

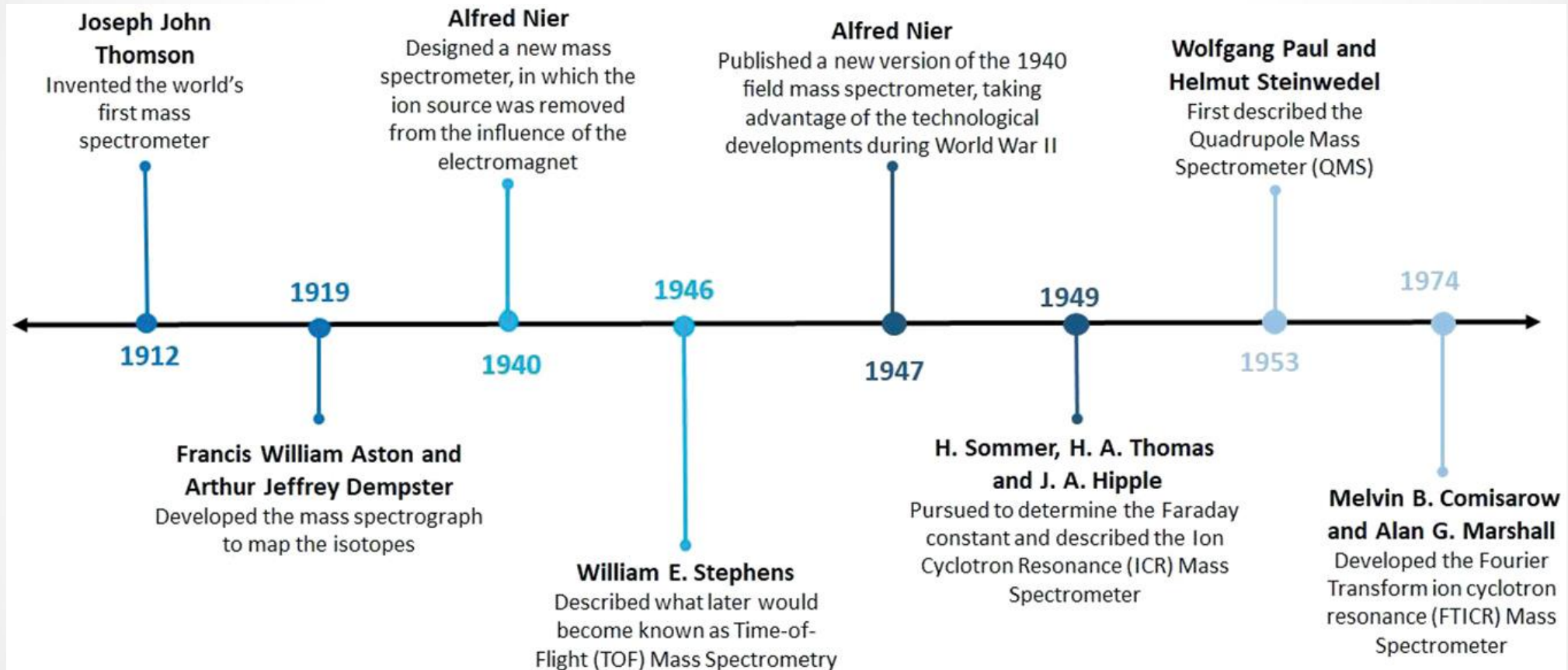
Σύγχρονες Αναλυτικές Τεχνικές

Διάλεξη 3

-Φασματομετρία Μαζών
Mass Spectrometry

Αλίκη Ντζιφά, PhD
2024

ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ-ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ



ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ-ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Nobel Laureates:



Joseph John Thomson
Physics 1906
first mass spectrometer



Francis William Aston
Chemistry 1922
mass spectrometry of isotopes



Wolfgang Paul
Physics 1989
quadrupole and
quadrupole ion trap MS

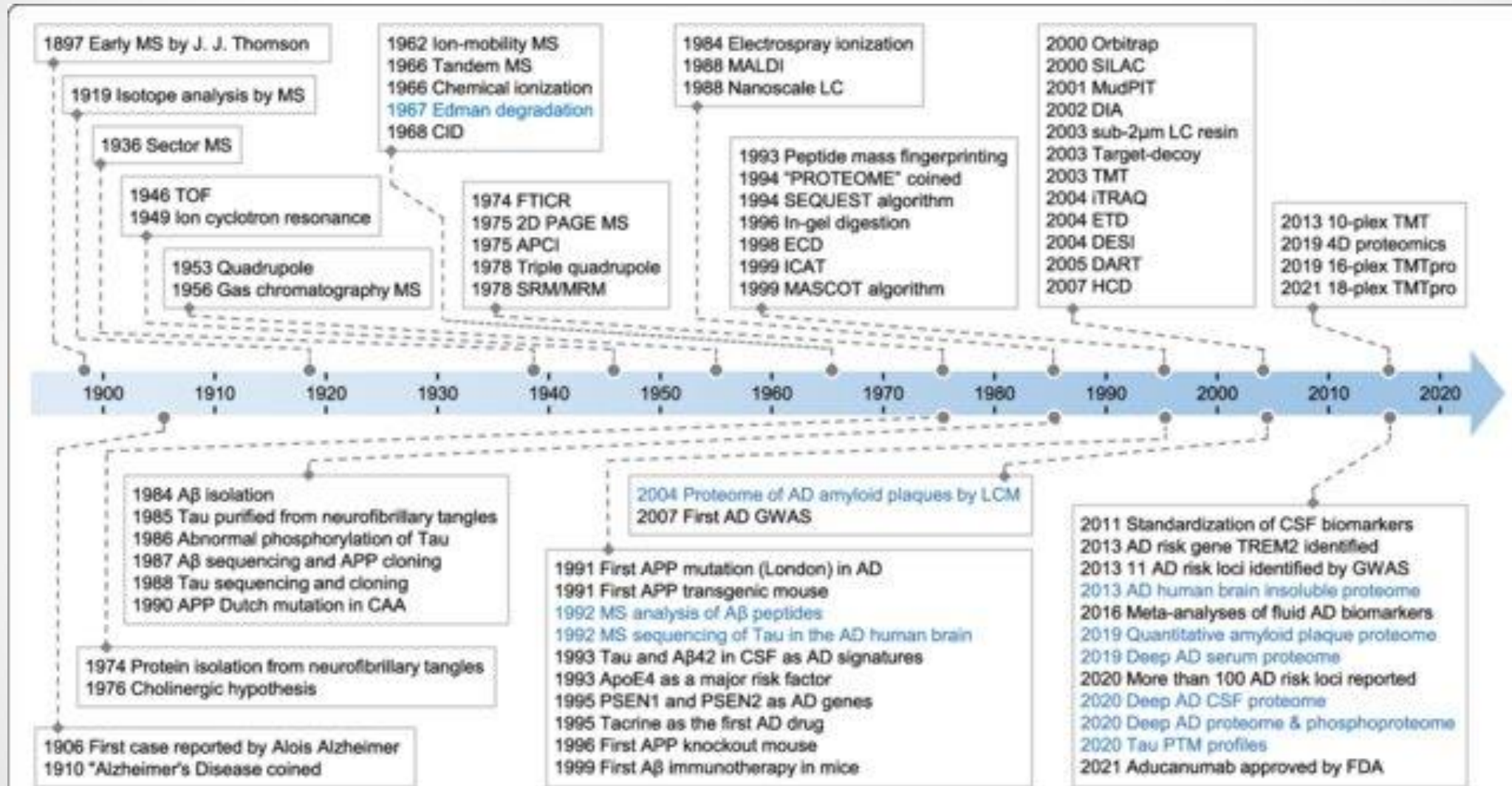


John B. Fenn
Chemistry 2002
electrospray ionization of
biomolecules



Koichi Tanaka
Chemistry 2002
Matrix-assisted laser
Desorption/ionization (MALDI)

ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ-ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ



ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ

Οι ολοένα και μεγαλύτερες απαιτήσεις στη χημική ανάλυση έχουν καταστήσει την MS ένα πολυδύναμο εργαλείο για ένα πολύ μεγάλο πλήθος επιστημονικών ερευνητικών δραστηριοτήτων.

❖ Αυτό οφείλεται στο ότι η συγκεκριμένη τεχνική είναι σε θέση να μας δώσει πληροφορίες για :

- την ποιοτική και ποσοτική σύσταση σύνθετων μειγμάτων αγνώστου περιεχομένου
- τη δομή ανόργανων, οργανικών και βιολογικών μορίων
- τη δομή και τη σύσταση στερεών επιφανειών με μορφή απεικόνισης
- την παρουσία αλλά και την αναλογία ισοτόπων ατόμων σε διάφορα δείγματα

ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ

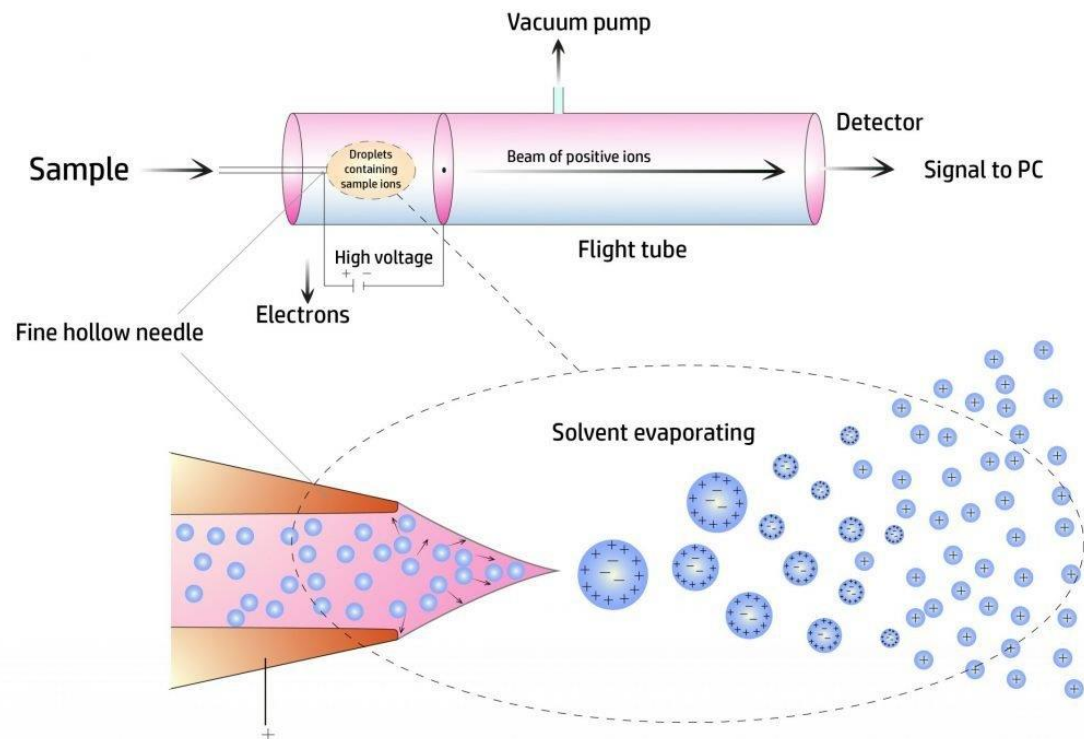
Η MS είναι τόσο βασική για την χημική ανάλυση, γιατί παρουσιάζει κάποιες πολύ σημαντικές ιδιότητες, όπως:

- ✓ πολύ **μεγάλη ευαισθησία** που αγγίζει τα 10^{-18} mol
- ✓ είναι σε θέση να μετρά με πολύ **μεγάλη ακρίβεια τις σχετικές μοριακές μάζες** με αποτέλεσμα την απόλυτη ταυτοποίηση ενώσεων ακόμη και πολύ μικρών συγκεντρώσεων
- ✓ και βέβαια είναι σε θέση θεωρητικά τουλάχιστον να έχει δυνατότητες ολικού ανιχνευτή
- ✓ και άρα να μπορεί να αναλύει **οποιοδήποτε σώμα ανεξάρτητα από τη φύση του**
- ✓ μπορεί **να συνδυαστεί** με την αέρια χρωματογραφία(GC) ή την υγρή χρωματογραφία(LC) και να παρέχει έτσι τις λεγόμενες συζευγμένες τεχνικές **GC-MS και LC-MS**, που είναι ένα ανεκτίμητο εργαλείο τόσο στην έρευνα όσο και σε αναλύσεις ρουτίνας.

❖Οι **τεχνολογίες omics** χρησιμοποιούν την MS, γιατί έχει αποδειχθεί ότι είναι σε θέση να βρει με μεγάλη επιτυχία τη δομή νουκλεοτιδίων, πεπτιδίων, πρωτεϊνών. Η έρευνα στη **μεταβολομική** πραγματοποιείται κυρίως με MS. **Η πρωτεομική** εφαρμόζει τη χρήση της MS σε πολλά διαφορετικά στάδια της έρευνας.

ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ-ΟΡΙΣΜΟΣ

- Οικογένεια τεχνικών προσδιορισμού δομής και ποσοτικού προσδιορισμού ενώσεων και στοιχείων, οι οποίες βασίζονται στον ιοντισμό ατόμων ή μορίων ή την παραγωγή ιοντικών θραυσμάτων μορίων στην αέρια φάση και την καταγραφή της σχετικής έντασης του ιοντικού ρεύματος που αντιστοιχεί σε κάθε **λόγο μάζας-προς-φορτίο (m/z)**



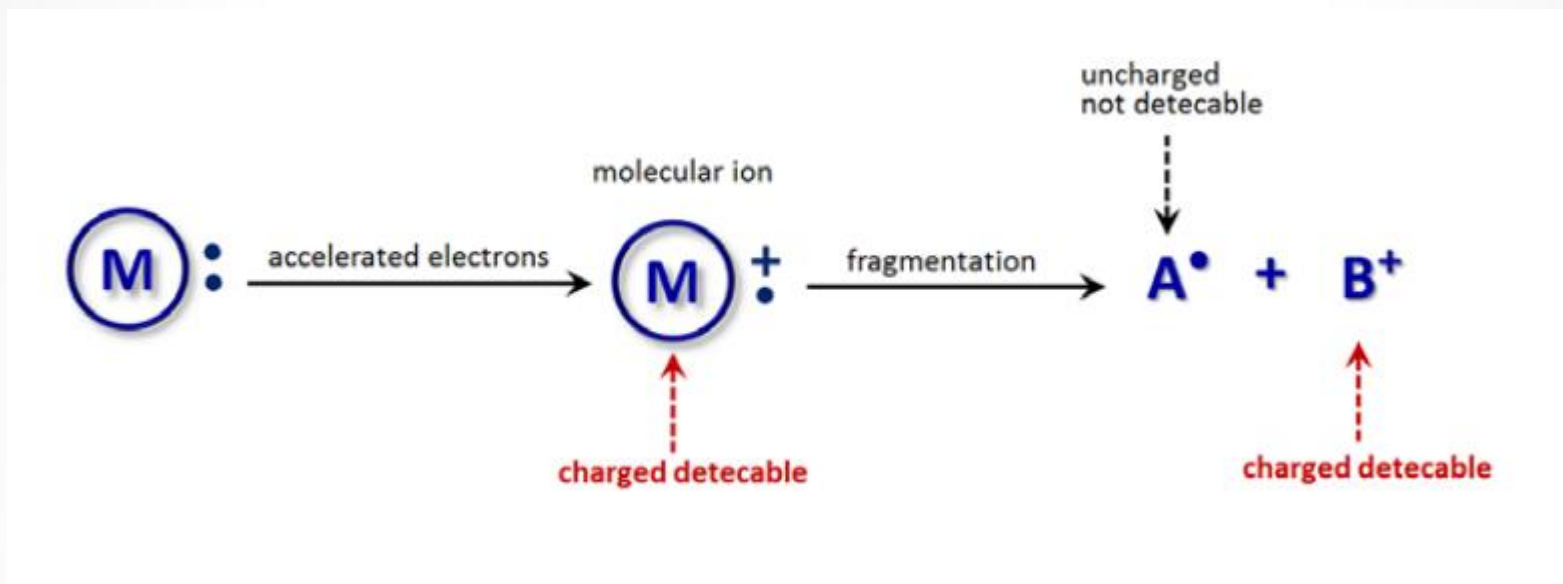
ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ-ΟΡΙΣΜΟΣ

- ❖ Χρησιμοποιούνται υψηλής ενέργειας ηλεκτρόνια προκειμένου να σπάσει ένα μόριο σε θραύσματα
- ❖ Ο διαχωρισμός και η ανάλυση των θραυσμάτων παρέχει πληροφορίες σχετικά με
 - Τη μάζα της ένωσης.
 - Τη δομή της ένωσης

Βασικές Αρχές Φασματοσκοπίας Μάζας

- Όταν ένα υψηλής ενέργειας ηλεκτρόνιο βομβαρδίζει ένα ουδέτερο μόριο ή άτομο (e^-) το ηλεκτρόνιο εκτρέπεται αλλά μεταβιβάζει μεγάλο μέρος της ενέργειάς του στο μόριο
- Με την αποβολή του ηλεκτρονίου το μόριο αποκτά θετικό φορτίο και ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο.
- Όταν ένα επιταχυνόμενο μοριακό ιόν περνά μεταξύ των πόλων ενός μαγνήτη εκτρέπεται από το μαγνητικό πεδίο
- Το ποσοστό εκτροπής εξαρτάται από το λόγο της μάζας-προς-φορτίο (m/z)
 - Υψηλός λόγος m/z χαμηλή εκτροπή
 - Χαμηλός λόγος m/z υψηλή εκτροπή
- ✓ Αν το μοναδικό ιόν που υπάρχει είναι το μοριακό ιόν από φάσμα μάζας παίρνουμε τιμή του μοριακού βάρους της ένωσης
- ✓ Το μοριακό ιόν συχνά κατακερματίζεται σε πολλά θραύσματα χαμηλότερου λόγου m/z .

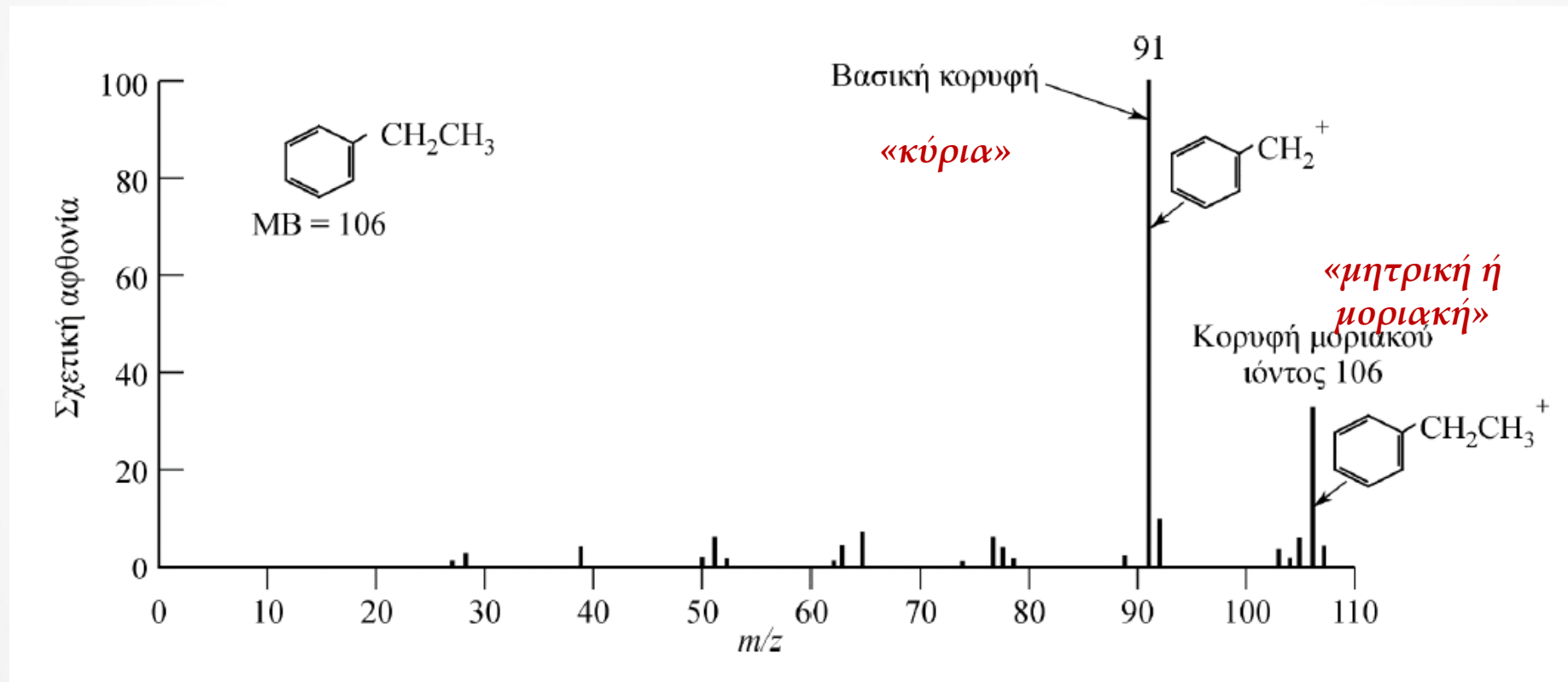
ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ-ΟΡΙΣΜΟΣ



- ❑ Ατμοί της ένωσης (π.χ. αιθυλοβενζόλιο) βομβαρδίζονται με δέσμη ηλεκτρονίων
- ❑ Αποσπάται ένα ηλεκτρόνιο από το μόριο του αναλύτη και σχηματίζεται το μοριακό ιόν
- ❑ Το φορτισμένο σωματίδιο M είναι το μοριακό ιόν (ίδια μοριακή μάζα με το μόριο)
- ❑ Με τη σύγκρουση μεταφέρεται αρκετή ενέργεια στα μόρια-διεγερμένη κατάσταση
- ❑ Κατά την αποδιέγερση γίνεται διάσπαση μέρους των μοριακών ιόντων προς ιόντα μικρότερης μάζας
- ❑ Τα θετικά ιόντα που παράγονται έλκονται μέσω της σχισμής του φασματομέτρου μαζών και διαχωρίζονται ανάλογα με τον λόγο μάζας-προς-φορτίο (m/z)

ΦΑΣΜΑ ΜΑΖΩΝ

- διάγραμμα που δείχνει την ένταση του μετρούμενου ρεύματος ως συνάρτηση του λόγου μάζας-προς-φορτίο (m/z)
- οριζόντιο άξονα έχει το λόγο m/z και στον κατακόρυφο την σχετική ένταση του λαμβανομένου σήματος



□ **Φάσμα μαζών αιθυλοβενζολίου**

**Άλλες κορυφές: θυγατρικές, ισοτόπων, θορύβου υποστρώματος*

ΑΤΟΜΙΚΗ & ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΑΖΑ

- **Ενοποιημένη μονάδα ατομικών μαζών (u):** ίση προς το 1/12 της μάζας ενός ουδέτερου ατόμου ^{12}C

- Συνήθως αναφέρεται και ως ένα Dalton (Da)

$$1 \text{ u} = 1 \text{ Da} = 1,66054 \times 10^{-27} \text{ kg} / \text{άτομο } ^{12}\text{C}$$

- **Ατομική μάζα** ^{35}Cl : $2,91407 \times 12,0000 \text{ Da} = 34,9688 \text{ Da}$

- **Μοριακή μάζα** $^{12}\text{C}^1\text{H}_4$: $12,0000 \times 1 + 1,007825 \times 4 = 16,0313 \text{ Da}$

- Ονομαστική (**μονοϊσοτοπική**) **μάζα** (nominal mass)
Για το $^{12}\text{C}^1\text{H}_4$: 16 u

- **Μέση μάζα** (average mass): συνδυασμός των ακριβών μαζών των ισοτόπων (AB) ή των μέσων ατομικών μαζών (MB)

ΛΟΓΟΣ ΜΑΖΑ-ΠΡΟΣ-ΦΟΡΤΙΟ

□ Ο **λόγος μάζα-προς φορτίο (m/z)** ενός ατομικού ή μοριακού ιόντος

Είναι ο λόγος χωρίς μονάδες του μαζικού αριθμού και του αριθμού των θεμελιωδών φορτίων z του ιόντος

✓ Λαμβάνεται με διαίρεση της ατομικής ή μοριακής μάζας ενός ιόντος (m) με τον αριθμό (z) των φορτίων που φέρει

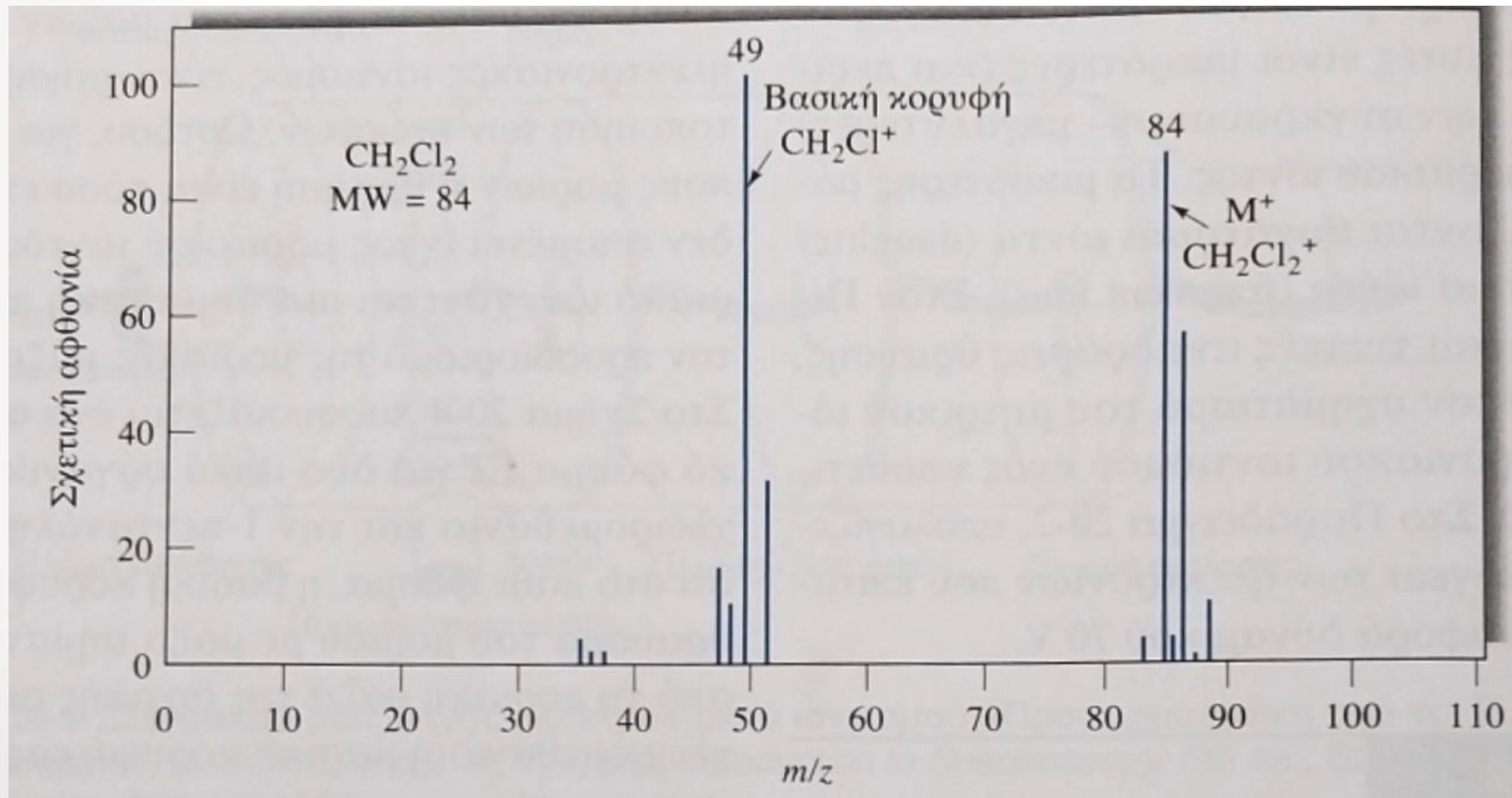
$$^{12}\text{C}^1\text{H}_4^+ \text{ m/z} = 16,032 / 1 = 16,032$$

$$^{12}\text{C}^1\text{H}_4^{2+} \text{ m/z} = 16,0313 / 2 = 8,0156$$

(*χωρίς μονάδες)

ΙΣΟΤΟΠΙΚΕΣ ΚΟΡΥΦΕΣ

- ✓ Υπάρχουν κορυφές σε λόγους m/z μεγαλύτερους από τον λόγο του μοριακού ιόντος
- ✓ Είναι ιόντα που έχουν τον ίδιο χημικό τύπο αλλά διαφορετική σύσταση
- ✓ Το ύψος των διαφορετικών κορυφών εξαρτάται από τη φυσική αφθονία των ισωτόπων



$^{12}\text{C}^1\text{H}_2^{35}\text{Cl}_2$: $m=84$

$^{13}\text{C}^1\text{H}_2^{35}\text{Cl}_2$: $m=85$

$^{12}\text{C}^1\text{H}_2^{35}\text{Cl}^{37}\text{Cl}$: $m=86$

$^{13}\text{C}^1\text{H}_2^{35}\text{Cl}^{37}\text{Cl}$: $m=87$

$^{12}\text{C}^1\text{H}_2^{37}\text{Cl}_2$: $m=88$

□ **Φάσμα μαζών διχλωρομεθανίου**

ΙΣΟΤΟΠΙΚΕΣ ΚΟΡΥΦΕΣ

ΠΙΝΑΚΑΣ 20-3 Φυσική αφθονία ισotόπων μερικών συνηθισμένων στοιχείων

Στοιχείο ^α	αφθονότερο ισotόπο	Αφθονία άλλων ισotόπων σε σχέση με 100 μέρη του αφθονότερου ^β
Υδρογόνο	¹ H	² H 0,015
Άνθρακας	¹² C	¹³ C 1,08
Άζωτο	¹⁴ N	¹⁵ N 0,37
Οξυγόνο	¹⁶ O	¹⁷ O 0,04 ¹⁸ O 0,20
Θείο	³² S	³³ S 0,80 ³⁴ S 4,40
Χλώριο	³⁵ Cl	³⁷ Cl 32,5
Βρόμιο	⁷⁹ Br	⁸¹ Br 98,0
Πυρίτιο	²⁸ Si	²⁹ Si 5,1 ³⁰ Si 3,4

^α Τα φθόριο (¹⁹F), φωσφόρος (³¹P), νάτριο (²³Na) και ιώδιο (¹²⁷I) δεν διαθέτουν άλλα φυσικά ισotόπα.

^β Οι αριθμοί δείχνουν το μέσο όρο του πλήθους των ισotόπων ατόμων που υπάρχουν ανά 100 άτομα του αφθονότερου ισotόπου. Δηλαδή για κάθε 100 άτομα ¹²C θα υπάρχουν κατά μέσο όρο 1,08 άτομα ¹³C.

Στη φύση υπάρχουν τρεις κατηγορίες στοιχείων:

- **“A” στοιχεία**—Μόνο ένα φυσικό ισotόπο υπάρχει (πχ F)
- **“A+1” στοιχεία** —Δύο φυσικά ισotόπα υπάρχουν τα οποία διαφέρουν κατά 1 Da (πχ C)
- **“A+2” στοιχεία**—Δύο φυσικά ισotόπα υπάρχουν τα οποία διαφέρουν κατά 2 Da (πχ Cl)

ΔΙΑΚΡΙΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ- RESOLVING POWER (R)

Διακριτική ικανότητα φασματομέτρου μαζών:

$$R = m/\Delta m$$

□ Η ικανότητα ενός φασματομέτρου μαζών να διαχωρίζει μάζες

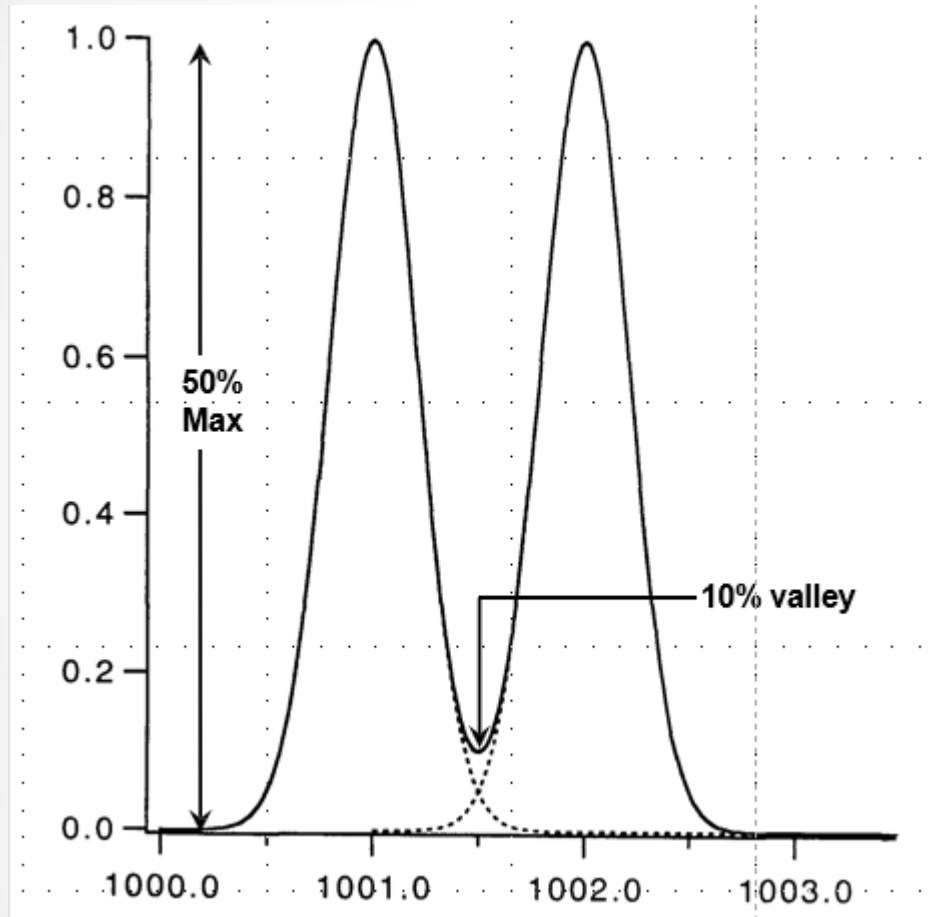
▪ m : η τιμή της μάζας της πρώτης κορυφής

▪ Δm : η διαφορά μαζών μεταξύ δύο μόλις διαχωριζόμενων κορυφών

$$\begin{array}{l} \text{N}_2^+ : 28,0061 \\ \text{CO}^+ : 27,9949 \end{array} \quad \left. \vphantom{\begin{array}{l} \text{N}_2^+ \\ \text{CO}^+ \end{array}} \right\} \begin{array}{l} \Delta m = 28,0061 - 27,9949 = \\ = 0,0112 \end{array}$$

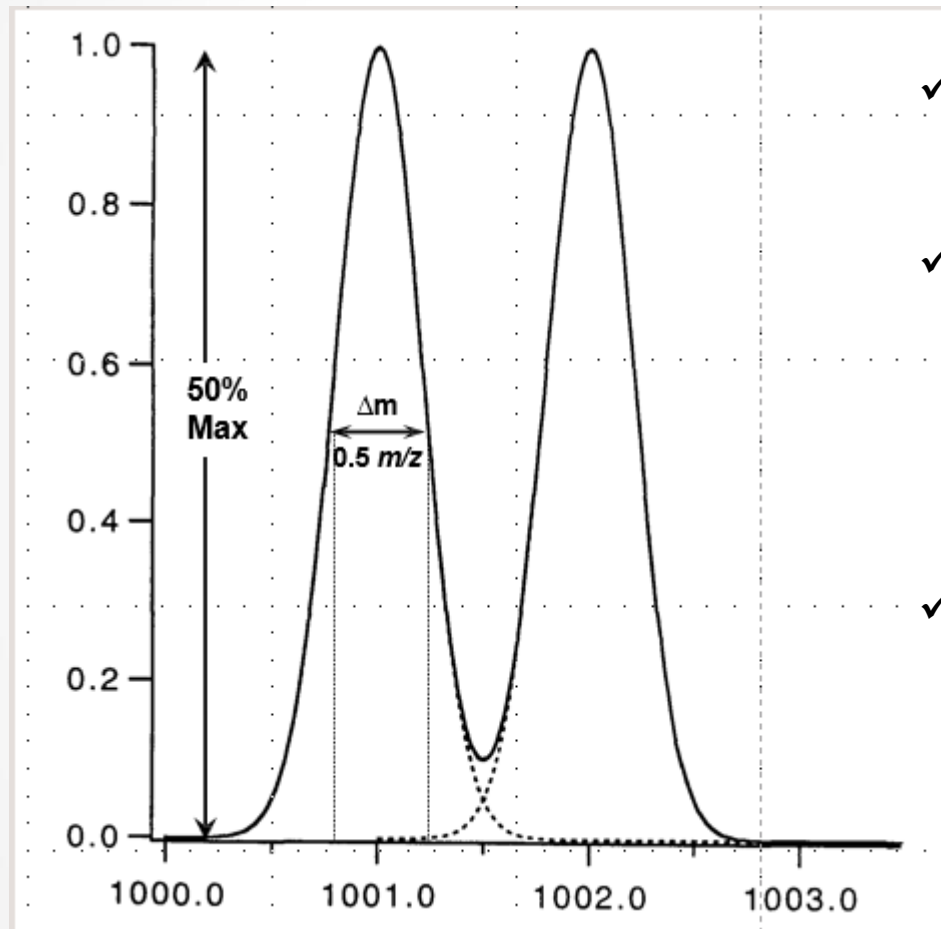
$$\text{Άρα: } R = m/\Delta m = 27,9949/0,0112 = 2500$$

ΔΙΑΚΡΙΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ- RESOLVING POWER (R)



- ✓ Δύο κορυφές θεωρείται ότι διαχωρίζονται όταν η επικάλυψή τους δεν υπερβαίνει ένα δεδομένο κλάσμα συνήθως 10% του ύψους τους
- ✓ $R = 1001/(1002-1001) = 1001$

ΔΙΑΚΡΙΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ- RESOLVING POWER (R)



- ✓ Ο προηγούμενος ορισμός δύσκολα εφαρμόζεται πρακτικά.
- ✓ Από μια μόνο κορυφή υπολογίζω:
το εύρος της κορυφής στο ισό του ύψους της κορυφής-**Full Width at Half Maximum**
FWHM = Δm
- ✓ $R = 1001 / (2 \times 0,5) = 1001$

ΔΙΑΚΡΙΣΙΜΟΤΗΤΑ-RESOLUTION (R)

□ **Διακρισιμότητα** είναι η διαφορά δυο γειτονικών τιμών ιόντων m/z ($m_2 - m_1$) προς την μάζα του πρώτου ιόντος (m) και εκφράζεται σε ppm:

$$(m_2 - m_1)/m_1 = \Delta m/m_1$$

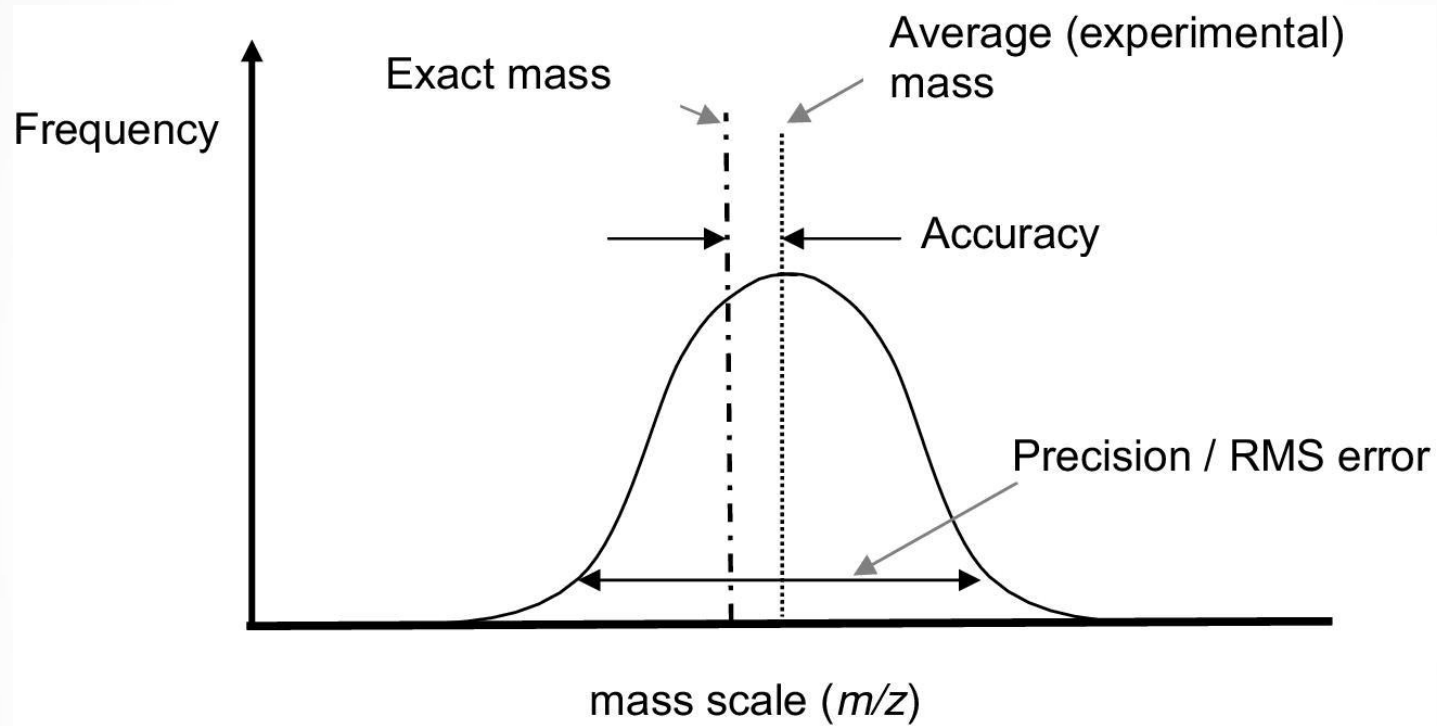
Παράδειγμα για:

N_2^+ : 28,0061 και CO^+ : 27,9949

$\Delta m/m_1 = 0,0004$ ή 400 ppm

Πολλές φορές αναφέρεται και ως **ακρίβεια (accuracy)**

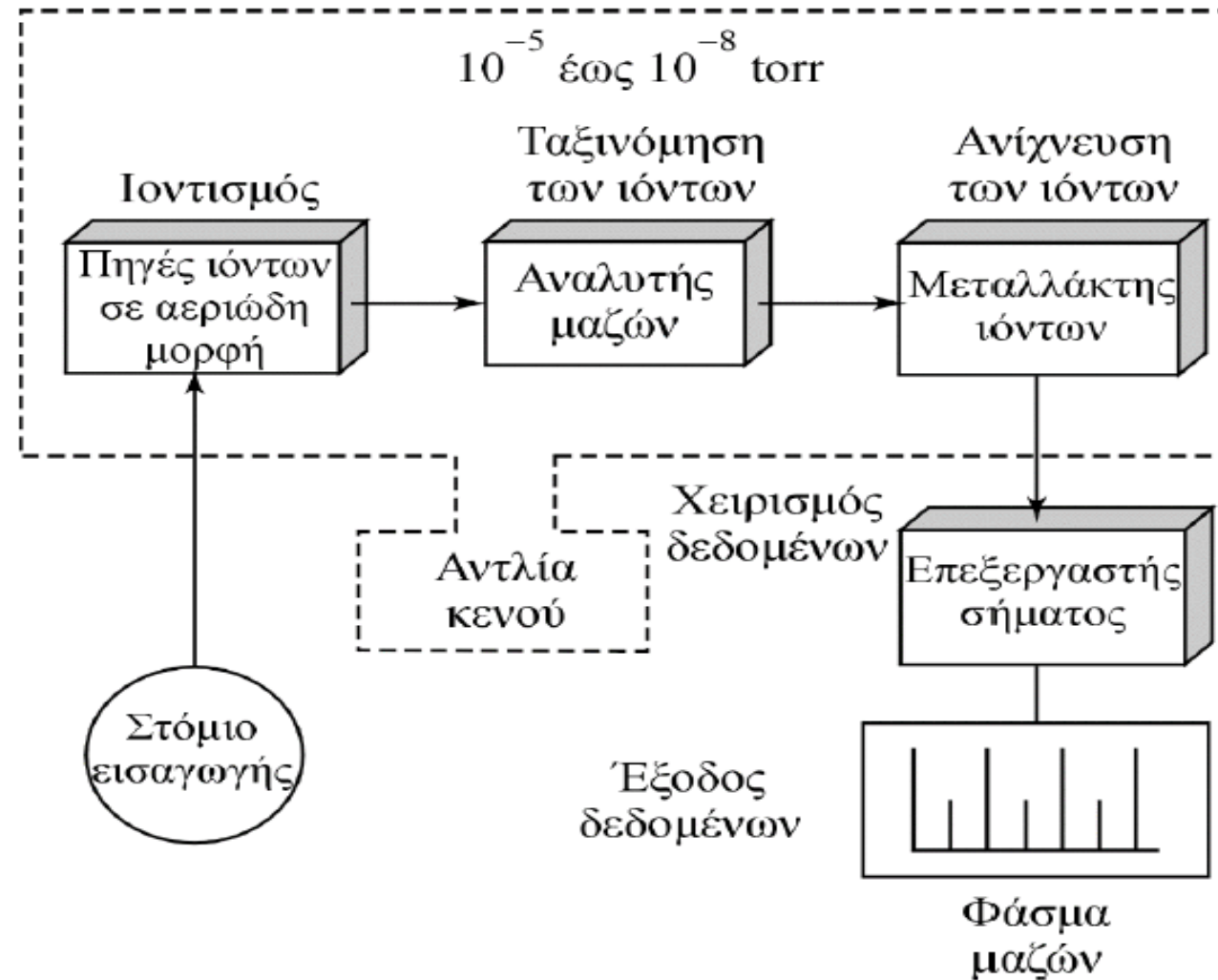
ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΜΑΖΑΣ-MASS ACCURACY



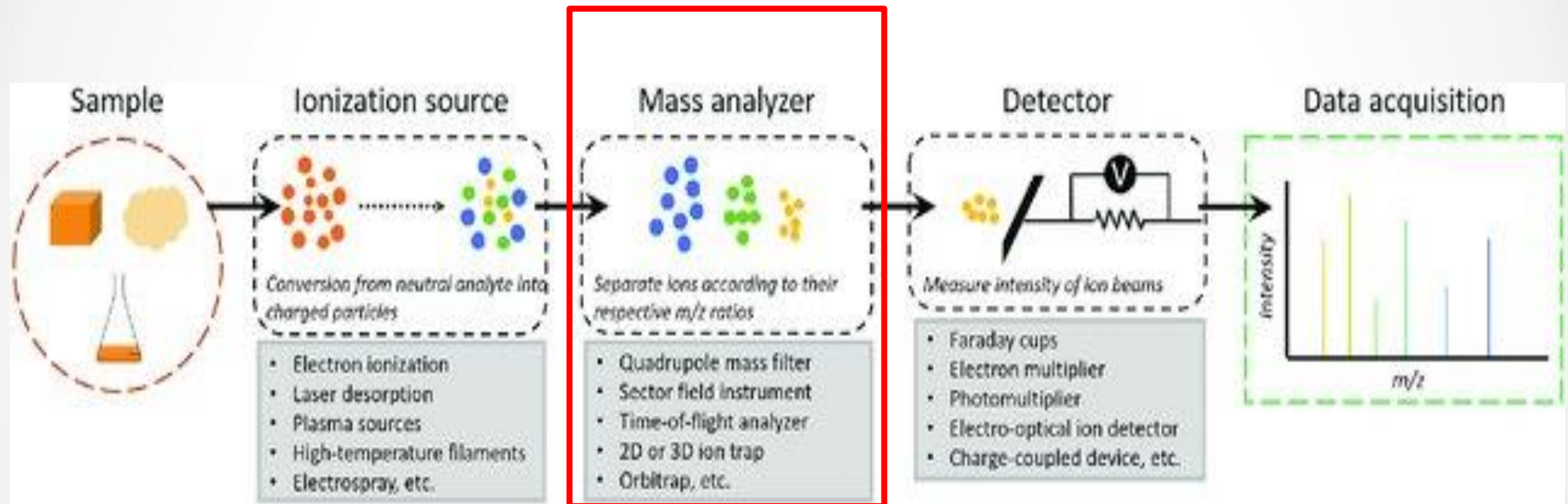
- η εγγύτητα της πειραματικής μάζας (measured accurate mass) προς την πραγματική τιμή (exact mass). Στη φασματομετρία μάζας προσδιορίζεται σε ppm χρησιμοποιώντας την ακόλουθη εξίσωση:

$$\text{Error} = (\text{monoisotopic exact mass} - \text{measured accurate mass}) / \text{monoisotopic exact mass} \times 10^6$$

ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΦΑΣΜΑΤΟΓΡΑΦΟΥ ΜΑΖΑΣ

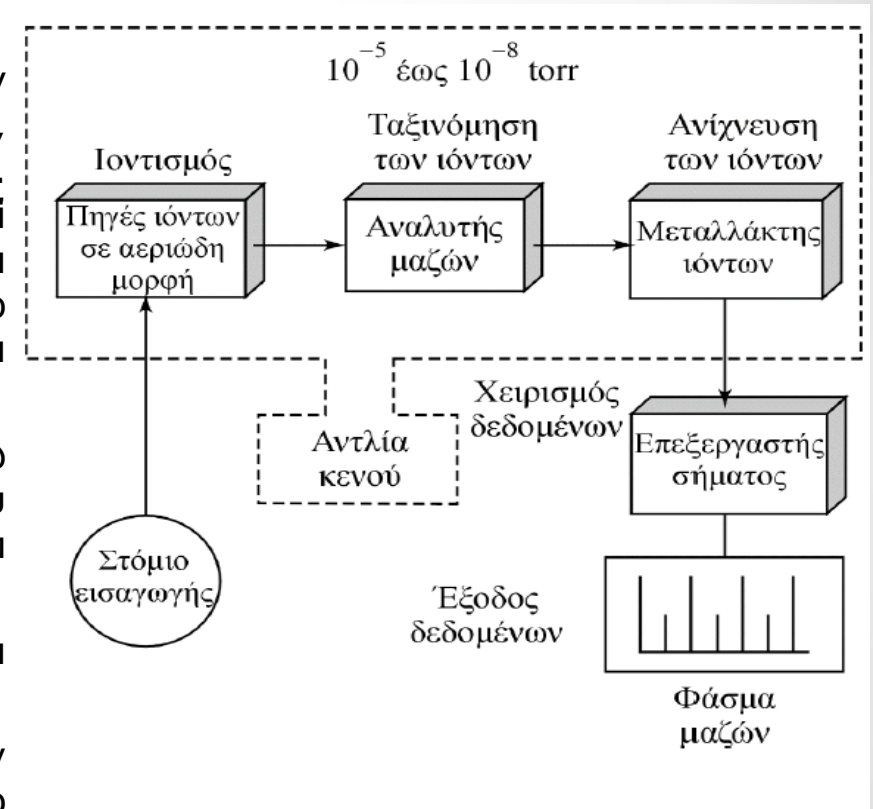


ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΦΑΣΜΑΤΟΓΡΑΦΟΥ ΜΑΖΑΣ



ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΦΑΣΜΑΤΟΓΡΑΦΟΥ ΜΑΖΑΣ

- 1. Το σύστημα εισαγωγής του δείγματος.** Τις περισσότερες φορές το δείγμα σε αέρια ή υγρή μορφή. Οι ποσότητες που εισάγονται είναι πολύ μικρές, της τάξης του ρmol ή και μικρότερες.
- 2. Την πηγή των ιόντων.** Σε αυτό το τμήμα τα μόρια των αναλυόμενων υλικών μετατρέπονται σε ιόντα με διάφορες τεχνικές, όπως βομβαρδισμός με ηλεκτρόνια, άλλα ιόντα ή μόρια, φωτόνια. Επίσης, για την μετατροπή σε ιόντα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ηλεκτρικό πεδίο ή υψηλή θερμοκρασία. Σε αρκετά φασματομέτρα μάζας το σύστημα εισαγωγής και η πηγή ιόντων είναι ένα ενιαίο τμήμα που παράγει ένα ρεύμα ιόντων, που κατόπιν επιταχύνονται και εισέρχονται στον αναλυτή μάζας.
- 3. Τον αναλυτή μάζων.** Είναι το κέντρο του συστήματος. Εδώ πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των ιόντων με βάση τις τιμές του λόγου m/z . Χρησιμοποιούνται αρκετοί αναλυτές μάζας με λειτουργία που στηρίζεται σε διαφορετικές αρχές.
- 4. Τον ανιχνευτή.** Η διάταξη αυτή μετατρέπει σε ηλεκτρικό σήμα τα ιόντα που διαχωρίστηκαν από τον αναλυτή μάζας.
- 5. Το σύστημα κενού.** Εσωτερικές και εξωτερικές αντλίες δημιουργούν συνθήκες κενού, πιέσεις της τάξης των $10^{-5} - 10^{-8}\text{Torr}$ σε όλο το φασματογράφο εκτός από το σύστημα επεξεργασίας, ανάγνωσης και καταγραφής δεδομένων.
- 6. Επεξεργασία δεδομένων.** Εδώ το ηλεκτρικό σήμα από τον ανιχνευτή καταφθάνει σε έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή, όπου με κατάλληλο λογισμικό γίνεται η επεξεργασία του, η ανάγνωση του και η καταγραφή του με τη μορφή του γραφήματος φάσματος μάζων.



ΑΝΑΛΥΤΕΣ ΜΑΖΩΝ

- ❑ Ο αναλυτής είναι μια διάταξη, που διαχωρίζει τα ιόντα που έρχονται από την πηγή ιόντων ανάλογα με το λόγο m/z .
- ✓ Άρα λοιπόν ένας ιδανικός αναλυτής θα ήταν σε θέση να διαχωρίσει ιόντα που διαφέρουν ελάχιστα στο λόγο m/z .
- ✓ Θα έπρεπε να είναι συμβατός με όλες τις τεχνικές ιονισμού, με όλες τις διαφορετικές διαδικασίες εισαγωγής του προς ανάλυση δείγματος
- ✓ και επιπλέον να μπορεί να διαχωρίσει ένα μεγάλο πλήθος εισερχόμενων ιόντων.

- ❖ Η πραγματικότητα όμως είναι διαφορετική, γιατί ιδανικός αναλυτής δεν υπάρχει. Άρα, λοιπόν γίνονται συμβιβασμοί ανάμεσα στο τι θέλουμε να πετύχουμε και στο πως μπορούμε να το πετύχουμε στο μέτρο του δυνατού.

- **Συνεχείς αναλυτές μαζών**

- Τετραπολικός αναλυτής μαζών ή τετράπολο quadrupole, Q)
- Αναλυτές μαγνητικού τομέα magnetic sector)

- **Παλμικοί αναλυτές μαζών**

- Τετραπολική παγίδα ιόντων ion trap, IT)
- Αναλυτές μαζών χρόνου πτήσης (Time of Flight, TOF)
- Αναλυτής κυκλοτρονιακού συντονισμού ιόντων με μετασχηματισμό Fourier (Fourier transform Ion Cyclotron Resonance, FTICR)
- Orbitrap

Διακριτική ικανότητα αναλυτών μαζών

α) χαμηλής διαχωριστικής ικανότητας ($R = 100 - 1000$)

➤ ιόντα διαχωρίζονται με βάση την ονομαστική μάζα, η οποία αντιστοιχεί στην πλησιέστερη ακέραια τιμή προς το μοριακό τους βάρος

(πχ CO από N₂ Δεν διακρίνονται)

β) υψηλής διαχωριστικής ικανότητας ($R = 10^4 - 10^5$)

➤ διαχωρισμός ιόντων με την ίδια ονομαστική μάζα αλλά διαφορετικές τιμές ακριβούς μάζας

πχ

$$\text{CO}^{++} = 27.995$$

$$\text{N}_2^{++} = 28.006$$

$$\text{CH}_2 \text{N}^+ = 28.019$$

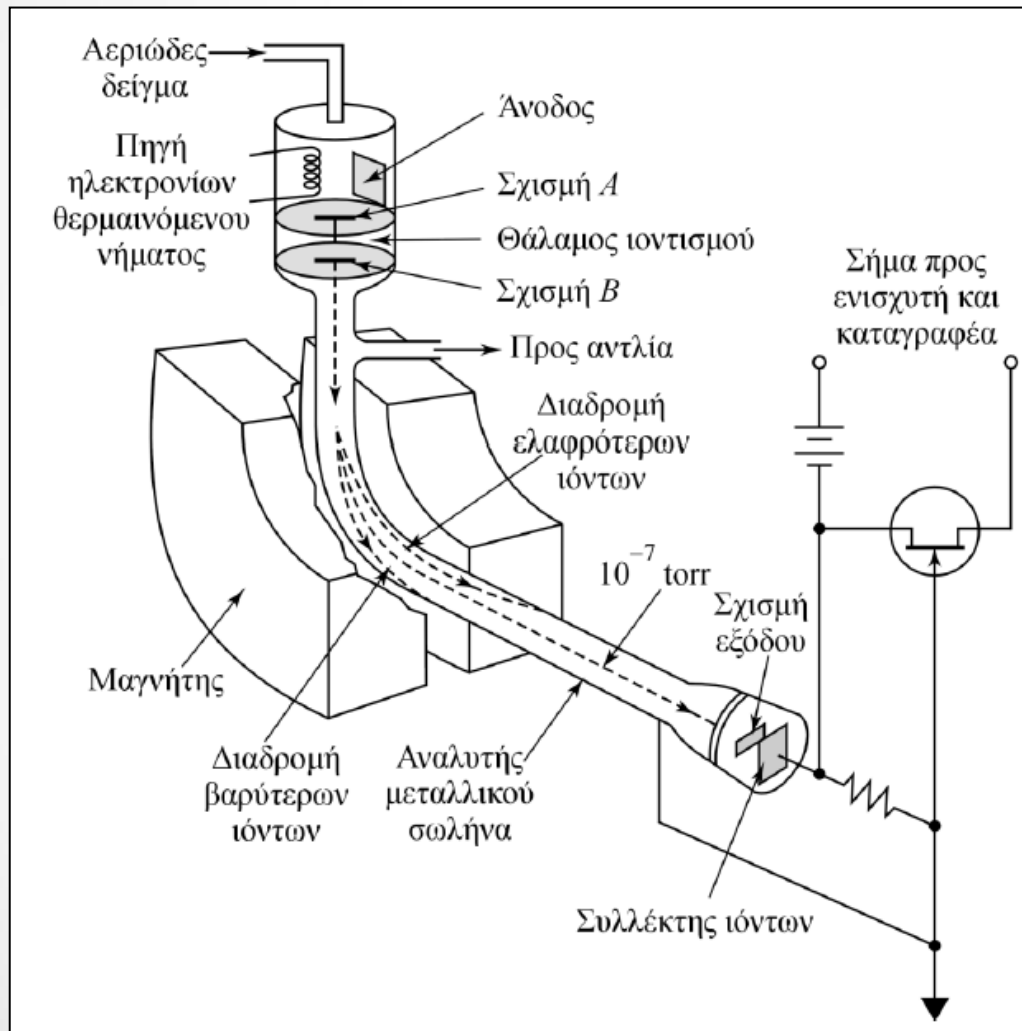
$$\text{C}_2\text{H}_4^{++} = 28.031$$

Διακριτική ικανότητα αναλυτών μαζών

- ❑ Η διακριτική ικανότητα (R) των φασματομέτρων μαζών διαφέρει σημαντικά:
 - Τα τετράπολα και οι παγίδες ιόντων έχουν σταθερό FWHM σε όλο το εύρος μαζών (συνήθως 0,7-0,4 u). Επομένως, η R μεταβάλλεται ανάλογα με το m/z . Αυτά είναι όργανα χαμηλής διακριτικής ικανότητας (Low Resolution MS)
 - Τα TOF και οι μαγνητικοί αναλυτές έχουν σταθερή R σε όλο το εύρος μαζών.
 - Αν π.χ. $R=20000$ σε m/z 200, τότε το $\Delta m=0,01u$ (ή 50 ppm)
 - Τα FTICR σε σταθερό χρόνο ανίχνευσης έχουν R αντιστρόφως ανάλογο του m/z .
 - Έτσι, αν $R=107$ σε m/z 100, τότε το $R=106$ σε m/z 1000 (FTICR).
 - Για το Orbitrap ισχύει κάτι ανάλογο:
 - αν $R=6 \times 10^4$ σε m/z 400, τότε το $R=2 \times 10^4$ σε m/z 4000

Αυτά τα όργανα είναι υψηλής διακριτικής ικανότητας (High Resolution MS, HRMS)

Αναλυτής Μαγνητικού τομέα απλής εστίασης (Magnetic Sector Analyzer, B)



- διαθέτει ένα μόνιμο μαγνήτη ή ηλεκτρομαγνήτη (συνήθως) που αναγκάζει τα ιόντα, που εισέρχονται σε αυτόν μετά την πηγή, να κινηθούν κατά μήκος μιας κυκλικής τροχιάς.
- Ανάλογα με την κατασκευή του τα ιόντα θα διαγράψουν τροχιές 60°, 90° ή 180°
- Οι πιο συνηθισμένοι τομείς είναι αυτοί των 90°

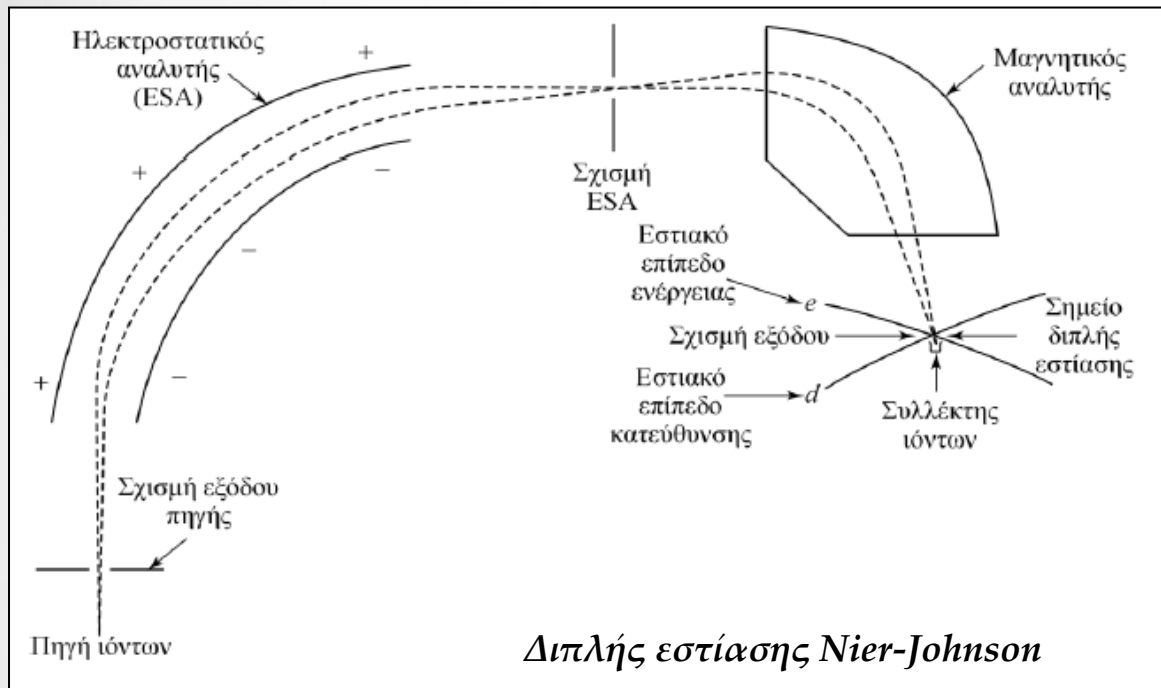
Αναλυτής Μαγνητικού τομέα απλής εστίασης (Magnetic Sector Analyzer, B)

- Για να καταφέρουν ιόντα με διαφορετικό λόγο m/z να εξέλθουν από τη σχισμή εξόδου και να καταλήξουν στον ανιχνευτή, μεταβάλλεται η ένταση του μαγνητικού πεδίου ή η τάση επιτάχυνσης κατά την έξοδο τους από την πηγή ιόντων
- ιόντα με το ίδιο φορτίο, θεωρητικά, αποκτούν την ίδια κινητική ενέργεια.
- Άρα τα μικρότερης μάζας ιόντα, αποκτούν μεγαλύτερες ταχύτητες από εκείνα που έχουν μεγαλύτερη μάζα και μέσα στον αναλυτή θα συνεχίσουν να κινούνται με τις ίδιες τιμές ταχυτήτων

$$\frac{m}{z} = \frac{B^2 r^2 e}{2V}$$

- B: ένταση του μαγνητικού πεδίου
- r: ακτίνα του τομέα
- V: τάση επιτάχυνσης

Αναλυτής Μαγνητικού τομέα διπλής εστίασης



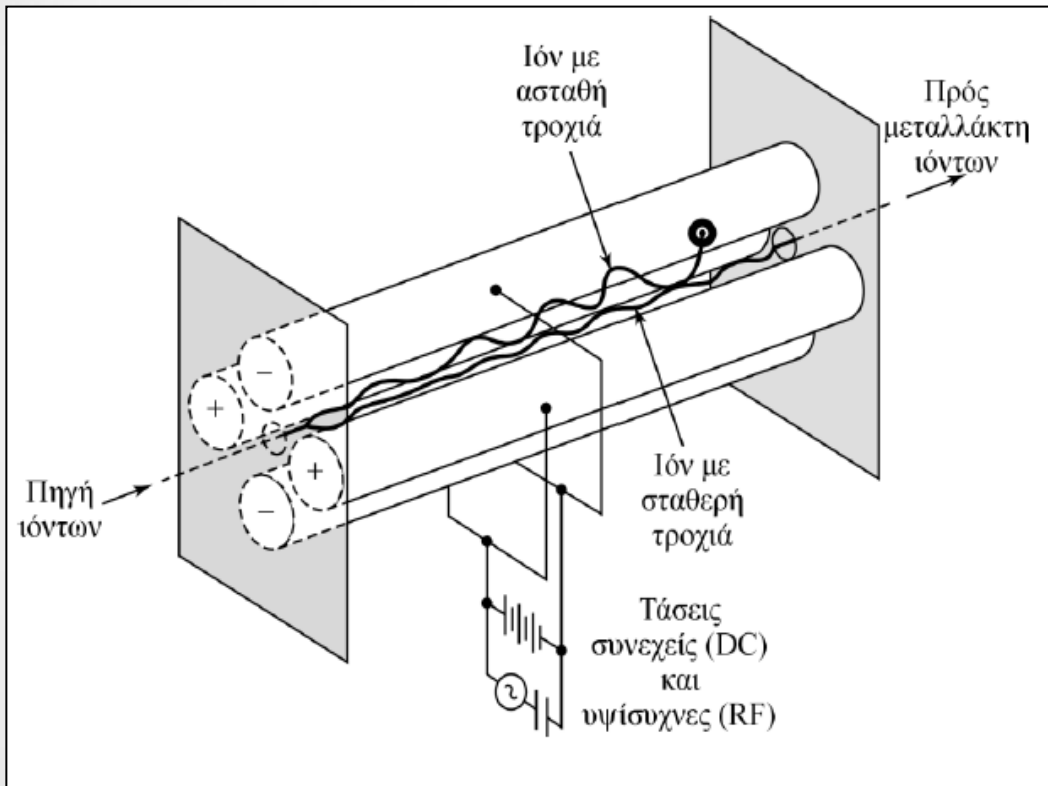
- ❑ συνδυασμός ηλεκτροστατικού αναλυτή και μαγνητικού αναλυτή
- ηλεκτροστατικός αναλυτής εστιάζει τα ιόντα με βάση την ενέργεια
- μαγνητικός αναλυτής εστιάζει τα ιόντα με βάση την διεύθυνση
- ❖ δυνατότητα μέτρησης μονάδων μάζας με ακρίβεια τρίτου ή τέταρτου δεκαδικού ψηφίου

- Αρχικά η δέσμη των ιόντων εισέρχεται στο χώρο ανάμεσα σε δύο κυρτά μεταλλικά ελάσματα στα οποία εφαρμόζεται σταθερή τάση- ηλεκτροστατικός αναλυτής (electrostatic analyzer, ESA).
- Τα ιόντα με μεγαλύτερη ή μικρότερη κινητική ενέργεια από αυτήν που καθορίζει η τάση του ESA καταλήγουν στο πάνω ή στο κάτω έλασμα και απομακρύνονται από τη δέσμη. Με αυτό τον τρόπο στη δέσμη ιόντων παραμένουν και εξέρχονται από τη σχισμή του ESA εκείνα των οποίων οι κινητικές ενέργειες βρίσκονται στο στενό πλαίσιο τιμών που ορίζει η τάση του ESA.
- Τα ιόντα στη συνέχεια μπαίνουν στον μαγνητικό αναλυτή, όπου γίνεται η δεύτερη εστίαση τους, αυτή της κατεύθυνσης κίνησης.

Φασματομέτρα Μαζών Μαγνητικού Τομέα

Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
<ul style="list-style-type: none">• Υψηλή διακριτική ικανότητα (διπλής εστίασης)• Προσδιορισμός μοριακών μαζών• Δυνατότητα προσδιορισμού ισοτόπων• Πολύ καλή ευαισθησία σε χαμηλή R• Δυνατότητα MS/MS• Εφαρμογή στον προσδιορισμό διοξινών, ουσιών doping	<ul style="list-style-type: none">• Ογκώδη όργανα• Υψηλό κόστος αγοράς και συντήρησης• Απαιτούν υψηλό κενό και υψηλές τάσεις λειτουργίας• Μειωμένη ευαισθησία σε υψηλή R• Προβληματική σύζευξη με πηγές ιοντισμού AP (ESI)• Ειδικά εκπαιδευμένο προσωπικό

Τετραπολικός αναλυτής μαζών (Quadrupole Mass Analyser, Q)



➤ «φίλτρο μαζών»

- Αποτελείται από τέσσερις, παράλληλες μεταξύ τους, κυλινδρικές, μεταλλικές ράβδους που λειτουργούν σαν ηλεκτρόδια
- ανά δύο, σε διαγώνια διάταξη να σχηματίζουν ζευγάρι και να συνδέονται το ένα ζεύγος με τον θετικό πόλο μια πηγής συνεχούς ρεύματος και το δεύτερο ζεύγος με τον αρνητικό πόλο
- σε κάθε ζευγάρι ράβδων εφαρμόζονται εναλλασσόμενες τάσεις που διαφέρουν μεταξύ τους κατά 180°
- Μια πηγή του εναλλασσόμενου ρεύματος & μια ακόμη πηγή συνεχούς ηλεκτρικού ρεύματος με τάση πόλων από 5 έως 10 Volt
- Τα ιόντα εκείνα που αντιστοιχούν στο δυναμικό που εφαρμόζεται θα διαπεράσουν και θα εξέλθουν από το τετράπολο προς τον ανιχνευτή διαγράφοντας ελικοειδείς τροχιές. Όλα τα υπόλοιπα ιόντα θα ακολουθήσουν παλλόμενη διαδρομή με αποτέλεσμα να προσκρουσθούν στις ράβδους, να εκφορτιστούν και να ην ανιχνευθούν

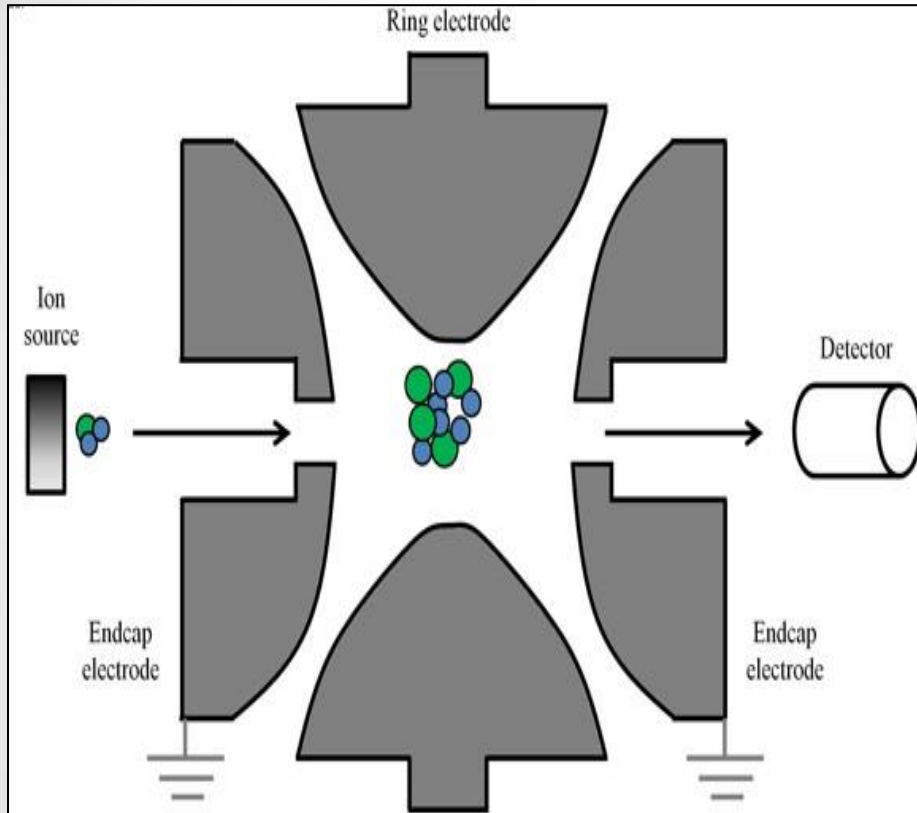
Τετραπολικός αναλυτής μαζών (Quatrupole Mass Analyser,Q)

- ✓ με αρκετά πλεονεκτήματα
- ✓ τον πιο συνηθισμένο τύπο αναλυτή στη φασματομετρία μάζας
- ✓ χαμηλό κόστος,
- ✓ μικρές διαστάσεις
- ✓ παρουσιάζει τις μεγαλύτερες μηχανικές αντοχές
- ✓ μεγάλες τιμές ταχυτήτων σάρωσης
- ✓ δυνατότητα σύζευξης με χρωματογραφικές τεχνικές
- ✓ διαθέσιμα πολλά φασματομέτρα μάζας με τετραπολικό αναλυτή, που μπορούν να διακρίνουν περιοχές ιόντων με λόγο m/z μέχρι 3000 ή και 4000
- ✓ εισάγεται μεγαλύτερη ποσότητα δείγματος

Τετραπολικός αναλυτής μαζών

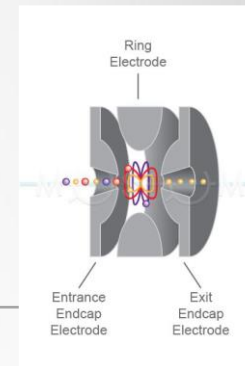
Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
<ul style="list-style-type: none">• Ο πιο αξιόπιστος και διαδεδομένος αναλυτής μαζών• Κατάλληλος για ποσοτική ανάλυση• Κατάλληλος ανιχνευτής χρωματογραφίας• Μεγάλη ταχύτητα σάρωσης ($>(1000 \text{ m/z}) \text{ s}^{-1}$)• Φθηνός αναλυτής μικρό μέγεθος εύκολη χρήση• Μέτριες απαιτήσεις κενού (10^{-5} Torr) και τάσης λειτουργίας• Δυνατότητα MS/MS (τριπλό τετράπολο)• Ιδανικό για σύζευξη με πηγές ιοντισμού AP	<ul style="list-style-type: none">• Χαμηλή διακριτική ικανότητα (FWHM: 0,5 u-R: 1000-2000)• Περιορισμένο εύρος m/z (μέγιστο 4000 u)• Μειωμένη ευαισθησία σε υψηλή R• Τυπικά σε πλήρη σάρωση, η ταχύτητα είναι 1 Hz (1 φάσμα/ s)

Αναλυτής παγίδα ιόντων (Ion trap, IT)



- **Η τρισδιάστατη παγίδα ιόντων** χρησιμοποιεί σταθερής έντασης συνεχές ρεύμα και ραδιοσυχνότητες δημιουργώντας εναλλασσόμενο ΗΠ
- από 2 πλευρικά μεταλλικά ηλεκτρόδια σε σχήμα υπερβολής (end cap) και ένα δακτυλιοειδές ηλεκτρόδιο (ring electrode) μεταξύ των δύο προηγούμενων
- Τα ιόντα παγιδεύονται στο χώρο μεταξύ των τριών αυτών ηλεκτροδίων μέσω ενός επαγομένου ΗΠ, που δημιουργείται από τη χρήση συνεχούς (DC) και εναλλασσόμενου (AC) ρεύματος
- ακολουθώντας πολύπλοκες τροχιές, επιβραδύνονται και προστατεύονται από τις μεταξύ τους συγκρούσεις με τη χρήση συνήθως του αδρανούς αερίου ηλίου (He)
- Καθώς το πλάτος της εφαρμοζόμενης εναλλασσόμενης τάσης μεταβάλλεται, ενώ η συχνότητα παραμένει σταθερή, τα ιόντα αποσταθεροποιούνται σταδιακά ανάλογα με το λόγο m/z . Η τάση υψηλής συχνότητας έχει ως αποτέλεσμα να αυξάνεται το πλάτος της ταλάντωσης που πραγματοποιούν στον οριζόντιο άξονα τα ιόντα και τελικά να εκτοξεύονται έξω από την παγίδα μέσω ενός εκ των δύο πλευρικών ηλεκτροδίων,
- πρώτα τα ιόντα μικρότερου λόγου m/z

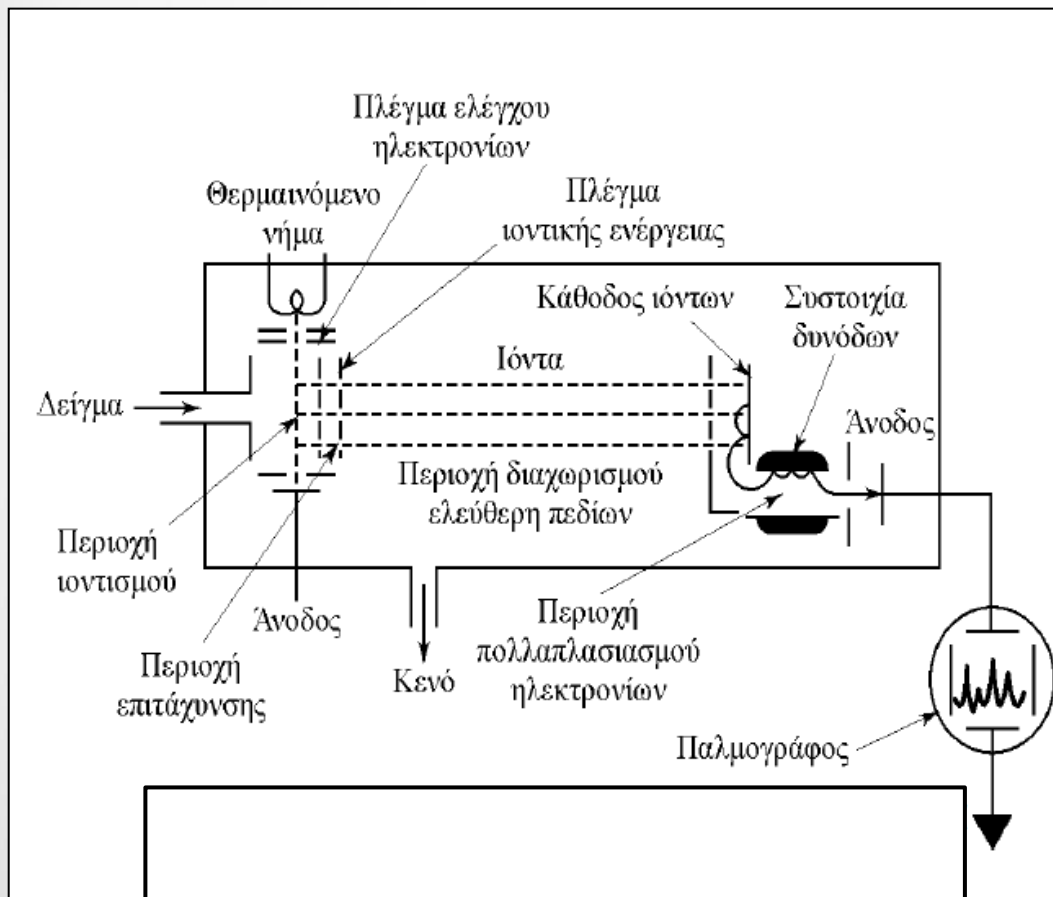
Αναλυτής παγίδα ιόντων (Ion trap, IT)



Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
<ul style="list-style-type: none">• Φθηνός αναλυτής με μικρό μέγεθος• Μεγάλη ταχύτητα σάρωσης ($> (1000 \text{ m/z}) \text{ s}^{-1}$)• Χαμηλή απαίτηση κενού (10^{-3} Torr)• Δυνατότητα MS/MS και MSⁿ (ταυτοποίηση δομής)• Υψηλή ευαισθησία (περιορισμό στις ενώσεις)• Κατάλληλος ανιχνευτής χρωματογραφίας• Μεταβολίτες φαρμάκων, μελέτες δομής πρωτεϊνών	<ul style="list-style-type: none">• Χαμηλή διακριτική ικανότητα (FWHM: $0,3u - R < 4000$)• Περιορισμένο εύρος m/z (ελάχιστο 100, μέγιστο 6000 u)• Περίπλοκη λειτουργία (παλμική), μεγάλος χρόνος από τη στιγμή που παράγονται τα ιόντα μέχρι την καταγραφή τους• Ανεπιθύμητη θραυσματοποίηση, κορεσμός παγίδας• Μικρή ακρίβεια ποσοτικοποίησης, μικρή γραμμική περιοχή

Αναλυτής χρόνου πτήσης (Time of Flight, TOF)

- ❑ Σωλήνας πορείας ή «πτήσης»: Τα ιόντα διαχωρίζονται λόγω διαφορετικών ταχυτήτων

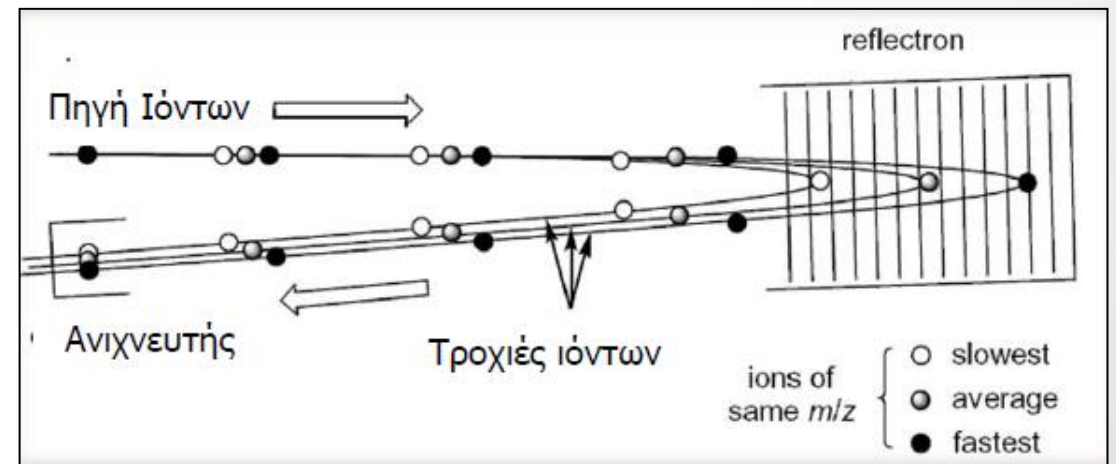
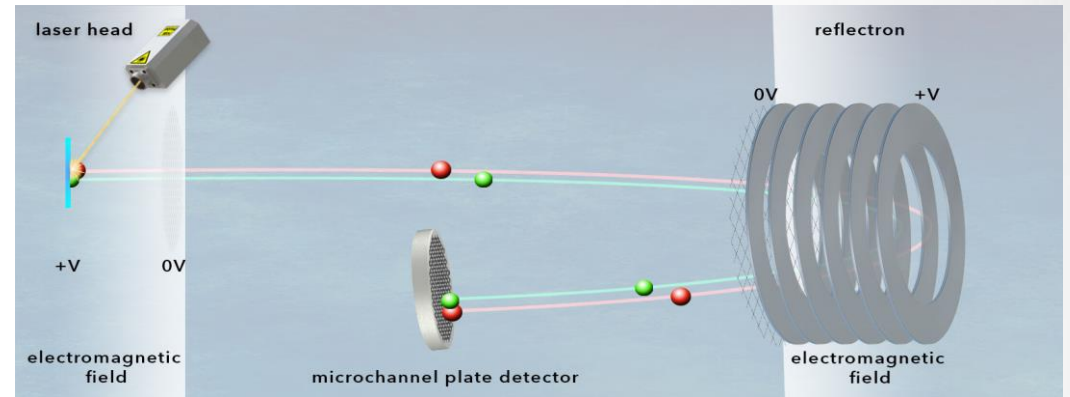


- ο διαχωρισμός βασίζεται στην κινητική ενέργεια και την ταχύτητα των ιόντων
- παραγόμενα ιόντα επιταχύνονται από ηλεκτρικό πεδίο,
- τα ιόντα περνούν μέσα μια διάταξη εστίασης και μετά εισέρχονται σε ένα ευθύγραμμο σωλήνα (**θάλαμος πτήσης**), μήκους d (περίπου 1m), όπου δεν υπάρχει ούτε ηλεκτρικό ούτε μαγνητικό πεδίο.
- Τα ιόντα επιταχύνθηκαν από το ίδιο πεδίο V , οπότε αν έχουν το ίδιο φορτίο θα έχουν αποκτήσει και την ίδια κινητική ενέργεια K
- ελαφρύτερα ιόντα θα κινούνται με μεγαλύτερες ταχύτητες από τα βαρύτερα, και θα χρειάζονται μικρότερο χρονικό διάστημα για να διασχίσουν τον θάλαμο πτήσης όπου θεωρούμε ότι κάνουν ευθύγραμμη ομαλή κίνηση

$$K = qV = zeV = \frac{1}{2} mu^2 \Rightarrow eV = \frac{1}{2} \frac{m}{z} u^2 = E$$

Αναλυτής χρόνου πτήσης (Time of Flight, TOF)

- ❖ παρατηρείται διασπορά των τιμών της κινητικής ενέργειας των ιόντων.
 - Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να εμφανίζονται μικρές διαφορές στους χρόνους πτήσης ιόντων με ίδιο λόγο m/z .
 - Γεγονός που οδηγεί στη διεύρυνση των κορυφών του φάσματος και μείωση της διαχωριστικής ικανότητας του αναλυτή.
-
- ❖ Το πρόβλημα αυτό λύνεται με τη χρήση κατόπτρου ιόντων- ανακλαστήρα.
 - Τα ταχύτερα ιόντα καθυστερούν μέσα στον ανακλαστήρα, γιατί εισέρχονται βαθύτερα μέσα σε αυτόν και κινούνται για μεγαλύτερη διαδρομή. Με αυτόν τον τρόπο τα βραδύτερα ιόντα, αλλά με ίδιο λόγο m/z , καταφέρνουν να τα προφτάσουν.

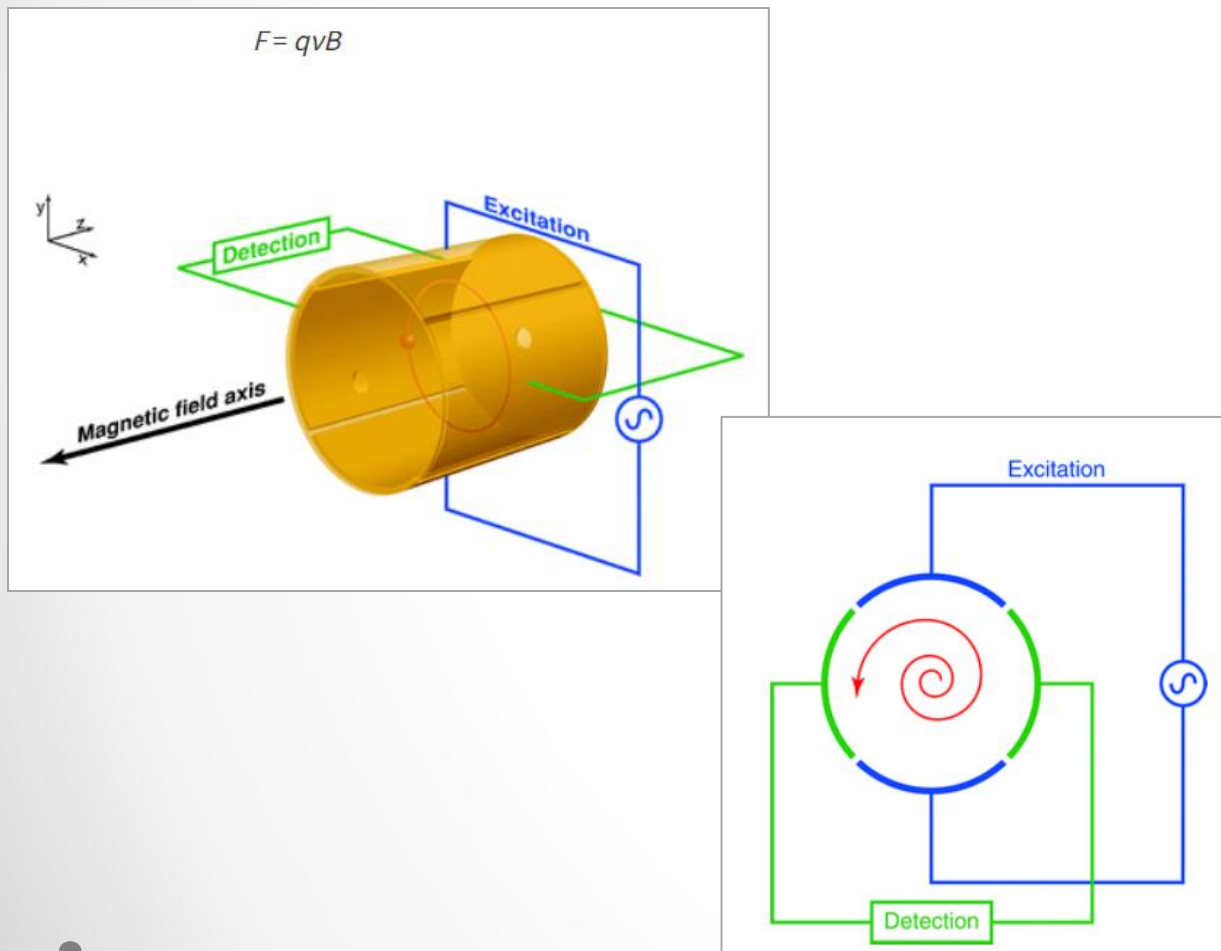


Αναλυτής χρόνου πτήσης (Time of Flight, TOF)

Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
<ul style="list-style-type: none">• Απλότητα λειτουργίας αναλυτή μαζών• Θεωρητικά απεριόριστο εύρος μαζών (reflectron TOF: 10000 u)• Τη μεγαλύτερη ταχύτητα σάρωσης (10^6 m/z s⁻¹ ή τυπικό εύρος σάρωσης σε 50Hz)• Υψηλή διακριτική ικανότητα (R: 10000-40000)• Δυνατότητα MS/MS (υβριδικό Q-TOF-MS)• Βιομόρια, μελέτες δομής πρωτεϊνών	<ul style="list-style-type: none">• Περιορισμένη δυναμική περιοχή σε ποσοτική ανάλυση• Απαιτούνται ακριβιά και ταχύτατα ηλεκτρονικά• Περιορισμένη ευαισθησία βελτιώνεται σημαντικά ως Q TOF• Παλμική πηγή ιοντισμού (MALDI)• Υψηλή απαίτηση κενού (10^{-7} Torr)

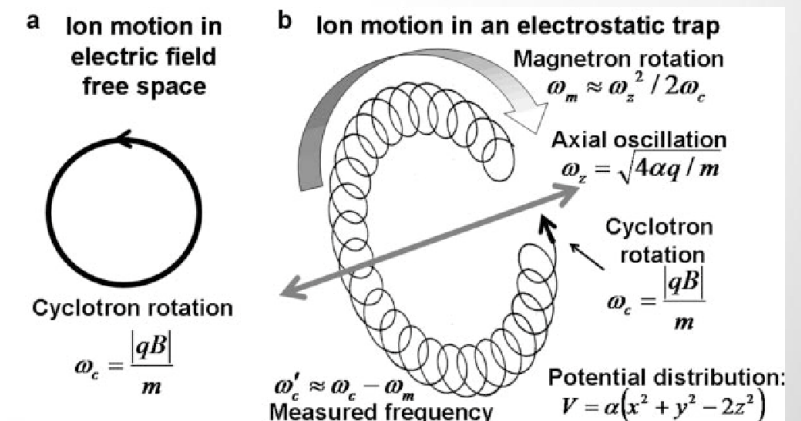
Αναλυτής ιοντικού κυκλοτρονικού συντονισμού με μετασχηματισμό Fourier (FT-ICR-MS)

- Ο αναλυτής με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform-FT) είναι η πιο πρόσφατη εκδοχή του αναλυτή που στηρίζεται στο **φαινόμενο του κυκλοτρονικού ιοντικού συντονισμού (Ion Cyclotron Resonance-ICR)**.

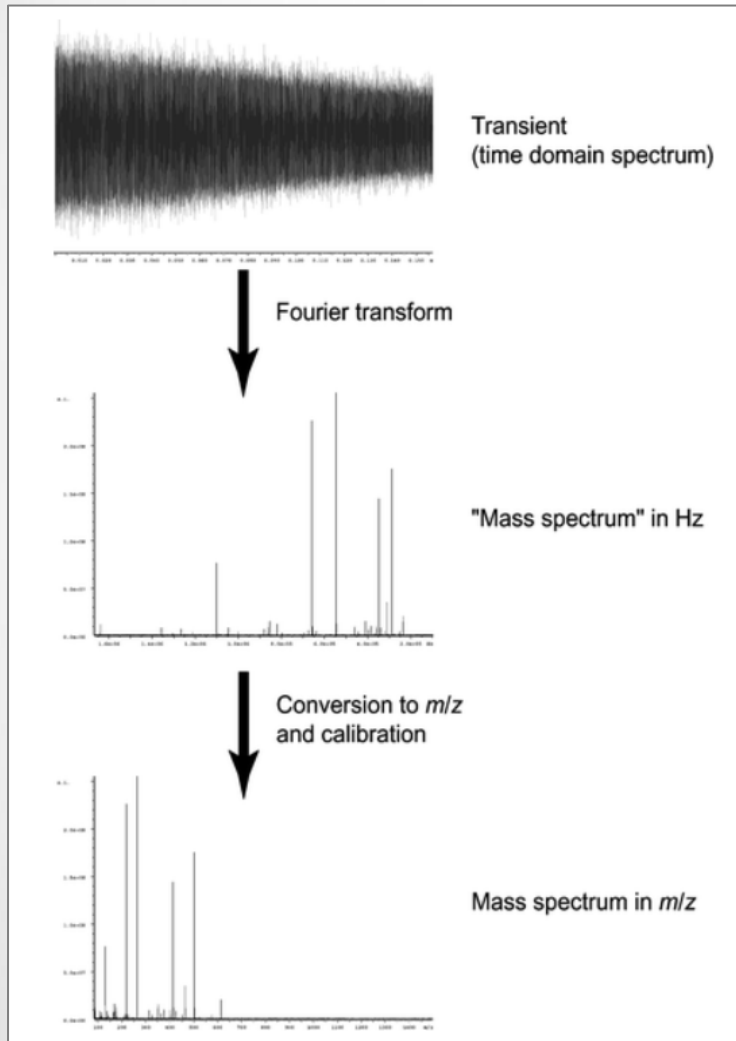


- ηλεκτρομαγνητικός αναλυτής στον οποίο εφαρμόζεται ισχυρό μαγνητικό πεδίο με αποτέλεσμα η ακτίνα της τροχιάς του ιόντος να γίνεται μικρότερη από τις εσωτερικές διαστάσεις του αναλυτή.

- Έτσι τα ιόντα παγιδεύονται σε μια κυκλική διαδρομή μέσα στο ICR και ένα ηλεκτρικό πεδίο που εφαρμόζεται εμποδίζει την έξοδο τους από την παγίδα.



Αναλυτής ιοντικού κυκλοτρονικού συντονισμού με μετασχηματισμό Fourier (FT-ICR-MS)



□ Η **κυκλοτρονική συχνότητα** σχετίζεται άμεσα με το λόγο m/z του ιόντος (αντιστρόφως ανάλογα).

$$\omega = \frac{qB}{m}$$

- Όταν ασκηθεί κατάλληλη εναλλασσόμενη τάση με συχνότητα που συμπίπτει με την κυκλοτρονική συχνότητα των ιόντων, τότε τα ιόντα που αντιστοιχούν σε αυτή διεγείρονται, απορροφώντας ενέργεια.
- Με αποτέλεσμα να αυξάνεται συνεχώς η ταχύτητα τους και κατά συνέπεια και η ακτίνα της κυκλικής τους τροχιάς.
- Όταν διακοπεί η εναλλασσόμενη τάση, σταθεροποιούνται τα ιόντα σε μια τελική τιμή ακτίνας, οπότε και ανιχνεύονται μέσω του επαγόμενου ρεύματος-ειδώλου που δημιουργούν.
- Μια άλλη διαδικασία είναι η διέγερση όλων των ιόντων με μια γρήγορη σάρωση συχνοτήτων (με γραμμική αύξηση από 0,070 μέχρι 3,6MHz) και το πολύπλοκο σήμα που προκύπτει αναλύεται στις επιμέρους συχνότητες με μετασχηματισμό Fourier (FT).

Αναλυτής ιοντικού κυκλοτρονικού συντονισμού με μετασχηματισμό Fourier (FT-ICR-MS)

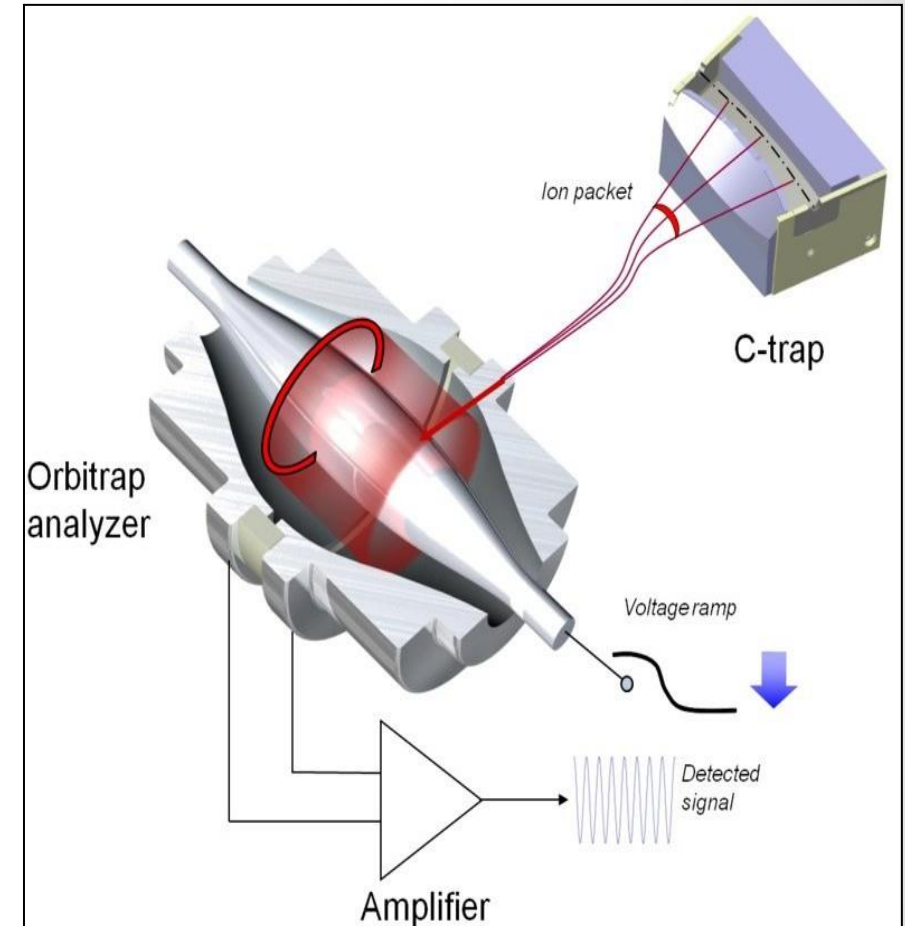
Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
<ul style="list-style-type: none">• Την υψηλότερη διακριτική ικανότητα ($R > 1.000.000$)• Θεωρητικά ο καλύτερος αναλυτής μαζών• Μεγάλη ακρίβεια στον προσδιορισμό μαζών (< 5 ppm)• Σταθερότητα στη βαθμονόμηση μαζών• Μη καταστρεπτική ανίχνευση ιόντων• Δυνατότητα MS/MS• Ανάλυση εξαιρετικά πολύπλοκων μιγμάτων• Εφαρμογές: Βιομόρια, περιβαλλοντικές μελέτες, ισοτοπική ανάλυση, προσδιορισμός λεπτής δομής, πρωτεΐνες, πεπτίδια	<ul style="list-style-type: none">•• Εξαιρετικά ακριβό όργανο – πολύπλοκη λειτουργία• Μικρή ταχύτητα σάρωσης (τυπικά 1 Hz)• Ογκώδες, ειδικές εργαστηριακές εγκαταστάσεις• Υψηλή απαίτηση κενού ($10^{-8} - 10^{-10}$ Torr)

Αναλυτής τροχιακής παγίδας ιόντων (Orbital Trap analyzer, Orbitrap)

- ❑ λειτουργεί παγιδεύοντας ιόντα σε κυκλική κίνηση.
- Αποτελείται από ένα κεντρικό ηλεκτρόδιο που έχει σχήμα ατράκτου και ένα κυλινδρικό εξωτερικό, ηλεκτρόδιο, ομοαξονικό με το κεντρικό
- Η διαφορά δυναμικού που εφαρμόζεται μεταξύ των δύο ηλεκτροδίων αναγκάζει τα ιόντα σε περιστροφική κίνηση γύρω από το κεντρικό ηλεκτρόδιο και ταυτόχρονα σε ταλάντωση κατά μήκος του άξονα z .

- Η κυκλική συχνότητα της ταλάντωσης $\omega = \sqrt{\frac{kz}{m}}$
- η εξάρτηση της συχνότητας από το λόγο m/z του ιόντος

- Διαφορετικά ιόντα ταλαντώνονται σε διαφορετικές συχνότητες, με αποτέλεσμα τον διαχωρισμό τους
- Μετρώντας τις συχνότητες ταλάντωσης που προκαλούνται από τα ιόντα στα εξωτερικά ηλεκτρόδια, αποκτώνται τα φάσματα μάζας των ιόντων χρησιμοποιώντας ανίχνευση του ρεύματος –ειδώλου
- εφαρμόζεται μετασχηματισμός Fourier (FT) για τη μετατροπή του σήματος σε φάσμα m/z



Αναλυτής τροχιακής παγίδας ιόντων (Orbital Trap analyzer, Orbitrap)

Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
<ul style="list-style-type: none">• Την υψηλότερη διακριτική ικανότητα μετά το FT-ICR ($R = 10000 - 140000$) μέχρι m/z 4000• Μεγάλη ακρίβεια στον προσδιορισμό μαζών (< 5 ppm)• Μεγαλύτερη χωρητικότητα από τις ιοντικές παγίδες• Μη καταστρεπτική ανίχνευση ιόντων• Δυνατότητα MS/MS (σε συνδυασμό με ιοντική παγίδα)• Ανάλυση εξαιρετικά πολύπλοκων μιγμάτων• Εφαρμογές: Προσδιορισμός από μικρά μόρια έως μεγαλομόρια- Βιομόρια, περιβάλλον και τρόφιμα, proteomics, lipidomics	<ul style="list-style-type: none">• Ακριβό όργανο (ειδικά τα υβριδικά) – πολύπλοκη λειτουργία• Σχετικά αργή σάρωση για εφαρμογές UPLC• Υψηλή απαίτηση κενού (10^{-8} Torr)

Τεχνικές ανάλυσης στη φασματομετρία μάζας

Οι τεχνικές ανάλυσης που μπορούν να χρησιμοποιηθούν, ανεξάρτητα από τη μέθοδο ιοντισμού και την τεχνική διαχωρισμού που ακολουθείται, στη φασματομετρία μάζας είναι :

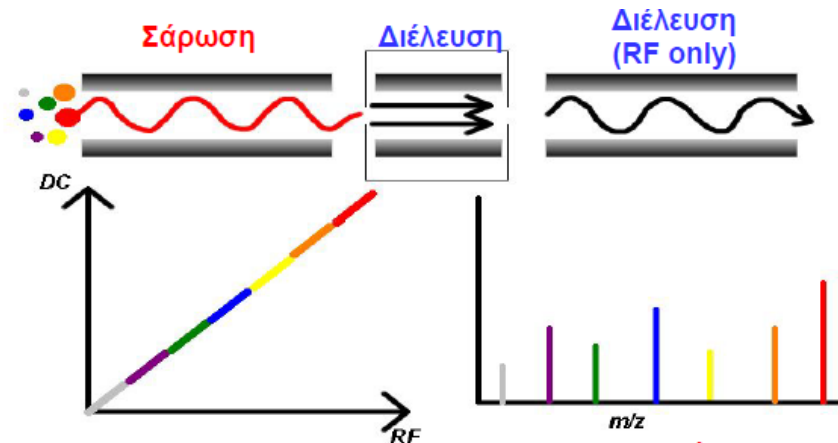
i. Η τεχνική πλήρους σάρωσης (full scan)

ii. Η τεχνική της επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων (single ion monitoring, SIM)

iii. Η συζευγμένη φασματομετρία μαζών (tandem mass spectrometry, MS/MS), που περιλαμβάνει μερικές υποπεριπτώσεις τεχνικών σάρωσης.

Τεχνική πλήρους σάρωσης (Full scan)

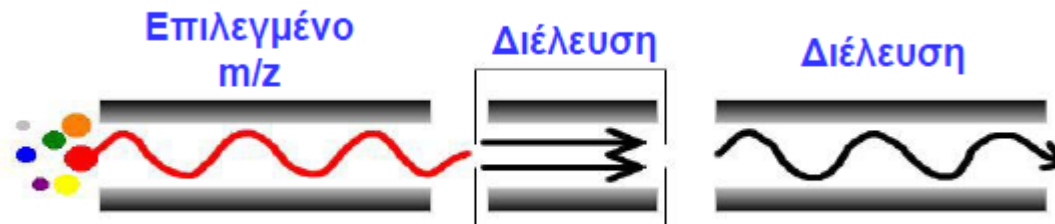
- για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα λαμβάνεται το πλήρες φάσμα του κάθε αναλύτη μεταξύ δυο ακραίων τιμών του λόγου m/z .



- ✓ Η συγκεκριμένη τεχνική μας επιτρέπει να ταυτοποιήσουμε μια άγνωστη ουσία προσδιορίζοντας τη σχετική μοριακή της μάζα ή συγκρίνοντας το φάσμα της με πρότυπα φάσματα.
- ✓ Αν θελήσουμε να αυξήσουμε την ευαισθησία της μέτρησης, αρκεί να αυξήσουμε το χρονικό διάστημα σάρωσης. Αυτό συμβαίνει, γιατί αυξάνεται το πλήθος των ιόντων που καταλήγουν στον ανιχνευτή.
- ✓ Μπορούμε επίσης να αυξήσουμε την ευαισθησία της σάρωσης μειώνοντας το εύρος σάρωσης του λόγου m/z με τον κίνδυνο όμως να χαθούν αναλυτικές πληροφορίες

Τεχνική της επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων (Single ion monitoring, SIM)

- ❑ χρησιμοποιείται στη ανάλυση ενώσεων των οποίων τα φάσματα είναι γνωστά.
- ✓ Επιλέγονται κάποια χαρακτηριστικά ιόντα του φάσματος της ουσίας που μας ενδιαφέρει και ο αναλυτής παρακολουθεί μόνο αυτά.
- ✓ παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία με το ενδεχόμενο όμως της λήψης ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων για την παρουσία όχι μόνο της επιλεγμένης ουσίας αλλά και άλλων ενώσεων .
- ✓ Ο λόγος είναι ότι τα επιλεγμένα ιόντα μπορούν να προέρχονται και από αυτές τις ενώσεις

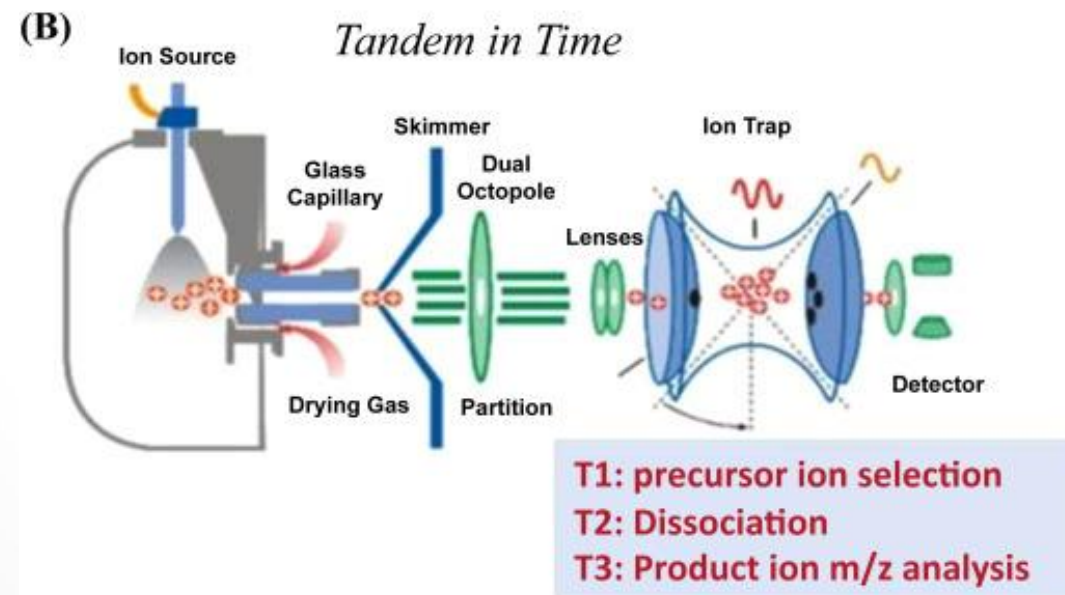
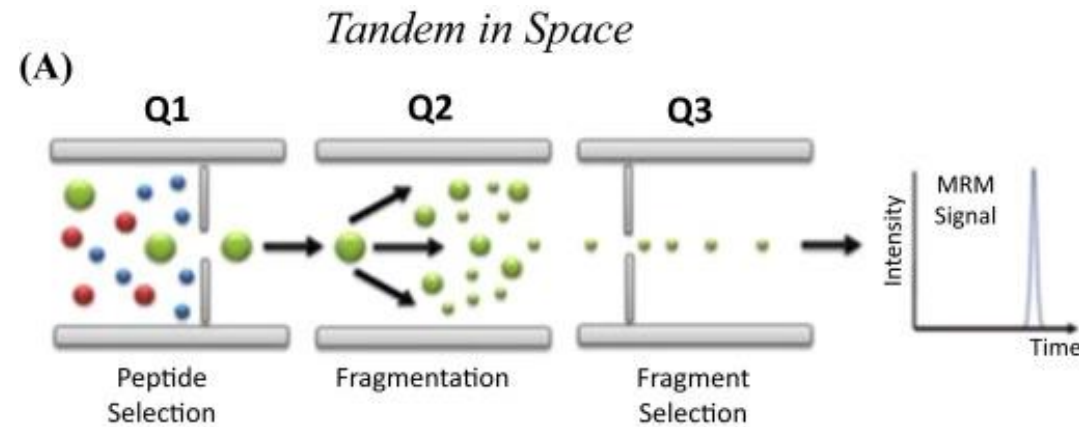


Διαδοχική φασματομετρία μαζών (Tandem Mass Spectrometry, MS/MS)

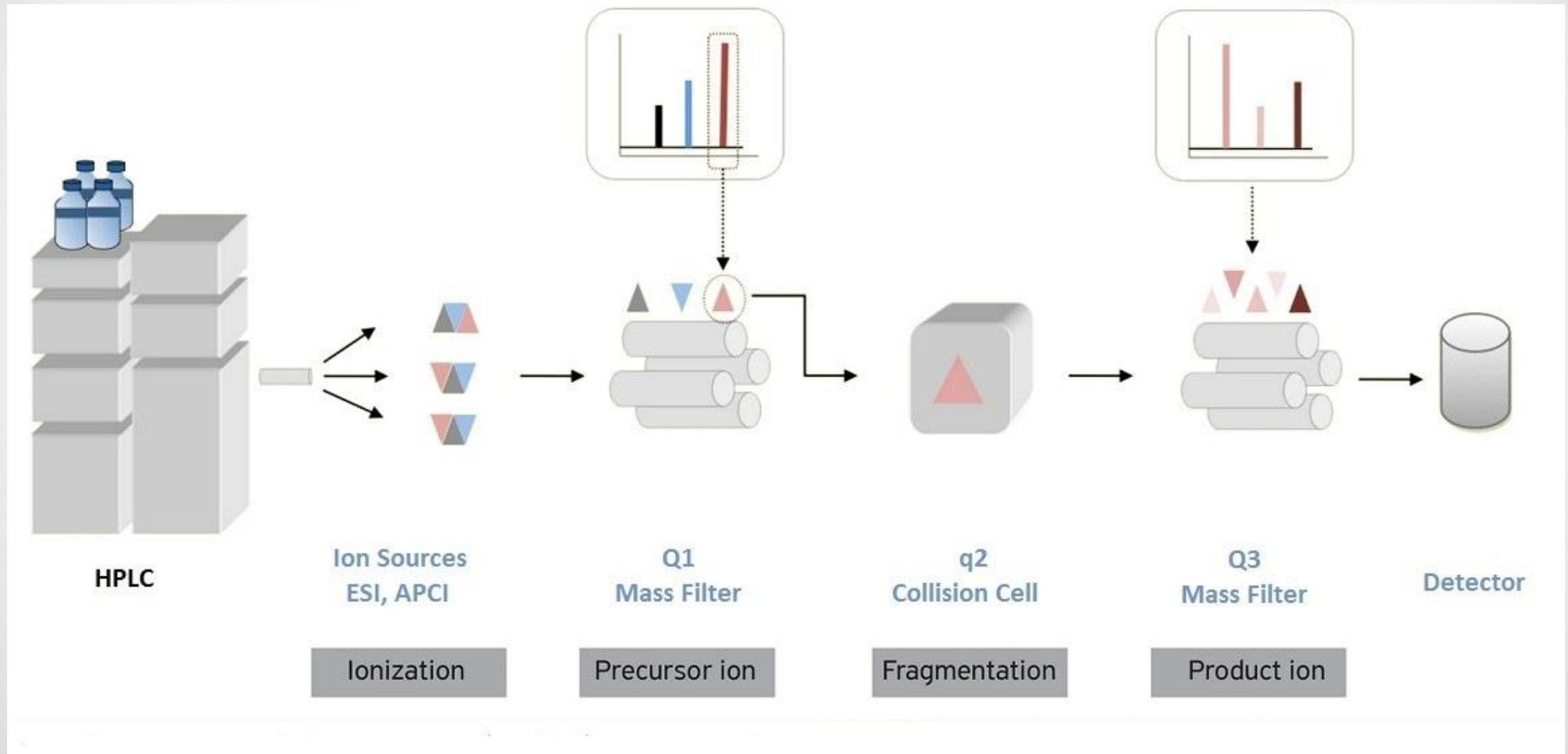
- ❑ αναφέρεται στις τεχνικές κατά τις οποίες το ένα στάδιο φασματομετρίας αζών (όχι απαραίτητα το πρώτο) εφαρμόζεται για την απομόνωση του ιόντος που μας ενδιαφέρει. Στο δεύτερο στάδιο διερευνάται η σχέση αυτού του ιόντος με άλλα, από τα οποία μπορεί να έχει παραχθεί ή μπορεί να έχει παράγει λόγω διάσπασης.
- διάφορους συνδυασμούς ηλεκτρικών τομέων, μαγνητικών τομέων, τετραπόλων κ.α.
- συστήματα
 - **τριπλών τετραπόλων (QQQ)**
 - υβριδικών όπως τα **Q-IT (Quadrupole - Ion Trap)**
 - **Q-TOF (Quadrupole - TOF)**
 - **IT-TOF (Ion Trap - TOF)**
 - **LIT-Orbitrap** (Linear Ion Trap – Orbitrap)
- Είτε ένα μόνο ιόν και να το αφήσουν να περάσει ή να επιτρέψουν την δίοδο όλων των ιόντων.
- Τα ιόντα μπορούν να υποβληθούν σε διάφορες διαδικασίες στους αναλυτές, οι οποίοι επίσης μπορούν να λειτουργήσουν είτε σε σάρωση είτε όχι
- παρέχουν πληροφορίες για τη δομή και τη σύνθεση πολύπλοκων ενώσεων όπως πολυσακχαριτών, λιπιδίων, πρωτεϊνών κ.α. και ταυτόχρονα να πετύχουμε περαιτέρω ευαισθησία και εξειδίκευση στις μετρήσεις

Διαδοχική φασματομετρία μαζών (Tandem Mass Spectrometry, MS/MS)

❖ η ανάλυση να πραγματοποιηθεί στο χώρο ή στο χρόνο

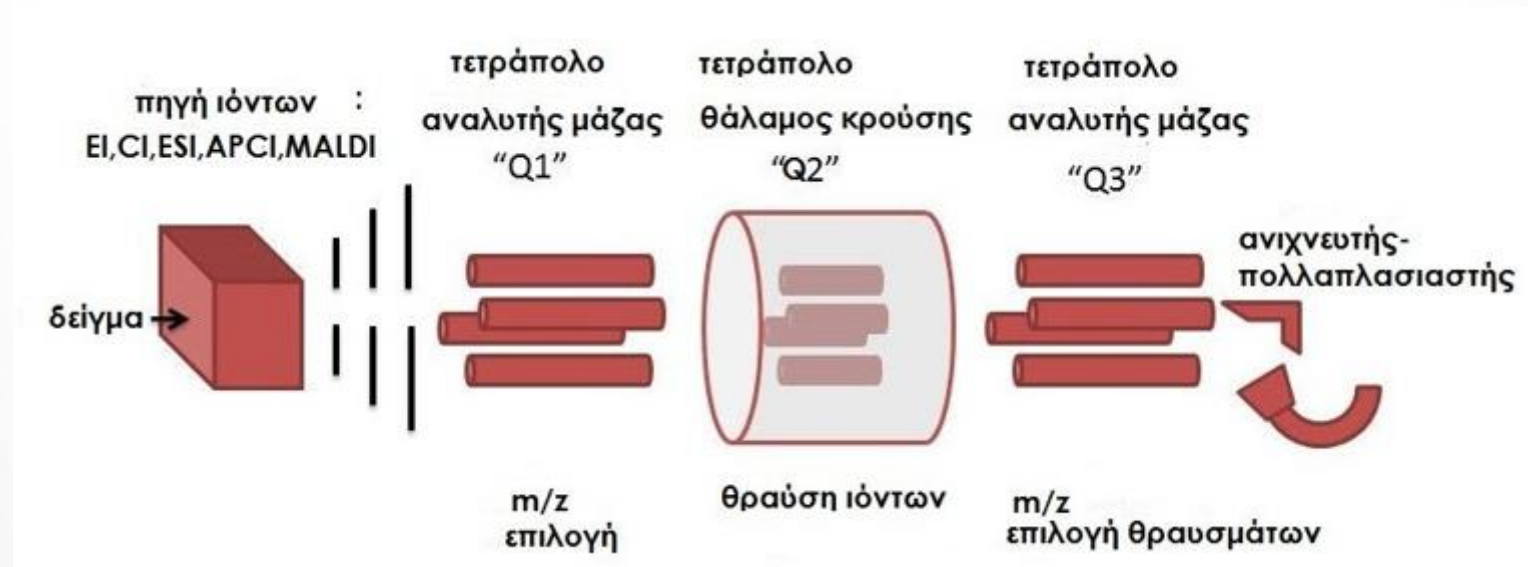


Τεχνική σε σειρά φασματομετρίας μαζών (Tandem Mass Spectrometry, MS/MS)



Tandem Mass Spectrometry in Space

- ✓ απαιτούνται τουλάχιστον δύο αναλυτές μαζών
- ✓ η πιο συνηθισμένη και χρησιμοποιούμενη διάταξη περιλαμβάνει τρία τετράπολα (Triple Quadrupole, QQQ).
- ✓ Q1 και Q3 τετράπολο λειτουργούν ως αναλυτές- διαχωριστές της διαδικασίας MS
- ✓ Q2 τετράπολο, είναι ένας θάλαμος κρούσεων-θραύσης των ιόντων που προέρχονται από το Q1. Στο θάλαμο του τετράπολου Q2 εισάγεται συνήθως ένα αδρανές αέριο όπως το ήλιο ή το αργό σε πίεση 10^{-3} με 10^{-4} Torr
- ✓ στη θέση του Q3: IT ή TOF αναλυτές δίνουν την δυνατότητα πραγματοποίησης πειραμάτων διαδοχικής MSⁿ φασματομετρίας
- ✓ φάσματα των αναλυόμενων ουσιών με μεγάλη διακριτική ικανότητα

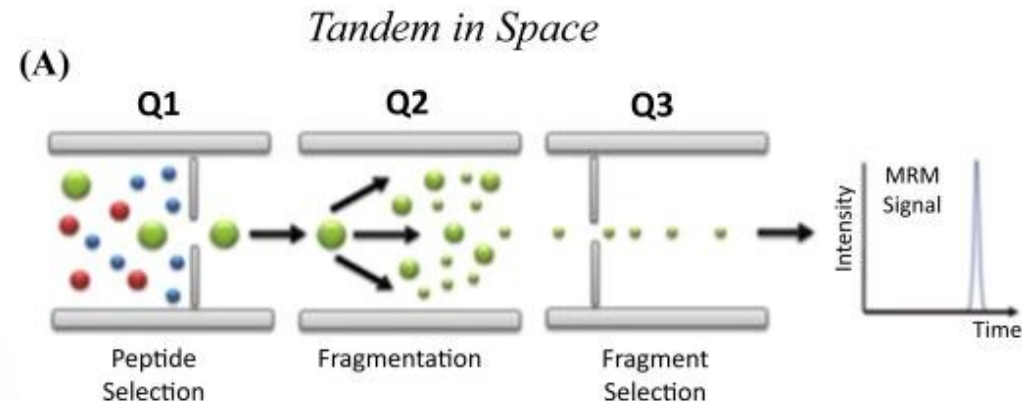


Tandem Mass Spectrometry in Space

Θραυσματοποίηση μέσω συγκρούσεων

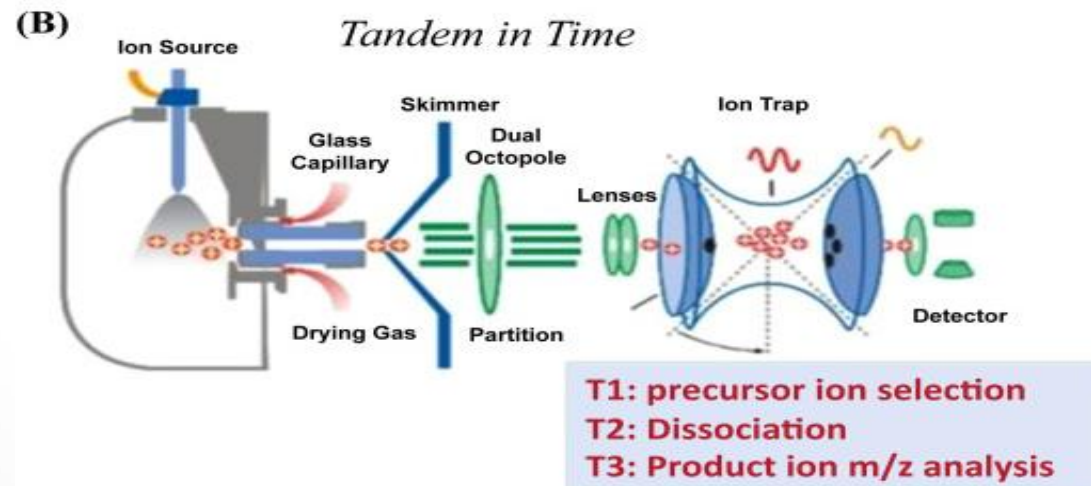
Collision Induced Dissociation (CID):

- ✓ η σύγκρουση ιόντων/ουδέτερων μορίων που προκαλεί τη μετατροπή της κινητικής ενέργειας σε εσωτερική ενέργεια και οδηγεί σε διάσπαση του ιόντος.
- ✓ Τα επιλεγμένα ιόντα (Q1) επιταχύνονται με την εφαρμογή ηλεκτρικού δυναμικού και συγκρούονται με ένα ουδέτερο αδρανές αέριο (Q2).
- ✓ Η σύγκρουση προκαλεί μετατροπή της κινητικής ενέργειας σε εσωτερική με αποτέλεσμα την διάσπαση του ιόντος
- ✓ Η διαδικασία πραγματοποιείται στο δεύτερο τετράπολο (Q2) που ονομάζεται κυψελίδα συγκρούσεων (collision cell)
- ✓ Ο βαθμός θραυσματοποίησης και παραγωγής προϊόντων εξαρτάται από την ενέργεια που παρέχεται στην κυψελίδα συγκρούσεων



Tandem Mass Spectrometry in Time

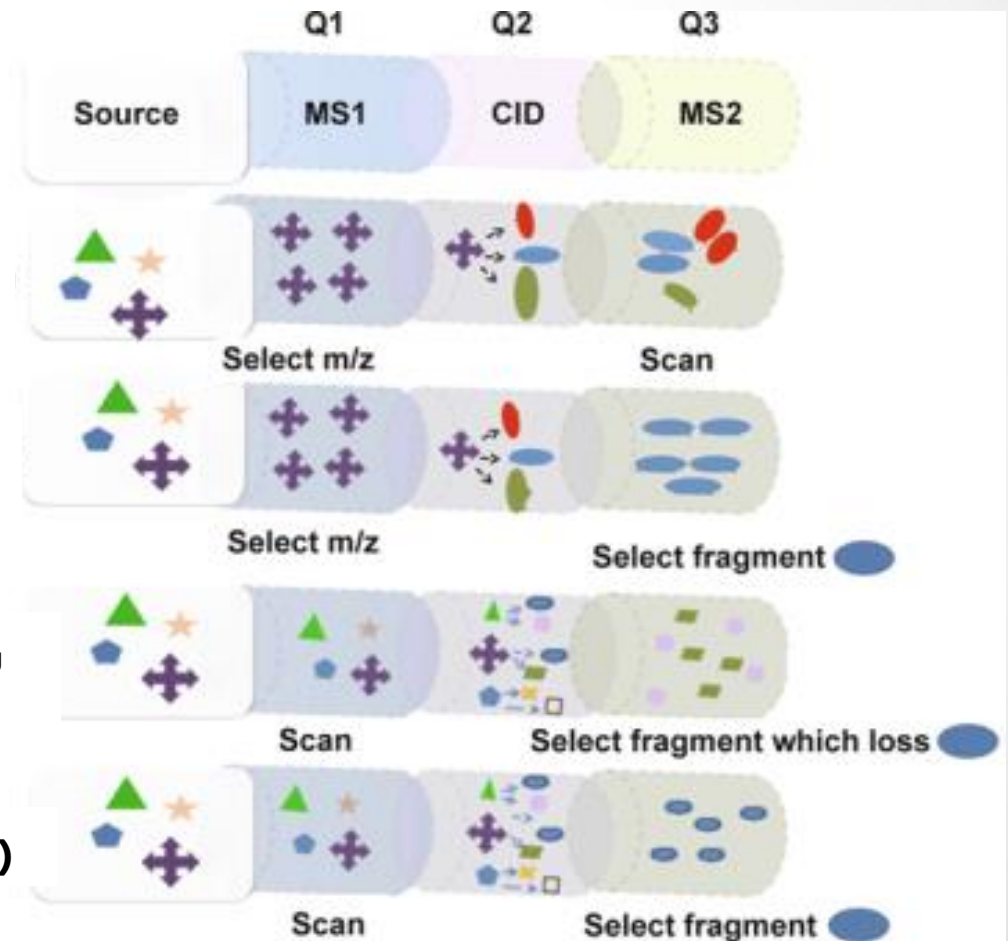
- τα όργανα που χρησιμοποιούνται είναι οι αναλυτές IT και FT-ICR-MS ή FT-Orbitrap (που λειτουργούν ως παγίδες ιόντων).
- Με αυτή τη διαδικασία επιλέγονται τα ιόντα που μας ενδιαφέρουν, αποθηκεύονται στον αναλυτή, θραύονται σε νέα ιόντα τα οποία αναλύονται στον ίδιο αναλυτή σε ένα άλλο, επόμενο πείραμα.
- Σαν αποτέλεσμα έχουμε τον διαχωρισμό δυο πειραμάτων στον χρόνο, πριν και μετά.
- Τα όργανα παγίδευσης μπορούν να εκτελέσουν πολλαπλά στάδια ανάλυσης, τα οποία μερικές φορές αναφέρονται ως MS^n και έχουν φτάσει μέχρι για $n=8$.
- σημαντικό μειονέκτημα: οι αναλυτές-παγίδες δεν μπορούν να συγκρατήσουν θυγατρικά ιόντα με λόγο m/z μικρότερο από το $1/3$ του αντίστοιχου λόγου του μητρικού ιόντος.



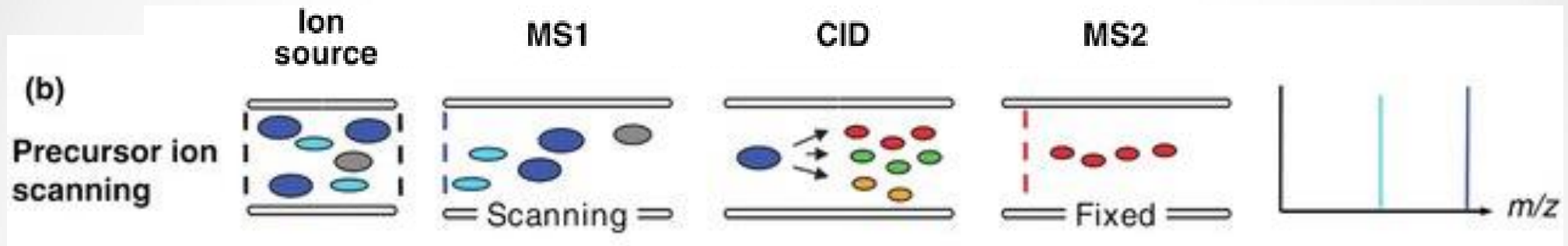
Τεχνικές σάρωσης MS/MS

Οι τέσσερις πιο συχνές τεχνικές σάρωσης MS/MS είναι:

- Σάρωση παραγόμενων Ιόντων (product-ion) ή multiple-reaction-monitoring (MRM)
 - σάρωση επιλεκτικής παρακολούθησης θραυσματοποίησης Ιόντων
 - η ανίχνευση απώλειας ουδέτερου μορίου (constant neutral loss)
 - σάρωση πρόδρομου ιόντος (precursor-ion)

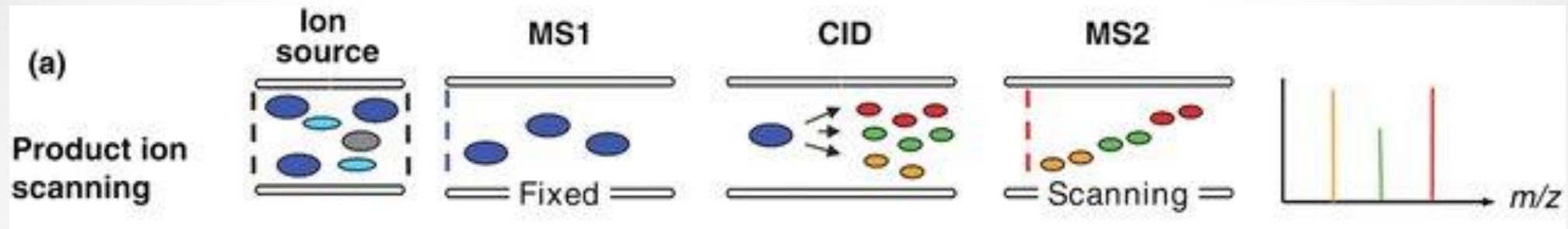


Σάρωση πρόδρομου ιόντος (Precursor ion scan)



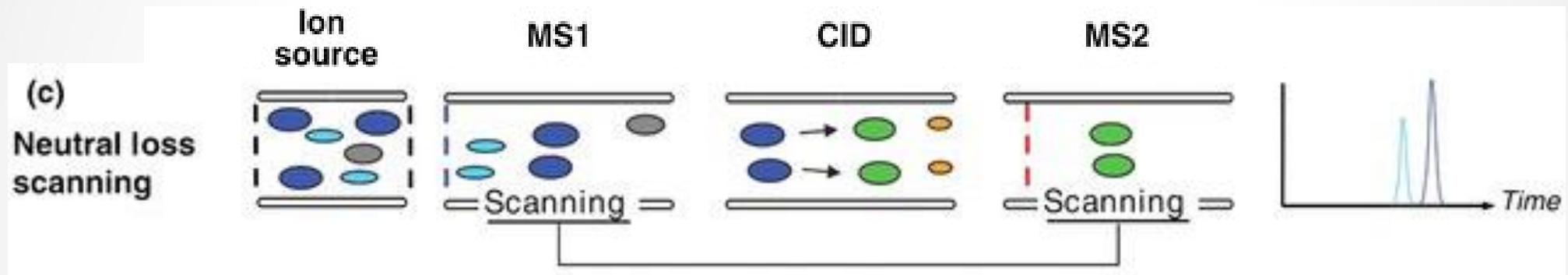
- ❑ Το τετράπολο Q1 λειτουργεί σε συνθήκες πλήρους σάρωσης και τα ιόντα εισέρχονται σε αυτό.
- ❑ Μετά την είσοδο τους στο Q2 υφίστανται θραύση και δημιουργούνται τα θυγατρικά ιόντα.
- ❑ Ακολουθεί η δεύτερη ανάλυση στην οποία το Q3, από όπου εξέρχονται ιόντα προς τον αναλυτή που έχουν συγκεκριμένες τιμές του λόγου m/z .
- ❑ Τα μητρικά ιόντα, που έδωσαν τα συγκεκριμένα θυγατρικά ιόντα, είναι αυτά που φαίνονται στο φάσμα που παραλαμβάνεται

Σάρωση παραγόμενων ιόντων (Product ion scan)



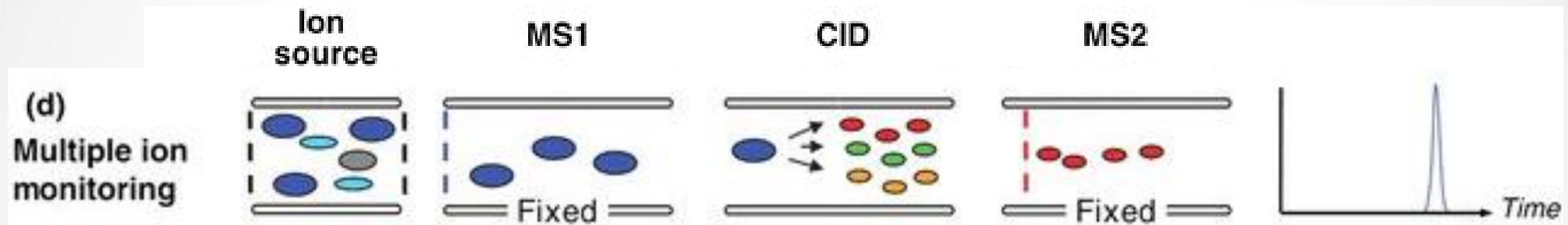
- ❑ Σε αυτή την τεχνική ο πρώτος αναλυτής Q1 επιλέγει ένα ιόν, που λέγεται πρόδρομο ιόν.
- ❑ Το επιλεγμένο ιόν μεταβαίνει στο Q2, όπου θραύεται σε ιόντα και σε ένα ή περισσότερα ουδέτερα μόρια. Η αιτία της θραύσης είναι η σύγκρουση των ταχέως κινούμενων προδρόμων ιόντων με τα μόρια αργού ή αζώτου που βρίσκονται εκεί.
- ❑ Τα φορτισμένα θραύσματα εισέρχονται στον Q3 που λειτουργεί σε συνθήκες πλήρους σάρωσης και κατόπιν στον ανιχνευτή .
- Η συγκεκριμένη τεχνική σάρωσης χρησιμοποιείται συχνά στην MS/MS.
- Ο συγκεκριμένος τρόπος όμως σάρωσης είναι αργός, οπότε δεν είναι κατάλληλος για ποσοτικές αναλύσεις. Είναι όμως κατάλληλος για την εξέταση πολύπλοκων μιγμάτων, επειδή έχει τη δυνατότητα να παρέχει πληροφορίες ξεχωριστά για τη δομή μιας ένωσης.

Σάρωση για την ανίχνευση απώλειας ουδέτερου μορίου (Constant neutral loss scan, CNL)



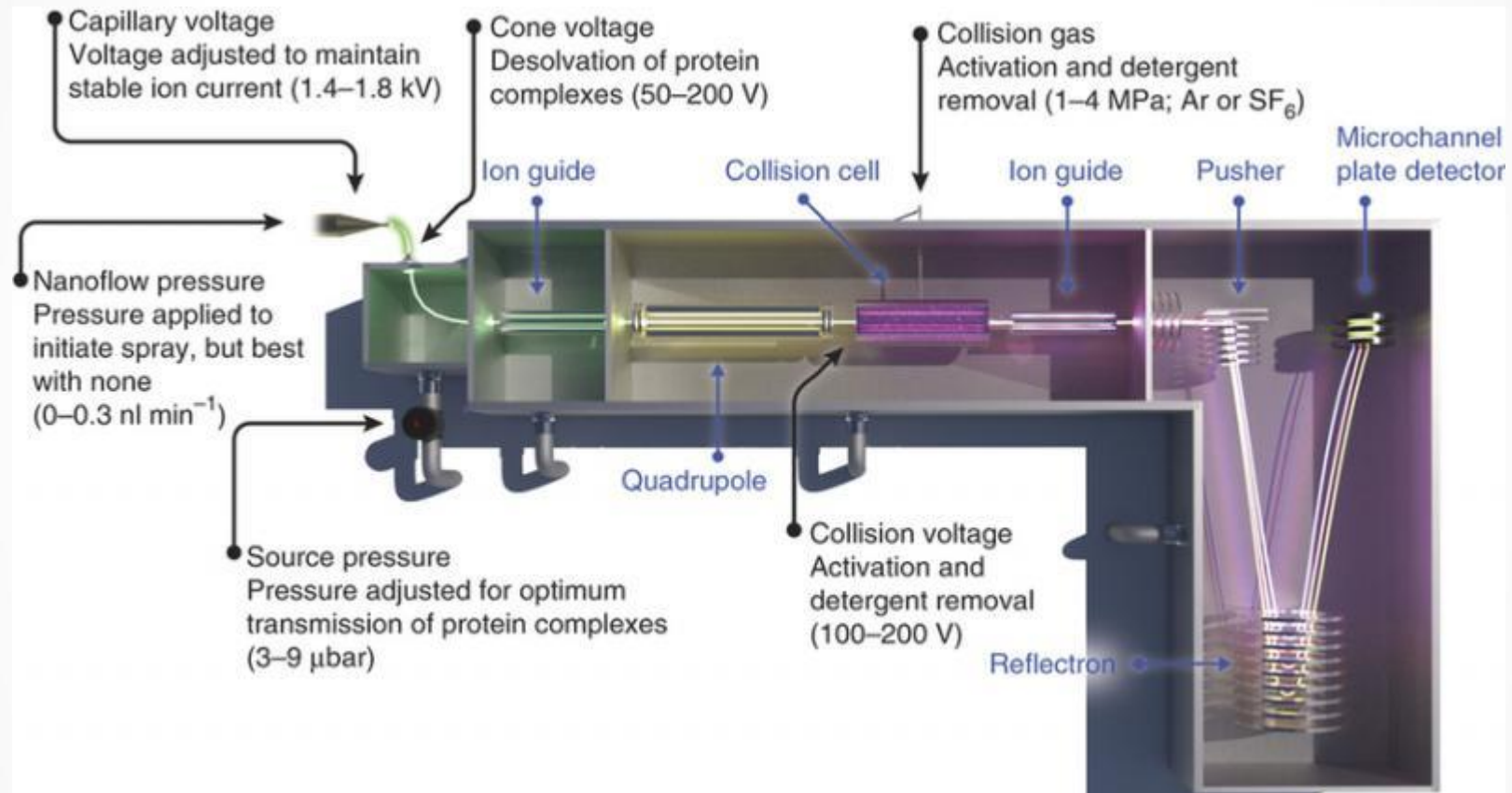
- ❑ Σε αυτή την τεχνική τα δύο τετράπολα Q1 και Q3 σαρώνουν ιόντα των οποίων οι λόγοι m/z έχουν μια καθορισμένη διαφορά.
- ❑ Οπότε ανιχνεύονται ιόντα που υφίστανται αυτή την απώλεια μάζας μέσα στο θάλαμο θραύσης Q2.
- ❑ Με αυτό τον τρόπο ανιχνεύονται ιόντα που προέρχονται από τη θραύση μορίων χημικών ενώσεων, που έχουν ίδια δομικά στοιχεία, π.χ. κατηγορίες λιπιδίων.

Σάρωση επιλεκτικής παρακολούθησης θραυσματοποίησης ιόντων

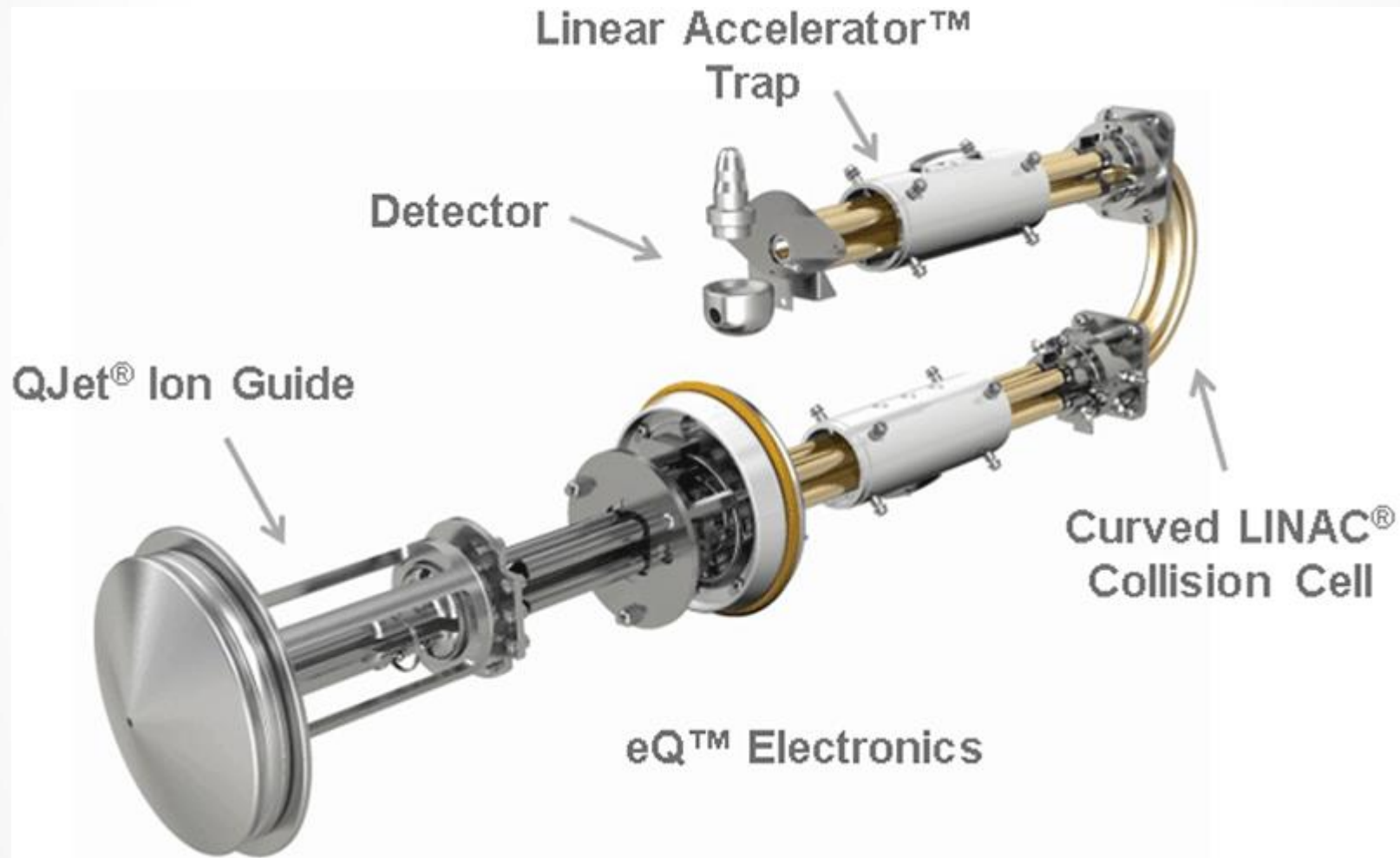


- ❑ Με αυτή την τεχνική επιλέγεται η παρακολούθηση μιας συγκεκριμένης αντίδρασης θραύσης ιόντος ή μιας ομάδας αντιδράσεων θραύσης.
- ❑ Όταν επιλέγεται μια μόνο αντίδραση θραύσης, δηλαδή όταν **ένα πρόδρομο ιόν** δίνει ένα θυγατρικό ιόν, τότε η τεχνική αυτή **ονομάζεται «επιλεκτική παρακολούθηση αντίδρασης θραυσματοποίησης ιόντων» (Single/Selected Reaction Monitoring, SRM)**.
 - ✓ Χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία, αναπαραγωγιμότητα και εκλεκτικότητα .
- ❑ Όταν επιλέγονται **δύο ή περισσότερα ιόντα θραύσης**, τότε η μέθοδος ονομάζεται **«παρακολούθηση πολλαπλών αντιδράσεων θραυσματοποίησης ιόντων» (Multiple Reaction Monitoring, MRM)**.
 - ✓ Και με αυτή τη μέθοδο πετυχαίνουμε υψηλή ευαισθησία και γρήγορη σάρωση.
 - ✓ Όπως και στην SRM έτσι και εδώ το υπόβαθρο χημικού θορύβου είναι χαμηλό.
 - ✓ Πρόβλημα: όταν μια χημική ένωση ταυτόχρονα να δίνει μητρικό ιόν ίδιου λόγου m/z με την ένωση, που αναλύεται, και βέβαια η θραύση της να δίνει τα ίδια θυγατρικά ιόντα.

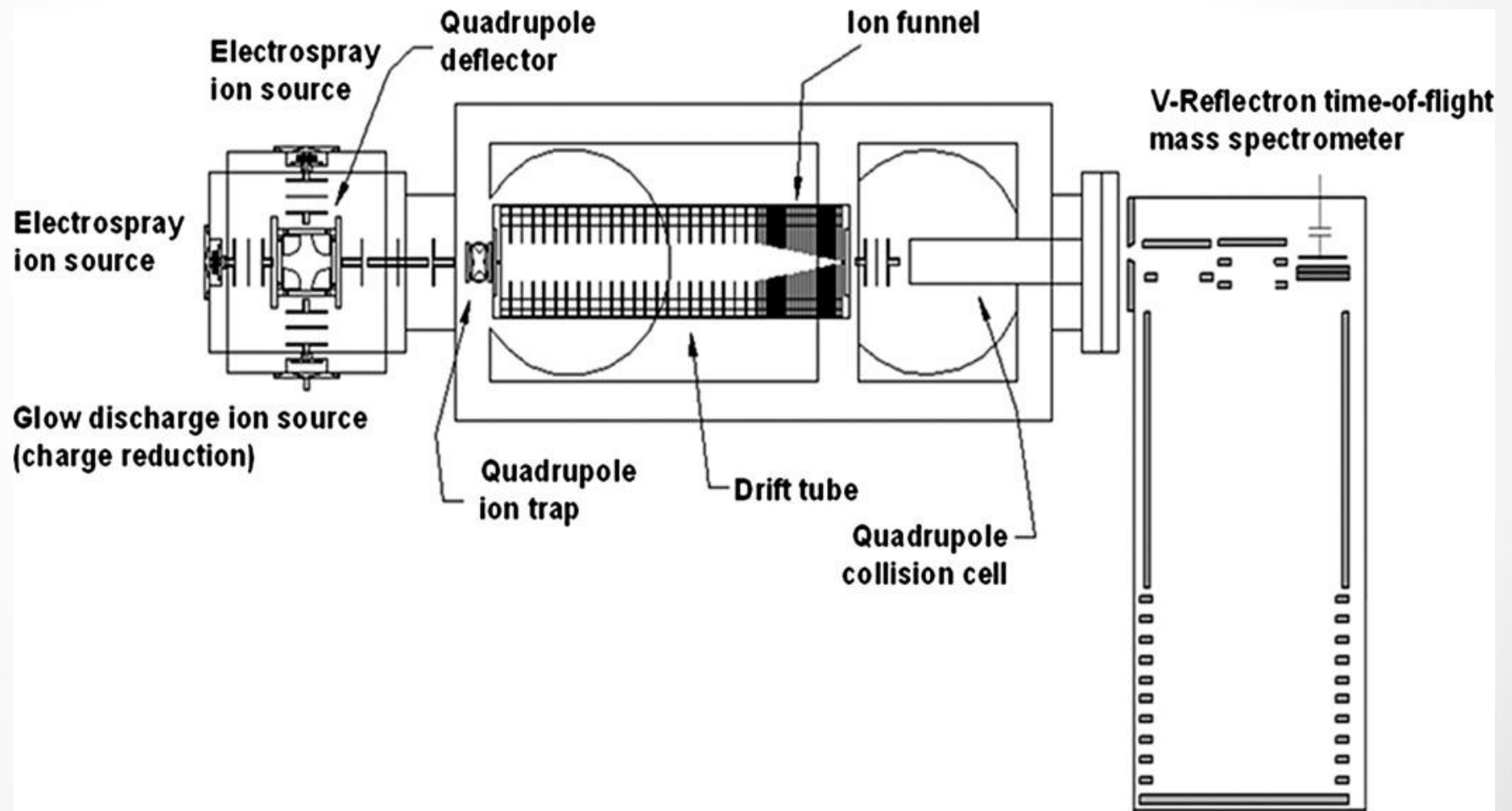
Υβριδικός Q-TOF αναλυτής



Υβριδικός Q-TRAP αναλυτής



Υβριδικός IT-TOF αναλυτής



Υβριδικός Linear Ion Trap – Orbitrap αναλυτής

Schematic of the Orbitrap Elite Hybrid MS

