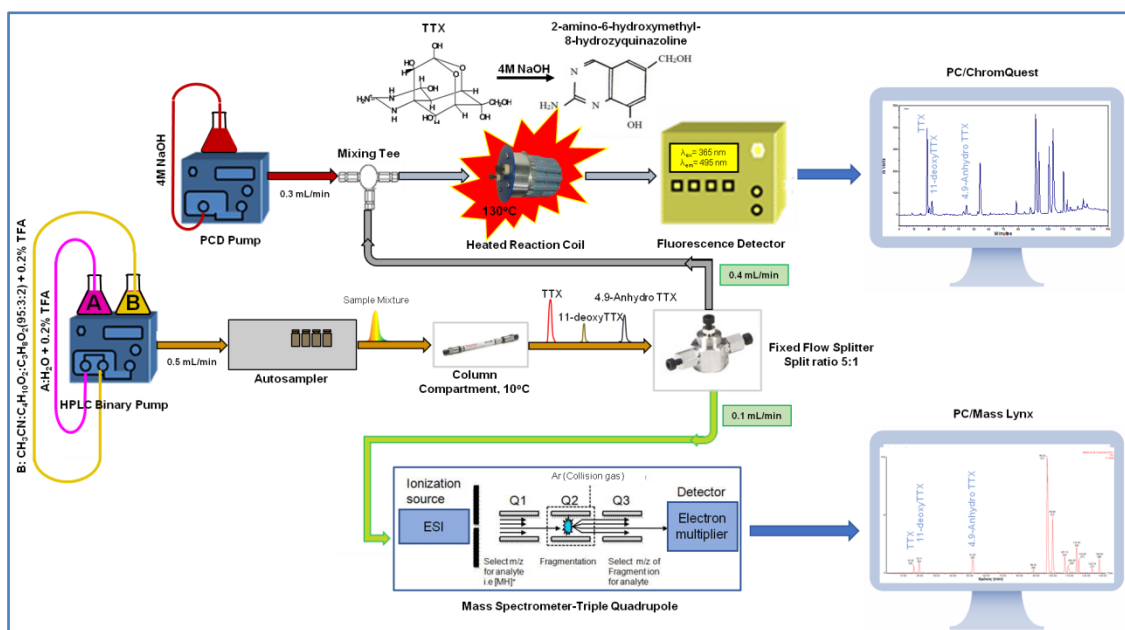


ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Ανάλυση της Τετραδοτοξίνης και των αναλόγων της στο  
*Lagocerphalus sceleratus* με υγρή χρωματογραφία και ταυτόχρονη  
φθορισμομετρική ανίχνευση και φασματομετρία μαζών.**



ΑΛΟΥΣΙ ΑΡΕΝΣ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2019

Ανάλυση της Τετραδοτοξίνης και των αναλόγων της στο *Lagocephalus sceleratus* με υγρή χρωματογραφία και ταυτόχρονη φθορισμομετρική ανίχνευση και φασματομετρία μαζών.

Αλούσι Άρενς

Υποβολή Πτυχιακής διατριβής που αποτελεί μέρος των απαιτήσεων για την απονομή του Πτυχίου του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Διεθνούς Πανεπιστημίου Ελλάδος

Ημερομηνία: 2019

Εισηγητής: Ρήγας Παντελής

Ανάλυση της ΤΤΧ και των αναλόγων της στο *Lagocephalus sceleratus* με υγρή χρωματογραφία και ταυτόχρονη φθορισμομετρική ανίχνευση και φασματομετρία μαζών.

Αλούσι Άρενς

Διεθνές Πανεπιστήμιο της Ελλάδος, Σχολή Γεωτεχνικών Επιστημών, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, 57400 Θεσσαλονίκη Τ.Θ. 141

### Περίληψη

Ο *Lagocephalus sceleratus* είναι ένα επικίνδυνο ψάρι που έχει μεταναστεύσει στα νερά της Μεσογείου και αποτελεί κίνδυνο για τη δημόσια υγεία λόγω της τετραδοτοξίνης (ΤΤΧ), που περιέχει. Η ΤΤΧ είναι μια τοξίνη η οποία μπορεί να προκαλέσει θάνατο με μυϊκή παράλυση, αναπνευστική καταστολή και κυκλοφοριακή ανεπάρκεια και συνυπάρχει με τα φυσικά ανάλογα της. Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει έγκυρη μέθοδος για τον προσδιορισμό της ΤΤΧ. Στην παρούσα έρευνα αναπτύχθηκε μια νέα μέθοδος ανάλυσης της ΤΤΧ και των αναλόγων της στο *L. Sceleratus*. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν ταυτόχρονα η μέθοδος υγρής χρωματογραφίας και παραγωγή μετά τη στήλη με φθορισμομετρική ανίχνευση (HPLC-PCD-FLD) και η μέθοδος υγρής χρωματογραφίας – φασματομετρίας μαζών (LC-MS/MS) με τεχνολογία τριπλού τετραπόλου. Η αναλυτική στήλη για τη μέθοδο ήταν Hypercarb (150 x 4,6 mm ID, 3μ) της Thermo Scientific. Η κινητή φάση Α είναι διάλυμα 0,2% τριφθοροξικό οξέος σε νερό και η κινητή φάση Β διάλυμα 3% 2-αιθόξυ-αιθανόλης, 2% 2-μεθόξυ-αιθανόλης και 0,2% τριφθοροξικό οξύ σε ακετονιτρίλιο. Η ροή της κινητής φάσης είναι 0,5 ml/min και μετά τη στήλη διαχωρίζεται σε 0,4 ml/min στο σύστημα παραγωγής και 0,1 ml/min στο σύστημα φασματομετρίας μάζας. Η θερμοκρασία της ανάλυσης είναι 10°C. Οι συνθήκες βαθμιδωτής έκλουσης είναι από 0 έως 20 λεπτά 0,5%B ισοκρατικά, από 20 έως 50 λεπτά 3% Β γραμμικά, από τα 50.1 έως τα 55 λεπτά 5% Β σε διακριτά βήματα, από τα 55 έως τα 75 λεπτά 9% γραμμικά, από τα 75 έως τα 100 λεπτά 13% γραμμικά, από τα 100 έως τα 115 λεπτά 20% γραμμικά, από τα 115 έως τα 130 λεπτά 20% ισοκρατικά, από τα 130 έως τα 140 λεπτά 0,5% γραμμικά και από τα 140 έως τα 260 λεπτά 0,5% ισοκρατικά. Ο φασματογράφος μάζας λειτούργησε με την διασύνδεση Z-Spray (+) ESI και σε κατάσταση MRM αναλύοντας 28 μεταπτώσεις. Από τη μέθοδο ανιχνεύτηκαν τριάντα δυο (32) τοξίνες εκ των οποίων ταυτοποιήθηκαν η ΤΤΧ, η 4,9-ανυδροΤΤΧ και έντεκα (11) ακόμα γνωστά και σημαντικά ανάλογα της ΤΤΧ όπως, η 11-deoxyΤΤΧ και 5-deoxyΤΤΧ με m/z 304, η 11-norΤΤΧ-6(S)-ol και η 11-norΤΤΧ-6THΣ-ol με m/z 290, η 6,11-dideoxyΤΤΧ με m/z 288, η 5,6,11-trideoxyΤΤΧ και η 4-epi-5,6,11-trideoxyΤΤΧ με m/z 272 και η 4,9-anhydro-5,6,11-trideoxyΤΤΧ και η 4,4a-anhydro-5,6,11-trideoxyΤΤΧ με m/z 254. Ενώ πραγματοποιήθηκε και η ανίχνευση του τετραδονικού οξέος με m/z 320. Ταυτόχρονα με την τεχνική LC-MS/MS ανιχνεύτηκαν κορυφές με ανάλογο m/z που δεν ήταν δυνατό να ταυτοποιηθεί η δομή των, ενώ με την τεχνική HPLC-PCD-FLD ανιχνεύτηκαν και κορυφές, που δεν εμφανίζονταν στην LC-MS/MS τεχνική. Η σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) των δύο μεθόδων για την ΤΤΧ και τέσσερα (4) ακόμα ανάλογα της για πέντε επαναλήψεις (n=5) ήταν < 1.5%. Το κατώτερο όριο ανίχνευσης (LOD) για την ΤΤΧ υπολογίστηκε στα 20,39 μg/L (HPLC-PCD-FLD), 14,20 μg/L και 21,35 μg/L (LC-MS/MS στις μεταπτώσεις m/z 320>302, 320>162) και για την 4,9-ανυδροΤΤΧ στα 49,85 μg/L (HPLC-PCD-FLD) και 83,82 μg/L (LC-MS/MS μεθόδους στις μεταπτώσεις m/z 302>162). Το κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) για την ΤΤΧ υπολογίστηκε στα 61,8 μg/L (HPLC-PCD-FLD), 43,02 μg/L και 64,69 μg/L (LC-MS/MS στις μεταπτώσεις m/z 320>302, 320>162) και για την 4,9-ανυδροΤΤΧ στα 151,05 μg/L (HPLC-PCD-FLD) και 254 μg/L (LC-MS/MS μεθόδους στις μεταπτώσεις m/z 302>162). Τα επίπεδα συγκέντρωσης της ΤΤΧ (mg/Kg) στους ιστούς του *L. sceleratus* κυμαίνονται από 146.27-274.53 (Γονάδες), 120.98-158.37 (Συκώτι), 5.19-11.73 (Μύες) και 2.02-7.46 (Δέρμα) και για τις δύο μεθόδους. Τα επίπεδα συγκέντρωσης της 4,9-ανυδροΤΤΧ (mg/Kg) στους ιστούς του *L. sceleratus* κυμαίνονται από 9.53-51.4 (Γονάδες), 19.97-27.51 (Συκώτι), 0.37-4.75 (Μύες) και 0.1-1.68 (Δέρμα) και για τις δύο μεθόδους.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ .....	iv
1. Εισαγωγή.....	1
2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση.....	3
2.1 <i>Lagocephalus sceleratus</i> .....	3
2.1.1 Προέλευση και εξάπλωση .....	3
2.1.2 Χαρακτηριστικά .....	4
2.1.3 Επιπτώσεις και κίνδυνος εξάπλωσης και κατανάλωσης.....	6
2.2 Τετραδοτοξίνη (TTX) .....	7
2.2.1 Δομή και ανάλογα της TTX .....	8
2.2.2 Κατανομή στη φύση .....	10
2.2.3 Τοξικότητα και μηχανισμός δράσης .....	10
2.2.4 Μέθοδοι ανάλυσης της τετραδοτοξίνης .....	12
2.3 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) .....	13
2.3.1 Εισαγωγή.....	13
2.3.2 Οργανολογία συστήματος HPLC.....	14
2.3.3 Στήλη Υγρής Χρωματογραφίας.....	15
2.3.4 Ανίχνευση με φθορισμό και παραγωγή μετά τη στήλη .....	17
2.4 Φασματομετρία μαζών (Mass Spectrometry, MS).....	18
2.4.1 Εισαγωγή.....	18
2.4.2 Οργανολογία συστήματος MS.....	18
2.5 Υγρή χρωματογραφία – φασματομετρία μαζών (LC/MS) .....	20
2.5.1 Εισαγωγή.....	20
2.5.2 Οργανολογία συστήματος LC/MS.....	22
2.5.2.1 Πηγή ιόντων.....	22
2.5.2.2 Αναλυτής Μαζών Τριπλού Τετράπολου .....	24

3. Σκοπός της εργασίας .....	26
4. Υλικά και μέθοδοι .....	27
4.1 Υλικά και όργανα .....	27
4.1.1 Πρώτη ύλη .....	27
4.1.2 Αντιδραστήρια και διαλύτες.....	27
4.1.3 Όργανα και συσκευές .....	27
4.2 Προετοιμασία δείγματος .....	28
4.3 Ανάπτυξη της μεθόδου ανάλυσης της τετραδοτοξίνης.....	30
4.3.1 Προσδιορισμός της ΤΤΧ με Υγρή Χρωματογραφία.....	30
4.3.2 Προσδιορισμός της ΤΤΧ με φασματομετρία μάζας.....	33
4.3.3 Αναλυτική περιγραφή του πειραματικού μέρους.....	35
5. Αποτελέσματα – Συζήτηση.....	37
5.1 Επιλογή αναλυτικής στήλης και κινητής φάσης.....	37
5.1.1 Επιλογή στατικής φάσης.....	37
5.1.2 Επιλογή κινητής φάσης Α .....	38
5.2 Μελέτη της επίδρασης του οργανικού διαλύτη.....	39
5.3 Μελέτη της θερμοκρασίας ανάλυσης .....	44
5.4 Γραμμικότητα.....	47
5.5 Επαναληψιμότητα – Repeatability (%RSD).....	51
5.6 Κατώτερο όριο ανίχνευσης και κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης .....	54
5.7 Ποιοτικός προσδιορισμός της ΤΤΧ και των αναλόγων της .....	58
5.8 Ποσοτικός προσδιορισμός της ΤΤΧ και της 4,9-ανυδροΤΤΧ.....	70
6. Συμπεράσματα .....	73
7. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα.....	74
8. Βιβλιογραφία .....	75

## ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

<b>ACN</b>	Acetonitrile	Ακετονιτρίλιο
<b>API</b>	Atmospheric Pressure Ionization	Ιονισμός σε Ατμοσφαιρική Πίεση
<b>ESI</b>	ElectroSpray Ionization	Ιονισμός με Ηλεκτροψεκασμό
<b>FLD</b>	Fluorescence Detection	Φθορισμομετρική Ανίχνευση
<b>GC</b>	Gas Chromatography	Αέρια Χρωματογραφία
<b>GC-MS</b>	Gas Chromatography – Mass Spectrometry	Αέρια Χρωματογραφία - Φασματομετρία Μάζας
<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Chromatography	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης
<b>HPLC-PCD-FLD</b>	High Pressure Liquid Chromatography with Post-Column Derivatization and Fluorescence Detection	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης με Παραγωγή μετά τη στήλη και Φθορισμομετρική Ανίχνευση
<b>IPA</b>	Isopropyl Alcohol	Ισοπροπυλική Αλκοόλη
<b>LC</b>	Liquid Chromatography	Υγρή Χρωματογραφία
<b>LC-MS/MS</b>	Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry	Υγρή Χρωματογραφία με Διαδοχική Φασματομετρία Μάζας
<b>LD</b>	Lethal Dose	Θανατηφόρος Δόση
<b>LOD</b>	Limit Of Detection	Κατώτερο Όριο Ανίχνευσης
<b>LOQ</b>	Limit Of Quantitation	Κατώτερο Όριο Ποσοτικοποίησης
<b>MRM</b>	Multiple Reaction Monitoring	Παρακολούθηση Πολλαπλών Αντιδράσεων
<b>NaOH</b>	Sodium Hydroxide	Υδροξείδιο του Νατρίου
<b>PCD</b>	Post-Column Derivatization	Παραγωγή μετά τη στήλη
<b>PEEK</b>	Polyetheretherketone	Πολυαιθεροαιθεροκετόνη
<b>RSD</b>	Relative Standard Deviation	Σχετική Τυπική Απόκλιση
<b>RT</b>	Retention Time	Χρόνος Κατακράτησης
<b>SIM</b>	Single Ion Monitoring	Παρακολούθηση Επιλεγμένου Ιόντος

<b>SRM</b>	Selected Reaction Monitoring	Παρακολούθηση Επιλεγμένης Αντίδρασης
<b>TTX</b>	Tetrodotoxin	Τετραδοτοξίνη
<b>UV</b>	UltraViolet	Υπεριώδης
<b>4,9-anhydroTTX</b>	4,9-anhydro Tetrodotoxin	4,9-ανυδρο Τετραδοτοξίνη

## 1. Εισαγωγή

Ο *Lagocephalus sceleratus*, γνωστός με την ονομασία Silver-cheeked toadfish, είναι ένας Λεσσεψιανός μετανάστης, που προέρχεται από την περιοχή του Ινδό-Ειρηνικού και είναι ένα εξαιρετικά δηλητηριώδες θαλάσσιο οστεώδες ψάρι της οικογένειας των Τετραοδοντιδών (*Tetraodontidae*) (Katikou et al., 2009). Είναι ένα χωροτακτικό είδος που εισήχθηκε στην Ανατολική Μεσόγειο και δημιούργησε αποικίες (Rodriguez et al., 2012). Επιπλέον επεκτάθηκε και προς τα δυτικά, στις ακτές της Αιγύπτου, της Λιβύης, της Τυνησίας, της Ιταλίας και της Ισπανίας (Souissi et al., 2014). Είναι ένα εξαιρετικά τοξικό και επιθετικό σαρκοβόρο ψάρι και τρέφεται με είδη ψαριών με αποτέλεσμα να έχει αρνητικές οικονομικές, οικολογικές και υγειονομικές επιπτώσεις στη Μεσόγειο (Kosker et al., 2016, Boustany et al., 2015). Ο *L. sceleratus* μπορεί να αποτελέσει πηγή τροφικής δηλητηρίασης με μεγάλο κίνδυνο θνησιμότητας καθώς περιέχει τη τετραδοτοξίνη (TTX) (Katikou et al., 2009).

Η τετραδοτοξίνη (TTX) είναι μια πρωτεϊνική νευροτοξίνη χαμηλού μοριακού βάρους, που αρχικά θεωρήθηκε ότι υπήρχε μόνο σε είδη pufferfish της οικογένειας *Tetraodontidae*. Εντούτοις, ανιχνεύτηκε σε μια σειρά διαφορετικών οργανισμών που περιλαμβάνουν: γαστερόποδα, αρθρόποδα, μαλάκια, βακτήρια κ.α. (Lago et al., 2015). Η TTX συνυπάρχει με τα φυσικά ανάλογα της. Μέχρι σήμερα έχουν αναφερθεί 30 δομικά ανάλογα της TTX, 26 φυσικά και 4 συνθετικά και ο βαθμός της τοξικότητας τους ποικίλει αναλόγως με τη δομή τους (Bane et al., 2014). Η TTX είναι μια από της πιο ισχυρές νευροτοξίνες που υπάρχουν, δρα αναστέλλοντας τους δίαυλους νατρίου και μειώνοντας τη διεγερσιμότητα της μεμβράνης των ζωτικών ιστών, των καρδιακών μυοκυττάρων, των σκελετικών μυών και των κεντρικών και περιφερειακών νευρικών συστημάτων, με αποτέλεσμα την εμφάνιση τυπικών συμπτωμάτων και σε κάποιες σοβαρές περιπτώσεις ακόμα και τον θάνατο, ενώ δεν έχει μέχρι στιγμής γνωστό αντίδοτο (Lago et al., 2015).

Η τετραδοτοξίνη (TTX) και πολλά από τα ανάλογα της βρίσκονται συνήθως σε μεγάλη ποικιλία ζωικών εκχυλισμάτων. Η παρουσία της ανιχνεύεται με τη βιοδοκιμή σε ποντικούς, ενώ έχουν αναπτυχθεί πρόσθετες τεχνικές για την ανάλυση της, όπως η ELISA, η φθορισμομετρική ανάλυση και η βιοδοκιμή κυτταρικής καλλιέργειας. Οι εναλλακτικές λύσεις που βασίζονται σε χημικές μεθόδους περιλαμβάνουν αέρια χρωματογραφία με φασματομετρία μάζας (GC-MS), χρωματογραφία ανοσοσυγγένειας, υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με παραγωγή μετά τη στήλη και ανίχνευση με φθορισμό (HPLC-PCD-FLD), HPLC με ανίχνευση με υπεριώδη ακτινοβολία (UV), υγρή χρωματογραφία με φασματομετρία μάζας απλού τετραπόλου (LC-MS) και υγρή χρωματογραφία



συζευγμένη με φασματομετρία μάζας τριπλού τετραπόλου (LC-MS/MS). Σήμερα, δεν υπάρχει έγκυρη μέθοδος LC-MS για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ΤΤΧ. Η δοκιμή διαφορετικών αναλυτικών στηλών και οι βελτιστοποιημένες συνθήκες LC-MS απαιτούνται για τον εντοπισμό και τον διαχωρισμό της ΤΤΧ και των αναλόγων της σε ένα δείγμα (Otero et al., 2013).

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιείται ανάπτυξη μεθόδου με τη ταυτόχρονη χρήση δύο μεθόδων ανίχνευσης. Η πρώτη μέθοδος είναι αυτή της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης και παραγωγή μετά τη στήλη με φθορισμομετρική ανίχνευση (HPLC-PCD-FLD) και η δεύτερη της υγρής χρωματογραφίας με διαδοχική φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS) με αναλυτή μαζών τριπλού τετραπόλου, με σκοπό την ταυτόχρονη ανάλυση της τετραδοτοξίνης (ΤΤΧ) και των αναλόγων της στο *Lagocephalus sceleratus* με τις δύο τεχνικές. Σκοπός είναι η επίτευξη πλήρη διαχωρισμού της ΤΤΧ και των αναλόγων της, η ταυτοποίηση τους και η ποσοτικοποίηση της ΤΤΧ και της 4,9-ανυδροΤΤΧ. Για την εγκυρότητα της μεθόδου πραγματοποιήθηκε έλεγχος της σχετικής τυπικής απόκλισης (%RSD) η γραμμικότητα των δύο μεθόδων και ο υπολογισμός του κατώτερου ορίου ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης LOD και LOQ, αντίστοιχα.

## 2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση

### 2.1 *Lagocephalus sceleratus*

Το *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789), είναι ένας Λεσσεψιανός μετανάστης, που προέρχεται από την περιοχή του Ινδό-Ειρηνικού και είναι ένα εξαιρετικά δηλητηριώδες θαλάσσιο οστεώδες ψάρι της οικογένειας των Τετραοδοντιδών (*Tetraodontidae*). Παρόμοια με τα κοινά τροπικά είδη το *L. sceleratus* μπορεί να αποτελέσει πηγή τροφικής δηλητηρίασης με μεγάλο κίνδυνο θνησιμότητας καθώς περιέχει τη τετραδοτοξίνη (ΤΤΧ), μια τοξίνη η οποία μπορεί να προκαλέσει θάνατο με μυϊκή παράλυση, αναπνευστική καταστολή και κυκλοφορική ανεπάρκεια (Katikou et al., 2009).

#### 2.1.1 Προέλευση και εξάπλωση

Με το άνοιγμα της διώρυγας του Σουέζ το 1869, ενώθηκαν δύο πολύ διαφορετικές ζωογεωγραφικές περιοχές: η υποτροπική Μεσογειακή Θάλασσα και η τροπική Ερυθρά Θάλασσα, η βορειότερη επέκταση του Ινδικού Ωκεανού (Katikou et al., 2009). Ως επακόλουθο, τα χωροκατακτητικά είδη που προέρχονταν από την Ερυθρά Θάλασσα μετανάστευσαν στην Ανατολική Μεσόγειο και δημιούργησαν νέες αποικίες και αποτέλεσαν ένα σημαντικό στοιχείο του μεσογειακού οικοσυστήματος. Αυτά τα θαλάσσια είδη έχουν χαρακτηριστεί ως Λεσσεψιανοί μετανάστες. Σήμερα, πάνω από 300 είδη που προέρχονται από την Ερυθρά Θάλασσα, έχουν εντοπιστεί στη Μεσόγειο Θάλασσα (Rodriguez et al., 2012). Τουλάχιστον έντεκα είδη της οικογένειας των Τετραοδοντιδών έχουν αναφερθεί όπως, τα *Lagocephalus guentheri*, *L. spadiceus*, *L. lagocephalus*, *L. suezensis*, *L. Sceleratus* κ.α. Ανάμεσα σε αυτά τα είδη, τη μεγαλύτερη ανησυχία δημιουργεί το *Lagocephalus sceleratus* που είναι εξαιρετικά επιθετικό και τοξικό ψάρι (Guardone et al., 2018).

Γνωστό με την ονομασία Silver-cheeked toadfish, το *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789), είναι ένας Λεσσεψιανός μετανάστης, που προέρχεται από την περιοχή του Ινδό-Ειρηνικού. Αρχικά ο *L. sceleratus* συλλέχθηκε στην Μεσόγειο Θάλασσα το Φεβρουάριο του 2003 στον κόλπο Gokona (νότιο Αιγαίο, Τουρκία) και τον Νοέμβριο του 2004 από τη Jaffa κατά μήκος της ισραηλινής ακτής. Στα ελληνικά ύδατα καταγράφηκε για πρώτη φορά στο Κρητικό Πέλαγος (Αιγαίο) τον Ιούλιο του 2005 (Katikou et al., 2009). Σύντομα, εγκατέστησε άφθονες αποικίες στις ακτές διάφορων χωρών, όπως το Ισραήλ, ο Λίβανος, η Κύπρος. Επιπλέον επεκτάθηκε και προς τα δυτικά, στις ακτές της Αιγύπτου, της Λιβύης, της Τυνησίας, της Ιταλίας και της Ισπανίας (Souissi et al., 2014). Για το λόγο αυτό θεωρείται ως ένας από τους ταχύτατα αναπτυσσόμενους Λεσσεψιανούς μετανάστες. Αυτός ο γρήγορος ρυθμός επέκτασης υποδηλώνει καλύτερη ικανότητα προσαρμογής σε διαφορετικές συνθήκες περιβάλλοντος και μπορεί να επηρεάσει την ποικιλία ή/και την αφθονία των εγχώριων ειδών στο εγγύς μέλλον (Katikou et al., 2009).

### 2.1.2 Χαρακτηριστικά

Το *Lagocephalus sceleratus* είναι ένα σαρκοβόρο ψάρι και τρέφεται με είδη ψαριών όπως γαρίδες, καβούρια, σουπιές, καλαμάρια ακόμα και με ψάρια του ίδιου είδους, συνήθως βρίσκεται και τρέφεται σε περιοχές με αμμώδες ή λασπώδες υπόστρωμα κοντά σε κοραλλιογενείς υφάλους σε βάθη που φτάνουν ως τα 100 μέτρα. Είναι ένα από τα μεγαλύτερα είδη της οικογένειας του φτάνοντας τα 110cm σε μήκος. Το σώμα του είναι επιμηκυμένο και ελαφρώς συμπιεσμένο στις πλευρές και με την κατάποση του νερού έχει την ικανότητα να το φουσκώσει. Αυτό το χαρακτηριστικό είναι κοινό για ruffer ψάρια, τα οποία είναι σχετικά αργεί κολυμβητές και έχουν ως εκ τούτου εξελίξει αυτή την ικανότητα προκειμένου να απωθούν τους θηρευτές τους (βλ. Φωτογραφίες 1-3). Το χρώμα στο σώμα του είναι σκούρο καφέ με τακτικές κηλίδες στην πλάτη, ασημί ζώνες στα πλευρά και άσπρη κοιλιά. Δεν έχει λέπια αλλά παρατηρούνται πολύ μικρές σπειροειδείς επιφάνειες στις κοιλιακές και ραχιαίες περιοχές. Κάθε σαγόني έχει δύο ισχυρά δόντια που μπορούν να καταστρέψουν τα δίκτυα αλιείας, δίνοντας έτσι στην οικογένεια του *L. sceleratus* το όνομα (tetras=τέσσερα, odontus=δόντι) (Boustany et al., 2015). Έχει αναφερθεί ότι έχει υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και έχει ένα ευνοϊκό προφίλ λιπαρών οξέων (Kosker et al., 2016).



Φωτογραφία 1: *Lagocephalus sceleratus*/Ρόδος-Δωδεκάνησα

<http://www.topontiki.gr/article/247795/malliakos-emfanisthike-epikindyno-toxiko-psari-lagokefalos>



Φωτογραφία 2: *Lagocephalus sceleratus*

<https://www.tuttobarche.it/magazine/pesce-mortale-lagocephalus.html>



Φωτογραφία 3: *Lagocephalus sceleratus*/Μαλιακός Κόλπος

<http://www.topontiki.gr/article/247795/malliakos-emfanisthike-epikindyno-toxiko-psari-lagokefalos>

### 2.1.3 Επιπτώσεις και κίνδυνος εξάπλωσης και κατανάλωσης

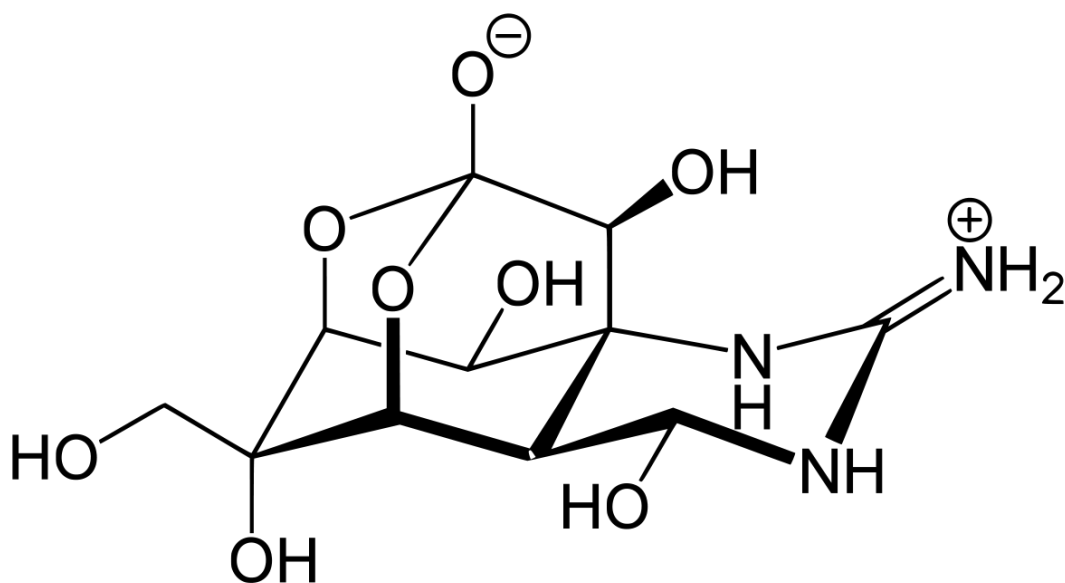
Ο *Lagocephalus sceleratus* και άλλα είδη της οικογένειας των Τετραοδοντιδών έχουν αρνητικές οικονομικές, οικολογικές και υγειονομικές επιπτώσεις στη Μεσόγειο (Kosker et al., 2016). Συγκεκριμένα ο *L. sceleratus* επηρεάζει τις τοπικές αγορές ψαριών με τρεις τρόπους: αποτρέποντας τους πελάτες από την αγορά αυτού του ψαριού, δημιουργώντας πρόσθετη εργασία που συνίσταται στην απόρριψη των ανεπιθύμητων ψαριών και στη μείωση τοπικών αποθεμάτων εμπορικών ψαριών όπως καλαμάρια και χταπόδια μέσω της θήρευσης τους (Kalogirou, 2013).

Η σημαντικότερη πτυχή από κοινωνικής άποψης είναι αναμφισβήτητα ο κίνδυνος που συνδέεται με την κατανάλωση των ψαριών, λόγω της τοξικότητάς τους (Kalogirou, 2013). Αρκετές δηλητηριάσεις λόγω της κατανάλωσης των ειδών από την οικογένεια των Τετραοδοντιδών έχουν σημειωθεί σε χώρες της ανατολικής Μεσογείου. Σύμφωνα με τις ισχύουσες ευρωπαϊκές νομοθετικές απαιτήσεις (Κανονισμός 853/2004/ΕΚ και Κανονισμός 854/2004/ΕΚ), τα δηλητηριώδη ψάρια της οικογένειας των Τετραοδοντιδών και τα προϊόντα που παράγονται από αυτά δεν πρέπει να διατίθενται στην αγορά για πώληση και κατανάλωση (Katikou et al., 2009).. Στις μεσογειακές αγορές της Αιγύπτου ο *L. sceleratus* πωλείται αποκεφαλισμένος και ευσπλαχνισμένος. Σε μια παγκόσμια προοπτική, περιστασιακές τυχαίες δηλητηριάσεις έχουν οδηγήσει σε πολυάριθμους θανάτους, οι περισσότεροι από τους οποίους έχουν τεκμηριωθεί σε χώρες της νοτιοανατολικής Ασίας, όπως η Μαλαισία, η Ταϊβάν, η Κορέα και το Χονγκ Κονγκ (Kalogirou, 2013).

Αν και αυτό το ψάρι είναι δηλητηριώδες, καταναλώνεται σε ορισμένες χώρες, συμπεριλαμβανομένων των χωρών της Μεσογείου, όπως η Τουρκία, η Αίγυπτος, το Ισραήλ και ο Λίβανος (Kosker et al., 2016). Στα ιαπωνικά και τα ασιατικά ύδατα, η ύπαρξη ψαριών που ανήκουν στην οικογένεια των Τετραοδοντιδών είναι πολύ συχνή. Οι Ιάπωνες είναι γνωστοί καταναλωτές του *fugu*, που θεωρείται γαστρονομική λιχουδιά, οι ειδικά εκπαιδευμένοι σεφ διδάσκονται να αφαιρούν τους δυνητικά τοξικούς ιστούς από την σάρκα των ψαριών. Παρόλα αυτά έχουν συμβεί δηλητηριάσεις ακόμα και με την προσεκτική απομάκρυνση των τμημάτων ιστού υψηλού κινδύνου. Το υπουργείο Υγείας, Εργασίας και Πρόνοιας δημοσίευσε έναν οδηγό με τα βρώσιμα μέρη και τα είδη ψαριών που επιτρέπεται να καταναλωθούν όπου ο *L. sceleratus* δεν περιλαμβάνεται στα βρώσιμα είδη. Ωστόσο, οι περιπτώσεις δηλητηρίασης με ΤΤΧ εξακολουθούν να εμφανίζονται σε αυτήν και σε άλλες ασιατικές χώρες (Rampla-Alegre et al., 2017; Bane et al., 2016).

## 2.2 Τετραδοτοξίνη (TTX)

Τον Ιούλιο του 1894, ο Δρ Yoshizumi Tahara παρουσίασε το δηλητήριο που απομονώθηκε από το υδατικό εκχύλισμα ωθηκών του είδους ψαριού globefish στη μηνιαία συνάντηση της φαρμακευτικής κοινότητας της Ιαπωνίας. Αργότερα, καθιέρωσε μια βελτιωμένη μέθοδο εκχύλισης και καθαρισμού κατάλληλη για την παραγωγή μεγάλης κλίμακας του δηλητηρίου. Τελικά, το 1909, επιβεβαίωσε ότι το globefish περιείχε μόνο μια τοξική ουσία και την ονόμασε τετραδοτοξίνη (tetrodotoxin) (σχήμα 1), λόγω του ονόματος της οικογένειας του είδους pufferfish από την οποία απομονώθηκε πρώτη φορά, Τετραοδοντίδες (*Tetraodontidae*) (Lago et al., 2015).



Σχήμα 1. Μοριακή δομή της τετραδοτοξίνης (TTX)

Τύπος :  $C_{11}H_{17}N_3O_8$

Μοριακή μάζα : 319,27 g/mol

Κωδικός IUPAC : (4R,4aR,5R,6S,7S,8S,8aR,10S,12S)-2-azaniumylidene-4,6,8,12-tetrahydroxy-6-(hydroxymethyl)-2,3,4,4a,5,6,7,8-octahydro-1H-8a,10-methano-5,7-(epoxymethanoxy)quinazolin-10-olate

CAS Number : 4368-28-9

### 2.2.1 Δομή και ανάλογα της TTX

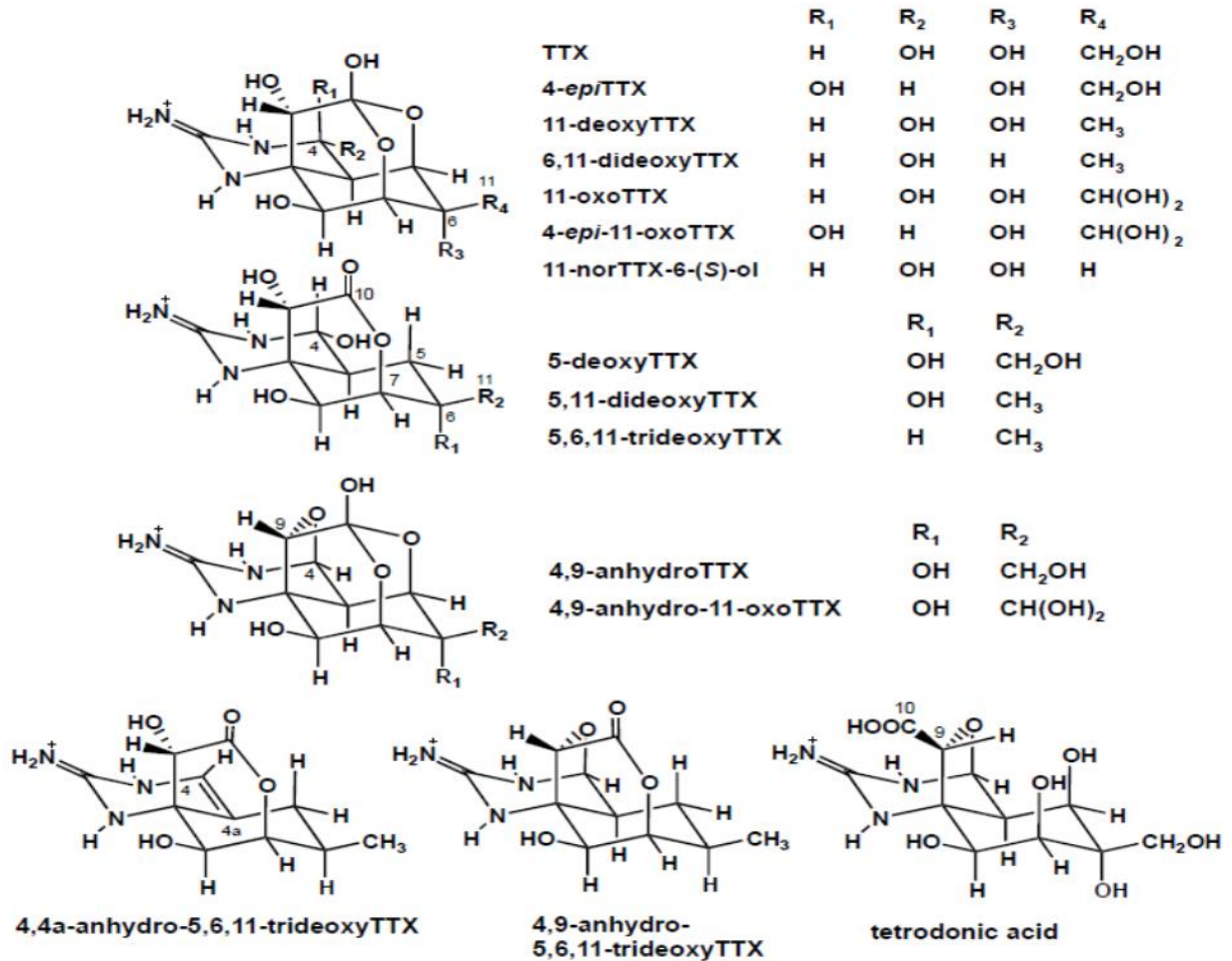
Η τετραδοτοξίνη (TTX) είναι ένα ετεροκυκλικό μόριο οργανικής υπερυδροκινοζολιαμίνης (αμινοπεριϋδροκουιναζολόνη). Η δομή της διασαφηνίστηκε από τον R. B. Woodward το 1964. Δομικά η TTX αποτελείται από ένα τμήμα γουανιδινίου συνδεδεμένο σε ένα πολύ οξυγονωμένο σκελετό άνθρακα που έχει ένα τμήμα 2,4-διοξαδαμαντάνιου που περιέχει 5 υδροξυλικές ομάδες (σχήμα 1). Η TTX συνυπάρχει με τα φυσικά ανάλογα της. Μέχρι σήμερα έχουν αναφερθεί 30 δομικά ανάλογα της TTX, 26 φυσικά και 4 συνθετικά και ο βαθμός της τοξικότητας τους ποικίλει αναλόγως με τη δομή τους. Τα σημαντικότερα από τα ανάλογα που έχουν ανιχνευθεί στα pufferfish και παρουσιάζουν ενδιαφέρον δίνονται στον πίνακα 1 (Bane et al., 2014). Η δομή των αναλόγων παρουσιάζεται στο σχήμα 2 (Gorapava Puilingi C. et al., 2015).

Πίνακας 1. Μοριακός τύπος και μοριακό βάρος της TTX και των αναλόγων της.

No.	Τοξίνες	Μοριακός τύπος	Μοριακό βάρος
1	TTX	$C_{11}H_{17}N_3O_8$	320
2	4-epiTTX	$C_{11}H_{17}N_3O_8$	320
3	6-epiTTX	$C_{11}H_{17}N_3O_8$	320
4	Tetrodonic acid	$C_{11}H_{17}N_3O_8$	320
5	11-oxoTTX	$C_{11}H_{17}N_3O_9$	336
6	4,9-anhydroTTX	$C_{11}H_{15}N_3O_7$	302
7	6-epi-4,9-anhydroTTX	$C_{11}H_{15}N_3O_7$	302
8	AnhydroTTX	$C_{11}H_{14}N_3O_7$	301
9	11-deoxyTTX	$C_{11}H_{17}N_3O_7$	304
10	5-deoxyTTX	$C_{11}H_{17}N_3O_7$	304
11	11-norTTX-6(S)-ol	$C_{10}H_{15}N_3O_7$	290
12	11-norTTX-6(R)-ol	$C_{10}H_{15}N_3O_7$	290
13	5,6,11-trideoxyTTX	$C_{10}H_{13}N_3O_6$	272
14	4-epi-5,6,11-trideoxyTTX	$C_{10}H_{13}N_3O_6$	272
15	5,11-dideoxyTTX	$C_{11}H_{17}N_3O_6$	288
16	6,11-dideoxyTTX	$C_{11}H_{17}N_3O_6$	288
17	1-hydroxy-8-epi-5,6,11-trideoxy TTX	$C_{11}H_{17}N_3O_6$	288
18	4,9-anhydro-5,6,11-trideoxyTTX	$C_{10}H_{11}N_3O_5$	254
19	4,4a-anhydro-5,6,11-trideoxyTTX	$C_{10}H_{11}N_3O_5$	254

(Bane et al., 2014)





Σχήμα 2. Η δομή της TTX και των αναλόγων της (Gorapava Puilingi C. et al., 2015)

Ανάμεσα στα ανάλογα αυτά, η 4-*epi*TTX και η 4,9-anhydroTTX είναι τα ανάλογα χημικής ισορροπίας της TTX, ενώ τα 4 deoxy ανάλογα, όπως τα 5-deoxyTTX, 11-deoxyTTX, 6,11-dideoxyTTX, 5,6,11-trideoxyTTX και τα 11-norTTX-6(S)-ol, 11-norTTX-6(R)-ol, που έχουν απομονωθεί από pufferfish είναι χημικά ανάλογα μη ισορροπίας (Bane et al., 2014).

Αυθεντικά πιστοποιημένα πρότυπα για τη TTX είναι διαθέσιμα από διάφορες εμπορικές πηγές και προέρχονται από οργανισμούς που περιέχουν TTX (κυρίως από ωθήκες pufferfish). Συνήθως τα πρότυπα περιέχουν και άλλα ανάλογα, αυτό εξαρτάται από την πηγή του οργανισμού. Ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα στη μελέτη των αναλόγων της TTX είναι η έλλειψη εμπορικά διαθέσιμων προτύπων. Είναι σημαντικό να πραγματοποιηθούν αναλύσεις για τη τοξικότητα των αναλόγων της TTX καθώς δεν υπάρχει εκτεταμένη έρευνα για όλα τα ανάλογα. Είναι γνωστό ότι τα deoxy ανάλογα



είναι λιγότερο τοξικά από τη TTX, ενώ τα hydroxyl ανάλογα είναι πιο τοξικά από τη TTX (Bane et al., 2014).

### **2.2.2 Κατανομή στη φύση**

Η τετραδοτοξίνη (TTX) είναι μια μη πρωτεϊνική νευροτοξίνη χαμηλού μοριακού βάρους, που αρχικά θεωρήθηκε ότι υπήρχε μόνο σε είδη pufferfish της οικογένειας *Tetraodontidae*. Εντούτοις, ανιχνεύτηκε σε μια διαφορετική σειρά φυλογενετικά μη σχετιζόμενων χερσαίων και υδρόβιων οργανισμών που περιλαμβάνουν: δινοφύκη, κοραλλιογενή άλγη, γαστερόποδα, αρθρόποδα, εχινόδερμα, βατράχια, σκουλήκια θαλάσσης και ξηράς, μαλάκια και βακτήρια. Η TTX αναγνωρίστηκε επίσης και σε καθιζήματα από θαλασσινά και γλυκά νερά (Lago et al., 2015).

Ανεξάρτητα από την άφθονη έρευνα, υπάρχει αβεβαιότητα σχετικά με τη βιοσύνθεση ή τη βιολογική προέλευση της TTX καθώς και την οικολογική της λειτουργίας. Ο κύριος μηχανισμός συσσώρευσης της τετραδοτοξίνης στα είδη pufferfish είναι η τροφική αλυσίδα, που αποτελείται από διάφορα στάδια και ξεκινά με θαλάσσια βακτήρια ως κύρια πηγή της TTX. Έχει αποδειχθεί ότι τα βακτηρίδια είναι ενδο-συμβιωτικά και κατοικούν φυσικά στο έντερο του ζώου. Ο μηχανισμός αυτός επισημαίνεται από το γεγονός ότι τα pufferfish γίνονται μη τοξικά όταν καλλιεργούνται τεχνητά με μη τοξική διατροφή και ότι τέτοια μη τοξικά pufferfish γίνονται τοξικά με τη τροφοδοσία τροφής που περιέχει TTX (Lago et al., 2015; Bane et al., 2016).

### **2.2.3 Τοξικότητα και μηχανισμός δράσης**

Η τετραδοτοξίνη (TTX) είναι μια από της πιο ισχυρές νευροτοξίνες που υπάρχουν, είναι 1200 φορές πιο τοξική στους ανθρώπους απ' ό,τι το κυάνιο και δεν έχει μέχρι στιγμής γνωστό αντίδοτο. Ο μηχανισμός της τοξικότητας της TTX έχει ερευνηθεί σε διάφορα ζωικά μοντέλα. Η TTX δρα αναστέλλοντας τους δίαυλους νατρίου και μειώνοντας τη διεγερσιμότητα της μεμβράνης των ζωτικών ιστών, των καρδιακών μυοκυττάρων, των σκελετικών μυών και των κεντρικών και περιφερικών νευρικών συστημάτων, με αποτέλεσμα την εμφάνιση τυπικών συμπτωμάτων και σε κάποιες σοβαρές περιπτώσεις ακόμα και τον θάνατο. Μια διαβάθμιση της σοβαρότητας των δηλητηριάσεων βασισμένη στη συμπτωματολογία δημιουργήθηκε από τους Fukuda και Tanii το 1941 (Πίνακας 2) (Lago et al., 2015).

Στις ανθρώπινες δηλητηριάσεις τα συμπτώματα αρχίζουν να εμφανίζονται από διάστημα 30 λεπτών έως 6 ώρες, ενώ συνήθως πραγματοποιείται πλήρης ανάρρωση σε 24 ώρες. Η TTX είναι υπεύθυνη για 30-50 περιπτώσεις δηλητηριάσεων το χρόνο. Η μόνη θεραπεία για τη δηλητηρίαση από TTX είναι η παρακολούθηση και η κατάλληλη υποστηρικτική περίθαλψη.

Η τοξικότητα της ΤΤΧ έχει μελετηθεί σε ποντικούς και κουνέλια από ορισμένους ερευνητές. Οι μέσες θανατηφόρες δόσεις (LD<sub>50</sub>) που ελήφθησαν από τα ποντίκια ήταν 10.7, 12.5, 532 μg/kg για ενδοπεριτοναϊκή, υποδόρια και ενδογαστρική χορήγηση τοξίνης, αντίστοιχα. Για τα κουνέλια η θανατηφόρος δόση (LD) ήταν 5.8, 3.8 μg/kg για ενδομυϊκή και ενδοφλέβια χορήγηση, αντίστοιχα (Lago et al., 2015).

Πίνακας 2. Συμπτώματα δηλητηρίασης από ΤΤΧ ανάλογα με το βαθμό επικινδυνότητας

Βαθμός	Συμπτώματα
1	Νευρομυϊκά συμπτώματα (παραισθησία γύρω από το στόμα, πονοκέφαλο, εφίδρωση, συστολή της κόρης) και ήπια γαστρεντερικά συμπτώματα (ναυτία, εμετός, διάρροια, κοιλιακό άλγος, αιματέμεση, υπερκινητικότητα).
2	Η παραισθησία εξαπλώνεται στον κορμό και τα άκρα, πρόωρη παράλυση και έλλειψη συντονισμού.
3	Αυξημένα νευρομυϊκά συμπτώματα (δυσαρθρία, δυσφαγία, αφαγία, λήθαργος, αταξία, παράλυση κρανιακών νεύρων, μυϊκούς σπασμούς) καρδιαγγειακά / πνευμονικά συμπτώματα (υπόταση ή υπέρταση, βραδυκαρδία, ταχυκαρδία, ασυστολία, κυανίωση, ωχρότητα, δύσπνοια), δερματολογικά συμπτώματα (δερματίτιδα, φλύκταινες) και αφωνία.
4	Διαταραγμένη κατάσταση συνείδησης, παράλυση του αναπνευστικού, σοβαρή υπόταση και καρδιακή αρρυθμία.

(Lago et al., 2015)

Επειδή η ΤΤΧ δεσμεύει τα κανάλια νατρίου με τάση και προκαλεί παράλυση, μπορεί επίσης να εφαρμοστεί ως πιθανό μέσο ανακούφισης από τον πόνο και ορισμένοι ερευνητές προσπαθούν να κάνουν χρήση της αναλγητικής δράσης του ΤΤΧ για τη θεραπεία διαφόρων τύπων πόνων όπως ο σοβαρός πόνος από καρκίνο μετά από χημειοθεραπεία ή για να βοηθήσουν στη μείωση των προκαλούμενων από επιθετικές αυξήσεις επιθυμιών για ηρωίνη και για το άγχος (Lago et al., 2015).

#### 2.2.4 Μέθοδοι ανάλυσης της τετραδοτοξίνης

Η τετραδοτοξίνη (ΤΤΧ) και πολλά από τα ανάλογα της βρίσκονται συνήθως σε μεγάλη ποικιλία ζωικών εκχυλισμάτων. Η παρουσία της ανιχνεύεται με τη βιοδοκιμή σε ποντικούς, αλλά αυτή η μέθοδος δεν είναι κατάλληλη και επιλεκτική για την ΤΤΧ σε βιολογικά δείγματα, καθώς δεν μπορεί να διακρίνει μεταξύ ΤΤΧ και των Σαξιτοξινών (Saxitoxins) (ή πολλών ομοειδών παραγόντων). Έχουν αναπτυχθεί πρόσθετες τεχνικές για την ανάλυση της ΤΤΧ, όπως η ELISA, η φθορισμομετρική ανάλυση και η βιοδοκιμή κυτταρικής καλλιέργειας. Οι εναλλακτικές λύσεις που βασίζονται σε χημικές μεθόδους περιλαμβάνουν αέρια χρωματογραφία με φασματομετρία μάζας (GC-MS), χρωματογραφία ανοσοσυγγένειας, υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με παραγωγή μετά τη στήλη και ανίχνευση με φθορισμό (HPLC-PCD-FLD), HPLC με ανίχνευση με υπεριώδη ακτινοβολία (UV), υγρή χρωματογραφία με φασματομετρία μάζας απλού τετραπόλου (LC-MS) και υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας τριπλού τετραπόλου (LC-MS/MS) (Otero et al., 2013).

Οι μέθοδοι που βασίζονται σε μονοκλωνικά αντισώματα (χρωματογραφία ανοσοσυγγένειας ή ELISA) παρουσιάζουν υψηλή ευαισθησία, αλλά είναι πολύ δαπανηρές και έχουν μειωμένη διασταυρούμενη δραστηριότητα. Αν και το όριο ποσοτικού προσδιορισμού της ΤΤΧ στη μέθοδο GC-MS είναι χαμηλό, απαιτεί μια σύνθετη διαδικασία εκχύλισης και θεωρείται αρκετά χρονοβόρα. Από την άλλη πλευρά, οι μέθοδοι HPLC-PCD-FLD ή HPLC-UV έχουν γενικά περιορισμένη ευαισθησία. Οι περισσότερες από τις μεθόδους αυτές συνήθως αναγνωρίζουν την ΤΤΧ αλλά όχι τα συνυπάρχοντα ανάλογα της. Αντίθετα, η χρήση της τεχνικής LC-MS στην ανάλυση της ΤΤΧ απαιτεί απλή προετοιμασία δείγματος σε σύγκριση με τη GC-MS τεχνική και παρέχει ένα καλύτερο όριο ανίχνευσης σε σύγκριση με τις μεθόδους HPLC-FLD και HPLC-UV, για παράδειγμα ένα όριο ανίχνευσης 1mg/ml σε HPLC-FLD έναντι 0,1ng/ml LC-MS (Otero et al., 2013).

Σήμερα, δεν υπάρχει έγκυρη μέθοδος LC-MS για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ΤΤΧ. Η δοκιμή διαφορετικών αναλυτικών στηλών και οι βελτιστοποιημένες συνθήκες LC-MS απαιτούνται για τον εντοπισμό και τον διαχωρισμό της ΤΤΧ και των αναλόγων της σε ένα δείγμα (Otero et al., 2013).

## 2.3 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

### 2.3.1 Εισαγωγή

Ο όρος χρωματογραφία περιλαμβάνει ένα πλήθος αναλυτικών τεχνικών που βρίσκουν εφαρμογή στον διαχωρισμό συστατικών μιγμάτων ουσιών. Οι τεχνικές εφαρμόζονται στη διαπίστωση της παρουσίας ή μη συστατικών σε μίγματα τα οποία περιέχουν άλλες ουσίες / προσμίξεις, γνωστής, ως επί το πλείστον, ταυτότητας. Η επιβεβαίωση της ταυτότητας των συστατικών του μίγματος προαπαιτεί τον χρωματογραφικό διαχωρισμό αυτών με σκοπό την απομόνωση τους (Καρκαλούσος, 2015).

Κάθε τεχνική περιλαμβάνει μια κινητή φάση, η οποία ρέει μεταφέροντας τις διαχωριζόμενες ουσίες (συστατικά ενός μίγματος) μέσω μιας στατικής φάσης. Η κινητή φάση αποτελείται από ένα διαλύτη ή σύστημα διαλυτών, ενώ η στατική φάση από πορώδες στερεό υλικό ή από υγρό καθηλωμένο σε στερεό υπόστρωμα. Ο διαχωρισμός των συστατικών στη χρωματογραφία βασίζεται στο διαφορετικό βαθμό αλληλεπίδρασης του κάθε συστατικού με τις δύο φάσεις, ο οποίος καθορίζεται από την αγκιστεία (φυσικοχημική συγγένεια) του συστατικού με την κάθε φάση. Κάθε μόριο μίας ουσίας κατά τη μετανάστευσή του μέσω της στήλης μετακινείται πάρα πολλές φορές μεταξύ της κινητής φάσης (όπου διαλύεται) και της στατικής φάσης (όπου προσροφάται ή κατανέμεται ή δεσμεύεται λόγω αγκιστείας κ.τ.λ.) και αντίστροφα (Καρκαλούσος, 2015).

Η διαφορετική αυτή αγκιστεία οφείλεται στις διαφορές των συστατικών του μίγματος σε ορισμένα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους, όπως π.χ. διαφορές στο μέγεθος του μορίου, το φορτίο, την πτητικότητα και τη διαλυτότητα. Η αγκιστεία αυτή περιγράφεται από τον συντελεστή κατανομής  $K$  (partition coefficient) ο οποίος ορίζεται ως:

$$K=C_s/C_m \quad (\text{Εξίσωση 1})$$

όπου:

$C_s$ : η συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας στη στατική φάση και

$C_m$ : η συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας στην κινητή φάση.

Ο συντελεστής κατανομής εκφράζεται δηλαδή από το λόγο της συγκέντρωσης της ουσίας στη στατική φάση προς τη συγκέντρωση της ουσίας στην κινητή φάση. Η κατανομή αυτή καθορίζεται από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της ουσίας, αλλά και από τη φύση της κινητής, όπως και της στατικής φάσης.

Η παράμετρος  $K$  είναι μία χαρακτηριστική σταθερά για τη δεδομένη χημική ένωση και το ζεύγος στατικής/κινητής φάσης, σε μια δεδομένη θερμοκρασία. Έτσι, μία ουσία που αλληλεπιδρά ισχυρά με τη στατική φάση «επιβραδύνεται» σε σχέση με μία ουσία που κατανέμεται πιο σημαντικά στην

κινητή φάση και «παρασύρεται ταχύτερα» από αυτή. Ως αποτέλεσμα, οι δύο ουσίες διαχωρίζονται. Πρέπει να τονισθεί ότι ο χρωματογραφικός διαχωρισμός είναι το αποτέλεσμα επαναλαμβανομένων ισορροπιών των συστατικών μεταξύ των δύο φάσεων κατά τη μετακίνησή τους. Είναι προφανές, ότι προκειμένου να διαχωριστούν δύο ουσίες θα πρέπει να διαφέρουν οι συντελεστές κατανομής αυτών (Καρκαλούσος, 2015).

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography – HPLC) είναι μια τεχνική που χρησιμοποιεί υψηλή πίεση για να αναγκάσει τον διαλύτη να μετακινηθεί μέσω πακεταρισμένων στηλών που περιέχουν πολύ μικρά σωματίδια τα οποία επιτυγχάνουν διαχωρισμούς υψηλής διαχωριστικής ικανότητας. Η χρήση μικρού μεγέθους σωματιδίων υλικού πλήρωσης αυξάνει το εμβαδόν της επιφάνειας της στατικής φάσης, που είναι διαθέσιμο να αλληλεπιδράσει με τα μόρια που μεταφέρονται μέσω της κινητής φάσης. Κατά συνέπεια, βελτιώνεται ο διαχωρισμός των αναλυόμενων μορίων και μειώνεται σημαντικά το μέγεθος της στήλης που απαιτείται για έναν διαχωρισμό (Καρκαλούσος, 2015).

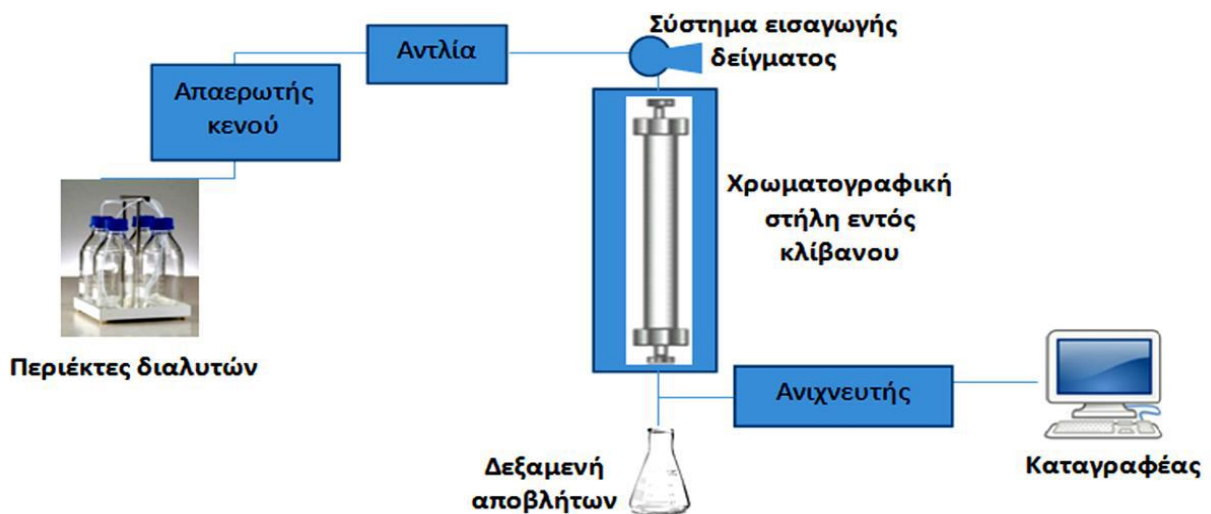
### 2.3.2 Οργανολογία συστήματος HPLC

Μια τυπική εργαστηριακή διάταξη υγρής χρωματογραφίας περιλαμβάνει τα παρακάτω επιμέρους μέρη (Σχήμα 3):

- ❖ Περιέκτες διαλυτών: Οι διαλύτες που θα αποτελέσουν την κινητή φάση αποθηκεύονται σε ειδικές φιάλες. Η κινητή φάση είναι απαραίτητη για τη μεταφορά των δειγμάτων μέσα από το σύστημα της υγρής χρωματογραφίας.
- ❖ Απαερωτής κενού: Ο απαερωτής εξασφαλίζει την απαέρωση της κινητής φάσης ώστε να είναι εφικτός ο έλεγχος της πίεσης στη χρωματογραφική στήλη.
- ❖ Αντλία (pump): Η αντλία εξασφαλίζει τη συνεχή άντληση και προώθηση της κινητής φάσης διαμέσου του συνόλου του συστήματος, από τους περιέκτες της κινητής φάσης μέχρι το δοχείο συλλογής αποβλήτων του συστήματος, υπό ρυθμιζόμενη υψηλή πίεση και ροή.
- ❖ Σύστημα εισαγωγής δείγματος: περιλαμβάνει βρόγχο σταθερού όγκου ή αυτόματο σύστημα εισαγωγής, μεταβλητού (προεπιλεγμένου) όγκου έγχυσης. Βρίσκεται πριν τη χρωματογραφική στήλη και επιτρέπει την εισαγωγή του δείγματος στη ροή της κινητής φάσης.
- ❖ Χρωματογραφική στήλη: Στη στήλη επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός του μίγματος στα συστατικά του. Εφόσον ο διαχωρισμός καθορίζεται και από τη θερμοκρασία η στήλη εμπεριέχεται σε θερμοστατούμενο κλίβανο ή φούρνο.
- ❖ Ανιχνευτής: Η ανίχνευση των εξερχόμενων ουσιών από τη στήλη γίνεται συνεχώς με τη βοήθεια του ανιχνευτή που βρίσκεται μετά τη στήλη. Κάποιοι από τους ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται στην HPLC είναι: οι ανιχνευτές ορατού-υπεριώδους (UV/Vis Detector), οι

ανιχνευτές συστοιχίας φωτοδιόδων (Diode Array Detector, DAD), οι ανιχνευτές δείκτη διάθλασης (Refractive Index Detector), οι φασματογράφοι μάζας MS (Mass Spectroscopy Detector, MS Detector), οι φθορισμομετρικοί ανιχνευτές (Fluorescence Detector) κ.α.

- ❖ Καταγραφικό: Το μετρούμενο σήμα που παράγεται συνεχώς κατά τη διάρκεια μιας ανάλυσης στέλνεται σε κάποιον υπολογιστή που παράγει το χρωματογράφημα της ανάλυσης.
- ❖ Δεξαμενή αποβλήτων: Είναι η δεξαμενή συλλογής της κινητής φάσης και των επιμέρους συστατικών του δείγματος. Όταν είναι επιθυμητή η συλλογή κλασμάτων της κινητής φάσης, χρησιμοποιείται ένας αυτόματος κλασματοσυλλέκτης (Καρκαλούσος, 2015).



Σχήμα 3. Τυπική διάταξη συστήματος HPLC (Καρκαλούσος, 2015).

### 2.3.3 Στήλη Υγρής Χρωματογραφίας

Η οργανολογία της HPLC χρησιμοποιεί ανοξείδωτο χάλυβα ή πλαστικές στήλες μήκους 5-30 cm, με εσωτερική διάμετρο 1-5 mm. Οι στήλες αυτές έχουν μεγάλο κόστος και φθείρονται εύκολα από σκόνη ή σωματίδια του δείγματος ή του διαλύτη και από τη μη αντιστρεπτή προσρόφηση ακαθαρσιών του δείγματος ή του διαλύτη. Κατά συνέπεια, η είσοδος στην κυρίως στήλη προστατεύεται από μια μικρού μήκους προστατευτική στήλη η οποία περιέχει την ίδια στατική φάση με την κυρίως στήλη. Τα μικρά σωματίδια και οι ισχυρά προσροφημένες ουσίες κατακρατούνται στην προστατευτική στήλη, που περιοδικά αντικαθίσταται (Harris D., 2011).

Η θέρμανση μιας χρωματογραφικής στήλης συνήθως μειώνει το ιξώδες του διαλύτη, συνεπώς μειώνει την απαιτούμενη πίεση ή επιτρέπει ταχύτερη ροή. Η αύξηση της θερμοκρασίας μειώνει την τους χρόνους κατακράτησης και βελτιώνει τη διαχωριστική ικανότητα επιτυγχάνοντας τη διάχυση

των ουσιών. Σαν αρνητική συνέπεια όμως, η αύξηση της θερμοκρασίας μπορεί να διασπά τη στατική φάση και να μειώνει το χρόνο ζωής στήλης. Η θερμοκρασία της στήλης πρέπει να παραμένει σταθερή ώστε να μην αυξομειώνεται από τη θερμοκρασία περιβάλλοντος, αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση ενός συστήματος θέρμανσης της στήλης ρυθμισμένο στους 10 °C πάνω από τη θερμοκρασία δωματίου. Έτσι βελτιώνεται η επαναληψιμότητα των χρόνων κατακράτησης και η πιστότητα της ποσοτικής ανάλυσης. Σε μια θερμαινόμενη στήλη, η κινητή φάση (διαλύτης) και η στήλη πρέπει να βρίσκονται στην ίδια θερμοκρασία γιατί αν οι θερμοκρασίες διαφέρουν, οι κορυφές παραμορφώνονται και οι χρόνοι κατακράτησης αλλάζουν. Η σταθερότητα αυτή επιτυγχάνεται με την κινητή φάση να διέρχεται από ένα προθερμασμένο μεταλλικό σπείραμα μεταξύ του εισαγωγέα δείγματος και της στήλης (Harris D., 2011).

Η πιο συνηθισμένη διάμετρος στήλης στην HPLC είναι 4,6mm. Υπάρχει μια τάση να χρησιμοποιούνται στενότερες στήλες (2mm, 1mm και τριχοειδείς στήλες έως και ~25μm), για διάφορους λόγους. Μικρότερης εσωτερικής διαμέτρου στήλες είναι πιο συμβατές με τα συστήματα φασματομετρίας μάζας, τα οποία απαιτούν μικρή ροή διαλύτη. Οι στήλες μικρής εσωτερικής διαμέτρου χρειάζονται μικρότερο δείγμα και παράγουν λιγότερα απόβλητα. Η θερμότητα που παράγεται από την τριβή του διαλύτη που ρέει στο εσωτερικό της στήλης διασκορπίζεται ευκολότερα από μια στενή στήλη, ώστε να διατηρηθεί σταθερή η θερμοκρασία. Τα όργανα πρέπει να είναι ειδικά σχεδιασμένα για να χρησιμοποιούν στήλες διαμέτρου <2mm, λόγω των υψηλότερων πιέσεων που αναπτύσσονται (Harris D., 2011).

Οι κύριες παράμετροι που χαρακτηρίζουν μια αναλυτική χρωματογραφική στήλη αναφέρονται παρακάτω. Ο κάθε εμπορικός οίκος προτείνει στήλες με συγκεκριμένες προδιαγραφές, ανάλογα με τις ανάγκες του αναλυτή (Καρκαλούσος, 2015).

1. Διαστάσεις της στήλης.
2. Μέγεθος σωματιδίων υλικού και μέγεθος πόρων υλικού.
3. Είδος στατικής φάσης.

Προδιαγραφές της στήλης που αναφέρονται είναι:

- Το διάστημα των τιμών pH, όπου η στήλη λειτουργεί αποτελεσματικά, χωρίς φθορά του πληρωτικού υλικού.
- Η μέγιστη πίεση στην οποία μπορεί να υποβληθεί μια στήλη χωρίς αλλαγή στο ύψος της θεωτηρικής πλάκας και των αριθμό θεωρητικών πλακών για έναν διαχωρισμό.

#### 2.3.4 Ανίχνευση με φθορισμό και παραγωγή μετά τη στήλη

Η απορρόφηση μιας οπτικής ακτινοβολίας (απορρόφηση φωτονίων) από ένα μόριο συνεπάγεται τη μετάβαση ηλεκτρονίων του σε ανώτερες ενεργειακές στάθμες. Το μόριο λέγεται ότι είναι σε διεγερμένη κατάσταση. Το μόριο σε διεγερμένη κατάσταση δεν παραμένει εκεί πολύ καιρό, αλλά αυθόρμητα αποδιεγείρεται σε πιο σταθερή βασική κατάσταση. Η διαδικασία αποδιέγερσης επιφέρεται με μεταφορά ενέργειας ύστερα από σύγκρουση του μορίου με διαλύτη ή με άλλα μόρια στο διάλυμα. Η ενέργεια αυτή μπορεί να αποδοθεί στο περιβάλλον, συνήθως ως θερμότητα. Κάποια διεγερμένα μόρια επιστρέφουν στην βασική κατάσταση εκπέμποντας οπτική ακτινοβολία (εκπομπή φωτονίων). Η διαδικασία αυτή ονομάζεται φθορισμός (Harris D., 2011).

Λόγω της απώλειας μέρους της ενέργειας υπό μορφή θερμότητας, η ενέργεια των φωτονίων ακτινοβολίας φθορισμού είναι μικρότερη από την ενέργεια των απορροφούμενων φωτονίων της ακτινοβολίας διέγερσης με αποτέλεσμα η εκπεμπόμενη ακτινοβολία να εμφανίζεται πάντοτε σε μεγαλύτερα μήκη κύματος σε σχέση με εκείνα της ακτινοβολίας διέγερσης. Για να παρουσιάζει μια οργανική ένωση έντονο φαινόμενο φθορισμού προϋποθέτει το μόριο της να διαθέτει το δυνατόν περισσότερα ακλόνητα τμήματα (όπως π.χ. αρωματικούς δακτυλίους), κάτι το οποίο λειτουργεί σαν περιορισμός στις δονήσεις του και επομένως και στην πλήρη απώλεια της απορροφημένης οπτικής ενέργειας υπό τη μορφή θερμικής ενέργειας (Harris D., 2011).

Οι ανιχνευτές φθορισμού διεγείρουν το έκλουσμα με λέιζερ και μετρούν το φθορισμό. Αυτοί οι ανιχνευτές είναι πολύ ευαίσθητοι και έχουν κατά προσέγγιση όριο ανίχνευσης 0,001-0,01 ng, αλλά αποκρίνονται μόνο στους λίγους αναλύτες που φθορίζουν. Για να αυξηθεί η δυνατότητα εφαρμογής των ανιχνευτών φθορισμού, μπορούν να προσδεθούν ομοιοπολικά στον αναλύτη φθορίζουσες ή ηλεκτρενεργές ομάδες. Αυτή η διαδικασία παραγωγής μπορεί να πραγματοποιηθεί στο μίγμα πριν το χρωματογραφικό διαχωρισμό ή προσθέτοντας αντιδραστήρια στο έκλουσμα μεταξύ στήλης και ανιχνευτή (καλείτε παραγωγή μετά τη στήλη) (Harris D., 2011).



## 2.4 Φασματομετρία μαζών (Mass Spectrometry, MS)

### 2.4.1 Εισαγωγή

Κατά την πρόσκρουση ηλεκτρονίων σχετικά υψηλής ενεργειακής στάθμης, σε μόρια μιας ένωσης, που βρίσκεται σε αέρια φάση και σε συνθήκες υψηλού κενού, τα μόρια της ένωσης μετατρέπονται συνήθως σε ιόντα με θετικό φορτίο. Στη συνέχεια, τα ιόντα ευθυγραμμίζονται σε λεπτή δέσμη μέσω της βοήθειας ηλεκτρικών πεδίων. Η δέσμη διέρχεται μέσω μαγνητικού ή ηλεκτρικού πεδίου, με συνέπεια το κάθε ιόν, ανάλογα με το λόγο μάζας προς ηλεκτρικό φορτίο ( $m/z$ ), να αποκλίνει από την αρχική κατεύθυνση. Έτσι παράγεται ηλεκτρικό ρεύμα από τα ιόντα με διαφορετικό λόγο  $m/z$ , το οποίο μπορεί να μετρηθεί με κατάλληλο ανιχνευτή. Το φάσμα μαζών της ένωσης, είναι το γράφημα που δείχνει τη σχετική ένταση του μετρούμενου ρεύματος ως συνάρτηση του λόγου μάζας προς φορτίο ( $m/z$ ). Ο λόγος  $m/z$  αντιστοιχεί αριθμητικά με το μοριακό βάρος του ιόντος, επειδή τα ιόντα που παράγονται φέρουν κατά κανόνα ένα φορτίο (Κακλαμάνος, 2009).

Φασματομετρία μαζών ονομάζεται η αναλυτική τεχνική ταυτοποίησης και προσδιορισμού της αρχικής ένωσης από τις πληροφορίες που παρέχει το φάσμα μαζών της. Η μορφή του φάσματος μαζών, που λαμβάνεται κάτω από αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες, είναι χαρακτηριστική της αρχικής ένωσης και χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση της. Γενικότερα η φασματομετρία μαζών χρησιμοποιείται σε μεγάλη κλίμακα, κυρίως για την επαλήθευση ή διερεύνηση της δομής των διαφόρων οργανικών ενώσεων κατά τη διαδικασία σύνθεσης, για την εξακρίβωση της δομής πολλών φυσικών ενώσεων, για τη διερεύνηση της παρουσίας και του ποσοστού ισοτόπων καθώς και ποιοτική και ποσοτική ανάλυση άγνωστων μιγμάτων ανόργανων και οργανικών ενώσεων (Κακλαμάνος, 2009).

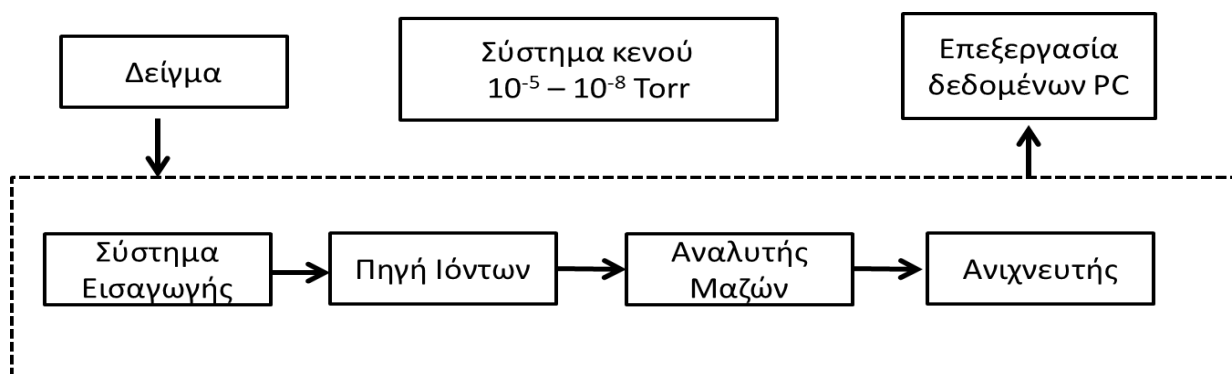
Η φασματομετρία μαζών μπορεί να συνδυασθεί είτε με την αέρια χρωματογραφία (GC) ή με την υγρή χρωματογραφία (LC) και έτσι παρέχει στον αναλυτή τις ονομαζόμενες συνδυασμένες τεχνικές GC-MS ή LC-MS, αλλά και άλλες συνδυασμένες τεχνικές, η συμβολή των οποίων τόσο στην έρευνα, όσο και σε εφαρμογές ρουτίνας θεωρείται ανεκτίμητη (Κακλαμάνος, 2009).

### 2.4.2 Οργανολογία συστήματος MS

Ένα τυπικό φασματόμετρο μαζών περιλαμβάνει τα εξής επιμέρους τμήματα (Σχήμα 4):

- ❖ Σύστημα εισαγωγής του δείγματος. Ο σκοπός αυτού του τμήματος είναι η εισαγωγή μικρών ποσοτήτων δείγματος στο όργανο. Το δείγμα εισάγεται κάτω από συνθήκες σταθερής ροής και στην υγρή ή αέρια μορφή του.

- ❖ Πηγή ιόντων. Ο σκοπός αυτού του τμήματος είναι η μετατροπή των εισερχόμενων συστατικών σε ιόντα. Υπάρχουν διάφορες τεχνικές ιοντισμού όπως: ο ιοντισμός με ηλεκτρόνια (Electron Impact), ο χημικός ιοντισμός (Chemical Ionization), ο ψεκασμός σε ηλεκτρικό δυναμικό (Electrospray), ο ιοντισμός με λέιζερ και υποβοήθηση υποστρώματος (MALDI) και ο βομβαρδισμός με άτομα (FAB). Κάποιες τεχνικές χρησιμοποιούν υψηλή ενέργεια, η οποία μεταφέρεται στην προσδιοριζόμενη ένωση κατά τον ιοντισμό προκαλώντας διάσπαση της σε θυγατρικά ιόντα (θραύση).
- ❖ Αναλυτή μαζών. Ο σκοπός αυτού του τμήματος είναι ο διαχωρισμός των ιόντων ανάλογα με το λόγο  $m/z$  που φέρουν. Είναι η πραγματική “καρδιά” του συστήματος καθώς από τον τύπο αναλυτή εξαρτάται η διαχωριστική ικανότητα (resolution) του οργάνου. Υπάρχουν διάφορες κατηγορίες αναλυτών μαζών, των οποίων η λειτουργία βασίζεται σε διαφορετικές αρχές, όπως ο αναλυτής απλής εστίασης, ο αναλυτής διπλής εστίασης, ο τετραπολικός αναλυτής (Quadrupole) και ο αναλυτής με τριπλό τετράπολο (Triple Quadrupole), η παγίδα ιόντων (Ion Trap), ο αναλυτής χρόνου πτήσης (Time of Flight, TOF) και ο υβριδικός αναλυτής Orbitrap.
- ❖ Ανιχνευτής. Ο σκοπός αυτής της διάταξης είναι να παράγει στην έξοδο του ηλεκτρικό σήμα (συνήθως ηλεκτρικό ρεύμα) ανάλογο του αριθμού ιόντων και του φορτίου τους, που δέχεται στην είσοδο του. Στη συνέχεια γίνεται επεξεργασία του σήματος με ειδικό λογισμικό σε ηλεκτρονικό υπολογιστή. Οι τύποι ανιχνευτών που χρησιμοποιούνται στη φασματομετρία μαζών είναι το φαρανταϊκό κύπελλο (Faraday cup) και ο ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής (Electron multiplier).
- ❖ Σύστημα κενού. Ο σκοπός αυτού του τμήματος είναι η συνεχής κάλυψη όλου του φασματομέτρου (πέραν του συστήματος επεξεργασίας δεδομένων) με συστήματα παραγωγής υψηλού κενού στην περιοχή  $10^{-5} - 10^{-8}$  Torr, οπότε δημιουργείται επαρκής ποσότητα ατμών για τη λήψη του φάσματος. Το κενό επιτυγχάνεται από εσωτερικές και εξωτερικές αντλίες (Κακλαμάνος 2009).



Σχήμα 4. Τυπική διάταξη φασματομέτρου μάζας (Κακλαμάνος (2009))

## 2.5 Υγρή χρωματογραφία - φασματομετρία μαζών (LC/MS)

### 2.5.1 Εισαγωγή

Η φασματομετρία μάζας (MS) είναι μια τεχνική που θεωρείται ευρέως ότι έχει καλή εκλεκτικότητα λόγω της ικανότητας της να διαχωρίζει τα οργανικά μόρια ανάλογα με τη μοριακή τους μάζα και επιτρέπει την ανίχνευσή τους και την ποσοτικοποίηση τους με εξαιρετικά υψηλή ευαισθησία. Ωστόσο, σε πολλές εφαρμογές είναι απαραίτητο να απομονωθεί ο επιθυμητός αναλύτης από ένα δείγμα που περιέχει χιλιάδες άλλα διαφορετικά μόρια. Συνήθως η φασματομετρία μάζας από μόνη της δεν μπορεί να ικανοποιήσει αυτή την ανάγκη, καθώς μπορεί να διαφοροποιεί μόνο τις ενώσεις με τον λόγο μάζας προς φορτίο ( $m/z$ ) ο οποίος είναι ανεπαρκής στις περισσότερες πρακτικές εφαρμογές της τεχνικής. Για παράδειγμα, περισσότερες από 1.500 ενώσεις μπορεί να έχουν την ίδια μοριακή μάζα σε περίπου 250 Da. Ως εκ τούτου, μια επιπρόσθετη τεχνική διαχωρισμού χρειάζεται πριν την εισαγωγή του δείγματος στο φασματόμετρο μάζας (Sargent, 2013).

Η υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (LC-MS) είναι ο συνδυασμός δύο επιλεκτικών τεχνικών που επιτρέπουν την απομόνωση και μέτρηση του επιθυμητού αναλύτη(ων) σε πολύπλοκα μίγματα. Η LC διαφοροποιεί τις ενώσεις από τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες και το MS διαφοροποιεί τις ενώσεις κατά μάζα (συγκεκριμένα τη σχέση μάζας προς φορτίο). Αυτή η διπλή επιλεκτικότητα καθιστά την τεχνική LC-MS ένα ισχυρό αναλυτικό εργαλείο. Το φασματόμετρο μάζας δρα όχι μόνο ως "ανιχνευτής LC" αλλά, τουλάχιστον σαν αρχή, παρέχει την ικανότητα να αναγνωρίζει τα είδη που αντιστοιχούν σε κάθε χρωματογραφική κορυφή μέσω του μοναδικού φάσματος μάζας. Η τεχνική παρουσιάζει κάποια πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα τα οποία αναλύονται παρακάτω:

#### Πλεονεκτήματα

- ❖ **Εκλεκτικότητα.** Ο συνδυασμός των δύο μηχανισμών διαχωρισμού LC και MS / (MS<sup>n</sup>) επιτρέπει την ανάλυση πολύπλοκων μιγμάτων. Η προκύπτουσα εκλεκτικότητα επιτρέπει την απομόνωση ενός συγκεκριμένου αναλύτη ή αναλυτών από το μείγμα και δίνει την βεβαιότητα ότι μετράται το σωστό συστατικό. Δεδομένου ότι οι αναλυτές διαχωρίζονται από τον λόγο μάζας προς φορτίο ( $m/z$ ), η τεχνική επιτρέπει τη χρήση ισοτοπικών επισημανθέντων εσωτερικών προτύπων τα οποία μπορεί να μην διαχωρίζονται στο LC, αλλά μπορούν να διαχωριστούν από τη διαφορά μάζας τους. Η χρήση σταθερών ισοτοπικά επισημασμένων (SIL) εσωτερικών προτύπων μπορεί να βοηθήσει στον έλεγχο της μεταβλητότητας σε μια ποσοτική ανάλυση.

- ❖ Ταχύτητα. Δεδομένου ότι η MS θα διακρίνει ενώσεις που βασίζονται στη μάζα, η χρωματογραφική μέθοδος δεν χρειάζεται να διαχωρίζει κάθε ένα συστατικό στο δείγμα, επομένως είναι δυνατή η ταυτόχρονη έκλυση μη ισοβαρικών αναλυτών. Αυτό επιτρέπει γρήγορους χρόνους ανάλυσης LC και μειωμένη προετοιμασία δειγμάτων, πράγμα που βοηθά στην ανάπτυξη μεθόδων και στην ανάλυση υψηλής απόδοσης δειγμάτων.
- ❖ Ευαισθησία. Η φασματομετρία μάζας είναι μια εγγενώς ευαίσθητη τεχνική. Η καλή επιλεκτικότητα οδηγεί επίσης σε μειωμένο θόρυβο, επιτρέποντας την ανίχνευση πολύ χαμηλών επιπέδων (fg/mL)

### Μειονεκτήματα

- ❖ Κόστος. Τα φασματόμετρα μάζας που μπορούν να συζευχθούν με συστήματα LC είναι ακριβά για αγορά και λειτουργία. Απαιτείται επίσης τακτική συντήρηση, αυξάνοντας το κόστος. Οι περιβαλλοντικές συνθήκες στο εργαστήριο πρέπει να ελέγχονται καλά για να εξασφαλίζεται η σταθερότητα του συστήματος.
- ❖ Πολυπλοκότητα. Από μόνα τους, τόσο η LC όσο και η MS τεχνική μπορούν να είναι δύσκολο να βελτιστοποιηθούν. Ο συνδυασμός των δύο οδηγεί σε μια πολύπλοκη συν-εξαρτώμενη συνέργεια. Ο μηχανισμός ιονισμού μπορεί να είναι ιδιαίτερα περίπλοκος - συχνά σχηματίζονται διάφορα είδη στην πηγή ιονισμού και μπορεί να προκύψει πολλαπλή φόρτιση. Πρέπει να ληφθεί μέριμνα για την επιλογή συνθηκών για βέλτιστη ευαισθησία και επαναληψιμότητα.
- ❖ Περιορισμένο δυναμικό εύρος. Σε σύγκριση με άλλες ποσοτικές τεχνικές, η LC-MS μπορεί να έχει περιορισμένο εύρος, όπου η απόκριση είναι γραμμική σε σχέση με τη συγκέντρωση. Συνήθως, οι κλίμακες δεν πρέπει να υπερβαίνουν τις 500 φορές τις συγκεντρώσεις.
- ❖ Υπερβολική επιλεκτικότητα. Στην ποσοτική ανάλυση είναι σύνηθες το γεγονός ότι το MS έχει ρυθμιστεί να ανιχνεύει μόνο συγκεκριμένους αναλύτες. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα ένα χρωματογράφημα που φαίνεται «πολύ καθαρό» και έτσι είναι εύκολο να αγνοηθεί ότι μπορεί να υπάρχουν πολλά συστατικά που δεν φαίνονται. Αυτά τα συστατικά μπορεί να προκαλέσουν προβλήματα με την ποσοτικοποίηση και μπορεί να είναι δύσκολο να εντοπιστούν αν δεν αναζητούνται (Sargent, 2013).

## 2.5.2 Οργανολογία συστήματος LC/MS

Η βασική οργανολογία ενός συστήματος LC/MS περιλαμβάνει έναν υγρό χρωματογράφο, μια πηγή ιόντων που χρησιμοποιείται στην εξάτμιση/ιονισμό των μορίων στόχων, έναν αναλυτή μαζών που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό των ιόντων αέριας φάσης με αναλογία μάζας-φορτίου ( $m/z$ ) και έναν ανιχνευτή, που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των διαχωρισμένων ως προς τη μάζα ιόντων και μέτρηση της σχετικής αφθονίας τους (Sargent, 2013).

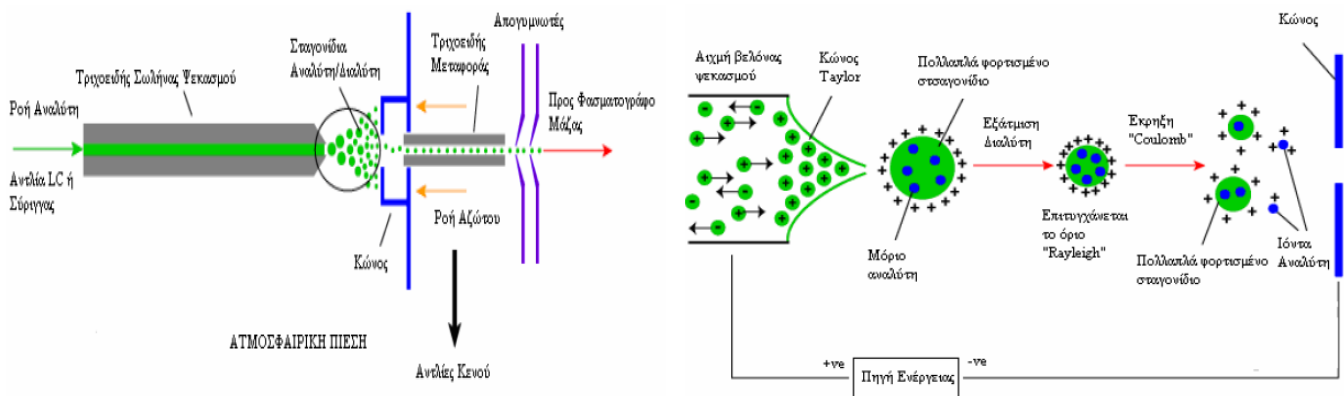
Η ανάπτυξη ενός εμπορικού LC/MS συστήματος έχει οδηγήσει σε ένα μεγάλο εύρος οργάνων που παράγονται και είναι διαθέσιμα για τον τελικό χρήστη. Αν και η επιλογή στις τεχνικές ιονισμού σε ένα LC/MS σύστημα παραμένει κάπως περιορισμένη, τα όργανα πλέον χρησιμοποιούν πολλούς διαφορετικούς τύπους αναλυτή μαζών. Νέοι τύποι ή παράγωγα του αναλυτή μαζών έχουν παρουσιαστεί σε τακτά χρονικά διαστήματα τα τελευταία χρόνια (Sargent, 2013).

### 2.5.2.1 Πηγή ιόντων

Το κύριο επίτευγμα στην άμεση σύζευξη των LC και MS (LC/MS) τεχνικών, ήταν η επίλυση του προβλήματος με την ασυμβατότητα εισαγωγής της ροής υγρής κινητής φάσης από τη στήλη LC στο κενό που απαιτείται στο φασματοόμετρο μάζας, με τη χρήση διασυνδέσεων ιονισμού ατμοσφαιρικής πίεσης (API). Η διασύνδεση API είναι ένα κρίσιμο τμήμα του φασματομέτρου μάζας και χρειάζεται να παράγει ιόντα από τα μόρια ενδιαφέροντος ενώ αντιμετωπίζει τυπικούς ρυθμούς ροής LC (0.2-2 mL/min). Σήμερα, ο ιονισμός ηλεκτροψεκασμού (ESI) και ο χημικός ιονισμός ατμοσφαιρικής πίεσης (APCI) είναι οι πιο συνηθισμένες τεχνικές API σε χρήση ρουτίνας για τον ποσοτικό προσδιορισμό μικρών μορίων με LC-MS. Η τεχνική ESI έχει επιτύχει τη συντριπτική δημοτικότητα έναντι της APCI. Αυτό μπορεί να σχετίζεται με την αυξανόμενη χρήση μεθόδων με πολλαπλούς αναλύτες, αλλά ίσως αντανακλά επίσης τις βελτιώσεις στην σχεδίαση πηγής και ανιχνευτή για ηλεκτροψεκασμό που δεν είναι παράλληλη με την APCI (Sargent, 2013).

Η τεχνική του ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI) βασίζεται στην παρατήρηση κατά την οποία όταν ένα υγρό ψεκάζεται μέσω ενός τριχοειδούς σωλήνα μέσα σε πεδίο μερικών χιλιάδων V, το υγρό διασπείρεται σε ένα νέφος από πολύ μικρές φορτισμένες σταγόνες (Κακλαμάνος, 2009). Έχουν καταβληθεί σημαντικές προσπάθειες για την κατανόηση των μηχανισμών που εμπλέκονται στην παραγωγή ιόντων για ηλεκτροψεκασμό, διότι η κατανόηση του πώς παράγονται τα ιόντα από την κινητή φάση στην αέρια φάση είναι ανεκτίμητη στη διάγνωση προβλημάτων όπως είναι η απώλεια της ευαισθησίας και των επιδράσεων της μήτρας. Ο ιονισμός πραγματοποιείται στην υγρή φάση και περιλαμβάνει τις ακόλουθες διαδικασίες (Σχήμα 5):

- Το υγρό εκλούσεως LC ρέει μέσω ενός μεταλλικού τριχοειδούς (capillary), που περιέχεται μέσα στον αισθητήρα (probe).
- Τα σταγονίδια σχηματίζονται με νεφελοποίηση της ροής LC σε ένα εκνέφωμα καθώς αφήνει το τριχοειδές του ηλεκτροψεκασμού.
- Ένα φορτίο μεταφέρεται στα σταγονίδια με την εφαρμογή μιας μεγάλης διαφοράς δυναμικού (2-5 kV) μεταξύ του τριχοειδούς ηλεκτροψεκασμού και του απέναντι ηλεκτροδίου (counter electrode).
- Το μέγεθος των σταγονιδίων μειώνεται με την εξάτμιση της κινητής φάσης με τη χρήση θερμαινόμενου αερίου ξήρανσης.
- Αυτή η αποδιαλυτοποίηση (desolvation) αυξάνει την πυκνότητα φορτίου στην επιφάνεια των μικρότερων σταγονιδίων.
- Η ηλεκτρική απώλεια λόγω της πυκνότητας φορτίου έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση των σταγονιδίων.
- Όταν αυτό υπερβαίνει την επιφανειακή τάση του σταγονιδίου, καταλήγει σε κολουμπική διάσπαση.
- Τα ιόντα αερίου φάσης σχηματίζονται καθώς το σταγονίδιο "εκρήγνυται" και δειγματίζεται τυπικά μέσω κάποιας μορφής οπής (Sargent, 2013).



Σχήμα 5. Σχηματική απεικόνιση της ESI πηγής και σχηματισμός ιόντων (Κακλαμάνος, 2009)

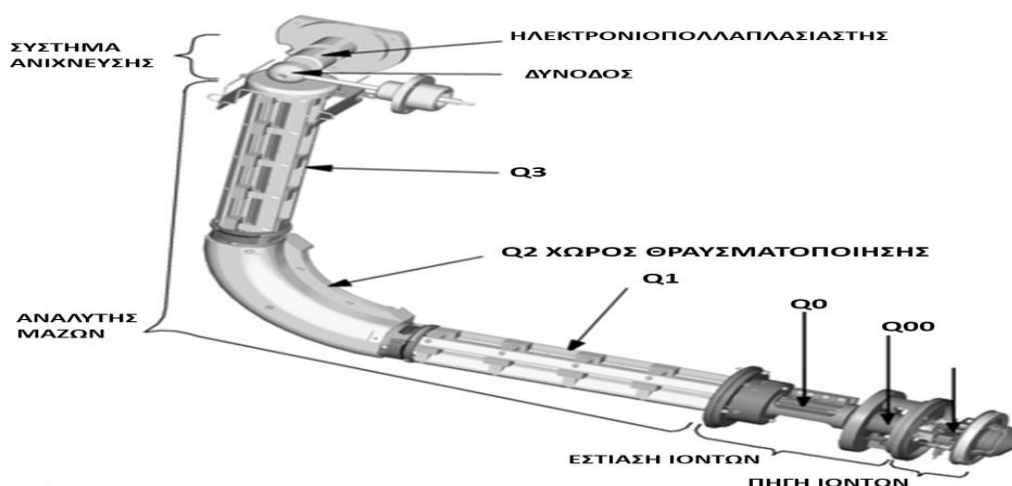
Το κύριο πλεονέκτημα της χρήσης του ESI για την ποσοτική LC-MS είναι ο σχηματισμός πρωτονιωμένων ή αποπρωτονιωμένων μορίων με μικρή θραυσματοποίηση, ιδανικό για την επιλογή των προδρόμων ιόντων και για τη μεγιστοποίηση της ευαισθησίας. Ο κύριος περιορισμός είναι η καταστολή ιόντος ή επίδραση ενίσχυσης του ιόντος λόγω της παρουσίας αναλυτών ή συστατικών της μήτρας που συν-εκλούουν. Αυτό το "φαινόμενο μήτρας" αναγνωρίζεται ως μία από τις κύριες πηγές αβεβαιότητας σε LC-MS και LC-MS/MS). Επιπλέον, η απόκριση μπορεί να είναι μη γραμμική σε υψηλές συγκεντρώσεις και το βέλτιστο pH για την απόκριση ESI μπορεί να έρχεται σε σύγκρουση με τις επιλογές που έγιναν για τον έλεγχο της LC εκλεκτικότητας (Sargent, 2013).

### 2.5.2.2 Αναλυτής Μαζών Τριπλού Τετράπολου

Η παραδοσιακή άποψη του φασματομέτρου μάζας είναι ένα μεγάλο όργανο που στέκεται στο δάπεδο και χρησιμοποιεί ένα μεγάλο ηλεκτρομαγνήτη για την παροχή φάσματος μάζας υψηλής ανάλυσης. Στην πράξη, αυτός ο τύπος οργάνου έχει δει μόνο περιορισμένη εφαρμογή για LC-MS. Στην πραγματικότητα, τα περισσότερα όργανα LC-MS χρησιμοποιούν έναν αναλυτή που περιλαμβάνει πολλά εξαρτήματα σε συνδυασμό, με τα πιο δημοφιλή για ποσοτική LC-MS να είναι τα φασματομέτρα με τριπλά τετράπολα (QQQ) (Sargent, 2013).

Παρά τη διαθεσιμότητα μιας ευρείας γκάμας αναλυτών μάζας καθένας με διαφορετικά χαρακτηριστικά απόδοσης, τα QQQ όργανα υπήρξαν η προτιμώμενη επιλογή για τους περισσότερους ποσοτικούς προσδιορισμούς ρουτίνας, δεδομένου ότι προσφέρουν τα καλύτερα χαρακτηριστικά απόδοσης για τον ποσοτικό προσδιορισμό (Sargent, 2013). Κάποια από τα χαρακτηριστικά αυτά είναι η ταχεία σάρωση και η δυνατότητα εφαρμογής φασματομετρίας μαζών σε σειρά/Tandem MS (Κακλαμάνος, 2009).

Η μεγάλη χρησιμότητα του συστήματος έγκειται στη δυνατότητα της διαδοχικής φασματομετρίας μαζών MS-MS. Αρχικά επιλέγεται στο πρώτο τετράπολο (Q1) μόνο ένα ιόν. Στη συνέχεια το μητρικό ιόν οδηγείται στο δεύτερο τετράπολο (Q2), όπου συγκρούεται με περίσσεια ενός αδρανούς αερίου (αργό ή ήλιο) και διασπάται σε παράγοντα θυγατρικά ιόντα. Το δεύτερο τετράπολο (Q2) αποτελεί την κυψελίδα συγκρούσεων (collision cell) και λειτουργεί ως χώρος θραυσματοποίησης του μητρικού ιόντος. Ο διαχωρισμός και η μέτρηση των θυγατρικών ιόντων πραγματοποιείται στο τρίτο τετράπολο (Q3) (Σχήμα 6) (Κακλαμάνος, 2009).



Σχήμα 6. Αναλυτής Μαζών με Τριπλό Τετράπολο (QQQ) (Κακλαμάνος, 2009).

Η παρακολούθηση των ιόντων μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορους τύπους σάρωσης/λειτουργίας: την πλήρη σάρωση (Full Scan), την παρακολούθηση επιλεγμένου ιόντος (Single Ion Monitoring-SIM), την παρακολούθηση επιλεγμένης αντίδρασης (Selected Reaction Monitoring-SRM ή Multiple Reaction Monitoring-MRM), τη σάρωση θυγατρικών (προϊόντων) ιόντων (Product Ion Scanning) και τη σάρωση πρόδρομου ιόντος (Precursor Ion Scanning) (Sargent, 2013).

Η λειτουργία πλήρους σάρωσης παρέχει ένα φάσμα πλήρους σάρωσης για κάθε ουσία. Η πλήρης σάρωση βοηθάει στον προσδιορισμό της ταυτότητας μιας άγνωστης ουσίας (προσδιορισμό μοριακού βάρους). Μπορεί να δώσει περισσότερες πληροφορίες από άλλους τύπους σάρωσης, αλλά υστερεί σε ευαισθησία και δεν ευνοεί την ποσοτικοποίηση της ουσίας (Κακλαμάνος, 2009).

Στη λειτουργία SIM παρακολουθείται ένα συγκεκριμένο ιόν ή ομάδα ιόντων. Είναι αποτελεσματική στην ανίχνευση μικρών ποσοτήτων (σε ίχνη) μιας γνωστής ουσίας σε πολύπλοκα μίγματα όταν το φάσμα μαζών της ουσίας είναι γνωστό. Επειδή παρακολουθούνται συγκεκριμένα ιόντα μπορούν να επιτευχθούν χαμηλότερα όρια ανίχνευσης και μεγαλύτερες ταχύτητες σάρωσης από τον τύπο της πλήρους σάρωσης. Όμως ενδέχεται να μειωθεί η εκλεκτικότητα, διότι οποιαδήποτε ουσία δίνει το συγκεκριμένο ιόν θα εμφανιστεί ως η ουσία στόχος οδηγώντας σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα (Κακλαμάνος, 2009).

Στη λειτουργία SRM (ή MRM) παρακολουθείται μια συγκεκριμένη αντίδραση ή ομάδα αντιδράσεων, όπως η αντίδραση θραυσματοποίησης ενός ή περισσοτέρων ιόντων. Στην περίπτωση αυτή παρακολουθείται συγκεκριμένος αριθμός μητρικών/θυγατρικών ιόντων, επιτρέποντας γρήγορη σάρωση και υψηλή εκλεκτικότητα. Οποιαδήποτε παρεμποδίζουσα ουσία θα πρέπει να σχηματίζει όχι μόνο ένα μητρικό ιόν του ίδιου λόγου  $m/z$  με την ουσία στόχο, αλλά θα πρέπει να διασπαστεί και να σχηματίσει και τα ίδια θυγατρικά ιόντα. Επίσης, το υπόβαθρο θορύβου είναι πολύ χαμηλό, άρα ένα συγκεκριμένο σήμα αντιστοιχεί σε πολύ υψηλότερη ανιχνευσιμότητα, αυξάνοντας ιδιαίτερα την ευαισθησία της μεθόδου (Κακλαμάνος, 2009).



### 3. Σκοπός της εργασίας

Ο σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν:

1. Η ανάπτυξη μιας καινοτόμου μεθόδου για ταυτόχρονη ανάλυση της τετραδοτοξίνης (ΤΤΧ) και των αναλόγων της στο *Lagocephalus sceleratus*, με υγρή χρωματογραφία και παραγωγή μετά τη στήλη με φθορισμομετρική ανίχνευση (HPLC-PCD-FLD) και με υγρή χρωματογραφία – φασματομετρία μαζών (LC-MS/MS) με αναλυτή μαζών τριπλού τετραπόλου.
2. Η επίτευξη καλού χρωματογραφικού διαχωρισμού των τοξινών και η ανίχνευση και ο χαρακτηρισμός των αναλόγων της ΤΤΧ.
3. Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός της τετραδοτοξίνης (ΤΤΧ) και της 4,9-ανυδροΤΤΧ (4,9-anhydroΤΤΧ).
4. Η επιβεβαίωση της ακρίβειας της μεθόδου με τον υπολογισμό της σχετικής τυπικής απόκλισης (%RSD) της γραμμικότητας και του κατώτερου ορίου ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης (LOD & LOQ).

## **4. Υλικά και μέθοδοι**

### **4.1 Υλικά και όργανα**

#### **4.1.1 Πρώτη ύλη**

Ο *Lagocephalus sceleratus* αλιεύτηκε στην περιοχή της νήσου Ρόδου και παραλήφθηκε τεμαχισμένος και χωρισμένος στα επιμέρους μέρη του, γονάδα, συκώτι, μύες και δέρμα. Μετά την παραλαβή τους τα επιμέρους μέρη τοποθετήθηκαν σε κατάψυξη και η συντήρησή τους έγινε στους  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) έως ότου ξεκινήσει η επεξεργασία τους.

#### **4.1.2 Αντιδραστήρια και διαλύτες**

Όλα τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη ήταν αναλυτικής καθαρότητας. Τα αντιδραστήρια καυστικό νάτριο (Sodium Hydroxide) και οξικό οξύ (Acetic Acid) προμηθεύτηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich (Germany). Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν όλοι HPLC – gradient grade. Οι διαλύτες μεθανόλη (Methanol), 1,4-διοξάνιο (1,4-Dioxan), χλωροφόρμιο (Chloroform), ισοπροπυλική αλκοόλη (Isopropyl Alcohol), ακετονιτρίλιο (Acetonitrile) και τριφθοροξικό οξύ (Trifluoroacetic Acid) προμηθεύτηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich (Germany). Οι διαλύτες 2-αιθόξυ αιθανόλη (2-ethoxy-ethanol) και 2- μεθόξυ αιθανόλη (2-methoxy ethanol) προμηθεύτηκαν από την εταιρεία Honeywell Fluka (Germany). Το πρότυπο της τετραδοτοξίνης (TX) – citrate free (98%) προμηθεύτηκε από την εταιρεία Latoxan (France) και το πρότυπο της 4,9-anhydrotetrodoxin από την εταιρεία Focus (PA, USA).

#### **4.1.3 Όργανα και συσκευές**

Τα συστήματα της υγρής χρωματογραφίας με ανιχνευτή φθορισμού, της παραγωγίσις μετά τη στήλη και της φασματομετρίας μαζών αποτελούνται από τα παρακάτω όργανα:

- Σύστημα Αντλιών δυο διαλυτών με μονάδα απαέρωσης (1100 Series Binary Pump, Agilent).
- Αυτόματος δειγματολήπτη (1100 Series Well - Plate Sampler, Agilent).
- Module Controller (1100/1200 Series, Agilent)
- Αναλυτική στήλη Hypercarb Porous Graphitic Carbon 150 x 4,6 mm, 3μ (Thermo Scientific, San Jose, USA).
- Θερμοστατούμενο φούρνο στηλών (1100 Series Thermo stated Column Compartment , Agilent).
- Διαχωριστής ροής (Standard Fix Flow Splitter, ASI, USA)

- Σύστημα παραγωγής μετά τη στήλη (Modular PCD System, Rigas Labs).
- Προγραμματιζόμενος ανιχνευτής φθορισμού (Fasma 502, Rigas Labs).
- Ηλεκτρονικό υπολογιστή Lenovo με λογισμικό ελέγχου και επεξεργασίας δεδομένων ChromQuest Version4.2.34.
- Φασματόμετρο μάζας με τριπλό τετράπολο (Quattro Micro API, Waters), με +ESI Z-Spray πηγή.
- Ηλεκτρονικό υπολογιστή Dell με λογισμικό ελέγχου και επεξεργασίας δεδομένων Masslynx Version4.1.

Παρακάτω αναγράφονται οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεκπεραίωση του πειράματος:

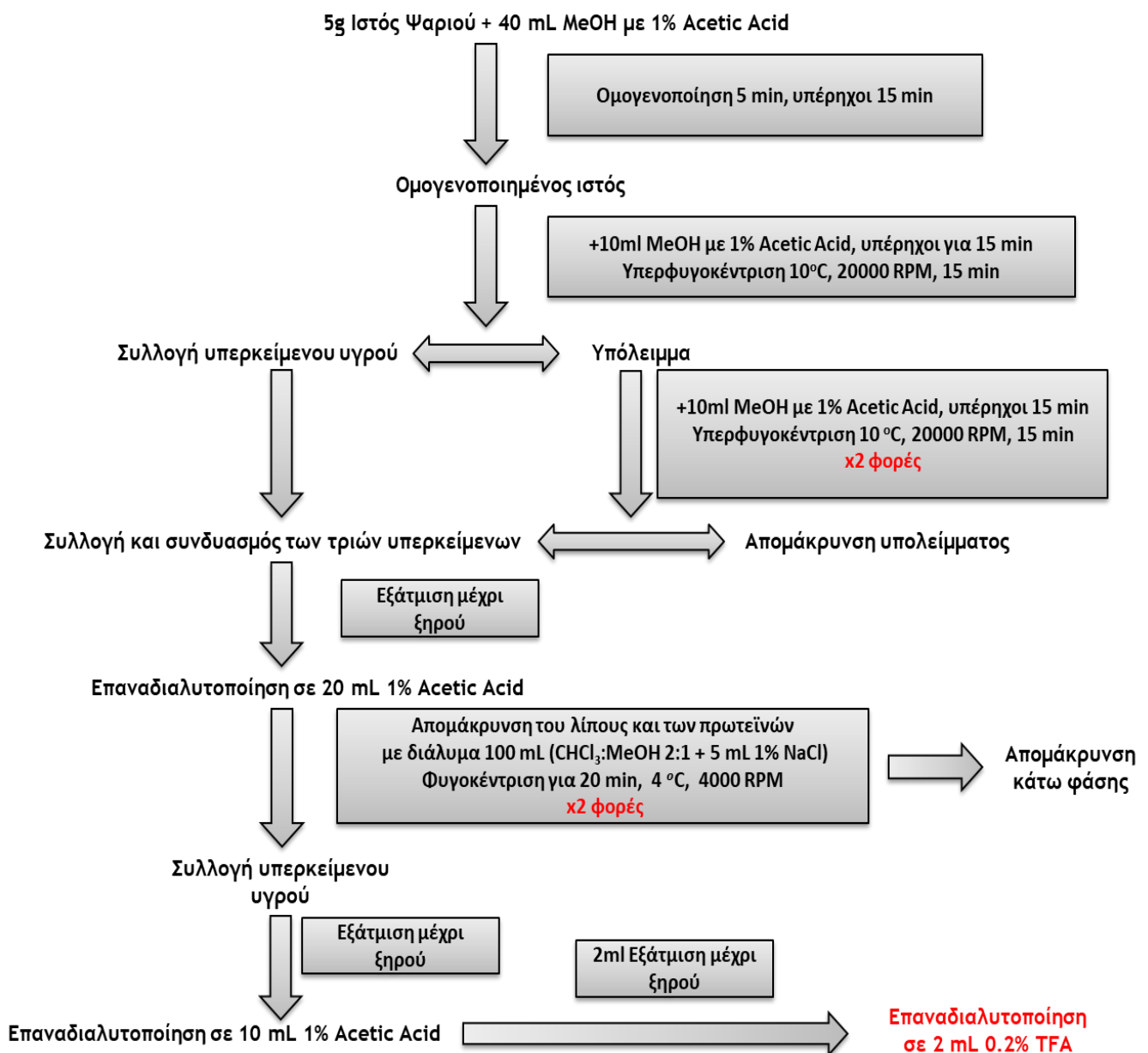
- Συσκευή παραγωγής υπερκαθαρού νερού (Ultra Clear Water, SG Water).
- Ομογενοποιητής (Ultra Turrax T25 Basic, Kika-Werke).
- Φυγόκεντρος (Universal 32R, Hettich Zentrifugen).
- Περιστροφικός εξατμιστήρας κενού (Laborta 4000-efficient, Heidolph).
- Αναλυτικός ζυγός ακριβείας  $\pm 0,0001$  g (Model 770, Kern).
- Λουτρό υπερήχων (Model FS28, Fisher Scientific).
- Μαγνητικός αναδευτήρας (Model CB162, Stuart).

## 4.2 Προετοιμασία δείγματος

Τα δείγματα παρασκευάστηκαν από τα τέσσερα επιμέρους κομμάτια του *L. scleratus* (γονάδες, σκώτι, μύες και δέρμα) με την παρακάτω μέθοδο (Σχήμα 7):

Ζυγίστηκαν 5g από το κατάλληλο τμήμα του *L. Scleratus* δείγματος και πραγματοποιήθηκε εκχύλιση του μυϊκού ιστού τους με 40ml μεθανόλης (w/v, 1% Acetic Acid) για 5 λεπτά σε ομογενοποιητή και για 15 λεπτά σε λουτρό υπέρηχων. Ακολούθησε υπερφυγοκέντριση του εκχυλίσματος στους 10°C, σε 20000 RPM για 15 λεπτά. Το υπερκείμενο υγρό συλλέχθηκε και το στερεό υπόλειμμα επεξεργάστηκε όπως και προηγουμένως άλλες δυο φορές. Τα τρία συνολικά υπερκείμενα διαλύματα συνδυάστηκαν, εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού στον περιστροφικό εξατμιστήρα και το στερεό υπόλειμμα διαλύθηκε σε 20 mL υδατικού διαλύματος 1% v/v οξικού οξέος. Ακολούθησε απομάκρυνση του λίπους στα δείγματα χρησιμοποιώντας μίγμα χλωροφορμίου μεθανόλης (2:1 v/v) και 5 mL 1% NaCl ακολουθώντας τη μέθοδο των Bligh and Dyer (1959). Η μέθοδος πραγματοποιήθηκε συνολικά τρεις φορές. Οι φάσεις του μίγματος διαχωρίστηκαν με

φυγοκέντριση και συλλέχθηκε το υπερκείμενο υδατικό στρώμα, το οποίο εξατμίστηκε μέχρι ξηρού και επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 10ml υδατικό διάλυμα 1% οξικού οξέος. Όγκος 2ml από το διάλυμα εξατμίστηκε μέχρι ξηρού και επαναδιαλυτοποιήθηκε με 2ml υδατικό διάλυμα 0,2% τριφθοροξικού οξέος (TFA). Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια των 2 ml και συντηρήθηκαν σε συνθήκες ψύξης. Στη συνέχεια τα δείγματα, από κάθε τμήμα του ψαριού που παρασκευάστηκε, χρησιμοποιήθηκαν για ανάλυση της τετραδοτοξίνης (TTX) και των αναλόγων της με τις τεχνικές HPLC-PCD-FLD και LC-MS/MS.



Σχήμα 7. Διάγραμμα ροής προετοιμασίας δείγματος της TTX από το *L. Sceleratus* (Tanis et al., 2016).

## 4.3 Ανάπτυξη της μεθόδου ανάλυσης της τετραδοτοξίνης

### 4.3.1 Προσδιορισμός της TTX με Υγρή Χρωματογραφία

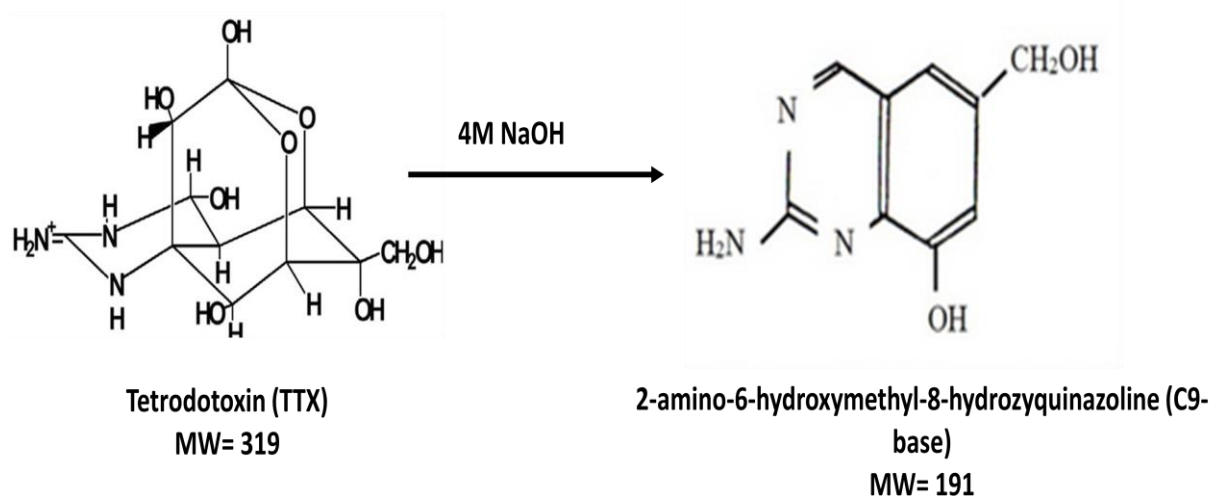
Ο ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός της τετραδοτοξίνης και των αναλόγων της στον *Lagocephalus sceleratus* πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας και παραγωγή μετά τη στήλη με φθορισμομετρική ανίχνευση (HPLC-PCD-FLD) ταυτόχρονα με τη μέθοδο υγρής χρωματογραφίας – φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS).

Τα συστήματα που χρησιμοποιήθηκαν με τη μέθοδο HPLC-PCD-FLD είναι ένα σύστημα υγρής χρωματογραφίας Agilent 1100 HPLC συνδεδεμένο με σύστημα παραγωγής μετά τη στήλη (PCD, Rigas Labs) ακολουθούμενο από ανιχνευτή φθορισμού (FASMA 502, Rigas Labs). Η μέθοδος που ακολουθήθηκε περιλαμβάνει τις παρακάτω συνθήκες, όπως αυτές προέκυψαν από τη διεξαγωγή πειραμάτων. Η βέλτιστη σύνθεση της κινητής φάσης αποτελούνταν από 0,2% τριφθοροξικό οξύ (Trifluoroacetic Acid, TFA) σε υπερκάθαρο νερό (κινητή φάση A) και από τον οργανικό διαλύτη που αποτελούταν από το μίγμα 3% 2-αιθόξυ αιθανόλη (2-ethoxy ethanol), 2% 2-μέθοξυ αιθανόλη (2-methoxy ethanol) και 0,2% TFA σε διαλύτη ακετονιτριλίου (Acetonitrile, ACN) (κινητή φάση B). Η επιλεγείσα βαθμιδωτή έκλυση είχε αρχική σύσταση σε κινητή φάση 99,5% A και 0,5% B, η οποία σταδιακά αυξανόταν μέχρι 20% B, όπως φαίνεται στον πίνακα 5. Η επιλεγείσα ροή για την ανάλυση ήταν 0,5 ml/min. Η ροή μετά τη στήλη διαχωριζόταν με αναλογία 5:1 από διαχωριστή ροής ώστε 0,4 ml/min της ροής να διοχετεύονται στο σύστημα παραγωγής και 0,1 ml/min στο φασματόμετρο μάζας. Η στήλη ήταν η Hypercarb (Thermo Fisher Scientific) με διαστάσεις 150 x 4,6 mm και 3μm διάμετρο πόρων. Η θερμοκρασία της στήλης ήταν στους 10°C. Ο όγκος έγχυσης των δειγμάτων ήταν 100 μL. Οι συνθήκες αναφέρονται συνοπτικά στον πίνακα 3.

Στο σύστημα παραγωγής μετά τη στήλη χρησιμοποιήθηκε ως αντιδραστήριο διάλυμα 4N καυστικού νατρίου σε υπερκάθαρο νερό με ροή 0,3 ml/min. Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκε αντιδραστήρας με πεπλεγμένη δομή, όγκου 1500μL (από PEEK) τοποθετημένος σε θερμοστατούμενο φούρνο στους 130°C. Στον φθορισμομετρικό ανιχνευτή το μήκος κύματος διέγερσης και εκπομπής ήταν 365 και 495 nm αντίστοιχα (Πίνακας 4) (Tanis et al., 2016).

Η αντίδραση παραγωγής της τετραδοτοξίνης πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφηκε από τους Yasumoto και Toouu (1985), με κάποιες διαφοροποιήσεις στις συσκευές και τις συνθήκες. Το υδροξείδιο του νατρίου (NaOH) χρησιμοποιήθηκε ως αντιδραστήριο ώστε να παραχθεί φθορίζων παράγωγο της TTX, 2-αμινο-6-υδροξυμεθυλ-8-υδροξυκουιναζολόνη (γνωστό και ως "C9 base", M.B. 191) (Σχήμα 8) με μήκος κύματος διέγερσης και εκπομπής στα 365 και 495 nm αντίστοιχα (Goto,

Kishi & Hirata, 1965). Σε ισχυρά αλκαλικό περιβάλλον αντιδρούν με παρόμοιο τρόπο και τα άλλα ανάλογα της TTX.



Σχήμα 8. Αντίδραση Παραγωγής της TTX

Πίνακας 3: Συνθήκες HPLC για την ανάλυση της TTX

Συνθήκες	Δεδομένα
Στήλη	Hypercarb (150 x 4,6 mm ID, 3μ)
Ροή	0.5 ml/min
Κινητή φάση A:	0.2% TFA
Κινητή φάση B:	ACN: 2-Ethoxy Ethanol: 2-Methoxy Ethanol: TFA (94.8:3:2:0.2%)
Θερμοκρασία στήλης	10 °C
Έκλυση	Βαθμιδωτή
Όγκος δείγματος	100 μL

Πίνακας 4. Συνθήκες PCD για την αντίδραση της TTX

Συνθήκες	Δεδομένα
Ροή PCD συστήματος	0.3 ml/min
Αντιδραστήριο	4N NaOH
Αντιδραστήρας	1500 $\mu$ L, 130 $^{\circ}$ C
Φθορισμομετρικός Ανιχνευτής	365 nm Διέγερση 395 nm Εκπομπή

Πίνακας 5. Συνθήκες βαθμιδωτής έκλυσης

Χρόνος (min)	A (%)	B (%)
0.0	99,5	0,5
20.0	99,5	0,5
50.0	97,0	3,0
50.1	95,0	5,0
55.0	95,0	5,0
75.0	91,0	9,0
100.0	87,0	13,0
120.0	80,0	20,0
130.0	80,0	20,0
140.0	99,5	0,5
260.0	99,5	0,5

#### 4.3.2 Προσδιορισμός της TTX με φασματομετρία μάζας

Το σύστημα του φασματομέτρου μάζας είναι το Micromass Quatro micro API (Waters, Manchester, UK) και λειτουργεί με ιονισμό ηλεκτροψεκασμού Z-Spray ESI (Electrospray Ionisation). Οι βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας του, όπως αυτές προέκυψαν από βελτιστοποίηση της πηγής ιονισμού είναι: θετικός ιονισμός, δυναμικό τριχοειδούς (Capillary Voltage) 3.2 kV, δυναμικό κώνου (Cone Voltage) 35 V, δυναμικό εξαγωγέα (Extractor Voltage) 2V, δυναμικό φακού εστίασης (RF Lens Voltage) 0.5 V, θερμοκρασία πηγής (Source temperature) 120 °C, θερμοκρασία εκνέφωσης (Desolvation temperature) 350 °C, ροή αερίου εκνέφωσης (Desolvation gas flow) 500 L/h N<sub>2</sub>, ροή αερίου κώνου (Cone gas flow) 50 L/h N<sub>2</sub>, αέριο σύγκρουσης Αργό (Collision gas) με Dwell time 0.5 sec.

Το φασματομέτρο μάζας βρίσκεται σε λειτουργία SRM/MRM. Οι μεταπτώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τη τετραδοτοξίνη και για τα ανάλογα της περιγράφονται στον Πίνακα 6. Για την ταυτοποίηση της TTX χρησιμοποιήθηκαν οι μετάπτωσης m/z 320/302 και 320/162 ενώ για την 4,9-anhydroTTX χρησιμοποιήθηκαν οι μετάπτωσης m/z 302/284, 302/175 και 302/162. Η ποσοτικοποίηση της TTX έγινε με m/z 320/302 και για την 4,9-anhydroTTX έγινε με m/z 302/162.

Πίνακας 6. Μεταπτώσεις των πρόδρομων ιόντων των τοξινών, το δυναμικό κώνου και η ενέργεια θραυσματοποίησης των προϊόντων.

Όνομα Τοξίνης	Πρόδρομα Ιόντα (Precursor Ion)	Προϊόντα ιόντα (Product Ion)	Δυναμικό κώνου (Cone Voltage)	Ενέργεια Θραυσματοποίησης (Collision Energy)
TTX				
4-epiTTX	m/z 320	m/z 302	50 V	25 eV
6-epiTTX		m/z 162		35 eV
Tetrodonic acid				
4,9-anhydroTTX	m/z 302	m/z 284	50 V	17 eV
6-epi-4,9-anhydroTTX		m/z 175		25 eV
		m/z 162		28 eV
11-deoxyTTX	m/z 304	m/z 286	47 V	25 eV
5-deoxyTTX		m/z 162		30 eV



11-norTTX-6(S)-ol	m/z 290	m/z 272	47 V	21 eV
11-norTTX-6(R)-ol		m/z 244		30 eV
		m/z 162		35 eV
5,6,11-trideoxyTTX	m/z 272	m/z 254	30 V	21 eV
4-epi-5,6,11-trideoxyTTX		m/z 178		26 eV
		m/z 162		29 eV
		m/z 146		35 eV
		m/z 133		35 eV
		m/z 122		35 eV
6,11-dideoxyTTX	m/z 288	m/z 270	35 V	22 eV
5,11-dideoxyTTX		m/z 252		25 eV
1-hydroxy-8-epi-5,6,11-trideoxy TTX		m/z 244		35 eV
		m/z 162		35 eV
		m/z 160		35 eV
		m/z 148		35 eV
4,9-anhydro-5,6,11-trideoxyTTX	m/z 254	m/z 236	45 V	19 eV
4,4a-anhydro-5,6,11-trideoxyTTX		m/z 162		24 eV
	m/z 286	m/z 133	47 V	26 eV
		m/z 254		20 eV
	m/z 245	m/z 162	47 V	30 eV
		m/z 186		20 eV

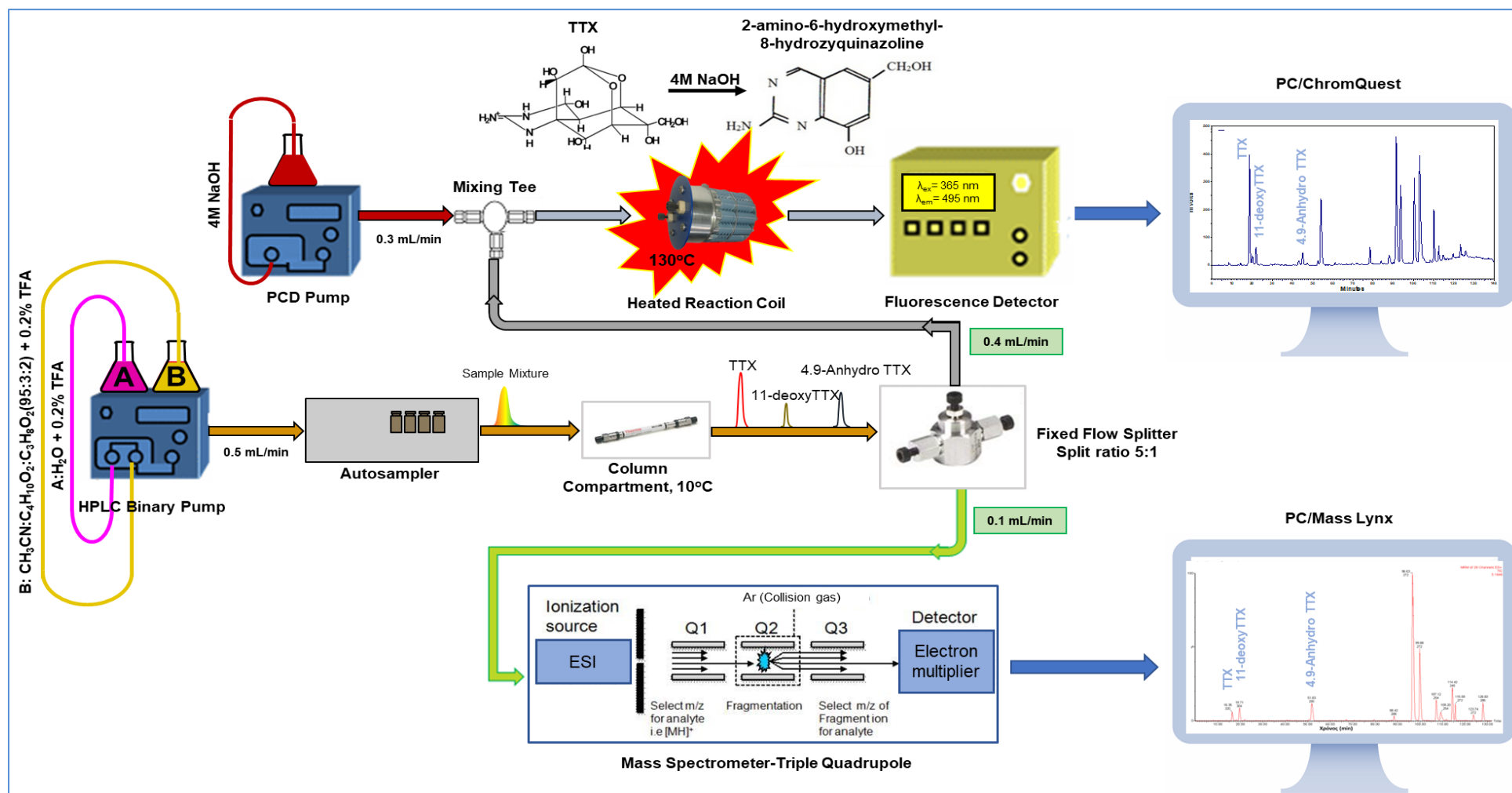
(Bane et al., 2014, Gorapava Puilingi C. et al., 2015, Yotsu-Yamashita M. et al., 2011, Yotsu – Yamashita et al., 2013, Rodriguez et al., 2012).

### 4.3.3 Αναλυτική περιγραφή του πειραματικού μέρους

Η μέθοδος της υγρής χρωματογραφίας με ταυτόχρονη φθορισμομετρική ανίχνευση και φασματομετρία μάζας ακολουθεί το παρακάτω διάγραμμα ροής:

Το σύστημα αντλιών δύο διαλυτών αποτελείται από το διαλύτη της κινητής φάσης Α (0,2% TFA σε H<sub>2</sub>O) και το διαλύτη της κινητής φάσης Β (ACN: 2-Ethoxy Ethanol: 2-Methoxy Ethanol: TFA σε αναλογίες 94.8:3:2:0.2%) και παρέχει συνεχή σταθερή ροή 0,5 ml/min των αναμιγμένων κινητών φάσεων στο σύστημα. Το μίγμα της κινητής φάσης ακολουθεί συνθήκες βαθμιδωτής έκλουσης από αρχική σύσταση 99,5%A και 0,5%B έως την σταδιακή αύξηση σε 20%B. Η ροή περνάει από τον αυτόματο δειγματολήπτη, όπου γίνεται η εισαγωγή του δείγματος και συνεχίζει στη θερμοστατούμενη στους 10°C στήλη (Hypercarb, 150 x 4,6 mm ID, 3μm), όπου πραγματοποιείται ο διαχωρισμός της ΤΤΧ και των αναλόγων της. Μετά τη στήλη η ροή διαχωρίζεται (Fixed Flow Splitter) σε δύο επιμέρους ροές των 0,4 ml/min και των 0,1 ml/min.

Η ροή των 0,4 ml/min κατευθύνεται στο σύστημα παραγωγής και αναμιγνύεται (Mixing Tee) με διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου συγκέντρωσης 4M (4M NaOH) ροής 0,3 ml/min. Η αναμιγμένη ροή περνάει από το πεπλεγμένο Reaction Coil (PEEK), όπου και πραγματοποιείται αντίδραση της ΤΤΧ στους 130°C, ώστε να παραχθεί το φθορίζων παράγωγο της, 2-αμινο-6-υδροξυμεθυλ-8-υδροξυκουιναζολόνη και αντίστοιχα να παραχθούν φθορίζων παράγωγα των αναλόγων της ΤΤΧ. Στη συνέχεια ακολουθεί ο φθορισμομετρικός ανιχνευτής, που λειτουργεί με μήκος κύματος διέγερσης και εκπομπής στα 365 και 495 nm, αντίστοιχα, όπου πραγματοποιείται η ανίχνευση των παραγώγων της ΤΤΧ και των αναλόγων της. Η καταγραφή των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται από το λογισμικό ChromQuest. Η ροή των 0,1 ml/min κατευθύνεται στο φασματόμετρο μάζας με αναλυτή μαζών τριπλού τετράπολου. Το υγρό διάλυμα ρέει μέσω τριχοειδούς σωλήνα στην πηγή ιόντων (+) ElectroSpray Ionisation, όπου δημιουργείται ένα εκνέφωμα από πολύ μικρές σταγόνες και με την εφαρμογή μεγάλης διαφοράς δυναμικού μεταφέρεται ένα θετικό φορτίο στις σταγόνες, οι οποίες διασπώνται σε ιόντα αέριας φάσης και μεταφέρονται στον αναλυτή μάζας. Στον αναλυτή μάζας τριπλού τετράπολου, που βρίσκεται σε λειτουργία SRM/MRM, επιλέγονται τα πρόδρομα ιόντα της ΤΤΧ και των αναλόγων της, ανάλογα με το m/z που φέρουν, παρακολουθείται η αντίδραση θραυσματοποίησης τους σε προϊόντα ιόντα και πραγματοποιείται ο διαχωρισμός και η μέτρηση τους. Τα ιόντα ανιχνεύονται και μετατρέπονται σε ηλεκτρικό σήμα μέσω του ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστή και γίνεται επεξεργασία και καταγραφή τους μέσω του λογισμικού Masslynx. Στο σχήμα 9 παρουσιάζεται το διάγραμμα ροής της μεθόδου που περιγράφηκε παραπάνω.



Σχήμα 9. Διάγραμμα ροής της μεθόδου ανάλυσης της TTX και των αναλόγων της με υγρή χρωματογραφία και ταυτόχρονη φθορισμομετρική ανίχνευση και φασματομετρία μάζας.

## 5. Αποτελέσματα – Συζήτηση

### 5.1 Επιλογή αναλυτικής στήλης και κινητής φάσης

#### 5.1.1 Επιλογή στατικής φάσης

Η στήλη Hypercarb έχει ως στατική φάση πορώδη γραφιτικό άνθρακα (Porous Graphitic Carbon, PGC) γεγονός που της προσδίδει μοναδικές ιδιότητες στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης. Οι χημικές επιφανειακές ιδιότητες του PGC το διακρίνουν από τις συμβατικές στατικές φάσεις στην υγρή χρωματογραφία, όπως τις χημικά τροποποιημένες στατικές φάσεις διοξειδίου του πυριτίου ή πολυμερικές στατικές φάσεις. Το PGC συμπεριφέρεται ως υλικό με ισχυρές ιδιότητες κατακράτησης για τους μη πολικούς αναλύτες όπως οι στατικές φάσεις αλκυλίου πυριτίου, ωστόσο η συμπεριφορά συγκράτησης και εκλεκτικότητας για πολικές και δομικά συγγενείς ενώσεις είναι πολύ διαφορετική. Το PGC παρέχει μοναδικές ιδιότητες κατακράτησης και διαχωρισμού των πολύ πολικών ενώσεων. Η επιφάνεια του είναι στερεό-επιλεκτική με την ικανότητα να διακρίνει γεωμετρικά ισομερή, διαστερομερή και άλλες στενά συγγενείς ενώσεις. Η Hypercarb στήλη είναι σταθερή σε όλο το εύρος pH 0-14 και δεν επηρεάζεται από επιθετικές κινητές φάσεις. Η συμβατότητα της με όλα τα συστήματα διαλυτών επιτρέπει τον διαχωρισμό ενός ευρέως φάσματος πολικότητας μέσα σε μια απλή χρωματογραφική διαδρομή. Η εκλεκτικότητα πλήρωσης της Hypercarb είναι διαφορετική από την εκλεκτικότητα της φάσης πυριτίου και της πολυμερικής φάσης. Ο μηχανισμός συγκράτησης της είναι διαφορετικός από τις συμβατικές C-18 στήλες. Οι στήλες Hypercarb βρίσκουν ευρεία εφαρμογή σε αναλύσεις όπως στις βιοχημικές, στις ασφάλειες τροφίμων και γενικότερα στα τρόφιμα και στα ροφήματα, στις περιβαλλοντικές και στις κλινικές (Application Notebook, Thermo Fisher Scientific, 2009).

Η αναλυτική στήλη που επιλέχθηκε για το χρωματογραφικό διαχωρισμό της τετραδοτοξίνης (TTX) και των αναλόγων της είναι η στήλη Hypercarb (150 x 4,6 mm) με μέγεθος σωματιδίων πληρωτικού υλικού 3μm, του εμπορικού οίκου Thermo Fisher Scientific. Η επιλογή έγινε βάση της διαφορετικότητας που παρέχουν στη στήλη οι μοναδικές ιδιότητες της από άλλες στήλες καθώς και στο γεγονός ότι δεν έχει χρησιμοποιηθεί σε έρευνα για την ανάλυση της TTX.

### 5.1.2 Επιλογή κινητής φάσης A

Η κατακράτηση πολικών ενώσεων και ιόντων στη Hypercarb οφείλεται σε συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διαλυμένων ουσιών και των επιφανειακών ηλεκτρονίων στον γραφίτικο άνθρακα, ο οποίος συμπεριφέρεται τόσο ως δότης ηλεκτρονίων όσο και ως δέκτης ηλεκτρονίων. Ο τύπος και η συγκέντρωση των ηλεκτρονικών τροποποιητών στην κινητή φάση μπορεί να έχουν αξιοσημείωτη επίδραση στη συγκράτηση, την επιλεκτικότητα και επίσης στην κορυφή συμμετρίας των διαλυμένων ουσιών που διαχωρίζονται σε στήλες Hypercarb (Method development guide for Hypercarb Columns, Thermo Fisher Scientific, 2007).

Ο πιο κοινά χρησιμοποιούμενος ηλεκτρονικός τροποποιητής, το τριφθοροξικό οξύ (TFA), μπορεί να λειτουργήσει ως ένας ανταγωνιστικός τροποποιητής ο οποίος μειώνει την πολική συγκράτηση. Κατά τον διαχωρισμό των ιονιζόμενων όξινων διαλυμένων ουσιών (αναλύτες), πολύ συχνά είναι απαραίτητο να χρησιμοποιείται TFA προκειμένου να επιτευχθεί έκλυση σε λογικό χρόνο ανάλυσης. Το TFA ανταγωνίζεται με τις όξινες διαλυμένες ουσίες για την επιφάνεια του γραφίτη, αποτρέποντας την πολύ ισχυρή συγκράτηση αυτών (Method development guide for Hypercarb Columns, Thermo Fisher Scientific, 2007).

Γενικά, οι όξινες διαλυμένες ουσίες απαιτούν την προσθήκη TFA στην κινητή φάση προκειμένου να επιτευχθεί έκλυση σε λογικό χρόνο ανάλυσης. Έτσι, το προτεινόμενο πρώτο βήμα στην ανάπτυξη μίας μεθόδου σε μια στήλη Hypercarb είναι η εκτέλεση της βαθμιδωτής έκλυσης, με 0.1% TFA στις κινητές φάσεις A, B (Method development guide for Hypercarb Columns, Thermo Fisher Scientific, 2007).

Στην μέθοδο που αναπτύχθηκε η κινητή φάση A ήταν 0,2% TFA σε υπερκάθαρο νερό και υπήρξε προσθήκη 0,2% TFA και στην κινητή φάση B με σκοπό τη μείωση των χρόνων έκλυσης των τοξινών και του συνολικού χρόνου ανάλυσης. Το ποσοστό αυξήθηκε από 0,1% σε 0,2%, διότι προσέφερε καλύτερες και πιο συμμετρικές κορυφές και μικρότερο χρόνο ανάλυσης.

## 5.2 Μελέτη της επίδρασης του οργανικού διαλύτη

Για τη μελέτη του οργανικού διαλύτη πραγματοποιήθηκαν πειράματα με διαφορετικούς διαλύτες για τη κινητή φάση Β. Η μελέτη εστιάστηκε κυρίως στην HPLC-PCD-FLD τεχνική, ώστε να επιτευχθούν οι επιθυμητοί διαχωρισμοί της ΤΤΧ και των αναλόγων της. Οι επιλεγόμενες συνθήκες βαθμιδωτής έκλουσης στον κάθε διαλύτη ήταν οι βέλτιστες ανάλογα με την πολικότητα του διαλύτη. Οι σταθερές συνθήκες στη διάρκεια της μελέτης παρουσιάζονται στον πίνακα 7. Οι οργανικοί διαλύτες που επιλέχθηκαν να μελετηθούν παρουσιάζονται παρακάτω:

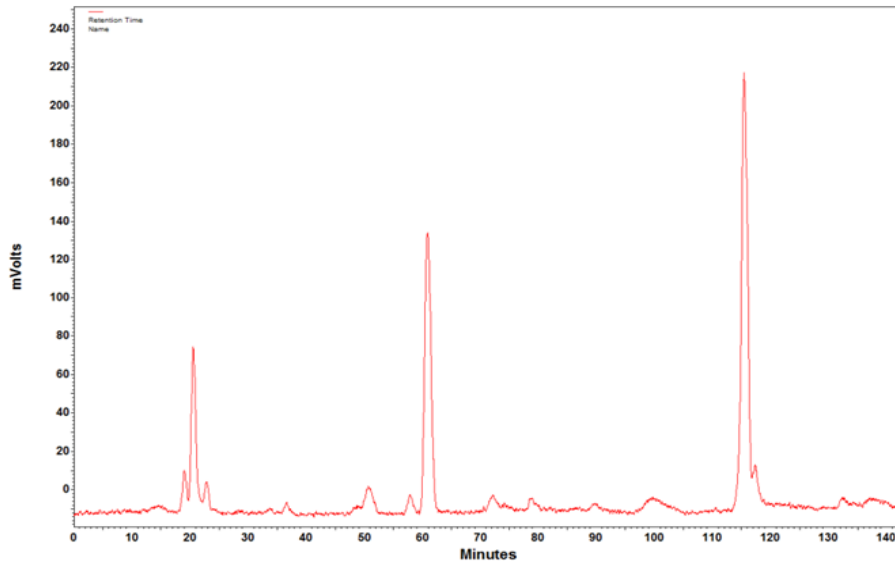
- Μεθανόλη (Methanol, CH<sub>3</sub>OH)
- 1,4 Διοξάνιο (1,4-Dioxan)
- Ισοπροπυλική Αλκοόλη (Isopropyl Alcohol, IPA)
- 2- Αιθόξυ αιθανόλη (2-Ethoxyl-ethanol)
- 2- Αιθόξυ-αιθανόλη (2-Ethoxyl-ethanol) + 2- Μεθόξυ-αιθανόλη (2-Methoxy-ethanol)

Πίνακας 7. Χρωματογραφικές συνθήκες μελέτης για τους οργανικούς διαλύτες.

Κινητή Φάση Α	0,2% TFA – 99,8% H <sub>2</sub> O
Κινητή Φάση Β	0,2% TFA – 99,8% ACN/Organic modifier
Ροή Κινητής Φάσης	0.50 ml/min
Ροή PCD συστήματος	0.30 ml/min
Στήλη	Hypercarb (150x4.6) Particle Sz (μ) 3
Θερμοκρασία στήλης	15 °C

Όλοι οι διαλύτες αναμίχθηκαν σε διαφορετικές αναλογίες ο καθένας με διαλύτη ακετονιτριλίου (Acetonitrile, ACN) και Organic modifier (Μεθανόλη, 1.4 Διοξάνιο, Ισοπροπυλική Αλκοόλη, 2- Αιθόξυ αιθανόλη, 2- Αιθόξυ-αιθανόλη + 2- Μεθόξυ-αιθανόλη).

## Μεθανόλη (Methanol)

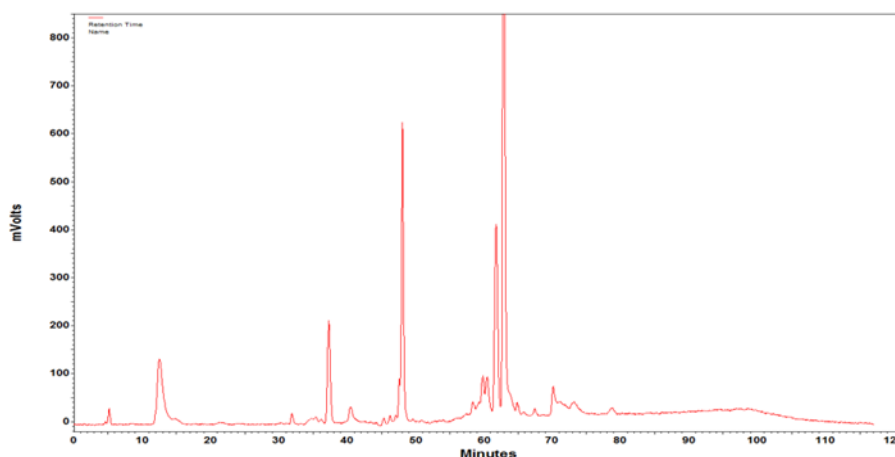


Βαθμιδωτή έκλυση	
Χρόνος (min)	B%
0.00	0.0
17.00	0.0
27.00	1.0
37.00	2.0
50.00	5.0
60.00	6.0
70.00	10
72.00	20.0
80.00	20.0
100.00	0.0

Σχήμα 10. Χρωματογράφημα HPLC-PCD-FLD δείγματος γονάδας με προσθήκη στην κινητή φάση Β οργανικού διαλύτη 10% μεθανόλη (Organic modifier) σε ακετονιτρίλιο. Συνθήκες βαθμιδωτής έκλυσης.

Στο χρωματογράφημα του σχήματος 10 παρατηρείται ότι η μεθανόλη είναι ένας αδύναμος οργανικός διαλύτης, που προσδίδει ελάχιστους διαχωρισμούς των τοξινών και έχει πολύ χαμηλή ευαισθησία και σήμα ανίχνευσης, ενώ παρουσιάζει και θόρυβο στη βασική γραμμή (baseline).

## 1,4 Διοξάνιο (1,4 Dioxan)

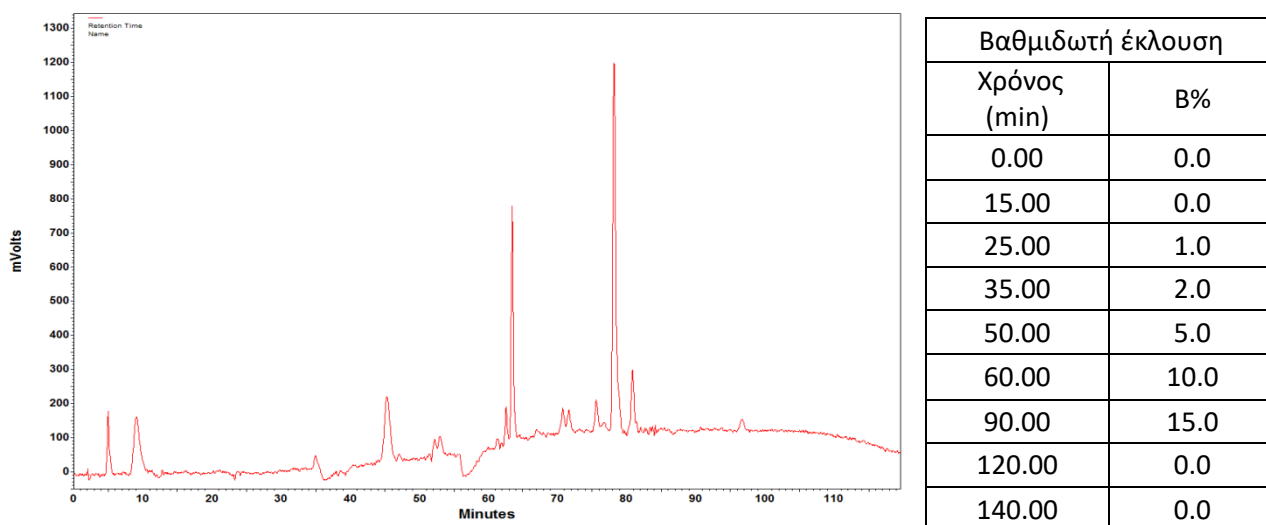


Βαθμιδωτή έκλυση	
Χρόνος (min)	B%
0.00	0.0
15.00	0.0
25.00	1.0
35.00	2.0
50.00	5.0
60.00	10.0
90.00	15.0
120.00	0.0
140.00	0.0

Σχήμα 11. Χρωματογράφημα HPLC-PCD-FLD δείγματος γονάδας με προσθήκη στην κινητή φάση Β οργανικού διαλύτη 10% 1.4-Διοξάνιο (Organic modifier) σε ακετονιτρίλιο. Συνθήκες βαθμιδωτής έκλυσης.

Στο χρωματογράφημα του σχήματος 11 παρατηρείται ότι το 1.4-Διοξάνιο είναι ένας ισχυρός διαλύτης που δεν προσφέρει αποτελεσματικούς χρωματογραφικούς διαχωρισμούς της ΤΤΧ και των αναλόγων, ενώ αυξάνει την ένταση της ανίχνευσης. Επίσης παρατηρείται ότι σε σύγκριση με τη μεθανόλη αποδίδει περισσότερους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς της ΤΤΧ και των αναλόγων της.

### Ισοπροπυλική αλκοόλη (Isopropyl Alcohol)

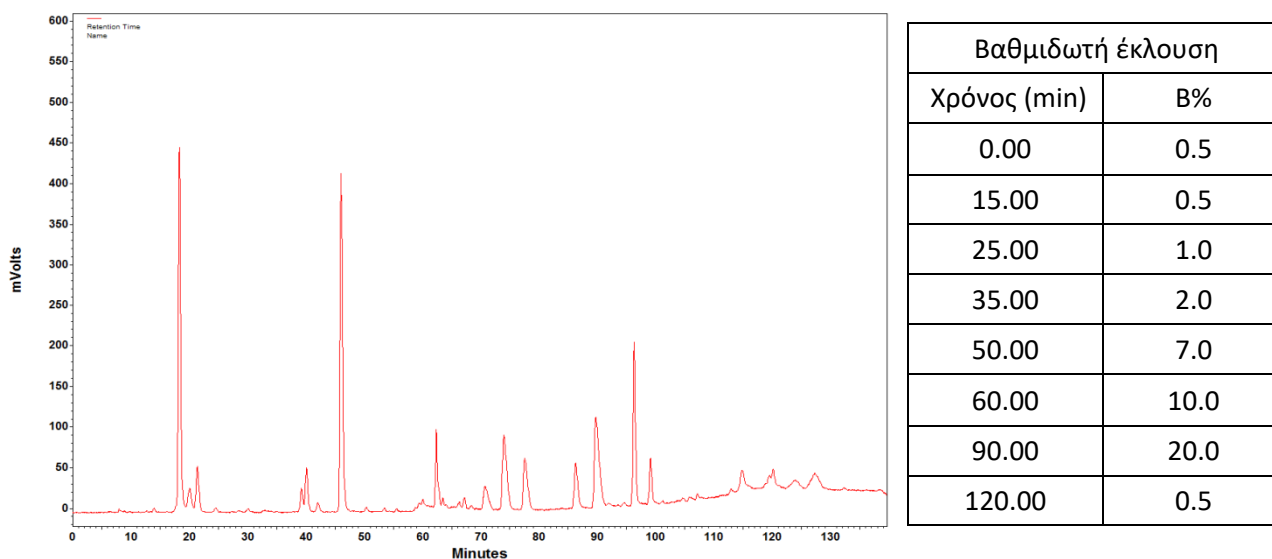


Σχήμα 12. Χρωματογράφημα HPLC-PCD-FLD δείγματος γονάδας με προσθήκη στην κινητή φάση Β οργανικού διαλύτη 30% Ισοπροπυλική αλκοόλης (Organic modifier) σε ακετονιτρίλιο. Συνθήκες βαθμιδωτής έκλυσης.

Στο χρωματογράφημα του σχήματος 12 παρατηρείται ότι η ισοπροπυλική αλκοόλη είναι ένας καλός και ισχυρός διαλύτης που δεν αποδίδει καλούς χρωματογραφικούς διαχωρισμούς της ΤΤΧ και των αναλόγων της, αλλά αποδίδει καλό σχήμα κορυφών. Επίσης παρατηρείται ότι υπάρχουν πολλά σημεία με νεκρούς όγκους (dead volumes), γεγονός που παρατηρήθηκε σε όλα τα πειράματα με την ισοπροπυλική αλκοόλη και έντονος θόρυβος στη βασική γραμμή (baseline). Σε σύγκριση με τη μεθανόλη και το 1.4-διοξάνιο έχει καλύτερα χρωματογραφικά αποτελέσματα, αλλά όχι τα επιθυμητά.



## 2- Αιθόξυ αιθανόλη (2-Ethoxy-ethanol)



Σχήμα 13. Χρωματογράφημα HPLC-PCD-FLD δείγματος γονάδας με προσθήκη στην κινητή φάση Β οργανικού διαλύτη 3% 2- αιθόξυ αιθανόλη (Organic modifier) σε ακετονιτρίλιο. Συνθήκες βαθμιδωτής έκλουσης.

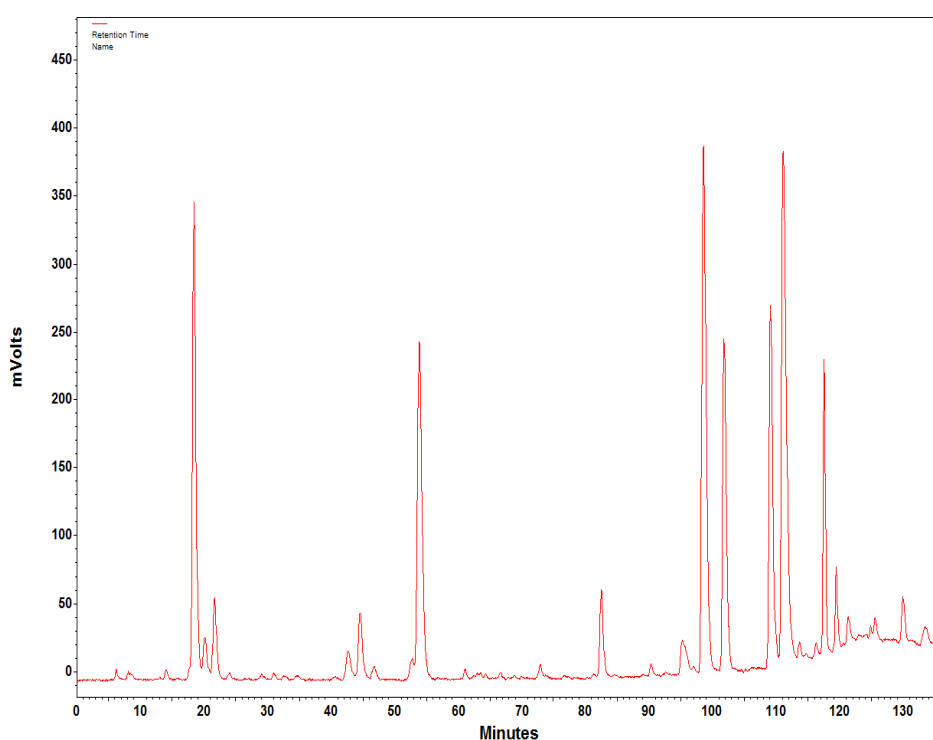
Στο χρωματογράφημα του σχήματος 13 παρατηρείται ότι η 2- αιθόξυ αιθανόλη παρά το γεγονός ότι είναι ένας ισχυρός διαλύτης σε μικρά ποσοστά απέδωσε καλούς χρωματογραφικούς διαχωρισμούς με καλό σχήμα κορυφών και χωρίς έντονο θόρυβο στη baseline. Επίσης απέδωσε ισχυρό ιονισμό που είχε ως αποτέλεσμα καλύτερη ανίχνευση της τετραδοτοξίνης και των αναλόγων της. Σε σύγκριση με τους άλλους οργανικούς διαλύτες παρατηρείται ότι εμφανίζονται περισσότερες τοξίνες και επιτυγχάνεται και διαχωρισμός της ΤΤΧ, αλλά δεν εμφανίζει πλήρη διαχωρισμό και απαιτείται εκτενέστερη μελέτη σε σχέση με το ποσοστό του, τη θερμοκρασία ανάλυσης και τις συνθήκες βαθμιδωτής έκλουσης.

## 2- Αιθόξυ αιθανόλη + 2- Μεθόξυ-αιθανόλη (2-Ethoxy-ethanol & 2-Methoxy-ethanol)

Ύστερα από εκτενή μελέτη για το ποσοστό και τις συνθήκες βαθμιδωτής έκλουσης για τον οργανικό διαλύτη 2- αιθόξυ αιθανόλη, προέκυψε ότι το ιδανικό ποσοστό είναι 3% σε ακετονιτρίλιο, ενώ παράλληλα έγινε προσθήκη 2% 2- μεθόξυ-αιθανόλη, το οποίο όπως παρατηρήθηκε επέδρασε θετικά και απέδωσε καλύτερους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς στις κορυφές των τοξινών και πιο σταθερούς χρόνους έκλουσης των κορυφών. Επίσης πραγματοποιήθηκε προσθήκη 0,2% TFA για καλύτερο σχήμα κορυφών. Περιληπτικά το μίγμα της κινητής φάσης Β περιέχει: Ακετονιτρίλιο - 2- αιθόξυ αιθανόλη - 2- μεθόξυ-αιθανόλη – τριφθοροξικό οξύ σε αναλογίες 94,8% - 3% -2% - 0,2%.

Οι ιδανικές συνθήκες που παρατηρήθηκαν για τη μεταβολή της σύστασης του οργανικού διαλύτη (Κινητή Φάση Β) αναλογικά με το ποσοστό της Κινητής Φάσης Α σε σχέση με το χρόνο είναι: από 0 έως 20 λεπτά 0,5%B ισοκρατικά, από 20 έως 50 λεπτά 3%B γραμμικά (linear gradient), από τα 50.1 έως τα 55 λεπτά 5%B σε διακριτά βήματα (step gradient), από τα 55 έως τα 75 λεπτά 9% γραμμικά, από τα 75 έως τα 100 λεπτά 13% γραμμικά, από τα 100 έως τα 115 λεπτά 20% γραμμικά, από τα 115 έως τα 130 λεπτά 20% ισοκρατικά, από τα 130 έως τα 140 λεπτά 0,5% γραμμικά και από τα 140 έως τα 260 λεπτά 0,5% ισοκρατικά, ώστε να πραγματοποιηθεί ισορρόπηση της στήλης για την επόμενη ανάλυση. Οι συνθήκες παρουσιάζονται παραπάνω στον πίνακα 3.

Στο σχήμα 14 παρουσιάζεται το χρωματογράφημα δείγματος γονάδας με όλες τις συνθήκες που αναφέρονται παραπάνω και οι συνθήκες βαθμιδωτής έκλουσης.



Βαθμιδωτή έκλουση	
Χρόνος (min)	B%
0.0	0,5
20.0	0,5
50.0	3,0
50.1	5,0
55.0	5,0
75.0	9,0
100.0	13,0
120.0	20,0
130.0	20,0
140.0	0,5
260.0	0,5

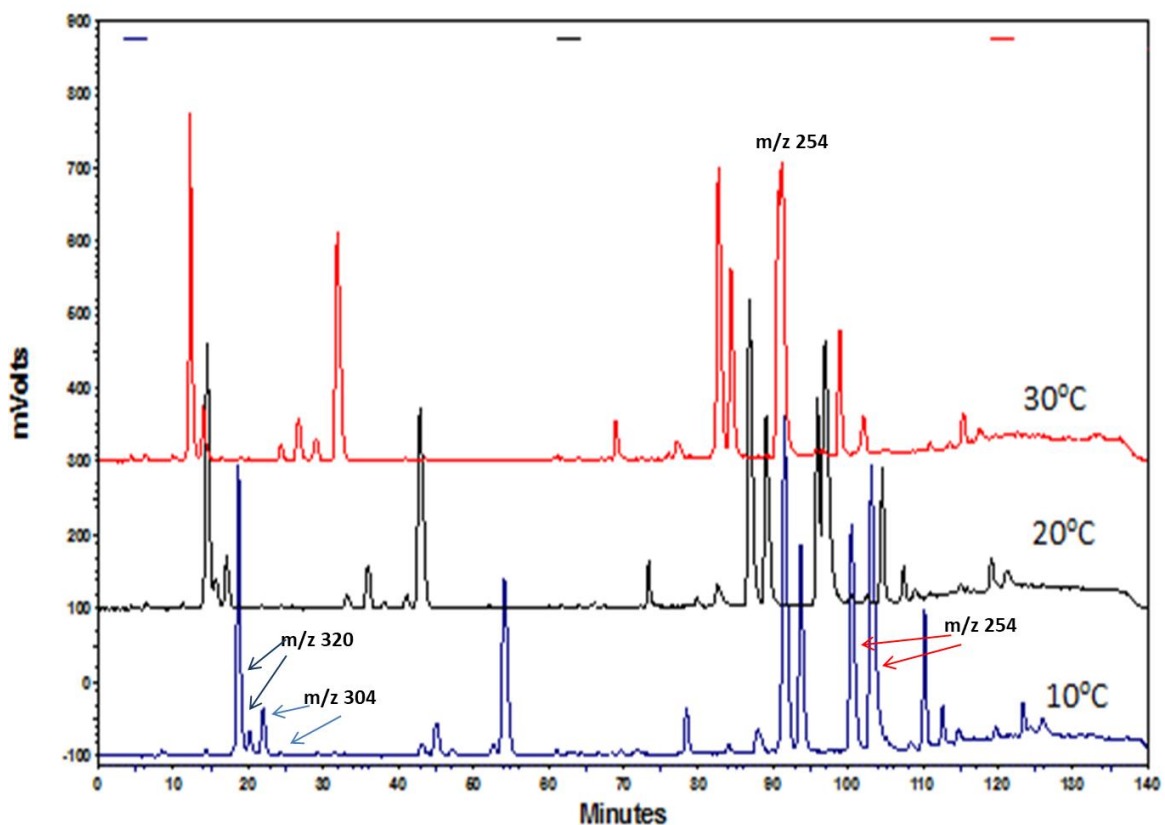
Σχήμα 14. Χρωματογράφημα HPLC-PCD-FLD δείγματος γονάδας με κινητή φάση Α τριφθοροξικό οξύ 0,2% και κινητή φάση Β ακετονιτρίλιο - 2- αιθόξυ αιθανόλη - 2- μεθόξυ-αιθανόλη – τριφθοροξικό οξύ σε αναλογίες 94,8% - 3% -2% - 0,2%.

### 5.3 Μελέτη της θερμοκρασίας ανάλυσης

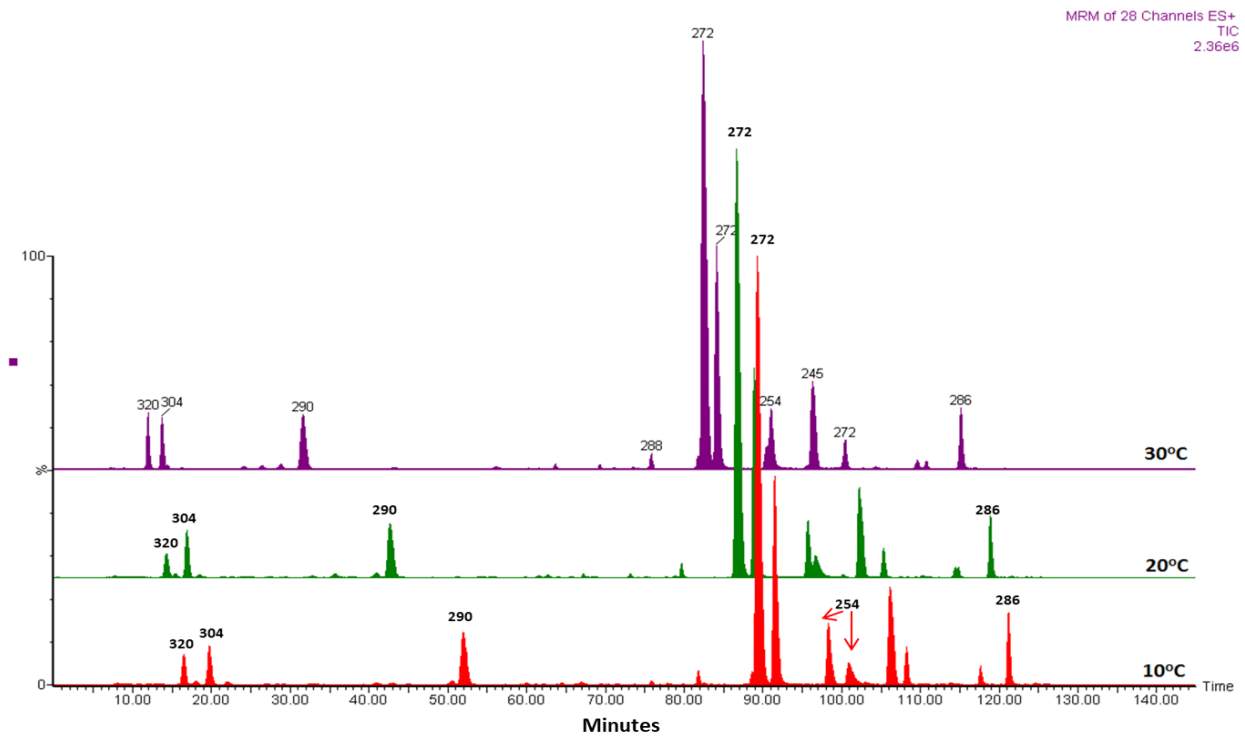
Η μελέτη της θερμοκρασίας πραγματοποιήθηκε στις θερμοκρασίες των 10°C, 20°C και 30°C με τις συνθήκες όπως αναγράφονται στους πίνακες 3,4 και 5. Να σημειωθεί ότι η θερμοκρασία των 10°C επιτεύχθηκε με peltier cooling στο θερμοστατούμενο φούρνο. Για τη μελέτη χρησιμοποιήθηκε δείγμα γονάδας επειδή περιέχει μεγαλύτερες ποσότητες της τετραδοτοξίνης και των αναλόγων της.

Στα σχήματα 15 και 16 παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα σε θερμοκρασίες 10, 20 και 30 °C με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας με ανίχνευση με φθορισμό (HPLC-PCD-FLD) και με τη μέθοδο υγρής χρωματογραφίας με φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS) αντίστοιχα.

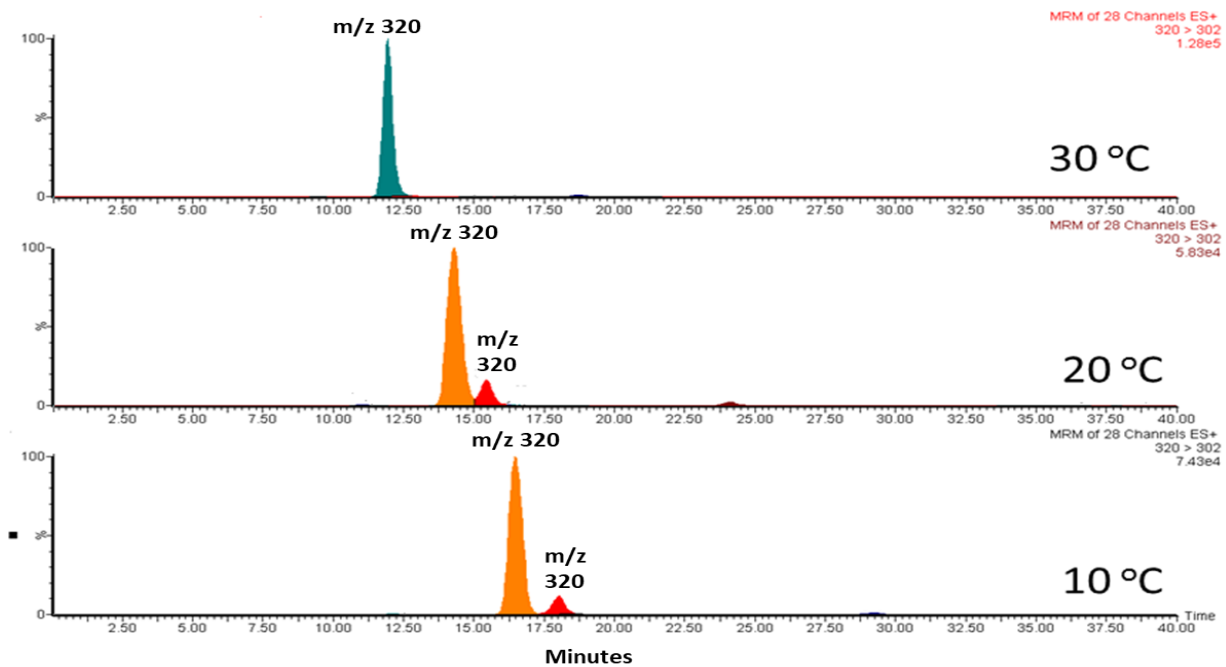
Στα σχήματα 17 και 18 παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα MRM της LC-MS/MS μεθόδου για τα ΤΤΧ ανάλογα με  $m/z$  320 στη μετάπτωση  $m/z$  320>302 και με  $m/z$  304 στη μετάπτωση  $m/z$  304>286.



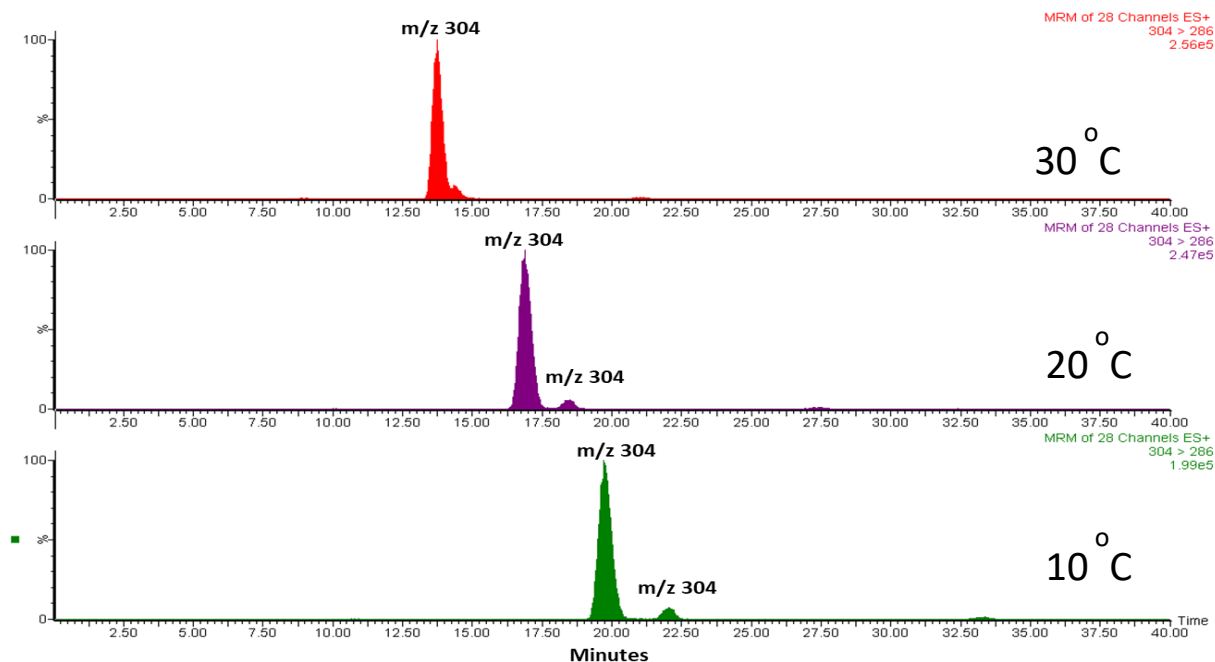
Σχήμα 15. Χρωματογραφήματα HPLC-PCD-FLD γονάδας στους: 10°C, 20°C και 30°C



Σχήμα 16. Χρωματογράφημα SRM/MRM με την LC-MS/MS μέθοδο για δείγμα γονάδας στους 10°C, 20°C και 30°C



Σχήμα 17. Χρωματογράφημα LC-MS/MS για δείγμα γονάδας στους 10°C, 20°C και 30°C στη μετάπτωση  $m/z$  320>302



Σχήμα 18. Χρωματογράφηματα LC-MS/MS για δείγμα γονάδας στους 10°C, 20°C και 30°C στο θραύσμα 304>286

Από τα χρωματογραφήματα του σχήματος 15 και του σχήματος 16 παρατηρείται ότι όσο πιο χαμηλή είναι η θερμοκρασία τόσο ο χρόνος έκλουσης των τοξινών αυξάνεται και η διαχωριστική ικανότητα της στήλης αυξάνει. Στη θερμοκρασία των 10°C παρατηρείται ο πλήρης διαχωρισμός των ΤΤΧ αναλόγων με  $m/z$  320 από τα ανάλογα ΤΤΧ με  $m/z$  304. Επίσης στους 10°C παρατηρείται η εμφάνιση μιας ακόμη τοξίνης με μοριακό ιόν 254, στους 20°C παρατηρείται ότι υπάρχει διαχωρισμός της ΤΤΧ από τις υπόλοιπες, αλλά οι  $m/z$  254 δεν διαχωρίζεται σωστά και στους 30°C δεν υπάρχει καθόλου διαχωρισμός της ΤΤΧ.

Ο πλήρης διαχωρισμός των ΤΤΧ αναλόγων με  $m/z$  320 από τα ανάλογα ΤΤΧ με  $m/z$  304, επιβεβαιώνεται και από χρωματογραφήματα LC-MS/MS των σχημάτων 17 και 18 αντίστοιχα, καθώς στους 10°C ο διαχωρισμός των κορυφών είναι πλήρης και στη βασική γραμμή (baseline), σε σχέση με τους 20°C και τους 30°C.

Για τους παραπάνω λόγους ως θερμοκρασία ανάλυσης της μεθόδου επιλέχτηκε η θερμοκρασία των 10°C, διότι σε σύγκριση με τις θερμοκρασίες των 20°C και 30°C παρέχει καλύτερους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς της ΤΤΧ και των αναλόγων.

## 5.4 Γραμμικότητα

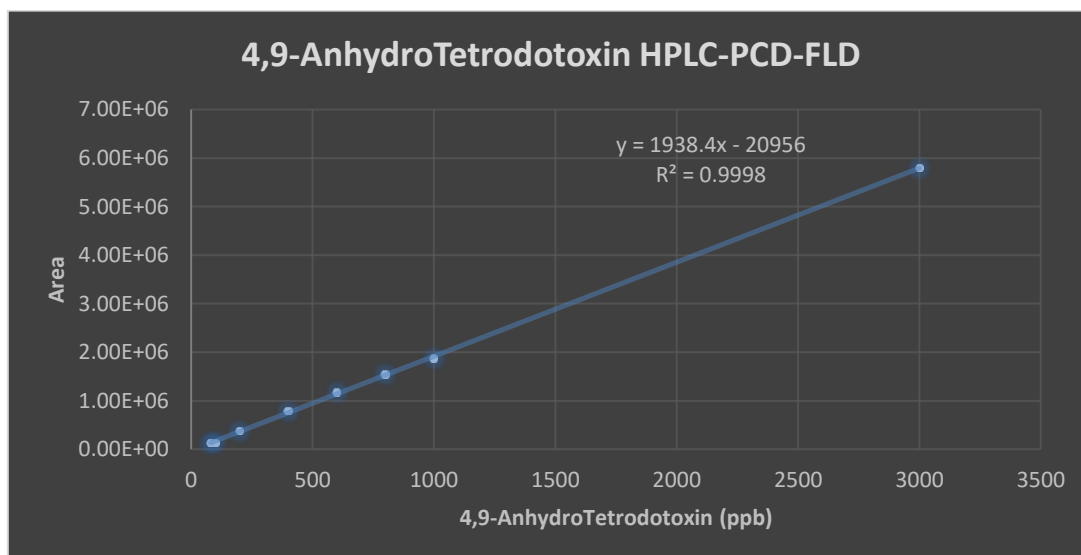
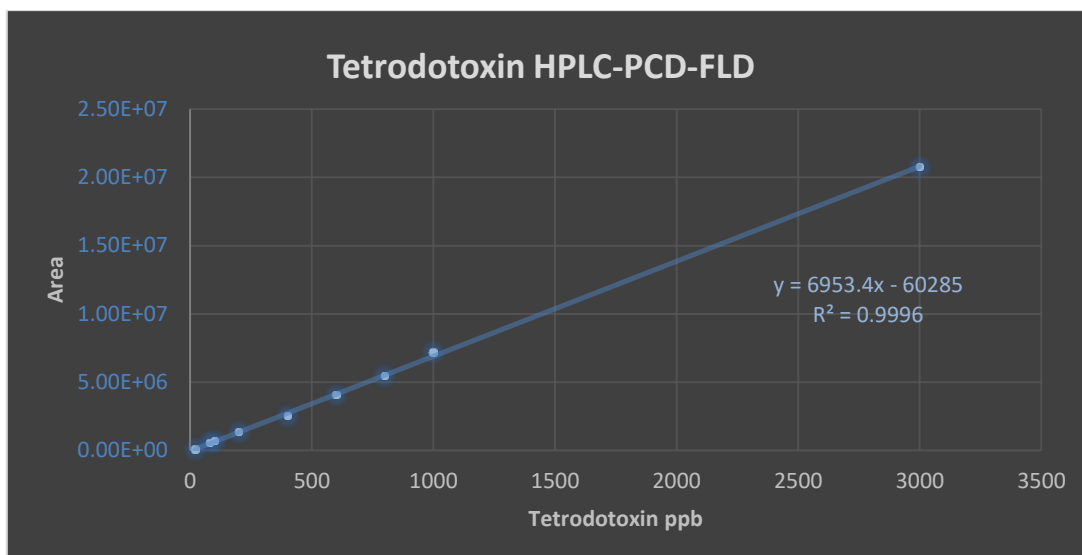
Για την κατασκευή της γραμμής αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα της τετραδοτοξίνης (ΤΤΧ) με εύρος συγκεντρώσεων από 20 έως 3000 µg/L (ppb) και της 4,9-anhydroΤΤΧ σε εύρος συγκεντρώσεων από 80 έως 3000 µg/L (ppb). Πραγματοποιήθηκαν τρεις (3) επαναλήψεις σε κάθε πρότυπο ουσίας και λήφθηκε ο μέσος όρος των 3 μετρήσεων. Τα δεδομένα για το εμβαδόν κορυφής της ΤΤΧ και της 4,9-anhydroΤΤΧ με βάση τη συγκέντρωση και οι χρόνοι κατακράτησης, για τη μέθοδο HPLC-PCD-FLD παρουσιάζονται στον Πίνακα 8 και για τη μέθοδο LC-MS/MS στις μεταπτώσεις m/z 320>302 και 320>162 και 302>162, παρουσιάζονται στον Πίνακα 9. Στα σχήματα 19 και 20, παρουσιάζονται οι γραμμές αναφοράς των δύο ουσιών για τις μεθόδους και στους πίνακες 10 και 11 παρουσιάζονται οι εξισώσεις παλινδρόμησης και οι συντελεστές συσχέτισης (Correlation Coefficient,  $R^2$ ) που υπολογίστηκαν από τη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων των γραμμών αναφοράς.

Πίνακας 8. Εμβαδόν κορυφής και χρόνος κατακράτησης των πρότυπων ουσιών της ΤΤΧ και της 4,9-anhydroΤΤΧ για την HPLC-PCD-FLD μέθοδο.

Concentration (ppb)	ΤΤΧ		4,9-anhydroΤΤΧ	
	Retention Time (min)	Peak Area	Retention Time (min)	Peak Area
20	18.64	69166	-	-
80	18.85	541893	44.71	131585
100	18.69	688757	44.65	135687
200	18.61	1350582	44.68	371679
400	18.63	2512860	44.69	784630
600	18.57	4051047	44.62	1174381
800	18.67	5421448	44.68	1544652
1000	18.63	7166844	44.70	1873777
3000	18.65	20765810	44.71	5795384

Πίνακας 9. Εμβαδόν κορυφής και χρόνος κατακράτησης των πρότυπων ουσιών της TTX και της 4,9-anhydroTTX για την LC-MS/MS μέθοδο.

Concentration (ppb)	TTX			4,9-anhydroTTX	
	Retention Time (min)	Area MRM (320>302)	Area MRM (320>162)	Retention Time (min)	Area MRM (302>162)
20	16.41	1171.69	171.71	-	-
80	16.66	4011.7	1266.57	42.45	2911.7
100	16.52	4989.8	1708.73	42.43	3697.6
200	16.41	8848.42	3001.81	42.41	7502.1
400	16.47	14450	5147.93	42.50	13599.3
600	16.48	19591.22	6784.06	42.49	19409.3
800	16.52	24080.98	8052.27	42.48	25210.8
1000	16.49	28619	9843.61	42.46	31952.1
3000	16.51	85956.3	32043.55	42.45	82952.6

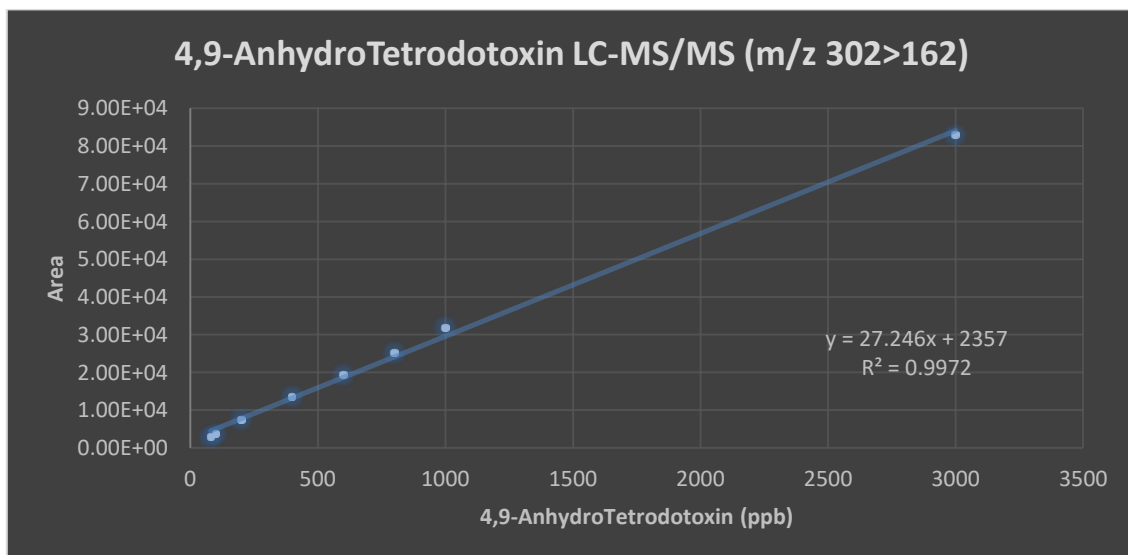
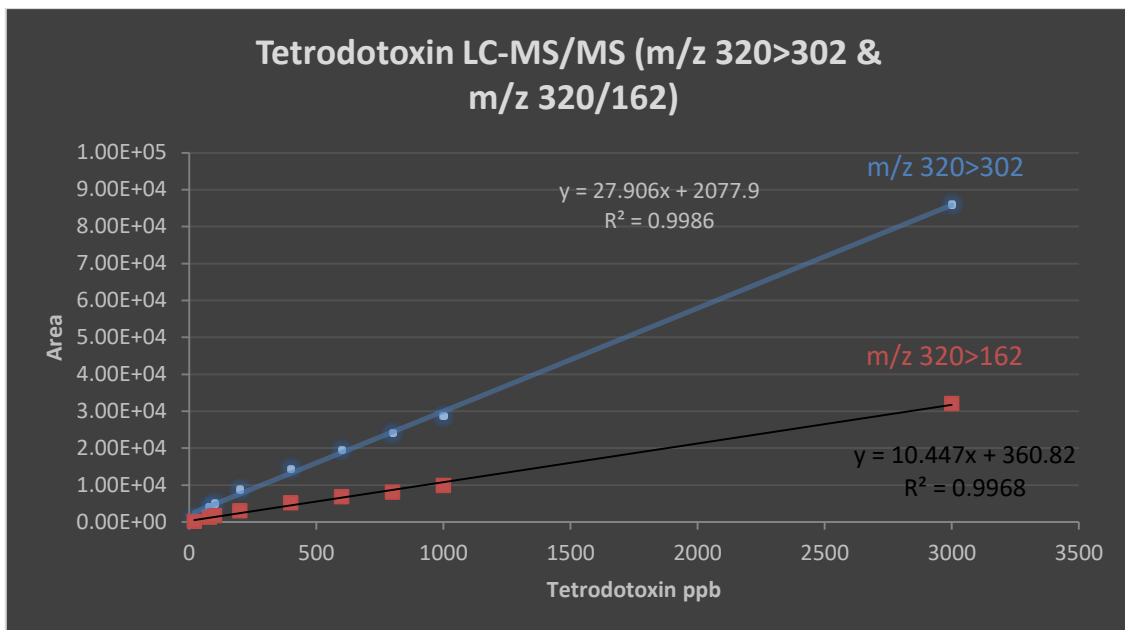


Σχήμα 19. Γραμμές αναφοράς για τη TTX και την 4,9-anhydroTTX με την HPLC-PCD-FLD μέθοδο.

Πίνακας 10. Εξισώσεις γραμμών αναφοράς για την TTX και την 4,9-anhydroTTX για τη μέθοδο HPLC-PCD-FLD.

Τοξίνες	Εξίσωση	R <sup>2</sup>
TTX	$y = 6953.4x - 60285$	0.9996
4,9-anhydroTTX	$y = 1938.4x - 20956$	0.9998





Σχήμα 20. Γραμμές αναφοράς για τη TTX και την 4,9-anhydroTTX με την LC-MS/MS μέθοδο.

Πίνακας 11. Εξισώσεις γραμμών αναφοράς για την TTX και την 4,9-anhydroTTX για τη μέθοδο LC-MS/MS.

Τοξίνες	Εξίσωση	R <sup>2</sup>
TTX (m/z 320>302)	$y = 27.906x + 2077.9$	0.9986
TTX (m/z 320>162)	$y = 10.447x + 360.82$	0.9968
4,9-anhydroTTX (m/z 302>162)	$y = 27.246x + 2357$	0.9972

## 5.5 Επαναληψιμότητα - Repeatability (%RSD)

Ο όρος σχετική τυπική απόκλιση ή επαναληψιμότητα (Relative Standard Deviation, %RSD) αναφέρεται στο πόσο προσεγγίζουν μεταξύ τους οι τιμές από μια σειρά μετρήσεων που έγιναν με τον ίδιο ακριβώς τρόπο σε μια συγκεκριμένη ποσότητα (Αναγνώστου Ν., 2016).

Ο υπολογισμός της επαναληψιμότητας πραγματοποιήθηκε σε δείγμα γονάδας για τη μέθοδο HPLC-PCD-FLD και για τη μέθοδο LC-MS/MS. Η επαναληψιμότητα υπολογίστηκε για πέντε διαδοχικές εγχύσεις του δείγματος, στις ίδιες συνθήκες ανάλυσης. Το %RSD για το χρόνο έκλουσης (Retention Time, RT) και το εμβαδόν κορυφής, υπολογίστηκε για τις τοξίνες: τετραδοτοξίνη (TTX), 11-deoxyTTX, 11-norTTX-6(R)-ol, 5,6,11-trideoxyTTX και για τη τοξίνη με m/z 286, (η τελευταία σε χρονική σειρά κορυφή που αναλύεται στο φασματογράφο μάζας). Στον Πίνακα 12 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τη μέθοδο HPLC-PCD-FLD και στον Πίνακα 13 για τη μέθοδο LC-MS/MS. Στα σχήματα 21 και 22 παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα για τις δυο μεθόδους αντίστοιχα.

Για τον υπολογισμό του %RSD αρχικά απαιτείται να υπολογιστεί ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση είτε του χρόνου έκλουσης, είτε του εμβαδού κορυφής.

Ο τύπος υπολογισμού του %RSD είναι ο εξής:

$$\%RSD = \frac{100}{\bar{x}} SD$$

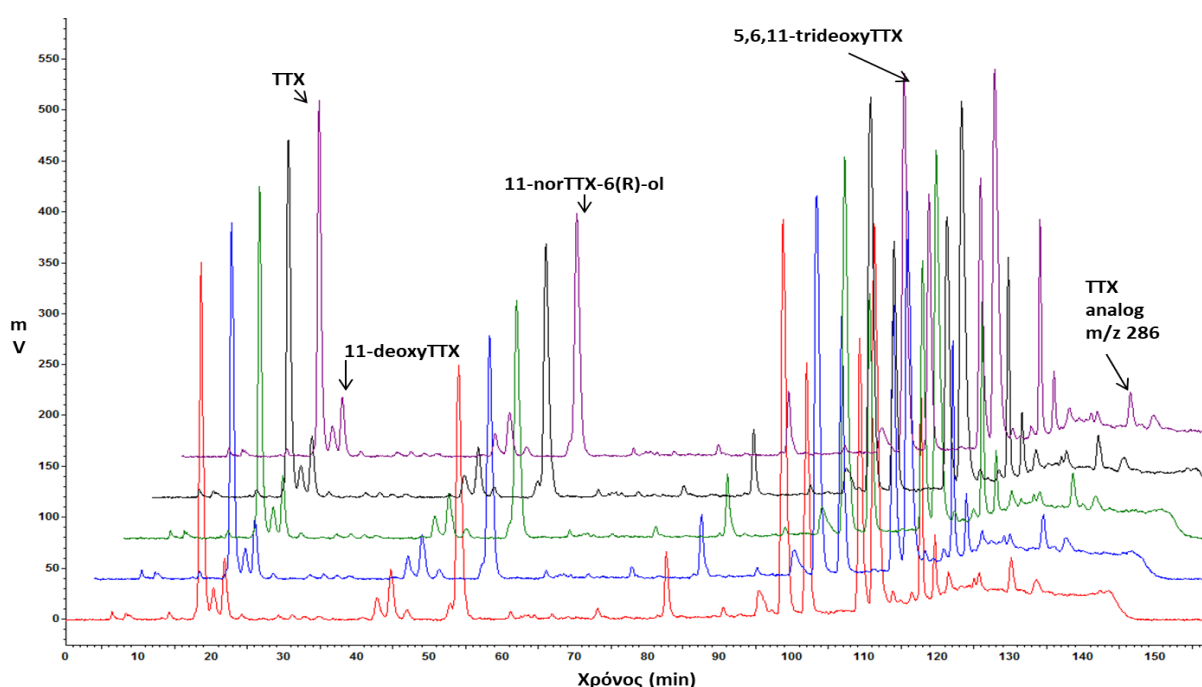
Όπου  $\bar{x}$ , είναι ο μέσος όρος και SD, είναι η τυπική απόκλιση (Αναγνώστου Ν., 2016).

Για να είναι αποδεκτό το %RSD των χρόνων και των εμβαδών από τις επαναλήψεις, δεν πρέπει να ξεπερνά το 2.0% (Αναγνώστου Ν., 2016). Από τα αποτελέσματα του υπολογισμού της επαναληψιμότητας, που αναγράφονται στους παρακάτω πίνακες, παρατηρείται ότι οι τιμές δεν υπερβαίνουν το 2% και για τις δύο παραμέτρους και στις δύο μεθόδους. Οι χρόνοι έκλουσης είναι σταθεροί και οι τιμές της σχετικής τυπικής απόκλισης κυμαίνονται από 0,12% έως 0,58% και για τα εμβαδά οι τιμές κυμαίνονται από 0,35% έως 1,45% και στις δύο μεθόδους.

**Από το %RSD αποδεικνύεται ότι η μέθοδος για την ανάλυση της τετραδοτοξίνης (TTX) και των αναλόγων της με ταυτόχρονη χρήση των τεχνικών HPLC-PCD-FLD και LC-MS/MS είναι ακριβείς και επαναλήψιμη.**

Πίνακας 12. Χρόνος κατακράτησης (RT) και εμβαδόν κορυφής των τοξινών σε δείγμα γονάδας. Υπολογισμός της επαναληψιμότητας με 5 επαναλήψεις στο ίδιο δείγμα με τη μέθοδο HPLC-PCD-FLD.

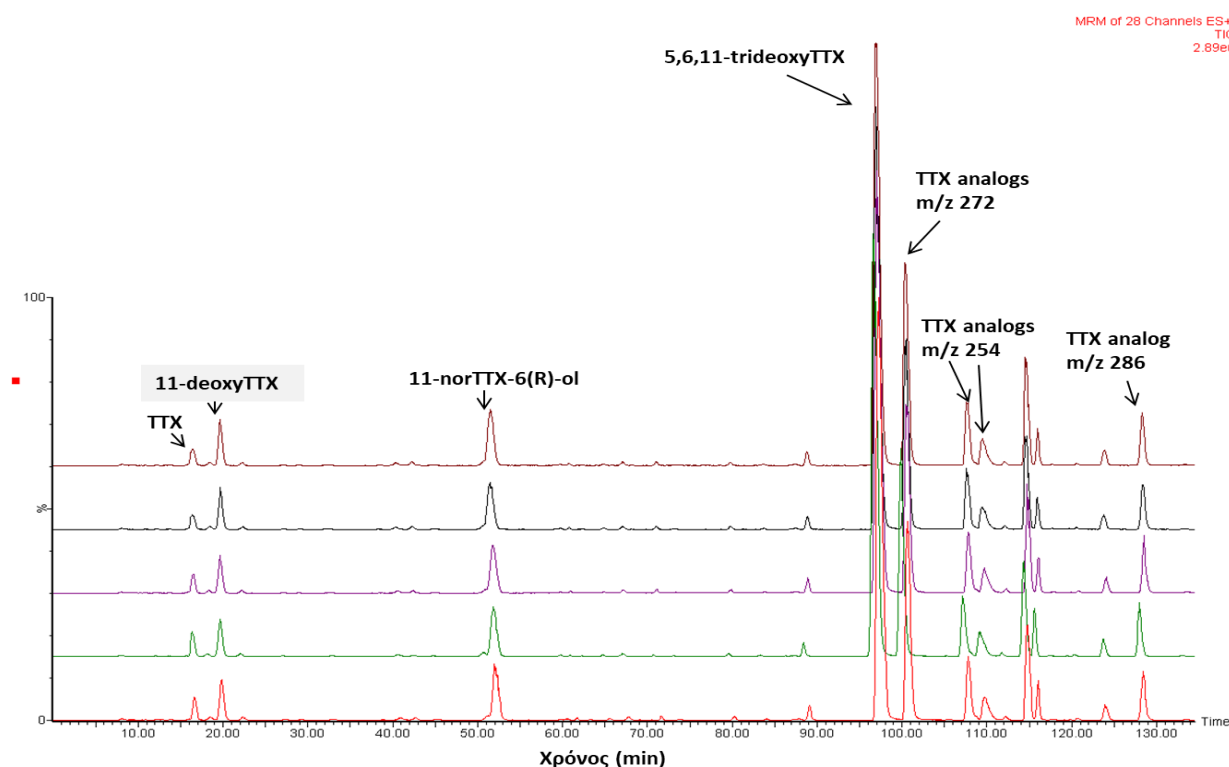
n=5	Tetrodotoxin		11-deoxyTTX		11-norTTX-6(R)-ol		5,6,11-trideoxyTTX		m/z 286	
	RT	Εμβαδόν	RT	Εμβαδόν	RT	Εμβαδόν	RT	Εμβαδόν	RT	Εμβαδόν
1	18.64	14021968	21.87	2452936	54.03	12962071	98.78	18614028	130.12	1317178
2	18.85	13970355	22.05	2461305	54.23	12752038	99.39	17886932	130.55	1278908
3	18.69	14098999	21.89	2487152	54.02	12852900	99.24	17938684	130.62	1302573
4	18.62	14031986	21.91	2442955	54	13038588	99.14	17994604	130.42	1298124
5	18.61	14099096	21.87	2408933	53.97	13054341	99.07	18095646	130.4	1311556
<b>Avg.</b>	18.68	14044481	21.92	2450656.2	54.05	12931987.6	99.12	18105979	130.42	1301668
<b>St. dev.</b>	0.09	49219.2	0.068	25497.7	0.092	114783	0.203	263284.7	0.172	13188.9
<b>%RSD</b>	0.47	0.35	0.31	1.04	0.17	0.89	0.20	1.45	0.13	1.01



Σχήμα 21. Μελέτη επαναληψιμότητας με χρωματογραφήματα δείγματος γονάδας με τη μέθοδο HPLC-PCD-FLD.

Πίνακας 13. Χρόνος κατακράτησης (RT) και εμβαδόν κορυφής των τοξινών σε δείγμα γονάδας. Υπολογισμός της επαναληψιμότητας με 5 επαναλήψεις στο ίδιο δείγμα, με τη μέθοδο LC-MS/MS.

(n=5)	Tetrodotoxin		11-deoxyTTX		11-norTTX-6(R)-ol		5,6,11-trideoxyTTX		286	
	RT	Εμβαδόν	RT	Εμβαδόν	RT	Εμβαδόν	RT	Εμβαδόν	RT	Εμβαδόν
1	16.41	58590	19.66	159807	51.88	305815	96.68	2559656	128	197470
2	16.67	57632	19.82	160145	52.04	306941	97.02	2536584	128.43	191102
3	16.51	57853	19.8	159654	51.78	308025	96.78	2527123	128.23	196002
4	16.41	59012	19.66	161755	51.46	309541	96.89	2505632	128.37	198507
5	16.46	59321	19.71	162056	51.51	313266	96.95	2567015	128.32	196824
<b>Avg.</b>	16.49	58481.6	19.73	160683.4	51.73	308717	96.86	2539202	128.27	195981
<b>St. dev.</b>	0.096	650.33	0.068	1014.9	0.220	2585.6	0.121	22233.4	0.15	2573.5
<b>%RSD</b>	0.58	1.1	0.35	0.63	0.43	0.84	0.13	0.88	0.12	1.31



Σχήμα 22. Μελέτη επαναληψιμότητας με χρωματογραφήματα δείγματος γονάδας με τη μέθοδο LC-MS/MS.

## 5.6 Κατώτερο όριο ανίχνευσης και κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης

Στις αναλυτικές μεθόδους χρησιμοποιούνται οι όροι κατώτερο όριο ανίχνευσης (limit of detection, LOD) και κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης (limit of quantification, LOQ). Το LOD είναι η μικρότερη συγκέντρωση (ή ποσότητα ουσίας) που μπορεί να ανιχνευθεί, ενώ το LOQ είναι η μικρότερη συγκέντρωση (ή ποσότητα ουσίας) που μπορεί να αναφερθεί ποσοτικά με ικανοποιητικό βαθμό εμπιστοσύνης (όρια εμπιστοσύνης 95%). Για τον υπολογισμό των LOD και LOQ απαιτείται η γνώση της εξίσωσης της καμπύλης αναφοράς, όπως και η τυπική απόκλιση πολλαπλών μετρήσεων και ειδικά του «χαμηλότερου προτύπου» (Αναγνώστου Ν., 2016).

Ο εξισώσεις υπολογισμού του LOD και του LOQ είναι ο εξής:

$$LOD=3.3 \frac{\sigma}{S} \text{ και } LOQ=10 \frac{\sigma}{S} \quad (1)$$

Όπου  $\sigma$  : είναι η τυπική απόκλιση και  $S$ : η κλίση της γραμμής αναφοράς (Αναγνώστου Ν., 2016).

Ο υπολογισμός του LOD και LOQ της TTX με την HPLC-PCD-FLD και με την LC-MS/MS μέθοδο (μεταπτώσεις με  $m/z$  320>302 και  $m/z$  320>162) πραγματοποιήθηκε με ανάλυση της διακύμανσης των δεδομένων του Πίνακα 8 και του Πίνακα 9 μέσω του προγράμματος excel. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης διακύμανσης παρουσιάζονται στον Πίνακα 14, στον Πίνακα 15 και στον Πίνακα 16 αντίστοιχα.

Πίνακας 14. Υπολογισμός LOD και LOQ με ανάλυση διακύμανσης της TTX για την HPLC-PCD-FLD τεχνική.

	βαθμοί ελευθερίας	SS	MS	F	Σημαντικότητα F
Παλινδρόμηση	1	3.35821E+14	3.35821E+14	17389.76401	3.80368E-13
Υπόλοιπο	7	1.3518E+11	19311403129		
Σύνολο	8	3.35956E+14			
	Συντελεστές	Τυπικό σφάλμα	t	τιμή-P	
Τεταγμένη στην αρχή	-60284.67562	<b>58865.72336</b>	-1.024104898	0.339867773	
Μεταβλητή X 1	<b>9525.180972</b>	72.23145972	131.8702544	3.80368E-13	
	Κατώτερο 95%	Υψηλότερο 95%	Κατώτερο 95,0%	Υψηλότερο 95,0%	
Τεταγμένη στην αρχή	-199479.9927	78910.64143	-199479.9927	78910.64143	
Μεταβλητή X 1	9354.380711	9695.981234	9354.380711	9695.981234	

Πίνακας 15. Υπολογισμός LOD και LOQ με ανάλυση διακύμανσης της TTX για την LC-MS/MS τεχνική στη μετάβαση με m/z 320 > 302.

	βαθμοί ελευθερίας	SS	MS	F	Σημαντικότητα F
Παλινδρόμηση	1	5408969083	5408969083	4910.425	3.16908E-11
Υπόλοιπο	7	7710694.553	1101527.793		
Σύνολο	8	5416679778			

	Συντελεστές	Τυπικό σφάλμα	t	τιμή-P
Τεταγμένη στην αρχή	2077.901629	<b>444.5834585</b>	4.673816781	0.002277
Μεταβλητή X 1	<b>103.3560307</b>	1.474946618	70.07442128	3.17E-11

	Κατώτερο 95%	Υψηλότερο 95%	Κατώτερο 95,0%	Υψηλότερο 95,0%
Τεταγμένη στην αρχή	1026.628801	3129.174	1026.6288	3129.174
Μεταβλητή X 1	99.86833613	106.8437	99.868336	106.8437

Πίνακας 16. Υπολογισμός LOD και LOQ με ανάλυση διακύμανσης της TTX για την LC-MS/MS τεχνική στη μετάβαση με m/z 320 >162.

	βαθμοί ελευθερίας	SS	MS	F	Σημαντικότητα F
Παλινδρόμηση	1	758086249	758086249	2171.417	5.48057E-10
Υπόλοιπο	7	2443844.189	349120.5984		
Σύνολο	8	760530093.1			

	Συντελεστές	Τυπικό σφάλμα	t	τιμή-P
Τεταγμένη στην αρχή	360.8156534	<b>250.2898897</b>	1.441591004	0.192617
Μεταβλητή X 1	<b>38.69348812</b>	0.830359788	46.59846092	5.48E-10

	Κατώτερο 95%	Υψηλότερο 95%	Κατώτερο 95,0%	Υψηλότερο 95,0%
Τεταγμένη στην αρχή	-231.025889	952.6572	-231.0259	952.6572
Μεταβλητή X 1	36.72999923	40.65698	36.729999	40.65698

Ο υπολογισμός του LOD και LOQ της 4,9-anhydroTTX με τις HPLC-PCD-FLD και LC-MS/MS μεθόδους (μετάπτωση με m/z 302>162) πραγματοποιήθηκε με ανάλυση της διακύμανσης των δεδομένων του Πίνακα 8 και του Πίνακα 9 μέσω του προγράμματος excel. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 17 και Πίνακα 18 αντίστοιχα.

Πίνακας 17. Υπολογισμός LOD και LOQ με ανάλυση διακύμανσης της 4,9-anhydroTTX για την HPLC-PCD-FLD τεχνική.

	<i>βαθμοί ελευθερίας</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Σημαντικότητα F</i>
Παλινδρόμηση	1	2.41888E+13	2.42E+13	6141.099	2.91E-10
Υπόλοιπο	6	23632999125	3.94E+09		
Σύνολο	7	2.42124E+13			
	<i>Συντελεστές</i>	<i>Τυπικό σφάλμα</i>		<i>t</i>	<i>τιμή-P</i>
Τεταγμένη στην αρχή	12151.30335	<b>29008.88714</b>		0.418882	0.689884
Μεταβλητή X 1	<b>1920.420367</b>	24.50604664		78.36516	2.91E-10
	<i>Κατώτερο 95%</i>	<i>Υψηλότερο 95%</i>	<i>Κατώτερο 95,0%</i>	<i>Υψηλότερο 95,0%</i>	
Τεταγμένη στην αρχή	-58830.9	83133.49	-58830.9	83133.49	
Μεταβλητή X 1	1860.456	1980.385	1860.456	1980.385	

Πίνακας 18. Υπολογισμός LOD και LOQ με ανάλυση διακύμανσης της 4,9-anhydroTTX για την LC-MS/MS τεχνική στη μετάβαση με m/z 302 >162.

	<i>βαθμοί ελευθερίας</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Σημαντικότητα F</i>
Παλινδρόμηση	1	4782403095	4.78E+09	2173.168	6.53E-09
Υπόλοιπο	6	13203959.52	2200660		
Σύνολο	7	4795607054			
	<i>Συντελεστές</i>	<i>Τυπικό σφάλμα</i>		<i>t</i>	<i>τιμή-P</i>
Τεταγμένη στην αρχή	2356.990736	<b>692.0477485</b>		3.405821	0.014392
Μεταβλητή X 1	<b>27.24588578</b>	0.584459348		46.61725	6.53E-09
	<i>Κατώτερο 95%</i>	<i>Υψηλότερο 95%</i>	<i>Κατώτερο 95,0%</i>	<i>Υψηλότερο 95,0%</i>	
Τεταγμένη στην αρχή	663.6109	4050.371	663.6109	4050.371	
Μεταβλητή X 1	25.81577	28.67601	25.81577	28.67601	

Το LOD και το LOQ των HPLC-PCD-FLD και LC-MS/MS μεθόδων, για την **TTX** υπολογίστηκε εφαρμόζοντας τις bold τιμές των πινάκων 14, 15 και 16 αντίστοιχα, στις εξισώσεις (1) και για την **4,9-anhydroTTX** υπολογίστηκε εφαρμόζοντας τις bold τιμές των πινάκων 17 και 18 αντίστοιχα, στις εξισώσεις (1). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 19.

Πίνακας 19. LOD και LOQ της TTX και της 4,9-anhydroTTX των μεθόδων HPLC-PCD-FLD και LC-MS/MS.

Μέθοδος		TTX		4,9-anhydroTTX	
		LOD (μg/L)	LOQ (μg/L)	LOD (μg/L)	LOQ (μg/L)
HPLC-PCD-FLD		20,39	61,8	49,85	151,05
LC-MS/MS	m/z 320>302	14,20	43,02	-	-
	m/z 320>162	21,35	64,69	-	-
	m/z 302>162	-	-	83,82	254

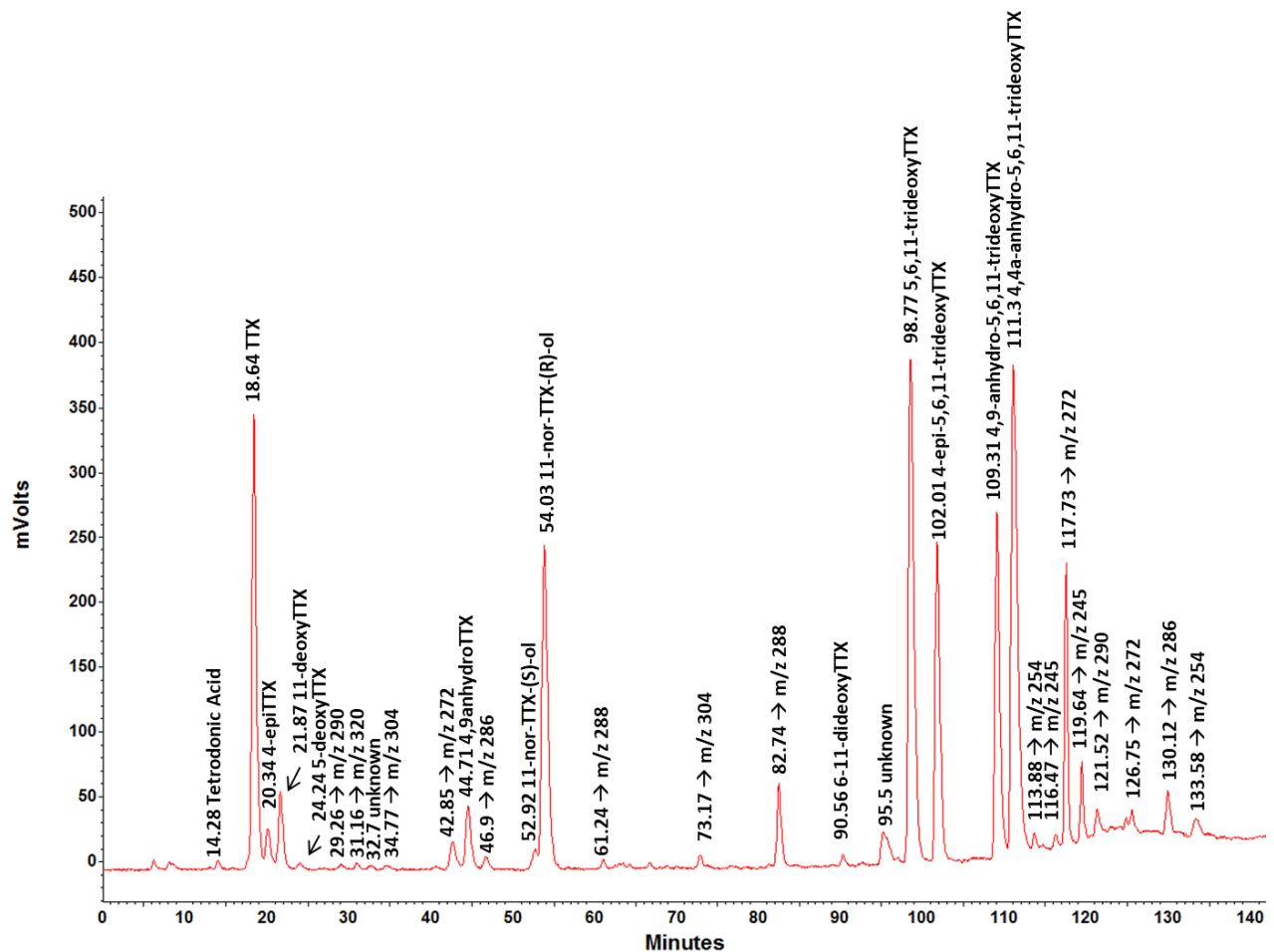
Σύμφωνα με τη Rodriguez και τους συνεργάτες της (2012), το LOD της μεθόδου ανάλυσης του *L. sceleratus* για την TTX ήταν 16 ng/ml και το LOQ 63 ng TTX/ml. Ο Chen και οι συνεργάτες του (2011), έχουν αναφέρει μια μέθοδο LC-MS που έδωσε διαχωρισμό των αναλόγων της TTX σε pufferfish, με LOD 0,1 ng.ml<sup>-1</sup> και LOQ 0,25 ng.ml<sup>-1</sup> και για τη TTX και για την 4,9-anhydroTTX. Το κατώτερο όριο ανίχνευσης (LOD) και το κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης (LOQ), που αποκτήθηκε από τα διαλύματα των προτύπων ήταν: TTX = 0,6 και 2,2 ng/ml και 4,9-anhydroTTX= 1,9 και 6,5 ng/ml, αντίστοιχα (Vlamiš et al., 2015). Από τα υπολογισμένα LOD και LOQ για τις δύο μεθόδους παρατηρείται ότι για την TTX τα αποτελέσματα είναι αποδεκτά, ενώ για την 4,9-anhydroTTX τα αποτελέσματα είναι ελαφρά υψηλότερα σε σχέση με άλλες μελέτες.



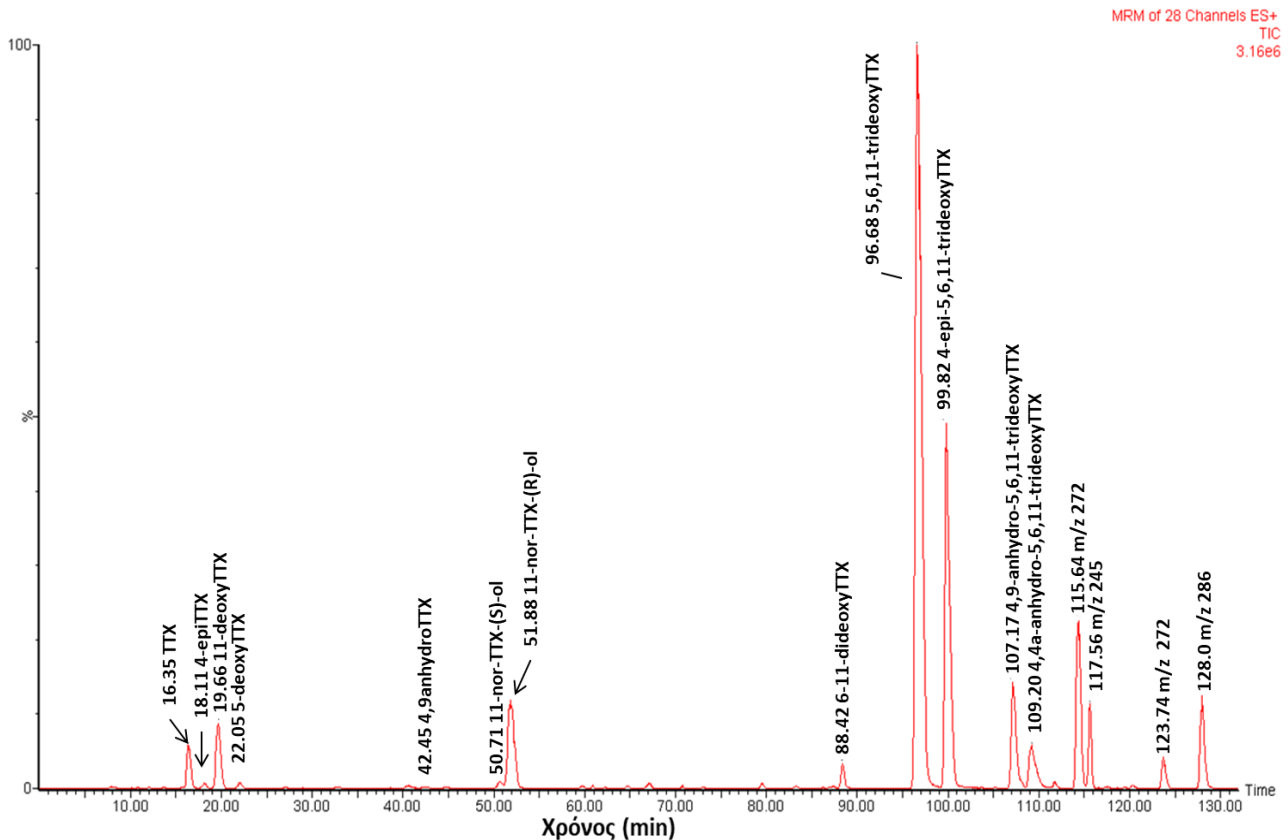
## 5.7 Ποιοτικός προσδιορισμός της ΤΤΧ και των αναλόγων της

Ο ποιοτικός προσδιορισμός της τετραδοτοξίνης (ΤΤΧ) και των αναλόγων της πραγματοποιήθηκε σε δείγμα από τον ιστό της γονάδας του *Lagocerphalus scleratus*. Η ταυτοποίηση των τοξινών του δείγματος πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου LC-MS/MS και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αντιστοίχιση των κορυφών και στη μέθοδο HPLC-PCD-FLD.

Στα σχήματα 23 και 24 παρουσιάζονται τα χρωματογράφημα του δείγματος της γονάδας με τις μεθόδους HPLC-PCD-FLD και LC-MS/MS αντίστοιχα.



Σχήμα 23. Χρωματογράφημα HPLC-PCD-FLD δείγματος γονάδας με αναγραφή της ΤΤΧ και των αναλόγων της που ανιχνεύτηκαν.

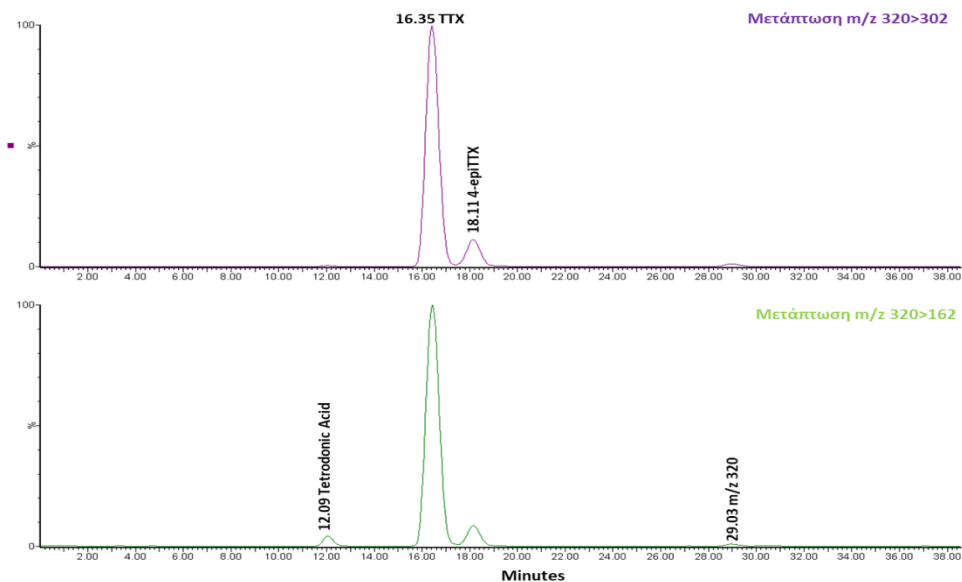


Σχήμα 24. Χρωματογράφημα MRM δείγματος γονάδας με τη μέθοδο LC-MS/MS, με αναγραφή της TTX και των αναλόγων της που ανιχνεύτηκαν.

Από τα χρωματογραφήματα των σχημάτων 23 και 24 παρατηρείται ότι οι χρόνοι έκλουσης των τοξινών από τις δύο τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση διαφέρουν ελαφρά μεταξύ τους και αυτό οφείλεται στη διαφορετική διαδρομή που ακολουθούσαν οι διαχωρισθείσες τοξίνες μετά τη στήλη για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό με τις μεθόδους HPLC-PCD-FLD και LC-MS/MS. Στην τεχνική LC-MS/MS οι χρόνοι είναι μικρότεροι καθώς οι τοξίνες οδηγούνται απευθείας στο φασματογράφο μάζας για την ανίχνευσή τους, ενώ στη τεχνική HPLC-PCD-FLD οι χρόνοι είναι μεγαλύτεροι καθώς οι τοξίνες περνούσαν από το reaction coil (1500  $\mu$ L), στο σύστημα παραγωγής, για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση τους και στη συνέχεια ανιχνεύονταν στο φθορισμομετρικό ανιχνευτή. Η διαφορά στους χρόνους ήταν σταθερή και δεν επηρέασε την αντιστοίχιση των κορυφών στις δύο τεχνικές. Στο χρωματογράφημα του σχήματος 23 παρατηρήθηκαν επιπλέον άγνωστες κορυφές που δεν ανιχνεύονται στο φασματόμετρο μάζας (πιθανώς να μην ιονίζονται με συνθήκες +ESI) και ο χαρακτηρισμός τους δεν κατέστη δυνατός λόγω έλλειψης αντιστοιχών προτύπων ουσιών.

Παρακάτω ακολουθεί αναλυτική περιγραφή της αντιστοίχισης και του χαρακτηρισμού της TTX και των αναλόγων της, ανάλογα με το μοριακό τους ιόν και τις μεταπτώσεις που χρησιμοποιήθηκαν γι' αυτό.

- LC-MS/MS χρωματογράφημα με κορυφές m/z 320

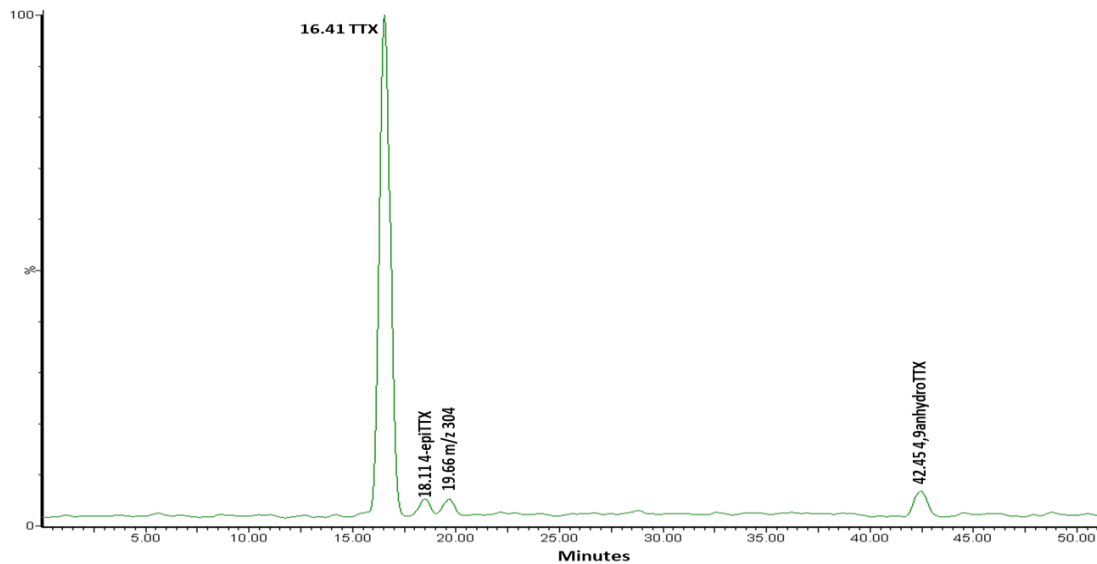


Σχήμα 25. Χρωματογράφημα MRM των μεταπτώσεων: m/z 320 > 302 / 162 (από πάνω προς τα κάτω αντίστοιχα) από δείγμα γονάδας με τη μέθοδο LC-MS/MS.

Σύμφωνα με τον Bane και τους συνεργάτες του (2014), το tetrodonic acid έχει m/z 320 και είναι ένα ανάλογο της TTX, το οποίο στα είδη pufferfish χρονικά εκλούεται πρώτο. Από το χρωματογράφημα του σχήματος 25 παρατηρείται ότι η κορυφή με m/z 320 στη μετάπτωση 320>162 στο χρόνο 12.04 min (Σχήμα 24- LC-MS/MS) και 14.27 min (Σχήμα 23-HPLC-PCD-FLD) είναι η πρώτη που εκλούεται οπότε μπορεί να χαρακτηρισθεί ως το tetrodonic acid. Η τετραδοτοξίνη (TTX) και η 4-epiTTX έχουν m/z 320 και εκλούνται αντίστοιχα σε σειρά, ενώ η 6-epiTTX υπάρχει αναλόγως με το είδος pufferfish, το τμήμα του ψαριού, το φύλο και την εποχή (Gorarana Puilingi C. et al., 2015). Από το χρωματογράφημα του σχήματος 25 παρατηρούνται δύο κορυφές m/z 320 σε χρόνους 16.35 και 18.11 min (Σχήμα 24) και 18.64 και 20.33 min (Σχήμα 23) αντίστοιχα, αυτές οι κορυφές αποδίδονται ως TTX και 4-epiTTX. Επίσης στο ίδιο χρωματογράφημα και στο χρόνο 29,03 min παρατηρείται μια ακόμα κορυφή με m/z 320 που αποδίδεται σε κάποιο άλλο ανάλογο της TTX με το ίδιο μοριακό βάρος ή την 6-epiTTX.

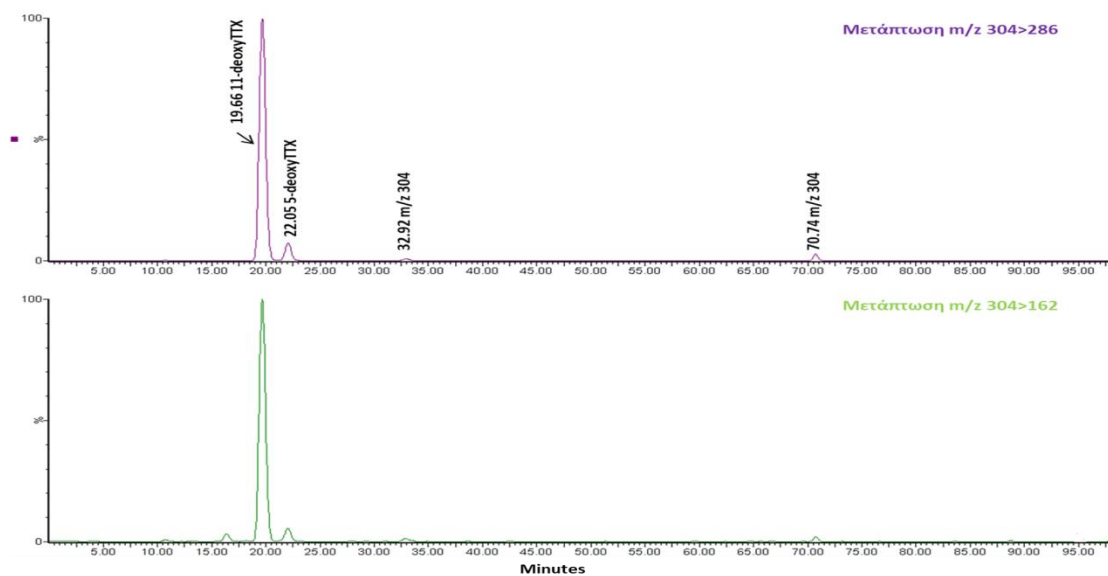
Η ταυτοποίηση της TTX επιβεβαιώνεται και από το χρωματογράφημα της πρότυπης ουσίας TTX. Στο Σχήμα 26 παρουσιάζεται το χρωματογράφημα της πρότυπης ουσίας TTX σε συγκέντρωση 1ppm.

Από το χρωματογράφημα προσδιορίζεται και η 4-ερίΤΤΧ στο χρόνο 18.11 min, ενώ παρατηρείται και  $m/z$  304 που αποδίδεται στα deoxyΤΤΧ ανάλογα και πιθανώς οφείλεται σε επιμόλυνση της πηγής του φασματόμετρου μάζας από προηγούμενη έγχυση (carry over).



Σχήμα 26. Χρωματογράφημα MRM πρότυπης ουσίας ΤΤΧ με τη μέθοδο LC-MS/MS.

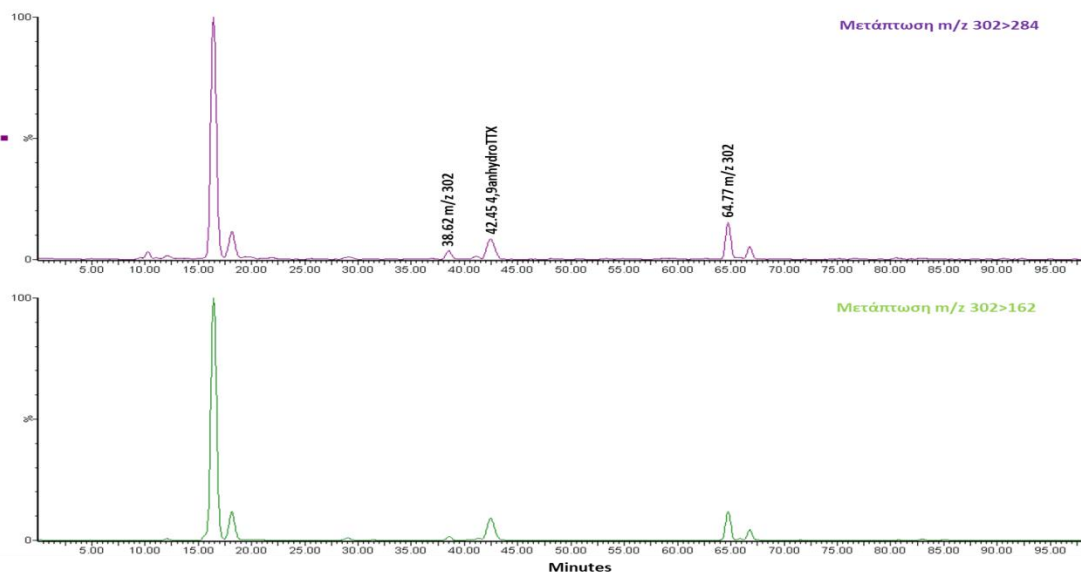
- LC-MS/MS χρωματογράφημα με κορυφές  $m/z$  304



Σχήμα 27. Χρωματογράφημα MRM των μεταπτώσεων:  $m/z$  304 > 286 / 162 (από πάνω προς τα κάτω αντίστοιχα) από δείγμα γονάδας με τη μέθοδο LC-MS/MS.

Σύμφωνα με τον Gogarava Puilingi και τους συνεργάτες του (2015), οι 5-deoxyTTX και 11-deoxyTTX με  $m/z$  304, εκλύονται με σειρά 11-deoxyTTX και 5-deoxyTTX αντίστοιχα. Από το χρωματογράφημα του σχήματος 27 παρατηρούνται δυο κορυφές με  $m/z$  304 σε χρόνο 19.71 και 22.0 min (Σχήμα 24-LC-MS/MS) και 21.87 και 24.24 min (Σχήμα 23-HPLC-PCD-FLD), αυτές μπορούν αποδοθούν ως 11-deoxyTTX και 5-deoxyTTX αντίστοιχα. Επίσης από το σχήμα 27 παρατηρούνται άλλες δύο μικρές κορυφές που δίνουν  $m/z$  304 και αποδίδονται σε άλλα ανάλογα της TTX με ίδιο μοριακό ιόν.

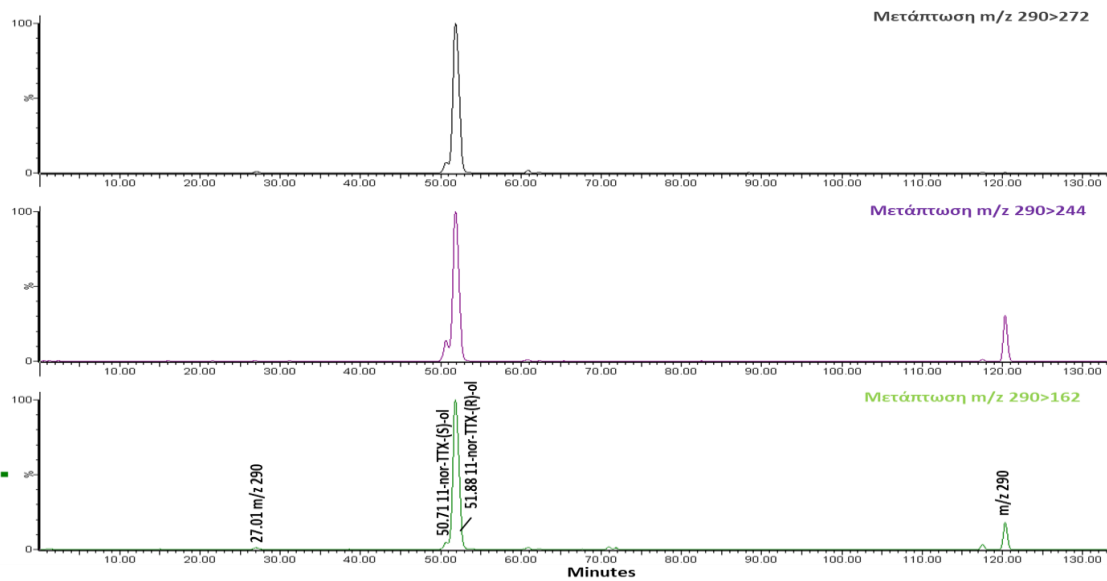
- LC-MS/MS χρωματογράφημα με κορυφές  $m/z$  302



Σχήμα 28. Χρωματογράφημα MRM των μεταπτώσεων:  $m/z$  302 > 284 /162 (από πάνω προς τα κάτω αντίστοιχα) από δείγμα γονάδας με τη μέθοδο LC-MS/MS.

Σύμφωνα με τον Bane και τους συνεργάτες του (2016), η 4,9-anhydroTTX και η AnhydroTTX με  $m/z$  302 είναι δυο από τα συνήθη TTX ανάλογα από τα rufferfish. Η 6-epi-4,9-anhydroTTX είναι η epi μορφή της 4,9-anhydroTTX με  $m/z$  302 που έχει ανιχνευτεί στη σαλαμάνδρα *Cynops pyrrhogaster* και μπορεί να υπάρχει και στα rufferfish. Από το χρωματογράφημα του σχήματος 28 παρατηρούνται 3 κορυφές με  $m/z$  302, στα 38.62, 42.45 και 64.77 min (Σχήμα 24-LC-MS/MS) και 40.80, 44.71 και 66.83 min (Σχήμα 23-HPLC-PCD-FLD). Από αυτές η κορυφή στα 42.45 min (Σχήμα 22) και 44.71 min (Σχήμα 21) αποδίδεται ως η 4,9-anhydroTTX. Η ταυτοποίηση της επιβεβαιώνεται και από το χρωματογράφημα της πρότυπης ουσίας του σχήματος 26 καθώς το πρότυπο της τοξίνης είναι καθαρότητας 98% και περιέχει και την 4,9-anhydroTTX που εκλύεται στα 42.45 min. Οι άλλες δύο κορυφές που δίνουν  $m/z$  302 αποδίδονται σε άλλα ανάλογα της TTX με ίδιο μοριακό ιόν.

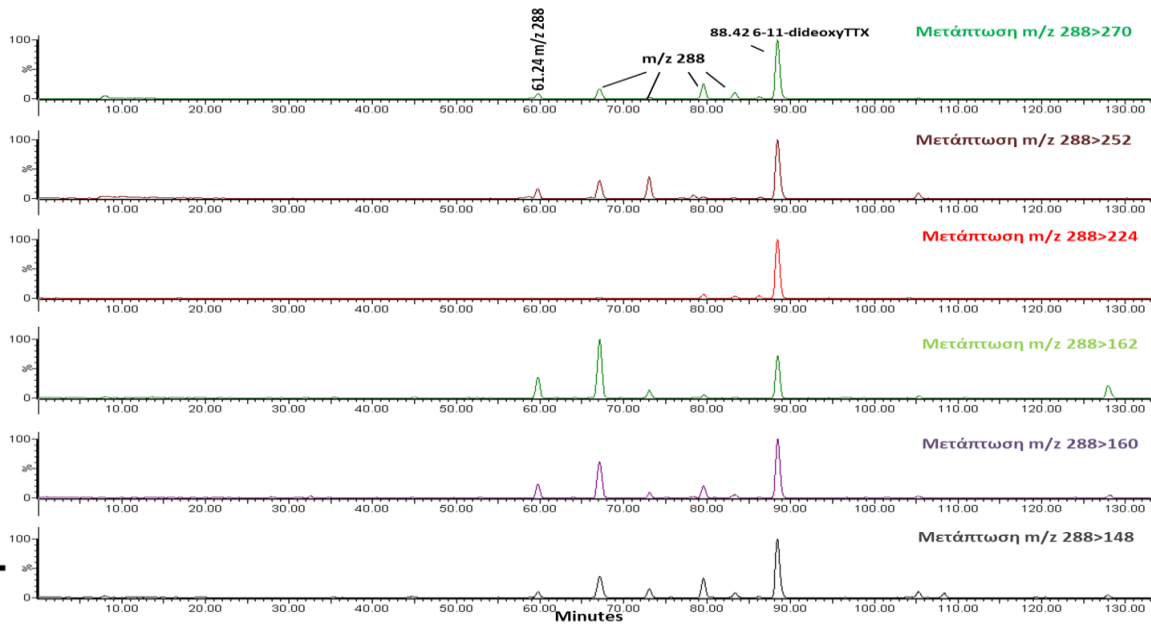
- LC-MS/MS χρωματογράφημα με κορυφές με  $m/z$  290



Σχήμα 29. Χρωματογράφημα MRM των μεταπτώσεων:  $m/z$  290 > 272 / 244 / 162 (από πάνω προς τα κάτω αντίστοιχα) από δείγμα γονάδας με τη μέθοδο LC-MS/MS.

Σύμφωνα με τον Bane και τους συνεργάτες του (2014), η 11-norTTX-6(S)-ol και η 11-norTTX-6(R)-ol είναι ανάλογα της TTX με  $m/z$  290 και έχουν αναφερθεί για την ύπαρξη τους σε αρκετές μελέτες στο *L. Sceleratus* και σε άλλα είδη pufferfish. Από το χρωματογράφημα του σχήματος 29, παρατηρούνται 4 κορυφές με  $m/z$  290. Η κορυφή σε χρόνο 50.71 min δεν έχει διαχωριστεί πλήρως από την κορυφή στα 51.83 min. Η 11-norTTX-6(S)-ol και η 11-norTTX-6(R)-ol εκκλύονται σε πολύ κοντινούς χρόνους και σε σειρά πρώτα η (S) και μετά η (R) (Rambla-Alegre et al., 2017, Rodriguez, et al., 2012, Bane et al., 2014). Έτσι οι κορυφές στο χρωματογράφημα με χρόνο 50.71 min (Σχήμα 24-LC/MS/MS) και 52.91 min (Σχήμα 23-HPLC-PCD-FLD) μπορεί να αποδοθούν ως 11-norTTX-6(S)-ol και η μεγαλύτερη κορυφή σε χρόνο 51.83 min (Σχήμα 24-LC/MS/MS) και 54.02 min (Σχήμα 23-HPLC-PCD-FLD) ως 11-norTTX-6(R)-ol. Τα ανάλογα της TTX είναι συνήθως παρόντα με 4-επί και 4,9-ανυδρο μορφές που είναι σε χημική ισορροπία με τη μορφή της TTX (Yotsu – Yamashita et al., 2013). Οπότε οι υπόλοιπες κορυφές που εμφανίζονται με  $m/z$  290 μπορεί να αποτελούν κάποια από τις 4-επί και 4,9-ανυδρο μορφές των 11-norTTX-6(S)-ol και η 11-norTTX-6(R)-ol.

- LC-MS/MS χρωματογράφημα με κορυφές με  $m/z$  288



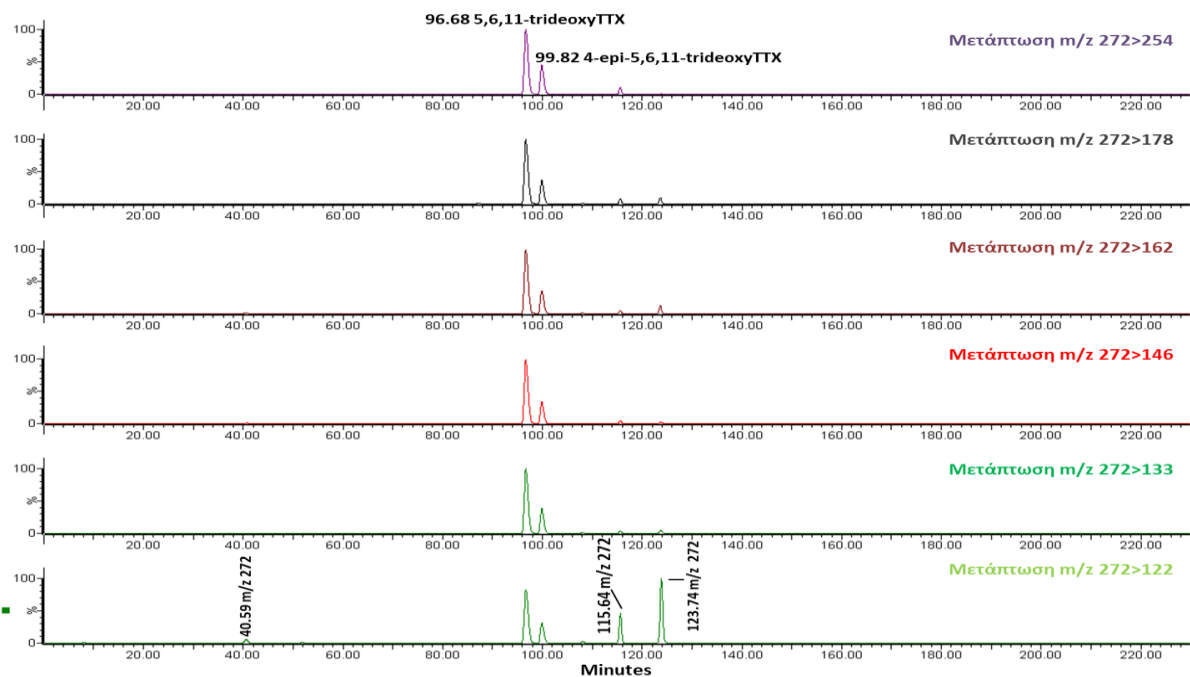
Σχήμα 30. Χρωματογράφημα MRM των μεταπτώσεων:  $m/z$  288 > 270 / 252 / 224 / 162 / 160 / 148 (από πάνω προς τα κάτω αντίστοιχα) από δείγμα γονάδας με τη μέθοδο LC-MS/MS.

Σύμφωνα με τη Yotsu – Yamashita και τους συνεργάτες της (2013), οι κορυφές του 5,11-dideoxyTTX και 6,11-dideoxyTTX με μοριακό ιόν 288 εκλύονται χωριστά στα 6,5 min και 8,9 min αντίστοιχα, στα φάσματα ιόντων θραύσματος των δύο αναλόγων dideoxyTTX παρατηρήθηκαν αφυδατωμένα ιόντα που έχασαν ένα και δύο νερά σε  $m/z$  270.1071 και 252.0946 για την 5,11-dideoxyTTX και ένα νερό σε  $m/z$  270.1101 για την 6,11-dideoxyTTX. Άλλα ιόντα μεγάλου θραύσματος για την 5,11-dideoxyTTX ανιχνεύθηκαν σε  $m/z$  133.0736 (α), 148.0840 (b), 160.0837 (c), 162.0674 (d), 176.0832 (e), και 206.0938 (g), ενώ για την 6,11-dideoxyTTX ανιχνεύθηκαν σε  $m/z$  148.0858 (b), 160.0858 (c), 176.0796 (e) και 224.1029 (h). Τα θραύσματα ιόντων (α), (d), (f) και (g) ήταν ειδικά για την 5,11-dideoxyTTX και (h) ήταν ειδικά για 6,11-dideoxyTTX, ενώ (b) και (e) παρουσιάστηκαν κοινά και για τα δύο ανάλογα της dideoxyTTX.

Από το χρωματογράφημα του σχήματος 30 για το μοριακό ιόν  $m/z$  288 και με βάση τις έξι (6) μεταπτώσεις που χρησιμοποιήθηκαν προκύπτουν 6 κορυφές με μοριακό ιόν  $m/z$  288. Λόγω του ότι η 6,11-dideoxyTTX εκλύεται δεύτερη και χαρακτηρίζεται από το θραύσμα ιόντος  $m/z$  224 από ότι η 5,11-dideoxyTTX. Μέσω του σχήματος 30 πραγματοποιείται η ταυτοποίηση της με την κορυφή  $m/z$  288 στο χρόνο 88.42 min (Σχήμα 24-LC-MS/MS) και την κορυφή στο χρόνο 90.55 min (Σχήμα 23-HPLC-PCD-FLD). Η 5,11-dideoxyTTX και οι υπόλοιπες κορυφές δεν είναι δυνατό να ταυτοποιηθούν

με ακρίβεια. Πιθανότατα, οι μικρότερες κορυφές είναι εκείνες των 4-ερί τύπων των 5,11-dideoxyTTX και 6,11-dideoxyTTX, αντιστοίχως, εφόσον τα ανάλογα TTX είναι συνήθως παρόντα με 4-ερί και 4,9-ανυδρο μορφές που είναι σε χημική ισορροπία με τη μορφή της TTX (Yotsu – Yamashita et al., 2013). Μια από τις κορυφές είναι πιθανό να αποτελεί και η 1-hydroxy-8-ερί-5,6,11-trideoxy TTX (Bane V. et al., 2014).

- LC-MS/MS χρωματογράφημα με κορυφές με m/z 272



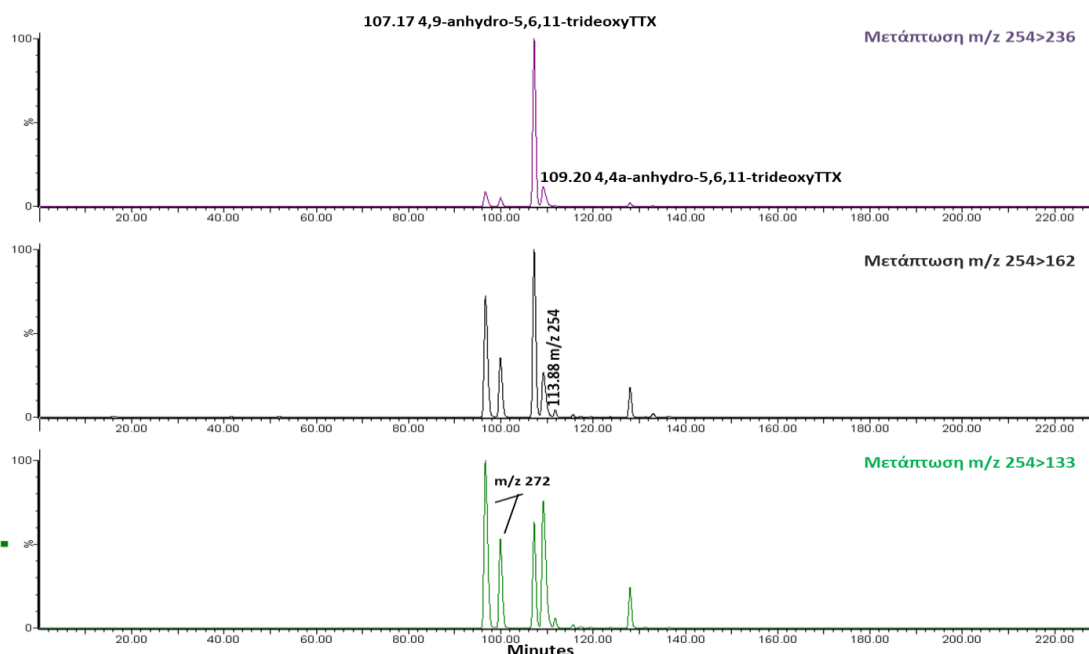
Σχήμα 31. Χρωματογράφημα MRM των μεταπτώσεων: m/z 272 > 254 / 178 / 162 / 146 / 133 / 122 (από πάνω προς τα κάτω αντίστοιχα) από δείγμα γονάδας με τη μέθοδο LC-MS/MS.

Σύμφωνα με τη Rodriguez και τους συνεργάτες της (2012), η 5,6,11-trideoxyTTX με m/z 272, βρέθηκε ότι είναι το κύριο και μεγαλύτερο ανάλογο TTX στον *L. Sceleratus*. Σε πολλές έρευνες έχει ανιχνευτεί και η 4-ερί μορφή της που είναι η 4-ερί-5,6,11-trideoxyTTX με m/z 272 (Bane V. et al., 2016). Η 5,6,11-trideoxyTTX έχει χαρακτηριστικά θραύσματα στα m/z 178 και 146, ενώ έχει ένα κοινό θραύσμα στο m/z 162 με τα υπόλοιπα ανάλογα της TTX (Bane V. et al., 2014). Από το χρωματογράφημα του σχήματος 31 παρατηρούνται πέντε (5) κορυφές με m/z 272, εκ των οποίων οι κορυφές στους χρόνους 96.68 και 99.88 min (Σχήμα 24 και 31-LC-MS/MS) και 98.77 και 102.01 min (Σχήμα 23-HPLC-PCD-FLD) μπορούν να χαρακτηρισθούν ως 5,6,11-trideoxyTTX και 4-ερί-5,6,11-



trideoxyTTX αντίστοιχα. Η 5,6,11-trideoxyTTX επιβεβαιώνεται και από το έντονο σήμα που παρουσιάζει στις μεταπτώσεις  $m/z$  272>178/146 στο σχήμα 31, που είναι χαρακτηριστικές για αυτή, αλλά και το ότι παρουσιάζει έντονο σήμα σε όλες τις μεταβάσεις που είναι χαρακτηριστικά θραύσματα του μορίου της (Bane V. et al., 2016). Η 4-*epi*-5,6,11-trideoxyTTX αποδίδεται ως η κορυφή στο χρόνο 99.88 min έχοντας μεγαλύτερο χρόνο κατακράτησης από την 5,6,11-trideoxyTTX. Οι κορυφές στους χρόνους 40.64, 115.64 και 123.84 min αποδίδονται σε άλλα ανάλογα της TTX με ίδιο μοριακό ιόν.

- LC-MS/MS χρωματογράφημα με κορυφές με  $m/z$  254

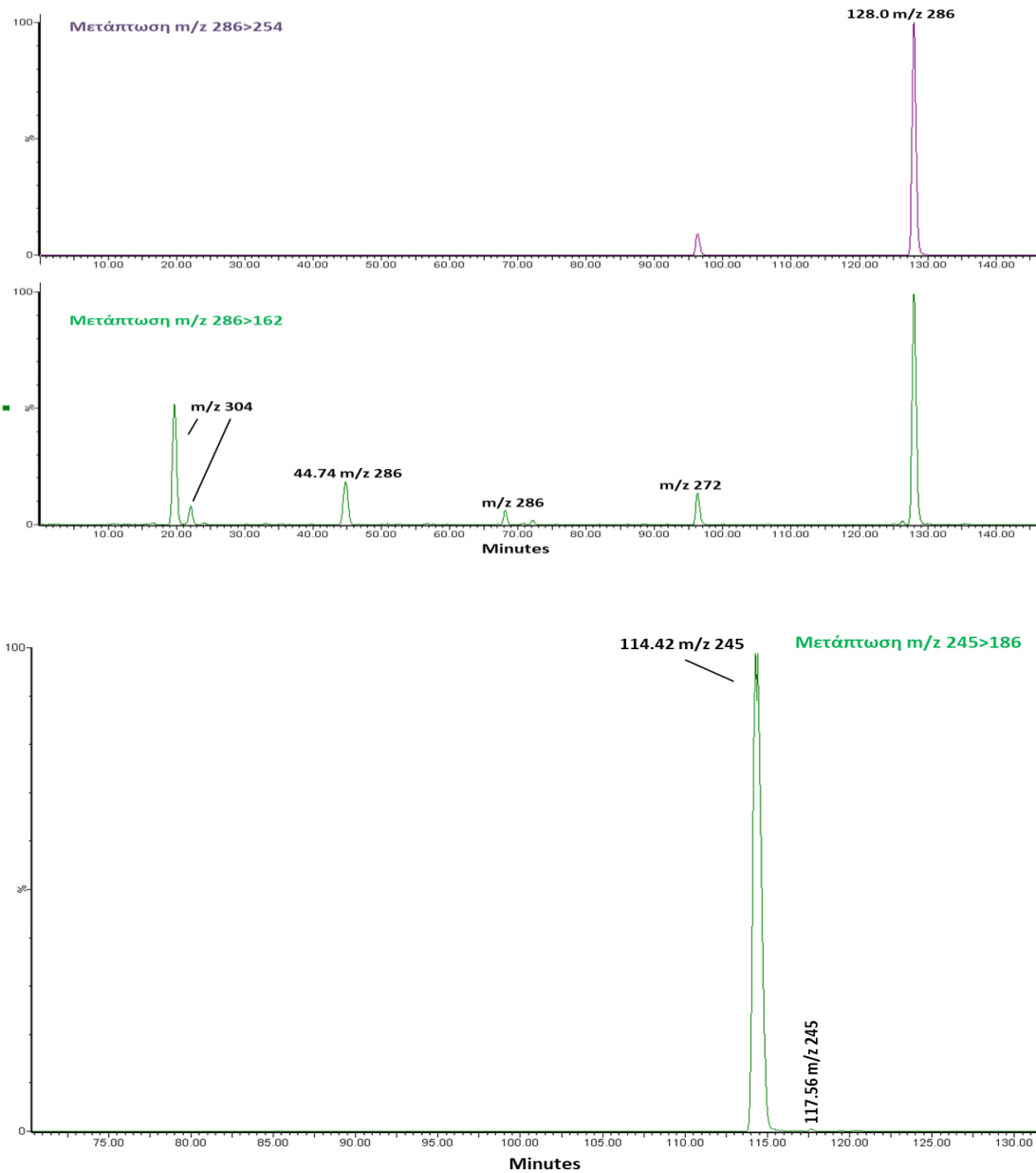


Σχήμα 32. Χρωματογράφημα MRM των μεταπτώσεων:  $m/z$  254 > 236 / 162 / 133 (από πάνω προς τα κάτω αντίστοιχα) από δείγμα γονάδας.

Σύμφωνα με τον Gorarava Puilingi και τους συνεργάτες του (2015), η 4,4a-anhydro-5,6,11-trideoxyTTX και η 4,9-anhydro-5,6,11-trideoxyTTX είναι σημαντικά TTX ανάλογα σε όλους σχεδόν τους τοξικούς ιστούς των pufferfish και έχουν δείξει σημαντικές συγκεντρώσεις σε όλα τα τοξικά pufferfish που ερευνήθηκαν. Η σειρά έκλουσης των αναλόγων TTX με  $m/z$  254, είναι πρώτη η 4,9-anhydro-5,6,11-trideoxyTTX και έπειτα η 4,4a-anhydro-5,6,11-trideoxyTTX (Rambla – Alegre M., 2017). Από το χρωματογράφημα του σχήματος 32 παρατηρούνται τρεις κορυφές με  $m/z$  254. Οι δύο πρώτες κορυφές σε χρόνο 107.12 και 109.20 min (Σχήμα 24-LC-MS/MS) και 109.30 και 111.30 min

(Σχήμα 23-HPLC-PCD-FLD) λόγω της μεγάλης έντασης του σήματος που επιδεικνύουν και στις δυο περιπτώσεις μπορούν να αποδοθούν ως 4,9-anhydro-5,6,11-trideoxyΤΤΧ και 4,4a-anhydro-5,6,11-trideoxyΤΤΧ αντίστοιχα. Η τρίτη μικρότερη κορυφή που παρατηρείται από το χρωματογράφημα του σήματος 32, αποδίδεται σε άλλο ανάλογο της ΤΤΧ με ίδιο μοριακό ιόν.

- LC-MS/MS χρωματογράφημα με κορυφές με  $m/z$  286 και 245



Σχήμα 33. Χρωματογραφήματα MRM των μεταπτώσεων:  $m/z$  286 > 254 / 162 και  $m/z$  245 > 186 (από πάνω προς τα κάτω αντίστοιχα) από δείγμα γονάδας με τη μέθοδο LC-MS/MS.

Τα μοριακά ιόντα  $m/z$  286 και 245 ανιχνεύθηκαν μετά από πλήρη σάρωση (Full Scan MS) που πραγματοποιήθηκε στο δείγμα της γονάδας καθώς και οι δυο έδιναν έντονες κορυφές που δεν αντιστοιχούσαν με κάποια από τις χαρακτηριστικές μάζες των αναλόγων της ΤΤΧ. Η  $m/z$  286 είναι χαρακτηριστικό θραύσμα των deoxy αναλόγων από την απώλεια ενός μορίου νερού (Bane V. et al., 2016). Έτσι μπορεί να θεωρηθεί ότι οι τρεις κορυφές με  $m/z$  286 που παρατηρούνται στο χρωματογράφημα του σχήματος 33 μπορεί να αποδοθούν ως κάποιες deoxy μορφές της ΤΤΧ που θραυματοποιήθηκαν πλήρως στο  $m/z$  286. Για το ιόν  $m/z$  245 δεν υπάρχει κάποια ταύτιση με τα θραύσματα των χαρακτηριστικών αναλόγων της ΤΤΧ, οπότε μπορεί να θεωρηθεί ως ένα νέο ανάλογο τοξίνης ΤΤΧ.

Για τις άγνωστες κορυφές που εμφανίστηκαν στα χρωματογραφήματα και τις  $m/z$  286 και 245, θα πρέπει να γίνει μια νέα εκτενής μελέτη ώστε να επιτευχθεί η αναγνώριση τους και να χαρακτηρισθούν ώστε να ολοκληρωθεί η πλήρης εικόνα για το προφίλ της ΤΤΧ και των αναλόγων της, που εμπεριέχονται στο *Lagocephalus sceleratus*.

Η ΤΤΧ και τα ανάλογα της που ανιχνεύτηκαν και ταυτοποιήθηκαν στο δείγμα του ιστού της γονάδας του *Lagocephalus sceleratus*, στους αντίστοιχους χρόνους έκλουσης τους, για τις μεθόδους υγρής χρωματογραφίας και παραγωγή μετά τη στήλη με ανίχνευση με φθορισμό και υγρή χρωματογραφία – φασματογραφία μάζας συζευγμένη με τριπλό τετράπολο, παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 20.

Πίνακας 20. ΤΤΧ και τα ανάλογα της στους χρόνους έκλουσης τους, στο δείγμα γονάδας, με τις τεχνικές HPLC-PCD-FLD και LC-MS/MS με τριπλό τετράπολο.

n	Τοξίνες	HPLC-PCD-FLD	LC-MS/MS
		Χρόνος Κατακράτησης (min)	Χρόνος Κατακράτησης (min)
1	Tetrodonic Acid	14,28	12,09
2	Tetrodotoxin	18,64	16,35
3	4-epiTTX	20,38	18,11
4	11-deoxyTTX	21,87	19,66
5	5-deoxyTTX	24,24	22,05
6	$m/z$ 290	29,26	27,01
7	$m/z$ 320	31,16	29,03
8	Άγνωστη	32,71	ND

9	m/z 304	34,77	32,92
10	m/z 302	40,80	38,62
11	m/z 272	42,85	40,59
12	4,9-anhydroTTX	44,72	42,45
13	m/z 286	46,9	44,74
14	11-norTTX-6(S)-ol	52,92	50,71
15	11-norTTX-6(R)-ol	54,03	51,88
16	m/z 288	61,24	58,86
17	m/z 304	73,14	70,74
18	m/z 288	82,75	79,58
19	6,11-dideoxyTTX	90,55	88,42
20	Άγνωστη	95,50	ND
21	5,6,11-trideoxyTTX	98,77	96,68
22	4-epi-5,6,11-trideoxyTTX	102,01	99,82
23	4,9-anhydro-5,6,11-trideoxyTTX	109,31	107,17
24	4,4a-anhydro-5,6,11-trideoxyTTX	111,30	109,20
25	m/z 254	113,88	111,75
26	m/z 245	116,47	114,36
27	m/z 272	117,73	115,64
28	m/z 245	119,64	117,56
29	Άγνωστη	121,52	ND
30	m/z 272	126,75	123,74
31	m/z 286	130,12	128,00
32	m/z 254	133,61	131,20

\*ND- Not Detected

## 5.8 Ποσοτικός προσδιορισμός της TTX και της 4,9-ανυδροTTX

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της τετραδοτοξίνης (TTX) και της 4,9-ανυδροTTX (4,9-anhydroTTX) πραγματοποιήθηκε σε δείγματα από τους ιστούς των επιμέρους τμημάτων του *Lagocephalus sceleratus* (γονάδα, συκώτι, μύες και δέρμα). Οι υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν με βάση τις συγκεντρώσεις και τα εμβαδά κορυφών των πρότυπων ουσιών TTX και 4,9-anhydroTTX που χρησιμοποιούνταν σε ημερήσια βάση με την εφαρμογή βαθμονομήσεων ενός επιπέδου (Single Level Calibration). Ενδεικτικά οι ποσότητες τοξίνης (mg/Kg) της TTX και της 4,9-anhydroTTX που προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο υγρής χρωματογραφίας και παραγωγίσις μετά τη στήλη με φθορισμομετρική ανίχνευση (HPLC-PCD-FLD) παρουσιάζονται στον Πίνακα 21 και με τη μέθοδο υγρής χρωματογραφίας – φασματομετρίας μάζας (LC-MS/MS) παρουσιάζονται στον Πίνακα 22.

Πίνακας 21. Ποσότητες της TTX (mg/Kg) και της 4,9-anhydroTTX (mg/Kg) στους ιστούς του *Lagocephalus sceleratus* που αποκτήθηκαν από την HPLC-PCD-FLD μέθοδο.

Ιστοί	HPLC-PCD-FLD	
	TTX (mg/Kg)	4,9-anhydroTTX (mg/Kg)
Γονάδα 1	243.14	23.56
Γονάδα 2	146.27	9.53
Γονάδα 3	234.50	16.62
Συκώτι 1	120.98	19.97
Μύες 1	5.19	0.37
Δέρμα 1	2.02	0.10

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 21 παρατηρείται ότι για την HPLC-PCD-FLD μέθοδο η ποσότητα της TTX (mg/Kg) και της 4,9-anhydroTTX (mg/Kg), στον ιστό των τριών δειγμάτων γονάδας είναι 243,14, 146,27 και 234,50 mg/Kg και 23,56, 9,53 και 16,62 mg/Kg (γονάδα 1,2 και 3, αντίστοιχα). Στο δείγμα από τον ιστό του συκωτιού1 η ποσότητα της TTX είναι 120,98 mg/Kg και η ποσότητα της 4,9-anhydroTTX είναι 19,97 mg/Kg, για τον ιστό των μυών1 η ποσότητα της TTX είναι 5,19 mg/Kg και η ποσότητα της 4,9-anhydroTTX είναι 0,37 mg/Kg και για τον ιστό του δέρματος1 η ποσότητα της TTX είναι 2.02 mg/Kg και η ποσότητα της 4,9-anhydroTTX είναι 0,10 mg/Kg. Παρατηρείται ότι οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις TTX και 4,9-anhydroTTX εμφανίζονται σε σειρά

από τις υψηλότερες στις χαμηλότερες στα δείγματα της γονάδας, του συκωτιού, των μυών και του δέρματος, αντίστοιχα.

Πίνακας 22. Ποσότητες της TTX (mg/Kg) και της 4,9-anhydroTTX (mg/Kg) στους ιστούς του *Lagocephalus sceleratus* που αποκτήθηκαν από την LC-MS/MS μέθοδο.

Ιστοί	LC-MS/MS	
	TTX (mg/Kg)	4,9-anhydroTTX (mg/Kg)
Γονάδα 4	274.53	51.40
Γονάδα 5	183.39	28.00
Γονάδα 6	268.39	35.55
Συκώτι 2	158.37	27.51
Μύες 2	11.73	4.75
Δέρμα 2	7.46	1.68

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 22 παρατηρείται ότι για την LC-MS/MS μέθοδο η ποσότητα της TTX (mg/Kg) και της 4,9-anhydroTTX (mg/Kg), στον ιστό των τριών δειγμάτων γονάδας είναι 274,53, 183,39 και 268,39 mg/Kg και 51,40, 28,0, και 35,55 mg/Kg (γονάδα 4, 5 και 6, αντίστοιχα). Στο δείγμα από τον ιστό του συκωτιού2 η ποσότητα της TTX είναι 158,37 mg/Kg και η ποσότητα της 4,9-anhydroTTX είναι 27,51 mg/Kg, για τον ιστό των μυών2 η ποσότητα της TTX είναι 11,73 mg/Kg και η ποσότητα της 4,9-anhydroTTX είναι 4,75 mg/Kg και για τον ιστό του δέρματος η ποσότητα της TTX είναι 7,46 mg/Kg και η ποσότητα της 4,9-anhydroTTX είναι 1,68 mg/Kg. Παρατηρείται ότι οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις TTX και 4,9-anhydroTTX εμφανίζονται σε σειρά από τις υψηλότερες στις χαμηλότερες στα δείγματα της γονάδας, του συκωτιού, των μυών και του δέρματος, αντίστοιχα.

Όταν συγκρίνεται η περιεκτικότητα της TTX στους διαφορετικούς ιστούς του *L. Sceleratus*, όλες οι μέθοδοι δείχνουν την ίδια τάση από την υψηλότερη στη χαμηλότερη περιεκτικότητα σε TTX: γονάδα > συκώτι > μύες > δέρμα. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις της TTX στη γονάδα και στο συκώτι σε σύγκριση με το δέρμα και τους μύες έχει επίσης παρατηρηθεί και σε *L. Sceleratus* από την Ελλάδα. Σε προηγούμενες μελέτες τα επίπεδα της τετραδοτοξίνης κυμαίνονταν στο εύρος: 0,17 – 239,32 mg/Kg , 0,19 – 87,53 mg/Kg, 0,07 – 10,16 mg/Kg και 0,15 – 6,63 mg/Kg στον ιστό γονάδας,

συκωτιού, μυών και δέρματος, αντίστοιχα (Acar et al., 2017, Katikou et al., 2009, Kosker et al., 2016, Reverte et al., 2015, Rodriguez et al., 2012).

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έρχονται σε συμφωνία με τις παραπάνω βιβλιογραφικές αναφορές καθώς παρουσιάζεται η ίδια τάση στην περιεκτικότητα της ΤΤΧ από την υψηλότερη στη χαμηλότερη συγκέντρωση στους ιστούς των επιμέρους τμημάτων του *L. sceleratus* και στις δύο μεθόδους. Επίσης έρχονται σε συμφωνία αναφορικά με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις στον ιστό της γονάδας και του συκωτιού σε σύγκριση με τους μύες και το δέρμα καθώς ο *L. sceleratus* έχει αλιευθεί στο νησί της Ρόδου.

Τα επίπεδα της ΤΤΧ στους επιμέρους ιστούς στην HPLC-PCD-FLD μέθοδο έρχονται σε συμφωνία με τα παραπάνω βιβλιογραφικά επίπεδα, με εξαίρεση τη γονάδα<sup>1</sup> και το συκώτι<sup>1</sup>, που παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα. Τα επίπεδα της ΤΤΧ στους επιμέρους ιστούς στην LC-MS/MS μέθοδο παρουσιάζονται υψηλότερα σε σύγκριση με τα επίπεδα της βιβλιογραφίας, με εξαίρεση τη γονάδα 5 που βρίσκεται εντός των επιπέδων. Οι μεταβολές στα επίπεδα συγκέντρωσης της ΤΤΧ στις γονάδες, τα συκώτια, τους μύες και τα δέρματα καθορίζονται ως συνάρτηση της εποχής συλλογής του *Lagocephalus sceleratus* και του φύλου του. Επιπλέον, τα θηλυκά βρέθηκαν γενικά πιο τοξικά από τα αρσενικά και τα υψηλότερα επίπεδα τοξικότητας καταγράφηκαν τον Μάρτιο, γεγονός που οδήγησε τους ερευνητές στο συμπέρασμα ότι η τοξικότητα αρχίζει να αυξάνεται καθώς πλησιάζει η εποχή ωοτοκίας (Kosker et al., 2016, Ali et al., 2011). Οπότε τα υψηλότερα επίπεδα συγκέντρωσης της ΤΤΧ στην παρούσα μελέτη μπορούν να αποδοθούν στη διαφορετική εποχή συλλογής και στο φύλο των *L. sceleratus*, από τα οποία παραλήφθηκαν οι ιστοί των επιμέρους τμημάτων.

Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Rodriguez, et al, (2012), σχετικά με την ποσότητα τοξίνης (μg/g) της 4,9-άνυδροΤΤΧ στο *Lagocephalus sceleratus* που λήφθηκε με την τεχνική LC-ESI-CID-MS/MS σε κατάσταση MRM, βρέθηκε ότι η ποσότητα της 4,9-άνυδροΤΤΧ στον ιστό της γονάδας κυμαίνεται από 0.54 έως 5.55 μg/g σε δύο είδη του ψαριού και στον ιστό του συκωτιού από 0.52 έως 6.60 μg/g, ενώ στους ιστούς των μυών και του δέρματος ήταν μικρότερο από το LOQ. Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας για την 4,9-άνυδροΤΤΧ παρουσιάζουν μεγαλύτερα επίπεδα σε σύγκριση με την έρευνα της Rodriguez et al., (2012), γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στη διαφορετική εποχή συλλογής και στο φύλο των *L. sceleratus*, από τα οποία παραλήφθηκαν οι ιστοί των επιμέρους τμημάτων.

## 6. Συμπεράσματα

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε για την ταυτόχρονη ανάλυση της τετραδοτοξίνης (TTX) και των αναλόγων της στο *Lagocephalus sceleratus*, με υγρή χρωματογραφία και παραγωγή μετά τη στήλη με φθορισμομετρική ανίχνευση (HPLC-PCD-FLD) και με υγρή χρωματογραφία – φασματομετρία μαζών (LC-MS/MS), ήταν αποδοτική καθώς με τη χρήση της αναλυτικής στήλης Hypercarb και με τη μελέτη για την επιλογή των κατάλληλων κινητών φάσεων και συνθηκών για την ανάλυση πραγματοποιήθηκε επιλεκτικός και ευαίσθητος χρωματογραφικός διαχωρισμός της TTX και των αναλόγων της.

Από τη μέθοδο ανιχνεύτηκαν τριάντα δυο (32) τοξίνες εκ των οποίων ταυτοποιήθηκαν η TTX, η 4,9-ανυδροTTX και έντεκα (11) ακόμα γνωστά και σημαντικά ανάλογα της TTX όπως, η 11-deoxyTTX και 5-deoxyTTX με  $m/z$  304, η 11-norTTX-6(S)-ol και η 11-norTTX-6(R)-ol με  $m/z$  290, η 6,11-dideoxyTTX με  $m/z$  288, η 5,6,11-trideoxyTTX και η 4-epi-5,6,11-trideoxyTTX με  $m/z$  272 και η 4,9-anhydro-5,6,11-trideoxyTTX και η 4,4a-anhydro-5,6,11-trideoxyTTX με  $m/z$  254. Ενώ πραγματοποιήθηκε και ανίχνευση του τετραδονικού οξέος με  $m/z$  320. Ταυτόχρονα ανιχνεύτηκαν κορυφές με γνωστό μοριακό ιόν που δεν ήταν δυνατό να ταυτοποιηθούν, ενώ ανιχνεύτηκαν και άγνωστες κορυφές με την μέθοδο HPLC-PCD-FLD που δεν ανιχνευτήκαν με την LC-MS/MS μέθοδο.

Η σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) της μεθόδου για την TTX και τέσσερα ακόμα ανάλογα της για πέντε επαναλήψεις ( $n=5$ ) ήταν ακριβείς και επαναλήψιμη καθώς δεν ξεπερνούσε το όριο του 1,5%, για τους χρόνους έκλουσης κυμαίνονταν από 0,12% έως 0,58% και για το εμβαδόν των κορυφών κυμαίνονταν από 0,63% έως 1,45% και στις δύο μεθόδους.

Το κατώτερο όριο ανίχνευσης (LOD) για την TTX υπολογίστηκε στα 20,39  $\mu\text{g/L}$ , 14,20  $\mu\text{g/L}$  και 21,35  $\mu\text{g/L}$  και για την 4,9-ανυδροTTX στα 49,85  $\mu\text{g/L}$  και 83,82  $\mu\text{g/L}$  για την HPLC-PCD-FLD και LC-MS/MS τεχνικές στις μεταπτώσεις  $m/z$  320>302, 320>162 και  $m/z$  302>162 αντίστοιχα. Το κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) για την TTX υπολογίστηκε στα 61,8  $\mu\text{g/L}$ , 43,02  $\mu\text{g/L}$  και 64,69  $\mu\text{g/L}$  και για την 4,9-ανυδροTTX στα 151,05  $\mu\text{g/L}$  και 254  $\mu\text{g/L}$  για την HPLC-PCD-FLD και LC-MS/MS τεχνικές στις μεταπτώσεις  $m/z$  320>302, 320>162 και  $m/z$  302>162 αντίστοιχα.

Συμπερασματικά αποδεικνύεται ότι η μέθοδος HPLC-PCD-FLD είναι απλή και παρέχει εξίσου χαμηλή ευαισθησία με την μέθοδο LC-MS/MS. Η ταυτόχρονη ανάλυση με την HPLC μέθοδο σε συνδυασμό με την μέθοδο LC-MS/MS παρέχει θετική επιβεβαίωση της παρουσίας της TTX και των αναλόγων μορφών της.



## 7. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

1. Η ανάπτυξη μεθόδου ταυτόχρονης ανάλυσης της τετραδοτοξίνης (ΤΤΧ) και των αναλόγων της στο *Lagocephalus sceleratus* με υγρή χρωματογραφία και παραγωγή μετά τη στήλη και ανίχνευση με φθορισμό και με υγρή χρωματογραφία – φασματομετρία μάζας, σε περισσότερους ιστούς του *Lagocephalus sceleratus*, όπου να είναι γνωστό το φύλο, η εποχή περιουλογής και τα χαρακτηριστικά του, ώστε να αναπτυχθεί καλύτερη εικόνα για το τοξικό του προφίλ.
2. Η ανάπτυξη της υπάρχουσας μεθόδου με διαφορετικού τύπου φασματομετρίας μάζας όπως φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας και ακρίβειας μάζας, που παρέχει καλύτερη διαχωριστική ικανότητα και υψηλή ακρίβεια μάζας για την ταυτοποίηση των άλλων αγνώστων τοξινών. Επιπλέον η υψηλή ευαισθησία, θα συντελέσει στην καλύτερη ανίχνευση και πλήρη ανάλυση όλων των αναλόγων της ΤΤΧ.
3. Η συλλογή κλασμάτων μεγάλων κορυφών όπως η 11-norΤΤΧ-6(R)-ol με  $m/z$  290, η 5,6,11-trideoxyΤΤΧ και η 4-epi-5,6,11-trideoxyΤΤΧ με  $m/z$  272, η ανάλυση τους με τεχνικές όπως NMR και FTIR και μετέπειτα η δημιουργία πρότυπων ουσιών από τις κορυφές αυτές.

## 8. Βιβλιογραφία

- Acar C., Ishizaki S. and Nagashima Y. (2017). Toxicity of the Lessepsian pufferfish *Lagocephalus sceleratus* from eastern Mediterranean coasts of Turkey and species identification by rapid PCR amplification. *Eur. Food Res. Technol.*, **243**, 49–57.
- Ali A.E., Gomaa M. and Othman H. (2011). Toxicological Studies on Puffer Fishes, *Lagocephalus sceleratus* and *Amblyrhynchotes hypeslogenion* in Suez Gulf, Red Sea, Egypt. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, **37**, 123-130.
- Bane V., Hutchinson S., Sheehan A., Brosnan B., Barnes P., Lehane M. and Furey A. (2016). LC-MS/MS method for the determination of tetrodotoxin (TTX) on a triple quadruple mass spectrometer. *Food Additives & Contaminants: Part A*, **33**, 1728-1740.
- Bane V., Lehane M., Dikshit M., O’Riordan A. and Furey A. (2014). Tetrodotoxin: Chemistry, Toxicity, Source, Distribution and Detection. *Toxins*, **6**, 693-755.
- Bligh E. G., and Dyer W. G. (1959). A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, **37**, 911-917.
- Boustany L., El Indary S. and Nader M. (2015). Biological characteristics of the Lessepsian pufferfish *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789) off Lebanon. *Cah. Biol. Mar.*, **56**, 137-142.
- Chen X.W., Liu H.X., Jin Y.B., Li S.F., Bi X., Chung S., Zhang S.S. and Jiang Y.Y. (2011) Separation, identification and quantification of tetrodotoxin and its analogs by LC-MS without calibration of individual analogs. *Toxicon*, **57**, 938–943.
- Eui Cho H., Youn Ahn S., Son S.I., In S., Hong R.S., Kim D.W., Woo S.H., Cheul Moon d. and Suncheon K. (2012). Determination and validation of tetrodotoxin in human whole blood using hydrophilic interaction liquid chromatography – tandem mass spectrometry and its application. *Forensic Science International*, **217**, 76-80.
- Gorapava Puilingi C., Kudo Y., Cho Y., Konoki K. and Yamashita-Yotsu M. (2015). Tetrodotoxin and Its Analogues in the Pufferfish *Arothron hispidus* and *A. nigropunctatus* from the Solomon Islands: A Comparison of Their Toxin Profiles with the Same Species from Okinawa, Japan. *Toxins*, **7**, 3436-3454.
- Goto T., Kishi Y. T. and Hirata, Y. (1965). Tetrodotoxin. *Tetrahedron*, **21**, 2059-2088.

- Guardone L., Gasperetti L., Maneschi A., Ricci E., Susini F., Guidi A. and Armani A. (2018). Toxic invasive pufferfish (Tetraodontidae family) along Italian coasts: Assessment of an emergent public health risk. *Food Control*, **91**, 330-338.
- Harris C.D. (2011). Υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης στο: *Ποσοτική χημική ανάλυση, Τόμος Β'*, pp 629-649, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
- Kalogirou S. (2013). Ecological characteristics of the invasive pufferfish *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789) in Rhodes, Eastern Mediterranean Sea. A case study. *Mediterranean Marine Science*, **14**, 251-260.
- Katikou P., Georgantelis D., Sinouris N., Petsi A. and Fotaras T. (2009). First report on toxicity assessment of the Lessepsian migrant pufferfish *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789) from European waters (Aegean Sea, Greece). *Toxicon*, **54**, 50-55.
- Kosker A. R., Ozogul F., Durmus M., Ucar Y., Ayas D., Regenstein J. and Ozogul Y. (2016). Tetrodotoxin levels in pufferfish (*Lagocephalus sceleratus*) caught in the Northeastern Mediterranean Sea. *Food Chemistry*, **210**, 332-337.
- Lago J., Rodriguez L., Blanco L., Vieites J. M. and Cabado A. (2015). Tetrodotoxin, an Extremely Potent Marine Neurotoxin: Distribution, Toxicity, Origin and Therapeutic Uses. *Marine Drugs*, **13**, 6384-6406.
- Otero P., Rodriguez P., Botana A.M., Alfonso A. and Botana L.M. (2013). Analysis of Natural Toxins. *Liquid Chromatography: Applications*, **15**, 411-418.
- Rambla-Alegre M., Reverte L., Del Rio V., De la Inglesia P., Palacios O., Flores C., Caixach J., Campbell K., Izquierdo-Munoz A., Elliott C., Campas M. and Diogene J. (2017). Evaluation of tetrodotoxins in puffer fish caught along the Mediterranean coast of Spain. Toxin profile of *Lagocephalus sceleratus*. *Environmental Research*, **158**, 1-6.
- Reverté, L., Iglesia P., Río V., Campbell K., Elliott C.T., Kawatsu K., Katikou P., Diogène J. and Campàs M (2015). Detection of tetrodotoxins in puffer fish by a self-assembled mono layer-based immunoassay and comparison with surface plasmon resonance, LC-MS/MS, and mouse bioassay. *Anal. Chem.*, **87**, 10839–10847.
- Rodriguez P., Alfonso A., Otero P., Katikou P., Georgantelis D. and Botana L. (2012). Liquid chromatography – mass spectrometry method to detect Tetrodotoxin and Its analogues in

- the puffer fish *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789) from European waters. *Food Chemistry*, **132**, 1103-1111.
- Sargent M. (2013). Guide to achieving reliable quantitative LC-MS measurements, 1<sup>st</sup> edition, RSC Analytical Methods Committee.
- Souissi J.B., Rifi M., Ghanem R., Ghazzi L., Boughedir W. and Azzurro E. (2014). *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789) expands through the African coasts towards the Western Mediterranean Sea: A call for awareness. *Management of Biological Invasions*, **5**, Issue 4.
- Vlami A., Katikou P., Rodriguez I., Rey V., Alfonso A., Papazachariou A., Zacharaki T., Botana M.A. and Botana M.L. (2015). First Detection of Tetrodotoxin in Greek Shellfish by UPLC-MS/MS Potentially Linked to the Presence of the Dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. *Toxins*, **7**, 1779-1807.
- Thermo Scientific (2007). Method Development Guide for Hypercarb Columns (TG20394\_E 12/07M), pp 1-34.
- Thermo Scientific Hypercarb Columns (2009). *Application Notebook (ANGSCHYPERCARB0609)*, Issue 1.
- Yasumoto T. and Tooru, M. (1985). Fluorometric determination of tetrodotoxin by high performance liquid chromatography. *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 3077-3080.
- Yotsu – Yamashita M., Jang J-H., Cho Y. and Konoki K. (2011). Optimization of simultaneous analysis of tetrodotoxin, 4-epitetrodotoxin, 4,9- anhydrotetrodotoxin and 5,6,11 – trideoxytetrodotoxin by hydrophilic interaction liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *Forensic Toxicol*, **29**, 61-64.
- Yotsu – Yamashita M., Abe Y., Kudo Y., Ritsou – Williams R., Paul J. V., Konoki K., Cho Y., Adachi M., Imazu T., Nishikawa T. and Isobre M. (2013). First Identification of 5,11-Dideoxytetrodotoxin in Marine Animals, and Characterization of Major Fragment Ions of Tetrodotoxin and Its Analogs by High Resolution ESI-MS/MS. *Marine drugs*, **11**, 2799-2813.
- Αναγνώστου Ν. (2016). Μεταπτυχιακή Διατριβή. Μεταβολές της σύστασης των ζαχάρων κατά την ωσμωτική αφυδάτωση ολόκληρων φρούτων, Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων, Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης.

Κακλαμάνος Π.Γ. (2009). Διδακτορική Διατριβή. Ανάπτυξη μεθόδων προσδιορισμού ορμονών με αυξητική δράση σε βιολογικά δείγματα με Υγρή Χρωματογραφία – Φασματομετρία Μαζών, Τμήμα Χημείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

Καρκαλούσος Π. (2015). Εργαστηριακές Ασκήσεις Κλινικής Χημείας, **8**, 222-260.

Τάνης Γ.Δ. (2016). Μεταπτυχιακή Διατριβή. Βελτιστοποίηση των συνθηκών ανάλυσης Τετραδοτοξίνης με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης και Παραγωγή μετά τη Στήλη, Τμήμα Φαρμακευτικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

<http://www.topontiki.gr/article/247795/malliakos-emfanisthike-epikindyno-toxiko-psari-lagokefalos>

<https://www.tuttobarche.it/magazine/pesce-mortale-lagocephalus.html>