



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΩΝ ΧΗΜΙΚΩΝ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ  
ΕΝΩΣΕΩΝ ΑΡΣΕΝΙΚΟΥ ΚΑΙ ΤΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΤΟΥΣ  
ΣΕ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ - ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ

Διδακτορική Διατριβή

Κανάκη Αικατερίνη

Επιβλέπων: Αναπληρωτής Καθηγητής Σπύρος Περγαντής

Ηράκλειο 2009



UNIVERSITY OF CRETE  
DEPARTMENT OF CHEMISTRY



ENVIRONMENTAL CHEMICAL PROCESSES LABORATORY

DEVELOPMENT OF ANALYTICAL METHODS FOR  
DETERMINING ARSENIC SPECIES AND THEIR INTERACTIONS  
IN ENVIRONMENTAL – BIOLOGICAL SYSTEMS

PhD Thesis

Katerina Kanaki

Supervisor: Associate Professor Spiros Pergantis

Heraklion 2009

## Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

1. Περγαντής Σπυρίδων (Επιβλέπων): Αν/τής Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Κρήτης.
2. Στεφάνου Ευριπίδης: Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Κρήτης.
3. Βασιλικογιαννάκης Γεώργιος: Αν/τής Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Κρήτης.
4. Μιχαλόπουλος Νικόλαος: Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Κρήτης.
5. Χανιωτάκης Νικόλαος: Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Κρήτης.
6. Τσιώτης Γεώργιος: Αν/τής Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Κρήτης.
7. Σπύρος Απόστολος: Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Κρήτης.

## ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

### ΠΡΟΣΩΠΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Όνοματεπώνυμο	Κανάκη Αικατερίνη
Διεύθυνση Αλληλογραφίας	Μονής Γουβερνέτου 30, Ηράκλειο, 71307
Τηλέφωνα Επικοινωνίας	6945573982, 2891032363
Ημερομηνία, Τόπος γέννησης	02/07/1979, Ηράκλειο, Κρήτη
Υπηκοότητα	Ελληνική

### ΣΠΟΥΔΕΣ

#### Σεπτέμβριος 1998 – Νοέμβριος 2003

**Δίπλωμα Χημικού Μηχανικού**, Τμήμα Χημικών Μηχανικών, Πολυτεχνική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης (Α.Π.Θ), Βαθμός Διπλώματος **7.82 (Λίαν Καλώς)**.

#### Ιούλιος 2004 - Απρίλιος 2007

**Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης:** Εργαστήριο Περιβαλλοντικών Χημικών Διεργασιών, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο, με τίτλο: *“Ανάπτυξη Μεθόδων Υγρής Χρωματογραφίας με Φασματομετρία Μαζών για Ανίχνευση και Χαρακτηρισμό Νέων Μορφών Αρσενικού (Θειο-αρσενοσάκχαρα) σε Βιολογικά Δείγματα”*

Επιβλέπων: Αναπληρωτής Καθηγητής Αναλυτικής Χημείας Σπύρος Περγαντής

#### Απρίλιος 2007 – Δεκέμβριος 2009

**Διδακτορικό Δίπλωμα:** Εργαστήριο Περιβαλλοντικών Χημικών Διεργασιών, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο, με τίτλο: *“Ανάπτυξη Αναλυτικών Μεθόδων για τον Προσδιορισμό Ενώσεων Αρσενικού και των Αλληλεπιδράσεών τους σε Περιβαλλοντικά – Βιολογικά Συστήματα”*

Επιβλέπων: Αναπληρωτής Καθηγητής Αναλυτικής Χημείας Σπύρος Περγαντής

### Ξένες Γλώσσες

Αγγλικά (καλή γνώση), First Certificate in English (FCE), Cambridge.

### Γνώση Η/Υ

Windows 95, 98, XP, Ms Office 2000, Χρήση Διαδικτύου, Γλώσσα Προγραμματισμού Fortran, Σχεδιαστικό Πακέτο Aspen Plus 10.2.



## ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ/ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

**Ιούλιος 2004 – Δεκέμβριος 2009:** Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας, Ηράκλειο, Εργαστήριο Περιβαλλοντικών Χημικών Διεργασιών

*“Ανάπτυξη Αναλυτικών Μεθόδων για τον Προσδιορισμό Ενώσεων Αρσενικού και των Αλληλεπιδράσεών τους σε Περιβαλλοντικά – Βιολογικά Συστήματα”*

### Χρήση Αναλυτικών Τεχνικών

- ◆ Φασματομετρία Μάζας Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος (ICP-MS) σε συνδυασμό με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC).
- ◆ Διαδοχική Φασματομετρία Μάζας Ιονισμού με Ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization MS/MS) σε συνδυασμό με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC).

**Δεκέμβριος 2003 – Μάιος 2004:** Εθνικό Κέντρο Έρευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης, Ινστιτούτο Τεχνικής Χημικών Διεργασιών, Εργαστήριο Περιβαλλοντικών Καυσίμων και Υδρογονανθράκων (Ε.Κ.Ε.Τ.Α./ Ι.Τ.ΧΗ.Δ/ Ε.Π.Κ.Υ.), Θεσσαλονίκη

*“Σύνθεση Διπλών Υδροξειδίων Φυλλόμορφης Δομής (Layered Double Hydroxides/ LDH), Τροποποίηση Ζεολιθικών και Μεσοπορώδων Υλικών” και “Αξιολόγηση καταλυτών στην Μονάδα Δοκιμής Μικροενεργότητας-Μικρού Χρόνου Επαφής (MAT-SCT)/ Ανάλυση των προϊόντων πυρόλυσης με Αέρια Χρωματογραφία (GC)”*

### Χρήση Αναλυτικών Τεχνικών

- ◆ Φασματοσκοπία Ατομικής Εκπομπής Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος (ICP-AES)
- ◆ Περιθλάση Ακτίνων-Χ (XRD)
- ◆ Θερμικές Αναλύσεις (TGA-DSC)
- ◆ Θερμοπρογραμματισμένη Εκρόφηση Αμμωνίας με Φασματογράφο Μάζας (TPD-NH<sub>3</sub>).
- ◆ Προσρόφηση/ Εκρόφηση Αζώτου (N<sub>2</sub>-BET)
- ◆ Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης - Στοιχειακή Μικροανάλυση (SEM-EDS)

**Ιούνιος 2002 – Αύγουστος 2002:** Ε.Κ.Ε.Τ.Α./ Ι.Τ.ΧΗ.Δ/ Ε.Π.Κ.Υ., Θεσσαλονίκη

Εκπόνηση Πρακτικής Άσκησης με τίτλο:

*“Παρασκευή και Χαρακτηρισμός Όξινων Ζεολιθικών Καταλυτικών Υλικών”*

- ◆ Σύνθεση και τροποποίηση ζεολιθικών υλικών.
- ◆ Φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των υλικών με τις τεχνικές: ICP-AES, XRD, TGA-DSC, TPD-NH<sub>3</sub>, N<sub>2</sub>-BET.

## ΕΡΓΑΣΙΕΣ

**Διπλωματική Εργασία Διπλώματος Χημικού Μηχανικού (Μάϊος – Οκτώβριος 2003):**

*“Καταλυτικά Πρόσθετα Υποστηριγμένου ZnO για την Μείωση του Θείου της Βενζίνης Καταλυτικής Πυρόλυσης – Μελέτη της Επίδρασης του Τύπου του Υλικού Υποστήριξης”*

Επίβλεψη: Καθηγητής Τμήματος Χημικών Μηχανικών Α.Π.Θ., Ι.Α. Βασάλος, Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Χημείας Α.Π.Θ., Κ.Σ. Τριανταφυλλίδης.

**Τεχνοοικονομική Μελέτη Εγκαταστάσεων (Μάρτιος 2002-Απρίλιος 2003):**

*“Σχεδιασμός Μονάδας Παραγωγής n-βουτανόλης με την Μέθοδο Υδροφορμυλίωσης του Προπυλενίου”*

Τμήμα Χημικών Μηχανικών, Α.Π.Θ, Μάρτιος 2002-Απρίλιος 2003

Επίβλεψη: Καθηγητής Τμήματος Χημικών Μηχανικών Α.Π.Θ., Α. Καράμπελας.

## ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ – ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΑ ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ

1. **“Arsenic In The Environment: From Nature To Humans, 2<sup>nd</sup> International Congress”** (21-23 Μαΐου, 2008, Βαλένθια, Ισπανία), Παρουσίαση Poster.
2. **“Training courses on Analytical Quality Control and method validation in support to the Water Framework Directive”** - Marie Curie Conferences and Training Courses (SCF), Βουδαπέστη, Ουγγαρία, 2-4 Νοεμβρίου 2006.
3. **“7<sup>th</sup> International Conference on Environmental and Biological Aspects of Main-Group Organometallics”** (10-12 Οκτωβρίου, 2006, Ηράκλειο, Κρήτη, Ελλάδα), Προφορική Παρουσίαση.
4. **“4<sup>th</sup> International Conference on Instrumental Methods of Analysis – Modern Trends and Applications”** (2-6 Οκτωβρίου 2005, Ηράκλειο Κρήτη, Ελλάδα), Παρουσίαση Poster.
5. **“20<sup>o</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Χημείας – Χημεία: Εκπαίδευση, Έρευνα και Εφαρμογές”** (20-24 Σεπτεμβρίου 2005, Ιωάννινα, Ελλάδα), Παρουσίαση Poster.
6. **“10<sup>th</sup> European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry”** (29 Ιανουαρίου – 2 Φεβρουαρίου 2005, Βουδαπέστη, Ουγγαρία), Παρουσίαση Poster.
7. **“10<sup>o</sup> Συνέδριο Μεταπτυχιακών Φοιτητών Χημείας”** (8-10 Ιουλίου 2005, Κολυμπάρι-Χανιά, Κρήτη, Ελλάδα), Προφορική Παρουσίαση.

## ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. V. Nischwitz, **K. Kanaki** and S. A. Pergantis, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2006, **21**, 33.
2. **K. Kanaki** and S. A. Pergantis, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2006, **1925**, 1931.
3. **K. Kanaki** and S. A. Pergantis, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2006, **387**, 2617.
4. **K. Kanaki** and S. A. Pergantis, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, 2007, **19**, 1559.

Στη μνήμη του πατέρα μου

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της συγγραφής της παρούσας διατριβής, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους τους ανθρώπους, οι οποίοι με βοήθησαν, με τον δικό τους τρόπο, να εκπληρώσω το στόχο μου ...

Κατ' αρχήν, το πρώτο "μεγάλο ευχαριστώ" το οφείλω στον επιβλέποντα καθηγητή μου, **κ. Σπύρο Περγαντή**, για την επιστημονική καθοδήγηση, τις πολύτιμες συμβουλές του και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, σε όλο το διάστημα της συνεργασίας μας, καθώς και για την οικονομική υποστήριξη που μου προσέφερε, μέσω του Προγράμματος Marie Curie Excellent Grant. Οι αποτελεσματικές λύσεις που είχε πάντα να μου προτείνει, σε οποιοδήποτε χημικό πρόβλημα αντιμετώπιζα, με βοήθησαν να συνεχίσω και να φέρω σε πέρας αυτή την δύσκολη προσπάθεια, ενώ, παράλληλα, αφήνοντας μου το περιθώριο να υλοποιώ τις ιδέες μου, συνέβαλλε καθοριστικά στην όξυνση της σκέψης και της κριτικής μου ικανότητας. Παράλληλα, πέρα από το επιστημονικό κομμάτι, του χρωστάω και ένα "μεγάλο και ξεχωριστό ευχαριστώ", για το ειλικρινές ανθρώπινο ενδιαφέρον του και για την ηθική συμπαράστασή του, σε περιόδους ιδιαίτερα δύσκολες για μένα.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής μου επιτροπής, **κ. Στεφάνου Ευριπίδη** (Καθηγητής Τμήματος Χημείας), **κ. Βασιλικογιαννάκη Γεώργιο** (Αν/τής Καθηγητής Τμήματος Χημείας), **κ. Μιχαλόπουλο Νικόλαο** (Καθηγητής Τμήματος Χημείας), **κ. Χανιωτάκη Νικόλαο** (Καθηγητής Τμήματος Χημείας), **κ. Τσιώτη Γεώργιο** (Αν/τής Καθηγητής Τμήματος Χημείας) και **κ. Σπύρο Απόστολο** (Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Χημείας), που δέχτηκαν να κρίνουν την παρούσα εργασία και να μου κάνουν σημαντικές και ιδιαίτερα χρήσιμες παρατηρήσεις. Ιδιαίτέρως, όμως, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στον **κ. Στεφάνου Ευριπίδη** και **κ. Μιχαλόπουλο Νικόλαο**, για την στήριξη και την συμπαράστασή τους, όλα αυτά τα χρόνια που βρίσκομαι στο Τμήμα Χημείας. Πάντα θα θυμάμαι το ειλικρινές τους ενδιαφέρον και την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφεραν απλόχερα, όποτε και αν τους τη ζήτησα.

Δε μπορώ να παραλείψω τις ευχαριστίες μου προς το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, που με δέχτηκε, το 2004, στο Γενικό Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών και μου παρείχε τις υλικοτεχνικές υποδομές, για την εκπόνηση της παρούσας διατριβής.

Στο σημείο αυτό, να ευχαριστήσω, επίσης, το Πρόγραμμα Marie Curie Excellent Grant, για την σημαντική οικονομική στήριξη που μου προσέφερε και χωρίς την οποία, η εκπόνηση της παρούσας εργασίας θα ήταν αδύνατη.

Ένας άνθρωπος που θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω είναι ο κ. **Κώστας Τριανταφυλλίδης**, Επίκουρος Καθηγητής του Τμήματος Χημείας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, με τον οποίο είχα πραγματοποιήσει τη Διπλωματική μου Εργασία, κατά τη διάρκεια των σπουδών στο Πόλυτεχνείο, και ο οποίος με παρότρυνε να ασχοληθώ με την έρευνα και την εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής. Η ευθάρρυνσή του, συνέβαλλε σημαντικά στην τελική μου απόφαση, για την εκπόνηση της παρούσας διατριβής.

Ακολουθώς, θα επιθυμούσα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου μας, με τα οποία συνυπάρξαμε όλα αυτά τα χρόνια στον ίδιο χώρο, διαμορφώνοντας ένα ευχάριστο κλίμα συνεργασίας.

Επίσης, νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω τα μέλη των εργαστηρίων των κ. Στεφάνου και Μιχαλόπουλου, για τις πολύ καλές σχέσεις που έχουμε αναπτύξει και γιατί, πραγματικά, όλα αυτά τα χρόνια, μου προσέφεραν, πρόθυμα, την βοήθειά τους, όποτε και αν τη ζήτησα.

Το “**μεγαλύτερο ευχαριστώ**”, θα ήθελα να το πώ στην οικογένειά μου, στους γονείς μου και στην αδερφή μου, τους οποίους ευγνωμονώ βαθιά, για ο,τι μου προσέφεραν, αυτά τα χρόνια. Η ηθική και οικονομική τους συμπαράσταση και η ευθάρρυνσή τους, σε κάθε δυσκολία που αντιμετώπιζα, αλλά και η ανεξάντλητη υπομονή που έδειξαν, ήταν για μένα τα σημαντικότερα εφόδια, για να συνεχίσω να διεκδικώ του στόχους μου.

Τελειώνοντας, θα ήθελα να αφιερώσω την παρούσα εργασία σε ένα πρόσωπο, που έχει φύγει από τη ζωή, στον αγαπημένο μου πατέρα, ο οποίος πάντα πίστευε σε μένα και τις ικανότητές μου, οπλιζοντας με, με δύναμη και θάρρος και μαθαίνοντάς με να μην τα βάζω κάτω, στις όποιες δυσκολίες της ζωής.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το αρσενικό αποτελεί ένα στοιχείο ευρέως διαδεδομένο στην φύση, του οποίου η τοξικότητα εξαρτάται από την οξειδωτική κατάσταση και το χημικό τύπο, με τον οποίο συναντάται. Η έκθεση του ανθρώπου σε αυτό, γίνεται, κυρίως, μέσω του φαγητού και του νερού, ενώ, ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις του στοιχείου, έχουν αναφερθεί σε θαλασσινές τροφές. Τα τελευταία χρόνια, έχει παρατηρηθεί σημαντική πρόοδος στον τομέα της ειδοταυτοποίησης του αρσενικού, με μια σειρά από καινούριες ενώσεις να έχουν ανιχνευτεί και ταυτοποιηθεί, σε μεγάλο αριθμό βιολογικών δειγμάτων. Λόγω της άμεσης συσχέτισης του αρσενικού με την ανθρώπινη υγεία, παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον οι προσπάθειες ανίχνευσης και ταυτοποίησης καινούριων ειδών του στοιχείου, τα οποία, πιθανόν, να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην βιοχημεία, το μεταβολισμό και τον γεωχημικό του κύκλο. Ένα πολύ σημαντικό εργαλείο για την ταυτοποίηση καινούριων ενώσεων αρσενικού, είναι οι τεχνικές φασματομετρίας μάζας, σε συνδυασμό με υγρή χρωματογραφία, και, ιδιαίτερα, οι μέθοδοι Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC), συζευγμένης, τόσο με Φασματομετρία Μάζας Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος (ICP-MS), όσο και με Διαδοχική Φασματομετρία Μάζας Ιονισμού μέσω Ηλεκτροψεκασμού (ESI-MS/MS).

Προς αυτή την κατεύθυνση στρέφεται η παρούσα διατριβή, της οποίας ο βασικός στόχος είναι η ανάπτυξη ευαίσθητων και εκλεκτικών μεθόδων, ικανών να ταυτοποιήσουν καινούριες ενώσεις αρσενικού, ακόμα και αν αυτές συναντώνται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, στα αναλυόμενα βιολογικά δείγματα. Η *in vitro* μελέτη του μεταβολισμού του ανόργανου αρσενικού και η ταυτοποίηση των τελικών μεταβολιτών, αποτελεί, επίσης, ένα σημαντικό κεφάλαιο της διατριβής.

Λέξεις κλειδιά: ειδοταυτοποίηση αρσενικού, μεταβολισμός αρσενικού, φασματομετρία μάζας, επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα, ηλεκτροψεκασμός.

## ABSTRACT

Arsenic is ubiquitous in the environment, with its toxicity being dependant on its oxidation state and its chemical form. People are exposed to arsenic mainly through drinking water and seafood. Chronic exposure to elevated concentrations of inorganic arsenic is believed to cause adverse health effects and contribute to cancers of the lung, bladder and skin.

Last years, a series of novel arsenic species has been detected and characterised in a variety of biological samples. These species may contribute significantly in the biogeochemistry and metabolism of arsenic, while, on the other hand, the toxicity of these compounds, which are considered to be metabolized *in vivo* to other species of unknown toxicity, has not been fully evaluated yet.

A very important tool for the identification of new arsenic compounds is mass spectrometry coupled with liquid chromatography HPLC. Especially, Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) and Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS), in combination with HPLC, have been applied for the detection and characterization of numerous arsenic species, which are found at very low concentrations in environmental and biological samples.

The objective of the present study was the development of sensitive and selective methods for the identification of new arsenic species in biological samples, and then the application of these methods in order to study the *in vitro* metabolism of inorganic arsenic. The analyses that were carried out during the present study were based on reversed phase and anion exchange HPLC methods coupled with both ICP-MS and ESI-MS/MS techniques.

**Keywords:** arsenic speciation, arsenic metabolism, ICP-MS, ESI-MS, mass spectrometry.



# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b><u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1</u></b>	<b>1</b>
Εισαγωγή – Σκοπός της Διατριβής	1
1.1. Το Αρσενικό στο Περιβάλλον	1
1.2. Αναλυτικές Τεχνικές Ειδοταυτοποίησης του Αρσενικού	6
1.3. Σημαντικά Ερωτήματα για το Αρσενικό - Βελτιωμένες Αναλυτικές Τεχνικές Ειδοταυτοποίησης - Σκοπός της Διατριβής	7
Βιβλιογραφία Κεφαλαίου 1	10
<b><u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2</u></b>	<b>12</b>
Αναλυτικές Τεχνικές	12
2.1. Φασματομετρία Μάζας Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry – ICP-MS)	12
2.2. Φασματομετρία Μάζας Ιονισμού μέσω Ηλεκτροψεκασμού (Electrospray Ionization - Mass Spectrometry – ESI-MS)	17
Βιβλιογραφία Κεφαλαίου 2	22
<b><u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3</u></b>	<b>23</b>
Ανάπτυξη Μεθόδου HPLC-ESI-MS/MS σε Συνδυασμό με Σάρωση Πρόδρομων Ιόντων (Precursor Ion Scan) για τον Προσδιορισμό Νέων Μορφών Οξο- και Θειο-Αρσενοσακχάρων σε Βιολογικά Δείγματα	23
3.1. Βιβλιογραφική Ανασκόπηση – Σκοπός	23
3.2. Πειραματικό Μέρος	28
3.2.1. Υγρή Χρωματογραφία HPLC σε Συνδυασμό με την Τεχνική ESI-MS/MS και τη Μέθοδο Σάρωσης Πρόδρομων Ιόντων (Precursor Ion Scan) για την Ανίχνευση Καινούριων Οξο- και Θειο- Αρσενοσακχάρων	28
3.2.2. Χημικά Αντιδραστήρια	29
3.2.3. Δείγματα	29

3.3. Αποτελέσματα	32
3.3.1. Ανάπτυξη Μεθόδου HPLC-ESI-MS/MS με Σάρωση Πρόδρομων Ιόντων για την Ανίχνευση Καινούριων Ενώσεων Οξο- και Θειο-Αρσενοσακχάρων	32
3.3.2. Όρια Ανίχνευσης της Μεθόδου HPLC-ESI-MS/MS - Σάρωση Πρόδρομων Ιόντων για τα Οξο- και Θειο- Αρσενοσάκχαρα	39
3.3.3. Εφαρμογή της Μεθόδου HPLC-ESI-MS/MS - Σάρωση Πρόδρομων Ιόντων για την Ανάλυση Βιολογικών Δειγμάτων	40
3.4. Συμπεράσματα	47
Βιβλιογραφία Κεφαλαίου 3	49
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4</b>	<b>50</b>
Σύνθεση Πρότυπων Ενώσεων Αρσενικού – Σεληνίου (As-Se) και Ανίχνευση και Ταυτοποίηση των ενώσεων αυτών με τις Μεθόδους HPLC-ESI-MS/MS-SRM και HPLC-ICP-MS	50
4.1. Βιβλιογραφική Ανασκόπηση – Σκοπός	50
4.2. Πειραματικό Μέρος	56
4.2.1. Φασματομετρία Μάζας Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος (ICP-MS) σε Συνδυασμό με Υγρή Χρωματογραφία HPLC	56
4.2.2. Διαδοχική Φασματομετρία Μάζας Ιονισμού μέσω Ηλεκτροψεκασμού (ESI-MS/MS) σε Συνδυασμό με Υγρή Χρωματογραφία HPLC	57
4.2.3. Χημικά Αντιδραστήρια	58
4.2.4. Σύνθεση των Πρότυπων Ενώσεων As-Se	59
4.3. Αποτελέσματα	61
4.3.1. Ανάπτυξη Μεθόδου HPLC-ICP-MS για την Ανίχνευση των, Πιθανά Σχηματιζόμενων, Ενώσεων As-Se	61
4.3.2. Ανάπτυξη Μεθόδου HPLC-ESI-MS/MS για την Ανίχνευση των, Πιθανά Σχηματιζόμενων, Ενώσεων As-Se	67
4.3.3. Εφαρμογή της Μεθόδου HPLC-ICP-MS για τη Διερεύνηση Σχηματισμού Ενώσεων As-Se σε Δείγματα Ανθρώπινων Ούρων	81
4.4. Συμπεράσματα	84
Βιβλιογραφία Κεφαλαίου 4	86

<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5</b>	<b>88</b>
Σύνθεση Πρότυπων Ενώσεων Αρσενικού-Γλουταθειόνης (As-GSH),	88
Προσδιορισμός τους με τις Μεθόδους HPLC-ESI-MS/MS-SRM και HPLC- ICP-MS και Μελέτη του Ρόλου τους στο Μεταβολισμό του Αρσενικού	
5.1. Βιβλιογραφική Ανασκόπηση – Σκοπός	88
5.2. Πειραματικό Μέρος	100
5.2.1. Διαδοχική Φασματομετρία Μάζας Ιονισμού μέσω Ηλεκτροψεκασμού (ESI-MS/MS) σε Συνδυασμό με Υγρή Χρωματογραφία HPLC	100
5.2.2. Φασματομετρία Μάζας Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος (ICP-MS) σε Συνδυασμό με Υγρή Χρωματογραφία HPLC	101
5.2.3. Χημικά Αντιδραστήρια	102
5.2.4. Σύνθεση Πρότυπων Ενώσεων των Συμπλόκων As-GSH	102
5.2.5. Μεθυλίωση των $iAs^{III}$ από την $CH_3B_{12}$ παρουσία GSH	104
5.3. Αποτελέσματα	105
5.3.1. Ανάπτυξη Μεθόδου HPLC-ESI-MS/MS-SRM για την Ανίχνευση των Συμπλόκων As-GSH	105
5.3.2. Ανάπτυξη Μεθόδου HPLC-ICP-MS για την Ανίχνευση και το Χαρακτηρισμό των Συμπλόκων As-GSH	124
5.3.3. Όρια Ανίχνευσης των Μεθόδων HPLC-ESI-MS/MS-SRM και HPLC-ICP-MS για τα Σύμπλοκα As-GSH	126
5.3.4. Εφαρμογή των Μεθόδων HPLC-ESI-MS/MS-SRM και HPLC-ICP-MS για τη Μελέτη της Αντίδρασης Μεθυλίωσης των $iAs^{III}$ από την $CH_3B_{12}$ Παρουσία GSH	127
5.3.5. Επίδραση των Συγκεντρώσεων του As και της GSH στο Σχηματισμό Συμπλόκων $As^{III}$ -GSH κατά την Αντίδραση Μεθυλίωσης των $iAs^{III}$ από τη $CH_3B_{12}$	132
5.3.6. Μελέτη της Κινητικής της Αντίδρασης Μεθυλίωσης των $iAs^{III}$ από την $CH_3B_{12}$	134
5.4. Συμπεράσματα	141
Βιβλιογραφία Κεφαλαίου 5	143

<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6</b>	<b>145</b>
<b>Εφαρμογή Μεθόδων Υγρής Χρωματογραφίας σε Συνδυασμό με</b>	<b>145</b>
<b>Φασματομετρία Μάζας για την Ανίχνευση και τον Χαρακτηρισμό Ενώσεων</b>	
<b>τύπου Θειο-Αρσενοσακχάρων σε Βιολογικά Δείγματα από Γλυκά Νερά</b>	
<b>6.1. Βιβλιογραφική Ανασκόπηση – Σκοπός</b>	<b>145</b>
<b>6.2. Πειραματικό Μέρος</b>	<b>152</b>
6.2.1. Φασματομετρία Μάζας Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος	152
(ICP-MS) σε Συνδυασμό με Υγρή Χρωματογραφία HPLC	
6.2.2. Υγρή Χρωματογραφία HPLC σε Συνδυασμό με Διαδοχική	153
Φασματομετρία Μάζας Ιονισμού μέσω Ηλεκτροψεκασμού (ESI-MS/MS)	
και τη Μέθοδο Παρακολούθησης Επεγμένων Αντιδράσεων (SRM)	
6.2.3. Χημικά Αντιδραστήρια	154
6.2.4. Δείγματα	155
<b>6.3. Αποτελέσματα</b>	<b>157</b>
<b>6.4. Συμπεράσματα</b>	<b>170</b>
<b>Βιβλιογραφία Κεφαλαίου 6</b>	<b>172</b>

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1**

### **ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ**

#### **1.1. Το Αρσενικό στο Περιβάλλον**

Το αρσενικό (As), ένα μεταλλοειδές ευρέως διαδεδομένο στην φύση,<sup>1</sup> ανήκει στη 15<sup>η</sup> ομάδα και 4<sup>η</sup> περίοδο του περιοδικού πίνακα και συναντάται στις οξειδωτικές καταστάσεις +3, +5 και -3.<sup>2</sup> Πρόκειται για μονοϊσοτοπικό στοιχείο, με σχετική ατομική μάζα ίση με 74.923 ατομικές μονάδες μάζας (amu) και ατομικό αριθμό 33 (1s<sup>2</sup>, 2s<sup>2</sup>, 2p<sup>6</sup>, 3s<sup>2</sup>, 3p<sup>6</sup>, 3d<sup>10</sup>, 4s<sup>2</sup>, 4p<sup>3</sup>), που συναντάται σε ζωντανούς οργανισμούς, στην ατμόσφαιρα, στο νερό και σε γεωλογικούς σχηματισμούς. Το σημαντικότερο ορυκτό του αρσενικού είναι ο αρσеноπυρίτης (FeAsS).<sup>3</sup> Η ύπαρξη του αρσενικού στο περιβάλλον, οφείλεται, τόσο σε φυσικές πηγές, όπως η ηφαιστειακή δραστηριότητα και η αποσάθρωση των πετρωμάτων,<sup>2</sup> όσο και σε ανθρωπογενείς δραστηριότητες, όπως η μεταλλουργία, η καύση ορυκτών καυσίμων και η χρήση εντομοκτόνων και συντηρητικών ξύλου, που περιέχουν ενώσεις του στοιχείου.<sup>4,1</sup> Η αναλογία φυσικές/ ανθρωπογενείς πηγές, είναι 60/40.<sup>2</sup>

Το αρσενικό συναντάται στα πετρώματα (2-3 mg/kg),<sup>2</sup> η αποσάθρωση των οποίων οδηγεί στο σχηματισμό των οξο-ανιόντων AsO<sub>3</sub><sup>3-</sup> (αρσενικόδη) και AsO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (αρσενικικά), που κυριαρχούν στα φυσικά νερά.<sup>5</sup> Τα είδη αυτά μεθυλιώνονται στο θαλάσσιο νερό, οπότε προκύπτουν τα παράγωγα μονομεθυλαρσενικό οξύ (MMA<sup>V</sup>) και διμεθυλαρσενικό οξύ (DMA<sup>V</sup>),<sup>6</sup> που φαίνονται στο Σχήμα 1.1.

Σε ορισμένες περιοχές του πλανήτη (Μπαγκλαντές, Ταϊβάν) έχουν ανιχνευτεί ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις ανόργανου αρσενικού στο πόσιμο νερό, γεγονός που αποτελεί απειλή για εκατομμύρια ανθρώπους, αφού οι ανόργανες μορφές του στοιχείου θεωρούνται υπεύθυνες για καρκινογένεση. Η μέγιστη επιτρεπόμενη συγκέντρωση αρσενικού στο πόσιμο νερό, σύμφωνα με τη νομοθεσία που ψηφίστηκε το 2001 από την Υπηρεσία Προστασίας Περιβάλλοντος των ΗΠΑ (US EPA), είναι 10 μg/L.<sup>7</sup>

Από την άλλη, σε πολλούς οργανισμούς, συναντώνται μια σειρά από οργανοαρσενικά παράγωγα. Επειδή πολλοί από τους οργανισμούς αυτούς (ψάρια, οστρακοειδή), αποτελούν ανθρώπινες τροφές, υπάρχει έντονο και συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον, σχετικά με το περιεχόμενό τους σε αρσενικό. Μεταξύ των οργανισμών που ζούν στο θαλάσσιο περιβάλλον, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα φύκη, τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως (Αμερική, Ιαπωνία) σαν

συμπληρώματα διατροφής, εξαιτίας των ιχνοστοιχείων που περιέχουν. Οι συγκεκριμένοι οργανισμοί προσλαμβάνουν τα ανόργανα αρσενικά ( $iAs^V$ ) από το θαλάσσιο νερό, λόγω των δομικών ιδιοτήτων που παρουσιάζουν οι ενώσεις αυτές με τα φωσφορικά, τα οποία αποτελούν θρεπτικά συστατικά για τους οργανισμούς. Στην προσπάθειά τους για αποτοξίνωση, τα φύκη μετατρέπουν τα τοξικά είδη σε αρσενοσάκχαρα (arsenosugars, ενώσεις αρσενικού οι οποίες περιέχουν στο μόριο τους ένα ριβοζικό δακτύλιο), και σε άλλες οργανικές ενώσεις απλούστερης δομής. Τα οξο-αρσενοσάκχαρα (oxo-arsenosugars), με δομή που φαίνεται στο Σχήμα 1.1, εκτός από τα φύκη, έχουν ανιχνευτεί και σε διάφορα οστρακοειδή, όπως μύδια και κυδώνια, τα οποία τρέφονται με φύκη.<sup>5</sup> Οι σημαντικότερες ενώσεις της κατηγορίας είναι τα παράγωγα DMAsSugar-Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate (Σχήμα 1.1). Στα ψάρια, καθώς επίσης και σε θαλάσσια ζώα, όπως ο αστακός, η κυριότερη ένωση αρσενικού είναι το αρσενοβητάνιο (arsenobetaine, AsB, Σχήμα 1.1), το οποίο εκκρίνεται αμετάβλητο στα ανθρώπινα ούρα και έχει μηδενική τοξικότητα.<sup>8</sup>

Το 2004 ανιχνεύτηκαν τα πρώτα παράγωγα μιας καινούριας κατηγορίας ενώσεων, γνωστής με την ονομασία θειο-αρσενοσάκχαρα (thio-arsenosugars),<sup>9,10</sup> τα οποία, όπως φαίνεται στο Σχήμα 1.1, είναι διμεθυλιωμένα αρσενοσάκχαρα, όπου το αρσενικό, αντί για άτομο οξυγόνου, συνδέεται με άτομο θείου. Τα δύο πρώτα παράγωγα που ταυτοποιήθηκαν ήταν τα DMThioAsSugar-Glycol και -Phosphate, ενώ, σε μετέπειτα μελέτες, μερικές εκ των οποίων πραγματοποιήθηκαν από την ομάδα μας, ανιχνεύτηκαν επιπλέον ενώσεις της κατηγορίας.<sup>11,12,13</sup> Τα τέσσερα θειο-αρσενοσάκχαρα που συναντώνται συχνότερα στο περιβάλλον είναι τα DMThioAsSugar-Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate (Σχήμα 1.1).

Τέλος, κάποιες από τις σημαντικότερες ενώσεις αρσενικού, οι οποίες έχουν ανιχνευτεί σε θαλάσσιους οργανισμούς, είναι και οι ακόλουθες: τετραμεθυλαρσενικό ιόν (TMA), οξειδιο της τριμέθυλαρσίνης (TMAO), αρσενοχολίνη (AsC), αρσενοβητάνιο-2 (AsB-2), καθώς και τριμεθυλιωμένα αρσενοσάκχαρα (Σχήμα 1.1).

Ενώ, όμως, μέχρι σήμερα, έχει δημοσιευτεί ένας σημαντικός αριθμός εργασιών, σχετικά με την ειδοταυτοποίηση του αρσενικού σε οργανισμούς από το θαλάσσιο περιβάλλον, ωστόσο, οι αντίστοιχες μελέτες που αφορούν οργανισμούς γλυκών νερών, είναι εξαιρετικά περιορισμένες. Οι συγκεντρώσεις του στοιχείου στα γλυκά νερά είναι χαμηλότερες σε σχέση με τις συγκεντρώσεις στο θαλάσσιο περιβάλλον, ενώ, όσον αφορά τα είδη που συναντώνται στα δύο περιβάλλοντα, η

κυριότερη διαφορά εντοπίζεται στο αρσενοβητάνιο. Το τελευταίο, ενώ αποτελεί το κυριότερο παράγωγο αρσενικού στα θαλάσσια ζώα, αντίθετα στα ζώα του γλυκού νερού συναντάται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις και μερικές φορές απουσιάζει εντελώς. Μεταξύ των οργανισμών που ζούν σε γλυκά νερά, ιδιαίτερη θέση κατέχουν τα μύδια και τα σαλιγκάρια, λόγω της χρήσης τους από τον άνθρωπο ως προϊόντα διατροφής, αλλά και λόγω του ότι έχουν την τάση να συσσωρεύουν μέταλλα (όπως αρσενικό) στους μαλακούς ιστούς τους, αποτελώντας με τον τρόπο αυτό δείκτες περιβαλλοντικής ρύπανσης.<sup>14,15</sup>

Στα μύδια του γλυκού νερού, εκτός από ανόργανο αρσενικό, έχουν ανιχνευτεί οι ενώσεις AsB, DMA<sup>V</sup>, καθώς και οξο-αρσενοσάκχαρα, ενώ σε πρόσφατη μελέτη ανιχνεύτηκαν, για πρώτη φορά, τα δύο θειο-αρσενοσάκχαρα DMThioAsSugar-Glycol και -Phosphate.<sup>16</sup> Η συγκεκριμένη, είναι και η πρώτη μελέτη, στην οποία αναφέρεται ύπαρξη ενώσεων αρσενικού – θείου (As-S) σε δείγματα γλυκού νερού, ενώ, μέχρι σήμερα, έχει αναφερθεί μια ακόμα μελέτη για την ύπαρξη τέτοιων ενώσεων σε αντίστοιχα δείγματα.<sup>17</sup>

Είναι γνωστό ότι η χρόνια έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις ανόργανου αρσενικού, προκαλεί αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου, προσβάλλοντας το γαστρεντερικό, το καρδιαγγειακό, το αναπνευστικό, το αιματοποιητικό και το νευρικό σύστημα, αλλά και ζωτικά όργανα, όπως το συκώτι. Σοβαρές ασθένειες του δέρματος έχουν επίσης αναφερθεί, με κυριότερη το μελάνωμα, ενώ άλλες επιπτώσεις της χρόνιας δηλητηρίασης από το αρσενικό (αρσενίκωση), είναι ο καρκίνος των πνευμόνων και της ουροδόχου κύστης.<sup>18</sup> Ο μηχανισμός τοξικότητας διαφέρει, ανάλογα με την οξειδωτική κατάσταση του στοιχείου, ενώ η σύγκριση της τοξικότητας των τρισθενών και πεντασθενών ενώσεων αποτελεί πολύπλοκο ζήτημα, αφού, στον οργανισμό, τα τρισθενή είδη μετατρέπονται σε πεντασθενή και αντίστροφα. Παράλληλα, στον οργανισμό, λαμβάνει χώρα μεθυλίωση του ανόργανου αρσενικού προς σχηματισμό των παραγώγων MMA<sup>V</sup> και DMA<sup>V</sup>.<sup>19,20</sup>

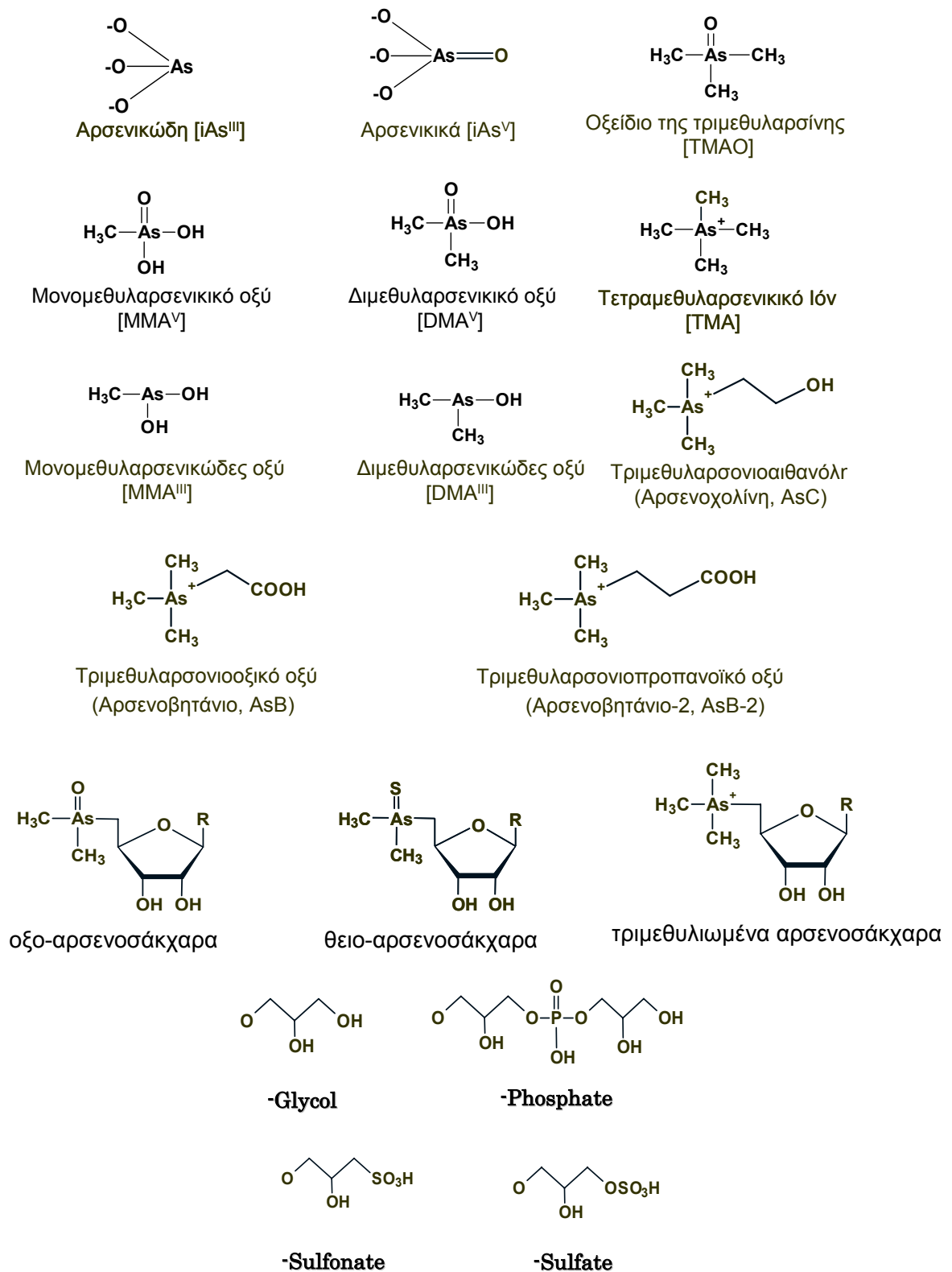
Ο ακριβής μηχανισμός μεθυλίωσης του αρσενικού δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί πλήρως, ωστόσο οι επικρατέστερες θεωρίες είναι αυτή των Cullen et al,<sup>21</sup> που είναι αποδεκτή από την πλειοψηφία των ερευνητών, και η πιο πρόσφατη, των Hayakawa et al.<sup>22</sup> Σύμφωνα με τον πρώτο και επικρατέστερο μηχανισμό των Cullen et al, τα iAs<sup>V</sup> αρχικά ανάγονται σε iAs<sup>III</sup> (μέσω πρόσληψης ενός ζεύγους ηλεκτρονίων) και, στη συνέχεια, τα τελευταία οξειδώνονται, μέσω προσθήκης μιας μεθυλομάδας. Σαν δότης μεθυλομάδας δρα η ένωση S-αδενοσυλομεθειονίνη (SAM)

και σαν αναγωγικό μέσο η γλουταθειόνη (GSH). Τα μεθυλιωμένα παράγωγα που σχηματίζονται, σύμφωνα με το μεταβολισμό αυτό, είναι τα MMA<sup>V</sup> και DMA<sup>V</sup> (ενδιάμεσα προϊόντα) καθώς και οι αντίστοιχοι τρισθενείς μεταβολίτες MMA<sup>III</sup> και DMA<sup>III</sup> (τελικά προϊόντα, Σχήμα 1.1). Σύμφωνα με το μηχανισμό των Hayakawa et al, αρχικά λαμβάνει χώρα ο σχηματισμός συμπλόκων αρσενικού - γλουταθειόνης (As<sup>III</sup>-GSH), τα οποία, έπειτα από μεθυλίωση, μέσω της SAM, οδηγούν στο σχηματισμό των ενώσεων MMA<sup>III</sup> και DMA<sup>III</sup>. Οι τελευταίες οξειδώνονται και οδηγούν στα τελικά προϊόντα MMA<sup>V</sup> και DMA<sup>V</sup>. Τα σύμπλοκα As<sup>III</sup>-GSH φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη μεθυλίωση του ανόργανου αρσενικού, ενώ τα MMA<sup>V</sup> και DMA<sup>V</sup> είναι οι τελικοί μεταβολίτες του στοιχείου, γεγονός που συμφωνεί με τις πειραματικές μετρήσεις σε ανθρώπινα ούρα, όπου τα δύο αυτά είδη κυριαρχούν.

Εκτός από την SAM, ένα άλλο πιθανό μέσο μεθυλίωσης του ανόργανου αρσενικού είναι η μεθυλοκοβαλαμίνη (CH<sub>3</sub>B<sub>12</sub>), μια μορφή της βιταμίνης B<sub>12</sub>. Η μεθυλίωση του αρσενικού από την CH<sub>3</sub>B<sub>12</sub>, παρουσία GSH, έχει μελετηθεί στο παρελθόν, με τα MMA<sup>V</sup> και DMA<sup>V</sup> να αναφέρονται ως τα κατεξοχήν προϊόντα.<sup>23,24</sup>

Ο μεταβολισμός του αρσενικού εξαρτάται και από τις αλληλεπιδράσεις του με άλλα στοιχεία, όπως το σελήνιο. Ο ανταγωνισμός των δύο στοιχείων αναφέρθηκε για πρώτη φορά σε μελέτη του 1938,<sup>25</sup> κατά την οποία, το αρσενικό στο πόσιμο νερό προστάτευσε τα πειραματόζωα από θανατηφόρα βλάβη στο συκώτι, που θα προκαλούσε η μεμονωμένη πρόσληψη των υψηλών συγκεντρώσεων σεληνίου. Ακολούθησαν παρόμοιες μελέτες,<sup>26,27,28</sup> οι οποίες οδήγησαν στην εκτίμηση ότι τα δύο στοιχεία αλληλεπιδρούν στο συκώτι, σχηματίζοντας ένα παράγωγο As-Se, το οποίο εκκρίνεται στην χολή. Το 2000, οι Gailer et al κατάφεραν να ανιχνεύσουν *in vivo* και να ταυτοποιήσουν την πρώτη ένωση As-Se, η οποία ήταν το ιόν [(GS)<sub>2</sub>AsSe]<sup>-</sup>.<sup>29</sup> Μέχρι σήμερα, έχει συντεθεί και ταυτοποιηθεί μια ακόμα ένωση As-Se, το διμέθυλοδιοσεληνοαρσενικό ιόν [(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>As(Se)<sub>2</sub>].<sup>30</sup> Επίσης, το σελήνιο έχει παρόμοια χημική συμπεριφορά με το θείο, συνεπώς, αντίστοιχα με τις ενώσεις As-S, που συναντώνται στο περιβάλλον, είναι δυνατή η ύπαρξη ενώσεων As-Se.





Σχήμα 1.1. Δομές ενώσεων αρσενικού στο περιβάλλον.

## 1.2. ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΙΔΟΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΑΡΣΕΝΙΚΟΥ

Η ανίχνευση και ο χαρακτηρισμός του μεγάλου αριθμού ενώσεων αρσενικού που συναντώνται στο περιβάλλον, έχει βασιστεί σε διάφορες αναλυτικές μεθόδους, όπως φασματομετρία ατομικής εκπομπής και απορρόφησης (AES και AAS, αντίστοιχα), σε συνδυασμό με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), για το διαχωρισμό των επιμέρους ενώσεων.<sup>31,32,33</sup> Οι παραπάνω τεχνικές ανίχνευσης παρουσιάζουν το μειονέκτημα της χαμηλής ευαισθησίας, με αποτέλεσμα, στις περισσότερες περιπτώσεις, να χαρακτηρίζονται ακατάλληλες για την ανάλυση βιολογικών δειγμάτων, στα οποία τα παράγωγα αρσενικού ενδέχεται να συναντώνται σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις. Επίσης, σε ορισμένες περιπτώσεις, εφαρμόστηκε φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR),<sup>34</sup> ωστόσο, η τεχνική αυτή προϋποθέτει την ανάλυση καθαρών δειγμάτων, απαλλαγμένων από πολύπλοκες μήτρες, με αποτέλεσμα να είναι απαραίτητη η χρονοβόρα κατεργασία του δείγματος και η απομόνωση των εξεταζόμενων ενώσεων. Επίσης, οι απαιτούμενες επεξεργασίες καθαρισμού αυξάνουν την πιθανότητα μεταβολών των ενώσεων αρσενικού.

Η κατάσταση έχει αλλάξει δραματικά από τα μέσα της δεκαετίας του 1980, όταν τα πρώτα όργανα Φασματομετρίας Μάζας Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος (ICP-MS) έγιναν εμπορικά διαθέσιμα και, λίγο αργότερα, χρησιμοποιήθηκαν σε συνδυασμό με συστήματα υγρής χρωματογραφίας. Στις μέρες μας, έχει δημοσιευτεί ένας μεγάλος αριθμός μελετών ειδοταυτοποίησης του αρσενικού, βασισμένες στην τεχνική HPLC-ICP-MS.<sup>35,36,37,38</sup> Η τεχνική αυτή παρέχει ικανοποιητικό διαχωρισμό των εξεταζόμενων ενώσεων και υψηλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα, γεγονός που επιτρέπει την ανάλυση δειγμάτων πολύπλοκης μήτρας, με ελάχιστη προετοιμασία του δείγματος. Στο σημείο αυτό, να επισημανθεί ότι η τεχνική ICP-MS αποτελεί ατομική φασματομετρική μέθοδο ανάλυσης, δηλαδή ανιχνεύει ιόντα ενός συγκεκριμένου ισότοπου, στην περίπτωση μας του <sup>75</sup>As. Για την ταυτοποίηση των ενώσεων αρσενικού με την τεχνική HPLC-ICP-MS, είναι απαραίτητη η ύπαρξη πρότυπων διαλυμάτων των εξεταζόμενων ενώσεων και η ταύτιση των χρόνων έκλουσης του αναλύτη, στα πρότυπα διαλύματα και στα αναλυόμενα δείγματα. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις, ο διαχωρισμός των διαφόρων συστατικών είναι αδύνατος, ενώ, από την άλλη, ενδέχεται να μην υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμες πρότυπες ενώσεις, γεγονός που καθιστά προβληματική την ταυτοποίηση.

Οι παραπάνω περιορισμοί οδήγησαν στην ανάγκη ανάπτυξης μοριακών φασματομετρικών τεχνικών, ικανών να δώσουν πληροφορίες για το μοριακό τύπο και τη δομή της ένωσης. Ειδικότερα, η τεχνική Φασματομετρίας Μάζας Ιονισμού μέσω Ηλεκτροψεκασμού (Electrospray Ionization Mass Spectrometry – ESI-MS) έχει εφαρμοστεί ευρέως στην ειδοταυτοποίηση οργανοαρσενικών ενώσεων τα τελευταία χρόνια.<sup>36,37,39</sup> Τα πλεονεκτήματα της συγκεκριμένης τεχνικής είναι ότι μπορεί να συνδυαστεί με υγρή χρωματογραφία, ενώ διαχειρίζεται μόρια μικρού και μεγάλου μοριακού βάρους και λειτουργεί σε ατμοσφαιρική πίεση και μέτρια θερμοκρασία. Παράλληλα, με την τεχνική αυτή είναι δυνατός ο σχηματισμός πολλαπλά φορτισμένων ιόντων, φαινόμενο πολύ σημαντικό στην ανάλυση πρωτεϊνών και πεπτιδίων. Ο ηλεκτροψεκασμός συνιστά μέθοδο “ήπιου ιονισμού” για ισχυρά πολικές, μη-πτητικές και θερμικά ασταθείς ενώσεις.

### **1.3. ΣΗΜΑΝΤΙΚΑ ΕΡΩΤΗΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΟ ΑΡΣΕΝΙΚΟ - ΒΕΛΤΙΩΜΕΝΕΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΙΔΟΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ - ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ**

Το αρσενικό αποτελεί ένα στοιχείο το οποίο, λόγω των αρνητικών επιπτώσεων που προκαλεί η χρόνια έκθεση σε αυτό, έχει απασχολήσει έντονα την επιστημονική κοινότητα και έχουν πραγματοποιηθεί πολυάριθμες μελέτες προσδιορισμού του στο περιβάλλον. Ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια, έχει παρατηρηθεί σημαντική πρόοδος στον τομέα της ειδοταυτοποίησης του αρσενικού, με μια σειρά από καινούριες ενώσεις να έχουν ανιχνευτεί και ταυτοποιηθεί σε μεγάλο αριθμό βιολογικών δειγμάτων. Ωστόσο, παρά το μεγάλο όγκο πληροφοριών που έχουν δημοσιευτεί για το στοιχείο αυτό, εξακολουθούν να υφίστανται κρίσιμα και αδιευκρίνιστα ερωτήματα, που αφορούν τη χημεία και τον κύκλο του στο περιβάλλον, ερωτήματα τα οποία χρήζουν αποσαφήνισης. Επιπλέον, λόγω της άμεσης συσχέτισης πολλών ενώσεων αρσενικού με την ανθρώπινη υγεία και τις επιπτώσεις που προκαλούν σε αυτή, κρίνεται επιτακτική η ανάγκη παρουσίασης ακριβών και αξιόπιστων αποτελεσμάτων.

Ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα που καλούνται να αντιμετωπίσουν οι ερευνητές, σχετίζεται με την ύπαρξη ελάχιστων, εμπορικά διαθέσιμων, πιστοποιημένων πρότυπων ενώσεων του στοιχείου, γεγονός που συχνά οδηγεί σε αδιέξοδο τις αναλύσεις ποσοτικοποίησης και ειδοταυτοποίησης. Σε πολλές περιπτώσεις, το παραπάνω πρόβλημα αντιμετωπίζεται με τη σύνθεση πρότυπων

ενώσεων στο εργαστήριο ή με την απομόνωση κλασμάτων, που περιέχουν τις εξεταζόμενες ενώσεις, από πραγματικά δείγματα, και στη συνέχεια την προσυγκέντρωση των κλασμάτων στις ενώσεις αυτές. Ο χαρακτηρισμός των πρότυπων αυτών, συνήθως, πραγματοποιείται με μοριακές φασματομετρικές τεχνικές. Βέβαια, αξίζει να σημειωθεί ότι, με τη χρήση τέτοιου είδους προτύπων, είναι δυνατός μόνο ο ποιοτικός χαρακτηρισμός των ενώσεων και όχι η ποσοτικοποίηση τους. Η ποσοτικοποίησή μιας ένωσης είναι σημαντική, προκειμένου να εκτιμηθεί με σαφήνεια ο κίνδυνος, που επιφυλλάσσει για τον άνθρωπο, η έκθεση στο αρσενικό (risk assessment). Από την άλλη, πολλές ενώσεις αρσενικού συναντώνται σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις στο περιβάλλον, με αποτέλεσμα, η ανάγκη ύπαρξης ευαίσθητων και εκλεκτικών αναλυτικών τεχνικών, να καθίσταται πιο επιτακτική από ποτέ.

Άλλοι καθοριστικοί παράγοντες, που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά τη μελέτη του αρσενικού και των ενώσεων του, είναι η σταθερότητα των ειδών, τόσο κατά τη δειγματοληψία, όσο και κατά την αποθήκευση και την επεξεργασία του δείγματος, η απόδοση της εκχύλισης, η χρωματογραφική ανάκτηση και, τέλος, οι παρεμποδίσεις από τα συστατικά της μήτρας του δείγματος. Η λανθασμένη εκτίμηση ή η παράβλεψη κάποιου από τους παραπάνω παράγοντες, είναι δυνατόν να οδηγήσει σε αναξιόπιστα και ανακριβή αποτελέσματα, γεγονός που συνεπάγεται μεγάλη αβεβαιότητα στις μελέτες αποτίμησης της έκθεσης του ανθρώπου (exposure assessment) στο αρσενικό.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ανίχνευση, τα τελευταία χρόνια, θειο-αρσενικών ενώσεων, οι οποίες αναφέρθηκαν για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία το 2004. Η καθυστέρηση στην ανίχνευσή τους, οφείλεται, σε μεγάλο ποσοστό, στην οξείδωση των ειδών, κατά την εκχύλισή και αποθήκευσή τους ή στην αδυναμία έκλουσής τους από τη στήλη, με τις χρησιμοποιούμενες χρωματογραφικές μεθόδους. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι προσπάθειες ανίχνευσης και ταυτοποίησης καινούριων ειδών αρσενικού, τα οποία, πιθανόν, να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη βιοχημεία του στοιχείου και στον γεωχημικό του κύκλο. Ένα πολύ σημαντικό εργαλείο για την ταυτοποίηση καινούριων ειδών αρσενικού, σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε βιολογικά δείγματα, είναι η τεχνική HPLC-ICP-MS. Ωστόσο, λόγω της αδυναμίας χαρακτηρισμού άγνωστων ενώσεων με τη συγκεκριμένη τεχνική, οι ερευνητές στρέφονται στη μοριακή φασματομετρία μάζας, η οποία, παρέχοντας δομικές πληροφορίες για τις εξεταζόμενες ενώσεις, συμβάλλει ουσιαστικά στην ταυτοποίησή τους.

Λαμβάνοντας υπόψη όλα όσα προαναφέρθηκαν σχετικά με την ύπαρξη του αρσενικού στο περιβάλλον και τα προβλήματα που προκύπτουν κατά τη μελέτη του στοιχείου αυτού, καταλήγουμε στο *σκοπό της παρούσας διατριβής, που ήταν η ανάπτυξη ευαίσθητων και εκλεκτικών μεθόδων, ικανών να ανιχνεύσουν και να ταυτοποιήσουν γνωστές, αλλά και καινούριες ενώσεις αρσενικού, ακόμα και αν αυτές συναντώνται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις στα αναλυόμενα βιολογικά δείγματα. Επίσης, μελετήθηκε in vitro ο μεταβολισμός του ανόργανου αρσενικού και έγιναν προσπάθειες ταυτοποίησης των τελικών μεταβολιτών.* Οι διαρκώς αναπτυσσόμενες τεχνικές φασματομετρίας μάζας, με πρωτοπόρες τις μεθόδους ICP-MS και ESI-MS, σε συνδυασμό με υγρή χρωματογραφία HPLC, είναι δυνατόν να δώσουν λύσεις σε πολλά από τα προαναφερόμενα προβλήματα και να συμβάλλουν στην πληρέστερη κατανόηση της χημείας και του μεταβολισμού του αρσενικού. Έμφαση δόθηκε στην αξιοπιστία και στην ευαισθησία των μεθόδων αυτών, καθώς και στις διαδικασίες που εφαρμόζονται, τόσο κατά τη δειγματοληψία, όσο και κατά την ανάλυση, έτσι ώστε να διασφαλιστεί η σταθερότητα των ειδών, η αποδοτική εκχύλιση και η έκλουση των ενώσεων από τη στήλη. Σε όλες τις περιπτώσεις, η ταυτοποίηση των ενώσεων βασίστηκε σε συντιθέμενα στο εργαστήριο πρότυπα διαλύματα, των οποίων το περιεχόμενο χαρακτηρίστηκε με την τεχνική HPLC-ESI-MS/MS.

**ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ 1**

- <sup>1</sup> B. K. Mandal and K. T. Suzuki, *Talanta*, 2002, **58**, 201.
- <sup>2</sup> W. R. Cullen and K. J. Reimer, *Chem. Rev.*, 1989, **89**, 713.
- <sup>3</sup> H. Onishi, in *Handbook of Geochemistry*, Vol II-2, ed. K. H. Wedepohl, Springer-Verlag, New York, 1969, pp. 33.
- <sup>4</sup> E. Merian, *Toxicological and Environmental Chemistry*, 1984, **8**, 9.
- <sup>5</sup> K. A. Francesconi, *Environ. Chem.*, 2005, **2**, 141.
- <sup>6</sup> M. O. Andreae, *Deep Sea Res.*, 1978, **25**, 391.
- <sup>7</sup> EPA, *Exposure and Health Effects*, Health and Ecological Criteria Division, Washington, 2001.
- <sup>8</sup> T. Kaise, S. Watanabe and K. Itoh, *Chemosphere*, 1985, **14**, 1327.
- <sup>9</sup> E. Schmeisser, R. Raml, K. A. Francesconi, D. Kuehnelt, A. Lindberg, C. Söeröes and W. Goessler, *Chem. Commun.*, 2004, 1824.
- <sup>10</sup> M. W. Fricke, P. A. Creed, A. N. Parks, J. A. Shoemaker, C. A. Schwegel and J. T. Creed, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, **19**, 1454.
- <sup>11</sup> V. Nischwitz, K. Kanaki and S. A. Pergantis, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2006, **21**, 33.
- <sup>12</sup> M. Kahn, R. Raml, E. Schmeisser, B. Vallant, K. A. Francesconi and W. Goessler, *Environ. Chem.*, 2005, **2**, 171.
- <sup>13</sup> V. Nischwitz and S. A. Pergantis, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2006, **20**, 3579.
- <sup>14</sup> C. Gundacker, *Environ. Pollut.*, 2000, **110**, 61.
- <sup>15</sup> R. Dallinger and W. Wiesser, *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 1984, **79**, 117.
- <sup>16</sup> C. Söeröes, W. Goessler, K. A. Francesconi, E. Schmeisser, R. Raml, N. Kienzl, M. Kahn, P. Fodor and D. Kuehnelt, *J. Environ. Monit.*, 2005, **7**, 688.
- <sup>17</sup> R. Schaeffer, K. A. Francesconi, N. Kienzl, C. Söeröes, P. Fodor, L. Varadi, R. Raml, W. Goessler and D. Kuehnelt, *Talanta*, 2006, **69**, 856.
- <sup>18</sup> C. H. Tseng, *J. Environ. Sci. Health C. Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.*, 2005, **23**, 55.
- <sup>19</sup> K. T. Suzuki, B. K. Mandal, A. Katagiri, Y. Sakuma, A. Kawakami, Y. Ogra, K. Yamaguchi, Y. Sei, K. Yamanaka, K. Anzai, M. Ohmichi, H. Takayama and N. Aimi, *Chem. Res. Toxicol.*, 2004, **17**, 914.
- <sup>20</sup> X. C. Le, X. Lu, M. Ma, W. R. Cullen, H. V. Aposhian and B. Zheng, *Anal. Chem.*, 2000, **72**, 5172.
- <sup>21</sup> W. R. Cullen, B. C. McBride and J. Reglinski, *J. Inorg. Biochem.*, 1984, **21**, 179.
- <sup>22</sup> T. Hayakawa, Y. Kobayashi, X. Cui and S. A. Hirano, *Arch. Toxicol.*, 2005, **79**, 183.
- <sup>23</sup> R. A. Zakharyan and H. V. Aposhian, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1999, **154**, 287.
- <sup>24</sup> S. A. Pergantis, M. Miguens-Rodriguez, N. P. Vela and D. T. Heitkemper, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, **19**, 178.

- 
- <sup>25</sup> A. L. Moxon, *Science*, 1938, **88**, 81.
- <sup>26</sup> O. A. Levander and C. A. Baumann, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1966, **9**, 98.
- <sup>27</sup> O. A. Levander and C. A. Baumann, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1966, **9**, 106.
- <sup>28</sup> H. S. Hsieh and H. E. Ganther, *Biochemistry*, 1975, **14**, 1632.
- <sup>29</sup> J. Gailer, G. N. George, I. J. Pickering, R. C. Prince, S. C. Ringwald, J. E. Pemberton, R. S. Glass, H. S. Younis, D. W. DeYoung and H. V. Aposhian, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 4637.
- <sup>30</sup> J. Gailer, G. N. George, H. H. Harris, I. J. Pickering, R. C. Prince, A. Somogyi, G. A. Buttigieg, R. S. Glass and M. B. Denton, *Inorg. Chem.*, 2002, **41**, 5426.
- <sup>31</sup> K. A. Francesconi and D. Kuehnelt, *Analyst*, 2004, **129**, 373.
- <sup>32</sup> S. Karthikeyan and S. Hirata, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003, **375**, 139.
- <sup>33</sup> P. Carrero, A. Malave, J. L. Burguera, M. Burguera and C. Rondon, *Anal. Chim. Acta*, 2001, **438**, 195.
- <sup>34</sup> K. A. Francesconi, J. S. Edmonds, R. V. Stick, B. W. Skelton and A. H. White, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1991, **1**, 2707.
- <sup>35</sup> S. Wangkarn and S. A. Pergantis, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2000, **15**, 627.
- <sup>36</sup> A. D. Madsen, W. Goessler, S. N. Pedersen and K. A. Francesconi, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2000, **15**, 657.
- <sup>37</sup> S. McSheehy, J. Szpunar, R. Lobinski, V. Haldys, J. Tortajada and J. S. Edmonds, *Anal. Chem.*, 2002, **74**, 2370.
- <sup>38</sup> V. W. Lai, A. S. Beach, W. R. Cullen, S. Ray and K. J. Reimer, *Appl. Organomet. Chem.*, 2002, **16**, 458.
- <sup>39</sup> M. Van Hulle, C. Zhang, X. R. Zhang and R. Cornelis, *Analyst*, 2002, **127**, 634.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

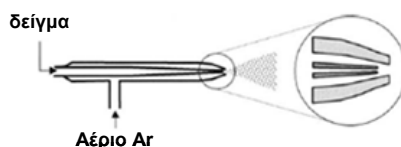
#### 2.1. ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ ΕΠΑΓΩΓΙΚΑ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ (INDUCTIVELY COUPLED PLASMA MASS SPECTROMETRY – ICP-MS)

Η τεχνική της Φασματομετρίας Μάζας Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος (ICP-MS) χαρακτηρίζεται από ευρεία δυναμική περιοχή (εφαρμόζεται δηλαδή για αναλύσεις σε μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων),<sup>1</sup> μικρούς χρόνους ανάλυσης, χαμηλά όρια ανίχνευσης και δυνατότητες πολυστοιχειακής ανάλυσης και μέτρησης ισοτοπικών λόγων.<sup>1</sup> Στα “αδύναμα σημεία” της συγκαταλέγονται οι φασματοσκοπικές παρεμποδίσεις, το ποσοστό των διαλυτών στερεών στο δείγμα (πρέπει να είναι μικρότερο από 0.2%) και ο περιορισμός προσδιορισμού πολύ υψηλών συγκεντρώσεων (μεγαλύτερων από μερικές εκατοντάδες mg/L).<sup>2</sup>

#### *Αρχές Λειτουργίας Της Τεχνικής ICP-MS*

Το πλάσμα (ιόντα, ηλεκτρόνια και ουδέτερα μόρια), σχηματίζεται από αέριο αργό (Ar) και ευθύνεται για την ατομοποίηση και τον ιονισμό του αναλύτη. Τα παραγόμενα ιόντα αναλύονται και διαχωρίζονται, με βάση το λόγο μάζα/φορτίο ( $m/z$ ), ενώ η ένταση μιας κορυφής στο φάσμα μάζας είναι ανάλογη με την ποσότητα του ισότοπου στο δείγμα. Η πειραματική διάταξη ICP-MS αποτελείται από το σύστημα εισαγωγής δείγματος (sample introduction system), την πηγή ιόντων (ion source), τον αναλυτή μάζας (mass analyzer) και τον ανιχνευτή (detector).<sup>3</sup>

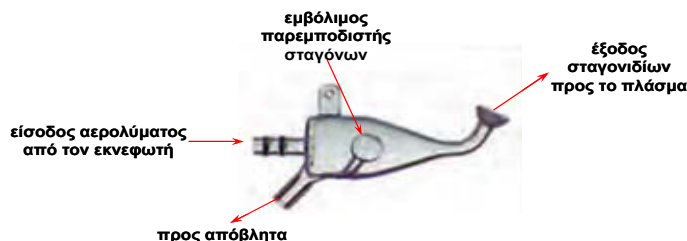
Το δείγμα, σε μορφή διαλύματος, αντλείται σε έναν εκνεφωτή, με την βοήθεια περισταλτικής αντλίας, η οποία εξασφαλίζει σταθερή ταχύτητα ροής. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε ομόκεντρος πνευματικός εκνεφωτής (Σχήμα 2.1), όπου το διάλυμα εισάγεται σε μια περιοχή χαμηλής πίεσης, που δημιουργείται από μια ταχεία ροή αερίου Ar,<sup>4,5</sup> με αποτέλεσμα το σχηματισμό αερολύματος, στο άκρο του εκνεφωτή.



**Σχήμα 2.1.** Ομόκεντρος πνευματικός εκνεφωτής του ICP-MS.

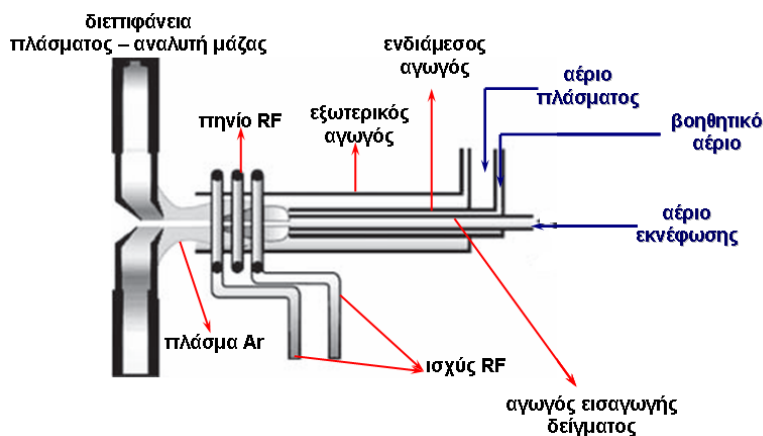


Το αερολύμα οδηγείται στο θάλαμο εκνέφωσης, όπου οι μεγαλύτερες και βαρύτερες σταγόνες απομακρύνονται στα απόβλητα και οι μικρότερες (1-5% του δείγματος) κατευθύνονται στο πλάσμα.<sup>1</sup> Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε κωνικός θάλαμος εκνέφωσης, με εμβόλιμο παρεμποδιστή σφαιρικού σχήματος, με σκοπό τη διάσπαση των μεγαλύτερων σταγόνων του αερολύματος (Σχήμα 2.2).



Σχήμα 2.2. Κωνικός θάλαμος εκνέφωσης του ICP-MS.

Στη συνέχεια, οι μικρότερες σταγόνες οδηγούνται στην πηγή ιονισμού, όπου λαμβάνει χώρα ατομοποίηση και ιονισμός του αναλύτη. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιείται πυρσός επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος, ο οποίος αποτελείται από τρεις ομόκεντρους αγωγούς από χαλαζία. Οι αγωγοί αυτοί είναι γνωστοί ως εξωτερικός, ενδιάμεσος και εισαγωγής δείγματος (Σχήμα 2.3).<sup>6</sup> Μεταξύ εξωτερικού και ενδιάμεσου αγωγού διέρχεται το αέριο πλάσματος (Ar, ~ 12-17 L/min), το οποίο συμβάλλει στη διατήρηση και σταθεροποίηση του πλάσματος και προστατεύει τον πυρσό από την υψηλή θερμοκρασία που αναπτύσσεται στο πλάσμα. Μια δεύτερη ροή αερίου Ar (~ 1 L/min, βοηθητικό αέριο), διέρχεται μεταξύ ενδιάμεσου αγωγού και αγωγού εισαγωγής δείγματος και κατευθύνει το πλάσμα στον πυρσό. Τέλος, το αέριο εκνέφωσης (Ar, ~ 1 L/min) διέρχεται από τον εκνεφωτή, με σκοπό να εισάγει το δείγμα στο κεντρικό τμήμα του πλάσματος.<sup>7</sup>

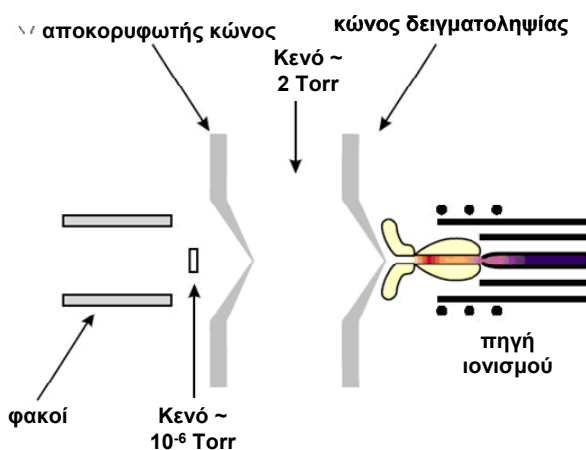


Σχήμα 2.3. Πηγή ιονισμού του ICP-MS.

Μια σπειροειδής ροή αερίου πλάσματος διέρχεται ανάμεσα στον εξωτερικό και τον ενδιάμεσο αγωγό του πυρσού, ενώ το πηνίο ραδιοσυχνοτήτων (RF), που περιβάλλει το άκρο του πυρσού, είναι συνδεδεμένο με μια γεννήτρια RF ισχύος ~ 750-1500 W και συχνότητας 27-40 MHz. Ηλεκτρική εκκένωση στο πηνίο, έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ηλεκτρονίων, τα οποία απομακρύνονται από τα άτομα Ar, με συνέπεια τον ιονισμό του τελευταίου.<sup>7</sup> Το ισχυρό ηλεκτρομαγνητικό πεδίο που δημιουργείται στο άκρο του πυρσού επιταχύνει τα ελεύθερα ηλεκτρόνια, τα οποία συγκρούονται με άτομα Ar, απομακρύνοντας από αυτά επιπλέον ηλεκτρόνια. Αυτός ο “επαγόμενος ιονισμός” του Ar, πραγματοποιείται αλυσιδωτά, με αποτέλεσμα το σχηματισμό του πλάσματος, το οποίο διατηρείται για όσο χρονικό διάστημα το πηνίο τροφοδοτείται με ισχύ RF. Η μεταφορά ενέργειας που λαμβάνει χώρα κατά τη διεργασία αυτή είναι γνωστή σαν “επαγόμενη σύζευξη”.

Καθώς το αερόλυμα του δείγματος εισάγεται στο πλάσμα (5000 - 10000 K), λαμβάνει χώρα απομάκρυνση του διαλύτη από την κάθε σταγόνα, με αποτέλεσμα τη μετατροπή της σε ένα πολύ μικρό στερεό σωματίδιο και την περαιτέρω ατομοποίησή της.<sup>8</sup> Τέλος, τα άτομα του αναλύτη, μέσω κρούσεων με τα υψηλής ενέργειας ηλεκτρόνια (και σε μικρότερο ποσοστό με τα ιόντα αργού), ιονίζονται.<sup>9</sup>

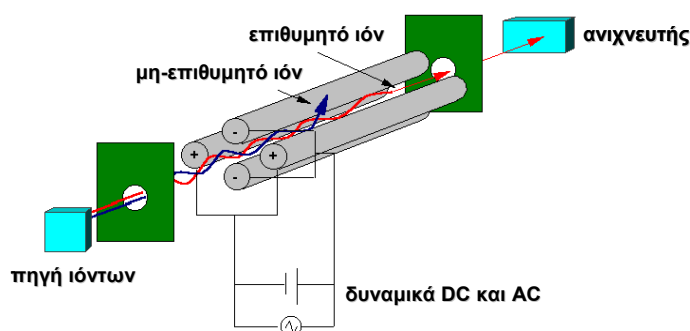
Ακολουθεί η διεπιφάνεια πλάσματος-αναλυτή μάζας (Σχήμα 2.4), η οποία μεταφέρει τα σχηματιζόμενα ιόντα, από το πλάσμα (ατμοσφαιρική πίεση), στην περιοχή υψηλού κενού του αναλυτή μάζας ( $10^{-6}$  Torr). Η διεπιφάνεια αποτελείται από τον κώνο δειγματοληψίας (οπή διαμέτρου 0.8-1.2 mm) και τον αποκορυφωτή κώνο (οπή διαμέτρου 0.4-0.8 mm). Μεταξύ των κώνων, με την βοήθεια μιας μηχανικής αντλίας, η πίεση διατηρείται στα 2 Torr,<sup>10</sup> ενώ η διεπιφάνεια ψύχεται με νερό ψύξης.



Σχήμα 2.4. Διεπιφάνεια πλάσματος - αναλυτή μάζας του ICP-MS.

Ακολουθεί το σύστημα εστίασης ιόντων, το οποίο έχει ως στόχο να μεταφέρει όσο το δυνατόν περισσότερα επιθυμητά ιόντα στον αναλυτή μάζας, ενώ αποτρέπει την είσοδο σε αυτόν ουδέτερων μορίων, φωτονίων και συστατικών της μήτρας.<sup>11</sup> Αποτελείται από φακούς (μεταλλικά πλακίδια, δίσκοι ή κύλινδροι), στους οποίους εφαρμόζεται υψηλό δυναμικό.<sup>11</sup>

Ακολουθεί ο αναλυτής μάζας, όπου με την βοήθεια μιας τουρμπομοριακής αντλίας, η πίεση διατηρείται στα  $10^{-6}$  Torr. Καθώς τα ιόντα εξέρχονται από το σύστημα των φακών εστίασης, εισάγονται στον αναλυτή μάζας, όπου διαχωρίζονται με βάση το λόγο  $m/z$ . Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε τετραπολικός αναλυτής μαζών, ο οποίος αποτελείται από τέσσερις, παράλληλα τοποθετημένες, μεταλλικές ράβδους, ίδιου μήκους και ίδιας διαμέτρου (15-20 cm μήκος και ~1 cm διάμετρος).<sup>12</sup> Οι ράβδοι συνδέονται ανα δύο και σχηματίζουν ένα ζεύγος στον άξονα X και ένα στον άξονα Y, ενώ κάθε ζεύγος είναι συνδεδεμένο με μια πηγή συνεχούς (DC) και εναλλασσόμενης (AC) τάσης. Ανάλογα με το εφαρμοζόμενο ηλεκτρικό πεδίο, ιόντα συγκεκριμένου λόγου  $m/z$  διέρχονται μέσω των ράβδων και εστιάζονται στον ανιχνευτή, ενώ τα υπόλοιπα ιόντα εκτρέπονται από το τετράπολο. Στο ένα ζεύγος ράβδων εφαρμόζεται δυναμικό  $+(U+V\cos(\omega t))$  και στο άλλο ζεύγος  $-(U+V\cos(\omega t))$ . Το  $U$  αντιστοιχεί σε σταθερή συνεχή τάση και το  $V\cos(\omega t)$  σε εναλλασσόμενη τάση στην περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων (RF), με πλάτος  $V$  και συχνότητα  $\omega$ . Κατά μήκος του κεντρικού άξονα του τετραπόλου, το ηλεκτρικό πεδίο είναι μηδέν. Τα ιόντα ταλαντεύονται κατά μήκος του κατακόρυφου άξονα και, με κατάλληλη επιλογή των τιμών  $U$ ,  $V$  και  $\omega$ , μόνο ιόντα συγκεκριμένου λόγου  $m/z$  ταλαντεύονται σταθερά, με κατεύθυνση προς τον ανιχνευτή (Σχήμα 2.5).



**Σχήμα 2.5.** Τετραπολικός αναλυτής μαζών.

Οι μάζες που μπορούν να προσδιοριστούν με αυτού του είδους τον αναλυτή δεν υπερβαίνουν τα 4000 Da, ενώ η διακριτική του ικανότητα φτάνει μέχρι 2000.<sup>13</sup>

Το τελευταίο τμήμα του ICP-MS είναι ο ανιχνευτής ιόντων. Ο πιο συνηθισμένος τύπος ανιχνευτή είναι ο ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής, που αποτελείται από μια σειρά δυνόδων, στις οποίες εφαρμόζονται αυξανόμενα δυναμικά. Τα ιόντα που εξέρχονται από τον αναλυτή μάζας προσκρούουν στην πρώτη δύνοδο, με αποτέλεσμα την εκπομπή ηλεκτρονίων. Αυτά τα δευτερογενή ηλεκτρόνια προσκρούουν στη δεύτερη δύνοδο, όπου παράγονται επιπλέον ηλεκτρόνια. Η ενίσχυση του ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστή είναι  $10^6$ , δηλαδή από την αρχική πρόσκρουση των ιόντων στην πρώτη δύνοδο παράγονται τελικά  $10^6$  ηλεκτρόνια στην έξοδο του ανιχνευτή.<sup>14</sup>

### ***Παρεμποδίες στα Φάσματα Ατομικών Μαζών***

Στη φασματομετρία ατομικών μαζών παρουσιάζονται σημαντικά προβλήματα φασματοσκοπικών και μη φασματοσκοπικών παρεμποδίων. Οι φασματοσκοπικές παρεμποδίες προκύπτουν όταν ένα ιοντικό σωματίδιο έχει τον ίδιο λόγο  $m/z$  με το ιόν του αναλύτη και διακρίνονται σε: *Ισοβαρικές, Πολυατομικών Ιόντων, Διπλά Φορτισμένων Ιόντων* και *Ιόντων Οξειδίων*.<sup>15</sup> Ισοβαρικά ονομάζονται τα ισότοπα που διαφέρουν ως προς τη μάζα τους λιγότερο από μια μονάδα μάζας, ενώ οι ισοβαρικές παρεμποδίες παρουσιάζονται στα ισότοπα μεγαλύτερης φυσικής αφθονίας (επιηρεάζουν την πιο ευαίσθητη κορυφή). Οι ισοβαρικές παρεμποδίες είναι προβλέψιμες από τους πίνακες φυσικής αφθονίας των ισωτόπων και μπορούν να πραγματοποιηθούν διορθώσεις με την χρήση κατάλληλου λογισμικού. Ένα σοβαρότερο πρόβλημα παρεμποδίων δημιουργείται από τα πολυατομικά ιόντα, που σχηματίζονται από αλληλεπιδράσεις μεταξύ πλάσματος και σωματιδίων της μήτρας του δείγματος ή της ατμόσφαιρας. Αυτές οι παρεμποδίες είναι δυνατόν να διορθωθούν με μέτρηση τυφλού διαλύματος ή την επιλογή ενός διαφορετικού ισωτόπου του αναλύτη. Η σοβαρότερη κατηγορία παρεμποδίων περιλαμβάνει το σχηματισμό οξειδίων και υδροξειδίων από τον ίδιο τον αναλύτη, από τα συστατικά της μήτρας, από το διαλύτη και από τα αέρια του πλάσματος. Οι παρεμποδίες αυτής της κατηγορίας αντιμετωπίζονται με τη ρύθμιση παραμέτρων, όπως η σύσταση των αερίων του πλάσματος, το ποσοστό και το είδος του διαλύτη, το μέγεθος του στομίου εισαγωγής του δείγματος, κ.λ.π.<sup>15</sup>

Οι μη φασματοσκοπικές παρεμποδίες περιλαμβάνουν τις επιδράσεις των συστατικών της μήτρας του δείγματος και γίνονται συνήθως αντιληπτές σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 500-1000  $\mu\text{g/mL}$ .<sup>15</sup> Στις περισσότερες περιπτώσεις, παρατηρείται μείωση του σήματος του αναλύτη, ενώ, υπό ορισμένες συνθήκες,

μπορεί να παρατηρηθεί και ενίσχυση. Οι παρεμποδίσεις αυτές ελαχιστοποιούνται με αραιώση των διαλυμάτων, με αλλαγή της πορείας εισαγωγής του δείγματος, με απομάκρυνση των συστατικών που δημιουργούν το πρόβλημα ή με τη χρήση κατάλληλου εσωτερικού προτύπου, το οποίο πρέπει να είναι ένα στοιχείο με μάζα και δυναμικό ιονισμού παρόμοια με εκείνα του αναλύτη. Παράλληλα, το στοιχείο αυτό πρέπει να είναι σπάνιο στη φύση, ώστε να ελαχιστοποιείται η πιθανότητα να υπάρχει στο εξεταζόμενο δείγμα (π.χ.  $^{115}\text{In}$ ,  $^{103}\text{Rh}$ ,  $^9\text{Be}$ ,  $^{232}\text{Th}$ ).

Στην παρούσα διατριβή, χρησιμοποιήθηκε φασματόμετρο μάζας X Series ICP-MS (Thermo Fisher Scientific, Winsford, United Kingdom), με τετραπολικό αναλυτή μαζών. Η εισαγωγή του δείγματος στον εκνεφωτή γίνεται με την βοήθεια περισταλτικής αντλίας, ενώ οι αγωγοί εισαγωγής δείγματος και αποβλήτων είναι κατασκευασμένοι από ειδικό πολυμερές (tygon) και έχουν εσωτερική διάμετρο ίση με 0.508 mm και 1.422 mm αντίστοιχα. Οι κώνοι που χρησιμοποιήθηκαν είναι κατασκευασμένοι από νικέλιο, και έχουν οπές διαμέτρου 1.0 mm και 0.75 mm (κόνος δειγματοληψίας και αποκορυφωτής κόνος, αντίστοιχα).

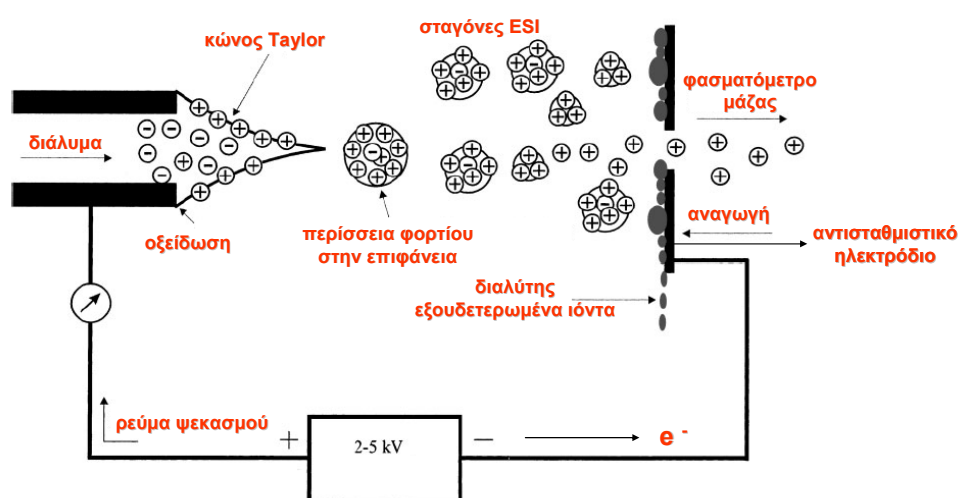
## **2.2. ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ ΙΟΝΙΣΜΟΥ ΜΕΣΩ ΗΛΕΚΤΡΟΨΕΚΑΣΜΟΥ (ELECTROSPRAY IONIZATION - MASS SPECTROMETRY – ESI-MS)**

Τα τελευταία χρόνια, οι τεχνικές μοριακής φασματομετρίας μάζας χρησιμοποιούνται ευρέως για την ειδοταυτοποίηση του αρσενικού σε περιβαλλοντικά και βιολογικά δείγματα, ενώ, σε πολλές περιπτώσεις, έχουν συμβάλλει καθοριστικά στην ανίχνευση και το χαρακτηρισμό καινούριων ενώσεων του στοιχείου.<sup>16</sup> Σε αντίθεση με τις τεχνικές ατομικής φασματομετρίας μάζας, με τις οποίες επιτυγχάνεται η ανίχνευση ατομικών ιόντων, οι μοριακές φασματομετρικές τεχνικές παρέχουν πληροφορίες σχετικά με το μοριακό τύπο της ένωσης.<sup>17</sup> Οι σημαντικότερες τεχνικές μοριακής φασματομετρίας μάζας, που έχουν χρησιμοποιηθεί σε μελέτες ειδοταυτοποίησης του αρσενικού, είναι η Φασματομετρία Μάζας Βομβαρδισμού με Ταχέα Άτομα (Fast Atom Bombardment-Mass Spectrometry – FAB-MS) και η Φασματομετρία Μάζας Ιονισμού μέσω Ηλεκτροψεκασμού (ESI-MS), η οποία χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή.

### Αρχές Λειτουργίας της Τεχνικής ESI-MS

Το 2002 ο John Fenn, σε εργασία του, για την οποία τιμήθηκε με μέρος του βραβείου Nobel Χημείας,<sup>18</sup> κατάφερε να αναπτύξει μια τεχνική ιονισμού, μέσω ηλεκτροψεκασμού, για την ανάλυση ισχυρά πολικών, μη-πιητικών και θερμικά ασταθών ενώσεων. Ο ηλεκτροψεκασμός λειτουργεί σε ατμοσφαιρική πίεση και μέτρια θερμοκρασία, και, σε αντίθεση με τον ηλεκτρονιακό και το χημικό ιονισμό (Electron Ionization - EI και Chemical Ionization - CI αντίστοιχα), όπου λαμβάνει χώρα η μετατροπή ουδέτερων μορίων σε ιόντα, στον ηλεκτροψεκασμό, τα ήδη υπάρχοντα ιόντα του αναλύτη, μεταφέρονται από το διάλυμα στην αέρια φάση.<sup>19</sup> Η ανάλυση των ιόντων του αναλύτη κατευθείαν από το διάλυμα είναι καθοριστικής σημασίας και συμβάλλει στη διατήρηση σημαντικών ιδιοτήτων του, όπως η οξειδωτική κατάσταση και ο μοριακός τύπος.<sup>20</sup>

Ο μηχανισμός με τον οποίο μεταφέρονται τα ιόντα του αναλύτη από το διάλυμα στην αέρια φάση, βασίζεται σε μια ηλεκτροστατικά ελεγχόμενη διαδικασία ψεκασμού. Το αραιωμένο διάλυμα του αναλύτη, διέρχεται, με ταχύτητα 0.1-10  $\mu\text{L}/\text{min}$ , μέσω ενός τριχοειδούς από ανοξείδωτο χάλυβα, στον οποίο εφαρμόζεται υψηλό δυναμικό (2-5 kV).<sup>21</sup> Το δυναμικό αυτό (θετικό ή αρνητικό), δημιουργεί βαθμιδωτό ηλεκτρικό πεδίο, ικανό να διαχωρίσει τα φορτία, ανάλογα με το πρόσημό τους, και να τα συγκεντρώσει στην επιφάνεια του υγρού. Υπό την επίδραση θετικού δυναμικού, τα θετικά ιόντα είναι εκείνα τα οποία κινούνται προς την επιφάνεια, ενώ τα αρνητικά απομακρύνονται από αυτήν.<sup>19</sup> Το τμήμα του διαλύματος που προεξέχει από το άκρο του τριχοειδούς και φέρει περίσσεια ηλεκτρικού φορτίου, σχηματίζει τον “κώνο του Taylor” (Σχήμα 2.6).



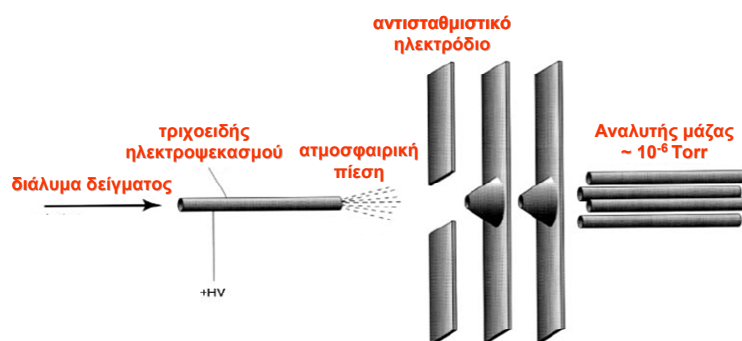
Σχήμα 2.6. Απεικόνιση της διαδικασίας του ηλεκτροψεκασμού.

Καθώς το δυναμικό αυξάνεται, το διάλυμα που σχηματίζει τον “κώνο του Taylor” υπερβαίνει το “όριο Rayleigh”,<sup>22</sup> (απωστική δύναμη Coulomb = επιφανειακή τάση του υγρού), με αποτέλεσμα ο κώνος να υφίσταται σχάση και οι φορτισμένες σταγόνες να αποσπώνται από το διάλυμα.<sup>21</sup> Οι σταγόνες αυτές κατευθύνονται προς τον αναλυτή μαζών, σχηματίζοντας φορτισμένα μόρια του αναλύτη στην αέρια φάση.<sup>20,23</sup>

Για το σχηματισμό των φορτισμένων μορίων του αναλύτη στην αέρια φάση, έχουν προταθεί δύο μηχανισμοί. Σύμφωνα με τον πρώτο μηχανισμό, που είναι γνωστός ως “Σχάση Coulomb”, η αυξανόμενη πυκνότητα φορτίου της σταγόνας (λόγω εξάτμισης του διαλύτη), έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των απωστικών δυνάμεων μεταξύ των φορτίων και τη μετέπειτα σχάση της σταγόνας. Τα παραγόμενα σταγονίδια υφίστανται περαιτέρω συρρίκνωση-σχάση, με τη διαδικασία αυτή να επαναλαμβάνεται αρκετές φορές, οπότε τελικά σχηματίζονται σταγονίδια με ένα μόνο φορτίο. Τα σταγονίδια αυτά, έπειτα από την εξάτμιση και των τελευταίων μορίων του διαλύτη, παράγουν τα ιόντα του αναλύτη στην αέρια φάση.<sup>20</sup> Σύμφωνα με το δεύτερο μηχανισμό, που είναι γνωστός σαν “Εξάτμιση Ιόντων”,<sup>24</sup> η αυξανόμενη πυκνότητα φορτίου στη σταγόνα, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της απωστικής δύναμης Coulomb μεταξύ των φορτίων, η οποία υπερνικά την επιφανειακή τάση του υγρού, απελευθερώνοντας τελικά τα ιόντα του αναλύτη από τη σταγόνα. Ανεξάρτητα από το μηχανισμό που λαμβάνει χώρα, η διαδικασία του ηλεκτροψεκασμού παράγει ιόντα στην αέρια φάση, τα οποία αναλύονται στο φασματομέτρο μάζας ως προς το λόγο  $m/z$ .

Η εκνέφωση του διαλύματος που διέρχεται από τον τριχοειδή, διευκολύνεται με τη χρήση ενός βοηθητικού αερίου, το οποίο επίσης συμβάλλει στην απομάκρυνση του διαλύτη από την σταγόνα.<sup>21</sup> Παράλληλα, μια άλλη ροή αερίου υπό πίεση (εκνεφωτικό αέριο) απελευθερώνεται γύρω από το άκρο του τριχοειδούς και βοηθάει στη σχάση του “κώνου Taylor”.

Η μεταφορά των ιόντων από την περιοχή ατμοσφαιρικής πίεσης της πηγής ιονισμού στην περιοχή υψηλού κενού του αναλυτή μάζας, γίνεται μέσω της διεπιφανείας πηγής ιονισμού - φασματομέτρου μάζας (Σχήμα 2.7). Το αέριο (ιόντα και ουδέτερα μόρια), αρχικά διέρχεται μέσω του κώνου δειγματοληψίας και εκτονώνεται (~1 Torr) και, στη συνέχεια, μέσω του αποκορυφωτή κώνου, οδηγείται στον αναλυτή μάζας, αφού διέλθει πρώτα από τους φακούς εστίασης.<sup>21</sup>



Σχήμα 2.7. Διεπιφάνεια πηγής ιονισμού - αναλυτή μάζας της τεχνικής ESI-MS.

### *Διαδοχική Φασματομετρία Μάζας (Tandem Mass Spectrometry – MS/MS)*

Ο ηλεκτροψεκασμός είναι μια διαδικασία, κατά την οποία λαμβάνει χώρα ελάχιστη ή μηδενική θραυσματοποίηση, επομένως δεν παρέχει σημαντικές δομικές πληροφορίες για το χαρακτηρισμό άγνωστων ενώσεων. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με διαδοχική φασματομετρία μάζας. Η διαδοχική φασματομετρία μάζας περιλαμβάνει δύο στάδια ανάλυσης μάζας, επιτρέποντας τη θραυσματοποίηση προεπιλεγμένων ιόντων (πρόδρομα ιόντα) και την ανάλυση των παραγόμενων ιόντων (προϊόντα ιόντα). Η θραυσματοποίηση των πρόδρομων ιόντων επιτυγχάνεται μέσω επαγόμενων συγκρούσεων ιόντος-μορίου, οι οποίες βασίζονται σε μια διαδικασία γνωστή ως “Επαγόμενη Διάσπαση μέσω Συγκρούσεων” (Collision Induced Dissociation – CID). Κατά τη διεργασία αυτή, στην κυψελίδα πρόσκρουσης, τα μοριακά ιόντα συγκρούονται με τα ουδέτερα μόρια ενός αδρανούς αερίου, οπότε η κινητική ενέργεια του ιόντος μετατρέπεται σε εσωτερική ενέργεια. Η μετατροπή αυτή οδηγεί στη σχάση των δεσμών και τη θραυσματοποίηση του μοριακού ιόντος σε προϊόντα ιόντα, τα οποία αναλύονται στον αναλυτή μάζας.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε φασματόμετρο μάζας τριπλού τετραπόλου και εφαρμόστηκε Σάρωση Προϊόντων Ιόντων (Product Ion Scan), Σάρωση Πρόδρομων Ιόντων (Precursor Ion Scan) και Παρακολούθηση Επιλεγμένων Αντιδράσεων (Selected Reaction Monitoring - SRM).<sup>25</sup>

### Σάρωση Προϊόντων Ιόντων

Στο πρώτο τετράπολο (Q1) επιλέγονται πρόδρομα ιόντα συγκεκριμένου λόγου  $m/z$ , τα οποία στη συνέχεια μεταφέρονται στην κυψελίδα πρόσκρουσης (Q2), συγκρούονται με τα άτομα του αδρανούς αερίου (Ar) και υφίστανται θραυσματοποίηση. Τα σχηματιζόμενα προϊόντα ιόντα αναλύονται στο τρίτο



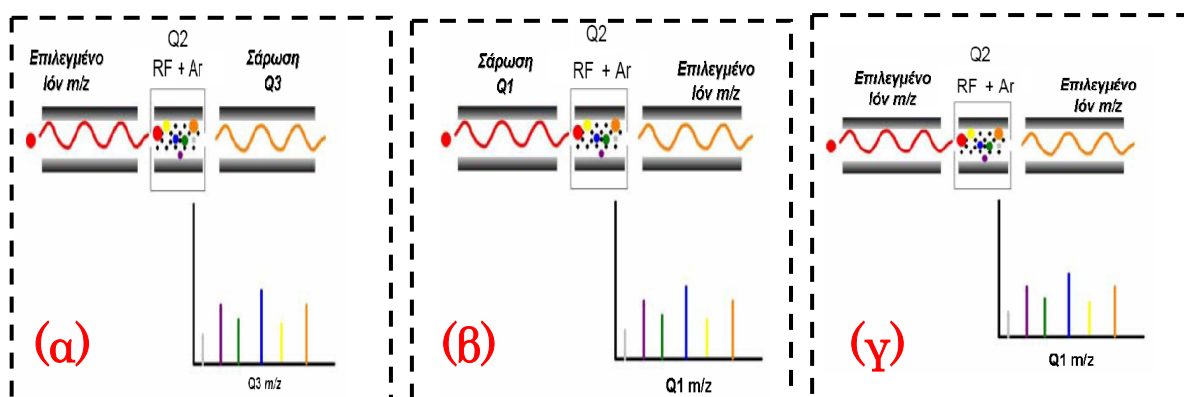
τετράπολο (Q3), το οποίο έχει ρυθμιστεί να σαρώνει σε μια περιοχή λόγων  $m/z$ , οπότε προκύπτει τελικά το φάσμα μάζας των προϊόντων ιόντων. Από το φάσμα αυτό λαμβάνονται πληροφορίες για τη δομή της πρόδρομης ένωσης (Σχήμα 2.8(a)).

### Σάρωση Πρόδρομων Ιόντων

Το φασματόμετρο μάζας Q3 ρυθμίζεται ώστε να επιτρέπει τη διέλευση μόνο ιόντων με συγκεκριμένους λόγους  $m/z$ , ενώ στο φασματόμετρο Q1, λαμβάνει χώρα σάρωση σε μια περιοχή λόγων  $m/z$ . Τα πρόδρομα ιόντα τα οποία διέρχονται από το Q1, ανιχνεύονται, αν και μόνο αν, έπειτα από τη θραυσματοποίησή τους στην κυψελίδα πρόσκρουσης, οδηγούν στο σχηματισμό του προεπιλεγμένου προϊόντος ιόντος. Αυτό το προϊόν ιόν, είναι το μοναδικό το οποίο μεταφέρεται στον ανιχνευτή από τον αναλυτή μάζας Q3 (Σχήμα 2.8(b)).

### Παρακολούθηση Επιλεγμένων Αντιδράσεων (SRM)

Στο τετράπολο Q1 επιλέγεται ένα πρόδρομο ιόν, το οποίο στη συνέχεια οδηγείται στην κυψελίδα πρόσκρουσης και θραυσματοποιείται. Στο τετράπολο Q3 παρακολουθούνται συγκεκριμένα προϊόντα ιόντα, αυτά με τη μεγαλύτερη ένταση, ενώ τελικά ανιχνεύονται μόνο εκείνα τα πρόδρομα ιόντα, τα οποία, διασπώμενα σε συγκεκριμένες ενέργειες, οδηγούν στο σχηματισμό των προεπιλεγμένων προϊόντων ιόντων (Σχήμα 2.8(γ)). Με τη μέθοδο SRM, επιτυγχάνεται ταχεία ανάλυση συστατικών, τα οποία συναντώνται σε πολύπλοκες μήτρες, σε ιχνοποσότητες. Πρόκειται για μια ιδιαίτερα εκλεκτική μέθοδο, με την οποία οι φασματοσκοπικές παρεμποδίσεις από τα συστατικά της μήτρας περιορίζονται στο ελάχιστο.



**Σχήμα 2.8.** (α) Σάρωση Προϊόντων Ιόντων, (β) Σάρωση Πρόδρομων Ιόντων και (γ) Παρακολούθηση Επιλεγμένων Αντιδράσεων (SRM) με την τεχνική ESI-MS/MS.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ 2

- <sup>1</sup> R. Thomas, Practical guide to ICP-MS. *A tutorial for beginners*, CRC Press, Taylor & Francis Group, 2nd edition, 2008.
- <sup>2</sup> A. A. Ammann, *J. Mass Spectrom.*, 2007, **42**, 419.
- <sup>3</sup> <http://www.cee.vt.edu/ewr/environmental/teach/smprimer/icpms/icpms.htm>.
- <sup>4</sup> R. Thomas, *Spectroscopy*, 2001, **16(5)**, 56.
- <sup>5</sup> J. Mora, S. Maestre, V. Hernandez and J. L. Todolí, *Trends Anal. Chem.*, 2003, **22**, 123.
- <sup>6</sup> R. S. Houk, V. A. Fassel and H. J. Svec, *Dyn. Mass Spectrom.*, 1990, **5**, 419.
- <sup>7</sup> R. Thomas, *Spectroscopy*, 2001, **16(6)**, 26.
- <sup>8</sup> S. J. Hill, *Inductively Coupled Plasma Spectrometry and its Applications*, Blackwell, 22<sup>nd</sup> edition, 2007.
- <sup>9</sup> T. Hasegawa and H. Haraguchi, in *ICPs in Analytical Atomic Spectrometry*, ed. A. Montaser and D. W. Golightly, 2<sup>nd</sup> edn., VCH, New York, 1992.
- <sup>10</sup> R. Thomas, *Spectroscopy*, 2001, **16(7)**, 26.
- <sup>11</sup> R. Thomas, *Spectroscopy*, 2001, **16(9)**, 38.
- <sup>12</sup> R. Thomas, *Spectroscopy*, 2001, **16(10)**, 44.
- <sup>13</sup> E. G. Stephanou, in *Introduction to Modern Mass Spectrometry I*, 2005.
- <sup>14</sup> R. Thomas, *Spectroscopy*, 2002, **17(4)**, 34
- <sup>15</sup> D. A. Skoog, F. James Holler and T. A. Nieman, *Αρχές της Ενόργανης Ανάλυσης*, 5η έκδοση, Μετάφραση, 2002.
- <sup>16</sup> K. A. Francesconi and D. Kuehnelt, *Analyst*, 2004, **129**, 373.
- <sup>17</sup> Z. Gong, X. Lu, M. Ma, C. Watt and X. C. Le, *Talanta*, 2002, **58**, 77.
- <sup>18</sup> J. B. Fenn, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2003, **42**, 3871.
- <sup>19</sup> I. I. Stewart, *Spectrochim. Acta B*, 1999, **54**, 1649.
- <sup>20</sup> S. J. Gaskell, *J. Mass Spectrom.*, 1997, **32**, 677.
- <sup>21</sup> N. B. Cech and C. G. Enke, *Anal. Chem.*, 2000, **72**, 2717.
- <sup>22</sup> D. C. Taflin, T. L. Ward and E. J. Davis, *Langmuir*, 1989, **5**, 376.
- <sup>23</sup> P. Kebarle and M. Peschke, *Anal. Chim. Acta*, 2000, **406**, 11.
- <sup>24</sup> J. V. Iribarne and B. A. Thompson, *J. Chem. Phys.*, 1976, **64**, 2287.
- <sup>25</sup> TSQ Quantum, *Hardware Manual*.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### **ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ HPLC-ESI-MS/MS ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ ΣΑΡΩΣΗ ΠΡΟΔΡΟΜΩΝ ΙΟΝΤΩΝ (PRECURSOR ION SCAN) ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΝΕΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΟΞΟ- ΚΑΙ ΘΕΙΟ-ΑΡΣΕΝΟΣΑΚΧΑΡΩΝ ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ**

#### 3.1. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ – ΣΚΟΠΟΣ

##### ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

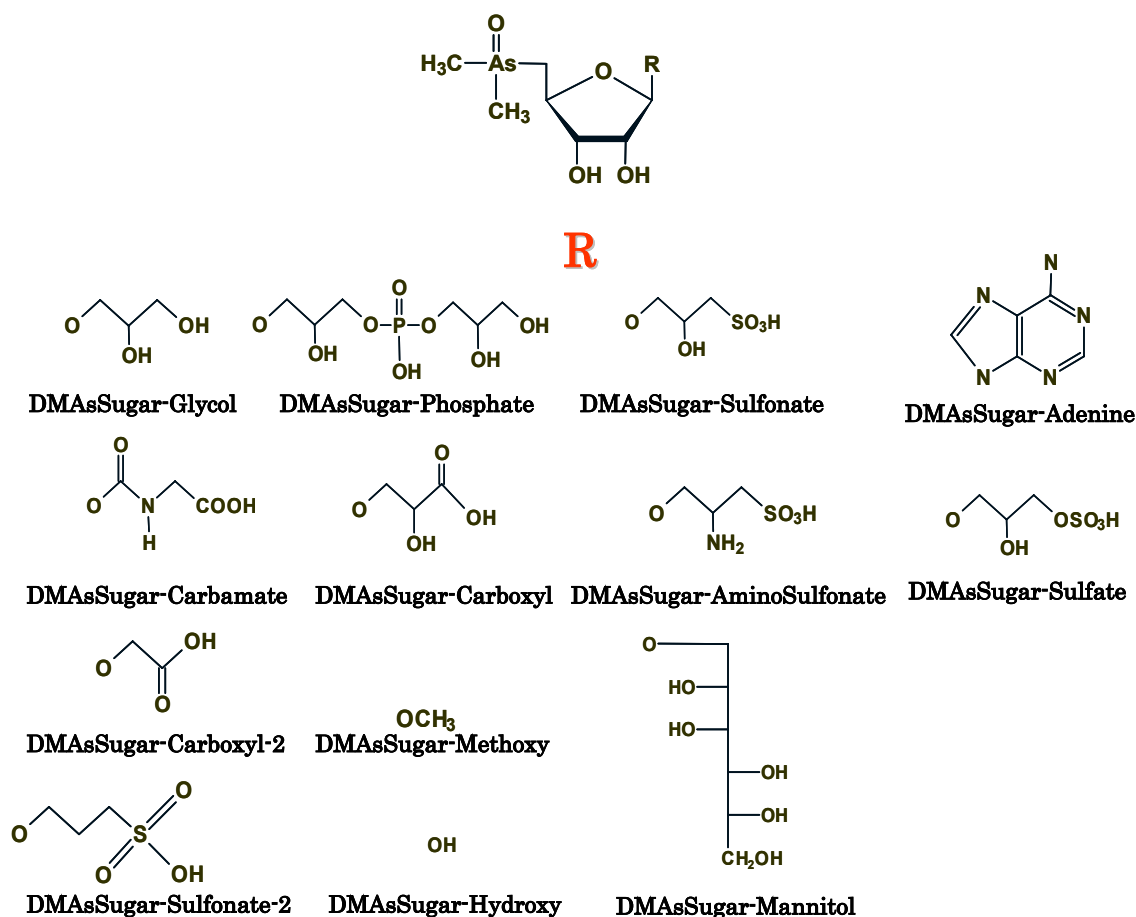
Οι σύγχρονες τεχνικές ειδοταυτοποίησης του αρσενικού και, ιδιαίτερα, οι ταχέως αναπτυσσόμενες τεχνικές φασματομετρίας μάζας, έχουν συμβάλλει σημαντικά στην πληρέστερη κατανόηση της βιοχημικής συμπεριφοράς του στοιχείου στο θαλάσσιο περιβάλλον.<sup>1,2</sup> Η έρευνα στον συγκεκριμένο τομέα έχει ευδοκιμήσει, κυρίως, λόγω των μελετών των Francesconi και Edmonds, οι οποίοι έχουν ανιχνεύσει και ταυτοποιήσει ένα σημαντικό αριθμό ενώσεων αρσενικού σε βιολογικά δείγματα θαλάσσιας προέλευσης.<sup>1,3,4,5</sup> Η περαιτέρω πρόοδος στο πεδίο αυτό, οφείλεται στην ανάπτυξη των μεθόδων Φασματομετρίας Μάζας Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος (ICP-MS)<sup>6,7,8,9</sup> και Διαδοχικής Φασματομετρίας Μάζας Ιονισμού μέσω Ηλεκτροψεκασμού (ESI-MS/MS).<sup>10,11,12</sup>

Ωστόσο, οι παραπάνω τεχνικές εστιάζονται στον στοχευμένο προσδιορισμό των ενώσεων αρσενικού, με το μοριακό τύπο, αλλά και η δομή των υπό ανίχνευση ενώσεων, να είναι γνωστά πριν τη διεξαγωγή της ανάλυσης. Αυτές οι “αναλύσεις στόχου” (“targeted analysis”), βασίζονται κυρίως στην τεχνική ICP-MS (όπου ο προσδιορισμός των “ενώσεων-στόχων” πραγματοποιείται σε συνδυασμό με υψηλή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) και την ανάλυση των αντίστοιχων πρότυπων διαλυμάτων), καθώς και στην τεχνική ESI-MS/MS. Οι δύο παραπάνω τεχνικές είναι δυνατόν να οδηγήσουν στην ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό μόνο περιορισμένου αριθμού καινούριων ενώσεων αρσενικού, με προβλέψιμες δομές, όπως συνέβη στην περίπτωση των τεσσάρων θειο-αρσενοσακχάρων (thio-arsenosugars) DMThioAsSugar-Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate, που ανακαλύφθηκαν πρόσφατα σε θαλάσσια φύκη και οστρακοειδή (Σχήμα 3.1).<sup>13,14,15,16</sup>

Το 1981, απομονώθηκαν, από φύκη, τα δύο πρώτα οξο-αρσενοσακχάρα (oxo-arsenosugars), DMAsSugar-Glycol και -Sulfonate, και χαρακτηρίστηκαν με φασματοσκοπία NMR.<sup>3</sup> Επίσης, σε φύκη ανιχνεύτηκαν και ταυτοποιήθηκαν (με

NMR) τα οξο-αρσενοσάκχαρα DMAsugar-Phosphate,<sup>17</sup> -Sulfate, -AminoSulfonate, -Methoxy και -Mannitol (Σχήμα 3.1),<sup>18</sup> ενώ, πρόσφατα ταυτοποιήθηκαν, με την τεχνική HPLC-ESI-MS/MS, τα σάκχαρα DMAsugar-Carboxyl, -Hydroxy και -Adenine (Σχήμα 3.1) σε δείγματα από φύκη,<sup>19</sup> και τα DMAsugar-Carbamate, Carboxyl-2 και Sulfonate-2 (Σχήμα 3.1), σε δείγμα από θαλάσσια κυδώνια.<sup>20,21</sup>

### Οξο-αρσενοσάκχαρα

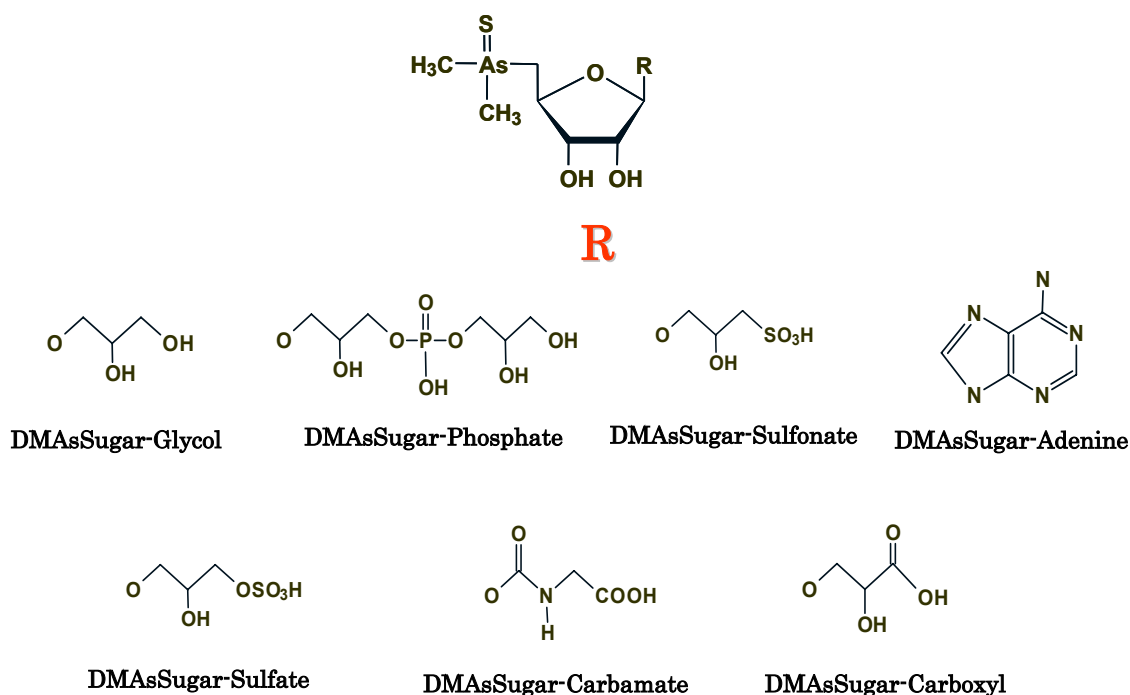


Σχήμα 3.1. Δομές των, μέχρι σήμερα, ταυτοποιημένων οξο-αρσενοσακχάρων.

Τα θειο-αρσενοσάκχαρα αποτελούν ενώσεις αρσενικού, που έχουν ανιχνευτεί και ταυτοποιηθεί, τα τελευταία χρόνια, σε θαλάσσια δείγματα. Τα σημαντικότερα παράγωγα της κατηγορίας είναι τα DMThioAsSugar-Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate,<sup>16</sup> ενώ, σε βιολογικά δείγματα, έχουν, επίσης, ανιχνευτεί και τα -Carboxyl, -Carbamate και -Adenine (Σχήμα 3.2).<sup>20</sup> Η ανίχνευση των παραπάνω ενώσεων βασίστηκε, κυρίως, στις αναλύσεις με HPLC-ESI-MS/MS και HPLC-ICP-MS, ενώ, σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις, υπάρχει

η πιθανότητα ύπαρξης, στα ίδια δείγματα, και άλλων ενώσεων της ίδιας κατηγορίας, οι οποίες δεν ανιχνεύτηκαν.

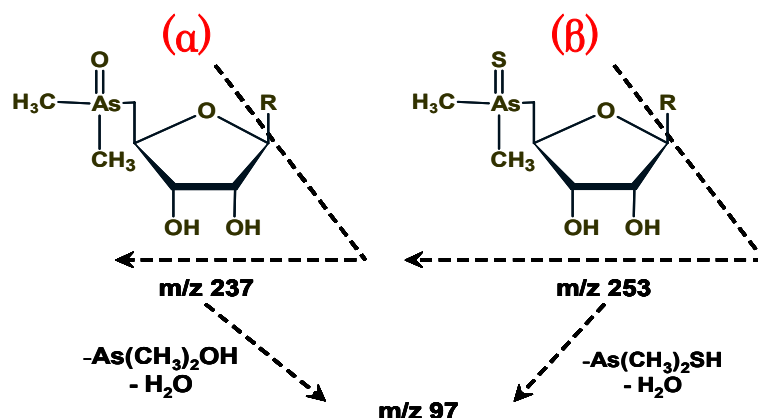
### Θειο-αρσενοσάκχαρα



**Σχήμα 3.2.** Δομές των, μέχρι σήμερα, ταυτοποιημένων θειο-αρσενοσακχάρων.

Για την ανίχνευση καινούριων ενώσεων αρσενικού στο περιβάλλον, κρίθηκε αναγκαία η ανάπτυξη μιας μεθόδου “μη στοχευμένης ανάλυσης”, ικανής να ανιχνεύσει τις ενώσεις αυτές και να συμβάλλει στον χαρακτηρισμό τους. Για το σκοπό αυτό, θα μπορούσε να αναπτυχθεί περαιτέρω η τεχνική ESI-MS/MS, με Σάρωση Πρόδρομων Ιόντων (Precursor Ion Scan), στην οποία στο πρώτο φασματόμετρο (Q1) λαμβάνει χώρα σάρωση ευρείας περιοχής λόγων  $m/z$ , ενώ ο δεύτερος αναλυτής μάζας (Q3) ρυθμίζεται ώστε να επιτρέπει τη διέλευση μόνο ιόντων με συγκεκριμένους λόγους  $m/z$ . Τα πρόδρομα ιόντα τα οποία διέρχονται από το Q1, ανιχνεύονται, αν και μόνο αν, έπειτα από τη θραυσματοποίησή τους στην κυψελίδα πρόσκρουσης (Q2), οδηγούν στο σχηματισμό προεπιλεγμένου προϊόντος ιόντος, στο οποίο επιτρέπεται η διέλευση από το Q3. Επομένως, γνωρίζοντας ότι μια κατηγορία ενώσεων ακολουθεί ένα γνωστό μονοπάτι θραυσματοποίησης, οδηγώντας στο σχηματισμό συγκεκριμένων προϊόντων ιόντων, είναι δυνατόν, επιλέγοντας τα συγκεκριμένα ιόντα, να ανιχνευτούν νέα μέλη της κατηγορίας αυτής των ενώσεων.

Το ενδιαφέρον εστιάζεται στα οξο- και θειο- αρσενοσακχάρα, τα οποία έχουν μελετηθεί εκτενώς από διάφορες ερευνητικές ομάδες,<sup>3,4,5,22,23,24</sup> χρησιμοποιώντας τις τεχνικές HPLC-ICP-MS και HPLC-ESI-MS/MS. Ιδιαίτερη έμφαση έχει δοθεί στα τέσσερα μέλη της σειράς των οξο-αρσενοσακχάρων, DMAsSugar-Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate και στα αντίστοιχα θειο-αρσενοσακχάρα. Η πορεία διάσπασης των οξο- και θειο- αρσενοσακχάρων έχει προταθεί σε πρόσφατη μελέτη της ομάδας μας,<sup>16</sup> να είναι αυτή που φαίνεται στο Σχήμα 3.3.



**Σχήμα 3.3.** Προτεινόμενη πορεία διάσπασης των (α) οξο- και (β) θειο-αρσενοσακχάρων.<sup>16</sup>

Κατά τη θραυσματοποίηση των οξο-αρσενοσακχάρων σχηματίζονται δυο χαρακτηριστικά προϊόντα ιόντα, με λόγους  $m/z$  97 και 237,<sup>16,23,25,26</sup> ενώ τα αντίστοιχα χαρακτηριστικά προϊόντα ιόντα για τα θειο-αρσενοσακχάρα είναι αυτά με λόγους  $m/z$  97 και 253.<sup>16</sup> Τα ιόντα  $m/z$  237 και 253 προέρχονται από το πρόδρομο ιόν, έπειτα από διάσπαση και απομάκρυνση της πλευρικής αλυσίδας (aglycone group), που συνδέεται στον ριβοζικό δακτύλιο. Το ιόν  $m/z$  97, το οποίο είναι κοινό και για τις δύο κατηγορίες αρσενοσακχάρων, προέρχεται από τα προηγούμενα προϊόντα ιόντα  $m/z$  237 και 253, έπειτα από περαιτέρω διάσπαση και απομάκρυνση ενός μορίου νερού, καθώς και των ομάδων  $\text{As}(\text{CH}_3)_2\text{OH}$  και  $\text{As}(\text{CH}_3)_2\text{SH}$ , αντίστοιχα. Επομένως, κάθε ένωση αρσενοσακχάρου, κατά τη διάσπασή της, δίνει ένα “μοναδικό” προϊόν ιόν ( $m/z$  237 ή  $m/z$  253), ενώ το ιόν  $m/z$  97 είναι κοινό και για τις δύο κατηγορίες. Η ύπαρξη κοινών προϊόντων ιόντων για κάθε ένωση, μιας κατηγορίας ενώσεων, υπαγορεύει την ανάπτυξη μεθόδου σάρωσης πρόδρομων ιόντων, με την τεχνική ESI-MS/MS, με σκοπό την ανίχνευση καινούριων παραγώγων, που ανήκουν στην κατηγορία αυτή.

### ΣΚΟΠΟΣ

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα οξο- και θειο-αρσενοσάκχαρα αποτελούν κατηγορίες οργανοαρσενικών ενώσεων, που συναντώνται σε ένα ευρύ φάσμα οργανισμών θαλάσσιας προέλευσης (φύκη, οστρακοειδή, κ.λ.π), άρα και σε ανθρώπινες τροφές. Μέχρι σήμερα, ένας σημαντικός αριθμός ενώσεων, των δύο παραπάνω κατηγοριών, έχει ανιχνευτεί και ταυτοποιηθεί σε δείγματα που προέρχονται από το θαλάσσιο περιβάλλον, εφαρμόζοντας μεθόδους “ανάλυσης στόχου”, στις οποίες η δομή των εξεταζόμενων ενώσεων είναι γνωστή πριν την ανάλυση. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν οι τεχνικές HPLC-ICP-MS και HPLC-ESI-MS/MS, με τη μέθοδο Παρακολούθησης Επιλεγμένων Αντιδράσεων (SRM), οι οποίες τα τελευταία χρόνια έχουν εφαρμοστεί, με ιδιαίτερη επιτυχία, στο πεδίο της ειδοαυτοποίησης του αρσενικού. Ωστόσο, στα δείγματα, στα οποία έχει ήδη επιβεβαιωθεί η ύπαρξη συγκεκριμένων αρσενοσακχάρων, όπως και σε άλλα δείγματα, ενδέχεται να υπάρχουν και άλλες ενώσεις της κατηγορίας, των οποίων η ανίχνευση δεν έχει ακόμα επιτευχθεί, λόγω της μη πρόβλεψης της δομής τους.

Σκοπός, λοιπόν, της παρούσας μελέτης ήταν η ανάπτυξη μιας αναλυτικής τεχνικής, κατάλληλης να ανιχνεύσει και να χαρακτηρίσει άγνωστες ενώσεις οξο- και θειο-αρσενοσακχάρων, χωρίς να είναι γνωστή, εκ των προτέρων, η δομή τους. Κάτι τέτοιο μπορεί να επιτευχθεί με την τεχνική ESI-MS/MS, εφαρμόζοντας τη μέθοδο σάρωσης πρόδρομων ιόντων. Ουσιαστικά, με τη μέθοδο αυτή πραγματοποιείται η ανίχνευση πρόδρομων ιόντων, τα οποία, διασπώμενα, δίνουν συγκεκριμένα προϊόντα ιόντα, χαρακτηριστικά των υπό εξέταση ενώσεων.

Το ενδιαφέρον εστιάστηκε στα οξο- και θειο-αρσενοσάκχαρα, τα οποία δίνουν χαρακτηριστικά προϊόντα ιόντα τα  $m/z$  237 και 97 (οξο-αρσενοσάκχαρα) και 253 και 97 (θειο-αρσενοσάκχαρα). Απουσία πρότυπων διαλυμάτων των εξεταζόμενων ενώσεων, η ανάπτυξη της μεθόδου σάρωσης πρόδρομων ιόντων βασίστηκε στην ανάλυση εμπορικά διαθέσιμων δειγμάτων από φύκη, τα οποία περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις των τεσσάρων οξο-αρσενοσακχάρων DMAsSugar-Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate και των αντίστοιχων θειο-αρσενοσακχάρων.

### 3.2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

#### **3.2.1. ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ HPLC ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ESI-MS/MS ΚΑΙ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΣΑΡΩΣΗΣ ΠΡΟΔΡΟΜΩΝ ΙΟΝΤΩΝ (PRECURSOR ION SCAN) ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙΝΟΥΡΙΩΝ ΟΞΟ- ΚΑΙ ΘΕΙΟ- ΑΡΣΕΝΟΣΑΚΧΑΡΩΝ**

Κατά τη διάρκεια των αναλύσεων με την τεχνική HPLC-ESI-MS/MS και τη μέθοδο σάρωσης πρόδρομων ιόντων, χρησιμοποιήθηκε το αυτοματοποιημένο σύστημα HPLC του φασματομέτρου μάζας TSQ Quantum (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA). Επιλέχθηκε χρωματογραφία ανιονανταλλαγής, χρησιμοποιώντας τη στήλη PRPX-100 (Μήκος x Εσωτερική Διάμετρος = 250 x 4.1 mm, Hamilton, Reno, NV, USA), πριν από την οποία τοποθετήθηκε η αντίστοιχη προστήλη PRPX-100. Για το διαχωρισμό των συστατικών εφαρμόστηκε βαθμιδωτή έκλυση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη Α υδατικό διάλυμα όξινου ανθρακικού αμμωνίου ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ), συγκέντρωσης 20 mM και ως διαλύτη Β υδατικό διάλυμα  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , συγκέντρωσης 20 mM και περιεκτικότητας σε μεθανόλη 40% κ.ο. Το pH των διαλυμάτων ρυθμίστηκε στην τιμή 10, με τη χρήση διαλύματος υδροξειδίου του αμμωνίου ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ). Επιλέχθηκε ταχύτητα ροής του εκλούσματος ίση με 1 mL/min και βρόχος εισαγωγής δείγματος χωρητικότητας 20  $\mu\text{L}$ . Όσον αφορά το πρόγραμμα έκλυσης, αυτό παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.1.

**Πίνακας 3.1.** Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλυσης της μεθόδου HPLC-ESI-MS/MS.

Χρόνος (min)	Διαλύτης Α (%)	Διαλύτης Β (%)	Μεθανόλη (%)
0	75	25	10
5	75	25	10
6	0	100	40
30	0	100	40
30.5	75	25	10
35	75	25	10

Η συγκεκριμένη χρωματογραφική μέθοδος αναπτύχθηκε παλαιότερα από την ομάδα μας, για την ανίχνευση των τεσσάρων θειο-αρσενοσακχάρων με τη μέθοδο HPLC-ESI-MS/MS-SRM.<sup>16</sup>

Η ανίχνευση των ενώσεων πραγματοποιήθηκε με το φασματόμετρο μάζας TSQ Quantum, το οποίο είναι εξοπλισμένο με τρία τετράπολα και πηγή ιονισμού



με ηλεκτροψεκασμό (ESI). Εφαρμόστηκε μέθοδος ανίχνευσης θετικών ιόντων, με βέλτιστες παραμέτρους λειτουργίας του οργάνου αυτές που φαίνονται στον Πίνακα 3.2. Στην πηγή ιονισμού οδηγείται το 24% του εκλούσματος από τη στήλη, ενώ το υπόλοιπο 76% καταλήγει στα απόβλητα (μέσω ενός συνδέσμου “T”).

**Πίνακας 3.2.** Παράμετροι λειτουργίας της τεχνικής ESI-MS/MS.

Παράμετροι Λειτουργίας	Βέλτιστες Τιμές
Δυναμικό Ηλεκτροψεκασμού [kV]	4.1
Ροή Βοηθητικού Αερίου – N <sub>2</sub> [Αυθ. Μονάδες]	25
Ροή Εκνεφωτικού Αερίου – N <sub>2</sub> [Αυθ. Μονάδες]	45
Δυναμικό Πηγής Ιονισμού [V]	0
Πίεση Αερίου στην Κυψελίδα Πρόσκρουσης (mtorr)	1.0
Διαχωριστική Ικανότητα τετραπόλων, Q1, Q3 (amu)	0.7
Θερμοκρασία Τριχοειδούς [°C]	300

### 3.2.2. ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Για τις αναλύσεις χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια:

- Μεθανόλη (gradient grade for HPLC, Sigma-Aldrich, Germany).
- Όξινο ανθρακικό αμμώνιο, NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (puriss., Riedel-de Haen, Seelze, Germany).
- Διάλυμα υδροξειδίου του αμμωνίου, NH<sub>4</sub>OH (puriss., p.a., Fluka, Buchs, Switzerland).

### 3.2.3. ΔΕΙΓΜΑΤΑ

#### Εμπορικά δείγματα από φύκη “kelp-1” και “kelp-2”

Οι ενώσεις αρσενικού στις οποίες βασίστηκε η ανάπτυξη της μεθόδου σάρωσης πρόδρομων ιόντων είναι τα τέσσερα οξο-αρσενοσάκχαρα DMAsSugar-Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate, καθώς και τα αντίστοιχα θειούχα παράγωγα, τα οποία απεικονίζονται στα Σχήματα 3.1 και 3.2, αντίστοιχα. Απουσία πρότυπων διαλυμάτων των ενώσεων αυτών, επιλέχθηκε η χρησιμοποίηση εμπορικών δειγμάτων από φύκη, τα οποία περιέχουν τις προς εξέταση ενώσεις. Τα δείγματα αυτά είναι τα “kelp-1” και “kelp-2”, τα οποία προμηθεύτηκαν από τον

Καναδά (Galloway's, Richmond, B.C. Canada), το 1999 (batch no. 231-0390-13) και 2005 (batch no. 231-0390-13), αντίστοιχα. Η εκχύλιση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με τον τρόπο που περιγράφεται στη συνέχεια.

- ◆ Εκχύλιση του στερεού δείγματος με απιονισμένο νερό (μάζα στερεού δείγματος/ όγκος νερού = 1g / 20mL).
- ◆ Ανακίνηση του αιωρήματος για 10 min σε συσκευή περιδίνησης (vortex), έως ότου επιτευχθεί ομογενοποίηση του.
- ◆ Φυγοκέντριση του αιωρήματος για 15 min - Απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού, το οποίο αποτελεί και το επιθυμητό εκχύλισμα.

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των αρσενοσακχάρων στα δύο δείγματα, καθώς και η συνολική συγκέντρωση αρσενικού.

**Πίνακας 3.3.** Συγκεντρώσεις αρσενοσακχάρων στα δείγματα “kelp-1” και “kelp-2”

<i>Δείγμα</i>	<i>οξο-αρσενοσάκχαρα</i>			
	<i>-Glycol</i>	<i>-Phosphate</i>	<i>-Sulfonate</i>	<i>-Sulfate</i>
<b>“kelp-1”</b>	8.2±2.3	0.77±0.90	1.3±0.8	14.7±2.6
<b>μg As/ g δείγματος</b>	<b>25±3.7</b>			
<i>Δείγμα</i>	<i>θειο-αρσενοσάκχαρα</i>			
	<i>-Glycol</i>	<i>-Phosphate</i>	<i>-Sulfonate</i>	<i>-Sulfate</i>
<b>“kelp-2”</b>	0.25±0.06	0.25±0.06	2.6±0.5	3.3±0.5
<b>μg As/ g δείγματος</b>	<b>75±15.9</b>			

#### **Εμπορικό δείγμα από φύκη “kelp-3”**

Το συγκεκριμένο δείγμα (*Ascophyllum nodosum*) διατίθεται στο εμπόριο και προμηθεύτηκε από τον Καναδά. Βρίσκεται με τη μορφή ομογενούς, κονιοποιημένης σκόνης και εκχυλίστηκε με απιονισμένο νερό (*στερεό δείγμα/ διαλύτης = 1:20*). Κατά την εκχύλιση έλαβε χώρα ανάδευση επί 30 min, σε συσκευή περιδίνησης και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Την εκχύλιση του στερεού ακολούθησε φυγοκέντρωσή του για 15 min, οπότε το υπερκείμενο υγρό απομακρύνθηκε και αναλύθηκε άμεσα.

*Σαλιγκάρια από τη λίμνη Magic Lake ("snail").*

Το συγκεκριμένο δείγμα συλλέχθηκε από τη λίμνη Magic Lake, στην περιοχή Pender Island, στον Καναδά, τον Ιούνιο του 2008 και στάλθηκε στο εργαστήριο μας, ως λυοφιλωμένο στερεό δείγμα. Πραγματοποιήθηκε εκχύλιση του στερεού με απιονισμένο νερό (*στερεό δείγμα/ διαλύτης = 1:20*), μέσω ανάδευσης, επί 30 min, σε συσκευή περιδίνησης και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Την εκχύλιση ακολούθησε φυγοκέντριση για 15 min και απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού.

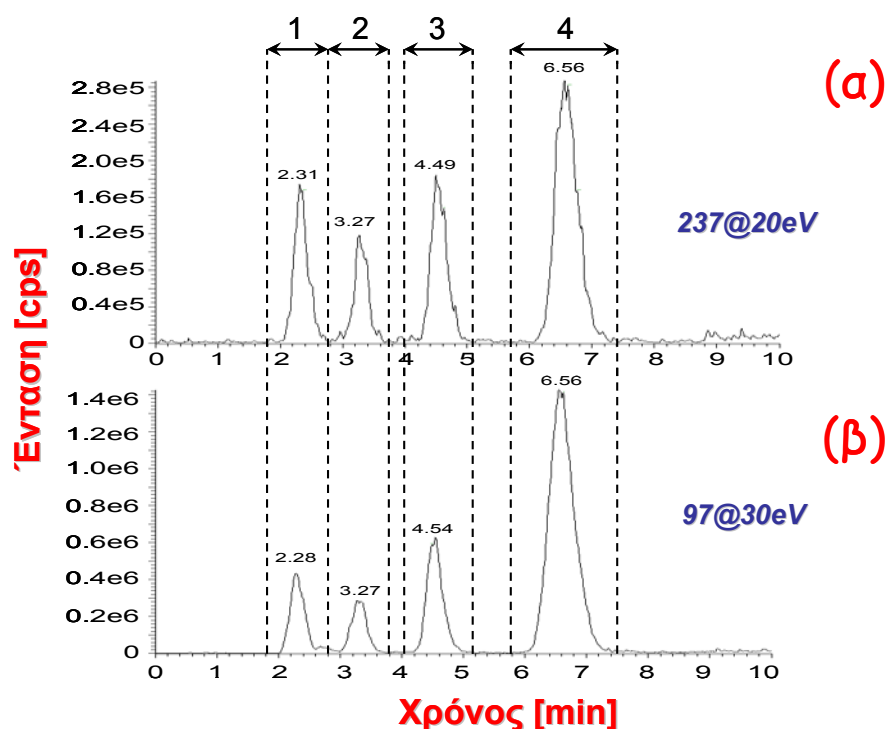
### 3.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### **3.3.1. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ HPLC-ESI-MS/MS ΜΕ ΣΑΡΩΣΗ ΠΡΟΔΡΟΜΩΝ ΙΟΝΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙΝΟΥΡΙΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΟΞΟ- ΚΑΙ ΘΕΙΟ- ΑΡΣΕΝΟΣΑΚΧΑΡΩΝ**

Η ανάπτυξη μεθόδου Σάρωσης Πρόδρομων Ιόντων, εφαρμόζοντας την τεχνική HPLC-ESI-MS/MS, για την ανίχνευση καινούριων ενώσεων οξο- και θειο-αρσενοσακχάρων, βασίστηκε στην ανάλυση εκχυλισμάτων των δειγμάτων “kelp-1” και “kelp-2”. Όπως έχει ήδη αναφερθεί στις προηγούμενες παραγράφους, τα οξο- και θειο-αρσενοσάκχαρα ακολουθούν ένα γνωστό μονοπάτι διάσπασης, δίνοντας χαρακτηριστικά προϊόντα ιόντα κατά τη θραυσματοποίησή τους. Πιο συγκεκριμένα, τα οξο-αρσενοσάκχαρα DMAsSugar-Glycol, -Phosphate, -Sulfonate, -Sulfate, -Carboxyl, -Carboxyl-2, -Carbamate, -Mannitol και -Sulfonate-2 δίνουν χαρακτηριστικά προϊόντα ιόντα με λόγους  $m/z$  237 και 97, ενώ τα θειο-αρσενοσάκχαρα DMThioAsSugar-Glycol, -Phosphate, -Sulfonate, -Sulfate, -Adenine, -AminoSulfonate, -Carbamate, -Carboxyl, -Carboxyl-2, -Hydroxy, -Methoxy και -Sulfonate-2, δίνουν τα προϊόντα ιόντα  $m/z$  253 και 97.<sup>27</sup>

Αρχικά, η μέθοδος σάρωσης πρόδρομων ιόντων εφαρμόστηκε για την ανίχνευση των τεσσάρων οξο-αρσενοσακχάρων DMAsSugar-Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate, τα οποία περιέχονται στο εκχύλισμα “kelp-1”.<sup>16</sup> Από την ανάλυση, λοιπόν, του δείγματος αυτού, προέκυψαν τα χρωματογραφήματα του Σχήματος 3.4, όπου απεικονίζεται το συνολικό ρεύμα πρόδρομων ιόντων, τα οποία, διασπώμενα, δίνουν τα προεπιλεγμένα προϊόντα ιόντα  $m/z$  237 και 97, σε συνάρτηση με το χρόνο έκλουσης. Στο πρώτο χρωματογράφημα (Σχήμα 3.4(α)) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που ελήφθησαν, επιλέγοντας σαν προϊόν ιόν το  $m/z$  237, ενώ στο δεύτερο (Σχήμα 3.4(β)) φαίνονται τα αντίστοιχα αποτελέσματα για το προϊόν ιόν  $m/z$  97.

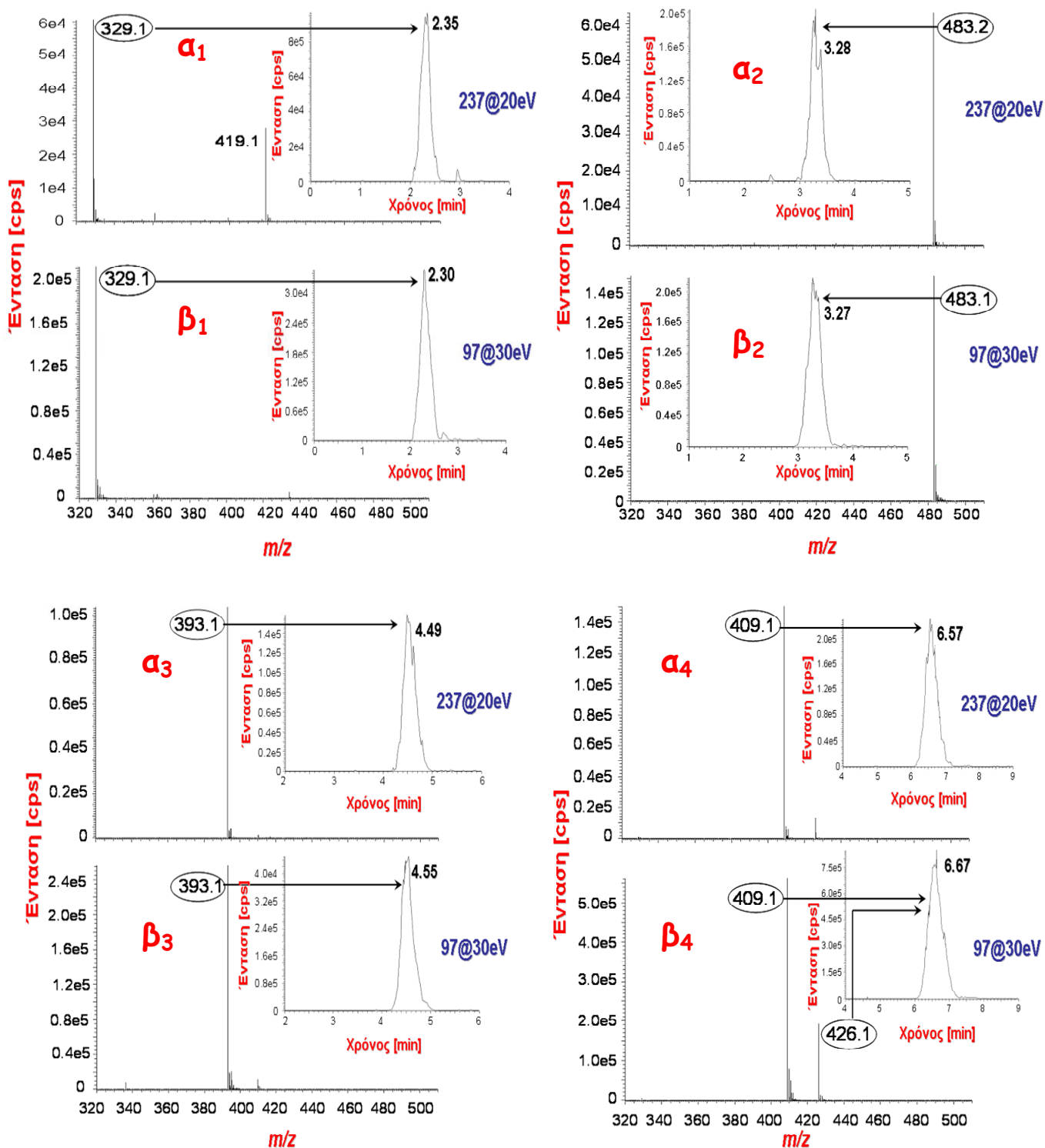
Η βέλτιστη ενέργεια διάσπασης, για την οποία μεγιστοποιείται η ένταση του σχηματιζόμενου προϊόντος ιόντος  $m/z$  237 ορίζεται στην τιμή 20 eV, ενώ η αντίστοιχη τιμή για το ιόν  $m/z$  97 ορίζεται στα 30 eV. Με σκοπό την επίτευξη μεγαλύτερης ευαισθησίας κατά την ανίχνευση των πρόδρομων ιόντων, τα δύο χρωματογραφήματα που ακολουθούν προέκυψαν σε δύο διαφορετικές χρωματογραφικές αναλύσεις, στη μια από αυτές επιλέγοντας σαν χαρακτηριστικό προϊόν ιόν το  $m/z$  237 και στην άλλη το  $m/z$  97.



**Σχήμα 3.4.** Χρωματογράφημα σάρωσης πρόδρομων ιόντων του δείγματος “kelp-1”, επιλέγοντας σαν χαρακτηριστικά προϊόντα ιόντα τα (α)  $m/z$  237 και (β)  $m/z$  97.

Σε καθένα από τα παραπάνω χρωματογραφήματα, παρατηρούνται τέσσερις συμμετρικές χρωματογραφικές κορυφές, οι οποίες διαχωρίζονται πλήρως, και περικλείονται εντός των ζωνών 1, 2, 3 και 4. Τα φάσματα μάζας πρόδρομων ιόντων που αντιστοιχούν σε καθεμία κορυφή, αναλύθηκαν λεπτομερώς και αξιολογήθηκαν, προκειμένου να διερευνηθούν τα πρόδρομα ιόντα που ανιχνεύονται, με την παρούσα μέθοδο. Στο Σχήμα 3.5 παρουσιάζονται αυτά τα φάσματα μάζας, καθώς επίσης και τα αντίστοιχα αναδομημένα χρωματογραφήματα ιόντων που αντιστοιχούν σε κάθε πρόδρομο ιόν.

Για να θεωρηθεί επιτυχής η ταυτοποίηση των ενώσεων που ανιχνεύονται με τη μέθοδο σάρωσης πρόδρομων ιόντων, πρέπει να πληρούνται τα δύο ακόλουθα κριτήρια: (α) τα πρόδρομα ιόντα με τον ίδιο ακέραιο λόγο  $m/z$ , πρέπει να είναι υπεύθυνα για το σχηματισμό, τόσο του προϊόντος ιόντος  $m/z$  237, όσο και του  $m/z$  97 και (β) τα πρόδρομα ιόντα με τον ίδιο ακέραιο λόγο  $m/z$ , τα οποία ανιχνεύονται κατά την παρακολούθηση των δύο προϊόντων ιόντων, πρέπει να επιδεικνύουν την ίδια χρωματογραφική συμπεριφορά, να έχουν δηλαδή τους ίδιους χρόνους έκλυσης και τα ίδια χρωματογραφικά προφίλ και για τα δύο προϊόντα ιόντα.

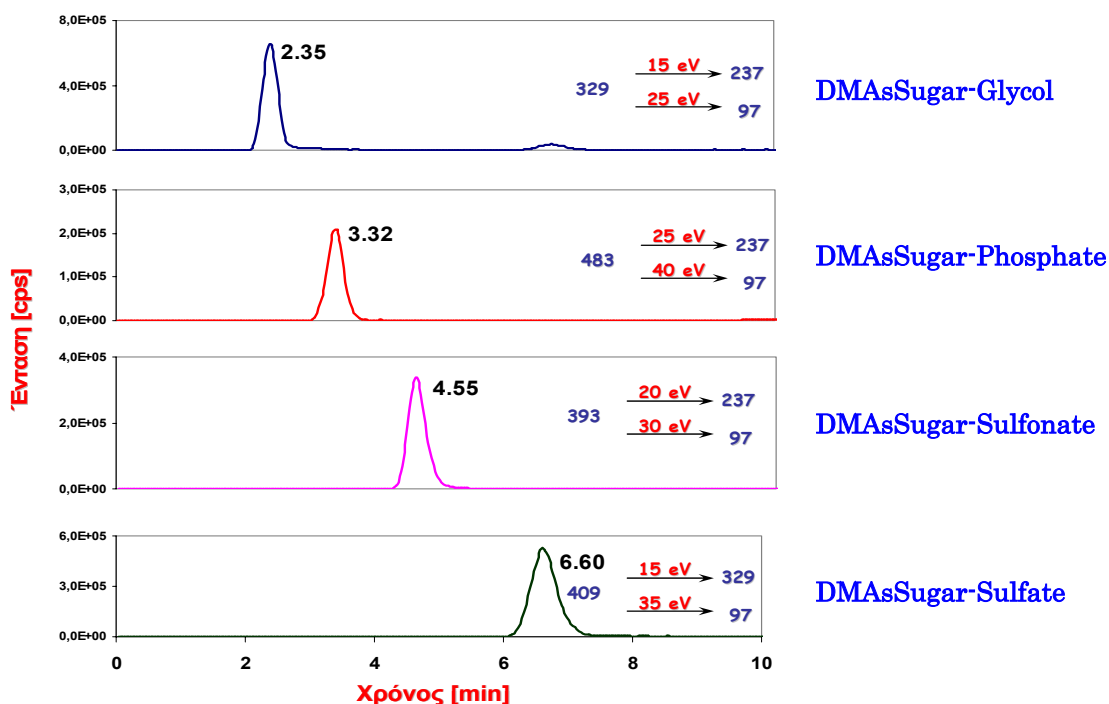


Σχήμα 3.5. Φάσματα μάζας πρόδρομων ιόντων, για τα προϊόντα ιόντα  $m/z$  237 ( $\alpha_1$ - $\alpha_4$ ) και  $m/z$  97 ( $\beta_1$ - $\beta_4$ ), και τα αντίστοιχα αναδομημένα χρωματογραφήματα ιόντων κάθε πρόδρομου ιόντος, όπως προέκυψαν από την ανάλυση του δείγματος “kelp-1”.

Στο Σχήμα 3.5, συγκρίνοντας τα ζεύγη των χρωματογραφικών κορυφών, που αντιστοιχούν στα πρόδρομα ιόντα, τα οποία προκύπτουν κατά την παρακολούθηση των προϊόντων ιόντων  $m/z$  237 και 97 (π.χ.  $\alpha_1$  με  $\beta_1$ , ...,  $\alpha_4$  με  $\beta_4$ ), παρατηρούνται

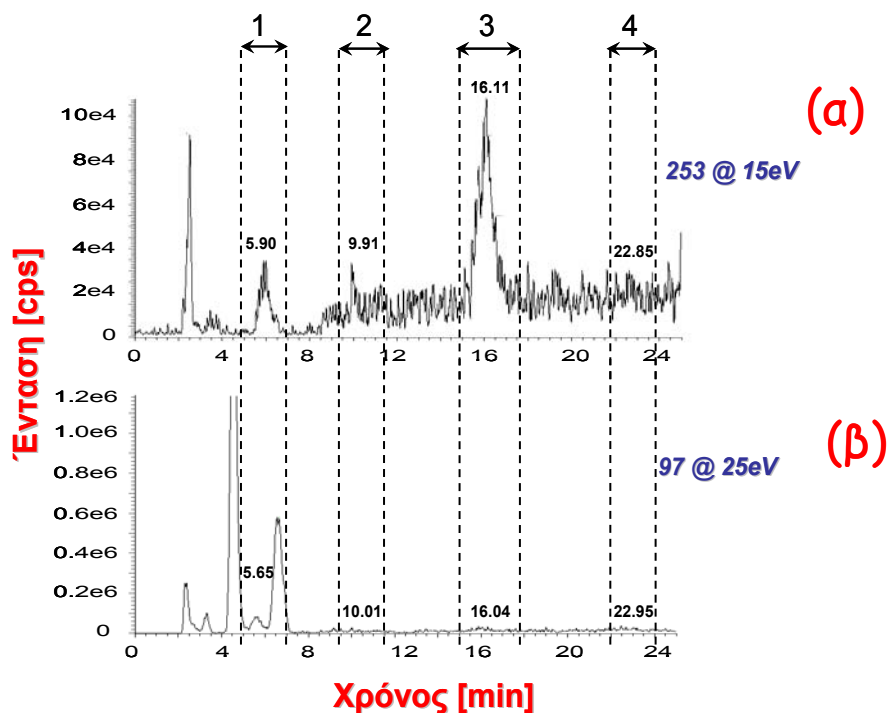
σχεδόν οι ίδιοι χρόνοι έκλουσης και τα ίδια χρωματογραφικά προφίλ. Επομένως, πληρείται το δεύτερο από τα δύο κριτήρια που αναφέρθηκαν παραπάνω. Επίσης, και στις δύο περιπτώσεις, δηλαδή κατά την παρακολούθηση τόσο του ιόντος  $m/z$  237 όσο και του ιόντος  $m/z$  97, προκύπτουν οι ίδιες ονομαστικές μάζες για τα πρόδρομα ιόντα, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με το πρώτο κριτήριο. Αυτό ισχύει και για τα τέσσερα μοριακά ιόντα που αποδίδονται στα οξο-αρσενοσάκχαρα DMAsSugar-Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate, δηλαδή για τα  $m/z$  329 (Σχήμα 3.5 (α<sub>1</sub>), (β<sub>1</sub>)), 483 (Σχήμα 3.5 (α<sub>2</sub>), (β<sub>2</sub>)), 393 (Σχήμα 3.5 (α<sub>3</sub>), (β<sub>3</sub>)) και 409 (Σχήμα 3.5 (α<sub>4</sub>), (β<sub>4</sub>)). Όσον αφορά το πρόδρομο ιόν  $m/z$  419, το οποίο εμφανίζεται στο χρωματογράφημα του Σχήματος 3.5 (α<sub>1</sub>), αυτό δεν αντιστοιχεί σε οξο-αρσενοσάκχαρο, αφού ο σχηματισμός του δεν παρατηρείται σε καμία άλλη περίπτωση. Επίσης, το πρόδρομο ιόν με λόγο  $m/z$  426 στο Σχήμα 3.5(β<sub>4</sub>) προέρχεται από το πρόδρομο ιόν  $m/z$  409, έπειτα από σχηματισμό  $[M+NH_4]^+$ , αντί για  $[M+H]^+$ . Το  $NH_4^+$  προέρχεται από την κινητή φάση, δηλαδή από το  $NH_4HCO_3$  και το  $NH_4OH$  που προστέθηκε, προς ρύθμιση του pH.

Αναλύοντας το δείγμα με τη μέθοδο HPLC-ESI-MS/MS-SRM, που αναπτύχθηκε σε προηγούμενη μελέτη μας,<sup>16</sup> προέκυψε συμφωνία μεταξύ των χρόνων έκλουσης των τεσσάρων οξο-αρσενοσάκχάρων (Σχήμα 3.6), και των κορυφών του χρωματογραφήματος του Σχήματος 3.5. Επιβεβαιώθηκε, λοιπόν, η ανίχνευση των ενώσεων αυτών με τη μέθοδο σάρωσης πρόδρομων ιόντων.



Σχήμα 3.6. Χρωματογράφημα HPLC-ESI-MS/MS-SRM του δείγματος “kelp-1”.

Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε η ίδια μέθοδος, για την ανίχνευση θειο-αρσενοσακχάρων, αναλύοντας το εκχύλισμα του δείγματος “kelp-2”, το οποίο περιέχει τις ενώσεις DMThioAsSugar-Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate. Κατά την ανάλυση του εκχυλίσματος, έλαβε χώρα παρακολούθηση των χαρακτηριστικών ιόντων  $m/z$  253 και 97, με βέλτιστες ενέργειες διάσπασης 15 eV και 25 eV, αντίστοιχα, οπότε προέκυψαν τα χρωματογράφημα του Σχήματος 3.7.



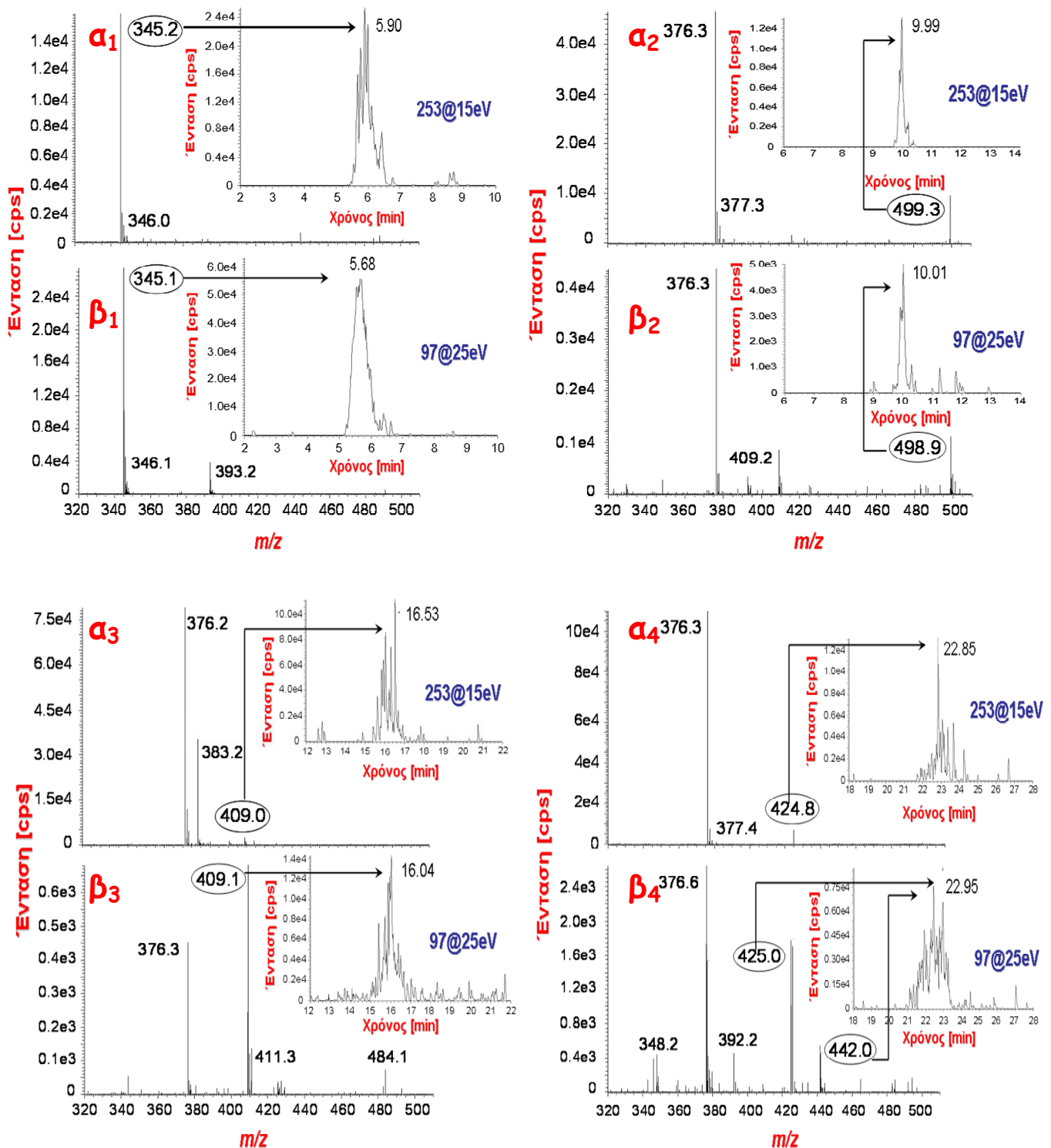
Σχήμα 3.7. Χρωματογράφημα σάρωσης πρόδρομων ιόντων του δείγματος “kelp-2”,

Λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης των θειο-αρσενοσακχάρων στο συγκεκριμένο δείγμα, ήταν απαραίτητη η λεπτομερής διερεύνηση ολόκληρου του χρωματογραφήματος και όχι μόνο των περιοχών στις οποίες εμφανίζονται κορυφές. Με τον τρόπο αυτό, είναι δυνατόν να ανιχνευτούν ενώσεις θειο-αρσενοσακχάρων, οι οποίες συναντώνται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στο δείγμα. Για την επιτυχή ανίχνευση πρόδρομων ιόντων που ανήκουν σε θειο-αρσενοσακχάρα, πρέπει να ισχύουν τα κριτήρια: (α) τα πρόδρομα ιόντα με το ίδιο  $m/z$ , πρέπει να δίνουν τα προϊόντα ιόντα  $m/z$  253 και  $m/z$  97 και (β) τα πρόδρομα ιόντα με το ίδιο  $m/z$ , τα οποία ανιχνεύονται κατά την παρακολούθηση των δύο προϊόντων ιόντων, πρέπει να έχουν την ίδια χρωματογραφική συμπεριφορά και στις δύο περιπτώσεις.

Εξετάζοντας το συνολικό χρωματογράφημα και το συνολικό φάσμα μάζας που προέκυψε σε κάθε περίπτωση, εντοπίστηκαν τέσσερα πρόδρομα ιόντα, τα οποία πληρούν τα δύο κριτήρια. Πρόκειται για τα πρωτονωμένα μόρια των τεσσάρων



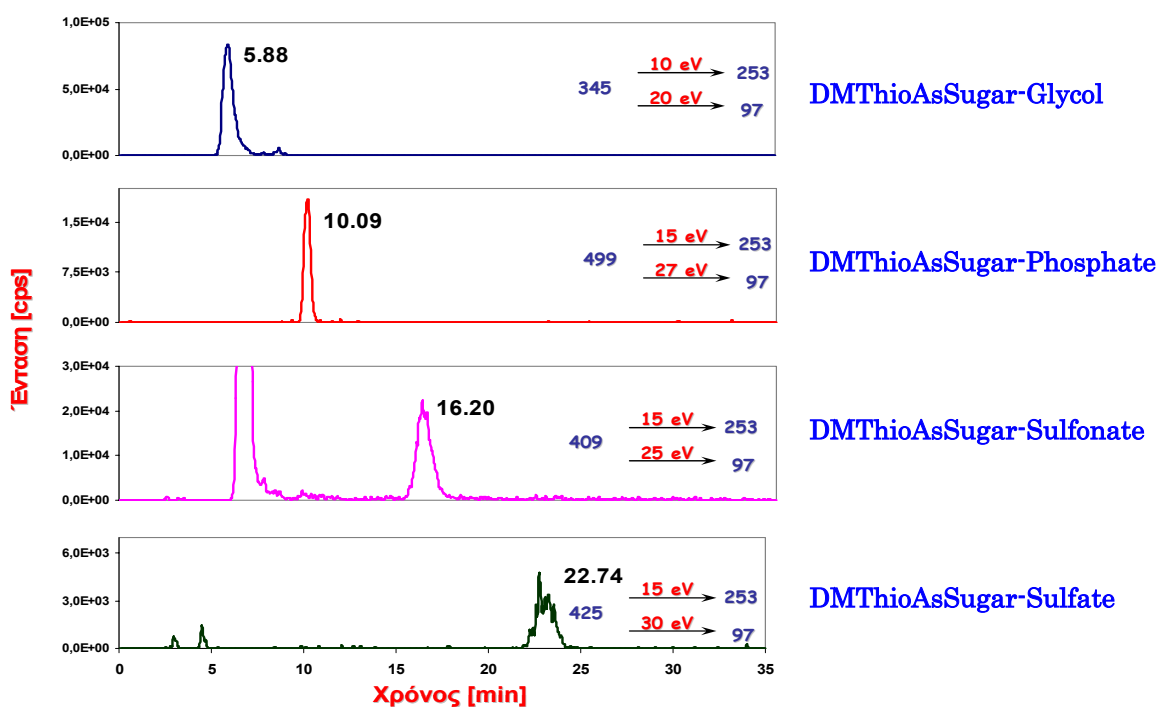
θειο-αρσενοσακχάρων -Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate, με λόγους  $m/z$  345, 499, 409 και 425, αντίστοιχα. Τα φάσματα μάζας αυτών των πρόδρομων ιόντων και τα αντίστοιχα αναδομημένα χρωματογραφήματα, φαίνονται στο Σχήμα 3.8.



Σχήμα 3.8. Φάσματα μάζας πρόδρομων ιόντων για τα προϊόντα ιόντα  $m/z$  253 ( $\alpha_1$ - $\alpha_4$ ) και  $m/z$  97 ( $\beta_1$ - $\beta_4$ ) και τα αντίστοιχα αναδομημένα χρωματογραφήματα ιόντων κάθε πρόδρομου ιόντος, όπως προέκυψαν από την ανάλυση του δείγματος “kelp-2”.

Στο φάσμα μάζας του Σχήματος 3.8(β<sub>4</sub>), εκτός από το πρωτονιωμένο μόριο της ένωσης DMThioAsSugar-Sulfate ( $[M+H]^+$  με λόγο  $m/z$  425), σχηματίζεται και το αντίστοιχο ιόν  $[M+NH_4]^+$ , με λόγο  $m/z$  442. Από την άλλη, το πρόδρομο ιόν  $m/z$  376 στα φάσματα μάζας των Σχημάτων 3.8(α<sub>2</sub>), (β<sub>2</sub>), (α<sub>3</sub>), (β<sub>3</sub>), (α<sub>4</sub>) και (β<sub>4</sub>), δεν αποδίδεται σε θειο-αρσενοσάκχαρο, αφού η συγκεκριμένη μάζα εμφανίζεται και στην περίπτωση εισαγωγής στο σύστημα “τυφλών” διαλυμάτων. Επίσης, το μοριακό ιόν  $m/z$  376 δεν αντιστοιχεί σε χρωματογραφική κορυφή, αλλά σε ένα “πλατώ” και, η ύπαρξη του, αποδίδεται, είτε σε προσμίξεις που υπάρχουν στην κινητή φάση, είτε σε συστατικά που έχουν κατακρατηθεί στη στήλη από προηγούμενες αναλύσεις και εκκλύονται, καθώς αυξάνεται το ποσοστό της μεθανόλης στην κινητή φάση. Σε μετέπειτα αναλύσεις, κατά τις οποίες παρασκευάστηκαν φρέσκα διαλύματα έκλυσης, το συγκεκριμένο μοριακό ιόν δεν παρατηρήθηκε. Ένα άλλο χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το πρόδρομο ιόν  $m/z$  484, το οποίο, ενώ παρατηρείται στο φάσμα μάζας του Σχήματος 3.8(β<sub>3</sub>), ωστόσο δεν εμφανίζεται στο αντίστοιχο φάσμα του Σχήματος 3.8(α<sub>3</sub>), οπότε δεν ανήκει σε θειο-αρσενοσάκχαρο.

Αναλύοντας το δείγμα “kelp-2” με τη μέθοδο HPLC-ESI-MS/MS-SRM, προέκυψε συμφωνία στους χρόνους έκλυσης των τεσσάρων θειο-αρσενοσακχάρων (Σχήμα 3.9), με τους χρόνους έκλυσης των κορυφών στα χρωματογραφήματα του Σχήματος 3.8. Αυτό επιβεβαιώνει την αντιστοιχία των τελευταίων κορυφών με τα τέσσερα θειο-αρσενοσάκχαρα –Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate.



Σχήμα 3.9. Χρωματογράφημα HPLC-ESI-MS/MS-SRM του δείγματος “kelp-2”.

Η μέθοδος σάρωσης πρόδρομων ιόντων χαρακτηρίζεται από χαμηλότερη ευαισθησία, σε σχέση με τη μέθοδο SRM. Σε μια προσπάθεια βελτιστοποίησης της ευαισθησίας και της εκλεκτικότητας της μεθόδου, εξετάστηκαν η θερμοκρασία του τριχοειδούς (250°C, 300°C και 350°C), η πίεση του αερίου στην κυψελίδα πρόσκρουσης (0.7, 1.0 και 1.5 mtorr) και η ενέργεια που εφαρμόζεται στην πηγή ιονισμού (0, 5 και 10 V). Ωστόσο, τα βέλτιστα αποτελέσματα προέκυψαν με τη μέθοδο που περιγράφηκε παραπάνω.

### 3.3.2. Όρια Ανίχνευσης της Μεθόδου HPLC-ESI-MS/MS-Σάρωση Πρόδρομων Ιόντων για τα Οξο- και Θειο- Αρσενοσάκχαρα

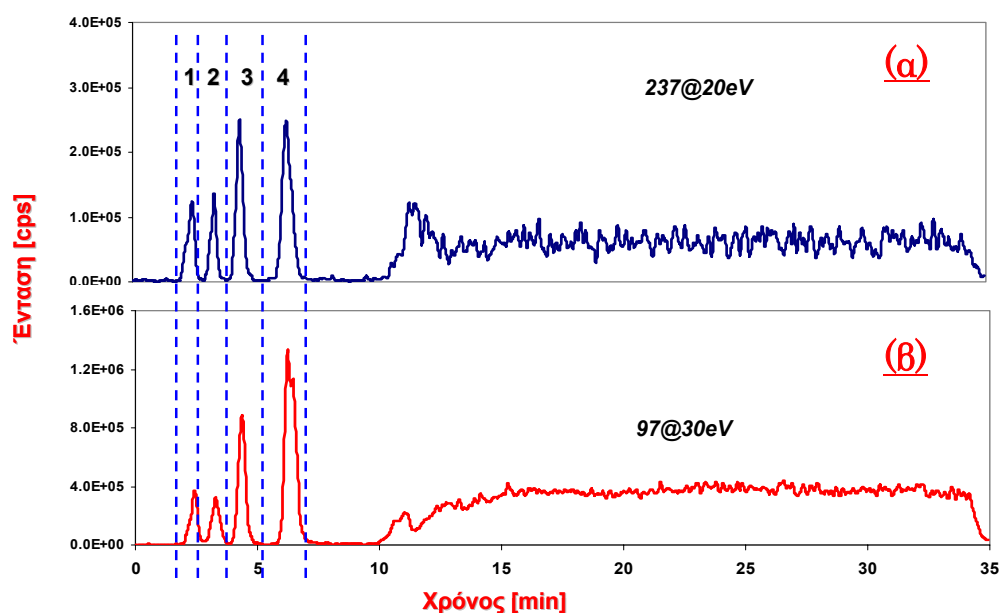
Προκειμένου να υπολογιστούν τα όρια ανίχνευσης για τα τέσσερα οξο- και τα τέσσερα θειο- αρσενοσάκχαρα με την τεχνική HPLC-ESI-MS/MS και τη μεθοδολογία σάρωσης πρόδρομων ιόντων, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις των εκχυλισμάτων “kelp-1” και “kelp-2”. Ως “όριο ανίχνευσης” ορίζεται η χαμηλότερη συγκέντρωση του αναλύτη, για την οποία η ένταση του αντίστοιχου πρόδρομου ιόντος είναι τρεις φορές μεγαλύτερη από το σήμα θορύβου. Το παραπάνω πρέπει να ισχύει κατά την παρακολούθηση και των δύο προϊόντων ιόντων, ενώ τα αποτελέσματα που προέκυψαν φαίνονται στον Πίνακα 3.4. Οι συγκεντρώσεις των αρσενοσακχάρων στα εκχυλίσματα υπολογίστηκαν με τη μέθοδο HPLC-ICP-MS, που αναπτύχθηκε σε μελέτη μας, για την ανίχνευση των τεσσάρων θειο-αρσενοσακχάρων DMThioAsSugar-Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate.<sup>16</sup> Λόγω αδυναμίας διαχωρισμού, με τη συγκεκριμένη μέθοδο, της ένωσης DMThioAsSugar-Glycol, από τα οξο-αρσενοσάκχαρα που περιέχονται στο δείγμα “kelp-2”, δεν κατέστη δυνατός ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της ένωσης αυτής και, επομένως, και των ορίων ανίχνευσής της.

**Πίνακας 3.4.** Όρια ανίχνευσης για τα οξο- και θειο- αρσενοσάκχαρα.

Ένωση	Όρια Ανίχνευσης (µg As/L)	
	οξο-αρσενοσάκχαρα	θειο-αρσενοσάκχαρα
-Glycol	13.6	-
-Phosphate	4.8	6.3
-Sulfonate	8.3	65.2
-Sulfate	73.7	81.4

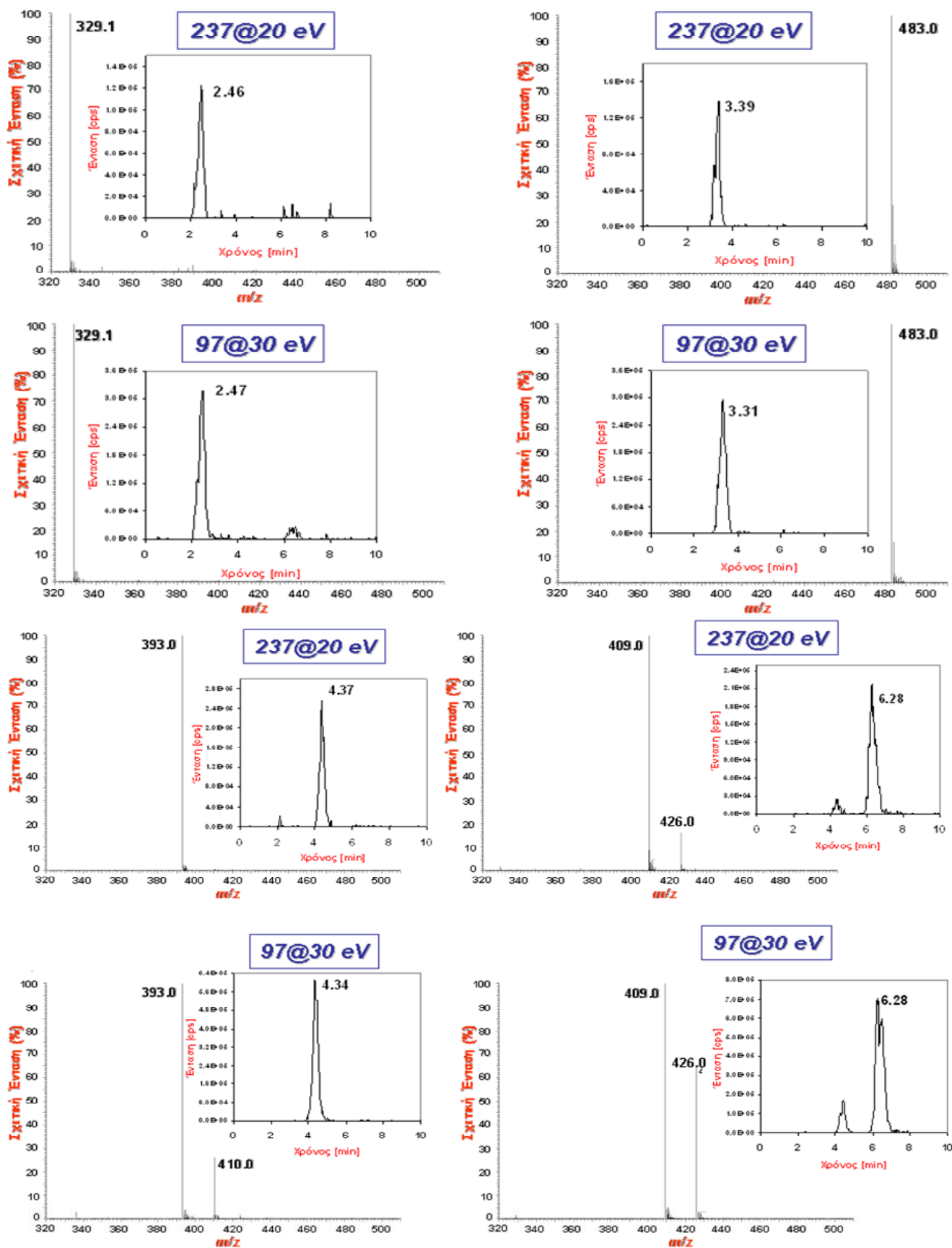
### 3.3.3. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ HPLC-ESI-MS/MS - ΣΑΡΩΣΗ ΠΡΟΔΡΟΜΩΝ ΙΟΝΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Έπειτα από την ανάπτυξη της μεθόδου σάρωσης πρόδρομων ιόντων, ακολούθησε η εφαρμογή της για την ανάλυση βιολογικών δειγμάτων. Αρχικά αναλύθηκε το εμπορικά διαθέσιμο δείγμα από φύκη “kelp-3”, οπότε παρακολουθώντας τα ιόντα  $m/z$  237 και 97 (χαρακτηριστικά των οξο-αρσενοσακχάρων) προέκυψε το χρωματογράφημα του Σχήματος 3.10.



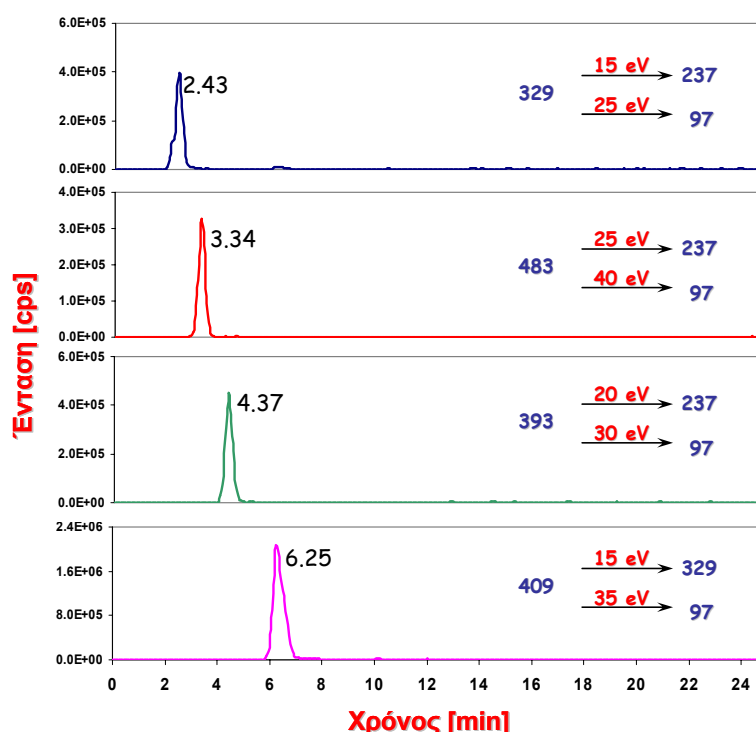
**Σχήμα 3.10.** Χρωματογράφημα σάρωσης πρόδρομων ιόντων του δείγματος “kelp-3”, επιλέγοντας σαν χαρακτηριστικά προϊόντα ιόντα τα (α)  $m/z$  237 και (β)  $m/z$  97.

Στο παραπάνω χρωματογράφημα διακρίνονται τέσσερις οξείες και συμμετρικές κορυφές, στις οποίες, με βάση το φάσμα μάζας πρόδρομων ιόντων, αντιστοιχούν τα μοριακά ιόντα  $m/z$  329, 483, 393 και 409 (πρωτονιωμένα μόρια οξο-αρσενοσακχάρων DMAsugar-Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate). Στη συνέχεια, εξετάστηκαν τα φάσματα μάζας, για το καθένα από τα παραπάνω μοριακά ιόντα και τα αντίστοιχα αναδομημένα χρωματογραφήματα ιόντων, που φαίνονται στο Σχήμα 3.11.



Σχήμα 3.11. Φάσματα μάζας πρόδρομων ιόντων για τα προϊόντα ιόντα  $m/z$  237 και  $m/z$  97 και τα αντίστοιχα αναδομημένα χρωματογραφήματα ιόντων κάθε πρόδρομου ιόντος, όπως προέκυψαν από την ανάλυση του δείγματος “kelr-3”.

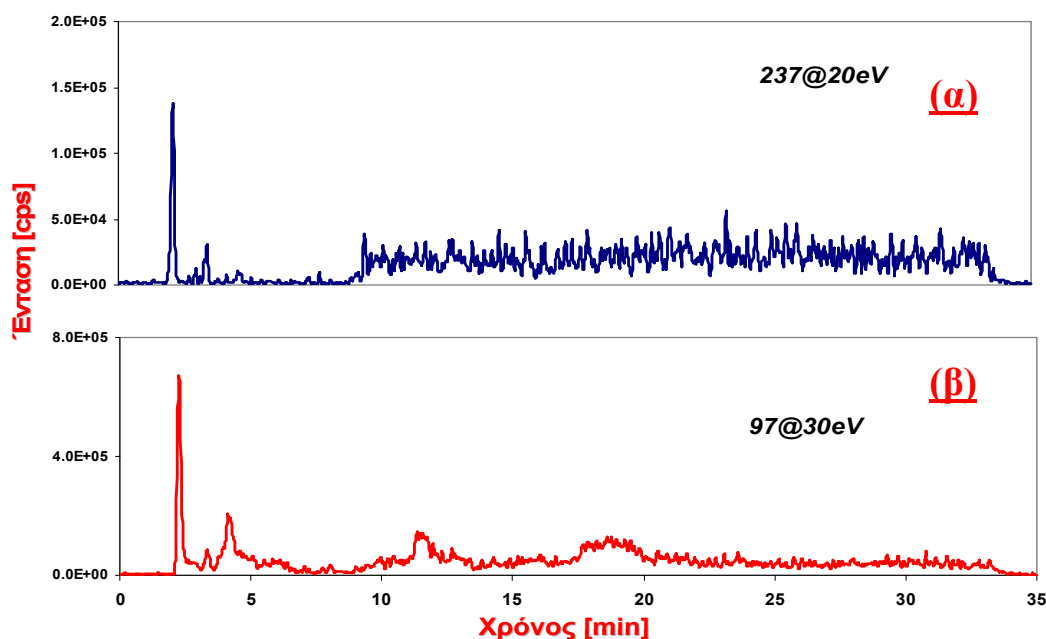
Όπως μπορεί να διαπιστώσει κανείς στα παραπάνω σχήματα, ικανοποιούνται και τα δύο κριτήρια (α) και (β) που απαιτούνται, ώστε να θεωρηθεί επιτυχής η ανίχνευση πρόδρομων ιόντων οξο-αρσενοσακχάρων, με τη μέθοδο σάρωσης πρόδρομων ιόντων. Πιο συγκεκριμένα, από τα φάσματα μάζας επιβεβαιώνεται η ανίχνευση των τεσσάρων πρόδρομων ιόντων  $m/z$  329, 483, 393 και 409, τα οποία αντιστοιχούν στα πρωτονιωμένα μόρια των τεσσάρων οξο-αρσενοσακχάρων DMA Sugar-Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate. Η ανίχνευση των παραπάνω ενώσεων, με τη συγκεκριμένη μέθοδο, έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα που προέκυψαν κατά την ανάλυση του δείγματος “kelp-3” με την μέθοδο HPLC-ESI-MS/MS-SRM (Σχήμα 3.12).



Σχήμα 3.12. Χρωματογράφημα HPLC-ESI-MS/MS-SRM του δείγματος “kelp-3”.

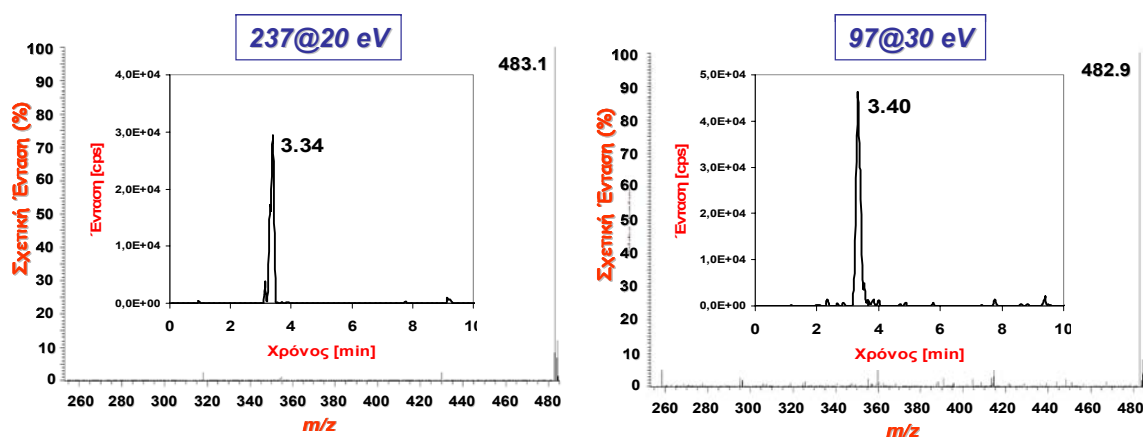
Στο παραπάνω δείγμα δεν ανιχνεύτηκαν άλλα πρόδρομα ιόντα τα οποία να ικανοποιούν τα κριτήρια (α) και (β), ενώ, εφαρμόζοντας την μέθοδο σάρωσης πρόδρομων ιόντων για την ανίχνευση θειο-αρσενοσακχάρων, δεν ανιχνεύτηκε κανένα παράγωγο της κατηγορίας αυτής.

Στη συνέχεια, επιλέχθηκε η ανάλυση ενός δείγματος “γλυκού νερού” και πιο συγκεκριμένα δείγματος από σαλιγκάρια (“snail”), τα οποία συλλέχθηκαν από την περιοχή Magic Lake, Pender Island. Το συγκεκριμένο δείγμα, μετά τη συλλογή του, υπέστη λυοφιλίωση και στάλθηκε στο εργαστήριο μας με τη μορφή στερεού, το οποίο, στη συνέχεια, εκχυλίστηκε όπως περιγράφεται στο Πειραματικό Μέρος της παρούσας εργασίας. Αναλύοντας, αρχικά, το συγκεκριμένο δείγμα με τη μέθοδο σάρωσης πρόδρομων ιόντων, που αναπτύχθηκε για τα οξο-αρσενοσάκχαρα, προέκυψε το συνολικό χρωματογράφημα που φαίνεται στο Σχήμα 3.13.



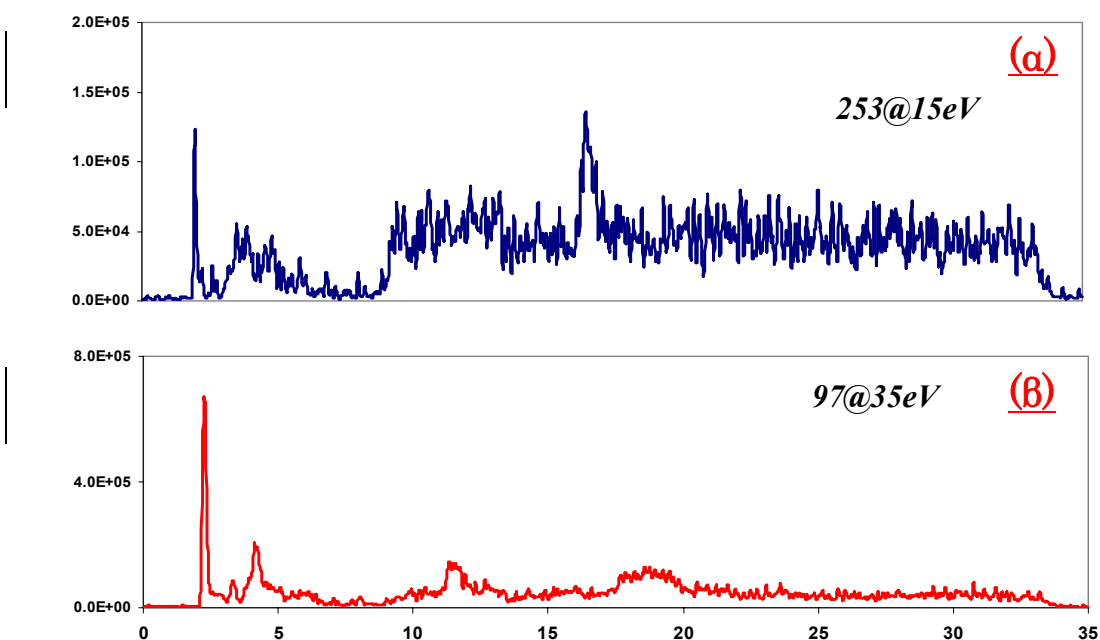
**Σχήμα 3.13.** Χρωματογράφημα σάρωσης πρόδρομων ιόντων του δείγματος “snail”, επιλέγοντας σαν χαρακτηριστικά προϊόντα ιόντα τα (α)  $m/z$  237 και (β)  $m/z$  97.

Στα παραπάνω χρωματογραφήματα διακρίνονται κάποιες κοινές κορυφές κατά την παρακολούθηση των προϊόντων ιόντων  $m/z$  237 και 97, ενώ από τη διερεύνηση του αντίστοιχου φάσματος μάζας προκύπτουν διάφορα πρόδρομα ιόντα, εκ των οποίων, μόνο αυτό με λόγο  $m/z$  483, το οποίο αντιστοιχεί στην ένωση DMAsSugar-Phosphate, πληρεί τα κριτήρια (α) και (β) που απαιτούνται, ώστε αυτό το πρόδρομο ιόν να ανήκει σε οξο-αρσενοσάκχαρο. Το φάσμα μάζας του παραπάνω μοριακού ιόντος, καθώς και το αντίστοιχο χρωματογράφημα, όπου φαίνεται ο χρόνος έκλουσής της ένωσης, δίνονται στο Σχήμα 3.14.



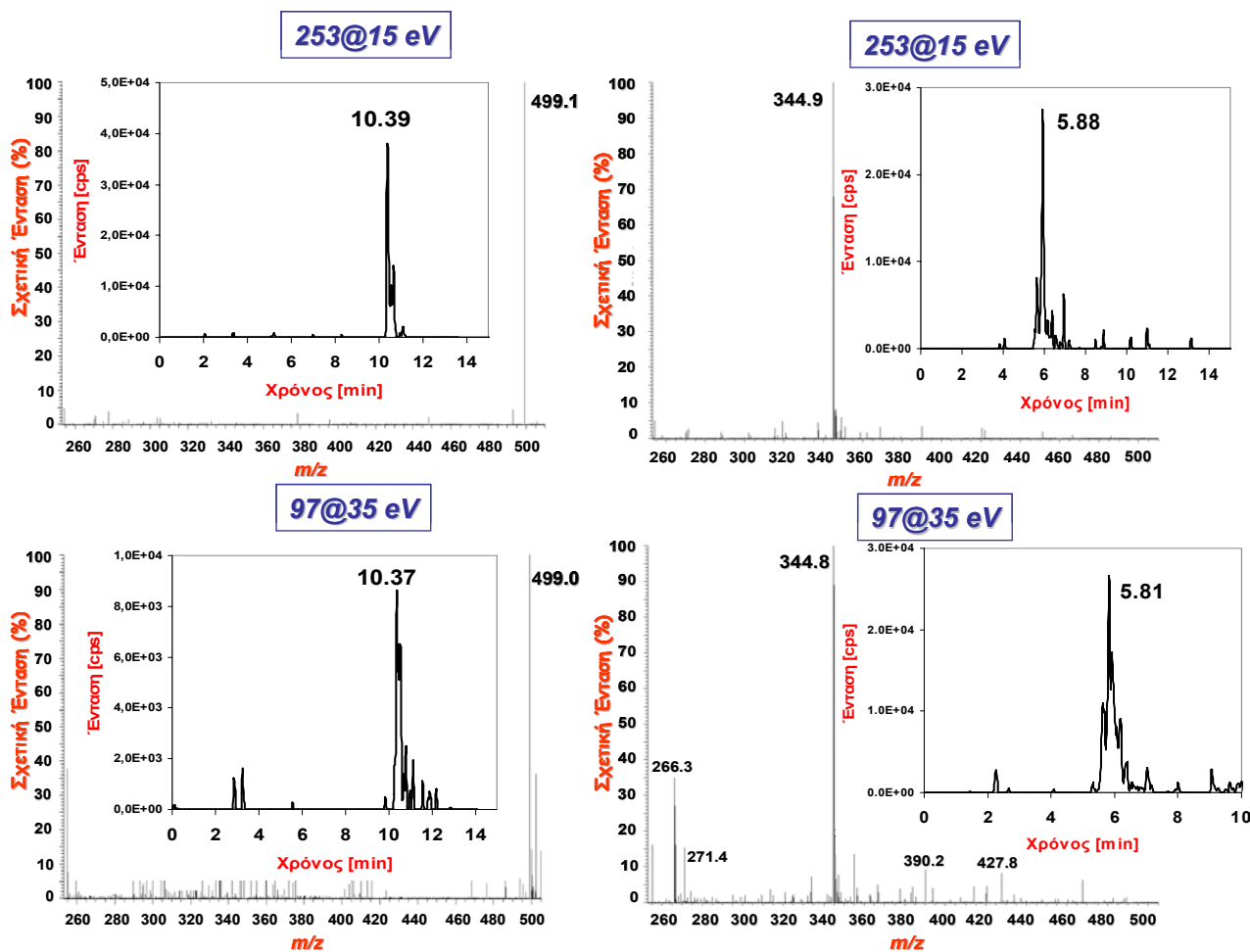
Σχήμα 3.14. Φάσματα μάζας πρόδρομων ιόντων για τα προϊόντα ιόντα  $m/z$  237 και  $m/z$  97 και τα αντίστοιχα αναδομημένα χρωματογραφήματα ιόντων κάθε πρόδρομου ιόντος, όπως προέκυψαν από την ανάλυση του δείγματος “snail”.

Ακολουθώς, εφαρμόστηκε η μέθοδος σάρωσης πρόδρομων ιόντων, με σκοπό την ανίχνευση θειο-αρσενοσακχάρων, κατά την οποία επιλέγονται ως χαρακτηριστικά προϊόντα ιόντα αυτά με λόγους  $m/z$  253 και 97. Αναλύοντας το ίδιο δείγμα με πριν, προέκυψε το συνολικό χρωματογράφημα του Σχήματος 3.15. Τα πρόδρομα ιόντα τα οποία ανιχνεύονται από το αντίστοιχο φάσμα μάζας, είναι τα  $m/z$  345 και 499, τα οποία αντιστοιχούν στα θειο-αρσενοσάκχαρα DMThioAsSugar-Glycol και -Phosphate. Τα φάσματα μάζας των μοριακών αυτών ιόντων, μαζί με τα αντίστοιχα χρωματογραφήματα απεικονίζονται στο Σχήμα 3.16.



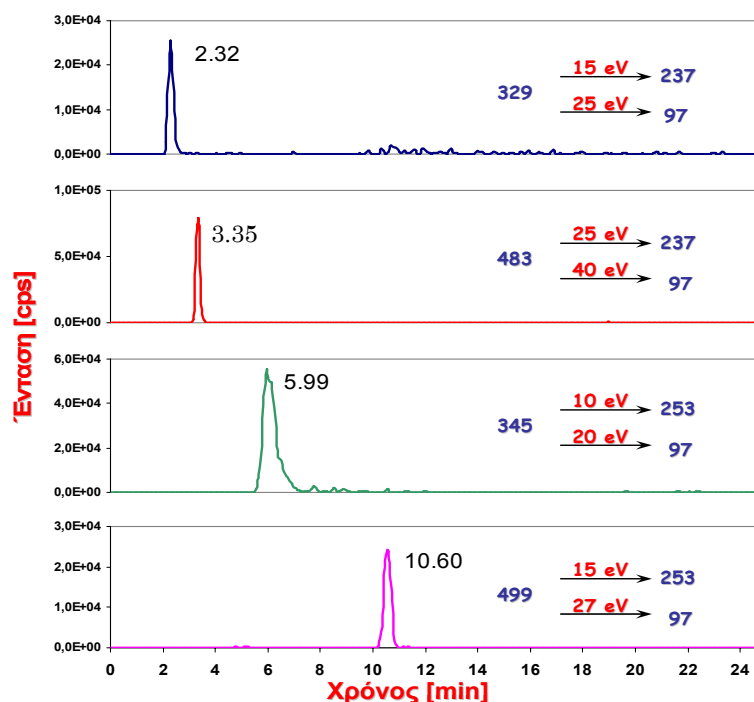
Σχήμα 3.15. Χρωματογράφημα σάρωσης πρόδρομων ιόντων του δείγματος “snail”, επιλέγοντας σαν χαρακτηριστικά προϊόντα ιόντα τα (α)  $m/z$  253 και (β)  $m/z$  97.





**Σχήμα 3.16.** Φάσματα μάζας πρόδρομων ιόντων για τα προϊόντα ιόντα  $m/z$  253 και  $m/z$  97 και τα αντίστοιχα αναδομημένα χρωματογραφήματα ιόντων κάθε πρόδρομου ιόντος, όπως προέκυψαν από την ανάλυση του δείγματος “snail”.

Τέλος, το παραπάνω δείγμα αναλύθηκε και με τη μέθοδο HPLC-ESI-MS/MS-SRM, με την οποία διαπιστώθηκε η ύπαρξη σε αυτό των δύο οξο-αρσενοσακχάρων DMAsSugar-Glycol και -Phosphate, καθώς και των αντίστοιχων θειο-αρσενοσακχάρων (Σχήμα 3.17). Ουσιαστικά, δηλαδή, με τη μέθοδο αυτή ανιχνεύτηκε μια επιπλέον ένωση, το οξο-αρσενοσακχαρο DMAsSugar-Glycol, το οποίο δεν κατέστη δυνατόν να ανιχνευτεί με τη μέθοδο σάρωσης πρόδρομων ιόντων. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η μέθοδος σάρωσης πρόδρομων ιόντων χαρακτηρίζεται από μικρότερη ευαισθησία σε σχέση με τη μέθοδο SRM, επομένως ενώσεις που συναντώνται σε μικρότερες συγκεντρώσεις, είναι αδύνατον να ανιχνευτούν με τη μέθοδο αυτή.



Σχήμα 3.17. Χρωματογράφημα HPLC-ESI-MS/MS-SRM του δείγματος “snail”.

Η παραπάνω μέθοδος σάρωσης πρόδρομων ιόντων εφαρμόστηκε επίσης στα πλαίσια μελέτης της ομάδας μας, και σε συνδυασμό με τη μέθοδο σάρωσης προϊόντων ιόντων, με σκοπό τον χαρακτηρισμό μιας άγνωστης ένωσης αρσενικού που ανιχνεύτηκε σε εκχυλίματα από θαλάσσια κυδώνια της οικογένειας *Tridacna maxima*, κατά τις αναλύσεις με HPLC-ICP-MS.<sup>21</sup> Παρακολουθώντας, λοιπόν, το προϊόν ιόν  $m/z$  97, χαρακτηριστικό τόσο για τα οξο- όσο και για τα θειο-αρσενοσάκχαρα, προέκυψε μια κορυφή στο χρωματογράφημα σάρωσης πρόδρομων ιόντων, στον ίδιο ακριβώς χρόνο με την κορυφή της άγνωστης ένωσης στο αντίστοιχο χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS. Από το φάσμα μάζας πρόδρομων ιόντων προέκυψε ότι στη συγκεκριμένη κορυφή αντιστοιχεί το πρόδρομο ιόν με λόγο  $m/z$  363. Εφαρμόζοντας, στη συνέχεια, σάρωση προϊόντων ιόντων για το παραπάνω μοριακό ιόν, ανιχνεύτηκαν τα ιόντα  $m/z$  97 και 237, χαρακτηριστικά της κατηγορίας των οξο-αρσενοσακχάρων. Τελικά το παραπάνω ιόν ταυτοποιήθηκε ως το καινούριο οξο-αρσενοσάκχαρο DMAsSugar-Sulfonate-2 (Σχήμα 3.1). Την παραπάνω δομή επιβεβαίωσαν και οι αναλύσεις Προσδιορισμού Ακριβούς Μάζας (accurate mass determination) και Παρακολούθησης Ιόντων (Single Ion Monitoring - SIM).

### 3.4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ολοκληρώνοντας την παρούσα μελέτη, η οποία είχε ως αντικείμενο την ανάπτυξη σύγχρονων αναλυτικών μεθόδων υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας, με σκοπό τη μη-στοχευμένη ανίχνευση καινούριων ενώσεων οξο- και θειο-αρσενοσακχάρων σε περιβαλλοντικά-βιολογικά δείγματα, εξήχθησαν μια σειρά από συμπεράσματα, τα οποία συνοψίζονται στα ακόλουθα:

- ◆ Ανάπτυξη μεθόδου HPLC-ESI-MS/MS εφαρμόζοντας τη μέθοδο σάρωσης πρόδρομων ιόντων, για την ανίχνευση καινούριων οξο- και θειο-αρσενοσακχάρων σε βιολογικά δείγματα θαλάσσιας προέλευσης. Η ανάπτυξη της συγκεκριμένης μεθοδολογίας βασίστηκε στην ανάλυση εμπορικά διαθέσιμων δειγμάτων από φύκη, των οποίων το περιεχόμενο σε οξο- και θειο-αρσενοσάκχαρα είναι ήδη γνωστό από προηγούμενες μελέτες που έχουν διεξαχθεί στο εργαστήριο μας. Πρόκειται για τα δείγματα “kelp-1” και “kelp-2”, τα οποία περιέχουν ικανοποιητικές συγκεντρώσεις στα τέσσερα πιο συνηθισμένα οξο-αρσενοσάκχαρα (DMAsSugar-Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate, Σχήμα 3.1) και τα αντίστοιχα θειούχα παράγωγα (DMThioAsSugar-Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate, Σχήμα 3.2).
- ◆ Η ανάπτυξη της μεθόδου σάρωσης πρόδρομων ιόντων, για την ανίχνευση των οξο-αρσενοσακχάρων, βασίστηκε στην παρακολούθηση των χαρακτηριστικών προϊόντων ιόντων, που σχηματίζονται κατά τη διάσπαση ενώσεων αυτής της κατηγορίας, δηλαδή των  $m/z$  237 και 97, ενώ, αντίστοιχα, για τα θειο-αρσενοσάκχαρα επιλέχθηκαν τα χαρακτηριστικά προϊόντα ιόντα  $m/z$  253 και 97.
- ◆ Ο διαχωρισμός των ενώσεων πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία ανιονανταλλαγής και με βάση τη μέθοδο που είχε προηγουμένως αναπτυχθεί στο εργαστήριο μας για την ανίχνευση και το χαρακτηρισμό των τεσσάρων θειο-αρσενοσακχάρων DMThioAsSugar-Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate, με την μεθοδολογία HPLC-ESI-MS/MS-SRM.
- ◆ Όλα τα αρσενοσάκχαρα που περιέχονται στα δείγματα “kelp-1” και “kelp-2”, ανιχνεύτηκαν επιτυχώς με την παρούσα μέθοδο σάρωσης πρόδρομων ιόντων. Παράλληλα, τα όρια ανίχνευσης που προέκυψαν για τις οκτώ ενώσεις, καθώς και η εκλεκτικότητα της μεθόδου υποδεικνύουν την καταλληλότητά της, ως προς τη μη-στοχευμένη ανίχνευση οξο- και θειο-αρσενοσακχάρων σε εκχυλίσματα δειγμάτων θαλάσσιας προέλευσης.

- ◆ Η παραπάνω μέθοδος σάρωσης πρόδρομων ιόντων εφαρμόστηκε στη συνέχεια για την ανάλυση ενός εμπορικού δείγματος από θαλάσσια φύκη καθώς και ενός δείγματος σαλιγκαριών, που ζουν σε λίμνη στην περιοχή του Καναδά. Οι αναλύσεις αυτές αποκάλυψαν την ύπαρξη διαφόρων οξο- και θειο-αρσενοσακχάρων, με τα αποτελέσματα να έρχονται σε συμφωνία με τα αντίστοιχα που προέκυψαν με τη μέθοδο SRM.
- ◆ Κατ'αντιστοιχία με τη μέθοδο σάρωσης πρόδρομων ιόντων για τα οξο- και θειο-αρσενοσάκχαρα, που αναπτύχθηκε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, είναι δυνατή η ανάπτυξη παρόμοιων μεθόδων, με σκοπό τη μη-στοχευμένη ανίχνευση άλλων ομάδων ενώσεων, οι οποίες, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, διασπώνται δίνοντας κάποια κοινά χαρακτηριστικά προϊόντα ιόντα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιων ενώσεων αποτελούν τα τριμεθυλιωμένα αρσενοσάκχαρα του τύπου  $Me_3 X(As)^+$  (όπου  $X =$  ριβοζικός δακτύλιος), τα οποία επίσης έχουν ανιχνευτεί σε ένα ευρύ φάσμα οργανισμών θαλάσσιας προέλευσης.
- ◆ Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι η μέθοδος σάρωσης πρόδρομων ιόντων αποτελεί το πρωταρχικό βήμα για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση καινούριων ενώσεων. Η επιβεβαίωση της ύπαρξης των ενώσεων αυτών, απαιτεί περαιτέρω αναλύσεις, με τεχνικές διαδοχικής φασματομετρίας μάζας, όπως είναι για παράδειγμα οι μέθοδοι σάρωσης προϊόντων ιόντων και προσδιορισμού της ακριβούς μάζας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ 3

- <sup>1</sup> K.A. Francesconi and J. S. Edmonds, *Adv. Inorg. Chem.*, 1997, **44**, 147.
- <sup>2</sup> K. A. Francesconi and D. Kuehnelt, *Analyst*, 2004, **129**, 373.
- <sup>3</sup> J. S. Edmonds and K. A. Francesconi, *Nature*, 1981, **289**, 602.
- <sup>4</sup> J. S. Edmonds and K. A. Francesconi, *Experientia*, 1987, **43**, 553.
- <sup>5</sup> K. A. Francesconi, S. Khokiattiwong, W. Goessler, S. N. Pedersen and M. Pavkov, *Chem. Commun.*, 2000, 1083.
- <sup>6</sup> R. S. Houk, *Anal. Chem.*, 1986, **58**, 97A.
- <sup>7</sup> G. M. Hieftje and G. H. Vickers, *Anal. Chim. Acta*, 1989, **216**, 1.
- <sup>8</sup> R. S. Houk, *Acc. Chem. Res.*, 1994, **27**, 333.
- <sup>9</sup> D. Beauchemin, *Anal. Chem.*, 2002, **74**, 2873.
- <sup>10</sup> S. J. Gaskell, *J. Mass Spectrom.*, 1997, **32**, 677.
- <sup>11</sup> A. P. Bruins, *J. Chromatogr. A*, 1998, **794**, 345.
- <sup>12</sup> S. McSheehy, J. Szpunar, R. Lobinski, V. Haldys, J. Tortajada and J. S. Edmonds, *Anal. Chem.*, 2002, **74**, 2370.
- <sup>13</sup> M. W. Fricke, P. A. Creed, A. N. Parks, J. A. Shoemaker, C. A. Schwegel and J. T. Creed, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, **19**, 1454.
- <sup>14</sup> E. Schmeisser, R. Raml, K. A. Francesconi, D. Kuehnelt, A-L. Lindberg, C. Söeröes and W. Goessler, *Chem. Commun.*, 2004, 1824.
- <sup>15</sup> M. Kahn, R. Raml, E. Schmeisser, B. Vallant, K. A. Francesconi and W. Goessler, *Environ. Chem.*, 2005, **2**, 171.
- <sup>16</sup> V. Nischwitz, K. Kanaki and S. A. Pergantis, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2006, **21**, 33.
- <sup>17</sup> J. S. Edmonds and K. A. Francesconi, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1983, **1**, 2375.
- <sup>18</sup> K. A. Francesconi, J. S. Edmonds, R. V. Stick, B. W. Skelton and A. H. White, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1991, **1**, 2707.
- <sup>19</sup> V. Nischwitz and S. A. Pergantis, *J. Agric. Food Chem.*, 2006, **54**, 6507.
- <sup>20</sup> V. Nischwitz and S. A. Pergantis, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2006, **20**, 3579.
- <sup>21</sup> V. Nischwitz and S. A. Pergantis, *Environ. Chem.*, 2007, **4**, 187.
- <sup>22</sup> S. Wangkarn and S. A. Pergantis, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2000, **15**, 627.
- <sup>23</sup> S. McSheehy, P. Pohl, R. Lobinski and J. Szpunar, *J. Anal. Chim. Acta*, 2001, **440**, 3.
- <sup>24</sup> J. J. Corr and E. H. Larsen, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1996, **11**, 1215.
- <sup>25</sup> V. Nischwitz and S. A. Pergantis, *Anal. Chem.*, 2005, **77**, 5551.
- <sup>26</sup> S. McSheehy, M. Marcinek, H. Chassaigne and J. Szpunar, *J. Anal. Chim. Acta*, 2000, **410**, 71.
- <sup>27</sup> V. Nischwitz and S. A. Pergantis, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2006, **21**, 1277.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4**

### **ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΑΡΣΕΝΙΚΟΥ - ΣΕΛΗΝΙΟΥ (As-Se) ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΑΥΤΩΝ ΜΕ ΤΙΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ HPLC-ESI-MS/MS-SRM ΚΑΙ HPLC-ICP-MS**

#### **4.1. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ – ΣΚΟΠΟΣ**

##### **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ**

Το αρσενικό (As) και το σελήνιο (Se) αποτελούν δύο στοιχεία ευρέως διαδεδομένα στο περιβάλλον, γνωστά για την τοξικότητά τους, ενώ, επιπλέον, το σελήνιο αποτελεί ιχνοστοιχείο απαραίτητο για τον ανθρώπινο οργανισμό. Φυσικές και ανθρωπογενείς δραστηριότητες ευθύνονται για την απελευθέρωση, τόσο του αρσενικού, όσο και του σεληνίου στο περιβάλλον.<sup>1,2</sup> Για παράδειγμα, μη μολυσμένα εδάφη, περιέχουν, κατά μέσο όρο, 5.0 – 14.5 mg As/ kg εδάφους και 0.5 – 5.5 mg Se/ kg εδάφους.<sup>3</sup> Η υδρόλυση των ενώσεων αρσενικού και σεληνίου που υπάρχουν στα εδάφη, σε συνδυασμό με τα αερόβια ή αναερόβια περιβάλλοντα που επικρατούν, καθώς και με τις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα, έχει ως συνέπεια την απελευθέρωση τοξικών ανόργανων ενώσεων των δύο παραπάνω μεταλλοειδών στα φυσικά νερά.<sup>4,5</sup> Εκτός από τις φυσικές πηγές, υπάρχουν και ανθρωπογενείς δραστηριότητες, όπως η καύση ορυκτών καυσίμων και οι μεταλλουργικές διεργασίες, οι οποίες προκαλούν μόλυνση των φυσικών υδάτων με αρσενικό και σελήνιο,<sup>6</sup> με περαιτέρω συνέπεια την συσσώρευση των μεταλλοειδών στην ανθρώπινη τροφική αλυσίδα.<sup>6,7</sup> Ο άνθρωπος εκτίθεται στις τοξικές μορφές του αρσενικού, κυρίως μέσω του πόσιμου νερού<sup>1,8</sup> και στις τοξικές μορφές του σεληνίου, κυρίως μέσω της τροφής.<sup>9</sup>

Η χρόνια έκθεση του ανθρώπου στο αρσενικό προκαλεί ποικίλες αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία του, όπως δερματολογικές, καρδιαγγειακές και νευρολογικές δυσλειτουργίες, ακόμα και καρκινογένεση.<sup>10,11</sup> Από την άλλη, το σελήνιο, ενώ αποτελεί στοιχείο απαραίτητο για τον οργανισμό, σε ένα εύρος συγκεντρώσεων (5-200 μg/ημέρα), ωστόσο, σε επίπεδα υψηλότερα από τα συνιστώμενα, παρουσιάζει αξιοσημείωτη τοξικότητα.<sup>12</sup> Οι πιο τοξικές μορφές αρσενικού και σεληνίου, είναι τα ανόργανα αρσενικά  $iAs^{III}$  ( $AsO_3^{3-}$ ) και σεληνιώδη  $iSe^{IV}$  ( $SeO_3^{2-}$ ) οξο-ανιόντα, αντίστοιχα.<sup>4,1</sup> Οι λεπτομέρειες σχετικά με τη χημεία, την τοξικότητα και το μεταβολισμό του αρσενικού, έχουν ήδη αναφερθεί σε

προηγούμενα κεφάλαια, για το λόγο αυτό, στο παρόν κεφάλαιο, θα δοθεί έμφαση στο σελήνιο και στις αλληλεπιδράσεις αρσενικού-σεληνίου, που έχουν παρατηρηθεί, μέχρι σήμερα.

Το σελήνιο εμφανίζεται σε 4 φυσικές οξειδωτικές καταστάσεις, τις 0 (στοιχειακό Se), -2 (σεληνιούχα), +4 (σεληνιώδη) και +6 (σεληνικικά),<sup>13</sup> και σε έξι φυσικά σταθερά ισότοπα, των οποίων η φυσική αφθονία φαίνεται στον Πίνακα 4.1.

**Πίνακας 4.1.** Σχετική αφθονία των φυσικών των ισωτόπων του σεληνίου.

Ισότοπο	<sup>74</sup> Se	<sup>76</sup> Se	<sup>77</sup> Se	<sup>78</sup> Se	<sup>80</sup> Se	<sup>82</sup> Se
Σχετική Ατομική Μάζα [amu]	73.92	75.92	76.92	77.92	79.92	81.92
Φυσική Αφθονία [%]	0.89	9.36	7.63	23.78	49.61	8.73

Οι ανόργανες σεληνιώδεις και σεληνικικές ενώσεις (στις οποίες το στοιχείο συναντάται στις οξειδωτικές καταστάσεις +4 (iSe<sup>IV</sup>) και +6 (iSe<sup>VI</sup>), αντίστοιχα), συναντώνται, κυρίως, στο νερό και στα πετρώματα, ενώ οι πιητικές οργανικές σεληνιούχες ενώσεις, (π.χ. (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Se), αποτελούν προϊόντα βιομεθυλίωσης του ανόργανου σεληνίου από μικροοργανισμούς. Πιο πολύπλοκες μορφές, όπως η σεληνοκουστεΐνη και η σεληνομεθειονίνη, που φαίνονται στο Σχήμα 4.1 (α) και (β) αντίστοιχα, βρίσκονται σε βιολογικούς ιστούς, αποτελώντας προϊόντα του μεταβολισμού, μέσω του οποίου το σελήνιο ενσωματώνεται στις πρωτεΐνες.<sup>14,15,16</sup>



**Σχήμα 4.1.** Δομές (α) σεληνοκουστεΐνης και (β) σεληνομεθειονίνης.

Το σελήνιο περιέχεται στο ένζυμο της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (Glutathione peroxidase – GSPx), το οποίο προστατεύει τα κύτταρα από οξειδωτικές βλάβες, υπεύθυνες για την ανάπτυξη διαφόρων μορφών καρκίνου.<sup>17</sup> Μελέτες έχουν αποδείξει ότι, ο χημικός τύπος με τον οποίο συναντάται το σελήνιο στον οργανισμό, αποτελεί κρίσιμη παράμετρο, αφού, για παράδειγμα, οι ανόργανες μορφές αποβάλλονται αμέσως, ενώ οι οργανικές κατακρατώνται και συσσωρεύονται.

Από τα τέλη της δεκαετίας του 1930, άρχισε η ανάπτυξη της έρευνας, σχετικά με το μεταβολισμό του σεληνίου και, μέχρι σήμερα, έχουν αναφερθεί στην

βιβλιογραφία ποικίλες αλληλεπιδράσεις του στοιχείου με άλλα στοιχεία, με σημαντικότερες αυτές με θείο και υδράργυρο, αλλά και μερικές με το αρσενικό. Σε μελέτες που διεξήχθησαν σε ποντίκια, τα οποία είχαν προσλάβει σελήνιο, με τη μορφή των ενώσεων  $iSe^{IV}$ , αποδείχτηκε ότι τα τροφικά αυτά απέβαλλαν το στοιχείο μέσω των ούρων, ως  $(CH_3)_3Se^+$ ,  $CH_3SeH$  και ως ανόργανο σελήνιο,<sup>18</sup> και, μέσω της αναπνοής, με τη μορφή της ένωσης  $(CH_3)_2Se$ .<sup>19</sup> Όπως συμβαίνει και με τη βιομεθυλίωση του ανόργανου αρσενικού, έτσι και με το ανόργανο σελήνιο, η βιομετατροπή του καταλύεται ενζυματικά.<sup>20</sup> Επιπλέον, το ανόργανο σελήνιο ενσωματώνεται σε ένα σημαντικό αριθμό σεληνοπρωτεϊνών.<sup>21</sup>

Ένας πρωτοφανής ανταγωνισμός ανάμεσα στα  $iAs^{III}$  και τα  $iSe^{IV}$  αναφέρεται για πρώτη φορά το 1938 από τον Μοxon, ο οποίος, έπειτα από μελέτες σε ποντίκια, ανακάλυψε ότι το αρσενικό παρουσιάζει προστατευτική δράση ενάντι στην τοξικότητα του σεληνίου.<sup>22</sup> Συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε ότι τα  $iAs^{III}$ , τα οποία περιέχονταν στο πόσιμο νερό (5 mg As/L), προστατέψαν τα τροφικά από θανατηφόρα βλάβη στο συκώτι, που θα προκαλούσε, απουσία του αρσενικού, η πρόσληψη των  $iSe^{IV}$ , μέσω της τροφής (11 mg Se/kg). Αυτό το πρώτο πείραμα αποδεικνύει ότι ο μεταβολισμός του αρσενικού και του σεληνίου συνδέονται.

Πρώιμες μελέτες σχετικά με το μεταβολισμό του σεληνίου σε ποντίκια, στα οποία είχαν χορηγηθεί και τα δύο στοιχεία, σε συγκεντρώσεις πάνω από τα επίπεδα τοξικότητας, έδειξαν ότι η παρουσία αρσενικού δρά ανασταλτικά στην αποβολή των πτητικών ενώσεων σεληνίου, μέσω της αναπνοής.<sup>23</sup> Η παραπάνω διαπίστωση προκάλεσε προβληματισμό, δεδομένου ότι η πνευμονική έκκριση του σεληνίου είχε, από πολύ νωρίς, θεωρηθεί ως μέσο, με το οποίο τα ζώα είχαν την δυνατότητα να απαλλαγθούν από την περίσσεια του στοιχείου που είχαν προσλάβει. Μετέπειτα μελέτες στα ίδια ζώα, στα οποία είχαν χορηγηθεί  $iAs^{III}$  και  $iSe^{IV}$ , απέδειξαν ότι η παρουσία του αρσενικού, εκτός του ότι εμποδίζει την αποβολή της ένωσης  $(CH_3)_2Se$ , προκαλούσε ταυτόχρονα δραματική αύξηση της χολικής έκκρισης του στοιχείου.<sup>24</sup> Η εξήγηση που δόθηκε για την συμπεριφορά αυτή, είναι ότι το αρσενικό ενισχύει την χολική έκκριση του σεληνίου.

Ο ακριβής μηχανισμός αποτοξίνωσης του οργανισμού από το σελήνιο, μέσω του αρσενικού, παραμένει αδιευκρίνιστος. Μέχρι σήμερα, διάφορες εξηγήσεις έχουν δοθεί, με επικρατέστερη, αυτή που αναφέρει ότι το σελήνιο και το αρσενικό αλληλεπιδρούν μεταξύ τους στο συκώτι, σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο As-Se, το οποίο, στη συνέχεια, εκκρίνεται στην χολή.



Η πρώτη ένωση As-Se που ανακαλύφθηκε *in vivo*, είναι το σύμπλοκο  $(GS)_2As-Se^- \leftrightarrow (GS)_2As=Se$ . Η ένωση αυτή ανιχνεύτηκε από τους Gailer et al, σε δείγματα χολής κουνελιών, στα οποία είχαν χορηγηθεί  $iAs^{III}$  και  $iSe^{IV}$ . Ο χαρακτηρισμός της ένωσης πραγματοποιήθηκε με τις τεχνικές απορρόφησης ακτίνων-X (X-Ray absorption spectroscopy)<sup>25</sup>, φασματοσκοπίας  $^{77}Se$  NMR, φασματοσκοπίας Raman και φασματομετρίας ατομικής εκπομπής επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP-AES), σε συνδυασμό με χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC).<sup>26</sup> Στη συνέχεια, μια καινούρια ένωση As-Se συντέθηκε, έπειτα από αντίδραση διαλυμάτων των ενώσεων  $Na_2SeO_3 \cdot 5H_2O$ ,  $(CH_3)_2As(O)ONa \cdot 2.5H_2O$  και GSH σε pH 7.5,<sup>27</sup> και χαρακτηρίστηκε με τις τεχνικές  $^{77}Se$  NMR, SEC-ICP-AES και ESI-MS. Πρόκειται για το διμέθυλοδιοσέληνοαρσενικό ιόν  $[(CH_3)_2As(Se)_2]^-$ .<sup>27</sup>

### ΣΚΟΠΟΣ

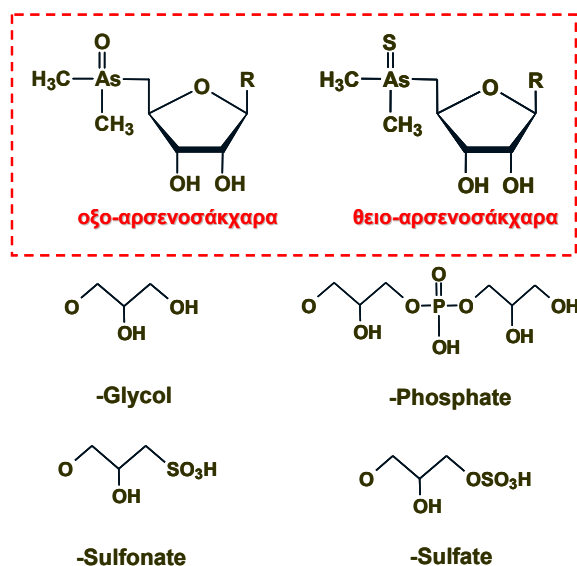
Οι ανόργανες μορφές  $iAs^{III}$  και  $iAs^V$  θεωρούνται υπεύθυνες για την εμφάνιση ποικίλων μορφών καρκίνου στον άνθρωπο.<sup>28</sup> Ωστόσο, μέχρι σήμερα, δεν υπάρχουν πολλές πληροφορίες, σχετικά με τις μορφές του στοιχείου που συναντώνται στο εσωτερικό των κυττάρων, επομένως, ο μηχανισμός της παραπάνω καρκινογένεσης δεν έχει κατανοηθεί πλήρως. Ένας τρόπος να κατανοηθεί ο συγκεκριμένος μηχανισμός, είναι να ταυτοποιηθούν οι μεταβολίτες του αρσενικού, που σχηματίζονται *in vivo* και να αξιολογηθεί η τοξικότητά τους.

Τα  $iAs^{III}$ , τα οποία σε pH 7.5 συναντώνται με τη μορφή του αρσενικόδους οξέος ( $As(OH)_3$ ), παρουσιάζουν ισχυρή συγγένεια με τιςθειόλες, ενώ αντιδρούν με την GSH, σε φυσιολογικές συνθήκες, δίνοντας το παράγωγο  $(GS)_3As$ .<sup>29</sup> Από την άλλη, το διμεθυλαρσενικό οξύ ( $DMA^V$ , βλ. Κεφ. 1) ανάγεται από την GSH, προς διμεθυλαρσενικό οξύ ( $DMA^{III}$ , βλ. Κεφ. 1), ενώ το τελευταίο αντιδρά με ένα επιπλέον μόριο τηςθειόλης, οδηγώντας τελικά στο σχηματισμό του παραγώγου  $(GH)_2As(GS)$ .<sup>30</sup> Παράλληλα, τα  $iSe^{IV}$  υφίστανται οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, παρουσία GSH, δίνοντας τα παράγωγα GS-Se-SG και GSSG.

Η ανταγωνιστική δράση αρσενικού και σεληνίου σε διάφορα θηλαστικά, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι μεταβολισμοί των δύο στοιχείων συνδέονται άμεσα. Ωστόσο, η έλλειψη κατάλληλων αναλυτικών τεχνικών, ικανών να ανιχνεύσουν αλλά και να χαρακτηρίσουν τα, πιθανά σχηματιζόμενα, παράγωγα As-Se, έχει ως αποτέλεσμα την αδυναμία πλήρους ερμηνείας του μεταβολισμού των μεταλλοειδών. Μέχρι σήμερα, το μοναδικό μόριο που έχει ανιχνευτεί *in vivo* και φαίνεται να

συνδέει τους μεταβολισμούς αρσενικού και σεληνίου, είναι το ιόν  $[(GS)_2As-Se]^-$ .<sup>25</sup> Η ανακάλυψη της ένωσης αυτής, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η βιοχημεία του αρσενικού καθορίζεται από τις αλληλεπιδράσεις του στοιχείου με τις θειόλες, αλλά και με τα ενδοκυτταρικά παραγόμενα είδη σεληνίου ( $HSe^-$ ).

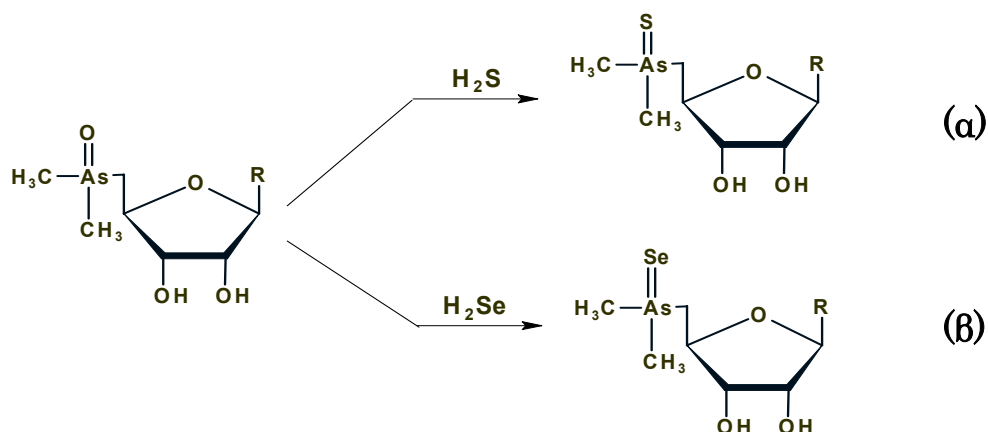
Το σελήνιο παρουσιάζει χημικές ομοιότητες με το θείο (S), γεγονός που αποτέλεσε και το έναυσμα, στην παρούσα μελέτη, για την διερεύνηση σχηματισμού παραγώγων As-Se, κατ'αναλογία με τα παράγωγα As-S, τα οποία ανακαλύφθηκαν πρόσφατα σε βιολογικά δείγματα.<sup>31,32,33,34</sup> Το ενδιαφέρον εστιασθηκε στα τέσσερα όξο-αρσενοσάκχαρα (oxo-arsenosugars) DMAsSugar-Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate και τα αντίστοιχα θειο-αρσενοσάκχαρα (thio-arsenosugars), που φαίνονται στο Σχήμα 4.2.



**Σχήμα 4.2.** Δομές των πιο διαδεδομένων όξο- και θειο-αρσενοσακχάρων.

Απουσία εμπορικά διαθέσιμων προτύπων διαλυμάτων, τα τέσσερα θειο-αρσενοσάκχαρα παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο από τα αντίστοιχα όξο-αρσενοσάκχαρα, έπειτα από κατεργασία των τελευταίων με αέριο  $H_2S$ , όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.3.<sup>31,32,33,34</sup>

Αντίστοιχα, λοιπόν, με την σύνθεση των τεσσάρων θειο-αρσενοσακχάρων, αποφασίστηκε η σύνθεση των, πιθανά σχηματιζόμενων, σεληνο-αρσενοσακχάρων (seleno-arsenosugars), μέσω της αντίδρασης των όξο-αρσενοσακχάρων με αέριο σεληνίδιο του υδρογόνου ( $H_2Se$ , Σχήμα 4.3).



**Σχήμα 4.3.** (α) Πορεία σύνθεσης θειο-αρσενοσακχάρων και (β) Προτεινόμενη πορεία σύνθεσης σεληνο-αρσενοσακχάρων, από τα αντίστοιχα οξο-αρσενοσακχάρων.

Επίσης, σε δεύτερη φάση, μελετήθηκε και η αντίδραση ανάμεσα στο DMAV, το οποίο αποτελεί σημαντικό μεταβολίτη του ανόργανου αρσενικού στον ανθρώπινο οργανισμό, με το αέριο  $H_2Se$ , προκειμένου να διερευνηθεί ο σχηματισμός πιθανών μεταβολιτών As-Se, με βάση αυτό το οργανοαρσενικό παράγωγο.

Ενδεχόμενα, η απουσία κατάλληλων αναλυτικών μεθόδων και προτύπων διαλυμάτων, αλλά και η αστάθεια τέτοιων ενώσεων, να αποτελούν τις κυριότερες αιτίες για την αδυναμία ανίχνευσης τους, μέχρι σήμερα, σε βιολογικά συστήματα. Στην παρούσα μελέτη, οι φασματομετρικές τεχνικές ICP-MS και ESI-MS/MS, σε συνδυασμό με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), ήταν αυτές που χρησιμοποιήθηκαν, για την ανίχνευση και το χαρακτηρισμό των, πιθανά σχηματιζόμενων, ενώσεων As-Se. Οι συγκεκριμένες τεχνικές επιλέχθηκαν λόγω της υψηλής ευαισθησίας και εκλεκτικότητας που παρέχουν, δίνοντας έτσι τη δυνατότητα ανίχνευσης των ενώσεων, ακόμα και αν αυτές συναντώνται σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις στα αναλυόμενα δείγματα.

## 4.2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 4.2.1. ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ ΕΠΑΓΩΓΙΚΑ ΣΥΖΕΥΤΜΕΝΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ (ICP-MS) ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ HPLC

Η τεχνική ICP-MS χρησιμοποιήθηκε, σε συνδυασμό με υγρή χρωματογραφία HPLC, με σκοπό την ανίχνευση και το χαρακτηρισμό των, πιθανά σχηματιζόμενων, ενώσεων As-Se. Για το διαχωρισμό των ενώσεων, χρησιμοποιήθηκε σύστημα HPLC, το οποίο περιλαμβάνει μία αντλία Marathon (Rigas Labs, Thessaloniki). Η χρωματογραφική μέθοδος βασίστηκε σε χρωματογραφία αντίστροφης φάσης με ιοντικό ζεύγος, χρησιμοποιώντας την στήλη Discovery C18 (Μήκος x Εσωτερική Διάμετρος = 150 mm x 4.6 mm, Supelco, Bellefonte, PA, USA) και την αντίστοιχη προστήλη (supelguard, Μήκος x Εσωτερική Διάμετρος = 20 mm x 4.0 mm Discovery C18). Σαν κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε υδατικό διάλυμα υδροξειδίου του τετραβούτυλαμμωνίου, συγκέντρωσης 5 mM (TBAH, ιοντικό ζεύγος) και σύστασης σε μεθανόλη 5 % κ.ο. Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε στην τιμή 7.5, με την προσθήκη διαλύματος μαλονικού οξέος. Πραγματοποιήθηκε ισοκρατική έκκλουση των συστατικών, με ταχύτητα ροής κινητής φάσης ίση με 0.6 mL/min και βρόχο εισαγωγής δείγματος χωρητικότητας 50  $\mu$ L.

Για την ανίχνευση των εξεταζόμενων ενώσεων χρησιμοποιήθηκε το φασματόμετρο μάζας X Series ICP-MS (Thermo Fisher Scientific, Winsford, United Kingdom), ενώ, κατά τη διάρκεια των αναλύσεων, παρακολουθούνταν τα ισότοπα  $^{75}\text{As}$ ,  $^{74}\text{Se}$ ,  $^{76}\text{Se}$ ,  $^{77}\text{Se}$  και  $^{82}\text{Se}$ . Όσον αφορά το ισότοπο  $^{80}\text{Se}$ , αυτό αποκλείστηκε από τις αναλύσεις με το ICP-MS, λόγω των φασματοσκοπικών παρεμποδισμών από το πολυατομικό ιόν  $^{40}\text{Ar}-^{40}\text{Ar}^+$ , που σχηματίζεται από το πλάσμα Ar. Οι βέλτιστες παράμετροι λειτουργίας δίνονται στον Πίνακα 4.2.

**Πίνακας 4.2.** Βέλτιστες παράμετροι λειτουργίας της τεχνικής ICP-MS.

Παράμετροι Λειτουργίας	Βέλτιστες Τιμές
Ροή αερίου εκνέφωσης [mL/min]	1.00
Ροή βοηθητικού αερίου [mL/min]	1.00
Ροή αερίου ψύξης [mL/min]	13.5
Ισχύς Πλάσματος [W]	1340
Βάθος λήψης δείγματος [Αυθαίρετες Μονάδες]	100

#### 4.2.2. ΔΙΑΔΟΧΙΚΗ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ ΙΟΝΙΣΜΟΥ ΜΕΣΩ ΗΛΕΚΤΡΟΦΕΚΑΣΜΟΥ (ESI-MS/MS) ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ HPLC

Κατά τις αναλύσεις με HPLC-ESI-MS/MS, για τον διαχωρισμό των ενώσεων χρησιμοποιήθηκε το αυτοματοποιημένο σύστημα HPLC του φασματομέτρου μάζας TSQ Quantum (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA). Επιλέχθηκε χρωματογραφία αντιστροφής φάσης και η στήλη BDS Hypersil C18 (Μήκος x Εσωτερική Διάμετρος = 150 mm x 2.1 mm, Thermo Fischer Scientific), πριν από την οποία τοποθετήθηκε η αντίστοιχη προστήλη. Ισοκρατική έκλυση των συστατικών έλαβε χώρα, με κινητή φάση διάλυμα μεθανόλης/ απιονισμένου νερού σύστασης κ.ο. 10/90 και ταχύτητα ροής 80  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Ο βρόχος εισαγωγής δείγματος ήταν χωρητικότητας 20  $\mu\text{L}$ . Στα πλαίσια της βελτιστοποίησης της χρωματογραφικής μεθόδου, εφαρμόστηκε, επίσης, χρωματογραφία ανιονανταλλαγής, χρησιμοποιώντας τη στήλη PRPX-100 (Μήκος x Εσωτερική Διάμετρος = 250 x 4.1 mm, Hamilton, Reno, NV, USA), πριν από την οποία τοποθετήθηκε η αντίστοιχη προστήλη PRPX-100. Με τη συγκεκριμένη μέθοδο εφαρμόστηκε βαθμιδωτή έκλυση των συστατικών, με διαλύτη Α υδατικό διάλυμα  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , συγκέντρωσης 20 mM και pH 10, και διαλύτη Β υδατικό διάλυμα  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , συγκέντρωσης 20 mM και περιεκτικότητας σε μεθανόλη 40% κ.ο. Το pH των διαλυμάτων ρυθμίστηκε στην τιμή 10, με τη χρήση υδατικού διαλύματος αμμωνίας ( $\text{NH}_3(\text{aq})$ ). Επιλέχθηκε ταχύτητα ροής ίση με 1  $\text{mL}/\text{min}$  και βρόχος εισαγωγής δείγματος χωρητικότητας 20  $\mu\text{L}$ . Όσον αφορά το πρόγραμμα έκλυσης, αυτό παρουσιάζεται στον Πίνακα 4.3.

**Πίνακας 4.3.** Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλυσης χρωματογραφίας ανιονανταλλαγής.

Χρόνος (min)	Διαλύτης Α (%)	Διαλύτης Β (%)	Μεθανόλη (%)
0	75	25	10
5	75	25	10
6	0	100	40
30	0	100	40
30.5	75	25	10
35	75	25	10

Η ανίχνευση των ενώσεων πραγματοποιήθηκε με το φασματόμετρο μάζας TSQ Quantum, το οποίο είναι εξοπλισμένο με σύστημα τριπλού τετραπόλου και πηγή ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI). Εφαρμόστηκε μέθοδος ανίχνευσης θετικών ιόντων, με βέλτιστες παραμέτρους λειτουργίας του οργάνου, αυτές που παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.4.

**Πίνακας 4.4.** Παράμετροι λειτουργίας της τεχνικής ESI-MS/MS.

Παράμετροι Λειτουργίας	Βέλτιστες Τιμές
Δυναμικό Ηλεκτροψεκασμού [kV]	4.1
Ροή Βοηθητικού Αερίου – N <sub>2</sub> [Αυθ. Μονάδες]	25
Ροή Εκνεφωτικού Αερίου – N <sub>2</sub> [Αυθ. Μονάδες]	45
Δυναμικό Πηγής Ιονισμού [V]	0
Θερμοκρασία Τριχοειδούς [°C]	300
Πίεση Αερίου στην Κυψελίδα Πρόσκρουσης (mtorr)	1.0
Διαχωριστική Ικανότητα τετραπόλων (amu)	0.7

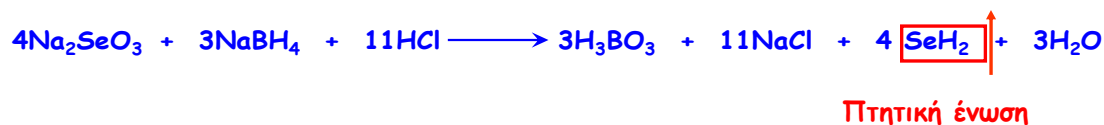
#### 4.2.3. ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Για τις αναλύσεις χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια:

- Μεθανόλη (gradient grade for HPLC, Merck, Darmstadt, Germany).
- Υδροχλωρικό οξύ (37%, puriss., p.a., Riedel-de Haen, Seelze, Germany).
- Διμεθυλαρσενικό οξύ (DMA<sup>V</sup>, puriss., 99%, Fluka, Buchs, Switzerland).
- Άνυδρο σεληνιώδες νάτριο (Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, puriss., purity 95% or greater, Fluka, Buchs, Switzerland).
- Βοροϋδρίδιο του νατρίου (NaBH<sub>4</sub>, puriss., p.a., purity 96% or greater, Fluka, Buchs, Switzerland).
- Υδροξείδιο του τετραβούτυλαμμωνίου (TBAH 30-hydrate, puriss., purity 99% or greater, Fluka, Buchs, Switzerland).
- Μαλονικό οξύ (malonic acid, puriss., purity 99% or greater, Fluka, Buchs, Switzerland).
- Όξινο ανθρακικό αμμώνιο, NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (puriss., Riedel-de Haen, Seelze, Germany).
- Διάλυμα υδροξειδίου του αμμωνίου, NH<sub>4</sub>OH (puriss., p.a., Fluka, Buchs, Switzerland).

#### 4.2.4. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ As-Se

Η σύνθεση των πρότυπων ενώσεων As-Se πραγματοποιήθηκε μέσω της διαβίβασης αερίου  $H_2Se$ , σε διαλύματα, τα οποία περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις ενώσεων αρσενικού. Πιο συγκεκριμένα, σε σφαιρική φιάλη χωρητικότητας 25 mL, αναμιγνύονται, αρχικά, 5 mL υδατικού διαλύματος HCl, συγκέντρωσης 10% κ.ο. και 5 mL υδατικού διαλύματος  $Na_2SeO_3$ , συγκέντρωσης είτε 500 mg/L είτε 1000 mg/L. Στη συνέχεια, με την βοήθεια σύριγγας και, μέσω ενός septum, λαμβάνει χώρα η “στάγδην” προσθήκη, στη σφαιρική φιάλη, 5 mL υδατικού διαλύματος  $NaBH_4$ , συγκέντρωσης 10 % κ.β. Το αέριο που παράγεται από την αντίδραση που λαμβάνει χώρα στην σφαιρική φιάλη ( $H_2$ ,  $H_2Se$ ), διοχετεύεται σε δοκιμαστικό σωλήνα, ο οποίος περιέχει το διάλυμα με τις ενώσεις αρσενικού. Στον σωλήνα αυτό έχει προηγουμένως διαβιβαστεί αέριο Ar, με σκοπό τη διατήρηση αδρανούς ατμόσφαιρας και, επομένως, την αποφυγή οξείδωσης των, πιθανά σχηματιζόμενων, ενώσεων As-Se. Απαραίτητη η χρήση απαγωγού, λόγω τοξικότητας  $H_2Se$ . Κατά την παραπάνω διαδικασία, λαμβάνει χώρα η αντίδραση:



Οι ενώσεις αρσενικού που χρησιμοποιήθηκαν για αντίδραση με το  $H_2Se$ , ήταν τα οξο-αρσενοσάκχαρα DMA<sup>V</sup>Sugar-Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate, τα οποία συναντώνται ευρέως σε θαλάσσιους οργανισμούς, καθώς και το DMA<sup>V</sup>. Όσον αφορά την ένωση DMA<sup>V</sup>, χρησιμοποιήθηκε πρότυπο διάλυμα της αντιστοιχης, εμπορικά διαθέσιμης ουσίας, συγκέντρωσης 100 μg DMA<sup>V</sup> (ή 54 μg As) /mL. Η απουσία πιστοποιημένων πρότυπων ενώσεων για τα τέσσερα παραπάνω οξο-αρσενοσάκχαρα, οδήγησε στη χρησιμοποίηση ενός εκχυλίσματος από εμπορικά διαθέσιμα φύκη, γνωστό ως “kelp-1”, το οποίο, όπως έχει αποδειχτεί σε προηγούμενες μελέτες,<sup>34</sup> περιέχει, σε ικανοποιητικές συγκεντρώσεις (0.7-14.7 μg As/g), τις τέσσερις αυτές ενώσεις. Σε ορισμένες περιπτώσεις, κατά τις αναλύσεις με HPLC-ESI-MS/MS, χρησιμοποιήθηκαν κλάσματα, εμπλουτισμένα στα οξο-αρσενοσάκχαρα DMA<sup>V</sup>Sugar-Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate, τα οποία απομονώθηκαν από το εκχύλισμα “kelp-1” και στη συνέχεια υπέστησαν προσυγκέντρωση. Πιο αναλυτικά, τα διαλύματα των οργανοαρσενικών ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν, παρασκευάστηκαν με τους τρόπους που περιγράφονται παρακάτω.

*Εκχύλισμα “kelp-1” – Παρασκευή του δείγματος “kelp-1 H<sub>2</sub>Se”*

Το εμπορικά διαθέσιμο δείγμα “kelp-1” (ομογενοποιημένη σκόνη), εκχυλίστηκε με απιονισμένο νερό (μάζα στερεού/ όγκος νερού = 1 g / 20 mL), μέσω ανάδευσης του αιωρήματος, για 10 min, σε συσκευή vortex. Ακολούθησε φυγοκέντριση του αιωρήματος για 15 min και απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού, το οποίο αποτελεί και το επιθυμητό εκχύλισμα. Τέλος, το παραπάνω εκχύλισμα αντέδρασε με το αέριο H<sub>2</sub>Se, οπότε προέκυψε το δείγμα “kelp-1\_H<sub>2</sub>Se”.

*Απομόνωση/ Προσυγκέντρωση κλασμάτων εμπλουτισμένων στα οξο-αρσενοσάκχαρα – Αντίδραση των κλασμάτων με αέριο H<sub>2</sub>Se*

Κλάσματα εμπλουτισμένα στα οξο-αρσενοσάκχαρα DMAsugar-Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate, συλλέχθηκαν κατά την ανάλυση του εκχυλίσματος “kelp-1”, με χρωματογραφία ανιόνταλλαγής. Χρησιμοποιήθηκε η στήλη PRP-X100 (Μήκος x Εσωτερική Διάμετρος = 250 x 4.1 mm, Reno, NV, USA), με κινητή φάση υδατικό διάλυμα NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, συγκέντρωσης 10 mM και pH 10. Τα κλάσματα που συλλέχθηκαν, υπέστησαν λυοφιλίωση, για την απομάκρυνση του διαλύτη και την προσυγκέντρωσή των συστατικών που περιέχουν και, στη συνέχεια, αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία -18 °C. Πριν την ανάλυση, κάθε κλάσμα διαλυτοποιήθηκε σε 1 mL απιονισμένου νερού και υπέστη αντίδραση με το αέριο H<sub>2</sub>Se, όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Τα δείγματα που προέκυψαν από την αντίδραση ονομάστηκαν “Glycol\_Fraction\_H<sub>2</sub>Se”, “Phosphate\_Fraction\_H<sub>2</sub>Se”, “Sulfonate\_Fraction\_H<sub>2</sub>Se” και “Sulfate\_Fraction\_H<sub>2</sub>Se”, ενώ τα αντίστοιχα κλάσματα πριν την αντίδραση, αναφέρονται ως “Oxo-Glycol\_Fraction”, “Oxo-Phosphate\_Fraction”, “Oxo-Sulfonate\_Fraction” και “Oxo-Sulfate\_Fraction”.

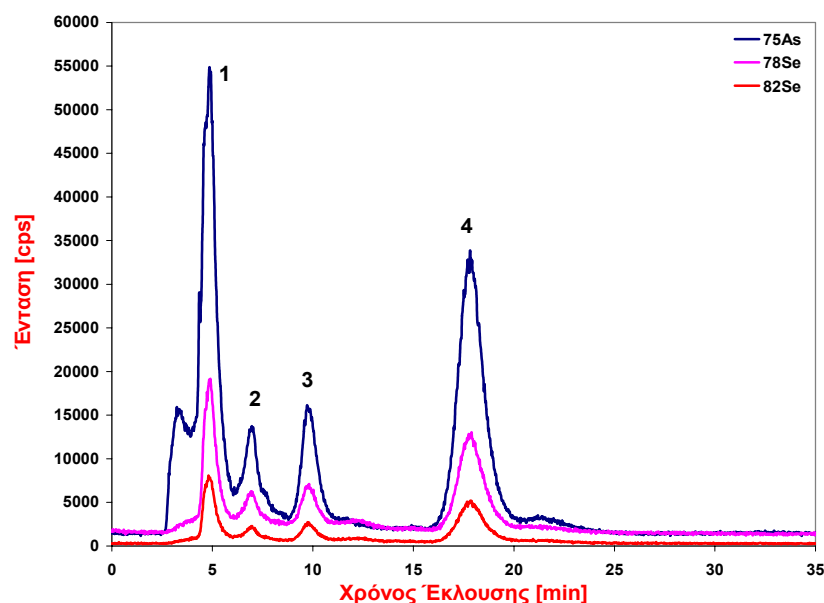


### 4.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 4.3.1. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ HPLC-ICP-MS ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ, ΠΙΘΑΝΑ ΣΧΗΜΑΤΙΖΟΜΕΝΩΝ, ΕΝΩΣΕΩΝ As-Se

Η μέθοδος HPLC-ICP-MS που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των, πιθανά σχηματιζόμενων, ενώσεων As-Se, αναπτύχθηκε παλαιότερα από την ομάδα μας, για το διαχωρισμό των τεσσάρων θειο-αρσενοσακχάρων DMThioAsSugar-Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate.<sup>34</sup>

Αρχικά, αναλύθηκε το δείγμα “kelp-1\_H<sub>2</sub>Se”, που προέκυψε από το εκχύλισμα “kelp-1”, έπειτα από αντίδρασή με αέριο H<sub>2</sub>Se. Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης που οδηγεί στο σχηματισμό του H<sub>2</sub>Se, χρησιμοποιήθηκαν 5 mL διαλύματος Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> (1000 mg/L), 5 mL διαλύματος HCl (10% κ.ο.) και 5 mL διαλύματος NaBH<sub>4</sub> (10% κ.β.). Το αέριο που παρήχθη (H<sub>2</sub>Se και H<sub>2</sub>) διοχετεύτηκε σε 5 mL από το εκχύλισμα του δείγματος “kelp-1”. Το συγκεκριμένο εκχύλισμα είναι γνωστό ότι περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις των τεσσάρων οξο-αρσενοσακχάρων (DMA<sub>s</sub>Sugar-Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate)<sup>34</sup>. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την παραπάνω ανάλυση, φαίνονται στο Σχήμα 4.4, όπου παρουσιάζεται η ένταση για τα ισότοπα <sup>75</sup>As, <sup>78</sup>Se και <sup>82</sup>Se.

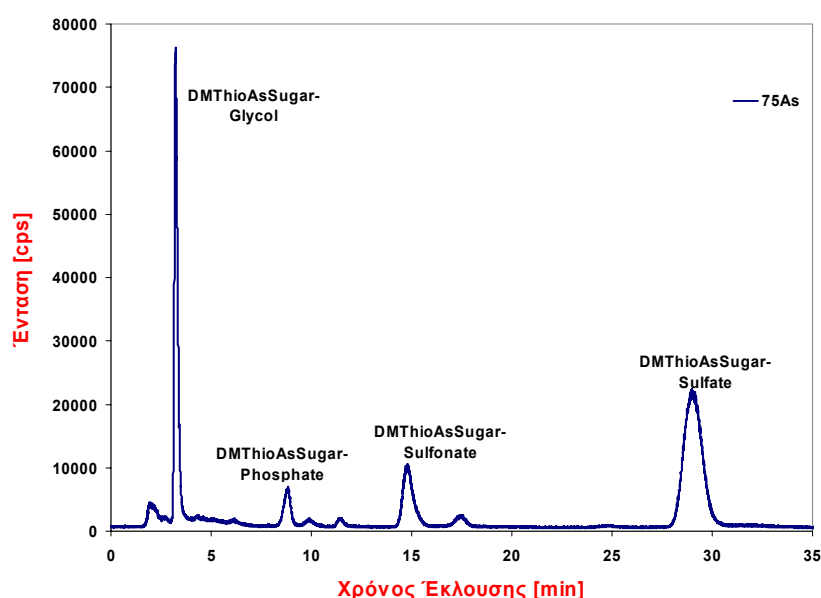


Σχήμα 4.4. Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS του δείγματος “kelp-1\_H<sub>2</sub>Se”.

Όπως διακρίνεται στο χρωματογράφημα αυτό, το αρσενικό και το σελήνιο συνεκλούνται σε, τουλάχιστον τέσσερις, χρωματογραφικές κορυφές (1, 2, 3 και 4),

που αντιστοιχούν σε χρόνους 4.92, 7.04, 9.76 και 17.82 min, αντίστοιχα. Επομένως, τα δύο αυτά στοιχεία συνυπάρχουν στην ίδια ένωση σε, τουλάχιστον τέσσερις, περιπτώσεις, ενώ, το συνολικό αρσενικό που αντιστοιχεί στις τέσσερις κορυφές είναι ίσο με το 90% του συνολικού αρσενικού που υπάρχει στο αρχικό δείγμα “kelp-1”, πριν αυτό υποστεί αντίδραση με το  $H_2Se$ . Από τις παραπάνω παρατηρήσεις, προκύπτει ότι το σύνολο σχεδόν του αρσενικού που υπάρχει στο αντιδρόν δείγμα, μετατρέπεται σε παράγωγα As·Se.

Η χρωματογραφική συμπεριφορά των ενώσεων που αντιστοιχούν στις κορυφές 1, 2, 3 και 4 είναι όμοια με αυτή των τεσσάρων θειο-αρσενοσακχάρων (DMThioAsSugar-Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate), τα οποία ανιχνεύτηκαν πρόσφατα σε βιολογικά δείγματα. Η σύνθεση των ενώσεων αυτών βασίστηκε στην διαβίβαση αερίου  $H_2S$  στο εκχύλισμα “kelp-1”, οπότε προέκυψε το δείγμα “kelp-1\_  $H_2S$ ”, το χρωματογράφημα του οποίου φαίνεται στο Σχήμα 4.5.



Σχήμα 4.5. Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS του δείγματος “kelp-1\_  $H_2S$ ”.

Η ομοιότητα μεταξύ των χρωματογραφημάτων των Σχημάτων 4.4 και 4.5, αποτελεί ένδειξη ότι οι ενώσεις που αντιστοιχούν στις τέσσερις κορυφές As·Se του Σχήματος 4.4, έχουν παρόμοια δομή με τα τέσσερα θειο-αρσενοσάκχαρα DMThioAsSugar-Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate. Έτσι, λοιπόν, γενώνται οι πρώτες υποψίες για, πιθανό, σχηματισμό των αντίστοιχων τεσσάρων σελινο-αρσενοσακχάρων, που παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.7.

Μια άλλη παράμετρος που εξετάστηκε, προκειμένου να ληφθούν χρήσιμες πληροφορίες, σχετικά με τη δομή των ενώσεων που αντιστοιχούν στις κορυφές 1, 2,

3 και 4 του Σχήματος 4.4, ήταν ο μοριακός λόγος As/Se, σε καθεμία από τις κορυφές αυτές. Ο λόγος αυτός βρέθηκε μεγαλύτερος από τη μονάδα, όπως φαίνεται στον Πίνακα 4.5, δηλαδή μεγαλύτερος από το λόγο As/Se που συναντάται στα προτεινόμενα σεληνο-αρσενοσάκχαρα (όπου είναι As/Se = 1). Η ερμηνεία που δίνεται για το παραπάνω αποτέλεσμα, είναι ότι η αναλογία του σεληνίου σε καθεμία από τις τέσσερις ενώσεις που αντιπροσωπεύουν οι αντίστοιχες κορυφές, είναι μικρότερη από αυτήν που προβλέπεται στα, πιθανά σχηματιζόμενα, σεληνο-αρσενοσάκχαρα. Ωστόσο, καθώς οι σχηματιζόμενες ενώσεις σεληνίου διέρχονται μέσα από τα διάφορα τμήματα σωληνώσεων του συστήματος HPLC, ενδέχεται να σχηματίζεται στοιχειακό σελήνιο ( $\text{Se}^0$ ), το οποίο τείνει να προσκολλάται πάνω στα τμήματα αυτά. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ή να αποκλειστεί η παραπάνω υπόθεση, αποφασίστηκε η, μετά την χρωματογραφική στήλη, προσθήκη οξειδωτικού μέσου, επιδιώκοντας την οξείδωση του  $\text{Se}^0$  και την τελική έκλουσή του από το σύστημα. Ως οξειδωτικό μέσο χρησιμοποιήθηκε υδατικό διάλυμα, αποτελούμενο από 0.2% κ.ο.  $\text{H}_2\text{O}_2$  και 1% κ.ο.  $\text{HNO}_3$ , ενώ η εισαγωγή του στον εκνεφωτή του ICP-MS, πραγματοποιήθηκε μέσω περισταλτικής αντλίας, με ταχύτητα ροής 0.5 mL/min. Έπειτα από την παραπάνω τροποποίηση, υπολογίστηκε, εκ νέου, ο λόγος As/Se, ο οποίος βρέθηκε, κατά μέσο όρο στις τέσσερις κορυφές, ίσος με  $1.1 \pm 0.1$  (Πίνακας 4.5). Οι τιμές αυτές βρίσκονται σε σύγκλιση με το λόγο As/Se στα, πιθανά σχηματιζόμενα, σεληνο-αρσενοσάκχαρα που απεικονίζονται στο Σχήμα 4.7.

**Πίνακας 4.5.** Μοριακοί λόγοι As/Se στις κοινές κορυφές As και Se.

Κορυφές	πριν την προσθήκη οξειδωτικού	μετά την προσθήκη οξειδωτικού
1	3.8	1.2
2	3.9	1.1
3	3.9	1.0
4	4.2	1.2
<b>μέσος όρος</b>	<b>4.0±0.2</b>	<b>1.1±0.1</b>

Ένα άλλο ερώτημα που προκύπτει από το χρωματογράφημα του Σχήματος 4.4, είναι γιατί οι μοναδικές κορυφές που παρατηρούνται για το σελήνιο είναι αυτές που παρατηρούνται και για το αρσενικό, και οι οποίες, πιθανολογείται, ότι αντιστοιχούν στα προτεινόμενα σεληνο-αρσενοσάκχαρα. Η εξήγηση που μπορεί να δοθεί είναι ότι, αφού τα τέσσερα οξο-αρσενοσάκχαρα DMAsSugar-Glycol, -

Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate αποτελούν τις κυριότερες ενώσεις αρσενικού, οι οποίες συναντώνται στο αντιδρόν εκχύλισμα “kelp-1”, είναι πιθανόν η διοχέτευση του αερίου  $H_2Se$  στο εκχύλισμα αυτό, να οδηγήσει στη μετατροπή των παραπάνω τεσσάρων οξο-ενώσεων στις αντίστοιχες ενώσεις As-Se. Ωστόσο, επειδή για την συγκεκριμένη αντίδραση χρησιμοποιείται πολύ υψηλή συγκέντρωση σεληνίου, με τη μορφή της ένωσης  $Na_2SeO_3$  (1000 mg/L), θα περιμένε κανείς το σχηματισμό και επιπλέον κορυφών για το σελήνιο, γεγονός, ωστόσο, που δεν επιβεβαιώθηκε εδώ.

Για το παραπάνω “παράδοξο” φαινόμενο δόθηκαν δύο πιθανές εξηγήσεις. Σύμφωνα με την πρώτη από αυτές, η αντίδραση του εκχυλίσματος “kelp-1” με το αέριο  $H_2Se$  λαμβάνει χώρα εκλεκτικά, δίνοντας μόνο τις κορυφές 1, 2, 3 και 4. Σύμφωνα με την δεύτερη εξήγηση, κατά την παραπάνω αντίδραση σχηματίζονται επιπλέον ενώσεις σεληνίου, οι οποίες κατακρατούνται ισχυρά στην χρωματογραφική στήλη και είναι αδύνατη η έκλουσή τους από αυτή. Την απάντηση στα παραπάνω ερωτήματα μπορεί να δώσει ο υπολογισμός της χρωματογραφικής ανάκτησης για το σελήνιο, ο οποίος πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία.

Αρχικά, αναλύθηκε το δείγμα “kelp-1\_  $H_2Se$ ” και συλλέχθηκε το έκλουσμα στην έξοδο της στήλης, για τόσο χρονικό διάστημα όσο και ο χρόνος ανάλυσης του δείγματος (Κλάσμα 1). Επανάληψη της παραπάνω διαδικασίας, αυτή τη φορά χωρίς να παρεμβάλλεται χρωματογραφική στήλη, οδήγησε στη συλλογή του Κλάσματος 2. Και στις δύο παραπάνω περιπτώσεις (με στήλη/ χωρίς στήλη), συλλέχθησαν “Τυφλά Κλάσματα” (χωρίς να πραγματοποιηθεί εισαγωγή δείγματος), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τη διόρθωση του σήματος υποβάθρου του αρσενικού και του σεληνίου. Από την ανάλυση όλων των συλλεγόμενων κλασμάτων με την τεχνική ICP-MS και τον προσδιορισμό της ολικής έντασης για τα ισότοπα  $^{75}As$ ,  $^{78}Se$  και  $^{82}Se$ , προέκυψε η % χρωματογραφική ανάκτηση, με βάση την ακόλουθη σχέση:

$$\% \text{ χρωματογραφική ανάκτηση} = \frac{\text{Διορθωμένη ένταση στοιχείου στο κλάσμα 1}}{\text{Διορθωμένη ένταση στοιχείου στο κλάσμα 2}} \times 100$$

Η χρωματογραφική ανάκτηση για το αρσενικό υπολογίστηκε ίση με 87%, ενώ για το σελήνιο προέκυψε το εξαιρετικά χαμηλό ποσοστό 0.7%. Η παραπάνω χαμηλή ανάκτηση για το σελήνιο, σημαίνει ότι το σύνολο σχεδόν του στοιχείου που εισάγεται στη στήλη κατακρατείται σε αυτή και μόνο ένα αμελητέο ποσοστό εκλύεται, δίνοντας τις κορυφές στο χρωματογράφημα του Σχήματος 4.4.

Επομένως, η αντίδραση μετατροπής των οξο-αρσενοσακχάρων στα, πιθανά σχηματιζόμενα, σεληνο-αρσενοσάκχαρα δεν γίνεται εκλεκτικά, αλλά εκλεκτική είναι η έκλυση των ενώσεων αυτών από τη στήλη. Η παραπάνω εκλεκτικότητα μπορεί να δικαιολογηθεί από το γεγονός ότι, αφού η συγκεκριμένη χρωματογραφία αναπτύχθηκε για την έκλυση των θειο-αρσενοσακχάρων, είναι πιθανό να είναι κατάλληλη για την έκλυση των, παρόμοιας δομής, πιθανά σχηματιζόμενων, σεληνο-αρσενοσακχάρων (στα οποία υπάρχει υποψία ότι αντιστοιχούν οι παραπάνω τέσσερις κορυφές), και μόνο αυτών. Από την άλλη, το εκχύλισμα του δείγματος “kelp-1”, σαν φυσικό προϊόν, αναμένεται να περιέχει πληθώρα οργανικών ενώσεων, με αποτέλεσμα η διοχέτευση περίσσειας σεληνίου σε αυτό (με την μορφή της ένωσης  $H_2Se$ ), να ευνοεί τον σχηματισμό οργανικών ενώσεων σεληνίου και πιθανόν ενώσεων υψηλού μοριακού βάρους. Η αδυναμία έκλυσης τέτοιων ενώσεων από τη στήλη, αποδίδεται στην ύπαρξη ιοντικού ζεύγους στην κινητή φάση.

Υπερ του σχηματισμού των τεσσάρων προτεινόμενων σεληνο-αρσενοσακχάρων του Σχήματος 4.7, συνηγορεί επίσης το γεγονός ότι το % κλάσμα του αρσενικού στην καθεμία από τις τέσσερις κορυφές As-Se του χρωματογραφήματος του Σχήματος 4.4 (εμβαδόν της κάθε κορυφής As/ εμβαδόν των τεσσάρων κορυφών As), είναι όμοιο με αυτό που προσδιορίστηκε για τα τέσσερα οξο-αρσενοσάκχαρα στο εκχύλισμα “kelp-1” όσο και με αυτό των τεσσάρων θειο-αρσενοσακχάρων στο δείγμα “kelp-1\_H<sub>2</sub>S” (Πίνακας 4.6).

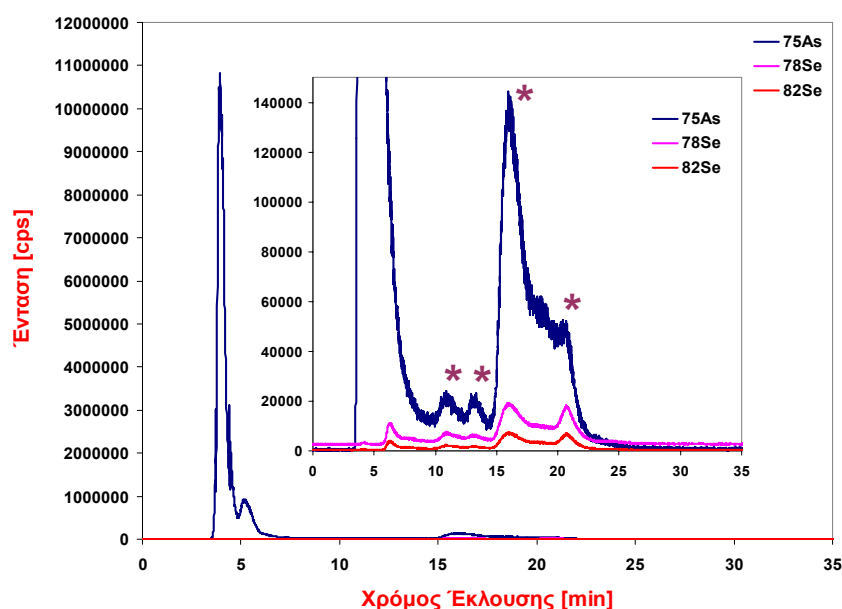
**Πίνακας 4.6.** % As στα οξο-, θειο- και, πιθανά, σεληνο-αρσενοσάκχαρα.

Ένωση	Κλάσμα μάζας As (%)		
	Y = Oxo	Y = Thio	Y = Se
Y-AsSugar-Glycol	27	32	37
Y-AsSugar-Phosphate	9	6	10
Y-AsSugar-Sulfonate	14	14	13
Y-AsSugar-Sulfate	50	48	40

Σε μετέπειτα πείραμα, κατά το οποίο έλαβε χώρα η προσθήκη οξειδωτικού διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ , 30% κ.ο.) στο παραπάνω δείγμα (με κ.ο. αναλογία  $H_2O_2$ / εκχύλισμα = 1/4), παρατηρήθηκε ότι οι τέσσερις κορυφές 1, 2, 3 και 4, που ήταν κοινές για τα δύο στοιχεία, εξαφανίστηκαν και στο οξειδωμένο πλέον δείγμα δεν υπήρχε καμία κοινή κορυφή As-Se. Όσον αφορά το αρσενικό, ενισχύθηκαν οι κορυφές που εκλύονται στο χρονικό διάστημα 0-3 min (οι οποίες

ανήκουν σε οξο-αρσενοσάκχαρα). Για το σελήνιο παρατηρήθηκαν πέντε καινούριες κορυφές, που, πιθανώς, προέκυψαν από την οξείδωση παραγώγων του στοιχείου, τα οποία υπήρχαν στο αρχικό δείγμα και ήταν αδυνατόν να εκλουστούν από τη στήλη.

Ακολούθησε η ανάλυση ενός πρότυπου διαλύματος της ένωσης DMA<sup>V</sup>, συγκέντρωσης 100 mg/L, έπειτα από αντίδραση με αέριο H<sub>2</sub>Se, οπότε προέκυψε το δείγμα “DMA<sup>V</sup>\_H<sub>2</sub>Se”. Για την πραγματοποίηση της συγκεκριμένης αντίδρασης χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες συνθήκες όπως και στην περίπτωση του δείγματος “kelp-1\_H<sub>2</sub>Se”. Από την ανάλυση του δείγματος αυτού προέκυψε το χρωματογράφημα που φαίνεται στο Σχήμα 4.6.



Σχήμα 4.6. Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS του δείγματος “DMA<sup>V</sup>\_H<sub>2</sub>Se”.

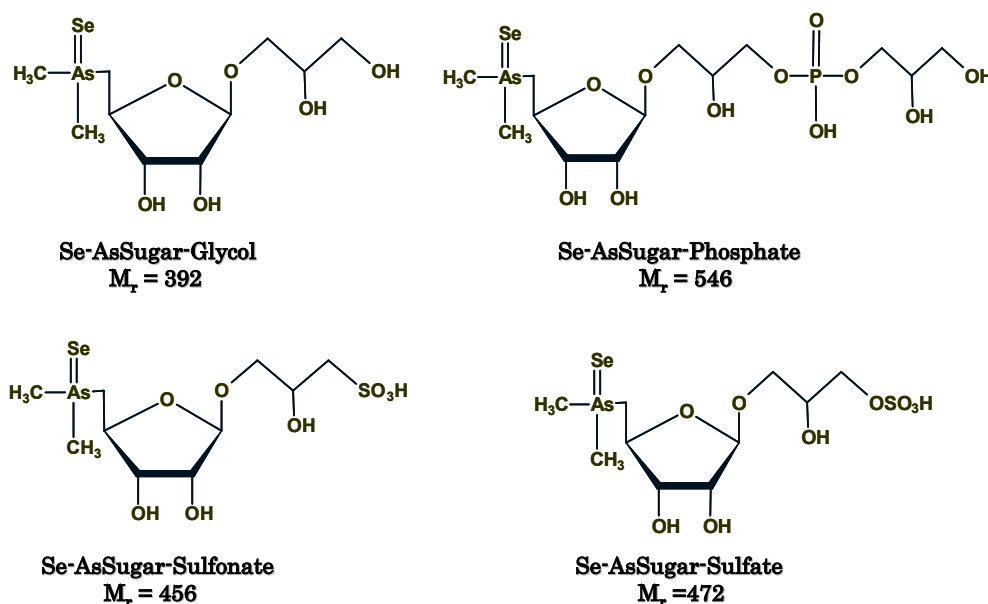
Και σε αυτή την περίπτωση, λαμβάνει χώρα συνέκλυση αρσενικού και σεληνίου (οι κοινές κορυφές επισημαίνονται με \*), ωστόσο, λόγω της χαμηλής έντασης που παρατηρείται για τις κορυφές του σεληνίου, αλλά και του μη ικανοποιητικού χρωματογραφικού διαχωρισμού τους, δεν κατέστη δυνατός ο υπολογισμός των μοριακών λόγων As/Se. Για να ταυτοποιηθούν οι κορυφές αυτές, κρίθηκε απαραίτητη η ανάλυση του δείγματος με την τεχνική HPLC-ESI-MS/MS.

### 4.3.2. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ HPLC-ESI-MS/MS ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ, ΠΙΘΑΝΑ ΣΧΗΜΑΤΙΖΟΜΕΝΩΝ, ΕΝΩΣΕΩΝ As-Se

Η ανάπτυξη μεθόδου HPLC-ESI-MS/MS βασίστηκε στην ανάλυση δειγμάτων, τα οποία προέκυψαν από διαλύματα εμπλουτισμένα σε ενώσεις αρσενικού, έπειτα από αντίδραση με αέριο  $H_2Se$ . Ο τρόπος παρασκευής των παραπάνω δειγμάτων περιγράφηκε αναλυτικά στο Πειραματικό Μέρος.

#### Πιθανά Σχηματιζόμενα Σελινο-Αρσενοσάκχαρα (seleno-arsenosugars)

Αρχικά, η μελέτη εστιάστηκε στα τέσσερα, πιθανά σχηματιζόμενα, σελινο-αρσενοσάκχαρα, Se-AsSugar-Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate, τα οποία φαίνονται στο Σχήμα 4.7.



**Σχήμα 4.7.** Προτεινόμενες δομές των, πιθανά σχηματιζόμενων, σελινο-αρσενοσακχάρων και μοριακό βάρος αυτών.

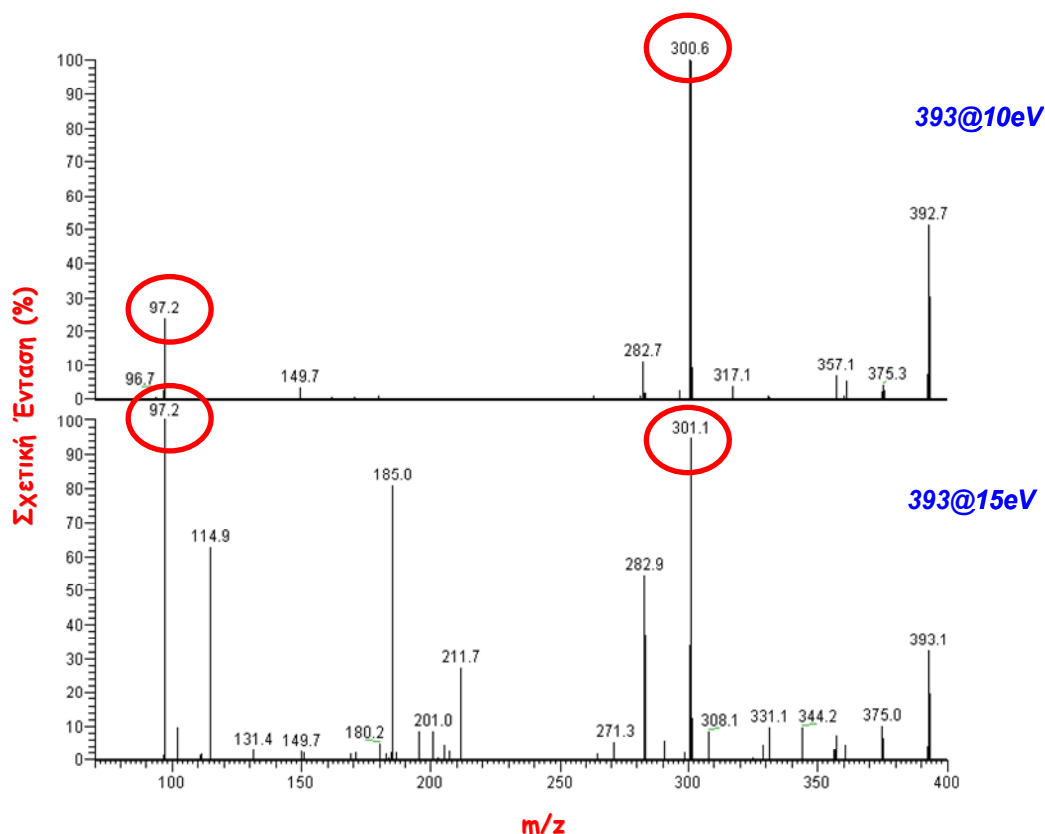
Εφαρμόστηκε μέθοδος σάρωσης προϊόντων ιόντων, για τα μοριακά ιόντα, τα οποία αντιστοιχούν στα προτεινόμενα σελινο-αρσενοσάκχαρα και από τα προϊόντα ιόντα που προέκυψαν και την αντίστοιχη ενέργεια διάσπασης, διαμορφώθηκαν οι καρπύλες διάσπασης, βάσει των οποίων αναπτύχθηκε η μέθοδος Παρακολούθησης Επιλεγμένων Αντιδράσεων (SRM). Επιλέχθηκε μέθοδος ανίχνευσης θετικών ιόντων, με τους λόγους  $m/z$  των μοριακών ιόντων να φαίνονται στον Πίνακα 4.7.

Πίνακας 4.7. Λόγοι  $m/z$ , πιθανά σχηματιζόμενων, σελινο-αρσενοσακχάρων.

Ένωση	Λόγος $m/z$ πρωτονιωμένου μορίου
Se-AsSugar-Glycol	393
Se-AsSugar-Phosphate	547
Se-AsSugar-Sulfonate	457
Se-AsSugar-Sulfate	473

#### Μέθοδος Σάρωσης Προϊόντων Ιόντων

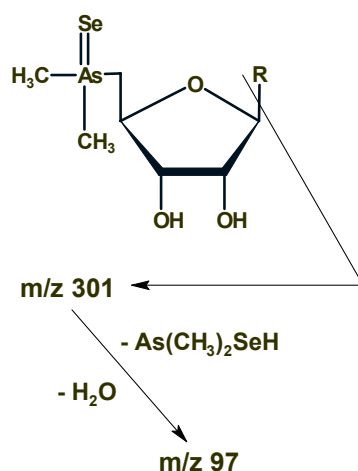
Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε σε συνδυασμό με υγρή χρωματογραφία αντιστροφής φάσης, και αρχικά αναλύθηκε το δείγμα “Glycol\_Fraction\_H<sub>2</sub>Se”, το οποίο αναμένεται να είναι εμπλουτισμένο στο, πιθανά σχηματιζόμενο, σελινο-αρσενοσάκχαρο Se-AsSugar-Glycol. Από την ανάλυση του συγκεκριμένου δείγματος, προέκυψαν τα φάσματα μάζας του Σχήματος 4.8.

Σχήμα 4.8. Φάσματα μάζας προϊόντων ιόντων του μοριακού ιόντος  $m/z$  393.

Σε ενέργειες διάσπασης 10 και 15 eV, το πρόδρομο μοριακό ιόν  $m/z$  393 διασπάται, δίνοντας δύο κύρια προϊόντα ιόντα, με λόγους  $m/z$  301 και 97. Συνολικά, μελετήθηκε η διάσπαση του πρόδρομου ιόντος σε ενέργειες 5-35 eV, ωστόσο, τα δύο παραπάνω φάσματα μάζας είναι αντιπροσωπευτικά της διάσπασης.

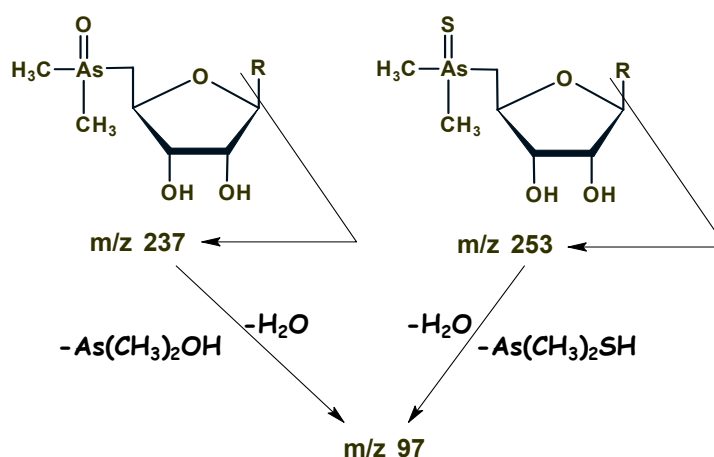


Υποθέτοντας ότι το πρόδρομο ιόν αντιστοιχεί στο σεληνο-αρσενοσάκχαρο Se-AsSugar-Glycol, δίνεται η προτεινόμενη πορεία σχηματισμού των δύο παραπάνω προϊόντων ιόντων (Σχήμα 4.9).



Σχήμα 4.9. Προτεινόμενη πορεία διάσπασης του μοριακού ιόντος  $m/z$  393.

Η παραπάνω πορεία διάσπασης είναι όμοια με αυτές των τεσσάρων οξο- και τεσσάρων θειο-αρσενοσακχάρων, οι οποίες αναφέρονται σε προηγούμενη μελέτη,<sup>34</sup> και απεικονίζονται στο Σχήμα 4.10.

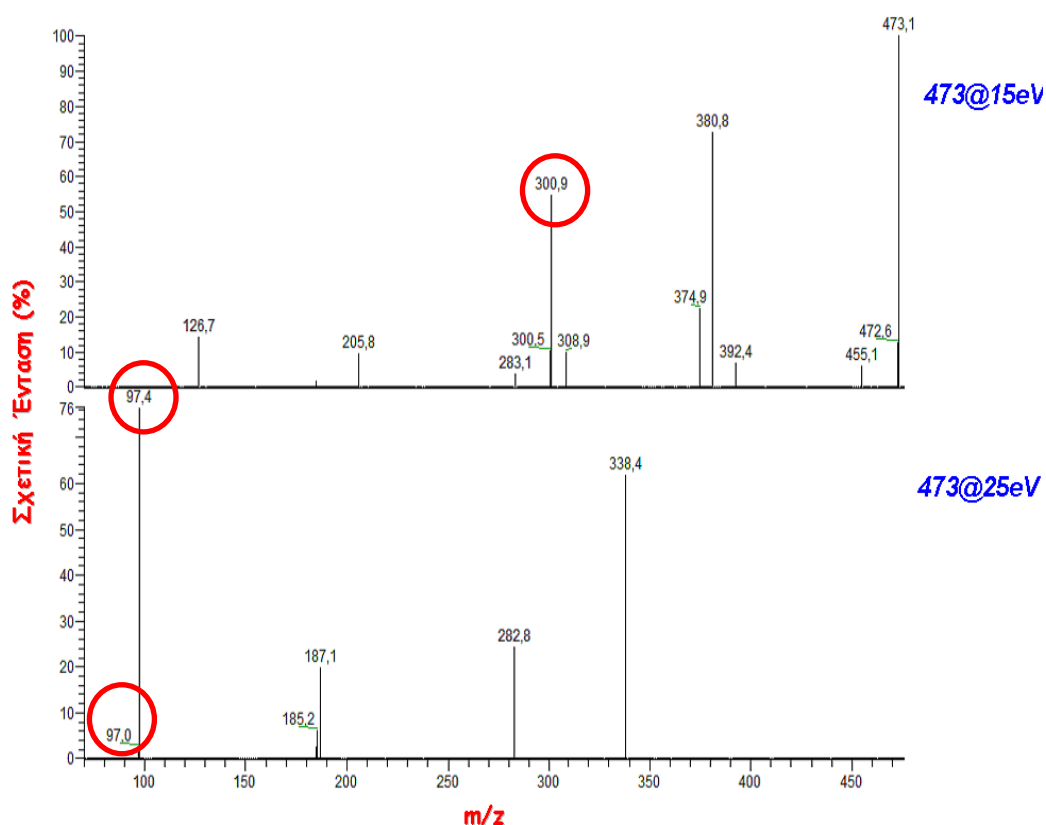


Σχήμα 4.10. Προτεινόμενη πορεία διάσπασης των οξο- και θειο-αρσενοσακχάρων.<sup>34</sup>

Όπως φαίνεται στο παραπάνω σχήμα, στην περίπτωση των οξο- και θειο-αρσενοσακχάρων, τα κύρια προϊόντα ιόντα που σχηματίζονται, είναι αυτά με λόγους  $m/z$  237 και 253 αντιστοίχα. Τα ιόντα αυτά προκύπτουν από την διάσπαση του πρόδρομου ιόντος και την απομάκρυνση από αυτό της πλευρικής αλυσίδας (aglycone), η οποία συνδέεται με τον ριβοζικό δακτύλιο. Αντίστοιχα, στην περίπτωση του, πιθανά σχηματιζόμενου, σεληνο-αρσενοσακχάρου, Se-AsSugar-Glycol, σχηματίζεται το προϊόν ιόν  $m/z$  301, το οποίο επίσης αποδίδεται στη

διάσπαση του πρόδρομου ιόντος και την απομάκρυνση από αυτό της ομάδας “aglycone” (Σχήμα 4.9). Από την άλλη, το προϊόν ιόν με λόγο  $m/z$  97 είναι κοινό και στις τρεις περιπτώσεις (οξο- θειο- και, πιθανά σχηματιζόμενων, σεληνο-αρσενοσακχάρων), και προέρχεται από περαιτέρω διάσπαση των προηγούμενων ιόντων  $m/z$  237, 253 και 301 (oxonium ions) και την απομάκρυνση από αυτά των ομάδων  $-As(CH_3)_2OH$ ,  $-As(CH_3)_2SH$  και  $-As(CH_3)_2SeH$  αντιστοιχα, καθώς και ενός μορίου νερού. Άλλα χαρακτηριστικά προϊόντα ιόντα που σχηματίζονται κατά τη διάσπαση του μοριακού ιόντος  $m/z$  393, είναι αυτά με λόγους  $m/z$  375, 283 και 185. Το πρώτο από αυτά ( $m/z$  375) σχηματίζεται από το πρόδρομο ιόν, έπειτα από απομάκρυνση ενός μορίου νερού, ενώ, αντιστοιχα, η απομάκρυνση ενός μορίου νερού από το προϊόν ιόν  $m/z$  301, οδηγεί στο σχηματισμό του ιόντος  $m/z$  283. Τέλος, το μοριακό ιόν  $m/z$  185 αντιστοιχεί στη δομή  $(CH_3)_2AsSe^+$ . Τα παραπάνω αποτελέσματα, λοιπόν, συνηγορούν υπέρ του σχηματισμού του σεληνο-αρσενοσακχάρου Se-AsSugar-Glycol με μοριακό ιόν  $m/z$  393.

Στη συνέχεια, αναλύθηκε το δείγμα “Sulfate\_Fraction\_H<sub>2</sub>Se”, που αναμένεται να είναι εμπλουτισμένο στο, πιθανά σχηματιζόμενο, σεληνο-αρσενοσάκχαρο Se-AsSugar-Sulfate (Σχήμα 4.7). Από την ανάλυση του συγκεκριμένου δείγματος προέκυψαν τα φάσματα μάζας του Σχήματος 4.11. Και σε αυτή την περίπτωση, ελήφθησαν φάσματα μάζας σε ενέργειες διάσπασης 5-35 eV, ωστόσο επιλέχθηκαν αντιπροσωπευτικά φάσματα. Όπως μπορεί, λοιπόν, να διακρίνει κανείς στα φάσματα αυτά, δύο από τα κύρια προϊόντα ιόντα που σχηματίζονται κατά τη διάσπαση του πρόδρομου ιόντος, είναι αυτά με λόγους  $m/z$  301 και 97 και, υποθέτωντας ότι το μοριακό ιόν  $m/z$  473 ανήκει στο, πιθανά σχηματιζόμενο, σεληνο-αρσενοσάκχαρο Se-AsSugar-Sulfate, προκύπτει ότι η πορεία σχηματισμού των παραπάνω προϊόντων ιόντων είναι αυτή που παρουσιάστηκε στο Σχήμα 4.9. Όπως και κατά τη διάσπαση του μοριακού ιόντος  $m/z$  393, έτσι και εδώ, σχηματίζονται τα προϊόντα ιόντα  $m/z$  283 και 185, των οποίων ο σχηματισμός ερμηνεύτηκε προηγουμένως. Επομένως, όλες οι ενδείξεις οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το μοριακό ιόν με λόγο  $m/z$  473, αντιστοιχεί στο σεληνο-αρσενοσάκχαρο Se-AsSugar-Sulfate.



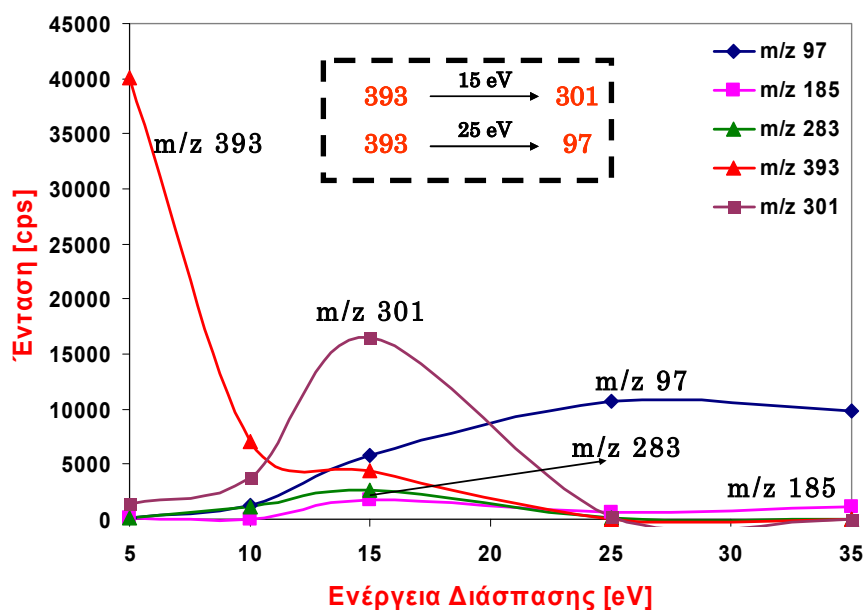
Σχήμα 4.11. Φάσματα μάζας προϊόντων ιόντων του μοριακού ιόντος  $m/z$  473.

Στη συνέχεια, προκειμένου να διερευνηθεί ο σχηματισμός των άλλων δύο σελινο-αρσενοακχάρων Se-AsSugar-Phosphate και Se-AsSugar-Sulfonate, αναλύθηκαν τα αντίστοιχα δείγματα “Phosphate\_Fraction\_H<sub>2</sub>Se” και “Sulfonate\_Fraction\_H<sub>2</sub>Se” Ωστόσο, από την ανάλυση των συγκεκριμένων κλασμάτων δεν προέκυψαν ικανοποιητικής ποιότητας φάσματα μάζας, γεγονός που, ενδεχομένως, οφείλεται στις χαμηλές συγκεντρώσεις των δύο πρόδρομων ενώσεων DMAsugar-Phosphate και –Sulfonate στα αντιδρώντα κλάσματα.

#### Μέθοδος Παρακολούθησης Επιλεγμένων Αντιδράσεων (SRM)

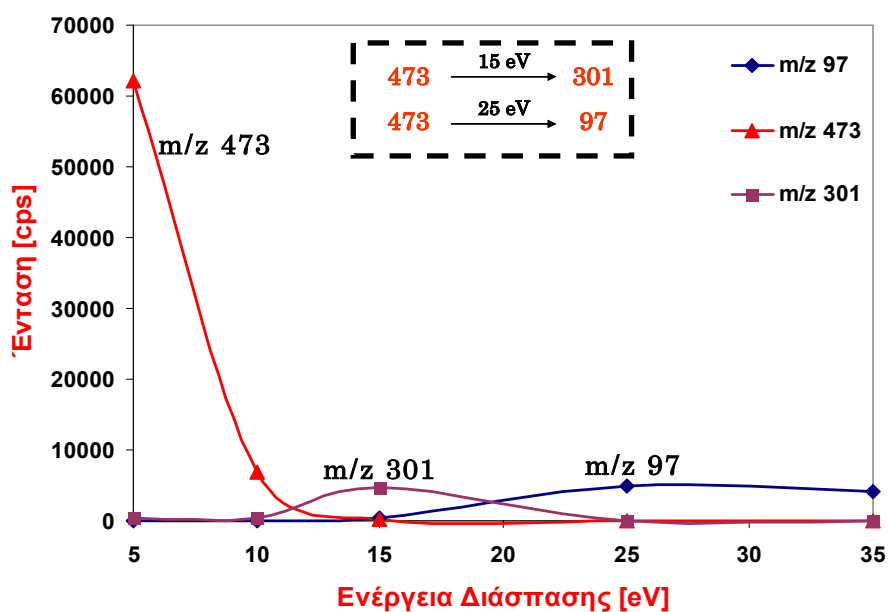
Από τα δεδομένα των φασμάτων μάζας προϊόντων ιόντων, διαμορφώθηκαν οι καμπύλες διάσπασης για τις εξεταζόμενες ενώσεις, στις οποίες καταγράφεται η ένταση των σχηματιζόμενων πρόδρομων και προϊόντων ιόντων, σε συνάρτηση με την εφαρμοζόμενη ενέργεια διάσπασης.

Στο Σχήμα 4.12 παρουσιάζονται οι καμπύλες διάσπασης για το μοριακό ιόν  $m/z$  393, το οποίο αποδίδεται στο σελινο-αρσενοακχαρο Se-AsSugar-Glycol. Τα ιόντα με λόγο  $m/z$  97 και 301 είναι αυτά με τη μεγαλύτερη ένταση, οπότε και αυτά που επιλέγονται για τη διαμόρφωση των χαρακτηριστικών αντιδράσεων SRM.



Σχήμα 4.12. Καμπύλες διάσπασης για το μοριακό ιόν  $m/z$  393.

Στη συνέχεια, παρουσιάζονται οι καμπύλες διάσπασης και οι χαρακτηριστικές αντιδράσεις SRM του μοριακού ιόντος  $m/z$  473, το οποίο αποδίδεται στο σεληνο-αρσενοσάκχαρο Se-AsSugar-Sulfate,



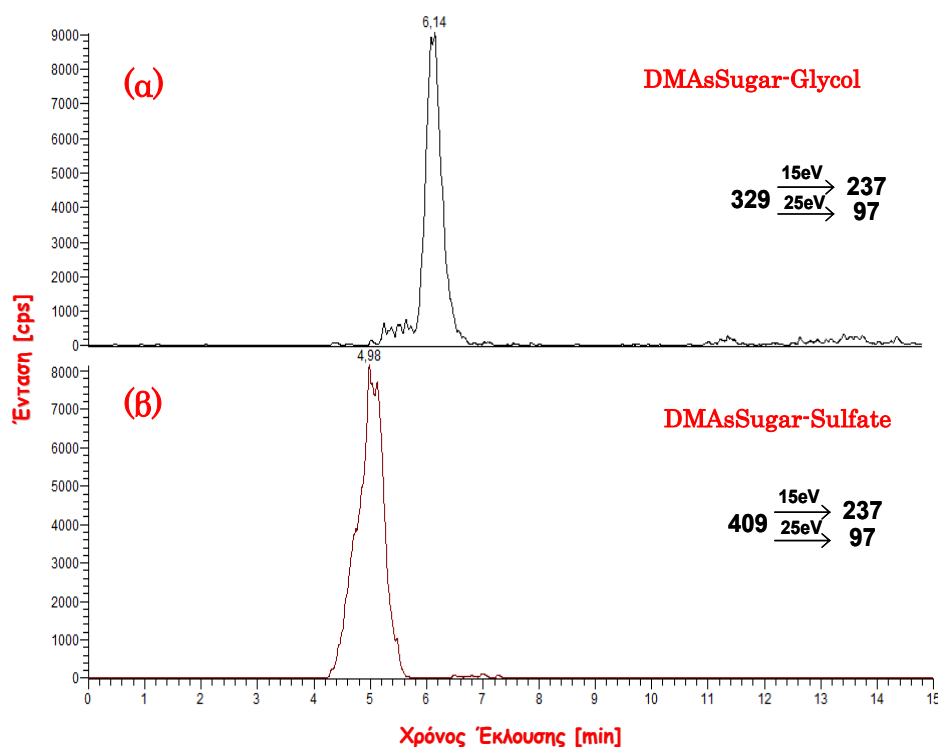
Σχήμα 4.13. Καμπύλες διάσπασης για το μοριακό ιόν  $m/z$  473.

Για την κάθε ένωση παρακολουθούνται δύο χαρακτηριστικές αντιδράσεις SRM, με σκοπό την επίτευξη μεγαλύτερης εκλεκτικότητας και την αποδοτικότερη ανίχνευση τυχόν παρεμποδισέων. Συνολικά, οι αντιδράσεις SRM που παρακολουθούνται, παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.8.

Πίνακας 4.8. Αντιδράσεις SRM για τα οξο-αρσενοσάκχαρα DMAsSugar-Glycol και -Sulfate καθώς και για τα αντίστοιχα σελινο-αρσενοσάκχαρα.

Ένωση	Πρόδρομο Μοριακό Ιόν ( $m/z$ )	Προϊόν Ιόν ( $m/z$ )	Ενέργεια Διάσπασης (eV)
DMAsSugar-Glycol	329	97	25
		237	15
DMAsSugar-Sulfate	409	97	25
		237	15
Se-AsSugar-Glycol	393	97	25
		301	15
Se-AsSugar-Sulfate	473	97	25
		301	15

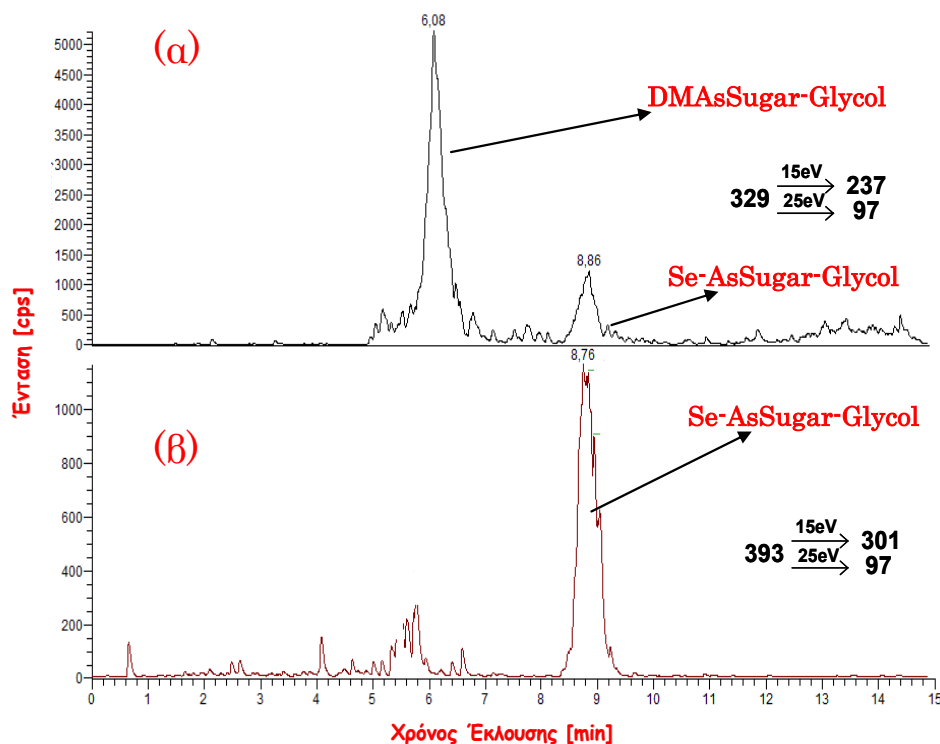
Εφαρμόζοντας τα παραπάνω ζεύγη αντιδράσεων SRM, αναλύθηκαν τα δείγματα “Glycol\_Fraction\_H<sub>2</sub>Se” και “Sulfate\_Fraction\_H<sub>2</sub>Se”. Επίσης, αναλύθηκαν και τα κλάσματα “Οξο-Glycol\_Fraction” και “Οξο-Sulfate\_Fraction”, που απομονώθηκαν από το εκχύλισμα “kelp-1”, και είναι εμπλουτισμένα στα οξο-αρσενοσάκχαρα DMAsSugar-Glycol και -Sulfate (Σχήμα 4.14(α) και 4.14(β)).



Σχήμα 4.14. Χρωματογράφημα HPLC-ESI-MS/MS-SRM του δείγματος (α) “Οξο-Glycol\_Fraction” και (β) “Οξο-Sulfate\_Fraction”.

Όπως φαίνεται στο παραπάνω σχήμα, το αρσενοσάκχαρο DMAsSugar-Glycol εκκλύεται σε χρόνο 6.14 min, ενώ το αρσενοσάκχαρο DMAsSugar-Sulfate σε χρόνο 4.98 min.

Ακολούθησε η ανάλυση του δείγματος “Glycol\_Fraction\_H<sub>2</sub>Se”, το οποίο, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μεθόδου σαρώσης προϊόντων ιόντων, περιέχει το σεληνο-αρσενοσάκχαρο Se-AsSugar-Glycol. Κατά την ανάλυση του δείγματος αυτού, παρακολουθούνταν οι αντιδράσεις SRM, τόσο για το σεληνο-αρσενοσάκχαρο Se-AsSugar-Glycol, όσο και για το αντίστοιχο οξο-αρσενοσάκχαρο DMAsSugar-Glycol, οπότε προέκυψαν τα παρακάτω χρωματογραφήματα (Σχήμα 4.15).



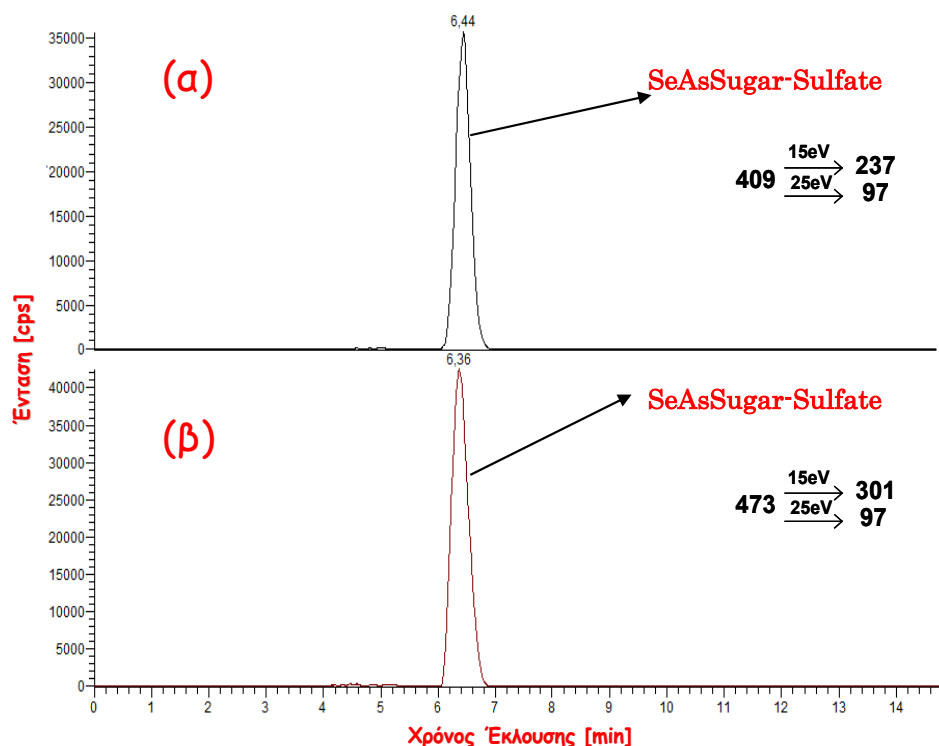
**Σχήμα 4.15.** Χρωματογράφημα HPLC-ESI-MS/MS-SRM του δείγματος “Glycol\_Fraction\_SeH<sub>2</sub>”.

Κατά την παρακολούθηση των αντιδράσεων SRM που διαμορφώθηκαν για το παράγωγο Se-AsSugar-Glycol, προκύπτει μια κορυφή σε χρόνο 8.76 min (Σχήμα 4.15(b)). Το αποτέλεσμα αυτό, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι στον ίδιο χρόνο παρατηρήθηκε και η κορυφή που αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν της συγκεκριμένης ένωσης ( $m/z$  393), στα φάσματα μάζας προϊόντων ιόντων, επιβεβαιώνει ότι η συγκεκριμένη κορυφή αντιστοιχεί στο παράγωγο Se-AsSugar-Glycol.

Στο Σχήμα 4.15(a) παρουσιάζεται το αντίστοιχο χρωματογράφημα που προκύπτει από την ανάλυση του ίδιου δείγματος, παρακολουθώντας τις αντιδράσεις SRM για το οξο-αρσενοσάκχαρο DMAsSugar-Glycol. Η ένωση αυτή

εκλούεται σε χρόνο 6.08 min, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από την ανάλυση του αντίστοιχου κλάσματος που είναι εμπλουτισμένο στο αρσενοσάκχαρο αυτό, δηλαδή του κλάσματος “Oxo-Glycol\_Fraction” (Σχήμα 4.14(α)). Ωστόσο, στο ίδιο χρωματογράφημα παρατηρείται και μια κορυφή για το σελινο-αρσενοσάκχαρο Se-AsSugar-Glycol, η οποία αποδίδεται στην οξείδωση, εντός της πηγής ιονισμού, της ένωσης αυτής, προς σχηματισμό του αντίστοιχου οξο-αρσενοσακχάρου.

Στη συνέχεια, παρουσιάζεται το αντίστοιχο χρωματογράφημα του δείγματος “Sulfate\_Fraction\_H<sub>2</sub>Se”, το οποίο είναι εμπλουτισμένο στο παράγωγο Se-AsSugar-Sulfate (Σχήμα 4.16), βάσει των αποτελεσμάτων της μεθόδου σάρωσης προϊόντων ιόντων. Και σε αυτή την περίπτωση παρακολουθούνται οι αντιδράσεις SRM, τόσο για το οξο-αρσενοσάκχαρο DMAsugar-Sulfate, όσο και για το αντίστοιχο σελινο-αρσενοσάκχαρο.



**Σχήμα 4.16.** Χρωματογράφημα HPLC-ESI-MS/MS-SRM του δείγματος “Sulfate\_Fraction\_H<sub>2</sub>Se”.

Όπως διαπιστώνεται στο Σχήμα 4.16(β), κατά την παρακολούθηση των αντιδράσεων SRM που αντιστοιχούν στο παράγωγο Se-AsSugar-Sulfate, προκύπτει μια συμμετρική και οξεία κορυφή σε χρόνο 6.36 min, που αντιστοιχεί στο συγκεκριμένο σελινο-αρσενοσάκχαρο (όπως επιβεβαιώνεται και από τις αναλύσεις με τη μέθοδο σάρωσης προϊόντων ιόντων). Στο χρωματογράφημα του Σχήματος

4.16(α), το οποίο προέκυψε παρακολουθώντας τις αντιδράσεις SRM του οξο-αρσενοσακχάρου DMAsSugar-Sulfate, παρατηρείται επίσης κορυφή για το σεληνο-αρσενοσάκχαρο Se-AsSugar-Sulfate (6.44 min), η οποία αποδίδεται στην οξείδωση του σακχάρου αυτού εντός της πηγής ιονισμού και στο σχηματισμό του αντίστοιχου οξο-αρσενοσακχάρου.

Συμπερασματικά, λοιπόν, από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει η επιτυχής σύνθεση των δύο σεληνο-αρσενοσακχάρων Se-AsSugar-Glycol και Se-AsSugar-Sulfate και η μετέπειτα ανίχνευση και ταυτοποίησή τους, συνδυάζοντας τις τεχνικές HPLC-ICP-MS και HPLC-ESI-MS/MS.

Με την τεχνική HPLC-ESI-MS/MS-SRM, αναλύθηκαν και ταυτοποιήθηκαν τα δύο σεληνο-αρσενοσάκχαρα, Se-AsSugar-Glycol και Se-AsSugar-Sulfate, σε διαλύματα που προέκυψαν, έπειτα από αντίδραση κλασμάτων εμπλουτισμένων στα αντίστοιχα οξο-αρσενοσάκχαρα, DMAsSugar-Glycol και DMAsSugar-Sulfate, με το αέριο  $H_2Se$ . Από την άλλη, με την τεχνική HPLC-ICP-MS, πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις του δείγματος “kelp-1\_ $H_2Se$ ”, το οποίο προέκυψε από το εκχύλισμα “kelp-1”, έπειτα από αντίδραση με το  $H_2Se$ . Στο δείγμα αυτό ανιχνεύτηκαν, τέσσερις, τουλάχιστον, ενώσεις As-Se, οι οποίες, σύμφωνα με όλες τις ενδείξεις, ανήκουν στα προτεινόμενα σεληνο-αρσενοσάκχαρα. Ωστόσο, προκειμένου να γίνει προσπάθεια ταυτοποίησης των τεσσάρων αυτών ενώσεων As-Se, αποφασίστηκε η ανάλυση του συγκεκριμένου δείγματος και με την μέθοδο HPLC-ESI-MS/MS-SRM, που αναπτύχθηκε παραπάνω. Το γεγονός, βέβαια, ότι κατά τις αναλύσεις με HPLC-ICP-MS χρησιμοποιήθηκε ιοντικό ζεύγος στην κινητή φάση (TBAH), απαγορεύει τη χρήση της ίδιας χρωματογραφικής μεθόδου και με την τεχνική ESI-MS/MS, λόγω του ότι το, θετικά φορτισμένο αντιδραστήριο TBAH, αναμένεται να παρεμποδίσει τον σχηματισμό ιόντων σεληνο-αρσενοσακχάρων και να δημιουργήσει υψηλό σήμα υποβάθρου στο φάσμα μάζας (εμποδίζοντας την ανίχνευση των σχηματιζόμενων ενώσεων). Έτσι, λοιπόν, εφαρμόζοντας τη μέθοδο HPLC-ESI-MS/MS, που αναπτύχθηκε προηγουμένως, αναλύθηκε το δείγμα “kelp-1\_ $H_2Se$ ”. Από την ανάλυση αυτή, δεν κατέστη δυνατή η ανίχνευση κανενός από τα δύο προαναφερόμενα σεληνο-αρσενοσάκχαρα, γεγονός που, πιθανόν, να οφείλεται στην πολύπλοκη μήτρα του δείγματος.

Στη συνέχεια της μελέτης, εξετάστηκε η σταθερότητα των δύο σεληνο-αρσενοσακχάρων Se-AsSugar-Glycol και Se-AsSugar-Sulfate, αναλύοντας τα αντίστοιχα δείγματα “Glycol\_Fraction\_ $H_2Se$ ” και “Sulfate\_Fraction\_ $H_2Se$ ”, με τη μέθοδο HPLC-ESI-MS/MS-SRM. Όπως παρατηρήθηκε από τις αναλύσεις αυτές, η

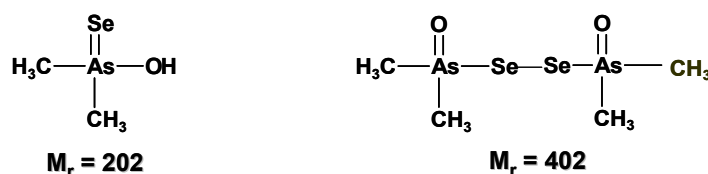


συγκέντρωση των δύο σεληνο-αρσενοσακχάρων μειώνεται σταδιακά με την πάροδο του χρόνου, ακόμα και όταν το διάλυμα που τα περιέχει διατηρείται σε αδρανή ατμόσφαιρα αερίου Ar και σε θερμοκρασία  $-18^{\circ}\text{C}$ . Αξίζει να σημειωθεί ότι, μετά την παρέλευση χρονικού διαστήματος 5-6 ωρών, τα σεληνο-αρσενοσάκχαρα δεν υφίστανται πλέον στο διάλυμα. Ταυτόχρονα, η συγκέντρωση των αντίστοιχων οξο-αρσενοσακχάρων αυξάνεται, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα προηγούμενα σεληνο-αρσενοσάκχαρα οξειδώνονται και μετατρέπονται στα αντίστοιχα οξο-παράγωγα.

### Μελέτη της αντίδρασης του DMA<sup>V</sup> με το SeH<sub>2</sub>

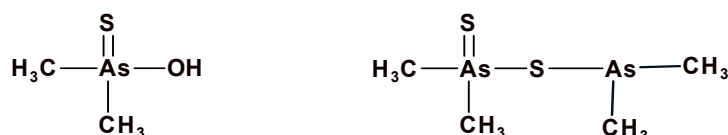
Όπως ήδη αναφέρθηκε, ένας από τους σημαντικότερους μεταβολίτες του ανόργανου αρσενικού, που συναντάται στα ανθρώπινα ούρα, είναι η ένωση DMA<sup>V</sup>. Το γεγονός αυτό, αποτέλεσε και το έναυσμα για τη διερεύνηση σχηματισμού ενώσεων As-Se, με βάση την ένωση αυτή. Η αντίδραση, λοιπόν, πρότυπου διαλύματος της ένωσης DMA<sup>V</sup>, με αέριο H<sub>2</sub>Se, και η ανάλυση, με HPLC-ICP-MS, του δείγματος “DMA<sup>V</sup>\_H<sub>2</sub>Se”, που προέκυψε, αποκάλυψε την παρουσία ενώσεων As-Se. Προκειμένου να ταυτοποιηθούν οι ενώσεις αυτές, αποφασίστηκε η ανάλυση του ίδιου δείγματος, με τη μέθοδο HPLC-ESI-MS/MS. Για την σύνθεση του δείγματος “DMA<sup>V</sup>\_H<sub>2</sub>Se”, χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες συνθήκες, όπως και στην περίπτωση σύνθεσής του για τις αναλύσεις με HPLC-ICP-MS, ενώ εφαρμόστηκε η ίδια χρωματογραφική μέθοδος που εφαρμόστηκε και στην περίπτωση των σεληνο-αρσενοσακχάρων.

Αρχικά, με σκοπό την ανίχνευση ενώσεων που φέρουν στο μόριο τους το σελήνιο, εφαρμόστηκε η μέθοδος πλήρους σάρωσης ιόντων (full scan MS). Ουσιαστικά, στη μέθοδο αυτή ενεργοποιείται μόνο το πρώτο από τα τρία τετράπολα του φασματομέτρου μάζας, δηλαδή το Q1, και παρακολουθούνται όλα τα μοριακά ιόντα που σχηματίζονται στην πηγή ιονισμού και διέρχονται από το Q1. Η παρατήρηση του φάσματος μάζας που προέκυψε και η παρακολούθηση των ισοτοπικών αναλογιών για το σελήνιο, αποκάλυψε την ύπαρξη δύο ενώσεων σεληνίου, οι οποίες έχουν πρωτονιωμένα μόρια με λόγους  $m/z$  203 και 403. Πιθανές δομές που αντιστοιχούν στις παραπάνω μάζες είναι αυτές που παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.17, ενώ προκειμένου να επιβεβαιωθούν, ή και να αποκλειστούν οι δομές αυτές, κρίθηκε απαραίτητη η ανάλυση του συγκεκριμένου δείγματος, με τη μέθοδο σάρωσης προϊόντων ιόντων για τα πρόδομα ιόντα  $m/z$  203 και 403.



**Σχήμα 4.17.** Προτεινόμενες δομές για τα μοριακά ιόντα  $m/z$  203 και 403.

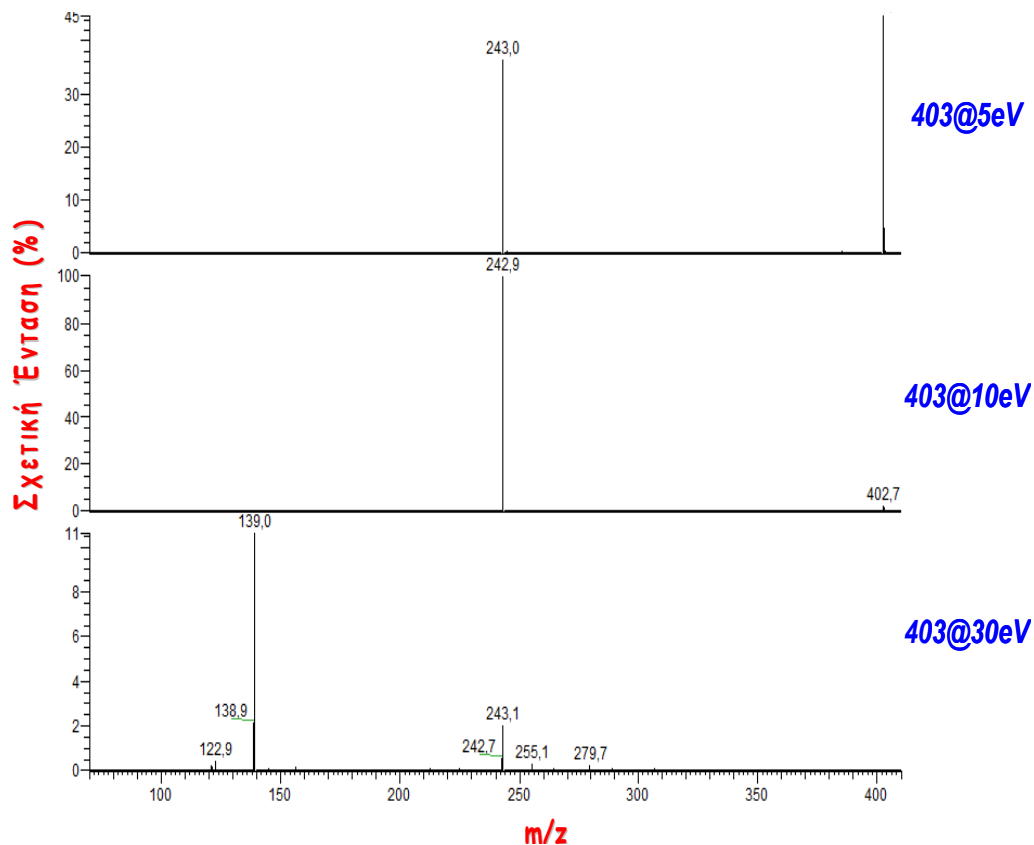
Στο σημείο αυτό, να σημειωθεί ότι η πρόβλεψη για την ύπαρξη των παραπάνω δομών, βασίστηκε σε προηγούμενη μελέτη των Fricke et al,<sup>35</sup> στην οποία, έπειτα από αντίδραση της ένωσης DMA<sup>V</sup> με αέριο H<sub>2</sub>S, ταυτοποιήθηκαν τα θειούχα παράγωγα διμέθυλο-θειοαρσενικικό οξύ (DMTA<sup>V</sup>) και διμέθυλο-αρσινό-διμεθυλο-διθειο-αρσενικικό οξύ (DMDTA<sup>V</sup>, Σχήμα 4.18).



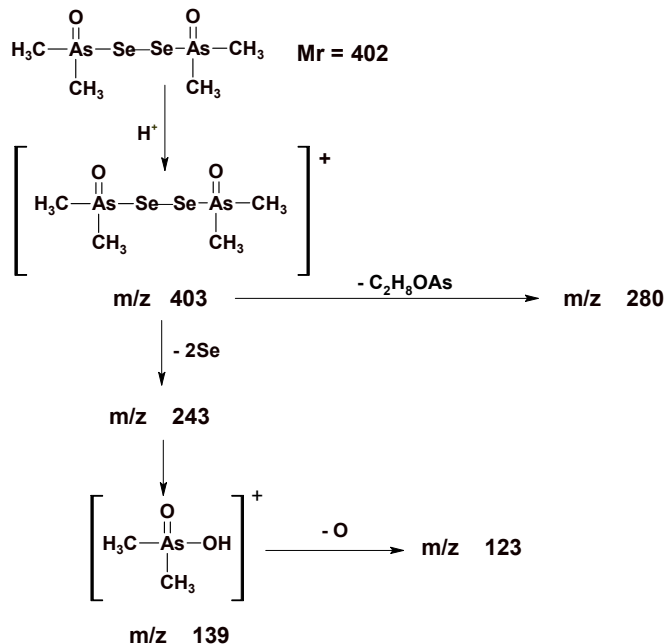
**Σχήμα 4.18.** Θειούχα παράγωγα που σχηματίζονται κατά την αντίδραση της ένωσης DMA<sup>V</sup> με αέριο H<sub>2</sub>S.<sup>35</sup>

Είναι ευδιάκριτη η ομοιότητα που υπάρχει ανάμεσα στις δύο κατηγορίες ενώσεων που παρουσιάζονται στα Σχήματα 4.17 και 4.18. Ακολούθησε η εφαρμογή της μεθόδου σάρωσης προϊόντων ιόντων για τα δύο παραπάνω προτεινόμενα παράγωγα As-Se, επιλέγοντας μια σειρά από ενέργειες διάσπασης για το κάθε μοριακό ιόν (5, 10, 15, 30 eV). Αρχικά, εξετάστηκε το μοριακό ιόν με λόγο  $m/z$  403, οπότε, αναλύοντας το δείγμα “DMA<sup>V</sup>\_H<sub>2</sub>Se”, προέκυψαν τα φάσματα μάζας του Σχήματος 4.19.

Όπως παρατηρείται στα φάσματα αυτά, τα κύρια προϊόντα ιόντα που σχηματίζονται, κατά τη θραυσματοποίηση του πρόδρομου ιόντος, είναι αυτά με λόγους  $m/z$  243 (το οποίο σχηματίζεται κυρίως σε χαμηλότερες ενέργειες, 5 και 15 eV), καθώς και τα 255, 280, 139 και 123 (τα οποία σχηματίζονται σε ενέργεια 30 eV). Υποθέτωντας ότι το μοριακό ιόν  $m/z$  403 αντιστοιχεί στη δομή που φαίνεται στο Σχήμα 4.17, διαμορφώνεται το πιθανό μονοπάτι διάσπασης της ένωσης αυτής, όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 4.20. Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το μοριακό ιόν με λόγο  $m/z$  403 αντιστοιχεί στο διμερές παράγωγο του σεληνίου του Σχήματος 4.17.

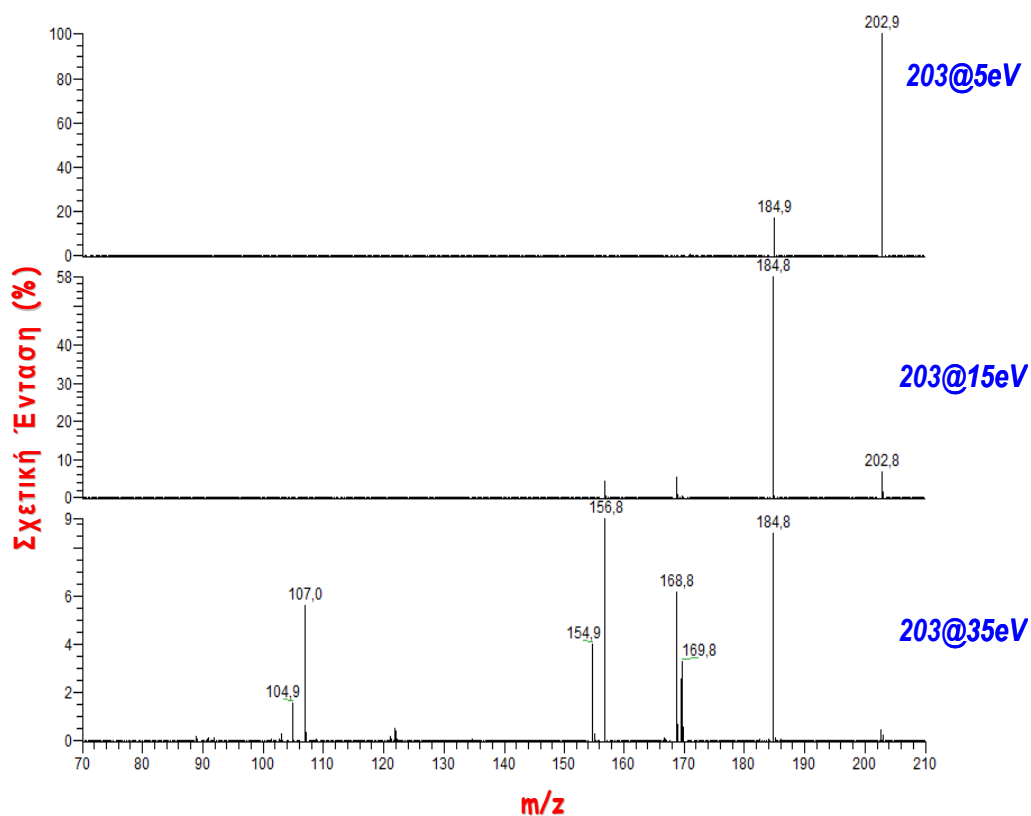


Σχήμα 4.19. Φάσματα μάζας προϊόντων ιόντων του μοριακού ιόντος  $m/z$  403.



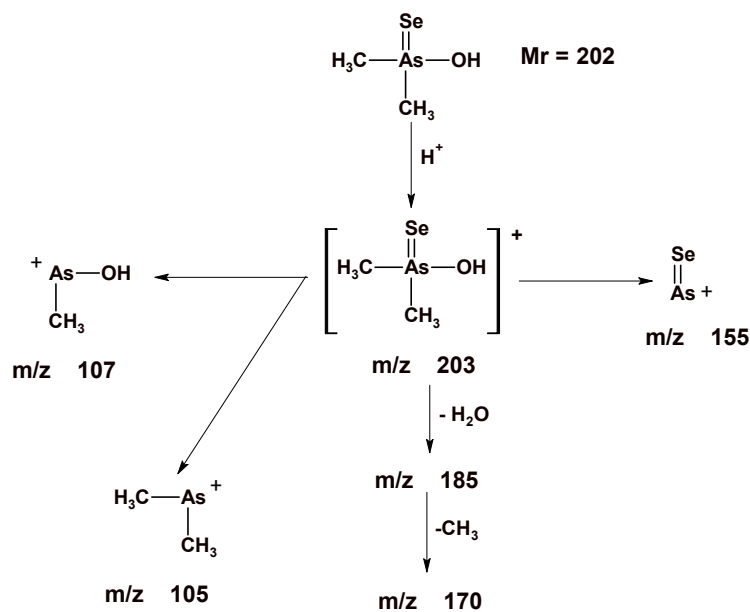
Σχήμα 4.20. Προτεινόμενη πορεία διάσπασης της ένωσης με μοριακό ιόν  $m/z$  403.

Ακολουθήσε η μελέτη του μοριακού ιόντος  $m/z$  203, με προτεινόμενη δομή που δίνεται στο Σχήμα 4.17. Αναλύοντας, λοιπόν, ξανά το δείγμα “DMAV<sub>2</sub>H<sub>2</sub>Se”, ελήφθησαν τα φάσματα μάζας του Σχήματος 4.21.



Σχήμα 4.21. Φάσματα μάζας προϊόντων ιόντων του μοριακού ιόντος  $m/z$  203.

Η προτεινόμενη πορεία διάσπασης του μοριακού ιόντος δίνεται στο Σχήμα 4.22. Τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν επιβεβαίωση του σχηματισμού του παραγώγου που φαίνεται στο Σχήμα 4.17.



Σχήμα 4.22. Προτεινόμενη πορεία διάσπασης της ένωσης με μοριακό ιόν  $m/z$  203.

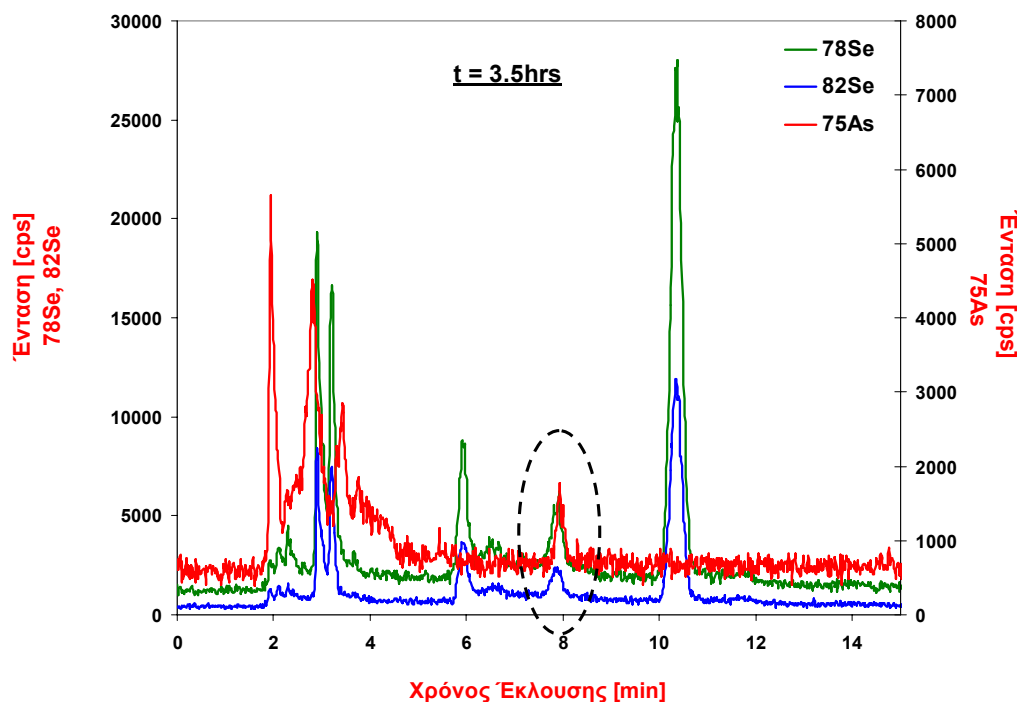
Η προσπάθεια εφαρμογής της χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκε με τη μέθοδο HPLC-ESI-MS/MS, για την ανάλυση του δείγματος “DMA<sup>V</sup>\_H<sub>2</sub>Se” και με την τεχνική HPLC-ICP-MS, έτσι ώστε να είναι δυνατή η άμεση σύγκριση των αποτελεσμάτων, δεν έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα. Στο χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS που προέκυψε, παρατηρήθηκε συνέκλουση των κορυφών, οι οποίες επικαλύπτονται από την κορυφή της ένωσης DMA<sup>V</sup>, για την οποία χρησιμοποιήθηκε η εξαιρετικά υψηλή συγκέντρωση 100 mg/L.

#### 4.3.3. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ HPLC-ICP-MS ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΕΝΩΣΕΩΝ As-Se ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΟΥΡΩΝ

Προκειμένου να διερευνηθεί ο σχηματισμός ενώσεων As-Se σε βιολογικά συστήματα, αποφασίστηκε η ανάλυση δειγμάτων ανθρώπινων ούρων, με την τεχνική HPLC-ICP-MS. Εφαρμόστηκε η μέθοδος που αναπτύχθηκε στην παράγραφο 4.3.1, βασισμένη σε χρωματογραφία αντίστροφης φάσης ιοντικού ζεύγους. Τα δείγματα ούρων ελήφθησαν από εθελοντή, ο οποίος είχε λάβει ταυτόχρονα αρσενικό και σελήνιο, μέσω συμπληρωμάτων διατροφής. Πιο συγκεκριμένα, στον εθελοντή χορηγήθηκαν 3 ταμπλέτες από ένα πολυβιταμινούχο συμπλήρωμα διατροφής, το οποίο περιέχει σελήνιο, σε συγκέντρωση 200 μg Se/ταμπλέτα και ~ 1 g από το δείγμα από φύκη “kelp-1”, το οποίο περιέχει τα τέσσερα οξο-αρσενοσάκχαρα του Σχήματος 4.2. Το φυσικό αυτό προϊόν χρησιμοποιείται ευρέως στην Αμερική ως συμπλήρωμα διατροφής. Τα δείγματα ούρων ελήφθησαν σε χρονικά διαστήματα 3.5, 6.5, 9, 11 και 12 ωρών, μετά τη λήψη των συμπληρωμάτων. Ως δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε ένα δείγμα ούρων, το οποίο ελήφθη πριν από τη χορήγηση των δυο μεταλλοειδών, δηλαδή τη χρονική στιγμή  $t = 0$  hrs. Όλα τα δείγματα, πριν την ανάλυσή τους, αποθηκεύτηκαν σε αδρανή ατμόσφαιρα αερίου Ar, προκειμένου να αποφευχθεί η οξείδωση των, πιθανά σχηματιζόμενων, μεταβολιτών As-Se.

Σε όλα τα δείγματα ανθρώπινων ούρων που αναλύθηκαν, διαπιστώθηκε όμοιο χρωματογραφικό προφίλ για το αρσενικό, με μικρές διαφορές να παρατηρούνται στην ένταση των σχηματιζόμενων κορυφών. Όσον αφορά το σελήνιο, και σε αυτή την περίπτωση, το χρωματογραφικό προφίλ των κορυφών παραμένει σχεδόν αμετάβλητο, με την ένταση όμως των κορυφών να ενισχύεται με την πάροδο του χρόνου. Μετά την παρέλευση χρονικού διαστήματος ίσου με 6.5

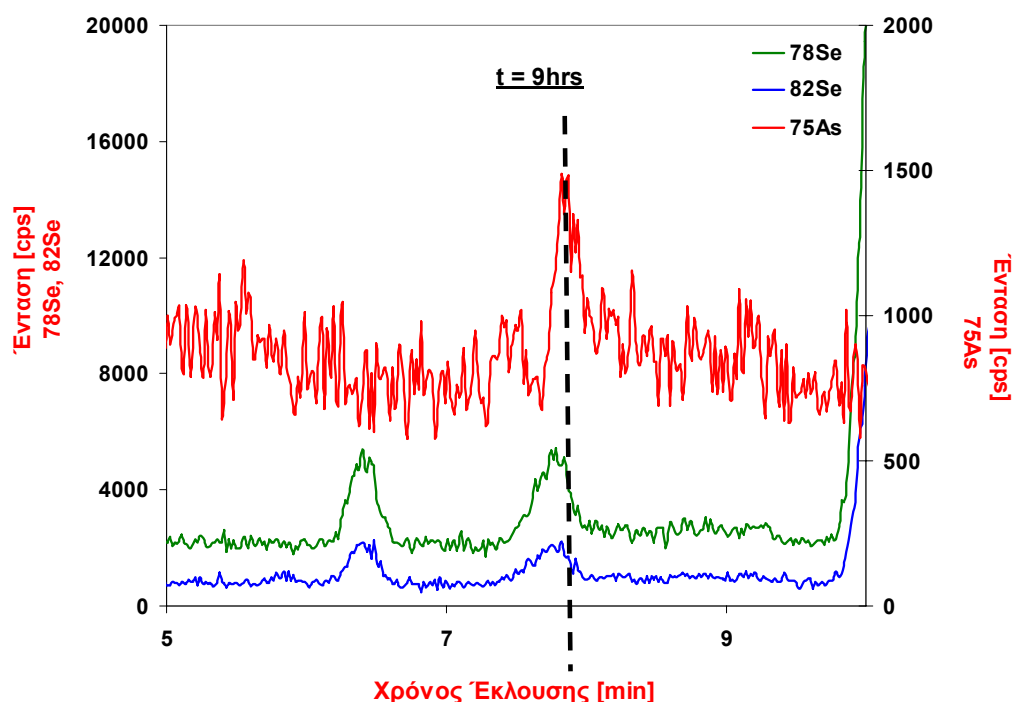
hrs, η ποσότητα του σεληνίου στα δείγματα παρουσιάζει πτωτική τάση. Ένα αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα σε χρόνο  $t = 3.5$  hrs, φαίνεται στο Σχήμα 4.23.



Σχήμα 4.23. Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS δείγματος ούρων σε χρόνο  $t=3.5$  hrs.

Στο παραπάνω χρωματογράφημα διακρίνονται διάφορες κορυφές, τόσο για το αρσενικό όσο και για το σελήνιο, εκ των οποίων, σε αυτή που αντιστοιχεί σε χρόνο  $\sim 8$  min φαίνεται να λαμβάνει χώρα συνέκλυση των δύο στοιχείων. Η παραπάνω κορυφή παρατηρήθηκε σε όλα τα δείγματα ούρων που αναλύθηκαν στην παρούσα μελέτη, με τάση μείωσης με το χρόνο λήψης του δείγματος. Ωστόσο, όπως διαπιστώθηκε σε ακόλουθα χρωματογραφήματα, η συγκεκριμένη κορυφή δεν αντιστοιχεί σε παράγωγο As-Se, αφού πρόκειται απλά για συνέκλυση των δύο κορυφών, οι οποίες αντιπροσωπεύουν διαφορετικές ενώσεις αρσενικού και σεληνίου. Χαρακτηριστικό είναι το χρωματογράφημα που προέκυψε κατά την ανάλυση δείγματος σε χρόνο  $t=9$  hrs (Σχήμα 4.24), όπου είναι εμφανής η ελάχιστη αλλά υπαρκτή διαφορά στους χρόνους έκλυσης.

Επομένως, δεν κατέστη δυνατή η ανίχνευση ενώσεων As-Se στα ανθρώπινα ούρα, έπειτα από ταυτόχρονη χορήγηση των δύο μεταλλοειδών, μέσω συμπληρωμάτων διατροφής.



Σχήμα 4.24. Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS δειγματος ούρων σε χρόνο  $t=9$  hrs.

Ενδέχεται, λοιπόν, τα δείγματα από ούρα να μην είναι κατάλληλα για τη διερεύνηση σχηματισμού των συγκεκριμένων ενώσεων. Να υπενθυμίσουμε ότι η μοναδική ένωση As-Se που έχει αναφερθεί, μέχρι σήμερα, στη βιβλιογραφία ανιχνεύτηκε σε δείγματα χολής ζώων, τα οποία είχαν προσλάβει υψηλές συγκεντρώσεις ανόργανου αρσενικού και σεληνίου, γεγονός που καθιστά τα δείγματα αυτά καταλληλότερα για μελέτες σχηματισμού σεληνο-αρσενικών ενώσεων. Παράλληλα, έχει αναφερθεί, σε πρόσφατη μελέτη, ότι ορισμένα φύκη από την περιοχή της Κορσικής περιέχουν αξιοσημείωτα υψηλές συγκεντρώσεις σε αρσενικό και σεληνίο. Η ανάλυση, λοιπόν, των δειγμάτων αυτών, με την μέθοδο που αναπτύχθηκε στην παρούσα μελέτη, θα είχε εξαιρετικό ενδιαφέρον προκειμένου να εξεταστεί η ύπαρξη ενώσεων As-Se.<sup>36</sup>

#### 4.4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ολοκληρώνοντας την παρούσα μελέτη, η οποία είχε ως αντικείμενο την σύνθεση και την ταυτοποίηση, με τεχνικές υγρής χρωματογραφίας - φασματομετρίας μάζας, ενώσεων που περιέχουν στο μόριο τους τόσο το αρσενικό όσο και το σελήνιο, εξήχθησαν μια σειρά από συμπεράσματα, τα οποία παρουσιάζονται αναλυτικά στις επόμενες παραγράφους. Να υπενθυμιστεί στο σημείο αυτό, ότι το ενδιαφέρον εστιάστηκε στα, πιθανά σχηματιζόμενα σεληνο-αρσενοσάκχαρα, που φαίνονται στο Σχήμα 4.7, για τα οποία υπήρχε η εκτίμηση ότι, πιθανώς, σχηματίζονται από τα αντίστοιχα οξο-αρσενοσάκχαρα DMAsSugar-Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate, που έχουν ανιχνευτεί σε ένα μεγάλο αριθμό θαλάσσιων οργανισμών. Η προσπάθεια σύνθεσης των σεληνο-αρσενοσακχάρων βασίστηκε στην αντίδραση των οξο-αρσενοσακχάρων με αέριο  $H_2Se$ . Επίσης, μελετήθηκε και η αντίδραση του τελευταίου με την ένωση  $DMA^V$ , και έγινε προσπάθεια ταυτοποίησης των προϊόντων που σχηματίστηκαν κατά την αντίδραση αυτή. Αναλυτικά, κατά την διάρκεια της παρούσας μελέτης, επετεύχθησαν οι παρακάτω στόχοι.

- ◆ Ανάπτυξη μεθόδου HPLC-ICP-MS, βασισμένης σε χρωματογραφία αντίστροφης φάσης ιοντικού ζεύγους, για την ανίχνευση ενώσεων As-Se. Η ανάπτυξη της μεθόδου βασίστηκε στην ανάλυση του δείγματος “kelp-1\_ $H_2Se$ ”, που προέκυψε από την αντίδραση του εκχυλίσματος “kelp-1” (το οποίο περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις των οξο-αρσενοσακχάρων DMAsSugar-Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate), με αέριο  $H_2Se$ . Από τις αναλύσεις αυτές, προέκυψε ο σχηματισμός, τουλάχιστον τεσσάρων, ενώσεων As-Se, οι οποίες, μάλιστα, παρουσιάζουν παρόμοια χρωματογραφική συμπεριφορά με τα τέσσερα θειο-αρσενοσάκχαρα DMThioAsSugar-Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate (που έχουν ανιχνευτεί σε βιολογικά δείγματα). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν με την παρούσα μεθοδολογία συνηγορούν υπέρ του σχηματισμού των τεσσάρων σεληνο-αρσενοσακχάρων του Σχήματος 4.7.
- ◆ Εφαρμογή της μεθόδου HPLC-ICP-MS, για την ανάλυση του δείγματος “ $DMA^V\_H_2Se$ ”, που προέκυψε από την αντίδραση πρότυπου διαλύματος της ένωσης “ $DMA^V$ ”, με αέριο  $H_2Se$ . Και σε αυτή την περίπτωση, παρατηρείται ο σχηματισμός ενώσεων As-Se, τα οποία μπορούν να διερευνηθούν περαιτέρω με την τεχνική HPLC-ESI-MS/MS.



- ◆ Ανάλυση, με την τεχνική HPLC-ICP-MS, δειγμάτων ανθρώπινων ούρων από εθελοντή, ο οποίος είχε λάβει ταυτόχρονα αρσενικό και σελήνιο, μέσω συμπληρωμάτων διατροφής. Τα δείγματα εξετάστηκαν για την ύπαρξη ενώσεων As-Se, ωστόσο, η προσπάθεια δεν στέφθηκε με επιτυχία.
- ◆ Ανάπτυξη μεθόδου HPLC-ESI-MS/MS, βασισμένης σε χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των ενώσεων As-Se που ανιχνεύτηκαν και με την τεχνική HPLC-ICP-MS. Ωστόσο, η ανάλυση του δείγματος “kelp-1\_H<sub>2</sub>Se”, με τη συγκεκριμένη τεχνική, δεν έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα, πιθανόν λόγω πολύπλοκης μήτρας του δείγματος. Επομένως, κρίθηκε απαραίτητη η απομόνωση, από το δείγμα “kelp-1”, κλασμάτων εμπλουτισμένων στα τέσσερα οξο-αρσενοσάκχαρα, τα οποία, στη συνέχεια, υπέστησαν αντίδραση με το αέριο H<sub>2</sub>Se, με σκοπό τη μετατροπή των οξο-αρσενοσακχάρων στα αντίστοιχα σελινο-αρσενοσάκχαρα. Η αντίδραση αυτή αποδείχτηκε επιτυχής, αφού οδήγησε στο σχηματισμό των δύο σελινο-αρσενοσακχάρων Se-AsSugar-Glycol και -Sulfate, τα οποία ανιχνεύτηκαν και ταυτοποιήθηκαν με τη μέθοδο HPLC-ESI-MS/MS.
- ◆ Εφαρμογή της μεθόδου HPLC-ESI-MS/MS για την ανάλυση του δείγματος “DMA<sup>V</sup>\_H<sub>2</sub>Se”. Ανίχνευση και ταυτοποίηση δύο παραγώγων As-Se, βασισμένων στην ένωση DMA<sup>V</sup>.
- ◆ Ο σχηματισμός ενώσεων As-Se καθώς και ο φασματομετρικός προσδιορισμός τους είναι μείζονος σημασίας για τη μελλοντική μελέτη πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των δύο μεταλλοειδών, σε βιολογικά συστήματα. Ωστόσο, το γεγονός ότι, όπως αποδείχτηκε στην παρούσα μελέτη, τα συγκεκριμένα παράγωγα είναι εξαιρετικά ασταθή, σε κανονικές συνθήκες, επομένως, ακόμα και αν συναντώνται σε βιολογικά δείγματα, αναμένεται η συγκέντρωσή τους να είναι εξαιρετικά χαμηλή, επιβάλλει τη χρησιμοποίηση ευαίσθητων και εκλεκτικών τεχνικών ανίχνευσης. Επίσης, ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται στις συνθήκες υπό τις οποίες γίνεται η αποθήκευση, αλλά και η επεξεργασία των εξεταζόμενων δειγμάτων, ώστε να αποφευχθεί η οξείδωσή τους.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ 4

- <sup>1</sup> W. R. Cullen and K. J. Reimer, *Chem. Rev.*, 1989, **89**, 713.
- <sup>2</sup> M. L. Berrow and A. M. Ure, *Occurrence and Distribution of Selenium*, M. Ilnat, Ed., CRC Press, Boca Raton, 1989, pp 213-242.
- <sup>3</sup> B. Zhu and M. A. Tabatabai, *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 1995, **59**, 1564.
- <sup>4</sup> J. E. Conde and M. S. Alaejos, *Chem. Rev.*, 1997, **97**, 1979.
- <sup>5</sup> P. Lahermo, G. Alfthan and D. J. Wang, *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 1998, **17**, 205.
- <sup>6</sup> J. O. Nriagu and J. M. Pacyna, *Nature*, 1988, **333**, 134.
- <sup>7</sup> J. M. Pacyna and L. W. Chang, *Toxicology of Metals*, Ed., CRC Lewis Publishers, Boca Raton, 1996, pp 9-28.
- <sup>8</sup> R. Nickson, J. McArthur, W. Burgess, K. M. Ahmed, P. Ravenscroft and M. Rahman, *Nature*, 1998, **395**, 338.
- <sup>9</sup> G. Yang, S. Wang, R. Zhou and S. Sun, *Am. J. Clin. Nutr.*, 1983, **37**, 872.
- <sup>10</sup> C. J. Chen, Y. C. Chuang, T. M. Lin and H. Y. Wu, *Cancer Res.*, 1985, **45**, 5895.
- <sup>11</sup> A. H. Smith, M. Goycolea, R. Haque and M. L. Biggs, *Am. J. Epidemiol.*, 1998, **147**, 660.
- <sup>12</sup> O. A. Levander and L. C. Argrett, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1969, **14**, 308.
- <sup>13</sup> L.H. Foster and S. Sumar, *Nutrition & Food Science*, Number 5, September/October 1995, 17–23.
- <sup>14</sup> S. Jiang, H. Robberecht, F. Adams and D. Vanden Berghe, *Toxicol. Environ. Chem.*, 1983, **6**, 191.
- <sup>15</sup> Bonneli, M. Conio and P. Massa, *Cancer Prevention and Control*, 1998, **100**, A351.
- <sup>16</sup> M. P. Rayman, *British Medical Journal*, 1997, **314**, 387.
- <sup>17</sup> G. F. Combs and L. Clark, *Selenium and Cancer Prevention: Antioxidant Nutrients and Disease Prevention* (Boca Ration: CRC Press, 1997).
- <sup>18</sup> M. Itoh and K. T. Suzuki, *Arch. Toxicol.*, 1997, **71**, 461.
- <sup>19</sup> H. E. Ganther, *J. Am. Coll. Toxicol.*, 1986, **5**, 1.
- <sup>20</sup> H. S. Hsieh and H. E. Ganther, *Biochim. Biophys. Acta*, 1977, **497**, 205.
- <sup>21</sup> W. C. Hawkes, E. C. Wilhelmsen and A. L. Tappel, *J. Inorg. Biochem.*, 1985, **23**, 77.
- <sup>22</sup> A. L. Moxon, *Science*, 1938, **88**, 81.
- <sup>23</sup> L. D. Kamstra and C. W. Bonhorst, *Proc. S. Dak. Acad. Sci.*, 1953, **32**, 72.
- <sup>24</sup> O. A. Levander and C. A. Baumann, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1966, **9**, 98.
- <sup>25</sup> J. Gailer, G. N. George, I. J. Pickering, R. C. Prince, S. C. Ringwald, J. E. Pemberton, R. S. Glass, H. S. Younis, D. W. DeYoung and H. V. Aposhian, *J. Am.Chem.Soc.*, 2000, **122**, 4637.
- <sup>26</sup> J. Gailer, S. Madden, M. F. Burke, M. B. Denton and H. V. Aposhian, *Appl. Organomet. Chem.*, 2000, **14**, 355.

- 
- <sup>27</sup> J. Gailer, G. N. George, H. H. Harris, I. J. Pickering, R. C. Prince, A. Somogyi, G. A. Buttigieg, R. S. Glass and M. B. Denton, *Inorg. Chem.*, 2002, **41**, 5426.
- <sup>28</sup> Z. Wang and T. G. Rossman, *Toxicology of Metals*, L. W. Chang., Ed., CRC Lewis Publishers, Boca Raton, F. L., 1996, pp. 221-229.
- <sup>29</sup> J. Gailer and W. Linder, *J. Chromatogr. B*, 1998, **716**, 83.
- <sup>30</sup> W. R. Cullen, B. C. McBride and J. Reglinski, *J. Inorg. Biochem.*, 1984, **21**, 179.
- <sup>31</sup> M. W. Fricke, P. A. Creed, A. N. Parks, J. A. Shoemaker, C. A. Schwegel and J. T. Creed, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, **19**, 1454.
- <sup>32</sup> E. Schmeisser, R. Raml, K. A. Francesconi, D. Kuehnelt D, A-L. Lindberg, C. Söeröes and W. Goessler, *Chem. Commun.*, 2004, 1824.
- <sup>33</sup> M. Kahn, R. Raml, E. Schmeisser, B. Vallant, K. A. Francesconi and W. Goessler, *Environ. Chem.*, 2005, **2**, 171.
- <sup>34</sup> V. Nischwitz, K. Kanaki and S. A. Pergantis, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2006, **21**, 33.
- <sup>35</sup> M. W. Fricke, M. Zeller, H. Sun, V. W.-M. Lai, W. R. Cullen, J. A. Shoemaker, M. R. Witkowski and J. T. Creed, *Chem. Res. Toxicol.*, 2005, **18**, 1821.
- <sup>36</sup> M Gosselin, J. M. Bouquegneau, F. Lefèbvre, G. Lepoint, G. Pergent, C. Pergent-Martini and S. Gobert, *BMC Ecology*, 2006, **6**, 12.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

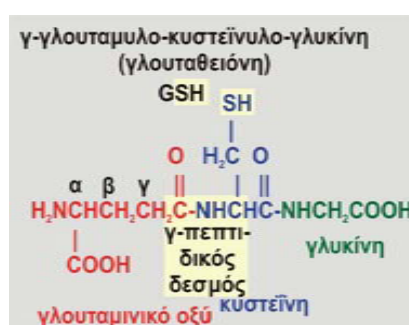
### ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΑΡΣΕΝΙΚΟΥ-ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ (As-GSH), ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥΣ ΜΕ ΤΙΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ HPLC-ESI-MS/MS-SRM ΚΑΙ HPLC-ICP-MS ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΟΥΣ ΣΤΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ ΤΟΥ ΑΡΣΕΝΙΚΟΥ

#### 5.1. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ – ΣΚΟΠΟΣ

##### ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

Ο ρόλος των σουλφιδρυλικών ομάδων (-SH), τόσο στον οξειδοαναγωγικό κύκλο, όσο και στην βιομεθυλίωση του αρσενικού, αποτελεί βασικό ερωτήμα της βιοχημείας και της έρευνας που σχετίζεται με την ειδοταυτοποίηση των στοιχείων.<sup>1</sup> Ο όρος “βιομεθυλίωση” αναφέρεται στην ενζυματικά καταλυόμενη μεταφορά μιας μεθυλομάδας, από ένα άτομο-δότη σε ένα άτομο-δέκτη.<sup>2</sup>

Η γλουταθειόνη (GSH) αποτελεί την πιο άφθονη σουλφιδρυλική ένωση που συναντάται στα κύτταρα, με τη μέση συγκέντρωσή της στα ερυθροκύτταρα να ανέρχεται σε 7 mM.<sup>3</sup> Πρόκειται για ένα τριπεπτιδίο, αποτελούμενο από τα αμινοξέα γλουταμινικό οξύ (γ-glutamic acid), κυστεΐνη (cysteine) και γλυκίνη (glycine) και το οποίο απεικονίζεται στο Σχήμα 5.1. Σήμερα, έχει πλέον διευκρινιστεί ο αντιοξειδωτικός ρόλος της GSH,<sup>4,5,6</sup> καθώς και η συμβολή της στην προστασία των κυττάρων από τις τοξίνες και τις ελεύθερες ρίζες.<sup>7</sup>

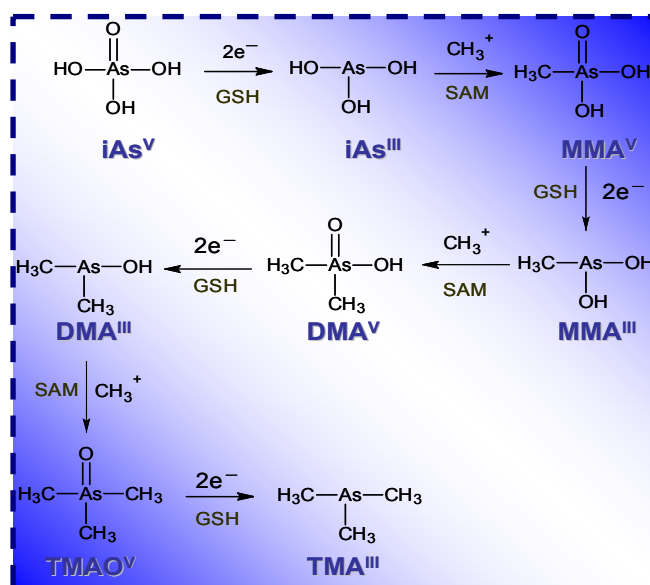


Σχήμα 5.1. Δομή της GSH.

Από την άλλη, το αρσενικό ανήκει στην κατηγορία των μεταλλοειδών και συναντάται στις οξειδωτικές καταστάσεις +3, +5 και -3. Τα τριοθενή ανόργανα είδη του στοιχείου είναι γνωστά ως αρσενικόδη (iAs<sup>III</sup>) και τα πεντασθενή ως αρσενικικά (iAs<sup>V</sup>), ενώ στην οξειδωτική κατάσταση -3 συναντώνται οι ενώσεις που

είναι γνωστές ως αρίνες. Εικάζεται ότι ο μηχανισμός τοξικότητας διαφέρει ανάλογα με την οξειδωτική κατάσταση του στοιχείου, με τα τριοθενή είδη να δεσμεύονται σε ένζυμα, τα οποία φέρουν σουλφιδρυλικές ομάδες και τα πεντασθενή να υποκαθιστούν τις φωσφορικές ενώσεις σε ενζυματικά καταλυόμενες αντιδράσεις, προκαλώντας, και στις δύο περιπτώσεις, αλλοίωση της φυσιολογικής δράσης του ενζύμου.<sup>8</sup> Η σύγκριση της τοξικότητας των παραπάνω ειδών αποτελεί πολύπλοκο ζήτημα, αφού στον οργανισμό τα πεντασθενή είδη μετατρέπονται σε τριοθενή και αντίστροφα, με τον ακριβή μηχανισμό αυτής της αλληλομετατροπής να μην έχει ακόμα διευκρινιστεί πλήρως.<sup>8</sup>

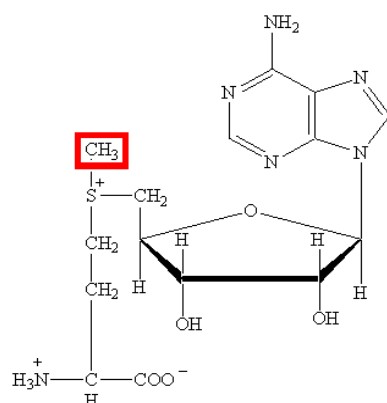
Ο μεταβολισμός του ανόργανου αρσενικού στους ζωντανούς οργανισμούς, έχει αποτελέσει, κατά καιρούς, αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας, με τον Challenger να διατυπώνει πρώτος τη θεωρία περί βιομεθυλίωσης των ανόργανων ενώσεων του στοιχείου<sup>9</sup> και μια σειρά άλλων ερευνητών να υιοθετούν, στη συνέχεια, την ίδια θεωρία.<sup>10,11</sup> Αναλυτικά, η σχέση ανάμεσα στην οξειδωτική κατάσταση του αρσενικού και τη μεθυλίωσή του, απεικονίζεται στο μηχανισμό που πρότειναν ο Cullen και οι συνεργάτες του το 1984 (Σχήμα 5.2).<sup>12</sup>



**Σχήμα 5.2.** Προτεινόμενη πορεία μεθυλίωσης του ανόργανου αρσενικού, από τον Cullen και τους συνεργάτες του.<sup>12</sup>

Στο σχήμα αυτό, μια σειρά από διαδοχικές αντιδράσεις οξειδοαναγωγής και μεθυλίωσης λαμβάνουν χώρα, με συνέπεια τα  $iAs^V$ , τα οποία προσλαμβάνονται, κυρίως, μέσω του πόσιμου νερού, αλλά και ορισμένων τροφών, να μετατρέπονται στα πεντασθενή μεθυλιωμένα οργανοαρσενικά παράγωγα μονομεθυλαρσενικό

οξύ ( $\text{MMA}^{\text{V}}$ ), διμεθυλαρσενικό οξύ ( $\text{DMA}^{\text{V}}$ ) και οξείδιο της τριμεθυλαρσίνης ( $\text{TMAO}^{\text{V}}$ ), καθώς και στην τριμεθυλαρσίνη ( $\text{TMA}^{\text{III}}$ ), όπου το αρσενικό συναντάται στην οξειδωτική κατάσταση  $-3$  (Σχήμα 5.2). Σύμφωνα με το μηχανισμό αυτό, αρχικά λαμβάνει χώρα αναγωγή των  $\text{iAs}^{\text{V}}$  σε  $\text{iAs}^{\text{III}}$ , ενώ ακολουθεί οξειδωτική μεθυλίωση των τελευταίων, προς σχηματισμό των πεντασθενών μεθυλιωμένων παραγώγων. Η GSH δρά ως αναγωγικό μέσο, παρέχοντας το ζεύγος ηλεκτρονίων που απαιτείται, για τη μετάβαση από την οξειδωτική κατάσταση  $+5$  στην οξειδωτική κατάσταση  $+3$ , ενώ, για τη μεθυλίωση, απαιτείται ένας δότης μεθυλομάδας, με προτεινόμενη την S-αδενοσυλομεθειονίνη (S-adenosylmethionine, SAM),<sup>13</sup> η δομή της οποίας φαίνεται στο Σχήμα 5.3.



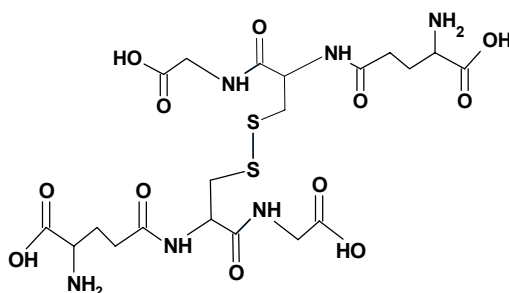
Σχήμα 5.3. Δομή της SAM.

Η μεθυλομάδα της SAM αποσπάται με τη μορφή καρβοκατιόντων ( $\text{CH}_3^+$ ), τα οποία μεθυλιώνουν τα  $\text{iAs}^{\text{III}}$ , προκαλώντας, παράλληλα, την οξείδωσή τους.<sup>14</sup> Συνέπεια των παραπάνω, είναι ο σχηματισμός των παραγώγων  $\text{MMA}^{\text{V}}$  και  $\text{DMA}^{\text{V}}$ , τα οποία αποτελούν και τους κύριους μεταβολίτες του αρσενικού στα ανθρώπινα ούρα.<sup>10</sup> Ωστόσο, πρόσφατα, τα αντίστοιχα τρισθενή είδη, μονομεθυλαρσενικό οξύ ( $\text{MMA}^{\text{III}}$ ) και διμεθυλαρσενικό οξύ ( $\text{DMA}^{\text{III}}$ ), των οποίων οι δομές φαίνονται στο Σχήμα 5.2, ανιχνεύτηκαν στα ούρα ασθενών, οι οποίοι είχαν προσλάβει υψηλές συγκεντρώσεις ανόργανου αρσενικού.<sup>15</sup> Μέχρι πρόσφατα, η μεθυλίωση του αρσενικού χαρακτηριζόταν ως “διαδικασία αποτοξίνωσης” του οργανισμού από τα βλαβερά ανόργανα είδη, αφού οι μεθυλιωμένοι μεταβολίτες  $\text{MMA}^{\text{V}}$  και  $\text{DMA}^{\text{V}}$  είναι λιγότερο τοξικοί από τα αντίστοιχα ανόργανα είδη.<sup>16,17</sup> Σήμερα, η μεθυλίωση χαρακτηρίζεται “διαδικασία βιοενεργοποίησης”, αφού η τοξικότητα των ενδιάμεσων μεταβολιτών  $\text{MMA}^{\text{III}}$  και  $\text{DMA}^{\text{III}}$  έχει αποδειχτεί μεγαλύτερη, ακόμα και από αυτή των ανόργανων μορφών.<sup>18</sup> Οι μεταβολίτες  $\text{MMA}^{\text{III}}$  και  $\text{DMA}^{\text{III}}$  φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη βιομετατροπή, αλλά και στην τοξικότητα, του

ανόργανου αρσενικού, επομένως, η παρουσία τους στα ανθρώπινα ούρα, επιβάλλεται να επιβεβαιωθεί με αξιόπιστες αναλυτικές μεθόδους. Πολλές από τις αρχικές μελέτες που εφαρμόστηκαν για την ταυτοποίηση των μεταβολιτών αυτών, βασίστηκαν στην ανάλυση πρότυπων διαλυμάτων των προς εξέταση ενώσεων, τα οποία παρασκευάστηκαν έπειτα από κατεργασία με αντιδραστήρια που περιέχουν θείο (sodium thiosulfate).<sup>19,15</sup> Αποτέλεσμα των παραπάνω συνθετικών μεθόδων, ήταν το τελικό διάλυμα να περιέχει, εκτός από τις επιθυμητές ενώσεις, και υψηλές συγκεντρώσεις θειούχων οργανοαρσενικών ενώσεων, όπως αποδείχτηκε αργότερα.<sup>20,21</sup> Το παραπάνω πρόβλημα αντιμετωπίστηκε, εφαρμόζοντας διαφορετικές συνθετικές πορείες και επιβεβαιώνοντας, στη συνέχεια, την καθαρότητα των τελικών προϊόντων, με πειράματα φασματοσκοπίας NMR.<sup>22</sup>

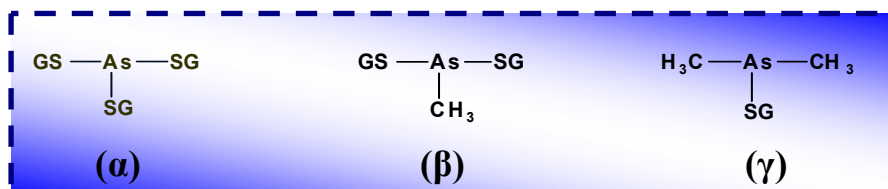
Τις τελευταίες δεκαετίες έχει αναπτυχθεί έντονο ενδιαφέρον, σχετικά με το ρόλο που διαδραματίζει η GSH στη μεθυλίωση και την τοξικότητα του αρσενικού. Επειδή οι μεθυλιωμένοι μεταβολίτες του στοιχείου αποτελούν ενώσεις με τοξικές και καρκινογενείς ιδιότητες, για το λόγο αυτό δίνεται ιδιαίτερη έμφαση στο ρόλο που διαδραματίζει η GSH στο μεταβολισμό αυτό.

Ο Scott και οι συνεργάτες του, διερεύνησαν τις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις μεταξύ  $iAs^V$  και GSH, αλλά και τη δέσμευση των  $iAs^{III}$  σε αυτή.<sup>8</sup> Κατά τη διάρκεια της συγκεκριμένης μελέτης, έλαβαν χώρα αντιδράσεις μεταξύ της GSH και των ενώσεων αρσενικόδες νάτριο ( $NaAsO_2$ ), ένυδρο αρσενικό νάτριο ( $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$ ),  $MMA^V$  και  $DMA^V$ . Η αντίδραση μεταξύ  $NaAsO_2$  και GSH, είχε ως αποτέλεσμα το σχηματισμό του συμπλόκου  $As(GS)_3$  (ArsenicTriGlutathione, ATG), ο χαρακτηρισμός του οποίου έγινε με Φασματοσκοπία NMR και Φασματομετρία Μάζας Βομβαρδισμού με Ταχεία Άτομα (FAB-MS). Από την άλλη, η ανάμιξη διαλυμάτων των ενώσεων  $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$  και GSH οδήγησε στην οξείδωση της τελευταίας και το σχηματισμό του δισουλφιδίου της γλουταθειόνης (GSSG), που φαίνεται στο Σχήμα 5.4.



Σχήμα 5.4. Δομή της GSSG.

Η αντίδραση της GSH με διαλύματα των ενώσεων  $\text{MMA}^{\text{V}}$  και  $\text{DMA}^{\text{V}}$ , οδήγησε στο σχηματισμό των συμπλόκων  $\text{CH}_3\text{As}(\text{GS})_2$  (MethylArsenicDiGlutathione - MADG) και  $(\text{CH}_3)_2\text{As}(\text{GS})$  (Di MethylArsenicGlutathione - DMAG).<sup>8</sup> Η ονομασία των συμπλόκων αυτών, στα οποία το αρσενικό συναντάται στην οξειδωτική κατάσταση +3 ( $\text{As}^{\text{III}}$ -GSH), παρουσιάζεται στον Πίνακα 5.1, ενώ οι δομές τους απεικονίζονται στο Σχήμα 5.5.



**Σχήμα 5.5.** Δομές των συμπλόκων (α) ATG (β) MADG και (γ) DMAG.

**Πίνακας 5.1.** Ονοματολογία των συμπλόκων ATG, MADG και DMAG.

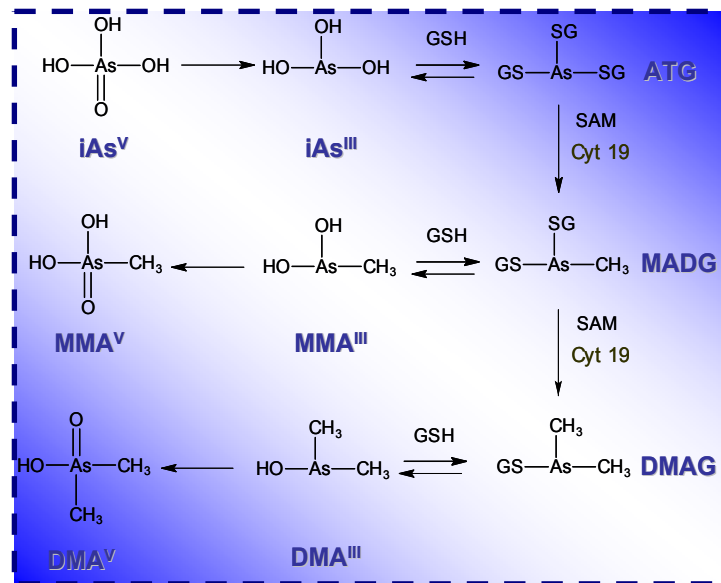
Ονοματολογία	Συντόμηση
tri(glutamyl-cysteinyl-glycinyl)trithio-arsenite	<b>ATG</b>
di(glutamyl-cysteinyl-glycinyl)methyl-dithio-arsonite	<b>MADG</b>
( $\bar{a}$ -glutamyl-cysteinyl-glycinyl)dimethyl-thio-arsinite	<b>DMAG</b>

Το 2000, οι Kala et al, ανέφεραν σε μελέτη τους ότι τα  $\text{iAs}^{\text{III}}$  μεταβολίζονται στο συκώτι ποντικών και εκκρίνονται τελικά στη χολή, με τη μορφή των συμπλόκων ATG και MADG.<sup>23</sup> Ωστόσο, παρόλο που τα σύμπλοκα αυτά αναφέρονται ως οι κύριοι μεταβολίτες του αρσενικού στη χολή των συγκεκριμένων ζώων, δε συμμετέχουν στο μεταβολισμό των  $\text{iAs}^{\text{III}}$ , όπως αυτός παρουσιάζεται από τους Cullen et al (Σχήμα 5.2).

Πρόσφατα, οι Hayakawa et al, εξέτασαν την πιθανότητα τα σύμπλοκα ATG και MADG να δρουν ως υποστρώματα για το ένζυμο Cyt19.<sup>24</sup> Το ένζυμο αυτό απομονώθηκε το 2002 από το συκώτι ποντικών<sup>25</sup> και ανήκει στην κατηγορία των μεθυλοτρανοφερασών του αρσενικού (arsenic methyltransferases). Οι μεθυλοτρανοφεράσες αποτελούν ένζυμα, τα οποία συμβάλλουν στη μεταφορά μιας μεθυλομάδας, από ένα δότη σε ένα δέκτη. Από την παραπάνω μελέτη, προέκυψε ότι τα  $\text{iAs}^{\text{III}}$  μεθυλιώνονται, μέσω σχηματισμού των συμπλόκων ATG και MADG και παρουσία των SAM, GSH και Cyt19. Επομένως, η αρχική υπόθεση των ερευνητών, ότι τα δύο σύμπλοκα ATG και MADG δρουν ως υποστρώματα για το ένζυμο Cyt19 και συμμετέχουν άμεσα στη μεθυλίωση του ανόργανου αρσενικού, επιβεβαιώθηκε. Στη συνέχεια, οι μελετητές πρότειναν τον εναλλακτικό μηχανισμό μεθυλίωσης του

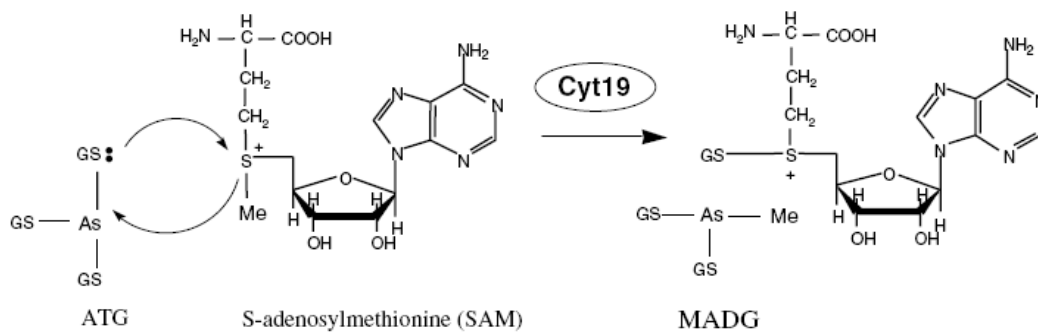


ανόργανου αρσενικού, σε βιολογικά συστήματα, ο οποίος απεικονίζεται Σχήμα 5.6.<sup>24</sup>



Σχήμα 5.6. Εναλλακτική πορεία βιομεθυλώσης του ανόργανου αρσενικού, σύμφωνα με τον Hayakawa και τους συνεργάτες του.<sup>24</sup>

Ο μηχανισμός δράσης του ενζύμου Cyt19 και της SAM, σχετικά με τη μεθυλίωση του συμπλόκου ATG, απεικονίζεται λεπτομερώς στο Σχήμα 5.7.

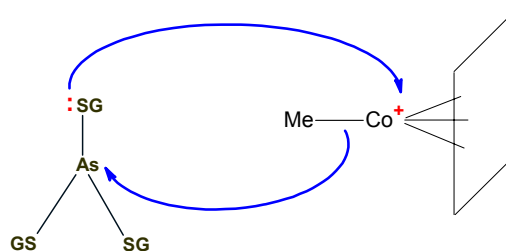


Σχήμα 5.7. Προτεινόμενος μηχανισμός μεθυλίωσης του συμπλόκου ATG, από την SAM, παρουσία του ενζύμου Cyt19.<sup>24</sup>

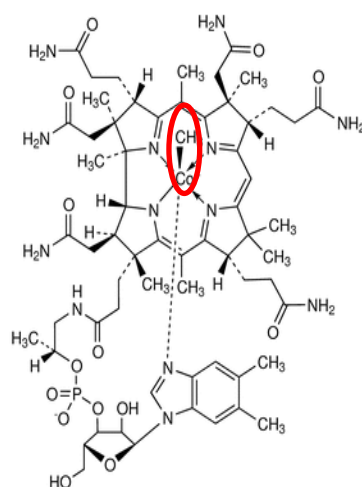
Όπως φαίνεται στο προηγούμενο σχήμα, το ζεύγος ηλεκτρονίων που φέρει το θείο της κυστεϊνικής ομάδας της GSH (η οποία περιέχεται στο σύμπλοκο ATG), προσβάλλει το κατιονικό θείο της SAM, με αποτέλεσμα τη μεταφορά μιας μεθυλομάδας στο σύμπλοκο ATG.

Οι διαφορές ανάμεσα στο μηχανισμό του Cullen και αυτόν του Hayakawa είναι σημαντικές, με τον δεύτερο να εμφανίζει τα πεντασθενή παράγωγα  $\text{MMA}^{\text{V}}$  και  $\text{DMA}^{\text{V}}$  σαν τελικά προϊόντα του μεταβολισμού του αρσενικού, επιβεβαιώνοντας τα πειραματικά δεδομένα, τα οποία αναφέρουν τα είδη αυτά ως τις επικρατέστερες ενώσεις του στοιχείου στα ανθρώπινα ούρα.<sup>26,27</sup> Από την άλλη, στο μηχανισμό του Cullen, οι παραπάνω ενώσεις παρουσιάζονται ως ενδιάμεσα προϊόντα, ενώ οι αντιστοιχες τρισθενείς  $\text{MMA}^{\text{III}}$  και  $\text{DMA}^{\text{III}}$  θεωρούνται οι τελικοί μεταβολίτες του στοιχείου. Επίσης, στον πρόσφατα προτεινόμενο μηχανισμό του Hayakawa, οι υψηλής τοξικότητας μεταβολίτες  $\text{MMA}^{\text{III}}$  και  $\text{DMA}^{\text{III}}$  οξειδώνονται και μετατρέπονται στους, λιγότερο τοξικούς,  $\text{MMA}^{\text{V}}$  και  $\text{DMA}^{\text{V}}$ , γεγονός που βρίσκεται σε συμφωνία και με την θεωρία του Arshian, σύμφωνα με την οποία “η οξείδωση του αρσενικού αποτελεί ταυτόχρονα διαδικασία αποτοξίνωσης του οργανισμού”.<sup>28</sup>

Στο σημείο αυτό, αξίζει να αναφερθεί η μελέτη των Zakharyan et al, οι οποίοι, το 1999, πρότειναν τη μεθυλίωση των  $\text{iAs}^{\text{III}}$  από την μεθυλοκοβαλαμίνη ( $\text{CH}_3\text{B}_{12}$ , Σχήμα 5.9), παρουσία GSH και απουσία ενζύμων, ισχυριζόμενοι ότι αυτό γίνεται μέσω πυρηνόφιλης προσβολής του δεσμού Co-C από ένα σύμπλοκο  $\text{As}^{\text{III}}$ -GSH, όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.8.<sup>29</sup>



**Σχήμα 5.8.** Προτεινόμενος μηχανισμός μη-ενζυματικής μεθυλίωσης των  $\text{iAs}^{\text{III}}$  από την  $\text{CH}_3\text{B}_{12}$ .<sup>29</sup>



**Σχήμα 5.9.** Δομή της  $\text{CH}_3\text{B}_{12}$ .

Όταν μια μεθυλομάδα μεταφέρεται (απουσία ενζύμων), από την  $\text{CH}_3\text{B}_{12}$  σε ένα ιόν βαρέως μετάλλου, λαμβάνει χώρα διάσπαση του δεσμού Co-C, η οποία, ανάλογα με τις συνθήκες, οδηγεί στο σχηματισμό ενός καρβοκατιόντος ( $\text{CH}_3^+$ ), μιας ρίζας ( $\text{CH}_3\cdot$ ) ή ενός καρβανιόντος ( $\text{CH}_3^-$ ).<sup>2</sup> Σε προηγούμενες μελέτες, έχει αποδειχτεί ότι τα  $\text{iAs}^{\text{III}}$  μεθυλιώνονται, απουσία ενζύμων και παρουσία  $\text{CH}_3\text{B}_{12}$  και GSH. Ωστόσο, σύμφωνα με την εξήγηση που δίνει ο Hogenkamp, η προσβολή του δεσμού Co-C από το σύμπλοκο  $\text{As}^{\text{III}}$ -GSH, λαμβάνει χώρα μόνο σε αλκαλικές και αυστηρά αναερόβιες συνθήκες.<sup>30,31</sup> Σε μελέτη του 1971, η οποία διεξήχθη σε εκχυλίσματα κυττάρων του μεθανοβάκιλλου, η  $\text{CH}_3\text{B}_{12}$  αναφέρεται σαν δότης μεθυλομάδας στην βιοσύνθεση της διμέθυλαρσίνης ( $(\text{CH}_3)_2\text{AsH}$ ), από τα  $\text{iAs}^{\text{III}}$  ή τα  $\text{iAs}^{\text{V}}$ .<sup>32</sup> Αργότερα, οι Buchet et al αναφέρουν ότι η  $\text{CH}_3\text{B}_{12}$  μεθυλιώνει τα  $\text{iAs}^{\text{III}}$ ,<sup>33</sup> ανεξάρτητα από την ύπαρξη ενζύμων, ενώ, στη μελέτη των Zakharyan et al, αποδεικνύεται ότι η  $\text{CH}_3\text{B}_{12}$  μεθυλιώνει τα  $\text{iAs}^{\text{III}}$ , απουσία ενζύμων, με την προϋπόθεση ότι η μεθυλίωση αυτή γίνεται παρουσία GSH.<sup>29</sup> Στην εργασία αυτή, η οποία βασίστηκε σε υγρή χρωματογραφία στήλης και στη χρήση του ραδιενεργού ισότοπου  $^{73}\text{As}$ , ανιχνεύτηκαν τα παράγωγα  $\text{MMA}^{\text{V}}$  και  $\text{DMA}^{\text{V}}$ , μεταξύ των προϊόντων της αντίδρασης. Η ίδια αντίδραση, μελετήθηκε, στη συνέχεια, και από τους Pergantis et al, αυτή τη φορά αποφευγοντας τη χρήση ραδιενεργών ισωτόπων και εφαρμόζοντας την τεχνική της Φασματομετρίας Μάζας Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος (ICP-MS), σε συνδυασμό με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC).<sup>34</sup> Ο διαχωρισμός των σχηματιζόμενων ενώσεων, πραγματοποιήθηκε σε στήλη ανιονανταλλαγής, ενώ τα παράγωγα που ανιχνεύτηκαν ήταν, και σε αυτή την περίπτωση, τα  $\text{MMA}^{\text{V}}$  και  $\text{DMA}^{\text{V}}$ . Και στις δυο παραπάνω μελέτες, διαπιστώθηκε ότι, απουσία της GSH, η μεθυλίωση δε λαμβάνει χώρα, ενώ, σε καμία από αυτές, δεν αναφέρεται η ύπαρξη συμπλόκων  $\text{As}^{\text{III}}$ -GSH, μεταξύ των προϊόντων της αντίδρασης. Το γεγονός αυτό, ενδεχομένως, οφείλεται στην οξείδωση ή την διάσπαση των συγκεκριμένων ενώσεων, υπό τις συνθήκες που επικρατούσαν, κατά την διάρκεια των εκάστοτε αναλύσεων. Για παράδειγμα, όπως αποδείχτηκε αργότερα, η ανάλυση των συμπλόκων με χρωματογραφία ανιονανταλλαγής και τη στήλη PRPX-100, προκαλεί την διάσπαση τους στη στήλη.<sup>35</sup> Το γεγονός, λοιπόν, ότι στη μελέτη των Pergantis et al, η συγκεκριμένη χρωματογραφία ήταν αυτή η οποία χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των προϊόντων της αντίδρασης μεθυλίωσης, εξηγεί, ως ένα βαθμό, την αδυναμία ανίχνευσης των συμπλόκων  $\text{As}^{\text{III}}$ -GSH.

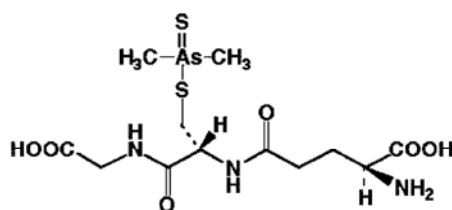
Οι πρώτες προσπάθειες για την ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό των συμπλόκων As<sup>III</sup>-GSH, βασίστηκαν σε φασματοσκοπία <sup>1</sup>H NMR και <sup>13</sup>C NMR και στην ανάλυση των, συντιθέμενων στο εργαστήριο, διαλυμάτων των τριών συμπλόκων ATG, MADG και DMAG. Οι μελέτες που ακολούθησαν, βασίστηκαν σε υγρή χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) χρησιμοποιώντας ενώσεις αρσενικού, ραδιενεργά ιχνοθετημένες με το ισότοπο <sup>73</sup>As.<sup>13,36</sup> Ωστόσο, καμία από τις δύο αυτές τεχνικές, δεν παρέχει την ευαισθησία και την εκλεκτικότητα που απαιτείται, για την ανίχνευση των συμπλόκων σε συγκεντρώσεις της τάξης των μερικών μg/L, στις οποίες, ενδέχεται, να συναντώνται τα είδη αυτά, σε βιολογικά συστήματα. Επιπλέον, οι τεχνικές υγρής χρωματογραφίας στήλης δεν εγγυώνται τη σταθερότητα των εξεταζόμενων ενώσεων, ενώ, η χρήση ραδιενεργών ισότοπων, όπως το <sup>73</sup>As, είναι τεχνικά πολύπλοκη, αλλά και ανεπιθύμητη. Οι παραπάνω λόγοι, οδήγησαν τους ερευνητές στην αναζήτηση σύγχρονων αναλυτικών τεχνικών υγρής χρωματογραφίας HPLC, σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας, για την εκλεκτική ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό των παραπάνω τριών ενώσεων.

Αρχικά, ο Kala και οι συνεργάτες του, χρησιμοποιώντας χρωματογραφία HPLC αντιστροφής φάσης, συζευγμένη, τόσο με ICP-MS, όσο και με Φασματομετρία Μάζας Ιονισμού μέσω Ηλεκτροψεκασμού (ESI-MS), εφαρμόζοντας τη Μέθοδο Επιλεγμένων Ιόντων (Selected Ion Monitoring - SIM), ταυτοποίησαν τα σύμπλοκα ATG και MADG, σε δείγματα χολής ποντικών, οι οποίοι είχαν προσλάβει υψηλές συγκεντρώσεις αρσενικών νατρίου.<sup>23</sup> Ωστόσο, με τη μέθοδο αυτή, δεν ήταν δυνατός ο ικανοποιητικός διαχωρισμός των εξεταζόμενων ενώσεων, ένα πρόβλημα που επιλύθηκε από τους Raab et al, οι οποίοι, χρησιμοποιώντας, επίσης, χρωματογραφία αντιστροφής φάσης, πέτυχαν τη λήψη συμμετρικών και πλήρως διαχωρισμένων κορυφών, για τα σύμπλοκα ATG, MADG και DMAG, κατά τις αναλύσεις με HPLC-ICP-MS και HPLC-ESI-MS.<sup>35</sup> Το 2004, η ερευνητική ομάδα των Kala et al, κατάφερε, χρησιμοποιώντας τις τεχνικές HPLC-ICP-MS και HPLC-ESI-MS-SIM, να ανιχνεύσει και να ταυτοποιήσει τα σύμπλοκα ATG και MADG, σε ούρα ποντικών, οι οποίοι είχαν εμβολιαστεί με υψηλές συγκεντρώσεις NaAsO<sub>2</sub> (0.5-5 mg/kg).<sup>37</sup> Η ιδιαιτερότητα των συγκεκριμένων τροφτικών, είναι ότι παρουσιάζουν έλλειψη στο ένζυμο γ-glutamyl transpeptidase, με συνέπεια να αδυνατούν να μεταβολίσουν και να διασπάσουν τη GSH. Επομένως, οι συγκεντρώσεις του τριπεπτιδίου στα κύτταρα των τροφτικών αυτών, είναι υψηλότερες από ότι συνήθως. Η συγκεκριμένη μελέτη αποτελεί την πρώτη αναφορά, για ύπαρξη συμπλόκων As<sup>III</sup>-GSH σε ούρα, προτείνοντας, παράλληλα, το

συκώτι και το έντερο, ως πιθανές θέσεις σχηματισμού των ATG και MADG, τα οποία, στη συνέχεια, μεταφέρονται στους νεφρούς, όπου φιλτράρονται, καταλήγοντας στα ούρα.

Παρόλο που η τεχνική ESI-MS έχει, κατά καιρούς, χρησιμοποιηθεί, για την ταυτοποίηση των τριοθενών συμπλόκων  $As^{III}$ -GSH, τόσο σε πρότυπα διαλύματα, όσο και σε βιολογικά δείγματα, ωστόσο, μέχρι σήμερα, έχει δημοσιευτεί μόνο μια μελέτη διαδοχικής φασματομετρίας μάζας (MS/MS), η οποία παρέχει δομικές πληροφορίες, σχετικά με τα προϊόντα ιόντα, που προκύπτουν από τη θραυσματοποίηση των εξεταζόμενων ενώσεων.<sup>38</sup> Πρόκειται για μια προκαταρκτική μελέτη, η οποία περιλαμβάνει και άλλα στοιχεία, πλην του αρσενικού, και, για το λόγο αυτό, αναφέρει μόνο ένα περιορισμένο αριθμό προϊόντων ιόντων, τα οποία σχηματίζονται κατά την θραυσματοποίηση των πρόδρομων ενώσεων.

Όπως είναι πλέον γνωστό, το αρσενικό παρουσιάζει ισχυρή συγγένεια με το θείο (S), σχηματίζοντας μια σειρά από πεντασθενή θειοαρσενικά παράγωγα  $As^V$ -S,<sup>39,40,41,42</sup> τα περισσότερα από τα οποία συνιστούν μικρά οργανικά μόρια. Μέχρι σήμερα, μόνο ένας μικρός αριθμός πεπτιδίων, τα οποία περιέχουν αρσενικό, έχει ανιχνευτεί *in vivo* και πρόκειται για μια σειρά από σύμπλοκα αρσενικού με φυτοχελατίνες (phytochelatin),<sup>43</sup> που συναντώνται σε διάφορα φυτά, καθώς και τα σύμπλοκα  $As^{III}$ -GSH, τα οποία αναφέρθηκαν προηγουμένως. Οι φυτοχελατίνες είναι πολυμερή της GSH και δρουν ως αντιοξειδωτικά. Από την άλλη, η πρώτη αναφορά για την ύπαρξη συμπλόκου  $As^V$ -GSH, όπου το αρσενικό συναντάται στην οξειδωτική κατάσταση +5, έγινε το 2007 από τον Feldmann και τους συνεργάτες του, οι οποίοι ανίχνευσαν και ταυτοποίησαν την ένωση  $DMTA^V$ -GSH (DimethylThioArsinicAcid-GSH), που φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.<sup>44</sup>



**Σχήμα 5.10.** Δομή του πεντασθενούς συμπλόκου  $DMTA^V$ -GSH.<sup>44</sup>

Το παράγωγο αυτό ανιχνεύτηκε σε λάχανα της οικογένειας *Brassica oleracea*, τα οποία είχαν προηγουμένως εκτεθεί σε υψηλές συγκεντρώσεις της ένωσης  $DMA^V$ . Η συγκεκριμένη ανακάλυψη, όχι μόνο αλλάζει το σκηνικό της αλληλεπίδρασης του αρσενικού με τα πλούσια σε θείο βιομόρια, αλλά επίσης δίνει

έμφαση και στο γεγονός ότι οι αλληλεπιδράσεις As-S ενδέχεται να διαδραματίζουν ρόλο - κλειδί στη δραστηριότητα του αρσενικού και των ενδιάμεσων προϊόντων του, καθώς και στο μονοπάτι μεταβολισμού του στοιχείου σε βιολογικά συστήματα. Όσον αφορά την ανίχνευση και το χαρακτηρισμό της συγκεκριμένης ένωσης, αυτή πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία HPLC αντίστροφης φάσης σε συνδυασμό με τις τεχνικές ESI-MS/MS και ICP-MS.<sup>44</sup>

### ΣΚΟΠΟΣ

Η μεθυλίωση των  $iAs^{III}$  από την  $CH_3B_{12}$ , παρουσία GSH, έχει μελετηθεί στο παρελθόν από διάφορες ερευνητικές ομάδες, με τα μεθυλιωμένα οργανοαρσενικά παράγωγα  $MMA^V$  και  $DMA^V$  να αναφέρονται ως τα κατεξοχην προϊόντα μεθυλίωσης, που έχουν ανιχνευτεί και ταυτοποιηθεί, μέχρι σήμερα. Επίσης, σε μια από τις μελέτες αυτές, επισημάνθηκε η ύπαρξη και του τρισθενούς παραγώγου  $MMA^{III}$ , γεγονός όμως που τίθεται υπό αμφισβήτηση, αφού οι αναλυτικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη, δεν ήταν ικανές να επιβεβαιώσουν την παρουσία της ένωσης αυτής. Ταυτόχρονα, στις παραπάνω μελέτες, γίνεται λόγος για τη συνολική απόδοση μεθυλίωσης των  $iAs^{III}$  (άθροισμα των συγκεντρώσεων των  $MMA^V$  και  $DMA^V$  προς την συγκέντρωση των  $iAs^{III}$ , που υπήρχε αρχικά στο μίγμα της αντίδρασης), η οποία, σε καμία περίπτωση, δεν υπερβαίνει το 22%. Επίσης, απουσία της GSH, η μεθυλίωση είναι αδύνατη. Οι παραπάνω παρατηρήσεις, δηλαδή η περιορισμένη απόδοση μεθυλίωσης και η απαραίτητη παρουσία της GSH στο σύστημα, προκειμένου να καταστεί δυνατή η μεθυλίωση, οδήγησαν στην ιδέα του πιθανού σχηματισμού των συμπλόκων  $As^{III}$ -GSH, ως ενδιάμεσων προϊόντων.

Η αδυναμία ανίχνευσης των συμπλόκων  $As^{III}$ -GSH στις, μέχρι σήμερα, διεξαχθείσες μελέτες μεθυλίωσης των  $iAs^{III}$  από την  $CH_3B_{12}$ , οφείλεται, κατά πάσα πιθανότητα, στην απουσία αναλυτικών μεθόδων, ικανών να ανιχνεύσουν, αλλά και να ταυτοποιήσουν, τα παράγωγα αυτά. Το γεγονός αυτό, αποτέλεσε το έναυσμα για την εκπόνηση της συγκεκριμένης μελέτης, η οποία είχε ως πρωταρχικό σκοπό την ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων, κατάλληλων για την ανίχνευση και το χαρακτηρισμό των συμπλόκων As-GSH. Πιο συγκεκριμένα, δόθηκε έμφαση στην ανάπτυξη μεθόδου HPLC-ESI-MS/MS, εφαρμόζοντας τη μέθοδο Παρακολούθησης Επιλεγμένων Αντιδράσεων (SRM), με σκοπό την εκλεκτική ανίχνευση και το χαρακτηρισμό των τριών τρισθενών συμπλόκων ATG, MADG και DMAG, καθώς

και του πεντασθενούς παραγώγου DMTA<sup>V</sup>-GSH. Η τελευταία ένωση αποφασίστηκε να συμπεριληφθεί στην παρούσα μελέτη, έτσι ώστε, για πρώτη φορά, να γίνει προσπάθεια ανίχνευσης και χαρακτηρισμού, των τεσσάρων συμπλόκων As-GSH, με την ίδια μέθοδο. Η μέθοδος SRM επιλέχθηκε λόγω της υψηλής ευαισθησίας και εκλεκτικότητας που εξασφαλίζει, αλλά και της ελαχιστοποίησης των παρεμποδισμών του αναλύτη από τα συστατικά της μήτρας, ιδιαίτερα στην περίπτωση πολύπλοκων βιολογικών δειγμάτων. Η ταυτοποίηση των τεσσάρων συμπλόκων As-GSH επιβεβαιώθηκε, περαιτέρω, με την τεχνική HPLC-ICP-MS.

Επειδή και οι δύο προηγούμενες μέθοδοι που αναφέρθηκαν χαρακτηρίζονται από υψηλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα, για το λόγο αυτό θεωρούνται κατάλληλες για την ανίχνευση ενώσεων, σε συγκεντρώσεις της τάξης των μερικών  $\mu\text{g/L}$ , επομένως ενδείκνυνται για αναλύσεις βιολογικών δειγμάτων. Στην παρούσα μελέτη, και οι δύο μέθοδοι βασίστηκαν σε χρωματογραφία αντιστροφής φάσης και βαθμιδωτή έκλυση, με στόχο τον διαχωρισμό και την έκλυση των ενώσεων από τη στήλη.

Την ανάπτυξη των αναλυτικών μεθόδων, ακολούθησε η μελέτη της μεθυλίωσης των  $i\text{As}^{\text{III}}$  από τη  $\text{CH}_3\text{B}_{12}$ , παρουσία GSH και απουσία ενζύμων, διερευνώντας, παράλληλα, τον πιθανό σχηματισμό συμπλόκων As-GSH, κατά την αντίδραση αυτή.

## 5.2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 5.2.1. ΔΙΑΔΟΧΙΚΗ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ ΙΟΝΙΣΜΟΥ ΜΕΣΩ ΗΛΕΚΤΡΟΨΕΚΑΣΜΟΥ (ESI-MS/MS) ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ HPLC

Η τεχνική ESI-MS/MS εφαρμόστηκε, σε συνδυασμό με υγρή χρωματογραφία HPLC, με σκοπό την ανίχνευση και το χαρακτηρισμό των τεσσάρων συμπλόκων As-GSH. Για το διαχωρισμό των ενώσεων, χρησιμοποιήθηκαν το αυτοματοποιημένο σύστημα HPLC του φασματομέτρου μάζας TSQ Quantum, αλλά και το ανεξάρτητο σύστημα HPLC, που αποτελείται από μια αντλία βαθμιδωτής έκλυσης τεσσάρων διαλυτών LC-20AD, της εταιρείας Shimadzu Corporation. Εφαρμόστηκε χρωματογραφία αντιστροφής φάσης, χρησιμοποιώντας τη στήλη BDS Hypersil C18 (Μήκος x Εσωτερική Διάμετρος: 150 mm x 2.1 mm, Thermo Fischer Scientific) και την αντίστοιχη προστήλη. Η ταχύτητα ροής του εκλούσματος ήταν ίση με 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  και ο βρόχος εισαγωγής δείγματος χωρητικότητας 20 $\mu\text{L}$  ή 50  $\mu\text{L}$ . Δοκιμάζοντας διάφορους συνδυασμούς διαλυτών και προγραμμάτων έκλυσης, προέκυψε η βέλτιστη μέθοδος, που παρατίθεται στον Πίνακα 5.2.

**Πίνακας 5.2.** Πρόγραμμα έκλυσης για το διαχωρισμό των συμπλόκων As-GSH.

Χρόνος (min)	% Διαλύτης Α	% Διαλύτης Β
	2% μεθανόλη + 0.05% φορμικό οξύ + νερό	100% μεθανόλη
0	100	0
10	100	0
11	90	10
25	90	10
26	100	0
35	100	0

Η ανίχνευση των ενώσεων πραγματοποιήθηκε με το φασματόμετρο μάζας TSQ Quantum (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA), το οποίο είναι εξοπλισμένο με τρία τετράπολα και πηγή ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI). Εφαρμόστηκε μέθοδος ανίχνευσης θετικών ιόντων, με βέλτιστες παραμέτρους λειτουργίας του οργάνου αυτές που παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.3. Το σύνολο του εκλούσματος από τη στήλη κατέληγε στην πηγή ιονισμού.



Πίνακας 5.3. Βέλτιστες παράμετροι λειτουργίας της τεχνικής ESI-MS/MS.

Παράμετροι Λειτουργίας	Βέλτιστες Τιμές
Δυναμικό Ηλεκτροψεκασμού [kV]	4.1
Ροή Βοηθητικού Αερίου – N <sub>2</sub> [Αυθ. Μονάδες]	25
Ροή Εκνεφωτικού Αερίου – N <sub>2</sub> [Αυθ. Μονάδες]	45
Δυναμικό Πηγής Ιονισμού [V]	0
Θερμοκρασία Τριχοειδούς [°C]	300
Πίεση Αερίου στην Κυψελίδα Πρόσκρουσης (mtorr)	1.0
Διαχωριστική Ικανότητα Τετραπόλων Q1, Q3 (amu)	0.7

### 5.2.2. ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ ΕΠΑΓΩΓΙΚΑ ΣΥΖΕΥΤΜΕΝΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ (ICP-MS) ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ HPLC

Μια άλλη τεχνική, η οποία χρησιμοποιήθηκε, σε συνδυασμό με υγρή χρωματογραφία HPLC, με σκοπό την ανίχνευση και το χαρακτηρισμό των συμπλόκων As-GSH, ήταν η φασματομετρία μάζας ICP-MS. Εφαρμόστηκε η ίδια χρωματογραφική μέθοδος, όπως και στην περίπτωση της τεχνικής HPLC-ESI-MS/MS και χρησιμοποιήθηκε το ανεξάρτητο σύστημα HPLC, που αποτελείται από την αντλία LC-20AD. Η ταχύτητα ροής του εκλούσματος που επιλέχθηκε (200  $\mu\text{L}/\text{min}$ ), δεν ήταν αρκετή για την επίτευξη ικανοποιητικής εκνέφωσης του διαλύματος, οπότε προστέθηκε, μετά τη στήλη (μέσω συνδέσμου “T”), συμπληρωματική ροή υγρού, ίση με 0.8  $\text{mL}/\text{min}$  και σύστασης 2% κ.ο. νιτρικού οξέος σε απιονισμένο νερό. Οι βέλτιστες παράμετροι λειτουργίας της τεχνικής ICP-MS, με τις οποίες επιτυγχάνεται η μέγιστη ευαισθησία κατά την ανίχνευση των ενώσεων αρσενικού, δίνονται στον Πίνακα 5.4.

Πίνακας 5.4. Βέλτιστες παράμετροι λειτουργίας της τεχνικής ICP-MS.

Παράμετροι Λειτουργίας	Βέλτιστες Τιμές
Ροή αερίου εκνέφωσης [mL/min]	1.00
Ροή βοηθητικού αερίου [mL/min]	1.00
Ροή αερίου ψύξης [mL/min]	13.5
Ισχύς Πλάσματος [W]	1400
Βάθος λήψης δείγματος [Αυθ. Μονάδες]	100

### 5.2.3. ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Για τις αναλύσεις χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια:

- Μεθανόλη (gradient elution ACS, Sigma, Buchs, Switzerland).
- Φορμικό οξύ (puriss. p.a., ACS, 88%–91% {T}, Fluka Chemika, Buchs, Switzerland).
- Νιτρικό οξύ (65%, puriss., p.a., Riedel-de Haen, Seelze, Germany).
- Υδροχλωρικό οξύ (37%, puriss., p.a., Riedel-de Haen, Seelze, Germany).
- Τρι-υδροξυμέθυλο-αμινομεθάνιο (tris,  $C_4H_{11}NO_3 \cdot HCl$ , ultra for molecular biology).
- Σουλφίδιο του διοθενούς σιδήρου ( $Fe^{II}S$ , Riedel-de Haen, Seelze, Germany).
- Διμεθυλαρσενικό οξύ ( $DMA^V$ , puriss., 99%, Fluka, Buchs, Switzerland).
- Αρσενικόδες νάτριο ( $NaAsO_2$ , BDH, Ltd., Poole, United Kingdom).
- Μονομεθυλαρσενικό οξύ ( $MMA^V$ , purity 99%, Supelco, Bellefonte, PA).
- Ανηγγμένη μορφή της γλουταθειόνης ( $C_{10}H_{17}N_3O_6S$ , puriss.  $\geq 97\%$ , Fluka).
- Μεθυλοκοβαλαμίνη ( $C_{63}H_{91}CoN_{13}O_{14}P$ , Sigma, Buchs, Switzerland).

### 5.2.4. ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ AS-GSH

Η σύνθεση των συμπλόκων ATG, MADG, DMAG και  $DMTA^V$ -GSH βασίστηκε σε υπάρχουσες πειραματικές μεθόδους, που αναφέρονται σε προηγούμενες μελέτες.<sup>8,23,44</sup>

#### ATG

Σε σφαιρική φιάλη, χωρητικότητας 50 mL, αναμιγνύονται  $NaAsO_2$  (0.037 g, 0.28 mmol) και GSH (0.26 g, 0.85 mmol), ενώ το μίγμα που προκύπτει διαλύεται σε 2.5 mL απιονισμένου νερού (το οποίο έχει υποστεί απαέρωση σε λουτρό υπερήχων). Το διάλυμα αφήνεται να αντιδράσει για 24 hrs, υπό αδρανή ατμόσφαιρα Ar και ανάδευση, ενώ, μετά το πέρας της αντίδρασης, λαμβάνει χώρα καταβύθιση του προϊόντος, με προσθήκη 10 mL μεθανόλης. Τέλος, το αιώρημα που προκύπτει, υφίσταται φυγοκέντριση και, έπειτα από την απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού, το στερεό ξηραίνεται σε θερμοκρασία δωματίου και αποθηκεύεται.

### MADG

Η πορεία που ακολουθείται για τη σύνθεση του συμπλόκου MADG, είναι όμοια με αυτή που περιγράφηκε προηγουμένως για το σύμπλοκο ATG. Πιο συγκεκριμένα, αναμιγνύονται MMA<sup>V</sup> (0.059 g, 0.36 mmol) και GSH (0.5 g, 1.63 mmol), τα οποία διαλύονται σε 2 mL απιονισμένου και απαερωμένου νερού. Τα παραπάνω συστατικά αντιδρούν για 24 hrs, ενώ, στο τέλος της αντίδρασης, λαμβάνει χώρα καταβύθιση του προϊόντος, με προσθήκη 10 mL αιθανόλης. Τέλος, το αιώρημα που προκύπτει, υφίσταται φυγοκέντρωση, απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού και ξήρανση του στερεού.

### DMAG

Για τη σύνθεση του παρόντος συμπλόκου αναμιγνύονται DMA<sup>V</sup> (0.035 g, 0.25 mmol) και GSH (0.23 g, 0.75 mmol), τα οποία διαλύονται σε 2.5 mL απιονισμένου και απαερωμένου νερού. Τα παραπάνω συστατικά αντιδρούν (με τις ίδιες συνθήκες που περιγράφηκαν προηγουμένως), ενώ στο τέλος της αντίδρασης λαμβάνει χώρα καταβύθιση του προϊόντος, έπειτα από προσθήκη 10 mL αιθανόλης. Τέλος, το αιώρημα που προκύπτει, υφίσταται φυγοκέντρωση, απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού και ξήρανση του στερεού.

Το στερεό που προκύπτει σε καθεμία από τις παραπάνω αντιδράσεις, διαλύεται σε 1 mL διαλύματος φορμικού οξέος – απιονισμένου νερού (0.1% κ.ο. σε φορμικό οξύ) και, αφού υποστεί την ανάλογη αραιώση, αναλύεται άμεσα με τις τεχνικές HPLC-ICP-MS και HPLC-ESI-MS/MS-SRM, προκειμένου να ταυτοποιηθεί το περιεχόμενό του.

Από την άλλη, για τη σύνθεση του πενταθενούς συμπλόκου DMTA<sup>V</sup>-GSH, πραγματοποιήθηκε η κατεργασία ενός διαλύματος DMA<sup>V</sup> (συγκέντρωσης 10 mg/L), με αέριο H<sub>2</sub>S, με αποτέλεσμα το σχηματισμό της ένωσης διμέθυλοθειοαρσενικό οξύ (DMTA<sup>V</sup>). Να επισημανθεί ότι το αέριο H<sub>2</sub>S, αποτελεί προϊόν της αντίδρασης του σουλφιδίου του δισθενούς σιδήρου (Fe<sup>II</sup>S) με υδροχλωρικό οξύ (συγκέντρωσης 10% κ.ο. σε απιονισμένο νερό). Στη συνέχεια, αναμιγνύονται 100 μL του διαλύματος DMTA<sup>V</sup> και 100 μL ενός διαλύματος GSH (συγκέντρωσης 100 mM) και το τελικό διάλυμα αφήνεται να αντιδράσει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, για χρονικό διάστημα 30 min, πριν από την ανάλυση του με τις τεχνικές HPLC-ICP-MS και HPLC-ESI-MS/MS.

### 5.2.5. ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΩΝ $iAs^{III}$ ΑΠΟ ΤΗΝ $CH_3B_{12}$ ΠΑΡΟΥΣΙΑ GSH

Η αντίδραση μεθυλίωσης του ανόργανου αρσενικού από την  $CH_3B_{12}$  έχει μελετηθεί και στο παρελθόν, ωστόσο, σε καμία από τις μελέτες αυτές δεν αναφέρεται η ανίχνευση των συμπλόκων As-GSH, μεταξύ των προϊόντων της αντίδρασης.<sup>29,34</sup> Έτσι, λοιπόν, στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε *in vitro* η μεθυλίωση του ανόργανου αρσενικού, χρησιμοποιώντας ένα σύστημα, αποτελούμενο από ρυθμιστικό διάλυμα tris, συγκέντρωσης 0.1 M και pH 7.8, που περιέχει  $NaAsO_2$ , ανηγμένη GSH και  $CH_3B_{12}$ .

Πιο συγκεκριμένα, η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιλαμβάνει την ανάμιξη, σε δοκιμαστικό σωλήνα (χωρητικότητας 15 mL), των διαλυμάτων GSH,  $NaAsSO_2$  και tris, με το μίγμα που προκύπτει να αφήνεται για επώαση στους 37°C, για χρονικό διάστημα 45 min, υπό αδρανή ατμόσφαιρα αερίου Ar. Ακολούθησε η προσθήκη του διαλύματος της  $CH_3B_{12}$ , ενώ, υπό αδρανή ατμόσφαιρα, συνεχίζεται η επώαση του τελικού διαλύματος, σε θερμοκρασία 37°C. Ανά συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα, απομακρύνονται κλάσματα από το μίγμα της αντίδρασης και αναλύονται άμεσα, με τις τεχνικές HPLC-ICP-MS και HPLC-ESI-MS/MS. Το μίγμα που προκύπτει ονομάζεται “μίγμα μεθυλίωσης”.

Επίσης, εξετάστηκε και η μεθυλίωση του ανόργανου αρσενικού, παρουσία ενός άλλου πιθανού μεθυλιωτικού μέσου, το οποίο ήταν η μεθυλιωμένη μορφή της GSH ( $CH_3-SG$ ). Στην περίπτωση αυτή, πραγματοποιήθηκε η ίδια διαδικασία με προηγουμένως, με τη διαφορά ότι αντί της  $CH_3B_{12}$ , προστέθηκε η  $CH_3-SG$  στο τελικό μίγμα αντίδρασης και εξετάστηκε, και σε αυτή την περίπτωση, η πιθανότητα μεθυλίωσης του αρσενικού.

### 5.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 5.3.1. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ HPLC-ESI-MS/MS-SRM ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ As-GSH

Η ανάπτυξη μεθόδου HPLC-ESI-MS/MS, για την ανίχνευση και το χαρακτηρισμό των τεσσάρων συμπλόκων As-GSH, βασίστηκε στην ανάλυση των πρότυπων διαλυμάτων των υπό εξέταση ενώσεων. Για το διαχωρισμό επιλέχθηκε χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, ενώ η ανάπτυξη της μεθόδου HPLC-ESI-MS/MS ακολούθησε τα παρακάτω στάδια:

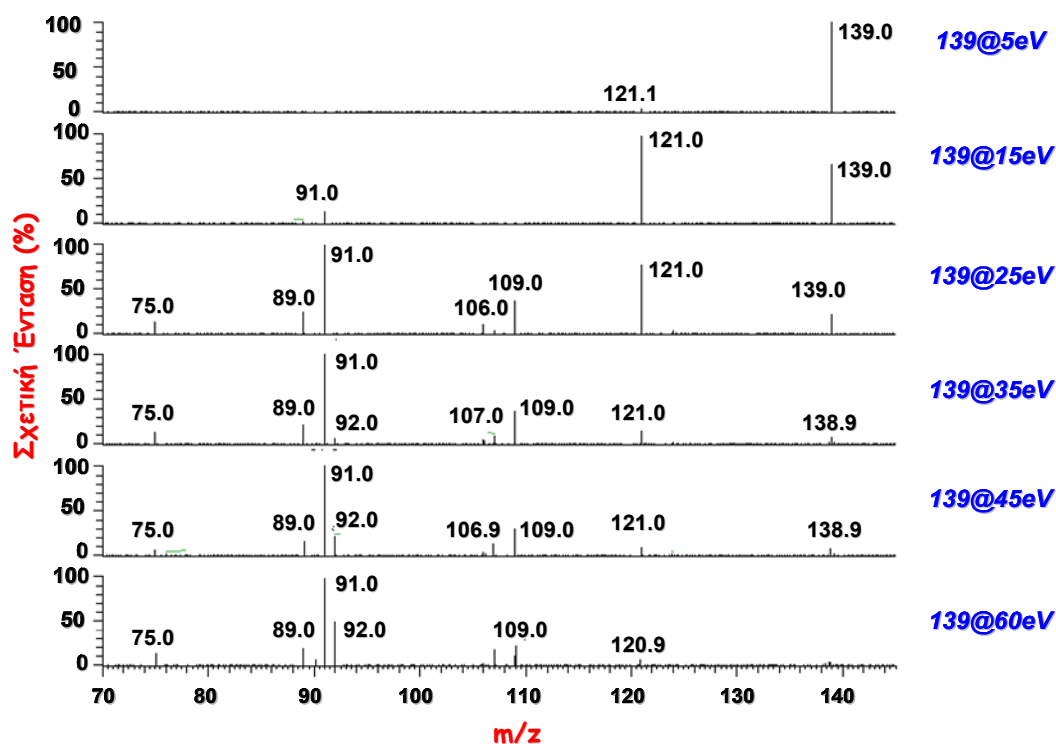
- Εφαρμογή της μεθόδου σάρωσης προϊόντων ιόντων (Product Ion Scan), για τις εξεταζόμενες ενώσεις, σε ενέργειες διάσπασης από 5 έως 60 eV, προς μελέτη των βέλτιστων συνθηκών διάσπασής τους.
- Κατασκευή καμπυλών διάσπασης (Collision Induced Dissociation, CID Breakdown Curves), για τις υπό εξέταση ενώσεις, με βάση τα δεδομένα που προέκυψαν από τη μέθοδο σάρωσης προϊόντων ιόντων.
- Ανάπτυξη μεθόδου παρακολούθησης επιλεγμένων αντιδράσεων (SRM), με βάση τα δεδομένα των καμπυλών διάσπασης. Για την κάθε ένωση επιλέγονται δύο χαρακτηριστικές αντιδράσεις SRM και οι βέλτιστες ενέργειες διάσπασης.
- Εφαρμογή των παραπάνω αντιδράσεων SRM, για την ανίχνευση των εξεταζόμενων ενώσεων και βελτιστοποίηση του χρωματογραφικού διαχωρισμού τους.

#### *Μέθοδος Σάρωσης Προϊόντων Ιόντων*

Λόγω της έλλειψης εμπορικά διαθέσιμων πρότυπων διαλυμάτων των συμπλόκων As-GSH, πραγματοποιήθηκε η σύνθεσή τους στο εργαστήριο και η μετέπειτα ταυτοποίησή τους, με την τεχνική HPLC-ESI-MS/MS. Συγκεκριμένα, αναλύθηκαν τα διαλύματα των ενώσεων ATG, MADG, DMAG και DMTA<sup>V</sup>-GSH, καθώς και τα διαλύματα των εμπορικά διαθέσιμων ενώσεων MMA<sup>V</sup>, DMA<sup>V</sup> και GSH, και διερευνήθηκαν τα προϊόντα ιόντα που σχηματίζονται, κατά τη διάσπαση (στο κελί πρόσκρουσης), των μοριακών ιόντων των παραπάνω ενώσεων. Στο παρόν στάδιο, ο χρωματογραφικός διαχωρισμός των συστατικών πραγματοποιήθηκε με ισοκρατική έκλυση και διάλυμα μεθανόλης/ απιονισμένου νερού, σύστασης κ.ο. 10/90 (pH ~ 5 - 6).

Σε πρώτη φάση, αναλύθηκαν πρότυπα διαλύματα των ενώσεων GSH, MMA<sup>V</sup> και DMA<sup>V</sup>, συγκέντρωσης 10 mg/L το καθένα, ωστόσο, στην περίπτωση του παραγώγου MMA<sup>V</sup>, η ευαισθησία της τεχνικής ήταν εξαιρετικά χαμηλή, με αποτέλεσμα την αδυναμία λήψης φασμάτων ικανοποιητικής ποιότητας. Για το λόγο αυτό, για την συγκεκριμένη ένωση, χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από προηγούμενη μελέτη.<sup>45</sup>

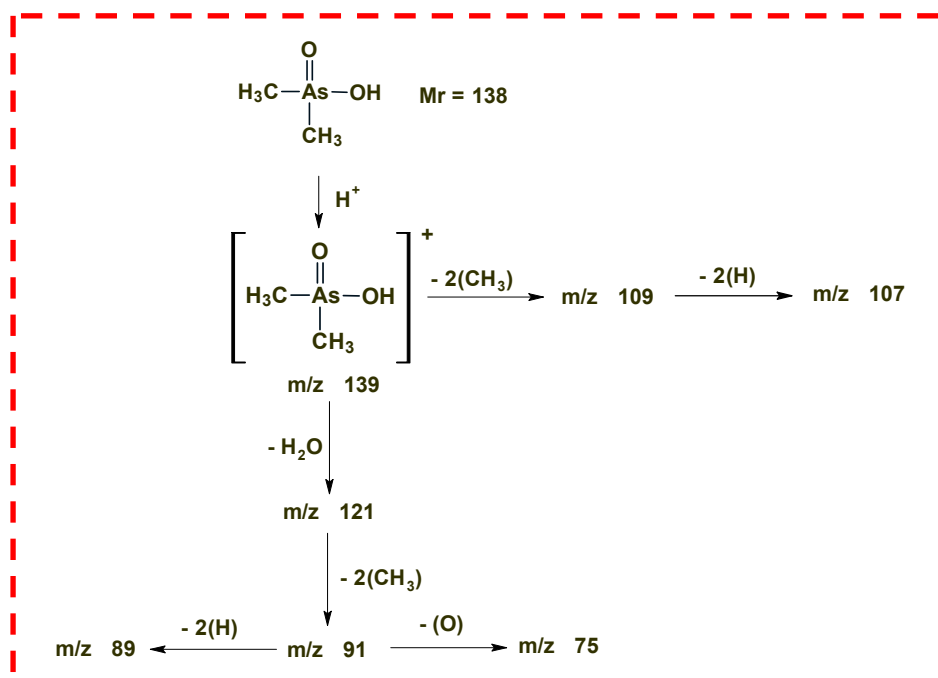
Στο Σχήμα 5.11 παρουσιάζονται τα φάσματα μάζας προϊόντων ιόντων, σε ενέργειες διάσπασης 5-60 eV, για την ένωση DMA<sup>V</sup>. Σε χαμηλές ενέργειες διάσπασης (5, 15 eV), εκτός από το πρόδρομο ιόν ( $m/z$  139), σχηματίζονται επίσης τα ιόντα με λόγους  $m/z$  121 και 91, ενώ, σε μεγαλύτερες ενέργειες, προκύπτουν περισσότερα ιόντα, με λόγους  $m/z$  109, 107, 106, 91, 89 και 75.



Σχήμα 5.11. Φάσματα μάζας προϊόντων ιόντων, σε ενέργειες 5-60 eV, για την ένωση DMA<sup>V</sup>.

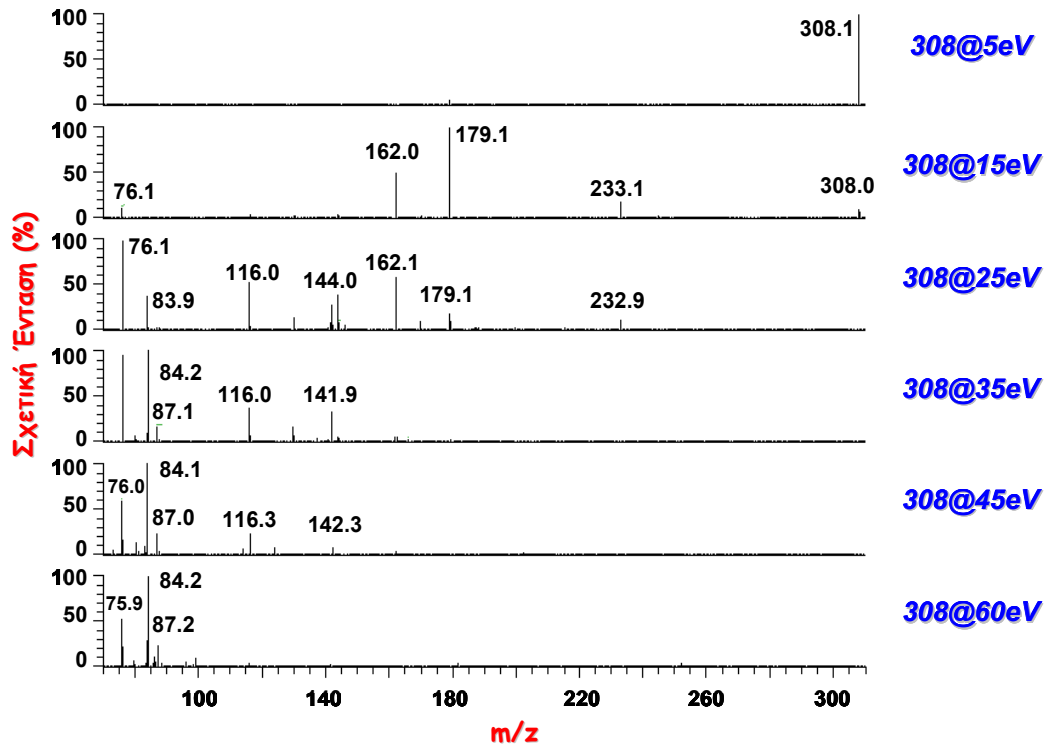
Η ερμηνεία των φασμάτων μάζας της ένωσης, φαίνεται στο Σχήμα 5.12. Όπως μπορεί να διακρίνει κανείς στο σχήμα αυτό, το ιόν με λόγο  $m/z$  121 προέρχεται από το πρόδρομο ιόν, έπειτα από απώλεια ενός μορίου νερού, ενώ, επιπλέον διάσπαση του τελευταίου, οδηγεί στο σχηματισμό του προϊόντος ιόντος  $m/z$  91 (που αντιστοιχεί σε  $\text{AsO}^+$  και  $\text{CH}_3\text{As}^+\text{H}$ ). Το συγκεκριμένο ιόν είναι δυνατόν να διασπαστεί περαιτέρω και να δώσει τα προϊόντα ιόντα  $m/z$  89 και 75, έπειτα από την απομάκρυνση ενός μορίου υδρογόνου ή ενός ατόμου οξυγόνου,

αντίστοιχα. Επιπλέον, από το πρόδρομο ιόν, έπειτα από διάσπαση και απώλεια δύο μεθυλομάδων, προκύπτει το ιόν με λόγο  $m/z$  109, από το οποίο σχηματίζεται και το ιόν με λόγο  $m/z$  107, έπειτα από την απώλεια ενός μορίου υδρογόνου.

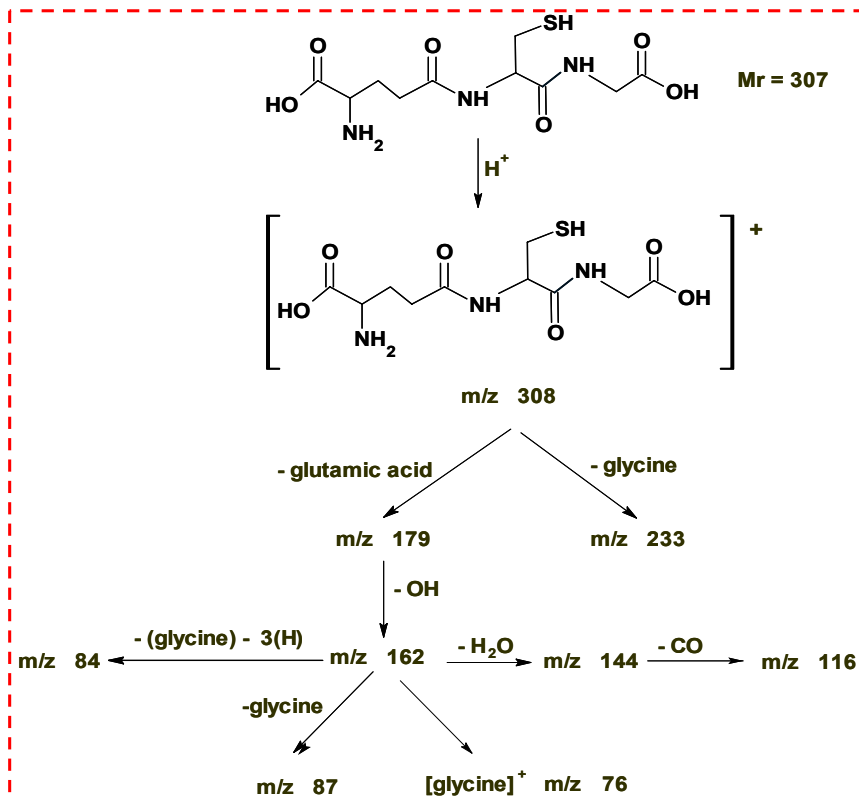


Σχήμα 5.12. Προτεινόμενη πορεία διάσπασης της ένωσης DMAV.

Ακολούθησε η ανάλυση πρότυπου διαλύματος GSH, οπότε προέκυψαν τα φάσματα μάζας προϊόντων ιόντων του Σχήματος 5.13. Σε ενέργεια διάσπασης 15 eV, σχηματίζονται τα ιόντα  $m/z$  233, 179, 162 και 76, ενώ, καθώς αυξάνεται η ενέργεια, σχηματίζονται επιπλέον ιόντα, με  $m/z$  116, 142, 144, 84 και 87. Στο Σχήμα 5.14 παρουσιάζεται η προτεινόμενη πορεία διάσπασης του πρωτονιωμένου μορίου της GSH. Από το πρόδρομο ιόν του μορίου της GSH ( $m/z$  308), έπειτα από απώλεια ενός μορίου γλουταμινικού οξέος (glutamic acid), προκύπτει το ιόν  $m/z$  179. Το τελευταίο, διασπώμενο, αποβάλλει μια υδροξυλομάδα (-OH), δίνοντας το ιόν  $m/z$  162, από το οποίο απομακρύνεται επιπλέον ένα μόριο νερού, δίνοντας το ιόν  $m/z$  144. Η απώλεια της ομάδας CO από το ιόν αυτό, οδηγεί στο προϊόν ιόν  $m/z$  116, ενώ η θραυσματοποίηση του πρόδρομου ιόντος, συνοδευόμενη από την απομάκρυνση ενός μορίου γλυκίνης (glycine), οδηγεί στο σχηματισμό του ιόντος  $m/z$  233. Τέλος, το προϊόν ιόν  $m/z$  76 αντιστοιχεί στο πρωτονιωμένο μόριο της γλυκίνης, ενώ το ιόν  $m/z$  87, προκύπτει από τη θραυσματοποίηση του ιόντος  $m/z$  162 και την απομάκρυνση ενός μορίου γλυκίνης.



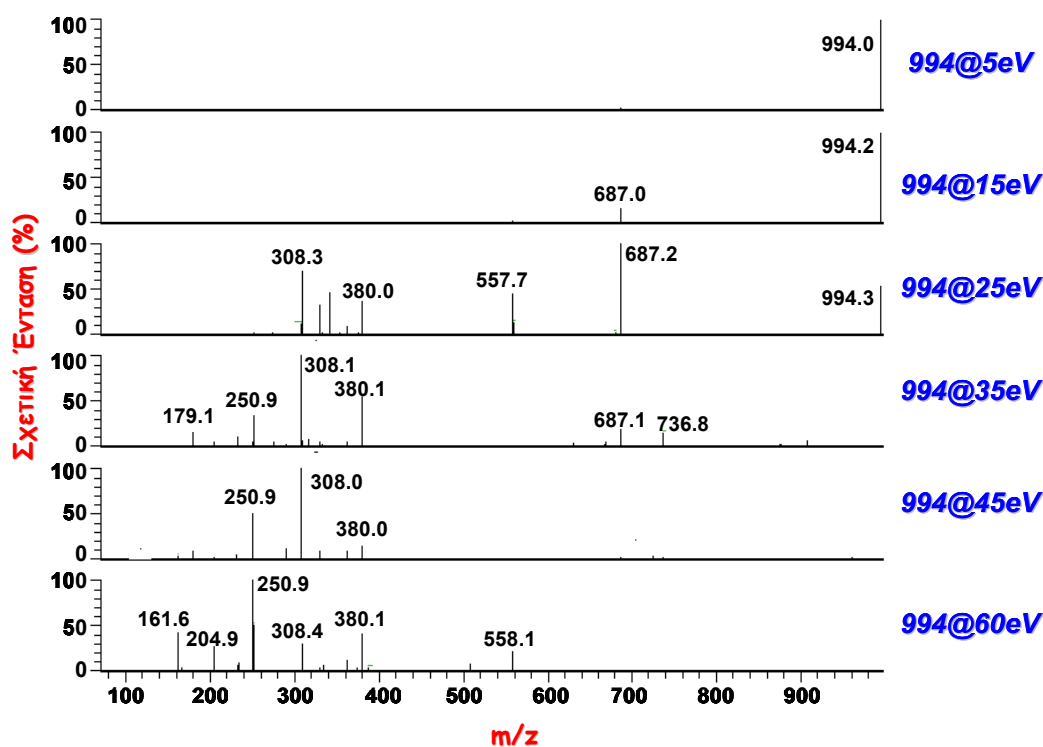
Σχήμα 5.13. Φάσματα μάζας προϊόντων ιόντων, σε ενέργειες 5-60 eV, για την ένωση GSH.



Σχήμα 5.14. Προτεινόμενη πορεία διάσπασης της ένωσης GSH.

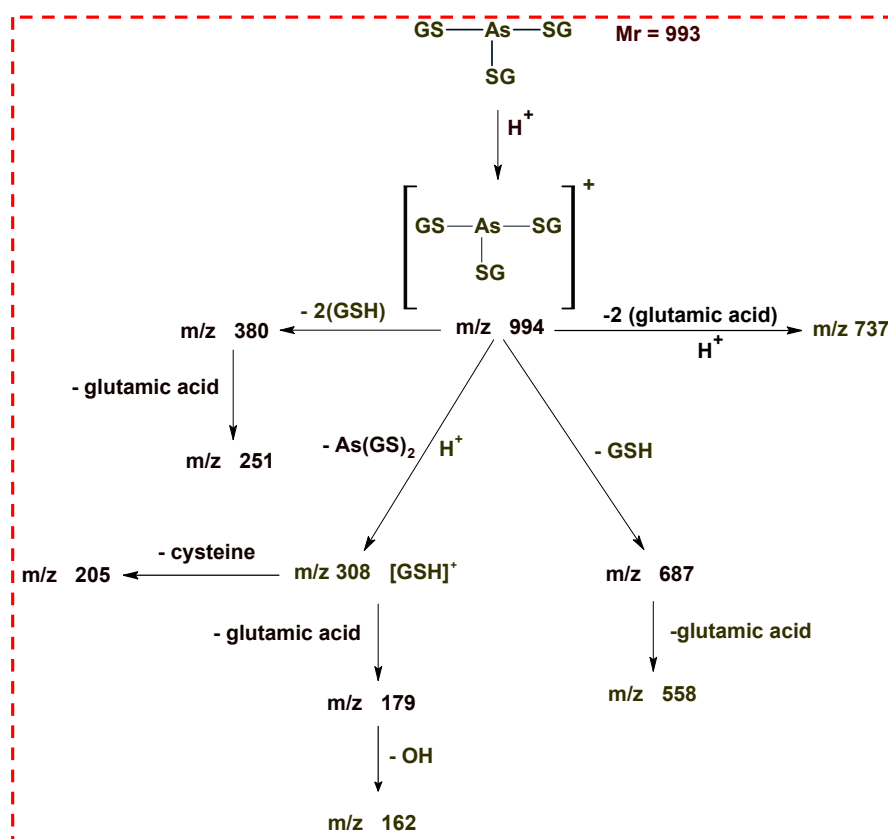


Ακολούθησε η ανάλυση του πρότυπου διαλύματος της ένωσης ATG, της οποίας το φάσμα μάζας φαίνεται στο Σχήμα 5.15.



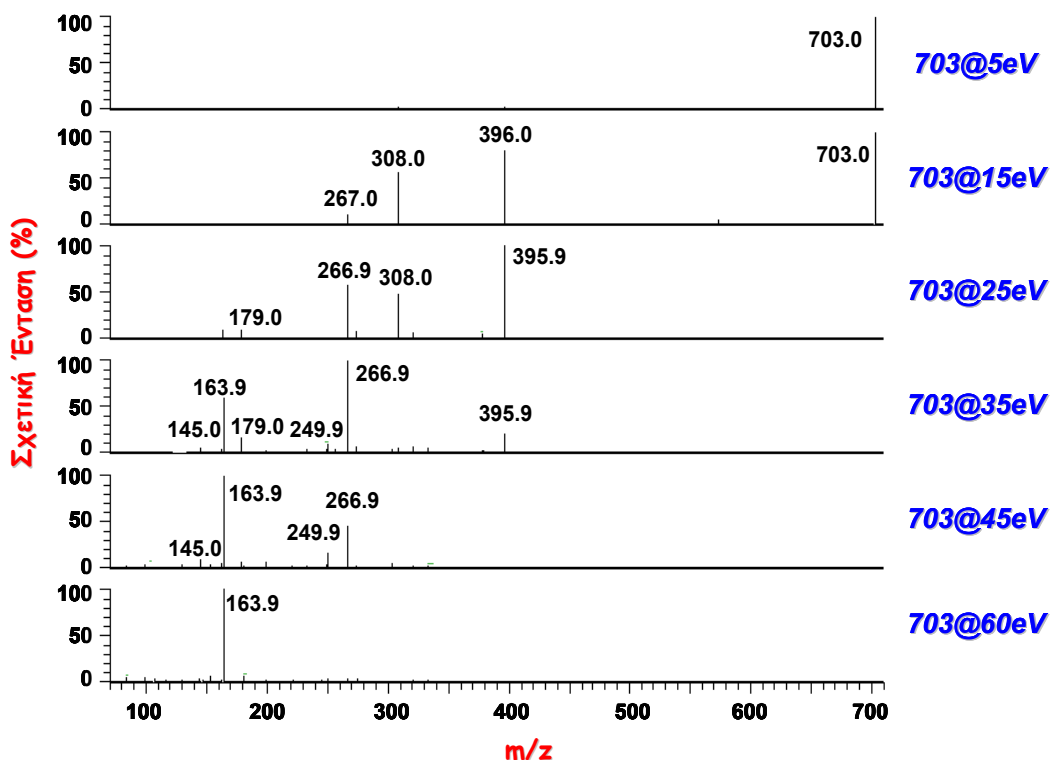
Σχήμα 5.15. Φάσματα μάζας προϊόντων ιόντων, σε ενέργειες 5-60 eV, για την ένωση ATG.

Το πρόδρομο ιόν ( $m/z$  994), διασπάται σε χαμηλές ενέργειες (5, 15 eV), αποβάλλοντας ένα μόριο GSH και δίνοντας το ιόν με λόγο  $m/z$  687. Το τελευταίο, έπειτα από αποβολή ενός μορίου γλουταμινικού οξέος, δίνει το ιόν  $m/z$  558, ενώ το ιόν  $m/z$  737 προέρχεται από την διάσπαση του πρόδρομου ιόντος και την απομάκρυνση δύο μορίων γλουταμινικού οξέος. Το ιόν  $m/z$  380, προέρχεται από θραυσματοποίηση του πρόδρομου ιόντος και απώλεια δύο μορίων GSH, ενώ, περαιτέρω διάσπαση του και απώλεια ενός μορίου γλουταμινικού οξέος, οδηγεί στο σχηματισμό του  $m/z$  251. Τέλος, τα ιόντα με λόγους  $m/z$  179 και 162, αποτελούν χαρακτηριστικά θραυσματα της GSH, όπως και το ιόν  $m/z$  205, το οποίο σχηματίζεται, αν από το πρωτονιωμένο μόριο αυτής ( $m/z$  308), απομακρυνθεί μια ομάδα κυστεΐνης (cysteine). Η προτεινόμενη πορεία διάσπασης του μοριακού ιόντος  $m/z$  994, απεικονίζεται στο Σχήμα 5.16.

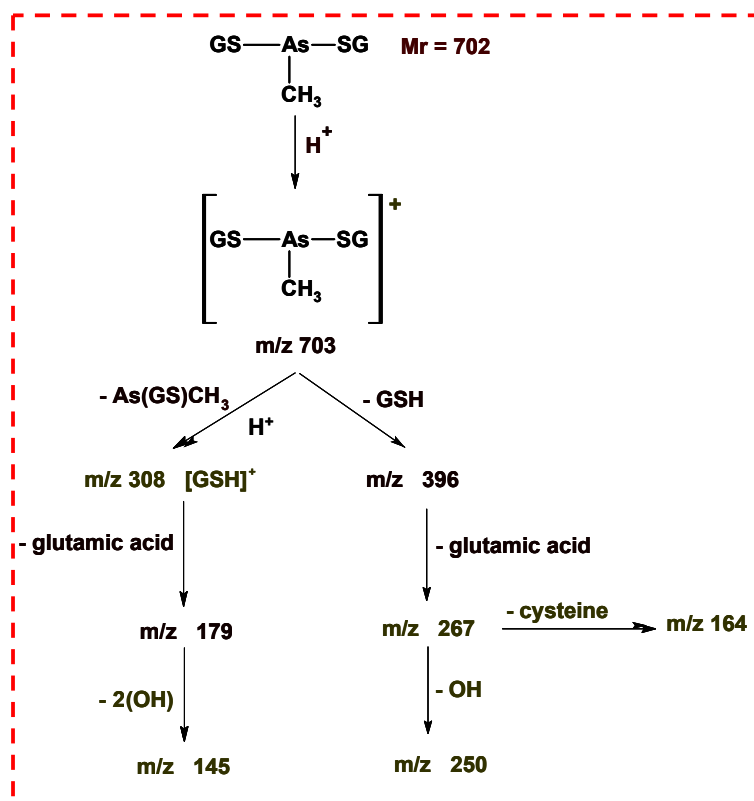


Σχήμα 5.16. Προτεινόμενη πορεία διάσπασης της ένωσης ATG.

Η επόμενη ένωση που μελετήθηκε, ήταν το σύμπλοκο MADG, του οποίου τα φάσματα μάζας προϊόντων ιόντων απεικονίζονται στο Σχήμα 5.17. Σε χαμηλότερες ενέργειες θραυσματοποίησης, τα κύρια προϊόντα ιόντα που σχηματίζονται, είναι τα  $m/z$  396 (το οποίο προέρχεται από το πρόδρομο ιόν  $m/z$  703, έπειτα από απώλεια ενός μορίου GSH) και  $m/z$  308 (πρωτονιωμένο μόριο GSH). Καθώς αυξάνεται η ενέργεια διάσπασης, σχηματίζονται επιπλέον ιόντα, με  $m/z$  267, 179, 164, 250 και 145. Η ερμηνεία σχηματισμού των παραπάνω ιόντων, δίνεται αναλυτικά στο Σχήμα 5.18. Τα ιόντα  $m/z$  179 και 145 αποτελούν χαρακτηριστικά θραύσματα της GSH, με την προέλευση του ιόντος  $m/z$  179 να αναλύεται στις προηγούμενες παραγράφους και το ιόν  $m/z$  145 να προέρχεται από αυτό με  $m/z$  179, έπειτα από την απομάκρυνση δύο υδροξυλομάδων. Η θραυσματοποίηση του ιόντος  $m/z$  396 και η απώλεια ενός μορίου γλουταμινικού οξέος, δίνει το ιόν  $m/z$  267, το οποίο, έπειτα από περαιτέρω θραυσματοποίηση και αποβολή μιας ομάδας κυστεΐνης, οδηγεί στο σχηματισμό του ιόντος  $m/z$  164. Τέλος, η απομάκρυνση μιας υδροξυλομάδας από το ιόν  $m/z$  267, οδηγεί στο σχηματισμό του ιόντος  $m/z$  250.

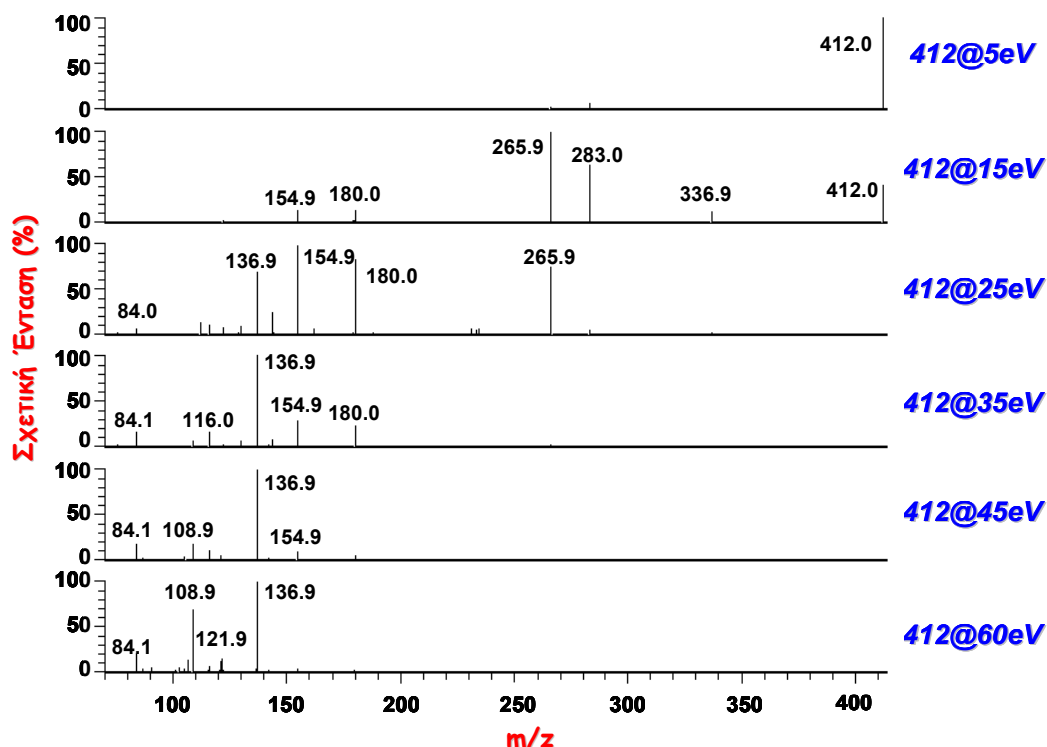


Σχήμα 5.17. Φάσματα μάζας προϊόντων ιόντων, σε ενέργειες 5-60 eV, για την ένωση MADG.

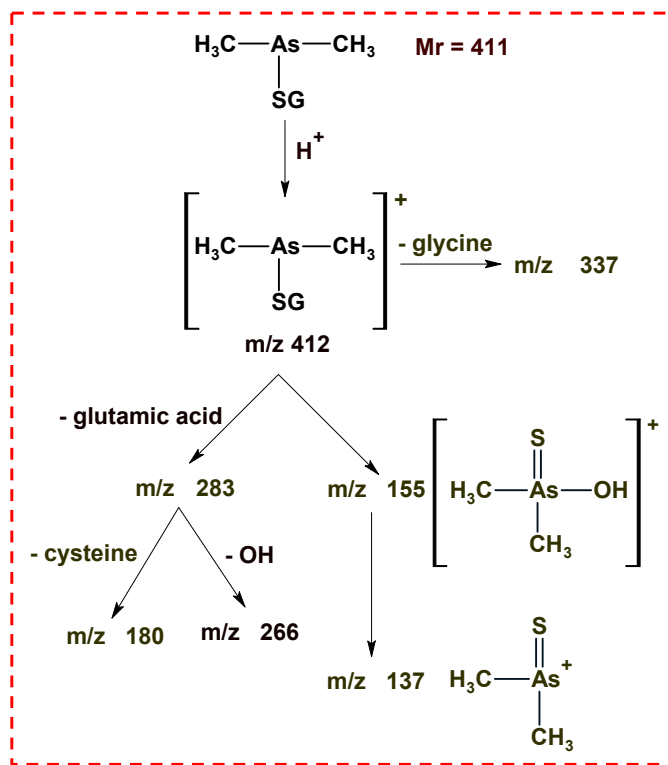


Σχήμα 5.18. Προτεινόμενη πορεία διάσπασης της ένωσης MADG.

Στη συνέχεια, αναλύθηκε το διμεθυλιωμένο παράγωγο DMAG, του οποίου το φάσμα μάζας προϊόντων ιόντων παρουσιάζεται στο Σχήμα 5.19 και η προτεινόμενη πορεία διάσπασης στο Σχήμα 5.20.



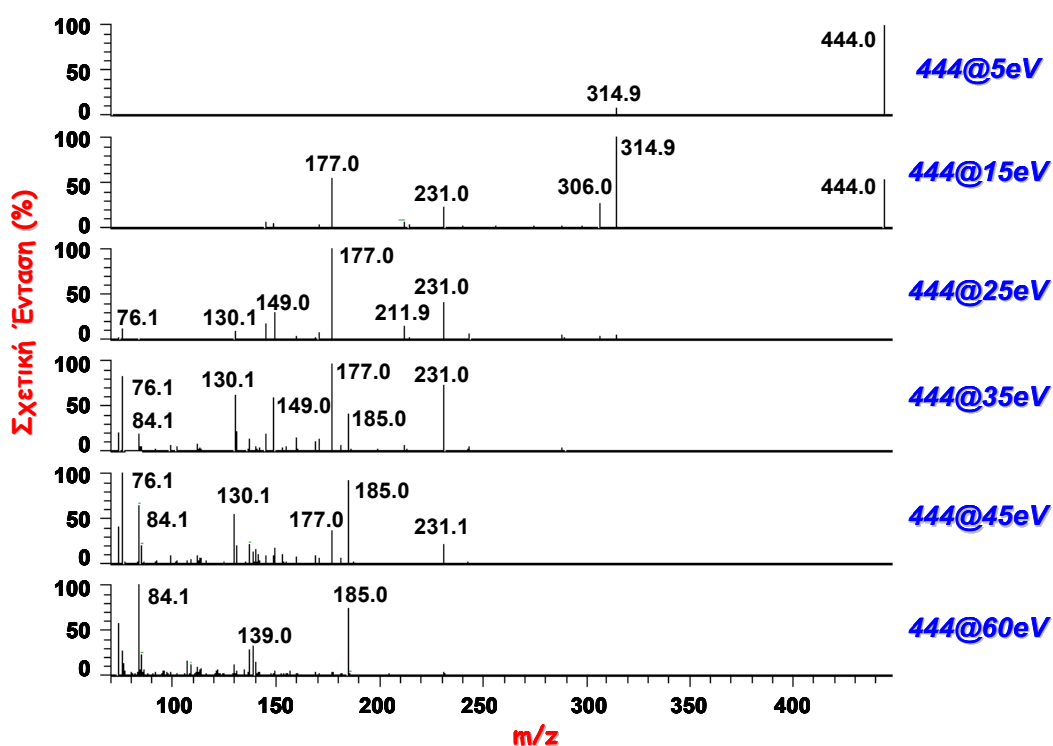
Σχήμα 5.19. Φάσματα μάζας προϊόντων ιόντων, σε ενέργειες 5-60 eV, για την ένωση DMAG.



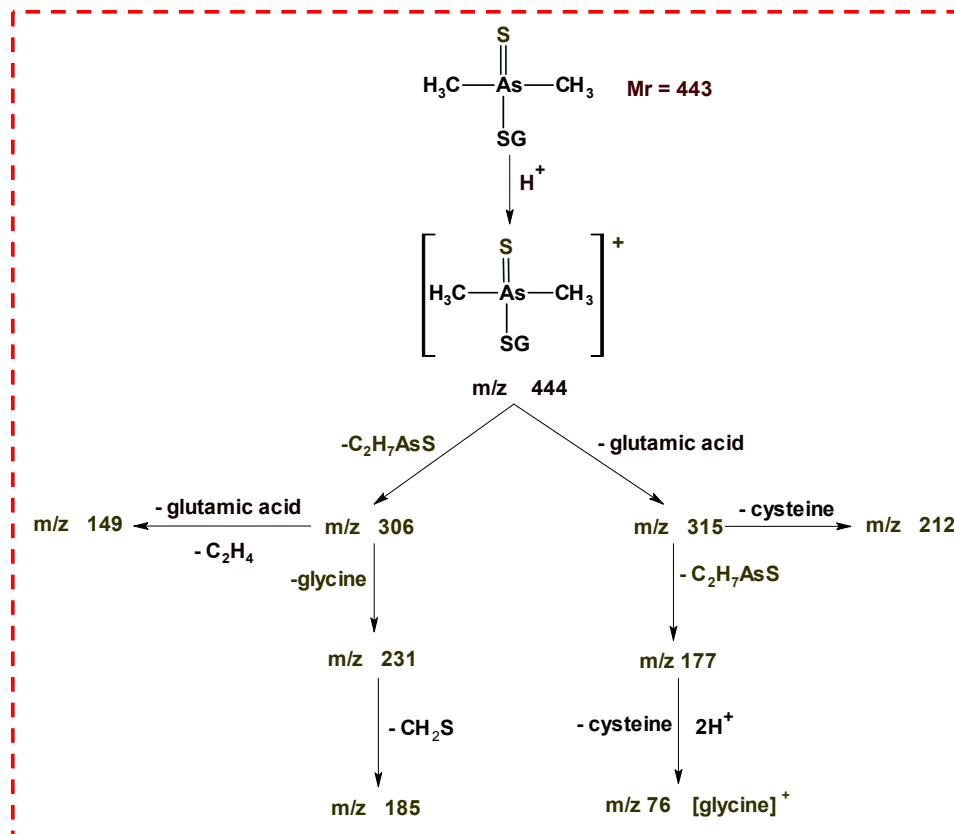
Σχήμα 5.20. Προτεινόμενη πορεία διάσπασης της ένωσης DMAG.

Το πρωτιωμένο μόριο της παρούσας ένωσης θραυσατοποιείται, συνοδευόμενο από απώλεια ενός μορίου γλουταμινικού οξέος, δίνοντας το προϊόν ιόν  $m/z$  283, το οποίο διαπάται περαιτέρω, δίνοντας, είτε το ιόν  $m/z$  266 (έπειτα από την απομάκρυνση μιας υδροξυλομάδας), είτε το ιόν  $m/z$  180 (έπειτα από την αποβολή ενός μορίου κυστεΐνης). Επίσης, η απομάκρυνση μιας ομάδας γλυκίνης από το πρόδρομο ιόν, οδηγεί στο σχηματισμό του ιόντος  $m/z$  337. Υπενθυμίζεται ότι τα ιόντα  $m/z$  116 και 84 αποτελούν χαρακτηριστικά θραύσματα της GSH.

Ακολούθησε η μελέτη του πεντασθενούς συμπλόκου DMTA<sup>V</sup>-GSH, του οποίου το φάσμα μάζας παρουσιάζεται στο Σχήμα 5.21 και η προτεινόμενη πορεία διάσπασης στο Σχήμα 5.22. Κατά τη θραυσατοποίηση της παραπάνω ένωσης, σχηματίζονται τα προϊόντα ιόντα με λόγους  $m/z$  315, 306, 231, 212, 185, 177, 149, 130, 76 και 84. Σε χαμηλές ενέργειες διάσπασης (5, 15 eV), σχηματίζονται, κατά κύριο λόγο, τα ιόντα με  $m/z$  315 (προέχεται από το πρόδρομο ιόν, έπειτα από την απομάκρυνση ενός μορίου γλουταμινικού οξέος), 306 (αποτέλεσμα της διάσπασης του πρόδρομου ιόντος και της αποβολής μιας ομάδας C<sub>2</sub>H<sub>7</sub>AsS), 231 (προκύπτει από την περαιτέρω διάσπαση του προηγούμενου ιόντος και την επιπλέον απομάκρυνση από αυτό ενός μορίου γλυκίνης) και, τέλος, 177 (προέρχεται από το ιόν με  $m/z$  315 και την απώλεια της ομάδας C<sub>2</sub>H<sub>7</sub>AsS). Σε υψηλότερες ενέργειες, σχηματίζονται επιπλέον τα προϊόντα ιόντα, με  $m/z$  212, 185, 149, 130, 76 και 84.



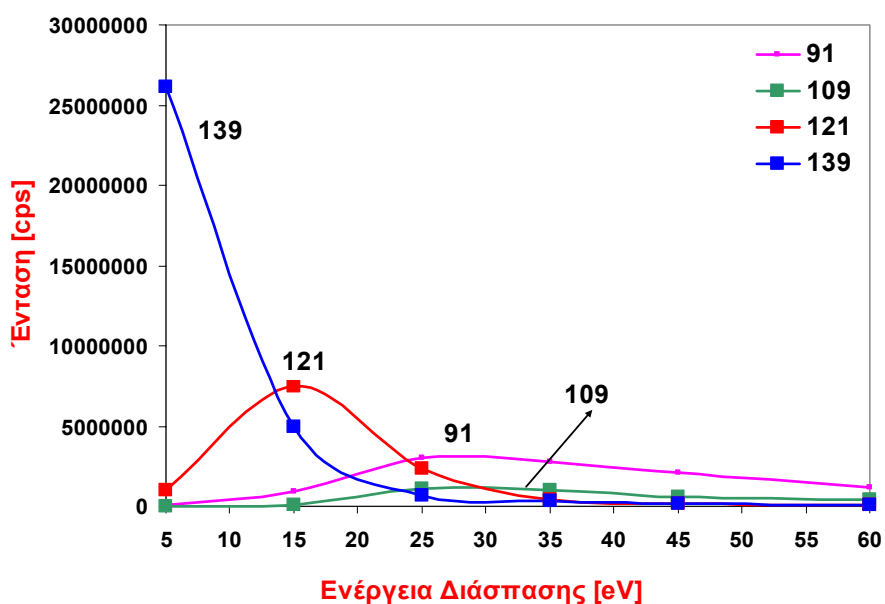
Σχήμα 5.21. Φάσματα μάζας προϊόντων ιόντων, σε ενέργειες 5-60 eV, για την ένωση DMTA<sup>V</sup>-GSH.



Σχήμα 5.22. Προτεινόμενη πορεία διάσπασης της ένωσης DMTA<sup>V</sup>-GSH.

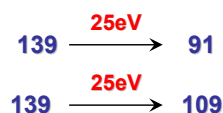
**Μέθοδος Παρακολούθησης Επιλεγμένων Αντιδράσεων (SRM)**

Από τα δεδομένα των φασμάτων μάζας προϊόντων ιόντων, διαμορφώθηκαν οι καμπύλες διάσπασης για τις εξεταζόμενες ενώσεις, στις οποίες καταγράφεται η ένταση των σχηματιζόμενων πρόδρομων και προϊόντων ιόντων, σε συνάρτηση με την εφαρμοζόμενη ενέργεια διάσπασης.



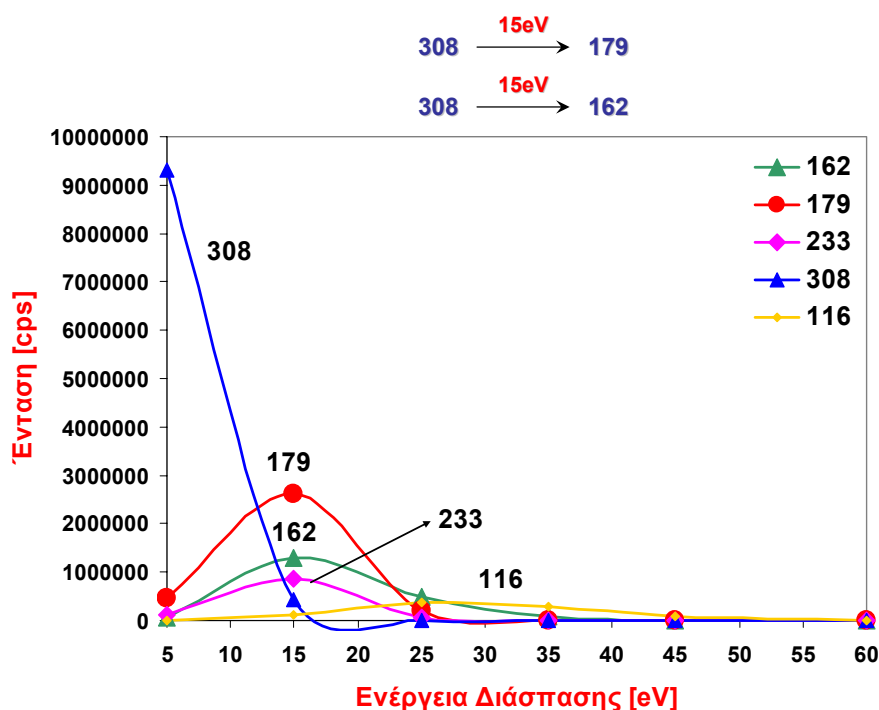
Σχήμα 5.23. Καμπύλες διάσπασης της ένωσης DMA<sup>V</sup>.

Τα κυριότερα ιόντα που σχηματίζονται, κατά τη θραυσματοποίηση της ένωσης DMA<sup>V</sup>, είναι τα  $m/z$  121, 109 και 91. Το ιόν  $m/z$  121 προέρχεται από την απομάκρυνση ενός μορίου νερού από το πρόδρομο ιόν ( $m/z$  139), μια απώλεια που δεν είναι ιδιαίτερα χρήσιμη, αφού οποιαδήποτε αλκοόλη, διασπώμενη, είναι δυνατόν να αποβάλλει ένα μόριο νερού. Για το λόγο αυτό, για την ανάπτυξη της μεθόδου SRM, επιλέγονται τα προϊόντα ιόντα με λόγους  $m/z$  109 και 91, οπότε προκύπτουν οι ακόλουθες χαρακτηριστικές αντιδράσεις:



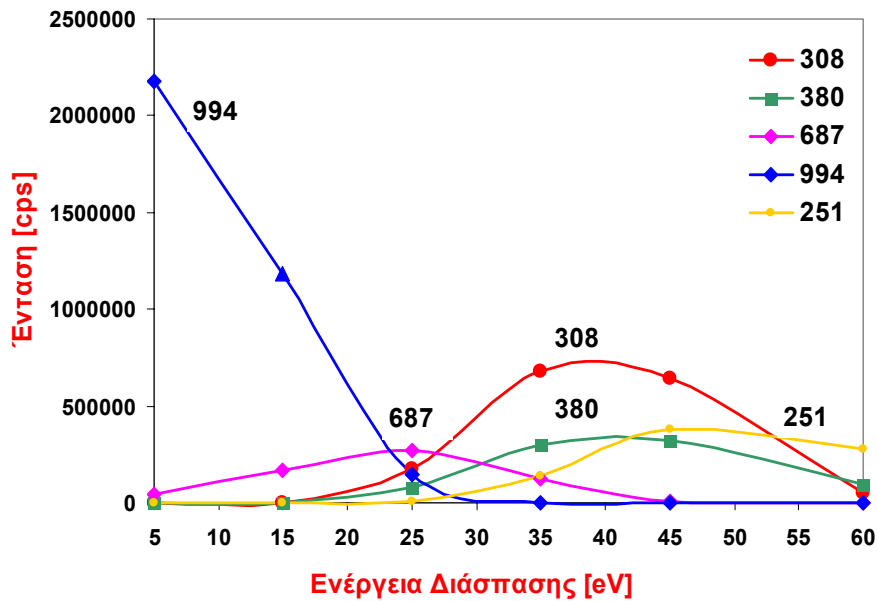
Στο σημείο αυτό, αξίζει να επισημανθεί ότι, για την κάθε ένωση, παρακολουθούνται δύο χαρακτηριστικές αντιδράσεις SRM, με σκοπό την επίτευξη μεγαλύτερης εκλεκτικότητας και την δυνατότητα ανίχνευσης των εξεταζόμενων ενώσεων.

Στη συνέχεια, κατασκευάστηκαν οι καμπύλες διάσπασης της GSH, σε ενέργειες 5-60 eV, οπότε προέκυψε το ακόλουθο γράφημα, με βάση το οποίο διαμορφώθηκαν οι χαρακτηριστικές αντιδράσεις SRM.



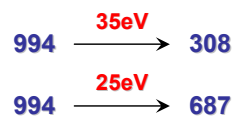
Σχήμα 5.24. Καμπύλες διάσπασης της ένωσης GSH.

Ακολούθησε η ανάλυση των συμπλόκων As<sup>III</sup>-GSH, ξεκινώντας από την ένωση ATG, της οποίας οι καμπύλες διάσπασης απεικονίζονται στο Σχήμα 5.25.

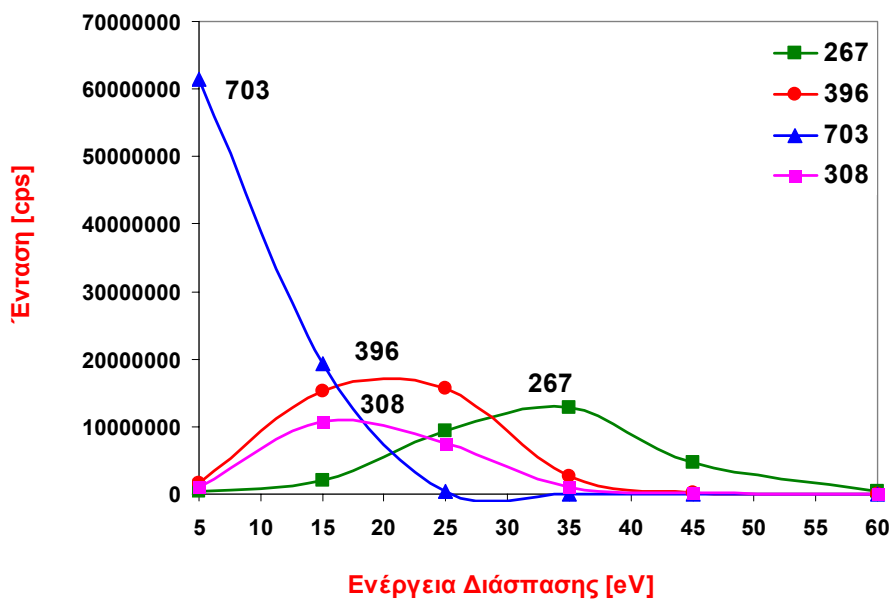


Σχήμα 5.25. Καμπύλες διάσπασης της ένωσης ATG.

Από τις καμπύλες αυτές, προέκυψαν οι χαρακτηριστικές αντιδράσεις SRM, οι οποίες είναι οι παρακάτω:



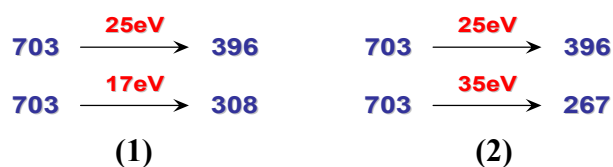
Ακολουθούν οι καμπύλες διάσπασης της ένωσης MADG στο Σχήμα 5.26.



Σχήμα 5.26. Καμπύλες διάσπασης της ένωσης MADG.

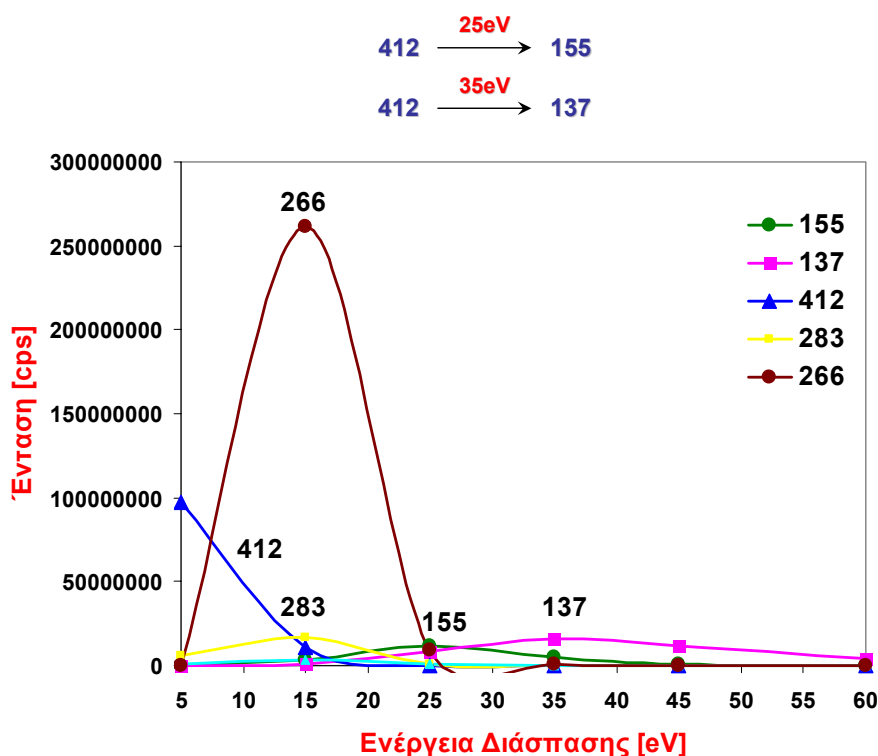


Από τις παραπάνω καμπύλες επιλέχθηκαν δύο διαφορετικά ζεύγη χαρακτηριστικών αντιδράσεων SRM, τα οποία είναι:



Εφαρμόζοντας, χωριστά, το κάθε ζεύγος αντιδράσεων, με τη μέθοδο HPLC-ESI-MS/MS-SRM, προέκυψε ότι το ζεύγος (1) παρέχει υψηλότερη ευαισθησία και εκλεκτικότητα, κατά την ανίχνευση της εξεταζόμενης ένωσης, και για το λόγο αυτό αποτέλεσε και την τελική επιλογή.

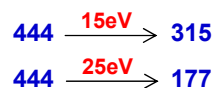
Στο Σχήμα 5.27 παρατιθενται οι καμπύλες διάσπασης για την ένωση DMAG, από τις οποίες προέκυψαν οι ακόλουθες αντιδράσεις SRM.

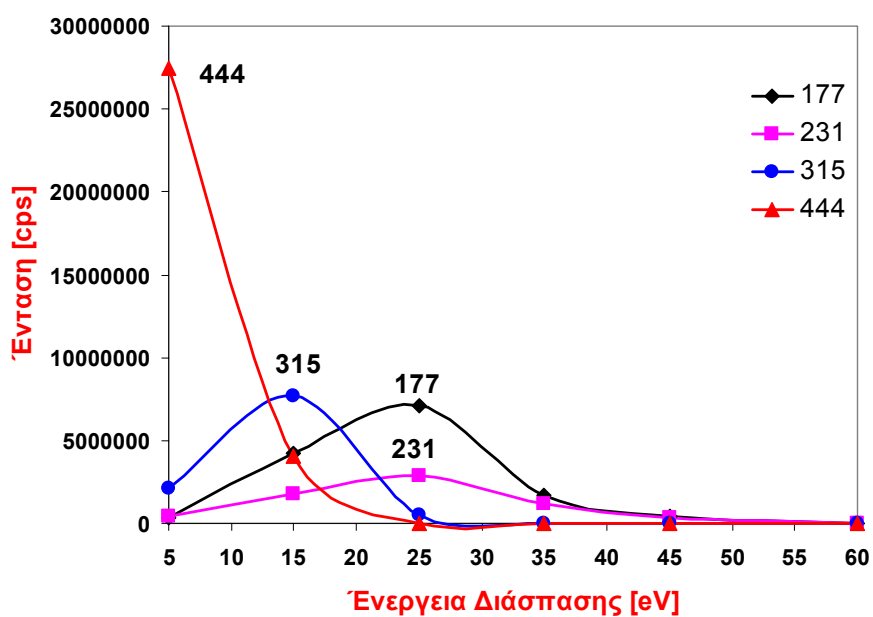


Σχήμα 5.27. Καμπύλες διάσπασης της ένωσης DMAG.

Το προϊόν ιόν με τη μεγαλύτερη ένταση είναι το  $m/z$  266. Ωστόσο, δεν επιλέχθηκε για τη διαμόρφωση των αντιδράσεων SRM, αφού τα άλλα δύο ιόντα παρείχαν μεγαλύτερη εκλεκτικότητα, κατά την ανίχνευση του DMAG.

Τέλος, στο Σχήμα 5.28, παρουσιάζονται οι καμπύλες διάσπασης για το πεντασθενές σύμπλοκο DMTA<sup>V</sup>-GSH, για το οποίο επιλέχθηκαν οι αντιδράσεις SRM:





Σχήμα 5.28. Καμπύλες διάσπασης της ένωσης DMTA<sup>V</sup>-GSH.

Οι χαρακτηριστικές αντιδράσεις SRM για τα σύμπλοκα As-GSH και για τις ενώσεις GSH, MMA<sup>V</sup> και DMA<sup>V</sup>, δίνονται στον Πίνακα 5.5. Για το MMA<sup>V</sup> επιλέχθηκε η αντίδραση SRM, που διαμορφώθηκε σε προηγούμενη μελέτη.<sup>45</sup>



Πίνακας 5.5. Χαρακτηριστικές αντιδράσεις SRM, για τις υπό εξέταση ενώσεις.

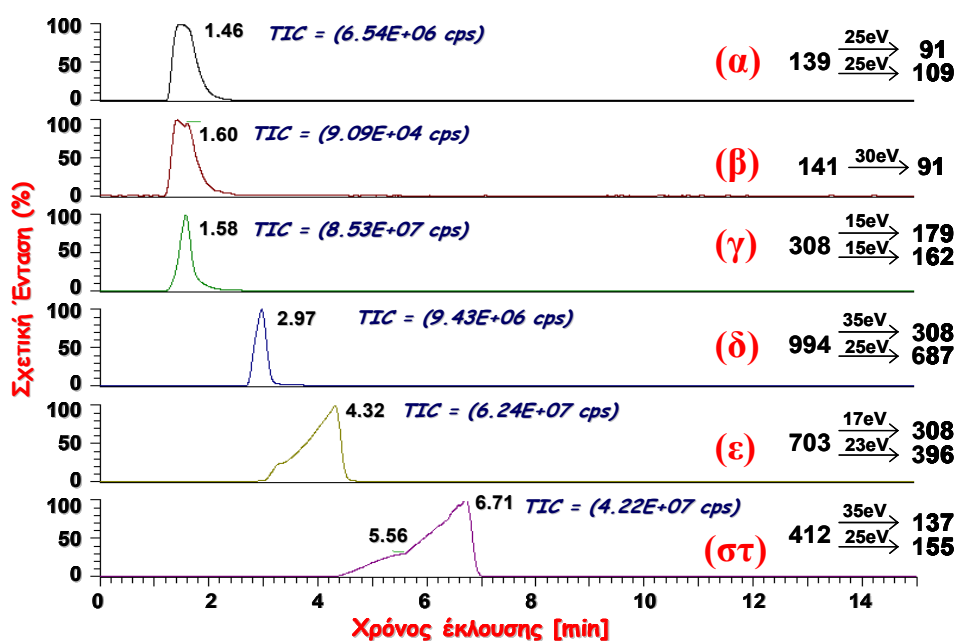
Ένωση	Πρόδρομο Μοριακό Ιόν ( <i>m/z</i> )	Προϊόν Ιόν ( <i>m/z</i> )	Ενέργεια Διάσπασης (eV)
<i>MMA<sup>V</sup></i>	141	91	35
<i>DMA<sup>V</sup></i>	139	109	25
		91	25
<i>GSH</i>	308	179	15
		162	15
<i>ATG</i>	994	687	25
		308	35
<i>MADG</i>	703	396	25
		308	17
<i>DMAG</i>	412	137	35
		155	25
<i>DMTA<sup>V</sup>-GSH</i>	444	315	15
		177	25

### **Βελτιστοποίηση χρωματογραφικού διαχωρισμού των συμπλόκων As-GSH**

Παρακολουθώντας τις παραπάνω αντιδράσεις και εφαρμόζοντας τη μέθοδο HPLC-ESI-MS/MS-SRM, αναλύθηκαν τα πρότυπα διαλύματα των ενώσεων, με σκοπό, τον χρωματογραφικό διαχωρισμό τους και την εκλεκτική ανίχνευσή τους. Αρχικά, το ενδιαφέρον εστιασθηκε στο διαχωρισμό των τριών τρισθενών συμπλόκων As<sup>III</sup>-GSH, δοκιμάζοντας διάφορες χρωματογραφικές μεθόδους, αλλά χρησιμοποιώντας κάθε φορά την ίδια στήλη αντιστροφής φάσης (BDS Hypersil C18, 150x2.1 mm, Thermo).

#### Μέθοδος Α

Η μέθοδος βασίστηκε σε χρωματογραφία αντιστροφής φάσης και ισοκρατική έκλυση των συστατικών με διάλυμα μεθανόλης/ απιονισμένου νερού σύστασης κ.ο 10/90. Αναλύοντας ένα πρότυπο διάλυμα των ενώσεων DMA<sup>V</sup>, MMA<sup>V</sup>, GSH, ATG, MADG και DMAG, προέκυψε το ακόλουθο χρωματογράφημα (Σχήμα 5.29).



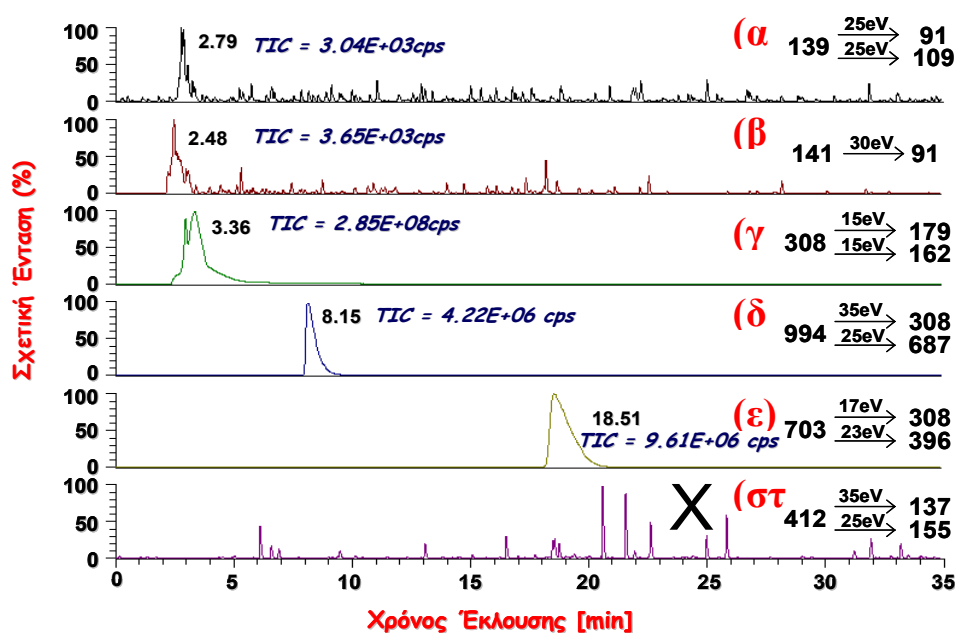
**Σχήμα 5.29.** Χρωματογράφημα HPLC-ESI-MS/MS-SRM των πρότυπων διαλυμάτων των ενώσεων (α) DMA<sup>V</sup>, (β) MMA<sup>V</sup>, (γ) GSH, (δ) ATG, (ε) MADG και (στ) DMAG (\* TIC=Total Ion Current).

Όπως παρατηρείται παραπάνω, λαμβάνει χώρα αλληλεπικάλυψη των κορυφών που αντιστοιχούν στα σύμπλοκα As<sup>III</sup>-GSH, ενώ καταγράφεται σημαντική μεταβολή στους χρόνους έκλυσης των συστατικών, μεταξύ διαδοχικών αναλύσεων.

Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε η μείωση του ποσοστού μεθανόλης και η προσθήκη φορμικού οξέος στο διαλύτη έκλουσης (Μέθοδος Β).

### Μέθοδος Β

Στη μέθοδο αυτή, χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης έκλουσης, μίγμα μεθανόλης/φορμικού οξέος/ απιονισμένου νερού, με κ.ο. αναλογία 5/ 0.05/ 94.95. Το αποτέλεσμα της ανάλυσης φαίνεται στο Σχήμα 5.30, όπου παρατηρείται η συνέκλουση των ενώσεων MMA<sup>V</sup>, DMA<sup>V</sup> και GSH, γεγονός όμως που δεν αποτελεί πρόβλημα, αφού οι συγκεκριμένες ενώσεις δεν αποτελούν τον πρωταρχικό στόχο της μελέτης. Τα σύμπλοκα ATG και MADG διαχωρίζονται πλήρως, δίνοντας τις κορυφές σε χρόνους 8.15 min και 18.51 min, ενώ δεν παρατηρείται κορυφή για την ένωση DMAG, στο χρονικό διάστημα που διαρκεί η ανάλυση (35min). Το γεγονός αυτό ερμηνεύεται ως αδυναμία έκλουσης του συγκεκριμένου παραγώγου, με τις δεδομένες χρωματογραφικές συνθήκες. Για το σκοπό αυτό, αποφασίστηκε η τροποποίηση της μεθόδου, οπότε προέκυψε η Μέθοδος Γ.



**Σχήμα 5.30.** Χρωματογράφημα HPLC-ESI-MS/MS-SRM των πρότυπων διαλυμάτων των ενώσεων (α) DMA<sup>V</sup>, (β) MMA<sup>V</sup>, (γ) GSH, (δ) ATG, (ε) MADG και (στ) DMAG (\* TIC=Total Ion Current).

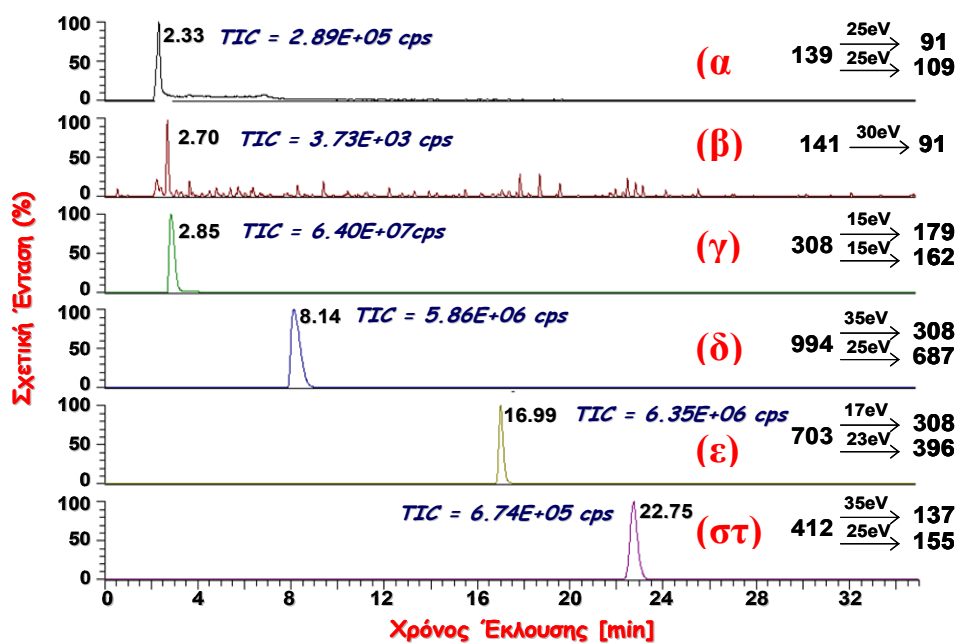
Μέθοδος Γ

Η παρούσα μέθοδος βασίστηκε σε βαθμιδωτή έκλυση δυο διαλυτών, Α και Β, όπου Α διάλυμα μεθανόλης/ φορμικού οξέος/ απιονισμένου νερού, σύστασης κ.ο. 5/ 0.05/ 94.95 και Β διάλυμα μεθανόλης 100% κ.ο. Το αναλυτικό πρόγραμμα έκλυσης παρουσιάζεται στον Πίνακα 5.6.

Πίνακας 5.6. Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλυσης της Μεθόδου Γ.

Χρόνος (min)	Διαλύτης Α (%)	Διαλύτης Β (%)
0	100	-
10	100	-
11	90	10
25	90	10
26	100	-
35	100	-

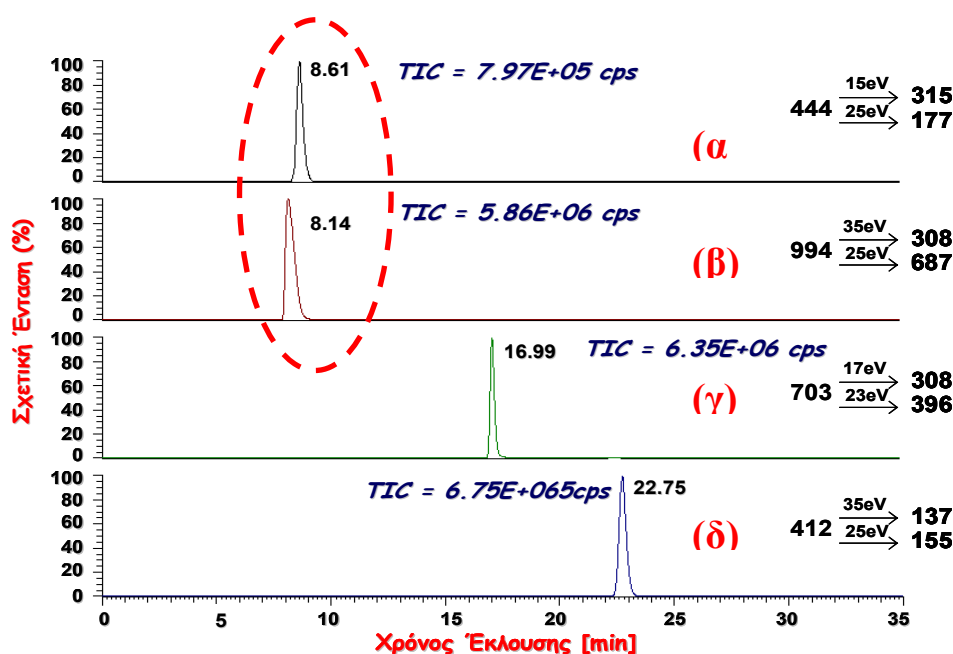
Το αποτέλεσμα της ανάλυσης του πρότυπου διαλύματος των έξι ενώσεων, απεικονίζεται στο χρωματογράφημα του Σχήματος 5.31.



Σχήμα 5.31. Χρωματογράφημα HPLC-ESI-MS/MS-SRM των πρότυπων διαλυμάτων των ενώσεων (α) DMAV, (β) MMAV, (γ) GSH, (δ) ATG, (ε) MADG και (στ) DMAG (\* TIC=Total Ion Current).

Με την παρούσα μέθοδο, επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των τριών συμπλόκων As<sup>III</sup>-GSH, στα οποία αντιστοιχούν οι κορυφές με χρόνους 8.14 min, 16.99 min και 22.75 min. Ωστόσο, με το εφαρμοζόμενο πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης, το μέγιστο ποσοστό μεθανόλης που εισάγεται στην πηγή ιονισμού ανέρχεται σε 14.5% κ.ο. Αυτό το ποσοστό, αν και δεν αποτελεί πρόβλημα στις αναλύσεις με την τεχνική HPLC-ESI-MS/MS, ωστόσο, δεν είναι συμβατό με την τεχνική HPLC-ICP-MS, όπου ποσοστά μεθανόλης υψηλότερα από 10% κ.ο., προκαλούν προβλήματα αστάθειας στο πλάσμα Ar, ενώ δημιουργούν, παράλληλα, επικαθίσεις στοιχειακού άνθρακα στους κώνους. Έτσι, λοιπόν, στις αναλύσεις με HPLC-ICP-MS, αποφασίστηκε η αραίωση του εκλούσματος, με διάλυμα 2% κ.ο. νιτρικού οξέος, το οποίο εισάγεται, μετά τη στήλη, μέσω ενός συνδέσμου “T”.

Στη μέθοδο που αναπτύχθηκε παραπάνω, αποφασίστηκε να συμπεριληφθεί και το πεντασθενές παράγωγο DMTA<sup>V</sup>-GSH, γεγονός που υπαγορεύει την αναπροσαρμογή της μεθόδου, ώστε να καταστεί κατάλληλη για το διαχωρισμό των τεσσάρων, πλέον, συμπλόκων As-GSH. Εφαρμόζοντας, λοιπόν, τις χαρακτηριστικές αντιδράσεις SRM, που παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.5 και τη Μέθοδο Γ, η οποία αναπτύχθηκε για το διαχωρισμό των τριών συμπλόκων As<sup>III</sup>-GSH, αναλύθηκε ένα πρότυπο διάλυμα των τεσσάρων συμπλόκων ATG, MADG, DMAG και DMTA<sup>V</sup>-GSH, δίνοντας το χρωματογράφημα του Σχήματος 5.32.



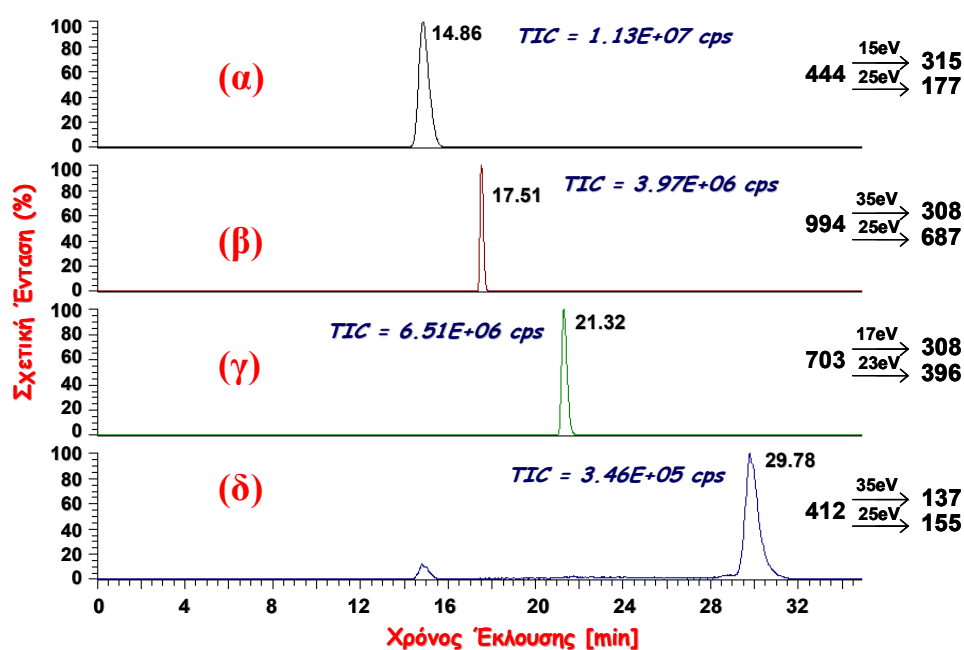
**Σχήμα 5.32.** Χρωματογράφημα HPLC-ESI-MS/MS-SRM των πρότυπων διαλυμάτων των ενώσεων (α) DMTA<sup>V</sup>-GSH, (β) ATG, (γ) MADG και (δ) DMAG (\* TIC=Total Ion Current).

Με τη μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται ικανοποιητικός διαχωρισμός των τριών συμπλόκων As<sup>III</sup>-GSH, ωστόσο, παρατηρείται συνέκλουση των DMTA<sup>V</sup>-GSH και ATG. Το γεγονός αυτό οδήγησε στην μείωση του ποσοστού της μεθανόλης στο έκλουσμα, οπότε προέκυψε η Μέθοδος Δ.

#### Μέθοδος Δ

Η Μέθοδος Δ βασίζεται σε βαθμιδωτή έκλουση δυο διαλυτών, Α και Β, όπου Α διάλυμα μεθανόλης/ φορμικού οξέος/ απιονισμένου νερού, αναλογίας κ.ο. 2 /0.05/ 97.95 και Β διάλυμα μεθανόλης 100% κ.ο. Το πρόγραμμα έκλουσης είναι το ίδιο με αυτό του Πίνακα 5.6. Η εφαρμογή λοιπόν της παρούσας μεθόδου και η ανάλυση πρότυπου διαλύματος, αποτελούμενο από τα τέσσερα σύμπλοκα As-GSH, είχε σαν αποτέλεσμα το ακόλουθο χρωματογράφημα (Σχήμα 5.33).

Με τη Μέθοδο Δ, επιτυγχάνεται ο πλήρης διαχωρισμός των τεσσάρων συμπλόκων As-GSH, γεγονός που την καθιστά κατάλληλη, για την ανίχνευση και το χαρακτηρισμό αυτών των ενώσεων, με την τεχνική HPLC-ESI-MS/MS-SRM.

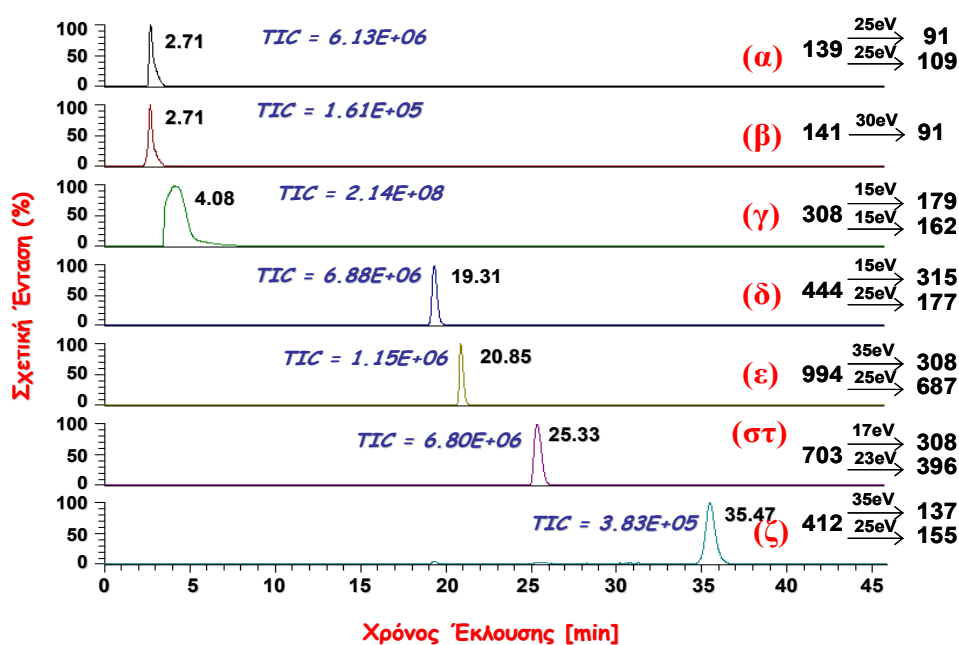


**Σχήμα 5.33.** Χρωματογράφημα HPLC-ESI-MS/MS-SRM των πρότυπων διαλυμάτων των ενώσεων (α) DMTA<sup>V</sup>-GSH, (β) ATG, (γ) MADG και (δ) DMAG (\* TIC=Total Ion Current).

Η παραπάνω μέθοδος αναπτύχθηκε, χρησιμοποιώντας το αυτοματοποιημένο σύστημα HPLC του οργάνου TSQ Quantum. Ωστόσο, επειδή στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η ανίχνευση και ο χαρακτηρισμός των συμπλόκων As-GSH, τόσο με

τη μέθοδο HPLC-ESI-MS/MS-SRM, όσο και με τη μέθοδο HPLC-ICP-MS, για το λόγο αυτό, κρίθηκε αναγκαία η χρήση κοινού συστήματος HPLC και για τις δύο τεχνικές, ώστε τα αποτελέσματα που προκύπτουν να είναι συγκρίσιμα.

Εφαρμόστηκε, λοιπόν, η Μέθοδος Δ, χρησιμοποιώντας το ανεξάρτητο σύστημα HPLC, το οποίο περιλαμβάνει την αντλία Shimadzu LC-20AD. Η ανάλυση πρότυπων διαλυμάτων των υπό εξέταση ενώσεων, έδωσε το χρωματογράφημα του Σχήματος 5.34. Συγκρίνοντας κανείς τα χρωματογραφήματα των Σχημάτων 5.33 και 5.34, διαπιστώνει αισθητές διαφορές στους χρόνους έκλυσης των συστατικών, οι οποίες οφείλονται στα διαφορετικά συστήματα HPLC, που χρησιμοποιήθηκαν για τις αναλύσεις.



**Σχήμα 5.34.** Χρωματογράφημα HPLC-ESI-MS/MS-SRM των πρότυπων διαλυμάτων των ενώσεων (α) DMA<sup>V</sup> (β) MMA<sup>V</sup> (γ) GSH (δ) DMTA<sup>V</sup>-GSH, (ε) ATG, (στ) MADG και (ζ) DMAG (\* TIC=Total Ion Current).

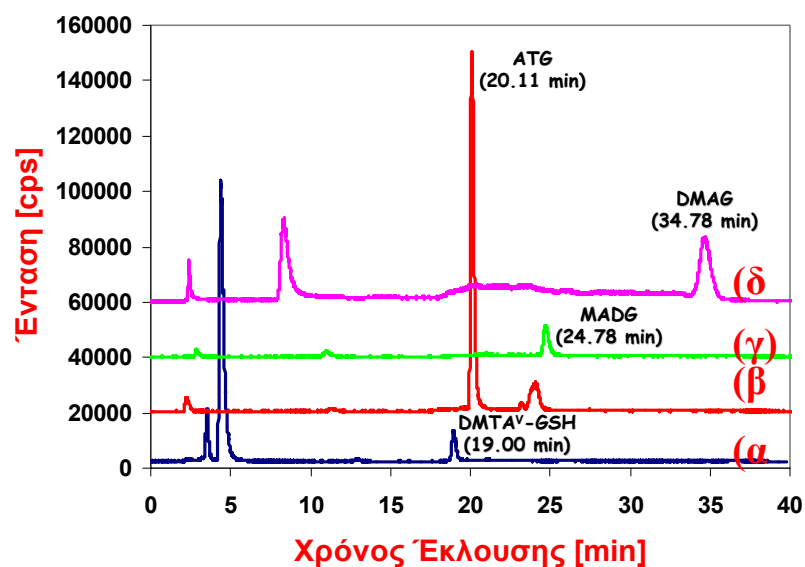
### 5.3.2. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ HPLC-ICP-MS ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΟ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ AS-GSH

Στο παρόν κεφάλαιο, περιγράφεται η ανάπτυξη μεθόδου HPLC-ICP-MS, για την ανίχνευση των τεσσάρων συμπλόκων ATG, MADG, DMAG και DMTA<sup>V</sup>-GSH. Η πειραματική διάταξη ICP-MS που χρησιμοποιήθηκε, καθώς και οι βέλτιστες πειραματικές παράμετροι λειτουργίας του οργάνου, περιγράφονται αναλυτικά στο



Πειραματικό Μέρος του κεφαλαίου, ενώ χρησιμοποιήθηκε η χρωματογραφική μέθοδος Δ, με το ανεξάρτητο σύστημα HPLC (Shimadzu LC-20AD).

Αρχικά, αναλύθηκαν τα πρότυπα διαλύματα των τεσσάρων συμπλόκων As-GSH, το περιεχόμενο των οποίων έχει ήδη ταυτοποιηθεί με την τεχνική HPLC-ESI-MS/MS-SRM. Τα πρότυπα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν, στην παρούσα μελέτη, για τα τέσσερα σύμπλοκα As-GSH, δεν είναι εμπορικά διαθέσιμα, αλλά παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο. Επομένως, αναμένεται να περιέχουν προσμίξεις (γεγονός που έχει ήδη επιβεβαιωθεί κατά τις αναλύσεις με HPLC-ESI-MS/MS-SRM), εμφανίζοντας περισσότερες από μια κορυφές για το  $^{75}\text{As}$ , στο χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS. Για την ευκολότερη, λοιπόν, ερμηνεία του χρωματογραφήματος αυτού, κάθε πρότυπο διάλυμα αναλύθηκε χωριστά, ενώ όλα μαζί τα χρωματογραφήματα παρουσιάζονται συνοπτικά στο ακόλουθο σχήμα.



**Σχήμα 5.35.** Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS των πρότυπων διαλυμάτων των ενώσεων (α)  $\text{DMTA}^{\text{V}}\text{-GSH}$ , (β) ATG, (γ) MADG και (δ) DMAG.

Τα τέσσερα σύμπλοκα  $\text{DMTA}^{\text{V}}\text{-GSH}$ , ATG, MADG και DMAG εκκλύονται σε χρόνους 19.00, 20.11, 24.78 και 34.78 min αντίστοιχα, ενώ, οι υπόλοιπες κορυφές που εμφανίζονται, οφείλονται σε προσμίξεις που περιέχουν τα, συντιθέμενα στο εργαστήριο, πρότυπα διαλύματα. Συγκρίνοντας τους χρόνους έκλυσης των συμπλόκων στα χρωματογραφήματα HPLC-ICP-MS και HPLC-ESI-MS/MS-SRM, προκύπτουν διαφορές, οι οποίες δικαιολογούνται από το γεγονός ότι χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές πειραματικές διατάξεις και, επομένως, διαφορετική συνδεσμολογία. Στον πίνακα που ακολουθεί παρατίθενται οι χρόνοι έκλυσης των τεσσάρων συμπλόκων, με τις δύο διαφορετικές τεχνικές ανάλυσης.

Πίνακας 5.7. Χρόνοι έκλυσης των συμπλόκων As-GSH.

Ένωση	Χρόνος Έκλυσης (min)		
	HPLC-ESI-MS/MS-SRM	HPLC-ICP-MS	% Απόκλιση
DMTAV-GSH	19.31	19.00	1.61
ATG	20.85	20.11	3.55
MADG	25.33	24.78	2.17
DMAG	35.47	34.78	1.95

### 5.3.3. ΌΡΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ HPLC-ESI-MS/MS-SRM ΚΑΙ HPLC-ICP-MS ΓΙΑ ΤΑ ΣΥΜΠΛΟΚΑ AS-GSH

Προκειμένου να υπολογιστούν τα όρια ανίχνευσης, για τα τέσσερα σύμπλοκα As-GSH, με τις τεχνικές HPLC-ESI-MS/MS-SRM και HPLC-ICP-MS, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις των πρότυπων διαλυμάτων των παραπάνω ενώσεων, σε διάλυμα φορμικού οξέος/ αποιονισμένου νερού, αναλογίας κ.ο. 0.1/ 99.9. Τα διαλύματα που προέκυψαν, αναλύθηκαν και με τις δύο τεχνικές και σαν όριο ανίχνευσης, για την κάθε ένωση, ορίστηκε η χαμηλότερη συγκέντρωση του αναλύτη, για την οποία η απόκριση της μεθόδου είναι τρεις φορές μεγαλύτερη από το σήμα θορύβου. Τα όρια ανίχνευσης που υπολογίστηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.8. Επίσης, στον πίνακα αυτό αναφέρεται και το ποσοστό της μεθανόλης στον διαλύτη έκλυσης, για το χρονικό διάστημα που διαρκεί η έκλυση του κάθε παραγώγου από τη στήλη, αφού η συγκεκριμένη παράμετρος επηρεάζει την ευαισθησία της μεθόδου.

Πίνακας 5.8. Όρια ανίχνευσης των τεσσάρων συμπλόκων As-GSH.

Ένωση	% κ.ο. ποσοστό μεθανόλης εκλούσιματος	Όρια Ανίχνευσης (µg/L)	
		HPLC-ESI-MS/MS-SRM	HPLC-ICP-MS
DMTAV-GSH	12	0.2	9.7
ATG	12	12.7	12.1
MADG	12	2.5	13.7
DMAG	2	2.8	28.2

Όπως διαπιστώνεται από τον Πίνακα 5.8, τα όρια ανίχνευσης που προκύπτουν με την τεχνική HPLC-ICP-MS, είναι παρόμοια και για τα τέσσερα σύμπλοκα As-GSH, ενώ, οι μικρές διαφορές που παρατηρούνται, αποδίδονται στο γεγονός ότι, κατά τη διάρκεια του προγράμματος έκλουσης, το ποσοστό της μεθανόλης μεταβάλλεται από 2% κ.ο. σε ~12% κ.ο. Όπως είναι γνωστό, η μεθανόλη ενισχύει το σήμα για το αρσενικό, κατά τις αναλύσεις με ICP-MS, αυξάνοντας το σήμα υποβάθρου του στοιχείου και, συνεπώς, επηρεάζοντας σημαντικά και τα όρια ανίχνευσης.<sup>46</sup> Τα χαμηλότερα όρια ανίχνευσης παρουσιάζουν τα σύμπλοκα DMTA<sup>V</sup>-GSH και ATG και ακολουθούν τα MADG και DMAG.

Από την άλλη, τα όρια ανίχνευσης των τριών συμπλόκων ATG, MADG και DMAG, με την τεχνική HPLC-ESI-MS/MS-SRM, είναι παραπλήσια, ενώ σημαντικά διαφέρουν τα όρια ανίχνευσης του πεντασθενούς συμπλόκου DMTA<sup>V</sup>-GSH, που είναι αρκετά χαμηλότερα. Το γεγονός ερμηνεύεται, αν λάβουμε υπόψη ότι η ευαισθησία, και συνεπώς και τα όρια ανίχνευσης της παρούσας τεχνικής, είναι άμεσα εξαρτώμενα από την εκάστοτε αναλυόμενη ένωση. Οι κατεξοχήν παράγοντες που ευθύνονται για τις παραπάνω διαφορές, είναι η υδροφοβικότητα, ο βαθμός μεθυλίωσης, η οξειδωτική κατάσταση, στην οποία συναντάται το αρσενικό, αλλά και ο βασικός χαρακτήρας της ένωσης, που επηρεάζει και το βαθμό πρωτονίωσης της. Μάλιστα, το γεγονός ότι το αρσενικό στην ένωση DMTA<sup>V</sup>-GSH συναντάται σε οξειδωτική κατάσταση +5, ενώ στα υπόλοιπα τρία σύμπλοκα σε οξειδωτική κατάσταση +3, είναι δυνατόν να ευθύνεται για τα σημαντικά χαμηλότερα όρια ανίχνευσης, που προκύπτουν για την ένωση αυτή.

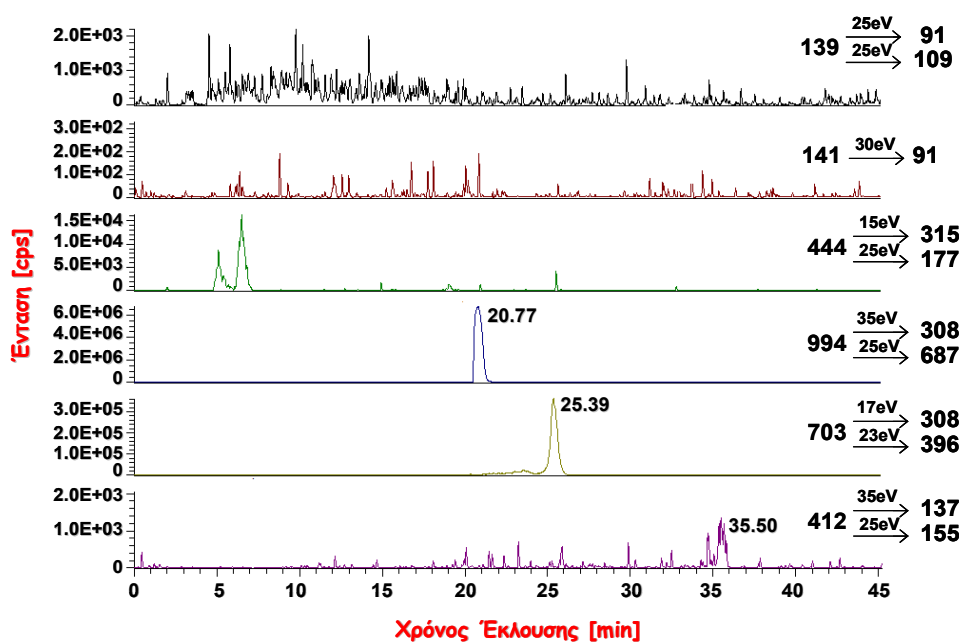
#### **5.3.4. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ HPLC-ESI-MS/MS-SRM ΚΑΙ HPLC-ICP-MS ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΩΝ $iAs^{III}$ ΑΠΟ ΤΗΝ $CH_3B_{12}$ ΠΑΡΟΥΣΙΑ GSH**

Οι μέθοδοι HPLC-ESI-MS/MS-SRM και HPLC-ICP-MS, που αναπτύχθηκαν παραπάνω, εφαρμόστηκαν περαιτέρω, με σκοπό τη μελέτη της μεθυλίωσης του ανόργανου αρσενικού και τη διερεύνηση της πιθανότητας σχηματισμού των συμπλόκων As-GSH, στα πλαίσια της μεθυλίωσης αυτής. Πιο συγκεκριμένα, εξετάστηκε η αντίδραση μεθυλίωσης του  $NaAsO_2$  από τη  $CH_3B_{12}$ , παρουσία GSH και απουσία ενζύμων. Η συγκεκριμένη αντίδραση έχει μελετηθεί

και στο παρελθόν, ωστόσο δεν έχει αναφερθεί η παρουσία συμπλόκων As-GSH μεταξύ των προϊόντων της.<sup>29,34</sup>

Η πορεία διεξαγωγής της παραπάνω αντίδρασης, περιγράφεται λεπτομερώς στο Πειραματικό Μέρος του παρόντος κεφαλαίου. Πιο συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια της συγκεκριμένης αντίδρασης, το μίγμα, αποτελούμενο από NaAsO<sub>2</sub>, GSH και CH<sub>3</sub>B<sub>12</sub>, αφήνεται για επώαση στους 37°C, υπό αδρανή ατμόσφαιρα αερίου Ar, ενώ, κλάσματα συγκεκριμένου όγκου, απομακρύνονται από το αντιδρών μίγμα και αναλύονται, είτε με HPLC-ESI-MS/MS-SRM, είτε με HPLC-ICP-MS.

Αρχικά, με την τεχνική HPLC-ESI-MS/MS-SRM, αναλύθηκε κλάσμα της αντίδρασης μεθυλίωσης, έπειτα από χρόνο επώασης ίσο με 5.5 hrs. Το συγκεκριμένο δείγμα περιείχε συνολική συγκέντρωση σε αρσενικό ίση με 9.5 mg/L, σε GSH 45 mM και σε CH<sub>3</sub>B<sub>12</sub> 0.17 mM, ενώ τα αποτελέσματα που προέκυψαν, φαίνονται στο χρωματογράφημα του Σχήματος 5.36.



**Σχήμα 5.36.** Χρωματογράφημα HPLC-ESI-MS/MS-SRM του μίγματος μεθυλίωσης, έπειτα από χρόνο επώασης 5.5 hrs.

Μεταξύ των προϊόντων της αντίδρασης, διακρίνονται τα τρία σύμπλοκα ATG, MADG και DMAG, σε χρόνους έκλυσης 20.77 min, 25.39 min και 35.50 min, αντίστοιχα. Τα ATG και MADG σχηματίζονται σε υψηλές συγκεντρώσεις (σύμφωνα με την ένταση των αντίστοιχων κορυφών), ενώ το DMAG φαίνεται να σχηματίζεται σε ιχνοποσότητες. Οι χρόνοι έκλυσης στο μίγμα μεθυλίωσης, συμπίπτουν με αυτούς στο πρότυπο διάλυμα, με τις αποκλίσεις που παρατηρούνται

να μην υπερβαίνουν το 0.3 %. Επίσης, στο παραπάνω χρωματογράφημα διακρίνεται η παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων GSH, ενώ δεν παρατηρούνται κορυφές για τα MMA<sup>V</sup> και DMA<sup>V</sup>, γεγονός που ενδεχομένως να οφείλεται στην χαμηλή ευαισθησία που παρουσιάζει η τεχνική, για τα δύο αυτά είδη.

Στη συνέχεια, προκειμένου να διερευνηθεί η πιθανότητα οι κορυφές που αποδόθηκαν στα τρία σύμπλοκα ATG, MADG και DMAG στο Σχήμα 5.36, να οφείλονται σε παρεμποδίσεις, αναλύθηκε ένα “τυφλό” κλάσμα μίγματος μεθυλίωσης, δηλαδή ένα κλάσμα από μίγμα αντίδρασης, μεταξύ της GSH και της CH<sub>3</sub>B<sub>12</sub>, χωρίς καθόλου αρσενικό. Στο κλάσμα αυτό, δεν ανιχνεύτηκε κανένα ιόν, με παρόμοια προϊόντα ιόντα με κάποιο από τα τρία σύμπλοκα As<sup>III</sup>-GSH.

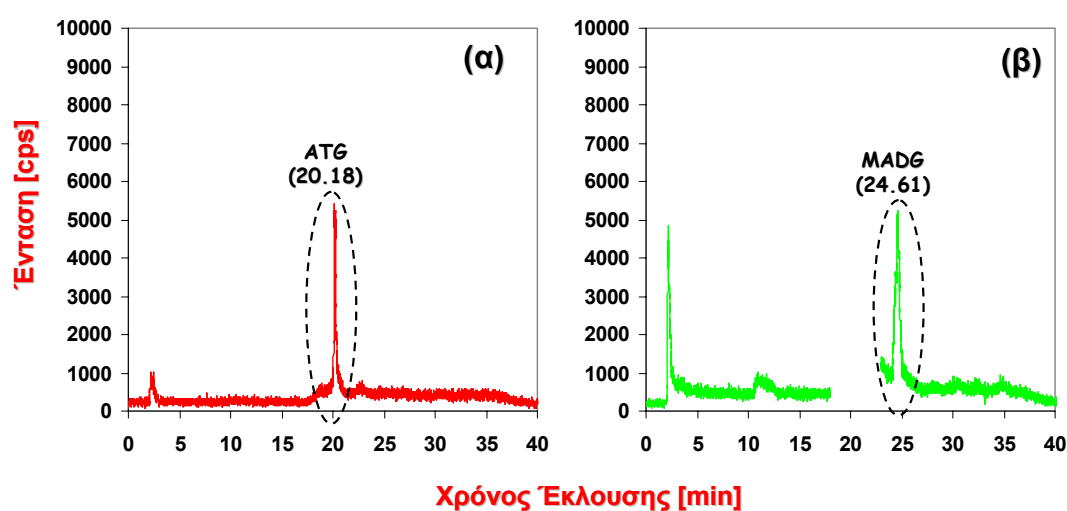
Μια άλλη παράμετρος που εξετάστηκε, προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι οι κορυφές που παρατηρούνται αντιστοιχούν στις υπό εξέταση ενώσεις, ήταν ο λόγος της έντασης των δύο σχηματιζόμενων προϊόντων ιόντων, που επιλέχθηκαν για τη διαμόρφωση των χαρακτηριστικών αντιδράσεων SRM. Ο λόγος αυτός, που αναφέρεται ως λόγος SRM, δίνεται για την κάθε ένωση, στον Πίνακα 5.9, όπου παρουσιάζεται και η σύγκριση των λόγων αυτών, ανάμεσα στα πρότυπα διαλύματα και στα αναλυόμενα κλάσματα, από το μίγμα μεθυλίωσης.

Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα του πίνακα αυτού, οι λόγοι SRM, ανάμεσα στα πρότυπα διαλύματα και στο μίγμα της αντίδρασης μεθυλίωσης, είναι παραπλήσιοι, γεγονός που αποτελεί μια επιπλέον ένδειξη ότι οι κορυφές που παρατηρούνται σε χρόνους 20.77 min, 25.39 min και 35.50 min, αντιστοιχούν στα τρία σύμπλοκα ATG, MADG και DMAG αντίστοιχα.

**Πίνακας 5.9.** Λόγοι SRM για τα σύμπλοκα As<sup>III</sup>-GSH, στο μίγμα της αντίδρασης μεθυλίωσης και στα πρότυπα διαλύματα.

Ένωση	Λόγοι SRM	
	<i>Πρότυπο Διάλυμα</i>	<i>Μίγμα Αντίδρασης Μεθυλίωσης</i>
<b>ATG</b>	308/687 = 2.0	308/687 = 2.03
<b>MADG</b>	396/308 = 1.82	396/308 = 1.79
<b>DMAG</b>	137/155 = 1.39	137/155 = 1.23

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η ανάλυση κλασμάτων του μίγματος μεθυλίωσης, έπειτα από χρόνους επώασης 3.5 και 2 hrs, δίνοντας τα χρωματογραφήματα που φαίνονται στο Σχήμα 5.37(α) και (β) αντίστοιχα. Και σε αυτή την περίπτωση, το κλάσμα που αναλύθηκε περιείχε 9.5 mg/L As, 45 mM GSH και 0.17 mM CH<sub>3</sub>B<sub>12</sub>. Στο Σχήμα 5.37(α) απεικονίζεται η ανάλυση κλάσματος από το μίγμα της αντίδρασης μεθυλίωσης, έπειτα από χρόνο επώασης 3.5 hrs και αφού υπέστη αραίωση σε απιονισμένο νερό (με αναλογία κλάσμα/απιονισμένο νερό ίση με 1:200). Από την άλλη, στο Σχήμα 5.37(β), απεικονίζεται η ανάλυση κλάσματος από το μίγμα της αντίδρασης μεθυλίωσης, σε χρόνο επώασης 2 hrs, χωρίς ωστόσο να λάβει χώρα, σε αυτή την περίπτωση, αραίωση του κλάσματος.



**Σχήμα 5.37.** Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS του μίγματος μεθυλίωσης, έπειτα από χρόνο επώασης (α) 3.5 hrs και (β) 2 hrs.

Στο Σχήμα 5.37(α) διακρίνεται ο σχηματισμός του συμπλόκου ATG, το οποίο αντιστοιχεί σε χρόνο έκλουσης 20.18 min. Η αραίωση του κλάσματος, πριν την ανάλυσή του, κρίθηκε απαραίτητη, αφού, λόγω της υψηλής συγκέντρωσης, στην οποία σχηματίζεται το σύμπλοκο ATG στη συγκεκριμένη αντίδραση (όπως αποδείχτηκε από τις αναλύσεις με HPLC-ESI-MS/MS-SRM), υπάρχει ο κίνδυνος βλάβης του ανιχνευτή, αν εισαχθεί μια τόσο υψηλή συγκέντρωση αρσενικού σε αυτόν. Στο συγκεκριμένο δείγμα, ωστόσο, δεν ανιχνεύτηκε το μεθυλιωμένο σύμπλοκο MADG, και ο λόγος είναι η αραίωση που υπέστη το κλάσμα, πριν την ανάλυσή του. Το παράγωγο MADG σχηματίζεται σε μικρότερη συγκέντρωση, σε σχέση με το ATG, κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, επομένως, προκειμένου να καταστεί δυνατή η ανίχνευσή του, αποφασίστηκε η εισαγωγή κλάσματος στο ICP-MS, χωρίς να γίνει αραίωση. Αναλύοντας, λοιπόν, κλάσμα από το μίγμα της

αντίδρασης, σε χρόνο επώασης 2 hrs, προέκυψε το χρωματογράφημα του Σχήματος 5.37(β). Για να αποφευχθεί η εισαγωγή στον ανιχνευτή του ICP-MS της υψηλής συγκέντρωσης αρσενικού που προέρχεται από το σύμπλοκο ATG, πραγματοποιήθηκε εκτροπή του εκλούσματος, για το χρονικό διάστημα που διαρκεί η έκλυση του συστατικού ATG από τη στήλη. Στο παραπάνω χρωματογράφημα, είναι εμφανής ο σχηματισμός του παραγώγου MADG, σε χρόνο ίσο με 24.61 min.

Οι χρόνοι έκλυσης των παραγώγων ATG και MADG στο μίγμα της αντίδρασης, ταιριάζουν με αυτούς των πρότυπων διαλυμάτων, αφού οι όποιες διαφορές παρατηρούνται δεν υπερβαίνουν το 0.2%. Στον Πίνακα 5.10 παρουσιάζεται μια σύγκριση των χρόνων έκλυσης, μεταξύ μίγματος αντίδρασης και πρότυπων διαλυμάτων. Όσον αφορά το DMAG, αυτό δεν ανιχνεύτηκε ως προϊόν μεθυλίωσης, με την τεχνική HPLC-ICP-MS, σε αντίθεση με την τεχνική HPLC-ESI-MS/MS-SRM, με την οποία διαπιστώθηκε ο σχηματισμός του σε ιχνοποσότητες. Η αδυναμία αυτή σχετίζεται με τα όρια ανίχνευσης της τεχνικής.

**Πίνακας 5.10.** Χρόνοι έκλυσης των τριών συμπλόκων As<sup>III</sup>-GSH.

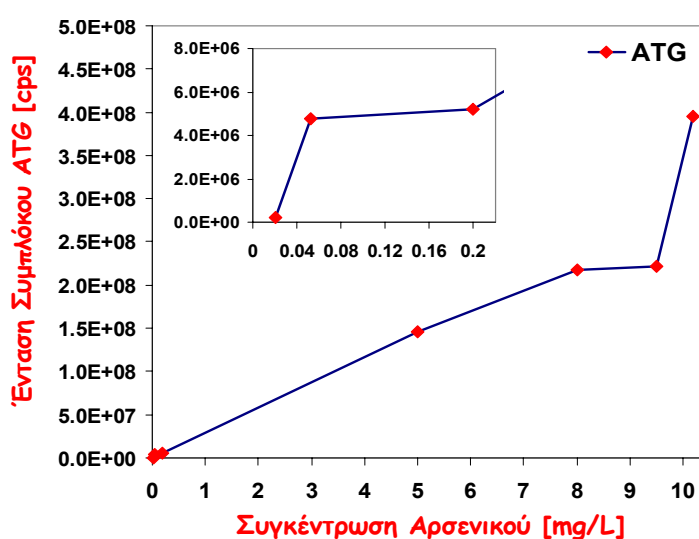
Ένωση	Χρόνοι έκλυσης (min)			
	<i>Πρότυπο διάλυμα</i>		<i>Μίγμα αντίδρασης</i>	
	<i>HPLC-ESI-MS/MS-SRM</i>	<i>HPLC-ICP-MS</i>	<i>HPLC-ESI-MS/MS-SRM</i>	<i>HPLC-ICP-MS</i>
<b>ATG</b>	20.85	30.11	20.77	20.18
<b>MADG</b>	25.33	24.78	25.39	24.61
<b>DMAG</b>	35.47	34.78	35.50	-

Το παράγωγο DMTA<sup>V</sup>-GSH δεν ανιχνεύτηκε στα προϊόντα της αντίδρασης, γεγονός αναμενόμενο, αφού το συγκεκριμένο σύμπλοκο έχει, προς το παρόν, ανιχνευτεί μόνο σε δείγματα φυτών.

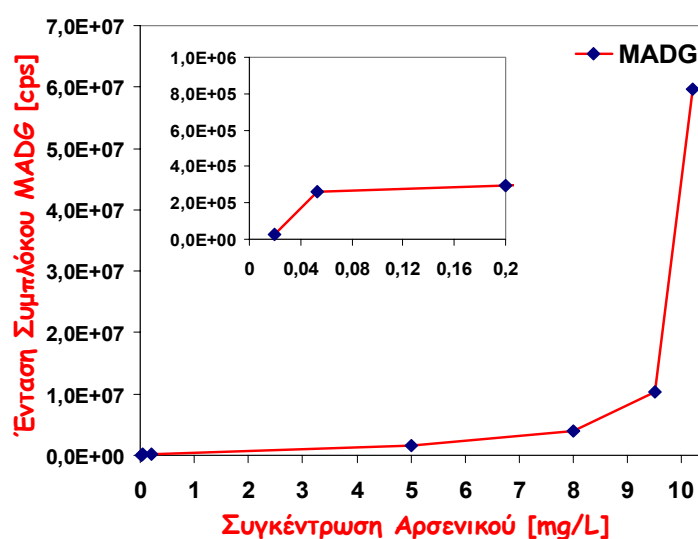
Συνοψίζοντας, τα σύμπλοκα ATG και MADG ανιχνεύτηκαν στο μίγμα της αντίδρασης μεθυλίωσης του ανόργανου αρσενικού από τη CH<sub>3</sub>B<sub>12</sub> και με τις δύο μεθόδους HPLC-ICP-MS και HPLC-ESI-MS/MS-SRM, ενώ το DMAG, ανιχνεύτηκε σε μικρές συγκεντρώσεις, μόνο με την δεύτερη τεχνική.

### 5.3.5. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ As ΚΑΙ GSH ΣΤΟ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ As<sup>III</sup>-GSH ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΩΝ iAs<sup>III</sup> ΑΠΟ ΤΗΝ CH<sub>3</sub>B<sub>12</sub>

Η μελέτη της επίδρασης των συγκεντρώσεων As και GSH στο σχηματισμό των συμπλόκων As<sup>III</sup>-GSH, κατά τη διάρκεια της αντίδρασης μεθυλίωσης, βασίστηκε στην τεχνική HPLC-ESI-MS/MS-SRM. Η επώαση του αντιδρώντος μίγματος διήρκησε 1.5 hrs (όπου οι συγκεντρώσεις των συμπλόκων παρουσιάζουν μέγιστο), ενώ χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις GSH και CH<sub>3</sub>B<sub>12</sub> ίσες με 22 mM και 0.17 mM, αντίστοιχα. Εξετάζοντας συγκεντρώσεις As σε εύρος 20 µg/L - 10.5 mg/L, κατασκευάστηκαν οι καμπύλες που φαίνονται παρακάτω.



Σχήμα 5.38. Παραγωγή του συμπλόκου ATG, ως προς τη συγκέντρωση As, στο μίγμα της αντίδρασης μεθυλίωσης (συγκέντρωση GSH 22 mM).

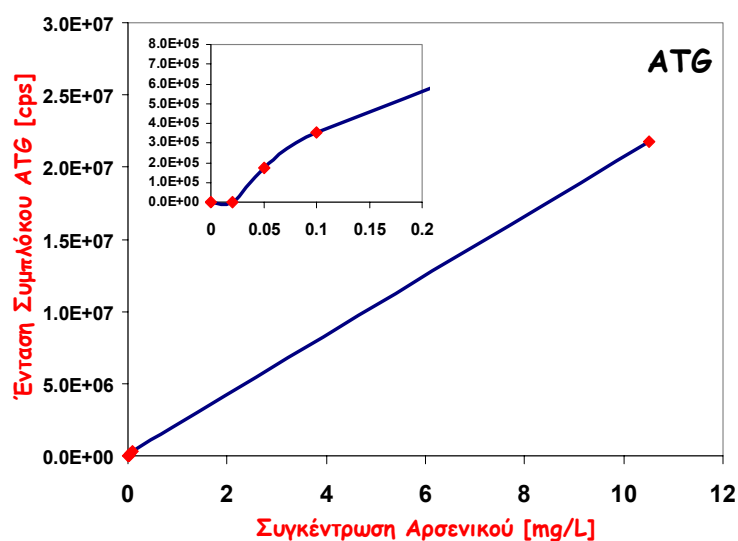


Σχήμα 5.39. Παραγωγή του συμπλόκου MADG, ως προς τη συγκέντρωση As, στο μίγμα της αντίδρασης μεθυλίωσης (συγκέντρωση GSH 22 mM).

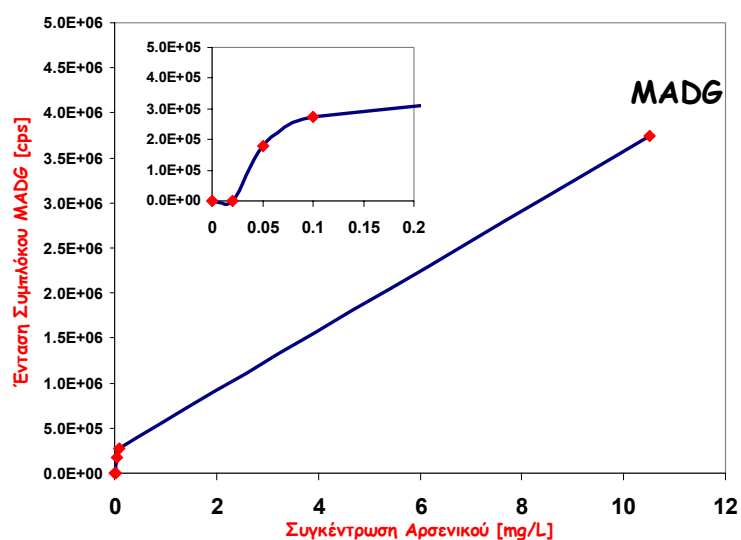


Όπως φαίνεται, αυξανόμενης της συγκέντρωσης As στο μίγμα, αυξάνεται η παραγωγή του ATG, ενώ ο σχηματισμός του ξεκινάει από τη συγκέντρωση των 20  $\mu\text{g As/L}$  (Σχήμα 5.38). Ο σχηματισμός του MADG (Σχήμα 5.39), ξεκινάει από συγκεντρώσεις 20  $\mu\text{g As/L}$  και αυξάνεται, καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση αυτή. Το DMAG ανιχνεύτηκε μόνο σε συγκέντρωση ίση με 10.5  $\text{mg As/L}$ .

Στη συνέχεια, μελετήθηκε ο σχηματισμός των συμπλόκων  $\text{As}^{\text{III}}\text{-GSH}$ , κατά την αντίδραση μεθυλίωσης, σε συνθήκες ίδιες με αυτές που προαναφέρθηκαν, με τη διαφορά ότι η συγκέντρωση της GSH μειώθηκε στην τιμή 7  $\text{mM}$  (συγκέντρωση GSH στα ερυθροκύτταρα). Τα αποτελέσματα φαίνονται στα Σχήματα 5.40 και 5.41.



Σχήμα 5.40. Παραγωγή του συμπλόκου ATG, ως προς τη συγκέντρωση As, στο μίγμα της αντίδρασης μεθυλίωσης (συγκέντρωση GSH 7  $\text{mM}$ ).

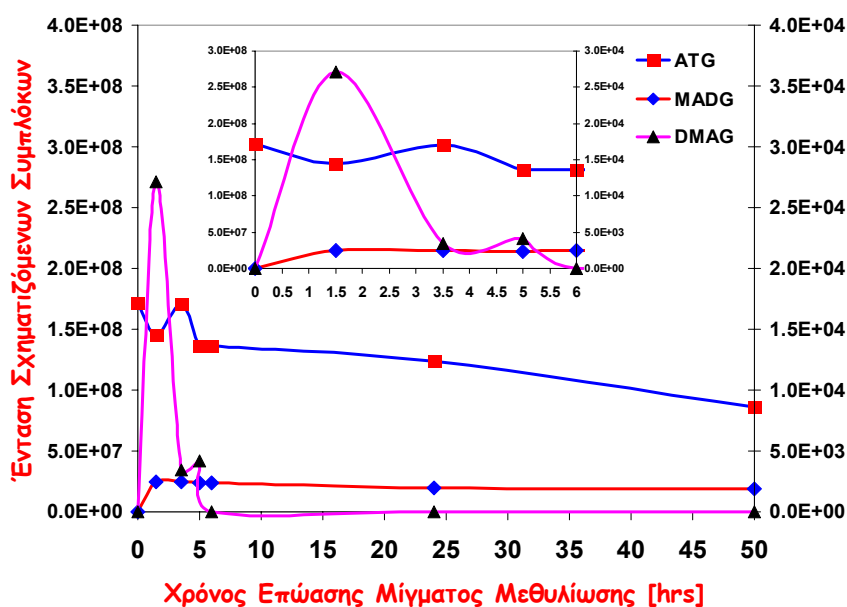


Σχήμα 5.41. Παραγωγή του συμπλόκου MADG, ως προς τη συγκέντρωση As, στο μίγμα της αντίδρασης μεθυλίωσης (συγκέντρωση GSH 7  $\text{mM}$ ).

Όπως διαπιστώνεται από τα παραπάνω σχήματα, το σύμπλοκο ATG ξεκινάει να σχηματίζεται σε συγκεντρώσεις ίσες με 50  $\mu\text{g As/L}$ . Ο σχηματισμός του MADG ξεκινάει από συγκέντρωση 50  $\mu\text{g As/L}$ , ενώ το DMAG δεν σχηματίζεται, σε καμία περίπτωση, όταν η συγκέντρωση της GSH είναι ίση με 7 mM.

### 5.3.6. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΙΝΗΤΙΚΗΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΩΝ $\text{iAs}^{\text{III}}$ ΑΠΟ ΤΗΝ $\text{CH}_3\text{B}_{12}$

Στη συνέχεια, εξετάστηκε η κινητική της αντίδρασης μεθυλίωσης των  $\text{iAs}^{\text{III}}$  από τη  $\text{CH}_3\text{B}_{12}$ , η οποία βασίστηκε στην ανάλυση κλασμάτων από το μίγμα της αντίδρασης, συναρτήσεως του χρόνου επώασης του μίγματος (Σχήμα 5.42). Επιλέχθηκαν συγκεντρώσεις, στις οποίες λαμβάνει χώρα ο σχηματισμός και των τριών συμπλόκων  $\text{As}^{\text{III}}$ -GSH (22 mM GSH, 0.17 mM  $\text{CH}_3\text{B}_{12}$  και 10.5 mg As/L). Έναρξη της αντίδρασης θεωρείται η χρονική στιγμή προσθήκης της  $\text{CH}_3\text{B}_{12}$  στο μίγμα ( $t=0\text{hrs}$ ), και ενώ η GSH και το  $\text{NaAsO}_2$  έχουν αντιδράσει επί 45 min. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στις παραγράφους που ακολουθούν

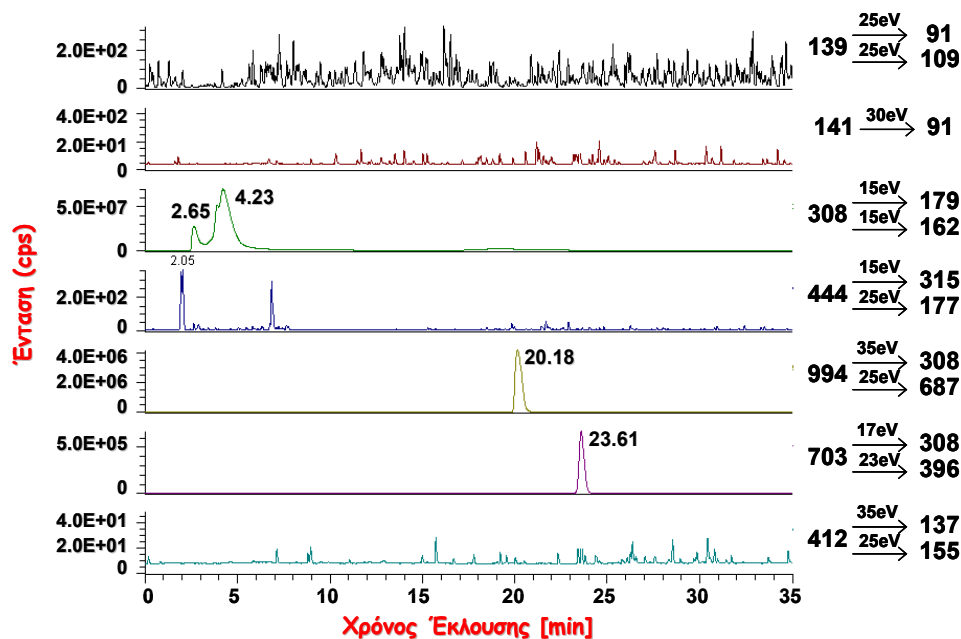


Σχήμα 5.42. Γραφική παράσταση της συγκέντρωσης των παραγόμενων συμπλόκων  $\text{As}^{\text{III}}$ -GSH, συναρτήσεως του χρόνου επώασης του μίγματος μεθυλίωσης.

Την χρονική στιγμή  $t=0$ , το σύμπλοκο ATG συναντάται στο μίγμα μεθυλίωσης σε υψηλές συγκεντρώσεις, γεγονός αναμενόμενο, αν λάβει κανείς υπόψη ότι η GSH και το  $\text{NaAsO}_2$  είχαν ήδη αντιδράσει για 45 min, πριν προστεθεί

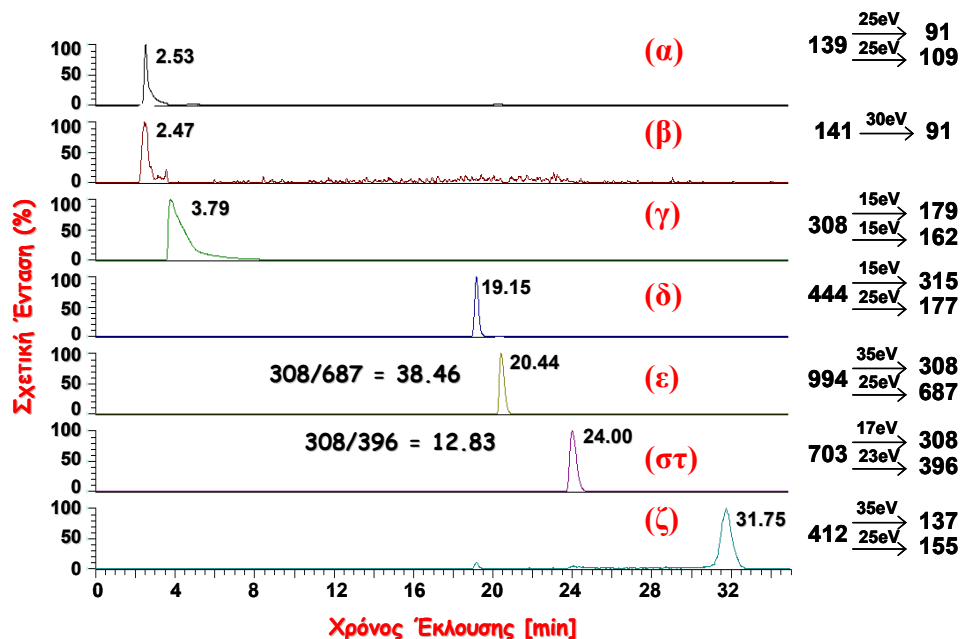
η  $\text{CH}_3\text{B}_{12}$ . Από την άλλη, τα μεθυλιωμένα σύμπλοκα MADG και DMAG εμφανίζουν μηδενικές συγκεντρώσεις σε χρόνο  $t=0$ , γεγονός που σημαίνει ότι, απουσία της  $\text{CH}_3\text{B}_{12}$ , δε λαμβάνει χώρα μεθυλίωση. Αυτή η παρατήρηση αποτελεί ένδειξη ότι η  $\text{CH}_3\text{B}_{12}$  δρα σαν δότης μεθυλομάδας, στο συγκεκριμένο σύστημα. Τα σύμπλοκα MADG και DMAG παρουσιάζουν μέγιστη συγκέντρωσή σε χρόνο  $t=1.5$  hrs, ενώ, αυξανόμενου του χρόνου επώασης, η παραγωγή του MADG παρουσιάζει σχεδόν σταθερή πορεία. Όσον αφορά το διμεθυλιωμένο σύμπλοκο DMAG, η συγκέντρωσή του ελαττώνεται συνεχώς και τελικά μηδενίζεται, μετά από χρόνο επώασης  $t=6$  hrs. Το σύμπλοκο ATG παρουσιάζει μέγιστη συγκέντρωση πριν την προσθήκη της  $\text{CH}_3\text{B}_{12}$ , μια συγκέντρωση η οποία, μετά από  $t=5$  hrs, ελαττώνεται διαρκώς. Έπειτα από  $t=50$  hrs, τα σύμπλοκα ATG και MADG εξακολουθούν να συναντώνται στο μίγμα της αντίδρασης, σε αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις, ενώ, έπειτα από  $t=120$  hrs, επισημάνθηκε η απουσία και των τριών συμπλόκων  $\text{As}^{\text{III}}$ -GSH. Τα παραπάνω ισχύουν όταν επικρατεί αδρανής ατμόσφαιρα αερίου Ar.

Προκειμένου να διερευνηθεί η σταθερότητα των σχηματιζόμενων συμπλόκων, σε ατμοσφαιρικές συνθήκες, πραγματοποιήθηκε ανάλυση κλάσματος του μίγματος μεθυλίωσης, στο οποίο δεν είχε διοχετευθεί Ar. Το χρωματογράφημα που προέκυψε φαίνεται στο Σχήμα 5.43, όπου διακρίνεται ο σχηματισμός των ATG και MADG. Το DMAG, πιθανόν, είναι περισσότερο ασταθές, επομένως, η απουσία αδρανούς ατμόσφαιρας, δεν συμβάλλει στη διατήρησή του στο μίγμα μεθυλίωσης.

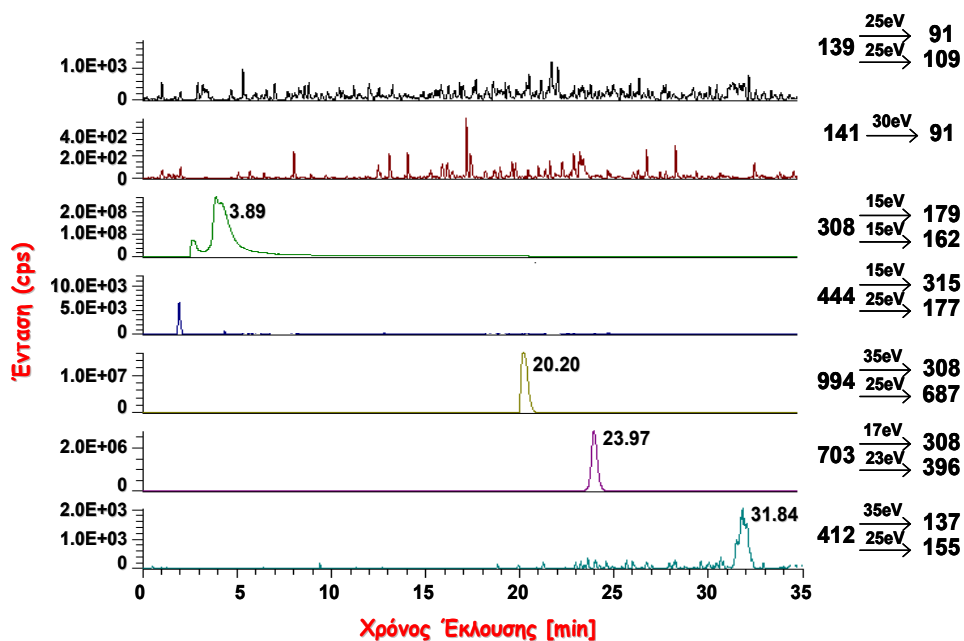


Σχήμα 5.43. Χρωματογράφημα HPLC-ESI-MS/MS-SRM του μίγματος μεθυλίωσης, έπειτα από χρόνο επώασης 1.5 hrs, απουσία ατμόσφαιρας αερίου Ar.

Είναι εμφανής η σύγκλιση στους χρόνους έκλυσης των ενώσεων στο μίγμα μεθυλίωσης και στα πρότυπα διαλύματα (Σχήμα 5.44), ενώ η ανάλυση του μίγματος μεθυλίωσης σε ατμόσφαιρα Ar, έδωσε το χρωματογράφημα του Σχήματος 5.45, όπου φαίνεται ο σχηματισμός και των τριών συμπλόκων As<sup>III</sup>-GSH.

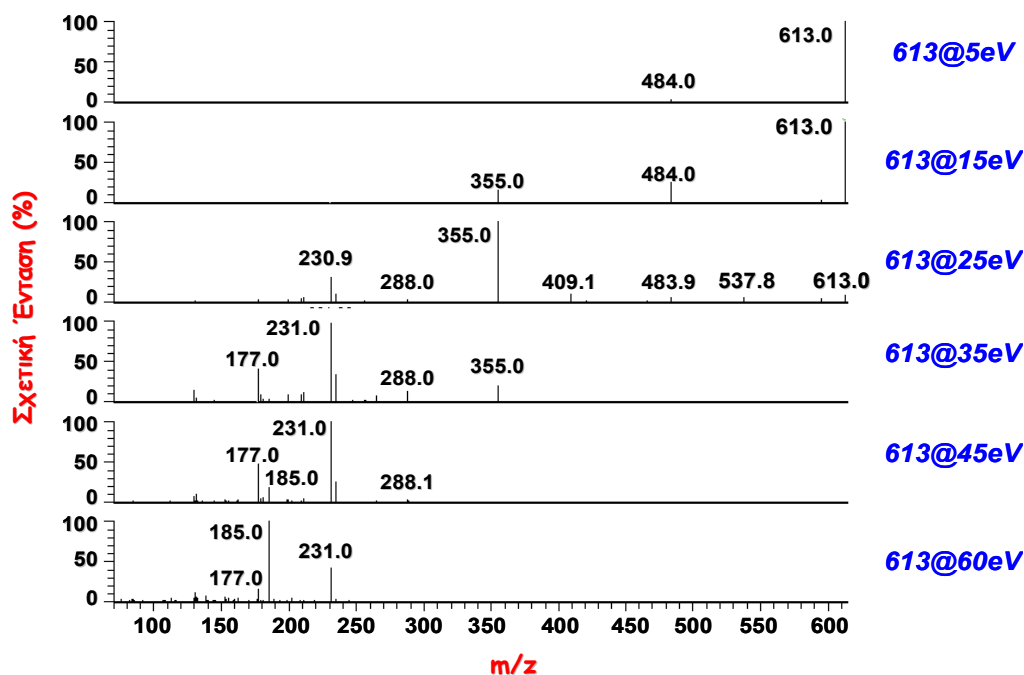


Σχήμα 5.44. Χρωματογράφημα HPLC-ESI-MS/MS-SRM των πρότυπων διαλυμάτων των ενώσεων (α) DMA<sup>V</sup> (β) MMA<sup>V</sup> (γ) GSH (δ) DMTA<sup>V</sup>-GSH, (ε) ATG, (στ) MADG και (ζ) DMAG.

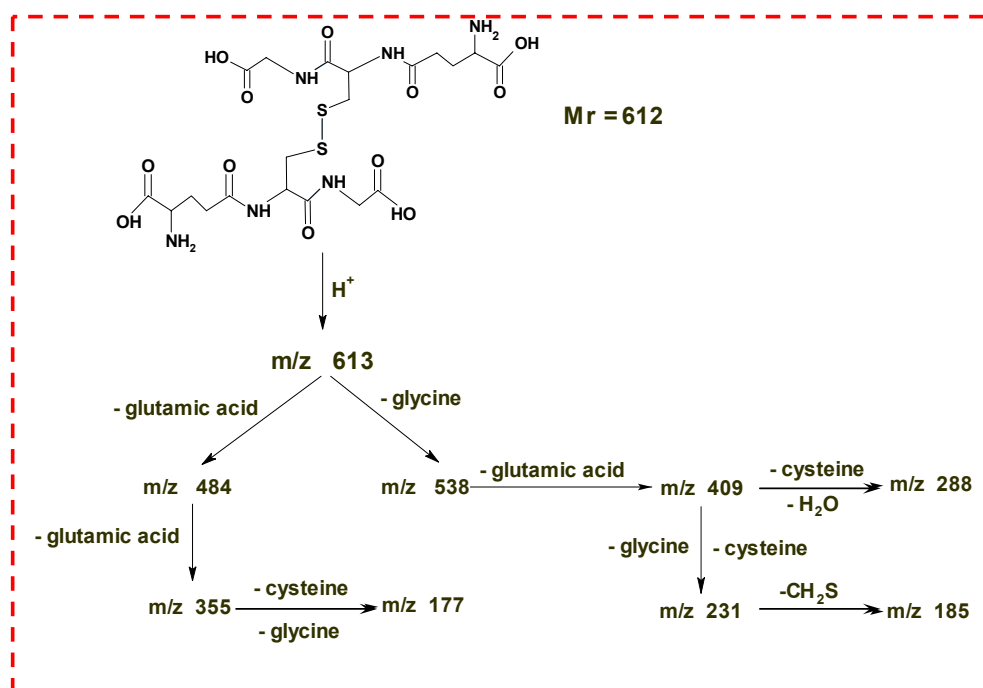


Σχήμα 5.45. Χρωματογράφημα HPLC-ESI-MS/MS-SRM του μίγματος μεθυλίωσης, έπειτα από χρόνο επώασης 1.5 hrs, παρουσία ατμόσφαιρας αερίου Ar.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η ένωση GSSG, οπότε και αναλύθηκε πρότυπο διάλυμα αυτής, που προέκυψε από την ανάμιξη διαλυμάτων GSH (15 mg/L) και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30% κ.ο.), σε κ.ο. αναλογία 1:1. Από την ανάλυση του τελικού διαλύματος, προέκυψαν τα φάσματα μάζας προϊόντων ιόντων του Σχήματος 5.46. Η προτεινόμενη πορεία διάσπασης της ένωσης δίνεται στο Σχήμα 5.47.

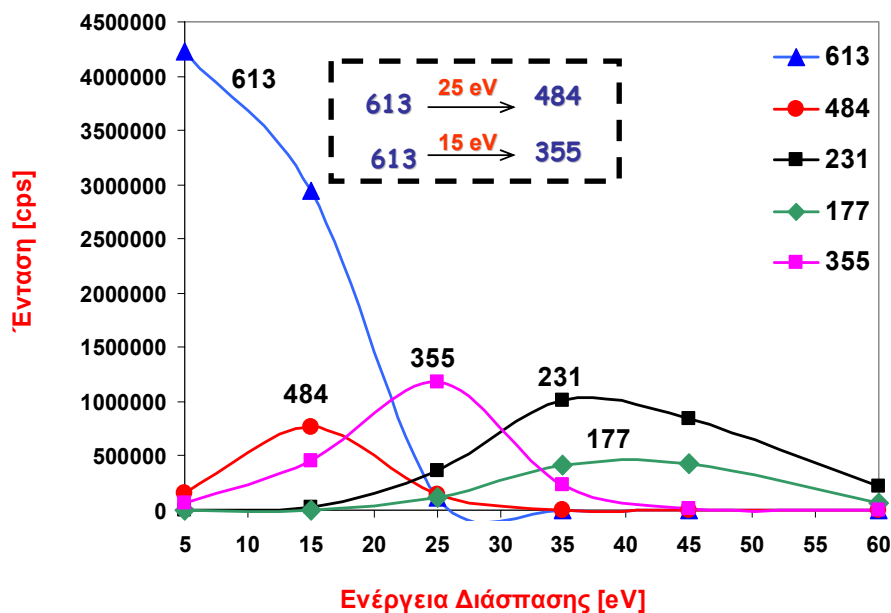


Σχήμα 5.46. Φάσματα μάζας προϊόντων ιόντων, σε ενέργειες 5-60 eV, για την ένωση GSSG.



Σχήμα 5.47. Ερμηνεία φασμάτων μάζας προϊόντων ιόντων της ένωσης GSSG.

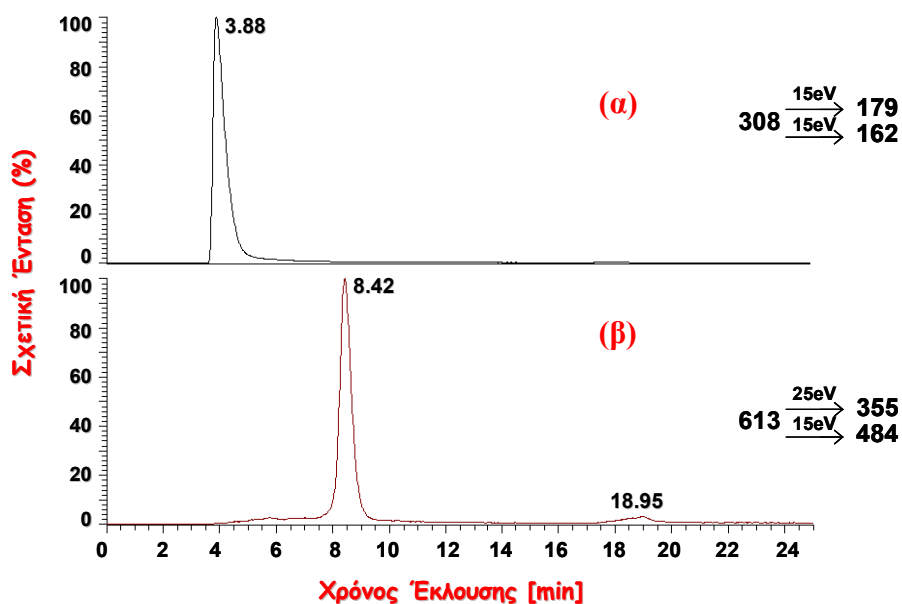
Στη συνέχεια, διαμορφώθηκαν οι καμπύλες διάσπασης για την ένωση GSSG, οι οποίες παρουσιάζονται στο Σχήμα 5.48. Στο σχήμα αυτό, φαίνονται επίσης και οι χαρακτηριστικές αντιδράσεις SRM, που διαμορφώθηκαν, για το παράγωγο αυτό.



Σχήμα 5.48. Καμπύλες διάσπασης της ένωσης GSSG.

Εφαρμόζοντας τις παραπάνω χαρακτηριστικές αντιδράσεις SRM, αλλά και αυτές της ένωσης GSH, αναλύθηκε ένα πρότυπο διάλυμα της τελευταίας, συγκέντρωσης 15 mg/L, καθώς και το αντίστοιχο διάλυμα της, στο οποίο είχε προστεθεί 30% κ.ο.  $H_2O_2$  (σε αναλογία  $GSH/H_2O_2 = 1/1$ ). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν φαίνονται στο Σχήμα 5.49.

Όπως διακρίνεται στο συγκεκριμένο χρωματογράφημα, το παράγωγο GSH εκλύεται σε χρόνο 3.88 min, ενώ για την ένωση GSSG παρατηρούνται δύο κορυφές, σε χρόνους 8.42 και 18.95 min, εκ των οποίων η πρώτη είναι αυτή που συναντάται σε μεγαλύτερη ένταση. Κατά την ανάλυση της ένωσης GSSG, με τη μέθοδο σάρωσης προϊόντων ιόντων, προέκυψε μια κορυφή σε χρόνο 8.5 min, που αντιστοιχεί στο πρωτονιωμένο μόριο της ένωσης GSSG. Επομένως, επιβεβαιώνεται ότι η πιο έντονη κορυφή σε χρόνο 8.42 min, που παρατηρείται στο παρακάτω χρωματογράφημα HPLC-ESI-MS/MS-SRM, είναι αυτή που αντιστοιχεί στο παράγωγο GSSG.



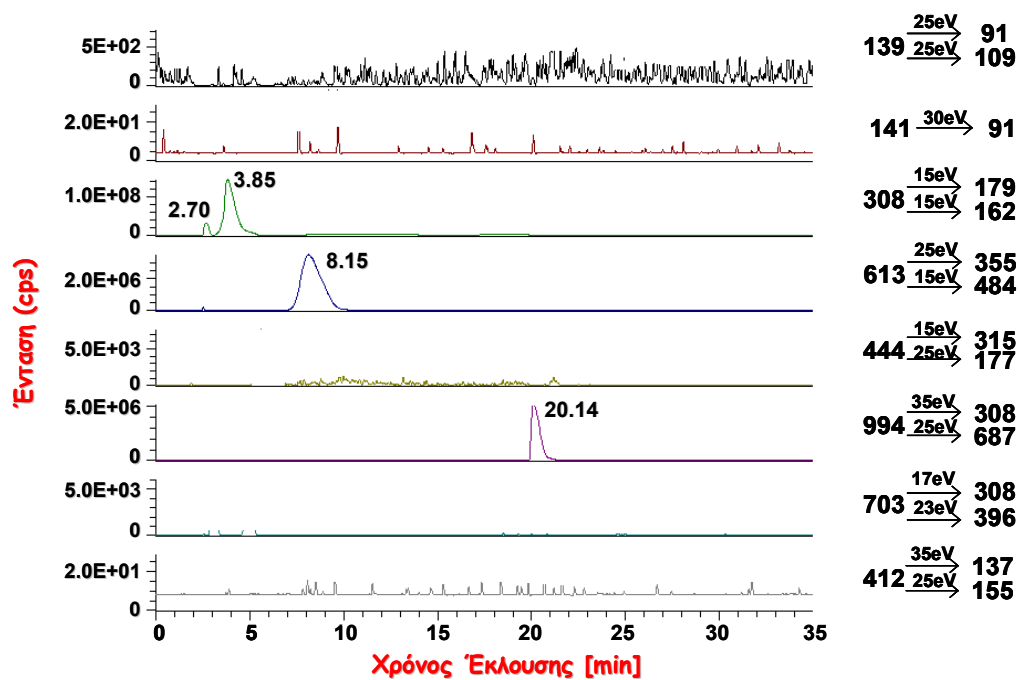
Σχήμα 5.49. Χρωματογράφημα HPLC-ESI-MS/MS-SRM των πρότυπων διαλυμάτων των ενώσεων (α) GSH και (β) GSSG.

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ο ρόλος της  $\text{CH}_3\text{B}_{12}$  ως μεθυλιωτικό μέσο, αποφασίστηκε η υλοποίηση της αντίδρασης, απουσία  $\text{CH}_3\text{B}_{12}$ , και παρουσία της μεθυλιωμένης μορφής της GSH ( $\text{CH}_3\text{-SG}$ ), ως πιθανού δότη μεθυλομάδας. Ο λόγος για τον οποίο δεν χρησιμοποιήθηκε η SAM, για το σκοπό αυτό, είναι ότι η συγκεκριμένη ένωση, για να δράσει σαν μεθυλιωτικό μέσο, απαιτεί την παρουσία ενζύμων, γεγονός που καθιστά πολύπλοκη τη μελέτη του συστήματος.

Η ανάλυση κλάσματος από μίγμα της αντίδρασης μεταξύ  $\text{NaAsO}_2$ , GSH και της  $\text{CH}_3\text{-SG}$ , οδήγησε στο χρωματογράφημα του Σχήματος 5.50. Το συγκεκριμένο μίγμα περιελάμβανε 10.5 mg/L As, 22 mM GSH και 17 mM  $\text{CH}_3\text{-SG}$ , ενώ το κλάσμα που αναλύθηκε αντιστοιχούσε σε χρόνο επώασης 40 min.

Στο σχήμα αυτό δε διακρίνεται ο σχηματισμός κανενός από τα μεθυλιωμένα παράγωγα MADG και DMAG, ενώ ο σχηματισμός του ATG ήταν αναμενόμενος, λόγω της παρουσίας της GSH στο μίγμα. Να επισημανθεί ότι η παραπάνω αντίδραση έλαβε χώρα σε αδρανή ατμόσφαιρα αερίου Ar.

Στη συνέχεια, αναλύθηκαν επιπλέον κλάσματα από το αντιδρών μίγμα, σε μεγαλύτερους χρόνους επώασης, ωστόσο, σε καμία περίπτωση, δεν παρατηρήθηκε ο σχηματισμός μεθυλιωμένων παραγώγων αρσενικού. Το γεγονός αυτό αποτελεί απόδειξη ότι στην αντίδραση μεθυλίωσης του αρσενικού, παρουσία GSH και  $\text{CH}_3\text{B}_{12}$ , η τελευταία είναι αυτή που δρά σαν δότης μεθυλομάδας.



Σχήμα 5.50. Χρωματογράφημα HPLC-ESI-MS/MS-SRM του μίγματος αντίδρασης μεταξύ αρσενικού, GSH και CH<sub>3</sub>-SG, έπειτα από χρόνο επώασης 40 min.



#### 5.4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ολοκληρώνοντας τη μελέτη σχετικά με την ανίχνευση και την ταυτοποίηση των συμπλόκων As-GSH με τεχνικές υγρής χρωματογραφίας - φασματομετρίας μάζας, αλλά και τη διερεύνηση του ρόλου που αυτά διαδραματίζουν στη μεθυλίωση του ανόργανου αρσενικού από τη  $\text{CH}_3\text{B}_{12}$ , παρουσία GSH, εξήχθησαν μια σειρά από συμπεράσματα, τα οποία παρουσιάζονται αναλυτικά παρακάτω. Να υπενθυμιστεί ότι τα σύμπλοκα που μελετήθηκαν είναι τα ATG, MADG και DMAG, στα οποία το αρσενικό συναντάται σε οξειδωτική κατάσταση +3 ( $\text{As}^{\text{III}}$ -GSH) και το ( $\text{DMTA}^{\text{V}}$ -GSH), το οποίο αποτελεί και το μοναδικό πεντασθενές σύμπλοκο  $\text{As}^{\text{V}}$ -GSH, το οποίο έχει, μέχρι σήμερα, ανιχνευτεί σε βιολογικό δείγμα. Πιο αναλυτικά, κατά τη διάρκεια της μελέτης αυτής, υλοποιήθηκαν οι παρακάτω στόχοι:

- ◆ Σύνθεση των τεσσάρων συμπλόκων As-GSH, ακολουθώντας συνθετικές πορείες που αναφέρονται σε προηγούμενες μελέτες.
- ◆ Ανάλυση των προτύπων διαλυμάτων των, συντιθέμενων στο εργαστήριο, συμπλόκων, εφαρμόζοντας την τεχνική ESI-MS/MS και τη Μέθοδο Σάρωσης Προϊόντων Ιόντων. Τα αποτελέσματα της μεθόδου αυτής, οδήγησαν στη διαμόρφωση των καμπυλών διάσπασης και των χαρακτηριστικών αντιδράσεων SRM, με συνέπεια την ανάπτυξη μεθόδου ESI-MS/MS-SRM.
- ◆ Εφαρμογή της μεθόδου ESI-MS/MS-SRM, σε συνδυασμό με χρωματογραφία HPLC αντίστροφης φάσης και τη βέλτιστη μέθοδο που αναπτύχθηκε οδήγησε στο διαχωρισμό αλλά και την εκλεκτική ανίχνευση των ενώσεων.
- ◆ Επιβεβαίωση του περιεχομένου των πρότυπων διαλυμάτων των ενώσεων As-GSH, με τη μέθοδο HPLC-ESI-MS/MS-SRM.
- ◆ Εφαρμογή της παραπάνω χρωματογραφικής μεθόδου, σε συνδυασμό με την τεχνική ICP-MS, για την επιβεβαίωση της ύπαρξης των τεσσάρων συμπλόκων As-GSH στα, συντιθέμενα στο εργαστήριο, πρότυπα διαλύματα.
- ◆ Προσδιορισμός των ορίων ανίχνευσης των τεσσάρων συμπλόκων As-GSH με τις τεχνικές HPLC-ESI-MS/MS-SRM και HPLC-ICP-MS. Όσον αφορά την τεχνική HPLC-ICP-MS, τα όρια ανίχνευσης κυμαίνονται στην περιοχή 10 - 28  $\mu\text{g/L}$ , ενώ με τη τεχνική HPLC-ESI-MS/MS-SRM, τα όρια ανίχνευσης είναι στην περιοχή 0.2 - 13  $\mu\text{g/L}$ . Αξίζει να γίνει αναφορά στα εξαιρετικά χαμηλά όρια ανίχνευσης που παρατηρούνται για την ένωση  $\text{DMTA}^{\text{V}}$ -GSH, με την τεχνική HPLC-ESI-MS/MS-SRM, γεγονός που μπορεί να

ερμηνευτεί από το γεγονός ότι η ευαισθησία της συγκεκριμένης τεχνικής εξαρτάται σημαντικά από τη δομή της εξεταζόμενης ένωσης.

- ◆ Εφαρμογή των μεθόδων HPLC-ESI-MS/MS-SRM και HPLC-ICP-MS για τη μελέτη της αντίδρασης μεθυλίωσης του ανόργανου αρσενικού από τη  $\text{CH}_3\text{B}_{12}$ , παρουσία της GSH. Για πρώτη φορά, τα σύμπλοκα  $\text{As}^{\text{III}}$ -GSH ανιχνεύτηκαν μεταξύ των προϊόντων της αντίδρασης. Επομένως, τα σύμπλοκα αυτά φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη μεθυλίωση του ανόργανου αρσενικού.
- ◆ Τα σύμπλοκα ATG και MADG εξακολουθούν να συναντώνται στο μίγμα της αντίδρασης, ακόμα και έπειτα από χρόνο επώασης ίσο με 50 hrs, ενώ, όσον αφορά το διμεθυλιωμένο σύμπλοκο DMAG, έπειτα  $t=6$  hrs, δεν ανιχνεύεται πλέον στο μίγμα της αντίδρασης. Σε ανάλυση που πραγματοποιήθηκε σε  $t=120$  hrs, επισημάνθηκε η απουσία και των τριών συμπλόκων  $\text{As}^{\text{III}}$ -GSH.
- ◆ Απουσία αδρανούς ατμόσφαιρας Ar, επισημαίνεται ο σχηματισμός μόνο των δύο συμπλόκων ATG και MADG και όχι του DMAG. Πιθανόν, το σύμπλοκο αυτό είναι περισσότερο ασταθές.
- ◆ Σε μια προσπάθεια διευκρίνησης της προέλευσης της μεθυλομάδας, η οποία ευθύνεται για τη μεθυλίωση του ανόργανου αρσενικού, δοκιμάστηκε η επίδραση ενός άλλου παραγώγου το οποίο φέρει μεθυλομάδα και αυτό είναι η μεθυλιωμένη μορφή της GSH, δηλαδή η ένωση  $\text{CH}_3\text{-SG}$ . Παρουσία της συγκεκριμένης ένωσης στο μίγμα της αντίδρασης, ωστόσο, και απουσία της  $\text{CH}_3\text{B}_{12}$  δεν λαμβάνει χώρα μεθυλίωση, γεγονός που σημαίνει ότι η  $\text{CH}_3\text{B}_{12}$  είναι αυτή που ευθύνεται για τη μεθυλίωση του αρσενικού.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ 5

- <sup>1</sup> D. J. Thompson, *Chem. Biol. Interact.*, 1993, **88**, 89.
- <sup>2</sup> J. S. Thayer, *Appl. Organomet. Chem.*, 2002, **16**, 677.
- <sup>3</sup> G. Bellomo, M. Vairetti, L. Stivala, F. Mirabelli, P. Richelmi and S. Orrenius, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1992, **89**, 4412.
- <sup>4</sup> S. Detlef and H. Sophie, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1998, **12**, 273.
- <sup>5</sup> S. Weixing, L. Junqiu, C. Mei, S. Fengrui and L. Shuying, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1999, **13**, 950.
- <sup>6</sup> G. Marjan, M. Simon, M. Anita, B. V. Julija and M. Joze, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2002, **16**, 1186.
- <sup>7</sup> A. Pompella, A. Visvikis, A. Paolicchi, V. De Tata and A. F. Casini, *Biochem. Pharmacol.*, 2003, **66**, 1499.
- <sup>8</sup> N. Scott, K. M. Hatleid, N. E. MacKenzie and D. E. Carter, *Chem. Res. Toxicol.*, 1993, **6**, 102.
- <sup>9</sup> F. Challenger, *Chem. Rev.*, 1945, **36**, 315.
- <sup>10</sup> E. A. Crecelius, *Environ. Health Perspect.*, 1977, **19**, 147.
- <sup>11</sup> M. Styblo, M. Delnomdedieu and D. J. Thomas, in *Toxicology of Metals – Biochemical Aspects. Handbook of Experimental Pharmacology*, M. G. Cherian and R. A. Goyer, Eds, Vol. 115, p. 407, Springer Verlag, Berlin.
- <sup>12</sup> W. R. Cullen, B. C. McBride and J. Reglinski, *J. Inorg. Biochem.*, 1984, **21**, 179.
- <sup>13</sup> M. Styblo, H. Yamauchi and D. J. Thomas, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1995, **135**, 172.
- <sup>14</sup> K. Nakamura, Y. Hisaeda, L. Pan and H. Yamauchi, *J. Organomet. Chem.*, 2009, **694**, 916.
- <sup>15</sup> B. K. Mandal, Y. Orga and K. T. Suzuki, *Chem. Res. Toxicol.*, 2001, **14**, 371.
- <sup>16</sup> S. Hirano, X. Cui, S. Li, S. Kanno, Y. Kobayashi and T. Hayakawa, *Arch. Toxicol.*, 2003, **77**, 305.
- <sup>17</sup> S. Hirano, Y. Kobayashi, X. Cui, S. Kanno, T. Hayakawa and A. Shraim, *Toxicol., Appl. Pharmacol.*, 2004, **198**, 458.
- <sup>18</sup> M. J. Mass, A. Tennant, B. C. Roop, W. R. Cullen, M. Styblo, D. J. Thomas and A. D. Kligerman, *Chem. Res. Toxicol.*, 2001, **14**, 355.
- <sup>19</sup> P. F. Reay and C. J. Asher, *Anal. Biochem.*, 1977, **78**, 557.
- <sup>20</sup> K. T. Suzuki, B. K. Mandal and Y. Orga, *Talanta*, 2002, **58**, 111.
- <sup>21</sup> K. T. Suzuki, B. K. Mandal, A. Katagiri, Y. Sakuma, A. Kawakami, Y. Orga, K. Yamaguchi, Y. Sei, K. Yamanaka, K. Anzai, M. Ohmichi, H. Takayama and N. Aimi, *Chem. Res. Toxicol.*, 2004, **17**, 914.
- <sup>22</sup> R. A. Zingaro, *Synthetic Methods of Organometallic and Inorganic Chemistry*, 1996, **3**, 198.

- 
- <sup>23</sup> S. V. Kala, M. W. Neely, G. Kala, C. I. Prater, D. W. Atwood, J. S. Rice and M. W. Lieberman, *J. Biol. Chem.*, 2000, **275**, 33404.
- <sup>24</sup> T. Hayakawa, Y. Kobayashi, X. Cui and S. A. Hirano, *Arch. Toxicol.*, 2005, **79**, 183.
- <sup>25</sup> S. Lin, Q. Shi, F. B. Fix, M. Styblo, M. A. Beck, K. M. Herbin-Davist, L. L. Hall, J. B. Simeonsson and D. J. Thomas, *J. Biol. Chem.*, 2002, **277**, 10795.
- <sup>26</sup> H. V. Aposhian and M. M. Aposhian, *Chem. Res. Toxicol.*, 2006, **19**, 1.
- <sup>27</sup> M. Vahter, *Sci. Prog.*, 1999, **82**, 69.
- <sup>28</sup> H. V. Aposhian, R. A. Zakharyan, M. D. Avram, M. J. Kopplin and M. L. Wollenberg, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2003, **193**, 1.
- <sup>29</sup> R. A. Zakharyan and H. V. Aposhian, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1999, **154**, 287.
- <sup>30</sup> H. P. Hogenkamp, G. T. Bratt and A. T. Kotchevar, *Biochemistry*, 1987, **26**, 4723.
- <sup>31</sup> H. P. Hogenkamp and G. T. Bratt, *Biochemistry*, 1985, **24**, 6428.
- <sup>32</sup> B. C. McBride and R. S. Wolfe, *Biochemistry*, 1971, **10**, 4312
- <sup>33</sup> J. P. Buchet and R. Lauwerys, *Arch. Toxicol.*, 1985, **57**, 125.
- <sup>34</sup> S. A. Pergantis, M. Miguens-Rodriguez, N. P. Vela and D. T. Heitkemper, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, **19**, 178.
- <sup>35</sup> A. Raab, A. A. Meharg, M. Jaspars, D. R. Genneyb and J. Feldmann, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, **19**, 183.
- <sup>36</sup> M. Styblo and D. J. Thomas, *Biochem. Pharmacol.* 1995, **49**, 971.
- <sup>37</sup> S. V. Kala, G. Kala, C. I. Prater, A. C. Sartorelli and M. W. Lieberman, *Chem. Res. Toxicol.* 2004, **17**, 243.
- <sup>38</sup> N. Burford, M. D. Eelman and K. Groom, *Inorg. Biochem.*, 2005, **99**, 1992.
- <sup>39</sup> H. R. Hansen, R. Pickford, J. Thomas-Oates, M. Jaspars and J. Feldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, **116**, 341.
- <sup>40</sup> E. Schmeisser, R. Raml, K. A. Francesconi, D. Kuehnelt, A.-L. Lindberg, C. Sörös and W. Goessler, *Chem. Commun.*, 2004, **16**, 1824.
- <sup>41</sup> M. W. Fricke, P. A. Creed, A. N. Parks, J. A. Shoemaker, C. A. Schwegel and J. T. Creed, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, **19**, 1454.
- <sup>42</sup> V. Nischwitz, K. Kanaki and S. A. Pergantis, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2006, **21**, 33.
- <sup>43</sup> A. Raab, H. Schat, A. A. Meharg and J. Feldmann, *New Phytologist*, 2005, **168**, 551.
- <sup>44</sup> A. Raab, S. H. Wright, M. Jaspars, A. A. Meharg and J. Feldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2007, **46**, 2594.
- <sup>45</sup> V. Nischwitz and S. A. Pergantis, *Anal. Chem.*, 2005, **77**, 5551.
- <sup>46</sup> Z. Hu, S. Hu, S. Gao, Y. Liu and S. Lin, *Spectrochim. Acta*, 2004, **59**, 1463.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6**

### **ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΟΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟ ΕΝΩΣΕΩΝ ΤΥΠΟΥ ΘΕΙΟ-ΑΡΣΕΝΟΣΑΚΧΑΡΩΝ ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΠΟ ΓΛΥΚΑ ΝΕΡΑ**

#### **6.1. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ – ΣΚΟΠΟΣ**

##### **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ**

Οι μελέτες προσδιορισμού των χημικών συστατικών, που συναντώνται σε υδρόβιους οργανισμούς, είναι δυνατόν να δώσουν εξαιρετικά χρήσιμα δεδομένα για το περιβάλλον που ζουν οι οργανισμοί, αλλά και για την τοξικότητα των παραπάνω συστατικών και τις συνέπειες που μπορεί να προκαλέσει στον άνθρωπο, η χρόνια κατανάλωσή τους. Είναι γνωστό ότι διαφορετικές ενώσεις αρσενικού συσσωρεύονται σε ποικίλα είδη φυτών και ζώων, που ζούν και αναπτύσσονται στο υδρόβιο περιβάλλον, και, ειδικότερα, στα θαλάσσια φύκη, τα ψάρια και τα οστρακοειδή, έχοντας σαν τελικό αποδέκτη (μέσω της τροφικής αλυσίδας) τον άνθρωπο. Η τοξικότητα του αρσενικού εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον χημικό τύπο του στοιχείου, με χαρακτηριστικό παράδειγμα το αρσενοβητάνιο (βλ. δομή στο Κεφ. 1), το οποίο αποτελεί το κύριο συστατικό των ψαριών και χαρακτηρίζεται ως μη-τοξική ένωση, ακίνδυνη για τον άνθρωπο. Από την άλλη, μερικοί οργανισμοί περιέχουν σημαντικά ποσά ανόργανου αρσενικού (το οποίο χαρακτηρίζεται από υψηλή τοξικότητα) καθώς και αρσενοσακχάρων (arsenosugars), ενώσεις άγνωστης, μέχρι σήμερα, τοξικότητας.

Τις τελευταίες δεκαετίες, έχουν πραγματοποιηθεί πολυάριθμες μελέτες ειδοταυτοποίησης του αρσενικού σε υδατικά συστήματα, οι οποίες, ωστόσο, έχουν επικεντρωθεί στο θαλάσσιο περιβάλλον. Αντίθετα, οι μελέτες που σχετίζονται με οργανισμούς που ζούν σε γλυκό νερό, είναι ιδιαίτερα σπάνιες, γεγονός που, κατά κύριο λόγο, οφείλεται στις σημαντικά χαμηλότερες συγκεντρώσεις αρσενικού στους οργανισμούς αυτούς, σε σχέση με τους αντίστοιχους θαλάσσιους.<sup>1</sup> Επίσης, τα περισσότερα ψάρια και οστρακοειδή, με τα οποία τρέφεται ο άνθρωπος, προέρχονται από το θαλάσσιο περιβάλλον, ωστόσο δε λείπουν και οι χώρες, όπως η Ουγγαρία, όπου ψάρια, τα οποία ζούν σε γλυκά νερά, αποτελούν βασικά προϊόντα της τοπικής διατροφής.<sup>1</sup>

### Θαλάσσιοι Οργανισμοί

Τα θαλάσσια φύκη προσλαμβάνουν τα ανόργανα αρσενικά (iAs<sup>III</sup>) και αρσενικά (iAs<sup>V</sup>) είδη, από το θαλάσσιο νερό και τα μεταβολίζουν, δίνοντας μια σειρά από οργανοαρσενικά παράγωγα, τα σημαντικότερα εκ των οποίων είναι τα αρσενοσάκχαρα. Από την άλλη, τα θαλάσσια μύδια περιέχουν αρσενικό σε συγκεντρώσεις της τάξης των mg/kg, με το αρσενοβητάνιο να είναι η κυρίαρχη ένωση αρσενικού στους οργανισμούς αυτούς.<sup>2</sup> Τα αρσενοσάκχαρα, τα οποία, εκτός από τα φύκη,<sup>3,4</sup> συναντώνται και σε οστρακοειδή,<sup>5,6</sup> περιέχουν στο μόριο τους ένα σάκχαρο με πέντε άτομα άνθρακα, που έχει τη δομή της φουρανόζης (Σχήμα 6.1), ενώ θεωρείται ότι μεταβολίζονται στον οργανισμό, προς σχηματισμό του αρσενοβητανίου. Τα πρώτα μέλη της σειράς ανιχνεύτηκαν σε φύκη<sup>7</sup> και είναι τα οξο-αρσενοσάκχαρα (oxo-arsenosugars) DMAsSugar-Glycol και -Sulfonate, ενώ, μέχρι σήμερα, έχουν ανιχνευτεί και ταυτοποιηθεί επιπλέον ενώσεις της κατηγορίας, γνωστές ως DMAsSugar-Phosphate, -Sulfate, -AminoSulfonate, -Methoxy, -Mannitol, -Hydroxy, -Carboxyl, -Carbamate, -Carboxyl-2, -Adenine και Sulfonate-2.<sup>8-9-10-11,12</sup> Τα οξο-αρσενοσάκχαρα που συναντώνται συχνότερα στο περιβάλλον, είναι τα -Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate, ενώ οι δομές όλων των παραπάνω ενώσεων φαίνονται στο Σχήμα 6.1.

Το 2004, ανακαλύφθηκε, σε δείγμα από μύδια, μια καινούρια κατηγορία ενώσεων, τα θειο-αρσενοσάκχαρα (thio-arsenosugars),<sup>13</sup> τα οποία έχουν παρόμοια δομή με τα αντίστοιχα οξο-αρσενοσάκχαρα, με τη διαφορά ότι, το αρσενικό, αντί για οξυγόνο, συνδέεται με άτομο θείου (Me<sub>2</sub>AsS<sup>-</sup>, Σχήμα 6.2). Τα δύο πρώτα θειο-αρσενοσάκχαρα που ανιχνεύτηκαν, είναι τα DMThioAsSugar-Glycol και -Phosphate,<sup>13</sup> ενώ ακολούθησε η ανίχνευση και ταυτοποίηση επιπλέον ενώσεων της κατηγορίας, των DMThioAsSugar-Sulfonate και -Sulfate,<sup>14,15,16</sup> καθώς και των DMThioAsSugar-Carboxyl, -Carbamate και -Adenine<sup>12</sup> (Σχήμα 6.2).

Η συντομογραφία της ονοματολογίας που χρησιμοποιείται για τα παραπάνω αρσενοσάκχαρα αποτελείται από τρία επιμέρους τμήματα:

◆ **Αριθμός μεθυλομάδων που συνδέονται με το άτομο του αρσενικού:**

DM (Di-Methyl): όταν πρόκειται για 2 μεθυλομάδες

◆ **Δεσμός As=O:**

AsSugars (οξο-αρσενοσάκχαρα)

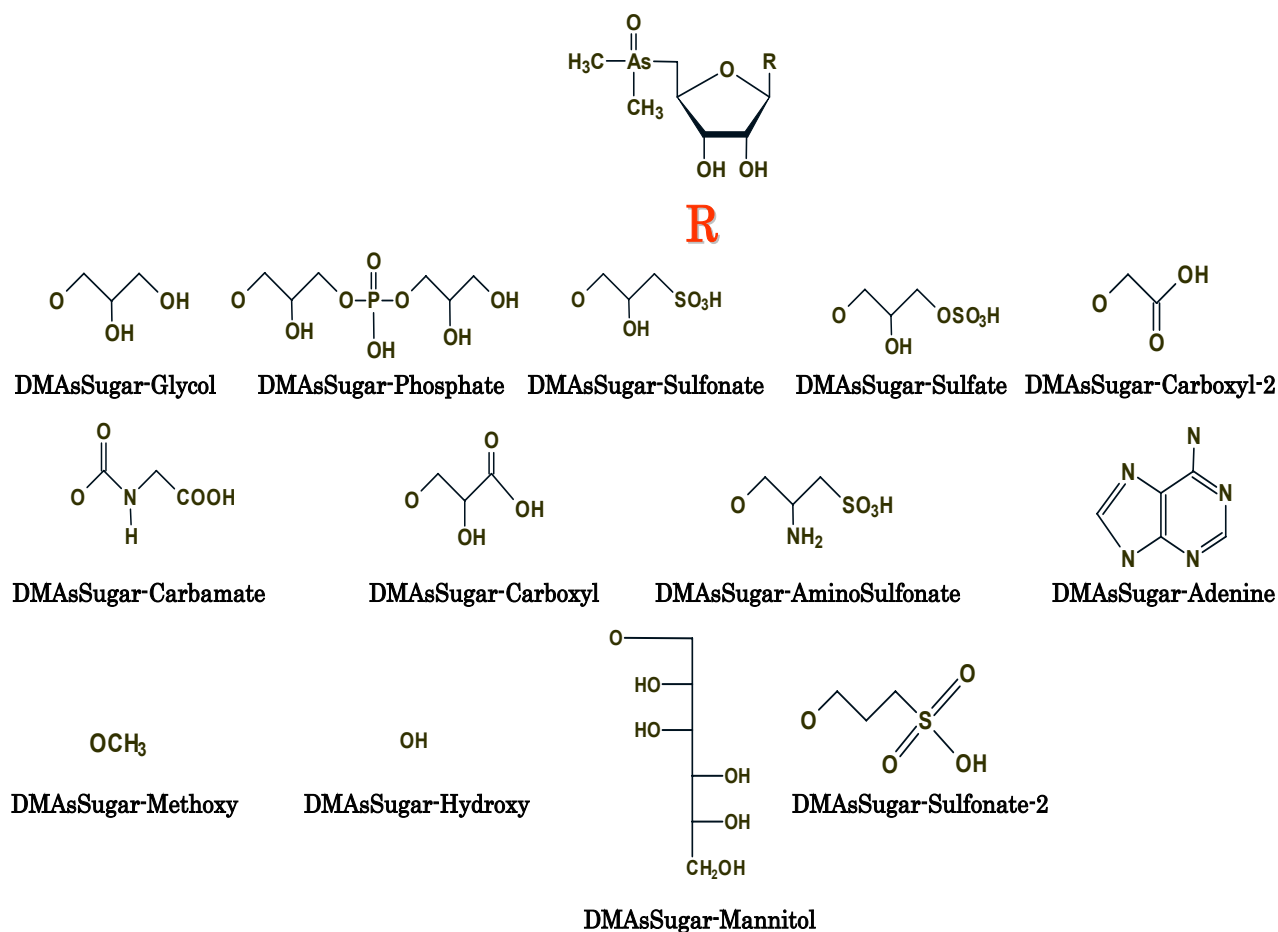
◆ **Δεσμός As=S:**

ThioAsSugars (θειο-αρσενοσάκχαρα)

◆ **Χαρακτηριστική ομάδα στην πλευρική αλυσίδα:**

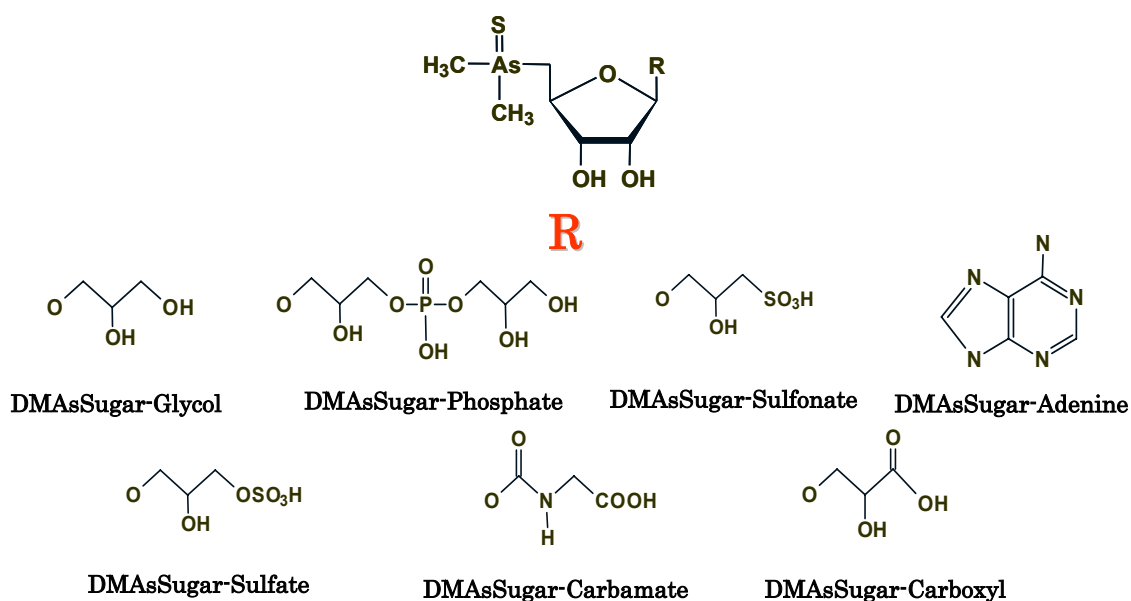
π.χ. - Glycol, -Phosphate, -Sulfonate, -Sulfate.

Οξο-αρσενοσάκχαρα



Σχήμα 6.1. Δομές των μέχρι σήμερα ταυτοποιημένων οξο-αρσενοσακχάρων.

Θειο-αρσενοσάκχαρα



Σχήμα 6.2. Δομές των μέχρι σήμερα ταυτοποιημένων θειο-αρσενοσακχάρων.

### *Οργανισμοί Γλυκού Νερού*

Σε αντίθεση με το μεγάλο αριθμό δημοσιεύσεων για την ειδοταυτοποίηση του αρσενικού σε θαλάσσιους οργανισμούς, υπάρχουν ελάχιστες μελέτες, όσον αφορά τα παράγωγα του στοιχείου σε δείγματα γλυκού νερού. Η συνολική συγκέντρωση του αρσενικού σε δείγματα του γλυκού νερού είναι σημαντικά χαμηλότερη, σε σχέση με τη συγκέντρωση του στοιχείου σε αντίστοιχα δείγματα θαλάσσιας προέλευσης,<sup>17</sup> ενώ διαφορές παρατηρούνται και όσον αφορά την ειδοταυτοποίηση του στοιχείου σε οργανισμούς από τα δύο παραπάνω περιβάλλοντα. Για παράδειγμα, το αρσενοβητάνιο αποτελεί την κυριότερη ένωση αρσενικού σε όλα τα είδη ψαριών, αλλά και στα μύδια θαλάσσιας προέλευσης, ωστόσο, μελέτες σε αντίστοιχους οργανισμούς από γλυκά νερά, οδηγούν σε αντιφατικά αποτελέσματα, όσον αφορά την ύπαρξη της συγκεκριμένης ένωσης. Έτσι λοιπόν, ενώ οι Siomi et al<sup>17</sup> και Slejkonec et al,<sup>18</sup> αναφέρουν το αρσενοβητάνιο ως το κυρίαρχο παράγωγο του στοιχείου σε ψάρια και σε μύδια του γλυκού νερού, οι Lawrence et al,<sup>19</sup> δεν κατάφεραν να ανιχνεύσουν τη συγκεκριμένη ένωση σε αντίστοιχους οργανισμούς, ενώ οι Koch et al,<sup>20</sup> την ανίχνευσαν, αλλά σε ιχνοποσότητες. Από την άλλη, οι Schaeffer et al, αναφέρουν τα οξο-αρσενοσάκχαρα, ως τα κυρίαρχα είδη αρσενικού σε φύκη, μύδια και ψάρια από ποτάμι, ενώ το αρσενοβητάνιο ανιχνεύτηκε σε ιχνοποσότητες.<sup>1</sup>

Μεταξύ των οργανισμών που ζούν στα γλυκά νερα, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα μύδια και τα σαλιγκάρια, τόσο λόγω της θέσης που κατέχουν στην τροφική αλυσίδα, όσο και λόγω του ρόλου τους σαν δείκτες περιβαλλοντικής ρύπανσης. Τα δύο παραπάνω είδη οργανισμών, αφενός μεν συμπεριλαμβάνονται στη διαίτα του ανθρώπου και, αφετέρου, καταναλώνονται ευρέως από πολλά είδη ζώων, ψαριών και πτηνών. Από την άλλη, οι οργανισμοί αυτοί, σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με άλλους οργανισμούς του γλυκού νερού, έχουν την τάση να συσσωρεύουν στους ιστούς τους διάφορα μέταλλα και μεταλλοειδή, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγεται και το αρσενικό.<sup>21,22</sup>

Η συνολική συγκέντρωση αρσενικού στα μύδια του γλυκού νερού, είναι συγκρίσιμη με τη συγκέντρωση του μεταλλοειδούς στα θαλάσσια μύδια, ωστόσο, είναι αισθητά υψηλότερη, σε σχέση με αυτή που παρατηρείται σε άλλους οργανισμούς του γλυκού νερού (σε μη-μολυσμένα νερά).<sup>20</sup> Μέχρι σήμερα, λίγες πληροφορίες είναι γνωστές σχετικά με την ειδοταυτοποίηση του αρσενικού σε μύδια από γλυκό νερό και, οι περισσότερες από αυτές, αφορούν δείγματα από περιοχές πλούσιες σε αρσενικό. Οι Koch et al, αναλύοντας εκχυλίσματα μυδιών,



κατάφεραν να ανιχνεύσουν την ένωση διμεθυλαρσενικό οξύ ( $\text{DMA}^{\text{V}}$ ), κάποια οξο-αρσενοσάκχαρα και μικρές ποσότητες ανόργανου αρσενικού ( $\text{iAs}^{\text{V}}$ ).<sup>20</sup> Σε πρόσφατη μελέτη, η οποία διεξήχθη από τους Söderöes et al, αναφέρεται, για πρώτη φορά, η ύπαρξη θειο-αρσενοσακχάρων σε οργανισμούς του γλυκού νερού και, πιο συγκεκριμένα, σε μύδια που συλλέχθηκαν από το Δούναβη στην Ουγγαρία.<sup>2</sup> Στη συγκεκριμένη μελέτη, η οποία βασίστηκε στην τεχνική HPLC-ICP-MS, ανιχνεύτηκαν τα θειο-αρσενοσάκχαρα DMThioAsSugar-Glycol και -Phosphate, καθώς και τα δύο αντίστοιχα οξο-αρσενοσάκχαρα, ενώ το αρσενοβητάνιο ανιχνεύτηκε σε μικρότερες συγκεντρώσεις και μόνο στα 3 από τα συνολικά 11 αναλυόμενα δείγματα. Σε μετέπειτα μελέτη, στην οποία, επίσης, εξετάστηκαν μύδια από το Δούναβη, προέκυψαν παρόμοια αποτελέσματα με τα προηγούμενα.<sup>1</sup>

Από την άλλη, τα σαλιγκάρια αποτελούν και αυτά πολύ σημαντικούς οργανισμούς του γλυκού νερού, που έχουν την τάση να συσσωρεύουν μέταλλα στους μαλακούς ιστούς τους.<sup>23</sup> Οι μελέτες ειδοταυτοποίησης του αρσενικού σε θαλάσσια σαλιγκάρια, αναφέρουν την ύπαρξη ενώσεων όπως το αρσενοβητάνιο (που αποτελεί την επικρατέστερη ένωση του στοιχείου και, πολλές φορές, συναντάται σε ποσοστό μέχρι και 95-98% του συνολικού αρσενικού),<sup>24,25</sup> ενώ, έχει αναφερθεί και η ύπαρξη οξο-αρσενοσακχάρων, όπως το DMAsSugar-Phosphate,<sup>26</sup> αλλά και του τετραμεθυλαρσενικού ιόντος (TMA, βλ. δομή Κεφ. 1).<sup>27</sup> Από την άλλη, οι μελέτες σε σαλιγκάρια που ζούν σε γλυκά νερά είναι εξαιρετικά περιορισμένες και αναφέρουν την ύπαρξη, στους οργανισμούς αυτούς, τόσο ανόργανου αρσενικού, όσο και της ένωσης TMA. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ανιχνεύτηκαν, σε ιχνοποσότητες, οι ενώσεις  $\text{DMA}^{\text{V}}$ ,  $\text{MMA}^{\text{V}}$ , αρσενοβητάνιο και το οξο-αρσενοσάκχαρο DMAsSugar-Glycol.<sup>28</sup> Όπως παρατηρείται, λοιπόν, ο κύκλος του αρσενικού στο θαλάσσιο περιβάλλον, παρουσιάζει διαφορές, σε σχέση με τον κύκλο του στοιχείου σε περιβάλλον γλυκού νερού.

### ΣΚΟΠΟΣ

Όπως ήδη αναφέρθηκε, τα θειο-αρσενοσάκχαρα αποτελούν μια καινούρια κατηγορία οργανοαρσενικών ενώσεων, που ανακαλύφθηκαν πρόσφατα στο θαλάσσιο περιβάλλον. Οι τέσσερις κύριες ενώσεις της κατηγορίας αυτής, οι οποίες έχουν ανιχνευτεί σε ένα σημαντικό αριθμό δειγμάτων (κυρίως οστρακοειδή και φύκη), είναι τα σάκχαρα DMThioAsSugar-Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate. Οι παραπάνω ενώσεις πρέπει, πλέον, να λαμβάνονται υπόψη, κατά τις μελέτες αποτίμησης του κινδύνου (risk assessment), που επιφυλάσσει η έκθεση

στο αρσενικό, μέσω των θαλασσινών προϊόντων διατροφής, ενώ η ύπαρξή τους περιπλέκει περισσότερο την βιοχημεία του στοιχείου στο θαλάσσιο περιβάλλον. Εικάζεται ότι οι ενώσεις αυτές σχηματίζονται *in vivo* από τα αντίστοιχα οξο-αρσενοσάκχαρα, που συναντώνται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα φύκη, με τα οποία τρέφονται τα θαλάσσια οστρακοειδή, ενώ, εναλλακτικά, είναι δυνατόν να προϋπάρχουν στα φύκη και να προσλαμβάνονται αυτούσια από τα οστρακοειδή.

Παρά το γεγονός ότι τα τέσσερα παραπάνω θειο-αρσενοσάκχαρα έχουν ανιχνευτεί σε ένα αξιοσημείωτο αριθμό δειγμάτων θαλάσσιας προέλευσης, ωστόσο, μέχρι σήμερα, έχουν αναφερθεί μόνο δύο μόνο μελέτες, σχετικά με την ύπαρξη των ενώσεων αυτών σε οργανισμούς από γλυκά νερά. Στις μελέτες αυτές εξετάστηκαν δείγματα από τον Δούναβη (φυτά, φύκη, ψάρια, μύδια, και βατράχια) και στα δείγματα αυτά ανιχνεύτηκαν δύο μόνο παράγωγα θειο-αρσενοσακχάρων, τα DMThioAsSugar-Glycol και -Phosphate.

Σκοπός της παρούσας μελέτης, ήταν η διερεύνηση της ύπαρξης των τεσσάρων πιο διαδεδομένων θειο-αρσενοσακχάρων (-Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate) σε οργανισμούς που ζουν και αναπτύσσονται σε γλυκά νερά, όπως λίμνες και ποτάμια. Επιλέχθηκαν δείγματα από μύδια και σαλιγκάρια, λόγω του ότι οι συγκεκριμένοι οργανισμοί αποτελούν προϊόντα διατροφής για τον άνθρωπο και, ταυτόχρονα, έχουν χαρακτηριστεί ως δείκτες περιβαλλοντικής ρύπανσης. Με τον τρόπο αυτό, επιδιώκεται μια πρώτη σύγκριση με τα αποτελέσματα που έχουν ήδη αναφερθεί στην βιβλιογραφία, σχετικά με την ειδοταυτοποίηση του αρσενικού σε τέτοιου είδους οργανισμούς. Παράλληλα, είναι δυνατόν να γίνουν οι πρώτες εκτιμήσεις, όσον αφορά τον κύκλο του στοιχείου στο οικοσύστημα των γλυκών νερών και κατά πόσο ο κύκλος αυτός διαφέρει από τον αντίστοιχο σε θαλάσσια συστήματα.

Η ανάλυση των δειγμάτων βασίστηκε σε μεθόδους HPLC-ICP-MS και HPLC-ESI-MS/MS-SRM, που είχαν αναπτυχθεί παλαιότερα από την ομάδα μας και είχαν εφαρμοστεί επιτυχώς, για την ανίχνευση θειο-αρσενοσακχάρων σε θαλάσσιους οργανισμούς.<sup>14</sup> Πρόκειται για ευαίσθητες και εκλεκτικές τεχνικές, ικανές να ανιχνεύσουν και να ταυτοποιήσουν ενώσεις της κατηγορίας των θειο-αρσενοσακχάρων, σε χαμηλές συγκεντρώσεις στα αναλυόμενα δείγματα. Το γεγονός ότι ενώσεις της κατηγορίας των θειο-αρσενοσακχάρων έχουν ανιχνευτεί σε ελάχιστες μόνο περιπτώσεις σε δείγματα γλυκών νερών, ενδεχομένως να σημαίνει ότι, ακόμα και αν οι ενώσεις αυτές συναντώνται σε τέτοιου είδους δείγματα, οι συγκεντρώσεις τους είναι χαμηλές. Επομένως είναι επιτακτική ανάγκη η

εφαρμογή κατάλληλων αναλυτικών τεχνικών, ικανών να ανιχνεύουν τις συγκεκριμένες ενώσεις σε χαμηλά επίπεδα συγκεντρώσεων. Ως τέτοιες, επιλέχθηκαν οι δύο παραπάνω φασματομετρικές τεχνικές. Παράλληλα, με τη συγκεκριμένη μελέτη κρίνεται και η καταλληλότητα των μεθόδων αυτών, όσον αφορά την ανάλυση οργανισμών που ζούν σε γλυκά νερά.

## 6.2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 6.2.1. ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ ΕΠΑΓΩΓΙΚΑ ΣΥΖΕΥΤΜΕΝΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ (ICP-MS) ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ HPLC

Για το διαχωρισμό των ενώσεων, χρησιμοποιήθηκε σύστημα HPLC, αποτελούμενο από την αντλία Marathon (Rigas Labs, Thessaloniki). Η χρωματογραφική μέθοδος που επιλέχθηκε βασίστηκε σε χρωματογραφία αντιστροφής φάσης με ιοντικό ζεύγος, χρησιμοποιώντας την στήλη Discovery C18 (Μήκος x Εσωτερική Διάμετρος = 150 mm x 4.6 mm, Supelco, Bellefonte, PA, USA) και την αντιστοιχη προστήλη (supelguard, Μήκος x Εσωτερική Διάμετρος = 20 mm x 4.0 mm, Discovery C18). Σαν κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε υδατικό διάλυμα, αποτελούμενο από 5 mM υδροξείδιο του τετραβούτυλαμμωνίου (TBAH, ιοντικό ζεύγος) και μεθανόλη, συγκέντρωσης 5% κ.ο. Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε στην τιμή 7.5, με την προσθήκη διαλύματος μαλονικού οξέος, ενώ εφαρμόστηκε ισοκρατική έκλυση των συστατικών, με ταχύτητα ροής εκλούσματος ίση με 1.0 mL/min και βρόχο εισαγωγής δείγματος χωρητικότητας 50  $\mu$ L.

Για την ανίχνευση των ενώσεων χρησιμοποιήθηκε το φασματόμετρο μάζας X Series ICP-MS (Thermo Fisher Scientific, Winsford, United Kingdom), με τετραπολικό αναλυτή μαζών. Κατά τη διάρκεια των αναλύσεων παρακολουθούνται τα ισότοπα  $^{75}\text{As}$  και  $^{77}\text{As}$  (πολυατομικά ιόντα  $\text{ArCl}^+$  λόγω ύπαρξης χλωρίου), ενώ οι βέλτιστες παράμετροι λειτουργίας του οργάνου δίνονται στον Πίνακα 6.1.

**Πίνακας 6.1.** Βέλτιστες παράμετροι λειτουργίας της τεχνικής ICP-MS.

Παράμετροι Λειτουργίας	Βέλτιστες Τιμές
Ροή αερίου εκνέφωσης [mL/min]	0.98
Ροή βοηθητικού αερίου [mL/min]	1.00
Ροή αερίου ψύξης [mL/min]	13.5
Ισχύς Πλάσματος [W]	1349
Βάθος λήψης δείγματος [Αυθ. Μονάδες]	90

### 6.2.2. ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ HPLC ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ ΔΙΑΔΟΧΙΚΗ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ ΙΟΝΙΣΜΟΥ ΜΕΣΩ ΗΛΕΚΤΡΟΦΕΚΑΣΜΟΥ (ESI-MS/MS) ΚΑΙ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ (SRM)

Κατά τη διάρκεια των αναλύσεων με την τεχνική HPLC-ESI-MS/MS και τη μέθοδο Παρακολούθησης Επιλεγμένων Αντιδράσεων (SRM), χρησιμοποιήθηκε το αυτοματοποιημένο σύστημα HPLC του φασματομέτρου μάζας TSQ Quantum (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA). Επιλέχθηκε χρωματογραφία ανιονανταλλαγής, χρησιμοποιώντας τη στήλη PRPX-100 (Μήκος x Εσωτερική Διάμετρος = 250 x 4.1 mm, Hamilton, Reno, NV, USA), πριν από την οποία τοποθετήθηκε η αντιστοιχη προστήλη. Για το διαχωρισμό των συστατικών εφαρμόστηκε βαθμιδωτή έκλυση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη Α υδατικό διάλυμα  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , συγκέντρωσης 20 mM και ως διαλύτη Β υδατικό διάλυμα  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , συγκέντρωσης 20 mM και περιεκτικότητας σε μεθανόλη 40% κ.ο. Το pH των διαλυμάτων ρυθμίστηκε στην τιμή 10, με τη χρήση διαλύματος  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Επιλέχθηκε ταχύτητα ροής του εκλούσματος 1 mL/min (το 24% οδηγείται στην πηγή ιονισμού και το υπόλοιπο στα απόβλητα) και βρόχος εισαγωγής δείγματος χωρητικότητας 20  $\mu\text{L}$ . Το πρόγραμμα έκλυσης παρουσιάζεται στον Πίνακα 6.2.

**Πίνακας 6.2.** Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλυσης της μεθόδου HPLC-ESI-MS/MS.

Χρόνος (min)	Διαλύτης Α (%)	Διαλύτης Β (%)	Μεθανόλη (%)
0	75	25	10
5	75	25	10
6	0	100	40
30	0	100	40
30.5	75	25	10
35	75	25	10

Για τον εκλεκτικό προσδιορισμό των όξο- και θειο-αρσενοσακχάρων εφαρμόστηκε η μέθοδος SRM, η οποία είχε αναπτυχθεί παλαιότερα από την ομάδα μας<sup>14</sup> ενώ για μεγαλύτερη εκλεκτικότητα, παρακολουθούνται δύο χαρακτηριστικές αντιδράσεις για κάθε πρόδρομο ιόν. Στον Πίνακα 6.3, παρουσιάζονται οι αντιδράσεις SRM για τα τέσσερα οξο-αρσενοσάκχαρα -Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate και για τα αντιστοιχα θειο-αρσενοσάκχαρα.<sup>14</sup>

Πίνακας 6.3. Χαρακτηριστικές αντιδράσεις SRM για τα οξο- και θειο-αρσενοσάκχαρα.

Ένωση	Πρόδρομο Ιόν (m/z)	Προϊόν Ιόν (m/z)	Ενέργεια Διάσπασης (eV)
DMAsSugar-Glycol	329	237	15
		97	25
DMAsSugar-Phosphate	483	237	25
		97	40
DMAsSugar-Sulfonate	393	237	20
		97	30
DMAsSugar-Sulfate	409	329	15
		97	35
DMThioAsSugar-Glycol	345	253	10
		97	20
DMThioAsSugar-Phosphate	499	253	15
		97	27
DMThioAsSugar-Sulfonate	409	253	15
		97	25
DMThioAsSugar-Sulfate	425	253	15
		97	30

### 6.2.3. ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Για τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια:

- Όξινο ανθρακικό αμμώνιο,  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (puriss., Riedel-de Haen, Seelze, Germany).
- Διάλυμα υδροξειδίου του αμμωνίου,  $\text{NH}_4\text{OH}$  (puriss., p.a., Fluka, Buchs, Switzerland).
- Υδροξείδιο του τετραβουτυλαμμωνίου, TBAH 30-hydrate (>99.0%, Fluka, Buchs, Switzerland).
- Μαλονικό οξύ (>99.0%, Fluka, Buchs, Switzerland).
- Μεθανόλη (gradient grade HPLC, Merck, Darmstadt, Germany).
- Υδροχλωρικό οξύ (37%, puriss., p.a., Riedel-de Haen, Seelze, Germany).
- Σουλφίδιο του διοθενούς σιδήρου ( $\text{Fe}^{\text{II}}\text{S}$ ) σε μορφή ράβδων (Riedel-de Haen, Seelze, Germany).

#### 6.2.4. ΔΕΙΓΜΑΤΑ

##### *“kelp-1”, “kelp-2”*

Εμπορικά δείγματα από φύκη (σε μορφή σκόνης), канаδικής προέλευσης, τα οποία προμηθεύτηκαν το 1999 (*“kelp-1”*, Galloway’s, Richmond, BC, Canada, batch no: 231-0390-13) και 2005 (*“kelp-2”* Galloway’s, Richmond, BC, Canada, batch no: 231-0390-15).

Η μέθοδος εκχύλισης που εφαρμόστηκε για τα δύο δείγματα “kelp-1” και “kelp-2”, περιελάμβανε τα παρακάτω στάδια:

- ✓ Εκχύλιση του στερεού με απιονισμένο νερό (όγκος νερού/ μάζα στερεού ~ 20 mL/ g).
- ✓ Ανακίνηση του αιωρήματος (συσσκευή περιδίνησης - vortex) για 10 min, έως ότου επιτευχθεί ομογενοποίηση του.
- ✓ Φυγοκέντριση του αιωρήματος για 15 min.
- ✓ Απομάκρυνση – Χρήση του υπερκείμενου υγρού.

Τα έκχυλίσματα των δύο παραπάνω δειγμάτων “kelp-1” και “kelp-2”, χρησιμοποιήθηκαν ως διαλύματα αναφοράς, για τα οξο- και θειο- αρσενοσάκχαρα, αντίστοιχα. Επίσης, ως πρότυπο διάλυμα για τα τέσσερα θειο-αρσενοσάκχαρα DMThioAsSugar-Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate χρησιμοποιήθηκε και το δείγμα “kelp-1\_H<sub>2</sub>S”, το οποίο παρασκευάστηκε από το έκχυλιμα του δείγματος “kelp-1”, έπειτα από τη διαβίβαση σε αυτό αερίου H<sub>2</sub>S. Το τελευταίο προήλθε από την αντίδραση του σουλφιδίου του δισθενούς σιδήρου (Fe<sup>II</sup>S) με υδροχλωρικό οξύ (HCl, 10% κ.ο).

##### *Μύδια που ζούν σε περιβάλλον γλυκού νερού (ποτάμι)*

Το συγκεκριμένο δείγμα ονομάστηκε *“mussel”* και συλλέχθηκε από ποτάμι (Quinsam River) στον Καναδά. Μετά τη συλλογή του, το δείγμα υπέστη λυοφιλίωση και στάλθηκε στο εργαστήριο μας με τη μορφή σκόνης. Πριν την ανάλυση, το δείγμα εκχυλίστηκε με απιονισμένο νερό (όγκος νερού/ μάζα στερεού ~ 50 mL/ g), μέσω ομογενοποίησης του έκχυλίσματος και τοποθέτησής του σε λουτρό υπερήχων για 10 min. Ακολούθησε φυγοκέντριση του ομογενοποιημένου έκχυλίσματος (15 min) και, τέλος, απομάκρυνση, φιλτράρισμα και άμεση ανάλυση του υπερκείμενου υγρού.

### Σαλιγκάρια που ζούν σε περιβάλλον γλυκού νερού (Λίμνη)

Πρόκειται για σαλιγκάρια (Εικόνα 1) που συλλέχθηκαν από την λίμνη Magic Lake στον Καναδά. Αναλύθηκαν συνολικά τρία δείγματα (“snail-1”, “snail-2” και “snail-3”), τα οποία διαφέρουν ως προς την ηλικία. Το δείγμα “snail-1” ανήκει σε αυγά σαλιγκαριών, το δείγμα “snail-2” σε ενήλικο σαλιγκάρι και το δείγμα “snail-3” σε σαλιγκάρι ηλικίας 2 μηνών. Μετά τη συλλογή τους, τα παραπάνω δείγματα υπέστησαν λυοφιλίωση και στάλθηκαν στο εργαστήριο μας ως στερεά. Πριν την ανάλυσή τους, εκχυλίστηκαν με απιονισμένο νερό (όγκος νερού/μάζα στερεού ~ 10 mL/g, 15 mL/g και 20 mL/g για τα δείγματα “snail-1”, “snail-2” και “snail-3”, αντίστοιχα), μέσω ομογενοποίησης του εκχυλίσματος και τοποθέτησής του σε λουτρό υπερήχων (10 min). Ακολούθησε φυγοκέντριση του ομογενοποιημένου εκχυλίσματος (15 min) και, στη συνέχεια, απομάκρυνση και φιλτράρισμα του υπερκείμενου υγρού, το οποίο αναλύθηκε άμεσα.



**Εικόνα 1:** Σαλιγκάρια από τη λίμνη Magic Lake στον Καναδά.



### 6.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

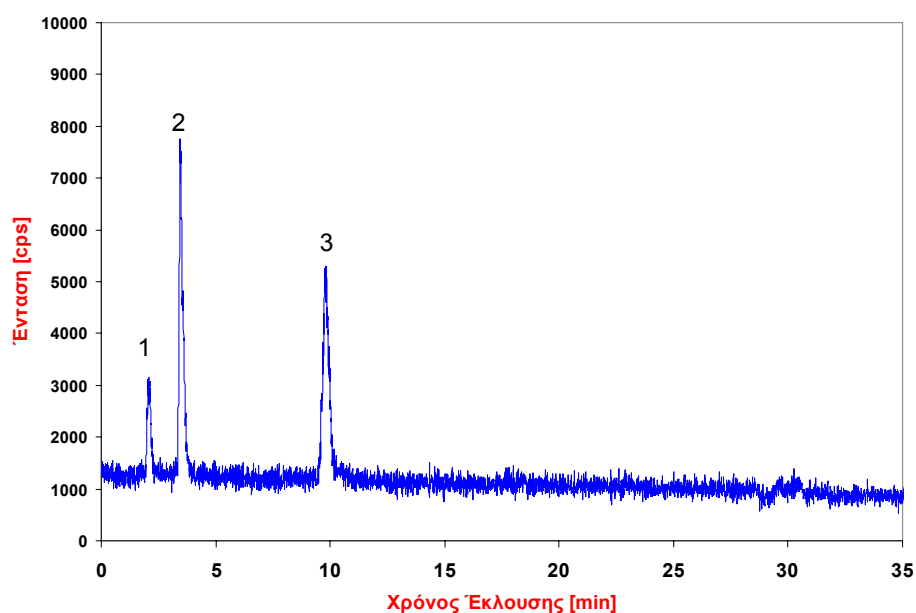
Όπως ήδη αναφέρθηκε, τα θειο-αρσενοσάκχαρα αποτελούν μια κατηγορία ενώσεων, που ανακαλύφθηκε πρόσφατα σε βιολογικά δείγματα θαλάσσιας προέλευσης. Στο εργαστήριο μας, αναπτύχθηκαν μέθοδοι HPLC-ICP-MS και HPLC-ESI-MS/MS-SRM, βασισμένες σε χρωματογραφία αντιστροφής φάσης με ιοντικό ζεύγος και χρωματογραφία ανιονανταλλαγής, αντίστοιχα, με σκοπό την εκλεκτική ανίχνευση των ενώσεων αυτών, σε βιολογικά δείγματα θαλάσσιας προέλευσης.<sup>14</sup> Σε προηγούμενη μελέτη μας, εφαρμόζοντας τις παραπάνω μεθόδους, επιτεύχθηκε η ανίχνευση των τεσσάρων, πιο διαδεδομένων, θειο-αρσενοσακχάρων DMThioAsSugar-Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate, σε δείγματα θαλάσσιων οστρακοειδών, αλλά και, για πρώτη φορά, σε δείγματα από φύκη.<sup>14</sup>

Στην παρούσα μελέτη, εξετάστηκε η ύπαρξη των παραπάνω τεσσάρων ενώσεων, σε μύδια και σαλιγκάρια, τα οποία ζούν σε περιβάλλον γλυκού νερού. Μέχρι σήμερα, έχουν αναφερθεί δύο μόνο μελέτες για την ύπαρξη τέτοιων ενώσεων σε οργανισμούς γλυκού νερού.<sup>2,1</sup>

#### *Δείγμα από Μύδια “mussel”*

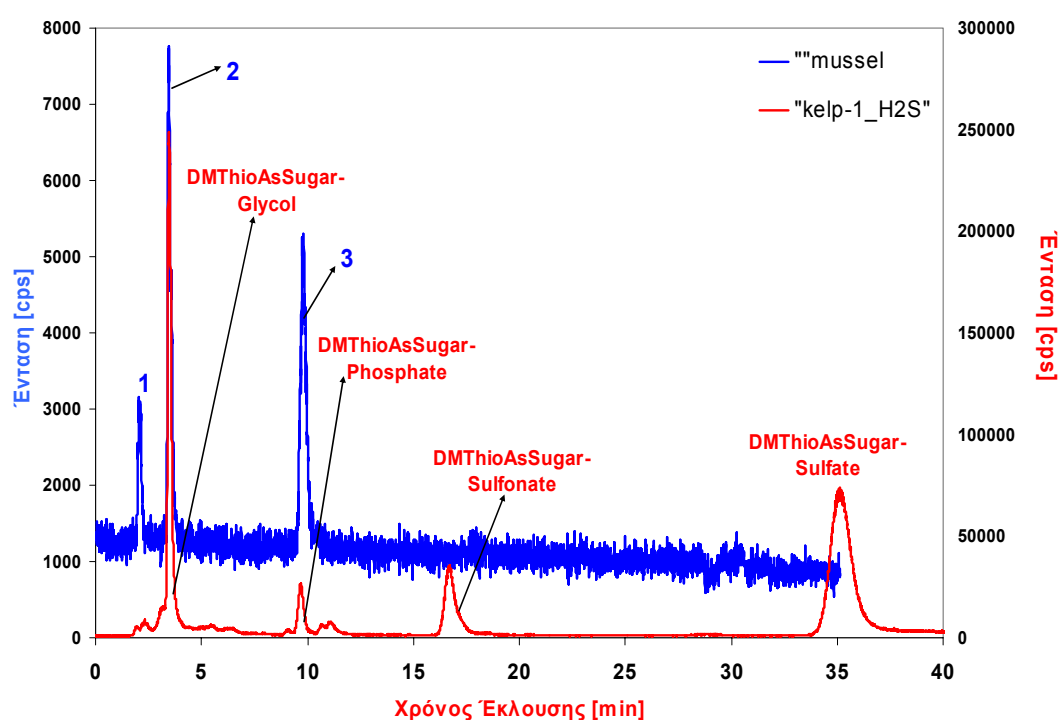
##### **(α) HPLC-ICP-MS**

Αρχικά, αναλύθηκε το δείγμα από μύδια (“mussel”), το οποίο προμηθεύτηκε από τον Καναδά, με τη μορφή στερεού λυοφιλιωμένου δείγματος. Η ανάλυση του εκχυλίσματος του δείγματος αυτού, έδωσε το χρωματογράφημα του Σχήματος 6.3.



Σχήμα 6.3. Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS του δείγματος από μύδια “mussel”.

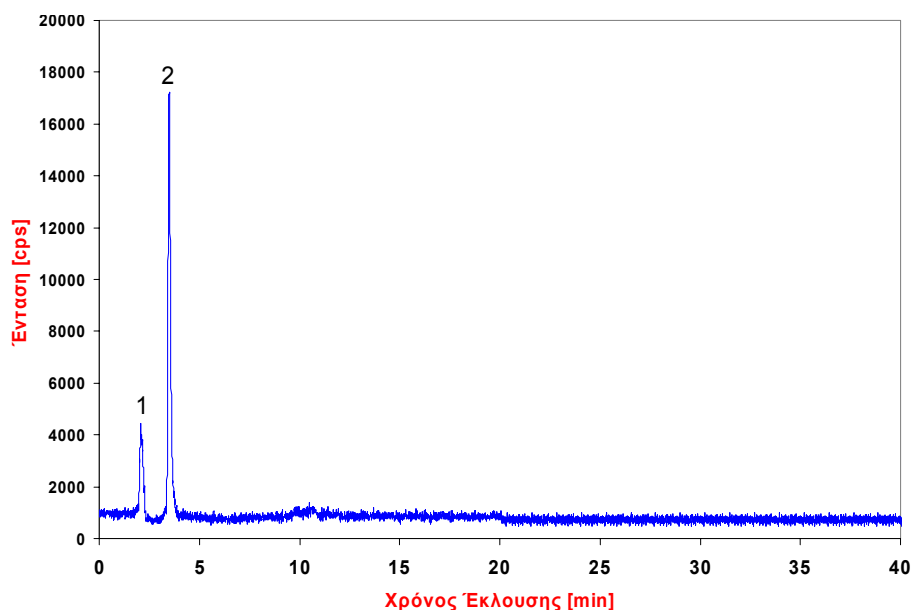
Στο χρωματογράφημα αυτό διακρίνονται 3 κορυφές αρσενικού, σε χρόνους 2.06, 3.46 και 9.83 min, αντίστοιχα. Για την ταυτοποίηση των κορυφών αυτών, αναλύθηκε το δείγμα “kelp-1\_H<sub>2</sub>S”, το οποίο, όπως είναι γνωστό από προηγούμενη μελέτη μας,<sup>14</sup> περιέχει τα τέσσερα θειο-αρσενοσάκχαρα DMThioAsSugar-Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate, σε υψηλές συγκεντρώσεις. Το χρωματογράφημα που προέκυψε από την ανάλυση του δείγματος αυτού, συγκρίθηκε με το χρωματογράφημα του δείγματος “mussel”, και διαπιστώθηκε ότι οι χρόνοι της 2<sup>ης</sup> και 3<sup>ης</sup> κορυφής συγκλίνουν με τους χρόνους που παρατηρήθηκαν για τα θειο-αρσενοσάκχαρα DMThioAsSugar-Glycol και -Phosphate, αντίστοιχα (Σχήμα 6.4).



**Σχήμα 6.4.** Σύγκριση των χρωματογραφημάτων των δειγμάτων “kelp-1\_H<sub>2</sub>S” και “mussel”. Στον άξονα δεξιά φαίνεται η ένταση <sup>75</sup>As για το δείγμα αναφοράς “kelp-1\_H<sub>2</sub>S” και στον άξονα αριστερά η αντίστοιχη ένταση για το δείγμα “mussel”.

Προκειμένου να εξακριβωθεί αν οι κορυφές 2 και 3 του παραπάνω σχήματος ανήκουν σε θειο-αρσενοσάκχαρα, αποφασίστηκε η προσθήκη οξειδωτικού στο δείγμα “mussel”, οπότε, στην περίπτωση που οι συγκεκριμένες κορυφές ανήκουν σε τέτοιες ενώσεις, αναμένεται η οξείδωσή τους, όπως έχει διαπιστωθεί στη βιβλιογραφία.<sup>14</sup> Σαν οξειδωτικό μέσο επιλέχθηκε το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30% κ.ο., με κ.ο. αναλογία δείγμα/ οξειδωτικό = 90/10). Το δείγμα που

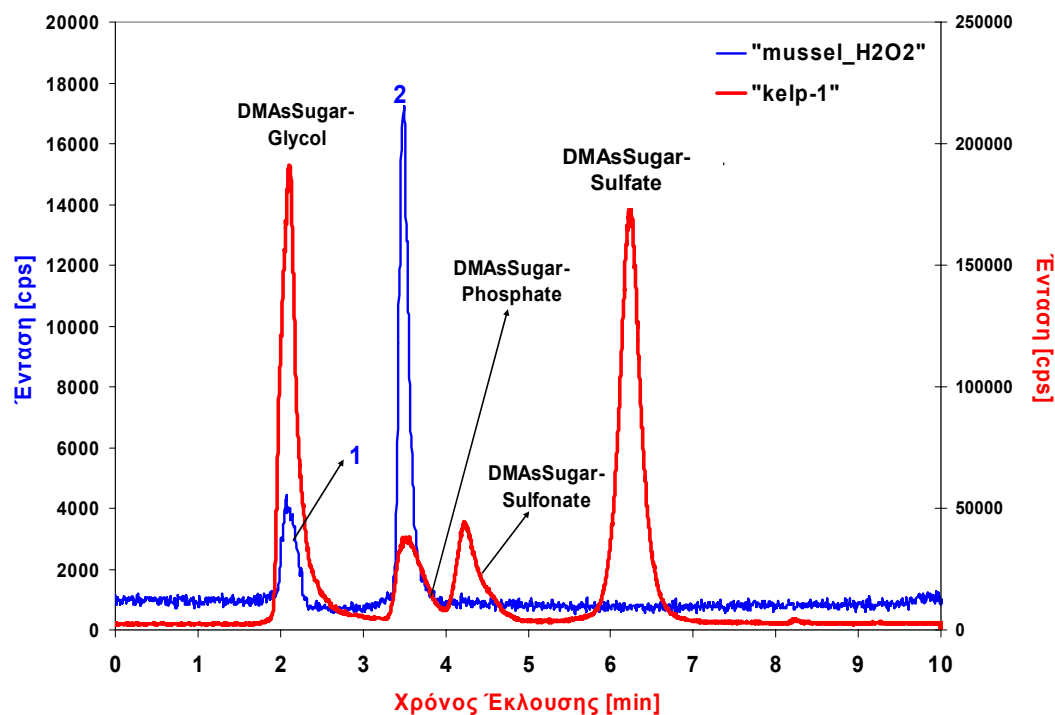
προέκυψε ονομάστηκε “mussel\_H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>”, ενώ η ανάλυσή του, με HPLC-ICP-MS, έδωσε το χρωματογράφημα του Σχήματος 6.5.



Σχήμα 6.5. Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS του δείγματος “mussel\_H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>”.

Μετά την προσθήκη του οξειδωτικού στο δείγμα “mussel”, η κορυφή 3 εξαφανίστηκε ενώ οι κορυφές 1 και 2 παρέμειναν και η έντασή τους αυξήθηκε αισθητά. Αυτό σημαίνει ότι, η ένωση η οποία αντιστοιχεί στην κορυφή 3, υπέστη οξείδωση και μετατράπηκε σε κάποια από τις ενώσεις, που αντιστοιχούν στις κορυφές 1 και 2. Οι παραπάνω παρατηρήσεις, ενισχύουν την αρχική υπόθεση ότι η κορυφή 3 ανήκει στο θειο-αρσενοσάκχαρο DMThioAsSugar-Phosphate, το οποίο, αφού οξειδωθεί από το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, μετατρέπεται στο αντίστοιχο οξο-αρσενοσάκχαρο. Από την άλλη, η κορυφή 2, για την οποία υπήρχε αρχικά η εκτίμηση ότι αντιστοιχεί στο θειο-αρσενοσάκχαρο DMThioAsSugar-Glycol, διαπιστώνεται ότι τελικά δεν ανήκει σε παράγωγο της κατηγορίας αυτής, αφού δεν έλαβε χώρα η αναμενόμενη οξείδωση. Για να διαπιστωθεί η ταυτότητα των κορυφών 1 και 2, αναλύθηκε το δείγμα αναφοράς “kelp-1”, το οποίο περιέχει τις ενώσεις DMAsSugar-Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate.<sup>14</sup>

Στο Σχήμα 6.6, φαίνεται η σύγκριση των χρωματογραφημάτων των δειγμάτων “kelp-1” και “mussel\_H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>”. Είναι εμφανής η σύγκλιση στους χρόνους έκλυσης των κορυφών 1 και 2, με αυτούς των οξο-αρσενοσάκχαρων -Glycol και -Phosphate.



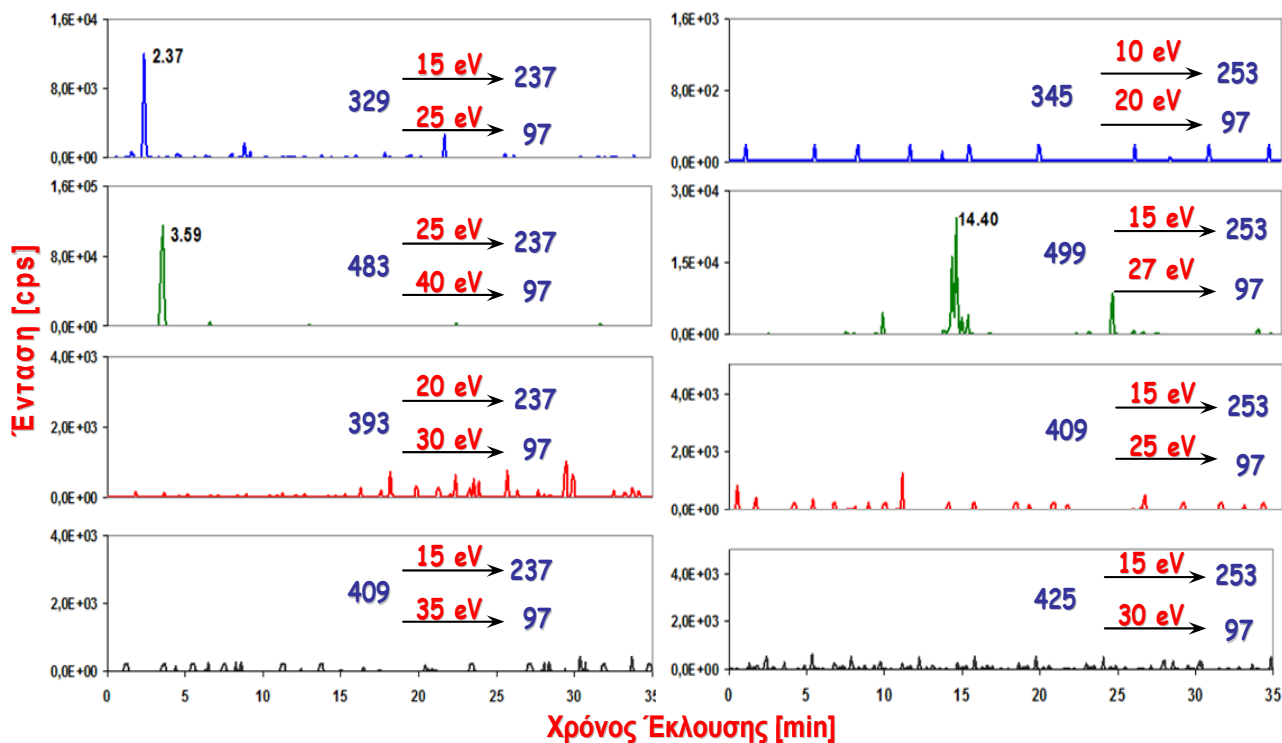
**Σχήμα 6.6.** Σύγκριση των χρωματογραφημάτων των δειγμάτων “kelp-1” και “mussel\_H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>”. Στον άξονα δεξιά φαίνεται η ένταση <sup>75</sup>As για το δείγμα αναφοράς “kelp-1” και στον άξονα αριστερά η αντίστοιχη ένταση για το δείγμα “mussel\_H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>”.

Η αύξηση της έντασης της κορυφής 2, μετά την προσθήκη του οξειδωτικού, οφείλεται στη μετατροπή του θειο-αρσενοσακχάρου DMThioAsSugar-Phosphate (κορυφή 3), στο αντίστοιχο οξο-αρσενοσακχαρο (κορυφή 2). Η ενίσχυση της κορυφής 1, θα περίμενε κανείς να οφείλεται, αντίστοιχα, στην οξείδωση του θειο-αρσενοσακχάρου DMThioAsSugar-Glycol στο αντίστοιχο οξο-αρσενοσακχαρο. Ωστόσο, το DMThioAsSugar-Glycol δεν ανιχνεύτηκε στο δείγμα, οπότε εικάζεται ότι η συγκεκριμένη ένωση, να μεν συναντάται στο αναλυόμενο δείγμα, αλλά σε χαμηλή συγκέντρωση (τέτοια που είναι αδύνατη η ανίχνευσή της), και με την προσθήκη του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> οξειδώνεται και δίνει την ένωση DMAsSugar-Glycol (κορυφή 1). Η χρωματογραφική ανάκτηση για το δείγμα “mussel” υπολογίστηκε ίση με 97%.

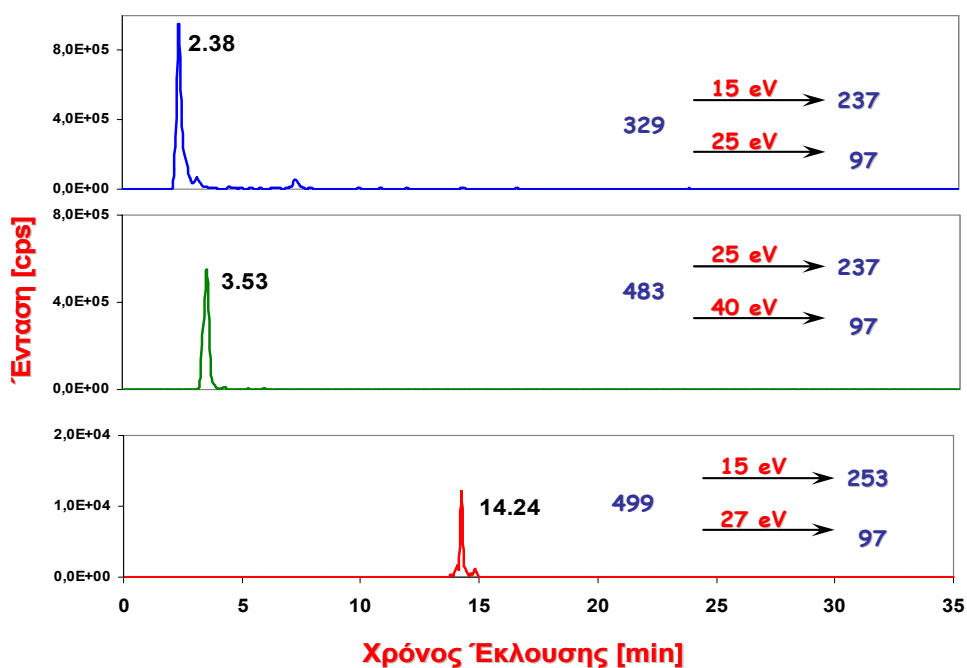
### (β) HPLC-ESI-MS/MS-SRM

Ακολούθησε η ανάλυση του δείγματος “mussel” με τη μέθοδο HPLC-ESI-MS/MS-SRM. Παρακολουθώντας, λοιπόν, τις χαρακτηριστικές αντιδράσεις SRM του Πίνακα 6.3, προέκυψε το χρωματογράφημα του Σχήματος 6.7, στο οποίο επιβεβαιώνεται η ύπαρξη των ενώσεων DMAsSugar-Glycol, DMAsSugar-

Phosphate και DMThioAsSugar-Phosphate, σε χρόνους έκλυσης 2.37, 3.59 και 14.40 min, αντίστοιχα. Οι χρόνοι αυτοί βρίσκονται σε πλήρη συμφωνία με τους χρόνους έκλυσης των ενώσεων στο εκχύλιμα του δείγματος “kelp-2” (Σχήμα 6.8), το οποίο χρησιμοποιείται σαν δείγμα αναφοράς.



Σχήμα 6.7. Χρωματογράφημα HPLC-ESI-MS/MS-SRM του δείγματος “mussel”.



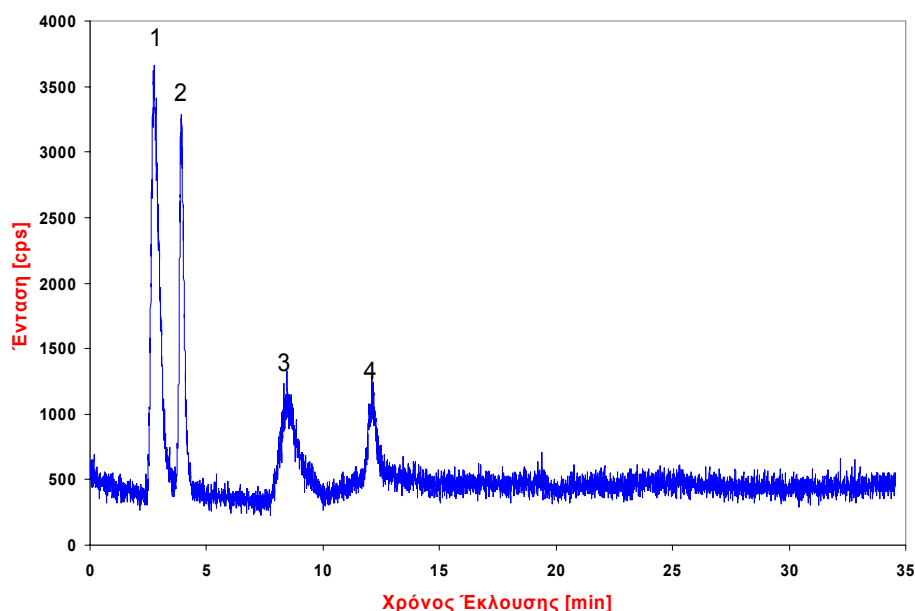
Σχήμα 6.8. Χρωματογράφημα HPLC-ESI-MS/MS-SRM του δείγματος αναφοράς “kelp-2”.

Επομένως, διασταυρώνοντας τα αποτελέσματα, με τις δύο τεχνικές HPLC-ICP-MS και HPLC-ESI-MS/MS-SRM, προκύπτει ότι, στο δείγμα “mussel”, περιέχονται τα δύο οξο-αρσενοσάκχαρα DMAsugar-Glycol και –Phosphate, καθώς και το θειο-αρσενοσάκχαρο DMThioAsSugar-Phosphate.

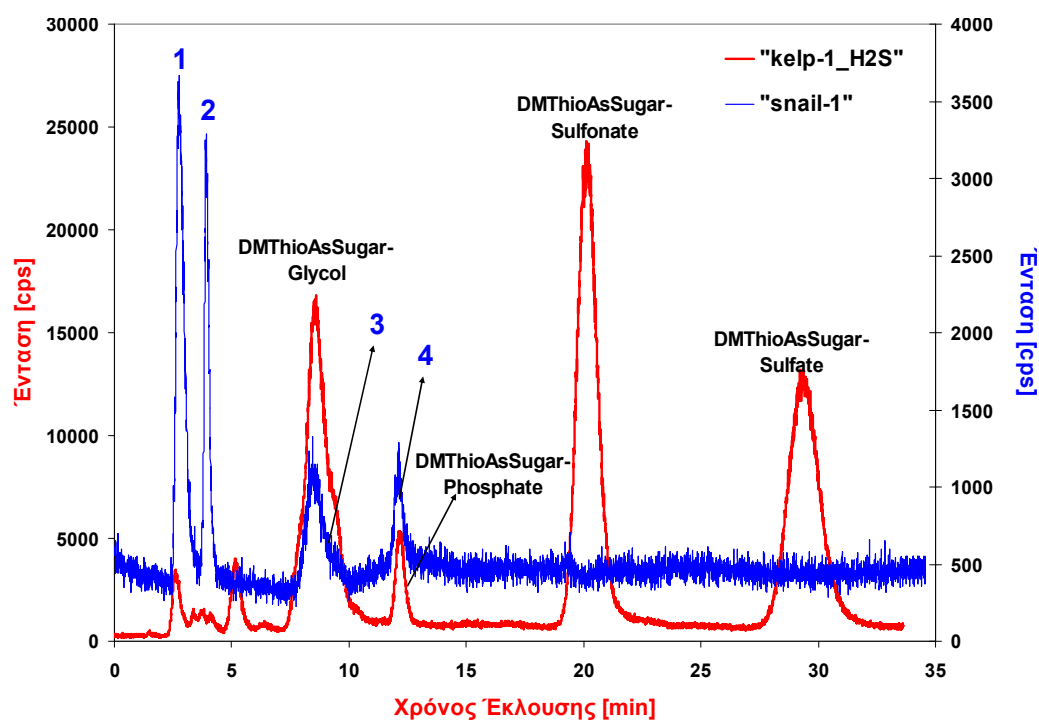
### Δείγμα από σαλιγκάρια “snail-1”

Στη συνέχεια, αναλύθηκε το δείγμα “snail-1”, το οποίο ανήκει σε αυγά από σαλιγκάρια, που συλλέχθηκαν από τη λίμνη Magic Lake, στην περιοχή Pender Island του Καναδά. Από την ανάλυση του δείγματος, προέκυψε το χρωματογράφημα του Σχήματος 6.9, όπου παρατηρούνται τέσσερις κορυφές για το αρσενικό, σε χρόνους έκλουσης 2.75, 3.93, 8.54 και 12.1 min. Ακολούθησε η ανάλυση του δείγματος αναφοράς “kelp-1\_H<sub>2</sub>S” και η σύγκριση του χρωματογραφήματος που προέκυψε, με το χρωματογράφημα του δείγματος “snail-1” φαίνεται στο Σχήμα 6.10.

Η σύγκριση αυτή αποκάλυψε την ταύτιση που υπάρχει στους χρόνους έκλουσης των κορυφών 3 και 4, με τους αντίστοιχους των θειο-αρσενοσακχάρων – Glycol και –Phosphate.

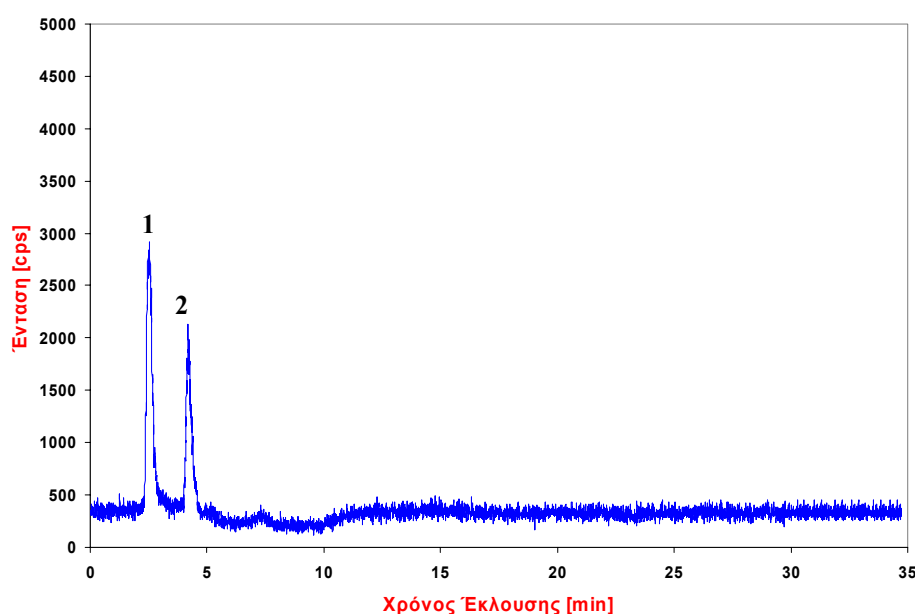


Σχήμα 6.9. Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS του δείγματος “snail-1”.



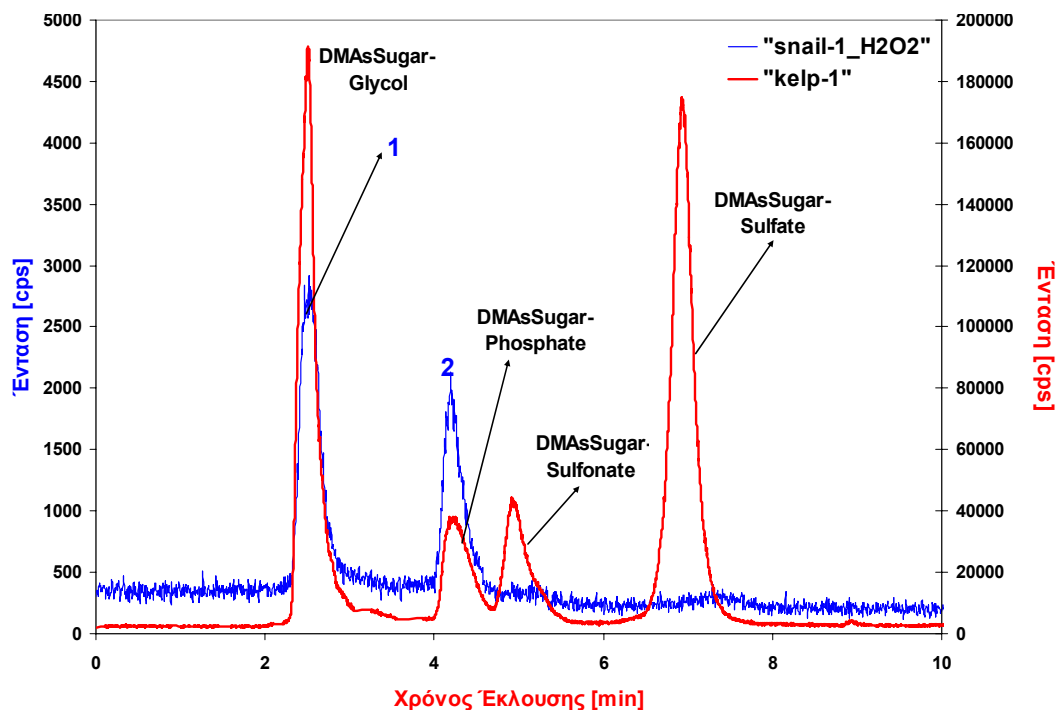
Σχήμα 6.10. Σύγκριση των χρωματογραφημάτων των δειγμάτων “kelp-1\_H<sub>2</sub>S” και “snail-1”. Στον άξονα δεξιά φαίνεται η ένταση <sup>75</sup>As για το δείγμα “snail-1” και στον άξονα αριστερά η αντίστοιχη ένταση για το δείγμα αναφοράς “kelp-1\_H<sub>2</sub>S”.

Η προσθήκη οξειδωτικού (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30 % κ.ο.) στο δείγμα “snail-1” (δείγμα/οξειδωτικό = 90/10 κ.ο.) και η ανάλυση του δειγματος που προέκυψε, οδήγησε στο χρωματογράφημα του Σχήματος 6.11. Είναι εμφανής η εξαφάνιση των κορυφών 3 και 4, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι οι κορυφές αυτές ανήκουν σε θειοαρσενοσάκχαρα, τα οποία με την προσθήκη του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> οξειδώνονται.



Σχήμα 6.11. Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS του δειγματος “snail-1\_H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>”.

Οι κορυφές 1 και 2 ανήκουν στα οξο-αρσενοσάκχαρα –Glycol και –Phosphate, όπως προκύπτει έπειτα από σύγκριση του παραπάνω χρωματογραφήματος με αυτό του δείγματος αναφοράς “kelp-1” (Σχήμα 6.12).

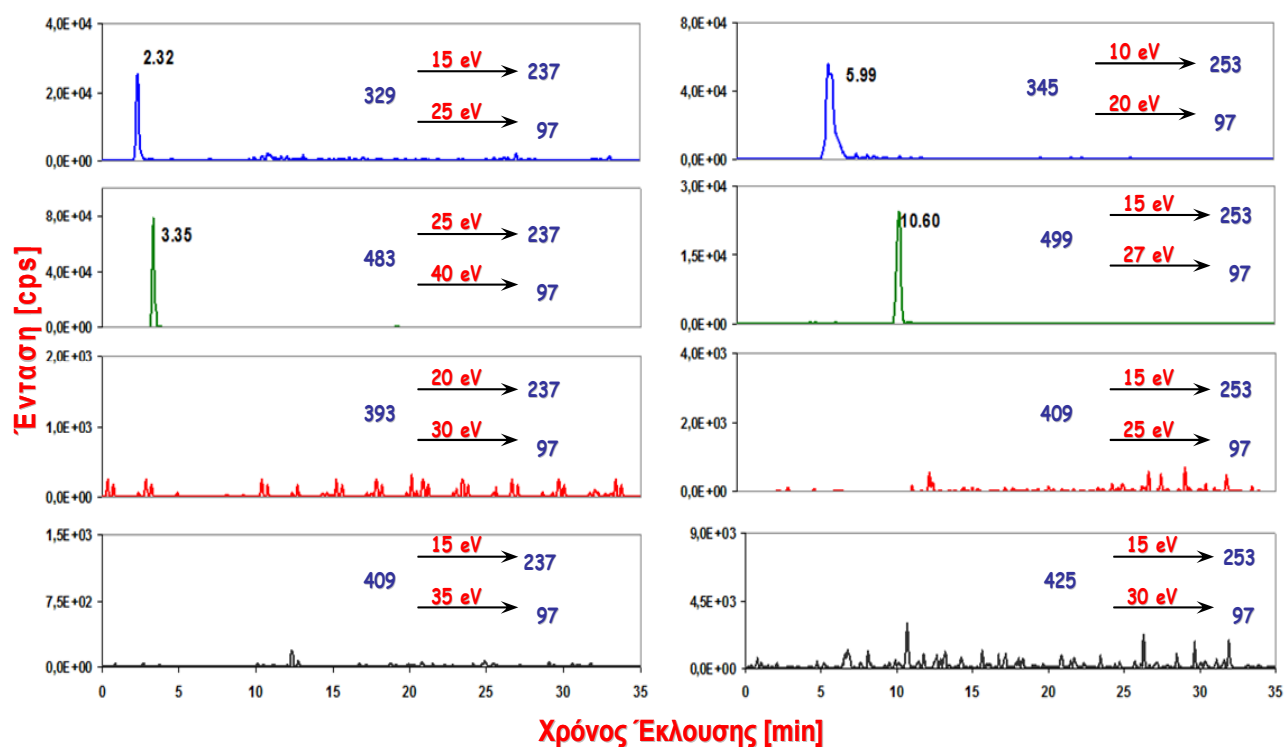


**Σχήμα 6.12.** Σύγκριση των χρωματογραφήματων των δειγμάτων “kelp-1” και “snail-1\_H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>”. Στον άξονα δεξιά φαίνεται η ένταση <sup>75</sup>As για το δείγμα αναφοράς “kelp-1” και στον άξονα αριστερά η αντίστοιχη ένταση για το δείγμα “snail-1\_H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>”.

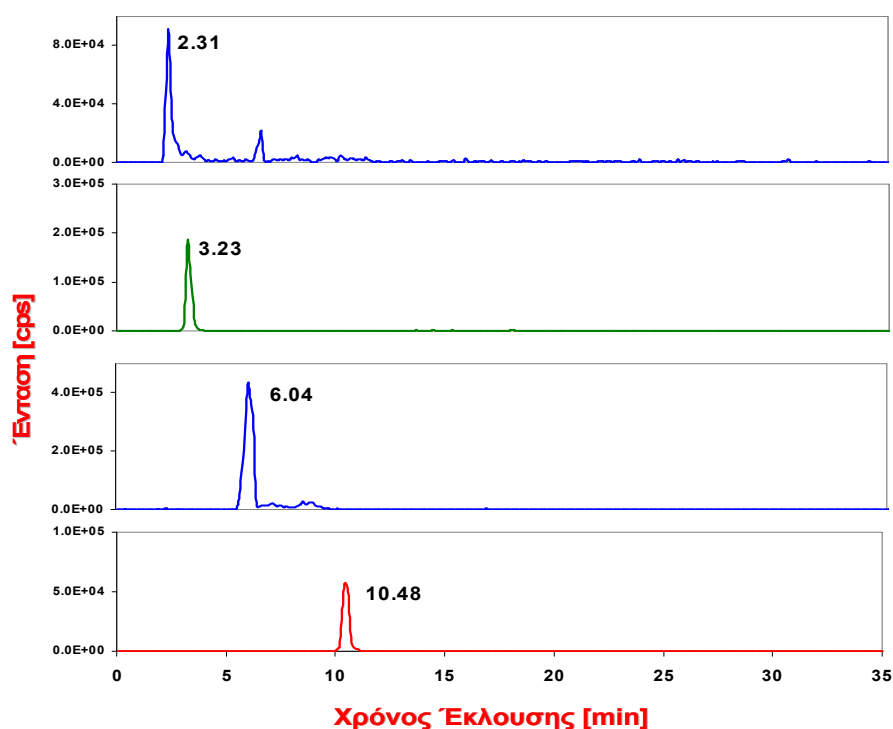
### (β) HPLC-ESI-MS/MS-SRM

Παρακολουθώντας τις χαρακτηριστικές αντιδράσεις SRM, που αντιστοιχούν στα τέσσερα οξο-αρσενοσάκχαρα (-Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate), καθώς και στα αντίστοιχα θειο-αρσενοσάκχαρα, προέκυψε το χρωματογράφημα του Σχήματος 6.13, που φαίνεται παρακάτω. Από το χρωματογράφημα αυτό, επιβεβαιώνεται η ύπαρξη στο δείγμα των οξο-αρσενοσάκχάρων DMAsSugar-Glycol και –Phosphate, καθώς και των αντίστοιχων θειο-αρσενοσάκχάρων DMThioAsSugar-Glycol και –Phosphate, σε χρόνους που συμφωνούν με τους αντίστοιχους στο δείγμα αναφοράς “kelp-2” (Σχήμα 6.14).





Σχήμα 6.13. Χρωματογράφημα HPLC-ESI-MS/MS-SRM του δείγματος “snail-1”.

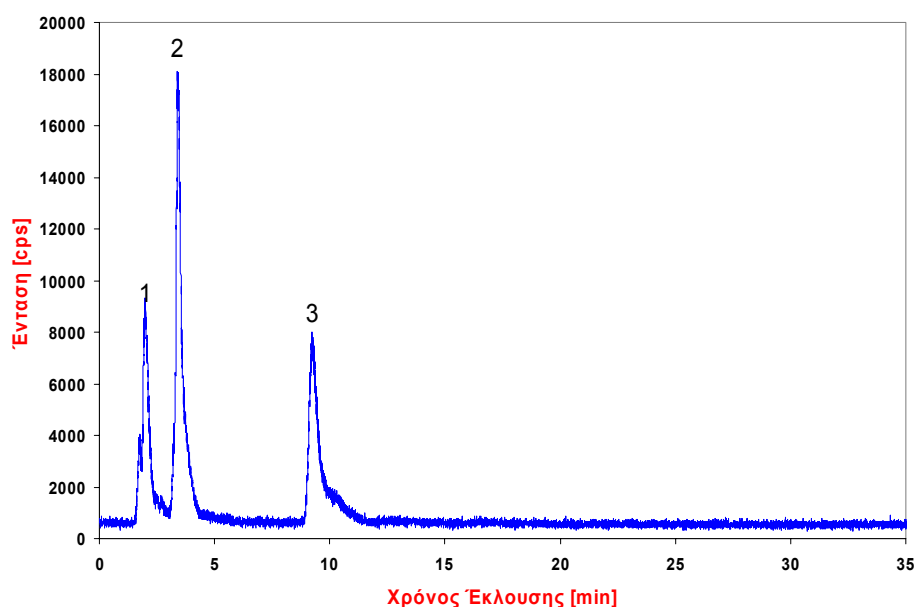


Σχήμα 6.14. Χρωματογράφημα HPLC-ESI-MS/MS-SRM του δείγματος αναφοράς “kelp-2”.

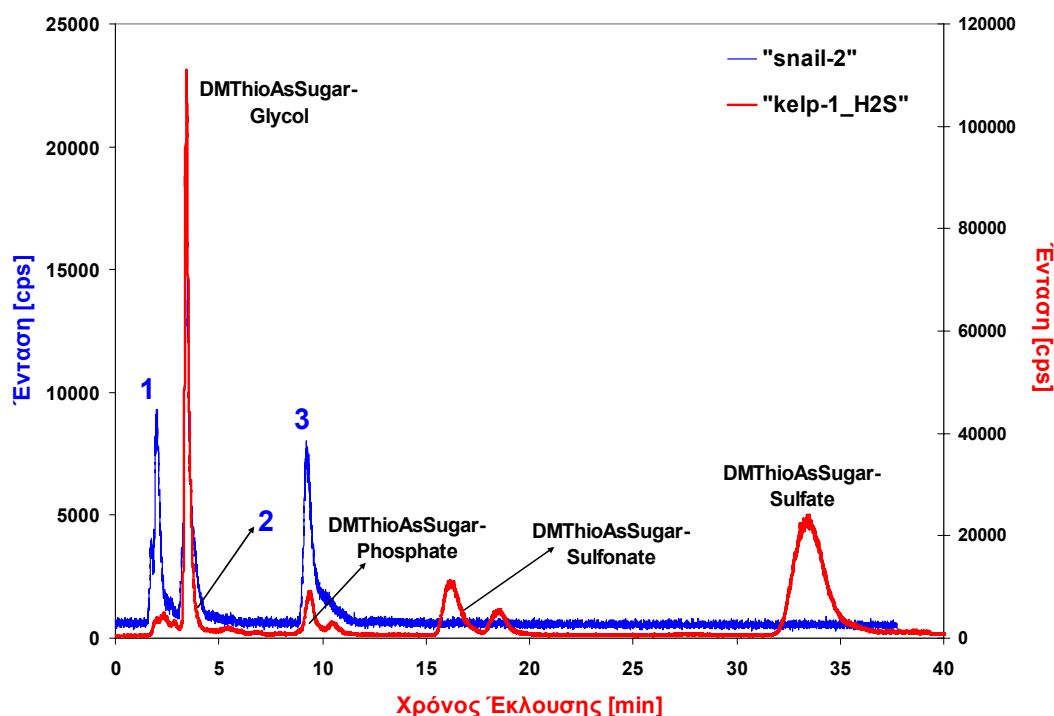
Στο συγκεκριμένο δείγμα, λοιπόν, ανιχνεύτηκαν τα οξο-αρσενοσάκχαρα DMASugar-Glycol και -Phosphate και τα αντίστοιχα θειο-αρσενοσάκχαρα. Τα αποτελέσματα των δύο τεχνικών, συμφωνούν απόλυτα μεταξύ τους.

Δείγμα από σαλιγκάρια “snail-2”**(β) HPLC-ICP-MS**

Στη συνέχεια, αναλύθηκε το δείγμα “snail-2”, οπότε προέκυψε το χρωματογράφημα του Σχήματος 6.15, ενώ η σύγκριση με το αντίστοιχο χρωματογράφημα του δείγματος “kelp-1\_H<sub>2</sub>S”, φαίνεται στο Σχήμα 6.16.



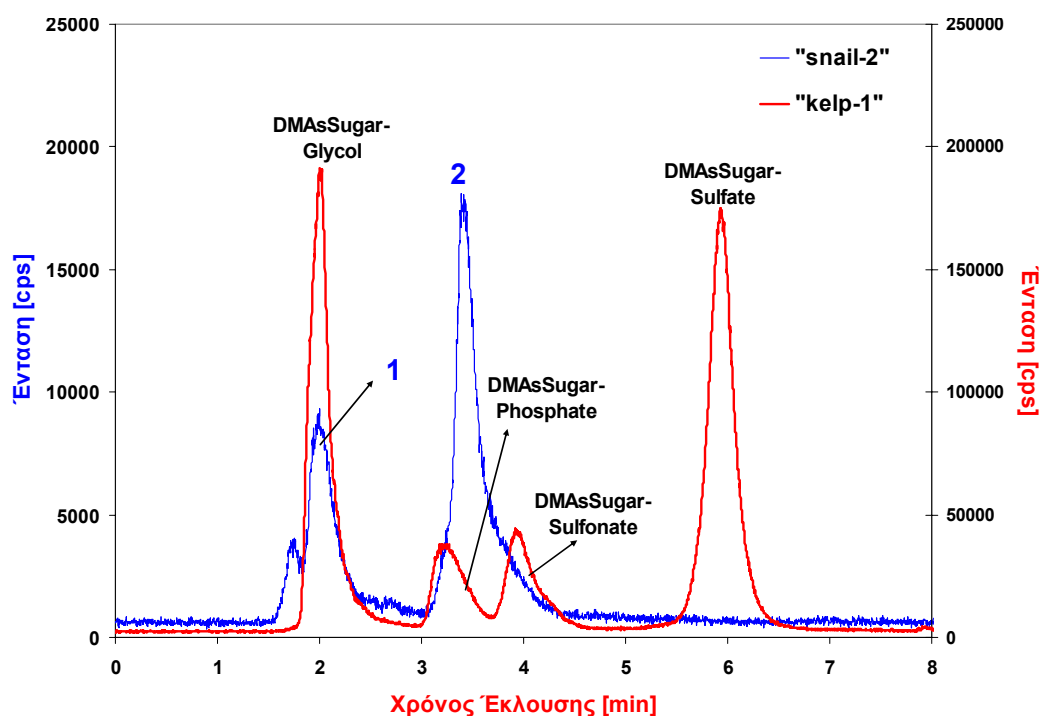
Σχήμα 6.15. Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS του δείγματος “snail-2”.



Σχήμα 6.16. Σύγκριση των χρωματογραφημάτων των δειγμάτων “kelp-1\_H<sub>2</sub>S” και “snail-2”. Στον άξονα δεξιά φαίνεται η ένταση <sup>75</sup>As για το δείγμα αναφοράς “kelp-1\_H<sub>2</sub>S” και στον άξονα αριστερά η αντίστοιχη ένταση για το δείγμα “snail-1”.

Στο παραπάνω σχήμα, φαίνεται να λαμβάνει χώρα συνέκλυση του θειο-αρσενοσακχάρου DMThioAsSugar-Glycol, με την ένωση που αντιστοιχεί στην κορυφή 2, καθώς επίσης και του θειο-αρσενοσακχάρου DMThioAsSugar-Phosphate, με την ένωση που αντιστοιχεί στην κορυφή 3.

Στη συνέχεια, παρατίθεται μια σύγκριση των χρωματογραφημάτων των δειγμάτων “kelp-1” και “snail-2” (Σχήμα 6.17), προκειμένου να διαπιστωθεί αν, κάποια από τις κορυφές του Σχήματος 6.15, αντιστοιχεί σε οξο-αρσενοσάκχαρο.



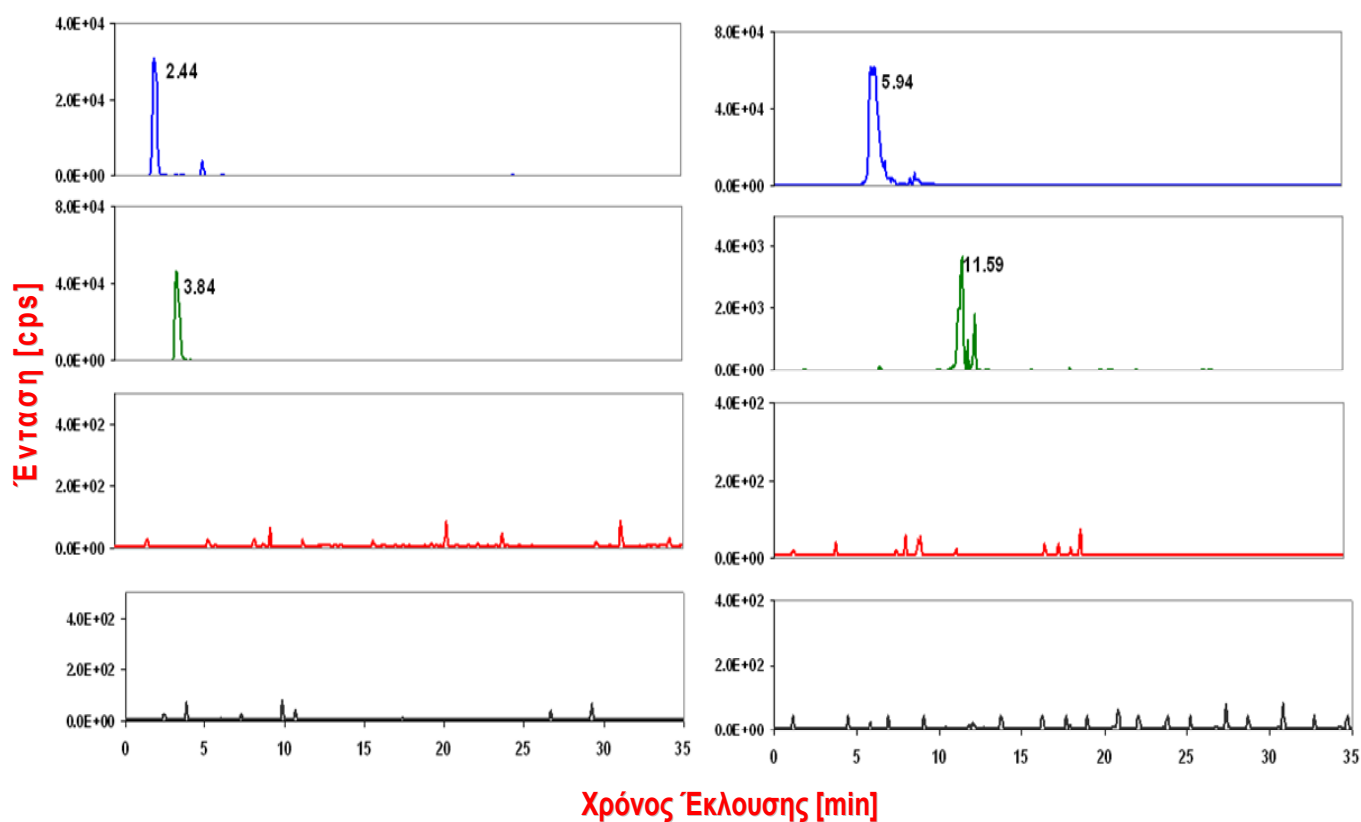
**Σχήμα 6.17.** Σύγκριση των χρωματογραφημάτων των δειγμάτων “kelp-1” και “snail-2”. Στον άξονα δεξιά φαίνεται η ένταση  $^{75}\text{As}$  για το δείγμα αναφοράς “kelp-1” και στον άξονα αριστερά η αντιστοιχη ένταση για το δείγμα “snail-2”.

Στο παραπάνω σχήμα, φαίνεται ότι η κορυφή 1 αντιστοιχεί στο οξο-αρσενοσάκχαρο DMAsSugar-Glycol. Η κορυφή 2 παρουσιάζει μεγάλο εύρος και είναι δυνατόν να αντιστοιχεί σε περισσότερες από μία ενώσεις, ενώ σε αυτό το χρονικό διάστημα συμβαίνει συνέκλυση των ενώσεων DMAsSugar-Phosphate και DMThioAsSugar-Glycol. Για να διευκρινιστεί ποιές ενώσεις συναντώνται στο δείγμα “snail-2”, εφαρμόστηκε η μέθοδος HPLC-ESI-MS/MS-SRM.

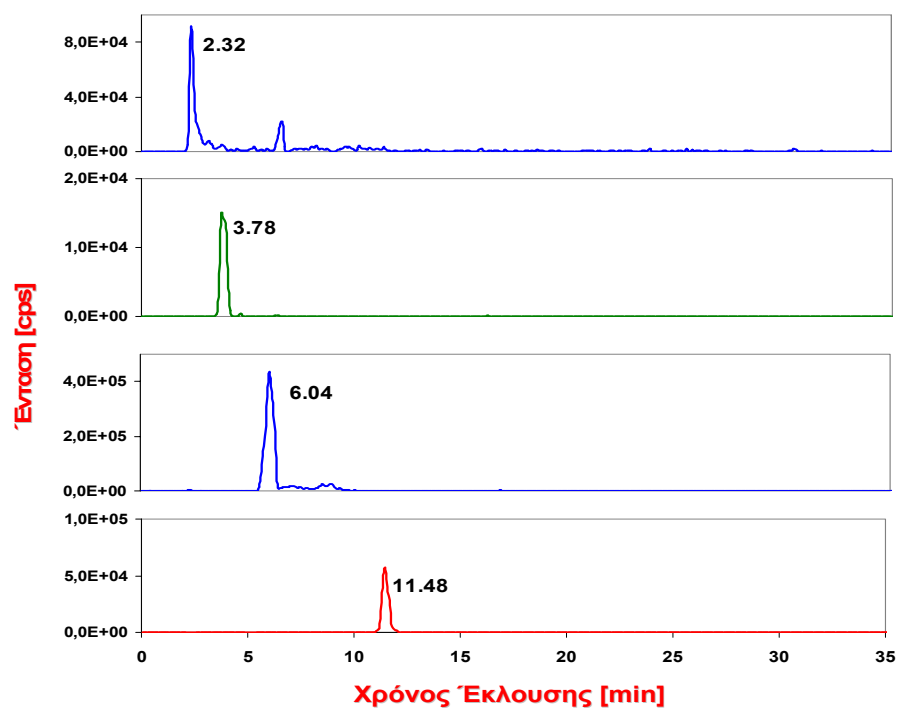
### (β) HPLC-ESI-MS/MS-SRM

Από τις αναλύσεις με HPLC-ESI-MS/MS, προέκυψε το χρωματογράφημα του Σχήματος 6.18, που επιβεβαιώνει την ύπαρξη των ενώσεων DMAsSugar-

Glycol, DMAsSugar-Phosphate, DMThioAsSugar-Glycol και DMThioAsSugar-Phosphate. Οι χρόνοι έκλυσης των ενώσεων αυτών, συμπίπτουν με τους αντίστοιχους στο δείγμα αναφοράς “kelp-2”. (Σχήμα 6.19).



Σχήμα 6.18. Χρωματογράφημα HPLC-ESI-MS/MS-SRM του δείγματος “snail-2”.



Σχήμα 6.19. Χρωματογράφημα HPLC-ESI-MS/MS-SRM του δείγματος αναφοράς “kelp-2”.

Από τις παραπάνω αναλύσεις, λοιπόν, προέκυψε ότι, στο δείγμα “snail-2” περιέχονται τα δύο οξο-αρσενοσάκχαρα DMAsSugar-Glycol και –Phosphate, καθώς και τα αντίστοιχα θειο-αρσενοσάκχαρα.

### Δείγμα από σαλιγκάρια “snail-3”

Ακολούθησε η ανάλυση του δείγματος “snail-3”, το οποίο ανήκει σε σαλιγκάρια ηλικίας 2 μηνών, από τη λίμνη Magic Lake, του Καναδά. Από τις αναλύσεις του συγκεκριμένου δείγματος, με την τεχνική HPLC-ICP-MS, ανιχνεύτηκαν οι ενώσεις DMAsSugar-Glycol, DMThioAsSugar-Glycol και DMThioAsSugar-Phosphate, ενώ, με την τεχνική HPLC-ESI-MS/MS-SRM, δεν κατέστη δυνατή η ανίχνευση καμίας ένωσης, γεγονός που, πιθανότατα, οφείλεται στις χαμηλές συγκεντρώσεις που συναντώνται οι ενώσεις, στο συγκεκριμένο δείγμα.

Στο σημείο αυτό, αξίζει να αναφερθεί και η εφαρμογή, κατά τη διάρκεια της παρούσας μελέτης, της μεθόδου HPLC-ESI-MS/MS-SRM, η οποία είχε αναπτυχθεί, από την ομάδα μας, παλαιότερα και με την οποία επιτυγχάνεται η ανίχνευση 50 διαφορετικών παραγώγων αρσενικού, παρακολουθώντας συνολικά 99 χαρακτηριστικές αντιδράσεις SRM.<sup>29</sup> Βασίζεται στη χρωματογραφική μέθοδο που εφαρμόστηκε και στην παρούσα εργασία, κατά τις αναλύσεις με HPLC-ESI-MS/MS-SRM, ενώ για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τις λεπτομέρειες της μεθόδου ESI-MS/MS, μπορεί κάποιος να ανατρέξει στην βιβλιογραφία.<sup>29</sup>

Αναλύοντας, λοιπόν, με τη συγκεκριμένη μέθοδο, τα προαναφερόμενα δείγματα από μύδια και σαλιγκάρια, εκτός από τα οξο- και θειο- αρσενοσάκχαρα που αναφέρθηκαν παραπάνω, ανιχνεύτηκαν και κάποιες επιπλέον ενώσεις, όπως παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 6.4.** Οργανοαρσενικικές ενώσεις που ανιχνεύτηκαν στα δείγματα μυδιών και σαλιγκαριών (όπου, \* = ανιχνεύτηκε και n.d = μη ανιχνεύσιμο).

	“Mussel”	“Snail-1”	“Snail-2”	“Snail-3”
TMA	*	*	n.d.	n.d.
DMA <sup>v</sup>	*	*	*	*
AsB	*	n.d.	n.d.	n.d.

#### 6.4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε η εφαρμογή των αναλυτικών τεχνικών HPLC-ICP-MS και HPLC-ESI-MS/MS, για την ανάλυση βιολογικών δειγμάτων, που ζούν σε περιβάλλον γλυκού νερού, με σκοπό την διερεύνηση της ύπαρξης, σε αυτά, ενώσεων της κατηγορίας των θειο-αρσενοσακχάρων. Οι αναλυτικές μέθοδοι που εφαρμόστηκαν, είχαν αναπτυχθεί σε παλαιότερη μελέτη μας, η οποία είχε ως στόχο την ανίχνευση των τεσσάρων πιο διαδεδομένων θειο-αρσενοσακχάρων DMThioAsSugar-Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate, σε δείγματα θαλάσσιων οργανισμών. Συνδυάζοντας, λοιπόν, στην παρούσα μελέτη, τις δυο προαναφερόμενες τεχνικές, αναλύθηκαν βιολογικά δείγματα, γλυκού νερού (λίμνες και ποτάμια), και πιο συγκεκριμένα μύδια και σαλιγκάρια, τα οποία προμηθεύτηκαν από περιοχές του Καναδά.

Όσον αφορά τα μύδια, τα οποία συλλέχθηκαν από το ποτάμι Quinsam River στον Καναδά (British Columbia), διαπιστώθηκε η ύπαρξη σε αυτά δύο οξο-αρσενοσακχάρων DMAsSugar-Glycol και -Phosphate, καθώς και του θειο-αρσενοσακχάρου DMThioAsSugar-Phosphate. Το παράγωγο DMAsSugar-Phosphate είναι αυτό που συναντάται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση, σύμφωνα με τις αναλύσεις, τόσο με HPLC-ICP-MS, όσο και με HPLC-ESI-MS/MS-SRM και ακολουθούν οι ενώσεις DMThioAsSugar-Phosphate και DMAsSugar-Glycol, ενώ η ένωση DMThioAsSugar-Glycol δεν ανιχνεύτηκε με καμία από τις δύο τεχνικές. Σε μελέτη που αναφέρεται στη βιβλιογραφία, κατά την οποία αναλύθηκαν μύδια από τον Δούναβη, παρουσιάζονται αντίστοιχα αποτελέσματα, με το σάκχαρο DMAsSugar-Phosphate, να είναι αυτό με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση. Στην ίδια μελέτη, η ένωση η οποία συναντάται στη μικρότερη συγκέντρωση, μεταξύ των τεσσάρων ενώσεων, είναι το θειο-αρσενοσάκχαρο DMThioAsSugar-Glycol, το οποίο στη δική μας εργασία δεν ανιχνεύτηκε. Στην εργασία μας, οι τρεις ενώσεις DMAsSugar-Glycol, DMAsSugar-Phosphate και DMThioAsSugar-Phosphate ανιχνεύτηκαν και με τις δύο μεθόδους HPLC-ICP-MS και HPLC-ESI-MS/MS-SRM, ενώ η ανάκτηση από τη στήλη υπολογίστηκε ίση με 97%, γεγονός που σημαίνει ότι το σύνολο, σχεδόν, του αρσενικού που υπάρχει στο δείγμα, εκλούεται με τη συγκεκριμένη χρωματογραφία. Τέλος, να σημειωθεί ότι στο δείγμα αυτό ανιχνεύτηκε και μικρή ποσότητα αρσενοβητανίου, μια ένωση η οποία αποτελεί το κυριότερο συστατικό των μυδιών που ζούν σε θαλάσσιο νερό καθώς και τα

παράγωγα DMA<sup>V</sup> και TMA, τα οποία επίσης βρέθηκαν σε μικρές ποσότητες. Τα αποτελέσματα αυτά, συμφωνούν με αντίστοιχα της βιβλιογραφίας.

Από την άλλη, στα τρία δείγματα από σαλιγκάρια, διαπιστώθηκε η ύπαρξη συνολικά τεσσάρων αρσενοσακχάρων, των DMAsSugar-Glycol, DMAsSugar-Phosphate, DMThioAsSugar-Glycol και DMThioAsSugar-Phosphate. Πιο συγκεκριμένα, στα δείγματα “snail-1” και “snail-2” ανιχνεύτηκαν τα οξο-αρσενοσάκχαρα -Glycol και -Phosphate, καθώς και τα αντίστοιχα θειο-αρσενοσάκχαρα, με τα αποτελέσματα των δύο τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν, να βρίσκονται σε απόλυτη συμφωνία μεταξύ τους. Αντίθετα, στο δείγμα “snail-3”, η εφαρμογή της τεχνικής HPLC-ESI-MS/MS-SRM δεν ήταν επιτυχής, αφού δεν οδήγησε στην ανίχνευση καμίας από τις οκτώ προς εξέταση ενώσεις (δηλαδή τα τέσσερα οξο- και τα αντίστοιχα τέσσερα θειο-αρσενοσάκχαρα). Με την τεχνική HPLC-ICP-MS, κατέστη δυνατός ο προσδιορισμός των δυο θειο-αρσενοσακχάρων DMThioAsSugar-Glycol και -Phosphate, καθώς και του οξο-αρσενοσακχάρου DMAsSugar-Glycol. Ο λόγος για τον οποίο δεν κατέστη δυνατή η ανίχνευση καμίας από τις τρεις παραπάνω ενώσεις, με την τεχνική HPLC-ESI-MS/MS-SRM, είναι οι χαμηλές συγκεντρώσεις των ενώσεων αυτών στο δείγμα.

Στην παρούσα εργασία, λοιπόν, επιτεύχθηκε, για πρώτη φορά, η ανίχνευση ενώσεων της κατηγορίας των θειο-αρσενοσακχάρων, σε δείγματα από σαλιγκάρια, τα οποία ζούν σε γλυκά νερά. Επίσης, το αρσενοβητάνιο, το οποίο συναντάται ευρέως σε αντίστοιχα δείγματα θαλάσσιας προέλευσης, δεν ανιχνεύτηκε, ενώ σε μικρές ποσότητες, βρέθηκαν οι ενώσεις DMA<sup>V</sup> και TMA. Σε αντίστοιχες μελέτες της βιβλιογραφίας, το αρσενοβητάνιο αναφέρεται ως η κυρίαρχη ένωση σε σαλιγκάρια από γλυκά νερά, ενώ, επίσης, σε μικρότερες ποσότητες έχουν αναφερθεί και οι ενώσεις DMA<sup>V</sup> και TMA.

Σε γενικές γραμμές, λοιπόν, όπως προκύπτει από τα παραπάνω προκαταρκτικά αποτελέσματα, ο κύκλος του αρσενικού στο οικοσύστημα των γλυκών νερών, φαίνεται να διαφέρει από τον κύκλο του μεταλλοειδούς στο θαλάσσιο περιβάλλον. Ωστόσο, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η παραπάνω υπόθεση, απαιτείται η περαιτέρω μελέτη και ανάλυση επιπλέον δειγμάτων και από τα δύο οικοσυστήματα. Παράλληλα, η εξέταση δειγμάτων από πολλές διαφορετικές περιοχές, είναι ένας παράγοντας που πρέπει να ληφθεί υπόψη, προκειμένου να προκύψουν αξιόπιστα και σαφή αποτελέσματα.

**BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ 6**

- <sup>1</sup> R. Schaeffer, K. A. Francesconi, N. Kienzl, C. Söeröes, P. Fodor, L. Varadi, R. Raml, W. Goessler and D. Kuehnelt, *Talanta*, 2006, **69**, 856.
- <sup>2</sup> C. Söeröes, W. Goessler, K. A. Francesconi, E. Schmeisser, R. Raml, N. Kienzl, M. Kahn, P. Fodor and D. Kuehnelt, *J. Environ. Monit.*, 2005, **7**, 688.
- <sup>3</sup> S. McSheehy, P. Pohl, D. Velez and J. Szpunar, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2002, **372**, 457.
- <sup>4</sup> K. A. Francesconi and D. Kuehnelt, 2002. *Arsenic compounds in the environment*, In Frankenberger WT, ed, Environmental chemistry of arsenic, Marcel Dekker Inc, Basel and New York, pp 51-94.
- <sup>5</sup> Y. Shibata and M. Morita, *Appl. Organomet. Chem.*, 1992, **6**, 343.
- <sup>6</sup> Y. Yamaoka, M. L. Carmona, J. M. Oclarit, K. Jin and Y. Shibata, *Appl. Organomet. Chem.*, 2001, **15**, 261.
- <sup>7</sup> J. S. Edmonds and K. A. Francesconi, *Nature*, 1981, **289**, 602.
- <sup>8</sup> J. S. Edmonds and K. A. Francesconi, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1983, **1**, 2375.
- <sup>9</sup> J. S. Edmonds and K. A. Francesconi, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1982, **1**, 2989.
- <sup>10</sup> K. A. Francesconi, J. S. Edmonds, R. V. Stick, B. W. Skelton and A. H. White, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1991, **1**, 2707.
- <sup>11</sup> V. Nischwitz and S. A. Pergantis, *J. Agric. Food Chem.*, 2006, **54**, 6507.
- <sup>12</sup> V. Nischwitz and S. A. Pergantis, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2006, **20**, 3579.
- <sup>13</sup> E. Schmeisser, R. Raml, K. A. Francesconi, D. Kuehnelt, A. Lindberg, C. Söeröes and W. Goessler, *Chem. Commun.*, 2004, 1824.
- <sup>14</sup> V. Nischwitz, K. Kanaki and S. A. Pergantis, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2006, **21**, 33.
- <sup>15</sup> M. W. Fricke, P. A. Creed, A. N. Parks, J. A. Shoemaker, C. A. Schwegel and J. T. Creed, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, **19**, 1454.
- <sup>16</sup> M. Kahn, R. Raml, E. Schmeisser, B. Vallant, K. A. Francesconi and W. Goessler, *Environ. Chem.*, 2005, **2**, 171.
- <sup>17</sup> K. Shiomi, Y. Sugiyama and Y. Nagashima, *Appl. Organomet. Chem.*, 1995, **9**, 105.
- <sup>18</sup> Z. Slejkovec, A. R. Byrne, B. Smoldis and M. Rossbach, *J. Anal. Chem.*, 1996, **354**, 592.
- <sup>19</sup> J. F. Lawrence, P. Michalik, G. Tam and H. B. S Conacher, *J. Agric. Food Chem.*, 1986, **34**, 315.
- <sup>20</sup> I. Koch, K. J. Reimer, A. Beach, W. R. Cullen, A. Gosden and V. M. Lai, in *Arsenic exposure and health effects IV*, ed. W. R. Chappell, C. O. Abernathy and R. L. Calderon, Elsevier, Amsterdam, 2001, pp. 115-123.
- <sup>21</sup> C. Gundacker, *Environ. Pollut.*, 2000, **110**, 61.
- <sup>22</sup> J. M. Roper, D. S. Cherry, J. W. Simmers and H. E. Tatem, *Environ. Pollut.*, 1996, **94**, 117.
- <sup>23</sup> R. Dallinger and W. Wiesser, *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 1984, **79**, 117.



- 
- <sup>24</sup> M. Ochsenkuhn-Petropulu, J. Varsamis and G. Parissakis, *Anal. Chim. Acta*, 1997, **337**, 323.
- <sup>25</sup> A. El Moll, R. Heimbürger, F. Lagarde, M. J. F. Leroy and E. Maier, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1996, **354**, 550.
- <sup>26</sup> M. Morita and Y. Shibata, *Analytical Sciences*, 1987, **3**, 575.
- <sup>27</sup> W. Goessler, D. Kuehnelt, C. Schlagenhäufen, J. Slejkovec and K. J. Irgolic, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1998, **13**, 183.
- <sup>28</sup> T. Kaise, M. Ogura, T. Nozaki, K. Saitoh, T. Sakurai, C. Matsubara, C. Watanabe and K. Hanaoka, *Appl. Organomet. Chem.*, 1997, **11**, 297.
- <sup>29</sup> V. Nischwitz and S. A. Pergantis, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2006, **21**, 1277.