



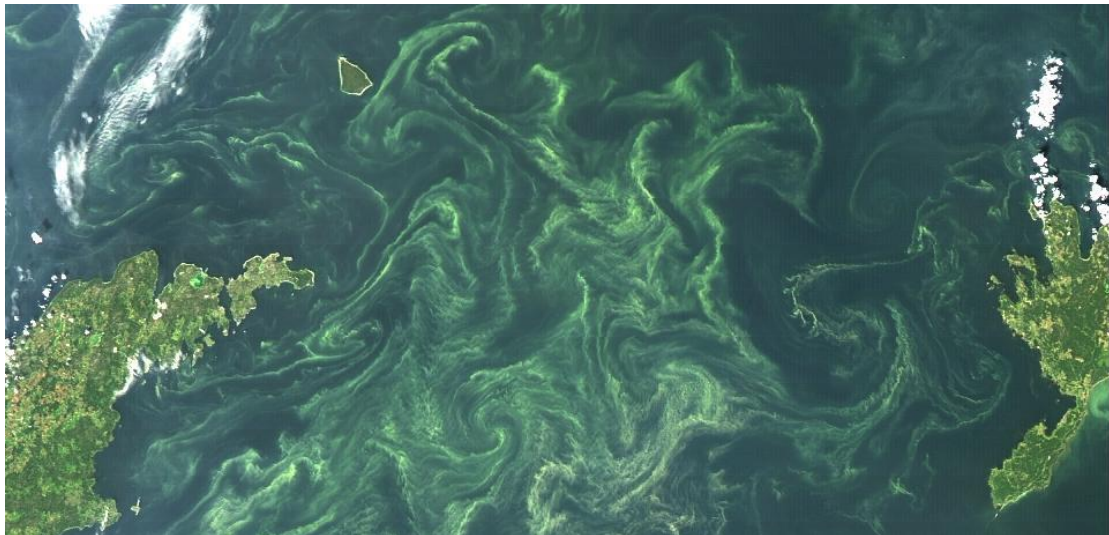
---

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ  
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ  
ΤΟΜΕΑΣ 1: ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

---

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Υδρόλυση της μικροκυστίνης-RR (MC-RR) και προσδιορισμός των  
αμινοξέων της για τη μελέτη του μηχανισμού οξείδωσης  
μικροκυστινών»**



**Ευσταθία Καράμπελα**

Αριθμός μητρώου: 05116012

Επιβλέπων: Φώτιος Τσόπελας, Επίκουρος καθηγητής Ε.Μ.Π.

ΑΘΗΝΑ 2022

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο «Καταλυτικών – Φωτοκαταλυτικών Διεργασιών και Περιβαλλοντικής Χημείας» στο Ινστιτούτο Νανοεπιστήμης - Νανοτεχνολογίας του ΕΚΕΦΕ "Δημόκριτος".

Με την ολοκλήρωση της εργασίας μου θα ήθελα να ευχαριστήσω αρχικά τον κ. Φώτιο Τσόπελα και την κ. Αναστασία Χισκιά τόσο για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος, όσο και για τις συμβουλές τους και την καθοδήγησή τους κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων και τη συγγραφή της εργασίας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Σεβαστή Ζερβού, τη Σοφία Ηλιακοπούλου, την Κατερίνα Παρασκευοπούλου και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για τη συνεργασία μας και την πολύτιμη βοήθειά τους κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου και όλους τους ανθρώπους που ήταν κοντά μου στη φοιτητική μου σταδιοδρομία.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τις τελευταίες δεκαετίες, η επιβάρυνση του περιβάλλοντος συνέβαλε στο φαινόμενο των μαζικών ανθήσεων των κυανοβακτηρίων στους υδάτινους πόρους. Οι κυανοτοξίνες αποτελούν δευτερογενείς μεταβολίτες των κυανοβακτηρίων και η αυξημένη παρουσία τους στα οικοσυστήματα έχει συνδεθεί με περιστατικά ασθενειών και θανάτων σε ζώα. Μία κατηγορία κυανοτοξινών είναι οι μικροκυστίνες. Πρόκειται για μονοκυκλικά επταπεπτίδια με ηπατοτοξική δράση, για τα οποία έχουν τεθεί όρια συγκέντρωσης στο πόσιμο νερό. Στους τρόπους αποικοδόμησης των μικροκυστινών συμπεριλαμβάνονται οι συμβατικές και προχωρημένες μέθοδοι οξείδωσης. Η παρούσα εργασία είχε ως στόχο α) την ανάπτυξη μίας μεθόδου υγροχρωματογραφίας σε συνδυασμό με μία αναλυτική τεχνική για χρήση σε υδρολυμένα μόρια μικροκυστινών και β) την ανάπτυξη μίας μεθόδου υδρόλυσης και την εφαρμογή της στη μικροκυστίνη-RR (MC-RR). Διασπώντας την μικροκυστίνη στα αμινοξέα της και παρακολουθώντας τις μεταβολές της συγκέντρωσής τους επιχειρείται ο εντοπισμός των περιοχών του μορίου που προσβάλλονται από τους οξειδωτικούς παράγοντες κατά την αποικοδόμησή.

Έγινε σύγκριση δύο τεχνικών προσδιορισμού αμινοξέων: της υγροχρωματογραφίας σε συνδυασμό με α) την φθορισμομετρία (LC-FL) και β) την φασματομετρία μαζών σε σειρά (LC-MS/MS). Στην περίπτωση της φθορισμομετρίας χρησιμοποιήθηκε στήλη αντίστροφης φάσης και ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου ( $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ) με  $\text{pH}=4$  παρουσία ακετονιτριλίου (ACN), ως κινητή φάση. Τα δείγματα προς ανάλυση υπόκεινταν σε διαδικασία παραγωγοποίησης με αντιδραστήριο το φθορενυλομεθυλοξυκαρβονυλοχλωρίδιο (FMOC-Cl). Για την φασματομετρία μαζών χρησιμοποιήθηκε στήλη ιοντοανταλλαγής και τα διαλύματα φορμικό αμμώνιο ( $\text{HCOONH}_4$ ) και ACN, 0.5% φορμικό οξύ ( $\text{HCOOH}$ ) ως κινητή φάση. Η ανίχνευση των αμινοξέων έγινε με επιλεκτική παρακολούθηση των αντιδράσεων θραυσματοποίησης ιόντων αφού πρώτα πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση της μεθόδου και βρέθηκαν οι μεταπτώσεις των ιόντων των αμινοξέων. Οι δύο τεχνικές εμφάνισαν παρόμοια γραμμικότητα αλλά η φθορισμομετρία αποδείχτηκε ακατάλληλη για την ανίχνευση ορισμένων αμινοξέων. Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης ήταν 0.0019-0.0086 mg/L και 0.0058-0.026 mg/L αντίστοιχα για τη μέθοδο LC-FL ενώ ήταν 0.050-0.097 mg/L, 0.15-0.29 mg/L αντίστοιχα για τη μέθοδο LC-MS/MS. Έτσι, η LC-MS/MS επιλέχθηκε ως η αποτελεσματικότερη, περισσότερο αξιόπιστη και γρήγορη μέθοδος και χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για την ανάλυση των δειγμάτων των μικροκυστινών μετά την υδρόλυση. Αποδείχτηκε πως τα αμινοξέα παραμένουν σταθερά κατά 77-93 % στις συνθήκες υδρόλυσης που εφαρμόστηκαν. Η MC-RR υδρόλύθηκε με επιτυχία, ωστόσο η συγκέντρωση των αμινοξέων που ανιχνεύτηκε ήταν υψηλότερη της αναμενόμενης, γεγονός που αποδίδεται σε επιμόλυνση των δειγμάτων.

**Λέξεις κλειδιά:** Μικροκυστίνες, Αμινοξέα, Υδρόλυση, LC-FL, LC-MS/MS

## ABSTRACT

During the last decades, environmental degradation has contributed to the phenomenon of cyanobacterial blooms in aquatic resources. Cyanotoxins are secondary metabolites of cyanobacteria and their increased presence in ecosystems has been linked to incidents of animal disease and death. Microcystins form a category of cyanotoxins. Specifically, they are monocyclic heptapeptides with hepatotoxic effects and standardized limits on their concentration in drinking water have been established. A particular molecular decomposition technique of microcystins includes conventional and advanced oxidation processes. This diploma thesis aims at a) the development of a liquid chromatography method coupled with a suitable quantification method, to be used in hydrolyzed microcystin molecules and b) the development of a hydrolysis technique and its application on microcystin-RR (MC-RR). By hydrolyzing the microcystin into its constituent amino acids and tracking the change of their concentration we attempt to locate the areas of the molecule attacked by the oxidating agents during the decomposition.

Two analytical techniques for the determination of amino acids were compared: liquid chromatography followed by a) fluorescent detection (LC-FL) and b) tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). In the case of fluorescence, use was made of a reverse phase column and an ammonium acetate ( $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ) buffer solution (pH=4) in the presence of acetonitrile (ACN) as a mobile phase. The analyzed samples were first derivatized using fluorenylmethyloxycarbonyl chloride (FMOC-Cl). For LC-MS/MS analysis, an ion exchange column and ammonium formate ( $\text{HCOONH}_4$ ) solution with ACN, 0.5% formic acid ( $\text{HCOOH}$ ) as mobile phase were utilized. Amino acid detection was achieved through multiple reaction monitoring (MRM) technique which was firstly optimized using the two transitions of each target amino acid. Both techniques showed similar linearity, however, fluorescence based one proved ineffective for the detection of certain amino acids. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were found to be 0.0019-0.0086 mg/L and 0.0058-0.026 mg/L respectively, for the LC-FL method while they were 0.050-0.097 mg/L and 0.15-0.29 mg/L respectively, for LC-MS/MS. Accordingly, LC-MS/MS was selected as the more effective, reliable and faster of the two techniques and consequently was used for monitoring the hydrolyzed microcystin. It was proved that the amino acids remained stable by 77-93 % under the specific hydrolysis conditions applied. MC-RR was successfully hydrolyzed but a higher-than-expected amino acid concentration was detected which was attributed to sample contamination.

**Key words:** Microcystins, Amino acids, Hydrolysis, LC-FL, LC-MS/MS

## Contents

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	2
ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	3
ABSTRACT .....	4
<i>Ευρετήριο εικόνων-διαγραμμάτων.....</i>	<i>7</i>
<i>Ευρετήριο πινάκων.....</i>	<i>9</i>
1 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	10
1.1 Κυανοβακτήρια .....	10
1.1.1 Εισαγωγή .....	10
1.1.2 Κυανοβακτηριακές ανθήσεις .....	11
1.1.3 Η εμφάνιση των κυανοτοξινών .....	11
1.1.4 Κατηγορίες κυανοτοξινών .....	12
1.1.5 Επιπτώσεις στον άνθρωπο και στο περιβάλλον .....	17
1.2 Μικροκυστίνες.....	19
1.2.1 Προέλευση .....	19
1.2.2 Δομή .....	19
1.2.3 Φυσικοχημικές ιδιότητες .....	20
1.2.4 Σύνθεση .....	21
1.2.5 Τοξικότητα .....	22
1.2.6 Νομοθεσία.....	22
1.3 Μέθοδοι απομάκρυνσης μικροκυστινών .....	23
1.3.1 Φυσικές μέθοδοι απομάκρυνσης .....	23
1.3.2 Βιοαποικοδόμηση .....	24
1.3.3 Συμβατικές μέθοδοι οξειδωσης.....	25
1.3.4 Προχωρημένες μέθοδοι οξειδωσης.....	25
1.4 Μέθοδοι διαχωρισμού και ανίχνευσης αμινοξέων .....	28
1.4.1 Υγροχρωματογραφία.....	28
1.4.2 Φασματοσκοπία φθορισμού .....	32
1.4.3 Φασματομετρία μαζών .....	36
1.4.4 Υδρόλυση πεπτιδίων .....	40
1.4.5 Χρωματογραφική ανάλυση αμινοξέων, πεπτιδίων, μικροκυστινών και άλλων κυανοτοξινών στο παρελθόν.....	42
2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	44
2.1 Σκοπός .....	44
2.2 Προσδιορισμός αμινοξέων με τη χρήση LC-FL.....	44

2.2.1	Αντιδραστήρια.....	44
2.2.2	Συσκευές και γυαλικά αναλώσιμα.....	45
2.2.3	Προετοιμασία προτύπων διαλυμάτων .....	45
2.2.4	LC-FL .....	49
2.3	Προσδιορισμός αμινοξέων με τη χρήση LC-MS/MS.....	52
2.3.1	Αντιδραστήρια.....	52
2.3.2	Συσκευές και γυαλικά αναλώσιμα.....	52
2.3.3	Προετοιμασία προτύπων διαλυμάτων .....	52
2.3.4	LC-MS/MS.....	53
2.4	Προκαταρκτικά πειράματα υδρόλυσης της MC-RR.....	59
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	61
3.1	Προσδιορισμός αμινοξέων με τη χρήση LC-FL.....	61
3.2	Προσδιορισμός αμινοξέων με τη χρήση LC-MS/MS.....	71
3.3	Προκαταρκτικά πειράματα υδρόλυσης της MC-RR.....	77
4	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	81
5	ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ.....	83
6	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	84

## Ευρετήριο εικόνων-διαγραμμάτων

**Εικόνα 1:** Εκτεταμένη άνθιση του γένους κυανοβακτηρίων *Nodularia* στη Βαλτική θάλασσα όπως παρατηρήθηκε από την Ευρωπαϊκή Διαστημική Υπηρεσία στις 13 Ιουλίου 2005 [2]

**Εικόνα 2:** Κυανοβακτηριακή άνθιση του είδους *Microcystis aeruginosa* σε ταμειυτήρα νερού στη Γαλλία όπου τα επίπεδα χρωροφύλλης-α στην επιφάνεια ξεπέρασαν τα 200  $\mu\text{g/L}$  [2]

**Εικόνα 3:** Η γενική δομή των μικροκυστινών [18]

**Εικόνα 4:** Η εξέλιξη των προϊόντων με  $m/z=781.5$  και  $m/z=1015.5$  κατά τη φωτοκατάλυση της MC-LR ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) με καταλύτες τους Degussa P25  $\text{TiO}_2$  ( $200 \text{ mg L}^{-1}$ ) και GO- $\text{TiO}_2$  ( $200 \text{ mg L}^{-1}$ ) υπό ακτινοβολία UV-A και ηλιακό φως αντίστοιχα

**Εικόνα 5:** Τυπική πειραματική διάταξη HPLC [46]

**Εικόνα 6:** Το φαινόμενο «καθρέφτης» ανάμεσα στο φάσμα εκπομπής και το φάσμα απορρόφησης ενός μορίου [48]

**Εικόνα 7:** Το μόριο FMOC-Cl (πηγή: PubChem)

**Εικόνα 8:** Η αντίδραση μεταξύ του FMOC-Cl και μίας αμινομάδας [49]

**Εικόνα 9:** Σχηματικό διάγραμμα ενός φθορισμομέτρου PMT (PhotoMultiplier Tube) [50]

**Εικόνα 10:** Συνοπτικά η αρχή λειτουργίας της φασματομετρίας μαζών [52]

**Εικόνα 11:** Από πάνω προς τα κάτω: α) Πείραμα Σάρωσης Παραγομένων Ιόντων, β) Πείραμα σάρωσης Πρόδρομου Ιόντος, γ) Πείραμα για Ανίχνευση Απώλειας Ουδέτερου Μορίου, δ) Πείραμα Επιλεκτικής Παρακολούθησης Αντιδράσεων Θραυσματοποίησης Ιόντων [55]

**Εικόνα 12:** Η διάταξη LC-FL στο εργαστήριο

**Εικόνα 13:** Η στήλη και η προσθήλη που χρησιμοποιήθηκαν στην διάταξη LC-FL

**Εικόνα 14:** Η διάταξη LC-MS/MS στο εργαστήριο

**Εικόνα 15:** Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε στη διάταξη LC-MS/MS

**Εικόνα 16:** Καμπύλη θραυσματοποίησης για την L-Αργινίνη

**Εικόνα 17:** Καμπύλη θραυσματοποίησης για την D-Αλανίνη

**Εικόνα 18:** Καμπύλη θραυσματοποίησης για την L-Λευκίνη

**Εικόνα 19:** Καμπύλη θραυσματοποίησης για το L-Ασπαραγινικό οξύ

**Εικόνα 20:** Καμπύλη θραυσματοποίησης για το D-Γλουταμινικό οξύ

**Εικόνα 21:** Συσκευή εξάτμισης με ρεύμα αζώτου και υδατόλουτρο

**Εικόνα 22:** Χρωματογράφημα LC-FL προτύπου διαλύματος L-Λευκίνης συγκέντρωσης 10  $\text{mg/L}$

**Εικόνα 23:** Χρωματογράφημα LC-FL προτύπου διαλύματος D-Λευκίνης συγκέντρωσης 10  $\text{mg/L}$

**Εικόνα 24:** Χρωματογράφημα LC-FL προτύπου διαλύματος L-Αργινίνης συγκέντρωσης 10  $\text{mg/L}$

**Εικόνα 25:** Χρωματογράφημα LC-FL προτύπου διαλύματος L-Γλουταμινικού οξέος συγκέντρωσης 10  $\text{mg/L}$

**Εικόνα 26:** Χρωματογράφημα LC-FL προτύπου διαλύματος D-Γλουταμινικού οξέος συγκέντρωσης 10 mg/L

**Εικόνα 27:** Χρωματογράφημα LC-FL προτύπου διαλύματος L-Ασπαραγινικού οξέος συγκέντρωσης 10 mg/L

**Εικόνα 28:** Χρωματογράφημα LC-FL προτύπου διαλύματος D-Αλανίνης συγκέντρωσης 1 mg/L

**Εικόνα 29:** Χρωματογράφημα LC-FL προτύπου διαλύματος μείγματος L-Αργινίνης, D-Αλανίνης και L-Λευκίνης συγκέντρωσης 1 mg/L

**Εικόνα 30:** Χρωματογράφημα LC-FL προτύπου διαλύματος μείγματος L-Αργινίνης, D-Αλανίνης και L-Λευκίνης συγκέντρωσης 500 μg/L

**Εικόνα 31:** Χρωματογράφημα LC-FL προτύπου διαλύματος μείγματος L-Αργινίνης, D-Αλανίνης και L-Λευκίνης συγκέντρωσης 100 μg/L

**Εικόνα 32:** Χρωματογράφημα LC-FL προτύπου διαλύματος μείγματος L-Αργινίνης, D-Αλανίνης και L-Λευκίνης συγκέντρωσης 50 μg/L

**Εικόνα 33:** Διάγραμμα βαθμονόμησης LC-FL για την L-Αργινίνη

**Εικόνα 34:** Διάγραμμα βαθμονόμησης LC-FL για την D-Αλανίνη

**Εικόνα 35:** Διάγραμμα βαθμονόμησης LC-FL για την L-Λευκίνη

**Εικόνα 36:** Χρωματογραφήματα LC-MS/MS μείγματος 5 αμινοξέων σε συγκέντρωση 100 μg/L

**Εικόνα 37:** Διάγραμμα βαθμονόμησης LC-MS/MS για την L-Λευκίνη

**Εικόνα 38:** Διάγραμμα βαθμονόμησης LC-MS/MS για την D-Αλανίνη

**Εικόνα 39:** Διάγραμμα βαθμονόμησης LC-MS/MS για το D-Γλουταμινικό οξύ

**Εικόνα 40:** Διάγραμμα βαθμονόμησης LC-MS/MS για το L-Ασπαραγινικό οξύ

**Εικόνα 41:** Διάγραμμα βαθμονόμησης LC-MS/MS για την L-Αργινίνη

**Εικόνα 42:** Χρωματογράφημα LC-MS/MS της μικροκυστίνης MC-RR (C=1 mg/L) μετά από υδρόλυση



## Ευρετήριο πινάκων

**Πίνακας 1:** Οι κατηγορίες των κυανοτοξινών, τα κυανοβακτήρια που τις παράγουν, η χημική δομή τους και το είδος της τοξικής δράσης τους [4, 7, 8] ((πηγή εικόνων: PubChem)

**Πίνακας 2:** Βιβλιογραφική έρευνα για τη χρωματογραφική ανάλυση αμινοξέων, πεπτιδίων, μικροκυστινών και άλλων κυανοτοξινών

**Πίνακας 3:** Τα αμινοξέα, το μοριακό τους βάρος και η χημική δομή τους (πηγή: PubChem)

**Πίνακας 4:** Η αναλογία των διαλυτών κατά τη χρωματογραφική ανάλυση ακολουθούμενη από φθορισμομετρία

**Πίνακας 5:** Η αναλογία των διαλυτών κατά τη χρωματογραφική ανάλυση ακολουθούμενη από φασματομετρία μαζών

**Πίνακας 6:** Τα μητρικά και θυγατρικά ιόντα των αμινοξέων και οι ενέργειες θραύσης που αξιοποιήθηκαν κατά την ανάλυση LC-MS/MS

**Πίνακας 7:** Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης των αμινοξέων στη μέθοδο LC-FL

**Πίνακας 8:** Οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις των αμινοξέων για τη συγκέντρωση των 500 µg/L στη μέθοδο LC-FL

**Πίνακας 9:** Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης των αμινοξέων στη μέθοδο LC-MS/MS

**Πίνακας 10:** Οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις των αμινοξέων για τη συγκέντρωση των 75 µg/L στη μέθοδο LC-MS/MS

**Πίνακας 11:** Η επί τοις εκατό σταθερότητα των αμινοξέων κατά την υδρόλυση και η αντίστοιχη σχετική τυπική απόκλιση

**Πίνακας 12:** Οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις των αμινοξέων της MC-RR μετά από υδρόλυση

**Πίνακας 13:** Η επί τοις εκατό ανάκτηση των αμινοξέων κατά την υδρόλυση της MC-RR, η αντίστοιχη σχετική τυπική απόκλιση και η συγκέντρωση των αμινοξέων στο δείγμα που αναλύθηκε

# 1 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## 1.1 Κυανοβακτήρια

### 1.1.1 Εισαγωγή

Τα κυανοβακτήρια είναι προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί που έχουν βρεθεί σε ποικίλα περιβάλλοντα όπως σε ωκεανούς, επιφανειακά νερά, πετρώματα ή στο χώμα. [1] Οι μεγαλύτεροι πληθυσμοί που παρατηρούνται και εξετάζονται σήμερα συναντώνται σε λίμνες ενώ εξαπλώνονται συνεχώς στις θάλασσες αλλά και επίγεια. Συνολικά έχουν εντοπισθεί σε περισσότερες από 80 χώρες μέχρι σήμερα, συνήθως σε τροπικές ή υποτροπικές περιοχές, ενώ ανακαλύπτονται συνεχώς σε νέα μέρη του κόσμου. [2, 3]

Τα κυανοβακτήρια διαθέτουν χαρακτηριστικά τόσο των βακτηρίων όσο και των φυκών. Όπως όλα τα φύκη, τα κυανοβακτήρια περιέχουν χλωροφύλλη και άλλες χρωστικές και μπορούν να φωτοσυνθέτουν. [4] Πιστεύεται μάλιστα πως τα κυανοβακτήρια αποτέλεσαν τους πρώτους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς στη Γη και συνέβαλαν στην παραγωγή του οξυγόνου της ατμόσφαιρας πριν από 3 δισεκατομμύρια χρόνια. [1] Όπως άλλα βακτήρια, τα κυανοβακτήρια δεν διαθέτουν πυρήνα ή άλλα εξειδικευμένα οργανίδια περικλειόμενα από μεμβράνη. [3] Κάποια κυανοβακτήρια διαθέτουν εξειδικευμένα κύτταρα για την επεξεργασία του αζώτου ενώ μερικά είδη έχουν αναπτύξει μηχανισμούς για την πλευστότητά τους που βασίζονται στην χρήση ενδοκυτταρικών κυστιδίων αερίου. Έτσι μπορούν να κινούνται κατακόρυφα μέσα στο νερό βελτιστοποιώντας τις συνθήκες ανάπτυξής τους. [4] Η γαλάζια χρωστική φυκοκυανίνη είναι μοναδική στα κυανοβακτήρια και σε αυτή οφείλεται η αναφορά που γίνεται στους συγκεκριμένους μικροοργανισμούς ως μπλε-πράσινα φύκη. [3]

Τα κυανοβακτήρια μπορούν να ζήσουν είτε αυτόνομα είτε σε αποικίες και νηματοειδείς σχηματισμούς. Αναπτύσσονται σε διαφορετικά βάθη (πλαγκτονικά), στην επιφάνεια του νερού (μεταφυτικά), προσκολλημένα σε άλλα φύκη, κυανοβακτήρια ή μακρόφυτα (επιφυτικά) ή προσκολλημένα σε υποστρώματα (βενθικά). Ενώ είναι μικροσκοπικοί οργανισμοί, οι πληθυσμοί τους είναι ορατοί με ποικίλες μορφές (π.χ σε αποικίες, ως αφροί ή σαν ένα χαλί) με χρώμα που κυμαίνεται από μπλε-πράσινο ή καφέ-κόκκινο έως μαύρο. Στις αποικίες τους συμβιώνουν με άλλους οργανισμούς, όπως ετεροτροφικά βακτήρια, φωτοαυτοτροφικά φύκη ή μύκητες και πολλές φορές οι αλληλεπιδράσεις τους διευκολύνουν την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό τους. [1, 4]

### 1.1.2 Κυανοβακτηριακές ανθήσεις

Τα τελευταία χρόνια παρατηρούνται μαζικές ανθήσεις των κυανοβακτηρίων στους υδάτινους πόρους, ως αποτέλεσμα της επιβάρυνσης του περιβάλλοντος. Τα ήρεμα, ευτροφικά ή υπερευτροφικά νερά που περιέχουν θρεπτικά συστατικά (άζωτο, φώσφορο και οργανικές ενώσεις), έχουν υψηλό pH, χαμηλή διαθεσιμότητα σε CO<sub>2</sub> και βρίσκονται σε ζεστά και ηλιόλουστα μέρη, αποτελούν τις ιδανικές συνθήκες για την ανάπτυξη των κυανοβακτηρίων. Οι χαμηλές συγκεντρώσεις του διαθέσιμου αζώτου σε σχέση με τον φώσφορο (χαμηλός λόγος N/P) και οι μικρότεροι ρυθμοί κατανάλωσης από ζωοπλαγκτόν συμβάλλουν επίσης στην εξάπλωση των κυανοβακτηρίων. Τα λύματα βιομηχανιών και εργοστασίων, οι αγροτικές πρακτικές και άλλες δραστηριότητες εμπλουτίζουν τα νερά με θρεπτικό φορτίο ενώ οι άνεμοι μεταφέρουν συχνά τις κυανοβακτηριακές ανθήσεις πιο κοντά στις κατοικημένες περιοχές. [3, 5] Τα κυανοβακτήρια φαίνεται να είναι πιο ανθεκτικά σε ζιζανιοκτόνα σε σχέση με άλλα φύκη. [1] Επιπροσθέτως το πρόβλημα επιδεινώνεται εξαιτίας της εξάντλησης των υγρότοπων που δρουν ως ζώνες ρύθμισης και φιλτράρουν τα θρεπτικά στοιχεία πριν αυτά φτάσουν στο νερό. Η ύπαρξη άλλων οργανισμών στο υδάτινο οικοσύστημα επηρεάζει επίσης την κυριαρχία των κυανοβακτηρίων. [4] Παρ' όλα αυτά δεν σχετίζονται όλες οι κυανοβακτηριακές ανθήσεις με φαινόμενα ευτροφισμού. Κάποιες από αυτές έχουν εντοπισθεί σε παρθένες περιοχές όπως λεκάνες απορροής στην Αυστρία ή σε μεγάλα ύψη των Άλπεων στην Ελβετία. [3]

### 1.1.3 Η εμφάνιση των κυανοτοξινών

Τα κυανοβακτήρια παράγουν ένα πλήθος δευτερογενών μεταβολιτών κατά τη διάρκεια της ζωής τους, ανάμεσα σε αυτούς και τις τοξικές ουσίες γνωστές ως κυανοτοξίνες. Αν και ο πρώτος πληθυσμός κυανοβακτηρίων που συνδέθηκε με περιστατικά ηπατοτοξικής δράσης σε ζώα ήταν ο *Nodularia spumigena* το 1878, μία τοξίνη της κατηγορίας των νοντουλαρινών απομονώθηκε από αυτά έναν αιώνα αργότερα και τότε καθορίστηκε η δομή της. [6] Τα πλαγκτονικά κυανοβακτήρια είναι αυτά που παραδοσιακά έχουν συνδεθεί περισσότερο με τους κινδύνους που ενέχει η παρουσία των τοξινών, γι' αυτό και έχουν συζητηθεί περισσότερο. Λιγότερες είναι οι μελέτες για τα τοξικά βενθικά κυανοβακτήρια των επιφανειακών νερών που τελευταία φαίνεται να εξετάζονται λεπτομερέστερα. [1]



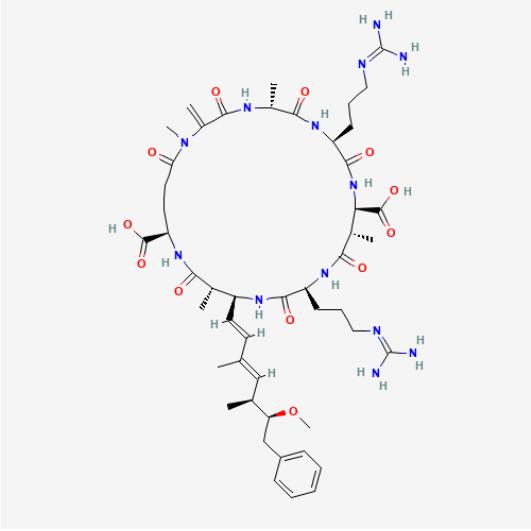
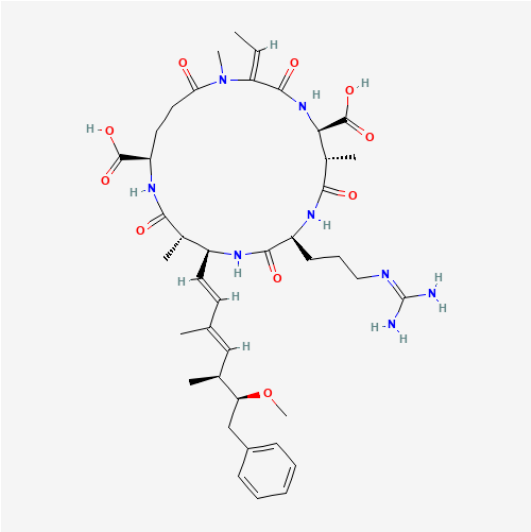
*Εικόνα 1: Εκτεταμένη άνθιση του γένους κυανοβακτηρίων Nodularia στη Βαλτική θάλασσα όπως παρατηρήθηκε από την Ευρωπαϊκή Διαστημική Υπηρεσία στις 13 Ιουλίου 2005 [2]*

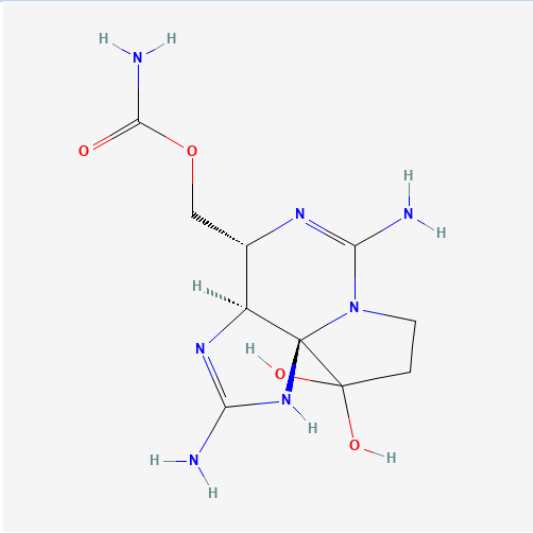
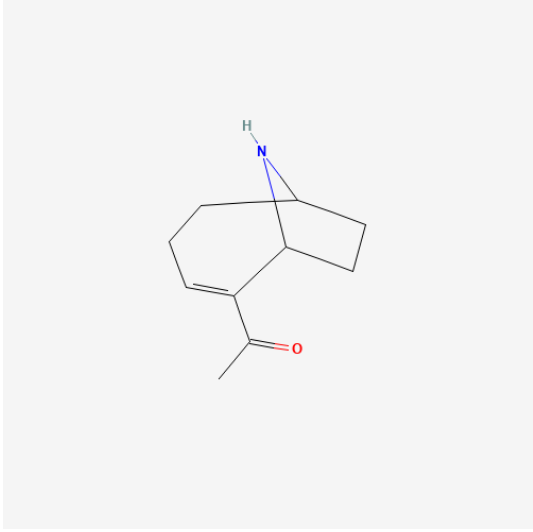
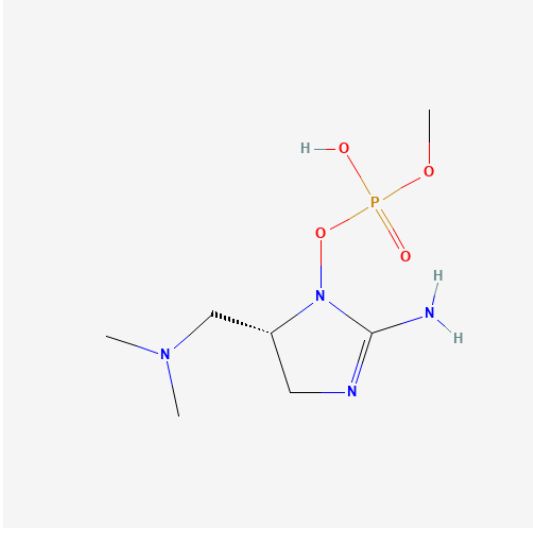
Οι παράγοντες που καθορίζουν την παραγωγή των κυανοτοξινών καθώς και τον βαθμό τοξικότητας, δεν έχουν γίνει πλήρως κατανοητοί. Οι κυανοτοξίνες δεν παράγονται από όλα τα είδη κυανοβακτηρίων, ωστόσο έχει υποτεθεί ότι τα υδάτινα περιβάλλοντα με υψηλές θερμοκρασίες και αυξημένα επίπεδα θρεπτικών συστατικών, ευνοούν την άνθηση των κυανοβακτηρίων με αυτή τη δυνατότητα. Η ίδια τοξίνη μπορεί να παραχθεί από διάφορα κυανοβακτήρια ενώ κάθε γένος κυανοβακτηρίων παράγει πολλές διαφορετικές τοξίνες. Σύμφωνα με μία εργαστηριακή μελέτη που εξέτασε την επίδραση των συγκεντρώσεων αζώτου και φωσφόρου σε δύο τοξικά και δύο μη τοξικά στελέχη του *Microcystis*, διαπιστώθηκε πως τα μη τοξικά στελέχη απαιτούν λιγότερα θρεπτικά στοιχεία για την ανάπτυξή τους όταν οι συγκεντρώσεις των θρεπτικών στοιχείων είναι χαμηλές. Όμως σε υψηλές συγκεντρώσεις τα τοξικά στελέχη ξεπέρασαν τα μη τοξικά. [4]

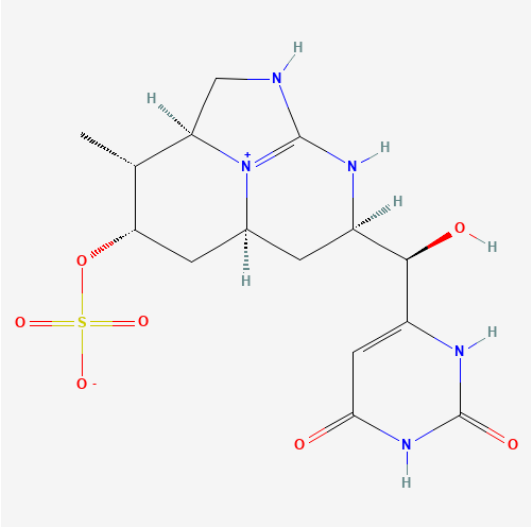
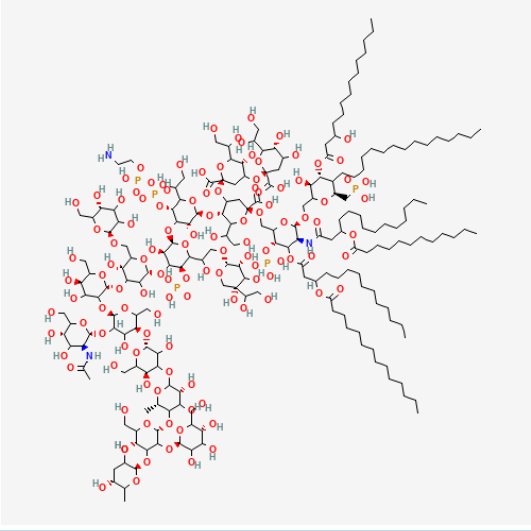
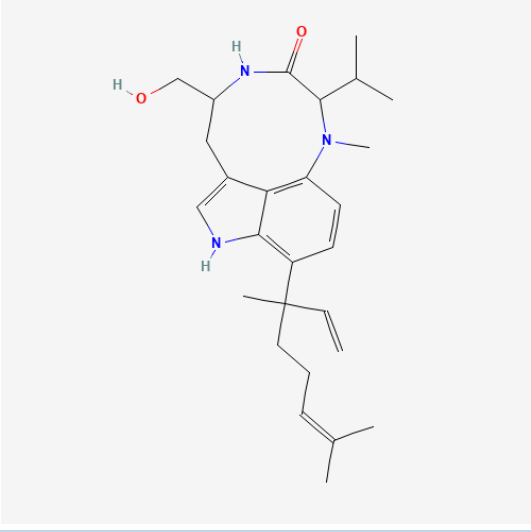
#### 1.1.4 Κατηγορίες κυανοτοξινών

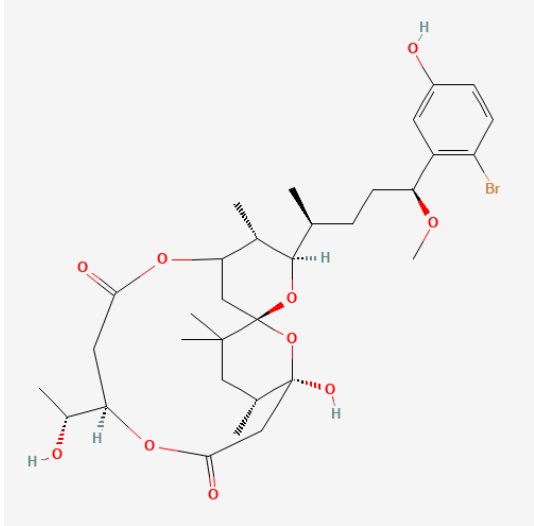
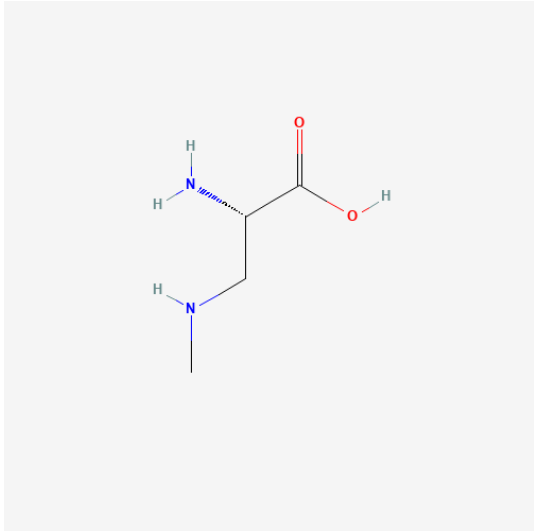
Οι κυανοτοξίνες αποτελούν χημικές ενώσεις με ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την οικοτοξικολογία, την τοξικολογία και την περιβαλλοντική χημεία. Στον πίνακα που ακολουθεί φαίνονται τα είδη των κυανοτοξινών που είναι γνωστά μέχρι σήμερα, τα γένη των κυανοβακτηρίων που τις παράγουν, η χημική δομή τους και η τοξική δράση που εμφανίζουν στα σπονδυλωτά, ιδιαίτερα στα θηλαστικά.

**Πίνακας 1:** Οι κατηγορίες των κυανοτοξινών, τα κυανοβακτήρια που τις παράγουν, η χημική δομή τους και το είδος της τοξικής δράσης τους [4, 7, 8] (πηγή εικόνων: PubChem)

Κυανοτοξίνες	Κυανοβακτήρια	Χημική δομή	Τοξική δράση
<b>Μικροκυστίνες</b>	Anabaena, Aphanocapsa, Hapalosiphon, Microcystis, Nostoc, Planktothrix (Oscillatoria)	Κυκλικά επταπεπίδια 	Ηπατοτοξικές
<b>Νοντουλαρίνες</b>	Nodularia spumigena	Κυκλικά πενταπεπίδια 	Ηπατοτοξικές
<b>Σαξιτοξίνες</b>	Anabaena, Aphanizomenon, Cylindrospermopsis, Lyngbya	Καρβαμικά αλκαλοειδή	Νευροτοξικές

			
<b>Ανατοξίνη-α</b>	Anabaena, Aphanizomenon, Planktothrix (Oscillatoria)	<b>Δικυκλικά αλκαλοειδή</b>	Νευροτοξική
			
<b>Ανατοξίνη-α(s)</b>	Anabaena	<b>Οργανοφωσφορικά</b>	Νευροτοξική
			
<b>Κυλινδροσπερμοψίνη</b>	Aphanizomenon, Cylindrospermopsin, Umezakia	<b>Αλκαλοειδή γουανιδίνης</b>	Ηπατοτοξική

			
<b>Λιποπολυσακχαρίτες (LPS)</b>	Aphanizomenon, Planktothrix (Oscillatoria)	<b>Λιποπολυσακχαρίτες</b>	<b>Δερματοτοξικοί</b>
			
<b>Τοξίνες Lyngbya</b>	Lyngbya	<b>Ινδόλο-αλκαλοειδή</b>	<b>Δερματοτοξικές</b>
			
<b>Απλυσιατοξίνη</b>	Lyngbya, Schizothrix, Planktothrix	<b>Ινδόλο-αλκαλοειδή</b>	<b>Δερματοτοξική</b>

	(Oscillatoria)		
<b>B-N-μεθυλαμινο-L-αλανίνη (BMAA)</b>	Anabaena, Cylindrospermopsin, Microcystis, Nostoc, Planktothrix (Oscillatoria)	Διαμινοξέα 	Νευροτοξική

Η τοξική δράση των κυανοτοξινών έχει μελετηθεί σημαντικά. Οι ηπατοτοξίνες προκαλούν ρήξη της δομής του ήπατος και υπερβολική συσσώρευση αίματος στο συκώτι. Αναστέλλουν επίσης τις πρωτεϊνικές φωσφατάσες τύπου 1 ή 2 (PP1 ή PP2A) στα ηπατικά κύτταρα ενώ έχουν ενοχοποιηθεί και για βλάβες στα νεφρά, την σπλήνα, την καρδιά και άλλα όργανα. Η μακροχρόνια έκθεση σε αυτές έχει συνδεθεί με αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης όγκων και καρκίνου. Οι νευροτοξίνες είναι οι τοξικότερες ενώσεις που παράγονται από τα κυανοβακτήρια. Δρουν ταχέως και παρεμβαίνουν στο νευρομυϊκό σύστημα προκαλώντας παράλυση των αναπνευστικών μυών και θάνατο από αναπνευστική ανεπάρκεια. Τέλος οι δερματοτοξικές κυανοτοξίνες μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές δερματίτιδες ενώ οι λιποπολυσακχαρίτες έχουν και φλεγμονώδη δράση. [7]



### 1.1.5 Επιπτώσεις στον άνθρωπο και στο περιβάλλον

Όπως γίνεται αντιληπτό, η παρουσία των κυανοβακτηρίων μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τα υδάτινα οικοσυστήματα. Κυανοβακτηριακές ανθήσεις σε λίμνες έχουν οδηγήσει σε έλλειψη του διαλυμένου στο νερό οξυγόνου με αποτέλεσμα τον θάνατο των ψαριών. Οι κυανοτοξίνες έχουν επίσης ενοχοποιηθεί για περιστατικά δηλητηρίασης ή ακόμη και θνησιμότητας σε ασπόνδυλα του νερού, υδρόβια πτηνά και άλλους θηρευτές. [4] Όπως έχει εκτιμηθεί 25 με 75% των κυανοβακτηριακών ανθήσεων είναι τοξικές. [3] Εκτός από τις τοξίνες τα κυανοβακτήρια παράγουν και άλλες ενώσεις (γεωσμίνη, 2-μεθυλοϊσοβορνεόλη) που αλλοιώνουν την γεύση και την οσμή του νερού, γεγονός που αποκλείει τις περιοχές αυτές ως πηγές πόσιμου νερού. [1] Κατά την αποσύνθεσή τους παράγονται επίσης σημαντικές ποσότητες αμμωνίας. [3] Συνολικά η ποιότητα του νερού υποβαθμίζεται ενώ η ισορροπία και η αρμονική λειτουργία του οικοσυστήματος διαταράσσονται.

Αν και η παρουσία των κυανοβακτηρίων στα επιφανειακά νερά είναι φυσική και χρήσιμη, οι μεγάλοι πληθυσμοί τους επηρεάζουν την βιοποικιλότητα της περιοχής. Οι υπόλοιποι οργανισμοί δυσκολεύονται να διαχειριστούν τις αυξανόμενες ποσότητες ενώ οι κυανοτοξίνες που παράγονται συσσωρεύονται σε αυτούς προκαλώντας σοβαρά προβλήματα στην ανάπτυξη και την αναπαραγωγή τους, οξειδωτικό στρες και βλάβες κυρίως στο ήπαρ. Περισσότερες είναι οι επιπτώσεις που αναφέρονται για τους οργανισμούς της στεριάς σε σχέση με τα υδρόβια είδη. Σκύλοι, φλαμίνγκο και βοοειδή έχουν πεθάνει από τοξίκωση που σχετίζεται με τις μικροκυστίνες, την ομοανατοξίνη-α και την ανατοξίνη-α. [1]



*Εικόνα 2: Κυανοβακτηριακή άνθιση του είδους *Microcystis aeruginosa* σε ταμειυτήρα νερού στη Γαλλία όπου τα επίπεδα χρωροφύλλης-α στην επιφάνεια ξεπέρασαν τα 200  $\mu\text{g/L}$  [2]*

Όσον αφορά τους ανθρώπους, υπάρχουν πολλές περιπτώσεις ασθενειών ή ακόμη και θανάτων που σχετίζονται με τις κυανοβακτηριακές ανθήσεις. Για παράδειγμα στην Βραζιλία το 1988 πέθαναν 88 και αρρώστησαν περίπου 2000 άνθρωποι εξαιτίας της παρουσίας κυανοτοξινών σε αποθέματα πόσιμου νερού μετά από πλημμύρα. Στην ίδια χώρα υπήρξαν 52 ακόμη θάνατοι και 64 ασθενείς από μικροκυστίνες που βρέθηκαν σε νερό που χρησιμοποιούνταν για αιμοκάθαρση ενώ στην Κίνα το 1993 παρατηρήθηκε αύξηση των ποσοστών καρκίνου του ήπατος στις περιοχές που εξαρτώνταν από επιφανειακό πόσιμο νερό [6]. Άλλες χώρες με γνωστά περιστατικά σοβαρών ασθενειών μετά από έκθεση σε κυανοβακτήρια και κυανοτοξίνες από το 1979 έως σήμερα είναι η Αυστραλία, ο Καναδάς, η Αγγλία, η Σουηδία και οι Η.Π.Α. [8]

Αξιοσημείωτη είναι και η οικονομική επιβάρυνση που υφίστανται οι τοπικές κοινωνίες από την παρουσία των κυανοβακτηρίων. Οι τοξικές ανθήσεις περιορίζουν τον τουρισμό με αποτέλεσμα την απώλεια σημαντικών εσόδων ενώ μεγάλα χρηματικά ποσά σπαταλούνται προκειμένου να αποκατασταθεί η ισορροπία του περιβάλλοντος. Χαρακτηριστικά αναφέρεται μία εκτίμηση που έγινε το 2009 για το κόστος του ευτροφισμού στα επιφανειακά νερά των Η.Π.Α. όπου υπολογίστηκε πως αυτό είναι μεγαλύτερο από 2.2 δισεκατομμύρια δολάρια ετησίως. [4]

## 1.2 Μικροκυστίνες

### 1.2.1 Προέλευση

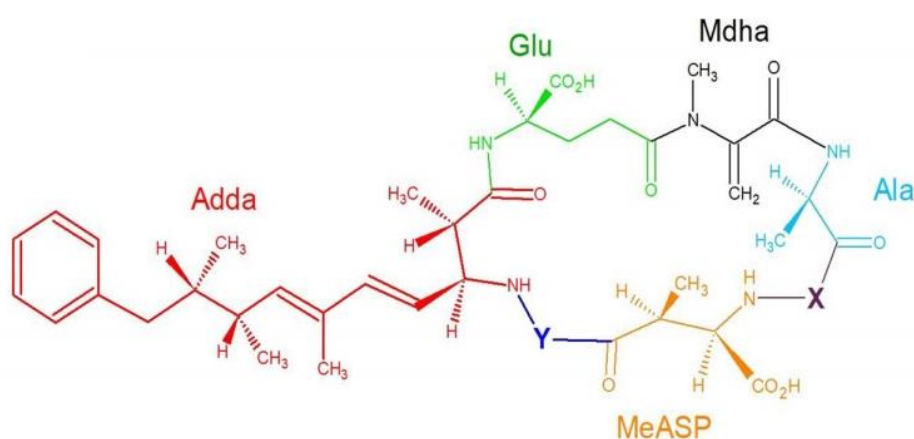
Οι μικροκυστίνες αποτελούν μία κατηγορία τοξινών που παράγονται από κυανοβακτήρια κυρίως σε υδατικά περιβάλλοντα. Το όνομά τους προήλθε το 1988 από το κυανοβακτήριο *Microcystis aeruginosa*, ωστόσο από τα κυανοβακτήρια που είναι γνωστά, 23 γένη και τουλάχιστον 27 είδη (π.χ. *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Dolichospermum*, *Limnothrix*, *Microcystis*, *Nostoc*, *Phormidium*, *Planktothrix* κ.α.) έχουν την ικανότητα να παράγουν μικροκυστίνες. Θεωρούνται δευτερογενείς μεταβολίτες, δηλαδή ενώσεις που δεν χρησιμοποιούνται στον πρωτογενή μεταβολισμό για την ανάπτυξη και την κυτταρική διαίρεση, ωστόσο φαίνεται να συμμετέχουν σε άλλες ενδογενείς και εξωγενείς λειτουργίες. [9] Μπορεί να λειτουργούν ως πεπτίδια ή λιποπεπτίδια που παράγονται από άλλα βακτήρια και μύκητες και δρουν ως αντιβιοτικά, παρεμποδιστές ενζύμων, ανοσοκατασταλτικά ή τοξίνες. [10] Όμως ο ακριβής ρόλος των μικροκυστινών στους οργανισμούς που τις παράγουν παραμένει αβέβαιος. [3] Γενικότερα οι μικροκυστίνες είναι οι συχνότερα απαντώμενες κυανοτοξίνες και αυτές που έχουν μελετηθεί περισσότερο. [5, 11, 12]

Στα φυσικά νερά, οι μικροκυστίνες υφίστανται μικροβιακή αποδόμηση και σε μικρότερο βαθμό φωτόλυση και προσρόφηση. Ωστόσο μπορούν να έρθουν σε επαφή με άλλους οργανισμούς για μεγάλο χρονικό διάστημα, θέτοντάς τους σε κίνδυνο. [3] Τα δείγματα που παραλαμβάνονται από τους υδάτινους πόρους συνήθως περιέχουν ποικιλία τοξινών. [13] Αυτές μπορεί να βρίσκονται μέσα στα κύτταρα των κυανοβακτηρίων, είτε εξωτερικά μετά από την λύση των κυττάρων που επέρχεται από τον φυσικό θάνατό τους αλλά και από τις πρακτικές επεξεργασίας του νερού. Ο αξιόπιστος προσδιορισμός όλων των μικροκυστινών που υπάρχουν σε ένα δείγμα είναι δύσκολος και απαιτεί εμπειρία και κατάλληλη οργανολογία. [5, 11, 14]

### 1.2.2 Δομή

Οι μικροκυστίνες είναι μονοκυκλικά επταπεπτίδια που αποτελούνται από μία ποικιλία αμινοξέων. Η γενική δομή τους είναι [-D-Ala-X-D-MeAsp-Y-Adda-D-Glu-Mdha-] όπου με D-Ala συμβολίζεται η D αλανίνη, με D-MeAsp το D-ερυθρο-β-μεθυλασπαραγινικό οξύ, με Adda το (2S,3S,8S,9S)-3-άμινο-9-μεθόξυ-2,6,8-τριμέθυλο-10-φαινυλδέκα-4,6-διενοϊκό οξύ, με D-Glu το D-γλουταμινικό οξύ και με Mdha η N-μεθυλδεϋδρολανίνη ενώ τα X και Y είναι δύο L αμινοξέα. Τα αμινοξέα X και Y μπορεί να είναι ίδια ή διαφορετικά. Ανάλογα με τον τύπο των X και Y αμινοξέων, την απομεθυλίωση του Mdha και τον ισομερισμό του Adda μπορεί να προκύψει ένα πλήθος μικροκυστινών. Μέχρι σήμερα έχουν ανακαλυφθεί περισσότερα από 310 μόρια μικροκυστινών, είτε παραλλαγές είτε συγγενικά είδη.

Το όνομα των μικροκυστινών προκύπτει από το είδος των X και Y αμινοξέων. Για παράδειγμα αν το αμινοξύ X είναι η λευκίνη και το αμινοξύ Y η αργινίνη, η τοξίνη ονομάζεται μικροκυστίνη LR (από τις συντομογραφίες των αμινοξέων στα αγγλικά) ή MC-LR. Η MC-LR είναι η μικροκυστίνη που έχει μελετηθεί περισσότερο έως τώρα εξαιτίας της τοξικότητάς της και αφθονίας της στην φύση. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι η MC-LR παρουσιάζεται σε ποσοστό από 46 έως 99.8% της συνολικής συγκέντρωσης μικροκυστινών στην φύση. Άλλες μικροκυστίνες που απαντώνται συχνά είναι οι MC-LA (λευκίνη,αλανίνη) , MC-RR (αργινίνη,αργινίνη), MC-YR (τυροσίνη,αργινίνη), MC-LF (λευκίνη,φαινυλαλανίνη) και MC-LW (λευκίνη,τρυπτοφάνη). [2, 15, 16]



Εικόνα 3: Η γενική δομή των μικροκυστινών [18]

### 1.2.3 Φυσικοχημικές ιδιότητες

Τα αμινοξέα που συναντώνται στο μόριο της μικροκυστίνης της προσδίδουν ξεχωριστές ιδιότητες. Για παράδειγμα το χαρακτηριστικό αμινοξύ Adda αυξάνει την υδροφοβικότητα και είναι απαραίτητο για την έκφραση της βιολογικής δραστηριότητας της μικροκυστίνης ενώ το αμινοξύ Mda λειτουργεί ως δέκτης για την αντίδραση Michael. [17] Μέσω της αντίδρασης Michael σχηματίζονται δεσμοί C-C. Πράγματι οι μικροκυστίνες αντιδρούν ήπια με τις οργανικές ενώσεις γλουταθειόνη και κυστεΐνη σχηματίζοντας άλλα προϊόντα. [5]

Συνολικά η δομή των μικροκυστινών περιλαμβάνει και πολικές και μη πολικές ομάδες. Η λιποφιλία επηρεάζεται σημαντικά από την παρουσία των καρβοξυλικών οξέων στα αμινοξέα Glu και MeAsp και τη συχνή εμφάνιση της αργινίνης στις θέσεις των X και Y αμινοξέων. Ταυτόχρονα οι μικροκυστίνες μπορούν να διαλυθούν στο καθαρό νερό και στην μεθανόλη αλλά σε υψηλές συγκεντρώσεις σχηματίζουν συσσωματώματα. Τείνουν να προσκολλούνται σε κάποια πλαστικά εάν

δεν υπάρχει αρκετή συγκέντρωση μεθανόλης στον διαλύτη. [2] Η κυκλική δομή τους τις καθιστά σταθερές και τους προσδίδει αντοχή σε θέρμανση, υδρόλυση και οξείδωση. Μπορούν να παραμείνουν για μήνες ή ακόμη και χρόνια σε κρύα, σκοτεινά υδατικά διαλύματα αλλά και σε ξηρά περιβάλλοντα εάν αποθηκευτούν σε θερμοκρασία δωματίου. [16, 18]

Η τοξικότητα των μικροκυστινών οφείλεται κυρίως στο αμινοξύ Adda. Όταν το αμινοξύ αυτό αφαιρείται, η τοξικότητα ολόκληρης της μικροκυστίνης μειώνεται σημαντικά. Εντούτοις, τα γεωμετρικά ισομερή του Adda στον C-7, δεν προσδίδουν τοξικότητα στις μικροκυστίνες -LR και -RR που εξετάστηκαν. Το αμινοξύ Glu φαίνεται επίσης να συνεισφέρει στη συνολική ηπατοτοξικότητα και συγκεκριμένα το ελεύθερο καρβοξυλικό οξύ που περιέχει. [5] Η εστεροποίηση της ελεύθερης καρβοξυλικής ομάδας του Glu μειώνει την τοξικότητα όπως επίσης και η αντικατάσταση του Mdha με N-μεθυλο λανθειονίνη. [19] Οι περισσότερες υποκαταστάσεις συμβαίνουν στα X και Y αμινοξέα ενώ η απομεθυλίωση στα αμινοξέα MeAsp και Mdha [20]. Οι μικροκυστίνες που περιέχουν πολικές υποκαταστάσεις στις θέσεις των X και Y αμινοξέων, όπως οι MC-RR και MC-M(O)R (σουλφοξείδιο μεθειονίνης, αργινίνη) είναι οι λιγότερο τοξικές. [3]

#### 1.2.4 Σύνθεση

Η εξέλιξη της βιοσύνθεσης των μικροκυστινών παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον. Οι μικροκυστίνες παράγονται από πολύ διαφορετικά μεταξύ τους κυανοβακτήρια: μονοκυτταρικά, πολυκυτταρικά, νηματώδη, βακτήρια με δυνατότητα σταθεροποίησης του αζώτου (heterocystous) ή χωρίς αυτή (nonheterocystous). Πολλά στελέχη παράγουν διάφορες μικροκυστίνες ταυτόχρονα αλλά μόνο μία ή δύο από αυτές κυριαρχούν σε κάθε στέλεχος. Την ίδια στιγμή, τα περισσότερα κυανοβακτήρια δεν συνθέτουν μικροκυστίνες ενώ ακόμη και ανάμεσα σε αυτά που το κάνουν, πολλά κοντινά είδη δεν έχουν την ίδια δυνατότητα. [21]

Η σύνθεση των μικροκυστινών γίνεται μη ριβοσωμικά από ένα μεγάλο ενζυμικό σύμπλοκο που κωδικοποιείται από τα γονίδια *mcyA-J* και εμφανίζει ομοιότητες με την σύνθεση των νοντουλαρινών (NODs). Για να δημιουργηθεί μία μικροκυστίνη συνεργάζονται μη ριβοσωμικές συνθετάσες πεπτιδίων, συνθετάσες πολυκετιδίων και άλλα ένζυμα τροποποίησης. Αρχικά συντίθεται το Adda με τη βοήθεια συνθετασών πολυκετιδίων και στη συνέχεια προστίθενται με τη σειρά τα υπόλοιπα έξι αμινοξέα από τις συνθετάσες πεπτιδίων. Ταυτόχρονα πραγματοποιούνται προσθήκες ή διορθώσεις από μεγάλες πολυλειτουργικές πρωτεΐνες ή ένζυμα κωδικοποιημένα από διαφορετικά γονίδια. Ανάλογα με τα είδη των γονιδίων που διαθέτουν τα κυανοβακτήρια, προκύπτουν διαφορές στην παραγωγή των μικροκυστινών. [2]

### 1.2.5 Τοξικότητα

Η μελέτη των μικροκυστινών είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την διασφάλιση της υγείας του ανθρώπου και της ισορροπίας του περιβάλλοντος. Όπως έχει αποδειχθεί η άνθηση των μικροκυστινών στους υδάτινους πόρους του πλανήτη, συνδέεται με περιστατικά δηλητηρίασης άγριων ή οικόσιτων ζώων και ψαριών αλλά και με την επιβάρυνση της ανθρώπινης υγείας. [18] Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι στη Σουηδία το 1994, 121 άνθρωποι εμφάνισαν ασθένειες του γαστρεντερικού συστήματος όταν πόσιμο νερό ήρθε σε επαφή με νερό που περιείχε μικροκυστίνες. Στην ίδια χώρα βοοειδή παρουσίασαν ηπατική βλάβη. Στην επαφή με μικροκυστίνες αποδόθηκαν και προβλήματα του αναπνευστικού συστήματος, ερεθισμοί του δέρματος, ηπατική δυσλειτουργία, γαστρεντερικές διαταραχές ή ακόμη και θάνατοι σκύλων, βοοειδών, ψαριών και πουλιών στο Ηνωμένο Βασίλειο, την περίοδο 1989-2004. [22]

Οι μικροκυστίνες είναι οι κυανοτοξίνες που απαντώνται συχνότερα στο νερό. Ειδικότερα η παρουσία τους στο πόσιμο νερό πάνω από τα θεσμοθετημένα όρια το καθιστά ακατάλληλο προς πόση. Όταν εισέλθουν στον ανθρώπινο οργανισμό δρουν ως παρεμποδιστές των πρωτεϊνικών φωσφατάσων 1 (PP1), PP2A, PP3 και PP4 με αποτέλεσμα την υπερβολική φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών στα κύτταρα από τις κινάσες. Οι φωσφατάσες PP1 και PP2A είναι τα ένζυμα που αποφωσφορυλιώνουν τα υπολείμματα σερίνης και θρεονίνης και υπάρχουν τόσο σε ευκαρυωτικά όσο και σε προκαρυωτικά κύτταρα. Η υπερφωσφορυλίωση των πρωτεϊνών οδηγεί σε αποσυναρμολόγηση των μικροϊνών, κυτταρική λύση και αιμορραγία του ήπατος. Άλλες επιπτώσεις είναι ο σχηματισμός όγκων και καρκινικών μεταλλάξεων καθώς και η διατάραξη των μηχανισμών της κυτταρικής διαίρεσης. [3]

### 1.2.6 Νομοθεσία

Στην προσπάθεια προστασίας της ανθρώπινης υγείας από τις κυανοτοξίνες, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας παρέχει πληροφορίες, συμβουλές και οδηγίες διαχείρισης. Ορισμένες χώρες έχουν υιοθετήσει αυτούσιες τις συγκεκριμένες οδηγίες ενώ άλλες έχουν αναπτύξει εθνικές πολιτικές και πρωτόκολλα διαχείρισης που διαφέρουν στην εγκυρότητα, το περιεχόμενο και το πεδίο εφαρμογής. Λιγότερες χώρες, όπως η Βραζιλία, έχουν θεσπίσει ειδική νομοθεσία για τον περιορισμό των μικροκυστινών στο πόσιμο νερό. Αυτή η νομοθεσία είναι συνήθως συμβαδίζουσα με την πρόταση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, σύμφωνα με την οποία η συγκέντρωση της μικροκυστίνης-LR στο νερό της πηγής που προορίζεται για πόσιμο νερό πρέπει να είναι μικρότερη ή ίση του 1 μg/L. [23] Για να εξαχθεί το συγκεκριμένο αποτέλεσμα θεωρείται σωματικό βάρος 60 Kg και ημερήσια κατανάλωση νερού ίση με 2 L, όπως συνηθίζεται. [22] Η συγκέντρωση που αναφέρθηκε αφορά το άθροισμα των ενδοκυτταρικών και εξωκυτταρικών



ποσοτήτων μικροκυστίνης στην περίπτωση που το νερό περιέχει κύτταρα κυανοβακτηρίων. Εάν η τιμή της συγκέντρωσης ξεπεράσει αυτό το όριο, τότε είναι απαραίτητη η περαιτέρω επεξεργασία του πόσιμου νερού ειδικά θα πρέπει να παραλαμβάνεται από άλλη πηγή. [24] Ο ΠΟΥ αναφέρει επίσης την τιμή 12 μg/L ως την ανώτερη συγκέντρωση μικροκυστινών στο νερό που μπορεί να καταναλώνεται για περιόδους έως 2 εβδομάδες χωρίς επιπλοκές, στις περιπτώσεις που υπάρχουν προβλήματα στο δίκτυο του νερού. Αφορά τους ενήλικες και δεν ενδείκνυται για επαναλαμβανόμενες υπερβάσεις του αρχικού ορίου. Στα βρέφη και τα μωρά, λόγω της μεγαλύτερης κατανάλωσης νερού ανά μονάδα σωματικού βάρους, είναι καλό να εξασφαλίζεται εναλλακτική πηγή νερού αν οι συγκεντρώσεις είναι μεγαλύτερες από 3 μg/L ακόμη και για μικρότερες περιόδους. [23]

Όσον αφορά τα νερά που χρησιμοποιούνται για ψυχαγωγικούς σκοπούς, ο ΠΟΥ έχει ορίσει ως ανώτατο όριο συγκέντρωσης μικροκυστινών την τιμή 24 μg/L. Οι παραπάνω τιμές βασίζονται σε μελέτες που έγιναν σε ποντίκια και αρουραίους χρησιμοποιώντας την μικροκυστίνη LR. Για την αποτελεσματικότερη προστασία της δημόσιας υγείας κρίνεται σημαντική η σύγκριση των τιμών αυτών με εκείνες που αφορούν συνολικά τις μικροκυστίνες μιας και συνήθως εμφανίζονται ως μείγματα. [23]

Παράλληλα έχουν καθοριστεί τιμές συγκέντρωσης κυττάρων κυανοβακτηρίων που χωρίζουν σε τρία επίπεδα την επικινδυνότητα και την πιθανότητα επιβάρυνσης της ανθρώπινης υγείας κατά την επαφή με το νερό για λόγους ψυχαγωγίας. Όταν τα νερά περιέχουν έως 20.000 κύτταρα/ml ο κίνδυνος για την υγεία είναι χαμηλός, για το εύρος 20.000 έως 100.000 κύτταρα/ml είναι μέτριος ενώ για περισσότερα από 100.000 κύτταρα/ml υψηλός. [4]

Το 1997 δημιουργήθηκε και ο πρώτος περιορισμός στη συγκέντρωση των κυανοτοξινών στα συμπληρώματα διατροφής. Συγκεκριμένα τέθηκε ίσος με 1 μg μικροκυστινών/g ξηρού βάρους κυανοβακτηρίων. [25]

## 1.3 Μέθοδοι απομάκρυνσης μικροκυστινών

### 1.3.1 Φυσικές μέθοδοι απομάκρυνσης

Μέχρι σήμερα έχει πραγματοποιηθεί σημαντική έρευνα για την απομάκρυνση των μικροκυστινών από το νερό. Η επεξεργασία του πόσιμου νερού συμπεριλαμβάνει ορισμένες θεμελιώδεις και κάποιες προαιρετικές διεργασίες που εξασφαλίζουν την υψηλή ποιότητά του. Τα βασικότερα βήματα επεξεργασίας περιλαμβάνουν συνήθως χοντρό φιλτράρισμα που ακολουθείται από διαύγαση για την αφαίρεση της φυσικής οργανικής ύλης και απολύμανση για αδρανιοποίηση των παθογόνων μικροοργανισμών. Αυτές οι τεχνικές μπορούν να χωριστούν σε δύο

κατηγορίες: αυτές που βασίζονται στην κατακράτηση ρύπων (κροκίδωση, καθίζηση, διήθηση άμμου, προσρόφηση κ.λπ.) και εκείνες που βασίζονται στην αποδόμηση των ρύπων (βιοαποικοδόμηση, οξειδωση κ.λπ.) [26, 27]

Η κροκίδωση και η καθίζηση χρησιμοποιούνται συχνά στην επεξεργασία του νερού. Η παραδοσιακή διαδικασία κροκίδωσης περιλαμβάνει την προσθήκη στο νερό ενός μεταλλικού άλατος (π.χ. θειϊκό αργίλιο, χλωριούχος σίδηρος), με αποτέλεσμα τη δημιουργία ιζήματος που παρασύρει και άλλα αιωρούμενα σωματίδια. [28] Ωστόσο η κροκίδωση δεν είναι αποτελεσματική στην αφαίρεση των εξωκυτταρικών μικροκυστινών και μπορεί να οδηγήσει σε λύση των κυανοβακτηριακών κυττάρων. Η καθίζηση ακολουθείται τυπικά από ταχεία ή αργή διήθηση με άμμο, χαλίκι ή ανθρακίτη. Δεν επιτυγχάνει σημαντική μείωση της τοξικότητας αλλά σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους είναι χρήσιμη. [26]

Η διήθηση με μεμβράνες εμφανίζει καλύτερα αποτελέσματα. Περιλαμβάνει τέσσερις κατηγορίες σύμφωνα με το μέγεθος των πόρων της μεμβράνης: μικροδιήθηση (0,1–10 μm), υπερδιήθηση (1–100 nm), νανοδιήθηση (περίπου 1 nm) και αντίστροφη όσμωση (0,1 nm). [27] Βασίζεται στη διαφορά πίεσης και μπορεί να αφαιρέσει και τις εξωκυτταρικές τοξίνες. Όμως το κόστος αγοράς και συντήρησης των μεμβρανών είναι υψηλό ενώ υπάρχει η ανάγκη υψηλής τεχνικής εξειδίκευσης. [26]

Ο ενεργός άνθρακας σε μορφή σκόνης ή κόκκων χρησιμοποιείται επίσης για την απομάκρυνση των ρύπων από το νερό εξαιτίας του υψηλού πορώδους του και της μεγάλης επιφάνειάς του. Οι εξωκυτταρικές μικροκυστίνες προσροφώνται σε αυτόν έντονα αλλά οι ενδοκυτταρικές μικροκυστίνες και τα κυανοβακτήρια όχι. Η προσρόφηση εξαρτάται από το μέγεθος των πόρων, τον χρόνο επαφής και την παρουσία άλλων ανταγωνιστικών ενώσεων που προσροφώνται. Είναι μία ασφαλής μέθοδος καθώς δεν παράγει παραπροϊόντα αλλά έχει υψηλό κόστος λόγω της απαίτησης για συχνή αλλαγή του άνθρακα. Έτσι λειτουργεί καλύτερα σε συνδυασμό με άλλες τεχνικές. [26, 29]

### 1.3.2 Βιοαποικοδόμηση

Αν και σε μικρότερο βαθμό σε σχέση με τις φυσικές και τις χημικές μεθόδους, για την απομάκρυνση των μικροκυστινών από το νερό χρησιμοποιείται και η βιοαποικοδόμηση. Είναι μία φιλική προς το περιβάλλον και οικονομικά αποδοτική μέθοδος. Οι μικροκυστίνες μπορούν να διασπαστούν από αρκετά υδρόβια βακτήρια που έχουν βρεθεί σε υδατικά περιβάλλοντα σε όλο τον κόσμο. Η πλειοψηφία των βακτηρίων με αυτή την ικανότητα ανήκουν στα α-πρωτεοβακτήρια (*Sphingomonas spp.* και *Sphingorhynchus spp.*) αλλά υπάρχουν και κάποια β-πρωτεοβακτήρια (π.χ. *Pseudomonas aeruginosa*) όπως και γ-πρωτεοβακτήρια (π.χ. *Raouibacter toxinivorans*), ακτινοβακτήρια και βάκιλλοι. [30] Η βιοαποικοδόμηση



των μικροκυστινών πραγματοποιείται κυρίως αερόβια. Ωστόσο νέες έρευνες αποκάλυψαν ότι μπορούν να αποικοδομηθούν ταχέως και αναερόβια με την προσθήκη ορισμένων φυσικών ιζημάτων. [31] Το μονοπάτι της αποικοδόμησης της μικροκυστινής MC-LR είναι επίσης γνωστό. Το βακτήριο ACM-3962 του είδους *Sphingomonas* μπορεί να διασπάσει την μικροκυστίνη χρησιμοποιώντας τρία ένζυμα και να την μετατρέψει με αυτόν τον τρόπο σε μη τοξικά προϊόντα. [32] Η βιοαποικοδόμηση μπορεί να διαρκέσει από μερικές ώρες έως αρκετές μέρες και είναι αποτελεσματική μόνο για τις εξωκυτταρικές μικροκυστίνες. Γι' αυτό θα πρέπει να χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλες τεχνικές επεξεργασίας του νερού όπως τη διήθηση ή την προσρόφηση. [26, 33]

### 1.3.3 Συμβατικές μέθοδοι οξείδωσης

Συχνά κατά τη συμβατική διαχείριση των μικροκυστινών πραγματοποιείται η προσθήκη στο νερό χημικών οξειδωτικών όπως είναι το χλώριο, το διοξειδίο του χλωρίου, το υπεροξειδίο του υδρογόνου, το όζον και το υπερμαγγανικό. Όσον αφορά τον βαθμό οξείδωσης έχει αποδειχθεί ότι η σειρά που συνήθως ισχύει είναι η εξής:  $O_3 > H_2O_2 > HOCl > ClO_2 > KMnO_4 > Cl_2$ . Ωστόσο παρατηρούνται διαφοροποιήσεις που εξαρτώνται από τον τύπο της ένωσης που οξειδώνεται κάθε φορά. [18] Τα οξειδωτικά προστίθενται συνήθως στην αρχή ή το τέλος της συνολικής διαδικασίας επεξεργασίας του νερού αλλά μπορούν να προστεθούν και σε ενδιάμεσα στάδια. Έχουν ως στόχο τον έλεγχο της οσμής και της γεύσης του νερού, την αφαίρεση πιθανών χρωματισμών και την απολύμανσή του. [34]

Η χλωρίωση, που χρησιμοποιείται ευρέως για τον καθαρισμό του πόσιμου νερού είναι μία πιθανή λύση για την απομάκρυνση των μικροκυστινών αλλά η αποτελεσματικότητά της εξαρτάται από λειτουργικές παραμέτρους όπως η φύση των ενώσεων χλωρίου που χρησιμοποιούνται. Ασθενέστερα οξειδωτικά με βάση το χλώριο, όπως το διοξειδίο του χλωρίου και οι χλωραμίνες, έχουν βρεθεί ανεπαρκή. Ταυτόχρονα εμφανίζει μειονεκτήματα όπως είναι η παραγωγή τοξικών παραπροϊόντων (τριαλογομεθάνια, αλογονούχα οξικά οξέα) και η αλλοίωση της γεύσης και της οσμής του νερού. Η χρήση υπερμαγγανικού έχει προοπτικές για την απομάκρυνση των μικροκυστινών από τα φυσικά νερά, καθώς φαίνεται να μειώνει την τοξικότητα σχηματίζοντας ακίνδυνα προϊόντα. Είναι πιο δραστικό από το χλώριο απέναντι στις μικροκυστίνες και έχει την ικανότητα να απενεργοποιεί τα κύτταρα του κυανοβακτηρίου *M. Aeruginosa*. Τέλος, η κατεργασία με όζον είναι μία οικονομικά βιώσιμη μέθοδος που αποδείχθηκε ότι περιορίζει τις τοξικές ιδιότητες των MC-LR και MC-RR. Έχει πλεονέκτημα για νερά πλούσια σε διαλυμένα οργανικά (DOC) ενώ η αλκαλικότητα είναι ο βασικός παρεμποδιστής. [18]

### 1.3.4 Προχωρημένες μέθοδοι οξείδωσης

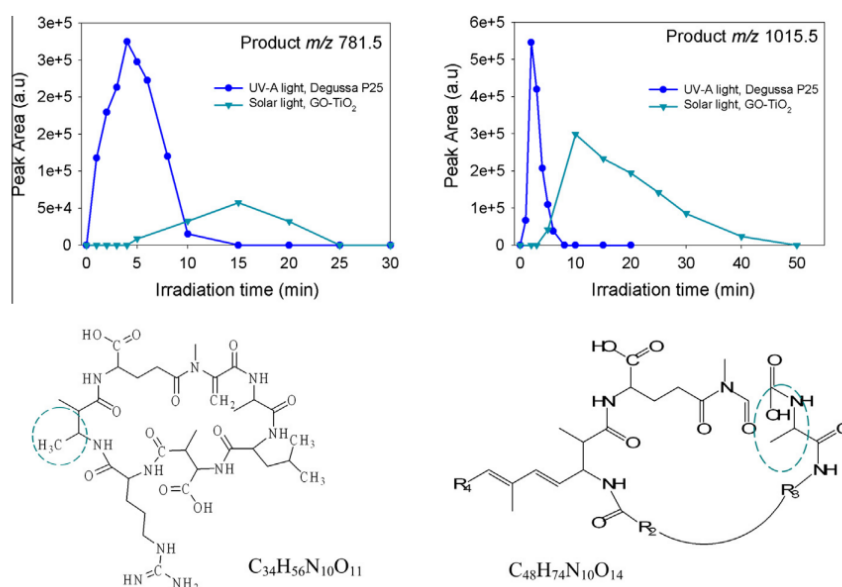
Οι προχωρημένες μέθοδοι οξείδωσης αποτελούν μία σημαντική, αποτελεσματική και φιλική προς το περιβάλλον εναλλακτική για την απομάκρυνση των μικροκυστινών από το νερό, που συζητείται όλο και περισσότερο τα τελευταία χρόνια. Έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την απομάκρυνση ή την αποικοδόμηση ιδιαίτερα ανθεκτικών ρύπων αλλά και ως προκατεργασία για την μετατροπή των ρύπων σε ενώσεις μικρότερου μοριακού βάρους, οι οποίες στη συνέχεια μπορούν να υποστούν περαιτέρω συμβατική ή βιολογική επεξεργασία. [35] Η αρχή λειτουργίας των προχωρημένων μεθόδων οξείδωσης βασίζεται στην παραγωγή των δραστικών ριζών και ιδιαίτερα των ριζών υδροξυλίου (OH•) μέσω χημικών, φωτοχημικών, ηχολυτικών ή ηλεκτροχημικών αντιδράσεων. Η επεξεργασία του νερού με αυτό τον τρόπο πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου και κανονική πίεση ενώ τα ιδανικά τελικά προϊόντα είναι το CO<sub>2</sub>, το νερό και διάφορα ανόργανα ιόντα. Κατά την επεξεργασία του νερού με προχωρημένες μεθόδους οξείδωσης είναι αναγκαίο να ληφθεί υπόψη η ύπαρξη άλλων ενώσεων (οργανική ύλη ή ανόργανα ιόντα) που δρουν ανταγωνιστικά με τους οργανικούς ρύπους - στόχους και αντιδρούν πρώτες με τις παραγόμενες ρίζες. [36, 37]

Κάποιες από τις βασικότερες χημικές προχωρημένες μεθόδους οξείδωσης είναι η οξείδωση Fenton και η οξείδωση με O<sub>3</sub> και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Στις φωτοχημικές κατατάσσονται η φωτόλυση με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV, η φωτόλυση με O<sub>3</sub>/UV, η φωτο-Fenton (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup>/UV) οξείδωση και η ετερογενής φωτοκατάλυση (TiO<sub>2</sub>/UV). Η ανοδική οξείδωση και η διεργασία/οξείδωση EF είναι ηλεκτροχημικές μέθοδοι. Η ηχόλυση, η ραδιόλυση και τα μικροκύματα είναι επίσης εναλλακτικές προχωρημένες μέθοδοι οξείδωσης. [18, 37, 38] Αξίζει να σημειωθεί ότι στα φυσικά οικοσυστήματα, σε πλήρη ηλιοφάνεια οι μικροκυστίνες υφίστανται αργή φωτοχημική διάσπαση και ισομερισμό. Ο ρυθμός της αντίδρασης ενισχύεται από την παρουσία συγκεκριμένων υδατοδιαλυτών κυττάρων (phycobiliproteins) και από ορισμένες φυσικά σχηματιζόμενες χουμικές ουσίες που δρουν ως φωτοευαισθητοποιητές. [34, 35]

#### 1.3.4.1 Ενδιάμεσα προϊόντα κατά την οξείδωση των μικροκυστινών με προχωρημένες μεθόδους οξείδωσης

Κατά την οξείδωση των μικροκυστινών προκύπτουν ενδιάμεσα προϊόντα τα οποία εμφανίζουν ενδιαφέρον τόσο για την διασαφήνιση του μηχανισμού αποικοδόμησης όσο και για την παρακολούθηση της τοξικότητας. Τα προϊόντα αυτά δεν είναι εμπορικά διαθέσιμα και η ταυτοποίηση τους μέχρι σήμερα έχει βασιστεί στη φασματομετρία μαζών. Σύμφωνα με το λόγο μάζας προς φορτίο (m/z) που μετράται πριν και μετά την οξείδωση της μικροκυστίνης σε συστήματα υγροχρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών (LC-MS), εξάγεται το συμπέρασμα για τις πιθανές θέσεις που έχει προσβληθεί το μόριο με αποτέλεσμα να προκύψουν οι νέες ενώσεις-ενδιάμεσα. Αν και η μέθοδος αυτή δίνει μία χρήσιμη πρώτη εκτίμηση, τα αποτελέσματα είναι αμφίβολα και χρήζουν επιβεβαίωσης. [39]

Ενδεικτικά αναφέρονται τα ενδιάμεσα προϊόντα που προέκυψαν από την αποικοδόμηση της μικροκυστίνης MC-LR υπό ακτινοβολία UV-A ή ηλιακό φως και φωτοκαταλύτες με βάση το  $\text{TiO}_2$ . Τα πρωτογενή ενδιάμεσα προϊόντα σχηματίζονται από την προσβολή του αμινοξέος Adda σε τρεις θέσεις και του αμινοξέος Mdha σε μία θέση, με τους δεσμούς διενίου να είναι η πιο επηρεασμένη θέση. Όλα τα άλλα αναγνωρισμένα ενδιάμεσα προϊόντα σχηματίζονται μέσω περαιτέρω οξείδωσης των πρωτογενών. Όσον αφορά τους μετασχηματισμούς στην πλευρική αλυσίδα Adda, η απώλεια της μεθοξυ-ομάδας οδηγεί σε ενδιάμεσο με  $m/z=1009,5$ . Διπλή υδροξυλίωση στον αρωματικό δακτύλιο του Adda αποδίδει το  $m/z=1027,5$  ενδιάμεσο. Ένα άλλο ενδιάμεσο που παρατηρείται με  $m/z=1045,5$  προέρχεται από τριπλή υδροξυλίωση της MC-LR (ένα στον αρωματικό δακτύλιο και δύο στην αλυσίδα Adda). Από την παρακολούθηση της αναστολής της πρωτεϊνικής φωσφατάσης (protein phosphatase inhibition assay, PPIA) εξάγεται το συμπέρασμα για μείωση της συνολικής τοξικότητας με την πάροδο του χρόνου ακτινοβολίας. [40]



**Εικόνα 4:** Η εξέλιξη των προϊόντων με  $m/z=781.5$  και  $m/z=1015.5$  κατά τη φωτοκατάλυση της MC-LR ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) με καταλύτες τους Degussa P25  $\text{TiO}_2$  ( $200 \text{ mg L}^{-1}$ ) και  $\text{GO-TiO}_2$  ( $200 \text{ mg L}^{-1}$ ) υπό ακτινοβολία UV-A και ηλιακό φως αντίστοιχα

Άλλα ενδιάμεσα προϊόντα εμφανίζονται με  $m/z=781.5$  και  $m/z=1015.5$ . Μπορεί να οφείλονται στη διάσπαση του δεσμού άνθρακα και του κυκλικού τμήματος [-Glu-Mdha-Ala-Leu-MeAsp-Arg-] της MC-LR και στη διάσπαση του δεσμού C-CO του διπλού υδροξυλιωμένου άνθρακα του προϊόντος με  $m/z=1029$  (από την προσβολή του Mdha) αντίστοιχα. [40] Μία ακόμη μελέτη φωτοκατάλυσης με  $\text{TiO}_2$ , αναφέρει επιπλέον ενδιάμεσες ενώσεις ( $m/z$ : 313.5, 368.5, 389, 411.5, 417, 437, 457, 515.5, 544, 795, 811, 835, 980.5, 1011.5 και 1031.5) και προτείνει τις πιθανές δομές τους. Τα ενδιάμεσα προϊόντα που προέκυψαν από τη χρήση

ακτινοβολίας UV-A και ηλιακού φωτός ήταν και στις δύο παραπάνω περιπτώσεις παρόμοια. [41]

Για την καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού οξείδωσης των παραπάνω τοξινών και την ταυτοποίηση των ενδιαμέσων προϊόντων προτείνεται σε αυτή την εργασία μία μέθοδος που στηρίζεται στην ανάλυση των αμινοξέων των μικροκυστινών. Συγκεκριμένα, η μικροκυστίνη υδρολύεται στα αμινοξέα της και με τη βοήθεια της υγροχρωματογραφίας σε συνδυασμό με τη φθορισμομετρία ή τη φασματομετρία μαζών, μετράται η συγκέντρωσή τους πριν και μετά την οξείδωση. Η μείωση της συγκέντρωσης ενός αμινοξέος αποκαλύπτει την προσβολή του από τα οξειδωτικά μέσα. Η παρούσα εργασία επικεντρώνεται στην κατασκευή της χρωματογραφικής μεθόδου και την υδρόλυση.

## 1.4 Μέθοδοι διαχωρισμού και ανίχνευσης αμινοξέων

### 1.4.1 Υγροχρωματογραφία

#### 1.4.1.1 Αρχή της μεθόδου

Η υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης αποτελεί μία ευρέως χρησιμοποιούμενη αναλυτική τεχνική κατάλληλη για τον διαχωρισμό, την ποσοτικοποίηση, την ταυτοποίηση και την ανάλυση χημικών ουσιών. Σε σχέση με άλλες τεχνικές διαχωρισμού, εμφανίζει πλεονεκτήματα όπως είναι η δυνατότητα εφαρμογής σε ένα πλήθος ενώσεων, η ακρίβεια στην ανάλυση, το ευρύ φάσμα του διαθέσιμου εξοπλισμού και η εύκολη πρόσβαση σε αυτή. [42] Τα δείγματα που μπορούν να αναλυθούν είναι είτε στερεά είτε υγρά, έχουν τυπικά όγκο περίπου 10  $\mu\text{L}$  και συγκέντρωση 0.1–100-mg/mL. [43] Ο διαχωρισμός των ενώσεων επιτυγχάνεται αξιοποιώντας τις αλληλεπιδράσεις του αναλύτη με την στατική και την κινητή φάση. Η στατική φάση ταυτίζεται με το πληρωτικό υλικό της στήλης ενώ η κινητή φάση εισάγεται σε αυτή με σταθερή ροή. Οι ενώσεις που περιλαμβάνονται στο προς διαχωρισμό δείγμα εξέρχονται σε διαφορετικούς χρόνους, που εξαρτώνται από τη δομή τους και από τη σύσταση της κινητής και της στατικής φάσης. Μετά τον διαχωρισμό, οι ουσίες που εξέρχονται από τη στήλη εντοπίζονται με τη βοήθεια ενός ανιχνευτή.

### 1.4.1.2 Είδη υγρής χρωματογραφίας

1. *Χρωματογραφία προσρόφησης (κανονικής φάσης):* Η στατική φάση είναι ένα σχετικά πολικό υλικό με μεγάλη ειδική επιφάνεια. Συνήθως χρησιμοποιούνται το πυρίτιο, η αλουμίνα και το οξείδιο του μαγνησίου. Η κινητή φάση είναι σχετικά μη πολική (επτάνιο ή τετραϋδροφουράνιο) και ανάλογα με τον βαθμό με τον οποίο τα διάφορα μόρια του μείγματος προσροφώνται στη στατική φάση, επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός. Οι πολικές ενώσεις εκλούνται αργότερα από τις μη πολικές.
2. *Χρωματογραφία αντίστροφης φάσης:* Η στατική φάση είναι έντονα μη πολική ενώ η κινητή φάση είναι σχετικά πολική (νερό σε ετραϋδροφουράνιο). Οι πολικές ενώσεις εκλούνται νωρίτερα από τις μη πολικές.
3. *Χρωματογραφία με χημικά συνδεδεμένες φάσεις:* Η στατική φάση είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με το υλικό στήριξης μέσω χημικής αντίδρασης. Συνήθως εφαρμόζεται ως χρωματογραφία αντίστροφης φάσης.
4. *Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής:* Η στατική φάση περιέχει ιοντικές ομάδες (π.χ.  $\text{NR}_3^+$  ή  $\text{SO}_3^-$ ) που αλληλεπιδρούν με τις ιοντικές ομάδες στα μόρια του δείγματος. Είναι κατάλληλη για τον διαχωρισμό αμινοξέων, ιοντικών μεταβολικών προϊόντων και οργανικών ιόντων.
5. *Χρωματογραφία ζεύγους ιόντων:* Τα ιοντικά μόρια των δειγμάτων ενώνονται με ιόντα αντίθετου φορτίου της κινητής φάσης σχηματίζοντας έτσι ζεύγη ιόντων. Αποτελεί χρωματογραφία αντίστροφης φάσης και δίνει τη δυνατότητα να αναλυθούν ταυτόχρονα οξέα, βάσεις και ουδέτερες ενώσεις.
6. *Χρωματογραφία ιόντων:* Αποτελεί ειδική κατηγορία της χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής αλλά ο εξοπλισμός που χρησιμοποιείται είναι διαφορετικός. Χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό ιόντων ισχυρών οξέων και βάσεων (π.χ.  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ).
7. *Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους:* Τα μόρια διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους. Τα μεγαλύτερα μόρια εκλούνται πρώτα και ακολουθούν τα μικρότερα. Επιλέγεται όταν το δείγμα που επεξεργαζόμαστε περιέχει ενώσεις με διαφορά στο μοριακό βάρος τουλάχιστον 10%.
8. *Χρωματογραφία συγγένειας:* Η στατική φάση περιέχει ειδικές ομάδες μορίων. Τα μόρια του δείγματος μπορούν να προσροφηθούν σε αυτή μόνο αν ικανοποιούνται ορισμένες συνθήκες που σχετίζονται με το φορτίο και την δομή (π.χ. αλληλεπίδραση αντισωμάτων και αντιγόνων).

[44]

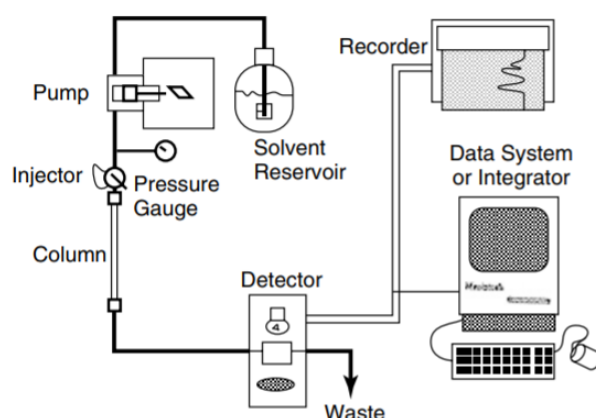
### 1.4.1.3 Βασικά τμήματα χρωματογράφου

#### 1.4.1.3.1 Εργαστηριακός εξοπλισμός

Στην Εικόνα 5 φαίνεται ο κύριος εξοπλισμός που χρησιμοποιείται για την HPLC εργαστηριακά. Τα μέρη που διακρίνονται είναι:

- Δοχείο διαλύτη
- Αντλία
- Εγχυτήρας
- Μανόμετρο
- Αναλυτική στήλη
- Ανιχνευτής
- Απόβλητα
- Σύστημα επεξεργασίας δεδομένων
- Καταγραφέας

Εκτός των εικονιζόμενων συχνά χρησιμοποιούνται συμπληρωματικά διαλύτες, προσθήλες, φίλτρα κ.α.



Εικόνα 5: Τυπική πειραματική διάταξη HPLC [46]

#### 1.4.1.3.2 Χρωματογραφική στήλη

Οι στήλες που χρησιμοποιούνται στην υγροχρωματογραφία κατασκευάζονται συνήθως από ανοξείδωτο χάλυβα. Οι περισσότερες έχουν μήκος από 5 έως 25 cm και είναι ευθύγραμμες. Η εσωτερική τους διάμετρος είναι συνήθως 3 έως 5 mm και το μέγεθος σωματιδίων του υλικού πλήρωσης είναι 3 ή 5  $\mu\text{m}$ . Για την αύξηση του χρόνου ζωής της αναλυτικής στήλης συχνά προηγείται μία μικρή προστατευτική στήλη (guard-column) ή προσθήλη (pre-column). Η προσθήλη απομακρύνει τα αιωρούμενα σωματίδια και τις προσμίξεις από τον διαλύτη, αλλά και τα συστατικά του δείγματος που συνδέονται με τη στατική φάση κατά μη αντιστρεπτό τρόπο. Η σύσταση του υλικού της πρέπει να είναι παρόμοια με αυτή της αναλυτικής στήλης ενώ το μέγεθος των σωματιδίων μεγαλύτερο έτσι ώστε να ελαχιστοποιείται η πτώση πίεσης. [45] Γενικότερα κατά τη λειτουργία της

χρωματογραφικής στήλης είναι επιθυμητό η πίεση να παραμένει σε σταθερά επίπεδα και γι αυτό ελέγχεται συνεχώς και χρησιμοποιείται ως δείκτης για την εξέλιξη της ανάλυσης.

#### 1.4.1.3.3 Στατική φάση/ Υλικό πλήρωσης

Οι δύο τύποι υλικών πλήρωσης που χρησιμοποιούνται στην υγροχρωματογραφία αποτελούνται είτε από επιφανειακώς καλυπτόμενα σωματίδια (pellicular particles) είτε από πορώδη. Με την πάροδο των χρόνων τα μικρά πορώδη σωματίδια αντικατέστησαν πλήρως τα μεγάλα επιφανειακώς καλυπτόμενα ενώ γίνονται συνεχείς προσπάθειες για την περαιτέρω μείωση του μεγέθους τους. Το υλικό τους είναι συνήθως η πυριτία ( $\text{SiO}_2$ ) αλλά συναντώνται και η αλουμίνα, συνθετικές ρητίνες πολυστυρενίου-διβινυλοβενζολίου ή ιοντοανταλλακτικές ρητίνες. Τα σωματίδια συχνά καλύπτονται σε λεπτά οργανικά στρώματα που συνδέονται με την επιφάνεια της στήλης με χημικό ή φυσικό τρόπο. [45]

#### 1.4.1.3.4 Κινητή φάση/ Διαλύτες

Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται στην υγρή χρωματογραφία παρασκευάζονται και τοποθετούνται σε γυάλινα δοχεία. Πριν την έναρξη της ανάλυσης απαερώνονται (sparging) και οι γραμμές μεταφοράς τους καθαρίζονται από τις φυσαλίδες που μπορεί να έχουν δημιουργηθεί στο σύστημα (purging). Έτσι εξασφαλίζεται ότι η ροή κατά την ανάλυση θα είναι ομαλή και δεν θα υπάρχουν απότομες μεταβολές της πίεσης. Κάποια συστήματα περιλαμβάνουν και φίλτρα απομάκρυνσης σκόνης ή αιωρούμενων σωματιδίων ενώ σε άλλες περιπτώσεις οι διαλύτες διηθούνται υπό κενό πριν την εισαγωγή τους στο δοχείο. Η σύσταση της κινητής φάσης μπορεί να περιλαμβάνει ένα μείγμα των διαλυτών. Ειδικές βαλβίδες οδηγούν τους απαραίτητους όγκους διαλυτών στον θάλαμο ανάμιξης και στη συνέχεια με τη βοήθεια της αντλίας η κινητή φάση φτάνει στη στήλη με ρυθμό ροής 0.1-10 mL/min. Ο διαχωρισμός μπορεί να γίνει είτε ισοκρατικά, είτε βαθμιδωτά. Στην ισοκρατική έκλυση η σύσταση της κινητής φάσης παραμένει σταθερή κατά τη διάρκεια της ανάλυσης και αποτελείται από έναν μόνο διαλύτη ή από μείγμα διαλυτών. Στη βαθμιδωτή έκλυση χρησιμοποιούνται δύο ή περισσότεροι διαλύτες που χρησιμοποιούνται διαφέρουν σημαντικά ως προς την πολικότητα και τη σύσταση με τον λόγο τους να μεταβάλλεται κατά τον διαχωρισμό. [45] Μερικοί ευρέως χρησιμοποιούμενοι διαλύτες στην υγροχρωματογραφία είναι το νερό, το ακετονιτρίλιο, αραιά υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα, η μεθανόλη, το τετραϋδροφουράνιο, το χλωροφόρμιο κ.α. [46] Εκτός από την ανάλυση οι διαλύτες χρησιμοποιούνται για τον καθαρισμό και τη συντήρηση της στήλης.



#### 1.4.1.3.5 Ανιχνευτής

Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται στην υγροχρωματογραφία χρειάζεται να διαθέτουν τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

- Ικανοποιητική ευαισθησία
- Σταθερότητα και αναπαραγωγικότητα
- Γραμμική απόκριση επεκτεινόμενη σε περιοχή αρκετών τάξεων μεγέθους
- Σύντομους χρόνους απόκρισης
- Αξιοπιστία και ευκολία στη χρήση
- Παρόμοια απόκριση προς όλες τις διαχωριζόμενες ουσίες
- Μη καταστρεπτική για τον αναλύτη ανίχνευση
- Συμβατότητα με ροές υγρών
- Μικρό εσωτερικό όγκο (για αποφυγή διεύρυνσης των κορυφών)

Διακρίνονται δύο βασικοί τύποι ανιχνευτών υγρής χρωματογραφίας. Εκείνοι που ανταποκρίνονται σε μία βασική ιδιότητα της κινητής φάσης (bulk property detectors), της οποίας η τιμή επηρεάζεται από την παρουσία των αναλυτών και εκείνοι που ανταποκρίνονται σε μία ιδιότητα του αναλύτη (solute property detectors) την οποία δεν διαθέτει η κινητή φάση. [45]

### 1.4.2 Φασματοσκοπία φθορισμού

#### 1.4.2.1 Το φαινόμενο του φθορισμού

Η φασματοσκοπία μελετά την αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με την ύλη. Τα μεγέθη που μετρώνται είναι η απορρόφηση, η στιγμιαία εκπομπή ή η σκέδαση ακτινοβολίας από το δείγμα. Συγκεκριμένα, η οπτική φασματοσκοπία εξετάζει τις αλληλεπιδράσεις που συμβαίνουν στην περιοχή UV-Vis (υπεριώδης και ορατή, < 700 nm), NIR (κοντά στην υπέρυθρη, 700-900 nm) και IR (υπέρυθρη, > 800 nm) του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος.

Η συμπεριφορά των μορίων κατά την ακτινοβόληση συνδέεται με την ενεργειακή τους κατάσταση. Κάθε μόριο βρίσκεται σε μία χαρακτηριστική ενεργειακή κατάσταση που συνδέεται με τη δομή του και τη δραστηριότητά του. Η βασική/θεμελιώδης κατάσταση του μορίου θεωρείται αυτή με τη χαμηλότερη ενέργεια ενώ οι καταστάσεις υψηλότερης ενέργειας ονομάζονται διεγερμένες. Ένα μόριο διαθέτει επίσης αποθέματα ενέργειας που σχετίζονται με δονητικές, περιστροφικές ή μεταφορικές κινήσεις, με το σπιν των ηλεκτρονίων κ.α. Τα οπτικά φαινόμενα σχετίζονται με τις δονητικές και τις ηλεκτρονιακές μεταβολές. Οι δονήσεις εξαρτώνται από τη μάζα των ατόμων και την ευελιξία των δεσμών μεταξύ



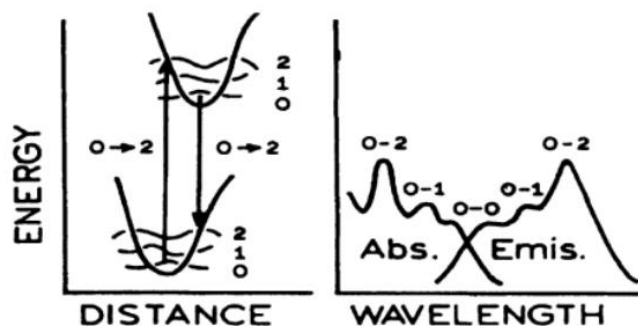
τους ενώ τα ηλεκτρόνια προκαλούν ενεργειακές μεταβολές όταν μεταναστεύουν από μία περιοχή του μορίου σε μία άλλη.

Όταν ένα μόριο δεχτεί ακτινοβολία με μήκος κύματος που βρίσκεται στο φάσμα απορρόφησής του, θα απορροφήσει την ενέργεια και θα περάσει από τη βασική σε μία διεγερμένη κατάσταση, στην οποία το ηλεκτρόνιο θα διατηρήσει το αρχικό του spin. Το μόριο θα επανέλθει στην αρχική του κατάσταση παράγοντας ή όχι ακτινοβολία ανάλογα με το περιβάλλον του. Στην περίπτωση της μη ακτινοβολίας, παράγεται θερμότητα που προκαλεί την μεταβολή στην ενέργεια. Όμως στην περίπτωση της ακτινοβολίας η μεταβολή προκαλείται μέσω του φθορισμού σε συγκεκριμένα μήκη κύματος εκπομπής. Ο φθορισμός πραγματοποιείται σε 3 στάδια: αρχικά επιτυγχάνεται θερμική ισορροπία με την μετάβαση του ηλεκτρονίου στο χαμηλότερο επίπεδο δόνησης της πρώτης διεγερμένης κατάστασης. Έπειτα το ηλεκτρόνιο μεταβαίνει σε ένα επίπεδο δόνησης της βασικής κατάστασης από όπου παράγεται ακτινοβολία. Τέλος το ηλεκτρόνιο μεταβαίνει στο χαμηλότερο επίπεδο δόνησης της βασικής κατάστασης. Εάν το spin του ηλεκτρονίου αντιστραφεί στην διεγερμένη κατάσταση, ο χρόνος για τη μετάβαση στη θεμελιώδη κατάσταση είναι μεγαλύτερος επειδή πρέπει να γίνει ξανά αλλαγή του spin. Αυτή η διεγερμένη κατάσταση ονομάζεται τριπλή και η μετάβαση από αυτή στη θεμελιώδη ονομάζεται φωσφορισμός. [47]

#### 1.4.2.2 Τα χαρακτηριστικά του φθορισμού

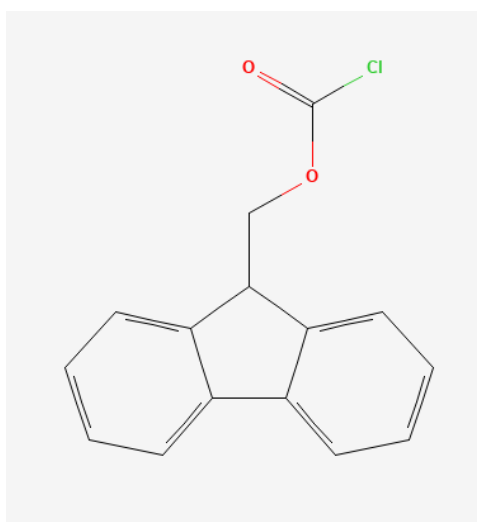
Το φαινόμενου του φθορισμού, εκτός από μερικές εξαιρέσεις, εμφανίζει ορισμένα γενικά χαρακτηριστικά:

- A. Το φάσμα εκπομπής είναι γενικά ανεξάρτητο από το μήκος κύματος διέγερσης
- B. Τα μήκη κύματος εκπομπής είναι μεγαλύτερα από αυτά της διέγερσης, εξαιτίας των απωλειών ενέργειας μεταξύ απορρόφησης και εκπομπής
- C. Το φάσμα φθορισμού ενός μορίου είναι «καθρέφτης» του φάσματος απορρόφησής του  
(παράδειγμα - εξαίρεση αποτελεί το p-τριφαινύλιο)

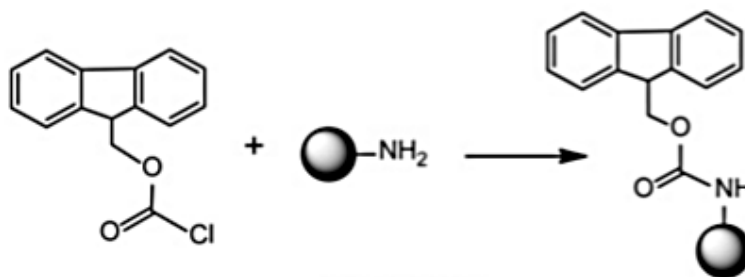


*Εικόνα 6: Το φαινόμενο «καθρέφτης» ανάμεσα στο φάσμα εκπομπής και το φάσμα απορρόφησης ενός μορίου [48]*

Η κβαντική απόδοση και ο χρόνος ζωής αποτελούν χαρακτηριστικά μεγέθη μίας φθοροφόρας ουσίας. Κβαντική απόδοση ονομάζεται ο λόγος των εκπεμπόμενων προς τα απορροφόμενα φωτόνια. Κυμαίνεται από 0 για ουσίες που δεν φθορίζουν αρκετά, έως 1 για ουσίες με υψηλά επίπεδα φθορισμού κάτω από ορισμένες συνθήκες. Ως χρόνος ζωής ορίζεται ο χρόνος που περνά ένα μόριο στη διεγερμένη κατάσταση πριν επιστρέψει στη θεμελιώδη κατάσταση. Ο φθορισμός μίας ουσίας εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως είναι η δομή της, η θερμοκρασία, ο διαλύτης, το pH κ.α. Γενικά οι φθοροφόρες ουσίες χωρίζονται σε 2 κατηγορίες: τις ενδογενείς και τις εξωγενείς. Ενδογενείς ονομάζονται οι προς ανάλυση φθοροφόρες ουσίες που φθορίζουν φυσικά ενώ οι εξωγενείς φθοροφόρες ουσίες προστίθενται σε ένα δείγμα που δεν διαθέτει τις επιθυμητές φασματικές ιδιότητες. [48] Χαρακτηριστικά αναφέρεται η ένωση 9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride (FMOC-Cl) που προστίθεται συχνά σε δείγματα αμινοξέων ως εξωγενής φθοροφόρα ουσία.



*Εικόνα 7: Το μόριο FMOC-Cl (πηγή: PubChem)*

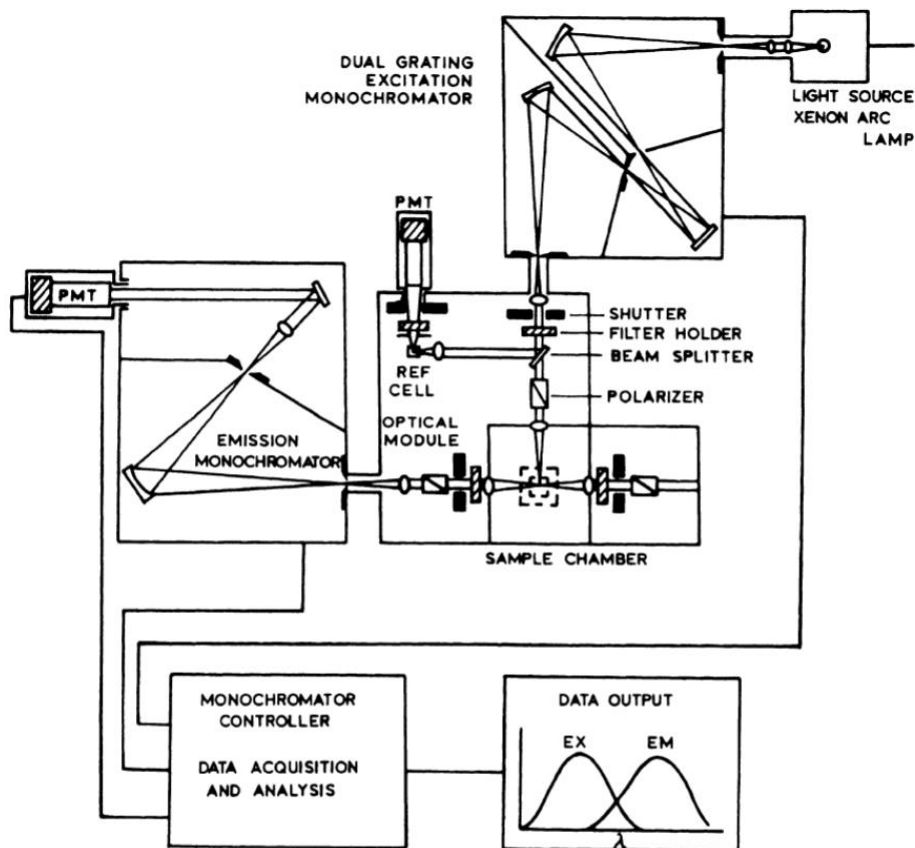


Εικόνα 8: Η αντίδραση μεταξύ του Fmoc-Cl και μίας αμινομάδας [49]

### 1.4.2.3 Φθορισμόμετρο

Μία τυπική διάταξη για ένα φθορισμόμετρο γενικής χρήσης περιλαμβάνει τα εξής:

- μία λάμπα *xenon* που λειτουργεί ως πηγή ακτινοβολίας/φωτός για τη διέγερση του αναλύτη
- θάλαμο τοποθέτησης του δείγματος
- διαφράγματα για αποκοπή της ακτινοβολίας διέγερσης ή εκπομπής
- διαχωριστή δέσμης ο οποίος κατευθύνει μέρος της ακτινοβολίας διέγερσης σε μία κυψελίδα αναφοράς
- μονοχρωμάτορες για την επιλογή των μηκών κύματος διέγερσης και εκπομπής
- πολωτές
- οπτικά φίλτρα για απομάκρυνση των ανεπιθύμητων μηκών κύματος από τη δέσμη φωτός διέγερσης ή του διαχεόμενου φωτός από την ακτινοβολία εκπομπής
- φωτοπολλαπλασιαστή για ανίχνευση του φθορισμού
- ηλεκτρονικές συσκευές και Η/Υ για την ποσοτικοποίηση του φθορισμού και την παρουσίαση των αποτελεσμάτων [50]

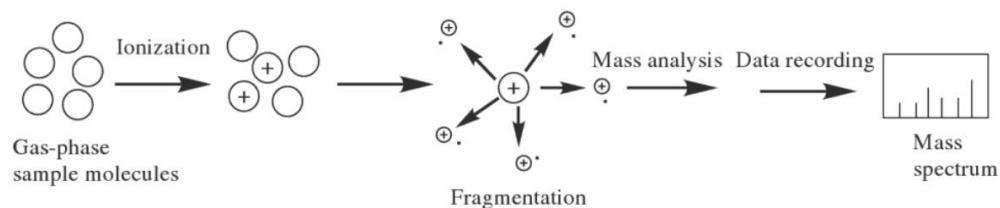


Εικόνα 9: Σχηματικό διάγραμμα ενός φθορισμομέτρου PMT (PhotoMultiplier Tube) [50]

### 1.4.3 Φασματομετρία μαζών

#### 1.4.3.1 Αρχή λειτουργίας

Η φασματομετρία μαζών (Mass Spectrometry, MS) αποτελεί μία αναλυτική τεχνική κατά την οποία τα μόρια (συστατικά) ενός δείγματος μετατρέπονται σε ταχύτατα κινούμενα ιόντα και στη συνέχεια διαχωρίζονται σε σχέση με το λόγο της μάζας προς το φορτίο τους ( $m/z$ ). Έπειτα ανιχνεύονται ποιοτικά και ποσοτικά ανάλογα με τον λόγο  $m/z$  και την αφθονία τους. Τα μόρια μπορούν να ιοντιστούν θερμικά, με τη χρήση ηλεκτρικών πεδίων ή με την επίδραση ηλεκτρονίων, φωτονίων ή ιόντων. [51]



*Εικόνα 10: Συνοπτικά η αρχή λειτουργίας της φασματομετρίας μαζών [52]*

Ο ιοντισμός και η θραυσματοποίηση πραγματοποιούνται σε κενό αέρος προκειμένου τα ιόντα να κινούνται ελεύθερα στον χώρο χωρίς να συγκρούονται μεταξύ τους ή να αλληλεπιδρούν με άλλα είδη. Οι συγκρούσεις θα μπορούσαν να προκαλέσουν την θραυσματοποίηση των μοριακών ιόντων ή ακόμη και την παραγωγή άλλων ενώσεων από τις αντιδράσεις μορίων και ιόντων. Κάτι τέτοιο θα μείωνε την ευαισθησία της μεθόδου και την ακρίβεια των αποτελεσμάτων. [52]

Γενικά, η φασματομετρία μαζών είναι ίσως η πιο ευέλικτη, κατανοητή και ευρέως διαδεδομένη αναλυτική τεχνική σήμερα με εφαρμογή σε ποικίλους τομείς ιδιαίτερα στις επιστήμες ζωής, τροφίμων, τις περιβαλλοντικές επιστήμες και τις τεχνολογίες optics. Οι πληροφορίες που δίνει αφορούν τη σύσταση αγνώστων μιγμάτων, τη χημική δομή πλήθους ενώσεων, την παρουσία και το ποσοστό ισωτόπων κ.α. Διαθέτει:

- a. μεγάλη εκλεκτικότητα που επιτυγχάνεται με την ακριβή μέτρηση των σχετικών μοριακών μαζών, γεγονός που επιτρέπει την απόλυτη ταυτοποίηση ενώσεων ακόμη και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις
- b. πολύ υψηλή ευαισθησία, που φτάνει έως τα  $10^{-18}$  mol
- c. δυνατότητα δράσης σαν ολικός ανιχνευτής (universal detector) που σημαίνει ότι μπορεί να εφαρμοστεί για την ανάλυση οποιασδήποτε ενώσεως
- d. δυνατότητα εύρεσης της δομής αγνώστων ενώσεων [53]

Ένα ακόμη από τα πλεονεκτήματα της φασματομετρίας μαζών που αξίζει να σημειωθεί, είναι η μικρή ποσότητα δείγματος (της τάξης των μικρογραμμάτων) που απαιτεί για ανάλυση. [51]

#### 1.4.3.2 Φασματογράφος Μαζών

Ένας τυπικός φασματογράφος μαζών αποτελείται από τα εξής τμήματα:

- Το σύστημα εισαγωγής του δείγματος, όπου το δείγμα εισάγεται σε υγρή ή αέρια μορφή και μεταφέρεται στην πηγή ιόντων
- Την πηγή ιόντων, που μετατρέπει τα ουδέτερα μόρια του δείγματος σε ιόντα στην αέρια φάση. Για αυτόν τον σκοπό έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιηθεί πολλές τεχνικές ιοντισμού.

- Τον αναλυτή μαζών, ο οποίος διαχωρίζει και αναλύει τα ιόντα σύμφωνα με τον λόγο  $m/z$
- Τον ανιχνευτή, ο οποίος συλλαμβάνει τα διαχωριζόμενα ιόντα και τα μετατρέπει σε ηλεκτρικό σήμα
- Το σύστημα κενού, που διατηρεί συνθήκες κενού στον φασματογράφο με τη βοήθεια εσωτερικών και εξωτερικών αντλιών
- Τον Η/Υ, ο οποίος καταγράφει, επεξεργάζεται, αποθηκεύει και παρουσιάζει τα δεδομένα

#### 1.4.3.2.1 Πηγή ιόντων

Η πηγή ιόντων μετατρέπει όπως αναφέρθηκε, τα συστατικά του δείγματος από ουδέτερα μόρια στερεής, υγρής ή αέρια φάσης σε αέρια ιόντα. Υπάρχουν πολλές τεχνικές ιοντισμού στη φασματομετρία μαζών όπως ο ιοντισμός ηλεκτρονίων, ο ιοντισμός λέιζερ με υποβοήθηση μήτρας (Matrix-assisted laser ionization, MALDI), ο ιοντισμός ηλεκτροψεκασμού με εκρόφηση (Desorption electrospray ionization, DESI), ο ιοντισμός ηλεκτροψεκασμού με εκχύλιση (Extractive electrospray ionization, EESI), ο χημικός ιοντισμός σε ατμοσφαιρική πίεση (Atmospheric-pressure chemical ionization, APCI) και άλλες. Ανάλογα με τις συνθήκες του ιοντισμού τα αποτελέσματα της ανάλυσης μπορεί να είναι πολύ διαφορετικά. Επίσης κάθε τεχνική δίνει διαφορετικά ιόντα, συνδυάζεται με συγκεκριμένα είδη αναλυτών και ενδείκνυται για συγκεκριμένους τύπους ενώσεων (π.χ. πολικές, μη πολικές). Ένας διαχωρισμός των τεχνικών ιοντισμού μπορεί να γίνει σε "μαλακές" και "σκληρές" τεχνικές. Στις σκληρές τεχνικές ιοντισμού χρησιμοποιείται υψηλή ενέργεια που προκαλεί διάσπαση/θραύση της ένωσης σε θυγατρικά ιόντα. Μαλακές καλούνται οι τεχνικές που επιτυγχάνουν τον ιοντισμό σε ηπιότερες συνθήκες με μικρή ή μηδαμινή θραύση.

Τις τελευταίες δεκαετίες, έχουν αναπτυχθεί τεχνικές ιοντισμού που επιτρέπουν την μετατροπή σε ιόντα σχεδόν οποιασδήποτε ένωσης, ακόμη και αν αυτή είναι μη πτητική ή θερμικά ασταθής. Μία από τις περισσότερο χρησιμοποιούμενες τεχνικές είναι ο Ηλεκτροψεκασμός (Electrospray ionization, ESI) που εφαρμόζεται συχνά μετά από διαχωρισμούς με υγρή χρωματογραφία. Τα ιόντα σε αυτή την περίπτωση παράγονται σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης, καθώς το δείγμα περνά μέσα από μία τριχοειδή βελόνα (εσωτερική διάμετρος <250  $\mu\text{m}$ ) όπου εφαρμόζεται διαφορά δυναμικού από +500 έως +4500 V. Η πραγματική τάση που απαιτείται εξαρτάται από την εσωτερική διάμετρο της βελόνας και τους διαλύτες που δείγματος. Ψεκάζοντας το δείγμα ηλεκτροστατικά, δημιουργείται ένα αερόλυμα φορτισμένων σταγονιδίων. Πολλές φορές χρησιμοποιείται ένα αέριο όπως το  $\text{N}_2$  για να επιταχύνει αυτή τη διαδικασία. Τα φορτισμένα σταγονίδια αποτελούνται από μόρια τόσο του διαλύτη όσο και του αναλύτη με θετικό ή αρνητικό φορτίο, ανάλογα με την πολικότητα της εφαρμοζόμενης τάσης. Τελικά, τα ιόντα αναλύτη απαλλάσσονται από τον διαλύτη και κατευθύνονται προς τον αναλυτή

μαζών του φασματογράφου. [54] Η ESI μπορεί να εφαρμοστεί για την ανάλυση ενώσεων μέσης έως υψηλής πολικότητας και μοριακά βάρη έως 100.000. Είναι ιδανική για βιομόρια όπως πεπτιδία, πρωτεΐνες, αμινοξέα, οργανικά οξέα κ.α.

#### 1.4.3.2 Αναλυτής μαζών

Οι διαφορετικοί τύποι αναλυτών μαζών μετρούν τα ιόντα διαφορετικά. Ο ιδανικός αναλυτής θα πρέπει να μπορεί να διαχωρίζει όσο το δυνατόν μικρότερες διαφορές  $m/z$ , να επιτρέπει την ανάλυση μεγάλου αριθμού ιόντων και να είναι συμβατός με όλες τις τεχνικές εισαγωγής δείγματος και ιοντισμού. Η διαχωριστική ικανότητα (Resolution, R) του αναλυτή μαζών δίνεται από τη σχέση:

$$R = \frac{m}{\Delta m}$$

όπου  $\Delta m$  η διαφορά μαζών δύο διαδοχικών κορυφών και  $m$  η μάζα της πρώτης κορυφής.

Οι αναλυτές μαζών που είναι διαθέσιμοι σήμερα μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες: τους αναλυτές τύπου δέσμης (beam analyzers) και τους αναλυτές παγίδας ιόντων (trapping analyzers). Στους αναλυτές τύπου δέσμης, τα ιόντα εγκαταλείπουν την πηγή ιόντων σε μια δέσμη και περνούν μέσω του πεδίου ανάλυσης στον ανιχνευτή ενώ στους αναλυτές παγίδας ιόντων τα ιόντα παγιδεύονται στο πεδίο ανάλυσης, αφού σχηματιστούν στον ίδιο τον αναλυτή ή εγχυθούν από εξωτερική πηγή ιόντων. Οι δημοφιλέστεροι αναλυτές μαζών είναι οι αναλυτές χρόνου πτήσης (Time of Flight, TOF), οι αναλυτές μαγνητικού τομέα (Magnetic sector Analyzer), τα τετράπολα (Quadrupole), οι παγίδες ιόντων (Ion Trap) και οι αναλυτές ιοντικού κυκλοτρονικού συντονισμού με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Ion Cyclotron, FT ICR). [54]

#### 1.4.3.3 Φασματομετρία μαζών σε σειρά (Tandem Mass Spectrometry, MS/MS)

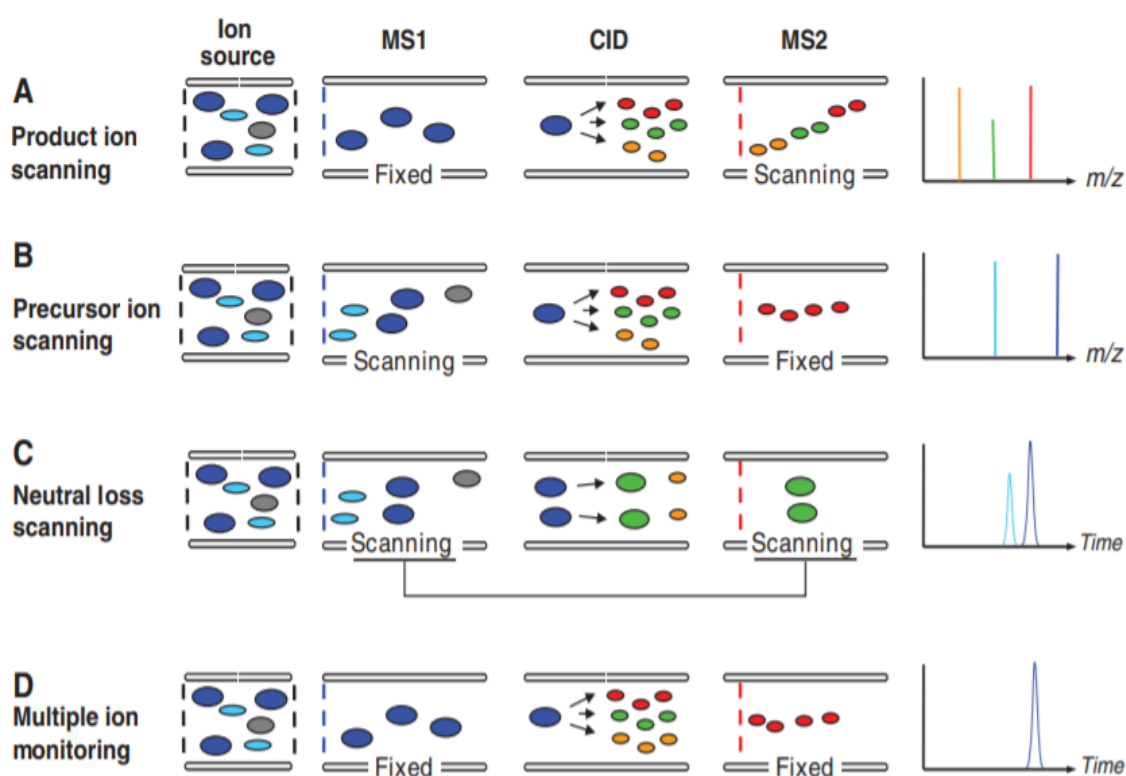
Όπως αποκαλύπτει και το όνομα, η φασματομετρία μαζών MS/MS περιλαμβάνει δύο στάδια της MS. Στο πρώτο στάδιο, τα ιόντα με τον λόγο  $m/z$  που μας ενδιαφέρει απομονώνονται από τα υπόλοιπα ιόντα που εξέρχονται από την πηγή. Αυτά τα ιόντα, που καλούνται μητρικά ή πρόδρομα ιόντα, υπόκεινται σε χημικές αντιδράσεις που μεταβάλλουν είτε τη μάζα τους, είτε το φορτίο τους. Τα ιόντα που προκύπτουν ονομάζονται θυγατρικά και αναλύονται στο δεύτερο στάδιο της MS/MS. Αυτή η τεχνική είναι ιδιαίτερα χρήσιμη όταν αναλύονται πολύπλοκα μείγματα.

Μία συχνά χρησιμοποιούμενη διάταξη στην MS/MS είναι το τριπλό τετράπολο. Αποτελείται από 3 τετράπολα σε σειρά. Το ενδιάμεσο τετράπολο

χρησιμοποιείται ως χώρος θραύσης των ιοντισμένων μορίων και πληρώνεται με αέριο σύγκρουσης (collision gas), που είναι συνήθως ένα αδρανές αέριο όπως το αργό. Τα άλλα δύο τετράπολα λειτουργούν ως αναλυτές μαζών. [53]

Στη φασματομετρία MS/MS υπάρχει η δυνατότητα εφαρμογής των εξής πειραμάτων σάρωσης:

- Σάρωση Παραγόμενων Ιόντων (Product Ion Scan)
- Σάρωση Πρόδρομου Ιόντος (Precursor IonScan)
- Σάρωση για την Ανίχνευση Απώλειας Ουδέτερου Μορίου (Constant Neutral Loss Scan, CNL)
- Επιλεκτική Παρακολούθηση Θραυσματοποίησης Ιόντων (Multiple Ion/Reaction Monitoring, MRM)



*Εικόνα 11: Από πάνω προς τα κάτω: α) Πείραμα Σάρωσης Παραγόμενων Ιόντων, β) Πείραμα σάρωσης Πρόδρομου Ιόντος, γ) Πείραμα για Ανίχνευση Απώλειας Ουδέτερου Μορίου, δ) Πείραμα Επιλεκτικής Παρακολούθησης Αντιδράσεων Θραυσματοποίησης Ιόντων [55]*

#### 1.4.4 Υδρόλυση πεπτιδίων

Τα πρώτα πειράματα όξινης υδρόλυσης πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκαν από τον Braconnot το 1820. Μέχρι το 1965 είχαν γίνει γνωστές διάφορες τεχνικές υδρόλυσης που περιλάμβαναν τη χρήση οξέων, βάσεων, ενζύμων και καταλυτών.



Για την επιλογή του κατάλληλου αντιδραστηρίου υδρόλυσης χρειάζεται πάντα να λαμβάνονται υπόψη οι εξής παράγοντες:

- Το αντιδραστήριο πρέπει να δίνει τις λιγότερες δυνατές παράπλευρες αντιδράσεις που μπορεί να οδηγήσουν σε καταστροφή των αμινοξέων
- Η δράση του αντιδραστηρίου πρέπει να είναι γνωστή, καθώς συχνά απαιτείται περιορισμένη υδρόλυση των πεπτιδίων και όχι ολική
- Το αντιδραστήριο δεν θα πρέπει να προωθεί τη σύνθεση ή την αναδιάταξη των πεπτιδικών δεσμών [56]

Τα παραπάνω είναι σημαντικά και κατά την βελτιστοποίηση των συνθηκών υδρόλυσης. Ως τυπικές συνθήκες υδρόλυσης πεπτιδίων επικράτησαν οι 110 °C σε διάλυμα HCl συγκέντρωσης 6 M για 24 περίπου ώρες. Μία μέθοδος, στην οποία χρησιμοποιήθηκε μείγμα πυκνού υδροχλωρικού οξέος και τριφθοροξικού οξέος σε αναλογία 2:1, στους 166 °C για 25 λεπτά αποδείχθηκε εξίσου αποτελεσματική στην υδρόλυση πρωτεϊνών, ιδιαίτερα των υδρόφοβων. [57]

Η υδρόλυση πεπτιδίων έχει εφαρμοστεί αρκετές φορές και στις μικροκυστίνες. Η υδρόλυση σε συμβατικό φούρνο με τις τυπικές συνθήκες που αναφέρθηκαν πιο πάνω και την προσθήκη μικρής ποσότητας φαινόλης (2%) στα δείγματα για αποφυγή οξειδωσης, είχε τα επιθυμητά αποτελέσματα. Ο χρόνος της υδρόλυσης αποδείχθηκε ότι μπορεί να μειωθεί σημαντικά (από 24 ώρες σε 10 μόλις λεπτά) με τη χρήση μικροκυμάτων. Οι βέλτιστες συνθήκες υδρόλυσης με μικροκύματα είναι οι 160 °C και τα 650 W για τη συσκευή υδρόλυσης που χρειάζεται να διαθέτει συγκεκριμένα χαρακτηριστικά. Η υδρόλυση μπορεί να πραγματοποιηθεί σε ανοιχτά ή κλειστά φιαλίδια, αλλά στην πρώτη περίπτωση απαιτείται η απομάκρυνση του οξέος που έχει μεταφερθεί στην αέρια φάση στο τέλος της διαδικασίας (συνήθως με ρεύμα αζώτου). [58] Αυτή η τεχνική εφαρμόστηκε επίσης για την υδρόλυση της μικροκυστίνης LR και της απομεθυλιωμένης μορφής της MC-RR, σε συνδυασμό με μία ανάλυση GC-MS, προκειμένου να αποκαλυφθεί η δομή των κυκλικών πεπτιδίων. [59] Τέλος, η υδρόλυση των μικροκυστινών μελετάται τα τελευταία χρόνια ως τρόπος αποικοδόμησής τους και απομάκρυνσής τους από τα φυσικά νερά. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται καταλύτες όπως είναι ο μαγκεμίτης ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) και διάφορα άλλα φυσικά ορυκτά. [60, 61]

Για την παρακολούθηση της εξέλιξης της υδρόλυσης χρησιμοποιούνται μέθοδοι που βασίζονται στη μέτρηση είτε της εναπομείνουσας πρωτεΐνης είτε των εμφανιζόμενων αμινοξέων.

### 1.4.5 Χρωματογραφική ανάλυση αμινοξέων, πεπτιδίων, μικροκυστινών και άλλων κυανοτοξινών στο παρελθόν

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται συνοπτικά μερικές από τις ερευνητικές εργασίες που έχουν γίνει όσον αφορά την ανάλυση αμινοξέων, πεπτιδίων και μικροκυστινών και γενικότερα κυανοτοξινών.

*Πίνακας 2: Βιβλιογραφική έρευνα για τη χρωματογραφική ανάλυση αμινοξέων, πεπτιδίων, μικροκυστινών και άλλων κυανοτοξινών*

ΑΝΑΛΥΤΗΣ	ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	ΡΥΘΜΙΣΤΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ	ΟΡΙΟ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ
<b>22 αμινοξέα</b>	Συστοιχία φωτοδιόδων (DAD)  Φθορισμός (FL)  Υγροχρωματογραφία (HPLC)	Fluorenylmethyloxycarbonyl chloride (FMOC)  Heptylamine (HEPA)  1- αδαμανταναμίνη  Υδροχλωρικό οξύ (HCl)  Ακετόνη  Ακετονιτρίλιο (ACN)  Τετραϋδροφουράνιο (THF)  Νερό	0.4 M βορικό οξύ (pH=9)	1-10 pmol	[62]
<b>Αμινοξέα και διπεπτίδια</b>	Συστοιχία φωτοδιόδων (DAD)  Υγροχρωματογραφία (HPLC)	Fluorenylmethyloxycarbonyl chloride (FMOC)  Υδροχλωρικό οξύ (HCl)  1- αδαμανταναμίνη  Νερό	0.2 M βορικό οξύ (pH=7.7-11.3)	-	[63]
<b>β-N-μεθυλαμινο- L-αλανίνη (BMAA)</b>	Φθορισμός (FL)  Υγροχρωματογραφία (HPLC)	Fluorenylmethyloxycarbonyl chloride (FMOC)  Εξάνιο  Οξικός αιθυλεστέρας  Ακετόνη  Νερό	2.5 mM οξικό αμμώνιο (pH=4)	16 μg L <sup>-1</sup>	[64]

<b>20 αμινοξέα και 17 αμίνες</b>	<p>Συστοιχία φωτοδιόδων (DAD)</p> <p>Φθορισμός (FL)</p> <p>Υγροχρωματογραφία (HPLC)</p>	<p>Φθαλαλδεΐδη (OPA)</p> <p>Μερκαπτοπροπιονικό οξύ (MPA)</p> <p>Ακετυλοκυστεΐνη (NAC)</p> <p>Μεθανόλη</p> <p>Ακετονιτρίλιο (ACN)</p> <p>Νερό</p>	0.05 M οξικό νάτριο (pH=7.2)	-	[65]
<b>MC-LR, κυλινδροσπερμοψίνη και νοντουλαρίνες</b>	<p>Φασματομετρία μαζών (MS)</p> <p>Υγροχρωματογραφία (UPLC)</p>	<p>Φορμικό οξύ (HCOOH)</p> <p>Μεθανόλη</p> <p>Νερό</p>	-	-	[66]
<b>12 μικροκυστίνες, κυλινδροσπερμοψίνη, ανατοξίνη-α, νοντουλαρίνες, οκαδαϊκό οξύ και δομοϊκό οξύ</b>	<p>Φασματομετρία μαζών σε σειρά (MS/MS)</p> <p>Υγροχρωματογραφία (HPLC)</p>	<p>Φορμικό οξύ (HCOOH)</p> <p>Ακετονιτρίλιο (ACN)</p> <p>Νερό</p>	-	1-10 ng L <sup>-1</sup>	[14]
<b>19 αμίνες και αμινοξέα</b>	<p>Φασματομετρία μαζών σε σειρά (MS/MS)</p> <p>Υγροχρωματογραφία (HPLC)</p>	<p>Φορμικό οξύ (HCOOH)</p> <p>Μεθανόλη</p> <p>Νερό</p>	-	0.01 - 44 ng μL <sup>-1</sup>	[67]

## 2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 2.1 Σκοπός

Ως σκοπός της παρούσης διπλωματικής εργασίας τίθεται η υδρόλυση του μορίου της μικροκυστίνης MC-RR, η ανάπτυξη μίας χρωματογραφικής μεθόδου και η επιλογή της κατάλληλης αναλυτικής τεχνικής για τον αποτελεσματικό διαχωρισμό και προσδιορισμό των αμινοξέων των μικροκυστινών. Έτσι μελλοντικά, επιδρώντας με συμβατικές ή προχωρημένες μεθόδους οξείδωσης στα υδρολυμένα μόρια των μικροκυστινών θα μπορούν να εντοπιστούν οι περιοχές του μορίου/αμινοξέα στα οποία γίνεται η προσβολή από τα οξειδωτικά μέσα. Με αυτόν τον τρόπο θα γίνει μία πρακτική επιβεβαίωση των εκτιμήσεων που υπάρχουν μέχρι σήμερα για τον μηχανισμό αποικοδόμησης των μικροκυστινών και την παραγωγή ορισμένων ενδιαμέσων προϊόντων. Πιο συγκεκριμένα, στην παρούσα εργασία θα γίνει σύγκριση της φθορισμομετρίας (FL) και της φασματομετρίας μαζών σε σειρά (MS/MS), σε συνδυασμό με την υγροχρωματογραφία (LC). Θα εξεταστούν η απόδοση, η γραμμικότητα και η επαναληψιμότητα και θα βρεθούν τα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) των δύο μεθόδων. Η μέθοδος με τα καλύτερα αποτελέσματα θα εφαρμοστεί για την αξιολόγηση της υδρόλυσης της MC-RR.

### 2.2 Προσδιορισμός αμινοξέων με τη χρήση LC-FL

#### 2.2.1 Αντιδραστήρια

Χρησιμοποιήθηκαν:

- Ακετόνη ( $\geq 99\%$ , Emplura)
- Ακετονιτρίλιο ( $\geq 99.9\%$ , Sigma-Aldrich)
- n-εξάνιο ( $\geq 96\%$ , Carlo Erba)
- Οξικός αιθυλεστέρας ( $\geq 99.8\%$ , Fisher Chemical)
- Οξικό οξύ ( $\geq 99.8\%$ , Fluka)
- Μεθανόλη ( $\geq 99\%$ , Fisher Chemical)
- Υπερκάθαρο νερό (Συσκευή εργαστηρίου)
- FMOC-Cl ( $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich)
- $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ( $\geq 99\%$ , Riedel-de Haen)
- Οξικό αμμώνιο ( $\geq 98\%$ , Riedel-de Haen)

## 2.2.2 Συσκευές και γυαλικά αναλώσιμα

Χρησιμοποιήθηκαν:

- Μετρητής pH με γυάλινο ηλεκτρόδιο (WTW)
- Ηλεκτρονικός αναλυτικός ζυγός (Sartorius AG)
- Πιπέτες
  - 5-40 μl (Finnpipette)
  - 200-1000 μl (JENCONS)
  - 10-100 μl (BRAND, Transferpette)
- Μαγνητικός αναδευτήρας (SCHOTT)
- Συσκευή Vortex (IKA)
- Συσκευή διήθησης και αντλία κενού
- Φούρνοι
- Συσκευή υπερκάθαρου νερού (TEMAK)
- Γυάλινες και πλαστικές σύριγγες
- Ογκομετρικές φιάλες, ποτήρια ζέσεως και ογκομετρικοί κύλινδροι
- Γυάλινα φιαλίδια και δοχεία
- Φίλτρα
  - Διήθησης (SUPELCO, 0.45 μm x 47mm & 0.2 μm x 47mm)
  - Σύριγγας (TARGET ANALYSIS S.A., 13 mm x 0.22 μm, PTFE)
  - Σύριγγας (Membrane Solutions, 13 mm x 0.45 μm, PVDF)

## 2.2.3 Προετοιμασία προτύπων διαλυμάτων

Τα αμινοξέα που χρησιμοποιήθηκαν στα πρότυπα διαλύματα είναι τα παρακάτω:

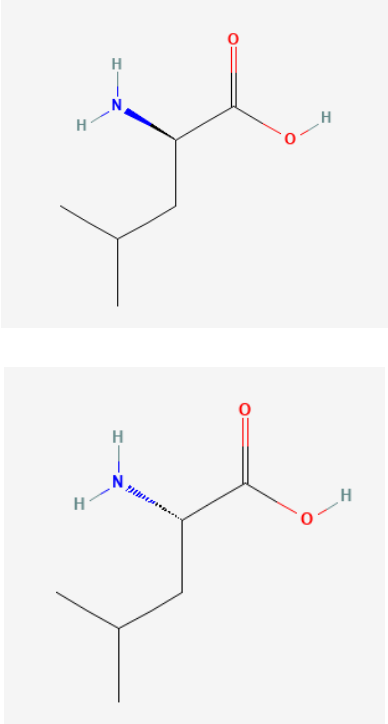
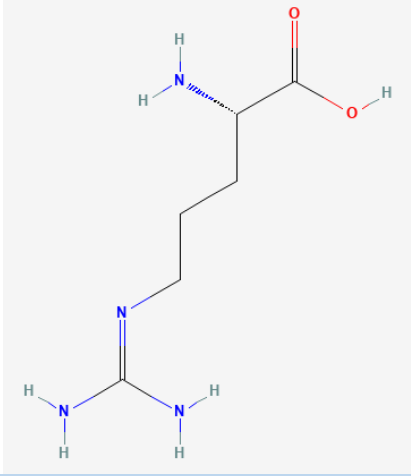
- D-Λευκίνη (99%, Sigma-Aldrich)
- L-Αργινίνη (≥ 98%, Sigma-Aldrich)
- L-Γλουταμινικό οξύ (≥ 99%, Sigma-Aldrich)
- L-Ασπαραγινικό οξύ (≥ 98%, Sigma-Aldrich)
- L-Λευκίνη
- D-Αλανίνη (≥ 98%, TCI)
- D-Γλουταμινικό οξύ (≥ 98%, TCI)

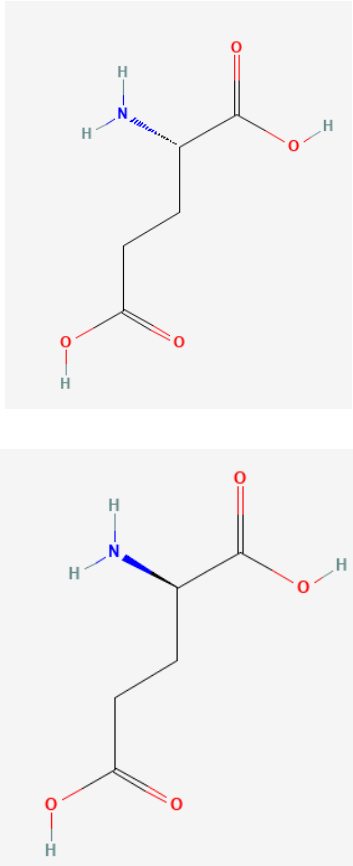
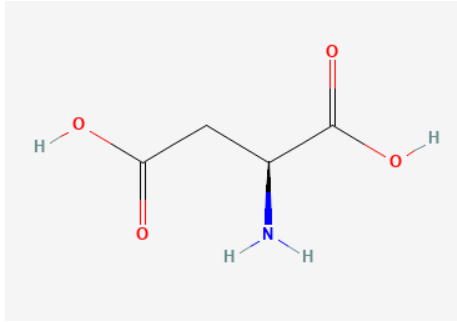
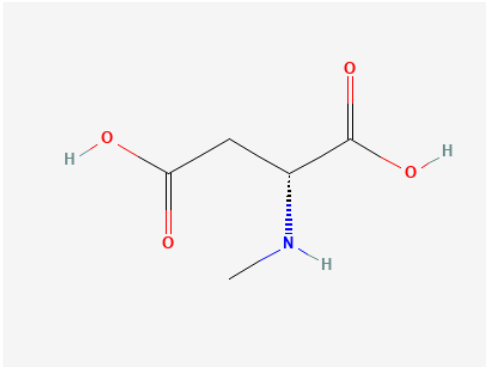
Από αυτά, τα αμινοξέα L-Αργινίνη, η D-Αλανίνη και D-Γλουταμινικό οξύ συναντώνται στις δύο συχνότερα απαντώμενες μικροκυστίδες, την MC-RR και την MC-LR. Στην MC-LR υπάρχει και η L-Λευκίνη. Τα χειρόμορφα τους χρησιμοποιήθηκαν έτσι ώστε να εξετασθούν τυχόν διαφορές στους χρόνους ανάσχεσης, ενώ το L-Ασπαραγινικό οξύ χρησιμοποιήθηκε καθώς ήταν διαθέσιμο και

θεωρήθηκε πως θα έχει ίδιο χρόνο ανάσχεσης με το D-ερυθρο-β-μεθυλασπαραγινικό οξύ. Για τα αμινοξέα Adda και Mdha δεν υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμα πρότυπα αναφοράς, ενώ στη βιβλιογραφία αναφέρεται πως κατά την υδρόλυση διασπώνται. Από το Mdha μπορεί επίσης να προκύψει η μεθυλαμίνη. [58]

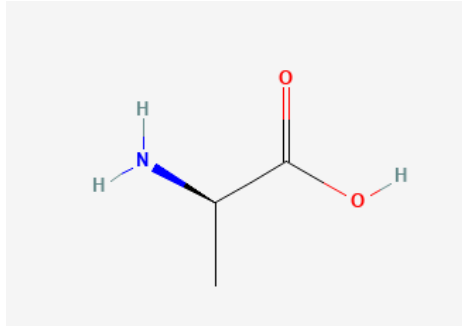
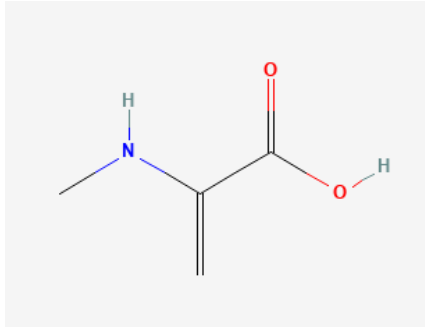
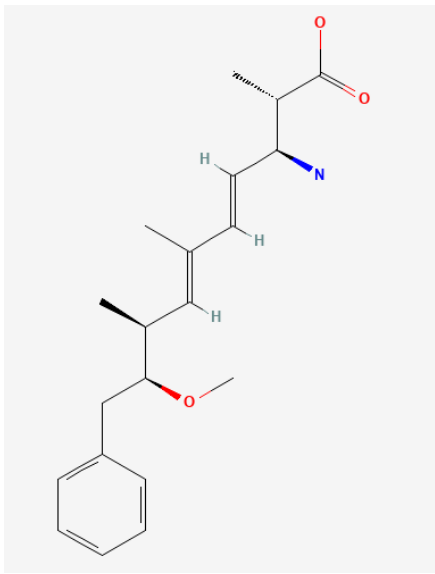
Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αμινοξέα που μας ενδιαφέρουν, το μοριακό τους βάρος και η χημική δομή τους.

*Πίνακας 3: Τα αμινοξέα, το μοριακό τους βάρος και η χημική δομή τους (πηγή: PubChem)*

Αμινοξύ	Μοριακό βάρος	Χημική Δομή
D-Λευκίνη & L-Λευκίνη	131.17 g/mol	
L-Αργινίνη	174.2 g/mol	

<p>L-Γλουταμινικό οξύ &amp; D-Γλουταμινικό οξύ</p>	<p>147.13 g/mol</p>	
<p>L-Ασπαργινικό οξύ</p>	<p>133.10 g/mol</p>	
<p>D-ερυθρο-β- μεθυλασπαργινικό οξύ</p>	<p>147.13 g/mol</p>	



D-Αλανίνη	89.09 g/mol	
Mdha	101.10 g/mol	
Adda	-	

Τα πρότυπα διαλύματα παρασκευάστηκαν από τη ζύγιση της απαιτούμενης ποσότητας αμινοξέων και τη διάλυσή τους σε υπερκάθαρο νερό, μέσα σε ογκομετρική φιάλη. Τα διαλύματα χαμηλότερων συγκεντρώσεων παρασκευάστηκαν με αραιώση. Έτσι προέκυψαν πρότυπα διαλύματα συγκέντρωσης 1000, 100, 10, 1 mg/L και 500, 200, 100, 50 µg/L. Αρχικά εξετάστηκε κάθε αμινοξύ ξεχωριστά και στη συνέχεια τα μείγματά τους.

## 2.2.4 LC-FL

### 2.2.4.1 Οργανολογία

Χρησιμοποιήθηκε το χρωματογραφικό σύστημα Waters 600 που περιλαμβάνει αντλία Waters 600 και χειριστή (controller) Waters 600. Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε η στήλη αντιστρόφου φάσεως Zorbax XDB-C18 της Agilent με διαστάσεις 50 mm x 4.6 mm και μέγεθος σωματιδίων 1.8 μm, μαζί με την προστήλη Agilent Eclipse XDB-C18 με διαστάσεις 12.5 mm x 4.6 mm και μέγεθος σωματιδίων 5 μm. Ο βρόγχος έγχυσης είχε όγκο 20 μl και η εισαγωγή του δείγματος γινόταν με τη βοήθεια σύριγγας. Ο ανιχνευτής φθορισμού (Jasco 821-FP Intelligent Spectrofluorometer) λειτουργούσε σε μήκος κύματος διέγερσης 254 nm και μήκος κύματος εκπομπής 315 nm. Η ρύθμιση της μεθόδου, η λήψη και η επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό Millennium 32.



*Εικόνα 12: Η διάταξη LC-FL στο εργαστήριο*



*Εικόνα 13: Η στήλη και η προστήλη που χρησιμοποιήθηκαν στην διάταξη LC-FL*

#### 2.2.4.2 Προετοιμασία κινητή φάσης/διαλυτών

Η κινητή φάση που χρησιμοποιήθηκε ήταν:

- A. Υδατικό διάλυμα  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  συγκέντρωσης 2.5 mM και  $\text{pH}=4.0$ . Η ρύθμιση του  $\text{pH}$  έγινε με πυκνό διάλυμα  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . Πριν την εισαγωγή του στο χρωματογραφικό σύστημα, πραγματοποιήθηκε διήθηση στο διάλυμα για την απομάκρυνση τυχόν στερεών από το άλας. Η παρασκευή του γινόταν καθημερινά πριν τη χρωματογραφία.
- B. Ακετονιτρίλιο

Για το conditioning (τα βήματα για την επαναφορά της στήλης από τις συνθήκες αποθήκευσης στις συνθήκες ανάλυσης), τον καθαρισμό και την αποθήκευση της στήλης στο τέλος της χρωματογραφίας χρησιμοποιήθηκαν ακετονιτρίλιο και υπερκάθαρο νερό. Συνολικά δηλαδή στο χρωματογραφικό σύστημα υπήρχαν 3 δοχεία με διαλύτες. Στην αρχή κάθε ανάλυσης, πραγματοποιούνταν sparging και purging όλων των διαλυτών.

#### 2.2.4.3 Παραγωγοποίηση

Για τη διαδικασία της παραγωγοποίησης προετοιμάστηκε υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα βορικού ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) συγκέντρωσης 0.025 M και  $\text{pH}=9.6$ . Η ρύθμιση του  $\text{pH}$  έγινε με διάλυμα  $\text{NaOH}$  συγκέντρωσης 2 M. Ταυτόχρονα, παρασκευάστηκε διάλυμα  $\text{FMOC-Cl}$  συγκέντρωσης 40 mM σε ακετόνη. Η συγκέντρωση αυτή επιλέχθηκε έτσι ώστε το αντιδραστήριο  $\text{FMOC-Cl}$  να βρίσκεται

σε περίσσεια της τάξης  $\frac{10000}{1}$  σε σχέση με τα moles των αμινοξέων στο δείγμα που πραγματοποιείται η αντίδραση της παραγωγοποίησης.

#### Διαδικασία παραγωγοποίησης

Σε φιαλίδιο προστέθηκαν 60 μL πρότυπου διαλύματος, 400 μL ρυθμιστικού διαλύματος βορικού, 40 μL ακετόνης και 400 μL διαλύματος FMOC-Cl. Το μείγμα αναδεύτηκε σε Vortex για 30 sec και αφέθηκε για 10 λεπτά σε σκοτεινό χώρο προκειμένου να ολοκληρωθεί η αντίδραση της παραγωγοποίησης. Έπειτα προστέθηκαν σε αυτό 800 μL διαλύματος οξικού αιθυλεστέρα/ n-εξανίου σε αναλογία 1/1. Το μείγμα αναδεύτηκε ξανά με αποτέλεσμα τη δημιουργία δύο φάσεων. Η οργανική φάση (πάνω φάση), στην οποία βρίσκεται το περισσευούμενο FMOC-Cl που δεν συνδέθηκε με τα αμινοξέα, απομακρύνθηκε με τη βοήθεια λεπτής σύριγγας και στο δείγμα προστέθηκαν ξανά 400 μL διαλύματος οξικού αιθυλεστέρα/ n-εξανίου. Ακολούθησε ανάδευση και διαχωρισμός των δύο φάσεων. Αυτή τη φορά λήφθηκε η υδατική φάση (κάτω φάση) που περιέχει τα προς ανάλυση αμινοξέα. Μετά από φίλτρανση το δείγμα ήταν έτοιμο για εισαγωγή στο χρωματογραφικό σύστημα.

#### 2.2.4.4 Συνθήκες διαχωρισμού

Για το conditioning της στήλης πέρασαν οι διαλύτες με τη σειρά που αναφέρεται: 20% H<sub>2</sub>O/ 80% ACN (10 min), 50% H<sub>2</sub>O/ 50% ACN (10 min), 50% CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>/ 50% ACN (15 min) και 75% CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>/ 25% ACN (10 min).

Ο διαχωρισμός των αμινοξέων έγινε βαθμιδωτά με αναλογία διαλυτών (gradient) που φαίνεται στον παρακάτω πίνακα. Η ροή της κινητής φάσης τέθηκε ίση με 0.7 ml/min και κάθε ανάλυση είχε διάρκεια 40 λεπτά.

*Πίνακας 4: Η αναλογία των διαλυτών κατά τη χρωματογραφική ανάλυση ακολουθούμενη από φθορισμομετρία*

Χρόνος (min)	CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>	ACN
0	75	25
5	75	25
10	60	40
20	50	50
25	0	100
27	0	100
37	75	25
40	75	25

Στο τέλος της μέρας, για τον καθαρισμό και την επαναφορά της στήλης στις συνθήκες αποθήκευσής της πέρασαν οι διαλύτες με τη σειρά που αναφέρεται: 75% H<sub>2</sub>O/ 25% ACN (20 min), 50% H<sub>2</sub>O/ 50% ACN (10 min) και 20% H<sub>2</sub>O/ 80% ACN (20 min). Η τελευταία αναλογία διαλυτών είναι και αυτή στην οποία η στήλη αποθηκεύεται μέχρι την επόμενη χρήση.

## 2.3 Προσδιορισμός αμινοξέων με τη χρήση LC-MS/MS

### 2.3.1 Αντιδραστήρια

Χρησιμοποιήθηκαν:

- Ακετονιτρίλιο (≥ 99.9%, Sigma-Aldrich)
- Μυρμηκικό οξύ (99%, Carlo Erba)
- Μυρμηκικό αμμώνιο (97.0%, BDH)
- Υδροχλωρικό οξύ (2M, analytical grade, Bernd Kraft GmbH)
- Υπερκάθαρο νερό (Συσκευή εργαστηρίου)

### 2.3.2 Συσκευές και γυαλικά αναλώσιμα

- Ηλεκτρονικός αναλυτικός ζυγός (Sartorius AG)
- Πιπέτες
  - 5-40 μl (Finnpipette)
  - 200-1000 μl (JENCONS)
  - 10-100 μl (BRAND, Transferpette)
- Συσκευή Vortex (IKA)
- Συσκευή διήθησης και αντλία κενού
- Φούρνοι
- Συσκευή υπερκάθαρου νερού (TEMAK)
- Ογκομετρικές φιάλες, ποτήρια ζέσεως και ογκομετρικοί κύλινδροι
- Γυάλινα φιαλίδια και δοχεία
- Inserts για φιαλίδια

### 2.3.3 Προετοιμασία προτύπων διαλυμάτων

Για την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων, χρησιμοποιήθηκαν ξανά τα αμινοξέα που φαίνονται στην παράγραφο 2.3.3. Αρχικά πραγματοποιήθηκε ζύγιση των αμινοξέων και έπειτα διάλυσή τους σε υδατικό διάλυμα HCl συγκέντρωσης 0.1

M, μέσα σε ογκομετρική φιάλη. Τα διαλύματα χαμηλότερων συγκεντρώσεων παρασκευάστηκαν με αραίωση. Έτσι προέκυψαν πρότυπα διαλύματα συγκέντρωσης 1000 και 100, 75, 50, 20, 10 και 5 µg/L. Αρχικά εξετάστηκε κάθε αμινοξύ ξεχωριστά και στη συνέχεια μείγματά τους.

## 2.3.4 LC-MS/MS

### 2.3.4.1 Οργανολογία

Χρησιμοποιήθηκε το χρωματογραφικό σύστημα Thermo Finnigan Surveyor που διαθέτει αντλία και αυτόματο δειγματολήπτη. Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε η στήλη ιοντοανταλλαγής Intradia Amino Acid της Imtakt, με διαστάσεις 100 mm x 3 mm και μέγεθος σωματιδίων 3 µm, η οποία ειδικεύεται στον διαχωρισμό αμινοξέων. Ο βρόγχος έγχυσης είχε όγκο 10 µl. Ο φασματογράφος μαζών (Thermo TSQ Quantum Discovery Max) διέθετε αναλυτή μαζών τύπου τετραπόλου τριών σταδίων και πηγή ESI. Η ρύθμιση της μεθόδου, η λήψη και η επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό Xcalibur 2.1 SP 1160.



Εικόνα 14: Η διάταξη LC-MS/MS στο εργαστήριο



Εικόνα 15: Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε στη διάταξη LC-MS/MS

#### 2.3.4.2 Προετοιμασία κινητή φάσης/διαλυτών και δειγμάτων

Η κινητή φάση που χρησιμοποιήθηκε ήταν:



- A. Υδατικό διάλυμα HCOONH<sub>4</sub> συγκέντρωσης 100 mM. Πριν την εισαγωγή του στο χρωματογραφικό σύστημα, πραγματοποιούνταν διήθηση στο διάλυμα για την απομάκρυνση τυχόν στερεών από το άλας. Η παρασκευή του γινόταν καθημερινά πριν τη χρωματογραφία.
- B. ACN, 0.5% HCOOH

Για το conditioning (τα βήματα για την επαναφορά της στήλης από τις συνθήκες αποθήκευσης στις συνθήκες ανάλυσης), τον καθαρισμό και την αποθήκευση της στήλης στο τέλος της χρωματογραφίας χρησιμοποιήθηκαν ακετονιτρίλιο και υπερκάθαρο νερό. Συνολικά δηλαδή στο χρωματογραφικό σύστημα υπήρχαν 3 δοχεία με διαλύτες. Στην αρχή κάθε ανάλυσης, πραγματοποιούνταν sparging και purging όλων των διαλυτών.

Τα δείγματα που εισάγονταν στο χρωματογραφικό σύστημα είχαν ως διαλύτη διάλυμα HCl συγκέντρωσης 0.1 M.

#### 2.3.4.3 Συνθήκες διαχωρισμού και ανίχνευσης των αμινοξέων

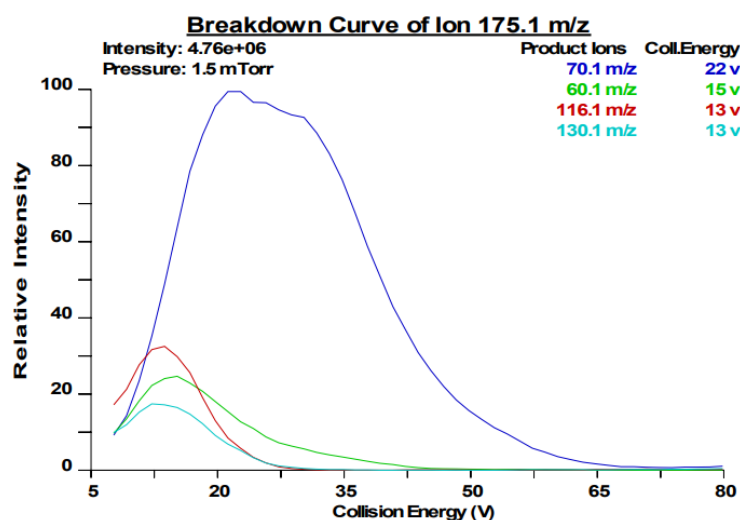
Ο διαχωρισμός των αμινοξέων έγινε βαθμιδωτά με αναλογία διαλυτών (gradient) που φαίνεται στον παρακάτω πίνακα. Η ροή της κινητής φάσης τέθηκε ίση με 0.4 mL/min και κάθε ανάλυση είχε διάρκεια 32 λεπτά. Ανάμεσα σε δύο αναλύσεις υπήρχε επίσης ένα διάστημα περίπου 10 λεπτών για την επαναφορά της στήλης στις αρχικές συνθήκες ανάλυσης. Η θερμοκρασία της στήλης ήταν σταθερή στους 30 °C.

*Πίνακας 5: Η αναλογία των διαλυτών κατά τη χρωματογραφική ανάλυση ακολουθούμενη από φασματομετρία μαζών*

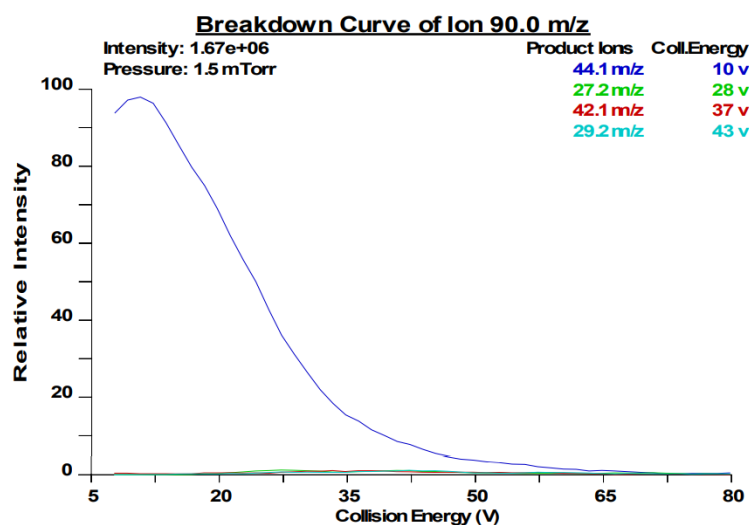
Χρόνος (min)	HCOONH <sub>4</sub>	ACN, 0.5% HCOOH
0	15	85
4	15	85
15	80	20
19	80	20
22	15	85
32	15	85

Ο ιοντισμός των ενώσεων πραγματοποιήθηκε με την τεχνική του ηλεκτροψεκασμού (Electrospray ionization, ESI) με θετικό ιοντισμό. Η ανίχνευση έγινε με επιλεκτική παρακολούθηση των αντιδράσεων θραυσματοποίησης ιόντων (Multiple Reaction Monitoring, MRM), χρησιμοποιώντας τα περισσότερο έντονα και χαρακτηριστικά ιόντα (μεταπτώσεις) που προέκυψαν από τη διαδικασία βελτιστοποίησης της μεθόδου.

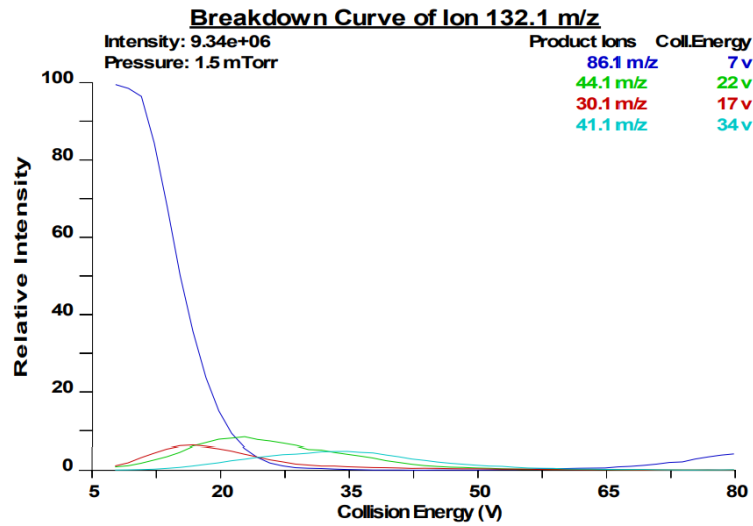
Στη συνέχεια, παρουσιάζονται οι καμπύλες θραυσματοποίησης για τα αμινοξέα L-Αργινίνη, D-Αλανίνη, L-Λευκίνη, L-Ασπαραγινικό οξύ και D-Γλουταμινικό οξύ όπου διακρίνονται οι μεταπτώσεις, δηλαδή η παραγωγή των θυγατρικών ιόντων και η σχετική ένταση του φαινομένου ανάλογα με την ενέργεια θραύσης (collision energy). Για την ποσοτικοποίηση και την ταυτοποίηση των αμινοξέων στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν τα δύο πρώτα ιόντα που αναγράφονται σε κάθε περίπτωση εκτός από την D-Αλανίνη που μόνο το ένα από τα ιόντα εμφάνιζε ικανοποιητική ένταση. Για μεγαλύτερη ακρίβεια, οι καμπύλες θραυσματοποίησης έγιναν σε τριπλές για το κάθε αμινοξύ και λήφθηκαν οι μέσοι όροι.



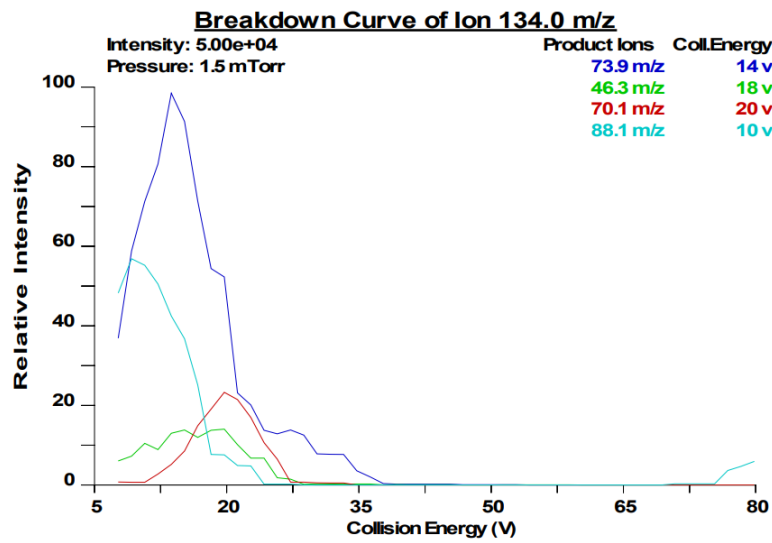
Εικόνα 16: Καμπύλη θραυσματοποίησης για την L-Αργινίνη



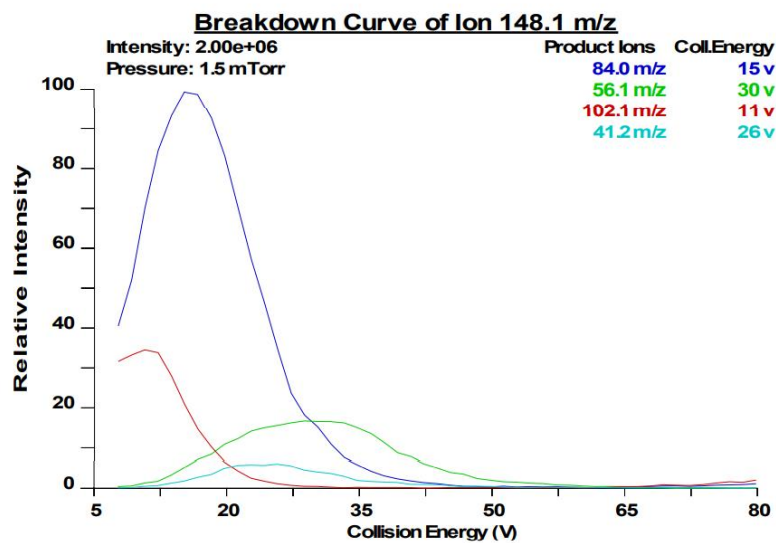
Εικόνα 17: Καμπύλη θραυσματοποίησης για την D-Αλανίνη



Εικόνα 18: Καμπύλη θραυσματοποίησης για την L-Λευκίνη



Εικόνα 19: Καμπύλη θραυσματοποίησης για το L-Ασπαραγινικό οξύ



Εικόνα 20: Καμπύλη θραυσματοποίησης για το D-Γλουταμινικό οξύ

Έτσι προέκυψε ο παρακάτω πίνακας στον οποίο παρουσιάζονται τα μητρικά ιόντα των αμινοξέων, τα θυγατρικά ιόντα που παράχθηκαν από αυτά και η ενέργεια που απαιτήθηκε για κάθε θραύση (collision energy). Το πρώτο θυγατρικό ιόν που αναφέρεται για κάθε αμινοξύ είναι και το ιόν ποσοτικοποίησης. Αυτά τα δεδομένα αξιοποιήθηκαν κατά την ανάλυση LC-MS/MS αφού πρώτα επιβεβαιώθηκαν από τη βιβλιογραφία. [68, 69]

Πίνακας 6: Τα μητρικά και θυγατρικά ιόντα των αμινοξέων και οι ενέργειες θραύσης που αξιοποιήθηκαν κατά την ανάλυση LC-MS/MS

Αμινοξύ	Μητρικό ιόν (m/z)	Θυγατρικά ιόντα (m/z)	Collision energy (eV)
L-Αργινίνη	175.1	70.1	25
		116.1	15
D-Αλανίνη	90.1	44.1	11
L-Λευκίνη	132.1	86.1	10
		44.1	22
L-Ασπαραγινικό οξύ	134.0	74.0	14
		70.1	20
D-Γλουταμινικό οξύ	148.1	84.0	15
		102.1	11
Adda	332.2	135.0	25
		286.0	15

Mdha	102.0	56.0	15
		86.0	15
MeAsp	148.0	102.0	15
		74.0	15

Τα θυγατρικά ιόντα των αμινοξέων Adda, Mdha και MeAsp βρέθηκαν μελετώντας τη δομή των αμινοξέων, από όπου προκύπτουν οι πιθανότερες θέσεις προσβολής των μορίων και άρα οι πιθανότερες μεταπτώσεις. Η μετάπτωση  $m/z=135$  του Adda προκύπτει από την σχάση της μεθόξυ ομάδας στο τμήμα  $\text{PhCH}_2\text{CH}(\text{OMe})$  του αμινοξέος [70], ενώ η μετάπτωση  $m/z=286$  από την αφαίρεση της ομάδας καρβοξυλίου. Οι μεταπτώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των Mdha και MeAsp επιλέχθηκαν εμπειρικά με βάση τη γενικότερη συμπεριφορά των αμινοξέων.

Τέλος, οι συνθήκες ιοντισμού που εφαρμόστηκαν κατά την ανάλυση MS/MS ήταν οι εξής:

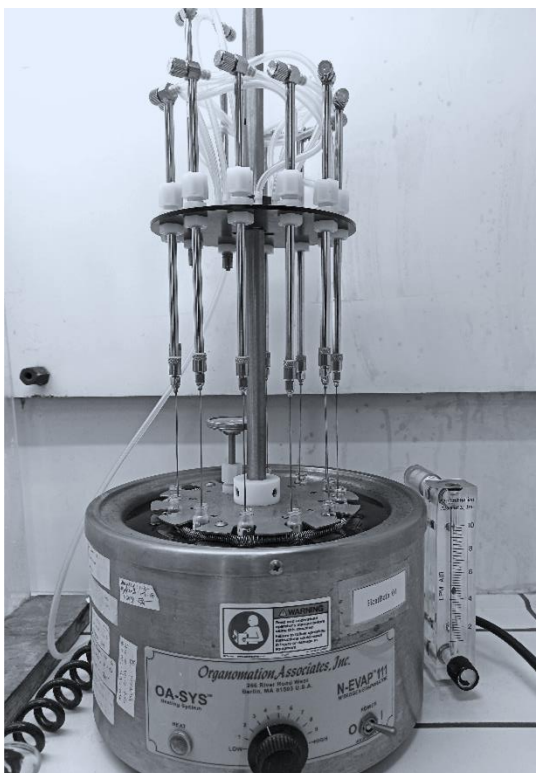
- Spray voltage: 4000 eV
- Sheath gas pressure: 30 A.U
- Auxiliary gas pressure: 10 A.U
- Ion transfer capillary temperature: 350 °C
- Collision pressure: 1.5 mTorr

## 2.4 Προκαταρκτικά πειράματα υδρόλυσης της MC-RR

Τα πειράματα της υδρόλυσης πραγματοποιήθηκαν σε συμβατικό ηλεκτρικό φούρνο εργαστηρίου στους 110 °C όπως αναφέρεται και στη βιβλιογραφία. [58] Τα δείγματα προς υδρόλυση τοποθετούνταν σε μικρά φιαλίδια μέσα σε ένα ποτήρι ζέσεως που έκλεινε με τριβλίο petri. Για την προετοιμασία του αντιδραστηρίου της υδρόλυσης, 200 mg φαινόλης προστέθηκαν σε 10 ml διαλύματος HCl 12 M (37%, Merck). Στο δείγμα προς υδρόλυση τοποθετούνταν 100 μl προτύπου διαλύματος και 100 μl HCl (με 10% φαινόλη) επομένως η υδρόλυση πραγματοποιούνταν σε διάλυμα HCl με τελική συγκέντρωση 6 M. Συνολικά έγιναν πειράματα υδρόλυσης σε:

- Πρότυπα διαλύματα μείγματος αμινοξέων σε διάφορες συγκεντρώσεις για 2,3 και 24 ώρες, προκειμένου να διαπιστωθεί η επίδραση της υδρόλυσης στα αμινοξέα
- Πρότυπο διάλυμα MC-RR συγκέντρωσης 1 mg/L για 24 ώρες
- Υπερκάθαρο νερό για 24 ώρες για να εξετασθούν τυχόν επιμολύνσεις

Μετά την υδρόλυση πραγματοποιούνται εξάτμιση της υγρής φάσης από τα δείγματα με ρεύμα αζώτου σε συσκευή που διαθέτε θερμοστατικό υδατόλουτρο. Ορισμένα δείγματα είχαν εξατμιστεί πλήρως κατά την υδρόλυση. Η συσκευή (Organomation Associates, 12 Position N-EVAP Nitrogen Evaporator) φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



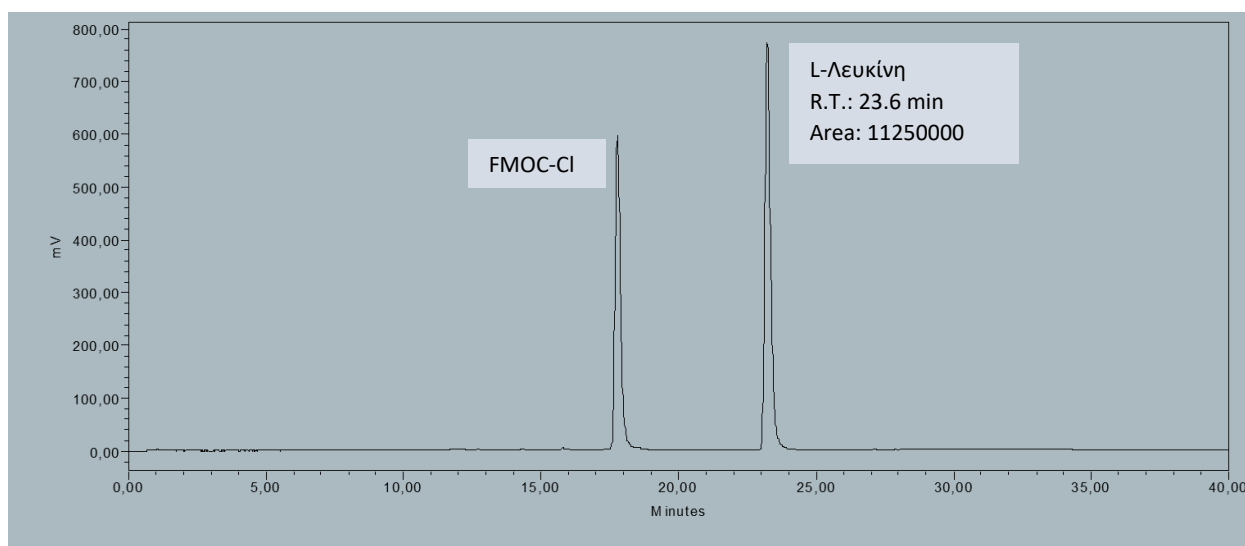
*Εικόνα 21: Συσκευή εξάτμισης με ρεύμα αζώτου και υδατόλουτρο*

Πριν την εισαγωγή στο χρωματογραφικό σύστημα τα δείγματα επαναδιαλυτοποιούνταν σε 100  $\mu\text{L}$  διαλύματος HCl συγκέντρωσης 0.1 M με σχολαστική ανάδευση. Έτσι η συγκέντρωση των αναλυτών στο διάλυμα προς ανάλυση επανερχόταν στη συγκέντρωση του προτύπου.

### 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

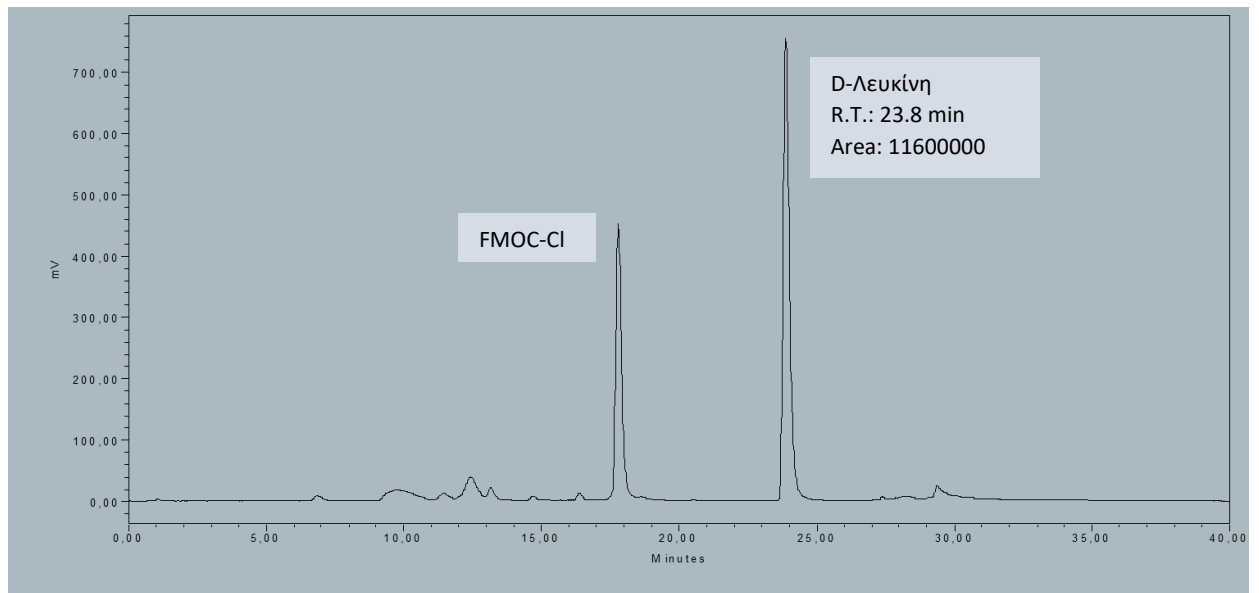
#### 3.1 Προσδιορισμός αμινοξέων με τη χρήση LC-FL

Αρχικά πραγματοποιήθηκε ανάλυση κάθε αμινοξέος ξεχωριστά με παραγωγοποίηση σε πρότυπα διαλύματα συγκέντρωσης 10 mg/L. Έτσι προσδιορίστηκε η θέση των αμινοξέων στο χρωματογράφημα, δηλαδή ο χρόνος ανάσχεσής τους. Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα όλων των αμινοξέων στα οποία αναγράφεται ο χρόνος ανάσχεσης (retention time) των αμινοξέων και το εμβαδόν που προκύπτει από την ολοκλήρωση των κορυφών (area). Εκτός από τα αμινοξέα, σε κάθε χρωματογράφημα εμφανίζεται μία επιπλέον κορυφή που ανήκει στο FMOC-Cl, το αντιδραστήριο της παραγωγοποίησης που παρέμεινε στο τελικό δείγμα. Η κορυφή αυτή διακρίνεται στα 18 min.



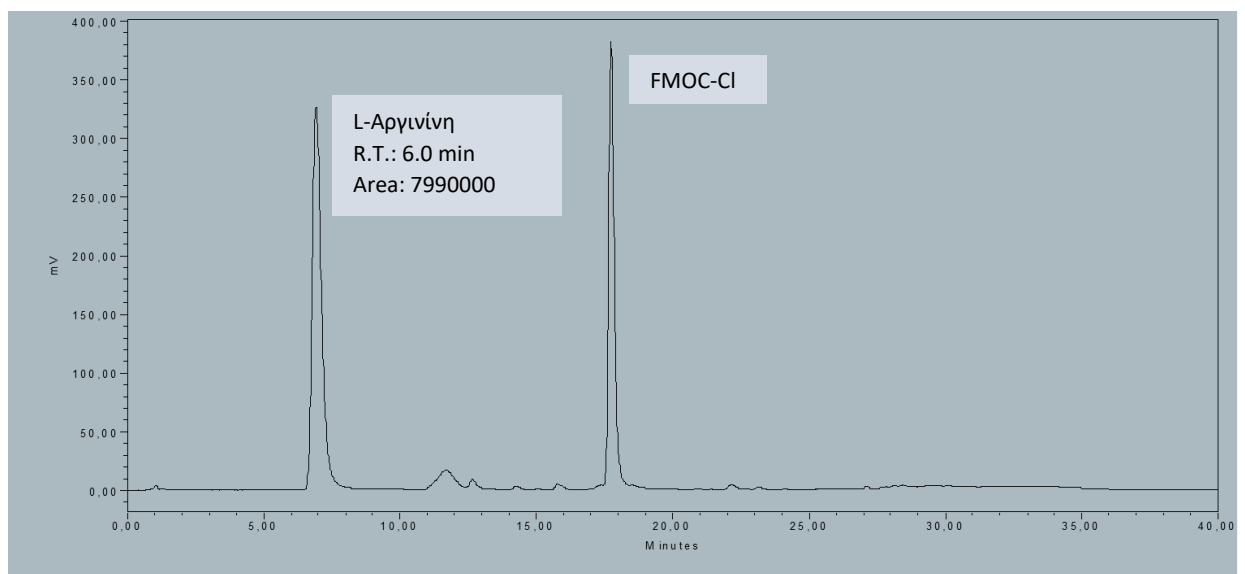
**Εικόνα 22:** Χρωματογράφημα LC-FL προτύπου διαλύματος L-Λευκίνης συγκέντρωσης 10 mg/L



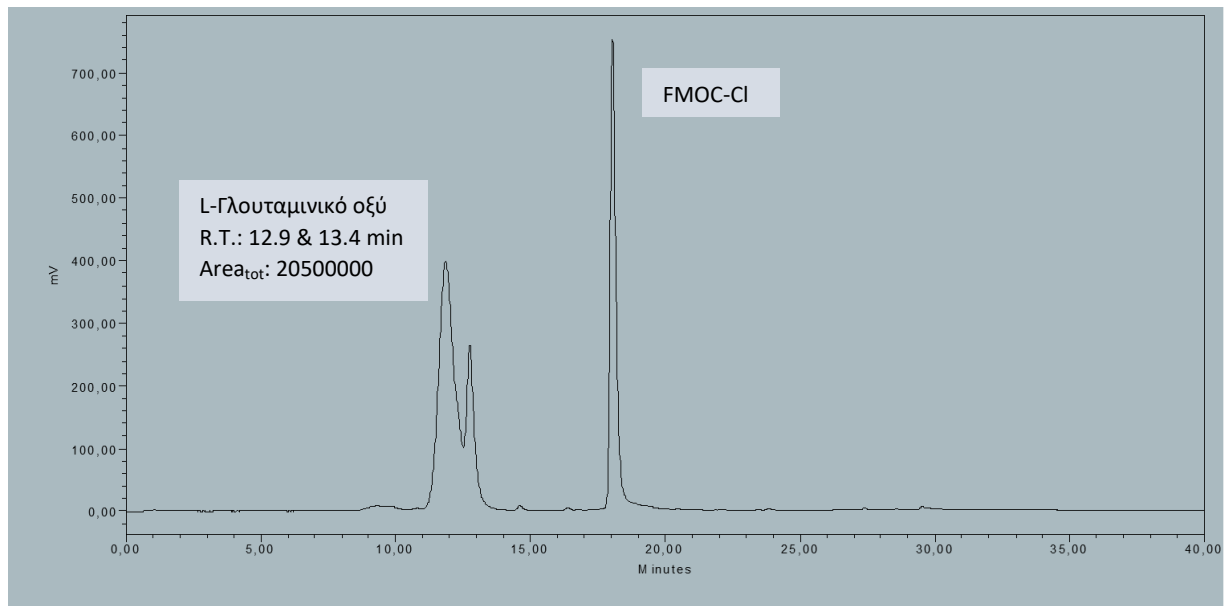


**Εικόνα 23:** Χρωματογράφημα LC-FL προτύπου διαλύματος D-Λευκίνης συγκέντρωσης 10 mg/L

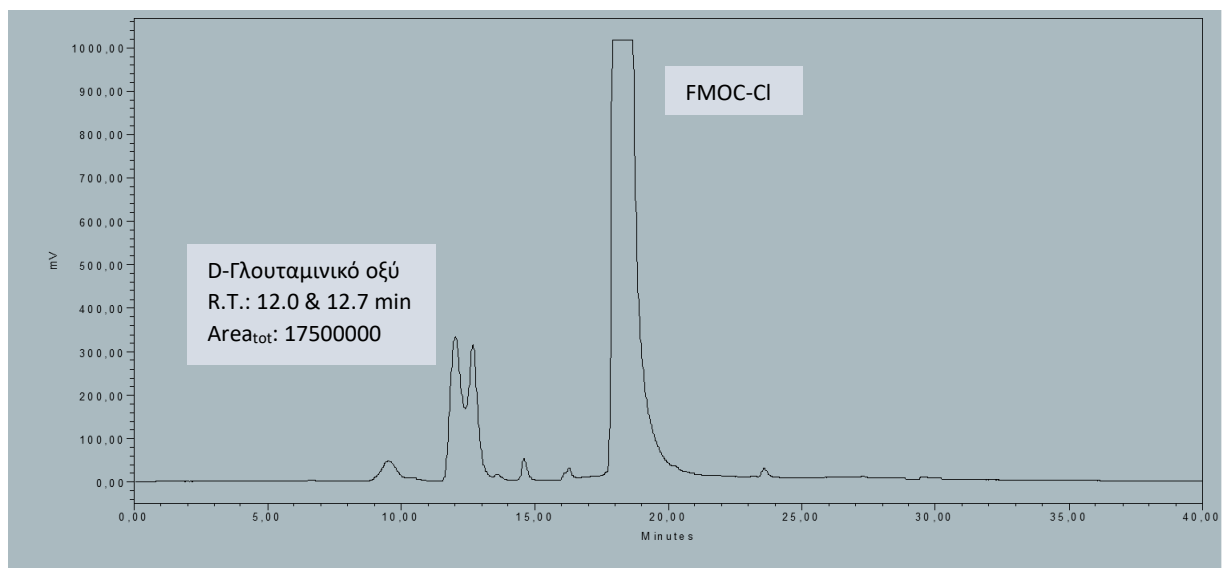
Όπως φαίνεται, τα εναντιομερή D και L της Λευκίνης εκλύονται στον ίδιο περίπου χρόνο και άρα δεν διαχωρίζονται σε αυτές τις συνθήκες.



**Εικόνα 24:** Χρωματογράφημα LC-FL προτύπου διαλύματος L-Αργινίνης συγκέντρωσης 10 mg/L

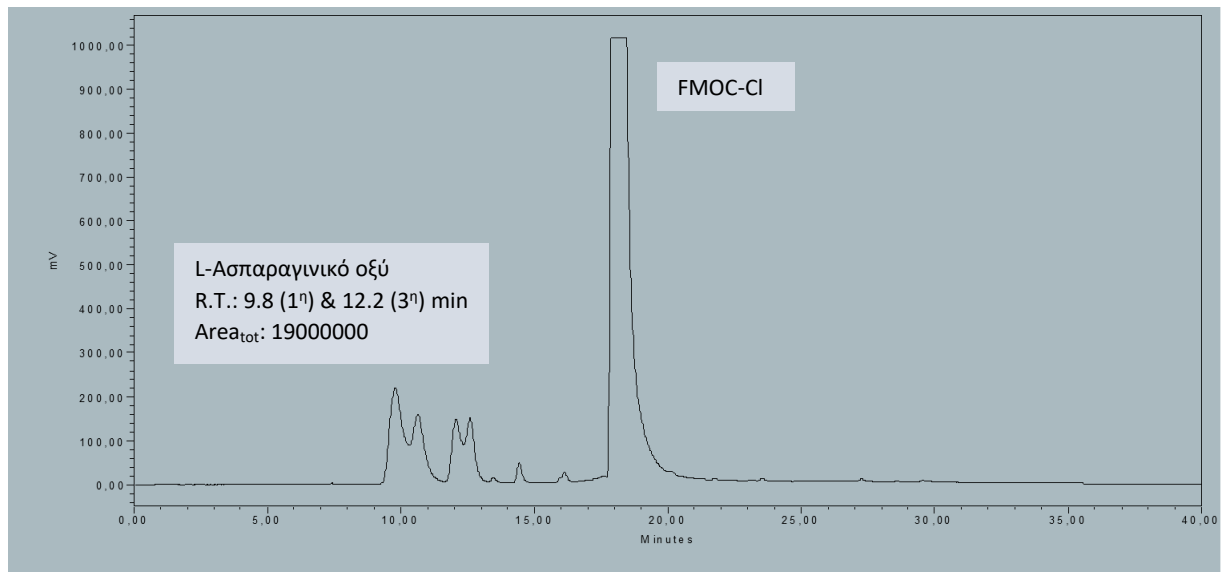


**Εικόνα 25:** Χρωματογράφημα LC-FL προτύπου διαλύματος L-Γλουταμινικού οξέος συγκέντρωσης 10 mg/L



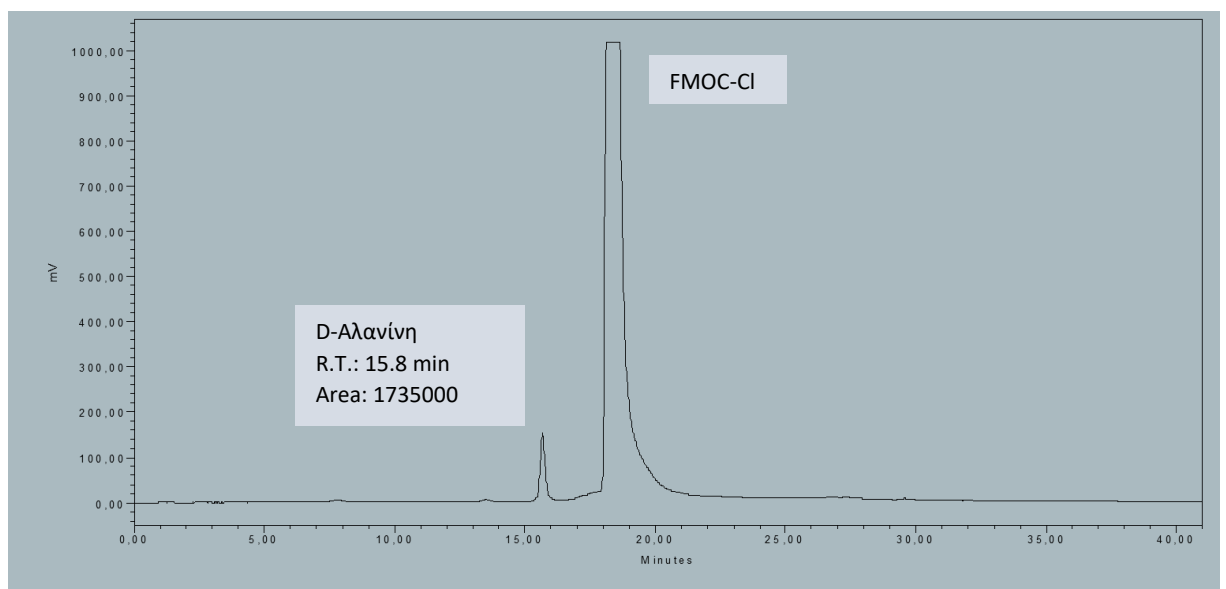
**Εικόνα 26:** Χρωματογράφημα LC-FL προτύπου διαλύματος D-Γλουταμινικού οξέος συγκέντρωσης 10 mg/L

Το γλουταμινικό οξύ εμφανίζει διπλή κορυφή κατά την έκλουσή του, γεγονός που δεν έχει ερμηνευτεί. Και σε αυτή την περίπτωση, η έκλυση των εναντιομερών D και L γίνεται περίπου στον ίδιο χρόνο.



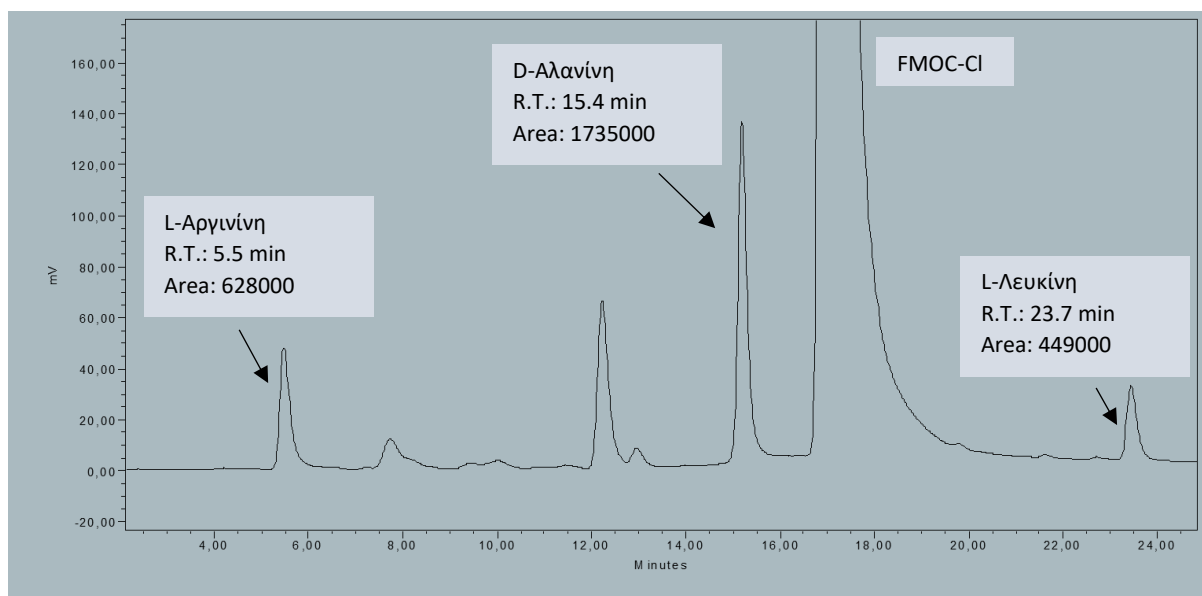
**Εικόνα 27:** Χρωματογράφημα LC-FL προτύπου διαλύματος L-Ασπαραγινικού οξέος συγκέντρωσης 10 mg/L

Στο χρωματογράφημα του L-Ασπαραγινικού οξέος εμφανίζονται δύο διπλές κορυφές. Οι δύο από τις κορυφές (3<sup>η</sup> και 4<sup>η</sup>) βρίσκονται σε χρόνους ανάλυσης ίδιους με αυτούς του γλουταμινικού οξέος. Μία πιθανή εξήγηση του φαινομένου είναι η επιμόλυνση των προτύπων διαλυμάτων των δύο αμινοξέων. Όμως και σε αυτή την περίπτωση δεν έχει δοθεί ικανοποιητική εξήγηση για την εμφάνιση διπλών κορυφών.



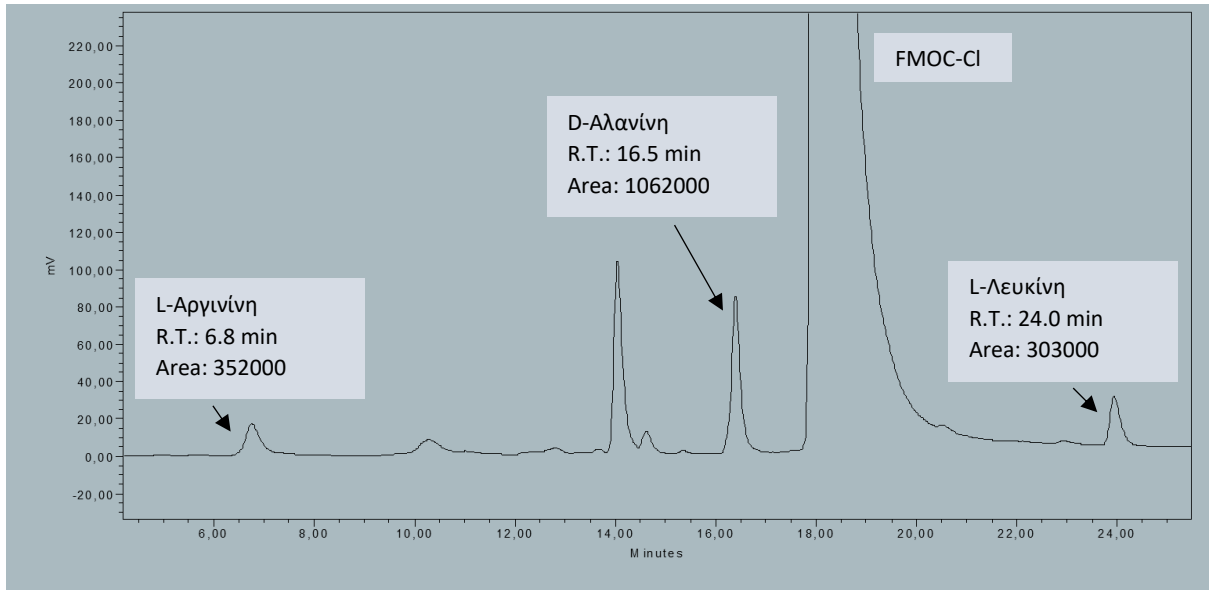
**Εικόνα 28:** Χρωματογράφημα LC-FL προτύπου διαλύματος D-Αλανίνης συγκέντρωσης 1 mg/L

Έπειτα πραγματοποιήθηκε ανάλυση στο μείγμα των αμινοξέων που περιέχονται στην MC-RR ή στην MC-LR, τα οποία εμφάνισαν οξείες συμμετρικές κορυφές ως ένδειξη καλού διαχωρισμού. Αυτά είναι η L-Αργινίνη, D-Αλανίνη και η L-Λευκίνη. Αναλύθηκαν συγκεντρώσεις προτύπων 1000, 500, 200, 100 και 50  $\mu\text{g/L}$  με 5 επαναλήψεις στην κάθε συγκέντρωση. Έτσι προέκυψαν τα παρακάτω χρωματογράφημα.

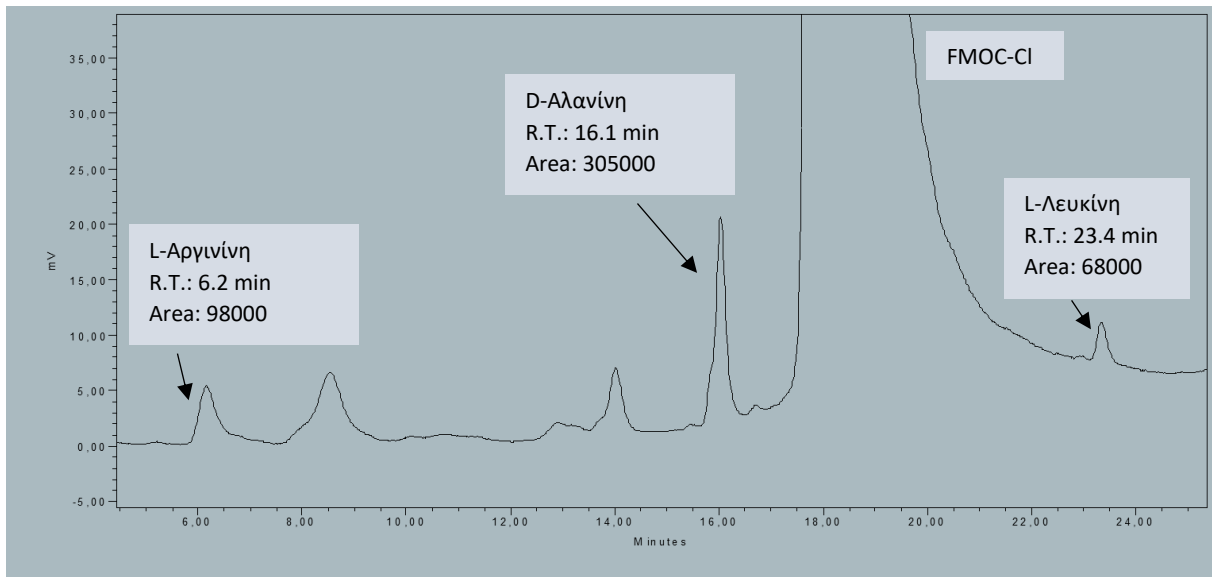


**Εικόνα 29:** Χρωματογράφημα LC-FL προτύπου διαλύματος μείγματος L-Αργινίνης, D-Αλανίνης και L-Λευκίνης συγκέντρωσης 1  $\text{mg/L}$

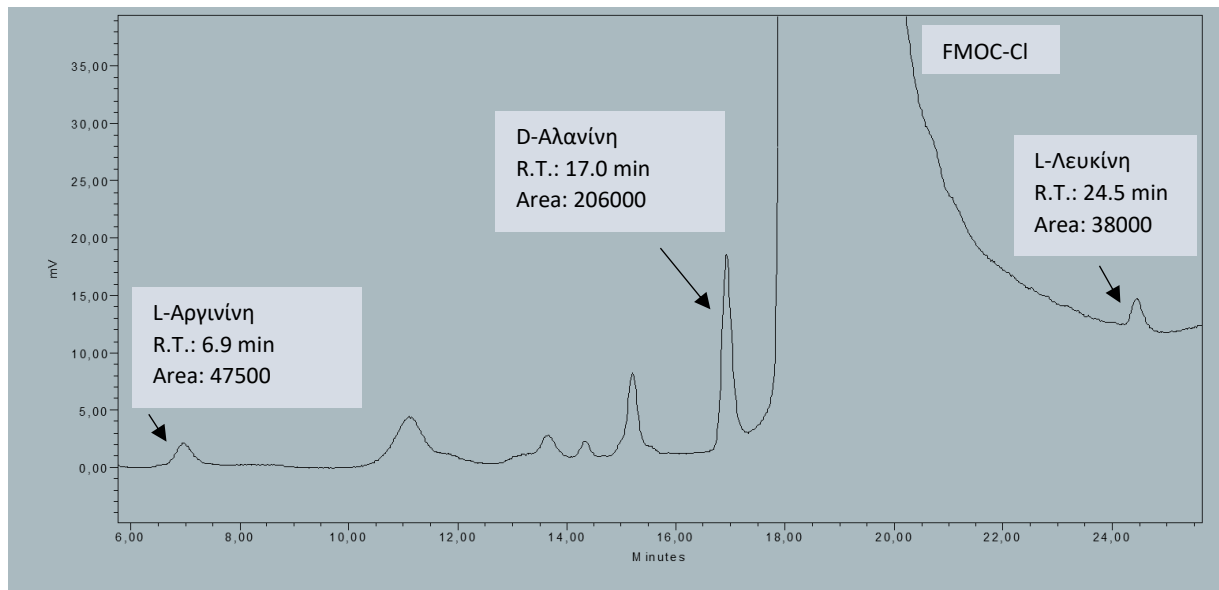
Όπως είναι αναμενόμενο, η L-Αργινίνη εκλύεται νωρίτερα καθώς πρόκειται για πολικότερο μόριο. Η D-Αλανίνη και η L-Λευκίνη εμφανίζουν μειωμένη πολικότητα.



**Εικόνα 30:** Χρωματογράφημα LC-FL προτύπου διαλύματος μείγματος L-Αργινίνης, D-Αλανίνης και L-Λευκίνης συγκέντρωσης 500 µg/L



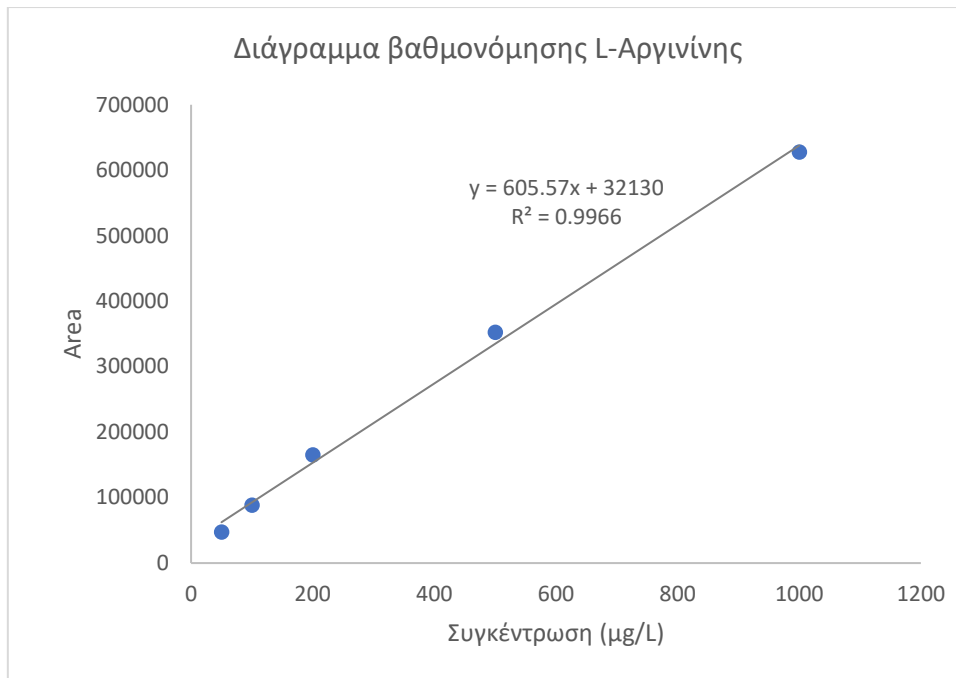
**Εικόνα 31:** Χρωματογράφημα LC-FL προτύπου διαλύματος μείγματος L-Αργινίνης, D-Αλανίνης και L-Λευκίνης συγκέντρωσης 100 µg/L



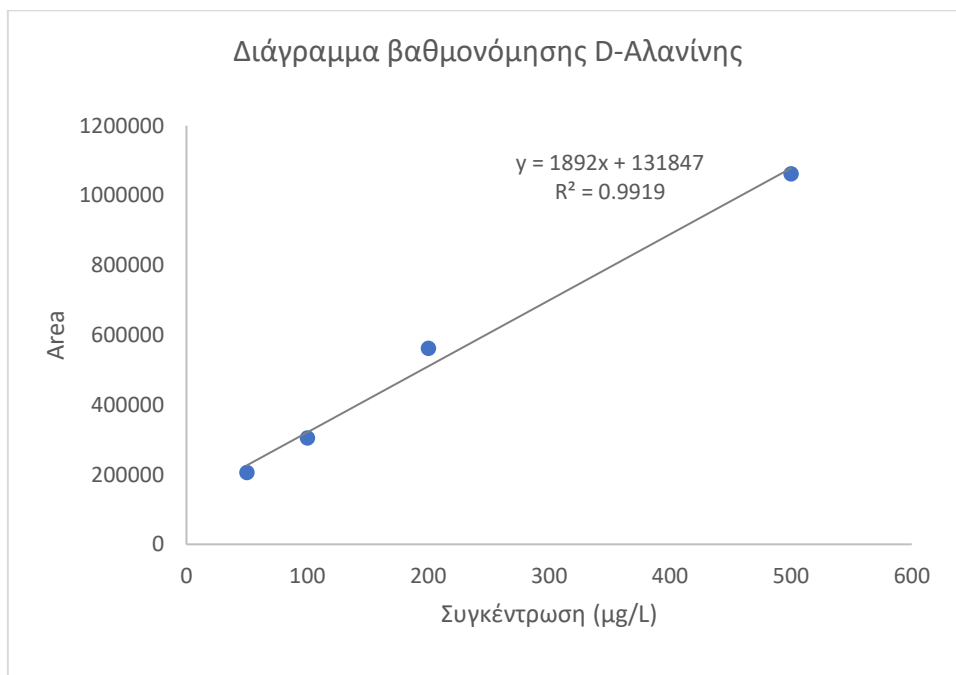
**Εικόνα 32:** Χρωματογράφημα LC-FL προτύπου διαλύματος μείγματος L-Αργινίνης, D-Αλανίνης και L-Λευκίνης συγκέντρωσης 50  $\mu\text{g/L}$

Όσο μειώνεται η συγκέντρωση των αμινοξέων στο πρότυπο διάλυμα, μειώνεται και το εμβαδόν των αντίστοιχων κορυφών. Η κορυφή που εμφανίζεται σε χρόνο 12-15 min δεν αντιστοιχεί σε κάποιο αμινοξύ. Εμφανίζεται σε όλα τα χρωματογραφήματα και στα blank δείγματα που έτρεχαν στην αρχή κάθε ημέρας. Το εμβαδόν της κορυφής μεταβάλλεται αλλά δεν υπάρχει κάποια γραμμικότητα σε σχέση με τις συγκεντρώσεις των αμινοξέων, επομένως πρόκειται πιθανότατα για κάποια επιμόλυνση. Επίσης, οι μικρές διαφοροποιήσεις στον χρόνο ανάσχεσης των αμινοξέων ήταν αναμενόμενες καθώς εξαρτώνται σημαντικά από τον τρόπο εισαγωγής (ένεση) του δείγματος στο χρωματογραφικό σύστημα.

Για την αξιολόγηση της απόδοσης της μεθόδου, κατασκευάστηκαν τα διαγράμματα βαθμονόμησης για τα 3 αμινοξέα L-Αργινίνη, D-Αλανίνη και L-Λευκίνη χρησιμοποιώντας την μέση τιμή των 5 επαναλήψεων για τις συγκεντρώσεις 1000, 500, 200, 100 και 50  $\mu\text{g/L}$ . Ο μέσος χρόνος ανάσχεσης κάθε αμινοξέος υπολογίστηκε ίσος με 5.98, 16.07 και 23.64 min αντίστοιχα.

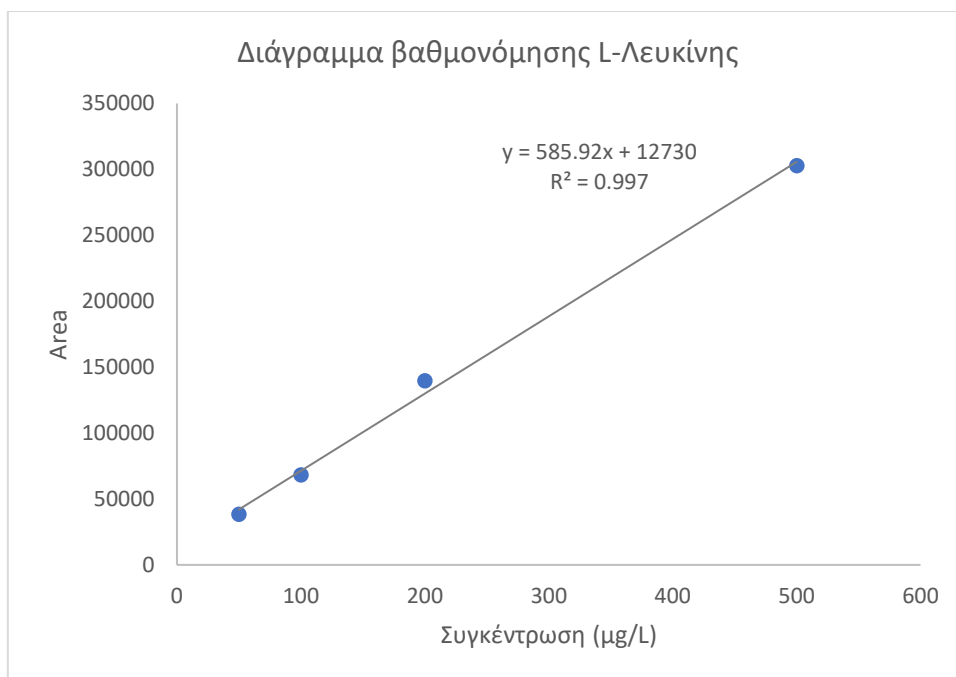


**Εικόνα 33:** Διάγραμμα βαθμονόμησης LC-FL για την L-Αργινίνη



**Εικόνα 34:** Διάγραμμα βαθμονόμησης LC-FL για την D-Αλανίνη





Εικόνα 35: Διάγραμμα βαθμονόμησης LC-FL για την L-Λευκίνη

Όπως φαίνεται και τα 3 αμινοξέα εμφανίζουν πολύ καλή γραμμικότητα με συντελεστή προσδιορισμού ( $R^2$ ) μεγαλύτερο από 0.99. Η γραμμικότητα για την L-Αργινίνη παραμένει υψηλή μέχρι τη συγκέντρωση των 1000 μg/L όμως για τα άλλα δύο αμινοξέα η γραμμικότητα μειώνεται σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 500 μg/L. Γι'αυτό τα σημεία που αντιστοιχούν σε συγκέντρωση 1000 μg/L έχουν παραλειφθεί από τα δύο διαγράμματα. Επίσης, γίνεται αντιληπτό ότι η D-Αλανίνη εμφανίζει μεγαλύτερα εμβαδά στο χρωματογράφημα σε σχέση με τα άλλα 2 αμινοξέα για τις ίδιες συγκεντρώσεις.

Για τον έλεγχο της ικανότητας της μεθόδου να ανιχνεύει χαμηλές συγκεντρώσεις του αναλύτη, υπολογίζεται το όριο ανίχνευσης (limit of detection, LOD). Το όριο ανίχνευσης αποτελεί τη χαμηλότερη συγκέντρωση ή μάζα του αναλύτη που μπορεί να ανιχνευθεί με καθορισμένη στάθμη εμπιστοσύνης. Εξαρτάται από τον λόγο της τιμής του αναλυτικού σήματος προς το μέγεθος των στατιστικών διακυμάνσεων του σήματος του τυφλού. Ο τύπος που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό του LOD είναι ο εξής:

$$\text{LOD} = \frac{SD_{100}}{S} * 3.3 \quad (4.1)$$

όπου  $S$  η κλίση της ευθείας στο διάγραμμα βαθμονόμησης και  $SD_{100}$  η τυπική απόκλιση (Standard Deviation) των διαλυμάτων συγκέντρωσης 100 μg/L. Η συγκέντρωση αυτή επιλέχθηκε γιατί είναι από τις μικρότερες που εξετάστηκαν και προσεγγίζει τα αναμενόμενα όρια ανίχνευσης. Η τυπική απόκλιση δίνεται από τον τύπο:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{x} - x_i)^2}{n - 1}} \quad (4.2)$$

Όπου  $x_i$  η αριθμητική τιμή της μέτρησης  $i$  και  $n$  ο αριθμός των μετρήσεων.

Έγινε επίσης υπολογισμός του ορίου ποσοτικοποίησης (limit of quantification, LOQ). Το όριο ποσοτικοποίησης ορίζεται ως η ελάχιστη συγκέντρωση του αναλύτη στο δείγμα, που μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά με αξιοπιστία. Χρησιμοποιήθηκε ο τύπος:

$$LOQ = \frac{SD_{100}}{S} * 10 \quad (4.3)$$

Οι υπολογισμοί έγιναν σε φύλλο excel και τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

*Πίνακας 7: Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης των αμινοξέων στη μέθοδο LC-FL*

<b>Αμινοξύ</b>	<b>LOD (mg/L)</b>	<b>LOQ (mg/L)</b>
L-Αργινίνη	0.097	0.29
D-Αλανίνη	0.050	0.15
L-Λευκίνη	0.061	0.19

Όπως φαίνεται τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης είναι αρκετά χαμηλά. Ωστόσο, λαμβάνοντας υπόψιν τις μικρές ποσότητες των μικροκυστινών που προορίζονται για ανάλυση, είναι επιθυμητές ακόμη μικρότερες τιμές.

Για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας της μεθόδου υπολογίστηκε η σχετική τυπική απόκλιση (relative standard deviation) %RSD. Η επαναληψιμότητα είναι το μέτρο της διασποράς των αποτελεσμάτων διαδοχικών ανεξάρτητων ελεγχών στο ίδιο δείγμα, που εκτελούνται κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Οι υπολογισμοί έγιναν για τη συγκέντρωση των 500  $\mu\text{g/L}$  για κάθε αμινοξύ, με 5 επαναλήψεις στην κάθε συγκέντρωση, σύμφωνα με τον τύπο:

$$\%RSD = \frac{SD * 100}{\bar{x}} \quad (4.4)$$

Όπου  $SD$  η απόλυτη τυπική απόκλιση που δίνεται από τον τύπο (4.2) και  $\bar{x}$  η μέση τιμή των μετρήσεων.

Οι υπολογισμοί έγιναν σε φύλλο excel και τα αποτελέσματα συγκεντρώνονται στον παρακάτω πίνακα:

*Πίνακας 8: Οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις των αμινοξέων για τη συγκέντρωση των 500 µg/L στη μέθοδο LC-FL*

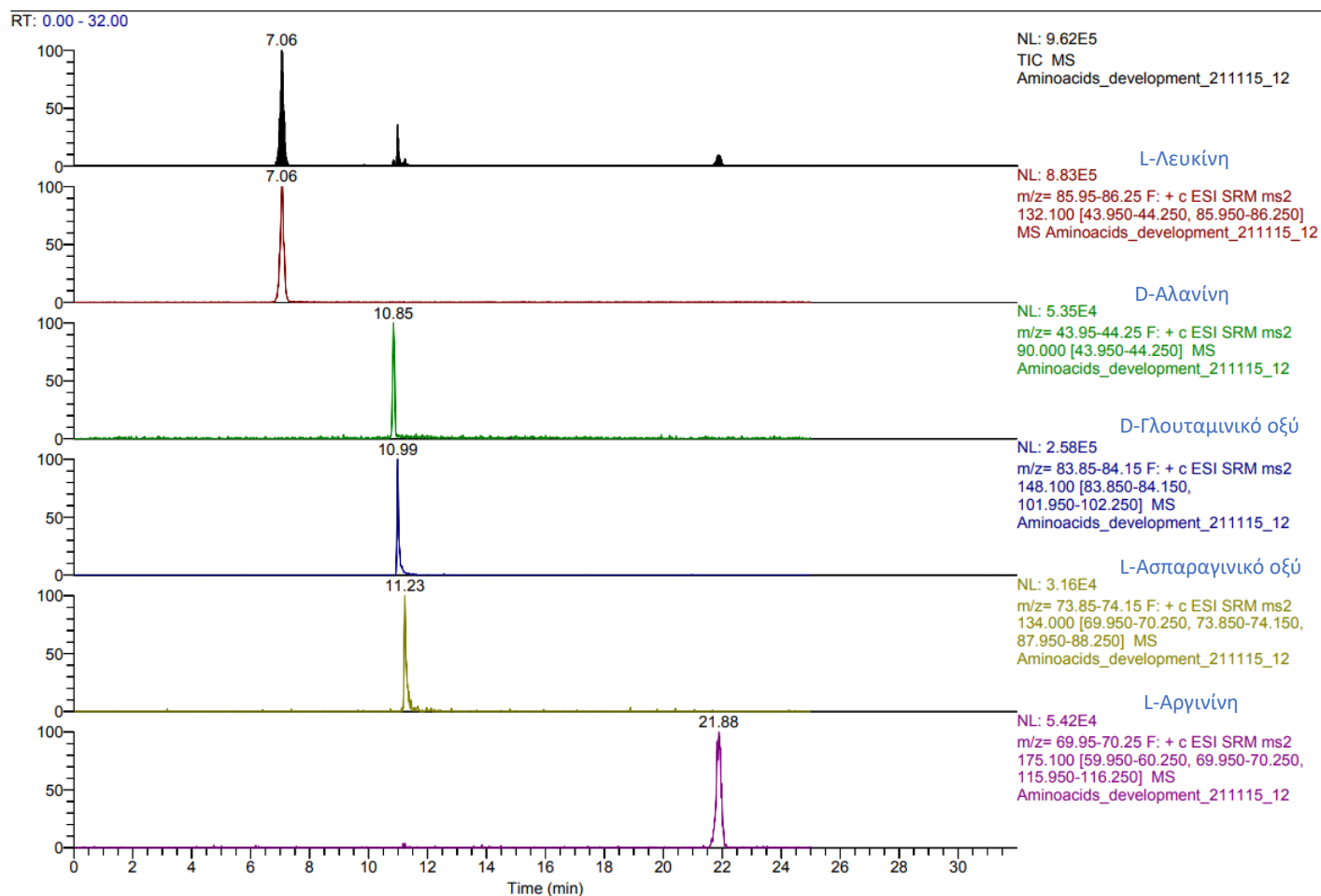
<b>Αμινοξύ</b>	<b>% RSD</b>
L-Αργινίνη	10.5
D-Αλανίνη	9.24
L-Λευκίνη	10.2

Οι τιμές της σχετικής τυπικής απόκλισης που προέκυψαν κρίνονται ικανοποιητικές αλλά ξεπερνούν τα επιθυμητά όρια (2-3%).

Συνολικά, η μέθοδος κρίθηκε αναποτελεσματική για τα αμινοξέα L-Ασπαραγινικό οξύ και D-Γλουταμινικό οξύ. Για αυτόν τον λόγο και για να επιτευχθούν ακόμη χαμηλότερα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης έγινε στη συνέχεια δοκιμή της υγροχρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών σε σειρά. Σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιήθηκε διαφορετική στήλη, ειδική για την ανάλυση αμινοξέων και καταργήθηκε το στάδιο της παραγωγοποίησης που πιθανώς συνεισέφερε σε επιμολύνσεις.

### 3.2 Προσδιορισμός αμινοξέων με τη χρήση LC-MS/MS

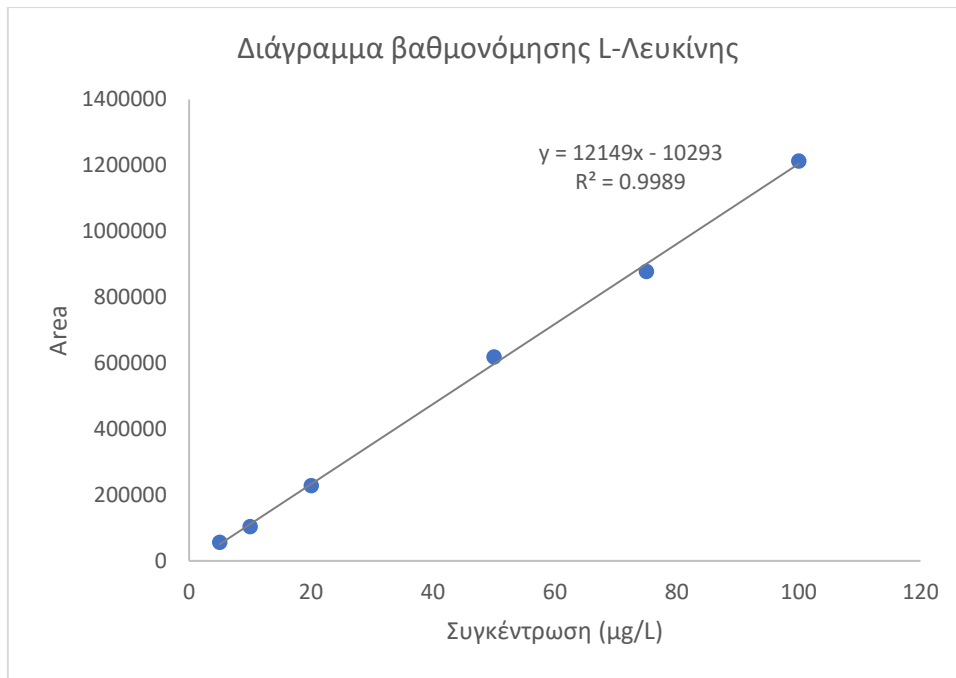
Πραγματοποιήθηκε ανάλυση του μείγματος των 5 αμινοξέων (L-Λευκίνη, D-Αλανίνη, D-Γλουταμινικό οξύ, L-Ασπαραγινικό οξύ και L-Αργινίνη) σε διάφορες συγκεντρώσεις με επιλεκτική παρακολούθηση των μεταπτώσεων που αναγράφηκαν στο πειραματικό μέρος της εργασίας. Τα χρωματογραφήματα που ακολουθούν αφορούν τα 100 µg/L. Πρώτα παρατίθεται το συνολικό χρωματογράφημα με τις κορυφές όλων των αμινοξέων και έπειτα ακολουθούν τα χρωματογραφήματα για κάθε αμινοξύ ξεχωριστά όπου φαίνονται και οι χρόνοι ανάλυσης. Αναγράφονται επίσης πληροφορίες όπως η ένταση του σήματος και οι λόγοι m/z των ιόντων. Σε αυτή την περίπτωση, τα αμινοξέα με την μικρότερη πολικότητα εκλούνται πρώτα, καθώς πρόκειται για στήλη ιοντοανταλλαγής.



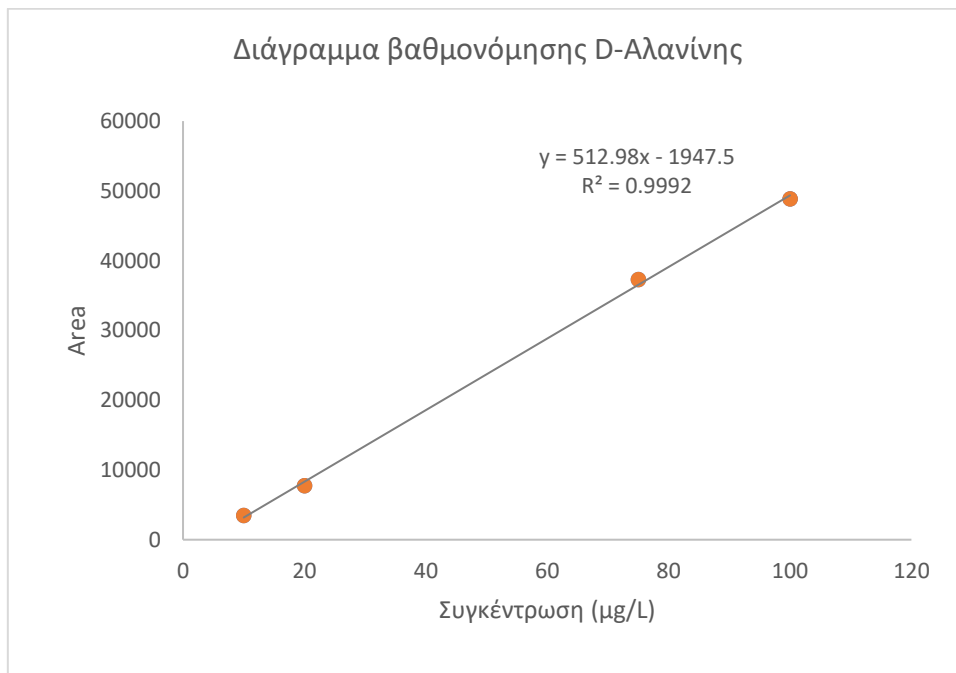
Εικόνα 36: Χρωματογραφήματα LC-MS/MS μείγματος 5 αμινοξέων σε συγκέντρωση 100 μg/L

Παρατηρείται ότι 3 από τα αμινοξέα εκλύονται περίπου στον ίδιο χρόνο, δηλαδή υπάρχει συνέκλυση η οποία όμως δεν επηρεάζει την ανίχνευση και την ποσοτικοποίησή τους. Το σήμα της L-Λευκίνης είναι αρκετά μεγαλύτερο και ακολουθεί το D-Γλουταμινικό οξύ. Όλα τα αμινοξέα φαίνονται καθαρά και εμφανίζουν οξείες, συμμετρικές κορυφές ενώ το σήμα του θορύβου είναι πολύ ασθενές και δεν προκαλεί παρεμβολές.

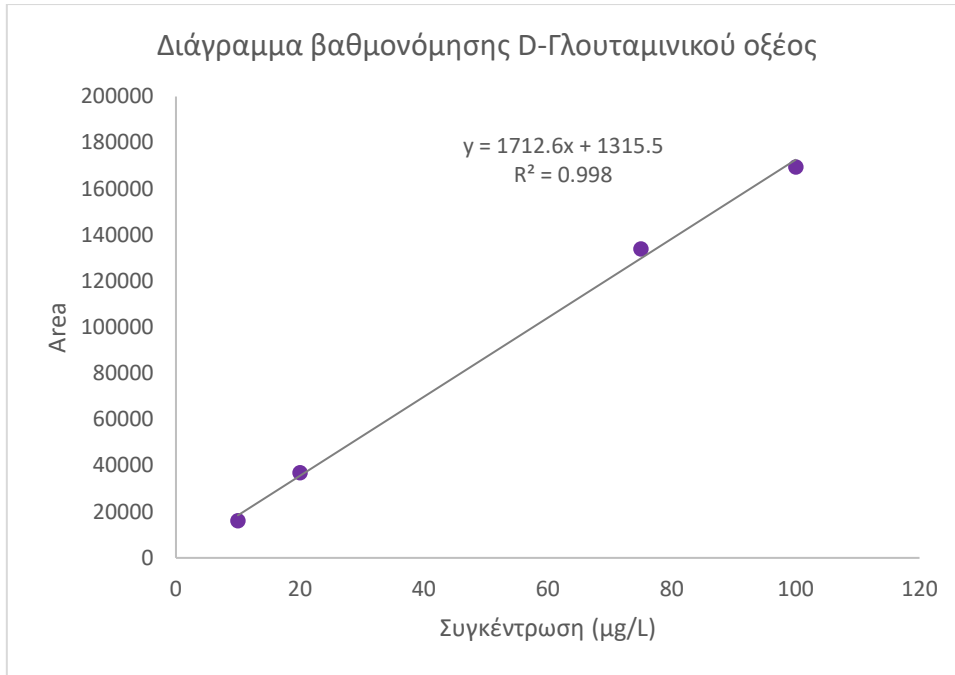
Για την αξιολόγηση της απόδοσης της μεθόδου, έγινε ανάλυση του μείγματος των παραπάνω αμινοξέων για συγκεντρώσεις 100, 75, 50, 20, 10 και 5 μg/L σε τριπλέτες. Έτσι κατασκευάστηκαν τα διαγράμματα βαθμονόμησης των αμινοξέων που φαίνονται στη συνέχεια.



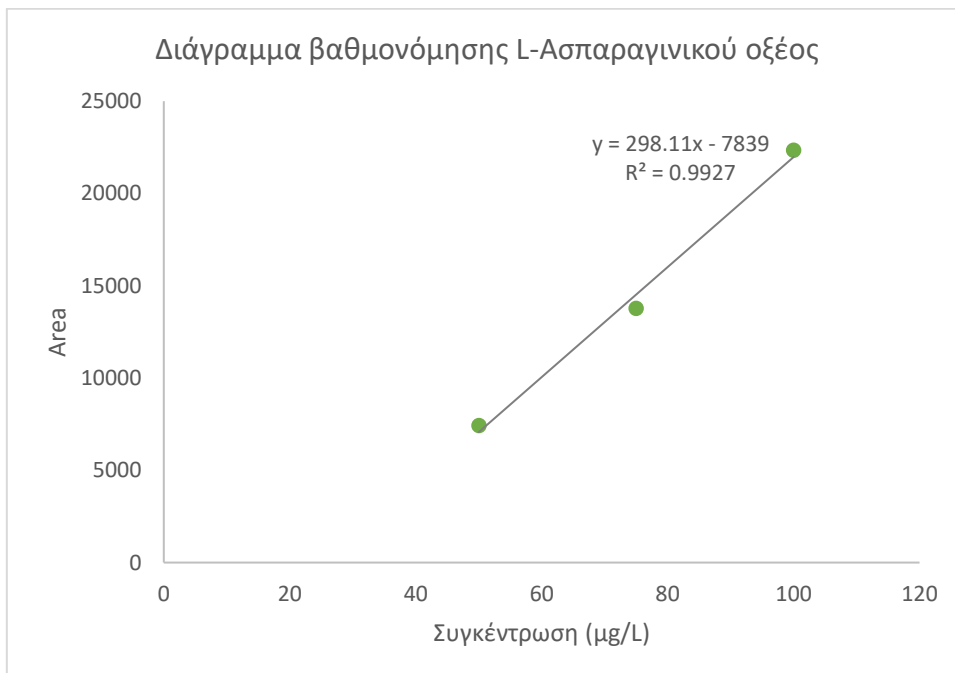
**Εικόνα 37:** Διάγραμμα βαθμονόμησης LC-MS/MS για την L-Λευκίνη



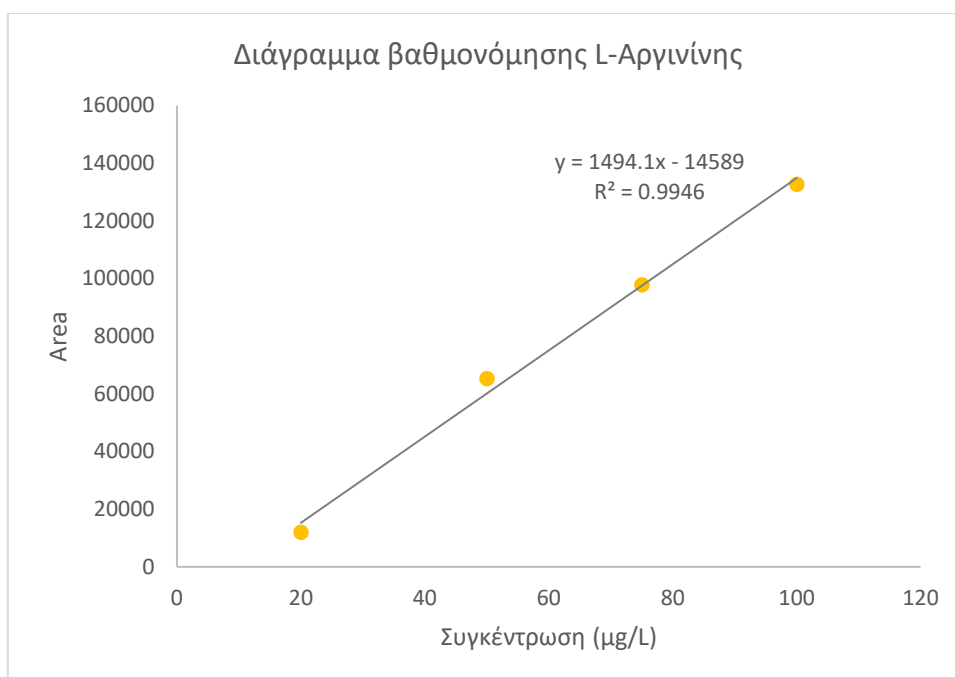
**Εικόνα 38:** Διάγραμμα βαθμονόμησης LC-MS/MS για την D-Αλανίνη



**Εικόνα 39:** Διάγραμμα βαθμονόμησης LC-MS/MS για το D-Γλουταμινικό οξύ



**Εικόνα 40:** Διάγραμμα βαθμονόμησης LC-MS/MS για το L-Ασπαραγινικό οξύ



Εικόνα 41: Διάγραμμα βαθμονόμησης LC-MS/MS για την L-Αργινίνη

Όπως γίνεται αντιληπτό, όλα τα αμινοξέα εμφανίζουν πολύ καλή γραμμικότητα με συντελεστές προσδιορισμού ( $R^2$ ) μεγαλύτερους από 0.99. Από τα διαγράμματα αφαιρέθηκαν τα σημεία που αντιστοιχούσαν σε έκτροπες τιμές (50 μg/L για την D-Αλανίνη και το D-Γλουταμινικό οξύ και 20 μg/L για το L-Ασπαραγινικό οξύ).

Έπειτα, έγινε υπολογισμός των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης σύμφωνα με τους τύπους (4.1), (4.2) και (4.3) που αναφέρονται πιο πάνω. Στη θέση της τυπικής απόκλισης  $SD_{100}$  χρησιμοποιήθηκαν οι τυπικές αποκλίσεις  $SD_5$ ,  $SD_{10}$  και  $SD_{20}$  των συγκεντρώσεων 5, 10 και 20 μg/L αντίστοιχα, όπου ήταν διαθέσιμες. Οι συγκεντρώσεις αυτές επιλέχθηκαν γιατί ήταν οι χαμηλότερες που εξετάστηκαν και προσεγγίζουν τα αναμενόμενα όρια ανίχνευσης.

Οι υπολογισμοί έγιναν σε φύλλο excel και τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 9: Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης των αμινοξέων στη μέθοδο LC-MS/MS

Αμινοξύ	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
L-Λευκίνη	0.0021	0.0064
D-Αλανίνη	0.0019	0.0058
D-Γλουταμινικό οξύ	0.0051	0.015
L-Ασπαραγινικό οξύ	0.0086	0.026

L-Αργινίνη	0.0085	0.026
------------	--------	-------

Παρατηρείται ότι τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης των αμινοξέων στη μέθοδο LC-MS/MS είναι αρκετά χαμηλότερα από τα αντίστοιχα στη μέθοδο LC-FL που εξετάστηκε νωρίτερα. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό, καθώς σημαίνει ότι θα μπορούν να χρησιμοποιούνται μικρότερες ποσότητες μικροκυστινών για τα πειράματα που θα ακολουθήσουν.

Για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας της μεθόδου υπολογίστηκε και σε αυτή την περίπτωση η σχετική τυπική απόκλιση %RSD για την συγκέντρωση των 75 µg/L για κάθε αμινοξύ και 3 επαναλήψεις στην συγκεκριμένη συγκέντρωση. Χρησιμοποιήθηκαν οι τύποι (4.2) και (4.4) που αναγράφονται στην προηγούμενη παράγραφο. Οι υπολογισμοί έγιναν σε φύλλο excel και τα αποτελέσματα συγκεντρώνονται στον παρακάτω πίνακα:

*Πίνακας 10: Οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις των αμινοξέων για τη συγκέντρωση των 75 µg/L στη μέθοδο LC-MS/MS*

<b>Αμινοξύ</b>	<b>%RSD</b>
L-Λευκίνη	2.5
D-Αλανίνη	5.0
D-Γλουταμινικό οξύ	8.2
L-Ασπαραγινικό οξύ	8.3
L-Αργινίνη	0.43

Παρατηρείται ότι οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις στην περίπτωση της LC-MS/MS είναι αρκετά μικρότερες συγκριτικά με την μέθοδο LC-FL για τα αμινοξέα L-Λευκίνη, D-Αλανίνη και L-Αργινίνη. Έτσι συμπεραίνεται ότι η μέθοδος LC-MS/MS εμφανίζει καλύτερη επαναληψιμότητα. Για τα D-Γλουταμινικό οξύ και L-Ασπαραγινικό οξύ οι τιμές της %RSD είναι αυξημένες σε σχέση με τα άλλα αμινοξέα, αλλά κρίνονται ικανοποιητικές.

Συνολικά, η μέθοδος LC-MS/MS ήταν αποτελεσματική για τον προσδιορισμό όλων των αμινοξέων. Επίσης, εμφάνισε χαμηλότερα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης αλλά και καλύτερη επαναληψιμότητα σε σύγκριση με την μέθοδο LC-FL. Έτσι, ήταν αυτή που επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια για τα πειράματα υδρόλυσης της MC-RR.



### 3.3 Προκαταρκτικά πειράματα υδρόλυσης της MC-RR

Αρχικά, για την εξέταση της σταθερότητας των αμινοξέων κατά την υδρόλυση, πραγματοποιήθηκε ανάλυση σε διαλύματα που περιείχαν το μείγμα των 5 αμινοξέων (L-Λευκίνη, D-Αλανίνη, D-Γλουταμινικό οξύ, L-Ασπαραγινικό οξύ και L-Αργινίνη) σε συγκέντρωση 2.5 mg/L. Συγκεκριμένα αναλύθηκαν 5 διαλύματα σε αυτή τη συγκέντρωση τα οποία δεν είχαν υποστεί υδρόλυση και 5 ακόμη διαλύματα που υπέστησαν υδρόλυση για 3 ώρες. Έπειτα, βρέθηκε ο μέσος όρος των 5 εμβαδών για κάθε αμινοξύ για την περίπτωση που δεν υπήρξε υδρόλυση. Η επί τοις εκατό σταθερότητα για κάθε αμινοξύ υπολογίστηκε σύμφωνα με τον τύπο:

$$\% \text{ σταθερότητα κατά την υδρόλυση} = \frac{\text{Εμβαδόν κορυφής του αμινοξέος στο υδρολυμένο διάλυμα}}{\text{Μέσος όρος εμβαδών κορυφής του αμινοξέος στα μη υδρολυμένα διαλύματα}} * 100$$

Οι υπολογισμοί έγιναν σε φύλλο excel και έτσι προέκυψε ο παρακάτω πίνακας, όπου φαίνεται και η σχετική τυπική απόκλιση που βρέθηκε χρησιμοποιώντας τους τύπους (4.2) και (4.4).

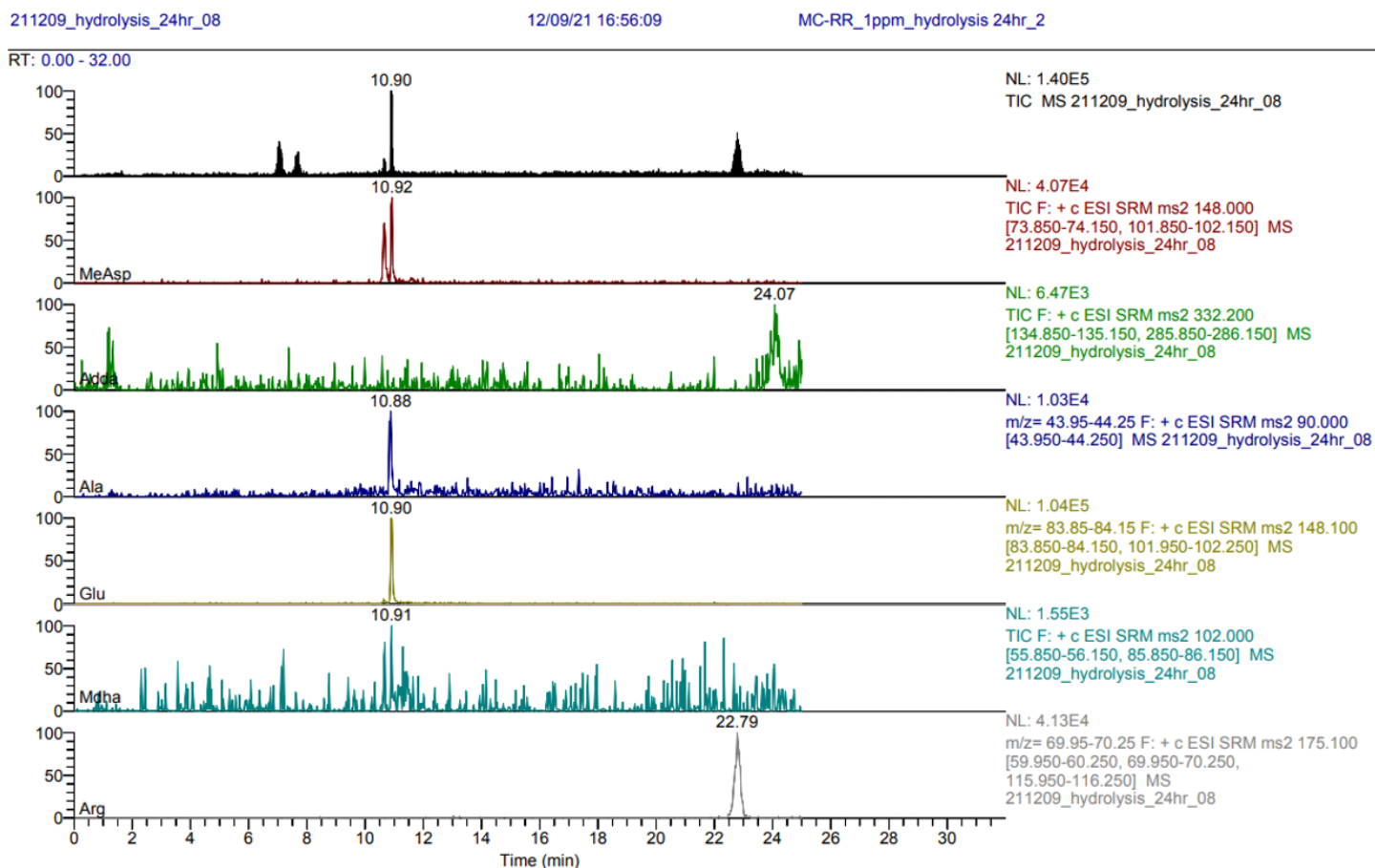
*Πίνακας 11: Η επί τοις εκατό σταθερότητα των αμινοξέων κατά την υδρόλυση και η αντίστοιχη σχετική τυπική απόκλιση*

<b>Αμινοξύ</b>	<b>% σταθερότητα κατά την υδρόλυση</b>	<b>%RSD</b>
L-Λευκίνη	87.8	16.6
D-Αλανίνη	76.5	16.4
D-Γλουταμινικό οξύ	77.4	13.7
L-Ασπαραγινικό οξύ	85.0	16.7
L-Αργινίνη	92.9	17.6

Παρατηρείται ότι η L-Αργινίνη έχει τη μεγαλύτερη σταθερότητα κατά την υδρόλυση 3 ωρών. Οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις εμφανίζονται αυξημένες.

Έπειτα πραγματοποιήθηκε υδρόλυση για 24 ώρες σε 4 δείγματα που περιείχαν την μικροκυστίνη MC-RR σε συγκέντρωση 1 mg/L. Παρατίθεται ενδεικτικά ένα από τα χρωματογραφήματα που προέκυψαν από την ανάλυση των δειγμάτων, όπου

φαίνονται οι χρόνοι ανάσχεσης των αμινοξέων της μικροκυστίνης και άλλες πληροφορίες, όπως η ένταση του σήματος.



Εικόνα 42: Χρωματογράφημα LC-MS/MS της μικροκυστίνης MC-RR (C=1 mg/L) μετά από υδρόλυση

Από το χρωματογράφημα της MC-RR μετά την υδρόλυση (Εικόνα 42) προσδιορίστηκαν τα αμινοξέα D-Αλανίνη (D-Ala), D-Γλουταμινικό οξύ (D-Glu) και L-Αργινίνη (L-Arg) με χρόνους ανάσχεσης 10.88 min, 10.90 min και 22.79 min αντίστοιχα, μετά από σύγκριση με τα αντίστοιχα πρότυπα. Στο μεθυλ-ασπαραγινικό οξύ (MeAsp) αποδίδεται κορυφή σε χρόνο περίπου 10.8 min σύμφωνα με τις μεταπτώσεις που επιλέχθηκαν (Πίνακας 6). Το μεθυλ-ασπαραγινικό οξύ και το D-Γλουταμινικό οξύ έχουν το ίδιο μοριακό βάρος, εκλούνται στον ίδιο περίπου χρόνο και εμφανίζουν μία κοινή μετάπτωση ( $m/z=102$ ). Γι' αυτό στο χρωματογράφημα του MeAsp παρατηρείται μία διπλή κορυφή. Η πρώτη κορυφή αντιστοιχεί στο μεθυλ-ασπαραγινικό οξύ και η δεύτερη στο D-Γλουταμινικό οξύ. Τα MdhA και Adda εμφανίζουν ασθενέστερο σήμα και οι κορυφές τους πλησιάζουν τον θόρυβο. Αξίζει επίσης να σημειωθεί ξανά ότι για τα αμινοξέα Adda, MdhA και MeAsp δεν υπήρχαν διαθέσιμα πρότυπα και άρα οι χρόνοι ανάσχεσής τους δεν είναι επιβεβαιωμένοι

αλλά βασίζονται στις εκτιμήσεις που έγιναν αρχικά για τις μεταπτώσεις τους. Η χρήση προτύπου με μεγαλύτερη συγκέντρωση μικροκυστίνης θα μπορούσε να διευκολύνει τον προσδιορισμό των αμινοξέων. Τέλος, στο συνολικό χρωματογράφημα (μαύρο) σε χρόνο περίπου 7 min εμφανίζονται δύο κορυφές οι οποίες όπως διαπιστώθηκε ανήκουν στις μεταπτώσεις της λευκίνης. Ωστόσο η λευκίνη δεν θα έπρεπε να υπάρχει στο δείγμα μας και έτσι συμπεραίνουμε ότι πρόκειται πιθανότατα για κάποια επιμόλυνση, κάτι που συναντάται και στην βιβλιογραφία. [71-73]

Η σχετική τυπική απόκλιση %RSD για τα αμινοξέα D-Αλανίνη, D-Γλουταμινικό οξύ, L-Αργινίνη και μεθυλ-ασπαραγινικό οξύ για τα 4 δείγματα (4 επαναλήψεις) που αναλύθηκαν υπολογίστηκε με τη βοήθεια των τύπων (4.2) και (4.4). Τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

*Πίνακας 12: Οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις των αμινοξέων της MC-RR μετά από υδρόλυση*

RSD %			
MeAsp	D-Ala	D-Glu	L-Arg
37.0	26.7	54.0	17.5

Οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις εμφανίζονται αυξημένες για μερικά από τα αμινοξέα, γεγονός που υποδεικνύει ότι η επαναληψιμότητα είναι σχετικά χαμηλή. Καθώς τα στάδια από την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων μέχρι την ανάλυση αυξάνονται, είναι αναμενόμενη και η αύξηση της αβεβαιότητας των μετρήσεων.

Για την αξιολόγηση της υδρόλυσης της MC-RR υπολογίστηκε επίσης η ανάκτηση των αμινοξέων D-Αλανίνη, D-Γλουταμινικό οξύ και L-Αργινίνη σύμφωνα με τα αναμενόμενα θεωρητικά αποτελέσματα, που προκύπτουν από τις καμπύλες βαθμονόμησης που κατασκευάστηκαν στην παράγραφο 4.2.

Λαμβάνοντας υπόψιν τα μοριακά βάρη των αμινοξέων ( $M_{r_{Arg}}=174.2$  g/mol,  $M_{r_{Ala}}=89.09$  g/mol,  $M_{r_{Glu}}=147.13$ ) και της MC-RR (1038.2 g/mol) και την εξίσωση που περιγράφει την υδρόλυση ( $MC - RR \rightarrow MeAsp + Adda + D - Glu + D - Ala + Mdha + 2L - Arg$ ), βρέθηκαν οι συγκεντρώσεις των αμινοξέων στο υδρολυμένο δείγμα προς ανάλυση. Έπειτα με βάση τις εξισώσεις των ευθειών από τα διαγράμματα της καμπύλης βαθμονόμησης υπολογίστηκαν τα αναμενόμενα εμβαδά των κορυφών στο χρωματογράφημα. Για την % ανάκτηση χρησιμοποιήθηκε η σχέση:

$$\% \text{ ανάκτηση αμινοξέων κατά την υδρόλυση της MC – RR} \\ = \frac{\text{Εμβαδόν κορυφής του αμινοξέος που μετρήθηκε πρακτικά}}{\text{Εμβαδόν κορυφής του αμινοξέος που υπολογίστηκε θεωρητικά}} * 100$$

Οι υπολογισμοί έγιναν σε φύλλο excel και τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα. Η %RSD υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας τους τύπους (4.2) και (4.4).

*Πίνακας 13: Η επί τοις εκατό ανάκτηση των αμινοξέων κατά την υδρόλυση της MC-RR, η αντίστοιχη σχετική τυπική απόκλιση και η συγκέντρωση των αμινοξέων στο δείγμα που αναλύθηκε*

<b>Αμινοξύ</b>	<b>Συγκέντρωση στο δείγμα προς ανάλυση (μg/L)</b>	<b>% ανάκτηση</b>	<b>%RSD</b>
D-Αλανίνη	85.5	201	26.7
D-Γλουταμινικό οξύ	141	352	54.0
L-Αργινίνη	335	95.8	17.5

Όπως γίνεται αντιληπτό, η % ανάκτηση των αμινοξέων κατά την υδρόλυση της MC-RR ξεπερνά το 100 στις περιπτώσεις της D-Αλανίνης και του D-Γλουταμινικού οξέος, συνεπώς η συγκέντρωση των αμινοξέων που ανιχνεύτηκε στο υδρολυμένο δείγμα ήταν μεγαλύτερη από την αναμενόμενη. Αυτό μαρτυρά την επιμόλυνση των δειγμάτων που αναλύθηκαν με αμινοξέα που προήλθαν από κάποια εξωτερική πηγή. Και τα 3 αμινοξέα που αναλύθηκαν παράγονται από τον άνθρωπο. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία ένα ιδιαίτερο φαινόμενο που έχει εντοπιστεί αρκετές φορές είναι η παρουσία αμινοξέων στο υδροχλωρικό οξύ. [71-73] Μπορεί να προέρχονται από ενώσεις στον ατμοσφαιρικό αέρα, από κάποιον μικροοργανισμό που ζει στο οξύ ή από φωτοχημικές αντιδράσεις μεταξύ του περιεχομένου του ατμοσφαιρικού αέρα και του οξέος. Γι' αυτό το λόγο είναι σημαντικό να εξασφαλίζεται η υψηλή καθαρότητα του οξέος και όλων των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται στην υδρόλυση και την ανάλυση, καθώς και η σχολαστική επιμέλεια κατά τη διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας. Τέλος η %RSD παρουσιάζεται αυξημένη γεγονός που υποδεικνύει χαμηλή επαναληψιμότητα και άρα την ανάγκη βελτιστοποίησης της μεθόδου.

## 4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την μελέτη που προηγήθηκε συμπεραίνεται ότι η υγροχρωματογραφία σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μαζών σε σειρά, αποτελεί την καταλληλότερη μέθοδο για ανάλυση των αμινοξέων των μικροκυστινών. Αυτό ισχύει για τους εξής λόγους:

- a. Στη φασματομετρία μαζών η ανίχνευση των αμινοξέων πραγματοποιείται στοχευμένα παρακολουθώντας συγκεκριμένες μεταπτώσεις ιόντων των αμινοξέων. Η παρουσία των θυγατρικών ιόντων αποτελεί ένα επιπλέον μέτρο ταυτοποίησης των αναλυτών, που δεν υπάρχει στη φθορισμομετρία. Στην περίπτωση των μικροκυστινών, αυτό το χαρακτηριστικό έχει πολύ μεγάλη σημασία για την ταυτοποίηση των αμινοξέων Adda και Mdha που δεν είναι εμπορικά διαθέσιμα και άρα έχουμε την εικόνα τους στο χρωματογράφημα μόνο μετά την υδρόλυση.
- b. Η φασματομετρία μαζών παρέχει το χρωματογράφημα κάθε αμινοξέος ξεχωριστά και έτσι παρουσιάζει με βεβαιότητα τις κορυφές που ανήκουν σε κάθε αμινοξύ. Ακόμη και στην περίπτωση της συνέκλυσης οι κορυφές φαίνονται καθαρά και είναι δυνατή η ολοκλήρωση της καθεμίας ξεχωριστά.
- c. Η φασματομετρία μαζών κατά την Επιλεκτική Παρακολούθηση Θραυσματοποίησης Ιόντων (MRM) επιτρέπει χαμηλότερα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης των αμινοξέων, γεγονός που περιορίζει την κατανάλωση της απαιτούμενης ποσότητας μικροκυστινών και αμινοξέων για την διεξαγωγή των πειραμάτων.
- d. Η μέθοδος LC-MS/MS παρουσίασε καλύτερη επαναληψιμότητα.

Έτσι, αν και η μέθοδος LC-FL εμφάνισε καλή γραμμικότητα για τον προσδιορισμό των αμινοξέων των μικροκυστινών προτιμάται η χρήση LC-MS/MS εάν αυτή είναι διαθέσιμη. Επιπροσθέτως, κατά τη μετάβαση από τη φθορισμομετρία στη φασματομετρία μαζών έγιναν δύο σημαντικές κινήσεις που συνέβαλαν στην λήψη καλύτερων αποτελεσμάτων. Αρχικά αφαιρέθηκε το στάδιο της παραγωγοποίησης, κάτι που μείωσε τον χρόνο προετοιμασίας των δειγμάτων, εξοικονόμησε αντιδραστήρια και περιόρισε τον παράγοντα του ανθρώπινου σφάλματος και των επιπλέον επιμολύνσεων. Ακόμη, για τη φασματομετρία μαζών χρησιμοποιήθηκε διαφορετική στήλη, ειδική για τα αμινοξέα, που διευκόλυνε τον διαχωρισμό.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την υδρόλυση της MC-RR ήταν ενθαρρυντικά. Η σταθερότητα των αμινοξέων με βάση τα πρότυπα των αμινοξέων αποδείχτηκε καλή, ωστόσο η ανάκτηση στην περίπτωση της MC-RR ήταν σημαντικά αυξημένη. Αυτό επισήμανε την αδυναμία της πειραματικής διαδικασίας ως προς την παρουσία επιμολύνσεων.

Γενικότερα, η μελέτη των μικροκυστινών παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον αλλά και προκλήσεις εξαιτίας της πολύπλοκης δομής τους. Η ανάπτυξη και βελτιστοποίηση των μεθόδων χρωματογραφίας, ανάλυσης και υδρόλυσης αποτελούν τα αρχικά βήματα για την καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού οξείδωσης αυτών των πεπτιδίων, που τίθεται ως τελικός στόχος.

## 5 ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

Από την παρούσα διπλωματική εργασία προέκυψαν ορισμένες προτάσεις για περαιτέρω έρευνα. Αρχικά στην ανάπτυξη της μεθόδου LC-MS/MS θα μπορούσαν να συμπεριληφθούν περισσότερα αμινοξέα και άλλων μικροκυστινών εκτός από τις MC-RR και MC-LR στις οποίες επικεντρώθηκε αυτή η εργασία. Τα αμινοξέα Adda και Mdha χρειάζονται περαιτέρω μελέτη, καθώς πρόκειται για μη πρωτεϊνικά αμινοξέα για τα οποία δεν υπάρχουν πρότυπα. Προτείνεται η χρήση *in silico* fragmentation για επιβεβαίωση των μεταπτώσεών τους, που εκτιμήθηκαν θεωρητικά. Ακόμη, χρειάζεται να βελτιστοποιηθεί η μέθοδος της υδρόλυσης και να περιοριστούν οι επιμολύνσεις κατά την πειραματική διαδικασία. Αυτό θα μπορούσε να επιτευχθεί με χρήση HCl κατάλληλου για την ανάλυση αμινοξέων και φυσικά με όσο το δυνατόν προσεκτικότερους χειρισμούς κατά την προετοιμασία των δειγμάτων προς ανάλυση, προκειμένου να περιοριστεί ο ανθρώπινος παράγοντας. Τέλος, ο χρόνος της υδρόλυσης θα μπορούσε να μειωθεί με χρήση ειδικής συσκευής μικροκυμάτων.

## 6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Catherine, Q., et al., *A review of current knowledge on toxic benthic freshwater cyanobacteria – Ecology, toxin production and risk management*. Water Research, 2013. **47**(15): p. 5464-5479.
2. Meriluoto, J., L. Spoof, and G.A. Codd, *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*. 2017: Wiley.
3. Zurawell, R.W., et al., *Hepatotoxic Cyanobacteria: A Review of the Biological Importance of Microcystins in Freshwater Environments*. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B, 2005. **8**(1): p. 1-37.
4. Cheung, M.Y., S. Liang, and J. Lee, *Toxin-producing cyanobacteria in freshwater: A review of the problems, impact on drinking water safety, and efforts for protecting public health*. Journal of Microbiology, 2013. **51**(1): p. 1-10.
5. Watanabe, M.F., et al., *Toxic Microcystis*. 1995: Taylor & Francis.
6. Moore, R.E., *Cyclic peptides and depsipeptides from cyanobacteria: A review*. Journal of Industrial Microbiology, 1996. **16**(2): p. 134-143.
7. Zanchett, G. and E.C. Oliveira-Filho, *Cyanobacteria and Cyanotoxins: From Impacts on Aquatic Ecosystems and Human Health to Anticarcinogenic Effects*. Toxins, 2013. **5**(10).
8. Lopez, C.B.a.J., E.B. and Dortch, Q. and Walton, B.T. and Hudnell, H.K. , *Scientific assessment of freshwater harmful algal blooms*. Interagency Working Group on Harmful Algal Blooms, Hypoxia, and Human Health of the Joint Subcommittee on Ocean Science and Technology, 2008: p. 65pp.
9. Kleinkauf, H. and H. Von Döhren, *A Nonribosomal System of Peptide Biosynthesis*. European Journal of Biochemistry, 1996. **236**(2): p. 335-351.
10. Stachelhaus, T. and M.A. Marahiel, *Modular structure of genes encoding multifunctional peptide synthetases required for non-ribosomal peptide synthesis*. FEMS Microbiology Letters, 1995. **125**(1): p. 3-14.
11. Karner, D.A., et al., *Microcystin algal toxins in Source and Finished Drinking Water*. Journal AWWA, 2001. **93**(8): p. 72-81.
12. Pelaez, M., et al., *Sources and Occurrence of Cyanotoxins Worldwide, in Xenobiotics in the Urban Water Cycle: Mass Flows, Environmental Processes, Mitigation and Treatment Strategies*, D. Fatta-Kassinos, K. Bester, and K. Kümmerer, Editors. 2010, Springer Netherlands: Dordrecht. p. 101-127.
13. Christophoridis, C., et al., *Occurrence and diversity of cyanotoxins in Greek lakes*. Scientific Reports, 2018. **8**(1): p. 17877.
14. Zervou, S.-K., et al., *New SPE-LC-MS/MS method for simultaneous determination of multi-class cyanobacterial and algal toxins*. Journal of hazardous materials, 2017. **323**: p. 56-66.
15. Jones, M.R., et al., *CyanoMetDB, a comprehensive public database of secondary metabolites from cyanobacteria*. Water Research, 2021. **196**: p. 117017.
16. A. de la Cruz, A., et al., *Can We Effectively Degrade Microcystins? - Implications on Human Health*. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry- Anti-Cancer Agents), 2011. **11**(1): p. 19-37.
17. Dawson, R.M., *the toxicology of microcystins*. Toxicon, 1998. **36**(7): p. 953-962.
18. Sharma, V.K., et al., *Destruction of microcystins by conventional and advanced oxidation processes: A review*. Separation and Purification Technology, 2012. **91**: p. 3-17.
19. Stotts, R.R., et al., *Structural modifications imparting reduced toxicity in microcystins from Microcystis spp.* Toxicon, 1993. **31**(6): p. 783-789.



20. Sivonen, K. and G. Jones, *Cyanobacterial toxins*. Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management, 1999. **1**: p. 43-112.
21. Christiansen, G., et al., *Microcystin Biosynthesis in <em>Planktothrix</em>: Genes, Evolution, and Manipulation*. Journal of Bacteriology, 2003. **185**(2): p. 564.
22. Codd, G.A., *CYANONET : a global network for cyanobacterial bloom and toxin risk management : initial situation assessment and recommendations*. Technical Documents in Hydrology / UNESCO (no. 76). 2005. 138
23. Organization, W.H., *Cyanobacterial toxins: Microcystins. Background document for development of WHO Guidelines for drinking-water quality and Guidelines for safe recreational water environments*. 2020.
24. Agency, E.E., *European water policies and human health Combining reported environmental information*. 2016.
25. Codd, G., et al., *Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health*. European Journal of Phycology, 1999. **34**(4): p. 405-415.
26. Pham, T.-L. and T.N. Dang, *Microcystins in Freshwater Ecosystems: Occurrence, Distribution, and Current Treatment Approaches*, in *Water and Wastewater Treatment Technologies*, X.-T. Bui, et al., Editors. 2019, Springer Singapore: Singapore. p. 15-36.
27. Merel, S., et al., *State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins*. Environment international, 2013. **59**: p. 303-327.
28. He, X., et al., *Toxic cyanobacteria and drinking water: Impacts, detection, and treatment*. Harmful algae, 2016. **54**: p. 174-193.
29. Roegner, A.F., et al., *Microcystins in potable surface waters: toxic effects and removal strategies*. Journal of applied Toxicology, 2014. **34**(5): p. 441-457.
30. Edwards, C., et al., *Biodegradation of microcystins and nodularin in freshwaters*. Chemosphere, 2008. **73**(8): p. 1315-1321.
31. Zhao, D., et al., *Variation of bacterial communities in water and sediments during the decomposition of Microcystis biomass*. PloS one, 2017. **12**(4): p. e0176397.
32. Bourne, D.G., et al., *Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin LR*. Applied and environmental microbiology, 1996. **62**(11): p. 4086-4094.
33. Massey, I.Y. and F. Yang, *A Mini Review on Microcystins and Bacterial Degradation*. Toxins, 2020. **12**(4): p. 268.
34. Treatment, W., *Principles and Design*. Hoboken: John Wiley & Sons, 2005.
35. Wang, J.L. and L.J. Xu, *Advanced Oxidation Processes for Wastewater Treatment: Formation of Hydroxyl Radical and Application*. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 2012. **42**(3): p. 251-325.
36. Ribeiro, A.R., et al., *An overview on the advanced oxidation processes applied for the treatment of water pollutants defined in the recently launched Directive 2013/39/EU*. Environment International, 2015. **75**: p. 33-51.
37. Oturan, M.A. and J.-J. Aaron, *Advanced Oxidation Processes in Water/Wastewater Treatment: Principles and Applications. A Review*. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 2014. **44**(23): p. 2577-2641.
38. Poyatos, J.M., et al., *Advanced Oxidation Processes for Wastewater Treatment: State of the Art*. Water, Air, and Soil Pollution, 2009. **205**(1): p. 187.
39. Lambropoulou, D.A. and L.M. Nollet, *Transformation products of emerging contaminants in the environment: analysis, processes, occurrence, effects and risks*. 2014: John Wiley & Sons.

40. Fotiou, T., et al., *Evaluation of the photocatalytic activity of TiO<sub>2</sub> based catalysts for the degradation and mineralization of cyanobacterial toxins and water off-odor compounds under UV-A, solar and visible light*. Chemical Engineering Journal, 2015. **261**: p. 17-26.
41. Fotiou, T., et al., *Photocatalytic Degradation of Microcystin-LR and Off-Odor Compounds in Water under UV-A and Solar Light with a Nanostructured Photocatalyst Based on Reduced Graphene Oxide–TiO<sub>2</sub> Composite. Identification of Intermediate Products*. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2013. **52**(39): p. 13991-14000.
42. Snyder, L.R., J.J. Kirkland, and J.W. Dolan, *Introduction to modern liquid chromatography*. 2011: John Wiley & Sons.
43. Miller, J.M., *Chromatography*, in *digital Encyclopedia of Applied Physics*. p. 1055-1102.
44. Meyer, V.R., *Practical high-performance liquid chromatography*. 2013: John Wiley & Sons.
45. Douglas A. Skoog, F.J.H., Stanley R. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis* 2007.
46. Miller, J.M., *Chromatography*. digital Encyclopedia of Applied Physics, 2003: p. 1055-1102.
47. Ramanujam, N., *Fluorescence spectroscopy in vivo*. Encyclopedia of analytical chemistry, 2000. **1**: p. 20-56.
48. Lakowicz, J.R., *Principles of fluorescence spectroscopy*. 2013: Springer science & business media.
49. Zhang, Y. and Y. Chen, *Fmoc-Cl fluorescent determination for amino groups of nanomaterial science*. IET nanobiotechnology, 2012. **6**(2): p. 76-80.
50. Lakowicz, J.R., *Instrumentation for fluorescence spectroscopy*, in *Principles of fluorescence spectroscopy*. 1999, Springer. p. 25-61.
51. Gross, J.H., *Mass spectrometry: a textbook*. 2006: Springer Science & Business Media.
52. Dass, C., *Fundamentals of contemporary mass spectrometry*. Vol. 16. 2007: John Wiley & Sons.
53. Θεοδωρίδης, Γ., et al., *Φασματομετρία μάζας*. 2015.
54. Glish, G.L. and R.W. Vachet, *The basics of mass spectrometry in the twenty-first century*. Nature reviews drug discovery, 2003. **2**(2): p. 140-150.
55. Domon, B. and R. Aebersold, *Mass spectrometry and protein analysis*. science, 2006. **312**(5771): p. 212-217.
56. Hill, R.L., *Hydrolysis of proteins*. Advances in protein chemistry, 1965. **20**: p. 37-107.
57. TSUGITA, A. and J.J. SCHEFFLER, *A rapid method for acid hydrolysis of protein with a mixture of trifluoroacetic acid and hydrochloric acid*. European journal of biochemistry, 1982. **124**(3): p. 585-588.
58. Reichelt, M., C. Hummert, and B. Luckas, *Hydrolysis of microcystins and nodularin by microwave radiation*. Chromatographia, 1999. **49**(11-12): p. 671-677.
59. Krüger, T., B. Christian, and B. Luckas, *Development of an analytical method for the unambiguous structure elucidation of cyclic peptides with special appliance for hepatotoxic desmethylated microcystins*. Toxicon, 2009. **54**(3): p. 302-312.
60. Fang, Y., et al., *Catalytic hydrolysis of microcystin-LR peptides on the surface of naturally occurring minerals*. Research on Chemical Intermediates, 2020. **46**(2): p. 1141-1152.
61. Fang, Y., et al., *Degradation of microcystin-LR in water: hydrolysis of peptide bonds catalyzed by maghemite under visible light*. Applied Catalysis B: Environmental, 2014. **160**: p. 597-605.

62. Jámbor, A. and I. Molnár-Perl, *Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride: Literature overview and further study*. Journal of Chromatography A, 2009. **1216**(15): p. 3064-3077.
63. Melucci, D., et al., *Fmoc-Cl as derivatizing agent for the analysis of amino acids and dipeptides by the absolute analysis method*. Chromatographia, 1999. **49**(5-6): p. 317-320.
64. Vergou, Y., et al.,  *$\beta$ -N-Methylamino-L-alanine interferes with nitrogen assimilation in the cyanobacterium, non-BMAA producer, Synechococcus sp. TAU-MAC 0499*. Toxicon, 2020. **185**: p. 147-155.
65. Kutlán, D. and I. Molnár-Perl, *New aspects of the simultaneous analysis of amino acids and amines as their o-phthaldialdehyde derivatives by high-performance liquid chromatography: Analysis of wine, beer and vinegar*. Journal of Chromatography A, 2003. **987**(1): p. 311-322.
66. León, C., et al., *Study of cyanotoxin degradation and evaluation of their transformation products in surface waters by LC-QTOF MS*. Chemosphere, 2019. **229**: p. 538-548.
67. Swann, L.M., F. Busetti, and S.W. Lewis, *Determination of amino acids and amines in mammalian decomposition fluid by direct injection liquid chromatography-electrospray ionisation-tandem mass spectrometry*. Analytical Methods, 2012. **4**(2): p. 363-370.
68. Thiele, B., et al., *Analysis of amino acids without derivatization in barley extracts by LC-MS-MS*. Analytical and bioanalytical chemistry, 2008. **391**(7): p. 2663-2672.
69. Gu, L., A.D. Jones, and R.L. Last, *LC- MS/MS assay for protein amino acids and metabolically related compounds for large-scale screening of metabolic phenotypes*. Analytical chemistry, 2007. **79**(21): p. 8067-8075.
70. Lawton, L.A., et al., *Isolation and characterization of microcystins from laboratory cultures and environmental samples of Microcystis aeruginosa and from an associated animal toxicosis*. Natural toxins, 1995. **3**(1): p. 50-57.
71. Sidle, A.B., *Amino acid content of atmospheric precipitation*. Tellus, 1967. **19**(1): p. 128-135.
72. Wolman, Y. and S.L. Miller, *Amino-acid contamination of aqueous hydrochloric acid*. Nature, 1971. **234**(5331): p. 548-549.
73. Sidle, A., *Amino-acid and Peptide Synthesis from Hydrogen Cyanide*. Nature, 1967. **216**(5113): p. 408-408.