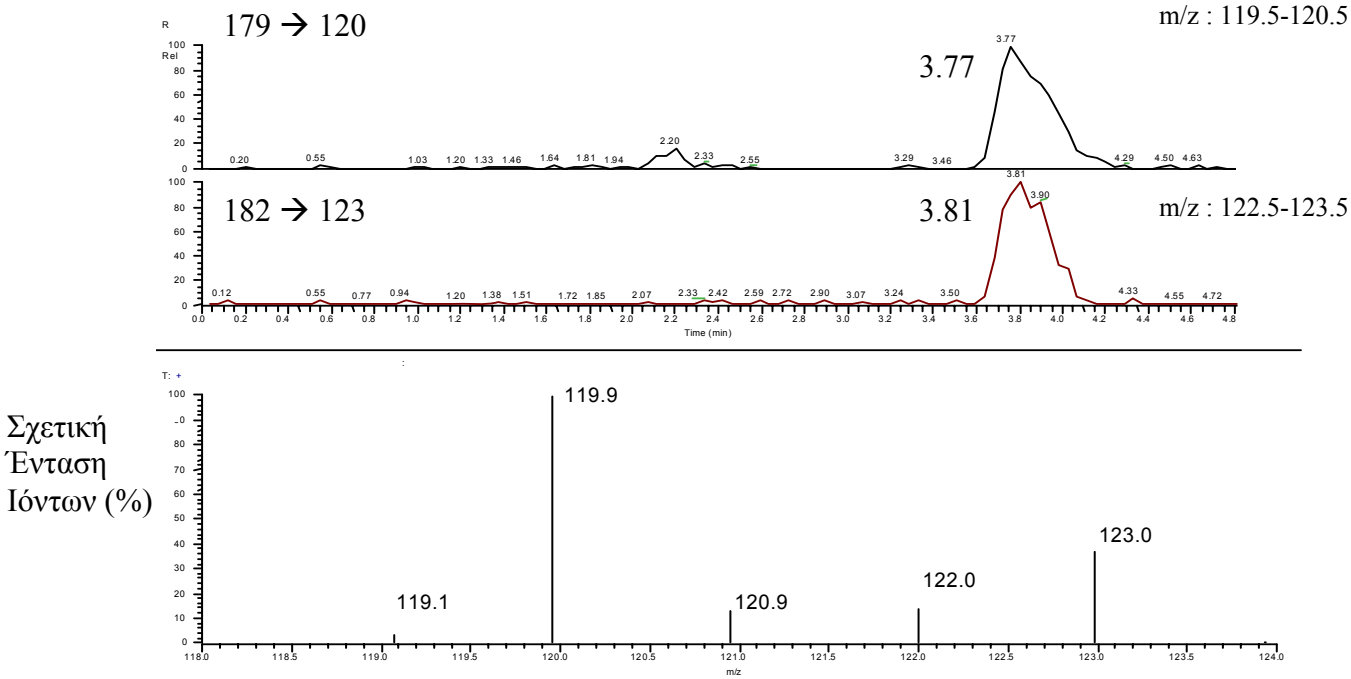
$$\mu = \overline{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}} \Rightarrow t_r = \overline{t_r} \pm \frac{ts_{t_r}}{\sqrt{15}} = 3.81 \pm \frac{4.3 \times 0.06}{3.87} = 3.81 \pm 0.07$$

Θεωρώντας τον χρόνο κατακράτησης του αρσενοβιτανίου στο πρότυπο διάλυμα ως την αποδεκτή τιμή του χρόνου κατακράτησης του αρσενοβιτανίου, το σχετικό σφάλμα στον χρόνο κατακράτησης του αρσενοβιτανίου στο εκχύλισμα dorm-2 είναι:

$$\text{σχετικό σφάλμα χρόνου κατακράτησης} = \left(\frac{t_{r_{\Delta\varepsilon\acute{\iota}\gamma\mu\alpha\tau o\varsigma}} - t_{r_{\Pi\rho\acute{o}\tau\upsilon\pi o\upsilon}}}{t_{r_{\Pi\rho\acute{o}\tau\upsilon\pi o\upsilon}}} \right) \times 100 = -0.01\%$$



Σχήμα 5.13 Τα χρωματογράφηματα και το φάσμα μάζας του εκχυλίσματος dorm–2 που περιέχει εσωτερικό πρότυπο d_3-αρσενοβιτανίο.



Σχήμα 5.14 Τα χρωματογράφηματα και το φάσμα μάζας πρότυπου διαλύματος αρσενοβιτανίου και d_3-αρσενοβιτανίου.

5.3.4.2 Ανάκτηση του αρσενοβιτανίου από το δείγμα dorm–2

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του αρσενοβιτανίου στο εκχύλισμα dorm-2 έγινε με βάση την εξίσωση της καμπύλης βαθμονόμησης που παρουσιάζεται στο Σχήμα 5.10. Το εκχύλισμα dorm-2 που μετρήθηκε ήταν αραιωμένο σε αναλογία 1:10 ως προς το αρχικό εκχύλισμα dorm–2. Ο μέσος όρος τριών μετρήσεων του λόγου I(120)/I(123) σε αυτό το δείγμα βρέθηκε: $\overline{\frac{I(120)}{I(123)}} = 2.72$ και η τυπική απόκλιση των μετρήσεων του λόγου I(120)/I(123) ως προς τον μέσο όρο βρέθηκε: $s_{\frac{I(120)}{I(123)}} = 0.12$. Άρα με στάθμη εμπιστοσύνης 95%, ο λόγος I(120)/I(123) στο εκχύλισμα dorm-2 υπολογίζεται:

$$\mu = \bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}} \Rightarrow \frac{I(120)}{I(123)} = \overline{\frac{I(120)}{I(123)}} \pm \frac{ts_{\frac{I(120)}{I(123)}}}{\sqrt{3}} = 2.72 \pm \frac{4.3 \times 0.12}{1.73} = 2.72 \pm 0.30$$

Ο συντελεστής μεταβλητότητας των μετρήσεων (%) υπολογίστηκε :

$$(\mathrm{CV}) = \frac{s_{(\frac{I(120)}{I(123)})_{\Delta\varepsilon\acute{\iota}\gamma\mu\alpha\tau o\varsigma}}}{(\overline{\frac{\mathrm{I(120)}}{\mathrm{I(123)}}})_{\Delta\varepsilon\acute{\iota}\gamma\mu\alpha\tau o\varsigma}} \times 100 = 4.41(\%)$$

Ακολουθεί αντικατάσταση της τιμής: $[\mathrm{I(120)/I(123)}]_{\mathbf{\Delta\varepsilon\acute{\iota}\gamma\mu\alpha\tau o\varsigma}}$=2.72 στην εξίσωση της καμπύλης βαθμονόμησης, καθώς και διάδοση σφάλματος ώστε να βρεθεί η συγκέντρωση του αρσενοβιτανίου και η τυπική απόκλιση της συγκέντρωσης αντίστοιχα, σε αυτό το αραιωμένο (1:10) εκχύλισμα dorm-2.

➢ *Υπολογισμός συγκέντρωσης αρσενοβιτανίου στο αραιωμένο εκχύλισμα dorm-2 από τη εξίσωση της καμπύλης βαθμονόμησης.*

Η εξίσωση της καμπύλης βαθμονόμησης είναι: y=0.0094x+0.0461, άρα:

$$y = 0.0094x + 0.0461 \Rightarrow \frac{\overline{I(120)}}{I(123)} = 0.0094 C_{\alpha\rho\sigma\varepsilon\nu o\beta\iota\tau\alpha\nu\acute{\iota}o\upsilon}(ng/mL) + 0.0461 \Rightarrow$$

$$C_{\alpha\rho\sigma\varepsilon\nu o\beta\iota\tau\alpha\nu\acute{\iota}o\upsilon} = \frac{2.72 - 0.0461}{0.0094}(ng/mL) = 284.5 ng/mL$$

➢ *Διάδοση σφάλματος για τον υπολογισμό της τυπικής απόκλισης της συγκέντρωσης του αρσενοβιτανίου.*

Από την εξίσωση της καμπύλης βαθμονόμησης προκύπτει ότι η συγκέντρωση του αρσενοβιτανίου είναι μία συνάρτηση της μορφής:

$$C_{\alpha\rho\sigma\varepsilon\nu o\beta\iota\tau\alpha\nu\acute{\iota}o\upsilon} = \frac{\frac{\mathrm{I}(120)}{\mathrm{I}(123)} - 0.0461}{0.0094}$$

Η αβεβαιότητα του λόγου I(120)/I(123) προκαλεί και αβεβαιότητα στον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του αρσενοβιτανίου. Έτσι η τυπική απόκλιση της συγκέντρωσης του αρσενοβιτανίου υπολογίζεται μέσω διάδοσης σφάλματος, άρα:

$$s^2_{C_{\alpha\rho\sigma\varepsilon\nu o\iota\tau\alpha\nu\acute{\iota}o\upsilon}} = \left(\frac{\partial\left(C_{\text{Αρσενοβιτανίου}}\right)}{\partial(\frac{\text{I(120)}}{\text{I(123)}})} \right)^2 \times s^2_{\frac{I(120)}{I(123)}} =$$

$$\left(\frac{\partial\left(\frac{\frac{I(120)}{I(123)} - 0.0461}{0.0094}\right)}{\partial(\frac{I(120)}{I(123)})} \right)^2 \times s^2_{\frac{I(120)}{I(123)}} = \left(\left(\frac{\frac{I(120)}{\partial(\frac{I(123)}{0.0094})}}{\partial(\frac{I(120)}{I(123)})} \right) - \left(\frac{\partial(\frac{0.0461}{0.0094})}{\partial(\frac{I(120)}{I(123)})} \right) \right)^2 \times s^2_{\frac{I(120)}{I(123)}} = \left(\frac{1}{0.0094} \right)^2 \times (0.12)^2 \Rightarrow$$

$$s_{C_{\alpha\rho\sigma\varepsilon\nu o\beta\iota\tau\alpha\nu\acute{\iota}o\upsilon}} = 12.8$$

Επομένως η συγκέντρωση του αρσενοβιτανίου που προσδιορίστηκε με όριο εμπιστοσύνης 95%, σε αυτό το αραιωμένο εκχύλισμα dorm-2 είναι:

$$\mu = \bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}} \Rightarrow C_{\alpha\rho\sigma\varepsilon\nu o\beta\iota\tau\alpha\nu\acute{\iota}o\upsilon} = \overline{C}_{\alpha\rho\sigma\varepsilon\nu o\beta\iota\tau\alpha\nu\acute{\iota}o\upsilon} \pm \frac{ts_{C_{\alpha\rho\sigma\varepsilon\nu o\beta\iota\tau\alpha\nu\acute{\iota}o\upsilon}}}{\sqrt{3}} = 60.5 \pm \frac{4.3 \times 12.7}{1.73} \Rightarrow$$

$C_{\boldsymbol{\alpha\rho\sigma\varepsilon\nu o\beta\iota\tau\alpha\nu\acute{\iota}o\upsilon}}$ = (284.5±31.6) ng/mL

Αυτό το διάλυμα παρασκευάστηκε με αραίωση του αρχικού εκχυλίσματος (1:10) άρα η συγκέντρωση του αρσενοβιτανίου στο αρχικό εκχύλισμα είναι:

$C_{\textbf{AsB αρχ.εκχυλίσματος Dorm–2}}$=10*(284.5±31.6) ng/mL=2845.0±316.0 ng/mL=2.84±0.32 μg/mL.

Επομένως στα 2 mL νερού που χρησιμοποιήθηκαν στην εκχύλιση θα περιέχεται ποσότητα αρσενοβιτανίου 5.68±0.64 μg. Αυτή η ποσότητα του αρσενοβιτανίου προήλθε από την εκχύλιση 0.2 g στερεού δείγματος dorm-2, άρα σε 1 g στερεού δείγματος dorm-2 η συγκέντρωση του αρσενοβιτανίου είναι :

$$C_{\mathbf{AsB\ Dorm-2}} = \left(\frac{5.68 \pm 0.64}{0.2}\right)\ \mu g\ /g_{\mathbf{\delta\varepsilon\acute{\iota}\gamma\mu\alpha\tau o\varsigma\ Dorm\text{-}2}} = 28.4 \pm 3.2\ \mu g\ /g_{\mathbf{\delta\varepsilon\acute{\iota}\gamma\mu\alpha\tau o\varsigma\ Dorm\text{-}2}}.$$

Με δεδομένο ότι το πρότυπο υλικό αναφοράς του dorm –2 περιέχει 39.1±1.1 μg αρσενοβιτανίου, η ανάκτηση (%) του αρσενοβιτανίου από το δείγμα dorm–2 ήταν:

$$\text{Ανάκτηση}\ (\%)_{\mathbf{Αρσενοβιτανίου}} = \frac{28.4}{39.1} \times 100 = 72.7\%$$

Πινακάς 5.2 Τα αποτελέσματα των μετρήσεων και των υπολογισμών, για τα δυο εκχυλίσματα dorm-2 με διαφορετική πυκνότητα.

	Αρ. εκχύλισμα dorm-2 (1:50)	Αρ. εκχύλισμα dorm-2 (1:10)
$t_{R\ \text{Αρσενοβιτανίου δείγματος}}$ (min)	3.93±0.10	3.78±0.05
$t_{R\ \text{Αρσενοβιτανίου πρότυπου}}$ (min)	3.95±0.04	3.81±0.07
Σχετικό σφάλμα t_R (%)	0.5	0.01
Συντ. μεταβλητότητας (CV) μετρήσεων του I(120)/I(123)	11.2 %	4.41 %
Όριο ανίχνευσης[α] (ng/mL)	4.2	-
Όριο ανίχνευσης[β] (ng/mL)	5.6	-
Συγκέντρωση αρσενοβιτανίου στο δείγμα dorm-2 (μg /g)	30.25±7.7	28.4±3.2
Πιστοποιημένη συγκέντρωση αρσενοβιτανίου στο δείγμα dorm-2 (μg/g)	39.1±1.1	39.1±1.1
Ανάκτηση αρσενοβιτανίου (%)	77.4	72.7
Γραμμικότητα (R^2)	0.9979	0.9991

[α] Όπως υπολογίστηκε από το άθροισμα του μέσου όρου 7 τυφλών διαλυμάτων και 3* την τυπική απόκλιση, με σημείο βαθμονόμησης πρότυπο διάλυμα αρσενοβιτανίου και d_3- αρσενοβιτανίου συγκέντρωσης 10 και 34,5 ng / mL αντίστοιχα.

[β] Όπως υπολογίστηκε από την καμπύλη βαθμονόμησης.

5.4 Συμπεράσματα

Σε αυτό το κεφάλαιο της εργασίας παρουσιάστηκε η ανάπτυξη μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού του αρσενοβιτανίου σε πρότυπο υλικό αναφοράς dorm-2 με την χρήση HPLC-ESI-IT-MS/MS. Ένας σημαντικός παράγοντας που ελήφθη υπόψη ήταν η βελτιστοποίηση των πειραματικών παραμέτρων για την ανίχνευση του αρσενοβιτανίου, ώστε το παρακολουθούμενο δευτερεύον ιόν του αρσενοβιτανίου να έχει την μέγιστη ένταση. Η βελτιστοποίηση επικεντρώθηκε τόσο στις παραμέτρους της πηγής ηλεκτροψεκασμού όσο και στις παραμέτρους της ιοντικής παγίδας και του συστήματος μεταφοράς του ιόντος m/z 179 από την πηγή ιονισμού στον αναλυτή μαζών. Επίσης για την ανάλυση των εκχυλισμάτων ο χρόνος κατακράτησης του αρσενοβιτανίου ρυθμίσθηκε ανάλογα, ώστε να αποφευχθεί η καταστολή (suppression) του σήματος του από τα συστατικά της μήτρας που δεν κατακρατούνται από την στήλη χρωματογραφίας.

Με την επιλογή της συγκεκριμένης κινητής φάσης ο προσδιορισμός του αρσενοβιτανίου πραγματοποιήθηκε με επιτυχία τόσο για το αραιό εκχύλισμα dorm-2 (αραιωμένο 1:50 ως προς το αρχικό εκχύλισμα) όσο και για το πιο πυκνό (αραιωμένο 1:10 ως προς το αρχικό εκχύλισμα). Αυτό φαίνεται συγκρίνοντας τον χρόνο κατακράτησης του αρσενοβιτανίου σε αυτά τα εκχυλίσματα dorm-2 με τον χρόνο κατακράτησης του αρσενοβιτανίου σε ανάλογα πρότυπα διαλύματα αρσενοβιτανίου και το σχετικό σφάλμα που προέκυψε από αυτή την σύγκριση, για τον χρόνο κατακράτησης ήταν 0.5% για το αραιό εκχύλισμα dorm-2 (1:50) και 0.01% για το πιο πυκνό (1:10), τιμές σχετικού σφάλματος που κρίνονται αποδεκτές. Επιπλέον με την επιλογή της συγκεκριμένης ταχύτητας ροής και με δεδομένο την διάμετρο της χρωματογραφικής στήλης που χρησιμοποιήθηκε, το εύρος των χρωματογραφικών κορυφών ήταν περίπου 0.5 min, τιμή αποδεκτή ώστε η διαχωριστικότητα να θεωρείται ικανοποιητική. Βέβαια ο επιτυχής διαχωρισμός του αρσενοβιτανίου βασίζεται και στο γεγονός ότι η αντίδραση παρακολούθησης που επιλέχθηκε είναι εκλεκτική ως προς το αρσενοβιτάνιο.

Η βελτιστοποίηση των πειραματικών παραμέτρων που έγινε ως προς την ένταση του θυγατρικού ιόντος του αρσενοβιτανίου m/z 120, είχε σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη ποσοτικού πρωτόκολλου ανάλυσης του αρσενοβιτανίου με χαμηλά όρια ανίχνευσης, της τάξης των 4.2 ng/ml. Το αποτέλεσμα αυτό είναι ενθαρρυντικό ως προς την χρήση της

ιοντικής παγίδας για ποσοτικό προσδιορισμό ιχνοποσοτήτων ενώσεων σε περιβαλλοντικά δείγματα. Επιπλέον η καλή γραμμικότητα των σημείων της καμπύλης βαθμονόμησης και για τις δύο περιοχές συγκεντρώσεων ανάλυσης που εξετάστηκαν κάνει την ποσοτική ανάλυση εφικτή με το συγκεκριμένο τύπο φασματομέτρου μάζας. Παρόλα αυτά ο μεγάλος αριθμός των πειραματικών παραμέτρων που μπορούν να βελτιστοποιηθούν (δυναμικό πηγής, πίεση εκνεφωτικού και βοηθητικού αερίου, σύστημα μεταφοράς ιόντων από την πηγή ιονισμού στην ιοντική παγίδα, ενέργεια θραυσματοποίησης, μέγιστος χρόνος ανοίγματος ιοντικής παγίδας) αυξάνει δραστικά το χρόνο ανάλυσης και τις απαιτήσεις στον χρήστη του οργάνου.

Από τα αποτελέσματα της ανάλυσης του αραιού εκχυλίσματος dorm-2 (1:50), μπορούμε να πούμε ότι η ακρίβεια της μεθόδου, όπως εκφράζεται μέσω της ανάκτησης του αρσενοβιτανίου (77.4%), είναι σε ικανοποιητικά επίπεδα. Καθώς επίσης και η επαναληψιμότητα των μετρήσεων, είναι αποδεκτή, όπως εκφράζεται από τον συντελεστή μεταβλητότητας των μετρήσεων του αραιωμένου εκχυλίσματος dorm-2 (CV: 11.2%). Μεταβαίνοντας σε υψηλότερα επίπεδα συγκεντρώσεων ανάλυσης, και συγκεκριμένα με την μέτρηση του πιο πυκνού αραιωμένου εκχυλίσματος Dorm-2 (1:10), η ακρίβεια της μεθόδου είναι λίγο χαμηλότερη (ανάκτηση: 72.7%) ενώ η επαναληψιμότητα βελτιώνεται (C.V: 4.41%).

Είναι εμφανές λοιπόν, ότι εφόσον η ανάκτηση του αρσενοβιτανίου τόσο σε χαμηλά όσο και υψηλά επίπεδα συγκεντρώσεων ανάλυσης, διατηρείται στο ίδιο επίπεδο (και στις δύο περιπτώσεις η ανάκτηση είναι μικρότερη του 80%) με μία μικρή διακύμανση, θα πρέπει να υπάρχει κάποια πηγή σφάλματος που δεν σχετίζεται με την πυκνότητα της μήτρας του δείγματος, και είναι η κύρια. Το πιο πιθανό είναι ότι αυτό το σφάλμα εντοπίζεται στο στάδιο της εκχύλισης του στερεού δείγματος dorm-2. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι ο τρόπος που έγινε η εκχύλιση του αρσενοβιτανίου από το υλικό αναφοράς στην συγκεκριμένη εργασία διαφέρει από αυτόν που έχει χρησιμοποιηθεί κατά την πιστοποίηση του αρσενοβιτανίου στο υλικό αναφοράς. Η εκχύλιση του αρσενοβιτανίου κατά την πιστοποίηση ήταν πιο προσεκτική, και πιο συγκεκριμένα η ίδια ποσότητα του υλικού αναφοράς εκχυλίστηκε δύο φορές, και τα εκχυλίσματα συνδυάστηκαν και έπειτα έγινε η ανάλυση, ενώ στην συγκεκριμένη περίπτωση η εκχύλιση έγινε μία φορά. Παρόλα αυτά η μεταβολή που παρουσιάζεται ως προς τις τιμές

της ακρίβειας και της επαναληψιμότητας καθώς αυξάνει η πυκνότητα του δείγματος υποδεικνύει την ύπαρξη και άλλων πηγών σφάλματος.

Εν κατακλείδι, από αυτό το πρώτο, το πιο απλό αλλά αναγκαίο βήμα εξέτασης των δυνατοτήτων της χρήσης του συγκεκριμένου φασματομέτρου μάζας ως προς την ποσοτική ανάλυση μπορούμε να καταλήξουμε στην εξής βασική εικόνα: Μπορούμε να υποστηρίξουμε ότι η ανάπτυξη ποσοτικού πρωτόκολλου ανάλυσης είναι εφικτή εφόσον η ιοντική παγίδα μπορεί να αποδώσει χαμηλά όρια ανίχνευσης και καλή γραμμικότητα στις μετρήσεις των σημείων βαθμονόμησης. Επιπλέον η πηγή ηλεκτροψεκασμού είναι συμβατή με της χρωματογραφικές συνθήκες ως προς τον προσδιορισμό των ενώσεων. Τέλος η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα της μεθόδου κυμαίνονται σε ικανοποιητικά επίπεδα, με την δυνατότητα να μπορούν να βελτιωθούν. Το επόμενο βήμα είναι να αναπτυχθεί μια ποσοτική μέθοδος σε χαμηλότερη ταχύτητα ροής, με σκοπό να εξεταστεί η σταθερότητα της πηγής σε πιο ήπιες και συμβατές συνθήκες.

6 Αναφορές

1. E.A. Woolson, *ACS Ser*. **1975**, 7,1.
2. W.R. Cullen, K.J.Reimer, *Chem.Rev*. **1989**, 713-764
3. J.H. Gulledge, J.T. O'Connor, *J. AWWA* **1973**, 548
4. A.Kabat-Pentias, H.Pendias, *CRC Press, Boca Raton, FL*,**1984**, 315
5. V.M. Goldschmidt, *Arsenic in: A.Muir (Ed), Geochemistry, Clarendon Press, Oxford*, **1954,** 468-478
6. R.W. Boyle, I.R. Jonasson, *J.Geochem.Explor.* **1973**, 2, 251
7. P.Collourn, B.J.Alloway, I.Thornton, *Sci. Total Environ.* **1975**, 4, 359
8. P.J.Petrerson, L.M. Benson, R. Zeive, *Metalloids, in : M.W.Lepp, (Ed.), Arsenic and Effect of Heavy Metals Pollution on Plants, vol.1, Appl.Sci.Publ, London,* **1981**, 299
9. F. Challenger, *Chem. Rev*. **1945**, 36, 315
10. W.R. Cullen, C.L. Froese, A. Lui, B.C.McBride, D.J. Patmore, M. Reimer, *J.Organomet. Chem.* **1977**, 139, 61
11. *WHO Arsenic Compounds, Enviromental Health Criteria 224, 2nd ed, World Organization Geneva*, **2001**
12. *U.S. Enviromental Protection Agency, Interim Primary Drinking Water Standards, Fed. Reg.* 40, **1975**, 990
13. P. Kurttio, H. Komulainen, E. Hakala, H.Kahelin, J.Pekkanen, Arch. *Envir. Contam. Toxicol.* **1998**, 34, 297
14. G.W.Page, *Environ. Sci. Technol.* **1981**, 151, 475
15. A.H. Welch, M.S. Lico, J.L. Hugles, *Ground Water*, **1998** 26, 297
16. F.N. Robertson, *Environ. Geochem. Health* **1989** 11, 171
17. N.E. Korte, Q. Fernando, *CRC Crit. Rev. Environ. Control*. **1991**, 21, 1
18. G. Matisoff, C.J. Hall, A.W. Varnes, W.H.Strain, *Ground Water* **1982**, 20, 446
19. K.J. Irgolic, H. Greschonig, A.G. Howard, *Arsenic in: A.Townshend (Ed), the encyclopedia of Analytical Science, Academic Press*, **1995**, 168-184
20. W.R. Penrose, *CRC Crit. Rev.Enviiron. Control*, **1974**, 465
21. A.C. Chapman, *Analyst*, **1926**, 51, 548

22. G.Lunde, *Environ. Health Perspect.* **1977**, 19, 47.
23. V.Nischwitz, S.Pergantis, *Anal. Chem.* **2005**, 77, 5551–5563
24. K.Shiomi, AShinagana, M.Azuma, H.Yamanaka, T.Kikuchi, *Comp.Biochem. Physiol.,C: Comp. Pharmacol*. **1983**, 74C, 393
25. J.R.Cannon, J.S.Edmons, K.A.Fransesconi, C.L.Raston, B.W.Skelton, A.H.White, *Aust.J.Chem.* **1981**, 34, 787
26. J.S.Edmonds, K.A.Fransesconi, C.L.Raston, B.W.Skelton, A.H.White, *Tetrahydron Lett.* **1977**, 1543
27. J.S. Edmonds, K.A. Fransesconi *Nature* (London) **1977**, 265, 436
28. J.R.Cannon, J.B.Saunders, R.F.Toia, *Sci. Total Environ.* **1983**, 31, 181
29. J.S.Edmonds,K.A.Fransesconi, P.S.Healy, A.H. White. *J.Chem.Soc.Perkin Trans.* **1982**, 1, 2989
30. Y.Shibita, M.Morita, J.S.Edmonds, *Agric. Biol.Chem.* **1987**, 51, 391
31. J.N.C.Whyte, J.R.Englar, *Bot.Mar.* **1983**, 26, 159
32. J.S.Edmonds, K.A.Fransesconi, *Experientia*. **1987**, 43 ,553
33. S.McSheehy, J.Szpunar, R.Lobinski, V.Halds, J.Tortajada, J.Edmonds, *Anal.Chem.* **2002**, 74, 2370-2378
34. K.A.Fransesconi, J.S.Edmonds, *Rapid Commun. in mass spectrum.* **2001**, 15, 1641-1646
35. C.I.Davinson, W.D.Goodly, T.P.Mathison, G.B.Wiersma, K.W.Brown, M.T.Reilly. *Envirom. Sci. Technol.* **1985**, 19, 27
36. *Feed Additive Compedium, vol 13, Munneapolis, The Miller publishing Company*, **1975**, 330
37. H.Smith, *Forensic Sci. Soc.* **1964**, 4, 192
38. *WHO Arsenic Compounds, Enviromental Health Criteria 224, 2nd ed., World Health, Organisation*, Geneva, **2001**
39. E.F.Pearson, C.A.Pounds, *J. Forensic Sci. Soc.* **1971,** 11, 229
40. *U.S.Department, of the Interior Bureau of mines, in : Minerals Yearbook, vol.1,* **1973**, 1360
41. W.T.Thompson, *Agricultural, Chemicals Book 1, Insecticides, Indianapolis, Thompson Publication, Washington.* **1973**, 300

42. A.M.Lansche, *Bureau of Mines, Bulletin, 630, US, Department of the Interior, Washington DC*, **1965**, 75
43. U.S. Department of Agriculture, *The pesticides Review*, **1970**, 46
44. *Enviromental Protection Agency, Ambient Water , Quality Criteria for Arsenic, U.S. Envir. Prot. Agency*. Rep. 440/5-80-021,**1980**, 1
45. R.S.Baker, H.F.Arle, J.H.Miller, J.T.Halstum. *Weed Sci.* **1969**, 17, 37
46. C.L.Perker, *USEPA, Contract, No. 68-01-5964, The mitre Corporation,* **1981**, 1
47. F.M.Fordyce, T.M.Williams, A. Paijipapapon, P. Charoenchaisei, *British Geol. Survey, Keyworth,* **1985**
48. R.M.Raie, *Ecotoxicol. Environ. Safety* **1996**, 35, 248
49. J.P.Buchet, R.Lauwerys, H.Roels, *Int. Arch. Occup. Envir. Health* **1981**, 48, 71
50. B.K.Mandal, Y.Ogra, K.T.Suzuki, *Chem.Res. Toxicol.* **2001**, 14, 371
51. X.C.Le, X.Lu, M.Ma, W.R.Cullen, H.V.Aposhian, B. Zheng, *Anal. Chem.* **2000**, 72, 5172
52. V.Benco, A.Dobisova, M.Macaj, *Atmos. Environ.* **1971**, 5, 275
53. M.J.Ellenhorn, *Arsenic in : Ellenhorn's Medical Toxicology: Diagnosis and Treatment of Hunan Poisoning 2nd ed. Williams and Wilkins*, Baltimore, **1997**, 1538
54. W.R.Cullen, K.J. Reimer, *Chem. Rev*. **1989**, 89, 713
55. T.Kaise, S.Fukui, *Appl.Organomet. Chem.* **1992**, 6, 155
56. X.C.Le, W.R.Cullen, K.J.Reimer, *Envir. Sci. Technol.* **1994**, 28, 1598
57. J.P.Buchet, D.Lison, M.Ruggeri, V.Foa, G.Elia, *Arch. Toxicol.* **1996**, 70,773
58. R.W.Whitacre, C.S.Pearse*, Arsenic and the Environment, Mineral Industries Bulletin, Colorado, School of Mines,* **1972**, 1
59. J.T.Hindmarsh, R.F.McCurdy, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **1986**, 23
60. *United Nations Synthesis Report on Arsenic in Drinking Waters,* **2001**
61. S.Meada*, in : J.O. Nriagu, (Ed.), Arsenic in the Environment Part I, Cycling and Characterization, Wiley, New York,* **1994**, 155-187
62. E.Astofi,A.Maccagno, J.C.G.Fernandez, R.Vaccaro, R.Stimola, *Biol. Trace Elem. Res.* **1981** 3, 133

63. J.C.Belton, N.C.Benson, M.L.Hana, R.T.Taylor, *J.Environ. Sci. Health. 20A,* **1985**, 37
64. H.Wolochow, E.M.Putman, M.Domdoroff, W.Z.Hassid, H.A.Barker, *J.Biol. Chem*. **1949**, 180, 1237
65. H.V.Aposhian, *Rev.Biochem. Toxicol.* **1989**, 10, 265
66. H.B.F.Dixon, *Adv.Inorg. Chem*. **1997**, 44, 191
67. J.Elder, T.T. Davies, *Draft Drinking Water Criteria, Document on Arsenic, U.S. EPA, Under EPA Contract No. 68-C8-0033, Washington DC, 20460, VIII-4*, **1993**, 1
68. J.S. Petrick, F.Ayala-Fierro, W.R. Cullen, D.E. Carter, H.V Aposhian, *Toxicol. Appl. Pharmacol*., **2000**, 163, 203
69. S. Lin, W.R.Cullen, D.J.Thomas, *Chem.Res. Toxicol.* **1999**, 12, 924
70. M.Styblo, S.V.Serves, W.R.Cullen, D.J.Thomas, *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, 10, 27
71. M.Styblo, L.M.Del Razo, L.Vega, D.R.Germolec, E.L.LeCluyse, G.A.Hamilton, W.Redd, C.Wang, W.R.Cullen, D.J.Thomas. *Arch. Toxicol*. **2000**, 74, 289
72. M.J.Mass, A.Tennant, B.C.Roop, W.R.Cullen, M.Styblo, D.J. Thomas, A.D. Kligerman, *Chem. Res. Toxicol.* **2001**, 14, 355
73. S.M.Nagvi, C.Vaishnavi, H.Singh, Toxicity and Metabolism of Arsenic in veterbrates, in : J.O.Nriagu (Ed.), *Arsenic in the Environment. Part II : Human Health and Ecosystem effects, John Wiley, and Sons, Inc, New York*, **1994**, 55-91
74. L.Gerhardsson, E.Dahlgren, A.Eriksson, B.E.A.Lagervist, J.Lundstorm, G.P.Nordberg, Scan. *J. Work.Envir. Health.* **1988**, 14, 130
75. W.E.Morton, D.A.Dunnete, in: *J.O. Nriagu (Ed.), Arseinc in the Enviroment. Part II : Human Health and Ecosystem Effects, Jonh Wiley and Sons, Inc, New York*, **1994**, 17-34
76. D.N.Guha, Mazumder, R.Haque, N.Ghosh, B.K.De, A.Santra, D.Chakraborti, A.H.Smith, *Int. J. Epidemiol.* **2000**, 29, 1047
77. A.H.Milton, Z. Hasan, A.Rahman, M.Rahman, *J.Occop. Health* **2001**, 43, 136
78. D.N.Guha Mazumder, J.Das Gupta, A.Santra, A.Pal, A.Ghose, S.Sarkar, N.Chattapadhaya, D.Chakraborti, in: C.O.Abernathy, R.L.Calderon,

W.R.Chappell, (Eds.) *Arsenic Exposure and Health Effects*, Chapman and Hall London, **1997**, 112

79. B.E.A Lagerkvist, H. Linderholm, G.F.Nordberg, *Int. Arch. Environ. Health.* **1988** 60, 361
80. C.W.Armstrong, R.B.Stroube, T.Rubio, W.S.Beckett, *Arch. Environm. Health* **1984**, 39, 274
81. A.Franzblau, R.Lilis, *Arch. Environm. Health* **1989**, 44, 385
82. F.S.Glazener, J.G.Ellis, P.K.Jonhson, *Calif. Med.* 1968, 109, 158
83. NRC (National Research Council), *Arsenic in Drinking Water*, National Academic Press, Washigton DC, **1999**.
84. K.C Saha, in : W.R. Chapell, C.O. Abernathy, R,L Calderon, (Eds.), *Arsenic Exposure and Health Effects*, Elsevier Science, Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Tokyo, **2001**, 387-396.
85. D.N.Guha Mazumder, *J. Assoc. Phys. India* **2001**, 49, 650
86. M.Tondel, M.Rahman, A.Magnuson, I.A.Chowdhury, M.H.Farequee, S.A.Ahmad, *Envir. Health Pespect.* **1999**, 107, 727
87. J.W.Southwick, A.E.Western, M.M.Beck, *Community health associated with arsenic in drinking water in Millard Country*, Utah, EPA-600/1-81-064, NTIS No. PB82 –108374, USEPA, Health Effects Labatory, Cincinnati, OH, **1981**
88. J.L.Valentine, L.S.Reisbord, H.K.Kang, M.D.Schluchter, *Arsenic effects of population health histories*, in : C.F. Mills, I.M. Bremner, K.J. Chesters (Eds.) *Trace Elements in Man and Animals*, Commonwealth, Agricultural Bureau, Slough, UK, **1985**, 289-294
89. IARC, *Carcinogenesis of Arsenic and Arsenic compound*, vol. 23, Lyon, **1980**, 291-305
90. M.N.Bates, A.H.Smith, C.Hopenhayn Rich, *Am. J. Epidemiol.* **1992**, 135, 462-476
91. C.J.Chen, T.L.Kuo, M.M.Wu*, Arsenic and cancers Letter*, **1988**, 1, 414-415
92. S.L.Bonchin-Cleland, H.Ding, J.A.Caruso, *Am. Lab*. **1995**, 34
93. M.J.Tomilson, L.Lin, J.A.Caruso, *Analyst*, **1995**, 120
94. K.Li, S.F.Y.Li, *Analyst*, **1995** 120, 361

95. S.Wangkarn, S.A.Pergantis, *J. Anal. At. Spectrom.* **2000**, 15, 627
96. B.Do, S.Robinet, D.Pradeau, F.Guyon, *J. Chromatogr. A*. **2001**, 87, 918
97. P.Thomas, K.Sniatecki, *J. Anal. At. Spectrom.* **1995**, 10, 615
98. Y.Shibata, M.Morita, *Anal.Sci.* **1989**, 5, 107
99. X.C.Le, W.R.Cullen, K.J.Reimer*, Environ. Sci. Technol.* **1994**, 28, 1598
100. J.Lintshinger, P.Schramel, A.Hatalak-Rauscher, I.Wendler, B.Michalke, *Fresenius J. Anal. Chem*. **1998**, 362, 313
101. J.Feldmann, K.John, P.Pengprecha, *Fresenius J. Anal. Chem*. **2000**, 368, 116
102. J.J.Corr, E.H.Larsen, *J. Anal. At. Spectrom.* **1996**, 11, 1215
103. E.H.Larsen, G.Pritzl, S.H.Hansen, *J. Anal. At. Spectrom*. **1993**, 8, 557
104. E.H.Larsen, *Spectrochim. Acta B.* **1998**, 53, 253
105. P.R.Haddad, P.E.Jackson, *Ion Chromatography Principles and Applications, Elsevier Science*, New York, **1990**, .195
106. T.Taniguchi, H. Tao, M.Tominaga, A.Miyazaki. *J. Anal. At. Spectrom*. **1999** 14, 651
107. T.Nakazato, T.Taniguguchi, H.Tao, M.Tominga, A.Miyazaki, *J.Anal.At. Spectrom.* **2000** 15, 1546
108. X.Zhang, R.Cornelis, J.de Kimpe, L.Mees, *J.Anal. At. Spectrom.* **1996**, 11, 1075
109. X.Zhang, R.Cornelis, J.de Kimpe, L.Mees, N. *Lameire Clin. Chem.* **1998**, 44, 141
110. S.McSheehy, R.Pohl, R.Lobinski, J.Szpunar, *Anal. Chim. Acta* **2001**, 440, 3
111. A.Geiszinger, W.Goessler, D. Kuehnelt, K.A.Francesconi, W.Kosmus, *Environ. Sci. Technol*. **1998**, 32, 2238
112. M.A. Suner, V.Devesa, O.Munoz, D.Veler, R.Montoro, *J.Anal. At. Spectrom*. **2001**, 16, 390
113. L.Ebdon, S.Hill, R.W.Ward, *Analyst* **1987**, 111, 1113
114. S.Kurosawa, K.Yasuda, M.Tagushi, S.Yasamaki, S.Toda, M.Morita, T.Uehiro, K.Fuwa, Agric.Biol. Chem. **1980** 44, 1993
115. M. Chausseau, C.Roussel, N. Gilon, J.M.Mermet, *Fresenius J.Anal. Chem*. **2000**, 366, 476
116. W.Weeder, D.Lievremont, M.Peret, F. Lagarde, J.C. Hubert, M. Leroy, M.C.Lett, *Biometals*, **1999**, 12, 141

117. G.Rauret, R.Rubio, A.Pardo, *Fresenius' J. Anal. Chem*. **1991** 340, 157
118. R.Rubio, A.Pardo, J.Alberti, G.Raunet, *Mikrochim. Acta* **1992**, 39, 109
119. R.T.Gettar, R.N.Garavaglia, E.A.Guatier, D.A.Batistoni, *J.Chromatogr. A.* **2000**, 211, 884
120. B.K.Mandal, O.Yasumitsu, K.T.Suzuki, *Chem. Res. Toxicol*. **1999**, 12, 924
121. X.C.Le, X.F.Li, V.Lai, M.Ma, S.Yalcin, J.Feldmann, *Spectrochim. Acta B*, **1998**, 53, 899
122. T.Nakazato, T.Taniguchi, H.Tao, M.Tominga, A.Miyazaki, *J.Anal. At. Spectrom*. **1996**, 11, 1075
123. J.Mattusch, R.Wenrich, *Anal. Chem*. **1998**, 70, 3649
124. T.Guerin, N.Molenat, A.Astruc, R.Pinel, *Appl.Organomet. Chem*. **2000**, 14, 401
125. S.Saverwyns, X.Zhang, F.Vanhaeche, R.Cornelis, L.Moens, R.D.ams*, J.Anal. At. Spectrom*. **1997**, 12, 1047
126. M.Moldovan, M.M.Gomez, M.A. Palacios, C.Camara, *Microchem*. **1998**, 59, 89
127. A.Woller, H.Garraud, J.Boisson, A.Marie, Dorthe, P.Fodor, O.F.X.Donard, *J.Anal. At. Spectrom.* **1998**, 13, 141
128. K.Saeki, H.Sakakibara, H.Sakai, T.Kunito, S.Tanabe*, Biometals*, 2000, 13, 241
129. J.J.Corr, E.H.Larsen, *J.Anal. At. Spectrom*. 1996, 11, 1215
130. Y.Shibita, M.Morita, *Anal. Chem.* **1989**, 61, 2116
131. S.A.Pergantis, K.A.Franchesconi, W.Geossler, J.E.Thomas- Oates, *Anal. Chem*. **1998**, 9, 4931
132. J.J.Corr, *J.Anal. At. Spectrom*. **1997**, 12, 537
133. S.A.Pergantis, W.Winnik, D.Betowski, *J.Anal. At. Spectrom*. **1999**, 12, 81
134. Y.Inoue, Y.Date, T.Sakai, N.Shimizu, K.Yoshida, H.Chen, K.Kuroda, G.Endo, *Appl. Organomet. Chem*. **1999**, 13, 81
135. M.H.Florencio, M.F. Duarte, A.M.M De Bettencourt, M.L.Gomes, L.F. Vilas, *Rapid. Commun. Mass Spectrom*. **1997**, 11, 469
136. S.N.Pedersen, K.A.Francesconi, *Rapid Commun. Mass Spectrom*. 2000, 14, 641
137. S. Chapman; *Physical Review*, **1937**, 10, 184
138. M. Dole et al.; *Journal of Chemical Physics*, **1968**, 49, 2240 and *Journal of Chemical Physics*, **1970**, 50, 4977.

139. J.B. Fenn et al.; *Journal of Physical Chemistry*, **1984**, 88, 4451 and *Zeitschrift für Physik D*, **1988**, 10, 361 and *Science*, 246; **1989**, 64
140. J.B. Fenn; *Agewandte Chemie - International Edition*, 42; **2003**, p3871
141. W. Paul, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*. **1990**, 29, 739
142. R.G.Cooks, R.G.McLuckey, S.A. Kaiser, *Chemical and Engineering News*, **1991**, 69 (12), 26-41
143. H. Dehmelt, *Physica Scripta*, **1995**, T59, 87-92
144. D.C. Taflin, T.L. Ward, E.J. Davis. *Langmuir* **1989**, 5, 376-384.
145. M.Dole, L.L.Mack, R.L.Hines, R.C.Moble, L.D.Ferguson, M.B.Alice. *J Chem Phys,* **1968**, 49, 2240-2249
146. J.V. Iribarne, BA.Thomson. *J. Chem. Phys.* **1976**. 64, 2287-2294
147. Edmond de Hoffmann, Vincent Stroobant. *Mass Spectrometry, Principles and Applications*, **2001**, second edition. 34.
148. A.P. Bruins.. In: *Cole RB (Ed.).New York: John Wiley and Sons*, Inc. **1997** 107-135
149. G.J. Van Bergel.. *In: Cole RB (Ed.). Electrospray ionization mass spectrometry*. New York: John Wiley and Sons, Inc. **1997**, 65-105
150. R.B. Colle, JH Zhu, *Rapid Commun Mass Spectrom* **1999,** 13, 607-611
151. R.Saf, C.Mirtl, K.Hummel. *Tetrahedron Lett*. **1994**, 35, 6653–6656
152. S.Z.Ackloo, R.W.Smith, J.K.Terlouw, B.E.McCarry, *Analyst*, **2000**, 125, 591–597
153. R.R.Ogorzalek Loo Smith. *J Am Soc Mass Spectrometry,* **1994**, 5, 221-229
154. J.L.Stephenson, S.A.McLuckey, *Anal Chem,* **1996**, 68, 4026
155. P.Kebarle, M.Peschke. *Analytica Chemica Acta,* **1999**, 1-25
156. M.H.Amad, N.B.Cech, G.S.Jackson, C.G.Enke. *J Mass Spectrom,* **2000**, 35, 784–789
157. S.Zhou, M. Hamburger., **1995**, 9, 1516–1521
158. T-Y.Yen, M.J.Charles, R.D.Voyksner, *J Am Soc Mass Spectrom,* **1996**. 7, 1106-1108
159. G.J.Van Bergel, S.A.McLuckey, G.L. Glish. *Rapid Comm Mass Spectrom* **1992**. 9, 1516–1521
160. G.J.Van Bergrel. *J Anal At Spectrosc* **1998**, 13, 603–607

161. Z.L. Cheng, K.W. Siu, R.Guevremont, S.S.Bergman..*J. Am. Mass Spectrom*. **1992** 3, 281
162. L. Tang, P. Kebarle. *Anal. Chem.* **1993**, 65, 3654–3668
163. N.B.Cech, C.G. Enke. *Anal. Chem.* **2000**, 72, 2717–2723
164. N.B. Cech, J.R. Krone, C.G. Enke. *Anal. Chem.* **1998**, 13, 603–607
165. S.Zhoo, K.D.Cook. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **2001**, 12, 206–214
166. A.Gomez, K.Tang.. *Phys. Fluids.* **1994**, 6, 404–414
167. K.Tang, R.D.Smith. *Int J Mass Spectrom*. **1999**, 185/186/187, 97-105
168. U.Bahr, A.Pfenninger, M.Karas, B.Stahl. *Anal Chem*, **1997**, 69, 4530–4535
169. M.Karas, U.Bahr, T.Dulks. *Fresenius J Anal Chem*, **2000**, 366, 669 – 676
170. A. Raffaelli, A.P. Buins. *Rapid Commun Mass Spectrom* **1991**, 5, 269–275
171. P.A. Karplus. *Protein. Sci.* **1996**, 6: 1302 – 1307
172. G.Wang, R.B.Cole.. In: Cole R.B. (Ed.). *Electrospray ionization mass spectrometry*. New York: Wiley, **1997**, 137–174
173. M.A. Kelly, M.M. Vestling, C.C.Fenselau, P.B.Smith.. *Org Mass Spectrom*. **1992**, 27, 1143–1147
174. G.Wang, R.B.Cole. *Organic Mass Spectrometry*, **1994**, 29, 419–427
175. S. Zhou, K.D. Cook. *J Am Soc Mass Spectrom* **2000**, 11, 961–966.
176. C.G. Enke. *Anal. Chem*. **1997**, 69, 4885–4893
177. G.J. Van Bergel, F.Zhou, J.T.Arronson. *Int J Mass Spectrom Ion Prod.* **1997**, 162, 55–67.
178. P.Kebarle, Y. Ho.. In: Cole RB (Ed.). **1997**, New York: Wiley. 14
179. N.B.Cech, C.G Enke..*Mass Spectrometry Reviews.* **2001**, 20 , 362–387.
180. V.G.Drozin .*J. Colloid. Sci.* **1995**, 7, 616
181. J.A. Loo, R.R.O Loo, K.J.Light, C.G. Edmonds, R.D. Smith. Anal Chem **1992** 64, 81–84.
182. J.H. Zhu, R.B. Cole..*J Am Soc Spectrom.* **2000**, 9, 1516–1521.
183. Edmond de Hoffmann, Vincent Stroobant. *Mass Spectrometry, Principles and Applications*, second edition. **1990**, 78-79.
184. Notes from the Thermo Electron European Training Institute

185. B.R.Larsen, C.Astorga-Llorens, M.H.Florencio,A.M.Bettencourt. *J. of Chromatogr. A*, **2001**, 962, 167-174
186. W.R. Cullen, M. Dodd. *Appl.Organomet. gem*. **1985**, 401-409
187. K.A.Francesconi, J.S.Edmonds, R.V.Stick., B.W.Skelton, A.H.White. *J.Chem.Soc*. **1991**,1, 2707-2716
188. V.M-N.Lai, Y.Sun, E.Ting, W.R.Cullen, K.J Reimer. *Toxicology and applied Pharmacology* **2004**, 198, 297-306
189. Skoog, Holler, Nieman. *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης*,εκδόσεις Κωσταράκης, **2002**.