

Ανάπτυξη Μεθόδου Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής
Απόδοσης με Διαδοχική Φασματομετρία Μάζας
Ιονισμού Ατμοσφαιρικής Πίεσης για τον Προσδιορισμό
Σεληνοσακχάρων σε Ανθρώπινα Ούρα

ΛΕΤΣΙΟΥ ΣΟΦΙΑ

**ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Σ. ΠΕΡΓΑΝΤΗΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

2004-2006

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή μου κ. Σπύρο Α. Περγαντή για την αμέριστη συμπαράσταση και καθοδήγησή του καθ' όλη την διάρκεια του μεταπτυχιακού μου. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα παιδιά του SAP Group 2004 για το φιλικό κλίμα συνεργασίας που υπήρχε στο εργαστήριο.

Επίσης ευχαριστώ τους καθηγητές μου κ. Ευριπίδη Στεφάνου και κ. Δημήτρη Γανωτάκη που δέχτηκαν να είναι η επιτροπή της εξέτασής μου.

Τέλος, ευχαριστώ τους φίλους μου που ο καθένας με τον δικό του τρόπο συνέβαλλε στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας και φυσικά την οικογένεια μου τόσο για την ψυχολογική συμπαράσταση όσο και την οικονομική υποστήριξη.

Η παρούσα μελέτη αφιερώνεται στον καθηγητή μου, στο SAP GROUP 2004 και σε εκείνους τους ανθρώπους που με βοήθησαν με το δικό τους τρόπο.....

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	5
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5
1.1 ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	5
1.2 ΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΣΕΛΗΝΙΟΥ	6
1.3 ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΤΟΥ ΣΕΛΗΝΙΟΥ	9
1.4 ΣΠΟΥΔΑΙΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΣΕΛΗΝΙΟΥ	11
1.5 ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΙΔΟΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ SE	13
1.6 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ	15
1.6.1 Οργανολογία Φασματομετρίας Μάζας	16
1.6.2 Μέθοδοι Ιονισμού	17
1.6.2.1 Ηλεκτρονιακός Ιονισμός	17
1.6.2.2 Χημικός Ιονισμός	18
1.6.2.4 Ιονισμός με Ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization, ES)	23
1.6.3 Μέθοδοι Διαχωρισμού Ιόντων	26
1.6.4 Διαδοχική Φασματομετρία Μάζας	30
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	37
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ	37
2.1 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ	37
2.1.1 Ηλεκτροψεκασμός (electrospray, ES)	37
2.1.2 Χημικός Ιονισμός σε Ατμοσφαιρική Πίεση (atmospheric pressure chemical ionization, APCI)	39
2.1.3 Φασματομετρία Μάζας Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS)	40
2.2 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	40
2.3 ΠΡΟΤΥΠΑ ΣΕΛΗΝΟΣΑΚΧΑΡΑ	41
2.4 ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΟΡΕΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	41
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	44
ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC) ΜΕ ΔΙΑΔΟΧΙΚΗ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ ΗΛΕΚΤΡΟΨΕΚΑΣΜΟΥ (ES-MS/MS) ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΣΕΛΗΝΟΣΑΚΧΑΡΩΝ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΟΥΡΑ	44
3.1 ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΓΙΑ ΜΕΓΙΣΤΗ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΚΑΙ ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ	44
3.1.1 Χημικές Ιδιότητες του Αναλύτη	44
3.1.2 Επίδραση του Διαλύτη στην Απόκριση του Ηλεκτροψεκασμού στα Σεληνοσάκχαρα	45
3.1.3 Επιλογή Μεθόδου Σάρωσης των Αναλυτών Μάζας	49
3.1.4 Βελτιστοποίηση Κινητής Φάσης HPLC για τον Διαχωρισμό των Σεληνοσακχάρων	54
3.2 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ (SRM) ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ HPLC-ES-MS/MS ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΣΕΛΗΝΟΣΑΚΧΑΡΩΝ ΣΤΑ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΟΥΡΑ	57
3.2.1 Ποιοτικοί Δείκτες για την Ταυτοποίηση Σεληνοσακχάρων με την Τεχνική HPLC-ES-MS/MS / Selected Reaction monitoring mode	59
3.2.2 Ποσοτικός Προσδιορισμός Σεληνοσακχάρων με την Τεχνική HPLC-ES-MS/MS / Μέθοδος Παρακολούθησης Επιλεγμένων Αντιδράσεων (Selected Reaction Monitoring)	61
3.3 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΑΡΩΣΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΑΠΩΛΕΙΑΣ ΟΥΔΕΤΕΡΩΝ ΟΜΑΔΩΝ (NEUTRAL LOSS SCAN) ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΣΕΛΗΝΟΣΑΚΧΑΡΩΝ ΣΤΑ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΟΥΡΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ HPLC-ES-MS/MS	64
3.4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ HPLC-ES-MS/MS ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΣΕΛΗΝΟΣΑΚΧΑΡΩΝ ΣΤΑ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΟΥΡΑ	65
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	67
ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC) ΜΕ ΔΙΑΔΟΧΙΚΗ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ ΧΗΜΙΚΟΥ ΙΟΝΙΣΜΟΥ ΣΕ ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΙΚΗ ΠΙΕΣΗ (HPLC-APCI-MS/MS) ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΣΕΛΗΝΟΣΑΚΧΑΡΩΝ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΟΥΡΑ	67

4.1 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ (SELECTED REACTION MONITORING) ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ HPLC-APCI-MS/MS ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΣΕΛΗΝΟΣΑΚΧΑΡΩΝ ΣΤΑ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΟΥΡΑ.....	68
4.1.1 Ποιοτικοί Δείκτες για την Ταυτοποίηση Σεληνοσακχάρων με την Τεχνική HPLC-APCI-MS/MS με Παρακολούθηση Επιλεγμένων Αντιδράσεων	71
4.1.2 Ποσοτικοί Δείκτες για τον Προσδιορισμό Σεληνοσακχάρων με την Τεχνική HPLC-APCI-MS/MS / Μέθοδος Παρακολούθησης Επιλεγμένων Αντιδράσεων (Selected Reaction Monitoring)	75
4.2 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΑΡΩΣΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΑΠΩΛΕΙΑΣ ΟΥΔΕΤΕΡΩΝ ΟΜΑΔΩΝ (NEUTRAL LOSS SCAN) ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΣΕΛΗΝΟΣΑΚΧΑΡΩΝ ΣΤΑ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΟΥΡΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ HPLC-APCI/MS/MS.....	78
4.3 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ SRM ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ SeGalNH ₂	80
4.3.1 Εφαρμογή της Μεθόδου Παρακολούθησης Επιλεγμένων Αντιδράσεων (Selected Reaction Monitoring) με την Τεχνική HPLC-APCI/MS/MS για την Ανίχνευση της SeGalNH ₂ στα Ανθρώπινα Ούρα.....	83
4.4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	87
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5.....	89
ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΞΙΟΛΟΓΙΣΗ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC) ΜΕ ΔΙΑΔΟΧΙΚΗ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ ΧΗΜΙΚΟΥ ΙΟΝΙΣΜΟΥ ΣΕ ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΙΚΗ ΠΙΕΣΗ (APCI-MS/MS) ΚΑΙ ΗΛΕΚΤΡΟΨΕΚΑΣΜΟΥ (ES-MS/MS).....	89
5.1 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ HPLC-ICP-MS ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΣΕΛΗΝΟΣΑΚΧΑΡΩΝ (SeGalNac και SeGluNac) ΣΤΑ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΟΥΡΑ	89
5.1.1 Ποσοτικός Προσδιορισμός Σεληνοσακχάρων με την τεχνική HPLC-ICP-MS	91
5.2 ΕΥΡΕΣΗ ΜΟΝΟΠΑΤΙΩΝ ΘΡΑΥΣΗΣ ΤΩΝ ΣΕΛΗΝΟΣΑΚΧΑΡΩΝ ΜΕ ΙΟΝΤΙΚΗ ΠΑΓΙΔΑ	92
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6.....	93
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΕΠΙΛΟΓΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	93
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	95

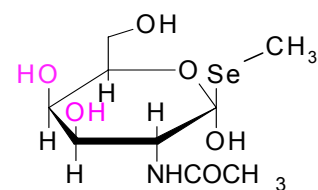
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Εισαγωγή

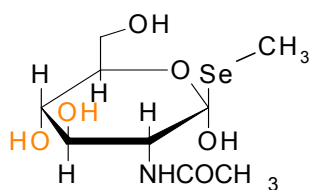
1.1 Σκοπός Εργασίας

Το σελήνιο (Se) ως ιχνοστοιχείο απαραίτητο για την συντήρηση της ζωής παρουσιάζει σημαντικό ερευνητικό ενδιαφέρον. Διάφορες μελέτες έχουν γίνει με απώτερο σκοπό να κατανοηθεί καλύτερα η βιοχημική συμπεριφορά του. Προς επίτευξη αυτού του στόχου είναι ιδιαίτερα σημαντικός και ο χαρακτηρισμός των μεταβολιτών Se στα ούρα θηλαστικών.

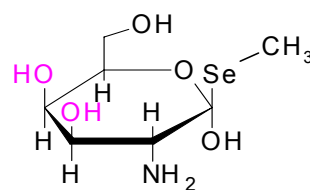
Στη παρούσα εργασία περιγράφεται η ανάπτυξη μεθόδων υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης και διαδοχικής φασματομετρίας μάζας, δύο τύπων ιονισμού ατμοσφαιρικής πίεσης, για τον προσδιορισμό ιχνοποσοτήτων σεληνοσακχάρων στα ανθρώπινα ούρα. Τα σεληνοσάκχαρα για τα οποία γίνεται λόγος είναι τα εξής: 1-methylseleno-2-acetamido-1,2-dideoxy β-D-galactopyranoside (**SeGalNAc**), το διαστεροϊσομερές του 1-methylseleno-2-acetamido-1,2-dideoxy β-D-glucopyranoside (**SeGluNAc**) και το 1-methylseleno-1,2-dideoxy β-D-galactopyranoside (**SeGalNH₂**). Παρακάτω δίνονται οι δομές των σεληνοσακχάρων που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία.



Σχήμα 1.1 SeGalNAc



Σχήμα 1.2 SeGluNAc



Σχήμα 1.3 SeGalNH₂

Πιο συγκεκριμένα περιγράφεται η ανάπτυξη μιας σειράς αναλυτικών μεθόδων κατάλληλων για εύκολο, γρήγορο και ακριβή προσδιορισμό ιχνοποσοτήτων σεληνοσακχάρων σε ακατέργαστα δείγματα ανθρώπινων ούρων. Επίσης, και η ανάπτυξη μεθόδων κατάλληλων για την ανίχνευση αγνώστων μορφών σεληνοσακχάρων. Η έννοια της «εύκολης και γρήγορης» τεχνικής συνδέεται με την ανάγκη τα βιολογικά δείγματα να μην

υποβάλλονται σε εκτενή επεξεργασία προκειμένου να αναλυθούν. Η επίπονη και πολλές φορές χρονοβόρα διαδικασία της επεξεργασίας των βιολογικών δειγμάτων δεν οδηγεί πάντα σε ακριβή αποτελέσματα εφόσον είναι πιθανόν σε αρκετές περιπτώσεις να αλλοιώνεται η αρχική μορφή του μεταβολίτη. Επίσης, ο ακριβής προσδιορισμός ενώσεων Se με φασματομετρία μάζας είναι ιδιαίτερα εύκολος κυρίως λόγω της ανίχνευσης των πολλαπλών ισotόπων του στοιχείου.

Προς επίτευξη των παραπάνω στόχων ερευνήθηκαν οι δυνατότητες της διαδοχικής φασματομετρίας μάζας (tandem mass spectrometry: MS/MS) για την ανίχνευση των σεληνοσακχάρων με εφαρμογή διαφόρων συνδυαστικών σαρώσεων. Αναλυτικότερα, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της παρακολούθησης επιλεγμένων αντιδράσεων (selected reaction monitoring, SRM) για τον ευαίσθητο και επιλεκτικό προσδιορισμό των γνωστών σεληνοσακχάρων και κατόπιν η μέθοδος απώλειας ουδέτερων μορίων (neutral loss scan) σε μια προσπάθεια ανίχνευσης αγνώστων μορφών σεληνοσακχάρων. Επιπλέον, λόγω της ιδιαίτερα σύνθετης μήτρας ακατέργαστων ούρων και των φαινομένων καταστολής του σήματος που συνήθως προκαλεί εξετάστηκαν δύο διαφορετικές πηγές ατμοσφαιρικού ιονισμού. Πιο συγκεκριμένα συγκρίθηκε το μέγεθος της παρατηρούμενης καταστολής σήματος κατά την ανάλυση ούρων με ηλεκτροψεκασμό και με χημικό ιονισμό σε ατμοσφαιρική πίεση. Αυτό πραγματοποιήθηκε με προσθήκη γνωστής ποσότητας των διαφόρων μορφών Se. Τέλος τα ποσοτικά αποτελέσματα της μεθόδου συγκρίθηκαν με αυτά της τεχνικής HPLC-ICP-MS.

1.2 Χημικές Ιδιότητες Σεληνίου

Το Se έχει έξι ηλεκτρόνια στην εξωτερική του στοιβάδα, ανήκει στην 16^η ομάδα του περιοδικού πίνακα, και βρίσκεται κάτω από το θείο. Έτσι παρουσιάζει παραπλήσιες χημικές ιδιότητες με το S, έχοντας όμως μεγαλύτερο και «μαλακότερο» άτομο που του επιτρέπει να ανταλλάσσει τα εξωτερικά του ηλεκτρόνια ευκολότερα με άλλα άτομα ή και με άτομα Se.

Επιπλέον, λόγω της παραπάνω ιδιότητας του χαρακτηρίζεται ως μεταλλοειδές εφόσον μπορεί να δίνει και να παίρνει ηλεκτρόνια από μέταλλα ή το υδρογόνο³.

Ο μεταλλικός του χαρακτήρας γίνεται εμφανής κυρίως στις ενώσεις του με το οξυγόνο, όπου έχει την τάση να δίνει ηλεκτρόνια, δικαιολογώντας έτσι την στερεά μορφή των ενώσεων αυτών όπως SeO_2 , ενώ το αντίστοιχο SO_2 συναντάτε σε αέρια μορφή. Ο μη-μεταλλικός του χαρακτήρας εμφανίζεται κυρίως στις ενώσεις του με υδρογόνο όπως στο H_2Se το οποίο εμφανίζεται περισσότερο όξινο απ' ότι το αντίστοιχο H_2S . Αυτό συμβαίνει εξαιτίας της ικανότητας που παρουσιάζει το Se να δέχεται ηλεκτρόνια από το υδρογόνο δημιουργώντας έτσι ένα πρωτόνιο H^+ και HSe^- , αυτή του η ιδιότητα βρίσκει εφαρμογή σε βιολογικά συστήματα⁴.

Στη στερεά μορφή στοιχειακού Se αλλά και των ενώσεων του με μέταλλα η διαφορά ενέργειας μεταξύ των ενεργειακών επιπέδων της βασικής και της διεγερμένης κατάστασης είναι πολύ μικρή, αυτό επιτρέπει στις ενώσεις αυτές να εμφανίζονται ως καλοί ημιαγωγοί του ηλεκτρισμού, ως καλοί φωτοαγωγοί και να είναι έντονα χρωματισμένες ενώσεις. Σημειώνεται ότι η εμπορική χρήση του Se βασίζεται στις παραπάνω ιδιότητες^{3,4}.

Το Se έχει έξι σταθερά ισότοπα: ^{74}Se (0.9 % ποσοστό φυσικής αφθονίας), ^{76}Se (9.0 %), ^{77}Se (7.6 %), ^{78}Se (23.5 %), ^{80}Se (49.8 %) και ^{82}Se (9.2%), και αρκετά ραδιοϊσότοπα εκ των οποίων το ^{75}Se (120 ημέρες χρόνο ημίσειως ζωής) βρίσκει εφαρμογή σε βιολογικές μελέτες. Τα ισότοπα του Se είναι ιδιαίτερα χρήσιμα κατά τον ποσοτικό προσδιορισμό του καθώς και των ενώσεών του με την τεχνική της φασματομετρίας μάζας.

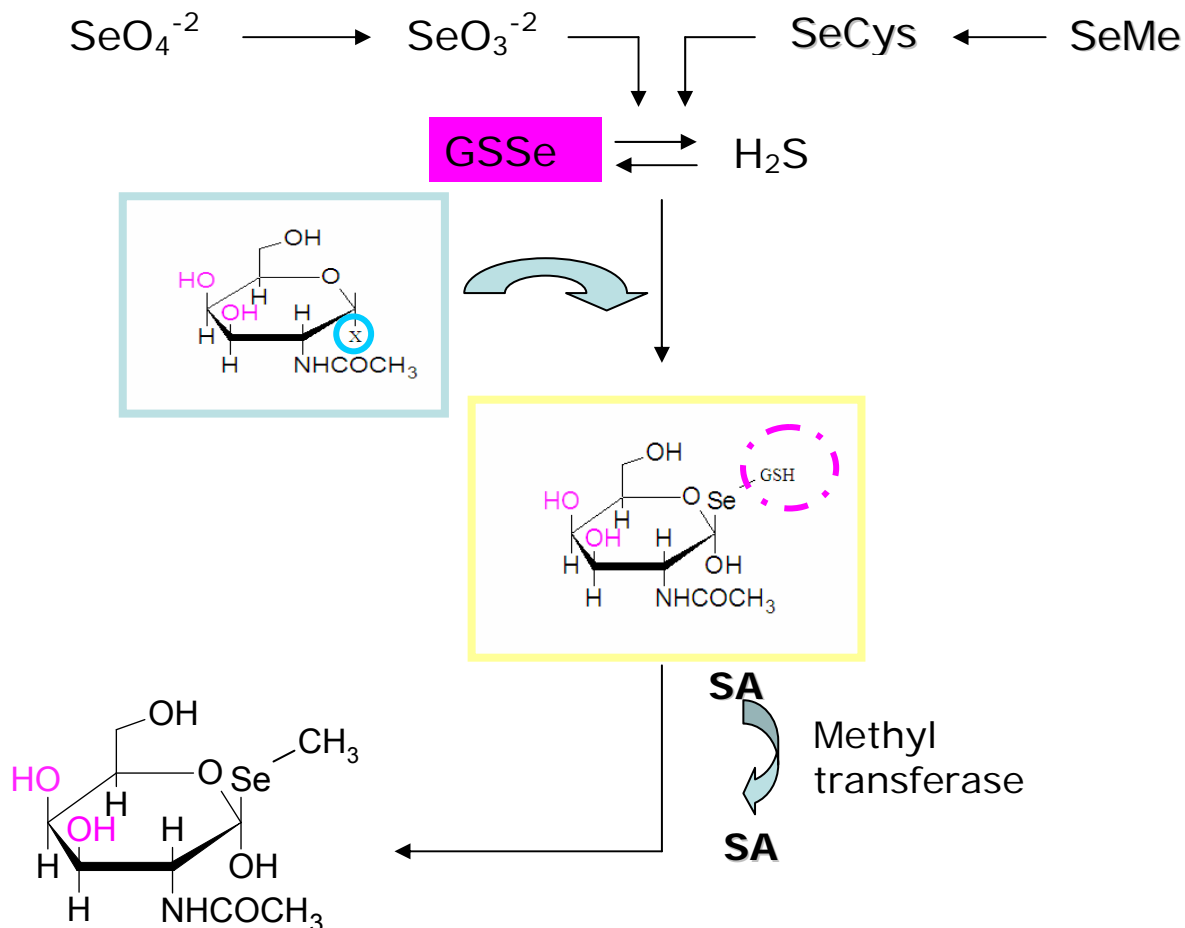
Ως προς τη βιοχημεία του Se, σημειώνεται ότι στον ανθρώπινο οργανισμό οι ανόργανες μορφές Se μεθυλιώνονται. Η περιγραφή της διαδικασίας της μεθυλίωσης αρχίζει με τη μελέτη του Frederic Challenger το 1945 όπου μπαίνουν οι πρώτες βάσεις για την κατανόηση της βιολογικής μεθυλίωσης του σεληνίου, του αρσενικού και του τελλουρίου⁵. Σύμφωνα με την μελέτη αυτή το τελικό προϊόν της μεθυλίωσης του σεληνίου ήταν το

διμεθυλοσεληνικό οξύ το οποίο εντοπίστηκε και σε ζώα το 1952 κατά τη μελέτη των McConnell και Portman⁶. Ο Challenger θεώρησε ότι οι ενώσεις $[\text{MeSe}(\text{O})\text{O}^-]$ και $[\text{MeSe}(\text{O})_2\text{O}^-]$ αποτελούν προϊόντα της βιολογικής μεθυλίωσης του Se, αλλά κάτι τέτοιο δεν αποδείχτηκε ποτέ. Έτσι, όλα δείχνουν ότι το Se μεθυλιώνεται στα βιολογικά συστήματα μέσω μιας αναγωγικής αντίδρασης σεληνιώδες/σεληνικό σε υδρίδιο του σεληνίου ανάλογης αυτής της θειώδες/θειικό σε υδρόθειο (7). Σε αυτή την μεταβολική πορεία ως προϊόντα φαίνονται να είναι το διμεθυλοσεληνικό που αποβάλλεται μέσω της διαδικασίας της αναπνοής και το κατιόν τριμεθυλοσεληνικό ιόν (TMeSe^+) που έχει αναφερθεί ότι αποβάλλεται μέσω των ούρων. Το γεγονός ότι το Se αποβάλλεται κυρίως κατ' αυτόν τον τρόπο αποτελεί σημαντικό αντικείμενο έρευνας για την μελέτη των μεταβολικών διεργασιών του Se.

Η διαδικασία της μεθυλίωσης έχει αποδειχτεί ότι είναι μια διαδικασία μείωσης της τοξικότητας των ενώσεων του Se. Έτσι, το διμεθυλοσεληνικό είναι λιγότερο τοξικό (περίπου 200 φορές) από τις ανόργανες μορφές του Se σεληνικό οξύ/ σεληνιώδες οξύ⁸. Η άμεση αποβολή του διμεθυλοσεληνικού, 71-79% από τον οργανισμό των ποντικών σε 6 ώρες, δικαιολογεί τον χαρακτηρισμό του ως ελάχιστα τοξικό. Επιπλέον, το τριμεθυλοσεληνικό ιόν TMeSe^+ αποδεικνύεται 20 φορές περισσότερο τοξικό από το διμεθυλοσεληνικό που σημαίνει ότι η περαιτέρω μεθυλίωση του στον οργανισμό δεν οδηγεί σε περαιτέρω μείωση της τοξικότητάς του.

Πρόσφατα, το 2002, σε μια μελέτη των Kobayashi et al. (9) βρέθηκε ότι τα σεληνοσάκχαρα, τα οποία αποτελούν και αντικείμενο της παρούσας εργασίας, είναι μεταβολικά προϊόντα του Se στον ανθρώπινο οργανισμό⁹. Πιο συγκεκριμένα το σεληνοσάκχαρο SeGalNAc χαρακτηρίζεται ως το κύριο προϊόν της μεταβολικής πορείας του Se στον ανθρώπινο οργανισμό, ενώ το ισομερές του SeGluNAc χαρακτηρίστηκε ως δευτερεύον προϊόν μεταβολισμού του Se. Σύμφωνα με τη μελέτη αυτή το σεληνοσάκχαρο

εντοπίστηκε αρχικά στο συκώτι και κατόπιν αποβάλλεται μέσω των ούρων. Μια πιθανή διαδικασία σχηματισμού φαίνεται στο Σχήμα 1.4.



Σχήμα 1.4 Πιθανή πορεία σχηματισμού του SeGalNAc στον ανθρώπινο οργανισμό.

1.3 Ιστορικά Στοιχεία της Χημείας του Σεληνίου

Το Se ανακαλύφθηκε από τον Σουηδό χημικό Berzelius το 1817 και πήρε το όνομα του από την ελληνική λέξη *σελήνη*. Το Se μέχρι και τα μέσα του περασμένου αιώνα χαρακτηρίζονταν ως τοξικό, υπεύθυνο για τις δηλητηριάσεις ζώων σε περιοχές της Ντακοτα (Dakota) και Γαϊόμινγκ (Wyoming) των Η.Π.Α. όπου το έδαφος είναι πλούσιο σε σ' αυτό⁹.

Επιπλέον, είχε παρατηρηθεί ότι στις περιοχές αυτές, κυρίως όπου το έδαφος είναι αλκαλικό, κάποια φυτά έχουν την ικανότητα να απορροφούν μεγάλες συγκεντρώσεις Se προκαλώντας αναπηρία και καταστροφή στις οπλές των ζώων που το καταναλώνουν. Επτά περίπου αιώνες πριν, καταγράφεται από τον Μάρκο Πόλο, σε ένα ταξίδι του στην Κίνα, ένα δηλητηριώδες φυτό που προκαλεί καταστροφή των οπλών των ζώων¹⁰. Η τοξικότητα του Se επιπλέον έχει εμφανιστεί σε ανθρώπους που ζουν στην Κίνα, στη Νότια Ντακότα και στη Βενεζουέλα.

Το γεγονός ότι το Se πρόκειται για ένα ιχνοστοιχείο απαραίτητο για τον άνθρωπο έγινε γνωστό το 1957¹¹. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν το 1973 με την μελέτη του Rotruck et al.¹² σύμφωνα με την οποία κοινοποιήθηκε ο ρόλος του Se στη υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (glutathione peroxidase) όπως επίσης και σε διάφορα ενζυματικά συστήματα¹³. Το Se εντοπίζεται κυρίως στο έδαφος, με αποτέλεσμα η συγκέντρωση του στα φυτά και στα ζώα εξαρτάται από το ποσοστό που υπάρχει στο έδαφος. Το Se υπάρχει στο έδαφος σε διάφορες μορφές όπως στοιχειακό Se, σεληνικό οξύ, σεληνιώδες οξύ, και οργανικές ενώσεις σεληνίου¹⁴. Μια μελέτη των Nye & Petersen, 1975 έδειξε ότι το ποσοστό του Se που απορροφάται από τα φυτά συνδέεται με τις υδατοδιαλυτές ενώσεις του Se που υπάρχουν στο έδαφος¹⁵. Προκειμένου να υπολογίσουμε το ποσοστό του Se στα φυτά πρέπει να γνωρίζουμε κάποιες φυσικές και χημικές ιδιότητες του εδάφους όπως είναι το pH, αναγωγική συμπεριφορά, και η μικροβιολογική δραστηριότητα. Η απορρόφηση του Se από τα φυτά αυξάνει με την αύξηση του pH (Baners 1988, Pfannauser, 1922a)¹⁶. Πιο συγκεκριμένα σε αλκαλικό έδαφος (pH 7.5-8.5) το σεληνικό ανάγεται προς ευδιάλυτα σεληνιούχα ιόντα τα οποία απορροφούνται εύκολα από διάφορα φυτά. Σε όξινο έδαφος (pH 4.5-6.5) το Se προσροφάτε σε οξείδια του σιδήρου τα οποία δεν είναι δυνατό να απορροφηθούν από τα φυτά (17). Επιπλέον πολλές αντιδράσεις μεταφοράς του Se προωθούνται λόγω ύπαρξης μικροβιακών δραστηριοτήτων.

1.4 Σπουδαιότητα του Σεληνίου

Στις μέρες μας η σπουδαιότητα του Se εντοπίζεται σε διάφορους τομείς της επιστήμης αλλά και της καθημερινής μας ζωής. Στη βιοχημεία υπογραμμίζεται η ύπαρξη του Se στο 21^ο αμινοξύ, την σεληνοκυστεΐνη¹⁸. Η σεληνοκυστεΐνη λαμβάνει μέρος στη σύνθεση των σεληνοπρωτεϊνών, οι οποίες παρουσιάζουν σημαντική ενζυματική και αναγωγική δράση. Οι σεληνοπρωτεΐνες λόγω των δομικών και μεταφορικών λειτουργιών που έχουν μπορούν να απομακρύνουν από τα κύτταρα ελεύθερες ρίζες ή ενώσεις του ενεργού οξυγόνου προστατεύοντας έτσι τον οργανισμό. Επίσης, καθίστανται υπεύθυνες για την παραγωγή της δραστηκής μορφής της θυρεοειδούς ορμόνης, για την ανδρική γονιμότητα, για τον έλεγχο της κυτταρικής διαίρεσης και για την ρύθμιση διάφορων γονιδιακών χαρακτηριστικών^{19,20}.

Στη γεωργία, το Se εντοπίζεται στα λιπάσματα αυξάνοντας έτσι την παραγωγικότητα των ζώων. Στο περιβάλλον, έχει διαπιστωθεί ότι η ύπαρξη του Se συμβάλλει στη μείωση της τοξικότητας του καδμίου, του ψευδαργύρου καθώς και του μεθυλιωμένου ψευδαργύρου. Στη μεταλλουργία βελτιώνει την ελαστικότητα του χάλυβα, ανοξειδωτού χάλυβα, και σιδήρου²¹.

Αποτελεί γεγονός αδιαμφισβήτητης σημασίας ότι η σπουδαιότητα του Se ξεπερνά τα επιστημονικά ενδιαφέροντα και εντοπίζεται σε διάφορες εκφάνσεις τις καθημερινής ζωής. Πρωταρχικά, το Se αποτελεί μέρος της καθημερινής μας διατροφής. Η διατροφική αξία του Se επιφέρει σημαντικά αποτελέσματα τόσο στις περιπτώσεις υπερκατανάλωσής του αλλά και στις περιπτώσεις ανεπάρκειάς του. Τα αποτελέσματα και στις δύο περιπτώσεις γίνονται εμφανή κυρίως στους ζωντανούς οργανισμούς γεγονός που επιβεβαιώνει την σημασία του Se στη καθημερινή ζωή.

Το Se συναντάται σε μεγάλο ποσοστό στα βραζιλιάνικα φιστίκια, στο συκώτι, σε διάφορα θαλασσινά κυρίως μαλάκια, στα λαχανικά κυρίως στο μπρόκολο, στο αλεύρι, και στη μαγιά^{22,23}. Η καθημερινή δΟΣολογία του Se σε φυσιολογικά επίπεδα κυμαίνεται πάνω από τα 70 μg/day, ενώ η τοξικότητα του εμφανίζεται με την κατανάλωση άνω των 700 μg Se /day²⁴. Το Se παίρνει μέρος στην διατροφικό κύκλο κυρίως μέσω των φυτών που το

απορροφούν από το έδαφος, έτσι ανεπάρκεια εντοπίζεται σε περιοχές που είναι φτωχές σε αυτό όπως είναι οι ηφαιστιογενείς περιοχές. Ειδικότερα, η ανεπάρκεια του Se οδηγεί στην ανικανότητα αναπαραγωγής (και στα δύο φύλα) αλλά και σε κατάθλιψη, διαφορές καρδιοπαθητικές ασθένειες όπως: white muscle –μυοπάθεια των καρδιακών και σκελετικών μυών προσβάλλει κυρίως τα άκρα και Keshan η οποία πρόκειται για θανατηφόρο ασθένεια, παρατηρήθηκε στις περιοχές της βορειοανατολικής Κίνας^{25,26}. Έχει βρεθεί ότι το Se είναι ικανό να ενισχύει το ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου ανεξάρτητα από την ηλικία. Σε μία ομάδα 22 ηλικιωμένων ανθρώπων χορηγήθηκαν 100 μg Se υπό μορφή μαγιάς (εμπλουτισμένης σε Se) καθημερινά για έξι μήνες. Διαπιστώθηκε ότι η ανταπόκριση του ανοσοποιητικού τους συστήματος ισοδυναμούσε με αυτήν νεότερων ανθρώπων. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι κυτταρικό περιβάλλον ανεπαρκή σε Se αντιδρά καταστροφικά σε διάφορους ιούς. Στο Πανεπιστήμιο της Βόρειας Καρολίνας οι Beck et al. διαπίστωσαν ότι ο καλοήθης ιός Cocksackie που προκαλεί στον άνθρωπο μια αρρώστια συναφής της πολιομυελίτιδας, σε περιβάλλον φτωχό σε Se είναι δυνατό να προκαλέσει την θανατηφόρο αρρώστια Keshan.

Αξίζει να σημειωθεί ότι το πεδίο που σήμερα συγκεντρώνει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον για το Se είναι ο ρόλος του στην αντιμετώπιση του καρκίνου. Αυτό προέκυψε από σημαντικές επιδημιολογικές μελέτες. Ενθαρρυντικά ήταν τα αποτελέσματα μιας δωδεκάχρονης έρευνας που πραγματοποιήθηκε στις Η.Π.Α. για το ρόλο του Se στον καρκίνο του προστάτη²⁷. Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν επίσης στην Κίνα έδειξαν τον σημαντικό ρόλο του Se για την αντιμετώπιση του καρκίνου στο συκώτι.

Τα παραπάνω είχαν σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση διατροφικών συμπληρωμάτων Se. Έχει βρεθεί ότι τα προϊόντα αυτά είναι περισσότερο αποτελεσματικά όταν περιέχουν οργανικές ενώσεις σεληνίου όπως σεληνομεθειονίνη, και αυτό γιατί ο μεταβολισμός του σεληνίου στον ανθρώπινο οργανισμό πραγματοποιείται μέσω μεθυλίωσης²⁸. Ο μεταβολισμός

του Se, και ιδιαίτερα οι μορφές του που εμφανίζονται στα ανθρώπινα ούρα, αναμφισβήτητα χρίει ιδιαίτερης σημασίας γι' αυτό και έχουν γίνει διάφορες μελέτες. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες κυρίως χρησιμοποιώντας την τεχνική της φασματομετρίας μάζας.

1.5 Αναλυτικές Μέθοδοι για τον Ειδοπροσδιορισμό Se

Ο ειδοπροσδιορισμός του Se σε βιολογικά δείγματα αποτελεί πρόκληση στον τομέα της αναλυτικής χημείας μιας και είναι ιδιαίτερα δύσκολος. Για το σκοπό αυτό έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες. Οι μέθοδοι που παρουσιάστηκαν για την ανάλυση ενώσεων Se στα ανθρώπινα ούρα στηρίζονται κυρίως στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης συνδυασμένη με ιονισμό ατμοσφαιρικής πίεσης με φασματοσκοπία μάζας (HPLC-API-MS), όπως επίσης και στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (HPLC-ICP/MS). Παρακάτω αναλύονται προβλήματα που εντοπίστηκαν κατά την διεξαγωγή των παραπάνω αναλυτικών μεθόδων.

Η χρωματογραφία που χρησιμοποιήθηκε είναι αυτή της αντίστροφης φάσης. Η συγκεκριμένη χρωματογραφία ευνοεί τον διαχωρισμό των σεληνοσακχάρων στα ούρα μιας και έχει παρατηρηθεί ότι οι περισσότερες ενώσεις σεληνίου εκλύονται μετά τον «νεκρό» όγκο της στήλης. Έτσι ο διαχωρισμός των σεληνοσακχάρων είναι ικανοποιητικός με τη χρησιμοποίηση κατάλληλης κινητής φάσης. Η τεχνική HPLC-ICP-MS πρόκειται για μια πολύ «δυνατή» τεχνική που χρησιμοποιείται κυρίως για στοιχειακό προσδιορισμό όπου και δίνει αποτελέσματα υψηλής εκλεκτικότητας και ευαισθησίας. Από την άλλη πλευρά, η τεχνική που περιλαμβάνει την χρωματογραφία υψηλής απόδοσης και ιονισμό ατμοσφαιρικής πίεσης σε συνδυασμό με φασματοσκοπία μάζας (HPLC-API/MS) χρησιμοποιείται κυρίως για μοριακό προσδιορισμό των ενώσεων. Έτσι η πρώτη τεχνική δεν δίνει πληροφορίες σχετικά με την δομή των ενώσεων σε αντίθεση με την δεύτερη που δίνει τέτοιες

πληροφορίες αλλά κρίνεται ως λιγότερο ευαίσθητη τεχνική και ανθεκτική σε φαινόμενα παρεμποδίσεων. Γίνεται αντιληπτό ότι οι δυο αυτές τεχνικές αλληλοσυμπληρώνονται μιας και με την πρώτη τεχνική δεν είναι εφικτό να προσδιοριστούν άγνωστες ενώσεις ενώ με την δεύτερη τεχνική είναι δύσκολος ο προσδιορισμός ενώσεων χαμηλής συγκέντρωσης σε βιολογικά δείγματα. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία^{39,40,41} ένα από τα προβλήματα που εντοπίζονται στην ανάλυση Se με την αναλυτική τεχνική HPLC-ICP-MS οφείλεται στο γεγονός ότι παρουσιάζει παρεμποδίσεις όπως $^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}^+$, $^{38}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$, $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$ που παράγονται στο πλάσμα Ar. Το πρόβλημα αυτό μπορεί να ξεπεραστεί ως ένα βαθμό, με την εισαγωγή κυψελίδας πρόσκρουσης (collision cell technology). Το πρόβλημα όμως εξακολουθεί να υπάρχει κατά την ανάλυση ούρων όπου εντοπίζονται «ψεύτικες» κορυφές σεληνίου οι οποίες είναι πιθανόν να προέρχονται από τα πολυατομικά ιόντα $^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}^+$, $^1\text{H}^{79}\text{Br}^+$, $^1\text{H}^{81}\text{Br}^+$. Επίσης κατά την ανάλυση με HPLC-ICP/MS ο χαρακτηρισμός ενώσεων Se στο «νεκρό» όγκο είναι ιδιαίτερα προβληματικός διότι είναι πιθανό να υπάρχουν αρκετές διαφορετικές ενώσεις με παρόμοια συμπεριφορά. Παρόλο τα παραπάνω εμπόδια η ανάλυση με την παραπάνω τεχνική έφερε ικανοποιητικά αποτελέσματα κάνοντας έτσι ένα σημαντικό βήμα στον ειδοπροσδιορισμό ενώσεων του σεληνίου στα ανθρώπινα ούρα. Αξίζει να σημειωθούν οι προσπάθειες των Gammelgard et al (42) κατά την οποία παρουσιάζεται μια πρώτη προσπάθεια ανίχνευσης του SeGalNAc. Επίσης παρόμοια αποτελέσματα περιλαμβάνει και η προσπάθεια των Bendals και Gammelgaard (43) και επίσης των Orga et al. (44) όπου παρουσιάζονται αρκετές πληροφορίες σχετικά με την ανίχνευση του SeGalNAc με τις παραπάνω τεχνικές. Τέλος η προσπάθεια των Gammelgaard et al.(45) σύμφωνα με την οποία παρουσιάζεται μια ολοκληρωμένη προσπάθεια ανίχνευσης, με την βοήθεια της παραπάνω τεχνικής, της SeGalNAc.

Η ανάλυση με HPLC-API-MS παρουσιάζει με την σειρά της τις δικές της δυσκολίες ως προς την ανάλυση των ενώσεων σεληνίου στα ανθρώπινα ούρα. Αναλυτικότερα, η

συγκεκριμένη ανάλυση απαιτεί την απομάκρυνση των αλάτων νατρίου από τα δείγματα των ούρων γιατί η παρουσία τους οδηγεί σε ταπείνωση του σήματος του αναλύτη. Έτσι τα δείγματα των ανθρώπινων ούρων πριν την ανάλυση τους, υποβάλλονται στη διαδικασία της λυοφιλοποίησης (lyophilization) ή στην διαδικασία εκχύλισης με μεθανόλη σε συνδυασμό με κάποιο χρωματογραφικό καθαρισμό. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με το ότι οι ενώσεις του σεληνίου εντοπίζονται σε ιχνοποσότητες στα ανθρώπινα ούρα δυσχεραίνει την εύκολη, γρήγορη και εκλεκτική ανάλυσή τους. Ένα άλλο πρόβλημα που εμποδίζει την ανάλυση του σεληνίου εντοπίζεται στον αποδοτικό ιονισμό των ενώσεων που απαιτείται κατά την διαδικασία της φασματομετρικής τους ανάλυσης. Οι ενώσεις του Se, που εντοπίζονται στα ανθρώπινα ούρα, κρίνονται ως ιδιαίτερα ασταθείς με αποτέλεσμα να διασπώνται υπό έντονες συνθήκες ιονισμού. Επίσης και κατά την ανάλυση με HPLC-API/MS ανίχνευση και χαρακτηρισμός ενώσεων Se που εκλύονται στον «νεκρό» όγκο είναι ιδιαίτερα προβληματική. Σημειώνονται οι προσπάθειες που έγιναν με ανάλυση HPLC-API/MS στις οποίες παρατηρούνται οι δυσκολίες που παρουσιάστηκαν παραπάνω. Αυτές είναι η προσπάθεια των Bente Gammelgaard et al(46) όπως και η προσπάθεια των V.Diaz Huerta et al (47). Σύμφωνα με τα παραπάνω η ανάγκη ανάπτυξης μιας τεχνικής με εύκολη και γρήγορη εφαρμογή φαντάζει αναγκαία.

1.6 Εισαγωγή στη Φασματομετρία Μάζας

Η φασματομετρία μάζας είναι μία ευαίσθητη τεχνική που χρησιμοποιείτε για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό χημικών ενώσεων. Βασίζεται στον διαχωρισμό των φορτισμένων (ιόντων) σωματιδίων με την βοήθεια κατάλληλης διάταξης αναλυτή μάζας (κυρίως μαγνητικού πεδίου, τετραπόλου, και χρόνου πτήσης) και στην εύρεση της αντιστοιχίας των μαζών των λαμβανομένων ιόντων με την δομή της πρόδρομης ένωσης. Η αντιστοιχία αυτή προϋποθέτει την γνώση των διαδικασιών ιονισμού και επιπλέον του

μηχανισμού της πιθανής θραυσματοποίησης των ιόντων (29). Ο ιονισμός των μορίων γίνεται με διάφορες τεχνικές, με συνηθέστερες τις: α) ηλεκτρονιακή πρόσκρουση (Electron impact ionization, EI) με ταχέως κινούμενα ηλεκτρόνια (συνήθως ενέργειας 70 eV), β) φωτοϊονισμός (Photoionization, PI), με την βοήθεια φωτός στην υπεριώδη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, γ) χημικός ιονισμός (Chemical ionization, CI), μέσω αντίδρασης με άλλα ιόντα, δ) με ηλεκτροψεκασμό (Electrospray, ES), ε) με χημικό ιονισμό ατμοσφαιρικής πίεσης (APCI). Ο προσδιορισμός της μοριακής μάζας διευκολύνεται από της λήψη του κατιόντος της χημικής ένωσης (πατρικού ιόντος ή πρόδρομου ιόντος), που προϋποθέτει την επιβιωσιμότητα του συγκεκριμένου κατιόντος. Επιπλέον, σε περιπτώσεις ανάλυσης χημικών ενώσεων με ίδιο μοριακό βάρος ή ισομερών, η θραυσματοποίηση του αρχικού πατρικού ιόντος δίνει πληροφορίες για την δομή των χημικών ενώσεων.

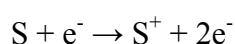
1.6.1 Οργανολογία Φασματομετρίας Μάζας

Ο φασματογράφος μάζας αποτελείται από τα ακόλουθα βασικά τμήματα: α) πηγή ιονισμού, β) αναλυτής μαζών και γ) ανιχνευτής ιόντων. Η πηγή ιονισμού είναι ο χώρος στον οποίο ένα μέρος του δείγματος (στις περισσότερες τεχνικές ιονισμού απαιτείται να βρίσκεται στην αέρια φάση) ιονίζεται και τα παραγόμενα ιόντα οδηγούνται στον αναλυτή μαζών. Ο σκοπός του αναλυτή μαζών είναι ο διαχωρισμός των ιόντων σύμφωνα με την μάζα προς το φορτίο τους, επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την επιλογή ιόντων με συγκεκριμένη μάζα προς φορτίο τα οποία υφίστανται επιπλέον ανάλυση. Τελικά τα ιόντα αυτά κατευθύνονται στον ανιχνευτή ιόντων. Ο ανιχνευτής συλλαμβάνει τα προσπίπτοντα ιόντα και ενισχύει το λαμβανόμενο ασθενές ηλεκτρικό σήμα. Η σύγχρονη φασματομετρία μάζας αποτελεί μία ποιοτική και ποσοτική αναλυτική τεχνική με μία συνεχώς ανανεούμενη ποικιλία μεθόδων ιονισμού, διαχωρισμού μαζών και ανίχνευσης ιόντων.

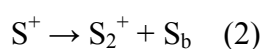
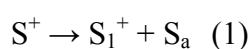
1.6.2 Μέθοδοι Ιονισμού

1.6.2.1 Ηλεκτρονιακός Ιονισμός

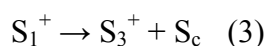
Η συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος ιονισμού στην αέρια φάση είναι του ηλεκτρονιακού ιονισμού (EI), με πλεονεκτήματα την άριστη κατανόηση του μηχανισμού της, την καθολικότητα της εφαρμογής της σε όλες τις πτητικές χημικές ενώσεις και την αναπαραγωγιμότητα των λαμβανομένων φασμάτων μάζας. Η μέθοδος βασίζεται στον ιονισμό ενός μορίου S που προκαλείται από την αλληλεπίδραση του με ταχέως κινούμενα ηλεκτρόνια:



Η παραγωγή των ηλεκτρονίων επιτυγχάνεται σε ένα πυρακτωμένο νήμα W ή Re, που αποτελεί την κάθοδο, και η επιτάχυνση τους επιτυγχάνεται με την βοήθεια ηλεκτρικού πεδίου, δυναμικού από 10 έως 250 V. Συνεπώς κάθε ηλεκτρόνιο αποκτά κινητική ενέργεια $E_{kin}=q_eV$, όπου q_e είναι το φορτίο του ηλεκτρονίου και V η εφαρμοζόμενη διαφορά δυναμικού. Συνήθως, το εφαρμοζόμενο δυναμικό είναι 70 V, με αποτέλεσμα κάθε ηλεκτρόνιο να αποκτά κινητική ενέργεια 70 eV (αποτελεί την πρότυπη κινητική ενέργεια ηλεκτρονίων που χρησιμοποιείται για την αρχειοθέτηση των φασμάτων μάζας σε βάσεις δεδομένων). Η πρόσκρουση του ηλεκτρονίου με κινητική ενέργεια E_{kin} μερικών δεκάδων eV είναι περισσότερο από αρκετή για τον ιονισμό του S, θεωρώντας ότι για τον απλό ιονισμό ενός ατόμου ή μορίου S χρειάζονται περίπου 5 – 25 eV. Έτσι κατά τον ιονισμό, το παραγόμενο κατιόν S^+ σχηματίζεται διεγερμένο και ακολουθεί πορείες μονομοριακής διάσπασης προς απλούστερα θραύσματα S_1^+, S_2^+, \dots :



ή ακόμη και δευτερογενής θραυσματοποίηση των πρωτογενών θραυσμάτων.



Οι πορείες θραυσματοποίησης εξαρτώνται από την μοριακή δομή του S και των παραγομένων κατιόντων, με αποτέλεσμα την ικανότητα προσδιορισμού της δομής του S με εξέταση του φάσματος μάζας. Είναι ακόμη δυνατή η ταυτοποίηση ισομερών με γνώμονα τις πιθανές διαφορές στις πορείες διάσπασης τους, και δεν είναι υπερβολικό να λεχθεί ότι η διασάφηση του μηχανισμού διάσπασης κατά τον ηλεκτρονιακό ιοντισμό απαιτεί "χημική διαίσθηση" και η ανάλυση του φάσματος μάζας καθίσταται ευκολότερη χρησιμοποιώντας χημικά επιχειρήματα. Τα σοβαρότερα μειονεκτήματα της μεθόδου του ηλεκτρονιακού ιοντισμού είναι η απαιτούμενη πτητικότητα της χημικής ένωσης (ή μίγματος ενώσεων) και η εκτενής μοριακή θραυσματοποίηση που συνοδεύει τον ιονισμό. Συχνά, παρατηρείται ακόμη και η έλλειψη της κορυφής που αντιστοιχεί στην μοριακή μάζα της χημικής ένωσης, με αποτέλεσμα την σχετική αδυναμία προσδιορισμού του μοριακού βάρους της ένωσης. Το δεύτερο μειονέκτημα, η εκτενής θραυσματοποίηση οδηγεί σε ένα πλήθος χαρακτηριστικών ιόντων και εντάσεων στο φάσμα μάζας. Έτσι τα φάσματα μάζας EI συνήθως αποτελούν "δακτυλικό αποτύπωμα" της χημικής ένωσης. Το φάσμα μάζας είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με "βιβλιοθήκες αναφοράς" για την ταυτοποίηση της χημικής ένωσης ή των χημικών ενώσεων που απαρτίζουν ένα μίγμα. Όταν η θραυσματοποίηση δεν είναι επιθυμητή, υπάρχουν εναλλακτικοί μέθοδοι ιονισμού μορίων στην αέρια φάση. Αυτοί είναι ο χημικός ιονισμός (CI), ο φωτοϊονισμός (PI), ο ιονισμός μέσω ηλεκτροψεκασμού (ES) και ο χημικός ιονισμός ατμοσφαιρικής πίεσης (APCI).

1.6.2.2 Χημικός Ιονισμός

Κατά τον χημικό ιονισμό (30), αντιδράσεις μεταξύ ιόντων του αέριου αντιδραστήριου και μορίων του αναλύτη έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή ιόντων. Ως αέριο αντιδραστήριο χρησιμοποιούνται συνήθως: το CH₄, το (CH₃)₃CH ή η αμμωνία NH₃. Τα αέρια αντιδραστήρια, που βρίσκονται σε μεγάλη περίσσεια σε σχέση με τον αναλύτη,

ιονίζονται αρχικά με ηλεκτρονιακό ιοντισμό (R^+) και κατόπιν μέσω χημικής αντίδρασης στην αέρια φάση δίνουν ιόντα της μορφής RH^+ . Μεγάλοι χρόνοι παραμονής ή υψηλή πίεση του αερίου συντελούν σε αντιδράσεις μεταφοράς φορτίου (ή ακόμη και ατόμων και ομάδων) μεταξύ του κατιόντος RH^+ και των συστατικών υπό ανάλυση S, δημιουργώντας ιόντα S^+ :



Το πλεονέκτημα της μεθόδου σε σχέση με τον ηλεκτρονιακό ιοντισμό είναι η χαμηλή ενέργεια η οποία εναποτίθεται στο παραγόμενο κατιόν S^+ ή SH^+ με αποτέλεσμα το μικρό ποσοστό θραυσματοποίησης του και την παρουσία (συνήθως) του πατρικού ιόντος του S με την επακόλουθη ευκολία προσδιορισμού του μοριακού βάρους του S. Τα λαμβανόμενα φάσματα μάζας είναι εξαιρετικά απλά, όμως περιέχουν πολύ μικρό ποσοστό πληροφορίας (εκτός της μοριακής μάζας του S) και δυστυχώς δεν είναι πάντα αναπαραγωγίσιμα, καθ' όσον εξαρτώνται πολύ από τις συνθήκες ιονισμού, το είδος του αερίου RH, την πίεση και τον χρόνο παραμονής του δείγματος στην περιοχή ιονισμού και την φύση του δείγματος.

Η μέθοδος του φωτοϊονισμού (Photoionization, P.I.) χρησιμοποιεί πηγή φωτός (συνήθως υπεριώδες, $\lambda < 350 \text{ nm}$) για τον ιονισμό του S, με την βοήθεια laser ή λυχνίας Hg ή Xe.

Η μέθοδος του φωτοϊονισμού δεν χρησιμοποιείται ευρέως για αναλύσεις ρουτίνας, αλλά αποτελεί μία μέθοδο ιονισμού σε ερευνητικό επίπεδο για την ανάλυση και ανίχνευση ασταθών ελευθέρων ριζών που παράγονται σε χημικές αντιδράσεις. Μάλιστα, με κατάλληλη επιλογή του μήκους κύματος της ιονίζουσας ακτινοβολίας είναι δυνατή η εκλεκτική ανίχνευση ορισμένων μορίων ή ελευθέρων ριζών.

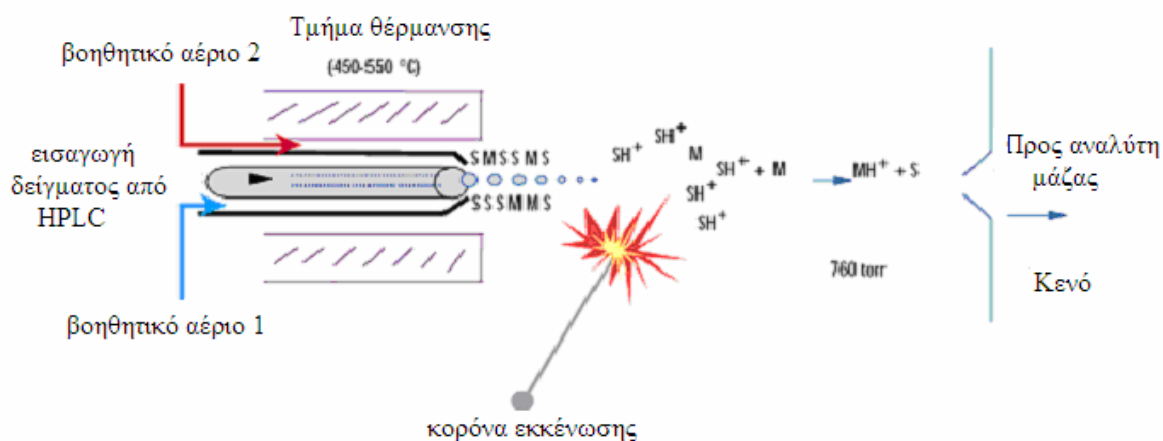
Οι τεχνικές ηλεκτροψεκασμού (ES) και χημικού ιονισμού ατμοσφαιρικής πίεσης (APCI) αποτελούν τεχνικές ιονισμού ατμοσφαιρικής πίεσης (Atmospheric Pressure Ionization, API) (31) και αποκαλούνται «μαλακές» τεχνικές ιονισμού διότι συνήθως δεν

προκαλούν θραυσματοποίηση των μοριακών ιόντων. Τα πλεονεκτήματα των τεχνικών ιοντισμού ατμοσφαιρικής πίεσης είναι:

1. Ύπαρξη μοριακού ιόντος στο φάσμα μάζας ακόμη και για μη-πητικές ενώσεις μεγάλης μοριακής μάζας.
2. Υψηλή ευαισθησία κατά την ανίχνευση των ενώσεων.
3. Εισαγωγή αναλύτη στην υγρή φάση, συμβατότητα με διάφορα είδη υγρής χρωματογραφίας.
4. Σχετικά εύκολη χρήση της τεχνικής.

Για να διαλέξουμε κάθε φορά μεταξύ των μεθόδων ιοντισμού λαμβάνουμε υπόψη την φύση των ενώσεων που μελετώνται. Πιο συγκεκριμένα η τεχνική του ηλεκτροψεκασμού προτιμάται στην περίπτωση που έχουμε ιοντικές ή πολύ πολικές ή θερμικά ασταθής ενώσεις καθώς και ενώσεις με μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 1000 Da. Με τον χημικό ιονισμό σε ατμοσφαιρική πίεση αναλύονται κυρίως ενώσεις που δεν είναι πολύ πολικές. Οι πητικές μη-πολικές ενώσεις αναλύονται καλύτερα με την τεχνική του ηλεκτρονιακού ιοντισμού. Έτσι, εάν έχουμε φυτοφάρμακα για ανάλυση, τα περισσότερα πολικά φυτοφάρμακα αναλύονται με ES, τα λιγότερα με APCI ενώ τα καθόλου με την τεχνική EI.

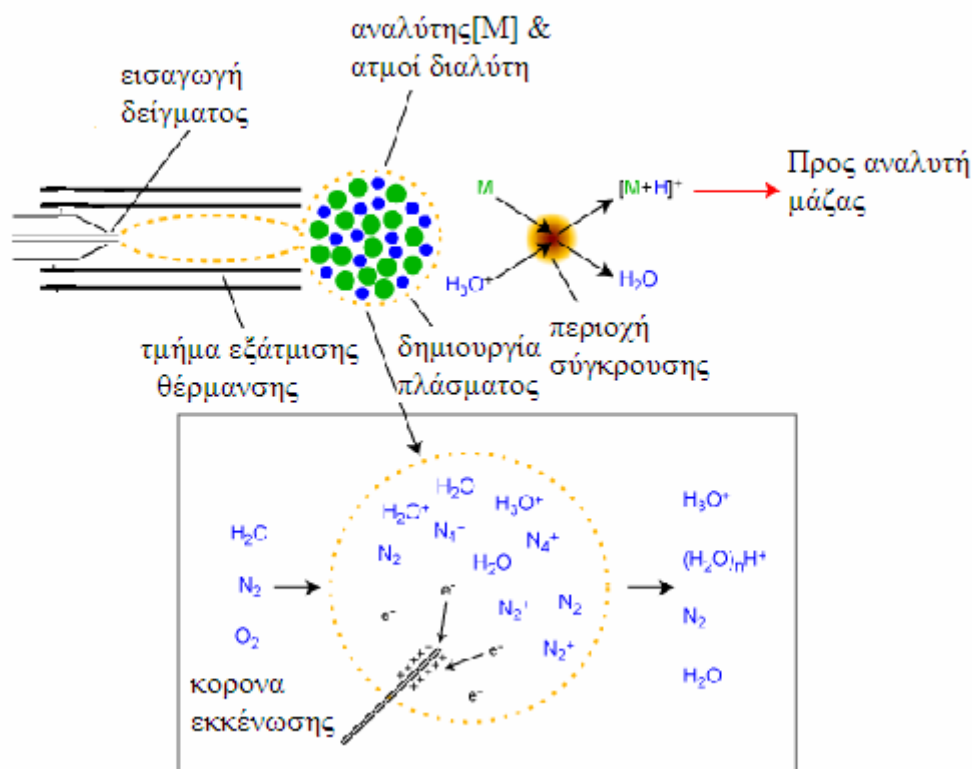
1.6.2.3 Χημικός Ιονισμός Ατμοσφαιρικής Πίεσης (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI)



Σχήμα 1.5. Τεχνική του χημικού ιοντισμού ατμοσφαιρικής πίεσης (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI, 31).

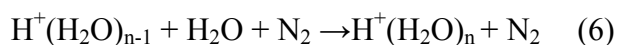
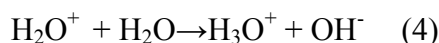
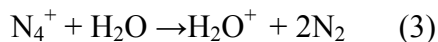
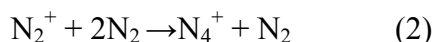
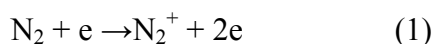
Ο χημικός ιονισμός ατμοσφαιρικής πίεσης (APCI) (31,33) βασίζεται στις αντιδράσεις μορίων-ιόντων στην αέρια φάση υπό ατμοσφαιρική πίεση. Πρόκειται για τεχνική ανάλογη με αυτή του χημικού ιοντισμού(CI). Η διαφορά του με τον χημικό ιονισμό εντοπίζεται στο γεγονός ότι η τεχνική του APCI λαμβάνει χώρα υπό συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης και οι κύριες εφαρμογές του αφορούν τον ιονισμό φαρμακευτικών ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους. Επιπλέον, η πηγή ιονισμού του APCI παρουσιάζει ομοιότητες με την πηγή ιονισμού του ES. Η διαφορά του οφείλεται στον τρόπο που ιονίζονται οι ενώσεις. Πιο συγκεκριμένα, κατά τον ηλεκτροψεκασμό ο ιονισμός γίνεται λόγω της διαφοράς δυναμικού μεταξύ της βελόνας ψεκασμού και του κώνου με ταυτόχρονη και γρήγορη αποδιαλύτωση των ενώσεων αντίθετα, κατά τον χημικό ιονισμό ατμοσφαιρικής πίεσης το προς ανάλυση δείγμα εισάγεται στον εκνεφωτή και αποδιαλυτώνεται μέσα σε ένα θερμαινόμενο σωλήνα πριν τη δημιουργία ιόντων. Σύμφωνα με το Σχήμα 1.5 το εκλούόμενο από την χρωματογραφική στήλη διάλυμα εισέρχεται σε ένα εκνεφωτή όπου μετατρέπεται σε σταγόνες (αναλύτη-κινητής φάσης).

Οι σταγόνες οδηγούνται με την βοήθεια ροής αερίου N_2 σε θερμαινόμενο σωλήνα όπου λαμβάνει χώρα η εξάτμιση τόσο του αναλύτη όσο και της κινητής φάσης. Στη συνέχεια, τα σχηματιζόμενα σωματίδια έρχονται σε επαφή με τα ιόντα N_2^+ καθώς και τα ιόντα N_4^+ τα οποία παράγονται από τη βελόνα εκκένωσης (corona discharge), λαμβάνει χώρα μια σειρά αντιδράσεων σχηματίζοντας έτσι H_3O^+ και $(H_2O)_nH^+$ ως δευτερεύοντα προϊόντα. Τα δευτερεύοντα αυτά ιόντα παίρνουν μέρος σε συνεχόμενες κρούσεις με τα μόρια του αναλύτη και τελικά σχηματίζονται τα πρωτονιωμένα ιόντα που αναλύονται (Σχήμα 1.6).



Σχήμα 1.6. Δημιουργία σταγόνων, αντιδράσεις μορίων-ιόντων στην αέρια φάση σύμφωνα με την τεχνική του APCI, 31 .

Υποθέτοντας ότι το N_2 είναι το βοηθητικό αέριο, και υπάρχουν ατμοί νερού στην πηγή ιονισμού, οι αντιδράσεις που πραγματοποιούνται στη βελόνα εκκένωσης είναι οι εξής:



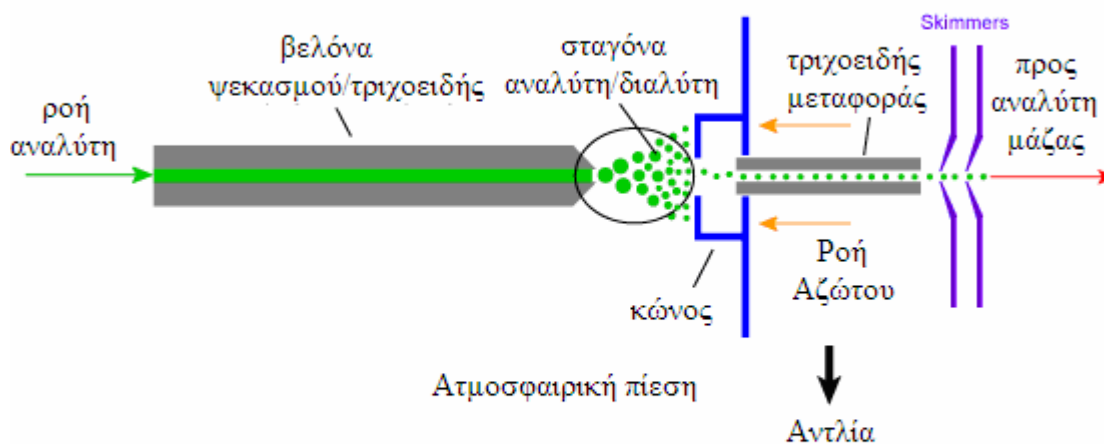
Οι αντιδράσεις που χαρακτηρίζονται από μεταφορά πρωτονίων (MH^+) παρατηρούνται με ανάλυση θετικών ιόντων.

Τα πλεονεκτήματα του χημικού ιονισμού ατμοσφαιρικής πίεσης είναι ότι λαμβάνουμε πληροφορίες σχετικά με την δομή των μορίων κι αυτό γιατί η εξάτμιση των σταγόνων αναλύτη-κινητή φάση είναι γρήγορη αποτρέποντας έτσι την θερμική αποσύνθεση των μορίων και επιτυγχάνοντας την διατήρηση της δομής της ένωσης. Ο χημικός ιονισμός ατμοσφαιρικής πίεσης χρησιμοποιείται κυρίως στη φαρμακευτική βιομηχανία για αναλύσεις μη πολικών και ημι-πτητικές ενώσεις μοριακού βάρους λιγότερο από 1200. Τέλος, αποτελεί καλή ιοντική πηγή για σύνδεση με υγρή χρωματογραφία.

1.6.2.4 Ιονισμός με Ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization, ES)

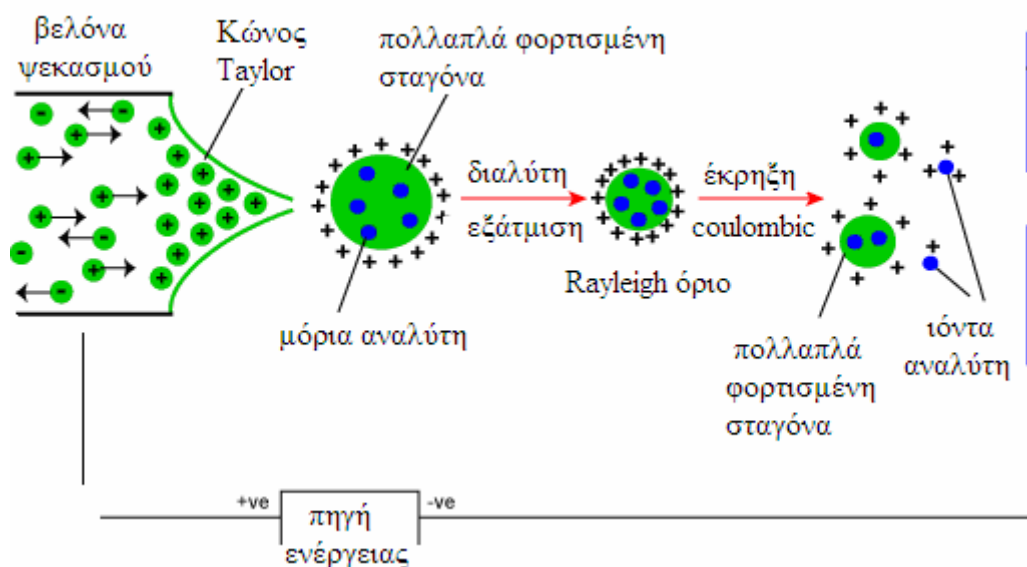
Ο ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας(ES/MS) (34,35,36) πρόκειται για μια τεχνική που χρησιμοποιείται για τον δομικό προσδιορισμό βιομορίων. Είναι μια ιδανική τεχνική κυρίως για την βιοχημική ανάλυση εφόσον μπορούν μεγάλα και μη-πτητικά μόρια να αναλύονται στην υγρή φάση συνδυάζοντας διάφορες τεχνικές διαχωρισμού όπως η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance

Liquid Chromatography, HPLC) και η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (Capillary Electrophoresis, CE).



Σχήμα 1.7 . Τεχνική του ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI)

Η λειτουργία της πηγής του ηλεκτροψεκασμού φαίνεται στο Σχήμα 1.7. Σύμφωνα με αυτή, το εκλούμενο από τη χρωματογραφική στήλη διάλυμα του αναλύτη εισέρχεται με ταχύτητα ροής περίπου 0.1-10μl/min σε ένα τριχοειδή σωλήνα. Στο τριχοειδή σωλήνα έχει εφαρμοστεί δυναμικό τάξεως 2-5kV το οποίο μπορεί να είναι είτε θετικό είτε αρνητικό ανάλογα με την φύση του αναλύτη. Το ηλεκτρικό πεδίο που δημιουργείται εξαιτίας της διαφοράς δυναμικού συμβάλλει στην συνεχόμενη δημιουργία ιόντων στην επιφάνεια του διαλύματος του αναλύτη.



Σχήμα 1.8. Δημιουργία σταγόνων ,αντιδράσεις μορίων –ιόντων σύμφωνα με τον Ηλεκτροψεκασμό.

Τα ιόντα του διαλύματος του αναλύτη συγκεντρώνονται στη κορυφή του τριχοειδή σωλήνα που ονομάζεται κώνος Taylor (Σχήμα 1.8), κατόπιν όταν η κυλομπική άπωση της επιφάνειας του ιόντος ξεπεράσει την επιφανειακή τάση του διαλύματος δημιουργούνται φορτισμένες σταγόνες (αναλύτη-κινητή φάση), οι οποίες αφήνουν τον τριχοειδή σωλήνα και κατευθύνονται προς τον αναλύτη μαζών. Στον ενδιάμεσο χώρο μεταξύ του τριχοειδή σωλήνα και της εισόδου του αναλύτη μαζών λαμβάνει χώρα η εξάτμιση της κινητής φάσης κι έτσι οι φορτισμένες σταγόνες σιγά-σιγά μικραίνουν και καταλήγουν στον σχηματισμό ιόντων αναλύτη τα οποία και εισέρχονται στον φασματόμετρο μάζας. Η παραπάνω διαδικασία λαμβάνει χώρα υπό ατμοσφαιρικής πίεσης .

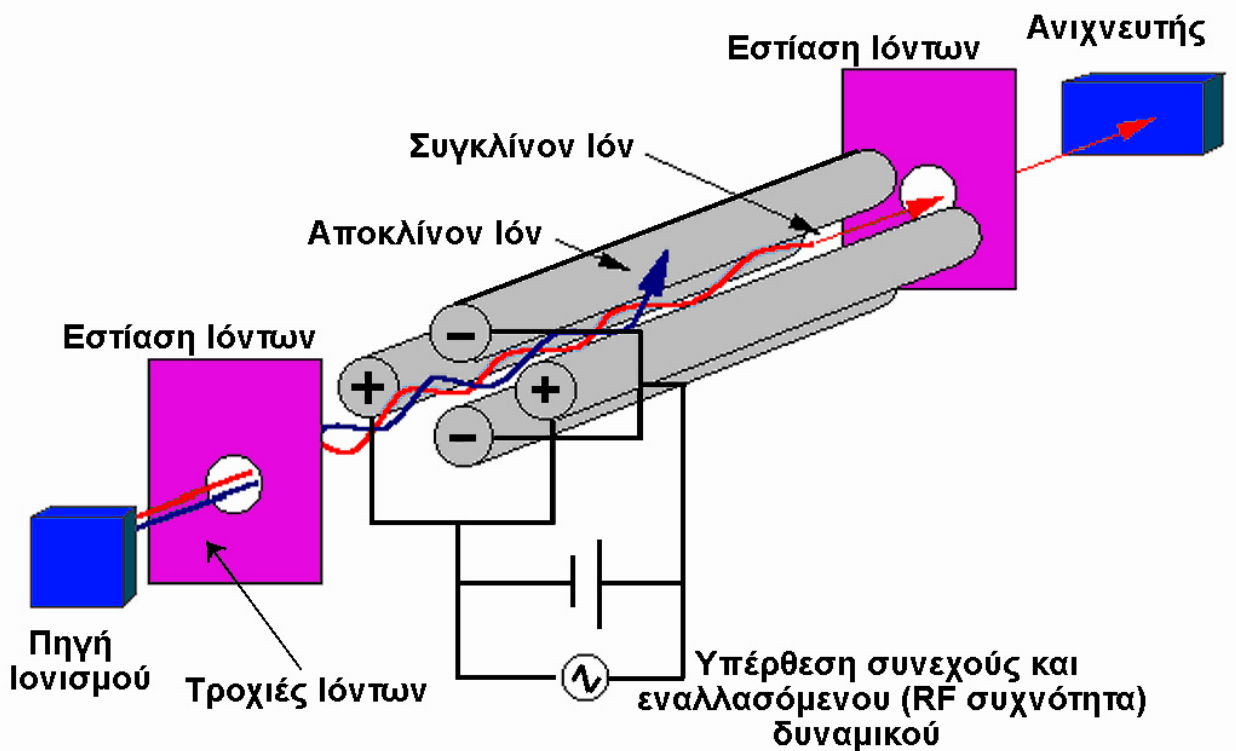
Ο αναλυτής μάζας όμως λειτουργεί σε χαμηλή πίεση γι'αυτό τα ιόντα πρέπει να περάσουν σε συνθήκες χαμηλότερης πίεσης προτού αναλυθούν. Έτσι, τα ιόντα περνούν από διάφορα τμήματα του αναλύτη μάζας που έχουν διαφορετική πίεση. Επίσης κατά την διαδικασία του ηλεκτροψεκασμού εκτός από ιόντα, δημιουργούνται και ουδέτερα μόρια καθώς και συγκρότημα πολλών ιόντων με ουδέτερα μόρια τα οποία πρέπει να

απομακρυνθούν. Αυτό επιτυγχάνεται με τη βοήθεια ενός αερίου που ονομάζεται βοηθητικό αέριο και μπορεί να είναι Ar ή και N₂.

Γενικά τα χαρακτηριστικά του ηλεκτροψεκασμού συνοψίζονται στα εξής: Πρόκειται για μια "μαλακή" τεχνική ιονισμού η οποία παρέχει πληροφορίες σχετικά με την δομή των μορίων. Είναι ιδανική για τις αναλύσεις μεγάλων βιομορίων καθώς και συνθετικών πολυμερών. Το μεγαλύτερο μειονέκτημα της τεχνικής βασίζεται στο γεγονός ότι δεν μπορούν να πραγματοποιηθούν πολλές θραυσματοποιήσεις μορίων καθώς και το ότι η ευαισθησία του εξαρτάται από την επιλογή του διαλύτη.

1.6.3 Μέθοδοι Διαχωρισμού Ιόντων

Τετραπολικό φίλτρο μαζών (quadrupole mass filter) αποτελεί μία από τις νεώτερες μεθόδους διαχωρισμού ιόντων, οικονομικότερη από την χρήση του μαγνητικού αναλύτη μαζών με αποτέλεσμα την σημαντικά ευρύτερη χρήση της. Ο διαχωρισμός μαζών επιτυγχάνεται με την υπέρθεση ενός εναλλασσόμενου ηλεκτρικού πεδίου έχοντας συχνότητα στην περιοχή των ραδιοκυμάτων (RF, radiofrequency) σε ένα συνεχές (DC) ηλεκτρικό πεδίο. Το DC-RF πεδίο εφαρμόζεται σε τέσσερις παράλληλες ράβδους, όπως δείχνεται στο επόμενο σχήμα.



Σχήμα 1.10 Τετραπολικό φίλτρο μαζών.

Σε κάθε ζεύγος αντιθέτως ευρισκομένων ράβδων το ηλεκτρικό πεδίο περιγράφεται με την σχέση:

$$W = 2[U + V\cos(\omega t)] \quad (7)$$

όπου U το δυναμικό του συνεχούς πεδίου, V το μέγιστο του δυναμικού του εναλλασσομένου πεδίου, ω η κυκλική συχνότητα του πεδίου RF και t ο χρόνος. Τα ιόντα που κατευθύνονται στην κατεύθυνση του Z άξονα (ορίζεται ως παράλληλος με τις ράβδους) αναγκάζονται να κινηθούν σε μία τροχιά ταλάντωσης ανάμεσα στους άξονες X και Y . Η μαθηματική ανάλυση της κίνησης ενός ιόντος στο συνδυασμό των πεδίων είναι αρκετά πολύπλοκη, και έχει επιτευχθεί χρησιμοποιώντας κλασική μηχανική (εξισώσεις Mathieu). Η περιγραφή της κίνησης του ιόντος μπορεί να γίνει με την εισαγωγή των παραμέτρων:

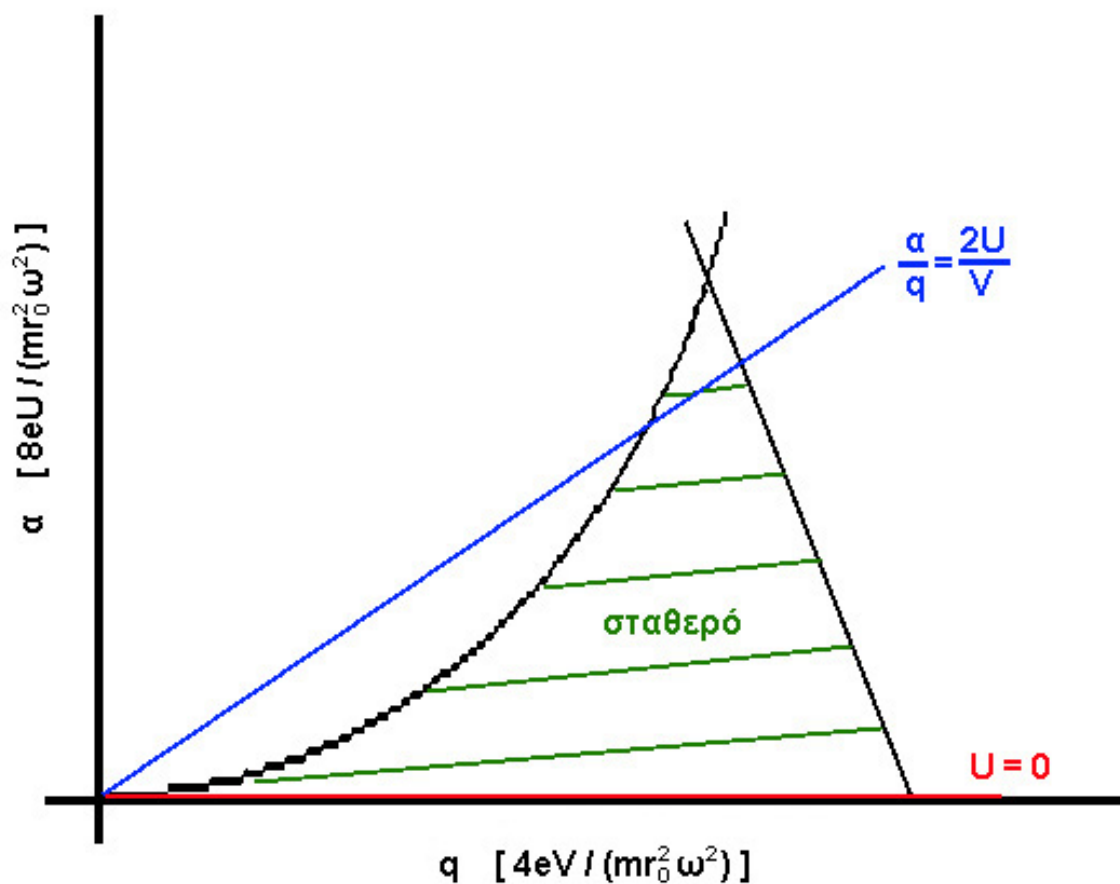
$$a = \frac{8zU}{mr_o^2 \omega^2} \quad (8)$$

και

$$q = \frac{4zV}{mr_o^2 \omega^2} \quad (9)$$

όπου z το φορτίο του ιόντος, m η μάζα του και r_o η ακτίνα του πεδίου (μέσον της απόστασης ανάμεσα στα κέντρα αντιθέτως ευρισκομένων ράβδων).

Οι υπολογισμοί δείχνουν οτι μόνο οι παράμετροι a και q αρκούν για τον προσδιορισμό της τροχιάς του ιόντος. Όταν το πλάτος της ταλάντωσης του ιόντος παραμένει σταθερό στο χρόνο η τροχιά χαρακτηρίζεται ως σταθερή, ενώ αν το πλάτος της ταλάντωσης αυξάνει με την πάροδο του χρόνου, τότε η τροχιά χαρακτηρίζεται ως ασταθής. Όπως είναι προφανές, μία σταθερή τροχιά έχει σαν αποτέλεσμα την δίοδο ενός ιόντος διαμέσου του χώρου καθ' όλο το μήκος των ράβδων, ενώ αντίθετα, αν η τροχιά είναι ασταθής, το ιόν τελικά προσκρούει πάνω στις ράβδους, εξουδετερώνεται και δεν κατορθώνει να φτάσει στον ανιχνευτή (που βρίσκεται στο άλλο άκρο των ράβδων). Η ανάλυση της τροχιάς ενός ιόντος φαίνεται στο ακόλουθο διάγραμμα σταθερότητας $a = f(q)$.



Σχήμα 1.11 Ανάλυση τροχιάς ενός ιόντος

Μόνο τα ιόντα με τιμές α και q στην (σχεδόν) τριγωνική γραμμοσκιασμένη περιοχή εκτελούν σταθερές ταλαντώσεις. Για ένα δεδομένο λόγο $2U/V$, ο λόγος α/q είναι ο ίδιος για όλες τις μάζες και τα σημεία λειτουργίας για όλες τις μάζες βρίσκονται σε μία ευθεία γραμμή στο διάγραμμα σταθερότητας, η οποία διέρχεται από την αρχή των αξόνων. Το διάγραμμα σταθερότητας και οι εκφράσεις των παραμέτρων α και q δείχνουν ότι:

α) η μάζα m είναι ανάλογη του V (με την ω σταθερή).

β) η διακριτική ικανότητα $\Delta m/m$ είναι σταθερή για σταθερό λόγο U/V και επίσης δεν μεταβάλλεται με την μάζα m .

γ) η διακριτική ικανότητα μπορεί να ρυθμιστεί με την μεταβολή του U .

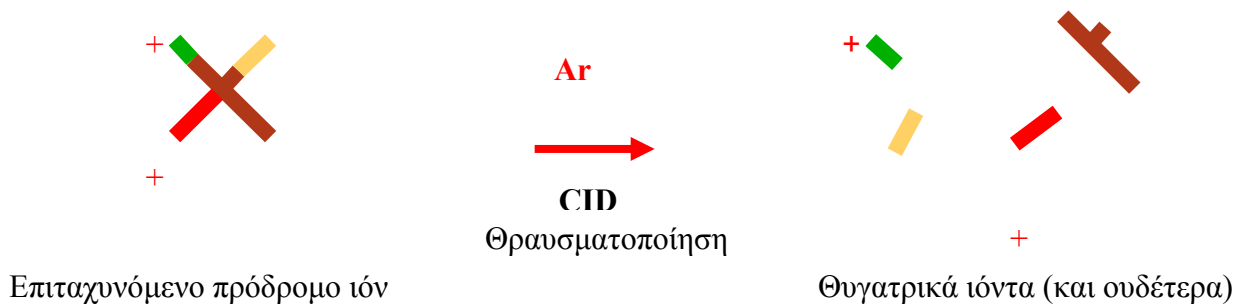
δ) οι παράμετροι a και q εξαρτώνται από το λόγο m/z .

Αξίζει να παρατηρηθεί ότι αν το εναλλασσόμενο πεδίο μηδενιστεί τότε όλα τα σημεία βρίσκονται στον q -άξονα και για ένα πολύ ασθενές εναλλασσόμενο πεδίο όλα τα ιόντα εκτελούν σταθερές ταλαντώσεις. Επιπλέον, λόγω της θερμικής κίνησης των ιόντων, η ανεξαρτησία της διακριτικής ικανότητας από την μάζα ισχύει μόνο για επαρκή χρόνο παραμονής στο τετραπολικό πεδίο και αρκετά στενή κατανομή ταχυτήτων στον άξονα Z . Η διαπερατότητα των ιόντων δια μέσου του τετραπολικού φίλτρου μειώνεται με την αύξηση της διακριτικής ικανότητας (αύξηση του U) καθ' όσον τα σημεία λειτουργίας ανέρχονται στο διάγραμμα σταθερότητας. Η σάρωση της κλίμακας μαζών συνήθως γίνεται είτε με μεταβολή της κυκλικής συχνότητας ω , ή με παράλληλη μεταβολή των εντάσεων των πεδίων U και V , κρατώντας τον λόγο U/V σταθερό. Τα πλεονεκτήματα του τετραπολικού φίλτρου μαζών είναι το μικρό κόστος και η αναπαραγωγιμότητα των λαμβανομένων φασμάτων μάζας. Μειονεκτήματα του είναι η χαμηλή διακριτική ικανότητα (1 amu) και η εξάρτηση της διαπερατότητας ενός ιόντος από την μάζα του. Οι τετραπολικοί φασματογράφοι μάζας χρησιμοποιούνται ευρέως στην καθημερινή χημική ανάλυση και συνήθως ακολουθούν τους αέριους χρωματογράφους (Gas Chromatography, GC) οι οποίοι επιτυγχάνουν τον διαχωρισμό των συστατικών ενός μίγματος για την ευκολότερη ταυτοποίηση κάθε συστατικού.

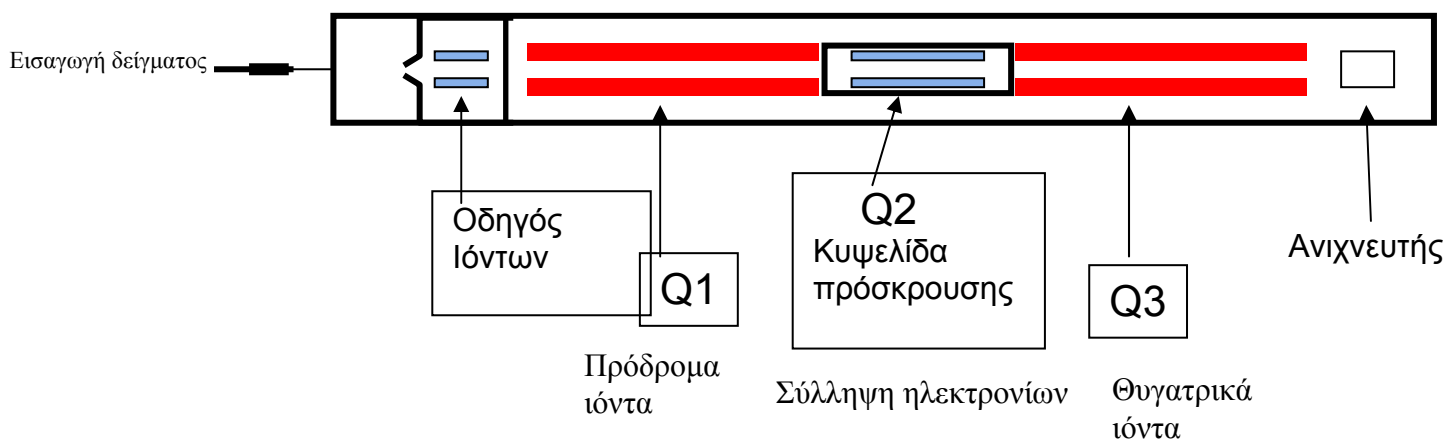
1.6.4 Διαδοχική Φασματομετρία Μάζας

Ο συνδυασμός σε σειρά δύο ή περισσοτέρων αναλυτών μάζας αποτελεί τη συζευγμένη ή διαδοχική φασματομετρία μαζών (tandem mass spectrometry, MS/MS)(37). Η εφαρμογή της συζευγμένης φασματομετρίας μαζών με τις αποκαλούμενες «μαλακές» τεχνικές ιονισμού κρίνεται σημαντική γιατί επιτρέπει την θραυσματοποίηση των πρόδρομων

ιόντων με αποτέλεσμα σημαντικές πληροφορίες να προκύπτουν για τα προς ανάλυση συστατικά. Πιο συγκεκριμένα, η «μαλακές» τεχνικές ιοντισμού, π.χ. ο ηλεκτροψεκασμός, χωρίς MS/MS δεν είναι εύκολο να παρέχει πληροφορίες σχετικά με την δομή των ενώσεων. Άλλες τεχνικές ιοντισμού οι αποκαλούμενες «σκληρές» (hard ionization), όπως το EI, δίνουν περισσότερες αντιδράσεις θραυσματοποίησης χωρίς την βοήθεια του MS/MS αλλά δεν δίνουν πληροφορίες σχετικά με τις σχέσεις μεταξύ πρόδρομων και προϊόντων ιόντων. Η κατάσταση αυτή περιπλέκεται ακόμη περισσότερο όταν εξετάζονται σύνθετα μίγματα. Για όλα αυτά απαιτείται πρώτα η απομόνωση, κατόπιν η εκλεκτική θραυσματοποίηση του πρόδρομου ιόντος και στη συνέχεια η μέτρηση m/z των προϊόντων ιόντων. Αυτό γίνεται εύκολα με MS/MS εφόσον ένας αναλυτής μαζών απομονώνει το πρόδρομο ιόν, το οποίο επιταχύνεται εντός κυψελίδας η οποία περιέχει αδρανές αέριο (Ar ή He) όπου και πραγματοποιείται και θραυσματοποίηση του, ο δεύτερος αναλυτής σαρώνει όλα τα θραύσματα ιόντα και έτσι καταγράφεται το φάσμα των προϊόντων ιόντων. Η κύρια μέθοδος θραυσματοποίησης που χρησιμοποιείται στην συζευγμένη φασματομετρία είναι η διάσπαση μέσω κρούσεων (Collision Induced Dissociation (CID)) κατά την οποία εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο το οποίο επιταχύνει τα πρόδρομα ιόντα τα οποία στη συνέχεια οδηγούνται σε συγκρούσεις με τα ουδέτερα μόρια του αερίου πρόσκρουσης (Ar, N₂) όπου και λαμβάνονται τα προϊόντα αντιδράσεων (Σχήμα 1.12).



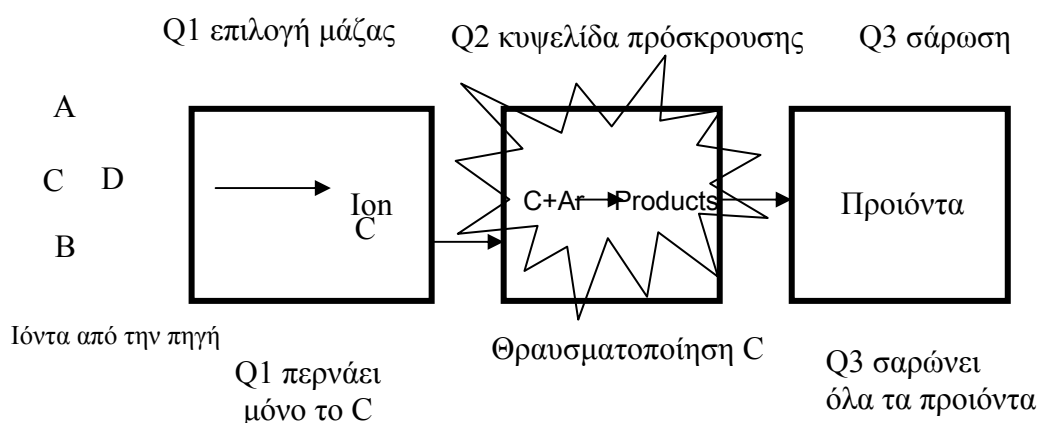
Σχήμα 1.12 Μέθοδος διάσπασης CID



Σχήμα 1.13 Τετραπολικός αναλύτης μαζών με συζευγμένη φασματομετρία μαζών (Triple Quadrupole Mass Analyzer Tandem MS/MS)

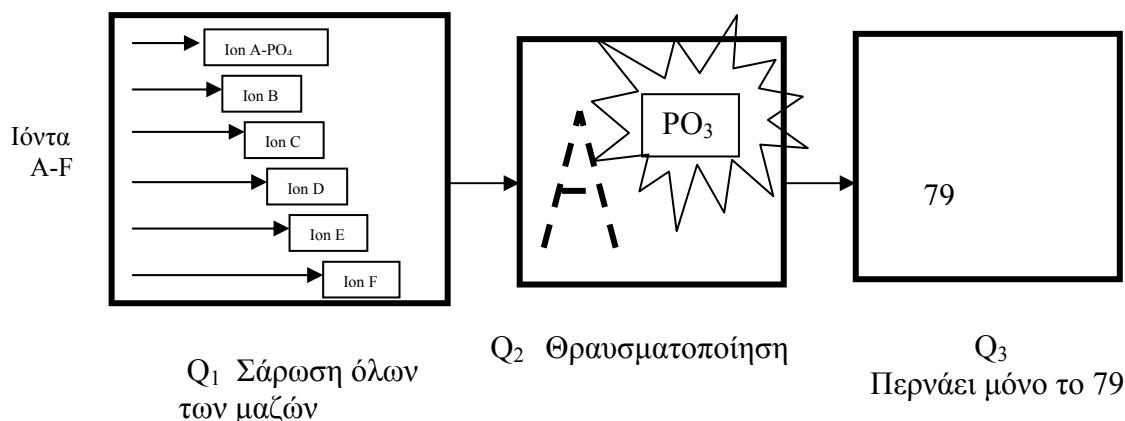
Η χρησιμοποίηση τετράπολου αναλυτή μαζών στη συζευγμένη φασματομετρία μαζών οδηγεί σε διάφορες συνδυαστικές σαρώσεις που με την σειρά τους βοηθούν στην ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων (38). Υπάρχουν δύο τρόποι σαρώσεων, α) Απλός τρόπος σάρωσης μάζας (single mass spectrometer scan mode MS) και β) Διπλός τρόπος σάρωσης μάζας (tandem mass spectrometer MS/MS). Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν : 1) Σάρωση προϊόντων ιόντων (Product Ion Scan Mode, Σχήμα 1.14). Σύμφωνα με αυτή στον πρώτο

τετράπολο Q₁ επιλέγεται να παρατηρείται ένα συγκεκριμένο πρόδρομο ιόν π.χ. ιόν C στη συνέχεια αυτό εισέρχεται στην κυψελίδα κρούσεων όπου με το αέριο σύγκρουσης παίρνει μέρος σε αντιδράσεις διάσπασης και σχηματίζονται τα προϊόντα τα οποία σαρώνονται όλα στο δεύτερο τετράπολο Q₃.



Σχήμα 1.14 Σάρωση προϊόντων ιόντων Product Ion Scan Mode.

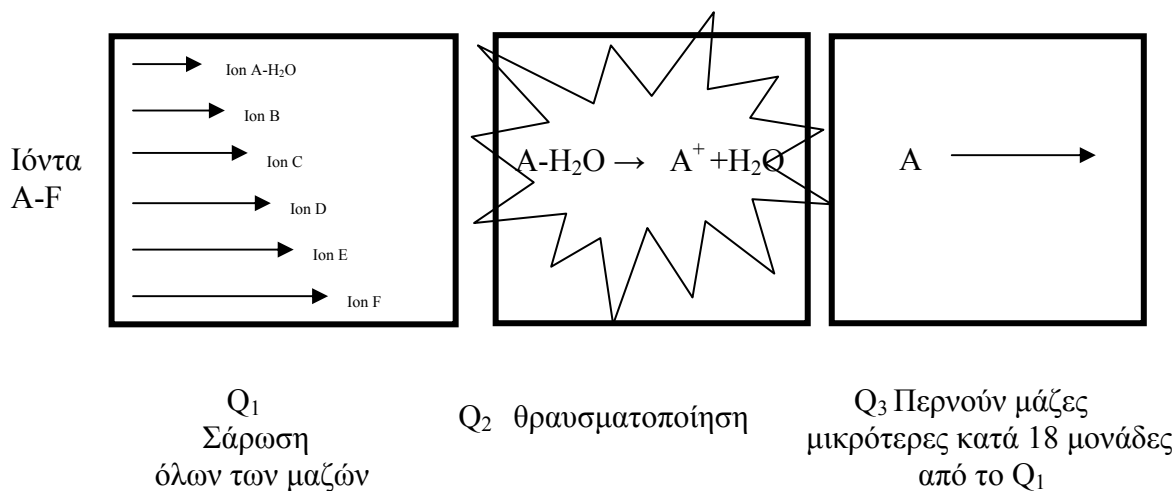
2) Σάρωση πρόδρομων ιόντων (Precursor Ion Scan Mode, Σχήμα 1.15). Στο πρώτο τετράπολο Q₁ σαρώνονται όλα τα πρόδρομα ιόντα τα οποία οδηγούνται στην κυψελίδα πρόσκρουσης όπου με τις συγκρούσεις τους με το αέριο σύγκρουσης παράγονται τα διάφορα προϊόντα διάσπασης από τα οποία επιλέγεται στο τετράπολο Q₃ να παρατηρείται ένα συγκεκριμένο προϊόν π.χ το ιόν με m/z 79.



Σχήμα 1.15. Σάρωση πρόδρομων ιόντων Precursor Ion Scan Mode

3) Σάρωση απώλειας ουδέτερων ομάδων (Constant Neutral Loss Scan, Σχήμα 1.16)

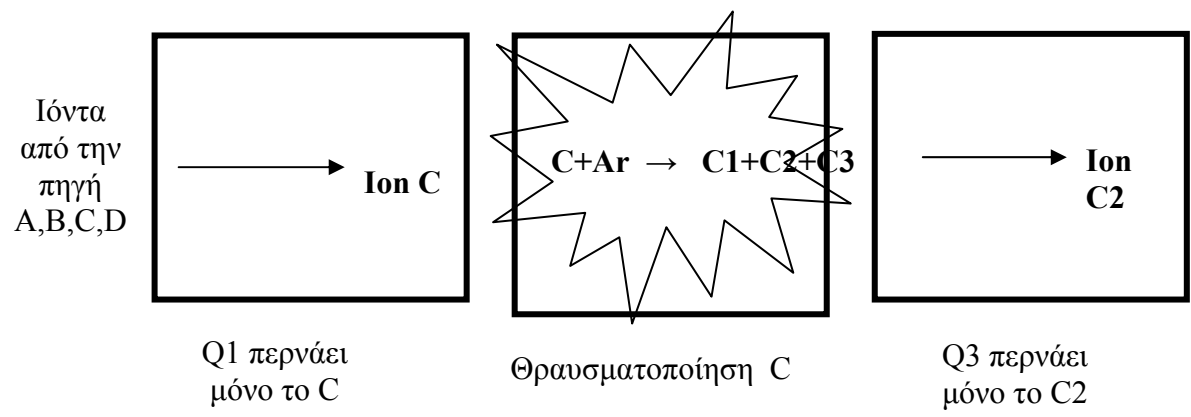
Σύμφωνα με την παραπάνω μέθοδο παρατηρούνται πρόδρομα ιόντα από τα οποία διασπώνται σταθερές ουδέτερες ομάδες. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται κυρίως για τον γρήγορο προσδιορισμό μεταβολικών πορειών. Αναλυτικότερα αν ένα μόριο με δομή X-Y μπορεί να χάσει το ουδέτερο κομμάτι του Y μέσω αντιδράσεων θραυσματοποίησης, το κομμάτι X του μορίου μπορεί να μεταβολίζεται συνεχώς αλλά το ουδέτερο κομμάτι Y παραμένει το ίδιο. Έτσι επιτρέπεται μια γρήγορη προσέγγιση μιας συγκεκριμένης μεταβολικής πορείας. Γενικά, το μόριο που παρατηρούμε $m/z=(M)$ περνάει από το πρώτο τετράπολο Q₁ στη συνέχεια στην κυψελίδα πρόσκρουσης Q₂ χάνεται το κομμάτι $m/z=(n)$ του μορίου $m/z=(M)$ και τέλος στον δεύτερο αναλυτή Q₃ περνάει το ιόν $m/z=(M-n)$ το οποίο ανιχνεύεται. Στη περίπτωση του σχήματος με την μέθοδο constant neutral loss scan παρατηρούμε το μόριο που αντιστοιχεί σε $m/z=(A-H_2O)$.



Σχήμα 1.16. Σάρωση σταθερών ουδέτερων ομάδων (Constant Neutral Loss Scan)

4) Τύπος σάρωσης επιλεγμένων αντιδράσεων (Selected Reaction Monitoring, Σχήμα 1.17).

Όπου παρατηρούνται οι αντιδράσεις θραυσματοποίησης που δίνει το μοριακό ιόν. Πρόκειται για μια πολύ εκλεκτική μέθοδο κατά την οποία μπορούν να παρατηρηθούν οι χαρακτηριστικές αντιδράσεις θραυσματοποίησης των μορίων που παρατηρούνται. Πιο συγκεκριμένα στο πρώτο τετράπολο Q₁ επιλέγεται να παρατηρείται ένα συγκεκριμένο μοριακό ιόν, στη κυψελίδα πρόσκρουσης η λαμβάνουν χώρα οι χαρακτηριστικές αντιδράσεις θραυσματοποίησής του, οι οποίες και παρατηρούνται στο τετράπολο Q₃.



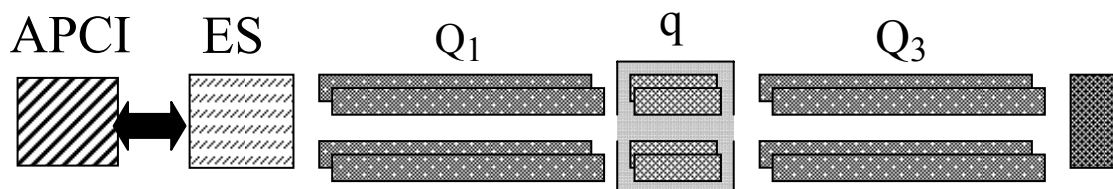
Σχήμα 1.17. Μέθοδος επιλεκτικών αντιδράσεων (Selected Reaction Monitoring).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Πειραματικό Μέρος

2.1 Οργανολογία

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (MS) με ιονισμό ατμοσφαιρικής πίεσης (Atmospheric Pressure Ionization, API). Το φασματόμετρο μάζας TSQ Quantum που χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρίας ThermoFinnigan (Σχήμα 2.1). Χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές πηγές API: α) πηγή ηλεκτροψεκασμού (Electrospray, ES) και β) πηγή χημικού ιονισμού σε ατμοσφαιρική πίεση (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI).



Σχήμα 2.1 Διάταξη του οργάνου διαδοχικής φασματομετρίας μάζας εξοπλισμένο με τριπλό τετράπολο, όπου αναγράφονται οι δυο πηγές ιονισμού ατμοσφαιρικής πίεσης (APCI και ES), οι αναλυτές μαζών Q1 και Q3 (τετράπολα) καθώς και η κυψελίδα πρόσκρουσης (q) η οποία περιέχει αέριο Ar.

2.1.1 Ηλεκτροψεκασμός (electrospray, ES)

Η εισαγωγή δείγματος κατά τη διαδικασία του ES γίνεται μέσω ενός τριχοειδούς σωλήνα PEEK (poly ether ether ketone) μήκους 35,5 cm ο οποίος συνδέει την πηγή με την

στήλη HPLC. Επειδή η ροή της κινητής φάσης (200 $\mu\text{L}/\text{min}$) είναι συμβατή με αυτή που μπορεί να δεχθεί το ES γίνεται εισαγωγή όλης της ροής χωρίς την μείωση αυτής μέσω ενός τεμαχιστή (splitter). Σε συνδυασμό με την τεχνική του ES χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία αντίστροφης φάσης με κινητή φάση που περιείχε 50% οξικό αμμώνιο 80 mM (pH 6.8), 10% μεθανόλη και 40% απιονισμένο νερό. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν C_{18} (2.1 x 150mm, BDS Hypersil, ThermoHypersil-Keystone). Επίσης δοκιμάστηκε και αντίστοιχη στήλη C_8 .

Σύμφωνα με το πώς διασπώνται τα υπό μελέτη σεληνοσάκχαρα στην κυψελίδα πρόσκρουσης με την εφαρμογή διαφόρων ενεργειών διάσπασης εφαρμόστηκε η μέθοδος παρακολούθησης επιλεγμένων αντιδράσεων (Selective Reaction Monitoring, SRM). Κατά την εφαρμογή της μεθόδου παρακολούθησης SRM οι παράμετροι του αναλύτη μάζας ρυθμίστηκαν σύμφωνα με τις τιμές που φαίνονται στον Πίνακα 2.1. Σημειώνεται ότι οι διαχωριστικές ικανότητες των τετραπόλων Q_1 και Q_3 ήταν 0,7 amu και στις δυο περιπτώσεις.

Πίνακας 2.1. Πειραματικοί παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ανάλυση τόσο των πρότυπων διαλυμάτων σεληνοσακχάρων όσο και των δειγμάτων ανθρώπινων ούρων, με τη μέθοδο παρακολούθησης SRM.

Παράμετροι του οργάνου	Τιμές
Δυναμικό ηλεκτροψεκασμού	4500 V
Ροή βοηθητικού αερίου 1	45*
Ροή βοηθητικού αερίου 2	25*
Θερμοκρασία τριχοειδούς	300 °C
Θερμοκρασία συστήματος APCI	350-650 °C
Δυναμικό πηγής ιονισμού (source CID, sCID)	0 V
Δυναμικό φακών εστίασης	126 V
Πίεση CID αερίου	1.0 mTorr

* Μονάδες οργάνου, έχουν ορισθεί από την κατασκευαστική εταιρεία.

Για τη μέθοδο της σάρωσης απώλειας ουδέτερου (Neutral Loss Scan) οι πειραματικές παράμετροι παίρνουν τις τιμές που δίνονται στον Πίνακα 2.1. Οι διαχωριστικές ικανότητες των τετραπόλων Q₁ και Q₃ ρυθμίζονται ως 0,7 και 6 amu, αντίστοιχα. Σημειώνεται ότι η ενέργεια διάσπασης της πηγής (sCID) ρυθμίζεται στο μηδέν και στις δύο περιπτώσεις μεθόδων σάρωσης. Έτσι, αποφεύγονται οι τυχόν απώλειες του πρόδρομου ιόντος, λόγω διάσπασης, κατά τη μεταφορά του από την πηγή στον αναλύτη μάζας.

2.1.2 Χημικός Ιονισμός σε Ατμοσφαιρική Πίεση (atmospheric pressure chemical ionization, APCI)

Κατά την χρησιμοποίηση της πηγής APCI η σύνδεσή της με το HPLC έγινε με ακριβώς τον ίδιο τρόπο που περιγράφεται στον ηλεκτροψεκασμό. Κατά την ανάλυση των γνωστών σεληνοσακχάρων με APCI χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία αντίστροφης φάσης με κινητή φάση 50% οξικό αμμώνιο 80 mM (pH 6,8), 10% μεθανόλη και 40% απιονισμένο νερό με ροή 500μl/min. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν C₁₈ (2.1 x 150mm, BDS Hypersil, ThermoHypersil-Keystone). Επιπλέον, για την ανάλυση του σεληνοσακχάρου SeGalNH₂ χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία αντίστροφης φάσης συνδεδεμένη εν σειρά με χρωματογραφία κατιονανταλλαγής. Οι στήλες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι C₁₈ (4.6 x 150 mm) και δύο PRP-X800 προστατευτικές στήλες, αντίστοιχα. Η κινητή φάση που χρησιμοποιήθηκε περιείχε 80% οξικό αμμώνιο 80 mM (pH 4.3), 10% μεθανόλη και 10% απιονισμένο νερό και τροφοδοτήθηκε με ροή 500μl/min.

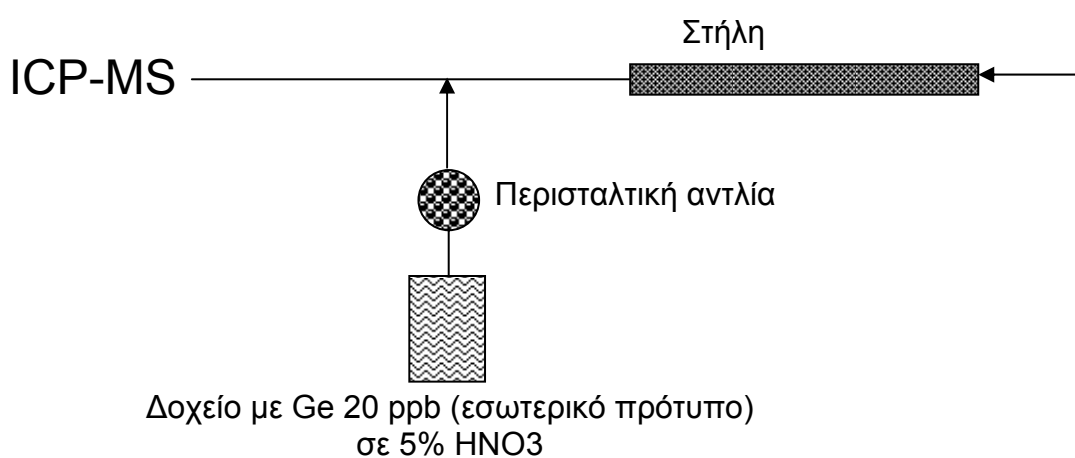
Σύμφωνα με την διάσπαση των ενώσεων στη κυψελίδα πρόσκρουσης σε διάφορες ενέργειες διάσπασης εφαρμόστηκε η μέθοδος παρακολούθησης επιλεκτικών αντιδράσεων. Επίσης χρησιμοποιήθηκε και η μέθοδος σάρωσης απώλειας ουδέτερων μορίων (Constant Neutral Loss Scan).

Για τη μέθοδο σάρωσης απώλειας ουδέτερου οι διαχωριστικές ικανότητες των αναλυτών μάζας ρυθμίστηκαν ως εξής: Q₁ 0,7 amu και Q₃ 6 amu. Επίσης η πίεση του αερίου της κυψελίδας πρόσκρουσης μειώθηκε ελαφρώς στα 0,7 mTorr.

Σημειώνεται ότι και με την τεχνική του HPLC-APCI-MS/MS οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με μηδενική ενέργεια διάσπασης στην πηγή ιονισμού (sCID).

2.1.3 Φασματομετρία Μάζας Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS)

Η τεχνική HPLC-ICP-MS χρησιμοποιήθηκε για ποσοτικούς προσδιορισμούς του SeGalNAc σε δείγματα ανθρώπινων ούρων και την σύγκριση των αποτελεσμάτων αυτών με αυτά που προσδιορίστηκαν με την τεχνική HPLC-ES-MS/MS. Οι συνθήκες χρωματογραφίας ήταν ίδιες με αυτές με την τεχνική HPLC-ES-MS/MS. Σημειώνεται ότι χρησιμοποιήθηκε εσωτερικό πρότυπο σύνθεσης 20 ppb Ge σε 5% νιτρικού οξέος. Ανάμιξη του εσωτερικού προτύπου με την κινητή φάση έγινε μετά την χρωματογραφική στήλη αλλά πριν από το ICP-MS όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.2.



Σχήμα 2.2. Πειραματική διάταξη για την προσθήκη εσωτερικού προτύπου Ge μετά την χρωματογραφική στήλη.

2.2 Αντιδραστήρια

Στην κινητή φάση των χρωματογραφικών μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν υπήρχε οξικό αμμώνιο 80 mM, μεθανόλη Lichrosolv HPLC grade της εταιρίας Merck. Στα

πειράματα για την επιλογή των διαλυτών στον ηλεκτροψεκασμό χρησιμοποιήθηκαν τα εξής: μεθανόλη Lichrosolv συγκέντρωσης 99,9% της εταιρίας Merck, οξικό οξύ 100% της εταιρίας Merck, φορμικό οξύ 88-91% της εταιρίας Fluka, κιτρικό οξύ της εταιρίας Fluka το οποίο σε διάλυμα ρυθμίστηκε σε διάφορα pH (2,4, 4,7 και 8,8), οξαλικό οξύ της εταιρίας Fluka, ακετονιτρίλιο 99% της εταιρίας Merck, οξικό αμμώνιο της εταιρίας Fluka από το οποίο παρασκευάστηκε διάλυμα 80 mM με ουδέτερο pH 6,8.

2.3 Πρότυπα Σεληνοσάκχαρα

Τα δύο διαστεροϊσομερή σεληνοσάκχαρα (SeGalNAc και SeGluNAc) συντέθηκαν στο εργαστήριο αναλυτικής χημείας στο Πανεπιστήμιο του Graz από τους P. Traar και F. Belaj, με υπεύθυνο καθηγητή τον Kevin A. Francesconi¹. Ενώ το τρίτο σεληνοσάκχαρο (SeGalNH₂) συντέθηκε στο εργαστήριο μας σύμφωνα με την συνθετική πορεία που περιγράφεται από την Gammelgaard et al.².

2.4 Δείγματα και Πορεία Ανάλυσης Δειγμάτων

Τα ανθρώπινα ούρα συλλέχθηκαν από εθελοντές πριν και μετά την κατανάλωση ενός διατροφικού συμπληρώματος σεληνίου (Super Selenium Plus, HealthAid) περιεκτικότητας 200 μg Se. Στην ετικέτα αναγράφεται ότι βρίσκεται υπό τη μορφή σεληνομεθειονίνης, ενώ αναλύσεις της ερευνητικής μας ομάδας βρήκαν ότι το Se βρίσκεται στην ανόργανή του μορφή. Στη δειγματοληψία χρησιμοποιήθηκαν τα πρώτα πρωινά ούρα της επόμενης ημέρας μετά την χορήγηση του συμπληρώματος. Ανάλυση των δειγμάτων έγινε χωρίς περαιτέρω κατεργασία αυτών.

Για τους ποσοτικούς προσδιορισμούς των σεληνοσακχάρων στα δείγματα ούρων χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι της εξωτερικής βαθμονόμησης και της προσθήκης γνωστής ποσότητας. Κατά την εφαρμογή της μεθόδου εξωτερικής βαθμονόμησης αναλύθηκαν

πρότυπα υδατικά διαλύματα των σεληνοσακχάρων συγκέντρωσης 100 µg/l Se, 50 µg/l Se, 25 µg/l Se, 12,5 µg/l Se καθώς και ακατέργαστα δείγματα ανθρώπινων ούρων. Με τη βοήθεια των πρότυπων διαλυμάτων δημιουργήθηκε πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης με την οποία έγινε ποσοτικός προσδιορισμός των σεληνοσακχάρων στα δείγματα ούρων. Κατά την εφαρμογή της μεθόδου προσθήκης γνωστής ποσότητας σε ορισμένη ποσότητα δείγματος ούρων προστίθεται γνωστή ποσότητα πρότυπων σεληνοσακχάρων. Πιο συγκεκριμένα, το κάθε δείγμα ούρων μοιράζεται σε πέντε υποδείγματα των 950 µl το καθένα. Κατόπιν προστίθεται στο πρώτο 50 µl απιονισμένου νερού, στο δεύτερο 37,5 µl απιονισμένου νερού και 12,5 µl SeGalNAc 2 ppm, στο τρίτο 25µl απιονισμένο νερό και στο τέταρτο 25µl SeGalNAc 2 ppm, και τελικά 50µl SeGalNAc 2 ppm. Από την ανάλυση των δειγμάτων αυτών προκύπτει καμπύλη βαθμονόμησης από την οποία υπολογίζεται η αρχική ποσότητα της ένωσης SeGalNAc στα ανθρώπινα δείγματα. Οι παραπάνω μέθοδοι ανάλυσης εφαρμόστηκαν σε συνδυασμό με τις τεχνικές HPLC-ES-MS/MS, HPLC-APCI-MS/MS, HPLC-ICP-MS.

Τέλος, σημειώνεται ότι για την εύρεση της επίδρασης της σύστασης της κινητής φάσης στην παραγωγή πρωτονιωμένων μορίων σεληνοσακχάρων με την τεχνική ES χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα με διάφορους συνδυασμούς των διαλυτών και αλάτων ή οξέων τα οποία περιείχαν 50 ng Se/ml υπό τη μορφή σεληνοσακχάρων. Η εισαγωγή τους έγινε με συνεχή ροή στο ES.

Για την ανάλυση των πρότυπων σεληνοσακχάρων με την τεχνική ES με αναλυτή μάζας ιοντική παγίδα, προς χαρακτηρισμό των προϊόντων ιόντων και ανεύρεση των μονοπατιών σχηματισμού τους, χρησιμοποιήθηκαν οι διαλύτες που δίνουν τη μεγαλύτερη απόκριση στο ES. Έτσι, για την ένωση SeGalNAc σαν διαλύτης χρησιμοποιήθηκε ο συνδυασμός απιονισμένου νερού με 20% μεθανόλης και 1% οξικό οξύ. Ενώ για την ένωση SeGluNAc χρησιμοποιήθηκε ο συνδυασμός απιονισμένου νερού με 50% ακετονιτρίλιο με

1% οξικό οξύ. Οι συγκεντρώσεις των ενώσεων SeGluNAc και SeGalNAc ήταν 10 $\mu\text{g Se / mL}$. Τα παραπάνω πρότυπα εισήχθησαν ξεχωριστά με συνεχή ροή με σύριγγα όγκου 250 μl .

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Ανάπτυξη Μεθόδου Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC) με Διαδοχική Φασματομετρία Μάζας Ηλεκτροψεκασμού (ES-MS/MS) για τον Προσδιορισμό Σεληνοσακχάρων σε Ανθρώπινα Ούρα

3.1 Βελτιστοποίηση Πειραματικών Παραμέτρων για Μέγιστη Ευαισθησία και Εκλεκτικότητα

Για την ανάπτυξη μιας ευαίσθητης και εκλεκτικής μεθόδου φασματομετρίας μάζας ηλεκτροψεκασμού (ES-MS) πρέπει να ληφθούν υπόψη διάφοροι παράμετροι, όπως: οι χημικές ιδιότητες του αναλύτη, η σύσταση της κινητής φάσης, το δυναμικό ηλεκτροψεκασμού που επηρεάζει την μεταφορά ιόντων του αναλύτη από την υγρή στην αέρια φάση, τα δυναμικά που εφαρμόζονται στους φακούς εστίασης για μέγιστη μεταφορά ιόντων από την πηγή ιοντισμού προς τον αναλυτή μάζας, και η επιλογή κατάλληλης μεθόδου σάρωσης των αναλυτών μάζας. Επιπλέον, σε περίπτωση σύνθετου δείγματος, π.χ. βιολογικό εκχύλισμα, θα πρέπει να γίνεται και διαχωρισμός του αναλύτη από τη μήτρα του δείγματος πριν από την εισαγωγή του στην πηγή του ES, προς αποφυγή παρεμποδίσεων.

3.1.1 Χημικές Ιδιότητες του Αναλύτη

Κατά κανόνα, ο αναλύτης που παρουσιάζει ικανοποιητική απόκριση κατά την φασματομετρία μάζας ηλεκτροψεκασμού είναι αυτός που βρίσκεται ήδη υπό την μορφή ιόντος στην υγρή φάση και έτσι η μεταφορά του στην αέρια μπορεί να γίνει με υψηλή απόδοση. Κατά συνέπεια η δομή των αναλυτών, ιδιαίτερα η παρουσία ιονίσιμων ομάδων, επηρεάζει σημαντικά την απόκριση του ES. Αναλύτες με βασικές ή όξινες ομάδες, οι οποίες μπορούν εύκολα να πρωτονιωθούν ή να αποπρωτονιωθούν, αντίστοιχα, ευνοούνται με την τεχνική αυτή. Αυτό συμβαίνει διότι, μέσα στο ηλεκτρικό πεδίο που σχηματίζεται μεταξύ της βελόνας ηλεκτροψεκασμού και του κώνου εισαγωγής, τα διάφορα ιόντα που περιέχονται στο

διάλυμα εμπλουτίζονται στην επιφάνεια των σταγόνων. Αυτό ευνοεί και την εισαγωγή τους στην αέρια φάση. Άλλος σημαντικός παράγοντας είναι η πολικότητα του αναλύτη. Αναλύτες με υδρόφοβες ομάδες παρουσιάζουν μεγαλύτερη συγγένεια προς την επιφάνεια των υδατικών σταγόνων που σχηματίζονται κατά τον ηλεκτροψεκασμό. Αν διαθέτουν και ομάδες που ιονίζονται, όπως π.χ. τα επιφανειοδραστικά μόρια, τότε ευνοείται ο σχηματισμός και η μεταφορά των ιόντων τους στην αέρια φάση.

Οι υπό μελέτη ενώσεις σεληνοσακχάρων πρωτονιώνονται στην υδατική φάση σε ελαφρώς όξινο pH και κατά συνέπεια μπορούν να σχηματίσουν κατιόντα στην αέρια φάση κατά την διαδικασία του ES. Πρέπει να σημειωθεί ότι δεν παρουσιάζουν επιφανειοδραστικές ιδιότητες σε υδατικά διαλύματα, κατά συνέπεια δεν είναι και οι πλέον ιδανικοί αναλύτες για την τεχνική του ES.

3.1.2 Επίδραση του Διαλύτη στην Απόκριση του Ηλεκτροψεκασμού στα Σεληνοσάκχαρα

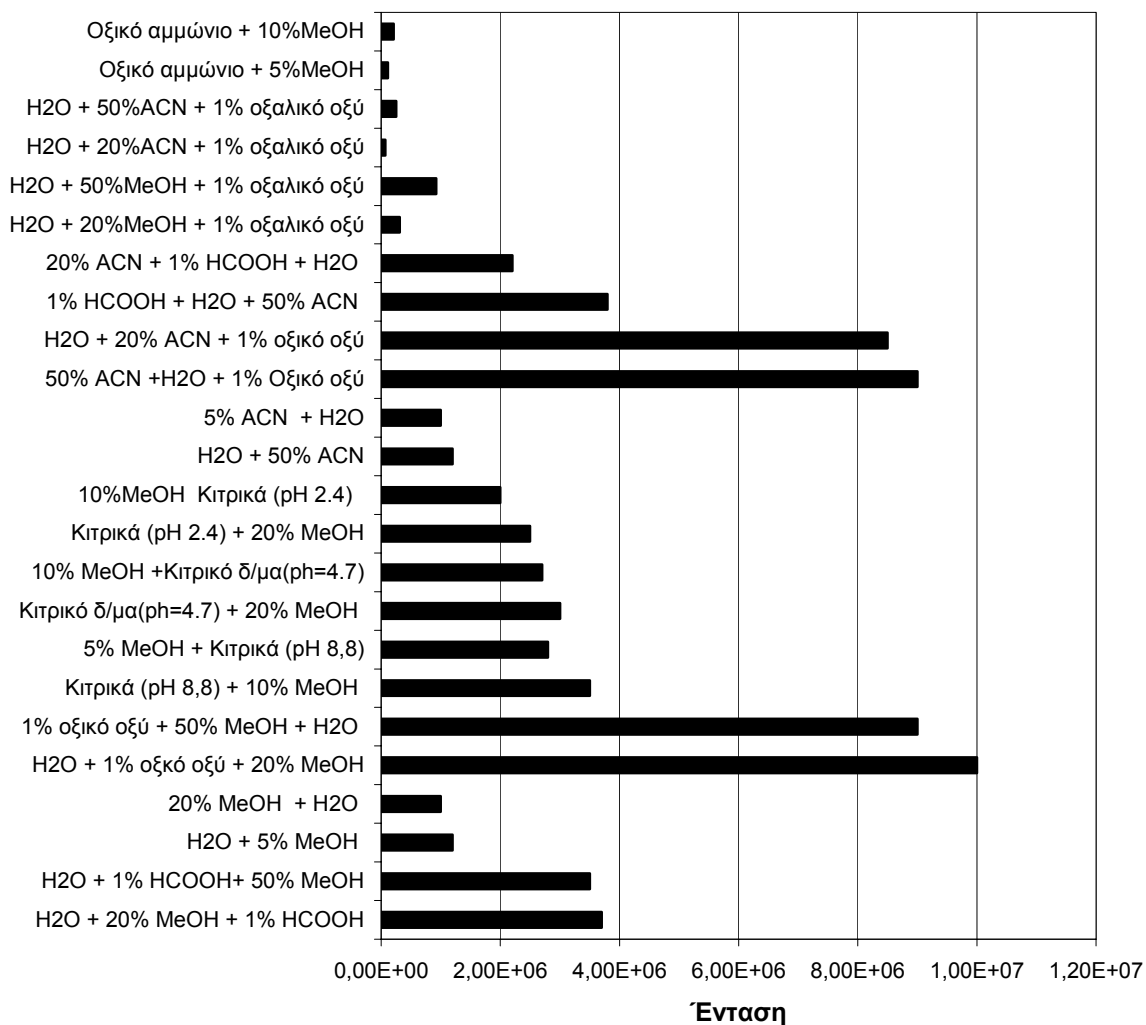
Η επιλογή του διαλύτη που χρησιμοποιείται κατά την ανάλυση ES εξαρτάται και από το είδος του αναλύτη. Έτσι για την ανάλυση θετικών ιόντων συνήθως απαιτούνται διαφορετικοί διαλύτες και pH σε σχέση με αυτούς που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση αρνητικών ιόντων. Στην περίπτωση των σεληνοσακχάρων πραγματοποιείται ανάλυση θετικών ιόντων.

Είναι επίσης γνωστό ότι ανάλογα με τις ιδιότητες του διαλύτη, όπως είναι η αγωγιμότητα και η επιφανειακή του τάση, ρυθμίζονται και η ταχύτητα ροής του διαλύτη και το δυναμικό ES έτσι ώστε να επιτευχθεί σταθερός και αποδοτικός ηλεκτροψεκασμός. Ένα βασικό χαρακτηριστικό του ιδανικού διαλύτη είναι να έχει σχετικά χαμηλή επιφανειακή τάση, συνήθως χαμηλότερη από αυτή του νερού, η οποία και συμβάλει στην δημιουργία σταθερού ηλεκτροψεκασμού.

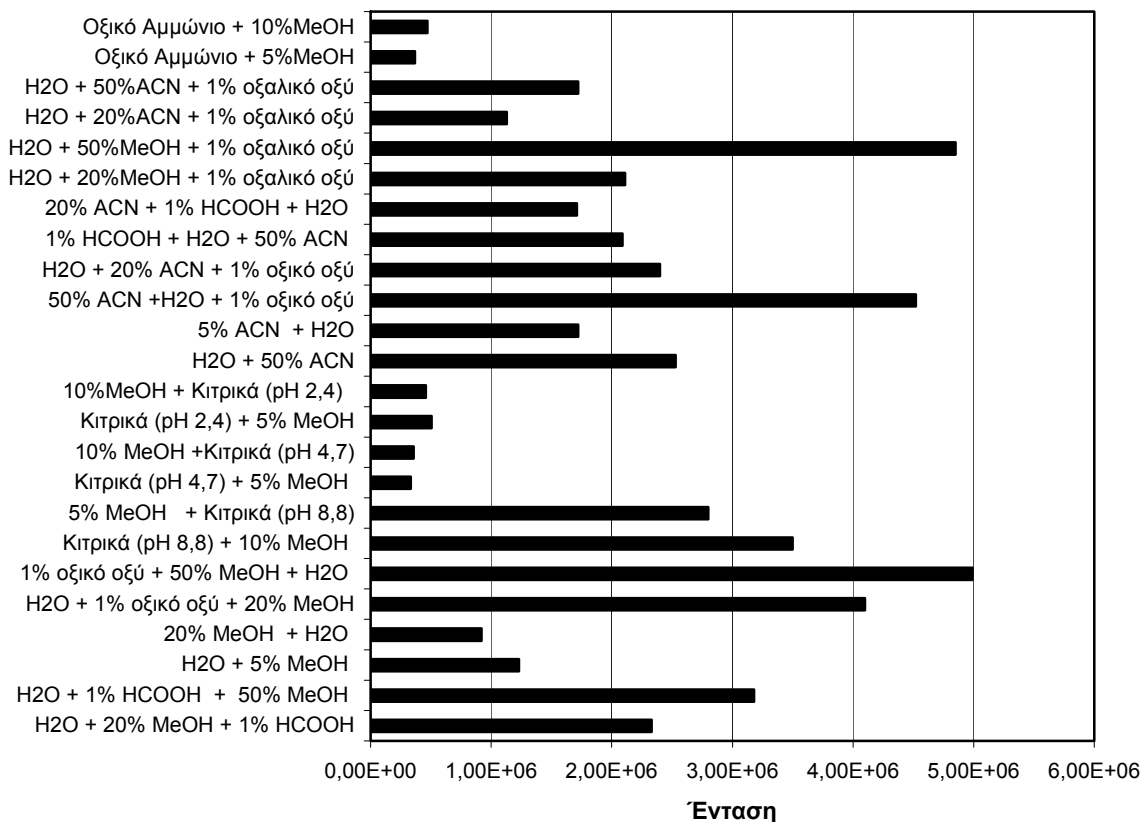
Κατά την ανάλυση θετικών ιόντων είναι εύκολο να υφίσταται σταθερός ηλεκτροψεκασμός με την χρησιμοποίηση διαλυμάτων που αποτελούνται από 50% πολικούς οργανικούς διαλύτες, όπως μεθανόλη, ακετυλονιτρίλιο, και 50% νερό. Όσο το διάλυμα γίνεται πιο υδατικό η επιφανειακή του τάση μεγαλώνει και έτσι είναι πιο δύσκολο να διατηρηθεί σταθερός ηλεκτροψεκασμός. Επίσης, είναι δύσκολο να επιτευχθεί σταθερός ηλεκτροψεκασμός στην περίπτωση μη πολικών διαλυτών, όπως είναι το εξάνιο και το τριχλωροεξάνιο, εξαιτίας της πολύ χαμηλής τους επιφανειακής τάσης και της χαμηλής διηλεκτρικής τους σταθεράς. Η επίδραση των παραγόντων αυτών στον σχηματισμό σταθερού ηλεκτροψεκασμού μειώνεται σημαντικά με την προσθήκη βοηθητικού αερίου εκνέφωσης. Το αέριο αυτό χρησιμοποιείται πλέον σε όλα τα σύγχρονα συστήματα HPLC ES-MS που χρησιμοποιούν υψηλές ροές κινητής φάσης (0,2-1,0 mL/min).

Στη παρούσα εργασία, για τις ενώσεις που εξετάζονται, επιλέγεται ο σχηματισμός και η ανάλυση θετικών ιόντων με τη τεχνική του ES. Ο μεταφορέας φορτίων στην περίπτωση αυτή είναι ένα κατιόν, συνήθως πρωτόνιο ή κατιόν νατρίου ή καλίου. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν διαλύτες που είναι δότες πρωτονίων όπως νερό/μεθανόλη και νερό/ακετονιτρίλιο σε διάφορες αναλογίες. Επιπλέον, προστέθηκε και ασθενές οξύ όπως οξικό οξύ ή το φορμικό οξύ για μεγαλύτερη παροχή πρωτονίων. Το χαμηλό pH των διαλυμάτων αυτών ευνοεί την πρωτονίωση των σεληνοσακχάρων. Επίσης, αυξάνεται και η αγωγιμότητα των διαλυμάτων.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, προκειμένου να βρεθεί ο κατάλληλος διαλύτης για τον προσδιορισμό σεληνοσακχάρων με ES-MS/MS εξετάστηκαν διάφοροι συνδυασμοί διαλυτών, οξέων και αλάτων (Σχήματα 3.1. και 3.2). Τα αποτελέσματα αυτά καταγράφηκαν κατόπιν συνεχούς ροής πρότυπων διαλυμάτων σεληνοσακχάρων στο φασματόμετρο μάζας ηλεκτροψεκασμού με τη βοήθεια αντλίας σύριγγας (syringe pump).



Σχήμα 3.1 Ένταση του ιόντος $[M+H]^+$ που αντιστοιχεί στο SeGalNAc σε διάφορους συνδυασμούς οργανικών διαλυτών και οξέων.



Σχήμα 3.2 Ένταση του ιόντος $[M+H]^+$ που αντιστοιχεί στο SeGluNAc σε διάφορους συνδυασμούς οργανικών διαλυτών και οξέων.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά βρέθηκαν ποιοι συνδυασμοί διαλυτών δίνουν την μεγαλύτερη απόκριση στο ES για το κάθε σεληνοσάκχαρο. Πιο συγκεκριμένα για την ένωση SeGalNAc οι διαλύτες που δίνουν την υψηλότερη απόκριση στον ηλεκτροψεκασμό κατά σειρά είναι: 1) υδατικό διάλυμα 20% μεθανόλης με 1% οξικό οξύ (ένταση: 1×10^7), 2) υδατικό διάλυμα 50% μεθανόλης με 1% οξικό οξύ (ένταση: 9×10^6), 3) υδατικό διάλυμα 50% ακετονιτριλίου με 1% οξικό οξύ (8.5×10^6), 4) υδατικό διάλυμα 20% ακετονιτριλίου με 1% οξικό οξύ (8.3×10^6). Αντίστοιχα, για την ένωση SegluNAc οι διαλύτες που δίνουν την υψηλότερη απόκριση στον ηλεκτροψεκασμό είναι : 1) υδατικό διάλυμα 50% μεθανόλης με 1% οξικό οξύ (5×10^6), 2) υδατικό διάλυμα 50% μεθανόλης με 1% οξαλικό οξύ (4.8×10^6), 3) υδατικό διάλυμα 50% ακετονιτριλίου με 1% οξικό οξύ (4.5×10^6), 4) υδατικό διάλυμα 20%

μεθανόλης με 1% οξικό οξύ ($4,1 \times 10^6$). Διαπιστώνεται ότι διαφορετικοί συνδυασμοί πολικών διαλυτών με οξικό οξύ δίνουν την υψηλότερη απόκριση στον ηλεκτροψεκασμό για το κάθε σεληνοσακχαρο. Βέβαια η τελική επιλογή του διαλύτη γίνεται σε συνδυασμό με τις απαιτήσεις του HPLC για τον ικανοποιητικό διαχωρισμό των σεληνοσακχάρων και για την κατακράτηση τους ώστε να αποφευχθεί συνέκλουση με τα συστατικά της μήτρας των δειγμάτων. Αναλυτικά εξετάζονται οι απαιτήσεις αυτές στην παράγραφο 3.1.4 .

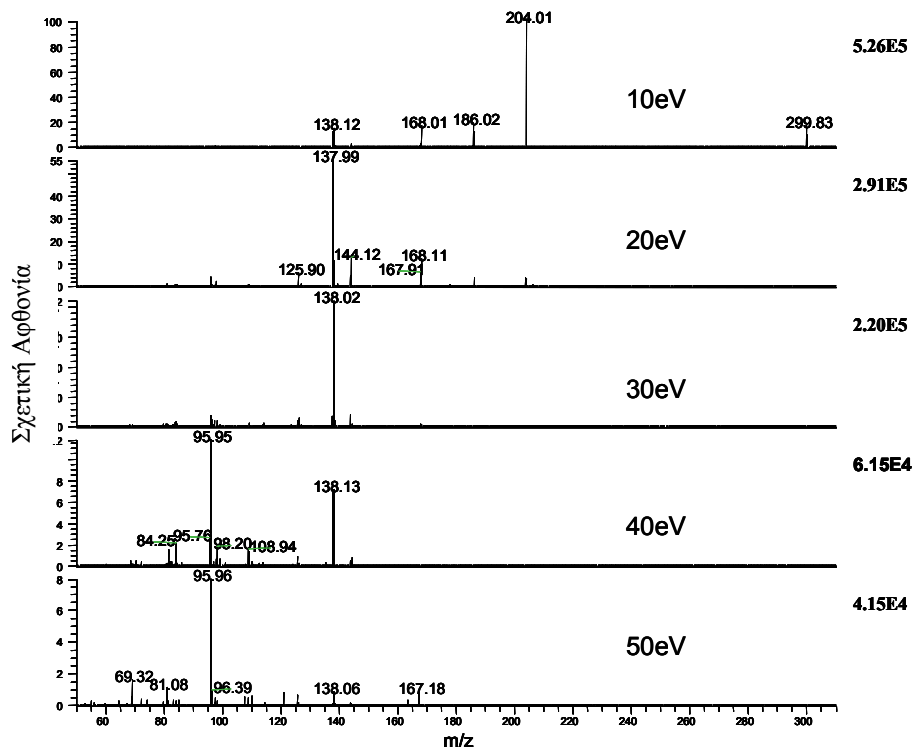
3.1.3 Επιλογή Μεθόδου Σάρωσης των Αναλυτών Μάζας

Η εφαρμογή διαφόρων μεθόδων σάρωσης των αναλυτών μάζας συμβάλλουν με την σειρά τους στην ανάπτυξη της συγκεκριμένης αναλυτικής μεθόδου. Γενικότερα, οι διάφορες μέθοδοι σάρωσης των αναλυτών μάζας στοχεύουν τόσο στην μεγιστοποίηση της εκλεκτικότητας όσο και της ευαισθησίας της αναλυτικής μεθόδου. Έτσι η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου σάρωσης έχει σαν στόχο τόσο τον διαχωρισμό των συγκεκριμένων σεληνοσακχάρων όσο και τον ακριβή προσδιορισμό τους στα ανθρώπινα ούρα.

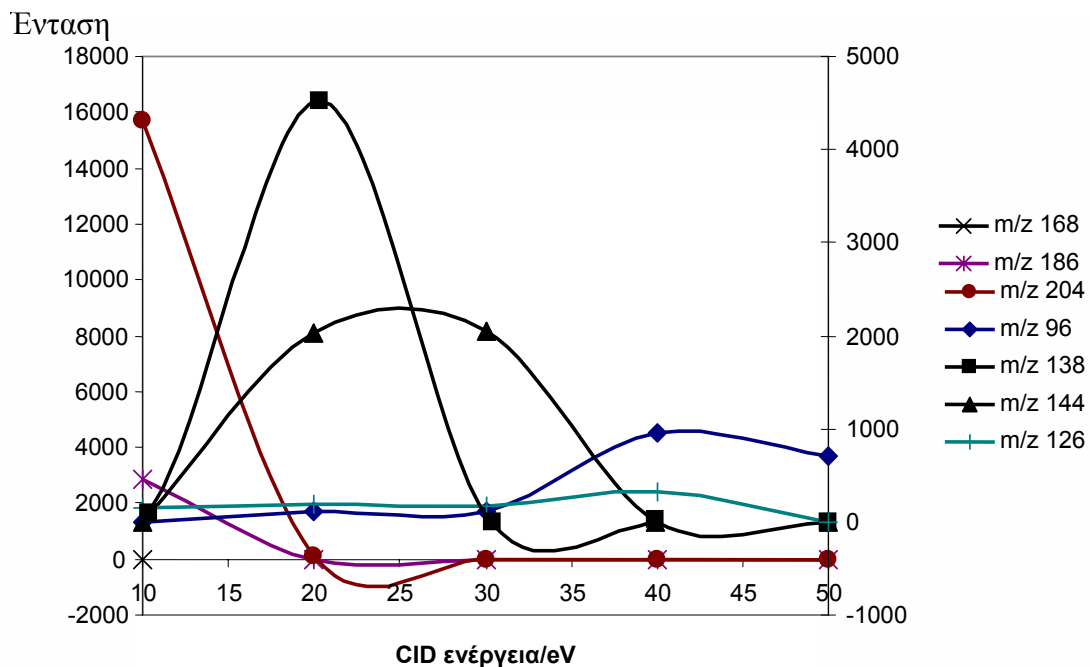
Αρχικά εφαρμόστηκε η μέθοδος ολικής σάρωσης (full scan) με στόχο την ανίχνευση των σεληνοσακχάρων. Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει σάρωση σε μια συγκεκριμένη περιοχή μαζών με ένα από τα δύο τετράπολα σάρωσης (Q1 ή Q3). Η μέθοδος αυτή δεν παρέχει την απαραίτητη ευαισθησία και εκλεκτικότητα μιας και δεν είναι εύκολος ο εντοπισμός των ιόντων που αντιστοιχούν στα σεληνοσακχάρα ανάμεσα στο μεγάλο αριθμό ιόντων χημικού υπόβαθρου. Έτσι κρίθηκε ακατάλληλη η σάρωση αυτή για τον προσδιορισμό ιχνοποσοτήτων σεληνοσακχάρων σε ούρα.

Στη συνέχεια εφαρμόστηκε μια πιο εκλεκτική και ευαίσθητη μέθοδος σάρωσης της διαδοχικής φασματομετρίας μάζας, η οποία είναι η παρακολούθηση επιλεγμένων αντιδράσεων (Selected Reaction Monitoring, SRM). Η ανάπτυξη αυτής της μεθόδου όμως απαιτεί πρώτα την μελέτη των αντιδράσεων διάσπασης των σεληνοσακχάρων στη κυψελίδα πρόσκρουσης του φασματομέτρου μάζας. Πιο συγκεκριμένα, τα πρόδρομα ιόντα που φτάνουν στη κυψελίδα πρόσκρουσης επιταχύνονται σε διάφορες ενέργειες και έτσι υφίστανται διάσπαση επαγόμενη από πρόσκρουση (Collision Induced Dissociation, CID) με άτομα Ar. Για να μελετηθεί καλύτερα αυτή η διεργασία εφαρμόστηκε η μέθοδος σάρωσης των προϊόντων ιόντων (product ion scan) για κάθε σεληνοσάκχαρο ξεχωριστά για να βρεθούν τα προϊόντα των αντιδράσεων διάσπασης του με την υψηλότερη ένταση. Στο Σχήμα 3.3 παρουσιάζονται τα φάσματα μάζας των προϊόντων ιόντων της ένωσης SeGalNAc όπως καταγράφηκαν σε διάφορες ενέργειες διάσπασης με τη μέθοδο σάρωσης των προϊόντων ιόντων (product ion scan).

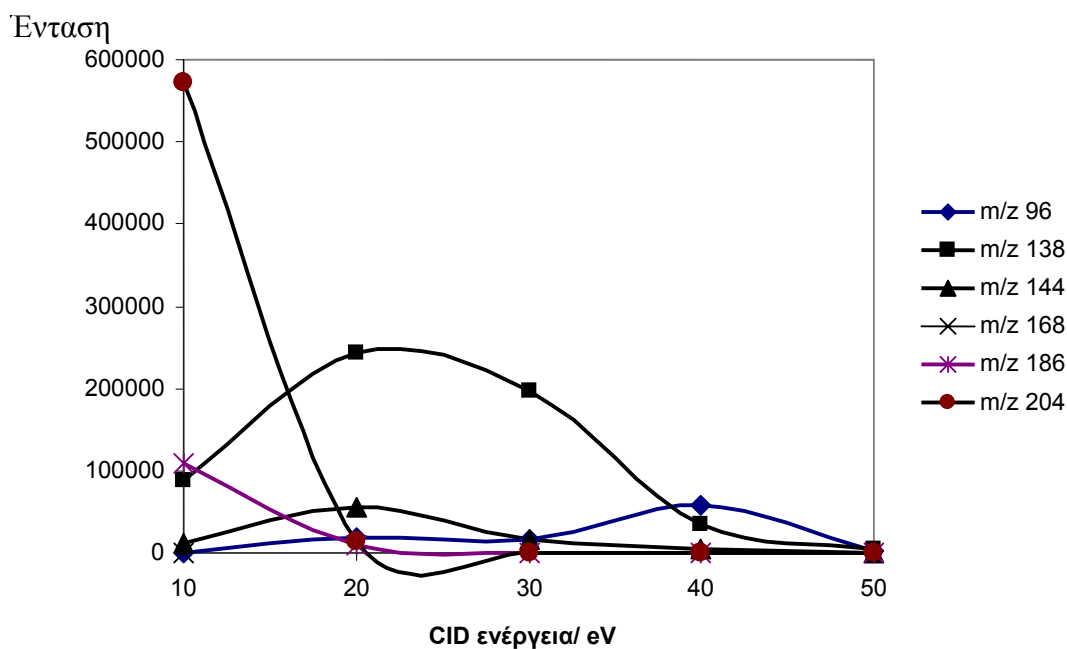
Από τις εντάσεις των προϊόντων ιόντων προκύπτουν καμπύλες διάσπασης (breakdown curves) οι οποίες με τη σειρά τους δίνουν πληροφορίες σχετικά με τη διάσπαση του σεληνοσακχάρου SeGalNAc στη κυψελίδα πρόσκρουσης (Σχήμα 3.4). Στις καμπύλες διάσπασης φαίνεται πιο είναι το προϊόν ιον με την μεγαλύτερη ένταση καθώς και η ενέργεια διάσπασης που αντιστοιχεί στο σχηματισμό του. Παρόμοια πειράματα πραγματοποιήθηκαν και για την ένωση SeGluNAc όπου προέκυψε η καμπύλη διάσπασης του Σχήματος 3.5.



Σχήμα 3.3 Φάσματα μάζας προϊόντων ιόντων της ένωσης SeGalNAc (m/z 300 $[SeGalNAc+H]^+$) σε διάφορες ενέργειες διάσπασης: 10eV, 20eV, 30eV, 40eV, 50eV.



Σχήμα 3.4 Καμπύλες διάσπασης για το για το $[M+H]^+$ της ένωσης SeGalNAc.



Σχήμα 3.5 Καμπύλες διάσπασης για το $[M+H]^+$ της ένωσης SeGluNAc.

Στον Πίνακα 3.1 συνοψίζονται τα προϊόντα ιόντα των ενώσεων SeGalNAc και SeGluNAc και οι συνθήκες υπό τις οποίες σχηματίστηκαν με μέγιστη ένταση.

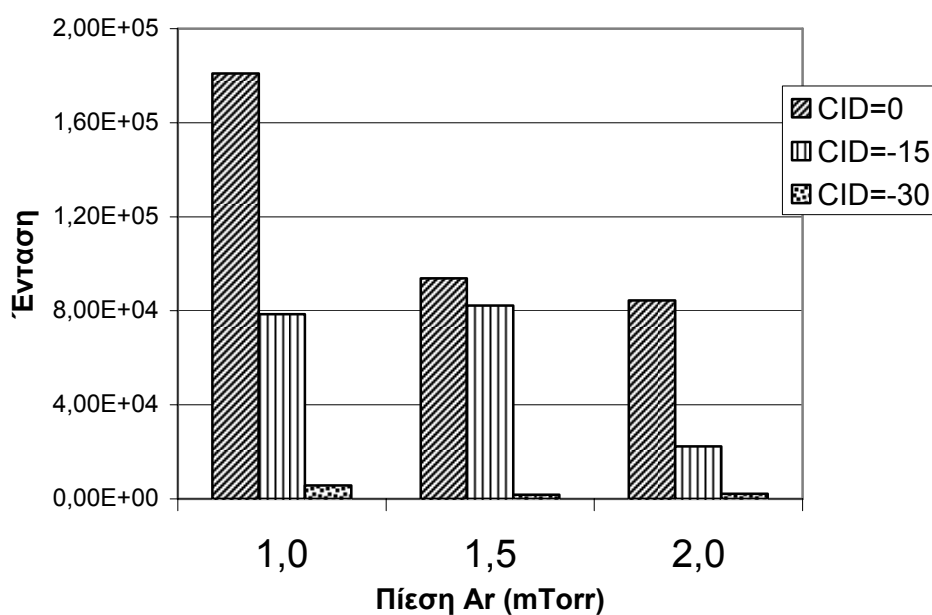
Πίνακας 3.1 Χαρακτηριστικά προϊόντα ιόντα των ενώσεων SeGalNAc και SeGluNAc με τις αντίστοιχες ενέργειες διάσπασης όπου επιτυγχάνεται μέγιστος σχηματισμός τους.

Θραύσμα (m/z)	Ενέργεια (eV)	
	SeGalNAc	SeGluNAc
96	40	40
138	20	23
144	20	20
168	10	10
186	10	10
204	10	10

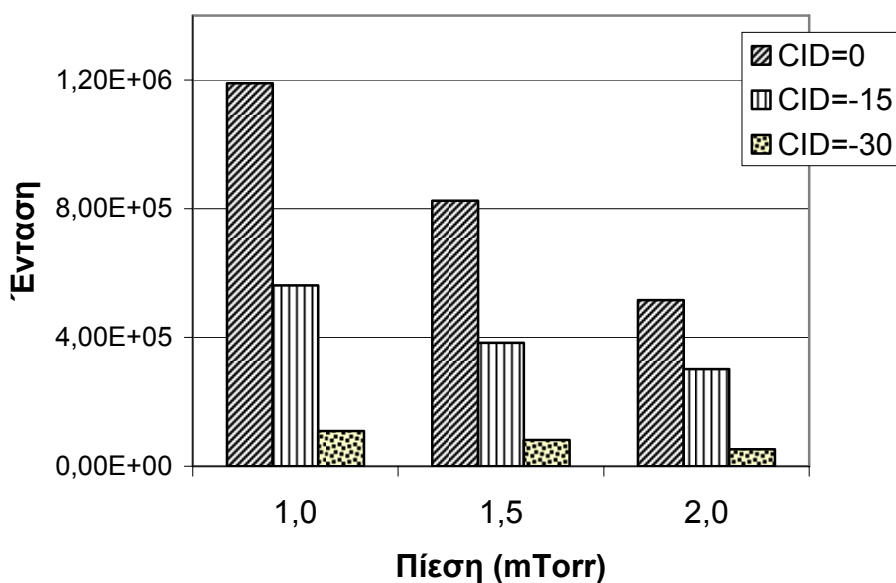
Από τα δεδομένα του Πίνακα 3.1 προκύπτουν οι συνθήκες παρακολούθησης των επιλεγμένων αντιδράσεων. Πιο συγκεκριμένα για τα δύο σεληνοσάκχαρα SeGalNAc και SeGluNAc παρακολουθούνται οι εξής αντιδράσεις διάσπασης: $m/z 300 \rightarrow m/z 138$, m/z

300→ m/z 204, m/z 300→ m/z 144, m/z 300→ m/z 186. Αναλυτικά τα μονοπάτια θραυσματοποίησης των σεληνοσακχάρων δίνονται στην παράγραφο 5.2 (Σχήμα 5.3). Επειδή οι δύο ενώσεις δίνουν τα ίδια χαρακτηριστικά θραύσματα κατά τη θραυσματοποίηση τους είναι φανερό ότι για τον προσδιορισμό τους απαιτείται χρωματογραφικός διαχωρισμός τους πριν την είσοδο τους στην πηγή του ES.

Ακόμη, μελετήθηκε η επίδραση της πίεσης του αερίου Ar της κυψελίδας πρόσκρουσης κατά τον σχηματισμό των προϊόντων ιόντων. Συγκεκριμένα, η πίεση του Ar μεταβλήθηκε από 1,0-2,0 mTorr. Ταυτόχρονα μελετήθηκε και η επίδραση εφαρμογής ενέργειας πρόσκρουσης στην πηγή του ES (source CID) από 0 – 30 V.



Σχήμα 3.6 Επίδραση της πίεσης αερίου Ar και της ενέργειας πρόσκρουσης της πηγής (source CID) από 0 – 30 V στην ένταση του προϊόντος ιόντος (m/z 204) του SeGalNAc.



Σχήμα 3.7 Επίδραση της πίεσης αερίου Ar και της ενέργειας πρόσκρουσης της πηγής ES (source CID) από 0 – 30 V στην ένταση του προϊόντος ιόντος (m/z 204) του SeGluNAc.

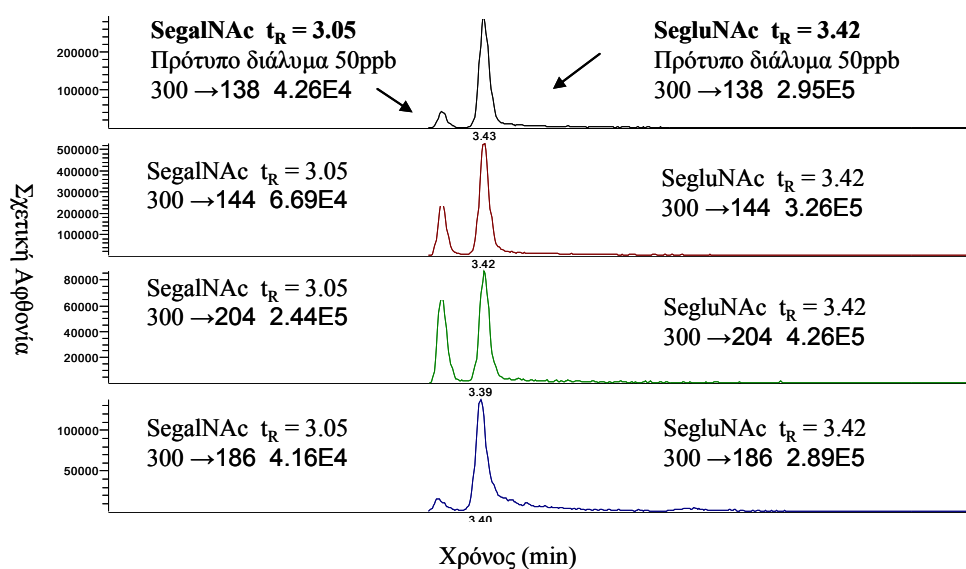
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στα Σχήματα 3.6 και 3.7 βρέθηκε ότι η βέλτιστη πίεση του Ar για μέγιστη ένταση των ιόντων θραυσμάτων είναι 1 mTorr, ενώ η ενέργεια πρόσκρουσης της πηγής είναι 0 V. Η μηδενική τιμή στην ενέργεια πρόσκρουσης της πηγής συμβάλλει στη μείωση των απωλειών λόγω διάσπασης του πρόδρομου ιόντος πριν την εισαγωγή του στον αναλυτή μαζών. Σημειώνεται ότι οι παραπάνω τιμές βελτιστοποίησης τόσο ως προς την πίεση του Ar όσο και ως προς την ενέργεια πρόσκρουσης της πηγής παρέμειναν σταθερές καθ' όλη τη διαδικασία ανάλυσης δειγμάτων ούρων με τη τεχνική του ηλεκτροψεκασμού.

3.1.4 Βελτιστοποίηση Κινητής Φάσης HPLC για τον Διαχωρισμό των Σεληνοσακχάρων

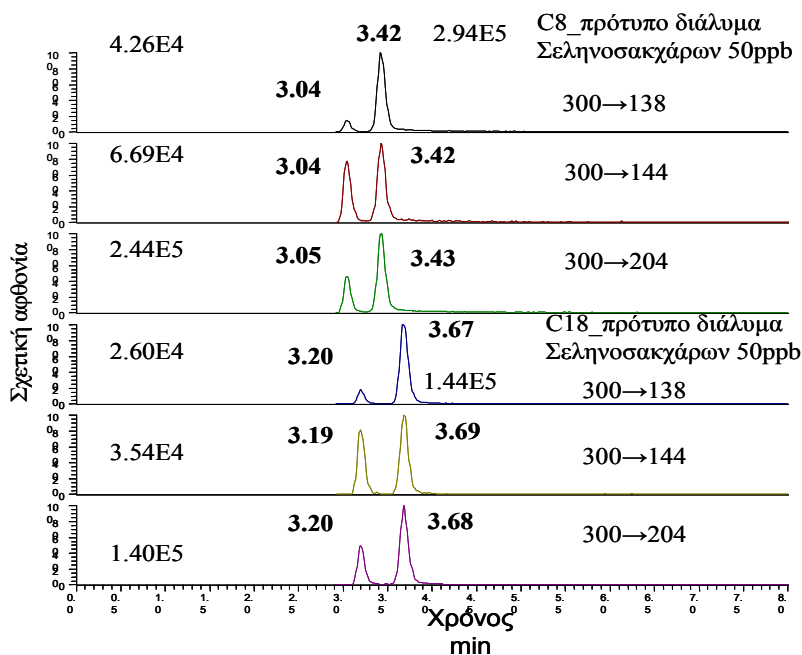
Ο διαχωρισμός των σεληνοσακχάρων SeGalNAc και SeGluNAc με HPLC κρίνεται δύσκολος εφόσον πρόκειται για ισομερείς ενώσεις. Στη προσπάθεια εφαρμογής HPLC κρίνεται απαραίτητη η εύρεση μιας κινητής φάσης η οποία οδηγεί στον διαχωρισμό των

σεληνοσακχάρων και είναι συμβατή με τον ηλεκτροψεκασμό. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν αρχικά, οι συνδυασμοί των διαλυτών που έδιναν την υψηλότερη απόκριση στον ηλεκτροψεκασμό για κάθε μια ένωση σύμφωνα με τα Σχήματα 3.1 και 3.2. Οι συνδυασμοί αυτοί όμως δεν έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα διαχωρισμού. Για το λόγω αυτό δοκιμάστηκαν και οι υπόλοιποι συνδυασμοί διαλυτών και διαπιστώθηκε ότι απέδωσε καλύτερα ο ακόλουθος συνδυασμός με στήλη C₈: υδατικό διάλυμα με 10% μεθανόλη και 50% οξικό αμμώνιο 40 mM (Σχήματα 3.8). Δυστυχώς όμως ο συνδυασμός αυτός έδωσε από τις χαμηλότερες αποκρίσεις στον ηλεκτροψεκασμό.

Όπως προέκυψε από εκτενή χρωματογραφικά πειράματα οι διαλύτες που λειτουργούν καλύτερα στον ηλεκτροψεκασμό χρωματογραφικά δεν δίνουν ικανοποιητικά αποτελέσματα καθώς και τα δύο σεληνοσάκχαρα έχουν τον ίδιο χρόνο έκλουσης.



Σχήμα 3.8 Χρωματογραφήματα των αντιδράσεων m/z 300→ m/z 138 (20eV), 300→144 (20eV) που καταγράφηκαν μετά την ανάλυση πρότυπων διαλυμάτων σεληνοσακχάρων (50ppb Se).

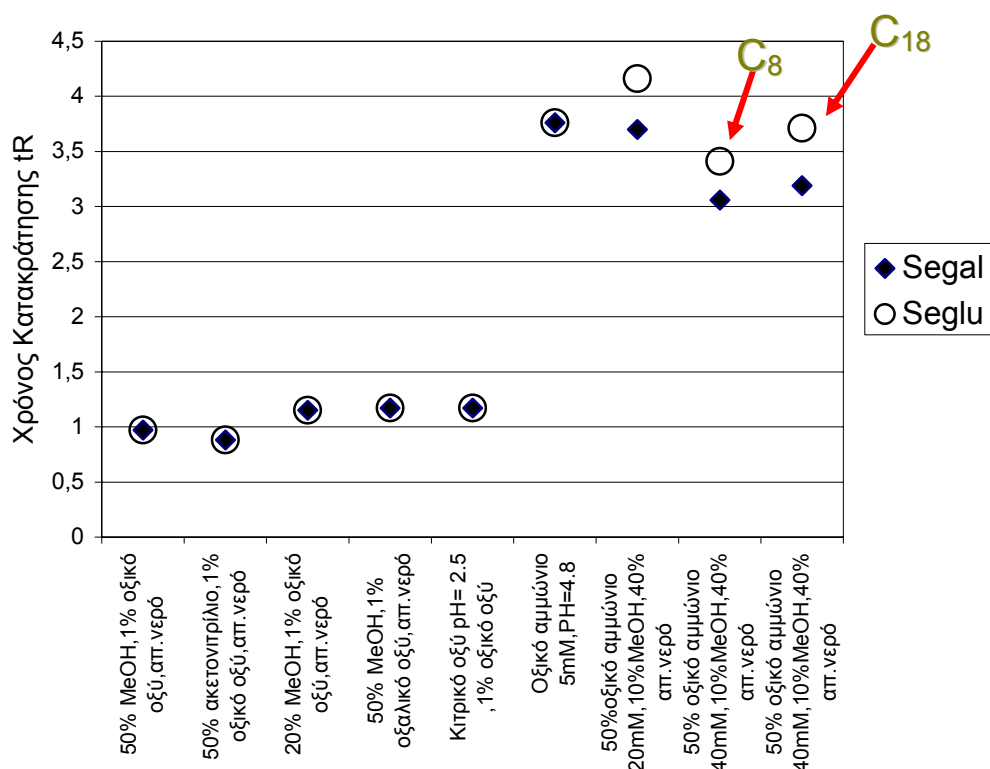


Σχήμα 3.9 Χρωματογραφήματα που καταγράφηκαν κατά την ανάλυση πρότυπων διαλυμάτων σεληνοσακχάρων (50 ppb Se) με κινητή φάση οξικό αμμώνιο 50% (80mM), 10% μεθανόλη, 40% απιονισμένο νερό, με στήλη C₈ και C₁₈. Δίνονται οι εντάσεις των χαρακτηριστικών αντιδράσεων m/z 300→ m/z 138 (20eV), 300→144 (20eV), 300→186 (10eV), 300→204 (10eV).

Διαπιστώθηκε ότι επιτυγχάνεται καλύτερος διαχωρισμός των ενώσεων αν χρησιμοποιηθεί ως διαλύτης 50% οξικό αμμώνιο 40mM σε ουδέτερο pH, 10% μεθανόλη, 40% νερό.

Στη συνέχεια, με αυτές τις συνθήκες κινητής φάσης έγινε σύγκριση μεταξύ της διαχωριστικής ικανότητας ($R = \frac{2\Delta t_R}{(W_A + W_B)}$) της στήλης C₈ και της στήλης C₁₈. Οι ποιοτικές διαφορές που εντοπίζονται παρουσιάζονται στο χρωματογράφημα του Σχήματος 3.9. Στο χρωματογράφημα αυτό, όπου παρουσιάζονται πρότυπα διαλύματα των σεληνοσακχάρων συγκέντρωσης 50ppb Se, διαπιστώνεται κάποια διαφορά στο χρόνο κατακράτησης των ενώσεων στις δύο στήλες. Συγκεκριμένα στη στήλη C₈ το SeGalNAc εμφανίζεται μετά την πάροδο 3 min ενώ αντίστοιχα η SeGluNAc μετά από 3.41 min. Με τη

στήλη C₁₈ SeGalNAc εμφανίζεται μετά την πάροδο 3.20 min, ενώ αντίστοιχα η SeGluNAc μετά από 3.68 min. Επιπλέον ο διαχωρισμός των σεληνοσακχάρων είναι καλύτερος με τη στήλη C₁₈ (Σχήμα 3.10).



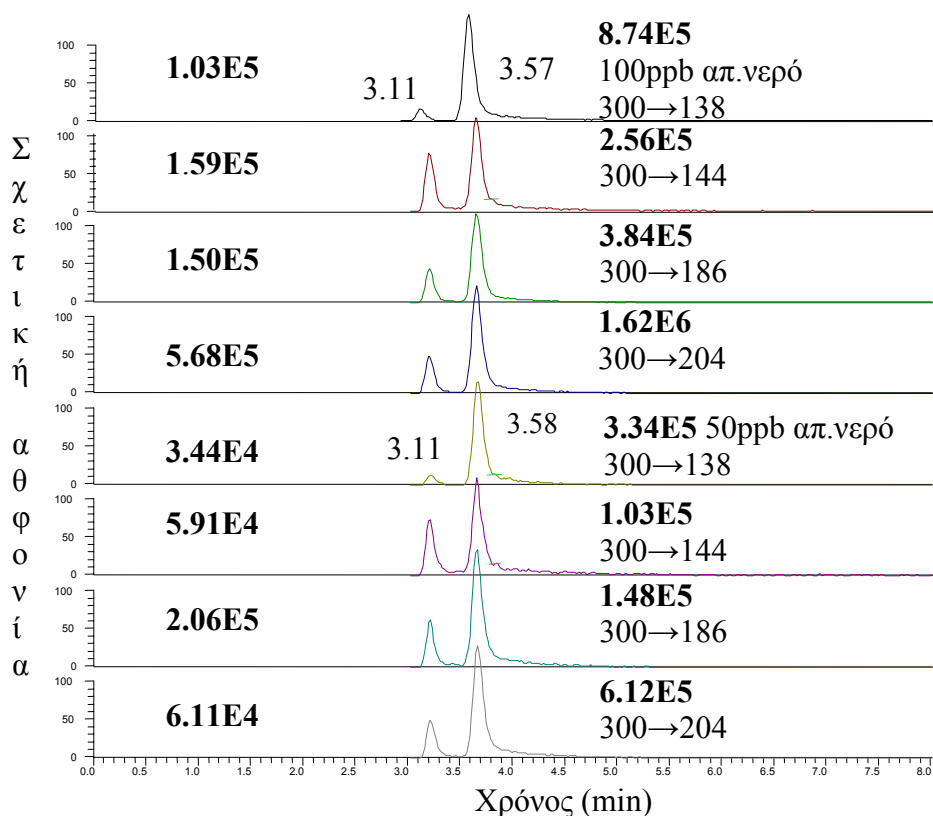
Σχήμα 3.10 . Διάφοροι συνδυασμοί διαλυτών για την εύρεση κινητής φάσης στην HPLC, με στήλη C₈ και C₁₈ , μέθοδος παρακολούθησης SRM.

3.2 Εφαρμογή της Μεθόδου Παρακολούθησης Επιλεγμένων Αντιδράσεων (SRM) με την Τεχνική HPLC-ES-MS/MS για την Ταυτοποίηση και τον Προσδιορισμό των Σεληνοσακχάρων στα Ανθρώπινα Ούρα.

Για την ανάπτυξη της μεθόδου παρακολούθησης επιλεγμένων αντιδράσεων με την τεχνική HPLC-ES-MS/MS χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση στην υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης 50% οξικό αμμώνιο 80 mM, 10% μεθανόλη, 40% απ. νερό, με στήλη C₁₈. Επιπλέον καταγράφηκαν οι εντάσεις των εξής χαρακτηριστικών αντιδράσεων για την

ένωση SeGalNAc: m/z 300→ m/z 138 (20eV), 300→204 (20eV), 300→144 (10eV), 300→186 (10eV). Οι ίδιες αντιδράσεις παρατηρούνται και για την ένωση SeGluNAc.

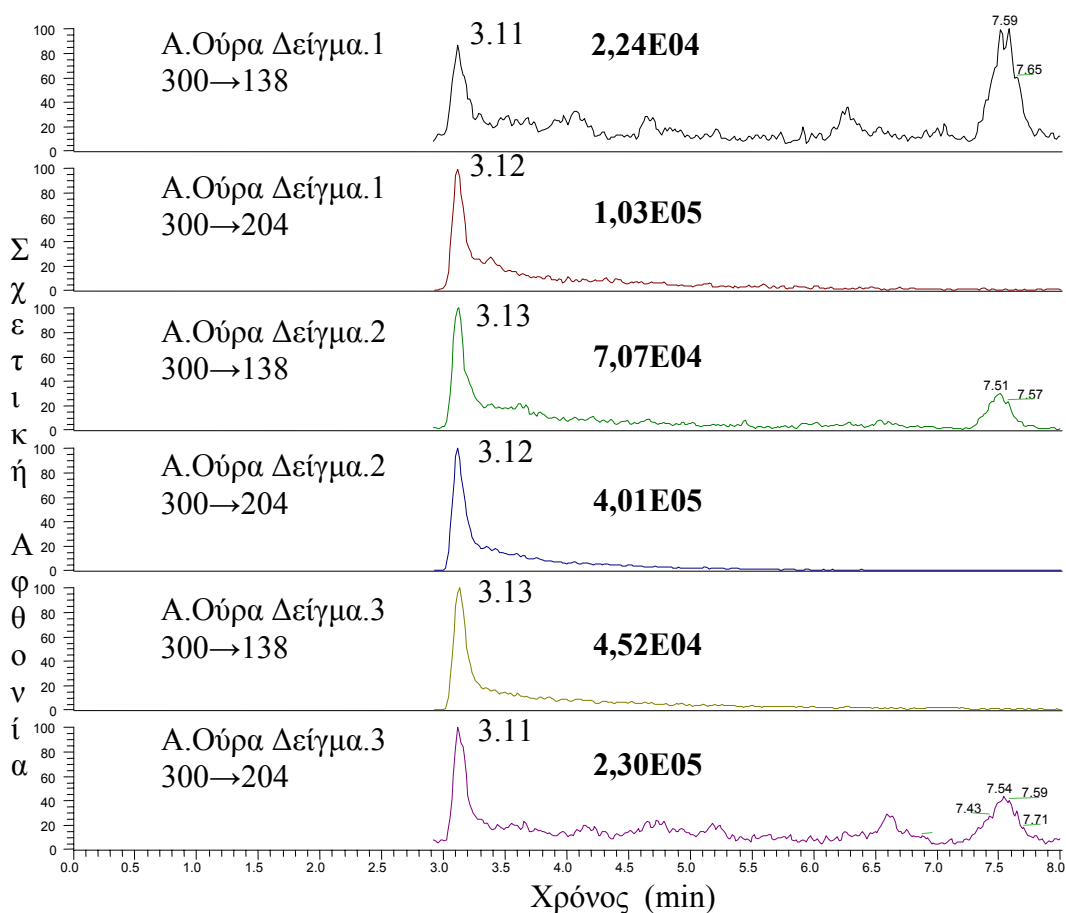
Στο χρωματογράφημα του Σχήματος 3.11 καταγράφηκαν για πρότυπα διαλύματα σεληνοσακχάρων για κάθε χαρακτηριστική αντίδραση. Στις χρωματογραφικές κορυφές αναγράφονται οι χαρακτηριστικές εντάσεις για το κάθε σεληνοσάκχαρο.



Σχήμα 3.11 Χρωματογραφήματα που καταγράφηκαν κατά την ανάλυση πρότυπων διαλυμάτων σεληνοσακχάρων (100 και 50 ppb σε Se) για κάθε χαρακτηριστική αντίδραση 300→138 (20eV), 300→144 (20eV), 300→204 (10eV), 300→186 (10eV).

Η εφαρμογή της συγκεκριμένης μεθόδου παρακολούθησης στην ανάλυση ανθρώπινων ούρων φέρει τα παρακάτω αποτελέσματα: στα ανθρώπινα ούρα εντοπίστηκε η ύπαρξη του SeGalNAc το οποίο χαρακτηρίζεται σύμφωνα με τη βιβλιογραφία ως το κύριο μεταβολικό

προϊόν του σεληνίου στα ανθρώπινα ούρα. Στο χρωματογράφημα που παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.12 φαίνεται η ανίχνευση της ένωσης αυτής στα ανθρώπινα ούρα.



Σχήμα 3.12 Χρωματογραφήματα που καταγράφηκαν κατά την ανάλυση δειγμάτων ανθρώπινων ούρων για τις παρακάτω χαρακτηριστικές αντιδράσεις 300→138 (20eV), 300→144 (20eV), 300→204 (10eV), 300→186 (10eV).

3.2.1 Ποιοτικοί Δείκτες για την Ταυτοποίηση Σεληνοσακχάρων με την Τεχνική HPLC-ES-MS/MS / Selected Reaction monitoring mode

Τυχόν φασματοσκοπικές παρεμποδίσεις κατά τον προσδιορισμό των σεληνοσακχάρων στα ούρα μπορούν να εντοπισθούν με υπολογισμό αναλογιών των εντάσεων των προϊόντων ιόντων. Απόκλιση των αναλογιών των ανθρώπινων ούρων από

αυτά των πρότυπων σεληνοσακχάρων αποτελεί ένδειξη ύπαρξης παρεμπόδισης. Οι τιμές των αναλογιών αυτών παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2.

Πίνακας 3.2 Αναλογίες θραυσμάτων αντιδράσεων διάσπασης m/z 300→ m/z 138(20eV), m/z 300→ m/z 144(20eV), m/z 300→ m/z 204(10eV), m/z 300→ m/z 186(10eV) σε πρότυπα διαλύματα και σε δείγματα ανθρώπινων ούρων της ένωσης SeGalNAc μετά τη χορήγηση συμπληρώματος σεληνίου περιεκτικότητας 200μg Se.

Αναλογίες θραυσμάτων	m/z 138/144	m/z 138/204	m/z 138/186	m/z 144/204	m/z 186/204	m/z 144/186
Πρότυπο Σεληνοσακχάρων (n=5)	0,62 ±0,05	0,18 ±0,01	0,71 ±0,04	0,29 ±0,01	0,25 ± 0,00	1,14±0,03
Δείγμα Ανθρ.Ούρων 1	0,59	0,18	0,49	0,31	0,37	0,83
Δείγμα Ανθρ.Ούρων 2	0,54	0,18	0,51	0,33	0,36	0,94
Δείγμα Ανθρ.Ούρων 3	0,81	0,19	0,21	0,23	0,87	0,26
Δείγμα Ανθρ.Ούρων 4	0,60	0,18	0,47	0,31	0,39	0,79
Δείγμα Ανθρ.Ούρων 5	0,61	0,18	0,48	0,30	0,38	0,78
Δείγμα Ανθρ.Ούρων 6	1,05	0,19	7,37	0,18	1,4	7,74
Δείγμα Ανθρ.Ούρων 7	0,54	0,12	0,03	0,22	4,55	0,05
Δείγμα Ανθρ.Ούρων 8	0,62	0,18	0,48	0,28	0,37	0,77
Δείγμα Ανθρ.Ούρων 9	0,64	0,27	0,52	0,42	0,40	0,84
Δείγμα Ανθρ.Ούρων 10	0,63	0,18	0,50	0,29	0,45	0,80

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Πίνακα 3.2 στο ιόν m/z 186 παρατηρείται σημαντική φασματοσκοπική παρεμπόδιση σε όλα τα δείγματα. Αυτό επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι οι τιμές των αναλογιών του στα δείγματα ούρων παρουσιάζουν σημαντική αυξητική τάση σε σχέση με τα πρότυπα διαλύματα. Οι τιμές των αναλογιών για τα υπόλοιπα θραύσματα των δειγμάτων βρίσκονται σε ικανοποιητική συμφωνία με τις τιμές των αναλογιών που καταγράφηκαν για τα πρότυπα διαλύματα. Τέλος, τα δείγματα ανθρώπινων ούρων 6 και 7 παρουσιάζουν τις σημαντικότερες αποκλίσεις για κάποιες αναλογίες εντάσεων θραυσμάτων .

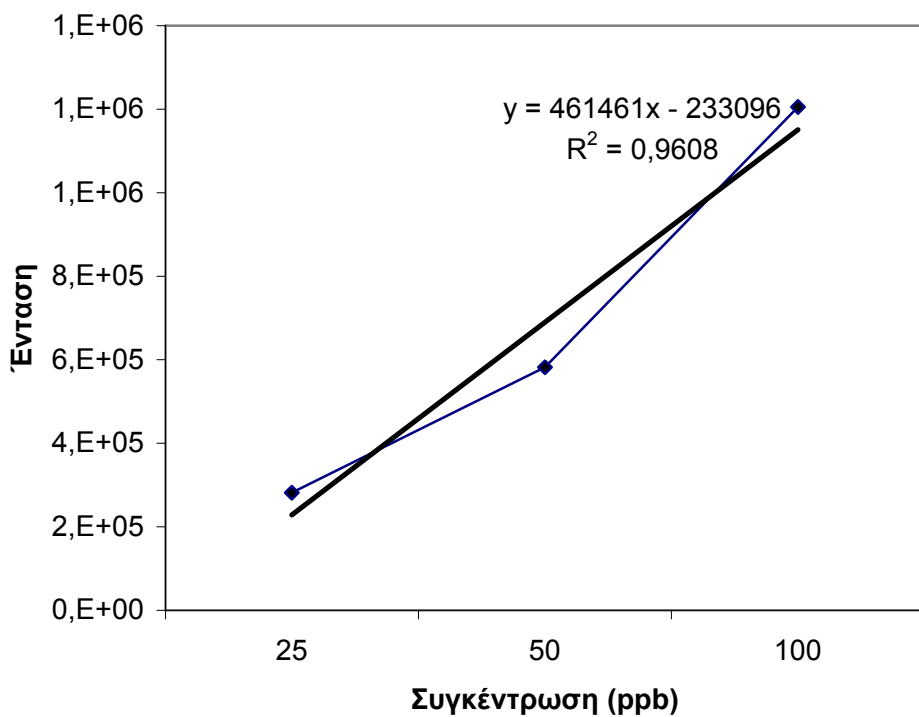
3.2.2 Ποσοτικός Προσδιορισμός Σεληνοσακχάρων με την Τεχνική HPLC-ES-MS/MS / Μέθοδος Παρακολούθησης Επιλεγμένων Αντιδράσεων (Selected Reaction Monitoring).

Για την μελέτη των ποσοτικών δεικτών της μεθόδου υπολογίστηκαν τα όρια ανίχνευσης των σεληνοσακχάρων SeGalNAc και SeGluNAc. Στον Πίνακα 3.3 παρουσιάζονται τα όρια ανίχνευσης για το κάθε προϊόν ιον των σεληνοσακχάρων.

Πίνακας 3.3 Όρια ανίχνευσης για τα όλα τα θραύσματα των χαρακτηριστικών αντιδράσεων της ένωσης SegalNAc.

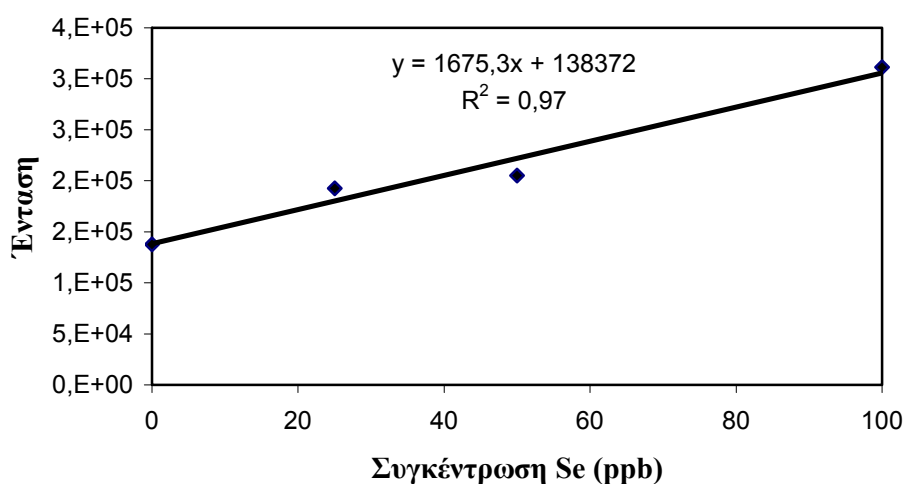
Προϊόν Ιον	Όρια Ανίχνευσης (ppb)
m/z 204	1,5
m/z 144	0,2
m/z 138	3,2
m/z 186	3,2

Ο ποσοτικός προσδιορισμός με την τεχνική του ES σε συνδυασμό με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης έγινε με τη μέθοδο εξωτερικής βαθμονόμησης καθώς και με τη μέθοδο σταθερής προσθήκης. Κατά την εξωτερική βαθμονόμηση προκύπτει η καμπύλη βαθμονόμησης του Σχήματος 3.13 από την οποία υπολογίζεται η συγκέντρωση του SeGalNAc στα δείγματα ούρων. Σημειώνεται ότι η καμπύλη βαθμονόμησης που προκύπτει αναφέρεται στο θραύσμα m/z 204.



Σχήμα 3.13 Διάγραμμα διαλυμάτων από εξωτερική βαθμονόμηση (διαλύματα SeGalNAc σε απιονισμένο νερό συγκέντρωσης 25, 50, 100 ppb).

Επίσης από τη μέθοδο σταθερής προσθήκης προκύπτει η καμπύλη του Σχήματος 3.13 με την οποία μπορούμε να ανιχνεύσουμε μη φασματομετρικά φαινόμενα παρεμπόδισης προερχόμενες από τη μήτρα του δείγματος.



Σχήμα 3.14 Διάγραμμα διαλυμάτων από μέθοδο σταθερής προσθήκης (διαλύματα SeGalNac σε δείγματα ανθρώπινων ούρων τελικής συγκέντρωσης 0, 25, 50, 100 ppb)

Τα ποσοτικά αποτελέσματα από την εφαρμογή των δυο μεθόδων βαθμονόμησης αναγράφονται στον Πίνακα 3.4.

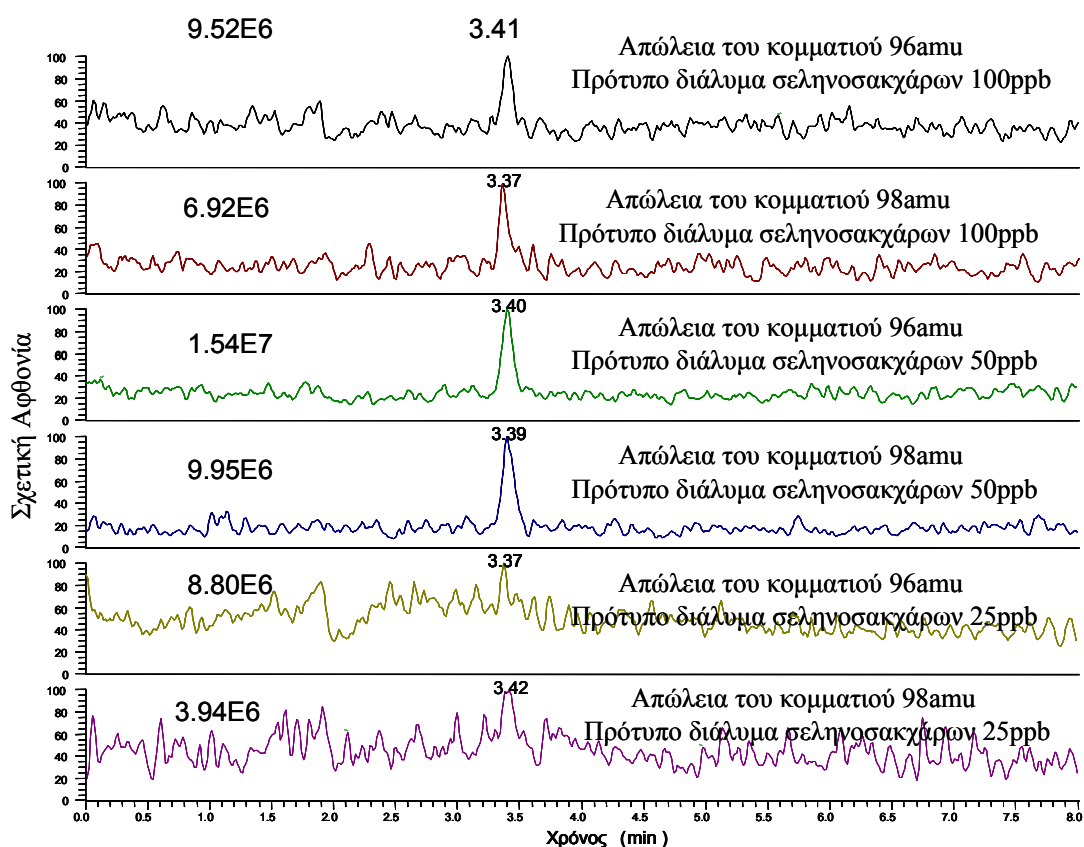
Πίνακας 3.4 Πίνακας ποσοτικών αποτελεσμάτων (ppb) αντιδράσεων διάσπασης 300→138 (20eV), 300→144 (20eV), 300→204 (10eV), 300→186 (10eV) με 1) εξωτερική βαθμονόμηση και 2) μέθοδος προσθήκης γνωστής ποσότητας.

Δείγματα	Εξωτερική Βαθμονόμηση				Μέσος Όρος
	Προϊόντα Ιόντα				
	m/z 138	m/z 144	m/z 186	m/z 204	
Δείγμα Ούρων 1	56	53	75	49	53 ± 4
Δείγμα Ούρων 2	50	47	79	54	50 ± 4
Δείγμα Ούρων 3	68	40	348	61	56 ± 15
Δείγμα Ούρων 4	30	37	836	45	37 ± 8
Δείγματα	Προσθήκη Γνωστής Ποσότητας				Μέσος Όρος
	Προϊόντα Ιόντα				
	m/z 138	m/z 144	m/z 186	m/z 204	
Δείγμα Ούρων 1	52	57	121	50	53 ± 4
Δείγμα Ούρων 2	58	53	57	54	55 ± 3
Δείγμα Ούρων 3	82	41	195	56	59 ± 21

Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 3.4 στο προϊόν m/z 186 παρατηρείται σημαντική απόκλιση αποτελεσμάτων μεταξύ των μεθόδων εξωτερικής βαθμονόμησης και της προσθήκης γνωστής ποσότητας.

3.3 Εφαρμογή της μεθόδου σάρωσης για την ανίχνευση της απώλειας ουδέτερων ομάδων (Neutral Loss Scan) για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των σεληνοσακχάρων στα ανθρώπινα ούρα με την τεχνική HPLC-ES-MS/MS.

Στη συνέχεια έγινε μια προσπάθεια εφαρμογής του τύπου σάρωσης απώλειας ουδέτερων ομάδων (Neutral Loss Scan) τόσο σε πρότυπα διαλύματα όσο και σε δείγματα ούρων. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή ανιχνεύεται η απώλεια της ομάδας CH_3SeH (96 amu) η οποία είναι χαρακτηριστική απώλεια κατά τη διάσπαση των σεληνοσακχάρων. Η χαρακτηριστική αυτή απώλεια από τα δύο σεληνοσακχάρα δίνει προϊόν ιον στα m/z 204. Η προσπάθεια σάρωσης απώλειας ουδέτερου σε πρότυπα διαλύματα φαίνεται στο Σχήμα 5.15.



Σχήμα 3.15 Χρωματογράφημα πρότυπων διαλυμάτων σεληνοσακχάρων (100 ppb Se) που καταγράφηκαν με τη μέθοδο σάρωσης απώλειας ουδέτερου κομματιού 96 amu το οποίο αντιστοιχεί στο κομμάτι CH_3SeH .

Όπως διαπιστώνεται από το χρωματογράφημα του Σχήματος 3.15 η ένταση των κορυφών για το πρότυπο δείγμα σεληνοσακχάρων είναι πολύ χαμηλή με αποτέλεσμα η εφαρμογή της μεθόδου σε δείγματα ανθρώπινων ούρων να μην επιφέρει ικανοποιητικά αποτελέσματα.

3.4 Συμπεράσματα της Τεχνικής HPLC-ES-MS/MS για τον Προσδιορισμό και την Ανίχνευση των Σεληνοσακχάρων στα Ανθρώπινα Ούρα.

Η τεχνική του ηλεκτροψεκασμού είναι μια τεχνική που επηρεάζεται από μεγάλο αριθμό πειραματικών παραμέτρων. Με σημαντικότερες την σύσταση της κινητής φάσης, τις χημικές ιδιότητες του αναλύτη και τη σύσταση της μήτρας των υπό εξέταση δειγμάτων. Σε προηγούμενες δημοσιευμένες μεθόδους ανάλυσης ανθρώπινων ούρων με την τεχνική του ES η εκτεταμένη επεξεργασία των ούρων ήταν βασική προϋπόθεση λόγω των παρεμποδίσεων κυρίως αλάτων (π.χ. νατρίου) και άλλων οργανικών συστατικών (π.χ. κρεατινίνη). Παρόλο αυτά η μέθοδος HPLC-ES-MS/MS που παρουσιάστηκε στη παρούσα εργασία έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα για τον προσδιορισμό και την ανίχνευση των σεληνοσακχάρων στα ανθρώπινα ούρα.

Πιο συγκεκριμένα αρχικά επιτεύχθηκε ο διαχωρισμός των ισομερών ενώσεων SeGalNAc και SeGluNAc με χρωματογραφία αντίστροφης φάσης με στήλη C₁₈ (R =1,2) και κινητή φάση σύστασης 50% οξικό αμμώνιο 80 mM, 10% απιονισμένο νερό και 40% μεθανόλη. Στη συνέχεια ανιχνεύτηκε και προσδιορίστηκε η ένωση SeGalNAc σε δείγματα ακατέργαστων ανθρώπινων ούρων.

Η αξιοπιστία της μεθόδου ενισχύεται από τους ποιοτικούς δείκτες όπως είναι οι αναλογίες των εντάσεων των θραυσμάτων των αντιδράσεων διάσπασης για κάθε σεληνοσάκχαρο ξεχωριστά αλλά και από τα ικανοποιητικά όρια ανίχνευσης που υπολογίστηκαν.

Τέλος, η εφαρμογή των μεθόδων εξωτερικής βαθμονόμησης και προσθήκης σταθερής ποσότητας επιβεβαιώνει και ενισχύει την ύπαρξη της SeGalNAc στα ανθρώπινα ούρα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Ανάπτυξη Μεθόδου Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC) με Διαδοχική Φασματομετρία Μάζας Χημικού Ιονισμού σε Ατμοσφαιρική Πίεση (HPLC-APCI-MS/MS) για τον Προσδιορισμό Σεληνοσακχάρων σε Ανθρώπινα Ούρα

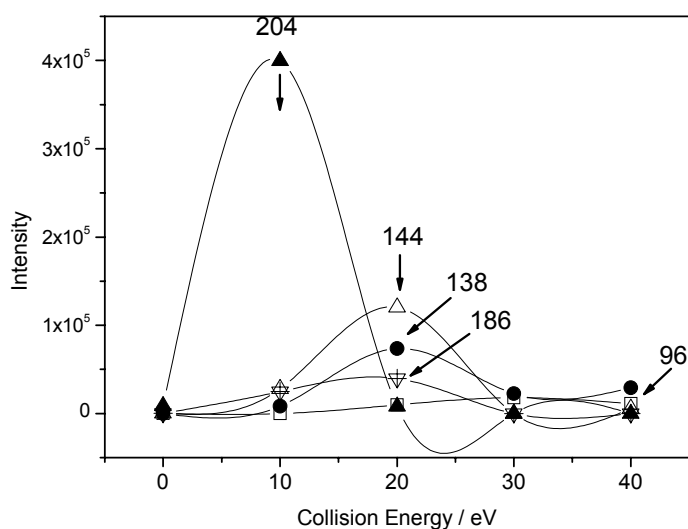
Ανάπτυξη Μεθόδου Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης με Διαδοχική Φασματομετρία Μάζας.

Η τεχνική της φασματομετρίας μάζας χημικού ιονισμού σε ατμοσφαιρική πίεση (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI) σε συνδυασμό με την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης HPLC εφαρμόστηκε σε μια προσπάθεια εύρεσης μιας περισσότερο ευαίσθητης και ανθεκτικής τεχνικής για τον προσδιορισμό σεληνοσακχάρων σε ακατέργαστα ανθρώπινα ούρα. Τα αποτελέσματα της τεχνικής APCI συγκρίθηκαν με αυτά της τεχνικής του ηλεκτροψεκασμού ώστε να επιτευχθεί πληρέστερη αξιολόγηση των μεθόδων.

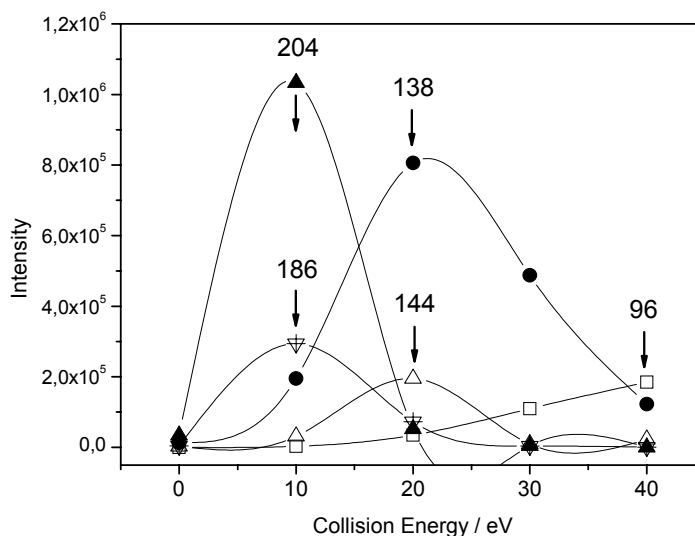
Κατά την ανάπτυξη της μεθόδου APCI χρησιμοποιήθηκε η ίδια χρωματογραφική μέθοδος με αυτή που παρουσιάστηκε για το ES (Κεφ. 3). Διευκρινιστικά αναφέρεται ότι η κινητή φάση αποτελείται από: 50% υδατικό διάλυμα με 80 mM οξικό αμμώνιο, 10% μεθανόλη και 40% απιονισμένο νερό. Χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφική στήλη αντίστροφης φάσης C₁₈ ίδια με αυτή που χρησιμοποιήθηκε με το ES. Τόσο στα πρότυπα διαλύματα των σεληνοσακχάρων όσο και στα δείγματα ούρων ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία προετοιμασίας με αυτή που περιγράφεται για τη μέθοδο HPLC-ES-MS/MS. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες μέθοδοι σάρωσης των αναλυτών μάζας, δηλ. εφαρμόστηκε η μέθοδος παρακολούθησης επιλεγμένων αντιδράσεων (Selected Reaction Monitoring, SRM), καθώς και η μέθοδος σάρωσης για την ανίχνευση της απώλειας ουδέτερων ομάδων (Neutral Loss Scan).

4.1 Εφαρμογή της Μεθόδου Παρακολούθησης Επιλεγμένων Αντιδράσεων (Selected Reaction Monitoring) με την Τεχνική HPLC-APCI-MS/MS για τον Προσδιορισμό των Σεληνοσακχάρων στα Ανθρώπινα Ούρα.

Η μέθοδος παρακολούθησης επιλεγμένων αντιδράσεων (SRM) εφαρμόζεται για τον προσδιορισμό συγκεκριμένων αναλυτών εφόσον είναι γνωστό το πως διασπώνται στην κυψελίδα πρόσκρουσης. Έτσι, αρχικά μελετήθηκε η διάσπαση των πρόδρομων ιόντων των σεληνοσακχάρων που σχηματίστηκαν στην πηγή APCI αφού επιταχύνθηκαν σε διάφορες ενέργειες. Από τα πειράματα αυτά κατασκευάστηκαν οι καμπύλες διάσπασης που φαίνονται στα Σχήματα 4.1 και 4.2.



Σχήμα 4.1 Καμπύλη διάσπασης του SeGalNAc όπου φαίνονται οι εντάσεις των προϊόντων ιόντων συνάρτηση της ενέργειας πρόσκρουσης (ο χαρακτηρισμός των προϊόντων ιόντων παρουσιάζεται στο Σχήμα 5.3).



Σχήμα 4.2 Καμπύλη διάσπασης του SeGluNAc όπου φαίνονται οι εντάσεις των προϊόντων ιόντων συνάρτηση της ενέργειας πρόσκρουσης (ο χαρακτηρισμός των προϊόντων ιόντων παρουσιάζεται στο Σχήμα 5.3).

Από τις καμπύλες διάσπασης των σεληνοσακχάρων SeGalNAc και SeGluNAc προκύπτουν τα οι βέλτιστες συνθήκες διάσπασης (Πίνακας 4.1).

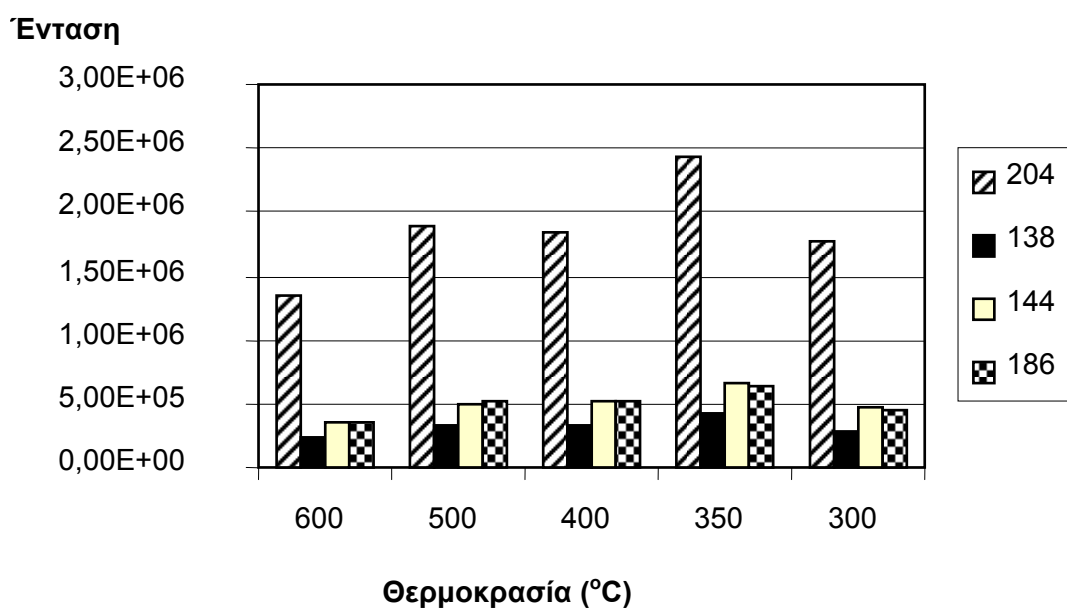
Πίνακας 4.1 Χαρακτηριστικά προϊόντα ιόντα των σεληνοσακχάρων SeGalNAc και SeGluNAc με τις αντίστοιχες ενέργειες διάσπασης στις οποίες εμφανίζουν μέγιστη ένταση.

Προϊόντα Ιόντα (m/z)	SeGalNAc Ενέργεια διάσπασης(eV)	SeGluNAc Ενέργεια διάσπασης(eV)
m/z 96	40	40
m/z 138	20	20
m/z 144	20	20
m/z 186	20	10
m/z 204	10	10

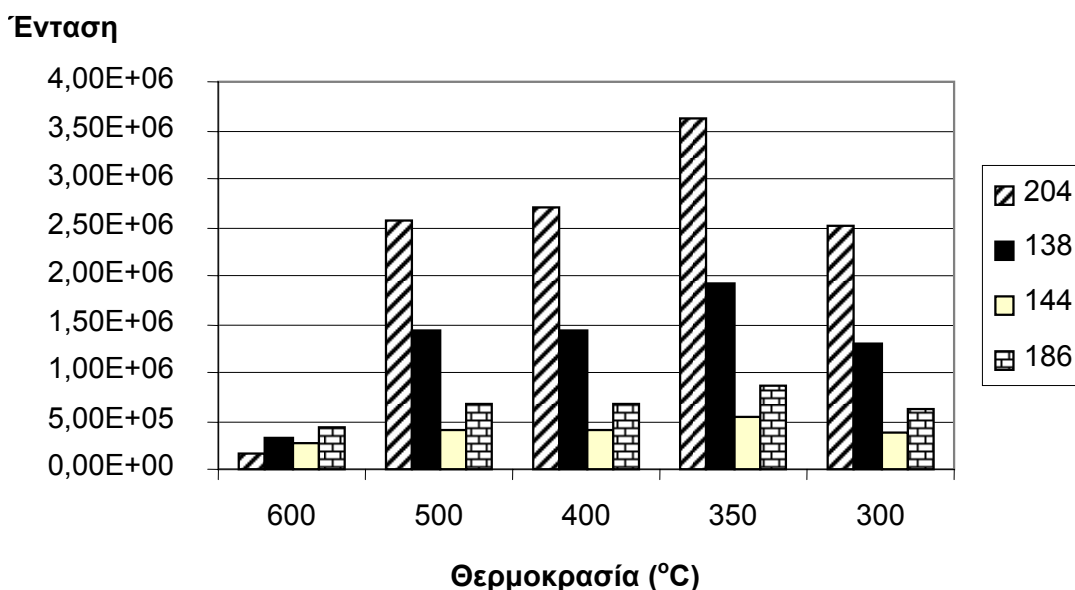
Από τις καμπύλες διάσπασης διαπιστώθηκε ότι τα πρωτονιομένα σεληνοσάκχαρα διασπώνται στην κυψελίδα πρόσκρουσης κατά τον ίδιο τρόπο είτε παράγονται με

ηλεκτροψεκάσμο είτε με χημικό ιονισμό σε ατμοσφαιρική πίεση. Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει από τις καμπύλες διάσπασης των ενώσεων που καταγράφηκαν αφού και με τις δύο μεθόδους ιονισμού τα πιο έντονα προϊόντα ιόντα ήταν αυτά με m/z 96, 138, 144 και 204. Τα θραύσματα αυτά σχηματίζονται με μέγιστη ένταση σε παραπλήσιες ενέργειες πρόσκρουσης. Έτσι λοιπόν με τη μέθοδο SRM στο APCI παρακολουθούνται οι εξής χαρακτηριστικές αντιδράσεις με τις αντίστοιχες ενέργειες διάσπασης και για τα δυο σεληνοσάκχαρα: 300→204 (10eV), 300→144 (20eV), 300→138 (20eV), 300→186 (20eV). Στην πηγή ιονισμού δεν εφαρμόστηκε ενέργεια επιτάχυνσης (source CID = 0 V).

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση της ευαισθησίας της μεθόδου SRM και για τα δύο πρότυπα σεληνοσάκχαρα ως προς την θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιείτε το APCI. Τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού παρουσιάζονται στα Σχήματα 4.3 και 4.4. Βέλτιστη θερμοκρασία και για τα δυο σεληνοσάκχαρα ήταν 350 °C.



Σχήμα 4.3 Ένταση προϊόντων ιόντων συνάρτηση της θερμοκρασίας του συστήματος APCI για πρότυπο SeGalNAc (100 ppb Se).

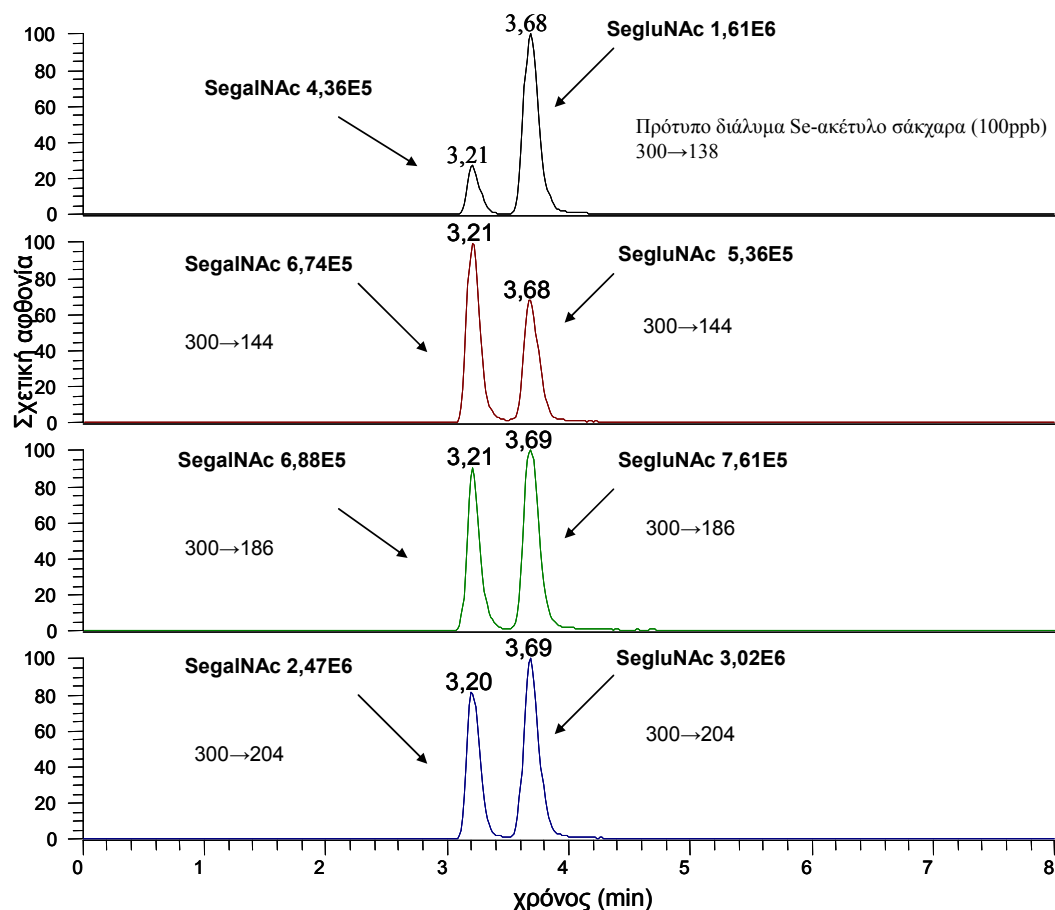


Σχήμα 4.4 Ένταση προϊόντων ιόντων συνάρτηση της θερμοκρασίας του συστήματος APCI για το διάλυμα SeGluNAc (100 ppb Se).

4.1.1 Ποιοτικοί Δείκτες για την Ταυτοποίηση Σεληνοσακχάρων με την Τεχνική HPLC-APCI-MS/MS με Παρακολούθηση Επιλεγμένων Αντιδράσεων

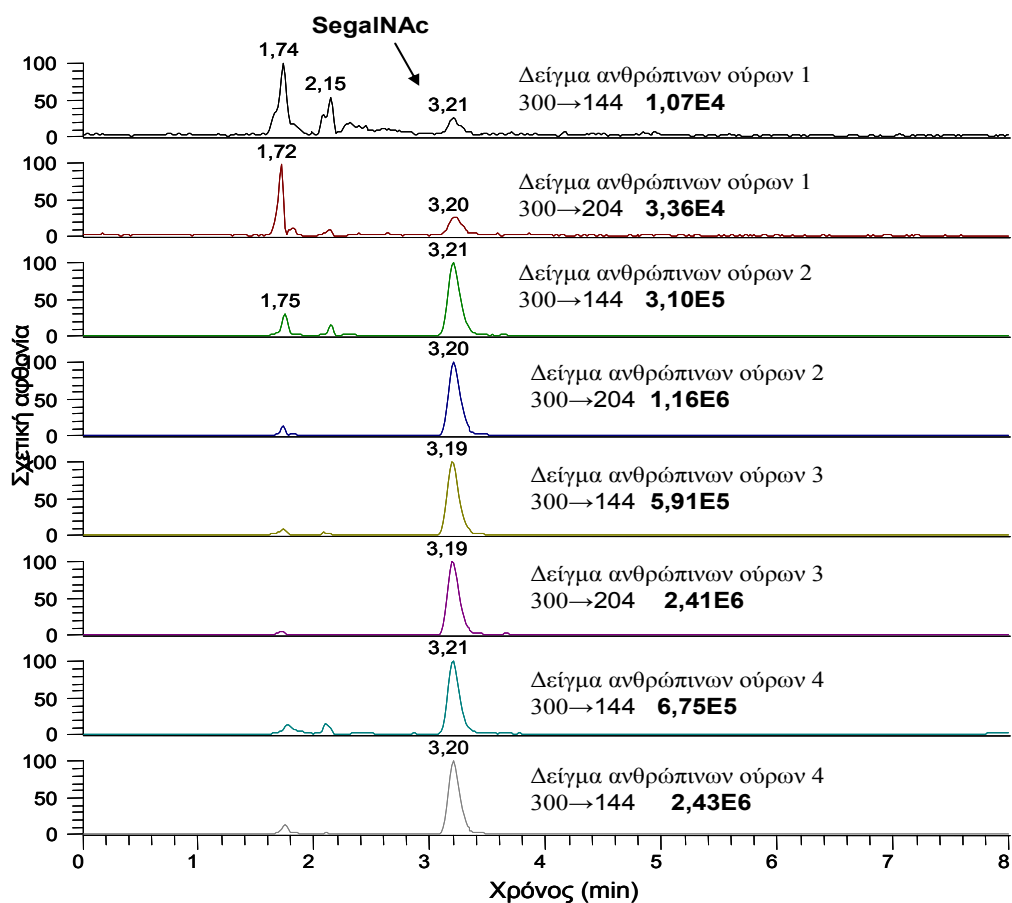
Ο πρώτος ποιοτικός δείκτης ταυτοποίησης που μελετάτε σχετίζεται με τον χρωματογραφικό διαχωρισμό των σεληνοσακχάρων. Με τη μέθοδο παρακολούθησης επιλεγμένων αντιδράσεων παρατηρούνται τα ίδια προϊόντα ιόντα και για τα δύο σεληνοσάκχαρα επομένως η μεθοδολογία αυτή δεν είναι ικανή να τα ξεχωρίσει. Για αυτό είναι αναγκαίος ο διαχωρισμός τους με HPLC πριν εισέλθουν στην πηγή APCI. Με την χρωματογραφική μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε παρατηρήθηκαν οι εξής χρόνοι κατακράτησης για καθένα από τα δύο σεληνοσάκχαρα: SeGalNAc με $t_R = 3.21$ min και SeGluNAc με $t_R = 3.68$ min. Το χρωματογράφημα του Σχήματος 4.5 το οποίο καταγράφηκε κατά την ανάλυση πρότυπου διαλύματος σεληνοσακχάρων, συγκέντρωσης 100 ppb Se για το καθένα, δείχνει ικανοποιητικό διαχωρισμό. Στο χρωματογράφημα φαίνονται οι

χαρακτηριστικοί χρόνοι κατακράτησης καθώς και οι εντάσεις των προϊόντων ιόντων των επιλεγμένων αντιδράσεων που παρακολουθούνται.



Σχήμα 4.5 Χρωματογραφήματα που καταγράφηκαν κατά την ανάλυση πρότυπων διαλυμάτων σεληνοσακχάρων συγκέντρωσης 100 ppb Se με εφαρμογή της μεθόδου SRM. Χαρακτηριστικές αντιδράσεις που καταγράφηκαν 300→138 (20eV), 300→144 (20eV), 300→186 (20eV), 300→204 (10eV). Στο χρωματογράφημα δίπλα σε κάθε κορυφή αναγράφεται και η απόλυτη έντασή της.

Στη συνέχεια εφαρμόστηκε η παραπάνω χρωματογραφική μέθοδος με SRM για την ανάλυση δειγμάτων ανθρώπινων ούρων τόσο μετά την χορήγηση συμπληρώματος Se (200 μg Se στο κάθε δισκίο συμπληρώματος) όσο και χωρίς χορήγηση συμπληρώματος. Με τη μέθοδο που αναπτύχθηκε ήταν εφικτή η ανίχνευση της ένωσης SeGalNAc στα ανθρώπινα ούρα.



Σχήμα 4.6 Χρωματογραφήματα που καταγράφηκαν κατά την ανάλυση ανθρώπινων ούρων μετά την χορήγηση διατροφικού συμπληρώματος Se 200 μg (δείγματα 2, 3, 4) αλλά και χωρίς τη χορήγηση συμπληρώματος (δείγμα 1). Ανίχνευση έγινε με την μέθοδο HPLC-APCI-MS/MS με SRM.

Σύμφωνα με το χρωματογράφημα στο Σχήμα 4.5 η παρατηρούμενη ένταση για το SeGalNAc και SeGluNAc με τη τεχνική του APCI είναι υψηλότερη σε σχέση με την τεχνική του ES, με αποτέλεσμα η τεχνική APCI να παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία (Πίνακας 4.2).

Πίνακας 4.2 Εντάσεις χαρακτηριστικών αντιδράσεων 300→138 (20eV), 300→144 (20eV), 300→186 (20eV), 300→204 (10eV) που καταγράφηκαν κατά την ανάλυση πρότυπου διαλύματος 100 ppb Se με τις τεχνικές APCI και ES.

Ένωση	Αντιδράσεις Παρακολούθησης	Ένταση ES	Ένταση APCI
Πρότυπο διάλυμα SegalNAc 100ppb Se	300→138	1,03E+05	4,36E+05
	300→144	1,59E+05	6,74E+05
	300→186	1,50E+05	6,88E+05
	300→204	5,68E+05	2,47E+06
Πρότυπο διάλυμα SegluNAc 100ppb Se	300→138	8,74E+05	1,61E+06
	300→144	2,56E+05	5,36E+05
	300→186	3,84E+05	7,61E+05
	300→204	1,62E+06	3,02E+06

Ο δεύτερος ποιοτικός δείκτης ταυτοποίησης της μεθόδου παρακολούθησης επιλεγμένων αντιδράσεων είναι ο υπολογισμός των αναλογιών των εντάσεων των προϊόντων ιόντων τόσο στα πρότυπα διαλύματα όσο και στα ανθρώπινα ούρα για την ένωση SeGalNAc (Πίνακας 4.3). Η συμφωνία μεταξύ των αναλογιών που βρέθηκαν για τα πρότυπα διαλύματα SeGalNAc και αυτών που καταγράφηκαν στα δείγματα ανθρώπινων ούρων συνηγορούν στην ύπαρξη SeGalNAc στα ανθρώπινα ούρα. Μόνο στο δείγμα 5 βρέθηκε κάποια παρεμπόδιση στο προϊόν ιον m/z 186 με αποτέλεσμα να απορριφθεί το συγκεκριμένο ιον από τη μέθοδο.

Πίνακας 4.3 Αναλογίες εντάσεων προϊόντων ιόντων της ένωσης SeGalNAc σε πρότυπα διαλύματα και σε δείγματα ανθρώπινων ούρων κατόπιν χορήγησης συμπληρώματος Se που περιείχε 200μg Se (δείγματα 2,3,4,5) και χωρίς τη χορήγηση συμπληρώματος (δείγμα 1).

Αναλογίες θραυσμάτων	m/z138/144	m/z 138/204	m/z 138/186	m/z144/204	m/z186/144	m/z186/204
Δείγμ.Απιον.Νερό (n=5)	0,64 ± 0,01	0,17 ±0,004	0,66±0,02	0,27 ± 0,01	1,01 ± 0,02	0,27±0,01
Δείγμα Ανθρ.Ούρων 1	0,57	0,14	0,56	0,25	1,05	0,27
Δείγμα Ανθρ.Ούρων 2	0,65	0,16	0,67	0,25	1,03	0,26
Δείγμα Ανθρ.Ούρων 3	0,66	0,18	0,59	0,27	1,12	0,30
Δείγμα Ανθρ.Ούρων 4	0,65	0,18	0,60	0,28	1,09	0,30
Δείγμα Ανθρ.Ούρων 5	0,65	0,18	0,19	0,28	3,41	0,95

4.1.2 Ποσοτικοί Δείκτες για τον Προσδιορισμό Σεληνοσακχάρων με την Τεχνική HPLC-APCI-MS/MS / Μέθοδος Παρακολούθησης Επιλεγμένων Αντιδράσεων (Selected Reaction Monitoring)

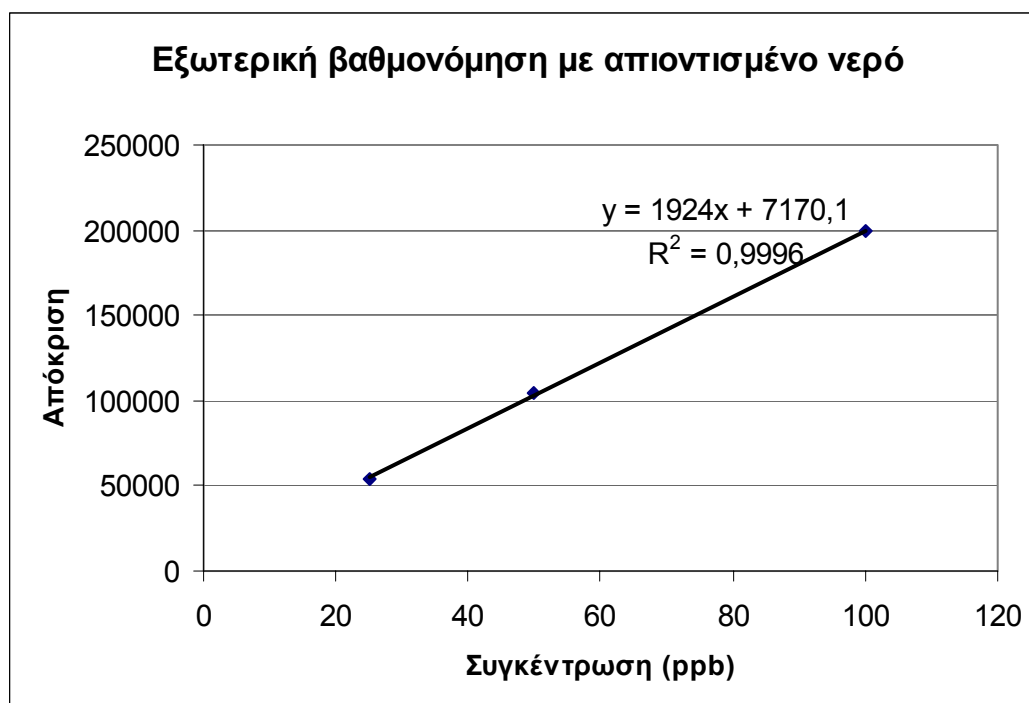
Στους ποσοτικούς δείκτες υπάγονται τα όρια ανίχνευσης, τα οποία υπολογίστηκαν για τα SeGalNAc και SeGluNAc και δίνονται στον Πίνακα 4.4.

Πίνακας 4.4 Όρια ανίχνευσης (3 φορές την τυπική απόκλιση 7 μετρήσεων τυφλών δειγμάτων) για κάθε προϊόν ιον των SeGalNAc και SeGluNAc χρησιμοποιώντας την τεχνική HPLC-APCI-MS/MS.

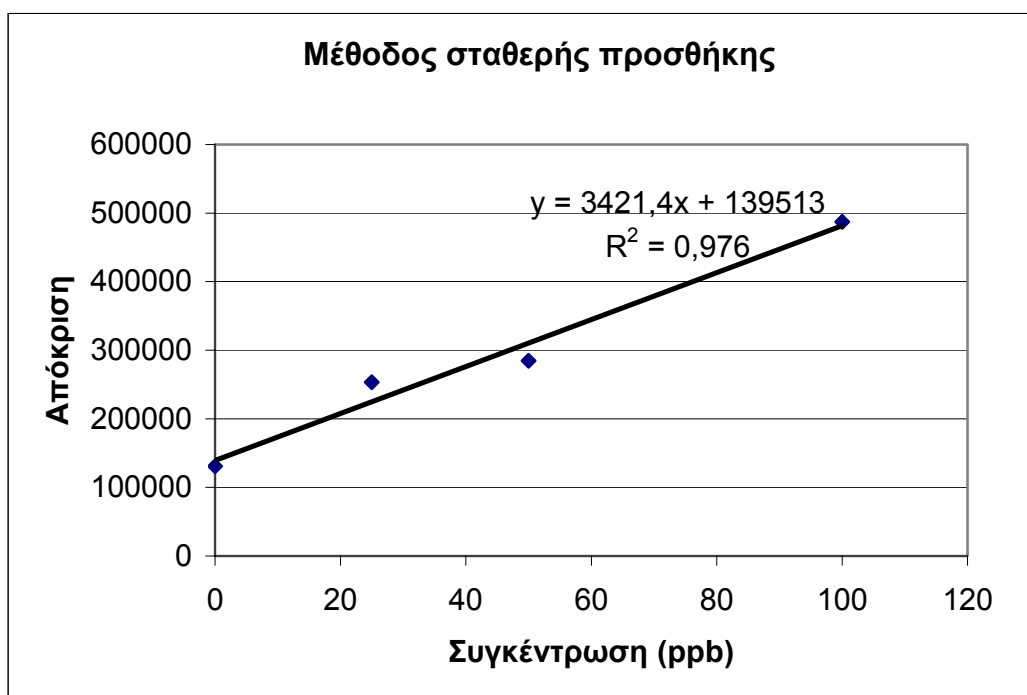
SeGalNAc και SeGluNAc				
Προϊόντα Ιόντα (m/z)	204	144	138	186
Όριο Ανίχνευσης (ppb)	0,006	0,01	0,02	0,01

Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο παρακολούθησης επιλεγμένων αντιδράσεων πραγματοποιήθηκε ποσοτική ανάλυση των δειγμάτων ούρων με εξωτερική βαθμονόμηση και

με τη μέθοδο προσθήκης γνωστής ποσότητας. Με τη μέθοδο της εξωτερικής βαθμονόμησης προκύπτει η καμπύλη βαθμονόμησης του Σχήματος 4.7. Με βάση την καμπύλη αυτή υπολογίζεται η συγκέντρωση του σεληνοσακχάρου SeGalNAc στα δείγματα ούρων. Επίσης από τη μέθοδο προσθήκης γνωστής ποσότητας προκύπτει η καμπύλη του Σχήματος 4.8 σύμφωνα με την οποία μπορούμε να υπολογίσουμε και πάλι την συγκέντρωση του σεληνοσακχάρου SeGalNAc στα δείγματα ούρων απουσία μη-φασματοσκοπικών παρεμποδίσεων. Στον Πίνακα 4.5 φαίνονται οι ποσότητες σε ppb της ένωσης SeGalNAc που προσδιορίστηκαν στα ανθρώπινα ούρα με εφαρμογή των παραπάνω μεθόδων.



Σχήμα 4.7 Εξωτερική καμπύλη βαθμονόμησης χρησιμοποιώντας πρότυπα διαλύματα SeGalNAc συγκέντρωσης 25, 50, 100 ppb Se.



Σχήμα 4.8 Καμπύλη προσθήκης γνωστής ποσότητας SeGalNAc σε δείγματα ανθρώπινων ούρων.

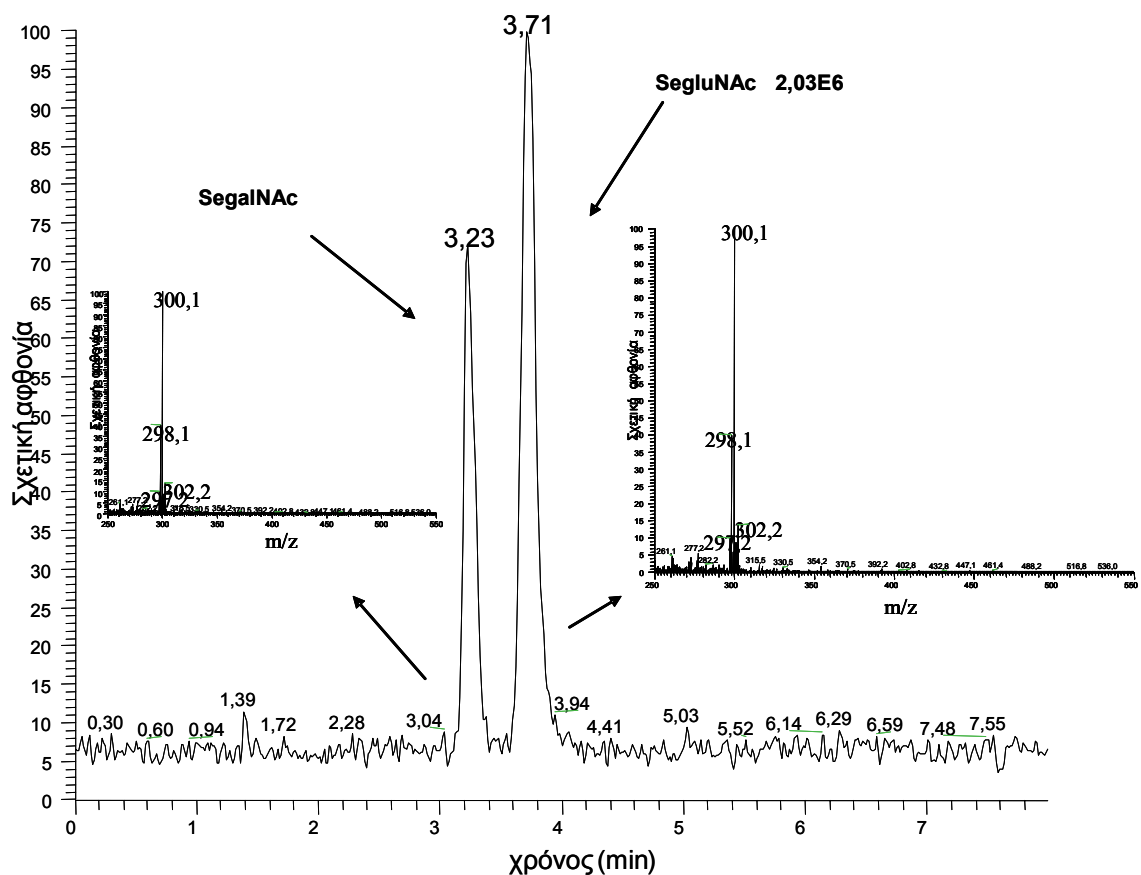
Πίνακας 4.5 Συγκεντρώσεις (ppb Se) της ένωσης SeGalNAc που βρέθηκαν στα δείγματα ανθρώπινων ούρων με εξωτερική βαθμονόμηση και με την μέθοδο της προσθήκης σταθερής ποσότητας. Τα δείγματα ούρων με το συμπλήρωμα ήταν τα ίδια.

Προσδιορισμός SeGalNAc με Εξωτερική Βαθμονόμηση (ng Se ανά mL ούρων)					
Δείγματα	Αντιδράσεις SRM (m/z)				Μέσος Όρος
	300→138	300→144	300→186	300→204	
Ούρα χωρίς συμπλήρωμα	36 ± 5	40 ± 4	42 ± 2	42 ± 4	40 ± 8
Ούρα με συμπλήρωμα	49 ± 4	48 ± 4	49 ± 4	51 ± 4	49 ± 2
Προσδιορισμός SeGalNAc με Προσθήκη Γνωστής Ποσότητας (ng Se ανά mL ούρων)					
Δείγματα	SRM transitions monitored (m/z)				Μέσος Όρος
	300→138	300→144	300→186	300→204	
Ούρα με συμπλήρωμα	66 ± 9	62 ± 4	59 ± 9	63 ± 10	62 ± 4

Επειδή η μήτρα δείγματος ανθρώπινων ούρων παρουσιάζει σημαντική διαφοροποίηση από δείγμα σε δείγμα είναι σημαντικό να εφαρμοστεί μεθοδολογία η οποία να επιτρέπει διόρθωση για τυχόν φαινόμενα μήτρας. Για το λόγο αυτό προτείνουμε την εφαρμογή της μεθόδου προσθήκης γνωστής ποσότητας, αν και είναι πιο χρονοβόρα.

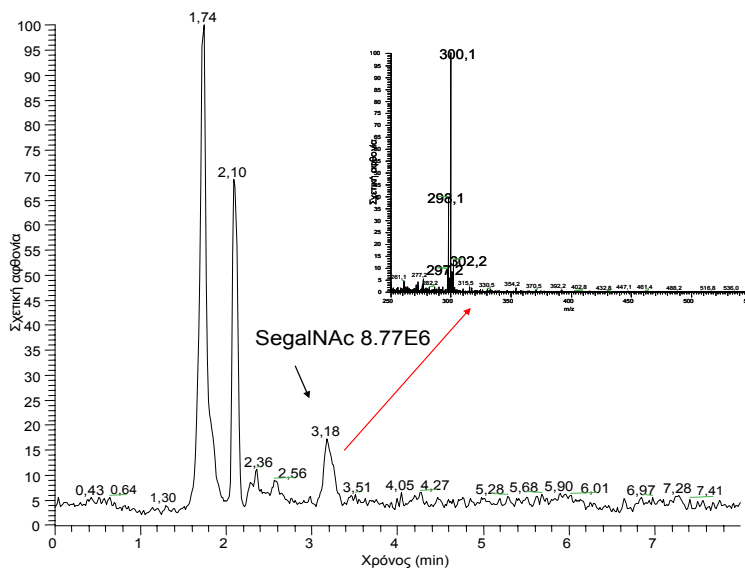
4.2 Εφαρμογή της Μεθόδου Σάρωσης για την Ανίχνευση της Απώλειας Ουδέτερων Ομάδων (Neutral Loss Scan) για την Ανίχνευση και Ταυτοποίηση των Σεληνοσακχάρων στα Ανθρώπινα Ούρα με την Τεχνική HPLC-APCI/MS/MS.

Στη συνέχεια αναπτύχθηκε και μέθοδος σάρωσης απώλειας ουδέτερων ομάδων. Ο τρόπος που λαμβάνει χώρα η συγκεκριμένη μέθοδος σάρωσης συζητήθηκε διεξοδικά στη παράγραφο 1.6.4. Πιο συγκεκριμένα με τη μέθοδο που αναπτύξαμε ανιχνεύονται οι ενώσεις που χάνουν το ουδέτερο κομμάτι με 96 amu κατά την διάσπασή τους στην κυψελίδα πρόσκρουσης. Στη περίπτωση των σεληνοσακχάρων το 96 amu αντιστοιχεί στην απώλεια HSeCH_3 . Η ίδια χρωματογραφική μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στην περίπτωση της ανάλυσης SRM χρησιμοποιήθηκε και εδώ. Αρχικά εφαρμόστηκε σε πρότυπο διάλυμα των σεληνοσακχάρων συγκέντρωσης 100 ppb και στη συνέχεια στα δείγματα ούρων. Σημειώνεται ότι τα αποτελέσματα της ήταν ικανοποιητικά σε σχέση με τα αντίστοιχα αποτελέσματα της σάρωσης απώλειας ουδέτερου που καταγράφηκαν με την τεχνική του ηλεκτροψεκασμού όπου η χαμηλή ευαισθησία δεν επέτρεψε την ανίχνευση σεληνοσακχάρων στα δείγματα ούρων.



Σχήμα 4.9 Χρωματογράφημα που καταγράφηκε κατά την ανάλυση πρότυπου διαλύματος που περιείχε το κάθε σεληνοσακχάρα σε 100 ppb Se με σάρωση απώλειας ουδέτερου κομματιού 96 amu. Στα ένθετα φαίνονται τα φάσματα μάζας των πρόδρομων ιόντων.

Η επιβεβαίωση της παρουσίας ενώσεων Se στις κορυφές του χρωματογράφηματος του Σχήματος 4.9 γίνεται από το φάσμα μάζας των πρόδρομων ιόντων το οποίο περιέχει κορυφές που αντιστοιχούν στις ισοτοπικές αναλογίες του Se. Εφαρμογή της μεθόδου σάρωσης απώλειας ουδέτερων κομματιών σε δείγματα ανθρώπινων ούρων δίνει στο χρωματογράφημα του Σχήματος 4.10, όπου γίνεται η ανίχνευση της ένωσης SeGalNAc .

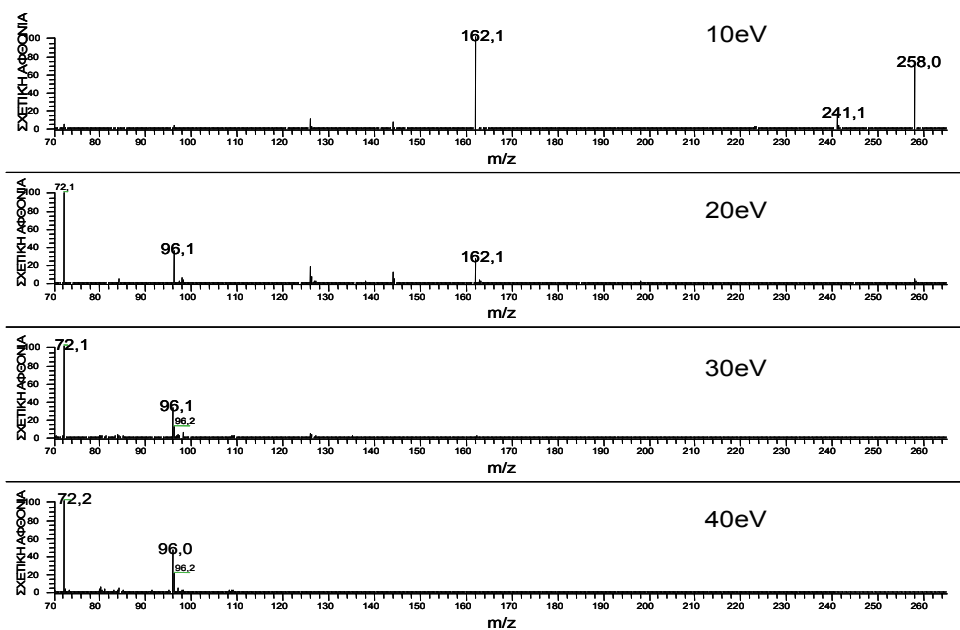


Σχήμα 4.10 Χρωματογράφημα που καταγράφηκε κατά την ανάλυση δείγματος ανθρώπινων ούρων για την ανίχνευση σεληνοσακχάρων με τη μέθοδο της απώλειας ουδέτερων ομάδων. Γίνεται, η επιβεβαίωση της παρουσίας του SeGalNAc από το φάσμα μάζας όπου φαίνεται το ιστοτοπικό «αποτύπωμα» του Se.

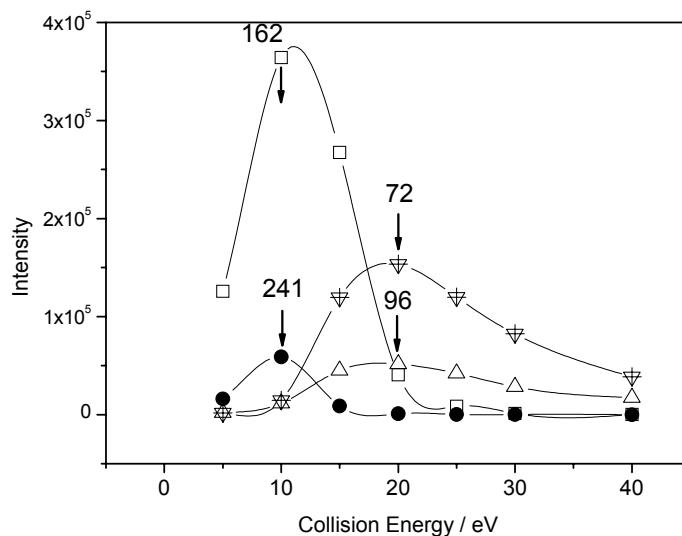
4.3 Ανάπτυξη Μεθόδου SRM για την Ανίχνευση SeGalNH₂

Αναφέρθηκε πρόσφατα ότι και η SeGalNH₂ εντοπίζεται ως μεταβολίτης του Se στα ανθρώπινα ούρα. Στην παρούσα εργασία παρουσιάζεται επίσης η ανάπτυξη μεθοδολογίας SRM για την ανίχνευσή της ένωσης αυτής στα ανθρώπινα ούρα.

Κατά την διαδικασία ανίχνευσης χρησιμοποιήθηκε η ίδια σύσταση κινητής φάσης με την προηγούμενη μέθοδο αλλά επίσης προστέθηκε στήλη κατιονανταλλαγής γιατί η ένωση αυτή δεν κατακρατείται σε στήλη αντίστροφης φάσης, ενώ εμφανίζεται θετικά φορτισμένη σε pH κάτω από 9. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος σάρωσης επιλεκτικών αντιδράσεων γι' αυτό και αρχικά μελετήθηκαν οι αντιδράσεις διάσπασης της ένωσης. Τα φάσματα μάζας των προϊόντων ιόντων που προέκυψαν δίνονται στο Σχήμα 4.11. Από τη παραπάνω διαδικασία προέκυψαν οι παρακάτω καμπύλες διάσπασης.



Σχήμα 4.11 Φάσματα μάζας προϊόντων ιόντων της πρωτονιωμένης SeGalNH₂ (m/z 258) για ενέργειες διάσπασης 10, 20, 30 και 40 eV.



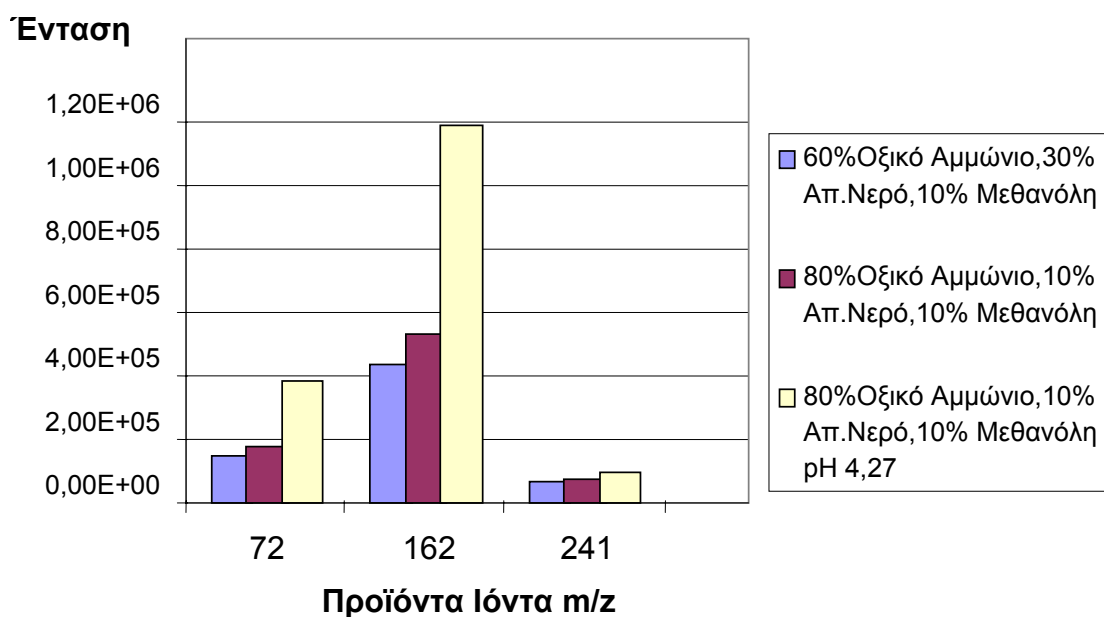
Σχήμα 4.12 Καμπύλη διάσπασης του SeGalNH₂ (m/z 258) όπου φαίνονται οι εντάσεις των προϊόντων ιόντων συνάρτηση της ενέργειας πρόσκρουσης.

Από την καμπύλη διάσπασης του Σχήματος 4.12 παίρνουμε πληροφορίες για τις βέλτιστες συνθήκες που απαιτούνται για την παρακολούθηση επιλεγμένων αντιδράσεων. Στον Πίνακα 4.6 αναγράφονται συγκεντρωτικά οι αντιδράσεις και συνθήκες παρακολούθησής τους.

Πίνακας 4.6 Τα επικρατέστερα θραύσματα με χαρακτηριστική ενέργεια διάσπασης που αντιστοιχεί στο βέλτιστο σχηματισμό τους.

Προϊόντα Ιόντα (m/z)	Ενέργεια CID (eV)
162	10
72	20
241	10
96	20

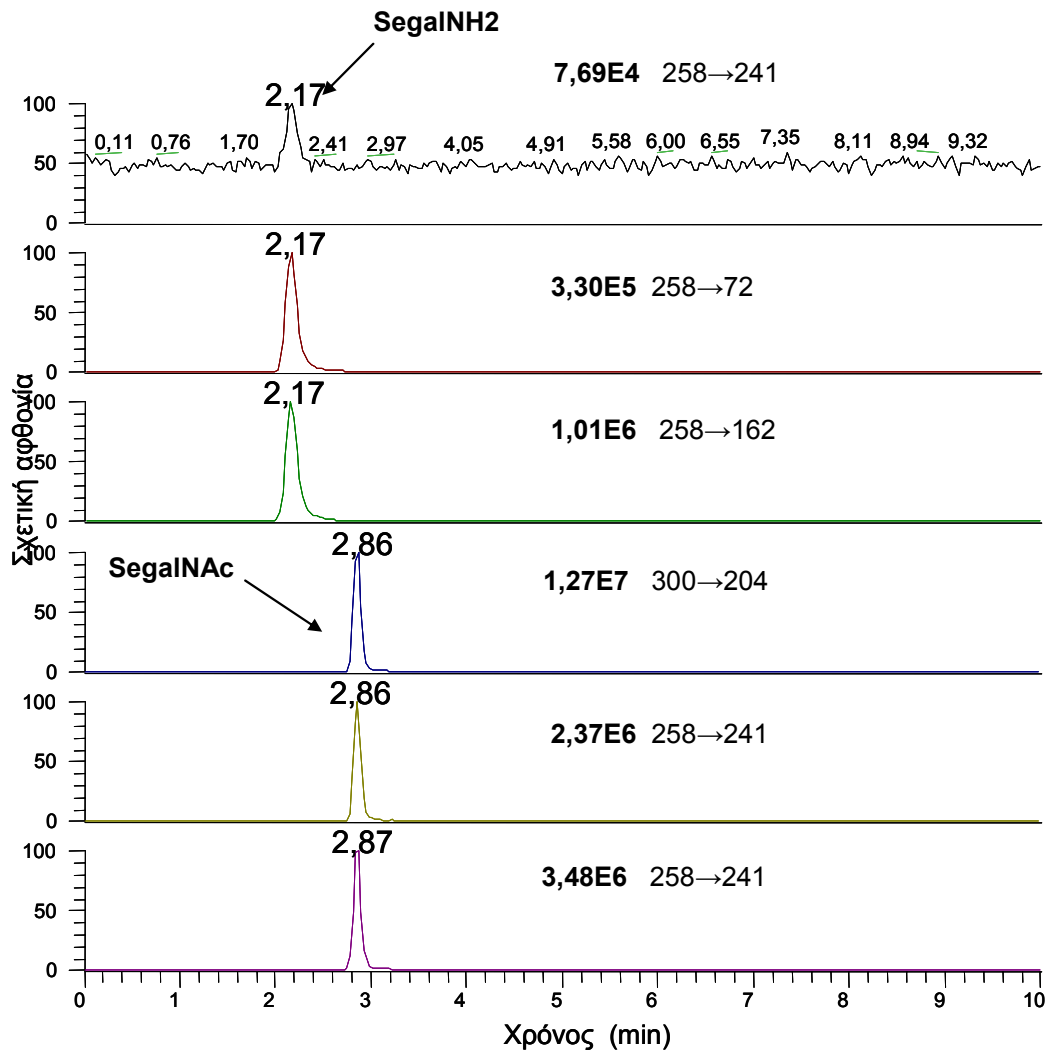
Σημειώνεται ότι η αντίδραση m/z 258 \rightarrow m/z 96 δεν παρακολουθείται με τη μέθοδο SRM που αναπτύχθηκε εξαιτίας της χαμηλής έντασης που παρουσιάζει. Επίσης για την ανάλυση της ένωσης SeGalNH_2 χρησιμοποιήθηκε συνδυαστική χρωματογραφία αντίστροφης φάσης και κατιονανταλλαγής με στήλη C_{18} και προστήλες PRP X800 με κινητή φάση 80% οξικό αμμώνιο 80 mM pH 4,3, 10% μεθανόλη και 10% απιονισμένο νερό. Προκειμένου τα βρεθεί η κινητή φάση που δίνει την υψηλότερη ένταση με τη συνδυαστική χρωματογραφία αντίστροφης φάσης και κατιονανταλλαγής έγιναν δοκιμές διάφορων συνδυασμών της κινητής φάσης. Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.13.



Σχήμα 4.13 Βελτιστοποίηση της σύστασης κινητής φάσης για μέγιστη ένταση προϊόντων ιόντων για τις αντιδράσεις m/z 258 \rightarrow m/z 162 (10eV), m/z 258 \rightarrow m/z 72 (20eV), m/z 258 \rightarrow m/z 241 (10eV).

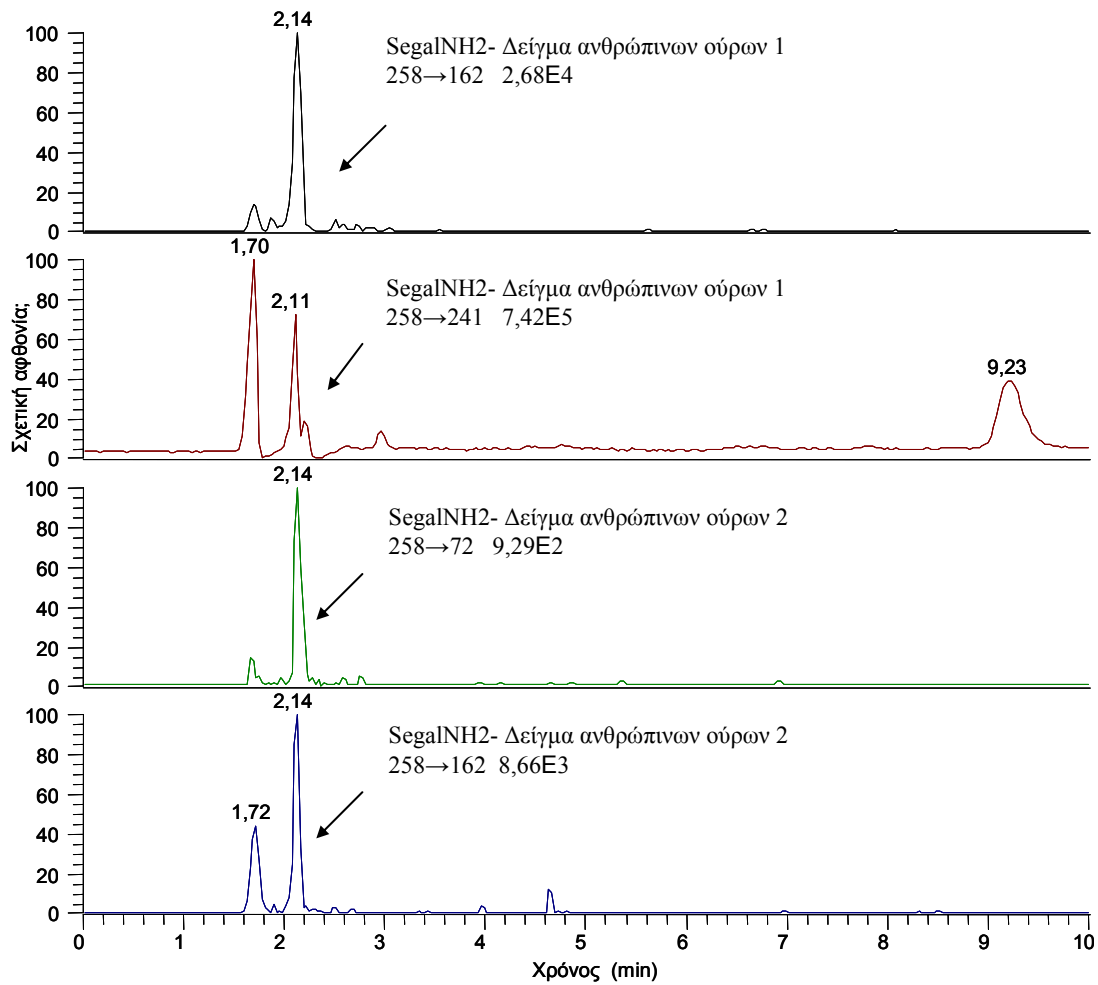
4.3.1 Εφαρμογή της Μεθόδου Παρακολούθησης Επιλεγμένων Αντιδράσεων (Selected Reaction Monitoring) με την Τεχνική HPLC-APCI/MS/MS για την Ανίχνευση της SeGalNH₂ στα Ανθρώπινα Ούρα.

Η εφαρμογή της συνδυαστικής χρωματογραφίας με τη τεχνική HPLC-APCI/MS/MS έφερε ικανοποιητικά αποτελέσματα. Στο Σχήμα 4.14 φαίνεται η ανίχνευση της SeGalNH₂ στο πρότυπο διάλυμα. Σημειώνεται ότι η διαδικασία σύνθεσης της ένωσης SeGalNH₂ είχε σαν αποτέλεσμα την ύπαρξη της ένωσης SeGalNAc στο πρότυπο διάλυμα, η οποία και παρατηρείται με τη μέθοδο παρακολούθησης SRM.



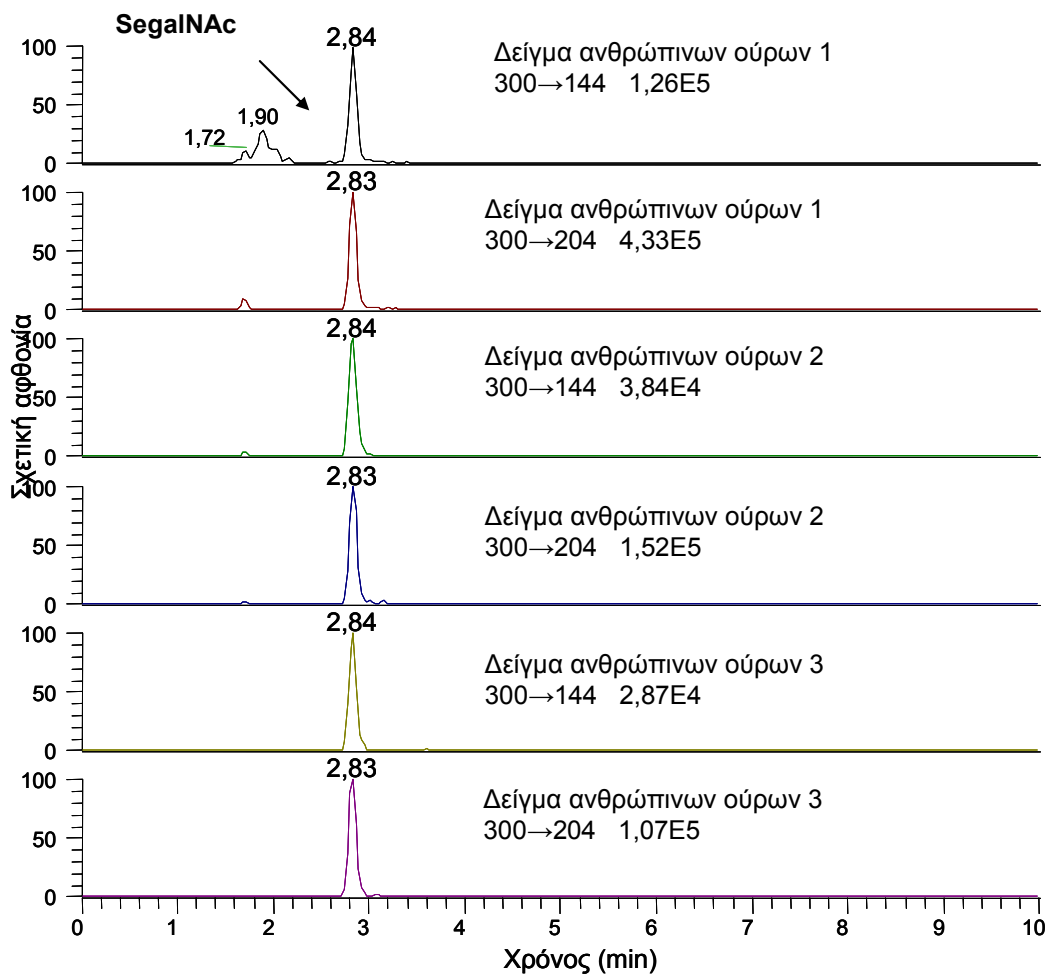
Σχήμα 4.14 Χρωματογραφήματα που καταγράφηκαν με SRM κατά την ανάλυση πρότυπου διαλύματος SeGalNH₂ για τις αντιδράσεις 258→162 (10eV), 258→72 (20eV) και 258→241 (10eV).

Εφαρμογή της μεθόδου στην ανάλυση δειγμάτων ούρων έδωσε τα χρωματογραφήματα που παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.15 όπου φαίνεται και η ύπαρξη της ένωσης SeGalNH₂.



Σχήμα 4.15 Χρωματογραφήματα που καταγράφηκαν κατά την ανάλυση δειγμάτων ανθρώπινων ούρων, οι αντιδράσεις που παρακολουθούνται 258→162 (10eV), 258→72 (20eV), 258→241 (10eV).

Επίσης με την συνδυαστική χρωματογραφική μέθοδο ανιχνεύτηκε και πάλι η ένωση SeGalNAc στα ανθρώπινα ούρα όπως φαίνεται στο χρωματογράφημα του Σχημάτος 4.16.



Σχήμα 4.16 Χρωματογραφήματα που καταγράφηκαν κατά την ανάλυση δειγμάτων ανθρώπινων ούρων για τις αντιδράσεις 300→138 (20eV), 300→144 (20eV), 300→186 (10eV), 300→204 (10eV).

Ποιοτική παράμετρος της ταυτοποίησης SeGalNac στα ανθρώπινα ούρα ήταν ο υπολογισμός των αναλογιών των εντάσεων των προϊόντων ιόντων τόσο στα πρότυπα διαλύματα όσο και στα δείγματα ανθρώπινων ούρων. Διαπιστώνεται ότι οι τιμές των αναλογιών των δειγμάτων των ανθρώπινων ούρων είναι πολύ κοντά στις αντίστοιχες τιμές των πρότυπων διαλυμάτων γεγονός που επιβεβαιώνει την ικανοποιητική ανίχνευση του SegalNac στα ανθρώπινα ούρα. Τα παραπάνω αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 4.7.

Πίνακας 4.7 Αναλογίες θραυσμάτων αντιδράσεων διάσπασης 300→138 (20eV), 300→144 (20eV), 300→186 (20eV), 300→204 (10eV) που καταγράφηκαν με τη συνδυαστική χρωματογραφική μέθοδο.

	m/z 138/144	m/z 138/204	m/z 144/204
Πρότυπο SeGalNAc (n=5)	0,7	0,19	0,28
Δείγμα Ανθρ. Ούρων 1	0,66	0,2	0,3
Δείγμα Ανθρ. Ούρων 2	0,58	0,17	0,30
Δείγμα Ανθρ. Ούρων 3	0,63	0,21	0,33
Δείγμα Ανθρ. Ούρων 4	0,61	0,16	0,27
Δείγμα Ανθρ. Ούρων 5	0,67	0,18	0,28
Δείγμα Ανθρ. Ούρων 6	0,63	0,18	0,29
Δείγμα Ανθρ. Ούρων 7	0,74	0,19	0,25

4.4 Συμπεράσματα

Η τεχνική του χημικού ιονισμού ατμοσφαιρικής πίεσης πρόκειται για μια τεχνική αρκετά ανθεκτική για διάφορες συνθήκες κινητής φάσης. Οι βελτιστοποιήσεις που πραγματοποιήθηκαν προκειμένου να αναπτυχθεί αφορούσαν κυρίως τη θερμοκρασία στην οποία επιτυγχάνεται χημικός ιονισμός. Σημειώνεται ότι παρόλο που η μέθοδος που παρουσιάστηκε στη παρούσα εργασία με την τεχνική HPLC-ES-MS/MS έφερε ικανοποιητικά αποτελέσματα για τον προσδιορισμό και την ανίχνευση των σεληνοσακχάρων στα ανθρώπινα ούρα η μέθοδος με τη τεχνική HPLC-APCI-MS/MS έρχεται να τη βελτιώσει σημαντικά για τον προσδιορισμό των σεληνοσακχάρων στα ανθρώπινα ούρα, αφού παρουσιάζει υψηλότερη ευαισθησία και σαφώς λιγότερες παρεμποδίσεις.

Πιο συγκεκριμένα αρχικά επιτεύχθηκε ικανοποιητικότερος διαχωρισμός των ισομερών ενώσεων SeGalNAc και SeGluNAc με χρωματογραφία αντίστροφης φάσης με

στήλη C₁₈ (R=1,7) και κινητή φάση σύστασης 50% οξικό αμμώνιο 80 mM, 10% απιονισμένο νερό και 40% μεθανόλη. Στη συνέχεια ανιχνεύτηκε και προσδιορίστηκε η ένωση SeGalNAc σε δείγματα ακατέργαστων ανθρώπινων ούρων. Επιπλέον, με την τεχνική HPLC-APCI-MS/MS επιτεύχθηκε η ανίχνευση και του σεληνοσακχάρου SeGalNH₂ στα ανθρώπινα ούρα. Το γεγονός αυτό ενισχύει την ευαισθησία της αναλυτικής μεθόδου με την συγκεκριμένη τεχνική σε σχέση με την τεχνική HPLC-ES-MS/MS. Ακόμη, η ευαισθησία της αναλυτικής μεθόδου με την τεχνική HPLC-APCI-MS/MS ενισχύεται από τα χαμηλά όρια ανίχνευσής της. Έτσι εκτός από τη μέθοδο σάρωσης SRM λειτούργησε με επιτυχία και η μέθοδος σάρωσης απώλειας ουδέτερης ομάδος.

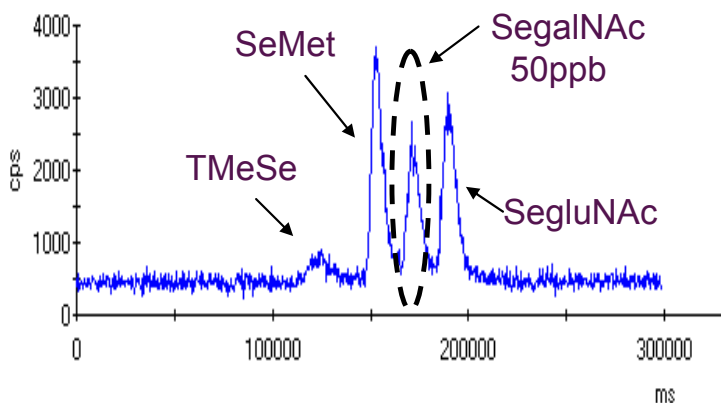
Τέλος, τα προηγούμενα ενισχύονται από τους ποιοτικούς δείκτες δηλαδή τις αναλογίες των εντάσεων των θραυσμάτων των αντιδράσεων που παρατηρούνται. Επιπλέον, η εφαρμογή των μεθόδων εξωτερικής βαθμονόμησης και προσθήκης γνωστής ποσότητας επιβεβαιώνει την ύπαρξη της SeGalNAc στα ανθρώπινα ούρα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Συμπληρωματικές Αναλυτικές Τεχνικές για την Αξιολόγηση των Μεθόδων Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC) με Διαδοχική Φασματομετρία Μάζας Χημικού Ιονισμού σε Ατμοσφαιρική Πίεση (APCI-MS/MS) και Ηλεκτροψεκασμού (ES-MS/MS)

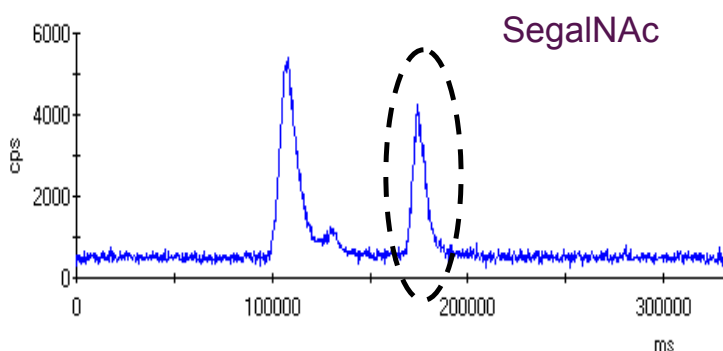
5.1 Ανάπτυξη της τεχνικής HPLC-ICP-MS για την Ταυτοποίηση και τον Προσδιορισμό των Σεληνοσακχάρων (SeGalNAc και SeGluNAc) στα Ανθρώπινα Ούρα

Τα αποτελέσματα της τεχνικής HPLC-ES-MS/MS επιβεβαιώθηκαν και με την χρήση της τεχνικής HPLC-ICP-MS. Στη συγκεκριμένη μελέτη αναλύθηκαν τόσο πρότυπα διαλύματα των σεληνοσακχάρων όσο και δείγματα ανθρώπινων ούρων. Στη διαδικασία ανάλυσης που περιγράφεται στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε η κινητή φάση και η στήλη που περιγράφονται στην παράγραφο 3.1.4. Έτσι, αρχικά αναλύθηκε πρότυπο διάλυμα ενώσεων σεληνίου συγκέντρωσης 50 ppb Se στο οποίο περιέχονται και τα σεληνοσάκχαρα (Σχήμα 5.1) και στη συνέχεια έγινε ανάλυση δειγμάτων ανθρώπινων ούρων για την ταυτοποίηση και προσδιορισμό της ένωσης SeGalNAc (Σχήμα 5.2) της οποίας η ύπαρξη στα ανθρώπινα ούρα διαπιστώθηκε με τις προηγούμενες τεχνικές. Σημειώνεται ότι στα χρωματογραφήματα που ακολουθούν φαίνεται το σήμα που αντιστοιχεί στο ισότοπο ^{78}Se το οποίο διαπιστώθηκε ότι δίνει υψηλότερη απόκριση.



Σχήμα 5.1 Χρωματογράφημα που καταγράφηκε κατά την ανάλυση πρότυπου διαλύματος ενώσεων σεληνίου TMeSe (τριμεθυλοσεληνικό ιόν), SeMet (σεληνομεθειονίνη), SeGalNac, SeGluNac για το ισότοπο ^{78}Se συγκέντρωσης 50 ppb Se.

Η ταυτοποίηση των σεληνοσακχάρων έγινε με σύγκριση των χρόνων κατακράτησης. Έτσι ο χρόνος κατακράτησης για το SeGalNac είναι 3.0 min (180 sec) (Σχήμα 5.1) τόσο στα πρότυπα διαλύματα όσο και στα δείγματα ανθρώπινων ούρων (Σχήμα 5.2), ενώ για την ένωση SeGluNac είναι 3.5 min (190 sec) στα πρότυπα διαλύματα. Το δείγμα ούρων, η ανάλυση του οποίου παρουσιάζεται στο Σχήμα 5.2 ήταν από εθελοντή που είχε λάβει διατροφικό συμπλήρωμα Se που περιείχε 200 μg Se. Η κορυφή στα 100 sec αντιστοιχεί σε περίσσεια ανόργανης μορφής Se προερχόμενη από το διατροφικό συμπλήρωμα.



Σχήμα 5.2 Χρωματογράφημα HPLC-ICP/MS για το ισότοπο ^{78}Se που καταγράφηκε κατά την ανάλυση δείγματος ανθρώπινων ούρων μετά τη χορήγηση συμπληρώματος Se 200 μg .

5.1.1 Ποσοτικός Προσδιορισμός Σεληνόσαςκάρων με την τεχνική HPLC-ICP-MS

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της εξωτερικής βαθμονόμησης καθώς και η μέθοδος προσθήκης γνωστής ποσότητας. Στον Πίνακα 5.1 συνοψίζονται τα αποτελέσματα από τις μεθόδους βαθμονόμησης που αναφέρθηκαν.

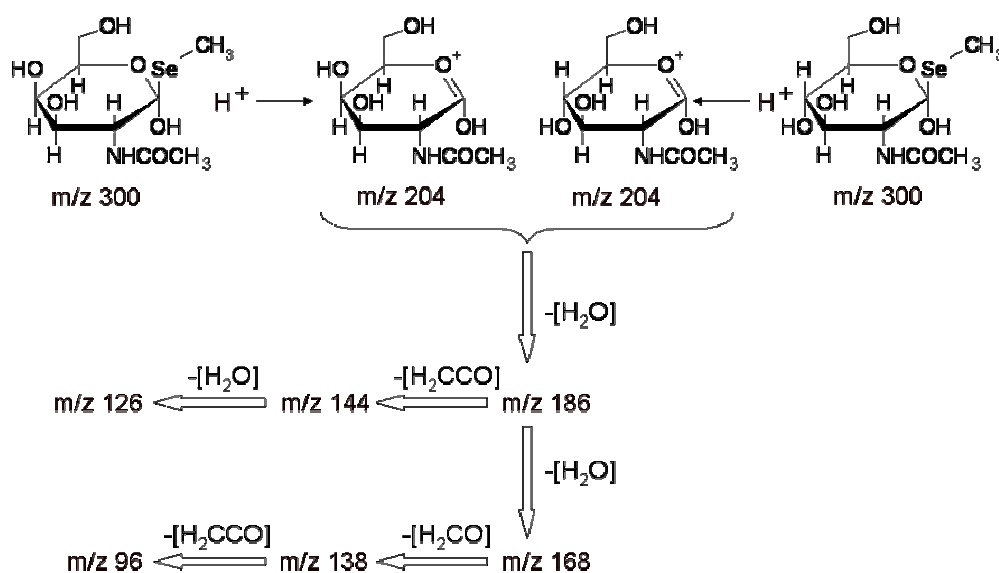
Πίνακας 5.1 Ποσοτικά αποτελέσματα για το ισότοπο ^{78}Se με εξωτερική βαθμονόμηση και με τη μέθοδο της προσθήκης γνωστής ποσότητας. Οι εθελοντές που είχαν δώσει τα δείγματα είχαν λάβει το διατροφικό συμπλήρωμα των 200 μg Se.

	Εξωτερική βαθμονόμηση (ppb Se) ^{78}Se
Δείγμα ανθρώπινων ούρων 1	58
Δείγμα ανθρώπινων ούρων 2	96
	Μέθοδος προσθήκης γνωστής ποσότητας (ppb Se) ^{78}Se
Δείγμα ανθρώπινων ούρων 1	89
Δείγμα ανθρώπινων ούρων 2	121

Η απόκλιση των τιμών μεταξύ των δύο μεθόδων οφείλεται σε παρεμποδίσσεις της μήτρας των ανθρώπινων ούρων.

5.2 Εύρεση Μονοπατιών Θραύσης των Σεληνοσακχάρων με Ιοντική Παγίδα

Παρόλο που οι καμπύλες διάσπασης των σεληνοσακχάρων παρέχουν αρκετές πληροφορίες για την ανάπτυξη της μεθόδου SRM, θελήσαμε να εξετάσουμε λεπτομερώς τις διεργασίες θραύσεις του κάθε σεληνοσακχάρου έτσι ώστε να τις κατανοήσουμε καλύτερα με απότερο σκοπό τον χαρακτηρισμό άλλων άγνωστων μεταβολιτών. Τα πειράματα αυτά έγιναν με ES με αναλυτή μάζας ιοντική παγίδα. Τα φάσματα μάζας που καταγράφηκαν (MS^n ; $n=1-6$) μας επέτρεψαν την εξιχνίαση των μονοπατιών θραύσης των SeGalNAc και SeGluNAc όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.3. Από τα φάσματα μάζας (τα οποία δεν παρουσιάζονται εδώ) φαίνεται η διαδοχική θραύση των σεληνοσακχάρων, αλλά επίσης και ενδιαφέρουσες διαφορές στις εντάσεις των προϊόντων ιόντων που προέρχονται από το κάθε σεληνοσακχαρο. Συγκεκριμένα το SeGluNAc δίνει έντονα τα προϊόντα ιόντα m/z 138 (μέσω του m/z 168), και χαμηλής έντασης ιον m/z 144 (μέσω του m/z 186), ενώ για το SeGalNAc εντάσεις αυτές αντιστρέφονται. Παρόμοιες σχετικές εντάσεις είχαν παρατηρηθεί και κατά την χρησιμοποίηση του αναλυτή τριπλού τετραπόλου.



Σχήμα 5.3 Μονοπάτια θραύσης των SeGalNAc και SeGluNAc όπως χαρακτηρίστηκαν με τη χρησιμοποίηση ιοντικής παγίδας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

Συμπεράσματα – Επίλογος της παρούσας εργασίας

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν στα κεφάλαια 3, 4 και 5 διαπιστώθηκε ότι η ανίχνευση και ταυτοποίηση των σεληνοσακχάρων στα ανθρώπινα ούρα είναι εφικτή τόσο με την τεχνική HPLC-ES-MS/MS όσο και με την τεχνική HPLC-APCI-MS/MS. Η τεχνική HPLC-APCI-MS/MS έδωσε πιο ικανοποιητικά όρια ανίχνευσης μιας και πρόκειται για μια τεχνική αρκετά ευαίσθητη και ανθεκτική κυρίως ως προς τα υπό ανάλυση δείγματα. Επιπλέον, με την τεχνική HPLC-ICP-MS ανιχνεύτηκαν και ταυτοποιήθηκαν τα σεληνοσακχαρα SeGalNAc και SeGluNAc επιβεβαιώνοντας το παραπάνω εφόσον πρόκειται για μια πολύ ευαίσθητη τεχνική ευρείας χρήσεως.

Χρωματογραφικά η ανίχνευση και ταυτοποίηση των σεληνοσακχάρων στα ανθρώπινα ούρα έγινε και με χρωματογραφία αντίστροφης φάσης αλλά και με την συνδυαστική χρωματογραφία αντίστροφης φάσης με προστήλες κατιονανταλλαγής. Οι χρωματογραφίες που χρησιμοποιήθηκαν περιόρισαν αρκετά τα φαινόμενα μήτρας. Η χρωματογραφία αντίστροφης φάσης έδωσε καλύτερη διαχωριστική ικανότητα $R=1,7$.

Τέλος, οι αναλυτικές μέθοδοι που αναπτύχθηκαν χρησιμοποιήθηκαν για εξαγωγή ποσοτικών αποτελεσμάτων. Κρίνεται ότι λόγω παρεμποδίσεων μήτρας η τεχνική προσθήκης γνωστής ποσότητας είναι η πλέον κατάλληλη για αυτό το σκοπό.

Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι το Se χαρακτηρίζεται ως ευεργετικό στοιχείο για τον άνθρωπο η ανάπτυξη της παρούσας μεθόδου κρίνεται ιδιαίτερα σημαντική εφόσον η εφαρμογή της σε κλινικές μελέτες θα είχε άμεσα σχέση με την υγεία του ανθρώπου. Πιο συγκεκριμένα, η ανάπτυξη της συγκεκριμένης μεθόδου είναι ενθαρρυντική ως προς την ανίχνευση Se στα ανθρώπινα ούρα μιας και θεωρείται ότι το Se ίσως παρέχει αντικαρκινική προστασία. Επιπλέον, η ανάπτυξη της συγκεκριμένης μεθόδου βασιζόμενης σε αναλυτικές

τεχνικές «ρουτίνας» συμβάλλει στην εύκολη εφαρμογή της σε βιοχημικό, βιοαναλυτικό ή κλινικό εργαστήριο μετά βέβαια από περαιτέρω αξιολόγησή της.

7. Βιβλιογραφία

1. Pedro Traar, Ferdinand Belaj and Kevin Francesconi, Synthesis of methyl 2-Acetamido-2-deoxy-1-seleno-b-D-gluco- and galacto-pyranoside : Selenium Metabolites in Human Urine, *Aust. J.Chem.*2004,57,1051-1053.
2. Lars Bendahl and Bente Gammelgaard, Separation and identification of S-methylgalactosamine-a new metabolite in basal human urine-by HPLC-ICP-MS and CE-nano-ESI-(MS)², *J.Anal.At.Spectrometry*,2004,19,950-957.
3. Monica Stadlober, Manfred Sager, Kurt Johann Irgolic, Effects of selenate supplemented fertilisation on the selenium levels of cereals-indentification and quantification of selenium compounds by HPLC-ICP-MS, *Food Chemistry* 73 (2001) 357-366.
4. Krief A, Hevesi L. Organoselenium chemistry I: functional group transformations. Berlin: Springer-Verlag, 1988:1-11.
5. Challenger F. Biological methylation. *Chem Rev.* 1945; 36:315-61.
6. McConnell KP, Portman OW.Excretion of dimethyl selenide by the rat. *J.Bio.Chem* 1952;195:277-82.
7. Ganther HE. Pathways of selenium metabolism including respiratory excretory products. *J Am Coll Toxicol* 1986;5:1-5.
8. Olson OE.Selenium toxicity in animals with emphasis on man. *J Am Coll Toxicol* 1986;5:45-70.
9. Parnham M. , J.Crap, E.Biochemistry Pharmacol.1987,36,3095-3102.
10. H.E.Ganther and J.R.Lawrence, *Tetrahedron*, 1997,53,1229
11. Schwarz K, Foltz CM, Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *J Biol Chem* 1957;79:3292-3.

12. Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG, Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 1973;179:588-90.
13. Birringer M, Pilawa S, Flohe L. Trends in selenium biochemistry. *Nat Prod Rep* 2002; 19:693-718.
14. Girling, C. A. (1984) Selenium in agriculture and the environment, *Agriculture. Ecosystems and Environment*, 11, 37-65.
15. Berrow, M. L., & Ure, A.M. (1989) Geological materials and soils. In M. Inhat, Occurrence and distribution of selenium (pp. 213-242). Florida : CRC Press.
16. Nye, S.M & Peterson, P.J.(1975). The content and distribution of selenium in soils and plants from seleniferous areas in Eire and England. In D.D. Hemphill, Trace substances in environmental health (Vol, 9 ,pp. 113-121).Columbia : University of Missouri.
17. Kevin Francesconi and Florence Panner Selenium metabolites in Urine: A critical Overview of past work and current status, *Clinical Chemistry* 50:12 2240-2253 (2004)
18. Y. Xia, X.Zhao, L.Zhu, and P.D. Whanger metabolism of selenate and selenomethionine by a selenium-deficient population of men in China. *J.Nutr.Biochemistry*,1992,vol. 3, May.
19. Y. Kobayashi, Y. Orga, K.Ishiwata, H.Takayama,N.Aimi and K.T. Suzuki, *PNAS*,2002,99,15932.
20. K.T. Suzuki and Y.Orga, *Food Addit. Contam.*,2002, 19,974.
21. M.P. Rayman, *Br.J.Nutr.*92, 557-573 (2004)
22. M.P. Rayman, *Lancet* 356,233-241 (2000)
23. M.F. Robinson, C.P. Jenkinson, G.Luzhen, C.D. Thomson, P.D.Whanger, in: A.Wendel (Ed.), *Selenium in Biology and Medicine*, Springer, Berlin, 1989,p.250.
24. Alaejos MS, Romero CD. Urinary selenium concentrations.*Clin.Chem* 1993;39:2040-52.
25. D.T. Tsay, A.W. Halverson, I.S. Palmer, *Nutr.Rep.Int.*2 (1970) 203.

26. Heidi Goenaga-Infante and Mike Sargent Understanding the role of Se in health using mass spectrometry, LGC Limited, Queens Road, Teddington, Middlesex TW11 OLY, UK.
27. Klein EA, Lippman SM, Thomson IM, Goodman PJ, Albanes D, Taylor PR, Coltman C, The selenium and vitamin C cancer prevention trial. *World J Chem* 2003;21:21-7.
28. Lobinski R, Edmonds JS, Suzuki KT, Uden PC. Species-selective determination of selenium compounds in biological materials. *Pure Appl Chem* 2000;72:447-61.
29. Αρχές ανόργανης ανάλυσης. Skoog-Holler-Nieman , Πέμπτη έκδοση, εκδ.κωσταράκη 2002.
30. Hughes, B.M., McKenzie, D.E. and Duffin, K.L., *J.Am.Soc. Mass Spectrometry*, 1993,4,604.
31. Atmospheric Pressure Ionization, School of Chemistry, University of Bristol.
32. Mass spectrometry resource, Atmospheric Pressure Chemical Ionization, University of Bristol.
33. Mass Spectroscopy, Principles and Applications, Edmond DE Hoffman, Jean Charette, Vincent Stroobant, Masson editeur, Paris, 1996.
34. Mass Spectrometry Resource, Electrospray Ionization, University of Bristol.
35. P. Kebarle, A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry, *J. mass spectrometry*. 35, 804 - 817, 2000.
36. Cech and Enke, Electrospray Ionization mass spectrometry, Willey Periodicals, Inc., *Mass Spec Rev* 20:362-387, 2001.
37. TSQ Quantum Hardware Manual, Introduction(Chapter 5)
38. TSQ Quantum Hardware Manual, Introduction(Chapter 1)
39. Shibita Y, Morita M., Fuwa K. Selenium and arsenic in biology: their chemical forms and biological functions. *Adv Biophys* 1992,28:31-80.

40. Gammelgaard B., Jessen KD, Kristensen FH, Jons O. Determination of trimethylselenium ion in urine by ion chromatography and inductively-coupled plasma-mass spectrometry detection. *Anal.Chim.Acta* 2000; 404:47-54.
41. Chatterjee A, Tao H, Shibita Y, Morita M. Determination of selenium compounds in urine by high-performance liquid chromatography –inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2003;997:249-57.