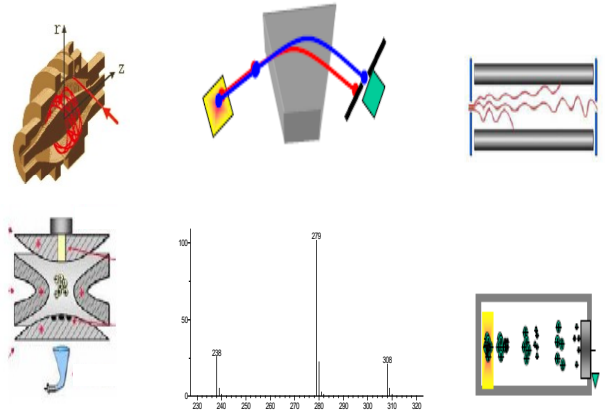


# ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ Β

ΜΑΡΙΟΣ ΚΩΣΤΑΚΗΣ – ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΘΩΜΑΙΔΗΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ



1

## Παρούσα Κατάσταση

- Τα τελευταία 20 χρόνια, η Φασματομετρία Μαζών έχει κυριαρχήσει ως αναλυτική τεχνική:
- Αναλύσεις Ρουτίνα
  - Φυτοφάρμακα
  - Κτηνιατρικά Κατάλοιπα
  - Οργανικοί ρύποι
- Έρευνα
  - Ανάπτυξη Νέων Μεθοδολογιών
  - Αναδυόμενοι Ρύποι
  - Αυθεντικότητα Τροφίμων, **Food Fraud**
  - Ανακάλυψη νέων βιοδεικτών.

2

## Γιατί;

- Ταυτόχρονος προσδιορισμός και ποσοτικοποίηση αναλυτών
- Χαμηλά όρια ανίχνευσης
- Δυνατότητα ανίχνευσης άγνωστων ενώσεων, ειδικά με τεχνικές υψηλής διακριτικής ικανότητας
- Μείωση σχέσης κόστους και χρόνου ανάλυσης
- Ισχυρά κριτήρια ανίχνευσης, ειδικά με τη διαδοχικής ή/και τη φασματομετρία υψηλής διακριτικής ικανότητας (**HRMS**)



3

## Ως Αποτέλεσμα...



- ✓ Χρήση φασματομετρίας μαζών από τον επίσημο έλεγχο
- ✓ Οι εξελιγμένες τεχνικές φασματομετρίας μαζών γίνονται όλο και πιο φιλικές στο χρήστη, ειδικά με HRMS
- ✓ Νέες προχωρημένες μεθοδολογίες αναπτύσσονται, αυθεντικότητα, αναδιδόμενοι ρύποι κλπ.
- ✗ Αυξημένες ανάγκες για κατευθύνσεις σχετικά με τη διασφάλιση ποιότητας.
- ✗ Τεχνική επάρκεια, όσο αυξάνεται η πολυπλοκότητα των προβλημάτων που επιλύονται.
- ✗ Κατευθυντήριες οδηγίες

4

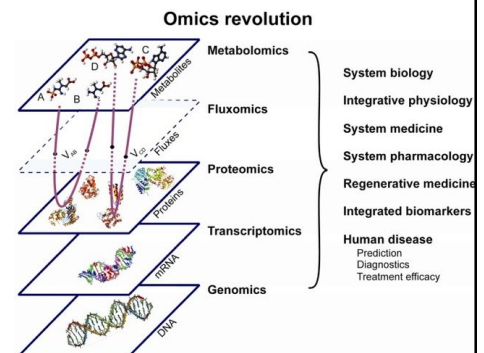
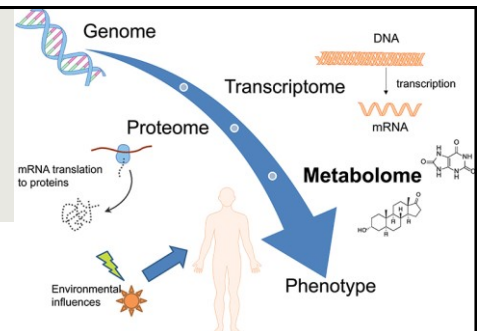
## Τεχνολογίες Omics

- Η εξέλιξη της φασματομετρίας μαζών είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την μεγάλη ανάπτυξη των τεχνολογιών **omics** και ιδιαίτερα της μεταβολομικής (**metabolomics**).
- **Omics**: Ως ομική αναφέρεται ο συλλογικός χαρακτηρισμός και η ποσοτικοποίηση μιας σειράς βιολογικών μορίων που μεταφράζονται στη δομή, τη λειτουργία και τη δυναμική ενός οργανισμού ή οργανισμών.
- Τα omics ξεκίνησαν από τη βιολογία (**genomics**) αλλά επεκτάθηκαν σε μια σειρά φυσικών επιστημών (ιδιαίτερα τη χημεία).

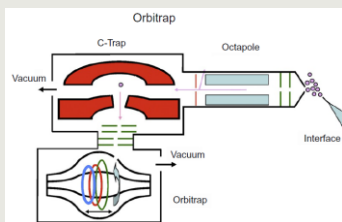
5

## Metabolomics

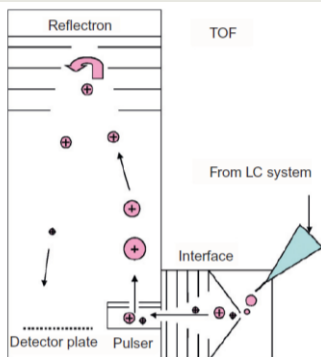
- Μεταβολομική είναι η επιστημονική μελέτη των χημικών διεργασιών των μεταβολιτών.
- Μεταβολίτες είναι τα μικρού μοριακού βάρους μόρια (**<1.5 kDa**) που δρουν είτε ως υπόστρωμα, είτε ως ενδιάμεσο προϊόν είτε ως τελικό προϊόν του κυτταρικού μεταβολισμού.



6



## ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ high resolution MS vs MS/MS



- Όταν αναφερόμαστε σε HRMS συστήματα και κυρίως στα πλαίσια των σύγχρονων ερευνητικών εφαρμογών σε συνδυασμό με όργανα ρουτινής αναφερόμαστε κυρίως για σύστημα (Q)TOF και orbitrap.
- Τα τελευταία χρόνια τα συστήματα αυτά έχουν γίνει πιο φιλικά προς το χρήστη και σε ένα λογικό κόστος για τη χρήση τους
- Θα γίνει μια σύγκριση μεταξύ των HRMS και των LRMS ως προς:

1. Εκλεκτικότητα
2. Ευαισθησία
3. Ποσοτικοποίηση
4. Ταυτοποίηση & Ανίχνευση Αγνώστων Ενώσεων

7

## Φασματομετρία Μαζών και εκλεκτικότητα

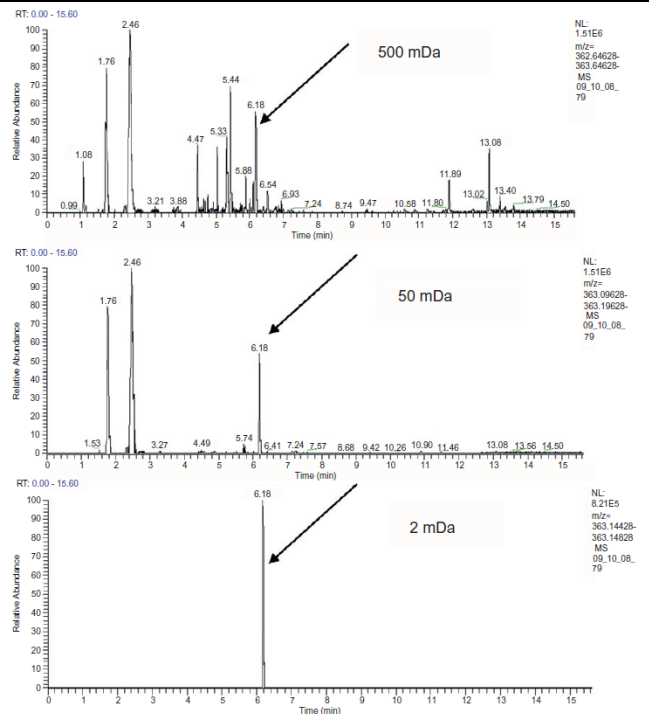
- Κριτήρια Εκλεκτικότητας
- Ανάλογα με τον τρόπο σάρωσης αλλάζουν και τα κριτήρια ταυτοποίησης:
- Ισοβαρικές Παρεμποδισεις

MS detector/Characteristics		Acquisition	Requirements for identification	
Resolution	Typical systems (examples)		minimum number of ions	additionally
Unit mass resolution	Single MS Quadrupole, ion trap, TOF	Full scan, limited m/z range, SIM	3 ions	S/N ≥ 3 <sup>iii</sup> Analyte peaks from both product ions in the extracted ion chromatograms must fully overlap.
	MS/MS Triple quadrupole, ion trap, Q-trap, Q-TOF, Q-Orbitrap	Selected or multiple reaction monitoring (SRM, MRM), mass resolution for precursor-ion isolation equal to or better than unit mass resolution	2 product ions	Ion ratio from sample extracts should be within <b>±30 % (relative)</b> of average of calibration standards from same sequence S/N ≥ 3 <sup>iii</sup>
Accurate mass measurement	High resolution MS: (Q-)TOF (Q-)Orbitrap	Full scan, limited m/z range, SIM, fragmentation with or without precursor-ion selection, or combinations thereof	2 ions with mass accuracy ≤ 5 ppm <sup>a, b, c, d</sup>	Analyte peaks from precursor and/or product ion(s) in the extracted ion chromatograms must fully overlap. Ion ratio: see D12

8

## Φασματομετρία Μαζών και εκλεκτικότητα

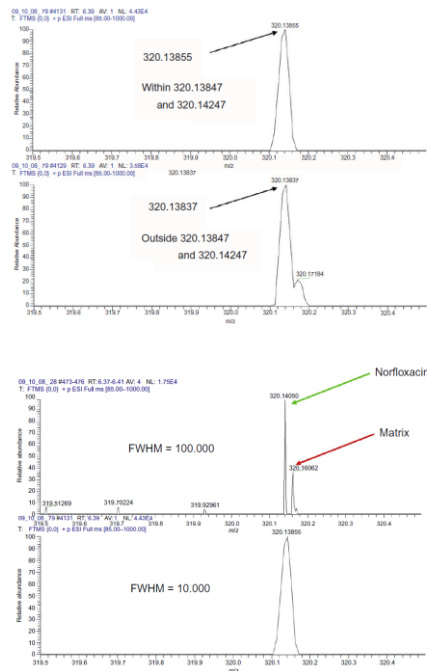
- Η εκλεκτικότητα είναι ο συνδυασμός του παράθυρου παρατήρησης και της πραγματικής διακριτικής ικανότητας που μπορεί να έχει το φασματόμετρο μαζών
- Σχήμα: Εκχύλιση από ήπαρ εμβολιασμένο με marbofloxacin, όλα τα φάσματα έχουν προκύψει από φασματόμετρο με διακριτική ικανότητα 10000 FWHM.



9

## Φασματομετρία Μαζών και εκλεκτικότητα

- Προσοχή: Πολλές φορές η εκλεκτικότητα δεν σχετίζεται με το παράθυρο παρατήρησης αλλά με τις παραμέτρους που ορίζει ο χρήστης
- Ανάγκη για τη χρήση MS/MS και στα HRMS για να προστεθεί ένα επιπλέον βαθμός ταυτοποίησης.



10

## HRMS & Ευαισθησία

Τρεις διαφορετικές περιοχές.

Ποιο περιορισμένο εύρος γραμμικής περιοχής του TOF, ωστόσο το orbitrap παρουσιάζει διευρυμένο εύρος γραμμικής περιοχής.

Στα TOF η γραμμική περιοχή βελτιώνεται με την βελτίωση των ηλεκτρονικών.

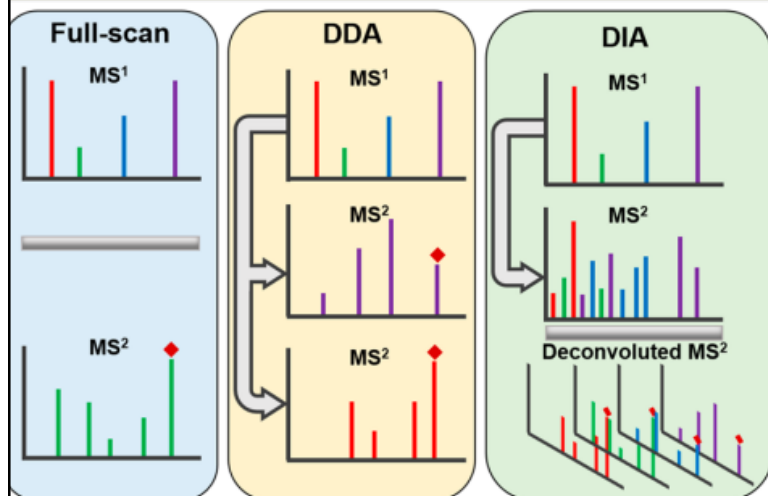
**TABLE 1** Comparison of Linearity as Obtained by Using Three Different LC-MS Detection Techniques

	Resolution	10–100 µg/kg	10–316 µg/kg	10–1000 µg/kg
Orbitrap	50,000	0.9962	0.9993	0.9992
TOF	12,000	0.9578	0.9374	0.7737
MS/MS	Unit resolution	0.9910	0.9978	0.9990

Given are the average coefficient of determinations, representing some 31 compounds detected by a multiresidue method. The two utilized HRMS technique operated at 12,000 and 50,000, respectively, resolution. The used MS/MS was a classical tandem quadrupole operated at unit resolution. Data is given for three different dynamic ranges to show the performance limits of the three techniques.

11

## Μέθοδοι Σάρωσης



• DDA: Data Dependent Acquisition

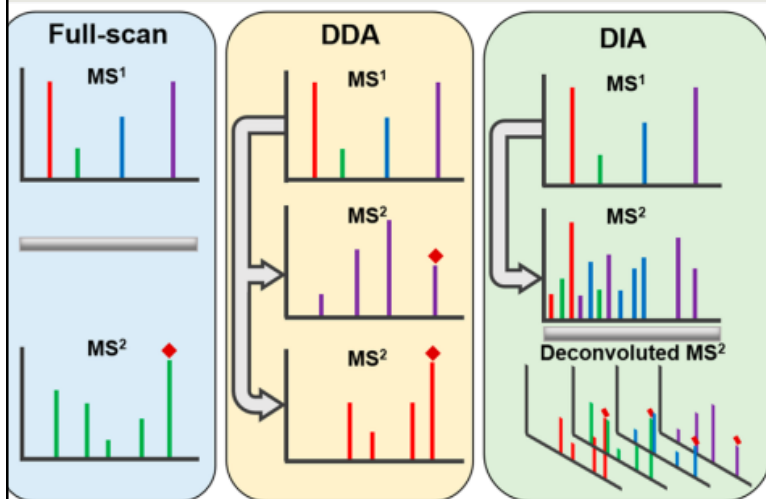
Μόνο επιλεγμένα ιόντα θραυσματοποιούνται σε ένα περιορισμένο παράθυρο παρατήρησης. Ενεργοποιείται όταν δει ένα συγκεκριμένο ποσοστό αφθονίας

**Πλεονέκτημα:** Υψηλή εκλεκτικότητα (λόγω θραυσματοποίησης), μειόμενος αριθμός παρεμποδίσεων.

**Μειονέκτημα:** Χάνεται η πληροφορία για το χαμηλότερης αφθονίας ιόντα.

12

## Μέθοδοι Σάρωσης



- DIA: Data Independent Acquisition

Καταγράφει όλα τα θραύσματα που παράγονται από την κυψελίδα συγκρούσεων, ανεξαρτήτως πρόδρομου ιόντος και έντασης αυτού.

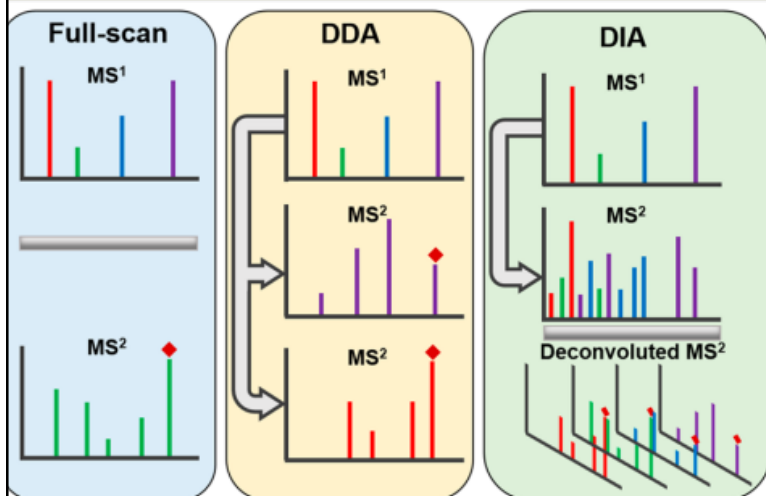
Πλεονέκτημα: Συλλέγει όλη την πληροφορία της θραυσματοποίησης

Μειονέκτημα: Απώλεια της ειδικότητας. Δεν είναι γνωστή η ακριβής μετάπτωση.

Η μετατροπή των δεδομένων γίνεται στη συνέχεια με λογισμικά

13

## Μέθοδοι Σάρωσης



- DIA: Data Independent Acquisition

Καταγράφει όλα τα θραύσματα που παράγονται από την κυψελίδα συγκρούσεων, ανεξαρτήτως πρόδρομου ιόντος και έντασης αυτού.

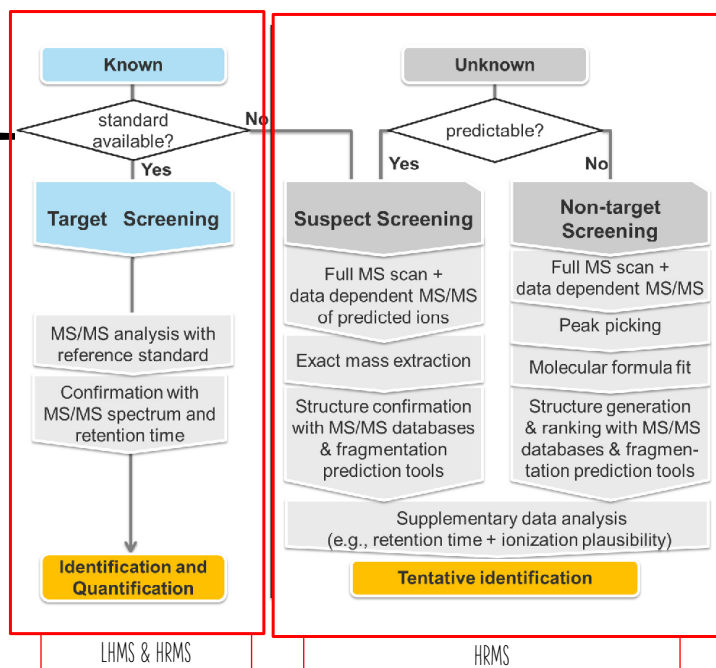
Πλεονέκτημα: Συλλέγει όλη την πληροφορία της θραυσματοποίησης

Μειονέκτημα: Απώλεια της ειδικότητας. Δεν είναι γνωστή η ακριβής μετάπτωση.

Η μετατροπή των δεδομένων γίνεται στη συνέχεια με λογισμικά

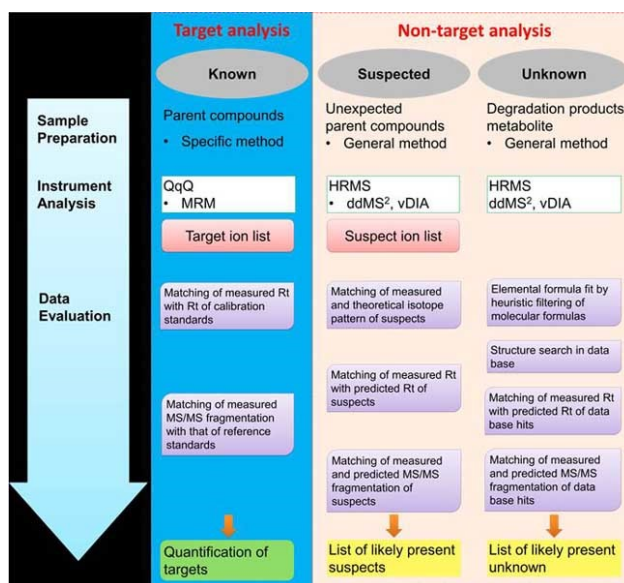
14

# Workflow & HRMS



15

# Workflow & HRMS

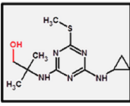
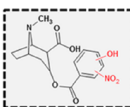


16



## Κριτήρια Ταυτοποίησης

- Η **1<sup>η</sup> Προσέγγιση** αφορά παραλλαγή της στοχευμένης σύρωσης
- Τα κριτήρια ταυτοποίησης είναι σημαντικά (5 επίπεδα ταυτοποίησης)

Example	Identification confidence	Minimum data requirements
	<b>Level 1: Confirmed structure</b> by reference standard	MS, MS <sup>2</sup> , RT, Reference Std.
	<b>Level 2: Probable structure</b> a) by library spectrum match b) by diagnostic evidence	MS, MS <sup>2</sup> , Library MS <sup>2</sup> MS, MS <sup>2</sup> , Exp. data
	<b>Level 3: Tentative candidate(s)</b> structure, substituent, class	MS, MS <sup>2</sup> , Exp. data
$C_6H_5N_3O_4$	<b>Level 4: Unequivocal molecular formula</b>	MS isotope/adduct
192.0757	<b>Level 5: Exact mass of interest</b>	MS