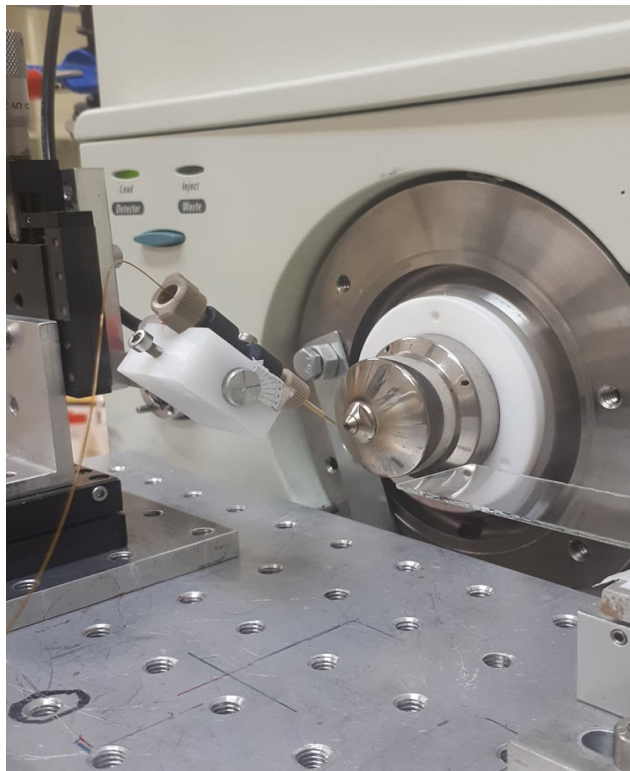




Επίδραση διαλυτών ψεκασμού στα φάσματα μάζας πρωτεϊνών κατά την εκρόφησή τους με ιοντισμό υπερηχητικής εκνέφωσης (DeSSI)

Τσολακούδης Ηλίας

Επιβλέπον Καθηγητής: Περγαντής Α. Σπυρίδων



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ 2018-2019

Ευχαριστίες

Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο καθηγητή του εργαστηρίου κ. Σπυρίδων Α. Περγαντή, που με δέχτηκε στο εργαστήριό του, μου εμπιστεύτηκε αυτό το πρόγραμμα και που με συμβούλευε σε όλη την διάρκεια του έτους. Ακόμη, μέσω αυτού του εργαστηρίου και αυτής της διπλωματικής εργασίας μου δόθηκε η ευκαιρία να αποκτήσω πολύτιμες νέες γνώσεις και νέες εμπειρίες, που θα μου επιτρέψουν να ενταχθώ όλο και περισσότερο στον τομέα της επιστημονικής έρευνας. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Πανεπιστήμιο για την παροχή των απαραίτητων αντιδραστηρίων και οργάνων.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα παιδιά του εργαστηρίου και συγκεκριμένα την Ιωάννα Χειλαδάκη, τον Μιχαήλ Χρονάκη, την Σοφία Γραφανάκη και τον Εμμανουήλ Χριστοφάκη, που με εντάξαν στην ομάδα και με βοήθησαν να προσαρμοστώ σε αυτό το νέο εγχείρημα της ζωής μου. Ήταν πολύτιμη η βοήθειά τους, αφού με συμβούλεψαν πως να κινούμαι και πως να εργάζομαι στο εργαστήριο μαζί με άλλους.

Σας ευχαριστώ όλους.

Περιεχόμενα

Περίληψη	4
1. Εισαγωγή	
1.1 Φασματομετρία μάζας	5
1.2 Πηγές ιοντισμού	6
1.2.1 Ιοντισμός ηλεκτροψεκασμού (Electrospray Ionization – ESI)	6
1.2.2 Εκρόφιση ιόντων με ηλεκτροψεκασμό (Desorption Electropray Ionization – DESI)	7
1.2.3 Ιοντισμός υπερηχητικής εκνέφωσης (Sonic Spray Ionization – SSI) και εκρόφιση ιόντων με ιοντισμό υπερηχητικής εκνέφωσης (Desorption Sonic Spray Ionization – DeSSI)	8
1.3 Αναλυτές μαζών	10
1.3.1 Τετραπολικό φασματόμετρο μάζας διαπερατότητας	10
1.4 Πρωτεΐνες	11
2. Βιβλιογραφική αναφορά	12
3. Πειραματικό μέρος	13
4. Αποτελέσματα και συζήτηση	
4.1 Μελέτη διαλυτών εκρόφισης	15
4.2 Μελέτη ροής διαλυτών	16
4.3 Μελέτη δείγματος χωρίς αποδιατακτικό αντιδραστήριο	17
5. Συμπεράσματα	18
6. Επόμενες μελέτες	19
7. Βιβλιογραφία	19

Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια έχει καθιερωθεί η ευρεία χρήση του φασματομέτρου μάζας στον τομέα της αναλυτικής χημείας, λόγω της υψηλής ευαισθησίας και της υψηλής απόδοσής του. Μία από τις κύριες απαιτήσεις αυτής της τεχνικής αποτελεί ο ιοντισμός του δείγματος, δηλαδή η αποδοτική παραγωγή ιόντων στην αέρια φάση για την ανάλυσή τους. Για αυτό τον λόγο η ανακάλυψη ολοένα και περισσότερων τεχνικών ιοντισμού αποτελεί σημαντικό γεγονός για τους ερευνητές, διότι αυξάνονται έτσι οι δυνατότητες για ανάλυση και ταυτοποίηση ουσιών.

Τις προηγούμενες δεκαετίες υπήρχε η πεποίθηση ότι τα ιόντα μπορούσαν να απομονωθούν μόνο από αέρια δείγματα και όχι απευθείας από διαλύματα. Ωστόσο, κάτι τέτοιο αποδείχθηκε λάθος, καθώς η τεχνική του ηλεκτροψεκασμού (ESI) και ο ιοντισμός εκτόξευσης με λέιζερ με την βοήθεια μήτρας (MALDI) [17], [18] επέτρεψαν την παραγωγή ιόντων από υδατικά διαλύματα, κάνοντας την ανάλυση πρωτεϊνών και νουκλεοτιδίων πλέον δυνατή. Οι δύο αυτές μέθοδοι μαλακού ιοντισμού, στη συνέχεια, έγιναν ευρέως χρησιμοποιούμενοι στον τομέα της φασματομετρίας μάζας. Εκτός από την τεχνική του ηλεκτροψεκασμού (ESI) και τον ιοντισμό με λέιζερ υποβοηθούμενη από μήτρα (MALDI) έχει ανακαλυφθεί ακόμη και μία νέα τεχνική, ο ιοντισμός υπερηχητικής εκνέφωσης (SSI). Αυτός ο τύπος ιοντισμού θεωρείται πιο απλός από τους άλλους δύο, καθώς με αυτόν τον τρόπο παράγονται φορτισμένα σταγονίδια υπό ατμοσφαιρικές συνθήκες υποβοηθούμενη από ροή αζώτου. Επειδή αυτή η διεργασία του ιοντισμού δεν απαιτεί θέρμανση, η τεχνική ιοντισμού με υπερηχητική εκνέφωση παρουσιάζει κάποια μοναδικά πλεονεκτήματα, καθώς είναι ιδανική για την ανάλυση θερμικά ασταθών ουσιών όπως πεπτιδίων.

Οι παραπάνω τεχνικές ιοντισμού σε συνδυασμό με την μέθοδο διαχωρισμού της υγρής χρωματογραφίας έδωσε νέες διαστάσεις στην ανάλυση μειγμάτων. Πιο συγκεκριμένα, η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας αποτελεί έναν αποτελεσματικό τρόπο διαχωρισμού οργανικών μειγμάτων και στην συνέχεια την ταυτοποίησή τους από το φασματόμετρο μάζας. Ωστόσο, κύριο ρόλο σε αυτή την ταυτοποίηση έχει και ο ιοντισμός των μορίων του δείγματος, ο οποίος και καθορίζει το είδος των μορίων που μπορούν να αναλυθούν, καθώς και το όριο ανίχνευσής τους.

Σε μια ιστορική αναδρομή βλέπουμε, ότι η πρώτη αναφορά για την τεχνική ιοντισμού υπερηχητικής εκνέφωσης έγινε το 1994 από τον ερευνητή Hirabayashi [3], ενώ η πρώτη αναφορά για την εκρόφηση ιόντων με υπερηχητική εκνέφωση (DeSSI) το 2006 από τον επιστήμονα Haddad [4], βασισμένος από τις αρχές της απλής υπερηχητικής εκνέφωσης (SSI). Αργότερα, ο ερευνητής Eberlin [3] την μετονόμασε Easy Ambient Sonic-spray Ionization (EASI), για να επισημάνει το πόσο εύκολη και γρήγορη είναι η ανάλυση με αυτή την τεχνική ιοντισμού σε συνθήκες περιβάλλοντος.

Με την ανάλυση δειγμάτων παρατηρήθηκε, ότι η εκρόφηση ιόντων υπερηχητικής εκνέφωσης (DeSSI) παρουσιάζει παρόμοια ευαισθησία με αυτή του ηλεκτροψεκασμού (DESI). Ωστόσο, το

φάσμα εκρόφησης ιόντων με ηλεκτροψεκασμό είναι πιο “καθαρό” από το DeSSI, λόγω της μικρότερης αφθονίας ιόντων του διαλύτη.

1. Εισαγωγή

1.1 Φασματομετρία μάζας

Το φασματόμετρο μάζας είναι από τις πλέον αναπτυσσόμενες αναλυτικές τεχνικές σε πολλούς τομείς τεχνολογίας και έρευνας, λόγω του ότι αποτελεί μια ταχύτατη και ευαίσθητη τεχνική τόσο για την ποιοτική όσο και την ποσοτική ανάλυση διαφόρων μορίων. Οι αυξανόμενες απαιτήσεις στη χημική ανάλυση και η πρόοδος της τεχνολογίας, προωθούν την συνεχή βελτιστοποίηση της, καθώς η ακρίβεια των μετρήσεων αποτελεί βασική προϋπόθεση για τους ερευνητές.

Με αυτή την χρήση αυτής της τεχνικής μπορεί να αναλυθεί ένα μεγάλο εύρος μορίων και θραυσμάτων μορίων, όπως πρωτεΐνες, και έτσι να ταυτοποιηθεί η σύσταση ενός αγνώστου δείγματος, η χημική δομή μεγάλου αριθμού ενώσεων, η παρουσία και το ποσοστό ισοτόπων.

Ο αναλύτης εισάγεται με την μορφή ιόντων στο φασματόμετρο μάζας, για τον λόγο αυτό χρησιμοποιούνται αρχικά διάφορες πηγές ιοντισμού που δημιουργούν ιόντα αναλύτη σε αέρια φάση. Ύστερα, με την χρήση μαγνητικού πεδίου τα ιόντα επιταχύνονται και συλλέγονται από τον ανιχνευτή και διαχωρίζονται με βάση τον λόγο της μάζας προς το φορτίο τους (m/z), το οποίο μπορεί να επιλεγθεί χειροκίνητα από τον ερευνητή. Όταν τα ιόντα φτάσουν στον ανιχνευτή, μετατρέπονται σε ηλεκτρόνια με την βοήθεια του ηλεκτρονοπολλαπλασιαστή, που προκαλεί έναν “καταρράκτη” ηλεκτρονίων, και παράγεται ηλεκτρικό ρεύμα από το οποίο προκύπτει και το ανάλογο φάσμα. Κάθε φάσμα παρουσιάζει την απόκριση του ανιχνευτή ως προς τον λόγο μάζας προς φορτίο (m/z).

Το φασματόμετρο μάζας αποτελείται από ένα σύστημα εισαγωγής δείγματος, την περιοχή ιοντισμού του αναλύτη, την περιοχή επιτάχυνσης των ιόντων, τον διαχωρισμό τους με την εφαρμογή ενός μαγνητικού πεδίου, τον ανιχνευτή και τέλος ένα σύστημα καταγραφής και επεξεργασίας δεδομένων για την απεικόνιση του φάσματος. Το φασματόμετρο μάζας λειτουργεί υπό κενό, προκειμένου να αποφεύγονται οι συγκρούσεις των ιόντων με μόρια του αέρα. Κάτι τέτοιο θα επηρέαζε τις μετρήσεις, καθώς θα έφταναν στον αναλυτή λιγότερα ιόντα αναλύτη ή και περισσότερα ιόντα, λόγω της παραγωγής νέων ιόντων κατά τις κρούσεις. Το κενό που υπάρχει μέσα σε ένα τέτοιο όργανο φτάνει από 10^{-3} έως 10^{-10} Torr, ενώ η διαφορά πίεσης με το εξωτερικό περιβάλλον ελέγχεται από ένα σύστημα αντλιών.

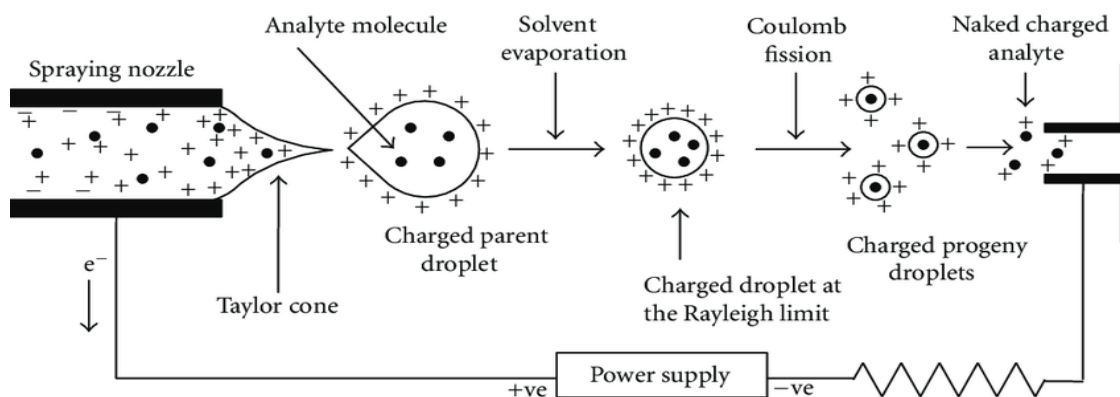
1.2 Πηγές ιοντισμού

Οι πηγές ιοντισμού χρησιμοποιούνται για τον ιοντισμό του δείγματος, προκειμένου να αναλυθεί με φασματομετρία μάζας. Υπάρχει μεγάλη ποικιλία πηγών ιοντισμού ανάλογα με τον αναλύτη που θέλουμε να μελετήσουμε. Οι κύριοι τρόποι ιοντισμού είναι ο ηλεκτρονιακός και ο χημικός ιοντισμός. Στον ηλεκτρονιακό ιοντισμό πραγματοποιείται βομβαρδισμός του αναλύτη με ηλεκτρόνια, τα οποία εκπέμπονται από ένα θερμό νήμα και επιταχύνονται μέσω μιας διαφοράς δυναμικού της τάξης των 70 V. Κατά τον χημικό ιοντισμό η πηγή ιοντισμού είναι πληρωμένη με ένα δραστικό αέριο, όπως το μεθάνιο, το οποίο βομβαρδίζεται με ηλεκτρόνια και τα δραστικά πλέον ιόντα ιοντίζουν με την σειρά τους τον αναλύτη. Αυτή η μορφή ιοντισμού φέρει λιγότερη θραυσματοποίηση σε αντίθεση με τον ηλεκτρονιακό ιοντισμό.

Ακόμη υπάρχει ο ιοντισμός ηλεκτροψεκασμού (Electrospray Ionization), καθώς και ο ιοντισμός υπερηχητικής εκνέφωσης (Sonic Spray Ionization), οι οποίοι ακολουθούν άλλες τεχνικές ιοντισμού που θα αναλυθούν παρακάτω.

1.2.1 Ιοντισμός ηλεκτροψεκασμού (Electrospray Ionization - ESI)

Στον ιοντισμό ηλεκτροψεκασμού τα ιόντα του αναλύτη προϋπάρχουν στο υγρό δείγμα, το οποίο στη συνέχεια ψεκάζεται με παράλληλη εφαρμογή ηλεκτρικού δυναμικού. Το δυναμικό, το οποίο εφαρμόζεται μεταξύ του τριχοειδούς σωλήνα εκνέφωσης και της εισόδου του φασματομέτρου μάζας, μπορεί να είναι είτε θετικό είτε αρνητικό, ανάλογα με το είδος των ιόντων που θέλουμε να αναλύσουμε. Με την εφαρμογή του επιθυμητού δυναμικού σχηματίζεται στο άκρο του τριχοειδούς ένας κώνος, όπου και συσσωρεύεται περίσσεια φορτισμένων σωματιδίων. Ο κώνος αυτός ονομάζεται «κώνος του Taylor». Όταν η απωστική δύναμη του Coulomb μεταξύ των φορτίων των ιόντων, που έχουν συσσωρευθεί στον κώνο, ξεπεράσει την επιφανειακή τάση του υγρού, δηλαδή το «όριο Rayleigh» τότε ο κώνος σχάζεται και μαζί με την ομοαξονική ροή αζώτου N_2 σχηματίζεται ένα λεπτόκοκκο αερόλυμα από φορτισμένα σταγονίδια. Ο διαλύτης εξατμίζεται πλήρως από τις φορτισμένες σταγόνες, με αποτέλεσμα να μεταφέρονται τα ιόντα από την υγρή στην αέρια φάση. Στην συνέχεια τα σταγονίδια αυτά κατευθύνονται στην είσοδο του φασματομέτρου, όπου και διαχωρίζονται ανάλογα το μέγεθος και το φορτίο τους.



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση εκτροπής ιόντων από το υγρό δείγμα με ηλεκτροψεκάσμο [6]

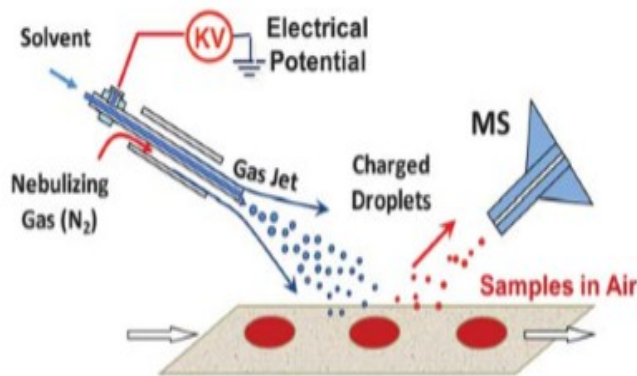
Η τεχνική αυτή παρουσιάζει πολλά σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι άλλων τεχνικών. Αρχικά, με τον ηλεκτροψεκάσμο μπορεί να αναλυθεί δείγμα μεγάλου όγκου, είτε στερεό είναι αυτό είτε υγρό. Επιπλέον χαρακτηρίζεται ως μία τεχνική ήπιου ιοντισμού σε σχέση με τις υπόλοιπες, με αποτέλεσμα να αναλύει βιολογικά δείγματα, δηλαδή δείγματα που καθορίζονται από μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων του. Τέλος, παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία στα αποτελέσματά του, καθορίζοντας δυνατό τόσο τον ποιοτικό όσο και τον ποσοτικό υπολογισμό του δείγματος.

Ωστόσο, αυτή η τεχνική ιοντισμού παρουσιάζει και ορισμένα μειονεκτήματα. Κύριο μειονέκτημα είναι το γεγονός ότι δεν μπορεί να αναλύσει και να ξεχωρίσει δείγματα μειγμάτων ικανοποιητικά. Ακόμη το όργανο είναι πολύ δύσκολο να καθαριστεί, με αποτέλεσμα να έχει την τάση να παραμένει μολυσμένη με υπολείμματα προηγούμενων πειραμάτων. Τέλος, τα πολλαπλά φορτία που συνδέονται με τα μοριακά ιόντα προκαλούν σύγχυση στα φασματικά δεδομένα.

1.2.2 Εκρόφηση ιόντων με ηλεκτροψεκάσμο (Desorption Electrospray Ionization - DESI)

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές ανάλυσης με την χρήση του φασματομέτρου μάζας κάτω από ατμοσφαιρικές συνθήκες, με πρώτη τον ιοντισμό ηλεκτροψεκάσμου και εκρόφηση ιόντων από δείγμα που τοποθετείται μπροστά από την είσοδο του φασματομέτρου [7]. Η τεχνική αυτή βρίσκει εφαρμογή τόσο σε στερεά δείγματα όσο και σε υγρά, παγωμένα διαλύματα και σε απορροφηθέντα αέρια [8]. Η μεγάλη διαφορά του ιοντισμού κάτω από ατμοσφαιρικές συνθήκες με τον απλό ηλεκτροψεκάσμο είναι, ότι στο φασματόμετρο εισάγονται μόνο τα ιόντα που θα αναλυθούν και όχι όλος ο όγκος του δείγματος. Ακόμη, δεν απαιτείται η προετοιμασία δείγματος καθιστώντας την τεχνική αυτή γρήγορη και εύκολη. Τέλος, το δυναμικό που εφαρμόζεται στον ηλεκτροψεκάσμο με εκρόφηση είναι 2 eV, που είναι παρόμοιο με αυτό του απλού ηλεκτροψεκάσμου, με αποτέλεσμα να υπάρχει μικρή θραυσματοποίηση όπως και σε κάθε

τεχνική ανάλυσης υπό συνθήκες περιβάλλοντος.



Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση της εκρόφησης ιόντων με την βοήθεια του ηλεκτροψεκασμού (DESI) από την επιφάνεια του δείγματος [7]

Ορισμένα σημαντικά χαρακτηριστικά αυτής της τεχνικής είναι ότι είναι γρήγορη, με υψηλές αποδόσεις στα αποτελέσματα και υψηλή ευαισθησία στα όρια ανίχνευσης. Επιπλέον, λόγω του μικρού ιονισμού προκαλείται μικρή θραυσματοποίηση στα ιόντα καθιστώντας την τεχνική αυτή ιδανική για την ταυτοποίηση μορίων σε μίγματα δειγμάτων. Τέλος, κατά τον ιοντισμό παράγονται και θετικά και αρνητικά ιόντα αυξάνοντας τις εφαρμογές που έχουν στην ανάλυση και ταυτοποίηση μορίων σε μίγματα δειγμάτων.

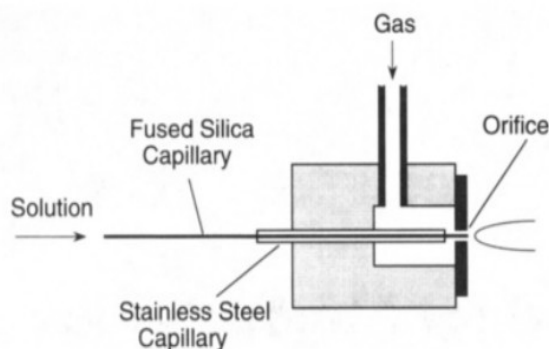
Κύριες εφαρμογές της αποτελούν η ταυτοποίηση φυσικών προϊόντων σε φυσικό υλικό, η ανάλυση υψηλής απόδοσης φαρμακευτικών παρασκευασμάτων, η ανίχνευση φαρμάκων καθώς και διάφορων μεταβολιτών τους. Ακόμη η μέθοδος DESI βρίσκει εφαρμογές και στην ανάλυση πρωτεϊνών και πρωτεϊνικών συμπλόκων, υδατανθράκων, ολιγονουκλεοτιδίων, καθώς και βιομηχανικών πολυμερών και μικρών οργανικών μορίων. Τέλος, ένα άλλο διαφορετικό επίκεντρο εφαρμογών της μεθόδου DESI αποτελεί η χρήση της στην εγκληματολογία και την δημόσια ασφάλεια, καθώς εκρηκτικές, τοξικές και βιομηχανικές ενώσεις ανιχνεύονται με υψηλή ευαισθησία απευθείας από τις επιφάνειες ποικίλων υλικών.

1.2.3 Ιοντισμός υπερηχητικής εκνέφωσης (Sonic Spray Ionization – SSI) και εκρόφηση ιόντων με ιοντισμό υπερηχητικής εκνέφωσης (Desorption Sonic Spray Ionization - DeSSI)

Μια άλλη τεχνική ιοντισμού είναι και ο ιοντισμός υπερηχητικής εκνέφωσης, ο οποίος και παρουσιάζει μικρότερη θραυσματοποίηση σε σχέση με τον ιοντισμό ηλεκτροψεκασμού και χωρίς την εφαρμογή εξωτερικού ηλεκτρικού πεδίου. Πιο συγκεκριμένα, ο ιοντισμός πνευματικού

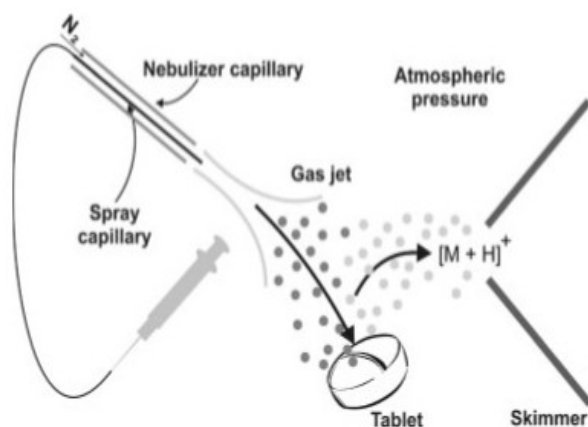
εκνεφωτή είναι μια νέα τεχνική μαλακού ιοντισμού που αναπτύχθηκε τελευταία, η οποία και δεν απαιτεί καμία βοηθητική μέθοδο όπως τάση ή θέρμανση ή κάποιο λέιζερ.

Η τεχνική λειτουργίας του είναι σχετικά απλή, καθώς η απόσπαση των ιόντων πραγματοποιείται με την βοήθεια μιας ροής αερίου αζώτου. Πιο συγκεκριμένα, η πηγή ιοντισμού αποτελείται από έναν εσωτερικό τριχοειδή σωλήνα τηγμένης πυριτίας και έναν δεύτερο εξωτερικό με μεγαλύτερη διάμετρο. Από τον εσωτερικό τριχοειδή ρέει ο διαλύτης, που χρησιμοποιείται προκειμένου να αποσπαστούν τα ιόντα από το δείγμα, και από τον εξωτερικό τριχοειδή αέριο άζωτο, το οποίο κατευθύνει τον διαλύτη στην επιθυμητή επιφάνεια.



Εικόνα 3: Διάταξη πηγής ιοντισμού με υπερηχητική εκνέφωση (SSI) [1]

Η ανάλυση μεγάλων μοριακών μορίων με σχετικά χαμηλό φορτίο έφερε την ανάγκη ανάπτυξης μιας τεχνικής ήπιου ιοντισμού όπως αυτή της υπερηχητικής εκνέφωσης (SSI). Η συσκευή αυτή έχει παρόμοιο σχεδιασμό με αυτό του ηλεκτροψεκασμού (ESI), με την κύρια διαφορά ότι η ροή αζώτου ιοντίζει το δείγμα με λιγότερη θραυσματοποίηση των μορίων. Για αυτόν τον λόγο ο ιοντισμός υπερηχητικής εκνέφωσης συνίσταται κυρίως για πρωτεομική ανάλυση. Αργότερα, αναπτύχθηκε και η εκρόφηση ιόντων από την επιφάνεια του δείγματος με την χρήση της υπερηχητικής εκνέφωσης (Desorption Sonic Spray Ionization – DeSSI) με την διαφορά, ότι αυτή πραγματοποιείται σε συνθήκες περιβάλλοντος.



Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση της εκρόφησης ιόντων από την επιφάνεια του δείγματος και την ανάλυσή τους με το σύστημα της υπερηχητικής εκνέφωσης (DeSSI) [7]

Ο ιοντισμός υπερηχητικής εκνέφωσης έχει εφαρμογή σε διάφορους τομείς. Μερικοί από αυτούς είναι για την ασφάλεια των τροφίμων, στην ιατροδικαστική χημεία και στις παρακολουθήσεις των αντιδράσεων, αποτελώντας την κύρια ατμοσφαιρική τεχνική ιοντισμού.

1.3 Αναλυτές μαζών

Συνολικά υπάρχουν διαφόρων ειδών φασματόμετρων μάζας, τα οποία διαφέρουν ως προς τον τρόπο λειτουργίας τους. Ωστόσο, όλα τα φασματόμετρα ξεχωρίζουν και ανιχνεύουν τα ιόντα με συγκεκριμένο λόγο μάζας προς φορτίο, καθιστώντας τα ιδανικά για αναλύσεις. Ορισμένα από τους αναλυτές μαζών είναι το φασματόμετρο μάζας μαγνητικού τομέα, το τετραπολικό φασματόμετρο μάζας διαπερατότητας, το φασματόμετρο μάζας χρόνου πτήσεως και το τετραπολικό φασματόμετρο μάζας παγίδευσης ιόντων.

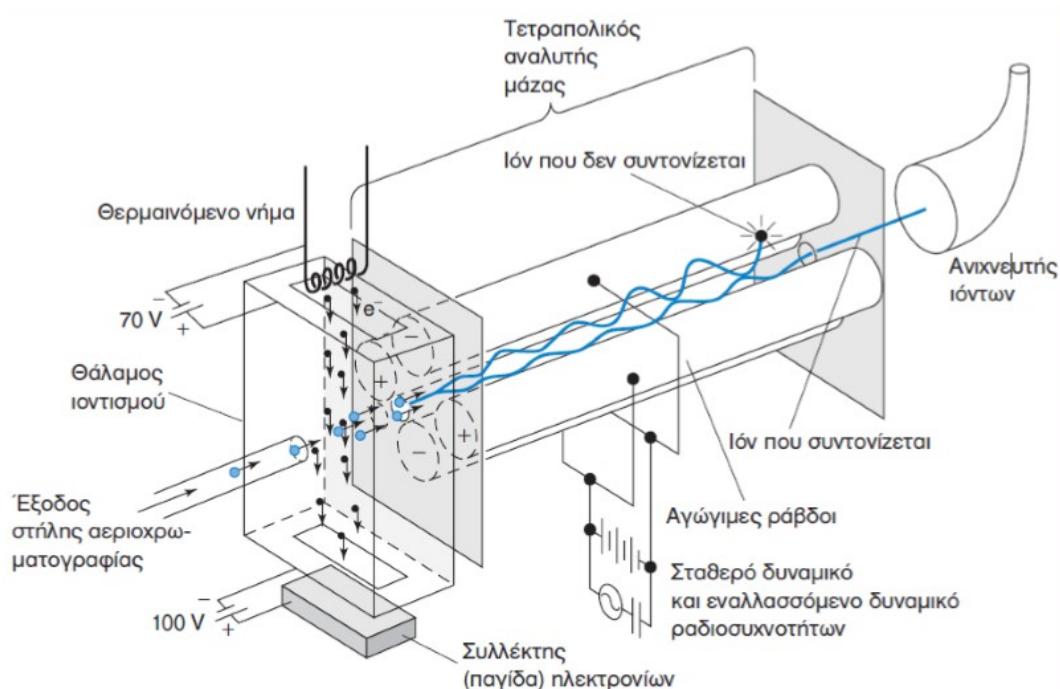
1.3.1 Τετραπολικό φασματόμετρο μάζας διαπερατότητας

Το τετραπολικό φασματόμετρο μάζας διαπερατότητας αποτελεί τον πιο σύνηθες αναλυτή μάζας, λόγω του χαμηλού του κόστους. Ο αναλυτής αυτός συνίσταται να είναι συνδεδεμένος με μια ανοιχτή τριχοειδή στήλη αέριας χρωματογραφίας, προκειμένου να αναλύονται τα ιόντα των ουσιών που εκλύονται από αυτήν.

Αρχικά, οι ουσίες που κατευθύνονται στον αναλυτή, διέρχονται από τον θάλαμο ιοντισμού, όπου παράγονται τα ιόντα και στην συνέχεια αυτά επιταχύνονται μέσω της εφαρμογής δυναμικού (5-15 V) προκειμένου αυτά να εισέλθουν στον τετραπολικό αναλυτή, ο οποίος και βρίσκεται συνεχώς σε κενό. Ο λόγος είναι προκειμένου να αποφευχθεί η πρόσκρουση των ιόντων με μόρια του αέρα, που έχουν ως αποτέλεσμα να δημιουργούνται νέα ιόντα, τα οποία και επηρεάζουν το τελικό φάσμα. Ο αναλυτής αυτός αποτελείται από τέσσερις παράλληλες μεταλλικές ράβδους στις οποίες εφαρμόζεται σταθερό δυναμικό, αλλά και ένα εναλλασσόμενο δυναμικό ραδιοσυχνότητας.

Το ηλεκτρικό πεδίο εκτρέπει τα ιόντα σε διάφορες τροχιές, καθώς αυτά κινούνται στο εσωτερικό του τετραπολικού αναλυτή μάζας και επιδρά στην επιλογή του επιθυμητού ιόντος με συγκεκριμένο λόγο μάζας προς φορτίο. Τα υπόλοιπα ιόντα, που δεν συντονίζονται, συγκρούονται με τις μεταλλικές ράβδους και απορρίπτονται πριν φτάσουν στον ανιχνευτή. Τα όργανα αυτά καταγράφουν 2-8 φάσματα το δευτερόλεπτο, καλύπτοντας ταυτόχρονα ένα εύρος έως 4000 μονάδες m/z .

Ένα από τα πλεονεκτήματα αυτού του αναλυτή μάζας είναι η σταθερή διακριτική τους ικανότητα, έναντι άλλων αναλυτών όπως τα όργανα μαγνητικού τομέα και διπλής εστίασης, με αποτέλεσμα ιόντα με m/z 500 και 501 διαχωρίζονται το ίδιο ικανοποιητικά με όσα έχουν m/z 100 και 101.



Εικόνα 5: Αναπαράσταση τετραπολικού αναλυτή μάζας [19]

1.4 Πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες είναι μεγάλα βιομόρια που αποτελούνται από μία ή περισσότερες μακρές αλυσίδες. Οι πρωτεΐνες επιτελούν μια τεράστια ποικιλία λειτουργιών μέσα στα κύτταρα, και πιο συγκεκριμένα συμμετέχουν ενεργά στην αντιγραφή του DNA, σε διάφορες μεταβολικές αντιδράσεις, παρέχουν δομή και στήριξη, διευκολύνουν την μεταφορά μορίων μέσα στα κύτταρα, καθώς και πολλά άλλα. Τα μεγάλα αυτά βιομόρια διαφέρουν ως προς την αλληλουχία των αμινοξέων τους, η οποία και υπάγεται από την αλληλουχία των γονιδίων.

Οι πρωτεΐνες στην φυσική τους κατάσταση μέσα στο κύτταρο έχουν σφαιρική δομή. Πιο

συγκεκριμένα, είναι σφικτά διπλωμένες και συμπαγείς δομές, ορισμένες από τις οποίες χαρακτηρίζονται και από την ισχυρή μη ομοιοπολική σύνδεσή τους με διάφορους συμπαράγοντες και προσθετικές ομάδες. Αυτές οι πρωτεΐνες όταν μετουσιωθούν, καταστρέφεται η τρισδιάστατη διαμόρφωσή τους στον χώρο, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται και η λειτουργικότητά τους. Αυτή η μετουσίωση μπορεί να προκληθεί από υψηλές θερμοκρασίες, από ακραίες τιμές pH, από απορρυπαντικά και διαλύματα που περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις ενώσεων, όπως ουρία και οργανικούς διαλύτες.

Μια ποικιλία τεχνικών ανίχνευσης βασίζονται στην καταστροφή των τρισδιάστατων μορφών τους, προκειμένου να πιστοποιηθεί η ύπαρξη ορισμένων πρωτεϊνών σε υδατικά διαλύματα. Μια από αυτές τις τεχνικές είναι και η χρήση του φασματομέτρου μάζας υποβοηθούμενο από μια τεχνική ιοντισμού. Πιο συγκεκριμένα, τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές ιοντισμού με πιο καινούρια αυτή του υπερηχητικού εκνεφωτή (SSI), η οποία και προκαλεί μια ήπια μορφή ιοντισμού στα μακρομόρια επιτρέποντας τον ιοντισμό τους, χωρίς την θραυσματοποίηση της αλυσίδας τους. Αυτό συμβαίνει, διότι ο ιοντισμός δεν προκαλείται από υψηλή θερμοκρασία ή από την εφαρμογή εξωτερικού δυναμικού, με αποτέλεσμα η ενέργεια που δίνεται στα μόρια να μην είναι αρκετή, ώστε τελικά να διασπαστούν οι δεσμοί τους. Τα πολλαπλά θετικά φορτισμένα ιόντα που παράγονται και παρατηρούνται στο φάσμα, προκύπτουν από την πρόσδεση πρωτονίων σε βασικές και αποπρωτιωμένες όξινες θέσεις και αντιστοιχούν ως ένα βαθμό στον βαθμό πρωτονίωσής τους στο υδατικό διάλυμα [9].

2. Βιβλιογραφική αναφορά

Το 2004 προτάθηκε για πρώτη φορά μια τεχνική ιοντισμού που πραγματοποιείται υπό ατμοσφαιρικές συνθήκες από τον ερευνητή Takáts και την ομάδα του και πιο συγκριμένα την εκρόφιση μορίων με ηλεκτροψεκασμό (DESI). Με την ανακάλυψη αυτής της τεχνικής ανάλυσης με το φασματομέτρο μάζας, η πρωτεωμική ανάλυση ήταν η πρώτη που επωφελήθηκε.

Μια από τις καινούριες τεχνικές ιοντισμού που ανακαλύφθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν ευρέως ως διεπαφή μεταξύ υγρής χρωματογραφίας και φασματομέτρου μάζας είναι ο ιοντισμός ψεκασμού υπερήχου (SSI), ο οποίος αρχικά χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση και την ανίχνευση πεπτιδίων, πρωτεϊνών και φαρμάκων σε μείγματα. Αυτή η το κύριο πλεονέκτημα, που παρουσιάζει αυτή η τεχνική έναντι άλλων τεχνικών, όπως ο ηλεκτροψεκασμός (ESI) και ο ιοντισμός με λέιζερ (MALDI), είναι ότι αποτελεί μια τεχνική ήπιου ιοντισμού ιδανική για θερμικά ασταθές ουσίες. Αυτό, διότι ο ιοντισμός των ουσιών δεν προκαλείται από κάποιου είδους θέρμανση ή κάποιας εφαρμογής εξωτερικού δυναμικού, επομένως και τα μόρια δεν παρουσιάζουν περαιτέρω θραυσματοποίηση [2], [5], [10], [11], [12], [13]

3. Πειραματικό μέρος

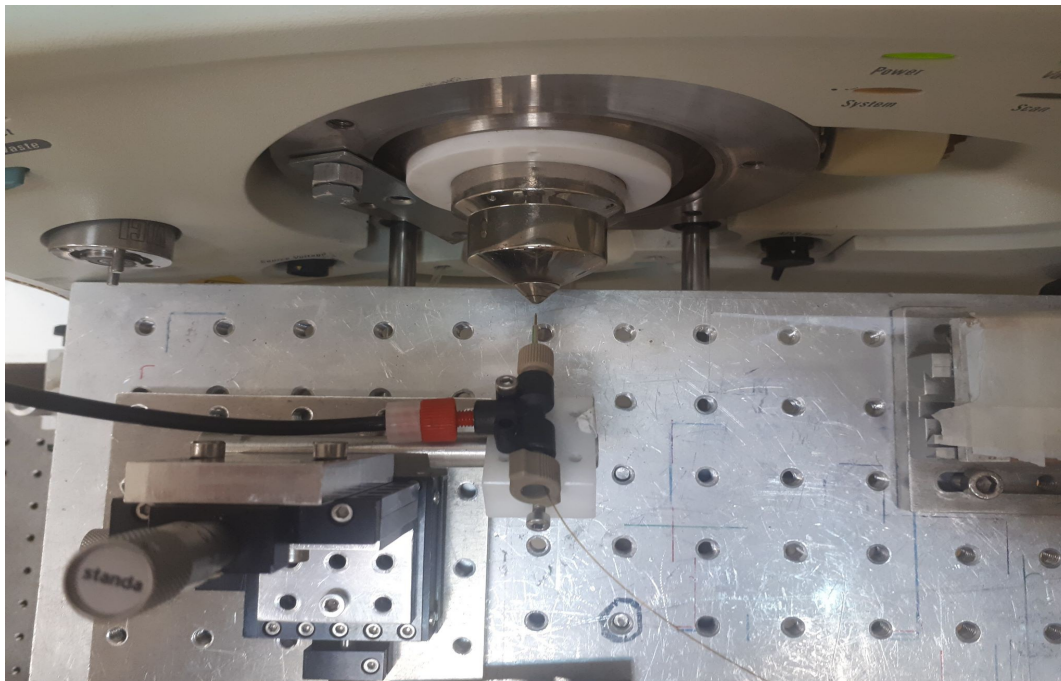
Για την συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία παρασκευάστηκαν δύο υδατικά διαλύματα πρωτεΐνη λυσοζύμης 1 ml και συγκέντρωσης 2.000 ppm. Στο πρώτο διάλυμα της πρωτεΐνης προστέθηκε ακόμη και 1 % φορμικό οξύ, προκειμένου να την πρωτονιώσει και να την αποδιατάξει πλήρως για την καλύτερη ανίχνευση της, λειτουργώντας έτσι ως αποδιατακτικό αντιδραστήριο. Το δεύτερο διάλυμα παρέμεινε “καθαρό” και χρησιμοποιήθηκε σε ένα δεύτερο στάδιο ανίχνευσης.

Ως διαλύτης εκ νέω φώσης χρησιμοποιήθηκαν διάφορα αντιδραστήρια και αναμειγμένα με νερό σε διάφορες αναλογίες, προκειμένου να εξακριβωθεί ποιος είναι ο πιο βέλτιστος. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε διαλύτης ακετονιτριλίου (ACN), ο οποίος στην συνέχεια αραιώθηκε με απιονισμένο νερό σε διάφορες αναλογίες (100%, 75%, 50%, 25% και 0% ACN). Έπειτα, ελέγχθηκε και η απόκριση του δείγματος με διαλύτη μεθανόλης (MeOH) και νερού, επίσης σε διάφορες αναλογίες (25%, 50%, 75% MeOH). Στην συνέχεια, ελέγχθηκαν και οι ροές διαλύτη μεθανόλης και νερού (σε αναλογία 1:1) με ταχύτητες 3 μl/min, 4 μl/min, 5 μl/min και 10 μl/min. Όλοι οι παραπάνω διαλύτες ήταν καθαροί, δηλαδή δεν χρησιμοποιήθηκε αποδιατακτικό αντιδραστήριο, ενώ το δείγμα που χρησιμοποιήθηκε για να ανιχνευτεί ήταν το πρώτο (αυτό με το αποδιατακτικό αντιδραστήριο). Τέλος, σε ένα δεύτερο στάδιο πραγματοποιήθηκε ξανά το πείραμα με το δεύτερο δείγμα της πρωτεΐνης (αυτό χωρίς το αποδιατακτικό αντιδραστήριο) και με διαλύτες ακετονιτρίλιο και νερό σε αναλογίες 100%, 75%, 50%, 25% και 0% ACN και την προσθήκη του φορμικού οξέος 1%, ως αποδιατακτικό αντιδραστήριο.

Η γωνία του εκνεφωτή με την επιφάνεια του δείγματος σταθεροποιήθηκε στις 40 μοίρες, ενώ η απόσταση του δείγματος από την είσοδο του φασματομέτρου υπολογίστηκε στα 2 mm. Η ροή του διαλύτη μεταβάλλονταν ανάλογα την μέτρηση, ενώ τη πίεση του αερίου αζώτου ρυθμίστηκε σταθερά στα 7 bar.



Εικόνα 6: Φωτογραφία του συστήματος DeSSI (από το πλάι)



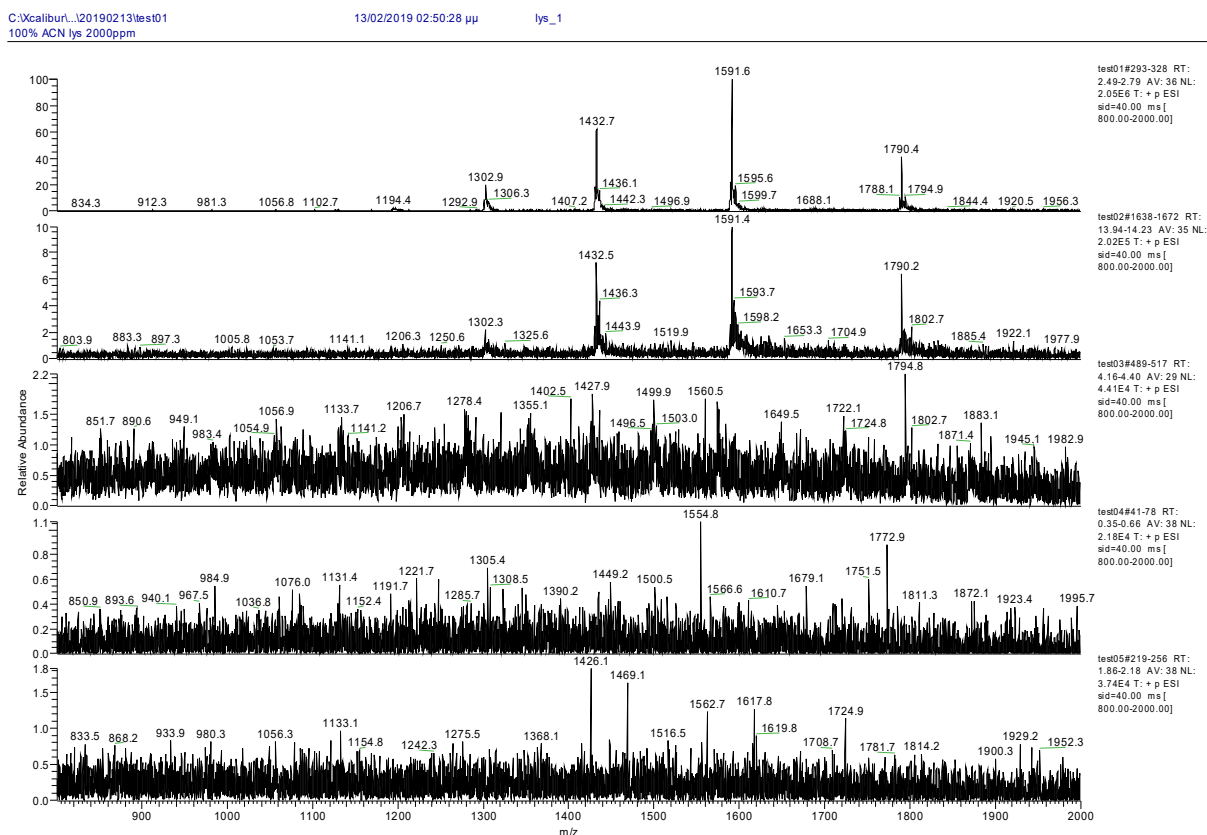
Εικόνα 7: Φωτογραφία του συστήματος DeSSI (κάτοψη)

4. Αποτελέσματα και συζήτηση

Σκοπός του συγκεκριμένου πειράματος είναι η μελέτη διαφόρων ειδών διαλυτών εκνέφωσης και σε διαφορετικές ταχύτητες, προκειμένου να βρεθούν οι κατάλληλες συνθήκες υπό τις οποίες έχουμε βέλτιστα αποτελέσματα. Οι παρακάτω αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν μόνο για τα θετικά ιόντα των πρωτεϊνών και όχι για τα αρνητικά. Παρακάτω αναλύονται και συζητούνται τα αποτελέσματα που λήφθηκαν με την τεχνική της εκρόφησης του δείγματος μέσω του ιοντισμού υπερηχητικής εκνέφωσης (DeSSI).

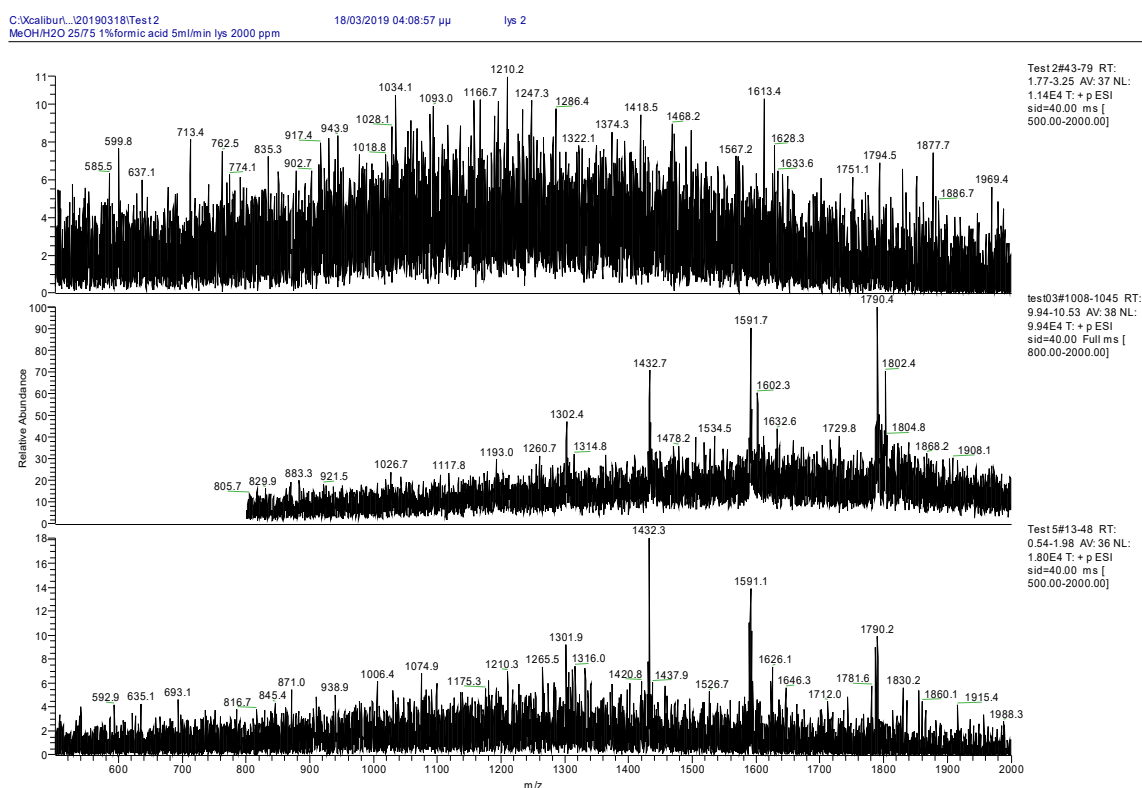
4.1 Μελέτη διαλυτών εκρόφησης

Αρχικά, μελετήθηκε ως διαλύτης εκρόφησης το ακετονιτρίλιο αναμειγμένο με νερό σε αναλογίες 100%, 75%, 50%, 25% και 0% και παρατηρήθηκαν αμέσως οι διαφορές. Όπως παρατίθενται τα φάσματα παρατηρείται, ότι η καλύτερη ανίχνευση της λυσοζύμης γίνεται με διαλύτη ακετονιτρίλιο (100% ACN), ενώ δεύτερος έρχεται ο διαλύτης ακετονιτρίλιου με νερό σε αναλογία (75% ACN). Για τους υπόλοιπες διαλύτες δεν πραγματοποιείται καμιά διάκριση της πρωτεΐνης, όπως παρατηρείται και στα παρακάτω φάσματα, καθώς φαίνεται να είναι “χαμένη” μέσα στο θόρυβο.



Εικόνα 8: Φάσμα μάζας DeSSI θετικών ιόντων λυσοζύμης με διαλύτη ακετονιτρίλιο με νερό σε αναλογία 100%, 75%, 50%, 25% και 0% ACN κατά σειρά (από πάνω προς τα κάτω)

Στην συνέχεια ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε μείγμα μεθανόλης με νερό σε αναλογία 25%, 50%, 75% MeOH. Όπως παρατηρείται και από τα πειραματικά δεδομένα, όσο αυξάνεται και η ποσότητα της μεθανόλης, τόσο και πιο εύκολα ανιχνεύεται η λυσοζύμη, που εκροφάται πάνω στην επιφάνεια. Πιο συγκεκριμένα, ο διαλύτης με αναλογία 25% μεθανόλη δεν παρουσιάζει κάποια απόκριση στην πρωτεΐνη, καθώς δεν μπορεί ανιχνευθεί μέσα από το θόρυβο. Αντιθέτως, στους διαλύτες 50% και 75% μεθανόλη παρατηρείται ικανοποιητική διάκριση των κορυφών της λυσοζύμης με καλύτερη, ενδεχομένως να είναι αυτή με το διαλύτη μεθανόλης σε αναλογία 50%. Αυτό, διότι βρέθηκε να έχει μεγαλύτερη ένταση κορυφής από τον άλλον και επομένως να είναι πιο ευδιάκριτη.

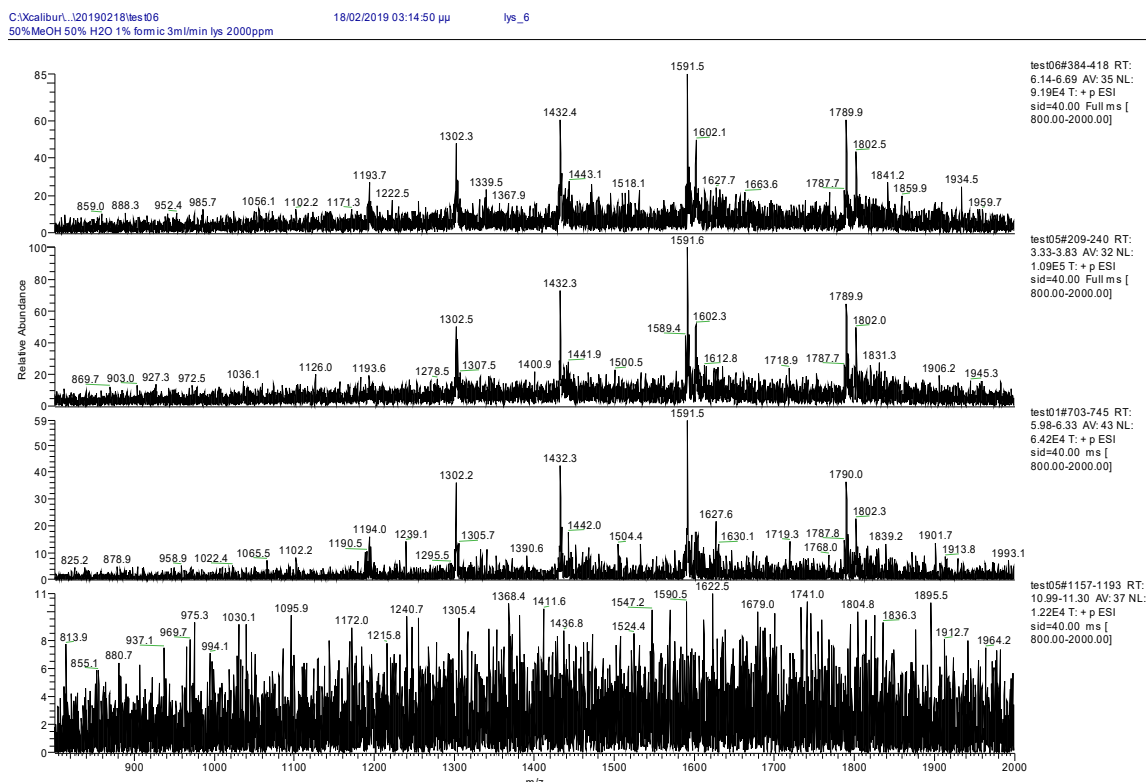


Εικόνα 9: Φάσμα μάζας DeSSI θετικών ιόντων λυσοζύμης με διαλύτη μεθανόλη και νερό σε αναλογίες 25%, 50%, 75% MeOH κατά σειρά (από πάνω προς τα κάτω)

4.2 Μελέτη ροής διαλυτών

Σε ένα δεύτερο στάδιο ελέγχθηκαν και διαφορετικές ροές διαλύτη, που έπεφτε πάνω στην επιφάνεια του δείγματος. Πιο συγκεκριμένα, οι ταχύτητες διαλύτη που ερευνήθηκαν είναι αυτές των 3 $\mu\text{l}/\text{min}$, 4 $\mu\text{l}/\text{min}$, 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ και 10 $\mu\text{l}/\text{min}$. Ο διαλύτης εκρόφησης που χρησιμοποιήθηκε σε αυτό το κομμάτι του πειράματος ήταν μεθανόλης-νερού σε αναλογία 1:1. Από τα παρακάτω φάσματα παρατηρήθηκε, ότι καλύτερη απόκριση είχαμε με την ροή των 3 $\mu\text{l}/\text{min}$ και των 4 $\mu\text{l}/\text{min}$,

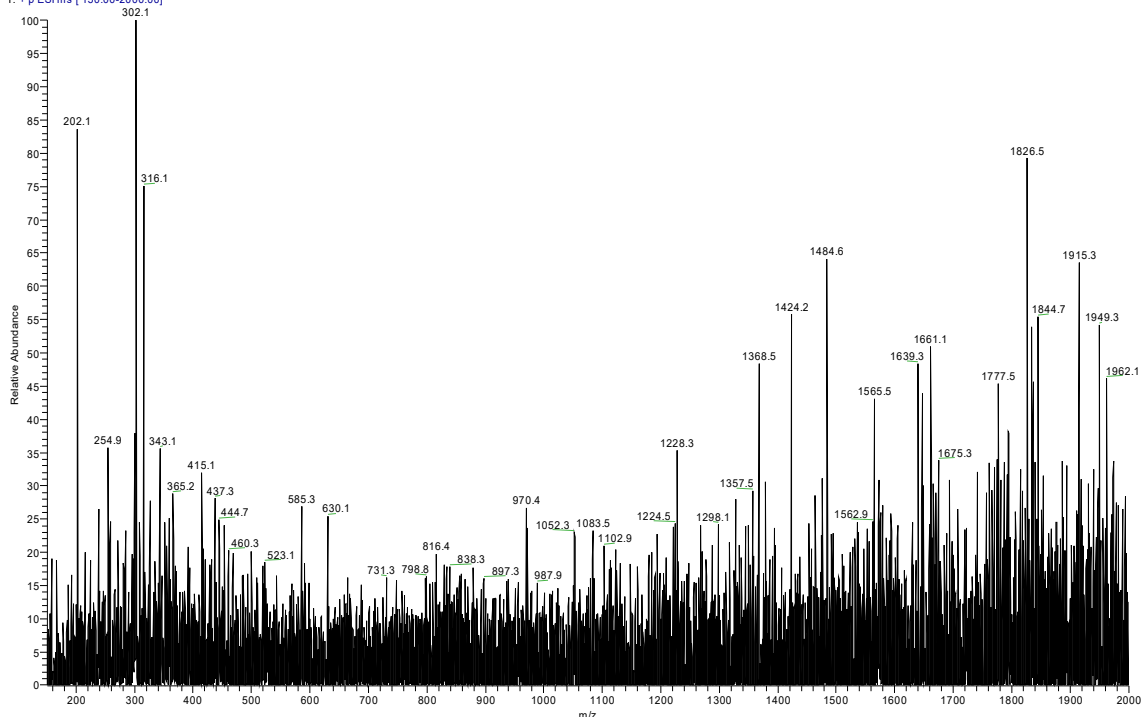
με αυτή των 3 $\mu\text{l}/\text{min}$ να παρατηρείται ότι το σήμα παρέμενε για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Στην περίπτωση των 4 $\mu\text{l}/\text{min}$ η πρωτεΐνη ανιχνεύονταν μόνο για κάποια δευτερόλεπτα στην αρχή του πειράματος και μετά εξαφανίζονταν. Για την ροή των 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ έχουμε ικανοποιητική ανίχνευση της πρωτεΐνης αλλά με την παρουσία σημαντικού θορύβου. Αντιθέτως, για την ροή των 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ δεν έχουμε καμία κορυφή στο φάσμα παρά μόνο έντονο θόρυβο, που δηλώνει το γεγονός ότι δεν γίνεται ανίχνευση του δείγματος.



Εικόνα 10: Φάσμα μάζας DeSSI θετικών ιόντων λυσοζύμης με ροή διαλύτη μεθανόλης και νερού (1:1) 3 $\mu\text{l}/\text{min}$, 4 $\mu\text{l}/\text{min}$, 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ και 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ κατά σειρά (από πάνω προς τα κάτω)

4.3 Μελέτη δείγματος χωρίς αποδιατακτικό αντιδραστήριο

Σε ένα τελευταίο στάδιο ελέγχθηκε και η περίπτωση όπου το αποδιατακτικό αντιδραστήριο δεν προστίθονταν απευθείας στο δείγμα αλλά στο διαλύτη εκνέφωσης. Επομένως, περιμέναμε να ληφθούν και διαφορετικά αποτελέσματα. Πιο συγκεκριμένα, ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε ξανά το ακετονιτρίλιο με τις ίδιες αναλογίες νερού, όπως προηγουμένως, στον οποίο προστέθηκε και αποδιατακτικό αντιδραστήριο (1% φορμικό οξύ). Διαπιστώθηκε στην συνέχεια, ότι δεν ανιχνεύεται με κανένα διαλύτη εκρόφησης το δείγμα πρωτεΐνης. Ενδεικτικά, παρατίθεται ένα φάσμα από το οποίο δεν υπάρχει το σήμα που περιμέναμε να δούμε των τριών κορυφών.



Εικόνα 11: Φάσμα μάζας DeSSI θετικών ιόντων λυσοζύμης διαλύτη ακετονιτρίλιου-νερού σε αναλογία 25% ACN και παρουσία αποδιατακτικού αντιδραστηρίου σε αυτό (από πάνω προς τα κάτω)

5. Συμπεράσματα

Η τεχνική της υπερηχητικής εκνέφωσης είναι μια σχετικά καινούρια τεχνική ιοντισμού, πάνω στην οποία γίνονται συνεχώς πειράματα, προκειμένου να κατέβει το όριο ανίχνευσης και γενικότερα να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες ανάλυσης δειγμάτων. Η περαιτέρω ανάπτυξη αυτής της τεχνικής είναι σημαντική, καθώς μπορεί να μας δώσει αξιόπιστα αποτελέσματα σε μικρό χρονικό διάστημα, αφού το δείγμα δεν χρειάζεται ιδιαίτερη προετοιμασία. Επιπλέον, δεν χρησιμοποιείται κάποιου είδους θέρμανσης ή εφαρμογής δυναμικού για τον ιοντισμό του δείγματος, καθώς αυτό επιτυγχάνεται με την ροή αερίου. Τέλος, με την χρήση αυτής της τεχνικής είναι δυνατή η ανίχνευση και η ανάλυση θετικών και αρνητικών ιόντων, χωρίς κάποια αλλαγή στην διαδικασία ιοντισμού παρά μόνο στην πολικότητα του φασματομέτρου μάζας.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα λαμβάνεται το συμπέρασμα, ότι καλύτερος διαλύτης εκρόφησης είναι το καθαρό ακετονιτρίλιο, χωρίς την ανάμειξή του δηλαδή με απιονισμένο νερό. Αυτό, διότι στα φάσματα που λήφθηκαν, παρατηρούνται αρκετά καθαρά οι σχετικές κορυφές της λυσοζύμης και μάλιστα φαίνεται να έχουν μεγάλη ένταση. Για τους άλλους διαλύτες τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά, είτε διότι δεν λαμβάνονταν το σήμα καθόλου, είτε διότι οι κορυφές δεν είχαν μεγάλη ένταση, με αποτέλεσμα η παρουσία του θορύβου να είναι αρκετά μεγάλη

και να παρεμποδίζει την ανίχνευσή του δείγματος. Ένας ακόμη παράγοντας που επηρεάζει την απόκριση του συστήματος, εκτός από το είδος του διαλύτη εκνέφωσης, είναι και η ταχύτητα του αερίου αζώτου, αφού με πολύ υψηλή ή πολύ χαμηλή ροή δεν είναι δυνατή η απόσπαση των ιόντων από την επιφάνεια του δείγματος. Έτσι, ελέγχθηκαν διάφορες ταχύτητες και καθορίστηκε η βέλτιστη ροή αερίου αζώτου, προκειμένου να ληφθεί φάσμα μεγάλης έντασης για το δείγμα της πρωτεΐνης.

Η τεχνική της υπερηχητικής εκνέφωσης αποτελεί μια πολύ υποσχόμενη τεχνική για τις θερμοδυναμικά ασταθές ενώσεις, όπου θα μπορεί ο ερευνητής να αναλύει εύκολα και γρήγορα μίγματα δειγμάτων με απόλυτη ακρίβεια. Ωστόσο, ακόμα είναι υπό μελέτη προκειμένου να ερευνηθούν περαιτέρω οι δυνατότητες της και ιδιαίτερα η σύζευξή της με άλλα όργανα και τεχνικές ανάλυσης.

6. Επόμενες μελέτες

Σε επόμενα πειράματα θα μπορούσε να ελεγχθούν διάφοροι ακόμη διαλύτες και διάφορες ουσίες που θα λειτουργήσουν ως αποδιατακτικά αντιδραστήρια. Επιπρόσθετα, θα μπορούσε να μελετηθεί, αν είναι δυνατή η ανίχνευση των ήδη μετουσιωμένων πρωτεϊνών χωρίς καθόλου να χρησιμοποιηθεί αποδιατακτικό αντιδραστήριο ούτε στο δείγμα, ούτε στον διαλύτη εκρόφησης. Κάτι τέτοιο ίσως ήταν δυνατό, αν κατά την παρασκευή του δείγματος της πρωτεΐνης το εκθέταμε σε ακραίες συνθήκες, προκειμένου να καταστραφεί η τριτοταγής δομή της πρωτεΐνης. Σε μια επόμενη σκέψη θα μπορούσε να ελεγχθεί η απόκριση αυτής της τεχνικής σε αμινοξέα ή άλλα βιομόρια.

7. Βιβλιογραφία

- [1] Atsumu. Hirabayashi, Minoru. Sakairi, and Hideaki. Koizumi. Sonic Spray Ionization Method for Atmospheric Pressure Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, **1994**; 66; (24), 4557-4559
- [2] LYU Yue-Guang et al. Progress of Sonic-Spray Ionization Mass Spectrometry and Its Applications, *Chin. J. Anal. Chem.*, **2019**; 47(1): 1–12
- [3] Hirabayashi A, Sakairi M, Koizumi H. *Anal. Chem.*, **1994**; 66(24); 4557–4559
- [4] Haddad R, Sparrapan R, Eberlin M N. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2010**; 20(19); 2901–2905
- [5] Yang Shui-Ping et al. Development of a Sonic Spray Ionization Source for the Mass Spectrometric Analysis of Proteins, *Chin. J. Anal. Chem.*, **2008**; 36(2); 266–272
- [6] Shibdas Banerjee and Shyamalava Mazumdar, Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte, *International Journal of Analytical Chemistry* Volume 2012

- [7] R. Ifa Demian et al. Desorption electrospray ionization and other ambient ionization methods: current progress and preview, *Analyst*, **2010**
- [8] Zoltan Takats et. al. Ambient mass spectrometry using desorption electrospray ionization (DESI): instrumentation, mechanisms and applications in forensics, chemistry, and biology, *J. Mass Spectrom.* **2005**; 40; 1261–1275
- [9] Viswanatham Katta and Brian T. Chait. Observation of the Heme-Globin Complex in Native Myoglobin by Electrospray-Ionization Mass Spectrometry, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**; 113; 8534-8535
- [10] Elahe Honarvar, Andre R. Venter. Comparing the Effects of Additives on Protein Analysis Between Desorption Electrospray (DESI) and Electrospray Ionization (ESI), *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2018**; 29; 2443-2455
- [11] Renato Haddad et.al. Desorption sonic spray ionization for (high) voltage-free ambient mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**; 20; 2901–2905
- [12] Zoltan Takats, Mass Spectrometry Sampling Under Ambient Conditions with Desorption Electrospray Ionization, **2004**; 306; 471-473
- [13] Atsumu Hirabayash. et. al. Sonic Spray Ionization Method for Atmospheric Pressure Ionization Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* **1994**; 66; 4557-4559
- [14] Zoltan Takats. et. al. Amino Acid Clusters Formed by Sonic Spray Ionization, *Anal. Chem.* **2003**; 75; 1514-1523
- [15] Andre Venter et. al. Droplet Dynamics and Ionization Mechanisms in Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, **2006**; 78; 8549-8555
- [16] Kevin A. et. al. Predicting the Highest Intensity Ion in Multiple Charging Envelopes Observed for Denatured Proteins during Electrospray Ionization Mass Spectrometry by Inspection of the Amino Acid Sequence, *Anal. Chem.* **2013**; 85; 8212–8218
- [17] Victor V. Laiko. et. al. Atmospheric Pressure Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* **2000**; 72; 652-657
- [18] Victor V. Laiko. et. al. Atmospheric Pressure MALDI/Ion Trap Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* **2000**; 72; 5239-5243
- [19] Harris, D. C. (2008). *Quantitative Chemical Analysis (7η εκδ.)*. New York: W.H. Freeman and Company