ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ ΓΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟ ΝΕΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΑΡΣΕΝΙΚΟΥ (ΘΕΙΟΑΡΣΕΝΟΣΑΚΧΑΡΑ) ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης

Γενικό Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών

Κανάκη Αικατερίνη

Επιβλέπων: Επίκουρος Καθηγητής Σ. Α. Περγαντής

Ηράκλειο 2007

UNIVERSITY OF CRETE

DEPARTMENT OF CHEMISTRY

ENVIRONMENTAL AND ANALYTICAL CHEMISTRY

DEVELOPMENT OF LIQUID CHROMATOGRAPHY MASS SPECTROMETRY METHODS FOR DETECTION AND CHARACTERIZATION OF NEW ARSENIC SPECIES (THIOARSENOSUGARS) IN BIOLOGICAL SAMPLES

MASTER OF SCIENCE

Aikaterini Kanaki

Supervisor: Assistant Professor S. A. Pergantis

Heraklion 2007

Ο χώρος και ο χρόνος είναι τρόποι με τους οποίους σκεφτόμαστε, όχι συνθήκες κάτω από τις οποίες υπάρχουμε.
Ο χρόνος, όπως τον αντιλαμβανόμαστε με τα ρολόγια και τα ημερολόγια, είναι μια επινόηση που δεν αφορά παρά τον άνθρωπο και τη δική του ερμηνεία του κόσμου

Albert Einstein

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Σ. Α. Περγαντής (Επιβλέπων - Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης)

Ε. Γ. Στεφάνου (Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης)

Γ. Ε. Βασιλικογιαννάκης (Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης)

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Κατ' αρχήν, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα Καθηγητή κ. Σ. Περγαντή, για την επιστημονική καθοδήγηση και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε σε όλο το διάστημα της συνεργασίας μας, καθώς και για την οικονομική υποστήριξη που μου προσέφερε, μέσω του Προγράμματος Marie Curie Excellent Grant.

Επίσης, ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Καθηγητή κ. Ε. Στεφάνου και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Γ. Βασιλικογιαννάκη, που δέχτηκαν να συμμετάσχουν στην τριμελή επιτροπή εξέτασης της παρούσας εργασίας.

Ευχαριστώ το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, που με δέχτηκε στο Γενικό Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα το 2004, καθώς και για την υλικοτεχνική υποστήριξη που μου παρείχε.

Ακολούθως, θα επιθυμούσα να ευχαριστήσω τον Dr. Volker Nischwitz, για τις πολύτιμες συμβουλές του στα πρώτα μου βήματα στο εργαστήριο και για τη συνεργασία του κατά την εκπόνηση της παρούσας μελέτης.

Σαφώς, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία μας όλα αυτά τα χρόνια.

Τελειώνοντας, ένα μεγάλο "ευχαριστώ" στην οικογένειά μου, στους γονείς μου και στην αδερφή μου, για την ηθική και οικονομική τους συμπαράσταση κατά τη διάρκεια των σπουδών μου και για τη στήριξη και ενθάρρυνσή τους κάθε χρονική στιγμή της ζωής μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το αρσενικό αποτελεί ένα στοιχείο ευρέως διαδεδομένο στη φύση, του οποίου η τοξικότητα εξαρτάται από την οξειδωτική κατάσταση και το χημικό τύπο με τον οποίο συναντάται. Η έκθεση του ανθρώπου σε αυτό γίνεται κυρίως μέσω του φαγητού και του νερού, ενώ ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις του στοιχείου έχουν αναφερθεί σε θαλασσινές τροφές. Τα φύκη και οι οργανισμοί που τρέφονται με αυτά, είναι πλούσιοι σε οξοαρσενοσάκχαρα (ενώσεις αρσενικού που περιέχουν στο μόριο τους ένα ριβοζικό δακτύλιο, $(CH_3)_2RAs{=}O$, όπου R = τμήμα που περιλαμβάνει το ριβοζικό δακτύλιο), ενώσεις άγνωστης τοξικότητας, οι οποίες μεταβολίζονται στον οργανισμό προς σχηματισμό άλλων ενώσεων.

Η πρόσφατη ανακάλυψη, σε δείγματα θαλάσσιων οστρακοειδών, δύο παραγώγων μιας καινούριας ομάδας οργανοαρσενικικών ενώσεων, γνωστής ως θειοαρσενοσάκχαρα ($(CH_3)_2RAs{=}S$), έδωσε το έναυσμα στην παρούσα εργασία για την εξερεύνηση της ύπαρξης επιπλέον ειδών αυτής της κατηγορίας σε βιολογικά δείγματα. Για το σκοπό αυτό, αναπτύχθηκαν μέθοδοι Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC) συζευγμένης με Φασματομετρία Μάζας Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος (ICP-MS) και Διαδοχική Φασματομετρία Μάζας Ηλεκτροψεκασμού (ES-MS/MS). Η ανάπτυξη των μεθόδων βασίστηκε στην ανάλυση πρότυπων διαλυμάτων των θειοαρσενοσακχάρων, τα οποία παρασκευάστηκαν έπειτα από κατεργασία των αντίστοιχων οξοαρσενοσακχάρων με H_2S. Αρχικά, για τη μέθοδο HPLC-ES-MS/MS χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία ανιονανταλλαγής, με προσθήκη υψηλού ποσοστού μεθανόλης στην κινητή φάση (έως και 40% κ.ο.) για την αποτελεσματική έκλουση των συστατικών από τη στήλη. Αντίστοιχα, η μέθοδος HPLC-ICP-MS, βασίστηκε σε χρωματογραφία αντίστροφης φάσης παρουσία ιοντικού ζεύγους και μικρού ποσοστού μεθανόλης (5% κ.ο.) στην κινητή φάση.

Ο συνδυασμός των δυο παραπάνω αναλυτικών τεχνικών οδήγησε στην ανακάλυψη, για πρώτη φορά, δυο καινούριων ενώσεων της κατηγορίας των θειοαρσενοσακχάρων σε εκχυλίσματα θαλάσσιων οργανισμών και φυκών. Επιπλέον, είναι η πρώτη φορά που ενώσεις της κατηγορίας των θειοαρσενοσακχάρων ανιχνεύονται σε δείγματα από φύκη.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Λέξεις κλειδιά: Θειοαρσενοσάκχαρα, ειδοταυτοποίηση αρσενικού, Φασματομετρία Μάζας, Επαγωγικά Συζευγμένο Πλάσμα, Ηλεκτροψεκασμός

ABSTRACT

Arsenic is ubiquitous in the environment, with its toxicity being dependant on its oxidation state and its chemical form. Humans are exposed to arsenic, mainly through their food and drinking water, while quite high concentrations of this element are found in seafood. Algae and organisms feeding on algae are rich in oxoarsenosugars (arsenic containing ribofuranosides, $(CH_3)_2RAs{=}O$, R = ribose moiety). The toxicity of these compounds, which are considered to be metabolized *in vivo* to other species of unknown toxicity, has not been fully evaluated yet.

Following recent reports on the detection of a new group of thioarsenosugars ($(CH_3)_2RAs{=}S$) in marine molluscs, we explored in the present study the presence of additional species of this group in various biological samples. For this reason High Performance Liquid Chromatography (HPLC) coupled with Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) and Electrospray Tandem Mass Spectrometry (ES-MS/MS) methods were developed. A series of thioarsenosugar standards was prepared, through the reaction of the corresponding oxoarsenosugars with H_2S.

First, conventional anion exchange chromatographic conditions were modified to achieve efficient elution of the thioarsenosugars. This required relatively high contents of methanol in the mobile phase (up to 40%). However, the high amount of methanol used with this method was not suitable for direct hyphenation with ICP-MS, without a specially adapted interface. Therefore, reversed phase anion pairing HPLC with low methanol content (5%) in the mobile phase was developed and used. The combined application of both analytical techniques revealed the presence of two novel thioarsenosugars in marine bivalves and marine algae. Moreover, this is the first time that the detection of thioarsenosugars in marine algae is reported.

Keywords: thioarsenosugars, arsenic speciation, Mass Spectrometry, Inductively Coupled Plasma, Electrospray

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 1

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ 1

1.2. ΠΗΓΕΣ ΑΡΣΕΝΙΚΟΥ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ 2

1.3. ΤΟ ΑΡΣΕΝΙΚΟ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ 3

1.4. ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΕΝΩΣΕΩΝ ΑΡΣΕΝΙΚΟΥ ΣΤΟ ΘΑΛΑΣΣΙΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ 6

1.5. ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΡΣΕΝΙΚΟΥ 12

1.6. ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΑΡΣΕΝΙΚΟΥ – ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ 15

1.7. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ 16

1.8. ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΑΡΣΕΝΙΚΟΥ ΣΕ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ - ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ 19

1.8.1. Τεχνικές Διαχωρισμού 19

1.8.2. Ατομικές Τεχνικές Ανίχνευσης 21

1.9. ΑΡΧΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ICP-MS 25

1.9.1. Σύστημα Εισαγωγής Δείγματος (Sample Introduction System) 26

1.9.2. Πηγή Ιόντων (Πλάσμα Αργού) 30

1.9.3. Διεπιφάνεια Πλάσματος - Αναλυτή Μάζας (Interface Region) 32

1.9.4. Σύστημα Εστίασης Ιόντων (Ion Focusing System) 33

1.9.5. Αναλυτής Μάζας (Mass Analyzer) 34

1.9.6. Σύστημα Ανίχνευσης Ιόντων (Ion Detection System) 36

1.10. ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΕΙΣ ΣΤΑ ΦΑΣΜΑΤΑ ΑΤΟΜΙΚΩΝ ΜΑΖΩΝ 36

1.11. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΑΣ 38

1.11.1. Ιονισμός μέσω Ηλεκτροψεκασμού σε συνδυασμό με Διαδοχική Φασματομετρία Μάζας (Electrospray Ionization-Mass Spectrometry – ESI-MS) 39

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 46

2.1. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ 46

2.1.1. Φασματομετρία Μάζας Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος σε συνδυασμό με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC – ICP-MS) 46

2.1.2. Διαδοχική Φασματομετρία Μάζας Ηλεκτροψεκασμού σε συνδυασμό με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC – ES-MS/MS) **49**

2.2. ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ **51**

2.3. ΔΕΙΓΜΑΤΑ **51**

2.4. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ **52**

2.5. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΘΕΙΟΑΡΣΕΝΟΣΑΚΧΑΡΩΝ **53**

2.6. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗΣ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ ΤΟΥ ΑΡΣΕΝΙΚΟΥ **55**

2.7. ΟΛΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΡΣΕΝΙΚΟΥ – ΑΠΟΔΟΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ **56**

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ **57**

3.1. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΕΧΝΙΚΗΣ HPLC-ES-MS/MS ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΟ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟ ΟΞΟ- ΚΑΙ ΘΕΙΟ- ΑΡΣΕΝΟΣΑΚΧΑΡΩΝ **57**

3.1.1. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) **57**

3.1.2. Διαδοχική Φασματομετρία Μάζας Ηλεκτροψεκασμού (ES-MS/MS) **59**

3.2. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΕΧΝΙΚΗΣ HPLC-ICP-MS ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΟ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟ ΚΑΙΝΟΥΡΙΩΝ ΘΕΙΟΑΡΣΕΝΟΣΑΚΧΑΡΩΝ ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ **70**

3.2.1. Βελτιστοποίηση Παραμέτρων Λειτουργίας ICP-MS **70**

3.2.2. Βελτιστοποίηση Χρωματογραφικού Διαχωρισμού **71**

3.3. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΜΕΘΟΔΩΝ HPLC-ICP-MS ΚΑΙ HPLC-ES-MS/MS ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΟ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟ ΚΑΙΝΟΥΡΙΩΝ ΘΕΙΟΑΡΣΕΝΟΣΑΚΧΑΡΩΝ ΣΕ ΘΑΛΑΣΣΙΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ **90**

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ **103**

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ **107**

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το αρσενικό (As) αποτελεί ένα στοιχείο ευρέως διαδεδομένο στην φύση, το οποίο σε στοιχειακή μορφή συναντάται ως γκρι κρυσταλλικό στερεό. Χαρακτηρίζεται ως μεταλλοειδές, δεδομένου ότι οι ενώσεις του παρουσιάζουν και μεταλλικές και μη-μεταλλικές ιδιότητες, ενώ σε σειρά αφθονίας μεταξύ των στοιχείων κατανέμεται 20° στον φλοιό της γης, 14° στο θαλάσσιο νερό και 12° στο ανθρώπινο σώμα[1]. Απομονώθηκε το 1250 μ.Χ. από τον Albertus Magnus και ανήκει στη $15^{η}$ ομάδα και $4^{η}$ περίοδο του περιοδικού πίνακα. Οι σταθερές οξειδωτικές καταστάσεις με τις οποίες συναντάται είναι +3, +5 και -3,[2] ενώ πρόκειται για μονοϊσοτοπικό στοιχείο, με σχετική ατομική μάζα ίση με 74.923 ατομικές μονάδες μάζας (amu) και ατομικό αριθμό 33 (ηλεκτρονική διαμόρφωση: $1s^2$, $2s^2$, $2p^6$, $3s^2$, $3p^6$, $3d^{10}$, $4s^2$, $4p^3$). Έχει χρησιμοποιηθεί στην ιατρική, τη γεωργία, την ηλεκτρονική, την βιομηχανία και τη μεταλλουργία,[3] ενώ έχει αναφερθεί ότι η χρόνια κατανάλωση αρσενικού, ακόμα και σε μικρές συγκεντρώσεις, οδηγεί σε καρκινογένεση. Η μεταλλική μορφή του στοιχείου παραμένει σταθερή σε ξηρή ατμόσφαιρα, αλλά οξειδώνεται κατά την έκθεση σε υγρασία. Ορισμένες φυσικές ιδιότητες του αρσενικού φαίνονται στον Πίνακα 1.1.[4]

Πίνακας 1.1: Φυσικές ιδιότητες του αρσενικού.

Ιδιότητες	**Τιμές**
Σημείο Τήξης (σε 39.1 MPa) [^{o}C]	816.0
Σημείο Ζέσεως [^{o}C]	615.0
Ειδικό Βάρος (26°C) [kg/m^3]	5.778
Ειδική Θερμότητα [J/mol·K]	24.6
Κρυσταλλικό Σύστημα	Εξαγωνικό

Το αρσενικό στην φύση σχηματίζει ανόργανες ενώσεις, με στοιχεία όπως το οξυγόνο, το χλώριο και το θείο και οργανικές ενώσεις, με στοιχεία όπως ο άνθρακας και το υδρογόνο. Η διάκριση μεταξύ ανόργανης και οργανικής μορφής του στοιχείου είναι πολύ σημαντική, αφού συνήθως η τελευταία χαρακτηρίζεται ως λιγότερο τοξική. Γενικά, οι ανηγμένες ανόργανες μορφές του αρσενικού θεωρούνται ιδιαίτερα τοξικές και υπεύθυνες για καρκινογένεση. Η πλειοψηφία των ενώσεων αρσενικού είναι άχρωμες και άγευστες σκόνες, που δεν είναι δυνατόν να ανιχνευτούν με την όσφρηση ή τη γεύση στο φαγητό, το νερό ή τον αέρα. Το στοιχείο αυτό συναντάται σε ζωντανούς οργανισμούς, στην ατμόσφαιρα, στο νερό και σε γεωλογικούς σχηματισμούς, ενώ συνήθως βρίσκεται σε ορυκτά που περιέχουν θείο, χρυσό, κοβάλτιο, νικέλιο και αντιμόνιο.[5]

1.2. ΠΗΓΕΣ ΑΡΣΕΝΙΚΟΥ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Το αρσενικό ελευθερώνεται στο περιβάλλον τόσο από φυσικές όσο και από ανθρωπογενείς πηγές. Η κυριότερη φυσική πηγή είναι η ηφαιστειακή δραστηριότητα, ενώ πηγές με μικρότερη συνεισφορά είναι η βλάστηση, η αποσάθρωση των πετρωμάτων και η βιολογική δραστηριότητα.[2] Από την άλλη, οι ανθρωπογενείς πηγές αρσενικού στο περιβάλλον, είναι οι ακόλουθες:

- ✓ Διεργασίες τήξης μετάλλων (απελευθέρωση σκόνης As_2O_3).
- ✓ Καύση ορυκτών καυσίμων.
- ✓ Χρήση μικροβιοκτόνων και εντομοκτόνων που περιέχουν ενώσεις του στοιχείου.[6]
- ✓ Χρήση ενώσεων αρσενικού σαν συντηρητικά ξύλου.[1]

Η αναλογία Φυσικές Εκπομπές As/ Ανθρωπογενείς Εκπομπές As, κατά γενική εκτίμηση είναι 60/40.[2] Η παγκόσμια παραγωγή αρσενικού παρουσίαζε συνεχή αύξηση μέχρι τα μέσα της δεκαετίας του 1940. Ωστόσο, η διακοπή της χρήσης ενώσεων αρσενικού σαν εντομοκτόνα και μικροβιοκτόνα, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των εκπομπών του στοιχείου στην ατμόσφαιρα.

1.3. ΤΟ ΑΡΣΕΝΙΚΟ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Πολύ πριν η ανθρώπινη δραστηριότητα επιδράσει στο φυσικό ισοζύγιο, το αρσενικό υπήρχε σε αφθονία στον φλοιό της γης, στο έδαφος, στα πετρώματα, στο νερό, στον αέρα και στους ζωντανούς οργανισμούς. Πρόκειται για ένα στοιχείο του οποίου οι ενώσεις μετατρέπονται από τη μια μορφή στην άλλη, μέσω αντιδράσεων με το οξυγόνο και άλλα μόρια που υπάρχουν στον αέρα, στο νερό και στο έδαφος ή μέσω βακτηριδιακής δράσης. Το αρσενικό το οποίο απελευθερώνεται από εργοστάσια παραγωγής ισχύος και από άλλες διεργασίες καύσης, βρίσκεται συνήθως προσροφημένο σε στερεά σωματίδια, με αποτέλεσμα η παραμονή του στην ατμόσφαιρα να διαρκεί πολλές ημέρες. Λόγω της υψηλής διαλυτότητας πολλών ενώσεων του στο νερό, το αρσενικό καταλήγει σε λίμνες, ποτάμια και υπόγεια νερά, μέσω της βροχής και του χιονιού ή μέσω των βιομηχανικών αποβλήτων. Μέρος του αρσενικού παραμένει προσροφημένο σε πετρώματα στον πυθμένα των λιμνών και των ποταμών, ενώ το υπόλοιπο μεταφέρεται μέσω του νερού. Το μεγαλύτερο ποσοστό του αρσενικού το οποίο προσλαμβάνεται από ορισμένα μαλάκια και συσσωρεύεται στους ιστούς τους, χαρακτηρίζεται ακίνδυνο.

Αέρας

Το αρσενικό στον αέρα βρίσκεται κυρίως προσροφημένο σε σωματιδιακή ύλη, με τη μορφή αρσενικωδών (As(III)) και αρσενικικών (As(V)) ενώσεων (ανόργανες μορφές στην τρισθενή και πεντασθενή οξειδωτική κατάσταση αντίστοιχα, Σχήμα 1.1).[7,8,9,10] Αυτά τα σωματίδια μεταφέρονται με ρεύματα αέρα και επιστρέφουν ξανά στο έδαφος, μέσω υγρής ή ξηρής εναπόθεσης. Οι οργανικές ενώσεις του στοιχείου στον αέρα είναι αμελητέας συγκέντρωσης, με εξαίρεση τις περιοχές όπου υπάρχει έντονη βιομηχανική δραστηριότητα ή γίνεται ευρεία χρήση ενώσεων αρσενικού ως εντομοκτόνα.[9] Οι συγκεντρώσεις του αρσενικού στον αέρα, κατά μέσο όρο, κυμαίνονται σε χαμηλά επίπεδα (0.4 - 30 ng/m^3). Σε απομακρυσμένες ή αγροτικές περιοχές δεν ξεπερνούν τα 2 ng/m^3,[11] ενώ υψηλότερες συγκεντρώσεις παρατηρούνται σε αστικές περιοχές (3 - 200 ng/m^3).[12] Πρόσφατη έρευνα στον ευρωπαϊκό χώρο, απέδειξε σταδιακή μείωση στο ποσοστό του αρσενικού στον αέρα, κατά τις τελευταίες δεκαετίες, η οποία πιθανότατα οφείλεται στη χρησιμοποίηση, από

τις περισσότερες βιομηχανικές μονάδες, εξοπλισμού κατακράτησης της παραγόμενης σκόνης και επομένως μέρους του αρσενικού που ελευθερώνεται.

Φλοιός

Η μέση συγκέντρωση του αρσενικού σε ιζηματογενή και πυριγενή πετρώματα είναι 2 mg/kg, ενώ υψηλότερες συγκεντρώσεις βρέθηκαν σε αργιλικά και φωσφορικά πετρώματα. Συσσωρεύεται επίσης σε κάποια θαλάσσια πετρώματα, όπου η συγκέντρωση του μπορεί να φτάσει τα 3000 mg/kg.[1]

Το αρσενικό συναντάται στην φύση με την μορφή 200 περίπου διαφορετικών ορυκτών, από τα οποία το πιο συνηθισμένο είναι ο αρσενοπυρίτης (FeAsS).[13]

Έδαφος

Η συγκέντρωση του αρσενικού στο έδαφος είναι μεγαλύτερη από αυτή που συναντάται στα πετρώματα και κυμαίνεται από 1 έως 40 mg/kg (μέση τιμή 5 mg/kg).[14,15] Οι παράγοντες που καθορίζουν τη συγκέντρωση αλλά και το είδος των ενώσεων αρσενικού στο έδαφος, είναι το κλίμα, τα οργανικά συστατικά του εδάφους, το δυναμικό οξειδοαναγωγής, το είδος του αρχικού πετρώματος, το pH και φυσικά η ανθρώπινη δραστηριότητα.[1] Η ανόργανη μορφή είναι αυτή που κυριαρχεί, με τα αρσενικικά και τα αρσενικώδη να υπερισχύουν σε αερόβιο και αναερόβιο περιβάλλον αντίστοιχα. Τα ανόργανα είδη του αρσενικού μεθυλιώνονται από μικροοργανισμούς, σχηματίζοντας, σε οξειδωτικές συνθήκες, τις ενώσεις μονομεθυλαρσονικό οξύ (MMA(V)), διμεθυλαρσενικικό οξύ (DMA(V)) και οξείδιο της τριμεθυλαρσίνης (TMAO), που φαίνονται στο Σχήμα 1.1.[16] Σε αναερόβιες συνθήκες, τα παραπάνω είδη είναι δυνατόν να αναχθούν στις πτητικές μεθυλαρσίνες.

Αξίζει να σημειωθεί ότι στο παρελθόν υπήρξε εκτεταμένη χρήση των ενώσεων MMA(V) και DMA(V) σαν εντομοκτόνα, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση αρσενικού στο έδαφος.[17]

Νερό

Το νερό αποτελεί μια από τις βασικότερες πηγές έκθεσης του ανθρώπου, αλλα και των υπόλοιπων ζωντανων οργανισμών, στο αρσενικό. Η μέγιστη επιτρεπόμενη

συγκέντρωση του στοιχείου στο πόσιμο νερό, σύμφωνα με τη νομοθεσία που ψηφίστηκε το 2001 από την EPA, είναι 10 μg/L.[12]

Το θαλάσσιο νερό περιέχει συγκεντρώσεις αρσενικού από 1 έως 8 μg/L, με κυριότερη και θερμοδυναμικά σταθερότερη μορφή το αρσενικικό ιόν. Επίσης, έχει αποδειχτεί ότι στο θαλάσσιο νερό λαμβάνει χώρα μερική βιολογική αναγωγή των As(V) σε As(III).[18] Στα γλυκά νερά, οι συγκεντρώσεις του στοιχείου εμφανίζουν μεγαλύτερο εύρος και κυμαίνονται από 1-10 μg/L (μη μολυσμένα νερά), μέχρι 100-5000 μg/L (νερά κοντά σε περιοχές με μεταλλεύματα).[19] Σε οξειδωτικές συνθήκες υπερισχύουν οι πεντασθενείς ανόργανες μορφές (H_3AsO_4, $H_2AsO_4^-$, $HAsO_4^{-2}$ και AsO_4^{-3}), ενώ σε αναγωγικές συνθήκες οι τρισθενείς (H_3AsO_4). Παρόλο που τα υπόγεια νερά δεν περιέχουν μεθυλιωμένες μορφές αρσενικού, αντιθέτως στα νερά των λιμνών, εκτός από ανόργανες μορφές (αρσενικώδη και αρσενικικά), συναντώνται και μεθυλιωμένα παράγωγα, όπως MMA(V) και DMA(V). Τέλος, το αρσενικό έχει ανιχνευτεί και στο νερό της βροχής, όπου σε μη μολυσμένες περιοχές συναντάται σε συγκεντρώσεις από 0.013 έως 0.5 μg/L.[20]

Χερσαία Φυτά

Στο παρελθόν, οι ενώσεις αρσενικού παρουσίαζαν ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών στη γεωργία, ξεκινώντας από τη χρήση τους σαν εντομοκτόνα και αποστειρωτικά εδάφους (π.χ. αρσενικώδες νάτριο).[21] Συνέπεια των εφαρμογών αυτών, ήταν η αλληλεπίδραση του στοιχείου με διάφορα χερσαία φυτά. Οι συνήθεις συγκεντρώσεις αρσενικού σε μη μολυσμένα φυτά είναι περίπου 0.2 μg/g,[22] ενώ γενικά οι συγκεντρώσεις που καταγράφονται είναι μικρότερες σε σχέση με αυτές που παρατηρούνται στο θαλάσσιο περιβάλλον. Η πιθανότητα δηλητηρίασης των ζώων, λόγω της κατανάλωσης φυτών που έχουν προσλάβει αρσενικό από το έδαφος, είναι πολύ μικρή, αφού η καταστροφή του φυτού λαμβάνει χώρα πριν η συγκέντρωση του στοιχείου φτάσει σε επίπεδα τοξικότητας.

Ζωντανοί Οργανισμοί – Άνθρωπος

Το αρσενικό είναι ένα στοιχείο το οποίο παρουσιάζει συσσωρευτικές τάσεις στους ζωντανούς ιστούς, ενώ στα θηλαστικά συσσωρεύεται κυρίως στα μαλλιά και τα νύχια. Το ανόργανο αρσενικό παρουσιάζει ιδιαίτερη συγγένεια με ιστούς πλούσιους σε κερατίνη και ιδιαίτερα με τα μαλλιά, όπου οι συγκεντρώσεις αποτελούν δείκτη της

έκθεσης στο στοιχείο. Οι τυπικές συγκεντρώσεις του αρσενικού στα μαλλιά κυμαίνονται από 0.08 έως 0.25 μg/g (συγκέντρωση 1 μg/g αποτελεί ένδειξη περίσσειας αρσενικού),[23] ενώ οι συγκεντρώσεις στα νύχια υγιών ανθρώπων είναι της τάξης των 0.34±0.25 μg/g.[24] Το συνολικό περιεχόμενο σε αρσενικό των ανθρώπινων ούρων κυμαίνεται από 5 έως 40 μg/ημέρα, ενώ συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 100 μg/ ημέρα υποδηλώνουν οξεία δηλητηρίαση από το στοιχείο.[23] Οι οργανικές ενώσεις του αρσενικού εκκρίνονται γρηγορότερα από τις ανόργανες και η πεντασθενής μορφή αποβάλλεται γρηγορότερα από την τρισθενή.[1]

1.4. ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΕΝΩΣΕΩΝ ΑΡΣΕΝΙΚΟΥ ΣΤΟ ΘΑΛΑΣΣΙΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Η κατανομή των ενώσεων αρσενικού στο θαλάσσιο περιβάλλον αποτελεί αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας, αφού είναι πλέον γνωστό ότι πολλές τροφές θαλάσσιας προέλευσης περιέχουν αυξημένες συγκεντρώσεις του στοιχείου. Όπως προαναφέρθηκε, το αρσενικό συναντάται στο θαλάσσιο νερό κυρίως με τη μορφή ανόργανων ενώσεων (αρσενικώδη και αρσενικικά). Από την άλλη, οι θαλάσσιοι οργανισμοί, ανίκανοι να αποφύγουν την έκθεση στο στοιχείο, έχουν αναπτύξει μηχανισμούς μετατροπής των τοξικών μορφών σε μη τοξικές (αποτοξίνωση), γεγονός που έχει σαν αποτέλεσμα την ύπαρξη πλήθους διαφορετικών ενώσεων αρσενικού στο θαλάσσιο οικοσύστημα. Η κατανομή αυτών των ενώσεων ποικίλει σημαντικά μεταξύ του νερού, των πετρωμάτων, των φυκών και των ζώων.

Θαλάσσιο Νερό – Θαλάσσια Πετρώματα

Η τυπική συγκέντρωση του αρσενικού στο θαλάσσιο νερό είναι 1-2 μg/L,[2] ενώ η ταυτοποίηση των επιμέρους ενώσεων του στοιχείου έγινε για πρώτη φορά το 1926 από τους Atkins και Wilson, οι οποίοι αναφέρουν σαν κυριότερες μορφές τα αρσενικώδη και αρσενικικά. Σήμερα, είναι γνωστό ότι με τις παραπάνω μορφές συνυπάρχουν και απλές μεθυλιωμένες μορφές, όπως τα MMA(V) και DMA(V).[25] Τα αρσενικικά συναντώνται στο θαλάσσιο νερό με τις μορφές AsO_4^{3-}, $HAsO_4^{2-}$ και $H_2AsO_4^-$, ενώ τα αρσενικώδη ως H_3AsO_3 και H_4AsO_4. Οι παραπάνω ενώσεις είναι δυνατόν να υποστούν βιολογική αναγωγή, μέσω της δράσης μικροοργανισμών, και

στη συνέχεια να μεθυλιωθούν σχηματίζοντας τα πεντασθενή είδη MMA(V) και DMA(V).

Οι πληροφορίες που έχουν καταγραφεί μέχρι σήμερα σχετικά με τα είδη αρσενικού που υπάρχουν στα θαλάσσια πετρώματα είναι εξαιρετικά περιορισμένες, αφού οι μέθοδοι εκχύλισης που εφαρμόζονται στην περίπτωση αυτή είναι πιθανόν να μεταβάλλουν το χημικό τύπο της ένωσης. Ο Reimer και οι συνεργάτες του,[26] αναφέρουν την ύπαρξη των οργανικών ενώσεων MMA(V), DMA(V) και TMAO σε θαλάσσια πετρώματα.

Φύκη

Η ταυτοποίηση των ενώσεων αρσενικού στα φύκη έχει εξέχουσα σημασία, αφού είναι γνωστό ότι αυτά τα είδη χρησιμοποιούνται ευρέως (π.χ. στην Αμερική) σαν συμπληρώματα διατροφής, εξαιτίας των ιχνοστοιχείων που περιέχουν. Στα φύκη (τα οποία περιέχουν αρσενικό σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 5 - 140 μg As/ g ξηρής μάζας) συναντάται η μεγαλύτερη ποικιλία οργανοαρσενικικών ενώσεων, με τα αρσενοσάκχαρα (ενώσεις αρσενικού οι οποίες περιέχουν στο μόριο τους ένα ριβοζικό δακτύλιο, Σχήμα 1.2) να αποτελούν τα κυρίαρχα είδη. Αυτή η κατηγορία οργανοαρσενικικών ενώσεων παρουσιάστηκε για πρώτη φορά σε εργασία του 1981,[27] στην οποία αναφέρεται η απομόνωση, από εκχύλισμα του καφέ φύκους (*Ecklonia radiata*), των οξοαρσενοσακχάρων DMAsSugar-Glycol και DMAsSugar-Sulfonate και ο χαρακτηρισμός τους με φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR). Το 1983, η ίδια ερευνητική ομάδα απομόνωσε (από το ίδιο φύκος) και ταυτοποίησε με NMR το σάκχαρο DMAsSugar-Phosphate,[28] ενώ στην ίδια εργασία αναφέρεται η απομόνωση υλικού τύπου λιπιδίων, το οποίο όμως δεν χαρακτηρίστηκε περαιτέρω. Σε μετέπειτα μελέτη, επιτεύχθηκε η απομόνωση τεσσάρων νέων οξοαρσενοσακχάρων, των DMAsSugar-Sulfate, DMAsSugar-AminoSulfonate, DMAsSugar-Methoxy και DMAsSugar-Mannitol, τα οποία χαρακτηρίστηκαν με NMR.[29]

Τα περισσότερα αρσενοσάκχαρα τα οποία έχουν ανιχνευτεί σε εκχυλίσματα φυκών είναι διμεθυλιωμένα παράγωγα Me_2AsO^- (Σχήμα 1.2), ενώ αυτά που συναντώνται σε μεγαλύτερη αναλογία είναι τα -Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate. Επίσης, στα φύκη έχει αναφερθεί η παρουσία του τριμεθυλιωμένου αρσενοσακχάρου TMAsSugar-Sulfate,[30] καθώς και άλλων ενώσεων, όπως το

διμεθυλαρσινοοξικό οξύ (DMAA), το διμεθυλαρσινοπροπανοϊκό οξύ (DMAP), η διμεθυλαρσινοαιθανόλη (DMAE),[31] τα DMA(V) και MMA(V) και τέλος τα As(III) και As(V).[32] Οι δομές των ενώσεων αυτών φαίνονται στο Σχήμα 1.1.

Σε πολύ πρόσφατη μελέτη η οποία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο μας, αναφέρεται για πρώτη φορά η παρουσία του αρσενοβητανίου (AsB) σε δείγμα εμπορικών και φρέσκων φυκών.[33] Επίσης, κατά τη διεξαγωγή της παρούσας διατριβής ανιχνεύτηκαν για πρώτη φορά σε φύκη τέσσερα παράγωγα μιας καινούριας κατηγορίας διμεθυλιωμένων αρσενοσακχάρων, γνωστής με την ονομασία θειοαρσενοσάκχαρα. Πρόκειται για διμεθυλιωμένα αρσενοσάκχαρα, του τύπου Me_2AsS^-, όπως φαίνεται στο Σχήμα 1.2. Συγκεκριμένα, ανιχνεύτηκαν τα σάκχαρα DMThioAsSugar-Glycol, DMThioAsSugar-Phosphate, DMThioAsSugar-Sulfonate και DMThioAsSugar-Sulfate.[34] Τέλος, σε πρόσφατη μελέτη, η οποία επίσης διεξήχθη στο εργαστήριό μας και ακολούθησε την παρούσα μελέτη,[35] αναφέρεται η παρουσία 30 οργανοαρσενικικών ενώσεων σε εμπορικά διαθέσιμα φύκη, εκ των οποίων τα σάκχαρα TMAsSugar-Phosphate, TMAsSugar-Sulfonate, DMAsSugar-Carboxyl, DMAsSugar-Adenine (Σχήμα 1.2), καθώς και το τετραμεθυλαρσενικικό ιόν (TMA), που φαίνεται στο Σχήμα 1.1, αναφέρονται για πρώτη φορά σε τέτοια δείγματα.

Θαλάσσιοι Οργανισμοί

Η ειδοταυτοποίηση των ενώσεων αρσενικού στα θαλάσσια ζώα είναι απαραίτητη για την κατανόηση των μηχανισμών βιοσυσσώρευσης και κατανομής του στοιχείου στο θαλάσσιο περιβάλλον. Το αρσενικό έχει ανιχνευτεί σε ιστούς των ζώων αυτών, με τη μορφή ανόργανων ενώσεων (αρσενικώδη και αρσενικικά), απλών μεθυλιωμένων μορφών (DMA(V), MMA(V), TMAO και TMA) και πολύπλοκων οργανικών μορίων (AsB, AsB-2, AsC, αρσενοσάκχαρα).[36,37] Η ένωση AsB (Σχήμα 1.1), ήταν η πρώτη η οποία ανιχνεύτηκε σε θαλάσσια ζώα, όταν απομονώθηκε το 1977 σε κρυσταλλική μορφή από αστακό της οικογένειας *Panulirus cygnus*,[38] ενώ αργότερα ανιχνεύτηκε και σε άλλα είδη θαλάσσιων οργανισμών.[29] Επιπλέον ενώσεις που ανιχνεύτηκαν σε θαλάσσια ζώα είναι το TMA,[39,40] καθώς επίσης και κάποια αρσενοσάκχαρα, τα οποία πιθανολογείται ότι προέρχονται από τα φύκη με τα οποία τρέφονται οι οργανισμοί αυτοί.[39,41,42] Το ανόργανο αρσενικό συναντάται σε πολύ μικρό ποσοστό στα θαλάσσια ζώα και συνήθως αντιπροσωπεύει το 2% της συνολικής συγκέντρωσης του στοιχείου.

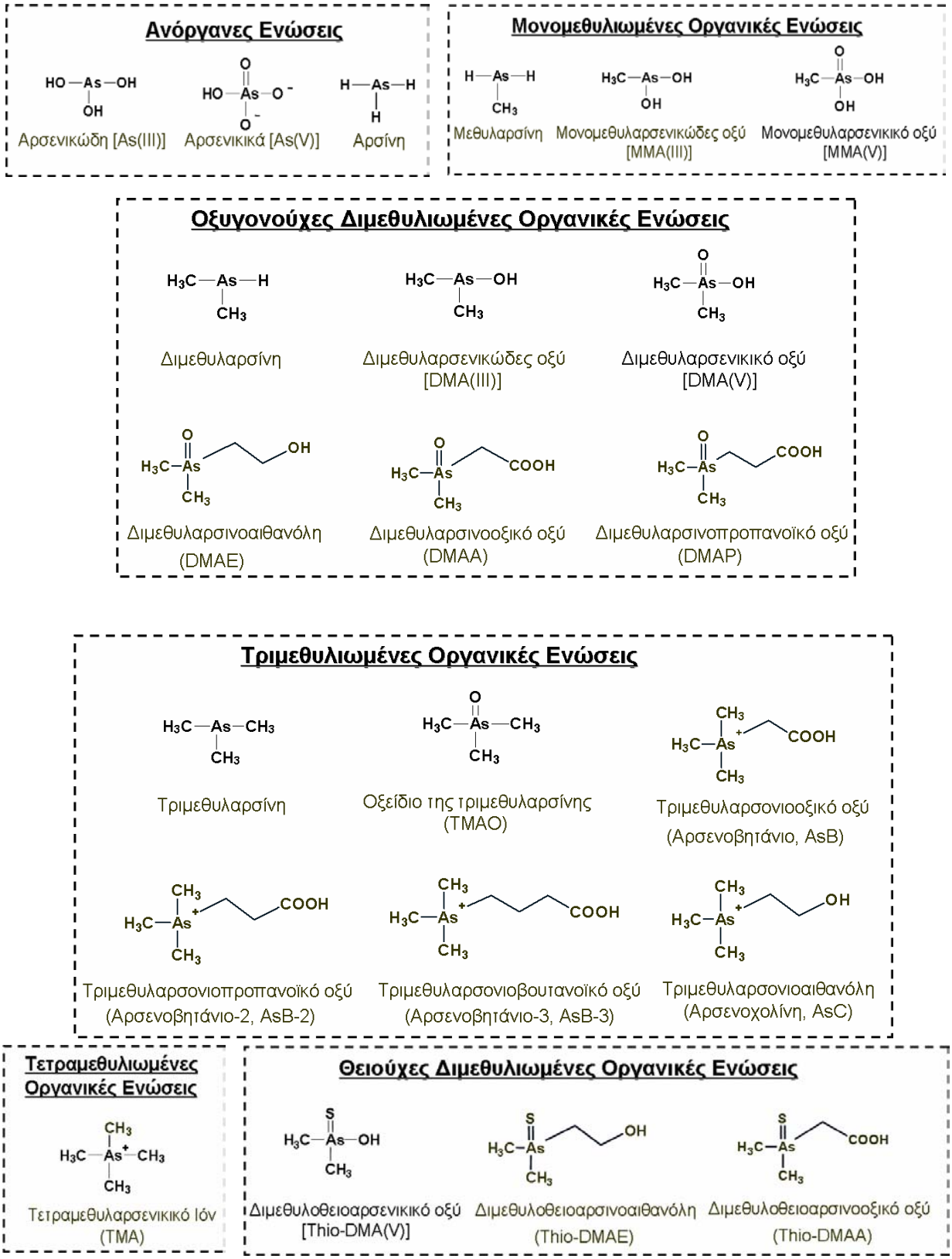
Πρόσφατα, μια καινούρια κατηγορία οργανοαρσενικικών ενώσεων, τα θειοαρσενοσάκχαρα, ανιχνεύτηκαν και χαρακτηρίστηκαν σε δείγματα οστρακοειδών. Πρωτοπόροι σε αυτή την έρευνα υπήρξαν οι Schmeisser et al, οι οποίοι το 2004 κατάφεραν για πρώτη φορά να ανιχνεύσουν και να χαρακτηρίσουν δύο ενώσεις αυτής της κατηγορίας (DMThioAsSugar-Glycol και DMThioAsSugar-Phosphate), σε κονσερβοποιημένο εμπορικό δείγμα μυδιού.[43] Ακολούθησαν παρόμοιες μελέτες (μια εκ των οποίων έγινε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας), οι οποίες, αφενός μεν επιβεβαίωσαν την ύπαρξη αυτών των δύο ενώσεων και σε άλλα είδη οστρακοειδών, αφετέρου κατάφεραν να ανιχνεύσουν και να χαρακτηρίσουν δύο επιπλέον ενώσεις της ίδιας κατηγορίας, τα θειοαρσενοσάκχαρα DMThioAsSugar-Sulfonate και DMThioAsSugar-Sulfate, χρησιμοποιώντας υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας.[34,44,45] Σε μελέτη που ακολούθησε στο εργαστήριό μας,[46] αναφέρεται για πρώτη φορά η ταυτοποίηση τριών καινούριων θειοαρσενοσακχάρων σε δείγμα οστρακοειδούς (*Tridacna derasa)*. Οι ενώσεις οι οποίες ανιχνεύτηκαν είναι τα θειοαρσενοσάκχαρα DMThioAsSugar-Carboxyl, DMThioAsSugar-Carbamate και DMThioAsSugar-Adenine (Σχήμα 1.2).

Στα Σχήματα 1.1 και 1.2 φαίνονται οι δομές των ανόργανων και οργανικών ενώσεων αρσενικού που συναντώνται σε δείγματα από το θαλάσσιο περιβάλλον. Η ονοματολογία που χρησιμοποιείται στην παρούσα εργασία για τα διμεθυλιωμένα και τριμεθυλιωμένα αρσενοσάκχαρα (συντόμευση "AsSugars"), αποτελείται από τρία επιμέρους τμήματα, ανάλογα με τη δομή:

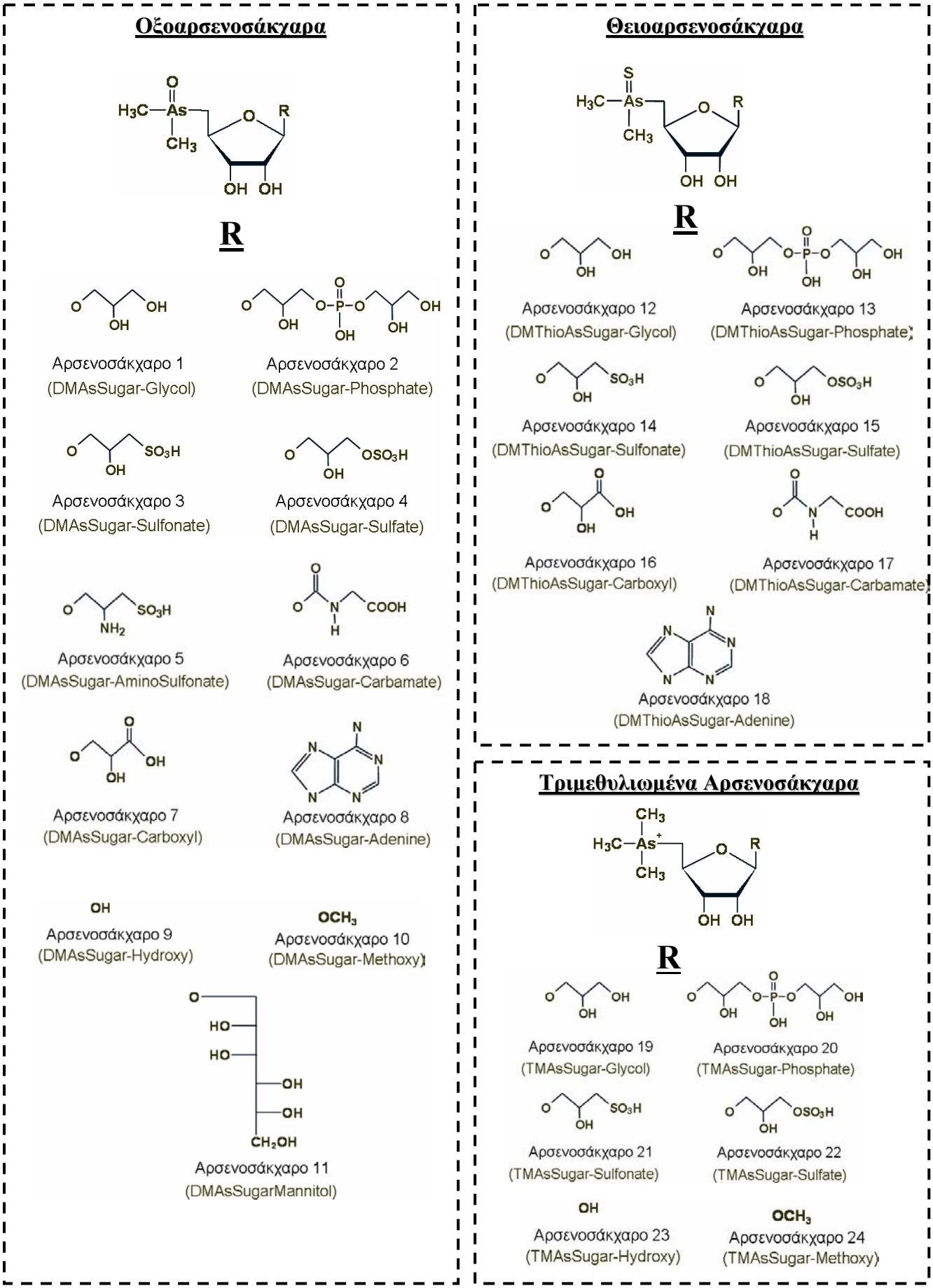
1. **Αριθμός μεθυλομάδων που συνδέονται με το άτομο του αρσενικού:**
   - ⇒ DM (Di-Methyl): όταν πρόκειται για 2 μεθυλομάδες
   - ⇒ TM (Tri-Methyl): όταν πρόκειται για 3 μεθυλομάδες
2. **Δεσμός As=O:** AsSugars (οξοαρσενοσάκχαρα)

   Δεσμός As=S: ThioAsSugars (θειοαρσενοσάκχαρα)
3. **Χαρακτηριστική ομάδα στην πλευρική αλυσίδα:**

   - Glycol, -Phosphate, -Sulfonate, -Sulfate, κ.λ.π.



Σχήμα 1.1. Ανόργανες - Οργανικές ενώσεις αρσενικού.



Σχήμα 1.2. Διμεθυλιωμένα - Τριμεθυλιωμένα Αρσενοσάκχαρα.

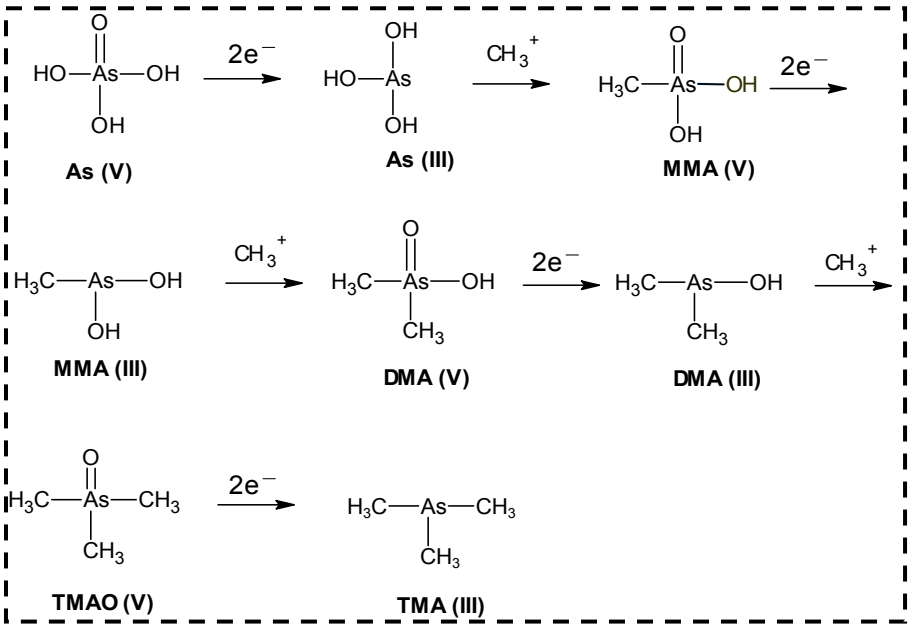
1.5. ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΡΣΕΝΙΚΟΥ

Ο άνθρωπος εκτίθεται σε ποικίλες ανόργανες και οργανικές μορφές αρσενικού, μέσω του νερού, του φαγητού και άλλων πηγών, όπως το έδαφος, ο αέρας κ.λ.π. Επίσης, το αρσενικό περιέχεται σε διάφορα φαρμακευτικά προϊόντα (Fowler solution)[47] καθώς επίσης και στο τσιγάρο,[48] ενώ οι εξαιρετικά υψηλές συγκεντρώσεις του στο νερό κάποιων χωρών (Μπαγκλαντές, Μογγολία, Ταϊβάν), ευθύνονται για καρκινογενέσεις σε ανθρώπους, οι οποίοι καταναλώνουν το νερό αυτό σε ημερήσια βάση.[49]

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες και η βιοδιαθεσιμότητα του αρσενικού εξαρτώνται από το χημικό του τύπο, επομένως η μελέτη της κινητικής και του μεταβολισμού των ενώσεων του στοιχείου στα ζώα και στον άνθρωπο είναι ιδιαίτερα πολύπλοκη. Μέχρι σήμερα, η έρευνα που έχει διεξαχθεί σχετικά με το μεταβολισμό του αρσενικού, αφορά τα πιο γνωστά είδη του στοιχείου (AsB, αρσενοσάκχαρα), που βρίσκονται σε σημαντικές συγκεντρώσεις σε διάφορες τροφές θαλάσσιας προέλευσης (οστρακοειδή, φύκη, ψάρια).

Είναι γνωστό ότι το ανόργανο αρσενικό μεθυλιώνεται στον ανθρώπινο οργανισμό (*in vivo)*, με κύρια θέση μεθυλίωσης το συκώτι. Τα σημαντικότερα προϊόντα μεθυλίωσης είναι τα DMA(V) και MMA(V), τα οποία αποβάλλονται γρήγορα με τα ούρα και χαρακτηρίζονται ως λιγότερο τοξικά από τις ανόργανες μορφές. Επομένως, η μεθυλίωση του αρσενικού θα μπορούσε να θεωρηθεί ως μια διαδικασία "αποτοξίνωσης" για τον οργανισμό, αφού οδηγεί στον σχηματισμό λιγότερο τοξικών ειδών.[50]

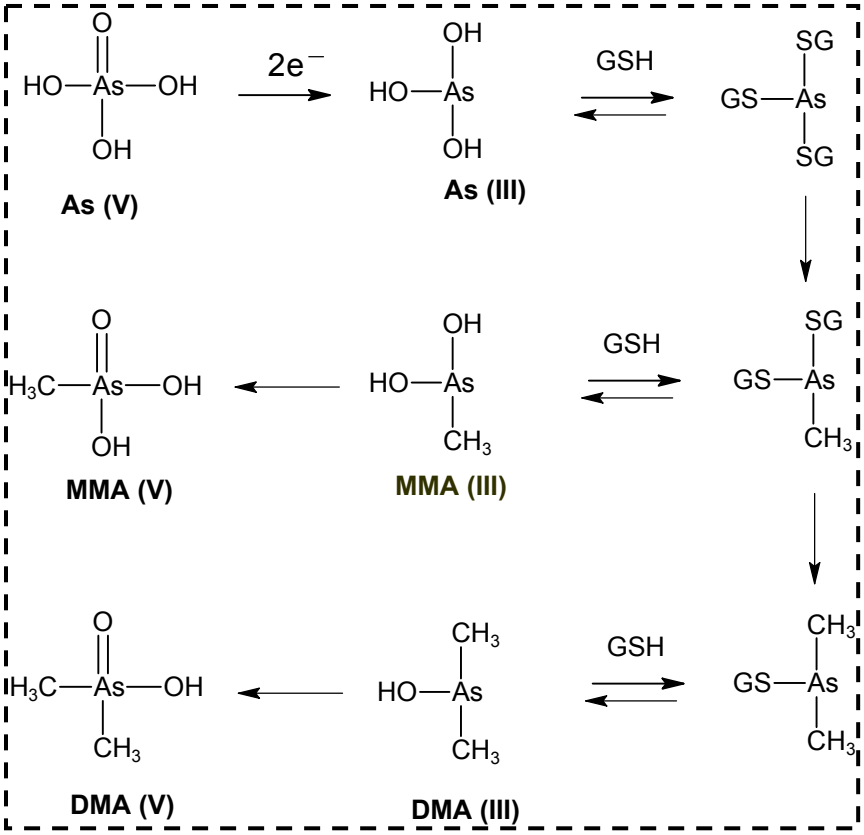
Μια πιθανή πορεία μεθυλίωσης του ανόργανου αρσενικού φαίνεται στο Σχήμα 1.3. Τα αρσενικικά είδη αρχικά ανάγονται σε αρσενικώδη (μέσω πρόσληψης ενός ζεύγους ηλεκτρονίων) και στη συνέχεια τα τελευταία οξειδώνονται, μέσω προσθήκης μιας μεθυλομάδας. Σαν δότης μεθυλομάδας δρα η ένωση θειο-αδενοσυλομεθειονίνη (S-Adenosylmethionine) και σαν αναγωγικό μέσο η γλουταθειόνη (GSH). Το σχηματιζόμενο παράγωγο MMA(V) μεθυλιώνεται περαιτέρω προς DMA(V), το οποίο αποβάλλεται αμέσως μέσω των ούρων.[51]



Σχήμα 1.3. Προτεινόμενος μηχανισμός βιομεθυλίωσης του ανόργανου αρσενικού στον οργανισμό.[51]

Ο μηχανισμός μεταβολισμού του ανόργανου αρσενικού στον ανθρώπινο οργανισμό, που φαίνεται στο Σχήμα 1.3, παρουσιάζει κάποιες αβεβαιότητες. Σύμφωνα με το μηχανισμό αυτό, τα πεντασθενή είδη MMA(V) και DMA(V) αποτελούν ενδιάμεσα προϊόντα μεθυλίωσης, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα αναλύσεων σε ούρα ανθρώπων (έπειτα από κατανάλωση ανόργανου αρσενικού), τα οποία έδειξαν σαν κύριους μεταβολίτες τις δύο παραπάνω ενώσεις.

Πρόσφατα, προτάθηκε ένα διαφορετικό μονοπάτι βιομεθυλίωσης του ανόργανου αρσενικού από τους Hayakawa et al,[52] σύμφωνα με το οποίο αρχικά σχηματίζονται σύμπλοκα του αρσενικού με τη γλουταθειόνη (As(III)-GS), τα οποία έπειτα από μεθυλίωση, μέσω της ένωσης θειο-αδενοσυλομεθειονίνη (SAM), οδηγούν στο σχηματισμό των ενώσεων MMA(III) και DMA(III). Τέλος, οι ενώσεις αυτές, έπειτα από οξείδωση (με προσθήκη H_2O_2 ή άλλου οξειδωτικού μέσου) σχηματίζουν τα τελικά προϊόντα MMA(V) και DMA(V) (Σχήμα 1.4).

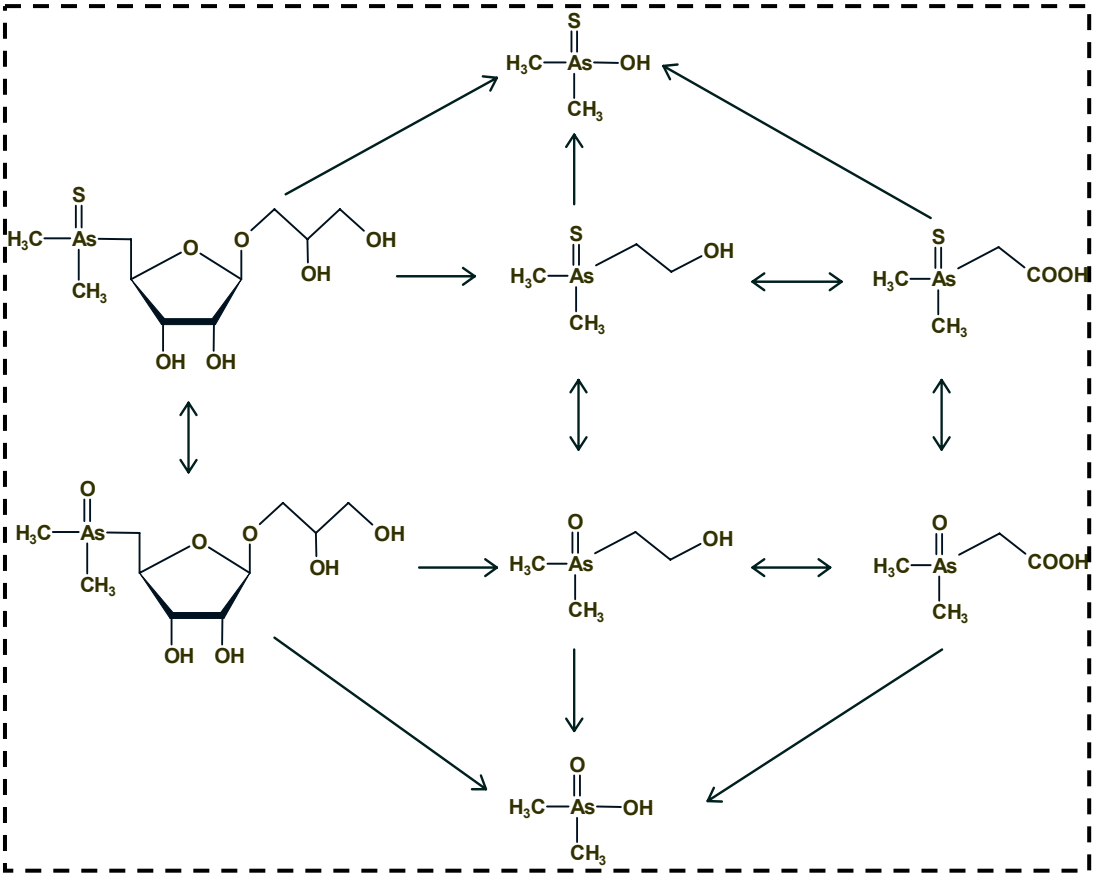


Σχήμα 1.4. Προτεινόμενος μηχανισμός βιομεθυλίωσης του ανόργανου αρσενικού στον οργανισμό.[52]

Ο παραπάνω μηχανισμός μοιάζει περισσότερο πιθανός, σε σχέση με αυτόν του Σχήματος 1.3, αφού συμφωνεί με τα αποτελέσματα των πειραματικών μετρήσεων, ωστόσο απαιτείται η επιβεβαίωση του. Ένα κρίσιμο σημείο που σχετίζεται με αυτό το μηχανισμό είναι ότι οι δομές των ενδιαμέσων προϊόντων και συγκεκριμένα των συμπλόκων As(III)-GSH δεν έχουν επιβεβαιωθεί με τις υπάρχουσες αναλυτικές μεθόδους.

Τα αρσενοσάκχαρα, τα οποία βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις σε θαλασσινά φαγητά ευρείας κατανάλωσης, παρουσιάζουν ιδιαίτερα πολύπλοκο μεταβολισμό, σε αντίθεση με το AsB το οποίο εκκρίνεται αμετάβλητο στα ούρα, αμέσως μετά την πρόσληψή του. Οι πρώτες μελέτες σχετικά με το μεταβολισμό των αρσενοσακχάρων, ανέφεραν σαν κύρια προϊόντα μεταβολισμού τα DMA(V) και DMAE.[53,54,55] Μελέτες σε πρόβατα, τα οποία τρέφονταν σχεδόν αποκλειστικά με φύκη πλούσια σε αρσενοσάκχαρα, έδειξαν την παρουσία στα ούρα των ζώων των ενώσεων DMA(V), DMAE, MMA(V), TMA, As(V) και DMAA, καθώς και των άγνωστων μέχρι τότε θειούχων οργανοαρσενικικών ενώσεων

διμεθυλοθειοαρσινοοξικό οξύ (Thio-DMAA) και διμεθυλοθειοαρσενικικό οξύ (Thio-DMA(V)), που φαίνονται στο Σχήμα 1.1.[56,57] Όσον αφορά το μεταβολισμό των αρσενοσακχάρων στον άνθρωπο, οι Raml et al,[58] αναφέρουν την παρουσία των ενώσεων DMA(V), DMAE, TMAO, DMAA, Thio-DMAA, Thio-DMAE και DMThioAsSugar-Glycol, στα ούρα εθελοντών, οι οποίοι είχαν καταναλώσει το οξοαρσενοσάκχαρο DMAsSugar-Glycol (με τη μορφή διαλύματος). Η προτεινόμενη πορεία μετατροπής του συγκεκριμένου αρσενοσακχάρου στον ανθρώπινο οργανισμό είναι η ακόλουθη:



Σχήμα 1.5. Πορεία μετατροπής του αρσενοσακχάρου DMAsSugar-Glycol στον ανθρώπινο οργανισμό.[58]

1.6. ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΑΡΣΕΝΙΚΟΥ – ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ

Η τοξικότητα του αρσενικού εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως ο χημικός τύπος, η οξειδωτική κατάσταση, η φυσική κατάσταση (στερεό, αέριο, διάλυμα), ο βαθμός απορρόφησής του από τα κύτταρα κ.λ.π.[1] Σήμερα, είναι γενικά

αποδεκτό ότι οι ανόργανες ενώσεις του στοιχείου παρουσιάζουν μεγαλύτερη τοξικότητα από τις οργανικές και ειδικότερα τα τρισθενή ανόργανα είδη είναι πιο τοξικά από τα πεντασθενή. Συγκεκριμένα, οι ενώσεις αρσενικού ακολουθούν την παρακάτω σειρά τοξικότητας: αρσίνες (-3) > ανόργανο αρσενικό (+3) > οργανικές ενώσεις (+3) > ανόργανο αρσενικό (+5) > τριμεθυλιωμένες ενώσεις > οργανικές ενώσεις (+5).

Όπως αναφέρθηκε, το ανόργανο αρσενικό μεταβολίζεται στον ανθρώπινο οργανισμό, δίνοντας σαν κύρια προϊόντα τις ενώσεις MMA(V) και DMA(V), ενώ *in vitro* μελέτες παρουσία γλουταθειόνης (GSH) απέδειξαν το σχηματισμό των συμπλόκων MMA(III)-GSH και DMA(III)-GSH, τα οποία είναι εξίσου τοξικά με την ανόργανη μορφή As(III).[59]

Η χρόνια έκθεση του ανθρώπου στο αρσενικό, προκαλεί σοβαρές επιπλοκές στην υγεία, προσβάλλωντας το γαστρεντερικό, το καρδιαγγειακό, το αναπνευστικό, το αιματοποιητικό και το νευρικό σύστημα, αλλά και ζωτικά όργανα, όπως το συκώτι. Σοβαρές ασθένειες του δέρματος έχουν επίσης αναφερθεί, με κυριότερες τη μελάνωση και τον καρκίνο του δέρματος. Οι ασθένειες αυτές εκδηλώνονται συνήθως έπειτα από 5-15 χρόνια συνεχούς έκθεσης στο στοιχείο.[60] Άλλες επιπτώσεις της χρόνιας δηλητηρίασης από το αρσενικό (αρσενίκωση), είναι ο καρκίνος των πνευμόνων και της ουροδόχου κύστης.

Στην Ταϊβάν, όπου οι κάτοικοι εκτίθενται σε υψηλές συγκεντρώσεις αρσενικού, μέσω του πόσιμου νερού, είναι ευρέως διαδεδομένη η ασθένεια του "Μαύρου Ποδιού" (Black Foot Disease), η οποία χαρακτηρίζεται από σταδιακή μείωση της κυκλοφορίας του αίματος, με τελικό σύμπτωμα την εμφάνιση γάγγραινας.[61]

1.7. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Όπως ήδη αναφέρθηκε, οι κυριότεροι παράγοντες οι οποίοι καθορίζουν την τοξικότητα και την βιοδιαθεσιμότητα του αρσενικού, είναι (εκτός από την ολική συγκέντρωση του στοιχείου) η οξειδωτική του κατάσταση και ο χημικός τύπος των ενώσεών του. Επομένως, για να εκτιμηθεί με σαφήνεια ο κίνδυνος που επιφυλλάσσει για τον άνθρωπο η έκθεση στο αρσενικό (risk assessment), απαιτείται, όχι μόνο ο

ακριβής προσδιορισμός της ολικής συγκέντρωσης έκθεσης στο στοιχείο, αλλά και η ταυτοποίηση των επιμέρους ενώσεων στις οποίες εκτίθεται ο οργανισμός.

Ο άνθρωπος εκτίθεται στο αρσενικό, κυρίως μέσω του πόσιμου νερού και των τροφών και ιδιαίτερα των τροφών θαλάσσιας προέλευσης, όπου έχουν αναφερθεί συγκεντρώσεις του στοιχείου ακόμα και τάξης μεγέθους υψηλότερες από αυτές που συναντώνται στο πόσιμο νερό αλλά και στα υπόλοιπα είδη διατροφής. Επομένως, ένα σχετικά μικρό σφάλμα κατά την ειδοταυτοποίηση του αρσενικού στις θαλασσινές τροφές, συνεπάγεται μεγάλη αβεβαιότητα στις μελέτες αποτίμησης της έκθεσης του ανθρώπου (exposure assessment) στο στοιχείο.

Από αναλυτική σκοπιά, μια πηγή αβεβαιότητας κατά τις μελέτες ειδοταυτοποίησης του αρσενικού, σχετίζεται με το κλάσμα του στοιχείου που παραμένει στο δείγμα μετά την εκχύλιση, δηλαδή με την απόδοση της εκχύλισης. Μια άλλη πολύ σημαντική πηγή αβεβαιότητας αναφέρεται στη χρωματογραφική ανάκτηση, δηλαδή στο ποσοστό του αρσενικού το οποίο εκλούεται από τη στήλη. Κάποιες ενώσεις αρσενικού είναι δυνατόν να εκχυλίζονται αποτελεσματικά από το εξεταζόμενο δείγμα, αλλά στη συνέχεια κατά την ανάλυση του εκχυλίσματος με υγρή χρωματογραφία, να κατακρατούνται στη στήλη και να μην είναι δυνατή η έκλουσή τους, υπο δεδομένες συνθήκες. Έτσι, λοιπόν, είναι δυνατόν να διαφεύγει η ανίχνευση άγνωστων ενώσεων του στοιχείου, με αποτέλεσμα να γίνονται ανακριβείς εκτιμήσεις σχετικά με τις ποσότητες και τις μορφές αρσενικού στις οποία εκτίθενται συγκεκριμένοι πληθυσμοί, μέσω των θαλασσινών τροφών. Η έκλουση, η ανίχνευση και ο χαρακτηρισμός τέτοιων ενώσεων μπορεί να συμβάλλει στην πληρέστερη κατανόηση της βιοχημείας, του μεταβολισμού και της τοξικολογικής συμπεριφοράς του αρσενικού.

Το 2004, στα πλαίσια μελέτης που πραγματοποιήθηκε από την Υπηρεσία Προστασίας Περιβάλλοντος των Η.Π.Α. (US EPA), ανακαλύφθηκε μια καινούρια ομάδα οργανοαρσενικικών ενώσεων, τα θειοαρσενοσάκχαρα. Το έναυσμα γι'αυτή την ανακάλυψη έδωσαν οι σχετικά χαμηλές χρωματογραφικές ανακτήσεις που λαμβάνονταν για το αρσενικό, κατά τις αναλύσεις εκχυλίσματος οστρακοειδών με τη μέθοδο HPLC-ICP-MS. Μάλιστα, παρατηρήθηκε ότι η αποθήκευση του εκχυλίσματος σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, για ορισμένο χρονικό διάστημα, συνέβαλε στη σταδιακή αύξηση αυτής της ανάκτησης και παράλληλα στην αύξηση της συγκέντρωσης των οξοαρσενοσακχάρων που είχαν ανιχνευτεί στο συγκεκριμένο εκχύλισμα. Σε μελέτες που ακολούθησαν ανακαλύφθηκαν τα δυο πρώτα

θειοαρσενοσάκχαρα DMThioAsSugar-Glycol και DMThioAsSugar-Phosphate, σε δείγματα θαλάσσιων οστρακοειδών.[43,44]

Οι παραπάνω ενώσεις πρέπει πλέον να λαμβάνονται υπόψη κατά τις μελέτες αποτίμησης του κινδύνου (risk assessment) που επιφυλάσσει η έκθεση στο αρσενικό, μέσω των θαλασσινών προϊόντων διατροφής, ενώ η ύπαρξή τους περιπλέκει περισσότερο το μεταβολισμό και την βιοχημεία του στοιχείου στο θαλάσσιο περιβάλλον. Όσον αφορά την προέλευσή των ενώσεων αυτών, εικάζεται ότι σχηματίζονται *in vivo* από τα αντίστοιχα οξοαρσενοσάκχαρα, που συναντώνται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα φύκη, με τα οποία τρέφονται τα θαλάσσια οστρακοειδή. Εναλλακτικά, τα θειοαρσενοσάκχαρα είναι δυνατόν να προϋπάρχουν στα φύκη και να προσλαμβάνονται αυτούσια από τα οστρακοειδή.

Όπως ήδη αναφέρθηκε στις προηγούμενες παραγράφους, το αρσενικό είναι ένα στοιχείο το οποίο παρουσιάζει ιδιαίτερη συγγένεια με το θείο. Από την άλλη, το θείο συναντάται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα βιολογικά συστήματα, με τη μορφή σουλφυδρυλικών ομάδων (-SH), με χαρακτηριστικό παράδειγμα τη γλουταθειόνη (GSH), η οποία αποτελεί την πιο άφθονη θειόλη στα κύτταρα. Ωστόσο, παρόλο που το αρσενικό δεσμεύεται σε ένα μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών που περιέχουν θείο, η ανακάλυψη των πρώτων ενώσεων As-S σε βιολογικά δείγματα έγινε μόλις πρόσφατα (2004), με την ανίχνευση και το χαρακτηρισμό αρχικά των ενώσεων Thio-DMAA και Thio-DMAE και στη συνέχεια των θειοαρσενοσακχάρων DMThioAsSugar-Glycol και DMThioAsSugar-Phosphate. Η καθυστέρηση αυτή εκτιμάται ότι οφείλεται στην αστάθεια των συγκεκριμένων ενώσεων (οξειδώνονται εύκολα προς τις αντίστοιχες οξυγονούχες ενώσεις) και ταυτόχρονα στην έλλειψη κατάλληλων χρωματογραφικών μεθόδων, που να επιτρέπουν την έκλουση τους από τη χρωματογραφική στήλη.

Η παρούσα εργασία ξεκίνησε με την υπόθεση ότι, εκτός από τα δυο πρόσφατα ανιχνεύσιμα θειοαρσενοσάκχαρα -Glycol και -Phosphate, είναι πιθανή η ύπαρξη στο περιβάλλον τουλάχιστον άλλων δυο ενώσεων αυτής της κατηγορίας, των -Sulfonate και –Sulfate (κατ'αντιστοιχία με τα οξοαρσενοσάκχαρα –Sulfonate και –Sulfate, που συναντώνται σε υψηλές συγκεντρώσεις στους θαλάσσιους οργανισμούς). Συνεπώς, σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη ευαίσθητων και εκλεκτικών μεθόδων, ικανών να ανιχνεύσουν καινούριες μορφές θειοαρσενοσακχάρων, ακόμα και αν αυτές συναντώνται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις στα δείγματα. Η ανίχνευση και ο χαρακτηρισμός των ενώσεων πραγματοποιήθηκαν με τις τεχνικές Υγρής Χρωματογραφίας (HPLC) σε συνδυασμό με Φασματομετρία Μάζας

Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος (ICP-MS) και Φασματομετρία Μάζας Ηλεκτροψεκασμού (ES-MS/MS). Η μέθοδος HPLC-ICP-MS, επιλέχθηκε λόγω της υψηλής ευαισθησίας και των χαμηλών ορίων ανίχνευσης που παρέχει, ενώ η τεχνική HPLC-ES-MS/MS, λόγω της ικανότητας της να δίνει δομικές πληροφορίες για τις υπό εξέταση ενώσεις και να συμβάλλει στο χαρακτηρισμό τους.

1.8. ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΑΡΣΕΝΙΚΟΥ ΣΕ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ - ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Η ανάγκη ταυτοποίησης των ενώσεων αρσενικού στο περιβάλλον εμφανίστηκε πριν από περίπου εκατό χρόνια, όταν διαπιστώθηκε η ύπαρξη υψηλών συγκεντρώσεων του στοιχείου σε τροφές θαλάσσιας προέλευσης. Αν και, σύμφωνα με τις πρώτες εκτιμήσεις, το αρσενικό στις τροφές αυτές βρισκόταν σε οργανική μορφή, ωστόσο, λόγω της έλλειψης διαθέσιμων αναλυτικών τεχνικών, δεν ήταν δυνατή η επιβεβαίωση της αρχικής πρόβλεψης. Για το σκοπό αυτό, αναπτύχθηκαν μέθοδοι ανίχνευσης και χαρακτηρισμού των ενώσεων του στοιχείου, οι οποίες εφαρμόστηκαν σε διάφορα είδη περιβαλλοντικών και βιολογικών δειγμάτων. Η αξιοπιστία των μεθόδων αυτών εξαρτάται από τη διαδικασία που εφαρμόζεται, τόσο κατά τη δειγματοληψία όσο και κατά την ανάλυση. Οι μεταβολές που υφίσταται το δείγμα κατά τη μεταφορά του από το πεδίο συλλογής στο εργαστήριο, είναι δυνατόν να οδηγήσουν σε μετατροπές των ενώσεων και αλλαγή της σύστασης, με συνέπεια το αποτέλεσμα της ανάλυσης να τίθεται υπό αμφισβήτηση. Επίσης, οι βέλτιστες συνθήκες αποθήκευσης, η μέγιστη χρονική περίοδος που μπορεί να αποθηκευτεί με ασφάλεια το δείγμα, καθώς και η μέθοδος εκχύλισης, είναι παράγοντες που πρέπει να εκτιμηθούν. Τέλος, ο έλεγχος της σταθερότητας των ειδών (stability test) σε διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης, κρίνεται απαραίτητος.

1.8.1. Τεχνικές Διαχωρισμού

Η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography - HPLC) αποτελεί την πιο συνηθισμένη μέθοδο διαχωρισμού των ενώσεων αρσενικού, ενώ η Αέρια Χρωματογραφία (Gas Chromatography – GC), η Χρωματογραφία Υπερκρίσιμου Υγρού (Supercritical Fluid Chromatography – SFC)

και η Ηλεκτροφόρηση Τριχοειδούς (Capillary Electrophoresis – CE) έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί αλλά σε μικρότερη έκταση.[62,63,64]

Οι κυριότεροι τύποι χρωματογραφίας HPLC που χρησιμοποιούνται σε μελέτες ειδοταυτοποίησης του αρσενικού είναι η Χρωματογραφία Ζεύγους Ιόντων, Ιονανταλλαγής και Αποκλεισμού Μεγεθών.

Χρωματογραφία Ζεύγους Ιόντων (Ion-Pair Chromatography)

Πρόκειται για έναν τύπο χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης, η οποία εφαρμόζεται σε αναλύσεις ουδέτερων αλλά και ιονισμένων μορίων. Η εκλεκτικότητα του διαχωρισμού καθορίζεται κυρίως από το είδος της κινητής φάσης, της οποίας τα δύο κύρια συστατικά είναι το ζεύγος ιόντων και ο διαλύτης (συνήθως νερό, μεθανόλη και ακετονιτρίλιο). Ο τύπος αλλά και η συγκέντρωση αυτών των δύο συστατικών μεταβάλλονται, ώστε να επιτευχθεί ο επιθυμητός διαχωρισμός. Παρόλο που ο ακριβής μηχανισμός στον οποίο βασίζεται ο διαχωρισμός δεν είναι πλήρως διευκρινισμένος, ωστόσο η επικρατέστερη θεωρία είναι αυτή του Σχηματισμού Ζεύγους Ιόντων.[65] Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, ο αναλύτης και το αντιδραστήριο ζεύγους ιόντων (ένωση μεγάλου μοριακού βάρους η οποία φέρει φορτίο αντίθετο από αυτό του αναλύτη), σχηματίζουν ένα ουδέτερο "ζεύγος" που κατανέμεται μεταξύ κινητής και στατικής φάσης. Οι χαμηλής πολικότητας στατικές φάσεις που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι υδρόφοβες αλκυλικές αλυσίδες μήκους 4, 8 ή 18 ατόμων άνθρακα (C4, C8 και C18 αντίστοιχα), χημικά δεσμευμένες σε διοξείδιο του πυριτίου (SiO_2). Το υδροξείδιο του τετραβουτυλαμμωνίου (TBAH) είναι το πιο συνηθισμένο ζεύγος κατιόντων που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των ενώσεων αρσενικού.[66,67,68] ενώ ποικίλα άλλα αντιδραστήρια έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για το σκοπό αυτό.[69,70,71,72]

Χρωματογραφία Ιονανταλλαγής (Ion-Exchange Chromatography)

Σε αυτού του είδους τη χρωματογραφία (που διακρίνεται επιμέρους σε κατιονανταλλαγής και ανιονανταλλαγής), ο μηχανισμός διαχωρισμού βασίζεται σε ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις Coulomb ανάμεσα στα ιόντα του αναλύτη και στις φορτισμένες λειτουργικές ομάδες, που βρίσκονται προσαρτημένες στο υλικό στήριξης της στήλης και φέρουν αντίθετο φορτίο από αυτό του αναλύτη.[65] Το υλικό στήριξης της στατικής φάσης αποτελείται συνήθως από πολυστυρένιο,

αιθυλοβινυλοβενζόλιο ή μέθυλακρυλικές ρητίνες. Στη χρωματογραφία κατιονανταλλαγής οι θετικά φορτισμένες ενώσεις κατακρατούνται στη στήλη, λόγω αλληλεπίδρασης με τις αρνητικά φορτισμένες λειτουργικές ομάδες (π.χ. φωσφορικό οξύ) που φέρει η στατική φάση. Αντίθετα, στη χρωματογραφία ανιονανταλλαγής, τα ανιονικά είδη είναι εκείνα που κατακρατούνται, λόγω αλληλεπίδρασης με τις θετικά φορτισμένες ομάδες της στατικής φάσης (π.χ. τεταρτοταγές αμμωνιακό κατιόν).

Σε μελέτες ειδοταυτοποίησης του αρσενικού, και τα δύο είδη χρωματογραφίας ιονανταλλαγής έχουν χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό των ειδών.[73,74,75]

Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγεθών (Size Exclusion Chromatography)

Ο μηχανισμός διαχωρισμού στη χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών βασίζεται στο μέγεθος και το σχήμα των ενώσεων. Η στατική φάση αποτελείται από πορώδη σωματίδια (π.χ. διοξείδιο του πυριτίου), ενώ στην ιδανική περίπτωση δεν υπάρχουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ του αναλύτη και της επιφάνειας της στατικής φάσης. Αυτού του είδους η χρωματογραφία εφαρμόζεται συνήθως σε αναλύσεις μακρομορίων (π.χ. πεπτίδια, πρωτεϊνες) ή για το διαχωρισμό μικρών μορίων απο πολύπλοκη μήτρα (η οποία αποτελείται από μόρια μεγάλου μεγέθους). Στην περίπτωση του αρσενικού, έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό οργανικών μορφών του στοιχείου σε διάφορους οργανισμούς.[76]

1.8.2. Ατομικές Τεχνικές Ανίχνευσης

Κατά τη διάρκεια των δεκαετιών του 1980 και 1990, οι οπτικές φασματοσκοπικές μέθοδοι, όπως η Φασματομετρία Ατομικής Απορρόφησης (Atomic Absorption Spectrometry – AAS), η Φασματομετρία Ατομικής Εκπομπής (Atomic Emission Spectrometry – AES) και η Φασματομετρία Ατομικού Φθορισμού (Atomic Fluorescence Spectrometry – AFS), άρχισαν να εφαρμόζονται ευρέως σε αναλύσεις ειδοταυτοποίησης του αρσενικού. Μετά τα μέσα της δεκαετίας του 1980, διαδόθηκε ευρέως η τεχνική της Φασματομετρίας Μάζας Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry – ICP-MS), ενώ από τα τέλη της δεκαετίας του 1990, η μοριακή φασματομετρία μάζας άρχισε να διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο σε αναλύσεις ειδοταυτοποίησης του αρσενικού περιβαλλοντικού και βιολογικού ενδιαφέροντος.

Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό του αρσενικού σε περιβαλλοντικά και βιολογικά συστήματα, πρέπει να χαρακτηρίζονται από υψηλή εκλεκτικότητα και ευαισθησία, ενώ η ταχεία ανάλυση των δειγμάτων ώστε να αποφευχθεί η μετατροπή των ειδών, αποτελεί επίσης καθοριστικό παράγοντα. Συχνά, απαιτείται ο συνδυασμός αναλυτικών τεχνικών, με σκοπό την επίτευξη υψηλής ευαισθησίας και εκλεκτικότητας.[77] Η απευθείας σύζευξη κάποιου συστήματος διαχωρισμού με το σύστημα ανίχνευσης, επιτρέπει το διαχωρισμό όλων των διαλυτών μορφών του στοιχείου και την εκλεκτική ανίχνευσή τους σε χαμηλές συγκεντρώσεις.

Όπως αναφέρθηκε, η πιο συνηθισμένη τεχνική διαχωρισμού στις αναλύσεις ειδοταυτοποίησης του αρσενικού είναι η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC). Αρχικά, οι προσπάθειες που έγιναν για τη σύζευξη της χρωματογραφίας HPLC με οπτικές φασματομετρικές μεθόδους, όπως η AAS και η AES, δε στέφθηκαν με επιτυχία, λόγω της χαμηλής ευαισθησίας των ανιχνευτών.[78] Αντίθετα, η σύζευξη συστήματος HPLC με ICP-MS (HPLC-ICP-MS), εξασφαλίζει αφενώς μεν το διαχωρισμό των ενώσεων αρσενικού, αφετέρου την υψηλή ευαισθησία και τα χαμηλά όρια ανίχνευσης που απαιτούνται για τον προσδιορισμό του στοιχείου στα πολύ χαμηλά επίπεδα συγκεντρώσεων που συναντώνται στο περιβάλλον. Παρακάτω, παρουσιάζονται συνοπτικά διάφορες αναλυτικές μέθοδοι, οι οποίες έχουν χρησιμοποιηθεί για την ειδοταυτοποίηση του αρσενικού.

Φασματομετρία Ατομικής Εκπομπής - Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος σε συνδυασμό με HPLC (HPLC-ICP-AES)

Η Φασματομετρία Ατομικής Εκπομπής με Επαγωγικά Συζευγμένο Πλάσμα (ICP-AES), χρησιμοποιεί ως μέσο διεγέρσεως των ατόμων του αναλύτη πλάσμα αργού, το οποίο έχει εξαιρετική σταθερότητα, σε αντίθεση με τις παλαιότερες τεχνικές εκπομπής τόξου και εκκενώσεως.[79] Το διάλυμα του δείγματος εισάγεται μέσα στο πλάσμα, όπου (λόγω της υψηλής θερμοκρασίας) εξαερώνεται και ατομοποιείται. Τα διεγερμένα άτομα του αναλύτη εκπέμπουν ακτινοβολία, καθώς μεταπίπτουν στην βασική ενεργειακή τους κατάσταση και στη μέτρηση αυτής της ακτινοβολίας βασίζεται η αρχή λειτουργίας της τεχνικής. Κάθε στοιχείο εκπέμπει ακτινοβολία σε συγκεκριμένο μήκος κύματος, γεγονός που επιτρέπει την ταυτοποίησή του. Η ένταση της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση του στοιχείου στο προς ανάλυση δείγμα, γεγονός που επιτρέπει την

ποσοτικοποίηση του στοιχείου.[80] Η συγκεκριμένη τεχνική έχει χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με HPLC για αναλύσεις ειδοταυτοποίησης του αρσενικού,[81,82] ωστόσο λόγω της χαμηλής ευαισθησίας της δεν είναι κατάλληλη για τον προσδιορισμό ιχνοποσοτήτων του στοιχείου.

Φασματομετρία Ατομικής Απορρόφησης σε συνδυασμό με HPLC και τεχνική σχηματισμού υδριδίων (HPLC-HG-AAS)

Η Φασματομετρία Ατομικής Απορρόφησης (AAS) βασίζεται στην απορρόφηση ακτινοβολίας χαρακτηριστικού μήκους κύματος, από τα άτομα ενός στοιχείου που βρίσκονται στην βασική ενεργειακή κατάσταση.[79] Η ατομοποίηση του προσδιοριζόμενου στοιχείου γίνεται συνήθως με φλόγα (Φλογοφασματομετρία Ατομικής Απορρόφησης – Flame Atomic Absorption Spectrometry – FAAS), ενώ η απορροφούμενη ακτινοβολία παράγεται από μια λυχνία κοίλης καθόδου (και αντιστοιχεί στην ενέργεια που απαιτείται για μια ηλεκτρονική μετάπτωση από τη θεμελιώδη σε μια διεγερμένη κατάσταση).[79]

Η τεχνική FAAS χρησιμοποιήθηκε στο παρελθόν σε συνδυασμό με HPLC για την ανίχνευση ενώσεων αρσενικού, αλλά λόγω της χαμηλής ευαισθησίας και των υψηλών επιπέδων θορύβου, η χρήση της μειώθηκε δραματικά. Η ευαισθησία της μεθόδου είναι δυνατόν να βελτιωθεί εισάγοντας σύστημα σχηματισμού υδριδίων (Hydride Generation – HG), με την προϋπόθεση βέβαια ότι οι εξεταζόμενες ενώσεις σχηματίζουν πτητικά υδρίδια.[83,84]

Φασματομετρία Ατομικής Απορρόφησης Ηλεκτροθερμικού Φούρνου Γραφίτη σε συνδυασμό με HPLC και HG (HPLC-HG-GFAAS)

Οι ηλεκτροθερμικοί ατομοποιητές παρέχουν υψηλή ευαισθησία, επειδή ολόκληρο το δείγμα ατομοποιείται σε σύντομο χρονικό διάστημα (μερικών msec ή sec). Με την τεχνική αυτή, εισάγεται δείγμα μερικών μL σε ηλεκτρικά θερμαινόμενο σωλήνα από γραφίτη, όπου μετά την απομάκρυνση του διαλύτη και την αποτέφρωση του δείγματος, η ένταση του ρεύματος αυξάνεται απότομα, προκαλώντας απότομη αύξηση της θερμοκρασίας (2000-3000°C). Το μετρούμενο μέγεθος στην περίπτωση αυτή είναι η ακτινοβολία που απορροφάται από τα ατομοποιημένα σωματίδια.[65]

Η απευθείας σύνδεση συστήματος GFAAS με HPLC αποτελεί ένα δύσκολο πρόβλημα, επειδή απαιτείται προκατεργασία του δείγματος (π.χ. ξήρανση) πριν την

εισαγωγή του στο φούρνο για ατομοποίηση. Για το λόγο αυτό, συχνά απαιτείται ο χρωματογραφικός διαχωρισμός των επιμέρους ενώσεων του δείγματος και στη συνέχεια η ανάλυσή του κάθε κλάσματος με GFAAS.[81]

Φασματομετρία Ατομικού Φθορισμού σε συνδυασμό με HPLC και HG (HPLC-HG-AFS)

Βασική αρχή της μεθόδου είναι η διέγερση των ατόμων του υπο εξέταση στοιχείου, μέσω απορρόφησης ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας από μια πηγή, που συνήθως είναι μια λυχνία εκκένωσης χωρίς ηλεκτρόδια ή σπανιότερα μια λυχνία κοίλης καθόδου. Τα διεγερμένα άτομα, κατά τη μετάπτωσή τους στην βασική ενεργειακή κατάσταση φθορίζουν, εκπέμποντας φως. Η ένταση του φθορίζοντος φωτός είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του εξεταζόμενου στοιχείου στο δείγμα. Στις αναλύσεις ειδοταυτοποίησης του αρσενικού που έχει χρησιμοποιηθεί η τεχνική σε συνδυασμό με HPLC και HG (HPLC-HG-AFS), παρατηρήθηκαν πολύ χαμηλά όρια ανίχνευσης, τα οποία σε πολλές περιπτώσεις ήταν συγκρίσιμα με αυτά της τεχνικής HPLC-ICPMS. Επίσης, με την τεχνική αυτή ήταν δυνατή η εξάλειψη του μείζονος προβλήματος των παρεμποδίσεων.[85]

Φασματομετρία Μάζας Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος (ICP-MS)

Η Φασματομετρία Μάζας Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος (ICP-MS) αναπτύχθηκε ως μια από τις σπουδαιότερες τεχνικές στοιχειακής ανάλυσης, λόγω των επιτυγχανόμενων χαμηλών ορίων ανίχνευσης για τα περισσότερα στοιχεία, του υψηλού βαθμού εκλεκτικότητας, της σχετικά καλής επαναληψιμότητας και ακρίβειας, της δυνατότητας πολυστοιχειακής ανάλυσης, της δυνατότητα μέτρησης ισοτοπικών λόγων και της ευρείας δυναμικής περιοχής.[65,86] Ωστόσο, όπως όλες οι αναλυτικές τεχνικές, παρουσιάζει κάποιους περιορισμούς ως προς τις εφαρμογές της. Πιο συγκεκριμένα, το ποσοστό των διαλυτών στερεών στο προς ανάλυση δείγμα πρέπει να ελέγχεται προσεκτικά, ώστε να μην υπερβαίνει το 0.2%, γιατί διαφορετικά λαμβάνει χώρα επικάθιση συστατικών της μήτρας στο φασματόμετρο. Συγκρινόμενη με την ICP-AES, η τεχνική ICP-MS έχει περιορισμένη δυνατότητα προσδιορισμού πολύ υψηλών συγκεντρώσεων του αναλύτη (μεγαλύτερων από μερικές εκατοντάδες mg/L). Τέλος, ένα από τα κυριότερα πλεονεκτήματα της τεχνικής, η απλότητα των

φασμάτων που παρέχει, μπορεί να λειτουργήσει εις βάρος της, κάνοντας τις φασματοσκοπικές παρεμποδίσεις δύσκολο να αποφευχθούν.

Στην τεχνική αυτή, για την ατομοποίηση και τον ιονισμό, χρησιμοποιείται πυρσός επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP). Μέχρι σήμερα, έχει αναφερθεί στην βιβλιογραφία ένας μεγάλος αριθμός αναλύσεων αρσενικού σε περιβαλλοντικά δείγματα χρησιμοποιώντας την τεχνική HPLC-ICPMS,[87,88,89,90,91,92] η οποία αποτελεί πλέον το πιο αποτελεσματικό εργαλείο στις αναλύσεις αρσενικού. Στον πίνακα που ακολουθεί, παρουσιάζονται τα όρια ανίχνευσης για το αρσενικό της τεχνικής ICP-MS, συγκρινόμενα με τα όρια ανίχνευσης των άλλων φασματομετρικών τεχνικών.

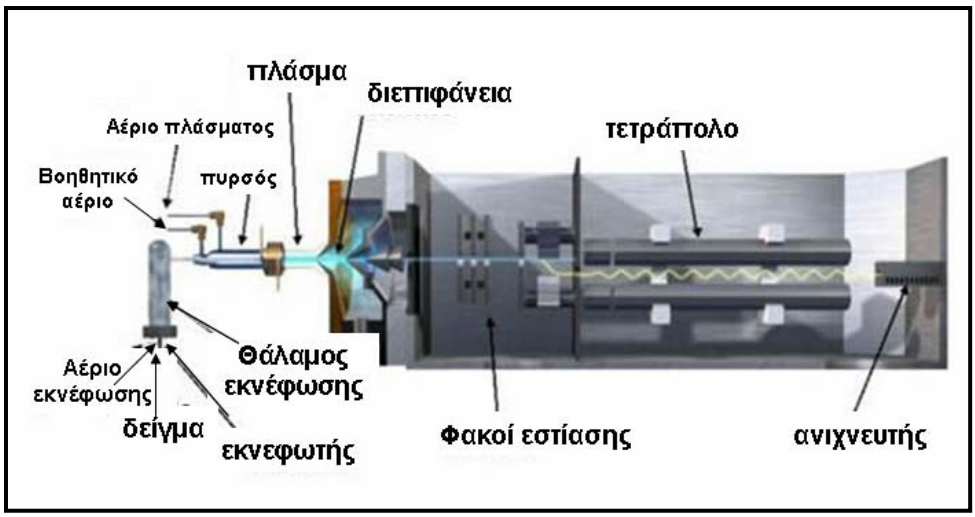
Πίνακας 1.2. Όρια ανίχνευσης για το αρσενικό φασματομετρικών μεθόδων.

Μέθοδος	FAAS	GFAA	ICP-AES	ICP-MS
Όρια Ανίχνευσης (μg/L)	150	0.05	2.0	0.0006

Η τεχνική ICP-MS χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία για αναλύσεις ταυτοποίησης νέων μορφών αρσενικού σε περιβαλλοντικά-βιολογικά δείγματα. Η αρχή λειτουργίας της τεχνικής περιγράφεται αναλυτικά στις παραγράφους που ακολουθούν.

1.9. ΑΡΧΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ICP-MS

Στο ICP-MS, το πλάσμα, που αποτελείται από ιόντα, ηλεκτρόνια και ουδέτερα μόρια, σχηματίζεται από αέριο αργό (Ar) και χρησιμοποιείται για την ατομοποίηση και τον ιονισμό του αναλύτη στο υπό εξέταση δείγμα. Τα παραγόμενα ιόντα διέρχονται μέσα από τα διάφορα τμήματα του οργάνου και καταλήγουν στον αναλυτή μάζας, όπου γίνεται ο διαχωρισμός των ισοτόπων με βάση το λόγο μάζα/φορτίο (m/z). Η ένταση μιας συγκεκριμένης κορυφής στο φάσμα μάζας, είναι ανάλογη με την ποσότητα του ισοτόπου στο δείγμα. Η οργανολογία ICP-MS αποτελείται από τρία βασικά μέρη, το σύστημα εισαγωγής του δείγματος, την πηγή ιόντων (πλάσμα αργού) και τον αναλυτή μάζας (Σχήμα 1.6).



Σχήμα 1.6. Σχηματική αναπαράσταση των βασικών τμημάτων του ICP-MS.

1.9.1. Σύστημα Εισαγωγής Δείγματος (Sample Introduction System)

Η πλειοψηφία των δειγμάτων που αναλύονται με ICP-MS, βρίσκονται σε μορφή διαλύματος. Υπάρχουν πολλοί τρόποι εισαγωγής του υγρού δείγματος στο ICP-MS και το αποτέλεσμα σε κάθε περίπτωση είναι ο σχηματισμός αερολύματος (aerosol), το οποίο ατομοποιείται και ιονίζεται μέσα στο πλάσμα. Το σύστημα εισαγωγής δείγματος (sample introduction system) αποτελεί το "αδύναμο" σημείο της τεχνικής, αφού μόνο το 1-5 % του δείγματος εισάγεται τελικά στο πλάσμα, ενώ το υπόλοιπο οδηγείται στα απόβλητα. Τα δύο βασικότερα τμήματα του συστήματος εισαγωγής δείγματος είναι ο εκνεφωτής (nebulizer), όπου γίνεται η εκνέφωση του δείγματος και ο σχηματισμός του αερολύματος και ο θάλαμος εκνέφωσης (spray chamber), όπου γίνεται ο διαχωρισμός και η διαλογή των σχηματιζόμενων σταγόνων.

Το δείγμα εισάγεται στον εκνεφωτή (τυπική ταχύτυτα ροής 1 mL/min), μέσω μιας περισταλτικής αντλίας, η οποία εξασφαλίζει σταθερή ταχύτητα ροής, ανεξάρτητα από το ιξώδες του διαλύματος. Στον εκνεφωτή, το δείγμα υπό την επίδραση ροής αερίου αργού, διασπάται σε ένα νέφος πολύ λεπτών σταγονιδίων και μετατρέπεται σε αερόλυμα. Το αερόλυμα κατόπιν οδηγείται στο θάλαμο εκνέφωσης, όπου γίνεται η διαλογή των σταγόνων, με τις μεγαλύτερες και βαρύτερες να οδηγούνται στα απόβλητα και τις μικρότερες να κατευθύνονται προς το πλάσμα. Η διαλογή των σταγόνων αποτελεί απαραίτητο στάδιο της ανάλυσης, αφού το πλάσμα δεν είναι ικανό να διασπάσει τις μεγάλες σταγόνες και επομένως μόνο οι μικρότερες

επιτρέπεται να εισέλθουν σε αυτό.[93] Ένας δευτερεύων ρόλος του θαλάμου εκνέφωσης είναι η εξομάλυνση των παλμών που δημιουργούνται κατά τη λειτουργία της περισταλτικής αντλίας.

Εκνεφωτές (Nebulizers)

Τα κυριότερα είδη εκνεφωτών που χρησιμοποιούνται στην τεχνική ICP-MS, είναι ο πνευματικός, ο θερμικός, ο υδραυλικός υψηλής πίεσης και ο εκνεφωτής υπερήχων.

Πνευματικός Εκνεφωτής (Pneumatic Nebulizer)

Ο πιο συνηθισμένος τύπος εκνεφωτή που χρησιμοποιείται στην τεχνική ICP-MS είναι ο πνευματικός εκνεφωτής (pneumatic nebulizer), ο οποίος εκμεταλλεύεται τη μηχανική δύναμη μιας ροής αερίου (πίεσης 20-30 psi) για το σχηματισμό του αερολύματος. Ανάλογα με τη γεωμετρία αλληλεπίδρασης υγρού-αερίου, οι πνευματικοί εκνεφωτές διακρίνονται σε ομόκεντρους (concentric) και διασταυρούμενης ροής (cross-flow). Συνήθως, οι εκνεφωτές είναι κατασκευασμένοι από γυαλί ή πολυμερικά υλικά (ιδιαίτερα στην περίπτωση ισχυρά διαβρωτικών δειγμάτων).

Στους ομόκεντρους εκνεφωτές (Σχήμα 1.7), το διάλυμα εισάγεται μέσω ενός τριχοειδούς σε μια περιοχή χαμηλής πίεσης, η οποία δημιουργείται από μια ταχεία ροή αερίου αργού. Η χαμηλή πίεση σε συνδυασμό με την υψηλή ταχύτητα του αερίου, έχουν ως αποτέλεσμα το σχηματισμό αερολύματος στο άκρο του εκνεφωτή. Τα πλεονεκτήματα αυτού του εκνεφωτή είναι η εξαιρετική ευαισθησία και σταθερότητα που παρέχει, ενώ χρησιμοποιείται κυρίως για την ανάλυση καθαρών δειγμάτων. Στα μειονεκτήματα του κατατάσσονται τα προβλήματα φραγμού του στομίου, που δημιουργούνται κατά την ανάλυση δειγμάτων με υψηλή περιεκτικότητα σε διαλυτά στερεά.[94]

Από την άλλη, οι εκνεφωτές διασταυρούμενης ροής (Σχήμα 1.7) χρησιμοποιούνται περισσότερο σε αναλύσεις δειγμάτων με πολύπλοκη μήτρα. Σε αυτή την περίπτωση, το αέριο αργό κατευθύνεται, υπό ορθή γωνία, στο άκρο του τριχοειδούς, σε αντίθεση με τον ομόκεντρο εκνεφωτή, όπου η ροή του αερίου είναι παράλληλη στον τριχοειδή. Το διάλυμα συνήθως διοχετεύεται στον τριχοειδή με την βοήθεια περισταλτικής αντλίας, ενώ σε άλλες περιπτώσεις κινείται λόγω της πίεσης

που δημιουργεί η ταχεία ροή αερίου. Σε κάθε περίπτωση, η επαφή ανάμεσα στο ταχείας ροής αέριο και το ρεύμα του υγρού, προκαλεί το σχηματισμό του αερολύματος. Σε αυτούς τους εκνεφωτές, η διάμετρος του τριχοειδούς είναι μεγαλύτερη (σε σχέση με τη διάμετρο του τριχοειδούς στους ομόκεντρους εκνεφωτές), με αποτέλεσμα να παρατηρούνται περιορισμένα προβλήματα φραγμού του στομίου. Από την άλλη, ένα από τα βασικότερα μειονεκτήματά τους είναι η χαμηλότερη απόδοση σχηματισμού μικρών σταγόνων, σε σχέση με τους ομόκεντρους εκνεφωτές.

Θερμικός Εκνεφωτής (Thermal Nebulizer)

Αυτός ο εκνεφωτής αποτελείται από έναν μικρής διαμέτρου σωλήνα (κατασκευασμένο από ανοξείδωτο χάλυβα), ο οποίος θερμαίνεται ηλεκτρικά, ώστε η θερμοκρασία του να είναι ίση με το σημείο ζέσεως του διαλύτη. Η εκνέφωση λαμβάνει χώρα κατά την αλληλεπίδραση της υγρής ροής του δείγματος και μιας αέριας ροής που σχηματίζεται κατά την εξάτμιση κλάσματος του διαλύτη. Το βασικό μειονέκτημα αυτού του εκνεφωτή είναι ότι δεν ανταποκρίνεται ικανοποιητικά σε όξινα διαλύματα ή διαλύματα με υψηλές συγκεντρώσεις σε άλατα.[95]

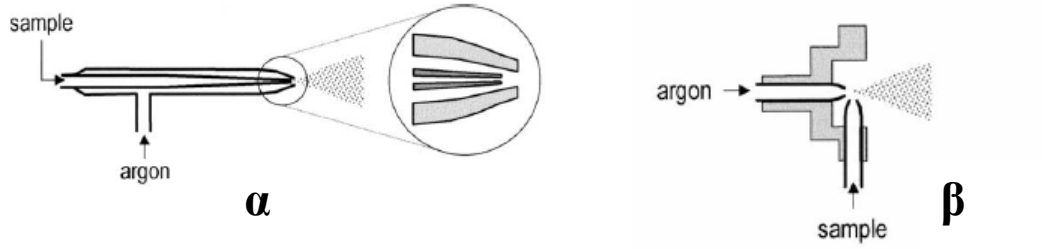
Υδραυλικός Εκνεφωτής Υψηλής Πίεσης (Hydraulic High Pressure Nebulizer)

Σε αυτή την περίπτωση, το αερόλυμα σχηματίζεται όταν μια ροή υγρού δείγματος υψηλής ταχύτητας, που εξέρχεται από μια οπή πολύ μικρής διαμέτρου (10-30 μm), προσκρούει σε μια στερεή επιφάνεια, τοποθετημένη μπροστά από το ακροφύσιο του εκνεφωτή. Παρά την ικανοποιητική αναλυτική συμπεριφορά του συγκεκριμένου εκνεφωτή, προκύπτουν σημαντικά προβλήματα λόγω φθοράς του ακροφυσίου.[95]

Εκνεφωτής Υπερήχων (Ultrasonic Nebulizer)

Στους εκνεφωτές υπερήχων, το διάλυμα του δείγματος αντλείται στην επιφάνεια ενός πιεζοηλεκτρικού μετατροπέα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, την αλληλεπίδραση μεταξύ υπερηχητικών κυμάτων και επιφάνειας υγρού δείγματος, οπότε προκύπτει το αερόλυμα.[95]

Παρακάτω απεικονίζονται σχηματικά ο ομόκεντρος εκνεφωτής και ο εκνεφωτής διασταυρούμενης ροής, που χρησιμοποιούνται περισσότερο σε εμπορικά όργανα ICP-MS.



Σχήμα 1.7. Κυριότεροι τύποι εκνεφωτών που χρησιμοποιούνται σε εμπορικά όργανα ICP-MS, (α) ομόκεκντρος εκνεφωτής (β) εκνεφωτής διασταυρούμενης ροής.[95]

Θάλαμοι Εκνέφωσης (Spray Chambers)

Οι κυριότεροι τύποι θαλάμων εκνέφωσης που χρησιμοποιούνται σε εμπορικά όργανα ICP-MS είναι οι διπλής διαδρομής και οι κυκλωνικοί. Οι θάλαμοι απλής διαδρομής χρησιμοποιούνται σε πολύ λίγες εφαρμογές και ειδικότερα σε συστήματα όπου δεν απαιτείται ισχυρός διαχωρισμός των σταγόνων του αερολύματος.

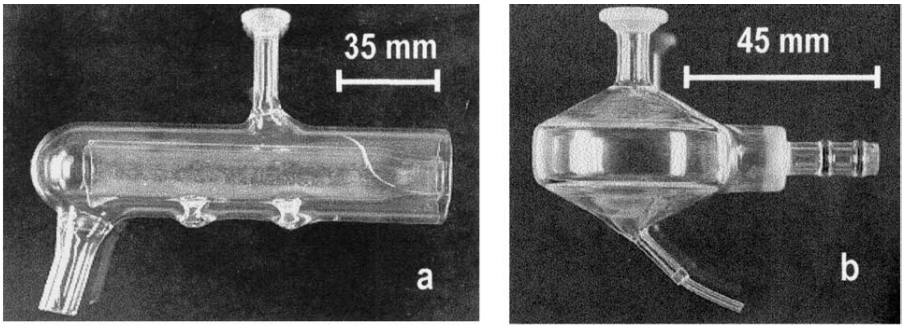
Διπλής Διαδρομής (Double-Pass)

Οι θάλαμοι εκνέφωσης αυτής της κατηγορίας (Σχήμα 1.8), που είναι και οι περισσότερο διαδεδομένοι, αποτελούνται από δύο ομόκεντρους σωλήνες. Το αερόλυμα, που έχει ήδη σχηματιστεί, εισάγεται στον εσωτερικό σωλήνα, όπου συλλέγονται οι μικρότερες σταγόνες, ενώ οι μεγαλύτερες σταγόνες εγκαταλείπουν τον αγωγό λόγω ορμής και απομακρύνονται στα απόβλητα.[95]

Κυκλωνικός (Cyclonic)

Η λειτουργία του κυκλωνικού θαλάμου εκνέφωσης (Σχήμα 1.8) βασίζεται στην ανάπτυξη φυγόκεντρου δύναμης. Αρχικά, οι σταγόνες διαχωρίζονται με βάση το μέγεθός τους, λόγω της περιδίνησης που προκαλεί η εφαπτομενική ροή αερολύματος-αερίου αργού μέσα στο θάλαμο. Οι μικρότερες σταγόνες μεταφέρονται στο πλάσμα, μέσω του αερίου ρεύματος, ενώ οι μεγαλύτερες προσκρούουν στα τοιχώματα και

απομακρύνονται από τον αγωγό αποβλήτων. Με αυτού του είδους το θάλαμο εκνέφωσης, επιτυγχάνεται μεγαλύτερη απόδοση εκνέφωσης και επομένως μεγαλύτερη ευαισθησία.[95]



Σχήμα 1.8. Κυριότεροι τύποι θαλάμων εκνέφωσης που χρησιμοποιούνται σε εμπορικά όργανα ICP-MS: (α) διπλής διαδρομής και (β) κυκλωνικός.[95]

1.9.2. Πηγή Ιόντων (Πλάσμα Αργού)

Τα κυριότερα μέρη της πηγής ιονισμού του ICP-MS είναι ο πυρσός πλάσματος (plasma torch), ένα πηνίο ραδιοσυχνοτήτων (πηνίο RF) και μια γεννήτρια ραδιοσυχνοτήτων (γεννήτρια RF).

Πυρσός Πλάσματος (Plasma Torch)

Ο πυρσός πλάσματος αποτελείται από τρεις ομόκεντρους αγωγούς, συνήθως κατασκευασμένους από χαλαζία (quartz). Οι αγωγοί αυτοί είναι γνωστοί ώς: εξωτερικός αγωγός (outer tube), ενδιάμεσος αγωγός (middle tube) και αγωγός εισαγωγής δείγματος (sample injector).[96] Μεταξύ εξωτερικού και ενδιάμεσου αγωγού διέρχεται αέριο αργό (~ 12-17 L/min), το οποίο αποτελεί το αέριο πλάσματος (plasma gas) και αφενώς μεν συμβάλλει στη διατήρηση και σταθεροποίηση του πλάσματος, αφετέρου προστατεύει τον πυρσό από την υψηλή θερμοκρασία που αναπτύσσεται στο πλάσμα. Μια δεύτερη ροή αργού (~ 1 L/min), αυτή του βοηθητικού αερίου (auxiliary gas), διέρχεται μεταξύ ενδιαμέσου αγωγού και αγωγού εισαγωγής δείγματος και είναι αυτή που κατευθύνει το πλάσμα μέσα στον πυρσό. Τέλος, μια τρίτη ροή αργού (~ 1 L/min), αυτή του αερίου εκνέφωσης (nebulizer gas), διέρχεται μέσα από τον

εκνεφωτή, με σκοπό να εισάγει το δείγμα στο κεντρικό τμήμα του πλάσματος. Σε περιπτώσεις ισχυρά διαβρωτικών δειγμάτων, ο αγωγός εισαγωγής του δείγματος είναι κατασκευασμένος από ανθεκτικά υλικά, όπως αλουμίνιο, λευκόχρυσος κ.λ.π.[96] Ο πυρσός είναι τοποθετημένος οριζόντια, στο κέντρο του πηνίου RF και σε απόσταση ~ 10-20 mm από την διεπιφάνεια πλάσματος-αναλυτή μάζας.

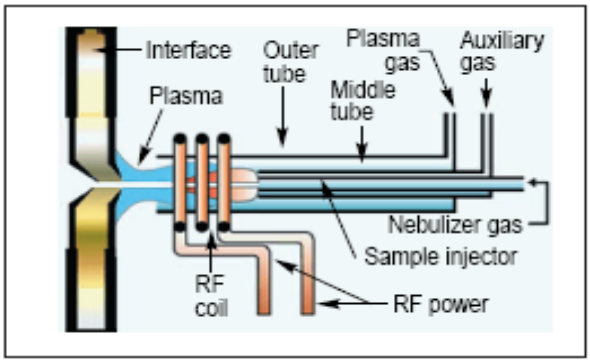
Εκκένωση Πλάσματος (Plasma Discharge)

Μια εφαπτομενική (σπειροειδής) ροή αερίου αργού κατευθύνεται ανάμεσα στον εξωτερικό και τον ενδιάμεσο αγωγό του πυρσού, ενώ το πηνίο RF το οποίο περιβάλλει το άκρο του πυρσού είναι συνδεδεμένο με μια γεννήτρια RF ισχύος ~ 750-1500 W και συχνότητας 27-40 MHz. Προκαλείται ηλεκτρική εκκένωση, η οποία έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό των πρώτων ηλεκτρονίων (seeds electrons), τα οποία απομακρύνονται από τα άτομα αργού, με συνέπεια τον ιονισμό του αργού.[97] Όταν εφαρμόζεται ισχύς RF στο πηνίο, δημιουργείται ισχυρό ηλεκτρομαγνητικό πεδίο στο άκρο του πυρσού, οπότε τα ελεύθερα ηλεκτρόνια επιταχύνονται μέσα στο πεδίο αυτό και συγκρούονται με άτομα αργού, απομακρύνοντας από αυτά επιπλέον ηλεκτρόνια. Αυτός ο "επαγώμενος ιονισμός" του αργού, ακολουθεί αλυσιδωτή αντίδραση, με αποτέλεσμα τη διάσπαση του αερίου σε άτομα, ιόντα και ηλεκτρόνια. Η μεταφορά ενέργειας που λαμβάνει χώρα κατά τη διεργασία αυτή είναι γνωστή σαν "επαγώμενη σύζευξη".

Ιονισμός Δείγματος (Sample Ionization)

Το αερόλυμα του δείγματος εισάγεται μέσα στο πλάσμα, μέσω του αγωγού εισαγωγής δείγματος, ενώ λόγω της πολύ υψηλής ταχύτητας με την οποία κινείται δημιουργεί μια οπή στο κέντρο του πλάσματος (Σχήμα 1.9). Στη συνέχεια, υφίσταται μια σειρά από φυσικές μεταβολές, ξεκινώντας από την απομάκρυνση του διαλύτη από την σταγόνα, η οποία πλέον μετατρέπεται σε ένα πολύ μικρό στερεό σωματίδιο. Ακολουθεί αεριοποίηση και ατομοποίηση του σωματιδίου μέσα στο πλάσμα, όπου τελικά, μέσω κρούσεων με τα υψηλής ενέργειας ηλεκτρόνια (και σε μικρότερο ποσοστό με τα ιόντα αργού), τα άτομα του δείγματος ιονίζονται.[98]

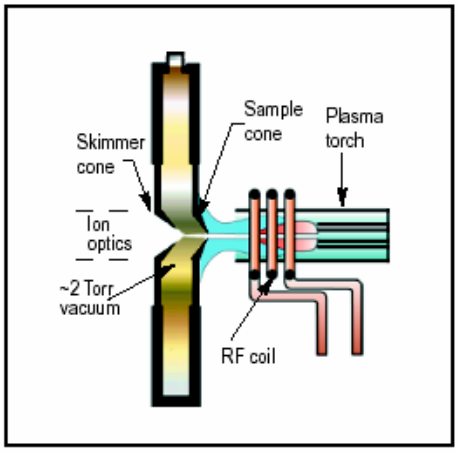
Στο σχήμα που ακολουθεί φαίνονται τα κυριότερα τμήματα από τα οποία αποτελείται η πηγή ιονισμού του ICP-MS.



Σχήμα 1.9. Σχηματική απεικόνιση της πηγής ιόντων του ICP-MS.[97]

1.9.3. Διεπιφάνεια Πλάσματος - Αναλυτή Μάζας (Interface Region)

Η περιοχή της διεπιφάνειας μεταξύ πλάσματος και αναλυτή μάζας (Σχήμα 1.10), αποτελεί ίσως το πιο κρίσιμο τμήμα του ICP-MS και το δυσκολότερο πρόβλημα που είχαν να αντιμετωπίσουν οι επιστήμονες στα πρώτα στάδια ανάπτυξης της τεχνικής. Ο ρόλος της διεπιφάνειας είναι να μεταφέρει τα σχηματιζόμενα ιόντα από το πλάσμα, όπου επικρατεί ατμοσφαιρική πίεση, στην περιοχή του φασματομέτρου μάζας, όπου επικρατεί υψηλό κενό (10^{-6} Torr). Η διεπιφάνεια αποτελείται από δύο μεταλλικούς κώνους, με πολύ μικρές οπές (orifices), μεταξύ των οποίων (με την βοήθεια μιας μηχανικής αντλίας) η πίεση διατηρείται στα 2 Torr.[99] Τα ιόντα, μετά το σχηματισμό τους στο πλάσμα, διέρχονται μέσω του πρώτου κώνου, ο οποίος ονομάζεται κώνος δειγματοληψίας (sampler cone) και έχει οπή διαμέτρου 0.8 – 1.2 mm. Στη συνέχεια, διανύοντας μια μικρή διαδρομή συναντούν το δεύτερο κώνο, τον αποκορυφωτή (skimmer cone), ο οποίος έχει οπή μικρότερης διαμέτρου από τον πρώτο (0.4-0.8 mm) και εξέρχονται από αυτόν με κατεύθυνση προς τους φακούς εστίασης. Οι κώνοι συνήθως είναι κατασκευασμένοι από νικέλιο. Παρόλο που ο λευκόχρυσος είναι υλικό με πολύ μεγαλύτερη αντοχή στη διάβρωση, χρησιμοποιείται σπάνια λόγω υψηλού κόστους. Για την αποφυγή των ανεπιθύμητων επιδράσεων που μπορεί να προκαλέσει η πολύ υψηλή θερμοκρασία του πλάσματος, η διεπιφάνεια ψύχεται με νερό ψύξης, ενώ συνήθως κατασκευάζεται από αλουμίνιο ή χαλκό.[99]

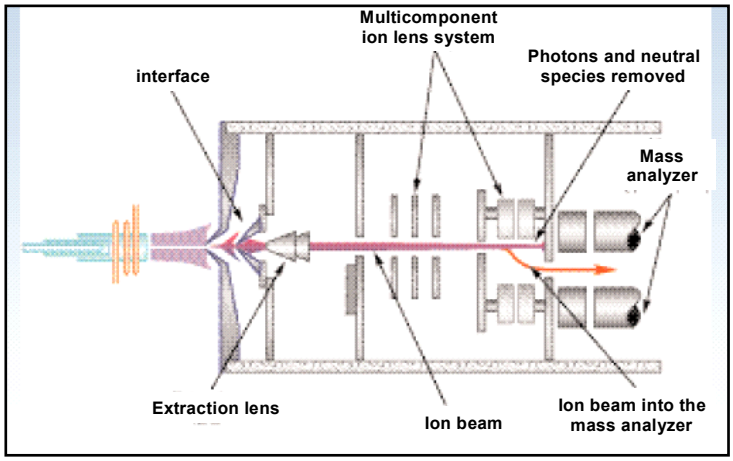


Σχήμα 1.10. Σχηματική απεικόνιση της διεπιφάνειας του ICP-MS.[99]

1.9.4. Σύστημα Εστίασης Ιόντων (Ion Focusing System)

Ο ρόλος του συστήματος εστίασης ιόντων είναι να μεταφέρει όσο το δυνατόν περισσότερα ιόντα του αναλύτη από την περιοχή ατμοσφαιρικής πίεσης του πλάσματος, στην περιοχή υψηλού κενού (~ 10^{-6} Torr) του αναλυτή μάζας. Επίσης, το σύστημα αυτό αποτρέπει την είσοδο στον αναλυτή μάζας και στον ανιχνευτή ουδέτερων μορίων, φωτονίων και συστατικών της μήτρας, τα οποία είναι δυνατόν να προκαλέσουν αστάθεια σήματος και αύξηση των επιπέδων θορύβου, επηρεάζοντας σημαντικά την απόδοση του συστήματος.[100]

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 1.11, το σύστημα εστίασης είναι τοποθετημένο μεταξύ αποκορυφωτή κώνου (skimmer cone) και αναλυτή μάζας (mass analyzer) και αποτελείται από έναν ή περισσότερους φακούς (ion lens system). Στους φακούς αυτούς, που βρίσκονται με τη μορφή μεταλλικών δίσκων, πλακιδίων ή κυλίνδρων, εφαρμόζεται υψηλό δυναμικό.[100] Η είσοδος των ουδέτερων μορίων, των φωτονίων και των συστατικών της μήτρας στο φασματόμετρο μάζας είναι δυνατόν να αποφευχθεί, τοποθετώντας ένα γειωμένο μεταλλικό δίσκο μετά τον αποκορυφωτή κώνο. Ο δίσκος αυτός επιτρέπει στη δέσμη ιόντων να φτάσει στον αναλυτή μάζας, απαγορεύοντας ταυτόχρονα στα υπόλοιπα είδη να συνεχίσουν τη διαδρομή τους προς αυτόν.[101] Εναλλακτικά, η τοποθέτηση φακών εστίασης σε ελαφρώς κεκλιμένο επίπεδο (off-axis) επιτρέπει στα ιόντα να οδηγούνται στον αναλυτή μάζας, ενώ τα ουδέτερα είδη και τα συστατικά της μήτρας εκτρέπονται από την πορεία τους και απομακρύνονται.



Σχήμα 1.11. Σχηματική απεικόνιση του συστήματος εστίασης ιόντων του ICP-MS.[100]

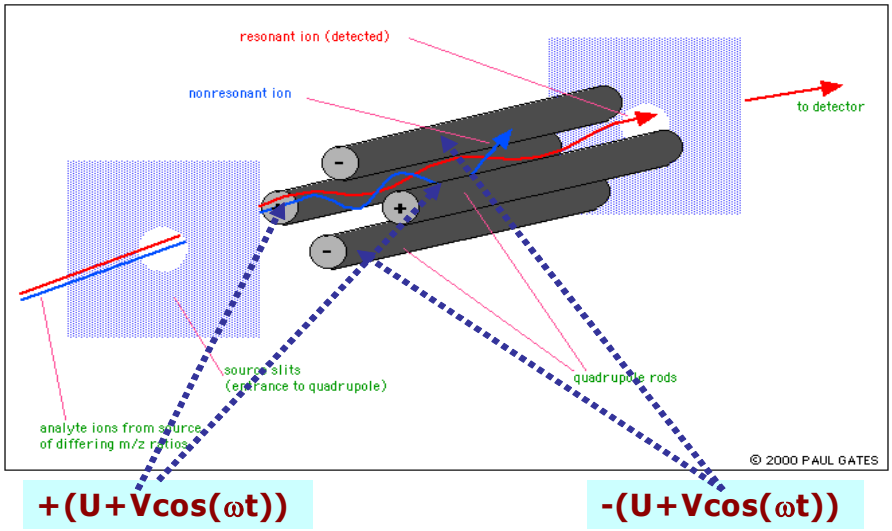
1.9.5. Αναλυτής Μάζας (Mass Analyzer)

Ο αναλυτής μάζας (mass analyzer) είναι τοποθετημένος ανάμεσα στους φακούς εστίασης και τον ανιχνευτή και η πίεση που επικρατεί σε αυτόν διατηρείται, με την βοήθεια μιας τουρμπομοριακής αντλίας (turbomolecular pump), στα 10^{-6} Torr. Καθώς τα ιόντα εξέρχονται από το σύστημα των φακών εστίασης (έχοντας την βέλτιστη κινητική ενέργεια), εισάγονται στον αναλυτή μάζας, όπου διαχωρίζονται με βάση το λόγο μάζα/φορτίο (m/z). Τρεις είναι οι κυριότεροι τύποι αναλυτών μάζας που χρησιμοποιούνται στα εμπορικά όργανα ICP-MS: το τετράπολο, οι αναλυτές διπλής εστίασης και οι αναλυτές χρόνου πτήσεως.[102] Από τους τρεις αυτούς τύπους, το τετράπολο αποτελεί τον πιο διαδεδομένο (χρησιμοποιείται στο 90% των εφαρμογών) και αρχή λειτουργίας του περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.

Αρχή Λειτουργίας Τετραπόλου (Quadrupole)

Το τετράπολο αποτελείται από τέσσερις μεταλλικές ράβδους (υπερβολικού ή κυλινδρικού σχήματος), ίδιου μήκους και ίδιας διαμέτρου (15-20 cm μήκος και ~1 cm διάμετρος), τοποθετημένες παράλληλα. Συνήθως, είναι κατασκευασμένες από ανοξείδωτο χάλυβα και μερικές φορές φέρουν επικάλυψη απο κεραμικό υλικό για προστασία από τη διάβρωση. Ανά δύο οι ράβδοι συνδέονται μεταξύ τους με τέτοιο τρόπο, ώστε να σχηματίζουν ένα ζεύγος στον άξονα X και ένα στον άξονα Y. Κάθε

ζεύγος ράβδων είναι συνδεδεμένο με μια πηγή συνεχούς (DC) και εναλλασσόμενης τάσης στην περιοχή ραδιοσυχνοτήτων (RF). Ανάλογα με το εφαρμοζόμενο ηλεκτρικό πεδίο, ιόντα συγκεκριμένου λόγου m/z διέρχονται μέσω των ράβδων και εστιάζονται στον ανιχνευτή, ενώ τα υπόλοιπα ιόντα (με διαφορετικούς λόγους m/z) εκτρέπονται από το τετράπολο.[102] Η τροχιά των ιόντων μέσω του τετραπόλου είναι ιδιαίτερα πολύπλοκη. Στο ένα ζεύγος ράβδων εφαρμόζεται δυναμικό +(U+Vcos(ωt)) και στο άλλο ζεύγος δυναμικό -(U+Vcos(ωt)). Στους παραπάνω όρους, το U αντιστοιχεί σε σταθερή συνεχή τάση και το Vcos(ωt) σε εναλλασσόμενη τάση στην περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων (RF), με πλάτος V και συχνότητα ω. Κατά μήκος του κεντρικού άξονα της διάταξης του τετραπόλου, το ηλεκτρικό πεδίο είναι μηδέν. Τα ιόντα ταλαντεύονται κατά μήκος του κατακόρυφου άξονα του τετραπόλου και με κατάλληλη επιλογή των τιμών U, V και ω, μόνο ιόντα συγκεκριμένου λόγου m/z ταλαντεύονται σταθερά, με κατεύθυνση προς τον ανιχνευτή. Όλα τα υπόλοιπα ιόντα ταλαντεύονται με μεγαλύτερο πλάτος, με αποτέλεσμα την πρόσκρουσή τους στα τοιχώματα των ράβδων και την εκτροπή τους. Πρακτικά, η συχνότητα της ταλάντωσης κυμαίνεται από 1 έως 2 MHz. Η ικανότητα του τετραπόλου να διαχωρίζει διαφορετικές μάζες, δηλαδή η διακριτική του ικανότητα (resolution), καθορίζεται από πολλούς παράγοντες, όπως το σχήμα, η διάμετρος και το μήκος των ράβδων, η συχνότητα RF, το κενό στο οποίο λειτουργεί ο αναλυτής μάζας, τα δυναμικά RF και DC, η κινητική ενέργεια των ιόντων κ.λ.π. Ωστόσο, οι μάζες που μπορούν να προσδιοριστούν με αυτού του είδους τον αναλυτή δεν υπερβαίνουν τα 4000 Da, ενώ η διακριτική του ικανότητα φτάνει μέχρι 2000.[103]

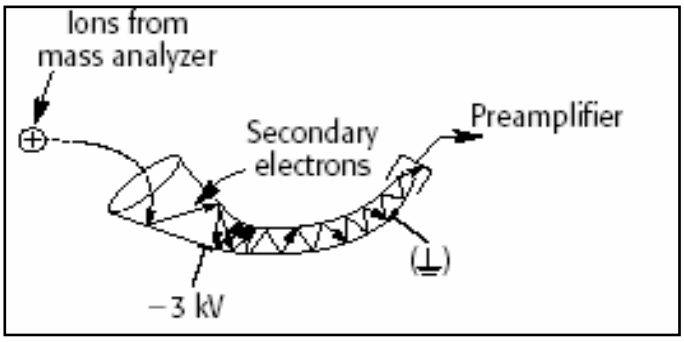


Σχήμα 1.12. Σχηματική απεικόνιση του τετραπολικού αναλυτή μαζών.[103]

1.9.6. Σύστημα Ανίχνευσης Ιόντων (Ion Detection System)

Το τελευταίο τμήμα του ICP-MS είναι ο ανιχνευτής ιόντων (ion detector), που βρίσκεται μετά τον αναλυτή μάζας. Ο πιο συνηθισμένος τύπος ανιχνευτή που χρησιμοποιείται στα εμπορικά όργανα ICP-MS, είναι ο ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής (electron multiplier).

Ο ανιχνευτής αυτού του τύπου αποτελείται από μια σειρά δυνόδων (dynodes), στις οποίες εφαρμόζονται αυξανόμενα δυναμικά. Τα ιόντα που εξέρχονται από τον αναλυτή μάζας προσκρούουν στην επιφάνεια της πρώτης δυνόδου, με αποτέλεσμα την εκπομπή ηλεκτρονίων. Αυτά τα δευτερογενή ηλεκτρόνια προσπίπτουν στη συνέχεια στη δεύτερη δύνοδο, όπου παράγονται επιπλέον ηλεκτρόνια. Η τυπική ενίσχυση του ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστή είναι 10^6, το οποίο σημαίνει ότι από την αρχική πρόσκρουση των ιόντων στην πρώτη δύνοδο παράγονται τελικά 10^6 ηλεκτρόνια στην έξοδο του ανιχνευτή. Μια τυπική διάταξη ηλεκρονιοπολλαπλασιαστή φαίνεται στο ακόλουθο σχήμα.



Σχήμα 1.13. Σχηματική απεικόνιση τυπικού ηλεκτρονιοπολλασπλασιαστή.[104]

1.10. ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΕΙΣ ΣΤΑ ΦΑΣΜΑΤΑ ΑΤΟΜΙΚΩΝ ΜΑΖΩΝ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ένα από τα πλεονεκτήματα της τεχνικής ICP-MS είναι η απλούστερη και ευκολότερη ερμηνεία των φασμάτων, σε αντίθεση με τις οπτικές φασματομετρικές μεθόδους. Όμως, στη φασματομετρία ατομικών μαζών παρουσιάζονται σοβαρά προβλήματα παρεμποδίσεων, οι οποίες διακρίνονται σε φασματοσκοπικές και μη φασματοσκοπικές.[65]

Φασματοσκοπικές Παρεμποδίσεις

Οι φασματοσκοπικές παρεμποδίσεις προκύπτουν όταν ένα ιοντικό σωματίδιο στο πλάσμα έχει τον ίδιο λόγο m/z με το ιόν του αναλύτη. Διακρίνονται οι εξής τύποι φασματοσκοπικών παρεμποδίσεων: Ισοβαρικές, Πολυατομικών Ιόντων, Διπλά Φορτισμένων Ιόντων και Ιόντων Οξειδίων.[65]

Ισοβαρικές Παρεμποδίσεις

Ισοβαρικά λέγονται τα σωματίδια που έχουν την ίδια μάζα. Στη φασματομετρία ατομικών μαζών, όταν κάνουμε λόγο για ισοβαρικά σωματίδια εννοούμε ισότοπα που διαφέρουν ως προς τη μάζα τους λιγότερο από μια μονάδα μάζας. Με όργανα πολύ υψηλής διακριτικής ικανότητας επιτυγχάνονται μικρότερες διαφορές. Συνήθως, ισοβαρικές παρεμποδίσεις παρουσιάζονται στα ισότοπα μεγαλύτερης φυσικής αφθονίας, επομένως επηρεάζουν την πιο ευαίσθητη κορυφή. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η επικάλυψη της κορυφής του πιο άφθονου ισοτόπου του νικελίου $^{58}Ni^{+}$, από το ισότοπο του σιδήρου $^{58}Fe^{+}$. Επειδή οι ισοβαρικές παρεμποδίσεις είναι προβλέψιμες από τους πίνακες φυσικής αφθονίας των ισοτόπων, μπορούν να πραγματοποιηθούν διορθώσεις με την χρήση κατάλληλου λογισμικού.

Παρεμποδίσεις Πολυατομικών Ιόντων

Ένα σοβαρότερο πρόβλημα παρεμποδίσεων δημιουργείται από διάφορα πολυατομικά ιόντα, που σχηματίζονται από αλληλεπιδράσεις μεταξύ πλάσματος και σωματιδίων της μήτρας του δείγματος ή της ατμόσφαιρας. Αυτός ο τύπος παρεμπόδισης συναντάται συχνότερα σε λόγους m/z μικρότερους από 82. Τα πιο συνηθισμένα πολυατομικά σωματίδια παρεμποδιστές είναι τα ακόλουθα: $^{40}Ar_2^{+}$, $^{40}ArH^{+}$, $^{16}O_2^{+}$, $H_2{}^{16}O^{+}$, $^{16}OH^{+}$ κ.λ.π. Μερικές από τις παραπάνω παρεμποδίσεις μπορούν να διορθωθούν με μέτρηση τυφλού διαλύματος, ενώ σε άλλες επιλέγεται ένα διαφορετικό ισότοπο του αναλύτη.

Παρεμποδίσεις από Οξείδια και Υδροξείδια

Η σοβαρότερη κατηγορία παρεμποδίσεων που συναντάται στο ICP-MS, περιλαμβάνει το σχηματισμό οξειδίων και υδροξειδίων από τον ίδιο τον αναλύτη, από τα συστατικά της μήτρας, από το διαλύτη και από τα αέρια του πλάσματος.

Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων παρεμποδίσεων είναι: η παρεμπόδιση του ισοτόπου $^{56}Fe^{+}$ από τα οξείδια $^{40}ArO^{+}$ και $^{40}CaO^{+}$, του ισοτόπου $^{59}Co^{+}$, από τα οξείδια $^{43}CaO^{+}$ και $^{42}CaOH^{+}$ κ.λ.π. Οι παρεμποδίσεις αυτής της κατηγορίας είναι δυνατόν να αντιμετωπιστούν με τη ρύθμιση ορισμένων πειραματικών παραμέτρων που επηρεάζουν το σχηματισμό οξειδίων, όπως η σύσταση των αερίων του πλάσματος, το ποσοστό και το είδος του απομακρυνόμενου διαλύτη, το μέγεθος του στομίου εισαγωγής του δείγματος, ο τρόπος εισαγωγής του δείγματος, το σύστημα φακών εστίασης κ.λ.π.[65]

Μη Φασματοσκοπικές Παρεμποδίσεις

Οι παρεμποδίσεις αυτής της κατηγορίας περιλαμβάνουν τις επιδράσεις των συστατικών της μήτρας του δείγματος και γίνονται συνήθως αντιληπτές σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 500-1000 μg/mL.[65] Στις περισσότερες περιπτώσεις παρατηρείται μείωση του σήματος του αναλύτη, αν και υπό ορισμένες συνθήκες μπορεί να παρατηρηθεί και ενίσχυση. Οι παρεμποδίσεις αυτού του τύπου είναι δυνατόν να ελαχιστοποιηθούν με αραίωση των διαλυμάτων, με αλλαγή της πορείας εισαγωγής του δείγματος ή με απομάκρυνση των συστατικών που δημιουργούν το πρόβλημα. Επίσης, οι παρεμποδίσεις είναι δυνατόν να εξουδετερωθούν με τη χρήση κατάλληλου εσωτερικού προτύπου, το οποίο πρέπει να είναι ένα στοιχείο με μάζα και δυναμικό ιονισμού παρόμοια με εκείνα του αναλύτη. Παράλληλα, το στοιχείο που χρησιμοποιείται σαν εσωτερικό πρότυπο πρέπει να είναι σπάνιο στη φύση, ώστε να ελαχιστοποιείται η πιθανότητα να υπάρχει στο εξεταζόμενο δείγμα (π.χ. ^{115}In, ^{103}Rh, ^{9}Be, ^{232}Th).

1.11. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΑΣ

Τα τελευταία χρόνια, οι μοριακές φασματομετρικές τεχνικές μάζας χρησιμοποιούνται ευρέως για την ειδοταυτοποίηση του αρσενικού σε περιβαλλοντικά και βιολογικά δείγματα, ενώ σε πολλές περιπτώσεις έχουν συμβάλλει καθοριστικά στην ανίχνευση και το χαρακτηρισμό καινούριων ενώσεων του στοιχείου.[78] Σε αντίθεση με τις ατομικές φασματομετρικές μεθόδους ανάλυσης (ICP-MS, ICP-AES, AFS, AAS), με τις οποίες επιτυγχάνεται η ανίχνευση του στοιχειακού αρσενικού, οι

μοριακές τεχνικές φασματομετρίας μάζας παρέχουν πληροφορίες σχετικά με το μοριακό τύπο της ένωσης.[77] Οι σημαντικότερες μοριακές φασματομετρικές τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί σε μελέτες ειδοταυτοποίησης του αρσενικού είναι η Φασματομετρία Μάζας Βομβαρδισμού με Ταχέα Άτομα (Fast Atom Bombardment-Mass Spectrometry – FAB-MS) και η Φασματομετρία Μάζας Ηλεκτροψεκασμού (Electrospray-Mass Spectrometry – ES-MS).[77] Στην παρούσα μελέτη, για την ειδοταυτοποίηση του αρσενικού σε βιολογικά δείγματα, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική ES-MS, η οποία περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.

1.11.1. Ιονισμός μέσω Ηλεκτροψεκασμού σε συνδυασμό με Διαδοχική Φασματομετρία Μάζας (Electrospray Ionization-Mass Spectrometry – ESI-MS)

Ιονισμός μέσω Ηλεκτροψεκασμού (Electrospray Ionization)

Παρόλο που το φαινόμενο του ηλεκτροψεκασμού ανακαλύφθηκε πριν από εκατοντάδες χρόνια, η σημασία του στην εξέλιξη της επιστήμης έγινε πλήρως κατανοητή στις αρχές του 20^{ου} αιώνα.[105] Το 1968, ο Dole και οι συνεργάτες του απέδειξαν πρώτοι τη δυνατότητα χρήσης του ηλεκτροψεκασμού σαν μέθοδο ιονισμού των μορίων, δίνοντας έτσι το έναυσμα για την ανάπτυξη της τεχνικής.[106] Η πρώτη εφαρμογή της μεθόδου έγινε το 1984, όταν η ερευνητική ομάδα του John Fenn δημοσίευσε μελέτη, όπου αναφέρεται ο ιονισμός βιολογικών μορίων μεγάλου μοριακού βάρους, χρησιμοποιώντας την τεχνική του ηλεκτροψεκασμού (Electrospray Ionization - ESI).[107] Στην εργασία του αυτή, για την οποία τιμήθηκε με μέρος του βραβείου Nobel Χημείας το 2002,[108] ο Fenn κατάφερε να αναπτύξει μια τεχνική "ήπιου ιονισμού" για ισχυρά πολικές, μη-πτητικές και θερμικά ασταθείς ενώσεις.

Σήμερα, ο ηλεκτροψεκασμός αποτελεί μια από τις πιο σημαντικές τεχνικές ιονισμού, η οποία μπορεί να συνδυαστεί τόσο με υγρή χρωματογραφία όσο και με φασματομετρία μάζας. Είναι απλή μέθοδος, η οποία διαχειρίζεται μόρια μικρού και μεγάλου μοριακού βάρους, ενώ λειτουργεί σε ατμοσφαιρική πίεση και μέτρια θερμοκρασία. Παράλληλα, με την τεχνική αυτή είναι δυνατός ο σχηματισμός πολλαπλά φορτισμένων ιόντων, φαινόμενο πολύ σημαντικό στην ανάλυση πρωτεϊνών και πεπτιδίων.

Στην πραγματικότητα, ο ηλεκτροψεκασμός δεν αποτελεί μέθοδο ιονισμού, σε αντίθεση με τον ηλεκτρονιακό και χημικό ιονισμό (Electron Ionization - EI και

Chemical Ionization - CI αντίστοιχα), όπου λαμβάνει χώρα η μετατροπή ουδέτερων μορίων σε ιόντα. Με τον ηλεκτροψεκασμό συνήθως δε δημιουργούνται ιόντα, απλά μεταφέρονται τα ήδη υπάρχοντα ιόντα του αναλύτη, από το διάλυμα στην αέρια φάση.[109] Η ανάλυση των ιόντων του αναλύτη κατευθείαν από το διάλυμα είναι καθοριστικής σημασίας, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις μη πτητικών ή θερμικά ασταθών ενώσεων (των οποίων η εξάτμισή πριν τον ιονισμό είναι αδύνατη) και συμβάλλει στη διατήρηση σημαντικών ιδιοτήτων του αναλύτη, όπως η οξειδωτική κατάσταση και ο μοριακός τύπος.[110]

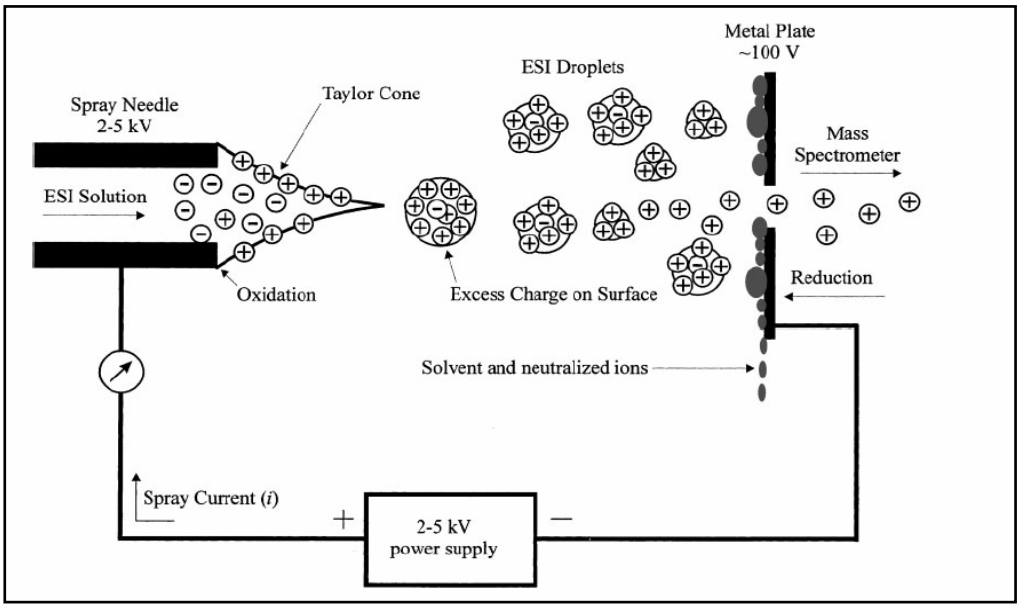
Ο μηχανισμός με τον οποίο μεταφέρονται τα ιόντα του αναλύτη από το διάλυμα στην αέρια φάση, βασίζεται σε μια ηλεκτροστατικά ελεγχόμενη διαδικασία ψεκασμού. Το αραιωμένο διάλυμα του αναλύτη αντλείται (0.1-10 μL/min) μέσω ενός τριχοειδούς από ανοξείδωτο χάλυβα (εσωτερικής διαμέτρου 100 μm), στον οποίο εφαρμόζεται υψηλό δυναμικό (2-5 kV).[111] Το δυναμικό αυτό, το οποίο μπορεί να είναι θετικό ή αρνητικό, δημιουργεί βαθμιδωτό ηλεκτρικό πεδίο, ικανό να διαχωρίσει τα φορτία ανάλογα με το πρόσημό τους και να τα συγκεντρώσει στην επιφάνεια του υγρού. Υπό την επίδραση θετικού δυναμικού, τα θετικά ιόντα είναι εκείνα τα οποία κινούνται προς την επιφάνεια, ενώ τα αρνητικά απομακρύνονται από αυτήν.[109] Το τμήμα του διαλύματος που προεξέχει από το άκρο του τριχοειδούς και φέρει περίσσεια ηλεκτρικού φορτίου, σχηματίζει τον "κώνο του Taylor" (Taylor Cone), όπως φαίνεται στο Σχήμα 1.14. Καθώς το δυναμικό αυξάνεται, το διάλυμα που σχηματίζει τον "κώνο του Taylor" υπερβαίνει το "όριο Rayleigh",[112] (το σημείο όπου η απωστική δύναμη Coulomb μεταξύ των φορτίων εξισορροπείται από την επιφανειακή τάση του υγρού), με αποτέλεσμα ο κώνος να υφίσταται σχάση και οι φορτισμένες σταγόνες να αποσπώνται από το διάλυμα.[111] Η διάμετρος των σχηματιζόμενων σταγόνων εξαρτάται από το εφαρμοζόμενο δυναμικό, την ταχύτητα ροής του διαλύματος και την φύση του διαλύτη.[113] Οι σταγόνες αυτές στη συνέχεια κατευθύνονται προς την είσοδο του αναλυτή μαζών, σχηματίζοντας φορτισμένα μόρια του αναλύτη στην αέρια φάση, με βάση έναν από τους δύο προτεινόμενους μηχανισμούς. [110,114]

Σύμφωνα με τον πρώτο μηχανισμό, που είναι γνωστός ως "Σχάση Coulomb" (Coulomb Fission), η αυξανόμενη πυκνότητα φορτίου της σταγόνας (λόγω εξάτμισης του διαλύτη, καθώς η σταγόνα διέρχεται από μια περιοχή ελαττωμένης πίεσης), έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των απωστικών δυνάμεων μεταξύ των φορτίων και τη σχάση της σταγόνας. Τα παραγόμενα σταγονίδια υφίστανται περαιτέρω συρρίκνωση-

σχάση και η διαδικασία επαναλαμβάνεται αρκετές φορές, οπότε τελικά σχηματίζονται σταγονίδια με ένα μόνο φορτίο, τα οποία, έπειτα από την εξάτμιση και των τελευταίων μορίων του διαλύτη, παράγουν τα ιόντα του αναλύτη στην αέρια φάση.[106]

Ο δεύτερος μηχανισμός, που είναι γνωστός σαν "Εξάτμιση Ιόντων" (Ion Evaporation), βασίζεται στις θεωρίες των Iribarne και Thomson.[115] Σύμφωνα με το μηχανισμό αυτό, η αυξανόμενη πυκνότητα φορτίου στη σταγόνα (λόγω εξάτμισης του διαλύτη), έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της απωστικής δύναμης Coulomb μεταξύ των φορτίων, η οποία υπερνικά την επιφανειακή τάση του υγρού, απελευθερώνοντας τελικά τα ιόντα του αναλύτη από τη σταγόνα.

Ανεξάρτητα από το μηχανισμό που λαμβάνει χώρα, η διαδικασία του ηλεκτροψεκασμού παράγει ιόντα στην αέρια φάση, τα οποία αναλύονται στο φασματόμετρο μάζας ως προς το λόγο μάζα/φορτίο (m/z). Η διαδικασία του ηλεκτροψεκασμού απεικονίζεται σχηματικά παρακάτω.

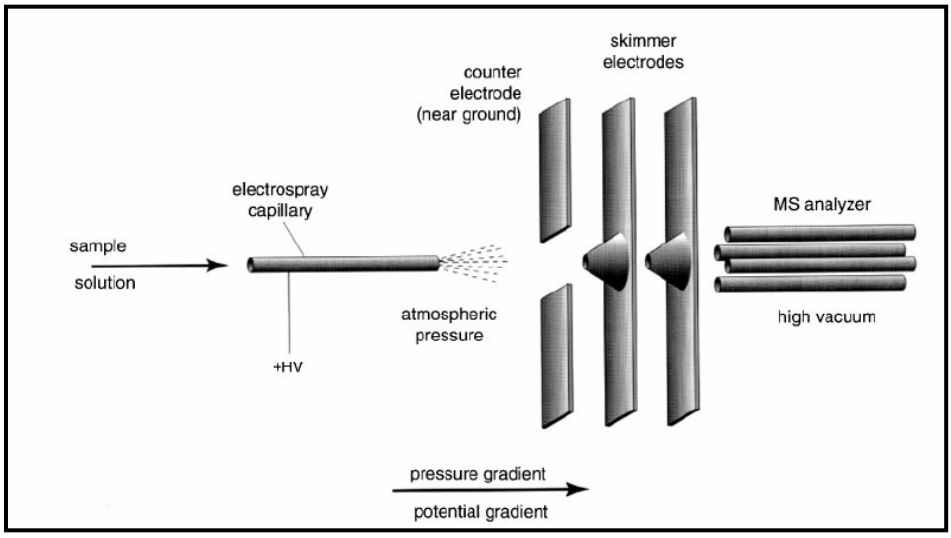


Σχήμα 1.14. Σχηματική απεικόνιση της τεχνικής ESI.

Η εκνέφωση του διαλύματος που διέρχεται από τον τριχοειδή είναι δυνατόν να διευκολυνθεί με τη χρήση ενός βοηθητικού αερίου (auxiliary gas), το οποίο επίσης συμβάλλει στην απομάκρυνση του διαλύτη από την σταγόνα.[111] Παράλληλα, μια άλλη ροή αερίου υπό πίεση (εκνεφωτικό αέριο, sheath gas) απελευθερώνεται γύρω από το άκρο του τριχοειδούς και βοηθάει στη σχάση του κώνου Taylor.

Ο ηλεκτροψεκασμός, είναι μια διεργασία η οποία λαμβάνει χώρα σε ατμοσφαιρική πίεση. Επειδή όμως ο αναλυτής μάζας λειτουργεί σε υψηλό κενό (~ 10^{-}

^{6} Torr), είναι απαραίτητη η μεταφορά των παραγόμενων αερίων ιόντων από την περιοχή ατμοσφαιρικής πίεσης στην περιοχή υψηλού κενού. Η μεταφορά αυτή γίνεται μέσω της διεπιφάνειας πηγής ιονισμού-φασματομέτρου μάζας (interface region, Σχήμα 1.15), η οποία συνήθως περιλαμβάνει ένα σύστημα άντλησης δύο σταδίων. Το αέριο, το οποίο αποτελείται από ιόντα και ουδέτερα μόρια, αρχικά διέρχεται μέσω ενός κώνου δειγματοληψίας (sampler cone), ο οποίος φέρει οπή διαμέτρου ~100 μm. Μέσω της οπής αυτής, το αέριο εκτονώνεται, καθώς μεταβαίνει από περιοχή ατμοσφαιρικής πίεσης σε περιοχή χαμηλής πίεσης (~1 Torr). Στη συνέχεια, το εκτονωθέν αέριο διέρχεται από έναν αποκορυφωτή κώνο (skimmer cone), απ'όπου τα εξερχόμενα ιόντα οδηγούνται, μέσω του συστήματος φακών εστίασης, στον αναλυτή μάζας.[110]



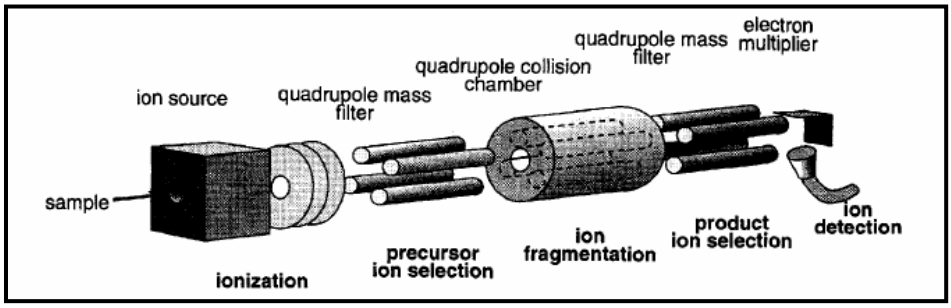
Σχήμα 1.15. Σχηματική απεικόνιση της διεπιφάνειας πηγής ιονισμού - αναλυτή μάζας στην τεχνική ESI-MS.

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

Ο ηλεκτροψεκασμός είναι μια διαδικασία η οποία παράγει ελάχιστη ή μηδενική θραυσματοποίηση, επομένως δεν παρέχει σημαντικές δομικές πληροφορίες για το χαρακτηρισμό άγνωστων ενώσεων. Για το σκοπό αυτό, στις περισσότερες εφαρμογές χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με διαδοχική φασματομετρία μάζας (Tandem Mass Spectrometry - MS/MS).

Η διαδοχική φασματομετρία μάζας περιλαμβάνει δύο στάδια ανάλυσης μάζας, επιτρέποντας τη θραυσματοποίηση προεπιλεγμένων ιόντων (πρόδρομα ιόντα – parent ions) και την ανάλυση των παραγόμενων ιόντων (προϊόντα ιόντα - product ions). Η θραυσματοποίηση των πρόδρομων ιόντων, επιτυγχάνεται μέσω επαγώμενων συγκρούσεων ιόντος-μορίου, με μια διαδικασία που είναι γνωστή ως "Επαγώμενη Διάσπαση μέσω Συγκρούσεων" (Collision Induced Dissociation – CID). Οι παραπάνω συγκρούσεις λαμβάνουν χώρα στην κυψελίδα πρόσκρουσης (collision cell), όπου το ιόν του αναλύτη συγκρούεται με τα άτομα ενός αδρανούς αερίου (αέριο πρόσκρουσης – collision gas). Συνήθως σαν αέριο πρόσκρουσης χρησιμοποιείται το αργό, ενώ ο πιο συνηθισμένος τύπος αναλυτή μάζας που συνδυάζεται με την τεχνική αυτή είναι το τετράπολο.

Στη συγκεκριμένη εργασία, χρησιμοποιήθηκε διαδοχική φασματομετρία μάζας με τρία τετράπολα (triple quadrupole), τα δύο εκ των οποίων λειτουργούν σαν αναλυτές μάζας και το τρίτο σαν κυψελίδα πρόσκρουσης. Οι τύποι σάρωσης που χρησιμοποιούνται συνήθως με αυτή την τεχνική είναι: Σάρωση Προϊόντων Ιόντων (Product Ion Scan), Σάρωση Πρόδρομων Ιόντων (Parent Ion Scan) και Παρακολούθηση Επιλεγμένων Αντιδράσεων (Selected Reaction Monitoring - SRM).[116] Όταν στο τετράπολο εφαρμόζεται μόνο δυναμικό RF, τότε αυτό λειτουργεί σαν συσκευή μεταφοράς ιόντων, ενώ όταν εφαρμόζονται ταυτόχρονα RF και DC, τότε λειτουργεί σαν αναλυτής μάζας.



Σχήμα 1.16. Σχηματική απεικόνιση αναλυτή μάζας τριών τετραπόλων.

Σάρωση Προϊόντων Ιόντων (Product Ion Scan)

Αποτελεί τον πιο συνηθισμένο τύπο σάρωσης, κατά τον οποίο τα ιόντα που σχηματίζονται στην πηγή, εισέρχονται στο πρώτο τετράπολο (Q1). Στο Q1, επιλέγονται ιόντα συγκεκριμένου λόγου m/z (πρόδρομα ιόντα), τα οποία μεταφέρονται στο δεύτερο τετράπολο (κυψελίδα πρόσκρουσης - Q2), όπου

συγκρούονται με τα άτομα του αδρανούς αερίου (αργό) και υφίσταται θραυσματοποίηση. Τα σχηματιζόμενα προϊόντα ιόντα αναλύονται στο τρίτο τετράπολο (Q3), το οποίο έχει ρυθμιστεί να σαρώνει σε μια περιοχή λόγων m/z, οπότε προκύπτει τελικά το φάσμα μάζας των προϊόντων ιόντων. Από το φάσμα αυτό είναι δυνατή η λήψη πληροφοριών σχετικά με τη δομή της πρόδρομης ένωσης (Σχήμα 1.17).

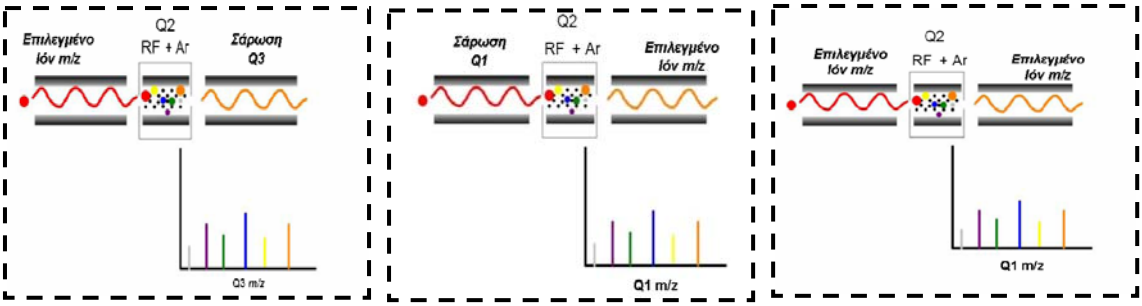
Σάρωση Πρόδρομων Ιόντων (Parent Ion Scan)

Στη σάρωση πρόδρομων ιόντων, το δεύτερο φασματόμετρο μάζας (Q3) ρυθμίζεται ώστε να επιτρέπει τη διέλευση μόνο ιόντων με συγκεκριμένους λόγους m/z, ενώ στο φασματόμετρο Q1, λαμβάνει χώρα σάρωση σε μια περιοχή λόγων m/z. Τα ιόντα τα οποία διέρχονται από το Q1, ανιχνεύονται, αν και μόνο αν, έπειτα από τη θραυσματοποίησή τους στην κυψελίδα πρόσκρουσης, οδηγούν στο σχηματισμό του προεπιλεγμένου προϊόντος ιόντος. Αυτό το προϊόν ιόν, είναι το μοναδικό το οποίο μεταφέρεται στον ανιχνευτή από τον αναλυτή μάζας Q3 (Σχήμα 1.17).

Παρακολούθηση Επιλεγμένων Αντιδράσεων (Selected Reaction Monitoring - SRM)

Σε αυτό τον τύπο σάρωσης (Σχήμα 1.17), παρακολουθείται περιορισμένος αριθμός πρόδρομων και προϊόντων ιόντων. Συγκεκριμένα, στο πρώτο τετράπολο (Q1) επιλέγεται ένα πρόδρομο ιόν, το οποίο στη συνέχεια οδηγείται στην κυψελίδα πρόσκρουσης (Q2) και θραυσματοποιείται. Στο τρίτο τετράπολο (Q3) παρακολουθούνται συγκεκριμένα προϊόντα ιόντα (συνήθως ένα ή δύο), αυτά με τη μεγαλύτερη ένταση. Με τη μέθοδο SRM, επιτυγχάνεται ταχεία ανάλυση συστατικών, τα οποία συναντώνται σε πολύπλοκες μήτρες, σε ιχνοποσότητες. Πρόκειται για μια πολύ εκλεκτική μέθοδο, με την οποία οι φασματοσκοπικές παρεμποδίσεις από τα συστατικά της μήτρας περιορίζονται στο ελάχιστο.

Στο σχήμα που ακολουθεί απεικονίζονται η μέθοδος Σάρωσης Προϊόντων Ιόντων, η μέθοδος Σάρωσης Πρόδρομων Ιόντων και η μέθοδος Παρακολούθησης Επιλεγμένων Αντιδράσεων (SRM)



Σχήμα 1.17. Σχηματική απεικόνιση (α) Σάρωσης Προϊόντων Ιόντων, (β) Σάρωσης Πρόδρομων Ιόντων και (γ) Παρακολούθησης Επιλεγμένων Αντιδράσεων.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Όπως ήδη αναφέρθηκε στο Θεωρητικό Μέρος της παρούσας εργασίας, η υψηλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα, τα χαμηλά όρια ανίχνευσης και ο μικρός χρόνος ανάλυσης της τεχνικής ICP-MS, την καθιστούν κατάλληλη για αναλύσεις ειδοταυτοποίησης και ολικού προσδιορισμού του αρσενικού, σε περιβαλλοντικά και βιολογικά δείγματα. Ταυτόχρονα, ένα άλλο βασικό πλεονέκτημα της τεχνικής αυτής σχετίζεται με την ελάχιστη ποσότητα αλλά και την ελάχιστη προεπεξεργασία του δείγματος που απαιτεί η ανάλυση. Από την άλλη, η μοριακή φασματομετρική τεχνική ES-MS/MS, λόγω της ικανότητας της να παρέχει δομικές πληροφορίες, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το χαρακτηρισμό καινούριων ενώσεων του στοιχείου. Όσον αφορά το διαχωρισμό των ενώσεων αρσενικού, η τεχνική που εφαρμόζεται συνήθως είναι η χρωματογραφία HPLC. Εκτιμώντας λοιπόν όσα προαναφέρθηκαν, αποφασίστηκε η εφαρμογή, στην παρούσα μελέτη, των συνδυασμένων τεχνικών HPLC-ICP-MS και HPLC-ES-MS/MS, για την ειδοταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό του αρσενικού σε δείγματα βιολογικής προέλευσης.

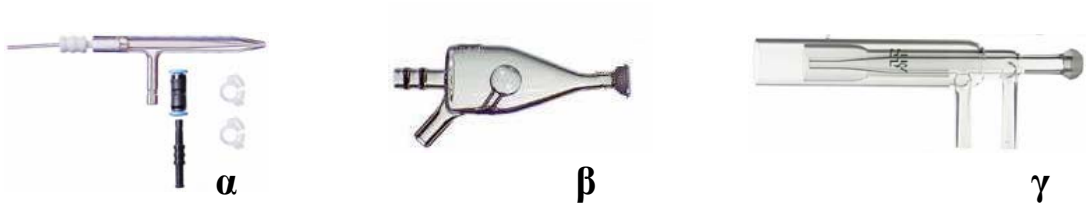
2.1. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

2.1.1. Φασματομετρία Μάζας Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος σε συνδυασμό με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC – ICP-MS)

ICP-MS

Για την ανίχνευση των ενώσεων αρσενικού στη συγκεκριμένη ερευνητική εργασία, χρησιμοποιήθηκε φασματόμετρο μάζας X Series ICP-MS (Thermo Electron Corporation, Winsford, UK), με τετραπολικό αναλυτή μαζών. Το όργανο είναι εξοπλισμένο με ομόκεντρο πνευματικό εκνεφωτή από χαλαζία και θάλαμο εκνέφωσης από γυαλί (impact bead), στον οποίο γίνεται η διαλογή των σταγόνων του αερολύματος, έτσι ώστε μέρος αυτών να οδηγείται στο πλάσμα και οι υπόλοιπες να απομακρύνονται στα απόβλητα. Η εισαγωγή του δείγματος στον εκνεφωτή γίνεται με την βοήθεια περισταλτικής αντλίας (ταχύτητα ροής ~ 0.8 mL/min), ενώ οι αγωγοί εισαγωγής δείγματος και αποβλήτων είναι κατασκευασμένοι από ειδικό πολυμερές

(tygon) και έχουν εσωτερική διάμετρο 0.508 mm και 1.422 mm αντίστοιχα. Ο πυρσός πλάσματος είναι από χαλαζία και φέρει στο άκρο του ένα γειωμένο μεταλλικό περίβλημα (shield), με σκοπό την βελτίωση της ευαισθησίας της τεχνικής. Ο αγωγός εισαγωγής δείγματος του πυρσού αυτού, έχει εσωτερική διάμετρο 1.5 mm. Στο Σχήμα 2.1 παρουσιάζονται ο εκνεφωτής, ο θάλαμος εκνέφωσης και ο πυρσός πλάσματος που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.



Σχήμα 2.1. Σχηματική απεικόνιση (α) εκνεφωτή (β) θαλάμου εκνέφωσης (γ) πυρσού πλάσματος της διάταξης ICP-MS.

Η περιοχή της διεπιφάνειας μεταξύ πλάσματος και αναλυτή μάζας αποτελείται από τον κώνο δειγματοληψίας (sampler cone) και τον αποκορυφωτή κώνο (skimmer cone), που φαίνονται στο Σχήμα 2.2. Και οι δύο είναι κατασκευασμένοι από νικέλιο, και έχουν οπές διαμέτρου 1.0 mm και 0.75 mm (για τον κώνο δειγματοληψίας και τον αποκορυφωτή κώνο αντίστοιχα).

Σχήμα 2.2. Σχηματική απεικόνιση (α) κώνου δειγματοληψίας (β) αποκορυφωτή κώνου της διάταξης ICP-MS.

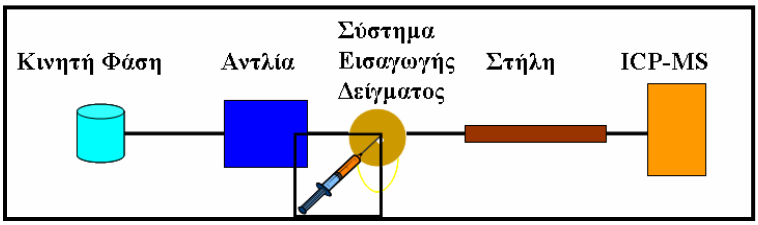
HPLC

Το σύστημα HPLC που χρησιμοποιήθηκε, περιλαμβάνει τα ακόλουθα τμήματα:

- ✓ Σύστημα παροχής της κινητής φάσης, αποτελούμενο από μια αντλία για ισοκρατική έκλουση (Marathon, Rigas Labs, Thessaloniki), με μέγιστη επιτρεπόμενη πίεση 6000 psi.
- ✓ Σύστημα εισαγωγής του δείγματος (injector), αποτελούμενο από μια περιστρεφόμενη βαλβίδα υψηλής πιέσεως έξι εισόδων, με βρόχο εισαγωγής δείγματος (loop) όγκου 50 μL.
- ✓ Χρωματογραφική στήλη.

Σε όλα τα τμήματα του συστήματος HPLC, χρησιμοποιήθηκαν σωληνώσεις εσωτερικής διαμέτρου 0.01 in, από ειδικό πολυμερικό υλικό PEEK (Polyetheretherketone).

Για να επιτευχθεί ο επιθυμητός διαχωρισμός των ενώσεων αρσενικού δοκιμάστηκαν διάφορες χρωματογραφικές μέθοδοι, από τις οποίες καταλληλότερη αποδείχτηκε η χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, με στήλη C18 και αντιδραστήριο ιοντικού ζεύγους υδροξείδιο του τετραβουτυλαμμωνίου (TBAH). Το υλικό πλήρωσης της στήλης αποτελείται από πορώδη σωματίδια silica gel (μεγέθους 5 μm), στα οποία βρίσκονται συνδεδεμένες αλειφατικές αλυσίδες 18 ατόμων άνθρακα. Πριν την κύρια στήλη, τοποθετήθηκε προστήλη αντίστροφης φάσης C18, ενώ η βέλτιστη σύσταση της κινητής φάσης ήταν 5 mM TBAH, σε υδατικό διάλυμα περιεκτικότητας σε μεθανόλη 5% κ.ο. και pH 7.5 (το οποίο ρυθμίστηκε με την προσθήκη μαλονικού οξέος). Αναλυτικά, η μεθοδολογία HPLC-ICP-MS περιγράφεται στο κεφάλαιο "Αποτελέσματα – Συζήτηση". Στο σχήμα που ακολουθεί φαίνεται ένα τυπικό σύστημα διαχωρισμού HPLC συνδεδεμένο με ανιχνευτή ICP-MS.



Σχήμα 2.3. Βασικά τμήματα πειραματικής διάταξης HPLC-ICP-MS.

Όπως φαίνεται στο παραπάνω σχήμα, το δείγμα εισάγεται με την βοήθεια μιας σύριγγας μικρολίτρων (injection) στον βρόχο, ο οποίος είναι προσαρτημένος στην περιστρεφόμενη βαλβίδα. Η κινητή φάση διέρχεται μέσα από τον βρόχο, συμπαρασύρει το δείγμα και το οδηγεί στη στήλη, όπου λαμβάνει χώρα ο διαχωρισμός των ενώσεων. Η κάθε ένωση, ανάλογα με τα χαρακτηριστικά της, εκλούεται από τη στήλη σε διαφορετικό χρόνο και οδηγείται στο ICP-MS, όπου παρακολουθούνται τα ιόντα με λόγους m/z 75 (As) και m/z 77 (πολυατομικά ιόντα $ArCl^+$ που υποδηλώνουν παρεμπόδιση λόγω ύπαρξης χλωρίου).

2.1.2. Διαδοχική Φασματομετρία Μάζας Ηλεκτροψεκασμού σε συνδυασμό με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC – ES-MS/MS)

ES-MS/MS

Για τις αναλύσεις ES-MS/MS που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε φασματόμετρο μάζας TSQ Quantum (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA), εξοπλισμένο με τρία τετράπολα. Εφαρμόστηκε η μέθοδος ανίχνευσης θετικών ιόντων (positive ion mode), ενώ οι βέλτιστες παράμετροι λειτουργίας του οργάνου παρουσιάζονται στο κεφάλαιο "Αποτελέσματα - Συζήτηση". Τέλος, χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι Σάρωσης Προϊόντων Ιόντων (Product Ion Scan) και Παρακολούθησης Επιλεγμένων Αντιδράσεων (SRM), που περιγράφονται στο Θεωρητικό Μέρος της εργασίας.

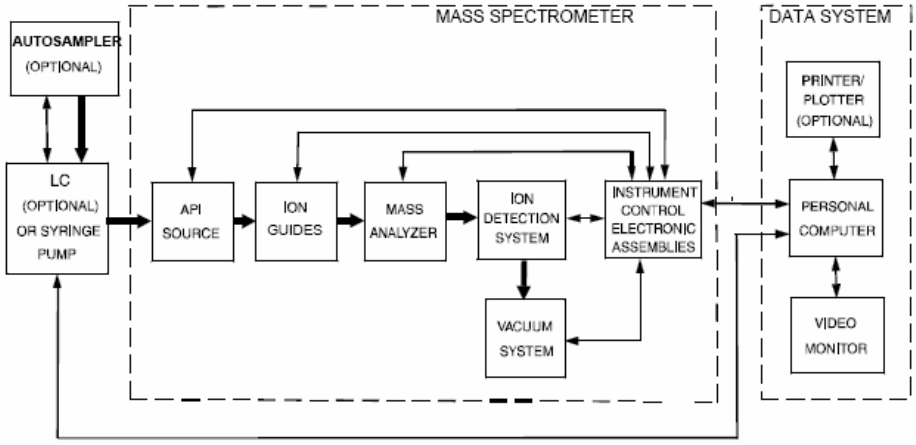
HPLC

Για το διαχωρισμό των ενώσεων αρσενικού χρησιμοποιήθηκε αυτοματοποιημένο σύστημα HPLC, το οποίο περιλαμβάνει:

- ✓ Αντλία HPLC κατάλληλη για βαθμιδωτή έκλουση τεσσάρων διαλυτών (Surveyor MS Pump, Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA), με ενσωματωμένο σύστημα απαέρωσης (degassing system).
- ✓ Αυτόματος δειγματολήπτης (Autosampler AS Surveyor, Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA), με περιστρεφόμενη βαλβίδα έξι εισόδων και βρόχο εισαγωγής δείγματος όγκου 20 μL.
- ✓ Χρωματογραφική στήλη.

Η σύνδεση της χρωματογραφικής στήλης με την πηγή ιονισμού, έγινε μέσω σωλήνωσης από πολυμερικό υλικό PEEK, εσωτερικής διαμέτρου 0.01 in. Η ταχύτητα ροής του εκλούσματος ρυθμίστηκε στο 1 mL/min. Επειδή όμως η ταχύτητα υγρού με την οποία είναι συμβατός ο ηλεκροψεκασμός δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 200 μL/min, για το λόγο αυτό παρεμβάλλεται στη σωλήνωση ένας διακλαδωτής ροής (post-column flow split). Πρόκειται για ένα σύνδεσμο σχήματος "T", ο οποίος επιτρέπει μόνο στο 24% του εκλούσματος (240 μL/min) να εισαχθεί στην πηγή, ενώ το υπόλοιπο απομακρύνεται στα απόβλητα. Η ταχύτητα ροής του υγρού επηρεάζει σημαντικά την απόδοση του ηλεκτροψεκασμού και συγκεκριμένα, μικρές ταχύτητες συνεπάγονται αύξηση της απόδοσης της διεργασίας, επομένως αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου. Ο διαχωρισμός των εξεταζόμενων ενώσεων αρσενικού στην προκείμενη περίπτωση, πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία ανιονανταλλαγής και βαθμιδωτή έκλουση δύο διαλυτών. Χρησιμοποιήθηκε η στήλη PRP-X100 (Μήκος x Εσωτερική Διάμετρος: 25.0 cm x 4.1 mm), της εταιρείας Hamilton (Reno, NV, USA).

Πριν την κύρια στήλη, τοποθετήθηκαν δύο κατιονανταλλακτικές προστήλες PRP-X800 (Hamilton, Reno, NV, USA), ενώ ως διαλύτες έκλουσης χρησιμοποιήθηκαν υδατικά διαλύματα άλατος όξινου ανθρακικού αμμωνίου (NH_4HCO_3), συγκέντρωσης 20 mM, σε pH 10. Ο ένας από τους δύο διαλύτες περιείχε επίσης μεθανόλη σε ποσοστό 40% κ.ο., ενώ το πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης που αναπτύχθηκε και χρησιμοποιήθηκε περιγράφεται αναλυτικά στο κεφάλαιο "Αποτελέσματα – Συζήτηση". Στο Σχήμα 2.4 που φαίνεται παρακάτω, απεικονίζονται τα κυριότερα τμήματα της οργανολογίας HPLC-ES-MS/MS.



Σχήμα 2.4. Βασικά τμήματα πειραματικής διάταξης HPLC-ES-MS/MS.

2.2. ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

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

- Όξινο ανθρακικό αμμώνιο (puriss., Riedel-de Haen, Seelze, Germany).
- Υδροχλωρικό οξύ (37%, puriss., p.a., Riedel-de Haen, Seelze, Germany).
- Σουλφίδιο του δισθενούς σιδήρου (FeS) σε μορφή ράβδων (Riedel-de Haen, Seelze, Germany).
- Διάλυμα υδροξειδίου του αμμωνίου (puriss., p.a., Fluka, Buchs, Switzerland).
- Υδροξείδιο του τετραβουτυλαμμωνίου, TBAH 30-hydrate (>99.0%, Fluka, Buchs, Switzerland).
- Μαλονικό οξύ (>99.0%, Fluka, Buchs, Switzerland).
- Μεθανόλη (gradient grade HPLC, Merck, Darmstadt, Germany).
- Διμεθυλαρσενικικό οξύ (DMA(V)) (puriss., 99.0%, Fluka, Buchs, Switzerland).
- Νιτρικό οξύ (65%, puriss., p.a., Riedel-de Haen, Seelze, Germany).

2.3. ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Κατά τη διεξαγωγή της παρούσας εργασίας, αναλύθηκαν βιολογικά δείγματα θαλάσσιας προέλευσης, τα οποία παράλληλα αποτελούν προϊόντα καθημερινής διατροφής. Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν τα παρακάτω δείγματα:

- Εμπορικό δείγμα από φύκη (σε μορφή σκόνης), καναδικής προέλευσης, το οποίο προμηθεύτηκε το 1999 (Galloway's, Richmond, BC, Canada, batch no: 231-0390-13). Αποθήκευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το δείγμα αυτό ονομάζεται KP-1 (Kelp Powder – 1).
- Εμπορικό δείγμα από φύκη (σε μορφή σκόνης), καναδικής προέλευσης, το οποίο προμηθεύτηκε το 2005 (Galloway's, Richmond, BC, Canada, batch no: 231-0390-15). Αποθήκευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ποιοτικά, πρόκειται για το ίδιο δείγμα με το KP-1, με μοναδική διαφορά την ημερομηνία προμήθειάς του και τον αριθμό της παρτίδας που ανήκει. Το δείγμα αυτό ονομάζεται KP-2 (Kelp Powder – 2).

- Εμπορικό δείγμα από φύκη (σε μορφή σκόνης), τύπου *Laminaria digitata,* ισλανδικής προέλευσης, το οποίο προμηθεύτηκε το 2004 (Mountain Rose Herbs Eugene, OR, USA). Αποθήκευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το δείγμα αυτό ονομάζεται KP-3 (Kelp Powder – 3).
- Οστρακοειδή τύπου κυδωνιών, της οικογένειας *Venus verrucosa*, τα οποία προμηθεύτηκαν από αγορά τροφίμων. Αποθήκευση σε θερμοκρασία -18°C, μέχρι την εκχύλισή τους. Τα δείγματα αυτά ονομάζονται, με βάση τη σειρά προμήθειας και ανάλυσης τους A-1, A-2 κ.λ.π.
- Οστρακοειδή τύπου μυδιών, της οικογένειας *Mytilus edulis*, τα οποία προμηθεύτηκαν από αγορά τροφίμων. Αποθήκευση σε θερμοκρασία -18°C, μέχρι την εκχύλισή τους. Τα δείγματα αυτά ονομάζονται, με βάση τη σειρά προμήθειας και ανάλυσης τους B-1, B-2 κ.λ.π.

2.4. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Εκχύλιση εμπορικών δειγμάτων από φύκη

Η μέθοδος εκχύλισης που εφαρμόστηκε για τα τρία δείγματα εμπορικά διαθέσιμων φυκών (KP-1, KP-2, KP-3), περιελάμβανε τα παρακάτω στάδια:

- ✓ Εκχύλιση του στερεού με απιονισμένο νερό (όγκος νερού/ μάζα στερεού ~ 20 mL/g).
- ✓ Ανακίνηση του αιωρήματος (συσκευή περιδίνησης - vortex) για 10 min, έως ότου επιτευχθεί ομογενοποίηση του.
- ✓ Φυγοκέντριση του αιωρήματος για 15 min (centrifuger 2000 g, Labnet International, Inc., Woodbridge, NJ, USA).
- ✓ Απομάκρυνση – Χρήση του υπερκείμενου υγρού.

Εκχύλιση οστρακοειδών

Όσον αφορά τα δείγματα οστρακοειδών, εφαρμόστηκε η ακόλουθη μέθοδος εκχύλισης:

- ✓ Διαμελισμός του οργανισμού αμέσως μετά την εξαγωγή του από το περιβάλλον θερμοκρασίας -18°C, όπου είχε αποθηκευτεί.

- ✓ Απομάκρυνση του ιστού χώνευσης του οργανισμού και ομογενοποίησή του (με τη βοήθεια ομογενοποιητή), έπειτα από προσθήκη 2 mL απιονισμένου νερού (το οποίο προηγουμένως είχε υποστεί απαέρωση σε λουτρό υπερήχων).
- ✓ Τοποθέτηση του εκχυλίσματος σε λουτρό υπερήχων για 10 min, με σκοπό την αποτελεσματικότερη εκχύλισή του.
- ✓ Φυγοκέντριση του ομογενοποιημένου μίγματος για 15 min (100% speed, Universal II, Hettich, Germany).
- ✓ Απομάκρυνση και φιλτράρισμα του υπερκείμενου υγρού (HPLC syringe filter, 0.45 μm cellulose acetate, Altech, IL, USA).
- ✓ Άμεση ανάλυση του εκχυλίσματος.

2.5. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΘΕΙΟΑΡΣΕΝΟΣΑΚΧΑΡΩΝ

Λόγω αρχικής έλλειψης εμπορικά διαθέσιμων πρότυπων διαλυμάτων των θειοαρσενοσακχάρων, κρίθηκε απαραίτητη η παρασκευή τους, με σκοπό την ανάπτυξη μεθοδολογίας ανίχνευσης και χαρακτηρισμού των συγκεκριμένων ενώσεων σε βιολογικά δείγματα. Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε περιγράφεται παρακάτω.

Πρότυπο διάλυμα S-1

Υδατικό εκχύλισμα του δείγματος KP-3, το οποίο περιέχει υψηλή συγκέντρωση του οξοαρσενοσακχάρου DMAsSugar-Sulfonate και μικρότερες συγκεντρώσεις των οξοαρσενοσακχάρων -Glycol, -Phosphate και -Sulfate, υφίσταται εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction - SPE), ώστε να απομονωθούν κλάσματα εμπλουτισμένα στην ένωση DMAsSugar-Sulfonate. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν ειδικά cartridges (μικροφυσίγγια), με ισχυρό ανιονανταλλακτικό χαρακτήρα, τα οποία ενεργοποιήθηκαν με μεθανόλη, νερό και διάλυμα οξικού αμμωνίου, συγκέντρωσης 2.5 mM. Στη συνέχεια, φορτώθηκε στο cartridge το εκχύλισμα του δείγματος KP-3 και πραγματοποιήθηκε η έκλουσή του χρησιμοποιώντας αρχικά 2.5 mM οξικό αμμώνιο και στη συνέχεια 10 mM όξινο ανθρακικό αμμώνιο (pH 10). Τελικά, συλλέχθησαν κλάσματα συνολικού όγκου 1 mL, τα οποία αναλύθηκαν με την τεχνική HPLC-ES-MS/MS, ώστε να ταυτοποιηθεί το περιεχόμενό τους.

Πρότυπο διάλυμα S-2

Κλάσματα εμπλουτισμένα στο αρσενοσάκχαρο DMAsSugar-Sulfate, συλλέχθησαν κατά την ανάλυση του εκχυλίσματος KP-1 με χρωματογραφία ανιονανταλλαγής (στήλη PRP-X100, κινητή φάση NH_4HCO_3, 10 mM, pH 10, ταχύτητα ροής 1.0 mL/min). Τα κλάσματα αυτά συνδυάστηκαν και υπέστησαν λυοφιλίωση (Freeze Dryer, CHRIST ALPHA 1-4 LSC, Gefriertrocknungsanlagen), με σκοπό την προσυγκέντρωσή τους.

Πρότυπα διαλύματα S-3 και S-4

Πρότυπα διαλύματα των αρσενοσακχάρων DMAsSugar-Glycol και DMAsSugar-Phosphate (S-3 και S-4 αντίστοιχα), δωρίστηκαν από τον Καθηγητή K. A. Francesconi (Karl-Franzens University, Graz, Austria). Τα πρότυπα αυτά, απομονώθηκαν από εκχυλίσματα φυκών και χαρακτηρίστηκαν με κρυσταλλογραφία ακτίνων X.

Πρότυπο διάλυμα S-5

Το πρότυπο διάλυμα S-5 παρασκευάστηκε από το πρότυπο διάλυμα S-1, έπειτα από κατεργασία του τελευταίου με H_2S για 10 min, με σκοπό τη μετατροπή του οξοαρσενοσακχάρου DMAsSugar-Sulfonate στο αντίστοιχο θειοαρσενοσάκχαρο. Το H_2S παρήχθη από την αντίδραση μεταξύ FeS και HCl (10% κ.ο.) και διαβιβάστηκε στο διάλυμα S-1, μέσω μιας σύριγγας. Σε αυτή την περίπτωση δεν κρίθηκε απαραίτητη η φυγοκέντριση του διαλύματος που προέκυψε από την αντίδραση.

Πρότυπο διάλυμα S-6

Το πρότυπο διάλυμα S-6 παρασκευάστηκε από το πρότυπο διάλυμα S-2, έπειτα από κατεργασία του τελευταίου με H_2S για 10 min (με τον ίδιο τρόπο που παρασκευάστηκε και το πρότυπο διάλυμα S-5). Σκοπός της ανίδρασης με H_2S, ήταν η μετατροπή της ένωσης DMAsSugar-Sulfate στην αντίστοιχη θειούχο. Δεν κρίθηκε απαραίτητη η φυγοκέντριση του διαλύματος που προέκυψε από την αντίδραση.

Πρότυπα διαλύματα S-7 και S-8

Τα πρότυπα διαλύματα S-7 και S-8 προέκυψαν από τα S-3 και S-4 αντίστοιχα, έπειτα από κατεργασία των τελευταίων με H_2S για 10 min (με τον τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω). Σκοπός της ανίδρασης με H_2S ήταν η μετατροπή των οξοαρσενοσακχάρων DMAsSugar-Glycol και -Phosphate στα αντίστοιχα θειοαρσενοσάκχαρα. Δεν κρίθηκε απαραίτητη η φυγοκέντριση των διαλυμάτων που προέκυψαν από την αντίδραση.

Πρότυπο διάλυμα S-9

Υδατικό εκχύλισμα του δείγματος KP-1, το οποίο περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις των οξοαρσενοσακχάρων DMAsSugar-Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate, καθώς και μικρή συγκέντρωση της ένωσης DMA(V), υπέστη κατεργασία με H_2S για περίπου 10 min. Η διαδικασία είναι η ίδια με αυτή που περιγράφηκε προηγουμένως, με τη διαφορά ότι στη συγκεκριμένη περίπτωση κρίθηκε απαραίτητη η φυγοκέντριση του δείγματος που προέκυψε από την αντίδραση (centrifuger 2000 g, Labnet International, Inc., Woodbridge, NJ, USA), με σκοπό την απομάκρυνση του σχηματιζόμενου ιζήματος.

2.6. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗΣ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ ΤΟΥ ΑΡΣΕΝΙΚΟΥ

Με σκοπό τον υπολογισμό της ανάκτησης του αρσενικού από τη χρωματογραφική στήλη, πραγματοποιήθηκε συλλογή κλασμάτων με το σύστημα HPLC και στη συνέχεια ανάλυσή τους με ICP-MS.

Αρχικά, αναλύθηκε το προς εξέταση δείγμα με HPLC-ICP-MS, ώστε να προσδιοριστεί ο χρόνος που απαιτείται για την έκλουση όλων των ενώσεων αρσενικού από τη στήλη (χρόνος ανάλυσης). Στη συνέχεια, συγκεκριμένος όγκος δείγματος εισήχθη στον βρόχο και έλαβε χώρα συλλογή του κλάσματος στην έξοδο της στήλης, για τόσο χρονικό διάστημα, όσο και ο χρόνος ανάλυσης του δείγματος (Κλάσμα 1). Έπειτα, επαναλήφθηκε η ίδια διαδικασία με προηγουμένως, αυτή τη φορά όμως χωρίς να παρεμβάλλεται χρωματογραφική στήλη (Κλάσμα 2). Και στις δύο περιπτώσεις (με στήλη/ χωρίς στήλη), συλλέχθησαν “Τυφλά Κλάσματα” (χωρίς να πραγματοποιηθεί εισαγωγή δείγματος), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τη

διόρθωση του σήματος υποβάθρου του αρσενικού. Τέλος, αναλύθηκαν όλα τα συλλεγόμενα κλάσματα με ICP-MS, και η % χρωματογραφική ανάκτηση για το αρσενικό υπολογίστηκε από την παρακάτω σχέση:

$$\textbf{\% Χρωματογραφική Ανάκτηση} \equiv \frac{\textbf{Διορθωμένη Ένταση Αρσενικού στο Κλάσμα 1}}{\textbf{Διορθωμένη Ένταση Αρσενικού στο Κλάσμα 2}} \times \mathbf{100}$$

2.7. ΟΛΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΡΣΕΝΙΚΟΥ – ΑΠΟΔΟΣΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ

Για τον ολικό προσδιορισμό του αρσενικού στα εξεταζόμενα δείγματα, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική ICP-MS. Πριν την ανάλυση, κρίθηκε απαραίτητη η διαλυτοποίηση των στερεών δειγμάτων, με τη μέθοδο της όξινης χώνευσης και τη χρήση ακτινοβολίας μικροκυμάτων (microwave assisted acid digestion). Συγκεκριμένα, για τη διαλυτοποίηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε πυκνό HNO_3 (65% κ.ο.) και εργαστηριακή συσκευή φούρνου μικροκυμάτων (Speedwave^{TM}, MWS-2, BERGHOF). Στο σημείο αυτό, αξίζει να σημειωθεί ότι σε όλες τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της συνολικής συγκέντρωσης του στοιχείου στο δείγμα, χρησιμοποιήθηκε διάλυμα εσωτερικού προτύπου ^{115}In, συγκέντρωσης 10 μg/L.

Έπειτα, προσδιορίστηκε η συνολική συγκέντρωση του αρσενικού στο εκχύλισμα και υπολογίστηκε η απόδοση της εκχύλισης εφαρμόζοντας την παρακάτω σχέση:

$$\textbf{\% Απόδοση Εκχύλισης} = \frac{\left(\textbf{Συγκέντρωση Αρσενικού στο Εκχύλισμα}\right)}{\left(\textbf{Συγκέντρωση Αρσενικού στο Στερεό Δείγμα}\right)} \times \mathbf{100}$$

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από πολύ νωρίς (1886) έγινε γνωστό ότι οι οξυγονούχες οργανοαρσενικικές ενώσεις (As=O) μετατρέπονται στα αντίστοιχα θειούχα παράγωγα (As=S), μέσω της αντίδρασης με αέριο H_2S.[117] Πρόσφατα, οι Schmeisser et al [43] συνέθεσαν πρότυπα διαλύματα των θειοαρσενοσακχάρων DMThioAsSugar-Glycol και DMThioAsSugar-Phosphate, τα οποία χρησιμοποίησαν προκειμένου να χαρακτηρίσουν τις δύο άγνωστες κορυφές που παρατηρήθηκαν, κατά την ανάλυση με Φασματομετρία Μάζας Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος σε συνδυασμό με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC-ICP-MS), εκχυλίσματος από μύδια. Ακολουθώντας την ίδια διαδικασία στην παρούσα ερευνητική εργασία, παρασκευάστηκαν μια σειρά από πρότυπα διαλύματα θειοαρσενοσακχάρων (όπως περιγράφεται στο Πειραματικό Μέρος), με σκοπό την ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μεθόδων HPLC-ICP-MS και Διαδοχικής Φασματομετρίας Μάζας Ηλεκτροψεκασμού σε συνδυασμό με HPLC (HPLC-ES-MS/MS), για την ανίχνευση των συγκεκριμένων ενώσεων σε βιολογικά δείγματα. Η μελέτη επικεντρώθηκε σε δείγματα θαλάσσιας προέλευσης, στα οποία ανιχνεύτηκαν και τα πρώτα μέλη της κατηγορίας των θειοαρσενοσακάρων.

3.1. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΕΧΝΙΚΗΣ HPLC-ES-MS/MS ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΟ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟ ΟΞΟ- ΚΑΙ ΘΕΙΟ- ΑΡΣΕΝΟΣΑΚΧΑΡΩΝ

Η ανάπτυξη της μεθόδου HPLC-ES-MS/MS βασίστηκε στην ανάλυση πρότυπων διαλυμάτων των υπό εξέταση ενώσεων.

Οι ενώσεις που εξετάστηκαν ήταν τα τέσσερα οξοαρσενοσάκχαρα -Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate και η ένωση DMA(V), καθώς και τα τέσσερα θειαρσενοσάκχαρα -Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate.

3.1.1. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

Ο διαχωρισμός των οξο- και θειο- αρσενοσακχάρων πραγματοποιήθηκε σε στήλη ανιονανταλλαγής (PRP-X100, Μήκος x Εσωτερική Διάμετρος = 25.0 cm x 4.1 mm, Hamilton, Reno, NV, USA), πριν από την οποία τοποθετήθηκαν δύο

κατιονανταλλακτικές προστήλες (PRP-X800, Hamilton). Εφαρμόστηκε πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης, με τους ακόλουθους διαλύτες:

Διαλύτης Α: Υδατικό διάλυμα άλατος όξινου ανθρακικού αμμωνίου (NH_4HCO_3), συγκέντρωσης 20 mM. Το pH ρυθμίστηκε στο 10, με τη χρήση διαλύματος NH_4OH.

Διαλύτης Β: Υδατικό διάλυμα άλατος NH_4HCO_3, συγκέντρωσης 20 mM και περιεκτικότητας σε μεθανόλη 40% κ.ο. Το pH ρυθμίστηκε στο 10, με τη χρήση διαλύματος NH_4OH.

Οι παραπάνω διαλύτες περιέχουν συστατικά δότες πρωτονίων (νερό, μεθανόλη και NH_4HCO_3), με αποτέλεσμα το θετικό ιονισμό των εξεταζόμενων ενώσεων. Αναλυτικά, το πρόγραμμα έκλουσης παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.1.

Πίνακας 3.1. Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης της μεθόδου HPLC-ES-MS/MS.

Χρόνος (min)	**Διαλύτης Α (%)**	**Διαλύτης Β (%)**	**Μεθανόλη (%)**	**Ταχύτητα Ροής (mL/min)**
0	75	25	10	1.0
5	75	25	10	1.0
6	0	100	40	1.0
30	0	100	40	1.0
30.5	75	25	10	1.0
35	75	25	10	1.0

Η ταχύτητα ροής του υγρού έκλουσης ρυθμίστηκε στο 1 mL/min, από το οποίο το 24% κατέληγε στην πηγή ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization - ESI) και το υπόλοιπο στα απόβλητα, ενώ χρησιμοποιήθηκε βρόχος εισαγωγής δείγματος, όγκου 20 μL (περισσότερες πήροφορίες δίνονται στο κεφάλαιο "Πειραματικό Μέρος – Οργανολογία").

Επιλέχθηκε το συγκεκριμένο πρόγραμμα έκλουσης κατόπιν βελτιστοποίησης, με σκοπό, αφενός μεν τον πλήρη διαχωρισμό των συστατικών που εκλούονται νωρίς (οξοαρσενοσάκχαρα) και αφετέρου τη μείωση των χρόνων έκλουσης των θειοαρσενοσακχάρων, τα οποία κατακρατούνται ισχυρά στη συγκεκριμένη στήλη.

3.1.2. Διαδοχική Φασματομετρία Μάζας Ηλεκτροψεκασμού (ES-MS/MS)

Για την ανάπτυξη μιας ευαίσθητης και εκλεκτικής μεθόδου ES-MS/MS, επιβάλλεται να ληφθούν υπόψη οι παρακάτω παράγοντες:

- ***Χημικές ιδιότητες του αναλύτη***

  Όσο πιο υδρόφοβο χαρακτήρα έχει ο αναλύτης, τόσο μεγαλύτερη είναι η συγγένεια που παρουσιάζει με την επιφάνεια της σταγόνας, επομένως τόσο πιο εύκολα γίνεται η μεταφορά των ιόντων του στην αέρια φάση. Επίσης, ο αναλύτης ο οποίος κατά κανόνα παρουσιάζει υψηλή απόκριση στον ηλεκτροψεκασμό, είναι αυτός που προϋπάρχει ιονισμένος στο διάλυμα. Συνεπώς, τα οξέα και οι βάσεις (τα οποία εύκολα αποπρωτονιώνοναι ή πρωτονιώνονται), συμπεριφέρονται ιδανικά κατά τη διαδικασία του ηλεκτροψεκασμού.

- ***Σύσταση του διαλύτη***

  Η επιφανειακή τάση του χρησιμοποιούμενου διαλύτη επηρεάζει σημαντικά την απόδοση του ηλεκτροψεκασμού. Επιθυμητή είναι η χρήση διαλυτών με σχετικά μικρή επιφανειακή τάση, ώστε να επιτυγχάνεται σταθερός ηλεκτροψεκασμός. Για το λόγο αυτό, προτείνεται η χρήση οργανικών διαλυτών, όπως η μεθανόλη και το ακετονιτρίλιο (που έχουν χαμηλότερη επιφανειακή τάση από το νερό). Αντίθετα, το εξάνιο και το τριχλωροεξάνιο, λόγω της εξαιρετικά χαμηλής επιφανειακής τάσης και του άπολου χαρακτήρα τους, δε συνιστώνται.

- ***Δυναμικό ηλεκτροψεκασμού***

  Το δυναμικό το οποίο εφαρμόζεται στον τριχοειδή, επηρεάζει τη μεταφορά των ιόντων από το διάλυμα στην αέρια φάση.

- ***Δυναμικά φακών εστίασης***

  Τα δυναμικά αυτά μπορούν να ρυθμιστούν, ώστε να επιτευχθεί ο μέγιστος ρυθμός μεταφοράς ιόντων, από την πηγή στον αναλυτή μάζας.

- ***Μέθοδος σάρωσης ιόντων***

Με την επιλογή της κατάλληλης μεθόδου σάρωσης επιτυγχάνεται υψηλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα ώστε, αφενός μεν να είναι δυνατή η ανίχνευση πολύ χαμηλών συγκεντρώσεων του αναλύτη και αφετέρου να αποφευχθούν προβλήματα παρεμποδίσεων, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις πολύπλοκης μήτρας του δείγματος.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε φασματόμετρο μάζας (TSQ Quantum), το οποίο διαθέτει πηγή ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI, αναλυτικά η οργανολογία περιγράφεται στο Πειραματικό Μέρος). Μετά το διαχωριμό των ενώσεων στη χρωματογραφική στήλη, τα ιόντα του κάθε αναλύτη (τα οποία προϋπάρχουν στο διάλυμα) οδηγούνται στην πηγή ιονισμού και τέλος αναλύονται στο φασματόμετρο μάζας.

Αρχικά, εφαρμόστηκε η μέθοδος Σάρωσης Προϊόντων Ιόντων (Product Ion Scan), με "Επαγώμενη Διάσπαση Μέσω Συγκρούσεων" (Collision Induced Dissociation - CID), για κάθε μοριακό ιόν εξεταζόμενης ένωσης. Σκοπός της μεθόδου ήταν η διερεύνηση των πιθανών μηχανισμών θραυσματοποίησης της κάθε ένωσης, ανάλογα με την ενέργεια διάσπασης (Collision Energy) που εφαρμόζεται στην κυψελίδα πρόσκρουσης. Από τις εντάσεις των προϊόντων ιόντων και τις αντίστοιχες ενέργειες διάσπασης, κατασκευάζονται για κάθε ένωση οι καμπύλες διάσπασης (breakdown curves), από τις οποίες επιλέγονται τα προϊόντα ιόντα με τη μεγαλύτερη ένταση (χαρακτηριστικά προϊόντα ιόντα), σε συγκεκριμένες ενέργειες διάσπασης. Στη συνέχεια, με βάση τις παραπάνω καμπύλες, αναπτύσσεται η μέθοδος Παρακολούθησης Επιλεγμένων Αντιδράσεων (Selected Reaction Monitoring - SRM). Πρόκειται για μια μέθοδο "ανάλυσης στόχου", με την οποία παρακολουθείται μια χαρακτηριστική αντίδραση (επιλέγοντας ένα πρόδρομο ιόν και το χαρακτηριστικό προϊόν ιόν, σε συγκεκριμένη ενέργεια διάσπασης) ή μια ομάδα αντιδράσεων για κάθε εξεταζόμενη ένωση. Η συγκεκριμένη μέθοδος χαρακτηρίζεται από απλότητα, γρήγορη ανάλυση, υψηλή εκλεκτικότητα και χαμηλά όρια ανίχνευσης, ενώ παράλληλα είναι "ελεύθερη παρεμποδίσεων".

Για την ανίχνευση των οξυγονούχων και θειούχων οργανοαρσενικικών ενώσεων με την τεχνική ES-MS/MS, εφαρμόστηκε ανάλυση θετικών ιόντων (positive ion mode). Στο συγκεκριμένο τύπο ανάλυσης, ο οποίος έχει εφαρμοστεί εκτενώς για

τη μελέτη των οξοαρσενοσακχάρων -Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate, τα προϊόντα ιόντα που ανιχνεύονται περιέχουν το άτομο του As, παρέχοντας έτσι σημαντικές δομικές πληροφορίες για τις υπο εξέταση ενώσεις. Αντίθετα, κατά την ανάλυση αρνητικών ιόντων, τα ανιχνεύσιμα ιόντα δεν περιέχουν το διμεθυλαρσενικικό τμήμα του μορίου (αφού ανιχνεύεται μόνο το τμήμα εκείνο της ένωσης που φέρει το αρνητικό φορτίο), οπότε λαμβάνονται λιγότερο σημαντικές πληροφορίες για το αρσενικό και τα άτομα με τα οποία αυτό συνδέεται.

Οι βέλτιστες πειραματικές παράμετροι λειτουργίας της μεθόδου ES-MS/MS, είναι αυτές που παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2.

Πίνακας 3.2. Βέλτιστες παράμετροι λειτουργίας της τεχνικής ES-MS/MS.

Παράμετροι Λειτουργίας	**Βέλτιστες Τιμές**
Δυναμικό Ηλεκτροψεκασμού [kV]	4.1
Ροή Βοηθητικού Αερίου – N_2 [Αυθ. Μονάδες]	25
Ροή Εκνεφωτικού Αερίου – N_2 [Αυθ. Μονάδες]	45
Δυναμικό Πηγής Ιονισμού [V]	0
Θερμοκρασία Τριχοειδούς [^oC]	300

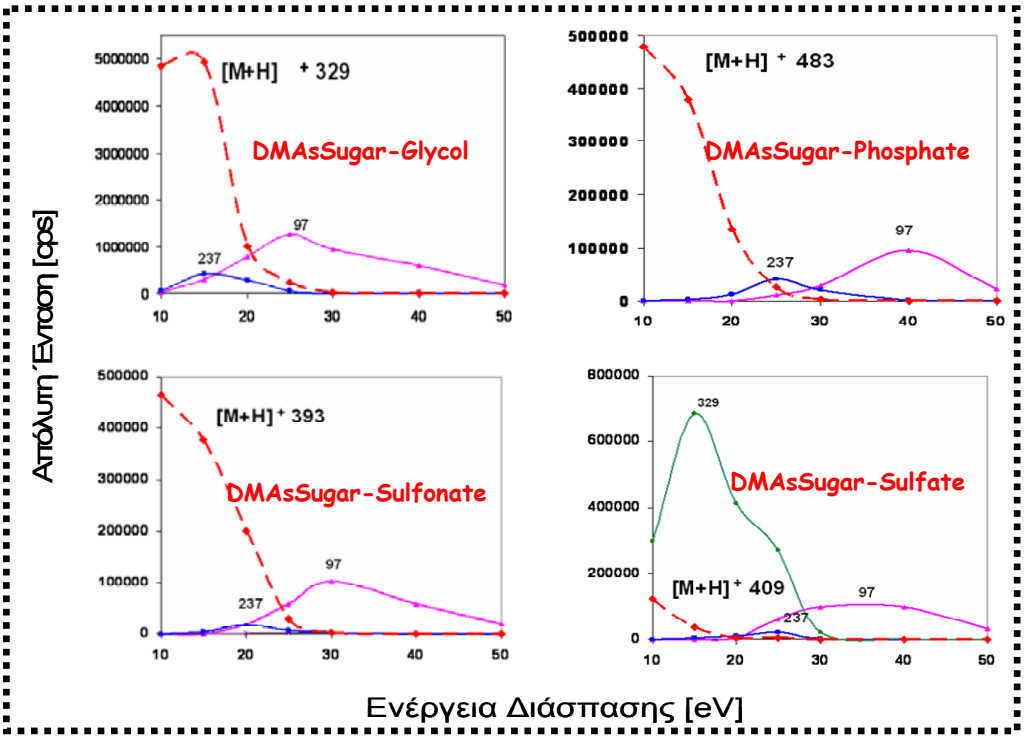
Οι διαχωριστικές ικανότητες των τετραπόλων Q1 και Q3 ρυθμίστηκαν στην τιμή 0.7. Οι λόγοι m/z των μοριακών ιόντων που αντιστοιχούν στα πρωτονιωμένα αρσενοσάκχαρα φαίνονται στον Πίνακα 3.3.

Πίνακας 3.3. Λόγοι m/z μοριακών ιόντων πρωτονιωμένων αρσενοσακχάρων.

Οξοαρσενοσάκχαρο	**Μοριακό Ιόν (m/z)**	**Θειοαρσενοσάκχαρο**	**Μοριακό Ιόν (m/z)**
DMAsSugar-Glycol	329	*DMThioAsSugar-Glycol*	345
DMAsSugar-Phosphate	483	*DMThioAsSugar-Phosphate*	499
DMAsSugar-Sulfonate	393	*DMThioAsSugar-Sulfonate*	409
DMAsSugar-Sulfate	409	*DMThioAsSugar-Sulfate*	425

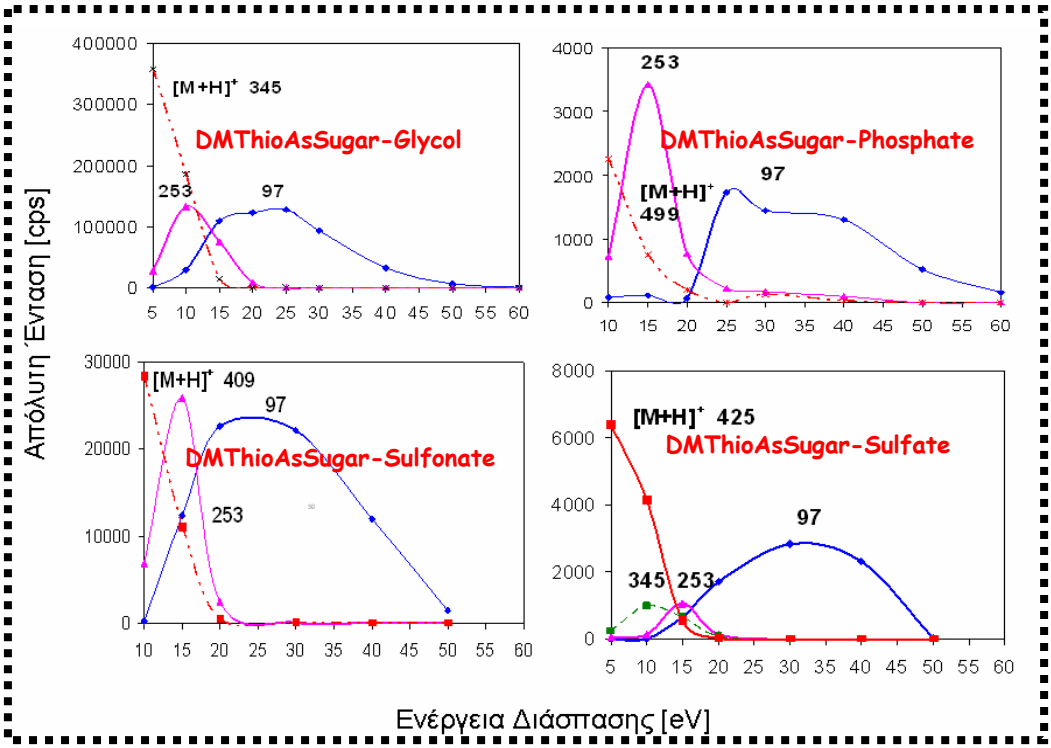
Σάρωση Προϊόντων Ιόντων (Product Ion Scan)

Αρχικά, αναλύθηκαν τα πρότυπα διαλύματα S1-S8, με τη μέθοδο Σάρωσης Προϊόντων Ιόντων και προέκυψαν τα φάσματα μάζας για τα οκτώ αρσενοσάκχαρα, σε διάφορες ενέργειες διάσπασης. Στη συνέχεια, κατασκευάστηκαν οι καμπύλες διάσπασης σε ενέργειες 5 - 60 eV, όπως παρουσιάζονται παρακάτω.



Σχήμα 3.1. Καμπύλες διάσπασης (breakdown curves) των τεσσάρων οξοαρσενοσακχάρων.

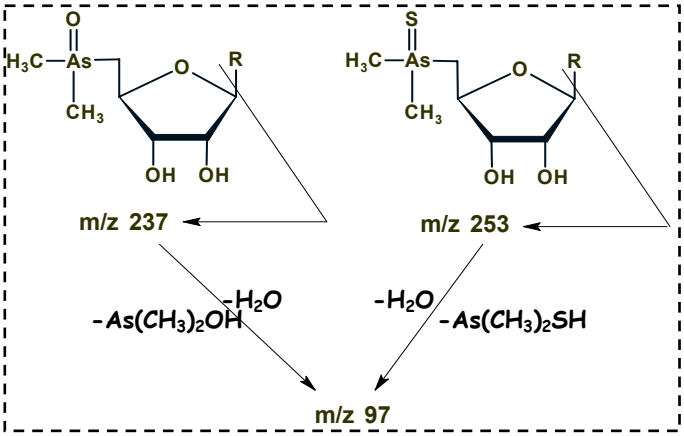
Από τα παραπάνω αποτελέσματα, προκύπτει ότι τα τέσσερα οξοαρσενοσάκχαρα παρουσιάζουν παρόμοια συμπεριφορά κατά τη θραυσματοποίησή τους, δίνοντας δύο κύρια προϊόντα ιόντα, αυτά με λόγους m/z 237 και 97. Καθώς αυξάνεται η ενέργεια διάσπασης, ευνοείται ο σχηματισμός του ιόντος με λόγο m/z 97, ενώ σε χαμηλότερες ενέργειες διάσπασης το ιόν με λόγο m/z 237 συναντάται σε μεγαλύτερη αναλογία.



Σχήμα 3.2. Καμπύλες διάσπασης (breakdown curves) των τεσσάρων θειοαρσενοσακχάρων

Αντίστοιχα, τα τέσσερα θειοαρσενοσάκχαρα, κατά τη θραυσματοποίησή τους δίνουν δύο κύρια προϊόντα ιόντα, με λόγους m/z 253 και 97, τα οποία παρουσιάζουν μέγιστες εντάσεις σε χαμηλές και υψηλές ενέργειες διάσπασης αντίστοιχα.

Επομένως, οι δυο κατηγορίες αρσενοσακχάρων δίνουν ένα κοινό προϊόν ιόν με λόγο m/z 97, ενώ τα ιόντα με λόγους m/z 237 και 253, είναι χαρακτηριστικά για τα οξο- και θειο- αρσενοσάκχαρα αντίστοιχα. Οι πιθανοί μηχανισμοί θραυσματοποίησης των παραπάνω ενώσεων φαίνονται στο Σχήμα 3.3.



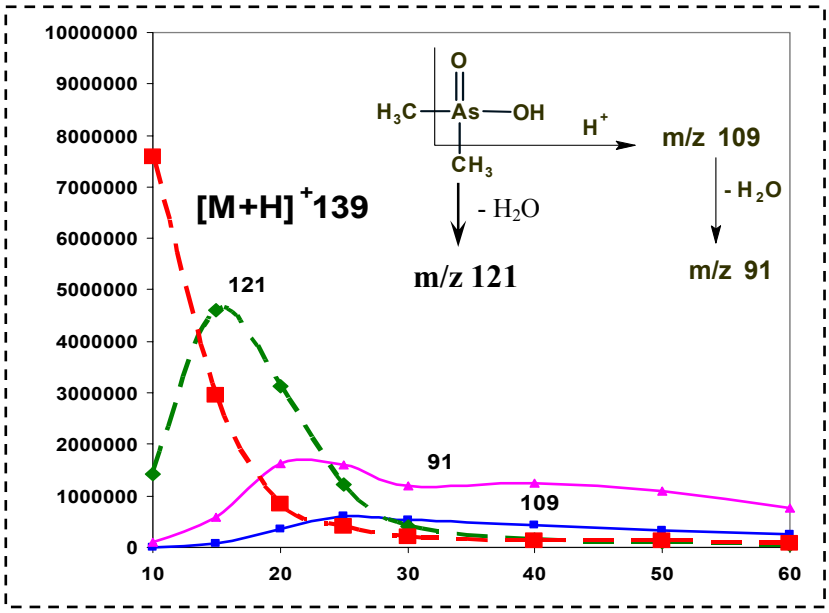
Σχήμα 3.3. Προτεινόμενοι μηχανισμοί θραυσματοποίησης των οξο- και θειο-αρσενοσακχάρων.

Από το παραπάνω σχήμα, είναι σαφές ότι οι δύο κατηγορίες διμεθυλιωμένων αρσενοσακχάρων επιδεικνύουν παρόμοια συμπεριφορά κατά τη θραυσματοποίησή τους. Σε χαμηλές ενέργειες διάσπασης, λαμβάνει χώρα απώλεια της εκάστοτε πλευρικής αλυσίδας (-Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate) και προκύπτει το ιόν της διμεθυλαρσινοπεντόζης ή διμεθυλαρσινοθειοπεντόζης, ανάλογα αν πρόκειται για οξο- ή θειο- αρσενοσάκχαρο. Στη συνέχεια, από τα παραπάνω μοριακά ιόντα, με περαιτέρω θραυσματοποίηση και απώλεια των μορίων $As(CH_3)_2XH$ (X = O ή S) και H_2O, σχηματίζεται το ιόν με λόγο m/z 97.

Η ένωση DMAsSugar-Sulfate, εκτός από τα δύο χαρακτηριστικά ιόντα με λόγους m/z 237 και 97, δίνει κατά τη θραυσματοποίησή της ένα επιπλέον ιόν, με λόγο m/z 329. Το ιόν αυτό, το οποίο αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν της ένωσης DMAsSugar-Glycol, προκύπτει από απώλεια της ουδέτερης ομάδας $-SO_3$. Παρόμοια συμπεριφορά παρουσιάζει και η ένωση DMThioAsSugar-Sulfate, από την οποία, έπειτα από απώλεια της ομάδας $-SO_3$, σχηματίζεται το ιόν με λόγο m/z 345 (που αντιστοιχεί στο ιόν της ένωσης DMThioAsSugar-Glycol). Η διάσπαση αυτή λαμβάνει χώρα στην πηγή ιονισμού, επομένως ο χρωματογραφικός διαχωρισμός των συστατικών πριν την είσοδο σε αυτή κρίθηκε απαραίτητος, έτσι ώστε να αποφευχθεί λάνθασμένη ερμηνεία των φασμάτων. Ένα άλλο κρίσιμο σημείο σχετίζεται με το γεγονός ότι οι ενώσεις DMAsSugar-Sulfate και DMThioAsSugar-Sulfonate, έχουν μοριακά ιόντα με τον ίδιο λόγο m/z 409. Ωστόσο, εφαρμόζοντας τη μέθοδο Παρακολούθησης Επιλεγμένων Αντιδράσεων (SRM), το πρόβλημα αυτό μπορεί να αντιμετωπιστεί με την επιλογή χαρακτηριστικών αντιδράσεων για την κάθε ένωση. Η μια από αυτές τις αντιδράσεις είναι κοινή και για τις δύο ενώσεις (409 → 97), ενώ η δεύτερη είναι μοναδική για κάθε ένωση (409→237 και 409→253 για την οξυγονούχο και θειούχο ένωση αντίστοιχα).

Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε η μέθοδος Σάρωσης Προϊόντων Ιόντων για την ανάλυση πρότυπου διαλύματος της ένωσης DMA(V) (η οποία έχει μοριακό ιόν με λόγο m/z 139) και από τα δεδομένα που καταγράφηκαν προέκυψαν οι παρακάτω καμπύλες διάσπασης, σε ενέργειες 10 - 60 eV.

Στο παρακάτω σχήμα φαίνονται οι καμπύλες διάσπασης και ο προτεινόμενος μηχανισμός θραυσματοποίησης της ένωσης DMA(V).



Σχήμα 3.4. Καμπύλες διάσπασης (breakdown curves) – Προτεινόμενος μηχανισμός θραυσματοποίησης της ένωσης DMA(V).

Όπως διαπιστώνεται από το παραπάνω σχήμα, τρια χαρακτηριστικά προϊόντα ιόντα που σχηματίζονται κατά τη θραυσματοποίηση του μοριακού ιόντος της ένωσης DMA(V), είναι αυτά με λόγους m/z 91, 109 και 121. Οι βέλτιστες ενέργειες διάσπασης ορίζονται για τα δυο πρώτα (m/z 91 και 109) στα 24 eV και για το τελευταίο (m/z 121) στα 15 eV.

Παρακολούθηση Επιλεγμένων Αντιδράσεων (SRM)

Για τον εκλεκτικό προσδιορισμό των οκτώ αρσενοσακχάρων και της ένωσης DMA(V), εφαρμόστηκε η μέθοδος Παρακολούθησης Επιλεγμένων Αντιδράσεων (SRM). Αφού επιλέχθηκαν (από τις καμπύλες διάσπασης) τα χαρακτηριστικά προϊόντα ιόντα και η αντίστοιχη ενέργεια διάσπασης, στην οποία η ένταση των ιόντων αυτών μεγιστοποιείται, διαμορφώθηκαν οι χαρακτηριστικές αντιδράσεις SRM για κάθε ένωση. Για μεγαλύτερη εκλεκτικότητα, παρακολουθούνται δύο χαρακτηριστικές αντιδράσεις για κάθε πρόδρομο ιόν. Στον Πίνακα 3.4, παρουσιάζονται οι αντιδράσεις SRM για τα τέσσερα οξοαρσενοσάκχαρα -Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate, καθώς και για την ένωση DMA(V) και στον Πίνακα 3.5 οι αντιδράσεις για τα τέσσερα θειοαρσενοσάκχαρα -Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate.

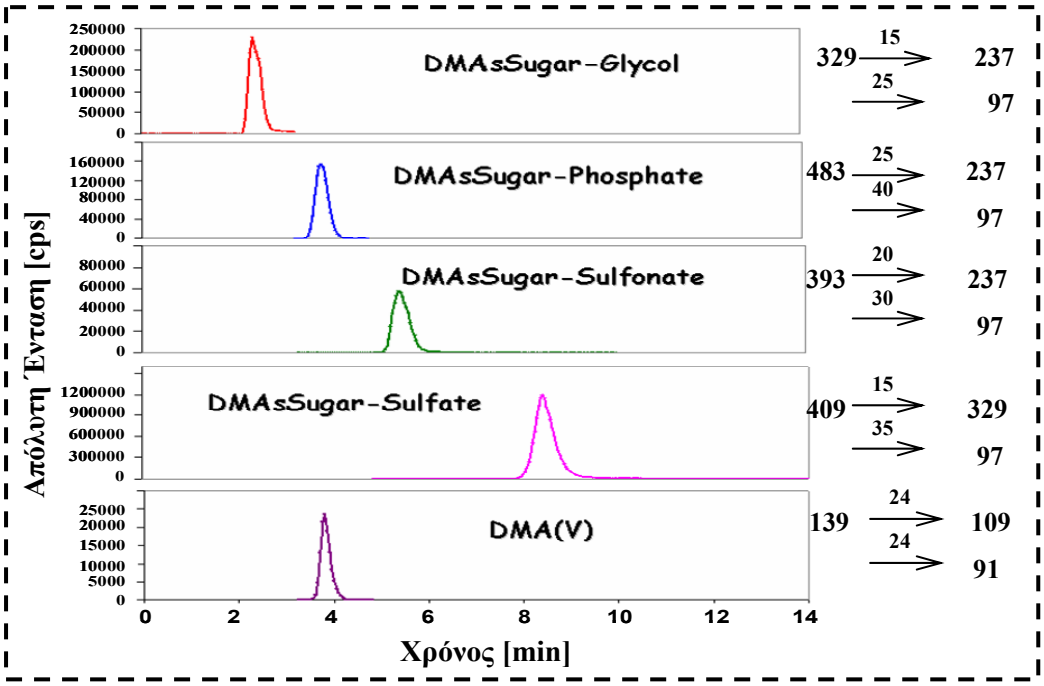
Πίνακας 3.4. Χαρακτηριστικές αντιδράσεις SRM για τα τέσσερα οξοαρσενοσάκχαρα και την ένωση DMA(V).

Ένωση	Πρόδρομο Ιόν (m/z)	Προϊόν Ιόν (m/z)	Ενέργεια Διάσπασης (eV)
DMAsSugar-Glycol	329	237	15
		97	25
DMAsSugar-Phosphate	483	237	25
		97	40
DMAsSugar-Sulfonate	393	237	20
		97	30
DMAsSugar-Sulfate	409	329	15
		97	35
DMA(V)	139	109	24
		91	24

Πίνακας 3.5. Χαρακτηριστικές αντιδράσεις SRM για τα τέσσερα θειοαρσενοσάκχαρα.

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

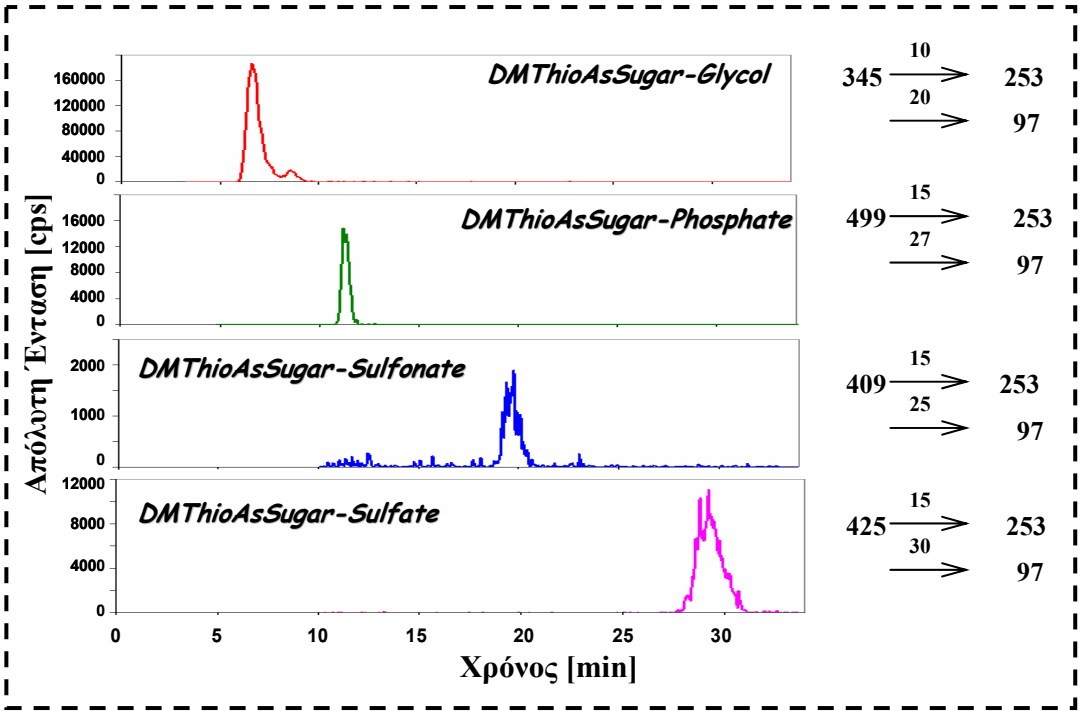
Παρακολουθώντας τις παραπάνω αντιδράσεις, αναλύθηκε αρχικά το εκχύλισμα του στερεού εμπορικού δείγματος από φύκη Kelp Powder-1 (KP-1), το οποίο περιέχει τα τέσσερα οξοαρσενοσάκχαρα και την ένωση DMA(V).[68] Το χρωματογράφημα που προέκυψε φαίνεται παρακάτω.



Σχήμα 3.5. Χρωματογράφημα HPLC-ES-MS/MS-SRM του δείγματος KP-1. Δεξιά του κάθε χρωματογραφήματος αναγράφονται οι επιλεγμένες αντιδράσεις διάσπασης που παρακολουθούνται και η βέλτιστη ενέργεια διάσπασης σε eV.

Εφαρμόζοντας λοιπόν τη συγκεκριμένη μέθοδο HPLC-ES-MS/MS-SRM, επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη των τεσσάρων οξοαρσενοσακχάρων και της ένωσης DMA(V) στο δείγμα KP-1. Από τις ενώσεις αυτές, οι DMAsSugar-Glycol και DMAsSugar-Sulfate συναντώνται στη μεγαλύτερη αναλογία. Ο διαχωρισμός των οξοαρσενοσακχάρων είναι ικανοποιητικός, ενώ επιτυγχάνεται εκλεκτική ανίχνευση τους, παρά το γεγονός ότι πρόκειται για την ανάλυση βιολογικού δείγματος πολύπλοκης μήτρας.

Στη συνέχεια, αναλύθηκε το πρότυπο διάλυμα S-9, το οποίο προήλθε από το δείγμα KP-1, έπειτα από κατεργασία του τελευταίου με αέριο H_2S. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης φαίνονται παρακάτω.



Σχήμα 3.6. Χρωματογράφημα HPLC-ES-MS/MS-SRM του πρότυπου διαλύματος S-9. Δεξιά του κάθε χρωματογραφήματος αναγράφονται οι επιλεγμένες αντιδράσεις διάσπασης που παρακολουθούνται και η βέλτιστη ενέργεια διάσπασης σε eV.

Όπως προκύπτει από το παραπάνω χρωματογράφημα, εφαρμόζοντας τη μέθοδο HPLC-ES-MS/MS με σάρωση SRM, κατέστη δυνατός ο χρωματογραφικός διαχωρισμός και η εκλεκτική ανίχνευση των τεσσάρων θειοαρσενοσακχάρων, που υπάρχουν στο πρότυπο διάλυμα S-9. Σε μεγαλύτερη αναλογία συναντάται το θειοαρσενοσάκχαρο -Glycol, κατ'αναλογία με το οξοαρσενοσάκχαρο -Glycol στο δείγμα KP-1 (από το οποίο προήλθε το S-9). Οι ενώσεις DMThioAsSugar-Sulfonate και DMThioAsSugar-Sulfate εκλούονται σε μεγάλους χρόνους, ακόμα και με τη χρήση υψηλού ποσοστού μεθανόλης στην κινητή φάση (έως 40% κ.ο.).

Επομένως, όπως προκύπτει από τα παραπάνω αποτελέσματα, η κατεργασία με H_2S του δείγματος KP-1, είχε ως συνέπεια τη μετατροπή των οξοαρσενοσακχάρων -Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate (που συναντώνται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο συγκεκριμένο δείγμα) στις αντίστοιχες θειούχες ενώσεις. Επίσης, η μέθοδος HPLC-ES/MS/MS-SRM που εφαρμόστηκε, παρέχει ικανοποιητικό διαχωρισμό αλλά και εκλεκτική ανίχνευση τόσο για τα τέσσερα οξο- όσο και για τα τέσσερα θειο- αρσενοσάκχαρα. Στη συνέχεια, η συγκεκριμένη μέθοδος εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό των οξο- και θειο- αρσενοσακχάρων στα υπόλοιπα πρότυπα

διαλύματα που παρασκευάστηκαν στα πλαίσια της παρούσας μελέτης. Στον Πίνακα 3.6 φαίνεται η ένωση στην οποία είναι εμπλουτισμένο το κάθε πρότυπο διάλυμα.

Πίνακας 3.6. Περιεχόμενο σε αρσενοσάκχαρα των πρότυπων διαλυμάτων.

Πρότυπο Διάλυμα	**Αρσενοσάκχαρο**
S-1	DMAsSugar-Sulfonate
S-2	DMAsSugar-Sulfate
S-3	DMAsSugar-Glycol
S-4	DMAsSugar-Phosphate
S-5	DMThioAsSugar-Sulfonate
S-6	DMThioAsSugar-Sulfate
S-7	DMThioAsSugar-Glycol
S-8	DMThioAsSugar-Phosphate

Παρά την ικανότητά της να παρέχει σημαντικές δομικές πληροφορίες για τις υπό εξέταση ενώσεις, η τεχνική ES-MS/MS παρουσιάζει σημαντικούς περιορισμούς. Για παράδειγμα, κατά την ανάλυση δειγμάτων πολύπλοκης μήτρας, όπως είναι τα εκχυλίσματα θαλάσσιων οστρακοειδών, τα οποία αναλύθηκαν στην παρούσα μελέτη, ανακύπτει το πρόβλημα των παρεμποδίσεων από τα συστατικά της μήτρας του δείγματος. Από την άλλη, η ευαισθησία που επιτυγχάνεται με τη συγκεκριμένη τεχνική περιορίζει τη δυνατότητα ανίχνευσης ενώσεων, οι οποίες συναντώνται σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις στα αναλυόμενα δείγματα. Για τους παραπάνω λόγους, λοιπόν, αποφασίστηκε η χρησιμοποίηση της τεχνικής HPLC-ICP-MS, με σκοπό την ανίχνευση ακόμα και ιχνοποσοτήτων των δυο καινούριων θειοαρσενοσακχάρων DMThioAsSugar-Sulfonate και DMThioAsSugar-Sulfate (που αποτελούσε και τον πρωταρχικό σκοπό της παρούσας διατριβής) σε βιολογικά δείγματα θαλάσσιας προέλευσης. Η τεχνική HPLC-ICP-MS, χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία, υψηλή εκλεκτικότητα και χαμηλά όρια ανίχνευσης, γεγονός που την καθιστά πλέον κατάλληλη για αναλύσεις βιολογικών δειγμάτων και την ανίχνευση σε αυτά πολύ χαμηλών συγκεντρώσεων των εξεταζόμενων συστατικών.

3.2. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΕΧΝΙΚΗΣ HPLC-ICP-MS ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΟ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟ ΚΑΙΝΟΥΡΙΩΝ ΘΕΙΟΑΡΣΕΝΟΣΑΚΧΑΡΩΝ ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Σε αυτό το κεφάλαιο περιγράφεται η ανάπτυξη μεθόδου HPLC-ICP-MS, για την ανίχνευση των τεσσάρων θειοαρσενοσακχάρων DMThioAsSugar-Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate, σε βιολογικά δείγματα. Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στα θειοαρσενοσάκχαρα -Sulfonate και -Sulfate, δυο καινούριες ενώσεις, οι οποίες για πρώτη φορά ανιχνεύτηκαν και χαρακτηρίστηκαν στα πλαίσια της παρούσας διατριβής. Η μέθοδος που θα αναπτυχθεί για το σκοπό αυτό, πρέπει να παρέχει ικανοποιητικό διαχωρισμό των υπό εξέταση ενώσεων (δίνοντας οξείες και συμμετρικές κορυφές, χωρίς αλληλεπικάλυψη), εκλεκτικότητα και χαμηλά όρια ανίχνευσης.

Όπως ήδη αναφέρθηκε στο Θεωρητικό Μέρος της εργασίας, τα θειοαρσενοσάκχαρα αποτελούν μια κατηγορία οργανοαρσενικικών ενώσεων, της οποίας τα πρώτα μέλη ανακαλύφθηκαν το 2004. Από αναλυτική σκοπιά, η καθυστέρηση αυτή αντικατοπτρίζει την αδυναμία των ευρέως χρησιμοποιούμενων μεθόδων να ανιχνεύσουν τις συγκεκριμένες ενώσεις. Πιθανές αιτίες είναι, αφενός μεν η ισχυρή κατακράτηση των ενώσεων στη στήλη, για δεδομένες συνθήκες χρωματογραφίας, και αφετέρου η οξείδωση των ενώσεων, λόγω απουσίας των συνθηκών εκείνων οι οποίες θα εξασφάλιζαν τη σταθερότητά τους. Οι παραπάνω παρατηρήσεις, εκτιμήθηκαν ιδιαίτερα κατά την ανάπτυξη της παρούσας αναλυτικής μεθοδολογίας.

Η ανάπτυξη μεθόδου HPLC-ICP-MS, βασίστηκε στην ανάλυση πρότυπων διαλυμάτων, των οποίων το περιεχόμενο σε θειοαρσενοσάκχαρα πιστοποιήθηκε με την τεχνική HPLC-ES-MS/MS, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως (Πίνακας 3.6).

3.2.1. Βελτιστοποίηση Παραμέτρων Λειτουργίας ICP-MS

Για την επίτευξη υψηλής ευαισθησίας κατά την ανάλυση με ICP-MS, κρίθηκε απαραίτητη η βελτιστοποίηση των επιμέρους παραμέτρων λειτουργίας του οργάνου. Πιο συγκεκριμένα, σε ημερήσια βάση, πριν την έναρξη των αναλύσεων, ρυθμίζονταν οι παράμετροι αυτές (χρησιμοποιώντας πρότυπο διάλυμα που περιέχει τα ισότοπα ^{115}In και ^{75}As), με σκοπό να ληφθεί η μέγιστη ένταση για τα ισότοπα ^{115}In και ^{75}As.

Οι τυπικές βέλτιστες τιμές μερικών από τις σημαντικότερες παραμέτρους, παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.7.

Πίνακας 3.7. Τυπικές βέλτιστες τιμές παραμέτρων λειτουργίας ICP-MS.

Παράμετρος	**Τιμή**
Ροή αερίου εκνέφωσης [mL/min]	0.98
Ροή βοηθητικού αερίου [mL/min]	1.00
Ροή αερίου ψύξης [mL/min]	13.5
Ισχύς Πλάσματος [W]	1349
Βάθος λήψης δείγματος [Αυθ. Μονάδες]	90

3.2.2. Βελτιστοποίηση Χρωματογραφικού Διαχωρισμού

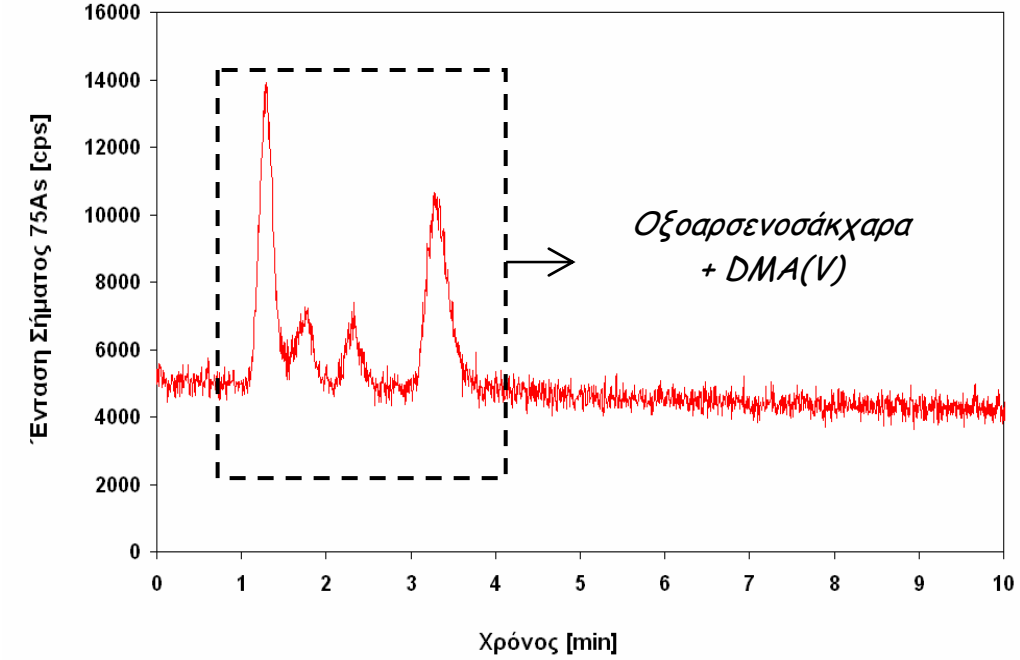
Για την βελτιστοποίηση του χρωματογραφικού διαχωρισμού των θειοαρσενοσακχάρων, χρησιμοποιήθηκαν τα πρότυπα διαλύματα S-5, S-6, S-7, S-8 και S-9. Το ενδιαφέρον επικεντρώθηκε στα άγνωστα μέχρι τότε σάκχαρα DMThioAsSugar-Sulfonate και DMThioAsSugar-Sulfate, τα οποία αποτελούσαν και το κύριο αντικείμενο της παρούσας μελέτης. Τα δύο ήδη γνωστά θειοαρσενοσάκχαρα DMThioAsSugar-Glycol και DMThioAsSugar-Phosphate έχουν μελετηθεί στο παρελθόν από άλλες ερευνητικές ομάδες και έχουν αναπτυχθεί διάφορες χρωματογραφικές μέθοδοι διαχωρισμού, ανίχνευσης και χαρακτηρισμού τους. Για τον παραπάνω λόγο δε δόθηκε ιδιαίτερη έμφαση στις συγκεκριμένες ενώσεις, κατά τη διεξαγωγή της παρούσας εργασίας.

Ποικίλοι συνδυασμοί κινητών φάσεων και χρωματογραφικών στηλών δοκιμάστηκαν, εως ότου επιτευχθεί η έκλουση από τη στήλη και ο διαχωρισμός των θειοαρσενοσακχάρων -Sulfonate και -Sulfate. Οι συνδυασμοί αυτοί παρουσιάζονται αναλυτικά παρακάτω.

Α. Χρωματογραφία Ανιονανταλλαγής

Στις περισσότερες μελέτες ειδοταυτοποίησης του αρσενικού σε περιβαλλοντικά και βιολογικά συστήματα, ο διαχωρισμός των επιμέρους ενώσεων του στοιχείου βασίζεται σε χρωματογραφία ανιονανταλλαγής, χρησιμοποιώντας τη στήλη PRP-X100 (Hamilton, Reno, NV, USA). Η συγκεκριμένη στήλη (Μήκος x Εσωτερική Διάμετρος = 10.0 cm x 4.1 mm) χρησιμοποιήθηκε αρχικά και στην παρούσα μελέτη. Πριν την κύρια στήλη, τοποθετήθηκε κατιονανταλλακτική προστήλη PRP-X800 (Hamilton, Reno, NV, USA). Πραγματοποιήθηκε ισοκρατική έκλουση, με υδατικό διάλυμα NH_4HCO_3, συγκέντρωσης 40 mM και 10% κ.ο. ποσοστό μεθανόλης, ενώ το pH ρυθμίστηκε στην τιμή 10, με τη χρήση διαλύματος NH_4OH. Επιλέχθηκε ταχύτητα ροής του υγρού έκλουσης ίση με 1 mL/min και βρόχος εισαγωγής δείγματος όγκου 20 μL. Μετά τη χρωματογραφική στήλη (post-column), τοποθετήθηκε σύνδεσμος σχήματος "T", με σκοπό την ταυτόχρονη εισαγωγή στο ICP-MS του εκλούσματος και ενός διαλύματος εσωτερικού προτύπου σταθερής συγκέντρωσης (Ge 20 μg/L, σε 5% κ.ο. HNO_3). Η ένταση του σήματος για το εσωτερικό πρότυπο επιτρέπει τη διόρθωση πιθανών ολισθήσεων του οργάνου (instrument signal drift).

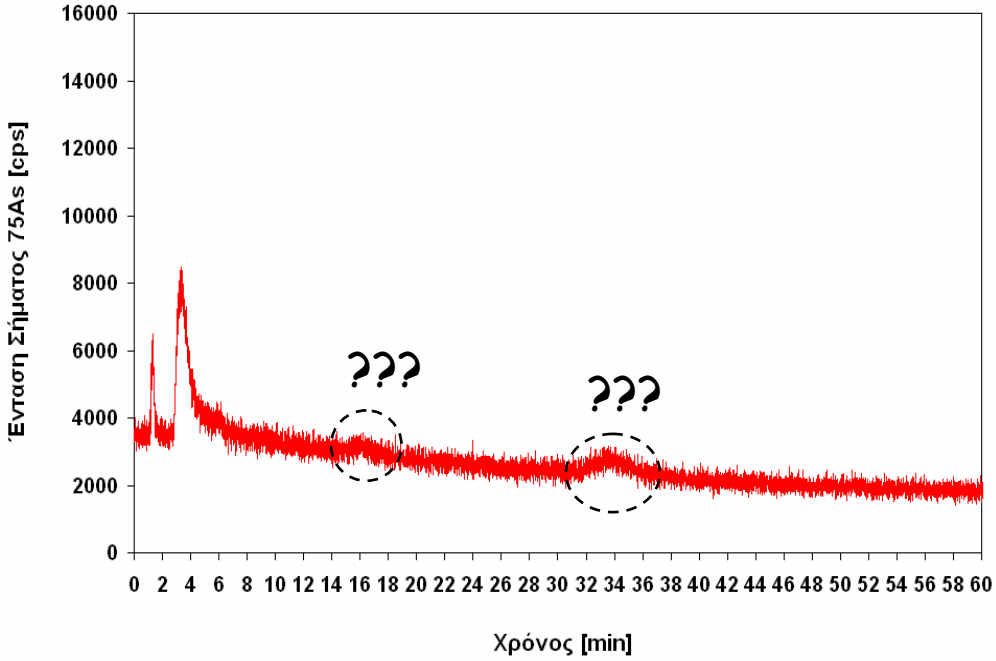
Αρχικά, αναλύθηκε το εκχύλισμα του δείγματος KP-1, το χρωματογράφημα του οποίου φαίνεται στο Σχήμα 3.7.



Σχήμα 3.7. Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS του δείγματος KP-1, με χρωματογραφία ανιονανταλλαγής.

Όπως προέκυψε από τις αναλύσεις HPLC-ES-MS/MS-SRM, στο δείγμα KP-1 οι ενώσεις που συναντώνται στις υψηλότερες συγκεντρώσεις είναι τα οξοαρσενοσάκχαρα -Glycol και -Sulfate, στα οποία αντιστοιχούν οι δύο κορυφές με τη μεγαλύτερη ένταση ($1^{η}$ και $4^{η}$ σε σειρά έκλουσης) που παρατηρούνται στο Σχήμα 3.7. Οι υπόλοιπες κορυφές αντιπροσωπεύουν τις ενώσεις με μικρότερη συγκέντρωση (DMAsSugar-Phosphate, DMAsSugar-Sulfonate και DMA(V)). Τα οξοαρσενοσάκχαρα -Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate, έχουν μελετηθεί εκτενώς στο παρελθόν και έχουν αναπτυχθεί ποικίλες μέθοδοι για το διαχωρισμό και την ανίχνευσή τους, επομένως, δεν εξετάστηκαν περαιτέρω στην παρούσα εργασία. Ωστόσο, η ανάλυση του δείγματος KP-1 γίνεται με σκοπό τον έλεγχο των χρόνων έκλουσης των ενώσεων αυτών, με τη δεδομένη κάθε φορά μέθοδο.

Αναλύθηκε επίσης το πρότυπο διάλυμα S-9 (το οποίο όπως προαναφέρθηκε προήλθε από το εκχύλισμα του δείγματος KP-1, έπειτα από κατεργασία με H_2S), στο οποίο έχει πιστοποιηθεί η ύπαρξη των θειοαρσενοσακχάρων -Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate, με αναλύσεις HPLC-ES-MS/MS. Στο συγκεκριμένο διάλυμα είναι πιθανή η ύπαρξη θειούχων παραγώγων του DMA(V), επειδή όμως η συγκέντρωση της ένωσης αυτής στο αντιδρόν δείγμα KP-1 είναι αρκετά μικρότερη από αυτή των οξοαρσενοσακχάρων, αναμένεται τα πιθανά θειούχα παράγωγά της να συναντώνται σε μικρότερες συγκεντρώσεις.



Σχήμα 3.8. Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS του πρότυπου διαλύματος S-9, με χρωματογραφία ανιονανταλλαγής.

Στο χρονικό διάστημα 1 - 6 min εκλούονται τόσο θειούχες ενώσεις, οι οποίες σχηματίστηκαν από την αντίδραση με H_2S, όσο και οξοαρσενοσάκχαρα ή DMA(V), τα οποία δεν αντέδρασαν. Οι δυο τελευταίες σε σειρά έκλουσης κορυφές, κατά πάσα πιθανότητα, ανήκουν σε θειοαρσενοσάκχαρα, τα οποία κατακρατούνται ισχυρά στη στήλη. Επίσης, το υψηλό σήμα υποβάθρου που παρατηρείται για το ισότοπο ^{75}As, ενδεχομένως εμποδίζει την ανίχνευση επιπλέον ενώσεων, οι οποίες βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις.

Επομένως, η συγκεκριμένη μέθοδος δεν είναι κατάλληλη για το διαχωρισμό και την έκλουση από τη στήλη όλων των συστατικών. Ενας λόγος είναι ότι η στήλη PRP-X100, εκτός από ανιονανταλλακτικό παρουσιάζει και υδρόφοβο χαρακτήρα, με αποτέλεσμα την ισχυρή κατακράτηση σε αυτή των θειοαρσενοσακχάρων. Σε προηγούμενη μελέτη αναφέρεται ότι η προσθήκη υψηλού ποσοστού μεθανόλης (μέχρι 40% κ.ο.) στην κινητή φάση μειώνει σημαντικά τους χρόνους έκλουσης αυτών των ενώσεων.[118] Ωστόσο, επειδή υψηλά ποσοστά οργανικών διαλυτών δεν είναι συμβατά με το ICP-MS (λόγω των επικαθίσεων στοιχειακού άνθρακα που προκαλούν στα διάφορα μέρη του οργάνου), αποφασίστηκε η εφαρμογή άλλης μεθόδου διαχωρισμού, η οποία βασίστηκε σε χρωματογραφία αντίστροφης φάσης.

Β. Χρωματογραφία Αντίστροφης Φάσης Παρουσία Ιοντικού Ζεύγους - Συμβατική Στήλη C18

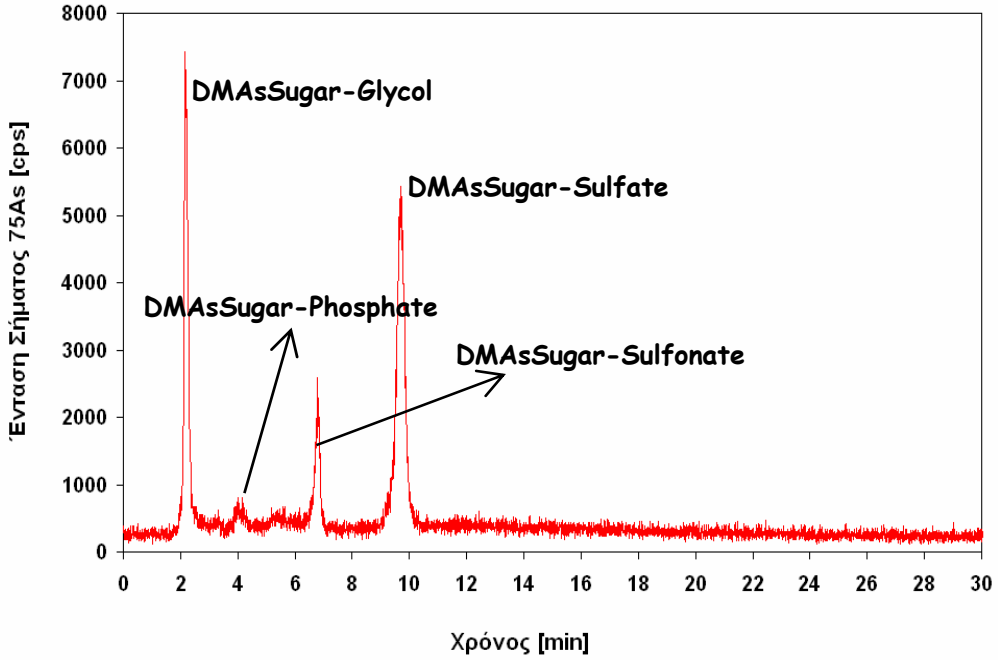
Μέθοδος Β.1

Σε αυτό το στάδιο εφαρμόστηκε χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, με ιοντικό ζεύγος υδροξείδιο του τετραβουτυλαμμωνίου ($C_{16}H_{37}NO{\cdot}30H_2O$, TBAH). Ο διαχωρισμός των ενώσεων πραγματοποιήθηκε σε συμβατική στήλη Discovery C18 (Supelco, Bellefonte, PA, USA), με τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

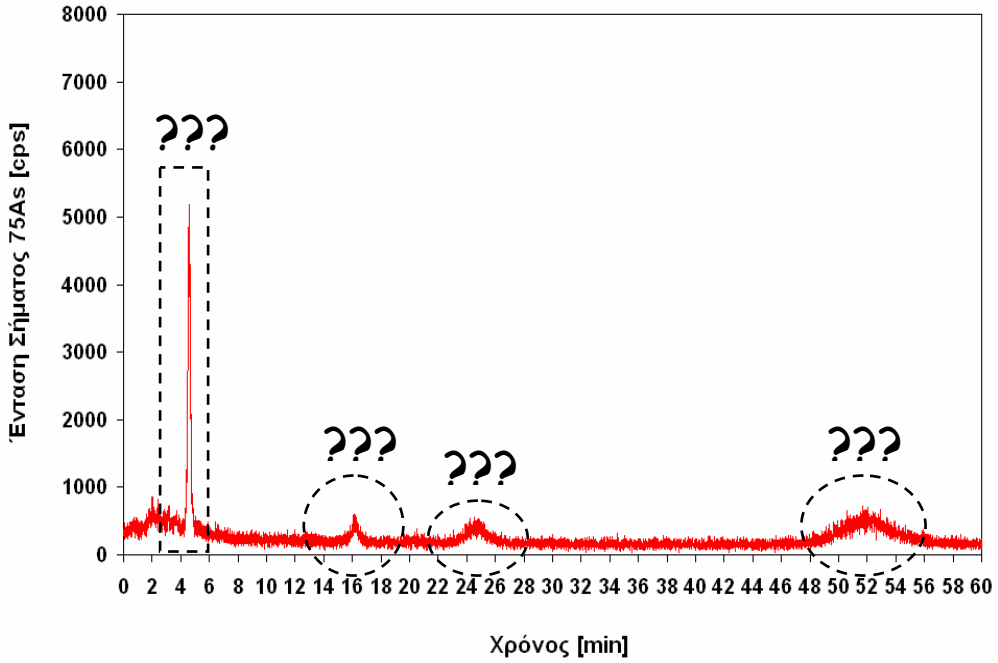
- Μήκος x Εσωτερική Διάμετρος = 15.0 cm x 4.6 mm
- Υλικό πλήρωσης στατικής φάσης: πορώδη σωματίδια silica gel (μέγεθος 5 μm), στα οποία βρίσκονται προσαρτημένες αλυσίδες δεκαοκτώ ατόμων άνθρακα (οκταδέκυλοσιλάνια, C18).

Πριν τη στήλη τοποθετήθηκε ανιονανταλλακτική προστήλη PRP-X100 (Hamilton, Reno, NV, USA), ενώ πραγματοποιήθηκε ισοκρατική έκλουση με υδατικό διάλυμα 1 mM TBAH. Το pH ρυθμίστηκε στην τιμή 6.3, με τη χρήση μαλονικού

οξέος και η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης στο 1 mL/min. Τέλος, χρησιμοποιήθηκε βρόχος εισαγωγής δείγματος όγκου 20 μL, ενώ ταυτόχρονα με το έκλουσμα, στο ICP-MS γινόταν εισαγωγή διαλύματος εσωτερικού προτύπου Ge (20 μg/L, σε 5% HNO_3). Από την ανάλυση του δείγματος KP-1 και του πρότυπου διαλύματος S-9, προέκυψαν τα ακόλουθα χρωματογραφήματα.



Σχήμα 3.9. Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS του δείγματος KP-1, με χρωματογραφία αντίστροφης φάσης παρουσία ιοντικού ζεύγους.

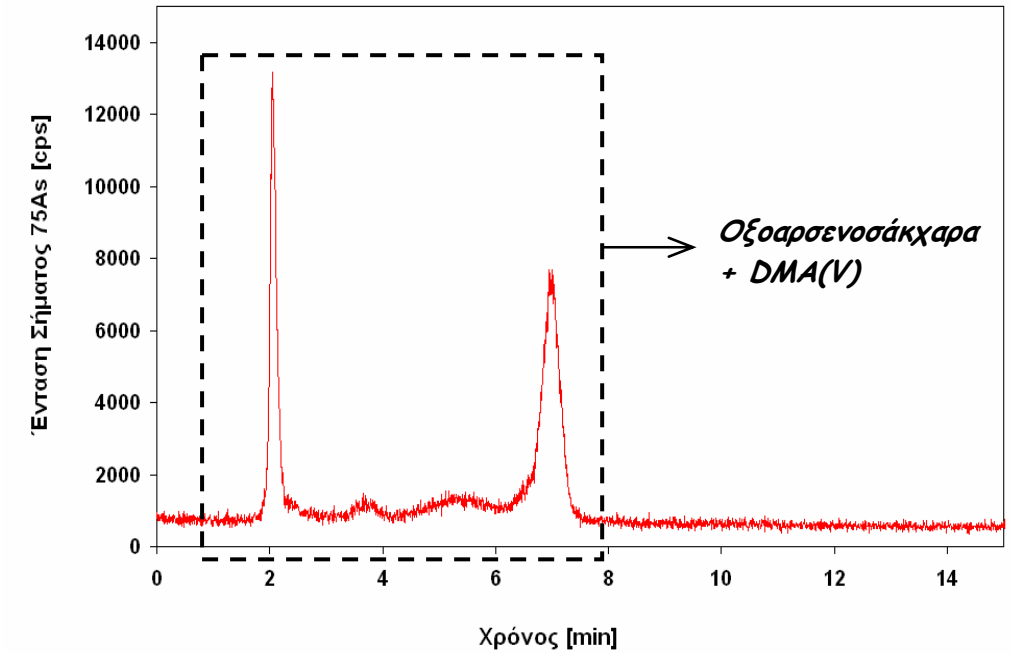


Σχήμα 3.10. Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS του πρότυπου διαλύματος S-9, με χρωματογραφία αντίστροφης φάσης παρουσία ιοντικού ζεύγους.

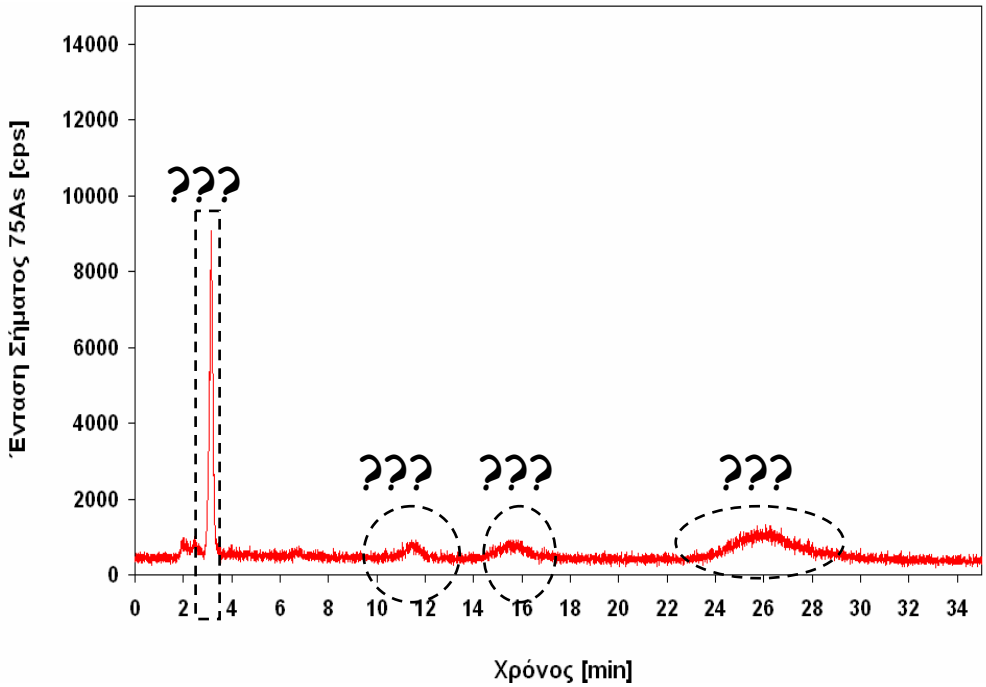
Στο χρωματογράφημα του δείγματος KP-1, η σειρά έκλουσης των τεσσάρων οξοαρσενοσακχάρων είναι γνωστή από προηγούμενες μελέτες (στις οποίες είχε αναλυθεί το δείγμα με τις παρούσες χρωματογραφικές συνθήκες). Στο χρωματογράφημα του Σχήματος 3.10, οι τέσσερις κύριες κορυφές αποδίδονται στα τέσσερα θειοαρσενοσάκχαρα. Ωστόσο, οι χρόνοι έκλουσης των δυο τελευταίων κορυφών είναι ιδιαίτερα μεγάλοι, γεγονός που οδήγησε στην προσθήκη μεθανόλης (5% κ.ο.) στο διάλυμα της κινητής φάσης, με σκοπό τη διευκόλυνση της έκλουσης των συστατικών. Να επισημάνουμε ότι με την τεχνική ICP-MS, επιτρέπεται η χρήση οργανικών διαλυτών μέχρι και 10% κ.ο. Η αύξηση του ποσοστού αυτού απαιτεί ειδικό εξοπλισμό (π.χ. ψυχόμενος θάλαμος εκνέφωσης ή αραίωση του εκλούσματος), που είτε δεν ήταν διαθέσιμος στην παρούσα μελέτη είτε είχε αρνητικές επιπτώσεις στην αποτελεσματικότητα της ανάλυσης (αραίωση του εκλούσματος ενδεχομένως να εμπόδιζε την ανίχνευση ιχνοποσοτήτων των υπό εξέταση ενώσεων).

Μέθοδος Β.2

Τροποποιώντας τη Μέθοδο Β.1, πραγματοποιήθηκε προσθήκη μεθανόλης (5% κ.ο.) στην κινητή φάση, διατηρώντας όλες τις υπόλοιπες παραμέτρους ίδιες με πριν. Έτσι, έπειτα από ανάλυση του δείγματος KP-1 και του πρότυπου διαλύματος S-9, προέκυψαν τα αποτελέσματα που φαίνονται στα Σχήματα 3.11 και 3.12.



Σχήμα 3.11. Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS του δείγματος KP-1, με χρωματογραφία αντίστροφης φάσης παρουσία ιοντικού ζεύγους.



Σχήμα 3.12. Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS του πρότυπου διαλύματος S-9, με χρωματογραφία αντίστροφης φάσης παρουσία ιοντικού ζεύγους.

Η προσθήκη μεθανόλης στην κινητή φάση, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του συνολικού χρόνου ανάλυσης, ωστόσο οι κορυφές σε μεγάλους χρόνους έκλουσης εξακολουθούν να παρουσιάζουν μεγάλο εύρος. Για το λόγο αυτό, προτάθηκε η αύξηση του ποσοστού μεθανόλης, μια λύση όμως που τελικά απορρίφθηκε, αφού όπως προαναφέρθηκε, υψηλές συγκεντρώσεις οργανικών διαλυτών δεν είναι συμβατές με το πλάσμα. Έτσι, αναζητήθηκαν άλλες λύσεις, όπως για παράδειγμα η χρησιμοποίηση στήλης μικρής διαμέτρου, από την οποία, υπό κατάλληλες συνθήκες, οι ενώσεις μπορούν να εκλουσθούν γρηγορότερα.

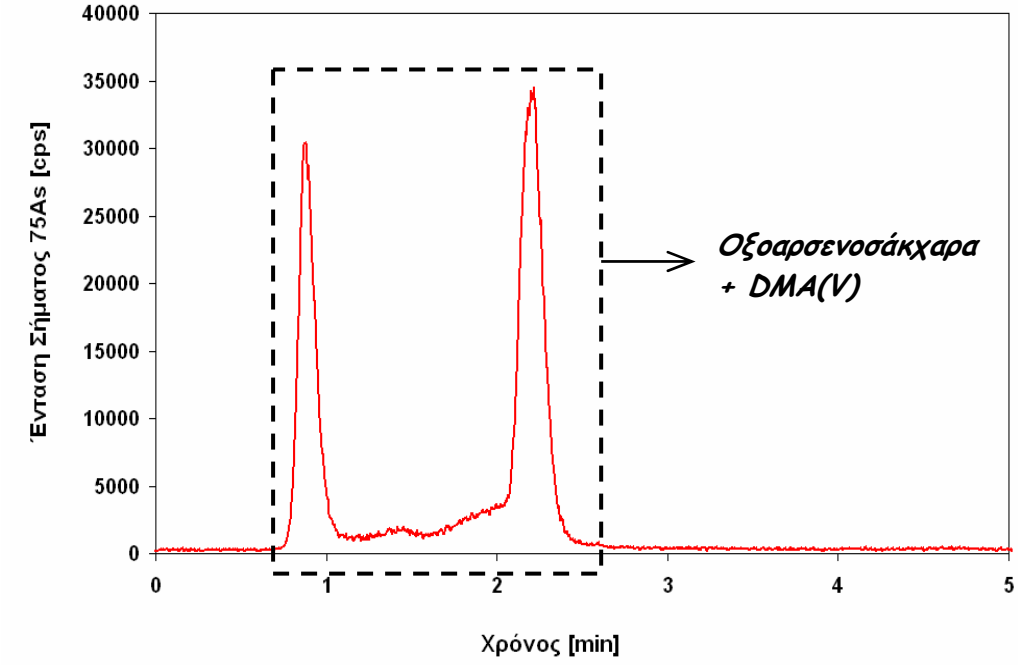
Γ. Χρωματογραφία Αντίστροφης Φάσης Παρουσία Ιοντικού Ζεύγους - Στήλη C18 Μικρής Διαμέτρου

Μέθοδος Γ.1

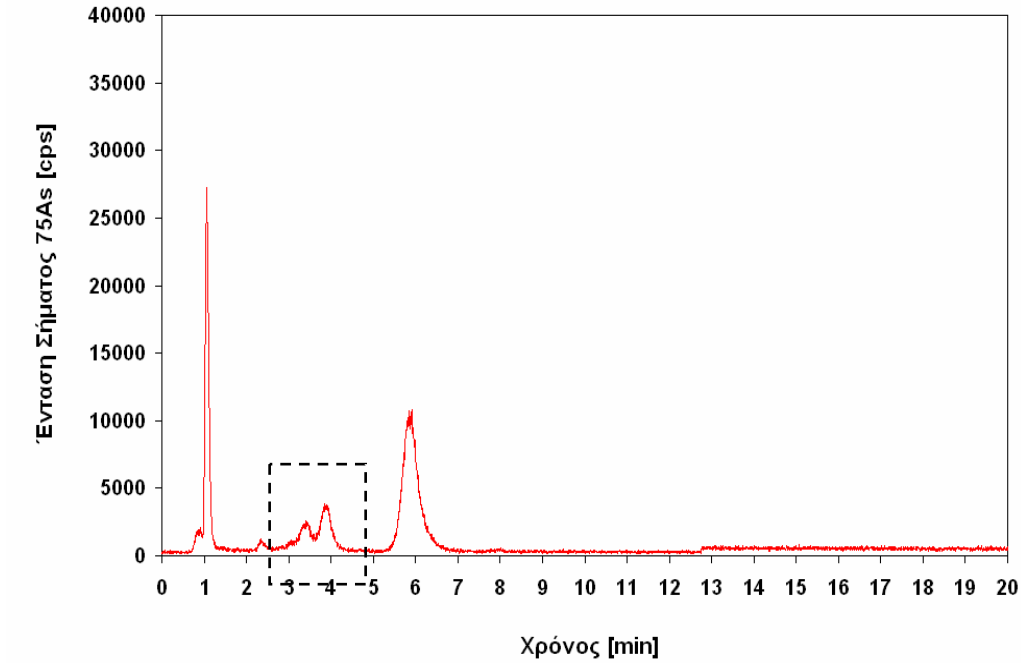
Στη συγκεκριμένη μέθοδο, χρησιμοποιήθηκε η στήλη Discovery C18 (Supelco, Bellefonte, PA, USA), με τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

- Μήκος x Εσωτερική Διάμετρος = 15.0 cm x 2.1 mm και μέγεθος σωματιδίων υλικού πλήρωσης (silica gel) 5 μm, στα οποία βρίσκονται προσαρτημένες αλυσίδες δεκαοκτώ ατόμων άνθρακα (οκταδέκυλοσιλάνια, C18).

Η έκλουση των συστατικών από τη στήλη πραγματοποιήθηκε με υδατικό διάλυμα TBAH (1 mM), περιεκτικότητας σε μεθανόλη 5% κ.ο. και pH 6.3. Επιλέχθηκε ταχύτητα ροής της κινητής φάσης ίση με 0.8 mL/min και βρόχος εισαγωγής δείγματος χωρητικότητας 20 μL. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν φαίνονται στα Σχήματα 3.13 και 3.14.



Σχήμα 3.13. Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS του δείγματος KP-1, με χρωματογραφία αντίστροφης φάσης παρουσία ιοντικού ζεύγους.

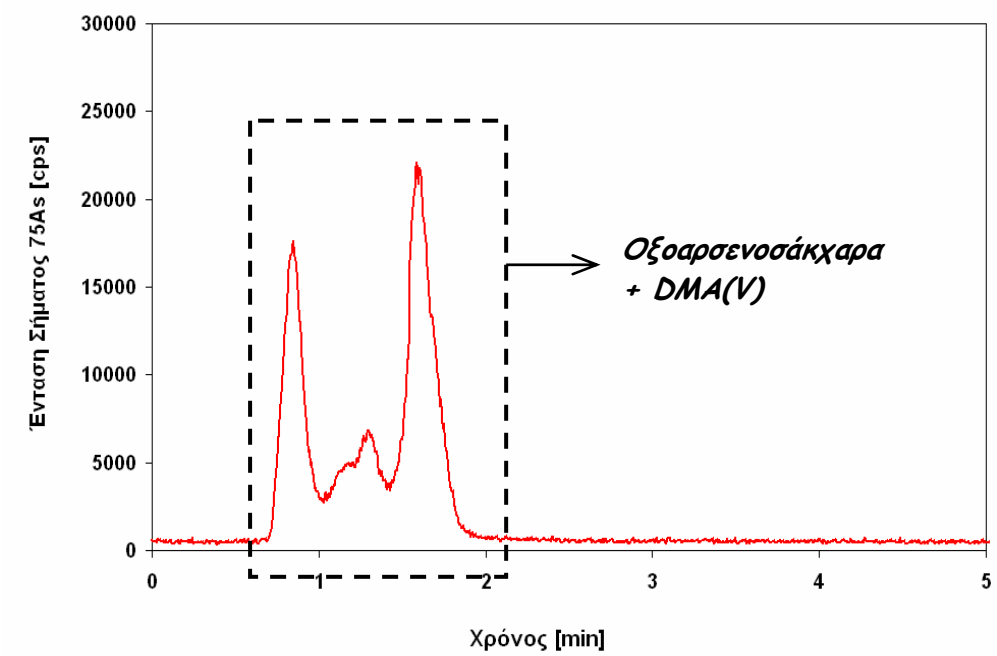


Σχήμα 3.14. Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS του πρότυπου διαλύματος S-9, με χρωματογραφία αντίστροφης φάσης παρουσία ιοντικού ζεύγους.

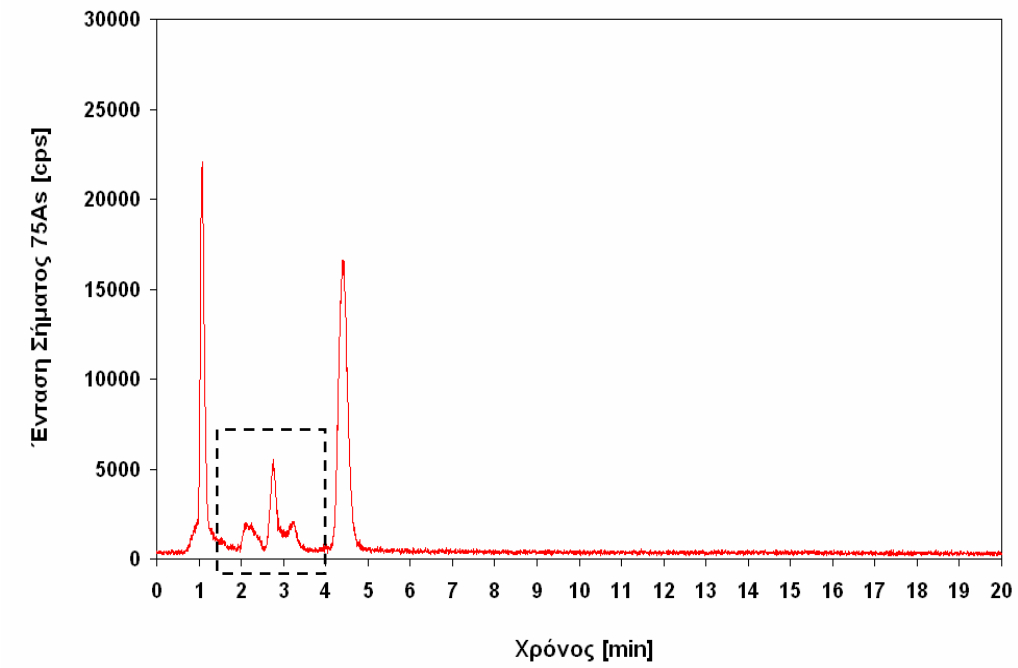
Όπως φαίνεται στα δυο παραπάνω χρωματογραφήματα, χρησιμοποιώντας στήλη αντίστροφης φάσης μικρής διαμέτρου με τις συνθήκες που αναφέρθηκαν προηγουμένως, επιτυγχάνεται σημαντική μείωση στους χρόνους κατακράτησης των συστατικών του πρότυπου διαλύματος S-9, με ταυτόχρονη όμως συνέκλουση κάποιων ενώσεων.

Μέθοδος Γ.2

Στην προσπάθεια να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα της συνέκλουσης των συστατικών, αυξήθηκε η συγκέντρωση του ιοντικού ζεύγους (TBAH) στην κινητή φάση. Το αντιδραστήριο ιοντικού ζεύγους σχηματίζει με τα ιονισμένα συστατικά του δείγματος ουδέτερα μόρια χαμηλής πολικότητας, τα οποία αλληλεπιδρούν με τη στατική φάση της στήλης και κατακρατούνται περισσότερο σε αυτή. Επομένως, η αύξηση της συγκέντρωσης του TBAH αναμένεται να προκαλέσει ισχυρότερη κατακράτηση κάποιων συστατικών στη στήλη, βελτιώνοντας το διαχωρισμό. Τροποποιώντας, λοιπόν, τη μέθοδο Γ.1, αυξήθηκε η συγκέντρωση του ιοντικού ζεύγους σε 5 mM, με όλες τις άλλες χρωματογραφικές παραμέτρους ίδιες με αυτές της μεθόδου Γ.1. Αναλύοντας το δείγμα KP-1 και το πρότυπο διάλυμα S-9, προέκυψαν τα αποτελέσματα που φαίνονται παρακάτω.



Σχήμα 3.15. Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS του δείγματος KP-1, με χρωματογραφία αντίστροφης φάσης παρουσία ιοντικού ζεύγους.

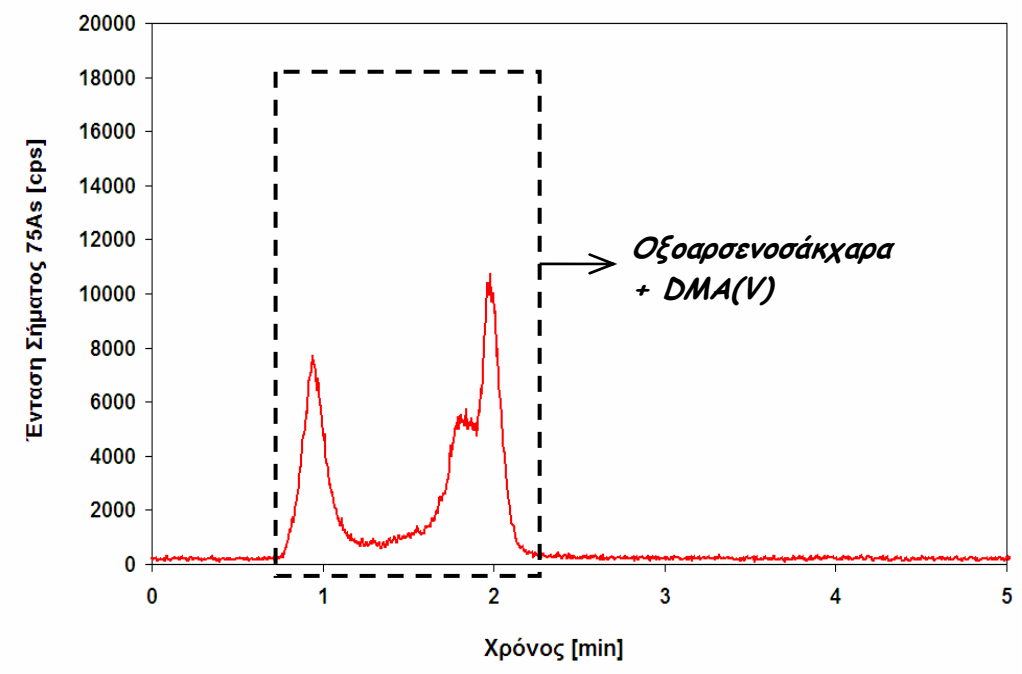


Σχήμα 3.16. Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS του πρότυπου διαλύματος S-9, με χρωματογραφία αντίστροφης φάσης παρουσία ιοντικού ζεύγους.

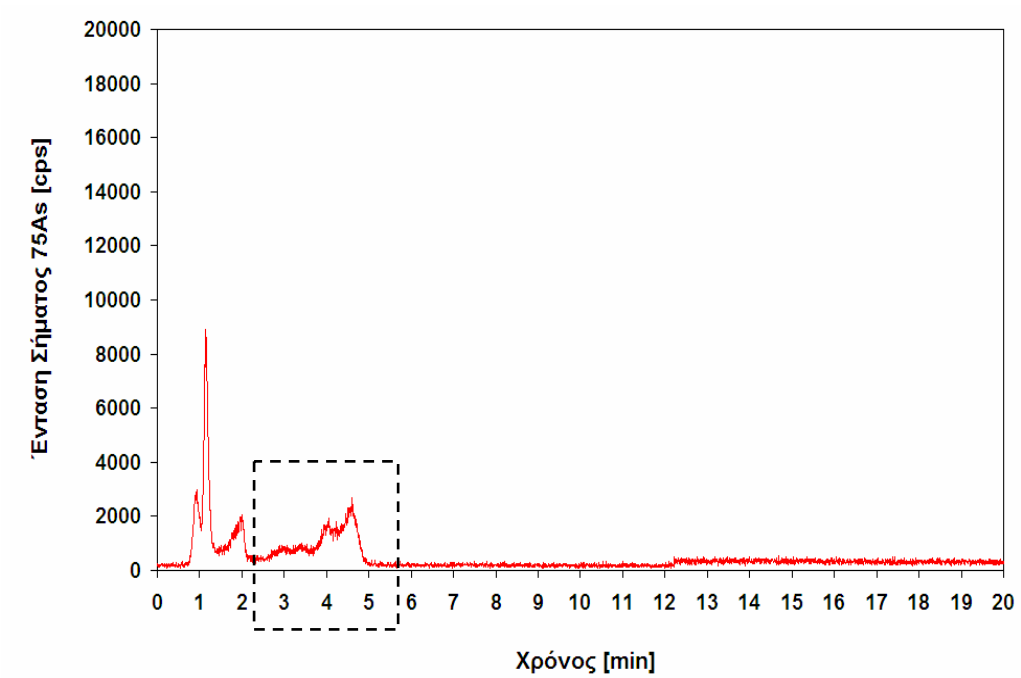
Όπως διαπιστώνεται, παρά την αύξηση της συγκέντρωσης του ιοντικού ζεύγους στην κινητή φάση, εξακολουθεί να λαμβάνει χώρα συνέκλουση κάποιων συστατικών (Σχήμα 3.16). Για το λόγο αυτό, αποφασίστηκε να εξεταστεί η επίδραση στο διαχωρισμό των συστατικών μιας άλλης παραμέτρου, του pH της κινητής φάσης.

Μέθοδος Γ.3

Αρχικά, το pH μειώθηκε από 6.3 σε 5.5. Οι υπόλοιπες χρωματογραφικές παράμετροι παρέμειναν ίδιες με αυτές της μεθόδου Γ.2, με εξαίρεση την ταχύτητα ροής της κινητής φάσης, η οποία μειώθηκε στο 0.7 mL/min (λόγω αυξημένης πίεσης που παρατηρήθηκε στο σύστημα HPLC). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν με τη συγκεκριμένη μέθοδο φαίνονται στα Σχήματα 3.17 και 3.18. Όπως διαπιστώνουμε, ο διαχωρισμός δεν βελτιώθηκε, αφού εξακολουθεί να λαμβάνει χώρα συνέκλουση συστατικών.



Σχήμα 3.17. Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS του δείγματος KP-1, με χρωματογραφία αντίστροφης φάσης παρουσία ιοντικού ζεύγους.

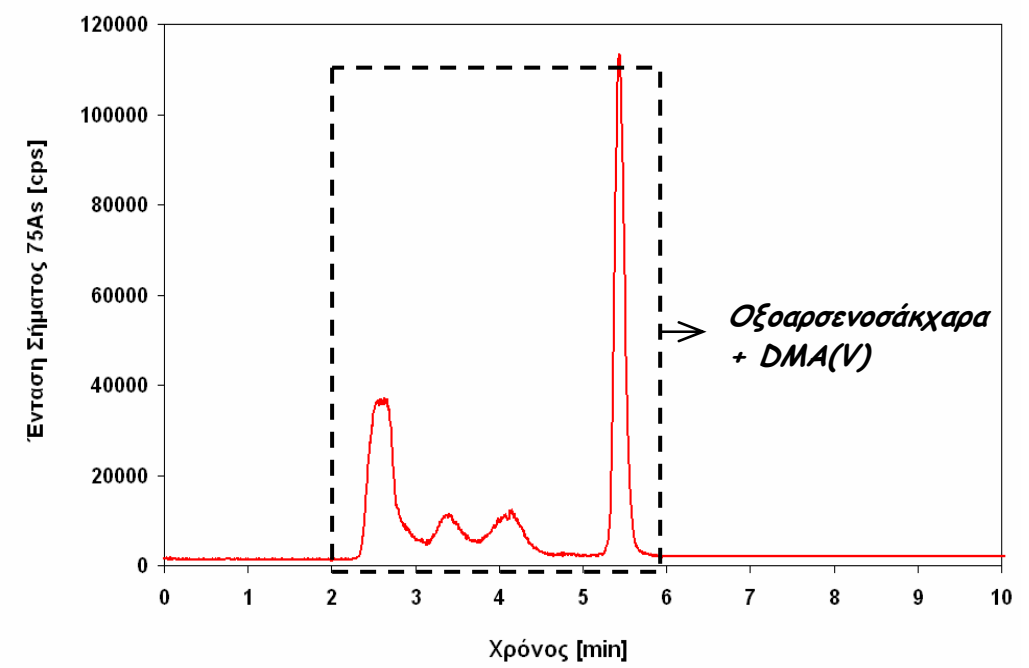


Σχήμα 3.18. Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS του πρότυπου διαλύματος S-9, με χρωματογραφία αντίστροφης φάσης παρουσία ιοντικού ζεύγους.

Μέθοδος Γ.4

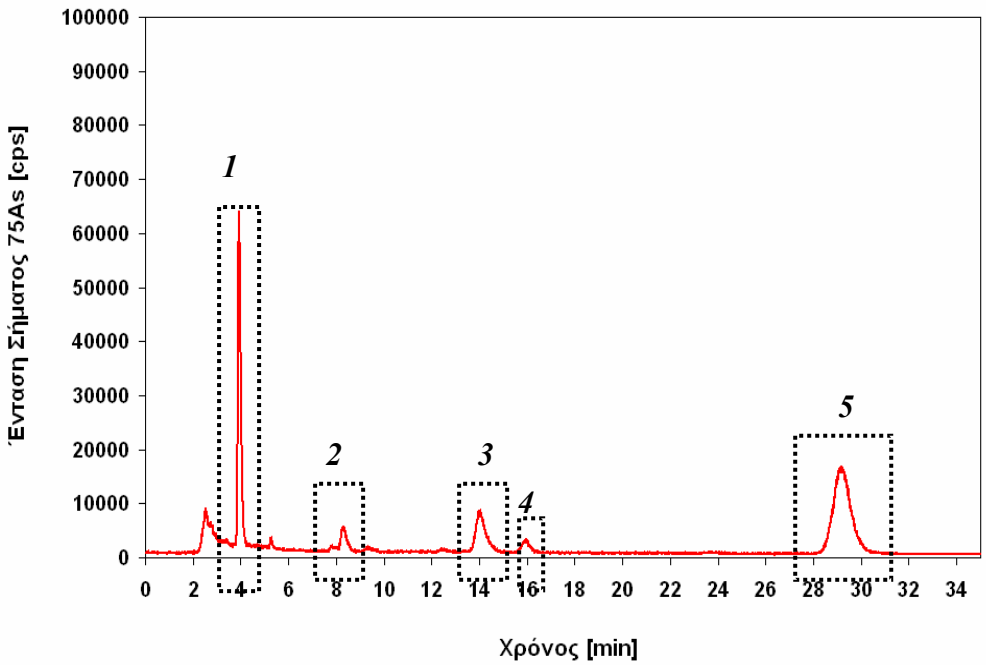
Το επόμενο βήμα ήταν η αύξηση του pH της κινητής φάσης από 5.5 σε 7.5. Οι υπόλοιπες χρωματογραφικές παράμετροι παρέμειναν ίδιες με αυτές της Μεθόδου Γ.3, με μοναδική διαφορά τη χρήση προστήλης Discovery C18 (2.0 x 2.1 mm, Bellefonte, PA, USA) πριν από την κύρια στήλη. Πραγματοποιήθηκε ισοκρατική έκλουση με υδατικό διάλυμα 5 mM TBAH, περιεκτικότητας σε μεθανόλη 5% κ.ο. και pH 7.5, όπως προαναφέρθηκε. Τέλος, επιλέχθηκε ταχύτητα ροής της κινητής φάσης ίση με 0.2 mL/min και βρόχος εισαγωγής δείγματος όγκου 20 μL.

Αναλύθηκαν ξανά το δείγμα KP-1 και το πρότυπο διάλυμα S-9, δίνοντας τα αποτελέσματα που απεικονίζονται στα Σχήματα 3.19 και 3.20.



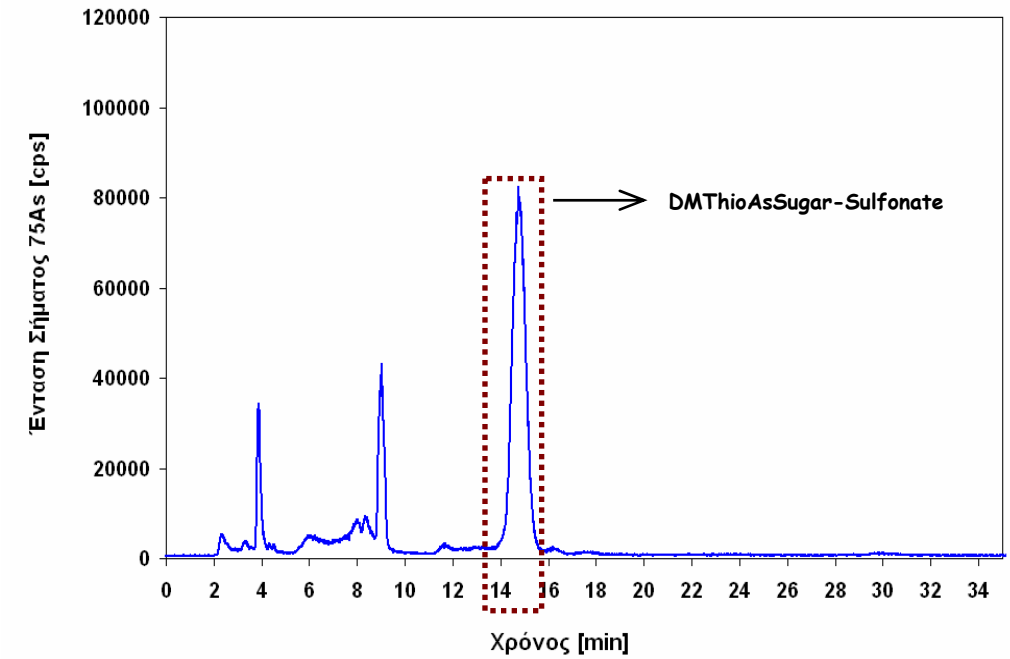
Σχήμα 3.19. Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS του δείγματος KP-1, με χρωματογραφία αντίστροφης φάσης παρουσία ιοντικού ζεύγους.

Όπως διαπιστώνεται, τα τέσσερα οξοαρσενοσάκχαρα τα οποία υπάρχουν στο δείγμα KP-1 δε διαχωρίζονται πλήρως, ωστόσο αυτό δεν αποτελεί πρόβλημα, αφού αντικειμενικός σκοπός της παρούσας αναλυτικής μεθοδολογίας ήταν η έκλουση και ο διαχωρισμός των θειοαρσενοσακχάρων -Sulfonate και –Sulfate, χωρίς να δίνεται ιδιαίτερη έμφαση στα υπόλοιπα συστατικά.



Σχήμα 3.20. Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS του πρότυπου διαλύματος S-9, με χρωματογραφία αντίστροφης φάσης παρουσία ιοντικού ζεύγους.

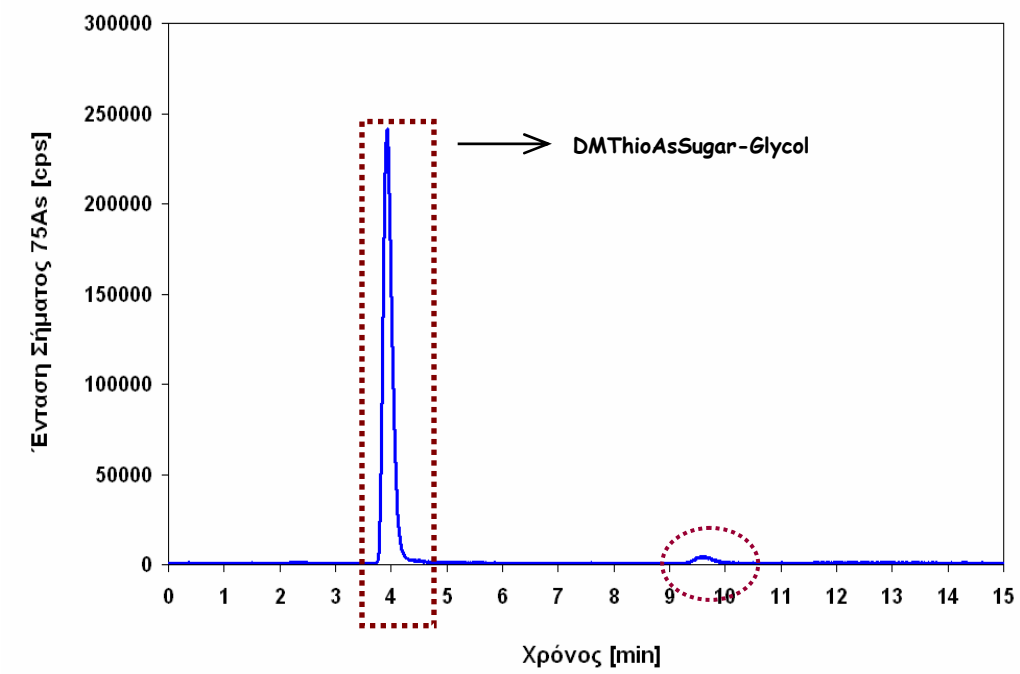
Όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.20, με τη συγκεκριμένη μέθοδο επιτυγχάνεται ικανοποιητικός διαχωρισμός των περισσότερων ενώσεων αρσενικού που συναντώνται στο πρότυπο διάλυμα S-9, με τις κορυφές που προκύπτουν να είναι οξείες, συμμετρικές και χωρίς αλληλεπικάλυψη. Οι κορυφές με τη μεγαλύτερη ένταση ανήκουν σε θειοαρσενοσάκχαρα, τα οποία είναι οι ενώσεις που συναντώνται στις υψηλότερες συγκεντρώσεις στο συγκεκριμένο διάλυμα (όπως αποδείχθηκε με τις αναλύσεις HPLC-ES-MS/MS), ενώ η κορυφή που εκλούεται στο χρονικό διάστημα 2-3 min αντιστοιχεί σε οξυγονούχες ενώσεις, οι οποίες δεν αντέδρασαν με το H_2S. Με σκοπό την ταυτοποίηση των κορυφών 1, 2, 3, 4 και 5, αναλύθηκαν πρότυπα διαλύματα θειοαρσενοσακχάρων (S-5, S-6, S-7 και S-8), καθώς και ένα πρότυπο διάλυμα της ένωσης DMA(V), το οποίο είχε υποστεί κατεργασία με H_2S. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν, παρουσιάζονται αναλυτικά στις παραγράφους που ακολουθούν.



Σχήμα 3.21. Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS του πρότυπου διαλύματος S-5, με χρωματογραφία αντίστροφης φάσης παρουσία ιοντικού ζεύγους.

Όπως προέκυψε από τις αναλύσεις HPLC-ES-MS/MS, το θειοαρσενοσάκχαρο DMThioAsSugar-Sulfonate είναι η ένωση με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση στο πρότυπο διάλυμα S-5, στο οποίο συναντώνται και τα υπόλοιπα θειοαρσενοσάκχαρα (-Glycol, -Phosphate, -Sulfate), αλλά σε μικρότερες αναλογίες. Άρα, η κύρια κορυφή που εμφανίζεται στο χρωματογράφημα του Σχήματος 3.21, αντιστοιχεί στο σάκχαρο DMThioAsSugar-Sulfonate και έπειτα από προσεκτική παρατήρηση διαπιστώνεται ότι ταιριάζει, ως προς το χρόνο και το σχήμα, με την κορυφή 3 του Σχήματος 3.20.

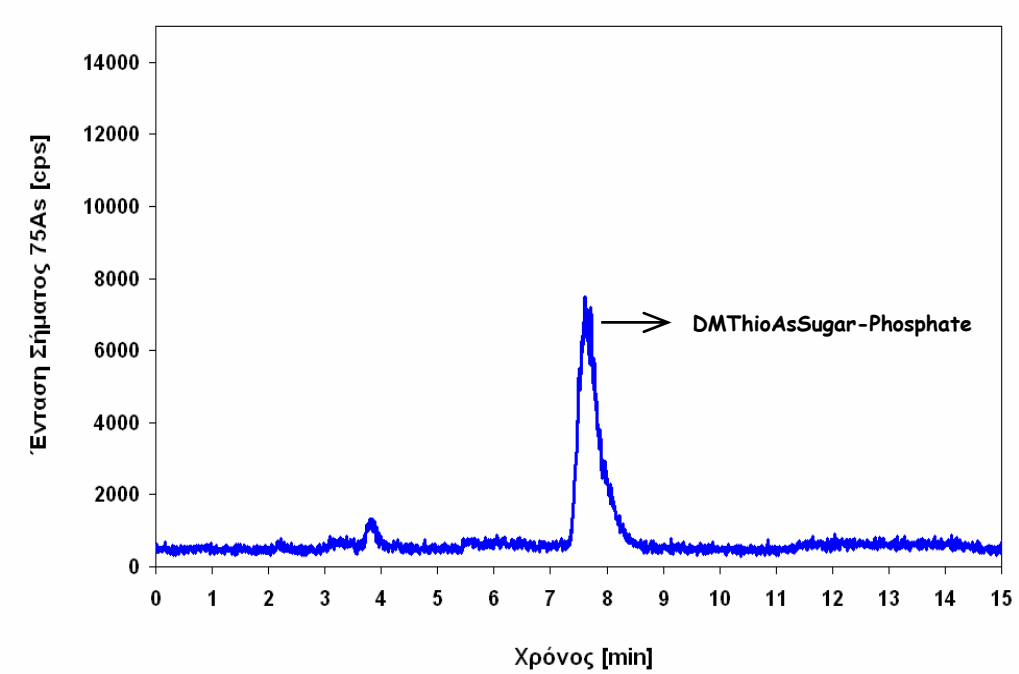
Ακολούθησε η ανάλυση του πρότυπου διαλύματος S-7, το οποίο με βάση τις αναλύσεις HPLC-ES-MS/MS, είναι εμπλουτισμένο με την ένωση DMThioAsSugar-Glycol. Στην ένωση αυτή επομένως, αντιστοιχεί η κύρια κορυφή που φαίνεται στο Σχήμα 3.22 και η οποία όπως προκύπτει έπειτα από σύγκριση με το χρωματογράφημα του πρότυπου διαλύματος S-9 (Σχήμα 3.20), ταιριάζει με την κορυφή 1.



Σχήμα 3.22. Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS του πρότυπου διαλύματος S-7, με χρωματογραφία αντίστροφης φάσης παρουσία ιοντικού ζεύγους.

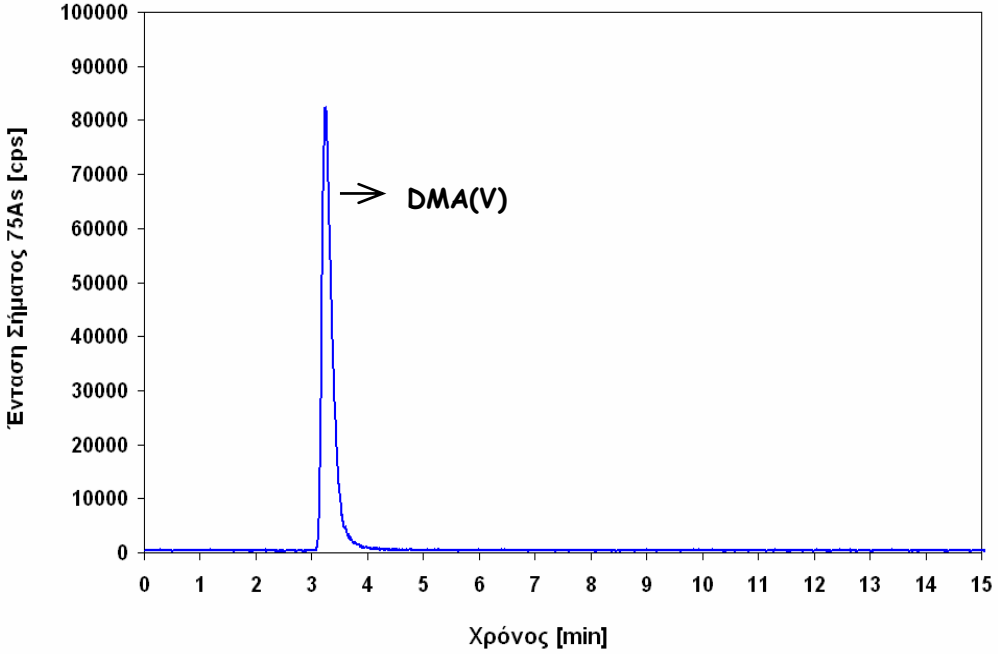
Στο παραπάνω χρωματογράφημα (Σχήμα 3.22), εκτός από την κύρια κορυφή που αντιστοιχεί στην ένωση DMThioAsSugar-Glycol, παρατηρείται και μια κορυφή μικρής έντασης (9-10 min), η οποία πιθανότατα ανήκει σε κάποιο θειοαρσενοσάκχαρο που σχηματίστηκε κατά την αντίδραση με H_2S. Η ύπαρξη αυτής της κορυφής δικαιολογείται από το γεγονός ότι το αρχικό διάλυμα (S-3) από το οποίο προήλθε το S-7, παρασκευάστηκε έπειτα από μερική απομόνωση του οξοαρσενοσακχάρου DMAsSugar-Glycol από φύκη, επομένως δεν πρόκειται για εντελώς καθαρή ουσία.

Ακολούθησε η ανάλυση του πρότυπου διαλύματος S-8, το οποίο είναι εμπλουτισμένο με την ένωση DMThioAsSugar-Phosphate. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο χρωματογράφημα του Σχήματος 3.23, όπου η κύρια κορυφή (7.5 - 8.5 min) αντιπροσωπεύει την παραπάνω ένωση. Σε αντίστοιχο χρόνο στο χρωματογράφημα του Σχήματος 3.20, διαπιστώνεται η ύπαρξη της κορυφής 2.

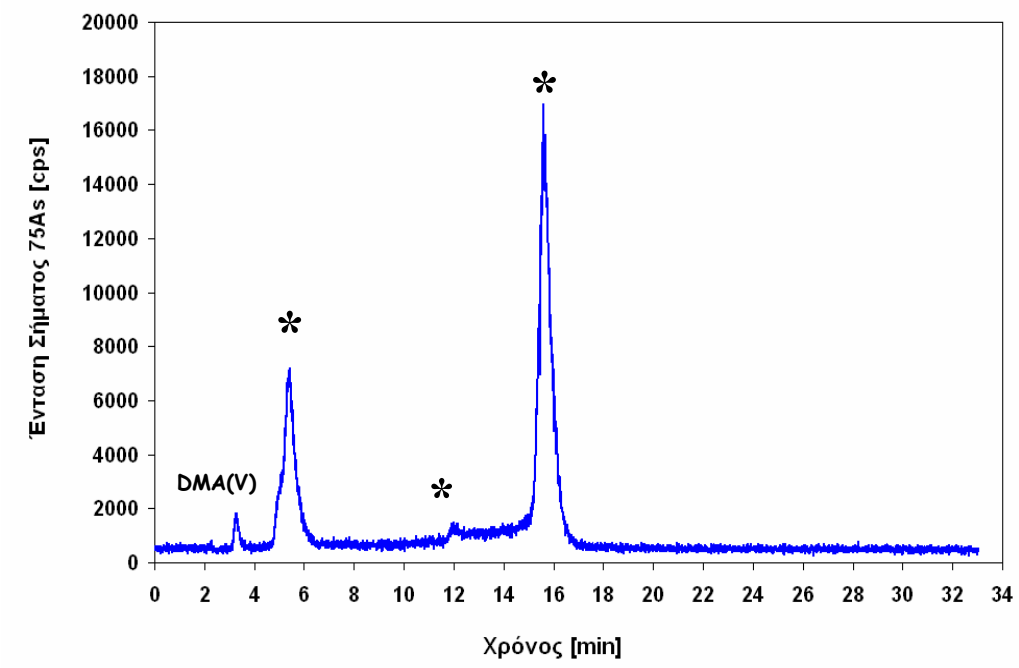


Σχήμα 3.23. Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS του πρότυπου διαλύματος S-8, με χρωματογραφία αντίστροφης φάσης παρουσία ιοντικού ζεύγους.

Στη συνέχεια, αναλύθηκε ένα πρότυπο διάλυμα της ένωσης DMA(V) (συγκέντρωσης 400 μg/L), καθώς και το αντίστοιχο διάλυμα έπειτα από κατεργασία με H_2S. Τα αποτελέσματα φαίνονται στα σχήματα που ακολουθούν.



Σχήμα 3.24. Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS πρότυπου διαλύματος DMA(V), με χρωματογραφία αντίστροφης φάσης παρουσία ιοντικού ζεύγους.

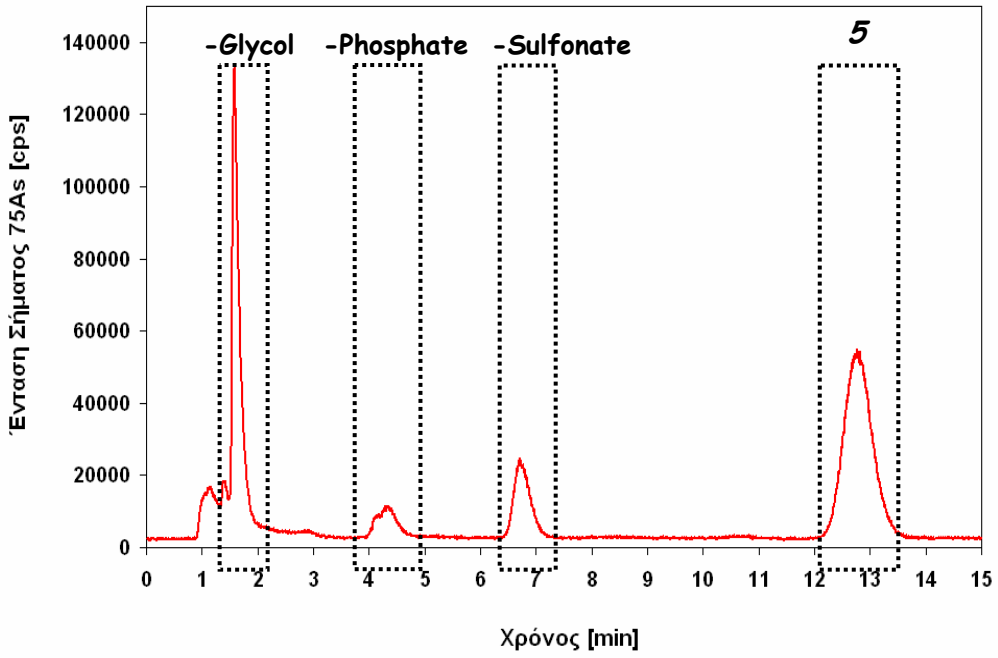


Σχήμα 3.25. Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS διαλύματος DMA(V)+ H_2S, με χρωματογραφία αντίστροφης φάσης παρουσία ιοντικού ζεύγους.

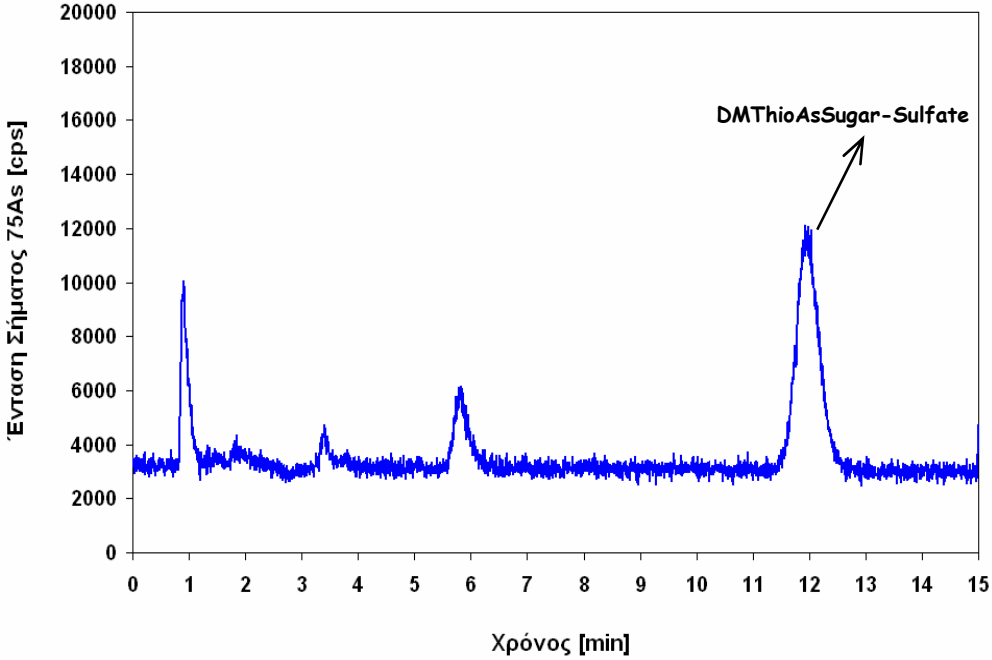
Όπως φαίνεται στα δύο παραπάνω χρωματογραφήματα, κατά την αντίδραση με H_2S της ένωσης DMA(V) σχηματίζονται περισσότερα από ένα παράγωγα (τα οποία συμβολίζονται με αστερίσκο (*)). Το γεγονός ότι στο μόριο της ένωσης DMA(V) υπάρχουν δύο άτομα οξυγόνου συνδεδεμένα με το άτομο του αρσενικού, είναι δυνατόν να συμβάλλει στο σχηματισμό περισσότερων από μιας θειούχων ενώσεων, λόγω της αντικατάστασης του οξυγόνου από το θείο. Συγκρίνοντας τα χρωματογραφήματα στα Σχήματα 3.20 και 3.25, παρατηρείται ότι η κορυφή σε χρόνο έκλουσης 16 min, εμφανίζεται και στις δυο περιπτώσεις. Προφανώς, το DMA(V), το οποίο υπάρχει στο εκχύλισμα KP-1, αντέδρασε με το H_2S σχηματίζοντας το συγκεκριμένο παράγωγο. Η διευκρίνιση της δομής των θειούχων παραγώγων του DMA(V) αποτελεί αντικείμενο ξεχωριστής έρευνας και δεν εξετάστηκε στην παρούσα μελέτη.

Η κορυφή 5 (Σχήμα 3.20) ταυτοποιήθηκε μετέπειτα, χρησιμοποιώντας το πρότυπο διάλυμα S-6 (εμπλουτισμένο με την ένωση DMThioAsSugar-Sulfate). Η ταχύτητα ροής αυξήθηκε από 0.2 σε 0.5 mL/min (στοχεύοντας στη μείωση του χρόνου ανάλυσης), ενώ αναλύθηκε ξανά το πρότυπο διάλυμα S-9, με σκοπό τον έλεγχο των χρόνων έκλουσης των συστατικών με τη δεδομένη ταχύτητα ροής. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα παρακάτω σχήματα, όπου φαίνεται η σημαντική

μείωση των χρόνων έκλουσης των συστατικών, σαν συνέπεια της αύξησης της ταχύτητας ροής.



Σχήμα 3.26. Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS πρότυπου διαλύματος S-9, με χρωματογραφία αντίστροφης φάσης παρουσία ιοντικού ζεύγους.



Σχήμα 3.27. Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS πρότυπου διαλύματος S-6, με χρωματογραφία αντίστροφης φάσης παρουσία ιοντικού ζεύγους.

Η κορυφή με τη μεγαλύτερη ένταση που εκλούεται τελευταία κατά την ανάλυση του διαλύματος S-6 (Σχήμα 3.27), αντιστοιχεί στο θειοαρσενοσάκχαρο -Sulfate. Παράλληλα, συγκρίνοντας τα χρωματογραφήματα στα Σχήματα 3.26 και 3.27, προκύπτει ότι η τελευταία σε σειρά έκλουσης κορυφή στο χρωματογράφημα του πρότυπου διαλύματος S-9 ανήκει στο θειοαρσενοσάκχαρο -Sulfate.

Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι στις αναλύσεις με χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, μεταξύ δυο διαδοχικών αναλύσεων, παρατηρούνται συνήθως μικρές μεταβολές στους χρόνους έκλουσης των συστατικών. Το φαινόμενο αυτό, οφείλεται στο γεγονός ότι στη συγκεκριμένη χρωματογραφία η αλληλεπίδραση των συστατικών με τη στατική φάση δεν είναι πλήρως διευκρινισμένη, με αποτέλεσμα σε πολλές περιπτώσεις να μην υπάρχει πλήρης ταύτιση των αποτελεσμάτων, ενώ ακόμα και μικρές διαφορές στη σύσταση της κινητής φάσης επηρεάζουν την έκλουση των συστατικών και το διαχωρισμό. Ωστόσο, στις περισσότερες περιπτώσεις αυτό δεν αποτελεί πρόβλημα, αφού οι χρονικές διαφορές είναι αμελητέες και επιπλέον η ταυτοποίηση μιας κορυφής κατά την ανάλυση με χρωματογραφία HPLC, δεν βασίζεται μόνο στο χρόνο έκλουσης αλλά και στο σχήμα της κορυφής. Έτσι λοιπόν, κορυφές που αντιστοιχούν στα ίδια συστατικά, παρουσιάζουν, εκτός από ίδιο χρόνο έκλουσης, και το ίδιο σχήμα, γεγονός που συμβάλλει στο χαρακτηρισμό τους.

Συνοψίζοντας λοιπόν, στο στάδιο αυτό της μελέτης επιτεύχθηκε η ανάπτυξη μεθόδου HPLC-ICP-MS, για την ανίχνευση και το χαρακτηρισμό των καινούριων θειοαρσενοσακχάρων -Sulfonate και -Sulfate, που αποτελούσαν και το βασικό στόχο της συγκεκριμένης διατριβής. Επίσης, με τη συγκεκριμένη μέθοδο κατέστη εφικτός ο διαχωρισμός του θειοαρσενοσακχάρου -Phosphate. Αντίθετα, το θειοαρσενοσάκχαρο -Glycol συνεκλούεται με τις οξυγονούχες οργανοαρσενικικές ενώσεις που υπάρχουν στα εξεταζόμενα δείγματα, χωρίς όμως αυτό να αποτελεί πρόβλημα, αφού η συγκεκριμένη ένωση έχει μελετηθεί στο παρελθόν από άλλες ερευνητικές ομάδες και δεν αποτελούσε πρωταρχικό στόχο της μελέτης μας. Οι βασικότερες παράμετροι της βέλτιστης χρωματογραφικής μεθόδου παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

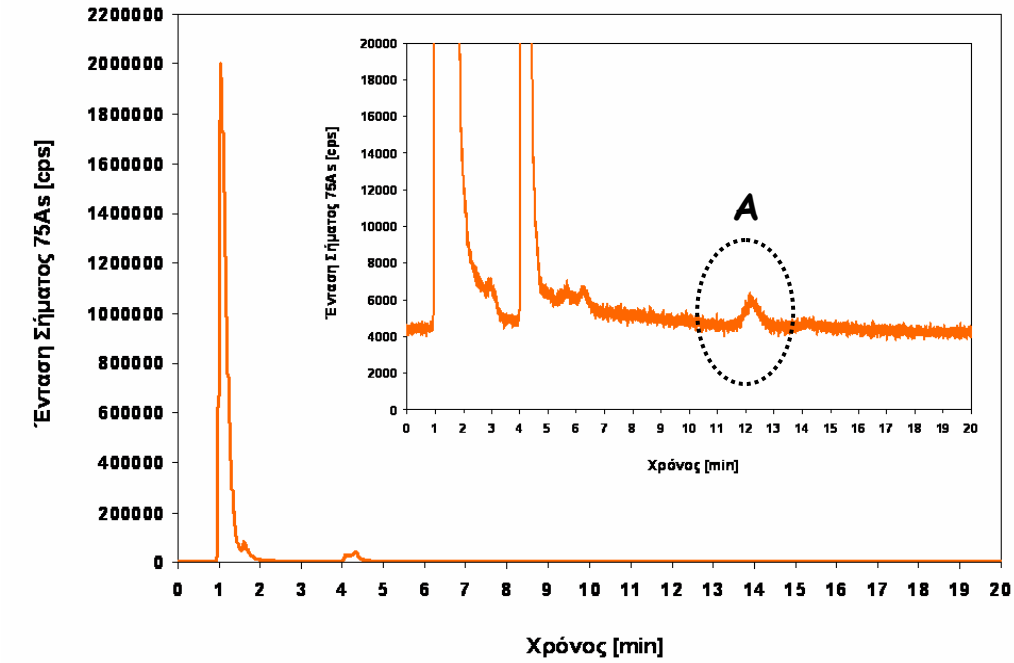
Πίνακας 3.8. Μέθοδος HPLC-ICP-MS για την ανίχνευση των θειοαρσενοσακχάρων

Στήλη	Κινητή φάση	Ταχύτητα Ροής (mL/min)	Loop (μL)
Αντίστροφης Φάσης C18 (150*2.1mm)	TBAH, 5mM, pH = 7.5, 5% MeOH	0.5	20

3.3. Εφαρμογή Μεθοδων HPLC-ICP-MS και HPLC-ES-MS/MS για την ανιχνευση και το χαρακτηρισμο Καινουριων Θειοαρσενοσακχαρων σε Θαλασσιους Οργανισμους

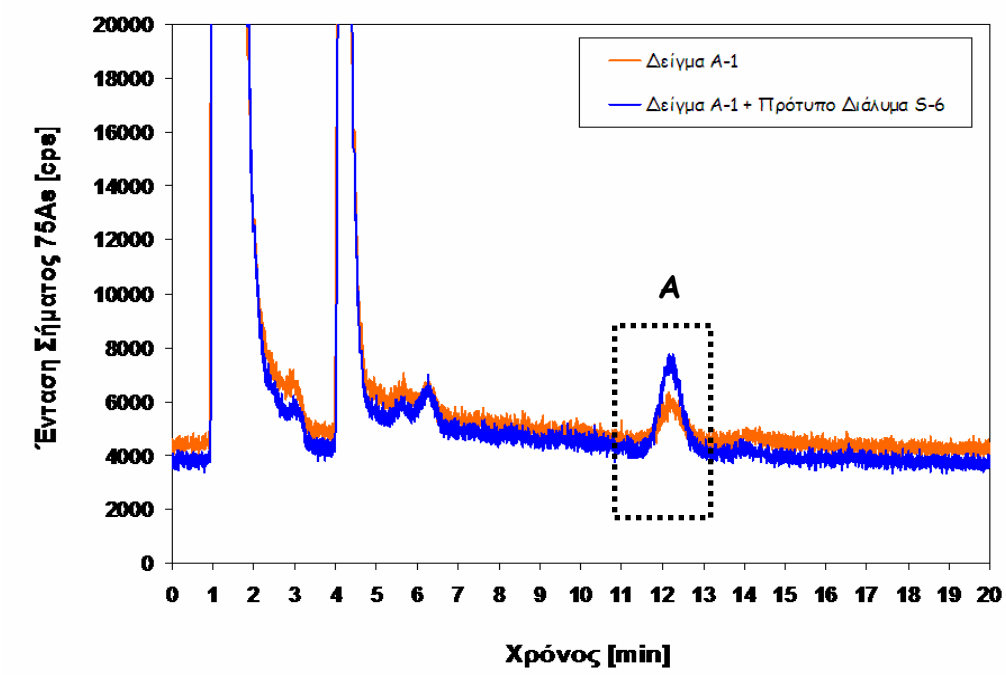
Έπειτα από την ανάπτυξη μεθόδου διαχωρισμού και ανίχνευσης των θειοαρσενοσακχάρων -Sulfonate και -Sulfate, ακολούθησε η εφαρμογή της μεθόδου σε θαλάσσια δείγματα. Στο σημείο αυτό, πρέπει να επισημάνουμε ότι πριν την ανάλυση των δειγμάτων γινόταν έλεγχος της αξιοπιστίας της μεθόδου, με την ανάλυση πρότυπων διαλυμάτων. Υπενθυμίζεται ότι η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τις αναλύσεις είναι αυτή που φαίνεται στον Πίνακα 3.8.

Αρχικά, η έρευνα επικεντρώθηκε στην ανάλυση δειγμάτων θαλάσσιων οργανισμών, όπου είχαν ανακαλυφθεί τα πρώτα μέλη της κατηγορίας των θεοαρσενοσακχάρων (-Glycol, -Phosphate). Το πρώτο δείγμα που αναλύθηκε (Δείγμα Α-1) ήταν εκχύλισμα οστρακοειδών (γνωστά με την ονομασία κυδώνια, clams), της ικογένεια *Venus verrucosa* (Εικόνα 4.1), που αγοράστηκε σε αγορά τροφίμων. Οι συνθήκες αποθήκευσης αλλά και η μέθοδος εκχύλισης των δειγμάτων περιγράφονται αναλυτικά στο Πειραματικό Μέρος της εργασίας. Το χρωματογράφημα που προέκυψε από την ανάλυση φαίνεται στο Σχήμα 3.28.



Σχήμα 3.28 Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS του Δείγματος Α-1.

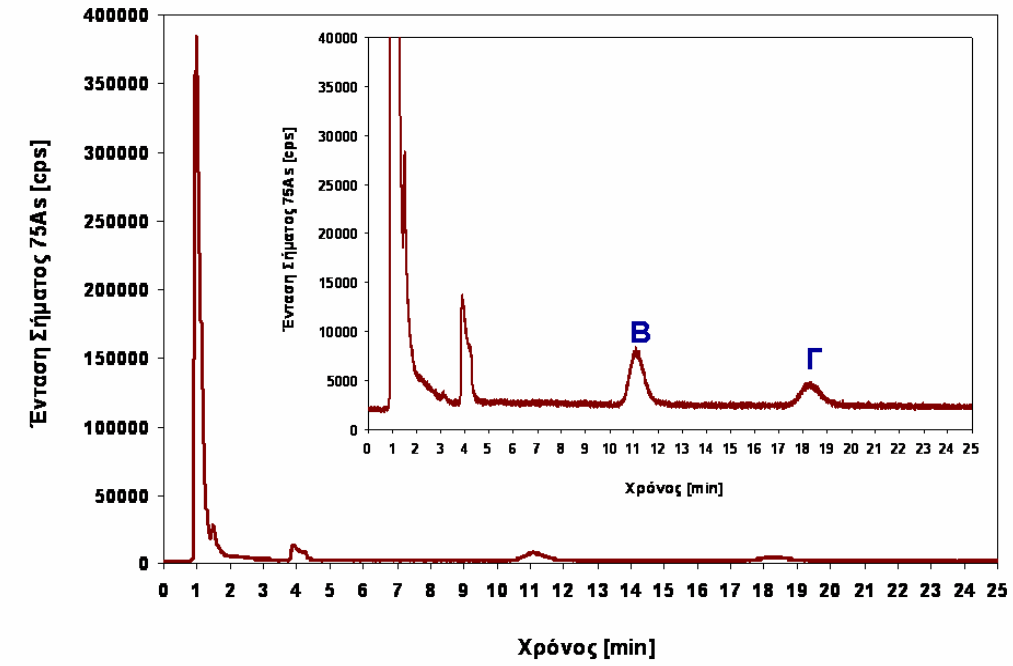
Στο Σχήμα 3.28, οι κορυφές που εκλούονται μεταξύ 1 – 2 min αντιστοιχούν σε οξοαρσενικικά είδη και ουδέτερα ή θετικά φορτισμένα μόρια, για τα οποία ο διαχωρισμός δεν είναι αποτελεσματικός. Το ενδιαφέρον εστιάστηκε στην κορυφή Α, η οποία ταυτίζεται, ως προς το χρόνο έκλουσης αλλά και το σχήμα, με την κορυφή που αντιστοιχεί στην ένωση DMThioAsSugar-Sulfate στο χρωματογράφημα του πρότυπου διαλύμματος S-6 (Σχήμα 3.27). Για την επιβεβαίωση της παραπάνω υπόθεσης, κρίθηκε απαραίτητος ο εμβολιασμός (spiking) του δείγματος Α-1 με το πρότυπο διάλυμα S-6. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση του εμβολιασμένου δείγματος φαίνονται στο παρακάτω χρωματογράφημα.



Σχήμα 3.29. Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS του εμβολιασμένου (με το πρότυπο διάλυμα S-6) Δείγματος Α-1.

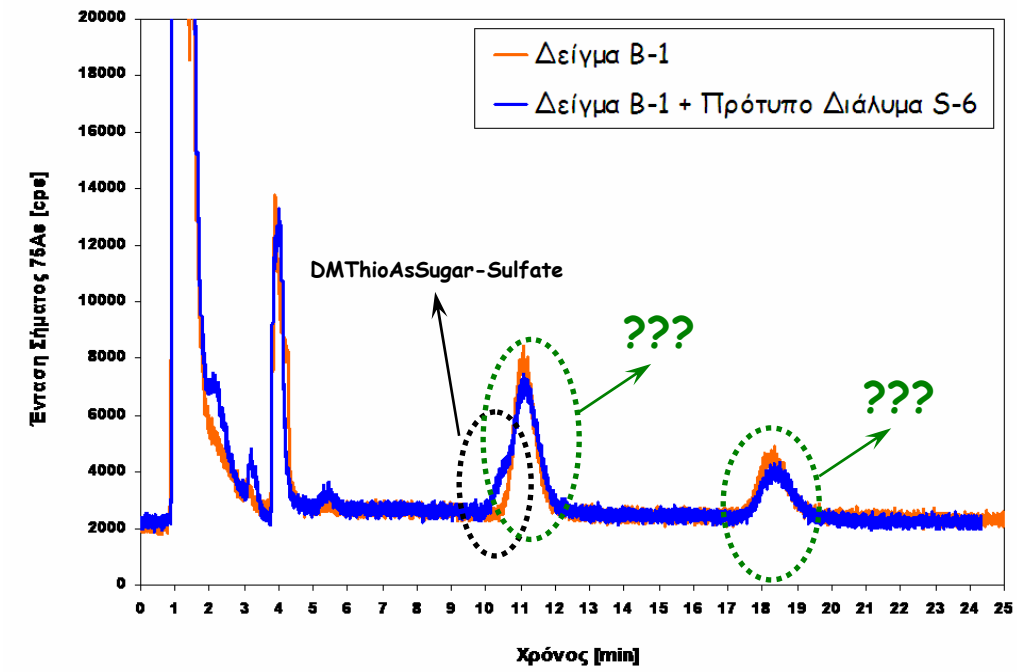
Όπως διαπιστώνεται από το παραπάνω χρωματογράφημα, μετά τον εμβολιασμό του δείγματος η κορυφή Α ενισχύεται, ενώ η ένταση των υπόλοιπων κορυφών παραμένει σχεδόν αμετάβλητη. Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η συγκεκριμένη κορυφή πράγματι αντιστοιχεί στο θειοαρσενοσάκχαρο DMThioAsSugar-Sulfate.

Το επόμενο δείγμα που αναλύθηκε (Δείγμα Β-1) ήταν ένα εκχύλισμα μπλέ μυδιού (blue mussel, Εικόνα 1), της οικογένειας *Mytilus edulis,* το οποίο επίσης αγοράστηκε σε αγορά τροφίμων. Από την ανάλυση του συγκεκριμένου δείγματος προέκυψε το παρακάτω χρωματογράφημα.



Σχήμα 3.30. Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS του Δείγματος Β-1.

Στο χρωματογράφημα του Σχήματος 3.30, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι κορυφές Β και Γ. Η αρχική υπόθεση σχετικά με την κορυφή Β, ήταν ότι αντιστοιχεί στην ένωση DMThioAsSugar-Sulfate. Ωστόσο, ο εμβολιασμός του δείγματος με το πρότυπο διάλυμα της ένωσης αυτής (S-6), αποκάλυψε το σχηματισμό δυο διαφορετικών κορυφών, όπως διακρίνεται στο Σχήμα 3.31. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει ότι η αρχική υπόθεση ήταν λανθασμένη και ότι τελικά η κορυφή Β δεν ανήκει στο θειοαρσενοσάκχαρο -Sulfate. Η κορυφή αυτή, λοιπόν, αντιστοιχεί σε κάποια άγνωστη ένωση αρσενικού, πιθανότατα θειούχα, αν λάβουμε υπόψη ότι παρουσιάζει παρόμοια χρωματογραφική συμπεριφορά με τα θειοαρσενοσάκχαρα -Sulfonate και -Sulfate (εκλούεται σε παραπλήσιο χρόνο με αυτά).



Σχήμα 3.31. Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS του εμβολιασμένου (με το πρότυπο διάλυμα S-6) Δείγματος B-1.

Ο χαρακτηρισμός των δυο άγνωστων ενώσεων του δείγματος B-1 με την τεχνική HPLC-ES-MS/MS δεν αποτελούσε ιδανική λύση, αφού, αφενός μεν οι συγκεντρώσεις των ενώσεων αυτών στο συγκεκριμένο δείγμα είναι πολύ μικρές, αφετέρου η μήτρα του δείγματος είναι ιδιαίτερα πολύπλοκη για ανάλυση με τη συγκεκριμένη τεχνική.

Στο σημείο αυτό πρέπει να διευκρινιστεί ότι ο λόγος του όγκου του πρότυπου διαλύματος εμβολιασμού προς τον όγκο του εκχυλίσματος (spike/ extractant ratio) σε κάθε περίπτωση επιλέχθηκε έτσι ώστε η ποσότητα του εμβολιασμένου συστατικού να είναι ίση με την ποσότητα του συστατικού αυτού στο εξεταζόμενο δείγμα.

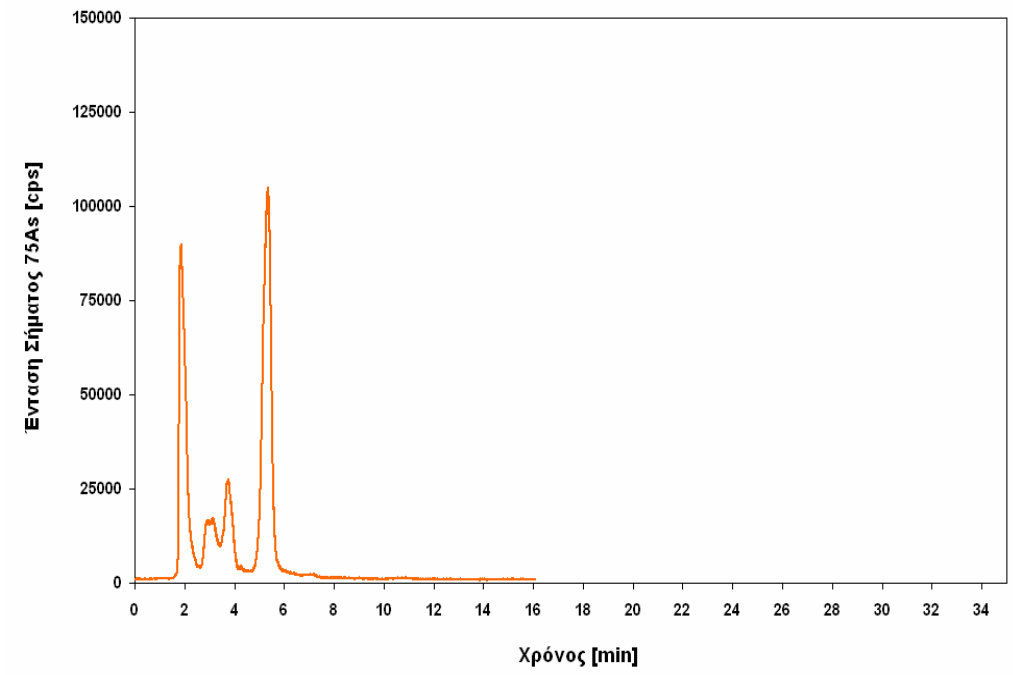
Στην εικόνα 1 φαίνονται τα οστρακοειδή τα οποία αναλύθηκαν σε αυτό το στάδιο της μελέτης.

α β

Εικόνα 1. Θαλάσσιοι οργανισμοί που αναλύθηκαν με HPLC-ICP-MS (α) κυδώνια της οικογένειας *Venus verrucosa* και (β) μύδια της οικογένειας *Mytilus edulis*.

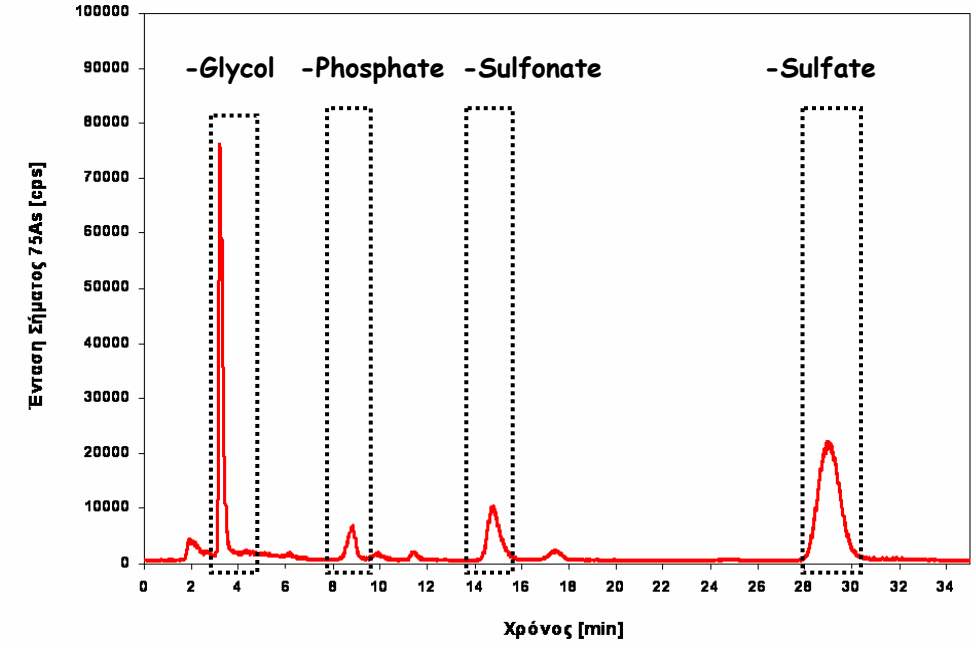
Στη συνέχεια, αποφασίστηκε η χρησιμοποίηση συμβατικής στήλης αντίστροφης φάσης C18 (15.0 cm x 4.6 mm). Η στήλη C18 μικρής διαμέτρου (15.0 cm x 2.1 mm), η οποία χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη και την εφαρμογή της μεθόδου HPLC-ICP-MS, δεν ανταποκρινόταν πλέον στις προδιαγραφές της, λόγω υπερφόρτωσης με δείγματα υψηλής συγκέντρωσης σε θείο (πρότυπα διαλύματα θειοαρσενοσακχάρων), αλλά και δείγματα ιδιαίτερα πολύπλοκης μήτρας (βιολογικοί ιστοί θαλάσσιων οργανισμών). Η επιλογή στήλης μεγαλύτερης διαμέτρου έγινε λόγω της μεγαλύτερης χωρητικότητας της στήλης αυτής, γεγονός που συνεπάγεται και αύξηση του χρόνου ζωής της. Η έκλουση των συστατικών και σε αυτή την περίπτωση πραγματοποιήθηκε με υδατικό διάλυμα TBAH (5 mM), περιεκτικότητας σε μεθανόλη 5% κ.ο. και pH=7.5. Τέλος, επιλέχθηκε ταχύτητα ροής κινητής φάσης ίση με 1.0 mL/min και βρόχος εισαγωγής δείγματος όγκου 50 μL.

Από την ανάλυση του δείγματος KP-1 αλλά και του πρότυπου διαλύματος S-9, προέκυψαν τα παρακάτω χρωματογραφήματα.



Σχήμα 3.32. Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS του δείγματος KP-1.

Στο παραπάνω χρωματογράφημα, οι τέσσερις κορυφές αντιστοιχούν, με βάση τη σειρά έκλουσης, στα οξοαρσενοσάκχαρα -Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate.

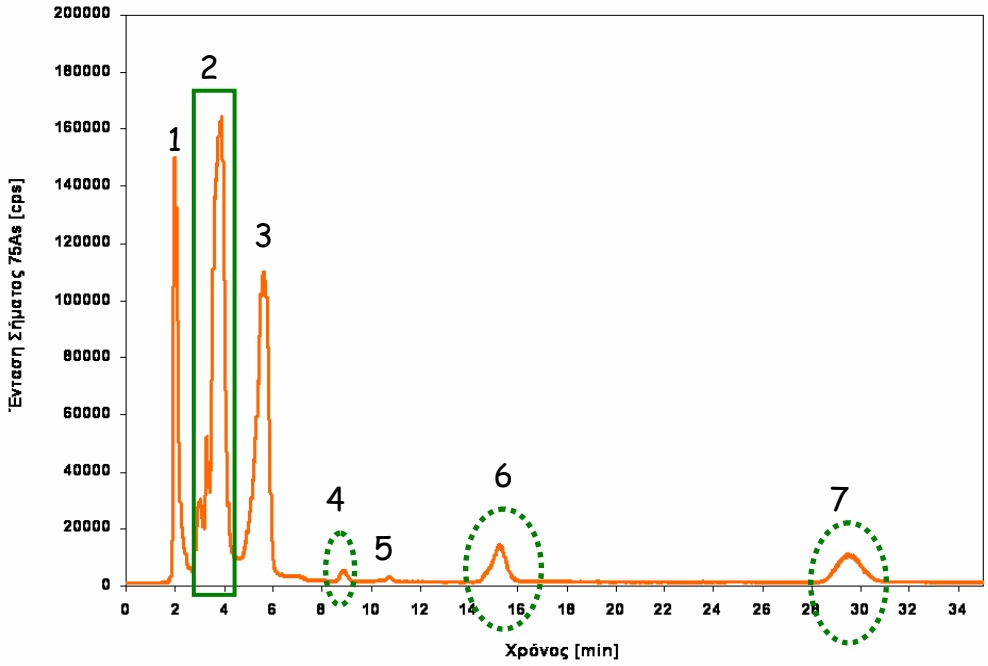


Σχήμα 3.33. Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS του πρότυπου διαλύματος S-9.

Ο διαχωρισμός για τα τέσσερα θειοαρσενοσάκχαρα, όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.33, είναι πλήρης, ενώ οι χρόνοι έκλουσης των συστατικών αυξήθηκαν.

Στη συνέχεια, εξετάστηκε ένα είδος δείγματος κατεργασμένων, εμπορικά διαθέσιμων φυκών (σε μορφή σκόνης), που χρησιμοποιείται σαν συμπλήρωμα διατροφής. Πρόκειται για το δείγμα Kelp Powder-2 (KP-2), που είναι το ίδιο με το δείγμα Kelp Powder-1, με μοναδική διαφορά την παρτίδα από την οποία προέρχονται τα δυο δείγματα και την ημερομηνία προμήθειάς τους (1999 και 2004 για τα KP-1 και KP-2 αντίστοιχα).

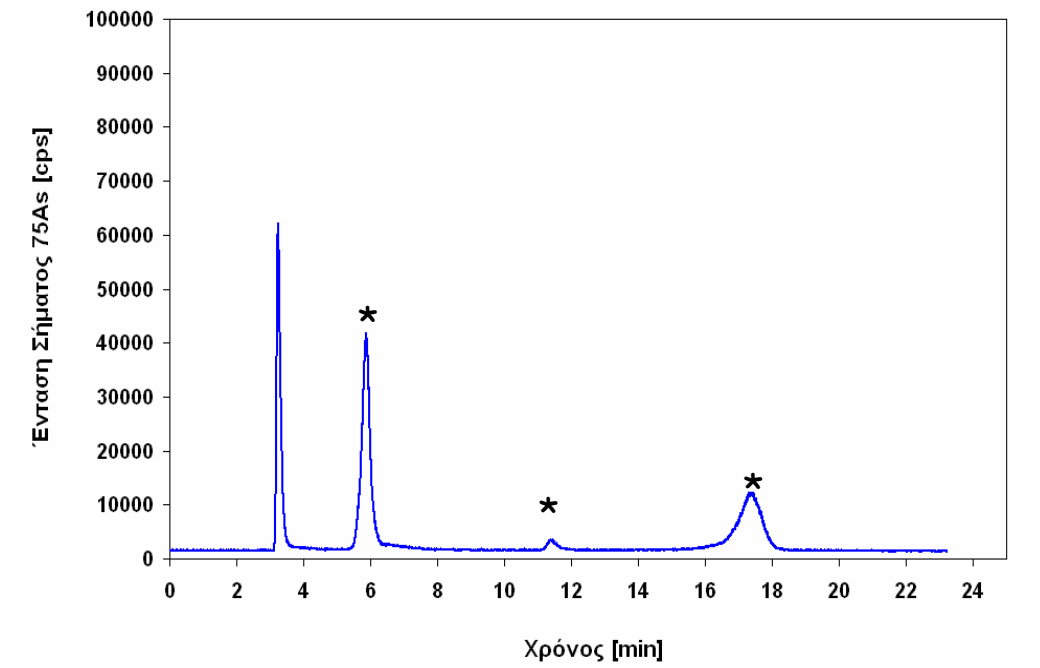
Αρχικά, εξετάστηκε η παρουσία στο δείγμα KP-2 των οξο- και θειο-αρσενοσακχάρων, εφαρμόζοντας τη μέθοδο HPLC-ICP-MS. Χρησιμοποιήθηκε η συμβατική στήλη C18, ενώ η έκλουση των συστατικών πραγματοποιήθηκε με υδατικό διάλυμα TBAH (5 mM), περιεκτικότητας σε μεθανόλη 5% κ.ο. και pH=7.5. Τέλος, επιλέχθηκε ταχύτητα ροής κινητής φάσης ίση με 1.0 mL/min και βρόχος εισαγωγής δείγματος όγκου 50 μL. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση του δείγματος KP-2 παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.34.



Σχήμα 3.34. Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS του δείγματος KP-2.

Συγκρίνοντας το παραπάνω χρωματογράφημα με αυτό του πρότυπου διαλύματος S-9 (Σχήμα 3.33), προκύπτει ότι οι κορυφές 6 και 7 αντιστοιχούν στα θειοαρσενοσάκχαρα -Sulfonate και -Sulfate αντίστοιχα. Έπειτα από σύγκριση με το χρωματογράφημα του δείγματος KP-1 (Σχήμα 3.32) ταυτοποιήθηκαν οι κορυφές 1 και 3, οι οποίες ανήκουν στα οξοαρσενοσάκχαρα -Glycol και -Sulfate αντίστοιχα. Στη ζώνη 2 εκλούονται τα συστατικά DMAsSugar-Phosphate, DMAsSugar-Sulfonate και DMThioAsSugar-Glycol, ενώ η κορυφή 4 αντιπροσωπεύει το θειοαρσενοσάκχαρο DMThioAsSugar-Phosphate.

Τέλος, η κορυφή 5 ανήκει σε κάποιο θειούχο παράγωγο της ένωσης DMA(V), όπως συμπεραίνεται έπειτα από σύγκριση με το χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος της ένωσης DMA(V), το οποίο είχε υποστεί κατεργασία με H_2S (Σχήμα 3.35).



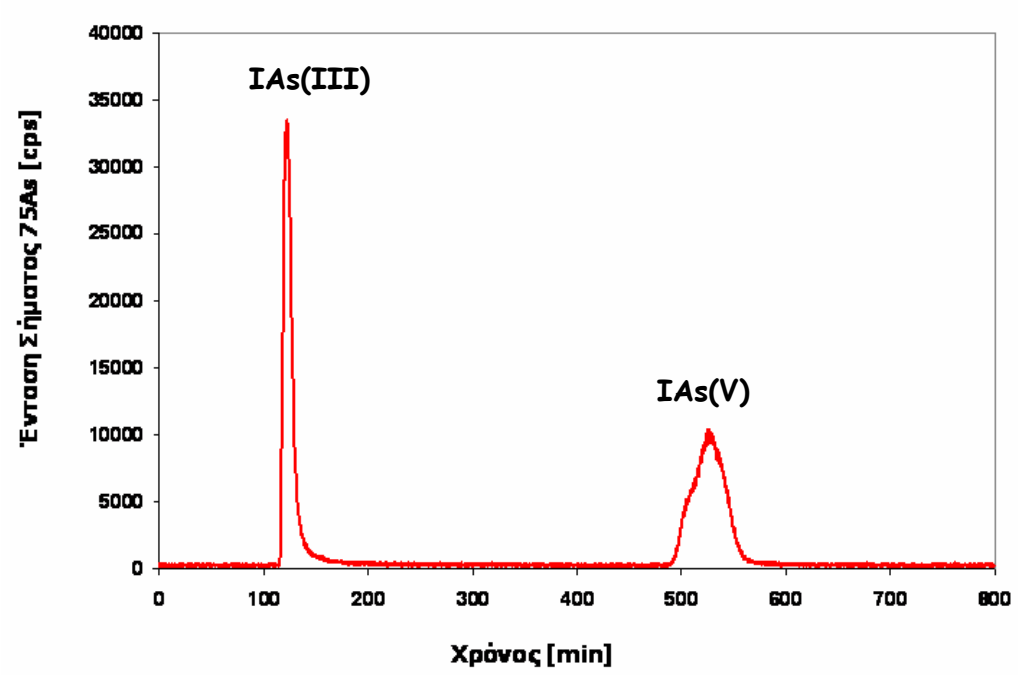
Σχήμα 3.35. Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS πρότυπου διαλύματος DMA(V)+H_2S.

Η ανάκτηση από τη στήλη για το δείγμα ΚΡ-2, με τη συγκεκριμένη χρωματογραφική μέθοδο, υπολογίστηκε ίση με (77±7)% για n=2 (όπου n: αριθμός των επαναλήψεων).

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η ποσοτικοποίηση όλων των θειοαρσενοσακχάρων του δείγματος ΚΡ-2, για τα οποία ο διαχωρισμός είναι πλήρης, δίνοντας συμμετρικές και καλά διαχωρισμένες κορυφές. Δηλαδή, ποσοτικοποιήθηκαν οι ενώσεις DMThioAsSugar-Phosphate, DMThioAsSugar-Sulfonate και DMThioAsSugar-Sulfate.

Η ποσοτικοποίηση βασίστηκε στην ανάλυση πρότυπου διαλύματος συγκέντρωσης 60 μg/L σε αρσενικώδη [iAs(III)] και 60 μg/L σε αρσενικικά [iAs(V)]. Στο Σχήμα 3.36 παρουσιάζεται το χρωματογράφημα που προέκυψε από την ανάλυση του πρότυπου διαλύματος βαθμονόμησης (iAs(III) - iAs(V)).

Απαραίτητη προϋπόθεση για τη σωστή ποσοτικοποίηση, είναι οι ενώσεις με βάση τις οποίες γίνεται η βαθμονόμηση (iAs(III) και iAs(V)) και οι αναλύτες να έχουν την ίδια ή παρόμοια απόκριση. Επίσης, καθοριστικός παράγοντας είναι η χρωματογραφική ανάκτηση, η οποία πρέπει να είναι η ίδια για όλα τα εξεταζόμενα είδη.



Σχήμα 3.36. Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS του πρότυπου διαλύματος iAs(III) – iAs(V).

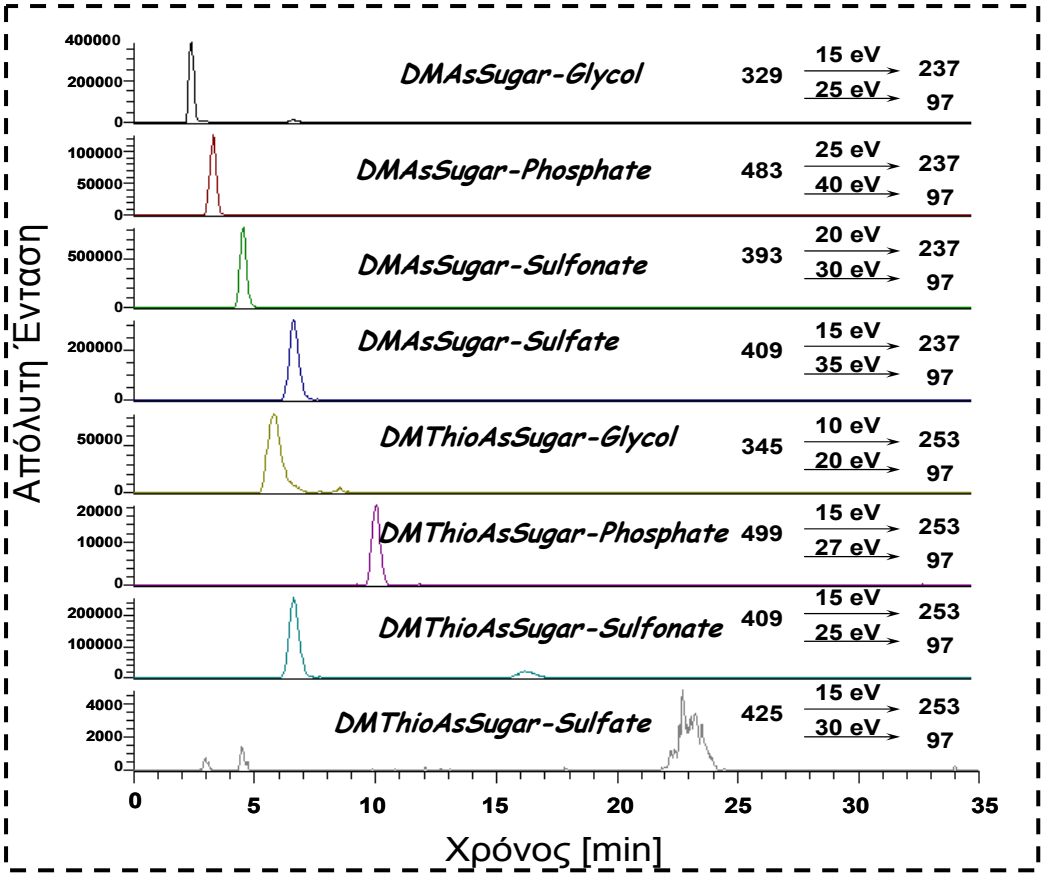
Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ποσοτική ανάλυση του δείγματος KP-2 παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.9.

Πίνακας 3.9. Συγκεντρώσεις θειοαρσενοσακχάρων (μg As/ g στερεού δείγματος) στο δείγμα KP-2 (n=2).

DMThioAsSugar-Phosphate	DMThioAsSugar-Sulfonate	DMThioAsSugar-Sulfate	Σύνολο
0.25 ± 0.06	2.6 ± 0.5	3.3 ± 0.5	75 ± 15.9

Σύμφωνα λοιπόν με τα παραπάνω αποτελέσματα, τα δύο καινούρια θειοαρσενοσάκχαρα DMThioAsSugar-Sulfonate και DMThioAsSugar-Sulfate, αντιστοιχούν στο 8% του συνολικά εκλουόμενου αρσενικού που μετρήθηκε στο δείγμα KP-2.

Η παρουσία των θειοαρσενοσακχάρων -Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate στο δείγμα KP-2, επιβεβαιώθηκε και με τη μέθοδο HPLC-ES-MS/MS. Εφαρμόστηκε, λοιπόν, η μέθοδος SRM, παρακολουθώντας τις χαρακτηριστικές αντιδράσεις για τα οκτώ αρσενοσάκχαρα (οι οποίες φαίνονται στους Πίνακες 3.4 και 3.5), οπότε προέκυψε το χρωματογράφημα του Σχήματος 3.37.

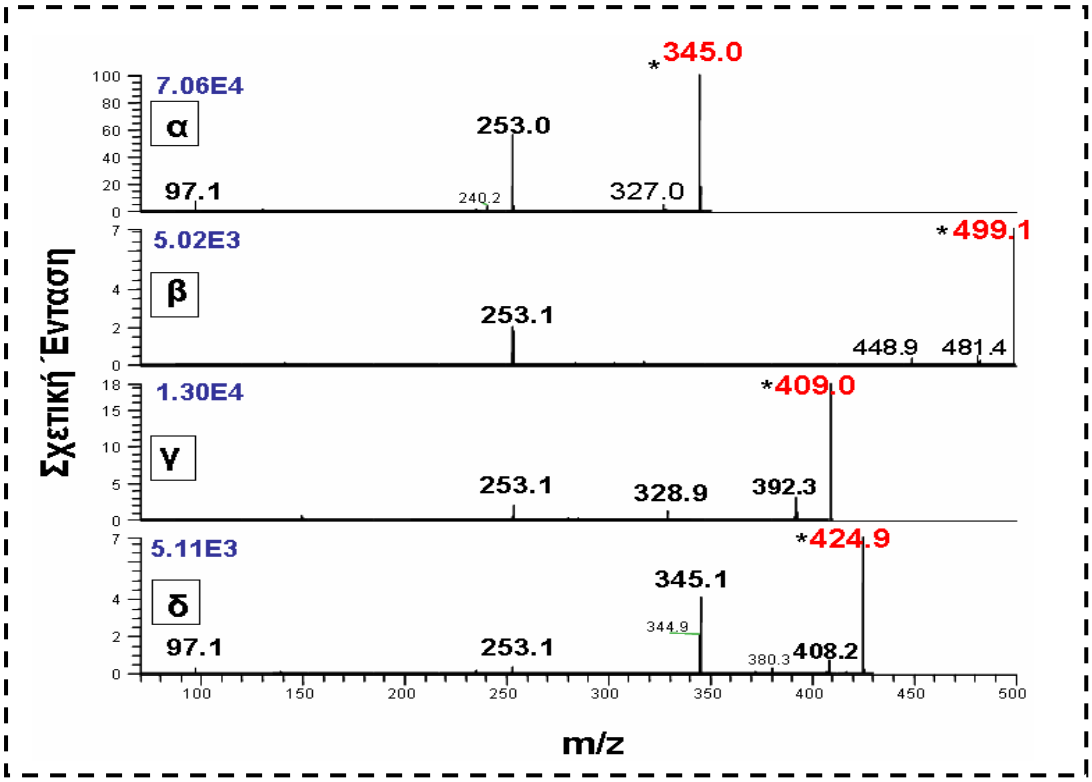


Σχήμα 3.37. Χρωματογράφημα HPLC-ES-MS-MS-SRM του δείγματος KP-2. Δεξιά του κάθε χρωματογραφήματος αναγράφονται οι επιλεγμένες αντιδράσεις διάσπασης που παρακολουθούνται και η βέλτιστη ενέργεια διάσπασης σε eV.

Το παραπάνω χρωματογράφημα αποκαλύπτει την ύπαρξη των τεσσάρων οξο- και των τεσσάρων θειο- αρσενοσακχάρων (-Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και -Sulfate), σε σημαντικές συγκεντρώσεις στο συγκεκριμένο εκχύλισμα. Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στην ανίχνευση των καινούριων θειοαρσενοσακχάρων -Sulfonate και –Sulfate, αλλά και στο γεγονός ότι ενώσεις της κατηγορίας των θειοαρσενοσακχάρων ανιχνεύονται για πρώτη φορά σε φύκη. Η ύπαρξη ενώσεων της συγκεκριμένης κατηγορίας, μέχρι πρόσφατα, είχε αναφερθεί μόνο σε δείγματα οστρακοειδών.

Παρά το γεγονός ότι και το KP-2 αποτελεί βιολογικό δείγμα θαλάσσιων οργανισμών (φύκη), ωστόσο η μήτρα του συγκεκριμένου δείγματος είναι λιγότερο πολύπλοκη, σε σχέση με τη μήτρα των δειγμάτων οστρακοειδών (τα οποία έχουν πιο λιπώδεις ιστούς). Επιπλέον, τα θειοαρσενοσάκχαρα συναντώνται στο συγκεκριμένο δείγμα σε συγκεντρώσεις ικανοποιητικά υψηλές, ώστε να είναι δυνατή η ανίχνευσή τους με HPLC-ES-MS/MS.

Μια επιπλέον απόδειξη για την ύπαρξη των ενώσεων αυτών στο συγκεκριμένο δείγμα αποτελούν τα εξαιρετικής ποιότητας φάσματα μάζας προϊόντων ιόντων που παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.38. Τα φάσματα αυτά συμφωνούν με τα αντίστοιχα πρότυπων διαλυμάτων των θειοαρσενοσακχάρων.



Σχήμα 3.38. Φάσματα μάζας προϊόντων ιόντων των θειοαρσενοσακχάρων που συναντώνται στο δείγμα KP-2 (α) – Glycol, (β) –Phosphate, (γ) –Sulfonate και (δ) – Sulfate. Με (*) συμβολίζονται τα πρόδρομα ιόντα. Η ενέργεια διάσπασης σε όλες τις περιπτώσεις ήταν ίση με 10 eV.

Η ποσοτικοποίηση με την τεχνική HPLC-ES-MS/MS δεν επιχειρήθηκε, αφού κάτι τέτοιο απαιτεί τη χρήση αυστηρώς χαρακτηρισμένων και ποσοτικοποιημένων πρότυπων διαλυμάτων, που δεν ήταν διαθέσιμα στην παρούσα μελέτη.

Λόγω, λοιπόν, της ύπαρξης των θειοαρσενοσακχάρων -Sulfonate και -Sulfate σε ικανοποιητικά υψηλές συγκεντρώσεις στο δείγμα KP-2, αποφασίστηκε το δείγμα αυτό να χρησιμοποιείται σαν πρότυπο διάλυμα των συγκεκριμένων ενώσεων, ώστε να αποφευχθεί η χρήση του πρότυπου διαλύματος S-9. Το τελευταίο, λόγω της υψηλής συγκέντρωσης H_2S που περιέχει, αφενός μεν δημιουργεί προβλήματα υπερφόρτωσης της χρωματογραφικής στήλης και αφετέρου είναι δυνατόν να

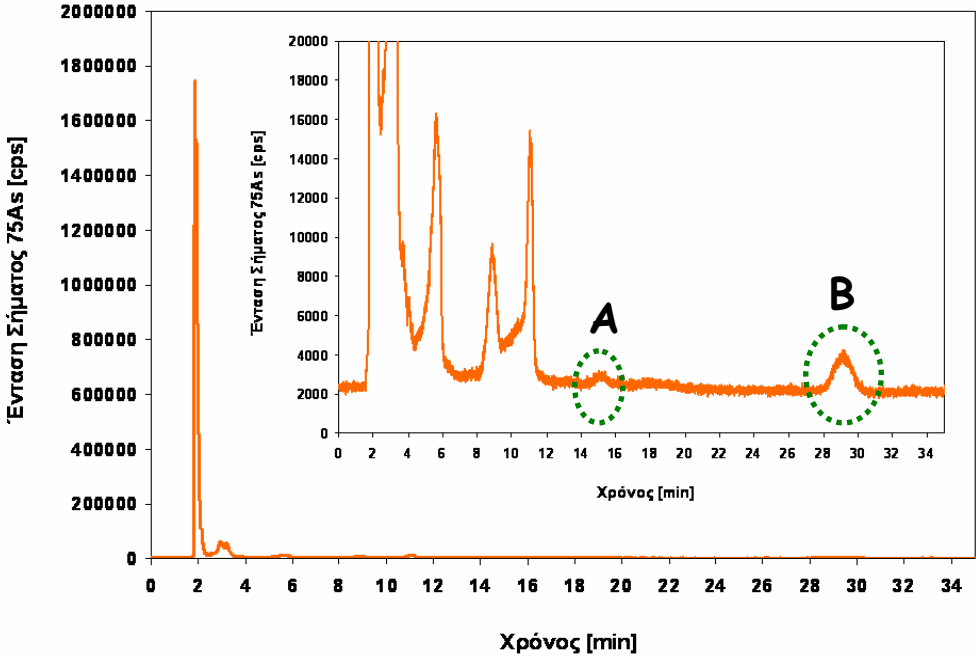
συμβάλλει στο σχηματισμό θειούχων ενώσεων, οι οποίες δεν υπάρχουν στο δείγμα, αλλά σχηματίζονται μέσα στη στήλη, έπειτα από αλληλεπίδραση των αντίστοιχων οξυγονούχων ενώσεων με το H_2S.

Η συνολική συγκέντρωση του αρσενικού στο στερεό δείγμα ΚΡ-2, όπως προσδιορίστηκε με την τεχνική ICP-MS, έπειτα από διαλυτοποίηση του δείγματος με τη μέθοδο όξινης χώνευσης και τη χρήση ακτινοβολίας μικροκυμάτων παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα. Στον ίδιο πίνακα δίνονται και τα αποτελέσματα συνολικού προσδιορισμού του αρσενικού στο δείγμα ΚΡ-1, καθώς και οι αποδόσεις της εκχύλισης (με νερό) για τα δυο παραπάνω δείγματα.

Πίνακας 3.10. Συνολική συγκέντρωση αρσενικού στα δείγματα ΚΡ-1 και ΚΡ-2 – Αποδόσεις εκχύλισης (n=3).

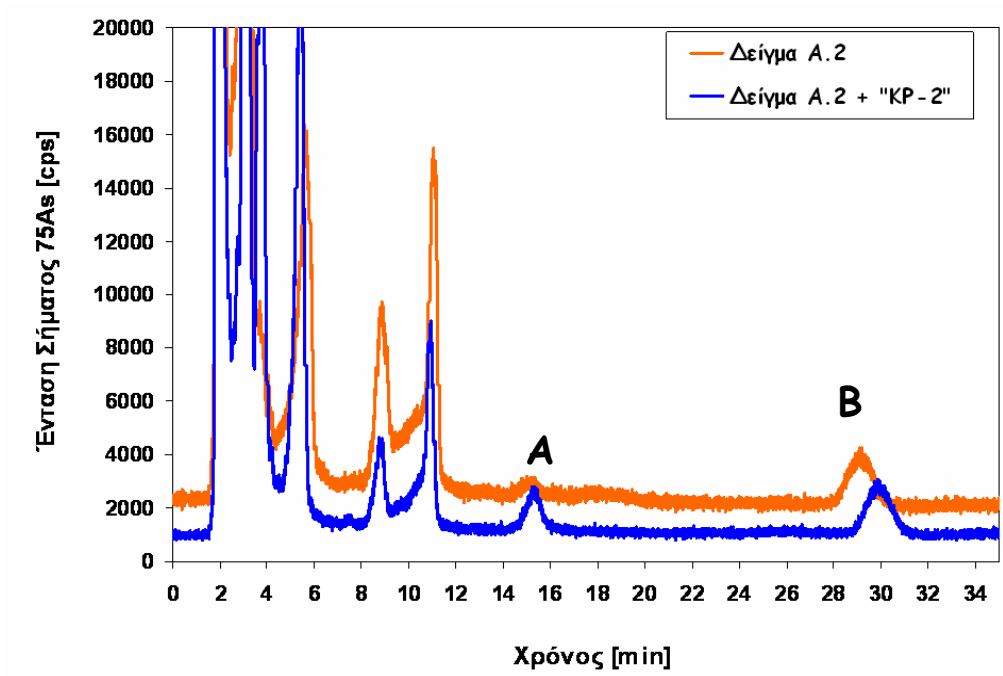
	Συγκέντρωση [μg As/ g στερεού δείγματος]	**Απόδοση Εκχύλισης [%]**
ΚΡ-1	18.9±0.8	86±4
ΚΡ-2	39.6±2.4	92±6

Στη συνέχεια, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης ενός άλλου οργανισμού της οικογένειας *Venus verrucosa* (Δείγμα Α-2).



Σχήμα 3.39. Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS του δείγματος Α-2.

Οι κορυφές Α και Β που διακρίνονται στο παραπάνω χρωματογράφημα, ταιριάζουν με τις κορυφές 6 και 7 των θειοαρσενοσακχάρων -Sulfonate και -Sulfate στο χρωματογράφημα του δείγματος ΚΡ-2. (Σχήμα 3.34). Ωστόσο, για περαιτέρω επιβεβαίωση πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός του δείγματος Α-2, με μικρή ποσότητα εκχυλίσματος ΚΡ-2 (σε αναλογία 1:5) και τα αποτελέσματα της ανάλυσης του εμβολιασμένου δείγματος φαίνονται παρακάτω.



Σχήμα 3.40 Χρωματογράφημα HPLC-ICP-MS του εμβολιασμένου (με εκχύλισμα του δείγματος ΚΡ-2) δείγματος Α-2.

Μετά τον εμβολιασμό του δείγματος Α-2, με το εκχύλισμα του δείγματος ΚΡ-2, οι κορυφές Α και Β ενισχύθηκαν, επιβεβαιώνοντας έτσι την αρχική υπόθεση ότι αντιστοιχούν στα θειοαρσενοσάκχαρα DMThioAsSugar-Sulfonate και DMThioAsSugar-Sulfate.

Η χρωματογραφική ανάκτηση του αρσενικού για το δείγμα Α-2, με τις δεδομένες χρωματογραφικές συνθήκες, υπολογίστηκε ίση με 91% (n = 1).

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι σε όλες τις περιπτώσεις η προσθήκη H_2O_2 σαν οξειδωτικό μέσο, είχε ως αποτέλεσμα την εξαφάνιση των θειοαρσενοσακχάρων DMThioAsSugar-Sulfonate και DMThioAsSugar-Sulfate από το χρωματογραφημα.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Όπως είναι γνωστό, ο άνθρωπος, αλλά και γενικότερα οι ανώτεροι οργανισμοί, εκτίθενται στο αρσενικό κυρίως μέσω του πόσιμου νερού και των τροφών τους. Υψηλότερες συγκεντρώσεις του στοιχείου καταγράφονται σε τροφές θαλάσσιας προέλευσης (ψάρια, οστρακοειδή, φύκη κ.λ.π.), στις οποίες συναντάται μεγάλη ποικιλία οργανοαρσενικικών κυρίως ενώσεων. Και επειδή η τοξικότητα του αρσενικού είναι άμεσα συνδεδεμένη με το χημικό τύπο με τον οποίο συναντάται το στοιχείο, αλλά και με την οξειδωτική του κατάσταση, για το λόγο αυτό οι μελέτες ειδοταυτοποίησης είναι απαραίτητες, για την κατανόηση του μεταβολισμού του και την αποτίμηση του κινδύνου που επιφυλάσσει η έκθεση σε αυτό.

Τα θειοαρσενοσάκχαρα $(CH_3)_2XAs=S$ (όπου X = ριβοζικός δακτύλιος) αποτελούν μια καινούρια κατηγορία οργανοαρσενικικών ενώσεων, της οποίας τα δυο πρώτα μέλη (DMThioAsSugar-Glycol και DMThioAsSugar-Phosphate) ανακαλύφθηκαν πρόσφατα (2004), σε δείγματα θαλάσσιων οργανισμών. Το γεγονός ότι οι οργανισμοί αυτοί αποτελούν προϊόντα καθημερινής διατροφής, καθιστά ιδιαίτερα σημαντική μια τέτοια ανακάλυψη, η οποία αποκαλύπτει την έκθεση του ανθρώπου σε καινούριες μορφές αρσενικού μέσω αυτών των τροφών. Η παραπάνω ανακάλυψη, έδωσε το έναυσμα για την εκπόνηση της παρούσας εργασίας, η οποία είχε ως στόχο την ανάπτυξη αναλυτικών τεχνικών για την εξερεύνηση της ύπαρξης επιπλέον μελών της κατηγορίας των θειοαρσενοσακχάρων σε βιολογικά δείγματα θαλάσσιας προέλευσης. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές HPLC-ICP-MS και HPLC-ES-MS/MS. Η τεχνική HPLC-ICP-MS επιλέχθηκε λόγω της υψηλής ευαισθησίας και εκλεκτικότητας, αλλά και των χαμηλών ορίων ανίχνευσης που παρέχει, ενώ η τεχνική HPLC-ES-MS/MS είναι κατάλληλη για το χαρακτηρισμό άγνωστων ενώσεων.

Πιο συγκεκριμένα, όπως παρουσιάστηκε στο κεφάλαιο "Αποτελέσματα-Συζήτηση" η μέθοδος HPLC-ES-MS/MS, βασίστηκε σε χρωματογραφία ανιονανταλλαγής, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση υδατικό διάλυμα άλατος NH_4HCO_3. Για την αποτελεσματική έκλουση όλων των συστατικών από τη στήλη, εφαρμόστηκε πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης δυο διαλυτών, κατά το οποίο το ποσοστό της μεθανόλης στο διαλύτη έφτανε μέχρι και 40% κ.ο. Παράλληλα, για τη μέθοδο HPLC-ICP-MS, χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία αντίστροφης φάσης

παρουσία ιοντικού ζεύγους (TBAH), με προσθήκη μικρού ποσοστού μεθανόλης (5% κ.ο.) στην κινητή φάση. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ανάπτυξη της βέλτιστης αναλυτικής μεθοδολογίας, βασίστηκε στην ανάλυση πρότυπων διαλυμάτων των θειοαρσενοσακχάρων, τα οποία παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο, έπειτα από αντίδραση των αντίστοιχων οξοαρσενοσακχάρων με αέριο H_2S.

Συνδυάζοντας επομένως τις δυο παραπάνω αναλυτικές τεχνικές υγρής χρωματογραφίας με φασματομετρία μαζών, αναλύθηκαν βιολογικά δείγματα θαλάσσιας προέλευσης (θαλάσσιοι οργανισμοί, φύκη) και τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από τις αναλύσεις αυτές, οδήγησαν στην επίτευξη των παρακάτω στόχων:

⇒ Ανίχνευση, για πρώτη φορά, δυο καινούριων ενώσεων της κατηγορίας των θειοαρσενοσακχάρων (DMThioAsSugar-Sulfonate και DMThioAsSugar-Sulfate) στο περιβάλλον και συγκεκριμένα σε ιστούς θαλάσσιων οστρακοειδών. Για την ανάλυση των δειγμάτων αυτών χρησιμοποιήθηκε η τεχνική HPLC-ICP-MS, αφού οι πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις των ενώσεων στα δείγματα και η ιδιαίτερα πολύπλοκη μήτρα των δειγμάτων, καθιστά προβληματική την ανάλυση με την μέθοδο HPLC-ES-MS/MS. Τα δείγματα που εξετάστηκαν ήταν οργανισμοί της οικογένειας *Venus verrucosa,* γνωστοί με την κοινή ονομασία "κυδώνια".

⇒ Ανίχνευση, για πρώτη φορά, ενώσεων της κατηγορίας των θειοαρσενοσακχάρων σε δείγματα από φύκη και συγκεκριμένα στο δείγμα "KP-2". Στο δείγμα αυτό ανιχνεύτηκαν τα δυο ήδη γνωστά θειοαρσενοσάκχαρα -Glycol και -Phosphate, αλλά και οι δυο καινούριες ενώσεις της κατηγορίας -Sulfonate και -Sulfate. Η ύπαρξη ενώσεων της κατηγορίας των θειοαρσενοσακχάρων είχε προηγουμένως αναφερθεί μόνο σε δείγματα θαλάσσιων οστρακοειδών και υπήρχε η εκτίμηση ότι οι ενώσεις αυτές σχηματίζονται *in vivo* σε τέτοιους οργανισμούς, έπειτα από κατανάλωση των αντίστοιχων όξο-ειδών. Ωστόσο, με την παρούσα ανακάλυψη ενισχύεται η υπόθεση ότι οι ενώσεις αυτές προσλαμβάνονται αυτούσιες από τα φύκη και τελικά ανιχνεύονται στους οργανισμούς που τρέφονται με αυτά. Από την άλλη βέβαια, δεν αποκλείεται τα δυο ενδεχόμενα να συμβαίνουν ταυτόχρονα, δηλαδή παράλληλα με την πρόσληψη των θειοαρσενοσακχάρων από τα φύκη, να λαμβάνει χώρα και ο *in vivo* σχηματισμός τους από τα αντίστοιχα οξοαρσενοσάκχαρα, τα οποία εισέρχονται στον οργανισμό, επίσης μέσω των φυκών.

⇒ Για την ανάλυση των δειγμάτων “ΚΡ-1” και “ΚΡ-2”, εκτός από την τεχνική HPLC-ICP-MS χρησιμοποιήθηκε και η τεχνική HPLC-ES-MS/MS. Η μήτρα των δειγμάτων αυτών είναι λιγότερο πολύπλοκη, σε σχέση με τη μήτρα των οστρακοειδών, και το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τις υψηλές συγκεντρώσεις των υπο εξέταση ενώσεων, επιτρέπει την ανάλυση των συγκεκριμένων δειγμάτων με την τεχνική HPLC-ES-MS/MS. Στο δείγμα “ΚΡ-1” επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη των τεσσάρων οξοαρσενοσακχάρων (-Glycol, -Phosphate, -Sulfonate και –Sulfate), ενώ στο δείγμα “ΚΡ-2” εκτός από τα τέσσερα οξο- ανιχνεύτηκαν επίσης και τα αντίστοιχα τέσσερα θειο-αρσενοσάκχαρα.

⇒ Οι υψηλές συγκεντρώσεις των θειοαρσενοσακχάρων DMThioAsSugar-Sulfonate και DMThioAsSugar-Sulfate στο εκχύλισμα του δείγματος “ΚΡ-2”, επιτρέπουν τη χρήση του σαν πρότυπο διάλυμα των ενώσεων αυτών, με σκοπό τη σύγκριση των χρόνων έκλουσης των συγκεκριμένων ενώσεων με τους χρόνους έκλουσης των κορυφών που προκύπτουν κατά την ανάλυση των δειγμάτων οστρακοειδών. Επίσης, το εκχύλισμα αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τον εμβολιασμό των δειγμάτων (spike solution), με σκοπό να επιβεβαιωθεί αν μια κορυφή, η οποία προκύπτει από την ανάλυση του δείγματος, ανήκει ή όχι σε κάποιο από τα δύο θειοαρσενοσάκχαρα. Το εκχύλισμα αυτό δηλαδή κατά κάποιο τρόπο υποκαθιστά πρότυπα διαλύματα θειοαρσενοσακχάρων, τα οποία παρασκευάστηκαν έπειτα από κατεργασία με H_2S.

⇒ Τα εμπορικά δείγματα από φύκη τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία (ΚΡ-1 και ΚΡ-2) είχαν υποστεί διάφορα στάδια κατεργασίας, όπως ξήρανση, λυοφιλίωση κ.λ.π. Αν και η κατεργασία αυτή των δειγμάτων, κατά πάσα πιθανότητα, δεν είναι ικανή να συμβάλλει στη δημιουργία των θειοαρσενοσακχάρων, ωστόσο το ενδεχόμενο αυτό δε μπορεί να αποκλειστεί εντελώς. Η ανάλυση “φρέσκων” δειγμάτων από φύκη, θα βοηθούσε στη διευκρίνιση του παραπάνω ζητήματος.

⇒ Η πιθανότητα σχηματισμού των θειοαρσενοσακχάρων κατά το χρονικό διάστημα της αποθήκευσης του δείγματος ΚΡ-2 ήταν μια παράμετρος η οποία εξετάστηκε. Ωστόσο, το γεγονός ότι στο δείγμα ΚΡ-1 (το οποίο ποιοτικά είναι το ίδιο με το δείγμα ΚΡ-2), το οποίο παρέμεινε αποθηκευμένο για αρκετά χρόνια πριν τη χρήση του στη συγκεκριμένη μελέτη, δεν ανιχνεύτηκαν θειοαρσενοσάκχαρα,

ενισχύει την υπόθεση ότι ο σχηματισμός των συγκεκριμένων ενώσεων δεν ευνοείται από τις συνθήκες αποθήκευσης.

⇒ Σε όλες τις περιπτώσεις, η προσθήκη του οξειδωτικού μέσου H_2O_2 στο εκχύλισμα, προκάλεσε την εξαφάνιση των κορυφών που ανήκουν στα θειοαρσενοσάκχαρα -Sulfonate και -Sulfate. Η ερμηνεία που δίνεται είναι ότι οι ενώσεις αυτές, παρουσία H_2O_2, οξειδώνονται στα αντίστοιχα As=O είδη.

Συμπερασματικά, λοιπόν, η ανακάλυψη δύο καινούριων ενώσεων αρσενικού σε θαλασσινές τροφές, η οποία επιτεύχθηκε στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, ουσιαστικά διεύρυνε τον κατάλογο των ενώσεων του στοιχείου, στις οποίες εκτίθεται ο άνθρωπος μέσω της καθημερινής του διατροφής. Σαν αποτέλεσμα αυτής της ανακάλυψης, κρίνεται πλέον απαραίτητο, κατά τις μελέτες αποτίμησης του κινδύνου (risk assessment) που επιφυλάσσει η έκθεση στο αρσενικό (μέσω των θαλασσινών φαγητών), να λαμβάνονται υπόψη και οι καινούριες αυτές ενώσεις (DMThioAsSugar-Sulfonate και DMThioAsSugar-Sulfate). Επιπλέον, ο μεταβολισμός των ενώσεων αυτών στον ανθρώπινο οργανισμό και οι τοξικολογικές ιδιότητες τόσο των ίδιων των ενώσεων όσο και των μεταβολιτών τους αποτελούν παραμέτρους που επιβάλλεται να εξεταστούν και να διευκρινιστούν. Συνολικά, η ύπαρξη των θειοαρσενοσακχάρων σε θαλάσσιους οργανισμούς περιπλέκει ακόμα περισσότερο την υπάρχουσα γνώση σχετικά με τη βιοχημεία του αρσενικού στο θαλάσσιο περιβάλλον.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

[1] B. K. Mandal and K. T. Suzuki, *Talanta*, 2002, **58**, 201.

[2] W. R. Cullen and K. J. Reimer, *Chem. Rev.*, 1989, **89**, 713.

[3] J. O. Nriagu and J. M. Azcue, in *Arsenic in the Environment. Part 1: Cycling and Characterization*, ed. J. O. Nriagu, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1990, pp. 1-15.

[4] S. P. Parker, in *Dictionary of Science and Technical Terms*, ed. McGraw-Hill, New York, 5th edn., 1994.

[5] ATSDR, *Toxicological profile for arsenic (UPDATE)*, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, 2002.

[6] E. Merian, *Toxicological and Environmental Chemistry*, 1984, **8**, 9.

[7] F. Beavington and P. A. Cawse, *Sci. Total Environ.*, 1978, **10**, 239.

[8] P. Brimblecombe, *Nature*, 1979, **280**, 104.

[9] C. I. Davidson, W. D. Goold, T. P. Mathison, G. B. Wiersma, K. W. Brown and M. T. Reilly, *Environ. Sci. Technol.*, 1985, **19**, 27.

[10] D. H. Peirson, P. A. Cawse and R. S. Cambray, *Nature*, 1974, **251**, 675.

[11] WHO, *Guidelines for Drinking Water Quality, Recommendations,* Vol. 2*,* World Health Organisation, Geneva, 2nd edn., 1996.

[12] EPA, *Exposure and Health Effects*, Health and Ecological Criteria Division, Washington, 2001.

[13] H. Onishi, in *Handbook of Geochemistry*, Vol II-2, ed. K. H. Wedepohl, Springer-Verlag, New York, 1969, pp. 33.

[14] W. N. Beyer and E. J. Cromartie, *Environ. Monit. Assess.*, 1987, **8(1)**, 27.

[15] H. J. M. Bowen, in *Elemental chemistry of the elements*, Academic Press, London, 1979.

[16] F. Reichert and R. A. Trelles, *An. Asoc. Quim. Argent.*, 1921, **9**, 89.

[17] B. C. McBride and R. S. Wolfe, *Biochemistry*, 1971, **10**, 4312.

[18] D. K. Johnson, *Nature*, 1972, **240**, 44.

[19] P. L. Smedley, W. M. Edmunds and K. B. Pelig-Ba, in *Environmental Geochemistry and Health*, Vol. 113, ed. J. D. Appleton, R. Fuge and G. J. H. McCall, Geological Society Special Publication, London, 1996, pp. 153.

[20] J. R. Scudlark and T. M. Church, *Atmos. Environ.*, 1988, **22(5)**, 937.

[21] NRC, in *Arsenic in drinking water*, National Academy Press, Washington, DC, 1999, pp. 310.

[22] G. Lunde, *Environ. Health Perspect.*, 1977, **19**, 47.

[23] H. L. Arnold, R. B. Odam and W. D. James, in *Disease of the skin clinical dermatology*, Saunders W. B. Company, Philadelphia, 8th edn., 1990, pp. 121.

[24] D. N. Guha Mujumder, A. K. Chakraborty, A. Ghosh, J. D. Gupta, D. P. Chakraborty, S. B. Dey and N. Chattopadhyay, *Bull. World Health Organ.*, 1988, **66**, 499.

[25] A. M. Featherstone, E. C. V. Butler, B. V. O'Grady and P. Michel, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1998, **13**, 1355.

[26] K. J. Reimer and D. A. Silver, in *Factors influencing arsenic application in marine sediments*, 70th Canadian Chemical Conference, Quebec, 1987, pp. 34.

[27] J. S. Edmonds and K. A. Francesconi, *Nature,* 1981, **289**, 602.

[28] J. S. Edmonds and K. A. Francesconi, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1983, **1**, 2375.

[29] K. A. Francesconi, J. S. Edmonds, R. V. Stick, B. W. Skelton and A. H. White, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1991, **1,** 2707.

[30] Y. Shibata and M. Morita, *Agric. Biol. Chem.*, 1988, **52**, 1087.

[31] J. J. Sloth, E. H. Larsen and K. Julshamn, *Rapid. Commun. Mass Spectrom*., 2005, **19**, 227.

[32] S. Tagawa, *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 1980, **46**, 1257.

[33] V. Nischwitz and S. A. Pergantis, *Analyst*, 2005, **130**, 1348.

[34] V. Nischwitz, K. Kanaki and S. A. Pergantis, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2006, **21**, 33.

[35] V. Nischwitz and S. A. Pergantis, *J. Agric. Food Chem.*, 2006, **54**, 6507.

[36] K. A. Francesconi and J. S. Edmonds, *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.*, 1993, **31**, 111.

[37] J. S. Edmonds, Y. Shibata, K. A. Francesconi, R. Rippingale and M. Morita, *Appl. Organomet. Chem.*, 1997, **11**, 281.

[38] J. S. Edmonds, K. A. Franceconi, J. R. Cannon, C. L. Raston, B. W. Skelton and A. H. White, *Tetrahydron Lett.*, 1977, **18**, 1543.

[39] M. Morita and Y. Shibata, *Analyst Sci.*, 1987, **3**, 575.

[40] W. R. Cullen and M. Dodd, *Appl. Organomet. Chem.*, 1989, **3**, 79.

[41] J. S. Edmonds, K. A. Francesconi, P. C. Healy and A. H. White, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1982, **1**, 2989.

[42] K. A. Francesconi, J. S. Edmonds and R. V. Stick, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1992, **1**, 1349.

[43] E. Schmeisser, R. Raml, K. A. Francesconi, D. Kuehnelt, A. Lindberg, C. Sörös and W. Goessler, *Chem. Commun.*, 2004, 1824.

[44] M. W. Fricke, P. A. Creed, A. N. Parks, J. A. Shoemaker, C. A. Schwegel and J. T. Creed, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, **19**, 1454.

[45] M. Kahn, R. Raml, E. Schmeisser, B. Vallant, K. A. Francesconi and W. Goessler, *Environ. Chem.,* 2005, **2**, 171.

[46] V. Nischwitz and S. A. Pergantis, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2006, **20**, 3579.

[47] M. N. Bates, *American journal of epidemiology*, 1992, **135**, 462.

[48]ATSDR, *Toxicological profile for arsenic*, Atlanta, TP-92/02, 1993.

[49] P. Bagla and J. Kaiser, *Science*, 1996, **274**, 174.

[50] R. A. Goyer, in *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons,* ed. McGraw-Hill, New York, 5th edn, 1996, pp. 696-698.

[51] X. Chris Le, X. Lu, M. Ma, W. R. Cullen, H. V. Aposhian and B. Zheng, *Anal. Chem.*, 2000, **72**, 5172.

[52] T. Hayakawa, Y. Kobayashi, X. Cui and S. Hirano, *Arch. Toxicol.*, 2005, **79**, 183.

[53] X. C. Le, W. R. Cullen and K. J. Reimer, *Clin. Chem.*, 1994, **40**, 617.

[54] M. Ma and X. C. Le, *Clin. Chem.*, 1998, **44**, 539.

[55] M. Van Hulle, C. Zhang, B. Schotte, L. Mees, F. Vanhaecke, R. Vanholder, X. R. Zhang and R. Cornelis, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, **19**, 58.

[56] H. R. Hansen, R. Pickford, J. Thomas-Oates, M. Jaspars and J. Feldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, **43**, 337.

[57] H. R. Hansen, A. Raab, M. Jaspars, B. F. Milne and J. Feldmann, *Chem. Res. Toxicol.*, 2004, **17**, 1086.

[58] R. Raml, W. Goessler, P. Traar, T. Ochi and K. A. Francesconi, *Chem. Res. Toxicol.*, 2005, **18**, 1444.

[59] M. Styblo, S. V. Serves, W. R. Cullen and D. J. Thomas, *Chem. Res. Toxicol.*, 1997, **10**, 27.

[60] C. H. Tseng, C. P. Tseng, H. Y. Chiou, Y. M. Hsueh, C. K. Chong and C. J. Chen, *Toxicology Letters*, 2002, **133**, 69.

[61] C. J. Chen, Y. C. Chuang, T. M. Lin and H. Y. Wu, *Cancer Research*, 1985, **45**, 5895.

[62] S. L. Bonchin - Cleland, H. Ding and J. A. Caruso, *Am. Lab.*, 1995, **34N**.

[63] M. J. Tomlinson, L. Lin and J. A. Caruso, *Analyst*, 1995, **120**, 583.

[64] K. Li and S. F. Y. Li, *Analyst*, 1995, **120**, 361.

[65] D. A. Skoog, F. James Holler and T. A. Nieman, *Αρχες της Ενόργανης Ανάλυσης*, 5η έκδοση, Μετάφραση, 2002.

[66] X. Zhang, R. Cornelis, J. de Kimpe and L. Mees, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1996, **11**, 1075.

[67] H. V. Aposhian, E. S. Gurzau, X. C. Le, A. Gurzau, S. M. Healy, X. Lu, M. Ma, L. Yip, R. A. Zakharyan, R. M. Maiorino, R. C. Dart, M. G. Tircus, D. Gonzalez-Ramirez, D. L. Morgan, D. Avram and M. M. Aposhian, *Chem. Res. Toxicol.*, 2000, **13**, 693.

[68] S. Wangkarn and S. A. Pergantis, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2000, **15**, 627.

[69] X. C. Le, W. R. Cullen and K. J. Reimer, *Environ. Sci. Technol.*, 1994, **28**, 1598.

[70] K. L. Ackely, C. B'Hymer, K. L. Sutton and J. A. Caruso, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1999, **14**, 845.

[71] X. C. Le and M. Ma, *J. Chromatogr. A*, 1997, **764**, 55.

[72] K. A. Francesconi, P. Micks, R. A. Stockton and K. J. Irgolic, *Chemosphere*, 1995, **14**, 1443.

[73] M. Vilano, A. Padro and R. Rubio, *Anal. Chim. Acta*, 2000, **411**, 71.

[74] P. M. Yehl and J. F. Tyson, *Anal. Comm.*, 1997, **34**, 49.

[75] K. Falk and H. Emons, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2000, **15**, 643.

[76] S. McSheehy, R. Pohk, R.lobinski and J. Szpunar, *Anal. Chim. Acta*, 2001, **440**, 3.

[77] Z. Gong, X. Lu, M. Ma, C. Watt and X. C. Le, *Talanta*, 2002, **58**, 77.

[78] K. A. Francesconi and D. Kuehnelt, *Analyst*, 2004, **129**, 373.

[79] Θ. Π. Χατζηϊωάννου και Μ. Α. Κουππάρη, Ενόργανη Ανάλυση, Αθήνα, 2000

[80] I. Jarvis and K. E. Jarvis, *J. Geochem. Expl.*, 1992a, **44**, 139.

[81] L. Ebdon, S. Hill and R. W. Ward, *Analyst*, 1987, **111**, 1113.

[82] S. Kurosawa, K. Yasuda, M. Tagushi, S. Yamazaki, S. Toda, M. Morita, T. Uehiro and K. Fuwa, *Agric. Biol. Chem.*, 1980, **44**, 1993.

[83] A. G. Howard and L. E. Hunt, *Anal. Chem.*, 1993, **65**, 2995.

[84] J. L. Capelo, I. Lavilla and C. Bendicho, *Anal. Chem.*, 2001, **73**, 3732.

[85] W. T. Corns, P. B. Stockwell, L. Ebdon and S. J. Hill, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1993, **8**, 71.

[86] R. S. Houk, *Anal. Chem.*, 1986, **58**, 97A.

[87] B. K. Mandal, O. Yasumitsu and K. T. Suzuki, *Chem. Res. Toxicol.*, 2001, **14**, 371.

[88] X. C. Le, X. F. Li, V. Lai, M. Ma, S. Yalcin and J. Feldmann, *Spectrochim. Acta B*, 1998, **53**, 999.

[89] T. Nakazato, T. Taniguchi, H. Tao, M. Tominga and A. Miyazaki, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2000, **15**, 1546.

[90] J. Mattusch and R. Wennrich, *Anal. Chem.*, 1998, **70**, 3649.

[91] T. Guerin, N. Molenat, A. Astruc and R. Pinel, *Appl. Organomet. Chem.*, 2000, **14**, 401.

[92] A. Wooler, H. Garraud, J. Boisson, A. Marie Dorthe, P. Fodor and O. F. X. Donard, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1998, **13**, 141.

[93] L. C. Bates and J. W. Olesik, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1990, **5**, 239.

[94] R. Thomas, *Spectroscopy*, 2001, **16(5)**, 56.

[95] J. Mora, S. Maestre, V. Hernandis and J. l. Todoli, *Trends in Analytical Chemistry*, 2003, **22**, 123.

[96] R. S. Houk, V. A. Fassel and H. J. Svec, *Dyn. Mass Spectrom.*, 1990, **5**, 419.

[97] R. Thomas, *Spectroscopy*, 2001, **16(6)**, 26.

[98] T. Hasegawa and H. Haraguchi, in *ICPs in Analytical Atomic Spectrometry*, ed. A. Montaser and D. W. Golightly, 2nd edn., VCH, New York, 1992.

[99] R. Thomas, *Spectroscopy*, 2001, **16(7)**, 26.

[100] R. Thomas, *Spectroscopy*, 2001, **16(9)**, 38.

[101] E. R. Denoyer, D. Jacques, E. Debrah and S. D. Tanner, *At. Spectrosc.*, 1995, **16(1)**, 1.

[102] R. Thomas, *Spectroscopy*, 2001, **16(10)**, 44.

[103] E. G. Stephanou, in *Introduction to Modern Mass Spectrometry I*, 2005.

[104] R. Thomas, *Spectroscopy*, 2002, **17(4)**, 34.

[105] S. Chapman, *Physical Review*, 1937, **10**, 184.

[106] M. Dole, L. L. Mack, R. L. Hines, R. C. Mobley, L. D. Ferguson and M. B. Alice, *J. Chem. Phys*., 1968, **49**, 2240.

[107] J. B. Fenn and M. Yamashita, *J. Phys. Chem.*, 1984, **88**, 4451.

[108] J. B. Fenn, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2003, **42**, 3871.

[109] I. I. Stewart, *Spectrochim. Acta B*, 1999, **54**, 1649.

[110] S. J. Gaskell, *J. Mass Spectrom.*, 1997, **32**, 677.

[111] N. B. Cech and C. G. Enke, *Anal. Chem.*, 2000, **72**, 2717.

[112] D. C. Taflin, T. L. Ward and E. J. Davis, *Langmuir*, 1989, **5**, 376.

[113] M. S. Wilm and M. Mann, *Int. J. Mass Spectrom*., 1994, **136**, 167.

[114] P. Kebarle and M. Peschke, *Analyt. Chim. Acta*, 1999, **20070**,1.

[115] J. V. Iribarne and B. A. Thompson, *J. Chem. Phys.*, 1976, **64**, 2287.

[116] TSQ Quantum, Hardware Manual.

[117] A. Michaelis and U. Paetow, *Justus Liebigs Ann. Chem.,* 1886, **233**, 60.

[118] V. Nischwitz and S. A. Pergantis, *Anal. Chem.*, 2005, **77**, 5551.