



Πανεπιστήμιο Κρήτης  
Τμήμα Χημείας

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης  
Γενικό Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα  
Τομέας Αναλυτικής Χημείας

---

Ανάλυση Δειγμάτων από Επιφάνειες  
Χρησιμοποιώντας  
Φασματομετρία Μάζας με Ιοντισμό/Εκρόφηση  
Υπερηχητικής Εκνέφωσης

---

**ΓΡΗΓΟΡΙΟΣ Σ. ΒΟΥΓΙΟΥΚΑΣ**

*Επιβλέπων Καθηγητής: Δρ. Σπυρίδων Α. Περγαντής*

*Ηράκλειο Μάρτιος 2019*

*UNIVERSITY OF CRETE*

*DEPARTMENT OF CHEMISTRY*

*GENERAL DEPARTMENT OF POST-GRADUATE STUDIES*

*Master of Science*

---

*Analysis of Samples from Surfaces using  
Desorption Sonic-Spray Ionization  
Mass Spectrometry*

---

GRIGORIOS S. VOUGIOUKAS

*Supervisor: Dr. Spiros A. Pergantis*

*Heraklion, 2019*

### *Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή*

1. Περγαντής Σπυρίδων, καθηγητής, Τομέας Αναλυτικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
2. Κατερινόπουλος Χαράλαμπος, καθηγητής, Τομέας Οργανικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
3. Σπύρος Απόστολος, αναπληρωτής καθηγητής, Τομέας Αναλυτικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

*This page intentionally left blank*

## Ευχαριστίες

Με το πέρας της μεταπτυχιακής μου διατριβής, θα ήθελα, καταρχάς, να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Δρ. Σπύρο Α. Περγαντή για την εμπιστοσύνη και την σημαντική καθοδήγηση που μου παρείχε καθ' όλη την διάρκεια της ερευνητικής μου εργασίας. Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου, που δουλέψαμε πλάι αυτά τα δύομισι χρόνια, για τις ωραίες στιγμές και το φιλικό κλίμα.

Επιπλέον, ευχαριστώ θερμά τους καθηγητές Δρ. Χαράλαμπο Κατερινόπουλο και Δρ. Απόστολο Σπύρο που δέχτηκαν να αξιολογήσουν την εργασία μου ως μέλη της τριμελούς επιτροπής εξέτασης.

Τέλος, αφιερώνω από καρδιάς την παρούσα εργασία στους γονείς μου, Σάββα και Ελένη, στην αδερφή μου Λίλιαν και στην γιαγιά μου Βαγγελιώ που συνέβαλαν με τον δικό τους τρόπο στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

# Περιεχόμενα

<b>Περίληψη</b> .....	<b>8</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>9</b>
<b>Κεφάλαιο 1   Εισαγωγή</b> .....	<b>10</b>
1.1 Πηγή Ιοντισμού.....	11
<b>1.1.1 Ιοντισμός με Ηλεκτροψεκασμό (ESI)</b> .....	<b>12</b>
1.2 Αναλυτής Μάζας.....	13
<b>1.2.1 Τετραπολική Παγίδα Ιόντων</b> .....	<b>14</b>
1.3 Ambient τεχνικές ιοντισμού.....	15
<b>1.3.1 Ιοντισμός με Εκρόφηση Ηλεκτροψεκασμού (DESI)</b> .....	<b>15</b>
<b>1.3.2 Ιοντισμός με Υπερηχητική Εκνέφωση</b> .....	<b>16</b>
<b>1.3.3 Εκρόφηση με Ιοντισμό Υπερηχητικής Εκνέφωσης</b> .....	<b>19</b>
<b>Σκοπός Διατριβής</b> .....	<b>23</b>
<b>Κεφάλαιο 2   Ανάπτυξη συστήματος EASI-MS</b> .....	<b>24</b>
2.1 Όργανα – Εξοπλισμός .....	24
<b>Κεφάλαιο 3   Ανάλυση ολόκληρων κόκκων καφέ</b> .....	<b>28</b>
3.1 Εισαγωγή .....	28
3.2 Πειραματικό μέρος.....	29
3.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση.....	30
<b>3.3.1 Ωμοί κόκκοι καφέ (Θετικά Ιόντα)</b> .....	<b>30</b>
<b>3.3.2 Ωμοί κόκκοι καφέ (Αρνητικά Ιόντα)</b> .....	<b>37</b>
<b>3.3.3 Καβουρδισμένοι κόκκοι</b> .....	<b>40</b>
3.4 Συμπεράσματα .....	44
<b>Κεφάλαιο 4   Ανάλυση πρωτεϊνών από επιφάνεια</b> .....	<b>45</b>
4.1 Εισαγωγή .....	45
<b>4.1.1 Θεωρία</b> .....	<b>45</b>
<b>4.1.2 Φασματομετρία Μάζας Πρωτεϊνών</b> .....	<b>50</b>
4.2 Πειραματικό μέρος .....	52

4.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση .....	55
4.3.1 Πίεση αερίου εκνέφωσης.....	56
4.3.2 Ροή διαλύτη εκνέφωσης.....	57
4.3.3 Προσθήκη οξέος στο διάλυμα της πρωτεΐνης.....	58
4.3.4 Συγκέντρωση πρωτεΐνης στο διάλυμα .....	59
4.3.5 Φάσματα μάζας EASI πρωτεϊνών από ξηρά spot.....	60
4.3.6 Προσθήκη διμεθυλοσουλφοξειδίου DMSO στις πρωτεΐνες .....	64
4.3.7 Προσθήκη διμεθυλοφορμαμιδίου DMF στις πρωτεΐνες.....	66
4.3.8 Προσθήκη αποδιατακτικών αντιδραστηρίων στον διαλύτη εκνέφωσης .....	68
4.3.9 Σύγκριση φασμάτων πρωτεϊνών ESI-MS και EASI-MS .....	72
4.4 Συμπεράσματα .....	73
<b>Κεφάλαιο 5   Ανάλυση επιφάνειας χαρτονομισμάτων .....</b>	<b>74</b>
5.1 Εισαγωγή .....	74
5.2 Πειραματικό Μέρος.....	75
5.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση.....	76
5.3.1. Προφίλ φασμάτων αυθεντικών χαρτονομισμάτων σειράς “Ευρώπη” .....	76
5.3.2 Διάκριση πλαστών χαρτονομισμάτων .....	78
5.3.3 Ανίχνευση κοκαΐνης σε αμερικανικά δολάρια.....	79
5.4 Συμπεράσματα .....	82
<b>Βιβλιογραφία.....</b>	<b>83</b>

## Περίληψη

Στην συγκεκριμένη μεταπτυχιακή διατριβή, η τεχνική της Φασματομετρία μάζας με Εκρόφηση/Ιοντισμό Υπερηχητικής Εκνέφωσης (Desorption Sonic-Spray Ionization Mass Spectrometry, DeSSI-MS ή διαφορετικά Easy Ambient Sonic-Spray Ionization Mass Spectrometry, EASI-MS) αναπτύχθηκε στο εργαστήριο, βελτιστοποιήθηκε, εξετάζοντας σημαντικές παραμέτρους, και εφαρμόστηκε σε τρεις ξεχωριστές κατηγορίες δειγμάτων. Στο πρώτο μέρος των αποτελεσμάτων, ολόκληροι κόκκοι καφέ, διαφόρων ποικιλιών, αναλύθηκαν κατευθείαν από την επιφάνεια τους και ταυτοποιήθηκαν πάνω από είκοσι μεταβολίτες που απαντώνται στους κόκκους καφέ. Σε ωμούς κόκκους καφέ, αξιοσημείωτη είναι η παρουσία μιας κατηγορίας ενώσεων, των C-5HTs, που σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές είναι υπεύθυνες για στομαχικές διαταραχές σε άτομα με ευαισθησία. Όπως εξακριβώθηκε, οι ενώσεις αυτές απομακρύνονται κατά την αποφλοίωση ή και με το καβούρδισμα του καφέ. Φυσικοί μεταβολίτες του καφέ αποτελούν οι τριακυλογλυκερόλες, οι παρουσία των οποίων συμβάλει στη συνεκτικότητα και στη γεύση του καφέ, και απαντώνται στους ωμούς κόκκους αλλά και στους καβουρδισμένους. Στους τελευταίους, ανιχνεύονται και διακυλογλυκερόλες που σχηματίζονται από τις τριακυλογλυκερόλες κατά το καβούρδισμα. Το δεύτερο μέρος εστιάζει στην ανάλυση πρωτεϊνών από επιφάνεια TEFLON®. Ξηρά spots από διαλύματα πρωτεϊνών σε επιφάνεια TEFLON® αναλύονται, δίνοντας τα χαρακτηριστικά φάσματα μάζας των πρωτεϊνών. Ένα μεγάλο κομμάτι των αναλύσεων αυτών αφορά την επιλογή κατάλληλων παραμέτρων για τις αναλύσεις, όπως την ροή του διαλύτη εκνέφωσης και την πίεση του αερίου. Στα διαλύματα των πρωτεϊνών ή στο διαλύτη εκνέφωσης προστίθενται ποσότητες διαφόρων ουσιών, που δρουν ως αποδιατακτικά μέσα (HCOOH, DMSO κ.α.) και ελέγχεται η επίδραση τους στην μορφή των φασμάτων μάζας. Στο τρίτο και τελευταίο μέρος, πραγματοποιείται ανάλυση τραπεζογραμματίων ευρώ και αμερικανικών δολαρίων. Από περιοχές τις επιφάνειας χαρτονομισμάτων ευρώ, λαμβάνονται φάσματα μάζας και τα προφίλ αυτών συγκρίνονται με άλλα χαρτονομίσματα με σκοπό την αναγνώριση πλαστών χαρτονομισμάτων. Οι αναλύσεις των αμερικανικών δολαρίων υποδεικνύουν την παρουσία κοκαΐνης στην επιφάνεια τους μετά από ταυτοποίηση χαρακτηριστικών κορυφών της ναρκωτικής ουσίας με MS/MS.



## Abstract

In this thesis, the technique of Desorption Sonic-Spray Ionization Mass Spectrometry, DeSSI-MS also known as Easy Ambient Sonic-Spray Ionization Mass Spectrometry (EASI-MS) was developed in the laboratory and applied to three separate sample categories.

In the first part, whole coffee beans, of different varieties, were analyzed directly from their surfaces and more than twenty metabolites found in coffee beans were identified. In raw coffee beans, the presence of a class of C-5HTs compounds, which according to bibliographic references are responsible for stomach disorders in susceptible persons, is noteworthy. Ascertained, these compounds are eliminated during barking or roasting of the coffee. Natural metabolites of coffee are triacylglycerols, the presence of which contributes to the flavour of coffee, that are found in both raw and roasted grains. In the latter, diacylglycerols formed by the triacylglycerols during roasting are also detected.

The second part focuses on the analysis of proteins on TEFLON® surface. Dried spots of proteins' aqueous solutions on TEFLON® surface are analyzed, giving typical mass spectra. A large part of these analysis involves the selection of optimum parameters for the analysis, such as the flow rate of the nebulizer solvent and the backpressure of the gas. Additives (HCOOH, DMSO etc.) are added either to the protein solutions or nebulizer solvent and their effect on the mass spectra is determined.

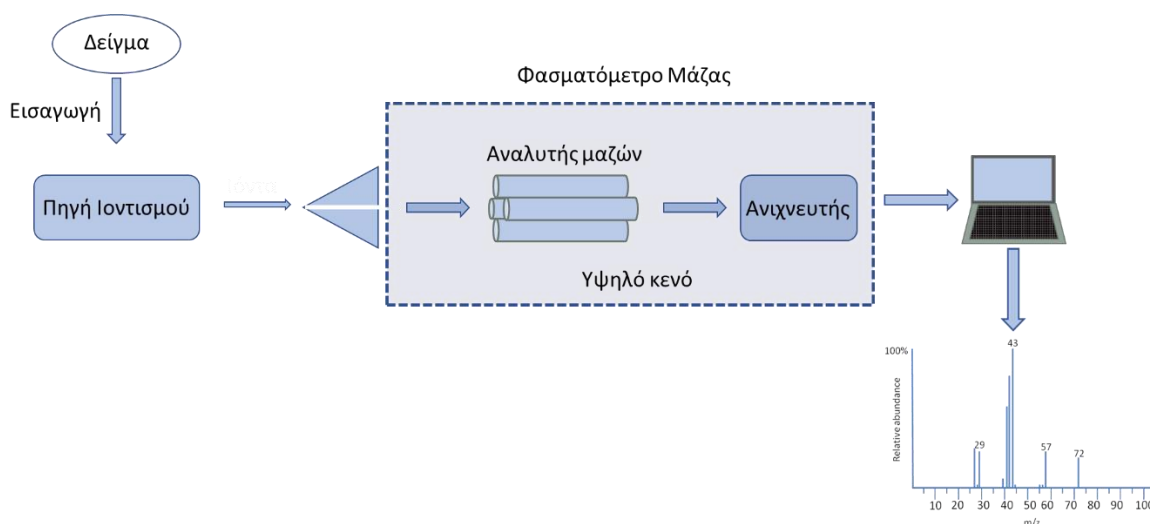
The third and final part consists of the analysis of euro banknotes and US dollars. From euro banknote areas, mass spectra are obtained and these profiles are compared with other banknotes with a view of identifying counterfeit notes. US dollar analyzes indicate the presence of cocaine on their surface after identification of characteristic drug peaks by MS/MS.

## Κεφάλαιο 1 | Εισαγωγή

Η φασματομετρία μάζας αποτελεί μία από τις μεγαλύτερες οικονομικά και τις πλέον αναπτυσσόμενες αναλυτικές τεχνικές μιας και πρόκειται για την μέθοδο με την μεγαλύτερη ακρίβεια στον υπολογισμό μοριακών μαζών χημικών ενώσεων. Βρίσκει εφαρμογή σε πολλούς τομείς τεχνολογίας και έρευνας. Η ανάπτυξη της μικροηλεκτρονικής καθώς και η αύξησή των απαιτήσεων της χημικής ανάλυσης, απογείωσαν την ανάπτυξη της τεχνικής και την κατέστησαν άκρως απαραίτητη για την επιστημονική έρευνα<sup>1</sup>. Κύριο πεδίο εφαρμογής είναι οι επιστήμες ζωής, οι επιστήμες των τροφίμων, οι περιβαλλοντικές επιστήμες και οι τεχνολογίες -omics. Αυτό συμβαίνει γιατί η φασματομετρία μάζας, δίνει διάφορες πληροφορίες όπως:

- α) την ποιοτική και ποσοτική σύσταση αγνώστων δειγμάτων,
- β) τη χημική δομή πολύ μεγάλου αριθμού ενώσεων,
- γ) την παρουσία και το ποσοστό ισοτόπων,
- δ) τη δομή και σύσταση επιφανειών με μορφή απεικόνισης (MS Imaging).

Το γενικό μοτίβο της τεχνικής της φασματομετρίας μάζας παρουσιάζεται στο παρακάτω διάγραμμα:



**Εικόνα 1** Γενικό σχήμα της πορείας στην φασματομετρία μάζας

Το εκάστοτε δείγμα εισάγεται με κάποια μέθοδο εισαγωγής (GC, LC, TLC κ.α.) στην πηγή ιοντισμού και εκεί ιοντίζεται στην αέρια φάση και τα ιόντα που προκύπτουν εισάγονται στον φασματογράφο μάζας. Εκεί υπό την παρουσία υψηλού κενού, μεταφέρονται στον αναλυτή μαζών όπου διαχωρίζονται αναλόγως τον λόγο μάζα προς

φορτίο  $m/z$ . Στην συνέχεια ένας ανιχνευτής μετατρέπει το φυσικό σήμα (αριθμός ιόντων) σε ηλεκτρικό σήμα και κατόπιν ένας υπολογιστής σε ψηφιακό και στην συνέχεια με χρήση κατάλληλου λογισμικού τα δεδομένα εξάγονται υπό την μορφή φάσματος.

Αρκετές τεχνικές πηγών ιοντισμού έχουν αναπτυχθεί και διάφοροι τύποι αναλυτών είναι διαθέσιμοι για την φασματομετρία μάζας. Αναλόγως ποια πηγή ιοντισμού και ποιος τύπος αναλυτή χρησιμοποιείται λαμβάνουμε διαφορετικά είδη πληροφοριών.

## 1.1 Πηγή Ιοντισμού

Η δημιουργία και ο σχηματισμός ιόντων είναι ίσως το πιο καθοριστικό στάδιο στην φασματομετρία μάζας μιας και η πηγή ιοντισμού που επιλέγεται σε κάθε περίπτωση καθορίζει την δημιουργία αυτών. Τα ουδέτερα μόρια του δείγματος μετατρέπονται σε ιόντα στην αέρια φάση προσλαμβάνοντας ή αποβάλλοντας ηλεκτρόνια, μέσω πρωτονίωσης ή αποπρωτονίωσης ή σχηματίζοντας adducts με φορτισμένα χημικά είδη. Επίσης είναι δυνατόν να προϋπάρχουν ιόντα αναλύτη στο υπό εξέταση υγρό δείγμα, στην περίπτωση αυτή η πηγή ιοντισμού απλώς μεταφέρει τα ιόντα «γυμνά» στην αέρια φάση.

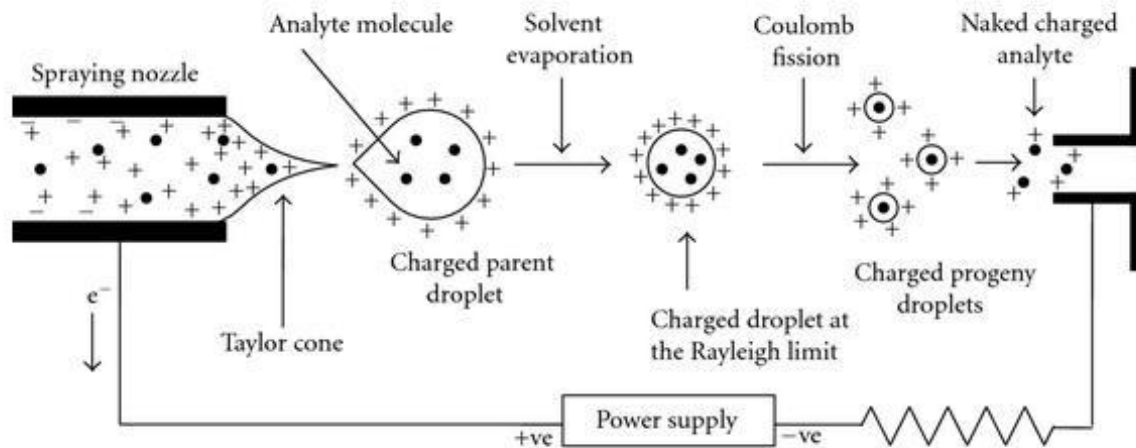
Παρακάτω αναφέρονται, επιγραμματικά, μερικές από τις πλέον διαδεδομένες τεχνικές ιοντισμού για δημιουργία μοριακών ιόντων.

- Ηλεκτρονιακός Ιοντισμός (Electron Impact, EI)
- Χημικός Ιοντισμός (Chemical Ionization, CI)
- Ιοντισμός Εκρόφησης υποβοηθούμενος από υλικό μήτρας και LASER (Matrix assisted LASER Desorption Ionization, MALDI)
- Ιοντισμός με Ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization, ESI)
- Ιοντισμός Πεδίου (Field Ionization, FI)
- Ιοντισμός με Υπερηχητική Εκνέφωση (Sonic-Spray Ionization, SSI)
- Ιοντισμός με Εκρόφηση Υπερηχητικής Εκνέφωσης (Desorption Sonic-Spray Ionization, DeSSI aka EASI)

- Ιοντισμός με Εκρόφηση Ηλεκτροψεκασμού (Desorption Electrospray Ionization, DESI)
- Χημικός Ιοντισμός Ατμοσφαιρικής Πίεσης (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI)
- Απευθείας Ανάλυση σε πραγματικό χρόνο (Direct Analysis in Real Time, DART)

### 1.1.1 Ιοντισμός με Ηλεκτροψεκασμό (ESI)

Η φασματομετρία μάζας με ιοντισμό με ηλεκτροψεκασμό περιγράφηκε πρώτη φορά από τους Yamashita και Fenn<sup>2</sup> το 1984 και σήμερα αποτελεί μια από τις σημαντικότερες τεχνικές για μετρήσεις βιομορίων, ανόργανων ενώσεων και πολυμερών.



Εικόνα 2 Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας του ηλεκτροψεκασμού <sup>3</sup>

Κατά τον ιοντισμό με ηλεκτροψεκασμό, η διαδικασία του οποίου αναπαρίσταται στην Εικόνα 2, εφαρμόζεται υψηλής τάσης δυναμικό στο υγρό δείγμα καθώς αυτό διέρχεται από τον τριχοειδή σωλήνα. Στην άκρη του τριχοειδούς τα φορτία συσσωρεύονται και σχηματίζεται ένας κώνος, ο κώνος Taylor, ο οποίος στην συνέχεια διασπάται, σχηματίζοντας μικρότερα φορτισμένα σταγονίδια. Λόγω της υψηλής θερμοκρασίας ο διαλύτης εξατμίζεται με αποτέλεσμα τα σταγονίδια να συρρικνώνονται περαιτέρω, αυξάνοντας έτσι την πυκνότητα του φορτίου τους. Όταν οι απωστικές δυνάμεις μεταξύ των φορτίων του σταγονιδίου υπερβούν την επιφανειακή τάση του υγρού, δηλαδή το όριο Rayleigh, το κάθε σταγονίδιο υφίστανται σχάση προς τον σχηματισμό ελεύθερων ιόντων αναλύτη<sup>3</sup>. Τα τελευταία κατευθύνονται τελικά προς τον αναλυτή μάζας.

Να σημειωθεί ότι με τον ηλεκτροψεκασμό, αναλόγως το δυναμικό που εφαρμόζεται μπορούν να προκύψουν είτε θετικά ή αρνητικά ιόντα αναλύτη. Σημαντικό επίσης είναι δοθεί έμφαση στο ότι κατά τον ηλεκτροψεκασμό δεν δημιουργούνται ιόντα<sup>2,4</sup>. Αυτά προϋπάρχουν στο δείγμα, αλλά με τον ηλεκτροψεκασμό μεταφέρονται στην αέρια φάση και καθίστανται ικανά να αναλυθούν.

## 1.2 Αναλυτής Μάζας

Τα φασματόμετρα μάζας διαφοροποιούνται αναλόγως με τον τύπο αναλυτή που διαθέτουν. Τα κύρια χαρακτηριστικά των αναλυτών μάζας είναι η ευαισθησία, η επαναληψιμότητα, η διακριτική ισχύς, το εύρος γραμμικότητας, η ταχύτητα σάρωσης και φυσικά το κόστος.

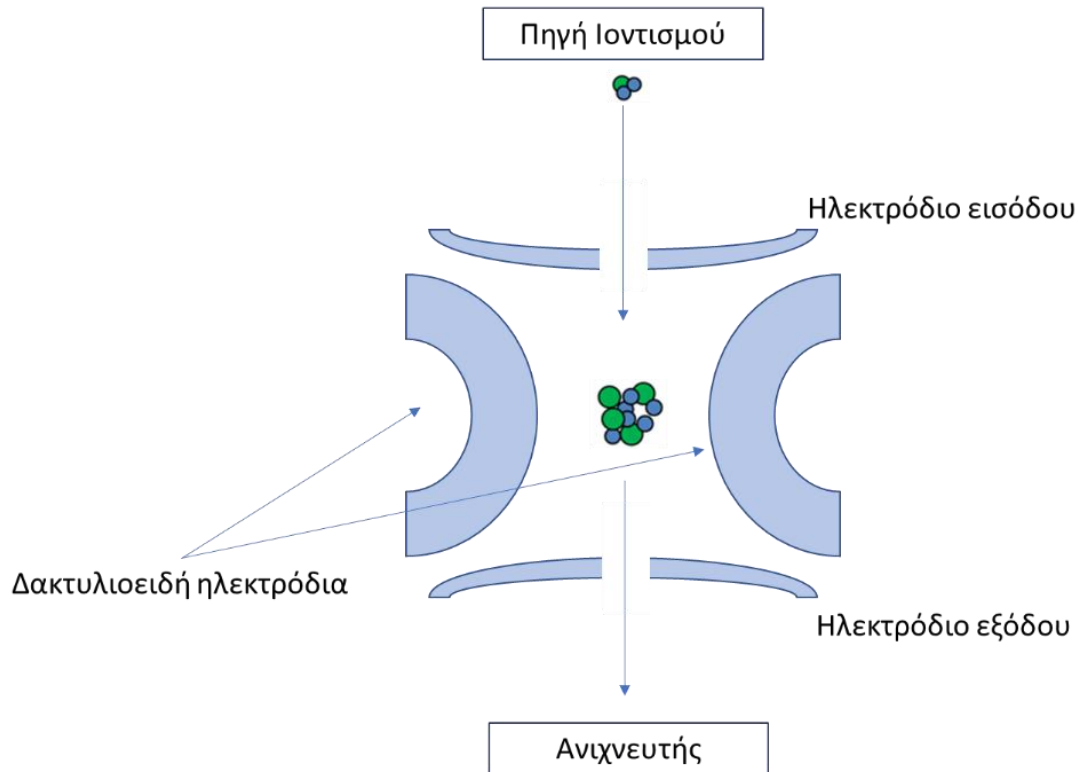
Οι αναλυτές μάζας μπορούν να διαχωριστούν σε δύο κατηγορίες σε συνεχείς και σε παλμικούς.

Οι συνεχείς αναλυτές μάζας σαρώνουν ξεχωριστά κάθε λόγο μάζα/φορτίο. Παράδειγμα τέτοιου αναλυτή μάζας αποτελεί το φασματόμετρο μάζας μαγνητικού τομέα, όπου τα ιόντα επιταχύνονται και διαχωρίζονται από μαγνητικό πεδίο ή διαφορά δυναμικού. Ένα ακόμα τέτοιο παράδειγμα είναι τα τετράπολα. Αυτά αποτελούνται από τέσσερις κυλινδρικές μεταλλικές ράβδους, όπου ανά δύο έχουν το ίδιο φορτίο. Μία τάση συνεχούς ρεύματος καθώς και μία τάση εναλλασσόμενου ρεύματος εφαρμόζεται σε κάθε ζεύγος. Τα ιόντα επιταχύνονται μέσω της σήραγγας μεταξύ των ηλεκτροδίων και όλες οι μάζες εκτός από μία απορρίπτονται.

Οι παλμικοί αναλυτές μάζας ανιχνεύουν όλους τους λόγους μάζα/φορτίο ταυτόχρονα. Τέτοια χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι το φασματόμετρο μάζας χρόνου-πτήσης (TOF), όπου επιταχύνει τα ιόντα και τα διαχωρίζει ανάλογα με την ταχύτητά τους, η οποία είναι αντιστρόφως ανάλογη με τη μάζα τους, και τα φασματόμετρα μάζας παγίδευσης ιόντων.

Στην συγκεκριμένη εργασία ως αναλυτής μάζας χρησιμοποιήθηκε μια τετραπολική παγίδα ιόντων (quadrupole ion trap) η λειτουργία της οποίας περιγράφεται παρακάτω.

### 1.2.1 Τετραπολική Παγίδα Ιόντων



Εικόνα 3 Σχηματική αναπαράσταση τετραπολικής παγίδας ιόντων.

Η είσοδος της παγίδας παραμένει ανοιχτή για ορισμένο χρονικό διάστημα και τα ιόντα που έχουν δημιουργηθεί από την πηγή ιοντισμού εισέρχονται στην παγίδα. Μια τάση εναλλασσόμενου ρεύματος υψηλής συχνότητας που εφαρμόζεται στο δακτυλιοειδές ηλεκτρόδιο και μια βοηθητική τάση σε χαμηλότερη συχνότητα που εφαρμόζεται στα ηλεκτρόδια εισόδου και εξόδου αναγκάζουν τα ιόντα να περιστρέφονται σε σταθερές τροχές μέσα στην κοιλότητα της παγίδας. Η μεταβολή του πλάτους στην κύρια συχνότητα διαχωρίζει τα ιόντα λόγω του λόγου μάζας/φορτίο, μιας και συντονίζει την συχνότητα των τροχιών τους με τη συχνότητα της βοηθητικής τάσης και συνεπώς αναγκάζει να περάσουν τα επιθυμητά μόνο ιόντα από την έξοδο στον ανιχνευτή ενώ τα υπόλοιπα αποσταθεροποιούνται και εκτονώνονται στα τοιχώματα της παγίδας<sup>5</sup>.

Είναι επίσης δυνατό να διατηρηθούν ιόντα με έναν συγκεκριμένο λόγο μάζας/φορτίο μέσα στην παγίδα και να αποφορτιστούν όλα τα άλλα ιόντα. Μετά από σύγκρουση με άτομα ηλίου (He), τα επιλεγμένα πρόδρομα ιόντα μπορούν να διασπαστούν και τα προκύπτοντα ιόντα να αναλυθούν περαιτέρω.

### 1.3 Ambient τεχνικές ιοντισμού

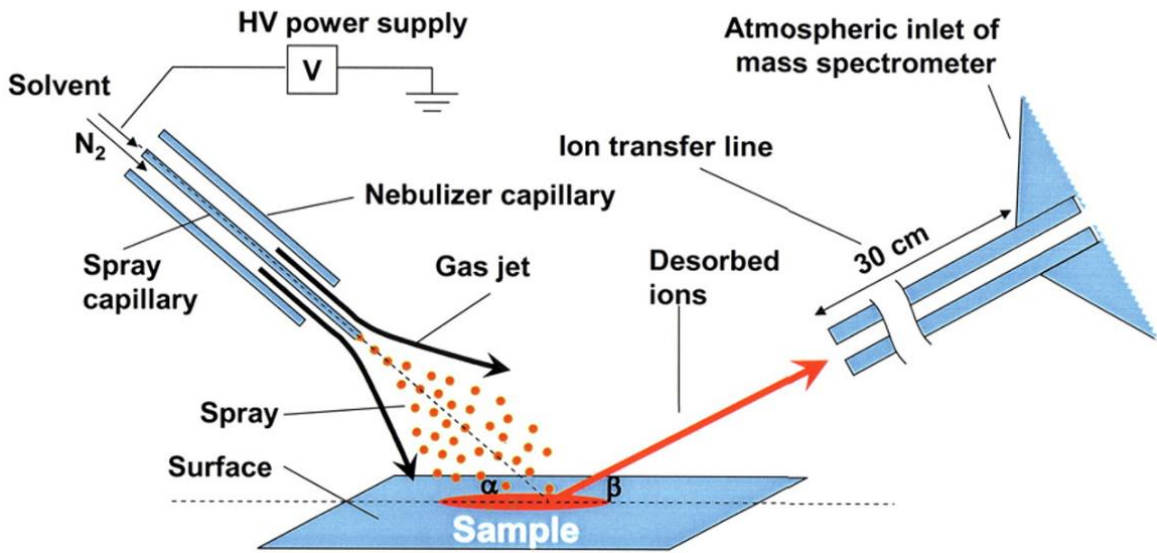
Γενικά ως ambient τεχνικές ιοντισμού θεωρούνται εκείνες, όπου ο ιοντισμός πραγματοποιείται σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης, δηλαδή υπό ανοιχτό περιβάλλον. Παράλληλα το προς ανάλυση δείγμα απαιτεί ελάχιστη ή και καθόλου προεργασία, και έτσι μπορεί να αναλυθεί άμεσα. Επίσης, οι ambient τεχνικές χαρακτηρίζονται από ευκολία στην χρήση τους και σχετική απλότητα στις διατάξεις τους. Τέλος, η χρήση τους έχει ως αποτέλεσμα την ανάλυση πολλών δειγμάτων σε μικρούς χρόνους κάτι που στην διεθνή ορολογία της αναλυτικής χημείας εκφράζεται ως high throughput analysis<sup>6</sup>.

Η απαρχή των ambient τεχνικών ιοντισμού ήταν το 2004 με την ανάπτυξη της εκρόφησης με ιοντισμό ηλεκτροψεκασμού (DESI)<sup>7</sup> και στην συνέχεια ακολούθησε η απευθείας ανάλυση σε πραγματικό χρόνο (DART)<sup>8</sup> το 2006. Παρότι οι ambient τεχνικές ανάλυσης μετράνε μόλις 15 χρόνια ύπαρξης, έχει αναγνωριστεί η συνεισφορά τους και η σημαντικότητα τους στην ανάλυση και δίνεται πολύ μεγάλη βάση στην ανάπτυξη νέων τέτοιων τεχνικών. Μια ambient τεχνική είναι και η εκρόφηση με ιοντισμό υπερηχητικής εκνέφωσης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία.

#### 1.3.1 Ιοντισμός με Εκρόφηση Ηλεκτροψεκασμού (DESI)

Ο ιοντισμός με εκρόφηση ηλεκτροψεκασμού περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Cooks και τους συνεργάτες τους το 2004<sup>7</sup>. Η σημαντικότητα της μεθόδου έγκειται στο ότι ο αναλύτης βρίσκεται σε μία στερεή επιφάνεια και αναλύεται σε ανοιχτό περιβάλλον, σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης, ενώ μπορεί να μην απαιτείται καμία επεξεργασία του δείγματος πριν την ανάλυση. Δηλαδή πρόκειται για μια ambient τεχνική ιοντισμού. Ένα ακόμα προτέρημα της μεθόδου είναι ότι η επιφάνεια στην οποία βρίσκεται ο αναλύτης, μπορεί να μετακινείται στις τρεις διαστάσεις, επιτρέποντας έτσι την χαρτογράφηση επιφάνειας του αναλύτη (imaging).

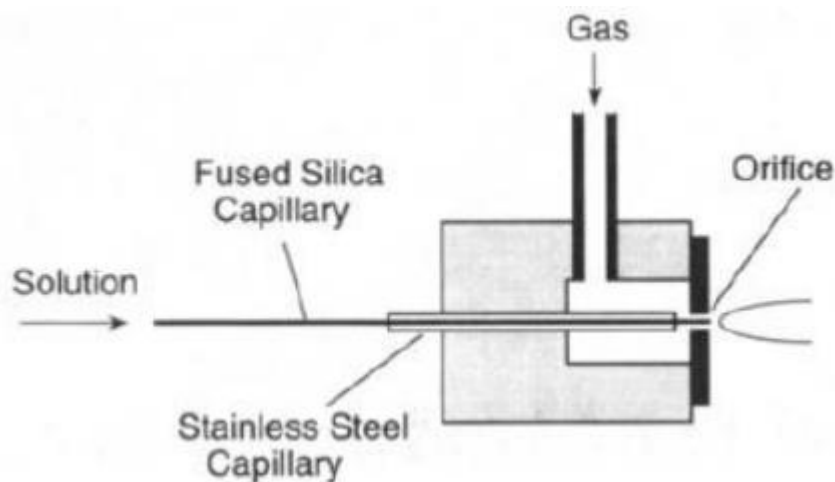
Στην Εικόνα 4 αναπαρίσταται η διαδικασία της εκρόφησης με ηλεκτροψεκασμό. Ο αναλύτης, όπως προαναφέρθηκε, βρίσκεται σε μία στερεή επιφάνεια. Στην επιφάνεια αυτή προσπίπτει, υπό συγκεκριμένη γωνία, το φορτισμένο αερόλυμα (electrospray) κάποιου διαλύτη (spray solvent). Τα μόρια του αναλύτη στην επιφάνεια εκροφούνται από το αερόλυμα και μεταφέρονται στην αέρια φάση όπου εκεί τα σταγονίδια που μεταφέρουν τα μόρια υφίστανται αεροδυναμική σχάση. Παράλληλα είναι πιθανόν να λαμβάνουν χώρα και αντιδράσεις μεταφοράς φορτίων μεταξύ των μορίων του αναλύτη και τον ιόντων του διαλύτη<sup>9</sup>.



Εικόνα 4 Διαγραμματική απεικόνιση της εκρόφησης με ηλεκτροψεκασμό<sup>7</sup>.

### 1.3.2 Ιοντισμός με Υπερηχητική Εκνέφωση

Το 1994 ανακαλύφθηκε τυχαία από την επιστημονική ομάδα του Hirabayashi<sup>10</sup>, ότι για την δημιουργία ιόντων με χρήση τριχοειδούς σωλήνα, δεν είναι απαραίτητη η εφαρμογή ηλεκτρικού δυναμικού ή υψηλών θερμοκρασιών, όπως απαιτείται κατά τον ιοντισμό με ηλεκτροψεκασμό. Αντ' αυτού η εκνέφωση και ο ιοντισμός επιτυγχάνονται λόγω της ομοαξονικής ροής αερίου αζώτου στον τριχοειδή σωλήνα, το οποίο ρέει με υψηλή ταχύτητα. Καθώς η βέλτιστη ένταση ιοντισμού επιτυγχάνεται όταν η ταχύτητα ροής του αερίου  $N_2$  είναι παραπλήσια της ταχύτητα του ήχου (1 Mach), η μέθοδος ονομάζεται ιοντισμός υπερηχητικής εκνέφωσης (Sonic Spray Ionization)



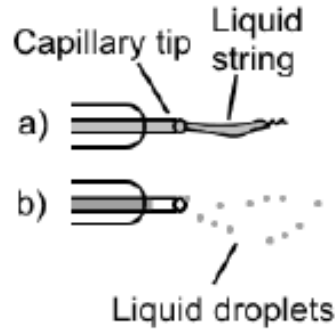
Εικόνα 5 Πρώτη πειραματική διάταξη Ιοντισμού Υπερηχητικής Εκνέφωσης<sup>10</sup>



Στην πρώτη διάταξη αυτής της μεθόδου (Εικόνα 5), χρησιμοποιήθηκε ένας τριχοειδής σωλήνας πυριτίου με εσωτερική διάμετρο 100  $\mu\text{m}$ . Με χρήση αντλίας σύριγγας, στον τριχοειδή εισάγεται διάλυμα νερού και μεθανόλης (1:1) με ροή 30  $\mu\text{L}/\text{min}$ , το οποίο εκνεφώνεται από την υψηλή ταχύτητα του αζώτου στο στόμιο. Το αερόλυμα που εξέρχεται από το στόμιο αποτελείται από σταγονίδια, φορτισμένα σταγονίδια και ιόντα. Η τοποθέτηση του στομίου μπροστά από την είσοδο ενός αναλυτή μάζας έδινε φάσματα μάζας παρόμοια με εκείνα του ESI, ακόμη και με πολλαπλά φορτισμένα ιόντα.

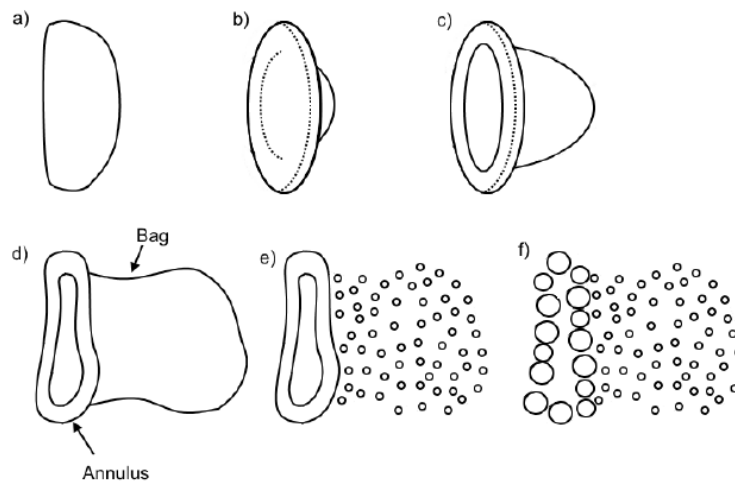
Μετά την ανακάλυψη του sonic spray ακολούθησε έρευνα της προέλευσης των φορτίων και η εξάρτησή τους από την ταχύτητα του αερίου εκνέφωσης<sup>11,12</sup>. Παρατηρήθηκε ότι η ένταση του ιοντισμού είναι μέγιστη όταν η ταχύτητα του αερίου εκνέφωσης είναι 1 Ma, δηλαδή ίση με την ταχύτητα του ήχου. Η ένταση μειώνεται σε ταχύτητα κάτω από 1 Ma, μέχρις ότου ένα συγκεκριμένο σημείο όπου παράγονται μόνο σταγονίδια, χωρίς φορτία ή ιόντα. Πάνω από 1 Ma η ένταση μειώνεται με την αύξηση της ταχύτητας. Η δημιουργία φορτισμένων σταγονιδίων και ιόντων πιθανώς εξαρτάται από το μέγεθος των σταγονιδίων. Στην υποηχητική περιοχή τα σταγονίδια είναι μεγάλα, όμως τα σταγονίδια πρέπει να έχουν διάμετρο μικρότερη από 10 nm για να σχηματιστούν ιόντα. Στην υπερηχητική περιοχή προκύπτει κύμα κρούσης λόγω της διαστολής και συμπίεσης του αερίου. Η θερμοκρασία του αερίου μειώνεται κατά την διαστολή, προκαλώντας συσσωμάτωση των σταγονιδίων και συνεπώς υψηλότερα μεγέθη σταγονιδίων και χαμηλότερες εντάσεις<sup>11</sup>.

Η προέλευση των φορτίων μπορεί να εξηγηθεί με το μοντέλο μιας ηλεκτρικής διπλοστιβάδας στην επιφάνεια υγρών, κάτι που παρατηρείται και σε ορισμένα φυσικά φαινόμενα όπως ο διαχωρισμός φορτίων σε έναν καταρράκτη<sup>13</sup>. Ένα υγρό περιέχει την ίδια ποσότητα θετικών και αρνητικών ιόντων, τα οποία σχηματίζουν διπολικά ζεύγη. Παρατηρήθηκε ότι στην διεπιφάνεια του υγρού με την αέρια φάση, η πλειονότητα των μορίων νερού στην επιφάνεια προσανατολίζεται με το αρνητικό μέρος του δίπολου τους προς την αέρια φάση και το θετικό τμήμα προς το νερό. Το ηλεκτρικό πεδίο που δημιουργείται είναι αρκετά ισχυρό για να προσελκύσει μικρά ιόντα όπως ιόντα  $\text{OH}^-$  και κατά συνέπεια ένα στρώμα αρνητικών ιόντων καλύπτει την επιφάνεια. Τα θετικά ιόντα  $\text{H}_3\text{O}^+$  βρίσκονται κάτω από αυτό το στρώμα. Εάν δημιουργηθούν σταγονίδια με διάμετρο μικρότερη από το πάχος της διπλοστιβάδας, τα θετικά και αρνητικά ιόντα θα κατανέμονται άνισα και η διάσπαση σε μικρότερα σταγονίδια θα προκαλέσει σχηματισμό φορτισμένων σταγονιδίων και από αυτά ιόντα αέριας φάσης<sup>13</sup>.



Εικόνα 6 Διαδικασία δημιουργίας σταγονιδίων στο άκρο του τριχοειδούς <sup>13</sup>

Ένα ακόμα μοντέλο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να εξηγήσει το σχηματισμό σταγονιδίων και τον διαχωρισμό φορτίων κατά τη διάσπαση τους, είναι ο μηχανισμός της “σακούλας” που προτάθηκε από τον Zilch και τους συνεργάτες του<sup>13</sup>. Με φωτογραφίες κοντινής λήψης, διαπιστώθηκε ότι στο ακροφύσιο του τριχοειδούς σχηματίζεται, αρχικά, ένα μικρό σταγονίδιο το οποίο πλαταίνει από την ροή του αερίου, σχηματίζοντας μια χορδή (εικόνα 6a). Αυτή η χορδή τραβιέται και τελικά διασπάται αεροδυναμικά σε σταγονίδια (εικόνα 6b)

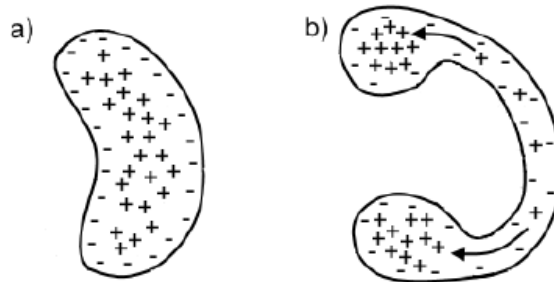


Εικόνα 7 Αεροδυναμική διάσπαση ενός σταγονιδίου νερού σύμφωνα με το μοντέλο της “σακούλας” <sup>13</sup>

Σύμφωνα με την αεροδυναμική διάσπαση κατά μοντέλο της “σακούλας” η ταχύτητα του αερίου είναι πολύ υψηλότερη από την ταχύτητα των σταγονιδίων, οι αεροδυναμικές διεργασίες αναγκάζουν τα σταγονίδια να διασπαστούν. Αρχικά το σταγονίδιο πλαταίνει (εικόνα 7a) και σχηματίζεται μια εγκοπή (εικόνα 7b, 7c), η οποία αναπτύσσεται σε μια σακούλα με δακτύλιο (εικόνα 7d). Το τμήμα της σακούλας επεκτείνεται μέχρι να σχαστεί σε πολλά μικρά σταγονίδια (εικόνα 7e). Τέλος σπάει και ο δακτύλιος σε μερικά μεγαλύτερα σταγονίδια (σχήμα 7f).

Παράλληλα με την διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα μια διαδικασία διαχωρισμού φορτίων. Όπως προαναφέρθηκε, σε ένα σταγονίδιο τα δίπολα ευθυγραμμίζονται με το

αρνητικό τους τμήμα προς την κατεύθυνση της αέριας φάσης (εικόνα 8a). Κατά τον σχηματισμό της σακούλας τα θετικά ιόντα μεταφέρονται μέσα στο δακτύλιο και τα αρνητικά ιόντα μέσα στην σακούλα (εικόνα 8b). Καθώς η σακούλα σχάζεται, δημιουργούνται πολλά μικρά αρνητικά φορτισμένα σταγονίδια, ενώ η σχάση του δακτυλίου δημιουργεί λιγότερα, θετικά φορτισμένα σταγονίδια.



Εικόνα 8 Διαχωρισμός φορτίων κατά την αεροδυναμική σχάση<sup>13</sup>

Στο SSI, σε αντίθεση με το ESI, κατά τον ιοντισμό παράγονται ταυτόχρονα τόσο θετικά όσο και αρνητικά ιόντα. Ρυθμίζοντας κατάλληλα το όργανο μπορούν να ανιχνευτούν είτε τα αρνητικά ή τα θετικά ιόντα ανάλογα με την υπό ανάλυση κάθε φορά ένωση. Επιπροσθέτως κατά το SSI, οι συνθήκες ιοντισμού είναι πολύ ήπιες, μιας και δεν εφαρμόζεται στον τριχοειδή δυναμικό ή υψηλή θερμοκρασία, προκαλώντας, έτσι, μικρή θραυσματοποίηση, μικρή ένταση υποβάθρου, λίγα adducts με τα μόρια του διαλύτη και υψηλό λόγο σήματος προς θόρυβο.

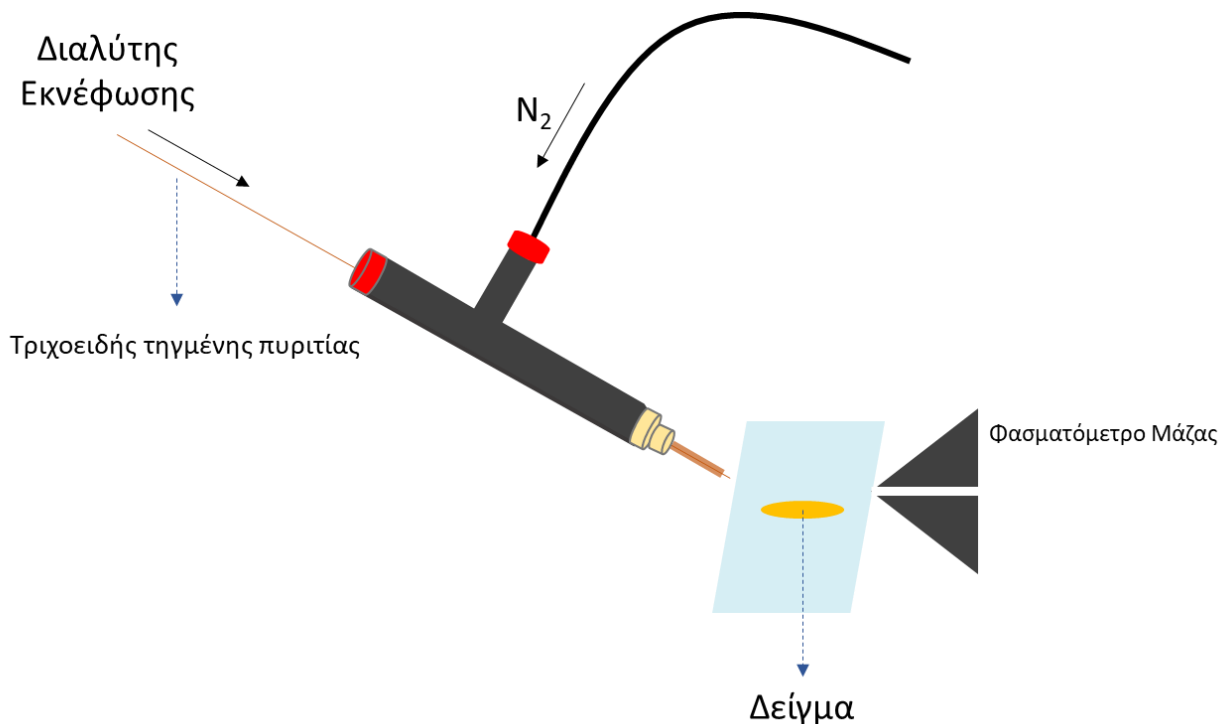
### 1.3.3 Εκρόφηση με Ιοντισμό Υπερηχητικής Εκνέφωσης

Η τεχνική της εκρόφησης με ιοντισμό υπερηχητικής εκνέφωσης εισάχθηκε πρώτη φορά το 2006 από τους Haddad et al.<sup>14</sup>. Η επιστημονική τους ομάδα συνδυάζοντας τις ήδη αναπτυγμένες τεχνικές των ιοντισμού υπερηχητικής εκνέφωσης και εκρόφησης με ηλεκτροψεκασμό, δημιούργησαν την εκρόφηση με ιοντισμό υπερηχητικής εκνέφωσης, Desorption Sonic-Spray Ionization (DeSSI), όπου λίγο αργότερα μετονομάστηκε σε Easy Ambient Sonic-Spray Ionization (EASI)<sup>15</sup>, ώστε να διαφοροποιείται από το DESI και παράλληλα να δίνεται έμφαση στην ικανότητα της μεθόδου, να είναι μία ambient τεχνική ιοντισμού.

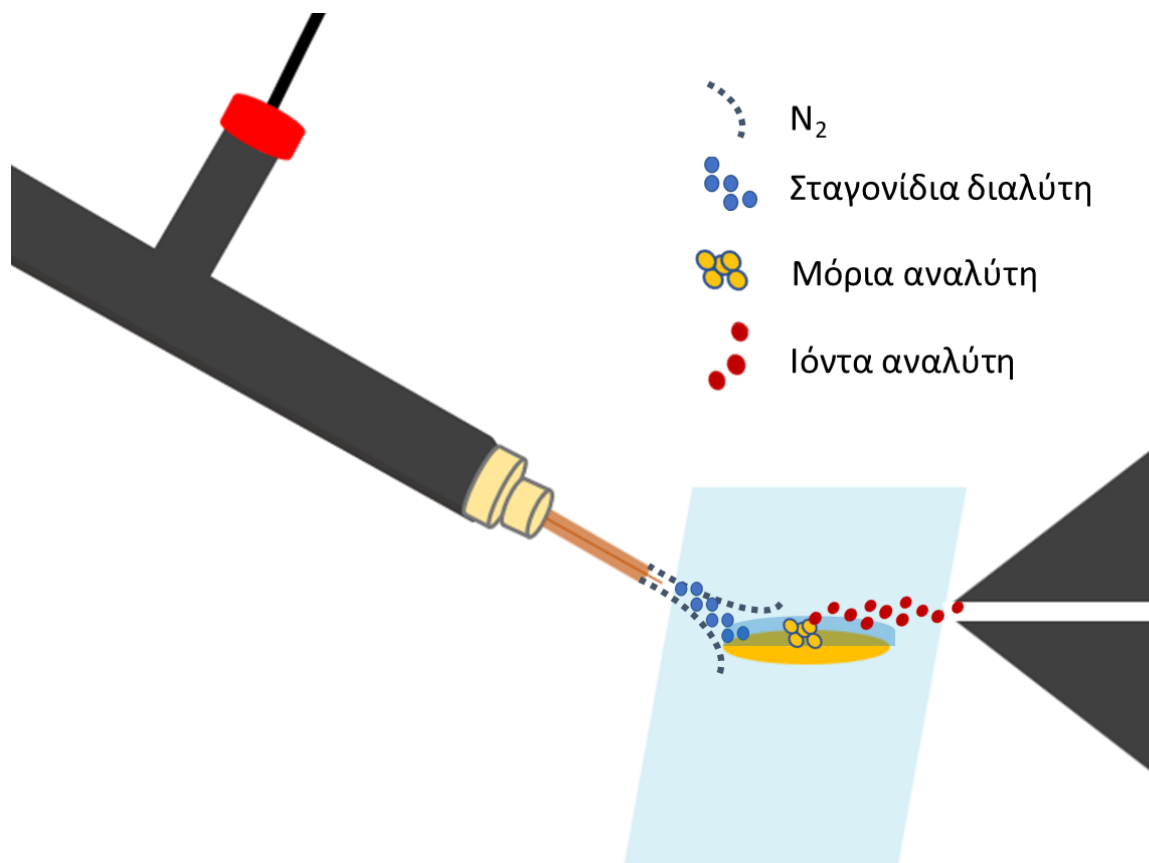
Η διάταξη της τεχνικής αυτής είναι παρόμοια με την τεχνική εκρόφησης με ηλεκτροψεκασμό, που περιγράφηκε στην ενότητα 1.3.1. Η βασική διαφορά της διάταξης είναι ότι στο EASI δεν χρησιμοποιείται δυναμικό, καθιστώντας την ακόμα πιο εύκολη στο στήσιμο. Πράγματι, η διάταξη του EASI δεν είναι εμπορικά διαθέσιμη, ωστόσο μπορεί

πολύ ευκολά να “στηθεί” με απλά εξαρτήματα και εργαλεία που είναι διαθέσιμα στο εργαστήριο (βλ. Κεφάλαιο 2).

Στην εικόνα 9, παριστάνεται γραφικά η διάταξη της τεχνικής EASI βασισμένη σε αυτή που στήθηκε στο εργαστήριο. Ένας διαλύτης εισέρχεται σε έναν λεπτό τριχοειδή σωλήνα τηγμένης πυριτίας και παράλληλα στο σύστημα διοχετεύεται αέριο άζωτο, η ομοαξονική ροή του οποίου στο ακροφύσιο εκνεφώνει τον διαλύτη (εικόνα 10) με τον τρόπο που περιγράφηκε στην ενότητα 1.3.2. Όπως αναπαρίσταται στην εικόνα 10, το παραγόμενο αερόλυμα προσπίπτει στην επιφάνεια όπου βρίσκεται το δείγμα, δημιουργώντας αρχικά μια στιβάδα από τον διαλύτη στην επιφάνεια του δείγματος, σε αυτό το στρώμα διαλύτη είναι δυνατόν να λάβει μέρος εκχύλιση του αναλύτη, τα μόρια του αναλύτη εκροφούνται από την επιφάνεια και εισάγονται στο φασματοόμετρο μάζας, όπου τα ιοντισμένα αναλύονται.



Εικόνα 9 Διάταξη εκρόφησης με ιοντισμό υπερηχητικής εκνέφωσης



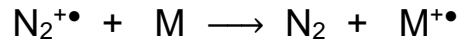
Εικόνα 10 Ακροφύσιο εκνεφωτή όπου παράγεται το αερόλυμα.

Καθώς στο EASI δεν χρησιμοποιείται ηλεκτρικό δυναμικό κατά την εκνέφωση του διαλύτη είναι εύλογο να δημιουργείται η απορία για το πως σχηματίζονται τα ιόντα του αναλύτη κατά την εκρόφηση. Πολλές μελέτες έχουν διεξαχθεί τα χρόνια που ακολούθησαν την ανάπτυξη της τεχνικής. Αρκετά πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι τα ιόντα του αερολύματος δεν επηρεάζουν τον ιοντισμό του αναλύτη. Σε μία έρευνα που δημοσιεύθηκε το 2010<sup>16</sup> για την ανάλυση μια φαρμακευτικής ταμπλέτας με τη μέθοδο του EASI, χρησιμοποιήθηκαν αρκετοί διαλύτες αερολύματος με διαφορετικές σταθερές ιοντισμού  $pK_a$ . Καθώς το αερόλυμα προσέπιπτε στην επιφάνεια του χαπιού, μια στρώση υγρού σχηματιζόταν και άρα πραγματοποιούνταν εκχύλιση της φαρμακευτικής ουσίας. Αν ο διαλύτης επηρέαζε τον ιοντισμό της φαρμακευτικής ουσίας, το αναμενόμενο θα ήταν ότι ο διαλύτης με χαμηλότερο  $pK_a$  θα οδηγεί σε υψηλότερες εντάσεις στο φάσμα, ωστόσο κάτι τέτοιο δεν συνέβη. Ακόμα, στην ίδια μελέτη<sup>10</sup> χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης δευτεριωμένο ακετονιτρίλιο,  $CD_3CN$ , όμως στο φάσμα μάζας τα μοριακά ιόντα αντιστοιχούσαν σε πρωτονιωμένα μόρια  $[M+H]^+$  και όχι δευτεριωμένα  $[M+D]^+$ .

Παρατηρήθηκε ότι η ένταση των ιόντων αυξάνεται με την αυξανόμενη ροή αζώτου. Όποτε η υπόθεση ήταν ότι η ροή του αερίου ίσως διαδραματίζει κάποιο ρόλο στον ιοντισμό του αναλύτη. Η δημοσίευση αυτή<sup>16</sup> προτείνει ότι τα μόρια του αζώτου εξ αιτίας

της υψηλής κινητικής τους ενέργειας και των κρούσεων που συμβαίνουν μεταξύ τους, ιοντίζονται σε  $N_2^{+\bullet}$  και στην συνέχεια πραγματοποιείται μια σειρά από αντιδράσεις μεταφοράς φορτίων με τα μόρια του αναλύτη.

Η κατιοντική ρίζα  $N_2^{+\bullet}$  αντιδρά με μόρια αναλύτη M προς σχηματισμό  $M^{+\bullet}$ .



Η ασταθής αυτή ρίζα,  $M^{+\bullet}$ , που μπορεί να ανιχνευτεί σε χαμηλές εντάσεις από το φασματοόμετρο, μπορεί να επάγει την πρωτονιώση άλλων μορίων αναλύτη, όπως φαίνεται στην παρακάτω χημική εξίσωση:



Ο μηχανισμός αυτός εξηγεί τα παρατηρούμενα δεδομένα στην συγκεκριμένη μελέτη, ωστόσο είναι τελείως διαφορετικός από το μηχανισμό ιοντισμού στο συμβατικό SSI, που περιγράφηκε στην ενότητα 1.3.2.

## Σκοπός Διατριβής

Η ραγδαία ανάπτυξη των τεχνολογικών και των βιολογικών επιστημών τα τελευταία χρόνια φέρνει στο επίκεντρο της επιστημονικής έρευνας τον τομέα της αναλυτικής χημείας και κάνει ολοένα και πιο επιτακτική την ανάγκη για ανάπτυξη νέων, αποδοτικότερων και αμεσότερων μεθόδων χημικής ανάλυσης. Επιπλέον, ο σημερινός τρόπος ζωής έχει ως επίπτωση την δραματική αύξηση στο ποσοστό εκδήλωσης ασθενειών, που η μελέτη τους απαιτεί μεταξύ άλλων και την επιφανειακή απεικόνιση βιολογικών ιστών. Έτσι πέρα από γρήγορες και αποδοτικές αναλυτικές τεχνικές απαιτείται και η ανάπτυξη καινοτόμων τεχνικών που θα επιτρέπουν την επιφανειακή ανάλυση.

Στην συγκεκριμένη μεταπτυχιακή διατριβή παρουσιάζεται η ανάλυση διαφόρων δειγμάτων από επιφάνειες σε συνθήκες ανοιχτής ατμόσφαιρας. Η μέθοδος που αναπτύχθηκε για αυτόν τον σκοπό είναι η φασματομετρία μάζας με εκρόφηση και ιοντισμό υπερηχητικής εκνέφωσης, Desorption Sonic-Spray Ionization (DeSSI) ή όπως προτιμάται να καλείται, Easy Ambient Sonic-Spray Ionization (EASI). Η τεχνική αυτή είναι σχετικά νέα στον χώρο της ανάλυσης και παρουσιάζει αρκετό ενδιαφέρον μιας και είναι πιο ήπια τεχνική ιοντισμού από την εκρόφηση με ηλεκτροψεκασμό (DESI) και είναι πιο εύκολη η ανάπτυξή της διάταξης της.

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής ήταν η ανάπτυξη του EASI-MS στο εργαστήριο, η βελτιστοποίηση του και η παρουσίαση ενδιαφερουσών εφαρμογών ανάλυσης με την χρήση του. Ως εκ τούτου πραγματοποιήθηκαν οι απευθείας αναλύσεις δειγμάτων όπως ολόκληρων κόκκων καφέ, πρωτεϊνών από επιφάνεια TEFLON® και χαρτονομισμάτων.

Ιδίως στην περίπτωση της ανάλυσης πρωτεϊνών δεν έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες επιφανειακής ανάλυσης πρωτεϊνών με την μέθοδο EASI-MS, η οποία ωστόσο φαίνεται να παρουσιάζει αρκετό ενδιαφέρον.

## Κεφάλαιο 2 | Ανάπτυξη συστήματος EASI-MS

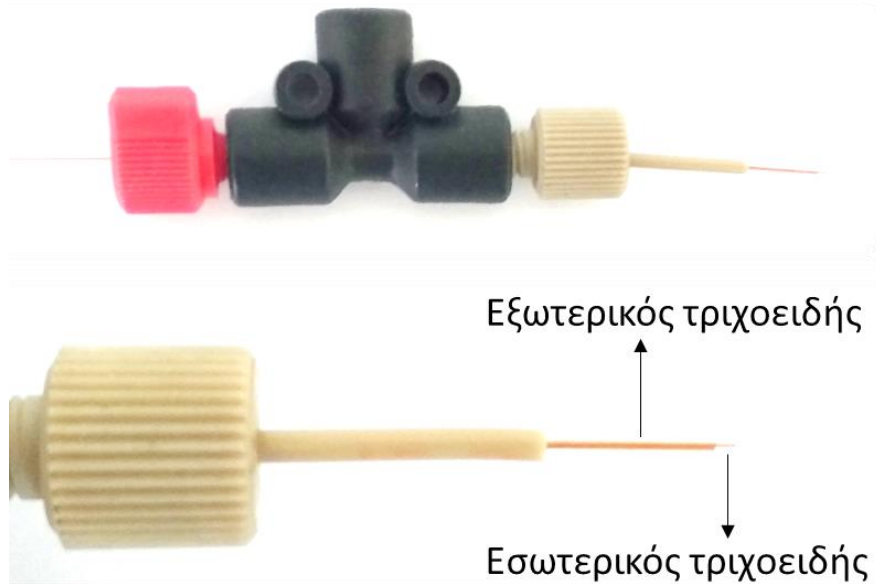
### 2.1 Όργανα – Εξοπλισμός

Τα όργανα/υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη της μεθόδου EASI-MS αναφέρονται παρακάτω:

- Φασματόμετρο μάζας ιοντικής παγίδας, Thermo Scientific LCQ Advantage.
- Αντλία σύριγγας, Cole Parmer
- Home-Built εκνεφωτής
- Γεννήτρια αζώτου, Peak Scientific
- Φιάλη πεπιεσμένου αζώτου, εξοπλισμένη με μειωτήρα Messo
- Τριχοειδείς τηγμένης πυριτίας, εσωτερικής διαμέτρου 540 nm και εξωτερικής διαμέτρου-690 μm Polymicron
- Τριχοειδείς τηγμένης πυριτίας, εσωτερικής διαμέτρου 50 nm και εξωτερικής διαμέτρου-360 μm Polymicron

Το πρώτο και πιο καθοριστικό βήμα για την παρούσα εργασία ήταν η ανάπτυξη της μεθόδου και καθώς η διάταξη του ιοντισμού με εκρόφηση υπερηχητικής εκνέφωσης δεν είναι εμπορικά διαθέσιμη, το στήσιμο της διάταξης στο εργαστήριο.

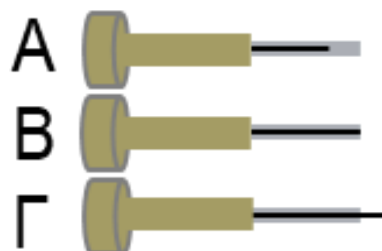




**Εικόνα 11** Πάνω, Ο εκνεφωτής που κατασκευάστηκε στο εργαστήριο  
Κάτω, ο εσωτερικός και εξωτερικός τριχοειδής

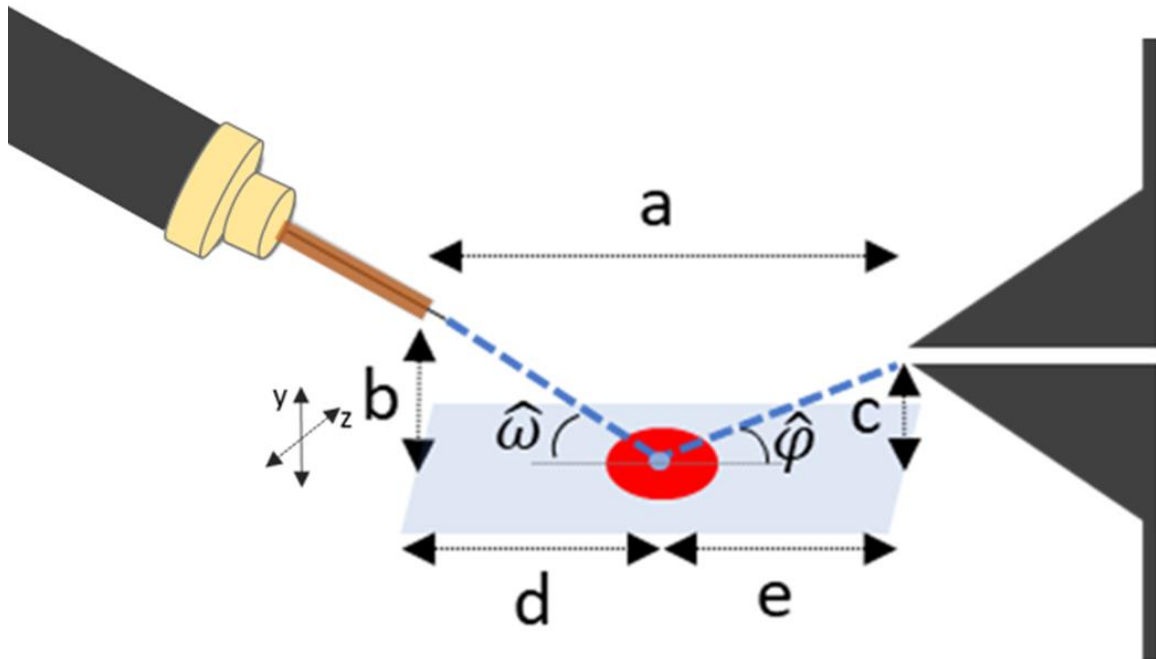
Το σύστημα εκνέφωσης κατασκευάστηκε εύκολα με πρώτες ύλες του εργαστηρίου. Τον εκνεφωτή αποτελεί ένα T με σφικτήρες από υλικό PEEK (polyether ether ketone), μέσα από τον οποίο διέρχεται ένας τριχοειδής σωλήνας τηγμένου πυριτίου με διαμέτρους (εσωτερική και εξωτερική) 50  $\mu\text{m}$  και 360  $\mu\text{m}$ . Στο άκρο του εκνεφωτή ο τριχώδης περιβάλλεται από έναν δεύτερο, εξωτερικό τριχοειδή με διαμέτρους 540  $\mu\text{m}$  και 690  $\mu\text{m}$  και μήκους, από τον οποίο διέρχεται το αέριο εκνέφωσης.

Με χρήση ειδικής μεγεθυντικής κάμερας, τοποθετούμε τον εσωτερικό τριχοειδή να εξέχει περίπου 1 mm από τον εξωτερικό. Η σχετική θέση του εσωτερικού και εξωτερικού τριχοειδή είναι ένα αρκετά κρίσιμο σημείο καθώς επηρεάζει άμεσα την εκνέφωση του διαλύτη. Αν ο εσωτερικός τριχοειδής τελειώνει πριν τον εξωτερικό (Α), φαίνεται να μην πραγματοποιείται ιοντισμός<sup>17</sup>. Όταν τα άκρα των τριχοειδών συμπίπτουν (Β), αρχίζει να παρατηρείται ιοντισμός, ενώ στην περίπτωση που ο εσωτερικός εξέχει (Γ), ο ιοντισμός είναι μέγιστος.



**Εικόνα 12** Τρόποι σχετικής θέσης τριχοειδών

Ο εκνεφωτής αφού κατασκευάστηκε, τοποθετήθηκε σε κατάλληλη βάση, που δίνει την δυνατότητα μεταβολής της θέσης του και της γωνίας του. Ακόμα, ανάμεσα στην βάση του εκνεφωτή και στην είσοδο του φασματόμετρου υπάρχει μία βάση για το δείγμα, η οποία επιτρέπει, και αυτή, την αυξομείωση του ύψους και την μετακίνηση του δείγματος. Στην εικόνα 13 παρουσιάζονται οι βασικές γεωμετρικές παράμετροι της διάταξης.



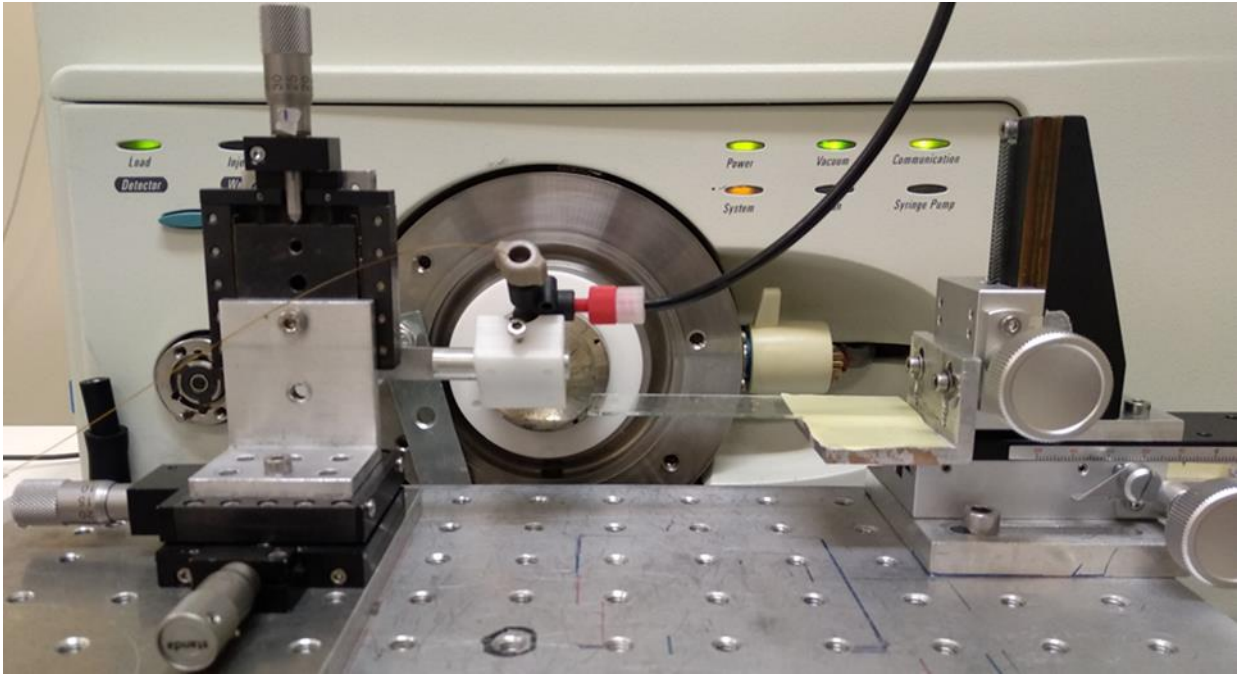
Εικόνα 13 Σχηματική απεικόνιση γεωμετρικών παραμέτρων της διάταξης.

- |                |  |
|----------------|--|
| <b>a</b>       | απόσταση εκνεφωτή από είσοδο φασματόμετρου                       |
| <b>b</b>       | ύψος εκνεφωτή από βάση δείγματος                                 |
| <b>c</b>       | ύψος εισόδου φασματόμετρου από βάση δείγματος                    |
| <b>d</b>       | απόσταση εκνεφωτή από δείγμα                                     |
| <b>e</b>       | απόσταση δείγματος από είσοδο φασματόμετρου                      |
| $\hat{\omega}$ | γωνία εκνεφωτή με την επιφάνεια της βάσης δείγματος              |
| $\hat{\phi}$   | γωνία εισόδου φασματόμετρου με την επιφάνεια της βάσης δείγματος |

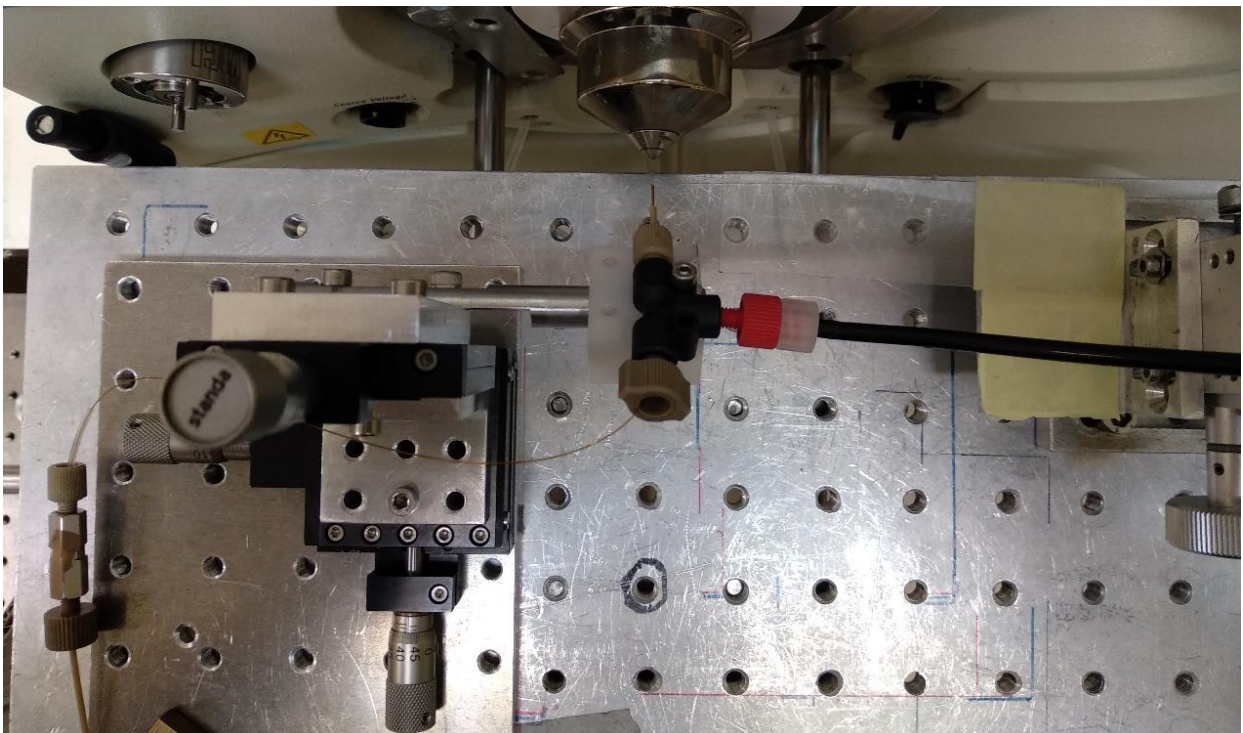
Όλες οι παραπάνω παράμετροι μπορούν να μεταβληθούν απευθείας, χειροκίνητα με κατάλληλη ρύθμιση της βάσης του εκνεφωτή ή και της βάσης του δείγματος. Κάθε διαφορετικό είδος δείγματος που αναλύθηκε απαιτούσε και διαφορετική ρύθμιση των γεωμετρικών παραμέτρων. Αυτές σε κάθε περίπτωση προσδιορίζονταν με ταυτόχρονη

χειροκίνητη μεταβολή και παρακολούθηση του φάσματος. Στην επόμενη ενότητα, για κάθε είδος ανάλυσης αναφέρονται οι γεωμετρικοί παράμετροι.

Στις εικόνες 14 και 15 παρουσιάζονται φωτογραφίες της διάταξης του EASI που στήθηκε στο εργαστήριο.



Εικόνα 14 Φωτογραφία της διάταξης από το εργαστήριο (Πρόσοψη).



Εικόνα 15 Φωτογραφία της διάταξης από το εργαστήριο (Κάτοψη)

## Κεφάλαιο 3 | Ανάλυση ολόκληρων κόκκων καφέ

### 3.1 Εισαγωγή

Ο καφές πρόκειται για το εμπόρευμα με τη δεύτερη μεγαλύτερη ζήτηση μετά το πετρέλαιο, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στην παγκόσμια οικονομία<sup>18</sup>. Καταναλώνεται καθημερινά από ανθρώπους σε όλον τον κόσμο, μιας και η καφεΐνη δρα ως διεγερτικό του κεντρικού νευρικού συστήματος, προσφέροντας έτσι ενέργεια και εγρήγορση στους καταναλωτές του. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια έχει πάψει να θεωρείται ως απλά ένα διεγερτικό ρόφημα. Την δεκαετία του '60 ξεκίνησε στην Καλιφόρνια το 3<sup>rd</sup> Wave Coffee movement το οποίο είναι μια κίνηση για την παραγωγή καφέ υψηλής ποιότητας και θεωρεί τον καφέ ως ένα βιοτεχνικό προϊόν, όπως το κρασί, παρά ως εμπόρευμα. Στα χρόνια που ακολούθησαν το 3<sup>rd</sup> Wave Coffee διαδόθηκε στις υπόλοιπες δυτικές χώρες και πλέον πολλοί είναι εκείνοι, που αναζητούν ένα ποιοτικό φλυτζάνι καφέ πλούσιο σε γεύσεις και αρώματα, γεγονός που αναγάγει την όλη διαδικασία παραγωγής του καφέ, από την καλλιέργεια έως την εκχύλιση του, σε επιστήμη<sup>18</sup>.

Κατά την παρούσα έρευνα, αναλύθηκαν ωμοί κόκκοι καφέ διαφόρων ποικιλιών και οι αντίστοιχοι ψημένοι κόκκοι καφέ. Σκοπός των αναλύσεων αυτών ήταν η εφαρμογή της μεθόδου EASI-MS για την ποιοτική ταυτοποίηση όσο δυνατόν περισσότερων μεταβολιτών από την επιφάνεια των κόκκων, αλλά και την παρατήρηση μεταβολής των μεταβολιτών κατά τον καβούρδισμα και την αποφλοιώση των κόκκων.

### 3.2 Πειραματικό μέρος

#### Αντιδραστήρια

Ακετονιτρίλιο, Chromasolv gradient grade, for HPLC,  $\geq 99.9\%$ , Sigma Aldrich

Μεθανόλη, Chromasolv for HPLC,  $\geq 99.9\%$ , Sigma Aldrich

Οξικό οξύ,  $\geq 99.8\%$ , Sigma Aldrich

#### Δείγματα

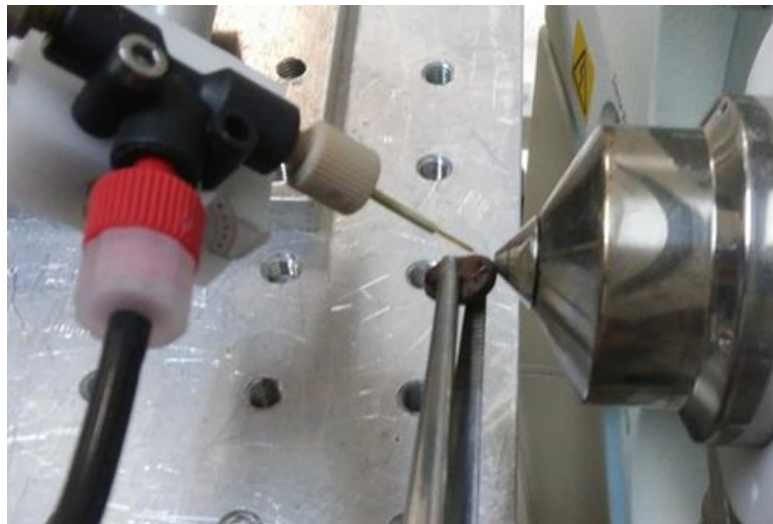
Ωμοί κόκκοι καφέ Arabica 100% (Guatemala)

Καβουρδισμένοι κόκκοι καφέ Arabica 100% (Guatemala)

Ωμοί κόκκοι καφέ Robusta 100% (Jimas)

Καβουρδισμένοι κόκκοι καφέ Robusta 100% (Jimas)

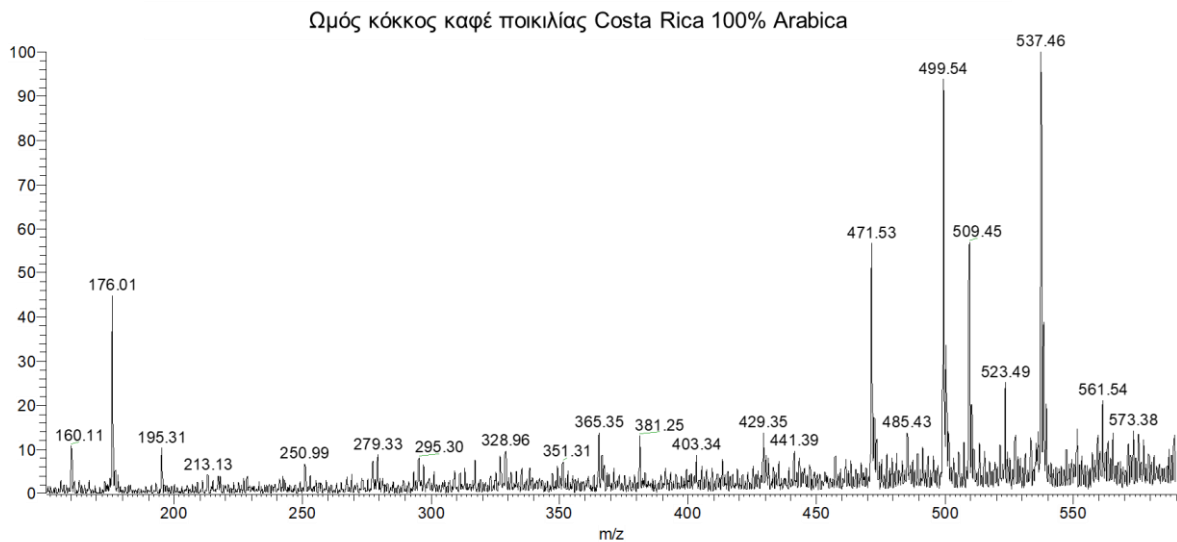
Κάθε κόκκος καφέ στηρίχθηκε με τσιμπίδα και τοποθετήθηκε μπροστά από την είσοδο του φασματόμετρου μάζας. Η πίεση του αζώτου ρυθμίστηκε στα 6 bar. Ως διαλύτης εκνέφωσης χρησιμοποιήθηκε ακετονιτρίλιο ή μεθανόλη με ροή 20  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Η γωνία του εκνεφωτή, κατόπιν σειράς παρατηρήσεων ρυθμίστηκε στις 35 μοίρες. Η απόσταση του κόκκου από την είσοδο του MS και του εκνεφωτή μεταβάλλονταν κατά την διάρκεια της ανάλυσης.



Εικόνα 16 Τοποθέτηση δείγματος κόκκου καφέ για ανάλυση.

### 3.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση

#### 3.3.1 Ωμοί κόκκοι καφέ (Θετικά Ιόντα)

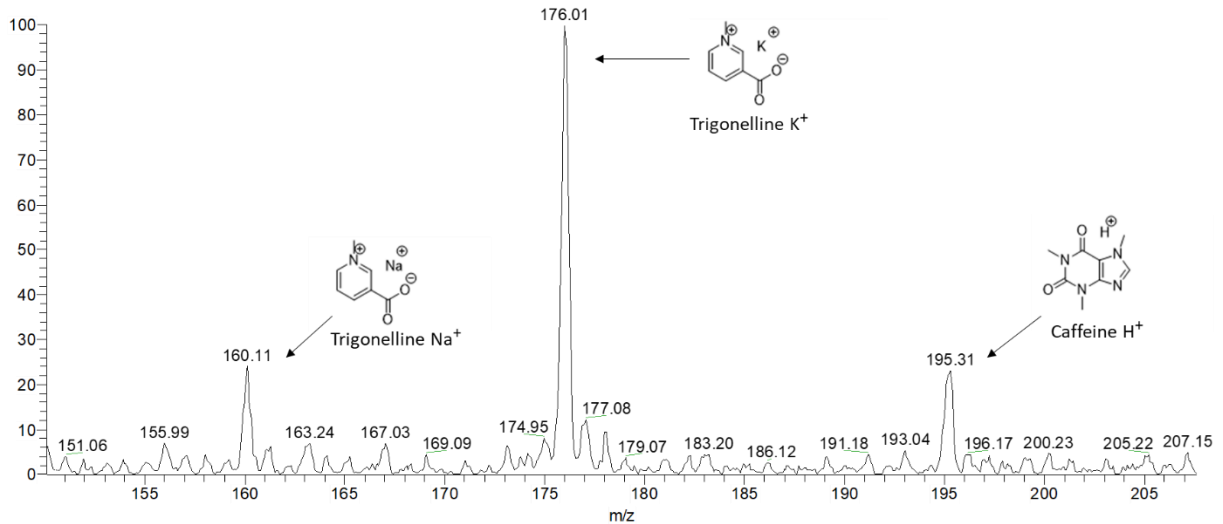


**Εικόνα 17** Φάσμα EASI-MS (+) ωμού κόκκου καφέ ποικιλίας Costa Rica, 100% Arabica, θετικά ιόντα.

Στην εικόνα 17 φαίνεται το φάσμα μάζας των θετικών ιόντων των ενώσεων που ανιχνεύονται στην επιφάνεια ενός ανέπαφου κόκκου καφέ ποικιλίας Arabica.

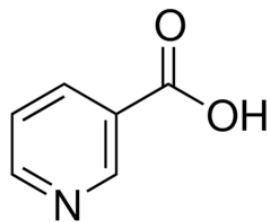
Γενικά, στην επιφάνεια των ωμών κόκκων καφέ υπάρχουν αρκετές ενώσεις οι οποίες έχουν σχηματιστεί κατά την διαδικασία της παραγωγής, έτσι το προφίλ των φασμάτων διαφέρει ανάλογα με την ποικιλία, τον τρόπο συγκομιδής και όλων των διαδικασιών που ακολουθούν την συγκομιδή.

Ωμός κόκκος καφέ ποικιλίας Costa Rica 100% Arabica



**Εικόνα 18** Φάσμα EASI-MS (+) ωμού κόκκου καφέ Costa Rica, 100% Arabica, θετικά ιόντα, εύρος m/z 150-210.

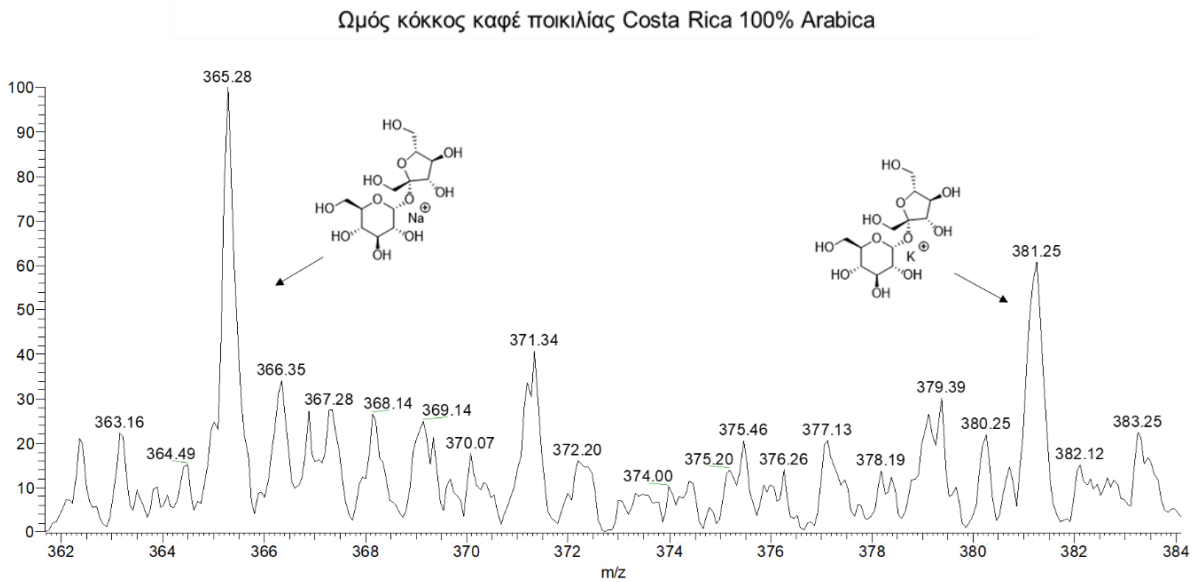
Η τριγονελλίνη που ανιχνεύεται στους ωμούς κόκκους πρόκειται για ένα αλκαλοειδές, παράγωγο της νιασίνης (βιταμίνη Β3 ή νικοτινικό οξύ) με μοριακό τύπο  $C_7H_7NO_2$  και μοριακό βάρος 137,14 g/mol. Στην ύπαρξη της οφείλεται ο σχηματισμός σημαντικών ενώσεων κατά το καβούρδισμα που συνεισφέρουν στα αρώματα του καφέ<sup>19</sup>. Στις υψηλές θερμοκρασίες του καβουρδίσματος η τριγονελλίνη διασπάται μερικώς προς σχηματισμό πυριδινών και νιασίνης. Συγκεκριμένα το νικοτινικό οξύ σχηματίζεται κατά την απομεθυλίωση της τριγονελλίνης<sup>20</sup>.



**Νιασίνη**

Η καφεΐνη είναι ένα αλκαλοειδές το οποίο ανήκει στην οικογένεια των μεθυλοξανθίνων, έχει μοριακό τύπο  $C_8H_{10}N_4O_2$  και με μοριακό βάρος 194,19 g/mol. Αποτελεί διεγερτικό του κεντρικού νευρικού συστήματος καθώς ανταγωνίζεται την αδενοσίνη κατά την πρόσδεση στους ειδικούς υποδοχής του εγκεφάλου<sup>21</sup>. Η καφεΐνη είναι μία από τις πολλές ενώσεις που συμβάλει στην γεύση του καφέ. Ο φυσικός της ρόλος ωστόσο στους καρπούς των καφεόδεντρων είναι να προστατεύει τους καρπούς από παράσιτα και έντομα μιας και αποτελεί φυσικό παρασιτοκτόνο που παραλύει τους οργανισμούς αυτούς<sup>22</sup>. Η συγκέντρωση της καφεΐνης στον καφέ διαφέρει και εξαρτάται από την ποικιλία και το καβούρδισμα. Η ποικιλία arabica φαίνεται να περιέχει την μισή

ποσότητα καφεΐνης από την ποικιλία robusta. Επίσης το έντονο καβούρδισμα μειώνει το ποσοστό της καφεΐνης.



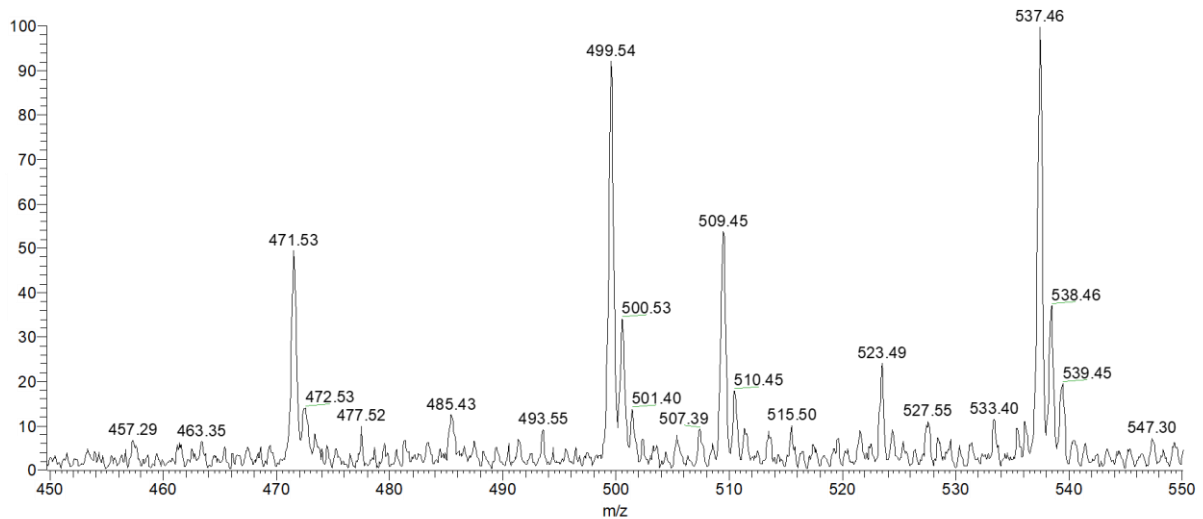
**Εικόνα 19** Φάσμα EASI-MS (+) ωμού κόκκου καφέ ποικιλίας Costa Rica, 100% Arabica, θετικά ιόντα, εύρος m/z 360-385.

Περίπου το 70% της μάζας ενός κόκκου καφέ αντιστοιχεί σε υδατάνθρακες. Στους ωμούς κόκκους καφέ της Arabica τα επίπεδα σουκρόζης κυμαίνονται από 6.25 έως 8.45%, ενώ της Robusta από 0.9% το 4.85%<sup>23</sup>. Η σουκρόζη συμβάλει στην γλυκιά και απαλή γεύση του καφέ, για αυτό και ο καφές Arabica χαρακτηρίζεται πιο γλυκός και απαλός από την Robusta.

Οι κορυφές με την μεγαλύτερη σχετική αφθονία που συναντάμε στο εύρος 450-550 m/z αντιστοιχούν σε μία κατηγορία ενώσεων που πρόκειται για αμιδία λιπαρών οξέων και σεροτονίνης, N-alkanoyl-5-hydroxytryptamides ή για συντομία C-5HTs και φαίνεται πως η παρουσία τους σχετίζεται με στομαχικές διαταραχές κατά την κατανάλωση καφέ σε άτομα με ευαισθησία<sup>24</sup>.



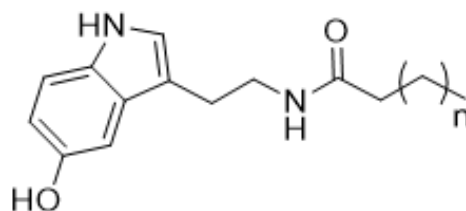
Ωμός κόκκος καφέ ποικιλίας Costa Rica 100% Arabica



**Εικόνα 20** Φάσμα EASI-MS (+) ωμού κόκκου καφέ ποικιλίας Costa Rica, 100% Arabica, θετικά ιόντα, εύρος m/z 450-550.

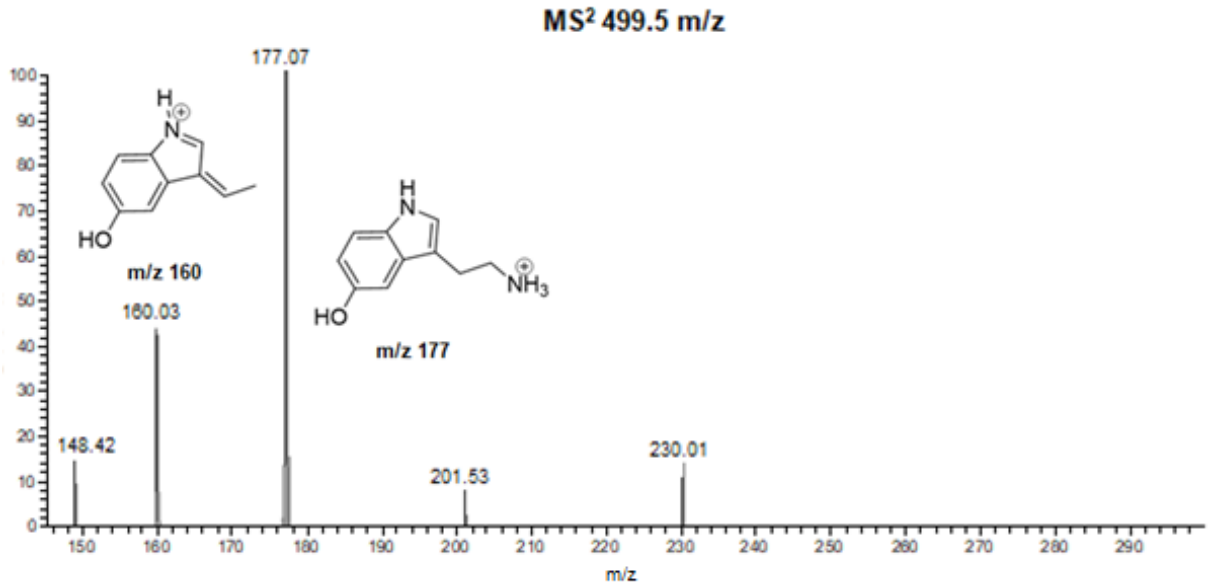
**Πίνακας 1** C-5HTs που παρατηρούνται στο φάσμα μάζας της εικόνας 20

m/z	Μοριακός τύπος	Ιόν
471,53	$C_{30}H_{50}N_2O_2$	$C_{20}5HT (M+H)^+$
493,55	$C_{30}H_{50}N_2O_2$	$C_{20}5HT (M+Na)^+$
499.54	$C_{32}H_{54}N_2O_2$	$C_{22}5HT (M+H)^+$
509,45	$C_{30}H_{50}N_2O_2$	$C_{20}5HT (M+K)^+$
523,49	$C_{32}H_{56}N_2O_2$	$C_{22}5HT (M+Na)^+$
537,46	$C_{32}H_{54}N_2O_2$	$C_{22}5HT (M+K)^+$

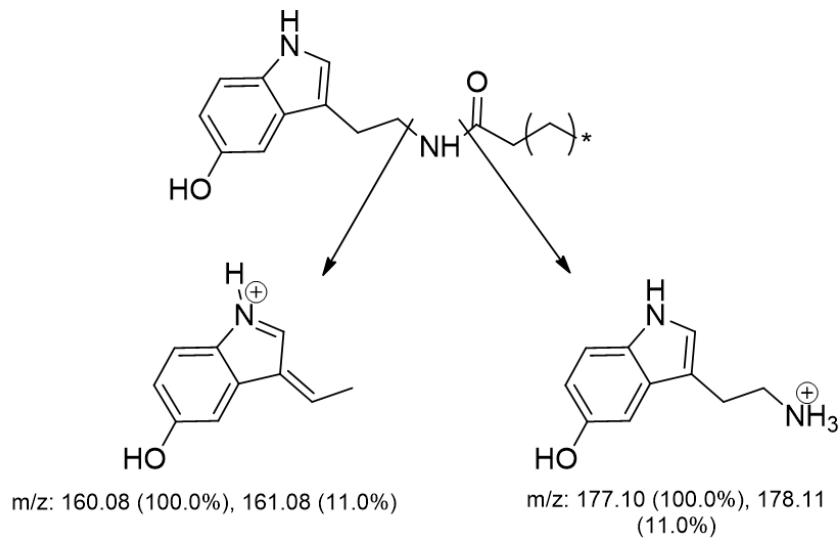


**N-alkanoyl-5-hydroxytryptamides (C-5HTs)**

Η ταυτοποίηση των κορυφών αυτών έγινε βιβλιογραφικά<sup>25, 26</sup> σε συνδυασμό με πειράματα χαρακτηρισμού MS/MS. Συγκεκριμένα σε πειράματα MS/MS αυτών των κορυφών παρατηρήθηκαν τα χαρακτηριστικά θραύσματά στα 160 και 177 m/z τα οποία αντιστοιχούν σε απώλεια των υδρογονοανθρακικών αλυσίδων.



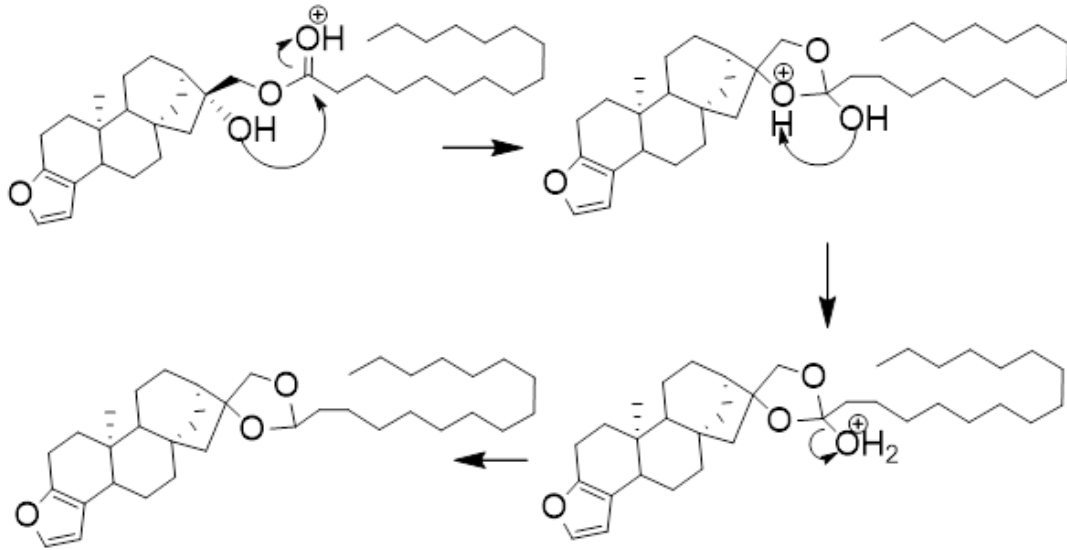
**Εικόνα 21** Φάσμα EASI-MS<sup>2</sup> (+) του ιόντος C<sub>22</sub>5HT (M+H)<sup>+</sup>, 499.5 m/z



**Εικόνα 22** Πιθανός μηχανισμός θραυσματοποίησης C-5HTs

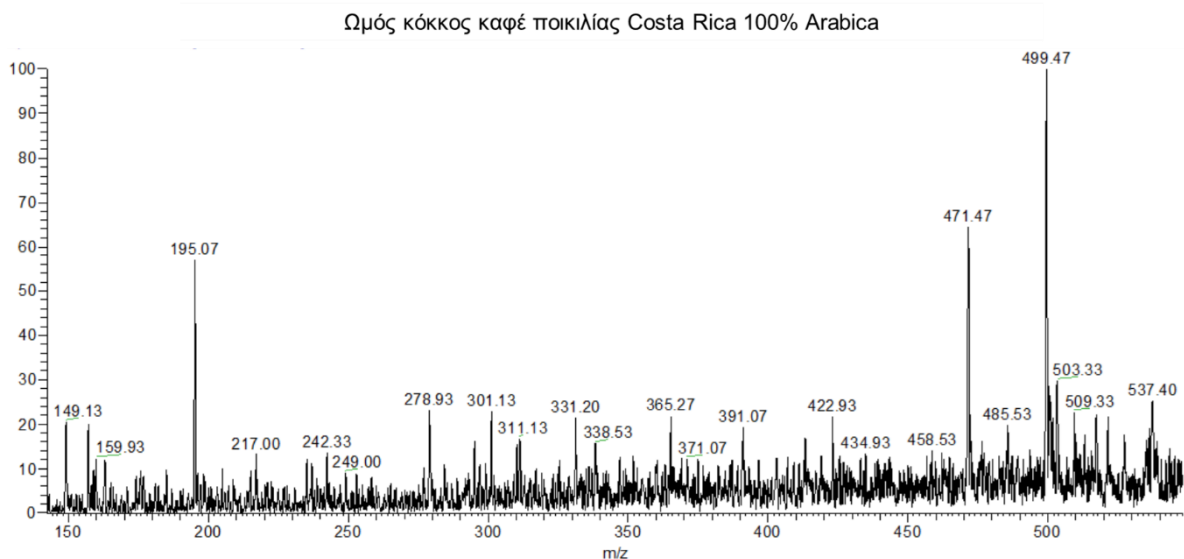
Η κορυφή στα 537,4 μπορεί να αντιστοιχεί ωστόσο, ταυτόχρονα, και σε ένα άλλο ιόν από αυτό που προτείνεται στον πίνακα 1. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία<sup>25</sup> η κορυφή αυτή ανήκει στο ιόν [M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup> ενός διτερπενίου, *cafestol palmitate* χωρίς ωστόσο να αιτιολογείται η απόσπαση νερού από το μόριο.

Στην εικόνα 23 φαίνεται ένας πιθανός μηχανισμός για την απόσπαση νερού από το διτερπένιο. Ο μηχανισμός αυτός προτείνει μία εσωτερική πυρηνόφιλη προσθήκη αλκοόλης σε καρβονύλιο προς σχηματισμό ακετάλης.



**Εικόνα 23** Πιθανός μηχανισμός αφυδάτωσης του διτερπενίου Cafestol palmitate

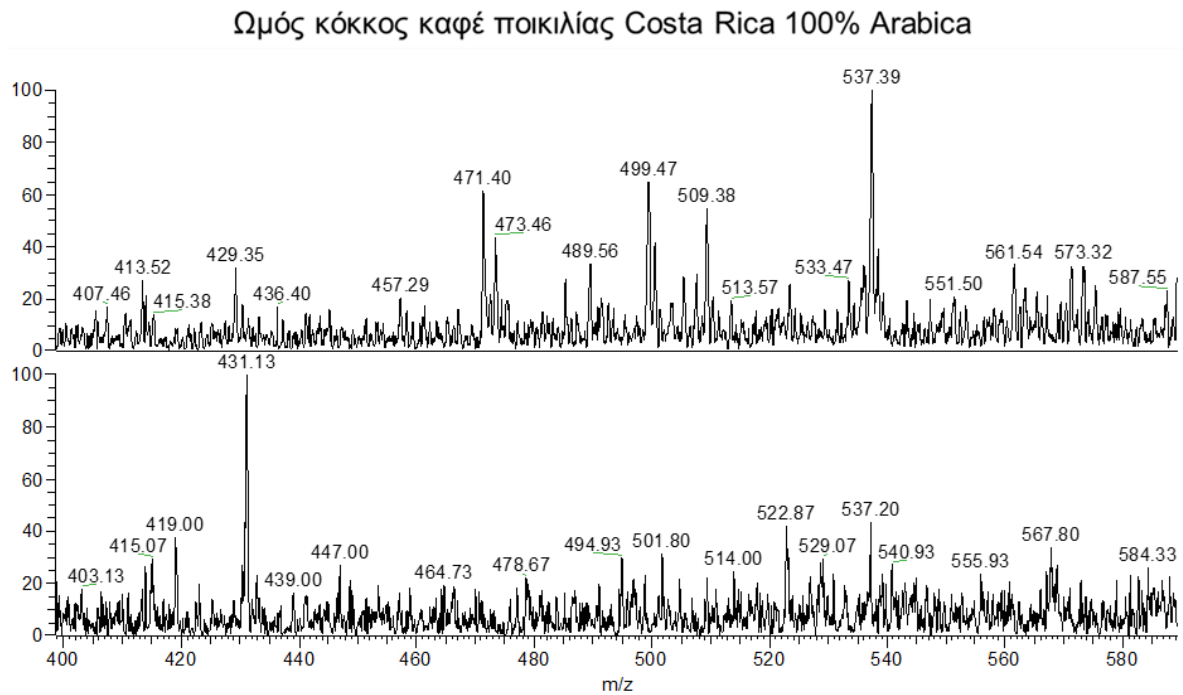
Προκειμένου να εξεταστεί αν πράγματι η κορυφή μπορεί να αντιστοιχεί και στο διτερπένιο, προστέθηκε στον διαλύτη εκνέφωσης 1% HCOOH. Η υπόθεση ήταν ότι η παρουσία οξέος θα αυξήσει την σχετική αφθονία των πρωτονιωμένων ιόντων άρα και της κορυφής στα 537,4 m/z. Ακόμα, η πυρηνόφιλη προσθήκη στο καρβονύλιο καταλύεται από οξέα.



**Εικόνα 24** Φάσμα EASI-MS (+) από ωμό κόκκο καφέ Arabica με προσθήκη 1% HCOOH στο spray

Στο παραπάνω φάσμα παρατηρούμε ότι οι κορυφές που αντιστοιχούν σε πρωτονιωμένα ιόντα ([Caffeine+H]<sup>+</sup>, [C<sub>20</sub>5HT+H]<sup>+</sup>, [C<sub>22</sub>5HT+H]<sup>+</sup>) εμφανίζουν αύξηση στην σχετική ένταση. Αντίθετα η κορυφή στα 537,4 παρουσιάζει μείωση της έντασης της, κάτι που είναι αντίθετο με το ότι αυτή η κορυφή αντιστοιχεί στο αφυδατωμένο διτερπένιο.

Στην εικόνα 25 παρουσιάζονται δύο φάσματα ενός κόκκου καφέ, στο πρώτο ο κόκκος αναλύθηκε άθικτος, ενώ στο δεύτερο η εξωτερική επιφάνεια αφαιρέθηκε με λείανση με ένα ψιλό γυαλόχαρτο.



**Εικόνα 25** Φάσματα EASI-MS (+) από ωμό κόκκο καφέ Arabica.

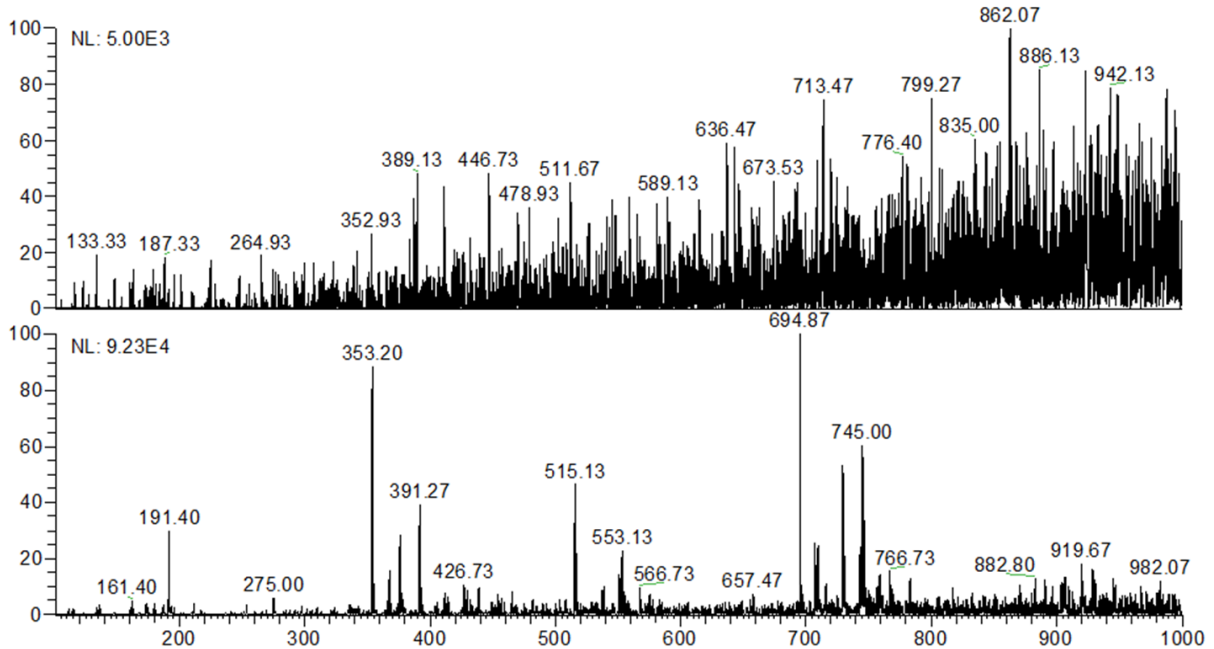
Πάνω, φάσμα χωρίς λείανση της εξωτερικής επιφάνειας. Κάτω, με λείανση της επιφάνειας.

Όπως φαίνεται στην περίπτωση που η εξωτερική επιφάνεια έχει αφαιρεθεί, οι κορυφές των C-5HTs έχουν εξαφανιστεί. Αυτό υποδεικνύει ότι τα C-5HTs βρίσκονται στην εξωτερική επιφάνεια των κόκκων του καφέ. Έτσι, υποθέτουμε ότι ο σχηματισμός των ενώσεων αυτών σχετίζεται με διεργασίες που πραγματοποιούνται στο περιβάλλον. Πράγματι, σύμφωνα με την βιβλιογραφία<sup>25</sup> ο σχηματισμός αυτών των αμιδίων λαμβάνει χώρα κυρίως κατά τις διαδικασίες μετά την συγκομιδή των κόκκων (post-harvest processes). Συγκεκριμένα, μετά την συγκομιδή αφαιρείται η σάρκα από τους καρπούς των καφεόδεντρων και στην συνέχεια οι κόκκοι εκπλένονται σε μεγάλες δεξαμενές και τέλος ξηραίνονται στον ήλιο. Τα C-5HTs, όπως προαναφέρθηκε, σχετίζονται με στομαχικές διαταραχές και, αξίζει να αναφερθεί ότι στο εμπόριο κυκλοφορούν αποφλοιωμένοι κόκκοι καφέ που χαρακτηρίζονται ως stomach-friendly καθώς δεν περιέχουν C-5HTs.

### 3.3.2 Ωμοί κόκκοι καφέ (Αρνητικά Ιόντα)

Προκειμένου να ανιχνευτούν αρνητικά ιόντα ήταν απαραίτητη η λείανση της εξωτερικής επιφάνειας των κόκκων με ένα γυαλόχαρτο, διαφορετικά τα φάσματα που λαμβάνονταν είχαν πολύ χαμηλή ένταση και εμφάνιζαν πολλές κορυφές που επικαλύπτονταν.

Ώμος κόκκος καφέ ποικιλίας Santos, Robusta

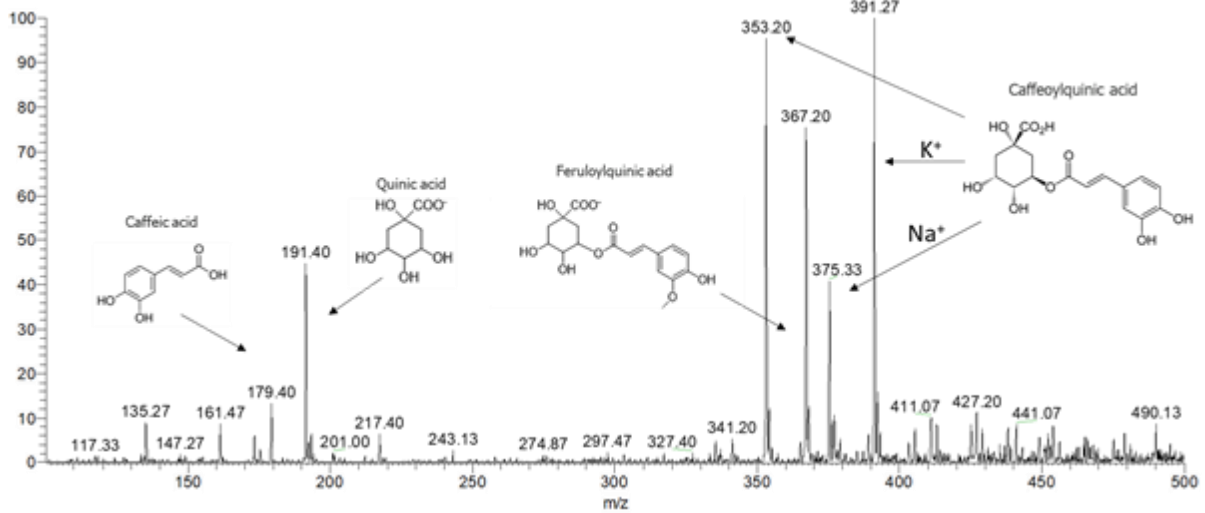


**Εικόνα 26** Φάσματα ESI-MS (-) από ωμό κόκκο καφέ Robusta.

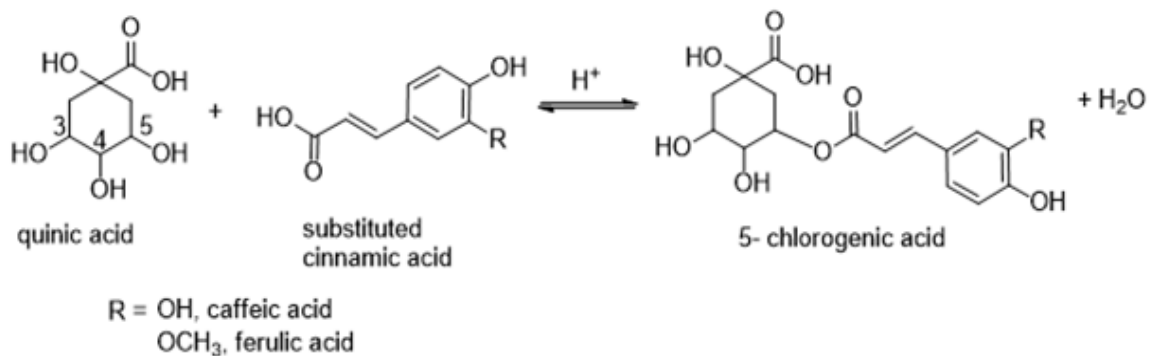
Πάνω, φάσμα χωρίς λείανση της επιφάνειας. Κάτω, με λείανση της επιφάνειας

Στο εύρος των 100-500 m/z παρατηρούμε διάφορα οξέα που υπάρχουν τον καφέ. Τα οξέα αυτά είναι υπεύθυνα για την οξύτητα του καφέ. Τα caffeoylquinic acids και τα feruloylquinic acids είναι τα κύρια χλωρογενικά οξέα που απαντώνται στους ωμούς κόκκους καφέ και είναι αυτά που τους προσδίδουν το χαρακτηριστικό χλωρό άρωμα<sup>27</sup>. Ακόμα στην παρουσία τους οφείλεται η αντιοξειδωτική δράση του καφέ<sup>28</sup>. Ένα σημαντικό μέρος αυτών των οξέων, ωστόσο χάνεται κατά το καβούρδισμα και την εκχύλιση<sup>29</sup>.

Ωμός κόκκος καφέ ποικιλίας Santos, Robusta

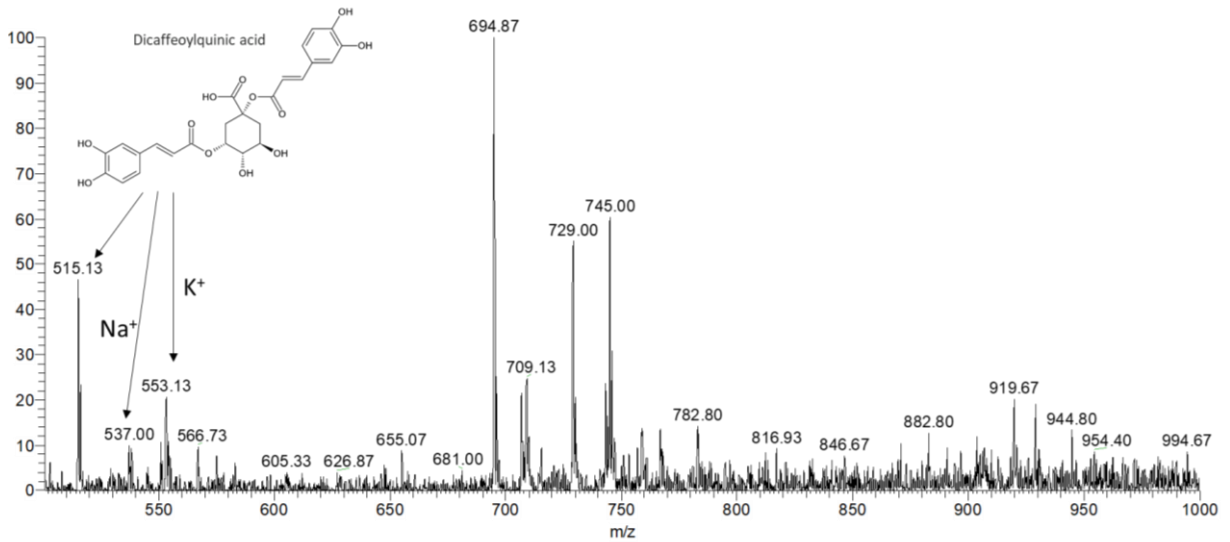


Εικόνα 27 Φάσμα EASi-MS (-) από ωμό κόκκο καφέ Robusta. Εύρος m/z 100-500



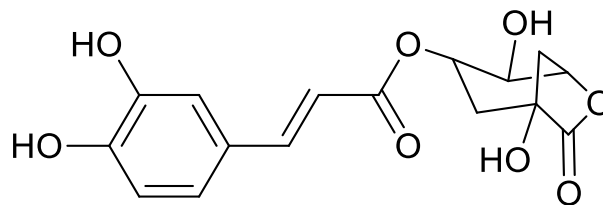
Εικόνα 28 Αντίδραση σχηματισμού χλωρογενικών οξέων.

Τα χλωρογενικά οξέα σχηματίζονται κατά την αντίδραση εστεροποίησης του quinic acid με τα οξέα p-coumaric, caffeic και ferulic<sup>30</sup>. Όπως παρατηρείται στο quinic υπάρχουν τέσσερις υδροξυλομάδες, αρά και τέσσερις θέσεις στις οποίες μπορεί να πραγματοποιηθεί η εστεροποίηση. Ωστόσο σύμφωνα με την βιβλιογραφία, στον καφέ απαντώνται τα 5-χλωρογενικά οξέα<sup>30</sup>.



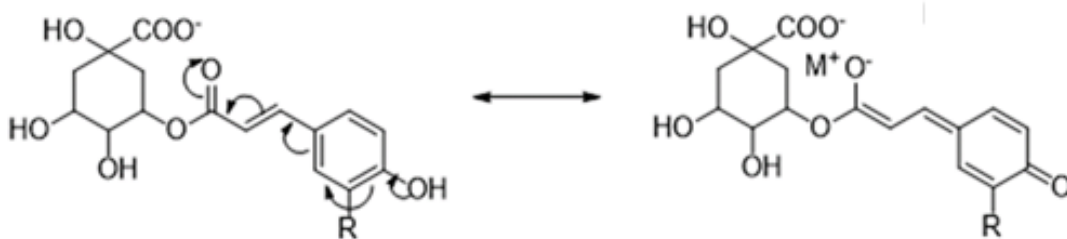
Εικόνα 29 Φάσμα αρνητικών ιόντων από ωμό κόκκο καφέ Robusta. Εύρος m/z 500-1000.

Οι κορυφές στο εύρος 690-550 m/z δεν ταυτοποιήθηκαν κατά την συγκεκριμένη μελέτη. Ωστόσο, σύμφωνα με την βιβλιογραφία<sup>27</sup> σε αυτό το εύρος εμφανίζονται διάφοροι γλυκοζίτες διτερπενίων και γλυκοζίτες των χλωρογενικών οξέων. Οι κορυφές στα 694 και 709 m/z θα μπορούσαν να αντιστοιχούν σε adducts Na<sup>+</sup> και K<sup>+</sup> με το διμερές του 3-Caffeoylquinic-1,5-lactone ο συντακτικός τύπος του οποίου φαίνεται παρακάτω.



Exact Mass: 336.08

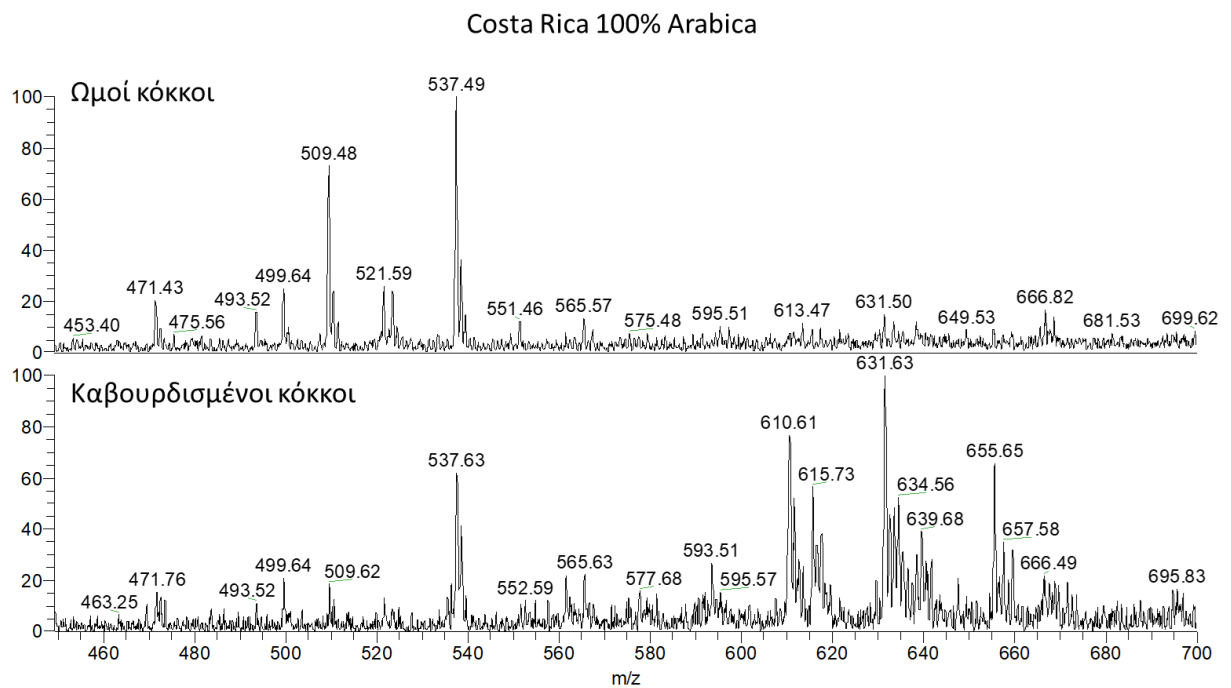
Στα δύο προηγούμενα φάσματα παρατηρήθηκαν κορυφές των caffeoylquinic και dicafeoylquinic acid με ιόντα Na<sup>+</sup> και K<sup>+</sup>. Αυτά τα αρνητικά φορτισμένα ιόντα μπορούν να προκύψουν μέσω μίας δομής συντονισμού που φαίνεται στην εικόνα 30. Σε αυτή την δομή οι αρνητικά φορτισμένες ομάδες μπορούν να συγκρατήσουν ένα κατιόν.



Εικόνα 30 Δομή συντονισμού χλωρογενικών οξέων.

### 3.3.3 Καβουρδισμένοι κόκκοι

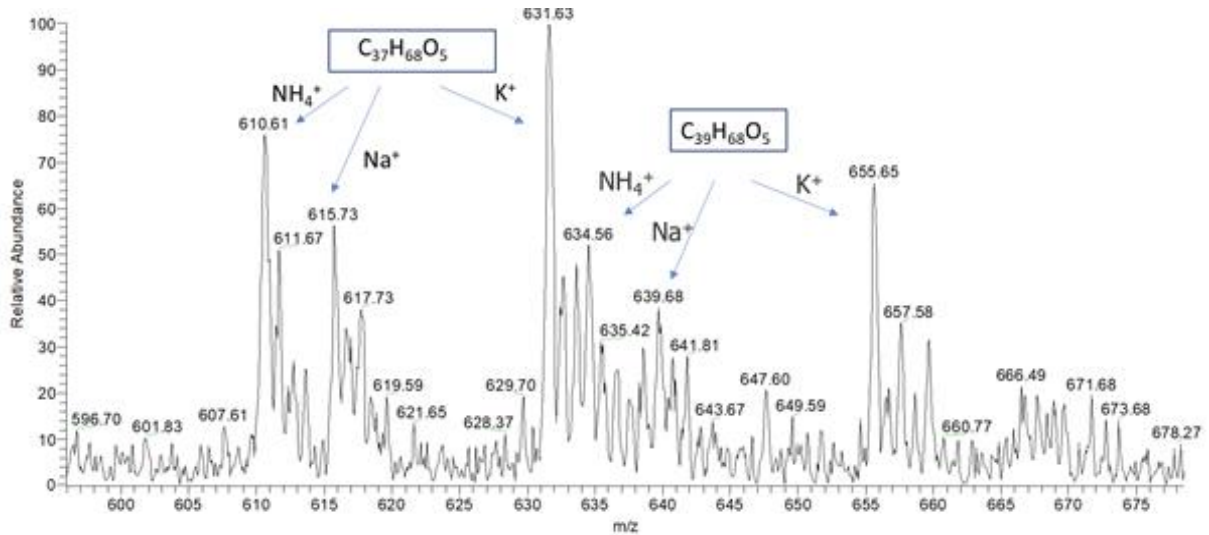
Κατά το καβούρδισμα των κόκκων του καφέ σχηματίζονται οι περισσότερες ενώσεις που είναι υπεύθυνες για την γεύση, τα αρώματα και την συνεκτικότητα του. Στις θερμοκρασίες που πραγματοποιείται το καβούρδισμα λαμβάνουν χώρα αντιδράσεις Maillard. Τα σάκχαρα καραμελοποιούνται και ο κόκκος παίρνει το χαρακτηριστικό σκούρο καφέ χρώμα. Παράλληλα η υγρασία που περιέχεται στους κόκκους διαφεύγει από τους πόρους. Όσο αυξάνεται η θερμοκρασία, κατά τις αντιδράσεις πυρόλυσης των οργανικών ενώσεων, διάφορες αρωματικές ενώσεις ελευθερώνονται ενώ παράλληλα παράγεται διοξείδιο του άνθρακα. Στο τέλος του καβουρδίσματος, κάθε κόκκος έχει αυξηθεί σε μέγεθος τουλάχιστον κατά 50% και έχει χαθεί σχεδόν το 20% του βάρους του<sup>31</sup>.



Εικόνα 31 Φάσματα EASI-MS (+) στο εύρος 450-600 m/z.

Παρακάτω παρουσιάζονται οι πιο σημαντικές παρατηρήσεις για τις μεταβολές διαφόρων μεταβολιτών πριν και μετά το καβούρδισμα.

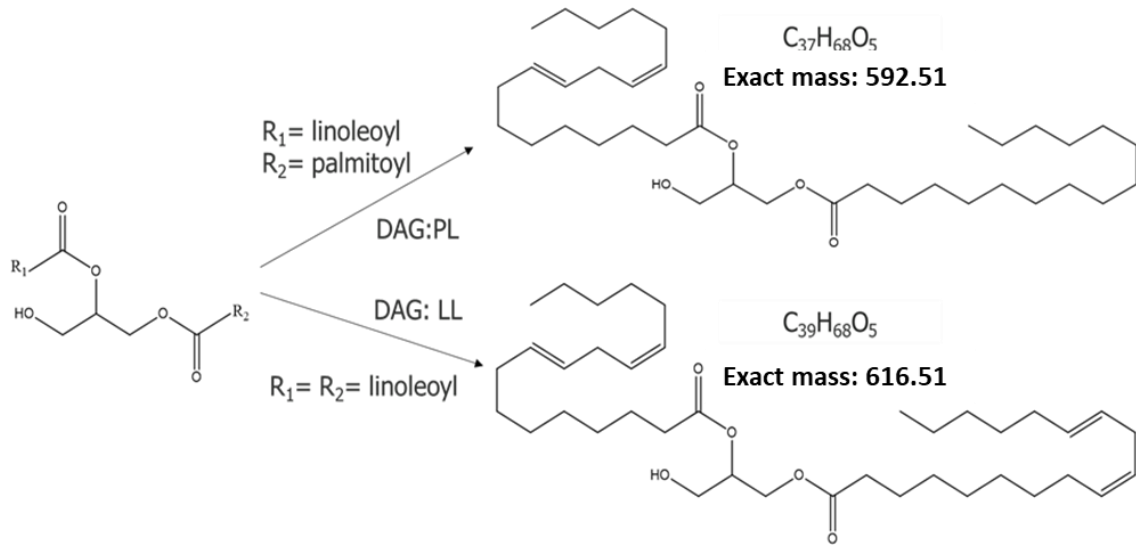




Εικόνα 32 Φάσμα EASI-MS (+) των διακυλογλυκερολών καβουρδισμένου καφέ.

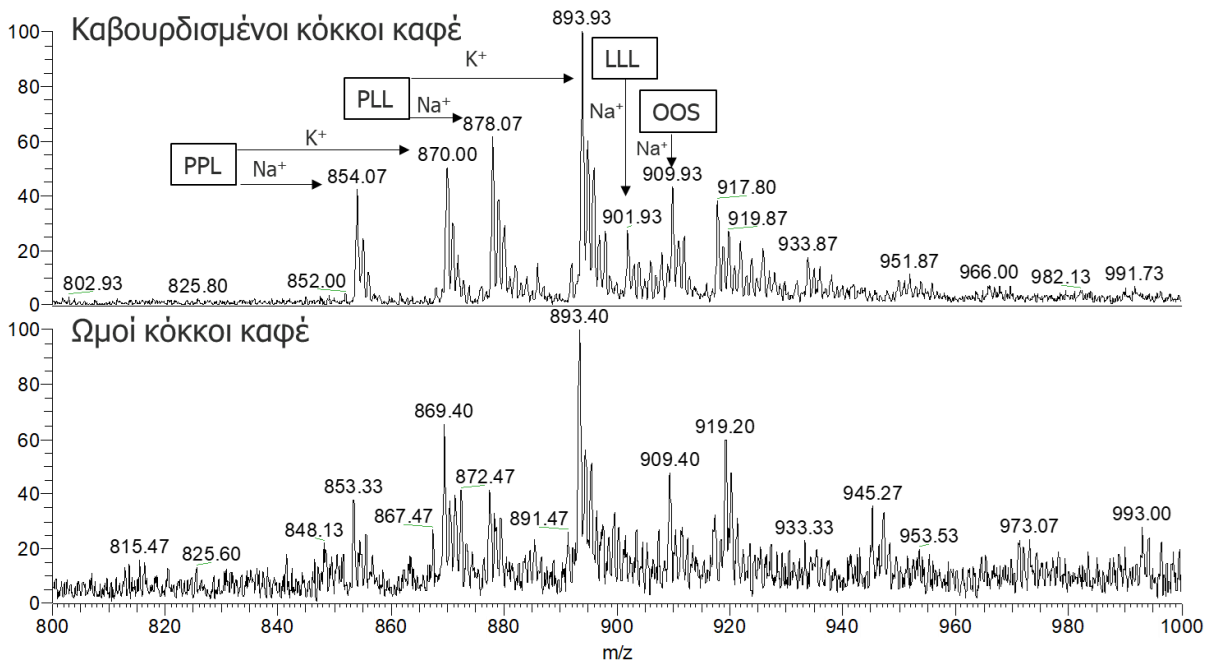
Σε πρώτη φάση παρατηρήθηκε πως κατά το καβούρδισμα μειώνονται αισθητά τα επίπεδα των C-5HTs, κάτι που αιτιολογεί την άποψη ότι όσο πιο έντονο επίπεδο καβουρδίσματος, τόσο λιγότερο “πειράζει” ο καφές το στομάχι. Ακόμα, στην περίπτωση του καβουρδισμένου καφέ παρατηρείται η εμφάνιση κορυφών με υψηλή ένταση στο εύρος των 600-700 m/z. Αυτές οι κορυφές αντιστοιχούν σε διακυλογλυκερόλες (DAGs) και πιο συγκεκριμένα σε 1, 2 διακυλογλυκερόλες, που συναντώνται στον καφέ.

Οι διακυλογλυκερόλες που παρατηρήθηκαν είναι η linoleoyl-palmitoyl-DAG και η linoleoyl-linoleoyl-DAG όπως διαπιστώθηκε με χρήση λογισμικού λιπιδομικής ανάλυσης. Τις διακυλογλυκερόλες τις παρατηρούμε μόνο ως adducts με  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Na}^+$  και  $\text{K}^+$  και όχι με  $\text{H}^+$ . Αυτό είναι πιθανόν να συμβαίνει λόγω του μεγέθους των ιόντων, Τα μεγαλύτερα ιόντα ενδέχεται να συγκρατούνται ισχυρότερα από τις πολικές ομάδες των διακυλογλυκερολών. Αξίζει να αναφερθεί ότι για πρώτη φορά παρατηρούμε adducts με κατιόντα αμμωνίου κατά τις αναλύσεις κόκκων καφέ. Είναι δυνατόν το  $\text{NH}_4^+$  να σχηματίστηκε κατά τις αντιδράσεις maillard και για αυτό να μην παρατηρούνταν στα φάσματα των ωμών κόκκων. Οι DAGs είναι, μεταξύ άλλων, υπεύθυνες για τα χαρακτηριστικά αρώματα του καβουρδισμένου καφέ.



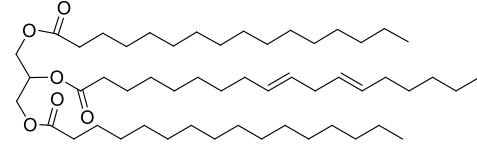
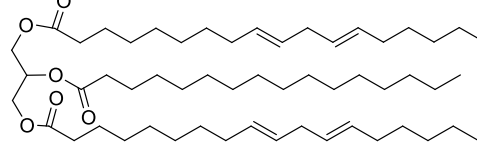
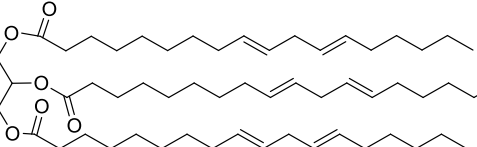
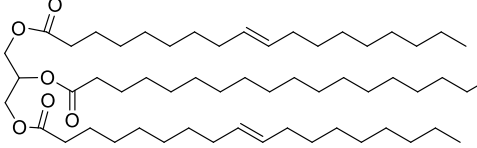
Εικόνα 33 Οι διακυλογλυκερόλες που παρατηρούνται στον καβουρδισμένο καφέ.

Στους ωμούς κόκκους καφέ περιέχονται υψηλά ποσοστά τριακυλογλυκερολών (TAGs) όπως υποδηλώνουν τα πειράματα αλλά και η βιβλιογραφία<sup>32</sup>. Κατά το καβούρδισμα οι TAGs διασπώνται προς DAGs<sup>26</sup>. Τόσο οι TAGs όσο και οι DAGs συνεισφέρουν στην συνεκτικότητα του εκχυλίσματος του καφέ.



Εικόνα 34 Φάσματα EASI-MS (+) των τριακυλογλυκερολών στους κόκκους καφέ.

Πίνακας 2 Τριακυλογλυκερόλες που παρατηρούνται στα φάσματα μάζας καβουρδισμένο καφέ

Όνομα	ΣΥΝΤΑΚΤΙΚΟΣ ΤΥΠΟΣ
PPL: Palmitoyl-palmitoyl-linoleoyl	 <p>Chemical Formula: <math>C_{53}H_{98}O_6</math> Exact Mass: 830.74</p>
PLL: Palmitoyl-linoleoyl-linoleoyl	 <p>Chemical Formula: <math>C_{55}H_{98}O_6</math> Exact Mass: 854.74</p>
LLL: Linoleoyl-linoleoyl-linoleoyl	 <p>Chemical Formula: <math>C_{57}H_{98}O_6</math> Exact Mass: 878.74</p>
OOS: Oleoyl-oleoyl-stearoyl	 <p>Chemical Formula: <math>C_{57}H_{106}O_6</math> Exact Mass: 886.80</p>

### 3.4 Συμπεράσματα

- Με την χρήση της μεθόδου EASI-MS κατέστη δυνατή η απευθείας ποιοτική ανάλυση ολόκληρων κόκκων καφέ.
- Ταυτοποιήθηκαν αρκετοί μεταβολίτες από την επιφάνεια κόκκων καφέ των ποικιλιών Arabica και Robusta.
- Στους ωμούς κόκκους καφέ οι πιο ενδιαφέροντες μεταβολίτες που ανιχνεύθηκαν ήταν μία ομάδα μορίων, τα λεγόμενα C-5HTs, που σχετίζονται με στομαχικές διαταραχές κατά την κατανάλωση καφέ.
- Τα C-5HTs φαίνεται να υπάρχουν μόνο στον εξωτερικό φλοιό του καφέ και απομακρύνονται τελείως κατά την αποφλοιώση του καφέ.
- Τα επίπεδα των C-5HTs μειώνονται κατά το καβούρδισμα των κόκκων του καφέ.
- Στους ωμούς κόκκους καφέ ανιχνεύθηκαν και τριακυλογλυκερόλες, οι οποίες κατά τις αντιδράσεις πυρόλυσης που λαμβάνουν χώρα κατά το καβούρδισμα, διασπώνται σε διακυλογλυκερόλες.
- Σημαντικοί μεταβολίτες που ανιχνεύθηκαν στους κόκκους, είναι τα χλωρογενικά οξέα, που πρόκειται για ενώσεις στην ύπαρξη των οποίων ο καφές οφείλει ένα μέρος της αντιοξειδωτικής του δράσης.

## Κεφάλαιο 4 | Ανάλυση πρωτεϊνών από επιφάνεια

### 4.1 Εισαγωγή

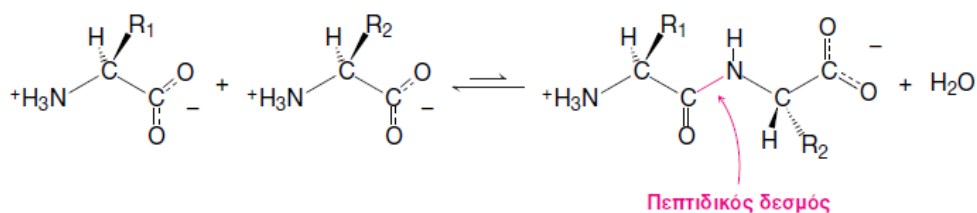
#### 4.1.1 Θεωρία

Αναμφισβήτητα οι πρωτεΐνες αποτελούν σημαντικά βιομόρια. Είναι υπεύθυνες για την δημιουργία, λειτουργία και την διατήρηση όλων των κυττάρων και κατά επέκταση των οργανισμών. Οι πρωτεΐνες είναι τα πιο πολυδύναμα μακρομόρια στους ζώντες οργανισμούς και εξυπηρετούν βασικές λειτουργίες σε όλες σχεδόν τις βιολογικές διεργασίες. Διάφορες βασικές ιδιότητες επιτρέπουν στις πρωτεΐνες να συμμετέχουν σε ένα τόσο ευρύ φάσμα λειτουργιών.

Οι πρωτεΐνες είναι γραμμικά πολυμερή δομούμενα από μονομερή αμινοξέων με μοριακό βάρος από 1.000 έως 1.000.000 Da. Η λειτουργία μιας πρωτεΐνης εξαρτάται άμεσα από την τρισδιάστατη δομή της. Οι πρωτεΐνες αναδιπλώνονται αυτόματα σε τρισδιάστατες δομές που καθορίζονται από την αλληλουχία των αμινοξέων του πρωτεϊνικού πολυμερούς. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες περιέχουν μια μεγάλη σειρά λειτουργικών ομάδων. Οι ομάδες αυτές περιλαμβάνουν αλκοόλες, θειόλες, θειοαιθέρες, καρβοξυλικές ομάδες, δισουλφιδικούς δεσμούς, καρβαμίδια και ποικιλία βασικών ομάδων. Όταν συνδυάζονται σε διάφορες αλληλουχίες, οι λειτουργικές αυτές ομάδες ερμηνεύουν το φάσμα των λειτουργιών των πρωτεϊνών. Υπάρχουν είκοσι είδη πλευρικών αλυσίδων στις πρωτεΐνες, που διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το μέγεθος, το σχήμα, το φορτίο, την υδροφοβικότητα και τη χημική δραστηριότητα. Πράγματι, όλες οι πρωτεΐνες, σε όλα τα είδη —βακτηριακές, αρχαϊκές και ευκαρυωτικές— είναι δομημένες από τα ίδια 20 αμινοξέα. Αυτό το βασικό αλφάβητο των πρωτεϊνών δημιουργήθηκε πριν από αρκετά δισεκατομμύρια χρόνια. Η καταπληκτική ποικιλία πρωτεϊνικών λειτουργιών είναι αποτέλεσμα της ποικιλότητας και ποικιλομορφίας αυτών των 20 δομικών στοιχείων<sup>33</sup>.

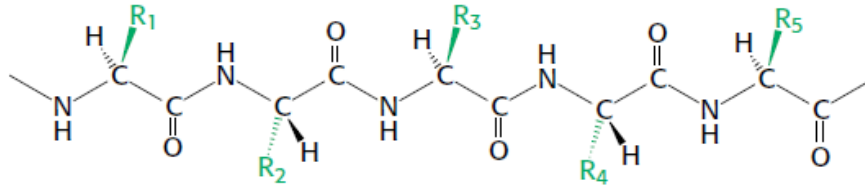
Διακρίνονται 4 στάδια δόμησης πρωτεϊνών:

#### ΠΡΩΤΟΤΑΓΗΣ ΔΟΜΗ



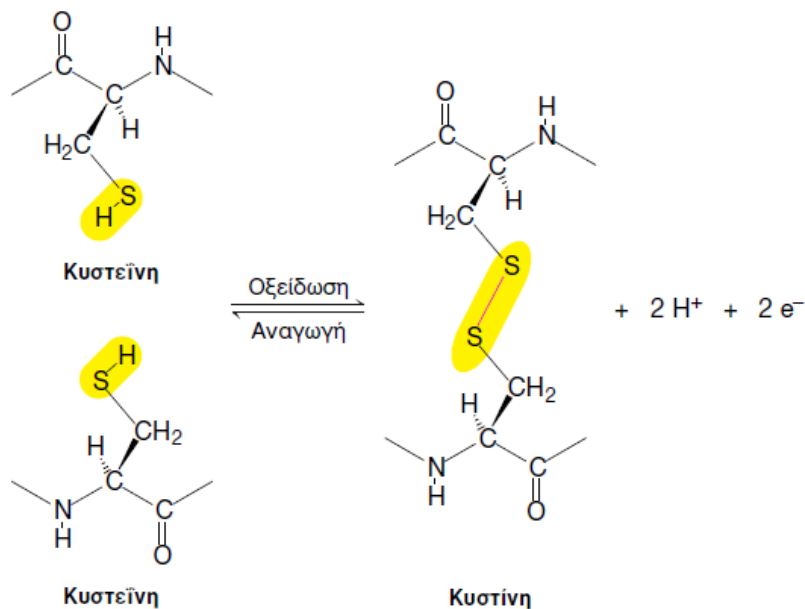
**Εικόνα 35** Η δημιουργία πεπτιδικού δεσμού. Η σύνδεση δύο αμινοξέων συνοδεύεται από την απώλεια ενός μορίου ύδατος<sup>33</sup>.

Μια σειρά αμινοξέων που ενώνονται με πεπτιδικούς δεσμούς δημιουργούν μια πολυπεπτιδική αλυσίδα. Η αλληλουχία των αμινοξέων μιας πρωτεΐνης εξαρτάται αποκλειστικά από το γονίδιο που φέρει τις πληροφορίες για την σύνθεση της.



**Εικόνα 36** Τα τμήματα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Η πολυπεπτιδική αλυσίδα αποτελείται από έναν σταθερό κορμό και ποικιλία πλευρικών αλυσίδων<sup>33</sup>.

Σε μερικές πρωτεΐνες, υπάρχουν διασυνδέσεις στη γραμμική πολυπεπτιδική αλυσίδα. Οι πιο κοινές διασυνδέσεις είναι δισουλφιδικοί δεσμοί, που σχηματίζονται από την οξείδωση ενός ζεύγους κατάλοιπων κυστεΐνης.

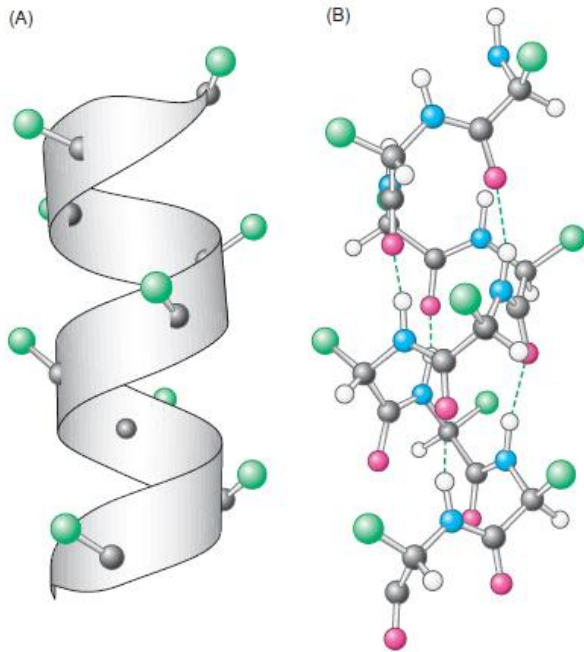


**Εικόνα 37** Σχηματισμός δισουλφιδικού δεσμού από δύο κατάλοιπα κυστεΐνης<sup>33</sup>.

## ΔΕΥΤΕΡΟΤΑΓΗΣ ΔΟΜΗ

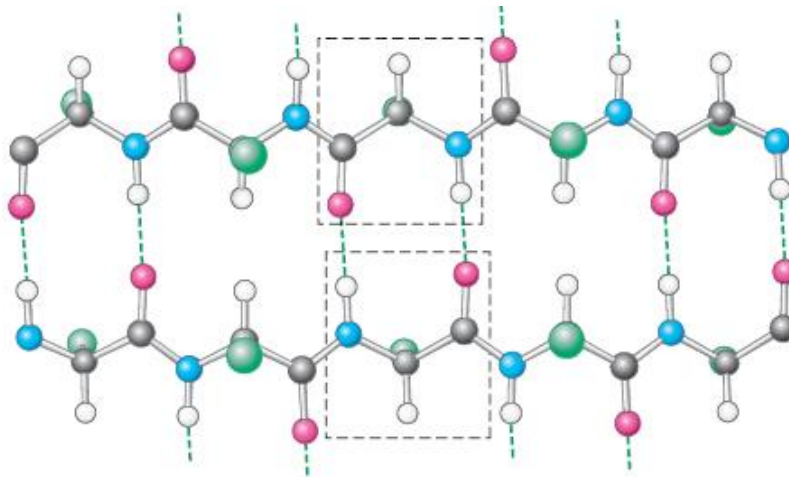
Οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες αναδιπλώνονται ώστε να πάρουν καθορισμένες δομές, όπως α-έλικα και β-πτυχωτή επιφάνεια.

Η α-έλικα είναι μια σπειροειδής δομή που σταθεροποιείται με ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου.



**Εικόνα 38** Η δομή μιας α-έλικας. (Α) Η τεικόνιση κορδέλας στην οποία ξεχωρίζουν τα άτομα α-άνθρακα και οι πλευρικές αλυσίδες (ράσινο). (Β) Μια πλάγια όψη του μοντέλου με ραίρες και ράβδους όπου διακρίνονται οι δεσμοί υδρογόνου (διακεκομμένες γραμμές) μεταξύ των ομάδων NH και CO<sup>33</sup>.

Οι β-πτυχωτές επιφάνειες σταθεροποιούνται με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των πολυπεπτιδικών αλυσίδων.



**Εικόνα 39** Μια β-επιφάνεια. Οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των ομάδων NH και CO συνδέουν το κάθε αμινοξύ με ένα και μόνο αμινοξύ στη γειτονική β-πτυχώση, σταθεροποιώντας τη δομή<sup>33</sup>.

### ΤΡΙΤΟΤΑΓΗΣ ΔΟΜΗ

Ενώ η δευτεροταγής δομή περιγράφει τη διαμόρφωση τμημάτων της πεπτιδικής αλυσίδας, η τριτοταγής δομή περιγράφει τη διαμόρφωση στον χώρο ολόκληρης της πεπτιδικής αλυσίδας της πρωτεΐνης. Η πεπτιδική αλυσίδα αναδιπλώνεται με αποτέλεσμα αμινοξέα που απέχουν πολύ μεταξύ τους στην πρωτοταγή δομή να προσεγγίζουν στην τριτοταγή δομή. Η σταθεροποίηση της τριτοταγούς δομής γίνεται με αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πλευρικών ομάδων R των αμινοξέων. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές μπορεί να είναι:

- Δισουλφιδικοί δεσμοί

Αναπτύσσονται μεταξύ των πλευρικών ομάδων της κυστεΐνης. Η πλευρική ομάδα της κυστεΐνης έχει την ομάδα SH.

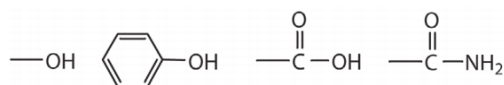
Ο δισουλφιδικός δεσμός είναι ομοιοπολικός δεσμός και πρόκειται για τη μοναδική ομοιοπολική αλληλεπίδραση που σταθεροποιεί την τριτοταγή δομή.

- Ηλεκτροστατικές δυνάμεις

Ονομάζονται και γέφυρες άλατος και αναπτύσσονται μεταξύ αντίθετα φορισμένων πλευρικών ομάδων δύο αμινοξέων.

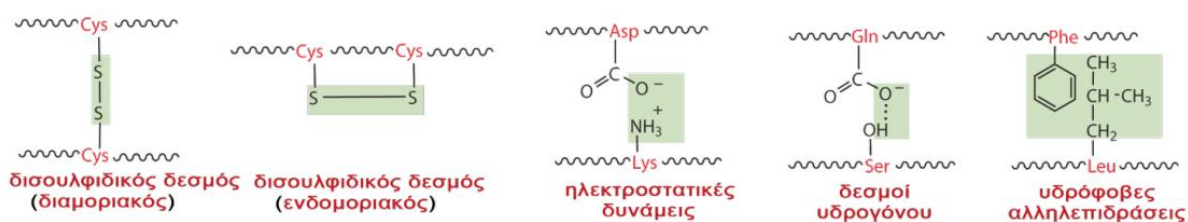
- Δεσμοί υδρογόνου

Αναπτύσσονται μεταξύ αμινοξέων των οποίων οι πλευρικές ομάδες R περιέχουν τις ομάδες:



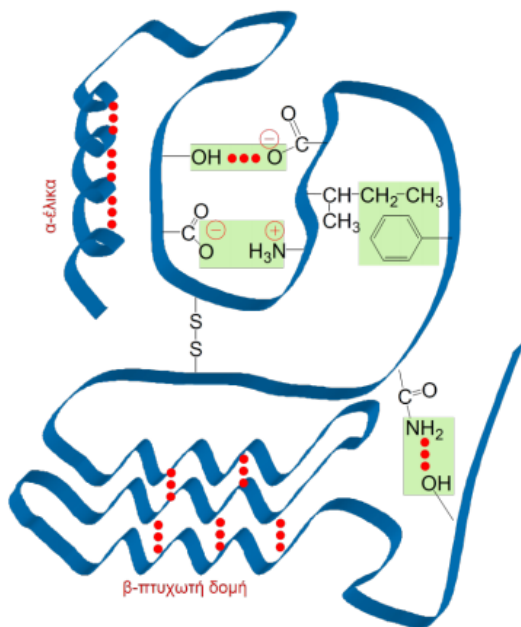
- Υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις

Αναπτύσσονται μεταξύ των πλευρικών ομάδων άπολων αμινοξέων (αλανίνης, λευκίνης κ.ά.). Οι άπολες πλευρικές ομάδες αυτών των αμινοξέων είναι υδρόφοβες και όταν βρεθούν σε υδατικό περιβάλλον τείνουν να συσσωματωθούν ώστε να μειώσουν την έκθεσή τους στο νερό.

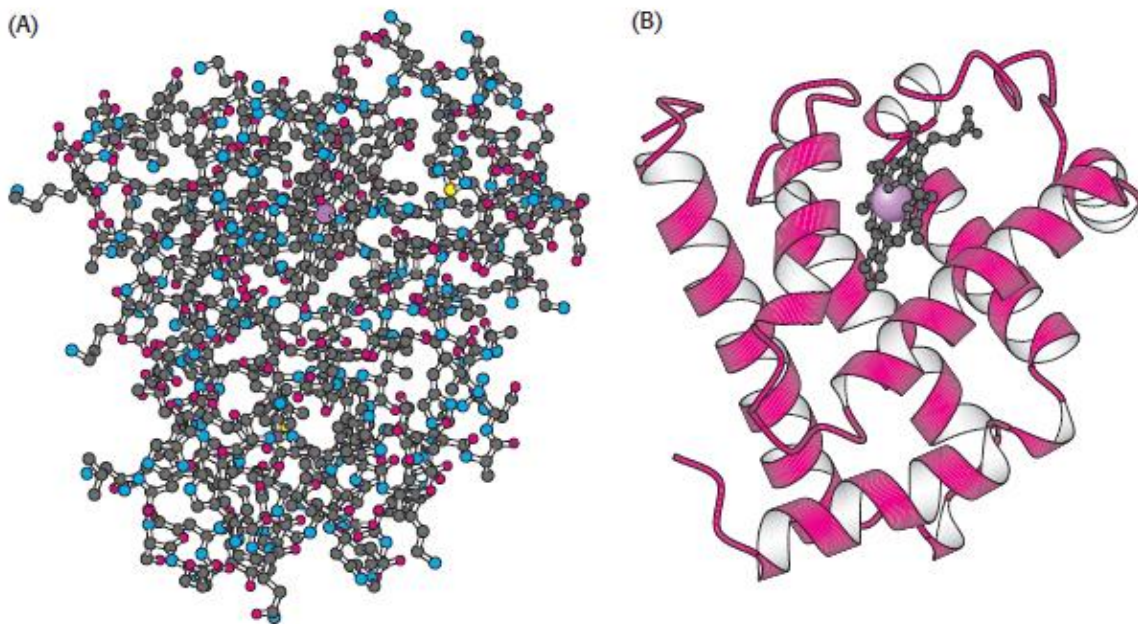


**Εικόνα 40** Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πλευρικών ομάδων των αμινοξέων που σταθεροποιούν την τριτοταγή δομή<sup>33</sup>





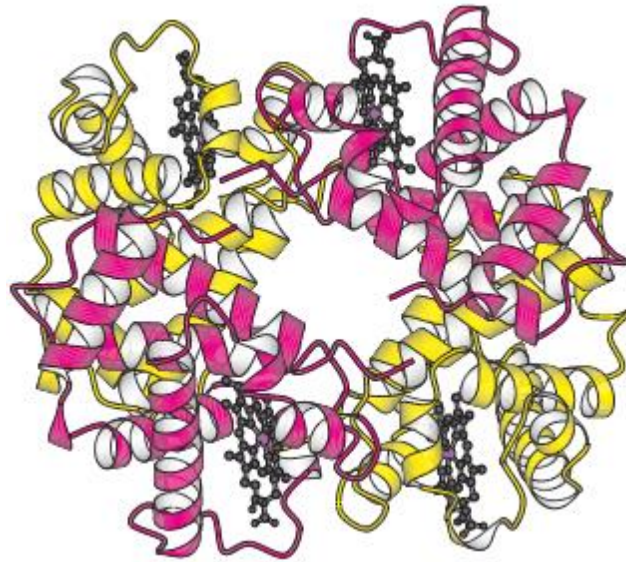
Εικόνα 41 Τριτοταγής δομή πρωτεϊνών όπου διακρίνεται και η δευτεροταγής και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ πλευρικών ομάδων<sup>33</sup>



Εικόνα 42 Η τρισδιάστατη δομή της μιοσφαιρίνης. (Α) Το μοντέλο με σφαίρες και ράβδους δείχνει όλα τα άτομα εκτός του υδρογόνου και αποκαλύπτει πολλές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αμινοξέων. (Β) Η σχηματική απεικόνιση φανερώνει ότι η πρωτεΐνη αποτελείται κυρίως από α-έλικες<sup>33</sup>.

#### ΤΕΤΑΡΤΟΤΑΓΗΣ ΔΟΜΗ

Η τεταρτοταγής δομή είναι το ανώτερο επίπεδο οργάνωσης των πρωτεϊνών. Τεταρτοταγή δομή έχουν οι πρωτεΐνες που αποτελούνται από δύο ή περισσότερες πεπτιδικές αλυσίδες. Είναι ο τρόπος που συνδέονται μεταξύ τους οι διάφορες πεπτιδικές αλυσίδες. Η τεταρτοταγής δομή σταθεροποιείται με τα ίδια είδη αλληλεπιδράσεων που σταθεροποιούν και την τριτοταγή δομή, δηλαδή με δεσμούς υδρογόνου, ηλεκτροστατικές ή υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διαφορετικών πεπτιδικών αλυσίδων. Για παράδειγμα, η αιμοσφαιρίνη που αποτελείται από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες έχει τεταρτοταγή δομή.



**Εικόνα 43** Το τετραμερές της ανθρώπινης αιμοσφαιρίνης είναι  $\alpha_2\beta_2$ . Αποτελείται από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, δύο  $\alpha$  και δύο  $\beta$ <sup>33</sup>.

#### 4.1.2 Φασματομετρία Μάζας Πρωτεϊνών

Για την ανάλυση πρωτεϊνών με φασματομετρία μάζας απαιτείται οι πρωτεΐνες να βρίσκονται σε διάλυμα ή σε στερεά κατάσταση και τα ιόντα τους να μεταβαίνουν στην αέρια φάση ώστε να εισαχθούν στον αναλυτή μαζών. Οι δύο κύριες μέθοδοι για τον ιοντισμό πρωτεϊνών είναι ιοντισμός ηλεκτροψεκασμού (ESI)<sup>34</sup> και ιοντισμός εκρόφησης με λέιζερ υποβοηθούμενος από μήτρα (MALDI)<sup>35</sup>. Στην ηλεκτροψεκασμό, τα ιόντα δημιουργούνται από τις πρωτεΐνες στο διάλυμα. Οι πλευρικές ομάδες των αμινοξέων που αποτελούν τις πρωτεΐνες διαθέτουν συνήθως καρβοξυλομάδες ή αμινομάδες και έτσι ανάλογα με το pH μια πρωτεΐνη αποκτά συνολικά θετικό ή αρνητικό φορτίο. Ο ηλεκτροψεκασμός επιτρέπει στα εύθραυστα μόρια να ιονίζονται άθικτα, μερικές φορές να διατηρούν της μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις. Αντίθετα, στο MALDI, οι πρωτεΐνες ενσωματώνονται εντός μίας μήτρας σε στερεή μορφή και τα ιόντα δημιουργούνται με παλμούς φωτός λέιζερ. Η ηλεκτροψεκασμός παράγει περισσότερα ιόντα πολλαπλών φορτίων από το MALDI, επιτρέποντας τη μέτρηση της πρωτεΐνης μεγάλης μάζας, ενώ το MALDI είναι γρήγορο και λιγότερο πιθανό να επηρεαστεί από τα ρυθμιστικά διαλύματα και πρόσθετες ουσίες<sup>36</sup>.

Υπολογισμός μάζας και φορτίων πρωτεΐνης<sup>37</sup>

Η κάθε κορυφή στο φάσμα μάζας μίας πρωτεΐνης αντιστοιχεί σε μόρια πρωτεΐνης με διαφορετικό αριθμό φορτίου.

Έστω ότι διαθέτουμε το φάσμα μάζας μίας πρωτεΐνης  $M$ . Θεωρούμε πως μια κορυφή στο φάσμα θα αντιστοιχεί στο πρωτονιωμένο ιόν  $MH_v^{v+}$  και θα έχει  $m/z = m_v$ .

Οπότε ισχύει:

$$m_v = \frac{\text{μάζα}}{\text{φορτίο}} = \frac{M + vMr(H)}{v} = \frac{M + 1,008v}{v} = \frac{M}{v} + 1,008 = m_v - 1,008 = \frac{M}{v}$$

Η αμέσως προηγούμενη κορυφή (αυτή με μικρότερο  $m/z$ ) θα αντιστοιχεί στο πρωτονιωμένο ιόν με  $v+1$   $H^+$  και φορτίο  $v+1$ ,  $MH_{v+1}^{(v+1)+}$  και θα έχει  $m/z = m_{v+1}$

$$m_{v+1} = \frac{\text{μάζα}}{\text{φορτίο}} = \frac{M + 1,008(v + 1)}{v + 1} = \frac{M}{v + 1} + 1,008 = m_{v+1} - 1,008 = \frac{M}{v + 1}$$

Συνδιάζοντας τις παραπάνω δύο σχέσεις προκύπτει:

$$\frac{m_v - 1,008}{m_{v+1} - 1,008} = \frac{M/v}{M/(v + 1)} = \frac{v + 1}{v}$$

Λύνοντας την παραπάνω εξίσωση είμαστε σε θέση να υπολογίσουμε την μάζα της πρωτεΐνης και το φορτίο της κάθε κορυφής.

## 4.2 Πειραματικό μέρος

### Εξοπλισμός

Πιπέτες ακριβείας, Eppendorf Research 2.2, 100, 1000  $\mu\text{L}$  και Gilson 1000  $\mu\text{L}$

Συσκευή παραγωγής υπερήχων, Elma

Φυγόκεντρος, miniSpin plus, Eppendorf

Σύριγγες υγρής χρωματογραφίας Hamilton, 500  $\mu\text{L}$

Αναλυτικός ζυγός με ακρίβεια 0.1 mg , Kern ABS

Αναλυτικός ζυγός με ακρίβεια 0.01 g, Kern S72

Ταινία PTFE (TEFLON®)

### Αντιδραστήρια

Νερό nanopure 18.2 M $\Omega$ /cm

Ακετονιτρίλιο, Chromasolv gradient grade, for HPLC,  $\geq 99.9\%$ , Sigma Aldrich

Μεθανόλη, Chromasolv for HPLC,  $\geq 99.9\%$ , Sigma Aldrich

Οξικό οξύ,  $\geq 99.8\%$ , Sigma Aldrich

Φορμικό οξύ, 88-91 %, Fluka

Διμεθυλοσουλφοξύδιο (DMSO), anhydrous,  $\geq 99.9\%$ , Sigma Aldrich

Διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF), anhydrous, 99.8%, Sigma Adich

### Δείγματα

Λυσοζύμη από ασπράδι αυγού

Μυογλοβίνη από καρδιά αλόγου

Κυτόχρωμα-C από καρδιά αλόγου

Ινσουλίνη από πάγκρεας βοοειδούς

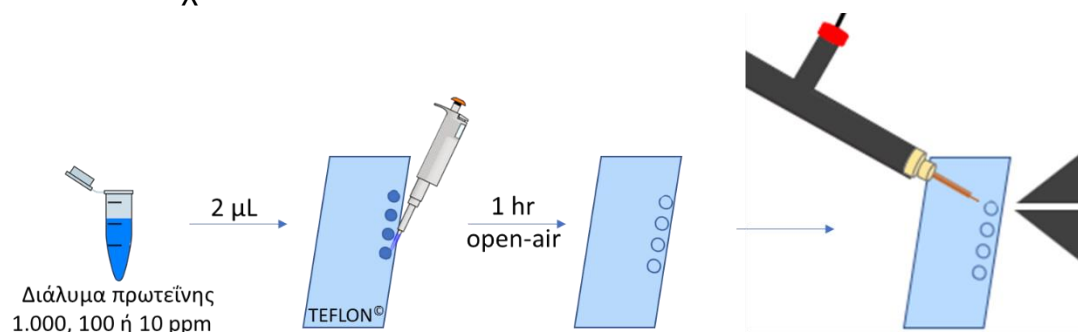
### Διαδικασία

Για κάθε πρωτεΐνη παρασκευάστηκε ένα πρότυπο υδατικό διάλυμα 1 mL και συγκέντρωσης 10.000 ppm. Με διαδοχικές αραιώσεις παρασκευάστηκαν τα αραιωμένα διαλύματα των 1.000, 100 και 10 ppm. Στις περισσότερες περιπτώσεις σε αυτά τα διαλύματα πραγματοποιήθηκε προσθήκη μικρής ποσότητας αντιδραστηρίων που σκοπός τους ήταν η πρωτονίωση και η αποδιάταξη της πρωτεΐνης. Στις περιπτώσεις

όπου δεν προστέθηκε κάποιο από αυτά τα αντιδραστήρια στο υδατικό διάλυμα της πρωτεΐνης, έγινε προσθήκη αυτού στον διαλύτη εκνέφωσης (ακετονιτρίλιο). Στον πίνακα 1 αναφέρονται τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και ο ρόλος τους. Στον πίνακα 4 αναφέρονται οι συνδυασμοί διαλυμάτων και του διαλύτη εκνέφωσης που πραγματοποιήθηκαν για κάθε πρωτεΐνη.

2  $\mu\text{L}$  κάθε διαλύματος εναποτίθεται σε επιφάνεια PTFE (Polytetrafluoroethylene), κοινώς γνωστό με την εμπορική ονομασία TEFLON<sup>®</sup>. Τα δείγματα αφήνονται να στεγνώσουν για μία ώρα στις συνθήκες του εργαστηρίου. Κατόπιν, η επιφάνεια τοποθετείται στην βάση του δείγματος του EASI και ψεκάζεται με το sonic-spray.

Η γωνία του εκνεφωτή με την επιφάνεια του δείγματος ρυθμίστηκε κατόπιν ελέγχου στις 40 μοίρες. Η απόσταση των δειγμάτων από την είσοδο του φασματόμετρου ήταν 3 mm. Η ροή του διαλύτη και η πίεση του αερίου εκνέφωσης ρυθμίστηκε στα 20  $\mu\text{L}/\text{min}$  και 7 bar αντίστοιχα.



Εικόνα 44 Διαγραμματική απεικόνιση της πειραματικής διαδικασίας για την ανάλυση πρωτεϊνών με EASI-MS

Πίνακας 3 Αντιδραστήρια που προστέθηκαν στα διαλύματα των πρωτεϊνών ή στον διαλύτη εκνέφωσης.

Αντιδραστήριο	Ρόλος
Φορμικό οξύ <chem>CC(=O)O</chem>	Πρωτονίωση και αποδιάταξη
Οξικό οξύ <chem>CC(=O)O</chem>	Πρωτονίωση και αποδιάταξη
Διμεθυλοσουλφοξύδιο (DMSO) <chem>CC(=O)S</chem>	Αποδιάταξη <sup>38</sup>
Διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) <chem>CN(C)C=O</chem>	Αποδιάταξη <sup>39</sup>

**Πίνακας 4** Συνδυασμοί αντιδραστηρίων που προστέθηκαν στα διαλύματα των πρωτεϊνών ή στον διαλύτη εκνέφωσης

<b>Πρωτεΐνη</b>	<b>Διαλύτης Εκνέφωσης</b>	<b>Υδατικό διάλυμα πρωτεΐνης</b>
Κυτόχρωμα c	acetonitrile	1 % HCOOH
α-λακταλβουμίνη	acetonitrile	1 % HCOOH
Λυσοζύμη	acetonitrile	1 % CH <sub>3</sub> COOH
	acetonitrile	1 % HCOOH
	acetonitrile	1 % DMF
	acetonitrile	1 % DMSO
	acetonitrile + 1 % HCOOH	-
	acetonitrile + 1 % DMSO	-
	acetonitrile + 1 % DMF	-
Ινσουλίνη	acetonitrile	1 % HCOOH
	acetonitrile	1 % DMF
	acetonitrile	1 % DMSO
	acetonitrile + 1 % HCOOH	-
	acetonitrile + 1 % DMF	-
	acetonitrile + 1 % DMSO	-
	Μυογλοβίνη	acetonitrile
acetonitrile		1% CH <sub>3</sub> COOH
acetonitrile		1 % DMF
acetonitrile		1 % DMSO
acetonitrile + 1 % HCOOH		-
acetonitrile + 1 % DMF		-
acetonitrile + 1 % DMSO		-

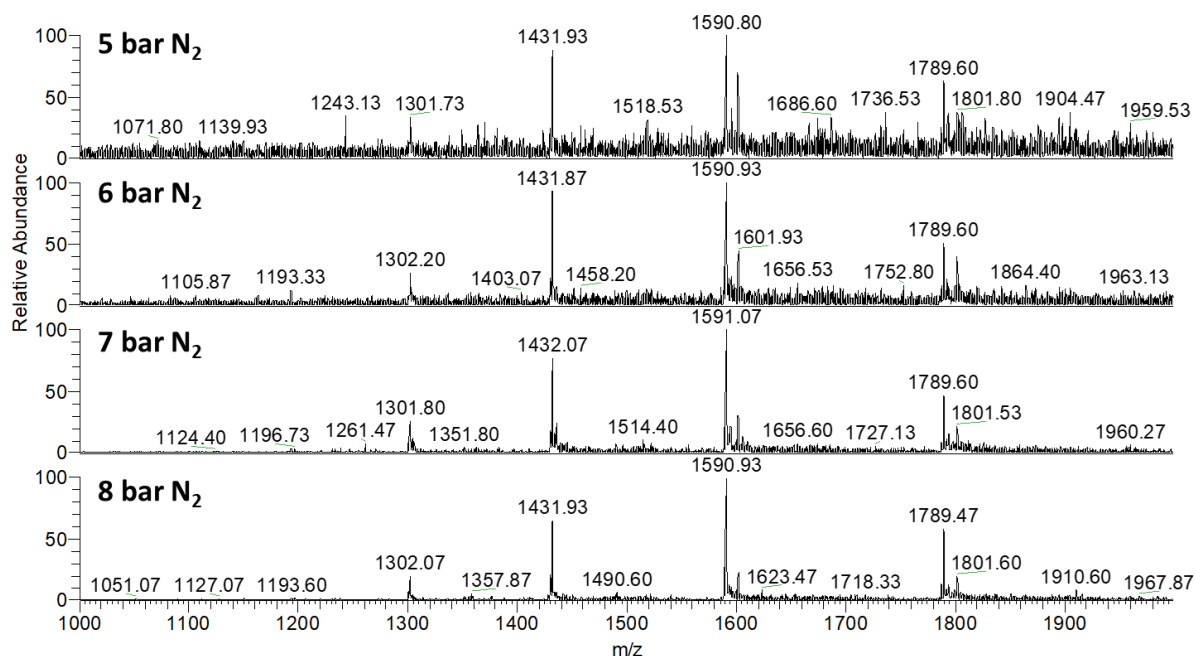
### 4.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση

Σκοπός των πειραμάτων αυτών ήταν η ανάλυση πρωτεϊνών με την μέθοδο EASI-MS και η βελτιστοποίηση της μεθόδου για την συγκεκριμένη ανάλυση. Οι αναλύσεις επιτευχθήκαν μόνο για θετικά ιόντα των πρωτεϊνών, επομένως όλα τα φάσματα που ακολουθούν αναφέρονται σε θετικά ιόντα. Στην παρούσα έρευνα η ανάλυση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται με εκρόφηση μέσω ιοντισμού υπερηχητικής εκνέφωσης EASI-MS. Ο ιοντισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιείται στο υδατικό διάλυμα αλλά και κατά την εκρόφηση από την επιφάνεια PTFE. Όπως αναφέρθηκε ο ιοντισμός με SSI είναι πιο ήπιος από τον ιοντισμό με ESI, επομένως, είναι αναμενόμενο, να παρατηρούμε κορυφές των πρωτεϊνών με μικρότερο αριθμό φορτίων σε σχέση με το ESI και έτσι οι κορυφές να είναι μετατοπισμένες σε υψηλότερα  $m/z$ , που σε κάποιες περιπτώσεις υπερβαίνουν τα 2,000  $m/z$ .

Πρωταρχικός στόχος των αναλύσεων πρωτεϊνών με EASI-MS ήταν η εύρεση των βέλτιστων τιμών πίεσης του αερίου εκνέφωσης ( $N_2$ ) και ροής του διαλύτη εκνέφωσης (ακετονιτρίλιο). Αφού έγινε ο προσδιορισμός αυτών των παραμέτρων, σε όλες τις αναλύσεις που ακολούθησαν εφαρμόστηκαν οι βέλτιστες τιμές.

### 4.3.1 Πίεση αερίου εκνέφωσης

Ξηρά spots από 2  $\mu\text{L}$  υδατικού διαλύματος 1000 ppm λυσοζύμης με 0.1% οξικό οξύ, εκροφήθηκαν σε διαφορετικές πιέσεις αερίου αζώτου (5, 6, 7 και 8 bar) υπό την ίδια ροή διαλύτη (20  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) και καταγράφηκαν τα αντίστοιχα φάσματα μάζας όπως φαίνονται παρακάτω.



**Εικόνα 45** Φάσματα EASI-MS (+) από ξηρά spots 2  $\mu\text{L}$  διαλύματος λυσοζύμης 1000 ppm 0,1%  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , σε πιέσεις αερίου εκνέφωσης 5, 6, 7 και 8 bar υπό ροή διαλύτη εκνέφωσης ακετονιτρίλιο 20  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

**Πίνακας 5** Τιμές απόλυτης έντασης ανάλογα με την πίεση του αερίου εκνέφωσης

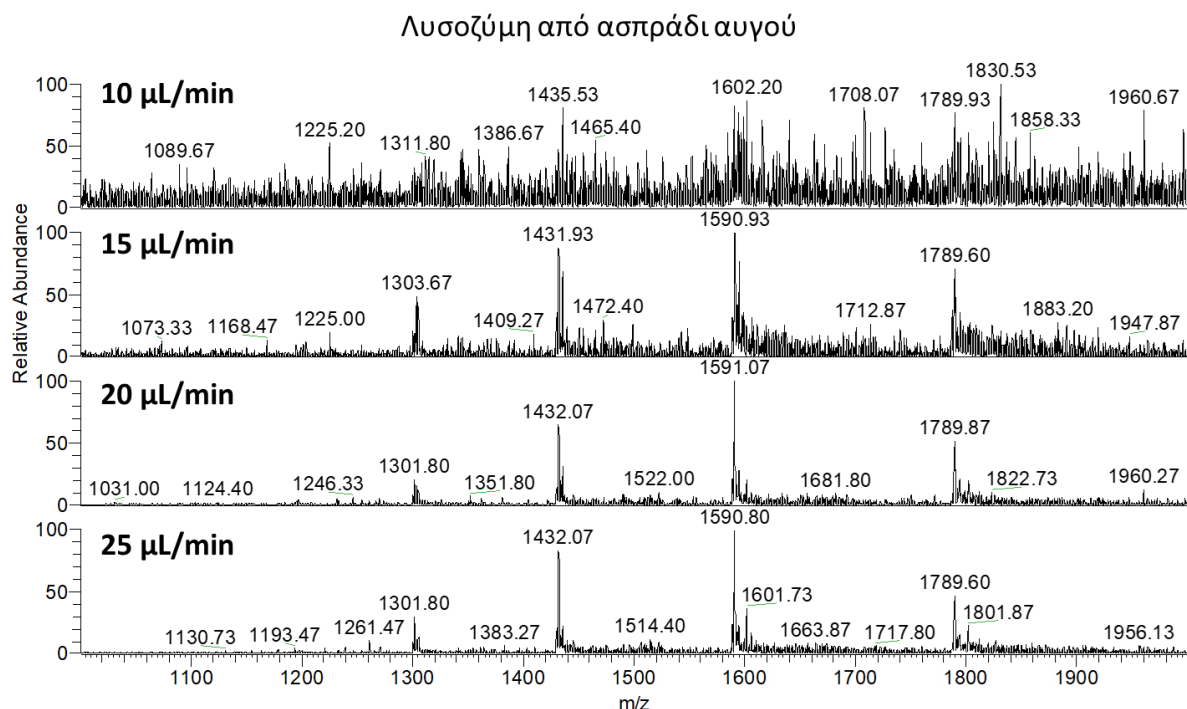
Πίεση N <sub>2</sub> ( bar)	Απόλυτη Ένταση
5	$5 \times 10^4$
6	$10^5$
7	$10^6$
8	$2 \times 10^6$

Στον πίνακα 5 φαίνονται οι τιμές των απολύτων εντάσεων των ιόντων που καταγράφηκαν σε κάθε φάσμα. Όπως φαίνεται, τα καλύτερα αποτελέσματα προέκυψαν στις πιέσεις 7 και 8 bar. Εκεί παρατηρείται ο μεγαλύτερος λόγος S/N και υψηλότερες απόλυτες εντάσεις ιόντων. Ωστόσο αν και στα 8 bar αντιστοιχεί υψηλότερη ένταση, αυτή η πίεση χαρακτηρίζεται ακατάλληλη καθώς η επιφάνεια φθειρόταν και το σήμα διαρκούσε μικρό χρονικό διάστημα. Έτσι ως βέλτιστη πίεση του αερίου εκνέφωσης θεωρείται η πίεση των 7 bar.



### 4.3.2 Ροή διαλύτη εκνέφωσης

Spots 2  $\mu\text{L}$  από υδατικό διάλυμα 1.000 ppm λυσοζύμης με 0.1% οξικό οξύ, εκροφήθηκαν σε διαφορετικές ροές διαλύτη ακετονιτριλίου (10, 15, 20 και 25  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) υπό την ίδια πίεση  $\text{N}_2$  (7 bar) και καταγράφηκαν τα αντίστοιχα φάσματα μάζας όπως φαίνονται παρακάτω.



**Εικόνα 46** Φάσματα EASI-MS (+) από ξηρά spots 2  $\mu\text{L}$  διαλύματος λυσοζύμης 1000 ppm (0,1%  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) σε ροές διαλύτη εκνέφωσης ακετονιτρίλιο 10, 15, 20 και 25  $\mu\text{L}/\text{min}$ , με παροχή αερίου  $\text{N}_2$  στα 7 bar.

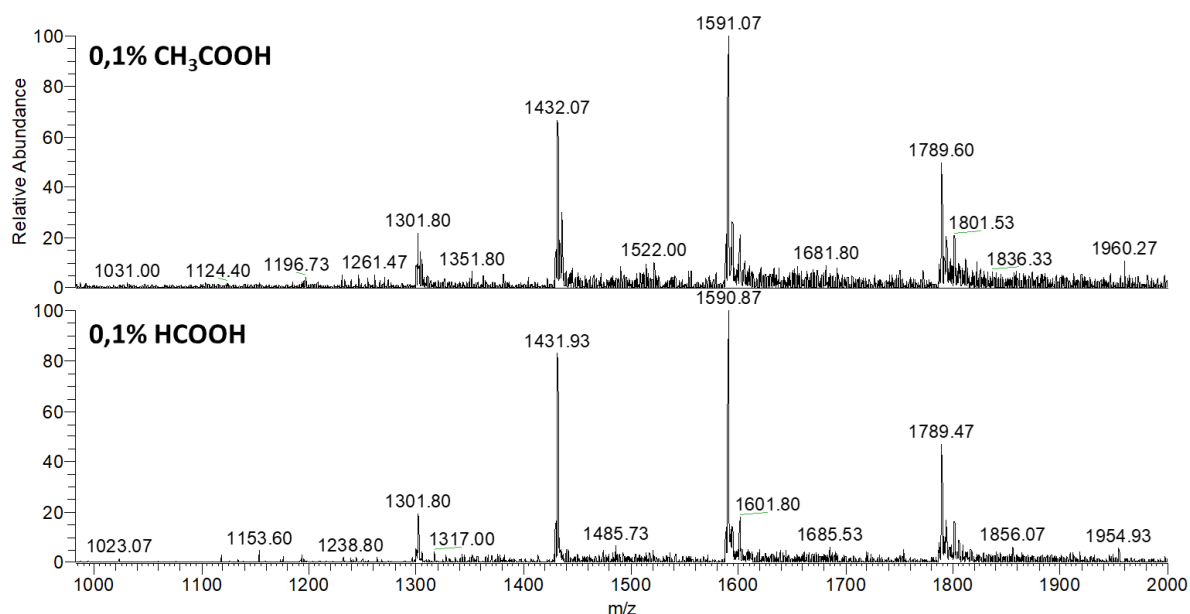
**Πίνακας 6** Τιμές απόλυτης έντασης ανάλογα με την ροή του διαλύτη εκνέφωσης

Ροή διαλύτη ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	Απόλυτη Ένταση
10	$2 \times 10^4$
15	$2 \times 10^5$
<b>20</b>	<b><math>10^6</math></b>
25	$8 \times 10^5$

Στον πίνακα 6 φαίνονται οι τιμές των απολύτων εντάσεων των ιόντων που καταγράφηκαν σε κάθε φάσμα. Όπως φαίνεται, τα καλύτερα αποτελέσματα προέκυψαν στις 20 και 25  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Εκεί παρατηρείται ο μεγαλύτερος λόγος S/N και υψηλότερες απόλυτες εντάσεις ιόντων. Ως βέλτιστη θεωρείται η ροή στα 20  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Από ροές 25  $\mu\text{L}/\text{min}$  και πάνω οι επιφάνεια βρέχεται και δημιουργείται ένα στρώμα υγρού πάνω από το spot της πρωτεΐνης που εμποδίζει την αποτελεσματική εκρόφηση οπότε το σήμα γρήγορα αρχίζει να ελαττώνεται.

### 4.3.3 Προσθήκη οξέος στο διάλυμα της πρωτεΐνης

Η προσθήκη κάποιου οξέος στο διάλυμα της πρωτεΐνης κρίνεται καθοριστική για την ανάλυση της με φασματομετρία μάζας. Τα οξέα διασπούν του δεσμούς υδρογόνου και αναιρούν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πεπτιδικών αλυσίδων και έτσι καταστρέφεται η τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης (μετουσίωση). Με αυτόν τον τρόπο η πλευρικές ομάδες των αμινοξέων εκτίθενται στο διάλυμα και πρωτονιόνονται οι καρβοξυλομάδες και οι αμινομάδες που αυτές διαθέτουν και η πρωτεΐνη αποκτά συνολικά μεγαλύτερο θετικό φορτίο άρα και μικρότερο  $m/z$ .



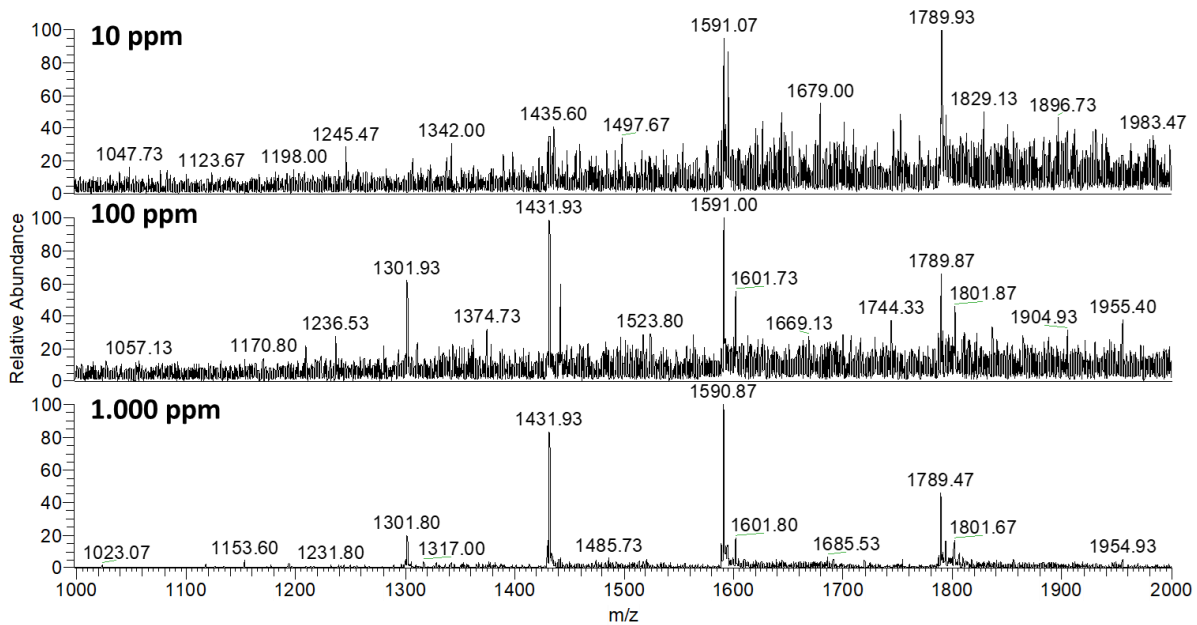
**Εικόνα 47** Φάσματα EASI-MS (+) από ξηρά spots 2  $\mu\text{L}$  διαλύματος λυσοζύμης 1000 ppm με προσθήκη στο διάλυμα: 0,1%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (πάνω) και 0,1%  $\text{HCOOH}$  (κάτω)

**Πίνακας 7** Τιμές απόλυτης έντασης ιόντων ανάλογα το οξύ που προστίθεται στο διάλυμα

Οξύ	$\text{pK}_a$	Απόλυτη Ένταση
$\text{CH}_3\text{COOH}$	4,76	$10^6$
$\text{HCOOH}$	3,75	$8 \times 10^6$

Και στις δύο περιπτώσεις τα φάσματα είναι αρκετά καλά, ωστόσο παρατηρούμε στην περίπτωση όπου έχει προστεθεί  $\text{HCOOH}$  το φάσμα έχει μεγαλύτερη ένταση ιόντων, κάτι που συμβαίνει καθώς το φορμικό οξύ είναι πιο ισχυρό οξύ κατά Bronsted-Lowry από το οξικό.

### 4.3.4 Συγκέντρωση πρωτεΐνης στο διάλυμα



**Εικόνα 48** Φάσματα EASI-MS (+) από ξηρά spots 2  $\mu$ L διαλυμάτων λυσοζύμης με συγκεντρώσεις 10, 100 και 1.000 ppm και 0,1% HCOOH.

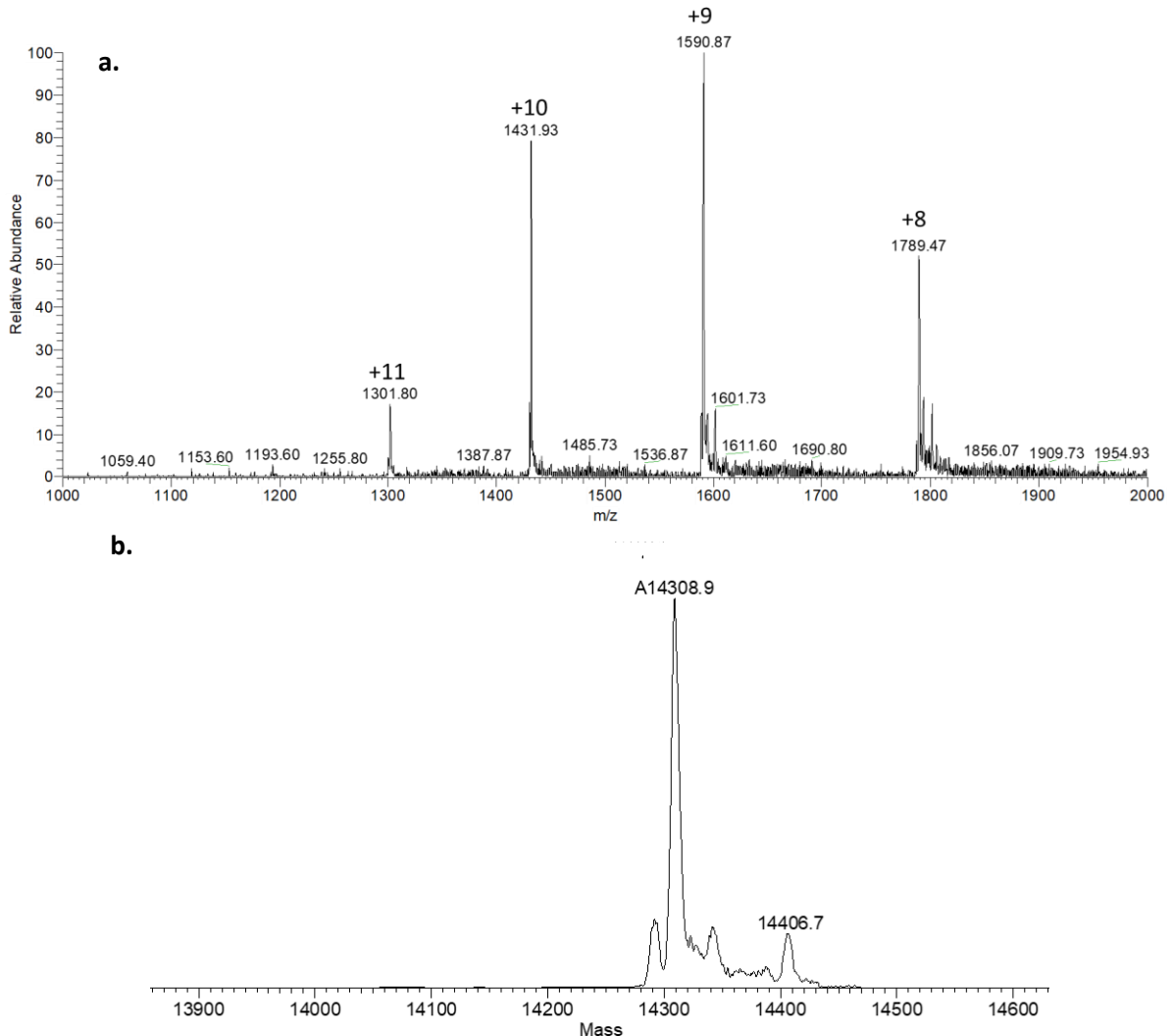
**Πίνακας 8** Τιμές απόλυτης έντασης ιόντων ανάλογα με την συγκέντρωση της πρωτεΐνης

Συγκέντρωση (ppm)	Ποσότητα πρωτεΐνης/spot (ng)	Απόλυτη Ένταση
10	0,02	$2 \times 10^4$
100	0,2	$5 \times 10^4$
1.000	2	$8 \times 10^6$

Ξηρά spots από 2  $\mu$ L τριών διαφορετικών διαλυμάτων λυσοζύμης 10, 100 και 1.000 ppm, εκροφήθηκαν. Προφανώς, όσο μεγαλύτερη η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο διάλυμα, τόσο μεγαλύτερη θα είναι και η επιφανειακή συγκέντρωση του κάθε spot. Όπως ήταν αναμενόμενο, το spot με την μεγαλύτερη επιφανειακή συγκέντρωση, εμφάνισε το καλύτερο φάσμα. Έτσι, όσο μικρότερη συγκέντρωση διαλύματος, τόσο πιο χαμηλή η ένταση του φάσματος και τόσο μικρότερος ο λόγος S/N.

## 4.3.5 Φάσματα μάζας EASI πρωτεϊνών από ξηρά spot

- Λυσοζύμη



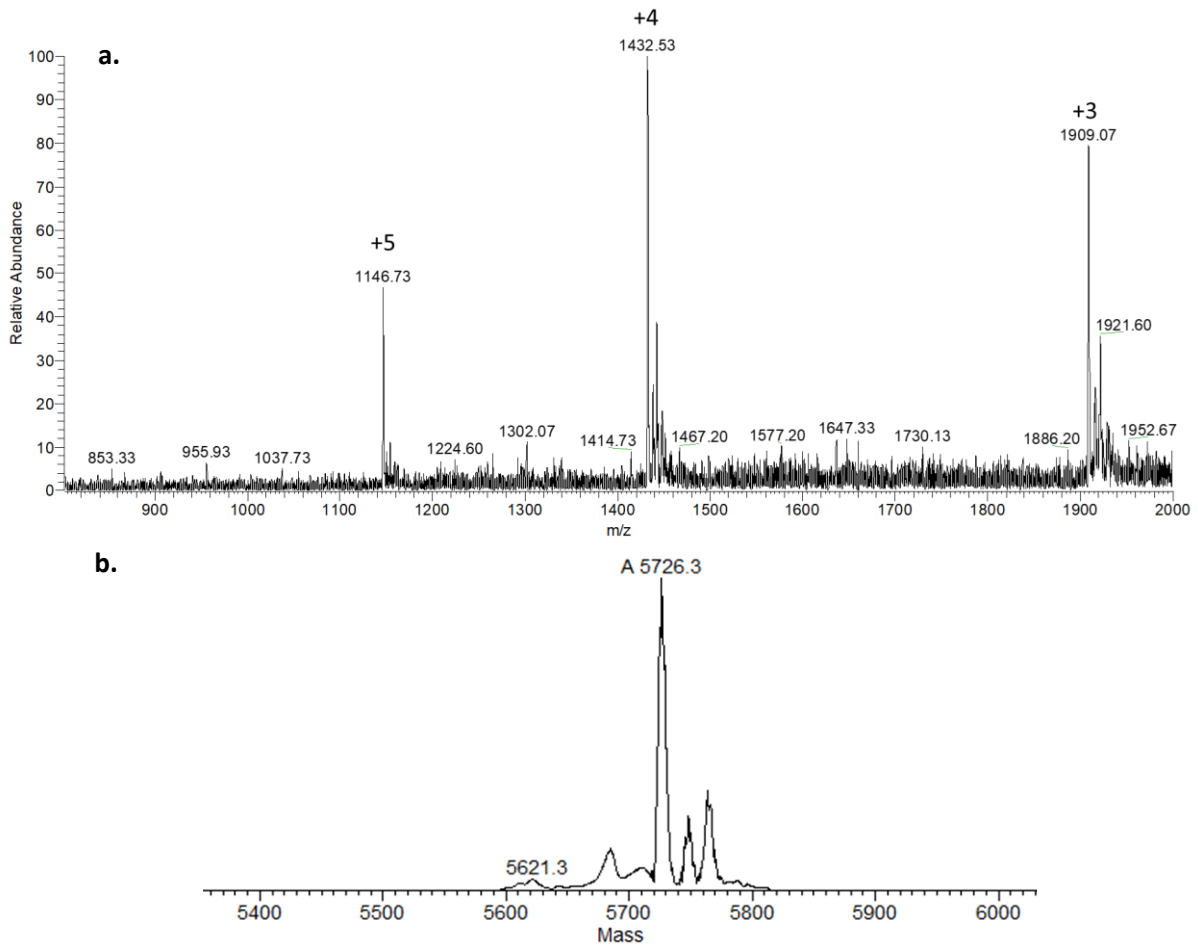
**Εικόνα 49 a.** Φάσμα EASI-MS (+) από ξηρό spot 2  $\mu\text{L}$  διαλύματος λυσοζύμης 1.000 ppm (1%  $\text{HCOOH}$ ) υπό ροή διαλύτη 20  $\mu\text{L}/\text{min}$  και πίεση αερίου 7 bar. **b.** Μοριακή μάζα λυσοζύμης (μεγαλύτερη κορυφή) όπως υπολογίστηκε με το λογισμικό MagTran 1.02.

Τα φορτία των κάθε κορυφών της λυσοζύμης στο φάσμα μάζας καθώς και η πειραματική μοριακή μάζα της υπολογίστηκε με την χρήση του λογισμικού προγράμματος MagTran 1.02. Η πειραματική μάζα υπολογίζεται στα 14.308,9 Da.

Παρατηρείται ωστόσο και μια μικρότερη κορυφή στα 14.406,7 Da που έχει διαφορά μάζας 97,8 Da από την κύρια κορυφή. Αυτή μπορεί να αντιστοιχεί στην φωσφορυλιωμένη λυσοζύμη, δηλαδή την πρωτεΐνη που περιέχει μία ορθοφωσφορική ομάδα ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ). Η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών είναι μια συνήθης μεταμεταφραστική διαδικασία, όπου κάποια αμινοξέα της νεοσύστατης πρωτεΐνης φωσφορυλιώνονται από κινάσες<sup>40</sup>. Ωστόσο, πιθανότερα, να ανήκουν σε συναρμογή της

πρωτεΐνης με φωσφορικά και θειικά που προϋπάρχουν στο αναλύτη όπως έχει παρατηρηθεί σε πειράματα με ηλεκτροψεκασμό<sup>41</sup>.

- Ινσουλίνη

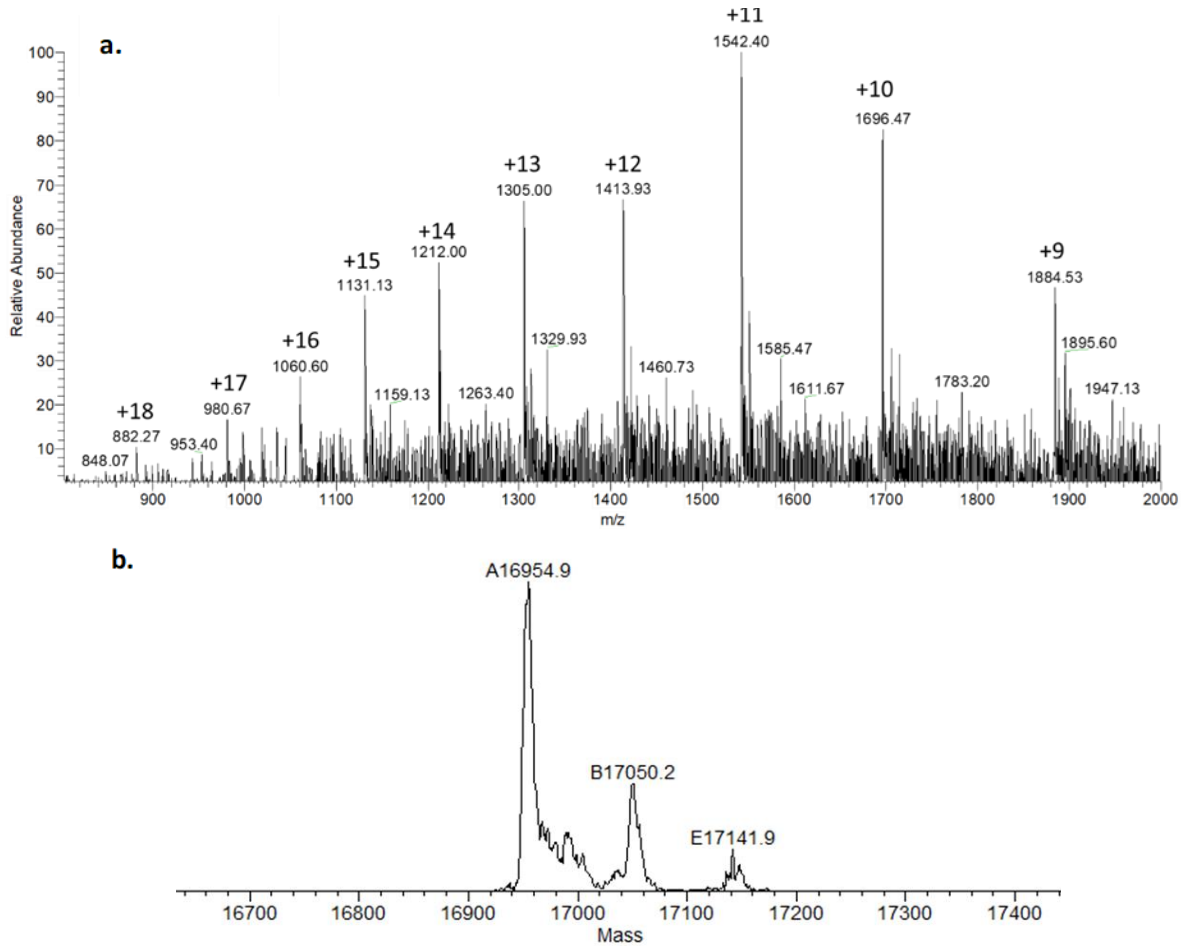


**Εικόνα 50 a.** Φάσμα EASI-MS (+) από ξηρό spot 2  $\mu\text{L}$  διαλύματος ινσουλίνης 1.000 ppm (1%  $\text{HCOOH}$ ) υπό ροή διαλύτη 20  $\mu\text{L}/\text{min}$  και πίεση αερίου 7 bar. **b.** Μοριακή μάζα ινσουλίνης (μεγαλύτερη κορυφή) όπως υπολογίστηκε με το λογισμικό MagTran 1.02.

Τα φορτία των κάθε κορυφών της ινσουλίνης στο φάσμα μάζας καθώς και η πειραματική μοριακή μάζα της υπολογίστηκε με την χρήση του λογισμικού προγράμματος MagTran 1.02. Η πειραματική μάζα υπολογίζεται στα 5.725,8 Da.

Οι κορυφές δεξιά της κύριας έχουν μάζες 5.748,2 και 5.763,4 που αντιστοιχούν σε διαφορά μάζας με την κύρια 21,9 και 37,4 αντίστοιχα. Αυτές οι κορυφές θα μπορούσε να αποτελούν adducts της ινσουλίνης με  $\text{Na}^+$  και  $\text{K}^+$ , δεδομένου του σφάλματος της ανάλυσης.

- Μυογλοβίνη

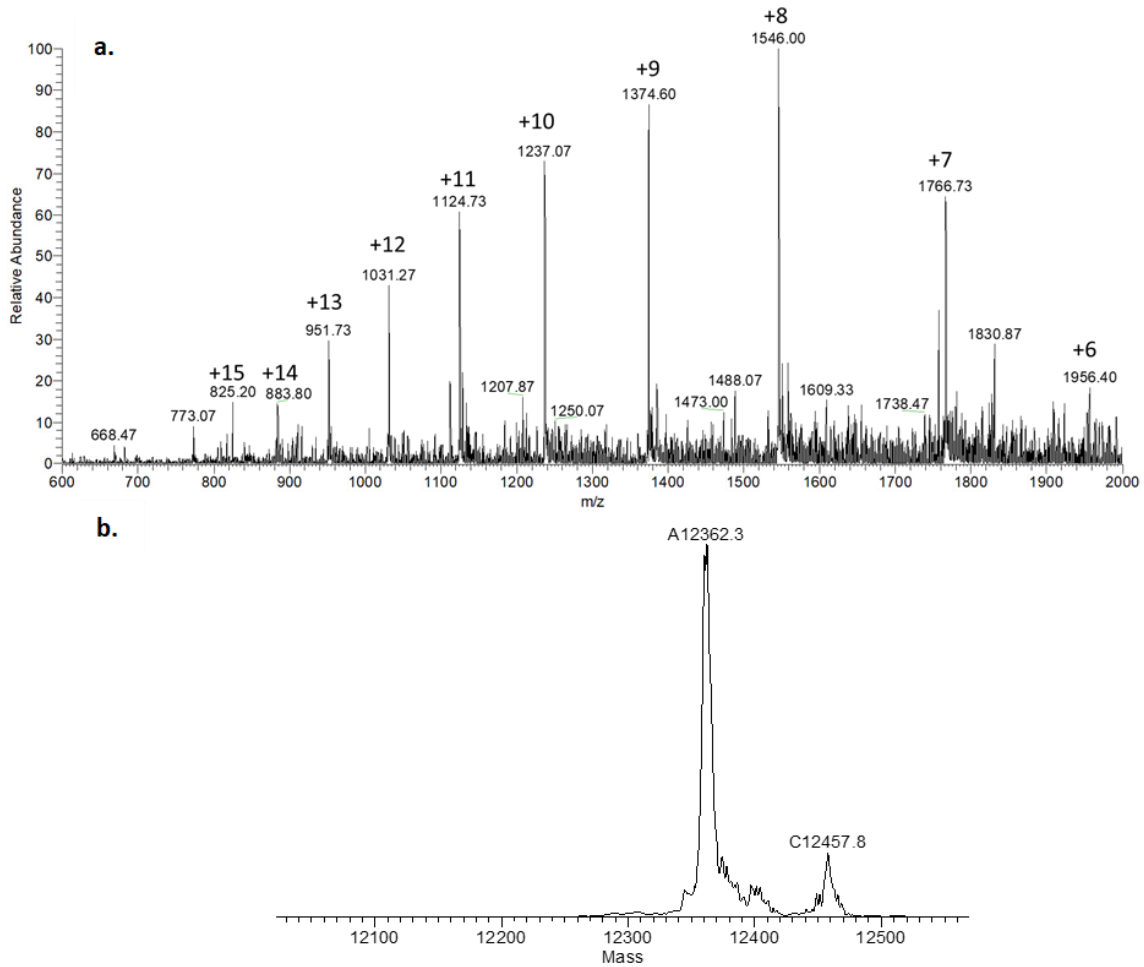


**Εικόνα 51 a.** Φάσμα EASI-MS (+) από ξηρό spot 2  $\mu$ L διαλύματος μυογλοβίνης 1.000 ppm (1% HCOOH) υπό ροή διαλύτη 20  $\mu$ L/min και πίεση αερίου 7 bar. **b.** Μοριακή μάζα μυογλοβίνης (μεγαλύτερη κορυφή) όπως υπολογίστηκε με το λογισμικό MagTran 1.02.

Τα φορτία των κάθε κορυφών της μυογλοβίνης στο φάσμα μάζας καθώς και η πειραματική μοριακή μάζα της υπολογίστηκε με την χρήση του λογισμικού προγράμματος MagTran 1.02. Η πειραματική μάζα υπολογίζεται στα 16.954,9 Da. Το φάσμα μάζας αντιστοιχεί στην απο-μυογλοβίνη, δηλαδή την μυογλοβίνη που στερείται της μη πρωτεϊνικής ομάδας, της αίμης.

Οι δύο κορυφές που παρατηρούνται δεξιά της κύριας εμφανίζουν διαφορά μάζας από την κύρια, 95,3 Da και 187 Da αντίστοιχα. Αυτές οι διαφορές υποδηλώνουν την ένωση της μυογλοβίνης με μία και με δύο ορθοφωσφορικές ομάδες ( $\text{PO}_4^{3-}$ )

• Κυτόχρωμα C



**Εικόνα 52 a.** Φάσμα EASI-MS (+) από ξηρό spot 2  $\mu$ L διαλύματος κυτοχρώματος c 1.000 ppm (1% HCOOH) υπό ροή διαλύτη 20  $\mu$ L/min και πίεση αερίου 7 bar. **b.** Μοριακή μάζα κυτοχρώματος C (μεγαλύτερη κορυφή) όπως υπολογίστηκε με το λογισμικό MagTran 1.02.

Τα φορτία των κάθε κορυφών του κυτοχρώματος C στο φάσμα μάζας καθώς και η πειραματική μοριακή μάζα του υπολογίστηκε με την χρήση του λογισμικού προγράμματος MagTran 1.02. Η πειραματική μάζα υπολογίζεται στα 12.362,3 Da.

Η κορυφή δεξιά της κύριας εμφανίζει διαφορά μάζας από την κύρια, 95,5 Da . Αυτή η διαφορά, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, υποδεικνύει την πρόσδεση μίας ορθοφωσφορικής ομάδας ( $\text{PO}_4^{3-}$ )

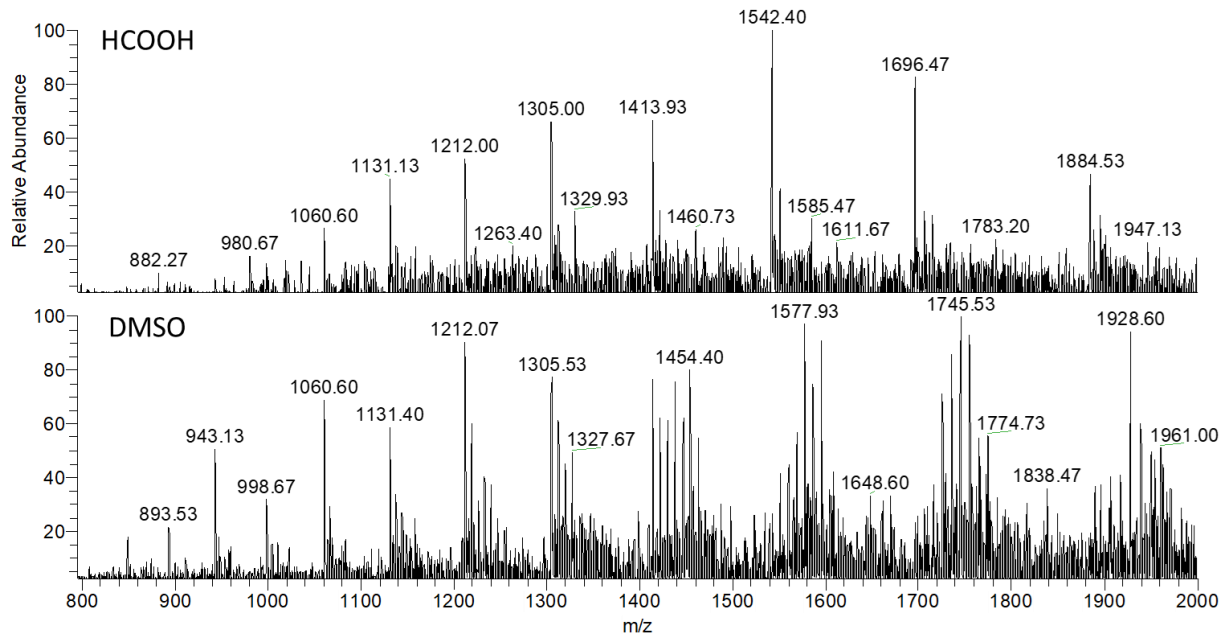
Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται μια σύγκριση των πειραματικών τιμών με τα αντίστοιχα θεωρητικά, όπως βρέθηκαν στην βιβλιογραφία<sup>27,29</sup>. Το πειραματικό MW αποτελεί μέσο όρο τεσσάρων διαφορετικών αναλύσεων για την κάθε πρωτεΐνη.

Πίνακας 9 Θεωρητικά και πειραματικά m/z των πρωτεϊνών

Πρωτεΐνη	Θεωρητικό MW	Πειραματικό MW	% Σφάλμα
Λυσοζύμη	14.306,1	14.307,2	0,02
Ινσουλίνη	5.733,5	5.727,6	0,1
Απόμυογλοβίνη	16.952,5	16.955,1	0,01
Κυτόχρωμα C	12.361,2	12.362,2	0,02

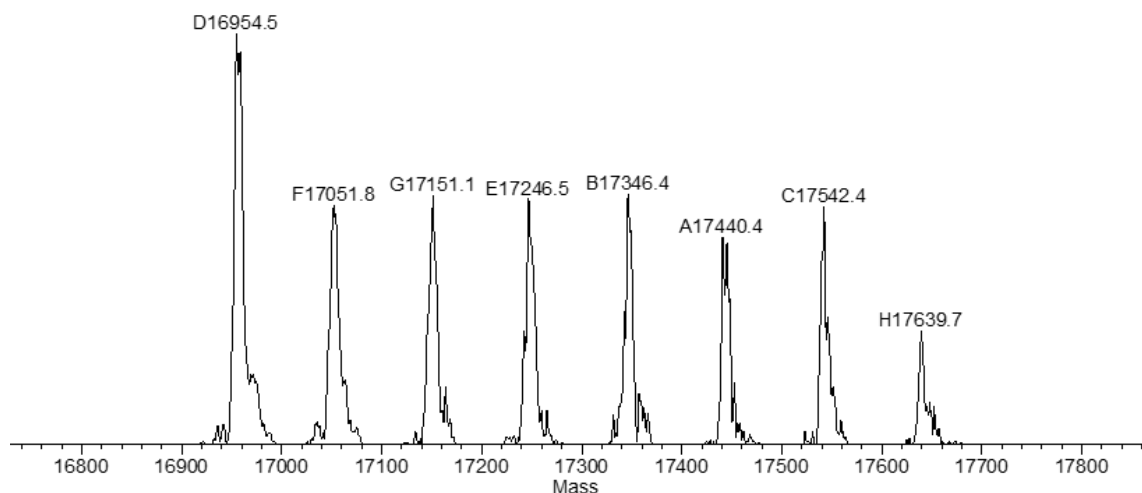
#### 4.3.6 Προσθήκη διμεθυλοσουλφοξιδίου DMSO στις πρωτεΐνες

Όταν στο διάλυμα της πρωτεΐνης αντί για φορμικό ή οξικό οξύ προσθέτουμε διμεθυλοσουλφοξίδιο (DMSO), η μορφή του φάσματος μάζας αλλάζει, με πολλές νέες κορυφές να εμφανίζονται, αναιρώντας την κατανομή των κορυφών που παρατηρούσαμε, όπως φαίνεται στα παρακάτω φάσματα.



**Εικόνα 53** Φάσματα EASI-MS (+) από ξηρά spot 2  $\mu$ L διαλύματος. Πάνω, spot από διάλυμα 1.000 ppm και 1% HCOOH. Κάτω, spot από διάλυμα 1.000 ppm και 1% DMSO.





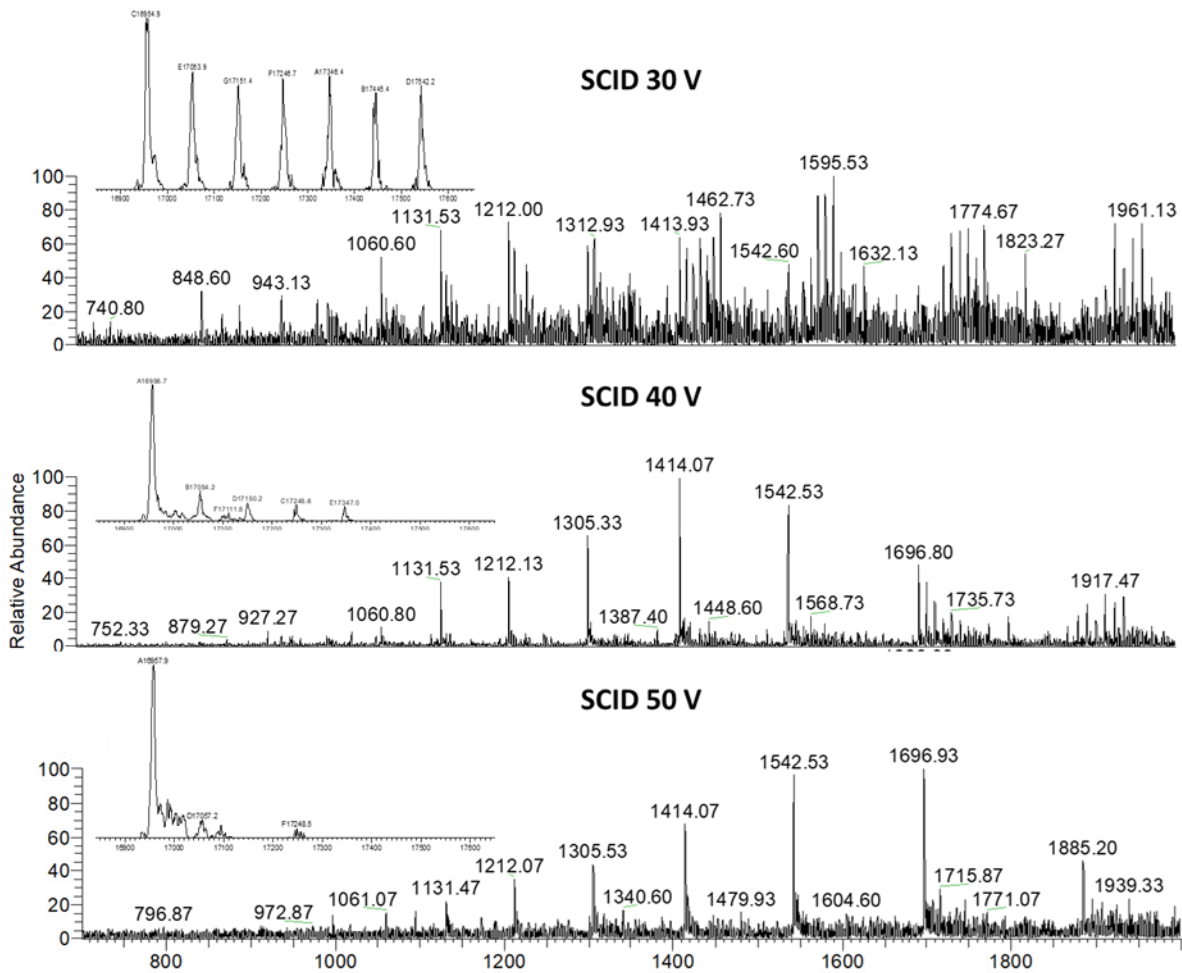
**Εικόνα 54** Ανάλυση των κορυφών του φάσματος της μυογλοβίνης με DMSO με το πρόγραμμα MagTran 1.02

Όπως φαίνεται από την ανάλυση των κορυφών του φάσματος μάζας EASI της μυογλοβίνης με DMSO, παρατηρούμε αρκετές διαφορές μάζας, που θα αντιστοιχούν σε κάποιες συναρμογές της πρωτεΐνης που προϋπάρχουν στο δείγμα της πρωτεΐνης, π.χ. με φωσφορικά ή θειικά, ή συναρμογές με ενώσεις και ιόντα που υπάρχουν στο διάλυμα της πρωτεΐνης.

Με δεδομένο ότι στην περίπτωση της μυογλοβίνης με HCOOH δεν παρατηρήθηκαν τόσες διαφορετικές οντότητες, καταλήγουμε στην υπόθεση ότι οι υπόλοιπες μορφές της μυογλοβίνης που παρατηρούνται αντιστοιχούν σε adducts της μυογλοβίνης με NaDMSO (Mr:101).

Όταν οι πρωτεΐνες αποδιατάσσονται, οι μη πολικές πλευρικές αλυσίδες εκτίθενται σε επαφή με τον διαλύτη και η ξεδιπλωμένη δομή δεσμεύει DMSO. Από αυτή την δέσμευση, η ελεύθερη ενέργεια της αποδιάταξη της πρωτεΐνης ελαττώνεται και επομένως η αποδιάταξη πραγματοποιείται ευκολότερα<sup>38</sup>. Αυτός είναι ο λόγος που το DMSO προκαλεί αποδιάταξη των πρωτεϊνών.

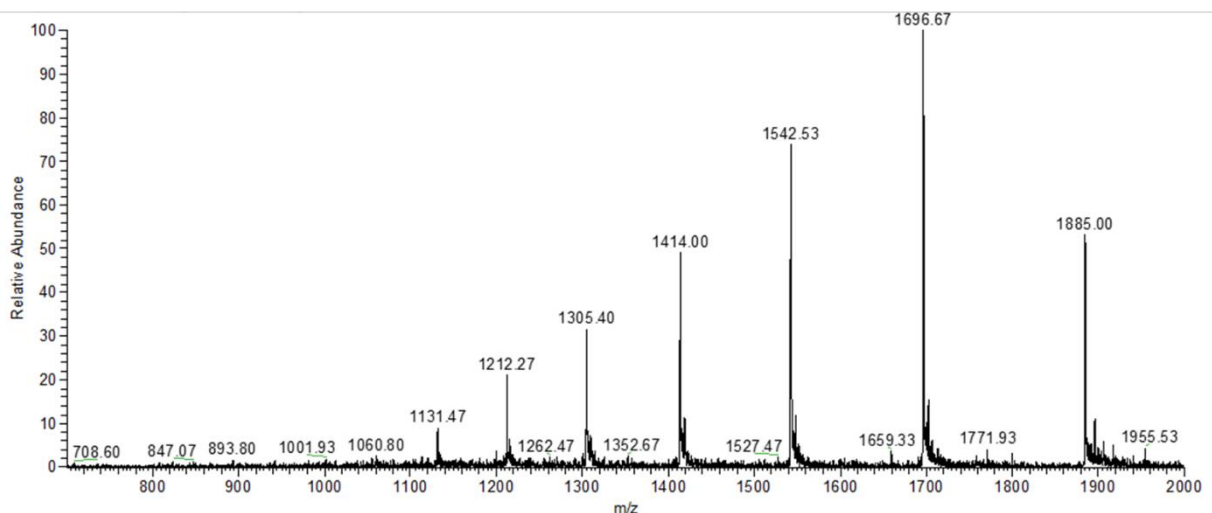
Μεταβάλλοντας την ενέργεια SCID (source collision-induced dissociation), παρατηρούμε ότι το φάσμα μάζας EASI της μυογλοβίνης γίνεται πιο καθαρό, δηλαδή τα adducts της μυογλοβίνης με NaDMSO διασπώνται. Όσο πιο υψηλή η ενέργεια SCID τόσο πιο έντονες συγκρούσεις πραγματοποιούνται μεταξύ των ιόντων της πρωτεΐνης. Έτσι τα adducts που κυρίως συγκροτούνται με διαμοριακές δυνάμεις, διασπώνται και επομένως δεν παρατηρούνται στα φάσματα. Σε αντίθεση οι φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες δεν διασπώνται, μιας και ο ομοιοπολικός δεσμός είναι πολύ ισχυρός από τις διαμοριακές δυνάμεις.



Εικόνα 55 Φάσμα EASI-MS (+) από ξηρά spot 2  $\mu$ L διαλύματος μυογλοβίνης 1.000 ppm με 1% DMSO σε διαφορετικές ενέργειες SCID, 30, 40 και 50 V.

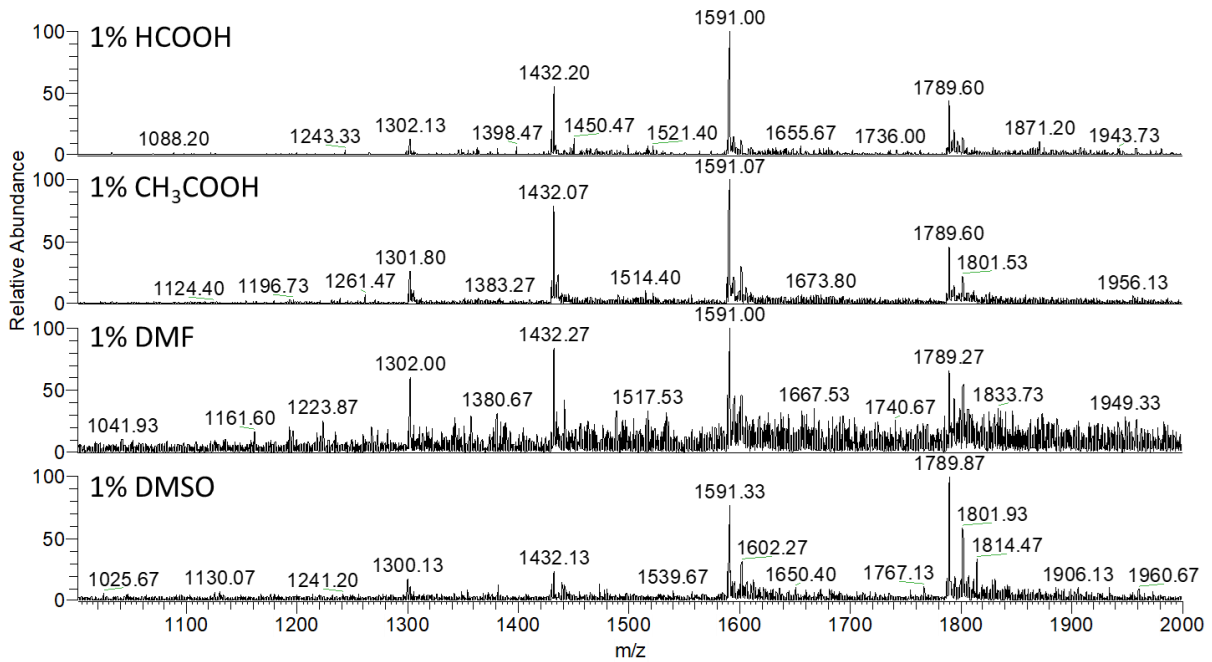
#### 4.3.7 Προσθήκη διμεθυλοφορμαμιδίου DMF στις πρωτεΐνες

Όπως διαπιστώθηκε και το DMF επάγει τον ιοντισμό των πρωτεϊνών, δίνοντας φάσματα μάζας με υψηλή ένταση ιόντων και αρκετές κορυφές.



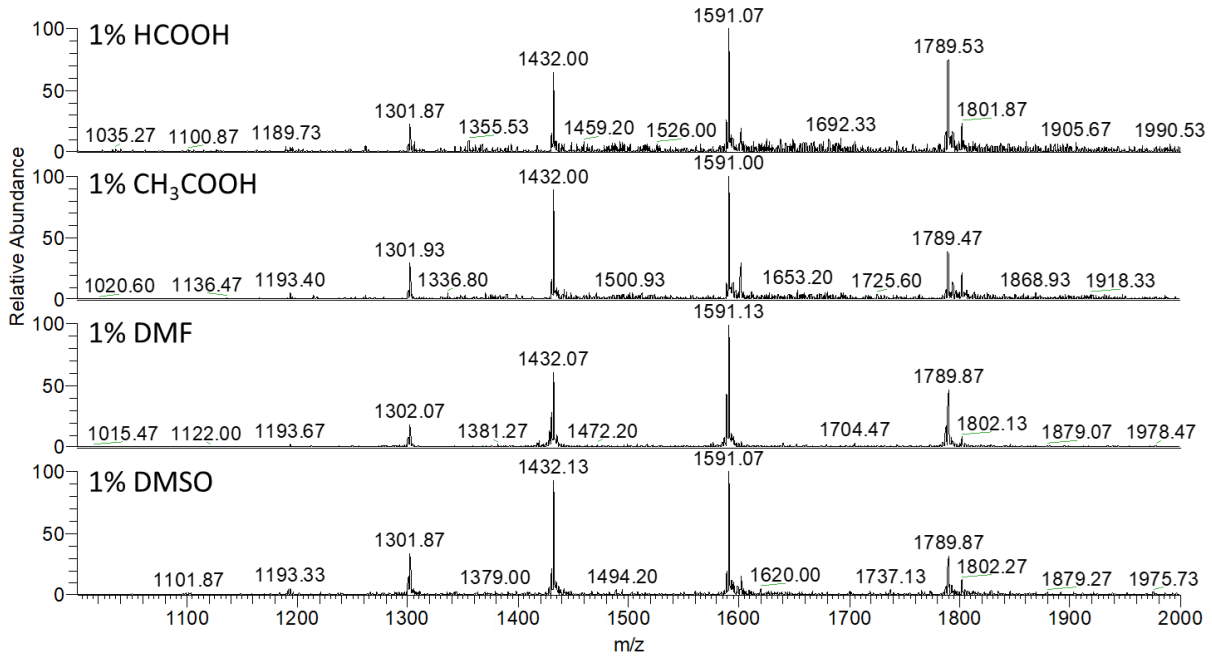
Εικόνα 56 Φάσμα EASI-MS (+) από ξηρά spot 2  $\mu$ L διαλύματος μυογλοβίνης 1.000 ppm και 1% DMF. SCID 50 V

Παρακάτω παρουσιάζονται συγκριτικά φάσματα μάζας της λυσοζύμης σε διαλύματα με διαφορετικό πρόσθετο. Στην πρώτη περίπτωση τα φάσματα έχουν ληφθεί σε SCID 10 V, ενώ στην δεύτερη περίπτωση σε SCID 50 V.



**Εικόνα 57** Φάσμα EASI-MS (+) από ξηρό spot 2  $\mu$ L διαλύματος λυσοζύμης 1.000 ppm σε SCID 10 V

Τα φάσματα γενικά έχουν παρόμοια ένταση, της τάξης  $10^5 - 10^6$ , που ωστόσο παρουσιάζει μικρές διακυμάνσεις από φάσμα σε φάσμα. Στα 10 V SCID παρατηρούμε περισσότερο θόρυβο στην περίπτωση του DMF και του DMSO, που οφείλεται σε adducts των πρωτεϊνών. Στην περίπτωση που η ενέργεια SCID αυξάνεται στα 50 V, σε όλα τα φάσματα αυξάνεται κατά ένα ποσοστό η σχετική ένταση των κορυφών και στην περίπτωση των φασμάτων με DMF και DMSO, τα φάσματα είναι πιο καθαρά λόγω αποδιάταξης των adducts.



Εικόνα 58 Φάσμα EASI-MS (+) από ξηρό spot 2  $\mu$ L διαλύματος λυσοζύμης 1.000 ppm σε SCID 50 V

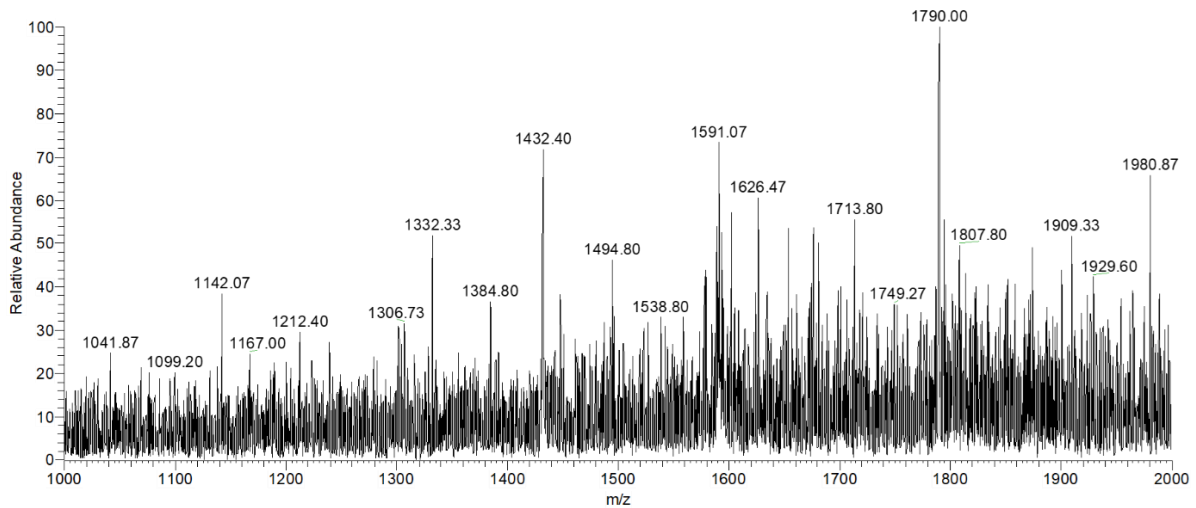
#### 4.3.8 Προσθήκη αποδιατακτικών αντιδραστηρίων στον διαλύτη εκνέφωσης

Σε όλες τις παραπάνω αναλύσεις, κάποιο οξύ ή γενικά κάποιο αποδιατακτικό αντιδραστήριο προστίθεται στο διάλυμα της πρωτεΐνης, Κάτι που όμως δεν είναι ιδιαίτερα πρακτικό στην περίπτωση της ανάλυσης ενός φυσικού βιολογικού ιστού λ.χ. Τι γίνεται όμως στην περίπτωση όπου το αντιδραστήριο αυτό προστίθεται στον διαλύτη εκνέφωσης και έτσι ψεκάζεται με αυτό το σποτ της πρωτεΐνης;

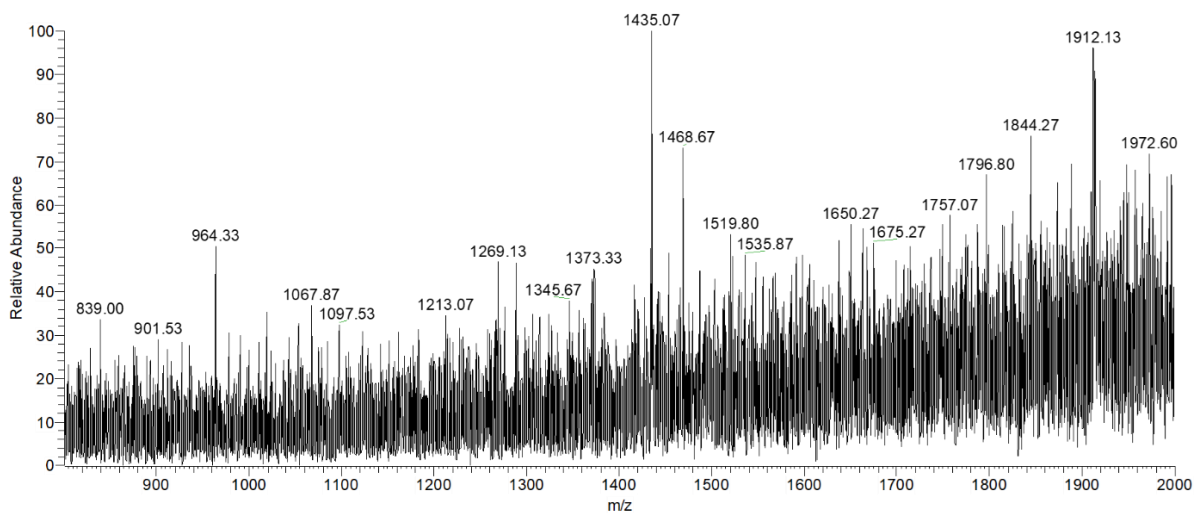
Σε πρώτη φάση λήφθηκαν φάσματα πρωτεϊνών χωρίς την παρουσία οξέος, DMSO ή DMF ούτε στο διάλυμα, ούτε στον διαλύτη εκνέφωσης. Έτσι μπορούμε να καταλάβουμε αν και κατά πόσο μια πρωτεΐνη μπορεί να ιοντιστεί στο νερό χωρίς κάποιο αποδιατακτικό αντιδραστήριο. Σε όλες τις περιπτώσεις των πρωτεϊνών που αναλύθηκαν υπό αυτές τις συνθήκες, παρατηρήθηκαν κορυφές που αντιστοιχούν σε κάποια φορτία, ωστόσο η ένταση ήταν πολύ χαμηλή και ο λόγος S/N μικρός, κάτι που συνηγορεί ότι η πρωτεΐνη ιοντίζεται σε σχετικά μικρό ποσοστό χωρίς την παρουσία κάποιου πρόσθετου.

Στην παρακάτω εικόνα παρατίθενται δύο φάσματα μάζας EASI της λυσοζύμης και της ινσουλίνης αντίστοιχα χωρίς την προσθήκη οξέος, DMF ή DMSO.

Λυσοζύμη από ασπράδι αυγού



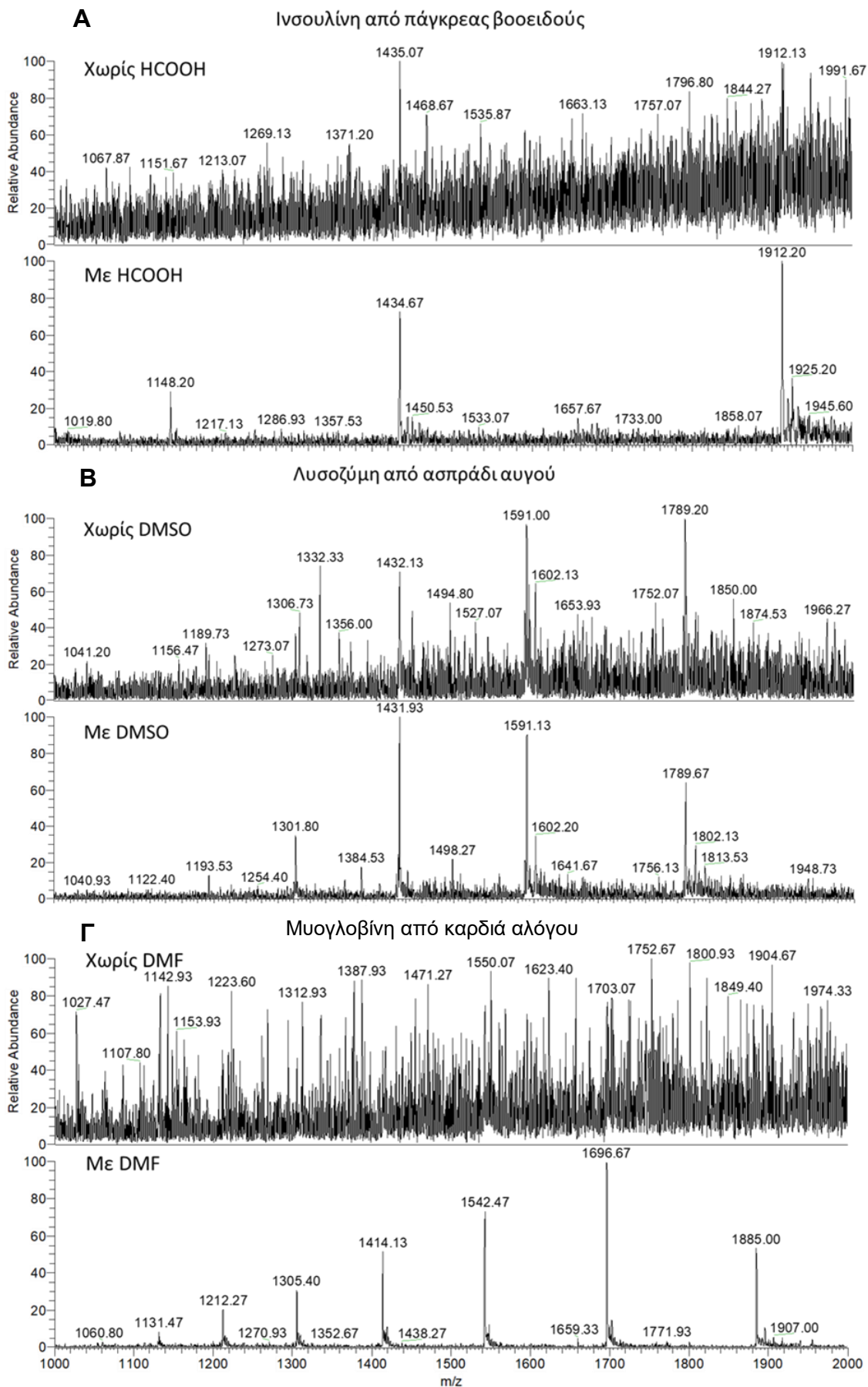
Ινσουλίνη από πάγκρεας βοειδούς



**Εικόνα 59** Φάσματα EASI-MS (+) από ξηρά spot 2  $\mu$ L διαλύματος (πάνω) λυσοζύμης 1000 ppm, (κάτω) ινσουλίνης 1000 ppm. Διαλύτης εκνέφωσης ακετονιτρίλιο 20  $\mu$ /min.

Όταν, ωστόσο, στον διαλύτη εκνέφωσης προστεθεί κάποιο οξύ, DMF ή DMSO, η μορφή των φασμάτων αλλάζει και πλέον διακρίνονται καθαρά οι κορυφές των ιόντων των πρωτεϊνών.

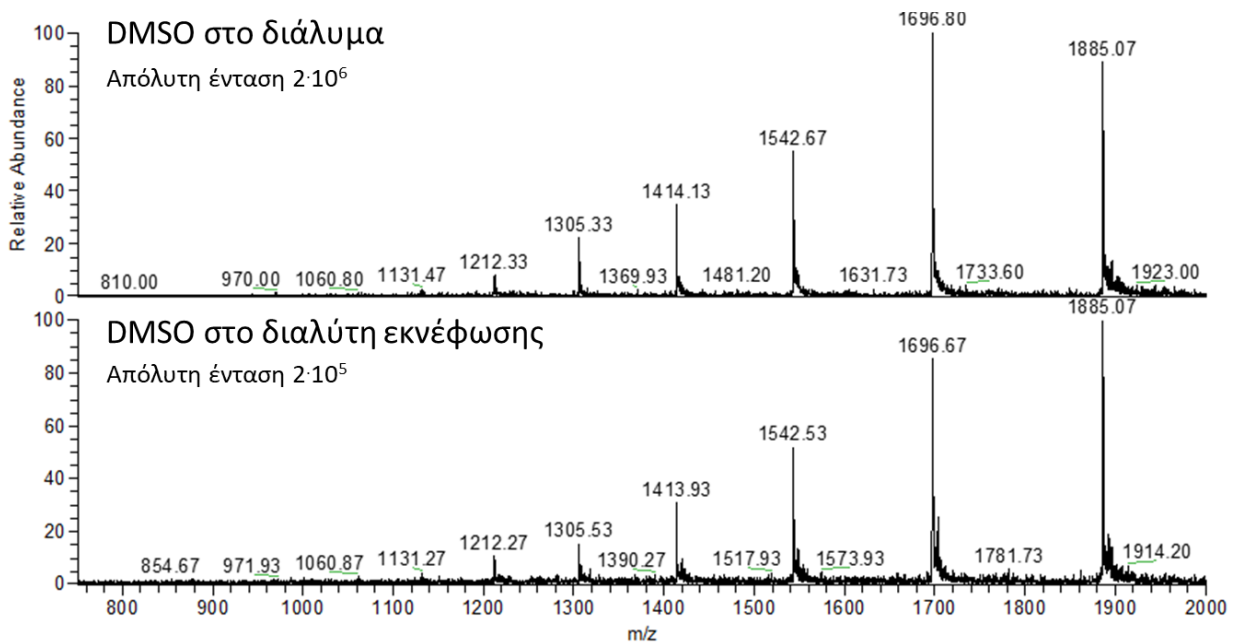
Παρακάτω παρουσιάζονται στα φάσματα μάζας τριών πρωτεϊνών (Λυσοζύμη, ινσουλίνη, μυογλοβίνη) χωρίς και με την προσθήκη κάποιου αντιδραστήριου στον διαλύτη εκνέφωσης. Όλα τα διαλύματα των πρωτεϊνών περιέχουν μόνο την πρωτεΐνη και νερό και κανένα άλλο αντιδραστήριο.



Εικόνα 60 Φάσματα EASI-MS (+) από ξηρά spots 2  $\mu$ L διαλυμάτων 1.000 ppm, με και χωρίς προθήκη κάποιου αποδιατακτικού αντιδραστήριου.

Τα φάσματα της εικόνας 59 Α. αντιστοιχούν σε spot υδατικού διαλύματος λυσοζύμης συγκέντρωσης 1.000 ppm, όπου (πάνω) αρχικά ως διαλύτης εκνέφωσης χρησιμοποιείται ακετονιτρίλιο, ενώ (κάτω) στην συνέχεια στο διαλύτη εκνέφωσης προστίθεται και 1% HCOOH. Έτσι παρατηρούμε μία τεράστια διαφορά μεταξύ των δύο φασμάτων. Ανάλογα αποτελέσματα προκύπτουν όταν στον διαλύτη εκνέφωσης προσθέτουμε 1% DMSO (εικόνα 59 Β.) ή DMF (εικόνα 59 Γ.)

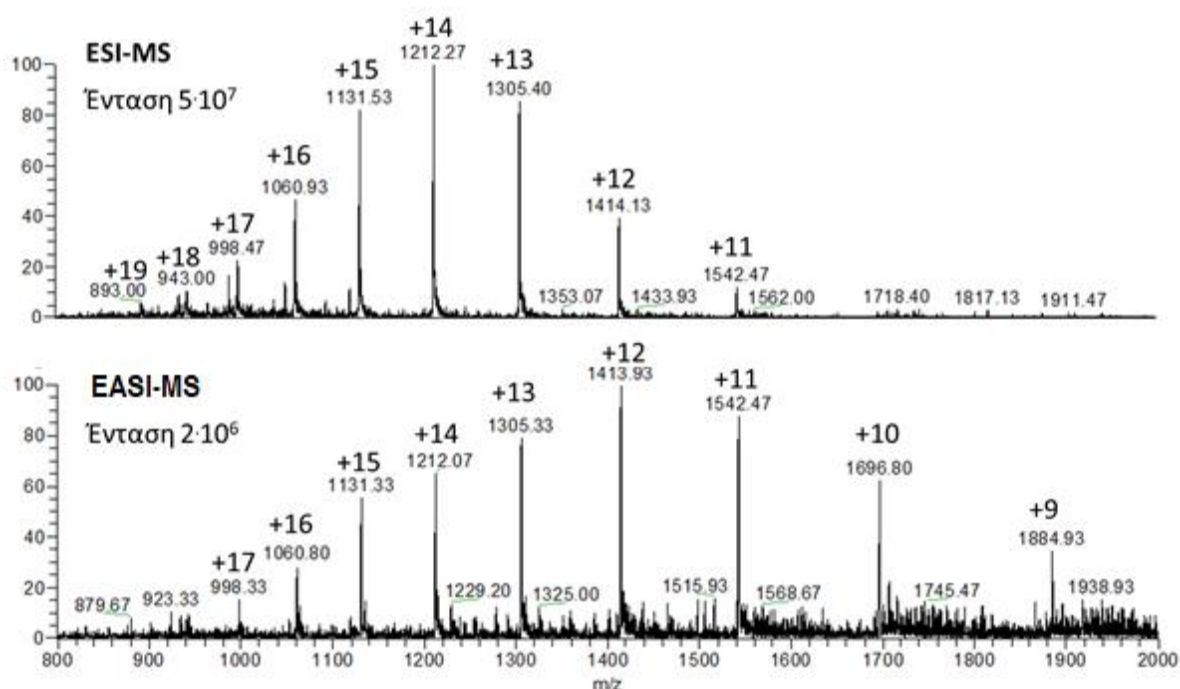
Επομένως, παρατηρούμε ότι για να καταγραφεί ένα φάσμα μάζας EASI πρωτεΐνης είναι απαραίτητη η προσθήκη κάποιου οξέος ή αποδιατακτικού αντιδραστηρίου, ώστε να ενισχυθεί ο ιοντισμός της πρωτεΐνης και να προκύψουν καθαρά φάσματα με σχετικά μεγάλη αφθονία ιόντων. **Τα αντιδραστήρια αυτά μπορούν να προστίθενται είτε στο υδατικό διάλυμα της πρωτεΐνης, ή απευθείας στον διαλύτη εκνέφωσης.** Και στις δύο περιπτώσεις τα φάσματα που προκύπτουν είναι παρόμοια, ωστόσο υψηλότερες εντάσεις ιόντων παρατηρούνται όταν το οξύ, DMSO ή DMF, προστίθενται στο διάλυμα της πρωτεΐνης. Αυτό είναι λογικό να συμβαίνει καθώς η πρωτεΐνη αλληλοεπιδρά περισσότερο με το αντιδραστήριο στο διάλυμα από ότι κατά την πρόσπτωση του διαλύτη εκνέφωσης στο spot της πρωτεΐνης.



**Εικόνα 61** Φάσματα EASI-MS (+) από ξηρά spot 2μL διαλύματος λυσοζύμης 1.000 ppm. Πάνω, 1% DMSO έχει προστεθεί στο διάλυμα της πρωτεΐνης. Κάτω 1% DMSO έχει προστεθεί στο διαλύτη εκνέφωσης.

### 4.3.9 Σύγκριση φασμάτων πρωτεϊνών ESI-MS και EASI-MS

Η τεχνική του ESI-MS και η τεχνική του EASI-MS, όσον αφορά την ανάλυση πρωτεϊνών, διαφέρουν σημαντικά. Οι διαφορές αυτές έχουν να κάνουν τόσο με την κατάσταση στην οποία βρίσκεται το προς ανάλυση δείγμα, όσο και στον μηχανισμό με τον οποίο πραγματοποιείται η εκνέφωση και ο ιοντισμός (βλέπε κεφάλαιο 1). Στον ηλεκτροψεκασμό η πρωτεΐνη βρίσκεται σε διάλυμα το οποίο εκνεφώνεται και εισέρχεται στο φασματομέτρο μάζας κατά συνεχή ροή, ενώ αντίθετα στην εκρόφηση με ιοντισμό υπερηχητικής εκνέφωσης, το δείγμα της πρωτεΐνης είναι στερεό με συγκεκριμένη ποσότητα δείγματος, το οποίο εκροφάται από την επιφάνεια. Είναι προφανές ότι η δύο τεχνικές έχουν διαφορετικά όρια ανίχνευσης και εμφανίζουν διαφορετικές εντάσεις ιόντων. Οποιαδήποτε σύγκριση που αφορά την ποσοτική ανάλυση των μεθόδων είναι ανούσια. Ωστόσο η ποιοτική σύγκριση των φασμάτων των δύο μεθόδων εμφανίζει ενδιαφέρον.



**Εικόνα 62** Φάσματα μάζας μυογλοβίνης. Πάνω ESI-MS(+), διάλυμα μυογλοβίνης 150 ppm, 1% οξικό. Κάτω, EASI-MS (+) ξηρό spot 2  $\mu$ L διαλύματος μυογλοβίνης 1% οξικό.

Στην παραπάνω εικόνα παρουσιάζονται δύο φάσματα μάζας της μυογλοβίνης, το πάνω είναι με την μέθοδο ESI-MS ενώ το κάτω με την μέθοδο EASI-MS. Όπως φαίνεται στην περίπτωση του ηλεκτροψεκασμού η ένταση είναι υψηλότερη κατά μια τάξη μεγέθους και το πιο σημαντικό, ιόντα μεγαλύτερου φορτίου να έχουν υψηλότερη ένταση σε σχέση με το EASI, δηλαδή πραγματοποιείται περισσότερη αποδιάταξη της πρωτεΐνης. Αντίθετα, με το EASI μεγαλύτερη ένταση εμφανίζουν τα ιόντα της πρωτεΐνης με χαμηλότερα φορτία.



#### 4.4 Συμπεράσματα

- Εφαρμόζοντας την μέθοδο EASI-MS ήταν εφικτό να ληφθούν φάσματα μάζας διαφόρων πρωτεϊνών από ξηρά σποτ υδατικών διαλυμάτων αυτών, εναποτιθέμενα σε επιφάνεια τεφλόν (PTFE). Η περιεκτικότητα της πρωτεΐνης (100, 1.000 και 10.000 ppm) στο διάλυμα είναι ανάλογη με την επιφανειακή περιεκτικότητα της πρωτεΐνης στο spot.
- Ως διαλύτης εκνέφωσης χρησιμοποιήθηκε ακετονιτρίλιο με ροή 20  $\mu\text{L}/\text{min}$ , ενώ ως αέριο εκνέφωσης χρησιμοποιήθηκε άζωτο με πίεση 7 bar.
- Για την λήψη καθαρών φασμάτων ήταν απαραίτητη η προσθήκη κάποιου αποδιατακτικού αντιδραστήριου. Αυτά το αντιδραστήριο μπορεί να είναι οξικό οξύ, φορμικό οξύ, DMSO ή DMF. Ο γενικός τρόπος δράσης τους είναι η αποδιάταξη της πρωτεΐνης, οδηγώντας σε περισσότερα φορτισμένα μόρια πρωτεΐνης, αυξάνοντας, αισθητά, την ένταση των ιόντων στα φάσματα. Χωρίς την προσθήκη κάποιου από αυτά τα φάσματα που λαμβάνονται έχουν υψηλό θόρυβο και χαμηλή ένταση.
- Το αποδιατακτικό αντιδραστήριο μπορεί να προστεθεί είτε στο υδατικό διάλυμα της πρωτεΐνης είτε στον διαλύτη εκνέφωσης. Και στις δύο περιπτώσεις τα φάσματα είναι παρόμοια σε μορφή, με κύρια διαφορά την ένταση. Υψηλότερες εντάσεις ιόντων παρατηρούνται όταν προστίθεται στο διάλυμα της πρωτεΐνης.
- Όλα τα φάσματα που ελήφθησαν, αναφέρονται σε θετικά ιόντα. Δυστυχώς, δεν κατέστη εφικτή η λήψη φασμάτων αρνητικών ιόντων. Αυτός είναι ένας από τους μελλοντικούς στόχους.
- Η μέθοδος EASI-MS δεν έχει πολύ χαμηλά όρια ανίχνευσης σε σχέση με άλλες μεθόδους και, προς το παρόν, περιορίζεται στην ανάλυση πρωτεϊνών με σχετικά μικρό μοριακό βάρος σε σχέση με το ESI, ωστόσο είναι πολύ πιο γρήγορη, εύκολη και επιτρέπει την επιφανειακή ανάλυση.

## Κεφάλαιο 5 | Ανάλυση επιφάνειας χαρτονομισμάτων

### 5.1 Εισαγωγή

Η χημική ανάλυση τραπεζογραμμάτιων αποτελεί ένα σημαντικό μέρος της ενασχόλησης της εγκληματολογικής χημείας (forensics). Τα ποσοστά πλαστογράφησης χαρτονομισμάτων έχουν ανέβει τις τελευταίες δύο δεκαετίες στην Ευρώπη και κατά συνέπεια στην Ελλάδα. Η τεχνολογική ανάπτυξη των εκτυπωτών αλλά και η ελεύθερη πρόσβαση, μέσω του διαδικτύου, σε πρώτες ύλες από τους παραχαράκτες, καθιστά τα πλαστά χαρτονομίσματα όλο και πιο πιστά αντίγραφα των αυθεντικών και δυσχεραίνει, έτσι, την ανίχνευσή και την απομάκρυνσή τους. Αυτός είναι ο πιο σημαντικός λόγος που από το 2013 η Ευρωπαϊκή Κεντρική Τράπεζα προέβη στην σταδιακή αντικατάσταση της “Πρώτης Σειράς” των χαρτονομισμάτων ευρώ (2002), με νέα χαρτονομίσματα (“Σειρά Ευρώπη”) που διαθέτουν περισσότερα χαρακτηριστικά ασφαλείας, όπως, υδατογραφήματα, φθορίζουσες χρωστικές, ολογράμματα και μικροτυπογραφικά στοιχεία, τα οποία επιβεβαιώνουν την αυθεντικότητά τους και κάνουν πιο δύσκολη την παραχάραξή τους.

Ένας άλλος λόγος, πέρα της παραχάραξης, που καθιστά ενδιαφέρουσα την χημική ανάλυση των χαρτονομισμάτων είναι ότι ένα σημαντικό ποσοστό των τραπεζογραμμάτιων σε παγκόσμια κλίμακα έχουν στην επιφάνεια τους ποσότητες κοκαΐνης και ίχνη από άλλες ναρκωτικές ουσίες<sup>42</sup>.

Σκοπός αυτών των αναλύσεων ήταν η επίδειξη των δυνατοτήτων της μεθόδου EASI-MS σε εφαρμογές της εγκληματολογικής χημείας. Μια σειρά χαρτονομισμάτων ευρώ αναλύθηκαν με στόχο την εύρεση των προφίλ των φασμάτων από ξεχωριστές περιοχές των χαρτονομισμάτων με σκοπό την διάκριση αυθεντικών με πλαστών. Να σημειωθεί ότι για λόγους ασφαλείας δεν έγινε ταυτοποίηση των κορυφών στα φάσματα αυτά. Επιπλέον αναλύθηκαν και αμερικανικά δολάρια με σκοπό την εύρεση ναρκωτικών ουσιών σε αυτά.

## 5.2 Πειραματικό Μέρος

### Αντιδραστήρια

Ακετονιτρίλιο, Chromasolv gradient grade, for HPLC,  $\geq 99.9\%$ , Sigma Aldrich

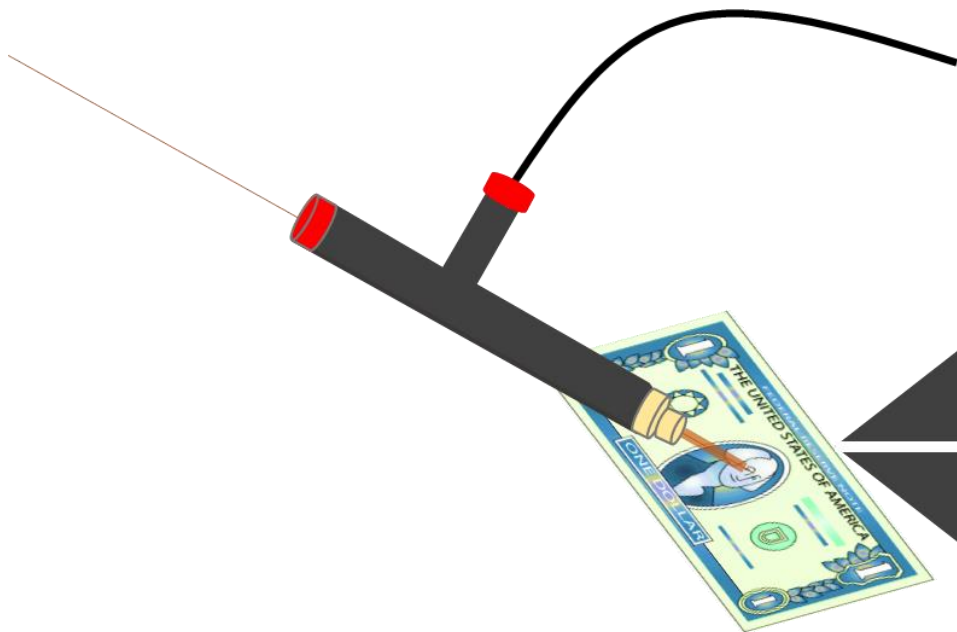
### Δείγματα

Χαρτονομίσματα 5, 10, 20 και 50 ευρώ

Χαρτονομίσματα των 1 δολαρίου ΗΠΑ

### Διαδικασία

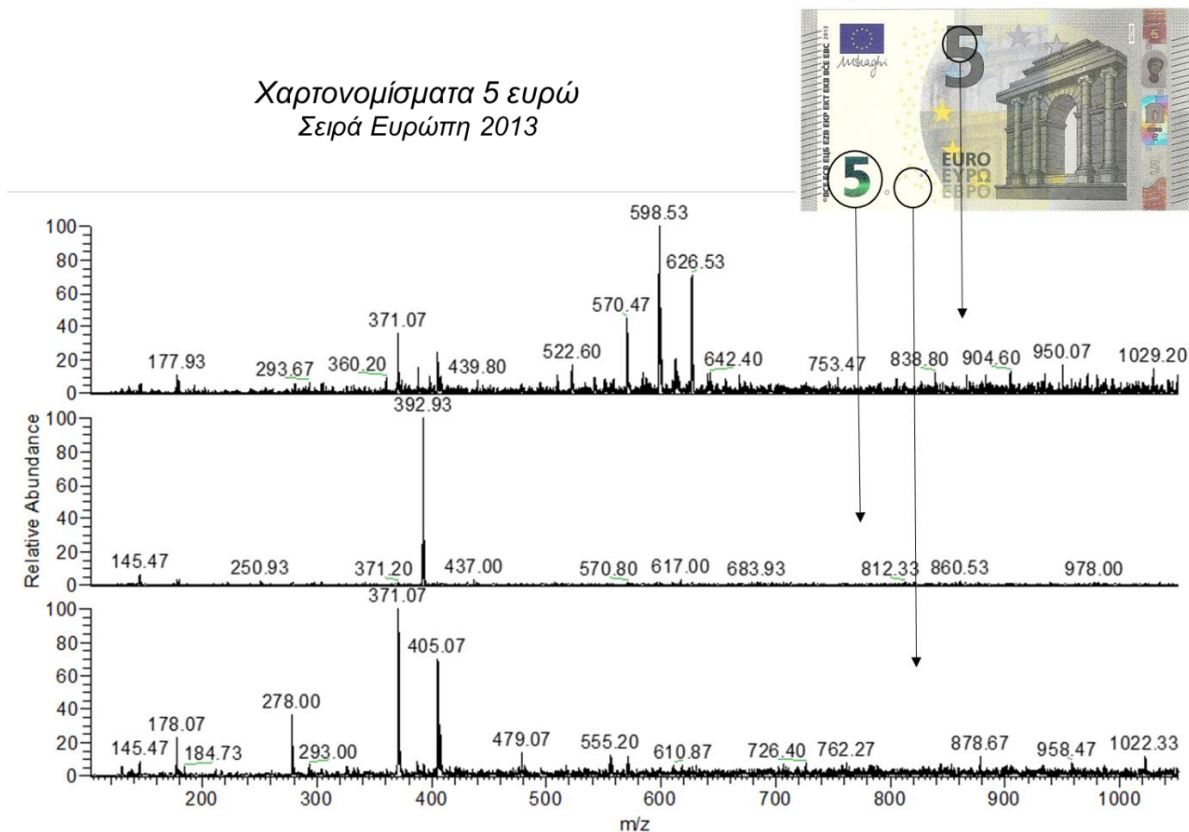
Κάθε χαρτονόμισμα τοποθετείται στην βάση δείγματος και ψεκάζεται σε διάφορες περιοχές αφότου έχει καθαριστεί με ακετονιτρίλιο με χρήση μπατονέτας. Ο διαλύτης που χρησιμοποιείται είναι ακετονιτρίλιο με ροή 15  $\mu\text{L}/\text{min}$  και η πίεση του αερίου ρυθμίζεται στα 6 bar, ενώ η γωνία του εκνεφωτή στα 35 μοίρες.



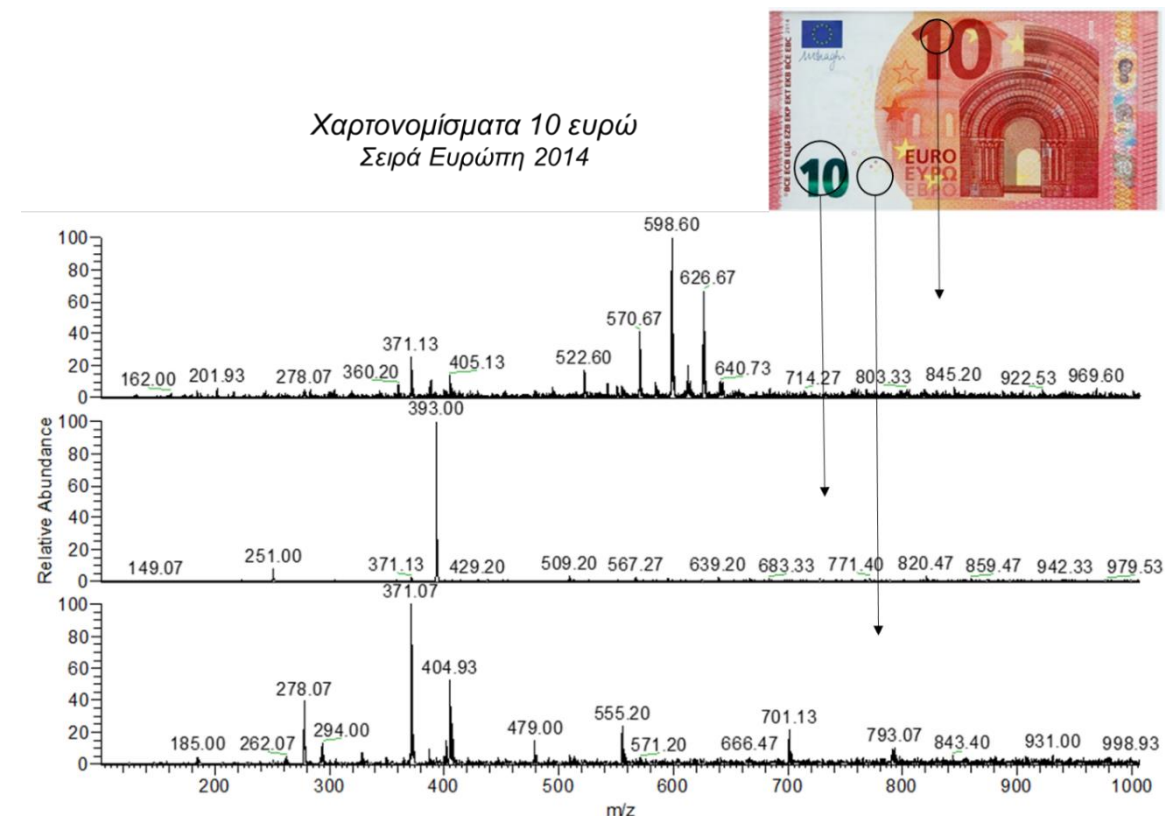
Εικόνα 63 Διαγραμματική απεικόνιση ανάλυσης χαρτονομισμάτων με EASI-MS

### 5.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση

#### 5.3.1. Προφίλ φασμάτων αυθεντικών χαρτονομισμάτων σειράς “Ευρώπη”

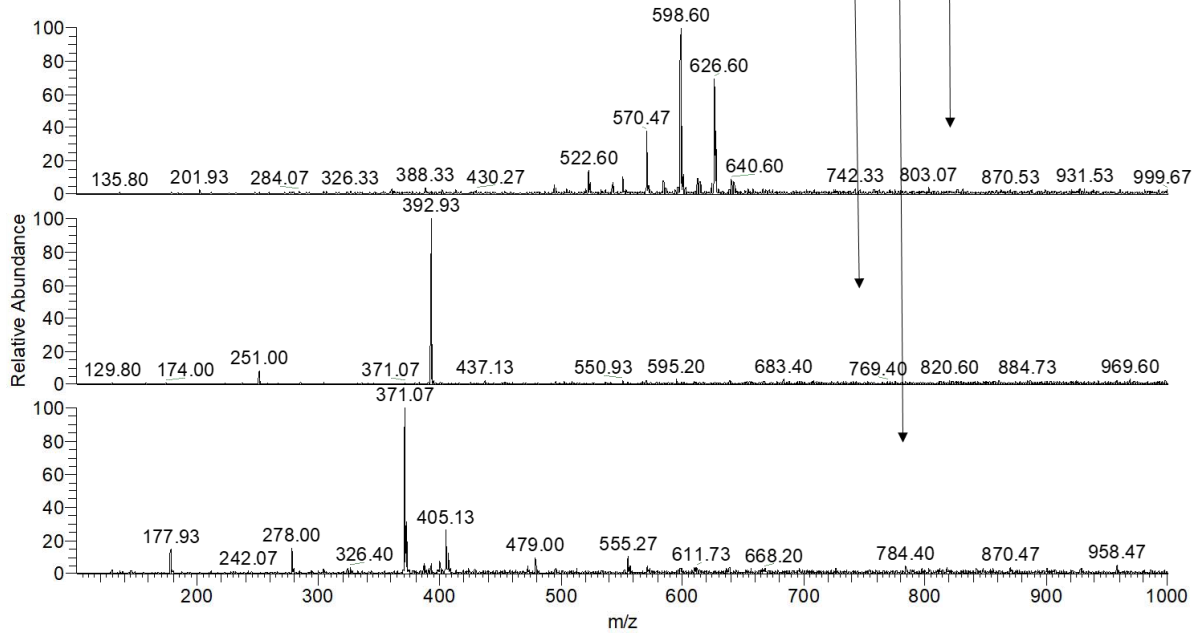


**Εικόνα 64** Φάσματα *EASI-MS (+)* χαρτονομίσματος 5 ευρώ σειράς 2013. Κάθε φάσμα αντιστοιχεί στην περιοχή που υποδεικνύουν τα βέλη.



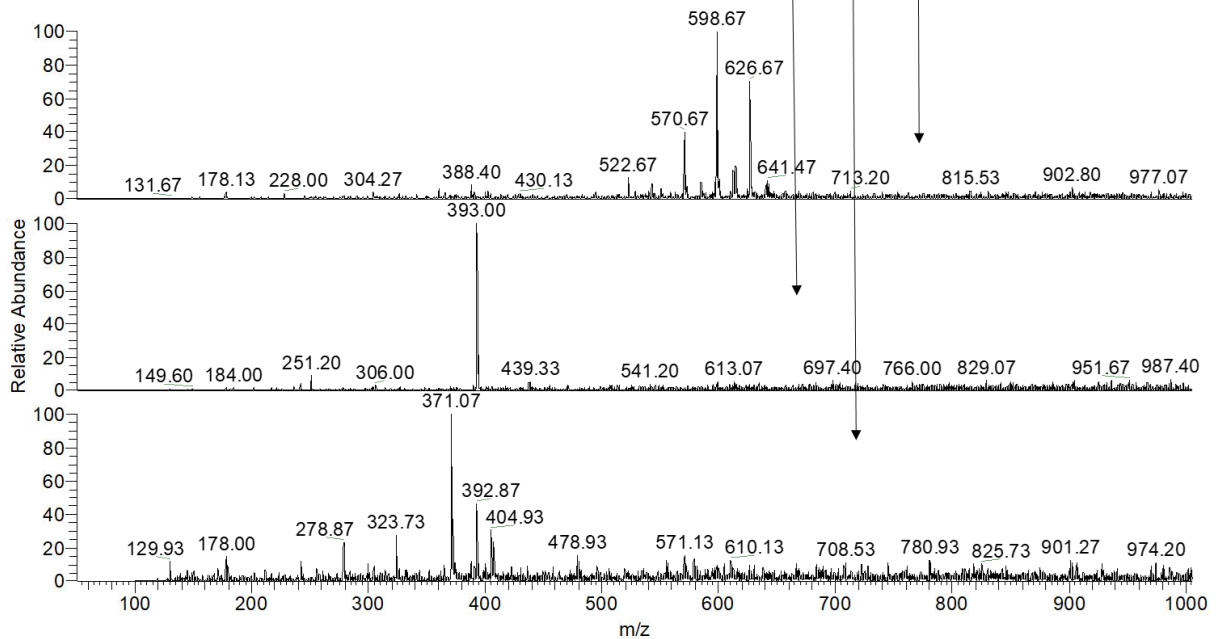
**Εικόνα 65** Φάσματα *EASI-MS (+)* χαρτονομίσματος 10 ευρώ σειράς 2014. Κάθε φάσμα αντιστοιχεί στην περιοχή που υποδεικνύουν τα βέλη.

Χαρτονομίσματα 20 ευρώ  
Σειρά Ευρώπη 2015



Εικόνα 66 Φάσματα EASI-MS (+) χαρτονομίσματος 20 ευρώ σειράς 2015. Κάθε φάσμα αντιστοιχεί στην περιοχή που υποδεικνύουν τα βέλη.

Χαρτονομίσματα 50 ευρώ  
Σειρά Ευρώπη 2017



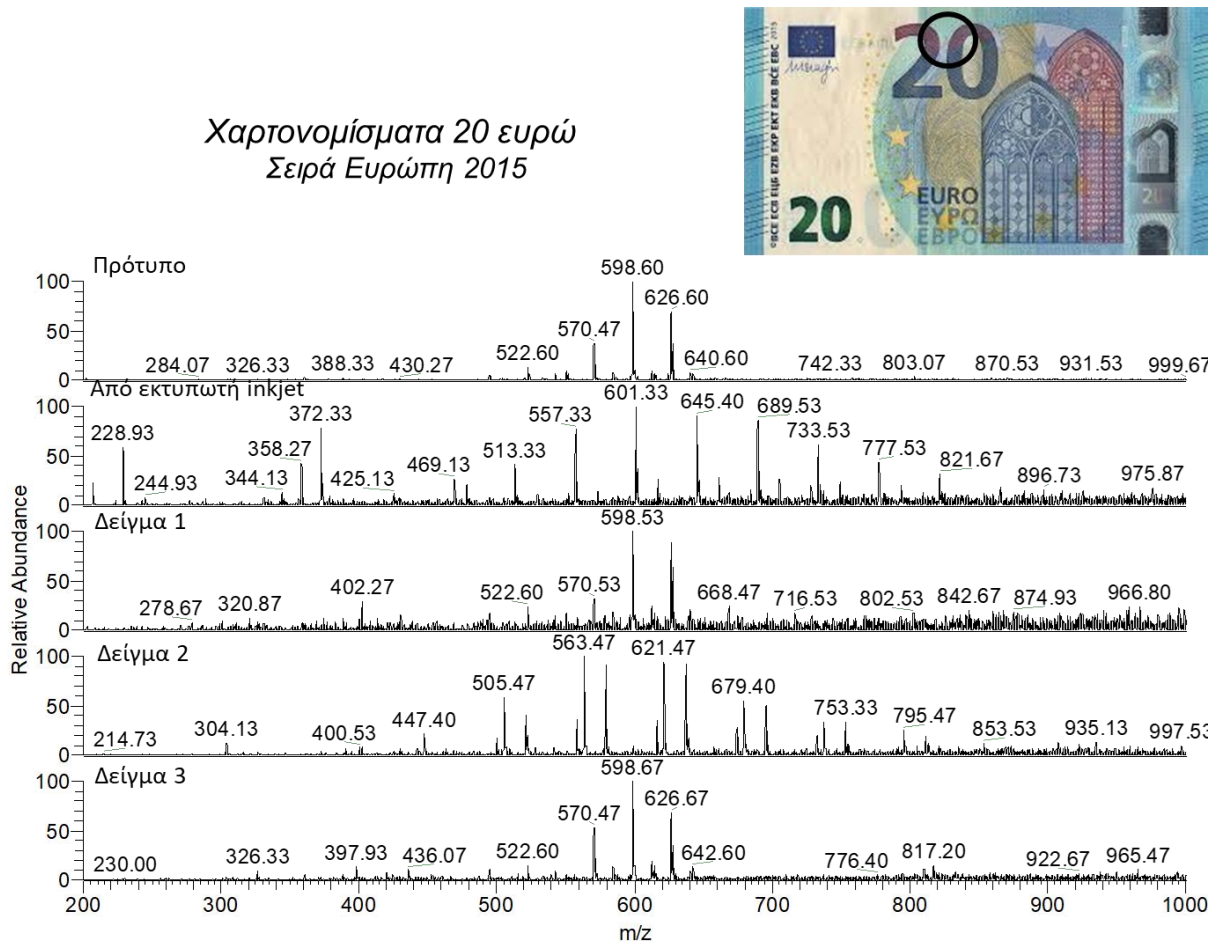
Εικόνα 67 Φάσματα EASI-MS (+) χαρτονομίσματος 50 ευρώ σειράς 2017. Κάθε φάσμα αντιστοιχεί στην περιοχή που υποδεικνύουν τα βέλη.

Παρατηρούμε, ότι και τα τέσσερα χαρτονομίσματα διαφορετικής αξίας, εμφανίζουν στις αντίστοιχες περιοχές ίδια φάσματα, με ελάχιστες διαφοροποιήσεις, ανεξάρτητα από το χρώμα της κάθε περιοχής. Αυτό μπορεί να έγκειται στο γεγονός ότι οι εκτυπωτές χρησιμοποιούν 4 βασικά χρώματα για να συνθέσουν ένα μεγάλο εύρος χρωμάτων. Στην λευκή περιοχή, παρατηρείται ένα σύνολο κορυφών που ενδέχεται να αντιστοιχεί σε μη ορατά μόρια με σκοπό την ιχνηθέτηση των αυθεντικών χαρτονομισμάτων.

### 5.3.2 Διάκριση πλαστών χαρτονομισμάτων

Τα προφίλ των φασμάτων πρότυπων χαρτονομισμάτων, εκτυπωμένων χαρτονομισμάτων από εκτυπωτή inkjet του εργαστηρίου και ενός πολύ μεγάλου αριθμού χαρτονομισμάτων, ίδιας αξίας, συγκρίθηκαν μεταξύ τους.

Στην περίπτωση των χαρτονομισμάτων αξίας 20 ευρώ, παρατηρήθηκε ένα μοναδικό δείγμα, ανάμεσα στα πενήντα διαφορετικά δείγματα που αναλύθηκαν, με διαφορετικό προφίλ φάσματος. Τα παρακάτω φάσματα αναφέρονται σε ένα πρότυπο (γνήσιο), ένα εκτυπωμένο και σε τρία από τα πενήντα δείγματα.



**Εικόνα 68** Σύγκριση φασμάτων *EASI-MS (+)* χαρτονομισμάτων 20 ευρώ.

Όλα τα φάσματα αναφέρονται στην κυκλωμένη περιοχή που φαίνεται στην εικόνα.

Όπως ήταν αναμενόμενο, το προφίλ του φάσματος του πρότυπου χαρτονομίσματος διαφέρει από το αντίστοιχό του εκτυπωμένου χαρτονομίσματος. Είναι προφανές ότι διαφορετικές χρωστικές χρησιμοποιούνται για την εκτύπωση αυθεντικών τραπεζογραμμάτων στα νομισματοκοπεία σε σχέση με αυτές στα εμπορικά διαθέσιμα μελάνια οικιακών εκτυπωτών.

Στην περίπτωση των δειγμάτων 1 και 3 (αλλά και 47 ακόμα χαρτονομισμάτων), τα φάσματα είναι παρόμοια με το φάσμα του πρότυπου. Αξίζει να σημειωθεί ότι το δείγμα 1 επρόκειτο για ένα φθαρμένο χαρτονόμισμα και για αυτό παρατηρείται περισσότερο θόρυβος.

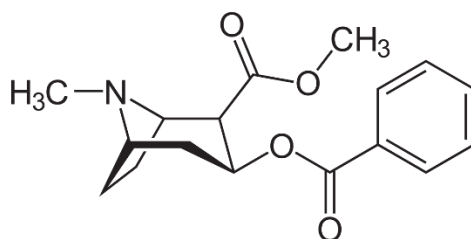
Στην περίπτωση του δείγματος 2, το προφίλ του φάσματος διαφέρει από το αντίστοιχο του πρότυπου. Αργότερα, με χρήση ανιχνευτή πλαστών χαρτονομισμάτων, επιβεβαιώθηκε ότι επρόκειτο για πλαστό χαρτονόμισμα, το οποίο απομακρύνθηκε από την αγορά.

### 5.3.3 Ανίχνευση κοκαΐνης σε αμερικανικά δολάρια

Τα περισσότερα χαρτονομίσματα έχουν ίχνη κοκαΐνης πάνω τους. Αυτό επιβεβαιώθηκε από αρκετές μελέτες<sup>43</sup>. Μόνο στην Καλιφόρνια υπολογίζεται πως κατά μέσο όρο τρία στα τέσσερα δολάρια έχουν ίχνη κοκαΐνης ή άλλων παράνομων φαρμάκων<sup>44</sup>.

Διάφορες θεωρίες έχουν προταθεί για να εξηγήσουν αυτή τη μόλυνση. Οι προφανείς είναι δύο, δηλαδή ότι ο εμποτισμός της κοκαΐνης στα χαρτονομίσματα οφείλεται στην χρήση τους κατά τις συναλλαγές για ναρκωτικά και τη χρήση τυλιγμένων χαρτονομισμάτων για την εισπνοή των ναρκωτικών. Μετά τον αρχικό εμποτισμό, η ουσία εναποτίθεται και σε άλλα χαρτονομίσματα μέσω επαφής κατά την στοίβαξη τους<sup>45</sup>.

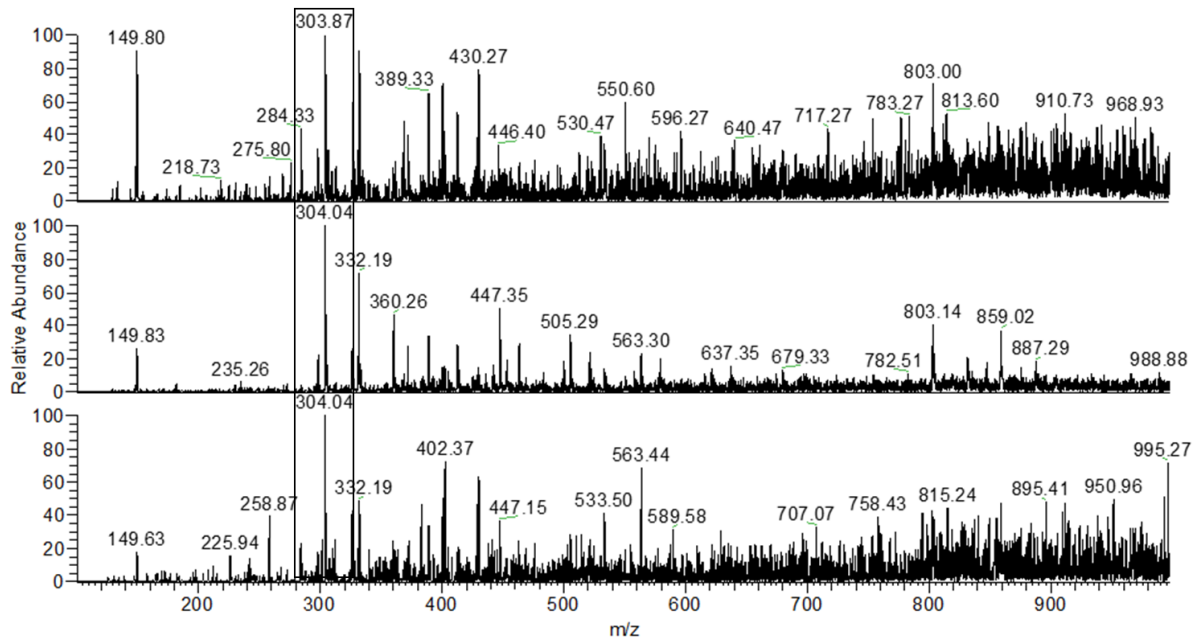
#### Κοκαΐνη ή βενζοϋλομεθυλεκγονίνη



**Μοριακή μάζα:** 303,353 g/mol

Τα παρακάτω φάσματα προέκυψαν κατά την ανάλυση τριών διαφορετικών δολαρίων. Η κορυφή στα 304 m/z αντιστοιχεί στα μόρια της κοκαΐνης που βρίσκονται στην επιφάνεια των χαρτονομισμάτων.

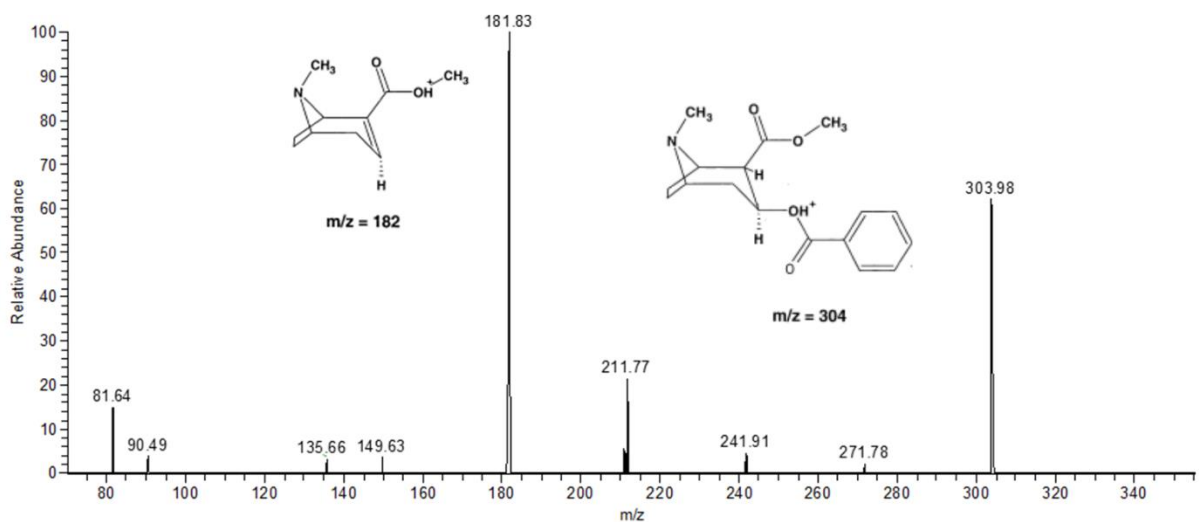
Χαρτονομίσματα ενός δολαρίου



Εικόνα 69 Φάσματα *EASI-MS* (+) χαρτονομισμάτων του ενός δολαρίου.

Η ταυτοποίηση της κοκαΐνης έγινε με πειράματα  $MS^2$  και  $MS^3$  όπως παρουσιάζεται παρακάτω, τα αποτελέσματα των οποίων είναι σύμφωνα με την βιβλιογραφία<sup>46</sup>.

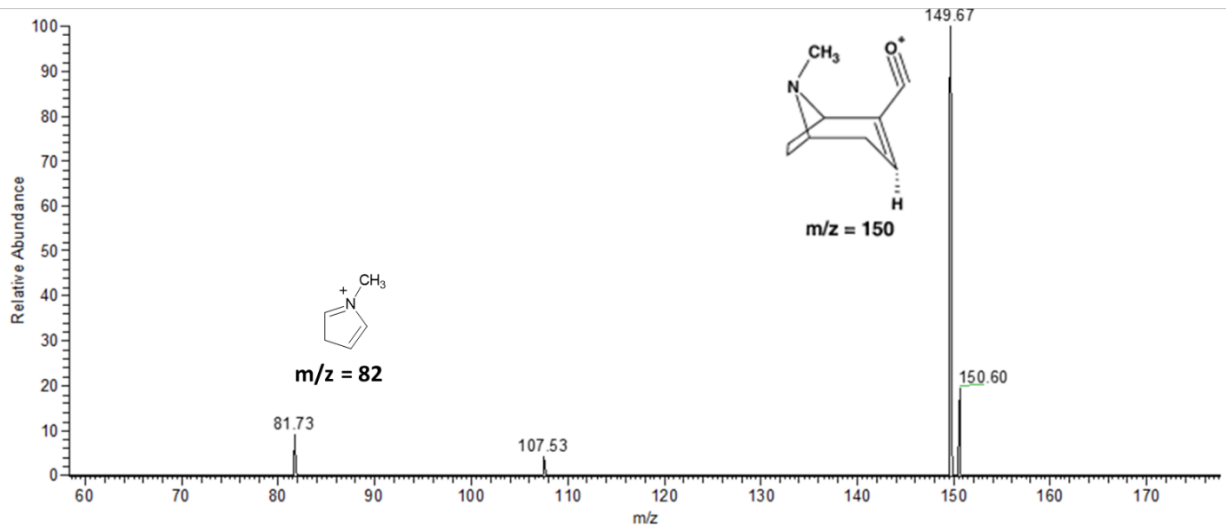
$MS^2$  303,98 m/z



Εικόνα 70 Φάσμα μάζας *EASI-MS*<sup>2</sup> (+) του ιόντος της κοκαΐνης 303,9 m/z

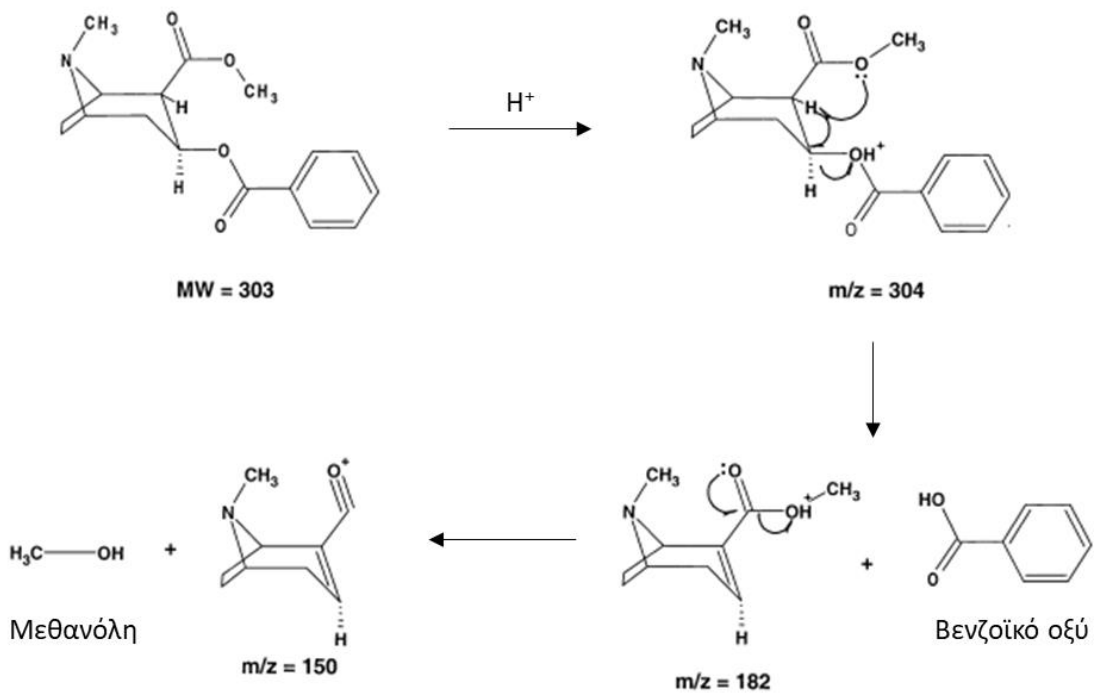


MS<sup>3</sup> 181,83



Εικόνα 71 Φάσμα EASI-M<sup>3</sup>(+) του θυγατρικού ιόντος της κοκαΐνης 181,8 m/z

### Κοκαΐνη



Εικόνα 72 Προτεινόμενος μηχανισμός θραυσματοποίησης της κοκαΐνης<sup>47</sup>.

## 5.4 Συμπεράσματα

- Στο συγκεκριμένο ερευνητικό πρόγραμμα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος EASI-MS με επιτυχία για την επιφανειακή ανάλυση χαρτονομισμάτων.
- Με την μέθοδο αυτή, λήφθηκαν φάσματα μάζας από διάφορα χαρτονομίσματα και τα προφίλ των φασμάτων συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα άλλων χαρτονομισμάτων, με αποτέλεσμα την ταυτοποίηση πλαστών χαρτονομισμάτων.
- Η μέθοδος EASI-MS επέτρεψε την ανίχνευση κοκαΐνης σε χαρτονομίσματα δολαρίων των ΗΠΑ.
- Η τεχνική EASI-MS έχει όλα τα απαραίτητα χαρακτηριστικά για την ανάλυση χαρτονομισμάτων. Επιτρέπει την επιφανειακή ανάλυση των χαρτονομισμάτων, δίχως να τα καταστρέφει. Είναι αρκετά γρήγορη τεχνική και κάθε χαρτόνισμα μπορεί να αναλυθεί μέσα σε μερικά δευτερόλεπτα. Παράλληλα, έχει ικανοποιητικά όρια ανίχνευσης και δίνει καθαρά φάσματα.

## Βιβλιογραφία

1. Gross, J. H. *Mass Spectrometry, A Textbook. Second Edition. Springer, Berlin. (2011)*
2. Yamashita, M. & Fenn, J. B. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J. Phys. Chem.* 88, 4451–4459 (1984).
3. Banerjee, S. & Mazumdar, S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *Int. J. Anal. Chem.*, 1–40 (2012).
4. Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. & Whitehouse, C. M. Electrospray ionization-principles and practice. *Mass Spectrom. Rev.* 9, 37–70 (1990).
5. Cadet, F., Garrigues, S. & de la Guardia, M. *Encyclopedia of Analytical Chemistry.* John Wiley & Sons, Ltd, New Jersey. (2012).
6. Huang, M. Z., Cheng, S. C., Cho, Y. T. & Shiea, J. Ambient ionization mass spectrometry: A tutorial. *Anal. Chim. Acta* 702, 1–15 (2011).
7. Takáts, Z., Wiseman, J. M., Gologan, B. & Cooks, R. G. Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. *Science.* 306, 471–473 (2004).
8. Fernández, F. M., Cody, R. B., Green, M. D., Hampton, C. Y., McGready, R., Sengaloundeth, S., White, N. J., Newton, P. N. Characterization of solid counterfeit drug samples by desorption electrospray ionization and direct-analysis in real time coupled to time-of-flight mass spectrometry. *ChemMedChem* 1, 702–705 (2006).
9. Takáts, Z., Wiseman, J. M. & Cooks, R. G. Ambient mass spectrometry using desorption electrospray ionization (DESI): Instrumentation, mechanisms and applications in forensics, chemistry, and biology. *J. Mass Spectrom.* 40, 1261–1275 (2005).
10. Hirabayashi, A., Sakairi, M. & Koizumi, H. Sonic Spray Ionization Method for Atmospheric Pressure Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry.* 66, 4557–4559 (1994).
11. Hirabayashi, A., Sakairi, M. & Koizumi, H. Sonic Spray Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 67, 2878–2882 (1995).

12. Hirabayashi, A. & Fernández de la Mora, J. Charged droplet formation in sonic spray. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* 175, 277–282 (1998).
13. Zilch, L. W., Maze, J. T., Smith, J. W., Ewing, G. E. & Jarrold, M. F. Charge separation in the aerodynamic breakup of micrometer-sized water droplets. *J. Phys. Chem. A* 112, 13352–13363 (2008).
14. Haddad, R., Sparrapan, R. & Eberlin, M. N. Desorption sonic spray ionization for (high) voltage-free ambient mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20, 2901–2905 (2006).
15. R., H., H.M.S., M., R.R., C. & M.N., E. Easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry combined with thin-layer chromatography. *Anal. Chem.* 80, 2744–2750 (2008).
16. Zivolic, F., Zancanaro, F., Favretto, D., Ferrara, S. D., Seraglia, R., Traldi, P. Pneumatically assisted desorption/ionization: 1. Some thoughts on the possible ionization mechanism(s). *J. Mass Spectrom.* 45, 411–420 (2010).
17. Räscher, A. Development of a new Desorption Sonic Spray Ionization Source for the Mass Spectrometric Analysis of Molecules directly from Surfaces. Master Thesis (2014).
18. Murthy, P. S. & Madhava Naidu, M. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition - A review. *Resour. Conserv. Recycl.* 66, 45–58 (2012).
19. Clifford, M. N. Chemical and Physical Aspects of Green Coffee and Coffee Products. *Coffee* 305–374 (1985).
20. Stennert, A. & Maier, H. G. Trigonelline in coffee. *Zeitschrift für Leb. und -forsch.* 199, 198–200 (1994).
21. Nehlig, A., Daval, J. L. & Debry, G. Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Res. Rev.* 17, 139–170 (1992).
22. Nathanson, J. A. Caffeine and related methylxanthines: possible naturally occurring pesticides. *Science* 226, 184–7 (1984).
23. Caporaso, N., Whitworth, M. B., Grebby, S. & Fisk, I. D. Non-destructive analysis of sucrose, caffeine and trigonelline on single green coffee beans by hyperspectral imaging. *Food Res. Int.* 106, 193–203 (2018).

24. Rubach, M., Lang, R., Skupin, C., Hofmann, T. & Somoza, V. Activity-Guided Fractionation to Characterize a Coffee Beverage that Effectively Down-Regulates Mechanisms of Gastric Acid Secretion as Compared to Regular Coffee. *J. Agric. Food Chem.* 58, 4153–4161 (2010).
25. Garrett, R., Schwab, V. N., Cabral, C. E., Henrique, Br. V. M., Ifa, R. D., Eberlin M. N., Rezender, Cl. M. Ambient mass spectrometry employed for direct analysis of intact Arabica coffee beans. *J. Braz. Chem. Soc.* 25, 1172–1177 (2014).
26. Rosa, J. S. da *et al.* Mass spectrometry screening of Arabica coffee roasting: A non-target and non-volatile approach by EASI-MS and ESI-MS. *Food Res. Int.* 89, 967–975 (2016).
27. Garrett, R. *et al.* Discrimination of arabica coffee cultivars by electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry and chemometrics. *LWT - Food Sci. Technol.* 50, 496–502 (2013).
28. Sato, Y. *et al.* In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *Int. J. Pharm.* 403, 136–138 (2011).
29. Duarte, S. M. *et al.* Effect of processing and roasting on the antioxidant activity of coffee brews. *Ciência e Tecnol. Aliment.* 25, 387–393 (2005).
30. Farah, A., de Paulis, T., Trugo, L. C. & Martin, P. R. Effect of Roasting on the Formation of Chlorogenic Acid Lactones in Coffee. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1505–1513 (2005).
31. Pittia, P., Dalla Rosa, M. & Lerici, C. R. Textural Changes of Coffee Beans as Affected by Roasting Conditions. *LWT - Food Sci. Technol.* 34, 168–175 (2001).
32. Segall, S. D., Artz, W. E., Raslan, D. S., Jham, G. N. & Takahashi, J. A. Triacylglycerol Composition of Coffee Beans ( *Coffea canephora* P.) by Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography and Positive Electrospray Tandem Mass Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 53, 9650–9655 (2005).
33. Berg, M. J., Tymoczko L. J., Gatto, Jr, Gr. J., Stryer L. *Biochemistry 8<sup>th</sup> Edition*, W. H. Freeman, New York. (2015).
34. Smith, R. D., Loo, J. A., Loo, R. R. O., Busman, M. & Udseth, H. R. Principles and practice of electrospray ionization—mass spectrometry for large

- polypeptides and proteins. *Mass Spectrom. Rev.* 10, 359–452 (1991).
35. Fenselau, C. Peer Reviewed: MALDI MS and Strategies for Protein Analysis. *Anal. Chem.* 69, 661A–665A (1997).
  36. Chait, B. T. Mass Spectrometry in the Postgenomic Era. *Annu. Rev. Biochem.* 80, 239–246 (2011).
  37. Harris, D. C. *Quantitative Chemical Analysis*. 9<sup>th</sup> Edition, (2015).
  38. Arakawa, T., Kita, Y. & Timasheff, S. N. Protein precipitation and denaturation by dimethyl sulfoxide. *Biophys. Chem.* 131, 62–70 (2007).
  39. Mattos, C. Proteins in organic solvents. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11, 761–764 (2001).
  40. Cieśla, J., Fraczyk, T. & Rode, W. Phosphorylation of basic amino acid residues in proteins: Important but easily missed. *Acta Biochim. Pol.* 58, 137–148 (2011).
  41. Chowdhury, S. K., Katta, V., Beavis, R. C. & Chait, B. T. Origin and removal of adducts (molecular mass = 98 u) attached to peptide and protein ions in electrospray ionization mass spectra. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1, 382–388 (1990).
  42. Carter, J. F., Sleeman, R. & Parry, J. The distribution of controlled drugs on banknotes via counting machines. *Forensic Sci. Int.* 132, 106–112 (2003).
  43. Jenkins, A. J. Drug contamination of US paper currency. *Forensic Sci. Int.* 121, 189–193 (2001).
  44. Abrahamson, A. Prevalence of Drug-Tainted Money Voids Case Law: Court cites findings that more than 75% of currency in L.A. bears traces of cocaine or other illegal substances". Retrieved 2008-07-23. *Los Angeles Times, LA, USA*.
  45. Oyler, J., Darwin, W. D. & Cone, E. J. Cocaine contamination of United States paper currency. *J. Anal. Toxicol.* 20, 213–216 (1996).
  46. Smith, R. M. & Casale, J. F. The Mass Spectrum of Cocaine: Deuterium Labeling and MS / MS Studies. *Microgram J.* 7, 16–41 (2010).
  47. Jeanville, P. M., Estapé, E. S., Needham, S. R. & Cole, M. J. Rapid confirmation/quantitation of cocaine and benzoylecgonine in urine utilizing high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 11, 257–263 (2000).

