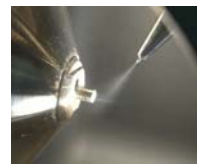
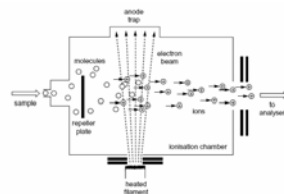
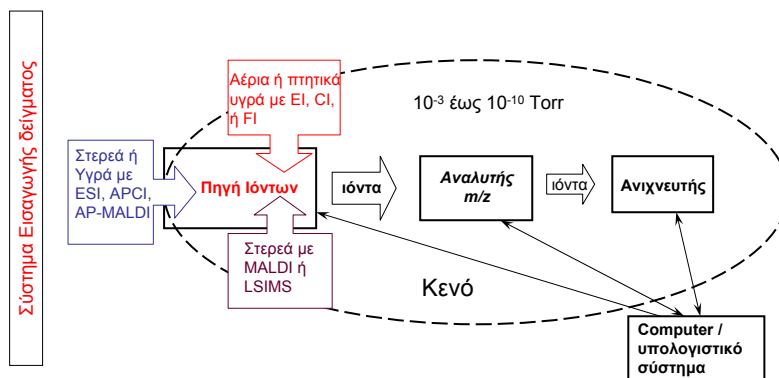


# ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ

## MASS SPECTROMETRY (μέρος 2)



## Πηγές Ιόντων



Στο τμήμα αυτό λαμβάνει χώρα ο ιοντισμός του δείγματος

# Πηγές Ιόντων

## Πηγές Αέριας Φάσης:

Το δείγμα πρώτα εξαερώνεται και μετά ιοντίζεται

- Πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (Electron Impact, **EI**)
- Χημικού ιοντισμού (Chemical Ionization, **CI**)

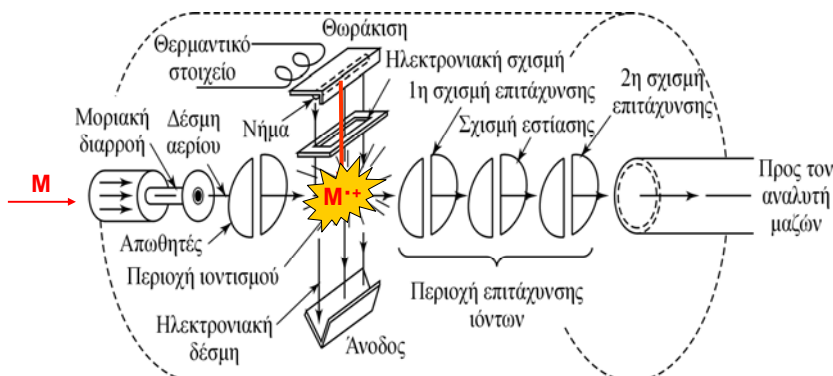
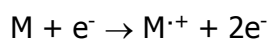
## Πηγές εκρόφησης:

Το δείγμα, σε υγρή ή στερεά κατάσταση, μετατρέπεται σε αεριώδη ιόντα

- Βομβαρδισμού με άτομα μεγάλης ταχύτητας (Fast Atom Bombardment, **FAB**)
- Ιοντισμός εκρόφησης με τη βοήθεια υλικού μήτρας (Matrix Assisted Desorption Ionization, **MALDI**)
- Ιοντισμός με Ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization, **ESI**)

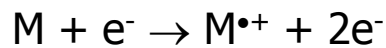
## Ιοντισμός με πρόσκρουση ηλεκτρονίων - EI -

Τα  $e^-$  παράγονται από ένα θερμαινόμενο νήμα (W ή Re) και επιταχύνονται με μια τάση 70 V (σταθερή ενέργεια επιτάχυνσης):

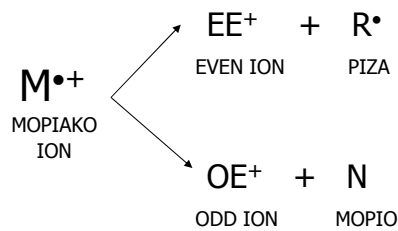


## Ιοντισμός με πρόσκρουση ηλεκτρονίων - EI -

Ιοντισμός :



Θραυσματοποίηση :

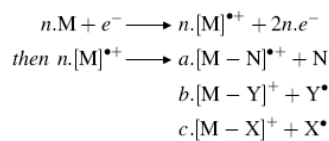
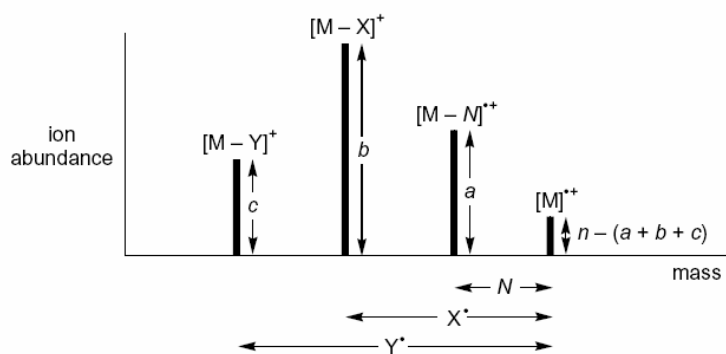


Θυγατρικά  
ιόντα:

EE<sup>+</sup>: ιόν με άρτιο αριθμό e

OE<sup>+</sup>: ιόν με περιττό αριθμό e

## Φάσματα EI - MS



Mass Spectrometry of Inorganic and Organometallic Compounds  
W. HENDERSON AND J. S. MCINDOE  
Wiley, 2005

## Ιοντισμός με πρόσκρουση ηλεκτρονίων - ΕΙ -

### ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

- Καθιερωμένη και επαρκώς μελετημένη τεχνική
- Μπορεί να εφαρμοστεί πρακτικά σε όλα τα πτητικά μόρια
- Επαναλήψιμο φάσμα μαζών
- Η θραυσματοποίηση χρησιμοποιείται για ταυτοποίηση δομής
- Αποτελεί τη βάση για την ανάπτυξη βιβλιοθηκών φασμάτων μαζών που περιέχουν το «αποτύπωμα» κάθε ένωσης

### ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

- Το δείγμα πρέπει να είναι θερμικά σταθερό και επαρκώς πτητικό
- Το μοριακό ιόν μπορεί να απουσιάζει ή αν έχει χαμηλή αφθονία

### ΕΦΑΡΜΟΓΗ:

- Η πλέον χρησιμοποιούμενη πηγή ιόντων στην τεχνική GC-MS (Q ή IT) για τον προσδιορισμό μη πολικών μορίων χαμηλής μοριακής μάζας (< 1000 Da).

## Χημικός Ιοντισμός - CI -

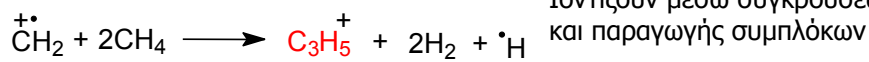
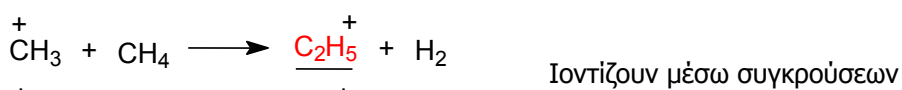
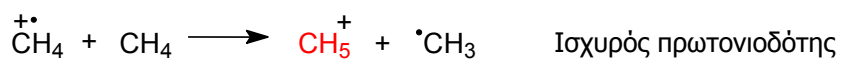
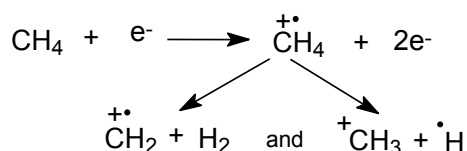
Βομβαρδισμός **αέριου αντιδραστηρίου** (συχνά CH<sub>4</sub>, NH<sub>3</sub> ή N<sub>2</sub>) με e<sup>-</sup> υψηλής ενέργειας με αποτέλεσμα το σχηματισμό ιόντων του αντιδραστηρίου. Τα **αέρια μόρια (M) του δείγματος** συγκρούονται με τα ιόντα του αντιδραστηρίου και τα ιοντίζουν με αντιδράσεις μεταφοράς πρωτονίων ή φορτίου, προσθήκης, ακόμα και πυρηνόφιλης υποκατάστασης.

Προϋπόθεση: ο λόγος [αντιδραστηρίου]/[δείγματος]= 10<sup>3</sup>-10<sup>4</sup>

**CI Χαμηλής πίεσης:** 10<sup>-3</sup> – 10<sup>-4</sup> Torr, ιδανική για GC-MS

**CI Ατμοσφαιρικής πίεσης:** APCI, ιδανική για LC-MS

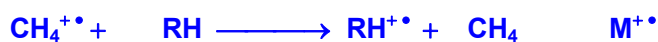
## Χημικός Ιοντισμός - CI -



Interpretation of Mass Spectra  
O. D. SPARKMAN AND J. T. WATSON  
Copyright 1978, 2004 USA

## Τύποι Χημικού Ιοντισμού

### ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΦΟΡΤΙΟΥ



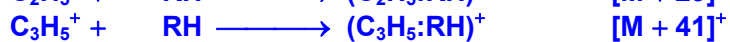
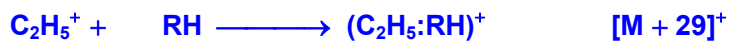
### ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΠΡΩΤΟΝΙΟΥ



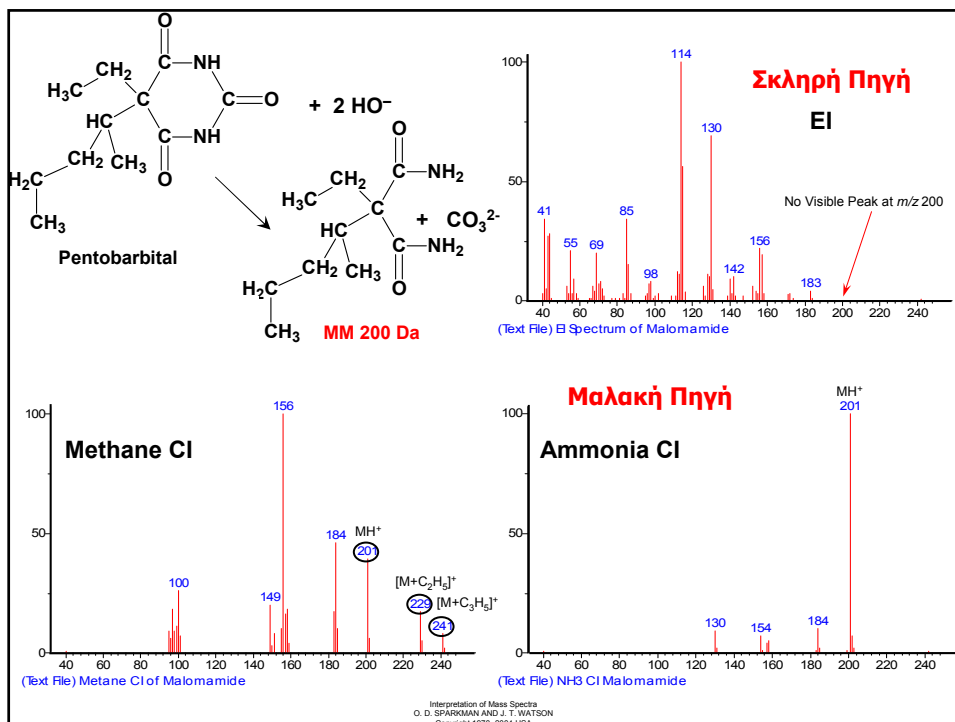
### ΑΠΟΣΠΑΣΗ ΥΔΡΙΔΙΟΥ



### ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΙΟΝΤΙΚΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΣΥΓΚΡΟΥΣΗ



Interpretation of Mass Spectra  
O. D. SPARKMAN AND J. T. WATSON  
Copyright 1978, 2004 USA



## Χημικός Ιοντισμός - CI -

### ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

- Δίνει πληροφορία για το MB της ένωσης, παράγοντας συνήθως τα ψευδομοριακά ιόντα  $[M+1]^+$  ή  $[M-1]^+$
- Απλό φάσμα μαζών χωρίς ιδιαίτερη θραυσματοποίηση

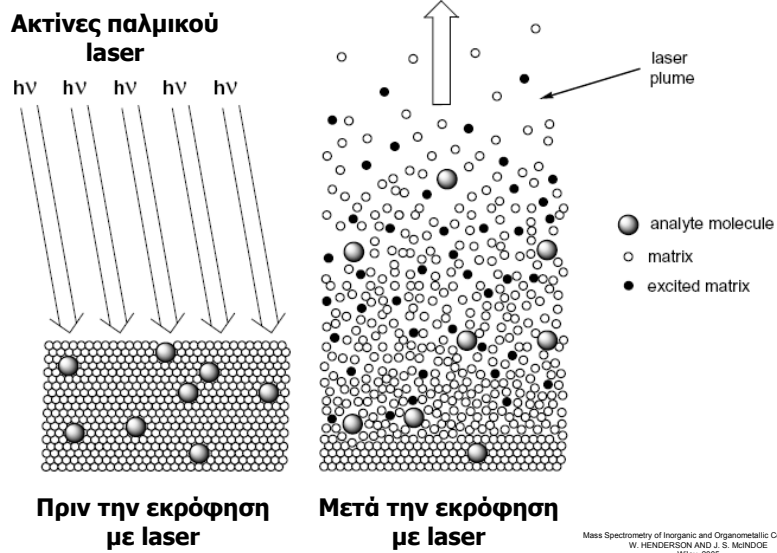
### ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

- Το δείγμα πρέπει να είναι θερμικά σταθερό και επαρκώς πτητικό
- Η ελλιπής θραυσματοποίηση δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ταυτοποίηση ένωσης μέσω έρευνας σε βιβλιοθήκες MS
- Τα αποτελέσματα εξαρτώνται από τον τύπο του αερίου, την πίεση ή τον χρόνο αντίδρασης και τη φύση του δείγματος

### ΕΦΑΡΜΟΓΗ:

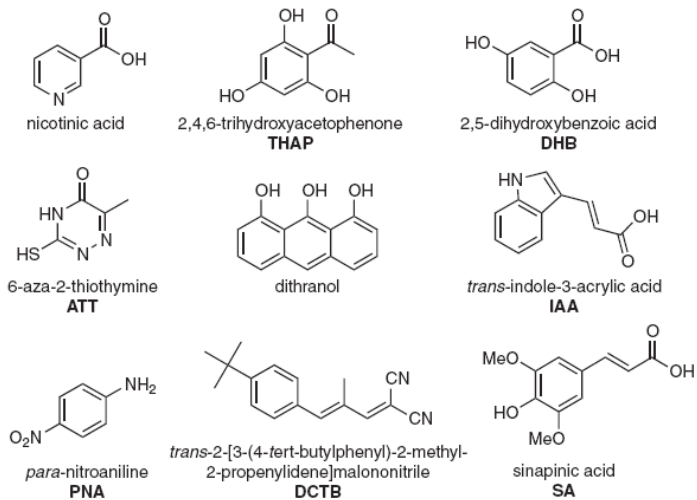
- Χρησιμοποιείται στην τεχνική GC-MS (Q ή IT) για τον προσδιορισμό μη πολικών μορίων χαμηλής μοριακής μάζας ( $< 1000$  Da).

## Ιοντισμός με εκρόφιση: (A) – MALDI



## - MALDI -

Συχνότερα χρησιμοποιούμενες μήτρες για MALDI



## - MALDI -

### ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

- Δίνει πληροφορία για το MB της ένωσης, παράγοντας συνήθως τα μονοφορτισμένα μοριακά ιόντα  $[M+1]^+$
- Απλό φάσμα μαζών χωρίς θόρυβο υποβάθρου και θραύσματα
- Εξαιρετικά διαδεδομένη τεχνική στην ανάλυση πρωτεϊνών

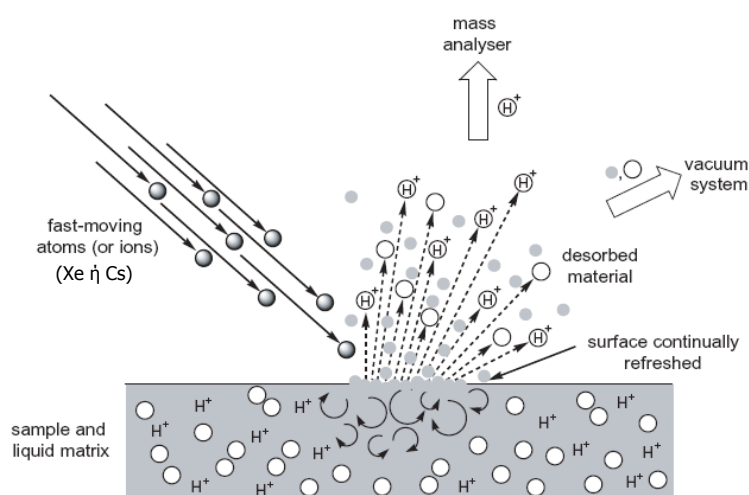
### ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

- Χαμηλή επαναληψιμότητα
- Ο αναλύτης δεν πρέπει να απορροφά την ακτινοβολία λέιζερ
- Απαιτεί παλμικό αναλυτή μαζών (TOF, IT)

### ΕΦΑΡΜΟΓΗ:

- Χρησιμοποιείται στην τεχνική TOF-MS για τον προσδιορισμό πολικών βιομορίων μεγάλης μοριακής μάζας ( $> 10000$  Da).

## Ιοντισμός με εκρόφιση: (B) – FAB



Mass Spectrometry of Inorganic and Organometallic Compounds  
W. HENDERSON AND J. S. McINDOE  
Wiley, 2005



## - FAB -

### ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

- Γρήγορη και απλή τεχνική
- Καλή τεχνική ιοντισμού για ποικιλία μορίων
- Οι σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες ιοντισμού επιτρέπουν τη μελέτη θερμικά ασταθών μορίων
- Απλά φάσματα, με μοριακά ιόντα και ισχυρά ιοντικά ρεύματα, οπότε είναι κατάλληλη για μετρήσεις MS υψηλής διακριτικής ικανότητας

### ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

- Υψηλός χημικός θόρυβος υποβάθρου
- Ο αναλύτης πρέπει να είναι διαλυτός και σταθερός σε υγρή μήτρα
- Προβληματική λειτουργία σε χαμηλά  $m/z$  (<200 Da)

### ΕΦΑΡΜΟΓΗ:

- Χρησιμοποιείται με όργανα MS μαγνητικού τομέα για τον προσδιορισμό πολικών οργανικών (βιο)μορίων σχετικά μεγάλης μοριακής μάζας (>200 Da), καθώς και τη μελέτη υλικών (SIMS).

## Ιοντισμός σε ατμοσφαιρική πίεση

### - API -

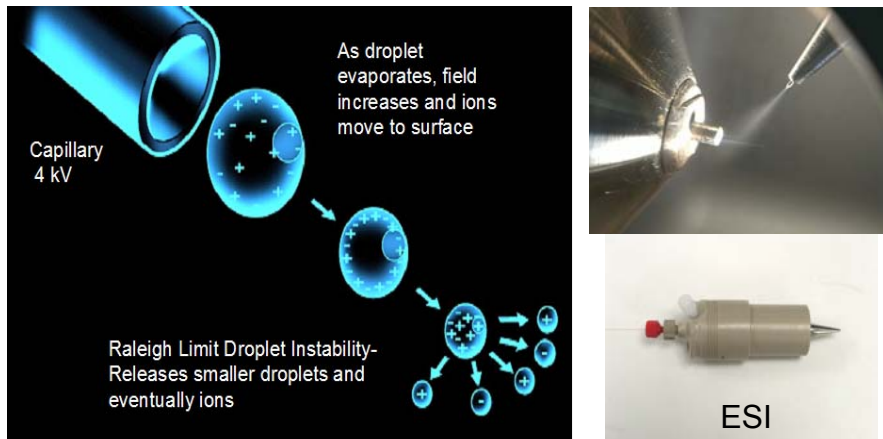
- **Ιοντισμός με Ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization, ESI)**

Το υγρό δείγμα ψεκάζεται μέσα από τριχοειδή σωλήνα στον οποίο εφαρμόζεται υψηλή τάση (3-4 kV) και σχηματίζεται αερόλυμα φορτισμένων σταγονιδίων

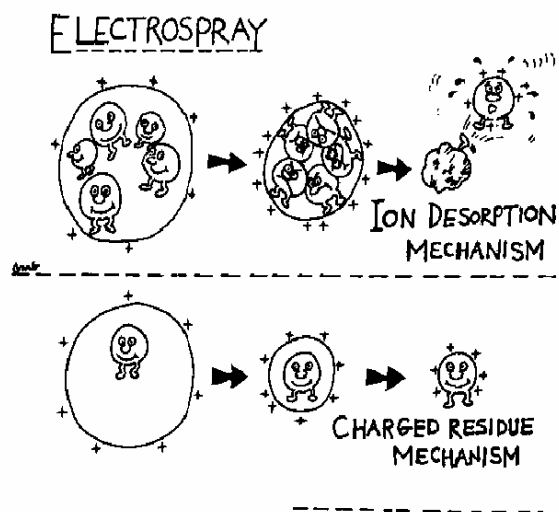
- **Χημικός ιοντισμός σε ατμοσφαιρική πίεση (Atmospheric Pressure CI, APCI)**

Το υγρό δείγμα διέρχεται μέσα από ένα θερμαινόμενο τριχοειδή σωλήνα (450°C) και εξατμίζεται, παράγοντας αεριώδη μόρια. Πλησίον της εξόδου του σωλήνα, υπάρχει μια ακίδα σε υψηλή τάση που ιοντίζει τον αέριο διαλύτη ή το  $N_2$  ( $N_2^+$ ), το οποίο με τη σειρά του ιοντίζει τα μόρια του αναλύτη στην αέρια φάση (μεταφορά φορτίου)

## Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό - ESI -



## Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό - ESI -



## - ESI -

### ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

- Τεχνική προσδιορισμού ΜΒ χωρίς περιορισμούς στη μάζα
- Καλή τεχνική ιοντισμού για ποικιλία μορίων (μετρίως πολικών και πολικών)
- Οι σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες ιοντισμού επιτρέπουν τη μελέτη θερμικά ασταθών μορίων
- Καλή ευαισθησία, εύκολη ποσοτικοποίηση
- Συνδυάζεται με LC και τριχοειδή ηλεκτροφόρηση

### ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

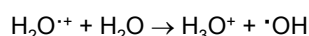
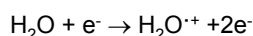
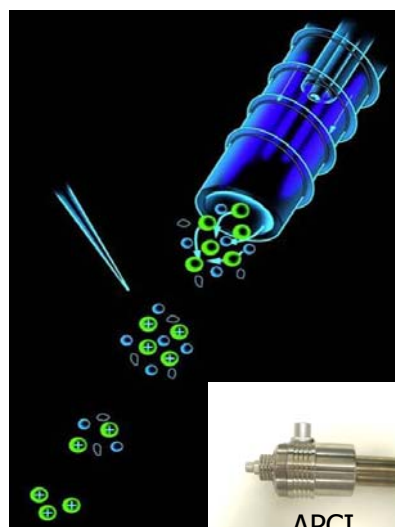
- Απαραίτητα χαμηλή ροή κινητής φάσης
- Τα ιόντα του αναλύτη δημιουργούνται στην υγρή φάση
- Απόσβεση σήματος σε διαλύματα με άλατα και ανταγωνιστική μήτρα
- Σχηματισμός ιόντων προσθήκης (adduct ions)

### ΕΦΑΡΜΟΓΗ:

- Χρησιμοποιείται με όργανα LC-MS για τον προσδιορισμό μορίων μεγάλου εύρους μαζών (από μικρά πολικά μόρια έως μεγάλα βιομόρια)

## Χημικός Ιοντισμός σε Α.Π.

### - APCI -



APCI

## - APCI -

### ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

- Σχηματισμός μοριακού ιόντος (πληροφορία για το MB)
- Εύκολη στη χρήση, με πολύ καλή επαναληψιμότητα
- Καλή ευαισθησία (συχνά καλύτερη του ESI)
- Μεγάλο εύρος στη ροή της κινητής φάσης (0,2 – 2 ml/min)
- Συνδυάζεται με LC και με συστήματα ESI

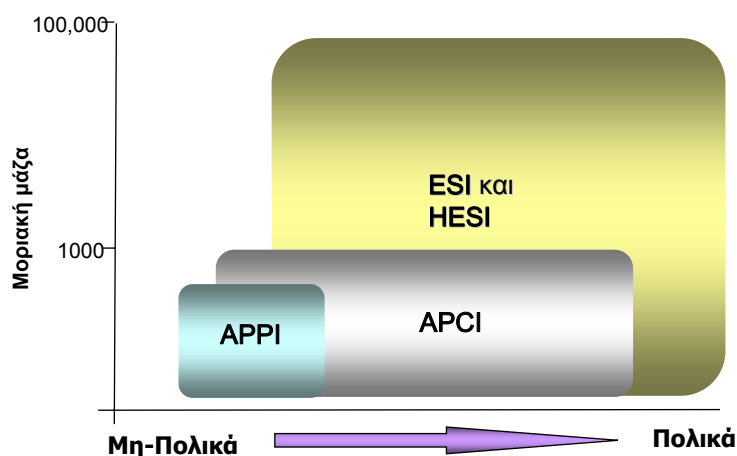
### ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

- Ακατάλληλη για ενώσεις με  $MB > 2000$ . Δεν σχηματίζει σειρές πολλαπλών φορτίων και δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για προσδιορισμούς μεγάλων βιομορίων
- Οι σχετικά υψηλές θερμοκρασίες δεν επιτρέπουν τη μελέτη θερμικά ασταθών μορίων (θερμοδιάσπαση ευπαθών μορίων)
- Αυξημένος θόρυβος σε χαμηλές τιμές m/z
- Απαραίτητη η χρήση πτητικών ρυθμιστικών διαλυμάτων

### ΕΦΑΡΜΟΓΗ:

- Χρησιμοποιείται με όργανα LC-MS για τον προσδιορισμό μετρίως πολικών μορίων μικρών μοριακών μαζών

## Σύγκριση ESI – APCI



## Σύγκριση ESI – APCI

	APCI	ESI
Ιοντισμός:	Στην αέρια φάση	Στο διάλυμα
Δυναμικό:	Εφαρμόζεται στη ακίδα	Εφαρμόζεται στον τριχοειδή σωλήνα
Θραυσματοποίηση:	Πιο «σκληρή» τεχνική, περισσότερα θραύσματα	«Μαλακός» ιοντισμός, λιγότερα θραύσματα
Αναλύτες:	MB<1000 Μέτριας πολικότητας	Μικρά και μεγάλα μόρια, κυρίως πολικά
Ιόντα:	Μονοφορτισμένα	Μονοφορτισμένα και πολλαπλών φορτίων
Ροή κινητής φάσης	0,2-2 mL/min	0,001 – 1 mL/min (κυρίως <0,4 mL/min)

## Σύζευξη HPLC με MS

### Συζευγμένη τεχνική

Χρησιμοποιείται στον:

1. Προσδιορισμό μη πτητικών ενώσεων (αποφυγή παραγωγοποίησης και χρήσης GC)
2. Προσδιορισμό θερμοευαίσθητων ενώσεων που δεν μπορούν να προσδιοριστούν με GC-MS
3. Προσδιορισμό της καθαρότητας χρωματογραφικής κορυφής και την ταυτοποίηση δομής άγνωστων ενώσεων (πχ μεταβολιτών φαρμάκων, πεπτιδίων, πρωτεϊνών κ.ά.)

## Σύζευξη HPLC με MS

### Προβλήματα Σύζευξης

1. Ασυμβατότητα μεταξύ των σχετικά μεγάλων όγκων διαλυτών της HPLC και του κενού που απαιτείται από το MS
2. Ασυμβατότητα με τα μη πτητικά ρυθμιστικά διαλύματα της κινητής φάσης της HPLC
3. Προβληματικός ιοντισμός μη πτητικών και θερμοευαίσθητων ενώσεων

## Σύζευξη HPLC με MS

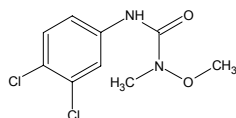
### Επίλυση προβλημάτων σύζευξης

1. Χρήση στηλών μικρής διαμέτρου και μήκους (με ταυτόχρονη μείωση του μεγέθους των σωματιδίων του πληρωτικού υλικού) και ελαχιστοποίηση του νεκρού όγκου
2. Διαχωρισμός ροής κινητής φάσης, ώστε ένα μόνο μικρό κλάσμα να εισάγεται στην πηγή ιόντων
3. Χρήση πτητικών ρυθμιστικών διαλυμάτων ( $\text{HCOOH}/\text{HCOONH}_4$ ) και ρυθμιστών pH της κινητής φάσης της HPLC ( $\text{HCOOH}$ ,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , τριαιθυλαμίνη)
4. Χρήση νέων τεχνικών ιοντισμού: ESI, APCI, MALDI

## LC – MS

### Θετικός Ιοντισμός

- Βάσεις (-NH<sub>2</sub>):
- |                  |      |
|------------------|------|
| $[M+H]^+$        | M+1  |
| $[M+NH_4]^+$     | M+18 |
| $[M+Na]^+$       | M+23 |
| $[M+K]^+$        | M+39 |
| $[M+MeOH+H]^+$   | M+32 |
| $[M+CH_3CN+H]^+$ | M+42 |

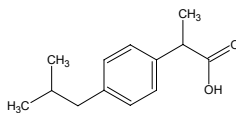


Linuron

Ιόντα προσθήκης  
(Adducts)

### Αρνητικός Ιοντισμός

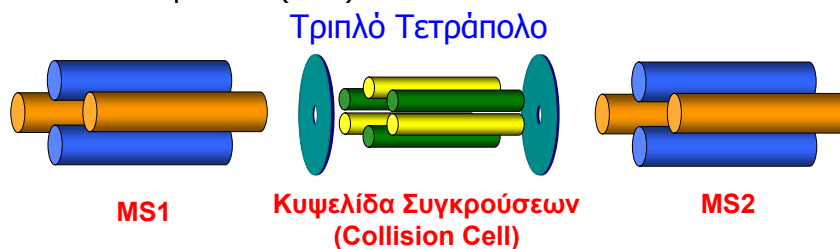
- Οξέα (-COOH, -OH):
- |                    |      |
|--------------------|------|
| $[M-H]^-$          | M-1  |
| $[M+CH_3COOH-H]^-$ | M+59 |
| $[M+HCOOH-H]^-$    | M+45 |



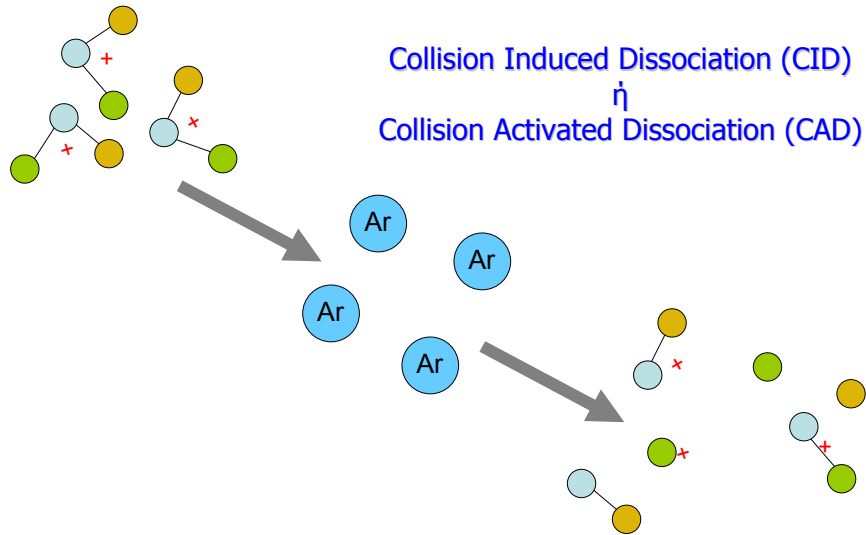
Ibuprofen

## Διαδοχική Φασματομετρία Μαζών Tandem Mass Spectrometry (MS/MS)

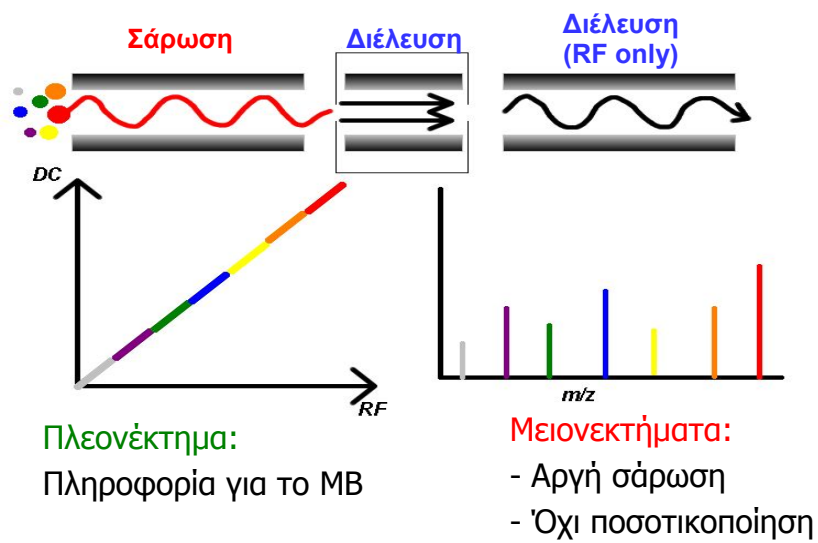
1. Το μητρικό ή πρόδρομο ιόν (parent or precursor ion) παράγεται στην πηγή ιοντισμού και επιλέγεται από το 1<sup>ο</sup> τετράπολο (MS1)
2. Οδηγείται στο 2<sup>ο</sup> τετράπολο (κυψελίδα συγκρούσεων) όπου συγκρούεται με περίσσεια ενός αδρανούς αερίου (Ar ή He), παράγοντας θυγατρικά ιόντα (daughter or product ions)
3. Ο διαχωρισμός και μέτρηση των θυγατρικών ιόντων γίνεται στο 3<sup>ο</sup> τετράπολο (MS2)



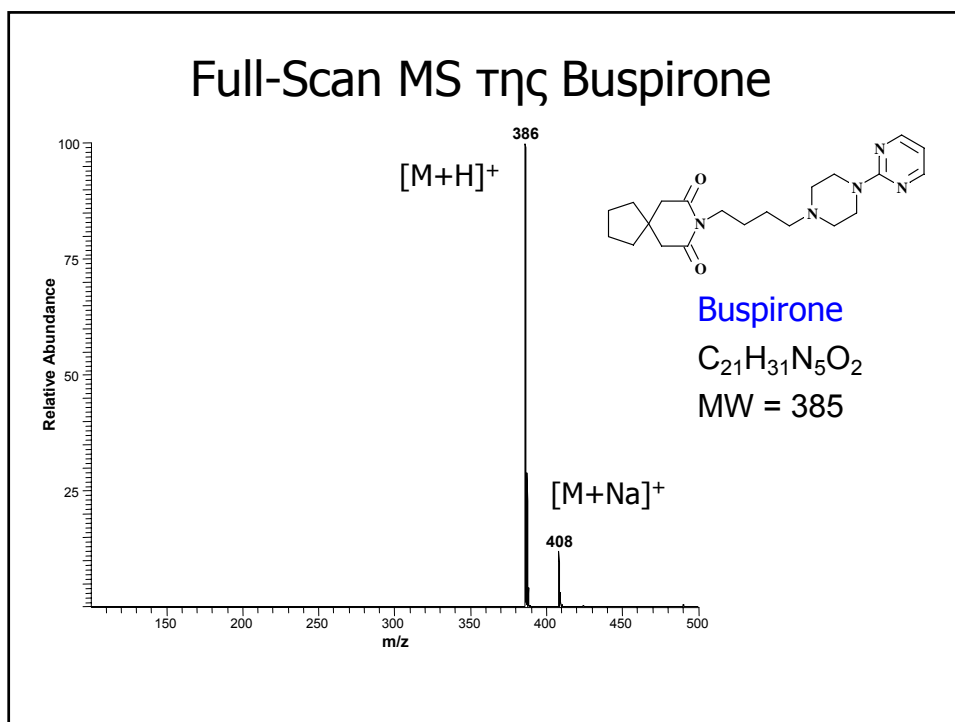
## Θραυσματοποίηση μέσω συγκρούσεων



## Φασματομετρία Μαζών Πλήρους Σάρωσης Full-Scan Mass Spectrometry





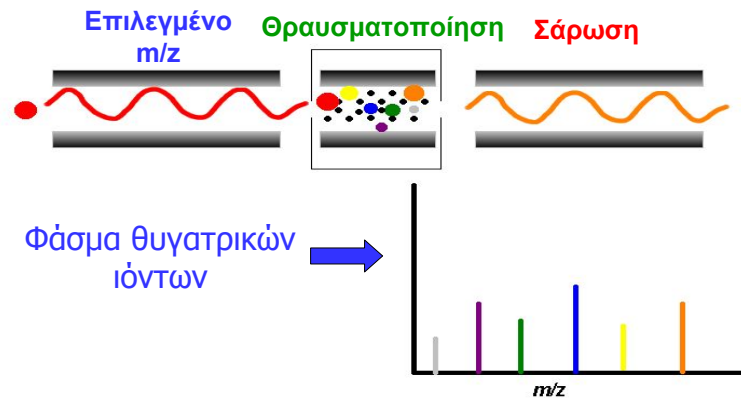


### Παρακολούθηση επιλεγμένου ιόντος Single Ion Monitoring (SIM)

- **Πλεονεκτήματα:**
  - Παρακολούθηση συγκεκριμένου αναλύτη
  - Γρήγορη σάρωση
  - Απλότητα

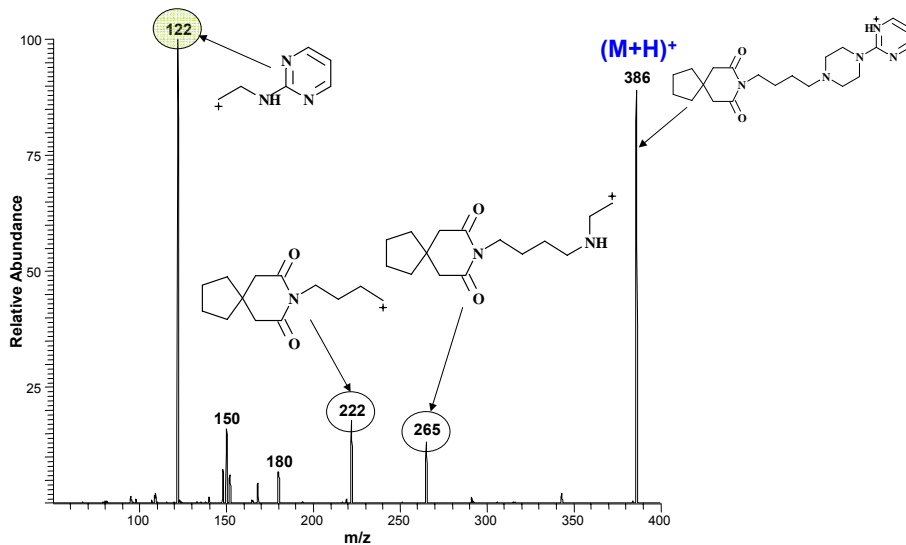
- **Μειονεκτήματα:**
  - Παρεμποδίσσεις
  - Όχι τόσο ευαίσθητο όσο η SRM λειτουργία

## MS/MS θυγατρικών ιόντων Product Ion Scanning

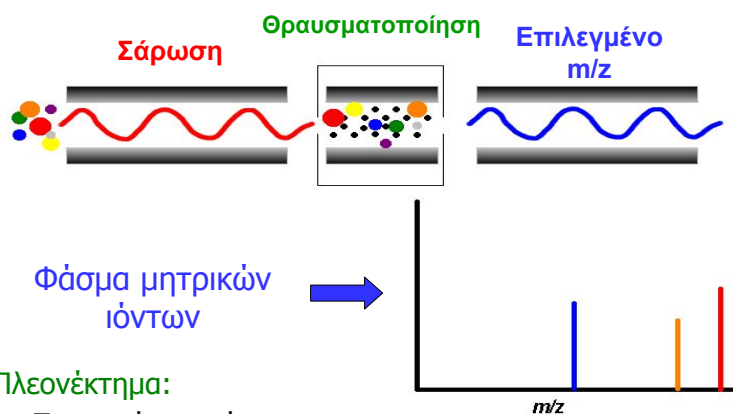


- **Πλεονέκτημα:**
  - Παρέχει πληροφορίες για τη δομή
- **Μειονέκτημα:**
  - Αργή σάρωση
  - Όχι ποσοτικοποίηση

## Φάσμα θυγατρικών ιόντων της Buspirone



## MS/MS επιλεγμένου μητρικού ιόντος Precursor Ion Scanning



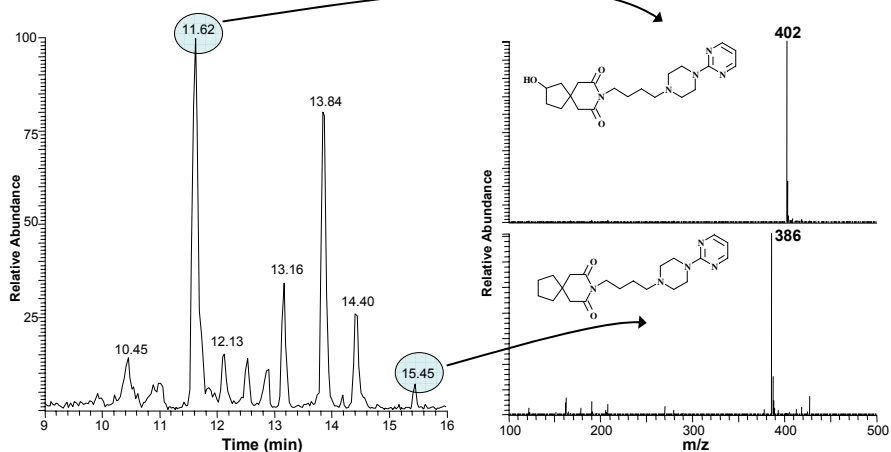
- **Πλεονέκτημα:**

- Ταυτοποίηση ενώσεων που δίνουν ένα συγκεκριμένο θυγατρικό ιόν (π.χ.,  $\text{PO}_3^-$  τα φωσφοπεπτίδια)

- **Μειονέκτημα:**

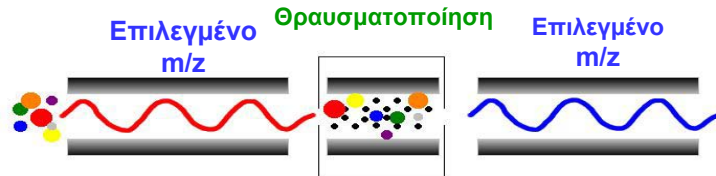
- Αργή σάρωση

## MS/MS μητρικών ιόντων των μεταβολιτών της Buspirone



Precursor Ion Scan: Το Q3 παρακολουθεί μόνο το  $m/z$  122

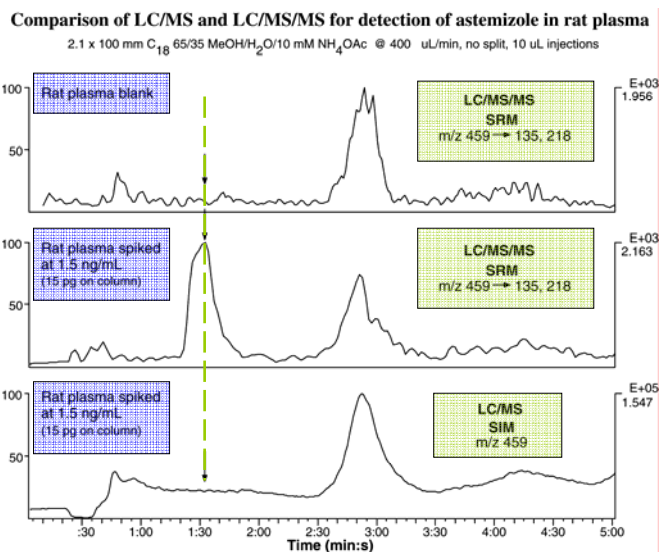
## Παρακολούθησης επιλεγμένης αντίδρασης Selected Reaction Monitoring (SRM)



Μετάπτωση ή «αντίδραση» :  $m_1/z \rightarrow m_2/z$

- Πλεονεκτήματα:
  - Παρακολούθηση επιλεγμένου αναλύτη
  - Γρήγορη σάρωση
  - "Ταυτόχρονη" παρακολούθηση πολλών μεταπτώσεων (MRM)
- Μειονέκτημα:
  - Οι πληροφορίες για τη δομή της ένωσης είναι περιορισμένες

## Εκλεκτικότητα MS/MS σε δείγματα με πολύπλοκη μήτρα



## Χρήσιμοι Ισοτόποι για MS

### **American Society for Mass Spectrometry (ASMS)**

<http://www.asms.org/>

Γενική εισαγωγή στην τεχνική MS:

<http://www.asms.org/whatisms/index.html>

Εκπαιδευτικές πηγές:

[http://www.asms.org/whatisms/edu\\_resources.html](http://www.asms.org/whatisms/edu_resources.html)

### **University of Arizona – Dept. of Chemistry:**

<http://www.chem.arizona.edu/massspec/>

### **Michigan State University - Dept. of Chemistry:**

<http://www.cem.msu.edu/~reusch/VirtualText/Spectrpy/MassSpec/masspec1.htm>

### **Isotope Pattern Calculator:**

<http://www.shef.ac.uk/chemistry/chemputer/isotopes.html>

## Συγγράμματα

- D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman «Αρχές της Ενόργανης Ανάλυσης», Μτφ. Μ.Ι. Καραγιάννης, Κ.Η. Ευσταθίου, Ν. Χανιωτάκης, Εκδόσεις Κωσταράκη, Αθήνα, 2002: Κεφ. 20, 27Δ-3 και 28Γ-6 (σελ.859)
- J. Throck Watson and O. David Sparkman "Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications, and Strategies for Data Interpretation" 4th Edition, John Wiley & Sons, 2007
- E. De Hoffmann and V. Stroobant "Mass Spectrometry, Principles and Applications" 3<sup>rd</sup> Edition, John Wiley & Sons, 2007
- K. Downard "Mass Spectrometry – A Foundation Course" 2<sup>nd</sup> Edition, RSC, 2007

## Σχήματα

Τα σχήματα της παρουσίασης ήταν από τις παρακάτω πηγές:

- Ευγενική παραχώρηση σχημάτων από τον Prof. O. David Sparkman (από το βιβλίο του J. Throck Watson and O. David Sparkman "Introduction to Mass Spectrometry, 4th Edition: Instrumentation, Applications, and Strategies for Data Interpretation" John Wiley & Sons, 2007)
- D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman «Αρχές της Ενόργανης Ανάλυσης», Εκδόσεις Κωσταράκη, Αθήνα, 2002: Κεφ. 11 και 20
- W. Henderson, J. S. McIndoe, "Mass Spectrometry of Inorganic and Organometallic Compounds" Wiley, 2005
- Thermo "Quantum TSQ Training course", 2007