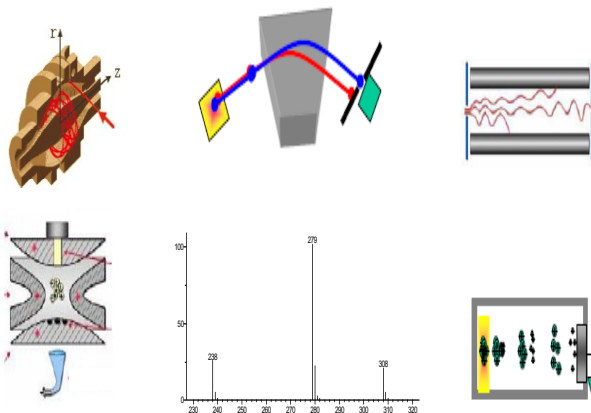
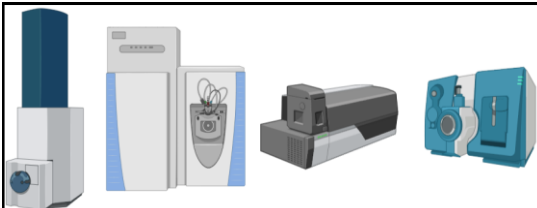


ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ

ΜΑΡΙΟΣ ΚΩΣΤΑΚΗΣ – ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΘΩΜΑΙΔΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ



1



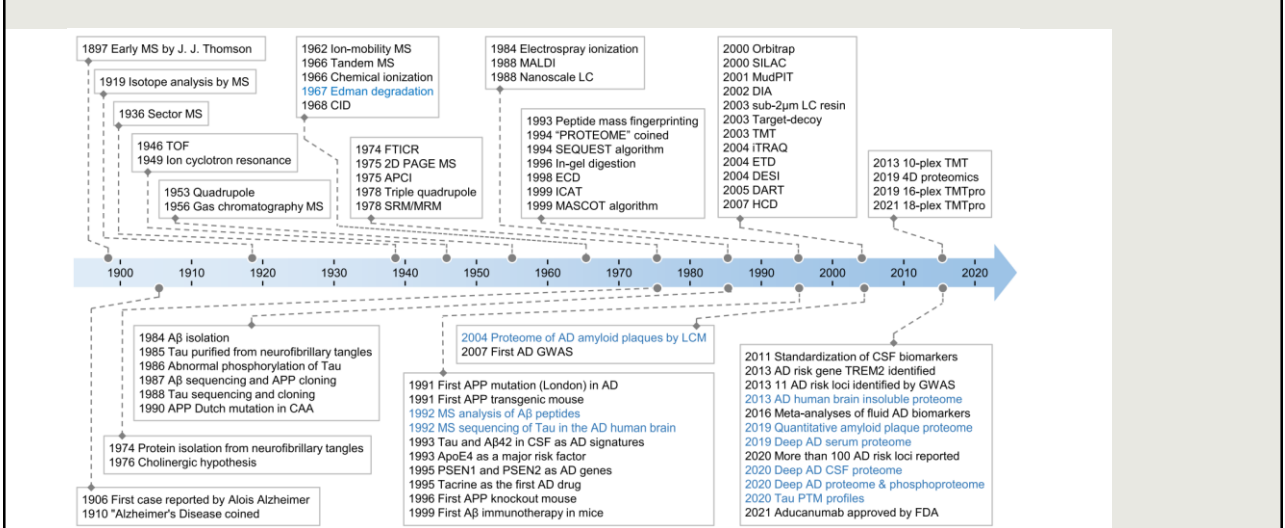
ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ

Ίσως η τεχνική με τη μεγαλύτερη ποικιλία εφαρμογών και την εντυπωσιακότερη ανάπτυξη την τελευταία δεκαετία. Η τεχνική MS παρέχει πληροφορίες σχετικά με:

- Τη στοιχειακή σύσταση του δείγματος
- Τη δομή ανόργανων, οργανικών, οργανο-μεταλλικών και βιολογικών μορίων
- Την ποιοτική και ποσοτική σύσταση μιγμάτων
- Τη δομή και τη σύσταση επιφανειών
- Την αναλογία ισωτόπων στοιχείων

2

ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΕΞΕΛΙΞΗ της MS



3

ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ

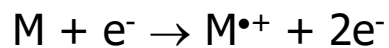
ΟΡΙΣΜΟΣ:

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)**

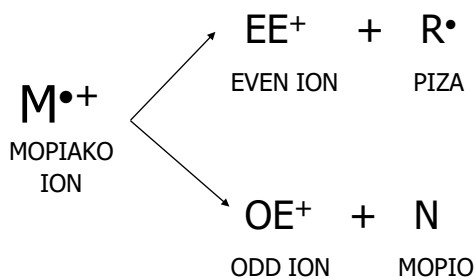
4

ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ

Ιοντισμός :

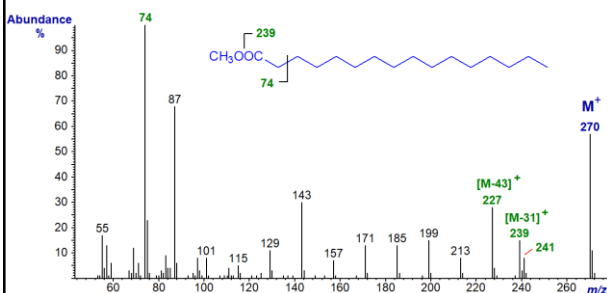


Θραυσματοποίηση :



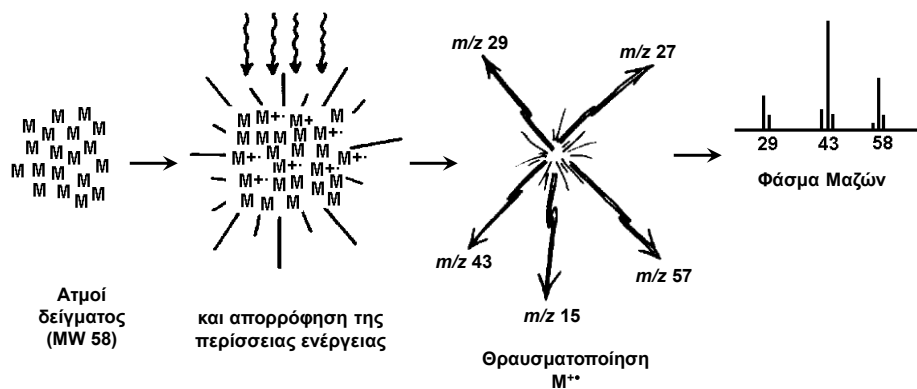
EE⁺: ιόν με άρτιο αριθμό e

OE⁺: ιόν με περιττό αριθμό e



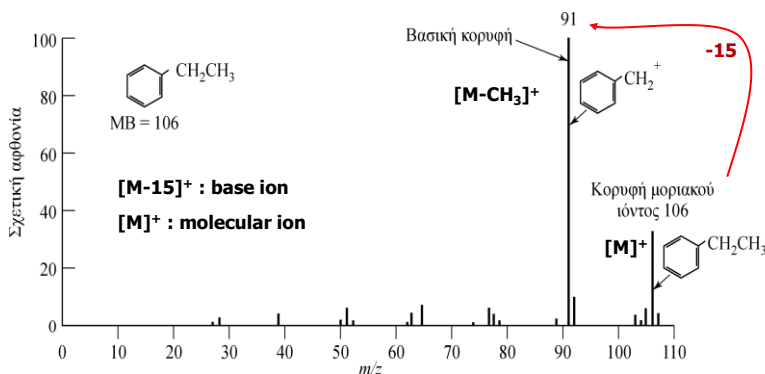
5

ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ



6

ΦΑΣΜΑ ΜΑΖΩΝ



Φάσμα μαζών πλήρους σάρωσης (Full Scan MS)

7

ΑΤΟΜΙΚΗ & ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΑΖΑ

Μονάδα ατομικής μάζας (u ή Da) : που ονομάζεται ενοποιημένη μονάδα ατομικής μάζας (u) ή dalton (Da), ορίζεται:

Το 1/12 της μάζας ενός ουδέτερου ατόμου ¹²C

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

Οι μονάδες u και Da αντιμετωπίζονται ως αδιάστατες, αλλά είναι αριθμητικά ισοδύναμες με g/mol.

Ακριβής μάζα (exact mass): (ονομάζεται επίσης ατομικό βάρος) είναι ο σταθμισμένος μέσος όρος των μαζών των ισωτόπων ενός στοιχείου.

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

Το βρώμιο αποτελείται από **50,69%** ⁷⁹Br με μάζα 78,91834 Da, και από **49,31%** ⁸¹Br με μάζα 80,91629 Da. Επομένως, η ατομική του μάζα είναι:

$$(0,5069) \times (78,91834 \text{ Da}) + (0,4931) \times (80,91629 \text{ Da}) = 79,904 \text{ Da}$$

Δεν υπάρχει άτομο Br με μάζα 79,904 Da.

8

ΑΤΟΜΙΚΗ & ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΑΖΑ

Μονοϊσοτοπική μάζα είναι η ακριβής μάζα του χημικού σωματιδίου με τα μεγαλύτερης αφθονίας ισότοπα του καθενός από τα συστατικά άτομα.

C₂H₅Br μονοϊσοτοπική μάζα: **(2x12 Da) + (5x1,007825 Da) + (1x78,91834 Da) = 107,95746 Da.**

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

Μοριακή μάζα ενός μορίου ή ενός ιόντος είναι το άθροισμα των ατομικών μαζών που αναφέρονται στον περιοδικό πίνακα.

Μοριακή μάζα:

¹²C¹H₄ : (12,0000x1) + (4x1,007825) = 16,0313 Da

C₂H₅Br: (2x12,011 Da) + (5x1,008 Da) + (1x79,904 Da) = 108,966 Da.

Ονομαστική μάζα (nominal mass) ενός μορίου ή ιόντος είναι η ακέραια μάζα του χημικού σωματιδίου με τα μεγαλύτερης αφθονίας ισότοπα καθενός από τα συστατικά άτομα.

- Για το ¹²C¹H₄: **(1x12) + (4x1)=16 u**
- Για το C₂H₅Br είναι **(2x12) + (5x1) + (1 x 79) = 108 u**

9

ΛΟΓΟΣ ΜΑΖΑ-ΠΡΟΣ-ΦΟΡΤΙΟ

- Ο **λόγος μάζα-προς φορτίο (m/z)** :
- Λαμβάνεται με διαίρεση της ατομικής ή μοριακής μάζας ενός ιόντος (m) με τον αριθμό (z) των φορτίων που φέρει
- ¹²C¹H₄⁺ : $m/z = 16,0313 / 1 = 16,0313$
- ¹²C¹H₄²⁺ : $m/z = 16,0313 / 2 = 8,0156$
- (χωρίς μονάδες)

10

Ισότοπα – Ισοτοπικές κορυφές

Στη φύση υπάρχουν τρεις κατηγορίες στοιχείων:

"A" στοιχεία – Μόνο ένα φυσικό ισότοπο υπάρχει

π.χ. Φθόριο

"A+1" στοιχεία – Δύο φυσικά ισότοπα υπάρχουν τα οποία διαφέρουν κατά 1 Da

π.χ. Άνθρακας

"A+2" στοιχεία – Δύο φυσικά ισότοπα υπάρχουν τα οποία διαφέρουν κατά 2 Da

π.χ. Χλώριο

ΠΙΝΑΚΑΣ 20-3 Φυσική αφθονία ισωτόπων μερικών συνηθισμένων στοιχείων

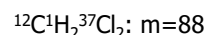
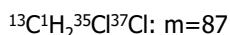
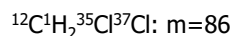
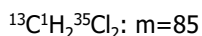
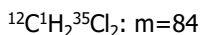
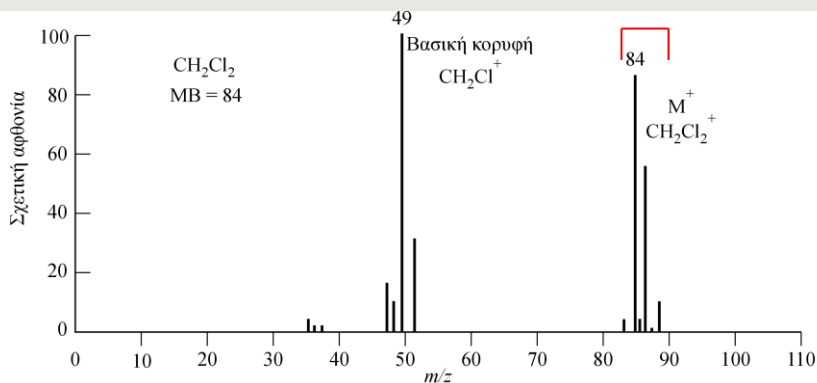
Στοιχείο ^a	αφθονότερο ισότοπο	Αφθονία άλλων ισωτόπων σε σχέση με 100 μέρη του αφθονότερου ^b	
Υδρογόνο	¹ H	² H	0,015
Άνθρακας	¹² C	¹³ C	1,08
Αζώτο	¹⁴ N	¹⁵ N	0,37
Οξυγόνο	¹⁶ O	¹⁷ O	0,04
		¹⁸ O	0,20
Θείο	³² S	³³ S	0,80
		³⁴ S	4,40
Χλώριο	³⁵ Cl	³⁷ Cl	32,5
Βρώμιο	⁷⁹ Br	⁸¹ Br	98,0
Πυρίτιο	²⁸ Si	²⁹ Si	5,1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

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

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

11

Ισότοπα – Ισοτοπικές κορυφές



12

Διακριτική Ικανότητα Resolving Power, R

Διακριτική ικανότητα φασματομέτρου μαζών:

$$R = m/\Delta m$$

Η ικανότητα να διακρίνει δύο μόλις διαχωριζόμενες κορυφές, m και $m+\Delta m$.

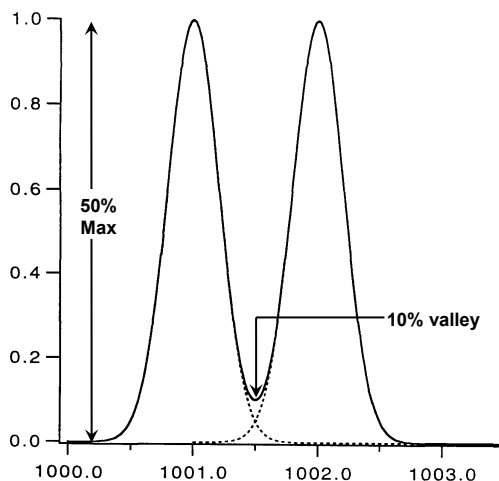
Διάκριση μεταξύ ιόντων ίδιας ονομαστικής μάζας, πχ:

$$\left. \begin{array}{l} N_2^+ : 28,0061 \\ CO^+ : 27,9949 \end{array} \right\} \Delta m = 28,0061 - 27,9949 = 0,0112$$

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

13

Διακριτική Ικανότητα Resolving Power, R



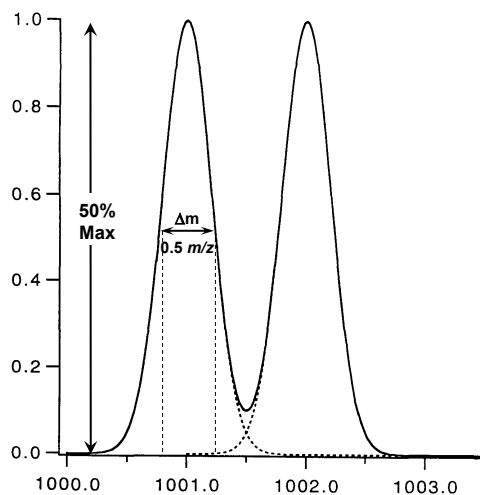
Δύο κορυφές (m/z) - ίσης έντασης - θεωρείται ότι διαχωρίζονται αν η επικάλυψη τους δεν υπερβαίνει το 10% του ύψους τους (συνήθως)

..... έτσι:

$$R = 1001/(1002-1001) = 1001$$

14

Διακριτική Ικανότητα Resolving Power, R



Ο προηγούμενος ορισμός
δύσκολα εφαρμόζεται
πρακτικά.

Από μια μόνο κορυφή:

Full Width at Half Maximum

FWHM = Δm

Εδώ:

$$R = 1001 / (2 \times 0,5) = 1001$$

15

Διακρισιμότητα Resolution

Διακρισιμότητα είναι η διαφορά δυο γειτονικών τιμών m/z ($m_2 - m_1$) και εκφράζεται σε ppm:

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

π.χ. για:

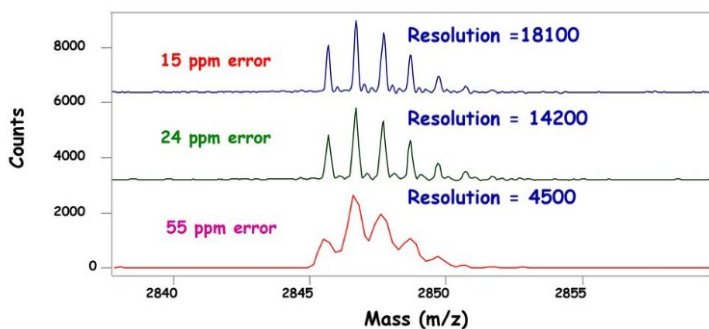
N_2^+ : 28,0061 και CO^+ : 27,9949

$$\Delta m / m_1 = 0,0004 \text{ ή } 400 \text{ ppm}$$

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

16

Mass Accuracy & Resolution



17

Ακρίβεια Μάζας Mass Accuracy

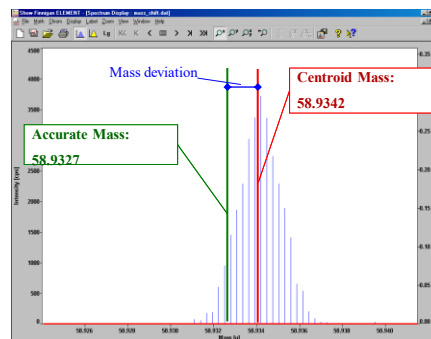
$\Delta m = \text{Mass Offset} = \text{Centroid Mass} - \text{Accurate Mass}$

$$0.0015 = 58.9342 - 58.9327$$

Mass Accuracy (ppm) = $[(\text{Mass Offset}) / \text{Accurate Mass}] \times 10^6$

$$\text{Mass Accuracy (ppm)} = (0.0015 / 58.9327) \times 10^6$$

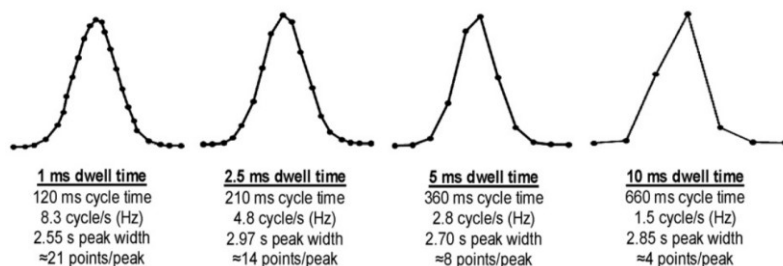
$$\text{Mass Accuracy} = 25.4 \text{ ppm}$$



18

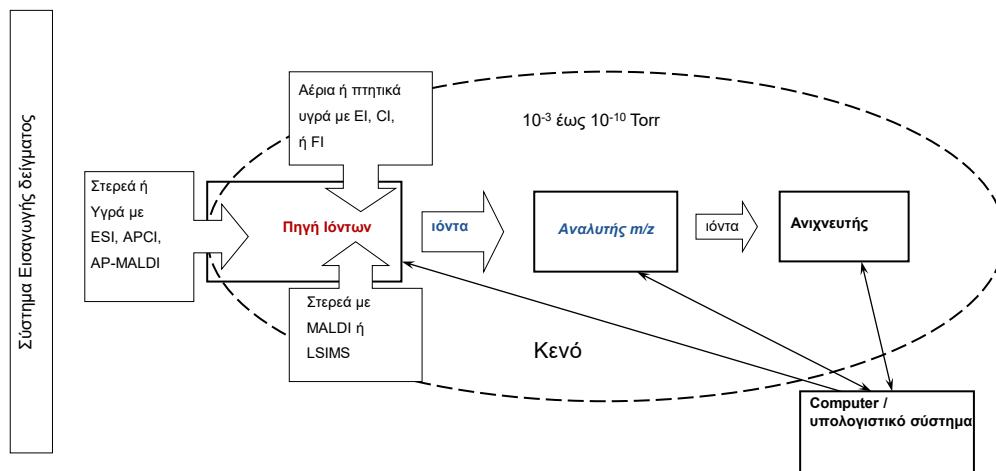
Ταχύτητα και εύρος σάρωσης Scan Rate and Scan Range

- **Εύρος σάρωσης:** ελάχιστο - μέγιστο m/z που μπορεί να «καταγράψει» ο αναλυτής μάζας
- **Ταχύτητα σάρωσης:** αριθμός των φασμάτων (ένα συγκεκριμένο εύρος μαζών) που μπορεί να καταγράψει ο αναλυτής μάζας σε 1 sec. Μονάδες: Hz (HR-MS) ή u/sec (Q)
- **Scan Time / Dwell time:** ο χρόνος που ο αναλυτής μάζας ολοκληρώνει ένα «scan event» και καταγράφει τις ιοντικές κρούσεις του



19

ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΟ ΜΑΖΩΝ



20

ΑΝΑΛΥΤΕΣ ΜΑΖΩΝ

Ο αναλυτής μαζών διαχωρίζει ιόντα με βάση το λόγο μάζα-προς-φορτίο (m/z). Το ιοντικό ρεύμα που καταγράφεται οφείλεται σε ένα μόνο m/z κάθε στιγμή.

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

21

Διακριτική ικανότητα αναλυτών μαζών

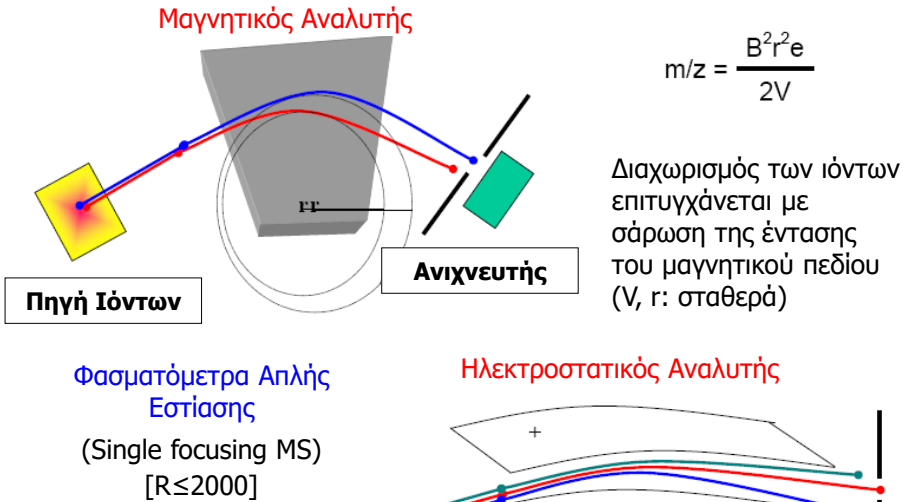
Η διακριτική ικανότητα (R) των φασματομέτρων μαζών διαφέρει σημαντικά:

- 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 $R=10^7$ σε m/z 100, τότε το $R=10^6$ 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)**

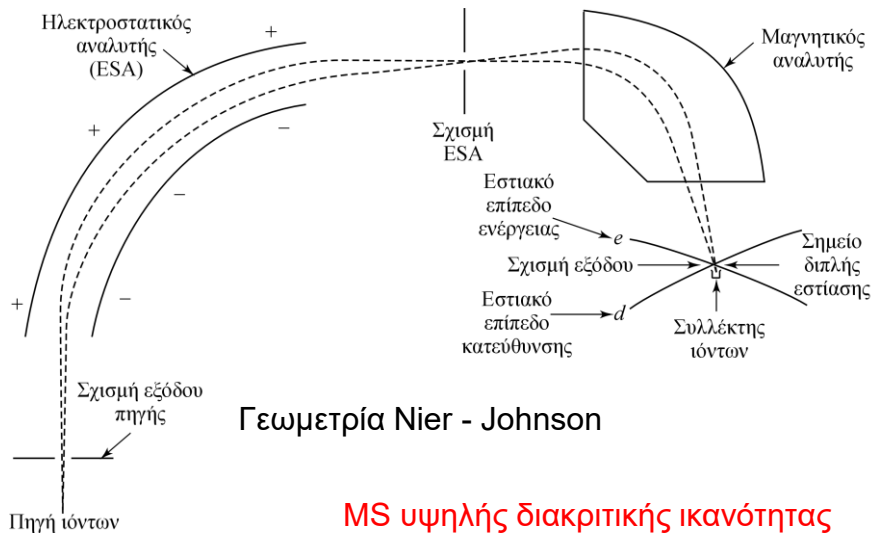
22

Αναλυτές μαγνητικού ή ηλεκτρικού τομέα



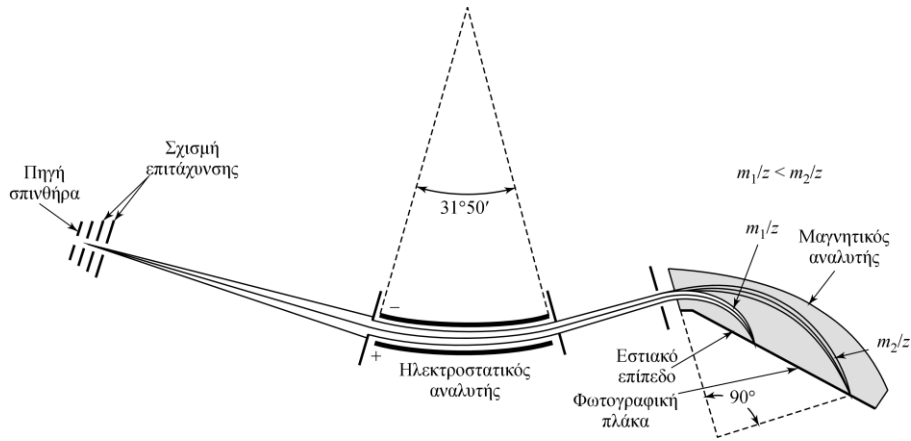
23

Αναλυτές μαγνητικού τομέα διπλής εστίασης



24

Αναλυτές μαγνητικού τομέα διπλής εστίασης



Γεωμετρία Mattachuh - Herzog

25

Φασματομέτρα μαζών μαγνητικού τομέα

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

- 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

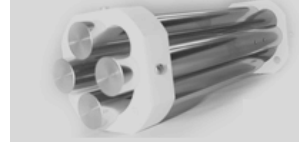
ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

- 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

26

ΤΕΤΡΑΠΟΛΙΚΟΣ ΑΝΑΛΥΤΗΣ ΜΑΖΩΝ

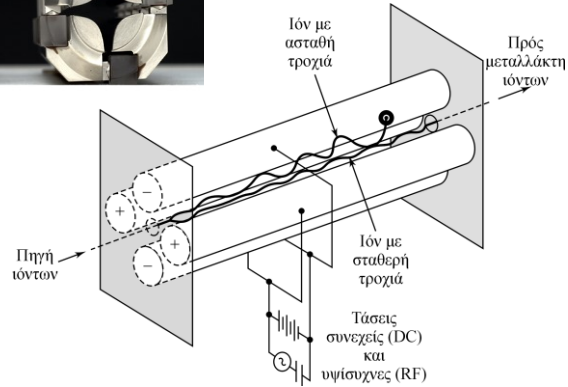
- ✓ Μικρό μέγεθος
- ✓ Το μικρότερο κόστος
- ✓ Υψηλή ταχύτητα σάρωσης (<100ms)
- ✓ Ανθεκτικός αναλυτής



Μόνο τα ιόντα με συγκεκριμένο m/z φτάνουν στον μεταλλάκτη ιόντων

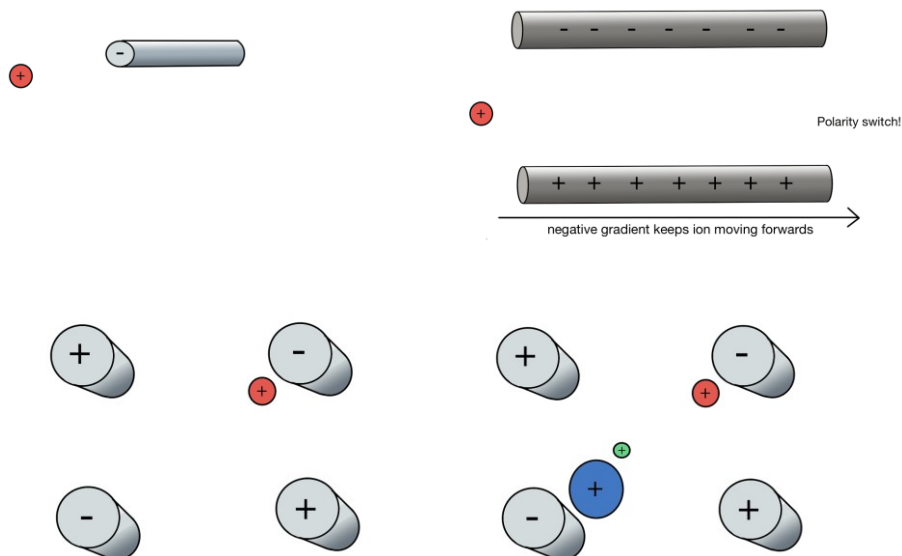
Χαμηλή Διακριτική ικανότητα: $\sim 1\text{Da}$ (u)

- Φίλτρο μαζών



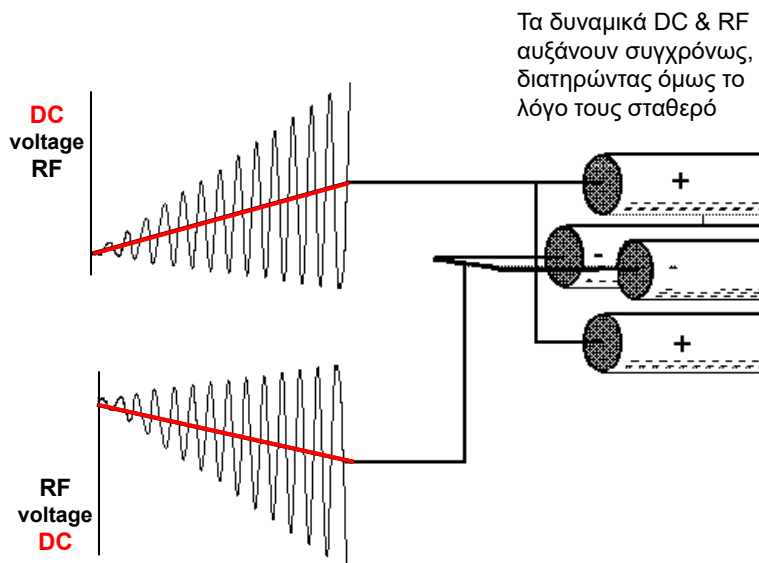
27

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΕΤΡΑΠΟΛΟΥ



28

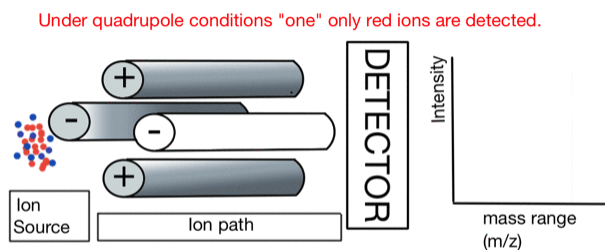
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΕΤΡΑΠΟΛΟΥ



29

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΕΤΡΑΠΟΛΟΥ

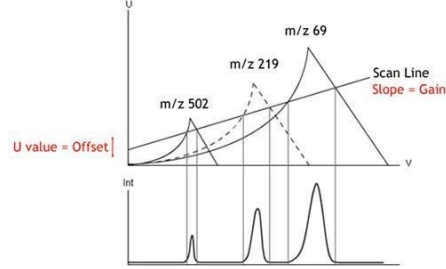
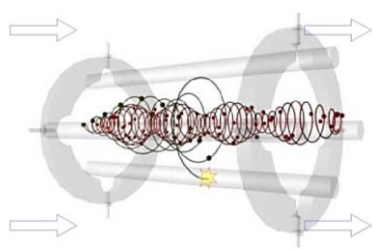
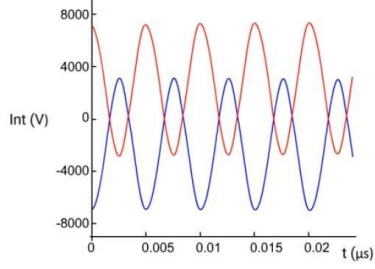
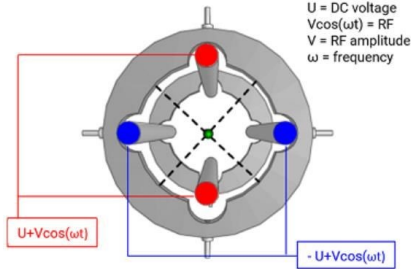
Σε συγκεκριμένο λόγο δυναμικών DC:RF, ΜΟΝΟ ένα ιόν έχει σταθερή τροχιά (ένα m/z φτάνει στον ανιχνευτή)



Όλες οι άλλες τιμές m/z ΦΙΛΤΡΑΡΟΝΤΑΙ εκτός ιοντικής δέσμης

30

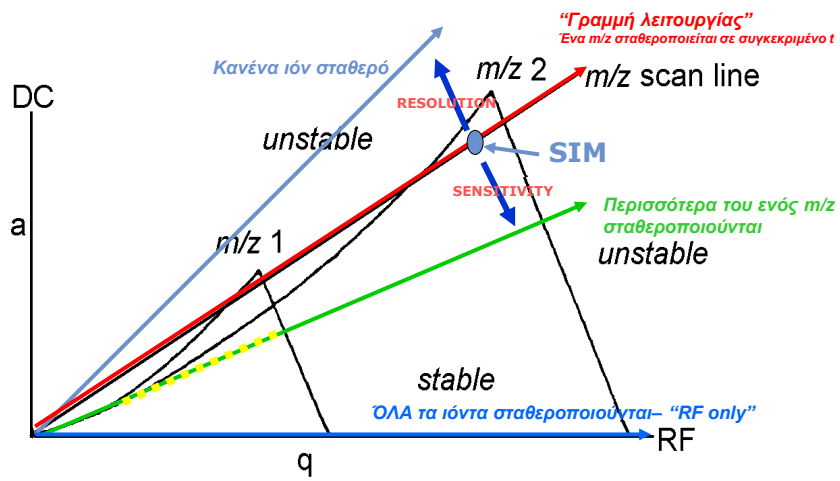
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΕΤΡΑΠΟΛΟΥ (3)



31

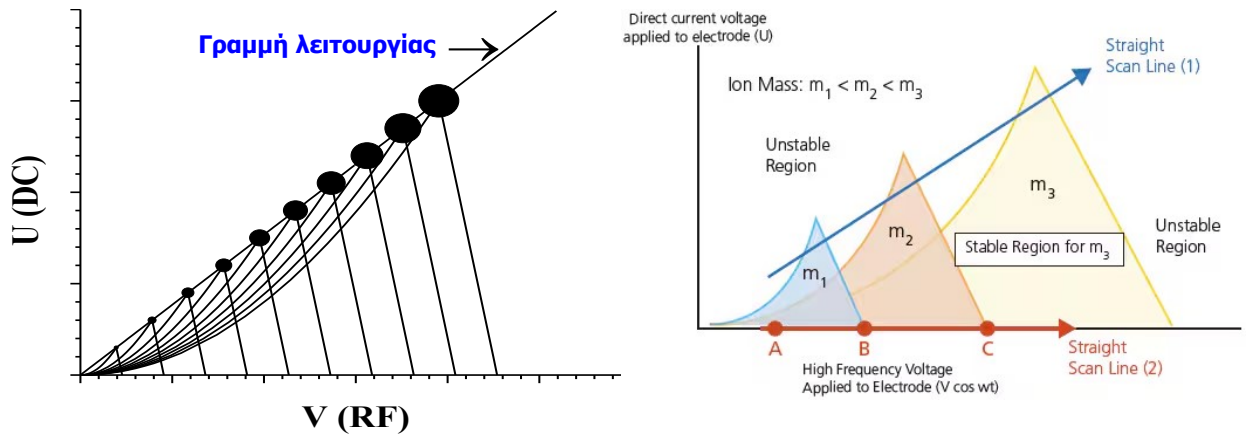
Διάγραμμα σταθερότητας ιόντων στο τετράπολο

(Ion Stability Diagram)



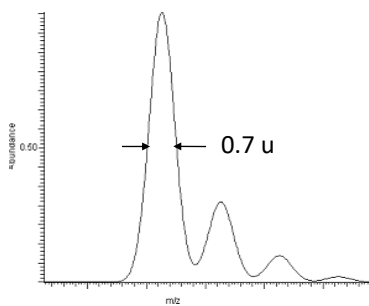
32

Πλήρης σάρωση ιόντων σε τετράπολο



33

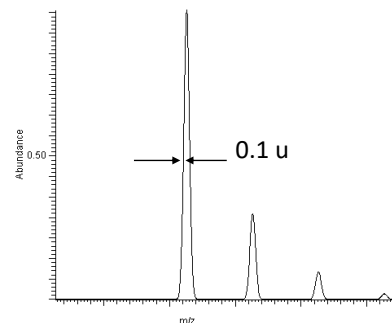
FWHM vs R στο τετράπολο



$$m/z \ 300 / 0.7 = R \ 428$$

$$m/z \ 500 / 0.7 = R \ 714$$

$$m/z \ 1000 / 0.7 = R \ 1.428$$



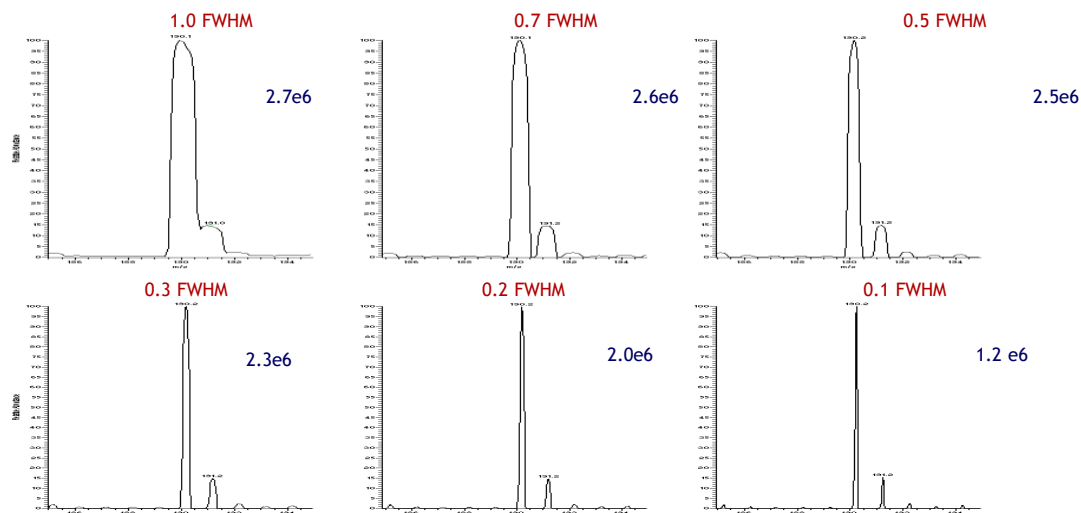
$$m/z \ 300 / 0.1 = R \ 3000$$

$$m/z \ 500 / 0.1 = R \ 5000$$

$$m/z \ 1000 / 0.1 = R \ 10.000$$

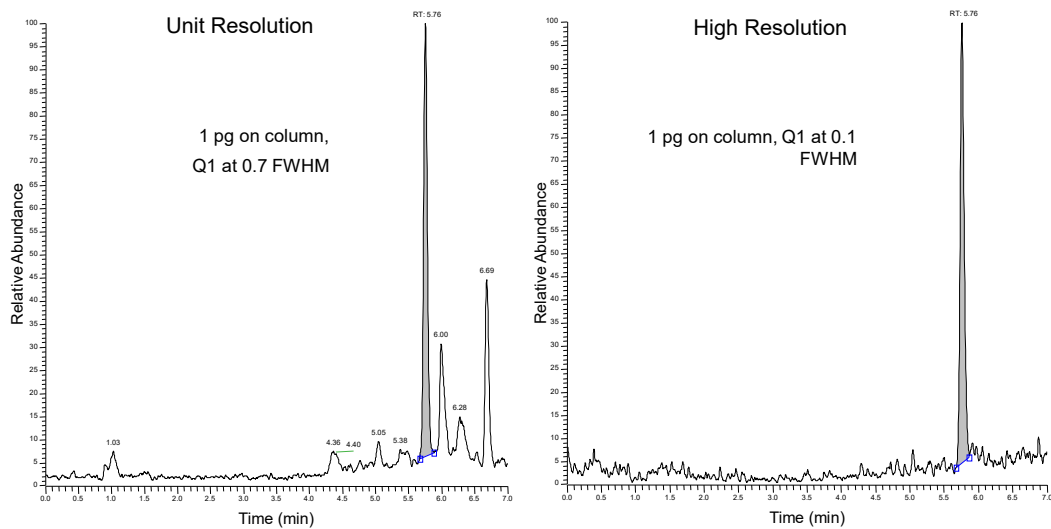
34

Resolution vs Intensity



35

LC/ESI/SRM of Clenbuterol – Urine matrix



36

Φασματοόμετρα μαζών με τετράπολο

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

- 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

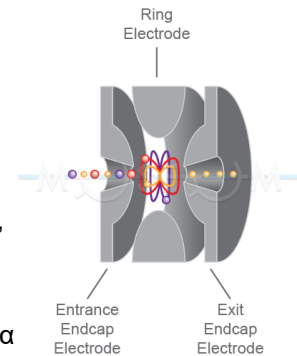
ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

- 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)

37

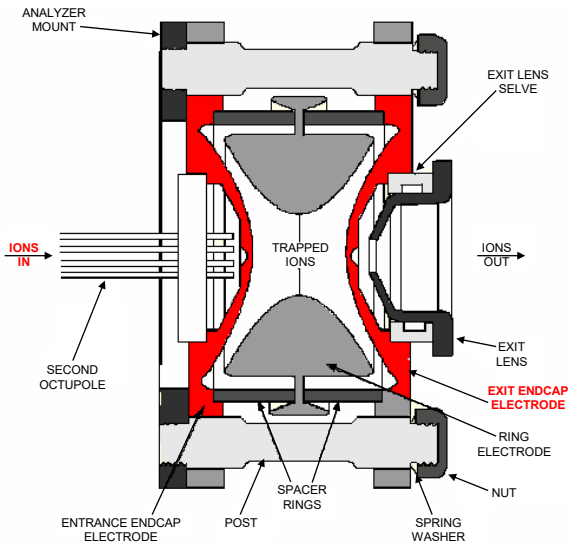
Τετραπολική Παγίδα Ιόντων

Δυο πλευρικά ηλεκτρόδια, γειωμένα, και ένα δακτυλιοειδές ηλεκτρόδιο στο οποίο εφαρμόζεται ένα δυναμικό RF που αυξάνει



38

Τετραπολική Παγίδα Ιόντων

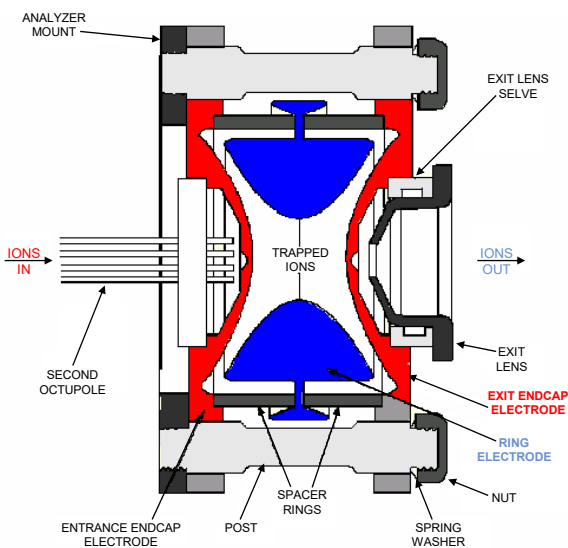


- Δυο **πλευρικά ηλεκτρόδια**, γειωμένα, και ένα δακτυλιοειδές ηλεκτρόδιο στο οποίο εφαρμόζεται ένα δυναμικό RF που αυξάνει

Courtesy of Ian Jardine - Thermo Electron

39

Τετραπολική Παγίδα Ιόντων



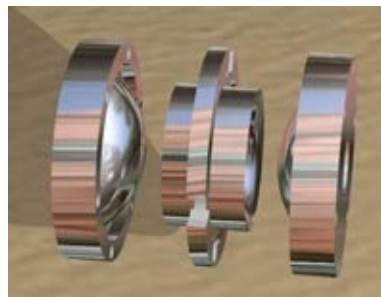
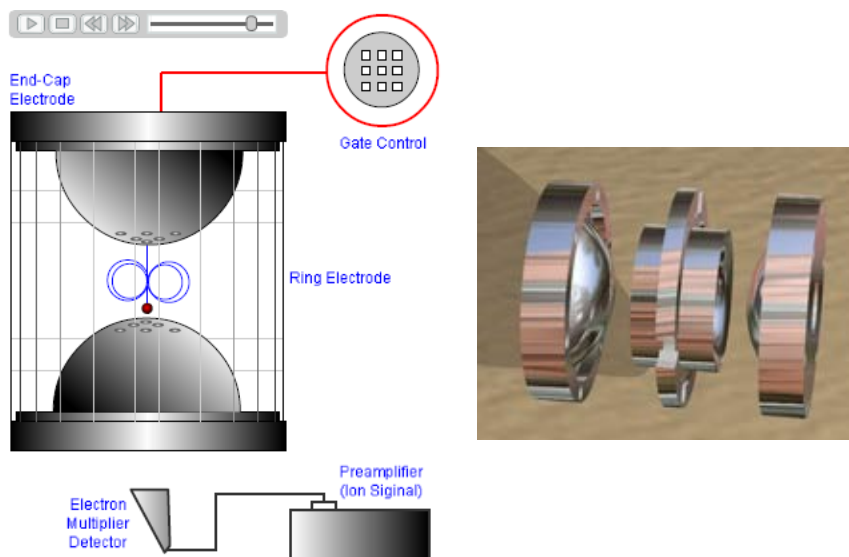
- Δυο **πλευρικά ηλεκτρόδια**, γειωμένα, και ένα **δακτυλιοειδές ηλεκτρόδιο** στο οποίο εφαρμόζεται ένα δυναμικό RF που αυξάνει

- Τα ιόντα είτε σχηματίζονται (GC/MS) είτε ενίονται (LC/MS ή GC/MS) στην παγίδα και αποθηκεύονται

- Ένα m/z αποσταθεροποιείται στο χρόνο αυξάνοντας το δυναμικό RF για την απόκτηση του φάσματος μαζί

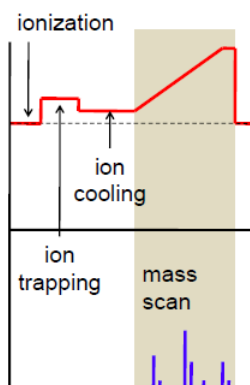
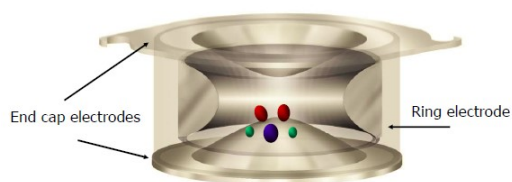
40

Τετραπολική Παγίδα Ιόντων



41

Τετραπολική Παγίδα Ιόντων



42

Τετραπολική Παγίδα Ιόντων (3D-IT)

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

- 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

ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

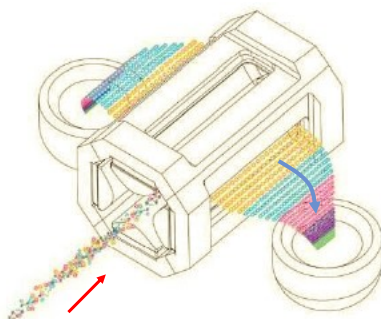
- Χαμηλή διακριτική ικανότητα (FWHM: 0,3 u – R< 4000)
- Περιορισμένο εύρος m/z (ελάχιστο 100, μέγιστο 6000 u)
- Περίπλοκη λειτουργία (παλμική), μεγάλος χρόνος από τη στιγμή που παράγονται τα ιόντα μέχρι την καταγραφή τους
- Ανεπιθύμητη θραυσματοποίηση, κορεσμός παγίδας
- Μικρή ακρίβεια ποσοτικοποίησης, μικρή γραμμική περιοχή

43

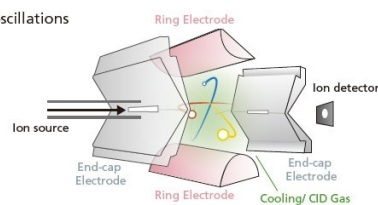
Γραμμική Παγίδα Ιόντων (2D-IT ή LIT)

Στις 2D-IT, τα ιόντα ενίονται αξονικά στην παγίδα, και κατά τη σάρωση εκβάλλονται ακτινικά σε 2 ανιχνευτές

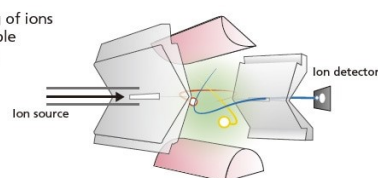
(Thermo LTQ)



(A) Stable ion oscillations



(B) Discharging of ions with unstable oscillations



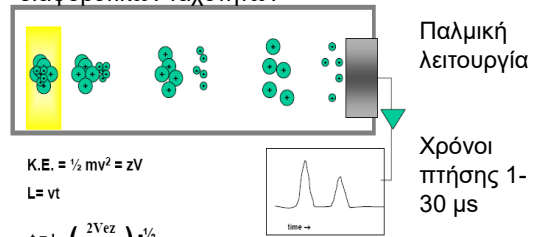
ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

Έχει μεγαλύτερη χωρητικότητα σε ιόντα από την 3D-IT, αυτό βελτιώνει τη γραμμική περιοχή και μειώνει τις ανεπιθύμητες αλληλεπιδράσεις μεταξύ ιόντων, δεν έχει κατώτατο περιορισμό μαζών, μπορεί να λειτουργήσει σαν κυψελίδα θραυσματοποίησης χωρίς παγίδευση (ταχύτερη λειτουργία), συμβατή με Orbitrap.

44

Αναλυτές μαζών «Χρόνου Πτήσης» (Time of Flight, TOF)

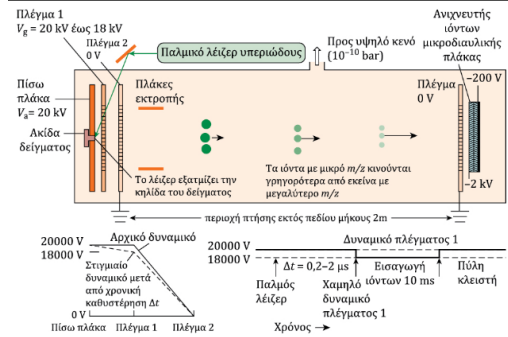
Σωλήνας πορείας ή «πτήσης»: Τα ιόντα διαχωρίζονται λόγω διαφορετικών ταχυτήτων



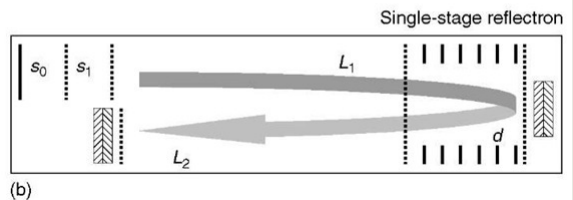
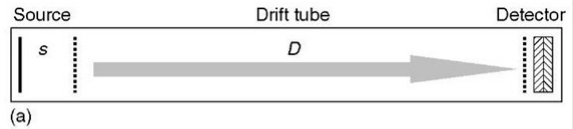
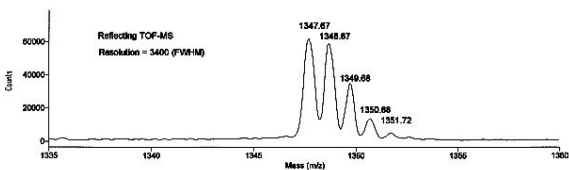
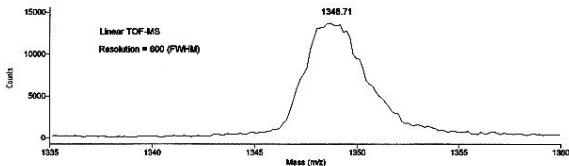
$$K.E. = \frac{1}{2} mv^2 = zV$$

$$L = vt$$

$$t = L \left(\frac{2VeZ}{m} \right)^{-1/2}$$



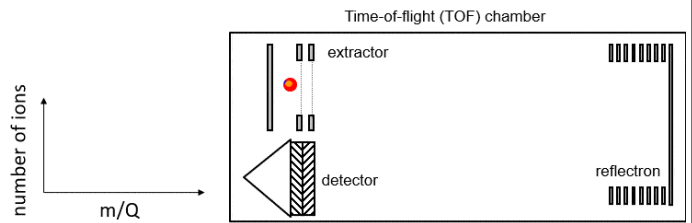
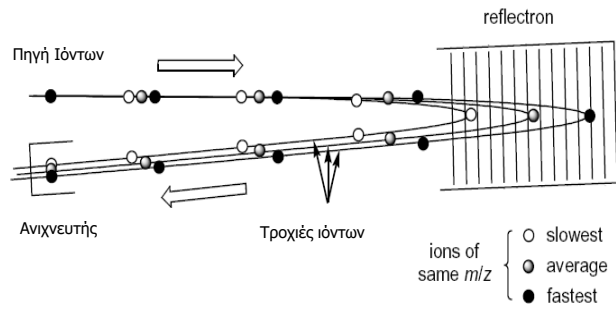
45



Reflectron TOF-MS

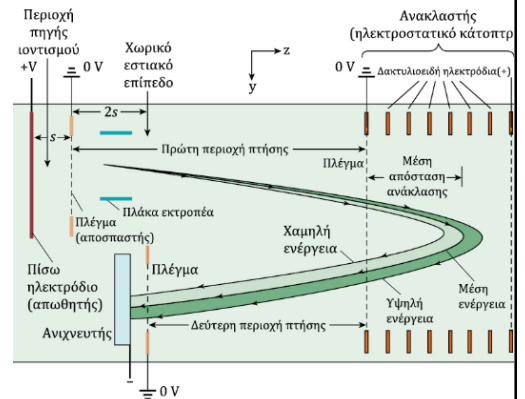
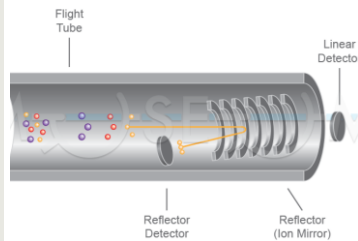
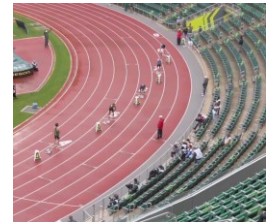
46

Reflectron TOF-MS



47

eflectron TOF-MS



48

Time of Flight, TOF

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

- 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

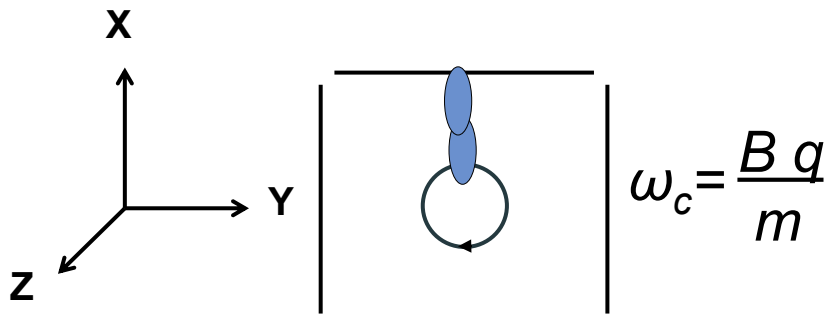
ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

- Περιορισμένη δυναμική περιοχή σε ποσοτική ανάλυση
- Απαιτούνται ακριβή και ταχύτατα ηλεκτρονικά
- Περιορισμένη ευαισθησία (βελτιώνεται σημαντικά ως Q-TOF)
- Παλμική πηγή ιοντισμού (MALDI)
- Υψηλή απαίτηση κενού (10^{-7} Torr)

49

Ιοντικός κυκλοτρονικός συντονισμός Ion Cyclotron Resonance, ICR

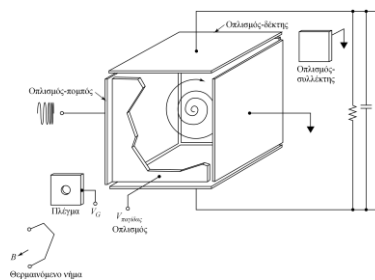
Ιοντική Κυκλοτρονική κίνηση - Ion Cyclotron Motion



ω_c : Ιοντική Κυκλοτρονική συχνότητα

50

Αναλυτής μαζών κυκλοτρονικού συντονισμού ιόντων με μετασχηματισμό Fourier FT-ICR-MS



51

FT-ICR-MS

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

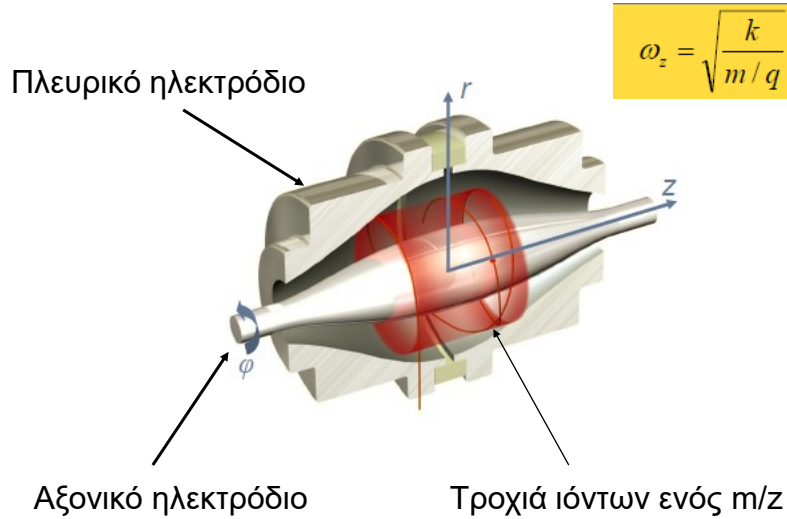
- Την υψηλότερη διακριτική ικανότητα ($R > 1\,000\,000$)
- Θεωρητικά ο καλύτερος αναλυτής μαζών
- Μεγάλη ακρίβεια στον προσδιορισμό μαζών (< 5 ppm)
- Σταθερότητα στη βαθμονόμηση μαζών
- Μη καταστρεπτική ανίχνευση ιόντων
- Δυνατότητα MS/MS
- Ανάλυση εξαιρετικά πολύπλοκων μιγμάτων
- Εφαρμογές: Βιομόρια, περιβαλλοντικές μελέτες, ισοτοπική ανάλυση, προσδιορισμός λεπτής δομής, πρωτεΐνες, πεπτιδία

ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

- Εξαιρετικά ακριβό όργανο – πολύπλοκη λειτουργία
- Μικρή ταχύτητα σάρωσης (τυπικά 1 Hz)
- Ογκώδεις, ειδικές εργαστηριακές εγκαταστάσεις
- Υψηλή απαίτηση κενού (10^{-8} - 10^{-10} Torr)

52

Orbitrap



53

Orbitrap

Τα ιόντα από την πηγή αποθηκεύονται σε ιοντική παγίδα, και ενίονται σταδιακά στο Orbitrap. Τα ιόντα σταθεροποιούνται σε κυκλικές τροχιές γύρω από το αξονικό ηλεκτρόδιο



54

Orbitrap



115,12476 115,13107

Διαχωριστική

ισχύς

15000

30000

60000

120000

240000

$C_7H_{15}^2H_3N^+$

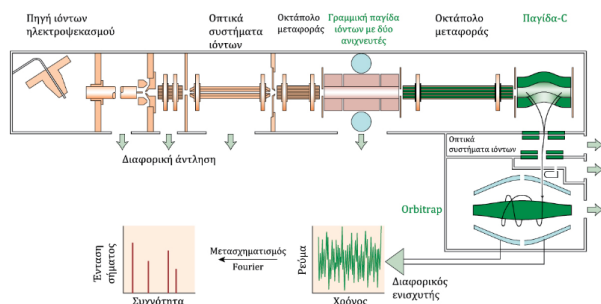
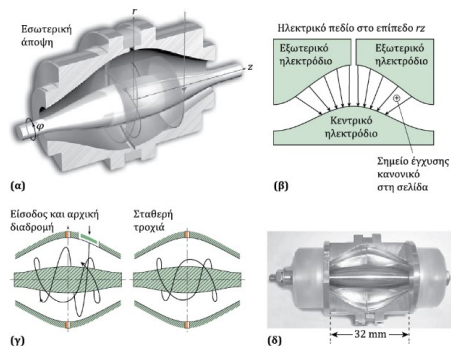
115,13400

115,12

115,14

m/z

ΕΙΚΟΝΑ 22-24 Επίδραση της διαχωριστικής ισχύος του Orbitrap στην ικανότητά του να διαχωρίζει ισοτοπικές ετικέτες μάζας που βρίσκονται πολύ κοντά μεταξύ τους και σχετίζονται με την Εικόνα 22-41. [Πηγή D. C. Frost, T. Greer, and L. Li, "High-Resolution Enabled 12-Plex DiLeu Isobaric Tags for Quantitative Proteomics," *Anal. Chem.* **2015**, 87, 1646].



55

Orbitrap

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

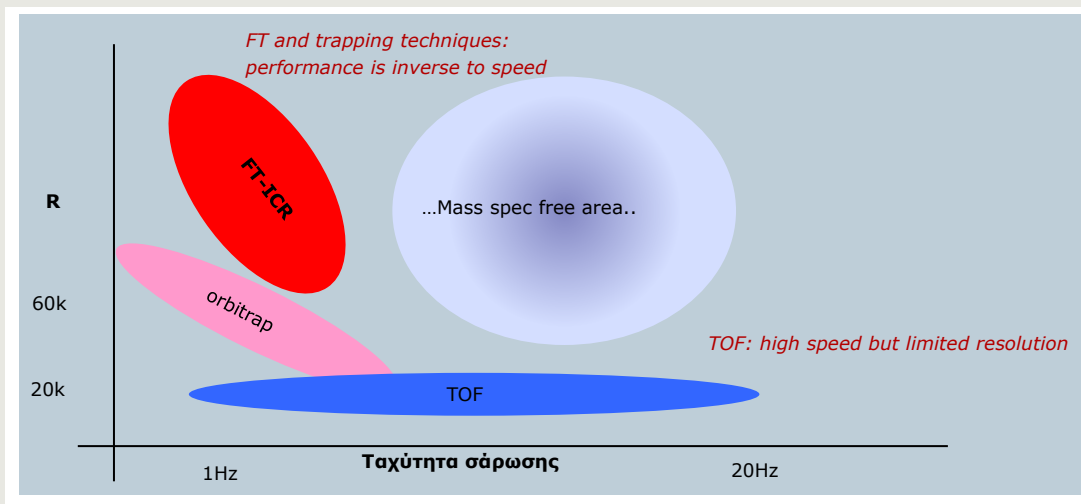
- Την υψηλότερη διακριτική ικανότητα μετά το FT-ICR ($R = 10000 - 140000$) μέχρι m/z 4000
- Μεγάλη ακρίβεια στον προσδιορισμό μαζών (<5 ppm)
- Μεγαλύτερη χωρητικότητα από τις ιοντικές παγίδες
- Μη καταστρεπτική ανίχνευση ιόντων
- Δυνατότητα MS/MS (σε συνδυασμό με ιοντική παγίδα)
- Ανάλυση εξαιρετικά πολύπλοκων μιγμάτων
- Εφαρμογές: Προσδιορισμός από μικρά μόρια έως μεγαλομόρια - Βιομόρια, περιβάλλον και τρόφιμα, proteomics, lipidomics

ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

- Ακριβό όργανο (ειδικά τα υβριδικά) – πολύπλοκη λειτουργία
- Σχετικά αργή σάρωση για εφαρμογές UPLC
- Υψηλή απαίτηση κενού (10^{-8} Torr)

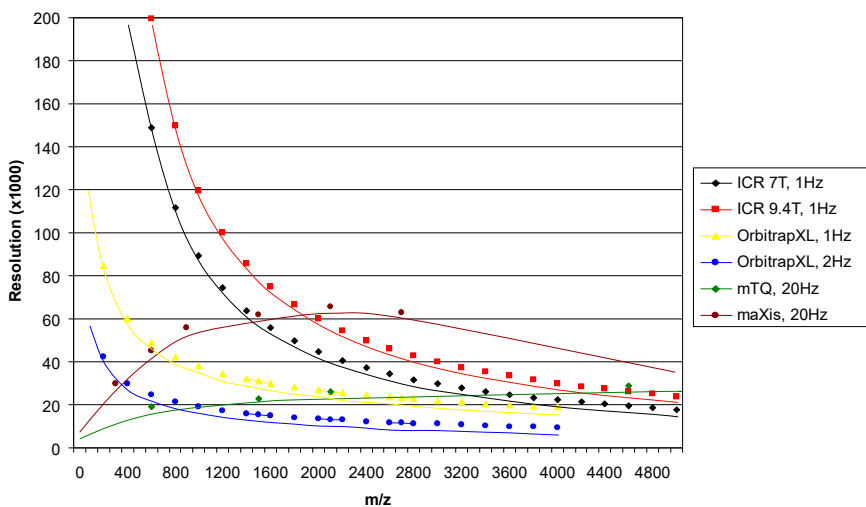
56

Απόδοση HR-MS : Συμβιβασμός ταχύτητας - R



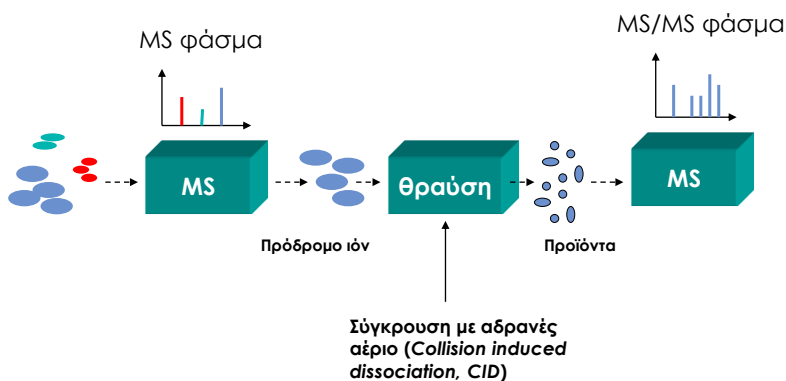
57

Resolution vs m/z



58

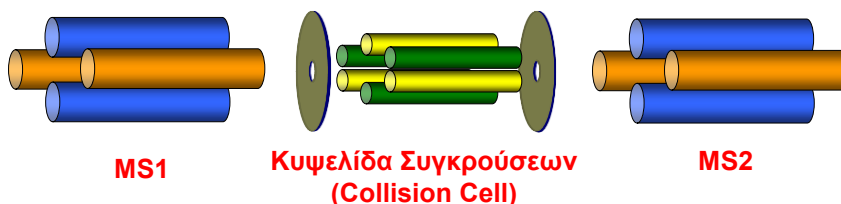
Διαδοχική Φασματομετρία Μαζών Tandem Mass Spectrometry (MS/MS)



59

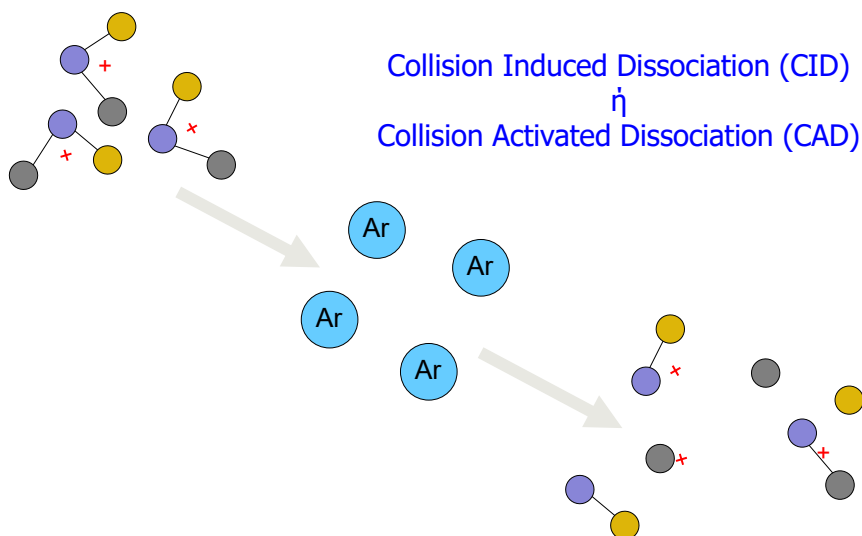
Τριπλό τετράπολο Triple Stage Quadrupole (TSQ ή QqQ)

1. Το μητρικό ή πρόδρομο ιόν (parent or precursor ion) παράγεται στην πηγή ιοντισμού και επιλέγεται από το 1^ο τετράπολο (MS1)
2. Οδηγείται στο 2^ο 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^ο τετράπολο (MS2)



60

Θραυσματοποίηση μέσω συγκρούσεων

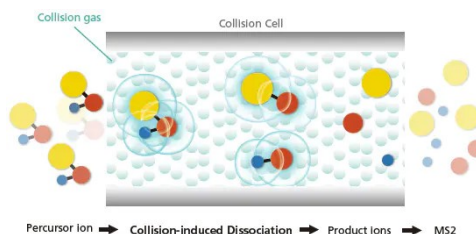
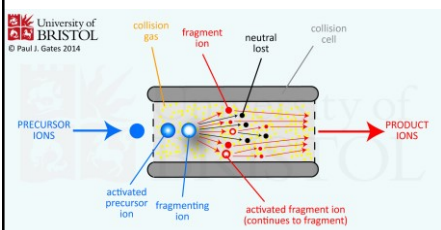


61

Θραυσματοποίηση μέσω συγκρούσεων

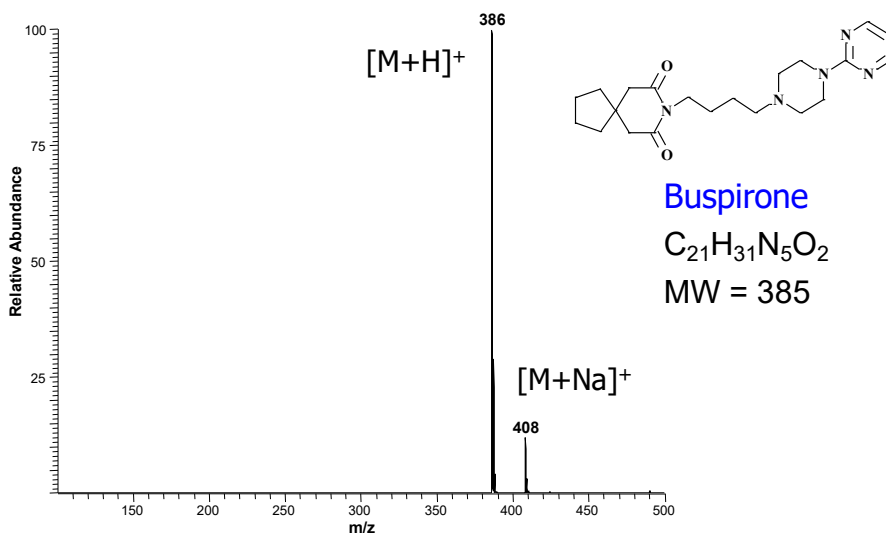
Collision Induced Dissociation (CID): η σύγκρουση ιόντων/ουδέτερων μορίων που προκαλεί τη μετατροπή της κινητικής ενέργειας σε εσωτερική ενέργεια και οδηγεί σε διάσπαση του ιόντος.

- 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)**



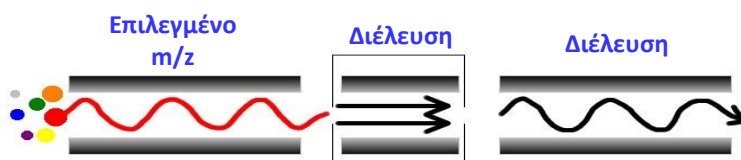
62

Full-Scan MS της Buspirone



65

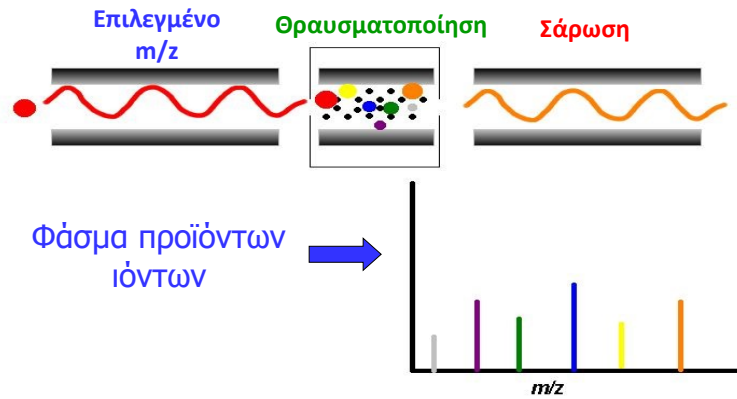
Παρακολούθηση επιλεγμένου ιόντος Single Ion Monitoring (SIM)



- **Πλεονεκτήματα:**
 - Παρακολούθηση συγκεκριμένου αναλύτη
 - Γρήγορη σάρωση
 - Απλότητα
- **Μειονεκτήματα:**
 - Παρεμποδίσεις
 - Όχι τόσο ευαίσθητο όσο η SRM λειτουργία

66

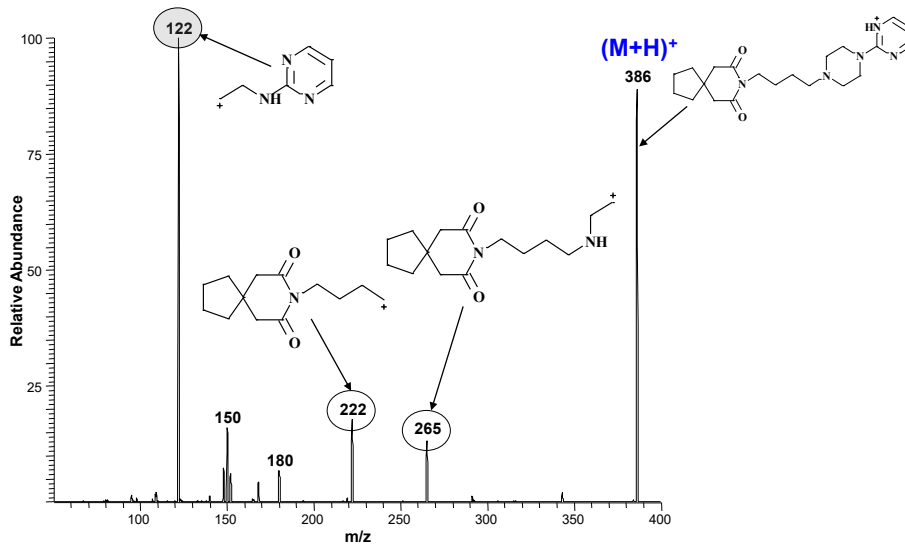
MS/MS προϊόντων ιόντων Product Ion Scanning



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

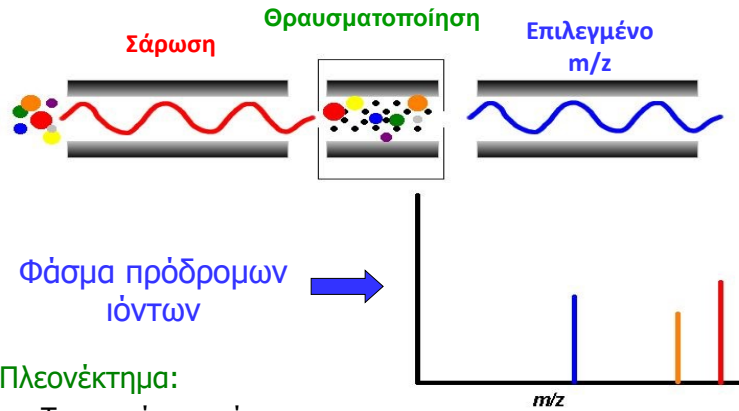
67

Φάσμα προϊόντων ιόντων της Buspirone



68

MS/MS πρόδρομων ιόντων Precursor Ion Scanning



- **Πλεονέκτημα:**

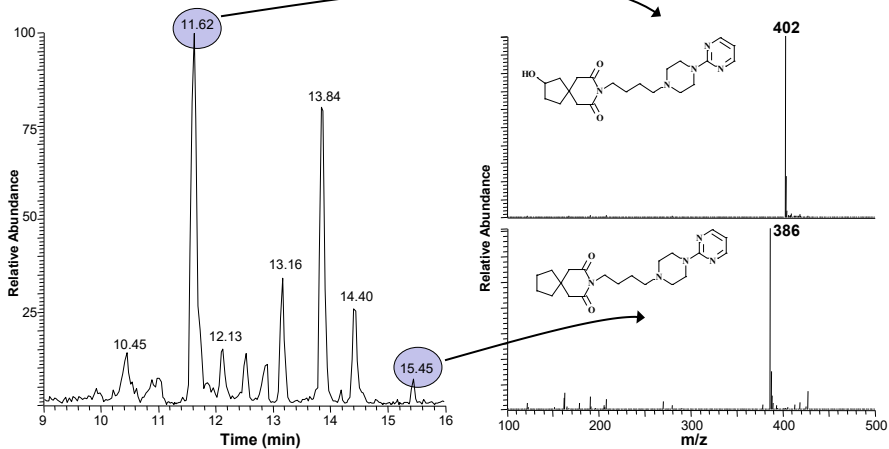
- Ταυτοποίηση ενώσεων που δίνουν ένα συγκεκριμένο προϊόν ιόν (π.χ., PO_3^- τα φωσφοπεπτίδια)

- **Μειονέκτημα:**

- Αργή σάρωση

69

MS/MS μητρικών ιόντων των μεταβολιτών της Buspirone



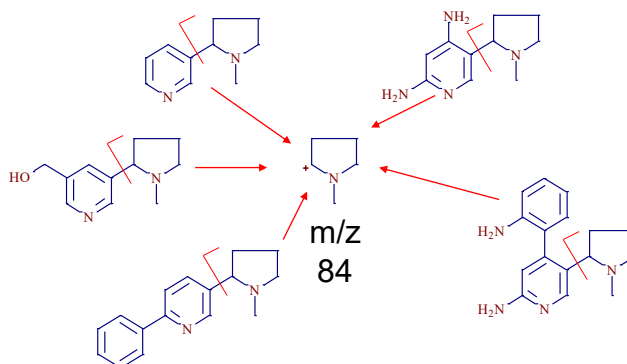
Precursor Ion Scan: Το Q3 παρακολουθεί μόνο το m/z 122

70

Precursor ion scans

Οι σάρωσεις πρόδρομων ιόντων χρησιμοποιούνται για πειράματα διαλογής (screening)

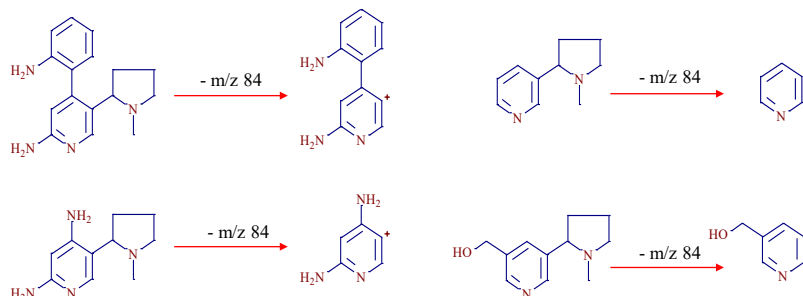
Όταν μια ομάδα ενώσεων, όλες δίνουν το ίδιο ιοντικό θραύσμα



71

Neutral loss scans

Η σάρωση με ανίχνευση απώλειας ουδέτερου μορίου χρησιμοποιείται για πειράματα διαλογής (screening), όταν το MS/MS μιας ομάδας ενώσεων εμφανίζει την ίδια απώλεια (μορίου ή ρίζας)



72

ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΛΟΓΗΣ (SCREENING METHOD)

ΤΕΧΝΙΚΗ ΣΑΡΩΣΗΣ ΠΡΟΔΡΟΜΟΥ ΙΟΝΤΟΣ:

Λήψη φάσματος μαζών των πρόδρομων ιόντων τα οποία θραυσματοποιούνται σε συγκεκριμένο προϊόν ιόν

	Μετάπτωση	
Diuron	232,9 → 72,3 → 46,5	} Κοινό προϊόν m/z
DCPMU	218,9 → 127,0 → 161,9	
DCPU	205,0 → 127,1 → 161,9	
DCA	162,0 → 127,1 → 109,1	
Irgarol	254,0 → 197,9 → 108,1	
M1	214,0 → 158,0 → 68,3	

96

73

ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΛΟΓΗΣ (SCREENING METHOD)

ΤΕΧΝΙΚΗ ΣΑΡΩΣΗΣ ΑΠΩΛΕΙΑΣ ΟΥΔΕΤΕΡΟΥ ΜΟΡΙΟΥ:

Λήψη φάσματος μαζών των πρόδρομων ιόντων που χάνουν ένα συγκεκριμένο κοινό θραύσμα

	Μετάπτωση	
Diuron	232,9 → 72,3 → 46,5	} Neutral loss: m/z 56
DCPMU	218,9 → 127,0 → 161,9	
DCPU	205,0 → 127,1 → 161,9	
DCA	162,0 → 127,1 → 109,1	
Irgarol	254,0 → 197,9 → 108,1	
M1	214,0 → 158,0 → 68,3	

Neutral loss:
m/z 56

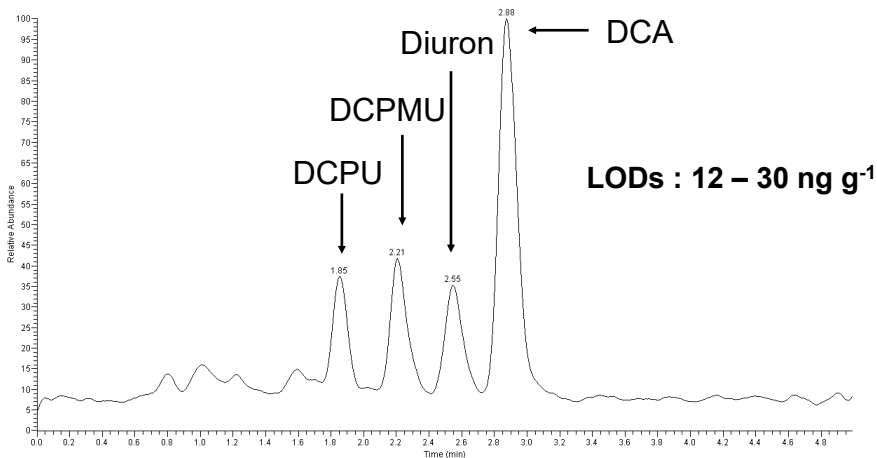
97

74

ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΛΟΓΗΣ (SCREENING METHOD)

ΤΕΧΝΙΚΗ ΣΑΡΩΣΗΣ ΠΡΟΔΡΟΜΟΥ ΙΟΝΤΟΣ

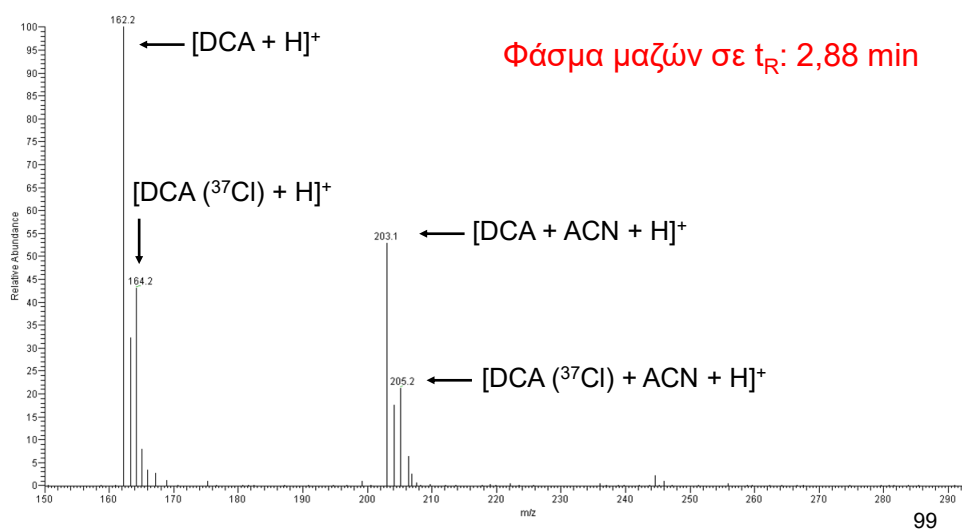
Χρωματογράφημα TIC για προϊόντα ιόντα m/z: 127 και 72,3



75

ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΛΟΓΗΣ (SCREENING METHOD)

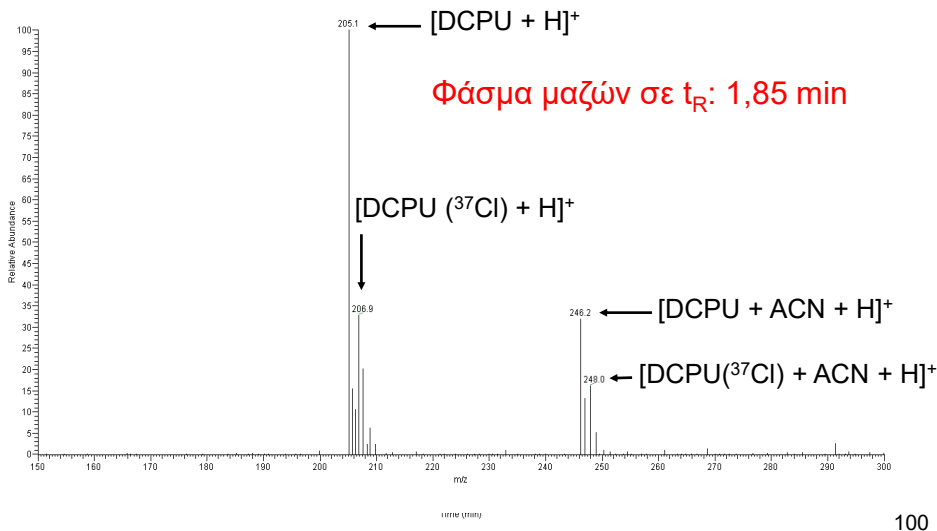
ΤΕΧΝΙΚΗ ΣΑΡΩΣΗΣ ΠΡΟΔΡΟΜΟΥ ΙΟΝΤΟΣ



76

ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΛΟΓΗΣ (SCREENING METHOD)

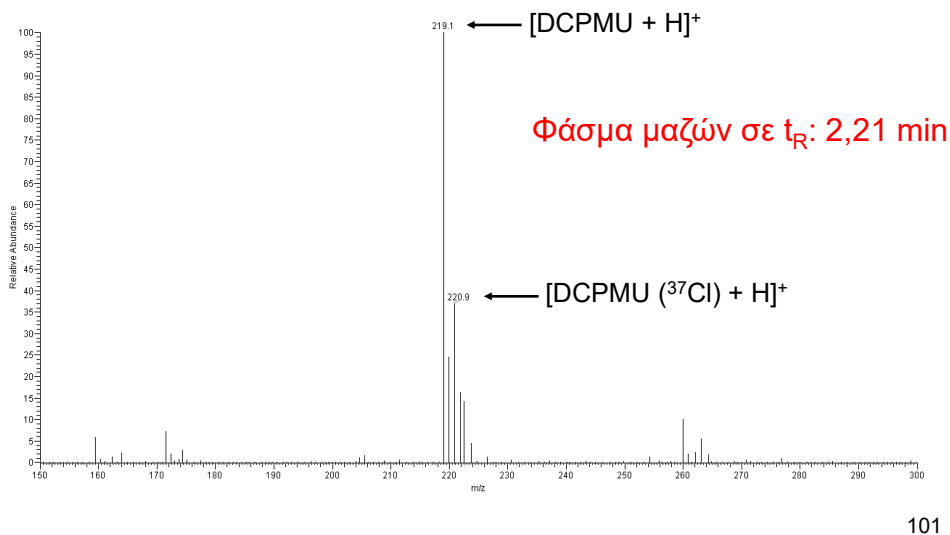
ΤΕΧΝΙΚΗ ΣΑΡΩΣΗΣ ΠΡΟΔΡΟΜΟΥ ΙΟΝΤΟΣ



77

ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΛΟΓΗΣ (SCREENING METHOD)

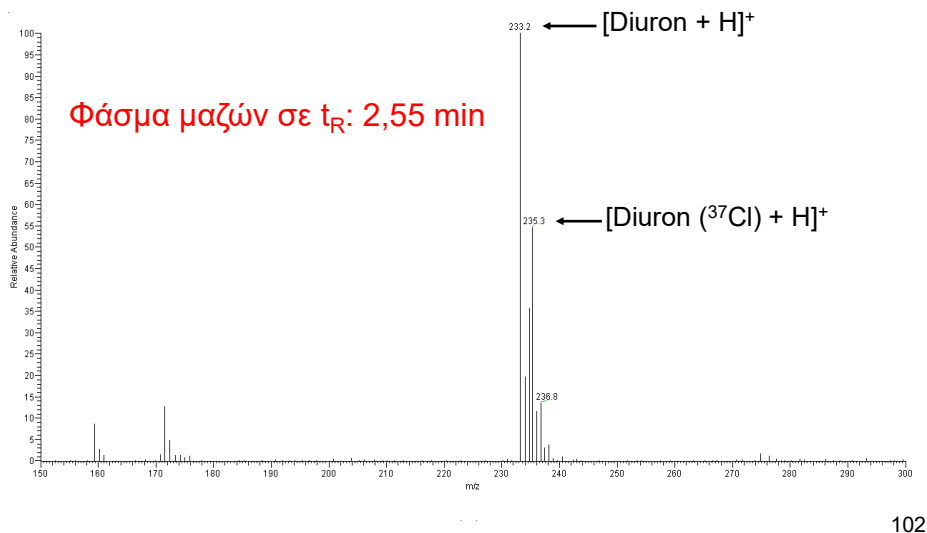
ΤΕΧΝΙΚΗ ΣΑΡΩΣΗΣ ΠΡΟΔΡΟΜΟΥ ΙΟΝΤΟΣ



78

ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΛΟΓΗΣ (SCREENING METHOD)

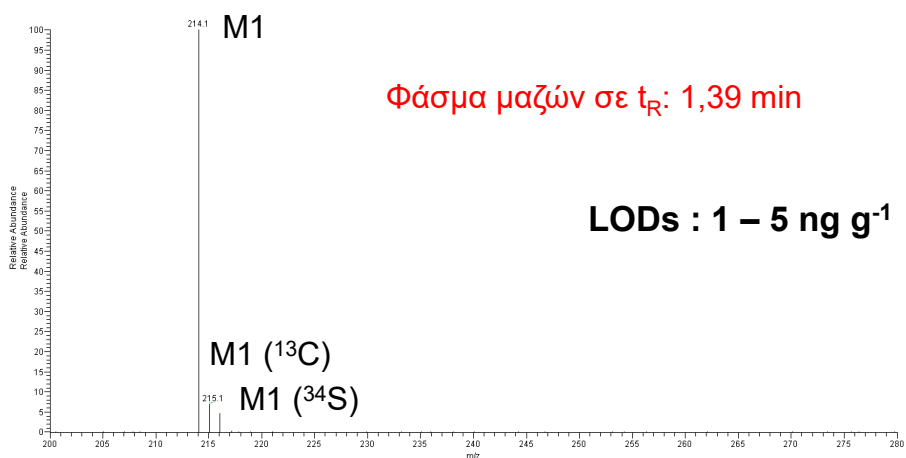
ΤΕΧΝΙΚΗ ΣΑΡΩΣΗΣ ΠΡΟΔΡΟΜΟΥ ΙΟΝΤΟΣ



79

ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΛΟΓΗΣ (SCREENING METHOD)

ΤΕΧΝΙΚΗ ΣΑΡΩΣΗΣ ΑΠΩΛΕΙΑΣ ΟΥΔΕΤΕΡΟΥ ΜΟΡΙΟΥ



103

80

ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΑΛΟΓΗΣ (SCREENING METHOD)

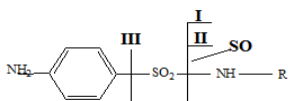
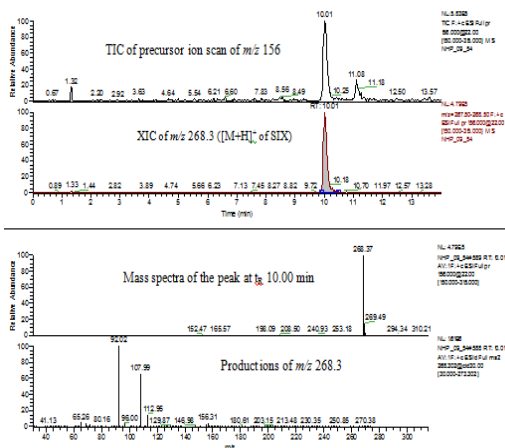
- Ημιποσοτικοί προσδιορισμοί: διαχωρισμός δειγμάτων που περιέχουν τις ενώσεις από μία δεδομένη συγκέντρωση (LOD) και πάνω από εκείνα που τις περιέχουν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις
- Ποιοτική εφαρμογή: μέσω των φασμάτων μαζών, για την ανίχνευση ενώσεων με παρόμοια δομή ή άγνωστους μεταβολίτες μιας ένωσης που είτε δίνουν κοινό προϊόν ιόν ή έχουν κοινή απώλεια ουδέτερου μορίου

104

81

DATA DEPENDENT SCANS

TIC και full-scan φάσμα της sulfisoxazole (SIX) σε δείγμα λαβράκι



I = 156

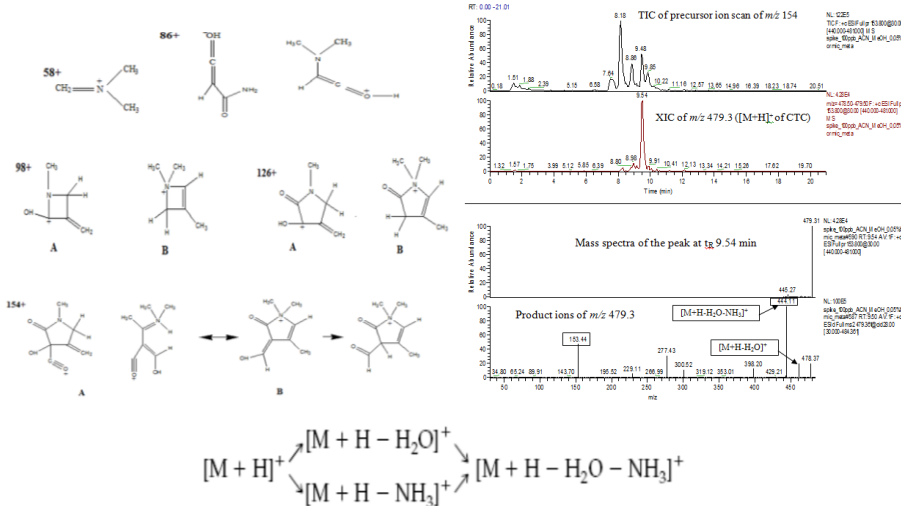
II = 108

III = 92

82

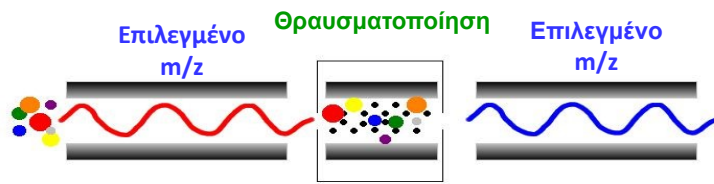
DATA DEPENDENT SCANS

Θραυσματοποίηση τετρακυκλινών



83

Παρακολούθησης επιλεγμένης αντίδρασης Selected Reaction Monitoring (SRM)



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

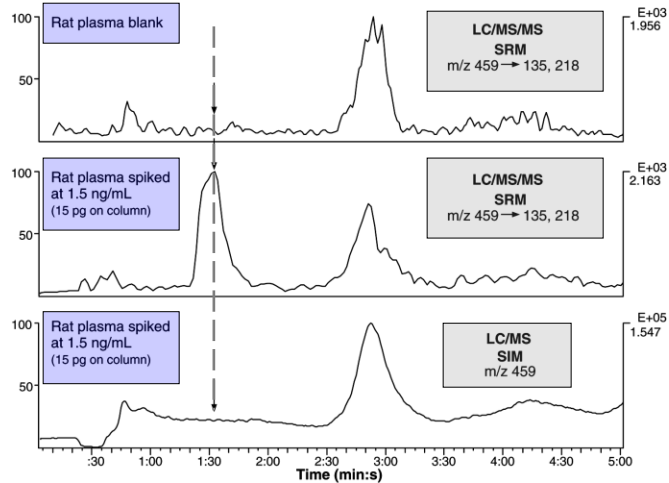
- Πλεονεκτήματα:
 - Παρακολούθηση επιλεγμένου αναλύτη
 - Γρήγορη σάρωση
 - “Ταυτόχρονη” παρακολούθηση πολλών μεταπτώσεων (MRM)
- Μειονέκτημα:
 - Οι πληροφορίες για τη δομή της ένωσης είναι περιορισμένες

84

Εκλεκτικότητα MS/MS σε δείγματα με πολύπλοκη μήτρα

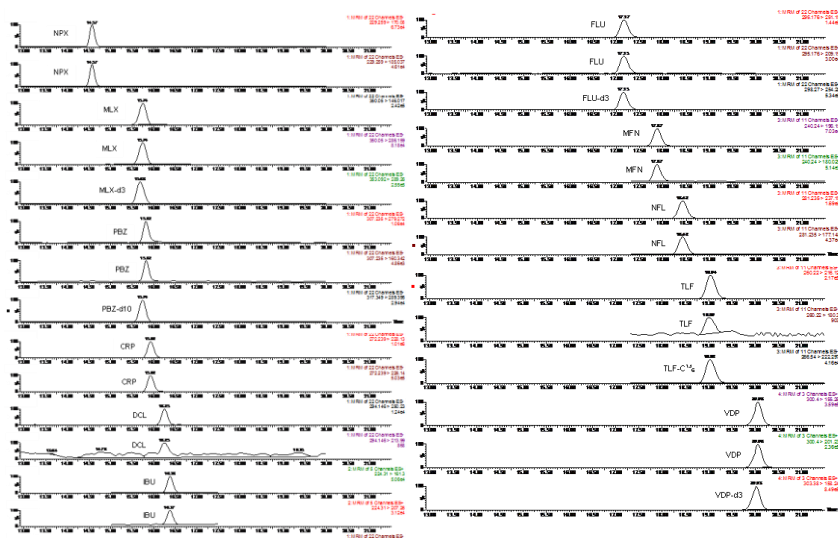
Comparison of LC/MS and LC/MS/MS for detection of astemizole in rat plasma

2.1 x 100 mm C₁₈ 65/35 MeOH/H₂O/10 mM NH₄OAc @ 400 μ L/min, no split, 10 μ L injections



85

MRM Χρωματογράφημα προσδιοριζόμενων ουσιών



86

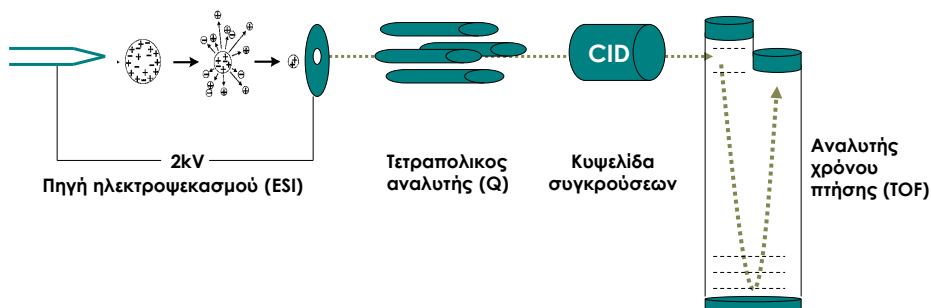
Scan Modes: Quadrupole MS

Scan Mode	Q1	Q2	Q3	Purpose
Full-Scan	Scanning	Pass All	Pass All	MW Info.
SIM	Fixed m/z	Pass All	Pass All	Quantitation
Product	Fixed m/z	Pass All (+ CE)	Scanning	Structural Info.
SRM	Fixed m/z	Pass All (+ CE)	Fixed m/z	Targeted Quantitation
Neutral Loss	Scanning	Pass All (+ CE)	Scanning	Analyte Screening
Precursor	Scanning	Pass All (+ CE)	Fixed m/z	Analyte Screening

- Red: single or triple quadrupole MS
- Green: triple quadrupole MS only

87

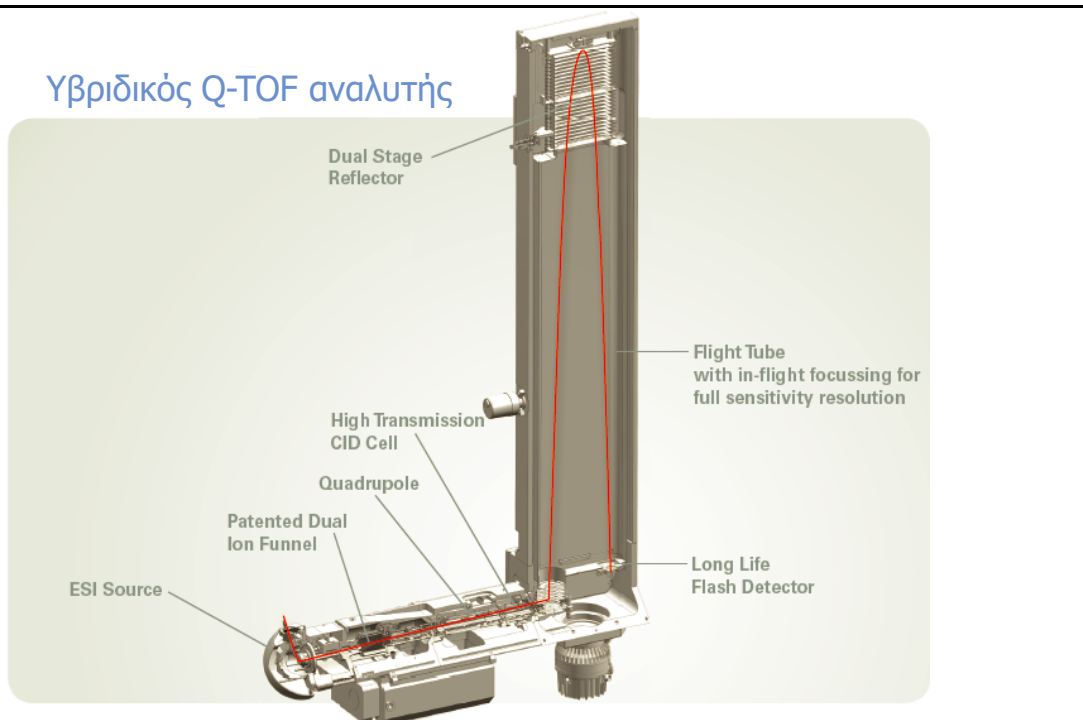
Υβριδικός Q-TOF αναλυτής



- Υψηλή διακριτική ικανότητα ($m/\Delta m \sim 10.000-20.000$, μέγιστο 40.000)
- Ακρίβεια μάζας: $(m_{\text{θεωρ.}} - m_{\text{πειραμ.}}) \times 10^6 / m_{\text{θεωρ.}} \sim 1-5$ ppm
- Υψηλή ευαισθησία: Κατώτερο όριο ανίχνευσης 100 fmol/μL

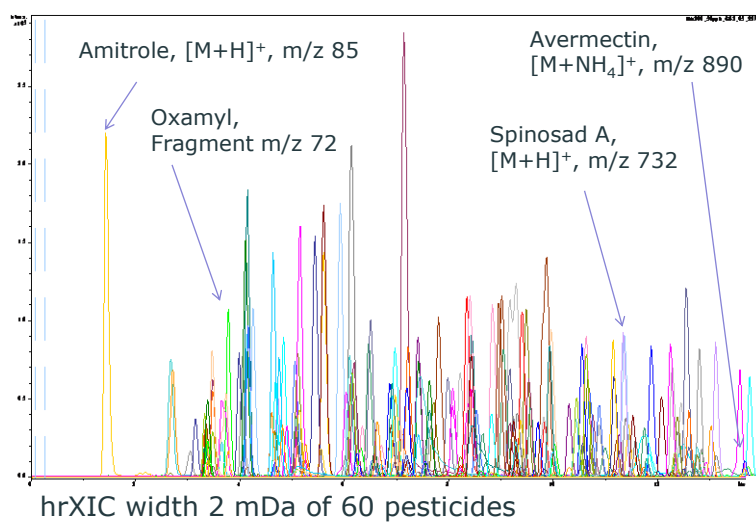
88

Υβριδικός Q-TOF αναλυτής



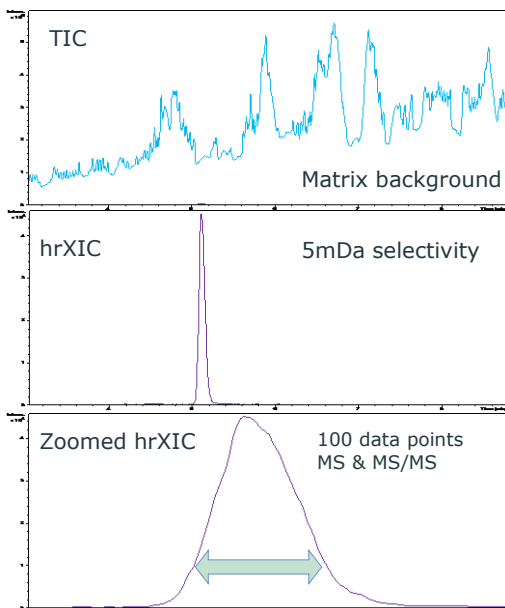
89

Broad mass bandwidth One-shot acquisition mode from 70 to 900 m/z



90

TARGET SCREENING ME LC-Q-TOF-MS



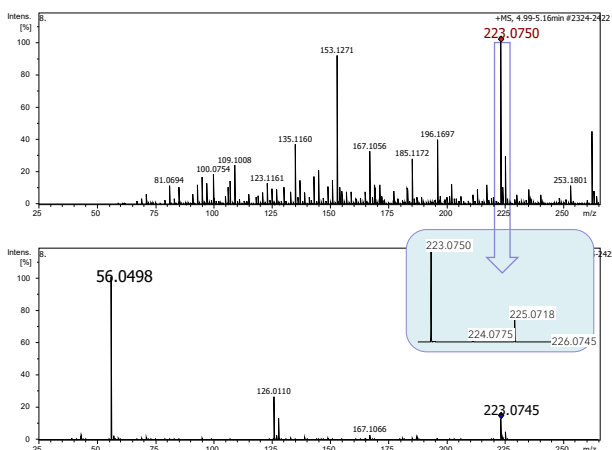
A) TIC from complex sample
60 pesticides spike into
ginger (QuEChERS)

B) High resolution extracted
ion chromatogram (hrXIC)
of m/z 223.0745 with 5mDa
discrimination width.
(Acetamiprid)

C) Magnified LC peak. High
speed acquisition rate in MS
and MS/MS mode. 100 data
points across this LS peak
allows precise quantitation.

91

TARGET SCREENING ME LC-Q-TOF-MS



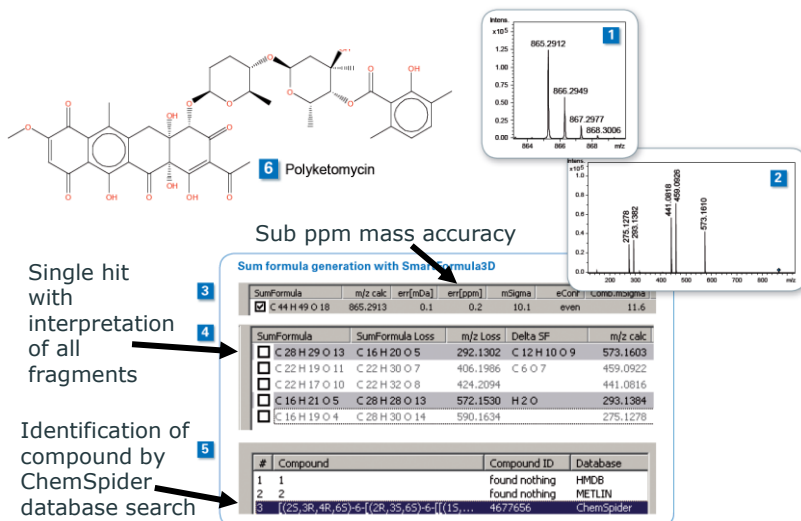
D) High-resolution
survey MS with m/z
223.0745 selected as
precursor.

E) High spectral
accuracy for ID

F) High sensitive
MS/MS spectrum even
at very low MW
(56.0498 m/z) for
confirmation by
fragment information.

92

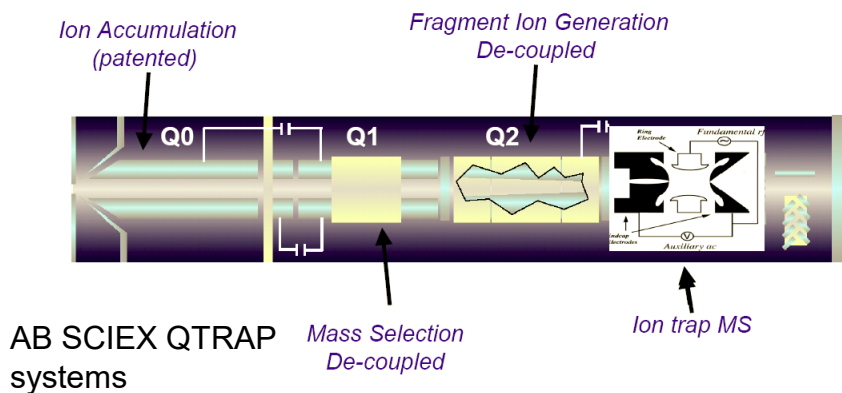
ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΑΓΝΩΣΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕ LC-Q-TOF-MS



93

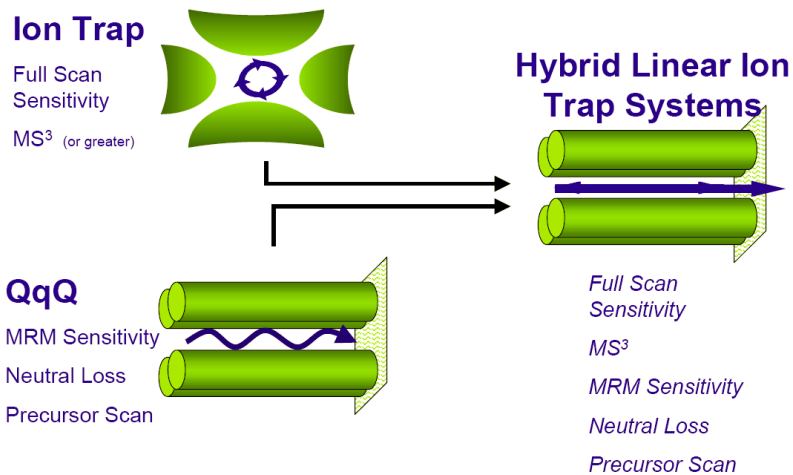
Υβριδικός Q-TRAP αναλυτής

Δυνατότητες και λειτουργίες QqQ + δυνατότητα MSⁿ



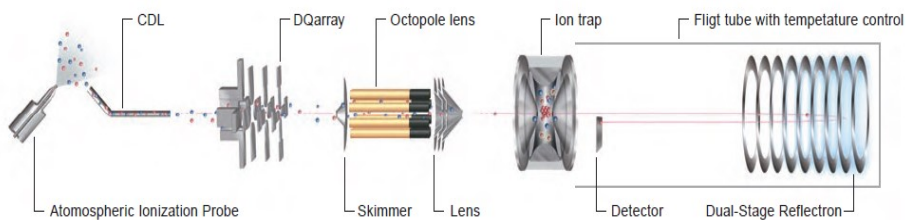
94

Υβριδικός Q-TRAP αναλυτής



95

Υβριδικός IT-TOF αναλυτής



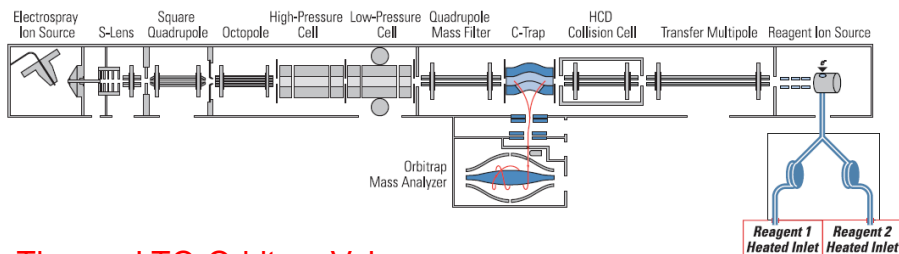
Shimadzu LCMS-IT-TOF

http://www.ssi.shimadzu.com/products/product.cfm?product=lcms_it_tof

96

Υβριδικός LTQ-ORBITRAP αναλυτής

Schematic of the LTQ Orbitrap Velos



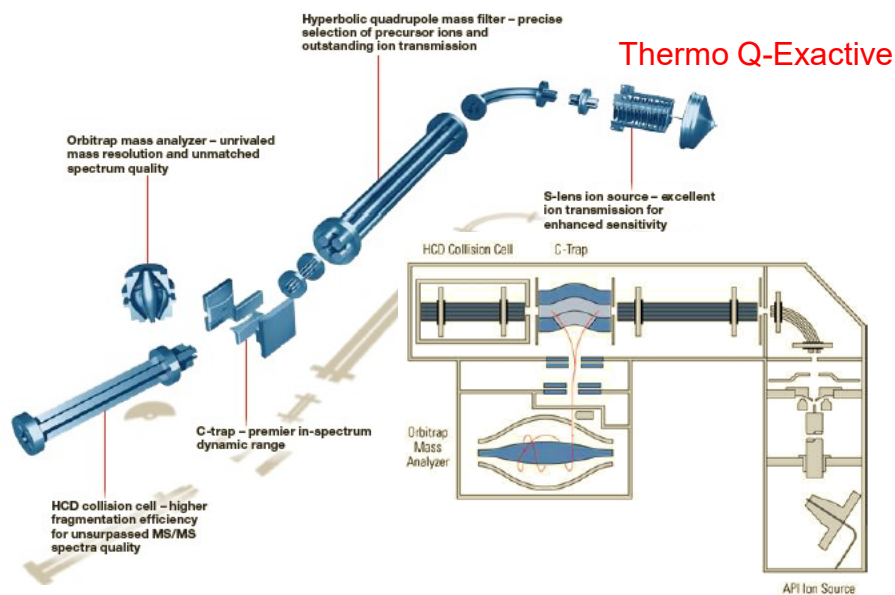
Thermo LTQ-Orbitrap Velos:

<http://fscimage.thermoscientific.com/images/D13092~.pdf>

Πρωτεομική, Μεταβολομική, ανακάλυψη και ανάπτυξη
φαρμακευτικών ενώσεων, βιοανάλυση

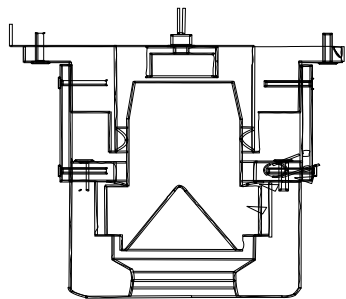
97

Υβριδικός Q-ORBITRAP αναλυτής



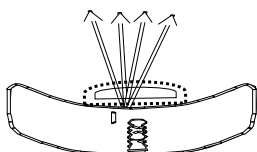
98

Μεταλλάκτης: Ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής



Δύνοδος μετατροπής

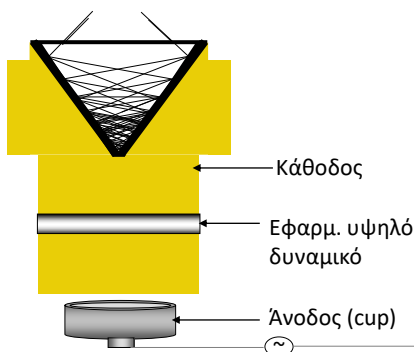
Τα εξερχόμενα από τον αναλυτή μάζας ιόντα συγκρούονται στη δύνοδο και παράγουν δευτερογενή σωματίδια (e^-). Αυτά εισέρχονται στον (ηλεκτρονιο) πολλαπλασιαστή.



99

Ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής

Τα 2γενή
σωματίδια
εισερχονται στον
πολλαπλασιαστή



Κάθε κρούση σωματιδίου στον πολλαπλασιαστή παράγει πολλαπλάσια σωματίδια.

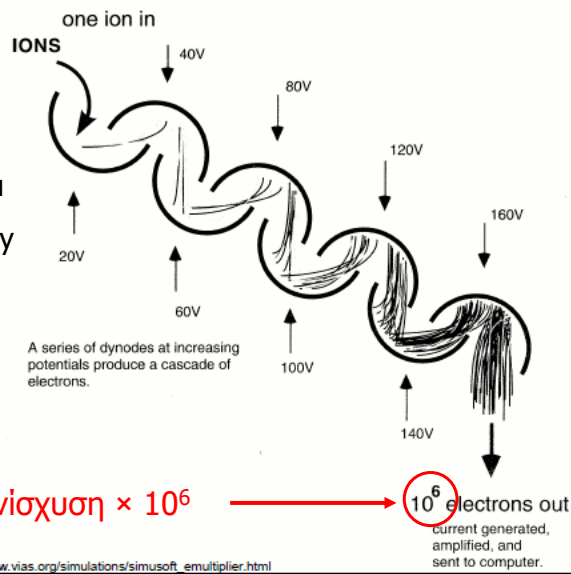
Το αποτέλεσμα είναι παραγωγή φορτίου στην άνοδο.

Το φορτίο αυτό είναι «ανάλογο» του σήματος που **παράγεται** από το ιόν.

100

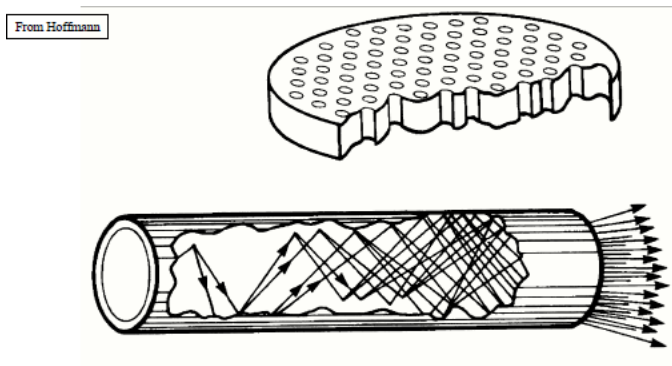
Ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής Διακριτών δυνόδων

- Χαμηλό θόρυβο
- Πολύ ευαίσθητοι
- Χρόνος ζωής $\sim 2\gamma$



101

Microchannel plate (MCP) ανιχνευτής



Χρήσιμος σε παλμική λειτουργία (TOF-MS)

102

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. 11 και 20
- 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" 3rd Edition, John Wiley & Sons, 2007
- K. Downard "Mass Spectrometry – A Foundation Course" 2nd Edition, RSC, 2007

103

Σχήματα

Τα σχήματα της παρουσίασης ήταν από τις παρακάτω πηγές:

- Ευγενική παραχώρηση 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
- Thermo
- Brucker
- Shimadzu
- AB Sciex

ntho@chem.uoa.gr

<http://trams.chem.uoa.gr>

ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ ΠΟΛΥ

104