

Διάλεξη 2^η
8 Δεκ. 2014

«Τεχνικές Χρωματογραφίας και Φασματομετρίας Μάζας»

ΕΝΟΤΗΤΑ 2

Σπύρος Περγαντής

A206

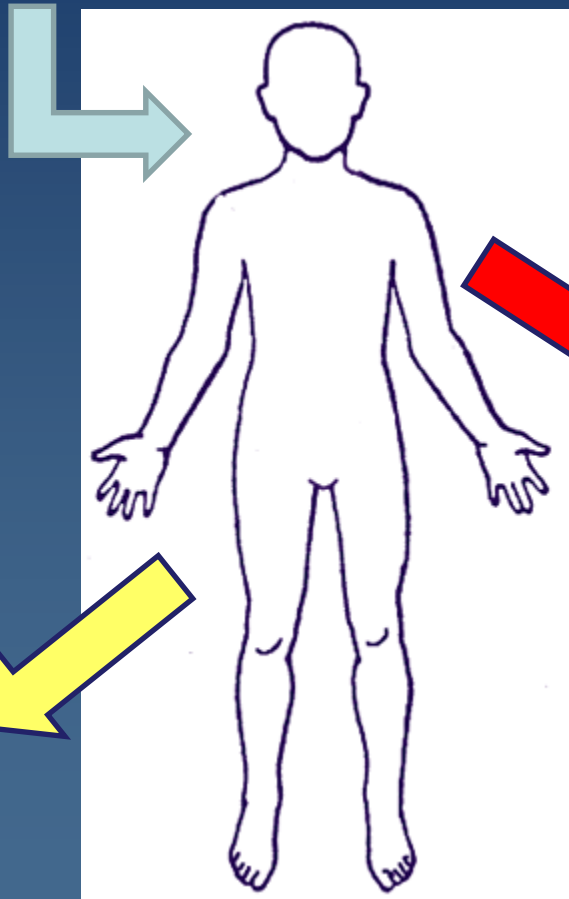
2810 545084

spergantis@chemistry.uoc.gr

Selenoproteomics in Human Serum:

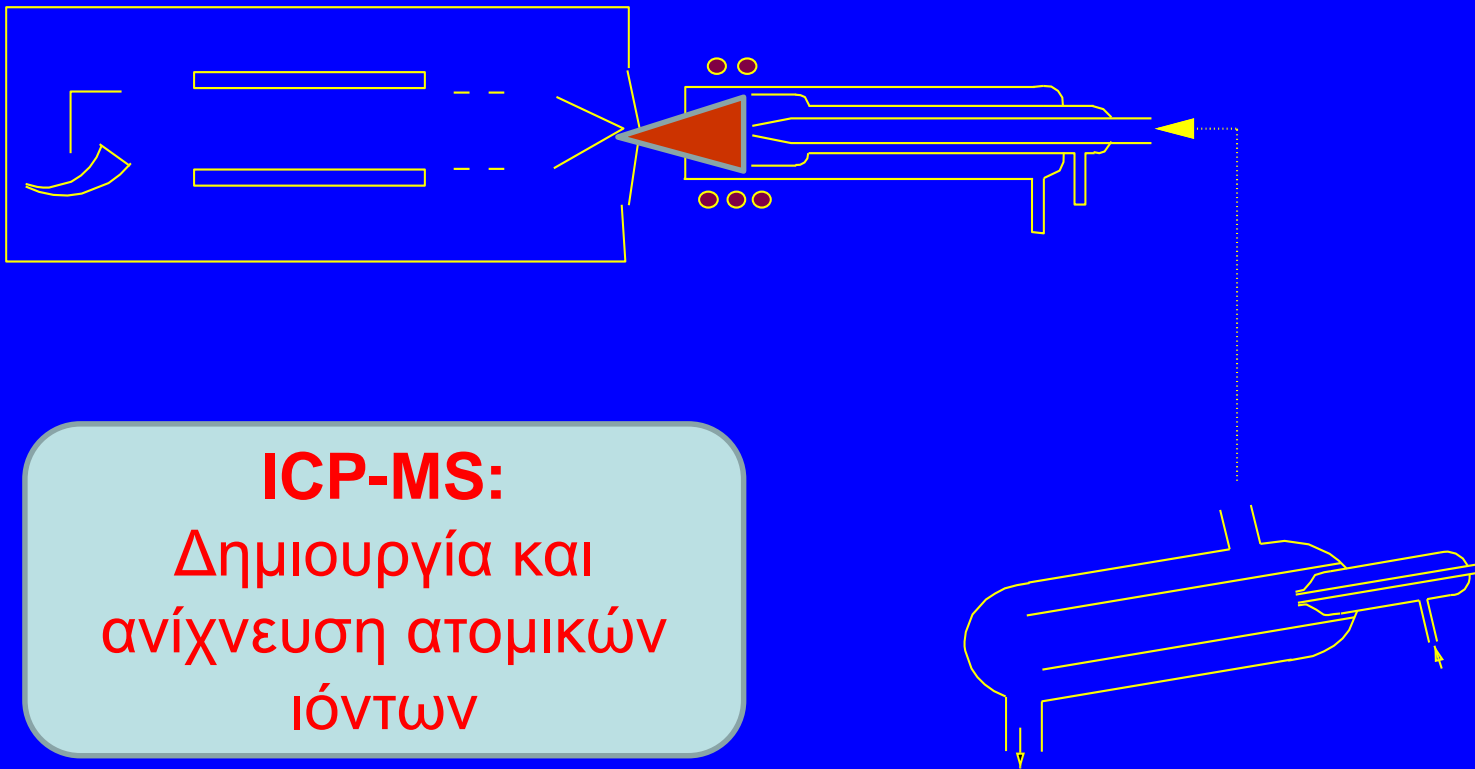
An Atomic Mass Spectrometric Approach





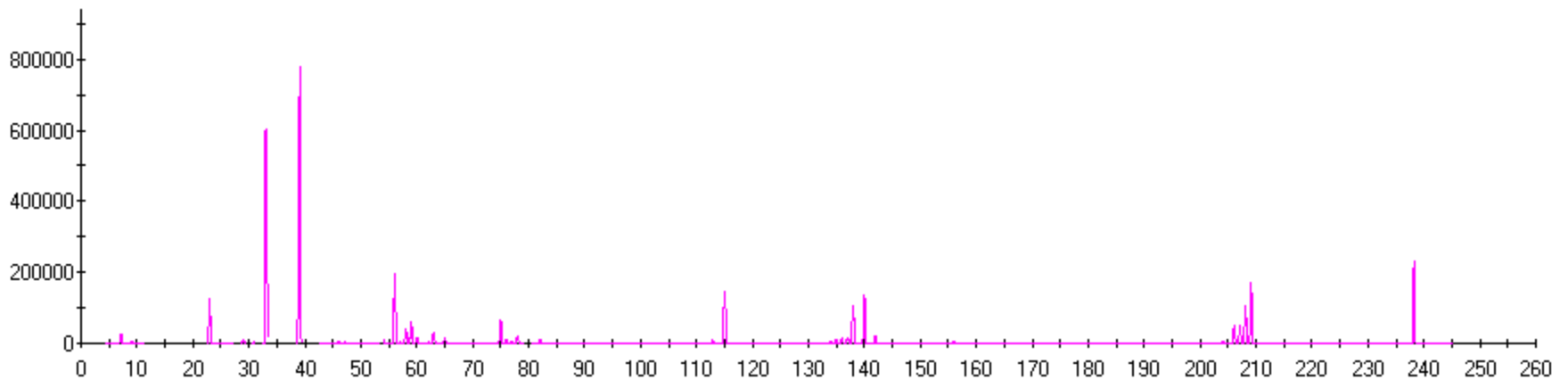
Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer

Φασματομετρία Μάζας Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος



ICP-MS:

Δημιουργία και
ανίχνευση ατομικών
ιόντων



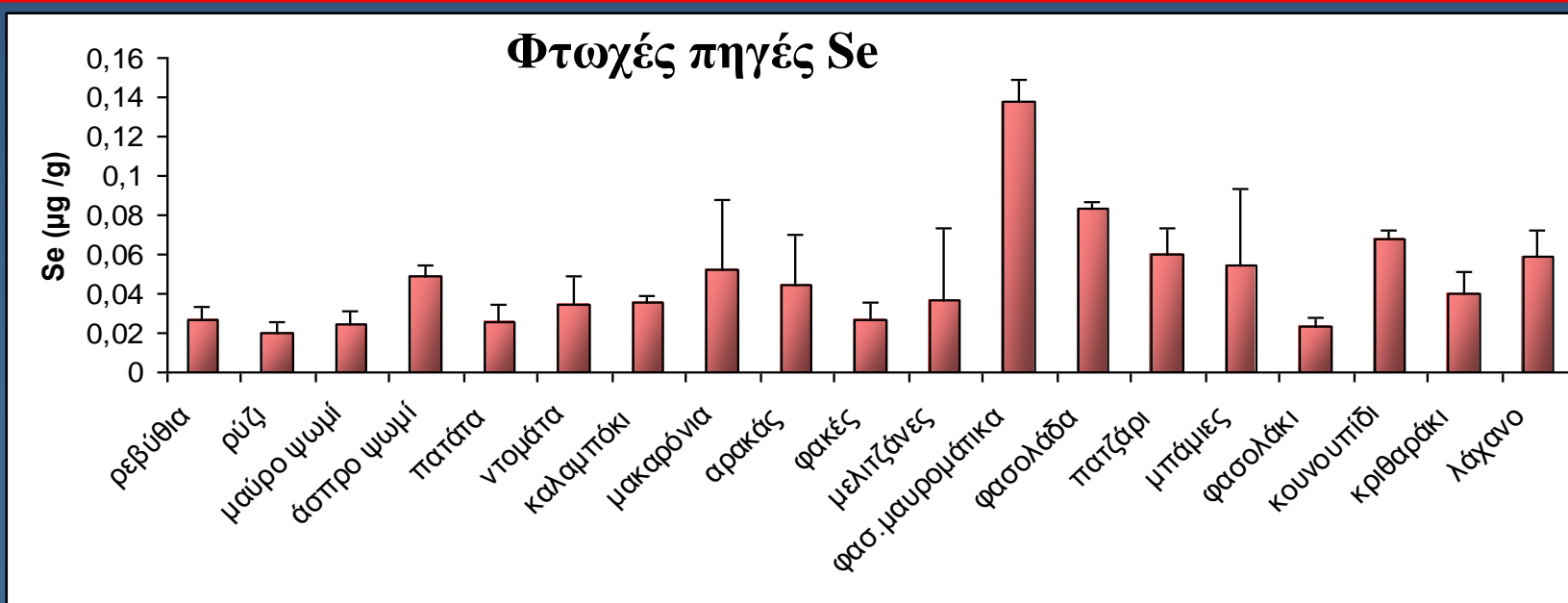
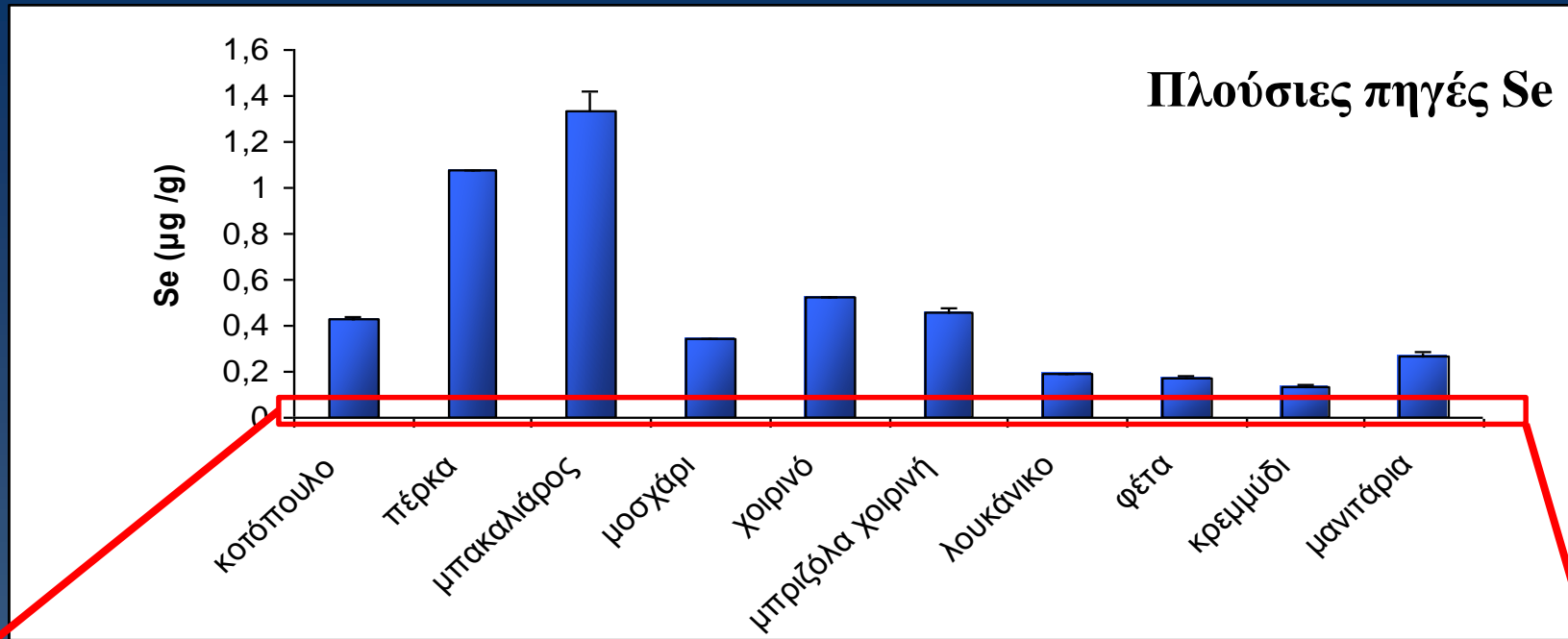
Πλεονεκτήματα:

- υψηλή ευαισθησία
- εκλεκτικότητα
- πολυστοιχεική ανάλυση
- συμβατότητα με HPLC

Ισότοπα	Ατομική μάζα (u)	Φυσική Αφθονία
^{74}Se	73.92247	0,89
^{76}Se	75.91921	9,37
^{77}Se	76.91991	7,63
^{78}Se	77.91731	23,77
^{80}Se	79.91651	49,61
^{82}Se	81.91669	8,73

m/z

Ολικός Προσδιορισμός Σεληνίου σε δείγματα τροφής



Αποτελέσματα μετρήσεων από μερίδες φαγητού

	Ποσότητα τροφίμου (g)	Se (μg / g)	Se (μg)
Μπριζόλα χοιρινή	76,4	0,455	34,8
Πατάτα	82,8	0,025	2,07
Συνολικά			36,9

	Ποσότητα τροφίμου (g)	Se (μg / g)	Se (μg)
Ρεβίθια	254,4	0,027	6,87
Φασολ. μαυρομάτικα	41,9	0,137	5,74
Συνολικά			12,6

	Ποσότητα (g ξηρού δείγματος)	Se (μg / g ξηρού δείγματος)	Se (μg)
Πέρκα	95,1	1,072	102
Μακαρόνια	125,0	0,052	6,5
Κουνουπίδι	40,4	0,068	2,75
Συνολικά			111,2

Ημερήσια πρόσληψη Se (εστιατόριο πανεπιστημίου)
 19,9 μg Se / ημέρα – 177,0 μg Se / ημέρα.

Μέση Ημερήσια Πρόσληψη Se

34,3 μg / άτομο/ ημέρα

Μορφωτικό Επίπεδο

- Στοιχειώδης εκπαίδευση: 34,9 μg / ημέρα
- Τριτοβάθμια εκπαίδευση: 31,3 μg / ημέρα

Τοποθεσία κατοικίας

- Αγροτική κατοικία: 36,2 μg / ημέρα
- Αστική κατοικία: 31,7 μg / ημέρα

Επαγγελματική Απασχόληση του αρχηγού του νοικοκυριού

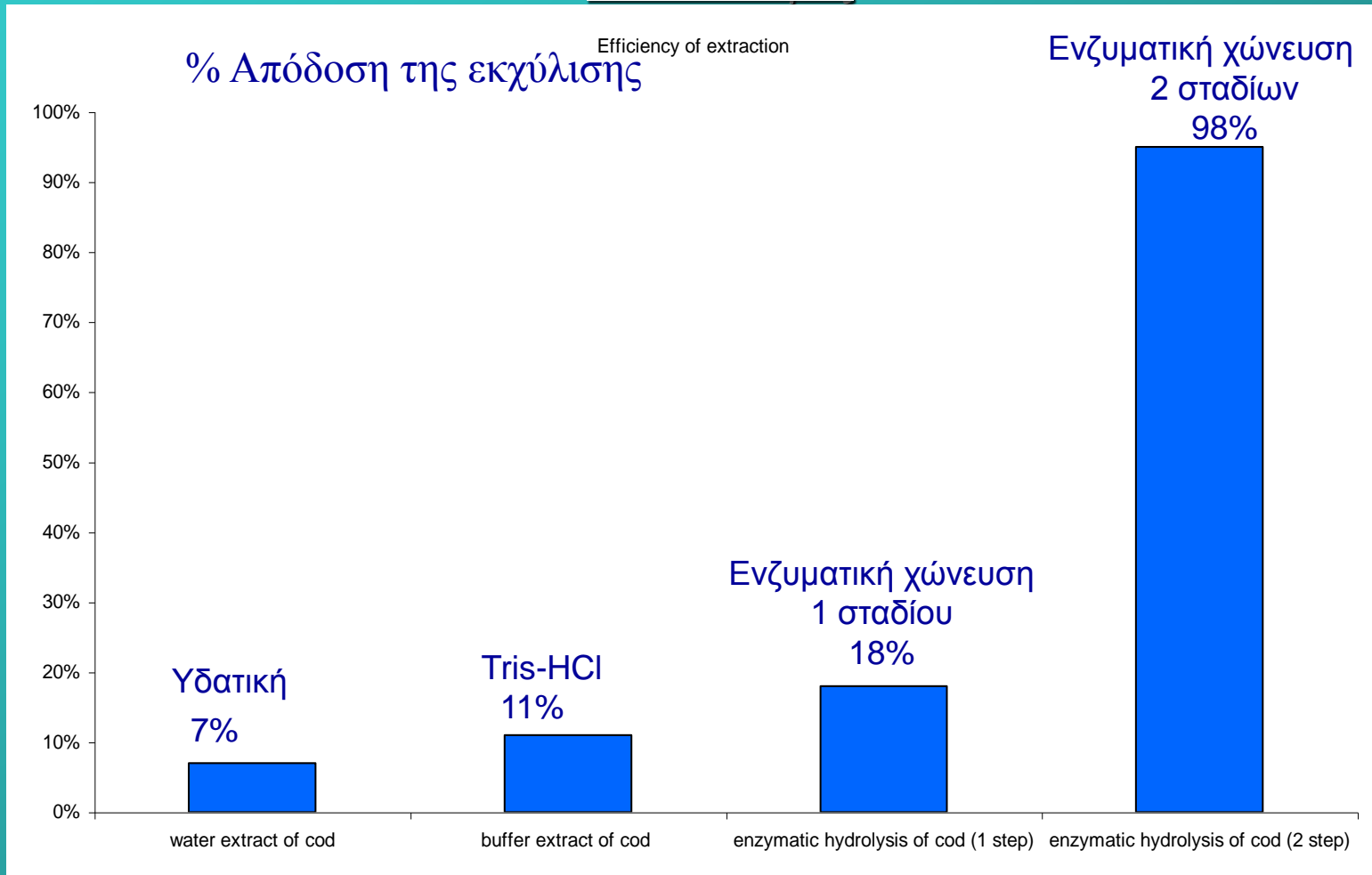
- Χειρωνακτική εργασία: 32,9 μg/ ημέρα
- Μη-χειρωνακτική εργασία: 30,4 μg/ ημέρα
- Συνταξιούχοι: 36,2 μg/ ημέρα
- Άνεργοι: 30,9 μg/ ημέρα

Ημερήσια Πρόσληψη Se σε διάφορες χώρες

Χώρα	Πρόσληψη Se (μg /άτομο/ημέρα)
Ελλάδα (παρούσα μελέτη)	34,3-27,9
Ελλάδα	39,3
Τουρκία	30
Ισπανία	32,3
Πολωνία	30-40
Ηνωμένο Βασίλειο	34
Ελβετία	70
Ολλανδία	67 & 110
Κροατία	33,9
Αίγυπτος	49
Αυστρία	48
Αυστραλία	110-120
Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής	60-150
Καναδάς	110-220
Γαλλία	166
Ιταλία	141

Υψηλής Απόδοσης Υγρή Χρωματογραφία συζευγμένη με τη Φασματομετρία Μάζας Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος (HPLC –ICP-MS) για την ειδοταυτοποίηση Σεληνίου στις τροφές

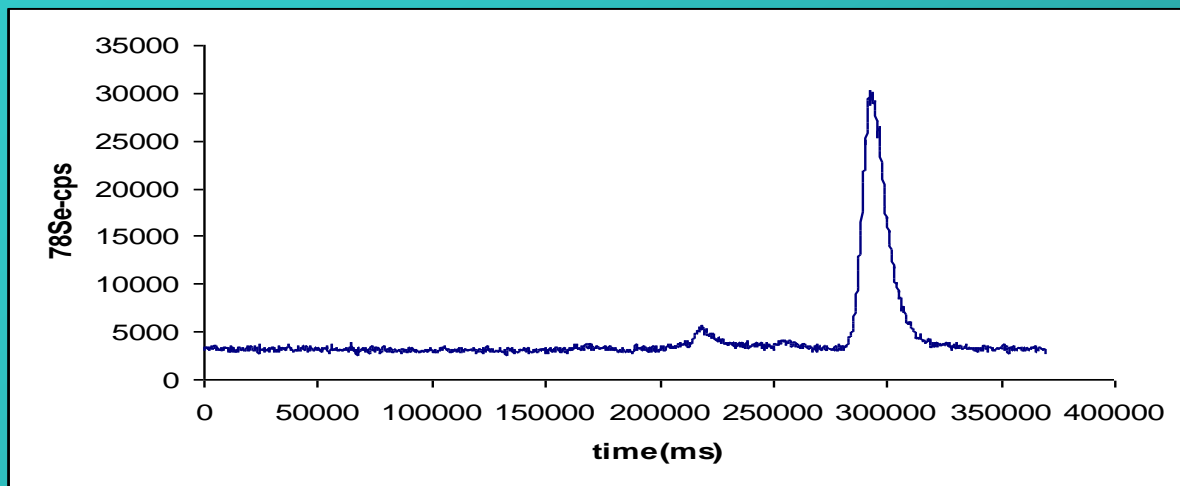
Μπακαλιάρος



ΕΝΖΥΜΑΤΙΚΗ ΧΩΝΕΥΣΗ ΔΥΟ ΣΤΑΔΙΩΝ

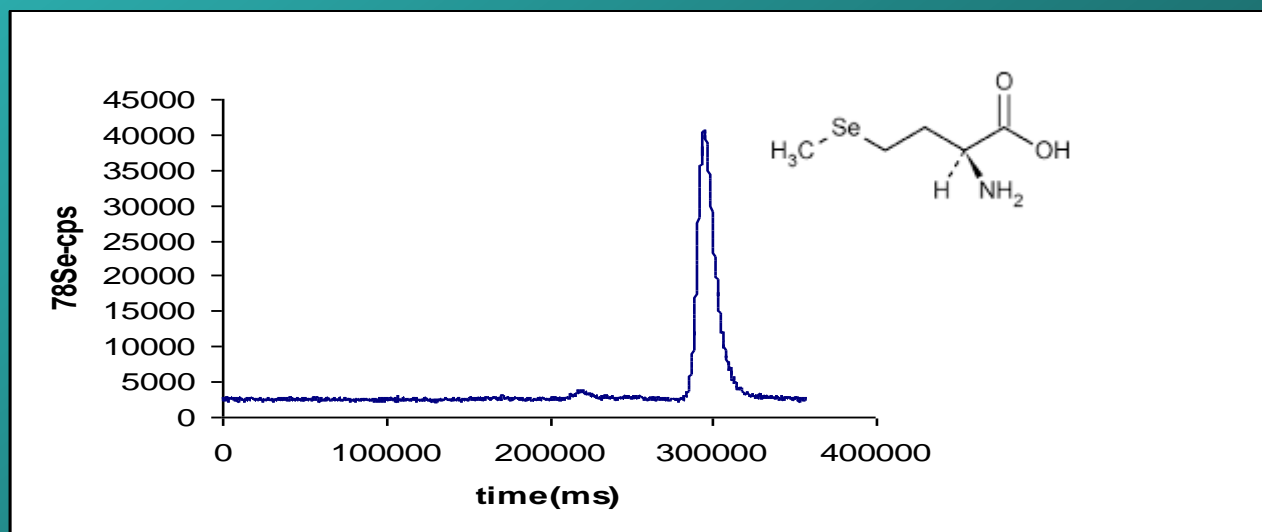
Κινητή φάση: $\text{CH}_3\text{COONH}_4 + 5\% \text{MeOH} - \text{pH } 7$

Μπακαλιάρος: 1,33 $\mu\text{g Se/g}$



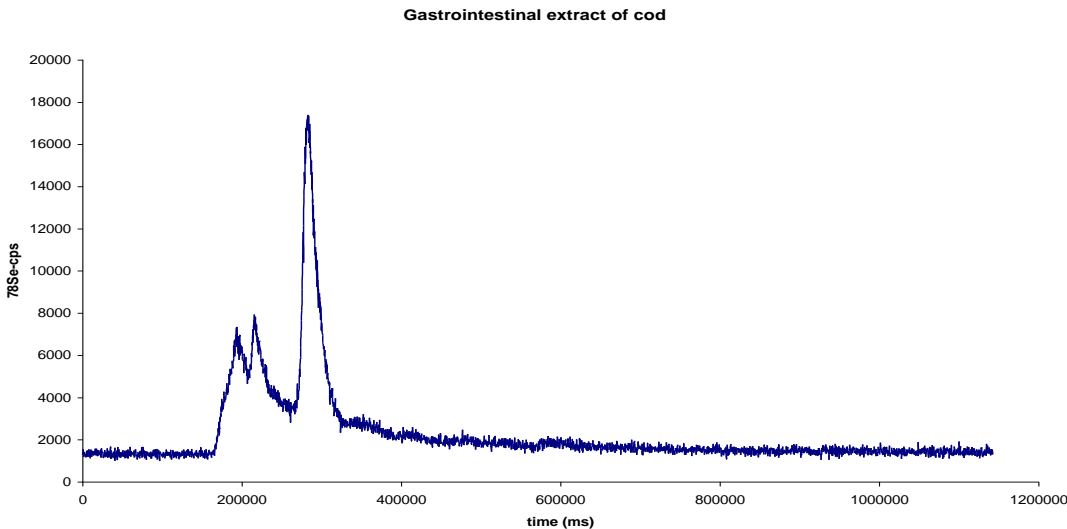
Χρωματογράφημα εκχυλίσματος του δείγματος μπακαλιάρου, από ενζυματική χώνευση (Pronase E) 2 σταδίων

Χρωματογράφημα εμβολιασμού (εκχύλισμα μπακαλιάρου από ενζυματική χώνευση 2 σταδίων + 50ppb SeMet)



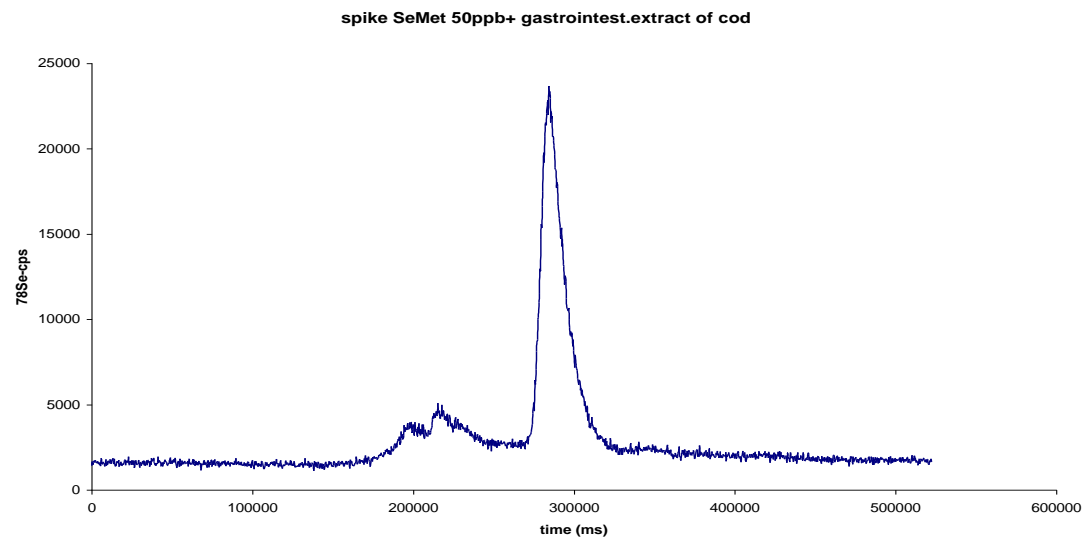
ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΗ ΧΩΝΕΥΣΗ

Κινητή φάση: $\text{CH}_3\text{COONH}_4 + 5\% \text{MeOH} - \text{pH } 7$
Μπακαλιάρος

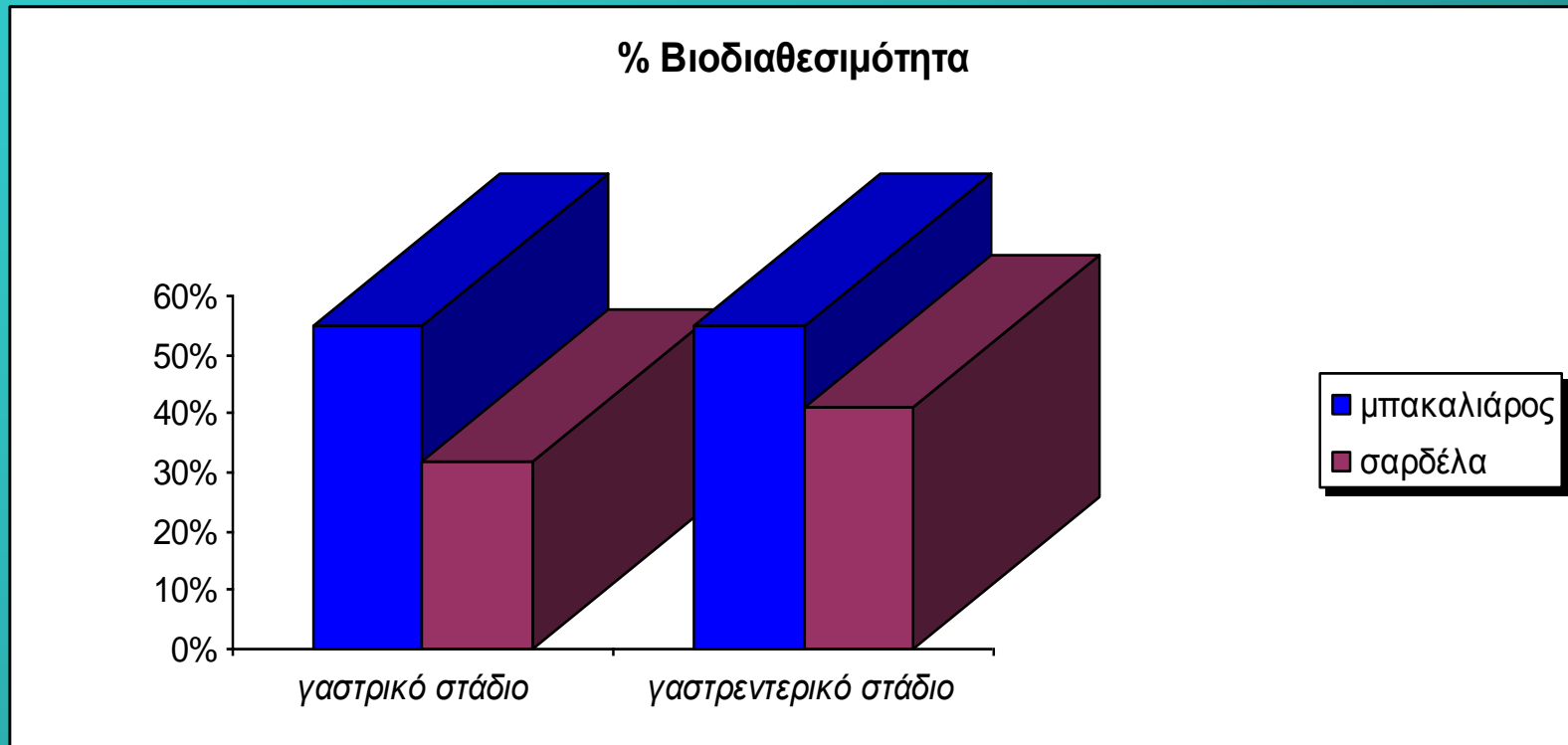


Χρωματογράφημα εκχυλίσματος του δείγματος μπακαλιάρου από γαστρεντερική χώνευση

Χρωματογράφημα εμβολιασμού (εκχύλισμα μπακαλιάρου από γαστρεντερική χώνευση + 50ppb SeMet)



% Βιοδιαθεσιμότητα



Βιοδιαθεσιμότητα Se από το μπακαλιάρo : 54%

Βιοδιαθεσιμότητα Se από τη σαρδέλα : 41%

Συμπεράσματα

- ❖ Υψηλή περιεκτικότητα πρωτεϊνών στη τροφή
→ Υψηλή συγκέντρωση Se
- ❖ Συνιστώμενη Ημερήσια Πρόσληψη Se - 55 μg / ημέρα
→ Ημερήσια Πρόσληψη Se για τον Έλληνα 34,3 μg / ημέρα (DAFNE)
- ❖ Ημερήσια πρόσληψη Se (εστιατόριο πανεπιστημίου)
19,9 μg Se / ημέρα – 177,0 μg Se / ημέρα.
- ❖ Ενζυματική Χώνευση 2 σταδίων → καλύτερη απόδοση της εκχύλισης (SeMet)
- ❖ Γαστρεντερική Χώνευση → % Βιοδιαθεσιμότητα Se (μπακαλιάρος 54%, σαρδέλα 41%)

Why are we interested in Se in biological systems?

Se essential micronutrient

- active site of glutathione peroxidase (GSH)
- Keshan disease (endemic cardiomyopathy)

Its essentiality is only over a very narrow concentration range, outside of which it is toxic.

Se protective roles against the development of cancer.

→ Assess Se status in man

Improved analytical methods for accurate quantification of Se in individual human serum proteins

Table 1. Selenocysteine-Containing Proteins in Mammals

Selenoproteins	Functions	Location
Glutathione peroxidase		
Cellular glutathione peroxidase (cGPx or GPX1)	Removal of hydroperoxides	Ubiquitous
Gastrointestinal glutathione peroxidase (GPx-GI or GPX2)	Removal of hydroperoxides	Gastrointestinal tracts
Extracellular glutathione peroxidase (eGPx or GPX3)	Removal of hydroperoxides	Plasma
Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx or GPX4)	Removal of phospholipid hydroperoxides	Ubiquitous, testis
5' Triiodothyronine deiodinase (5'-DI)		
Type 1 5'-DI	Conversion of T4 to T3, T4 to rT3	Thyroid gland, liver, kidney
Type 2 5'-DI	Conversion of T4 to T3	Pituitary gland, CNS, brown adipose tissue
Type 3 5'-DI	Conversion of T4 to rT3	Placenta
Thioredoxin reductase (TrxR)		
TRxR1	Reduction of thioredoxin	Ubiquitous (cytosol)
TRxR2	Reduction of thioredoxin	Ubiquitous (mitochondria)
TRxR3	?	Testis
Selenoprotein P	Antioxidant ? Se carrier ?	Plasma
Selenoprotein W	?	Ubiquitous, muscle
Selenophosphate synthetase 2 (SPS2)	Synthesis of selenophosphate (?)	Ubiquitous
15-kDa selenoprotein	?	Ubiquitous
SeIT	?	?
SeIR/SeIX	?	?
SeIN	?	?

GPx

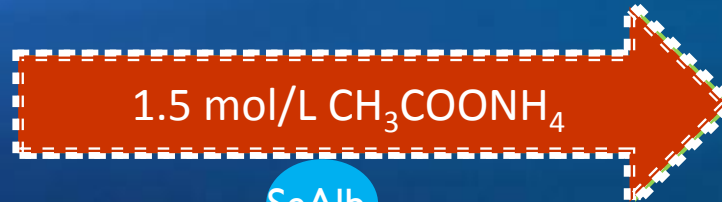
SeIP

dcAF – LC – meID – ICP-QMS

0 – 5 min

10 min

15 – 20 min



SeAlb

BLUE-HP



SeIP

HEP-HP



Knotted
Reactor

GPx

Peristaltic
pump

4.2 % MeOH

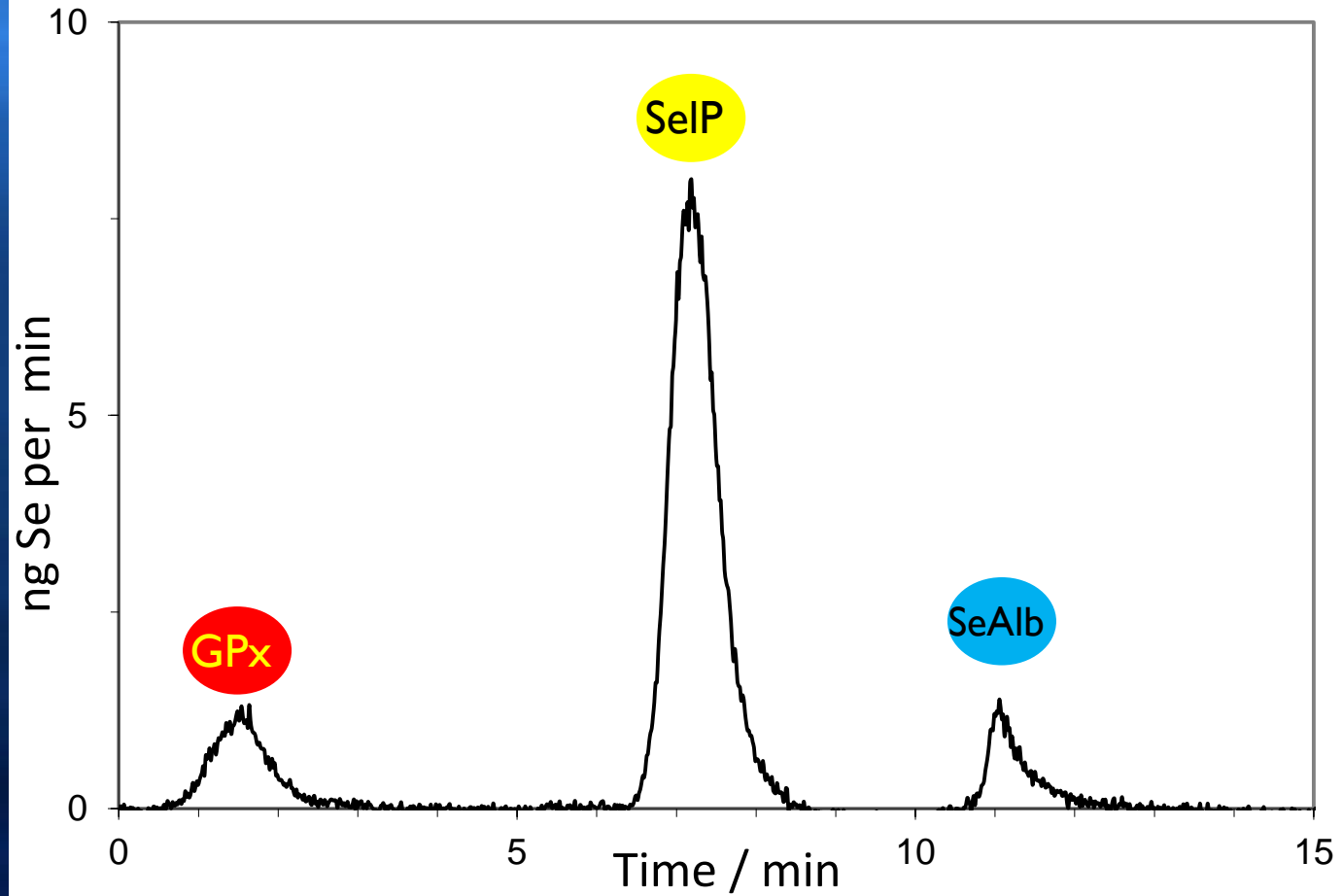


Enriched ⁷⁷Se
in 25% MeOH



ICP-QMS

dcAF – LC – meID – ICP-QMS



Se species content in BCR human serum reference materials as reported in this work and the literature.

Serum Sample	Method used	Number of samples	GPx + non-retained Se species	SeIP	SeAlb	Sum (GPx+ SeIP+ SeAlb)	Certified Total (ng Se mL ⁻¹)
Reported in:							
BCR 637							81 ± 7
This work	dcAF-LC-[ON-meID]-ICP-QMS	27	16 ± 3	52 ± 5	8.9 ± 2.5	77 ± 9	
ref. 17	AE-dcAF-LC-[ON-ID]-ICP-QMS	3	13 ± 1	65 ± 5	14 ± 1	92 ± 5	
ref. 17	AE-dcAF-LC-[ON-EC]-ICP-QMS	3	13 ± 1	59 ± 2	16 ± 1	88 ± 1	
ref. 17	AE-dcAF-LC-[OFF-EC]-ICP-SFMS	3	10 ± 1	57 ± 2	7 ± 1	74 ± 2	
ref. 18	AE-SPE- dcAF-LC-[ON-EC]-ICP-QMS	3	9.9 ± 0.1	51 ± 1	18 ± 3	79 ± 3	
ref. 18	dcAF-LC-[ON-EC]-ICP-QMS	3	30.4 ± 0.3	57 ± 1	24 ± 0.4	111 ± 1	

Abbreviations:

dcAF: double column affinity chromatography

AE: anion exchange chromatography

ON-ID: on-line isotope dilution

ON-meID: on-line methanol enhanced isotope dilution

OFF-EC: Off-line external calibration

ON-EC: on-line external calibration

AE-SPE: anion exchange solid phase extraction

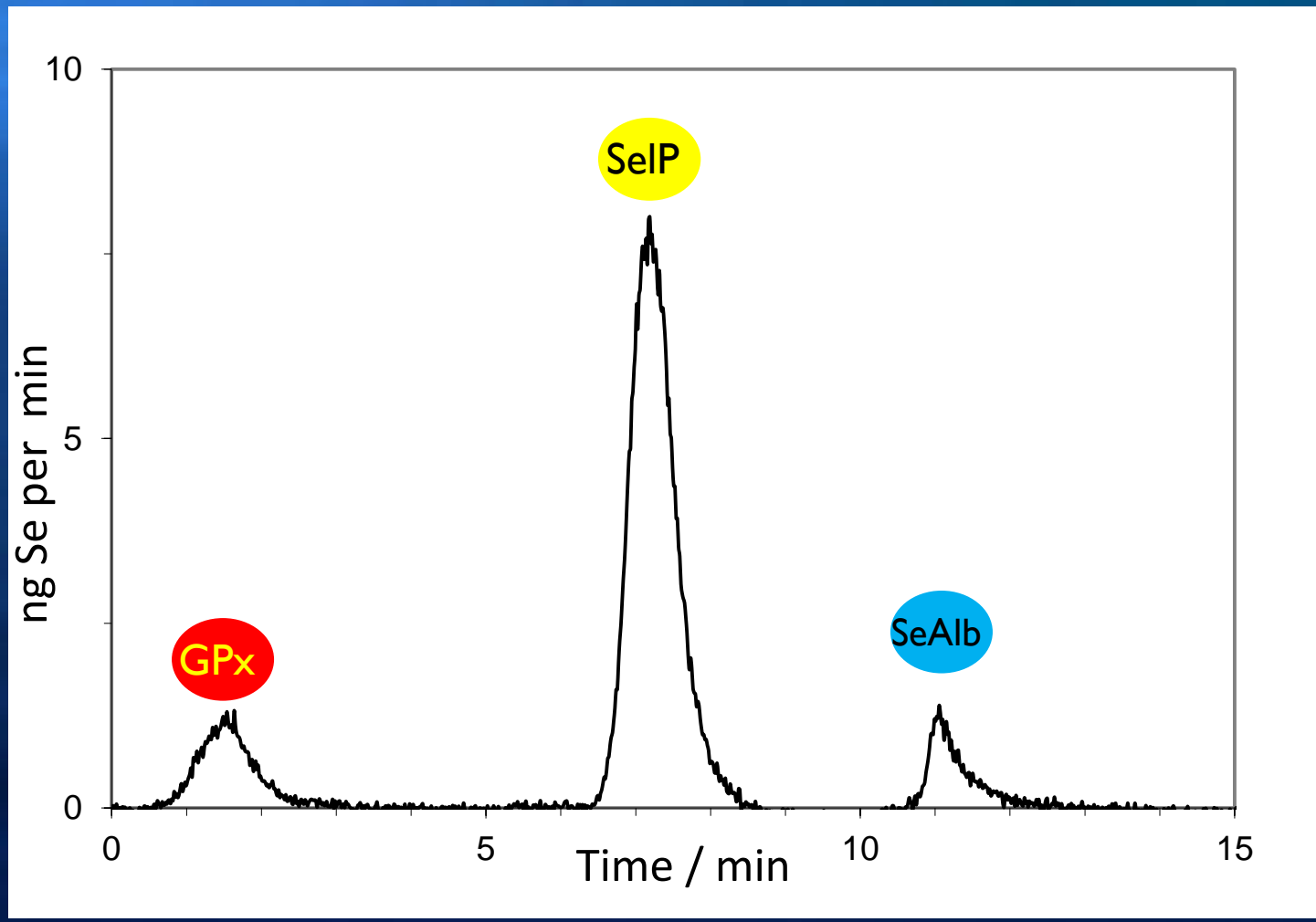
ICP-QMS: ICP quadrupole mass spectrometry

ICP-SFMS: ICP sector field mass spectrometry

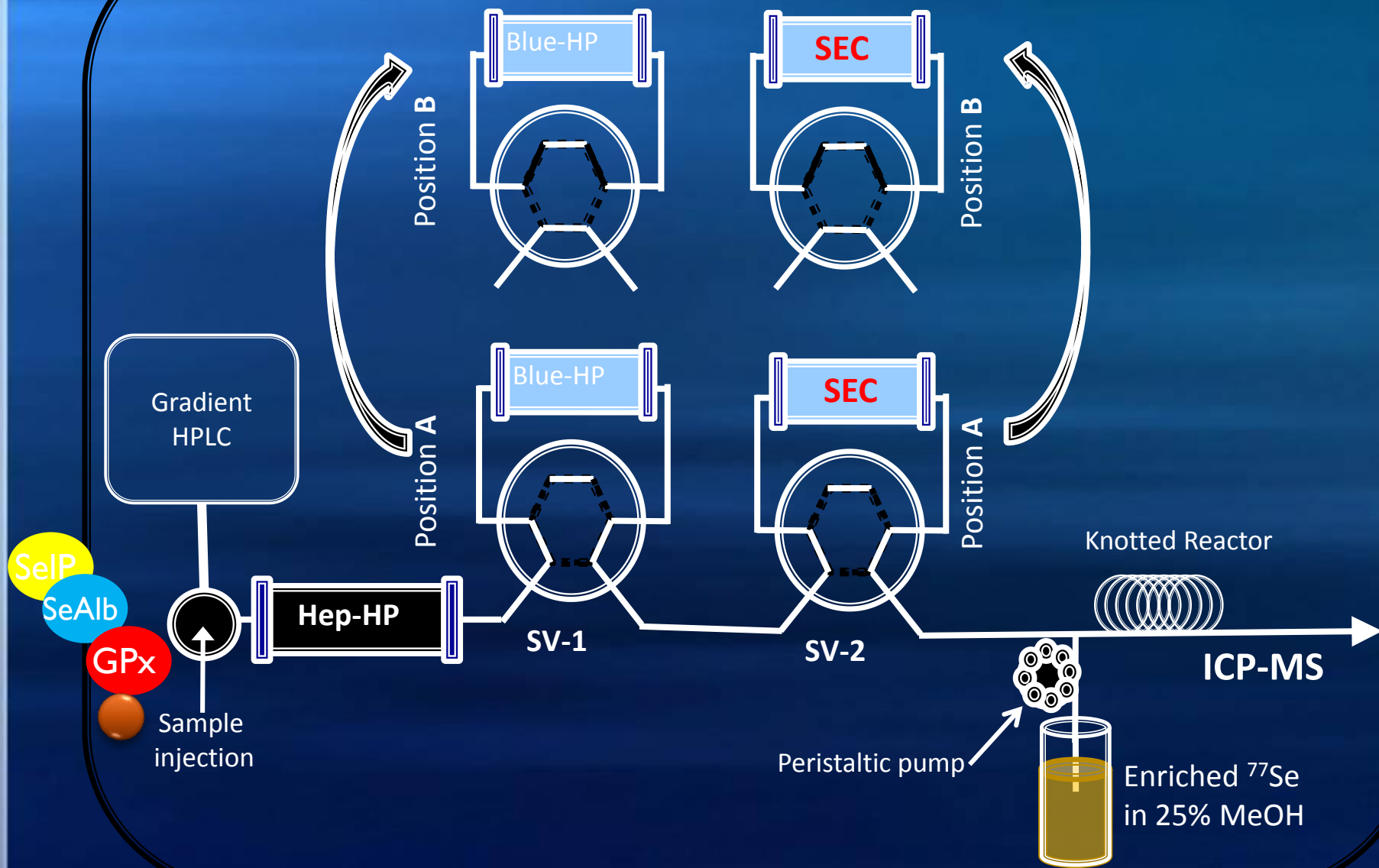
References

[17] Jitaru, P., Cozzi, G., Gambaro, A., Cescon, P., *et al.*, *Anal. Bioanal. Chem.* 2008, 391, 661-669.

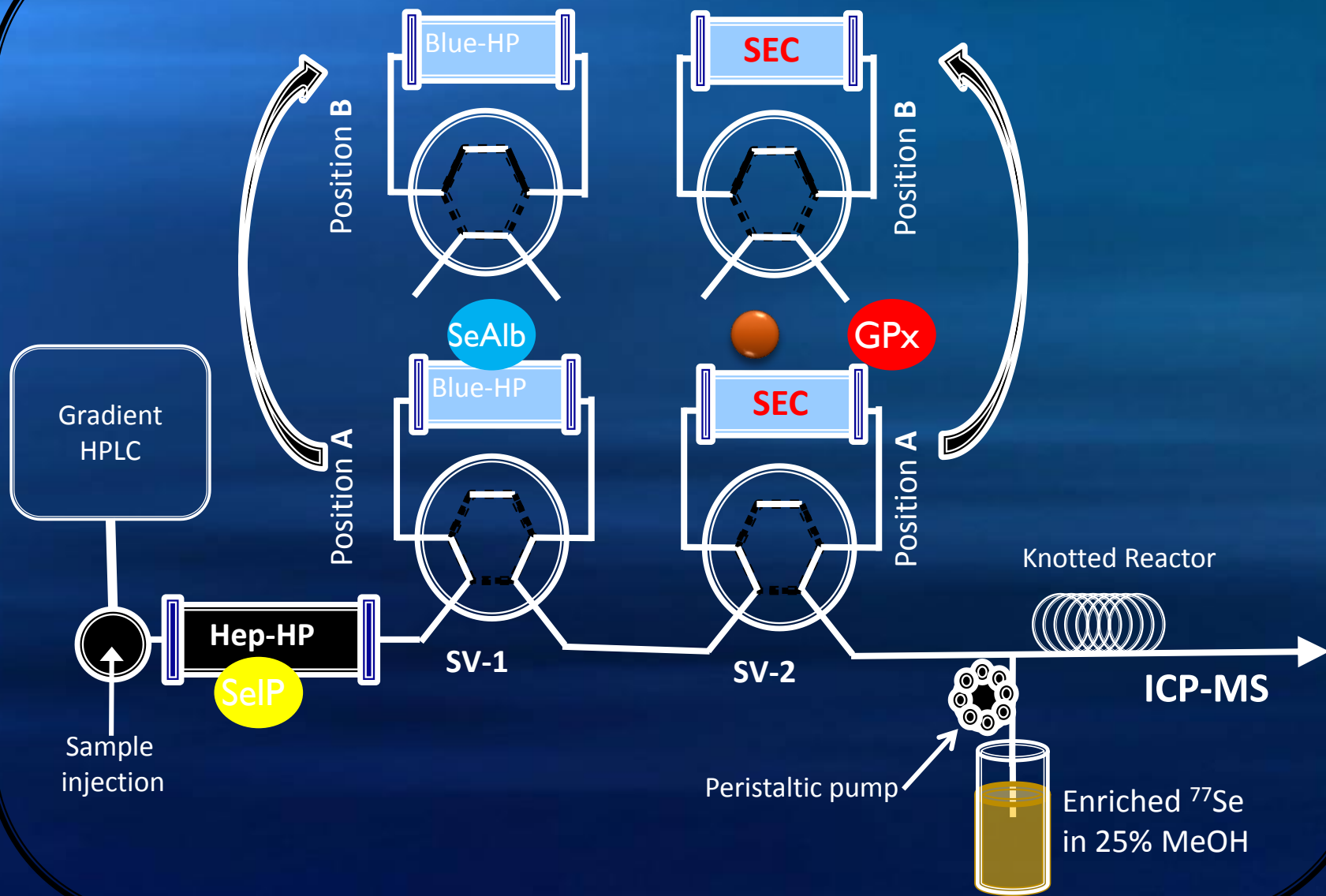
[18] Jitaru, P., Prete, M., Cozzi, G., Turetta, C., *et al.*, *J. Anal. At. Spectrom.* 2008, 23, 402-406.

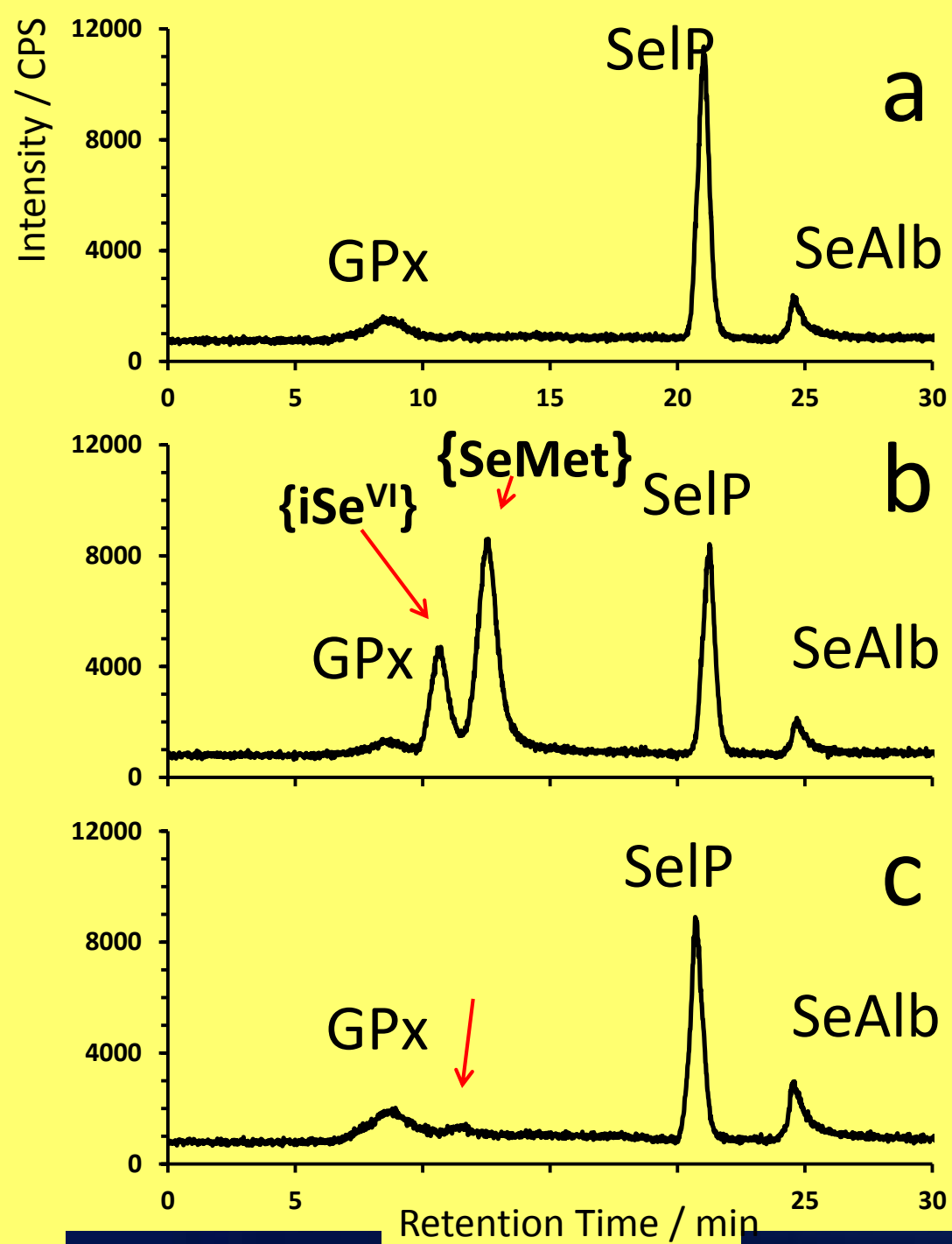


dcAF-SEC-ON-ID-ICP-MS



dcAF-SEC-ON-ID-ICP-MS

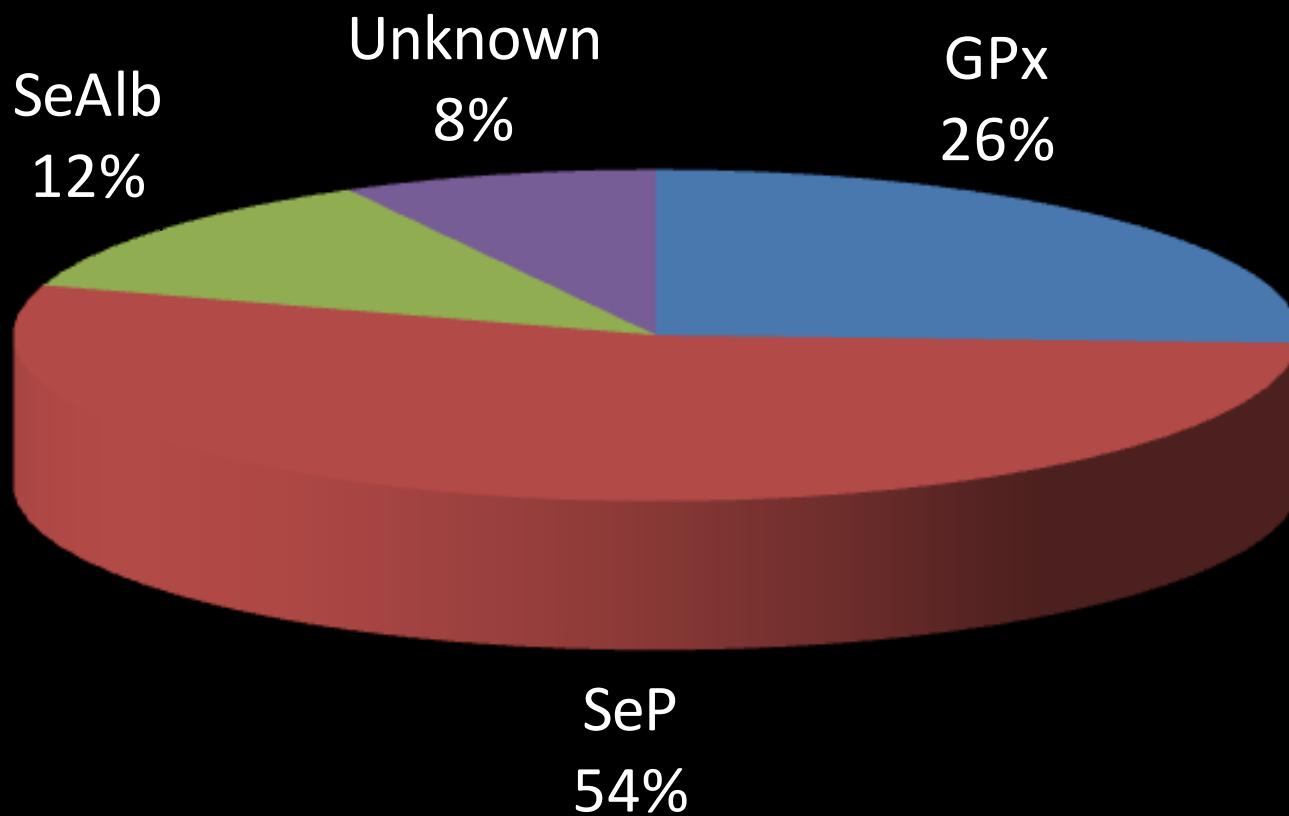




Average Se levels in Selenoproteins and Se-containing proteins along with some average anthropometric values by gender.

	All Participants (n=399)	Females (n=161)	Males (n=237)	P*
GPx (ng Se mL ⁻¹)	23 ± 10	23 ± 10	24 ± 10	0.413
SelP (ng Se mL ⁻¹)	49 ± 15	51 ± 14	48 ± 16	0.027
SelAlb (ng Se mL ⁻¹)	11 ± 4	11 ± 4	11 ± 5	0.979
Total Se (ng Se mL ⁻¹)	92 ± 34	94 ± 32	90 ± 35	0.259
Age (years)	40 ± 11	38 ± 12	40 ± 11	0.003
BMI	26 ± 5	24 ± 5	27 ± 4	<0.001

% Se distribution (n=399)



Conclusions

- High throughput, robust modified dcAF-LC-isotope dilution ICP-QMS,
- Use of reference materials for validation
- Baseline values for selenoproteins and Se-containing proteins in human serum samples taken from an apparently healthy Greek population (n=399),
- Such studies can potentially reveal links between disease and specific Se species and their levels.

Identification of an Sb(V)-citrate complex in juice stored in PET

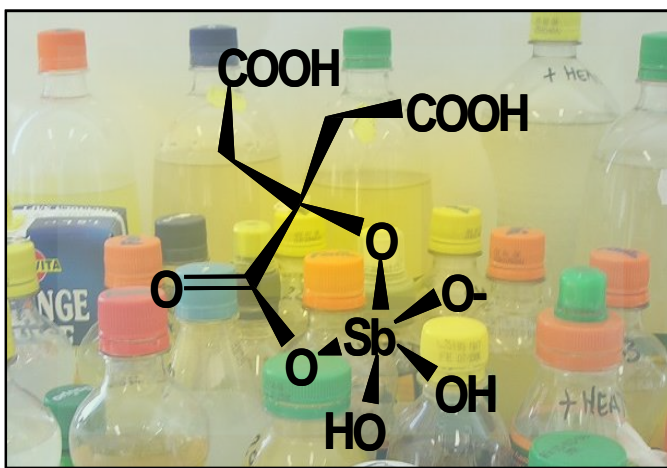
Chemical Technology



A complex issue

22 August 2006

Antimony leached from plastic bottles may form a novel citrate complex in citrus juices, which could affect its toxicity, report researchers in Greece.



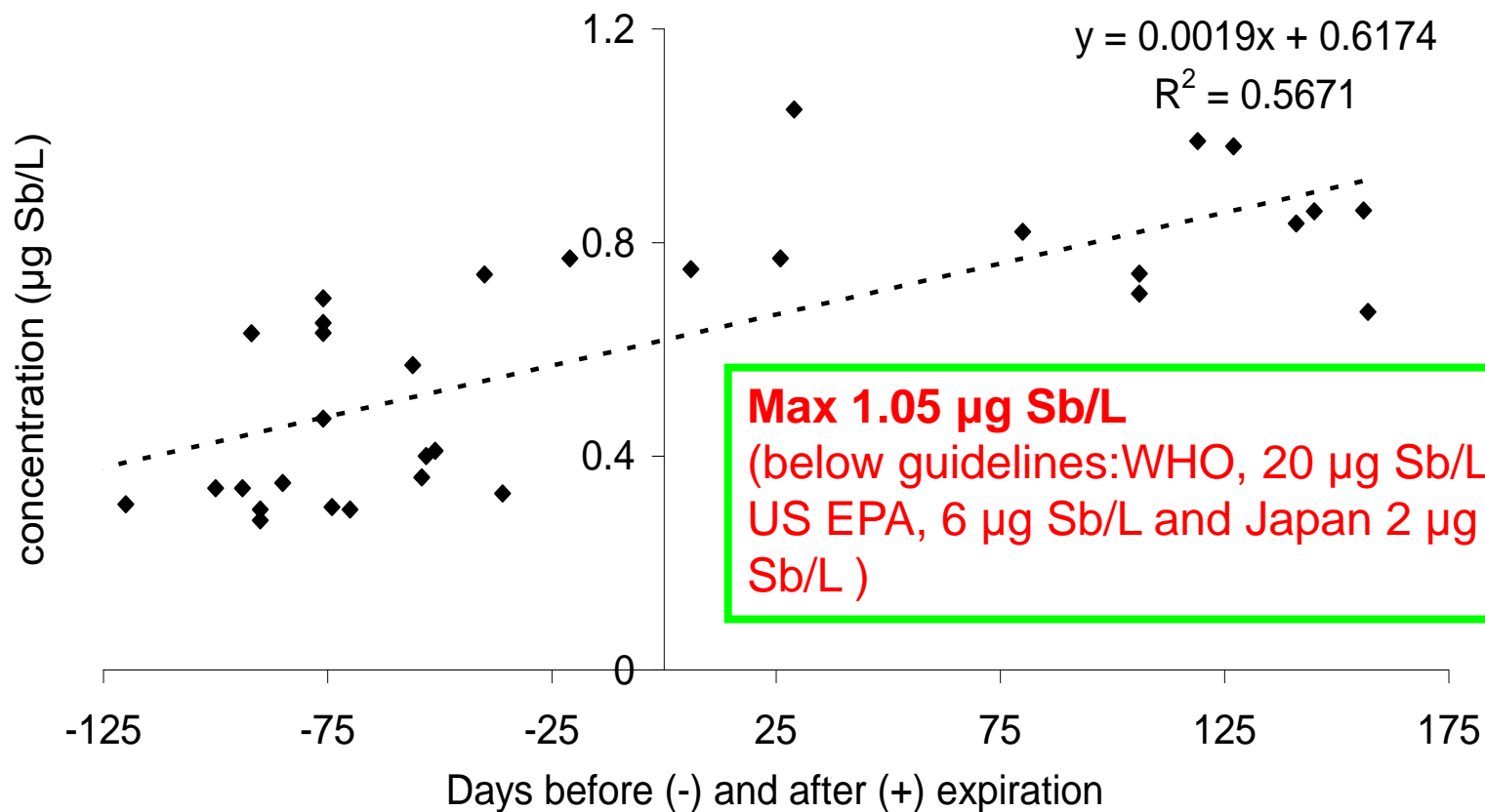
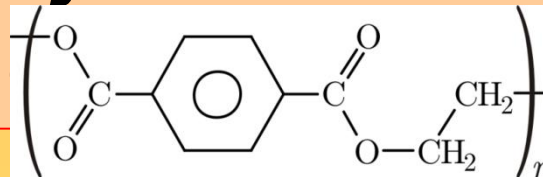


major issues

- ▶ Sb concentration **guidelines** recommended for Sb in drinking water:
 1. WHO; 20 μg Sb/L
 2. US EPA; 6 μg Sb/L
 3. Germany; 5 μg Sb/L
 4. Japan; 2 μg Sb/L
- ▶ Question were raised about the chemical form of Sb present in the water and other foods



Total Sb in juices stored in PET



Total Sb in juices in PET bottles shows correlation to the expiration date



Sb in PET bottled juices

QUESTIONS:

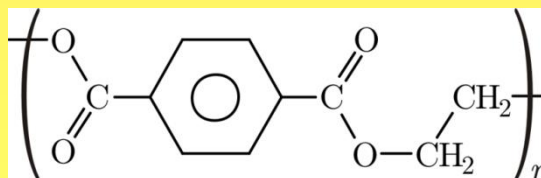
- 1) What are the Sb-concentrations in juices?
- 2) Which Sb-species are present in juices/water?



EXPERIMENTAL SET-UP:

Total Sb analysis and Sb speciation of water and carbonated or non-carbonated citrus fruit drinks contained in:

- 1) PET bottles
- 2) Glass bottles
- 3) Tetra packs



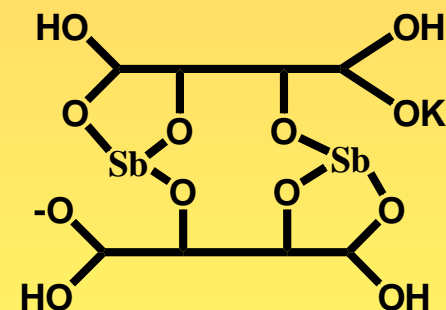


Speciation by HPLC-ICP-MS

Column: PRP-X100 column = anion exchange column

Standards:

1. **Sb(V)**: $[\text{Sb}(\text{OH})_6]^-$
2. **Sb(III)**: Sb(III)-tartrate (stable and soluble)
3. **Sb(V) + citric acid** → **Sb(V)-citrate**



Sb(III)-tartrate

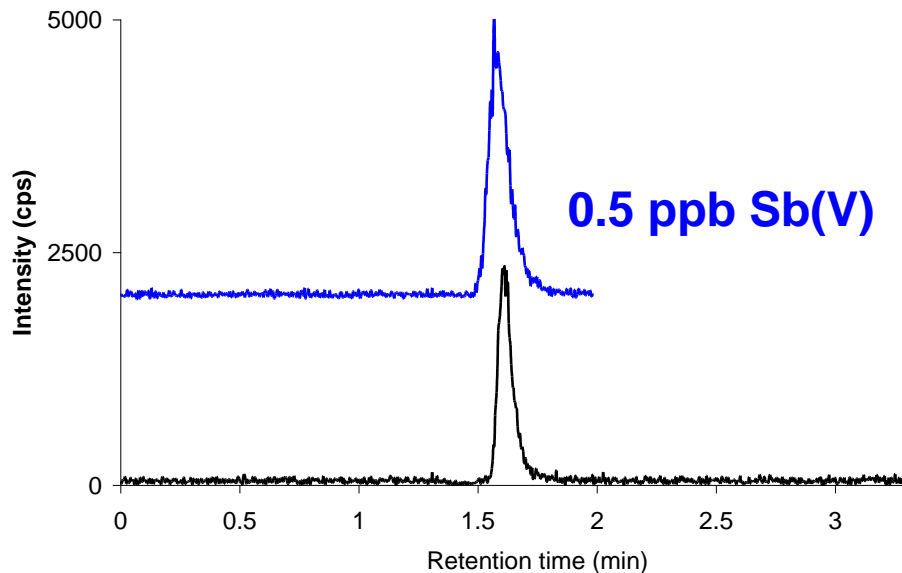
Mobile phase: 1.5 mL/min 20 mM EDTA + 2 mM phthalic acid, hence, complexing chemistry is involved



Sb speciation by HPLC-ICP-MS

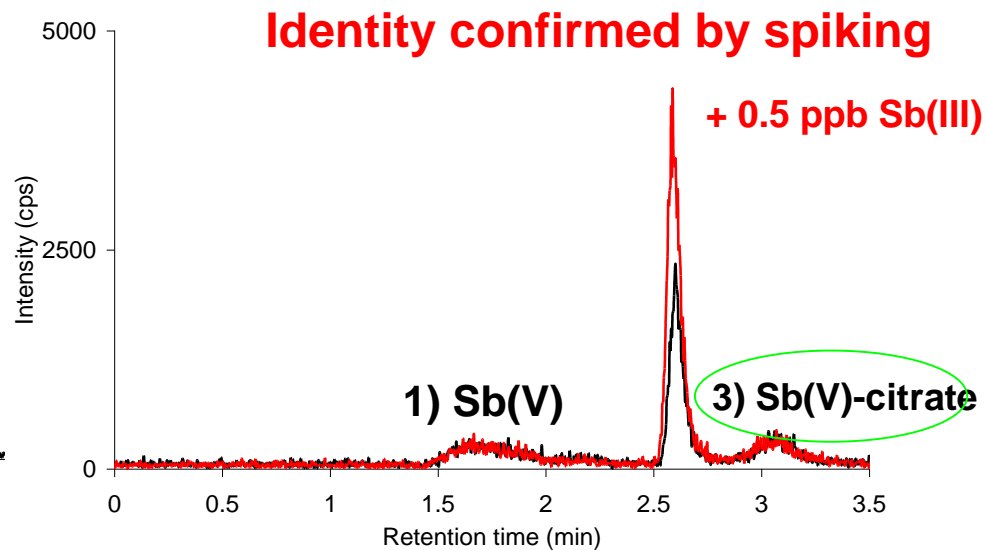
Identification by matching retention time between analyte and a standard

Water in PET



100% Sb(V)

Citrus fruit juices in PET

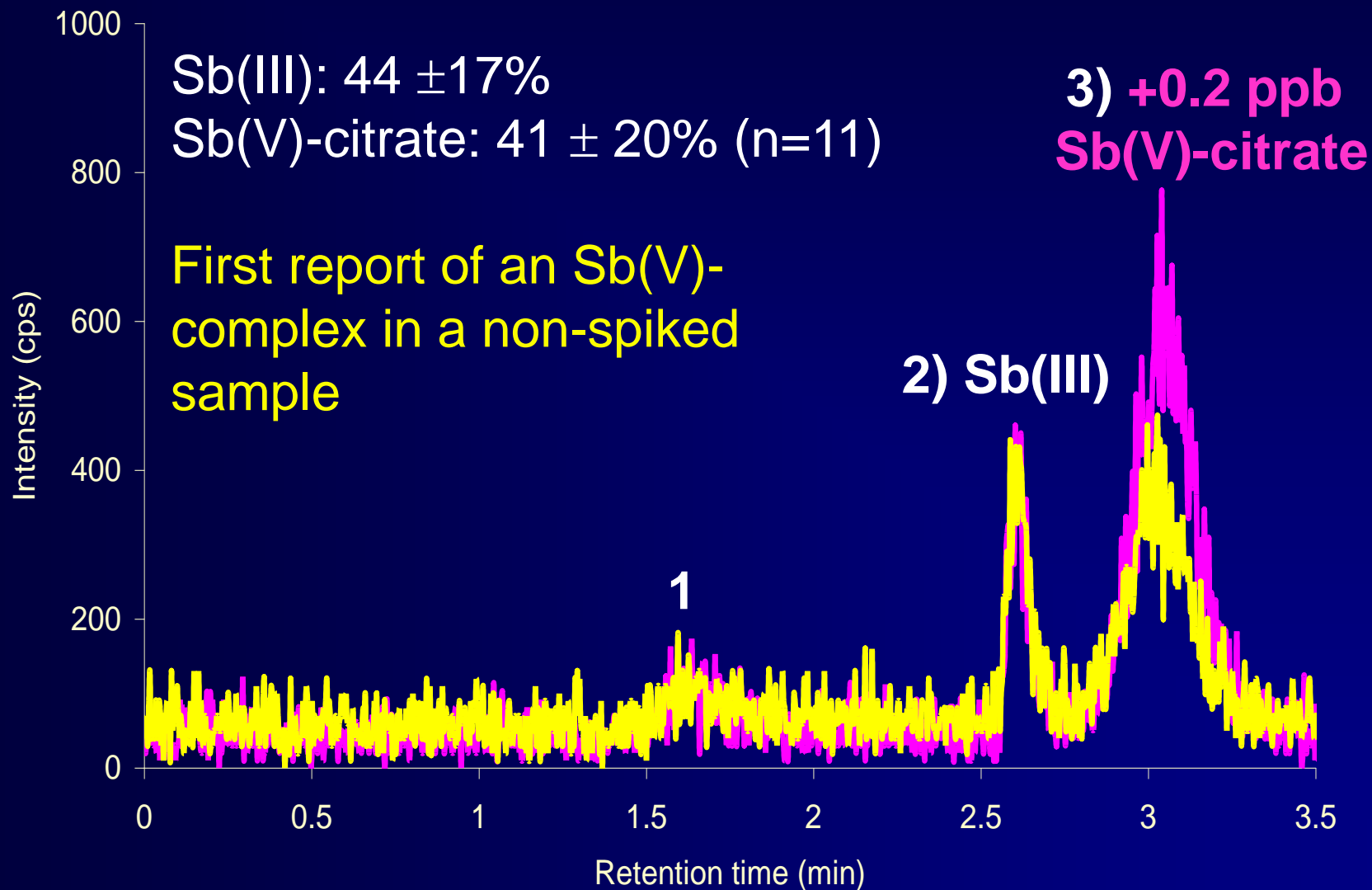


Sb(III): $44 \pm 17\%$ (n=11)

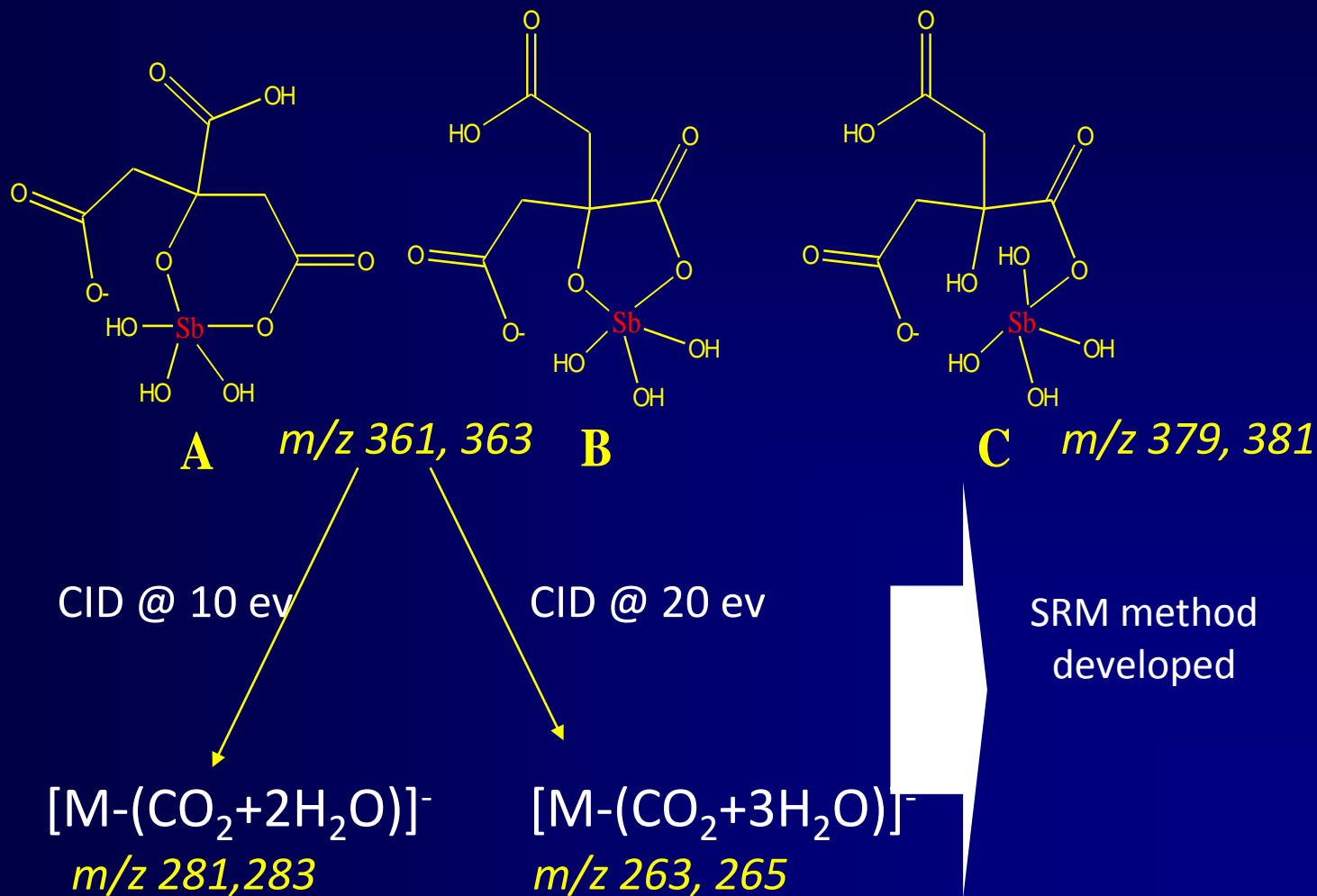
*Sb(V)-citrate: $41 \pm 20\%$ n=11)

* Hansen, H. R. and Pergantis, S. A. JAAS

Speciation of Sb in juices contained in PET bottles using AE-ICP-MS

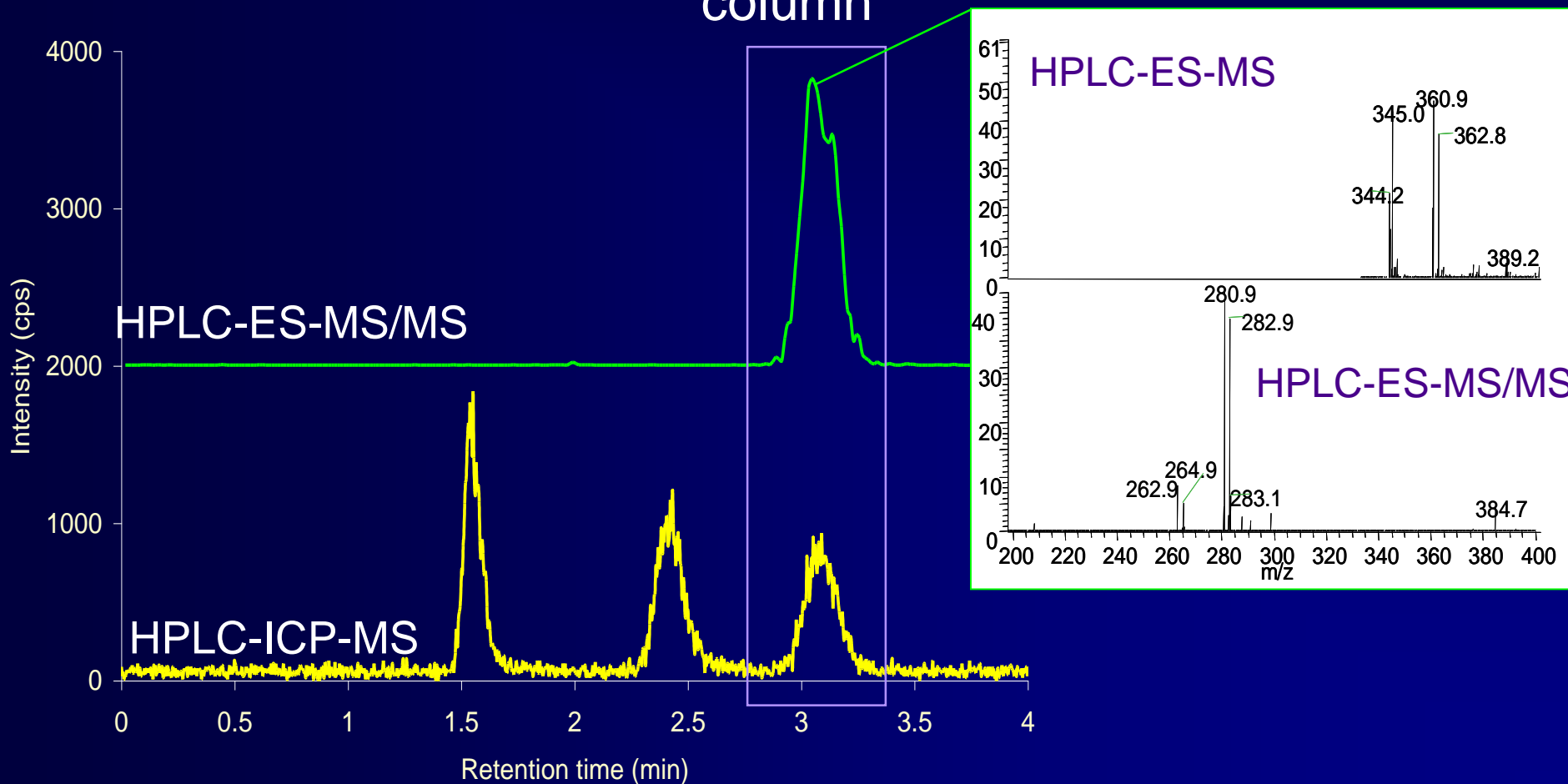


$K[Sb(OH)_6] + \text{Citric acid} \rightarrow \text{Sb(V)-citrate}$ by direct infusion ES-MS(/MS)



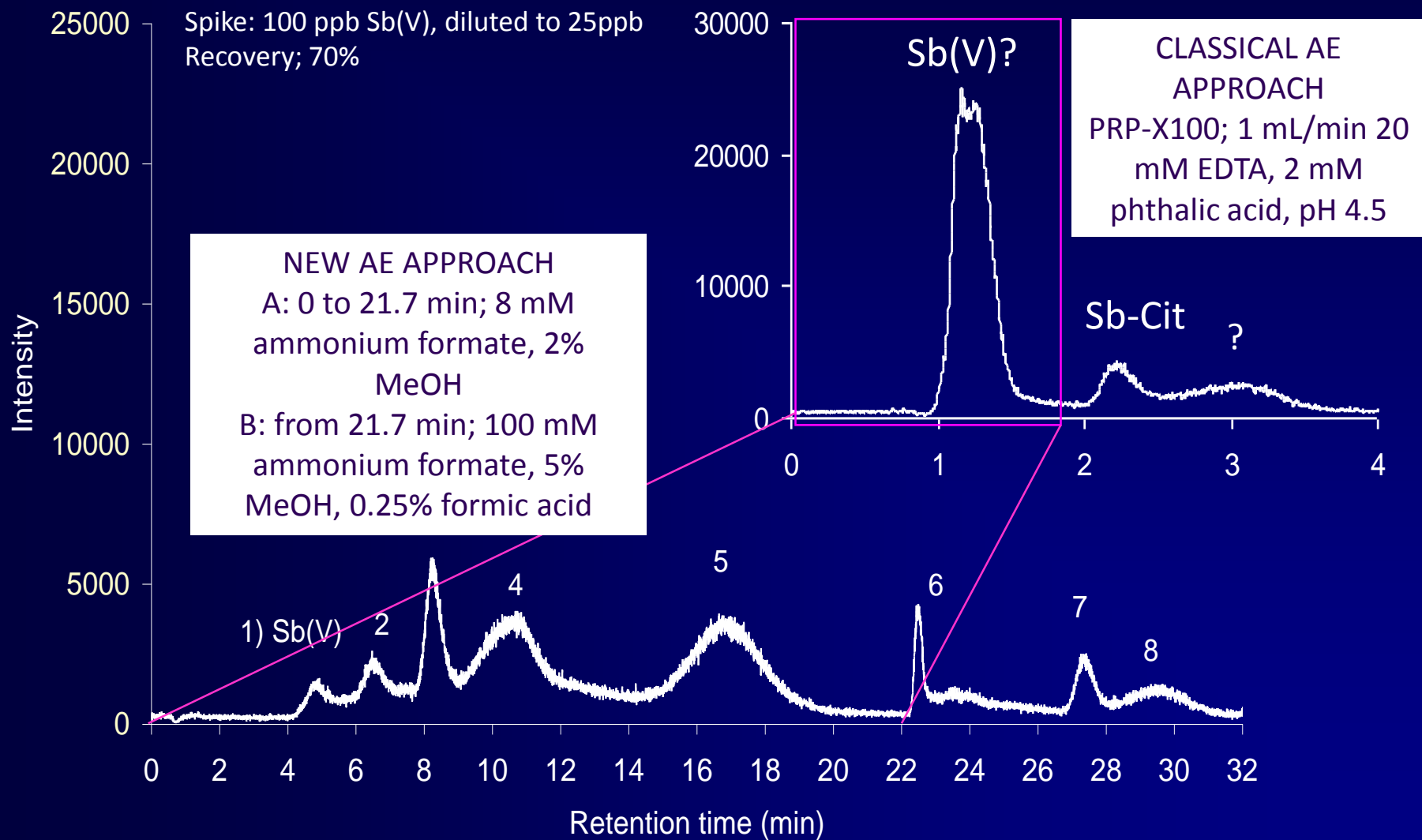
Analysis of the Sb(V)-Citrate standard using AE-ES-MS/MS (Mobile phase of EDTA, phthalic acid)

Confirming the identity of the Sb(V)-citrate complex on the column

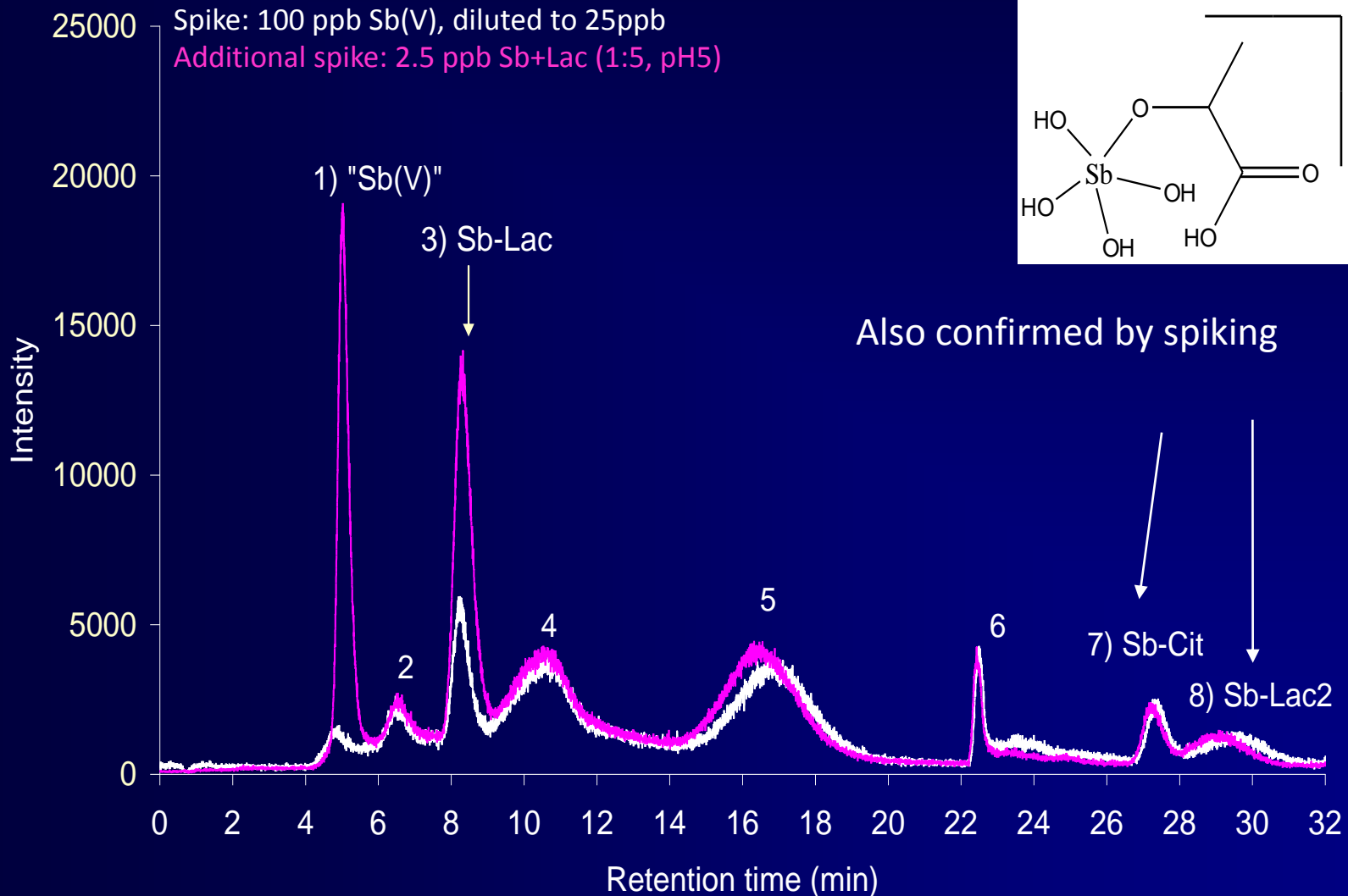


- Sb(V)-citrate is a major Sb-compound present in juices of citrus fruits stored in PET bottles
- Do Sb(V)-complexes form significantly in other matrices????

Sb-complexes in yoghurt spiked with Sb(V) (~1% lactic acid)?



Sb in yoghurt spiked with an Sb-Lac standard by AE-ICP-MS



Sb-species in yoghurt spiked with Sb(V) by AE-ES-MS(/MS)

Also confirmed by spiking

H. R. Hansen* and S. A. Pergantis, "Identification of Sb(V)-complexes in biological and food matrices and their stibine formation efficiency during hydride generation with ICP-MS detection" *Anal. Chem.* 2007, 79(14), 5304-5311

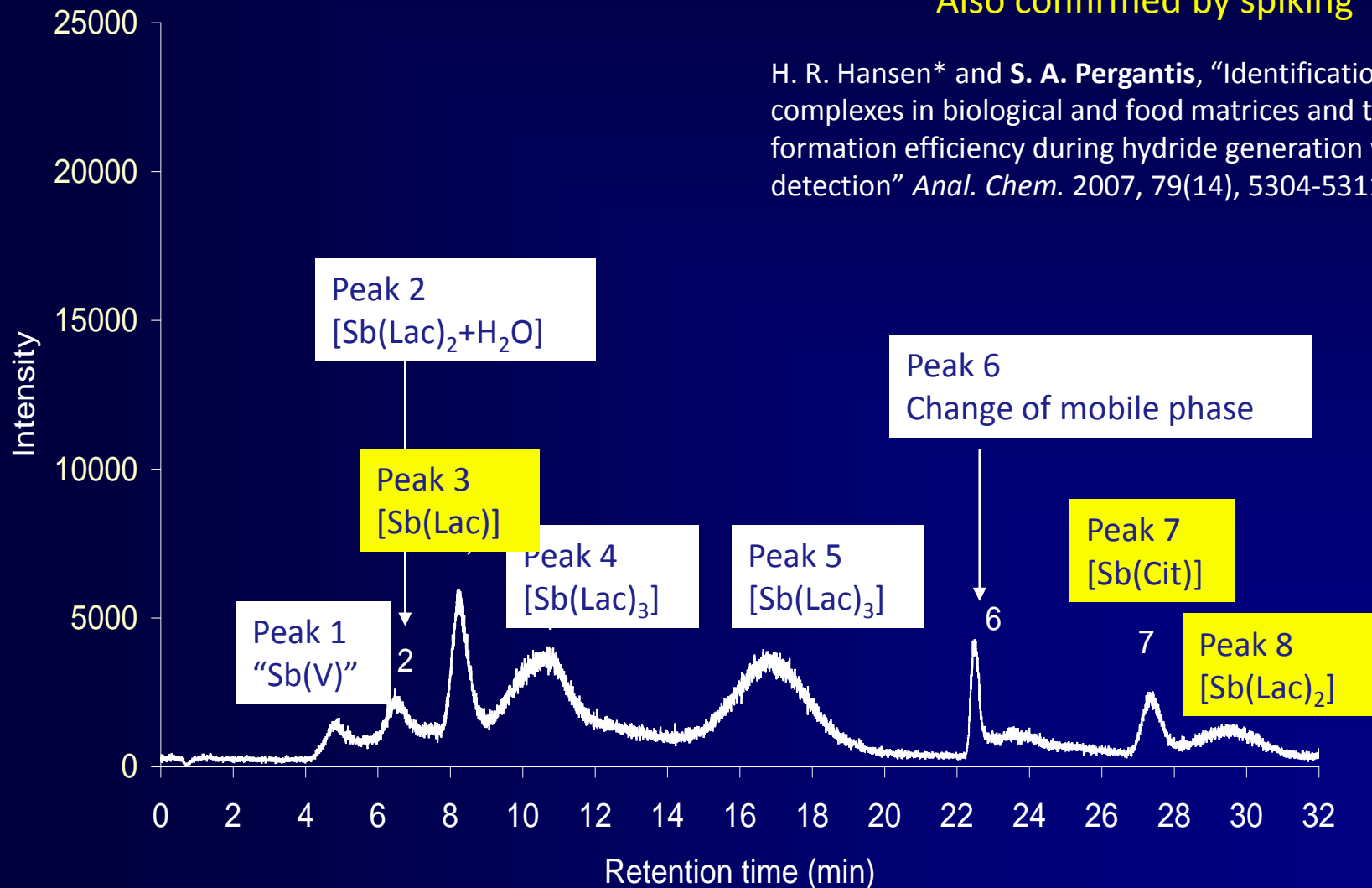
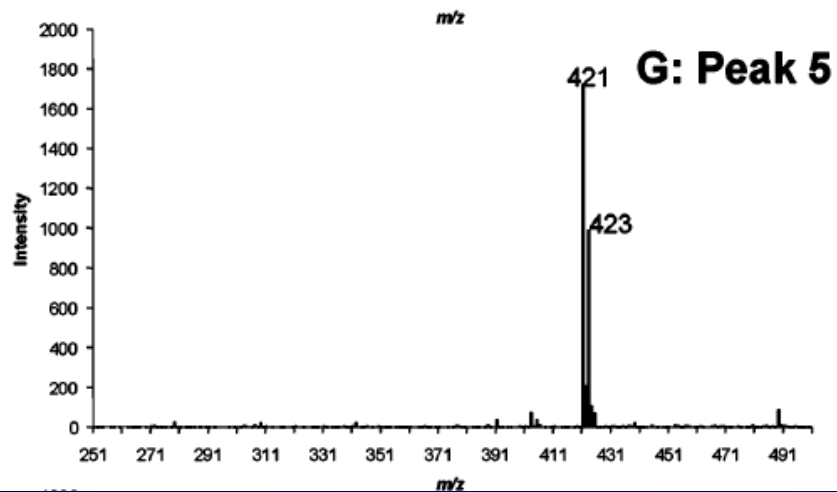
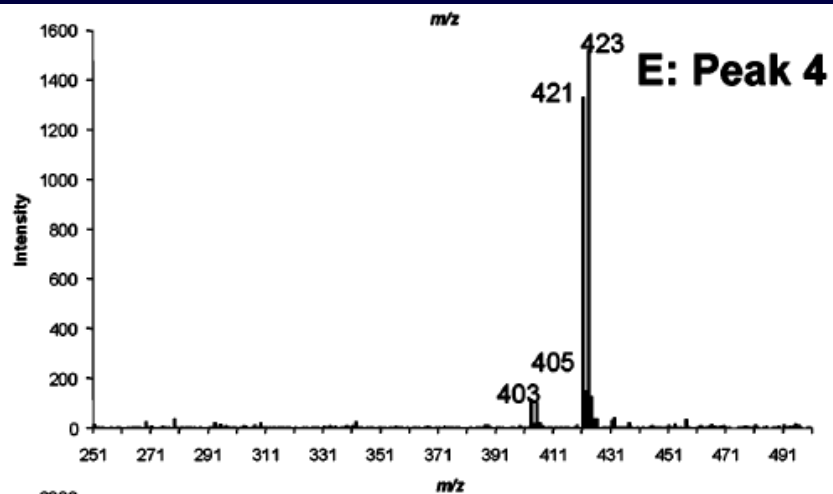
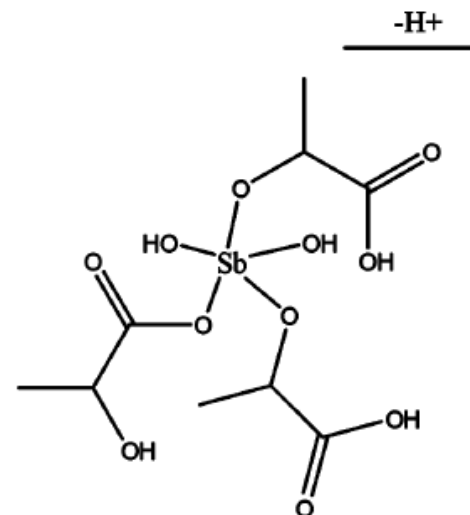


Table 2. Assignments of Prominent Ions Observed for Inorganic Sb(V) Spiked into Yoghurt, Citric Acid, Lactic Acid, and Their CID Product Ions Recorded Following HPLC-separation (Method B) of 10 mg of Sb/L and Analyzed by ES-MS and ES-MS/MS in Negative Ionization Mode

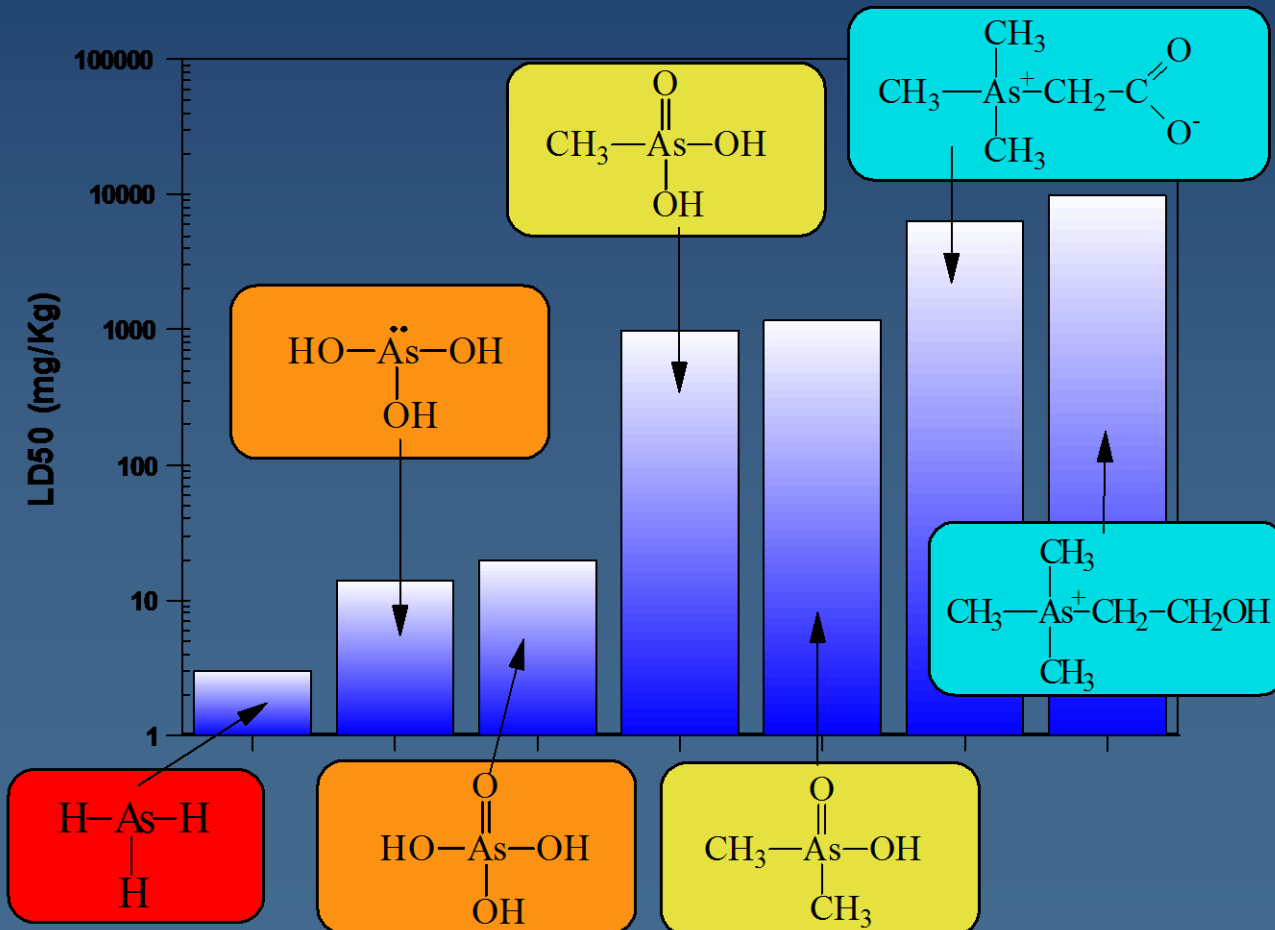
peak no. (min)	molecular ion (<i>m/z</i>)	interpretation	product ion (<i>m/z</i>) (eV)	assignment
Sb(V) in Yoghurt				
2 (5.3)	349–351	$[\text{Sb}(\text{OH})_3(\text{LacH})_2 - \text{H}]^-$	331–333 (10)	$[\text{M} - \text{H}_2\text{O}]^-$
3 (7.5)	259–261	$[\text{Sb}(\text{OH})_3(\text{Lac}) - \text{H}]^-$	241–243 (10)	$[\text{Sb}(\text{O})_2(\text{Lac})]^-$
	277–279	$[\text{Sb}(\text{OH})_4(\text{Lac})]^-$	153–155 (30)	$[\text{SbO}_2]^-$
4 (9.4)	421–423	$[\text{Sb}(\text{OH})_2(\text{LacH})_3 - \text{H}]^-$	403–405 (20)	$[\text{M} - \text{H}_2\text{O}]^-$
			313–315 (20)	$[\text{Sb}(\text{O})(\text{Lac})_2]^-$
			267–269 (20)	
			225–227 (30)	$[\text{Sb}(\text{O})(\text{Lac})]^-$
5 (13.0)	421–423	$[\text{Sb}(\text{OH})_2(\text{LacH})_3 - \text{H}]^-$	403–405 (20)	$[\text{M} - \text{H}_2\text{O}]^-$
			313–315 (20)	$[\text{Sb}(\text{O})(\text{Lac})_2]^-$
			267–269 (20)	
			225–227 (30)	$[\text{Sb}(\text{O})(\text{Lac})]^-$
7 (27.0)	361–363	$[\text{Sb}(\text{OH})_3(\text{CitH})]^-$	281–283 (10)	$[\text{Sb}(\text{OH})_5\text{OC}(\text{O})\text{CH}_2\text{OH}]^-$
			263–265 (30)	$[\text{Sb}(\text{OH})_4\text{OC}(\text{O})\text{CH}_2\text{O}]^-$
8 (29.0)	331–333	$[\text{Sb}(\text{OH})_2(\text{Lac})_2]^-$	313–315 (10)	$[\text{M} - \text{H}_2\text{O}]^-$
			225–227 (30)	$[\text{Sb}(\text{O})(\text{Lac})]^-$
Sb/Lactic Acid (1:10, pH 5)				
(8.0)	259–261	$[\text{Sb}(\text{OH})_3(\text{Lac}) - \text{H}]^-$	241–243 (10)	$[\text{Sb}(\text{O})_2(\text{Lac})]^-$
	277–279	$[\text{Sb}(\text{OH})_4(\text{Lac})]^-$	153–155 (30)	$[\text{SbO}_2]^-$
Sb/Citric Acid (1:5 Nonadjusted pH)				
(27.0)	361–363	$[\text{Sb}(\text{OH})_3(\text{CitH})]^-$	281–283 (10)	$[\text{Sb}(\text{OH})_5\text{OC}(\text{O})\text{CH}_2\text{OH}]^-$
			263–265 (30)	$[\text{Sb}(\text{OH})_4\text{OC}(\text{O})\text{CH}_2\text{O}]^-$
Sb/Lactic Acid (1:10, pH 3)				
(29.0)	331–333	$[\text{Sb}(\text{OH})_2(\text{Lac})_2]^-$	313–315 (10)	$[\text{M} - \text{H}_2\text{O}]^-$
	(313–315)		225–227 (30)	$[\text{Sb}(\text{O})(\text{Lac})]^-$



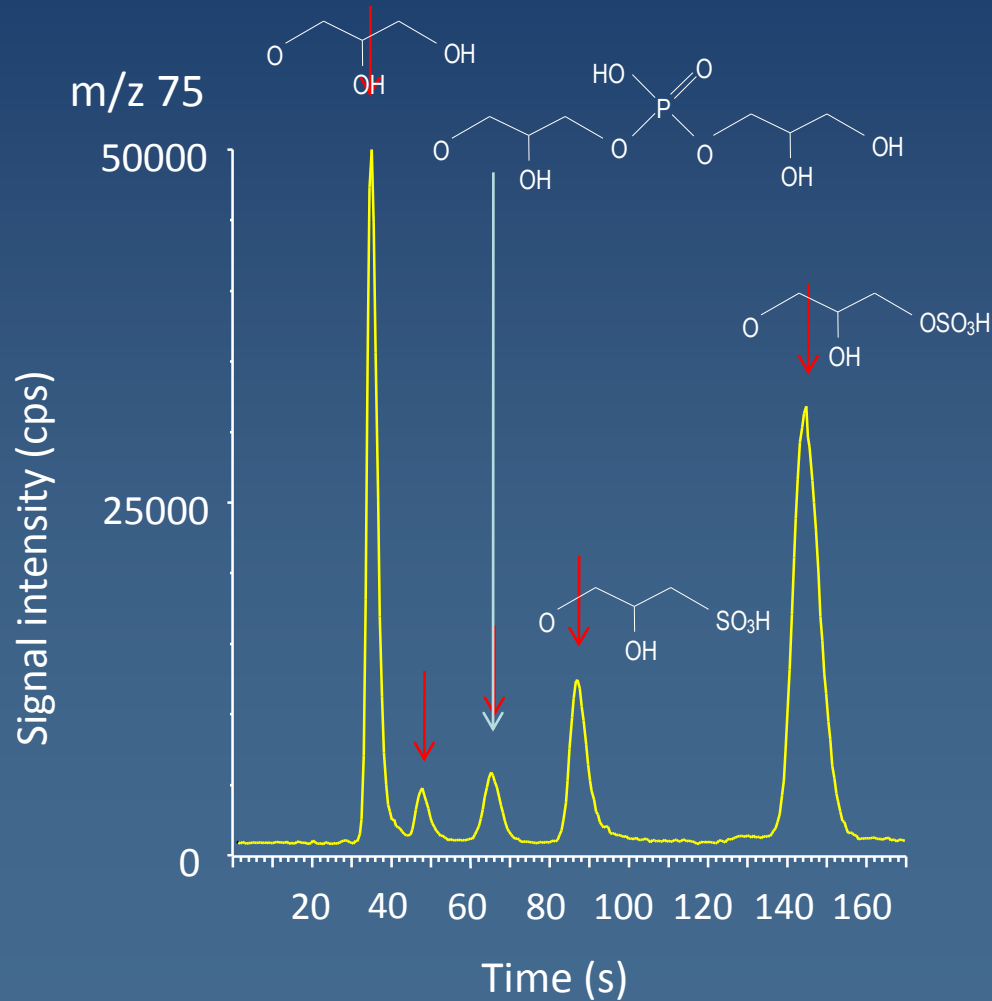
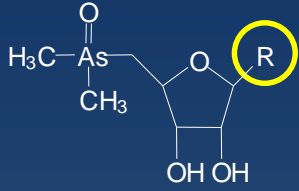
F: Suggested structure peak 4,5



Elemental Speciation Analysis: Determination of all individual physicochemical forms of an element in a sample.



Ion pairing reversed phase HPLC - ICP-MS chromatogram of kelp powder extract



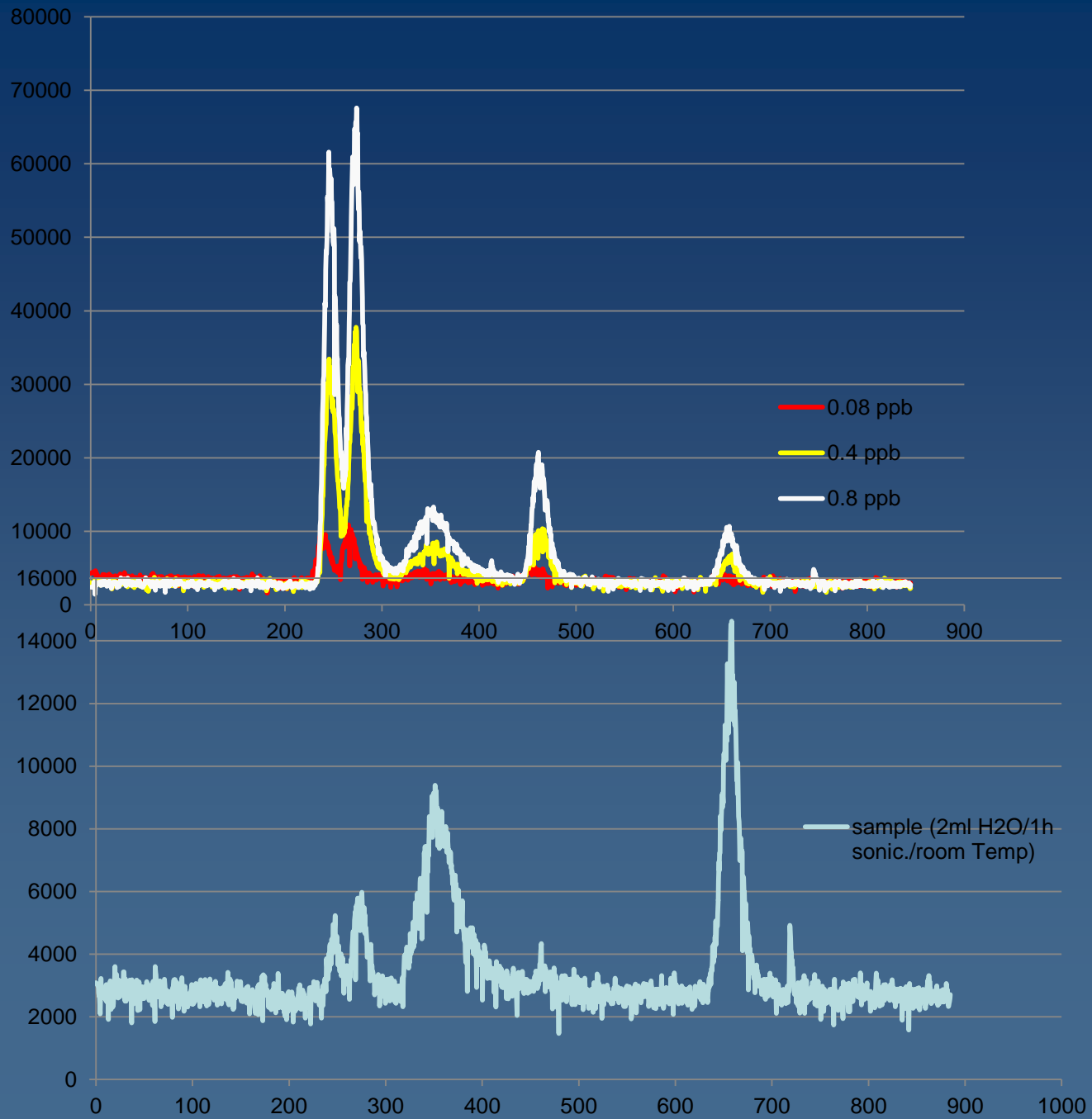
Trace Elemental Speciation using HPLC-ICP-MS

Advantages of HPLC-ICP-MS

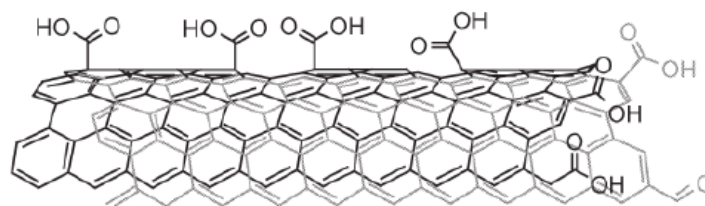
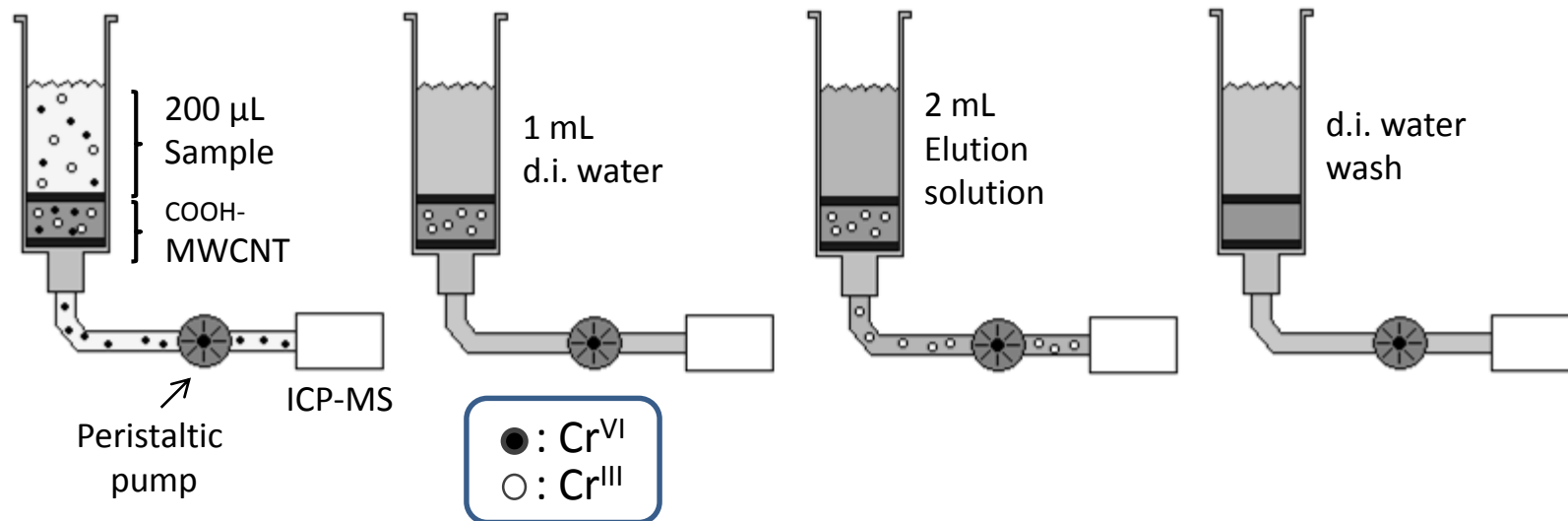
- Excellent limits of detection (ppb or ppt)
- Almost no interferences
- Accurate Quantification

Disadvantages of HPLC-ICP-MS

- Standards required
- Increased uncertainty of identification based on retention times
- Unable to characterize unknown species

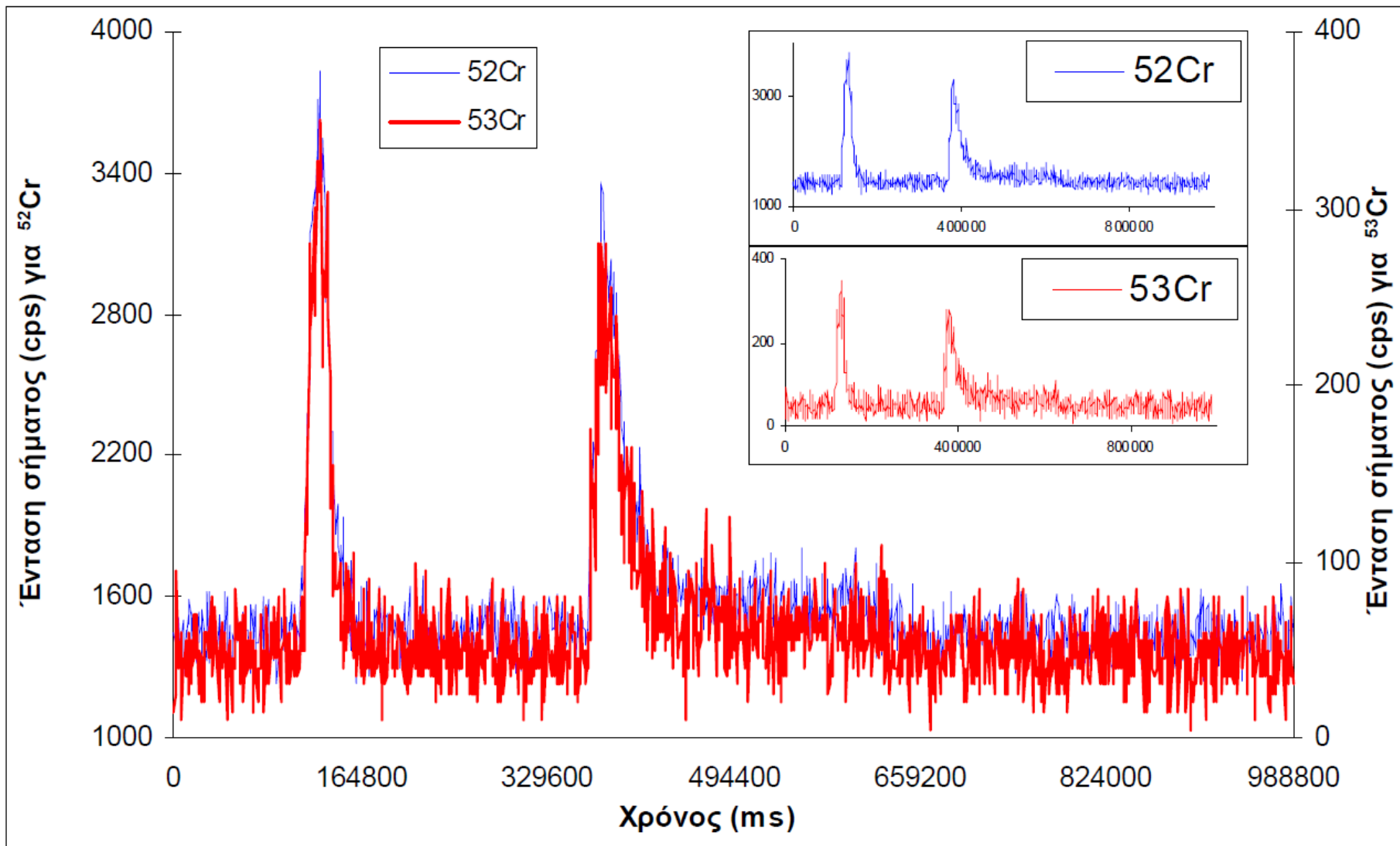


CrVI and CrIII Speciation Analysis

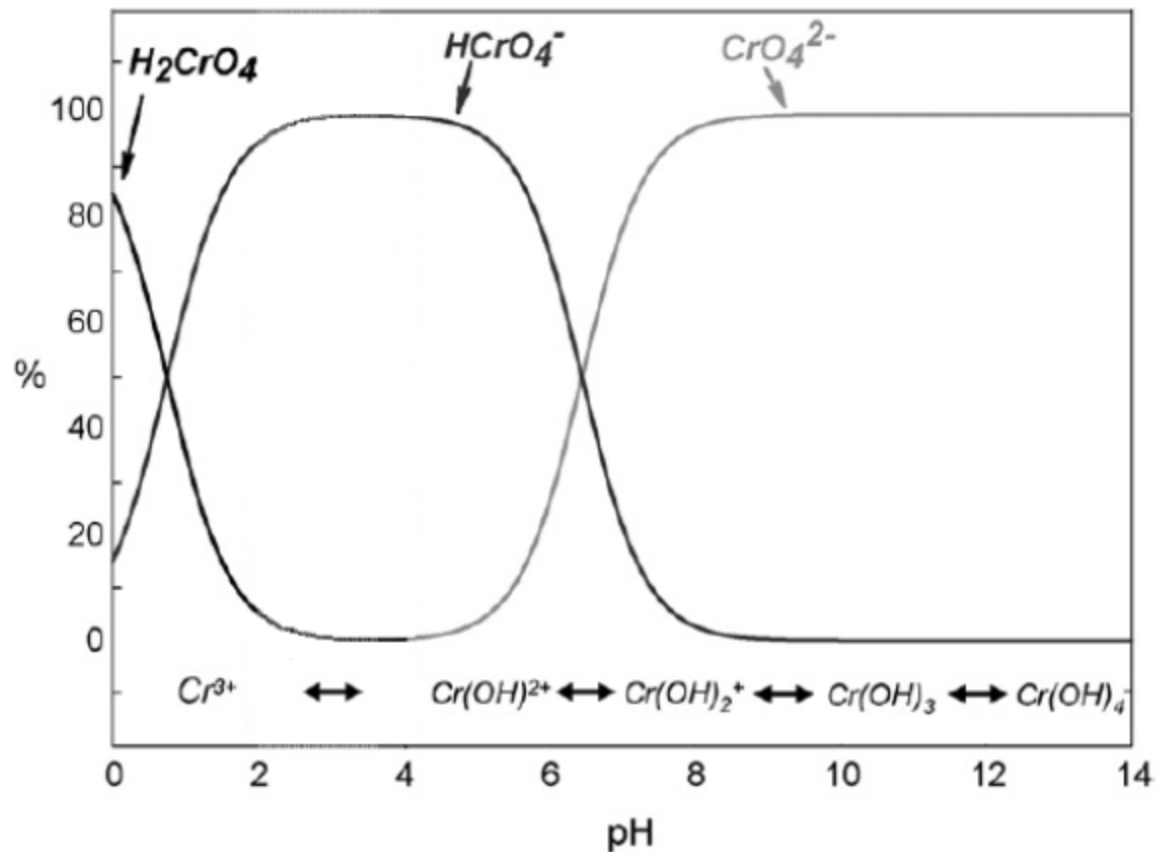


Σχήμα 2.2. Απεικόνιση τμήματος τροποποιημένου νανοσωλήνα άνθρακα. Φαίνονται οι καρβοξυλομάδες που έχουν εμφανιστεί στον κορμό και στο άκρο του νανοσωλήνα.

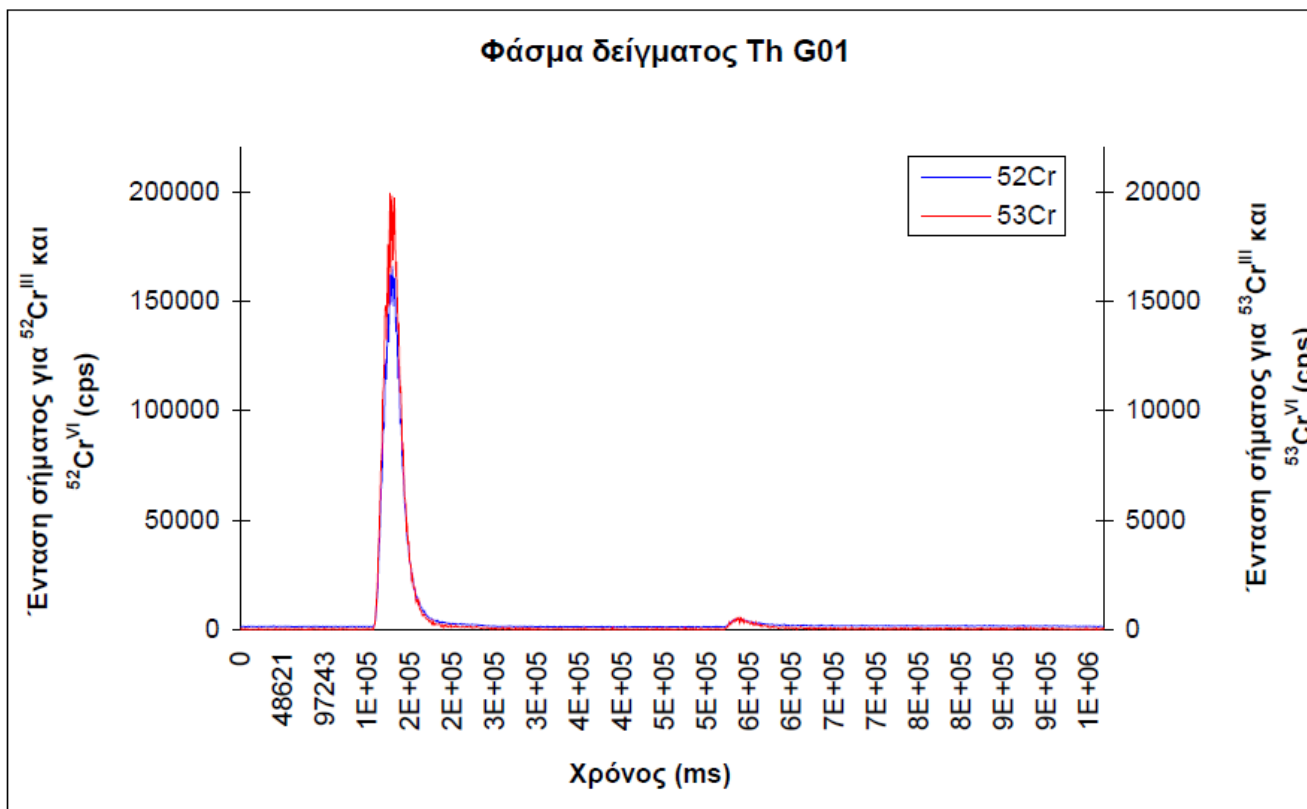
Πηγή: Hirsch A. & Vostrowsky O., Functionalization of carbon nanotubes, Topics in Current Chemistry, 245: 193-237, 2005



Γράφημα 3.13. Φάσμα μέτρησης των ισοτόπων ^{52}Cr (μπλε χρώμα) και ^{53}Cr (κόκκινο χρώμα) των δύο οξειδωτικών καταστάσεων του χρωμίου Cr^{III} και Cr^{VI} συγκέντρωσης 0,5 ppb έκαστο.



Διάγραμμα 3.1. Κλασματική αναλογία ειδών Cr^{VI} και Cr^{III} σε υδατικά συστήματα
 Πηγή: Goessler W. & Hagendorfer H., Talanta, 76: 656-661, 2008

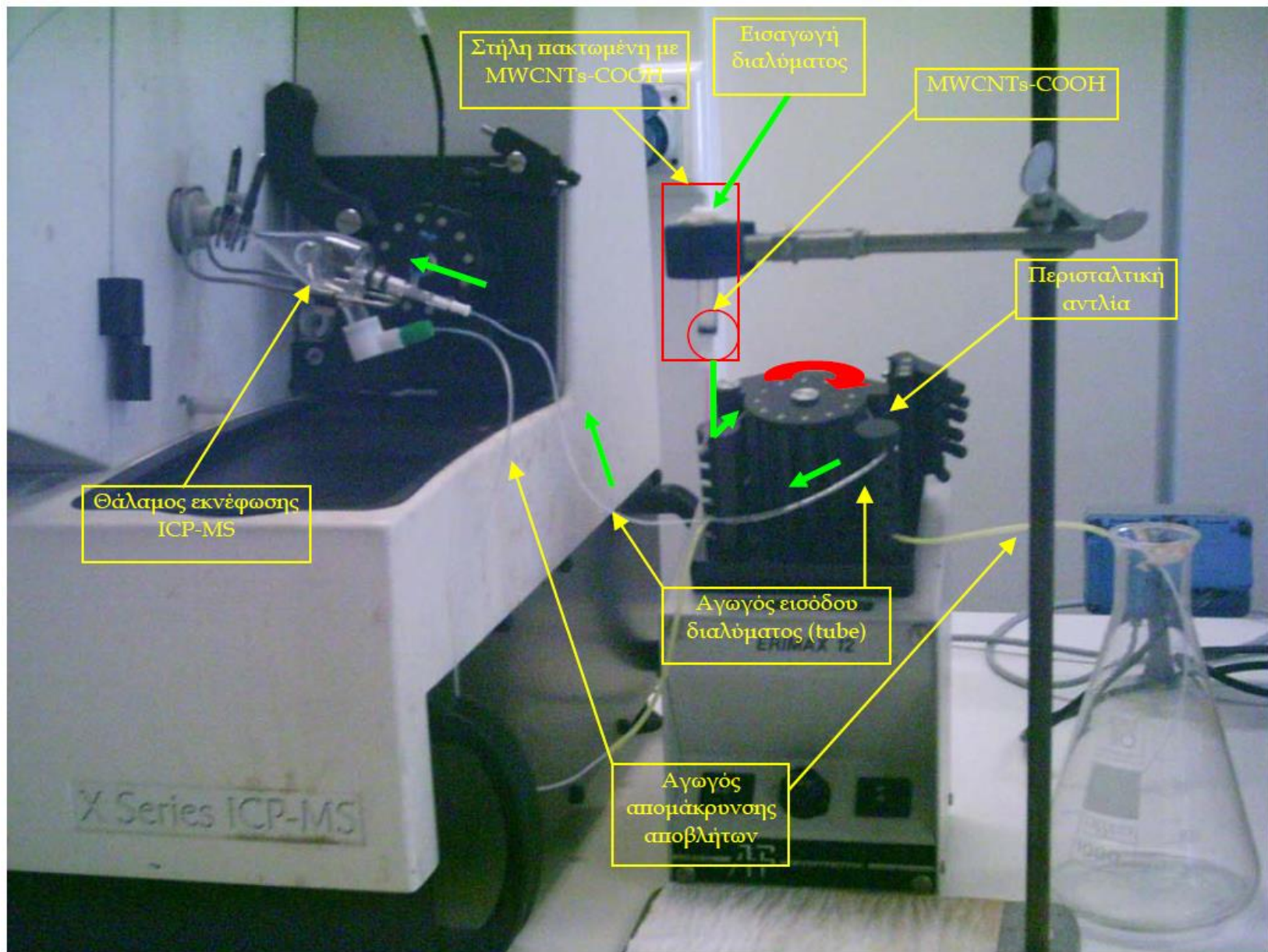


Γράφημα 5.15. Φάσμα δείγματος Th G01 (οικία). Η πρώτη κορυφή αντιστοιχεί στο εξασθενές χρώμιο και η δεύτερη στο τρισθενές. Με μπλε χρώμα απεικονίζεται το φάσμα του ισότοπου ^{52}Cr (αριστερός κάθετος άξονας) και με κόκκινο το φάσμα του ^{53}Cr (δεξιός κάθετος άξονας).

Πίνακας 5.31. Εκτιμώμενες συγκεντρώσεις δείγματος Th G01

Συγκέντρωση x_0 (ppb)

$^{52}\text{Cr}^{\text{III}}$	0,9
$^{53}\text{Cr}^{\text{III}}$	1,0
$^{52}\text{Cr}^{\text{VI}}$	28,3
$^{53}\text{Cr}^{\text{VI}}$	26,3



Εικόνα 3.1. Πειραματική διάταξη σύζευξης της πακτωμένης με MWCNTs-COOH στήλης με ICP-MS. Με κόκκινο βέλος συμβολίζεται η φορά περιστροφής της περισταλτικής αντλίας, με πράσινα η διαδρομή του υδατικού διαλύματος χρωμίου.