ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ 1 : ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ανάπτυξη και εφαρμογή μεθόδου προσδιορισμού ολικών μικροκυστινών

ΙΩΑΝΝΗΣ ΡΑΠΤΗΣ

Αριθμός μητρώου: 05116401

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

ΑΘΗΝΑ 2024

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ 2
ΠΡΟΛΟΓΟΣ 4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ 5
ABSTRACT 6
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ 7
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ 8
Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 9
Κεφάλαιο 1ο : ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΑ- ΚΥΑΝΟΤΟΞΙΝΕΣ 9
1.1 Κυανοβακτήρια 9
1.2 Κυανοτοξίνες 11
1.3 Μικροκυστίνες 15
1.4 Παρουσία μικροκυστινών σε υδατικό περιβάλλον 18
1.5 Νομοθεσία 22
1.6 Μέθοδοι προσδιορισμού μικροκυστινών 24
1.7 Μέθοδος ανάλυσης MMPB 26
Κεφάλαιο 2ο : ΤΕΧΝΙΚΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ 43
2.1 Προκατεργασία δείγματος 43
2.2 Οργανολογία τεχνικής εκχύλισης στερεάς φάσης 44
2.3 Υλικά πλήρωσης τεχνικής στερεάς εκχύλισης 46
2.4 Εφαρμογή τεχνικής εκχύλισης στερεάς φάσης 48
Κεφάλαιο 3ο : ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ 50
3.1 Εισαγωγή 50
3.2 Οργανολογία υγρής χρωματογραφίας 51
Κεφάλαιο 4ο : ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ 53
4.1 Εισαγωγή 53
4.2 Οργανολογία φασματόμετρων μαζών 54
4.3 Τεχνικές σάρωσης 57
5. ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ 58
Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 59

Κεφάλαιο 6ο : ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ – ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ 59
6.1 Αντιδραστήρια 59
6.2 Συσκευές – Υλικά 59
6.3 Όργανα 60
6.4 Παρασκεύη πρότυπων διαλυμάτων 61
Κεφάλαιο 7ο: ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΟΛΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΚΥΣΤΙΝΩΝ 62
7.1 Ανάπτυξη μεθόδου οξείδωσης 62
7.2 Ανάπτυξη μεθόδου εκχύλισης στερεάς φάσης 63
7.3 Ανάπτυξη μεθόδου ανίχνευσης MMPB στο LC-MS/MS 64
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 65
8.1 Αποτελέσματα πειραμάτων οξείδωσης 65
8.2 Αποτελέσματα πειραμάτων εκχύλισης στερεάς φάσης 67
8.3 Προσδιορισμός του MMPB με LC-MS/MS 69
8.4 Ποσοτικοποίηση των ολικών μικροκυστινών μετά από οξείδωση σε MMPB 75
8.4 Εφαρμογή μεθόδου σε πραγματικό δείγμα και σύγκριση με άλλες τεχνικές 78
9.Συμπεράσματα-Προτάσεις για μελλοντική έρευνα 81
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 82

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Ινστιτούτο Νανοεπιστήμης - Νανοτεχνολογίας του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών (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 την καθοδήγησή τους κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων και τη συγγραφή της εργασίας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως την κ. Σεβαστή Ζερβού για τη συνεργασία μας, καθώς διδάχτηκα πάρα πολλά πράγματα τόσο σε επιστημονικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο και κυρίως με τις συμβουλές της με βοήθησε να γίνομαι καλύτερος. Επίσης, την ευχαριστώ για την πολύτιμη συμβολή της στην συγγραφή και την παρουσίαση της διπλωματικής μου.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου και όλους τους ανθρώπους που ήταν κοντά μου στη φοιτητική μου σταδιοδρομία για την συμπαράσταση, την υπομονή τους, την εμπιστοσύνη τους και την υποστήριξη τους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι μικροκυστίνες είναι κυκλικά επταπεπτίδια με ηπατοτοξική δράση και αποτελούν τοξικούς δευτερογενείς μεταβολίτες των κυανοβακτηριών, γνωστοί ως κυανοτοξίνες. Οι μικροκυστίνες προκαλούν σοβαρή βλάβη στο συκώτι. Συγκεκριμένα, προκαλούν διάσπαση της δομής των ηπατικών κυττάρων, αύξηση του βάρους του συκωτιού λόγω ενδοηπατικής αιμορραγίας, αιμοδυναμικό σοκ, καρδιακή ανεπάρκεια και τελικά θάνατο σε ανθρώπους, ψάρια, πτηνά, ζωοπλανγκτόν, μύδια και θηλαστικά. Οι μικροκυστίνες διαθέτουν κυκλική επταπεπτιδική δομή με το Adda (3 - άμινο - 9 - μέθοξυ - 2,6,8 - τριμέθυλ - 10 -φαινυλδεκα - 4,6 - διενοϊκό οξύ) να είναι το αμινοξύ που αποτελεί χαρακτηριστικό αυτής της ομάδας των κυανοτοξινών και στο οποίο οφείλετε κυρίως η τοξικότητα τους. Επομένως, αποτελεί σημαντική πρόκληση ο προσδιορισμός των ολικών μικροκυστινών λαμβανόντας υπόψη την υψηλή τοξικότητα τους. Μεταξύ των μεθόδων προσδιορισμού μικροκυστινών στο νερό υπάρχουν εκείνες με τις οποίες μπορεί να υπολογιστεί η συγκέντρωση του συνόλου τους (ELISA και PPIA) καθώς και εκείνες με τις οποίες προσδιορίζονται οι συγκεντρώσεις επιλεγμένων μικροκυστινών (HLPC-PDA, LC-MS και LC-MS/MS). Παρότι με τις τεχνικές στοχευμένης ανίχνευσης (HLPC-PDA, LC-MS και LC-MS/MS) επιτυγχάνεται αξιόπιστος προσδιορισμός των επιμέρους μικροκυστινών, δεν μπορεί να εκτιμηθεί το σύνολο τους λόγω του περιορισμένου αριθμού των εμπορικά διαθέσιμων αναλυτικών προτύπων που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση. Οι βιοχημικές τεχνικές ELISA και PPIA παρέχουν πληροφορία σχετικά με τη συγκέντρωση των ολικών μικροκυστινών όμως είναι απαραίτητη η προμήθεια δαπανηρών εμπορικά διαθέσιμων κιτ για τον προσδιορισμό. Στην παρούσα μελέτη, για τον προσδιορισμό των ολικών μικροκυστινών στο νερό έγινε ανάπτυξη αναλυτικής μεθόδου που βασίζεται στον προσδιορισμό του MMPB (2-μεθυλο-3μεθοξυ-4 φαινυλοβουτυρικό οξύ) που προκύπτει από την οξείδωση και απόσπαση του χαρακτηριστικού αμινοξέος Adda των μικροκυστινών, με βάση την αντίδραση οξείδωσης Lemieux. Ο καθαρισμός και η απομόνωση του MMPB μετά την αντίδραση, έγινε με χρήση της τεχνικής εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE) και η ανάλυση για τον προσδιορισμό του MMPB έγινε με υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μαζών (LC-MS/MS). Αυτή η τεχνική προσφέρει μια απλή στην εκτέλεση και ταυτόχρονα μη κοστοβόρα μέθοδο για τον προδιορισμό των ολικών μικροκυστινών που για να πραγματοποιηθεί δεν χρειάζεται την χρήση προτύπων μικροκυστινών ούτε και την προμήθεια βιοχημικών κιτ. Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης προκύπτει ότι η τεχνική είναι ειδική ως προς την ανίχνευση του αμινοξέος Adda και συνεπώς ανιχνεύει το σύνολο των μικροκυστινών συμπεριλαμβανομένων και των προϊόντων μετασχηματισμού τους που εμπεριέχουν το Adda. Η μέθοδος παρουσίασε γραμμικότητα από 0.5 – 5 μg/L, είχε όριο ανίχνευσης 0.2 μg/L και η πιστότητα της (%RSD) κυμάνθηκε από 25% έως 30%.

Λέξεις κλειδιά: Μικροκυστίνες, MMPB(2-μεθυλο-3μεθοξυ-4 φαινυλοβουτυρικό οξύ) , Οξείδωση Lemieux , SPE, LC-MS/MS

ABSTRACT

Microcystins are cyclic heptapeptides with hepatotoxic properties, classified as cyanotoxins, which are secondary metabolites produced by cyanobacteria. These compounds induce severe hepatic damage, including the disruption of liver cell architecture, increased liver mass due to intrahepatic hemorrhage, hemodynamic shock, cardiac failure, and potentially fatal outcomes in a wide range of organisms, including humans, fish, birds, zooplankton, mussels, and mammals. The toxicity of microcystins is primarily attributed to the presence of the amino acid Adda (3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-dienoic acid), a unique feature of these cyanotoxins. Currently, more than 300 structural variants of microcystins have been identified, differing in their amino acid composition, which poses significant challenges in accurately quantifying total microcystin content due to their high toxicity. Various analytical methods have been developed for the detection of microcystins in water. These can be broadly categorized into two groups: methods that estimate the total concentration of microcystins, such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and protein phosphatase inhibition assay (PPIA), and methods that target specific microcystin variants, such as high-performance liquid chromatography-photodiode array detection (HPLC-PDA), liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS), and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). While targeted detection techniques (e.g., HPLC-PDA, LC-MS, and LC-MS/MS) provide reliable identification of individual microcystin variants, they are limited in estimating total microcystin content due to the restricted availability of commercial analytical standards. On the other hand, ELISA and PPIA offer a broader estimation of total microcystins, but require expensive commercial kits for analysis. In this study, an analytical method was developed for the determination of total microcystins in water based on the detection of MMPB(2-methyl-3-methoxy-4-phenylbutyric acid), a product formed through the oxidation and sequestration of the Adda amino acid, using the Lemieux oxidation reaction. The purification and isolation of MMPB were performed using solid-phase extraction (SPE), followed by analysis via liquid chromatography in conjuction with mass spectrometry (LC-MS/MS). This approach provides a cost-effective and straightforward method for total microcystin detection without the need for microcystin-specific standards or biochemical kits. The results of the study indicate that the method is specific to the detection of Adda-containing microcystins and their transformation products. The method exhibited a linear response in the concentration range of 0.5 to 5 µg/L, with a detection limit of 0.2 µg/L, and a repeatability (relative standard deviation, %RSD) ranging from 25% to 30%.

Key words: Microcystins , MMPB (2-methyl-3-methoxy-4-phenylbutyric acid), Lemieux Oxidation, SPE, LC-MS/MS

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. ΓΕΝΙΚΗ ΔΟΜΗ ΜΙΚΡΟΚΥΣΤΙΝΩΝ [2] 16
Εικόνα 2: Κυανοβακτηριακό bloom στη λίμνη της Καστοριάς[10].....20
Εικόνα 3: Bloom Microcystis Aeruginosa στην Γαλλία[2].....21
Εικόνα 4: Γενικευμένη μορφή αντίδρασης Lemieux[23] 26
Εικόνα 5: Μηχανισμός αντίδρασης Lemieux[23].....27
Εικόνα 6: Αντίδραση οξείδωσης Lemieux σε μικροκυστίνες[24] 27
Εικόνα 7: Επιδράσεις μελετημένων παραγόντων στην ανάκτηση του MMPB[25].....28
Εικόνα 8: Διάγραμμα επίδρασης θερμοκρασίας στην οξείδωση Lemieux [23].....29
Εικόνα 9: Διάγραμμα επίδρασης του pH στην παραγωγή του MMPB [24] 29
Εικόνα 10: Διάγραμμα επίδρασης του χρόνου οξείδωσης(h) και των συγκεντρώσεων των NaIO4 και KMnO4 στην παραγωγή του MMPB[24].....30
Εικόνα 11: Σχηματικό διάγραμμα οργανολογίας SPE. (a) Εφαρμογή πίεσης με σύριγγα στο φυσίγγιο. (b) Χρήση κενού για μεμονωμένο φυσίγγιο. (c) Διάταξη κενού για πολλαπλά φυσίγγια[59].....44
Εικόνα 12: Διάταξη μικροστήλης SPE[59].....45
Εικόνα 13: Σχηματικό διάγραμμα εκχύλισης στερεάς φάσης [59].....49
Εικόνα 14: Οργανολογία υγρής χρωματογραφίας [64] 52
Εικόνα 15: Λειτουργία φασματομέτρου μάζας [65] 54
Εικόνα 16: Φάσμα θραυσματοποίησης (MS/MS spectrum) του MMPB.....70
Εικόνα 17: Μηχανισμοί θραυσματοποίησης για τον σχηματισμό των θυγατρικών ιόντων Α) m/z 65, Β) m/z 91 και Γ) m/z 131 που επιλέχθηκαν για την ανίχνευση του MMPB.....71
Εικόνα 18: Καμπύλες θραυσματοποίησης των θυγατρικών ιόντων που επιλέχθηκαν για την ανίχνευση του MMPB 72
Εικόνα 19: MRM χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος MMPB συγκέντρωσης 100μg/L 73
Εικόνα 20: Καμπύλη βαθμονόμησης MMPB.....74
Εικόνα 21: MRM χρωματογράφημα δείγματος τελικής συγκέντρωσης 3 ppb spiked MC-LR.....75
Εικόνα 22: Καμπύλη βαθμονόμησης MC-LR 76
Εικόνα 23: Σχηματική απεικόνιση στοχευμένης μεθόδου SPE, LC-MS/MS με διάταξη διπλού φυσιγγίου SPE[66] 79

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Κατηγοριοποίηση κυανοτοξινών ανάλογα με την δομή, όργανα-στόχους και γενών κυανοβακτηρίων.....12
Πίνακας 2: Εμφάνιση μικροκυστινών στις λίμνες της Ελλάδας 19
Πίνακας 3: Βιβλιογραφική ανασκόπηση μεθόδου MMPB σε δείγματα νερού 31
Πίνακας 4: Βιβλιογραφική ανασκόπηση μεθόδου MMPB σε διάφορα υποστρώματα.....33
Πίνακας 5: Βιβλιογραφική ανασκόπηση με συγκρίσεις της μεθόδου MMPB με άλλες τεχνικές προσδιορισμού μικροκυστινών.....41
Πίνακας 6 : Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης.....64
Πίνακας 7: Αποτελέσματα βελτιστοποίησης οξείδωσης 66
Πίνακας 8: Αποτελέσματα πειραμάτων βελτιστοποίησης μεθόδου εκχύλισης στερεάς φάσης 68
Πίνακας 9: Αποτελέσματα μεθόδου MMPB στο πραγματικό δείγμα 80
Πίνακας 10: Σύγκριση τεχνικών προσδιορισμού μικροκυστινών σε δείγμα λίμνης Καστοριάς..80

Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1ο : ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΑ- ΚΥΑΝΟΤΟΞΙΝΕΣ

1.1 Κυανοβακτήρια

Τα κυανοβακτήρια γνωστά και ως κυανοφύκη ή «blue-green algae» οφείλουν την ονομασία τους στους χρωματισμούς που αποκτούν λόγω της φωτοσύνθεσης, διότι παράγουν την γαλάζια(κυανή) χρωστική φυκοκυανίνη και περιέχουν χλωροφύλλη που τους προσδίδει πράσινο χρώμα. [1] Αυτοί οι οργανισμοί βρίσκονται σε όλο τον κόσμο, σε ωκεανούς, λίμνες, ποτάμια, εδάφη ακόμα και σε περιβάλλοντα τόσο διαφορετικά όπως το έδαφος της Ανταρτικής και οι ηφαιστειακές θερμοπηγές, καθώς και εκεί που δεν μπορεί να αναπτυχθεί άλλη βλάστηση. [2]

Τα κυανοβακτήρια είναι μονοκύτταροι ή πολυκύτταροι αερόβιοι οργανισμοί που διαθέτουν χλωροφύλλη Α μέσω της οποίας φωτοσυνθέτουν και είναι «φωτοαυτότροφα» διότι για να αναπτυχθούν χρειάζονται μόνο νερό, διοξείδιο του άνθρακα, αέρα, ανόργανα συστατικά όπως φώσφορο, πυρίτιο, ασβέστιο και φως. Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των κυανοβακτηρίων είναι η θερμοκρασία και η αλμυρότητα του νερού, το βάθος και οι άνεμοι που επικρατούν και η ύπαρξη άλλων ανταγωνιστικών προς αυτά οργανισμών. [2]

Πολλά είδη κυανοβακτηρίων διαθέτουν κυτταροπλασματικά συσσωματώματα που ονομάζονται κύστες και επιτρέπουν την ρύθμιση της πλευστότητας με την κυλινδρική δομή τους που είναι γεμισμένη με αέριο. Αυτή η λειτουργία τους δίνει ένα σημαντικό μηχανισμό που τους επιτρέπει να προσαρμόζουν την κάθετη θέση τους στο νερό, δηλαδή να πηγαίνουν σε διάφορα βάθη. Με αυτό τον τρόπο τα κυανοβακτήρια μπορούν να μετακινηθούν σε περιοχές που υπάρχουν θρεπτικά συστατικά και γενικότερα όπου οι συνθήκες ευνοούν την ανάπτυξή τους.[3]

Τα κυανοβακτήρια είναι σημαντικοί πρωτογενείς παραγωγοί της τροφικής αλυσίδας με μεγάλη θρεπτική αξία. Ειδικότερα, συμμετέχουν στον κύκλο του αζώτου συμβάλλοντας σημαντικά στη γονιμότητα του χώματος και του νερού. Από την άλλη κάποια είδη – γένη κυανοβακτηρίων παράγουν πολλούς δευτερογενείς μεταβολίτες οι οποίοι είναι τοξικοί ή έχουν βιοδραστικότητα σε άλλους οργανισμούς και ιδιαίτερα στα θηλαστικά. [2]

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). 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. [4], [5]

Κάτω από κατάλληλες συνθήκες ο πληθυσμός των κυανοβακτηρίων αυξάνεται εκθετικά με αποτέλεσμα την δημιουργία ενός πυκνού στρώματος κυανοβακτηρίων, ένα φαινόμενο που είναι γνωστό ως άνθιση – bloom. Οι κυανοβακτηριακές ανθίσεις στους ωκεανούς μπορεί να καλύψουν εκατοντάδες τετραγωνικά μέτρα [2]. Το φαινόμενο της άνθισης – bloom μπορεί να διαρκέσει αρκετές εβδομάδες, παρόλο που ο χρόνος ζωή του κάθε μεμονωμένου κυανοβακτηρίου είναι μόλις μερικές ημέρες, ενώ οι κατάλληλες συνθήκες που απαιτούνται για την εμφάνιση αυτού του φαινόμενου είναι οι εξής :

α) ήπια θερμοκρασία νερού (15 – 30^{o}C)

β) pH ουδέτερο προς αλκαλικό (6 – 9)

γ) ασθενείς άνεμοι ή άπνοια που έχουν ως αποτέλεσμα στάσιμα νερά

δ) ευτροφικές συνθήκες στο νερό, δηλαδή αυξημένα επίπεδα συγκέντρωσης φωσφόρου και αζώτου

Οι ανθίσεις – blooms συνήθως σχηματίζονται αργά το καλοκαίρι ή νωρίς το φθινόπωρο και είναι πιο συχνές σε ευτροφικά ή υπερευτροφικά υδατικά συστήματα. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι ταραχώδεις και υψηλές ροές δεν είναι ευνοϊκές για την ανάπτυξη των κυανοβακτηρίων καθώς επηρεάζουν την ικανότητα του οργανισμού να διατηρηθεί σε ένα σταθερό βάθος. Αντίθετα, οι δυνατές βροχές και οι καταιγίδες αυξάνουν την συγκέντρωση των θρεπτικών συστατικών στο νερό με αποτέλεσμα να ευνοείται ο σχηματισμός άνθισης – bloom. [3]

1.2 Κυανοτοξίνες

Τα κυανοβακτήρια παράγουν ισχυρές τοξίνες, οι οποίες αποτελούν δευτερογενείς μεταβολίτες τους. Οι τοξίνες των κυανοβακτηρίων είναι είτε συνδεδεμένες στην μεμβράνη είτε βρίσκονται ελεύθερες μέσα στα κύτταρα και έχει παρατηρηθεί ότι το μεγαλύτερο μέρος των τοξινών ελευθερώνεται καθώς τα κύτταρα γερνάνε και πεθαίνουν με αποτέλεσμα να εκλύουν το κυτταρικό τους περιεχόμενο.[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. [5]

Οι κυανοτοξίνες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ανάλογα με την τοξικότητά τους σε νευροτοξίνες, ηπατοτοξίνες και σε αυτές που έχουν άλλου είδους τοξικότητα π.χ. ερεθισμός δέρματος . Επίσης, μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ανάλογα με τη χημική τους δομή σε 3 ομάδες: κυκλικά πεπτίδια, αλκαλοειδή και λιποπολυσακχαρίτες (LPS).

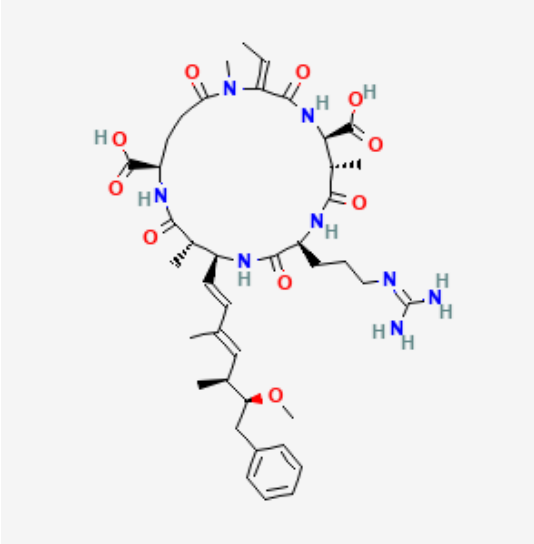
Τα κυκλικά πεπτίδια περιέχουν είτε πέντε (νοντουλαρίνες) είτε εφτά (μικροκυστίνες) αμινοξέα, όπου τα δύο τελευταία αμινοξέα της γραμμικής πεπτιδικής αλυσίδας ενώνονται για να σχηματίσουν μια κυκλική δομή. Είναι διαλυτά στο νερό και, εκτός ίσως από κάποιες υδρόφοβες μικροκυστίνες, αδυνατούν να διαπεράσουν άμεσα τις λιπιδικές μεμβράνες ζωικών, φυτικών ή βακτηριακών κυττάρων, οπότε για να μπουν στο κύτταρο και να ασκήσουν την τοξική τους δράση χρησιμοποιούν πρωτεΐνες-μεταφορείς της μεμβράνης, οι οποίες κανονικά μεταφέρουν απαραίτητα, για το κύτταρο, θρεπτικά. Στα υδάτινα οικοσυστήματα οι ουσίες αυτές παραμένουν μέσα στα κύτταρα των κυανοβακτηρίων και απελευθερώνονται με τη λύση των κυττάρων τους.

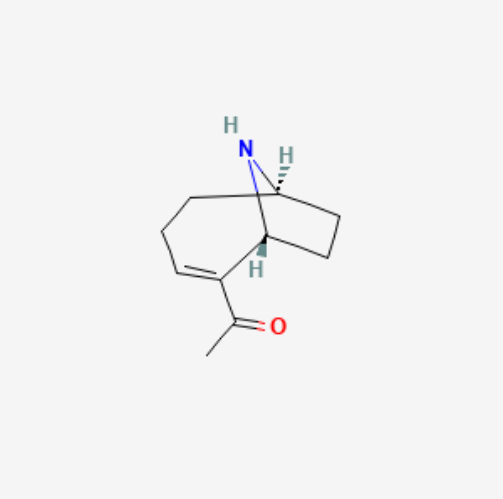
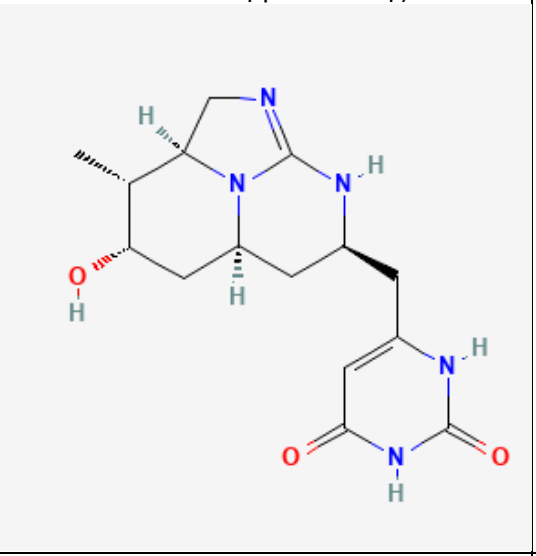
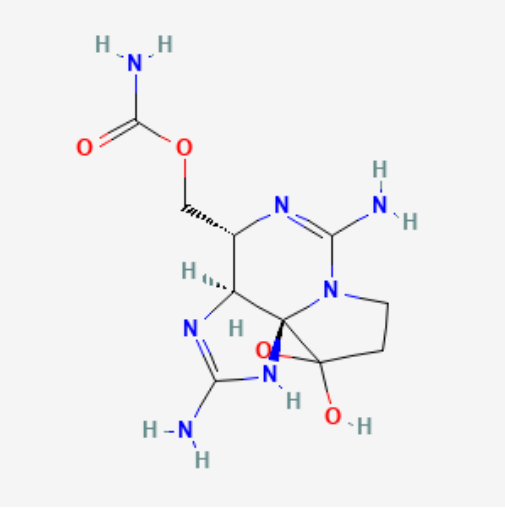
Τα αλκαλοειδή είναι μια μεγάλη ομάδα ετεροκυκλικών αζωτούχων ενώσεων και παράγονται κυρίως από τα φυτά, αλλά και από κάποια βακτήρια. Είναι σταθερά βιοδραστικά και σχεδόν πάντα τοξικά. Εκτός από άνθρακα, υδρογόνο και άζωτο, τα αλκαλοειδή μπορεί να περιέχουν οξυγόνο, θείο και πιο σπάνια χλώριο, βρώμιο και φώσφορο. Οι μη-θειούχες αλκαλοειδείς τοξίνες των κυανοβακτηρίων είναι όλες νευροτοξικές (ανατοξίνες και σαξιτοξίνη), ενώ το

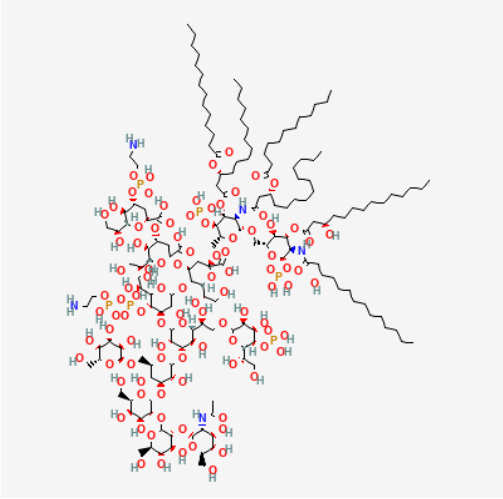
θειούχο αλκαλοειδές κυλινδροσπερμοψίνη μπλοκάρει την πρωτεϊνική σύνθεση με επίδραση κυρίως στα ηπατικά κύτταρα. Μερικά κυανοβακτήρια παράγουν αλκαλοειδή που είναι κυρίως δερματοξικά (απλυσιατοξίνες, λυνγκμπυατοξίνη), αλλά έχουν συσχετιστεί και με τη γαστρεντερίτιδα και με πιο γενικά συμπτώματα όπως ο πυρετός.

Οι λιποπολυσακχαρίτες είναι μεγάλα μόρια, αποτελούμενα από ένα λιπίδιο κι έναν πολυσακχαρίτη ενωμένα με ομοιοπολικό δεσμό. Συνήθως βρίσκονται στην εξωτερική μεμβράνη του κυτταρικού τοιχώματος των gram-αρνητικών βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων των κυανοβακτηρίων, όπου δημιουργούν συμπλέγματα με πρωτείνες και φωσφολιπίδια. Οι λιποπολυσακχαρίτες συμπεριφέρονται ως ενδοτοξίνες και μπορούν να προκαλέσουν ερεθισμό και αλλεργικές αντιδράσεις όταν έρθουν σε επαφή με κάποιο ιστό. Σε σχέση με τους λιποπολυσακχαρίτες άλλων παθογόνων gram-αρνητικών βακτηρίων, όπως η Salmonella, οι λιποπολυσακχαρίτες των κυανοβακτηρίων δεν έχουν τόσο ισχυρή τοξική δράση.

***Πίνακας 1**: Κατηγοριοποίηση κυανοτοξινών ανάλογα με την δομή, όργανα-στόχους και γενών κυανοβακτηρίων*

ΚΥΑΝΟΤΟΞΙΝΗ	ΧΗΜΙΚΗ ΔΟΜΗ	ΟΡΓΑΝΟ-ΣΤΟΧΟΣ	ΓΕΝΗ ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΩΝ
Μικροκυστίνες	Κυκλικά επταπεπτίδια	Ήπαρ	*Microcystis, Anabaena, Planktothrix (Oscillatoria), Nostoc, Hapalosiphon, Anabaenopsis*
Νοντουλαρίνες	Κυκλικά πενταπεπτίδια 	Ήπαρ	*Nodularia spumigena*

Ανατοξίνη-α	Δικυκλικά αλκαλοειδή 	Νευρικές συνάψεις	*Anabaena, Planktothrix (Oscillatoria), Aphanizomenon*
Κυλινδροσπερμοψίνη	Αλκαλοειδή γουανιδίνης 	Ήπαρ	*Aphanizomenon, Cylindrospermopsin, Umezakia*
Σαξιτοξίνες	Καρβαμικά αλκαλοειδή 	Νευρικές συνάψεις	*Anabaena, Aphanizomenon, Cylindrospermopsis, Lyngbya*

LPS	Λιποπολυσακχαρίτες 	Δυνητικά ερεθιστικό, προσβάλει εκτεθειμένο ιστό	*Aphanizomenon, Planktothrix (Oscillatoria)*

Όσον αφορά τους τρόπους έκθεσης του ανθρώπινου οργανισμού στις κυανοτοξίνες αυτοί είναι οι εξής :

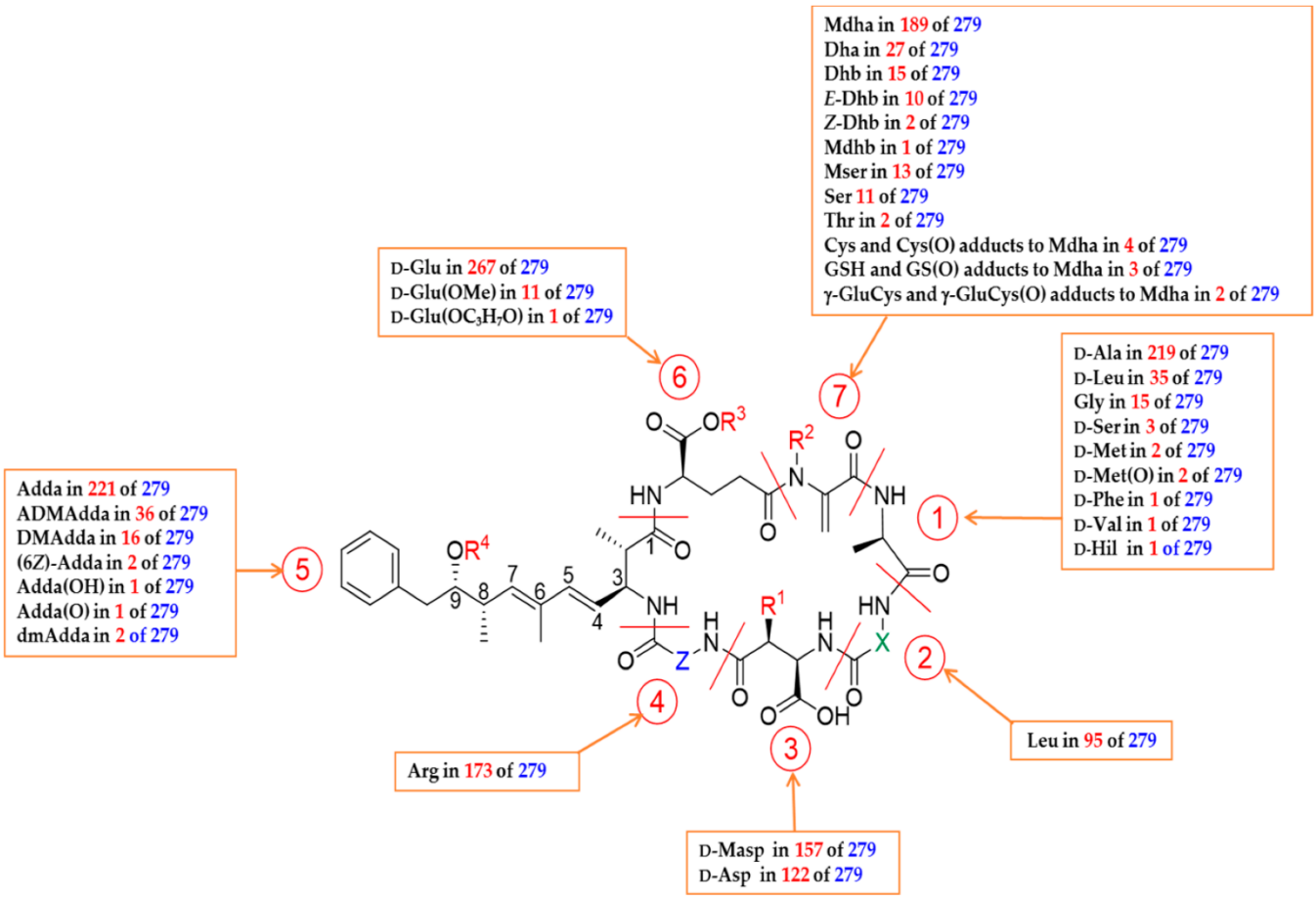
1. Κατάποση νερού
2. Δραστηριότητες σε λίμνη (π.χ. κολύμπι)
3. Κατανάλωση ψαριών-οστράκων
4. Κατανάλωση σπιρουλίνας (νέο είδος superfood)

1.3 Μικροκυστίνες

Οι μικροκυστίνες είναι κυκλικά επταπεπτίδια (κυκλικά πεπτίδια με επτά αμινοξέα) με ηπατοτοξική δράση και πήραν το όνομά τους από το κυανοβακτήριο NRC-1 *Microcystis aeruginosa*, από όπου απομονώθηκαν για πρώτη φορά το 1959 από τους Bishop, Anet & Gorham ως ολικό εκχύλισμα. Είναι παγκοσμίως οι πιο συχνά παρατηρούμενες κυανοβακτηριακές τοξίνες σε φαινόμενα άνθισης – bloom σε γλυκό και υφάλμυρο νερό.

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. Μπορεί να λειτουργούν ως πεπτίδια ή λιποπεπτίδια που παράγονται από άλλα βακτήρια και μύκητες και δρουν ως αντιβιοτικά, παρεμποδιστές ενζύμων, ανοσοκατασταλτικά ή τοξίνες. [6] Όμως ο ακριβής ρόλος των μικροκυστινών στους οργανισμούς που τις παράγουν παραμένει αβέβαιος. [1]

Η γενική δομή των μικροκυστινών είναι: cyclo-(D-alanine^{1} -X ^{2} -D-MeAsp^{3} -Z ^{4} -Adda^{5} -D-glutamate^{6} -Mdha^{7}) όπου τα X και Z είναι διάφορα L-αμινοξέα, το D-Me Asp είναι D-ερυθρό-β-Μεθυλασπαρτικό οξύ, το Mdha είναι N-Μεθυλδεϋδραλανίνη και το Adda είναι το αμινοξύ (2S, 3S, 8S, 9S) - 3 - άμινο - 9 - μέθοξυ - 2,6,8 - τριμέθυλ - 10 - φαινυλδεκα - 4,6 - διενοϊκό οξύ και είναι χαρακτηριστικό της δομής αυτής της ομάδας των κυκλικών πεπτιδικών τοξινών. 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.



Εικόνα 1. *ΓΕΝΙΚΗ ΔΟΜΗ ΜΙΚΡΟΚΥΣΤΙΝΩΝ [2]*

Η πιο διαδεδομένη από τις μικροκυστίνες, η Μικροκυστίνη-LR έχει στην θέση X την λευκίνη (L) και στην θέση Z την αργινίνη (R). 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). Γενικά, οι μικροκυστίνες λόγω της δομής τους είναι αρκετά σταθερές σε υψηλές θερμοκρασίες και δεν μετουσιώνονται με το βράσιμο. Συνήθως η απομάκρυνση των τοξινών από τα ύδατα γίνεται μέσω της βιοαποικοδόμησης και της φωτόλυσης. [2], [7-8]

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. [8]

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.Οι μικροκυστίνες, όπως αναφέρθηκε, είναι κυρίως ηπατοτοξικές δηλαδή προκαλούν σοβαρή βλάβη στο συκώτι. Συγκεκριμένα, όταν εισέλθουν στον ανθρώπινο οργανισμό δρουν ως παρεμποδιστές των πρωτεϊνικών φωσφατασών 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. [1]

1.4 Παρουσία μικροκυστινών σε υδατικό περιβάλλον

Οι κυανοβακτηριακές ανθίσεις - blooms έχουν την τάση δημιουργούνται επανειλημμένα στους ίδιους ταμιευτήρες νερού. Στις Μεσογειακές χώρες έχει παρατηρηθεί πως είναι πολύ πιθανή η ανάπτυξη κυανοβακτηριακών ανθίσεων – blooms που αποτελούνται από το είδος Microcystis spp και έχουν υψηλή ενδοκυτταρική συγκέντρωση μικροκυστινών. Οι κυανοτοξίνες απαντώνται κυρίως στα εσωτερικά ύδατα κατά τη διάρκεια έντονων φαινομένων άνθισης τοξικών κυανοβακτηρίων. Το φαινόμενο της άνθισης αναφέρεται για πρώτη φορά παγκοσμίως το 1878, ενώ στην Ελλάδα η πρώτη αναφορά καταγράφεται το 1987 στις λίμνες Βιστωνίδα, Κορώνεια, Βόλβης και Καστοριάς. [9]

Αναλύτικα παρατίθονται στον **Πίνακα 2** τα δείγματα που έχουν ληφθεί από διάφορες λίμνες στην χώρα μας τα τελευταία χρόνια και οι μικροκυστινές που έχουν ανιχνευθεί σε καθεμία αντίστοιχα. [10]

***Πίνακας 2**: Εμφάνιση μικροκυστινών στις λίμνες της Ελλάδας [10]*

ΛΙΜΝΗ	ΔΕΙΓΜΑ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ	ΑΝΙΧΝΕΥΜΕΝΕΣ ΜΙΚΡΟΚΥΣΤΙΝΕΣ
ΚΑΣΤΟΡΙΑ	ΒΙΟΜΑΖΑ	2016	*dmMC-RR, MC-RR, MC-YR, dm^3 MC-LR, MC-LR, MC-HilR, MC-WR, MC-LA, MC-LW*
	ΦΙΛΤΡΑΡΙΣΜΕΝΟ ΝΕΡΟ		*dmMC-RR, MC-RR, MC-YR, dm3 MC-LR, MC-LR, MC-HilR*
ΠΑΜΒΩΤΙΔΑ	ΒΙΟΜΑΖΑ	2015	*MC-RR, MC-YR, MC-LR*
	ΦΙΛΤΡΑΡΙΣΜΕΝΟ ΝΕΡΟ	2014	*dmMC-RR, MC-RR, MC-YR, MC-LR*
ΖΑΖΑΡΗ	ΒΙΟΜΑΖΑ	2014	*MC-RR, MC-YR*
	ΦΙΛΤΡΑΡΙΣΜΕΝΟ ΝΕΡΟ		*MC-RR, MC-LR*
ΜΙΚΡΗ ΠΡΕΣΠΑ	ΒΙΟΜΑΖΑ	2014	*MC-RR, MC-YR, dm3 MC-LR, MC-LR*
	ΦΙΛΤΡΑΡΙΣΜΕΝΟ ΝΕΡΟ		*MC-RR, MC-YR, MC-LR*
ΒΕΓΟΡΙΤΙΔΑ	ΒΙΟΜΑΖΑ	2008	*MC-RR, MC-LR*
	ΦΙΛΤΡΑΡΙΣΜΕΝΟ ΝΕΡΟ	2014	*dmMC-RR, MC-RR, MC-YR, dm3 MC-LR, MC-LR, MC-LY*
ΤΡΙΧΩΝΙΔΑ	ΒΙΟΜΑΖΑ	2008	*dmMC-RR, MC-YR, dm3 MC-LR*
ΧΕΙΜΑΔΙΤΙΔΑ	ΒΙΟΜΑΖΑ	2008	*dmMC-RR, MC-RR, MC-YR, MC-LR, MC-HilR*
ΒΟΛΒΗ	ΒΙΟΜΑΖΑ	2009	*MC-RR*
ΠΕΤΡΩΝ	ΒΙΟΜΑΖΑ	2009	*MC-RR, MC-LR*

***Εικόνα 2**: Κυανοβακτηριακό bloom στη λίμνη της Καστοριάς[9]*

Όπως έχει προαναφερθεί η παρουσία των μικροκυστινών στο νερό μπορεί να προκαλέσει σοβαρά προβλήματα στην ανθρώπινη υγεία ή ακόμα να επιφέρει και θάνατο. Από επιδημιολογική έρευνα που διεξάχθηκε στην πόλη Haimen και στην επαρχεία Fusui στην Κίνα, προκύπτει ότι υπάρχει υψηλή συσχέτιση της παρουσίας των μικροκυστινών στο νερό με τον πρωτογενή καρκίνο του ήπατος. [11] Το πιο σοβαρό περιστατικό που προκάλεσαν οι κυανοτοξίνες, έγινε το 1996 στην Caruaru της Βραζιλίας, όπου πέθαναν 100 από τους 131 ασθενείς που υπέστησαν νεφρική κάθαρση λόγω της παρουσίας μικροκυστινών στο νερό. [12]

Γενικότερα, η παγκόσμια κλιματική αλλαγή, όπως η αύξηση της θερμοκρασίας του νερού και οι εκτεταμένες περίοδοι ξηρασίας σε συνδυασμό με την αύξηση των θρεπτικών συστατικών έχει ως αποτέλεσμα την μαζική και παρατεταμένη εμφάνιση κυανοβακτηριακών ανθίσεων σε πολλούς ταμιευτήρες νερού παγκοσμίως. Επίσης, οι υπερβολικά υψηλές θερμοκρασίες που αναπτύσσονται κατά την διάρκεια της άνοιξης και του καλοκαιριού έχουν ως συνέπεια την μείωση της κάθετης ταραχώδους ανάμειξης των υδάτων, με αποτέλεσμα να ευνοείται ο ρυθμός ανάπτυξης των κυανοβακτηρίων καθώς και η πιθανότητα δημιουργίας τοξικής κυανοβακτηριακής άνθισης. Συνεπώς, περαιτέρω θέσπιση προγραμμάτων για την παρακολούθησής τους στην χώρα μας, αλλά και σε όλο το κόσμο, θα ωφελήσει την προστασία της δημόσιας υγείας.

Εικόνα 3: *Bloom Microcystis Aeruginosa στην Γαλλία[2]*

1.5 Νομοθεσία

Στην προσπάθεια προστασίας της ανθρώπινης υγείας από τις κυανοτοξίνες, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας παρέχει πληροφορίες, συμβουλές και οδηγίες διαχείρισης. Ορισμένες χώρες έχουν υϊοθετήσει αυτούσιες τις συγκεκριμένες οδηγίες ενώ άλλες έχουν αναπτύξει εθνικές πολιτικές και πρωτόκολλα διαχείρισης που διαφέρουν στην εγκυρότητα, το περιεχόμενο και το πεδίο εφαρμογής.

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO), με βάση τα αποτελέσματα ερευνών για τις κυανοτοξίνες έθεσε ως όριο για την Μικροκυστίνη-LR το 1 μg/L πόσιμου νερού[13] και η παράμετρος αυτή μετράται μόνο όταν υπάρχει πιθανότητα ανάπτυξης φυτοπλαγκτού στο νερό στην πηγή υδροληψίας (αύξηση πυκνότητας κυανοβακτηριακών κυττάρων ή δυναμικού σχηματισμού φυτοπλαγκτού). Για να εξαχθεί το συγκεκριμένο αποτέλεσμα θεωρείται σωματικό βάρος 60 Kg και ημερίσια κατανάλωση νερού ίση με 2 L, όπως συνηθίζεται. [14] Η συγκέντρωση που αναφέρθηκε αφορά το άθροισμα των ενδοκυτταρικών και εξωκυτταρικών ποσοτήτων μικροκυστίνης στην περίπτωση που το νερό περιέχει κύτταρα κυανοβακτηρίων.

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. [13]

Όσον αφορά τα επιφανειακά ύδατα ισχύουν τα εξής :

1. Όταν, από την ταυτότητα των υδάτων κολύμβησης, συνάγεται η δυνατότητα ανάπτυξης κυανοβακτηρίων, πραγματοποιείται κατάλληλη παρακολούθηση προκειμένου να εντοπίζονται εγκαίρως οι κίνδυνοι για την υγεία.
2. Όταν εμφανίζεται ανάπτυξη κυανοβακτηρίων και έχει εντοπισθεί ή τεκμαίρεται κίνδυνος για την υγεία, λαμβάνονται αμέσως κατάλληλα διαχειριστικά μέτρα προκειμένου να προληφθεί η έκθεση, συμπεριλαμβανομένης της ενημέρωσης του κοινού. [13]

Αξίζει να σημειωθεί ότι 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.[15]

Τέλος 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. [5]

1.6 Μέθοδοι προσδιορισμού μικροκυστινών

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων ετών υπάρχει αυξανόμενη ανησυχία όσον αφορά τις επιπτώσεις των μικροκυστινών στην υγεία, καθώς δρουν ως παράγοντες δημιουργίας όγκων, μέσω της αναστολής της πρωτεινικής φωσφατάσεων 1 και 2A, οι οποίες διαδραματίζουν καίριο ρόλο στην φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων. Αυτό έχει οδήγησει στην ανάγκη ανάπτυξης αξιόπιστων αναλυτικών μεθόδων για την παρακολούθηση αυτής της κατηγορίας κυανοτοξινών στο νερό σε ποσοτικό επίπεδο.

Οι μέθοδοι προσδιορισμού μικροκυστινών στο νερό μπορούν να χωρισθούν σε δύο ομάδες. Στην μία ομάδα κατατάσσονται οι μέθοδοι που απλά υποδεικνύουν την παρουσία των τοξινών στο δείγμα, όπως η μέθοδος ενζυμικής ανοσοπροσρόφησης (enzyme-linked immune sorbent assay, ELISA) και η βιοδοκιμασία αναστολής της πρωτεινικής φωσφατάσης (phosphatase inhibition assay, PPIA). Στην δεύτερη ομάδα είναι οι μέθοδοι που διεξάγονται για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των διάφορων μεμονωμένων κυανοτοξινών. [16]

Η εξέλιξη της τεχνικής LC-MS/MS με την τεχνολογία τριπλού τετραπόλου έχει οδηγήσει σήμερα στην αποδοχή της ως το πλέον αξιόπιστο εργαλείο για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των κυανοτοξινών. Η δυνατότητα παρακολούθησης των μεταπτώσεων από μητρικά σε θυγατρικά ιόντα με την τεχνική MS/MS προσφέρει τέτοια εκλεκτικότητα και ευαισθησία που μπορεί να οδηγήσει στην εκτίμηση ότι δεν είναι απαραίτητος ο χρωματογραφικός διαχωρισμός. Η λογική αυτή μπορεί να οδηγήσει σε σφάλματα, ιδιαίτερα όταν συνυπάρχουν πολλές διαφορετικές τοξίνες με παραπλήσια δομή. [17]

Για τις περισσότερες μικροκυστίνες, ο ιονισμός και η θραυσματοποίηση στο τριπλό τετράπολο οδηγούν στη μετάπτωση Μητρικό ιόν σε ADDA και τελικώς μετράται το ιόν με μάζα 135.0 (m/z του ADDA). Αυτό σημαίνει ότι όταν δεν υπάρχει διαχωρισμός των μικροκυστινών στη στήλη, υπάρχει ο κίνδυνος ο φασματογράφος μάζας να μην μπορεί να διακρίνει το σήμα (m/z 135.0) που προέρχεται από διαφορετικά μητρικά ιόντα (διαφορετικές μικροκυστίνες).

Τα σφάλματα αυτά, παρότι μικρά από ποσοτικής άποψη, μπορεί να έχουν μεγάλη σημασία όταν οι μετρήσεις γίνονται για ανίχνευση των κυανοτοξινών στα πρώτα στάδια ανάπτυξης του bloom. Σημειώνεται, ότι ακόμη και όταν επιτυγχάνεται διαχωρισμός, υπάρχουν πολλές (~70) μικροκυστίνες για τις οποίες δεν υπάρχει πρότυπη ουσία και που επομένως πιθανώς να συνεκλούονται με τις υπό προσδιορισμό ουσίες. Για τους παραπάνω λόγους θα πρέπει να επιτυγχάνεται επαρκής διαχωρισμός όπου αυτό είναι δυνατό και να ρυθμίζονται οι παράμετροι του φασματογράφου μάζας έτσι ώστε να ελαχιστοποιούνται οι παρεμβολές. [17]

Η αντιστρόφου φάσεως υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC, LC) είναι μέθοδος που μας επιτρέπει τον ταυτόχρονο ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των μικροκυστινών.

Η υγρή χρωματογραφία χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με ανιχνευτή υπεριώδους – UV (Ultra Violet), ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (PDA) ή/και με ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών (MS). [18] Οι μέθοδοι αυτοί είναι σχετικά γρήγοροι όμως για να επιτευχθούν χαμηλότερα όρια ανίχνευσης απαιτείται καθαρισμός και προσυγκέντρωση του δείγματος.

Τέλος για την χρήση αυτών των μεθόδων απαιτείται ειδική και ακριβή οργανολογία ,καθώς και ύπαρξη εξειδικευμένου προσωπικού κάτι που αυξάνει τον χρόνο ανάλυσης. [19], [20]

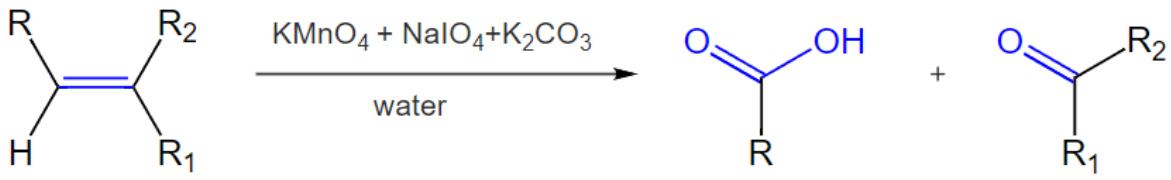
Η ELISA είναι μία εναλλακτική λύση για τον προσδιορισμό των μικροκυστινών, όπου χρησιμοποιούνται είτε πολυκλωνικά είτε μονοκλωνικά αντισώματα. [21], [22] Η ELISA είναι μία γρήγορη μέθοδος, χαμηλού κόστους, που απαιτεί ελάχιστη προκατεργασία δείγματος και μπορεί να προσδιορίσει τις μικροκυστίνες στο επίπεδο που έχει ορίσει ο WHO.[23] Μειονεκτήματα της είναι ότι δεν μπορεί να προσδιορίσει και να ποσοτικοποιήσει την κάθε τοξίνη ξεχωριστά και μπορεί να υπολογιστεί χαμηλότερη συγκέντρωση των μικροκυστινών από την πραγματική. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η κάθε μικροκυστίνη έχει διαφορετικό βαθμό διασταυρούμενης δραστικότητας (cross reactivity). [24] Τέλος τα κιτ δοκιμών ELISA μπορεί να δώσουν διαφορετικά αποτελέσματα ανάλογα με την κατασκευαστική εταιρία. [16]

Η βιοδοκιμασία αναστολής της πρωτεινικής φωσφατάσης (PPIA) αποτελεί μία γρήγορη μέθοδο καθώς πολλά δείγματα μπορούν να αναλυθούν σε λίγες ώρες. Αυτή η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα των τοξινών να αναστέλλουν την πρωτεινική φωσφατάση . Μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι δε προσδιορίζονται μόνο οι μικροκυστίνες αλλά και άλλες ενώσεις που προκαλούν αναστολή στα ένζυμα φωσφατάσης, καθώς επίσης και το γεγονός ότι η κάθε μικροκυστίνη δεν αναστέλλει τα ένζυμα στον ίδιο βαθμό με συνέπεια να μην προκύπτουν ακριβή αποτελέσματα. Ωστόσο, παρέχει σημαντικές τοξικολογικές πληροφορίες σχετικά με τη βιοδραστικότητα των μικροκυστινών, καθώς η ανίχνευση βασίζεται στη λειτουργική δραστηριότητα παρά στην αναγνώριση της χημικής δομής. [24]

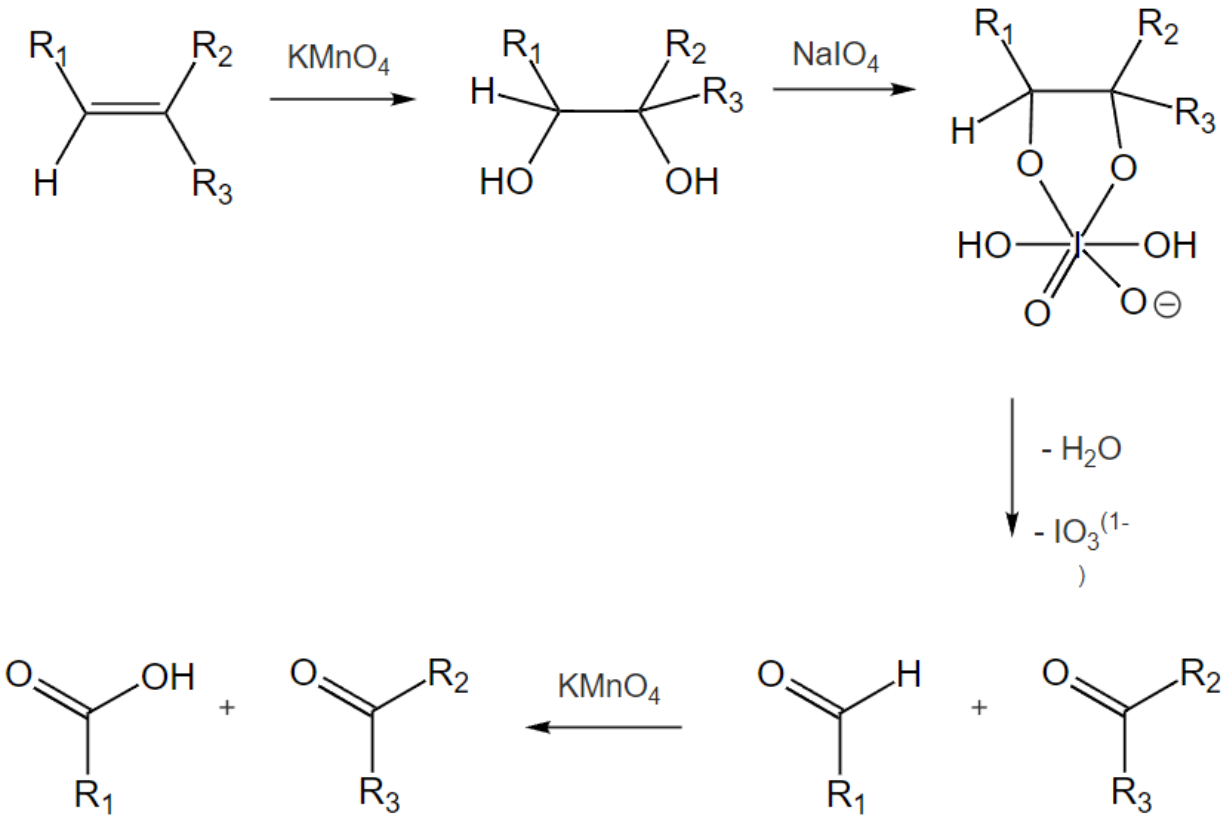
1.7 Μέθοδος ανάλυσης MMPB

Στην παρούσα εργασία για την ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού ολικών μικροκυστινών έγινε χρήση της μεθόδου MMPB, η οποία δίνει την δυνατότητα ανίχνευσης χαμηλών συγκεντρώσεων,αλλά και την ικανότητα προσδιορισμού τόσο των ελεύθερων όσο και των συνδεδεμένων μορίων μικροκυστινών. Επίσης έχει την δυνατότητα ανίχνευσης με χρήση τόσο της υγρής όσο και της αέριας χρωματογραφίας, ενώ αξίζει να σημειωθεί ότι αυτή η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί σε μια μεγάλη ποικιλία υποστρωμάτων με κυριότερα τα δείγματα νερού και ψαριών.

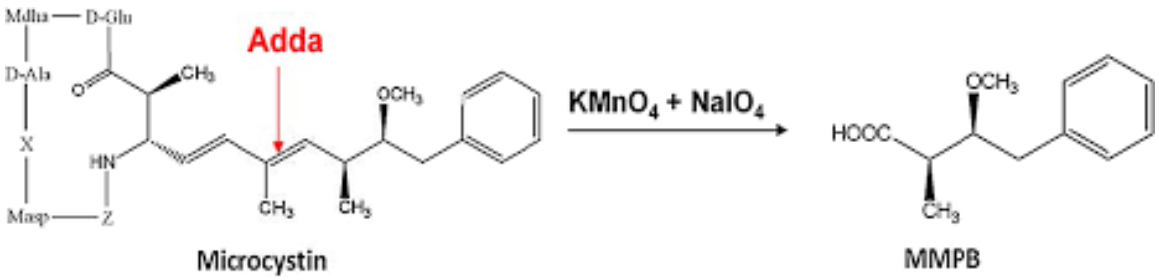
Αυτή η μέθοδος βασίζεται στην παραγωγοποίηση των Adda των μικροκυστινών σε MMPB (2-μεθυλο-3μεθοξυ-4 φαινυλοβουτυρικό οξύ) με την αντίδραση οξείδωσης Lemieux (**Εικόνα 4**) ή σε ελάχιστες περιπτώσεις με χρήση οζονόλυσης. Η οξείδωση Lemieux ανακαλύφθηκε το 1955 από τους Lemieux-Von Rudloff για την οξείδωση των ολεφινών με υπεριωδικό νάτριο ($NaIO_4$) με παρουσία υπερμαγγανικού καλίου ($KMnO_4$) ως καταλύτη της αντίδρασης σε αναλογία συγκεντρώσεων [$NaIO_4$]:[$KMnO_4$] = 80:1 και η γενικευμένη μορφή και ο μηχανισμός της αντίδρασης παρατίθενται στην **Εικόνα 5** και στην **Εικόνα 6** αντίστοιχα. [25]



***Εικόνα 4**: Γενικευμένη μορφή αντίδρασης Lemieux[25]*

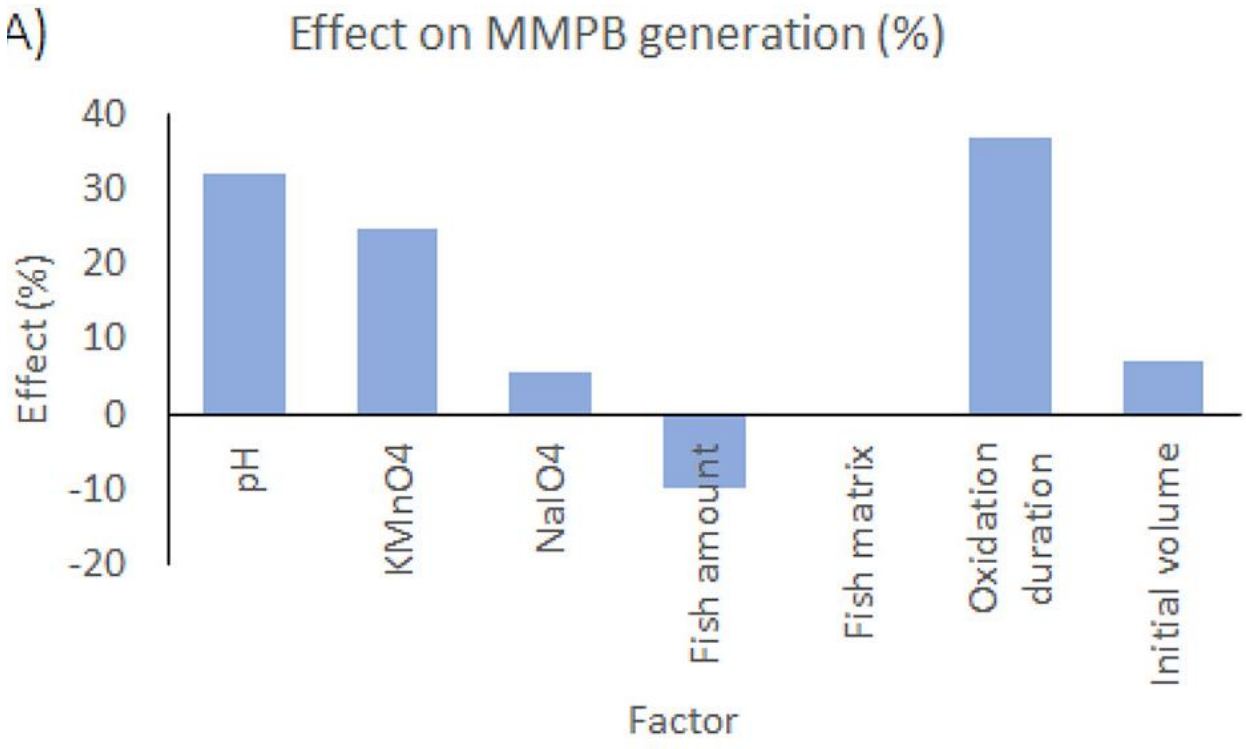


Εικόνα 5: *Μηχανισμός αντίδρασης Lemieux*[25]

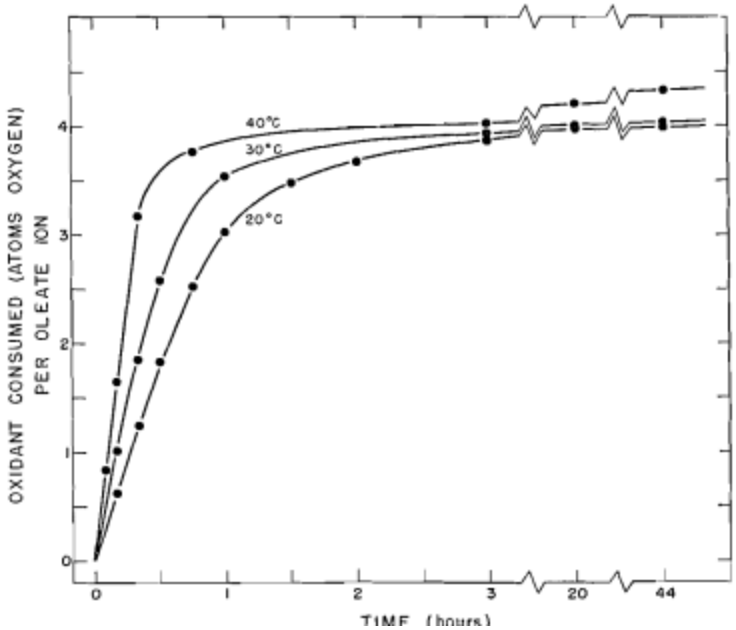


Εικόνα 6: *Αντίδραση οξείδωσης Lemieux σε μικροκυστίνες*[26]

Η συγκεκριμένη οξείδωση είναι μια εύκολα διαχειρίσιμη αντίδραση, καθώς πραγματοποιείται σε συνθήκες θερμοκρασίας δωματίου(25°C) και με χρήση απλού εργαστηριακού εξοπλισμού. Οι παράγοντες που επηρεάζουν κυριώς την απόδοση αυτής της αντίδρασης είναι το pH , ο χρόνος οξείδωσης και οι συγκεντρώσεις των αντιδρώντων(**Εικόνα 7**) , ενώ παραμένει ανεπηρέαστη από την θερμοκρασία (**Εικόνα 8**).

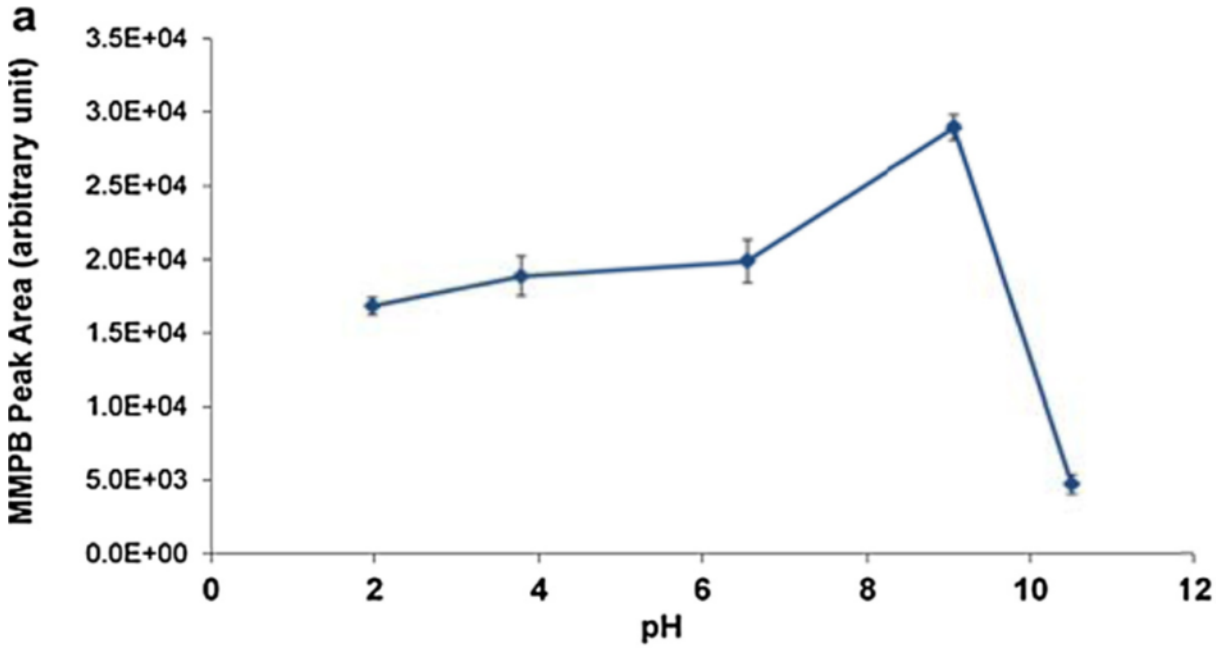


Εικόνα 7: *Επιδράσεις μελετημένων παραγόντων στην ανάκτηση του MMPB[27]*



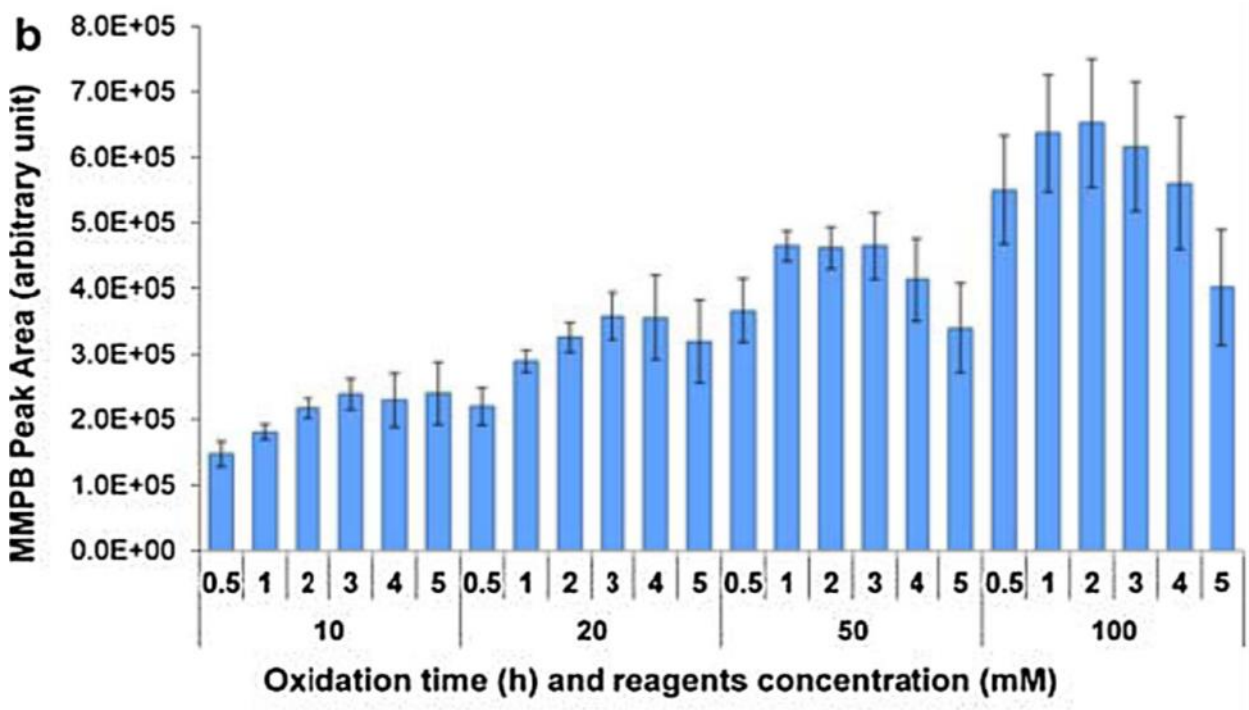
***Εικόνα 8**: Διάγραμμα επίδρασης θερμοκρασίας στην οξείδωση Lemieux [25]*

Η αντίδραση ξεκινάει με προσθήκη $NaIO_4$ και $KMnO_4$ στο δείγμα νερού που αναδεύεται συνεχώς με ταυτόχρονη παρουσία pHμετρου και έχει ένα έντονο μωβ χρώμα. Έπειτα γίνεται προσθήκη ανθρακικού καλίου συγκέντρωσης 1M (K_2CO_3) για να πραγματοποιηθεί η ρύθμιση του pH στις βέλτιστες συνθήκες της αντιδράσης, που είναι το pH=9 (**Εικόνα 9**).



***Εικόνα 9**: Διάγραμμα επίδρασης του pH στην παραγωγή του MMPB [26]*

Στην συνέχεια το διάλυμα καλύπτεται με αλουμινόχαρτο και αφήνεται να οξειδωθεί για το βέλτιστο χρονικό διάστημα των 2 ωρών (**Εικόνα 10**) με συνεχή ανάδευση.



***Εικόνα 10**: Διάγραμμα επίδρασης του χρόνου οξείδωσης(h) και των συγκεντρώσεων των NaIO4 και KMnO4 στην παραγωγή του MMPB [26]*

Μόλις ολοκληρωθεί αυτό το χρονικό διάστημα η αντίδραση τερματίζεται με προσθήκη όξινου θειώδες νατρίου συγκέντρωσης 4 M (Na_2HSO_3) εώς τον πλήρη αποχρωματισμό του διαλύματος. Αξίζει να σημειωθεί ότι κατά την διάρκεια αυτού του αποχρωματισμού η θερμοκρασία του διαλύματος αυξάνεται εώς και 35^o C και το pH φτάνει ακόμα και σε τιμές 2-3.

Στον **Πίνακα 3** και **Πίνακα 4** συνοψίζονται οι μέθοδοι προσδιορισμού κυανοτοξινών με χρήση μεθόδου MMPB που έχουν πραγματοποιηθεί και παρατίθενται το είδος και ο αριθμός των αναλυτών που προσδιορίζονται σε κάθε μελέτη, το υπόστρωμα, ο τρόπος προκατεργασίας του δείγματος,το εσωτερικό πρότυπο,τα χαρακτηριστικά της οξείδωσης (συγκεντρώσεις αντιδρώντων,διάρκεια οξείδωσης,pH, τρόπος τερματισμού αντίδρασης) και το υλικό προσρόφησης για την SPE, η στήλη και η κινητή φάση, η τεχνική διαχωρισμού-προσδιορισμού και τα χαρακτηριστικά ποιότητας: όριο ανίχνευσης (LoD) και % ανάκτηση (Recovery). Τέλος στον **Πίνακα 5** συνοψίζονται οι συγκρίσεις που έχουν γίνει μεταξύ της μεθόδου MMPB με των υπόλοιπων μεθόδων προσδιορισμού ολικών μικροκυστινών.

Πίνακας 3: *Βιβλιογραφική ανασκόπηση μεθόδου MMPB σε δείγματα νερού*

Ref.	Matrix	Quantif. strategy	IS	Sample amount	Oxid. time (h)	[$KMnO_4$]	[$NaIO_4$]	pH	Termination	SPE conditions	Instrumental Analysis	Analytical Column	Analytical conditions	LoD
[28]	Δείγματα νερού και καλλιέργεια Nostoc	Matrix spiked MC-LR καμπύλη βαθμονόμησης	N/A	0.2 – 1 mg αποξηραμένης βιομάζας (διαλυμένης σε 1 ml H2O)	1	50mM	50mM	N/A	N/A	Strata-X SPE (60 mg) Έκλουση με 1 mL 90% ACN	LC-MS/MS	Kinetex F5 LC (2.6mm x 150, 2.1 mm)	Κινητές φάσεις : (A) H_20 and (B) 95% CH_3CN Gradient μεταξύ A 30-75%	N/A
[29]	Επιφανειακά νερά	Εσωτερική πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης με MMPB σε οξειδωμένο matrix	4-PB or D3-MMPB (50 ng/L or 10 ng/L)	10 mL	1	0.35 M	0.4 M	9	4 M NaHSO3	**Online SPE** Thermo Hypersil Gold aQ C18 (20 mm × 2 mm, 12 m particle size) Έκλουση με (H_2O + 0.5% HCOOH	SPE − UHPLC–MS/MS	Thermo Hypersil Gold C18 selectivity (100 mm × 2.1 mm, 1.9 μm)	On-line κινητές φάσεις : (A) HPLC-H_2O με 0.5% (v/v) HCOOH και (B) was MeOH με 0.5% (v/v) HCOOH	0.5 ng L^{-1}
[30]	Επιφανειακά νερά	Πρότυπα διαδικαστικής βαθμονόμησης με υδατικά δείγματα του MC-LR	d3-MMPB (0.2 nmol)	1 mL	2	0.02 M	0.23 M	9	0.4 mL of 10% $NaHSO_3$	HLB Oasis Έκλουση με 6 mL methanol	LC-MS/MS	HSS T3	Κινητές φάσεις : Μυρμηγκικό αμμώνιο και MeOH	N/A
[31]	Δείγματα νερού	Matrix matched καμπύλη βαθμονόμησης, MMPB spiked μετά την ρύθμιση του pH	4-PB (100 μg/L)	2 mL	ΟΖΟΝΟΛΥΣΗ					No SPE	GC-MS	DB-5MS capillary (30 mm, 0.25 mm)	Το διάλυμα μεταφέρθηκε σε ένα φιαλίδιο των 5 mL με βιδωτό πώμα και προστέθηκαν με τη σειρά μεθανόλης, πυριδίνης και στη συνέχεια MCF	0.34 mg L^{-1}

Ref.	Matrix	Quantif. strategy	IS	Sample amount	Oxid. time (h)	[$KMnO_4$]	[$NaIO_4$]	pH	Termination	SPE conditions	Instrumental Analysis	Analytical Column	Analytical conditions	LoD
[32]	Δείγμα νερού και ιζήματος λίμνης	Spiked με διαφορετικές ποσότητες MCs	No IS	400 mL για νερό, N/A για ίζημα	1	20 mg mL^{-1}	4000 mg L^{-1}	9	40% NaHSO3	Sep-Pak C18 cartridge Έκλουση με 10 mL MeOH	HPLC-FLD	Synergi Hydro-RP C18 (4 mm, 250 mm 4.6 mm)	Κινητές φάσεις από ACN και 0.05% TFA Gradient ACN 70-100%	125 ng L^{-1} για H_2O 100 ng g^1 ιζήματος
[33]	Δείγμα νερού	In situ oxidized MC-LR matrix matched καμπύλη βαθμονόμησης	4-PB (10 μg/L)	0.5 mL (5x or 10x αραιώσεις)	0.5	0.15 M	0.15 M	N/A	40% (w/v) $NaHSO_3$	Strata X 100 mg Έκλουση με 2% φορμικού διαλύματος σε MeOH (3 mL)	LC-MS/MS	Kinetex™ 2.6 mm C18 100 Å, LC Column (150 x 2.1 mm)	Κινητές φάσεις A (2 mM φορμικό οξύ και 3.6 mM μυρμηγκικό αμμώνιο σε υπερκάθαρο νερό) and B (95% ACN (v/ v) σε 2 mM φορμικό οξύ και 3.6 mM μυρμηγκικό αμμώνιο) Gradient 30-60% A	0.05 μg L^{-1}
[26]	Δείγμα νερού	MMPB και οξειδωμένες MCs στο matrix για ανακτήσεις	4-PB (150 μg/L)	N/A	1	0.5 M	0.5 M	9	$NaHSO_3$	No SPE	LDTD-APCI-MS/MS	T-960 LDTD-APCI	Θέρμανση δειγμάτων σε 40 ◦C για 5 λεπτά μέχρι την πλήρης εξάτμιση του διαλύτη	0.2 μg L^{-1}
[34]	Δείγμα νερού	In situ οξειδωμένη MC-LR matrix matched καμπύλη βαθμονόμησης	4-PB (1μg/L)	100 mL	>1	0.025 M	0.025 M	9	$NaHSO_3$	C18 Έκλουση με 10 mL of MeOH	GC-MS	DB-Wax capillary column (30 m × 0.25 mm × 0. 25 μm)	Το διάλυμα μεταφέρθηκε σε ένα φιαλίδιο των 200 μl και προστέθηκαν με τη σειρά μεθανόλης, πυριδίνης και στη συνέχεια MCF	0.56 mg L^{-1}
[35]	Δείγμα νερού	Spiked MC-LR	d3-MMPB (20-200ng)	50 mL	4	0.024 M	0.024 M	N/A	20% $NaHSO_3$	No SPE	GC-MS	HP-1 capillary column (0.32 mm x 25 m)	Μετατροπή σε μεθυλεστέρα χρησιμοποιώντας διάλυμα BF3- MeOH 14%	0.1 ng

Πίνακας 4: *Βιβλιογραφική ανασκόπηση μεθόδου MMPB σε διάφορα υποστρώματα*

Ref.	Matrix	Quantif. strategy	IS	Sample amount	Oxid. Time (h)	[$KMnO_4$]	[$NaIO_4$]	pH	Termination	SPE conditions	Instrumental Analysis	Analytical Column	Analytical conditions	LoD
[27]	Συκώτι ψαριού και φιλέτο	In situ MMPB matrix matched καμπύλη βαθμονόμησης	d3-MMPB (500 ng/g)	100 mg λυοφιλοποιημένου δείγματος	2	0.3 mM	20mM	8	$NaHSO_3$	Oasis HLB 3 cc (400 mg) Έκλουση με 4 mL MeOH	LC-QTOF MS	Waters BEH C18, (50 × 2.1 mm, 1.7 μm)	Κινητές φάσεις : 0.1% φορμικό οξύ σε H2O (A) και 0.1% φορμικό οξύ σε MeOH (B) Gradient από 95% A σε 95% B	7.28 ng g^{-1}
[36]	Μυς ψαριού	External calibration curve – oxidized MC-LR	N/A	0.01 g αποξηραμένων ιστών	3	0.1 M	0.1 M	9	$NaHSO_3$ (40% w/v)	No SPE	LC-MS	Zorbax Eclipse-C18 (150 mm x 4.6 mm, 5 μm)	Κινητές φάσεις : 60% A (MeOH) και 40% B (0.05%, v/v trifluoroacetic acid)	N/A
[37]	Νεφρό, συκώτι, μαλλιά,αίμα, χολή,ούρα, εμετό σκύλων	Έτοιμα προ-οξειδωμένα spikes of MC-LR	N/A	100 mg (συκώτι και νεφρό, υγρό βάρος) 50 mg (μαλλιά, d. w.) 500–1500 μL (αίμα) 0,2 μL–500 μL (χολή, ούρα)	2	0.1M	0.1 M	N/A	40% $NaHSO_3$ (w/v)	Strata X SPE (200 mg) Έκλουση με 5 mL 90% ACN	LC-MS/MS	Kinetex C18 (2.6 μm, 100 Å, 150 × 2.1 mm)	Κινητές φάσεις : C (2 mM φορμικού οξέος και 3.6 mM μυρμηκικό αμμώνιο σε υπερκάθαρο νερό) και D (95% ACN (v/v) σε 2 mM φορμικού οξέος και 3.6 mM μυρμηκικό αμμώνιο) Gradient μεταξύ C 30-70%	4.0 ng g^{-1} συκώτι και νεφρό σκύλου

Ref.	Matrix	Quantif. strategy	IS	Sample amount	Oxid. Time (h)	$[KMnO_4]$	$[NaIO_4]$	pH	Termination	SPE conditions	Instrumental Analysis	Analytical Column	Analytical conditions	LoD
				10 mg (εμετός, υγρό βάρος)										
[38]	Συκώτι δελφινιού	Matrix spikes και matrix οξειδωμένης MC-LR καμπύλη βαθμονόμησης	No IS	0.01 g ξηρό	2.5	0.1 M	0.1 M	N/A	40% (w/v) $NaHSO_3$	Strata X Polymeric SPE Έκλουση με 5 mL 90% ACN	LC–MS/MS	KinetexTM 2.6 mm C18 100 Å, LC (150 x 2.1 mm)	Κινητές φάσεις : A (2 mM φορμικού οξέος και 3.6 mM μυρμηκικό αμμώνιο σε υπερκάθαρο νερό) και B (95% ACN (v/v) σε 2 mM φορμικού οξέος και 3.6 mM μυρμηκικό αμμώνιο) Gradient μεταξύ A 30-70 %	1.3 μg g^{-1}
[39]	Συκώτι και μυς ψαριού	Συγκέντρωσαν υπάρχουσες μελέτες για τις κυανοτοξίνες στα ψάρια και το γλυκό νερό από λίμνες σε όλο τον κόσμο σε ένα παγκόσμιο σύνολο δεδομένων για να ελέγξουν την υπόθεση ότι οι συγκεντρώσεις κυανοτοξίνης στα ψάρια αυξάνονται με τις συγκεντρώσεις της τοξίνης του νερού.												
[40]	Συκώτι γουρουνιού	Matrix matched καμπύλη βαθμονόμησης, MMPB spiked μετά την ρύθμιση του pH	No IS	0.05 g ξηρό	2	0.2 M	0.2 M	N/A	N/A	OASIS PRiME HLB (60mg, 3 cc)	UPLC-MS/MS	ACQUITY UPLC BEH C18 (50mm×2.1 mm, 1.8 μm, 130Å)	Κινητές φάσεις: comprised water (0.1% CH_3COOH v/v) και ACN Gradient 2-90%	N/A
[41]	Algae	MMPB μετά από οξειδωτική πέψη χρησιμοποιώντας	d3-MMPB (1μg)	0.02 g ξηρό	1	0.2 M	0.5 M	9	40% (w/v) $NaHSO_3$	No SPE	LC- MS/MS (vs CP-MIMS-MS/MS)	Zorbax 1.8 μm SB-C18 (2.1 × 50 mm)	Mobile phase of 2 mM μυρμηγκικό αμμώνιο και 50 mM φορμικό οξύ σε	1 μg L^{-1}

Ref.	Matrix	Quantif. strategy	IS	Sample amount	Oxid. Time (h)	[$KMnO_4$]	[$NaIO_4$]	pH	Termination	SPE conditions	Instrumental Analysis	Analytical Column	Analytical conditions	LoD
		βαθμονόμηση αραίωσης MMPB-d3											H_2OA) and 95% ACN (B) Gradient 20% -90% B	
[42]	Συκώτι και πλάσμα ψαριών	In situ oxidized MC-LR matrix matched καμπύλη βαθμονόμησης	No IS	0.5 g υγρό βάρος συκωτιού 0.4 g πλάσματος	3	0.2 M	0.2 M	9	$NaHSO_3$	Oasis HLB (60 mg, 3 CC) Έκλουση με 2 mL of 90% MeOH σε νερό με 0.05% CH_3COOH	LC-MS/MS	Allure C18 (50 x 3.2 mm, 5 μm)	Κινητές φάσεις : A (5 mM μυρμηγκικό αμμώνιο and 0.1% φορμικό οξύ) και B ACN Gradient 5-95% B	6.2 ng g^{-1} συκώτι 5.2 ng g^{-1} πλάσμα
[43]	Κυανοβακτήρια και συκώτι ψαριού	Spikes MC-LR χρησιμοποιήθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό και τη δημιουργία καμπυλών για ποσοτικοποίηση δειγμάτων χωρίς matrix spikes	N/A	1.5-6.3 g υγρό βάρος συκωτιού	2	0.25 M	0.25 M	N/A	40% (w/v) $NaHSO_3$	Strata-X (200 mg) Έκλουση με 5 mL 90% ACN	HPLC-MS/MS	Phenomenex Kinetex™ 2.6 mm F5 100 Å, LC (150 2.1 mm)	Κινητές φάσεις : 40% A (5% MeOH in 0.05% CH_3COOH) and 60% B (95% MeOH in 0.05% CH_3COOH)	2 ng/g
[44]	Μυς ψαριού	Matrix matched καμπύλη βαθμονόμησης, MMPB spiked πριν	No IS	0.05 g ξηρό	2	0.1 M	0.1 M	N/A	1 mL $NaHSO_3$ (40% w/v)	Oasis HLB Έκλουση με 2 × 1.5 mL από 80%	UPLC-MS/MS	ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm, 130 Å)	Κινητές φάσεις : H_2O (0.1% CH_3COOH v/v) και ACN Gradient ACN 10-80%	N/A

Ref.	Matrix	Quantif. strategy	IS	Sample amount	Oxid. Time (h)	[$KMnO_4$]	[$NaIO_4$]	pH	Termination	SPE conditions	Instrumental Analysis	Analytical Column	Analytical conditions	LoD
		την ρύθμιση pH								MeOH με 0.1% TFA				
[45]	Ιστοί ψαριών	Matrix matched καμπύλη βαθμονόμησης, MMPB spiked πριν SPE	4-PB (500 μg kg^{-1})	1 g υγρό βάρος	2	0.5 M	0.5 M	9	NaHSO3	Strata SDB-L Έκλουση με 5 mL of MeOH	LDTD-APCI-MS/MS	T-960 LDTD-APCI ionization 140 interface model	Θέρμανση δειγμάτων σε 40 ◦C για 5 λεπτά μέχρι την πλήρης εξάτμιση του διαλύτη	2.7 ng g^{-1}
[46]	Συκώτι ψαριών, έντερα, βράγχια και μύες	Τυπική καμπύλη βαθμονόμησης MMPB	No IS	0,06 g εντερικός ιστός 0,01 g ήπαρ, βράγχια και μύες	4	0.1 M	0.1 M	9	$NaHSO_3$ (40% w/v)	Strata X (60 mg) Έκλουση 2 φορές με 1 ml από 90% MeOH/0.01% TFA	LC-MS/MS	BDS Hypersil C8 (50 mm x 2.1 mm)	Κινητές φάσεις A: 0.1% φορμικό οξύ and B: ACN Gradient 25-90 % B	4.76 ng/g (dw) ιστού 2.59 ng/g (dw) συκωτιού 1.68 ng/g (ww) ιστού 0.64 ng/g (ww) συκωτιού
[47]	Έντερο και συκώτι ψαριού	MMPB που δημιουργείται από οξείδωση MC-LR	No IS	1 g υγρό βάρος	overnight	0.002M	0.09M	9	20 % $NaHSO_3$	No SPE	GC–MS	HP-5 MS column (0.25 lm coating, 0.25 mm i.d. 9 30 m	Το ασθενώς αλκαλικό μίγμα της αντίδρασης οξινίστηκε με σταγόνες 10 % αραίωσης H_2SO_4 με επιπλέον H_2O και	0.2 ng g^{-1}

Ref.	Matrix	Quantif. strategy	IS	Sample amount	Oxid. Time (h)	[$KMnO_4$]	[$NaIO_4$]	pH	Termination	SPE conditions	Instrumental Analysis	Analytical Column	Analytical conditions	LoD
													στη συνέχεια εκχυλίστηκε με διαιθυλαιθέρα. Τα αιθερικά εκχυλίσματα συνδυάστηκαν, αντίστοιχα, και ξηράνθηκαν με άνυδρο Na_2S0_4	
[48]	Συκώτι και μυς ψαριών	MMPB καμπύλη βαθμονόμησης που δημιουργείται από οξείδωση MC-LR	4-PB (2–14 mg)	1 mL από (7 g ομογενοποιημένα σε 5 mL νερό)	3	0.36M	0.0096 M	9	$NaHSO_3$	No SPE	SPME-GC/MS	DB5 (30 m × 0.25 mm ID, phase thickness 0.25 μm)	Δείγματα (100 mL) ξηράνθηκαν (Speed Vac SVC100, SAVANT) και διαλύθηκαν σε διάλυμα MeOH 5% HCl (1 mL) και ακολούθησε θέρμανση για 1 ώρα στους 70°C	40 ng g^{-1}
[49]	Ιζήματα λίμνης	Matrix matched καμπύλη βαθμονόμησης και με Oxidized MC-LR και MMPB	N/A	2 g ξηρό	1-4	0.05M	0.1M	9	Saturated $NaHSO_3$	Sep-pak C18 cartridge Έκλουση με 10 mL of MeOH	HPLC	Synergi Hydro-RP C18 (4 μm, 250 mm × 4.6 mm)	Κινητές φάσεις 60% A (MeOH) and 40% (v/v) B (0.05%, v/v TFA)	0.5 g g^{-1}
[50]	Ιστός και ορός σαλιγκαριού	Matrix matched καμπύλη βαθμονόμησης και με	N/A	0,01 g αποξηραμένος ιστός Ορός: 1 ml	3	0.1 M	0.1 M	9	$NaHSO_3$ (40% w/v)	Oasis HLB 30 mg	LC-MS/MS	Purospher STAR RP-18 (30 mm x 4 mm)	Κινητές φάσεις A: 0.1% φορμικό οξύ B: ACN	N/A

Ref.	Matrix	Quantif. strategy	IS	Sample amount	Oxid. Time (h)	[$KMnO_4$]	[$NaIO_4$]	pH	Termination	SPE conditions	Instrumental Analysis	Analytical Column	Analytical conditions	LoD
		Oxidized MC-LR και MMPB								(1 mL) Έκλουση με 80% MeOH με 0.1 M HOA			Gradient 25-90% B	
[51]	Κυανοβακτήρια	MMPB καμπύλη βαθμονόμησης	No IS	0.05 g ξηρό	1-4	0.5 M	0.2 M	9	20 μL of $NaHSO_3$	N/A	HPLC	Synergi Hydro-RP C18 (4μm,250mm×4.6mm)	60% A (100% MeOHl) και 40% B (0.05% υδατικό διάλυμα TFA) Gradient 50-80 % A	1 ng g^{-1}
[52]]	Algae	MMPB που δημιουργείται από οξείδωση MC-LR	4-PB (4.0 mg/L)	N/A	N/A	50mg/L	20mg/mL	1.6	$NaHSO_3$	No SPE	HPLC-PDA	Hypersil base deactived silica C18 (250 x 4.6 mm; 5 μm)	50% A (100% MeOH) and 50% B (0.05 mol/L of KH_2PO_4)	N/A
[53]	Bloom δείγματος νερού	Πρότυπο διάλυμα MC-LR διανέμεται με μικροσύριγγα για τη δημιουργία μιας καμπύλης βαθμονόμησης	d3-MMPB (100 ng)	N/A	3	0.025 M	0,1 mL	N/A	20% $NaHSO_3$	InertSep RP-1, 30 mg/1 mL Έκλουση 2 φορές με 0.2 mL 90% MeOH και με 0.6 mL H2O	HPLC-MS	Mightysil RP-18 (10× 250 mm)	Κινητή φάση 60% MeOH σε 50 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών	N/A

Ref.	Matrix	Quantif. strategy	IS	Sample amount	Oxid. Time (h)	[$KMnO_4$]	[$NaIO_4$]	pH	Termination	SPE conditions	Instrumental Analysis	Analytical Column	Analytical conditions	LoD
[54]	Δείγματα αίματος	MC-LR Spikes	N/A	N/A	3	0.02 M	0.02 M	9	0.5–1.5 g $NaHSO_3$	3M Empore SDB-XC 7 mm/3 mL	GC/MS	Rtx-5MS (0.25mm coating, 0.25mm i.d. 30m)	N/A	5 ng g^{-1}
[55]	Συκώτι αρουραίου ή κοτόπουλου	In situ oxidized MC-LR matrix matched καμπύλη βαθμονόμησης	4-PB (6 μg)	1 g υγρό βάρος	3	0.02 M	0.02 M	9	0.5–1.5 g $NaHSO_3$	SDB-XC cartridge Έκλουση με 100% MeOH	LC-MS	Inertsil ODS-3 (5m, 4.6 x 50 mm)	Gradient 40–70% B (95% MeOH/5%ddH2O/0.05% HOAc)	5 ng g^{-1}
[56]	Ανθρώπινος ορός και συκώτι	MC-LR Spikes	N/A	N/A	3	0.02 M	0.02 M	9	0.5–1.5 g $NaHSO_3$	Empore SDB-XC 7 mm Έκλουση με70% MeOH	GC-MS	Rtx-5MS (0.25mm coating, 0.25mm i.d. 30m)	Τα δείγματα ξηράνθηκαν με ρεύμα αέρα ή αερίου αζώτου και ανασυστάθηκαν σε εξάνιο	16 pg
[57]	Ανθρώπινος Ορός	Matrix matched καμπύλη βαθμονόμησης MMPB spiked πριν την SPE	4-PB	0.4–1.0 mL	3	0.02 M	0.02 M	9	0.5–1.5 g $NaHSO_3$	Empore SDB-XC 7 mm Έκλουση με 70% MeOH	LC/MS	Symmetry C8 (3.5 μm, 2.1 100 mm)	Κινητές φάσεις από ACN/0.05% TFA και υπερκάθαρο νερό/0.05% TFA Gradient 10-60% οργανικό	0.16 ng/mL
[58]	Μύδια ζέβρας	Spike με MC-LR και σχεδίαση της καμπύλης βαθμονόμησης ως συγκέντρωση MC-LR έναντι	N/A	N/A	overnight	0.1 M	0.4 M	9	1 M H_2SO_4	Supelco C18	LC–MS	N/A	N/A	N/A

Ref.	Matrix	Quantif. strategy	IS	Sample amount	Oxid. Time (h)	[$KMnO_4$]	[$NaIO_4$]	pH	Termination	SPE conditions	Instrumental Analysis	Analytical Column	Analytical conditions	LoD
		απόκρισης MRM												
[59]	Λυοφιλοποιημένα ιζήματα	Τυπική καμπύλη βαθμονόμησης MMPB	d3-MMPB	ΟΖΟΝΟΛΥΣΗ						ODS Έκλουση με 90% MeOH-H_2O	EI-GC/MS	DB-17 (30 m × 0.25 mm, 0.25 mm)	Μετατροπή σε μεθυλεστέρα χρησιμοποιώντας διάλυμα BF3- MeOH 14%	0.1 mg/g
[60]	Blue-green algae	Τυπική καμπύλη βαθμονόμησης MMPB	4-PB (0.01 - 0.1 mmol)	0.2-1 mg	4	0.024 M	0.02 M	N/A	20% $NaHSO_3$	No SPE	GC-FID	HP- 1 capillary (0.32 mm x 25 m)	Μετατροπή σε μεθυλεστέρα χρησιμοποιώντας διάλυμα BF3- MeOH 14%	N/A
ΜΕΛΕΤΕΣ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΥΝΘΗΚΩΝ														

Πίνακας 5: *Βιβλιογραφική ανασκόπηση με συγκρίσεις της μεθόδου MMPB με άλλες τεχνικές προσδιορισμού μικροκυστινών.*

Βιβλιογραφική αναφορά	Υπόστρωμα - Matrix	Τεχνικές προσδιορισμού MCs	Συμπεράσματα
[36]	**ΜΥΣ ΨΑΡΙΟΥ**	**ELISA-MMPB**	**Οι εξωκυτταρικές MCs με MMPB εντοπίστηκαν σε LOD χαμηλότερο από εκείνου της ELISA**
[37]	**ΙΣΤΟΙ ΣΚΥΛΟΥ**	**ELISA-MMPB**	**Χρήση MMPB λόγω καλύτερης ανίχνευσης των συζευγμένων Adda MCs με μικρό LOD**
[38]	**ΣΥΚΩΤΙ ΔΕΛΦΙΝΙΟΥ**	**LC-MS/MS-ELISA-MMPB**	**Η ανάλυση με ELISA αποδείχθηκε αναξιόπιστη για τον εντοπισμό των MCs/NODs για το συγκεκριμένο υπόστρωμα**
[43]	**ΙΣΤΟΙ-ΣΥΚΩΤΙ ΨΑΡΙΟΥ**	**LC-MS/MS-ELISA-MMPB**	**Η μέθοδος MMPB είχε ως αποτέλεσμα χαμηλότερα όρια ανίχνευσης και μπορεί να αντιπροσωπεύει καλύτερα τα συνολικά MC / NODS (μεταβολισμένα και μη) σε δείγμα ψαριού.**
[30]	**ΝΕΡΟ**	**LC-MS/MS-ELISA-MMPB**	**Οι συγκεντρώσεις με MMPB ήταν τούλαχιστον 5 φορές μεγαλύτερες από εκείνες που μετρήθηκαν με ELISA**

[33]	**ΝΕΡΟ**	**LC-MS/MS-ELISA-MMPB**	**Η μέθοδος MMPB απέδειξε υπερτίμηση στις μετρήσεις με ELISA**
[47]	**ΙΣΤΟΙ ΨΑΡΙΟΥ**	**PPIA-MMPB**	**Μεγαλύτερες συγκεντρώσεις με την μέθοδο MMPB**
[54]	**ΑΙΜΑ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**	**ELISA-MMPB**	**8-51% χαμηλότερες συγκεντρώσεις MCs με την μέθοδο ELISA**

Μέσω της βιβλιογραφικής ανασκόπησης παρατηρούμε ότι οι μέλετες που χρησιμοποιούν την μέθοδο MMPB σε δείγματα νερού είναι συνολικά 10 ,εκ των οποίων στις 9 από αυτές χρησιμοποιείται η οξείδωση Lemieux και σε 1 γίνεται χρήση της μεθόδου οζονόλυσης. Επίσης από αυτές τις μελέτες μόνο στις 3 τα δείγματα αναλύθηκαν με LC-MS/MS ,ενώ παρόλο που σε 6 από αυτές έγινε χρήση της τεχνικής στερεάς εκχύλισης μόνο σε 1 έγινε απευθείας αναλύση στο δείγμα νερού με χρήση οργανολογίας On-line SPE – UHPLC–MS/MS ,χωρίς περαιτέρω προκατεργασία του δείγματος. [29] Τέλος αξίζει να αναφερθεί ότι από αυτές τις μελέτες μόνο σε μια έγινε αναφορά για την τελική ανάκτηση (35%) του MMPB [32] , ενώ σε μια μελέτη γίνεται αναφορά για την πιστότητα της μεθόδου , όπου αναλύονται τα ίδια δείγματα μετά απο 6 μήνες με %RSD<10%. [29]

Κεφάλαιο 2^{ο} : ΤΕΧΝΙΚΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ

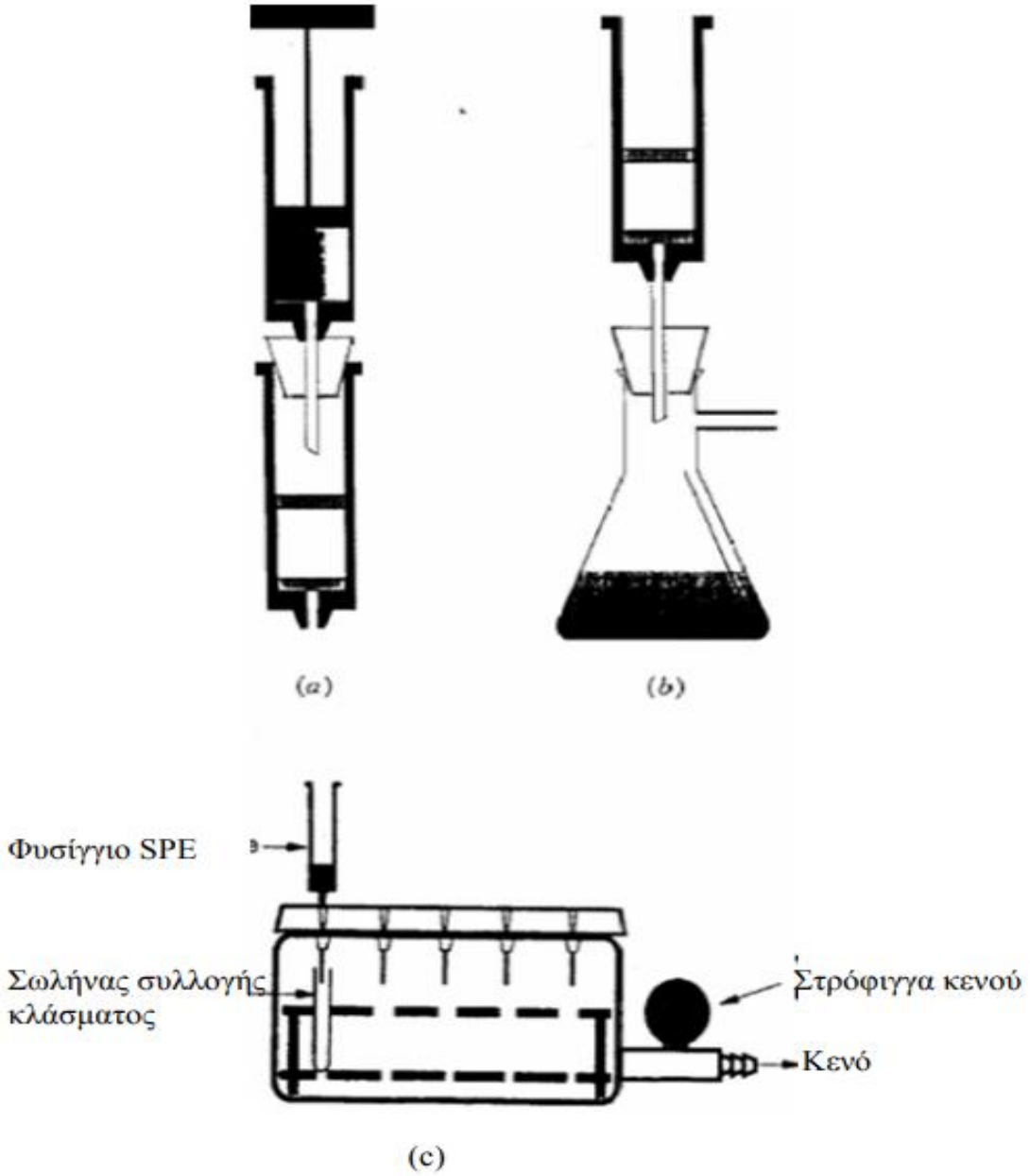
2.1 Προκατεργασία δείγματος

Η προκατεργασία δείγματος είναι βασικό τμήμα των προσδιορισμών οργανικών ρύπων με υγροχρωματογραφία (LC) και αποσκοπεί στην παραλαβή ενός εμπλουτισμένου, ομογενούς και αναπαραγώγιμου διαλύματος κατάλληλο για έγχυση στη χρωματογραφική στήλη. Η προκατεργασία του δείγματος ξεκινάει με τη συλλογή του δείγματος και επεκτείνεται μέχρι την έγχυση του στο χρωματογραφικό σύστημα.

Στην παρούσα εργασία η προκατεργασία δείγματος γίνεται με την τεχνική της εκχύλισης στερεάς φάσης (solid phase extraction, SPE) και είναι απαραίτητη για τους εξής λόγους. Πρώτον, γίνεται προσυγκέντρωση του υδατικού δείγματος, προκειμένου να αυξηθεί η ευαισθησία της μεθόδου. Δεύτερον για να παραλάβουμε ένα κλάσμα απαλλαγμένο από παρεμποδίζουσες ουσίες, ακίνδυνο για τη στήλη και συμβατό με την κινητή φάση της LC, δηλαδή ο διαλύτης να αναμιγνύεται με την κινητή φάση χωρίς να επηρεάζει την κατακράτηση ή τη διαχωριστικότητα των συστατικών του δείγματος. Τρίτον με την SPE επιλύονται πολλά προβλήματα της υγρής / υγρής εκχύλισης, όπως ο ατελής διαχωρισμός φάσεων, η μη ποσοτική ανάκτηση των διαχωριζόμενων ουσιών και η χρήση ακριβού και εύθραυστου εξοπλισμού (διαχωριστικές χοάνες). [61]

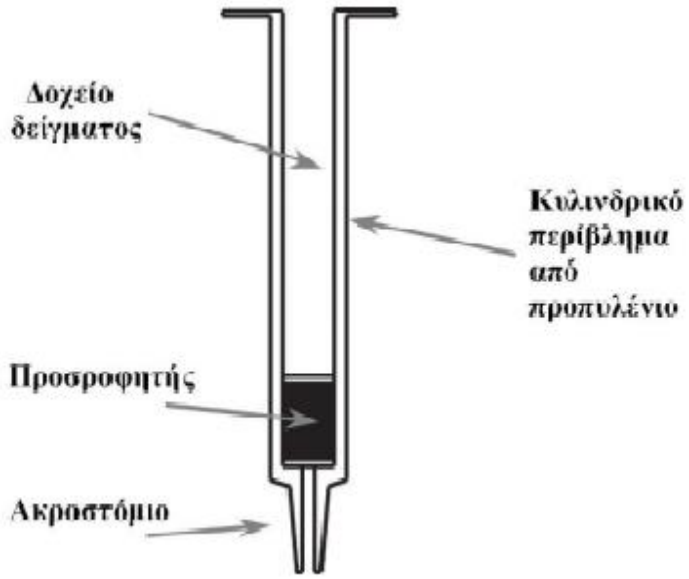
2.2 Οργανολογία τεχνικής εκχύλισης στερεάς φάσης

Η βαρύτητα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως κινητήριος δύναμη αλλά η ροή μέσω των φυσιγγίων είναι εξαιρετικά αργή και γι' αυτό πρακτικά ανεφάρμοστη. Έτσι, απαιτείται μια βασική υποδομή με χρήση ειδικών διατάξεων με εφαρμογή πίεσης ή κενού,όπως φαίνεται παρακάτω.



Εικόνα 11: *Σχηματικό διάγραμμα οργανολογίας SPE. (a) Εφαρμογή πίεσης με σύριγγα στο φυσίγγιο. (b) Χρήση κενού για μεμονωμένο φυσίγγιο. (c) Διάταξη κενού για πολλαπλά φυσίγγια*[61]

Το προσροφητικό υλικό που χρησιμοποιείται στην εκχύλιση στερεάς φάσεως είναι ακινητοποιημένο σε μικροστήλες- φυσίγγια ή σε δίσκους εκχύλισης. Οι μικροστήλες SPE μοιάζουν με σύριγγες που στο κάτω μέρος (πριν το ακροστόμιο) περιέχουν ένα στρώμα πληρωτικού υλικού (προσροφητής) και προτιμώνται σε σύγκριση με τους δίσκους εκχύλισης λόγω της δυνατότητας αυτοματοποίησης με την ταυτόχρονη εκχύλιση δέκα και πλέον δειγμάτων χρησιμοποιώντας πολύ μικρούς όγκους.



***Εικόνα 12**: Διάταξη μικροστήλης SPE[61]*

2.3 Υλικά πλήρωσης τεχνικής στερεάς εκχύλισης

Η κατακράτηση των ουσιών από τα υλικά πλήρωσης είναι βασικότερο στάδιο της SPE. Οι δυνάμεις που αναπτύσσονται κατά τις μη πολικές αλληλεπιδράσεις (non-polar interaction) είναι κυρίως οι δυνάμεις Van der Waals ή διασποράς. Το υλικό πλήρωσης είναι μη πολικό όπως και οι ουσίες που κατακρατούνται, ενώ ο διαλύτης που τις περιέχει είναι πολικός. Γενικά οι μη πολικές κατακρατήσεις είναι λιγότερο εκλεκτικές από τις πολικές και εκείνες της ιονανταλλαγής.

Κατά τις πολικές κατακρατήσεις (polar extraction) αναπτύσσονται δεσμοί υδρογόνου, αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου, π-π δεσμοί καθώς και μία ποικιλία αλληλεπιδράσεων κατά την οποία έχουμε κατανομή ηλεκτρονίων ανάμεσα στις χαρακτηριστικές ομάδες των ατόμων, προκαλώντας θετική και αρνητική πολικότητα. Στις πολικές κατακρατήσεις το υλικό πλήρωσης είναι πολικό όπως και οι ουσίες που κατακρατούνται, ενώ ο διαλύτης που τις περιέχει είναι μη πολικός.

Στην περίπτωση της ιονανταλλαγής (ion exchange) οι δυνάμεις που αναπτύσσονται είναι ιοντικές. Οι αλληλεπιδράσεις δημιουργούνται μεταξύ μίας ουσίας που έχει ένα φορτίο (θετικό ή αρνητικό) και του υλικού πλήρωσης που έχει φορτίο αντίθετο από αυτό της ουσίας. Σημαντικό ρόλο στη κατακράτηση παίζει το pH και η ιοντική ισχύς. Η ιονανταλλαγή χωρίζεται σε δύο κατηγορίες: την ανιονανταλλαγή και την κατιονανταλλαγή.

Τα υλικά πλήρωσης που χρησιμοποιούνται ευρέως στην τεχνική στερεάς εκχύλισης είναι: πυριτία (silica, SiO_2), αργίλια (alumina, Al_2O_3), πυριτικά άλατα μαγνησίου , άνθρακας σε μορφή γραφίτη (carbon) καθώς και υδρογονανθρακικές δομές χημικά συνδεδεμένες σε πυριτία (bonded silica). Για αρκετά χρόνια ως υλικό πλήρωσης χρησιμοποιούνταν κυρίως οι υδρογονανθρακικές δομές που είναι χημικά συνδεδεμένες σε πυριτία (bonded silica). Αυτή η κατηγορία έχει μεγάλη ποικιλία ειδών με κύριους εκπροσώπους τους τα C_8 και C_{18}. Ωστόσο υπάρχουν και κάποια μειονεκτήματα, με κυριότερα το μικρό εύρος τιμών pH (pH 2-9) και την παρουσία υπολειμμάτων από ομάδες σιλανόλης. Επόμενη κατηγορία υλικών πλήρωσης είναι τα υλικά που βασίζονται στα πολυμερή, όπως Oasis HLB. Τα πολυμερή αποδίδουν σε όλο το εύρος τιμών pH (1- 14) και μπορούν να αντέξουν διαλύτες και ρυθμιστικά διαλύματα τα οποία βλάπτουν ή καταστρέφουν τα υλικά πλήρωσης βασισμένα σε πυριτία. Επίσης είναι σφαιρικά (εν αντιθέσει με τις υδρογονανθρακικές δομές σε πυριτία οι οποίες είναι ευθύγραμμες) με αποτέλεσμα να έχουν μεγαλύτερη επιφάνεια επαφής και επομένως μεγαλύτερη χωρητικότητα αναλύτη. Ακόμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό βασικών, ουδέτερων και όξινων ουσιών λόγω του ότι παρουσιάζουν ταυτόχρονα υδροφοβικό και υδροφιλικό χαρακτήρα.

Ένα ακόμα σημαντικό πλεονέκτημά τους είναι και το γεγονός ότι μπορεί να στεγνώσουν σε οποιοδήποτε από τα τέσσερα βήματα της SPE χωρίς να επηρεαστεί η ανάκτηση του αναλύτη και η αναπαραγωγιμότητα. [62], [63]

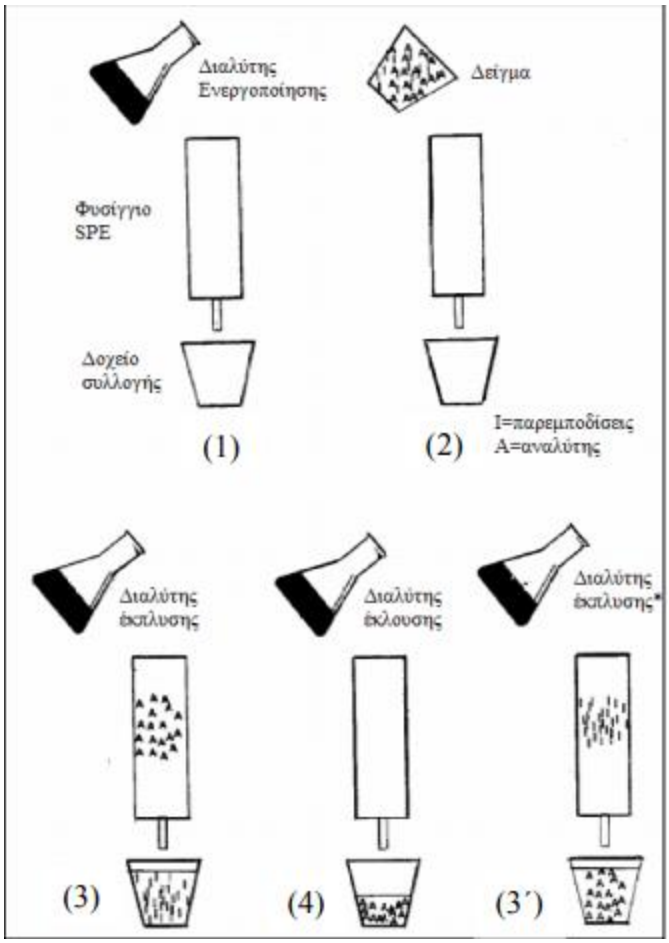
Γενικά υπάρχει μεγάλη ποικιλία πληρωτικών υλικών και η επιλογή του κατάλληλου τύπου προσροφητικού υλικού στην τεχνική στερεάς εκχύλισης γίνεται ανάλογα με:

- *Φύση αναλυτών*
- *Φύση υποστρώματος*
- *Απαιτούμενος βαθμός καθαρότητας*

2.4 Εφαρμογή τεχνικής εκχύλισης στερεάς φάσης

Η όλη διαδικασία της εκχύλισης στερεάς φάσης περιλαμβάνει τα παρακάτω τέσσερα στάδια: [64], [65]

1. Ενεργοποίηση του προσροφητικού υλικού, ώστε να δημιουργηθεί το κατάλληλο περιβάλλον για την ανάπτυξη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του προσροφητικού υλικού και του αναλύτη. Για την ενεργοποίηση του προσροφητικού υλικού χρησιμοποιούνται μικροί όγκοι διαλύτη ενεργοποίησης, που είναι συνήθως μεθανόλη (MeOH) και στην συνέχεια προστίθεται διαλύτης ίδιος με αυτόν που περιέχεται το δείγμα.
2. Κατά το στάδιο αυτό το δείγμα περνάει μέσα από το φυσίγγιο ώστε να κατακρατηθεί ο αναλύτης από το προσροφητικό υλικό. Ο όγκος του δείγματος πρέπει να σχετίζεται με την χωρητικότητα του προσροφητικού υλικού. Σημαντικό ρόλο σε αυτό το στάδιο παίζει και η ταχύτητα ροής.
3. Έκπλυση του φυσιγγίου που αποσκοπεί στην απομάκρυνση των παρεμποδίζουσων ουσιών που έχουν κατακρατηθεί, εκπλένοντας το φυσίγγιο με ένα διαλύτη μέσης ισχύος, χωρίς την ταυτόχρονη έκλουση μέρους του αναλύτη. Συνήθως, χρησιμοποιείται νερό.
4. Έκλουση του αναλύτη που στόχος αυτού του σταδίου είναι η ποσοτική παραλαβή του αναλύτη με όσο το δυνατόν μικρότερο όγκο. Η ταχύτητα ροής πρέπει να είναι σχετικά μικρή ώστε να είναι αποτελεσματική η έκλουση. Ο διαλύτης έκλουσης είναι συνήθως ένα ισχυρό εκλουστικό μέσο.



Εικόνα 13: *Σχηματικό διάγραμμα εκχύλισης στερεάς φάσης* [61]

Κεφάλαιο 3ο : ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

3.1 Εισαγωγή

Στην υγρή χρωματογραφία στήλης (LC) η στατική φάση είναι στερεό πορώδες υλικό ή υγρό καθηλωμένο σε στερεό υπόστρωμα, που βρίσκεται συσκευασμένο σε στήλη , ενώ η κινητή φάση είναι υγρό. Η διαβίβαση της υγρής κινητής φάσης μέσα στην στατική φάση πετυχαίνεται λόγω βαρύτητας ή με χρήση αντλιών χαμηλής πιέσεως , όταν η στατική φάση αποτελείται από σχετικώς μεγάλης διαμέτρου σωματίδια , που παρουσιάζουν μικρή αντίσταση, είτε με την χρήση αντλιών υψηλής πιέσεως , όταν η στατική φάση αποτελείται από πολύ μικρής διαμέτρου σωματίδια υψηλής διαχωριστικής αποδόσεως .

Η LC είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για τον διαχωρισμό και την ανάλυση μειγμάτων μοριακών ή ιοντικών ενώσεων με χαμηλές τάσεις ατμών, καθώς και θερμικά ασταθών ενώσεων, που δεν μπορούν να εξαερωθούν χωρίς να διασπαστούν.

Οι χρωματογραφικοί μηχανισμοί διαχωρισμού , που λαμβάνουν χώρα στην υγρή χρωματογραφία στήλης και με βάση τους οποίους μπορούν να ταξινομηθούν τα διάφορα είδη χρωματογραφίας είναι η προσρόφηση, η κατανομή, η ιονταλλαγή , ο μοριακός αποκλεισμός και η συγγένεια. [66]

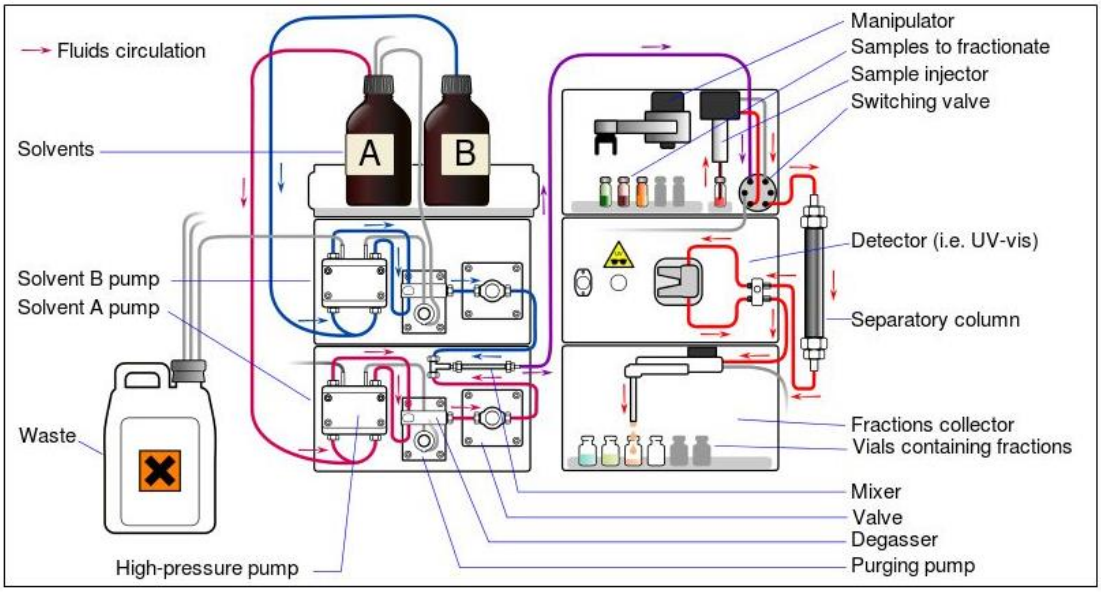
3.2 Οργανολογία υγρής χρωματογραφίας

Μια συσκεύη υγρής χρωματογραφίας αποτελείται από 5 βασικά τμήματα :

1. **Σύστημα παροχής κινητής φάσεως** , που αποτελείται από μια αντλία υψηλής πιέσεως και συνήθως ένα σύστημα για την βαθμιαία αλλαγή της συστάσεως της κινητής φάσεως. Σε αντίθεση με την ισοκρατική έκλουση ,στην οποία η κινητή φάση έχει σταθερή σύσταση, στη βαθμιδωτή έκλουση (gradient elution) η σύσταση της κινητής φάσεως μεταβάλλεται βαθμιαία ή κατά τακτά χρονικά διαστήματα με βάση διάφορα προγράμματα. Για την επίτευξη αυτής της έκλουσης απαιτείται μονάδα προγραμματισμού και ελέγχου του συστήματος παροχής, που συνήθως ελέγχεται από μικρουπολογιστή. Τα δοχεία αποθηκεύσεως διαλυτών πληρώνονται με διαλύτες διαφορετικής πολικότητας (με την προυπόθεση ότι είναι αναμείξιμοι) ή διαλύματα διαφορετικού pH ή διαφορετικής ιοντικής ισχύος ή συγκέντρωσεις κάποιου άλατος και αναμειγνύονται στο θάλαμο αναμείξεως πριν την προωθησή τους από την αντλία. Οι διαλύτες θα πρέπει να είναι καθαροί και να απαερώνονται. Επειδή κατά την λειτουργία της αντλίας δημιουργούνται παλμοί ροής που διαταράσσουν τη σταθερότητα του χρωματογραφήματος, παρεμβάλλεται μια συσκευή αποσβέσεως των παλμών για την εξομάλυνση του καταγραφήματος.
2. **Σύστημα εισαγωγής δείγματος (injector) ,** που αποτελείται από ένα ακίνητο χαλύβδινο κύλινδρο με 6 διαύλους, από τους οποίους ο ένας οδηγεί στην στήλη.Μέσα στο χαλύβδινο κύλινδρο υπάρχει ένας κινητός κύλινδρος από Teflon, ο οποίος διαθέτει τρεις αύλακες , ο καθένας από τους οποίους συνδέει ένα ζευγάρι διαύλων. Στη θέση φορτώσεως η κινητή φάση προωθείται προς τη στήλη, ενώ με την βοήθεια σύριγγας πληρώνεται ο βρόχος δείγματος με το προς ανάλυση διάλυμα του δείγματος. Ακολούθως ο δακτύλιος του Teflon στρέφεται κατά 30^{o} (θέση εισαγωγής), οπότε η κινητή φάση παρασύρει ποσοτικά τον όγκο του δείγματος και τον προωθεί προς την στήλη. Με το σύστημα αυτό δείγματα όγκου λίγων μL εισάγονται με ακρίβεια και επαναληπτικότητα σε πιέσεις μέχρι και 41 MPa .
3. **Στήλες ,** που είναι ευθύγραμμοι σωλήνες από χάλυβα και αγοράζονται συνήθως έτοιμες από παρασκευαστικές εταιρείες , καθώς η πληρωσή τους είναι πολύ δύσκολο να γίνει από τον αναλυτή.
4. **Ανιχνευτής ,** που κάνει ορατό το διαχωρισμό που γίνεται στην στήλη και επιτρέπει την αξιοποίηση του στην ανάλυση. Ένας ιδανικός ανιχνευτής θα πρέπει να έχει τα εξής χαρακτηριστικά : 1) Να αποκρίνεται σε όλα τα συστατικά του μείγματος ή να έχει γνωστή εκλεκτικότητα αποκρίσεως , 2) Να επιτρέπει χαμηλά όρια ανιχνεύσεως, στην περιοχή των ng-μg , 3) Να μην αποκρίνεται στην κινητή φάση , 4) Να παρέχει απόκριση στην περιοχή συγκεντρώσεων των διαχωριζόμενων συστατικών , 5) Να μην επηρεάζεται από μεταβολές της θερμοκρασίας και της ταχύτητας ροής του υγρού

εκλούσεως , 6) Να έχει αμελητέο νεκρό όγκο, ώστε να μην συμμέτεχει στην διεύρυνση της ζώνης κάθε συστατικού και κατά συνέπεια της κορυφής του. Οι κυριότεροι ανιχνευτές υγρής χρωματογραφίας είναι ο διαφορικός ανιχνευτής δείκτη διαθλάσεως, ο ανιχνευτής υπεριώδους-ορατού, ο ανιχνευτής φθορισμού , ο ανιχνευτής υπέρυθρου , ο αμπερομετρικός ανιχνευτής και το φασματόμετρο μαζών .

5. **Καταγραφέας ,** που αποτελεί το φθηνότερο και απλούστερο τρόπο παρουσιάσεως του χρωματογραφήματος και πρέπει να χαρακτηρίζεται από ταχεία απόκριση και να έχει τη δυνατότητα επιλογής ενισχύσεως του σήματος. [66]



***Εικόνα 14**: Οργανολογία υγρής χρωματογραφίας [66]*

Κεφάλαιο 4ο : ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ

4.1 Εισαγωγή

Η φασματομετρία μαζών (Mass Spectrometry, MS) είναι ίσως η τεχνική που μπορεί να βρει την μεγαλύτερη ποικιλία εφαρμογών, σε σχέση με τις άλλες αναλυτικές τεχνικές που είναι διαθέσιμες. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι η τεχνική αυτή μας παρέχει πληροφορίες σχετικά με: 1) τη στοιχειακή σύσταση του εξεταζόμενου δείγματος, 2) τις δομές ανόργανων, οργανικών και βιολογικών μορίων, 3) την ποιοτική και ποσοτική σύσταση σύνθετων μιγμάτων, 4) τη δομή και σύσταση στερεών επιφανειών και 5) την αναλογία ισοτόπων ατόμων σε δείγματα.

Η φασματομετρία μάζας βασίζεται στον ιοντισμό των μορίων και την παραγωγή μοριακών και/ή θυγατρικών ιόντων, τον διαχωρισμό των μαζών των ιόντων σύμφωνα με τον λόγο μάζας m προς το φορτίο τους z με την βοήθεια κατάλληλης διάταξης και τέλος την καταγραφή της σχετικής έντασης του ιονικού ρεύματος και την εύρεση της αντιστοιχίας των μαζών των λαμβανομένων ιόντων με την δομή της πρόδρομης ένωσης. Το φάσμα μαζών που λαμβάνεται από ένα φασματογράφο μαζών είναι η γραφική απεικόνιση της έντασης των ιόντων συναρτήσει του λόγου τους m/z. Οι κορυφές μαζών αντιστοιχούν σε συγκεκριμένο m/z ενώ το ύψος τους εκφράζει το σχετικό ποσοστό του ιόντος σε σχέση με τα υπόλοιπα ιόντα που παράγονται κατά τον ιοντισμό. Η κορυφή με την μεγαλύτερη ένταση καλείται βασική κορυφή (base peak). Το φάσμα κανονικοποιείται σε σχέση με την ένταση της βασικής κορυφής η οποία παρουσιάζεται με ένταση 100% και συνεπώς καταγράφεται το φάσμα των σχετικών εντάσεων. Με τον ιοντισμό του μορίου και ανάλογα με την μέθοδο ιοντισμού παράγεται το μητρικό ή μοριακό ιόν και άλλα ιόντα – θραύσματα τα οποία δημιουργούνται από την διάσπαση του μοριακού ιόντος με διάφορους μηχανισμούς που είναι χαρακτηριστικοί της αναλυόμενης ένωσης και επιτρέπουν την ταυτοποίηση της. Η έκταση με την οποία λαμβάνει χώρα η θραυσματοποίηση εξαρτάται από την ποσότητα της ενέργειας που προσδίδεται από την πηγή ιοντισμού στην ένωση και από την δομή της.

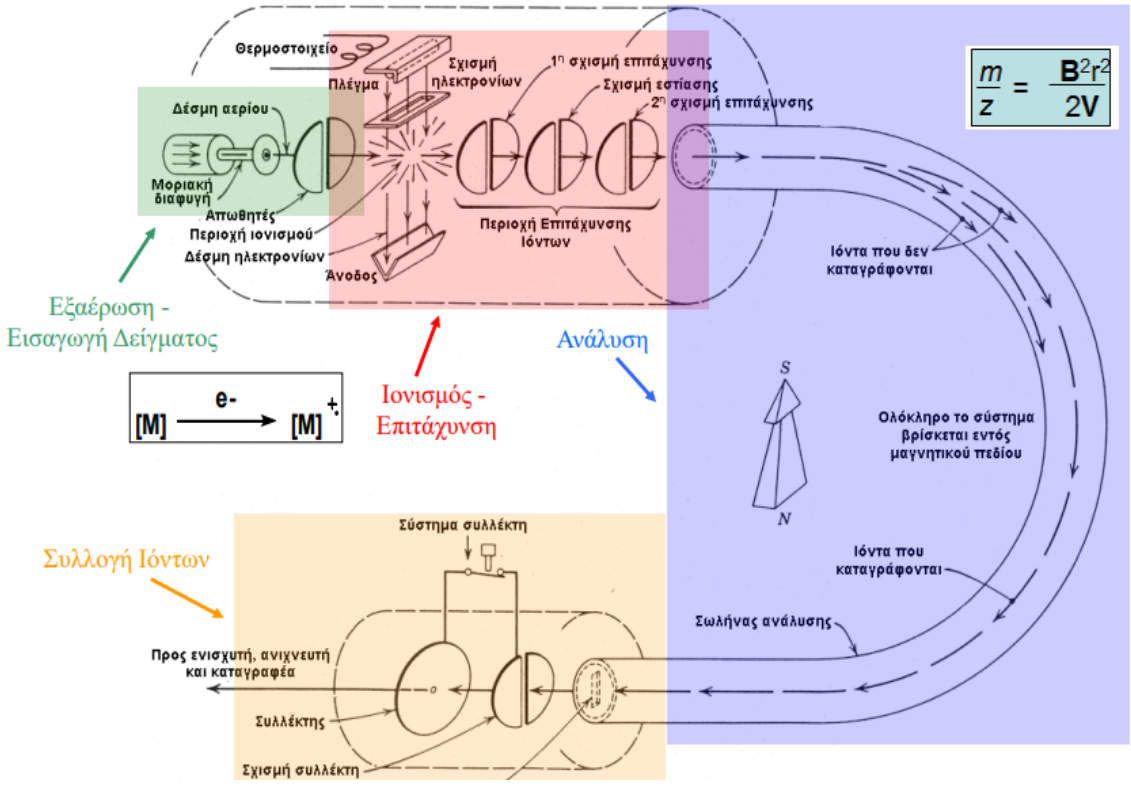
Τα πλεονεκτήματα της φασματομετρίας μαζών όπως η μεγάλη εκλεκτικότητα, η δυνατότητα χρήσης της ως ένας καθολικός ανιχνευτής (απόκριση σε όλες τις ενώσεις ανεξάρτητα της δομής τους), και η πολύ υψηλή ευαισθησία της σε συνδυασμό με την εξέλιξη της μικροηλεκτρονικής και των συστημάτων σύζευξης με αέρια και υγρή χρωματογραφία (συνδυάζοντας έτσι την μεγάλη διαχωριστική ικανότητα των χρωματογραφικών μεθόδων με την σημαντική ικανότητα ταυτοποίησης και προσδιορισμού της ένωσης) την καθιστούν μία τεχνολογία αιχμής στην χημικά ανάλυση με ικανότητα προσδιορισμού συγκεντρώσεων σε πολύ χαμηλά επίπεδα. [67]

4.2 Οργανολογία φασματόμετρων μαζών

Ο φασματογράφος μαζών αποτελείται από τα ακόλουθα βασικά τμήματα:

1. *Σύστημα εισαγωγής δείγματος*
2. *Πηγή ιόντων*
3. *Αναλυτής μαζών*
4. *Ανιχνευτής ιόντων*

Εκτός από αύτα τα τμήματα κάθε φασματόμετρο μαζών περιλαμβάνει συστήματα δημιουργίας υψηλού κενού, καθώς και συστήματα παρουσιάσεως των φασμάτων όπως καταγραφείς και παλμογράφους. Τα σύγχρονα φασματόμετρα μαζών περιλαμβάνουν ηλεκτρονικό υπολογιστή, τόσο για τον κεντρικό έλεγχο της λειτουργίας τους , όσο και για την ταχεία επεξεργασία , παρουσίαση και ερμηνεία του φάσματος.



***Εικόνα 15**: Λειτουργία φασματομέτρου μάζας [67]*

Στη συνέχεια αναλύονται τα επιμέρους τμήματα του φασματογράφου μαζών.

1. Το σύστημα εισαγωγής δείγματος χρησιμοποιείται για την εισαγωγή ενός αντιπροσωπευτικού δείγματος στην πηγή ιόντων με ελάχιστη απώλεια κενού. Η εισαγωγή του δείγματος με υγρή χρωματογραφία απαιτεί την παρουσία ενός διασυνδετή (interface) της εξόδου της αναλυτικής στήλης με την πηγή ιόντων προκειμένου ο ιονισμός να γίνει στην υγρή ή στην αέρια φάση ανάλογα με τον τύπο της πηγής ιόντων. Οι πιο σημαντικές παράμετροι σε αυτά τα συστήματα εισαγωγής είναι η ροή της κινητής φάσης, η θερμοκρασία που εφαρμόζεται και το αέριο εκνέφωσης.
2. Ο σχηματισμός των ιόντων του αέριου αναλύτη αποτελεί καθοριστική διαδικασία για τους στόχους της μέτρησης και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Η μορφή του φάσματος μαζών μίας ουσίας εξαρτάται πάρα πολύ από την τεχνική παραγωγής ιόντων. Οι πηγές ιόντων χωρίζονται σε δύο πολύ μεγάλες κατηγορίες: α. τις πηγές αέριας φάσης (gas-phase sources) όπου το δείγμα πρώτα εξαερώνεται και μετά ιοντίζεται και β. τις πηγές εκρόφησης (desorption sources) όπου το δείγμα από στερεή ή υγρή κατάσταση μετατρέπεται απευθείας σε αεριώδη ιόντα. Αναλυτικότερα οι πηγές ιόντων είναι οι εξής :
    - Χημικός Ιοντισμός (CI)
    - Πρόσκρουσης Ηλεκτρονίων (EI)
    - Ιοντισμός σε ατμοσφαιρική πίεση με ηλεκτροψεκασμό (ESI)
    - Χημικός ιοντισμός υπό ατμοσφαιρική πίεση (APCI)
    - Φασματομετρία μαζών δευτερογενούς ιόντος (SIMS)
    - Φωτοϊοντισμός (PI)

    Συγκεκριμένα στην παρούσα εργασία γίνεται χρήση του ESI που αποτελεί μια από της σημαντικότερες τεχνικές για μετρήσεις βιομορίων όπως πολυπεπτίδια, πρωτεΐνες και ολιγονουκλεοτίδια με μοριακά βάρη ≥100.000 Da. Ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI) είναι ήπιος τρόπος ιοντισμού που μετατρέπει τα ιόντα που υπάρχουν στην υγρή φάση σε ιόντα αέριας φάσεως. Η συγκεκριμένη τεχνική μπορεί να παράγει πολλαπλώς φορτισμένα ιόντα. Συνεπώς το m/z ενώσεων μεγάλου μοριακού βάρους γίνεται μικρότερο με αποτέλεσμα να είναι μέσα στο εύρος μαζών που μπορεί να μετρήσει ο αναλυτής μαζών. Η διαφορά δυναμικού που εφαρμόζεται στο ακροφύσιο του ESI βοηθάει στην αντιστάθμιση των διαφόρων ειδικών αγωγιμοτήτων που παρουσιάζουν οι κινητές φάσεις και σταθεροποιεί τη γραμμή βάσεως του χρωματογραφήματος κατά την βαθμιδωτή έκλουση. Το αέριο άζωτο είναι το αέριο εκνέφωσης που βοηθάει στην απομάκρυνση του εκάστοτε διαλύτη. Στον αισθητήρα του ESI εισάγονται δύο αέρια. Το αέριο εκνέφωσης (sheath gas) και το αέριο ξήρανσης ή βοηθητικό αέριο

(auxillary gas). Το πρώτο διαρρέει το κεντρικό τμήμα του ακροφυσίου αλλά εξωτερικά από τη βελόνα. Το δείγμα έρχεται σε επαφή με το αέριο στο άκρο - τέρμα της μεταλλικής βελόνας. Το δεύτερο αέριο ρέει στον εξωτερικό δακτύλιο του ακροφυσίου σε πορείες πάντα παράλληλες προς το επίπεδό του. Ο ιοντισμός με ESI πραγματοποιείται σε ατμοσφαιρική πίεση και θερμοκρασία. Το υγρό διάλυμα του περιέχει τους αναλύτες διέρχεται μέσα από μία ανοξείδωτη τριχοειδή βελόνα (ακροφύσιο) στην οποία εφαρμόζεται υψηλό δυναμικό (3-5 kV). Το υγρό ψεκάζεται από την άκρη της βελόνας. Ο ψεκασμός υποβοηθείται από έναν εξωτερικό σωλήνα (εκνεφωτή) που διαβιβάζει αέριο, το αέριο εκνέφωσης. Η υψηλή τάση που εφαρμόζεται προκαλεί τα ιόντα όμοιας πολικότητας να έρθουν στην υγρή φάση και έτσι σχηματίζονται φορτισμένα σταγονίδια (αερόλυμα) που αποτελούνται από ιόντα και των δύο πολικοτήτων, αλλά κυρίως ιόντα της ίδια πολικότητας με αυτή της τάσης. Στη συνέχεια γίνεται απομάκρυνση του διαλύτη με την βοήθεια του αερίου ξήρανσης και αυτό προκαλεί την εμφάνιση των φορτισμένων μορίων του αναλύτη τα οποία εισέρχονται στην συνέχεια στον κώνο εισαγωγής του φασματόμετρου μαζών. [67]

3. Ο τετραπολικός αναλυτής μαζών είναι ένας ιδανικός ανιχνευτής για τη χρωματογραφία εφόσον επιτρέπει γρήγορη σάρωση ακόμη και σε χαμηλά δυναμικά λαμβάνοντας υπόψη τις υψηλές πιέσεις που ασκούνται στο LC-MS. Το τετράπολο ανήκει στην κατηγορία των συσκευών με χαμηλή διακριτική ικανότητα (1 amu), δηλαδή μπορεί να μετρήσει το m/z ενός ιόντος στην κοντινότερη ακέραιη τιμή και να δώσει πληροφορίες για τη στοιχειακή του σύνθεση. Το ένα ζεύγος των ράβδων τροφοδοτείται με θετική τάση συνεχούς ρεύματος (+DC) και το άλλο με αρνητική (-DC) , ενώ εφαρμόζεται και εναλλασσόμενη τάση ραδιοσυχνοτήτων (RF) με διαφορά φάσης 180^{o} μεταξύ των δύο ζευγών. Έτσι δημιουργείται ένα ταλαντευόμενο ηλεκτρικό πεδίο στο χώρο μεταξύ των ράβδων. Λόγω της εφαρμογής ενός χαμηλού δυναμικού (10-20 V) η δέσμη των ιόντων που εισέρχονται στο τετράπολο κινούνται κατά μήκος των αξόνων, με τροχιά σαν τρισδιάστατο κύμα. Ο διαχωρισμός των μαζών επιτυγχάνεται με τη μεταβολή της τάσης στις ράβδους (σάρωση 0 - ±250 V DC, 0 - ±1500 V RF) ενώ ο λόγος RF/DC διατηρείται σταθερός (~6). Σε δεδομένες συνθήκες σάρωσης μαζών μόνο ένα συγκεκριμένο ιόν m/z μπορεί να διανύσει όλη την διαδρομή του φίλτρου και να φτάσει στον ανιχνευτή. Όλα τα υπόλοιπα ιόντα θα ακολουθήσουν μία παλλόμενη διαδρομή με αποτέλεσμα να προσκρουσθούν στις ράβδους, να εκφορτιστούν και να μην ανιχνευθούν.

4.3 Τεχνικές σάρωσης

Οι κυριότερες τεχνικές σάρωσης στην φασματομετρία μαζών είναι οι εξής :

- ***Σάρωση θυγατρικών ιόντων (Product-Ion Scan)*** : Στο πρώτο στάδιο απομονώνεται το ιόν που μας ενδιαφέρει το οποίο αποτελεί μοριακό τμήμα του αναλύτη. Στο δεύτερο τετράπολο στην κυψελίδα συγκρούσεων λαμβάνει χώρα η θραυσματοποίηση του ιόντος μέσω σύγκρουσης με μόρια αντιδραστηρίου αερίου. Στο δεύτερο στάδιο τα θραύσματα του ιόντος σαρώνονται και παράγουν το φάσμα μαζών των ιόντων που σχηματίζονται στην κυψελίδα συγκρούσεων δηλαδή τα θραύσματα-προϊόντα ιόντα.
- ***Σάρωση μητρικών ιόντων (Precursor-Ion Scan)*** : Σε αυτό το είδος σάρωσης, ρυθμίζεται το τρίτο τετράπολο έτσι ώστε να εκπέμπει ιόντα με μία μόνο τιμή m/z, δηλαδή αυτή του παραγόμενου ιόντος (προϊόν-θραύσμα) ενώ το πρώτο τετράπολο σαρώνει μία περιοχή m/z συγκεκριμένου εύρους ανοχής. Στο δεύτερο τετράπολο διέρχονται μόνο τα ιόντα που πέρασαν από το πρώτο και λειτουργώντας σαν κυψελίδα συγκρούσεων δημιουργεί πολλαπλά θραύσματα. Ο ανιχνευτής δίνει σήμα μόνο όταν ιόντα εκπέμπονται και από τα δύο και με αυτόν τον τρόπο το ιόν που εκπέμπεται από το πρώτο τετράπολο θραυσματοποιείται και δίνει τα επιθυμητά προϊόντα.
- ***Παρακολούθηση επιλεγμένης αντίδρασης (Selected Reaction Monitoring)*** : Στη περίπτωση αυτή παρατηρούνται οι αντιδράσεις θραυσματοποίησης που δίνει το μοριακό ιόν ή κάποιο πρόδρομο ιόν. Πρόκειται για μια πολύ εκλεκτική μέθοδο κατά την οποία μπορούν να καταγραφούν οι χαρακτηριστικές αντιδράσεις θραυσματοποίησης των μορίων που παρατηρούνται. Πιο συγκεκριμένα, στο πρώτο τετράπολο επιλέγεται να παρατηρεί ένα συγκεκριμένο μοριακό ιόν. Ακολούθως λαμβάνει χώρα θραυσματοποίηση του μοριακού ιόντος στη κυψελίδα πρόσκρουσης. Το τρίτο τετράπολο ρυθμίζεται έτσι ώστε να καταγράφει συγκεκριμένο προϊόν διάσπασης και έτσι καταγράφεται μια συγκεκριμένη αντίδραση. [67]

5. ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η ανάπτυξη μίας γρήγορης και αξιόπιστης μεθόδου για τον προσδιορισμό των συνολικών μικροκυστινών που υπάρχουν σε δείγματα νερού, με την τεχνική της Υγρής Χρωματογραφίας συζευγμένης με Φασματομετρία Μάζας (LC-MS/MS). Επίσης η παρούσα διπλωματική εργασία στοχεύει στην ανάπτυξη μιας μεθόδου που γίνεται απευθείας στο δείγμα νερού,χωρίς περαιτέρω προκατεργασία, διότι με βάση την βιβλιογραφική ανασκόπηση αυτό πραγματοποιήθηκε σε μια μόνο μελέτη στην οποία υπάρχει και πιο ακριβή και εξακριβωμένη τεχνολογία. [29] Επίσης η μέθοδος διαθέτει την δυνατότητα να μην χρειάζεται πρότυπα ολών των γνωστών μικροκυστινών κάτι το οποίο είναι ιδιαιτέρως σημαντική, διότι μικρός μόνο αριθμός κυανοτοξινών είναι διαθέσιμος ως πρότυπες ουσίες και αυτό λόγω της δύσκολης απομόνωσης και καθαρισμού από τις καλλιέργειες των κυανοβακτηρίων, της σχετικά μικρής ζήτησης και του αυξημένου κόστους. Τέλος στην παρούσα διπλωματική εργασία έγινε εξακριβώση της απόδοσης και της πιστότητας της συγκεκριμένης μεθόδου, καθώς μόνο σε μια μελέτη έγινε αναφορά για την τελική ανάκτηση(35%) του MMPB [32] , ενώ επίσης μόνο σε μια μελέτη γίνεται αναφορά για την πιστότητα της μεθόδου , όπου αναλύονται τα ίδια δείγματα μετά απο 6 μήνες με %RSD<10%. [29]

Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 6ο : ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ – ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

6.1 Αντιδραστήρια

Για την παρασκευή διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια :

- *Υπερμαγγανικό κάλιο ($KMnO_4$) (καθαρότητας 99 %), Ferak (Berlin, Germany)*
- *Υπεριωδικό νάτριο ($NaIO_4$) (καθαρότητας 99.8%), Honeywell, Fluka , (United Kingdom) ,*
- *Ανθρακικό κάλιο (K_2CO_3) (καθαρότητας 99 %), Riedel (Hannover, Germany)*
- *Οξινο θειώδες νάτριο ($NaHSO_3$), Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), ACS REAGENT*
- *Υδροξείδιο του νατρίου (NaOH) σφαιρίδια (καθαρότητας 98%), Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)*
- *MMPB (2-methyl-3- methoxy-4-phenylbutyric acid), (καθαρότητας >98%), TCI (Tokyo, Chem. Industry CO, Japan)*
- *Microcystin-LR (MC-LR), Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)*
- *Μεθανόλη (MeOH) (καθαρότητας ≥ 99%), Fisher Chemical*
- *Μυρμηκικό οξύ (HCOOH) (καθαρότητας 99%), Carlo Erba*
- *Ακετονιτρίλιο ACN (καθαρότητας ≥ 99.9%), Sigma-Aldrich*
- *Υπερκαθαρό νερό (18.2 MΩ/cm) συσκευής TEMAK*

6.2 Συσκευές – Υλικά

Για την παρασκευή διαλυμάτων και για την προκατεργασία των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι εξής συσκευές:

- *Αυτόματες πιπέττες 10-100 μl και 100-1000 μl, Eppendorf*
- *Συσκευή υπερήχων Bandelin sonorex super RK 106*
- *Φυγόκεντρος HARRIER 18/80 Refrigerated SANYO*
- *pHμετρο, WTW MULTI 3410(Weilheim, Germany)-Digital pH/D.O./conductivity meter for a digital IDS sensor*
- *Ποτήρια ζέσεως των 70-85-100 ml*
- *Ογκομετρικό κύλινδρο των 50 και 100 mL*
- *Ογκομετρικές φιάλες των 5-10-25 mL*
- *Πιπέττες Pasteur*
- *Πλαστικοί σωλήνες μικροφυγοκέντρησης (microcentrifuge tube) Eppendorf 1,5 mL*
- *Συσκευή εξάτμισης με άζωτο, 12 θέσεων Organomation N-VAP 111*

- *Αναλυτικός ζυγός με ακρίβεια τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων της εταιρίας METTLER (Type: AC 100)*
- *Συσκευή υπερκάθαρου νερού (18,2 ΜΩ/cm) της εταιρείας TEMAK (Type:TSDW10)*
- *Γυάλινα φιαλίδια αυτόματου δειγματολήπτη 1.5 mL (32 x 11,6mm), Grace*
- *Inserts για τα φιαλίδια 0.25 mL, Kinesis*
- *Συσκευή εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE, Supelco) αποτελούμενη από:*
  α. Διαφραγματική αντλία κενού (KNF Ladoport)
  β. Συστοιχία (manifold) SPE 12 θέσεων λειτουργίας υπό κενό, με σωληνώσεις από Teflon
  γ. Φυσίγγια (cartridges) SPE: Envi C-18 και OASIS HLB , 200 mg - 6 mL
  δ. Φιάλη συλλογής όγκου τουλάχιστον 10 L
  ε. Γυάλινες φιάλες δειγμάτων 1 L, βαθμονομημένες
  στ. Γυάλινοι σωλήνες συλλογής εκλουσμάτων των 10 mL

6.3 Όργανα

Σε αυτή την εργασία χρησιμοποιήθηκε σύστημα LC-MS/MS (Υγροχρωματογραφία με ανιχνευτή Φασματομετρίας Μάζας τεχνολογίας τριπλού τετραπόλου) αποτελούμενο από τα εξής μέρη:

- *Αναλυτική στήλη αντστρόφου φάσης (reverse-phase) υγροχρωματογραφίας Atlantis T3, 2.1 x 100mm, 3μm (Waters, Ireland)*
- *Αυτόματος δειγματολήπτης Finnigan Surveyor Autosampler Plus με ενσωματωμένο θερμοστάτη στηλών*
- *Ανιχνευτής Διαδοχικής Φασματομετρίας Μάζας (MS/MS) Finnigan TSQ Quantum Discovery Max που περιλαμβάνει:*
  α) Πηγή ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ElectronSpray Ionization, ESI)
  β) Αναλυτή Μάζας με τρία τετράπολα (triple stage quadrupole analyzer)

6.4 Παρασκεύη πρότυπων διαλυμάτων

Για την παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων MMPB και MC-LR χρησιμοποιήθηκαν πρότυπες στερεές ουσίες. Η παρασκευή των διαλυμάτων παρακαταθήκης (stock solutions) των ουσιών έγινε με διαλυτοποίηση των στερεών προτύπων (~10 mg MMPB) και αραίωση σε ογκομετρική των 10 mL με νερό και παραμονή σε λουτρό υπερήχων για 5 min. Από τα μεμονωμένα διαλύματα παρακαταθήκης παρασκευάσθηκαν πρότυπα διαλύματα infusion συγκέντρωσης 1 mg/L σε 50% μεθανόλη- 50% νερό με 0.5% HCOOH με, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση των κατάλληλων παραμέτρων ανίχνευσης στο φασματογράφο μάζας με προσθήκη 100 μL από 10 mg/L MMPB με 5 μL HCOOH και 895 μL διαλύτη (50% MeOH – 50% H_2O).

Επίσης με αραιώση προτύπου διαλύματος MMPB 10 mg/L με διάλυμα 50% H_2O-50% MeOH γίνεται παρασκεύη προτύπων διαλυμάτων MMPB 10, 50 και 100 μg/L.

Τέλος όλοι οι εμβολιασμοί (spikes) με την μικροκυστίνη MC-LR στα δείγματα μας γίνονται με πρότυπο διάλυμα 10 mg/L MC-LR και επειδή τα πρότυπα αυτά είναι αποθηκευμένα σε μεθανόλη, πριν την προσθήκη τους στα δείγματα νερού, με χρήση της συσκευής εξάτμισης με άζωτο εξατμίζουμε την μεθανόλη ,έτσι ώστε να μην γίνεται οξείδωση της κατά την διάρκεια της αντίδρασης.

Κεφάλαιο 7ο: ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΟΛΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΚΥΣΤΙΝΩΝ

7.1 Ανάπτυξη μεθόδου οξείδωσης

Κατά την ανάπτυξη της μεθόδου οξείδωσης η αρχική ποσότητα δείγματος νερού που οξειδώνεται είναι 50 mL με την αναλογία συγκεντρώσεων οξειδωτικών να είναι [$NaIO_4$]:[$KMnO_4$] = 80. Επίσης διατηρούνται σταθερές οι βέλτιστες τίμες του pH(9), θερμοκρασίας(δωματίου), χρόνου(2 h) που βρέθηκαν στην βιβλιογραφία.

Επομένως τα βήματα που ακολουθούνται κατά την διάρκεια του σταδίου της οξείδωσης είναι τα εξής :

1) Εμβολιασμός επιθυμητής ποσότητας MC-LR σε 50 mL δείγματος νερού και παραμονή σε λουτρό υπερήχων για 5 min, λόγω της τάσης των μικροκυστινών να προσκολλούνται στα τοιχώματα επιφανειών
2) Προσθήκη 12.5 mL από διάλυμα 400 mM $NaIO_4$ υπό συνεχή ανάδευση
3) Προσθήκη 230 μL από διάλυμα 300 mM $KMnO_4$ υπό συνεχή ανάδευση
4) Ρύθμιση pH=9 με προσθήκη διαλύματος 1 M K_2CO_3 με χρήση σταγονόμετρου
5) Οξείδωση διαλύματος σκεπασμένου με αλουμινόχαρτο για 2 ώρες υπό συνεχή ανάδευση
6) Τερματισμός αντίδρασης με προσθήκη διαλύματος 4 M $NaHSO_3$ με χρήση σταγονόμετρου εώς τον πλήρη αποχρωματισμό του διαλύματος

Μετά τον τερματισμό της αντίδρασης ακολουθεί ο καθαρισμός και η απομόνωση του MMPB, όπως περιγράφεται στην § 7.2 και η ανάλυση στο σύστημα LC-MS/MS όπως περιγράφεται στην § 7.3.

7.2 Ανάπτυξη μεθόδου εκχύλισης στερεάς φάσης

Κατά την ανάπτυξη της μεθόδου εκχύλισης στερεάς φάσης για τον καθαρισμό του MMPB μετά την αντίδραση της οξείδωσης, επιλέγεται η χρήση φυσιγγίων Envi C-18 με εκλουστικό διαλύτη μεθανόλη, καθώς επίσης επιλέγεται και η ρύθμιση του pH=7 των δειγμάτων πριν την εκχύλισή τους.

Επομένως τα βήματα που ακολουθήθηκαν κατά την διάρκεια του σταδίου της τεχνικής στερέας εκχύλισης είναι τα εξής :

1) Ρύθμιση pH=7 στα δείγματα με προσθήκη με σταγονόμετρο διαλύματος 2M NaOH
2) Ενεργοποίηση των φυσιγγίων Envi C-18 με προσθήκη πρώτα 6 mL MeOH και έπειτα 6 mL H_2O
3) Πέρασμα δειγμάτων
4) Ξήρανση με κενό αέρα για 15 λεπτά
5) Τοποθέτηση δοκιμαστικών σωλήνων κάτω από τις θέσεις που έχουν τοποθετηθεί τα cartridges για παραλαβή δείγματος μετά από έκλουση με 6 mL MeOH
6) Ξήρανση με κενό αέρα εώς ότου πλήρης εξάτμισης
7) Επανασύσταση με 250 μL 50% H_2O – 50% MeOH
8) Μεταφορά σε Eppendorf και χρήση φυγόκεντρου
9) Μεταφορά σε inserts για τα γυάλινα φιαλίδια αυτόματου δειγματολήπτη

7.3 Ανάπτυξη μεθόδου ανίχνευσης MMPB στο LC-MS/MS

Κατά το χρωματογραφικό διαχωρισμό, για την επιλογή του καταλληλότερου προγράμματος έκλουσης των ενώσεων, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές με διαφορετικές αναλογίες όγκων των διαλυτών, έτσι ώστε να επιτευχθεί ο καλύτερος δυνατός διαχωρισμός και η καλύτερη δυνατή μορφή των κορυφών.

Τελικά το πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης ξεκινούσε από 65% **H_2O** – 35% **ACN** και κατέληγε σε 65% **H_2O** – 35% **ACN** (**Πίνακας 6**). Μετά το τέλος του προγράμματος στα 32 min το σύστημα επέστρεφε στις αρχικές συνθήκες για 10 min για εξισορρόπηση. Η ταχύτητα ροής ήταν 0,2 mL/min, ο όγκος ένεσης ήταν 15 μL και η στήλη είχε σταθερή θερμοκρασία στους 35°C.

Πίνακας 6 *: Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης*

ΧΡΟΝΟΣ(min)	ΤΑΧΥΤΗΤΑ ΡΟΗΣ (mL/min)	ACN%	H_2O%
0	0.2	35	65
10	0.2	35	65
16	0.2	90	10
22	0.2	90	10
25	0.2	35	65
30	0.2	35	65
31	0.2	35	65

Κατά τον ιοντισμό του MMPB με την πηγή ESI το μητρικό ιόν που προκύπτει είναι το $[M+H]^+$ = 209. Κατά την αυτόματη θραυσματοποίηση του MMPB στο δεύτερο τετράπολο βρέθηκαν τα θυγατρικά ιόντα m/z 131, 91 και 65. Ο ιοντισμός ήταν θετικός και οι τιμές των παραμέτρων που επιλέχθηκαν ήταν οι ακόλουθες:

- Spray Voltage: 3000 V
- Ion transfer capillary temperature: 325^{o}C
- Sheath gas pressure (N2): 10 A.U. (arbitary units)
- Auxilliary gas: 5 A.U.

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

8.1 Αποτελέσματα πειραμάτων οξείδωσης

Η θεμελιώδης διαφορά μεταξύ της εξεταζόμενης μεθόδου προσδιορισμού μικροκυστινών σε σχέση με ολές τις υπόλοιπες βασίζεται στην παραγωγοποίηση των Adda των μικροκυστινών σε MMPB με την αντίδραση οξείδωσης Lemieux με υπεριωδικό νάτριο ($NaIO_4$) με παρουσία υπερμαγγανικού καλίου ($KMnO_4$) ως καταλύτη.

Οι παράγοντες που επηρεάζουν κυριώς την απόδοση αυτής της αντίδρασης είναι το pH , ο χρόνος οξείδωσης και οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων. Εφόσον οι τιμές του pH και του χρόνου οξείδωσης είναι προκαθορισμένες μέσω της βιβλιογραφίας [26], επιλέχθηκε να γίνουν μια σειρά πειραμάτων με στόχο την εύρεση της βέλτιστης αναλογιάς μεταξυ των συγκεντρώσεων των αντιδραστηριών του υπεριωδικού νατρίου ($NaIO_4$) και υπερμαγγανικού καλίου($KMnO_4$).

Αφορμή για αυτήν την επιλόγη έδωσε η έλλειψη πληροφοριών σχετικά με την απόδοση και την πιστότητα της συγκεκριμένης αντίδρασης, καθώς από τις μελέτες που πραγματοποιήθηκαν μόνο σε μια έγινε αναφορά για την τελική ανάκτηση (35%) του MMPB[32], ενώ σε μια μελέτη γίνεται αναφορά για την πιστότητα της μεθόδου , όπου αναλύονται τα ίδια δείγματα μετά απο 6 μήνες με %RSD<10%. [29] Επομένως έγινε προσπάθεια εύρεσης συνθηκών που να αποφέρουν μια πιο επιθυμητή απόδοση.

Όσον αφορά τις αναλογίες συγκεντρώσεων των αντιδραστηρίων έγινε σύγκριση μεταξύ της αναλογίας [$NaIO_4$]:[$KMnO_4$] = 1:1 [26], [28-31], [33-35] , καθώς και της αναλογίας [$NaIO_4$]:[$KMnO_4$] = 80:1, που είναι οι πρωταρχικές συνθήκες οξείδωσης Lemieux. [25]

Για κάθε αναλογία αναλύθηκαν 6 δείγματα στα οποία έγινε εμβολιασμός της μικροκυστίνης MC-LR με στόχο η τελική συγκέντρωση της μικροκυστίνης να είναι το 1 μg/L , που ορίζεται ως το νομοθετικό όριο από τον παγκόσμιο οργανισμό WHO. [13] Τα αποτελέσματα των πειραμάτων παρατίθονται στον **Πίνακα 7**.

Πίνακας 7: *Αποτελέσματα βελτιστοποίησης οξείδωσης*

[$NaIO_4$]:[$KMnO_4$]	% ΑΝΑΚΤΗΣΗ MMPB	% ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ MMPB	%RSD
1:1	23.6	35.0	30.4
1:1	34		
1:1	46.7		
1:1	47.2		
1:1	18.5		
1:1	40.1		
80:1	35.4	46.8	29.3
80:1	65.8		
80:1	29.3		
80:1	55.7		
80:1	53.2		
80:1	41.7		

Με βάση τα αποτελέσματα έγινε τελική επιλογή της αναλογίας [$NaIO_4$]:[$KMnO_4$] = 80:1 μιας και προσφέρει και μεγαλύτερη ανάκτηση, αλλά και ελαφρώς καλύτερη πιστότητα.

8.2 Αποτελέσματα πειραμάτων εκχύλισης στερεάς φάσης

Κατά την ανάπτυξη της μεθόδου της εκχύλισης στερεάς φάσης για τον καθαρισμό και την απομάκρυνση ανεπιθύμητων μορίων που υπάρχουν στα δείγματα νερού, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών των πιο σημαντικών παραγόντων της εκχύλισης στερεάς φάσης.

Για τις δοκιμές εκχυλίστηκαν δείγματα υπερκάθαρου νερού εμβολιασμένα με MMPB τελικής συγκέντρωσης 100 μg/L όπου προηγουμένως είχαν προστεθεί όλα τα αντιδραστήρια της οξείδωσης για να γίνει καλύτερη προσομοίωση της μήτρας (matrix). Για κάθε συνθήκες αναλύθηκαν τα δείγματα εις διπλούν.

Για την σύγκριση των αποτελεσμάτων υπολογίστηκε η % ανάκτηση (% recovery, R) με βάση την **Εξίσωση 1** για κάθε δοκιμή.

$$\% \, Ανάκτηση, R = (C1 - C2)/ C3 \times 100 \textbf{ (Εξίσωση 1)}$$

Όπου: C1= η συγκέντρωση της υπό προσδιορισμό ουσίας στο spiked δείγμα

C2= η συγκέντρωση της υπό προσδιορισμό ουσίας στο blank

C3= η συγκέντρωση του spike

Αρχικά μελετήθηκε η εύρεση του κατάλληλου πληρωτικού υλικού , ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη ανάκτηση των ενώσεων. Στη συνέχεια, μελετήθηκαν οι παράμετροι που σχετίζονται με τις συνθήκες του pH του αρχικού δείγματος και το ποσοστό που επηρεάζουν την κατακράτηση των ενώσεων στο πληρωτικό υλικό κατά το πέρασμα του δείγματος από αυτό.

Σε όλες τις δοκιμές για την ανάπτυξη της μεθόδου της τεχνικής στερέας εκχύλισης χρησιμοποιήθηκε ως οργανικός εκλουστικός διαλύτης η μεθανόλη(MeOH) σε ποσότητα 6 mL.

Για την εύρεση του κατάλληλου πληρωτικού υλικού έγινε σύγκριση στο ποσοστό ανάκτησης μεταξύ των φυσιγγίων OASIS HLB και των Envi C-18, τα οποία επιλέχθηκαν βάσει της βιβλιογραφίας, με τα αποτελέσματα να είναι παρόμοια και επομένως να επιλέγονται τα φυσίγγια Envi C-18, λόγω μειωμένου κόστους.

Όσον αφορά τις συνθήκες του pH του αρχικού δείγματος που εξετάστηκαν αυτές ήταν το pH=2, που είναι το pH που προκύπτει μετά τον τερματισμό της αντίδρασης με προσθήκη όξινου θειώδες νατρίου και το pH=7. Τα αποτελέσματα αυτής της σύγκρισης έδειξαν καλύτερη ανάκτηση MMPB σε ουδέτερο pH, επομένως επιλέχθηκε να γίνει χρήση διαλύματος 2M NaOH για ρύθμιση του pH του δείγματος σε τιμή 7 μετά τον τερματισμό της οξείδωσης και πριν περαστεί το δείγμα από τα cartridges. Στον **Πίνακα 8** παρατίθενται τα αποτελέσματα των πειραμάτων βελτιστοποίησης της μεθόδου στερεάς εκχύλισης.

Πίνακας 8: *Αποτελέσματα πειραμάτων βελτιστοποίησης μεθόδου εκχύλισης στερεάς φάσης*

ΠΛΗΡΩΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	pH	%ΑΝΑΚΤΗΣΗ MMPB	%ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ MMPB
OASIS HLB	2	87.9	85.5
OASIS HLB	2	83.2	
OASIS HLB	7	103	105
OASIS HLB	7	107	
Envi C-18	2	76.9	76.7
Envi C-18	2	76.5	
Envi C-18	7	98.3	100
Envi C-18	7	102	

8.3 Προσδιορισμός του MMPB με LC-MS/MS

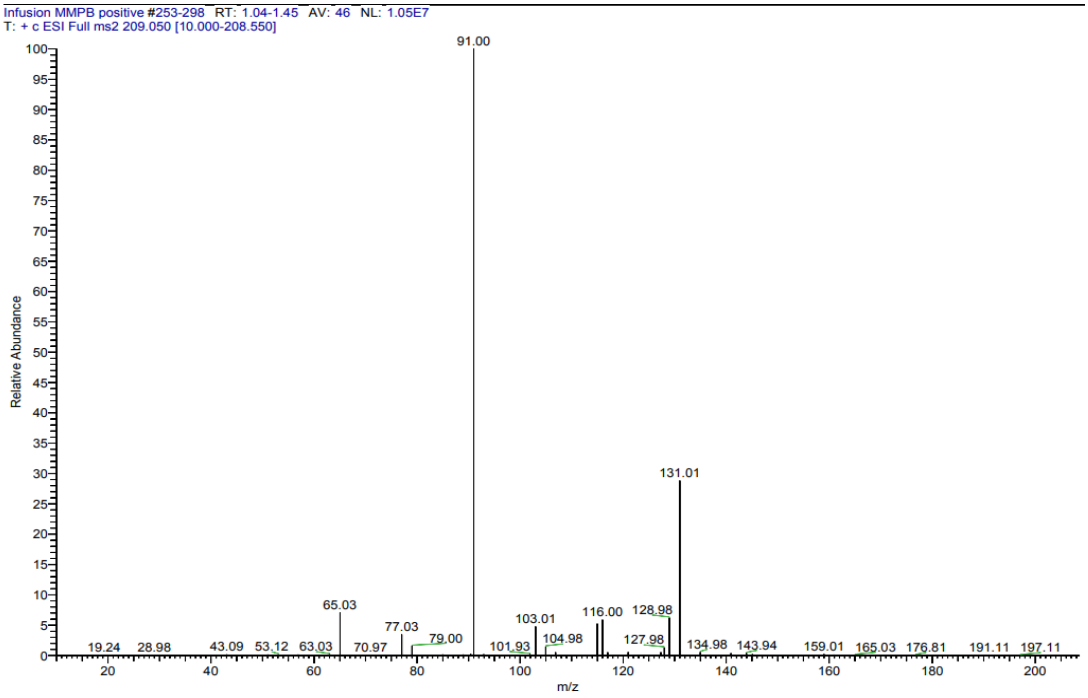
Για τον προσδιορισμό του MMPB που παράγεται από την οξείδωση των μικροκυστινών αναπτύχθηκε μέθοδος σε σύστημα LC-MS/MS με πηγή ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (electrospray ionization, ESI).

Για τον χρωματογραφικό διαχωρισμό του αναπτύχθηκε κατάλληλη μέθοδος υγροχρωματογραφίας (LC) με βαθμιδωτή έκλουση. Ο βέλτιστος διαχωρισμός στην στήλη Atlantis T3 επιτεύχθηκε με πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης (**Πίνακας 6**) και η κινητή φάση αποτελούταν από (A) Νερό (0.5% HCOOH) και (B) Ακετονιτρίλιο (0.5% HCOOH). Το μυρμηκικό οξύ (HCOOH) χρησιμοποιήθηκε στην κινητή φάση ως πρωτονιοδότης και ως οργανικός διαλύτης επιλέχθηκε το ακετονιτρίλιο διότι:

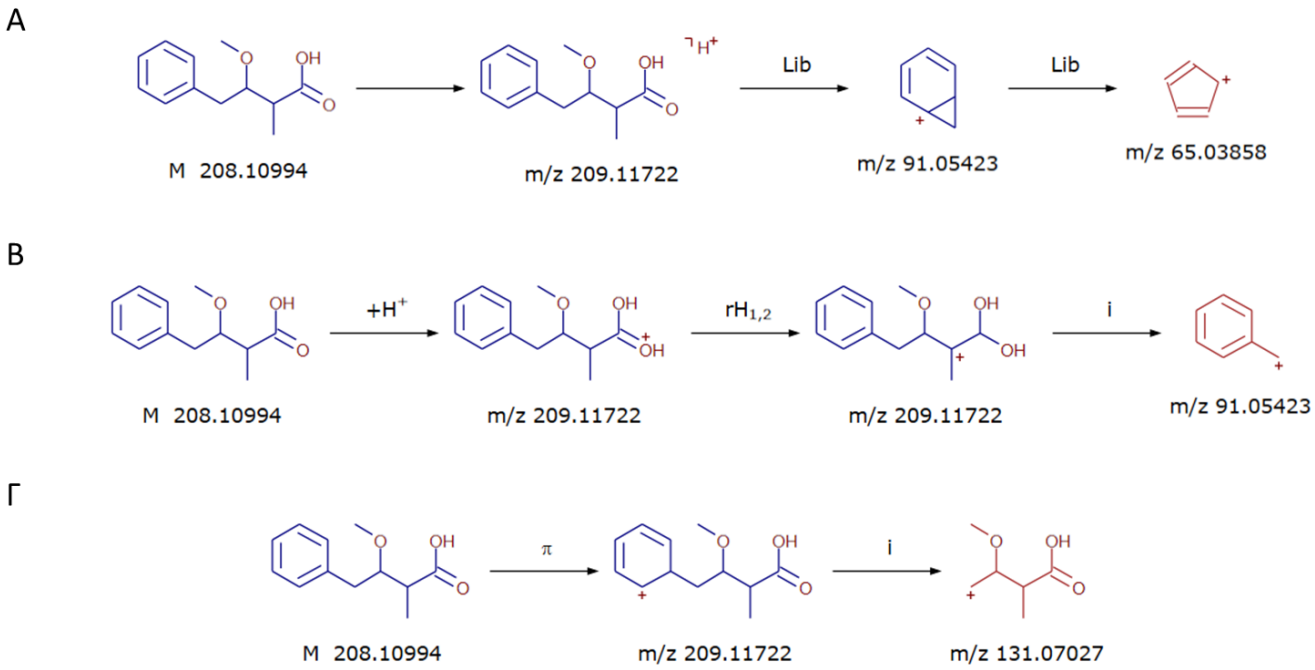
i) έχει χαμηλότερο ιξώδες από τη μεθανόλη
ii) είναι μικρότερη η πιθανότητα εμφάνισης φυσαλίδων
iii) δεν αναπτύσει υψηλή πίεση στο σύστημα και
iv) είναι καλύτερος πρωτονιοδότης

Για την εύρεση του μητρικού ιόντος, των θυγατρικών ιόντων και των βέλτιστων συνθηκών ιοντισμού χρησιμοποιήθηκε πρότυπο διάλυμα MMPB, συγκέντρωσης 1 mg/L. Αρχικά, έγινε έγχυση (infusion) στο σύστημα του MS της ένωσης με ταχύτητα ροής 5 μL/min για να βρεθεί το πρόδρομο ιόν. Κατά τον θετικό ιοντισμό του MMPB με την πηγή ESI το πρόδρομο ιόν που προκύπτει είναι το $[M+H]^+$ = 209. Στη συνέχεια, το πρόδρομο ιόν θραυσματοποιήθηκε στην κυψελίδα θραυσματοποίησης (collision cell), παρουσία Αργού (1,5 mTorr) και με την βοήθεια αυτόματου λογισμικού, λήφθηκαν οι καμπύλες θραυσματοποίησης και επιλέχθηκαν τα τρία (3) θυγατρικά ιόντα με την μεγαλύτερη ένταση και την αντίστοιχη βέλτιστη ενέργεια θραυσματοποίησης (collision energy). Η ανίχνευση του MMPB στο ESI-MS/MS, επιτεύχθηκε με τη μέθοδο σάρωσης πολλαπλών αντιδράσεων (multiple reaction monitoring, MRM), όπου γινόταν παρακολούθηση τριών μεταπτώσεων από το μητρικό σε θυγατρικό ιόν.

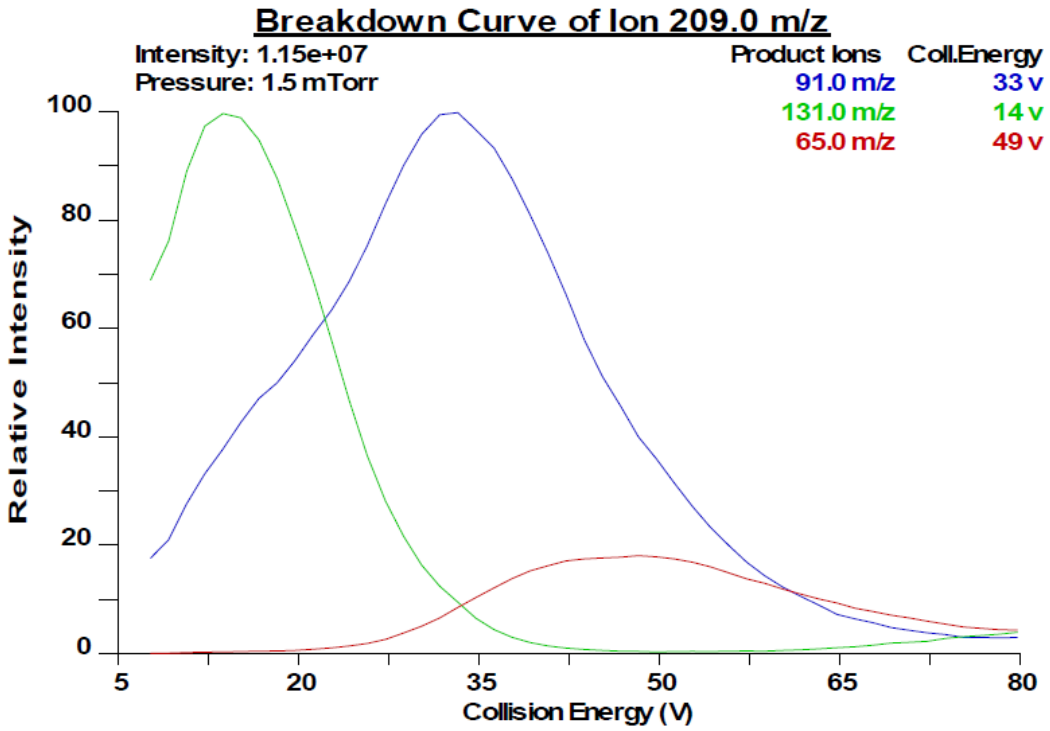
Τα θυγατρικά ιόντα που προέκυψαν ήταν τα *m/z* 131, 91 και 65 με collision energy 14 V, 33 V και 49 V, αντίστοιχα. Στην **Εικόνα 16** παρατίθενται το φάσμα θραυσματοποίησης του MMPB, ενώ επίσης στην **Εικόνα 17** παρουσιάζονται οι μηχανισμοί θραυσματοποίησης με τις δομές των ιόντων που επιλέχθηκαν για την ανίχνευση του MMPB και στην **Εικόνα 18** παρατίθενται οι σχετικές καμπύλες θραυματοποίησης. Για την ποσοτικοποίηση του MMPB επιλέχθηκε η μετάπτωση στο θυγατρικό ιόν *m/z* 131.



Εικόνα 16: *Φάσμα θραυσματοποίησης (MS/MS spectrum) του MMPB*



***Εικόνα 17**: Μηχανισμοί θραυσματοποίησης για τον σχηματισμό των θυγατρικών ιόντων Α) m/z 65, Β) m/z 91 και Γ) m/z 131 που επιλέχθηκαν για την ανίχνευση του MMPB*

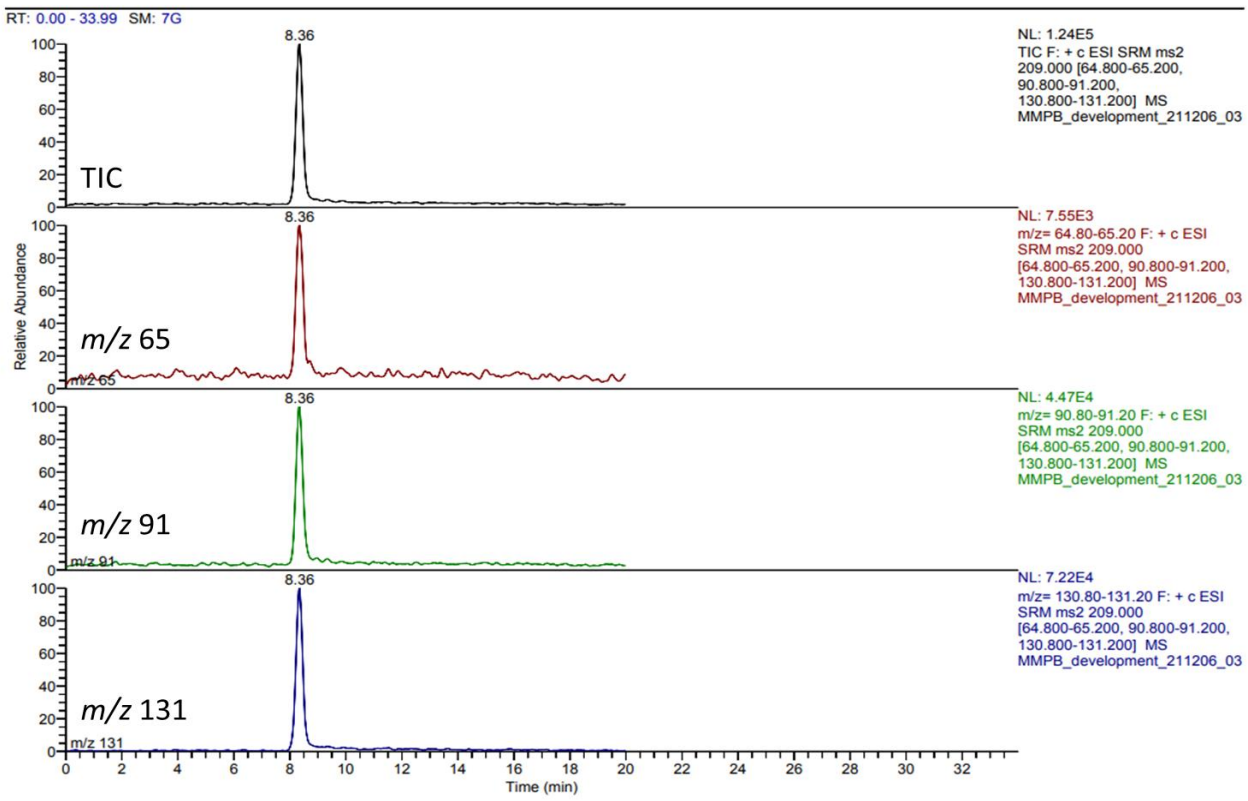


Εικόνα 18: *Καμπύλες θραυσματοποίησης των θυγατρικών ιόντων που επιλέχθηκαν για την ανίχνευση του MMPB*

Με στόχο την αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου, έγινε βελτιστοποίηση των συνθηκών ιοντισμού παρουσία κινητής φάσης. Κατά τα πειράματα βελτιστοποίησης, πραγματοποιήθηκαν εγχύσεις πρότυπου διαλύματος MMPB στο σύστημα LC-MS/MS όπου άλλαζαν διαδοχικά οι συνθήκες ιοντισμού. Οι βέλτιστες τιμές των παραμέτρων ήταν:

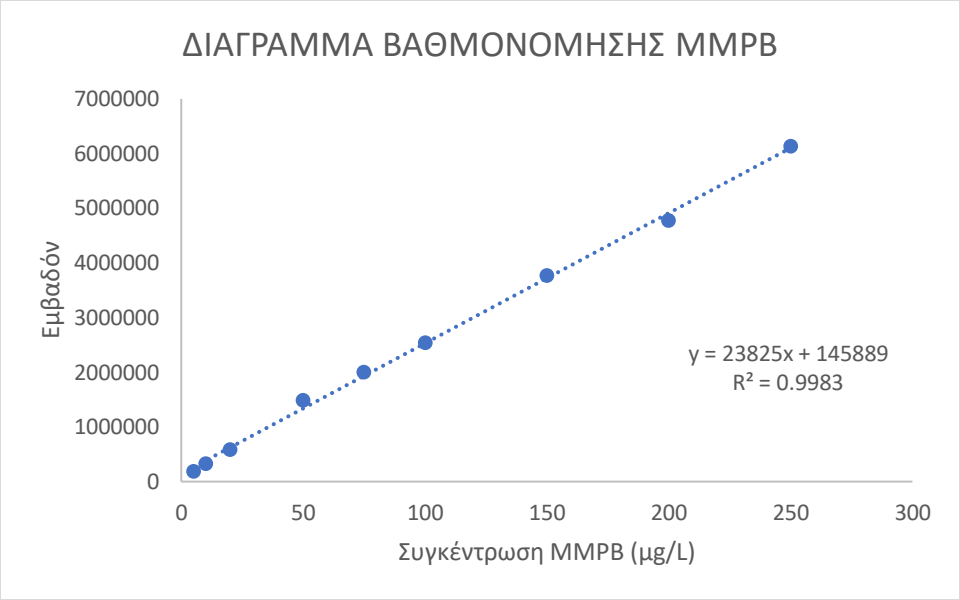
- Spray Voltage: 3500 V
- Ion transfer capillary temperature: 325^{o}C
- Sheath gas pressure (N_2): 10 A.U. (arbitary units)
- Auxilliary gas: 5 A.U.

Στην **Εικόνα 19** παρατίθενται το MRM χρωματογράφημα προτύπου διαλύματος MMPB, συγκέντρωσης 100 μg/L, με την εφαρμογή των βέλτιστων συνθηκών χρωματογραφικής ανάλυσης, ιοντισμού και ανίχνευσης, όπως αυτές προέκυψαν από την μελέτη ανάπτυξης της μεθόδου στο σύστημα LC-MS/MS. Εκεί διακρίνεται η κορυφή του MMPB στα ~8min.



Εικόνα 19: *MRM χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος MMPB συγκέντρωσης 100μg/L*

Για την εκτίμηση της γραμμικότητας της αναπτυχθείσας LC-MS/MS μεθόδου αναλύθηκαν πρότυπα διαλύματα MMPB συγκέντρωσης 5, 10, 20, 50, 75, 100, 150, 200 και 250 μg/L, εις τριπλούν. Στην **Εικόνα 20** παρατίθεται το διάγραμμα βαθμονόμησης του MMPB.



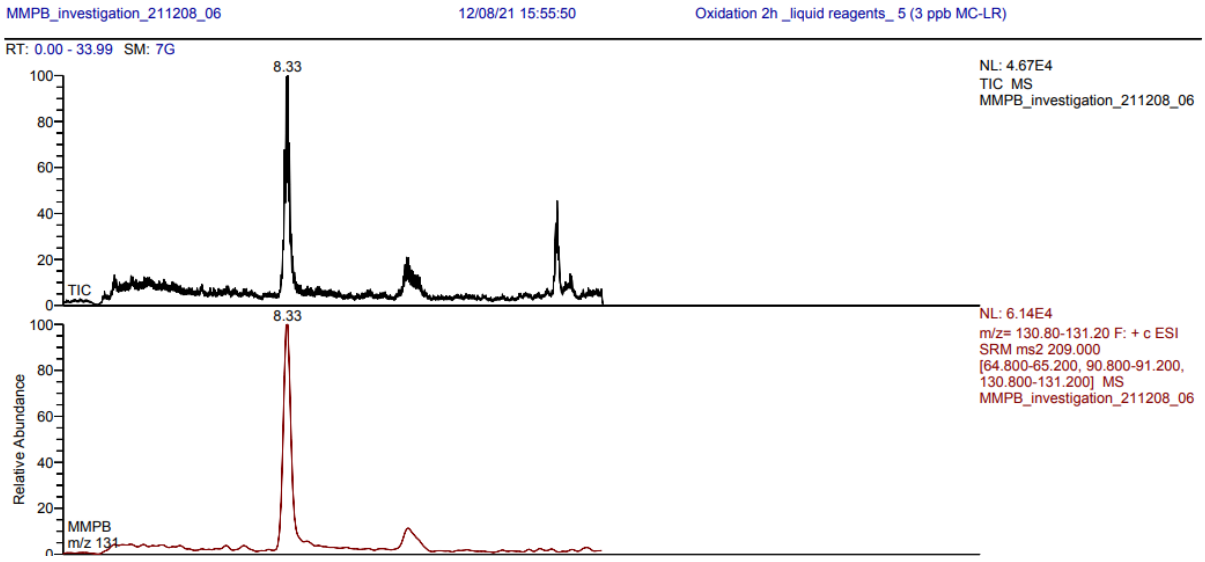
***Εικόνα 20**: Διάγραμμα βαθμονόμησης MMPB*

Η γραμμικότητα της μεθόδου μέσω οπτικής εξέτασης, αλλά και λόγω τιμής του μέγιστου συντελεστή προσδιορισμού (coefficient of determination) R^2= 0,9983 κρίνεται εξαιρετική.

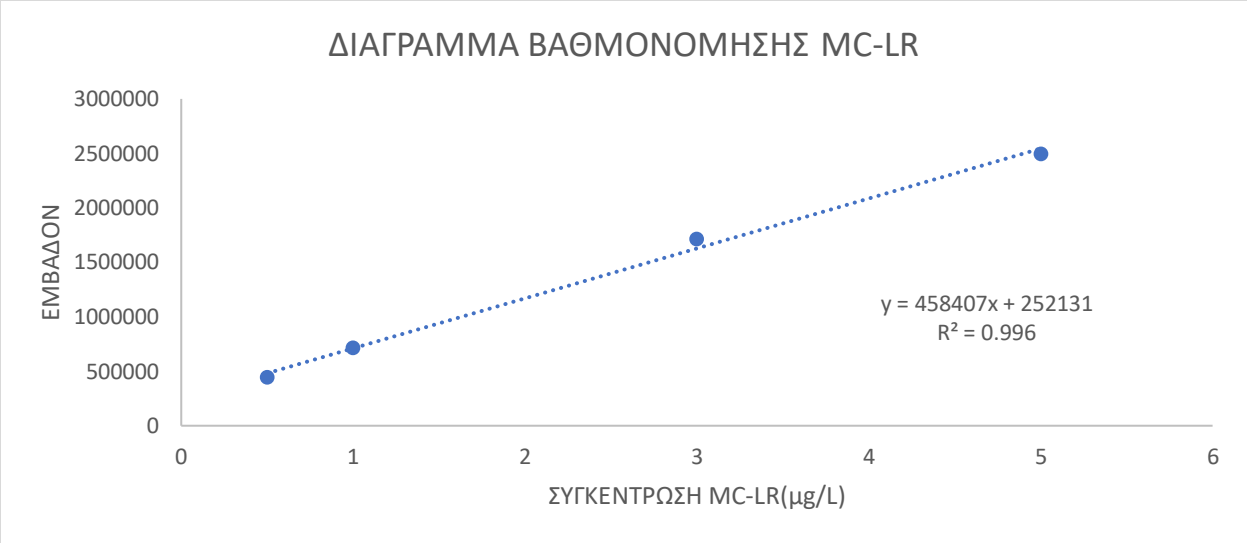
Σύμφωνα με τον **Πίνακα 3** η μέθοδός μας είναι από τις λίγες που πραγματοποιούνται σε δείγματα νερού και χρησιμοποιούν πρότυπα διαλύματα MMPB για τον σχηματισμό της καμπύλης βαθμονόμησης, καθώς κατά κύριο λόγο χρησιμοποιούν εσωτερικά πρότυπα (d3-MMPB ή 4-PB) για τον σχηματισμό της. [26], [29-31], [33-35]

8.4 Ποσοτικοποίηση των ολικών μικροκυστινών μετά από οξείδωση σε MMPB

Για την εκτίμηση της γραμμικότητας και του εύρους μετρήσεων της αναπτυχθείσας μεθόδου για τον προσδιορισμό των ολικών μικροκυστινών στο νερό, αναλύθηκαν δείγματα νερού εμβολισμένα με MC-LR σε τελική συγκέντρωση 0.5, 1, 3 και 5 μg/L. Η γραμμική περιοχή επιλέγεται να είναι μέχρι τα 5 μg/L, λόγω κόστους μεγαλύτερων συγκεντρώσεων (working range), οπότε σε περίπτωση μεγαλύτερων συγκεντρώσεων πραγματοποιούνται αραιώσεις. Το χρωματογράφημα (**Εικόνα 21**) και το διάγραμμα βαθμονόμησης (**Εικόνα 22**) παρουσιάζονται σε αντίστοιχα σχήματα.



Εικόνα 21: *MRM χρωματογράφημα δείγματος τελικής συγκέντρωσης 3 ppb spiked MC-LR*



Εικόνα 22: *Διάγραμμα βαθμονόμησης MC-LR*

Ως όριο ανίχνευσης (limit of detection, LOD) ορίζεται η ελάχιστη συγκέντρωση του αναλύτη στο δείγμα που μπορεί να ανιχνευτεί αξιόπιστα. Εξαρτάται από τον λόγο της τιμής του αναλυτικού σήματος προς το μέγεθος των στατιστικών διακυμάνσεων του σήματος του τυφλού. Ως όριο ποσοτικοποίησης (limit of quantification, LOQ) ορίζεται η ελάχιστη συγκέντρωση του αναλύτη στο δείγμα που μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά αξιόπιστα. Τα όρια αύτα υπολογίζονται μετά από ανάλυση παλινδρόμησης με τους εξής τύπους :

LOD = 3.3σ / S (Εξίσωση 2)

LOQ = 10σ / S (Εξίσωση 3)

,όπου S η κλίση της ευθείας στο διάγραμμα βαθμονόμησης και σ η τυπική απόκλιση των διαλυμάτων συγκέντρωσης 0.5 μg/mL. Η συγκέντρωση αυτή επιλέχθηκε γιατί είναι από τις μικρότερες που εξετάστηκαν και προσεγγίζει τα αναμενόμενα όρια ανίχνευσης. Η τυπική απόκλιση δίνεται από τον τύπο:

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{n-1}\sum_{n=1}^{\infty}(\bar{x} - xi)^2}$$

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

Επομένως μέσω της στατιστικής επεξεργασίας με ανάλυση παλινδρόμησης που πραγματοποιήθηκε στο excel, αλλά και την χρήση των εξισώσεων **2** και **3** υπολογίζονται τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποιήσης με τα εξής αποτελέσματα :

LOD = 0.2 μg/L και **LOQ = 0.5 μg/L**

Μέσω της βιβλιογραφικής ανασκόπησης για χρήση της μεθόδου MMPB σε δείγματα νερού παρατηρήθηκε ότι το όριο ανίχνευσης που επιτύγχαναν ήταν μεταξύ 0.5 ng/L - 0.56 mg/L, επόμενως το όριο ανίχνευσης που υπολογίστηκε κύμαινεται σε αυτό το πλαίσιο τιμών και το κυριότερο είναι ότι επιτυγχάνεται ανίχνευση 5 φορές κάτω από το νομοθετικό όριο των 1 μg/L. [13]

8.4 Εφαρμογή μεθόδου σε πραγματικό δείγμα και σύγκριση με άλλες τεχνικές

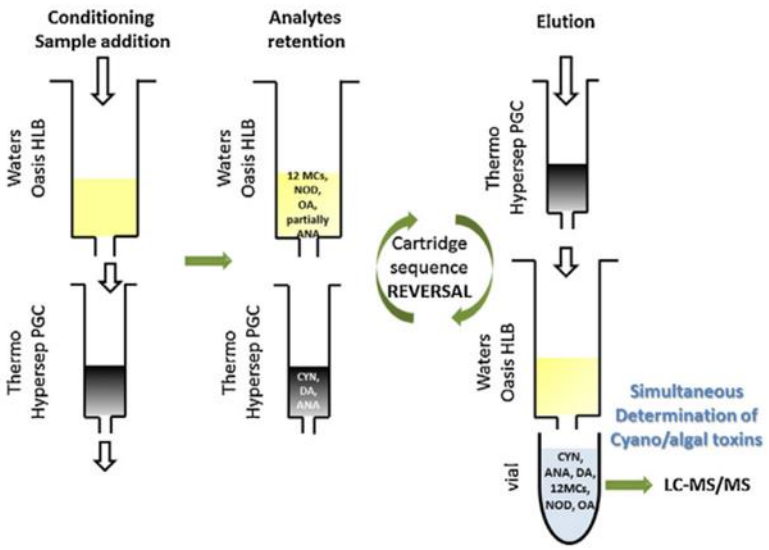
Η μέθοδος που αναπτύχθηκε εφαρμόστηκε για την ανάλυση δείγματος από την λίμνη της Καστοριάς. Η δειγματοληψία του δείγματος είχε γίνει τον Οκτώβριο του 2014 και διατηρούταν από τότε σε ψύξη (4 ^{o}C). Το δείγμα είχε αναλυθεί αμέσως μετά την δειγματοληψία του με μέθοδος στοχευμένης ανάλυσης με LC-MS/MS για τον προσδιορισμό 12 MCs. [10]

Το δείγμα νερού λίμνης αναλύθηκε εκ νέου για τον προσδιορισμό των ολικών μικροκυστινών με την αναπτυχθήσα μέθοδο του MMPB και παράλληλα πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των ολικών μικροκυστινών με εμπορικά διαθέσημο kit της PPIA και με την στοχευμένη μέθοδο SPE, LC-MS/MS με στόχο την σύγκριση των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από κάθε μέθοδο.

Η βιοδοκιμασία αναστολής της πρωτεινικής φωσφατάσης (PPIA) αποτελεί μία γρήγορη μέθοδο καθώς πολλά δείγματα μπορούν να αναλυθούν σε λίγες ώρες. Αυτή η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα των τοξινών να αναστέλλουν την πρωτεινική φωσφατάση και παρέχει σημαντικές τοξικολογικές πληροφορίες σχετικά με τη βιοδραστικότητα των μικροκυστινών, καθώς η ανίχνευση βασίζεται στη λειτουργική δραστηριότητα παρά στην αναγνώριση της χημικής δομής.

Ο προσδιορισμός με PPIA έγινε με την χρήση του εμπορικά διαθέσιμου Microcystins/Nodularins PP2A kit (Eurofins—Abraxis) και οι μετρήσεις στα 405 nm έγιναν με το Infinite M200 reader (Tecan, Männedorf, Switzerland), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το δείγμα αναλύθηκε απευθείας και με αραίωση 1:10. Τα δείγματα αναλύθηκα εις διπλούν.

Η μέθοδος dual sequential SPE-LC-MS/MS (**Εικόνα 23**) είναι μια γρήγορη, απλή και αποτελεσματική μέθοδος για τον προσδιορισμό πολλαπλών κατηγοριών κυανοβακτηριακών τοξινών και φυκιών στο νερό. Η εξαγωγή δειγμάτων νερού πραγματοποιήθηκε με διπλή διαδοχική στερεά εκχύλιση με την χρήση 2 διαφορετικών φυσιγγίων SPE (OASIS HLB-HyperSep Hypercarb PGC). Η ικανότητα της μεθόδου είναι σημαντική διότι ανιχνεύει και αναγνωρίζει σωστά ένα ευρύ φάσμα τοξινών διαφόρων χημικών κατηγοριών σε μια μόνο ανάλυση, ενώ επίσης η μέθοδος μειώνει σημαντικά το χρόνο και το κόστος της ανάλυσης και ταυτόχρονα επιτυγχάνεται ταυτόχρονα προσδιορισμός ενός ευρέος φάσματος τοξινών από διαφορετικές χημικές τάξεις.[68]



Εικόνα 23*: Σχηματική απεικόνιση στοχευμένης μεθόδου SPE, LC-MS/MS με διάταξη διπλού φυσιγγίου SPE[68]*

Με την μέθοδο MMPB έγιναν 3 πείραματα και η διαδικασία υπολογισμού της ανάκτησης του MMPB αυτών των πειραμάτων γίνεται βάσει του διαγράμματος βαθμονόμησης της MC-LR (**Εικόνα 22**). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν με την μέθοδο MMPB παρουσιάζονται στον **Πίνακα 9** , ενώ επίσης στον **Πίνακα 10** παρουσιάζεται η σύγκριση των μετρήσεων μεταξύ των διάφορων τεχνικών που επιλέχθηκαν για τον προσδιορισμό μικροκυστινών στο δείγμα της λίμνης Καστοριάς.

***Πίνακας 9**: Αποτελέσματα μεθόδου MMPB στο πραγματικό δείγμα*

ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΑΝΑΚΤΗΣΗ MMPB (μg/L)	ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ MMPB (μg/L)	%ΑΝΑΚΤΗΣΗ	%RSD
1	2250	2708	327	25.7
2	3509		424	
3	2365		285	

***Πίνακας 10:** Σύγκριση τεχνικών προσδιορισμού μικροκυστινών σε δείγμα λίμνης Καστοριάς*

ΤΕΧΝΙΚΗ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ MCs (μg/L)
ΜΕΘΟΔΟΣ MMPB	2708
LC-MS/MS (2014)	827
PPIA	13.1
DUAL SPE-LC-MS/MS	2.3

Σύμφωνα με τον **Πίνακα 10** παρατηρείται ότι όλες οι τεχνικές μεταξύ τους παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στα αποτελέσματα. Η μείωση που παρατηρείται στην συγκέντρωση των μικροκυστινών από το 2014 όταν αναλύεται το ίδιο δείγμα με την χρήση της τεχνικής DUAL SPE-LC-MS/MS και της PPIA οφείλεται στον μετασχηματισμό του αμινοξέος Adda των μικροκυστινών. Αντιθέτως, η ραγδαία αύξηση που παρατηρείται με την ανάλυση του δείγματος με την μέθοδο του MMPB υποδεικνύει ότι η μέθοδος έχει την δυνατότητα να εντοπίζει τα προιόντα μετατροπής που μένει άθικτο το αμινοξύ Adda επομένως δεν ανιχνεύονται εν τέλει οι ολικές μικροκυστίνες , αλλά το σύνολο των προιόντων μετασχηματισμού με Adda , που δεν έχουν την τοξικότητα από τις αρχικές τοξίνες.

9.Συμπεράσματα-Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας έγιναν δοκιμές της μεθόδου MMPB σε δείγματα απιονισμένου νερού, καθώς και σε δείγμα από την λίμνη Καστοριά. Αρχικά, επείδη η μέθοδος δεν απαιτεί πρότυπα μικροκυστινών, όπως σε στοχευμένες αναλύσεις, αλλά και λειτουργεί απευθείας στο νερό αυτομάτως μειώνει δραστικά το κόστος της διεργασίας.

Με βάση των αποτελεσμάτων, όμως η μέθοδος αποδεικνύεται μη επαναλήψιμη, καθώς στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν παρατηρήθηκε ότι το %RSD ήταν μεγαλύτερο του 25%, επομένως δεν μπορούμε να στηριχθούμε σε ένα μόνο δείγμα για την κατανόηση του περιεχόμενού του.

Επίσης η απόδοση της αντίδρασης, παρόλο που έγιναν βελτιστοποιήσεις στα κομμάτια τις οξείδωσης και της τεχνικής στερεάς εκχύλισης, δεν κατάφερε να ξεπεράσει το 50 %.

Επιπλέον λόγω των αποτελεσμάτων της μεθόδου PPIA σε σύγκριση με τις άλλες μεθόδους διαπιστώνουμε ότι η μέθοδος μας δεν συσχετίζεται με την τοξικότητα. Επομένως καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η μέθοδος μας εντοπίζει τα προιόντα μετατροπής που μένει άθικτο το Adda, επομένως δεν ανιχνεύουμε εν τέλει τις ολικές μικροκυστίνες , αλλά το σύνολο των προιόντων μετασχηματισμού με Adda , που δεν έχουν την τοξικότητα από τις αρχικές τοξίνες.

Άρα εν τέλει η μέθοδος κρίνεται ως ειδική ως προς την ανίχνευση του αμινοξέος Adda , διότι υπολογίζει όλο το φορτίο των μικροκυστινών ,σε αντίθεση με την στοχευμένη μέθοδο με LC-MS/MS που μπορούμε να ανιχνεύσουμε μικροκυστίνες ,που υπάρχουν διαθέσιμα πρότυπα.

Τέλος, μέσω των παραπάνω συμπερασμάτων οι κατευθύνσεις για μελλοντική έρευνα θα πρέπει να επικεντρωθούν στην ανάλυση και βελτίωση των παραμέτρων της μεθόδου, όπως η σταθερότητα της διαδικασίας οξείδωσης και της στερεάς εκχύλισης, για να μειωθούν τα επίπεδα μεταβλητότητας, καθώς και να επιτευχθεί αύξηση της απόδοσης της αντίδρασης. Επίσης θα ήταν χρήσιμο να αναπτυχθούν περαιτέρω τεχνικές που να ανιχνεύουν το σύνολο των μικροκυστινών χωρίς μεγάλο κόστος.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

[1] R. W. Zurawell, H. Chen, J. M. Burke, and E. E. Prepas, “Hepatotoxic cyanobacteria: a review of the biological importance of microcystins in freshwater environments,” *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, vol. 8, no. 1, pp. 1–37, 2005.

[2] J. Meriluoto, L. Spoof, and G. A. Codd, *Handbook of cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis*. John Wiley & Sons, 2017.

[3] N. Bouaïcha *et al.*, “Structural diversity, characterization and toxicology of microcystins. Toxins, 11 (12), 714,” 2019.

[4] Q. Catherine, W. Susanna, E.-S. Isidora, H. Mark, V. Aurelie, and H. Jean-François, “A review of current knowledge on toxic benthic freshwater cyanobacteria–ecology, toxin production and risk management,” *Water Res*, vol. 47, no. 15, pp. 5464–5479, 2013.

[5] M. Y. Cheung, 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*, vol. 51, pp. 1–10, 2013.

[6] T. Stachelhaus and M. A. Marahiel, “Modular structure of genes encoding multifunctional peptide synthetases required for non-ribosomal peptide synthesis,” *FEMS Microbiol Lett*, vol. 125, no. 1, pp. 3–14, 1995.

[7] M. R. Jones *et al.*, “CyanoMetDB, a comprehensive public database of secondary metabolites from cyanobacteria,” *Water Res*, vol. 196, p. 117017, 2021.

[8] A. A de la Cruz *et al.*, “Can we effectively degrade microcystins?-Implications on human health,” *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, vol. 11, no. 1, pp. 19–37, 2011.

[9] T. Lanaras, S. Tsitsamis, C. Chlichlia, and C. M. Cook, “Toxic cyanobacteria in Greek freshwaters,” *J Appl Phycol*, vol. 1, no. 1, pp. 67–73, 1989, doi: 10.1007/BF00003537.

[10] C. Christophoridis *et al.*, “Occurrence and diversity of cyanotoxins in Greek lakes,” *Sci Rep*, vol. 8, no. 1, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-35428-x.

[11] Y. Ueno *et al.*, “Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay,” 1996.

[12] S. M. Azevedo *et al.*, “Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil,” *Toxicology*, vol. 164, no. 1–3, p. 32, 2001.

[13] G. WHO, “Guidelines for drinking-water quality,” *World Health Organization*, vol. 216, pp. 303–304, 2011.

[14] G. A. Codd *et al.*, “Cyanonet: A global network for cyanobacterial bloom and toxin risk management: initial situation assessment and recommendations,” 2005.

[15] G. Codd, S. Bell, K. Kaya, C. Ward, K. Beattie, and J. Metcalf, “Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health,” *Eur J Phycol*, vol. 34, no. 4, pp. 405–415, 1999.

[16] T. Triantis, K. Tsimeli, T. Kaloudis, N. Thanassoulias, E. Lytras, and A. Hiskia, “Development of an integrated laboratory system for the monitoring of cyanotoxins in surface and drinking waters,” *Toxicon*, vol. 55, no. 5, pp. 979–989, May 2010, doi: 10.1016/j.toxicon.2009.07.012.

[17] Τ. Καλούδης *et al.*, “ΜΕΤΡΟΛΟΓΙΚΑ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΕΣ ΛΥΣΕΙΣ ΣΤΟΥΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥΣ ΚΥΑΝΟΤΟΞΙΝΩΝ ΣΕ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ.”

[18] A. R. Tillmanns, F. R. Pick, and R. Aranda-Rodriguez, “Sampling and analysis of microcystins: implications for the development of standardized methods,” *Environmental Toxicology: An International Journal*, vol. 22, no. 2, pp. 132–143, 2007.

[19] P. Kumar, A. Rautela, V. Kesari, D. Szlag, J. Westrick, and S. Kumar, “Recent developments in the methods of quantitative analysis of microcystins,” *J Biochem Mol Toxicol*, vol. 34, no. 12, 2020, doi: 10.1002/jbt.22582.

[20] I. Y. Massey *et al.*, “A mini-review on detection methods of microcystins,” *Toxins (Basel)*, vol. 12, no. 10, 2020, doi: 10.3390/toxins12100641.

[21] F. M. Young, J. S. Metcalf, J. A. O. Meriluoto, L. Spoof, L. F. Morrison, and G. A. Codd, “Production of antibodies against microcystin-RR for the assessment of purified microcystins and cyanobacterial environmental samples,” *Toxicon*, vol. 48, no. 3, pp. 295–306, 2006.

[22] S. Nagata *et al.*, “Novel monoclonal antibodies against microcystin and their protective activity for hepatotoxicity,” *Nat Toxins*, vol. 3, no. 2, pp. 78–86, 1995.

[23] P. R. Hawkins *et al.*, “A review of analytical methods for assessing the public health risk from microcystin in the aquatic environment,” *Journal of Water Supply: Research and Technology—Aqua*, vol. 54, no. 8, pp. 509–518, 2005.

[24] J. An and W. W. Carmichael, “Use of a colorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immunosorbent assay for the study of microcystins and nodularins,” *Toxicon*, vol. 32, no. 12, pp. 1495–1507, 1994.

[25] R. U. Lemieux and E. von Rudloff, “Periodate–permanganate oxidations: I. Oxidation of olefins,” *Can J Chem*, vol. 33, no. 11, pp. 1701–1709, 1955.

[26] A. Roy-Lachapelle, P. B. Fayad, M. Sinotte, C. Deblois, and S. Sauvé, “Total microcystins analysis in water using laser diode thermal desorption-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry,” *Anal Chim Acta*, vol. 820, pp. 76–83, 2014, doi: 10.1016/j.aca.2014.02.021.

[27] M. T. Anaraki *et al.*, “Optimization of an MMPB Lemieux Oxidation method for the quantitative analysis of microcystins in fish tissue by LC-QTOF MS,” *Science of the Total Environment*, vol. 737, 2020, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.140209.

[28] A. J. Foss *et al.*, “Analysis of total microcystins and nodularins by oxidative cleavage of their ADMAdda, DMAdda, and Adda moieties,” *Anal Chim Acta X*, vol. 6, p. 100060, 2020.

[29] G. Munoz, S. V. Duy, A. Roy-Lachapelle, B. Husk, and S. Sauvé, “Analysis of individual and total microcystins in surface water by on-line preconcentration and desalting coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry,” *J Chromatogr A*, vol. 1516, pp. 9–20, 2017.

[30] L. Rosenblum, A. Zaffiro, W. A. Adams, and S. C. Wendelken, “Effect of chlorination by-products on the quantitation of microcystins in finished drinking water,” *Toxicon*, vol. 138, pp. 138–144, 2017.

[31] L. L. Zhang, R. P. Yu, L. P. Wang, S. F. Wu, and Q. J. Song, “Transformation of microcystins to 2-methyl-3-methoxy-4-phenylbutyric acid by room temperature ozone oxidation for rapid quantification of total microcystins,” *Environ Sci Process Impacts*, vol. 18, no. 4, pp. 493–499, 2016.

[32] C. Wang *et al.*, “A sensitive method for the determination of total microcystins in water and sediment samples by liquid chromatography with fluorescence detection,” *Analytical Methods*, vol. 7, no. 2, pp. 759–765, 2015.

[33] A. J. Foss and M. T. Aubel, “Using the MMPB technique to confirm microcystin concentrations in water measured by ELISA and HPLC (UV, MS, MS/MS),” *Toxicon*, vol. 104, pp. 91–101, 2015.

[34] X. Xu, R. Yu, L.-P. Wang, S. Wu, and Q. Song, “Sensitive determination of total microcystins with GC-MS method by using methylchloroformate as a derivatizing reagent,” *Analytical Methods*, vol. 5, no. 7, pp. 1799–1805, 2013, doi: 10.1039/c3ay26195f.

[35] K. Kaya and T. Sano, “Total microcystin determination using erythro-2-methyl-3-(methoxy-d3)-4-phenylbutyric acid (MMPB-d3) as the internal standard,” *Anal Chim Acta*, vol. 386, no. 1–2, pp. 107–112, 1999, doi: 10.1016/S0003-2670(99)00012-4.

[36] Z. Mohamed, Z. Ahmed, A. Bakr, M. Hashem, and S. Alamri, “Detection of free and bound microcystins in tilapia fish from Egyptian fishpond farms and its related public health risk assessment,” *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, vol. 15, no. 1, pp. 37–47, 2020.

[37] A. J. Foss, M. T. Aubel, B. Gallagher, N. Mettee, A. Miller, and S. B. Fogelson, “Diagnosing microcystin intoxication of canines: Clinicopathological indications, pathological characteristics,

and analytical detection in postmortem and antemortem samples," *Toxins (Basel)*, vol. 11, no. 8, p. 456, 2019.

[38] A. Brown, A. Foss, M. A. Miller, and Q. Gibson, "Detection of cyanotoxins (microcystins/nodularins) in livers from estuarine and coastal bottlenose dolphins (Tursiops truncatus) from Northeast Florida," *Harmful Algae*, vol. 76, pp. 22–34, 2018.

[39] N. M. Flores, T. R. Miller, and J. D. Stockwell, "A global analysis of the relationship between concentrations of microcystins in water and fish," *Front Mar Sci*, vol. 5, p. 30, 2018.

[40] B. Greer, J. P. Meneely, and C. T. Elliott, "Uptake and accumulation of Microcystin-LR based on exposure through drinking water: An animal model assessing the human health risk," *Sci Rep*, vol. 8, no. 1, pp. 1–10, 2018.

[41] K. D. Duncan, D. G. Beach, E. J. Wright, T. Barsby, C. G. Gill, and E. T. Krogh, "Direct online quantitation of 2-methyl-3-methoxy-4-phenyl butanoic acid for total microcystin analysis by condensed phase membrane introduction tandem mass spectrometry," *Analytical Methods*, vol. 10, no. 27, pp. 3310–3316, 2018.

[42] D. Vudathala *et al.*, "Analysis of microcystin-LR and nodularin using triple quad liquid chromatography-tandem mass spectrometry and histopathology in experimental fish," *Toxicon*, vol. 138, pp. 82–88, 2017.

[43] A. J. Foss, J. Butt, S. Fuller, K. Cieslik, M. T. Aubel, and T. Wertz, "Nodularin from benthic freshwater periphyton and implications for trophic transfer," *Toxicon*, vol. 140, pp. 45–59, 2017.

[44] B. Greer, R. Maul, K. Campbell, and C. T. Elliott, "Detection of freshwater cyanotoxins and measurement of masked microcystins in tilapia from Southeast Asian aquaculture farms," *Anal Bioanal Chem*, vol. 409, no. 16, pp. 4057–4069, 2017.

[45] A. Roy-Lachapelle, M. Solliec, M. Sinotte, C. Deblois, and S. Sauvé, "Total analysis of microcystins in fish tissue using laser thermal desorption–atmospheric pressure chemical ionization–high-resolution mass spectrometry (LDTD-APCI-HRMS)," *J Agric Food Chem*, vol. 63, no. 33, pp. 7440–7449, 2015.

[46] S. Cadel-Six, D. Moyenga, S. Magny, S. Trotereau, M. Edery, and S. Krys, "Detection of free and covalently bound microcystins in different tissues (liver, intestines, gills, and muscles) of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Method characterization," *Environmental Pollution*, vol. 185, pp. 333–339, 2014, doi: 10.1016/j.envpol.2013.10.016.

[47] F. Bieczynski, V. A. Bianchi, and C. M. Luquet, "Accumulation and biochemical effects of microcystin-LR on the Patagonian pejerrey (Odontesthes hatcheri) fed with the toxic cyanobacteria Microcystis aeruginosa," *Fish Physiol Biochem*, vol. 39, no. 5, pp. 1309–1321, 2013.

[48] P. Suchy and J. Berry, “Detection of total microcystin in fish tissues based on lemieux oxidation and recovery of 2-methyl-3-methoxy-4-phenylbutanoic acid (MMPB) by solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry (SPME-GC/MS),” *Int J Environ Anal Chem*, vol. 92, no. 12, pp. 1443–1456, 2012, doi: 10.1080/03067319.2011.620703.

[49] X. Wu, C. Wang, B. Xiao, Y. Wang, N. Zheng, and J. Liu, “Optimal strategies for determination of free/extractable and total microcystins in lake sediment,” *Anal Chim Acta*, vol. 709, pp. 66–72, 2012, doi: 10.1016/j.aca.2011.10.027.

[50] M.-R. Neffling, E. Lance, and J. Meriluoto, “Detection of free and covalently bound microcystins in animal tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry,” *Environmental Pollution*, vol. 158, no. 3, pp. 948–952, 2010, doi: 10.1016/j.envpol.2009.10.023.

[51] X. Wu, B. Xiao, R. Li, Z. Wang, X. Chen, and X. Chen, “Rapid quantification of total microcystins in cyanobacterial samples by periodate-permanganate oxidation and reversed-phase liquid chromatography,” *Anal Chim Acta*, vol. 651, no. 2, pp. 241–247, 2009, doi: 10.1016/j.aca.2009.08.026.

[52] X. Wu, B. Xiao, Y. Gong, Z. Wang, X. Chen, and R. Li, “Kinetic study of the 2-methyl-3-methoxy-4-phenylbutanoic acid produced by oxidation of microcystin in aqueous solutions,” *Environ Toxicol Chem*, vol. 27, no. 10, pp. 2019–2026, 2008, doi: 10.1897/07-525.1.

[53] T. Sano, H. Takagi, M. Nishikawa, and K. Kaya, “NIES certified reference material for microcystins, hepatotoxic cyclic peptide toxins from cyanobacterial blooms in eutrophic water bodies,” *Anal Bioanal Chem*, vol. 391, no. 6, pp. 2005–2010, 2008.

[54] E. D. Hilborn *et al.*, “Serologic evaluation of human microcystin exposure,” *Environ Toxicol*, vol. 22, no. 5, pp. 459–463, 2007, doi: 10.1002/tox.20281.

[55] J. L. Ott and W. W. Carmichael, “LC/ESI/MS method development for the analysis of hepatotoxic cyclic peptide microcystins in animal tissues,” *Toxicon*, vol. 47, no. 7, pp. 734–741, 2006.

[56] M. Yuan, W. W. Carmichael, and E. D. Hilborn, “Microcystin analysis in human sera and liver from human fatalities in Caruaru, Brazil 1996,” *Toxicon*, vol. 48, no. 6, pp. 627–640, 2006, doi: 10.1016/j.toxicon.2006.07.031.

[57] R. M. Soares *et al.*, “Sublethal exposure from microcystins to renal insufficiency patients in Rio de Janeiro, Brazil,” *Environ Toxicol*, vol. 21, no. 2, pp. 95–103, 2006, doi: 10.1002/tox.20160.

[58] L. M. D. Pires *et al.*, “Assimilation and depuration of microcystin-LR by the zebra mussel, Dreissena polymorpha,” *Aquatic Toxicology*, vol. 69, no. 4, pp. 385–396, 2004, doi: 10.1016/j.aquatox.2004.06.004.

[59] K. Tsuji, H. Masui, H. Uemura, Y. Mori, and K. Harada, “Analysis of microcystins in sediments using MMPB method,” *Toxicon*, vol. 39, no. 5, pp. 687–692, 2001.

[60] T. Sano, K. Nohara, F. Shiraishi, and K. Kaya, “A method for micro-determination of total microcystin content in waterblooms of cyanobacteria (blue-green algae),” *Int J Environ Anal Chem*, vol. 49, no. 3, pp. 163–170, 1992, doi: 10.1080/03067319208027567.

[61] S. Mitra and R. Brukh, “Sample preparation: an analytical perspective,” *Sample preparation techniques in analytical chemistry*, vol. 162, 2003.

[62] F. Chapuis, V. Pichon, and M.-C. Hennion, “Molecularly Imprinted Polymers: Developments and applications of new selective solid-phase extraction materials.,” *LC GC Eur*, pp. 408–417, 2004.

[63] I. Liška, “Fifty years of solid-phase extraction in water analysis–historical development and overview,” *J Chromatogr A*, vol. 885, no. 1–2, pp. 3–16, 2000.

[64] V. Camel, “Solid phase extration of trace elements,” *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc*, vol. 58, pp. 1177–1233, 2003.

[65] V. Pérez-Fernández, L. Mainero Rocca, P. Tomai, S. Fanali, and A. Gentili, “Recent advancements and future trends in environmental analysis: Sample preparation, liquid chromatography and mass spectrometry,” *Anal Chim Acta*, vol. 983, pp. 9–41, 2017, doi: 10.1016/j.aca.2017.06.029.

[66] Μ. Όξενκιουν Πετροπούλου, “Θεωρίες δεσμών για τα σύμπλοκα,” 2015.

[67] R. E. Ardrey, *Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction*, vol. 2. John Wiley & Sons, 2003.

[68] S.-K. Zervou, C. Christophoridis, T. Kaloudis, T. M. Triantis, and A. Hiskia, “New SPE-LC-MS/MS method for simultaneous determination of multi-class cyanobacterial and algal toxins,” *J Hazard Mater*, vol. 323, pp. 56–66, 2017.